

DOI: 10.1360/yc-007-0376

## 嗜盐古生菌 *br* 基因的遗传分析

徐晓红<sup>1</sup>, 吴敏<sup>2</sup>, 张会斌<sup>3</sup>, 刘志虎<sup>3</sup>

1. 浙江大学宁波理工学院, 宁波 315100;
2. 浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310027;
3. 阿尔金山国家自然保护区管理处, 库尔勒 841000

**摘要:** 从新疆阿尔金山地区阿乌拉仔盐湖分离纯化到几株极端嗜盐古生菌 AJ11, AJ12 和 AJ13, 采用 PCR 技术分别扩增了其 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, 测定了基因的核苷酸序列。基于 16S rDNA 序列的同源性比较以及系统发育学研究表明, 分离到的菌株是 *Natrinema* 属中成员, 并构成一个独立的微生物种群。随后的遗传分析, 包括 GC 含量、转换与颠换的比率、同义突变率分析, 表明 *br* 基因间具有较高的遗传分歧程度, 并面临着净化选择和偏倚突变压的双重抑制。研究为物种资源及 BR 蛋白资源的进一步利用打下基础。

**关键词:** 嗜盐古生菌; 16S rDNA; 系统发育; 细菌视紫红质; 遗传分析

## Genetic analysis of the *br* gene in halophilic archaea isolated from Xinjiang region

XU Xiao-Hong<sup>1</sup>, WU Min<sup>2</sup>, Zhang Hui-Bin<sup>3</sup>, LIU Zhi-Hu<sup>3</sup>

1. Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315100, China;
2. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;
3. The Altun Mountain National Nature Reserve, Kuerle 841000, China

**Abstract:** Some novel members of extremely halophilic Archaea, strain AJ11, AJ12 and AJ13, were isolated from Aularz Lake located in Altun Mountain National Nature Reserve of Xinjiang Uygur Autonomous Region in China. Partial DNA fragments encoding a bacteriorhodopsin (BR) as well as for 16S rRNA of isolated strains were amplified by PCR and their DNA sequences were determined subsequently. On the basis of homology and phylogenetic analysis about 16S rDNA, it was considered that the isolated strains formed a microbiological population are the members of genus *Natrinema*. The results of genetic analysis, such as GC content, transition/transversion (Ti/Tv) rate ratios, synonymous substitution rates (*K*s), indicated that the *br* fragments with high level of genetic divergence are faced with both purifying selection and bias mutation pressure. The study provides the base for using of species and BR proteins resources.

**Keywords:** halophilic archaea; 16S rDNA; phylogeny; bacteriorhodopsin; genetic analysis

极端嗜盐古生菌是一类属于嗜盐菌科, 存在于古细菌<sup>[1]</sup>。我国西部地区存在大量天然的盐湖, 蕴藏着丰富的极端嗜盐古生菌物种资源。但由于地理高盐域——死海、大盐湖及其他天然或人工盐碱湖

收稿日期: 2006-10-24; 修回日期: 2006-11-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30370029)和浙江大学宁波理工学院科研启动基金资助项目(编号: 1140257G413)[Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30370029) and Scientific Research Start-up Foundation of Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University (No. 1140257G413)]

作者简介: 徐晓红(1978—), 女, 硕士, 专业方向: 微生物分子遗传。Tel: 0574-81142676; E-mail: xxh@nit.zju.edu.cn

通讯作者: 吴敏(1958—), 男, 教授, 研究方向: 分子遗传。Tel: 0571-88206261; E-mail: wumin@cls.zju.edu.cn

位置独特、气候条件恶劣,许多盐湖资源尤其是阿尔金山地区的盐湖资源缺少必要的研究。细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)是一类视黄醛结合蛋白,它以 7 次跨膜定位于一些嗜盐古生菌的质膜上,实现泵质子的功能<sup>[2-4]</sup>。尽管 *br* 作为一个重要的功能基因,具有广泛的理论价值和应用前景,但缺少对其分子遗传分析方面的研究<sup>[5,6]</sup>。

我们在新疆阿尔金山国家自然保护区盐湖中分离纯化到几株极端嗜盐古生菌,扩增了其 BR 蛋白螺旋 C 至螺旋 G 的基因保守片段和 16S rDNA 序列,进行了系统发育及遗传分析研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株及培养基

菌株 AJ11、AJ12 和 AJ13 分离自阿尔金山地区阿乌拉仔盐湖的水样,对照菌株为 *Halobacterium salinarium* (*halobium*) R1M1,由复旦大学生命科学学院李庆国教授惠赠。菌株分离和培养采用富集培养基<sup>[7]</sup>: 250 g NaCl, 20 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3 g Na<sub>3</sub>-citrate, 2 g KCl, 0.2 g CaCl<sub>2</sub>, 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。

### 1.2 基因组总 DNA 的提取

DNA 提取方法参见文献[8]并做修正如下: 细胞采用反复冻融破碎并加蛋白酶 K 消化, DNA 用等量酚: 氯仿抽提后, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇沉淀, 离心、冻干、使用前溶解, 并用分光光度法测定 DNA 浓度。

### 1.3 16S rDNA 序列 PCR 扩增

按 Gupta<sup>[9]</sup>方法设计一对扩增 16 S rDNA 序列的引物, 正向引物 rDNA22F 为 5'-ATTCCGGTTGATCCTGC-3', 反向引物 rDNA1521R 为 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGAC-3'。PCR 反应条件为 100 μL 反应体系 25 个循环; 变性: 94 °C, 1 min; 复性: 50 °C, 1 min; 延伸: 72 °C, 2 min。

### 1.4 DNA 序列的转化

PCR 产物经 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(Sangon)纯化后, 连接到质粒 pUCm-T 上, 转化大肠杆菌 DH5α, 在含氨苄霉素(Amp<sup>r</sup>)的 LB 平板生长过夜, 挑选白斑, PCR 验证后, 随机取 3 个阳性克隆测序。DNA 序列采用双脱氧法和 ABI Prism 377XL 测序仪, 经 M13 通用引物双向测定获得。

### 1.5 系统发育树的构建

菌株 AJ11、AJ12 和 AJ13 的 16S rDNA 序列与从 GenBank 数据库中获得的嗜盐菌 16S rDNA 序列采用 ClustalW 1.8 软件包进行多序列匹配排列, 并进行手工修正<sup>[10]</sup>。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, 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 1,000。

### 1.6 *br* 基因的确证及遗传分析

根据 BR 蛋白保守序列 PLLLLDL 和 KVGFGFI<sup>[11]</sup> 设计一对用于扩增自螺旋 C 至螺旋 G 的基因片段的简并引物, 正向引物为 *br* 331F 5'-CCGCTG(CT)TG(CT)TG(CT)T(AC)GACCTCG-3'。反向引物为 *br* 686R 5'-AGGATGA(GA)(CG)CCGAA(CG)CCGACCTT-3', 菌株 *Hbt.salinarium* 的 *br* 基因做为参考位点。PCR 反应条件为: 100 μL 反应体系 25 个循环; 变性: 94 °C, 1 min; 复性: 60 °C, 1 min; 延伸: 72 °C, 1 min。PCR 产物通过 4.0%的琼脂糖电泳分离确定目的片段, 经克隆后测序。GC 含量及转换与颠换比率采用 Mega 2.1 软件及部分手工计算获得, 同义替换率和非同义替换率经 K-estimated 软件<sup>[12]</sup>计算获得。

## 2 结果

### 2.1 基于 16S rDNA 序列的系统发育分析

用一对引物扩增菌株 AJ11、AJ12 和 AJ13 的 16SrDNA 序列, 分别得到 1,474、1,473 和 1,473 个碱基, 其 GenBank 序列号分别为: AY570916、AY570917 和 AY570918。基于 16S rDNA 序列构建的嗜盐古生菌系统发育树见图 1。系统发育树采用邻接法构建, 其中 *Archaeoglobus flugidus* 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 0.1 Knu(每个碱基发生 0.1 次替代)。菌株名称边上列举了其 GenBank 序列号。从系统发育树上可以看到, 分离的菌株与 *Natrinema* 属下已知的 3 个菌株<sup>[13,14]</sup>分在同一分支中。表 1 给出了分离菌株与 *Natrinema* 属下菌株及其余部分菌株之间的 16S rDNA 序列相似性。

### 2.2 PCR 检测 *br* 基因

菌株 AJ11、AJ12 和 AJ13 的 *br* 基因部分序列经测定, 其片段大小都为 401 bp, GenBank 的序列号分

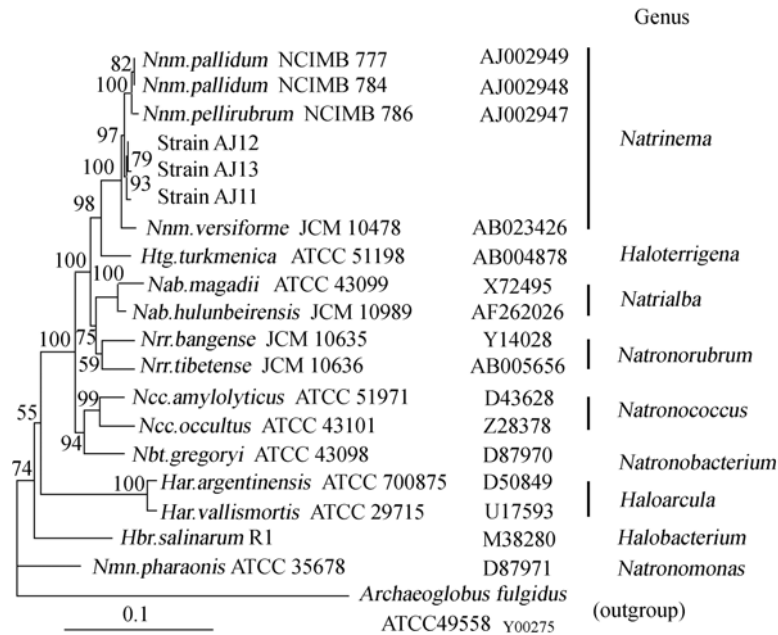


图 1 根据 16Sr DNA 序列构建的极端嗜盐菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of extremophilic halophilic archaea on the basis of 16S rDNA sequences

表 1 极端嗜盐菌各菌株 16S rDNA 序列相似性(%)

Table 1 Similarity of 16S rDNA sequence of extremophilic halophilic archaea strains(%)

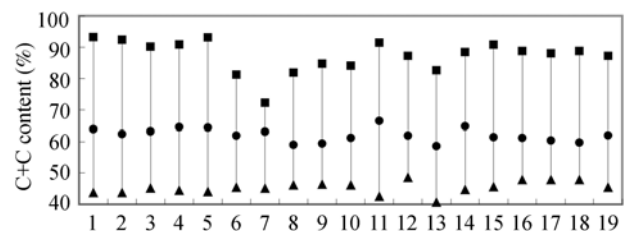
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>Nnm.pallidum</i> NCIMB 777	-	-	-	-	-	-	-	-
2. <i>Nnm.pallidum</i> NCIMB 784	98.7	-	-	-	-	-	-	-
3. <i>Nnm.pellirubrum</i>	98.0	97.7	-	-	-	-	-	-
4. <i>Nnm.versiforme</i>	96.8	96.8	96.4	-	-	-	-	-
5.Strain AJ11	97.7	97.8	97.3	98.1	-	-	-	-
6.Strain AJ12	97.9	98.0	97.6	98.5	99.7	-	-	-
7.Strain AJ13	97.3	97.7	97.3	98.2	99.5	99.7	-	-
8. <i>Htg.turkmenia</i>	94.5	94.7	94.3	95.6	96.1	96.4	96.0	-
9. <i>Hbr.salinarum</i>	87.7	87.8	87.5	89.3	89.3	89.3	89.1	88.1

别为: AY570919、AY570920 和 AY570921。尽管分离菌株 *br* 基因片段之间的核苷酸存在差异, 氨基酸残基却完全相同。比较不同菌株 BR 蛋白序列发现, 菌株 AJ11 与 *arg-4* 之间的氨基酸残基存在 97% 的一致, 而与其他已报道菌株之间的氨基酸同源性不到 60%。这个结果表明 PCR 方法获取的核苷酸片段是编码 BR 蛋白 C 螺旋到 G 螺旋的序列。

### 2.3 *br* 基因片段遗传分析

根据已报道的所有 *br* 基因 C 螺旋到 G 螺旋间的片段, 计算和描绘了其密码子不同位点的 GC 含量(图 2)。发现所有 *br* 片段都富含 GC, 其值从 60.1% 到 67.9% 不等, 平均值为 64.6%; 密码子第 3 位平均 GC 含量达 90%, 明显高于密码子第一位的 GC 含量; 而密码子第一位的 GC 含量明显高于第二位的。结

果表明, *br* 基因面临强大的进化压力。

图 2 *br* 基因片段不同密码子位点的 GC 含量

●: 密码子第一位; ▲: 密码子第二位; ■: 密码子第三位。

Fig. 2 GC content of different codons in *br* gene segments

●: 1st Codon; ▲: 2nd Codon; ■: 3 rd Codon.

菌株名称及参考文献 Strains and references:

1: *Hrr.sp.aus-1*<sup>[16]</sup>; 2, 12: *Hrr.sodomense*, *Htg.sp.arg-4*<sup>[5]</sup>; 3: *Hrr.sp.aus-2*<sup>[17]</sup>; 4: XZ515<sup>[18]</sup>; 5, 7, 9:mex, shark, port<sup>[11]</sup>; 6: *Har.vallismortis*<sup>[19]</sup>; 8: *Har.argentinensis*<sup>[20]</sup>; 10: *Har.japonica*<sup>[21]</sup>; 11: *Har.mukohataei*<sup>[22]</sup>; 13: *Hbr.salinarum*<sup>[23]</sup>; 14: *Har.sp.AJ4*<sup>[24]</sup>; 15: *Nnm.sp.AB3*<sup>[25]</sup>; 16-18: AJ11, AJ12, AJ13; 19: The average.

不同 *br* 基因片段的转换与颠换比率平均值为 0.57, 表明存在较低水平的转换与颠换偏好。目前在嗜盐菌科 4 个属中发现具有光驱动质子泵功能的蛋白, 根据来源, 可以将 BR 蛋白细分为: 来自 *Halorubrum* 属的古视紫红质(archaerhodopsin, aR); 来自 *Halobacterium* 属的 bR; 来自 *Haloarcula* 属的十字视紫红质(cruixrhodopsin, cR) 和来自 *Haloterrigena* 属的德耳塔视紫红质(deltarhodopsin, dR)<sup>[6,15]</sup>。采用 Kimura 双参数法分别计算不同类别 *br* 基因编码区域的同义替代率(*Ks*)和非同义替代率(*Ka*)(表 2), 结果表明 *br* 基因存在高水平的遗传分化。

表 2 不同类别 *br* 基因片段间的非同义替代率(*Ka*)、同义替代率(*Ks*)及它们之间的比值

Table 2 Nonsynonymous substitution rates (*Ka*), Synonymous substitution rates (*Ks*) and the ratio between them in different kind of *br* gene segments

	AJ11 <i>br</i> vs. <i>ar</i>	AJ11 <i>br</i> vs. <i>br</i>	AJ11 <i>br</i> vs. <i>cr</i>	AJ11 <i>br</i> vs. <i>dr</i>
<i>Ka</i>	0.387	0.408	0.459	0.018
<i>Ks</i>	1.148	0.854	0.830	0.193
<i>Ka/Ks</i>	0.337	0.478	0.553	0.093

### 3 讨论

基于 16S rDNA 序列的系统发育树上, 菌株 AJ11、AJ12 和 AJ13 构成同一分支, 并且序列同源性高于 99.5%, 表明分离自阿乌拉拉仔盐湖的嗜盐古生菌组成了一个微生物类群。在系统发育树上, 分离菌株与 *Natrinema* 属下已发现的物种构成一个分支, 该分支结点具有较高的自展值(97%), 表明分离菌株属于 *Natrinema* 属。新疆地区盐湖蕴涵了大量 *Natrinema* 属的菌株<sup>[25-27]</sup>, 也表明此类型菌株的分布具有一定地域性。

密码子第二位的替代全部是非同义替代, 而 *br* 基因同时是高表达的功能基因, 因此密码子第二位 GC 含量主要受到净化选择的制约, 表现为其值较低。密码子第三位的替代, 大部分是同义替代, 因此 GC 含量主要受到偏倚突变压的制约, 表现为其值较高(90%)。密码子第一位有一小部分是同义的替代, 造成其 GC 含量介于第三位和第二位之间。显然 *br* 基因片段的 GC 含量受到偏倚突变压及净化选择的双重制约。嗜盐古生菌 *Halobacterium* NRC-1 全基因组的 GC 含量为 67.9%<sup>[28,29]</sup>, 这与 *br* 基因片段的 GC 含量类似(平均值为 64.6%)。不同 *br* 基因间的 GC 含量比较类似, 也可推测不仅 *Halobacterium* NRC-1, 其他嗜盐古生菌全基因组也存在 GC 偏好。

通过采用不同嗜盐古生菌的 16S rDNA 序列作

为分子时钟的方法, Ihara 等<sup>[5]</sup>证实 *br* 基因具有长时间的遗传分歧。*br* 基因具有较低的转换与颠换比率符合高水平遗传分化基因存在低的转换与颠换率这个现象<sup>[30]</sup>。比较 AJ11 与其他属菌株之间的 *br* 基因片段, 结果表明密码子第三位的 GC 含量高达 90%, *Ks* 接近 1.0, 同义替换已趋向饱和。*Ks* 值与物种的分歧程度有关, AJ11 与来自 *Halobacterium*、*Haloarcula* 和 *Halorubrum* 属下的菌株比较, 其 *br* 基因片段间具有较大的 *Ks* 值, 说明 AJ11 与这些物种间存在较高遗传分歧程度, 与之相反, AJ11 与 *Htg.sp.arg-4* 的 *br* 基因片段间存在较小的 *Ks* 值, 表明 AJ11 与 *Htg.sp.arg-4* 间存在较低遗传分歧程度。低的 *Ka/Ks* 值说明嗜盐古生菌 *br* 基因的非同义突变位点受到强的选择压力作用。

到目前为止, 已在 5 个不同的属中发现具有 *br* 基因, 分别是: *Halorubrum*, *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloterrigena* 和 *Natrinema*。尽管已分离菌株属于 *Natrinema* 属, 但根据基因的遗传分析表明, 来自于 AJ11、AJ12 和 AJ13 的 *br* 基因应划分为 dR 类而不是重新另为一类。研究为物种资源及 BR 蛋白资源的进一步利用打下基础。

### 参考文献(References):

- [1] Radax C, Gruber C, Stan-Lotter H. Novel haloarchaeal 16S rRNA gene sequences from Alpine Permo-Triassic rock salt. *Extremophiles*, 2001, 5 (4): 221-228.
- [2] Oesterhelt D, Stoekenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature*, 1971, 233 (39): 149-152.
- [3] Luecke H, Schobert B, Richter HT, Cartailler JP, Lanyi JK. Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution. *Science*, 1999, 286(5438): 255-260.
- [4] XU Xiao-Hong, WU Min. Spectral analysis and application of photoelectric characteristics in bacteriorhodopsin. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2004, 31 (5): 570-574.  
徐晓红, 吴敏. BR 蛋白的光谱分析与光电特性应用. 浙江大学学报(理学版), 2004, 31 (5): 570-574.
- [5] Ihara K, Umemura T, Katagiri I, Kitajima-Ihara T, 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.
- [6] XU Xue-Wei, WU Min, RUAN Hong, HUANG Wei-Da, Dilbar Tohty. Sequencing and analysis partial sequence of the gene for a novel Br protein. *Hereditas*(Beijing), 2004, 26(3): 343-348.  
许学伟, 吴敏, 阮红, 黄伟达, 迪丽拜尔·托乎提. 一个新

- 的 Br 蛋白基因部分序列测定及分析. 遗传, 2004, 26(3): 343—348.
- [7] Oesterhelt D, Stoerkenius W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fraction into red and purple membrane. *Methods Enzymol*, 1974, 31: 667—678.
- [8] LI Ling, 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 基因的克隆和表达. 浙江大学学报(工学版), 2001, 35(3): 324—327.
- [9] Gupta R, Lanter JM, Woese CR. Sequence of the ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an archaeobacterium. *Science*, 1983, 221: 656—659.
- [10] XU Xue-Wei, WU Min, HUANG Wei-Da. Isolation and 16S rDNA sequence analysis of extremely halophilic archaea from saline in Altun region. *Journal of Zhejiang University (Engineering Science)*, 2004, 38(4): 508—512.  
许学伟, 吴敏, 黄伟达. 阿尔金山盐湖极端嗜盐古生菌的分离及 16S rDNA 序列分析. 浙江大学学报(工学版), 2004, 38(4): 508—512.
- [11] Otomo 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(11): 2389—2396.
- [12] COMERON JM. K-Estimator: calculation of the number of nucleotide substitutions per site and the confidence intervals. *Bioinformatics*, 1999, 15(9): 763—764.
- [13] McGenity TJ, Gemmell RT, Grant WD. Proposal of a new halobacterial genus *Natrinema* gen.nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom.nov. and *Natrinema pallidum* nom.nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, 48(4): 1187—1196.
- [14] Xin H, Itoh T, Zhou P, Suzuki K, Kamekura M, Nakase T. *Natrinema versiforme* sp.nov., an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(3): 1297—1303.
- [15] Mukohata Y, Ihara K, Tamura T, Sugiyama Y. Halobacterial rhodopsin. *J Biochem*, 1999, 125(4): 649—657.
- [16] Mukohata Y, Sugiyama Y, Ihara K, Yoshida M. An Australian *Halobacteria* contains a novel proton pump retinal protein: archaeorhodopsin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 151(3): 1339—1345.
- [17] Uegaki K, Sugiyama Y, Mukohata Y. Archaeorhodopsin-2, from *Halobacterium* sp. aus-2 further reveals essential amino acid residues for light-driven proton pumps. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 286(1): 107—110.
- [18] WANG H, ZHAN SX, SUN QA, XU DQ, ZHAO W, HUANG WD, LI QG. Primary structure of helix C to helix G of a new retinal protein in H.sp.xz515. *Chin Sci Bull*, 2000, 45(12): 1108—1112.
- [19] Kitajima T, Hirayama J, Ihara K, Sugiyama Y, Kamo N, Mukohata Y. Novel bacterial rhodopsins from *Haloarcula vallismortis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 220(2): 341—345.
- [20] Tateno M, Ihara K, Mukohata Y. The novel ion pump rhodopsins from *Haloarcula* form a family independent from both the bacteriorhodopsin and archaeorhodopsin families/tribes. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 315(1): 127—132.
- [21] Yatsunami R, Kawakami T, Ohtani H, Nakamura S. A novel bacteriorhodopsin-like protein from *Haloarcula japonica* strain TR-1: gene cloning, sequencing, and transcript analysis. *Extremophiles*, 2000, 4(2): 109—114.
- [22] Sugiyama Y, Yamada N, Mukohata Y. The light-driven proton pump, cruxrhodopsin-2 in *Haloarcula* sp. arg-2 (bR<sup>+</sup>, hR<sup>-</sup>), and its coupled ATP formation. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 318(3): 287—292.
- [23] Dunn R, McCoy J, Simsek M, Majumdar A, Chang SH, Rajbhandary UL, Khorana HG. The bacteriorhodopsin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(11): 6744—6748.
- [24] XU Xue-Wei, WU Min, RUAN Hong, HONG Jie, HUANG Wei-Da. Partial Sequence of the gene for a new BR protein, and nucleotide sequence of 16S rRNA encoding gene from a halophilic archaeum AJ4. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 20(1): 55—60.  
许学伟, 吴敏, 阮红, 洪洁, 黄伟达. 嗜盐古生菌 AJ4 中 BR 蛋白基因部分片段和 16S rRNA 基因序列研究. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(1): 55—60.
- [25] YU Xiao-Wei, Dilbar Tohty, WU Yue-Hong, WU Min. Bacteriorhodopsin gene and phylogenetic analysis on halophilic archaea AB3. *Journal of Zhejiang University (Engineering Science)*, 2005, 39(3): 418—422.  
俞晓伟, 迪丽拜尔·托乎提, 吴月红, 吴敏. 嗜盐菌 AB3 中细菌视紫红质和系统发育研究. 浙江大学学报(工学版), 2005, 39(3): 418—422.
- [26] XU Xiao-Hong, WU Min, CAO Yi, WU Yue-Hong. Isolation and phylogenetic analysis of halophilic archaea AJ6. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2005, 32(1): 83—88.  
徐晓红, 吴敏, 曹轶, 吴月红. 嗜盐古生菌 AJ6 的分离及系统发育分析. 浙江大学学报(理学版), 2005, 32(1): 83—88.
- [27] Xu XW, Ren PG, Liu SJ, Wu M, Zhou PJ. *Natrinema altunense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake in Altun Mountain in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55: 1311—1314.
- [28] 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(4): 846—849.
- [29] Ng WV, Kennedy SP, Mahairas GG, Berquist B, Pan M, Shukla HD, Lasky SR, Baliga NS, Thorsson V, Sbrogna J, Swartzell S, Weir D, Hall J, Dahl TA, Welti R, Goo YA, Leithauser B, Keller K, Cruz R, Danson MJ, Hough DW, Maddocks DG, Jablonski PE, Krebs MP, Angevine CM, Dale H, Isenbarger TA, Peck RF, Pohlschroder M, Spudich JL, Jung KW, Alam M, Freitas T, Hou S, Daniels CJ, Dennis PP, Omer AD, Ebhardt H, Lowe TM, Liang P, Riley M, Hood L, DasSarma S. Genome sequence of *Haloarcula* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(22): 12176—12181.
- [30] Yang Z, Yoder AD. Estimation of the transition transversion rate bias and species sampling. *J Mol Evol*, 1999, 48(3): 274—283.