

研究报告

积磷小月菌调控蛋白 Mlp21700 的异源表达及其与多聚磷酸盐(Poly-P)代谢基因启动子的结合

钟传青¹ 王静¹ 宗工理² 姜天翼¹ 曹广祥^{2*}

(1. 山东建筑大学市政与环境工程学院 山东 济南 250101)

(2. 山东省医学科学院山东省医药生物技术研究中心 山东 济南 250062)

摘要:【背景】积磷小月菌(*Microlunatus phosphovorus*)是重要的聚磷微生物, 在好氧条件下积累聚磷酸盐并在厌氧条件分解聚磷酸盐, 这个过程可能受到精细的基因调控。【目的】利用凝胶迁移实验(EMSA)分析调控蛋白 Mlp21700 结合的多聚磷酸盐(Poly-P)代谢基因启动子, 找到 Mlp21700 可能的调控靶点。【方法】以积磷小月菌 JN459 菌株的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 Mlp21700 编码序列, 构建重组质粒 pET28a-21700 并转化到大肠杆菌 *Transetta*(DE3)菌株, 诱导表达后采用非变性方法纯化获得 Mlp21700 融合蛋白。利用 PCR 方法分别扩增各个 Poly-P 代谢基因的启动子, 用生物素标记后作为探针。采用 EMSA 分析 Mlp21700 在试验条件下是否结合启动子以及结合强度。【结果】DNA 测序和酶切验证表明 pET28a-21700 携带正确的 Mlp21700 编码序列。SDS-PAGE 分析显示试验条件下 *Transetta*(DE3)菌株大量表达可溶性 Mlp21700, 纯化的重组 Mlp21700 蛋白纯度大于 90%, 含量为 0.64 mg/mL。EMSA 分析表明在试验条件下 Mlp21700 能够结合 *Mlp26610* 基因 *ppgk* 和 *Mlp44770* 基因 *ppx* 的启动子。【结论】调控蛋白 Mlp21700 可能参与 *Mlp26610* 和 *Mlp44770* 基因的转录调控, 进而调控 Poly-P 的分解过程。

关键词: 积磷小月菌, 多聚磷酸盐, 调控蛋白, 启动子, 凝胶迁移实验

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31500094); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2015EM018); Innovation Project of Shandong Academy of Medical Sciences (201604)

*Corresponding author: Tel: 86-531-82919606; E-mail: caozhong0402@163.com

Received: May 06, 2017; Accepted: July 11, 2017; Published online (www.cnki.net): August 15, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(31500094); 山东省自然科学基金(ZR2015EM018); 山东省医学科学院医药卫生科技创新工程项目(201604)

*通信作者: Tel: 86-531-82919606; E-mail: caozhong0402@163.com

收稿日期: 2017-05-06; 接受日期: 2017-07-11; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-08-15

Heterologous expression of *Microlunatus phosphovorus* regulatory protein Mlp21700 and its binding to promoters of Poly-P metabolic genes *in vitro*

ZHONG Chuan-Qing¹ WANG Jing¹ ZONG Gong-Li² JIANG Tian-Yi¹
CAO Guang-Xiang^{2*}

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Shandong Jianzhu University, Jinan, Shandong 250101, China)

(2. Shandong Medicinal Biotechnology Centre, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250062, China)

Abstract: [Background] *Microlunatus phosphovorus* is one of the important phosphorus accumulating organisms. It can accumulate polyphosphate (Poly-P) aerobically and hydrolyze Poly-P anaerobically, a process fine-tuned by specific regulatory genes. [Objective] To investigate Poly-P metabolic genes bound by Mlp21700, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed. [Methods] The coding sequence of *Mlp21700* was amplified and cloned into pET28a to generate a recombinant plasmid pET28a-21700 that was then transformed into *Transtetta*(DE3) to express the recombinant protein Mlp21700. Mlp21700 was purified under non-denaturing conditions. Promoter sequences of Poly-P metabolic genes were amplified by PCR, labeled with biotin, and used as probes in EMSA assays to investigate binding of Mlp21700 to the above probes. [Results] pET28a-21700 was confirmed by DNA sequencing and enzyme digestion. SDS-PAGE analysis indicated that Mlp21700 was highly expressed in soluble form. The purity of Mlp21700 surpassed 90% and the concentration reached 0.64 mg/mL. Our EMSA assays showed that Mlp21700 bound to the promoters of *Mlp26610* (*ppgk*) and *Mlp44770* (*ppx*). [Conclusion] Mlp21700 may directly regulate *Mlp26610* and *Mlp44770*, and thus regulate Poly-P metabolism.

Keywords: *Microlunatus phosphovorus*, Poly-P, Regulatory protein, Promoter, EMSA

磷是引起水体富营养化的关键因子之一, 当总磷临界负荷量达到 200–500 mg/(m²·a)时水体就可能处于富营养化状态^[1], 因此去除污水中过量的磷元素具有重要的环保意义。增强型生物除磷系统(Enhance biological phosphorus removal, EBPR)是目前常用的生物除磷技术, 在污水处理工艺中常用于降低可溶性磷含量^[2-3]。研究表明 EBPR 系统中积磷小月菌(*Microlunatus phosphovorus*)约占总菌群的 2.7%, 占聚磷微生物(Phosphorus accumulating organisms, PAOs)的 9%, 并且具有显著的聚磷效果, 胞内多聚磷酸盐(Polyphosphate, Poly-P)最高可达细胞干重的 10%^[4-6]。

M. phosphovorus 的基因组已经完成 DNA 测序, 分析显示有多个基因参与 Poly-P 的合成和分解代谢^[7]。Poly-P 的合成主要由多聚磷酸盐激酶 PPK

负责, 分别由 *Mlp47700*、*Mlp05750* 和 *Mlp50300* 基因编码, PPK 可以催化 ATP (或 GTP)提供磷酸基团合成 Poly-P, 但该反应是一个可逆反应。Poly-P 的分解途径比较复杂, 多聚磷酸盐外切酶 PPX 可以从 Poly-P 末端释放磷酸基团, 由 *Mlp44770* 基因编码; 葡萄糖激酶 PPGK 能够利用 Poly-P 磷酸化葡萄糖, 由 *Mlp05430* 和 *Mlp26610* 基因编码; 多聚磷酸盐腺苷酸磷酸转移酶 PAP 可以催化 Poly-P 和 AMP 合成 ADP, 由 *Mlp23310* 基因编码; 此外, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸激酶 PPNK 能够以 Poly-P 为供体合成 NADP, 由 *Mlp17420* 基因编码。*M. phosphovorus* 具有 PAOs 的典型特征, 在好氧条件下利用 ATP 合成 Poly-P, 在厌氧条件下分解 Poly-P 并提供能量, 说明 Poly-P 的合成和分解基因受到环境条件的调控, 但是目前还不清楚哪个基因调控 Poly-P 的合成

和分解, 以及如何调控。

积磷小月菌 JN459 菌株是从市政污水处理系统中分离得到的一株 PAOs, 经鉴定为 *Microcylunatus phosphovorius*, 具有显著的生物除磷效果^[8]。本课题组研究发现转录调控蛋白 Mlp21700 可能调控 Poly-P 的代谢。本研究拟通过分析 Mlp21700 与 Poly-P 代谢基因启动子的体外结合作用, 探讨 Mlp21700 在 Poly-P 代谢中发挥的调控作用, 为进一步阐明 *M. phosphovorius* 中 Poly-P 代谢调控的分子机制提供实验证据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

积磷小月菌 JN459 (*Microcylunatus phosphovorius* JN459)由本实验室分离、鉴定^[8]。感受态大肠杆菌 DH5 α 和 Transetta(DE3)菌株均购自北京全式金生物技术有限公司。克隆载体 pMD18-T 购自大连 TaKaRa 公司; 原核表达载体 pET28a 购自德国 Novagen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

酵母提取物、胰蛋白酶、氨苄青霉素、卡那霉素和生化试剂购自济南博尚生物技术有限公司; *EasyTaq* DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶和生物素标记试剂盒购自美国 Thermo 公司; Immobilon-Ny+购自美国密理博公司; ECL 化学发光试剂盒购自美国 GE 公司; Ni 亲和层析柱、辣根过氧化物酶标记链霉亲和素、DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒和 BCA 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, DNA 测序由济南博尚生物技术有限公司完成。

PCR 仪、电泳仪、电泳槽和转印槽购自美国 Bio-Rad 公司; 微量紫外分光光度计购自日本岛津公司; 超声波破碎仪购自美国 SONICS 公司; 胶片洗片机购自上工申贝(集团)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养基和培养条件

大肠杆菌培养采用 LB 培养基^[9], 根据需要加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素(Kanmycin)或者 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素(Ampicillin); 培养温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。积磷小月菌的培养基成分为(g/L): 葡萄糖 0.20, 胰蛋白胨 0.20, 谷氨酸钠 0.20, 酵母膏 0.20, 磷酸氢二钾 0.18, 硫酸铵 0.04, 七水硫酸镁 0.04, 琼脂粉 15.00 (固体培养基), pH 7.0; 培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 Mlp21700 表达载体的构建

提取 JN459 菌株的基因组 DNA 作为模板, 采用 21700exp-For 和 21700exp-Rev 引物(表 1) PCR 扩增 *Mlp21700* 基因的编码区序列, 并连接到克隆载体 pMD18-T, DNA 测序筛选得到含正确插入序列的重组质粒 pMD18T-21700, 然后用 *Nde* I 和 *Eco*R I 限制性内切酶切下插入片段并连接到表达载体 pET28a, 最后筛选获得重组质粒 pET28a-21700。

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
21700exp-For	<u>CCCATATG</u> AGCGCGTCCCCCGGTGAGGT CGGCCGC
21700exp-Rev	CCGA <u>ATTCT</u> CAACGCAGCAGCTTGGCG GCCAACAC
P05430-For	TGTGCTCCACCGTACGCTGA
P05430-Rev	CTGTTCCGTGTGGTCCCCCGA
P05750-For	TGCCGGGCGAACAATGGGTTA
P05750-Rev	TTCGACCTCCGTATTCCGGCTA
P17420-For	GAGGAATCGAAGGGGGCGGGAT
P17420-Rev	GACCATCTCGCCACCTTCGCT
P23310-For	TCGCTCTCGGTGTTGATCGAT
P23310-Rev	CACGCGGACCCTCGACCATCCG
P26610-For	TCGGGCGCCGATCCGCCGAAGC
P26610-Rev	TGTGTCCTTCCGTGAAACCT
P44770-For	ACTTGCCACGTCGAACTGCCT
P44770-Rev	TCGCGCGAGTGAACCTCCGA
P47700-For	CTAGGAGTGTGCTGATCCCCGT
P47700-Rev	TCAGCCATCTGGACAACCTATC
P50300-For	CGTCGCGAATTTCGTACATCTG
P50300-Rev	TTGCTCACCTTGGGCTCTCG

注: 下划线表示限制性内切酶的作用位点。

Note: Restriction enzyme digestion sites are underlined.

1.2.3 Mlp21700 重组蛋白的表达与纯化

将重组质粒 pET28a-21700 转化到 *Transetta*(DE3) 菌株, 在含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜, 按 2% 接种量接入含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至对数生长期加入 IPTG 进行诱导, 同时将温度调整至 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h。按照非变性方法纯化 Mlp21700 融合蛋白, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 悬浮菌体, 超声波破壁并 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 10 min 去除细胞碎片; 然后将上清液上样至 Ni 亲和层析柱, 用溶液 B (50 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗去杂蛋白, 用溶液 C (50 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 将 Mlp21700 融合蛋白从 Ni 柱上洗脱下来; 最后透析到溶液 D (50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 5% 甘油, pH 8.0) 中, 用 BCA 试剂测定蛋白质浓度, 最后电泳检测蛋白纯度。

1.2.4 启动子的 PCR 扩增与生物素标记

分析 Poly-P 合成和分解基因的序列, 设计用于 PCR 扩增各基因上游基因间隔区域的引物(表 1)。以 JN459 菌株的基因组 DNA 为模板 PCR 扩增各启动子片段, PCR 反应体系: 10 \times Buffer 5 μL , DMSO 2.5 μL , dNTPs 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 基因组 DNA 100 ng, 上、下游引物各 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$, *EasyTaq* DNA 聚合酶 2.5 U, ddH₂O 补足至 50 μL 。PCR 反应条件: 97 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 97 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收目的条带, 然后测定 DNA 浓度。将回收的启动子 DNA 于 97 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 变性, 迅速转移到冰浴中冷却获得单链 DNA。然后用生物素标记单链 DNA, 反应体系为: 5 \times TdT reaction buffer 10 μL , 单链 DNA 100 nmol/L, Biotin-11-UTP 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$, TdT 7.5 U, ddH₂O 补足至 50 μL 。反应体系 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 加入 2.5 μL 0.2 mol/L 的 EDTA (pH 8.0) 终止反应, 然后用氯仿/异戊醇(24:1, 体积

比)抽提 1 次, 最后用 PCR 仪缓慢退火使单链 DNA 复性成双链 DNA。复性条件: 97 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 然后每隔 8 s 降低温度 0.1 $^{\circ}\text{C}$, 降至 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.5 Mlp21700 与启动子结合能力的分析

凝胶迁移实验(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)的反应体系为: 5 \times Buffer (100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L DTT, 20% Fioll-400, pH 8.0) 4 μL , Poly-dIdC 0.5 μL , 标记启动子 0.5–2.0 μL , Mlp21700 蛋白 4–15 μL , ddH₂O 补足至 20 μL 。室温(15–25 $^{\circ}\text{C}$)温育 20 min, 然后采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶分离(丙烯酰胺:双丙烯酰胺为 39:1, 体积比), 100 V 恒压电泳 1.5 h。电泳后用湿转法将 DNA 转移至带正电荷的尼龙膜 Immobilon-Ny+ 上, 转印好的尼龙膜经干燥和紫外交联处理与辣根过氧化物酶缀合的链霉亲和素孵育, 用 ECL 化学发光试剂盒显影, 最后用 X 胶片曝光和图像采集。

2 结果与分析

2.1 Mlp21700 的表达载体构建和重组蛋白表达纯化

以 JN459 菌株的基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 *Mlp21700* 基因的编码区序列, PCR 产物连接到 pMD18-T 组成中间载体 pMD18T-21700。*Mlp21700* 扩增序列经 DNA 测序检验正确后从 pMD18T-21700 上切下, 然后构建到表达载体 pET28a 组成重组质粒 pET28a-21700, 最后用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Eco*R I 处理重组质粒 pET28a-21700, 并用 DNA 电泳检测, 结果显示插入片段长度符合 *Mlp21700* 基因的大小(图 1A)。重组质粒 pET28a-21700 经热激转化到 *Transetta*(DE3) 菌株, IPTG 诱导后收集菌体, 采用非变性方法纯化 Mlp21700 融合蛋白并透析到含 5% 甘油的 Tris-NaCl 溶液中, BCA 法测定蛋白浓度为 0.64 mg/mL, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测显示 Mlp21700 融合蛋白的分子量大小约 28 kD (图 1B), 与预期大小一致, 光密度分析表明蛋白质纯度达到 90% 以上。

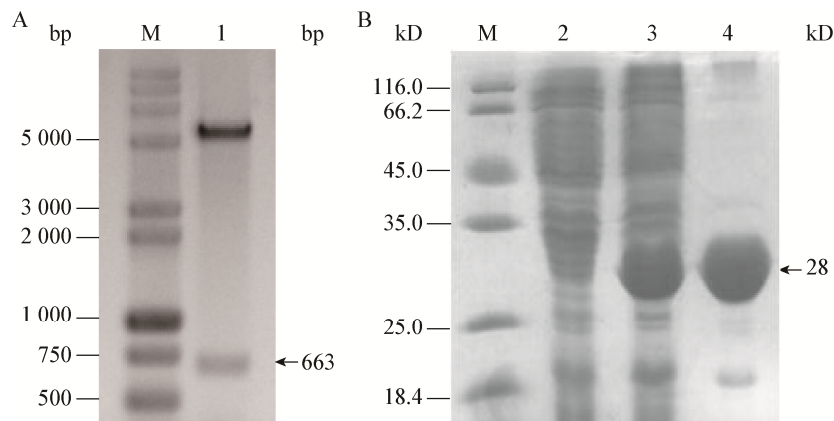


图1 Mlp21700 表达载体的酶切验证(A)和蛋白诱导表达纯化(B)电泳图

Figure 1 Restriction map of recombinant plasmid pET28a-21700 (A), expression and purification of Mlp21700 fusion protein (B)

注: M: 分子量标准; 1: pET28a-21700 重组质粒的 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切产物; 2: 未诱导菌体蛋白; 3: IPTG 诱导菌体蛋白; 4: 纯化 Mlp21700 蛋白。

Note: M: Marker; 1: pET28a-21700 was digested with *Nde* I and *Eco*R I; 2: Crude cell lysis of *Transetta*(DE3); 3: Cell lysis after the culture was induced by IPTG; 4: Purified Mlp21700 fusion protein.

2.2 Poly-P 合成与分解相关基因的启动子扩增

M. phosphovor 中 *Mlp05430* (*ppgk*) 与 *Mlp05440*、*Mlp05450* 和 *Mlp054460* 组成一个操作子, *Mlp05750* (*ppk*)与 *Mlp05740* 组成一个操作子, *Mlp17420* (*ppnk*) 与 *Mlp17410*、*Mlp17400* 和 *Mlp17390* 组成一个操作子, *Mlp44770* (*ppx*)与 *Mlp44780*、*Mlp44790* 和 *Mlp44800* 组成一个操作子, *Mlp47700* (*ppk*)与 *Mlp47690* 和 *Mlp47710* 组成一个操作子, 而 *Mlp23310* (*pap*)、*Mlp26610* (*ppgk*)和 *Mlp50300* (*ppk*)都是独立的转录单位。试验根据各转录单位的基因间隔区域分别设计 PCR 引物(图 2A), 然后通过 PCR 扩增到共 8 个转录单位的启动子片段, DNA 电泳显示各个启动子片段的长度符合预期大小(图 2B)。

2.3 Mlp21700 与 Poly-P 相关基因启动子的体外结合分析

采用 EMSA 分析 Mlp21700 在体外条件下与 Poly-P 代谢相关基因启动子的结合情况。PCR 产物经切胶回收后用生物素标记, 在室温条件下将 0.16 nmol Mlp21700 蛋白与启动子片段混合, 温育 20 min 后用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 同时采

用加入相同量的启动子片段但不加 Mlp21700 蛋白的样品作为对照, 电泳结束后转到尼龙膜上并用辣根过氧化物酶缀合的链霉亲和素孵育检测, 结果如图 3 所示。结果显示在试验条件下加入 Mlp21700 蛋白不影响启动子 P05430、P05750、P14720、P23310、P47700 和 P50300 的电泳迁移速度, 而添加 Mlp21700 蛋白能够显著降低启动子 P26610 和 P44770 的电泳迁移速度, 说明 Mlp2170 蛋白能够结合启动子 P26610 和 P44770, 提示 Mlp2170 可能在体内调控 *Mlp26610* 和 *MlpP44770* 基因的转录起始。

为进一步了解 Mlp21700 与靶基因启动子的结合特征, 试验分别将等量的启动子 P26610 和 P44770 与不同量的 Mlp21700 蛋白混合, 分析 Mlp21700 蛋白结合靶基因启动子的能力。EMSA 结果显示, 随着蛋白用量的增加, Mlp21700 与启动子 P26610 和 P44770 的结合程度增强, 0.04 nmol Mlp21700 可以结合部分 P26610 和 P44770 启动子, 0.08 nmol 或 0.16 nmol Mlp21700 可以结合全部的 P26610 和 P44770 启动子(图 3C), 表明 Mlp21700 蛋白能特异性结合 *Mlp26610* 和 *MlpP44770* 基因的启动子。

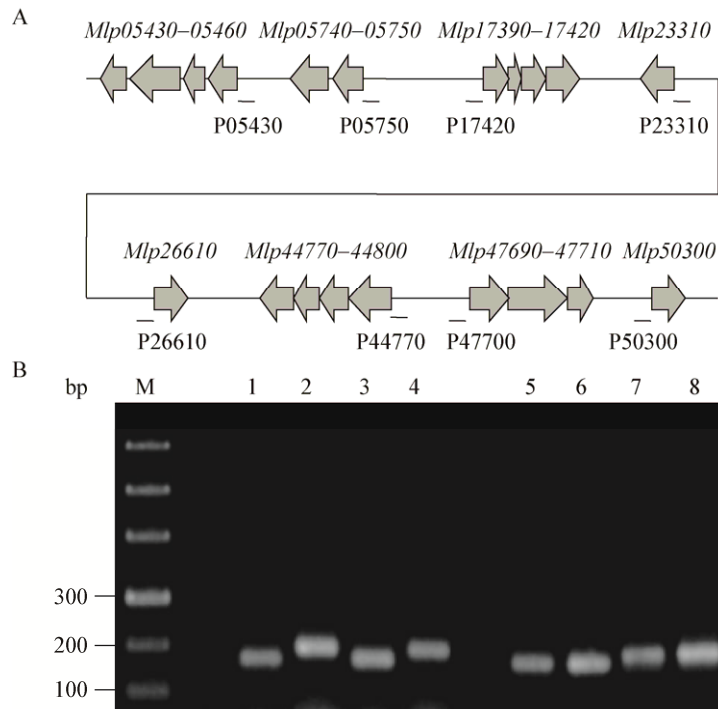


图 2 Poly-P 合成与分解相关基因的启动子设计示意图(A)和启动子片段的 PCR 产物电泳图(B)

Figure 2 Diagram of the promoters of the genes involved in the Poly-P metabolism (A), PCR products of the promoter fragment (B)

注: M: DNA 分子量标准; 1-8: P05430、P05750、P14720、P23310、P26610、P44770、P47700 和 P50300.

Note: M: DNA Marker; 1-8: Promoters of P05430, P05750, P14720, P23310, P26610, P44770, P47700 and P50300.

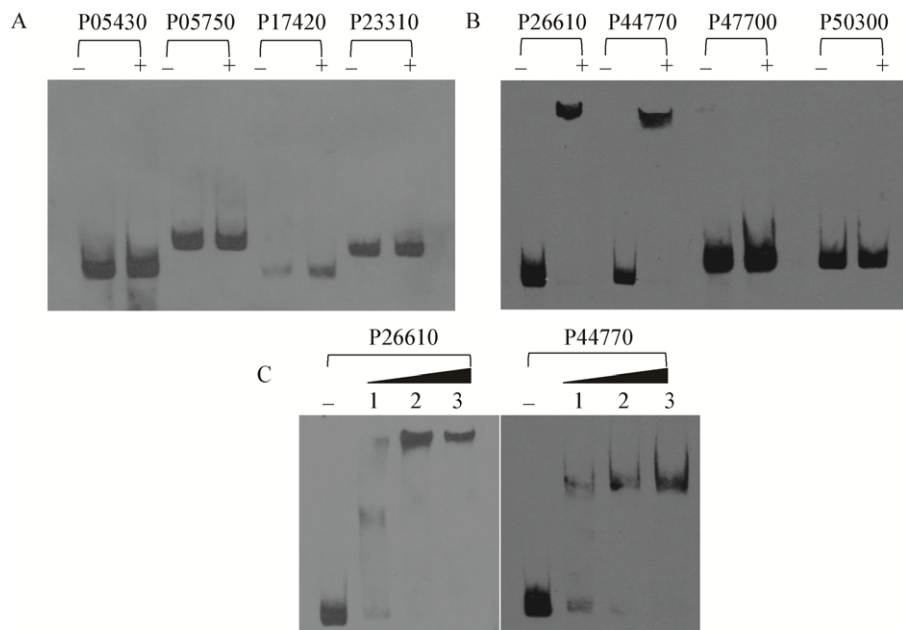


图 3 Mlp21700 与不同启动子 EMSA 试验的结合情况(A、B)和结合能力分析(C)

Figure 3 EMSA analyses of Mlp21700 binding to different promoters (A and B), specific binding (C)

注: -: 不加 Mlp21700 蛋白; +: 加 0.16 nmol Mlp21700 蛋白; 1-3: 分别加 0.04、0.08 和 0.16 nmol Mlp21700 蛋白.

Note: -: Promoter was incubated without Mlp21700; +: With 0.16 nmol Mlp21700; 1-3: With 0.04, 0.08 and 0.16 nmol Mlp21700, respectively.

3 讨论与结论

课题组的前期研究证实, JN459 菌株在 SBR 试验装置中对人工合成污水的除磷率约为 93.7%, 对市政污水体系的除磷率达到 84.4%, 并且具有典型的好氧聚磷和厌氧释磷特征^[8], 说明其 Poly-P 代谢相关基因受到溶氧水平的调控。Mlp21700/Mlp21720 是 *M. phosphovor* 的双组分信号转导系统(Two component signal transduction system, TCS)^[7]。Mlp21720 是组氨酸激酶, 负责将外界环境刺激信号转化为细胞内的化学信号; Mlp21700 是应答调控蛋白, 可以激活或者抑制下游基因的表达。蛋白质序列比对分析显示, Mlp21720 与细菌中多个感应溶氧水平的组氨酸激酶具有较高的相似度, 比如与同属于放线菌目的结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* 中组氨酸激酶 DevS 的相似性为 53% (94% 覆盖度), 研究显示 DevR/S TCS 响应溶氧水平并调控 *M. tuberculosis* 的休眠^[10]。因此我们推测 Mlp21700/Mlp21720 是 *M. phosphovor* 响应氧分子的 TCS, 负责调控 Poly-P 的代谢。

在此背景下, 本文采用大肠杆菌异源表达 Mlp21700 蛋白, 通过非变性方法纯化获得浓度为 0.64 mg/mL、纯度达到 90% 以上的融合蛋白, 然后用 EMSA 分析 Mlp21700 在体外条件下与 Poly-P 代谢相关基因启动子的结合情况。基因组分析显示 *M. phosphovor* 基因组中有 3 个 PPK (Mlp47700、Mlp05750 和 Mlp50300) 参与 Poly-P 合成, 2 个 PPGK (Mlp05430 和 Mlp26610)、1 个 PAP (Mlp17420)、1 个 PPNK (Mlp23310) 和 1 个 PPX (Mlp44770) 参与 Poly-P 的分解, 这些蛋白的编码基因分别由 8 个转录单位负责转录, 本文的试验结果表明 Mlp21700 能够结合 Mlp26610 和 MlpP44770 基因的启动子, 说明 Mlp21700/Mlp21720 TCS 可能参与调控 Poly-P 的分解代谢。通过对 Mlp26610 和 MlpP44770 基因启动子序列的比对分析, 我们没有找到相似性序列和保守结合位点, 需要采用 DNase I 足迹试验来确定 Mlp21700 的结合位点。

此外, TCS 的应答调控蛋白通常是全局性调控因子, Mlp21700 除调控 Poly-P 代谢之外, 可能还具有其他生物学功能, 因此可以通过染色质免疫共沉淀技术(Chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-Seq)找到 Mlp21700 在基因组上的靶基因, 并用基因敲除和回补技术进行功能验证。

文献还显示在新月柄杆菌 *Caulobacter crescentus* 和不动细菌 *Acinetobacter* sp. 中 PhoB/PhoR TCS 可能调控 PPK 的表达^[11-12], 生物信息学分析预测部分微生物 PPK 编码基因的启动子中也存在可能的 PhoB 结合位点, 但是这些结合位点都没有经过试验证实^[13-14]。此外, *M. tuberculosis* 的 SenX3/RegX3 TCS 也参与 PPK (Rv2984) 的表达调控, 影响 Poly-P 合成^[15]。因此, 细菌中 Poly-P 的代谢可能受到多个 TCS 的协同调控, 在不同环境条件下响应多种环境信号。

此外, PstSCAB 系统和 Pit 系统是细菌的磷转运系统^[16]。PstSCAB 系统在低磷环境下消耗 ATP 向胞内转运无机磷; Pit 系统的磷亲和力较低, 在高磷环境下向细胞内转运无机磷, 或在 Poly-P 分解过程中向细胞外转运无机磷。PhoB/PhoR TCS 和 PhoU 是细菌磷转运系统的调控因子, PhoU 可能是信号传导的中介, PhoB/PhoR TCS 在低磷水平条件下诱导 PstSCAB 系统表达并抑制 B 型 Pit 系统^[12,17]。研究还显示磷转运和 Poly-P 合成之间有关联, 在低磷条件下 PstSCAB 系统和 PPK 的表达水平都明显上升, 但 Poly-P 合成速度并没有升高, 而添加过量磷时 PPK 的活性会显著上升, 说明磷转运系统和 Poly-P 代谢存在关联调控^[14]。*M. phosphovor* 也存在 PstSCAB 系统(Mlp47720, Mlp47730, Mlp47740, Mlp477500)、Pit 系统(Mlp00530, Mlp29830, Mlp51060)和 PhoB/PhoR-PhoU 磷转运调控系统(Mlp24520, Mlp24530, Mlp47360), 说明 *M. phosphovor* 的 Poly-P 代谢和磷转运系统也可能存在关联调控, 因此阐明其 Poly-P 代谢调控还需要进一步分析磷转运系统及其调控。

综上所述, Mlp21700 可以在体外条件下结合 Mlp26610 (PPGK)和 Mlp44770 (PPX)编码基因的启动子, Mlp21700/Mlp21720 TCS 可能是 *M. phosphovorus* 中新发现的 Poly-P 分解代谢的调控因子。

REFERENCES

- [1] Strokal M, Yang H, Zhang YC, et al. Increasing eutrophication in the coastal seas of China from 1970 to 2050[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 85(1): 123-140
- [2] Gebremariam SY, Beutel MW, Christian D, et al. Research advances and challenges in the microbiology of enhanced biological phosphorus removal-a critical review[J]. *Water Environment Research*, 2011, 83(3): 195-219
- [3] Sun X, Zhu WJ, Wang L, et al. Review on the main microorganisms and their metabolic mechanisms in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) systems[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(3): 892-902 (in Chinese) 孙雪, 朱为静, 王亮, 等. 强化生物除磷系统主要微生物及其代谢机理研究进展[J]. *应用生态学报*, 2014, 25(3): 892-902
- [4] Mino T. Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal[J]. *Biochemistry Biokhimiia*, 2000, 65(3): 341-348
- [5] Nakamura K, Hiraishi A, Yoshimi Y, et al. *Microlunatus phosphovorus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(1): 17-22
- [6] Xu LJ, Guo CY, Peng YZ, et al. Review on the microbiological and biochemical characteristics of enhanced biological phosphorus removal system[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2011, 17(3): 427-434 (in Chinese) 徐立杰, 郭春艳, 彭永臻, 等. 强化生物除磷系统的微生物学及生化特性研究进展[J]. *应用与环境科学学报*, 2011, 17(3): 427-434
- [7] Kawakoshi A, Nakazawa H, Fukada J, et al. Deciphering the genome of polyphosphate accumulating actinobacterium *Microlunatus phosphovorus*[J]. *DNA Research*, 2012, 19(5): 383-394
- [8] Zhong CQ, Jiang TY, Wang J, et al. Isolation of phosphate-accumulating bacteria *Microlunatus phosphovorus* JN459 and its phosphate-accumulating characteristics[J]. *Journal of Shandong Jianzhu University*, 2015, 30(1): 25-28 (in Chinese) 钟传青, 姜天翼, 王静, 等. 聚磷菌-JN459 的分离和聚磷特性研究[J]. *山东建筑大学学报*, 2015, 30(1): 25-28
- [9] Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*[M]. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2012: 1811-1822
- [10] Kaur K, Taneja NK, Dhingra S, et al. DevR (DosR) mimetic peptides impair transcriptional regulation and survival of *Mycobacterium tuberculosis* under hypoxia by inhibiting the autokinase activity of DevS sensor kinase[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 195
- [11] Geißdörfer W, Ratajczak A, Hillen W. Transcription of *ppk* from *Acinetobacter* sp. strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(3): 896-901
- [12] Lubin EA, Henry JT, Fiebig A, et al. Identification of the PhoB regulon and role of PhoU in the phosphate starvation response of *Caulobacter crescentus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 198(1): 187-200
- [13] Yang C, Huang TW, Wen SY, et al. Genome-wide PhoB binding and gene expression profiles reveal the hierarchical gene regulatory network of phosphate starvation in *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47314
- [14] Yuan ZC, Zaheer R, Morton R, et al. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(9): 2686-2697
- [15] Sanyal S, Banerjee SK, Banerjee R, et al. Polyphosphate kinase 1, a central node in the stress response network of *Mycobacterium tuberculosis*, connects the two-component systems MprAB and SenX3-RegX3 and the extracytoplasmic function sigma factor, sigma E[J]. *Microbiology*, 2013, 159(10): 2074-2086
- [16] van Veen HW. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, 72(4): 299-315
- [17] Gardner SG, Johns KD, Tanner R, et al. The PhoU protein from *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(9): 1741-1752