

# 极端嗜盐古菌遗传转化系统的研究

周梅先 向 华\* 谭华荣

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

**摘 要** 对极端嗜盐古菌遗传转化系统的研究进展进行了综述,内容包括抗性标记基因的选择,基因克隆和表达载体系统的发展以及受体系统的改造。

**关键词** 极端嗜盐古菌,遗传转化系统,基因克隆与表达

中图分类号 Q933 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)03-0267-05

根据目前生物界最新的分类标准,地球上的生命可分为三大类,称为域(Domains),即细菌(Bacteria)域,古菌(Archaea)域和真核生物(Eukarya)域<sup>[1]</sup>。古菌具有如下特征:膜脂成分和结构以及细胞壁组份和结构与细菌和真核生物截然不同,基因和基因组的组织方式接近于细菌,但是在 DNA 复制、转录和翻译机制上与真核生物更相似;对抑制细菌生长的抗生素一般不敏感,而对抑制真核细胞生长的某些抗生素敏感。古菌的发现加深了我们对生命本质的认识,古菌也因此成为研究的热点。

极端嗜盐古菌是古菌的一个重要菌群,能在 2~5mol/L NaCl 高盐环境中最适生长。极端嗜盐古菌也是极端环境微生物的重要组成部分,极具应用前景<sup>[2]</sup>。极端嗜盐古菌由于其特殊的进化地位和潜在的应用价值,已成为微生物生理、生化、生态及进化学家研究的重要对象。近年来在分子生物学领域也取得了长足的进步,这主要得益于极端嗜盐古菌分子遗传学方面的几个关键技术:如极端嗜盐古菌 PEG-介导的原生质体转化方法的建立<sup>[3]</sup>,极端嗜盐古菌遗传转化系统的发展,以及基因删除(Knock out)<sup>[4]</sup>,基因互补(Complementation)<sup>[5,6]</sup>和定点突变(Directed mutagenesis)<sup>[7]</sup>等技术在极端嗜盐古菌中的应用等。本文将就极端嗜盐古菌遗传转化系统这一领域的研究进展作一综述。

## 1 极端嗜盐古菌的载体系统

质粒在极端嗜盐古菌中普遍存在,根据载体构建的需要,人们对极端嗜盐古菌的较小质粒 pHV2<sup>[8]</sup>、pHGN1<sup>[9]</sup>、pGRB1<sup>[10]</sup>、pHSB1<sup>[11]</sup>和 pZMX10(3.9kb,周梅先、向华、谭华荣等,未发表资料)进行了全序列测定,对较大质粒 pHH1<sup>[6]</sup>、pNRC100<sup>[12]</sup>和 pHK2<sup>[13]</sup>进行了最小复制子定位,这些质粒为极端嗜盐古菌载体系统的发展提供了基本材料。另外,莫维

诺林(Mevinolin, Mev)和新生霉素(Novobiocin, Nov)等抗生素的抗性选择标记基因的相继克隆以及重要表达调控元件如启动子的研究为极端嗜盐古菌载体系统的逐步完善奠定了基础。

### 1.1 抗性选择标记及其基因克隆

极端嗜盐古菌由于其独特的生理生化和遗传特性及其细胞内的高盐浓度,使其对常规的抗生素不敏感,因此,寻找合适的抗性选择标记非常重要。1986年 Cabrera 及其同事报道了真核生物 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoA 还原酶)的抑制剂莫维诺林也强烈地抑制极端嗜盐古菌的 HMG-CoA 还原酶的活性<sup>[14]</sup>。1993年 Nieto 等人发现极端嗜盐古菌对新生霉素和茴香霉素(Anisomycin, Ani)很敏感<sup>[15]</sup>,新生霉素是 DNA 促旋酶的活性抑制剂,茴香霉素几乎对所有的极端嗜盐古菌有强烈的抑制效果,尤其是对 *Haloferax* 属的成员。

目前用于极端嗜盐古菌遗传转化系统抗性选择的抗生素主要是新生霉素、莫维诺林、茴香霉素和硫链丝菌素(Thio-strepton, Ths)等,相应的抗性基因也已在极端嗜盐古菌中被相继克隆。1989年 Lam 等人利用 *Haloferax volcanii* 对莫维诺林的自发抗性突变体,采用鸟枪法克隆到莫维诺林的抗性基因,并将其定位在一个 3.5kb 的片段上<sup>[16]</sup>。1992年 Lam 等人又对该 3.5kb 的 DNA 片段进行了测序,发现含有一个 HMG-CoA 还原酶基因(*hmg*),由于其启动子区域内-29 碱基处的碱基 G 突变为 C,从而导致了莫维诺林抗性<sup>[17]</sup>。1990年 Holmes 等人筛选到 *Haloferax* Aa 2.2 对新生霉素的自发抗性突变体<sup>[18]</sup>,同样采用鸟枪法克隆到新生霉素的抗性基因。1991年 Holmes 等人又利用同源重组和 DNA 序列分析证明新生霉素抗性基因为促旋酶 B 亚基基因(*gyrB*)的突变体,基因突变导致 *gyrB* 蛋白在 82、122 和 137 位氨基酸发生变化,从

收稿日期 2001-09-20,修回日期 2002-02-20。

基金项目:中国科学院知识创新工程资助项目基金资助(No. KSCX2-3-01-02)。

\* 通讯作者。Tel 86-10-62656916; Fax 86-10-62654083; E-mail xiangh@sun.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

而使突变菌株抗新生霉素能力比野生型菌株提高至 1000 倍<sup>[19]</sup>。1992 年 Mankin 等人采用两步筛选程序,得到了 *Halobacterium halobium* 对茴香霉素和硫链丝菌素有抗性的自发突变体,通过部分测序发现抗性来自于 *Halobacterium halobium* 染色体上 23S rRNA 基因的两个位点突变,1159 位 A → G 导致硫链丝菌素抗性,而 2471 位 C → T 导致茴香霉素抗性<sup>[20]</sup>。近来, Wendoloski 等人从亲缘关系比较远的 *Haloarcula hispanica* 菌株中克隆到 Simvastatin(莫维诺林衍生物)抗性基因(*hmgA*)<sup>[21]</sup>,它与来自于 *Haloferax volcanii* 的莫维诺林抗性基因 *hmg* 只有 78% 的一致性。将此抗性基因用于载体 pMDS99 的构建,发现该载体可以在 *Haloferax volcanii* 中稳定存在,而且与染色体 DNA 重组率很低。

### 1.2 极端嗜盐古菌的克隆载体

以极端嗜盐古菌内源性质粒为基础,已发展了一系列的克隆载体,组成元件见表 1。这些载体多为穿梭载体,带有极端嗜盐古菌复制子,大肠杆菌复制子,多克隆位点以及用于在极端嗜盐古菌和大肠杆菌中筛选转化子的抗性选择标记。1989 年 Lam 等人首次构建了克隆载体 pWL101 和 pWL102,这两个载体都是 *E. coli-Haloferax volcanii* 穿梭载体,是由 *Haloferax volcanii* 的内源性质粒 pHV2 衍生而来的<sup>[16]</sup>。较为常用的是 pWL102,它不仅可以在 *Haloferax volcanii* 以及 *Haloferax* 属的其它成员(如 *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 等),而且还可以转化 *Halobacterium halobium* 以及亲缘关系比较远的 *Haloarcula* 属的成员<sup>[22]</sup>。另外, pWL102 比较稳定,在无抗性选择压力下传代 30 次,载体仍然不丢失<sup>[22]</sup>。与 pWL102 相似,由 *Halobacterium halobium* 质粒 pHH1 衍生的 *E. coli-Halobacterium halobium* 穿梭载体 pUBP2 不仅可以转化

*Haloferax volcanii*, 而且也可以转化亲缘关系比较远的 *Haloarcula* 属的成员,另外其在无抗性选择压力下也比较稳定<sup>[22]</sup>。因此, pWL102 和 pUBP2 是极端嗜盐古菌研究中较为通用的克隆载体,并广泛用于其它载体的构建。

由 *Haloferax* Aa 2.2 的内源性质粒 pHK2 衍生的 pMDS 系列克隆载体都是 *E. coli-Haloferax volcanii* 穿梭载体,其主要代表是 pMDS20 和 pMDS30。pMDS20 含有许多克隆位点,便于对极端嗜盐古菌的基因进行克隆<sup>[23]</sup>,利用该载体构建的表达载体已成功表达了来自于 *Haloferax alicantei* 的 β-半乳糖苷酶基因<sup>[24,25]</sup>。pMDS20 经进一步加工,并与 pUC19 的多克隆位点和 *lacZ'* 基因相连构建的 pMDS30 克隆载体,则可在 *E. coli* 中方便地根据蓝白斑来筛选克隆。Kamekura 等人利用 pMDS30 上的多克隆位点成功地克隆表达了丝氨酸蛋白酶(嗜盐溶解酶 R4)基因和龙胆酸盐 1,2-过氧化物酶基因<sup>[26]</sup>。将 pMDS20 与克隆至 pBluescript SK-的莫维诺林抗性基因连接得到一个含有新生霉素和莫维诺林两种抗性选择标记的克隆载体 pMLH3,由于外源基因的插入失活使得目标转化子的检测更加容易<sup>[23]</sup>。此外,还有一些克隆载体具有特殊的用途,如 pHRZH 是由 *Halobacterium halobium* SB3 的内源性质粒 pHSB1 衍生的 *E. coli-Halobacterium halobium* 穿梭载体,含有 *Halobacterium halobium* 的完整的 rRNA 操纵子,其 23S rRNA 基因上有两个位点发生突变导致对茴香霉素(C2471T)和硫链丝菌素(A1159G)两种抗生素产生抗性,在这两个位点之间设计新的突变,利用 pHRZH 上的 rRNA 操纵子与染色体同源重组并通过上述两种抗性选择获得重组子,可以实现对染色体 rRNA 操纵子定点突变之目的<sup>[20]</sup>。

表 1 极端嗜盐古菌的克隆载体

Table 1 The cloning vectors in extremely halophilic archaea

克隆载体	复制子	选择标记	其它元件	大小	宿主	文献
pWL101	pHV2, pBR322	Amp <sup>r</sup> , Mev <sup>r</sup>	无	15	<i>E. coli-Hf. volcanii</i>	[16]
pWL102	pHV2, pBR322	Amp <sup>r</sup> , Mev <sup>r</sup>	无	10.5	<i>E. coli-Hf. volcanii</i>	[16]
pMDS1	pHK2, pBS(+)	Amp <sup>r</sup> , Nov <sup>r</sup>	无	20.4	<i>E. coli-Hf. volcanii</i>	[35]
pMDS10	pHK2, pBS(+)	Amp <sup>r</sup> , Nov <sup>r</sup>	无	12.7	<i>E. coli-Hf. volcanii</i>	[35]
pMDS11	pHK2, pBS(+)	Amp <sup>r</sup> , Nov <sup>r</sup>	无	9.5	<i>E. coli-Hf. volcanii</i>	[35]
pMDS20	pHK2, <i>E. coli ori</i>	Amp <sup>r</sup> , Nov <sup>r</sup>	无	10	<i>E. coli-Hf. volcanii</i>	[23]
pMDS30	pHK2, <i>E. coli ori</i>	Amp <sup>r</sup> , Nov <sup>r</sup>	<i>lacZ'</i>	9.75	<i>E. coli-Hf. volcanii</i>	[26]
pMDS99	pHV2, <i>E. coli ori</i>	Kna <sup>r</sup> , Mev <sup>r</sup>	无	7.3	<i>E. coli-Hf. volcanii</i>	[21]
pMLH3	pHK2, <i>E. coli ori</i>	Amp <sup>r</sup> , Mev <sup>r</sup> , Nov <sup>r</sup>	无	11.3	<i>E. coli-Hf. volcanii</i>	[23]
pUBP2	pHH1, <i>E. coli ori</i>	Amp <sup>r</sup> , Mev <sup>r</sup>	无	12.3	<i>E. coli-Hf. volcanii</i>	[6]
pHRZH	pHSB1, pBR322	Amp <sup>r</sup> , Ani <sup>r</sup> , This <sup>r</sup>	rRNA operon	14.4	<i>E. coli-Hb. halobium</i>	[20]

### 1.3 极端嗜盐古菌的表达载体

将极端嗜盐古菌的克隆载体与极端嗜盐古菌特殊的启动子及其它表达调控元件加以组合可构建成表达载体,实现基因的同源或异源表达,以进行基因功能的研究。

一些极端嗜盐古菌的膜蛋白基因可与极端嗜盐杆菌(*Halobacterium* sp.)的细菌视蛋白(Bacterio-opsin)基因(*bop*)的启动子融合而实现高效表达。1993 年,Heymann 等人将 *bop* 强启动子与嗜盐视蛋白(Halo-opsin)基因(*hop*)融合,利用 *E.*

*coli-Haloferax volcanii* 穿梭载体 pH455 构建的表达质粒,在嗜盐菌视紫质(Halorhodopsin,简称 HR)缺陷型菌株 *Halobacterium halobium* 中实现了嗜盐视蛋白的过量表达<sup>[27]</sup>。这是第一个关于含有 7 个螺旋的跨膜蛋白在极端嗜盐古菌中成功表达的例子,表明该系统也可能适用于跨膜蛋白家族的其它成员在极端嗜盐古菌中的表达及功能研究。同年, Krebs 等人将定点突变的传感视紫质(Sensory rhodopsin I,简称 SR-I)基因(*srI*)与 *bop* 启动子区以及终止区融合,利用 pGB1 衍生

的表达质粒 pSO7 $\Delta$  在传感视紫质 I 缺陷型菌株 *Halobacterium salinarium* 中实现了突变的 SR-I 表达<sup>[7]</sup>。1996 年 Otomo 将 *bop* 启动子与 His-95 发生突变的 *hop* 融合, 在嗜盐菌视紫红质缺陷型菌株 *Halobacterium salinarium* 中进行了表达, 发现 His-95 对于嗜盐菌视紫质的氯化物的运输非常关键<sup>[28]</sup>。1998 年 Kamekura 等人用同样的方法将带有 *bop* 启动子的来自于 JCM9743 菌株的 *bop* 插入非整合质粒载体 pXLNov-R, 在细菌视紫质(Bacteriorhodopsin, 简称 BR)缺陷型菌株 *Halobacterium salinarium* 中得到了表达<sup>[29]</sup>。另外, *bop* 启动子也适用于一些异源膜蛋白在极端嗜盐古菌中的表达。1999 年 Turner 等人根据在 *Halobacterium salinarium* 中高效表达细菌视紫质的分子机制构建了一个异源膜蛋白表达系统<sup>[31]</sup>。他们将 *bop* 启动子以及 *bop* 5'-编码区与外源蛋白基因, 如 *E. coli* 的天冬氨酸转氨甲酰酶催化亚基基因, 人类毒蕈碱性受体亚型 M1 基因以及酵母  $\alpha$  交配因子受体 Ste2 基因等的编码区融合, 利用 *E. coli*-*Halobacterium salinarium* 穿梭载体 pUBP2 在 *Halobacterium salinarium* 中实现了这些基因的融合表达。当改变 *bop* 5'-编码区的 DNA 序列后, *bop* 表达水平显著下降, 说明原 *bop* 5'-编码区序列对基因的高效表达也非常重要。Turner 等人的工作发展了一个新的异源膜蛋白表达系统, 该系统可以产生出毫克级的膜结合蛋白。

除 *bop* 启动子外, 来自 *Halobacterium salinarium* 的铁氧还蛋白基因的启动子和来自 *Haloferax volcanii* 的 tRNA 基因的启动子等也被用于表达载体构建中启动子活性的研究。1996 年, Danner 和 Soppa 构建了 *E. coli*-*Haloferax volcanii* 穿梭表达质粒 pSE4。他们将来自于 *Halobacterium salinarium* 的铁氧还蛋白基因的强启动子与来自 *Haloferax volcanii* 的二氢叶酸还原酶基因相连, 根据二氢叶酸还原酶对 trimethoprim 的抗性研究了极端嗜盐古菌的启动子元件<sup>[32]</sup>。1999 年 Schreier 等人在 *Haloferax volcanii* 中研究了来自于 *Pyrococcus furiosus* 的谷氨酸脱氢酶基因和麦芽糖调控基因的启动子活性<sup>[33]</sup>。近来, Long 和 Salin 将来自于 *Halobacterium salinarium* 的过氧化氢酶-过氧化物酶基因亚克隆至穿梭载体 pWLI02 和 pWLI202, 并转化 *Halobacterium salinarium*, 在不同的古菌启动子作用下启动该基因的表达。当在自身启动子作用下, 过氧化氢酶-过氧化物酶活性提高两倍, 当在来源于 *Haloferax volcanii* 的 tRNA 基因启动子作用下, 过氧化氢酶-过氧化物酶活性提高 3 倍<sup>[34]</sup>。

## 2 极端嗜盐古菌的受体系统

### 2.1 受体限制性障碍的克服

与细菌类似, 极端嗜盐古菌不同属间、种间以及其与 *E. coli* 之间存在着限制修饰系统<sup>[18, 35]</sup>。1986 年 Lodwick 等人发现 *Haloferax volcanii* 的 DNA 序列 GATC 中腺嘌呤不发生甲基化<sup>[30]</sup>。1990 年 Holmes 等人发现 *Haloferax volcanii* 和 *Haloferax Aa 2.2* 中至少存在一个限制系统<sup>[18]</sup>, 当 pMDS2 被连接到 pUC18 并转化 *E. coli* (*dam*<sup>+</sup>) 后, 经过修饰的重组质粒重新转化 *Haloferax volcanii* 和 *Haloferax Aa 2.2* 转化效率比原来的重

组质粒 pMDS2 直接转化二者的效率降低 1000 倍以上。另外, 穿梭载体在转化 *Haloferax Aa 2.2* 后, 来自 *E. coli* 的 DNA 片段经常缺失, 从而使重组质粒无法再转化 *E. coli* (*dam*<sup>+</sup>)。1991 年 Holmes 等人又通过研究证明 *Haloferax volcanii* 存在着与 *E. coli* 相似的限制修饰系统, 通过识别腺嘌呤甲基化的 DNA 序列而将其降解掉<sup>[35]</sup>。他们构建的穿梭克隆载体 pMDS1、pMDS10 和 pMDS11 在 *E. coli* (*dam*<sup>+</sup>) 中进行遗传操作后, 再转化 *Haloferax volcanii* 时转化效率下降了几个数量级, 而来自于 *E. coli* JM110 (*dam*<sup>-</sup> *dcm*<sup>-</sup>) 的非甲基化的质粒 DNA 在 *Haloferax volcanii* 中不被限制, 来自于 *E. coli* JM101 (*dam*<sup>+</sup> *dcm*<sup>+</sup>) 的 A 和 C 碱基被甲基化的质粒 DNA 转化 *Haloferax volcanii* 时, 转化效率下降了 10<sup>3</sup>。1992 年 Cline 等人发现 *Haloferax volcanii*, *Haloferax mediterranei*, *Haloferax Aa 2.2*, *Halobacterium halobium* 和 *Haloarcula vallismortis* 对来源于 *E. coli* (*dam*<sup>+</sup>) 的穿梭载体具有限制性, 转化效率下降 10<sup>3</sup> 以上, 但 *Haloarcula hispanica* 对来源于 *E. coli* (*dam*<sup>+</sup>) 的穿梭载体几乎没有限制性<sup>[22]</sup>。Danner 和 Soppa 在研究 *Halobacterium salinarium* 的远端启动子时构建的质粒文库在转化 *Haloferax volcanii* 之前, 先经过 JM110 去甲基化, 转化效率恢复到 10<sup>7</sup> / $\mu$ g<sup>[32]</sup>。要从根本上解决受体的限制性障碍, 必须获得限制系统发生了缺陷的菌株, 但目前还没有拿到这样的菌株, 故可以将构建好的载体在适当菌株(如 *E. coli* JM110)中去甲基化后再转化极端嗜盐古菌的有关菌株<sup>[35]</sup>。

### 2.2 受体内源性质粒的去除

为了消除内源性质粒对克隆片段及载体特性分析的干扰, 以及质粒间的不相容排斥, 往往需去除受体菌中的内源性小质粒。1987 年, Charlebois 等人采用溴化乙锭消除了极端嗜盐古菌 *Haloferax volcanii* 的内源性小质粒 pHV2, 得到了受体菌株 WFD11<sup>[8]</sup>, 并被用作外源 DNA 转化的受体菌。但是, 诱变剂溴化乙锭的处理同时产生了不良后果, 即在 WFD11 菌株中引入了新的基因突变, 其表现是造成了 WFD11 菌株生长缓慢及其正常生长必需的大质粒 pHV3 在培养过程中的高频丢失, 因而限制了其在遗传工程中的应用。最近, Wendoloski 等人利用质粒的不相容性以及在不抗性选择压力下质粒的自发丢失获得了新的受体菌株 DS70<sup>[21]</sup>。他们首先将质粒 pWLI02 转化含有内源性质粒 pHV2 的野生型 *Haloferax volcanii* NCIMB2012 菌株, 通过 simvastatin 抗性选择转化子。进一步在有选择压力下进行液体培养传代, 如此多个循环, 并在固体抗性平板上分离单菌落, 通过质粒制备筛选到一个不含有 pHV2, 仅含有 pWLI02 的菌株。然后在没有抗性选择压力下继续传代, 导致 pWLI02 丢失, 结果得到了 1 株不含内源性质粒 pHV2 的新的受体菌株 DS70。与 WFD11 相比, DS70 菌株在其改造过程中未经诱变剂处理, 未产生新的基因突变, 因此与其野生型一样生长良好, 是一个较好的受体菌株。

## 3 结 语

极端嗜盐古菌遗传转化系统已经取得了令人瞩目的成就, 但仍有很多问题有待于解决, 如抗性标记单一、抗性标记

基因易与染色体重组造成载体稳定性较差,高效表达的强启动子不多,转化效率难与细菌相比等。而且构建的遗传转化系统主要集中于 *Halobacterium* 和 *Haloferax* 属的成员(目前已知极端嗜盐古菌有十余个属)从而限制了对其它属的研究。随着分子生物学技术的飞速发展,进一步加强对极端嗜盐古菌遗传转化系统的研究不仅可以加快我们对古菌生命本质规律的认识,也可在实践上加速对极端嗜盐古菌有用资源的开发和利用。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Woese C R, Kandler O, Wheelis M L. Towards a natural system of organisms: proposal for domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 4576 ~ 4579
- [ 2 ] Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 2001, **5**: 73 ~ 83
- [ 3 ] Cline S W, Doolittle W F. Efficient transfection of the archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol*, 1987, **169**( 3 ): 1341 ~ 1344
- [ 4 ] Peck R F, DasSarma S, Krebs M P. Homologous gene knockout in the archaeon *Halobacterium salinarum* with *ura3* as a counterselectable marker. *Mol Microbiol*, 2000, **35**( 3 ): 667 ~ 676
- [ 5 ] Krebs M P, Hauss T, Heyn M P *et al.* Expression of the bacteriopsin gene in *Halobacterium halobium* using a multicopy plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 859 ~ 863
- [ 6 ] Blaseio U, Pfeifer F. Transformation of *Halobacterium halobium*: Development of vectors and investigation of gas vesicle synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 6772 ~ 6776
- [ 7 ] Krebs M P, Spudich E N, Khorana H G *et al.* Synthesis of a gene for sensory rhodopsin I and its functional expression in *Halobacterium halobium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 3486 ~ 3490
- [ 8 ] Charlebois R L, Lam W L, Cline S W *et al.* Characterization of pHV2 from *Halobacterium volcanii* and its use in demonstrating transformation of an archaeobacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 8530 ~ 8534
- [ 9 ] Hall M J, Hackett N R. DNA sequence of a small plasmid from *Halobacterium* strain GN101. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**( 24 ): 10501
- [ 10 ] Hackett N R, Krebs M P, DasSarma S *et al.* Nucleotide sequence of a high copy number plasmid from *Halobacterium* strain GRB. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**( 11 ): 3408
- [ 11 ] Hackett N R, DasSarma S. Characterization of the small endogenous plasmid of *Halobacterium* strain SB3 and its use in transformation of *H. halobium*. *Can J Microbiol*, 1989, **35**: 86 ~ 91
- [ 12 ] Wal-lap N G, Dassarma S. Minimal replication origin of the 200-kilobase *Halobacterium* plasmid pNRC100. *J Bacteriol*, 1993, **175**( 15 ): 4584 ~ 4596
- [ 13 ] Holmes M L, Pfeifer F, Dyall-Smith M L. Analysis of the halobacterial plasmid pHK2 minimal replicon. *Gene*, 1995, **153**: 117 ~ 121
- [ 14 ] Cabrera J A, Bolds J, Shields P E *et al.* Isoprenoid synthesis in *Halobacterium halobium*. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a concentration in response to mevalonate availability. *J Biol Chem*, 1986, **261**( 8 ): 3578 ~ 83
- [ 15 ] Nieto J J, Fernandez-Castillo, Garcia M T *et al.* Survey of antimicrobial susceptibility of moderately halophilic eubacteria and extremely halophilic aerobic archaeobacteria: utilization of antimicrobial resistance as a genetic marker. *System Appl Microbiol*, 1993, **16**: 352 ~ 360
- [ 16 ] Lam W L, Doolittle W F. Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989, **86**: 5478 ~ 5482
- [ 17 ] Lam W L, Doolittle W F. Mevinolin-resistant mutations identify a promoter and the gene for a eukaryote-like 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase in the archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *J Biol Chem*, 1992, **267**( 9 ): 5829 ~ 5834
- [ 18 ] Holmes M L, Dyall-Smith M L. A plasmid vector with a selectable marker for halophilic archaeobacteria. *J Bacteriol*, 1990, **172**( 2 ): 756 ~ 761
- [ 19 ] Holmes M L, Dyall-Smith M L. Mutations in DNA gyrase result in novobicin resistance in halophilic archaeobacteria. *J Bacteriol*, 1991, **173**( 2 ): 642 ~ 648
- [ 20 ] Mankin A S, Zyrianova I M, Kagrananova V K *et al.* Introducing mutations into the single-copy chromosomal 23S rRNA gene of the archaeon *Halobacterium halobium* by using an rRNA operon-based transformation system. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1992, **89**: 6535 ~ 6539
- [ 21 ] Wendoloski D, Ferrer C, Dyall-Smith M L. A new simvastatin (mevinolin)-resistance marker from *Haloarcula hispanica* and a new *Haloferax volcanii* strain cured of plasmid pHV2. *Microbiology*, 2001, **147**: 959 ~ 964
- [ 22 ] Cline S W, Doolittle W F. Transformation of members of the genus *Haloarcula* with shuttle vectors based on *Halobacterium halobium* and *Haloferax volcanii* plasmid replicons. *J Bacteriol*, 1992, **174**( 3 ): 1076 ~ 1080
- [ 23 ] Holmes M L, Pfeifer F, Dyall-Smith M L. Improved shuttle vectors for *Haloferax volcanii* including a dual-resistance plasmid. 1994, *Gene*, **46**: 117 ~ 121
- [ 24 ] Patenge N, Haase A, Bolhuis H *et al.* The gene for a halophilic  $\beta$ -galactosidase (*bgaH*) of *Haloferax alicantei* as a reporter gene for promoter analyses in *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol*, 2000, **36**( 1 ): 105 ~ 113
- [ 25 ] Holmes M L, Dyall-Smith M L. Sequence and expression of a halobacterial  $\beta$ -galactosidase gene. *Mol Microbiol*, 2000, **36**( 1 ): 114 ~ 122
- [ 26 ] Kamekura M, Seno Y, Dyall-Smith M. Halolysin R4, a serine proteinase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*: gene cloning, expression and structural studies. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1294**: 159 ~ 167
- [ 27 ] Heymann J A W, Havelka W A, Oesterhelt D *et al.* Homologous overexpression of a light-driven anion pump in an archaeobacterium. *Mol Microbiol*, 1993, **7**( 4 ): 623 ~ 630
- [ 28 ] Otomo J. Influence exercised by histidine-95 on chloride transport and the photocycle in halorhodopsin. *Biochemistry*, 1996, **35**: 6684 ~ 6689
- [ 29 ] Kamekura M, Seno Y, Tomioka H *et al.* Detection and expression of

- strain HT( JCM9743 ) which does not possess bacteriorhodopsin activity. *Extremophiles* , 1998 , 2 : 33 ~ 39
- [ 30 ] Lodwick D , Ross H N M , Harris J E *et al.* *dam* methylation in the archaeobacteria. *J Gen Microbiol* , 1986 , **132** : 3055 ~ 3059
- [ 31 ] Turner G J , Reusch R , Winter-Vann M W *et al.* Heterologous gene expression in a membrane-protein-specific system. *Protein Expr Purif* , 1999 , **17** : 312 ~ 323
- [ 32 ] Danner S , Soppa J. Characterization of the distal promoter element of halobacteria *in vivo* using saturation mutagenesis and selection. *Mol Microbiol* , 1996 , **19** ( 6 ) : 1265 ~ 1276
- [ 33 ] Schreier H J , Robinson-Bidle K A , Romashko A M *et al.* Heterologous expression in the archaea : transcription from *Pyrococcus furiosus* *gdh* and *mtrA* promoters in *Haloferax volcanii*. *Extremophiles* , 1999 , **3** : 11 ~ 19
- [ 34 ] Long S , Salin M L. Archaeal promoter-directed expression of the *Halobacterium salinarum* catalase-peroxidase gene. *Extremophiles* , 2000 , **4** : 351 ~ 356
- [ 35 ] Holmes M , Nuttall S D , Dyall-Smith M L. Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on *Haloferax* DNA gyrase. *J Bacteriol* , 1991 , **172** ( 12 ) : 3807 ~ 3813

## Development of the Genetic Transformation System in Extremely Halophilic Archaea

ZHOU Mei-Xian   XIANG Hua\*   TAN Hua-Rong

( *Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China* )

**Abstract** The development of the genetic transformation systems in extremely halophilic Archaea was reviewed in this paper. Included are the screening of selectable markers for resistance to antibiotics , the development of gene cloning and expression vectors , and the modifications of the host organisms .

**Key words** extremely halophilic Archaea , genetic transformation system , gene cloning and expression

Received : 09-20-2001

This work was supported by Grant from the " Knowledge Innovation Project ( KIP )" of Chinese Academy of Sciences ( No. KSCX2-3-01-02 ).

\* Corresponding author. Tel : 86-10-62656916 ; Fax : 86-10-62654083 ; E-mail : xiangh@sun.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>