

# 嗜盐古菌中氯视紫红质基因序列的遗传分析

时 晗, 吴 敏, 许学伟, 周 祯

(浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310058)

**摘 要:**采用 PCR 方法扩增了嗜盐古菌 AB19、AB30 和 AJ5 编码螺旋 C 至螺旋 G 的氯视紫红质 (halorhodopsin, HR) 蛋白基因片断和 16S rRNA 基因 (16S rDNA), 测定了它们的核苷酸序列, 与已报道的 *hr* 基因序列差异显著. 获得 AJ5 HR 蛋白基因序列在 *Halobiforma* 属中尚属首次. 对 *hr* 基因序列进行的遗传分析, 包括 GC 含量、转换与颠换的比值、密码子使用偏好, 表明 *hr* 基因面临进化选择和偏倚突变压的双重制约, 是一类进化程度较高的基因. 对比 *br* 基因编码蛋白螺旋 C 到 G 的序列发现它们具有相似的种属特征. 采用 BR 和 HR 蛋白螺旋 C 到 G 序列构建系统发生树比传统的 16S rDNA 序列具有优势, BR 和 HR 可以作为两种新型的分子指标.

**关 键 词:**嗜盐古菌; 氯视紫红质; 细菌视紫红质; 遗传分析; 16S rDNA

中图分类号: Q78, Q93

文献标识码: A

文章编号: 1008-9497(2008)01-080-07

SHI Han, WU Min, XU Xue-wei, ZHOU Zhen (College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Genetic analysis of partial sequences of the gene for halorhodopsin in halophilic archaea.** Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2008, 35(1): 80~86

**Abstract:** Partial DNA fragments encoding for helix C to G of halorhodopsin in halophilic archaea AB19, AB30 and AJ5, as well as the 16S rDNA sequences of AB19 and AB30 were proliferated by PCR, and their nucleotide sequences were determined. The detection of AJ5 *hr* gene is the first in the genus *Halobiforma*. The genetic analysis on *hr* gene including GC content, the ratio of transition and transversion, and the codon usage preference indicated that *hr* genes were highly evolved, which were restricted by deflected mutation pressure and evolutionary choice. On the basis of homology and phylogenetic analysis about *hr* and *br* partial fragments encoding helix C to G, *hr* and *br* genes had a similar species variation. And the phylogenetic tree based on the HR and BR helix C to G sequences was more predominant than the one based on 16S rDNA sequences. The two protein sequences could be marked as novel molecular indices.

**Key words:** halophilic archaea; halorhodopsin; bacteriorhodopsin; genetic analysis; 16S rDNA

细胞膜的阴离子转运功能远没有细胞膜的质子转运功能研究得透彻, 在真核细胞和细菌中有一些阴离子泵的报道, 如 ATP 驱动的重碳酸盐泵<sup>[1]</sup>和海洋内伞藻细胞内的氯离子泵<sup>[2]</sup>, 氯视紫红质 (halorhodopsin, HR) 是迄今唯一报道的光驱动的阴离子泵<sup>[3]</sup>. HR 在极端嗜盐菌中普遍存在<sup>[4]</sup>, 是其细胞膜上的一种功能蛋白, 具有稳定的七次跨膜螺旋晶格结构和光驱动氯离子泵的功能. 主要是运输氯离子, 同时也向细胞内运输溴离子、碘离子和硝酸根离子. 在细胞生

长过程中, HR 吸收光能将阴离子转运入细胞内以维持细胞膜两端的渗透压平衡.

HR 作为嗜盐古菌细胞膜上一个重要的功能基因, 对它的研究有广泛的理论价值, 但目前缺少对其分子遗传方面的分析. 细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, BR) 是嗜盐古菌质膜上的光驱动的质子泵<sup>[5]</sup>, BR 和 HR 蛋白序列具有高达 35% 的同源性, 它们在功能和结构上都比较类似<sup>[6]</sup>. 一些研究者根据 BR 蛋白的种属来源将 BR 蛋白分成四类, 而 HR

收稿日期: 2006-10-25.

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 (2005048636).

作者简介: 时 晗 (1981-), 女, 硕士生, 主要从事分子遗传学研究.

蛋白没有类似的报道。

笔者在新疆艾比盐湖中分离纯化到几株极端嗜盐古菌,扩增了其 HR 蛋白螺旋 C 至螺旋 G 的基因保守片断和 16S rDNA 序列,结合 BR 蛋白序列对 HR 进行了系统发育及遗传分析研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株的分离与培养

菌株 AB19、AB30 分离自新疆艾比盐湖的水样, *Halobiforma salilacus* AJ5 由本实验室保存,菌株分离和培养基配方<sup>[7]</sup>为 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。

*E. coli* Top10, 用作基因工程受体菌, 由本实验室保存。

### 1.2 嗜盐古菌总基因组的提取

基因组 DNA 提取方法见文献[8]。

### 1.3 PCR 扩增

根据文献[9,10]设计一对 16S rDNA 序列 PCR 扩增引物, 采用大肠杆菌的 16S rRNA 基因序列做位置参照点, 序列如下: Forward6—22: 5'-AT-TCCGGTTGATCCTGC-3'; Reverse1540—1521: 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCAG-3'。PCR 反应条件为 50 μL 反应体系 30 个循环; 变性: 94 °C, 45 s; 退火: 55 °C, 45 s; 延伸: 72 °C, 75 s。

根据文献[11]合成一对简并引物扩增 *hr* 基因序列, 用 *Nmn. pharaonis* 的 *hr* 基因作为参照位点, 序列如下: hr361—381: 5'-TGGGG(C/G)CG(C/G)TA(C/T)CT(C/G)ACGTGG-3'; hr782—754: 5'-AACGCGAAGA(C/T)G TACTTCGCGA(A/C)GA(C/T)GTC-3'。50 μl 反应体系 30 个循环; 变性 94 °C, 45 s; 退火 55 °C, 45 s; 延伸 72 °C, 45 s。

### 1.4 目的基因序列的转化及测序

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(Sangon)纯化后, 使用 pMD 18-T Vector 克隆载体试剂盒(Takara)连接到 T 载体上, 转化大肠杆菌 Top10, 在含氨苄青霉素(amp<sup>+</sup>)的 LB 平板上 37 °C 生长过夜, 挑取 9 个白斑和 1 个蓝斑振荡培养至对数生长期并抽提质粒, 经 PCR 和酶切验证后, 随机取 3 个阳性重组质粒测序。DNA 序列采用 ABI Prism 377XL 自动测序仪, 经 M13 通用引物正反双向测定获得。

### 1.5 系统发育树的构建

菌株 AB19、AB30 的 16S rDNA 序列与从 GenBank 数据库中获得的嗜盐菌 16S rDNA 序列, 用 seqpup 录入, 并用 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, 比对后的序列用 seqpup 转化为 phylip 格式, 用 Meg3.0 软件包录入序列, 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 bootstrap 取值为 1000<sup>[49]</sup>。

菌株 AB19、AB30、AJ5 的 *hr* 基因和 *br* 基因核心序列翻译成氨基酸序列, 与 GenBank 中相关序列用 seqpup 软件录入, 在 genedoc 软件中手工聚类, 其中的缺口用中性元素填补后用同 16S rDNA 序列的方法构建系统发生树。

### 1.6 *hr* 基因的遗传分析

氨基酸残基亲水性分析采用 Kyte 和 Doollittle 的方法, 在线分析。*hr* 核心序列的嗜好密码子、碱基组成和碱基转换/颠换比值采用 Meg3.0 软件及部分手工计算获得。

## 2 结果

### 2.1 嗜盐古菌的 16S rDNA 序列和系统发育分析

用一对引物扩增菌株 AB19 和 AB30 的 16SrDNA 序列, 分别得到 1472 和 1474 个碱基。表 1 为部分菌株 16S rDNA 序列同源性差异分析, 基于 16S rDNA 序列构建的嗜盐古菌系统发育树见图 1。从树上可以看到, 以 *Archaeoglobus flugidus* 为外种群, 此系统发育亚树基本分为 6 个分支, 菌株 AB19 与 *Haloarcula* 属的菌株分在同一分支中, 与 *Har. marismortui* ATCC 43049<sup>T</sup> 的三条 16S rDNA 序列相似性在 94.6%~99.4% 不等; AB30 与 *Haloterrigena* 属的菌株处于同一分支中。

### 2.2 嗜盐古菌 AB19、AB30 和 AJ5 的 HR 蛋白基因部分序列

菌株 AB19、AB30 和 AJ5 经一对 *hr* 简并引物扩增, 分别获得 422、425 和 422 个碱基对的基因部分序列, 电泳图谱见图 2。测序结果表明, 该三条序列与已报道菌株的编码 HR 蛋白 GC 片段的核苷酸序列具有明显差异。HR 蛋白的氨基酸序列亲水性分析采用 Kyte 和 Doollittle (1982) 的方法<sup>[12]</sup>, 跨膜蛋白用 9 个残基作为区间计算, 结果表明菌株 AB19、AB30 和 AJ5 与 *Hbt. salinarum* NRC-1 的 HR 蛋白 GC 片断具有相似的亲水性图谱, 见图 3。

表 1 嗜盐古菌各菌株 16S rDNA 序列相似性  
Table 1 Similarity of 16SrDNA sequence of halophilic archaea strains

No. and Abbreviation	Similarity of 16S rDNA sequences/%										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 strain AB19		86.9	87.8	88.1	87.8	98.8	94.6	99.3	99.4	89.7	87.5
2 strain AB30			87.8	94.2	94.0	87.7	88.8	87.3	87.1	87.0	98.6
3 <i>Hbt. salinarum</i> NRC-1				90.0	90.2	87.4	90.1	87.9	87.6	87.1	90.4
4 <i>Hbf. salilacus</i> AJ5 <sup>T</sup>					99.0	87.9	89.6	88.2	88.0	87.9	94.0
5 <i>Hbf. haloterrestis</i> 135 <sup>T</sup>						87.6	89.6	84.8	87.7	87.8	93.5
6 <i>Har. vallismortis</i> NCBM 2082 <sup>T</sup>							94.4	99.5	98.8	89.1	87.2
7 <i>Har. marismortui</i> ATCC43049 <sup>T</sup> rrnA								94.8	94.4	90.7	88.7
8 <i>Har. marismortui</i> ATCC43049 <sup>T</sup> rrnB									99.2	89.6	87.6
9 <i>Har. marismortui</i> ATCC43049 <sup>T</sup> rrnC										89.6	87.4
10 <i>Hmc. mukohataei</i> arg-2 <sup>T</sup>											87.0
11 <i>Htg. thermotolerans</i> H6											

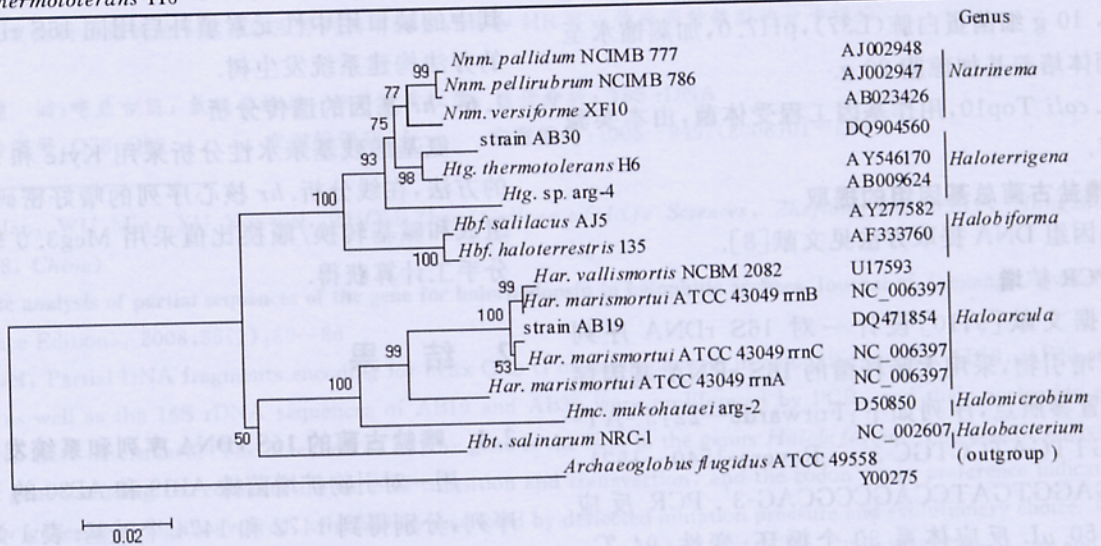


图 1 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences from the 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. The bar represents the scale of estimated evolution distance (2 substitutions at any nucleotide position per 100 nucleotide positions)

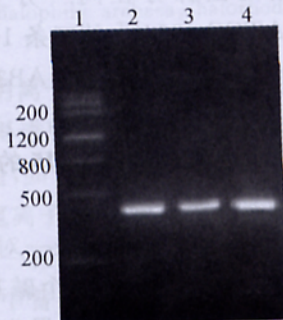


图 2 菌株 AB19、AB30 和 AJ5 的 *hr* 基因部分序列 PCR 产物扩增图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of *hr* partial gene sequences for AB19, AB30 and AJ5.

The products for separated on a 2.0% Agarose gel

1. DNA Marker; 2. AB19; 3. AB30; 4. AJ5

lane 1. DNA marker, lane 2. AB19, lane 3. AB30, lane 4. AJ5

菌株 AB19、AB30 和 AJ5 的 HR 蛋白序列分别与已报道菌株的 HR 蛋白序列同源性在 59%~90%、61%~76% 和 59%~76% 之间,各菌株间 HR 蛋白螺旋 C 到 G 序列间的比较见图 4, HR 蛋白中视黄醛结合和阴离子传输相关的氨基酸残基较保守. 序列上方的横线表示根据 *Hbt. salinarum* HR 蛋白质高级结构<sup>[12]</sup> 推测的跨膜螺旋; E 和 C 分别表示膜外侧和膜内侧; A 表示与氯离子(阴离子)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; # 表示跨膜螺旋内部面向脂分子的氨基酸残基; MYM 表示推测的蛋白疏水区域.

计算并描绘了其密码子不同位点的 GC 含量(见图 5),可见所有 *hr* 片段都富含 GC,其值从 60.2 到 66.9 不等,平均值为 64.8%. 密码子第三位平均

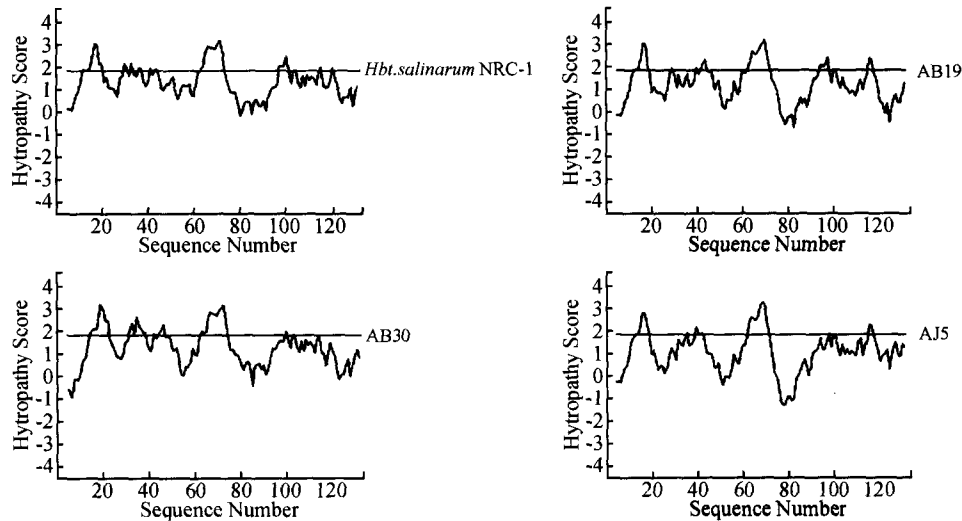


图 3 菌株 *Hbt. salinarum* NRC-1、AB19、AB30 和 AJ5 中 HR 蛋白自氨基酸 106~246 计算得的亲水指数  
 Fig. 3 Hydropathic profile from amino acid residue 106 to 241 of *Hbt. salinarum* NRC-1, AB19, AB30 and AJ5 HR  
 The profile is calculated according to Kyte and Doolittle (1982) with span setting of 9

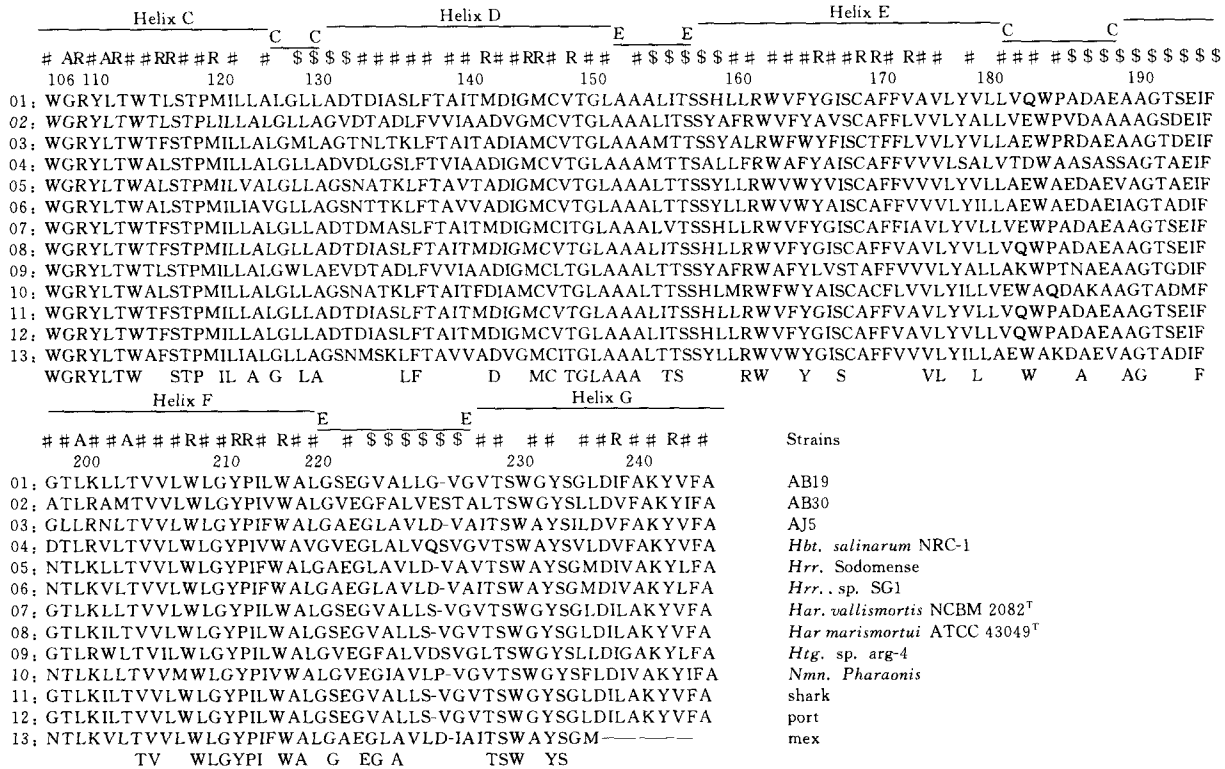


图 4 嗜盐古菌 HR 螺旋 C 至螺旋 G 的氨基酸排列比较  
 Fig. 4 Alignment of known HR sequences from various halophilic archaea

Gaps (denoted as -) were introduced into sequences to optimize alignments. Numbering of residues corresponds to *Hbt. salinarum* NRC-1 HR. Black cylinders above the sequences indicate the transmembrane helices (helix C to G) based on the three-dimensional structure of *Hbt. salinarum* HR. E and C above black cylinders indicate extracellular and cytoplasmic sides, respectively. Amino acid residues in Cl<sup>-</sup> (anion ion channel) are marked as A, and amino acid residues contacting retinal are marked as R. Deduced hydrophilic regions are marked as \$. Amino acid residues facing lipids in transmembrane helices are marked as #. Consensus sequences among all halorhodopsins are shown at the bottom of the sequences.

GC 含量高达 90.0%, 并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, 表明 *hr* 基因面临强大的进化压力。通过 Meg3.0 软件包分析不同 *hr* 核心序列碱基转换

颠换比平均值为 0.6, 颠换多于转换, T-C 转换多于 A-G, C-G 和 T-G 颠换明显多于 A-T 和 A-C 转换; 对 *hr* 的密码子使用频率和相对同义密码子使用频率(relative synonymous codon usage, RSCU) 分析发现, 在所有研究序列中没有一例具有终止密码子, 密码子使用频率也具有较明显的偏倚, 表明 *hr* 基因是一类具有较高遗传分化水平的基因。

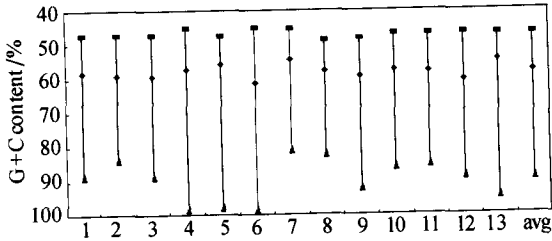


图 5 *hr* 基因片段不同密码子位点的 GC 含量  
Fig. 5 Differentiation of GC content at different codon sites among 13 *hr* gene fragments

Symbols and strains: (◆) the first site of codon, (▲) the second site of codon, (■) the third site of codon; (1) strain port, (2) strain shark, (3) *Har. vallismortis* NCBM 2082<sup>T</sup>, (4) *Hrr. sodomense* SG1, (5) strain mex, (6) *Hrr. sodomense*, (7) *Nmn. Pharaonis*, (8) *Haloterrigena sp. arg-4*, (9) *Hbt. salinarum* NRC-1, (10) *Har. marismortui* ATCC 43049<sup>T</sup>, (11) strain AB19, (12) strain AB30, (13) *Hbf. salilacus* AJ5<sup>T</sup>, (avg) average value

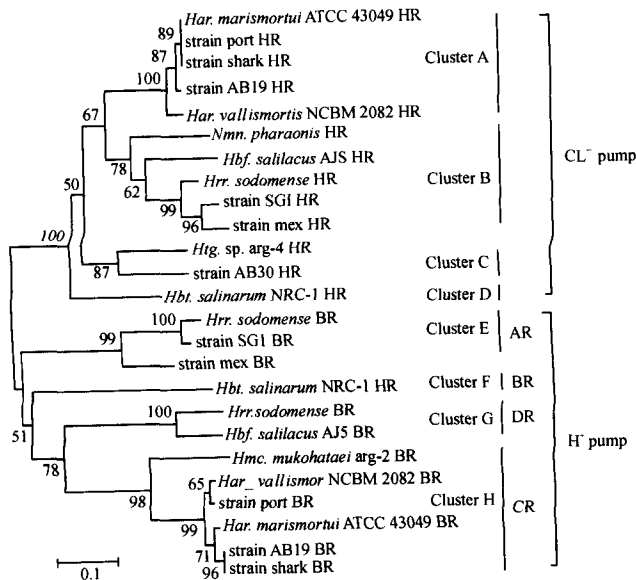


图 6 基于 HR、BR 蛋白部分序列的无根树  
Fig. 6 Unrooted phylogenetic tree based on partial HR and BR protein sequences

The tree was constructed using the neighbor-joining method with bootstrap values calculated from 1000 trees. The number at each branch point represents the percentage bootstrap support. Bar, 0.1 sequence divergence

BR 和 HR 蛋白的螺旋 C-G 在序列和空间结构上都有高度的保守性, 因此选取 12 个 BR 蛋白和 13

个 HR 蛋白的螺旋 C-G 序列构建系统发生树(见图 6). 从树上可以看到, 25 个序列被分在两个大的分支中, 与它们的功能紧密相关. 从 H<sup>+</sup> pump 分支中 12 条 BR 蛋白序列依据来源于不同属被分为四大类群, AR、BR、CR 和 DR<sup>[13]</sup>, 而在 Cl<sup>-</sup> pump 分支中的 13 条 HR 蛋白序列也有类似的分布。

### 2.3 数据库序列号

菌株 AB19、AB30 和 AJ5 的 *hr* 基因序列, AB19 和 AB30 的 16S rDNA 序列, 已登陆到 GenBank 核苷酸序列 GenBank 数据库中, 序列号及相关菌株的数据库序列号如表 2 所示。

## 3 讨论

从 16S rDNA 序列的系统发育亚树上, 菌株 AB19 与 *Har. marismortui* 和 *Har. vallismortis* 分在同一分支中, 序列同源性在 94.6%~99.4%, 而与其它序列同源性低于 93%; AB30 与 *Htg thermotolerans* 处于同一分支中, 同源性达到 98.6%。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<sup>[16]</sup>. 所以 AB19 和 AB30 分别是 *Haloarcula* 和 *Haloterrigena* 属下的新成员. 采用 HR 和 BR 蛋白螺旋 C-G 序列构建的系统发生树, 根据蛋白的相应功能分为两大类群, 在每一类群中对比 16S rDNA 序列构建的系统发生树都有很好的一致性, 但在局部分析时, 比较 16S rDNA 序列对构建的系统树有一定的优势, 表现为嗜盐古菌中存在 rRNA 异质性的现象(如: *Haloarcula marismortui* 中的 *rrnA*、*rrnB* 和 *rrnC*), 而 *hr* 和 *br* 作为细胞膜上重要的功能基因, 还未发现该现象. 并且蛋白序列比 16S rDNA 序列更容易排序, 没有密码子选择的问题而排除了饱和效应的影响. 因此建议 HR 和 BR 蛋白的螺旋 C-G 序列可以作为嗜盐古菌中系统发育分析的新型分子指标。

目前, 嗜盐古菌为一个科(嗜盐菌科), 15 个属, 50 几个种<sup>[14]</sup>, 现已报道的 HR 蛋白分别来自于 5 个属中: *Halobacterium*、*Haloarcula*、*Halorubrum*、*Haloterrigena* 和 *Natronomonas*<sup>[6]</sup>. 上世纪 90 年代, 人们把来自不同属中的具有质子泵功能的视黄醛结合蛋白分成 4 类: *Haloarcula* 属的古视紫红质 (archaerhodopsin, AR), *Halorubrum* 属的十字视紫红质 (cruxrhodopsin, CR), *Haloterrigena* 属的德尔塔视紫红质 (deltarhodopsin, DR) 和 *Halobacterium* 属中的 BR<sup>[17]</sup>. 类似的报道未出现在具有氯

表 2 嗜盐古生菌菌株及其 *hr*、*br* 基因和 16S rDNA 序列的数据库登陆号

Table 2 Halobacterial strains and accession numbers of genes encoding for halorhodopsin and bacteriorhodopsin and 16S rDNA gene sequences

Genus or Species	Strains	<i>br</i>	<i>Hr</i>	16S rDNA
<i>Hbt. salinarum</i>	NRC-1	NC_002607	NC_002607	NC_002607
<i>Hrr. Sodomense</i>	Unknown	D50848	AB009622	X82169
	SG1	X70291	X70292	ND
<i>Har. vallismortis</i>	NCBM 2082 <sup>T</sup>	D31882	D31881	U17593
<i>Har. marismortui</i>	ATCC 43049 <sup>T</sup>	NC_006396	NC_006396	NC_006397
<i>Hmc. mukohataei</i>	arg-2 <sup>T</sup>	S76743	ND	D50850
<i>Haloterrigena</i>	arg-4	AB009620	AB009621	AB009624
<i>Htg. thermotolerans</i>	H6	ND	ND	AY546170
<i>Nmn. pharaonis</i>	Unknown	ND	J05199	D87971
<i>Hbf. salilacus</i>	AJ5 <sup>T</sup>	AY607024	DQ904562	AY277582
<i>Hbf. haloterrestris</i>	135 <sup>T</sup>	ND	ND	AF333760
Miscellaneous	Shark	D11058	D43765	ND
	Port	D11057	D43766	ND
	Mex	D11056	D11136	ND
	AB19	DQ352132	DQ471855	DQ471854
	AB30	ND	DQ904561	DQ904560

ND, not determined

离子泵功能的视黄醛结合蛋白中. 在 HR 和 BR 蛋白序列构建的系统发育亚树上可以看到, H<sup>+</sup> pump 分支中 BR 蛋白序列依据来源于不同属被分为 AR-DR 四大类群, 而在 Cl<sup>-</sup> pump 分支中也有类似的分布. 由此可见, HR 与 BR 不但有相似的蛋白结构和功能<sup>[16]</sup>, 同样具有相似的种属特征.

从 16S rDNA 的系统发育亚树上看, AB19、AB30 和 AJ5 与 *Hbt. salinarum* NRC-1 有较明显的进化距离, 然而它们的 HR 蛋白序列 CG 片段之间都有相似的亲水性图谱, 具有类似的二级结构. 根据 HR 蛋白螺旋 C 到 G 间序列的比较发现, HR 蛋白的 N 端氨基酸排列次序的变异比较明显, 但是位于螺旋 C 到 G 内的氨基酸残基相对保守. 与视黄醛结合的 19 个氨基酸残基(Y109、W112 等)都绝对保守; 与阴离子通道相关的氨基酸残基 R108、T111 和 T203 都绝对保守, 而第 200 位氨基酸部分保守在 13 条 HR 序列中, 4 条为 Arg, 其余为 Lys, 具有明显的种属特征, 但依然保持其作为阴离子通道的功能. 在 *Haloarcula*、*Halorubrum* 和 *Natromonas* 属中为 Lys, *Halobacterium* 和 *Haloterrigena* 属中的为 Arg. 笔者所获得的三条 HR 序列中, AB19 的是 Lys, AJ5 和 AB30 的为 Arg, 这与它们的 16S rDNA 序列所分析结果非常一致, 可见 HR 蛋白具有明显的种属差异. 而且螺旋内氨基酸保守性大于螺旋间, 这与螺旋内氨基酸更多的参与离子传递和视黄醛生色团的绑定, 维持蛋白质结构有关; 位于细胞膜外侧

的序列比位于细胞膜内侧的序列具有更多的疏水性氨基酸, 这与细胞膜外侧序列面对环境较为恶劣有关. 其中 AJ5 菌株中的 HR 蛋白是在 *Halobiforma* 属中的第一次发现.

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%). 密码子第二位的替代, 全部是非同义替代, 而 *hr* 基因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. 密码子第一位有一小部分是同义的替代, 使其 GC 含量介于第三位和第二位之间. *hr* 基因序列密码子使用也存在明显的偏倚, 对 Val 而言, 密码子 GUC 和 GUG 的使用频率明显高于 GUU 和 GUA, 对于 Phe 而言, UUC 的使用频率明显高于 UUU, 对于 Tyr 而言 UAC 的使用频率也明显高于 UAU 等等, 这与偏倚突变压密切相关. 显然 *hr* 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. *hr* 基因具有较低的转换与颠换比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>[17]</sup>, 因此它们是一类进化水平较高的基因. 分析的这 13 条 *hr* 基因序列间 GC 含量比较一致, 平均值为 64.8%, 与已完成测序工作的三株嗜盐古菌的总基因组 GC 含量类似<sup>[18~20]</sup>, 如嗜盐古菌 *Hbt. salinarum* NRC-1 全基因组的 GC 含量为 67.9%<sup>[18]</sup>, 因此可以推测其它嗜盐古生菌全基因组也存在 GC 偏好.

## 参考文献(References):

- [1] GIHRING T M, BOND P L, PETERS S C, et al. Arsenic resistance in the archaeon "Ferroplasma acidarmanus"; new insights into the structure and evolution of the ars genes[J]. **Extremophiles**, 2003, 7(2): 123-130.
- [2] GERENCSEK G A, ZHANG J. Cl<sup>-</sup>-ATPases: Novel primary active transporters in biology[J]. **J Exp Zool**, 2001, 289(4): 215-223.
- [3] NISHIDA H, SAKAMOTO T, TAKESHITA T, et al. Crystallization of halorhodopsin from *Halobacterium* sp. shark[J]. **Biochim Biophys Acta**, 2005, 1749(1): 143-145.
- [4] KOLBE M, BESIR H, ESSEN L O, et al. Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution [J]. **Science**, 2000, 288(5470): 1390-1396.
- [5] CHENG L Y, ZHANG Y, LIU S G, et al. Studies on the temperature effect on bacteriorhodopsin of purple and blue membrane by fluorescence and absorption spectroscopy[J]. **Acta Biochim Biophys Sin**, 2006, 38(10): 691-696.
- [6] 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(1): 163-174.
- [7] 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.
- [8] 李凌, 吴敏, 乔守怡, 等. br 基因的克隆及表达[J]. **浙江大学学报: 工学版**, 2001, 35(3): 324-327.  
LI Ling, 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.
- [9] GUPTA R, LANIER J M, WOESE C R. Sequence of the ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an archaeobacterium[J]. **Science**, 1983, 221: 656-659.
- [10] ARAHAL D R, DEWHIRST F E, PASTER B J, et al. Phylogenetic analysis of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1996, 62(10): 3779-3786.
- [11] OTOMO J, MURAMATSU T. Over-expression of a new photo-active halorhodopsin in *Halobacterium salinarium*[J]. **Biochim Biophys Acta**, 1995, 1240(2): 248-256.
- [12] KYTE J, DOOLITTLE R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. **Journal of Molecular Biology**, 1982, 157: 105-132.
- [13] WANG Y R, HONG J, MING M, et al. Rapid cloning of an archaeorhodopsin gene from *Halobacterium* species xz515 by LPA[J]. **J Fudan Univ: Natural Sci**, 2003, 42: 576-582.
- [14] MUKOHATA Y, IHARA K, TAMURA T, et al. Halobacterial rhodopsin [J]. **Journal of Biochem**, 1999, 125: 649-657.
- [15] MAGYARI K, SIMON V, VARO G. The influence of the halide ions on the photochemical reaction cycle of pharaonis halorhodopsin[J]. **J Photochem Photobiol B**, 2006, 82(1): 16-20.
- [16] GYÖRGY V. Analogies between halorhodopsin and bacteriorhodopsin [J]. **BBA Bioenergetics**, 2000, 1460: 220-229.
- [17] COMERON J M. K-estimator: calculation of the number of nucleotide substitutions per site and the confidence intervals[J]. **Bioinformatics**, 1999, 15: 763-764.
- [18] NG W V, KENNEDY S P, MAHAIRAS G G, et al. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1 [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2000, 97(22): 12176-12181.
- [19] 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.
- [20] FALB M, PFEIFFER F, PALM P, et al. Living with two extremes: conclusions from the genome sequence of *natronomonas pharaonis*[J]. **Genome Res**, 2005, 15(10): 1336-1343.

(责任编辑 涂 红)