

新疆伊吾湖嗜盐菌 *bop* 基因多样性

古丽巴哈尔·阿巴拜克利^{1,2}, 吴敏^{2*}, 吴月红², 邵娇芳²

(1. 新疆师范大学 生命与环境科学学院生物系, 新疆 乌鲁木齐 830054;

2. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310027)

摘要:为了研究新疆中部地区伊吾湖嗜盐微生物和细菌视蛋白基因(*bop*)资源,分离纯化了 95 株嗜盐和耐盐菌,并从中挑选了 10 株红色的菌株,采用 PCR 和 TA 克隆的方法,扩增出 *bop* 基因螺旋 C 到螺旋 G 的核心序列,测定了基因的核苷酸序列.基于 *bop* 基因序列的同源性比较和系统发育学分析,发现 9 个序列分布在同一分支下,表明伊吾湖嗜盐菌 *bop* 基因具有一定的多样性和明显的自身地域性.

关键词:伊吾湖;嗜盐菌;细菌视蛋白基因;多样性

中图分类号:Q939

文献标识码:A

文章编号:1008-9497(2007)01-080-05

Gulibahaer ·Ababakeli^{1,2}, WU Min², WU Yue-hong², SHAO Jiao-fang² (1. Department of Biology, College of Life Sciences and Environment, Xinjiang Normal University, Wulumuqi 830054, China; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Bop gene diversity of Yiwu Lake in Xinjiang. Journal of Zhejiang University(Science Edition), 2007, 34(1):80~84

Abstract: In order to study the halophiles and bacterio-opsin protein (*bop*) gene resource from Yiwu Lake located in Xinjiang Region, ninety-five halophilic strains were isolated. Ten red strains from the isolates were picked out and the genes encoding for bacterio-opsin protein fragment were proliferated by PCR. Their nucleotide sequences were determined subsequently. On the basis of phylogenetic analysis of the *bop* gene sequences, it was found that nine sequences clustered together. It is indicated that the *bop* genes of halophilic archaea from Yiwu lake have some diversity and terrain traits.

Key words: Yiwu Lake; Halophilic archaea; bacterio-opsin protein gene; diversity

细菌视蛋白(bacterio-opsin protein)基因 *bop* 是嗜盐菌内的一类基因.它编码的肽链由 248 个氨基酸构成,并与生色团视黄醛结合,形成细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)蛋白. BR 蛋白定位于嗜盐菌的细胞膜上,在光照的条件下吸收光能,将质子从质膜内侧泵到质膜外侧,形成跨膜电势差,从而为细胞提供能量.由于 BR 蛋白光循环质子泵的功能,对嗜盐菌生存竞争有利,目前已在 20 株嗜盐菌中发现 *bop* 基因的存在(见表 1),其中包括已确定分类的 6 株.

伊吾湖,又名吐尔库里湖,是位于我国新疆哈密地区伊吾县的内陆盐湖.湖表卤水矿化度 269.91 g/L, pH 值 7.43,湖水的化学类型为硫酸盐型硫酸镁亚

型^[18].盐湖蕴藏着丰富的嗜盐菌资源,是研究嗜盐菌物种和 *bop* 基因的良好对象.

笔者从新疆伊吾盐湖分离纯化了 95 株耐盐和嗜盐菌,选取其中 10 株嗜盐菌,采用 PCR 和 TA 克隆的方法,获取了 *bop* 基因螺旋 C 到螺旋 G 序列,分析了其多样性.

1 材料和方法

1.1 样品来源

2004 年 6 月,笔者从新疆中部哈密地区伊吾盐湖的不同地点,采集了 24 个水样,75 个土样和泥样.样品采集后放于 4℃ 阴暗处保存,运抵实验室

收稿日期:2005-08-05.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30370029),国家重点基础研究发展规划资助项目(973 计划)子项目(编号:2004CB719604-3).

作者简介:古丽巴哈尔·阿巴拜克利(1969-),女,讲师,硕士,主要从事生物化学与分子生物学研究.

*通讯作者:吴敏,教授,Email: wumin@zju.edu.cn

后,立即分离嗜盐微生物.

表 1 嗜盐古生菌菌株及其 *bop* 基因的数据库登陆号

Table 1 Halobacterial strains and accession numbers of gene encoding bacteriorhodopsin

属名	菌株	<i>bop</i> 基因登陆号	参考文献
Halobacterium	Hbt. salinarum S9	M11720	1
	Hbt. salinarum NRC-1	NC_002607	2
Halorubrum	Hrr. sp. aus-1	J05165	3
	Hrr. sp. aus-2	S56354	4
	Hrr. sodomense	D50848	5
Haloarcula	Har. vallismortis NCBM 2082 ^T	D31882	6
	Har. marismortui A TCC 43049 ^T	NC_006397	7
	Har. argentinensis arg-1 ^T	D31880	8
	Har. japonica TR1 ^T	AB029320	9
Halomicrobium	Hmc. mukohataei arg-2 ^T	S76743	10
Haloterrigena	Htg. sp. arg-4	AB009620	5
Natrinema	Nnm. altunense AJ2 ^T	A Y279548	11
	Nnm. altunense sp. AB3	A Y279549	12
Miscellaneous	shark	D11058	13
	port	D11057	13
	mex	D11056	13
	SGI	X70291	14
	xz515	AF306937	15
	AB1	A Y279547	16
	AJ4	A Y279550	17

1.2 菌株分离和纯化

菌种分离和富集培养采用 5 种不同的培养基, 分别如下:

Medium B (DSMZ medium 97) (g/L): Casamino acids (Difco) 7.50, Yeast extract (Difco) 10.00, NaCl 250.00, MgSO₄ · 7H₂O 20.00, 柠檬三酸钠 3.00, KCl 2.00, FeSO₄ · 7H₂O 0.05, MnSO₄ · H₂O 0.20, pH 7.4.

Medium C (DSMZ medium 823) (g/L): Casamino acids (Difco) 1.00, Yeast extract (Difco) 1.00, 水溶性淀粉 2.00, NaCl 125.00, MgCl₂ · 6H₂O 160.00, K₂SO₄ 5.00, CaCl₂ · 2H₂O 0.10, pH 7.0.

Medium D^[19] (g/L): Casamino acids (Difco) 7.50, Yeast extract (Difco) 10.00, NaCl 200.00, 柠檬三酸钠 3.00, MgSO₄ · 7H₂O 0.20, KCl 2.00, 少量 FeCl₂ · 6H₂O 和 MnCl₂ · 4H₂O, pH 7.4.

Medium E^[20] (g/L): 细菌蛋白胨 (Oxoid, L37) 10.00, NaCl 250.00, MgSO₄ · 7H₂O, 20.00, 柠檬酸钠 3.00, KCl 2.00, CaCl₂ 0.20, pH 7.0.

Medium HM^[21] (g/L): 蛋白胨 5.00, Yeast extract (Difco) 10.00, 葡萄糖 1.00, NaCl 100.00, KCl 2.00, MgSO₄ · 7H₂O 1.00, CaCl₂ · 2H₂O

0.36, NaBr 0.23, NaHCO₃ 0.06, 少量 FeCl₃, pH 7.0.

固体培养基加琼脂 15~20 g/L.

土样先用相应培养基悬浮,再取少量悬浮液加到液体培养基中;水样直接取少量加到液体培养基中,37℃光照振荡培养 7 d.培养液适当稀释涂布平板,经反复划线纯化 3 次以上,直至获得单菌,甘油菌 - 80℃长期保存.

1.3 总 DNA 提取

DNA 提取方法参见文献[11].

1.4 PCR 扩增和 TA 克隆

按 O'tomo^[13]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 扩增参见文献[11].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 pMD 18-T(TaKaRa)上,再转化到大肠杆菌 Top10 菌株,在含氨苄霉素(AMP^r)的平板生长过夜,挑选白色菌落,经 PCR 和酶切验证后,随机挑取 3 个阳性克隆测序.

1.5 系统发育分析

将 10 株嗜盐菌的 *bop* 核心序列与从 GenBank 数据中获得的相应序列,采用 Sequp 软件包录入,

使用其中 Clustal W 1.8 软件进行多序列匹配排列,其中形成的缺口用中性元素填补,并手工修正.通过 Mega 3.0 软件包进行推测和分析系统发育树.用于比较的相关菌株的基因库登陆号见表 1.

2 结果

2.1 嗜盐菌菌株的选取

通过 5 种不同的培养基,目前已获得 95 株耐盐和嗜盐菌.菌株颜色有红色、白色、黄色和无色等.从中挑选了 10 株菌用于下步研究,这些菌株菌落隆起且成圆形,颜色为红色、亮红色或淡红色的菌株.

2.2 系统发育和相似性分析

采用一对简并引物扩增菌株 *bop* 基因,经测序获得 416 个或 398 个碱基的序列.基于嗜盐菌 *bop* 基因螺旋 C 到螺旋 G 序列构建的系统发育树见图 1.从图中可见,此无根树基本分成 4 个分枝,菌株 YW016、YW020、YW021、YW022、YW028、YW034、YW035、YW041、YW049 与菌株 AJ4 构成一个分枝,它们都属于分支 A.菌株 YW059 与菌株 *aus-1*、SG1 和 *Hrr. sodomense* 构成另一个分枝,它们都属于分支 B.其中代表菌株 YW016 和 YW059 已递交到 GenBank,其登陆号分别为:DQ146999 和 DQ147000.

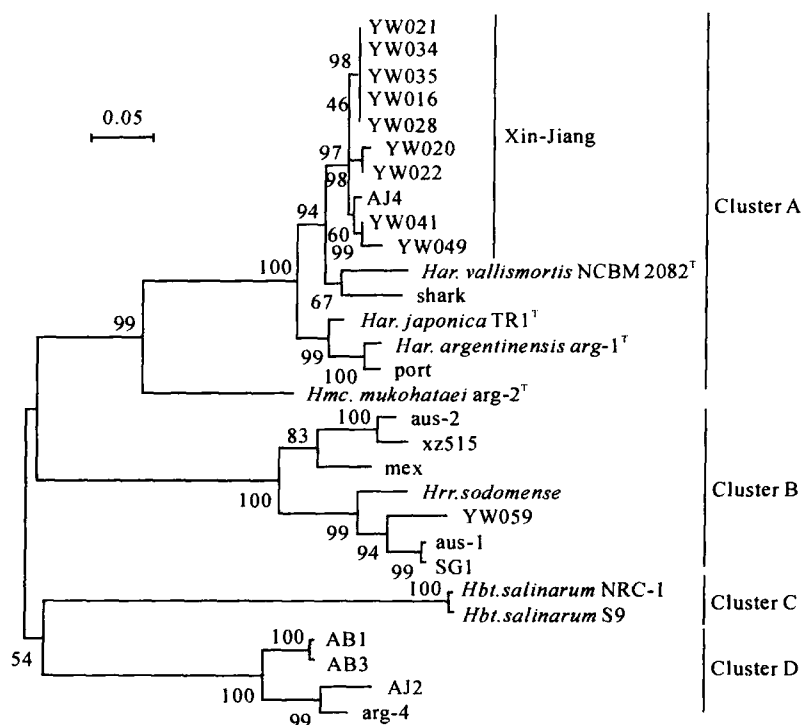


图 1 根据嗜盐菌 *bop* 核心序列构建的无根系统发育树

系统发育树采用邻接法,置信度采用 1000 次重复计算,分支节点的数值代表置信度.标尺代表每个核苷酸位置发生 0.05 次替代

Fig. 1 Unrooted phylogenetic tree based on the partial *bop* sequences from isolates and other related organisms

The tree was constructed using the neighbor - joining method with bootstrap values calculated from 1000 resamplings. The number at each branch point represents the percentage bootstrap support. Bar, 0.05 substitutions per nucleotide position

3 讨论

嗜盐微生物的生长对盐浓度具有明显的依赖性.极端嗜盐菌,又称嗜盐古菌,是一类在 2.5 mol/L 到饱和的盐培养基中生长最好的菌;中度嗜盐菌,是一类在 0.5 mol/L 和 2.5 mol/L NaCl 浓度之间有最佳生长的细菌;耐盐菌是一类能耐盐的非嗜盐菌,一般生长范围超过 2.5 mol/L NaCl^[22].培养基 B、C、D、E 的 NaCl 浓度都超过 3 mol/L,主要用于

分离极端嗜盐菌;培养基 HM 的 NaCl 浓度约 1.7 mol/L,主要用于分离中度嗜盐菌和耐盐菌.伊吾盐湖盐浓度高达 269.91 g/L,这为嗜盐微生物的生长提供了良好的环境,为菌株的分离提供了便利的条件.嗜盐古菌由于具有菌红素,大多数菌株呈现红色;而中度嗜盐菌和耐盐菌,主要属于细菌域,缺乏菌红素,因而呈现褐色、黄色、白色或无色较多.因此通过对分离菌株耐盐度和菌落颜色的分析,可以初步分辨这些嗜盐菌.

PCR 扩增片段为嗜盐菌 *bop* 基因螺旋 C 到螺

旋 G 之间的部分片断,对应第 91 位到 222 位氨基酸序列(以 *Hbt. salinarum* S9 为参照)。螺旋内的氨基酸序列,部分是维持质子泵功能所必须的(L93、E166、T170、E204、T205、F208、D212、K216),部分是与视黄醛结合,对于维持蛋白结构非常重要的(D115、M118、G122、W138、S141、M145、W182、Y185、P186、W189、D212、K216)^[23],因此,具有较高的保守性,可以比较准确地说明嗜盐菌 *bop* 基因在系统进化树上的进化关系。

通过对 *bop* 基因序列的系统发育分析可知,伊吾湖嗜盐菌 *bop* 基因具有一定的多样性,其中 9 个序列分布在分支 A 中,1 个分布在分支 B 中。不同地区分离的嗜盐菌可能具有不同的 *bop* 基因,分支 A 中的 9 个序列与菌株 AJ4 的相应序列,都来源于新疆地区,分支 D 中的 AJ2、AB1 和 AB3 也来源于新疆地区,它们构成了两个独特的类群。由此可见,新疆地区的 *bop* 基因具有明显的自身地域性,序列也丰富了 *bop* 基因。从数量上分析,分支 A 内的序列出现频率最高(90%),表明盐湖内分支 A 的 *bop* 基因占优势。以上结果反映了伊吾湖中嗜盐菌 *bop* 基因多样性分布的独特特征,这也为进一步研究我国盐湖微生物基因资源和蛋白应用开发提供了重要的数据信息。

参考文献(References):

- [1] DUNN R, MCCOY J, SIMSEK M, et al. The bacteriorhodopsin gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78 (11): 6744-6748.
- [2] NG W V, KENNEDY S P, MAHAIRAS G G, et al. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (22): 12176-12181.
- [3] SUGIYAMA Y, MAEDA M, FUTAIM, et al. Isolation of a gene that encodes a new retinal protein, archaerhodopsin, from *Halobacterium* sp. aus-1 [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264 (35): 20859-20862.
- [4] UEGAKI K, SUGIYAMA Y, MUKOHATA Y. Archaerhodopsin-2, from *Halobacterium* sp. aus-2 further reveals essential amino acid residues for light-driven proton pumps [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 286(1): 107-110.
- [5] IHARA K, UMEMURA T, KATAGIRI I, et al. Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation[J]. *J Mol Biol*, 1999, 285: 163-174.
- [6] KITAJIMA T, HIRAYAMA J, IHARA K, et al. Novel bacterial rhodopsins from *Haloarcula vallismortis* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 220 (2): 341-345.
- [7] BALIGA N S, BONNEAU R, FACCIOTTI M T, et al. Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea [J]. *Genome Res*, 2004, 14 (11): 2221-2234.
- [8] TATENO M, IHARA K, MUKOHATA Y. The novel ion pump rhodopsins from *Haloarcula* form a family independent from both the bacteriorhodopsin and archaerhodopsin families/tribes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 315 (1): 127-132.
- [9] 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.
- [10] SUGIYAMA Y, YAMADA N, MUKOHATA Y. The light-driven proton pump, cruxrhodopsin-2 in *Haloarcula* sp. arg-2 (bR+, hR-), and its coupled ATP formation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1188 (3): 287-292.
- [11] XU X W, WU M, HUANG W D. Isolation and characterization of a strain of *Natrinema* containing a *bop* gene [J]. *Zhejiang Univ SCI*, 2005, 6B (2): 142-146.
- [12] 俞晓伟,迪丽拜尔·托乎提,吴月红,等.嗜盐菌 AB3 中细菌视紫红质和系统发育研究 [J]. *浙江大学学报:工学版*, 2005, 39(3): 418-422.
YU Xiao-wei, D. Tuft. WU Yue-hong, et al. Bacteriorhodopsin gene and phylogenetic analysis on halophilic archaea AB3 [J]. *Journal of Zhejiang University: Engineering Science*, 2005, 39(3): 418-422.
- [13] OTOMO J, URABE Y, TOMIOKA H, et al. The primary structures of helices A to G of three new bacteriorhodopsin-like retinal proteins [J]. *J Gen Microbiol*, 1992, 138 (11): 2389-2396.
- [14] SOPPA J, DUSCHL J, OESTERHELT D. Bacteriorhodopsin, haloopsin, and sensory opsin I of the halobacterial isolate *Halobacterium* sp. strain SGI: three new members of a growing family [J]. *J Bacteriol*, 1993, 175 (9): 2720-2726.
- [15] WANG Y R, HONG J, MING M, et al. Rapid cloning of an archaerhodopsin gene from *Halobacterium* species xz515 by LPA [J]. *J Fudan Univ: Natural SCI*, 2003, 42: 576-582.
- [16] 许学伟,吴敏,阮红,等.一个新的 Br 蛋白基因部分序列测定及分析 [J]. *遗传*, 2004, 26: 343-348.
XU Xue-wei, WU Min, RUAN Hong, et al. Analy-

- sis of partial sequence of the gene for a novel Br protein[J]. **Genetics**, 2004, 26: 343-348.
- [17] 许学伟,吴敏,阮红,等.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[J]. **中国生物化学与分子生物学报**, 2004, 20(1): 55-60.
XU Xue-wei, WU Min, RUAN Hong, et al. Partial sequence of the gene for a new BR protein, and nucleotide sequence of 16S rRNA encoding gene from a halophilic archaeum AJ4[J]. **Chin J Biochem Mol Biol**, 2004, 20(1): 55-60.
- [18] 郑喜玉,张明刚,徐昶,等.中国盐湖志[M].北京:科学出版社,2002.
ZHENG Xi-yu, ZHANG Ming-gang, XU Chang, et al. **China Salt Lake Log**[M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [19] XIN H W, L TOH T, ZHOU PJ, et al. *Natronobacterium nitratireducens* sp. nov., a haloalkaliphilic archaeon isolated from a soda lake in China[J]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2001, 51: 1825-1829.
- [20] OESTERHELT D, STOECKENIUS W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fraction into red and purple membrane[J]. **Methods Enzymol**, 1974, 31: 667-678.
- [21] VENTOSA A, QUESADA E, RODR ÍGUEZ-VALERA F, et al. Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-negative rods[J]. **J Gen Microbiol**, 1982, 128: 1959-1968.
- [22] 任培根,周培瑾.中度嗜盐菌的研究进展[J]. **微生物学报**, 2003, 43: 427-431.
REN Pei-gen, ZHOU Pei-jin. Research progress of moderately halophilic eubacteria[J]. **Acta Microbiol Sinica**, 2003, 43: 427-431.
- [23] HENDERSON R, BALDWIN J M, CESKA T A. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy[J]. **J Mol Biol**, 1990, 213: 899-909.

(责任编辑 涂红)

(上接第 72 页)

- [9] ZHENG Y S, YING L Q, SHEN Z Q. Polymerization of propylene oxide by a new neodymium complex of calixarene derivative [J]. **Polymer**, 2000, 41: 1641-1643.
- [10] ZHENG Y S, SHEN Z Q. Polymerization of styrene with calixarene-neodymium complex using alkylmagnesium as cocatalyst [J]. **Eur Polym J**, 1999, 35(6): 1037-1042.
- [11] KEMP R A, BROWN D S, LATTMAN M, et al. Calixarenes as a new class of external electron donors in Ziegler-Natta polypropylene catalysts [J]. **J Mol Catal A-Chem**, 1999, 149: 125-133.
- [12] LING J, SHEN Z Q. Lanthanum tris(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenolate) as a novel, versatile initiator for homo- and copolymerization of cyclic carbonates and lactones [J]. **Macromolecular Chemistry and Physics**, 2002, 203(12): 1872-1876.
- [13] LING J, SHEN Z Q, HUANG Q H. Novel single rare earth aryloxide initiators for ring-opening polymerization of 2,2-dimethyltrimethylene carbonate [J]. **Macromolecules**, 2001, 34(22): 7613-7616.
- [14] BRODE G L, KOLESKE J V. Lactone polymerization and polymer properties [J]. **J Macromol Sci Chem**, 1972, 6: 1109-1116.

(责任编辑 涂红)