

盐单胞菌属 *BYS-1* 四氢嘧啶合成基因 *ectABC* 克隆及其盐激表达

何 健, 黄 星, 顾立锋, 蒋建东, 李顺鹏*

(南京农业大学生命科学学院微生物学系 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 利用 SEFA-PCR 技术从中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. *BYS-1* 总 DNA 中克隆了四氢嘧啶合成基因 *ectABC* 及其上游序列 (GenBank accession number DQ017757); OMIGA 软件分析结果显示 *ectA*、*ectB*、*ectC* 位于同一个操纵子上, 大小分别为 573bp、1251bp 和 387bp, 预测编码的 DAT (L-二氨基丁酸转氨酶)、DAA (L-二氨基丁酸乙酰转移酶) 和 ES (四氢嘧啶合酶) 大小分别为 21.1kDa (191 amino acid)、45.7kDa (417 amino acid) 和 14.5kDa (129 amino acid), 将包含 *ectABC* 基因及其上游 1000bp 序列的片段克隆到 pUC19 中并转化 *E. coli* DH5 α , 转化子 *E. coli* pUC19ECT 能够在盐激条件下合成四氢嘧啶, 但其耐盐能力没有得到显著改善。

关键词 四氢嘧啶; *ectABC* 基因; SEFA-PCR; *Halomonas* sp. *BYS-1* 盐激表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)01-0028-05

四氢嘧啶 (1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid) 为 N-乙酰化的二氨基丁酸通过分子内脱水形成的一种嘧啶衍生物, 是中度嗜盐菌 (Moderately halophilic bacteria) 细胞中最重要的相容性溶质 (Compatible solute)^[1~4]; 四氢嘧啶分子结构特点是高度水溶性、不带静电荷, 在细胞内高浓度积累可以提高细胞内的渗透压, 但不会影响到生物大分子的正常生理功能。最近的研究发现四氢嘧啶具有广泛的抗逆保护效果, 能够稳定酶蛋白、DNA 和细胞膜结构, 帮助细胞抵抗冷冻、干旱、高温、高渗、高盐、辐射等各种逆境^[4~10]; 获得四氢嘧啶合成基因及其上游调控序列, 并研究其结构特性和表达调控, 将有助于阐明中度嗜盐菌渗透调控的分子机制, 同时为构建抗逆的基因工程菌或作物新品种提供基因资源。

中度嗜盐菌中四氢嘧啶的合成途径以天冬氨酸半醛 (ASA) 为前体, 共分 3 步^[5]; 第一步由 L-二氨基丁酸转氨酶 (L-Diaminobutyric acid transaminase, DAT) 催化合成 L-二氨基丁酸 (DABA), 第二步由 L-二氨基丁酸乙酰转移酶 (L-Diaminobutyric acid transferase, DAA) 催化合成 N-乙酰-L-2,4-二氨基丁酸 (ADABA), 第三步由四氢嘧啶合酶 (Ectoine synthase, ES) 催化合成四氢嘧啶, 相关酶系 DAT、DAA 和 ES 的合成基因分别为 *ectB*、*ectA* 和 *ectC*, 这 3 个基因在染色体上连

锁构成 *ectABC* 操纵子。

利用 SEFA-PCR 技术从 *Halomonas* sp. *BYS-1* 总 DNA 中成功扩增到 *ectABC* 基因全长及其上游序列, 并对 *ectABC* 基因在 *E. coli* 中的功能表达进行了初步的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Halomonas* sp. *BYS-1* (GenBank Accession: AY0662217) 从处理含盐废水的耐盐活性污泥中分离得到, 能在含 0% ~ 15% NaCl 的以苯乙酸为唯一碳源的 M9 基础盐培养基中生长。

1.1.2 酶和试剂: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、*La-Taq* 酶等均购自大连 TaKaRa 公司; DNA 纯化回收试剂盒购自 Vitagene 公司。

1.1.3 培养基: 实验中用的 LB、M9 培养基均参照文献 [11] 配制。

1.2 分子操作

质粒 DNA 的提取 (碱裂解法)、染色体总 DNA 的提取 (高盐沉淀法) 酶连、转化均按文献 [11] 操作, DNA 的纯化回收参照试剂盒说明书进行操作。

1.3 *ectABC* 基因保守片段的 PCR 扩增

根据 *Halomonas elongata* 2851T 和 *Halomonas elongata* DSM3043 中 *ectABC* 基因序列 (GenBank

基金项目: 国家“863 计划”(2004AA246070); 江苏省科技攻关项目 (BE2003343)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-84396314; E-mail jsp@njau.edu.cn

作者简介: 何 健 (1973 -) 男, 南京农业大学讲师, 博士研究生, 研究方向为环境微生物学。E-mail hejian@njau.edu.cn

收稿日期 2005-06-22; 接受日期 2005-07-19; 修回日期 2005-11-03

Accession :AF031489 和 AJ011103) 的保守区设计了多条引物, 两两配对以 *Halomonas* sp. BYS-1 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增条件: 94°C 3min; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 2min, 33 个循环, 72°C 10min。其中一对引物扩增出长度和理论值符合的约 750bp 片段, 正向引物为 5'-AGACCCAGATTCT CGAACGCA-3', 反向引物为 5'-TGATACCGCCCTC GCCCT-3' (在 AF031489 对应位置分别为 1093bp ~ 1113bp 和 1828bp ~ 1811bp)。

1.4 SEFA-PCR 扩增已知片段的上下游序列

1.4.1 SEFA-PCR 原理和步骤: SEFA-PCR (Self-Formed Adaptor PCR) 是本实验室王世明博士设计开发的一种新的 PCR 技术, 可扩增一已知 DNA 序列两端很长 (最长可达 6 ~ 8kb) 的未知序列, 其原理和步骤见图 1, 其中 A 为以 Hemi-Sp3 为引物在低退火温度下进行 PCR, 使 Hemi-Sp3 在已知序列附近配对并向已知序列方向扩增, 得到包含已知序列 (部分和 Sp1、Sp2、Hemi-Sp3 互补) 和临近的未知序列的目标片段; B 为以 Sp1 为引物在高退火温度下进行 PCR, 使目标片段得到适当扩增 (排除杂带); C 为以 Sp1 和 Hemi-Sp3 为引物进行不对称 PCR, 在目标片段得到大量扩增的同时, 使 Hemi-Sp3 "回头" 和自身链配对并向 5' 端延伸, 结果是目标片段的 3' 端和 5' 端均有和 Sp2 配对的序列; D 为用 Sp2 为引物在高进行退火温度下进行 PCR 扩增。

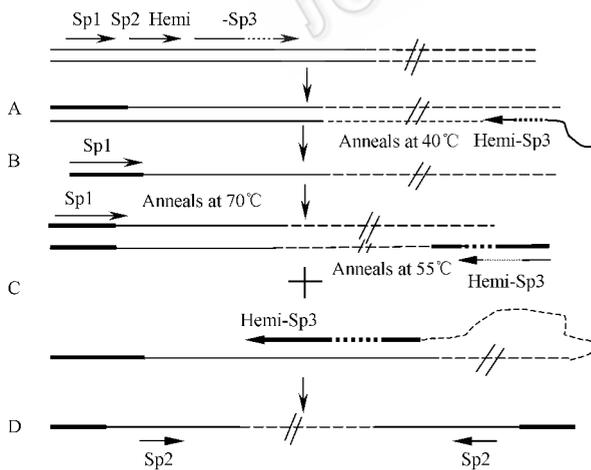


图 1 SEFA-PCR 技术原理和步骤图示

Fig. 1 Schematic diagram of SEFA-PCR

1.4.2 SEFA-PCR 引物设计: 向保守片段下游 (3' 端) 扩增的引物为: 3Sp1: 5'-GCCGGCAGCT CAATTACGGTCACAATAAC-3' ($T_m = 73^\circ\text{C}$); 3Sp2: 5'-AGATGGCATTGTTTCATGGCCTGGATATGT-3' ($T_m = 70^\circ\text{C}$); 3Hemi-Sp3: 5'-ACCGGAACTAACGCA, NNN,

NNN, NNN, GCCATC-3' ($T_m = 55^\circ\text{C}$ 简并引物)。向保守片段上游 (5' 端) 引物为: 5Sp1: 5'-CGGATGGC CGCTTCCACTGCGTTAGTTC-3' ($T_m = 74^\circ\text{C}$); 5Sp2: 5'-TCCAGGCCATGAACAATGCCATCTGTTGAC-3' ($T_m = 72^\circ\text{C}$); 5Hemi-Sp3: 5'-CAATATACTCACGACC, NNN, NNN, NNN, CCGTTA-3' ($T_m = 50^\circ\text{C}$ 简并引物)。

1.4.3 SEFA-PCR 扩增: 扩增体系: 15 μL 2 \times GC buffer I, 5 μL 2.5mmol/L dNTPs, 2 μL 5 $\mu\text{mol/L}$ Hemi-Sp3, 1.5U LA-Taq, 1.5 μL 模板 (*Halomonas* sp. BYS-1 总 DNA, 约 50ng/ μL), 总体积 30 μL 。PCR 反应条件: 94°C 1min, 94°C 30s, 40°C 3min, 以每秒增加 0.2°C 的速度升至 70°C, 70°C 5min。取出 PCR 管加入 2 μL 5 $\mu\text{mol/L}$ Sp1 作为引物后继续进行 PCR, 反应条件: 94°C 30s, 70°C 5.5min, 25 个循环。接下来进行 8 轮不对称 PCR: 94°C 30s, 70°C 5.5min, 2 个循环; 94°C 30s, 50°C 30s, 1 个循环; 8 轮不对称 PCR 完成后再次 70°C 延伸 5min。

1.4.4 SEFA-PCR 产物的扩增: 扩增体系: 15 μL 2 \times GC buffer I, 5 μL 2.5mmol/L dNTPs, 2 μL 5 $\mu\text{mol/L}$ Sp2, 1.5U LA-Taq, 1.5 μL SEFA-PCR 扩增产物 (作为模板), 总体积 30 μL 。PCR 条件: 94°C 3min, 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 5min, 33 个循环, 72°C 10min。

1.5 序列测定

将 PCR 产物切胶回收, 与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在含有 IPTG 和 X-Gal 的 LB (含 100mg/L Amp) 平板上进行蓝白斑筛选, 挑取白色菌落, 提取质粒验证后, 由上海博亚公司测定插入片段序列。利用 OMIGA 软件对克隆序列进行序列的拼接、同源性比较和 ORF 分析。

1.6 *ectABC* 基因及其上游序列的扩增和载体构建

根据拼接的序列设计引物, 正向引物为: 5'-TCAGAGGATCCGGGCGTGAAAACCTGTTTCTAA-3' (*Bam*H I); 反向引物为: 5'-ACTGA GGTACCCCTC TAAAAAAAACCAGCCC-3' (*Kpn*I)。

扩增片段进行 *Bam*H I 和 *Kpn*I 双酶切后和同样双酶切的 pUC19 连接, 构建质粒 pUC19ECT, 酶连产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在含有 IPTG 和 X-Gal 的 LB (含 100mg/L Amp) 平板上进行蓝白斑筛选, 挑取白色菌落, 提取质粒进行酶切和 PCR 验证。

1.7 转化子细胞四氢嘧啶的提取和测定

参照参考文献 [1] 采用 HPLC 方法测定四氢嘧啶。按 8% 接种量接种含有质粒 pUC19ECT 的转化子于不同 NaCl 浓度的 100ml M9 基础盐培养基中培

养 24h 培养物 6000r/min 离心,菌泥用等渗的 NaCl 溶液洗涤一次,冻干,加入 400 μ L 的提取液 [methanol/chloroform/water = 10:5:4 (V/V/V)],剧烈振荡 60min,加入 130 μ L 三氯甲烷和 130 μ L 水,再次振荡 30min;13000r/min 离心 30min,回收水相,冻干。用 500 μ L 80% (V/V)乙腈溶解。HPLC 检测仪为 waters600 检测柱为 C18 反相柱,检测器为紫外检测器,工作波长 215nm;测定条件:流动相为乙腈/水 (80/20, V/V),流量为 1.0mL/min,进样量为 20 μ L,采用外标法按峰面积定量。

2 结果和分析

2.1 *ectABC* 序列片段的获得

我们曾参考文献报道的扩增 *ectABC* 的多对保守引物^[1,7] 根据已报道的 *ectABC* 基因序列设计简并引物,以 *Halomonas* sp. BYS-1 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,但未能扩增出目标产物。采用 SEFA-PCR 扩增未知序列,首先要知道序列中的一个片段碱基组成才能设计 SEFA-PCR 引物,根据已报道的 *H. elongata* DSM2581T 和 *H. elongata* DSM3043 中 *ectABC* 基因序列的保守区,设计多对引物,两两配对进行 PCR 扩增,其中一对引物的产物电泳条带清晰,大小约 750bp 和理论值大小相符(图 2),测序结果表明这一片段和 *H. elongate* DSM2581T *ectABC* 基因序列中的 1093 ~ 1828bp 同源,同源率为 78%。

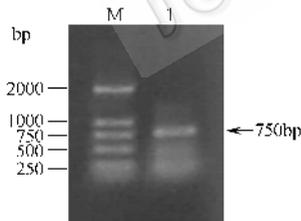


图 2 *ectABC* 基因片段扩增产物电泳图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the *ectABC* gene fragment
M. DL2000 marker ;1. Amplified product of *ectABC*.

2.2 *ectABC* 基因片段上下游序列的克隆

于 *ectABC* 基因保守片段已知序列中设计进行 SEFA-PCR 的引物,其中向保守片段下游(3'端)扩增引物为 3Sp1、3Sp2 和 3HemiSp3,向保守片段上游(5'端)扩增引物为 5Sp1、5Sp2 和 5HemiSp3,以 *Halomonas* sp. BYS-1 总 DNA 为模板分别向片段的上游和下游进行 SEFA-PCR 扩增(图 3)。经过两步扩增后上下游 SEFA-PCR 扩增均得到了清晰的长度在 2kb 以上的条带(图 3 上箭头所示),其中 3'端产物大小约为 6.5kb,5'端产物大小约为 4.3kb。上下

游产物的长度完全可以覆盖 *ectABC* 基因序列上游各 2000bp 序列以上。测序结果用 OMIGA 软件对序列进行拼接、ORF 和启动子分析,结果表明上下游 SEFA-PCR 扩增产物分别为 *ectABC* 基因片段的 3'端和 5'端序列。

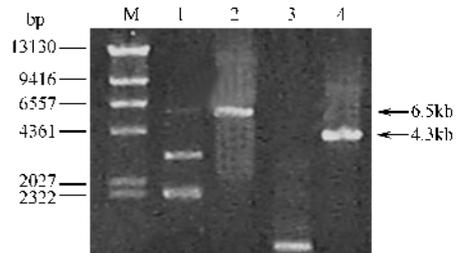


图 3 SEFA-PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of SEFA-PCR products

M. λ -HindIII marker ;1. SEFA-PCR amplified product of 3' end ;2. Final amplified products of 3' end ;3. SEFA-PCR amplified product of 5' end ;4. Final amplified products of 3' end.

2.3 *ectABC* 基因及其上游序列的克隆和序列分析

根据拼接的序列,于 *ectABC* ORF 上游约 1000bp 和下游约 100bp 处设计引物,以 *Halomonas* sp. BYS-1 总 DNA 为模板对 *ectABC* 基因及上游序列进行 PCR 扩增,扩增结果和理论值相符(图 4 泳道 1);测序结果表明其长度为 3532bp(GenBank 登录号为 DQ017757),包含 *ectABC* 基因 2423bp,上游序列 980bp 和下游序列 129bp。

对 *ectABC* 基因及上游序列分析结果显示 *ectA* (1014 ~ 1586bp)、*ectB* (1713 ~ 2963bp)、*ectC* (3051 ~ 3437bp)依次排列,位于同一个操纵子上,*ectA*、*ectB* 和 *ectC* 大小分别为 573bp、1251bp 和 387bp,可能的启动子位于 947 ~ 991bp。预测编码的蛋白质 DAT (L-二氨基丁酸转氨酶),DAA (L-二氨基丁酸乙酰转移酶),ES (四氢嘧啶合酶)大小分别为 21.1kDa (191 amino acid)、45.7 kDa (417 amino acid) 和 14.5kDa (129 amino acid)。

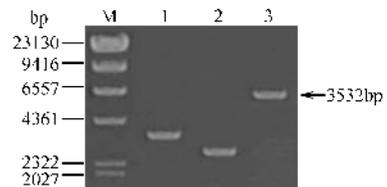


图 4 *ectABC* 基因和 pUC19ECT 电泳图谱

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of *ectABC* and pUC19ECT

M. λ -HindIII marker ;1. *ectABC* include upstream sequence ;2. pUC19 (BamHI and KpnI digested) ;3. pUC19ECT (SacI digested).

2.4 *ectABC* 基因表达载体的构建和转化

为研究获得的 *ectABC* 基因能否实现功能表达,

将上述扩增的 3532bp 片段克隆到 pUC19 载体上,构建重组质粒 pUC19ECT 转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,挑选含有重组质粒的转化子 *E. coli* (pUC19ECT),提取质粒进行验证,图 4 中泳道 2 为 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切的 pUC19 载体,泳道 3 为 *Sac* I 单酶切的 pUC19ECT,大小为 6200bp 左右,和理论值大小一致,表明 3532bp 片段已经克隆到 pUC19 载体上。

2.5 *ectABC* 基因在渗透压诱导下的表达

将转化子 *E. coli*(pUC19ECT)接种于不同 NaCl 浓度的 M9 基础盐培养基中培养,测定了转化子细胞提取物中四氢嘧啶含量,在 0mol/L、0.4mol/L 和 0.8mol/L 的转化子细胞提取物中四氢嘧啶含量分别为 7.1、19.4 和 32.3 μ mol($g \cdot dry \cdot wt$)⁻¹,与培养基盐浓度呈正相关。说明包含 *ectABC* 基因在 *E. coli* 细胞中能够实现功能表达,且四氢嘧啶的合成受到盐份的诱导,表明与渗透压调控有关的序列位于 *ectABC* 基因上游 1000bp 以内。

但耐盐性试验表明,和对照 *E. coli*(pUC19)相比,转化子 *E. coli*(pUC19ECT)的耐盐性并没有得到显著的改善,其原因可能与四氢嘧啶在细胞内的积累浓度低有关。在高盐的基础盐培养基中 *E. coli* 细胞自身能够合成海藻糖、氨基酸和甜菜碱等作为相容性溶质来平衡外界的渗透压,在 0.8mol/L 的基础盐培养基中其细胞内的相容性溶质质量达到了 300 μ mol($g \cdot dry \cdot wt$)⁻¹[10],而转化子 *E. coli*(pUC19ECT)在 0.8mol/L 的基础盐培养基中其细胞内四氢嘧啶只有 32.3 μ mol($g \cdot dry \cdot wt$)⁻¹,只占总相容性溶质浓度的 1/10,还不足以产生显著的渗透保护效果。

3 讨论

四氢嘧啶是广泛存在于各种中度嗜盐菌细胞中的最重要的调渗物质,但由于检测手段的限制,在很长一段时间里,人们没有意识到它的存在,直到核磁共振技术的出现,四氢嘧啶才被发现^[2,4]。四氢嘧啶对微生物、动物和植物细胞具有广泛的抗冷冻、干旱、高温、高盐、辐射等抗逆保护效果^[4-10],所以在微生物和植物耐盐抗旱基因工程中具有广泛的应用前景,Hideki 等^[7]将 *ectABC* 基因克隆到烟草细胞中,使烟草细胞转化子的耐盐能力提高到 500mmol/L NaCl。但是,目前对四氢嘧啶合成的调控机制特别是与外界渗透压变化的关系还不甚清楚,仍有待于深入研究。

本文实现了 *ectABC* 基因盐激表达,但转化子的

耐盐能力并没有得到显著提高,其原因可能是 *ectABC* 基因表达量低,不足以快速合成足够的四氢嘧啶。今后应在合适的高效表达载体选择,对 *ectABC* 基因启动子和 RBS 位点进行改造以及四氢嘧啶合成的代谢调控等方面进行深入研究,以期提高 *ectABC* 基因表达水平。

本实验所用的 SEFA-PCR 是由王世明博士设计的一种新的 PCR 技术,可以用来扩增一已知 DNA 序列两端很长的(最长可达 6~8kb)的未知序列。利用 SEFA-PCR,已经从多种细菌、植物、和真菌共 50 余个样品中成功扩增出未知序列。和其它从一已知区域扩增未知区域的 PCR 技术如反转录 PCR、Ligation-mediated PCR 和 Tail-PCR 相比,SEFA-PCR 的优点是步骤较简单(两步 PCR 反应、3 个引物),不涉及酶切和酶连操作,费用和耗时较少,扩增的片段长(最长可达 6kb 以上),且可靠性高,因此 SEFA-PCR 具有广泛的应用前景。但是需要注意的是,因扩增的片段较长,用于 PCR 的 *Taq* 酶必须是能扩增长片段的 *Taq* 酶,如 TaKaRa 公司的 *La-Taq*。

致谢 王世明博士为本研究提供 SEFA-PCR 技术支持,包括引物设计,PCR 扩增程序等,在此表示衷心的感谢!

参 考 文 献

- [1] Anne UK, Erhard B. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(2): 772-783.
- [2] Antonio V, Joaquín J, Nieto AO. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(2): 504-544.
- [3] 任培根,周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展. *微生物学报*, 2003, **43**(3): 427-431.
- [4] 王颖群,陶 涛. 微生物渗透压调节过程中的相容性溶质. *微生物学通报*, 1994, **21**(5): 293-296.
- [5] Canovas D, Vargas C, Calderon MI. Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM3043. *Syst Appl Microbiol*, 1998, **21**: 487-497.
- [6] David Ca'novas, Carmen V, Fernando IG, et al. Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *The Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**(41): 25794-25801.
- [7] Hideki N, Kazuya Y. Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiology*, 2000, **122**: 1239-1247.
- [8] Manzanera M, García de Castro A, Tøndervik M, et al. Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(9): 4328-4333.
- [9] Yancy PH, Clark ME, Hand SC. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 1982, **217**: 1214-1222.

- [10] Mohamed J, Roland T, Karine G. Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(15): 5027 - 5035.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验克隆. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999.

Cloning of the ectoine biosynthesis gene *ectABC* from *Halomonas* sp. BYS-1 and salt stressed expression in *Escherichia coli*

HE Jian, HUANG Xing, GU Li-feng, JIANG Jian-dong, LI Shun-peng*

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Microbiology Department, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Ectoine was the main compatible solute of moderately halophilic bacteria. In order to clone the *ectABC* gene which involved in the ectoine biosynthesis pathway from total DNA of moderately halophilic bacteria *Halomonas* sp. BYS-1, firstly a 750bp fragment of *ectABC* gene was amplified by PCR using combinations of forward primers and reverse primers designed according to the *ectABC* genes of *Halomonas elongata* 2851T and *Halomonas elongata* DSM3043. Then the upstream and downstream sequences of the 750bp fragment were amplified by SEFA PCR (Self-Formed Adaptor PCR), a new PCR method amplified relatively long flanking sequences from tagged sequences in a simple way without enzyme excision and ligation. The 3532bp fragment include 2423bp *ectABC*, 980bp upstream sequences and 129bp downstream sequences were cloned from *Halomonas* sp. BYS-1 using a pair of conserved primers designed according to acquired sequences by SEFA PCR. The GenBank accession number of the 3532bp fragment is DQ017757. ORF analysis revealed that *ectA*, *ectB*, *ectC* cluster to an operon, the size of *ectA*, *ectB*, and *ectC* were 573bp, 1251bp and 387bp respectively. The predicted molecular masses of the encoded proteins were 21.1kDa (191 amino acids, EctA), 45.7 kDa (417 amino acids, EctB), and 14.5 kDa (129 amino acids, EctC) respectively. The 3532bp fragment was ligated to the MCS site of vector pUC19 and transformed *E. coli* DH5 α to construct *E. coli* (pUC19ECT). Transformant *E. coli* (pUC19ECT) could synthesis ectoine under salt stress, the intracellular ectoine level were 7.1, 19.4 and 32.3 μ mol/(g \cdot dry \cdot wt) when the salinities of the mediums were 0, 0.4 and 0.8mol/L sodium chloride respectively. But the accumulation of ectoine could not promote the growth of *E. coli* (pUC19ECT) under high salinity.

Keywords: Ectoine biosynthesis; *ectABC*; SEFA-PCR; *Halomonas* sp. BYS-1; Salt stressed expression

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2004AA246070); Key Programs for Science and Technology of Jiangsu Province (BE2003343)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-25-84396314; E-mail: lsp@njau.edu.cn

Received: 14 June 2005/Accepted: 19 July 2005/Revised: 3 November 2005

科学出版社生命科学编辑部新书推介

《微生物基因组》(译) Microbial Genomes

[美] CM 费雷泽, TD 里德, KE 纳尔逊, 编. 许朝晖, 喻子牛, 主译

科学出版社 2006年1月出版, ISBN 7-03-015664-1, 定价 75.00

本书是由微生物基因组学开创者们撰写, 重点介绍了10年来微生物学转向全基因组序列研究的进展, 包括微生物基因组学历史, 作为基因组学工具的生物信息学, 核心功能, 微生物基因组的进化, 微生物基因组的调查和基因组数据库的应用共6个部分, 所有内容均涉及本学科前沿, 作者们现身说法, 深入浅出, 既能使初涉微生物基因组学领域的研究生们, 又能在微生物学和基因组学方面有造诣的专家们感兴趣, 是微生物学专著中的精品。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)。

邮购地址: 100717 北京东黄城根北街16号科学出版社科学分社, 联系人: 阮芯, 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致电索要书目 010-64012501