

# 新疆艾比湖嗜盐菌的细菌视紫红质和 16S rRNA 基因序列的研究 Studies on Bacteriorhodopsin Gene and Sequence of 16S rRNA Encoding Genes of Halophilic Archaea of Xingjiang Aibi Lake

旭格拉·哈布丁<sup>1</sup>, 迪丽拜尔·托乎提<sup>1\*</sup>, 吴 敏<sup>2</sup>, 周培瑾<sup>3</sup>

Xugela·Habden<sup>1</sup>, Dilbar·Tohty<sup>1\*</sup>, WU Min<sup>2</sup> and ZHOU Pei-Jin<sup>3</sup>

1 新疆师范大学 生命与环境科学学院, 乌鲁木齐 830053

2 浙江大学 生命科学学院 杭州 310027

3 中国科学院微生物研究所 北京 100080

1 College of Life and Environment Sciences, Xinjiang Normal University, Wulumuqi 830053, China

2 College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

3 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

**摘 要** 为了研究分析嗜盐古生菌物种与细菌视紫红质(BR)蛋白基因资源,从 40 份土壤、湖水及淤泥样品中分离出 148 株嗜盐菌,对其中 6 株菌采用聚合酶链式反应(PCR)方法对其编码螺旋 C 至螺旋 G 的蛋白基因片段和 16S rRNA 基因进行了扩增,并测定了基因的核苷酸序列。与已报道的相应片段进行对比,ABDH10、ABDH11 和 ABDH40 中的螺旋 C 至螺旋 G 的蛋白与其他菌株差异显著。基于 16S rRNA 序列的同源性比较以及系统发育学研究表明,ABDH10 和 ABDH40 是 *Natronorubrum* 属下的新成员和 *Natrinema* 属下的新成员,ABDH40 的 16S rRNA 序列已登录到 GenBank,其序列号为 AY989910。ABDH11 中的螺旋 C 至螺旋 G 的蛋白与其他菌株差异显著。

**关键词** 嗜盐古生菌,细菌视紫红质,16S rRNA,系统发育

中图分类号 Q517,Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0046-05

**Abstract** One hundred and forty-eight strains of halophilic archaea were isolated from 40 samples of soil, lake water, and silt. To study and analyze the species and bacteriorhodopsin(BR) protein resource, partial DNA fragments encoding BR protein from helix C to helix G and 16S rRNA encoding genes from 6 strains of halophilic archaea were amplified by polymerase chain reaction(PCR), and their DNA sequences were determined. The results indicate that the reduced amino acid sequences of BR protein from helix C to helix G of ABDH11 is obviously different from those of other existing proteins. The results of homology analysis on BR gene and 16S rRNA and phylogenetic analysis on 16S rRNA show that strains ABDH10 and ABDH40 are novel members of genus *Natronorubrum* and *Natrinema*, respectively; the sequence of ABDH40 was obtained from GenBank and the number of sequence is AY989910. The protein from helix C to helix G of ABDH11 is significantly different from that of other strains.

**Key words** halophilic archaea, bacteriorhodopsin, 16S rDNA, phylogenesis

Received: July 17, 2006; Accepted: August 28, 2006.

This work was supported by a grant from National Natural Science Foundation of China (No. 30060001).

\* Corresponding author. Tel: +86-991-4332230; Fax: +86-991-4332535; E-mail: dilbar.th@163.com

国家自然科学基金资助项目(No.30060001),自治区特批基金 2002-10 项目,中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

近年来 随着分子生物学技术的应用 极端嗜盐菌遗传多样性的研究得到迅速发展 新种和新属不断地被报道,极端嗜盐菌属于古菌域(Archaea domain)嗜盐菌目(Halobacteriaceae)嗜盐菌科(Halobacteriaceae)。根据国际原核生物分类学委员会(International Committee on Systematics of Prokaryotes, ICSP)公布的数据,到 2004 年 9 月份, Halobacteriaceae 科共有 18 个属: *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halococcus*, *Halorubrum*, *Halogeometricum*, *Haloterrigenia*, *Halobaculum*, *Halorhabdus*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronorubrum*, *Natronomonas*, *Halomicrobium*, *Halosimplex*, *Halobiforma*, *Halobaculum*, *Halobacteriaceae* 科成员以及 50 多个种。

细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)是嗜盐古生菌紫膜上的唯一蛋白质,并以 7 次  $\alpha$  螺旋(A-G)的基本二级结构跨膜定位于其质膜上<sup>[1]</sup>。从 *Halobacterium halobium* 分离的 BR 蛋白是由 248 个氨基酸组成,分子量约为 26kD,第 216 位的赖氨酸通过希夫碱基和生色团视黄醛分子相连<sup>[2]</sup>。天然状态下,每 3 个 BR 单体组成三聚体,构成六角形二维晶格的膜片层-紫膜(purple membrane, pm)。对它的深入研究,有助于了解细胞膜信号传导途径中膜蛋白受体作用机制与传导模型;同时 BR 又是细胞膜上离子通道的原型蛋白,其跨膜转运质子的机制可以为其他离子通道蛋白结构功能的研究起到指导性作用;在太阳能电池、人工视网膜、光信息储存、神经网络、生物芯片等应用领域中 BR 的光电响应和光致变色特性有着广阔的利用前景。因此,将野外分离的 BR 和人工改造的 BR 蛋白应用于研究 BR 结构和功能,并结合晶体学研究,阐明其光反应和质子泵机制,已成为目前 BR 蛋白研究中的一个热点<sup>[3]</sup>。

我们在新疆北部艾比湖中分离纯化得到的嗜盐菌 ABDH10 和 ABDH11 的生长盐浓度范围在 20% ~ 25%,基于 16S rRNA 基因(16S rDNA)序列进行了系统发育分析,随后扩增了菌株 ABDH11 的 BR 蛋白自螺旋 C 至螺旋 G 的基因保守片段,并同已报道的其它菌株相应的 BR 蛋白序列进行了氨基酸相似性分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

菌株 ABDH10 和 ABDH11 分离于艾比湖,对照菌株为 *Halobacterium halobium* R1M1,由复旦大学生

命科学学院李庆国教授惠赠。

### 1.2 分离和培养

菌种分离和富集培养采用高盐培养基,配方如下:200g NaCl, 20g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 3g 柠檬酸钠, 2g KCl, 0.2g CaCl<sub>2</sub>, 10g 细菌蛋白胨(L37), pH7.2, 加蒸馏水至 1L。固体培养基加琼脂 20g。

土样先用高盐培养基悬液培养,再取少量悬液加到液体培养基中;冰样解冻后取少量加到液体培养基中;水样直接取少量加到液体培养基中,37℃ 光照振荡培养 7d。适当稀释涂布平板,经反复划线纯化,直至获得单菌落。

### 1.3 基因组总 DNA 的提取

DNA 提取方法参见文献 [4]。

### 1.4 PCR 扩增

根据文献 [5, 6] 报道的已知 16S rRNA 序列,使用 DNASTAR 软件设计一对引物,正向为 5'-ATTCCGGTTGATCCTGC-3',反向为 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCAG-3'。PCR 反应条件为 50 $\mu$ L 反应体系 30 个循环;变性:94℃, 45s;退火:50℃, 45s;延伸:72℃, 90s。

按 Otomo<sup>[7]</sup>方法设计一对简并引物,正向引物为 5'-CCGCTQ(CT)TQ(CT)TQ(CT)T(AC)GACCTCG-3'。反向引物为 5'-AGGATGAC(GA)X(CG)CCGAA(CG)CCGACCTT-3'。PCR 反应条件为:50 $\mu$ L 反应体系 30 个循环;变性:94℃, 30s;退火:55℃, 30s;延伸:72℃, 30s。

### 1.5 DNA 序列的转化和测序

PCR 产物用直接 T/A 克隆法进行克隆,先将该片段纯化,连接到质粒 pUCm-T 上,再转化到大肠杆菌 JM109 菌株,在含氨苄霉素(AMP<sup>+</sup>)的平板上生长过夜,挑选白斑,经 PCR 和酶切验证后,随机取 3 个阳性克隆测序。

### 1.6 系统发育树的构建

将菌株 AB1 的 16S rRNA 序列与从 GenBank 数据库中获得的嗜盐菌 16S rRNA 序列作比较,采用 Clustalw1.8 软件包进行多序列匹配排列,其中形成的缺口用中性元素填补。用 PHYLIP 程序包中的 DNAdist 程序计算进化距离,根据“Kimura 双参数”方式,通过序列数据计算矩阵距离,然后使用 Neighbor-joining 方法,进行系统进化树估算。各分支的重复性用 PHYLIP 程序包中的 Seqboot、Consense 程序分析,重复数为 1000。

### 1.7 数据库序列号(Accession number)

菌株 AB1 的 16S rRNA 序列和 BR 基因序列准

备登录到 GenBank 核苷酸序列数据库中,其它相关 菌株的数据库登录序列号如 Table 1.

表 1 嗜盐古生菌株及其 BR 基因和 16S rRNA 序列的数据库登录号  
Table 1 Database accession number of halophilic archaea BR gene and 16S rDNA

Species		bR <sup>a</sup>	16S rRNA <sup>b</sup>
Halorcula	<i>argentinensis</i>	D31880	D50849
	<i>japonica</i>	AB029320	D28872 (p)
	<i>vallismortis</i>	D31882	U17593
	<i>ajimwensis</i>	AY279550	
<i>Halomicrobium</i>	<i>mukohataei</i>	S76743	D50850
<i>Halobacterium</i>	<i>salinarum</i>	MI1720	M38280
<i>Halorubrum</i>	<i>sodomense</i>	D50848	X82169
	<i>mex</i>	D50848	
<i>Haloterrigena</i>	<i>sp. arg-4</i>	AB009620	AB009624
	<i>turkmenica</i>		AB004878
	<i>thermotolerans</i>		AF115478
<i>Natronococcus</i>	<i>occultus</i>		Z28378
	<i>amylolyticus</i>		D43628
Miscellaneous	strain Mex	D11056 (p)	
	strain Port	D11057 (p)	
	strain Shark	D11058 (p)	
	strain XZ515	AF306937	
<i>Natrinema altumense</i>	AS 1.3731		AY208972
<i>Natrinema pallidum</i>	NCIMB777		AJ002949
<i>Natrinema pellirubrum</i>	NCIMB786		AJ002947
<i>Natrinema versiforme</i>	AS1.2365		AB023426
<i>Natronorubrum bangense</i>	AS1.1984		Y14028
<i>Natronorubrum tibetense</i>	AS1.2123		AB005656
<i>Natrialba aegyptiaca</i>	DSM13077		AF251941
<i>Natrialba asiatica</i>	DSM122787		D14123
<i>Natrialba huluribeirensis</i>	AS1.1986		AF262026
<i>Natrialba chahannaensis</i>	AS1.1977		AJ004806
<i>Natronobacterium gregoryi</i>	ATCC43098		D87970

Notes (a) Database accession number of BR gene (b) Database accession number of 16S rRNA sequence (c) (p) some sequence.

## 2 结果

### 2.1 嗜盐古生菌菌株 ABDH10 的 16S rRNA 序列和系统发育分析

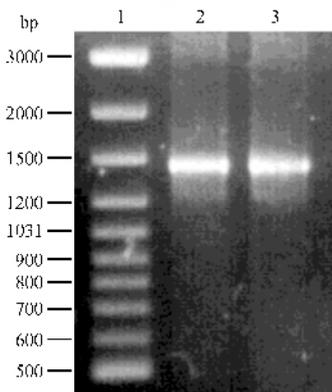


图 1 菌株 AB116S rRNA PCR 序列扩增物图

Fig. 1 Strains AB1 16S rDNA PCR products

1 :DNA Marker ; 2 :Reference strains R1M1 ; 3 :ABDH10.

用一对引物扩增菌株 ABDH10,得到 1473 个碱基,其 16S rRNA 序列电泳图见 Fig.1. 测序结果表明 ABDH10 的 16S rRNA 序列与其它已报道菌株的 16S rRNA 序列大小类似,但核苷酸排列次序差异明显。

用一对引物扩增菌株 ABDH10,得到 1473 个碱基,基于 16S rRNA 序列构建的嗜盐古生菌系统发育树见 Fig.2. 从树上可知,ABDH10(以 AB29 代表)的

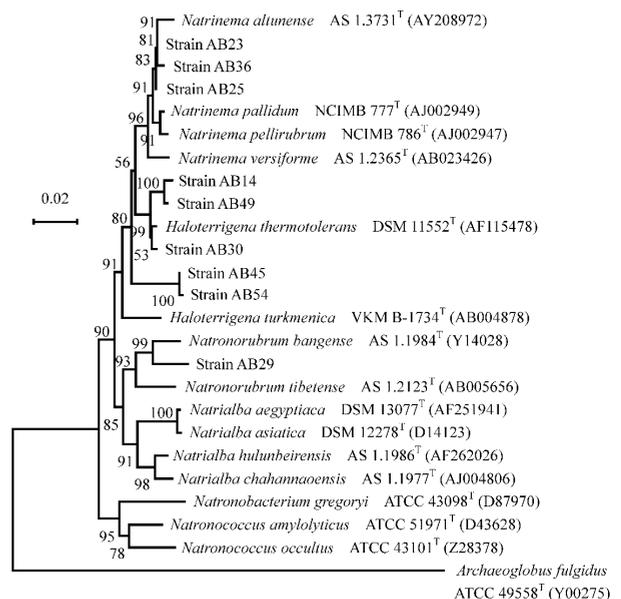


图 2 采用邻接法根据 16S rRNA 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Used 16S rRNA sequence to construct

neighbor-joining (NJ) phylogenetic trees

16SrDNA 序列与其他已报道菌株的 16S rRNA 序列大小类似,但核苷酸排列次序差异明显。

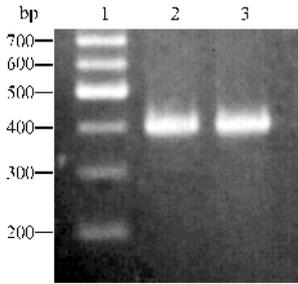


图3 菌株 AB DH11 BR 蛋白基因部分序列 PCR 产物扩增图

Fig.3 The PCR products of some sequence from Strains AB DH11 BR gene

1 :DNA marker 2 :reference strain R1M1 3 :ABDH11.

2.2 嗜盐古生菌菌株 ABDH11 的 BR 基因部分序列  
用一对简并引物扩增菌株 ABDH11,得到 401 个碱基,其序列电泳图分别见 Fig.3。序列分析表明 AB1 的 BR 蛋白 CG 片段与对照菌株 Hb.halobium R1M1 的 BR 蛋白 CG 片段具有明显差异。

2.3 嗜盐古生菌 BR 蛋白序列比较

嗜盐古生菌 ABDH11 与其它不同菌株 BR 蛋白之间的序列比较,结果表明 ABDH11 的 BR 蛋白与其它已报道菌株的 BR 蛋白序列有明显差别。

序列上方的横线表示根据 Hbt. salinarum BR 蛋白高级结构推测的跨膜螺旋;E 和 C 分别表示膜外侧和膜内侧;P 表示与质子通道相关的氨基酸残基;R 表示与视黄醛结合相关的氨基酸残基;B 表示和质子通道及视黄醛结合都相关的氨基酸残基。

Fig.4 显示亲水指数与氨基酸序列间的关系,根据 Kyte 等人<sup>[8]</sup>方法用 9 个残基作为区间计算。

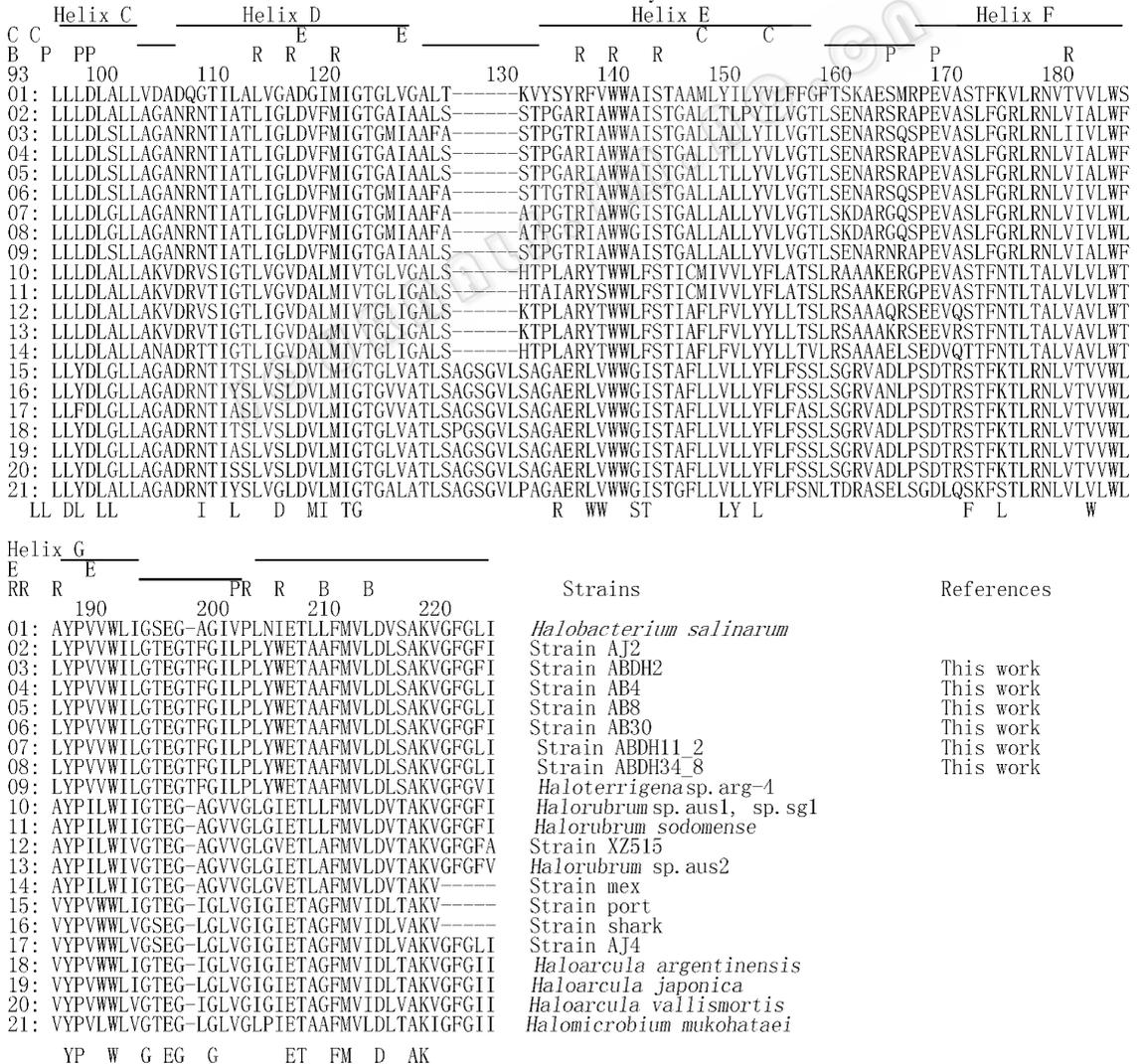


图4 BR 蛋白来自螺旋 C 至螺旋 G 的氨基酸排列比较

Fig.4 The comparison of BR protein sequence from helix C to helix G

### 3 讨论

根据嗜盐菌分类标准<sup>[9]</sup>,新的分类单位应当同核苷酸序列的系统发育学分析相一致,16S rRNA 序列的系统发育学进化距离也和表型特征及化学分类数据有非常好的相关性。从16S rRNA 构建的系统发育树上( Fig.2 ),菌株 ABDH10 与 AB29 与 *Natronorubrum bangense* AS 1.1984 构成一个分支,序列同源性小于97.5%。一般认为,16S rRNA 序列同源性低于98%,可以认为属于不同种,同源性小于93%~95%,可以认为属于不同属<sup>[10-12]</sup>。因此,从系统发育树和16S rRNA 序列同源性角度分析,ABDH10 有可能是 *Natronorubrum* 属下的新成员。

各嗜盐古生菌菌株之间,BR 蛋白的 N 端氨基酸排列次序的变异比较明显,但位于螺旋 C 和螺旋 G 内的氨基酸残基相对保守,例如,菌株 *Ha. argentinensis* 和 *Ha. japonica* 之间,菌株 XZ515 和 *Hr. sp. aus-2* 之间的 BR 蛋白 CG 片段同源性都达到95%以上( Table 2 )。但菌株 ABDH11 的 BR 蛋白 CG 片段与已报道的 BR 蛋白相应序列差异明显,与 *Hb. sp. arg-4* 的 BR 氨基酸序列相似性最高,为90%,而与其他菌株的 BR 蛋白部分序列相似性都低于60%,说明菌株 ABDH11 中发现的蛋白是一个新型的 BR 蛋白。菌株 ABDH11 和参比菌株 *Halobacterium halobium* R1M1 的 BR CG 片段有类似的亲水性图谱( Fig.4 ),也表明 AB1 中发现的蛋白结构上与已报道的 BR 蛋白类似,具有跨膜的  $\alpha$ -螺旋结构。

### 4 结语

通过对6株的16S rRNA 基因序列及 BR 蛋白基因序列的研究,结果表明:新疆艾比湖地区,除非嗜盐菌外,还存在着丰富的嗜盐菌群,它代表着特定的种质资源,也是特定的基因资源,它为进一步研究抗盐的生物学机制及分离抗盐基因提供研究材料和种质资源,而 BR 蛋白是存在于嗜盐菌紫膜上的唯一蛋白,它作为光驱动质子泵、光电转换器和光敏材料

有着广阔的应用前景,其潜在经济价值是巨大的。此研究对筛选新的微生物来源的生理活性物质,丰富此类生物资源保护和开发利用奠定了基础,为新疆生物资源调查增添了新内容。

### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Margush T, McMorris FR. Consensus n-trees. *Bulletin of Mathematical Biology*, 1981 **43** :239 - 244.
- [ 2 ] Stoeckenius W. Bacterial rhodopsins: Evolution of a mechanistic model for the ion pumps. *Protein Science*, 1999, **8** :447 - 459.
- [ 3 ] Brown LS. Proton transport mechanism of bacteriorhodopsin as revealed by site-specific mutagenesis and protein sequence variability. *Biochemistry* 2001, **66**( 11 ):1546 - 1554.
- [ 4 ] Li L(李凌), Wu M(吴敏), Qiao SY(乔守怡), et al. Cloning and expression of the bacteriorhodopsin gene. *J of Zhejiang University (Engineering Science)* 2001 **35**( 3 ):324 - 327.
- [ 5 ] Gupta R, Lanter JM, Woese CR. Sequence of the ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an archaeobacterium. *Science*, 1983, **221** :656 - 659.
- [ 6 ] Arahall DR, Dewhurst FE, Paster BJ, et al. Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol*, 1996 **62**( 10 ):3779 - 3786.
- [ 7 ] Kyte J, Doolittle R. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982 **157** :105 - 132.
- [ 8 ] YATSUNAMI R, KAWAKAMI T, OHTANI H, et al. A novel bacteriorhodopsin-like protein from *Haloarcula japonica* strain TR-1: Gene cloning, sequencing, and transcript analysis. *Extremophiles*, 2000 **4**( 12 ):1108 - 1112.
- [ 9 ] Oren A, Ventosa A, Grant WD. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order halobacteriales. *Int J Syst Bacteriol*, 1997 **47** :233 - 238.
- [ 10 ] Wang ZX(王振雄), Xu Y(徐毅), Zhou PJ(周培瑾). Taxonomy of a new species of haloalkalophilic archaeon. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报) 2000 **40**( 2 ):115 - 120.
- [ 11 ] Devereux R, He S H, Doyle C L, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol*, 1990 **172**( 7 ):3609 - 3619.
- [ 12 ] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 1994 **44** :846 - 849.