

南极适冷菌 *Psychrobacter* sp. G 普遍胁迫蛋白 (USP) 基因的克隆及其胁迫条件下的应答特征分析*

宋维志^{1,2}, 林学政^{1,2*}, 车 帅^{1,2}

(1. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 2. 国家海洋局 海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘 要: 根据南极适冷菌 *Psychrobacter* sp. G 基因组测序草图发现并克隆到了 1 个普遍胁迫蛋白 (Universal Stress Protein, USP) 基因 *Usp1141*。该基因 ORF 长 462 bp, 编码 153 个氨基酸, 蛋白理论分子量为 17 kDa, pI 为 5.23。通过多序列比对发现该 USP 含有交替排列的 4 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠, 以及与 ATP 结合相关的氨基酸残基, 表明该蛋白可能通过与 ATP 结合而发挥作用。利用实时定量 PCR 技术对该蛋白在不同胁迫条件下的表达情况进行分析发现, 温度变化对 *Usp1141* 基因的表达没有显著影响; 低盐度 (0, 15) 胁迫会显著抑制其表达, 而高盐度 (90, 120) 胁迫则会显著促进其表达; 在温度与盐度协同胁迫条件下, 当培养基盐度低于菌株生长的最适盐度时, 无论温度高低, *Usp1141* 基因的表达均受到抑制, 而当培养基盐度高于最适盐度时, 无论温度高低, *Usp1141* 基因的表达均会提高。实时定量 PCR 研究表明, *Usp1141* 基因可能在南极适冷菌 *Psychrobacter* sp. G 对环境渗透压变化的适应性中发挥作用。

关键词: 适冷杆菌; 普遍胁迫蛋白; 应激反应; 表达分析

中图分类号: Q751

文献标识码: A

文章编号: 1671-6647(2013)01-0145-08

南极生态系统具有独特的地理环境及气候特征, 如常年低温、干燥、盐度高且变化大、强辐射等, 生存于其中的南极细菌必须采用独特的适应机制来应对这种极端的生存环境^[1-3]。

普遍胁迫蛋白 (Universal Stress Protein, USP) 最早在大肠杆菌的双向等电聚焦电泳中发现, 并被命名为 C13.5 蛋白^[4]。研究发现, 该基因与大肠杆菌的多种胁迫和饥饿刺激应答反应均相关, 包括生长稳定期, C、N、磷酸盐、硫酸盐及氨基酸的缺乏, 热激、氧化剂、金属、酒精、抗生素等有害物质的处理^[5]。大肠杆菌 USP 家族成员包括 *UspA*, *UspC*, *UspD*, *UspE*, *UspF*, *UspG* (*UspB* 并不属于 USP 家族)^[6]。目前所发现的 USP 大多属于 *UspA* 家族, 它能够形成同型二聚体, 在大肠杆菌中还发现了 *UspA* 的异型二聚体, 这可能是 USP 具有多种生物学功能的原因^[7]。

尽管已经在很多物种中发现 USP 能被多种胁迫刺激诱导, 但其明确的作用机理还不清楚, 至今对 USP 的研究对象主要集中于中温菌大肠杆菌^[6-9], 而对生存于南极这一极端生境的适冷菌的 USP 的研究尚未见报道。为进一步了解南极细菌的生境适应机制, 根据南极适冷菌 *Psychrobacter* sp. G 的基因组测序草图, 通过设计特异性引物, 克隆得到 1 个 USP 基因。通过实时定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 对其在不同胁迫条件下的表达情况进行了研究, 以期阐明该基因在南极适冷菌生境适应性中的作用。

* 收稿日期: 2012-03-22

资助项目: 国家自然科学基金——南极适冷菌 *Psychrobacter* sp. G 温度与盐度胁迫下基因表达谱分析及冷/热基因应答机制研究 (41176174). E-mail: wythe1987@163.com

作者简介: 宋维志 (1987-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事极端环境微生物方面研究。

* 通讯作者, E-mail: linxz@fio.org.cn

(王佳实 编辑)

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基与试剂

南极适冷菌 *Psychrobacter* sp. G 分离自南极乔治王岛西南部的的水样并保存于本实验室中^[10]。

所使用不同盐度培养基的成份见表 1, 培养基于 1×10^5 Pa 下湿热灭菌 20 min。海水取自山东青岛海域, 盐度为 31。

大肠杆菌感受态细胞 DH5 α (D9057)、克隆载体 pMD18-T(D101A)、RNA 提取试剂盒(D9108D)、反转录试剂盒(DRR037A)、SYBR PrimeScriptTMRT-PCR Kit(DRR041A)均购自大连 Takara 公司; 基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)、琼脂糖凝胶回收试剂盒(DP209-2)均购自天根生化科技(北京)有限公司。

表 1 培养基成份

Table 1 Components of culture media

| 盐 度 | 蛋白胨 /g | 酵母粉 /g | 氯化钠 /g | 海 水 /mL | 去离子水 /mL |
|-----|-----------|-----------|-----------|------------|-------------|
| 0 | 5 | 1 | 0 | 0 | 1 000 |
| 15 | 5 | 1 | 0 | 480 | 520 |
| 45 | 5 | 1 | 14 | 1 000 | 0 |
| 90 | 5 | 1 | 59 | 1 000 | 0 |
| 120 | 5 | 1 | 89 | 1 000 | 0 |

1.2 *Usp1141* 基因的克隆

为获取 *Usp1141* 基因全长及其完整的调控序列, 根据菌株 *Psychrobacter* sp. G 的基因组草图, 选取 *Usp1141* 基因起始密码子 ATG 上游 -500~-600 bp 的序列以及终止密码子 TAA 下游 0~100 bp 的序列, 利用软件 Primer 5.0 设计特异性引物 *Usp1141*-F 和 *Usp1141*-R(表 2)。PCR 扩增反应条件如下: 95 °C 4 min; 42 °C 30 s, 72 °C 40 s, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保持。PCR 产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒切胶纯化后连接到 pMD-18T 载体并转化大肠杆菌 DH5 α 。含有插入片段的阳性克隆并由上海桑尼生物科技有限公司完成测序。

1.3 生物信息学分析

扩增得到的 *Usp1141* 基因的核苷酸序列通过 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)与 GenBank 中已有的序列进行比对分析。启动子序列(-35 区, -10 区)、核糖体结合位点(RBS)由 Softberry 网站(<http://linuxl.softberry.com/berry.phtml>)分析获得^[11]。蛋白等电点(pI)、分子量(MW)由 Lasergene-EditSeq (v. 1.02; DNASTAR Inc.)计算得出。使用 Lasergene 序列分析软件包(v. 1.02; DNASTAR Inc.)中的 MegAlign, 将 *Usp1141* 与其他菌种 *UspA* 进行多序列比对, 所选取的 *UspA* 分别来自于 *Psychrobacter arcticus*(YP_265125), *Moraxella catarrhalis*(YP_003627803), *Pseudomonas stutzeri*(YP_001172977), *Methylobacterium alcaliphilum*(YP_004916566), *Dichelobacter nodosus*(YP_001208950), *Cardiobacterium hominis*(YP_05705139), *Saccharophagus degradans*(YP_527252), *Acinetobacter baumannii*(ACJ41690)和 *Escherichia coli*(ACT43718)。选取与菌株 G 进化关系较近菌株的 *UspA* 蛋白, 使用软件

Mega 4.0 中的邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建系统发育树,通过自展检测法(bootstrap test)评估所构建的系统发育树的可靠性^[12]。

1.4 胁迫处理

首先将菌株 G 在最适生长温度(20 °C)和盐度(45)条件下培养,待培养液 OD₆₀₀ 达到 0.5 时(指数生长期),进行如下的胁迫处理:1)温度胁迫:将菌株分别于 0、10 和 30 °C 培养,并分别于 2、6 和 12 h 时取样并于 -80 °C 保存。2)盐度胁迫:将 OD₆₀₀ 为 0.5 的培养液于 20 °C 下 8 000 g 离心 5 min,收集菌体。将获得的菌体分别重悬于与离心前体积相等的、盐度分别为 0、15、90 和 120 的培养基中。重悬后的菌体于 20 °C 继续培养 2、6 和 12 h 后取样并于 -80 °C 保存。3)温度盐度协同胁迫:按照盐度胁迫的操作方法,将 OD₆₀₀ 为 0.5 的培养液分别于如下条件下继续培养:温度 0 °C,盐度 15;温度 30 °C,盐度 15;温度 0 °C,盐度 90;温度 30 °C,盐度 90。菌株于上述条件下继续培养 2、6 和 12 h 后取样并于 -80 °C 保存。最适生长条件(温度为 20 °C,盐度为 45)下继续培养的菌株于相同时间点(2、6 和 12 h)取样设为对照,进行基因差异表达分析。

1.5 *Usp1141* 基因表达分析

利用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,获得的总 RNA 的质量通过测定其 A260/A280 值确定。使用 PrimeScript RT Reagent Kit 将得到的 500 ng RNA 反转录为 cDNA。使用 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒进行实时定量分析。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH)基因作为内参基因^[13-14]。使用软件 Primer 5.0 设计 *Usp1141* 基因和 GAPDH 基因实时定量 PCR 引物,引物 *Usp1141*-QF、*Usp1141*-QR、GAPDH-QF、GAPDH-QR 序列详见表 2。qRT-PCR 仪为 Stratagene Mx3000P qPCR System,反应条件如下:95 °C, 5 s; 47 °C, 15 s; 72 °C, 20 s, 40 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保持。所有实验均重复 3 次。基于临界循环值(Ct)对 mRNA 进行定量,采用相对 Ct 值法(2^{-ΔΔCt})进行数据处理,对照组 *Usp1141* 基因的表达量标准化为 1^[15]。使用 SPSS 16.0 对样本的重复性以及样本间的差异进行统计分析。P>0.05 时,样本间不存在显著性差异;0.01<P<0.05 时,样本间存在显著性差异(用 * 表示);当 P<0.01 时,样本间存在极显著差异(用★表示)。

表 2 基因克隆和 qRT-PCR 引物

Table 2 Primers used in the gene cloning and qRT-PCR analysis

| 引物 | 核苷酸序列 (5' - 3') |
|--------------------|---------------------------|
| <i>Usp1141</i> -F | ATAAAGCCACGTGCTCTAAAATATG |
| <i>Usp1141</i> -R | CAGCCACAGCAAGCAAGAAA |
| <i>Usp1141</i> -QF | ATTTGAGATGGCAGTTG |
| <i>Usp1141</i> -QR | GGCTTTGGCTACGAG |
| GAPDH- QF | AGTCAGGCACATTTAGCG |
| GAPDH- QR | GGCATAGCCCCATTCATT |

2 结果与分析

2.1 *Usp1141* 基因核苷酸及蛋白氨基酸序列分析

根据南极适冷菌 *Psychrobacter* sp. G 的基因组测序草图和功能注释,发现一个 *UspA* 基因(*Usp1141*)。通过设计特异性引物,克隆到了该基因的全长序列。基因序列测定表明,该基因 ORF 长 462 bp,编码 153 个

氨基酸,理论蛋白分子量为 17 kDa, pI 值为 5.23。启动子序列-35 区 (5'-ATGAAA-3') 和-10 区 (5'-TAGTAAAAT-3') 分别位于-304 bp 和 -276 bp 处,起始密码子上游 11 bp 处有一个典型的 RBS 序列 (5'-AGGA-3') (图 1)。Usp1141 基因序列及推导的氨基酸序列已提交 GenBank,获得的序列注册号为 JQ782515。多序列比对结果表明,Usp1141 的氨基酸序列与其他已知物种的 UspA 氨基酸序列存在相似性很高的保守区;Usp1141 的二级结构为交替排列的 4 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠;与 ATP 结合相关的氨基酸残基分别位于 β 1, β 2, β 4, α 4 和 β 5 上 (图 2)。

从构建的系统发育树可以看出,Usp1141 与来自同属菌株 *Psychrobacter arcticus* 273-4 的 UspA 进化关系很近,与同科菌株 *Moraxella catarrhalis* RH4 的 UspA 进化关系次之,而与 *Escherichia coli* 和 *Bacillus subtilis* 的 UspA 的进化关系则较远 (图 3)。

```

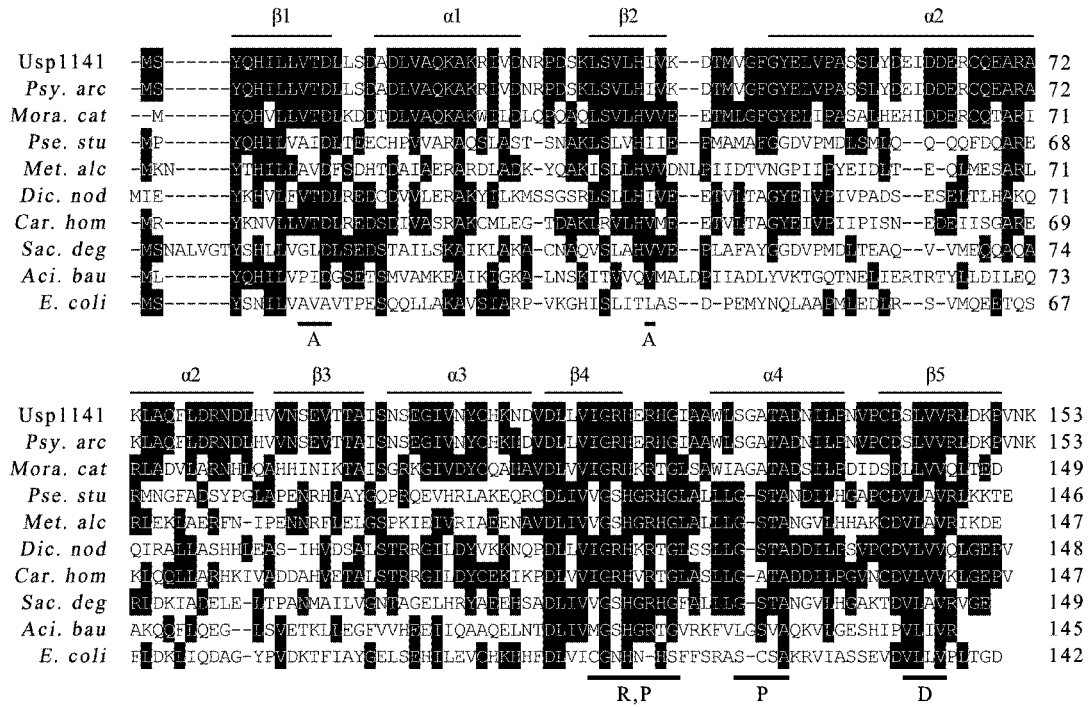
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....
TATCCTTATGCATTAATTAATTACTTCAGTATCATCTTAGCCAATAACCAAGGTATGAAAATCGATATCAGCAATTAAATAGTAAAATTTATATTTA
.....
                                     -35区                                     -10区
      100     110     120     130     140     150     160     170     180
.....
TAAAAAGATCGCTTTGAATAAACCAATTAGAGTTATCAAAGCATCATAGGTCATCTTCGAATTGAATGGCATTATCAGCTAAAAAGAATTTCG
.....
      190     200     210     220     230     240     250     260     270
.....
CTAACGACAGTAGATGGGGCTAATACGCTAGTAAGTCAAGACAGTGGGTGGAGAAAACAATAAGTCATCAAGAATAACGGATAAAGATAGCG
.....
280      290      300      310      320      330      340      350      360      370
.....
CCCGATTTAACAAAGCCTACTTAACAGCAGTCATTAGTAGTGTATAGTTAAATCATCTGCCACAAGCAAGGAGCGGCTCATGAGTTACCAA
.....
                                     RBS                                     M S Y Q
      380     390     400     410     420     430     440     450     460
.....
CATATTTTATTTGGTCACCGATTTACTATCCGATGCTGACTTGGTTGCTCAAAAAGCCAAGCGTATCGTTGATAATCGTCTGACTCCAAATTA
.....
H I L L V T D L L S D A D L V A Q K A K R I V D N R P D S K L
.....
      470     480     490     500     510     520     530     540     550
.....
TCGGTATTACATATCGTAAAAGATACCAATGGTTGGCTTTGGCTACGAGCTGGTGCCTGCCCTCAAGCTTATATGATGAGATTGATGATGAGCGT
.....
S V L H I V K D T M V G F G Y E L V P A S S L Y D E I D D E R
.....
560      570      580      590      600      610      620      630      640      650
.....
TGCCAAGAAGCGCTGCAAACTGGCGCAGTTTGGGATCGTAATGACTTACATGTGGTCAACTCGAAGTGCAACTGCCATCTCAAATAGT
.....
C Q E A R A K L A Q F L D R N D L H V V N S E V T T A I S N S
.....
      660     670     680     690     700     710     720     730     740
.....
GAAGGCATCGTCAACTATTGCCATAAGAATGACGTTGATTTATGGTTATTTGGTTCATGAACGTCATGGGATAGCAGCTTGGCTTAGTGGC
.....
E G I V N Y C H K N D V D L L V I G R H E R H G I A A W L S G
.....
      750     760     770     780     790     800     810     820     830
.....
GCAACGGCAGATAAATATCTTGCCAAATGTACCTTGTGACAGCTTAGTTGTGAGACTTGATAAGCCCGTTAATAAATAAGTGTAGGCATAGAAT
.....
A T A D N I L P N V P C D S L V V R L D K P V N K *
.....
      840     850     860     870     880     890     900     910
.....
TAATACAGTCGATACTAAATAAGCTGAATGCACTTTATTATAGGGCGAACTGGTACAAATTTTCTTGCTTGCT
.....

```

黑体加下划线代表-35区、-10区和RBS;黑体代表起始密码子ATG和终止密码子TAA

图1 Usp1141基因全长序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Full-length nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of Usp1141 gene



序列上方横线代表 4 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠;序列下方的黑线代表与 ATP 接触的氨基酸残基(A: 腺嘌呤; R: 核糖; P: 磷酸基团; D: 二聚物表面)

图 2 *Usp1141* 与其他菌种 *UspA* 的多序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of *Usp1141* with other representative bacterial *UspA*

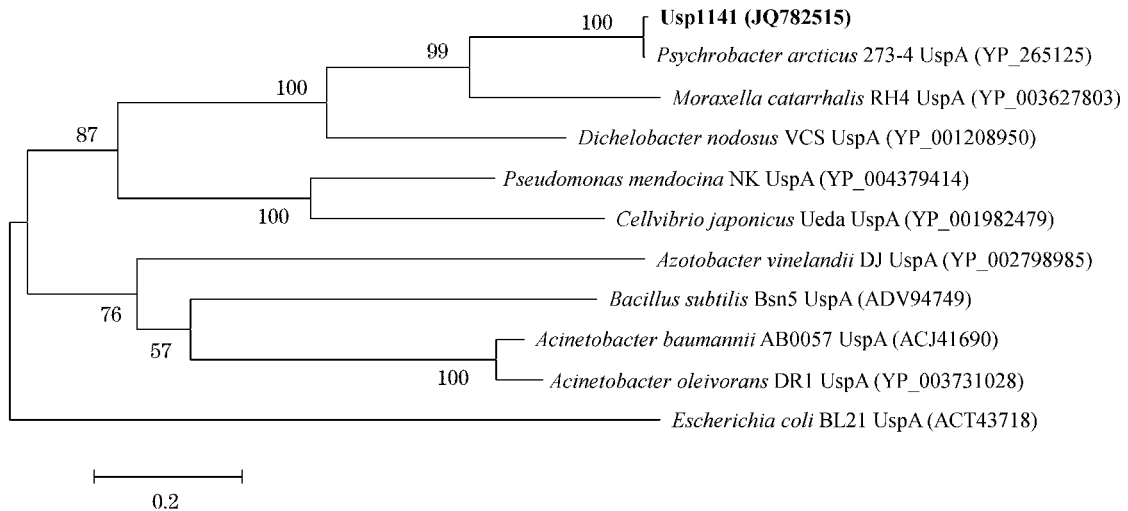


图 3 *Usp1141* 的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *Usp1141*

2.2 *Usp1141* 基因对温度胁迫的应答特征

qRT-PCR 研究表明,温度对 *Psychrobacter* sp. G *Usp1141* 基因的表达基本没有影响。无论是低

温(0, 10 °C)还是高温(30 °C)处理,其表达均没有显著性变化(图 4)。

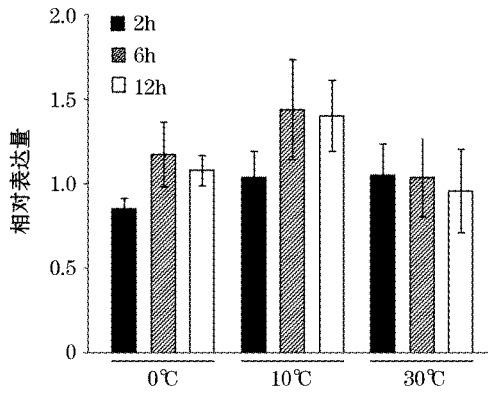


图 4 *Usp1141* 基因对温度胁迫的应答特征

Fig. 4 Expression characteristics of *Usp1141* gene in response to temperature stresses

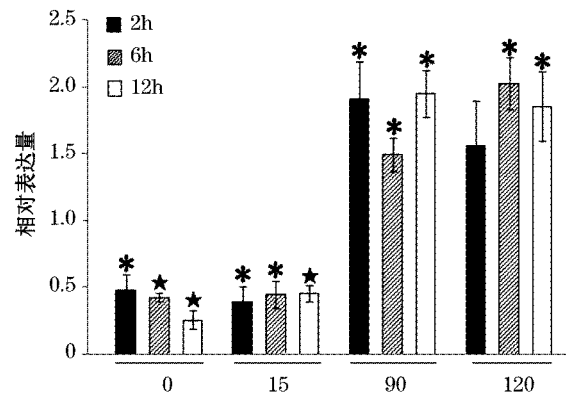


图 5 *Usp1141* 基因对盐度胁迫的应答特征

Fig. 5 Expression characteristics of *Usp1141* gene in response to salinity stresses

2.3 *Usp1141* 基因对盐度胁迫的应答特征

当培养基盐度(0, 15)低于菌株 G 生长的最适盐度时, *Usp1141* 基因的表达会受到显著抑制。当培养基盐度为 0 且处理时间为 12 h 时, 其表达量最低, 仅为对照的 0.25 倍; 当培养基盐度(90, 120)高于菌株生长的最适盐度时, *Usp1141* 基因的表达水平则会显著升高; 当盐度为 120 且处理时间为 6 h 时, 其表达量为对照的 2 倍(图 5)。

2.4 *Usp1141* 基因对温度和盐度协同胁迫的应答特征

当培养基盐度低于菌株生长的最适盐度时, 无论温度低于还是高于最适温度, *Usp1141* 基因的表达均受到抑制。当培养温度为 0 °C, 培养基盐度为 15 时, 其表达受到显著抑制, 仅为对照的 0.15 倍; 当培养温度为 30 °C, 培养盐度为 15, 处理时间为 2 h 时, 其表达量仅为对照组的 0.41 倍。当培养基盐度高于菌株生长的最适盐度时, 无论温度低于还是高于最适温度, *Usp1141* 基因的表达水平平均会提高。当培养温度为 0 °C, 培养基盐度为 90 的培养条件时, 基因表达量会显著升高, 并在 6 h 后达到对照组的 1.8 倍; 当培养温度为 30 °C, 培养基盐度为 90 时, 基因表达量在前 2 h 内无明显变化, 但在随后的 10 h 内, 其表达量会显著提高, 达到对照组的 1.7 倍(图 6)。

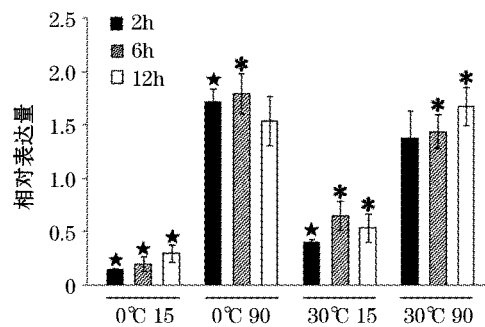


图 6 *Usp1141* 基因对温度和盐度协同胁迫的应答特征

Fig. 6 Expression characteristics of *Usp1141* gene in response to combined stresses of temperature and salinity

3 讨 论

极地生态系统的独特性为研究极端条件环境下微生物的适应机制提供了极好的资源。南极细菌 *Psychrobacter* sp. G 分离自南极乔治王岛西南部的水样中, 其最适生长温度为 20 °C, 当温度高于 30 °C 则完全停止生长, 表明该菌属于适冷菌。本研究从 *Psychrobacter* sp. G 中克隆得到了 1 个 USP 编码基因 *Usp1141*。

多序列比对结果表明,*Usp1141* 的氨基酸序列与其他已知物种的 UspA 氨基酸序列存在相似性很高的保守区,并发现有与结合 ATP 相关的氨基酸残基(图 2)。这些表明 *Usp1141* 可能与其他 UspA 蛋白发挥类似的生物学功能,并通过与 ATP 结合来发挥作用^[16]。进化树分析表明,*Usp1141* 与同属的 *Psychrobacter arcticus* 273-4 的 UspA 进化关系较近,与同一科的 *Moraxella catarrhalis* RH4(YP_003627803)的 UspA 进化关系次之,这与上述菌株基于 16S rRNA 的系统进化关系基本一致(图 3)。

实时定量 PCR 研究表明,温度变化对 *Usp1141* 基因的表达基本没有影响(图 4),与之不同的是,热激处理会诱导中温菌大肠杆菌 UspA 的表达^[5],这表明适冷菌 *Psychrobacter* sp. G 可能采取其他机制来适应外界温度的变化,如在低温下诱导冷激蛋白的表达^[17-19],高温下诱导热激蛋白的表达等^[20-21]。当培养基盐度低于菌株生长的最适盐度时(0,15),*Usp1141* 基因的表达会受到显著抑制;而高盐度(90,120)下其表达量则会显著提高(图 5)。这表明 *Usp1141* 可能在菌株 G 对渗透压变化的适应性中发挥作用。在自然条件下,南极细菌通常需要同时面对多种环境压力,如在南极地区,温度变化通常伴随着盐度变化^[3]。因此对温度盐度协同胁迫下 *Usp1141* 基因的表达情况也进行了研究。结果表明,*Usp1141* 基因在温盐协同胁迫下的表达情况与在温度和盐度单因子影响时的表达情况基本一致,即 *Usp1141* 基因表达量的变化与温度无关,低盐度会抑制其表达,而高盐度会诱导其表达(图 6)。

尽管 USP 已经在很多物种中发现,但其明确的作用机理还不清楚。且之前的研究主要集中于嗜中温菌大肠杆菌^[6, 8-9],对南极适冷菌的 USP 的研究目前尚未见报道。南极适冷菌 *Psychrobacter* sp. G 的生存环境与大肠杆菌完全不同,本研究对阐明适冷菌中 USP 的作用机理有一定意义。

参考文献(References):

- [1] MARGESIN R, SCHINNER F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology [J]. *Journal of Biotechnology*, 1994, 33(1):1-14.
- [2] PEARCE D A. Climate change and the microbiology of the Antarctic peninsula region [J]. *Science Progress*, 2008, 91(2):203-217.
- [3] THOMAS D N, DIECKMANN G S. Antarctic Sea ice—a habitat for extremophiles [J]. *Science*, 2002, 295(25):641-644.
- [4] VAN BOGELEN R A, HUTTON M E, NEIDHARDT F C. Gene-protein database of *Escherichia coli* K-12; edition 3 [J]. *Electrophoresis*, 1990, 11(12):1131-1166.
- [5] KVINT K, NACHIN L, DIEZ A, et al. The bacterial universal stress protein; function and regulation [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(2):140-145.
- [6] GUSTAVSSON N, DIEZ A, NYSTROM T. The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage [J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(1):107-117.
- [7] NACHIN L, BRIVE L, PERSSON K C, et al. Heterodimer formation within universal stress protein classes revealed by an in silico and experimental approach [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 380(2):340-350.
- [8] NYSTR M T, NEIDHARDT F C. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli* [J]. *Molecular Microbiology*, 1992, 6(21):3187-3198.
- [9] SIEGELE D A. Universal stress proteins in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(18):6253-6254.
- [10] LIN X Z, CUI S S, XU G Y, et al. Cloning and heterologous expression of two cold-active lipases from the Antarctic bacterium *Psychrobacter* sp. G [J]. *Polar Research*, 2010, 29:421-429.
- [11] PANICKER G, MOJIB N, NAKATSUJI T, et al. Occurrence and distribution of capB in Antarctic microorganisms and study of its structure and regulation in the Antarctic biodegradative *Pseudomonas* sp. 30/3 [J]. *Extremophiles*, 2010, 14(2):171-183.
- [12] KUMAR S, NEI M, DUDLEY J, et al. MEGA: A biologistcentric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2008, 9(4):299-306.
- [13] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9):e45.
- [14] HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations [J]. *Genes and Immunity*, 2005, 6(4):279-284.
- [15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^(Delta Delta)

- C(T)) method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [16] ZAREMBINSKI T I, HUNG L W, MUELLER D H, et al. Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(26): 15189-15193.
- [17] BAKERMANS C, TOLLAKESEN S L, GIOMETTI C S, et al. Proteomic analysis of *Psychrobacter cryohalolentis* K5 during growth at subzero temperatures [J]. *Extremophiles*, 2007, 11(2):343-354.
- [18] BERGER F, MORELLET N, MENU F, et al. Cold shock and cold adaptation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(11):2999-3007.
- [19] KAWAMOTO J, KURIHARA T, KITAGAWA M, et al. Proteomic studies of an Antarctic cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, for global identification of cold-inducible proteins [J]. *Extremophiles*, 2007, 11(6):819-826.
- [20] LIU S, ZHANG P, CONG B, et al. Molecular cloning and expression analysis of a cytosolic Hsp70 gene from Antarctic ice algae *Chlamydomonas* sp. ICE-L [J]. *Extremophiles*, 2010, 14(3):329-337.
- [21] GARCIA D L, ALCAZAR A, BAQUERO F, et al. Identification of in vivo HSP90-interacting proteins reveals modularity of HSP90 complexes is dependent on the environment in psychrophilic bacteria [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2011, 16(2):203-218.

Cloning and Characteristic Analysis of Universal Stress Protein (USP) Gene of Antarctic Bacterium *Psychrobacter* sp. G in Response to Stress Treatments

SONG Wei-zhi^{1, 2}, LIN Xue-zheng^{1, 2*}, CHE Shuai^{1, 2}

(1. *First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China;*

2. *Key Lab of Marine Bioactive Substances, SOA, Qingdao 266061, China*)

Abstract: A universal stress protein gene, designated as *Usp1141*, was cloned from the Antarctic psychrotrophic bacterium *Psychrobacter* sp. G according to its genomic draft. The ORF of *Usp1141* gene was 462 bp in length and encoded a protein consisting of 153 amino acid residues with a molecular mass of 17 kDa and a calculated pI of 5.23. Multiple sequences alignment revealed that four α -helices and five β -sheets were alternately arranged in its secondary structure. Several conserved amino acid residues related with ATP combination were identified. qRT-PCR analysis showed that the expression of *Usp1141* gene was not significantly affected by temperature shift, but it was obviously inhibited by low salinity (0, 15), and remarkably enhanced by high salinity (90, 120). The results under the combined temperature and salinity stress were consistent with that of salinity stress only, indicating that *Usp1141* gene of *Psychrobacter* sp. G might be involved in the adaptation of the environmental osmotic fluctuation.

Key words: *Psychrobacter*; universal stress protein; stress response; expression analysis

Received: March 22, 2012