

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55(7):851–862; 4 July 2015  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140522

## 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

杨秀清, 席婧雯

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】研究不同碳源,特别是联苯条件下红球菌的细胞转录应答,以挖掘与多氯联苯(PCBs)转运、代谢及其调控相关的基因,为进一步全面理解 PCB 微生物降解的分子机制奠定基础。【方法】以一株多氯联苯降解菌红球菌(*Rhodococcus* sp. R04)为材料,分别提取不同碳源(乙醇、葡萄糖和联苯)培养条件下菌体的总 RNA,反转录合成 cDNA。采用高通量测序法分别对这三种样品进行转录组测序,分析测序数据得出全基因组表达模式,并对不同条件下的基因表达进行差示分析,进而对联苯代谢网络和红球菌中其他基因的转录调节和代谢应答反应做出相关性分析。Q-RT-PCR 分析不同碳源培养条件下的基因表达情况。【结果】测序结果表明,与葡萄糖和乙醇相比,联苯培养条件下明显上调( $\log_2$  Ratio  $\geq 1$ )基因个数分别为 375 和 332 个。与葡萄糖相比,联苯培养条件下,相关基因上调表达量与 Q-RT-PCR 实验结果基本一致。功能分类获得细胞组分、分子功能和生物学过程三大类别 160 多个细小分支的差示表达基因,部分基因参与联苯代谢转录调控、联苯转运、抗氧化应激反应以及信号传导通路系统等多种生理过程。参与联苯上游代谢途径的众多同工酶基因中,只有 *bphC2* 和 *bphD1* 在联苯中大量上调表达,其余同工酶在联苯中基本量不变或下调表达。转录组注释及差示分析推测,红球菌 R04 中苯甲酸的代谢主要是通过儿茶酚邻位途径、间位途径以及原儿茶酸途径三条代谢途径完成。【结论】与葡萄糖和乙醇相比,红球菌 R04 在联苯培养条件下基因表达差异明显,这为我们进一步解析多氯联苯代谢特征和代谢调控提供理论依据。

**关键词:**联苯代谢,苯甲酸代谢,转录应答,相关性分析

**中图分类号:**Q935      **文章编号:**0001-6209(2015)07-0851-12

多氯联苯(PCBs)的生物降解一直是关注的热点,绝大多数好氧微生物以共代谢过程通过联苯降解通路代谢 PCBs<sup>[1]</sup>。联苯/PCB 生物降解的代谢动力学和代谢机理已被人们熟知,但联苯/PCB 胁迫下,微生物相关细胞生理调节反应和联苯通路可能存在的辅助机制信息却很少。常规研究方法不能全

面地对整个代谢网络应答作出分析,而转录组研究能够突破常规方法的局限性,从整体水平研究基因功能和基因结构,从而推及整个代谢网络,不仅能够揭示特定生物学过程的分子机理,还能直观监测整个细胞代谢特征。

红球菌 R04 能够利用联苯为唯一碳源生长并

**基金项目:**国家自然科学基金(3080030);山西省自然科学基金(2014011030-3)

**作者简介:**杨秀清(1975-),男,山西代县人,副教授,主要从事微生物生物转化与生物催化方面的研究工作。Tel/Fax: +86-351-7010215;E-mail: xiuqyang@sxu.edu.cn

**收稿日期:**2014-11-03; **修回日期:**2014-11-28

能通过共代谢降解 PCBs<sup>[2]</sup>, 在联苯上游代谢途径中, 该菌通过联苯双加氧酶、二氢二羟基联苯双加氧酶、羟基联苯双加氧酶和联苯水解酶将联苯/PCB 代谢为苯甲酸或是氯代苯甲酸。由于氯代苯甲酸同样为环境污染物, 因此红球菌 R04 对氯代苯甲酸代谢途径的研究也关系到多氯联苯能否被彻底降解。本课题以前的研究发现, 该菌与其它联苯降解菌中的联苯代谢基因簇结构均不相同, 属于第四类多氯联苯代谢基因簇<sup>[3]</sup>。且对该菌株基因组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>[3-4]</sup>。此外, 测序表明在红球菌 R04 中存在多种代谢同工酶, 其中参与联苯代谢的 2,3-二羟基联苯 1,2-双加氧酶含 8 个同工酶, HOPDA 水解酶含 3 个同工酶<sup>[4]</sup>, 这些同工酶对多氯联苯代谢调控的作用未知。令人感兴趣的是, 我们在红球菌 R04 中发现了气囊蛋白基因簇, 然而, 气囊蛋白基因在放线菌中的功能至今也没有被认识<sup>[5]</sup>。

为了探究这种新型联苯降解菌的转录调控机制和代谢状况, 如在联苯压力下的各种同工酶的作用、抗氧化应激反应应答、细胞分裂状况、胞内信号传导及气囊蛋白的合成调节等应激过程, 本实验对 R04 菌株在以葡萄糖、乙醇和联苯为单一碳源条件下转录组进行测序, 并对表达差异基因进行分析。我们锁定了红球菌 R04 中 24 个参与联苯和苯甲酸代谢途径的基因, 根据这些基因在 3 种碳源条件下的差异表达数据, 我们能够直观了解联苯通路上下游基因及同工酶基因的表达状况, 并对 R04 中苯甲酸的多条代谢途径进行推测, 同时为联苯胁迫下菌体的一些形态及生理生化反应提供基因表达和转录调节证据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养及收集

**1.1.1 菌株来源:** 实验所用红球菌 R04 由本实验室保存。

**1.1.2 培养基:** LB 培养基: 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母膏, 5 g NaCl, 加水定容至 1 L。基础矿物培养基: 2.93 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.87 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.1 g NaCl, 5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.006 g NiSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.03 g CaCl<sub>2</sub>, 微量元素盐溶液 200 μL, 加水定容至 1 L。微量元素

盐溶液: 0.18 g Na<sub>3</sub>-Citrate · 2H<sub>2</sub>O, 0.034 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.005 g CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.005 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.004 g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.002 g MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.003 g ZnCl<sub>2</sub>, 0.002 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 加水定容至 1 L。

**1.1.3 静息细胞的制备及菌体收集:** 接种红球菌 R04 至 50 mL 的 LB 培养基中, 30℃、200 r/min 振荡培养, 待菌体浓度达到 OD<sub>600</sub> 值为 1.0 时, 6000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 30 mL 磷酸缓冲液 (20 mmol/L, pH 8.0) 洗涤 2 次, 以 5 mL 上述缓冲液重新悬浮菌体, 菌悬液室温放置 2-3 h。分别将 1 mL 上述菌悬液加入到含有 0.1% 联苯和含有 0.2% 葡萄糖的 50 mL 基础盐培养基中, 30℃、200 r/min 振荡培养, 至培养基中菌体浓度达到 OD<sub>600</sub> 值为 1.0 时, 8000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 备用。

### 1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

将收集到的菌体在液氮中研磨 5-10 min, 加入 1 mL Trizol (购自日本 TaKaRa 公司), 室温静置 10 min; 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈振荡 30 s 至样品乳化, 室温静置 3 min; 4℃、12000 r/min 离心 15 min, 将上层无色水相转移到新管中, 加入等体积异丙醇上下颠倒混匀沉淀水相中的 RNA, 室温放置 15 min; 4℃、12000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀, 4℃、12000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 室温放置干燥 RNA 沉淀, 加入 30 μL RNase-free water 溶解 RNA, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 (购自美国 Thermo 公司) 检测总 RNA 完整性和纯度质量。

将上述 RNA 溶液加入无 RNase 的 DNase I 去除基因组 DNA, 用外反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa 公司) 合成 cDNA。取上述 cDNA 溶液 2 μL 用 Nanodrop 2000 测定样品的浓度及纯度 (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的比值)。反转录出的 cDNA 用 RNase-free water 稀释至所需浓度, -20℃ 冻存备用。

### 1.3 转录组测序分析

**1.3.1 转录组测序:** 分别以葡萄糖、乙醇和联苯为唯一碳源条件下培养红球菌 R04, 生长至对数前期时提取各样品总 RNA, 以 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物 (random hexamers) 合成第一条 cDNA 链, 加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第二条 cDNA 链, 然后用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择, 最后进行 PCR 扩增, 建好的测序文

库用 IlluminaHiSeq™ 2000 进行测序。

**1.3.2 转录组测序数据分析:** 测序得到的原始图像数据经 base calling 转化为原始序列数据 raw data, 对原始数据质量评估和可信度分析, 去除测序过程中低质量的序列以及杂质数据后得到 Clean reads, 运用短 reads 比对软件 SOAPaligner/soap2 将 clean reads 分别比对到参考基因组和参考基因序列后统计出比对结果。在对基因表达注释后得出基因覆盖度、基因表达量和基因功能注释信息, 进而基因的差异表达分析<sup>[6]</sup>, 差异表达分析主要包括差异基因表达模式聚类分析, Gene Ontology (GO) 功能分析和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway 分析。

基因表达量的计算使用 RPKM 法 (Reads Per Kb per Million reads)<sup>[7]</sup>, 按公式(1)计算。

$$RPKM = \frac{10^6 C}{NL/10^3} \quad \text{公式(1)}$$

设 RPKM(A) 为基因 A 的表达量, 则 C 为唯一比对到基因 A 的 reads 数, N 为唯一比对到参考基因的总 reads 数, L 为基因 A 编码区的碱基数。RPKM 法能消除基因长度和测序量差异对计算基因表达的影响, 计算得到的基因表达量可直接用于比较不同样品间的基因表达差异。本实验中转录组测序部分和测序结果分析部分由深圳华大基因科技服务有限公司完成。

#### 1.4 Q-RT-PCR 分析

**1.4.1 引物的合成:** 基于 R04 基因组序列设计实时荧光定量分析的引物<sup>[4]</sup>, 运用引物设计软件 Primer 5.0 设计目标基因和内参 16S rRNA 的引物序列。(引物序列及扩增产物长度列见表 1), 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 用 ddH<sub>2</sub>O 稀释至终浓度 20 μmol, -20℃ 冻存备用。

**1.4.2 实时荧光 PCR 分析:** 本实验所用实时荧光 PCR 仪为 ABI 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA), 本实验所用 QuantiFast SYBR Green PCR Kit 购自德国 QIAGEN 公司。实时荧光 PCR 扩增反应体系依照试剂说明书进行, 每个样品设制 3 组平行试验。利用两步法 PCR 进行扩增, 程序为: 95℃ 5 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 设制 40 个循环。

**1.4.3 数据分析:** 对各组样本的溶解曲线进行监测, 获得到达阈值时的循环数 C<sub>t</sub> 值 (每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数),

并运用 C<sub>t</sub> 值定量比较, 即 ΔΔC<sub>t</sub> 法分析两种样品的表达差异。以上数据均通过软件 StepOne Software v2.2 (Applied Biosystems) 分析得出。

## 2 结果

### 2.1 Rhodococcus sp. R04 转录组测序研究概述

**2.1.1 基因的差异表达:** 通过转录组测序分析获得了 3 种碳源条件下的基因差异表达, 图 1 显示了 3 种不同碳源环境下基因两两比对的差异表达数量 (log<sub>2</sub> Ratio ≥ 1)。根据 GO 功能分类注释分析可将转录组测序的得到的 Unigene 分为细胞组分 (cellular component)、分子功能 (molecular function) 和生物学过程 (biological process) 三大类别, 每一大类又可分为若干分支, 我们将 GO 功能分类与基因表达差异相结合, 得出每个类别甚至是每个细小分支的差异表达状况, 有助于我们对基因的整体表达模式进行宏观分析<sup>[8]</sup>。以联苯和葡萄糖为例, 我们根据 GO 给出的分类信息并结合本实验研究需要将部分类别下的所有差异表达基因进行了整理 (图 2), 在对上述转录组归类整理后我们能够获得某一生物过程或某一结构成分所有相关基因的整体表达水平。

(1) 抗氧化酶类的差异表达: 在研究中发现, 两种含锰的过氧化氢酶在联苯压力下高效上调表达, 上调倍数分别高达 193 倍、76 倍, 这两种过氧化氢酶是参与应对机体氧化应激反应的重要抗氧化酶类<sup>[9]</sup>。氧化应激是机体在遭受有害刺激时体内活性氧自由基 (ROS) 和活性氮自由基 (RNS) 过多累积, 导致抗氧化系统受损从而对细胞产生多种毒性作用的病理状态。过氧化氢酶能不断清除体内生成的过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 和过氧化物, 阻止它们进一步产生氧化性质更强的羟自由基。而另一种重要抗氧化化合物超氧化物歧化酶 (SOD) 能够通过歧化反应催化超氧化物转化为氧气和过氧化氢, 是生物体内清除自由基的首要物质<sup>[9]</sup>。测序结果表明其在联苯中上调表达 9.4 倍, 而在实时荧光 PCR 实验结果显示其上调倍数高达 32.9 倍。以上结果说明在联苯毒性作用下红球菌体内产生了过多的 ROS 和 RNS, 致使氧化系统和抗氧化系统失衡, 诱导抗氧化酶类高效表达, 从而增强机体的抗氧化防御功能。

表 1. RT-PCR 所需引物  
Table 1. Primers in RT-PCR

ORF	Primer Sequence (5'→3')	Amplicon length/bp	Direction
16S rRNA	CACACTGGACTGAGACACC	205	forward
	TCTCCACTACCGTCACTTG		reverse
5227	ACATCGACGATGGCTTCC	207	forward
	TCAGGACGACGGTGACAT		reverse
5808	CTCCACTGGCAGAGATCATG	218	forward
	CCGTCCGTTGAGGATGTAAT		reverse
9073	GGTGAAGAAGTTGCAGGAT	223	forward
	TTGTGGAACAGTTCGGAAT		reverse
5811	GAAGTGTGCGGTGAAGTC	196	forward
	CGAACCAGGCTGTCTGAT		reverse
7658	ATGCTCCGAATGTTGTG	211	forward
	CGTTCCGAGATGAACT		reverse
5806	CGACTGCTACGAGATCAC	187	forward
	AACGGACCTGTGTAGC		reverse
9025	CCAGACCATCGAGCATTC	221	forward
	AGGCGTAATTGGACAGGAC		reverse
9076	ATGTTTCGTACACAGACC	203	forward
	TCAGGGAGTCTCGGGTCCG		reverse
7204	CGGTGAAGTCTGTGTGAT	190	forward
	CGTGGGTAGTGGATCTT		reverse
7671	GCCGATTACAACCAGAT	187	forward
	ACCGAACATCATTGACCAT		reverse
7661	CGCTCGTCTGTCTCCAC	183	forward
	CGCTCGTCTGTCTCCAC		reverse
7668	ATGGCTTCGGATTCAAG	205	forward
	CATACACAGGTCGTAG		reverse
0737	CGAGGACTGGCAGCACAT	191	forward
	ATGGCGGTGTCGGTGAAC		reverse
7333	CCGATCCCGAATCCGTGG	207	forward
	GGTGAGCCCGAAATGG		reverse
7334	ATCGGTGGACGAGGAAC	190	forward
	ATGGGAACGGGGACG		reverse
7335	AGGACCTGACTGGCTGG	210	forward
	CGAACGCCCTTGACCCCC		reverse
7336	GCAGCCCTACGGGGTGGAG	216	forward
	GCCTTGCTCGTCAACCAC		reverse
7337	CCCTCACACATCTGAAG	175	forward
	GAGCAGATCACCGTCCAG		reverse
7338	CGGAAGGGGTGGGCAATC	186	forward
	GACGGCACCGAATCTCAG		reverse
7339	GCTGCTGACCTCCCTGC	178	forward
	GCCTCGTCTTCTCCTCGG		reverse
7340	TACAGCCACTACGCCACC	204	forward
	ACGCCTGGAGGGAGACGG		reverse
8438	GTCGGACTCGCCACGTCAATC	211	forward
	CGCCGCCGTGGAGGTGCTCGAC		reverse
7432	ATGCCGATCTACCGCTTC	174	Forward
	GCTGTGTCCTGATGAT		Reverse
7669	CGGGTTCTTTCCGGTTGC	207	Forward
	TGGGAGGTCCACATCT		Reverse
7666	CGTGGTAGGGCACTTGAAG	199	Forward
	CCAATACCTGGCTGTTTCTC		Reverse
7440	AGTTCGGGACCCCTCTG	216	Forward
	AGTCTCTCTGTGCGGTGG		Reverse
7441	GACCTGCTCATCAAGATC	207	Forward
	GGACCTTCTCGTTGTACTC		Reverse
7443	GAACGAGACCACGCAGAT	188	Forward
	TGCAGCCCGAACAGAT		Reverse
7393	GCCCTCATCAGTCAACG	214	Forward
	GAACGGCAGGACCATCT		Reverse
3770	AGTCCAGCAACGAGACCAAG	221	Forward
	GTTCCGATACAGGCACAGG		Reverse

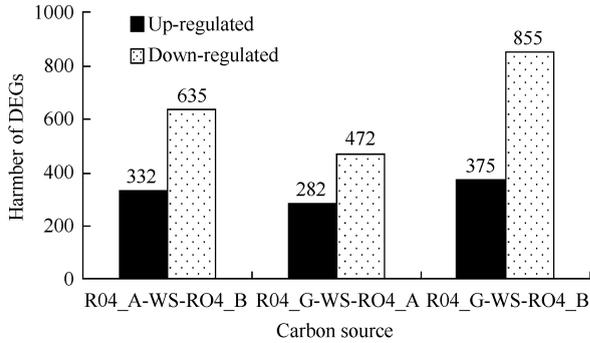


图 1. 基因在三种不同碳源下差异表达数量

Figure 1. The number of genes differential expression in different carbon source.

(2) 细胞分裂相关蛋白的差异表达: 在培养过程中观察到与葡萄糖和乙醇相比红球菌 R04 在联苯中生长明显滞后, 其对数期延长且细胞生长至稳定期时的细胞生物量较少 (数据未发表), 而 Parnell 等在研究联苯对伯克氏菌 LB400 细胞形态的影响时也发现, 联苯可以减小菌体的生物表面积, 且在透射电镜扫描下发现了细胞膜内外膜分离现象<sup>[1]</sup>。基于以上生理现象本课题分析了细胞分裂相关蛋白

的转录量, 发现除了 FtsH 微弱上调 (约 1.3 倍) 之外, 其余 FtsA、FtsB、FtsI、FtsQ、FtsW 等蛋白全部下调表达, 除此之外还有部分分裂活动有关的基因同样表达下调, 其中包括一个已知的细胞分裂启动蛋白和两个与细胞分裂中运输相关的 ATP 结合酶等。这表明红球菌的生长分裂活动受到了联苯或者其代谢中间产物的抑制, 导致生物量的缓慢积累。

(3) 双组分调节系统的差异表达: 细菌利用双组分调节系统对环境的变化, 它们将外界刺激信号传入菌体内, 通过磷酸化的方式启动反应调节蛋白, 作用于相关基因的转录及表达, 也可对目的基因的表达产物进行修饰<sup>[10]</sup>。为能进一步了解红球菌在联苯刺激下的信号传导特性及转录调控应答模式。我们初步探究了红球菌在联苯刺激下的双组分系统的转录应答状况。通过转录组分析我们在红球菌 R04 中共发现了 32 个组氨酸蛋白激酶, 其中有 29 个为双组分调节系统成员, 在 11 个上调的组氨酸蛋白激酶中有 8 个为 NarL 家族成员, 其余 2 个为 OmpR 家族成员, 1 个 LytF 家族成员, 而在下调的 18

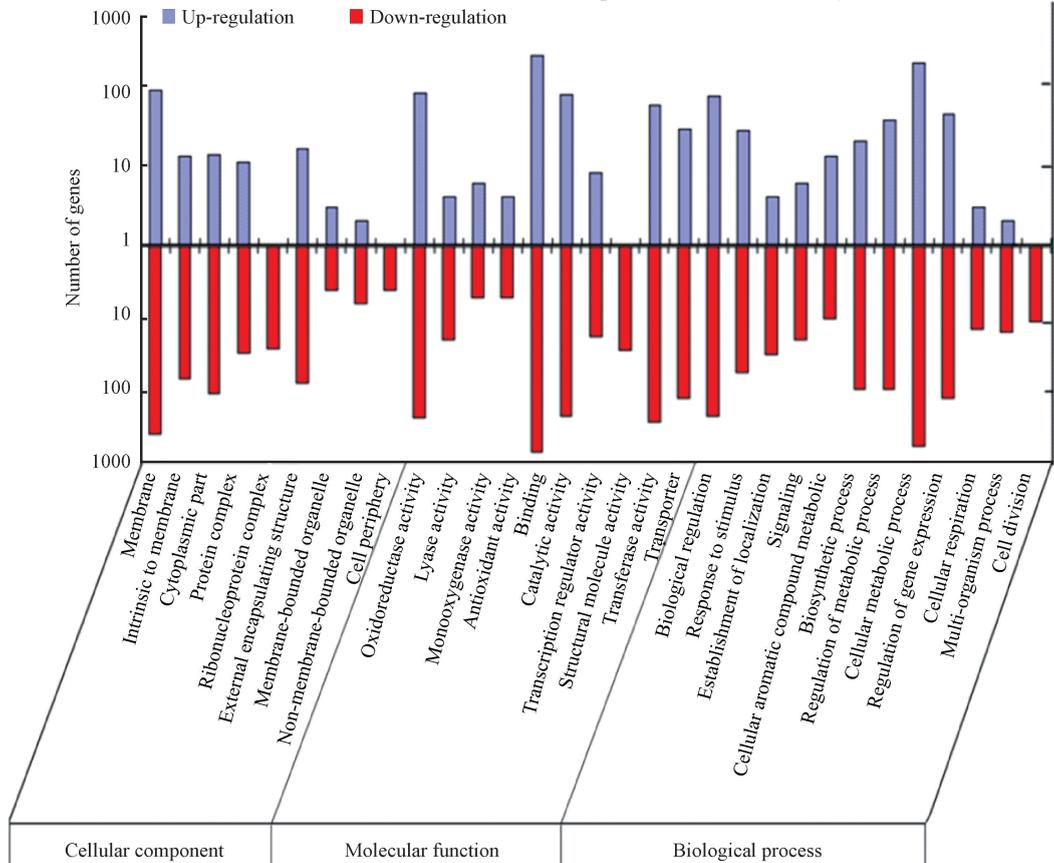


图 2. 基因在联苯和葡萄糖培养条件下的差异表达

Figure 2. Differential expression of *Rhodococcus* sp. R04 under the condition of glucose and biphenyl as carbon source.

个组氨酸蛋白激酶中 OmpR 家族成员共 11 个,其余 NarL 家族成员 5 个, LuxR 和 CitB 家族成员各 1 个;除此之外我们一共监测到 39 个双组分调节系统中的反应调节蛋白,与感应蛋白转录模式较为一致,在 9 个上调基因中主要为 NarL 家族成员(7 个),而在 30 个下调基因当中也多为 OmpR 家族成员(10 个)和 NarL 家族成员(14 个)。

(4)核糖体结合蛋白的差异表达:核糖体是细胞中含量最多,也最为复杂的 RNA-蛋白复合体之一,它除了负责细胞内蛋白质的合成以外,还与细胞的生长、分化、细胞寿命、胚胎发育、癌症发生有关<sup>[11-12]</sup>。核糖体蛋白质除了参与蛋白质的合成也同样具有广泛的核糖体外功能,如独立于核糖体外发挥调控基因转录、mRNA 翻译、细胞的增殖、分化和凋亡等<sup>[13-14]</sup>。在本研究中我们发现,与葡萄糖和乙醇相比在联苯中培养的红球菌核糖核蛋白复合物全部下调表达,已确定的 25 个核糖核蛋白复合物中核糖体大亚基蛋白 L33 下调表达数千倍, L31 和 L28 下调表达倍数也分别高达 832 和 549,核糖体小亚基蛋白 S14 下调 26 倍,小亚基蛋白 S18 和 S20 也下调表达数十倍。Denef 等在对伯克氏菌 LB400 在联苯压力下全基因组代谢网络的研究中也发现核糖核蛋白基因表达下调的现象<sup>[1]</sup>。

(5)气囊蛋白的差异表达:气囊蛋白是发现于蓝藻和嗜盐古菌中的一类可组装成胞内气囊的蛋白,其功能主要是为水生微生物提供浮力以保证其获得生存所需的氧气和光照以帮助微生物度过不良环境<sup>[15-16]</sup>。本实验室在对红球菌 R04 的基因组测序中发现了含有 8 个气囊蛋白的基因簇,令人感兴趣的是在联苯压力下气囊蛋白基因全部上调表达,与葡萄糖相比 *gvpA*、*gvpF*、*gvpG*、*gvpJ*、*gvpK*、*gvpL*、*gvpO*、*gvpS* 在联苯中分别上调 9 倍、9.8 倍、15.2 倍、11.4 倍、2.1 倍、3.1 倍、13.5 倍和 3.9 倍。同样在实时荧光试验结果中气囊蛋白均上调表达且检测出的表达水平比测序结果略高。(以上基因的上调表达倍数分别是 13.4、15.4、22.5、7、8.7、3.8、17、4 和 13.1)。基于气囊蛋白一般存在于浮游菌或是极端环境古生菌等特性以及存在于红球菌中的转座子特征,我们推测红球菌中的气囊蛋白基因簇是菌株在长期进化过程中由于基因水平转移作用获得的<sup>[17]</sup>。然而红球菌作为一种土壤微生物并不需要生成气囊以提供浮力,且其在抗逆(联苯)环境中高调表达说

明气囊蛋白还存在其他的生理功能。

**2.1.2 Q-RT-PCR 实验结果:**针对转录组测序结果,我们选取了部分基因进行实时荧光定量 PCR 实验,这部分基因包括联苯通路上下游基因、苯甲酸代谢相关基因、气囊蛋白合成基因、与氧化应激反应相关的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶基因、与细胞分裂有关的 FtsZ 蛋白基因以及其他一些氧化还原酶基因等等,实验结果与转录组测序结果基本一致(见表 2),但也有部分结果差异较大,例如 SOD 基因在测序中上调表达 9.4 倍,在 Q-RT-PCR 实验中上调 32.9 倍;一种含锰的过氧化氢酶在测序结果和荧光定量 PCR 的上调表达倍数分别是 187.4 和 112.9;一种转座酶活性的蛋白在测序结果和荧光定量 PCR 的上调表达倍数分别是 4.3 和 20.5;而一种具有酰基辅酶 A 脱氢酶活性的蛋白在转录组测序中上调 6.14 倍, Q-RT-PCR 结果则显示这种蛋白在联苯中下调约 1.3 倍。

## 2.2 红球菌 R04 在不同碳源条件下联苯代谢相关基因的差异表达

**2.2.1 位于同联苯代谢上游基因簇中联苯代谢基因的差异表达:**红球菌 R04 能够有效降解联苯及多种芳香族化合物,并能降解多种多氯联苯,它通过联苯代谢通路实现对 PCBs 的降解,联苯代谢通路及相关基因见图 3,联苯代谢途径中的联苯双加氧酶对底物特异性选择及氧化是代谢的第一步,因而联苯 2,3-双加氧酶的催化氧化能力直接影响菌株对联苯及多氯联苯的降解作用。联苯双加氧酶(BphA)由大小亚基和铁氧还蛋白及铁氧还蛋白还原酶四部分构成,这四部分由 *bphA1*、*bphA2*、*bphA3*、*bphA4* 四个相邻基因编码<sup>[18]</sup>,转录组测序结果表明,与葡萄糖为碳源培养相比,联苯双加氧酶这四个基因在联苯条件下上调表达量基本一致(上调表达率分别为 4.32、4.46、4.61 和 4.90)。此外,与 *bphA* 位于同一基因簇中的 2,3-二氢二羟基联苯脱氢酶(*bphB*)、2,3-二羟基联苯双加氧酶(*bphC2*)以及 HOPDA 水解酶(*bphD1*)上调表达率分别为 3.48、3.92 和 4.79。联苯下游途径是将代谢中间物 2-羟基-2,4-戊二烯(或其氯化衍生物)通过一系列酶的作用降解为丙酮酸和乙醛,作用于戊二烯的这一系列酶也位于同一基因簇中,其中 2-酮基-4-戊烯酸水合酶(*bphE*)以及乙醛脱氢酶(*bphG*)上调倍率分别高达 6.06 和 5.40,而 4-羟基-2-氧代戊酸醛缩酶(*bphF*)上调表达率也高达 4.17(图 4)。

表 2. *Rhodococcus* sp. R04 在葡萄糖和联苯为碳源条件下部分基因的差异表达Table 2. Differential expression of *Rhodococcus* sp. R04 under the condition of glucose and biphenyl as carbon source

Gene ID	Gene name	Gene product	G-RPKM	BP-RPKM	Expression ratio(BP/G)	
					Sequencing results	RT-PCR Results
RHOGL005227		Hypothetical protein	93.93	1526.56	4.02	4.19 ± 0.09
RHOGL005808		Acyl-CoA dehydrogenase	27.56	1122.44	5.35	4.93 ± 0.11
RHOGL007204		Cu/Zn superoxide dismutase	44.43	416.67	3.23	5.04 ± 0.17
RHOGL009025		Hypothetical protein	45.80	427.35	3.22	2.58 ± 0.07
RHOGL007658		Integrase catalytic region	178.43	4902.62	4.78	5.57 ± 0.12
RHOGL005806		MaoC protein	30.46	535.45	4.14	5.87 ± 0.15
RHOGL008438	<i>ftsZ</i>	Cell division protein FtsZ	970.86	569.07	-0.77	-1.85 ± 0.06
RHOGL009076		Mn-containing catalase	2.11	394.10	7.55	6.82 ± 0.14
RHOGL007671		IS110 family transposase	10.29	43.96	2.09	4.36 ± 0.05
RHOGL007661	<i>bphD</i>	2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase	372.10	10278.21	4.79	5.48 ± 0.09
RHOGL007668	<i>bphC</i>	2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase	1524.75	23090.07	3.92	3.12 ± 0.17
RHOGL007669	<i>bphB</i>	2,3-dihydroxy-2,3-dihydrophenyl propionate dehydrogenase	2822.40	31599.88	3.48	2.45 ± 0.14
RHOGL007666	<i>bphA1</i>	Large terminal subunit of phenylpropionatedioxygenase	1371.55	27358.90	4.32	4.96 ± 0.12
RHOGL007440	<i>bphE</i>	2-keto-4-pentenoate hydratase	5.62	374.01	6.06	6.26 ± 0.17
RHOGL007441	<i>bphG</i>	acetaldehyde dehydrogenase	11.99	505.20	5.40	4.93 ± 0.12
RHOGL007443	<i>bphF</i>	4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase	88.64	370.56	2.06	1.77 ± 0.08
RHOGL007393		4-hydroxybenzoate-3-monooxygenase	8.41	150.22	4.16	4.74 ± 0.12
RHOGL003770	<i>benA1</i>	Benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit	310.88	6379.71	4.34	3.59 ± 0.06
RHOGL000737		DHB dehydrogenase	32.84	59.10	0.85	1.79 ± 0.09
RHOGL007333	<i>gvpK</i>	Gas vesicle synthesis protein	102.34	218.37	1.09	3.12 ± 0.08
RHOGL007334	<i>gvpS</i>	Gas vesicle protein	34.97	135.91	1.96	3.71 ± 0.24
RHOGL007335	<i>gvpL</i>	Gas vesicle protein	62.02	191.09	1.62	1.93 ± 0.24
RHOGL007336	<i>gvpJ</i>	Gas vesicle protein	26.43	300.56	3.51	2.81 ± 0.23
RHOGL007337	<i>gvpO</i>	Gas vesicle synthesis protein	57.58	777.14	3.75	4.12 ± 0.19
RHOGL007338	<i>gvpF</i>	Gas vesicle synthesis protein	88.09	860.59	3.29	3.94 ± 0.22
RHOGL007339	<i>gvpG</i>	Gas vesicle synthesis protein	40.84	621.77	3.93	4.49 ± 0.17
RHOGL007340	<i>gvpA</i>	Gas vesicle synthesis protein	65.53	591.06	3.17	3.74 ± 0.06
RHOGL007432		Acyl-CoA dehydrogenase activity	33.50	205.88	2.62	-0.297 ± 0.11
RHOGL005811		Quinone reductase	4.51	271.61	5.91	5.31 ± 0.1
RHOGL009073		Hypothetical protein CE2760	34.68	1569.22	5.50	4.43 ± 0.25

Epression ratio is the log<sub>2</sub> biphenyl / glucose ratio.

**2.2.2 联苯代谢过程中其他同工酶的差异表达:**除了编码联苯代谢系统的基因簇之外,联苯代谢菌株还有大量的联苯代谢相关的同工酶,例如红球菌 RHA1 中有 3 个基因簇编码联苯双加氧酶系统(分别是 *bphAaAbAcAd*、*etbAa1Ab1C* 和 *etbAa2Ab2AcD2*),而 *bphC* 有 6 个同源物,*bphD* 有 3 个同源物。紫红红球菌能够编码 8 个 *bphC*,红球菌 P6 中至少含有 3 个编码 *bphC* 同系物的基因<sup>[19-22]</sup>。本实验室对红球菌的基因组测序中发现 R04 中含有 8 个能够编码 2,3-二羟基联苯 1,2-双加氧酶的基因和 3 个可以编

码 HOPDA 水解酶的基因<sup>[4]</sup>。为进一步探索在联苯压力下同工酶的作用,我们对三种不同碳源条件培养下同工酶转录组进行评估,我们在葡萄糖、联苯和乙醇条件下检测到 7 个 *bphC* 和 3 个 *bphD* 基因的表达,图 4 给出了红球菌 R04 中所有编码 2,3-二羟基联苯双加氧酶和 HOPDA 水解酶的同工酶在联苯和葡萄糖培养条件下的差异表达倍率,结果显示除位于同一基因簇中的 *bphC2* 和 *bphD1* 在联苯中大量上调表达外,*bphC4* 和 *bphD2* 上调表达倍率不超过 1,其余同工酶在联苯中均下调表达。

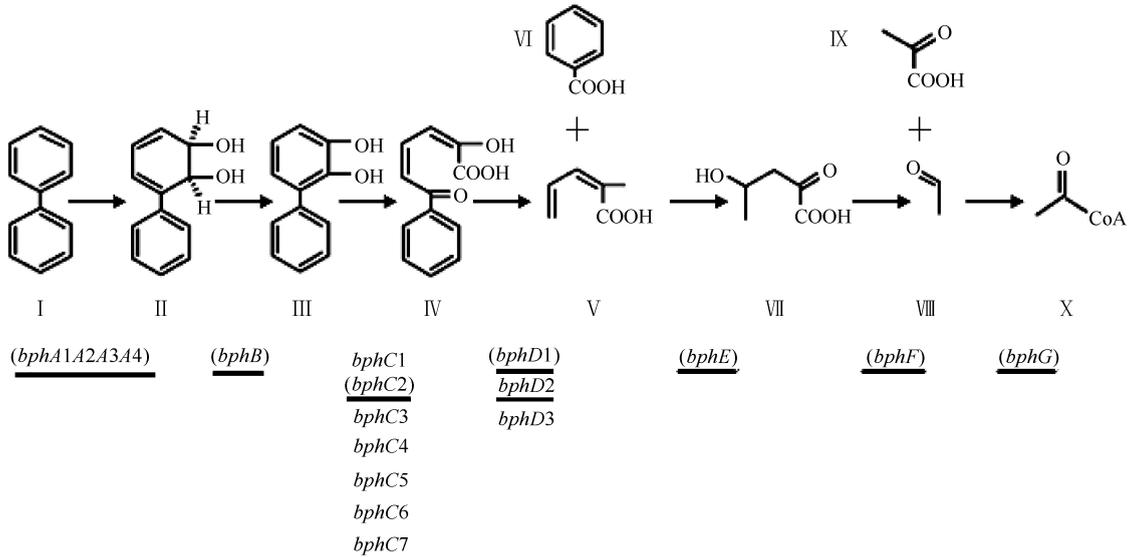


图 3. 联苯代谢通路

Figure 3. Biphenyl metabolic pathway. I: Biphenyl; II: 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl; III: 2,3-dihydroxybiphenyl; IV: 2-Hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate; V: 2-Hydroxypenta-2,4-dienoate; VI: Benzoate; VII: 4-Hydroxy-2-oxovalerate; VIII: Acetaldehyde; IX: Pyruvate; X: Acetyl-CoA. The biphenyl pathway, a common pathway for degradation of PCBs. Homologous genes potentially encoding each step are listed and classified as follows: underlined, up-regulated on biphenyl; in parentheses, located in one cluster and constitutively expressed at high levels.

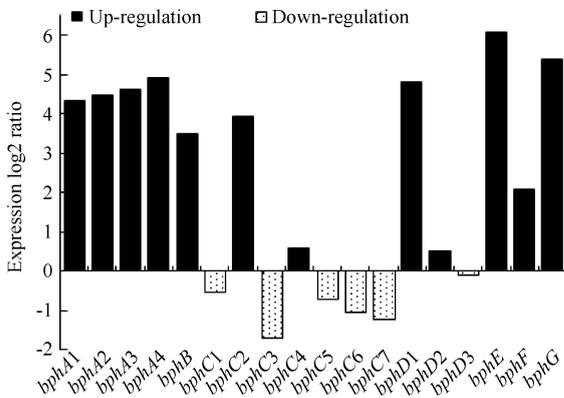


图 4. 联苯代谢通路中相关基因的差异表达

Figure 4. The differential expression of genes in biphenyl pathway.

## 2.3 红球菌 R04 在联苯压力下的苯甲酸代谢

### 2.3.1 苯甲酸的好氧代谢概述: 联苯/PCB 上游途径反应产生苯甲酸和戊二烯或它们的氯化衍生物。戊二烯(或其氯化衍生物)可通过联苯下游通路中的酶逐步代谢为丙酮酸和乙醛,经丙酮酸脱氢酶和乙醛脱氢酶作用最终形成乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环(图 5)。微生物对苯甲酸的有氧降解主要有儿茶酚途径、龙胆酸途径和原儿茶酸途径。如图 5 所示,儿茶酚途径主要是在苯甲酸 1,2-双加氧酶作用下双羟基化生成中间产物 2-氢-1,2-二羟基苯

甲酸(DHB),在 DHB 脱氢酶的催化下进一步生成儿茶酚,儿茶酚在儿茶酚 1,2-双加氧酶或儿茶酚 2,3-双加氧酶的作用下分别内开环生成粘康酸或者外开环生成 2-羟基粘康酸半醛,经一系列反应后进入三羧酸循环<sup>[23-25]</sup>,以上两种儿茶酚途径又被称为邻位途径和间位途径;龙胆酸途径中首先由苯甲酰辅酶 A 连接酶作用生成苯甲酰辅酶 A,然后在羟化酶的作用下逐步羟基化生成龙胆酸,通过一系列的最终生成反丁烯二酸和丙酮酸<sup>[1,26]</sup>;苯甲酸的原儿茶酸途径是在苯甲酸 4-羟化酶或 3-羟化酶的作用下在对位或间位加氧生成 4-羟基苯甲酸或 3-羟基苯甲酸,又经 4-羟基苯甲酸 3-单加氧酶或 3-羟基苯甲酸 4-单加氧酶的作用生成原儿茶酸。原儿茶酸开环裂解生成 3-酮脂肪酸烯醇内酯,经一系列反应后最后生成琥珀酸和乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环<sup>[27]</sup>。

### 2.3.2 红球菌 R04 中苯甲酸的代谢: 利用转录组差异表达数据锁定了一些与苯甲酸代谢相关的基因,在红球菌 R04 中共发现有三条备用的代谢途径,分别是儿茶酚的邻位途径、间位途径和原儿茶酸途径,但在不同生长条件下参与苯甲酸降解途径中相关酶的表达量有所差异。数据分析表明在联苯压力下,苯甲酸 1,2-双加氧酶、DHB 脱氢酶、儿茶酚 1,

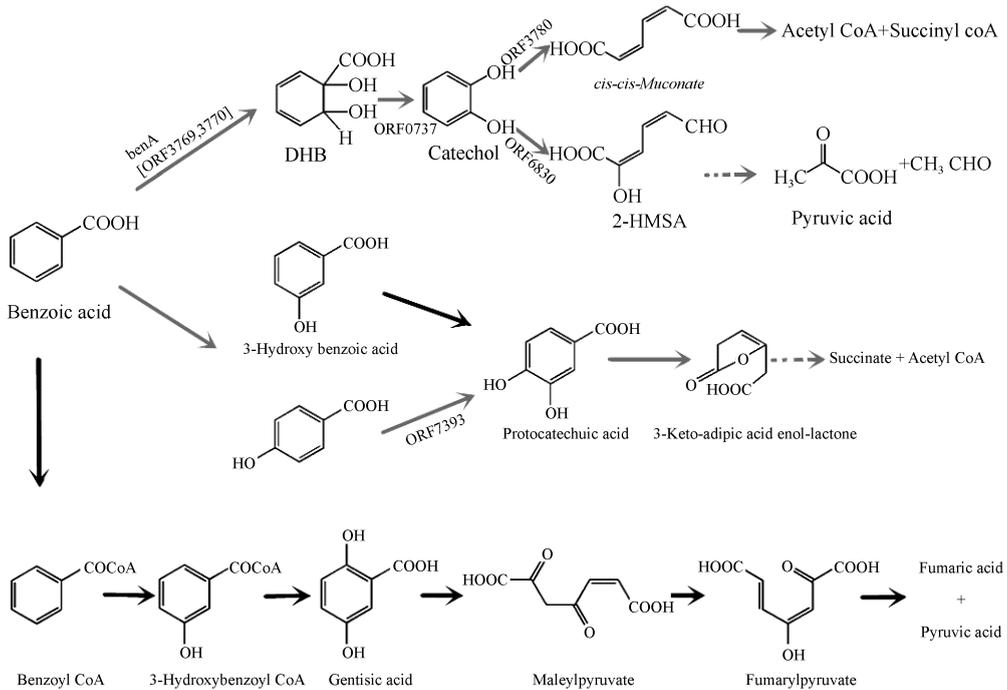


图 5. 苯甲酸代谢通路

Figure 5. Benzoate metabolic pathway. Three benzoate metabolic pathways in *Rhodococcus* sp. R04 are marked by gray arrows, they are *ortho* cleavage pathway, *meta* cleavage pathway and protocatechuic acid pathway. The dashed lines indicate that there are several reactions in this process.

2-双加氧酶以及 4-羟基苯甲酸 3-单加氧酶等基因显著上调表达,上调倍数分别高达 24.9 倍、4.2 倍和 17.9 倍。而儿茶酚 2,3-双加氧酶则下调约 3 倍(图 6)。表明联苯培养条件下,苯甲酸的降解主要依赖邻位途径,同时原儿茶酚途径也参与了部分降解。虽然在非联苯条件下三条代谢途径都有所表达(代

谢途径图 5 灰色箭头所示),但就基因的 *RPKM* 表达量而言,苯甲酸的降解主要是通过邻位途径来完成的。有研究发现邻位途径和间位途径不是严格区分的,当底物苯甲酸盐浓度增高时两种裂解途径会同时进行<sup>[25]</sup>。因而推测在不同的苯甲酸浓度下红球菌 R04 的两种儿茶酚途径通过转录调节作用单独或共同参与降解作用。

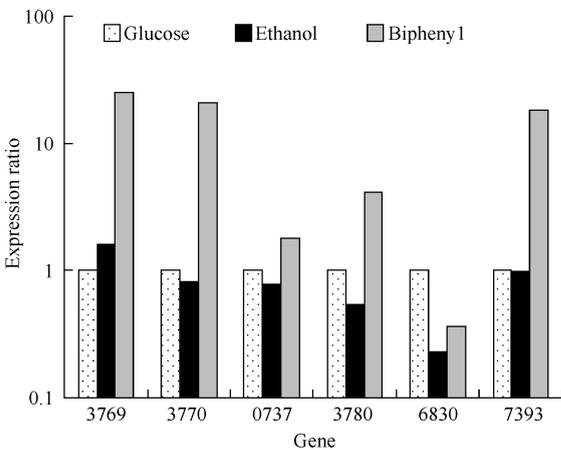


图 6. 苯甲酸代谢通路中相关基因的差异表达

Figure 6. The differential expression of genes in benzoate pathway.

### 3 讨论

联苯及其衍生物的生物降解研究始于 70 年代,至今发现的联苯降解菌包括革兰氏阴性菌如 *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Achromobacter* 等和革兰氏阳性菌 *R. sp. RHA1*, *R. Globerulus* P6, *R. Erythropolis* TA421, *R. sp. M5* 等等。红球菌 R04 是继以上这些联苯降解菌之后又一株能有效降解联苯及多氯联苯的菌株。该菌株的联苯降解基因结构与上述已发现的降解菌结构有很大的不同。Detmar H 根据联苯降解基因结构的不同将其分为三类:第一类是简单的 *bphABCD* 基因簇,第二类中 *bphA4* 位于整个基因簇后面即 *bphA1A2A3BCDA4*,第三类 *bphB*

和 *bphC* 交换位置即 *bphACBD*<sup>[28]</sup>。通过构建基因文库和基因组测序结果均表明红球菌 R04 联苯降解基因结构与上述三种结构均不相同, 基因顺序为 *bphBCAD*<sup>[3-4]</sup>, 同时, 在基因组也没有发现与前三类相似转录调控结构, 表明该基因簇的调控具有特异性。

本课题选用葡萄糖、乙醇和联苯为碳源条件分别比较红球菌的转录组特点。葡萄糖是一种可被微生物普遍利用的基础碳源和能源物质, 其代谢过程简单, 微生物可通过糖酵解作用将葡萄糖转化为丙酮酸直接进入三羧酸循环, 因而以葡萄糖为培养条件可作为不同碳源环境代谢状况的一个对照。红球菌 R04 能够直接利用乙醇为唯一碳源和能源生长, 并且能够利用乙醇的共代谢作用降解某些单氯代苯甲酸如 4-氯代苯甲酸<sup>[29]</sup>。乙醇成为工业化培养红球菌株可靠的碳源和能源物质对该菌在化工生产中的应用是一大利好, 对于乙醇条件下的转录组数据的研究能够为进一步研究乙醇条件下菌体的代谢情况提供更多的基础生物学数据。

通过转录组的差异表达分析发现红球菌 R04 中位于同一基因簇中的联苯通路上下游基因整体上调表达, 该结果与之前报道的其他降解菌的表达模式具有相似性<sup>[30]</sup>。联苯通路中其他同工酶转录模式分析显示这些同工酶基因在同种碳源条件下表达量差异较大, 其中 *bphC1* (ORF6973)、*bphC2* (ORF7668) 和 *bphC6* (ORF3758) 在 3 种碳源中表达量均显著高于其他同工酶(表达量高 10 倍以上), *bphD1* (ORF7661) 和 *bphD2* (ORF6972) 在 3 种碳源中表达量均高于 *bphD3* (ORF0890)。这些结果表明不同的同工酶对同一种底物具有不同的活性, 而酶的多样性与其底物多样性和专一性有极大的关系<sup>[21]</sup>。此外, 除了结果中提到的位于同一基因簇中的 *bphC* 和 *bphD* 在不同碳源条件下基因的表达量差异较大之外, 其余的同工酶基因各自在 3 种碳源条件下表达量相差较小, 说明在联苯或是中间代谢产物主要诱导位于同一基因簇上基因, 而对游离于基因簇之外的其他基因几乎无诱导作用。这些同工酶的存在说明联苯的降解通路有组成型或底物和中间产物诱导型两种表达模式<sup>[19]</sup>。

本课题对联苯途径的代谢产物苯甲酸的降解模式分析得出, 在联苯压力下红球菌 R04 中苯甲酸的代谢主要利用儿茶酚途径和原儿茶酸途径共同作

用。这种表达模式与之前报道的 RHA1 苯甲酸降解通路基本一致, 却与伯克氏菌株 LB400 和 *Corynebacterium glutamicum* 等其他芳香族化合物降解菌有所不同, 伯克氏菌中苯甲酸的降解主要通过邻位途径和两条不同的苯甲酸-CoA 途径, 而在 *Corynebacterium glutamicum* 中苯甲酸的降解可依靠儿茶酚途径、龙胆酸途径和原儿茶酸途径<sup>[1,31]</sup>。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] Yang X, Sun Y, Qian S. Biodegradation of seven polychlorinated biphenyls by a newly isolated aerobic bacterium (*Rhodococcus* sp. R04). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2004, 31(9): 415-420.
- [3] 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.
- [4] Yang X, Xue R, Shen C, Li S, Gao C, Wang Q, Zhao X. Genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain R04, a polychlorinated-biphenyl biodegrader. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(18): 5032-5033.
- [5] Walsby AE, Dunton PG. Gas vesicles in actinomycetes? *Trends in Microbiology*, 2006, 14(3): 99-100.
- [6] Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research*, 1997, 7(10): 986-995.
- [7] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621-628.
- [8] Martinez P, Agullo L, Hernandez M, Seeger M. Chlorobenzoate inhibits growth and induces stress proteins in the PCB-degrading bacterium *Burkholderia xenovorans* LB400. *Archives of Microbiology*, 2007, 188(3): 289-297.
- [9] Hu P, Tirelli N. Scavenging ROS: superoxide dismutase/catalase mimetics by the use of an

- oxidation-sensitive Nanocarrier/enzyme conjugate. *Bioconjugate Chemistry*, 2012, 23(3): 438-449.
- [10] West AH, Stock AM. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26(6): 369-376.
- [11] Maheshwari Y, Rao M, Sykes DE, Tyner AL, Weiser MM. Changes in ribosomal protein and ribosomal RNA synthesis during rat intestinal differentiation. *Cell Growth & Differentiation: the Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 1993, 4(9): 745-752.
- [12] Chakraborty A, Uechi T, Higa S, Torihara H, Kenmochi N. Loss of ribosomal protein L11 affects zebrafish embryonic development through a p53-dependent apoptotic response. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4152.
- [13] Wool IG. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 1996, 21(5): 164-165.
- [14] Aseev LV, Boni IV. Extraribosomal functions of bacterial ribosomal proteins. *Molekuliarnaia Biologiia*, 2011, 45(5): 805-816.
- [15] Hayes PK, Walsby AE, Walker JE. Complete amino acid sequence of cyanobacterial gas-vesicle protein indicates a 70-residue molecule that corresponds in size to the crystallographic unit cell. *The Biochemical Journal*, 1986, 236(1): 31-36.
- [16] Englert C, Horne M, Pfeifer F. Expression of the major gas vesicle protein gene in the halophilic archaeobacterium *Haloferax mediterranei* is modulated by salt. *Molecular & General Genetics: MGG*, 1990, 222(2-3): 225-232.
- [17] Letek M, Gonzalez P, Macarthur I, Rodriguez H, Freeman TC, Valero-Rello A, Blanco M, Buckley T, Cherevach I, Fahey R, Hapeshi A, Holdstock J, Leadon D, Navas J, Ocampo A, Quail MA, Sanders M, Scotti MM, Prescott JF, Fogarty U, Meijer WG, Parkhill J, Bentley SD, Vazquez-Boland JA. The genome of a pathogenic *rhodococcus*: cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. *PLoS Genetics*, 2010, 6(9): e1001145.
- [18] Iwasaki T, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M. Multiple-subunit genes of the aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase play an active role in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5396-5402.
- [19] Goncalves ER, Hara H, Miyazawa D, Davies JE, Eltis LD, Mohn WW. Transcriptomic assessment of isozymes in the biphenyl pathway of *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9): 6183-6193.
- [20] Taguchi K, Motoyama M, Kudo T. Multiplicity of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase genes in the Gram-positive polychlorinated biphenyl degrading bacterium *Rhodococcus rhodochrous* K37. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(4): 787-795.
- [21] McKay DB, Prucha M, Reineke W, Timmis KN, Pieper DH. Substrate specificity and expression of three 2, 3-dihydroxybiphenyl 1, 2-dioxygenases from *Rhodococcus globerulus* strain P6. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(9): 2944-2951.
- [22] Yang XQ, Xie F, Zhang G, Shi Y, Qian S. Purification, characterization, and substrate specificity of two 2, 3-dihydroxybiphenyl 1, 2-dioxygenase from *Rhodococcus* sp. R04, showing their distinct stability at various temperature. *Biochimie*, 2008, 90(10): 1530-1538.
- [23] Ampe F, Lindley ND. Flux limitations in the ortho pathway of benzoate degradation of *Alcaligenes eutrophus*: metabolite overflow and induction of the meta pathway at high substrate concentrations. *Microbiology*, 1996, 142(7): 1807-1817.
- [24] Neidle EL, Hartnett C, Ornston LN. Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* benABC genes for benzoate 1, 2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(17): 5385-5395.
- [25] Cao B, Geng A, Loh KC. Induction of ortho- and meta-cleavage pathways in *Pseudomonas* in biodegradation of high benzoate concentration: MS identification of catabolic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(1): 99-107.
- [26] Altenschmidt U, Oswald B, Steiner E, Herrmann H, Fuchs G. New aerobic benzoate oxidation pathway via benzoyl-coenzyme A and 3-hydroxybenzoyl-coenzyme A in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(15): 4851-4858.
- [27] Fu W, Oriol P. Degradation of 3-phenylpropionic acid by *Haloferax* sp. D1227. *Extremophiles: Life Under*

- Extreme Conditions*, 1999, 3(1): 45-53.
- [28] Dietmar H. Pieper Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(2): 170-191.
- [29] Zhang GQ, Yang XQ, Xie FH, Chao YP, Qian SJ. Cometabolic degradation of mono-chloro benzoic acids by *Rhodococcus* sp. R04 grown on organic carbon sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(7): 1169-1174.
- [30] Parnell JJ, Denev VJ, Park J, Tsoi T, Tiedje JM. Environmentally relevant parameters affecting PCB degradation: carbon source- and growth phase-mitigated effects of the expression of the biphenyl pathway and associated genes in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Biodegradation*, 2012, 21(4): 147-156.
- [31] Shen XH, Huang Y, Liu SJ. Genomic analysis and identification of catabolic pathways for aromatic compounds in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbes and Environments*, 2005, 20(3): 160-167.

## Transcriptomic and benzoate metabolic pathways of *Rhodococcus* sp. R04 cultured in biphenyl

Xiuqing Yang\*, Jingwen Xi

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

**Abstract:** [ **Objective** ] Studying transcriptional characteristics of *Rhodococcus* sp. R04 is to find the genes that participate in the transportation, metabolism and regulation of polychlorinated biphenyls (PCBs), and disclose the molecular mechanism of biodegradation of PCBs. [ **Methods** ] Strain R04 was separately cultivated on ethanol, glucose and biphenyl. The total RNA of the above different cultures was extracted, and the cDNA was obtained by reverse transcription and determined by high-throughput sequencing. The data obtained by sequencing were analyzed to find the correlation among the PCBs metabolic network, gene transcription regulation and metabolic response. [ **Results** ] The sequencing results showed that 375 genes were up-regulated during grown on biphenyl, relative to growth on glucose, and 332 genes were up-regulated, relative to growth on ethanol. Those genes were found to participate in multiple biological processes of biphenyl metabolite. Among the genes relative to biphenyl/PCBs degradation, the genes located on the gene cluster in the upper biphenyl pathway were significantly up-regulated, while *bphC4* and *bphD2* were up-regulated slightly. By contrast, the other genes encoding BphC and BphD isozymes in the biphenyl pathway were down-regulated even if growth on biphenyl. [ **Conclusion** ] Transcriptomic analysis suggested that benzoate was degraded via ortho cleavage pathway, meta cleavage pathway or protocatechuic acid pathway, which provide more valuable data for us to reveal the characteristics and regulation of downstream metabolic pathways of biphenyl and PCBs.

**Keywords:** biphenyl metabolic, benzoate metabolic, transcription response, correlation analysis

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (3080030) and by the National Natural Science Foundation of Shanxi Province (2014011030-3)

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

Received: 3 November 2014/Revised: 28 November 2014