



## 红球菌 R04 联苯/多氯联苯代谢相关调控蛋白 RHOGL007659 的生理功能

杨秀清<sup>\*</sup>, 杨琳

山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

**摘要:**【目的】研究红球菌(*Rhodococcus* sp.) R04 调控蛋白 RHOGL007659 的生理功能及其缺陷菌株的代谢特性, 初步探究红球菌 R04 降解联苯的调控机制。【方法】通过基因同源重组敲除红球菌 R04 联苯代谢相关基因 *RHOGL007659*。比较红球菌 R04 (野生型)和缺陷型菌株 R04 $\Delta$ 7659 (基因 *RHOGL007659* 缺陷型的 R04)在不同碳源培养下的生长情况, HPLC 分析 R04 和 R04 $\Delta$ 7659 转化联苯的能力。提取 R04 和 R04 $\Delta$ 7659 的总 RNA, 实时荧光定量 PCR 检测联苯降解关键基因的转录表达。纯化 BphB (联苯降解脱氢酶)和 BphD (联苯降解水解酶), 制备多克隆抗体。Western blot 分析 BphB 和 BphD 蛋白在 R04 和 R04 $\Delta$ 7659 中的表达水平。【结果】获得了 *RHOGL007659* 基因的缺陷型菌株 R04 $\Delta$ 7659, 与 R04 相比, R04 $\Delta$ 7659 在联苯培养条件下的生物量趋近于零。HPLC 分析表明, *RHOGL007659* 基因的缺失使红球菌 R04 丧失转化联苯的能力。实时荧光定量 PCR 结果表明, 在联苯培养条件下, 缺失 *RHOGL007659* 后的 R04, 其联苯降解关键基因均有不同程度的下调表达。Western blot 分析显示 *RHOGL007659* 缺失后, 联苯降解关键酶 BphB 和 BphD 表达量均降低, 这与实时荧光定量 PCR 结果相一致。【结论】RHOGL007659 是红球菌 R04 联苯降解关键基因簇的调控蛋白, 该蛋白对红球菌 R04 代谢联苯过程具有正调控作用。

**关键词:** 红球菌(*Rhodococcus* sp.) R04, 联苯/多氯联苯, 转录调控, 调控蛋白

微生物对其生长环境具有一定的适应性, 当外界变化不利于微生物生长时, 如温度、pH、活性氧浓度、渗透压、营养物质等变化时, 微生物会产生一系列适应代偿反应。原核生物对环境的适应, 对营养条件改变适应的相关应答, 都是基

因表达调控的结果。原核生物基因表达调控主要发生在转录水平, 调控基因表达形成调控蛋白, 调控蛋白与操纵序列结合调控基因转录<sup>[1]</sup>。结合后能减弱或阻止蛋白表达的调控蛋白为阻遏蛋白, 简称负调控。结合后能增强或启动蛋白表达的调

基金项目: 国家自然科学基金(3080030)

<sup>\*</sup>通信作者。Tel/Fax: +86-351-7010215; E-mail: xiuqyang@sxu.edu.cn

收稿日期: 2017-11-23; 修回日期: 2018-01-18; 网络出版日期: 2018-01-31

控蛋白为激活蛋白, 简称正调控<sup>[2]</sup>。

多氯联苯是一种环境异生化合物<sup>[3]</sup>, 其对环境和生物体均有一定的毒害作用<sup>[4-5]</sup>。当多氯联苯大量存在, 不利于细胞的生长发育时, 会通过信号转导激活起调控作用的相关基因, 大量合成代谢多氯联苯蛋白和应激反应相关蛋白, 减少其他蛋白的合成, 节省能量, 使细胞更适应外部环境<sup>[6]</sup>。目前发现的不同菌株中联苯/多氯联苯降解途径的调控蛋白有以下几种。真养产碱杆菌(*Ralstonia eutropha*) A5 Tn4371 *bph* 基因簇和假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) KKS102 *bph* 基因簇 *bphSEFGA1A2BCDA4R*, 是由 BphS 负调控的<sup>[7-8]</sup>。伯克氏菌(*Burkholderia xenovorans*) LB400 有一个属于 LysR 家族的正调节基因 *ORF10103*<sup>[9]</sup>。类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) KF707 联苯降解基因簇 *bphR1A1A2A3A4BCX0X1X2X3* 由 BphR1 和 BphR2 共同调节, 前者属于 GntR 家族, 后者属于 LysR 家族<sup>[10-12]</sup>。

红球菌(*Rhodococcus* sp.) R04 是分离于华北油田污染土壤中的革兰氏阳性菌, 可以高效降解苯酚、萘、联苯和多氯联苯等多种芳香族化合物<sup>[13]</sup>。我们课题组对红球菌 R04 降解联苯/多氯联苯已经研究多年, 对其代谢途径以及途径中的多种酶已经比较清楚, 但对该菌联苯降解关键基因的调控过程还不清晰。课题组先前的研究发现, 联苯降解基因簇 *bph* 上的 *RHOGL007659* 基因在联苯培养下的表达量提高了数倍<sup>[14]</sup>, 我们推测其对红球菌 R04 降解多氯联苯的过程会有影响, 可能为 *bph* 基因簇上的一个调控蛋白。因此在本研究中, 我们将构建 *RHOGL007659* 缺陷型菌株, 并对缺陷型菌株和野生型菌株的生长和代谢进行分析, 以期确定 *RHOGL007659* 基因的生理功能。这为进一步研究红球菌 R04 降解多氯联苯过程中的调控方式

及调控机制奠定了基础, 为其在多氯联苯污染环境原位修复和应用提供一定的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *Rhodococcus* sp. R04, R04ΔBphD, *E. coli* DH5α, *E. coli* BL21(DE3)和 pK18mobsacB 质粒由本实验室保存。

**1.1.2 培养基:** (1) LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 5; (2) LBP 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10; (3) LBG 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 5, 葡萄糖 10; (4) 红球菌基础培养基(g/L):  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  5.85,  $(NH_4)_2SO_4$  5.00,  $KH_2PO_4$  2.93,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.30, NaCl 0.20,  $CaCl_2$  0.03,  $NiSO_4 \cdot 7H_2O$   $6 \times 10^{-4}$ , 微量元素盐溶液 200 μL。微量元素盐溶液(g/L):  $Na_3$ -Citrate·2H<sub>2</sub>O 0.180,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.034,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.005,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.005,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.004,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.002,  $ZnCl_2$  0.003,  $H_3BO_3$  0.002<sup>[14]</sup>。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** FastPfu DNA Polymerase, pEASY-T3 Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司; 酵母粉、胰蛋白胨购自 Oxoid 公司; 质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购自北京中科瑞泰生物科技有限公司; 限制性内切酶 *Hind* III, *Bam*HI, *Eco*R I, *Pst* I 购自大连宝生物工程有限公司; *Nru* I 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; T4 DNA Ligase 购自 Fermentas 公司; 氨苄青霉素(Amp), 卡那霉素(Kan), 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 联苯购自军事医学科学院试剂站; 色谱纯甲醇购自天津科密欧化学试剂有限公司; DYY-6C 型电泳仪购自北京市六一仪器厂; EC250-90 型电泳仪购自美国 Thermo Fisher 公司; 日立 UV-201

分光光度计购自美国 Hitachi Instruments 公司；Delta Vision Deconvolution microscope 购自美国 Delta Vision 公司；高效液相色谱仪购自美国 Waters 公司，色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 液相色谱柱(4.6 mm×250 mm)；反转录试剂盒 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司；辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

**1.1.4 实验动物：**新西兰大白兔，体重约 2 kg。

## 1.2 RHOGL007659 氨基酸序列分析

将 RHOGL007659 核酸序列与蛋白序列提交 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，搜索同源序列并进行分析。通过 DNAMAN 分析 HOGL007659 蛋白序列与其他联苯降解调控蛋白序列的相似性。

## 1.3 RHOGL007659 基因敲除

**1.3.1 RHOGL007659 基因克隆** 根据 RHOGL007659 序列设计引物 F1/R1 (表 1)，以红球菌 R04 的基因组作为模板进行 PCR 扩增，PCR 反应条件：94 °C 5 min；94 °C 20 s，55 °C 30 s，72 °C 90 s，30 个循环；72 °C 5 min。

**1.3.2 敲除载体构建：**载体 pK18mobsacB 与 RHOGL007659 以 Hind III 和 BamH I 双酶切，连接，筛选得到阳性重组质粒。Nru I 单酶切，酶切后质粒进行自连接，转化大肠杆菌，筛选。

**1.3.3 电转与筛选：**将方法 1.3.2 筛选得到的阳性重组质粒 pK18mobsacB-Δ7659 电转化到红球菌 R04 感受态，电转化条件为：电压 2.5 kV、电容 25 μF、电阻 800 Ω，电击时间 8 ms。电击后，立即加入 800 μL LBP 培养基，30 °C 培养 4 h，取 400 μL 涂在含有卡那霉素(终浓度为 50 μg/mL)的 LB 平板

表 1. 实验所用引物序列

Table 1. Primer sequences used in this research

Primer	Oligonucleotide sequence (5'→3')
F1	TAGGATCCGAGGTGAACAAGAAGAAA ATCC
R1	TAAAGCTTCGAGCGTGACCGTTATCGC CACC
F2	CGTGGTAGGGGCACTTGAAG
R2	CCAATACCTGGCTGTTTCTC
F3	CGGGTTCTTTTCGGTTGC
R3	TGGGAGGGTCCACATCT
F4	ATGGCTTCGGATTCAAG
R4	CATACACAGGTCGTAG
F5	CGCTCGTTCTGCTCCAC
R5	CGCTCGTTCTGCTCCAC
16S rRNA F <sub>292</sub>	CACACTGGGACTGAGACACG
16S rRNA R <sub>436</sub>	TCTCCCACTACCGTCACTTG
bphB F	TCAGAATTCATGGGATGGCTCGATGGA
bphB R	GCCCTGCAGTTCCTCACTTGGTTGTTT

上，30 °C 培养 72 h。将平板得到的转化子，接种于 3 mL LBG 培养基中，30 °C 培养 24 h，取 20 μL 培养液涂在含有 10% 蔗糖的 LBP 平板上，30 °C 培养 48 h，挑取单菌落进行菌落 PCR。

## 1.4 红球菌 R04 与缺陷型菌株的生物量测定

**1.4.1 R04 与 R04Δ7659 菌株在联苯/葡萄糖为碳源培养下的生物量：**采用静息细胞法<sup>[14]</sup>处理 R04 和 R04Δ7659，将 2 种菌株分别接种到含联苯和葡萄糖的基础培养基中，2 种碳源终浓度均为 10 mmol/L。每隔 4 h 取样，测定 2 种菌株在不同时期的 OD<sub>600</sub>。

**1.4.2 R04、R04Δ7659、R04ΔBphD (基因 bphD 缺陷型的 R04) 菌株在 HOPDA (联苯中间代谢产物，2-羟基-6-氧基-6-苯基-2,4-己二烯酸)为碳源培养下的生物量：**采用静息细胞法处理 3 种菌株，分别接种于等量的以 HOPDA 为唯一碳源的基础培养基中。每隔 4 h 取样，测定 R04 和 2 种不同

缺陷型菌株在不同时期的  $OD_{600}$ 。

## 1.5 R04 与 R04 $\Delta$ 7659 转化联苯分析

**1.5.1 样品制备：**将 R04 和 R04 $\Delta$ 7659 的静息细胞分别加入到含有联苯的基础培养基中，30 °C 振荡培养，每隔 5 h 取样。加入等体积色谱纯甲醇，旋涡混合 2 min，充分混匀后取出 1 mL 离心 (12000 r/min，10 min)，取上清作为待测样品，进行 HPLC 分析。

**1.5.2 测定方法——HPLC 分析<sup>[15]</sup>：**色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 液相色谱柱 (4.6 mm × 250 mm)；流动相为甲醇：水 (体积比 9：1)；柱温为室温；检测波长为 254 nm；流速 1.0 mL/min；进样量 10  $\mu$ L。

**1.5.3 数据统计分析：**所有菌株生长和转化实验均重复 3 次，计算结果取平均值，实验结果以平均值  $\pm$  标准差表示。

## 1.6 降解联苯的关键基因的转录表达分析

分别提取葡萄糖中培养的红球菌 R04 和联苯中培养的 R04 $\Delta$ 7659 的总 RNA，使用试剂盒将其反转录为 cDNA，将其浓度都调整到 60 ng/ $\mu$ L，以 2 种 cDNA 为模板，以 F2/R2、F3/R3、F4/R4 和 16S rRNA F<sub>292</sub>/16S rRNA R<sub>436</sub> (表 1) 为引物进行实时荧光定量 PCR。PCR 条件如下：95 °C 5 min；95 °C 10 s，60 °C 30 s，40 个循环；反应结束后对各组样本的溶解曲线进行监测，得到到达阈值时的循环数  $C_t$  值，并运用  $C_t$  值定量比较，即  $\Delta\Delta C_t$  法分析 2 种样品的表达差异。所获数据均通过软件 StepOne Software v2.2 (Applied Biosystems) 进行分析。

## 1.7 脱氢酶(BphB)重组蛋白的表达与纯化

**1.7.1 BphB 表达载体构建：**以红球菌 R04 基因组为模板，以 BphB F、BphB R (表 1) 为引物，通过 PCR 扩增获得目的片段，PCR 产物经 *EcoR* I

和 *Pst* I 双酶切后连入 pBV220 载体，转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ，获得的重组质粒经双酶切和 PCR 鉴定后，送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

**1.7.2 BphB 重组蛋白的表达与纯化** 将方法 1.7.1 构建好的表达载体 pBV220-bphB 导入 *E. coli* BL21 (DE3)，在含有氨苄青霉素 (终浓度 50  $\mu$ g/mL) 平板上筛选，挑取单菌落，在含有氨苄青霉素 (终浓度 50  $\mu$ g/mL) LB 液体培养基中 30 °C 培养至对数生长期，42 °C 诱导培养 5 h。收集菌体，破碎后进行 SDS-PAGE 检测。超声破碎后的沉淀用洗涤液 (1% Triton X-100 的 Tris-HCl 溶液) 洗涤后，将包涵体溶解于 8 mol/L 尿素溶液中。粗蛋白溶液上样于 Q-Sepharose 柱，以含有 8 mol/L 尿素的 0–0.5 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 溶液进行线性梯度洗脱，收集目标蛋白溶液上样于凝胶排阻层析 Sephacryls-200，以含有 8 mol/L 尿素 Tris-HCl 缓冲液洗脱，收集洗脱液，SDS-PAGE 检测纯化蛋白。纯化后的蛋白以磷酸缓冲液透析 24 h，–80 °C 冰箱保存备用。

## 1.8 水解酶(BphD)重组蛋白的表达与纯化

课题组先前构建好的表达载体 pBV220-bphD 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中，在含有氨苄青霉素 (终浓度 50  $\mu$ g/mL) 平板上筛选，挑取单菌落，在含有氨苄青霉素 (终浓度 50  $\mu$ g/mL) LB 液体培养基中 30 °C 培养至对数生长期，38 °C 诱导培养 5 h。BphD 重组蛋白的诱导表达及纯化方法参考文献并稍作修改<sup>[16]</sup>。收集菌体，超声破碎后上清上样于 Q-Sepharose 柱，以 0–0.5 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 溶液进行线性梯度洗脱。收集到的目标蛋白溶液加入硫酸铵 (终浓度 1 mol/L)，上样于疏水层析柱，以 0.5–0 mol/L 硫酸铵梯度洗脱，收集洗脱液，SDS-PAGE 检测纯化蛋白。纯化后的蛋白置于 –80 °C 冰箱保存备用。

## 1.9 BphB 和 BphD 多克隆抗体的制备及特异性检测

**1.9.1 多克隆抗体制备:** 取适量纯化蛋白溶液与等体积弗氏完全佐剂混合, 皮下注射新西兰大白兔, 首次免疫抗原量 0.6 mg/只, 分别于首次免疫后 21、35、49 d 进行加强免疫, 抗原量减半。首次免疫后 57 d 采全血, 获得抗血清。Protein A 琼脂糖亲和层析法纯化抗血清。

**1.9.2 多克隆抗体特异性检测:** 纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后, 转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 兔抗 BphB 和兔抗 BphD 作为一抗 (1:1000), 辣根过氧化物酶 (HRP) 山羊抗兔 IgG 作为二抗 (1:8000), 进行 Western blot 检测。

### 1.10 联苯降解关键基因蛋白表达水平检测

将 R04 和 R04Δ7659 分别接种于含葡萄糖、HOPDA、联苯的基础培养基中, 30 °C 培养 24 h。收集菌体, 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 洗涤 2 次后重悬, 玻璃珠破碎菌体, 离心后上清为提取的总蛋白。用 CBB 法测定总蛋白含量浓度,

保证上样量一致。SDS-PAGE 分离后, 电转移至 PVDF 膜上, 方法 1.9 中制备的兔抗 BphB 和兔抗 BphD 作为一抗 (1:1000), HRP 标记的山羊抗兔 IgG 作为二抗 (1:10000), ECL 化学发光显色, X 线胶片曝光。

## 2 结果和分析

### 2.1 RHOGL007659 氨基酸序列分析

红球菌 R04 转录组测序发现, *RHOGL007659* 在联苯培养条件下表达量异常增高, 是葡萄糖培养条件下的 27 倍<sup>[14]</sup>, 我们推测其可能与联苯降解过程有关, 可能参与联苯降解的调控过程。将 *RHOGL007659* 核苷酸序列和蛋白序列分别提交 NCBI, 发现其功能并未注释。*RHOGL007659* 蛋白序列与其他联苯降解过程的调控蛋白序列对比分析表明 (图 1), 与其他调控蛋白相比, *RHOGL007659* 分子量较小, 只有 96 个氨基酸, 且相似性也较低, 但却包含了保守的 VS.....AL DNA 结合区域。其中与 KF707 中的 BphR1 调控蛋白相似性为 21.50%,

RHOGL007659	MLIPFAIFYLVPRVYN...LVATPYRLDQAV...VSANNYNEALDKIVA	43
BphR1_KF707	SLIEVTFQRLRADIVEGRLAAGSRLGVEDLKSRYEVSGGTMREALSLLVA	79
BphS_KKS102	TALESTYATLRDAILRGSYPQSSRLHLETLKSSSLGVSGSTLREAITRIIG	85
BphS_Tn4371	LPSSPPYATLRDCILRGSHPCGSRLHLETLKSSSLGVSGSTLREAITRLVG	85
ORF0_LB400	SLIEATFQRLRADIVEGRLAAGSRLAIEDLKSRYEVSGGTVREALSLLVA	79
RHOGL007659	HENVTLAAFDSLAKMKAATAVQATDAA.VASELNTIIGQTS...GDLQA	89
BphR1_KF707	ENLVQTCQQRGFHVTPMSLGDMDLAATRIALESEALRQSVLNGDAEWEA	129
BphS_KKS102	DRIVVAEGCKGFRVAPMSICLDDLT SARIMLESAAIVESINLGGDGWED	135
BphS_Tn4371	DRIVVAEGCKGFKVAPMSICLDDLT SARITLETTAIVESINLGGDGWED	135
ORF0_LB400	NNLVQTCQQRGFHVTPMSLGDMDLAATRIALECEALRQSVLNGDAEWEA	129
RHOGL007659	TLVAGPR	96
BphR1_KF707	RTVSSFH	136
BphS_KKS102	QIVTSFR	142
BphS_Tn4371	QIVISFR	142
ORF0_LB400	RVVSSYH	136

图 1. RHOGL007659 氨基酸序列分析

Figure 1. Analysis of the amino acid sequence of *RHOGL007659*. Multiple alignment between *RHOGL007659* (*Rhodococcus* sp. R04), BphR1 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707), BphS (*Pseudomonas* sp. KKS102), BphS (Tn4371 originally isolated from *R. eutropha* A5), ORF0 (*Pseudomonas* sp. LB400).

与 KKS102 中的 BphS 调控蛋白相似性为 17.14%，与 Tn4371 中的 BphS 调节蛋白相似性为 19.05%，与 LB400 中的调控蛋白 ORF0 相似性为 20.56%。因此 RHOGL007659 可能是一个不同的调控蛋白，推测其对联苯降解过程的调控具有一定的特异性。

## 2.2 RHOGL007659 缺陷型菌株的筛选

为了研究 RHOGL007659 的生理功能，我们通过同源重组构建 RHOGL007659 基因缺陷型重组质粒。筛选得到的阳性重组质粒经酶切鉴定表明含有目的基因，测序验证敲除载体构建成功。重组质粒电转 R04 后，从 LBP 平板上挑取单菌落进行菌落 PCR，结果如图 2 所示。由图 2 可知，11、13 和 14 泳道的菌株 RHOGL007659 基因敲除成功。以 11 泳道菌株的基因组为模板，F4 和 R4 (表 1) 为上下游引物，进行 PCR 扩增。扩增产物测序后，序列正确，表明 RHOGL007659 基因敲除成功，将 11 泳道缺陷型菌株命名为 R04 $\Delta$ 7659。

## 2.3 红球菌 R04 和缺陷型菌株在不同碳源培养下的生长

实验测定了 R04 和 R04 $\Delta$ 7659 在葡萄糖和联苯两种碳源中的生物量。如图 3 所示，R04 与 R04 $\Delta$ 7659



图 2. 缺陷型菌株菌落 PCR 的琼脂糖凝胶电泳  
Figure 2. Agarose gel electrophoresis of colony PCR of deficient mutant strains. Lane 1: negative control; lane 2: positive control; lane 3–14: suspected deficient mutant strains; M: marker.

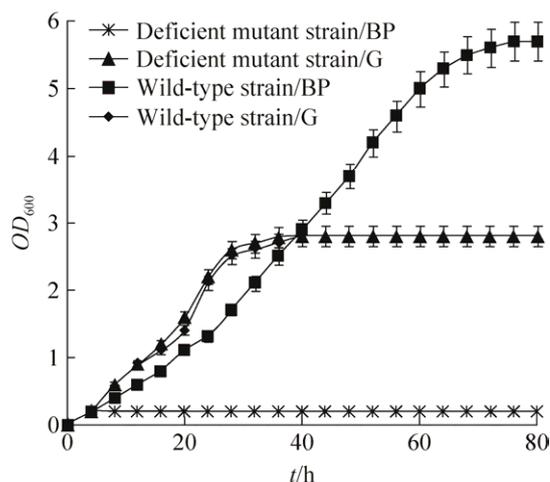


图 3. 野生型菌株和缺陷型菌株在联苯/葡萄糖培养下的生物量

Figure 3. Biomass of the wild-type strain and the deficient mutant strain in different carbon sources.

在以葡萄糖为碳源培养时，生长状况几乎相同，生物量一致。R04 在联苯培养条件下生物量明显增加，且在培养过程中观察到有黄色物质(HOPDA)生成。而 R04 $\Delta$ 7659 在联苯为碳源时，生物量几乎没有变化。这表明 RHOGL007659 的缺失影响到红球菌 R04 对联苯的降解，且菌体自身无法获得生长所需的能量，导致生物量没有增加。

我们测定了红球菌 R04 和两种缺陷型菌株 R04 $\Delta$ 7659、R04 $\Delta$ BphD 在 HOPDA 为唯一碳源的培养基中的生长变化情况。如图 4 所示，R04 $\Delta$ BphD 生物量增加较少，说明 BphD 的缺失严重影响了菌株对 HOPDA 的降解。R04 $\Delta$ 7659 生物量明显低于 R04，但却比 R04 $\Delta$ BphD 高，说明 R04 $\Delta$ 7659 可以利用 HOPDA 作为唯一碳源进行生长，这表明 RHOGL007659 缺失后，影响了 BphD 的表达，但并没有完全抑制其表达。

## 2.4 红球菌 R04 与缺陷型菌株代谢联苯

我们测定了 R04 和 R04 $\Delta$ 7659 以联苯为碳源进行培养时的联苯剩余量。结果如图 5 所示，R04

在 15 h 时, 联苯全部降解, 而 R04 $\Delta$ 7659 在 20 h 后联苯仍然剩余 88%, 几乎没有降解, 培养过程中未发现黄色物质(HOPDA)生成。说明 *RHOGL007659* 的存在对于红球菌 R04 降解联苯的过程是必需的, 在其缺失时严重影响或几乎阻断了联苯的降解。

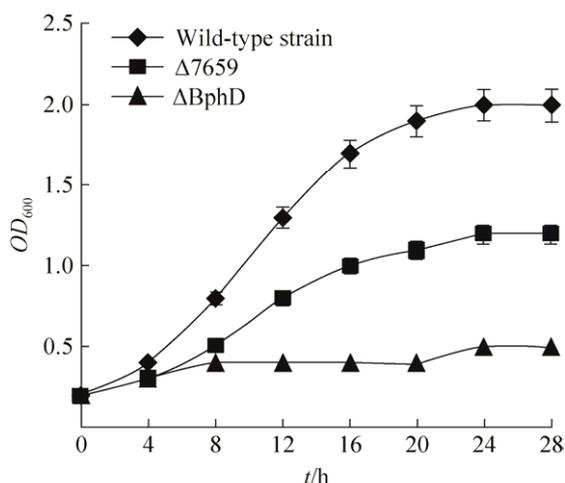


图 4. 野生型菌株和缺陷型菌株在 HOPDA 培养下的生物量

Figure 4. Biomass of the wild-type strain and the deficient mutant strain in HOPDA.

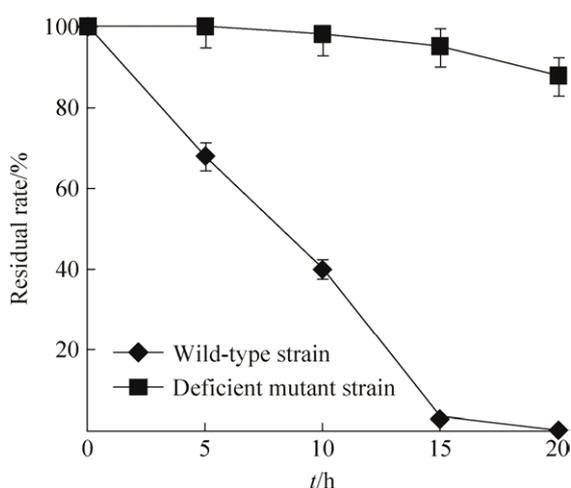


图 5. 野生型菌株与缺陷型菌株对联苯的转化

Figure 5. Transformation of biphenyl by wild-type strain and deficient mutant strain.

## 2.5 联苯降解关键基因的转录表达

以 16S rRNA 为内参, *bphA1*、*bphB*、*bphC*、*bphD* 基因表达量如图 6 所示。与葡萄糖为碳源的野生型菌株基因表达相比, 以联苯为碳源的缺陷型菌株 R04 $\Delta$ 7659 中, *bphA1* 基因下调表达 6.2 倍, *bphB* 基因下调表达 2.38 倍, *bphC* 基因下调表达 2.92 倍, *bphD* 基因下调表达 8.1 倍。说明 *RHOGL007659* 的缺失影响到红球菌 R04 联苯降解关键蛋白的表达。

## 2.6 降解联苯关键基因的 Western blot 分析

提取红球菌 R04 野生型和缺陷型菌株 R04 $\Delta$ 7659 在三种碳源(葡萄糖, HOPDA 和联苯)培养条件下的总蛋白, 通过 Western blot 分析 BphB 和 BphD 的相对表达量, 结果如图 7 所示。与葡萄糖为碳源的野生型菌株相比, 以联苯为碳源的野生型菌株 BphB 和 BphD 的表达量显著提高。R04 $\Delta$ 7659 以联苯为碳源培养时 BphB 和 BphD 的表达量均显著下降, 此结果与实时荧光定量 PCR 结果一致。说明联苯可诱导其降解关键基因的表达, 同时 *RHOGL007659* 的缺失对于降解基因的表达有

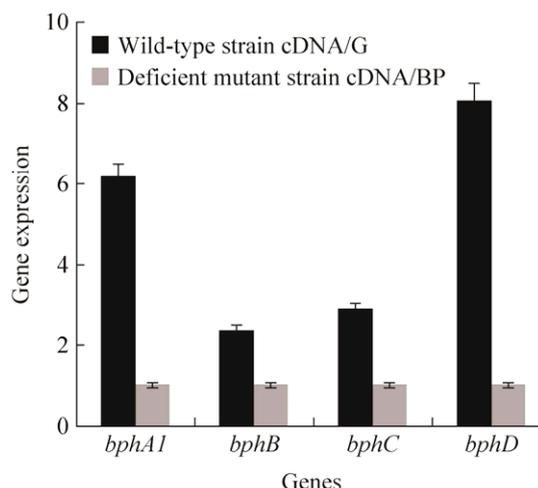


图 6. *bphA1*, *bphB*, *bphC*, *bphD* 基因相对表达量

Figure 6. The gene expression relative quantity of PCB degradation gene.

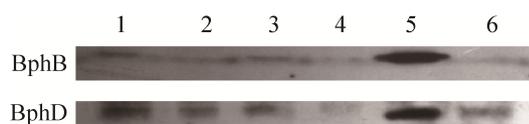


图 7. 联苯降解关键基因 **BphB** 和 **BphD** 的 Western blot 分析

Figure 7. Western blot analysis of key genes for biphenyl degradation BphB and BphD. Lane 1: wild-type strain/glucose; lane 2: deficient mutant strain /glucose; lane 3: wild-type strain/HOPDA; lane 4: deficient mutant strain/HOPDA; lane 5: wild-type strain/biphenyl; lane 6: deficient mutant strain/biphenyl.

较强的抑制作用, *RHOGL007659* 对于联苯降解关键基因的表达具有正调控作用。在以 HOPDA 为碳源培养时,野生型菌株中 BphB 和 BphD 有少量表达,而 R04 $\Delta$ 7659 中 BphB 和 BphD 的表达量也明显降低,同样说明了这一点。

### 3 讨论

Pieper DH 根据基因结构的不同将联苯降解基因簇分为 3 类:第一类是简单的 *bphABCD* 基因簇,如 KF707、LB400;第二类是 *bphA4* 位于整个基因簇后面即 *bphA1A2A3BCDA4*,如 KKS102、A5;第三类中 *bphB* 和 *bphC* 交换,即 *bphACBD*,如 RHA1<sup>[17]</sup>。本课题前期研究发现,红球菌 R04 与其他联苯降解菌中的联苯代谢基因簇结构均不相同,基因顺序为 *bphBCA1A2A3A4D*,属于第四类多氯联苯基因簇<sup>[18-19]</sup>。对其多氯联苯降解酶基因进行序列同源性分析,发现除 *bphC* 外的基因与其他红球菌多氯联苯降解酶基因序列同源性有很大的不同<sup>[19]</sup>。该菌株基因测序发现这个新型的基因簇位于一个大的转座子内部,其调控基因也与已知降解菌类不同<sup>[18-19]</sup>,表明该基因簇的表达调控具有特异性。

红球菌 R04 可以高效降解多氯联苯,同时,

多氯联苯的存在会影响菌株的生长发育,也会影响降解联苯关键蛋白和一些相关调控蛋白的转录表达<sup>[18]</sup>。课题组前期研究发现,红球菌 R04 在联苯不存在的情况下,降解联苯的关键蛋白表达量都较低,加入联苯后,其表达量升高 20 倍以上<sup>[14]</sup>。如本文所研究的 *RHOGL007659*,在联苯培养条件下,其表达量是葡萄糖培养条件下的 27 倍<sup>[14]</sup>。在联苯和其他芳香族化合物的代谢中,代谢的调控是比较常见的,如前文提到的真养产碱杆菌(*Ralstonia eutropha*) A5、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) KKS102、伯克氏菌(*Burkholderia xenovorans*) LB400、类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) KF707 等,联苯代谢都是由调控因子/调控蛋白进行正调控或者负调控的。此外,*Rhodococcus* sp. M5 中联苯降解操纵子 *bpdC1C2BADEF* 是受由 BpdS 组氨酸激酶和 BpdT 反应调节蛋白组成的双组分信号转导系统调控的<sup>[20]</sup>。本文研究的 *RHOGL007659* 位于红球菌 R04 基因组降解联苯关键基因簇上,结果显示其缺陷型菌株丧失转化联苯的能力,且联苯降解关键基因均有不同程度的下调表达,*RHOGL007659* 与 LB400 中的 ORF10103 调节蛋白功能一致,均为正调节作用。红球菌除能降解联苯/多氯联苯外,还能高效降解苯酚、萘等多种芳香族化合物,其降解基因的表达也是由调控蛋白进行调节的。*Rhodococcus* sp. DK17 中的转录调控因子 OphR 能够调控邻苯二甲酸代谢操纵子 *ophA1A2BA3A4C* 的转录表达,属于 IclR 家族<sup>[21]</sup>。*Rhodococcus* sp. TFB 降解萘通过龙胆酸途径,龙胆酸代谢操纵子 *nagIKL* 上游的 *orf4* 也编码一种 IclR 调节蛋白,调节 *nag* 基因的转录<sup>[22]</sup>。最近研究发现 *Novosphingobium* sp. HR1a 通过调节蛋白 PahR 来控制高分子量多环芳烃的降解<sup>[23]</sup>。

课题组先前对红球菌的基因组测序中发现 R04 中含有 3 个可以编码 HOPDA 水解酶的基因 *bphD1*、*bphD2* 和 *bphD3*，其中 *bphD1* 位于联苯降解基因簇上(本研究中用到的 BphD 即此 *bphD1* 的表达产物)，另外 2 个游离于该基因簇外<sup>[18]</sup>。在联苯、葡萄糖、乙醇 3 种不同碳源培养下检测 3 个 *bphD* 基因的转录表达，结果显示 *bphD1* 在联苯中上调表达约 28 倍，*bphD2* 上调表达约 2 倍，*bphD3* 略有下调表达<sup>[14]</sup>。除 *bphD1* 在不同碳源条件下基因的表达量差异较大之外，*bphD2* 和 *bphD3* 各自在 3 种碳源条件下表达量相差较小，说明联苯或其中间代谢产物主要诱导位于同一基因簇上的基因，而对游离于基因簇之外的其他基因几乎无诱导作用<sup>[14]</sup>。这些同工酶的存在说明联苯的降解通路有组成型和底物或中间产物诱导型两种表达模式<sup>[24]</sup>。红球菌 R04 野生型、R04Δ7659 和 R04ΔBphD 在 HOPDA 中的生物量实验(图 4)中，我们发现 BphD 敲除后，菌株仍然能利用少量 HOPAD 进行生长，说明水解酶 BphD2 或 BphD3 参与了 HOPDA 的降解。同样，*RHOGL007659* 敲除后，BphD 表达下调，但仍有一定的表达，另外还有 BphD2 或 BphD3 的本底表达也参与了 HOPDA 的降解过程。

图 8 为 *RHOGL007659* 在红球菌 R04 联苯代谢关键基因 *bph* 基因簇中的位置<sup>[18]</sup>。联苯/多氯联苯进入红球菌 R04 中，经联苯双加氧酶(BphA1A2A3A4)催化生成 2,3-二氢二羟基联苯，再被脱氢酶(BphB)转化生成 2,3-二羟基联苯(DHBP)，后经 2,3-二羟基联苯双加氧酶(BphC)断裂间位形成黄色开环化合物 2-羟基-6-氧基-6-苯基-2,4-己二烯酸(HOPDA)，最后被水解酶(BphD)水解为苯甲酸，进入苯甲酸代谢途径<sup>[19]</sup>。红球菌 R04 *bph* 基因簇中 *bphBCA1A2A3A4D* 基因作为一个转录单位共同进行转录，因此在研究联苯降解关键基因的表达时，我们选取了位于



图 8. *RHOGL007659* 在基因组中的位置

Figure 8. The positions of the *RHOGL007659* gene in the genome.

*bph* 基因簇上游和下游的 *bphB* 和 *bphD* (图 8)，通过分析其在 R04 和 R04Δ7659 中的蛋白表达，同时结合转录表达的结果分析 *RHOGL007659* 对于 *bph* 基因簇的调控作用。结果如图 7 显示，在联苯培养条件下，R04Δ7659 中 BphB 和 BphD 的表达量与野生型相比明显下降。联苯降解关键基因的转录表达分析(图 6)中，R04Δ7659 中 *bphA1*、*bphB*、*bphC*、*bphD* 在联苯培养下转录量均下降。我们可以确定 *RHOGL007659* 是红球菌 R04 基因组联苯降解关键基因簇上的一个调控蛋白，该蛋白对红球菌 R04 代谢联苯过程具有正调控作用。

## 参 考 文 献

- [1] Sampley ML, Özcan S. Regulation of insulin gene transcription by multiple histone acetyltransferases. *DNA and Cell Biology*, 2012, 31(1): 8–14.
- [2] Santillán M. Bistable behavior in a model of the *lac* operon in *Escherichia coli* with variable growth rate. *Biophysical Journal*, 2008, 94(6): 2065–2081.
- [3] Pi WQ, Qu YY, Zhang Q, Zhou JT. Advance on regulation and metabolic pathway in bacterial degradation of xenobiotics. *Environmental Science & Technology*, 2010, 33(4): 72–76, 90. (in Chinese)  
皮文清, 曲媛媛, 张强, 周集体. 异生型化合物生物降解及调控机理研究进展. *环境科学与技术*, 2010, 33(4): 72–76, 90.
- [4] Dai QZ, Min X, Weng ML. A review of polychlorinated biphenyls (PCBS) pollution in indoor air environment. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 2016, 66(10): 941–950.
- [5] Perkins JT, Petriello MC, Newsome BJ, Hennig B. Polychlorinated biphenyls and links to cardiovascular disease. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(3):

- 2160–2172.
- [6] Xu DM, Su CY, Song XF, Shi Q, Fu JL, Hu LH, Xia XM, Song EQ, Song Y. Polychlorinated biphenyl quinone induces endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, and calcium release. *Chemical Research in Toxicology*, 2015, 28(6): 1326–1337.
- [7] Mouz S, Merlin C, Springael D, Toussaint A. A GntR-like negative regulator of the biphenyl degradation genes of the transposon Tn 4371. *Molecular and General Genetics*, 1999, 262(4/5): 790–799.
- [8] Ohtsubo Y, Delawary M, Kimbara K, Takagi M, Ohta A, Nagata Y. BphS, a key transcriptional regulator of *bph* genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(39): 36146–36154.
- [9] Deneff VJ, Park J, Tsoi TV, Rouillard JM, Zhang H, Wibbenmeyer JA, Verstraete W, Gulari E, Hashsham SA, Tiedje JM. Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4961–4970.
- [10] Watanabe T, Inoue R, Kimura N, Furukawa K. Versatile transcription of biphenyl catabolic *bph* operon in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(40): 31016–31023.
- [11] Watanabe T, Fujihara H, Furukawa K. Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl-catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(12): 3575–3582.
- [12] Fujihara H, Yoshida H, Matsunaga T, Goto M, Furukawa K. Cross-regulation of biphenyl- and salicylate-catabolic genes by two regulatory systems in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(13): 4690–4697.
- [13] Yang XQ, Sun Y, Qian SJ. Biodegradation of seven polychlorinated biphenyls by a newly isolated aerobic bacterium (*Rhodococcus* sp. R04). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2004, 31(9): 415–420.
- [14] Yang XQ, Xi JW. Transcriptomic and benzoate metabolic pathways of *Rhodococcus* sp. R04 cultured in biphenyl. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(7): 851–862. (in Chinese)  
杨秀清, 席婧雯. 联苯培养条件下红球菌 R04 转录表达和苯甲酸代谢途径解析. *微生物学报*, 2015, 55(7): 851–862.
- [15] Teotia D, Saini SS, Gaid M, Beuerle T, Beerhues L, Sircar D. Development and validation of a new HPLC method for the determination of biphenyl and dibenzofuran phytoalexins in rosaceae. *Journal of Chromatographic Science*, 2016, 54(6): 918–922.
- [16] Yang XQ, Li PL, Zheng Y, Shen C. Purification and characterization of a pH-stable and thermostable biphenyl hydrolase from *Rhodococcus* sp. R04. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(12): 1633–1641. (in Chinese)  
杨秀清, 李鹏丽, 郑媛, 沈翀. 一种 pH 和热稳定的联苯水解酶的纯化及其特征. *微生物学报*, 2010, 50(12): 1633–1641.
- [17] Pieper DH. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(2): 170–191.
- [18] Yang XQ, Xue R, Shen C, Li SR, Gao C, Wang Q, Zhao XX. Genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain R04, a polychlorinated-biphenyl biodegrader. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(18): 5032–5033.
- [19] Yang X, Liu X, Song L, Xie F, Zhang G, Qian S. Characterization and functional analysis of a novel gene cluster involved in biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain R04. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(6): 2214–2224.
- [20] Ono Y, Makino N, Hoshino Y, Shoji K, Yamanaka T. An iron dioxygenase from *Alcaligenes faecalis* catalyzing the oxidation of pyruvic oxime to nitrite. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 139(2/3): 103–108.
- [21] Choi KY, Kang BS, Nam MH, Sul WJ, Kim E. Functional identification of OphR, an IclR family transcriptional regulator involved in the regulation of the phthalate catabolic operon in *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Indian Journal of Microbiology*, 2015, 55(3): 313–318.
- [22] Tomás-Gallardo L, Gómez-Álvarez H, Santero E, Floriano B. Combination of degradation pathways for naphthalene utilization in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7(2): 100–113.
- [23] Segura A, Hernández-Sánchez V, Marqués S, Molina L. Insights in the regulation of the degradation of PAHs in *Novosphingobium* sp. HR1a and utilization of this regulatory system as a tool for the detection of PAHs. *Science of the Total Environment*, 2017, 590–591: 381–393.
- [24] Abbasian F, Lockington R, Megharaj M, Naidu R. A review on the genetics of aliphatic and aromatic hydrocarbon degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(2): 224–250.

# Physiological function of regulatory protein RHOGL007659 involved in metabolism biphenyl/polychlorinated biphenyl in *Rhodococcus* sp. R04

Xiuqing Yang<sup>\*</sup>, Lin Yang

Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China

**Abstract:** [Objective] The physiological function of regulatory protein RHOGL007659 in *Rhodococcus* sp. R04 and the metabolic properties of the mutant strain were investigated to explore its regulation mechanism of biphenyl degradation. [Methods] The *RHOGL007659* gene was knocked out by homologous recombination, and the growth of the wild-type strain and deficient mutant strain in different carbon sources were compared. The transformation of biphenyl by the wild-type strain and the deficient mutant strain was detected by HPLC. Total RNAs were extracted from the wild-type strain and deficient mutant strain, and quantitative RT-PCR was carried out to analyze the transcriptional variation of *bphA*, *bphB*, *bphC* and *bphD* between the wild-type strain and the deficient mutant strain. BphB and BphD were expressed in *Escherichia coli* BL 21(DE3) and polyclonal antibodies were prepared after purification. BphB and BphD expression levels in the wild strain and deficient mutant strains were detected by Western blot. [Results] The deficient mutant strain R04 $\Delta$ 7659 of *RHOGL007659* gene was obtained. The biomass of the deficient mutant strain significantly reduced in biphenyl culture, and almost did not grow. HPLC analysis showed that the deletion of *RHOGL007659* gene resulted in inability to transform biphenyl by *Rhodococcus* sp. R04. Q-RT PCR experiment disclosed that the key genes of biphenyl degradation were down regulated in different degrees under biphenyl culture condition in the *RHOGL007659* deficient mutant strain, the same results were obtained by Western blot. [Conclusion] RHOGL007659 is a regulatory protein of the upper biphenyl degradation gene in *Rhodococcus* sp. R04, and functions as a positive regulatory factor of the metabolism of biphenyl by *Rhodococcus* sp. R04.

**Keywords:** *Rhodococcus* sp. R04, biphenyl/polychlorinated biphenyls, transcription regulation, regulatory protein

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (3080030)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel/Fax: +86-351-7010215; E-mail: xiuqyang@sxu.edu.cn

Received: 23 November 2017; Revised: 18 January 2018; Published online: 31 January 2018