

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(5):603-608; 4 May 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

极端耐盐放线菌白色普氏菌 YIM 90005^T 四氢嘧啶及 5-羟基四氢嘧啶合成相关基因的克隆

李岩^{1,2#}, 董雷^{1#}, 王磊², 方福瑾¹, 何敏¹, 曹中莹¹, 梁媛¹, 唐蜀昆¹, 李文均^{1*}

¹ 云南大学省微生物研究所, 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室, 昆明 650091

² 中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

摘要:【目的】为了研究耐盐放线菌对高盐环境的适应机理。【方法】用 HPLC 定量检测了极端耐盐、丝状产孢放线菌——白色普氏菌 (*Prauserella alba*) YIM 90005^T 在不同盐浓度下胞内相容性溶质的种类和含量。【结果】结果发现, 四氢嘧啶和 5-羟基四氢嘧啶是其主要的相容性溶质。在培养基 NaCl 浓度为 10% 时, 四氢嘧啶在胞内累积浓度最大, 为 18.77 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 干菌体重。之后随 NaCl 浓度的升高, 胞内的四氢嘧啶含量逐渐减少, 而 5-羟基四氢嘧啶的含量逐渐增加, 在该菌耐受的最高 NaCl 浓度下 (24% w/v), 胞内 5-羟基四氢嘧啶含量达到最大值, 为 22.98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 干菌体重。设计兼并引物, 利用染色体步移, 克隆得到四氢嘧啶及 5-羟基四氢嘧啶合成相关基因 *ectABCD*。序列分析表明, *ectABCD* 位于一个操纵子中。进一步对不同 NaCl 浓度培养条件下 *ectB, D* 的表达量进行定量分析, 结果表明该基因簇表达量随着培养基中 NaCl 浓度的增加而增大。【结论】研究结果证实 5-羟基四氢嘧啶是 *P. alba* YIM 90005^T 在极高盐浓度条件下起渗透调节及保护的相容性溶质。

关键词: 白色普氏菌, 相容性溶质, 四氢嘧啶, 基因克隆

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)05-0603-06

生活在海洋潮间带、盐湖、晒盐场等高盐环境下的微生物在干旱季节时随着细胞周围水分的蒸发, 面临着细胞失水死亡的危险^[1]。渗透压的调节是这类微生物要克服的首要问题。原核生物通过两种方式调节胞内外的渗透压, 一种是在胞内积累高浓度的 K^+ , Cl^- 来平衡胞外的高渗环境, 这种方式主要存在于极端嗜盐古菌 (如: *Halobacteria*) 和嗜盐厌氧细菌 (如: *Haloanaerobiales*) 中^[2-3]; 另一种方式

存在于绝大多数原核生物中, 通过在胞内积累相容性溶质的方式来平衡渗透压^[4]。相容性溶质的概念是 Brown 和 Simpson 于 1976 年提出, 是指分子量小、极性大、易溶于水, 在生理范围内不带电荷, 即使在胞内积累很大的量也不会影响细胞代谢的一类小分子物质^[5]。这类小分子物质一方面能够调节渗透压, 同时对细胞有渗透保护的作用。相容性溶质主要包括糖类及糖苷类, 氨基酸类, 甜菜碱类和四氢

基金项目: 国家“973 项目” (2010CB833801); 国家自然科学基金 (30860002, 30870005); 高等学校博士学科点专项科研基金 (200806730001); 云南大学国家级大学生创新性试验计划项目 (91067323)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-871-5033335; E-mail: wjli@ynu.edu.cn

作者简介: # 两作者同等贡献。李岩 (1983-), 男, 山东肥城人, 博士研究生, 研究方向为微生物生理学, E-mail: liyan0709@hotmail.com; 董雷 (1989-), 男, 河南固始人, 本科生, E-mail: dongleiwjsw@vip.qq.com

收稿日期: 2010-12-19; **修回日期:** 2010-02-28

嘧啶类^[6]。

白色普氏菌(*Prauserella alba*) YIM 90005^T 是本实验室于 2003 年发表的极端耐盐放线菌新种,该菌分离自新疆的盐土中^[7],能在 0–24% NaCl 浓度的 SMM 培养基中生长。由于该菌盐适应范围广,耐盐度高,生长快,且是典型的丝状产孢放线菌,所以是研究极端耐盐放线菌耐盐机制的良好材料。为了研究白色普氏菌对高盐环境的适应机理,我们测定了该菌在 0–24% NaCl 不同盐浓度下积累相容性溶质的种类和含量,随着盐浓度的增加,四氢嘧啶和 5-羟基四氢嘧啶成为其胞内主要的相容性溶质。

四氢嘧啶即 1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸,该物质是多种蛋白、核酸的保护剂,已广泛应用于制药、化妆品生产、科学实验及农作物改良等相关领域,亦用于卵子、精子、人体组织和整个器官的冷冻保护剂^[8–9]。四氢嘧啶合成途径中,天冬氨酸 β-半醛依次经二氨基丁酸氨基转移酶(EctB),二氨基丁酸乙酰转移酶(EctA),四氢嘧啶合成酶(EctC)的催化下合成四氢嘧啶(ectoine)^[10–11],四氢嘧啶在四氢嘧啶羟化酶的催化下,在嘧啶环的第五位碳上羟基化生成 5-羟基四氢嘧啶,其极性比四氢嘧啶大、溶解性以及和细胞内的各种酶类的相容性更好的,对胞内酶类的保护作用更优^[12–13]。

本研究中,通过保守序列分析,设计兼并引物,利用染色体步移,克隆四氢嘧啶及 5-羟基四氢嘧啶合成相关基因 *ectABCD* 及其上游、下游调控序列,Real-time PCR 分析其合成相关基因在不同 NaCl 浓度下的表达量,以确定四氢嘧啶及 5-羟基四氢嘧啶在高盐胁迫中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:白色普氏菌 YIM 90005^T (= DSM 44590^T = CCTCC AA001016^T) 保藏于云南大学省微生物研究所放线菌室。菌株的培养采用 SMM (supplemented minimal medium) 培养基,其配方为: MgSO₄ · 7H₂O (24 g/L) 25 mL/L, Na₂HPO₄ + K₂HPO₄ (50 mmol/L each) 10 mL/L, Glucose 5 g/L, Trace element solution 1 mL/L, Casamino acids (20% w/v) 10 mL/L, Glycine (20% w/v) 25 mL/L 调 pH 7.0, 115℃, 25 min。Trace element solution 配方

如下: FeSO₄ · 7H₂O 2 g/L, MnCl₂ · 2H₂O 1 g/L, ZnSO₄ · 7H₂O 1 g/L。实验中用到的 NaCl 浓度分别为 0, 3, 5, 8, 10, 13, 15, 18, 20, 22, 24%, 按所需要的梯度添加。菌株在 28℃ 培养至指数期,低温高速收集菌体,并真空冷冻干燥。

1.1.2 主要仪器和试剂:摇床 SuKun SKY-2102C 上海苏坤实业有限公司; Thermo 高速冷冻离心机 ST 16R, Thermo Scientific, Germany, Real-time 仪器 ABI 7000, Applied Biosystems, Inc, America; PCR 仪 BIO-RAD MyCycler, BIO-RAD, America, Eppendorf BioPhotometer 8.5 mm lighter center light lichtstrahlhohe, Eppendorf, Germany, Aligent HPLC 1100; 柱子规格: C₁₈ 柱, 250 mm × 4.6 nm, Agilent Technologies, America; 胶回收试剂盒 TIANgel Midi Purification Kit, 目录号 DP209-2; 连接试剂盒 TaKaRa pMD-18T Vector, 目录号 D101A; 染色体步移用 TaKaRa Genome walking Kit, 目录号 D316; RNA 的提取试剂盒 天根 RNA simple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒, 目录号 DP419; cDNA 的反转录试剂盒 天根 TIANScript cDNA 试剂盒, 目录号 KR104; Real-time PCR 扩增试剂盒 天根 Real Master Mix (SYBR Green), 目录号 FP202。

1.2 四氢嘧啶的检测

胞内相容性溶质的提取方法按照参考文献 [10]。四氢嘧啶及羟基四氢嘧啶检测波长: 210 nm; 柱温: 40℃; 流动相: 纯水。

1.3 四氢嘧啶合成相关基因的克隆

四氢嘧啶合成途径的 3 个基因 *ectA*、*ectB* 和 *ectC* 中, *ectB* 最为保守, 选取已知的放线菌的四氢嘧啶合成基因 *ectB* 的氨基酸序列, 设计兼并引物, 进行 PCR 扩增, 得到阳性片段后, 以其为模板, 利用染色体步移的方法得到其上下游调控序列。

1.3.1 兼并引物的设计: 选取最为保守的 EctB 的氨基酸序列, 利用在线软件 CODEHOP 设计兼并引物, 引物序列如下: P1: 5'-GGCGCCTGAACTACGG NCAYAAAYMA-3', P2: 5'-CCGTAGTTCAGGGCGCCN GCNCCNGC-3'。兼并引物的设计见文献 [14]。

1.3.2 PCR 扩增及染色体步移方法: 基因组 DNA 的提取见参考文献 [15], PCR 体系及扩增条件: 50 μL 体系, 10 × Buffer 5 μL, dNTP 4 μL, P1 1 μL, P2 1 μL, Taq 0.3 μL, H₂O 37.7 μL, 模板 DNA 1 μL。扩增条件: 95℃ 预变性 4 min, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s 共 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

扩增产物经琼脂糖凝胶检测,切胶回收,纯化,试剂盒连接后克隆测序。染色体步移用 TaKaRa Genome walking Kit (D316),原理及操作步骤见试剂盒。

1.3.3 序列分析: GenBank 中对克隆得到的序列分别进行核酸序列和氨基酸序列比对,分析每个基因的起始密码子和终止密码子,并在 NCBI 中 BLAST 后调取相近的序列进行 CLUSTAL 比对,在线软件 http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html 预测分析启动子。

1.4 不同 NaCl 浓度培养下四氢嘧啶合成相关基因的表达定量研究

针对 *ectB*, *D* 进行不同盐浓度下的基因的表达量进行定量分析,引物分别为: P3 :5'-GAGCTCG-TCGTCCGACCAGTAGGTGC-3', P4:5'-GCCTGTCCA-AGTCCGATCGGCGGTTAC-3' 和 P5: 5'-GTGCACG-TCGAAGATCGACCGCAC-3', P6 :5'-CAGGGCTATT-GGCAGGAAGTGGGG-3'。扩增产物长度分别为 170、178 bp。

2 结果

2.1 白色普氏菌 YIM 90005^T 相容性溶质的检测

HPLC 定量检测不同盐浓度下积累相容性溶质的种类和含量,结果表明,随着盐浓度的增加,四氢嘧啶和 5-羟基四氢嘧啶成为其胞内主要的相容性溶质。在 NaCl 浓度为 10% (w/v) 时,该菌胞内四氢嘧啶积累量达到最大值,为 18.77 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 干菌体重,之后随着 NaCl 浓度的增加,胞内四氢嘧啶含量逐渐减少,5-羟基四氢嘧啶的含量逐渐增加,在其耐受的最大盐浓度下(24% NaCl),胞内积累到最大量,为 22.98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 干菌体重。结果如图 1 所示。由此表明,对于 *P. alba* YIM 90005^T 来说,在高盐浓度下,主要依靠合成四氢嘧啶和 5-羟基四氢嘧啶作为胞内主要渗透调节保护物,抵抗外界的渗透胁迫。

2.2 四氢嘧啶合成相关基因的克隆

根据已全基因组测序放线菌中的四氢嘧啶合成基因 *ectB* 的氨基酸序列,设计一对简并引物,PCR 扩增中

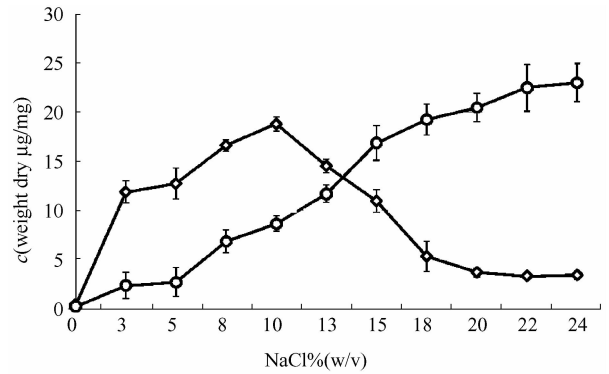


图 1 不同 NaCl 浓度培养下 *P. alba* YIM 90005^T 胞内四氢嘧啶(\diamond)及 5-羟基四氢嘧啶的含量(\circ)

Fig. 1 Ectoine (diamond) and 5-hydroxyectoine(circle) content of *P. alba* YIM 90005^T inoculated at different NaCl concentrations.

获得 500 bp 左右的片段,将扩增产物回收,连接到 pMD-18T 载体上,测序,在 GenBank 中进行 BLAST 比较,比较结果表明,获得了氨基转移酶基因 *ectB*,通过 Genome Walking Kit 方法,扩增得到其上下游片段,获得 3529 bp 基因序列。序列分析表明,获得的 DNA 片段存在 4 个转录方向一致的读码框,即 *ectA*, *ectB*, *ectC*, *ectD*; GenBank 序列号为 (*ectA* HQ728267, *ectB* HQ728268, *ectC* HQ728269, *ectD* HQ728270),其在基因簇中的排列顺序、序列大小、间隔序列如图 2 所示。并对其序列进行了开放阅读框分析,如图 3 所示。同源性分析表明,*ectA* 属于 NAT_F super family,与 *Saccharomonospora viridis* DSM 43017^T EctA 同源性为 78.9%; *ectB* 属于 AAT_1 superfamily,与 *S. viridis* DSM 43017^T EctB 同源性为 80.4%; *ectC* 属于 Cupin_2 super family,与 *S. viridis* DSM 43017^T EctC 同源性为 68.2%; *ectD* 属于 PhyH super family,与 *S. viridis* DSM 43017^T EctD 同源性为 71.2%。

通过互联网 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 在线启动子分析,得到 *P. alba* YIM 90005^T 中 *ectABCD* 基因可能的启动子序列及位置,如图 3 所示。*ectA*, *ectB*, *ectC* 和 *ectD* 在 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 已被证明是作为一个操纵子来转录的^[11],在 *P. alba* YIM 90005^T 中,各基因之间虽然



图 2 *ectABCD* 排列顺序、长度及间隔序列示意图

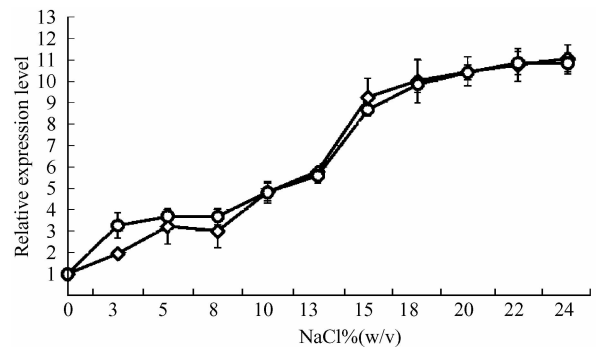
Fig. 2 Map of the sequence *ectABCD*.

图3 *ectABCD* 的序列分析结果Fig. 3 The sequence analysis of *ectABCD* gene cluster.

具有一定的基因间隔序列,但在 *ectB*、*ectC* 和 *ectD* 上游序列进行启动子分析,没有发现可能的启动子区。推测 *ectABCD* 可能作为同一个操纵子进行转录。

2.3 不同盐浓度培养下四氢嘧啶合成相关基因表达的定量研究

获得 *P. alba* YIM 90005^T 四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶合成基因簇 *ectABCD* 后,进一步对其在不同盐浓度条件下的表达进行分析。将 *P. alba* YIM 90005^T 在 SMM 培养基中培养至指数期,盐浓度分别为 0, 3, 5, 8, 10, 13, 15, 18, 20, 22, 24% (w/v), 以 16S 为内参做相对定量分析,结果显示 *ectB*, *D* 的表达量随培养基中 NaCl 浓度的增加一直呈递增趋势,在该菌能耐受的最高盐浓度下(24% NaCl),其相对表达量达到最大值。两个基因的相对表达量增大倍数基本一致,最高增长倍数近 11 倍,如图 4 所示。此结果表明,在高盐条件下, *P. alba* YIM 90005^T 四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶相容性溶质的积累,主要依靠 *ectABCD* 基因簇的高效表达。同时,该菌株能在 0-24% NaCl 较宽盐范围内生长良好,也可能与 *ectABCD* 基因受盐调控表达相关。

图4 *ectB* (◇) 及 *ectD* (○) 相对表达定量结果Fig. 4 Relative quantification of *ectB* (diamond) and *ectD* (circle) at different salt concentrations.

3 讨论

本研究以极端耐盐的放线菌 *P. alba* YIM 90005^T 为研究材料,分析了从低盐浓度到高盐浓度一系列的盐浓度梯度下胞内积累的相容性溶质,结果显示, *P. alba* YIM 90005^T 主要积累四氢嘧啶和 5-羟基四氢嘧啶作为相容性溶质,在 NaCl 浓度为

10% 时, 四氢嘧啶的胞内浓度最大, 在盐浓度 > 15% 后, 5-羟基四氢嘧啶成为主要的相容性溶质。基于 2 种相容性溶质在渗透胁迫中的重要作用, 进一步克隆了四氢嘧啶及 5-羟基四氢嘧啶合成相关基因 *ectABCD*。在线启动子分析软件分析表明, *ectABCD* 位于一个操纵子中, Real-time PCR 表明, *ectB*, *D* 同步表达, 并且随着 NaCl 浓度的增加在胞内的表达量呈逐渐增大之势, 在最高盐浓度时, 表达量达到最大值。*ectD* 的表达使四氢嘧啶被催化为 5-羟基四氢嘧啶。*P. alba* YIM 90005^T 胞内 5-羟基四氢嘧啶比四氢嘧啶的含量大得多的主要原因可能类似于 *Streptomyces coelicolor* A3 (2), 在 *ectABCD* 转录为 mRNA 后优先稳定 *ectD* 部分, 或者在翻译后增强了 EctD 的稳定性^[11]。同时, 5-羟基四氢嘧啶比四氢嘧啶极性更大、有更好的溶解性、与细胞内的各种酶类有更好的相容性, 对胞内大分子物质有更好的保护作用, 已有证据表明 5-羟基四氢嘧啶比四氢嘧啶对胞内的酶类有更好的保护作用^[13-14]。本研究结果证实 5-羟基四氢嘧啶是 *P. alba* YIM 90005^T 在极高盐浓度条件下起渗透调节及保护的相容性溶质。有效相容性溶质的选择可能是 *P. alba* YIM 90005^T 能耐盐浓度达 24% 原因所在。

已有证据表明, 对四氢嘧啶合成酶的敲除可导致 *Halomonas elongata* 在高盐浓度下利用相容性溶质合成支路合成新的相容性溶质^[16]。因此, 在未来的研究工作中对 *P. alba* YIM 90005^T 相容性溶质合成关键基因敲除并进行耐盐度分析, 将有可能对该菌耐盐机制中起决定性作用的相容性溶质种类进行确定。但 *P. alba* YIM 90005^T 耐盐机制受细胞全局调控, 各种相容性溶质的种类和含量变化都将影响到它的耐盐能力。目前该菌正在进行基因组序列测定, 对于该菌的全基因组进行分析可以对其他相容性溶质的合成途径及种类进行精确预测, 之后进行的转录组学或蛋白组学分析结果将对其耐盐范围广而高的特性进行深入的揭示。

参考文献

[1] Grant WD. Life at low water activity. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, 2004, 359: 1249-1267.

[2] Glinski EA, Trüper HG. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *Federation of Microbiological Societies Microbiological Reviews*, 1994, 15: 95-108.

[3] Roeßler M, Müller V. Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(12): 743-754.

[4] Saum SH, Müller V. Salinity-Dependent switching of Osmolyte Strategies in a Moderately Halophilic Bacterium: Glutamate Induces Proline Biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(19): 6968-6975.

[5] Brown AD. Microbial water stress. *Bacterioogyl Reviews*, 1976, 40: 803-846.

[6] 赵百锁, 杨礼富, 王磊, 卢伟东, 杨苏声. 中度嗜盐菌相容性溶质机制的研究进展. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(5): 937-941.

[7] Li WJ, Tang SK, Xu LH, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E, Jiang CL. *Prauserella halophila* sp. nov. and *Prauserella alba* sp. nov., moderately halophilic actinomycetes from saline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53: 1545-1549.

[8] Doronina NV, Ezhov VA, Beschastnyi AP, Trotsenko YA. Biosynthesis of the Bioprotectant Ectoine by Aerobic Methylophilic Bacteria from Methanol. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2010, 46(2): 173-176.

[9] Lippert K and Galinski EA. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992, 37: 61-65.

[10] Kuhlmann AU, Bremer E. Osmotically Regulated Synthesis of the Compatible Solutes Ectoine in *Bacillus pasteurii* and Regulated *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 772-783.

[11] Bursy J, Kuhlmann AU, Pittelkow M, Hartmann H, Jebbar M, Bremer E. Synthesis and Uptake of the Compatible Solutes Ectoine and 5-Hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) in Response to Salt and Heat Stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(23): 7286-7296.

[12] Borges N, Ramos AN, Baven D, Sharp RJ, Santos H. Comparative study of the thermostabilizing properties mannosyglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles*, 2002, 6: 209-216.

[13] Manzanera M, García de Castro A, Tøndervik A, Rayner-Brandes M, Strøm AR, Tunnacliffe A. Hydroxyectoine Is Superior to Trehalose for Anhydrobiotic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4328-4333.

[14] Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S. CODEHOP (Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3763-3766.

[15] Li WJ, Xu P, Schumann P, Zhang YQ, Pukall R, Xu LH, Stackebrandt E, Jiang CL. *Georgenia ruanii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China), and emended description of the genus *Georgenia*. *International Journal of Systematic and*

Evolutionary Microbiology, 2007, 57: 1424-1428.

[16] Ma YH, Galinski EA, Grant WD, Oren A, Ventosa A. Meeting Review: Halophiles 2010: Life in Saline Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(21): 6971-6981.

Cloning and characterization of gene cluster for biosynthesis of ectoine and 5-hydroxyectoine from extreme halotolerant actinomycete strain *Prauserella alba* YIM 90005^T

Yan Li^{1,2#}, Lei Dong^{1#}, Lei Wang², Fujin Fang¹, Min He¹, Zhongying Cao¹, Yuan Liang¹, Shukun Tang¹, Wenjun Li^{1*}

¹Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China

²State Key Laboratories for Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100093, China

Abstract: [**Objective**] To study adaptive mechanism in hypersaline environments of extreme halotolerant filamentous actinomycetes. [**Methods**] Using HPLC we analyzed compatible solutes from extreme halotolerant filamentous actinomycete strain *Prauserella alba* YIM 90005^T that was cultivated at different NaCl concentrations. [**Results**] Ectoine and 5-hydroxyectoine were two major compatible solutes for strain *Prauserella alba* YIM 90005^T. Ectoine accumulated to the maximum content of 18.77 μg/mg dry cell weight after being inoculated in 10% NaCl (w/v). And 5-hydroxyectoine reached 22.98 μg/mg dry cell weight after being inoculated in 24% NaCl (w/v). The *ectA* (acyltransferase), *ectB* (aminotransferase), *ectC* (ectoine synthase) and *ectD* (ectoine hydroxylase) genes cluster encoding genes on ectoine and hydroxyectoine synthesis were further cloned by designing the degenerate primer and genome walking methods. The sequence analysis indicated that *ectABCD* was an operon. Furthermore, the expression of *ectB* and *ectD* inoculated at different salt concentrations was quantified by real-time PCR, and the results indicated that the expression of the gene cluster would be increasing as the salt concentration increased. [**Conclusion**] 5-hydroxyectoine was the major compatible solute for osmotic regulation of strain *Prauserella alba* YIM 90005^T to adapt high salt concentration.

Keywords: *Prause Prauserella alba*, Compatible solutes, Ectoine, Gene clone

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (973 Program) (2010CB833801), by the National Natural Science Foundation of China (30860002, 30870005), by the Doctoral Discipline Foundation in the Higher Education Institutions of Ministry of Education (200806730001) and by the National Innovative Program for Under Graduate Students (91067323)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-871-5033335; E-mail: wjli@ynu.edu.cn

#Those authors contributed equally to this work.

Received: 19 December 2010 / Revised: 28 February 2011