



研究报告

基于转录组分析铜绿假单胞菌 DN1 降解荧蒹特性

李艳鹏 田越欣 郝志丹 马艳玲*

西部资源与现代生物技术教育部重点实验室 陕西省生物技术重点实验室 西北大学生命科学学院
陕西 西安 710069

摘要:【背景】铜绿假单胞菌 DN1 是一株从石油污染土壤中分离筛选到的具有广谱降解功能的菌株。

【目的】深入了解荧蒹胁迫条件下铜绿假单胞菌 DN1 降解污染物过程中重要的降解相关基因信息。【方法】通过高通量测序技术对铜绿假单胞菌 DN1 进行转录组测序, 对其所有的转录本进行 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 分类和 Pathway 注释、GO (gene ontology) 分类和富集分析。【结果】转录组测序显示: 与对照组相比, 荧蒹诱导组检测到 6 189 个基因, 其中 1 919 个基因上调表达, 1 603 个基因下调表达。KEGG 注释分析显示差异上调表达基因匹配到了 112 个 KEGG 代谢途径, 注释到“代谢途径”的 1 408 个基因(约占总差异基因的 73.4%)中有 317 个基因参与了碳氢化合物代谢及含有苯环结构的异源生物质的生物降解, 占“代谢途径”的 16.53%, 暗示了菌株 DN1 降解荧蒹可能与这些途径有密切关系。另外, 主要代谢途径中的差异表达基因主要集中在 ABC 转运系统、氨基酸生物合成、双组分系统及碳代谢, 这些途径大多数参与了底物的识别转运、信号转导及基因表达调控。【结论】进一步拓展了铜绿假单胞菌 DN1 在荧蒹胁迫条件下的代谢途径和逆境反应, 也为微生物修复环境污染研究夯实了理论基础。

关键词: 铜绿假单胞菌 DN1, 转录组, 荧蒹, 降解, 基因表达

Transcriptomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* DN1 upon degradation of fluoranthene

LI Yan-Peng TIAN Yue-Xin HAO Zhi-Dan MA Yan-Ling*

Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, College of Life Science, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China

Abstract: [Background] *Pseudomonas aeruginosa* DN1, isolated from a petroleum-contaminated soil, exhibits a versatile metabolism and can utilize both *n*-alkanes and aromatic hydrocarbons. [Objective] The aim of this study was to fully understand the expression of vital genes for fluoranthene degradation and the changes of transcriptional spectrum of the DN1 in response to fluoranthene. [Methods] An RNA-Seq-based transcriptome was conducted for a global analysis of the DN1 in media with fluoranthene and glucose respectively, and all transcripts were subjected to KEGG classification and pathway

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31000069); Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2017ZDXM-SF-105)

*Corresponding author: E-mail: mayanling@nwu.edu.cn

Received: 28-05-2019; Accepted: 04-09-2019; Published online: 27-09-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31000069); 陕西省重点研发计划重点项目(2017ZDXM-SF-105)

*通信作者: E-mail: mayanling@nwu.edu.cn

收稿日期: 2019-05-28; 接受日期: 2019-09-04; 网络首发日期: 2019-09-27

annotation, GO classification and enrichment analysis. **[Results]** A total of 6 189 assembled contigs were obtained and analyzed in detail. In contrast to control group with glucose, 1 919 genes that corresponded to this degradation in the DN1 were found to be up-regulated and 1 603 genes were found to be down-regulated. KEGG pathway analysis showed that 112 KEGG pathways with up-regulated expression were variant, and 317 of the 1 408 genes that were about 73.4% of total differential genes annotated to the “metabolism” pathway involved in carbohydrate metabolism and xenobiotics biodegradation and metabolism, accounting for 16.53% of the “metabolism” pathway, which suggested that fluoranthene degradation by the DN1 may be closely related to these pathways. Moreover, the differentially expressed genes of primary metabolic pathways were identified and the results indicated that the main pathways, such as ABC transporters, biosynthesis of amino acids, two-component system and carbon metabolism, involved mostly in substrates recognition and transport, signal transduction and gene expression regulation. **[Conclusion]** The results will be expected to enhance our understanding on fluoranthene metabolic pathway and stress response of the DN1 in future studies, as well as lay a solid theoretical foundation for the research on microbial remediation of environmental pollutants.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa* DN1, Transcriptome, Fluoranthene, Degradation, Gene expression

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类由 2 个或 2 个以上苯环构成的稠环化合物, 主要源于森林草地火灾、石油渗漏以及垃圾焚烧、石油、沥青质等不完全燃烧^[1-2]。由于 PAHs 的毒性和“三致性”(致突变性, 致畸性, 致癌性), 严重威胁着生态系统, 尤其是人类的健康^[3]。因此, 多环芳烃的去除是环境科学家们共同关心的问题^[4]。其中, 微生物降解是去除环境中多环芳烃污染物的最主要途径, 具有成本低、效率高、环境友好性等特点^[5]。大量研究表明, 自然界中存在许多可高效降解 PAHs 的菌株, 如分枝杆菌属(*Mycobacterium*)^[6]、红球菌属(*Rhodococcus*)^[7]、不动杆菌属(*Acinetobacter*)^[8]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[9]等, 为环境保护与污染防治提供了菌种资源。假单胞菌属作为最有效的 PAHs 降解细菌属之一, 它们能够利用碳氢化合物作为碳源生长, 并在多环芳烃类污染环境生存^[9-10]。

目前, 关于烃类污染物降解菌的降解机理研究大都从分子水平上对菌株的基因及基因簇进行探索, 而从转录组测序与分析上揭示微生物降解机理及功能的研究工作还比较少。转录组测序反映了微生物细胞在一定条件下生理活动中基因的差异表达, 直接揭示了参与特定处理过程的相关基因及其转录状态变化。Goncalves 等^[11]通过分析

红球菌 RHA1 的转录组数据, 发现联苯和乙苯胁迫条件下 320 个功能基因发生上调表达, 而在苯甲酸诱导下只有 65 个基因上调表达, 同时还发现有 22 个酶(含 8 个新酶)可能参与了联苯的降解过程。于红艳等^[12]利用比较转录组分析克雷白氏肺炎杆菌 Tzyx1 对多环芳烃的降解特性, 发现正常培养和多环芳烃胁迫培养条件下, 得到 254 个显著性差异表达基因。因此, 分析转录组可以获得 RNA 水平上基因的表达信息。荧蒽作为一种高分子量多环芳烃, 与低分子量多环芳烃如菲或萘相比, 其结构更加稳定, 属于一种难降解的持久性有机污染物。本课题组前期从长庆油田石油污染土壤中分离筛选到一株具有石油烃降解功能的菌株, 测序并命名为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) DN1, NCBI 登录号为 CP017099^[13-14]。全基因组测序结果显示, 菌株 DN1 中含有 100 个以上可能参与降解途径的烃类降解相关基因^[15]。本研究进一步对菌株 DN1 进行转录组测序, 比较正常培养和荧蒽诱导培养这两种条件下基因的差异表达情况, 寻找表型与基因型之间的相互关系, 以揭示荧蒽的降解路径和特性, 这些研究有助于进一步研究菌株 DN1 降解荧蒽的生理生化和遗传机制, 有利于阐明多环芳烃的微生物降解机制, 为多环芳烃生物修复技术的应用提供理论指导与科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 菌株 DN1 由本实验室从石油污染土壤中分离所得。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

蛋白胨和酵母浸粉, Oxoid 公司; 普通化学试剂药品, 天津市科密欧化学试剂有限公司。恒温培养箱, 上海智城分析仪器有限公司。LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 10.0; MSM 无机盐培养基(g/L): 硫酸铵 1.0, 磷酸氢二钾 7.0, 磷酸二氢钾 3.0, 硫酸镁 0.1, 氯化钠 0.5, pH 7.2。1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.2 培 养 条 件

将保存的菌株 DN1 于 LB 中活化后, 挑取单克隆接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至对数期, 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。无菌水洗涤菌体 3 次, 转接入 MSM 无机盐培养基中。对照组及实验组分别以 50 mg/L 葡萄糖和荧蒽为唯一碳源, 37 °C、200 r/min 培养 5 d。然后分别以 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。葡萄糖-MSM 培养基培养的菌体样品命名为 CK, 荧蒽-MSM 培养基培养的菌体样品命名为 EF, 每组设立 3 个平行。

1.3 RNA 提 取

低温保存菌体样品, 送至广州赛哲生物科技有限公司进行 RNA 的提取及质量检测, 利用 Illumina 高通量测序平台 HiSeq PE 150 进行 RNA-Seq 转录组测序。

1.4 转 录 组 数 据 组 装 及 注 释

测序得到的原始数据(raw reads), 包括 Reads 的序列及碱基的测序质量。为保证数据质量, 首先要对数据过滤以减少数据噪音, 包括: 去除低质量(质量值 SQ≤20 的碱基数占整条 Read 的 50% 以上)、测序接头和含 N 比例大于 10% 的 Reads。将质量控制后的 High quality clean reads 利用 Bowtie 工具比对到核糖体数据库过滤掉核糖体的序列, 之后利用 TopHat2 比对软件比对到参考基因组上, Cufflinks

进行组装、Cuffmerge 合并, 得到包括已知基因和一些新基因的完整基因^[16-17]。比对好的基因分别在 NCBI、GO、KEGG 进行比对注释^[18-19]。

1.5 差异基因表达分析及富集分析

根据 CK、EF 与参考基因组比对结果, 利用 FPKM (fragments per kilobase per million)方法计算基因的表达量, 并以此作为每个转录本/基因在样品中各自的表达量^[17,20]。之后利用错误发生率(false discovery rate, FDR)和差异表达量倍数在 2 倍以上的基因(Log₂FC; FC: folds change)来筛选差异基因, 通过筛选 FDR<0.05 且|Log₂FC|>1 的差异表达基因用于后续分析^[21]。经过多重检验校正后, 选择 Q-value≤0.05 的基因进行差异表达基因富集分析, 确定差异表达基因参与的最主要的生化代谢途径、信号转导途径及差异基因行使的主要生物学功能。

2 结 果 与 分 析

2.1 铜绿假单胞菌株 DN1 在荧蒽胁迫环境下的转录组学分析

利用 Illumina 高通量测序平台 HiSeq PE 150 对荧蒽胁迫条件下菌株 DN1 进行转录组学测序, 两个样本分别得到 28 325 987 条(CK、对照组、葡萄糖条件)和 18 579 321 条(EF、实验组、荧蒽条件)序列。将这些有效序列分别比对到核糖体和参考基因组 DN1 (CP017099)上过滤之后, 分别得到 28 098 931 条和 18 434 341 条序列。能够比对到基因组多个位置的被称为 Multiple matched Reads, 这种 Reads 可信度较低, 一般不用作基因表达差异分析; 能够比对到基因组唯一位置的被称为 Unique matched reads, 可信度高。因此统计 Unique matched reads 用于后续分析, 以保证分析结果的可信度。如表 1 所示, 能够比对到基因组上的匹配序列分别占有效序列的 99.19% (CK)和 99.22% (EF), 其中完全匹配的序列(mapping ratio)分别为 82.34% 和 80.51%, 而 Multiple matched reads 的比例较低, 说明测序质量较好。

表 1 样品与参考基因组比对结果

Table 1 RNA-Seq data for reads number in two samples

Sample	CK	EF
Total reads	28 098 931	18 434 341
Mapped reads	23 379 855 (82.34%)	14 862 426 (80.51%)
Multiple matched reads	635 162 (2.80%)	476 928 (2.55%)
Unique matched reads	20 825 415 (74.27%)	14 385 498 (77.96%)

2.2 基因差异表达分析

基因表达量通常使用 FPKM, 即每百万测序碱基中匹配到每千个转录子测序碱基中所包含的测序片段数。FPKM 只计算 2 个 Reads 能比对到同一个转录本的 Fragments 数量。FPKM 法通过归一化处理可以消除组间差异基因如长度差异及转录组测序量差异对基因表达量的影响, 并将归一化后的基因表达量直接用于分析组间样品之间的基因表达差异。利用错误发生率(FDR)和差异表达量倍数在 2 倍以上的基因(\log_2FC ; FPKM-EF/FPKM-CK)的差异基因筛选方法, 通过筛选 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$ 的差异表达基因用于后续分析。其中 FPKM-EF 表示荧蒽诱导下菌株 DN1 的基因表达量, FPKM-CK 表示对照组葡萄糖诱导下菌株 DN1 的基因表达量。

根据铜绿假单胞菌株 DN1 的转录组数据分析差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 荧蒽(EF)和葡萄糖(CK)诱导下的 RNA-Seq 数据分别得到了 6 189 个和 6 144 个基因。其中, 菌株在荧蒽诱导处理后共发现 3 522 个显著差异表达基因, 其中 1 919 个基因(31.01%)上调表达, 1 603 个基因(25.90%)下调表达。转录组中显著性差异表达基因的可视化火山图如图 1 所示。图 1 横坐标表示 2 个样品的差异倍数的对数值, 纵坐标表示 2 个样品的 FDR 的负 lg 值; 红色和绿色的点分别表示基因表达量显著上调和下调, 蓝色的点表示差异不显著, 显著性差异的判断标准为以 $FDR < 0.05$, 差异倍数在 2 倍以上为准。

2.3 铜绿假单胞菌株 DN1 转录组功能注释分析

Gene ontology (GO)分析是利用 GO 数据库对差异表达基因按照生物学过程(biological process)、

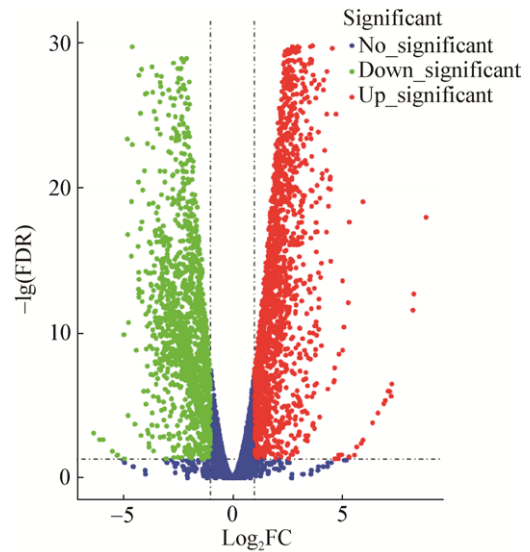


图 1 荧蒽与葡萄糖诱导后差异表达基因火山图

Figure 1 Volcano plot of differentially expressed genes induced by fluoranthene and glucose respectively

分子功能(molecular function)及细胞组分(cellular component)三大功能类别进行 GO 功能分类。为了获取到菌株 DN1 在荧蒽胁迫条件下转录组学完整的基因功能信息, 将实验组和对照组分析得到的差异基因进行了 GO 二级水平上功能富集分析, 共得到 2 333 个显著性差异表达基因, (其中显著性上调基因有 580 个, 下调基因有 1 803 个), 下调基因占 DEGs 的 77.3%, 说明荧蒽对细胞有很大的毒性, 会导致其代谢活性减弱。其中参与生物学过程、分子功能、细胞组分的比例分别为 39.95%、28.76%、31.29% (图 2)。

菌株 DN1 在降解荧蒽过程中, 参与底物识别、结合转运、酶催化活性及生物降解代谢过程的相关基因发生了显著性差异表达。整体上来说, 差异表达基因数量最多的两大类属于生物过程和细胞组分, 分别为 932 个和 730 个, 且差异表达基因主要归属于细胞过程(cellular progress)、代谢过程(metabolic process)、细胞(cell)、细胞组分(cell part)等功能分类, 分别有 292、278、233 和 223 个差异表达基因。此外, 分子功能类别之中变化最大的功能基因类别为催化活性(catalytic activity)、结合(binding), 分别含有 318、250 个差异表达基因。

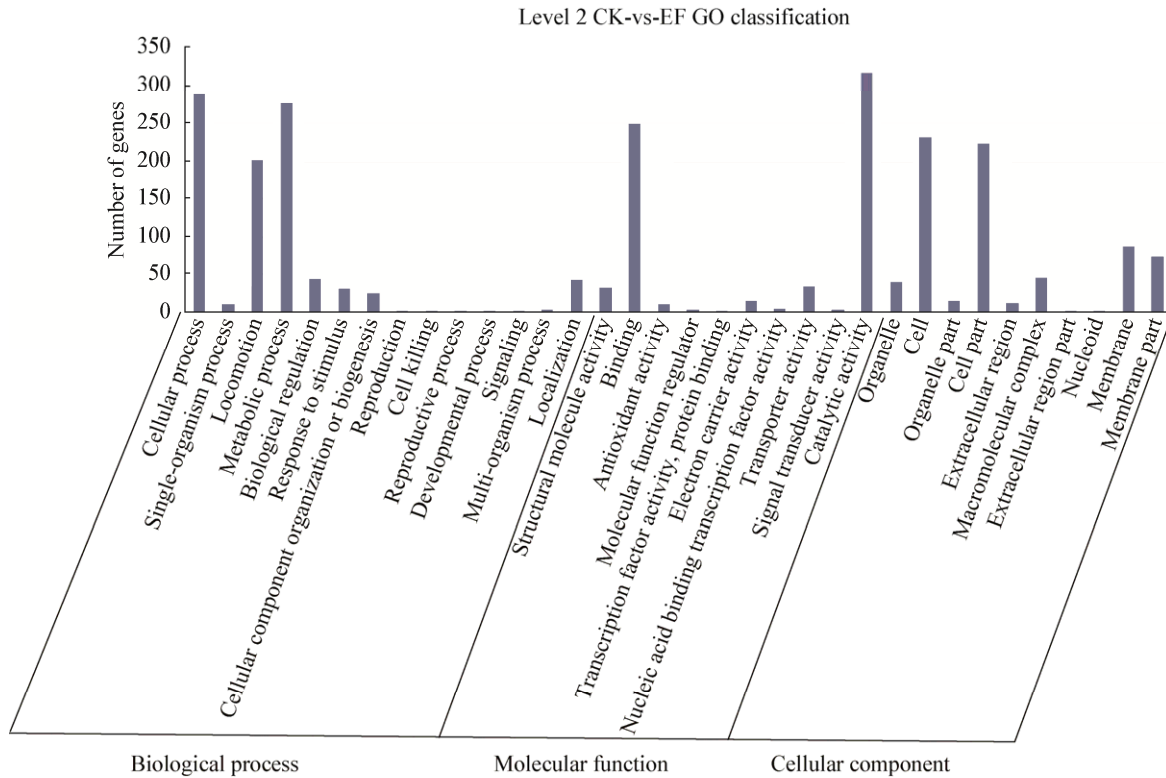


图 2 差异表达基因 GO 富集分析

Figure 2 GO enrichment results of differentially expressed genes

进一步分析“细胞过程”这个功能类别的相关差异表达基因，发现这些差异基因上调表达量超过 8 倍的基因转录本主要归类于膜转运(membrane transport)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)、其他氨基酸代谢(metabolism of other amino acids)、能量代谢(energy metabolism)、辅助因子和维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins)等相关过程(表 2)。这些过程中的差异基因可能密切参与了菌株 DN1 降解茆蕈过程中底物识别、底物转运、信号转运以及生物降解等生理过程。

详细分析“细胞组分”这个功能类别的相关差异表达基因，获悉这些差异表达基因的功能主要集中在膜转运(membrane transport)、能量代谢(energy metabolism)、信号转导(signal transduction)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)等相关过程。其中，在上调的 40 个“细

胞组分”转录本中有 14 个转录本归类于“膜转运”，而且表达量高于 8 倍以上的基因主要为“膜转运”基因(表 2)，这个结果表明菌株 DN1 在降解茆蕈的过程中，细胞组分中一些参与膜转运的基因可能会发挥其作用，参与茆蕈的识别，协助茆蕈跨膜转运，进而完成降解作用。

2.4 差异表达基因 KEGG pathway 富集分析

对菌株 DN1 转录组的差异表达基因进行 KEGG 代谢途径分析，以进一步了解这些基因可能参与的生物学过程。分析结果显示，共有 1 918 个差异表达基因匹配到了 112 个 KEGG 代谢途径。主要分为四大类别：遗传信息处理(genetic information processing)、环境信息处理(environmental information processing)、细胞过程(cellular processes)、代谢(metabolism)。在 KEGG 注释信息中，1 408 个基因注释到 Metabolism pathway，约占总差异基因的 73.4% (图 3 所示)，其中分别有 269 个

表 2 部分表达量变化超过 8 倍的上调表达基因数据分析

Table 2 Statistics analysis of some different genes expression level beyond 8 times

Main class	Gene ID	Expression difference using Log ₂ ratio	KEGG pathway	KEGG ID
Cellular process	BG483_RS25255	5.026 776 494	—	—
	BG483_RS18640	4.674 491 400	Membrane transport	K03227
	BG483_RS12905	3.822 162 841	Metabolism of other amino acids	K06163
	BG483_RS30820	3.501 592 104	—	—
	BG483_RS24070	3.496 614 276	Membrane transport	K02460
	BG483_RS03855	3.471 566 862	—	—
	BG483_RS05110	3.460 362 137	Amino acid metabolism	K01953
	BG483_RS28200	3.382 398 426	—	—
	BG483_RS18175	3.229 306 461	Energy metabolism	K00362
	BG483_RS12915	3.223 861 296	Metabolism of other amino acids	K06165
Metabolic process	BG483_RS18610	3.197 312 788	Membrane transport	K04058
	BG483_RS03860	5.612 810 047	—	—
	BG483_RS25255	5.026 776 494	—	—
	BG483_RS12905	3.822 162 841	Metabolism of other amino acids	K06163
	BG483_RS30820	3.501 592 104	—	—
	BG483_RS03855	3.471 566 862	—	—
	BG483_RS05110	3.460 362 137	Amino acid metabolism	K01953
	BG483_RS11205	3.422 734 74	—	—
	BG483_RS28200	3.382 398 426	—	—
	BG483_RS18175	3.229 306 461	Energy metabolism	K00362
Cell part	BG483_RS12915	3.223 861 296	Metabolism of other amino acids	K06165
	BG483_RS03870	3.196 715 274	—	—
	BG483_RS06855	3.114 692 039	Amino acid metabolism; Global and overview	K00836
	BG483_RS18590	5.666 837 645	—	—
	BG483_RS06095	4.087 070 697	—	—
	BG483_RS30820	3.501 592 104	—	—
	BG483_RS24070	3.496 614 276	Membrane transport	K02460
	BG483_RS04965	3.437 411 344	Membrane transport	K13893
	BG483_RS28200	3.382 398 426	—	—
	BG483_RS18610	3.197 312 788	Membrane transport	K04058
Metabolic process	BG483_RS03860	5.612 810 047	—	—
	BG483_RS25255	5.026 776 494	—	—
	BG483_RS00650	4.468 132 403	—	—
	BG483_RS03810	4.312 940 401	Metabolism of terpenoids and polyketides	K12241
	BG483_RS12905	3.822 162 841	Metabolism of other amino acids	K06163
	BG483_RS30820	3.501 592 104	—	—
	BG483_RS03855	3.471 566 862	—	—
	BG483_RS05110	3.460 362 137	Amino acid metabolism	K01953
	BG483_RS11205	3.422 734 74	—	—
	BG483_RS16960	3.304 509 029	—	—
	BG483_RS18175	3.229 306 461	Energy metabolism	K00362
	BG483_RS12915	3.223 861 296	Metabolism of other amino acids	K06165
	BG483_RS03870	3.196 715 274	—	—
BG483_RS06855	3.114 692 039	Amino acid metabolism; Global and overview	K00836	

Note: —: None.

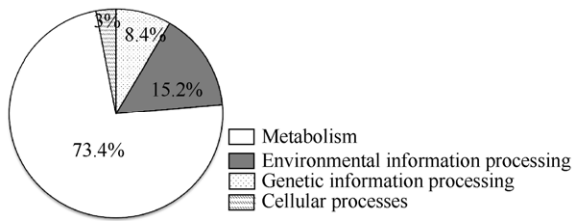


图3 KEGG 一级分类

Figure 3 KEGG classification in A class

基因属于“Global and overview”和“Amino acid metabolism”(图4所示),在所有分类中所占比例最高,约占1918个功能基因中的14.03%;其次,“Carbohydrate metabolism”、“Membrane transport”、“Metabolism of cofactors and vitamins”在总功能基因数中所占比例次之,分别为252个(13.14%)、190个(9.91%)、121个(6.31%)。

菌株DN1中含有317个基因参与了碳水化合物代谢及含有苯环结构异源生物质的生物降解,如图5所示,在Carbohydrate metabolism类别中,含有15条不同的代谢途径(图5A),Xenobiotics biodegradation and metabolism类别中,含有14条不同的代谢途径(图5B)。其中在Xenobiotics biodegradation and metabolism途径中,这些途径主要与苯环结构的代谢有关,包括:苯甲酸盐降解(benzoate degradation, ko00362)、多环芳烃降解

(polycyclic aromatic hydrocarbon degradation, ko00624)、氨基苯甲酸酯降解(aminobenzoate degradation, ko00627)、氟苯甲酸降解(fluorobenzoate degradation, ko00364)、甲苯降解(toluene degradation, ko00623)、二甲苯降解(xylene degradation, ko00622)、萘降解(naphthalene degradation, ko00626)和苯乙烯降解(styrene degradation, ko00643)等。这些降解途径与我们之前的研究结果大体一致,菌株DN1可以有效地降解多环芳烃类化合物,如蒽、芘、萘、菲^[13]。全基因组测序结果显示,菌株DN1含有100多个PAHs降解相关基因,包括多种双加氧酶及降解转运蛋白,气相色谱-质谱联用结果显示,菌株DN1降解蒽的第一步是通过在苯环上加氧而引发的^[15]。

此外,菌株DN1转录组的差异表达基因主要集中在ABC转运系统(ABC transporters, ko02010)、氨基酸生物合成(biosynthesis of amino acids, ko01230)、双组分系统(two-component system, ko02020)及碳代谢(carbon metabolism, ko01200),这些途径大多数参与了底物的识别转运、信号转导及基因表达调控。如图6所示,黑色柱形图表示差异基因在KEGG代谢通路中的所有显著性表达基因数量,带点的白色方框表示所有差异表达基因中

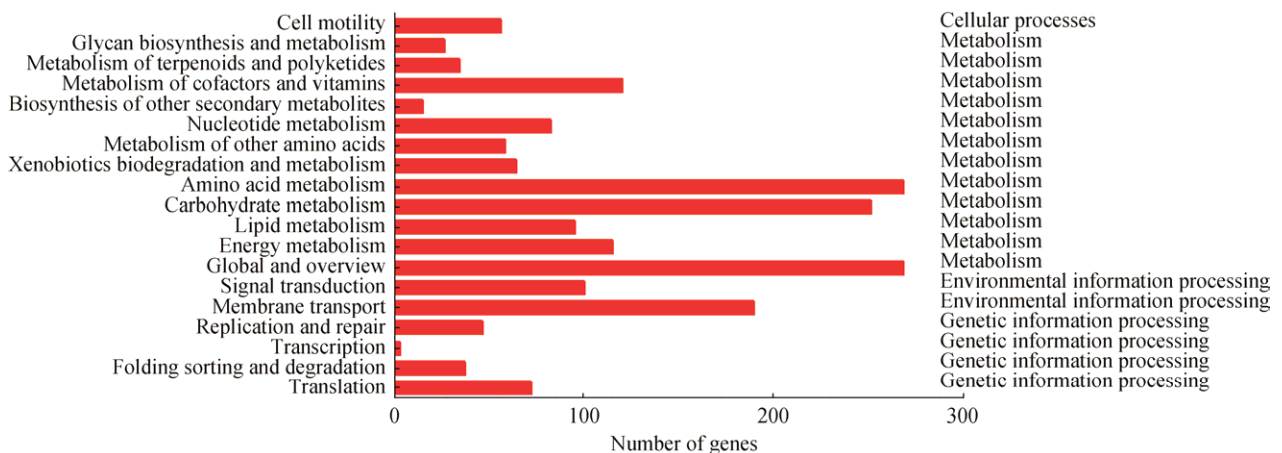


图4 差异表达基因 KEGG 二级分类

Figure 4 KEGG classification of differentially expressed genes in B class

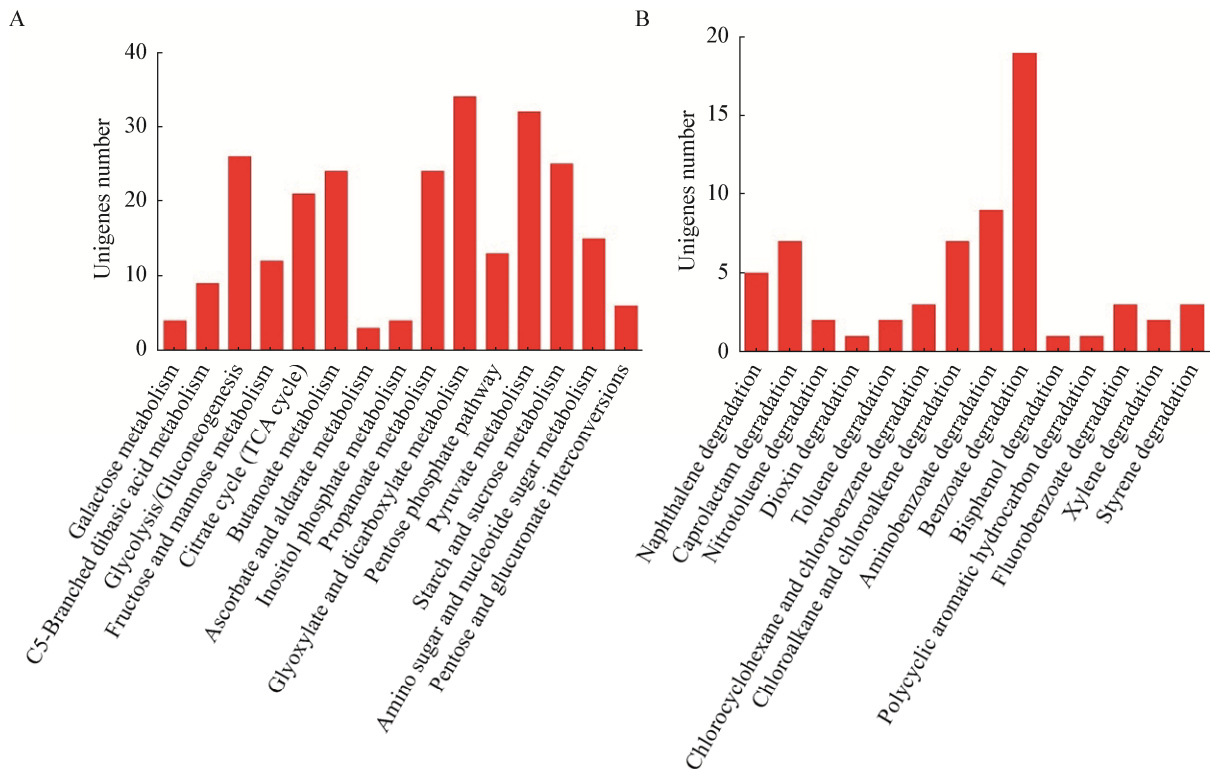


图 5 不同 KEGG pathways 基因富集分析

Figure 5 Gene enrichment analysis of different KEGG pathways

注: A: 碳水化合物代谢; B: 异源生物降解及代谢。

Note: A: Carbohydrate metabolism; B: Xenobiotics biodegradation and metabolism.

的显著性表达上调的基因数量。同时, 利用 KEGG 数据库比对分析到菌株 DN1 转录组数据中, 发现含有大量差异表达基因可能与多环芳烃的生物降解有关, 且其差异基因比例较高。例如: 129 个碳代谢基因中有 80 个基因发生显著性差异表达, 约占总数的 62.02%; 31 个芳烃降解基因中有 20 个基因发生显著性差异表达; 34 个苯甲酸降解基因中有 19 个基因显著性差异表达; 除此之外, 还有 9 个氨基苯甲酸酯降解基因, 5 个萘降解基因, 3 个氯环己烷及氯苯降解基因。这些参与芳香族化合物生物降解过程的差异表达基因, 在荧蒽诱导下发生显著性差异表达, 表现出对荧蒽的响应, 因此预测它们可能参与了荧蒽的生物降解途径。菌株 DN1 转录组中还发现有 11 个差异表达基因匹配到细菌趋化系统(bacterial chemotaxis, ko02030), 这些基因可能参与了荧蒽微生物降解过程中的底物响应。部分可能与菌株 DN1

降解荧蒽相关的差异表达基因如表 3 所示。

荧蒽胁迫条件下, DN1 菌株中双加氧酶基因及荧蒽降解过程中重要的代谢途径龙胆酸、苯甲酸、儿茶酚及原儿茶酸降解等的基因(簇)表达量普遍显著上调, 与这些代谢途径基因距离较近或处于同一基因簇的 ABC 转运系统蛋白表达量显著提高, 如: ABC 转运蛋白通透酶、磷酸盐 ABC 转运蛋白-底物结合蛋白、ABC 转运蛋白-ATP 结合蛋白等。与此同时, 转录组数据分析表明: 在荧蒽降解过程中, 趋化性蛋白及信号传导蛋白的表达量显著提高, 如 RS00950、RS00960 及 RS00965 编码的趋化蛋白 CheR、CheW、CheA, RS00940 及 RS32695 编码的趋化反应调节蛋白-谷氨酸甲酯酶和混合型传感组氨酸激酶/反应调节剂调节蛋白, 这些基因的显著性表达是对荧蒽胁迫条件的应答及信号传递。

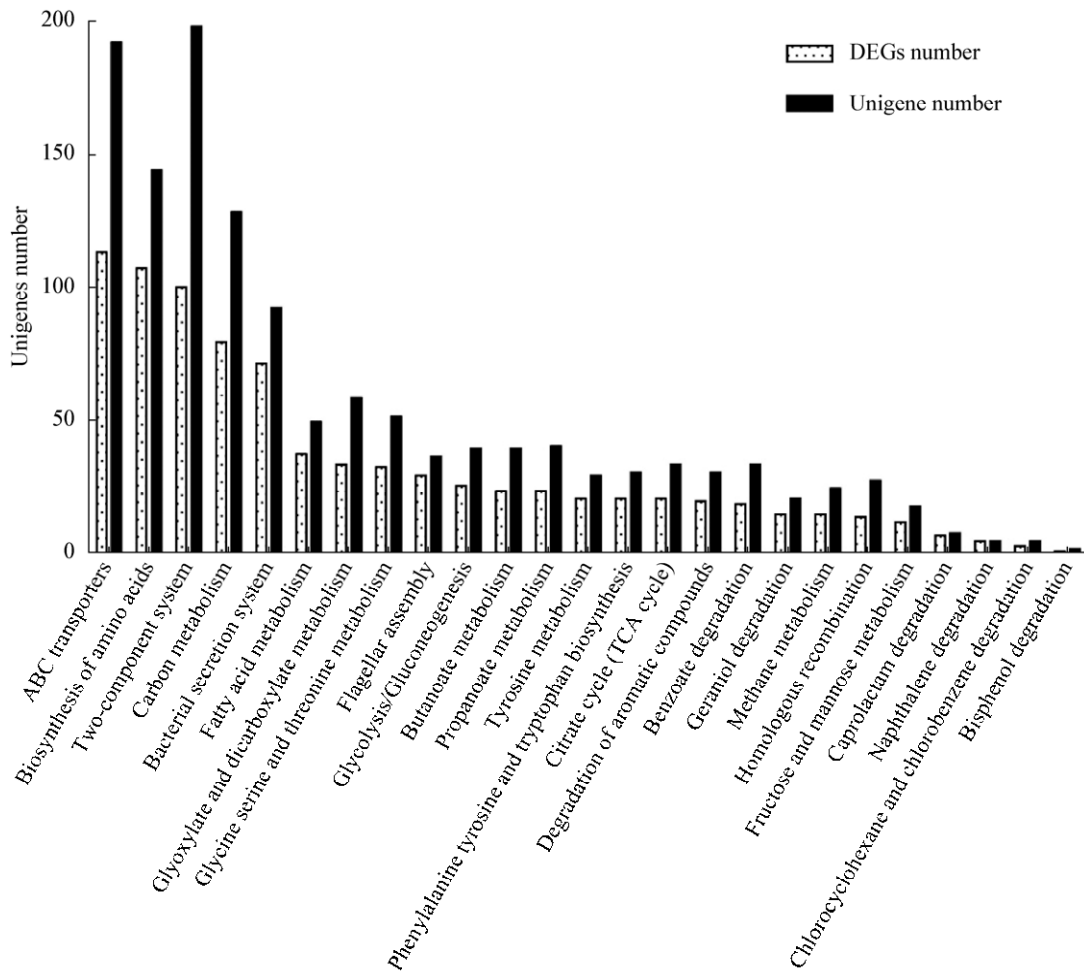


图 6 主要代谢通路中的基因表达及差异表达基因情况

Figure 6 The unigene number and differently expressed genes in primary KEGG pathway

3 讨论与结论

目前关于铜绿假单胞菌降解烃类化合物的报道已有很多,但从转录组水平对铜绿假单胞菌降解特性研究的报道还较少^[22-23]。本研究采用 Illumina HiSeq PE 150 高通量测序技术对正常培养组和荧蒽诱导组条件下菌株 DN1 进行转录组学测序,结果显示两组样品在转录组文库中的基因覆盖度均占 98% 以上,且能够比对到基因组上的匹配序列分别占有有效序列的 99.19% (葡萄糖条件)和 99.22% (荧蒽条件),其中完全匹配的序列(mapping ratio)分别为 82.34% 和 80.51%,而 Multiple matched reads 的比例较低,说明测序质量较好。

虽然铜绿假单胞菌株 DN1 已经完成了全基因组测序,但是各种烃类污染物胁迫条件下菌株 DN1 对其降解机制还不清楚。我们通过对葡萄糖和荧蒽处理条件下菌株 DN1 的转录组分析对比,发现有 3 522 个显著差异表达基因,其中 1 919 个基因上调表达,1 603 个基因下调表达,说明荧蒽胁迫条件下菌株 DN1 体内存在着较完整的适应系统,会启动一系列基因表达变化来适应这一过程,差异表达上调基因主要表现在参与底物识别、结合转运、酶催化活性及生物降解代谢过程等功能类别中。于红艳等^[12]比较了克雷白氏杆菌在正常培养和多环芳烃胁迫培养条件下 2 个样品的转录组数据,得到了 254 个差异表达基因,其中在多环芳烃作碳源时,有

表 3 菌株 DN1 转录组中部分与荧蒽降解有关的差异表达基因
Table 3 Prediction of genes involved in fluoranthene degradation

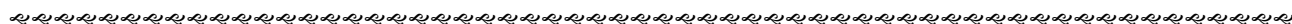
Gene ID	Gene length (bp)	Log ₂ FC	Up & Down	P-value	FDR	KEGG Pathway	Annotation
BG483_RS00835	720	1.031	076 58 Up	3.43E-06	7.20E-06	Benzoate degradation, Degradation of aromatic compounds	Protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit beta
BG483_RS01255	1 905	2.019	564 592 Up	1.98E-18	1.39E-17	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis, Phenylalanine metabolism	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
BG483_RS01265	855	2.401	643 608 Up	5.83E-16	3.19E-15	Biosynthesis of amino acids, Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	Shikimate dehydrogenase
BG483_RS01270	447	2.624	049 285 Up	3.99E-05	7.53E-05	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, Biosynthesis of amino acids	3-dehydroquinate dehydratase
BG483_RS01280	1 185	3.835	990 355 Up	2.56E-44	3.33E-42	Degradation of aromatic compounds, Benzoate degradation	4-hydroxybenzoate 3-monoxygenase
BG483_RS07030	1 257	1.729	866 809 Up	1.27E-18	9.05E-18	Glycine, serine and threonine metabolism, Methane metabolism...	Serine hydroxymethyltransferase
BG483_RS07190	1 062	1.545	688 669 Up	4.79E-11	1.58E-10	Tyrosine metabolism	Gentisate 1,2-dioxygenase
BG483_RS07205	645	2.130	074 362 Up	4.53E-13	1.82E-12	Styrene degradation, Tyrosine metabolism	Glutathione S-transferase
BG483_RS07215	1 335	1.899	689 222 Up	1.52E-21	1.43E-20	Styrene degradation, Tyrosine metabolism	Cytochrome P450
BG483_RS07375	933	-1.743	486 398 Down	9.40E-13	3.66E-12	Degradation of aromatic compounds, Benzoate degradation...	Catechol 1,2-dioxygenase
BG483_RS07410	1 395	-3.188	680 001 Down	6.35E-16	3.45E-15	Aminobenzoate degradation	Anthranilate 1,2-dioxygenase large subunit
BG483_RS07415	492	-2.142	131 92 Down	1.18E-11	4.14E-11	Aminobenzoate degradation	Anthranilate 1,2-dioxygenase small subunit
BG483_RS07420	1 023	-1.279	372 905 Down	1.58E-06	3.42E-06	Aminobenzoate degradation	Anthranilate dioxygenase reductase
BG483_RS07435	489	1.785	138 515 Up	5.47E-07	1.24E-06	Degradation of aromatic compounds, Benzoate degradation...	Benzoate 1,2-dioxygenase small subunit
BG483_RS07465	675	1.181	690 512 Up	9.28E-07	2.05E-06	Two-component system	DNA-binding response regulator
BG483_RS07485	3 111	1.494	048 484 Up	2.64E-06	5.61E-06	Two-component system	Resistance-nodulation-cell division (RND) efflux transporter
BG483_RS07490	3 132	1.278	898 07 Up	3.45E-05	6.55E-05	Two-component system	Resistance-nodulation-cell division (RND) efflux transporter
BG483_RS07520	1 125	1.319	427 761 Up	4.19E-11	1.40E-10	Valine, leucine and isoleucine degradation, Propanoate metabolism, Carbon metabolism...	Aminotransferase
BG483_RS07620	1 230	-3.730	142 846 Down	1.09E-17	7.07E-17	Valine, leucine and isoleucine degradation, Propanoate metabolism, Carbon metabolism...	Acyl-CoA dehydrogenase
BG483_RS08230	1 104	1.359	200 945 Up	7.14E-11	2.32E-10	ABC transporters	Spermidine/putrescine-binding protein
BG483_RS08245	957	2.974	392 638 Up	1.72E-29	3.55E-28	ABC transporters, Sulfur metabolism	Hypothetical protein
BG483_RS08250	987	2.069	319 072 Up	9.90E-16	5.29E-15	ABC transporters, Sulfur metabolism	Aliphatic sulfonate-binding protein
BG483_RS08540	372	2.874	011 605 Up	3.10E-05	5.90E-05	Two-component system	Carbon storage regulator
BG483_RS00940	1 050	2.823	812 513 Up	1.85E-27	3.08E-26	Bacterial chemotaxis, Two-component system	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase
BG483_RS00950	843	2.689	517 322 Up	2.05E-20	1.70E-19	Bacterial chemotaxis, Two-component system	Chemotaxis protein CheR
BG483_RS00960	486	1.140	496 008 Up	0.005	852 525	Bacterial chemotaxis, Two-component system	Chemotaxis protein CheW
BG483_RS00965	1 920	1.795	457 661 Up	5.50E-16	3.02E-15	Bacterial chemotaxis, Two-component system	Chemotaxis protein CheA
BG483_RS12800	1 158	1.306	371 189 Up	6.05E-10	1.79E-09	ABC transporters	Aliphatic amidase expression-regulating protein
BG483_RS12930	795	2.912	435 81 Up	7.78E-24	9.23E-23	ABC transporters	Phosphonate ABC transporter PhnE
BG483_RS12935	1 005	3.100	463 528 Up	4.23E-36	1.77E-34	ABC transporters	Phosphonate ABC transporter substrate-binding protein
BG483_RS12940	837	2.903	400 852 Up	1.06E-24	1.36E-23	ABC transporters	Phosphonate ABC transporter ATP-binding protein

73 个基因表达上调, 181 个基因表达下调。与芳烃胁迫条件下克雷白氏杆菌差异基因表达情况相比, 菌株 DN1 在荧蒹胁迫条件下得到的差异基因个数较多, 为了获得每个差异表达转录本潜在的代谢途径, 进一步将这些差异表达上调基因进行 KEGG 注释分析^[24], 得到了 112 条 KEGG 代谢途径, 分析发现这些代谢途径中的基因主要集中在 ABC 转运系统、氨基酸生物合成、双组分系统及碳代谢, 大多数参与了底物的识别转运、信号转导及基因表达调控。112 条 KEGG 代谢途径中有 1 408 个基因注释到“代谢途径”中, 约占总差异基因的 73.4%, 其中有 317 个基因参与了碳氢化合物代谢及含有苯环结构异源生物物质的生物降解。此外, 在这些差异表达基因中存在大量可能与 PAHs 降解有关的基因, 例如 80 个基因参与了碳代谢途径(ko01200), 20 个基因参与了多环芳烃化合物降解(ko00624), 19 个基因参与了苯甲酸降解(ko00362), 5 个基因参与了萘降解(ko00626)等, 暗示了菌株 DN1 降解荧蒹可能与这些途径有密切关系。之前的研究^[15]表明, 菌株在降解荧蒹的过程中, 主要是通过荧蒹的 C-1,2、C-2,3 或者 C-7,8 位置进行加氧反应促使苯环裂解。本研究中, 菌株 DN1 在荧蒹降解过程中重要的双加氧酶基因及代谢途径如龙胆酸、苯甲酸、儿茶酚及原儿茶酸降解等中的基因(簇)表达量普遍显著上调, 揭示了这些基因可能都参与了荧蒹的降解过程, 降解酶系统的酶蛋白编码基因可能是通过相互作用来完成这个复杂的降解过程^[15,25]。此外, 在转录组的差异表达基因中还有一部分是基因功能未知的假定蛋白, 这些基因可能参与了菌株 DN1 特定的荧蒹降解机制, 具体功能有待进一步探索。

REFERENCES

- [1] Shen GF, Tao S, Chen YC, et al. Emission characteristics for polycyclic aromatic hydrocarbons from solid fuels burned in domestic stoves in rural China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(24): 14485-14494
- [2] Gupta S, Pathak B, Fulekar MH. Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: a review[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2015, 14(2): 241-269
- [3] Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action[J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2005, 45(2/3): 106-114
- [4] Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK, et al. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1369
- [5] Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 169(1/3): 1-15
- [6] Kim YH, Engesser KH, Cerniglia CE. Two polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone reductases from a pyrene-degrading *Mycobacterium*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 416(2): 209-217
- [7] Song XH, Xu Y, Li GM, et al. Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(10): 2122-2128
- [8] Throne-Holst M, Wentzel A, Ellingsen TE, et al. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(10): 3327-3332
- [9] Gai ZH, Zhang ZZ, Wang XY, et al. Genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DQ8, an efficient degrader of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(22): 6304-6305
- [10] Patel PA, Kothari VV, Kothari CR, et al. Draft genome sequence of petroleum hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* strain PK6, isolated from the Saurashtra region of Gujarat, India[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(1): e00002-14
- [11] Gonçalves ER, Hara H, Miyazawa D, et al. Transcriptomic assessment of isozymes in the biphenyl pathway of *Rhodococcus* sp. strain RHA1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9): 6183-6193
- [12] Yu HY, Zhang XX, Chen HY, et al. Comparative transcriptomic analysis on *Klebsiella pneumoniae* Tzyx1 in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, 38(2): 689-695 (in Chinese)
于红艳, 张昕欣, 陈红云, 等. 利用比较转录组分析克雷白氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae* Tzyx1)降解多环芳烃特性[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(2): 689-695
- [13] Lu W, Luo N, Dong W, et al. Identification and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 in fluoranthene biodegradation[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(11): 3486-3492 (in Chinese)
路薇, 罗娜, 董文, 等. 一株降解荧蒹的铜绿假单胞菌的

- 筛选鉴定及其特性[J]. 环境科学学报, 2015, 35(11): 3486-3492
- [14] Dong W, He CQ, Li YP, et al. Complete genome sequence of a versatile hydrocarbon degrader, *Pseudomonas aeruginosa* DN1 isolated from petroleum-contaminated soil[J]. Gene Reports, 2017, 7: 123-126
- [15] He CQ, Li YP, Huang C, et al. Genome sequence and metabolic analysis of a fluoranthene-degrading strain *Pseudomonas aeruginosa* DN1[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 580-589
- [16] Kim D, Pertea G, Trapnell C, et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions[J]. Genome Biology, 2013, 14: R36
- [17] Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-Seq experiments with TopHat and Cufflinks[J]. Nature Protocols, 2012, 7(3): 562-578
- [18] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(S1): D480-D484
- [19] Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, et al. Gene ontology analysis for RNA-Seq: accounting for selection bias[J]. Genome Biology, 2010, 11: R14
- [20] Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq[J]. Bioinformatics, 2009, 25(9): 1105-1111
- [21] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data[J]. Genome Biology, 2010, 11(10): R106
- [22] Shukor MY, Hassan NAA, Jusoh AZ, et al. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* diesel-degrading strain from Antarctica[J]. Journal of Environmental Biology, 2009, 30(1): 1-6
- [23] Hua F, Wang H. Uptake modes of octadecane by *Pseudomonas* sp. DG17 and synthesis of biosurfactant[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 112(1): 25-37
- [24] Shang CH, Bi GC, Yuan ZH, et al. Discovery of genes for production of biofuels through transcriptome sequencing of *Dunaliella parva*[J]. Algal Research, 2016, 13: 318-326
- [25] Kweon O, Kim SJ, Jones RC, et al. A polyomic approach to elucidate the fluoranthene-degradative pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(13): 4635-4647



稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 我刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。