

一个新的 Br 蛋白基因部分序列测定及分析

许学伟¹, 吴敏¹, 阮红¹, 黄伟达², 迪丽拜尔·托乎提³

(1. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310027; 2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433; 3. 新疆师范大学生物系, 乌鲁木齐 830054)

摘要: 从新疆北部艾比湖分离纯化到极端嗜盐古生菌 AB1, 采用 PCR 方法扩增了其 16S rRNA 基因(16S rDNA)和编码螺旋 C 至螺旋 G 的细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, Br)蛋白基因片段, 并测定了基因的核苷酸序列。基于 16S rDNA 序列的同源性比较及系统发育学研究表明, AB1 是 *Natronococcus* 属中新成员。通过对菌株 AB1 的 Br 蛋白亲水性分析表明, AB1 的 Br 蛋白与已报道 Br 蛋白有类似的超二级结构, 进一步的蛋白质序列聚合比对结果表明, AB1 中 Br 蛋白螺旋 C 至螺旋 G 的氨基酸序列与其他菌株差异明显。研究结果表明菌株 AB1 的 Br 蛋白是一种新的 Br 蛋白。

关键词: 嗜盐古生菌; 细菌视紫红质; 16S rDNA

中图分类号: Q517, Q78

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2004)03-0343-06

Analysis of Partial Sequence of the Gene for A Novel Br Protein

XU Xue-Wei¹, WU Min¹, RUAN Hong¹, HUANG Wei-Da², Dilbar Tohty³

(1. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

2. College of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China;

3. Department of Biology, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China)

Abstract: A strain of halophilic archaeum AB1 was isolated and purified from Aibi Lake located in the north of Xinjiang Uygur Autonomous Region. Partial DNA fragment encoding a bacteriorhodopsin (Br) protein as well as 16S rRNA of AB1 was amplified by PCR, and their nucleotide sequences were determined subsequently. On the basis of homology and phylogenetic analysis about 16S rRNA gene (16S rDNA), it could be speculated that the strain AB1 is a novel member of the genus *Natronococcus*. The hydrophathy analysis of Br fragment revealed that the AB1 Br had a transmembrane heptahelical structure similar to that of other Brs. On the other hand, homology alignment using the deduced partial amino acid sequence of Br protein of AB1 with other Br proteins showed that AB1 Br protein is obviously different to others. These facts indicated that the Br in halophilic archaeum AB1 is a new Br protein.

Key words: Halophilic archaea; bacteriorhodopsin; 16S rDNA

细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, Br)是嗜盐古生菌紫膜上的惟一蛋白质,并以 7 次 α 螺旋(A-G)跨膜定位于其质膜上。从 *Halobacterium halobium* 分离的 Br 蛋白是由 248 个氨基酸组成,分子质量约为 26kDa,第 216 位的赖氨酸通过希夫碱基和生色团视黄醛分子相连^[1]。将野外分离的

Br 和人工改造的 Br 蛋白用于研究 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^[2]。

我们在新疆北部艾比湖中分离纯化到耐盐范围在 20%~25% 的嗜盐古生菌 AB1,基于 16S rRNA 基因(16S rDNA)序列进行了系统发育分析,随后扩

收稿日期:2003-06-24;修回日期:2003-12-02

基金项目:国家自然科学基金资助(30370029)项目[Supported by National Natural Science Foundation of China (30370029)]

作者简介:许学伟(1978-),男,硕士,研究方向:嗜盐古生菌系统分类及进化。E-mail:xxwju@hotmail.com

通讯作者:吴敏(1958-),男,教授,研究方向:分子遗传。E-mail:wumin@cls.zju.edu.cn

增了菌株 AB1 的 Br 蛋白自螺旋 C 至螺旋 G 的基因保守片段,并同已报道的其他菌株相应的 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 AB1 分离自艾比湖,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:250g NaCl,20g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,3g 柠檬酸钠,2g KCl,0.2g $CaCl_2$,10g 细菌蛋白胨(L37),pH7.0,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浮,再取少量悬浮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[3]。

1.4 PCR 扩增

根据文献[4,5]报道的已知 16S rDNA 序列,使用 DNASTAR 软件设计一对引物,正向为 5'-AT-TCCGGTTGATCCTGC-3',反向为 5'-AGGAG-GTGATCCAGCCGAC-3'。PCR 反应条件为:50μL 反应体系 30 个循环;变性:94℃,45s;退火:50℃,45s;延伸:72℃,1min。

按 Otomo^[6]方法设计一对简并引物,正向引物为 5'-CCGCTG(CT)TG(CT)TG(CT)T(AC)GACCTCG-3'。反向引物为 5'-AGGATGA(GA)(CG)CCGAA(CG)CCGACCTT-3'。PCR 反应条件为:50μL 反应体系 30 个循环;变性:94℃,45s;退火:60℃,45s;延伸:72℃,1min。

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,在含苄青霉素(AMP^r)的平板生长过夜,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 rDNA 序列与从 GenBank

数据库获得的嗜盐菌 16S rDNA 序列,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 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 rDNA 序列和 br 基因序列已登陆到 GenBank 核苷酸序列数据库中,它们的序列号分别为 AY277581 和 AY279547。其他相关菌株的数据库登陆序列号如表 1。

表 1 嗜盐古生菌菌株及其 br 基因和 16S rDNA 序列的数据库登陆号

Table 1 Halobacterial strains and accession numbers of genes encoding bacteriorhodopsins and 16S rDNA

物种及其类别 species and classify		br ^a	16S rDNA ^b
<i>Haloarcula</i>	<i>argentinensis</i>	D31880	D50849
	<i>japonica</i>	AB029320	D28872(p) ^c
	<i>vallismortis</i>	D31882	U17593
<i>Halomicrobium</i>	<i>mukohataei</i>	S76743	D50850
<i>Halobacterium</i>	<i>salinarum</i>	M11720	M38280
<i>Halorubrum</i>	<i>sodomense</i>	D50848	X82169
	sp. aus-1	J05165	D32081
	sp. aus-2	S56354	D32082
	sp. SG1	X70291	ND ^c
<i>Haloterrigena</i>	sp. arg-4	AB009620	AB009624
	<i>turkmenica</i>	ND ^c	AB004878
	<i>thermotolerans</i>	ND ^c	AF115478
<i>Natronococcus</i>	<i>occultus</i>	ND ^c	Z28378
	<i>amylolyticus</i>	ND ^c	D43628
Miscellaneous	strain Mex	D11056(p) ^c	ND ^c
	strain Port	D11057(p) ^c	ND ^c
	strain Shark	D11058(p) ^c	ND ^c
	strain XZ515	AF306937	ND ^c

a: GenBank 数据库中 br 序列登陆号; b: GenBank 数据库中 16S rDNA 序列登陆号; c: ND, 未测定; (p), 部分序列。

a: Accession number of br gene sequence for electronic retrieval from GenBank database; b: Accession number of 16S rDNA sequence for electronic retrieval from GenBank database; c: ND, not determined; (p), partial sequence.

2 结 果

2.1 嗜盐古生菌菌株 AB1 的 16S rDNA 序列和系统发育分析

用一对引物扩增菌株 AB1, 得到 1469 个碱基, 其 16S rDNA 序列电泳图见图 1。测序结果表明

AB1 的 16S rDNA 序列与其他已报道菌株的 16S rDNA 序列大小类似,但核苷酸排列次序差异明显。

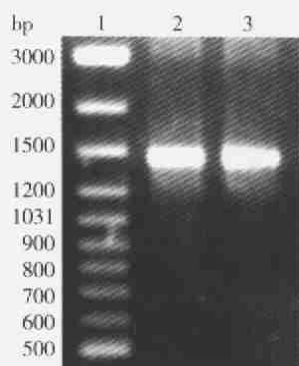


图 1 菌株 AB1 16S rDNA 序列 PCR 产物扩增图

1: DNA Marker; 2: 参比菌株 R1M1; 3: AB1。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of AB1 16S rDNA sequence

The products were separated on a 2.0% (w/v) Agarose gel.

lane1: DNA marker, lane2: R1M1, lane 3: AB1.

基于 16S rDNA 序列构建的嗜盐古生菌系统发育亚树见图 2。从树上可以看到,以 *Archaeoglobus flugidus* 做为外种群,此系统发育亚树基本分成 6 个分枝,菌株 AB1 与 *Ntc. occultus* 和 *Ntc. amylyticus* 同分在一个分枝中。

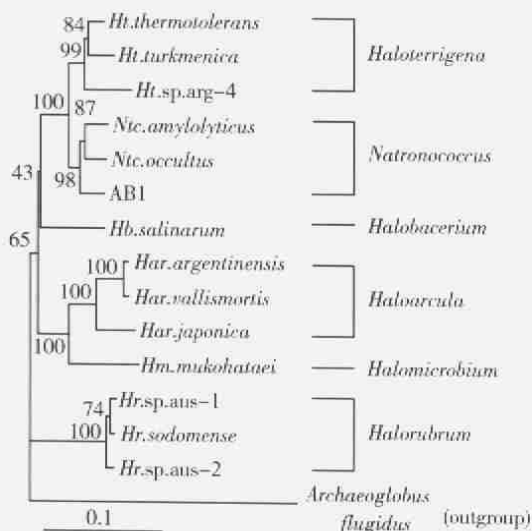


图 2 根据 16Sr DNA 序列构建的极端嗜盐菌系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of extremely halophilic archaea on the basis of 16S rDNA sequences

The tree was constructed using the NJ method with bootstrap values calculated from 1000 trees. The number at each branch point represents the percentage bootstrap support. Bar, 0.1 sequence divergence.

2.2 嗜盐古生菌菌株 AB1 的 br 基因部分序列

用一对简并引物扩增菌株 AB1, 得到 401 个碱基, 其序列电泳图分别见图 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。

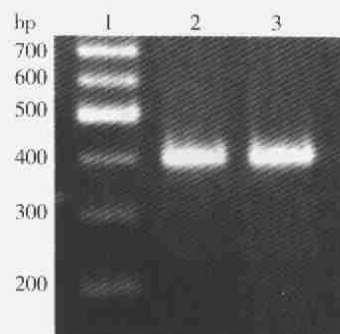


图 3 菌株 AB1 br 基因部分序列 PCR 产物扩增图

1: DNA Marker; 2: 参比菌株 R1M1; 3: AB1。

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of AB1 partial gene sequences br

The products for separated on a 4.0% (w/v) Agarose gel. lane1: DNA marker, lane2: R1M1, lane3: AB1.

2.3 嗜盐古生菌 Br 蛋白序列比较

图 4 显示亲水指数与氨基酸序列间的关系。结果表明菌株 AB1 和 *Halobacterium halobium*

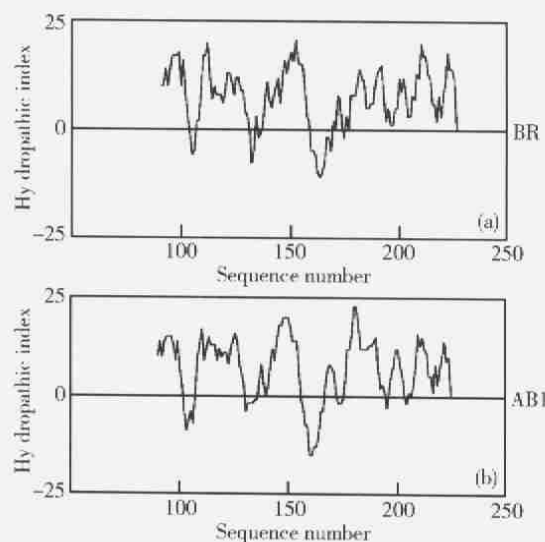


图 4 菌株 R1M1 和 AB1 中 Br 蛋白自氨基酸 91~223 计算得的亲水指数

根据 Kyte 和 Doolittle^[7]方法用 9 个残基做为区间计算。

Fig. 4 Hydropathic profile from amino acid residue 91 to 223 of *Halobacterium halobium* R1M1 Br (a) and AB1 Br (b).

The profile is calculated according to Kyte and Doolittle^[7] with span setting of 9.

R1M1 的 Br CG 片段有非常类似的亲水性图谱。

2.4 嗜盐古生菌 Br 蛋白序列比较

图 5 为嗜盐古生菌 AB1 与其他不同菌株 Br 蛋

白之间的序列比较,各菌株 Br 蛋白之间的相似性差异列于表 2。序列比较结果表明 AB1 的 Br 蛋白与其他已报道菌株的 Br 蛋白序列都不相同。

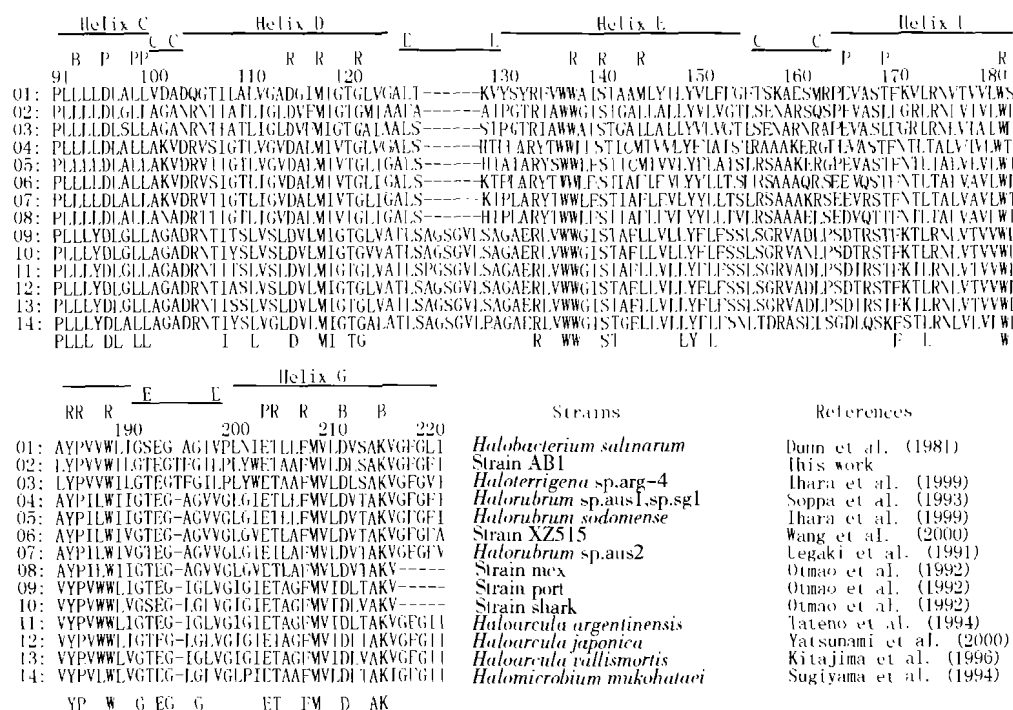


图 5 Br 蛋白自螺旋 C 至螺旋 G 的氨基酸排列比较

序列上方的横线表示根据 *H. salinarum* Br 蛋白高级结构^[12]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. 5 Alignment of known Br sequences from various halophilic archaea

Gaps (denoted as-) were introduced into sequences to optimize alignments. Numbering of residues corresponds to *Hb. halobium* (*salinarum*) Br. Black lines above the sequences indicate the transmembrane helices (helix C to G) based on the three-dimensional structure of *Hb. salinarum* Br^[12]. E and C above black cylinders indicate extracellular and cytoplasmic sides, respectively. Amino acid residues in proton channel are marked as P, and amino acid residues contacting retinal are marked as R. Amino acid residues which line both the retinal binding pocket and proton channel are marked as B. Consensus sequences among 15 bacteriorhodopsins are shown at the bottom of the sequences.

表 2 Br 蛋白同源性比较

Table 2 Homology indices between bacteriorhodopsins

菌株名称及编号 (Number and Scientific name)	序列相似性百分比 (% Similarity of sequence)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>Halobacterium salinarum</i>		55	55	57	58	53	55	51	47	47	50	50	50	50
2. Strain AB1	63		90	52	53	54	55	51	51	50	53	54	53	56
3. <i>Haloterrigena</i> sp. arg-4	63	89		53	54	54	55	51	50	50	53	53	53	56
4. <i>Halorubrum</i> sp. aus1 & sp. sg1	61	62	62		95	84	84	78	49	46	52	52	50	53
5. <i>Halorubrum sodomense</i>	60	62	62	91		83	84	78	49	46	52	52	50	54
6. Strain XZ515	59	61	60	82	83		96	87	46	44	48	48	48	52
7. <i>Halorubrum</i> sp. aus2	60	62	61	83	83	95		87	48	47	50	50	50	52
8. Strain mex	60	61	61	81	83	89	88		50	47	48	48	47	52
9. Strain pork	58	62	61	59	59	59	60	62		94	95	94	94	75
10. Strain shark	56	59	58	57	58	58	59	60	85		90	92	94	75
11. <i>Haloarcula argentinensis</i>	58	61	60	58	59	58	59	60	96	84		97	97	78
12. <i>Haloarcula japonica</i>	59	62	60	61	60	60	61	63	94	87	94		97	79
13. <i>Haloarcula vallismortis</i>	57	61	60	59	61	60	60	61	88	90	89	89		78
14. <i>Halomicrobium mukohataei</i>	58	65	63	62	63	61	61	63	75	73	75	76	75	

注: 对角线上方表示 Br 蛋白序列间相似性百分比, 对角线下方表示 br 基因序列间相似性百分比。

Note: Percentage of similarity of the Br proteins (above the diagonal) and br genes (below the diagonal) is shown.

3 讨 论

目前嗜盐古生菌为一个科(嗜盐菌科)、15 个属、50 几个种^[12],现已在 5 个属中发现了 Br 蛋白,它们分别是: *Halobacterium*、*Haloarcula*、*Halorubrum*、*Haloterrigena* 和 *Halomicrobium*^[8,9]。上世纪 90 年代,人们把不同属菌株中分离出来的具有质子泵功能的视黄醛结合蛋白分成四类: *Haloarcula* 属的古视紫红质(*archaerhodopsin*, Ar), *Halorubrum* 属的十字视紫红质(*cruxrhodopsin*, Cr), *Haloterrigena* 属的德耳塔视紫红质(*deltarhodopsin*, Dr)和 *Halobacterium* 属的 Br。随着对嗜盐古生菌的研究,一些菌株在各个属之间进行变动,例如菌株 *arg-2^T* 基于 16S rRNA 基因序列的研究,将其定种为 *Haloarcula mukohataei*^[13],但对菌株的形态和极性脂的研究,又将其归类为 *Halomicrobium mukohataei*^[14]。根据 Ar、Br、Cr 和 Dr 之间结构功能相似性,现已将这些直系同源物统称为 Br^[9]。

根据嗜盐菌分类标准^[15],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 rDNA 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 rDNA 构建的系统发育树上看(图 2),菌株 AB1 与 *Ntc. occultus* 和 *Ntc. amylyticus* 分在同一类群中,序列同源性分别为 94.62%和 95.44%,与其余菌株序列同源性低于 93%。一般认为,16S rDNA 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^[16~18]。因此,从系统发育树和 16S rDNA 序列同源性角度分析,菌株 AB1 是 *Na-tronococcus* 属下一个新成员。

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 *Har. argentinensis* 和 *Har. 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(表 2)。但菌株 AB1 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%,而与其余菌株的 Br 蛋白部分序列相似性都低于 60%,说明菌株 AB1 中发现的蛋白是一个新型的 Br 蛋白。菌株 AB1 和参比菌株 *Halobacterium halobi-*

um R1M1 的 Br CG 片段有类似的亲水性图谱(图 4),也表明 AB1 中发现的蛋白质结构上与已报道的 Br 蛋白类似,具有跨膜的 α -螺旋结构。

将各菌株的 Br 蛋白 C-G 片段相互比较后可以发现(图 5),结合视黄醛的氨基酸残基,除了 M145 外都绝对保守,说明了这些氨基酸残基对于维持 Br 蛋白结构稳定的重要性。在不同的 Br 蛋白中,结合视黄醛 C18 原子的 Met 只被 Leu 或 Phe 替换。Br 的人工突变体 M145F(Met145 被替换为 Phe)研究表明,改变 Met145 影响了暗适应状态视黄醛异构体的组成,造成全-反式视黄醛明显多于 13-顺式视黄醛,形成最大吸收峰 10nm 的蓝移,但对光适应时视黄醛异构体组成和 Br 泵质子的功能没有影响^[19]。

同结合视黄醛的氨基酸残基保守性相似,Br 蛋白内与质子通道相关的氨基酸残基也非常保守(图 5)。例如,L 态传递质子的 D212,M 态释放质子到胞内侧的 E204,以及 O 态从胞外侧吸收质子的 D96 都绝对保守,改变这些氨基酸残基将会改变 Br 的功能,甚至还会引起功能的丧失^[20,21]。在各菌株的 Br 蛋白中,E166 替换为 D166 的现象非常普遍,这个位置上两者数量上各占 50%,这与 Glu 和 Asp 的化学结构、电荷及分子大小相似有关。而 T170 发生改变只有菌株 AB1 和 *Hb. sp. arg-4*。通过对突变体 T170C 的研究表明^[22],Thr 是通过氨基酸构象的改变调节 D96 的 pKa,从而影响质子传递。在菌株 AB1 的 Br 蛋白中,Leu 代替了 Thr,这两个氨基酸残基在化学结构上有一定的差异,菌株 AB1 中的 Br 蛋白是研究 T170 在质子传递中作用的好材料。

相对螺旋内氨基酸残基的保守,各菌株 Br 蛋白内连接两个螺旋之间的氨基酸残基变化比较大(图 5)。其中有 6 个菌株的 Br 蛋白螺旋 D 和螺旋 E 之间,插入了 6 个类似的氨基酸残基,菌株 AB1 和 *Hb. sp. arg-4* 的 Br 蛋白在螺旋 F 和螺旋 G 之间都插入了一个 T。由此可见,螺旋内氨基酸保守性大于螺旋间,这与螺旋内氨基酸更多的参与质子传递,维持蛋白质结构有关;位于紫膜外侧的序列比位于紫膜内侧的序列插入现象更为普遍,这与紫膜外侧序列面对环境较为恶劣有关。

通过对菌株的系统发育学研究,可以确定菌株的分类学地位,并在此基础上,设计引物,测定 Br 蛋白 C-G 片段序列,这已成为一种快速筛选具有新 Br

蛋白的新嗜盐古生菌的方法。

参考文献(References):

- [1] Stoeckenius W. Bacterial rhodopsins: Evolution of a mechanistic model for the ion pumps. *Protein Science*, 1999, 8: 447~459.
- [2] Brown L S. Proton transport mechanism of bacteriorhodopsin as revealed by site-specific mutagenesis and protein sequence variability. *Biochemistry*, 2001, 66(11): 1546~1554.
- [3] LI Lin, WU Min, QIAO Shou-Yi, CHEN Kang-Sheng. Cloning and expression of the bacteriorhodopsin gene. *Journal of Zhejiang University (Engineering Science)*, 2001, 35(3): 324~327.
李 凌, 吴 敏, 乔守怡, 陈抗生. *br* 基因的克隆及表达. *浙江大学学报(工学版)*, 2001, 35(3): 324~327.
- [4] Gupta R, Lanter J M, Woese C R. Sequence of the ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an archaeobacterium. *Science*, 1983, 221: 656~659.
- [5] Arahall D R, Dewhirst F E, Paster B J, Volcani B E, Ventosa A. 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.
- [6] Ohtsuka J, Urabe Y, Tomioka H, Sasabe H. The primary structures of helices A to G of three new bacteriorhodopsin-like retinal proteins. *J Gen Microbiol*, 1992, 138: 2389~2396.
- [7] Kyte J, Doolittle R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982, 157: 105~132.
- [8] Ihara K, Umemura T, Katagiri I, Kitajima-Ihara K, Sugiyama Y, Kimura Y, Mukohata Y. Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation. *J Mol Biol*, 1999, 285(1): 163~174.
- [9] Mukohata Y, Ihara K, Tamura T, Sugiyama Y. Halobacterial rhodopsin. *J Biochem*, 1999, 125: 649~657.
- [10] WANG Hui, ZHAN Shu-xuan, SUN Qing-an, XU De-qiang, ZHAO Wei, HUANG Wei-da, LI Qing-guo. Primary structure of helix C to helix of a new retinal protein in *H. sp. xz515*. *Chin Sci Bull*, 2000, 45(12): 1108~1112.
- [11] Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol*, 1990, 213: 899~929.
- [12] Asker D, Ohta Y. *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria(Egypt). *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52: 729~738.
- [13] Ihara K, Watanabe S, Tamura T. *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., two new extremely halophilic archaea collected in Argentina. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1997, 47: 73~77.
- [14] Oren A, Elevi R, Watanabe S, Ihara K, Corcelli A. *Halomicrobium mukohataei* gen. nov., comb. nov., and emended description of *Halomicrobium mukohataei*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52: 1831~1835.
- [15] Oren A, Ventosa A, Grant W D. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47: 233~238.
- [16] WANG Zhen-Xiong, XU Yi, ZHOU Pei-Jin. Taxonomy of a new species of haloalkalophilic Archaron. *Acta Microbiol Sinica*, 2000, 40(2): 115~120.
王振雄, 徐 毅, 周培瑾. 嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究. *微生物学报*, 2000, 40(2): 115~120.
- [17] Devereux R, He S H, Doyle C L, Orkland S, Stahl D A, Legall J, Whitman W B. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol*, 1990, 172(7): 3609~3619.
- [18] Stackebrandt E, Goebel B M. 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.
- [19] Ihara K, Amemiya T, Miyashita Y, Mukohata Y. Met-145 is a key residue in the dark-adaptation of bacteriorhodopsin homologs. *Biophys J*, 1994, 67: 1187~1191.
- [20] Luecke H, Schobert B, Richter H T, Cartailler J P, Lanyi J K. Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution. *Science*, 1999, 286(8): 255~260.
- [21] Luecke H. Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1460: 133~156.
- [22] Brown L S, Varo R, Needleman J K, Lanyi J K. Functional significance of a protein conformation change at the cytoplasmic end of helix F during the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys J*, 1995, 69(5): 2103~2111.