



研究报告

藤黄微球菌 V017 基因组测序及对辐照的转录组响应

孙敏 陈天宇 冯红*

四川大学生命科学学院 四川省分子生物学与生物技术重点实验室 四川 成都 610064

摘要:【背景】耐辐射微生物是一类重要的极端微生物资源,在研究其耐受机制以及环境保护等方面具有重大的意义。【目的】从基因组和转录组角度解析耐辐射藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) V017 的抗性遗传背景以及对辐照的转录组响应。【方法】利用 PacBio 平台对菌株 V017 进行基因组测序,通过比较基因组分析菌株 V017 特有的基因序列,并通过 RNA 测序分析菌株 V017 对伽马辐照的转录组响应及其差异表达基因。【结果】通过从头组装获得菌株 V017 的完全基因组,其大小为 2 527 399 bp,GC 含量为 72.9%;比较基因组分析发现菌株 V017 基因组中存在特有的移动元件序列,可能有助于适应辐照极端环境。转录组分析表明菌株 V017 在辐照处理后,脂肪酸和色氨酸等基础代谢途径显著下调,而与 DNA 损伤修复相关的代谢途径则显著上调,其中同源重组修复可能是菌株 V017 响应辐照的主要途径。【结论】根据藤黄微球菌 V017 的基因组和转录组分析表明,细胞可能利用特异性的移动元件序列通过 DNA 重排适应辐照环境,同时通过启动 DNA 损伤修复和改变一些基础代谢响应辐照胁迫,这可能是菌株 V017 产生中度辐照抗性特性的重要原因。这些研究为进一步理解耐辐射微生物的适应和抗性机制,以及耐辐射微生物资源的开发利用奠定基础。

关键词:耐辐射微生物,藤黄微球菌,基因组,转录组,抗性机制

Complete genome of *Micrococcus luteus* V017 and its transcriptomic response to gamma ray radiation

SUN Min CHEN Tianyu FENG Hong*

Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China

Abstract: [Background] Radioresistant microorganisms are important type of extreme microbial resources, which are of great significance for studying radiation-resistance mechanism and environmental protection. [Objective] To analyze the genetic background of *Micrococcus luteus* V017 and the transcriptome response to radiation through genome and transcriptome. [Methods] The full genome of strain V017 was sequenced and its unique gene sequence was revealed by comparative genome analysis. Further, transcriptome response of strain V017 to gamma ray radiation was performed, and then followed by functional analysis of their differentially expressed genes. [Results] The whole genome of V017 was obtained through *de novo* assembly. The genome size was 2 527 399 bp with GC content of 72.9%.

Foundation item: Science and Technology Support Program of Sichuan Province (2016NZ0106)

*Corresponding author: Tel: 86-28-85470226; E-mail: hfeng@scu.edu.cn

Received: 14-07-2020; Accepted: 02-09-2020; Published online: 25-11-2020

基金项目: 四川省科技支撑计划(2016NZ0106)

*通信作者: Tel: 028-85470226; E-mail: hfeng@scu.edu.cn

收稿日期: 2020-07-14; 接受日期: 2020-09-02; 网络首发日期: 2020-11-25

Comparative genome analysis revealed many mobile element sequences unique in V017 genome, which may be helpful for it to adapt to the extreme irradiation environment. Transcriptome analysis showed that the basic metabolic pathways such as fatty acid and tryptophan metabolic pathways were significantly down-regulated. By contrary, expression level of the DNA damage repair pathways was significantly up-regulated. Especially, homologous recombination repair may play a major role in response to irradiation. **[Conclusion]** The genomic and transcriptome data analysis implied that the specific mobile sequences of strain V017 may help to adapt to the radiation environment through modulation of DNA rearrangement. Alternation of DNA damage repair and basic metabolic pathways in response to radiation stress may be an important reason for the moderate radiation resistance of strain V017. These studies laid the foundation for further understanding the adaptation and resistance mechanisms of radioresistant microorganisms, as well as the utilization of its microbial resources.

Keywords: radioresistant microorganisms, *Micrococcus luteus*, genome, transcriptome, resistance mechanism

在自然界辐照无处不在,给微生物造成选择压力,导致产生耐辐射微生物。自首次从辐照灭菌的罐头食品中分离出耐辐射异常球菌(*Deinococcus radiodurans* R1)后^[1],研究人员陆续从各种生境,如沙漠^[2]和核燃料废弃物^[3]等环境中分离获得了各种耐辐射的微生物,并成为一类重要的极端微生物资源,在环境修复^[4-5]与农业生产^[6]等方面具有潜在的应用前景。

探究耐辐射菌株的抗性机制一直是研究人员关注的热点。1999年研究人员完成了*D. radiodurans* R1的基因组测序,发现其基因组中约有200余个基因具有种属的特异性,并且存在大量的通过基因水平转移(Horizontal Gene Transfer)获得的插入序列,这可能是该菌进化适应的一种推动力^[7]。虽然许多耐辐射微生物的基因组完成了测序,但是目前对这些微生物的适应机制和抗性机制仍然缺乏必要的认识。转录组分析是研究基因功能的一种重要手段,可在基因组水平上研究基因表达及其调控网络。Liu等^[8]和Tanaka等^[9]先后利用转录组分析,发现*D. radiodurans* R1菌株的DNA损伤修复与三羧酸循环(TCA)等代谢途径在细胞辐照后扮演重要的作用。林敏课题组从我国新疆戈壁分离到一株新种*D. gobiensis* I-0,并分析了该菌株对紫外照射的转录组应答,发现*lexA*、*recA*和*recB*基因的表达模式与紫外线照射后的大肠杆菌明显不同^[10],

这表明在对辐照的应答过程中,扮演调控作用的基因可能具有种属特异性。

藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)是一种革兰氏阳性细菌,广泛存在于土壤和水体环境中,能够促进植物生长^[11],并用于土壤污染修复^[12-13]等,在*M. luteus*中还发现一个类似生长激素的细胞复苏促进因子^[14-15]。目前关于藤黄微球菌有耐辐射特性的相关报道极少。本实验室在前期研究中分离获得一株具有辐射中度抗性的藤黄微球菌 V017,本研究从基因组和转录组的角度分析该菌的耐辐射遗传背景以及对辐照的转录组响应,为进一步探索耐辐射微生物资源、研究耐辐射机理及应用价值提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

在一辐照间靠近钴源(⁶⁰Co- γ 射线)旁的地面,用浸泡含0.1%吐温80的磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)棉球(无菌)擦拭取样,该地面日常受到的 γ 射线剂量约为3 Gy/min,样品在辐照间内无菌密封后带回实验室4℃保存。通过PBS多次洗涤取样棉球后得到土壤样品,菌株 V017 (CGMCC 1.18419)从该土样中分离获得。前期实验发现该菌对 γ 射线具有中等抗性,能够耐受5.0 kGy的 γ 射线辐照。

1.1.2 培养基

TGY 培养基(g/L): 胰蛋白胨 5.0, 酵母粉 3.0, 葡萄糖 1.0, pH 7.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 和 2×TB Green Premix Ex Taq II, 宝生物工程(大连)有限公司; 2×Taq Master Mix, 南京诺维赞生物科技有限公司; 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 密封钴源, 四川省原子能研究院辐照工程与工艺研究所。Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek 公司; 全自动微生物鉴定仪, Biolog 公司; NanoDrop One 微量分光光度计, Thermo Fisher 公司; CFX Connect 实时定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株 V017 的鉴定

利用通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGA CTT-3'), 以 V017 菌株的少许菌落为模板, PCR 扩增 16S rRNA 基因, 引物终浓度 0.5 μmol/L。PCR 反应体系(20 μL): 2×Taq Master Mix 10 μL, 27F、1492R (10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 8 μL。PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。然后将 V017 菌株的 16S rRNA 基因扩增产物, 经 DNA 测序并与 NCBI 数据库中的序列进行搜索比对。同时, 利用 Biolog 全自动微生物鉴定仪按照使用指南分析测试了 V017 菌株对 95 种碳源的代谢利用情况。最后, 根据 16S rRNA 基因序列和代谢特征对 V017 菌株进行鉴定。

1.2.2 基因组 DNA 的提取及测序

将菌株 V017 在 30 °C、200 r/min 下培养, 然后 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用液氮速冻后-80 °C 保存。然后, 用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取样品基因组 DNA, 并委托北京诺禾致源科技股份有限公司, 采用三代 PacBio 单

分子测序平台进行基因组测序。基因组原始测序数据已上传 NCBI SRA 数据库(PRJNA644446)。

1.2.3 菌株 V017 辐照处理及生长曲线测定

收集在 TGY 培养液中的 V017 菌株, 经 PBS 缓冲液洗涤后, 调至菌液浓度 OD_{600} 为 0.8 并将菌液均分 3 份。其中 1 份菌液放于冰上作为对照组, 不做辐照处理; 另外 2 份置于冰上进行 γ 射线辐照, 累积剂量分别为 250 Gy 和 500 Gy, 其中 γ 辐照剂量率为 5.8 Gy/min。将辐照处理后的细胞和对照组分别加入 2×TGY 液体培养基, 并在 30 °C、200 r/min 进行培养。然后分别在 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 6.0 h 取样, 测定细胞密度(OD_{600})。同时, 将各时间点样品经 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 在液氮中速冻, 最后保存于-80 °C 备用。每个处理设置 3 个重复。

1.2.4 菌株 V017 总 RNA 的提取和测序

用 Trizol 试剂提取菌株 V017 的总 RNA, 并委托北京诺禾致源科技股份有限公司采用 Illumina 公司的 NovaSeq 6000 平台进行转录组测序。RNA 测序的原始数据已上传 NCBI SRA 数据库(PRJNA644446)。

1.2.5 测序数据处理与分析

将菌株 V017 基因组测序获得的原始数据用 Trimmomatic (V0.33)软件^[16]进行过滤处理, 得到有效数据。然后利用 SMRT Link V5.0.1 软件^[17]进行从头组装, 得到菌株 V017 的基因组草图, 最后再通过优化和校正, 获得一个封闭环状的基因组完成序列。最后对菌株 V017 的基因组分别进行了 GO (Gene Ontology)注释^[18]和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路分析^[19]等。组装好的菌株 V017 基因组数据已上传至 GenBank 数据库(登录号 CP058971)。

将菌株 V017 转录组测序得到的原始数据进行过滤, 得到有效数据, 用 HISAT 2.0 软件^[20]映射到其基因组上, 使用 StringTie 软件^[21]计算并统计每个转录组样品中每个基因的表达量(Transcripts Per Kilobase Million, TPM)。最后参考 Maza 的参数^[22]、

利用 edgeR 软件计算样本间的差异表达基因 (Differentially Expressed Genes, DEG), 其中差异基因定义为 Log_2FC 的绝对值大于或等于 1, 错误发现率(False Discovery Rate, FDR)小于 0.05。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 分析

采用实时荧光定量 PCR 验证所选基因的转录水平。实时荧光定量 PCR 特异性引物见表 1, PCR 反应体系参考文献[23], 其中引物终浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$, 模板 cDNA 5.0 ng 。PCR 反应条件: 95°C 3 min; 95°C 10 s, 57°C 10 s, 72°C 30 s, 40 个循环; 95°C 10 s。同时, 以菌株 V017 的 16S rRNA 基因作为内参基因。实时荧光定量 PCR 数据采用 Livak 法进行处理^[24]。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers of real-time qPCR

基因 Gene	上游引物 Forward primers (5'→3')	下游引物 Reverse primers (5'→3')	片段长度 Size (bp)
<i>radA</i>	CGGACACCCTGCGTCTGA	GCAGGGTCTGCACGGAGT	105
<i>recA</i>	AAGCAGTTCGGCAAGGGTTC	AGGACTCCGGGCCGTAGAT	154
<i>lexA</i>	GCCGTCGTCGCAGGTCTC	CGCCATGACGTCCTCGACC	140
<i>Ribonuclease J2</i>	AGCCCAGTTCGTGATGCC	ACGTAGCCGCACTCCACCTC	175
<i>Extracellular protease precursor</i>	TCGCTGTCCGACATCGCC	GCGTTCTGGTAGGTGGTGCC	140
<i>elaB</i>	TGAGCAGCCGCAGACCGA	GCGAGGGCCAGGAACG	159
16S rRNA	CGGTTGTGTCGCTGTGTCG	GCCTTCGCCATCGGTGTTC	147

2 结果与分析

2.1 菌株 V017 的鉴定

菌株 V017 在 TGY 培养基上 30°C 培养 2-3 d 后, 可形成表面光滑有凸起、边缘整齐黄色菌落 (图 1A), 其 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号为 MN006451)与 NCBI 数据库中的藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)高度相似, 相似性为 99.9% (图 1B)。同时, 应用 Biolog 全自动微生物鉴定仪测试分析了菌株 V017 对 95 种碳源的代谢和利用情况, 结果发现菌株 V017 可以利用 25 种碳源, 其中包括吐温 40、D-核糖、醋酸、L-苹果酸、丙酮酸、2,3-丁二醇、2'-脱氧腺苷、肌苷、D-L- α -磷酸甘油等; 但对 R-环糊精、淀粉、甘露聚糖、

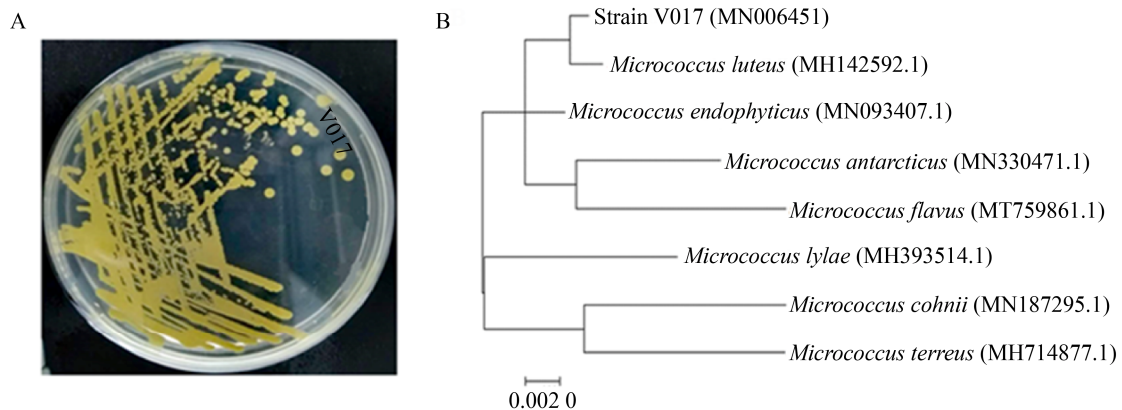


图 1 菌株 V017 的菌落形态(A)及基于 16S rRNA 基因序列用最大似然法构建的系统发育树(B)

Figure 1 Colony morphology (A) and phylogenetic tree (B) based on 16S rRNA gene sequence by maximum likelihood method of strain V017

注: 系统发育树中的编号为菌株的 GenBank 号; 系统发育树的标尺表示两菌株间此长度的差异度为 0.2%

Note: The number is the GenBank accession of the strain at the end of the phylogenetic tree; The ruler of the phylogenetic tree indicates that the difference is 0.2 percent between the two strains

吐温 80、D-果糖、麦芽糖、D-洛酮糖、松二糖、D-乳酸甲酯、琥珀酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、丁二胺、腺苷、1-磷酸- α -D-葡萄糖、6-磷酸- α -D-葡萄糖等 16 种碳源利用较弱。通过与数据库的对比,也表明菌株 V017 与藤黄微球菌(*M. luteus*)在碳源利用方面高度相似。最终,综合菌落特征、16S rRNA 基因序列和生理代谢特征,将具有中等辐照抗性的菌株 V017 鉴定为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)。

2.2 *Micrococcus luteus* V017 基因组组装及注释

经 PacBio 平台测序和从头组装获得了藤黄微球菌 V017 的全基因组序列,基因组大小为 2 527 399 bp,GC 含量为 72.9%;预测编码基因 2 359 个。其 GO 注释结果见图 2,这些基因可分为 3 大条目,即生物学过程(Biological Process)、分子功能(Molecular Function)以及细胞组分(Cell Component)。其中,在生物学过程中,代谢过程(Metabolic Process)和细胞过程(Cellular Process)所含基因最多,涉及基因数目分别是 787 个(43%)和 702 个(39%);在分子功能类中,参与催化活性(Catalytic Activity)和结合(Binding)相关的基因最

多,分别占该类基因数目的 47%和 38%;在细胞组分类中,细胞结构体(Cellular Anatomical Entity)和细胞内(Intracellular)相关的基因所占比例最多,分别占该类基因数目的 50%和 38%。

2.3 *Micrococcus luteus* 不同菌株比较基因组学分析

截至 2019 年 11 月,在 NCBI 公共数据库中已上传有 67 个 *M. luteus* 基因组,其中只有 7 个是组装完全的。因此,本研究将菌株 V017 的基因组与这 7 个基因组进行了比较基因组分析,总体情况见表 2。这 8 株藤黄微球菌的基因组大小在 2.48–2.84 Mb 范围内,其中 V017 具有 48 个特有的基因,包括 32 个编码移动元件序列(Mobile Element Sequences),说明菌株 V017 处于快速的变异中,这可能与适应辐照环境有关。

2.4 *Micrococcus luteus* V017 的辐照处理与转录组测序

将藤黄微球菌 V017 细胞在 2 个辐照剂量处理后,与未处理的对照组进行培养,分别用 OD_{600} 绘制了生长曲线。由图 3 可见,在辐照处理后,细胞的恢复生长低于对照组,而且 500 Gy 的辐照处

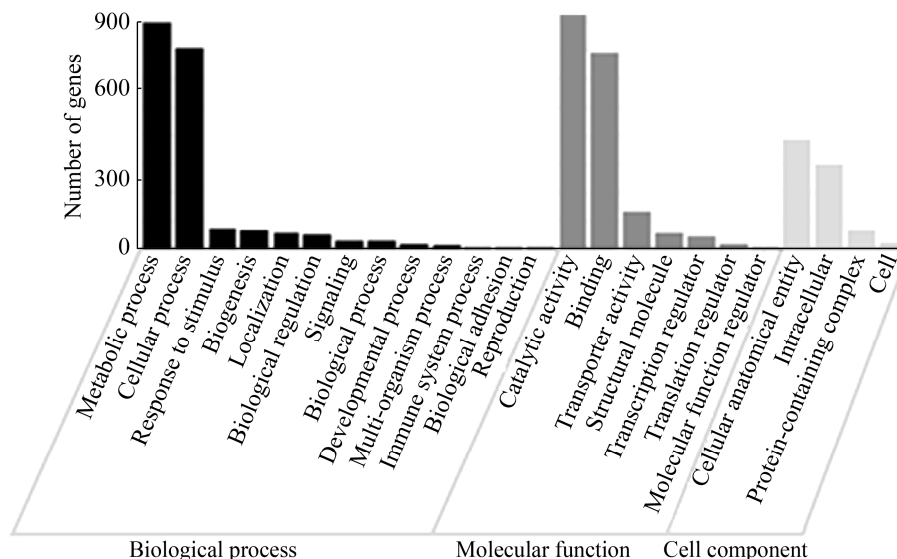


图 2 藤黄微球菌 V017 菌株基因组 GO 功能注释及分类统计

Figure 2 Gene ontology classification of *Micrococcus luteus* V017 genome

表 2 菌株 V017 与其他 7 株藤黄微球菌基因组比较分析

Table 2 Comparison of V017 genome sequences with the other 7 *M. luteus* genomes

藤黄微球菌 <i>M. luteus</i> strains	基因组大小 (Mb)	所有基因数 All genes	编码基因数 Coding genes	转运 RNA tRNA	核糖体 RNA rRNA	重复序列数 Repeat region	GC content (%)	GenBank accession No.	References
NCTC2665	2.50	2 407	2 356	48	3	58	73.0	ASM2320	[25]
trpE16	2.50	2 402	2 351	48	3	59	73.0	ASM87779	[26]
SGAir 0127	2.65	2 635	2 583	48	4	46	72.8	ASM307152	[27]
SA211	2.48	2 366	2 314	48	4	38	73.1	ASM369167	[28]
SB1254	2.55	2 497	2 445	48	4	42	72.9	ASM411701	-
AS2	2.84	2 776	2 723	50	4	70	73.3	ASM528033	[29]
ATCC4698	2.56	2 549	2 494	51	4	105	73.1	ASM609441	[30]
V017	2.53	2 413	2 359	50	4	92	72.9	CP058971	This work

理后细胞生长最慢。根据 3 组细胞的生长曲线, 分别选择 0.0、0.5、1.0、3.0 和 6.0 h 共 5 个时间点取样提取 RNA, 等量合并每个时间点的 3 个重复 RNA 样品, 然后进行转录组测序。将 15 个转录组数据分别使用 HISAT 2.0 软件映射藤黄微球菌 V017 基因组, 每个样品 Clean Reads 几乎均可映射到基因组, 映射率均大于 92%, 这表明菌株 V017 转录组数据可靠, 可用于后续分析。

利用 edgeR 软件分析统计了不同处理每个时间点与对照相比的差异基因数目。如图 4 所示, 当 γ 射线辐照剂量为 250 Gy 时, 在不同恢复培养时间点共有差异基因数目为 759 个, 其中上调的基因数目为 448 个, 下调的基因数目为 311 个; 当 γ

辐照剂量为 500 Gy 时, 差异基因数目增多, 共 1 196 个, 其中上调的基因数目为 776 个, 下调的基因数目为 420 个。说明基因组水平上表达模式的改变程度与辐照的剂量有关。无论哪个剂量, 恢复培养的早期(0 h), 下调的基因数量最多, 分别占总下调基因数目的 65% (250 Gy)和 44.5% (500 Gy), 说明辐照对细胞造成的损伤可导致许多基因的表达下调; 随着恢复培养时间的延长, 表达上调的基因数目逐渐增加, 反映了各种代谢途径的上调, 细胞逐步恢复正常的生长和代谢。

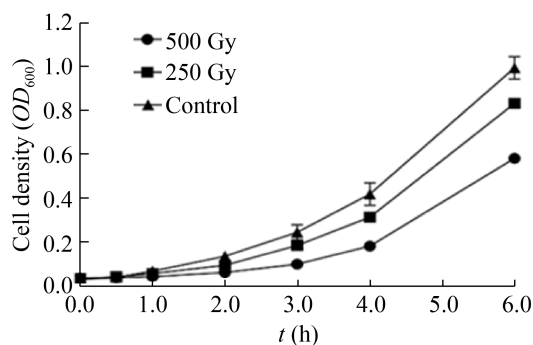


图 3 菌株 V017 在 γ 射线处理后恢复培养的生长曲线
Figure 3 The growth curve of strain V017 recovery culture after γ -ray treatment

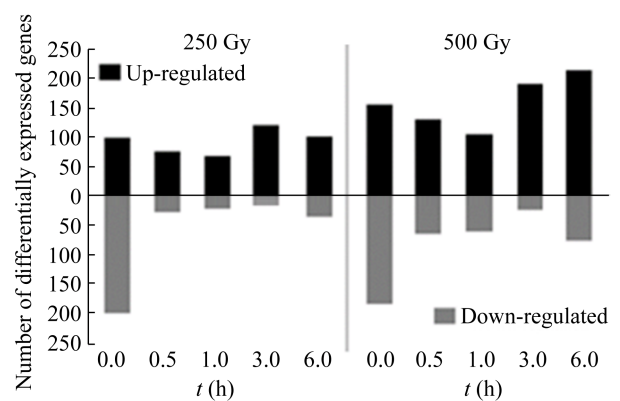


图 4 在不同剂量 γ 射线辐照处理后菌株 V017 的差异表达基因数目
Figure 4 Number of differentially expressed genes of V017 under different doses of γ -ray irradiation

2.5 辐照胁迫导致的 KEGG 富集代谢途径

进一步将差异基因进行 KEGG 富集分析, 发现共有 213 个差异基因具有 KO 号, 并富集于 104 个 KEGG 代谢途径中, 图 5 展示了富集程度最高的 20 个 KEGG 代谢途径, 主要包括脂肪酸代谢 (Fatty Acid Metabolism)、丙酸盐代谢 (Propanoate Metabolism)、脂肪酸降解 (Fatty Acid Degradation) 和各种氨基酸代谢等途径。主要的差异表达基因汇总于表 3, 这些基因大多能够参与多条代谢途径, 在辐照后的早期表达水平显著下调, 但在培养后期逐渐恢复正常表达。例如: 参与脂肪酸代谢的 3-酮酰基辅酶 A 硫解酶 (3-Ketoacyl-CoA Thiolase, FadA) 和 3-羟酰基辅酶 A 脱氢酶 (3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase, FadB) 基因在辐照早期的表达量与对照相比, 分别下调了 3.2 倍和 1.6 倍; 在丙酸盐代谢途径中, 2-甲基柠檬酸脱氢酶 (2-Methylcitrate Dehydratase) 与 异柠檬酸甲酯裂解酶 (Methylisocitrate Lyase) 等基因在辐照后的早期其

表达量也有 2 倍多的下调; 色氨酸代谢途径中的酰基辅酶 A 脱氢酶 (Acyl-CoA Dehydrogenase) 和醛脱氢酶 (Aldehyde Dehydrogenase) 等基因的表达量均下调; 在碳水化合物代谢途径中, 丙酮酸代谢 (Pyruvate Metabolism) 途径在辐照后也被抑制, 其中丙酮酸脱氢酶 (Pyruvate Dehydrogenase) 与乙酰辅酶 A 合成酶 (Acetyl-CoA Synthetase) 等基因表达量分别下调了 1.2 倍和 1.5 倍。值得注意的是丙酸盐途径的代谢产物如乙酰辅酶 A 可以进入三羧酸 (TCA) 循环。

2.6 DNA 损伤修复相关途径基因的差异表达

辐照对细胞的损伤是多样的, 其中 DNA 损伤对细胞是致命的。如果 DNA 损伤不被及时修复, 细胞将面临死亡, 拥有高效的 DNA 损伤修复是细胞耐辐射的关键之一。因此, 我们进一步分析了涉及 DNA 修复相关的基因。在 V017 菌株基因组中主要存在 3 条 DNA 损伤修复途径: DNA 切除、错配和同源重组修复, 共包括 37 个基因。

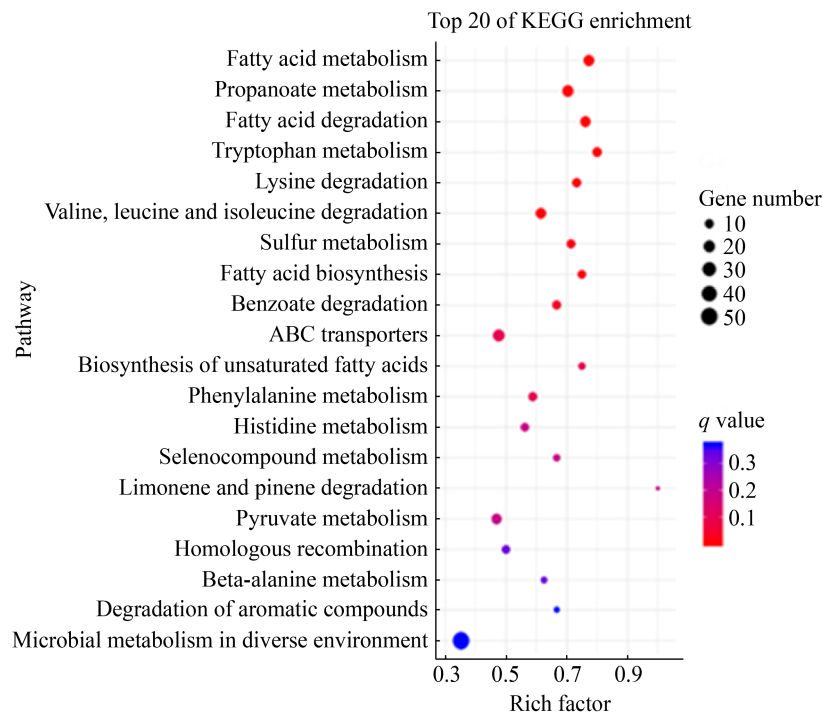


图 5 差异表达基因 KEGG 富集的前 20 个代谢途径

Figure 5 Top 20 KEGG pathways enriched with the differentially expressed genes

表 3 辐照胁迫响应 KEGG 富集代谢途径中的主要差异表达基因

Table 3 Differentially expressed genes in KEGG-enriched metabolism pathways in response to γ -ray radiation stress by *M. luteus* V017

基因编号 Gene ID	注释 Annotation	途径 Pathway	γ 辐照剂量 γ -radiation dosage (Gy)	相对表达倍数 Relative expression fold (Log ₂ FC)				
				0.0 h	0.5 h	1.0 h	3.0 h	6.0 h
Peg.1094	3-ketoacyl-CoA thiolase (FadA)	FM/PM/FD/TM/PyM	250	-3.12	0.11	0.56	0.45	0.68
			500	-3.21	-0.52	-0.29	0.72	1.01
Peg.1095	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (FadB)	FM	250	-1.64	0.08	0.18	0.13	0.18
			500	-1.63	-0.27	-0.33	-0.59	-0.34
Peg.231	Acyl-CoA dehydrogenase (FadE)	FM/FD	250	-0.76	-0.46	-0.67	-0.38	-1.50
			500	-0.01	-0.11	-0.74	-0.66	-1.33
Peg.1844	Acetyl-CoA carboxylase (AccABCD)	FM/PM/PyM	250	-0.56	-0.17	-0.21	-0.24	0.73
			500	-1.14	-0.61	-0.18	-0.32	4.77
Peg.600	Methylcrotonyl-CoA carboxylase	FM/PM/PyM	250	-1.42	-0.31	0.22	0.34	0.30
			500	-2.11	-0.99	0.82	0.36	0.66
Peg.1080	3-oxoacyl-ACP reductase(FabG)	FM	250	0.06	-3.42	-0.05	0.05	-0.46
			500	-0.22	-3.34	-0.17	-0.01	-0.58
Peg.1092	Fatty-acyl-CoA	FM/FD	250	-2.05	-0.02	0.01	-0.16	0.30
			500	-1.92	-0.24	-0.28	-0.36	-0.18
Peg.1989	Long chain fatty acid CoA ligase (FadD)	FM/FD	250	-0.36	0.07	1.52	0.85	0.59
			500	-0.45	0.16	1.43	1.37	0.76
Peg.1992	Enoyl-CoA hydratase	FM/FD/PM/TM	250	0.07	-0.01	0.06	1.05	0.57
			500	-0.14	0.24	0.49	1.12	0.88
Peg.59	Aldehyde dehydrogenase	FM/TM/PyM	200	-1.12	-0.16	-0.22	0.13	-0.81
			500	-0.44	0.35	-0.19	-0.28	-1.07
Peg.1885	Acyl-CoA dehydrogenase	FD/TM	250	-1.80	-0.40	-0.02	0.15	0.39
			500	-1.71	-0.26	-0.05	0.51	0.08
Peg.2175	Alcohol dehydrogenase	FD	250	-3.57	0.27	0.22	-0.46	0.19
			500	-3.90	-0.31	-0.17	-0.11	-1.60
Peg.230	Acetyl-CoA synthetase	FM/PM/PyM	250	-1.32	0.21	0.02	0.69	0.47
			500	-1.49	0.07	0.40	0.94	0.24
Peg.1343	Gnt R family transcription regulator	PM	250	-1.62	0.50	0.53	0.25	1.41
			500	-2.56	-0.85	0.27	0.42	1.28
Peg.1344	2-methylcitrate dehydratase	PM	250	-1.47	-0.11	0.19	0.57	0.71
			500	-2.00	-0.77	-0.48	0.74	0.62
Peg.1345	Methylisocitrate lyase	PM	250	-2.02	-0.43	0.20	0.61	0.87
			500	-2.36	-1.10	-0.30	0.97	0.40
Peg.1346	2-methylcitrate synthase	PM	250	-1.24	-0.10	0.18	0.26	0.15
			500	-1.56	-0.69	-0.46	0.23	0.43
Peg.165	Catalase KatE	TM	250	-2.09	-0.44	-0.51	-0.02	-0.26
			500	-1.42	-0.27	-0.10	-0.32	0.02
Peg.212	Pyruvate dehydrogenase	PyM	250	-1.94	-0.22	-0.40	-0.13	-0.27
			500	-1.15	-0.04	-0.70	-0.54	-0.16
Peg.150	Malate synthase	PyM	250	-1.77	2.67	0.92	0.35	0.56
			500	-0.87	3.18	2.75	0.86	0.95
Peg.1847	L-lactate dehydrogenase	PyM	250	0.66	0.06	0.07	0.36	1.32
			500	0.03	0.14	0.03	0.43	1.31

注: FA: 脂肪酸代谢; PM: 丙酸盐代谢; FD: 脂肪酸降解; TM: 色氨酸代谢; PyM: 丙酮酸代谢

Note: FA: Fatty acid metabolism; PM: Propanoate metabolism; FD: Fatty acid degradation; TM: Tryptophan metabolism; PyM: Pyruvate metabolism

表 4 显示在辐照处理后, DNA 损伤修复途径各时间点与未处理的对照相比的差异表达基因, 可见接近半数的 DNA 损伤修复的基因(17 个)在辐照处理后的较短时间内(<1 h)上调表达, 随着细胞恢

复生长时间的延长(6 h), 上调的基因数目逐渐减少, 并且 500 Gy 辐照剂量的基因下调表达程度明显高于 250 Gy。在菌株 V017 的核苷酸切除修复(Nucleotide Excision Repair, NER)途径中, UvrA、

表 4 DNA 损伤修复基因响应辐照胁迫后的差异表达

Table 4 Differential expression of DNA damage repair genes in response to γ -ray radiation stress by *M. luteus* V017

基因编号 Gene ID	注释 Annotation	途径 Pathway	γ 辐照剂量 γ -radiation dosage (Gy)	相对表达倍数 Relative expression fold (Log ₂ FC)				
				0.0 h	0.5 h	1.0 h	3.0 h	6.0 h
Peg.336	UvrD	NER/MMR	250	1.05	0.59	0.39	0.47	0.50
			500	1.37	0.96	0.72	0.80	0.68
Peg.520	DNA ligase (NAD ⁺)	NER/BER/MMR	250	0.54	0.37	0.30	0.05	-0.22
			500	1.12	0.71	0.61	0.12	-0.33
Peg.1040	UvrB	NER	250	0.97	0.69	0.78	0.41	-0.07
			500	1.44	0.93	1.08	0.65	0.03
Peg.1050	UvrA	NER	250	0.98	0.52	0.72	0.47	0.24
			500	1.50	0.99	1.18	0.90	0.65
Peg.1033	DNA polymerase I	NER/BER/HR	250	-0.01	-0.07	-0.37	-1.67	-0.10
			500	-0.16	-0.28	-0.55	-1.80	-0.30
Peg.138	Exodeoxyribonuclease III	BER	250	0.84	0.58	0.54	0.36	-0.33
			500	1.53	1.07	0.82	0.58	-0.27
Peg.704	DNA-3-methyladenine glycosylase	BER	250	2.72	2.41	2.53	1.93	-0.03
			500	3.91	3.44	3.56	2.47	-0.11
Peg.208	DNA polymerase III subunits gamma and tau	MMR/HR	250	1.34	1.02	0.98	0.48	0.36
			500	1.92	1.57	1.47	0.83	0.45
Peg.287	DNA polymerase III subunits delta & prime subunit	MMR/HR	250	0.54	0.36	0.37	0.15	-0.17
			500	1.22	0.85	0.84	0.44	-0.26
Peg.1164	DNA polymerase III subunits delta subunit	MMR/HR	250	0.53	0.42	0.40	0.43	0.26
			500	1.01	0.89	0.82	0.75	0.44
Peg.1436	DNA polymerase III subunits epsilon subunit	MMR/HR	250	0.81	0.57	0.60	0.03	0.17
			500	1.11	0.90	0.97	0.20	0.08
Peg.207	RecR	HR	250	1.8	1.4	1.2	1.0	0.5
			500	1.9	1.5	1.5	1.4	0.8
Peg.640	RecA	HR	250	2.9	2.3	1.8	1.0	0.1
			500	3.5	2.9	2.3	1.5	0.5
Peg.1210	RuvB	HR	250	2.18	1.55	1.20	0.68	-0.07
			500	2.39	2.02	1.90	0.97	0.07
Peg.1211	RuvA	HR	250	1.91	1.87	1.29	0.88	0.72
			500	2.22	2.27	1.78	1.26	0.94
Peg.108	RadA	HR	250	2.55	2.17	2.47	2.03	1.04
			500	3.36	2.77	2.96	2.54	1.57
Peg.274	RecQ	HR	250	0.91	0.52	0.73	0.49	0.53
			500	1.58	0.90	1.16	0.69	0.50
Peg.1553	RmuC	HR	250	2.54	2.20	1.99	1.74	0.86
			500	3.37	2.90	2.68	2.11	1.163

注: NER: 核苷酸切除修复; BER: 碱基切除修复; MMR: 错配修复; HR: 同源重组

Note: NER: Nucleotide excision repair; BER: Base excision repair; MMR: Mismatch repair; HR: Homologous recombination

UvrB 和 UvrD 的表达量上调 1.5 倍以上;涉及碱基切除修复(Base Excision Repair, BER)途径的 DNA-3-甲基腺嘌呤糖基化酶的表达量上调 3 倍;DNA 错配修复(Mismatch Repair, MMR)途径的主要基因,如 *mutS*、*mutL* 以及 *mutH* 的表达量没有显著差异,可能 MMR 途径没有参与其细胞辐照后的 DNA 损伤修复。

细胞在遭受 γ 射线辐照后会造大量的 DNA 双链断裂(Double Strand Breaks, DSB), DNA 同源重组是参与细菌双链断裂修复的主要途径^[31]。在菌株 V017 基因组中,KEGG 注释参与同源重组(Homologous Recombination, HR)的基因共 18 个,其中 12 个(表 4)是差异表达基因,其余 6 个基因的表达变化不大。同源重组修复途径中的主要基因,如 RadA、RecA 以及 RmuC 等蛋白编码基因在辐照处理后短期内上调表达 2-3 倍。因此,在菌株 V017 中,同源重组修复是应对 DNA 损伤的主要途径。此外,我们发现菌株 V017 的基因组中没有 RecC、RecD 和 SbcB 等蛋白,但是存在 RecFOR

复合物,这表明 V017 菌株主要是利用 RecA 介导的 RecFOR 途径来完成 DNA 修复,而不是 RecBC 途径。在 V017 的 RecFOR 途径中,RecR 与 RecQ 的基因表达量上调约 2 倍,但是 RecF、RecO 以及 SSB (Single Stranded DNA Binding Protein)结合蛋白的表达量却没有显著的变化,因此 RecFOR 途径其他组分的表达量没有显著差异,这也许是菌株 V017 只具有中度辐射抗性的重要原因。

2.7 RT-qPCR 验证

为了评估转录组数据的可靠性,采用实时荧光定量 PCR 分析了所选 6 个基因在 3 个时间点(0.0、0.5、1.0 h)的表达量,结果见图 6。然后,利用皮尔森相关系数(Pearson Correlation Coefficient)检验转录组测序数据与实时荧光定量 PCR 结果的相关性,发现编码 RadA、RecA、LexA 以及 *Extracellular protease precursor* 的基因存在较高的相关性($|r|>0.8$),*Ribonuclease J2* 与 *ElaB* 两者的结果中度相关($0.5<|r|<0.8$)。可以看出 RT-qPCR 分析与转录组测序的结果具有良好的一致性,说明转录组分析的数据可靠。

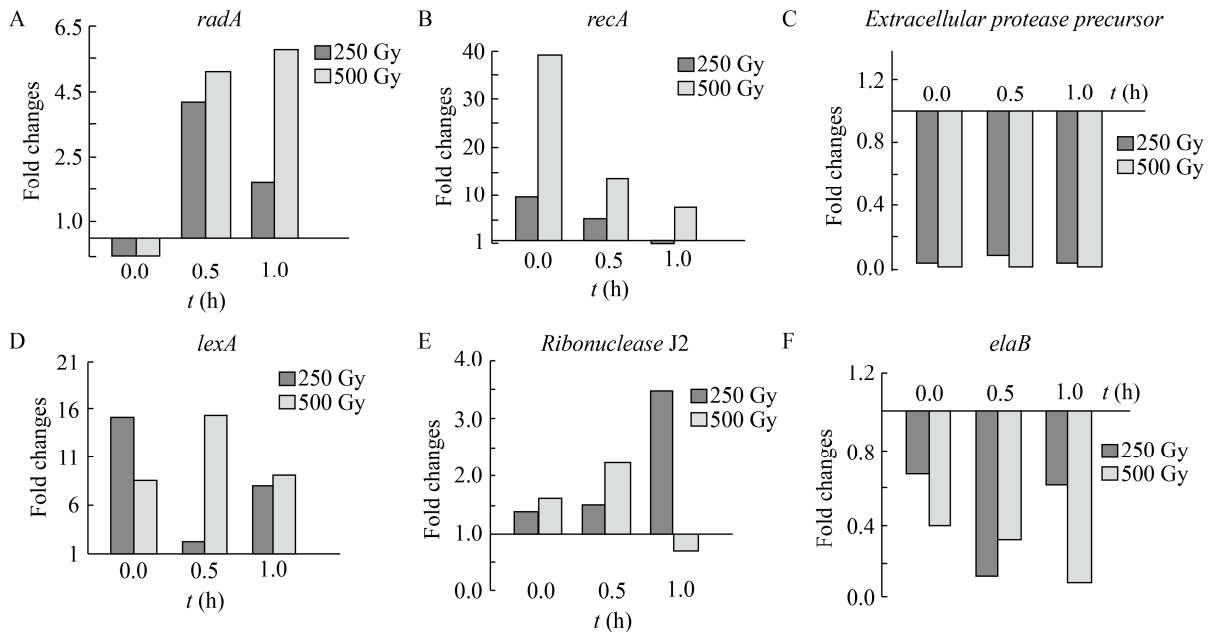


图 6 实时荧光定量 PCR 验证

Figure 6 Verification of RNA-seq by real-time qPCR

3 讨论与结论

虽然对耐辐射微生物菌株已经有诸多报道,而且基因组和转录组分析已用于解析 *D. radiodurans* R1 等菌株的耐辐射机制^[8-9],但目前关于耐辐射藤黄微球菌对辐照转录组应答的研究却很少。本研究通过将 8 个藤黄微球菌(*M. luteus*)的基因组进行比较分析后发现,菌株 V017 中有 32 个特异的移动元件,转录组分析表明大多数的移动元件在辐照后其表达量并无显著变化,暗示菌株 V017 可能是通过增加其基因组的可塑性来适应极端环境,因为辐射微生物的 DNA 重排显著提高^[32]。此外,菌株 V017 基因组中还发现有大量的重复序列(表 2),覆盖转座子的重复序列占基因组大小的 3%,这可能也与移动元件序列有关,而在 *Deinococcus* 菌属的多个菌株基因组中也发现有大量的移动元件序列^[10],这些移动元件可能为细胞不断适应辐照环境提供进化的动力。

γ 射线辐照后,菌株 V017 多条代谢途径如脂肪酸代谢、丙酸盐代谢、丙酮酸代谢和氨基酸代谢等发生改变。脂肪酸代谢具有重要的生物学功能:脂肪酸衍生物可以担当胞内信使的功能;脂肪酸可以合成细胞膜的重要成分——糖脂和磷脂;同时脂肪酸的 β 氧化可为细胞提供能量^[33]。在多种微生物中,已观察到多种胁迫可改变细胞内脂肪酸的组成和饱和度,进而影响细胞膜的流动性^[34-35]。在菌株 V017 中,脂肪酸代谢途径的下调也许就是细胞内脂肪酸组分改变的内在原因,这种变化与辐射抗性的关系值得进一步研究。此外,菌株 V017 参与脂肪酸 β 氧化的蛋白 FadA 和 FadB 在辐照后显著下调,从而可在辐照响应中降低能量消耗,最小化对能量的需求^[8]。在碳水化合物代谢中,辐照处理后导致菌株 V017 的丙酸盐和丙酮酸代谢途径下调。在原核细胞中,丙酸盐代谢通过 2-甲基柠檬酸合酶(2-Methylcitrate Synthase)将丙酸盐与草酰乙酸(Oxaloacetate)缩合为柠檬酸甲酯,随后在 2-甲基柠檬酸脱氢酶(2-Methylcitrate Dehydratase)与异

柠檬酸甲酯裂解酶(Methylisocitrate Lyase)的作用下生成丙酮酸与琥珀酸,从而可为三羧酸循环(TCA)不断补充原料^[36-37]。在菌株 V017 辐照后的早期,丙酸盐代谢途径中编码 2-甲基柠檬酸合酶、2-甲基柠檬酸脱氢酶与异柠檬酸甲酯裂解酶这 3 个关键酶的基因,其表达均显著下调,表明细胞可能通过抑制其代谢以响应辐照胁迫。推测丙酸盐和丙酮酸代谢的下调可能降低丙酮酸和琥珀酸的合成,从而进一步抑制下游的 TCA 循环途径。这与在辐照后的 *D. radiodurans* R1^[38]与 *M. luteus* SC1204^[39]早期观察到的 TCA 途径受到抑制一致。 γ 射线辐照通常伴随着产生大量的活性氧自由基(Reactive Oxygen Species, ROS)。因此,一些抗辐照的细菌同时具有较强的抗氧化性^[31]。转录组分析显示 *D. radiodurans* R1 和 *Pontibacter korlensis* 在辐照后,过氧化氢酶(Catalase)和锰离子转运蛋白基因显著上调^[34,40]。但是,在菌株 V017 的转录组数据中,编码过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和金属离子转运蛋白的基因都没有因为辐照胁迫而上调表达。此外,我们发现菌株 V017 的色氨酸途径在辐照后被抑制。然而具有芳香族侧链的蛋白容易受到 ROS 的攻击,其中色氨酸最容易被氧化损伤^[41-42]。这表明菌株 V017 遭受辐照后抑制其色氨酸代谢途径,可避免蛋白质遭受 ROS 的攻击损伤。

D. radiodurans R1 菌株极高的抗辐射特性得益于其高效且精确的 DNA 修复系统^[43],V017 在辐照后的核苷酸切除修复途径可能主要是依赖于 UvrA 的方式。在 *D. radiodurans* R1 菌株的 UvrA 对于 UvrABC 核酸内切酶修复系统起着重要的作用^[7],而且 UvrA 除了参与 DNA 修复之外,可能还参与损伤 DNA 的转运,可及时地将受损 DNA 转运出细胞,有利于阻止在细胞 DNA 损伤修复过程中重新将其整合到基因组中,确保了 DNA 修复的精准和高效^[44]。RecA 蛋白的高诱导被认为是同源重组发生的主要标志,对辐照后的细胞基因组的恢复至关重要,*D. radiodurans* R1 菌株 DNA 的

同源重组修复途径主要是利用 RecA 介导的 RecFOR 途径来完成^[45-46]。Gutman 等发现缺少 RecA 蛋白的 *D. radiodurans* R1 突变体表现出对电离辐射和紫外线等的极度敏感^[47]。尽管 RecA 功能在该过程中占主导地位, 但 DNA 合成的引发不仅需要 RecA, 还需要其同源物 RadA 蛋白, RadA 可有助于 DNA 合成的启动^[48]。然而辐照后在菌株 V017 中, RadA 的表达量上调 3 倍多, 与 RecA 蛋白的表达量相似, 这表明 RadA 与 RecA 蛋白在菌株 V017 的同源重组途径中均发挥着重要作用。在 RecFOR 修复途径中, 复合体 RecOR 负责帮助 RecA 识别单链 DNA, 复合体 RecFR 负责双链 DNA 或双链-单链的连接, 其中 RecR 蛋白是与 RecA 相互作用的关键部分^[49-50]。然而在菌株 V017 中, RecR 基因的表达量上调约 2 倍, 这说明 RecFOR 复合体在 DNA 损伤修复时可能发挥一定的作用; 但由于 RecO 和 RecF 的表达量没有显著的变化, 这有可能是导致菌株 V017 的耐辐射能力低于 *D. radiodurans* R1 的原因之一。Deng 等^[39]解析了在辐照胁迫下 *M. luteus* SC1204 的蛋白组学变化, 揭示氨基酸和丙酮酸等代谢途径在此菌辐照抗性方面发挥重要作用, 但 DNA 修复相关的蛋白表达无显著变化, 说明耐辐射微生物的抗性机制既有一些相似性, 也具有一定的差异。

总之, 本研究从基因组和转录组角度解析了藤黄微球菌 V017 的辐射抗性机理, 为深入了解耐辐射微生物的分子机理, 以及藤黄微球菌应用于辐射污染区土壤修复等方面提供了一定的理论依据。

REFERENCES

- [1] Anderson AW, Nordan HC, Cain RF, Parrish G, Duggan D. Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation[J]. Food Technology, 1956, 10: 575-578
- [2] Rainey FA, Ferreira M, Nobre MF, Ray K, Bagaley D, Earl AM, Battista JR, Gómez-Silva B, McKay CP, Da Costa MS. *Deinococcus peraridilitoris* sp. nov., isolated from a coastal desert[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(7): 1408-1412
- [3] Tišáková L, Pipiška M, Godány A, Horník M, Vidová B, Augustín J. Bioaccumulation of ¹³⁷Cs and ⁶⁰Co by bacteria isolated from spent nuclear fuel pools[J]. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2013, 295(1): 737-748
- [4] Lange CC, Wackett LP, Minton KW, Daly MJ. Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(10): 929-933
- [5] Xu R, Wu KJ, Han HW, Ling ZM, Chen ZJ, Liu P, Xiong J, Tian FK, Zafar Y, Malik K, et al. Co-expression of YieF and PhoN in *Deinococcus radiodurans* R1 improves uranium bioprecipitation by reducing chromium interference[J]. Chemosphere, 2018, 211: 1156-1165
- [6] Pan J, Wang J, Zhou ZF, Yan YL, Zhang W, Lu W, Ping SZ, Dai QL, Yuan ML, Feng B, et al. IrrE, a global regulator of extreme radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*, enhances salt tolerance in *Escherichia coli* and *Brassica napus*[J]. PLoS One, 2009, 4(2): e4422
- [7] White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, Dodson RJ, Haft DH, Gwinn ML, Nelson WC, Richardson DL, et al. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1[J]. Science, 1999, 286(5444): 1571-1577
- [8] Liu YQ, Zhou JZ, Omelchenko MV, Beliaev AS, Venkateswaran A, Stair J, Wu LY, Thompson DK, Xu D, Rogozin IB, et al. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(7): 4191-4196
- [9] Tanaka M, Earl AM, Howell HA, Park MJ, Eisen JA, Peterson SN, Battista JR. Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance[J]. Genetics, 2004, 168(1): 21-33
- [10] Yuan ML, Chen M, Zhang W, Lu W, Wang J, Yang MK, Zhao P, Tang R, Li XN, Hao YH, et al. Genome sequence and transcriptome analysis of the radioresistant bacterium *Deinococcus gobiensis*: insights into the extreme environmental adaptations[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e34458
- [11] Raza FA, Faisal M. Growth promotion of maize by desiccation tolerant *Micrococcus luteus*-chp37 isolated from Cholistan desert, Pakistan[J]. Australian Journal of Crop Science, 2013, 7(11): 1693-1698
- [12] Jampasri K, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Ounjai P, Kumsopa A. Phytoremediation of fuel oil and lead co-contaminated soil by *Chromolaena odorata* in association with *Micrococcus luteus*[J]. International Journal of Phytoremediation, 2016, 18(10): 994-1001
- [13] Jampasri K, Pokethitiyook P, Poolpak T, Kruatrachue M, Ounjai P, Kumsopa A. Bacteria-assisted phytoremediation of fuel oil and lead co-contaminated soil in the salt-stressed

- condition by *Chromolaena odorata* and *Micrococcus luteus*[J]. International Journal of Phytoremediation, 2020, 22(3): 322-333
- [14] Mukamolova GV, Murzin AG, Salina EG, Demina GR, Kell DB, Kaprelyants AS, Young M. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(1): 84-98
- [15] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, Young M, Kell DB. A bacterial cytokine[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(15): 8916-8921
- [16] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120
- [17] Ardui S, Ameer A, Vermeesch JR, Hestand MS. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(5): 2159-2168
- [18] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 25-29
- [19] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(1): D277-D280
- [20] Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown[J]. Nature Protocols, 2016, 11(9): 1650-1667
- [21] Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(3): 290-295
- [22] Maza E. In papyro comparison of TMM (edgeR), RLE (DESeq2), and MRN normalization methods for a simple two-conditions-without-replicates RNA-Seq experimental design[J]. Frontiers in Genetics, 2016, 7: 164
- [23] Castillo H, Li XP, Schilkey F, Smith GB. Transcriptome analysis reveals a stress response of *Shewanella oneidensis* deprived of background levels of ionizing radiation[J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0196472
- [24] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [25] Rokem JS, Vongsangnak W, Nielsen J. Comparative metabolic capabilities for *Micrococcus luteus* NCTC 2665, the "Fleming" strain, and actinobacteria[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(11): 2770-2775
- [26] Lichev A, Angelov A, Cucurull I, Liebl W. Amino acids as nutritional factors and (p)ppGpp as an alarmone of the stringent response regulate natural transformation in *Micrococcus luteus*[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 11030
- [27] Kutmutia SK, Drautz-Moses DI, Uchida A, Purbojati RW, Wong A, Kushwaha KK, Putra A, Premkrishnan BNV, Heinle CE, Vettath VK, et al. Complete genome sequence of *Micrococcus luteus* strain SGAir0127, isolated from indoor air samples from Singapore[J]. Microbiology Resource Announcements, 2019, 8(41): e00646-19
- [28] Martínez FL, Anton BP, DasSarma P, Rajal V, Irazusta V, Roberts RJ, DasSarma S. Complete genome sequence and methylome analysis of *Micrococcus luteus* SA211, a halophilic, lithium-tolerant Actinobacterium from Argentina[J]. Microbiology Resource Announcements, 2019, 8(4): e01557-18
- [29] Sher S, Rehman A, Hansen LH, Nielsen TK. Complete genome sequences of highly arsenite-resistant bacteria *Brevibacterium* sp. strain CS2 and *Micrococcus luteus* AS2[J]. Microbiology Resource Announcements, 2019, 8(31): e00531-19
- [30] Shiota S, Nakayama H. UV endonuclease of *Micrococcus luteus*, a cyclobutane pyrimidine dimer-DNA glycosylase/abasic lyase: cloning and characterization of the gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(2): 593-598
- [31] Daly MJ. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(3): 237-245
- [32] Repar J, Supek F, Klanjscek T, Warnecke T, Zahradka K, Zahradka D. Elevated rate of genome rearrangements in radiation-resistant bacteria[J]. Genetics, 2017, 205(4): 1677-1689
- [33] Fujita Y, Matsuoka H, Hirooka K. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria[J]. Molecular Microbiology, 2007, 66(4): 829-839
- [34] Suutari M, Laakso S. Microbial fatty acids and thermal adaptation[J]. Critical Reviews in Microbiology, 1994, 20(4): 285-328
- [35] Ghorbal SKB, Chatti A, Sethom MM, Maalej L, Mihoub M, Kefacha S, Feki M, Landoulsi A, Hassen A. Changes in membrane fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* in response to UV-C radiations[J]. Current Microbiology, 2013, 67(1): 112-117
- [36] Pronk JT, Van Der Linden-Beuman A, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP. Propionate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the metabolon hypothesis[J]. Microbiology, 1994, 140(4): 717-722
- [37] Brock M, Maerker C, Schütz A, Völker U, Buckel W. Oxidation of propionate to pyruvate in *Escherichia coli*. Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase[J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(24): 6184-6194
- [38] Luan HM, Meng N, Fu J, Chen XM, Xu X, Feng Q, Jiang H, Dai J, Yuan XE, Lu YP, et al. Genome-wide transcriptome and antioxidant analyses on gamma-irradiated phases of *Deinococcus radiodurans* R1[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85649

- [39] Deng WY, Yang Y, Gao P, Chen H, Wen WT, Sun Q. Radiation-resistant *Micrococcus luteus* SC1204 and its proteomics change upon gamma irradiation[J]. *Current Microbiology*, 2016, 72(6): 767-775
- [40] Dai J, Dai WK, Qiu CZ, Yang ZY, Zhang Y, Zhou MZ, Zhang L, Fang CX, Gao Q, Yang Q, et al. Unraveling adaptation of *Pontibacter korlensis* to radiation and infertility in desert through complete genome and comparative transcriptomic analysis[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10929
- [41] Sghaier H, Thorvaldsen S, Saied NM. There are more small amino acids and fewer aromatic rings in proteins of ionizing radiation-resistant bacteria[J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(4): 1483-1491
- [42] Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins[J]. *Amino Acids*, 2003, 25(3/4): 207-218
- [43] Battista JR, Earl AM, Park MJ. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation?[J]. *Trends in Microbiology*, 1999, 7(9): 362-365
- [44] Agostini HJ, Carroll JD, Minton KW. Identification and characterization of *uvrA*, a DNA repair gene of *Deinococcus radiodurans*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(23): 6759-6765
- [45] Rocha EP, Cornet E, Michel B. Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems[J]. *PLoS Genetics*, 2005, 1(2): e15
- [46] Bentchikou E, Servant P, Coste G, Sommer S. A major role of the RecFOR pathway in DNA double-strand-break repair through ESDSA in *Deinococcus radiodurans*[J]. *PLoS Genetics*, 2010, 6(1): e1000774
- [47] Gutman PD, David Carroll JD, Lan Masters C, Minton KW. Sequencing, targeted mutagenesis and expression of a *recA* gene required for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*[J]. *Gene*, 1994, 141(1): 31-37
- [48] Slade D, Lindner AB, Paul G, Radman M. Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*[J]. *Cell*, 2009, 136(6): 1044-1055
- [49] Morimatsu K, Kowalczykowski SC. RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair[J]. *Molecular Cell*, 2003, 11(5): 1337-1347
- [50] Shan Q, Bork JM, Webb BL, Inman RB, Cox MM. RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 265(5): 519-540