

张帆,袁媛,曾艳,等. 赤红球菌甲苯胁迫响应蛋白基因的克隆、生物信息学分析和表达变化研究[J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2022, 46(2): 140-146.

ZHANG Fan, YUAN Yuan, ZENG Yan, et al. The cloning, bioinformatic analysis and expression variation of a gene cloning toluene stress response protein in *Rhodococcus ruber* [J]. Journal of Jiangxi Normal University (Natural Science), 2022, 46(2): 140-146.

文章编号:1000-5862(2022)02-0140-07

赤红球菌甲苯胁迫响应蛋白基因的克隆、 生物信息学分析和表达变化研究

张帆,袁媛,曾艳,付薇,彭仁*

(江西师范大学生命科学学院,江西 南昌 330022)

摘要:从赤红球菌 SD3 中克隆了一个甲苯胁迫响应蛋白基因 *tsrp1*, 该基因长度为 417 bp, 在 GenBank 的登录号为 MK371001. 该基因编码的蛋白质 Tsrp1 由 138 个氨基酸残基组成, 理论分子量为 14.2 kDa, 理论等电点为 4.82, 不稳定系数为 18.68, 总平均疏水指数为 -0.154, 属于酸性稳定的亲水蛋白. Tsrp1 无信号肽和二硫键、无跨膜区、无保守结构域, 存在于细胞质中. 在 *R. ruber* SD3 中 Tsrp1 蛋白与 *R. rhodochrous*、*R. zopfii*、*R. pyridinivorans*、*R. hoagii*、*M. brevis* 和 *C. manganitolerans* 中的序列相似蛋白的相似性分别为 94.93%、71.29%、67.96%、44.58%、42.05% 和 35.00%. 通过分子对接发现 Tsrp1 与 c-di-GMP 存在相互作用. 在甲苯和苯酚胁迫下, 在赤红球菌 SD3 中 *tsrp1* 基因的表达分别为原来的 40.19 倍和 14.73 倍.

关键词:赤红球菌;有机溶剂胁迫;荧光定量 PCR;生物信息学

中图分类号:Q 89 **文献标志码:**A **DOI:**10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2022.02.05

0 引言

随着化妆品、医药、塑料、电子等领域的快速发展,排放的有机溶剂越来越多,对环境的污染逐渐加重,对人的健康以及其他生物的正常生长都有严重的负面影响.若男性长期在含有甲苯、苯等有机溶剂的环境中生活,则患前列腺癌的风险就会显著增加^[1];人们长期饮用被苯酚污染的水就会引起头晕、贫血、神经系统疾病甚至癌症等^[2].

红球菌属于放线菌目,是介于分枝杆菌(*Mycobacterium*)和诺卡氏菌(*Nocardia*)之间的一类好氧、G+C含量高的革兰氏阳性菌.一般来说,红球菌属可划分为4个或6个分支^[3],其中一些菌株含有多种水解酶、合成酶,在生物降解、生物催化、生物合成等领域中具有广泛的应用价值^[4-7].如赤红球菌能够降解苯酚、四氢呋喃、萘等,合成丙烯酸酰胺,产红色素,且具有一定的有机溶剂耐受性^[5-13].

通常有机溶剂等一些有机化合物对微生物会产

生毒害,然而微生物能够对这些有机化合物的胁迫做出响应,抵抗它们的毒害作用.常见的响应机制包括利用细胞内代谢来降解和转化有机溶剂;通过上调分子伴侣的表达来协助蛋白的正确折叠;通过外排泵将有机化合物及时排出细胞外;降低细胞膜的流动性和表面疏水性;降低细胞比表面积;加强外膜囊泡的外排作用^[14].

本实验室已分离得到赤红球菌 SD3 (*R. ruber* SD3) 菌株,该菌株可降解一些有机污染物,并在生物修复领域中具有应用价值^[15].此外,本实验室还进行了赤红球菌 SD3 的定量蛋白质组学研究,组学研究结果表明:在甲苯胁迫下,有一个功能未表征的蛋白上调倍数最高,达到 3.34 倍^[13],该蛋白被命名为甲苯胁迫响应蛋白 1 (Tsrp1).为了进一步研究 Tsrp1,本文对 *tsrp1* 基因进行 TA 克隆,然后对 Tsrp1 蛋白进行了生物信息学分析.此外,利用 qPCR 比较了 *tsrp1* 基因在甲苯和苯酚胁迫下的表达变化情况,以期对赤红球菌的有机溶剂胁迫响应机制解析以及 Tsrp1 的功能研究奠定基础.

收稿日期:2021-10-18

基金项目:国家自然科学基金(31960011)和江西省研究生创新专项资金(YC2020-S185)资助项目.

通信作者:彭仁(1972—),男,江西丰城人,教授,博士,主要从事微生物生物化学研究. E-mail:renpeng@jxnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

R. ruber SD3 保存于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CCTCC NO:M 2012035。

1.2 方法

1.2.1 *R. ruber* SD3 基因组 DNA 的提取 挑取 *R. ruber* SD3 单菌落至 50 mL LB 液体培养基中,于 35 ℃、180 r·min⁻¹ 条件下震荡培养 48~60 h,即得 *R. ruber* SD3 种子液。取 1 mL *R. ruber* SD3 种子液接种至 50 mL LB 液体培养基中,于 35 ℃、180 r·min⁻¹ 条件下震荡培养至 *O*_{D600 nm} 值为 1.0,即得培养液。利用 TIANamp bacteria DNA Kit(购自 Tiangen 公司)从 *R. ruber* SD3 培养液中提取基因组 DNA。提取后的基因组 DNA 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.2 在 *R. ruber* SD3 中 *tsrp1* 基因的 TA 克隆 以提取的 *R. ruber* SD3 基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增 *tsrp1* 基因。其中 *tsrp1* 基因扩增的正向引物和反向引物序列分别为 CGCGGATCCATGACCACCGC-CAAGACCC-3' (*Bam*H I) 和 5'-CCGGAATTCCTTGAGGAGATCGCGGCG-3' (*Eco*R I),横线处分别为 *Bam*H I 和 *Eco*R I 的酶切位点。在 PCR 体系中含有基因组 DNA 1.0 μL、GoTaq® Green Master Mix 12.5 μL、正向引物和反向引物各 1.0 μL、ddH₂O 9.5 μL。PCR 扩增程序为 94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,61 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,设置 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。在 PCR 扩增结束后,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。利用纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化,然后与 pESI-T 载体连接后以热激法转化至 *E. coli* TOP10 感受态细胞中,挑取阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.3 赤红球菌 *Tsrp1* 的生物信息学分析 根据核酸序列,得到 *Tsrp1* 的蛋白质序列。通过 ProtParam 在线网站 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 *Tsrp1* 的基本理化性质进行分析;利用 SignalP-5.0 Server 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测 *Tsrp1* 蛋白是否存在信号肽;使用 PredictProtein 软件 (<https://www.predictprotein.org/>)

预测 *Tsrp1* 序列中二硫键的位置;利用 PSORT 软件 (<http://psort1.hgc.jp/form.html>) 进行 *Tsrp1* 蛋白的亚细胞定位分析。通过 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测在 *Tsrp1* 中是否存在跨膜区域;采用 NCBI 中的 Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>) 分析在 *Tsrp1* 中含有何种保守结构域^[15];使用 Clustal Omega 进行多序列比对^[16];登录 psipred 在线网站 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>),预测 *Tsrp1* 的 2 级结构^[17];通过 I-TASSER 在线网站 (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 预测 *Tsrp1* 的 3 级结构^[18]。利用 Autodock 软件将 *Tsrp1* 蛋白与 c-di-GMP 进行分子对接^[19]。

1.2.4 *R. ruber* SD3 在甲苯和苯酚胁迫下 *tsrp1* 基因的表达变化 向 50 mL LB 液体培养基中加入 1 mL 种子液,同时分别加入体积分数为 0.2% 的甲苯及质量分数为 0.08% 的苯酚。在 35 ℃、200 r·min⁻¹ 的恒温摇床中培养 24 h,离心收集菌体。

采用硅基质吸附柱法从菌体中抽提 RNA。采用 HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit(cDNA 一链合成试剂盒)对提取的 RNA 进行逆转录,反应体系见表 1,反应条件为 25 ℃ 5 min、50 ℃ 15 min、85 ℃ 下处理 5 min 使酶失活。

表 1 逆转录反应体系

试剂	用量
2 × RT Mix	10 μL
HiScript Enzyme Mix	2 μL
Oligo (dT) 18	1 μL
Random hexamers	1 μL
Total RNA	1 μg
Rnase free ddH ₂ O	加至 20 μL

R. ruber SD3 在甲苯和苯酚胁迫下 *tsrp1* 基因的表达变化用荧光定量 PCR 进行分析。荧光定量 PCR 体系为 2 × SYBR Green Mix 5 μL、正向引物和反向引物各加 0.5 μL、cDNA 2 μL,最后用 ddH₂O 定容至 10 μL。荧光定量 PCR 程序为 95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火和延伸 30 s,反应 40 个循环。用于 qPCR 的引物序列如表 2 所示。所有样品重复 3 次,qPCR 结果采用 2^{-ΔΔCT} 法^[20] 进行分析。

表 2 用于 qPCR 的引物序列

Gene	Forward sequence(5'-3')	Reverse sequence(5'-3')
16Srrna	ACTGGGCGTAAAGAGYTCGT	CGCATTTACCGCTACAC
<i>tsrp1</i>	GCTCAGAAGATCGCCGAGTC	AGGTTGCCGCTCTGCTTG

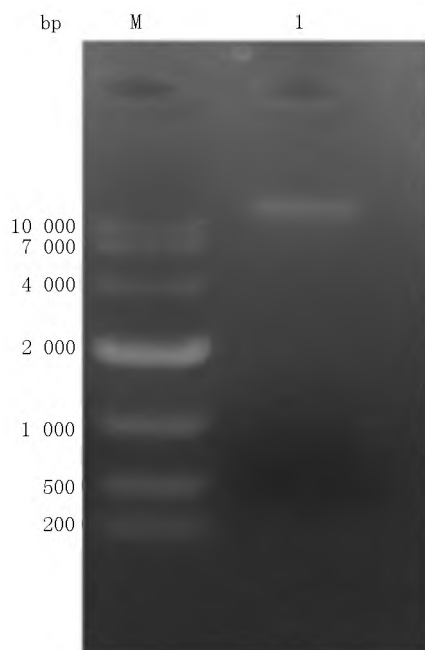
2 结果与分析

2.1 在 *R. ruber* SD3 中 *tsrp1* 基因的克隆

提取后的 *R. ruber* SD3 基因组 DNA 如图 1 所示,条带大小相符.在 TA 克隆过程中获得的阳性克隆进行菌液 PCR 鉴定,结果如图 2 所示.由图 2 可知:条带位于 250 ~ 500 bp 之间,与 *tsrp1* 基因的大小相符.

将转化成功的阳性克隆在 37 °C 振荡培养后,根据质粒小量抽提试剂盒(购自 Solarbio 公司)步骤提取重组质粒,用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行酶切鉴定,结果如图 3 所示.由图 3 可知:在酶切后出现 2 个条带,其中一个条带接近 2 000 bp,与 pESI-T 质粒的大小(1 865 bp)相符.另一个条带在 250 ~ 500 bp 之间,与 *tsrp1* 基因的大小(417 bp)相符.

将阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,获得 *tsrp1* 基因序列.将该基因序列提交 GenBank,登录号为 MK371001.



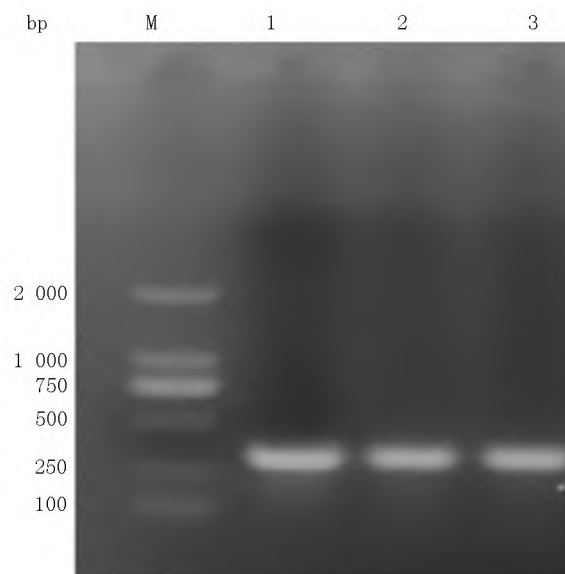
注:M 为 D2000 DNA Marker,1 为赤红球菌 SD3 基因组 DNA.

图 1 赤红球菌 SD3 基因组 DNA

2.2 Tsrp1 蛋白的生物信息学分析

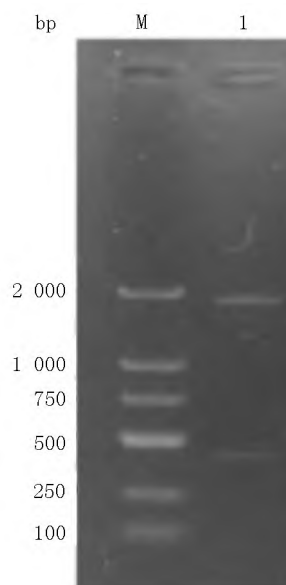
根据 *tsrp1* 基因序列确定 Tsrp1 蛋白质序列.Tsrp1 蛋白由 138 个氨基酸残基组成,分子式为 $C_{611}H_{1007}N_{171}O_{214}S_1$,理论分子量为 14.2 kDa,理论等电点为 4.82.带负电荷残基总数(Asp + Glu)有 19 个,带正电荷残基总数(Arg + Lys)有 15 个.该蛋白半衰期相对较长,在酵母细胞中大于 20 h,在大肠杆

菌中大于 10 h.经计算,该蛋白不稳定系数(the instability index (II))为 18.68 (< 40),由此推测 Tsrp1 蛋白稳定性较强.对 Tsrp1 蛋白进行亲/疏水性分析,结果表明该蛋白总平均疏水指数(grand average of hydropathicity, GRAVY)为 -0.154,这表明 Tsrp1 蛋白亲水性较强.在 ProtScale 网站上进行进一步分析,结果如图 4 所示.在 68 位谷氨酸处得分最低(-1.256),在第 95 位亮氨酸处得分最高(0.978).



注:M 为 D2000 DNA Marker,1 ~ 3 为菌液 PCR 鉴定.

图 2 阳性克隆的菌液 PCR 鉴定



注:M 为 D2000 DNA Marker,1 为双酶切鉴定.

图 3 阳性克隆的双酶切鉴定

Tsrp1 蛋白没有二硫键和信号肽,也没有跨膜区.亚细胞定位分析表明 Tsrp1 蛋白存在于细胞质中.NCBI 的 Conserved Domain 预测结果表明 Tsrp1 蛋白没有保守结构域.

在 NCBI 中搜索与 *R. ruber* SD3 中 Tsrp1 序列相似的蛋白,然后进行多序列比对,比对结果如图 5 所示.在 *R. ruber* SD3 中 Tsrp1 蛋白与 *R. rhodochrous*、*R. zopfii*、*R. pyridinivorans*、*R. hoagii*、*M. brevis*、*C. manginitolerans* 中的序列相似蛋白的相似性分别为 94.93%、71.29%、67.96%、44.58%、42.05%、35.00%,并且在这 7 种蛋白质中有 14 个氨基酸残基位点完全相同.

对 Tsrp1 蛋白二级结构进行预测(见图 6),该蛋白二级结构主要是 α -螺旋,占比为 81.85%.利用 I-TASSER 在线建模工具预测得到 Tsrp1 蛋白的

3 级结构模型如图 7 所示.该蛋白的 2 级结构和 3 级结构模型为功能研究奠定基础.

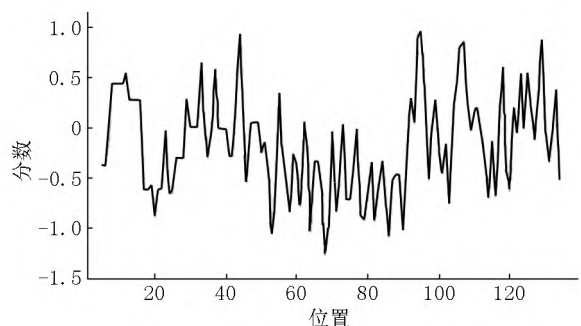


图4 Tsrp1 蛋白的亲/疏水性分析

<i>R. hoagii</i>	MA-----TQSTTTANANTT-----GAARTTAKTTLDGIESVT	33
<i>R. pyridinivorans</i>	MTAPT---KTTAAKATDAAAKATEAATKAAAEATATAQQSAEKLSTAAAVADKAATEFT	57
<i>R. zopfii</i>	MTTPKTPSA-----AKAATDAAAKAATDAT---DAAQKVAASATQAATRATEELS	47
<i>R. ruber</i>	MTTAKTPVDAVAKTTADAANKANEAATAKATADAT---AAAQKIAESATAAANQATAEFT	56
<i>R. rhodochrous</i>	MTTAKTPVDAVAKTTADTAKANEAATAKATADAT---AAAQKIAESATTAANQATAEFT	56
<i>M. brevis</i>	-----MSSS-NPIADATAVLT	15
<i>C. manginitolerans</i>	-----MVAQNTTGTKKTEIPT	16
	:	:
<i>R. hoagii</i>	KSPDENLGRVQSFNETFLDAAKLSGNLTLDTYEKALSSVLDNFNRSIATAAKFDWVATVVD	93
<i>R. pyridinivorans</i>	KTVDEATERFQEFNAKFVDAAKQSGNLGVDTYEKAVASSLLDLQEKVADATPVEWVADLAK	117
<i>R. zopfii</i>	KAVDDTTARVNDNFNGKIVDAAKQSGNLAVDTYEKTVFSLLDLQEKFAEATPVEWVADLAK	107
<i>R. ruber</i>	KALDDSAARLSEFNKVVDAAKQSGNLTVDTYERAVSSLLDLQEKLASASPIGWVEDLTK	116
<i>R. rhodochrous</i>	KALDESAARLSEFNKVVDAAKQSGNLTVDTYERAVTSLLDLQEDLASATPIAWVEDLTK	116
<i>M. brevis</i>	PNIEETAQRIRRELNEKLITAAKQSGNLTLDAYEKTLAGIVELETKVAGATQLDWISALAN	75
<i>C. manginitolerans</i>	VDFDAAAERIRSLNEQVIEQAKKQGNASLDWEKALQTVVDFEQKAAGASQLDFVKALTD	76
	.: .: ** .** *:***: :*: : * *: : :	
<i>R. hoagii</i>	AQTTLVQGLSAAATTAAREVLQ	115
<i>R. pyridinivorans</i>	AQVSFARELTTVTSTARDLLK	139
<i>R. zopfii</i>	AQVSFARELTTATTARDLLK	129
<i>R. ruber</i>	AQVSFARELTTATTTARDLLK	138
<i>R. rhodochrous</i>	AQVSFARELTTVTTTARDLLK	138
<i>M. brevis</i>	AHTSFVTEVSSAYVTAARDALK	97
<i>C. manginitolerans</i>	AHVNFTTSTSDAYLKAARELLK	98
	:..: : : : :: *: :	

注:*R. rhodochrous*、*R. zopfii*、*R. pyridinivorans*、*R. hoagii*、*M. brevis*、*C. manginitolerans* 的 Tsrp1 序列相似的蛋白在 NCBI 中的序列号分别为 OOL29969、WP_072813063、WP_019289712、NKZ90064、WP_066906770、WP_153505852.

图5 *R. ruber* SD3 的 Tsrp1 与其他物种序列相似蛋白的多重序列比对



图6 Tsrp1 蛋白的 2 级结构预测



图7 Tsrp1 蛋白的 3 级结构预测

对 Tsrp1 蛋白及 c-di-GMP 小分子进行能量优

化、加氢、加力场,根据计算机模拟空腔位点的算法,分子对接模拟结果如图 8 所示.对接结果打分表明 -CDOCKER_ENERGY 为 2.031 4, -CDOCKER_INTERACTION_ENERGY 为 44.235 4.这说明小分子化合物能够与蛋白较好地结合.从图 9 可以看出:c-di-GMP 小分子能够与 Tsrp1 蛋白中的氨基酸残基 Thr 15、Asp 18、Ala 44、Thr 45、Gln 99 形成稳定的分子间氢键作用力,结合较为牢固;它还能够与 Tsrp1 蛋白中的氨基酸残基 Val 12、Ala 41、Ala 44、Ala 48、Ala 51、Tyr 88、Val 92、Leu 96 形成共轭作用力,共同维持 2 者之间的结合稳定性.

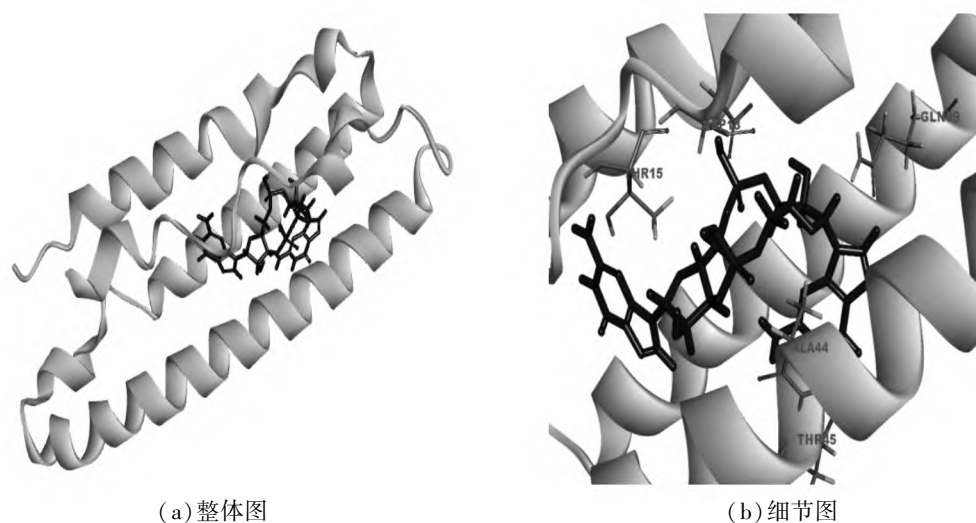


图8 c-di-GMP对接 Tsrp1 的3维模式整体图

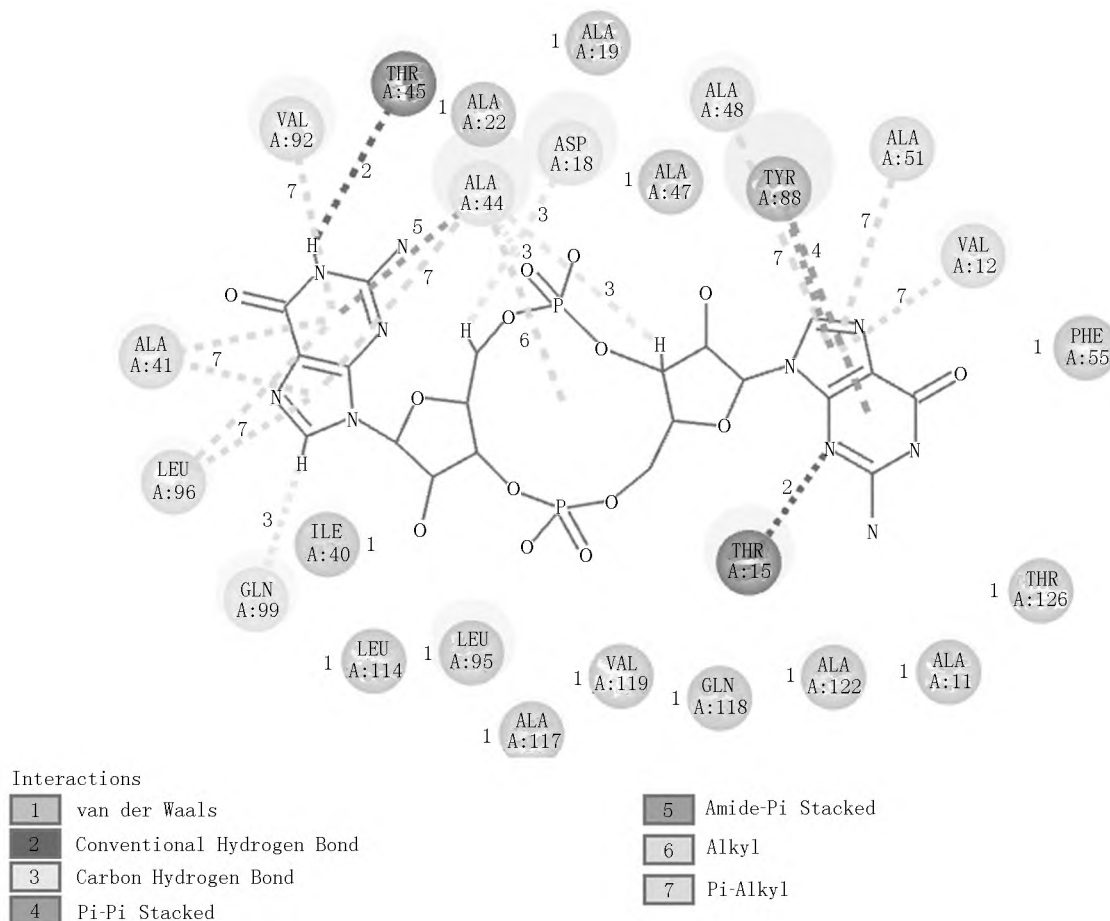


图9 c-di-GMP对接 Tsrp1 的2维模式图

2.3 *R. ruber* SD3 中 *tsrp1* 基因在甲苯和苯酚胁迫下的表达

为了探明 *tsrp1* 与 *R. ruber* SD3 有机溶剂耐受性之间的关系,本文利用荧光定量 PCR 方法研究了在甲苯和苯酚胁迫下 *R. ruber* SD3 中 *tsrp1* 基因表达变化情况。

图10表明:与野生型对照组相比,在体积分数

为0.2%的甲苯胁迫下 *tsrp1* 基因的 mRNA 相对表达量为原来的40.19倍 ($P < 0.01$),在质量分数为0.08%的苯酚胁迫下 *tsrp1* 基因的 mRNA 相对表达量为原来的14.73倍 ($P < 0.001$).这说明 Tsrp1 蛋白与 *R. ruber* SD3 对于甲苯和苯酚的胁迫响应之间存在密切联系。

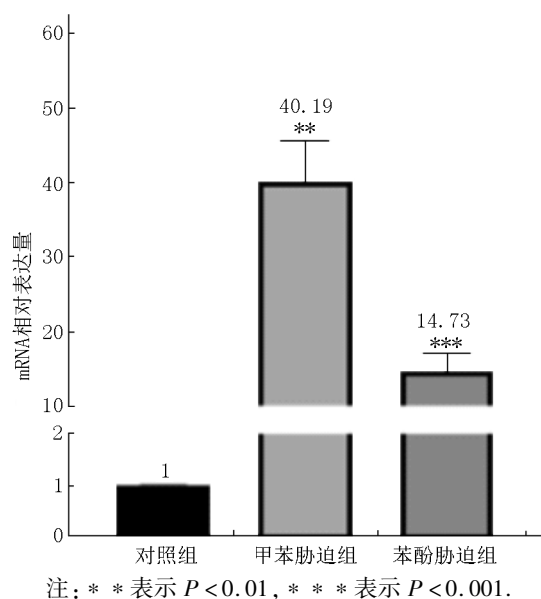


图10 在甲苯和苯酚胁迫下 *R. ruber* SD3 中 *tsrp1* 基因的表达变化情况

3 讨论

近年来,人们越来越重视有机溶剂引起的环境污染问题,对于这类污染物质的治理方法通常有物理法、化学法和生物法。物理法通常是采用吸附、萃取等物理作用来去除污染物质,而化学法是通过催化作用来消除或降低污染物质的毒害作用。生物法相对于物理法和化学法来说具有经济、耗能少、处理效率高、处理量大、无2次污染等优点,是目前在污染治理中应用较为广泛的处理技术之一。迄今为止,国内外科研工作者筛选得到了一些能够降解有机溶剂的微生物,其中包括 *P. putida* KF715^[21]、*P. fluorescens* S613^[22]、*R. equi*^[23]、*R. rhodochrous* RPK1^[24]、厌氧反硝化菌群^[25]等。当微生物在处理有机溶剂时,就会引起胁迫响应,造成一些基因表达的变化。如 S. Basak 等^[26]发现在有机溶剂胁迫下,大肠杆菌突变体的 *manXYZ* 膜保护基因表达上调,但具体机制有待解析。Fan Xin 等^[27]报道赤红球菌 SD3 在甲苯和苯酚胁迫下, *DnaK* 的表达分别上调了 29.87 倍和 3.93 倍。当 *R. anatipestifer* RA-GD 菌株暴露在有机溶剂中时,一种 ABC 外排泵——*RIA_1614*——也会发生显著上调^[28]。笔者发现:赤红球菌 SD3 在苯酚和甲苯胁迫下, *tsrp1* 基因表达量发生显著上调。然而 *Tsrp1* 是一种没有保守结构域的蛋白质,在 NCBI 和 Uniprot 数据库中均未阐述它的生物学功能。本文通过研究分子对接发现 *Tsrp1* 与 c-di-GMP 存在相互作用。c-di-GMP 是在细菌中普遍存在的第二信使,能够调节一系列细胞功能,包括生物膜形

成、运动性、毒性和其他多种生理过程。c-di-GMP 与效应蛋白或核糖开关结合可以调节细菌的多种生理活动^[29]。因此,笔者认为 *Tsrp1* 可能作为 c-di-GMP 的效应蛋白在赤红球菌 SD3 的有机溶剂耐受性方面发挥作用。

4 参考文献

- [1] AUDREY B L, SAUVÉ J F, PARENT M E. Occupational exposure to benzene, toluene, xylene and styrene and risk of prostate cancer in a population-based study [J]. *Occupational and Environmental Medicine*, 2018, 75(8): 562-572.
- [2] 曾琦斐, 陈科. 水中苯酚含量测定方法研究进展 [J]. *辽宁化工*, 2018, 47(1): 73-76.
- [3] ZHAO Guozhen, LI Jie, ZHU Wenyong, et al. *Rhodococcus artemisiae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the pharmaceutical plant *Artemisia annua* L [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(4): 900-905.
- [4] DELORENZO D M, ROTTINGHAUS A G, HENSON W R, et al. Molecular toolkit for gene expression control and genome modification in *Rhodococcus opacus* PD630 [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7: 727-738.
- [5] 祝玉洪, 刘龙, 周景文, 等. 不透明红球菌转化合成 α -酮异己酸的培养条件优化 [J]. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(4): 553-557.
- [6] YAMAMURA E T. Bioconversion of pyridoxine to pyridoxamine through pyridoxal using a *Rhodococcus* expression system [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2019, 127(1): 79-84.
- [7] BELL K S, PHILP J C, AW D W J, et al. The genus *Rhodococcus* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 85(2): 195-210.
- [8] ZHAO Tiantao, GAO Yanhui, YU Tiantian, et al. Biodegradation of phenol by a highly tolerant strain *Rhodococcus ruber* C1; biochemical characterization and comparative genome analysis [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 208: 111709.
- [9] HUANG Hui, LIU Minbo, LIU Yiming, et al. Thiamine-mediated cooperation between auxotrophic *Rhodococcus ruber* ZM07 and *Escherichia coli* K12 drives efficient tetrahydrofuran degradation [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 594052.
- [10] WANG Zhenglong, SUN Ying, LI Xiaodan, et al. A novel acetaldehyde dehydrogenase with salicylaldehyde dehydrogenase activity from *Rhodococcus ruber* strain OA1 [J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(12): 1401-1410.
- [11] JIAO Song, LI Fulong, YU Huimin, et al. Advances in acrylamide bioproduction catalyzed with *Rhodococcus* cells harboring nitrile hydratase [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(3): 1001-1012.
- [12] 陈红爽, 张孟阳, 王丽娟, 等. 紫外线等离子体复合诱变

- 赤红球菌提高红色素产量 [J]. 食品研究与开发, 2019, 40(6):46-51.
- [13] KUANG Sufang, FAN Xin, PENG Ren. Quantitative proteomic analysis of *Rhodococcus ruber* responsive to organic solvents [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2018, 32(6):1418-1430.
- [14] SARDESSAI Y, BHOSLE S. Tolerance of bacteria to organic solvents [J]. Research in Microbiology, 2002, 153(5):263-268.
- [15] LU Shennan, WANG Jiyao, CHITSAZ F, et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020 [J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(D1):D265-D268.
- [16] SIEVERS F, HIGGINS D G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences [J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1079:105-116.
- [17] JONES D T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 292(2):195-202.
- [18] YANG Jianyi, YAN Renxiang, ROY A, et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction [J]. Nature Methods, 2015, 12(1):7-8.
- [19] SEELIGER D, DE GROOT B L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina [J]. Journal of Computer - Aided Molecular Design, 2010, 24(5):417-422.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [21] SUENAGA H, YAMAZOE A, HOSOYAMA A, et al. Complete genome sequence of the polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Pseudomonas putida* KF715 (NBRC 110667) isolated from biphenyl-contaminated soil [J]. Genome Announc, 2017, 5(7):e01624-16.
- [22] WANG Dongping, HAN C S, DICHOSA A E K, et al. Draft genome sequence of *Pseudomonas putida* strain S610, a seed-borne bacterium of wheat [J]. Genome Announc, 2013, 1(6):e01048.
- [23] ALTAEE N, EI-HITI G A, FAHDIL A, et al. Screening and evaluation of poly(3-hydroxybutyrate) with *Rhodococcus equi* using different carbon sources [J]. Arabian Journal for Science and Engineering, 2017, 42:2371-2379.
- [24] WATCHARAKUL S, RÖTHER W, BIRKE J, et al. Biochemical and spectroscopic characterization of purified Latex Clearing Protein (Lcp) from newly isolated rubber degrading *Rhodococcus rhodochrous* strain RPK1 reveals novel properties of Lcp [J]. BMC Microbiol, 2016, 16:92.
- [25] 王迪, 王国英, 李亚男, 等. 焦化土壤中降解苯酚的厌氧反硝化菌群结构 [J]. 环境科学与技术, 2018, 41(8):6-10.
- [26] BASAK S, GHOSH S K, PUNETHA V D, et al. An experimental modeling of trinomial bioengineering-crp, rDNA, and transporter engineering within single cell factory for maximizing two-phase bioreduction [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95:818-825.
- [27] FAN Xin, YUAN Yuan, ZHANG Fan, et al. Expression, rapid purification and functional analysis of DnaK from *Rhodococcus ruber* [J]. Protein and Peptide Letters, 2021, 28(9):1023-1032.
- [28] LI Shengdou, CHEN Qiwen, GONG Xiaowei, et al. RanB, a putative ABC-type multidrug efflux transporter contributes to aminoglycosides resistance and organic solvents tolerance in *Riemerella anatipestifer* [J]. Vet Microbiol, 2020, 243:108641.
- [29] 袁媛, 彭仁. 环二鸟苷酸对细菌运动调控的研究进展 [J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2020, 44(2):182-189.

The Cloning, Bioinformatic Analysis and Expression Variation of a Gene Cloning Toluene Stress Response Protein in *Rhodococcus ruber*

ZHANG Fan, YUAN Yuan, ZENG Yan, FU Wei, PENG Ren*

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

Abstract: Agene of *tsrp1* encoding toluene stress response protein is cloned from *Rhodococcus ruber* SD3. The length of the gene is 417 bp with the accession number of MK371001 in GenBank. It encodes a protein of 138 amino acid residues with an estimated molecular weight of 14. 2 kD and an isoelectric point of 4. 82. It also has a instability index of 18. 68 and a grand average of hydropathicity of -0. 154, and thus it is acidic, stable and hydrophilic protein. The protein has no signal peptide, disulfide bonds and conservative domain. It exists in the cytoplasm. Tsrp1 in *Rhodococcus ruber* SD3 has a similarity of 94. 93%, 71. 29%, 67. 96%, 44. 58%, 42. 05% and 35. 00% with sequence similar proteins in *R. rhodochrous*, *R. zopfii*, *R. pyridinivorans*, *R. hoagii*, *M. brevis* and *C. manganitolentans*, respectively. Tsrp1 is found to interact with c-di-GMP by molecular docking. The expression of *tsrp1* gene has an increase of 40. 19 folds and 14. 73 folds under toluene and phenol stress, respectively.

Key words: *Rhodococcus ruber*; organic solvents stress; fluorescence quantitative PCR; bioinformatics

(责任编辑:刘显亮)