

کلونینگ و بیان ژن drRRA باکتری داینوکوکوس رادیودورانس در اشیریشیا کلی سویه Origami

رامین فلاح زاده^۱، جلیل فلاح مهرآبادی^{۲*}، امیر میرزایی^۳، محمد داود غفاری^۴

۱- کارشناسی ارشد، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۲- استادیار، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: داینوکوکوس رادیودورانس یکی از باکتریهای مقاوم به پرتو است و میتواند در محیطهای رادیو اکتیو که سایر موجودات قادر به رشد در آن نیستند، به حیات خود ادامه دهد. مطالعات نشان میدهد که چندین پروتئین آنتی اکسیدان و ترمیم کننده DNA در مقاومت بخشی آن نسبت به پرتو نقش دارند. پروتئین DrRRA یکی از پروتئینهای تنظیمی مهم داینوکوکوس رادیودورانس در مقاومت بخشی به پرتو است. هدف از این مطالعه کلونینگ و بیان ژن drRRA در اشیریشیا کلی بوده است.

مواد و روش ها: ژن drRRA داینوکوکوس رادیودورانس بصورت سنتتیک در وکتور pGEM-B1 ساخته شد و به دنبال آن در وکتور بیانی pET21a ساب کلون شد. برای تایید ساب کلونینگ، هضم آنزیمی و توالیابی انجام شد. برای تایید بیان ژن drRRA در اشیریشیا کلی سویه Origami، ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید و وسترن بلاتینگ انجام شد.

یافته ها: پلاسمید pET21a حاوی ژن drRRA به همراه برچسب هیستیدینی در قسمت C-ترمینال بطور موفقیت آمیز ساخته شد. همچنین، پروتئین نوترکیب DrRRA بصورت داخل سلولی در اشیریشیا کلی ترانسفورم شده تولید شد.

نتیجهگیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ساب کلونینگ و بیان ژن drRRA در میزبان اشیریشیا کلی امکانپذیر میباشد، همچنین، میزان بیان پروتئین هدف مناسب بوده و میتوان مقاومت بخشی پروتئین DrRRA را به پرتو در سیستمهای پروکاریوتی و یوکاریوتی نیز بررسی کرد.

کلمات کلیدی: مقاومت به پرتو، ژن drRRA، داینوکوکوس رادیودورانس

مقدمه

داینوکوکوس رادیودورانس^۱ یکی از مقاومترین ارگانیسم های مقاوم به پرتو در جهان محسوب میشود که بواسطه توانایی وسیع مقاومت در برابر آسیب های وارده به DNA از منابع مختلف مانند پرتو گاما، فرابنفش، پراکسید هیدروژن و خشکی شناسایی شده است (۱۱). سویه های وحشی این ارگانیسم، هنگامی که در معرض دوز های بیشتر از ۵ کیلو گری^۲ از پرتو گاما در طول فاز رشد نمایی زنده میمانند و بدلیل توانایی فوق العاده این سویه ها در زنده ماندن، برای سالها یک مدل ارگانیسم ایدهآل برای مطالعه ژن هایی که در پایداری و حفاظت از DNA نقش دارند، بوده است (۲ و ۱۲).

اولین مسیر حفاظت علیه استرس اکسیداتیو وجود آنزیم های آنتی اکسیدان همانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز است که بیومولکولها

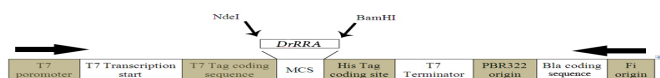
را از آسیب های ناشی از ROS^۳ محافظت میکند. دومین مسیر حفاظت علیه استرس اکسیداتیو تولید پروتئین های دخیل در ترمیم DNA دو رشت های میباشد (۱ و ۲). شکست های DNA دو رشت های بسیار خطرناک بوده و باید ترمیم گردد، بطوری که باکتری داینوکوکوس رادیودورانس میتواند دوز هایی از اشعه گاما را متحمل شود که هزار شکست DNA دو رشت های در طول ژنوم ایجاد میکنند (۱۰ و ۱۸). ترمیم شکستگی DNA دو رشت های در داینوکوکوس رادیودورانس بعد از مواجه شدن با دوز های بالایی از اشعه گاما خیلی سریع بوده و هنگامی که سلولها بعد از مواجه شدن با اشعه در محیط کشت غنی قرار میگیرند، در زمان دو تا سه ساعت خود را ترمیم میکنند (۱). تعداد زیادی پروتئین در میکروارگانیسم های مقاوم به پرتو در پاسخ به استرس های یونیزان شناسایی شدهاند (۱۸ و ۱۹) که یکی از این پروتئین های ترمیم کننده DNA در این ارگانیسم پروتئین DrRRA

Reactive Oxygen Species ۳

Deinococcus radiodurans ۱

kilo Gray ۲

*نویسنده مسئول: جلیل فلاح مهرآبادی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
پست الکترونیک: Raminfallah2009@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۲/۲۶
تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۲



شکل ۱. نمایش وکتور نوترکیب خطی شده PET2۱a حامل ژن بهینه شده drRRR این ژن درون جایگاه NdeI/BamH I واقع در MCS وکتور وارد شد.

بیان ژن drRRR

وکتور بیانی PET2۱a حاوی ژن drRRR به سلول مستعد اشریشیا کلی سویه Origami ترانسفورم شد و تایید ترانسفورم شدن این سویهها توسط کشت بر روی محیط LB Agar حاوی آمپیسیلین (با غلظت ۰/۱ میلیمولار) انجام شد و دنبال آن، کلنیهای خالص رشد کرده به محیط کشت LB Broth حاوی آمپی سیلین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد داخل شیکر انکوباتور کشت داده شد تا به چگالی نوری ۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسید (OD_{۶۰۰}). بیان پروتئین DrRRR بواسطه اضافه کردن IPTG (Isopropyl β-D- IPTG) با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار القا شد. سلولهای باکتری به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و به منظور بررسی بیان ژن، مقدار یک میلیلیتر از نمونه انکوبه شده را رسوب و سپس به آن مقدار صد میکرولیتر بافر نمونه (80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS (v/v), 5% glycerol (v/v), 10% β-mercaptoethanol, 0.001% blue 0.001) اضافه و به مدت پنج دقیقه جوشانده شد. در نهایت ۲۵ میکرولیتر از این نمونههای پروتئینی روی ژل پلی اکریلامید ۱۲٫۵٪ (w/v) حاوی سدیم دودسیل سولفات با ولتاژ ۹۰ به مدت دو ساعت الکتروفورز شدند (۴ و ۱۴).

وسترن بلات

به منظور شناسایی و تأیید باند منسوب به پروتئین DrRRR، پس از الکتروفورز نمونه های پروتئینی در کنار مارکر عمل انتقال آنها به غشاء نیتروسلولزی با جریان برق مستقیم به میزان ۲۰ mA/cm^۲ برای مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. پس از انکوباسیون غشاء با رقت ۱/۱۰۰۰ از آنتیبادی ضد His-tag، اتصال آن به برچسب هیستیدینی با استفاده از آنتیبادی ثانویه goat_anti.mouse IgG متصل به HRP، پس از افزودن محلول DAB^۴ بررسی شد (۴ و ۱۴).

یافته ها

نتایج ترانسفورم وکتور pGEM-B1 ژن drRRR

پس از ترانسفورم وکتور pGEM-B1 حاوی ژن drRRR به باکتریهای *E. coli* DH5α، کلنیهای رشد یافته بر روی محیط LB agar حاوی 3,3'-diaminobenzidine ۶

میباشد و این پروتئین که بعنوان تنظیم کننده پاسخ^۴ به DNA متصل میگردد و نقش بسیار مهمی در مقاومت به پرتو های یونیزان دارد (۵ و ۹)، بنابراین هدف از این مطالعه کلونینگ و بیان ژن drRRR در میزبان باکتریایی بوده است.

مواد و روشها

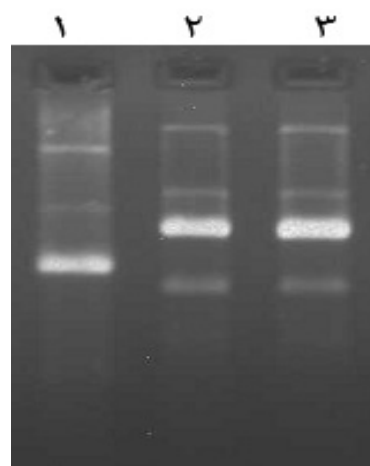
ژن، وکتور، میزبان، آنزیمها

ژن drRRR درون وکتور pGEM-B1 توسط شرکت Bioneer کره سنتز شد که در توالی پپتیدی این ژن تغییری لحاظ نشده بود و تنها بر اساس Codon usage، اشریشیا کلی حاصل شده بود. توالی ژن drRRR دارای ۱۱۵۲ جفت باز است که در طراحی این ژن در ابتدای آن جایگاه Nde I و انت های آن در BamH I قرار داده شده بود (شکل ۱). وکتور PET2۱a، اشریشیا کلی سویه DH5α و Origami (شرکت Novagen)، خریداری شد. آنزیمهای برشی اندونوکلاز، آنزیم DNA ligase T4، کیت استخراج وکتور و مواد شیمیایی (شرکت Roche) خریداری شد. نشانگر مولکولی ۱ Kbp و نشانگر پروتئینی Prestained marker (با غلظت ۶۲۵ میکروگرم در ۵۰۰ میکرولیتر) از شرکت فرمنتاز لیتوانی خریداری و به میزان ۱۰ میکرولیتر برای SDS-PAGE استفاده شد. وکتور pGEM حاوی این ژن با آنزیمهای اندونوکلاز برشی BamH I و Nde I برش داده شد. تمام مراحل خالصسازی ژن و وکتور به روش الکتروفورز و استخراج از ژل آگارز انجام گردید. در نهایت قطعه مورد نظر با فرآیند لیگاسیون (Ligation) در وکتور PET2۱a (تحت کنترل پروموتور فاژ T7) کلون شد. وکتور PET2۱a دارای توالی کدکننده هیستدین (۶XHis-Tag) میباشد که به صورت فیوژن در انتهای C-ترمینال ژن خارجی بیان میگردد (۸). پس از ترانسفورم محصول لیگاسیون در سلول مستعد (Competent) اشریشیا کلی DH5α و کشت آن در محیط کشت LB Agar حاوی آنتیبیوتیک آمپیسیلین (با غلظت ۰/۱ میلیمولار) و به دنبال آن کلنیهای رشد یافته بعنوان کلونهای واجد وکتور و احتمالاً واجد قطعه ژن انتخاب شدند. برای اطمینان از وارد شدن قطعه ژن در وکتور، این کلنیهها به صورت تصادفی انتخاب و درون محیط کشت LB Broth حاوی آمپیسیلین (با غلظت ۰/۱ میلیمولار) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز داخل شیکر انکوباتور کشت داده شد. پس از انجام استخراج وکتور، صحت استخراج وکتور توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شد (شکل ۲). تایید قرارگیری صحیح قطعه ژنی در قسمت جایگاه کلونینگ چندگانه (MCS^۵)، به وسیله آزمایش هضم با دو آنزیم برشی BamH I و Nde I (بایستی توالی نوکلئوتیدی حدود ۱۱۵۲ جفت باز مشاهده

گرد) انجام شد.

۴	Response	regulator
۵	Multiple cloning site	

آنتیبیوتیک آمپیسیلین انتخاب شدند. به منظور غربال کردن کلنیهای حاوی ساختار صحیح، پلاسمیدهای استخراج شده از این کلنیها روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شده و پلاسمیدهای سنگینتر که به نظر میرسید دارای قطعه حدود ۱۱۵۲ جفت بازی بودند، به منظور تأیید نهائی با آنالیز آنزیمی انتخاب شدند (شکل ۲).



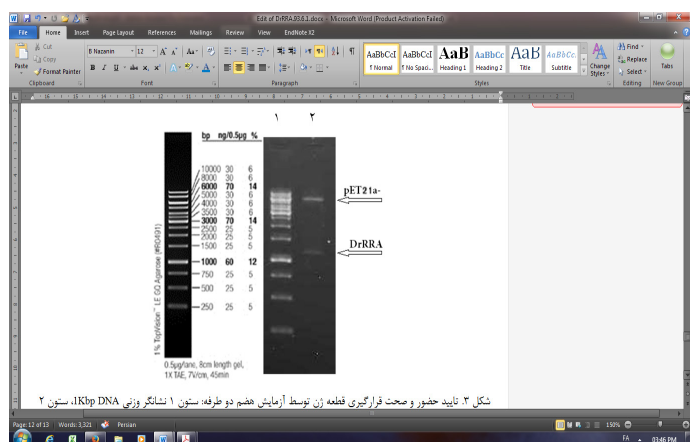
شکل ۲. نتایج استخراج پلاسمید. ستون ۱: وکتور pET ۲۱a (با اندازه ۵۴۴۳ bp)، ستون ۲ و ۳: وکتور pET ۲۱a حاوی ژن سنتتیک drRRA (با اندازه ۶۵۹۵ bp)

تایید پلاسمید های pGEM-B1 حاوی ژن drRRA

با توجه به طرح این پلاسمید (شکل ۱) و محلهای شناسائی آنزیم-های محدود کننده بر روی آن انتظار میرفت که با هضم همزمان این پلاسمید توسط دو آنزیم BamH I و NdeI قطعه کلون شده با اندازه حدود ۱۱۵۲ جفت باز خارج گردد. پلاسمید های pGEM-B1 استخراج شده از سویه های ترانسفورم شده با استفاده دو آنزیم BamH I و NdeI هضم آنزیمی شد و قطعه مورد نظر با وزن مولکولی ۱۱۵۲ جفت باز از وکتور ۳۰۰۳ جفت بازی جدا شد.

۳-۳- تایید صحت واکنش لیگاسیون با روش هضم آنزیمی و تعیین توالی

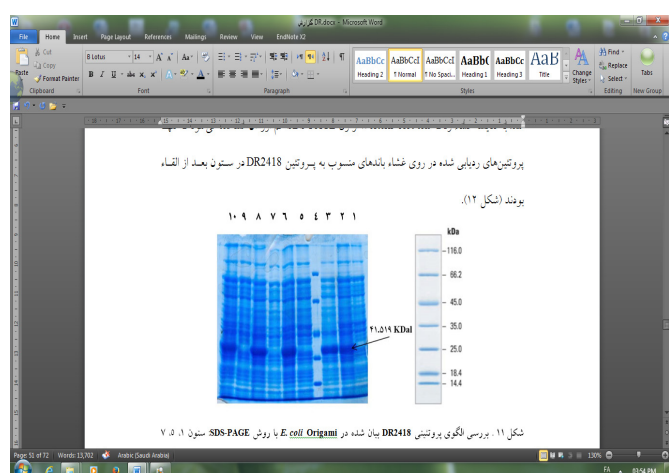
ژن drRRA با فرآیند لیگاسیون در جایگاه برشی BamH I و NdeI وکتور pET۲۱a تحت کنترل پروموتور فائز TV کلون شد. پس از انجام استخراج وکتور، صحت استخراج پلاسمید با استفاده هضم آنزیمی BamHI و NdeI تأیید شد و دو باند ۱۱۵۲ جفت بازی و ۵۴۴۳ جفت بازی ظاهر شد (شکل ۳). همچنین، پلاسمید نو ترکیب فوق با استفاده از پرایمر TV promoter تعیین توالی شد. نتایج تعیین توالی، صحت سازه ژنی از لحاظ ورود ژن، جهت صحیح ورود ژن و عدم وجود جهش در توالی ژن را مورد تایید قرار داد.



شکل ۳. تایید حضور و صحت قرارگیری قطعه ژن توسط آزمایش هضم دو طرفه: ستون ۱ نشانگر وزنی ۱Kbp DNA، ستون ۲ نتیجه هضم با آنزیمهای Nde I و BamH I یک قطعه با اندازه ۱۱۵۲ bp (ژن drRRA) و یک قطعه با اندازه ۵۴۴۳ bp (وکتور pET ۲۱a) مشاهده میشود.

۳-۴- نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات

وکتور نو ترکیب pET۲۱a- drRRA به سویه E.coli Origami ترانسفورم شد و پس از القا با IPTG در غلظت ۰.۲ mM، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. به منظور انجام SDS-PAGE سلولها را رسوب داده و سپس لیز شدند. پروتئین نو ترکیب DrRRA بیان شده در سویه Origami حاوی وکتور pET۲۱a- drRRA با وزن مولکولی ۴۱/۵۱۹ کیلودالتون قابل مشاهده بود (شکل ۴). همچنین برای تایید بیان پروتئین از وسترن بلات استفاده شد که نتیجه آن در شکل ۵ آمده است.



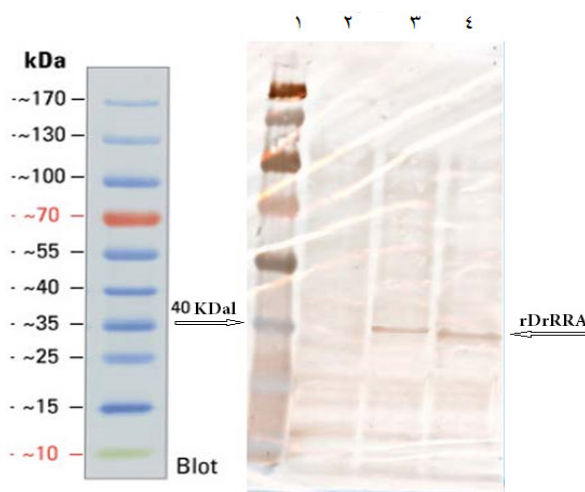
شکل ۴. بررسی الگوی پروتئینی DrRRA بیان شده در E. coli Origami با روش SDS-PAGE: ستون ۱، ۵ و ۷: رسوب E. coli Origami حاوی پلاسمید قبل از القا بعنوان کنترل منفی. ستون ۴: unstain Ladder، ستونهای ۲، ۳، ۶ و ۸: رسوب باکتری E. coli Origami حاوی pET۲۱a- drRRA چهار ساعت بعد از القاء

و ۱۶). بطوری که موتانت های drRRA به پرتو گاما بسیار حساسند و قابلیت سلول برای جلوگیری از آسیب های ناشی از رادیکال های آزاد بطور قابل توجهی کاهش مییابد (۱۸). رادیکال های اکسیژن و هیدروژن پراکسید از شکست مولکول های آب توسط پرتو بوجود می آید که منجر به آسیب به غشای سلولی، DNA و پروتئین میشود. در مطالعات نشان داده شده است که سویه های اشیریشیا کلی نوترکیب حاوی ژن drRRA دارای فعالیت نسبی بیشتری در از بین بردن رادیکال های سمی اکسیژن هستند. مکانیسم دفاعی معمول در سلول علیه H_2O_2 و O_2^- توسط آنزیم های دارای فعالیت آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز انجام میگردد (۶). بیان ژن drRRA در اشیریشیا کلی منجر به افزایش بیان KatG میشود که با افزایش دوز اشعه گاما میزان بیان KatG افزایش مییابد. بنابراین، ژن drRRA یکی از ژن های بسیار مهم در حفاظت سلول های داینوکوکوس در مقابل اثرات اشعه گاما میباشد (۷). اگرچه فرضیات متنوعی در مورد مکانیسم مقاومت به اشعه وجود دارد اما تحقیقات اخیر نشان میدهد که میزان یون Mn^{2+} در مقاومت بخشی موثرتر است و پروتئین DrRRA نقش نقل و انتقال این یون را در سلول به عهده دارد بطوری که اگر این پروتئین در باکتری های مقاوم به پرتو حذف ژنی شود، باکتری مورد نظر مقاومت خود را از دست میدهد.

نتایج Blast پروتئین DrRRA نشان داد که این پروتئین همولوگ RRS^y (تنظیم کننده پاسخ) شامل دو دامین مشخص شامل یک دامین حفاظت شده گیرنده انت های آمینی و یک دامین انت های کربوکسیلی افکتور متغیر میباشد که انت های کربوکسیلی دارای ویژگی اتصال به DNA میباشد. ونگ و همکاران (Wang et al) گروه آسپارتیک اسید پروتئین DrRRA را که در سیگنال ترانسداکشن نقش دارد را جهش نقطه ای دادند، نتایج این مطالعه نشان داد که این پروتئین نقش بسیار مهمی در میزان القای مقاومت به پرتو دارا است، بطوری که میزان مقاومت به پرتو در سویه های دارای جهش بسیار کاهش یافته بود (۲۰). اها و همکارانش (Ohba et al) در سال ۲۰۰۹، پروتئین DR۱۷۰۹ را در اشیریشیا کلی سویه BI۲۱ بیان کردند و نشان دادند که مقاومت به اشعه در باکتری داینوکوکوس توسط یک مکانیسم چند مرحله های کنترل میشود و یون های Mn^{2+} و Fe^{2+} نقش بسزایی در ایجاد مقاومت به اشعه دارند. این محققان همچنین نشان دادند که زمانی که سلول های بیان کننده پروتئین DR۱۷۰۹ را با H_2O_2 و UV مجاور کنند، میزان بقا و ماندگاری این سویه ها نسبت به سویه های وحشی اشیریشیا کلی بیشتر میشود (۱۳).

یانگ و همکارانش (YuanYuan et al) در سال ۲۰۰۷، بیان همزمان دو ژن pprI و drRRA را در داینوکوکوس، در میزان مقاومت به اشعه بررسی کردند. آنها این دو ژن را در داینوکوکوس حذف کردند و نتایج این مطالعه نشان داد که موتانت های فاقد این دو ژن بسیار

response regulator ۷



شکل ۵. شناسایی و تأیید پروتئین DrRRA با روش وسترن بلات با استفاده از آنتیبادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی
ستون ۱: Pre-stain Ladder، ستون ۲: نمونه غیرالقا، ستون ۳ و ستون ۴: نمونه های القا شده

بحث

تشعشعات به صورت ذرات یا امواج الکترومغناطیسی همانند اشعه گاما، اشعه X، اشعه ماوراء بنفش و امواج رادیویی باعث ایجاد آسیب اکسیداتیو در میان مولکول های حیاتی از جمله پروتئینها و اسید های نوکلئیک میشود (۳). در آسیب های DNA با منشا پرتو فرابنفش و دیگر تشعشعات یونیزان در پاسخ به تغییرات کروماتین، به شدت گروه آمینی پروتئین، تحریک میشود. ایجاد رادیکال های آزاد توسط پرتو های فرابنفش برای DNA مضر بوده و اغلب موجب القاء جهش های تصادفی میشوند (۱۷). مطالعات نشان داده است که باکتری داینوکوکوس رادیودورانس به اشعه های یونیزان که باعث شکست های DNA میشود، بسیار مقاوم میباشد (۵). داینوکوکوس رادیودورانس یک ارگانیسم مولتی ژنومیک است یعنی دارای ده کپی از ژنوم در داخل سلول است و این باکتری میتواند از نوترکیبی همولوگ برای بازآرایی ژنوم متعاقب اشعه استفاده کند. اکثر میکروارگانیسم های مقاوم به پرتو رنگدانه های محافظت کننده در برابر نور تولید میکنند که قادر به جذب تابش فرابنفش میباشند. استراتژی پایداری و بقاء مقاومت در برابر اشعه در میکروارگانیسم داینوکوکوس رادیودورانس نشان میدهد که مقاومت میکروبی توسط القاء برخی از ژنها، پروتئینها و آنزیم های خاص مسیر مکانیسم ترمیم DNA، صورت میگیرد (۸ و ۹) و همین طور برخی از پروتئین های دخیل در متابولیسم آنتی اکسیدانتی در باکتری های مقاوم به پرتو نقش بسیار مهمی دارد. مطالعات نشان میدهد که پروتئین DrRRA در باکتری داینوکوکوس رادیودورانس میتواند بطور قابل توجهی بیان ژن های recA و pprA را القا کند که منجر به افزایش فعالیت آنزیماتیک کاتالاز در این باکتری میشود (۱۵)

حساستر از سويه هاى تيپ وحشى بودند و بنا بر اين اين دو ژن بسيار مهم و حياتى در القاي مقاومت به اشعه هستند (۲۱).

نتيجه گيرى كلى

با توجه به آنكه پيشگيرى عليه اثرات مضر اشعه هاى يونيزان يكي از حوزه هاى مورد توجه دانشمندان است، اين مطالعه با هدف بررسى اثرات حفاظت بخش ژن drRRA سلول پروكارىونى، عليه پرتو هاى يونيزان انجام شده است. علاوه، هدف ن هاى اين مطالعه، استفاده از اين پروتئين حاصل از اين ژن در سلول هاى يوكارىوتى پيشرفته مانند رده هاى سلولى و در ن هايت انسانها در آينده ميباشد. به همين منظور، پيشنهاد ميگردد آزمون سنجش مقاومت در ميزبان هاى پروكارىوتى و يوكارىوتى انجام شود كه در صورت موفقيت در ايجاد مقاومت سلولى ميتوان از آن در كاربرد هاى بالينى متعددى بهره گرفت.

سپاسگزارى

كليهي نويسندگان از حمايت هاى مادى و معنوى پژوهشكده فناورى زىستى دانشگاه صنعتى مالك اشتر صميمانه قدردانى مينمايند.

منابع

1. Adam V, Royant A, Nivière V, Molina-Heredia FP, Bourgeois D. Structure of superoxide reductase bound to ferrocyanide and active site expansion upon X-ray-induced photo-reduction. *Structure*. 2004 Sep;9(12):1729-40.
2. Askerl D, Tarek SA, Teruhiko B, Kenji U. *Deinococcus aquiradiocola* sp. nov. isolated from a radioactive site in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009 Jan;59 (Pt 1):144-9.
3. Bonacossa C, Almeida D, Coste G, Sommer G, Bailone A. Quantification of RecA protein in *Deinococcus radiodurans* reveals involvement of RecA, but not LexA, in its regulation, *Mol. Genet. Genomic*. 2002;268 :41-28 .
4. Brown TA. *Gene Cloning and DNA Analysis, an introduction*. 4rd ed. Blackwell Science; 2001.
5. Cox, MM. Historical overview: searching for replication help in all of the replaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 8180-98:8173.
- 6- Daly MJ. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat Rev Microbiol*. 2009;-7:237 245.
7. Ghosal D, Omelchenko MV, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Venkateswaran A, et al. How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS Microbiol Rev*. 2005; 375-29:361.
8. Hua Y, Narumi I, Gao G, Tian B, Satoh K, Kitayama S, et al. PprI: a generals witch responsible for extreme radio resistance of *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;360-306:354 .
9. Karsten U, Escoubeyrou K, Charles F. The effect of redissolution solvents and HPLC columns on the analysis of mycosporine-like amino acids in the eulittoral macroalgae *Prasiolacrispa* and *Porphyraumbilicalis*. *Hegol Mar Res*. 2009;238-63:231 .
10. Krisko A, Radman M. Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jul;7(1):5).
11. Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Tatusov RL, Minton KW, Koonin EV, et al. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001; 79-65:44.
12. Moseley BE, Evans DM. Isolation and properties of strains of *Micrococcus Deinococcus radiodurans* unable to excise ultraviolet light-induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways. *J Gen Microbiol*. 1983;2445-129:2437 .
13. Ohba H, Satoh K, Sghaier H. Identification of PprM: A modulator of the PprI dependent DNA damage response in *Deinococcus radiodurans*. *Extremophiles*. 2009;479-13:471 .
14. QIAexpress, detection and assay handbook. 2rd ed. QIAGEN GmbH; Apr 1999.
15. Sambrook J. Russel DW. *Molecular cloning. a laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA. 2001;587-592 .
16. Sheng DH, Tian B, Zhang SW, Xu ZJ, Hua YJ. Effects of PprI and RecX on antioxidant activity of *Deinococcus radiodurans*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2006 Apr;46(2):238-42.
17. Singh OV, Gabani P. Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. *J Appl Microbiol*. 2011;861-110:851 .
18. Tanaka M, Earl AM, Howell HA, Park MJ, Eisen JA, Peterson SN, et al. Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that con Tribute to extreme radio resistance. *Genetics*. 2004; 33-168:21.
19. Wang L, Xu G, Chen H, Zhao Y, Xu N, Tian B, et al. DrRRA: a novel response regulator essential for the extreme radio resistance of *Deinococcus radiodurans*. *Molecular Microbiology*. 2008;6(67):1211-1222.
20. Wang LY, Yin LF, Guangzhi XU, MingFeng LI, Zhang H, Tian B, et al. Cooperation of PprI and DrRRA in response to extreme ionizing radiation in *Deinococcus radiodurans*. *Chin Sci Bull*. January 2012;1)57).
- 21- YuanYuan WU, Tian B, Yuejin H. dr1127: A novel gene of *Deinococcus radiodurans* responsible for oxidative stress. *Chinese Science Bulletin*. August 2007; 52(15):2081-2087.