

含子和外显子的 SRAP 多态性标记。由于 SRAP 标记主要是对 ORFs 进行扩增,提高了扩增结果与表现型的相关性。一方面,SRAP 标记采用 PCR 扩增,不需要像 RFLP 标记那样要求高纯度和高浓度的 DNA 和使用放射性同位素,减少了对试剂质量、仪器设备的要求,同时也减少了对实验操作人员的身体等方面的损害;另一方面,SRAP 标记也不需像 RAPD、SSR 标记那样花费大量人力、物力进行引物设计、开发,也不需像 AFLP 那样需要预扩增和连接,减少了对人力、物力的需求和依赖,并且多次重复试验结果稳定克服了 RAPD 重复性、稳定性差的缺点。而最为重要的一点是 SRAP 标记比 RAPD 标记稳定且其多态性可与 AFLP 标记相媲美。由于具有这些优点,SRAP 标记已经在很多作物^[3-26]上开展了一系列的相关研究。对于分析像西瓜这种遗传差异小的作物,SRAP 标记尤其显示了它的优点。

李严^[27]曾对两种不同的银染方法进行比较。而本研究首次对银染固定时间、染色液浓度、显色液浓度进行探索分析。结果表明效果较为理想。与此同时,本研究采用 SRAP 分子标记对西瓜品种 D₁、D₂、D₃、H₁、H₂、H₃、M₁、M₂、M₃、m₁、m₂、m₃ 的多态性进行了分析。每对引物组合产生 13~25 对比较清晰的扩增带。8 对引物组合产生的多态性带的比例为 16.666%~38.464%,平均为 28.675%。这表明 SRAP 标记多态性还是较高的,可以适于分析西瓜等遗传差异小的作物。

由于 SRAP 标记是对 ORFs 进行扩增,因而对基因相对较少的着丝粒附近以及端粒的扩增较少。如果结合可扩增这些区域的 SSR 标记,将可获得覆盖整个基因组的连锁图。再者,SRAP 是基于 PCR 的方法,易于实现自动化,随着 SRAP 的发展和自动化,以此为基础,结合其他的标记,可快速地构建高饱和度的遗传图谱。SRAP 是一种新型的分子标记技术,已经在多种植物的研究中成功地应用,它适于在不同作物上用于各种目的的研究。SRAP 标记将会成为植物研究领域的一个有力的工具。虽然分子标记辅助育种一次性投资大,比传统的表型选择成本高,但其成本/效益比却不高,特别在处理复杂的性状上显示出了极具潜力的用途。

参考文献:

- [1] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- [2] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 271-282.
- [3] Riaz A, Potter D, Stephen M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2004, 129: 204-211.
- [4] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 168-180.
- [5] 于拴仓,柴敏,姜立纲.主要番茄品种的分子鉴别研究[J].农业生物

科学,2005,21(5):84-89.

- [6] 赵新亮,马强.玉米 SRAP 反应体系的建立与优化[J].安徽农业科学,2006,34(15):3619-3620.
- [7] 李丽,郑晓鹰,柳李旺.用 SRAP 标记分析黄瓜品种遗传多样性及鉴定品种[J].分子植物育种,2006,4(5):702-708.
- [8] 林忠旭,张献龙,聂以春.新型标记 SRAP 在棉花 F₂ 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析[J].遗传学报,2004,31(6):622-626.
- [9] 文雁成,王汉中,沈金雄,等.用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础[J].中国农业科学,2006,39(2):246-256.
- [10] 卢泳全,吴为人.应用 SRAP 技术从大米草根中分离盐胁迫应答基因(英文)[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2006,32(5):511-514.
- [11] Hashizume T, Sato T, Shimamoto I, et al. Determination of genetic purity of hybrid seed in watermelon (*Citrullus lanatus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) using RAPD[J]. *Japan Breed*, 1993, 43:367-375.
- [12] 刘立军,蒙祖庆,邢秀龙,等.芝麻基因组 SRAP 扩增体系的优化研究[J].分子植物育种,2006,4(5):726-730.
- [13] 潘俊松,王刚,李效尊,等.黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位[J].自然科学通报,2005,15(2):167-172.
- [14] 吴洁,谭文芳,何俊蓉,等.甘薯 SRAP 连锁图构建淀粉含量 QTL 检测[J].分子植物育种,2005,3(6):841-845.
- [15] 郭大龙,罗正荣.部分柿属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化[J].果树学报,2006,23(1):138-141.
- [16] 张建成,王传堂,焦坤,等. SRAP 标记技术在花生种子纯度鉴定中的应用[J].中国农学通报,2005,21(12):35-39.
- [17] 李敏,王琪,付福友.不同品种郁金香的 SRAP 研究[J].中草药,2006,37(8):1255-1258.
- [18] 梁景霞,祁建民,吴为人,等.烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立[J].中国烟草学报,2005,11(4):33-38.
- [19] 彭飒,郭美丽,陈跃华,等.红花 SRAP 扩增体系的建立和优化[J].第二军医大学学报,2006,27(5):544-547.
- [20] 刘月光,滕永勇,潘辰,等.应用 SRAP 标记对莲藕资源的聚类分析[J].氨基酸和生物资源,2006,28(1):29-32.
- [21] 武志朴,杨文香,刘大群,等.小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步研究[J].河北农业大学学报,2005,28(3):66-69.
- [22] 任羽,王得元,张银东,等.辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J].分子植物育种,2004,2(5):689-693.
- [23] 林忠旭,张献龙,聂以春,等.棉花 SRAP 遗传连锁图构建[J].科学通报,2003,48(5):1676-1679.
- [24] Riaz Ahmad, Dan Potter, Stephen M Southwick. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular marker[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2004, 129(2):204-210.
- [25] 李严,张春庆.西瓜杂交种遗传多态性的 SRAP 标记分析[J].园艺学报,2005,32(4):643-647.
- [26] Li G, Gao M, Yang B, Quiros C F. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(1):168-180.
- [27] 李严,张春庆.新型分子标记-SRAP 技术体系优化及应用前景分析[J].中国农学通报,2005,21(5):108-112.

巴里坤湖和玛纳斯湖嗜盐菌的分离及功能酶的筛选

顾晓颖¹,李冠¹,吴敏^{1,2}

(1.新疆大学生命科学与技术学院,新疆乌鲁木齐 830046;2.浙江大学生命科学学院,浙江杭州 310058)

摘要:目的:了解新疆巴里坤湖与玛纳斯湖中嗜盐菌及功能酶的多样性。方法:从两湖中采集水样进行菌种分离,采用 PCR 方法扩增出其 16S rRNA 基因(16S rDNA),并测定了基因的序列。对分离菌株进行了蛋白酶、淀粉酶、酯酶、脂肪酶、以及纤维素酶的筛选。结果:从两湖水样共分离得到 51 株嗜盐菌。基于 16S rDNA 序列的同源性比较和系统发育学分析,发现从两湖分离获得的中度嗜盐菌分别属于 *Planococcaceae*、*Bacillaceae*、*Staphylococcus*、*Halomonadaceae*、*Salicicolaceae* 以及 *Pseudomonadaceae* 6 个属。分离得到的极端嗜盐古菌属于 *Halobacteriaceae* 属。功能酶筛选结果表明产蛋白酶的嗜盐菌共有 15 株,产酯酶的共有 23 株,产淀粉酶的共有 8 株,未获得产脂肪酶和纤维素酶的嗜盐菌。结论:新疆巴里坤湖和玛纳斯湖中有丰富的嗜盐微生物资源及酶资源,有重要的研究意义和应用前景。

关键词:盐湖;中度嗜盐菌;嗜盐古菌;生物多样性;极端水解酶

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1004-311X(2007)03-0026-05

Isolation and Enzyme Screening of Halophiles from Barkol Lake and Manasi Lake

GU Xiao-ying¹, LI Guan^{1*}, WU Min²

(1. College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China;

2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 301158, China)

Abstract: Objective: To understand the diversity of halophilic archaea and bacteria diversity and the extracellular hydrolytic enzymes diversity of Barkol lake and Manasi lake. **Methods:** Water samples were collected and the phylogenetic diversity of halophilic bacteria associated with the water was investigated. Protease, esterase, amylase, lipase and cellulase from these strains were screened. **Results:** 51 strains of halophilic bacteria were isolated. On the basis of the homology and phylogenetic analysis of 16S rDNA, it was considered that the halophilic bacteria were identified as members of halophilic bacteria from the two lakes were related to the genera *Planococcaceae*, *Bacillaceae*, *Staphylococcus*, *Halomonadaceae*, *Salicolaceae*, *Pseudomonadaceae* and extremely halophilic archaea strains were identified as members of the genera *Halobacteriaceae*. 15 strains produce protease, 23 strain produce esterase, 8 strains produce amylase and no strain produce lipase and cellulase. **Conclusion:** It was indicated that there are abundant resource of halophilic microorganism and enzyme in Barkol lake and Manasi lake.

Key words: salt lake; halophilic bacteria; halophilic archaea; biodiversity; extracellular hydrolytic enzymes

极端水解酶如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等在食品工业、饲料业、生物及化学工业方面都有重要应用前景。由于工业生产中某些生产条件的限制,已有的水解酶往往达不到最大活性,因此寻找能够适应不同温度、酸碱度以及盐活度的极端水解酶就成为一类重要的课题^[1-7]。嗜盐菌是在 NaCl 浓度在 3~15% 之间生存的一类原核生物^[8],由于其生境为特殊的高盐环境,因此嗜盐菌所分泌产生的水解酶往往都具有耐高盐的性质。

巴里坤湖位于天山东段北坡,湖面海拔 1 585m,湖盆长期以来为积盐中心,湖水矿化度高达 276~283g/L,晶间盐矿化度高达 456~463g/L^[9]。玛纳斯湖位于准噶尔盆地西部,盐储量高达 15.8×10⁸t,是新疆三大盐基地之一^[10]。两湖都有较高的中盐分。本实验采用巴里坤湖的晶间湖水和马纳斯的湖水作为实验材料,首次系统研究湖中极端微生物的群落结构并进行了蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、酯酶以及脂肪酶的筛选,以期了解巴里坤湖和玛纳斯湖嗜盐微生物的多样性以及酶资源的多样性。结果表明两湖中有较丰富的嗜盐菌物种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

2005年6月分别采集新疆的巴里坤盐湖(92°43'~92°52'东经,43°36'~43°42'北纬)水样2份和玛纳斯盐湖(85°37'~86°16'东经,45°37'~45°55'北纬)水样3份,样品采集后放于4℃暗处保存,运抵实验室后立即开始分离。

1.1.2 试剂

Casamino acids, Yeast extract, 购自美国 BD 公司。Protease-peptone no.3 购自 Difco 公司。KCl, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, MnSO₄·H₂O, NaCl, CaCl₂·2H₂O, NaHCO₃, FeCl₃, KH₂PO₄, 柠檬酸钠、葡萄糖、琼脂,均来自上海沪试;刚果红、三丁酸甘油酯、羧甲基纤维素钠购自上海生工,以上试剂均为分析纯。脱脂牛奶由光明乳业生产,购于新疆大学教育超市。

1.1.3 仪器

高压灭菌锅为日本 SANYO;3M 电热恒温干燥箱;BP2100S 型电子天平;高速冷冻离心机为 Eppendorf 公司 5417R 型;电泳仪为 Bio-Rad 公司产 POWERPAC300 型;PCR 仪为 MJ 产的 PTC-100 型。

1.1.4 培养基

① CM 培养基(/L): Casamino acids 7.50g, Yeast extract 10.00g, Na₃-citrate 3.00g, KCl 2.00g, MgSO₄·7H₂O 20.00g, FeSO₄·7H₂O 0.05g, NaCl 200.00g, pH 7.2。

② HM 培养基(/L)(Ventosa, et al., 1982): NaCl 100.0g, KCl

2.0g, MgSO₄·7H₂O 1.0g, CaCl₂·2H₂O 0.36g, NaHCO₃ 0.06g, FeCl₃ Tr, Protease-peptone no.3 5.0g, Yeast extract 10.0g, Glucose 1.0g, pH 7.2~7.4。

③ APA 培养基(/L): NaCl 20.0g, KH₂PO₄ 2.0g, MgSO₄·7H₂O 1.0g, Protease-peptone no.3 5.0g, Yeast extract, 5.0g, Glucose 1.0g, Na₂CO₃ 10.00g, 其中, Na₂CO₃ 与培养基分开灭菌,待温度降到 55℃ 后混匀。pH 9.5~10。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离与保藏

水样经 0.45μm 和 0.22μm 滤膜过滤,滤膜加入液体培养基震荡均匀后,梯度稀释涂布平板。37℃ 光照培养 5~14d,经反复划线纯化,直至获得单菌落。菌株采用液体石蜡法 4℃ 和甘油管法 80℃ 长期保藏。

1.2.2 嗜盐菌产极端酶菌株筛选

产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶及酯酶的嗜盐菌都采用平板筛选方式,分别采用脱脂牛奶^[11](1%)、可溶性淀粉^[12](1%)、羧甲基纤维素钠(0.4%)^[13]、吐温-60(1%)、3-丁酸甘油酯(1%)作为底物。将菌株接入相应的培养基,培养一段时间后观察菌株是否产生透明圈。

1.2.3 基因组总 DNA 提取

采用嗜盐菌 DNA 少量快速提取方法。新鲜菌体加 400μL 无菌水破细胞,100℃ 处理 10min。

1.2.4 PCR 扩增

根据菌株的不同设计两对通用引物。古菌:

上游:5'-ATT CCG GTT GAT CCT GC-3';

下游:5'-AGG AGG TGA TCC AGC CGC AG-3'

细菌:

上游:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';

下游:5'-ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT-3'

PCR 反应条件为 50μL 反应体系 33 个循环;变性:95℃, 30s;退火:50℃, 45s;延伸:72℃, 1min。

1.2.5 系统发育树的构建

将所分离获得所有菌株的 16S rDNA 序列与从 GenBank 数据库中获得的嗜盐菌 16S rDNA 序列,采用 Clustal W 软件进行序列比对,然后利用 MEGA 3.1 软件进行序列分析,统计计算有关的数据和遗传距离并根据不同科,选取合适的外种群,基于遗传距离,采用邻接法(N-J, Neighbor Joining)构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 极端嗜盐古菌与中度嗜盐菌的分离

根据富集后涂布的平板,因其单菌落的不同形态及其生长的培养基分为两类,挑单菌后分别培养,共得到 51 个单菌,玛纳斯湖分得 28 株(编号为 MNS1~MNS28),巴里坤湖分得 23 株(编号为 BLK1~BLK23)。中度嗜盐菌 35 株,极端嗜盐古菌 16 株。

嗜盐古菌在液体中一般需要培养 2~3d。平板上的单菌落均有蜡样光泽,以红色、桔红色为主,需要生长 3~5d。中度嗜盐菌在液体和固体培养基中都为黄色或白色,在平板上表

收稿日期:2007-03-02;修回日期:2007-03-26

基金项目:国家“973”项目资助(2004CB719604-3);国家自然科学基金项目资助(30670048)

作者简介:顾晓颖(1982-),女,硕士生,专业方向:植物学、植物生物技术, E-mail: guxiaoying82@hotmail.com; * 通讯作者:李冠(1949-),男,博/硕士导师,教授, Tel: 0991-8581106, E-mail: guanli@xju.edu.cn。

现为干燥或湿润,液体中生长 1~2d,平板上需生长 2~4d。

2.2 极端嗜盐古菌及中度嗜盐菌 16S rDNA 序列比较及其系统发育

根据 PCR 扩增的结果,将所有的 16S rDNA 序列与从 Gene-Bank 数据库中获得的嗜盐菌 16S rDNA 序列进行比对,发现所有的 51 株菌中有 13 株菌属于 Bacili (*Planococcea*、*Bacillaceae*、*Staphylococcaceae* 三个属), 20 株菌属于 Gammaproteobacteria (*Halomonadaceae*、*Staphylococcaceae* 两个属), 16 株菌属于 Halobacteria (*Halobacteriaceae* 一个属), 2 株菌属 Alphaproteobacteria (*Pseudomonadaceae* 一个属)(表 1)。其中,近 25% 菌株的序列与相应的标准菌株有 100% 的相似性,40% 菌株的序列与相应的标准菌株有 99% 的相似性,35% 菌株的序列与相

应的标准菌株有 98%~96% 的相似性。菌株 BLK7、BLK8、BLK9、BLK10、BLK11、BLK12、BLK13、BLK14、BLK15、BLK16、BLK19、MNS2、MNS10、MNS13、MNS20,这 15 株与已发表种的 16S rDNA 序列有 96%~98% 的相似度。其中,MNS10 与 *Halovibrio denitrificans* 为 96%, BLK7 与 *Halomonas campaniensis* 为 96%, BLK8 和 BLK14 与 *Halomonas boliviensis* 为 97%, BLK19 与 *Haloterrigena thermotolerans* 为 97%, BLK10、BLK12、BLK13 与 *Halomonas campisalis* 为 97%~98%, BLK9 与 *Bacillus vietnamensis* 为 98%, BLK16 与 *Planococcus citreus* 为 98%, BLK15 与 *Bacillus aquamaris* 为 98%, BLK11 与 *Haloterrigena thermotolerans* 为 98%, MNS2 与 *Haloarcula hispanica* 为 98%, MNS13 与 *Haloarcula marismortui* 为 98%, MNS20 与 *Halobacterium saccharovorum* 为 98%。

表 1 巴里坤和玛纳斯两盐湖中嗜盐菌株的系统分类

Table 1 Taxonomic identification of the strains from the Barkol and Manasi salt lake

total	Bacili			Gammaproteobacteria		Alphaproteobacteria	Halobacteria	
	<i>Planococcaceae</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Halomonadaceae</i>	<i>Salicocaceae</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Halobacteriaceae</i>	
Barkol	1	4	0	13	0	0	5	23
Manasi	0	0	8	0	7	2	11	28
Total		13		20		2	16	51

根据序列比对结果,选择相应的标准菌株序列,构建了系统发育树。图 1、2、3 分别表示嗜盐细菌革兰氏阳性菌、嗜盐细菌革兰氏阴性菌及嗜盐古菌的系统发育树。Gammaproteobacteria 科下的 MNS10 与 HGD3 相近,而 HGD3 是 2006 年刚刚发表的菌株,其分类地位还没有确定下来,所以在系统发育树上表现为与其他菌株在不同分类地位下(图 1)。

巴里坤盐湖中嗜盐菌的多样性大于玛纳斯湖,但是玛纳斯湖中的嗜盐古菌的个数大于巴里坤湖。同时,两湖中的中度嗜盐菌的数量均大于嗜盐古菌的数量,这些可能都与两湖的地质结构,形成以及不同的盐浓度有关。

2.3 极端嗜盐古菌与中度嗜盐菌中酶的多样性

在已分离的 51 株菌中,产酯酶的共有 26 株,产蛋白酶的

共有 14 株,产淀粉酶的有 8 株,产脂肪酶的共有 0 株,产纤维素酶的共有 0 株,(见表 2)。巴里坤湖中的嗜盐菌有 61% 产酶,其中,中度嗜盐菌产酶的有 14 株,嗜盐古菌产酶的有 4 株。玛纳斯湖中的嗜盐菌有 79% 产酶,其中,中度嗜盐菌产酶的有 22 株,嗜盐古菌产酶的有 6 株。51% 的菌株能利用吐温 60,只有 28% 和 26% 的菌株具有水解脱脂牛奶和可溶性淀粉的能力。分离菌株的产酶能力存在着种群差异, Gammaproteobacteria 和 Halobacteria 两科产酶的菌株比较多,分别有 60% 和 16% 的菌株能够产生嗜极水解酶,并且都能分泌酯酶、蛋白酶和淀粉酶。其次是 Bacilli 科有 13% 的菌株有产酶的能力,能够分泌酯酶、蛋白酶和淀粉酶。可见,属于中度嗜盐菌的科其产酶菌株的种类和菌株数量比嗜盐古菌中产酶菌的数量

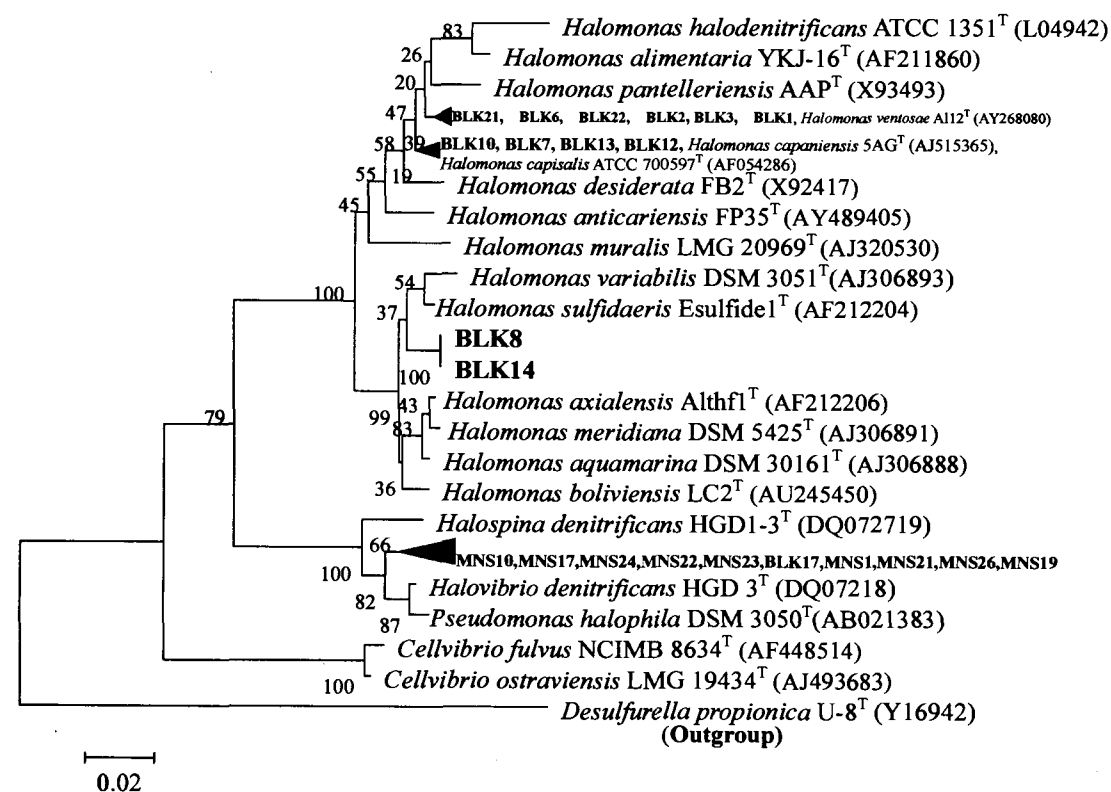


图 1 根据 16S rDNA 序列构建的 Gammaproteobacteria 科和 Alphaproteobacteria 科的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of class Gammaproteobacteria and Alphaproteobacteria based on 16S rDNA gene sequences

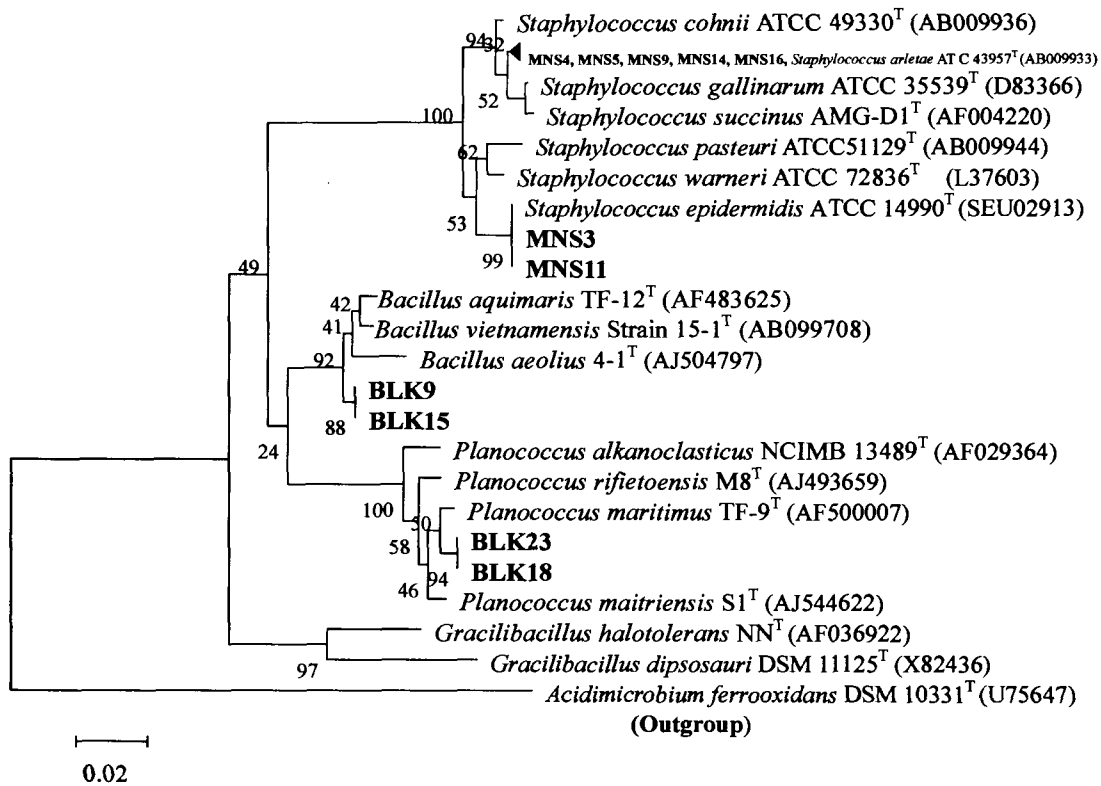


图2 根据16S rDNA序列构建的 *Bacilli* 科的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of class *Bacilli* based on 16S rDNA sequences

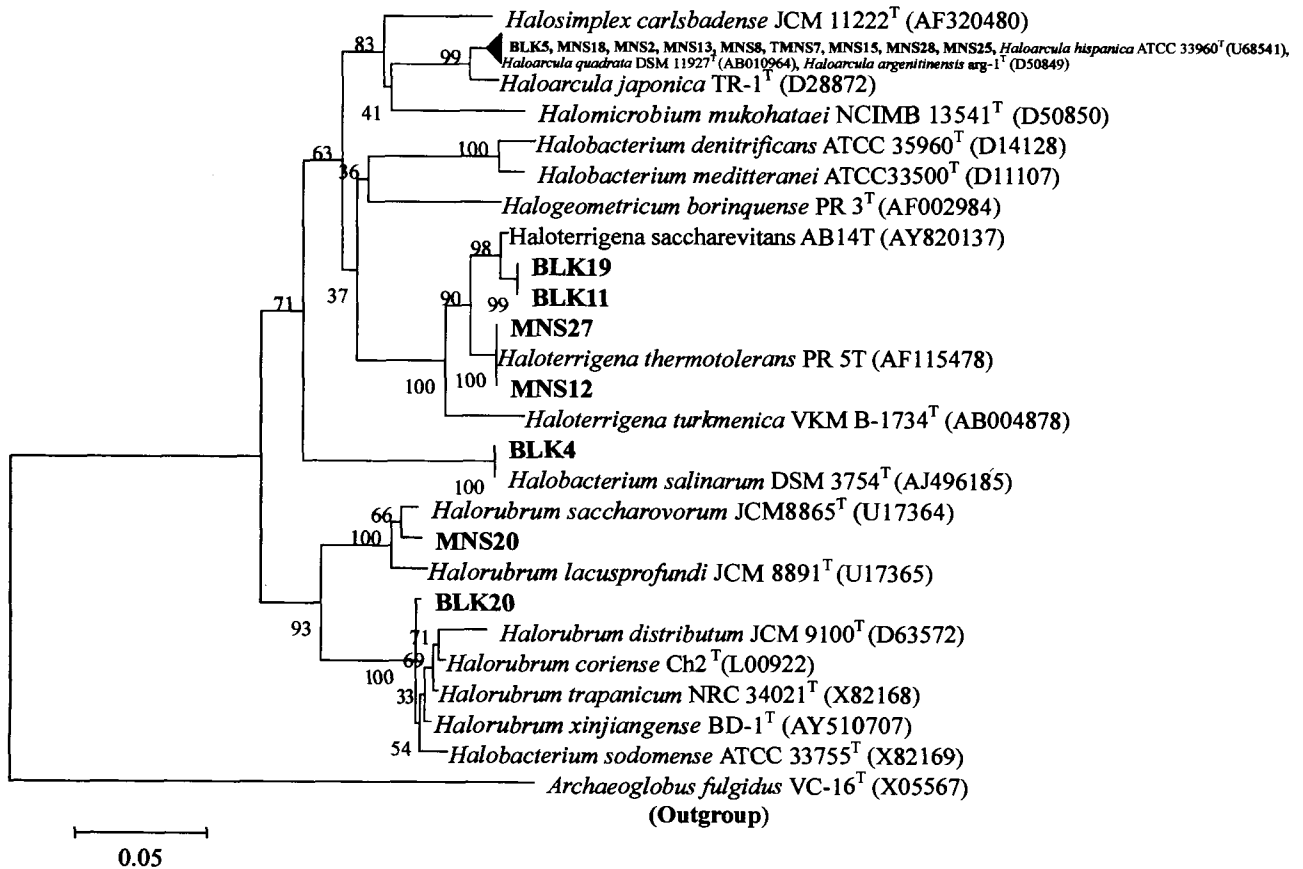


图3 根据16S rDNA序列构建的 *Halobacteria* 科的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of class *Halobacteria* based on 16S rDNA gene sequences

多。特别是 *Bacilli* 科,水解酶的种类和菌株数量均高于其他几个科,这与所报道的相符,先前已有部分该科菌株所产生的酶

用于工业生产^[14]。也可以看到,没有一株菌能够同时产 5 种酶,仅有 2 株同时产 3 种酶,8 株同时产两种酶。由于这几株菌较高的产酶多样性,因而具有较高工业应用潜力。

表 2 从巴里坤和玛纳斯两湖中分离得到的中度嗜盐菌和嗜盐古菌中每种酶的产酶菌数量

Table 2 Hydrolytic activity of the moderately bacteria and halophilic archae from the Barkol and Manasi salt lake

Genus	Lipase	Esterase	Protease	Cellulase	Amylase	total
<i>Gammaproteobacteria</i>	0	10	5	0	2	17
<i>Bacilli</i>	0	6	9	0	5	20
<i>Alphaproteobacteria</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Halobacteria</i>	0	9	0	0	1	10
Total	0	26	14	0	8	48

3 讨论

嗜盐菌是一类需要一定盐浓度并且在一定盐浓度中生长的微生物,根据其嗜盐浓度的不同,又分为轻度嗜盐菌(最适盐浓度 0.2~0.5mol/L)、中度嗜盐菌(最适盐浓度 0.5~2.0mol/L)和极端嗜盐菌(最适盐浓度 >3mol/L)。其中,部分极端嗜盐菌为古菌。嗜盐菌不仅是极端环境的重要组成部分,其本身也是一种重要的微生物资源。16S rDNA 由于既含保守序列又含可变序列的核酸序列,并且其序列变化速度与进化速率相适应,常用于生物物种的分子进化分析^[15]。16S rDNA 序列的系统发育学进化距离和表型特征及化学分类数据有非常好的相关性。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^[16,17]。对巴里坤、玛纳斯两盐湖中的 51 株嗜盐菌的研究表明,有 35% 的菌株与相应的标准菌株有 96%~98% 的相似性,这些菌株可能代表着新的分类单元,有进一步研究的价值。

嗜盐酶因其特殊的活性,可应用于处理海产品、酱制产品以及化工、制药、石油、发酵等排放含高浓度无机盐废水的工业部门^[18]。虽然已有一下主要的水解酶从嗜盐菌中分离出来并进行了性质的研究^[19-22],并且应用于工业生产的嗜盐菌在生物研究方向有极大的潜能,但对其所产极端水解酶的报道还不多见^[7],基本上都是应用于高盐环境中油脂的水解方面^[6]。下一步工作可以寻找产酶量较大,并且有较高酶活的菌株,进一步研究其所产酶的性质,还可以克隆出编码该极端酶的基因,构建具有极端酶基因的工程菌,通过微生物发酵更好的用于工业生产,并且能用于了解嗜盐酶在高温环境下仍可保持活性的机理,以及极端嗜盐菌所产的嗜盐蛋白质如何在极端高盐环境中进化的问题。

新疆是世界盐湖分部最密集的地区之一,具有丰富的物种资源。通过对两个不同盐含量盐湖中可培养嗜盐菌多样性及嗜盐酶多样性的分析,发现了一些有利用价值的物种资源,这对盐湖进一步的开发利用有很大的价值。

致谢:衷心感谢浙江大学嗜极微生物实验室许学伟博士后、张心齐博士、吴月红博士在工作中给予的指导,感谢周祯硕士、李杨霞硕士、卢哲硕士给予的帮助!

参考文献:

[1] Marhuenda - Egea, Frutos C, Bonete, et al. Extreme halophilic enzymes in organic solvents[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4):385 - 389.

[2] Javor B J. Industrial microbiology of solar salt production[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 28:42 - 47.

[3] Birbirm, Sesal C. Extremely halophilic bacterial communities in fiereflikochisar Salt lake in Turkey[J]. *Turkish Journal of Biology*, 2003, 27:7 - 22.

[4] Oreb A. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39:1 - 7.

[5] Pandey, A, Nigam P, Soccol C R, et al. Advances in microbial amylases[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2000, 31:135 - 152.

[6] C Sa' nchez - Porro, S Martín, E Mellado, et al. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94:295 - 300.

[7] 孟凡旭,吴敏,董浩莹,等.阿牙克库木湖嗜盐菌的分离及功能酶的筛选[J]. *浙江大学学报:理学版*, 2006, 33(6):671 - 675.

[8] Antonio Ventosa, Joaquín J Nieto, Aharon Oren. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62:504 - 544.

[9] 梁匡一.新疆的盐湖及其地址、水文地质条件[J]. *干旱区研究*, 1987, 1:1 - 8.

[10] Chapman, Hall. Farina A *Principles and Methods in Landscape Ecology*[M]. London, 1998:1 - 58.

[11] Ventosa F, Quesada F, Rodríguez V, et al. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram - negative rods[J]. *Journal of General Microbiology*, 1982, 128:1959 - 1968.

[12] Cowan D A. *Industrial Enzymes in Biotechnology*[M]. The Science and The Business eds Moses, V. and Cape, R. E., 1991:311 - 340. Reading: Harwood Academic Publishers.

[13] Ronald M Teather, Peter J Wood. Use of congo red - Polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the borine numer[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43:777 - 780.

[14] Mcoonnell D J, Cantwell B A, Devine K M. Genetic engineering of extracellular enzyme systems of *Bacilli*[J]. *Annual New York Academy of Science*, 1986, 469:1 - 17.

[15] 陈文新. 细菌系统发育[J]. *微生物学报*, 1998, 38(3):240 - 243.

[16] Devereux R, He S H, Doyle C L, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(7):3609 - 3619.

[17] Fry N K, Warwick S, Saunders N A, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*[J]. *Journal General Microbiology*, 1991, 137(5):1215 - 1222.

[18] 天作亮.海水直接利用及其环境问题分析[J]. *给水排水*, 1998, 243:64.

[19] Amoozegar M A, Malekzadeh F, Malik A. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp, strain MA - 2[J]. *Journal of microbiological Methods*, 2003, 52:353 - 359.

[20] Waino M, Ingvorsen K. Production of betaxylanase and beta - xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*[J]. *Extremophiles*, 2003, 7(2):87 - 93.

[21] Hiraga K, Nishikata Y, Namwong S, et al. Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2 - 5[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69(1)L:38 - 44.

[22] Sanchez - porro C, Mellado E, Bertoldo C, et al. Screening and characterization of the proteinase CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76[J]. *Extremophiles*, 2003, 7(3):221 - 228.

采食高氟水草对绵羊肋软中 BMP - 2 表达与分布的影响

王利¹, 金曙光^{1*}, 张俊霞²

(1. 内蒙古农业大学动物与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农业大学生物工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:目的:观察过量氟对绵羊肋软骨中 BMP - 2 基因表达及分布的影响。方法:利用内蒙古内陆湖泊乌梁素海高氟水草龙须眼子菜作为饲料氟源,设计 3 个不同氟添加水平(50、100、150mg/kg)和 1 个对照组。2 个月饲喂后屠宰,采用 cRNA - mRNA 原位杂交技术检测绵羊肋软骨中 BMP - 2 表达及分布情况。结果:在正常生长期绵羊肋软骨中只能检测到极少量的 BMP - 2 表达,主要集中于外边缘的成纤维细胞中;而添加高氟水草氟含量 50mg/kg 的试验 I 组, BMP - 2 在成纤维细胞、幼稚软骨细胞、同源细胞群和肥大软骨细胞处均有表达;添加高氟水草氟含量 100mg/kg 的试验 II 组, BMP - 2 在成纤维细胞、幼稚软骨细胞、分裂的同源细胞