

检测环境放射性和遗传毒性物质的耐辐射球菌生物传感器的构建

高冠军, 范陆, 陆辉明, 华跃进*

浙江大学原子核农业科学研究所, 农业部核农学重点开放实验室, 杭州 310029

* 联系人, E-mail: yjhua@zju.edu.cn

2008-01-26 收稿, 2008-03-20 接受

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2004CB19604)、国家高科技研究发展计划(批准号: 2007AA021305)、国家杰出青年科学基金(批准号: 30425038)和国家自然科学基金(批准号: 30330020)资助项目

摘要 基于经遗传修饰的极端抗辐射细菌——耐辐射球菌, 构建了一个实时全细胞生物传感器, 以检测高放射性环境中的放射性物质和遗传毒物. 把加强型绿色荧光蛋白(eGFP)连接到耐辐射球菌中一个可受 DNA 损伤诱导调控的关键基因——*recA* 基因的启动子后, 所得到的融合 DNA 片段(*PrecA-egfp*)由质粒携带转化入耐辐射球菌 R1 菌株, 从而最终获得了生物传感器菌株 DRG300. 这个改造过的菌株可以在 *recA* 基因启动子的引发下表达 eGFP 荧光蛋白, 从而发出荧光. 根据耐辐射球菌活细胞中荧光强度和 eGFP 蛋白表达量之间的相关性, 我们发现在 DRG300 菌株中荧光的产生量同 DNA 损伤因子(如 γ 射线和丝裂霉素 C)之间有很显著的剂量相关性. 同以前报道的全细胞传感器相比, 本研究构建的这个重组菌株同时具有广阔的剂量探测范围和较高的灵敏度. 研究结果表明, DRG300 可作为一个潜在全细胞生物传感器, 基于此构建的检测系统, 可以用来实时监测环境中放射性和毒性污染物所造成的生物学危害.

关键词

耐辐射球菌
生物传感器
eGFP
RecA
遗传性毒物
DNA 损伤
电离辐射
丝裂霉素 C

由于环境放射性污染物引发了一系列危害, 如 DNA 损伤、基因组稳定性下降、疾病和细胞死亡 [1], 人们对环境样品潜在的放射活性和毒性进行快速检测可靠手段的需求不断增加. 可同时检测放射性和遗传毒性物、经基因工程改造的微生物成为一种可供选择的原位环境检测技术 [2,3]. 工程化的大肠杆菌已被广泛用来作为检测遗传毒性物的生物传感器 [4~7]. 然而, 在高剂量放射环境下, 大多数微生物的生存力下降, 并最终影响这些工程菌成为有效检测放射环境中化学危害和遗传毒性物质的生物传感器.

耐辐射球菌具有对电离辐射、紫外线、干旱及其他一系列 DNA 损伤因子的超强抵抗力, 并具有使不产生致死和遗传突变的高效率 DNA 修复系统 [8~10]. 耐辐射球菌可以在 60 Gy/h 辐射剂量下持续生长 [11], 或在经受 15 kGy 剂量的急性辐照后存活 [12]. 这种极端辐射抗性使耐辐射球菌成为对放射性废料堆积地

点进行环境生物修复的首要候选者之一 [11,13]. 本研究考虑到 eGFP 荧光报告基因较其他报告系统有更多优点 [14], 故在耐辐射球菌细胞中表达 eGFP 荧光蛋白, 并构建了经基因工程改造的菌株作为实时检测放射性和遗传毒性物质含量的生物传感器.

为了验证 eGFP 可以被表达并产生可见荧光的胞内信号, 我们把两个不同的启动子分别同 *egfp* 基因融合, 并通过穿梭质粒载体克隆进耐辐射球菌. 研究结果表明, 经遗传改造的菌株 DRG100 和 DRG300 分别可以在其自身的 *groEL* 基因启动子(*PgroEL*)和受 DNA 损伤诱导的 *recA* 基因启动子(*PrecA*)启动下表达 eGFP 并发出荧光. 本研究分析了 DRG300 菌株从电离辐射损伤复愈中, 胞内荧光强度同 RecA 蛋白表达水平间的关系. 基于两者之间密切的关联性, 本研究进一步获取了菌株 DRG300 暴露在不同剂量的电离辐射和不同浓度的丝裂霉素 C 之后的细胞压力实时

反应,以此来评估耐辐射球菌生物传感器在放射性环境中的潜在应用价值。

1 材料和方法

() 菌株、质粒、培养基和生长条件. 本研究选用耐辐射球菌R1 菌株和大肠杆菌JM109 菌株. 穿梭载体pRADZ3 为Wisconsin大学Cox M赠送. 耐辐射球菌在TGY培养基(0.5%蛋白胨, 0.1%葡萄糖, 0.3%酵母提取物)或添加了 1.5%琼脂的TGY平板上于 32

下通风培养. 大肠杆菌在LB培养基(1.0%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1.0% NaCl)或添加了 1.5%琼脂的LB平板上于 37 下通风培养. 删选菌落时, 分别在大肠杆菌培养基中添加终浓度大约是 50 $\mu\text{g/mL}$ 的氯苄青霉素, 在耐辐射球菌培养基中添加终浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$ 的氯霉素. 对大肠杆菌的转化采用 CaCl_2 法. 对耐辐射球菌的转化采用先前描述的改造 CaCl_2 法[15].

() 重组质粒和菌株的构建. 为了检测 *egfp* 基因是否能在耐辐射球菌细胞内表达并产生荧光, 本研究构建了一个穿梭载体 pRADG (携带有耐辐射球菌 *groEL* 基因启动子, *PgroEL*)和一个对比质粒 pRADGW (不含有 *PgroEL*). 以 pEGFP 质粒(BD ClonTech)为模版, 采用以下引物进行 PCR 扩增: F1, 5'-AGCTACTAGTGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' (*Spe*); F2, 5'-CATAGAGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' (*Bgl*); R12, 5'-ACGTGGATCCTCAGAGCATATGTGCCTTGACAGCTCGTC-3'(*BamH*), 获得了两个分别含有不同限制性酶切位点(*Spe* -

BamH 和 *Bgl* -*BamH* 位点)的 *egfp* 基因片段. DNA 片段分别经相应的限制性酶切后, 克隆进 pRADZ3 质粒的对应位点, 获得了构建质粒 pRADG 和 pRADGW (图 1).

同时, 以耐辐射球菌基因组为模板, 采用以下引物进行 PCR 扩增: PrecAF, 5'-CATGAGATCTGAAGGATAAAAGCCTCCATCACAGCG-3'(*Bgl*); PrecAR: 5'-CTTCACTAGTTTGGTGCGTCCTTGCTCATGGGTG-3'(*Spe*), 获得了一条带有在 *cina-ligT-recA* 操纵子 [16]内的 *recA* 基因启动子(*PrecA*)的DNA片段(约 2.3 kb). PCR产物经 *Bgl* 和 *Spe* 酶消化后, 被克隆进pRADG质粒的 *Bgl* -*Spe* 位点. 获得的质粒被命名为pRADG-PrecA (图 1).

质粒 pRADZ3, pRADW, pRADG 和 pRADG-PrecA 分别被转化入耐辐射球菌 R1 菌株. 转化子经氯霉素抗性筛选获得, 并分别命名为耐辐射球菌菌株 DRZ3, DRG070, DRG100 和 DRG300 (图 1).

() 耐辐射球菌中 eGFP 蛋白的表达和可见荧光. 耐辐射球菌的 DRZ3, DRG070, DRG100 和 DRG300 菌株分别在含有 3 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 TGY 培养基中培育到指数生长时期(A_{600} 约为 0.8), 随后被涂敷在玻璃片上, 用荧光显微镜(Leica MPS30, Germany)或激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM510, Germany)检测.

() 辐照下耐辐射球菌 DRG300 菌株荧光强度同 RecA 表达水平之间的关联性. 耐辐射球菌 DRG300 菌株在 32 下生长到指数增长期, 并进行荧光强度检测, 带有 pRADZ3 质粒的 DRZ3 菌株被用来

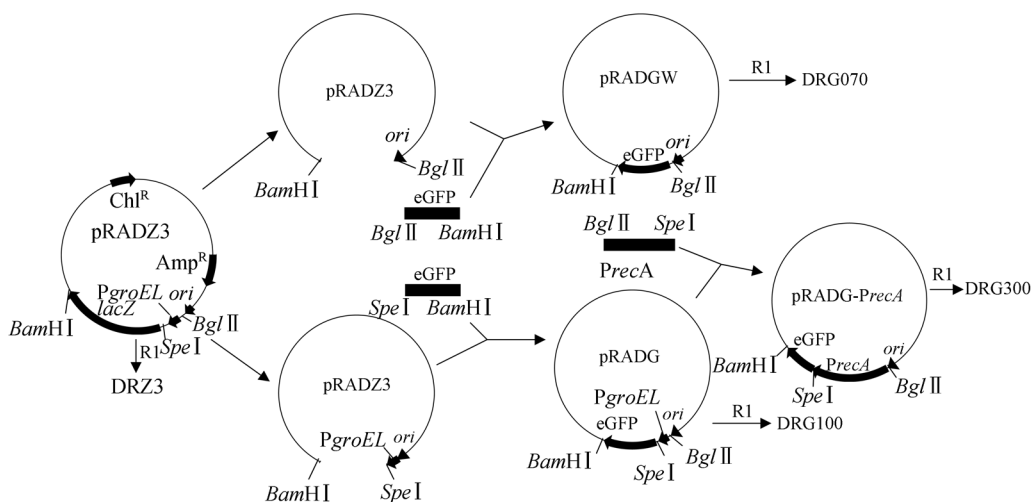


图 1 重组载体的构建及相关的转录子和限制性酶切位点

做RecA的Western杂交分析. 两个菌株样品在室温下以4 kGy剂量的 ^{60}Co γ 射线照射1 h后, 复愈0, 0.5, 1.5, 3和6 h分别收集. DRZ3菌株的样品被悬浮在磷酸缓冲液中以600 W功率冰上超声5 min破碎细胞, 并将细胞碎片离心去除(16000 $\times g$, 20 min). 上清中的蛋白总量由Bradford蛋白染色法^[17]测定, 其中RecA蛋白量由Western杂交按标准方法进行, 即在电泳后, 将胶上的蛋白转移到一张聚氟乙烯膜(PVDF膜, Amersham Pharmacia Biotech, Buckingham Shire, England)上, 以免抗RecA血清(实验室储存)孵育. 碱性磷酸化的抗兔IgG血清(Amersham Pharmacia Biotech)被用作第二抗体. 抗GroEL的Western杂交条带被用来作为样品的对照. PVDF膜上的化学发光信号由胶成像系统(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)进行成像和定量.

我们对每个DRG300样品照相并进行荧光强度分析. 荧光分析参照文献[6]并作了略微调整. 细胞样品的荧光强度通过一台荧光分光仪(Shimadzu, Japan)检测, 激发光波长为488 nm, 散射光波长为535 nm. 耐辐射球菌DRG070菌株被用来作为基线校正样品以使仪器调零. 每个样品进行了3次重复测定, 记录荧光强度原始数据. 以下实验结果提供的数据中包括了特异荧光强度(SFI, 初始荧光强度值除以每个时间点上的600 nm波长光的密度). 在检测每一种压力作用时, 我们也计算了相对荧光感应因子 RFI_t , 其等于相对光密度 A_t/A_0 除相对荧光强度 RF_t/RF_0 , 即 $\text{RFI}_t = (\text{RF}_t \times A_0) / (\text{RF}_0 \times A_t)$. 其中 RF_t 是DNA损伤压力作用下样品的原始荧光强度, RF_0 是没有损伤压力作用的对照组的原始荧光强度, A_t 是损伤压力作用下样品在600 nm光下的光密度, 而 A_0 是无压力作用的对照组的光密度.

() DNA损伤压力处理. 为了探索耐辐射球菌*PrecA-egfp*生物传感器监测放射物和毒物的可行性, 我们将菌株DRG300在TGY培养基中培养到指数生长期, 随后引入两种环境压力—— γ 射线和丝裂霉素C. 在放射性辐照处理实验中, 指数增长期的细胞被悬浮在10 mL磷酸钠缓冲液中, 对其中1 mL菌液在室温下以不同剂量水平进行辐照1 h. 不同剂量水平通过调整样品同 γ 射线放射源之间的距离来实现. 处理后, 悬液经不同时间复愈后进行照相和荧光强度测定. 每个样品进行了3次平行实验. 在丝裂霉素C处理实验中, 指数增长期的DRG300菌株在室温下经

不同浓度的丝裂霉素C处理1 h, 并随后在32℃下复愈0.5, 1.5, 3和6 h. 处理过的样品随后进行照相和荧光强度分析. 每个样品进行了3次平行实验.

2 结果和分析

2.1 耐辐射球菌中eGFP产生荧光

为了验证外源的*egfp*基因可以经耐辐射球菌*groEL*基因启动子启动并表达, DRG100和DRG070菌株被培养到指数生长期并使用GFP抗体进行Western杂交分析. 结果表明,*egfp*基因可以在正常生长条件下的DRG100菌株中成功表达, 而在DRG070菌株中没有检测到eGFP的表达(图2(a)). 荧光成像分析显示, 所有DRG100细胞发出激发波长为488 nm, 散射波长为535 nm的绿色荧光; 而DRG070细胞中无法检测到荧光(图2(b)). 这说明, 经由*PgroEL*诱导,*egfp*基因可以在耐辐射球菌种成功表达.

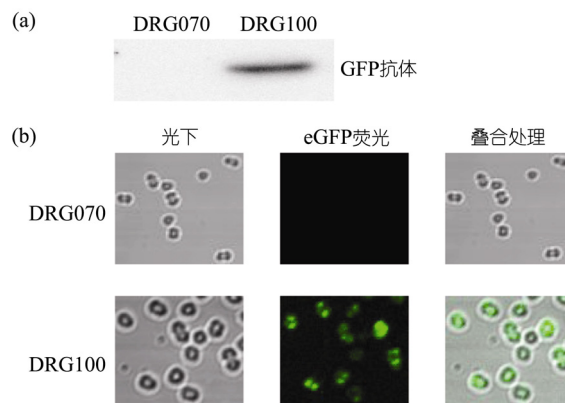


图2 eGFP的表达及验证

(a) 对含有pRADG质粒的DRG100菌株和含有pRADW质粒的DRG070菌株进行eGFP蛋白的Western杂交分析. (b) DRG100菌株的eGFP荧光检测, DRG070菌株作为对照

2.2 eGFP荧光强度同RecA表达丰度之间的关联性

为了建立耐辐射球菌细胞中在*recA*启动子引发下eGFP荧光强度同RecA表达水平之间的联系, 我们分析了DRG300菌株的荧光强度, 并对4 kGy剂量 γ 射线照射后的DRZ3菌株中的RecA蛋白进行了Western杂交分析(图3(a)). 结果证明, DRZ3菌株辐照后RecA表达呈逐渐上升趋势, 并在复愈3 h后达到最大值, 随后便迅速下降(图3(b)), 这同转录分析结果相一致^[18]. 同时, DRG300菌株在经4 kGy剂量 γ 射线照射后, SFI显著增加(图3(b)). 随后荧光强度达到一个平台期或略有下降. 由图3(b)可见, RecA蛋白

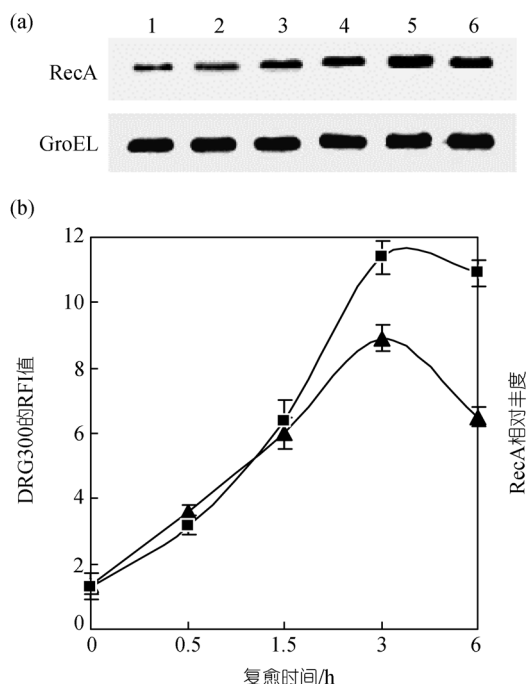


图3 荧光强度同 RecA 表达的 Western 杂交结果间的关联性

(a) 4 kGy γ 射线照射后 DRG300 菌株 RecA 蛋白表达的 Western 杂交分析。泳道 2~6 代表的样品分别在辐照后复愈了 0, 0.5, 1.5, 3 和 6 h; 泳道 1 的样品取自辐照前。抗 GroEL 条带作为上样对照; (b) γ 射线辐照后 DRG300 菌株中 RecA 相对表达水平(Western 杂交)(▲)同 eGFP (RFI)(■)之间的关系

的变化趋势同 eGFP 的荧光变化特征基本一致,只是在 3 h 后, RecA 蛋白迅速减少而 eGFP 的 SFI 值下降缓慢。这种差异也许是因为 RecA 对蛋白水解的敏感性,而 eGFP 可以在耐辐射球菌中相对保持稳定。结果说明 eGFP 标签适合作为研究基因表达差异,其反映的启动子活性水平是即时的,较少受到标签蛋白自身降解因素的影响。

2.3 γ 射线辐照的细胞内反应

γ 射线辐照可产生几百个双链断裂损伤(DSB),而DSB是最致命的DNA损伤形式。辐照后耐辐射球菌基因组范围的转录特征谱和蛋白质组学分析显示, γ 射线辐照是同源重组修复蛋白RecA的有效诱导因子 [19,20]。本研究计算DRG300 菌株中荧光强度同 γ 射线辐照剂量的相关性。结果显示,在不同剂量的 γ 射线照射后,荧光均没有任何延迟便被诱导产生,在复愈 3 h 左右强度达到最大值,随后便缓慢下降(图 4(a)和图 4(d))。低剂量辐射下,荧光强度反应同辐射剂量

间不呈线性关系(数据未显示)。辐射剂量在 0.25 至 2 kGy 之间,荧光强度同辐射剂量间保持持续的线性相关性。当辐射剂量超过 4 kGy 后,荧光强度随剂量增加的上升进入平台期(图 4(b)和图 4(c))。这些结果说明,DRG300 的荧光强度同广阔的辐射剂量范围呈线性关系,并且最大荧光强度可以达到本底值的 12 倍。

2.4 细胞对丝裂霉素 C 的应答

为了进一步探索此生物传感器对化学性遗传毒物的荧光应答,DRG300 菌株被用来检测其对丝裂霉素 C 的剂量相关性反应。在低剂量毒素下,荧光应答同浓度剂量不呈线性关系(数据未给出);而丝裂霉素 C 浓度在 0.001~1 $\mu\text{g/mL}$ 之间,荧光强度同浓度剂量始终呈线性关系(图 5)。最大值出现在用 10 $\mu\text{g/mL}$ 剂量处理后。在更高的浓度下,由于细胞毒害效应,荧光诱导曲线不再上升并保持稳定。更高浓度的丝裂霉素 C 也导致细胞生存力显著下降,这也导致了荧光强度显著减少。

3 讨论

如今,许多微生物经过遗传工程改造,被用来检测和降解污染物 [2,3]。然而,这些微生物往往对极端环境(如强放射性)非常敏感。因此有必要开发一种能够在强辐射环境下生存的新的生物传感器。最近,极端抗辐射细菌耐辐射球菌和 *D. geothermalis* 已经被工程化改造,用以清除有机溶剂和铀 [11,21]。但是,对放射废料的快速有效的检测方法尚在摸索中,而我们的工作为这一领域提供了一个潜在的候选者。本研究构建了荧光蛋白标签系统,以开发其在耐辐射球菌活细胞中的潜在应用价值。

在最近的研究中,加强型绿色荧光蛋白 eGFP 被广泛用作报告基因。同生物荧光素酶相比,荧光蛋白更适合用来构建实时监测系统 [2]。本研究实验结果显示, *egfp* 基因可以在耐辐射球菌启动子(*PgroEL*和 *PrecA*)的诱发下表达并发出荧光。基于 *PrecA-egfp* 融合基因的生物传感器 DRG300 具有实时监测电离辐射生物学效应的能力。通过荧光显微镜计量 eGFP 荧光强度,可以计算出感受器相应受到的电离辐射剂量或丝裂霉素 C 浓度。

参与 DNA 修复 SOS 应答系统的基因的启动子,如 *recA*, *recN*, *uvrA* 和 *alkA* 等已被用来同报告基因融合来分析遗传性毒物 [2]。而不同启动子的分析灵敏度各不相同 [4,5,7]。本研究将耐辐射球菌 *cinA-ligT-recA*

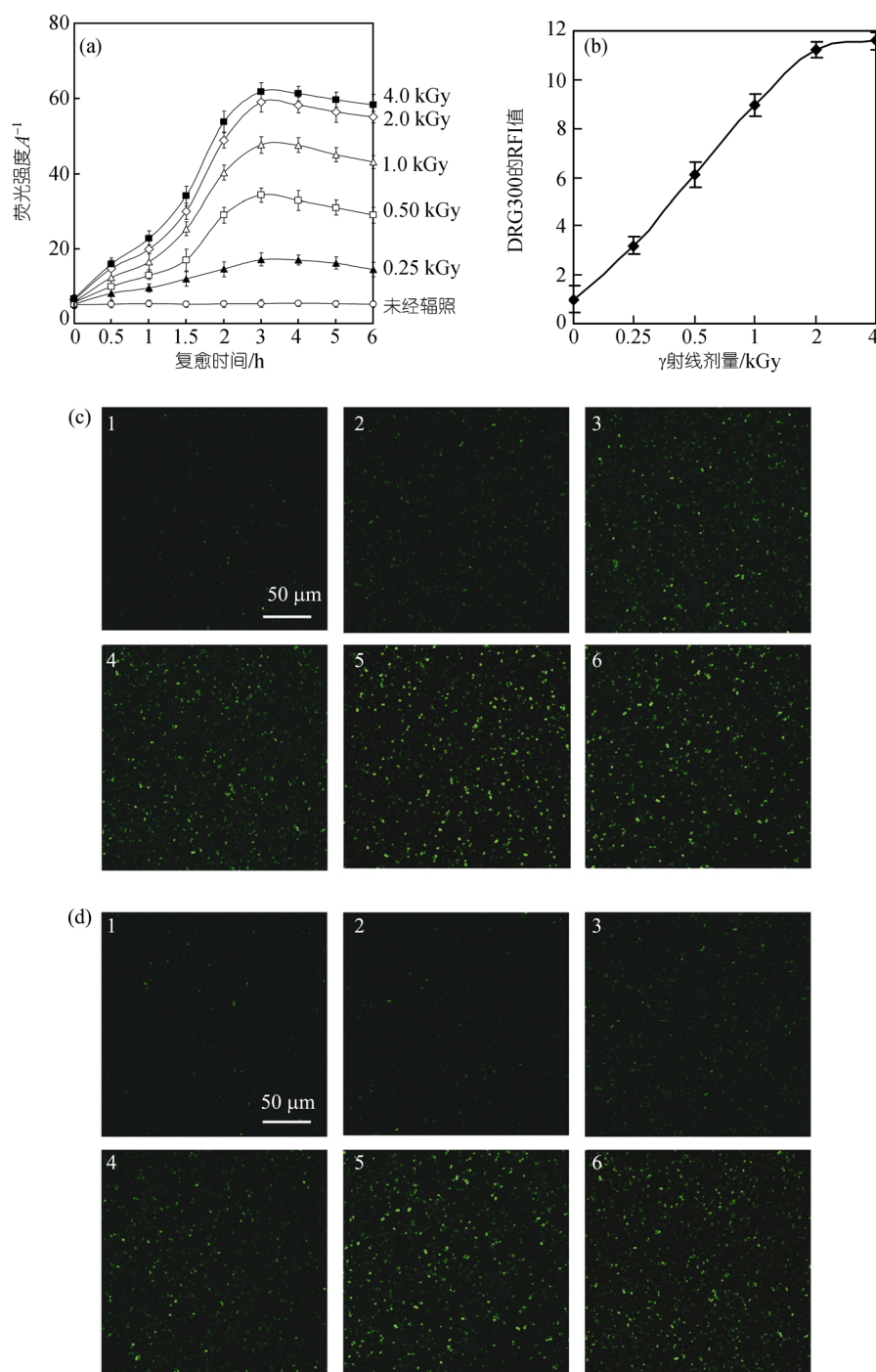


图 4 辐照压力过后 DRG300 菌株的应答

(a) DRG300 细胞分别经 0.25(▲), 0.5(□), 1(△), 2(◆)和 4 kGy(■)剂量的 γ 射线照射后, 其荧光强度的剂量相关曲线. 样品辐照后, 分别经 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 和 6 h 的复愈后测荧光强度值. (b) DRG300 菌株经不同剂量 γ 射线辐照后的 eGFP 应答特征. (c) DRG300 细胞经 0.25 (2), 0.5 (3), 1 (4), 2 (5)和 4 kGy (6)剂量 γ 射线辐照后的显微成像, 样品取自辐照后复愈 3 h 后; 1 为未经辐照的样品, 作为对照. (d) DRG300 菌株经 4 kGy 剂量辐照后复愈 0 (2), 0.5 (3), 1.5 (4), 3 (5)和 6 h (6)后的共聚焦显微成像; 1 为未经辐照的 DRG300 菌株, 作为对照

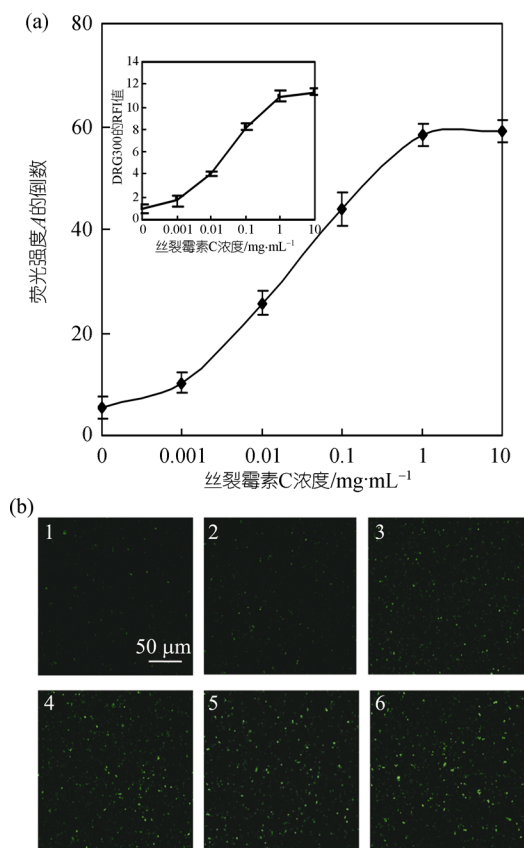


图5 DRG300 菌株在丝裂霉素 C 压力下的应答

(a) DRG300 细胞在不同浓度丝裂霉素 C 压力下 eGFP 应答特征曲线; (b) DRG300 细胞经 0.001 (2), 0.01 (3), 0.1 (4), 1 (5) 和 10 $\mu\text{g/mL}$ (6) 的丝裂霉素 C 处理后的显微成像, 样品取自处理后复愈 3 h; 1 为未经处理的样品, 作为对照

操纵子中预测的 *recA* 基因启动子 (*PrecA*)^[16] 作为感应器, 检测了 DRG300 菌株对两种不同的 DNA 损伤因子 (γ 射线和丝裂霉素 C) 的反应. 研究结果显示, 在测试条件下, DRG300 的荧光强度显示出同电离辐射剂量和丝裂霉素 C 浓度的相关性, 并且在一定的剂量/浓度范围内, 这种相关性呈现显著的线性特征. 荧光强度同两种不同压力因素间关系的相似性可能是因为电离辐射和丝裂霉素 C 都可以产生 DNA 损伤从而引发 RecA 蛋白表达. DRG300 生物传感器可以检测 250~4000 Gy 的广阔范围的 γ 射线辐照, 也可以检测 0.001~1 $\mu\text{g/mL}$ (0.003~3 $\mu\text{mol/L}$) 的广阔浓度范围内的丝裂霉素 C. 此荧光系统为采用生物传感器实时检测环境中放射性和毒性污染物的丰度提供了可行性. 根据先前关于大肠杆菌的相关报道^[7], 当 DRG300 细胞内的一些膜蛋白被突变后, 可能可以探测更低剂量的丝裂霉素 C.

基于 Western 杂交的 RecA 蛋白含量测定证明, 启动子 *PrecA* 同 eGFP 蛋白基因的融合使辐照后 *recA* 基因表达同荧光强度紧密关联. 这种关联性提示, 相比体外转录和蛋白质组学分析, 将 eGFP 基因同目标基因的启动子融合可以快速、敏感地平行监测活细胞中的基因或蛋白表达差异.

总之, 异源 eGFP 标签可以作为一种有效的工具来指导耐辐射球菌的工程化, 以监测环境中 DNA 损伤因子 (辐射、毒物、金属、宇宙射线和微重力), 并具有在生物修复领域的综合应用价值.

致谢 谨以此文纪念浙江大学原子核农业科学研究所成立 50 周年.

参考文献

- 1 Daly M J. Engineering radiation-resistant bacteria for environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11(3): 280—285^[DOI]
- 2 Belkin S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(3): 206—212^[DOI]
- 3 Kohler S, Belkin S, Schmid R D. Reporter gene bioassays in environmental analysis. *Fresenius J Anal Chem*, 2000, 366(6-7): 769—779^[DOI]
- 4 Vollmer A C, Belkin S, Smulski D R, et al. Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA'::lux*, *uvrA'::lux*, or *alkA'::lux* reporter plasmids. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(7): 2566—2571
- 5 Davidov Y, Rozen R, Smulski D R, et al. Improved bacterial SOS promoter∷lux fusions for genotoxicity detection. *Mutat Res*, 2000, 466(1): 97—107
- 6 Kostrzynska M, Leung K T, Lee H, et al. Green fluorescent protein-based biosensor for detecting SOS-inducing activity of genotoxic compounds. *J Microbiol Methods*, 2002, 48(1): 43—51^[DOI]
- 7 Norman A, Hestbjerg H L, Sorensen S J. Construction of a ColD *cda* promoter-based SOS-green fluorescent protein whole-cell bio-sensor with higher sensitivity toward genotoxic compounds than constructs based on *recA*, *umuDC*, or *sulA* promoters. *Appl Environ*

- Microbiol, 2005, 71(5): 2338—2346[DOI]
- 8 Minton K W. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. Mol Microbiol, 1994, 13(1): 9—15[DOI]
- 9 Battista J R, Earl A M, Park M J. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? Trends Microbiol, 1999, 7(9): 362—365[DOI]
- 10 Cox M M, Battista J R. *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(11): 882—892[DOI]
- 11 Lange C C, Wackett L P, Minton K W, et al. Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments. Nat Biotechnol, 1998, 16(10): 929—933[DOI]
- 12 Daly M J, Ouyang L, Fuchs P, et al. *In vivo* damage and recA-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. J Bacteriol, 1994, 176(12): 3508—3517
- 13 Brim H, McFarlan S C, Fredrickson J K, et al. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. Nat Biotechnol, 2000, 18(1): 85—90[DOI]
- 14 Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A. Studying protein dynamics in living cells. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(6): 444—456[DOI]
- 15 Meima R, Lidstrom M E. Characterization of the minimal replicon of a cryptic *Deinococcus radiodurans* SARK plasmid and development of versatile *Escherichia coli*-*D. radiodurans* shuttle vectors. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(9): 3856—3867[DOI]
- 16 Bonacossa A C, Coste G, Sommer S, et al. Quantification of RecA protein in *Deinococcus radiodurans* reveals involvement of RecA, but not LexA, in its regulation. Mol Genet Genomics, 2002, 268(1): 28—41[DOI]
- 17 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72: 248—254
- 18 Lipton M S, Pasa-Tolic L, Anderson G A, et al. Global analysis of the *Deinococcus radiodurans* proteome by using accurate mass tags. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(17): 11049—11054[DOI]
- 19 Huan C, Zhenjian X, Bing T, et al. Transcriptional profile in response to ionizing radiation at low dose in *Deinococcus radiodurans*. Prog Nat Sci, 2007, 17(5): 529—536[DOI]
- 20 Zhang C, Wei J, Zheng Z, et al. Proteomic analysis of *Deinococcus radiodurans* recovering from gamma-irradiation. Proteomics, 2005, 5(1): 138—143[DOI]
- 21 Appukuttan D, Rao A S, Apte S K. Engineering of *Deinococcus radiodurans* R1 for bioprecipitation of uranium from dilute nuclear waste. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(12): 7873—7878[DOI]