

嗜盐古菌 *Haloterrigena thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup>  
*bop* 基因序列研究

李永华, 金文涛, 霍颖异, 吴敏\*

(浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310027)

**摘要:** 对标准菌株 *Haloterrigena thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup>, 其编码螺旋 C 至螺旋 G 的细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)蛋白基因(*bop* 基因)片断采用 PCR 方法进行了扩增, TA 克隆并测定了其核苷酸序列. 对翻译出的氨基酸序列进行亲水性分析, 表明该菌株的 BR 蛋白与已报道相应序列具有类似的二级结构. 蛋白序列聚合比对结果表明, 该菌株 BR 蛋白与 *Natrinema* 属的 BR 蛋白具有一定相似性. 在这一 *Haloterrigena* 属的标准菌株中证实 *bop* 基因, 进一步丰富了 *bop* 基因资源.

**关键词:** 嗜盐古菌; 细菌视紫红质; 系统发育

**中图分类号:** Q933

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1008-9497(2007)05-576-04

LI Yong-hua, JIN Wen-tao, HUO Ying-yi, WU Min (College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Partial sequence of *bop* gene for *Haloterrigena thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup>.** Journal of Zhejiang University(Science Edition), 2007, 34(5): 576~579

**Abstract:** Partial DNA fragment encoding for a bacteriorhodopsin (BR) protein of *Haloterrigena thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> was proliferated by PCR. The nucleotide sequence was determined subsequently. The hydrophilic analysis of BR fragment revealed that the BR had a transmembrane heptahelical structure similar to that of other BRs. By homology alignment, it was showed that BR proteins from *Haloterrigena* and *Natrinema* genus had high homology indices. In two phylogenetic trees based on 16S rRNA gene and partial *bop* gene sequences, strain JCM 11050<sup>T</sup> belongs to the *Haloterrigena* genera and formed a independent cluster, which was separated from strain arg-4. The detection of a *bop* gene in this type strain of *Haloterrigena* enlarged the *bop* gene resource.

**Key words:** halophilic archaea; bacteriorhodopsin; phylogenesis

嗜盐古菌是一类生存于高盐环境下的古生菌, 其最低生长 NaCl 浓度往往大于 1.5 mol/L, 在趋于饱和的盐度中也能生长. 大部分嗜盐古菌可以产生类胡萝卜素用以避免辐射伤害, 因此嗜盐古菌的积累可能导致其栖息环境变为红色<sup>[1]</sup>. 细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)是嗜盐古菌紫膜上的唯一蛋白质, 从 *Halobacterium halobium* 分离的 BR 蛋白由 248 个氨基酸残基组成, 以 7 次  $\alpha$  跨膜螺旋(A-G)定位于质膜上, 第 216 位的赖氨酸通过希夫碱基和生色团视黄醛分子相连. BR 蛋白是一个光驱动质子泵, 在光照条件下能将质子从膜内传递到膜外,

产生跨膜的质子梯度, 将光能转变为电化学势能, 从而提供生命活动所需之能量<sup>[2,3]</sup>.

BR 既是典型的膜蛋白, 又是典型的离子通道蛋白, 对其深入探索有助于理解其它类似蛋白的结构和功能. 此外 BR 蛋白独特的光电响应和光致变色性质, 使其在众多领域有着广阔的应用前景. 自从上世纪 60 年代末, Oesterhelt 和 Stoeckenius 从嗜盐古菌中发现以后, BR 蛋白已成为研究得最热和最透彻的膜蛋白之一<sup>[4]</sup>.

截止到 2006 年底嗜盐菌科已经有 20 个属, 已在 6 个属中发现了 BR 蛋白, 它们分别是: *Halobac-*

收稿日期: 2006-04-27.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目子项目(973, 2004CB719604-3); 中国博士后科学基金资助项目(2005038636).

作者简介: 李永华(1979-), 男, 硕士生, 主要从事分子进化研究.

\* 通讯作者, 吴敏, 教授, Email: wumin@cls.zju.edu.cn

terium、*Haloarcula*、*Halorubrum*、*Halomicrobium*、*Haloterrigena* 和 *Natrinema*<sup>[5]</sup>。而 *Haloterrigena* 属只在分类地位尚未确定的菌株 *arg-4* 中发现 *bop* 基因<sup>[6]</sup>，因此，笔者选取了该属的标准菌株 *Haloterrigena thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup>，扩增了编码螺旋 C 至螺旋 G 的 *bop* 基因部分片段，同已报道的其它菌株相应的 BR 蛋白序列进行了分析比较。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

菌株 *Haloterrigena thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup>，购自日本微生物保藏中心(Japan Collection of Microorganisms)，对照菌株为 *Halobacterium salinarum* R1M1，为本实验室保存。

### 1.2 培养

菌种富集培养采用高盐培养基，配方如下：250 g NaCl，20 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O，3 g 柠檬酸钠，2 g KCl，0.2 g CaCl<sub>2</sub>，10 g 细菌蛋白胨(L37)，pH7.0，加蒸馏水至 1 L。固体培养基加琼脂 20 g。

### 1.3 基因组总 DNA 的提取

DNA 提取方法参见文献[7]。

### 1.4 PCR 扩增

PCR 方法和条件参见文献[5]。

### 1.5 DNA 序列的转化和测序

PCR 产物用直接 TA 克隆法进行克隆，先将该片段纯化，连接到质粒 pMD18-T(Takara)上，再转化到大肠杆菌 TOP10 菌株，在含氨苄霉素(AMP<sup>+</sup>)的平板生长过夜，挑选白斑，经电泳和 PCR 验证后，随机取 3 个阳性克隆测序。

### 1.6 系统发育树的构建

将从 GenBank 数据库中获得的相关嗜盐菌 16SrRNA 基因序列或 *bop* 基因部分序列，采用

Clustalw1.8 软件包进行多序列匹配排列，形成的缺口用中性元素填补。采用 MEGA3.1 软件中的 Neighbor-joining 方法，进行系统进化树估算，重复数为 1 000。

## 2 结果

### 2.1 PCR 产物电泳分析

采用一对简并引物扩增菌株 JCM 11050<sup>T</sup>，得到 401 个碱基，序列电泳图见图 1。序列分析表明，菌株 JCM 11050<sup>T</sup> 的 *bop* 基因片段与对照菌株 R1M1 的相应序列长度相似。

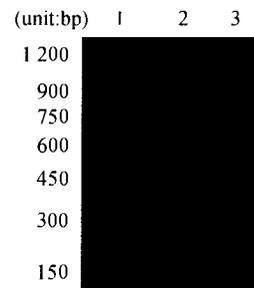


图 1 菌株 JCM 11050<sup>T</sup> *bop* 基因部分序列 PCR 产物扩增图  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of JCM 11050<sup>T</sup> partial *bop* gene sequence. The products were separated on a 2.0% Agarose gel 1:DNA Marker;2:参比菌株 R1M1; 3:JCM 11050<sup>T</sup>

### 2.2 嗜盐古菌 BR 蛋白序列比较

将获得的菌株 JCM 11050<sup>T</sup> 的 *bop* 基因序列翻译成氨基酸序列，与已报道的序列进行比较(见图 2)。结果表明 JCM 11050<sup>T</sup> 的 BR 蛋白 C-G 片段序列与其它已报道菌株的 BR 蛋白序列存在差别。通过氨基酸亲水指数分析(见图 3)，发现菌株 JCM 11050<sup>T</sup> 和 R1M1 的 BR 蛋白 CG 片段存在类似的亲水性图谱。

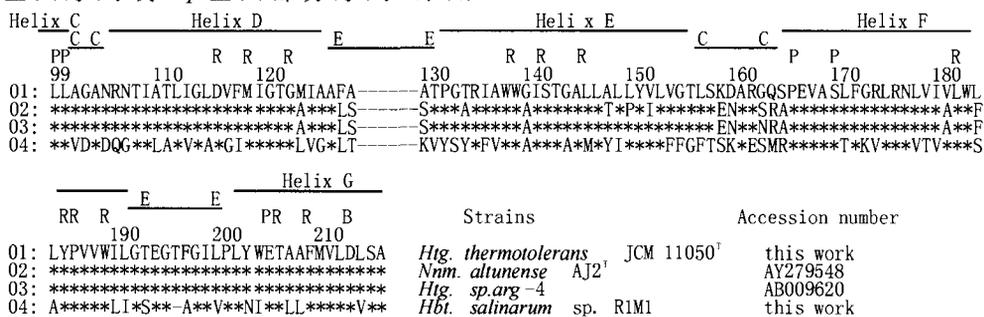


图 2 BR 蛋白自螺旋 C 至螺旋 G 的氨基酸排列比较

Fig. 2 Alignment of known BR sequences from various halophilic archaea. Gaps (denoted as —) were introduced into sequences to optimize alignments.

序列上方的横线表示根据 *Hbt. salinarum* BR 蛋白高级结构<sup>[8]</sup>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。相同的氨基酸残基用星号(\*)表示

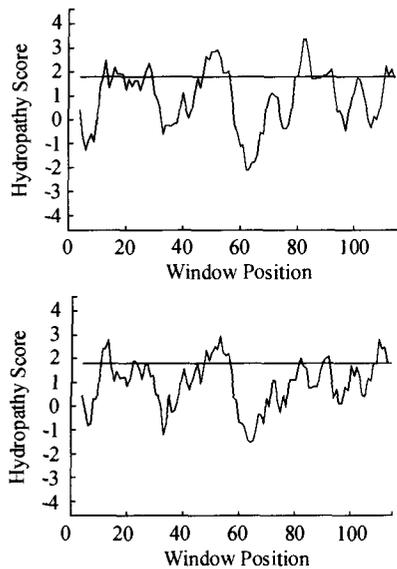


图 3 菌株 R1M1 和 JCM 11050<sup>T</sup> 中 BR 蛋白自氨基酸 99~216 位计算得的亲水指数

Fig. 3 Hydropathic profile from amino acid residue 99 to 216 of *Hbt. salinarum* R1M1 BR and *Htg. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> BR

根据 Kyte 和 Doolittle<sup>[9]</sup>方法用 9 个残基作为区间计算

### 2.3 系统发育分析

基于 16S rRNA 基因序列构建的嗜盐古菌系统发育树见图 4. 以 *Archaeoglobus fulgidus* 作为外种群, 菌株 JCM 11050<sup>T</sup> 与 *Haloterrigena* 的相关菌株构成一个分支, 独立于菌株 *Htg. sp. arg-4* 与 *Nnm. sp. XA3-1* 构成的分支. 基于 *bop* 核心序列构建的系统发育树见图 5, 采用 *Hbt. salinarum* sp. S9 的 *hop* 序列作为外种群, 菌株 JCM 11050<sup>T</sup> 位于 *Htg. sp. arg-4* 和 *Nnm. altunense* AJ2<sup>T</sup> 之外.

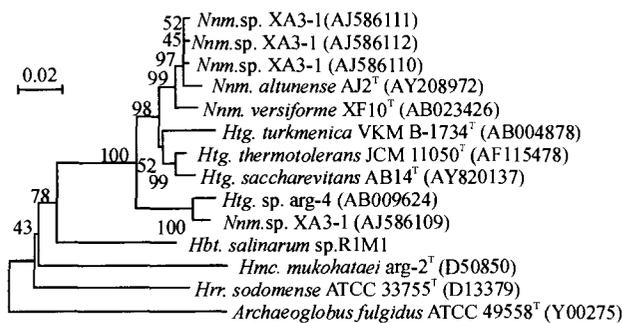


图 4 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树  
Fig. 4 Phylogenetic tree of extremely halophilic archaea on the basis of 16S rRNA gene sequences.

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, 0.02 sequence divergence

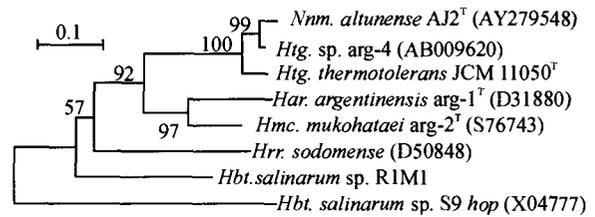


图 5 基于 *bop* 基因部分序列构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of extremely halophilic archaea on the basis of partial *bop* gene sequences.

The tree was constructed using the NJ method with bootstrap values calculated from 1000 trees. Bar, 0.1 sequence divergence.

## 3 讨论

菌株 *Htg. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> 的 BR 蛋白部分序列, 与菌株 *Nnm. altunense* AJ2<sup>T</sup> 和 *Htg. sp. arg-4* 的相应序列具有较高的相似性 (86.4% 和 89.8%). 亲水指数分析和蛋白二级结构预测可知 (见图 2 和图 3), 菌株 JCM 11050<sup>T</sup> 的 BR 蛋白 CG 片段具有类似于菌株 R1M1 相应序列的跨膜  $\alpha$ -螺旋结构. 以上研究结果表明, 获得的序列属于编码 BR 蛋白 CG 片段的 *bop* 基因. 除菌株 AJ2<sup>T</sup> 和 arg-4 外, 该序列与已报道菌株 AB1 和 AB3 的 BR 蛋白部分序列相似性为 97.5%<sup>[10,11]</sup>, 而其余都低于 60.0%<sup>[6]</sup>, 表明获得的序列为一个新型的 *bop* 基因序列.

16S rRNA 基因由于自身优点, 例如为生物体共有、演化年代久远、功能同源、具有保守和高变序列、分子大小合适操作、与某些大分子共演化等, 已成为微生物鉴定中常用分子指标. 但通过 16S rRNA 基因构建的系统发育树, 只是一种基因树, 并不能准确反映物种的进化关系. 因此, 目前微生物鉴定和分类需结合表型分析、细胞壁和细胞膜成分分析, 基因组 GC 含量和 DNA 杂交等多相分类学研究方法. 嗜盐古菌中存在 16S rRNA 基因多拷贝现象, 例如菌株 *Har. marismortui* DSM3752<sup>T</sup> 存在多个 16S rRNA 基因, 彼此间序列差异可高达 5%<sup>[12,13]</sup>, 菌株 *Hsx. carlsbadense* 2-9-1<sup>T</sup> 也发现存在 3 个不同的 16S rRNA 基因, 彼此间序列差异可达 3%<sup>[14]</sup>, 菌株 *Nnm. sp. XA3-1* 中甚至发现了 4 个 16S rRNA 基因<sup>[15]</sup> (见图 4). Ihara 等人通过 16S rRNA 基因序列<sup>[6]</sup>, 将菌株 arg-4 归类于 *Haloterrigena* 属. 基于 16S rRNA 基因的系统发育树上, 菌株 *Htg. sp. arg-4* 却与 *Nnm. sp. XA3-1* 构成一个独立的分支, 位于 *Haloterrigena* 和 *Natrinema* 属

的外部;菌株 arg-4 与标准菌株 *Htg. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> 和 *Nnm. altunense* AJ2<sup>T</sup> 的 BR 蛋白相似性分别为 89.8% 和 95.8%, 表明该菌株的分类学地位有待进一步研究。*bop* 基因在嗜盐古菌 20 个属中的 6 个分别发现<sup>[5]</sup>, 此前 *Haloterrigena* 属中只在菌株 arg-4 中涉及。通过对标准菌株 *Htg. thermotolerans* JCM 11050<sup>T</sup> 的研究, 进一步证实了该属存在 *bop* 基因。与已报道菌株相应氨基酸序列的差异, 也表明该属中的 BR 蛋白代表一个新的类群, 是研究其功能的良好材料。

### 参考文献(References):

- [1] DASSARMA S, KENNEDY S P, Berquist B, et al. Genomic perspective on the photobiology of *Halobacterium* species NRC-1, a phototrophic, phototactic, and UV-tolerant haloarchaeon[J]. **Genome Research**, 2004, 14:1025-1035.
- [2] BROWN L S. Proton transport mechanism of bacteriorhodopsin as revealed by site-specific mutagenesis and protein sequence variability [J]. **Photosynthesis Research**, 2001, 70:3-17.
- [3] MUKOHATA Y, IHARA K, TAMURA T, et al. Halobacterial rhodopsins[J]. **Journal of Biochemistry**, 2001, 125: 649-657.
- [4] 陈德亮, 胡坤生. 细菌视紫红质研究的新进展[J]. **生物物理学报**, 2000, 17(3):441-448.  
CHEN De-liang, HU Kun-sheng. Progress in bacteriorhodopsin research[J]. **Acta Biophysica Sinica**, 2001, 17(3): 441-448.
- [5] XU Xue-wei, WU Min, HUANG Wei-da. Isolation and characterization of a novel strain of *Natrinema* containing a *bop* gene[J]. **Journal of Zhejiang University: Science Edition**, 2005, 6B(2):142-146.
- [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, 285:163-174.
- [7] 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 Shou-yi, et al. Cloning and expression of the bacteriorhodopsin gene[J]. **Journal of Zhejiang University: Engineering Science**, 2001, 35(3):324-327.
- [8] 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.
- [9] KYTE J, DOOLITTLE R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. **Journal of Molecular Biology**, 1982, 157:105-132.
- [10] 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(3): 343-348.  
XU Xue-wei, WU Min, RUAN Hong, et al. Sequencing and analysis partial sequence of the gene for a novel BR protein[J]. **Hereditas**, 2004, 26(3):343-348.
- [11] 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, DILBAR Tohty, 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.
- [12] AMANN G, STETTER K O, LLOBET-BROSSA E, et al. Direct proof for the presence and expression of two 5% different 16S rRNA genes in individual cells of *Haloarcula marismortui*[J]. **Extremophiles**, 2000, 4(6): 373-376.
- [13] BALIGA N S, BONNEAU R, FACCIOTTI M T, et al. Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea[J]. **Genome Research**, 2004, 14:2221-2234.
- [14] VREELAND R H, STRAIGHT S, KRAMES J, et al. *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., sp. nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate[J]. **Extremophiles**, 2002, 6(6):445-452.
- [15] BOUCHER Y, DOUADY C J, SHARMA A K, et al. Intragenomic heterogeneity and intergenomic recombination among haloarchaeal rRNA genes [J]. **Journal of Bacteriology**, 2004, 186(12): 3980-3990.

(责任编辑 涂红)