

嗜盐菌 AB3 中细菌视紫红质和系统发育研究

俞晓伟¹, 迪丽拜尔·托乎提², 吴月红¹, 吴敏¹

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

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,分离纯化得到极端嗜盐古生菌 AB3. 采用聚合酶链式反应(PCR)方法对其编码螺旋 C 至螺旋 G 的蛋白基因片断和 16S rRNA 基因进行了扩增,并测定了基因的核苷酸序列. 翻译出的氨基酸序列与已报道的相应片断进行对比,AB3 中的螺旋 C 至螺旋 G 蛋白与其他菌株差异显著. 基于 BR 蛋白和 16S rDNA 序列的同源性比较以及系统发育学研究表明,AB3 是 *Natrinema* 属中的新成员. 菌株 AB3 的 16S rDNA 序列已被 GenBank 数据库收录,其序列号为 A Y277583.

关键词: 嗜盐古生菌;细菌视紫红质;16S rDNA;系统发育

中图分类号: Q78;Q93

文献标识码: A

文章编号: 1008-973X(2005)03-418-05

Bacteriorhodopsin gene and phylogenetic analysis on halophilic archaea AB3

YU Xiao-wei¹, DILBAR Tohty², WU Yue-hong¹, WU Min¹

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

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

Abstract: In order to study and analyze the species and bacteriorhodopsin (BR) protein resource, a strain of extremely halophilic archaea AB3 was isolated. Partial DNA fragments encoding a BR protein from helix C to helix G and a 16S rRNA encoding gene (16S rDNA) from AB3 were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and their DNA sequences were determined. The results indicate that compared to the deduced amino acid sequences of other existing BRs, BR protein from helix C to helix G of AB3 is obviously different. The results of homology analysis on BR gene and 16S rDNA and phylogenetic analysis on 16S rDNA show that the strain AB3 is a new member of genus *Natrinema*. The GenBank accession number of the 16S rDNA sequences of strain AB3 is A Y277583, and the research establishes a convenient and rapid method for screening a new halophilic archaeum for a new BR protein.

Key words: halophilic archaea; bacteriorhodopsin; 16S rDNA; phylogenesis

细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)是嗜盐古生菌紫膜上的唯一蛋白质,也是目前嗜盐古生菌研究中的热点蛋白.从 *Halobacterium halobium* 分离的 BR 蛋白是由 248 个氨基酸组成,分子量约为 26 kD,第 216 位的赖氨酸通过希夫碱基和生色团视黄醛分子相连,并以 7 次螺旋(A~G)跨膜定位于其质膜上.由于 BR 是一个简单的膜蛋白,以此作为模型,对它的深入研究,有助于阐明细胞膜信号传导

途径中膜蛋白受体的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的离子通道蛋白结构功能的研究起到指导性作用;BR 的光电响应和光致变色特性使其在太阳能电池、人工视网膜、光信息存储、神经网络、生物芯片等应用领域有着广阔的前景.

从新疆北部艾比湖中分离纯化得到耐盐范围为 20%~25% 的嗜盐古生菌 AB3,扩增了菌株 AB3 的

BR 蛋白螺旋 C 至螺旋 G 的基因保守片断和 16S rRNA 基因(16S rDNA),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和基于 16S rDNA 序列的系统发育分析。

1 材料和方法

1.1 菌株

菌株 AB3 分离自艾比湖,对照菌株为 *Halobacterium salinarum* R1M1,由复旦大学生命科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,配方为:250 g NaCl、20 g MgSO₄·7H₂O、3 g 柠檬酸钠、2 g KCl、0.2 g CaCl₂、10 g 细菌蛋白胨(L37)、pH 7.0,加蒸馏水至 1 L。固体培养基加琼脂 20 g。

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 7 d。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[1]。

1.4 PCR 扩增

根据 16S rDNA 序列^[2],使用 DNASTAR 软件设计一对引物,正向为 5'-ATTCCGGTTGATCCTGC-3',反向为 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA G-3'。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)反应条件为 50 μL 反应体系 30 个循环;变性:94℃,45 s;退火:50℃,45 s;延伸:72℃,90 s。

按 Otomo 等人^[3]方法设计一对用于扩增螺旋 C 至螺旋 G 的基因片断简并引物,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:50 μL 反应体系 30 个循环;变性:94℃,45 s;退火:55℃,45 s;延伸:72℃,1 min。

1.5 DNA 序列的转化

PCR 产物连接到质粒 pUCm-T 上,转化大肠杆菌(*E. coli*)DH5,经重组筛选,提取质粒并测序。

1.6 系统发育树的构建

将菌株 AB3 的 16S rDNA 序列与从 GenBank 数据库中获得的嗜盐菌 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 DNA dist 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 1 000。

1.7 数据库序列号

菌株 AB3 的 BR 蛋白部分序列和 16S rDNA 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 AY279549 和 AY277583。其他相关菌株的数据库序列号如表 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

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

物 种 类 别	BR ¹⁾	16S rDNA ²⁾
<i>Haloarcula argentinensis</i>	D31880	D50849
<i>japonica</i>	AB029320	D28872(p) ³⁾
<i>vallismortis</i>	D31882	U17593
<i>Halomicrobium mukohataei</i>	S76743	D50850
<i>Halobacterium salinarum</i>	M11720	M38280
<i>Halorubrum sodomense</i>	D50848	X82169
sp. aus ⁻ 1	J05165	D32081
sp. aus ⁻ 2	S56354	D32082
sp. SGI	X70291	ND ³⁾
<i>Haloterrigena</i> sp. arg ⁻ 4	AB009620	AB009624
<i>Natrinema pallidum</i>	ND ³⁾	AJ002948
<i>pellirubrum</i>	ND ³⁾	AJ002947
<i>versiforme</i>	ND ³⁾	AB023426(p) ³⁾
Miscellaneous strain Mex	D11056(p) ³⁾	ND ³⁾
strain Port	D11057(p) ³⁾	ND ³⁾
strain Shark	D11058(p) ³⁾	ND ³⁾
strain XZ515	AF306937	ND ³⁾

注: (1) GenBank 数据库中 BR 序列登陆号。

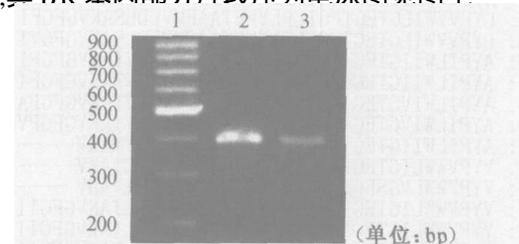
(2) GenBank 数据库中 16S rDNA 序列登陆号。

(3) ND: 未测定; (p): 部分序列。

2 实验结果

2.1 嗜盐古生菌 AB3 的 BR 基因部分片断序列

用一对简并引物扩增菌株 AB3,得到 395 个碱基,其 BR 基因部分片段序列电泳图见图 1。



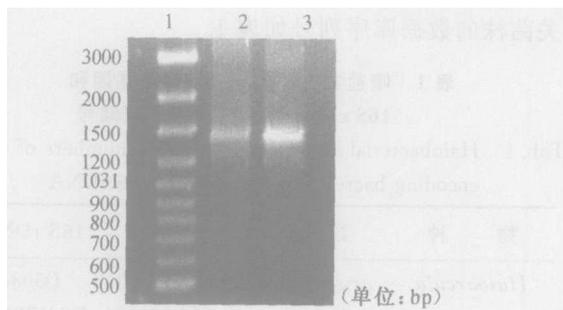
1—DNA Marker; 2—参比菌株 R1M1; 3—AB3

图 1 菌株 AB3 BR 蛋白基因部分序列 PCR 产物扩增图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of AB3 partial BR gene

2.2 嗜盐古生菌 AB3 的 16S rDNA 序列

用一对引物扩增菌株 AB3,得到 1 470 个碱基,其 16S rDNA 序列电泳图见图 2. 测序结果表明 AB3 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,见图 5.



1—DNA Marker; 2—参比菌株 R1M1; 3—AB3

图 2 菌株 AB3 16S rDNA 序列 PCR 产物扩增图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of AB3 16S rDNA

2.3 嗜盐古生菌 BR 蛋白序列比较

图 3 为嗜盐古生菌 AB3 与其他不同菌株 BR

的序列的比较,AB3 中的 BR 蛋白与已报道的蛋白质有明显差别. 序列上方的横线为根据 *Hbt. salinarum* BR 蛋白质高级结构^[4]推测的跨膜螺旋;E 和 C 分别为膜外侧和膜内侧;P 为与质子通道相关的氨基酸残基;R 为与视黄醛结合相关的氨基酸残基;B 为和质子通道及视黄醛结合都相关氨基酸残基.

图 4 显示亲水指数与氨基酸序列间的关系,根据 Kyte 等人^[5]方法用 9 个残基作为区间计算.

2.4 嗜盐古生菌 16S rDNA 序列同源性比较及系统发育

表 2 为各菌株 16S rDNA 序列同源性差异分析. 所构建的嗜盐古生菌系统发育树图 5 是采用邻接法构建,其中 *Archaeoglobus fulgidus* 为外类群,结点上的数值代表 1 000 次重复的自展值,底部的线段表示每个碱基发生 0.1 次替代. 从树上可以看到,以 *Archaeoglobus fulgidus* 作为外种群,此系统发育亚树基本分成 A、B 和 C 个分枝,菌株 AB3 与 *Nnm. pallidum*、*Nnm. pellirubrum* 和 *Nnm. versiforme* 同分在一个分枝中.

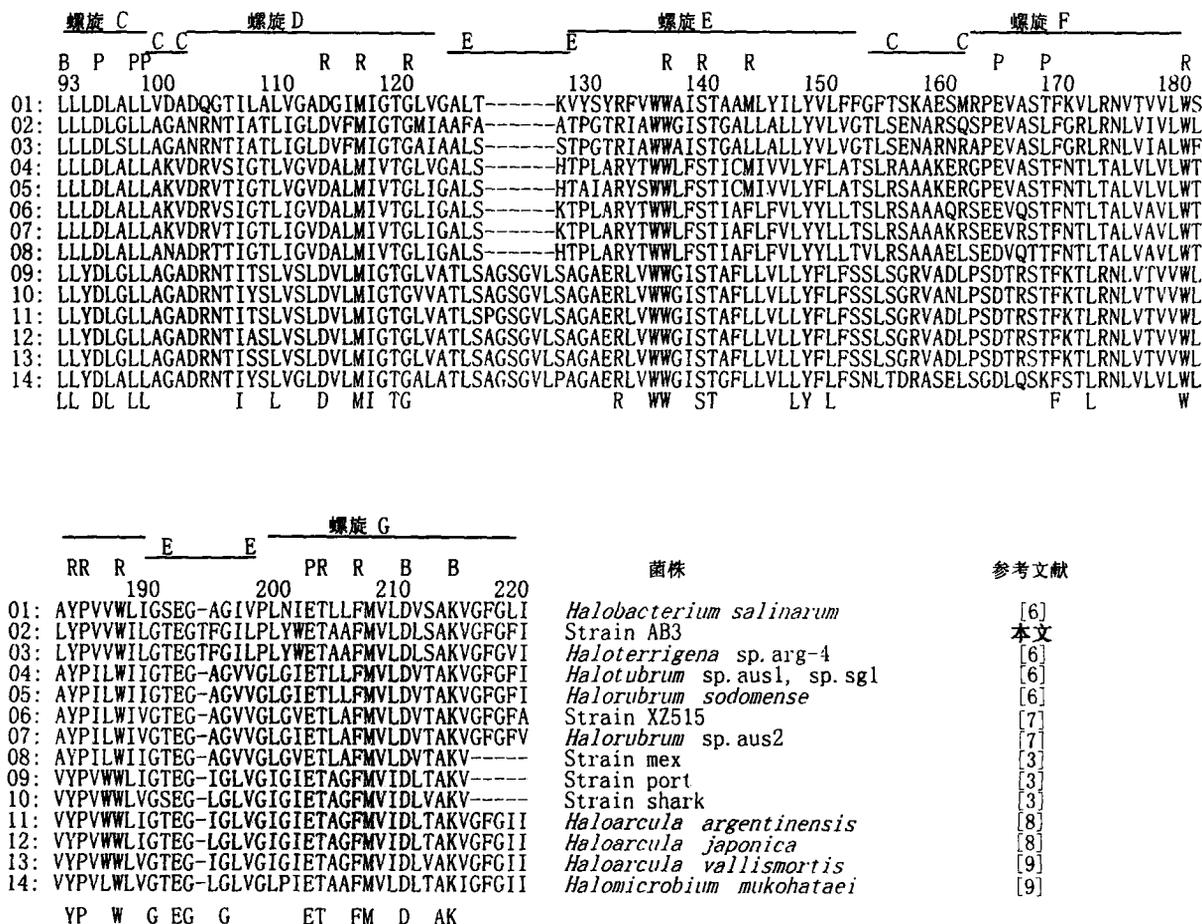


图 3 BR 蛋白自螺旋 C 至螺旋 G 的氨基酸排列比较

Fig.3 Alignment of known BR sequences from various halophilic archaea

表 2 16S rDNA 序列同源性比较

Tab.2 Homology indices between 16S rDNA sequences

菌 株	序列相似度 / %												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>Natrinema pallidum</i>	—	97	97	94	92	87	85	85	76	83	85	85	85
2 <i>Natrinema pellirubrum</i>	—	—	96	94	91	86	84	84	75	82	84	84	84
3 AB3	—	—	—	95	93	88	86	87	78	84	86	86	86
4 <i>Natrinema versiforme</i>	—	—	—	—	92	87	84	84	77	83	84	84	84
5 <i>Haloterrigena</i> sp. arg ⁻ 4	—	—	—	—	—	87	85	85	77	84	84	85	84
6 <i>Halobacterium salinarum</i>	—	—	—	—	—	—	87	87	78	86	86	86	86
7 <i>Haloarcula argentinensis</i>	—	—	—	—	—	—	—	98	84	90	86	86	85
8 <i>Haloarcula vallismortis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	84	89	85	85	84
9 <i>Haloarcula japonica</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	79	76	76	75
10 <i>Halomicrobium mukohataei</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	86	87	85
11 <i>Halorubrum</i> sp. aus ⁻ 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	98	98
12 <i>Halorubrum</i> sp. aus ⁻ 2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	97
13 <i>Halorubrum sodomense</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

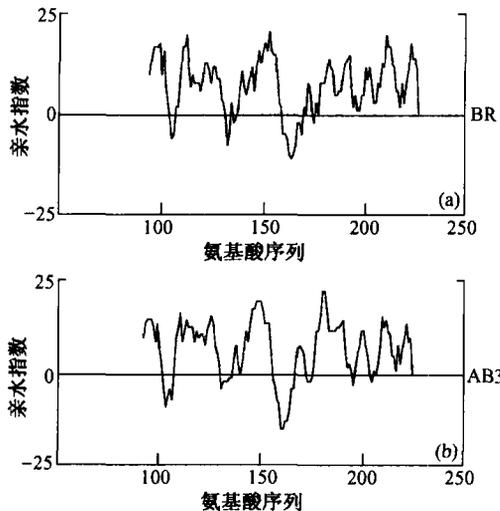


图 4 菌株 R1M1 和 AB3 中 BR 蛋白自氨基酸 93 ~ 223 计算得的亲水指数

Fig. 4 Hydropathic profile from amino acid residue 93 to 223 of *Hbt. salinarum* R1M1 BR and AB3 BR

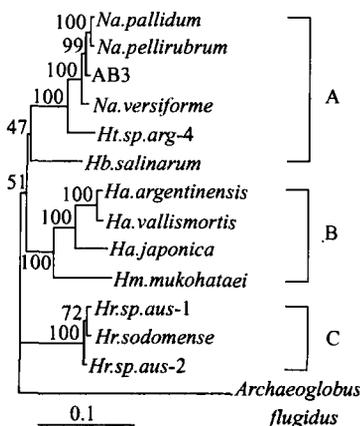


图 5 根据 16S rDNA 序列构建的极端嗜盐菌系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of 16S rDNA from halobacterial strains

3 讨论

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 94% 以上. 但菌株 AB3 的 BR 蛋白 CG 片段与已报道的 BR 蛋白相应序列差异明显, 见图 3, AB3 与 *Htg. 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 AB3 中发现的蛋白是一个新型的 BR 蛋白. 菌株 AB3 和参比菌株 *Hbt. salinarum* R1M1 的 BR CG 片段有非常类似的亲水性图谱, 见图 4, 也表明 AB3 中发现的蛋白结构上与已报道的 BR 蛋白类似.

根据嗜盐菌分类标准^[10], 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, 菌株 AB3 与 *Nnm. pallidum*、*Nnm. pellirubrum* 和 *Nnm. versiforme* 分在同一类群中, 序列同源性分别为 97%、96% 和 95%, 而其他序列同源性低于 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^[11]. 因此, 从系统发育树和 16S rDNA 序列同源性角度分析, 菌株 AB3 是 *Natrinema* 属下的一个新成员.

4 结 语

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、光电转换器核光敏材料,有着广阔的运用前景.对 38 株难盐菌的分离以及典型菌株 AB3 的分类学研究结果表明:新疆的阿尔金山地区盐湖含有丰富的嗜盐菌物种资源和特定的 BR 蛋白基因资源.下一步的研究工作是将已获得的 BR 蛋白序列作为探针,杂交分子文库,获得野外分离菌株的 BR 蛋白全序列,并应用到光子开关的研究上.

参考文献(References):

- [1] 李凌,吴敏,乔守怡,等. BR 基因的克隆和表达[J]. 浙江大学学报:工学版,2001,35(3):324-327.
LI Lin, WU Min, QIAO Shouyi, et al. Cloning and expression of the bacteriorhodopsin gene [J]. *Journal of Zhejiang University: Engineering Science*, 2001, 35(3): 324-327.
- [2] ARAHAL D R, DEWHIRST F E, PASTER B J, et al. Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62(10): 3779-3786.
- [3] OTMAO J, URABE Y, TOMIOKA H, et al. The primary structures of helices A to G of three new bacteriorhodopsin-like retinal proteins [J]. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138: 2389-2386.
- [4] HENDERSON R, BALDWIN J M, CESKA T A. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution electron cryo-microscopy [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 213: 899-929.
- [5] KYTE J, DOOLITTLE R. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157: 105-132.
- [6] IHARA K, UMEMURA T, KATAGIRI I, et al. Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 285(1): 163-174.
- [7] WANG H, ZHAN S X, SUN Q A, et al. Primary structure of helix C to helix G of a new retinal protein in *H. sp. xz515* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(12): 1108-1112.
- [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 [J]. *Extremophiles*, 2000, 4(2): 109-114.
- [9] KITAJIMA T, HIRAYAMA J, IHARA K, et al. Novel bacterial rhodopsins from *Haloarcula vallismortis* [J]. *Biochemistry and Biophysics Research Communication*, 1996, 220(2): 341-345.
- [10] OREN A, VENTOSA A, GRANT W D. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order halobacteriales [J]. *International Journal of System Bacteriology*, 1997, 47: 233-238.
- [11] 王振雄,徐毅,周培瑾.嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究[J].微生物学报,2000,40(2),115-120.
WANG Zhen-xiong, XU Yi, ZHOU Pei-jin. Taxonomy of a new species of halobacterial archaeon [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(2): 115-120.

下期论文摘要预登

多跳频信号的盲分离与参数盲估计

张朝阳,曹千芊,陈文正

(浙江大学 信息与电子工程学系,浙江 杭州 310027)

摘 要: 针对接收到的多个未知任何先验参数的跳频信号,提出一种先分离各个信号再对其分别进行时频分析来估计跳频参数的方法.首先采用特征矩阵联合近似最优化(JADE)算法分离跳频信号,再利用多窗口重叠的平滑伪 Wigner-Ville 分布(SPWVD)来估计出跳频信号的跳周期、定时偏差和跳频频率(跳频图案)等参数.通过将多个时频分析的窗口重叠来克服时频分析中交叉项的影响.仿真结果表明,该估计算法显著提高了估计的准确度和可靠性.

关键词: 盲分离;盲估计;跳频;特征矩阵联合近似最优化;平滑伪 Wigner-Ville 分布