

研究报告

耐辐射奇球菌中 PprI 蛋白的单分子动态作用机制

谢李平¹, 陈晓敏², 陈琨², 郭芊宏¹, 翟帆帆¹, 郑志勤^{*1,3,4}, 樊军^{*2}

1 西南科技大学, 四川 绵阳 621010

2 电子科技大学, 四川 成都 611731

3 四川轻化工大学, 四川 宜宾 644000

4 国家卫生健康委核技术医学转化重点实验室(绵阳市中心医院), 四川 绵阳 621010

谢李平, 陈晓敏, 陈琨, 郭芊宏, 翟帆帆, 郑志勤, 樊军. 耐辐射奇球菌中 PprI 蛋白的单分子动态作用机制[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1046-1061.

XIE Liping, CHEN Xiaomin, CHEN Kun, GUO Qianhong, ZHAI Fanfan, ZHENG Zhiqin, FAN Jun. Single-molecule dynamic mechanism of PprI in *Deinococcus radiodurans*[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1046-1061.

摘要:【背景】在日益严重的环境污染中,越来越多的生物受到核辐射、化学污染、生物污染等危害,严重影响到生态系统的平衡,而耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)具有强大的 DNA 修复能力,使它能在各种极端环境下生存。PprI 蛋白作为 *D. radiodurans* 中 DNA 损伤修复过程的开关,异源表达后可以显著提高其他真核和原核生物在极端环境下的生存率。目前对 PprI 蛋白的研究大多局限于传统生化手段,在活细胞内实时动态观测单个 PprI 蛋白的反应过程仍然相对滞后。【目的】探究 DNA 损伤前后 PprI 蛋白在单分子水平的动态变化,从单分子角度精准揭示 PprI 蛋白在 DNA 损伤修复中的关键作用,为研究耐辐射奇球菌 DNA 修复机制奠定理论基础。【方法】利用光转换荧光蛋白 mMaple3 原位标记的 PprI 蛋白,通过基于全内反射荧光(total internal reflection fluorescent, TIRF)显微成像的单分子示踪光激活定位显微镜(single-particle tracking photoactivated localization microscopy, sptPALM)技术,持续激活低密度的 mMaple3 荧光蛋白,实现活细胞内 PprI 蛋白的单分子定位与示踪,明确 PprI 蛋白在 DNA 损伤前后的分子动力学特征。【结果】通过对 PprI 蛋白表现扩散系数分布的拟合,将其分为 3 种运动状态,即固定态($D^*=0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$)、缓慢扩散态($D^*=0.21 \mu\text{m}^2/\text{s}$)和快速扩散态($D^*=0.65 \mu\text{m}^2/\text{s}$)。发现在 DNA 受到损伤后的细胞中, PprI 蛋白扩散态分子比例显著上升,而其固定态分子比例显著下降。【结论】利用单分子示踪技术精确表征了 PprI 蛋白在 DNA

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFC3402400); 国家自然科学基金(32101049, 32271271, 62205048); 四川省自然科学基金(2023NSFSC0638); 国家卫生健康委核技术医学转化重点实验室(绵阳市中心医院) (2021HYX007)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFC3402400), the National Natural Science Foundation of China (32101049, 32271271, 62205048), the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2023NSFSC0638), and the NHC Key Laboratory of Nuclear Technology Medical Transformation (Mianyang Central Hospital) (2021HYX007).

*Corresponding authors. E-mail: FAN Jun, fan.jun@uestc.edu.cn; ZHENG Zhiqin, zhengzhiqin168@163.com

Received: 2024-05-17; Accepted: 2024-07-03; Published online: 2024-07-25

受损后大部分蛋白运动速率偏向快速运动，表面 DNA 损伤释放了较大比例的结合态 PprI 蛋白。本研究可以深化 PprI 介导的 DNA 损伤修复系统的分子机制模型，也可以为利用单分子技术研究其他 DNA 修复反应提供技术参考。

关键词：耐辐射奇球菌；PprI 蛋白；DNA 损伤修复；单分子示踪；表观扩散系数

Single-molecule dynamic mechanism of PprI in *Deinococcus radiodurans*

XIE Liping¹, CHEN Xiaomin², CHEN Kun², GUO Qianhong¹, ZHAI Fanfan¹, ZHENG Zhiqin^{*1,3,4}, FAN Jun^{*2}

1 Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan, China

2 University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 611731, Sichuan, China

3 Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 644000, Sichuan, China

4 NHC Key Laboratory of Nuclear Technology Medical Transformation (Mianyang Central Hospital), Mianyang 621010, Sichuan, China

Abstract: [Background] Amid the aggravating environmental pollution, increasing organisms are endangered by nuclear radiation, chemical pollution, and biological pollution, which seriously disrupts the balance of ecosystems. *Deinococcus radiodurans* with remarkable performance of DNA repair can survive in various extreme environments. PprI acts as a switch in the DNA repair process in *D. radiodurans*, and the heterologous expression of this protein can significantly enhance the survival rates of other eukaryotes and prokaryotes in extreme conditions. The available studies on PprI molecules are predominantly conducted with biochemical methods, and the real-time dynamic observation on reactions of single PprI molecules in living cells remains underdeveloped. **[Objective]** We explored the dynamics of PprI at the single-molecule level before and after DNA damage and revealed the role of PprI in DNA repair, aiming to enhance our understanding of the DNA repair mechanism in *D. radiodurans*. **[Methods]** The PprI molecules of *D. radiodurans* were labeled with the photo-activated fluorescent protein mMaple3. The low-density mMaple3 fluorescent protein was continuously activated by single-particle tracking photoactivated localization microscopy (sptPALM) based on total internal reflection fluorescent (TIRF) microimaging to realize the single-molecule localization and tracking of PprI in living cells, on the basis of which the molecular dynamics of PprI molecules before and after DNA damage was clarified. **[Results]** By analyzing the distribution of the apparent diffusion coefficients of PprI molecules, we identified three distinct species: immobile molecules ($D^*=0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$), slow-diffusing molecules ($D^*=0.21 \mu\text{m}^2/\text{s}$), and fast-diffusing molecules ($D^*=0.65 \mu\text{m}^2/\text{s}$). After DNA damage, we observed a significant increase in the proportion of diffusing PprI molecules and a significant decrease in the proportion of immobile molecules. **[Conclusion]** Using the single-molecule tracking technique, we accurately characterized the movement of PprI molecules, finding that most PprI molecules moved fast after DNA damage. Additionally, DNA damage at the surface released a large proportion of immobile PprI molecules. This study improves the molecular mechanism model of the PprI-mediated DNA repair system and paves a way for

studying other DNA repair reactions using single-molecule techniques.

Keywords: *Deinococcus radiodurans*; PprI; DNA repair; single-molecule tracking; apparent diffusion coefficient

耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)是一种能在极端环境下生存的微生物,是 Anderson 等^[1-3]在 1956 年发现的一种直径约 2 μm 的非致病性化能异养需氧型球菌,菌落表面光滑湿润、呈粉红色^[2,4-5]。其细胞大部分处于二分体时期,少数属于四分体时期^[6-10]。这种细菌具有超强的辐射、氧化、高温、干旱等抗性^[2],对数生长期的 *D. radiodurans* 能够承受比大肠杆菌 (*Escherichia coli*)高 50–100 倍的电离辐射,对紫外线(ultraviolet, UV)的抗性也比大肠杆菌高近 40 倍^[7,11],其强大的抗逆性使其成为研究极端环境下生命适应机制的重要模型。

D. radiodurans 的抗逆性主要依赖于其特有的 PprI 介导的 DNA 损伤修复通路(如 PprI-DdrO 辐射应答体系^[12])。PprI 也叫 IrrE,是 Earl 等和 Hua 等几乎同时发现的一种金属蛋白酶^[13-15],主要定位于拟核,在细胞质中也有分布^[16],被认为是激活 DNA 损伤修复途径的总开关。*pprI* 基因被研究应用于其他生物中以期提高它们的抗性,当转入大肠杆菌,其对乙醇、丁醇、醋酸的抗性可增强 10–100 倍^[17],并且上调修复基因 *recA* 的表达,对电离辐射抗性可增强约 1.6 倍^[18-19],Yue 等^[20]在不加诱导剂的条件下,PprI 蛋白能正常表达,并能提高菌体的抗氧化能力,导入到酵母中能增加乙醇发酵的产量并提高电离辐射抗性^[21-22],导入到乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中提高了乳酸产量和应激耐受性^[23]。*pprI* 基因在真核细胞中也起作用,它可以提高油菜的抗盐能力^[24],导入小鼠和人类的细胞,发现 PprI 蛋白可以上调 Rad51 的表达,减轻急性辐照造成的 DNA 损伤,提高细胞

生存率^[25-26]。说明 PprI 在抗逆性中发挥重要的调控地位,因此需要从多角度深入解读 PprI 蛋白在细胞中如何行使其生物学功能。

PprI 的晶体结构已被 Vujčić-Zagar 等^[27]解析出,该蛋白质由 3 个结构域组成:一个锌肽酶样结构域、一个螺旋转向螺旋基序和一个环核苷酸磷酸二酯酶/腺苷环化酶/FhlA 结构域(cGMP phosphodiesterase/adenylyl cyclase/FhlA, GAF)样结构域。PprI 的 N-末端结构域含有折叠的锌金属蛋白酶,并含有保守的 HEXXH 序列,其中 H82、E83、H86 和 E113 对于金属离子结合以及 PprI 蛋白酶功能是不可缺少的,缺失将会导致对辐射敏感^[15]。Ludanyi 等^[28]和 Wang 等^[12]证明 PprI 作为靶向 DdrO 的蛋白酶发挥作用。Lu 等^[29]在最近的工作中揭示 PprI 蛋白酶与单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)相互作用,ssDNA 在体内和体外均以长度依赖性方式增强 PprI 与 DdrO 的相互作用,以及激活 PprI 的酶切功能,并有研究表明,PprI 蛋白在 DNA 损伤的早期、中期和晚期的表达量均无发生变化^[30]。当 DNA 发生损伤后,PprI 感应 DNA 损伤从而被激活^[29],在 PprI-DdrO 辐射应答体系中,PprI 发挥酶切功能,将结合在修复基因启动子上的 DdrO 蛋白二聚体解离为单体,解除修复基因的抑制,暴露启动子位点便于 RNAP 结合,触发下游 DNA 修复通路^[12],对损伤 DNA 进行修复。

单分子示踪光激活定位显微镜(single-particle tracking photoactivated localization microscopy, sptPALM)是一种结合光激活定位显微镜(photoactivated localization microscopy, PALM)与单分子示踪(single-particle-tracking, SPT)

技术的综合方法^[31-32], 通过结合光激活定位显微镜的高分辨率成像效果和单分子追踪的动力学分析, 实现了对生物样品中单个分子的超分辨动态成像, 为生命科学领域的研究提供了强大的工具。相较于传统 PALM, sptPALM 使用较低的激光激发强度, 可以更长时间地跟踪分子。首先使用特定波长的激光随机激活光激活/光转换荧光蛋白, 使其从暗状态转变为亮状态^[33], 成像若干帧, 通过高灵敏度的显微镜系统捕捉激活的单分子的荧光信号, 直到荧光分子被不可逆的光漂白, 在连续的时间序列中, 将一系列图像上的分子位置连接起来, 形成一条轨迹。当其他分子被激活时, 重复该过程, 直到所有荧光标记分子都被漂白成像^[34]。利用 sptPALM 可以分析单分子的运动特性, 如速度、扩散系数等, 揭示其在细胞内的动态行为^[34-35]。mMaple3 光转换荧光蛋白具有高信号效率、低二聚化趋势、高光子预算等诸多优势, 所以在基于单分子的超分辨率成像领域具有广阔的应用前景, 从而实现更精确和高效的超分辨率成像^[36]。

本研究通过给予细胞 200 J/m² UV 或 20 μg/mL 丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 胁迫, 观察单个菌落的生存率, 验证 mMaple3 荧光蛋白原位标记 PprI 蛋白对菌株生存率的影响; 其次用 mMaple3 原位标记 PprI 蛋白的菌株, 基于 sptPALM 技术探究 PprI 蛋白在 DNA 受到 UV 或 MMC 胁迫后的动力学变化。从单分子角度揭示 PprI 蛋白在 DNA 修复过程中的运动状态变化, 以期全面阐明 PprI 蛋白在 DNA 修复过程中的应激反应奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

D. radiodurans 野生型(DR-WT)来源于西南科技大学江士杰老师课题组; mMaple3 质粒来源

于 McGill 大学 Stephanie Weber 团队; mMaple3 荧光蛋白原位标记 PprI 的 *D. radiodurans* 菌株(DR-PprI-mMaple3)由本课题组构建。

1.2 培养基

胰蛋白胨葡萄糖酵母(tryptone glucose yeast, TGY)培养基(1%胰蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 0.1%葡萄糖, 添加 2%琼脂则为固体培养基)用于 *D. radiodurans* 的培养。培养 DR-PprI-mMaple3 时添加 20 μg/mL 的卡那霉素; 基本培养基(minimal medium, MM)^[7], 具有较低的自发荧光, 用于成像时为 *D. radiodurans* 提供营养, 保证 *D. radiodurans* 在实验过程中正常存活。

1.3 主要试剂和仪器

SYBR-GOLD 染料, Biosharp 公司。载玻片, VWR International 公司; UV 照射灯, Philips 公司; 紫外强度功率测试仪, 林上科技有限公司; 全内反射荧光(total internal reflection fluorescent, TIRF)显微镜, Olympus 公司; 405 nm 激光器, 长春新产业光电技术有限公司; 488 nm 激光器和 561 nm 激光器, Coherent Corp 公司; EMCCD 相机, Andor 公司; 多波段滤波器, Chroma 公司。

1.4 *D. radiodurans* 菌培养条件

将 DR-WT 和 DR-PprI-mMaple3 菌株在 TGY (不含或含有终浓度 20 μg/mL 卡那霉素)平板上进行划线分离, 30 °C 恒温培养箱中倒置培养, 3 d 后挑取单一菌落接种至 3 mL TGY (含 20 μg/mL 卡那霉素)液体培养基中, 30 °C、220 r/min 振荡培养过夜。次日, 将培养过夜的菌液接种至 20 mL MM 培养基中进行稀释, 使其 OD₆₀₀ 为 0.2-0.3, 继续扩大培养直至达到对数生长前期, 即 OD₆₀₀ 值为 0.5-0.6, 全程避光。

1.5 表型分析试验

1.5.1 200 J/m² UV 辐照处理

准备 7 个试管, 依次编号, 每个试管中装入 9 mL 无菌去离子水备用。吸取 1 mL 对数生

长期(OD_{600} 为 0.6–0.8)的菌液于 1 号试管中混匀,完成 10 倍稀释,从 1 号试管中吸取 1 mL 菌液加入 2 号试管中,完成 10^2 倍稀释,依次完成 10^{-7} 倍稀释。

完成稀释后依次吸取 1 μ L 菌悬液,按试管编号顺序依次接种于 TGY 固体培养基。预热紫外灯至功率稳定,在无菌环境下进行 200 J/m² UV 辐照处理。处理完成后将平板倒置放于 30 °C 恒温培养箱中培养 2–3 d。

1.5.2 MMC 处理

在培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 时,即对数生长期的菌液中加入终浓度为 20 μ g/mL 的 MMC,充分混匀后,进行 10^{-10} – 10^{-7} 倍稀释,依次接种于 TGY 固体培养基,然后将平板倒置放于 30 °C 恒温培养箱中培养 2–3 d。

1.6 显微镜样品制备

1.6.1 制片

将对数生长期的菌液以 4 500 r/min 离心 3 min 得到菌沉淀,重悬于 20 μ L 的 MM 培养基中备用。为保证菌株的正常生理状态,将 2% 低荧光琼脂糖与 2 \times MM 培养基 1:1 混合,将混合液体滴于载玻片上,迅速放置另一片载玻片于上方,形成平整的琼脂糖平面,用于菌液成像。当琼脂糖凝固后,取下上方载玻片,在平面上滴入 2.5 μ L 重悬的菌液,重新盖回上层载玻片。

1.6.2 UV 辐照样品处理

预热紫外灯至功率稳定,将滴有菌液的平面平放于紫外灯下进行辐照后,进行后续成像。

1.6.3 MMC 样品处理

将菌液培养至对数期后,在培养瓶中加入终浓度为 20 μ g/mL 的 MMC,快速混匀后立即取 1 mL 菌液,于 4 500 r/min 离心 3 min 得到菌体沉淀,然后按照 1.6.1 中方法制备显微镜成像样品,用于成像。

1.6.4 PprI 蛋白与拟核的双色成像

SYBR-GOLD 染料与 DNA 结合的亲和力高,结合后能够极大地增强荧光信号,可以用来实现对拟核的检测。对于 SYBR-GOLD 染核的细胞,吸取 1 μ L 稀释的 1:100 的 SYBR-GOLD 染料与 20 μ L 重悬菌液混匀,然后再滴于琼脂糖平面上成像。先采集 561 nm 激光激活图像,再采集 488 nm 激光激活图像。

1.7 TIRF 显微镜成像

1.7.1 PprI-mMaple3 单分子信号采集

将制备完成的样品倒置于显微镜物镜上,选择菌体数目合适的视野。将采集曝光时间设置为每帧 15.7 ms,采集明场图像后用高功率 561 nm 激光对 *D. radiodurans* 的自发荧光和预激活荧光信号进行预漂白。预漂白结束后将 561 nm 激光功率调至 6 mW,以 1 W/cm² 的 405 nm 激光在单个细胞中激活单个 mMaple3 荧光蛋白。合适的 561 nm 激光功率可在保证 mMaple3 信号足够强的同时,实现 mMaple3 信号的长时间追踪。

1.7.2 拟核信息采集

完成单分子信息采集后,关闭 405 nm 和 561 nm 激光,调整 488 nm 激发光功率为 0.5 mW,采集细胞拟核信息。

1.8 数据分析

1.8.1 PprI-mMaple3 单分子数据处理

数据处理基于 MATLAB 软件。为了从采集信号中筛选出正确的荧光蛋白信号以避免自发荧光的干扰,我们将利用荧光强度对单分子信号筛选。首先对图像进行带通滤波处理,随后对局部荧光信号进行二维椭圆高斯拟合,最后根据荧光信号强度阈值对荧光信号进行取舍。使用 MATLAB 软件中自定义脚本对明场图中的细胞轮廓进行勾勒^[37],确保只在目的区域内进行单分子追踪。当分子信号连续出现在 3 个

像素(0.48 μm)窗口中, 认定是同一分子运动轨迹。由于荧光蛋白的闪烁特性, 我们允许轨迹中可以丢失一帧。最后利用 MATLAB 软件中自定义的脚本, 根据表观扩散系数阈值将分子运动轨迹分为固定态和扩散态。

1.8.2 PprI-mMaple3 单分子表观扩散系数拟合

利用均方位移(mean square displacement, MSD), 根据公式 $D^* = \text{MSD}/(4\Delta t)$ 计算表观扩散系数, 只保留运动轨迹不小于 4 步的数据。根据表观扩散系数来区分固定态分子和扩散态分子^[38]。单运动状态表观扩散系数分布可以用单指数模型描述如下:

$$f_{D^*}(x; D_1^*) = \frac{(4/D_1^*)^4 x^3 e^{-4x/D_1^*}}{6}。$$

根据上述方程拟合单分子的 D^* 分布来得到表观扩散系数 D_1^* , 其中 x 是 D^* 的概率密度。已有研究表明, 正常细胞中 PprI 可能存在 3 种不同运动速率的分子^[16]。本研究使用固定的 D^* 值, 根据以下表达式拟合 DNA 损伤细胞中 PprI 的 3 种状态, 可以得出 PprI 蛋白在细胞内的运动情况。

$$f_{D^*}(x; D_1^*, D_2^*, D_3^*, A_1, A_2, A_3) = \frac{A_1(4/D_1^*)^4 x^3 e^{-4x/D_1^*}}{6} + \frac{A_2(4/D_2^*)^4 x^3 e^{-4x/D_2^*}}{6} + \frac{A_3(4/3)^4 x^3 e^{-4x/D_3^*}}{6}$$

其中: D_1^* 、 D_2^* 、 D_3^* 是 PprI 分子 3 种不同运动状态的表观扩散系数, A_1 、 A_2 和 A_3 是 3 种状态的分子比例, $A_1 + A_2 + A_3 = 1$ 。

2 结果与分析

2.1 UV 辐照和 MMC 抑制 *D. radiodurans* 生长的表型分析

利用 mMaple3 光转换荧光蛋白原位标记

D. radiodurans 中 PprI 蛋白, 可在荧光显微镜下实现 PprI 蛋白的追踪(图 1A)。UV 辐照使 DNA 形成不同的嘧啶二聚体(pyrimidine dimer), 如 TT 二聚体, 使得双螺旋之间的连接键减弱, 从而破坏 DNA 双链。高剂量的 UV 辐照还可直接破坏 DNA 链, 导致 DNA 双链断裂, 从而影响生物正常的生存和繁衍。MMC 属于 DNA 交联剂, 其氮丙啶与氨甲酰基具有烷化功能, 可进入双链 DNA 的疏水性沟槽内与其中的碱基发生双烷基化交联反应以抑制 DNA 复制, 在一定程度上破坏了 DNA 稳定的双螺旋构象^[3]。通过对 DR-WT 和 DR-PprI-mMaple3 进行 UV 辐照处理和 MMC 处理, 产生损伤 DNA, 探究 *D. radiodurans* 的存活率, 确认 *D. radiodurans* 在 200 J/m² UV 辐照处理和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MMC 处理下能否正常生长。由菌落表型试验结果得知, 当细胞经受 200 J/m² UV 辐照或 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MMC 处理后, DR-WT 和 DR-PprI-mMaple3 生存率均无显著变化(图 1B、1C), mMaple3 原位标记 PprI 蛋白对菌株的生存活性无明显影响(图 1C)。综上, *D. radiodurans* 具有强大、高效的 DNA 修复功能, 在受到 200 J/m² UV 辐照或 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MMC 处理后, 细胞能快速做出应激反应, 对损伤 DNA 进行修复, 使得细胞能继续正常生存。

2.2 PprI 蛋白在细胞内运动状态分析

PprI 与 mMaple3 荧光蛋白在细胞中融合表达, 实现 PprI 信号分子的可视化。通过 PprI-mMaple3 信号分子独特的光物理特性(强度和持续时间)去剔除 *D. radiodurans* 中自发闪烁分子, 当分子信号连续出现在 3 个像素(0.48 μm)窗口中, 认定为一个连续的分子运动轨迹^[38]。非常短的轨迹(如 <4 步)受细胞限制、运动模糊和定位误差影响, 具有较大的统计不确定性, 通常在分析中被忽略^[34,38]。当筛选值大于 4 步时可以去除更多的自发闪烁分子, 但同时也会损失更多的

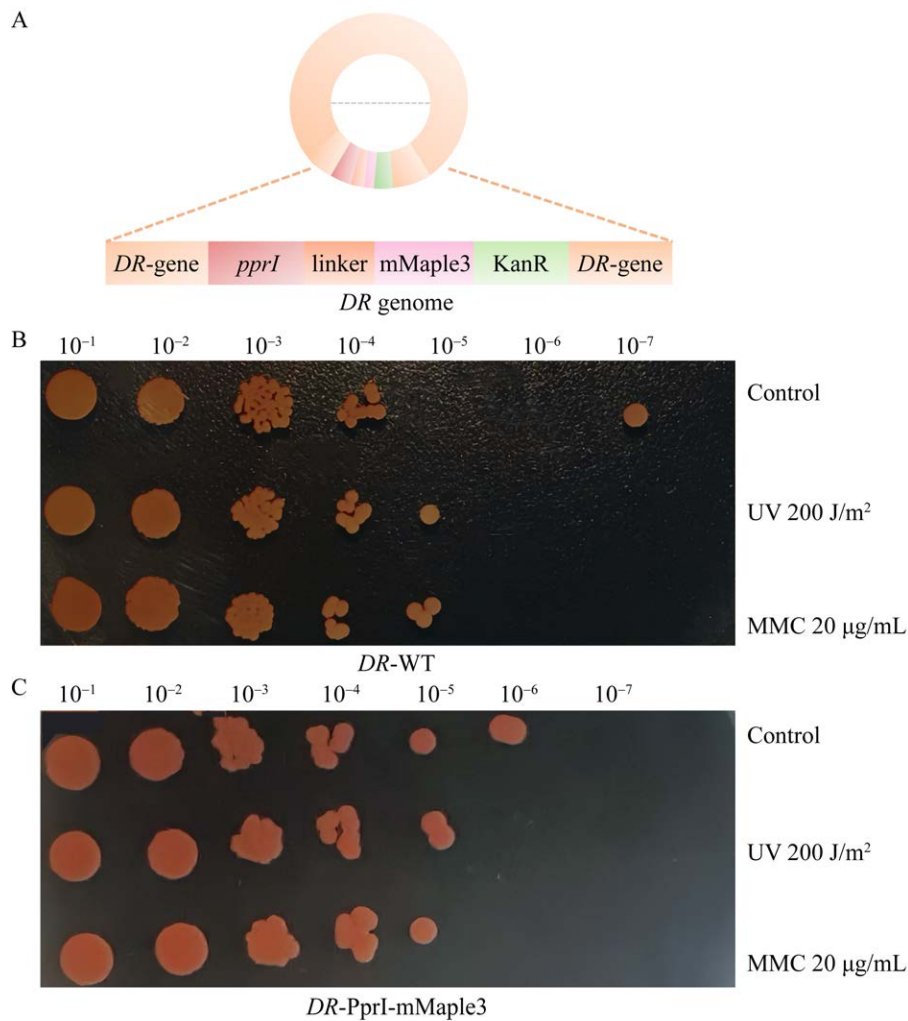


图 1 菌株 DR-WT 和 DR-PprI-mMaple3 对紫外线或丝裂霉素 C 敏感性测试 A: 使用同源重组技术用光转换 mMaple3 荧光蛋白标记 PprI 蛋白 C 端示意图, 在 *pprI* 和 mMaple3 基因之间插入柔性 linker, 使得 *pprI* 基因与 mMaple3 基因可以在细胞内更好地融合表达; KanR 抗性基因用于筛选重组成功的克隆菌株。B: 菌株 DR-WT UV 和 MMC 敏感性测试, 利用指定剂量的紫外线照射和固定浓度的 MMC 处理后, 克隆菌株的存活率反映了对 UV 或 MMC 的敏感性, 结果显示野生型细胞对紫外线和 MMC 不敏感。C: 菌株 DR-PprI-mMaple3 UV 和 MMC 敏感性测试, mMaple3 在细胞内表达不影响 *D. radiodurans* 的生存率, 并且与野生型相比, DR-PprI-mMaple3 菌株对 UV 和 MMC 同样不敏感。

Figure 1 Ultraviolet or mitomycin C susceptibility testing of strain DR-WT and strain DR-PprI-mMaple3. A: The C-terminus PprI was labeled with the photoconvertible fluorescent protein mMaple3 using homologous recombination, a flexible linker is inserted between the *pprI* and mMaple3 genes, allowing for better fusion expression of the *pprI* and mMaple3 genes within the cell; KanR resistance genes used for screening cloned strains with successful recombination. B: UV or MMC sensitivity assays of DR-WT, survival of clonal strains after treatment with the indicated doses of UV irradiation and fixed concentrations of MMC responded to sensitivity to UV or MMC, the results show that DR-WT are insensitive to UV and MMC. C: UV or MMC sensitivity assays of DR-PprI-mMaple3, the expression of mMaple3 in cells does not affect the survival rate of *D. radiodurans*, and DR-PprI-mMaple3 cells are equally insensitive to UV and MMC compared with DR-WT.

PprI-mMaple3 分子, 所以取 4 步为阈值对分子运动轨迹进行筛选, 根据持续帧数的差异可以去除绝大多数采集的自发闪烁分子, 减少自发闪烁对单分子追踪的影响。在 TIRF 显微镜明场下采集的细胞轮廓(图 2)与 405 nm 荧光下采集的 PprI-mMaple3 分子信号(图 2B、2D 中大于 3 个像素的红色信号表示)合并后得到单个 PprI-mMaple3 分子在细胞内连续 18 帧的实时运动轨迹, PprI-mMaple3 固定态分子和扩散态分子均连续出现在 3 个像素窗口中且实时运动轨迹大于 4 步。

使用 MATLAB 软件根据明场图勾出细胞轮廓, 并对信号进行处理分析。在活细胞中,

PprI-mMaple3 分子可能以不同的运动状态存在, 这取决于它们的特定功能, 基于先前的研究, 已知大多数蛋白质处于 2 种运动状态^[38-39]。因此, 首先将 PprI-mMaple3 分子简单分为 2 种状态, 并自由拟合为扩散态 $D^* > 0.11 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [蓝色表示运动轨迹(图 2C)]和固定态 $D^* < 0.11 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ^[39] [红色表示运动轨迹(图 2A)]。

2.3 UV 处理后 DNA 损伤细胞中 PprI 蛋白的亚细胞分布

561 nm 激光的功率越高, 荧光信号漂白率越高, 荧光信号的强度也越高。由于 *D. radiodurans* 具有强烈的自发荧光, 使用高功率的 561 nm 激

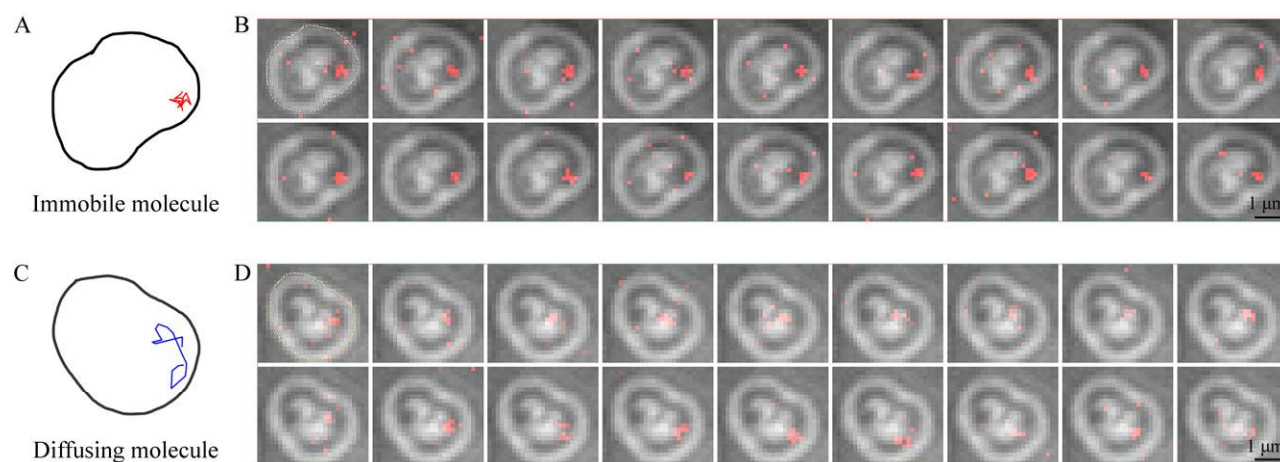


图 2 TIRF 显微镜下 PprI-mMaple3 分子在 *D. radiodurans* 细胞中的运动轨迹图 A: 固定态 PprI-mMaple3 运动轨迹示例。B: 单个固定态 PprI-mMaple3 分子在 405 nm 荧光下连续 18 帧的运动轨迹示例图, 红色信号大于 3 个窗口的为 PprI-mMaple3 信号, 小于 3 个窗口的为噪音, 在连续 18 帧中, PprI-mMaple3 固定态分子运动轨迹大于 4 步且连续出现在 3 个以上窗口中。C: 扩散态 PprI-mMaple3 运动轨迹示例。D: 单个扩散态 PprI-mMaple3 分子在 405 nm 荧光下连续 18 帧的运动轨迹, 在连续 18 帧中, PprI-mMaple3 扩散态分子运动轨迹大于 4 步且连续出现在 3 个以上窗口中。

Figure 2 Molecular trajectories of PprI in *D. radiodurans* under TIRF microscope. A: Example of motion trajectory of immobile PprI-mMaple3. B: Example tracks of a single immobile PprI-mMaple3 molecule imaged over 18 consecutive frames under 405 nm fluorescence, a red signal greater than 3 windows is a PprI-mMaple3, while a signal less than 3 windows is a noise signal, in 18 consecutive frames, immobile PprI-mMaple3 molecule trajectories were greater than 4 steps and appeared in more than 3 consecutive windows. C: Example of motion trajectory of diffusing PprI-mMaple3. D: Example tracks of a single diffusing PprI-mMaple3 molecule imaged over 18 consecutive frames, under 405 nm fluorescence, in 18 consecutive frames, diffusing PprI-mMaple3 molecule trajectories were greater than 4 steps and appeared in more than 3 consecutive windows.

光, 不仅可以对预激活的信号进行漂白, 还可以采集到清晰细胞隔膜(图 3A、3B), 同时对细胞的自发荧光漂白, 减少背景噪音, 以便后续采集由 405 nm 荧光激活的新成熟的信号分子。SYBR-GOLD 染料的化学结构包含一个 DNA 结合部分和一个荧光团, 当与 DNA 结合时, 荧光团的荧光增强, 从而发出荧光信号, 以此定位细胞拟核位置。使用 SYBR-GOLD 染料对 UV

处理后 DNA 受损的 *D. radiodurans* 细胞拟核进行染色, 在功率为 0.5 mw 的 488 nm 激发光下成像, 获得经 UV 处理后 DNA 损伤细胞中拟核的位置(图 3C-3D)。

将细胞隔膜图像与拟核图像叠加, 可确定拟核在 DNA 损伤细胞中的相对位置(图 3E-3F)。随机选取一个细胞进行单分子轨迹分析, 与叠加图对比, 结果显示, 经 UV 处理后 DNA 损伤细

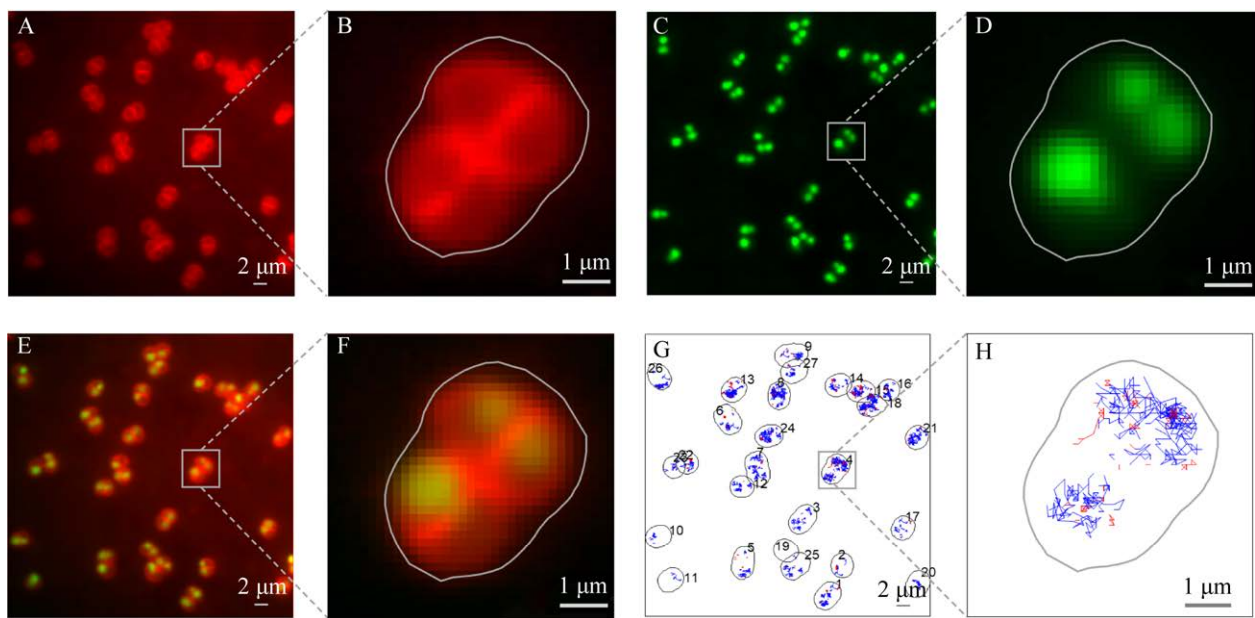


图 3 UV 处理后 DNA 损伤细胞中荧光成像和 PprI-mMaple3 分子轨迹图 A: 561 nm 荧光下细胞隔膜, 因 *D. radiodurans* 具有强烈的自发荧光, 在 561 nm 荧光下可以清楚地看到细胞膜和细胞隔膜。B: 隔膜放大图。C: 488 nm 荧光下经 SYBR-GOLD 染料染后的细胞拟核。D: 细胞拟核放大图。E: 拟核共定位图, 拟核与细胞隔膜共定位, 共定位成功显示为黄色。F: 共定位放大图。G: 分子运动轨迹图(同 2.2, 红色表示固定态分子, 蓝色表示扩散态分子), PprI-mMaple3 分子出现在整个细胞中, 但扩散态分子更多定位在拟核。H: 分子运动轨迹放大图。

Figure 3 Fluorescence imaging and single-molecule trajectories of PprI-mMaple3 in DNA damage cell after UV treatment. A: The septum of *D. radiodurans* under 561 nm fluorescence, due to the strong autofluorescence of *D. radiodurans*, the cell membrane and septum can be clearly seen under 561 nm fluorescence. B: Enlarged image of septum. C: Nucleoid under 488 nm fluorescence after dyeing with SYBR-GOLD. D: Enlarged image of nucleoid. E: Colocalization of septum with nucleoid, colocalization of nucleoid and cellular septum, successfully displayed in yellow for colocalization. F: Enlarged image of colocalization. G: Molecular trajectories of PprI (Same as 2.2. Red: Immobile molecules; Blue: Diffusing molecules), PprI-mMaple3 molecules appear throughout the cell, the diffusing molecules are more localized in the nucleus. H: Enlarged image of molecular trajectories.

胞中 PprI 分子存在于整个细胞中,但大多优先覆盖拟核区域,尤其是扩散态分子(图 3G-3H),与拟核表现出强的共定位。扩散的 PprI 分子倾向于在整个拟核区域寻找结合点,参与 DNA 修复相关的活化途径。另外,我们的实验结果表明,经 MMC 处理后,PprI 分子的拟合定位趋势与 UV 处理结果一致。

2.4 UV 辐照处理对 PprI 蛋白的影响

为了测量 PprI 分子在 DNA 损伤后的动力学特性,用 UV 处理菌株 DR-PprI-mMaple3,实现 DNA 损伤后 PprI 单分子示踪。通过荧光强度、持续帧数、运动轨迹大小筛选出 PprI-mMaple3 信号分子,根据 MSD 计算出 PprI-mMaple3 信号分子的表现扩散系数。初步尝试用 2 种运动状态对 PprI-mMaple3 信号分子拟合,但拟合结果不理想,说明 PprI-mMaple3 在细胞中存在 3 种运动状态,并且据本课题组先前研究结果表明,对 PprI-mMaple3 分子进行三态拟合效果更理想^[16]。

根据表现扩散系数的大小,可将 PprI-mMaple3 分子分为与特异性 DNA 稳定结合的固定态^[40] ($D^*=0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$)、PprI 与 DNA 或蛋白(如 DdrO 蛋白)发生瞬时相互作用的缓慢扩散态^[12,29,40] ($D^*=0.21 \mu\text{m}^2/\text{s}$)和 PprI 蛋白自身在细胞内扩散的快速扩散态($D^*=0.65 \mu\text{m}^2/\text{s}$)。本研究共采集 259 个对照组细胞,共得到 27 528 个信号分子,其中 39.9%为固定态($D^*=0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$)、29.9%为缓慢扩散态($D^*=0.21 \mu\text{m}^2/\text{s}$),30.2%为快速扩散态($D^*=0.65 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (图 4A);在 UV 辐照处理后共采集 634 个细胞,得到 13 340 个信号分子,其中 11.1%为固定态($D^*=0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$),41.6%为缓慢扩散态($D^*=0.21 \mu\text{m}^2/\text{s}$),47.3%为快速扩散态($D^*=0.65 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (图 4B)。UV 辐照处理后,DNA 损伤细胞中扩散态分子占比均增多,快速扩散态和缓慢扩散态比例分别由 30.2%和 29.9%上

升为 47.3%和 41.6%,而固定态分子显著减少,比例由 39.9%下降为 11.1%。总体上来说,扩散态分子呈现显著上升趋势,固定态分子出现显著下降(图 4C)。细胞内处于稳定结合状态的 PprI 蛋白在 DNA 受到损伤后,被释放出转变为扩散态,其中一部分与 DNA 或蛋白瞬时作用,变为缓慢扩散态,在细胞中执行修复 DNA 的生物学功能,剩下的则为快速扩散态继续在细胞中扩散,搜寻结合底物。

2.5 MMC 处理对 PprI 蛋白的影响

利用化学试剂 MMC 对 *D. radiodurans* 中 DNA 损伤处理,共采集 575 个 MMC 处理后 DNA 损伤细胞,统计分析得到 11 204 个信号分子。结果显示,MMC 对细胞中 PprI 分子造成的动力学变化趋势与 UV 辐照处理结果相似,扩散态出现上升现象,而固定态出现下降现象。快速扩散态比例由 30.2%上升为 50.0%,缓慢扩散态比例由 29.9%上升为 38.2%,而固定态比例则由 39.9%下降为 11.8% (图 5A、5B)。总的来说,扩散态分子比例呈现显著上升趋势,固定态分子比例出现显著下降(图 5C),固定态分子的释放导致细胞内扩散态分子增多,转变为缓慢扩散态和快速扩散态,在细胞中与损伤 DNA 或蛋白底物结合变为缓慢扩散态,行使内切酶的功能,开启下游修复基因对损伤 DNA 的修复。

由此,结合 UV 或 MMC 处理细胞后细胞中 PprI 蛋白的数据,可知 PprI 蛋白在物理和化学损伤后其扩散态比例均出现上升趋势,固定态比例呈现下降趋势。这些现象表明,当 DNA 损伤后,PprI 蛋白在寻找结合位点经历了 3 种运动状态,即与 DNA 稳定结合的固定态,在细胞中自由扩散寻找靶向分子快速扩散态,在细胞中与靶向分子瞬时结合的缓慢扩散态。当 DNA 发生损伤后,PprI 分子蛋白响应损伤信号,活性被激活,细胞内与 DNA 稳定结合的固定态

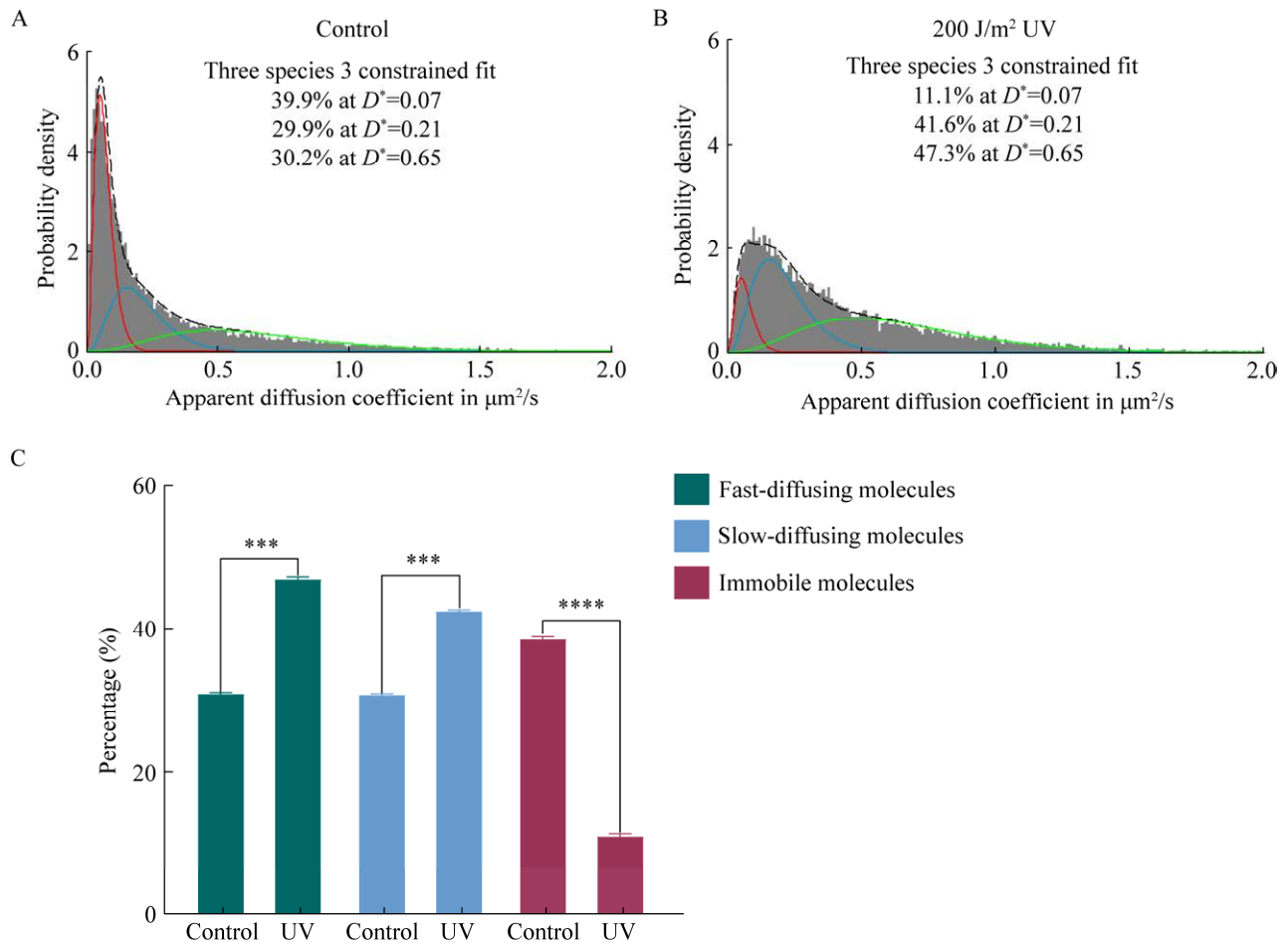


图 4 UV 辐照对 PprI 单分子动力学影响 A: 259 个对照组细胞的 27 528 个信号分子 D^* 拟合(红色曲线表示固定态分子, 蓝色曲线表示缓慢扩散态分子, 绿色曲线表示快速扩散态分子)。B: 634 个 200 J/m² UV 辐照后细胞中 13 340 个信号分子 D^* 拟合, 与对照组相比 200 J/m² UV 辐照处理导致 PprI 分子倾向运动态, 88.9% 为扩散态分子, 比对照组增加了 28.8%。C: 多次独立重复试验统计 200 J/m² UV 处理前后细胞中快速扩散态(绿色)、缓慢扩散态(蓝色)和固定态分子(红色)占比变化, 可知 UV 处理后细胞内 PprI 分子扩散态增加, 固定态减少。

Figure 4 Effect on PprI single-molecule dynamics after UV treatment. A: Distribution of D^* values of 27 528 PprI-mMaple3 molecules in 259 control cells (The red curve represents immobile molecules, the blue curve represents slow-diffusing molecules, and the green curve represents fast-diffusing molecules). B: Distribution of D^* values of 13 340 PprI-mMaple3 molecules in 634 treatment cells, compared with the control group, 200 J/m² UV treatment resulted in a tendency for PprI molecules to transport dynamically, with 88.9% being diffuse molecules, an increase of 28.8% compared to the control group. C: Multiple independent repeated experiments, the proportion of fast-diffusing (green), slow-diffusing (blue) and immobile molecules (red) in cells before and after 200 J/m² UV treatment. It can be seen that after UV treatment, the diffusing PprI molecules in cells increases, while the immobile decreases. ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

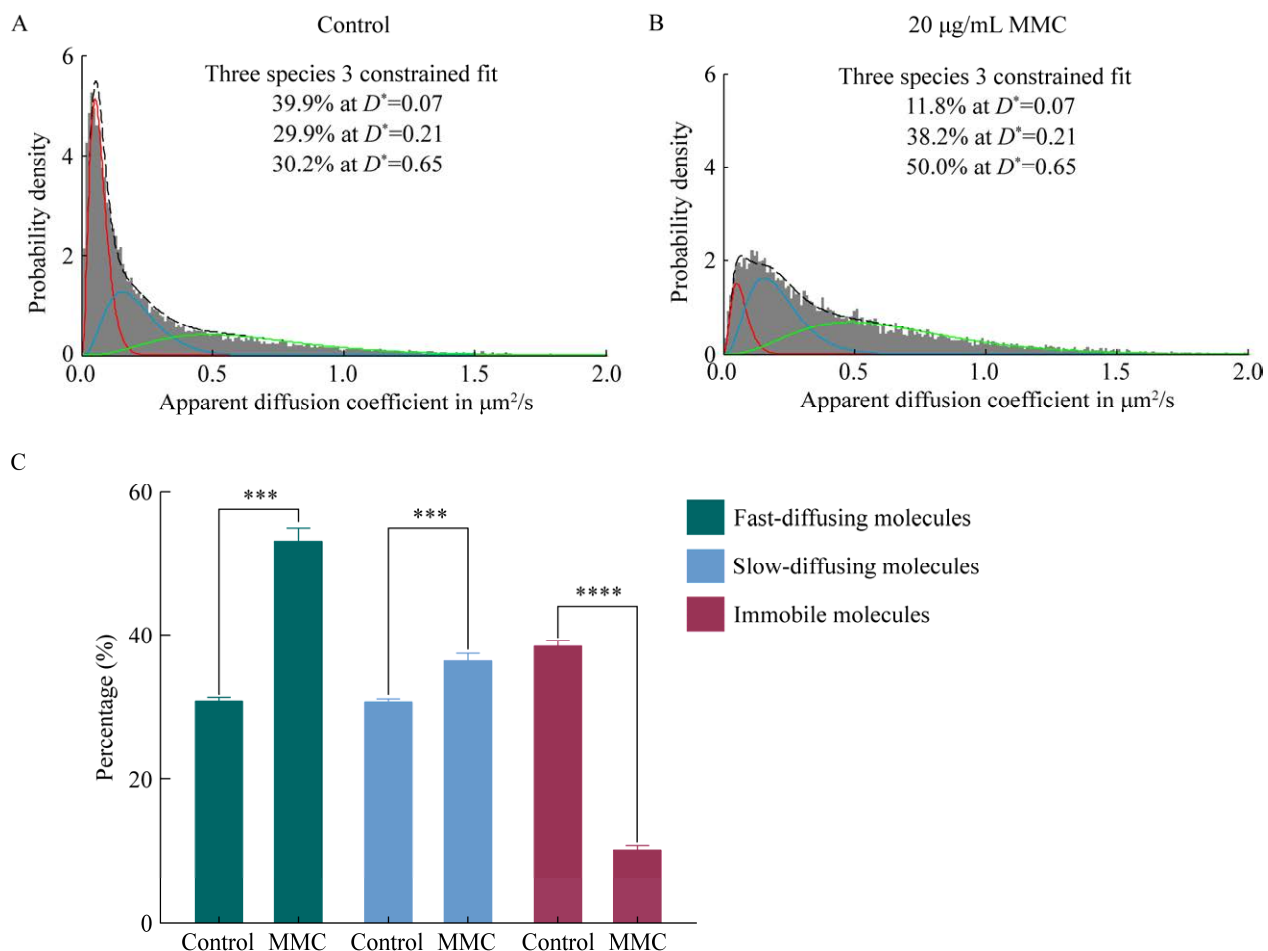


图 5 丝裂霉素 C 处理对 PprI 单分子动力学影响 A: 259 个对照组细胞的 27 528 个 PprI-mMaple3 信号分子 D^* 拟合(红色曲线表示固定态分子, 蓝色曲线表示缓慢扩散态分子, 绿色曲线表示快速扩散态分子)。B: 575 个 20 µg/mL MMC 处理后细胞中 11 204 个 PprI-mMaple3 信号分子 D^* 拟合, 与对照组相比 20 µg/mL MMC 处理导致细胞内 PprI 分子倾向运动态, 88.2% 的分子为运动态, 比对照组细胞增加了 28.1%。C: 多次独立重复试验统计 20 µg/mL MMC 处理前后细胞中快速扩散态(绿色)、缓慢扩散态(蓝色)和固定态分子(红色)占比变化, 可知 MMC 处理后细胞内 PprI 分子扩散态增加, 固定态减少。

Figure 5 Effect on PprI single-molecule dynamics after MMC treatment. A: Distribution of D^* values of 27 528 PprI-mMaple3 molecules in 259 control cells (The red curve represents immobile molecules, the blue curve represents slow-diffusing molecules, and the green curve represents fast-diffusing molecules). B: Distribution of D^* values of 11 204 PprI-mMaple3 molecules in 575 treatment cells, compared with the control group, 20 µg/mL MMC treatment resulted in a tendency for PprI molecules to transport dynamically, with 88.2% being diffuse molecules, an increase of 28.1% compared to the control group. C: Multiple independent repeated experiments, The proportion of fast-diffusing (green), slow-diffusing (blue) and immobile molecules (red) in cells before and after 20 µg/mL MMC treatment. It can be seen that after MMC treatment, the diffusing PprI molecules in cells increases, while the immobile decreases. ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

分子转变为扩散态, 扩散态分子与靶向分子结合形成缓慢扩散态, 行使内切酶功能, 暴露下游修复基因的启动子位点, 开启下游修复基因转录, 修复损伤 DNA, 其余的扩散态分子则继续在细胞中搜寻靶向分子。

3 讨论

PprI 介导的 DNA 损伤修复通路赋予 *D. radiodurans* 超强的 DNA 修复能力, 其可以直接感应 DNA 损伤及其他细胞损伤信号而被激活, 开启防御系统, 包括 DNA 损伤修复系统、转录、翻译及翻译后修饰系统、抗氧化系统、代谢系统, 协同促进 *D. radiodurans* 的恢复^[41]。但以往研究大多致力于细胞结构、生物化学和遗传方式层面揭示 PprI 的特征, 缺少在单分子层面的探索^[12-15]。在活细胞中, 蛋白质的功能和相互作用往往受到多种因素的影响, 如细胞内的信号转导、代谢状态等, 并且细胞内的蛋白质分子在功能、结构和动态行为上常常存在异质性^[12,27,29-30,42]。单分子研究能够捕捉到这种异质性, 通过表观扩散系数、运动轨迹、亚细胞定位等信息揭示不同蛋白质分子之间的差异。通过单分子研究, 我们能够实时地监测这些变化对蛋白质功能的影响, 从而更全面地了解蛋白质在细胞内的角色, 这对于理解细胞内复杂的生物过程具有重要意义。

DNA 损伤早期上调的蛋白参与应激相关功能, 而晚期上调的蛋白具有修复相关功能^[42], 但是 PprI 蛋白在 DNA 损伤的整个时期表达水平均未发生变化^[30], 只会在 DNA 损伤后发生 PprI 蛋白的磷酸化修饰水平上调^[42]。本研究发现 DNA 损伤细胞中, PprI 蛋白更加倾向拟核, 与 DNA 未损伤细胞的倾向性一致^[16], 这提示我们, 在 DNA 受到损伤后, 为保持基因组完整性, PprI 蛋白响应损伤信号在拟核中行使修复

有关的生物学功能(图 6)。

为了探究 PprI 蛋白在 DNA 受到损伤处理后, 细胞内扩散态和固定态分子占比变化情况, 以推断 PprI 在 DNA 受损细胞中发挥的功能。一般情况下, 蛋白在细胞内存在 2 种运动状态, 即固定态和扩散态^[38-39]。但 PprI 蛋白分布广泛, 在细胞拟核内外均有分布, 用两态进行拟合时拟合效果并不理想, 提出用 3 种状态拟合, 三态拟合结果更接近真实数据^[16]。由于定位误差, 固定分子的表现扩散系数不可能为 0, 先前工作中通过测量大肠杆菌中固定的 mMaple3 计算出显微镜定位误差为 30 nm, 平均 $D^*=0.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ^[16]。根据表观扩散系数大小, 将 PprI 蛋白拟合为 3 种运动状态, 即特异性 DNA 稳定结合的固定态($D^*=0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$)、在细胞中与结合位点瞬时相互作用的缓慢扩散态($D^*=0.21 \mu\text{m}^2/\text{s}$)和在细胞中自由扩散的快速扩散态($D^*=0.65 \mu\text{m}^2/\text{s}$)。固定态表现扩散系数为 $0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 高于定位误差的 $0.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 可能是因为固定态的表现扩散系数不完全来源于定位误差, PprI 蛋白也有可能在大肠杆菌中表达的 mMaple3 可能与在 *D. radiodurans* 中表达的 mMaple3 略有不同。

经 UV 辐照的 PprI 蛋白产生了损伤应激反应, 相较于对照组数据, 胁迫之后细胞内 PprI 蛋白的运动状态发生显著变化, 快速扩散态占比和缓慢扩散态占比均高于对照组, 固定态分子占比则减少。由此进一步利用化学试剂 MMC 对细胞进行处理, 拟合处理结果与 UV 辐照处理结果相似。ssDNA 以长度和浓度依赖性与 PprI 蛋白结合, 激活 PprI 酶切活性^[29], 将结合在启动子片段的 DdrO 二聚体解离为单体开启下游转录修复^[12]。在本研究中, DNA 损伤后细胞中产生更多的扩散态 PprI 分子, 这说明细胞内产生断裂 DNA, 与特异性 DNA 稳定结合的

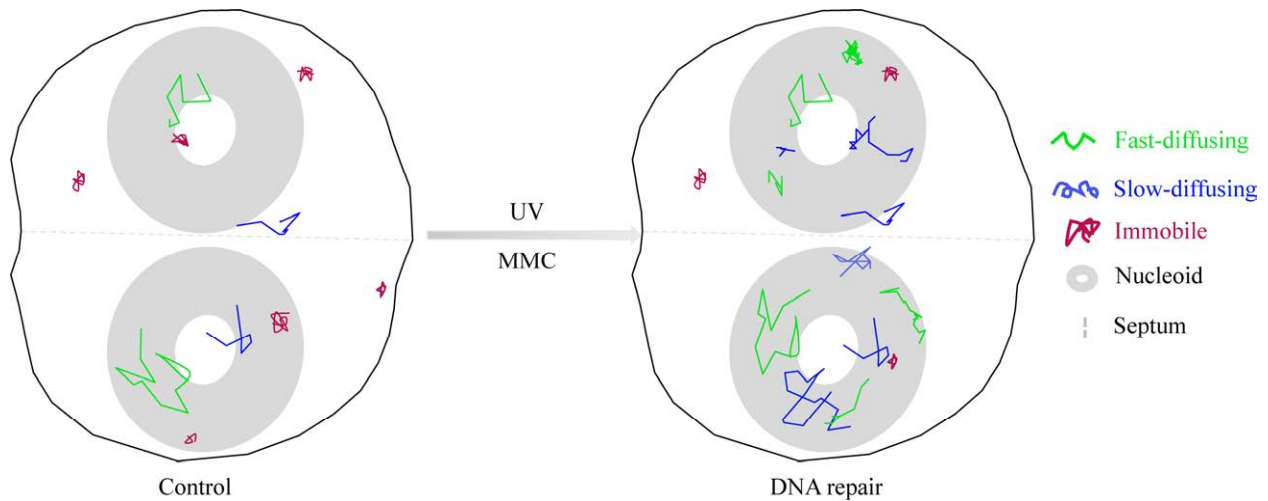


图 6 *D. radiodurans* 中 PprI 蛋白介导的 DNA 损伤修复分子机制模型 DNA 损伤后, PprI 响应损伤信号, 与 DNA 稳定结合的固定态分子做出应激反应, 部分转变为扩散态分子, 导致固定态分子减少, 扩散态分子一部分为快速扩散态在细胞内搜寻结合底物, 另一部分与靶向分子结合后转变为缓慢扩散态, 行使生物学功能, 对 DNA 进行修复。

Figure 6 A hypothetical model of DNA damage response pathway mediated by PprI in *D. radiodurans*. After DNA damage, PprI responds to damage signals, and immobile molecules that stably bind to DNA undergo a stress response, transforming into diffusing molecules, resulting in a decrease in the number of immobile molecules. Some diffusing molecules search for binding substrates in cells in a rapidly diffusing, while others bind to target proteins and transform into a slow diffusing, work it biological functions to repair DNA.

PprI 蛋白被释放, 转变为扩散态分子, 在拟核中一部分扩散态 PprI 分子与靶向分子(如 DdrO 蛋白)发生瞬时结合, 导致细胞内缓慢扩散态增多, 在 PprI-DdrO 损伤应答体系中行使内切酶的功能, 酶切游离在细胞中的抑制因子 DdrO 蛋白, 使其二聚体为两段小肽, 导致结合在下游修复基因启动子位点上的 DdrO 解离, 暴露出下游修复基因启动子位点, 开启修复基因的转录, 进而实现对损伤 DNA 的修复; 另一部分扩散态 PprI 分子继续扩散在细胞中, 搜寻靶向底物(图 6)。

4 结论

本研究通过 sptPALM 技术, 利用 mMaple3 光转换荧光蛋白标记 PprI 的 *D. radiodurans*, 深入研究了 PprI 在 DNA 损伤细胞中的亚细胞定

位、分子运动轨迹以及分布状态的动态反应过程, 揭示了 DNA 损伤后细胞中产生更多扩散态分子, 倾向在细胞拟核中与蛋白因子结合形成缓慢扩散态, 发挥内切酶功能, 解除下游修复基因的抑制, 使修复基因表达, 完成对 DNA 的修复。这为在分子层面理解 PprI 介导的应答修复作用机制提供了理论模型。总之, 本文在单分子水平上探究 PprI 介导的修复机制, 对于深入理解生命体系中的 DNA 损伤响应和修复机制, 以及对核辐射治理和辐射保护剂研发都具有重要的指导意义。

REFERENCES

- [1] ANDERSON A, NORDON H, CAIN RF, PARRISH G, DUGGAN D, ANDERSON A, NORDAN H, PARISH G, CULLUM-DUGAN 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] BLASIUS M, SOMMER S, HÜBSCHER U. *Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit?[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 43(3): 221-238.
- [3] SLADE D, RADMAN M. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2011, 75(1): 133-191.
- [4] MAKAROVA KS, ARAVIND L, WOLF YI, TATUSOV RL, MINTON KW, KOONIN EV, DALY MJ. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(1): 44-79.
- [5] DALY MJ. Engineering radiation-resistant bacteria for environmental biotechnology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2000, 11(3): 280-285.
- [6] FLOCH K, LACROIX F, SERVANT P, WONG YS, KLEMAN JP, BOURGEOIS D, TIMMINS J. Cell morphology and nucleoid dynamics in dividing *Deinococcus radiodurans*[J]. Nature Communications, 2019, 10: 3815.
- [7] VENKATESWARAN A, McFARLAN SC, GHOSAL D, MINTON KW, VASILENKO A, MAKAROVA K, WACKETT LP, DALY MJ. Physiologic determinants of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2620-2626.
- [8] BATTISTA JR. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*[J]. Annual Review of Microbiology, 1997, 51: 203-224.
- [9] HARSOJO H, KITAYAMA S, MATSUYAMA A. Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*[J]. The Journal of Biochemistry, 1981, 90(3): 877-880.
- [10] PASSOT FM, NGUYEN HH, DARD-DASCOT C, THERMES C, SERVANT P, ESPÉLI O, SOMMER S. Nucleoid organization in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*[J]. Molecular Microbiology, 2015, 97(4): 759-774.
- [11] IRWIN JA. Overview of extremophiles and their food and medical applications[M]//Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles. Amsterdam: Elsevier, 2020: 65-87.
- [12] WANG YG, XU Q, LU HM, LIN L, WANG LY, XU H, CUI XY, ZHANG H, LI TT, HUA YJ. Protease activity of PprI facilitates DNA damage response: Mn²⁺-dependence and substrate sequence-specificity of the proteolytic reaction[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0122071.
- [13] EARL AM, MOHUNDRO MM, MIAN IS, BATTISTA JR. The IrrE protein of *Deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of *recA* expression[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(22): 6216-6224.
- [14] HUA YJ, NARUMI I, GAO GJ, TIAN B, SATOH K, KITAYAMA S, SHEN BH. PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 306(2): 354-360.
- [15] GAO GJ. Construction of DNA damage response gene *pprI* function-deficient and function-complementary mutants in *Deinococcus radiodurans*[J]. Chinese Science Bulletin, 2005, 50(4): 311.
- [16] ZHAI FF, HAO L, CHEN XM, JIANG T, GUO QH, XIE LP, MA Y, DU XB, ZHENG ZQ, CHEN K, FAN J. Single-molecule tracking of PprI in *D. radiodurans* without interference of autoblinking[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1256711.
- [17] CHEN TJ, WANG JQ, ZENG LL, LI RZ, LI JC, CHEN YL, LIN ZL. Significant rewiring of the transcriptome and proteome of an *Escherichia coli* strain harboring a tailored exogenous global regulator IrrE[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e37126.
- [18] GAO GJ, TIAN B, LIU LL, SHENG DH, SHEN BH, HUA YJ. Expression of *Deinococcus radiodurans* PprI enhances the radioresistance of *Escherichia coli*[J]. DNA Repair, 2003, 2(12): 1419-1427.
- [19] RAJAN R, BELL CE. Crystal structure of RecA from *Deinococcus radiodurans*: insights into the structural basis of extreme radioresistance[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 344(4): 951-963.
- [20] 乐东海, 高冠军, 华跃进. 耐辐射球菌 *pprI* 在大肠杆菌中表达增强细胞抗氧化能力的研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(3): 324-327.
- YUE DH, GAO GJ, HUA YJ. Study on enhances of the antioxidation in *Escherichia coli* by expression of *Deinococcus radiodurans pprI*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(3): 324-327 (in Chinese).
- [21] LUO P, ZHANG YN, SUO YK, LIAO ZP, MA Y, FU HX, WANG JF. The global regulator IrrE from *Deinococcus radiodurans* enhances the furfural tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 136: 69-77.
- [22] MA RQ, ZHANG Y, HONG HZ, LU W, LIN M, CHEN M, ZHANG W. Improved osmotic tolerance and ethanol production of ethanologenic *Escherichia coli* by IrrE, a global regulator of radiation-resistance of *Deinococcus radiodurans*[J]. Current Microbiology, 2011, 62(2): 659-664.
- [23] DONG XR, TIAN B, DAI S, LI T, GUO LN, TAN ZF, JIAO Z, JIN QS, WANG YP, HUA YJ. Expression of PprI from *Deinococcus radiodurans* improves lactic acid production and stress tolerance in *Lactococcus lactis*[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0142918.
- [24] PAN J, WANG J, ZHOU ZF, YAN YL, ZHANG W, LU W, PING SZ, DAI QL, YUAN ML, FENG B, HOU XG, ZHANG Y, MA RQ, LIU TT, FENG L, WANG L, CHEN M, LIN M. 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.
- [25] WEN L, YUE L, SHI Y, REN LL, CHEN TT, LI N, ZHANG SY, YANG W, YANG ZS. *Deinococcus radiodurans pprI* expression enhances the radioresistance of eukaryotes[J]. Oncotarget, 2016, 7(13): 15339-15355.
- [26] SHI Y, WU W, QIAO HP, YUE L, REN LL, ZHANG SY, YANG W, YANG ZS. The protein PprI provides protection against radiation injury in human and mouse cells[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 26664.
- [27] VUJICIC-ZAGAR A, DULERMO R, Le GORREC M, VANNIER F, SERVANT P, SOMMER S, de GROOT A, SERRE L. Crystal structure of the IrrE protein, a central regulator of DNA damage repair in *Deinococcaceae*[J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 386(3): 704-716.

- [28] LUDANYI M, BLANCHARD L, DULERMO R, BRANDELET G, BELLANGER L, PIGNOL D, LEMAIRE D, de GROOT A. Radiation response in *Deinococcus deserti*: IrrE is a metalloprotease that cleaves repressor protein DdrO[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 94(2): 434-449.
- [29] LU HZ, CHEN ZJ, XIE T, ZHONG ST, SUO SS, SONG S, WANG LY, XU H, TIAN B, ZHAO Y, ZHOU RH, HUA YJ. The *Deinococcus* protease PprI senses DNA damage by directly interacting with single-stranded DNA[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 1892.
- [30] LIU YQ, ZHOU JZ, OMELCHENKO MV, BELIAEV AS, VENKATESWARAN A, STAIR J, WU LY, THOMPSON DK, XU D, ROGOZIN IB, GAIDAMAKOVA EK, ZHAI M, MAKAROVA KS, KOONIN EV, DALY MJ. 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.
- [31] MANLEY S, GILLETTE JM, PATTERSON GH, SHROFF H, HESS HF, BETZIG E, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy[J]. *Nature Methods*, 2008, 5: 155-157.
- [32] PATTERSON GH, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells[J]. *Science*, 2002, 297(5588): 1873-1877.
- [33] LEE SH, SHIN JY, LEE A, BUSTAMANTE C. Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(43): 17436-17441.
- [34] STRACY M, UPHOFF S, de LEON FG, KAPANIDIS AN. *In vivo* single-molecule imaging of bacterial DNA replication, transcription, and repair[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(19): 3585-3594.
- [35] 江婷, 翟帆帆, 钟珊珊, 樊军. DNA 损伤修复的单分子水平研究进展[J]. *自然杂志*, 2023, 45(1): 22-32.
- JIANG T, ZHAI FF, ZHONG SS, FAN J. Advances in single-molecule investigation on DNA damage repair[J]. *Chinese Journal of Nature*, 2023, 45(1): 22-32 (in Chinese).
- [36] WANG SY, MOFFITT JR, DEMPSEY GT, XIE XS, ZHUANG XW. Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-molecule-based superresolution imaging[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(23): 8452-8457.
- [37] PAIGE MF, BJERNELD EJ, MOERNER WE. A comparison of through-the-objective total internal reflection microscopy and epifluorescence microscopy for single-molecule fluorescence imaging[J]. *Single Molecules*, 2001, 2(3): 191-201.
- [38] STRACY M, LESTERLIN C, de LEON FG, UPHOFF S, ZAWADZKI P, KAPANIDIS AN. Live-cell superresolution microscopy reveals the organization of RNA polymerase in the bacterial nucleoid[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(32): E4390-E4399.
- [39] STRACY M, SCHWEIZER J, SHERRATT DJ, KAPANIDIS AN, UPHOFF S, LESTERLIN C. Transient non-specific DNA binding dominates the target search of bacterial DNA-binding proteins[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(7): 1499-1514.e6.
- [40] LU HM, CHEN H, XU GZ, SHAH AMUH, HUA YJ. DNA binding is essential for PprI function in response to radiation damage in *Deinococcus radiodurans*[J]. *DNA Repair*, 2012, 11(2): 139-145.
- [41] LU HM, GAO GJ, XU GZ, FAN L, YIN LF, SHEN BH, HUA YJ. *Deinococcus radiodurans* PprI switches on DNA damage response and cellular survival networks after radiation damage[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2009, 8(3): 481-494.
- [42] LIU SH, WANG F, CHEN HY, YANG ZX, NING YF, CHANG C, YANG D. New insights into radio-resistance mechanism revealed by (phospho)proteome analysis of *Deinococcus radiodurans* after heavy ion irradiation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(19): 14817.