

研究报告

来源于 *Micrococcus luteus* 的复苏促进因子异源表达及其对活性污泥中休眠细菌的促生长作用

张宇^{1*} 王慧荣¹ 梅荣武¹ 李明智¹ 李欲如¹ 丁林贤² 苏晓梅² 朱瑞芬³

(1. 浙江省环境保护科学设计研究院 浙江 杭州 310007)

(2. 浙江师范大学地理与环境科学学院 浙江 金华 321004)

(3. 浙江省环境科技有限公司 浙江 杭州 311121)

摘要:【背景】复苏促进因子(Resuscitation promoting factor, RPF)是由某些放线菌分泌的一类活性蛋白质,最初在 *Micrococcus luteus* 中被发现。它不但能够复苏休眠细菌恢复生长,而且对正常的细菌也有促生长效果。然而关于 RPF 对于环境样品中除原始宿主以外细菌的复苏促进作用研究还鲜有报道。【目的】以寻找新的菌种资源、开发环境功能菌角度研究了 RPF 对环境样品中潜在休眠菌群的复苏促进作用。【方法】首先对来源于 *Micrococcus luteus* IAM 14879 的 RPF (MIRPF)蛋白序列进行生物信息学分析和同源建模;随后克隆了 MIRPF 编码基因并在大肠杆菌中异源表达;最后利用重组 MIRPF 对活性污泥样品中潜在的休眠细菌开展了复苏促生长研究。【结果】MIRPF 在进化树上处于单独分支,远离其它 RPF 家族成员;建模结构分析表明 MIRPF 具有与 C 型溶菌酶相似的催化结构域,这有助于解释 RPF 家族蛋白具有溶解酶活性;重组 MIRPF 在大肠杆菌中获得了可溶性表达,它能够促进休眠态 *M. luteus* IAM 14879 生长,保留了其生理活性;利用重组 MIRPF 从某污水厂活性污泥样品中分离获得了 *Dietzia*、*Paracoccus*、*Rhodococcus* 和 *Brevundimonas* 菌株。【结论】为环境样品中微生物多样性研究及特殊微生物资源的发掘提供新的方法,也为基于 MIRPF 的废水生物强化处理技术研发提供理论依据。

关键词: 复苏促进因子, 藤黄微球菌, 异源表达, 休眠细菌, 活性污泥

Foundation items: The Project for Science and Technology Plan of Zhejiang Province (2017F30030, 2017C33016); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY18E080005); The Special Project for Major Science and Technology of Zhejiang Province (2015C03007)

*Corresponding author: Tel: 86-571-87985421; E-mail: zhangyu0103@126.com

Received: December 17, 2017; Accepted: April 08, 2018; Published online (www.cnki.net): April 12, 2018

基金项目: 浙江省科技计划(2017F30030, 2017C33016); 浙江省自然科学基金(LY18E080005); 浙江省重大科技专项(2015C03007)

*通信作者: Tel: 86-571-87985421; E-mail: zhangyu0103@126.com

收稿日期: 2017-12-17; 接受日期: 2018-04-08; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-04-12

Heterologous expression of resuscitation promoting factor from *Micrococcus luteus* and promotes growth dormant bacteria from activated sludge

ZHANG Yu^{1*} WANG Hui-Rong¹ MEI Rong-Wu¹ LI Ming-Zhi¹ LI Yu-Ru¹
DING Lin-Xian² SU Xiao-Mei² ZHU Rui-Fen³

(1. Environmental Science Research and Design Institute of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310007, China)

(2. College of Geography and Environmental Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China)

(3. Zhejiang Environment Technology Co. Ltd., Hangzhou, Zhejiang 311121, China)

Abstract: [Background] Resuscitation promoting factor (RPF) is an active protein secreted by some different actinobacteria species, which was first reported in *Micrococcus luteus*. It resuscitates the dormant bacteria and promotes the growth of active bacteria. However, few studies have investigated its contribution in environmental samples to the growth or resuscitation of bacteria other than the original host. [Objective] In order to find novel strains and explore the functional bacteria, we investigated the role of RPF in promoting the latent dormant bacteria from specific environmental sample. [Methods] Firstly, bioinformatics analysis and homology modeling of *Micrococcus luteus* RPF (MIRPF) was performed. Subsequently, the MIRPF encoding gene was cloned and expressed in *Escherichia coli*; Finally, we used the purified recombinant MIRPF to study the resuscitation effect toward latent dormant bacteria from an activated sludge sample. [Results] Bioinformatics analysis revealed that the MIRPF branched separately and was distant from other RPF family members in the phylogenetic tree. Structural analysis of its “RPF-domain” suggested that MIRPF has a similar catalytic structure domain as C-type lysozyme, this finding helps explain why RPF family members have lysozyme-like activity; the recombinant MIRPF was expressed in soluble form in *E. coli* expression system, could promote the growth of *M. luteus* IAM 14879 and retain its physiological activity. By used purified recombinant MIRPF, we isolated *Dietzia*, *Paracoccus*, *Rhodococcus*, and *Brevundimonas* strains from an activated sludge sample. [Conclusion] These results not only provide a novel method for the study of microbial diversity and the exploration of special microbial resources in environmental samples, but also provide a theoretical basis for the research and development of wastewater bioaugmentation technology based on MIRPF.

Keywords: Resuscitation promoting factor, *Micrococcus luteus*, Heterologous expression, Dormant bacteria, Activated sludge

复苏促进因子(Resuscitation promoting factor, RPF)是由某些放线菌分泌的活性蛋白质,能够复苏休眠细菌恢复生长,对正常生长的细菌也有促生长效果,复苏促进因子最初在藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)中被发现^[1],随后在结核分枝杆菌属(*Mycobacterium* sp.)^[2]、棒杆菌属(*Corynebacterium* sp.)^[3]、链霉菌属(*Streptomyces* sp.)^[4]等种属也发现了 *rpf* 同源基因。

来源于 *M. luteus* RPF (MIRPF)除了对自身体眠态细胞具有复苏促进效果,还可以复苏其它几种高

G+C%含量革兰氏阳性细菌的生长,表现出跨物种的活性^[1-2,5-6],而 MIRPF 也是迄今所发现作用效果最为敏感,在皮摩尔浓度(pmol/L)下便可复苏自身体眠态细胞^[1]。目前 RPF 对休眠细胞复苏机制还不明确,已有的研究表明其自身具有溶菌酶活性^[7],推测它利用溶菌酶活性切割细菌细胞壁组分,产生肽聚糖片段,该片段作为启动休眠态细菌生长的信号分子^[8]。

目前有关 RPF 的研究主要集中在医学领域(致病菌的快速检测和诊断),而关于 RPF 对于特殊环

境样品中除原始宿主以外细菌的复苏促进作用研究还处于刚起步阶段。近年来的研究均表明在污水生物处理系统、污染环境、及特殊环境样品中, RPF 可以复苏除自身宿主以外的某些细菌, 并且这些细菌在环保领域展现出了应用前景。Li 等^[9]利用 *M. luteus* 培养上清液所制备的 RPF 粗提液在制药废水中发现了新种细菌 *Gordonia jinhuaensis* ZYR 51T。Su 等^[10]利用同样方法在多氯联苯污染的底泥中分离到了一株新型多氯联苯降解菌株 *Rhodococcus biphenylivorans* TG9T。除此还证明了 *M. luteus* 所制备的 RPF 粗提液能显著提高 PCBs 污染土壤中菌群对联苯降解效率及菌群多样性^[11-12]。Puspita 等^[13]利用来源于 *Tomitella biformata* 的复苏促进因子在冻土冰楔样品中分离到了一株 *Brevibacterium antiqum* strain VKM Ac-2118 相近菌株。

本文以寻找新的菌种资源、开发环境功能菌角度研究了 RPF 对活性污泥样品中潜在功能菌(群)的复苏促进作用, 对来源于 *Micrococcus luteus* IAM 14879 的 RPF (MIRPF)蛋白序列进行系统进化分析及序列比对, 并同源建模了其空间结构; 对其编码基因进行了克隆及大肠杆菌异源表达; 利用大肠杆菌异源表达所制备的重组 MIRPF, 对活性污泥样品中潜在的微生物资源开展了复苏促生长研究。上述研究结果有利于更好地理解 RPF 促生长机理, 为环境样品功能微生物资源的挖掘提供新的方法, 也为最大限度地激发土著微生物对污染基质的降解效率及环保生物强化技术研发奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株及质粒

Micrococcus luteus IAM 14879 为 *rpf* 基因来源菌, 由浙江师范大学丁林贤教授馈赠; *Escherichia coli* BL21(DE3) CodonPlus 用于目的基因克隆和表达, 本实验室保存; 表达质粒 pET-28a(+)用于重组载体构建, 为本实验室保存。

1.2 主要试剂、仪器及培养基

限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、PrimeSTAR

Max DNA Polymerase、T4 DNA 连接酶、DNA 及蛋白分子量标准, 宝生物工程(大连)有限公司; 细菌基因组提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒及分析纯试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白胨、酵母提取物, OXOID 公司; 细菌微量培养瓶, 亚速旺(上海)商贸有限公司; 蛋白纯化用亲和层析介质 NTA Agarose, QINGEN 公司; 寡核苷酸序列委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; 生化培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, Panasonic 公司; 台式微量离心机, BECKMAN COULTER 公司; NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计、PCR 仪、超低温冰箱, Thermo Fisher Scientific 公司; 电泳仪, 上海天能科技有限公司; 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

LMM 培养基(g/L): NH_4Cl 4.000, KH_2PO_4 1.400, 生物素 0.005, L-蛋氨酸 0.020, 维生素 B1 0.040, 肌苷 1.000, MgSO_4 0.030, L-乳酸锂盐 10.000, 1.0 mL 矿物质盐溶液(0.375 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.785 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.183 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.029 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.089 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 调节 pH 至 7.5, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

LB 固体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂粉 15.0, 调节 pH 至 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 待冷却至 50–60 °C 时倒制平板。

改良 SOB 培养基(g/L): 胰化蛋白胨 20.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 0.5, KCl 2.5 mmol/L, 将原配方中 10 mmol/L MgCl_2 降低到 8.5 mmol/L, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.3 序列比对及同源建模

将 *M. luteus* 的 RPF 蛋白序列通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与 GenBank 数据库中不同细菌来源的复苏促进因子做同源性比较, 选取典型的 RPF 序列利用 ClustalX 1.83 软件进行多重序列比对后应用 MEGA 4.0.2 软件构建系

统发育树。基于结构的序列比对利用在线工具 ESPript (<http://esprict.ibcp.fr>)完成。

同源建模由 Phyre2^[14]在线完成(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>),将 *MIRPF* 的氨基酸序列输入三级结构模建服务器 Phyre2 中,服务器利用穿珠法以 PDB 数据库中已解析的三级结构为模板分别产生多个模型,随后利用蛋白质结构评价服务器 PSVS (http://psvs-1_5-dev.nesg.org/)对这些模型进行评估和排序,最后汇总评估信息确定 *MIRPF* 的三维结构模型。

1.4 *rpf* 基因克隆

提取 *Micrococcus luteus* 基因组 DNA, *rpf* 基因(GenBank 编号 CP001628)通过 PCR 从上述菌株的基因组 DNA 中扩增得到。上游引物: 5'-GCGCGGATCCATGGACACCATGACTCTCTTC ACC-3',下游引物:5'-GATCAAGCTTTCAGGCCTG CGGCAGGACGAGCTCC-3',划线部分为 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。PCR 反应体系: *M. luteus* IAM 14879 基因组 DNA (50 ng/ μ L) 1 μ L, 上、下游引物(20 pmol/ μ L)各 1 μ L, PrimeSTAR Max Premix (2 \times) 25 μ L,灭菌去离子水补足到 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。反应结束电泳检测 PCR 产物。PCR 产物经限制性内切酶酶切,应用同样酶切割 pET-28a 质粒。然后将酶切的目的基因片段与线性载体片段利用 T4 DNA 连接酶连接,构建重组质粒 pET-28a-*rpf*。连接产物转化 *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus 感受态细胞,用含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基进行阳性克隆筛选,随机挑取单克隆进行测序验证。

1.5 蛋白质表达和纯化

将测序验证正确的工程菌株接种到 200 mL 改良的 SOB 液体培养基^[7]中(含 50 μ g/mL 卡那霉素), 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养,待菌体生长到 OD_{600} 为 0.6–0.8 时,加入终浓度 0.001 mol/L IPTG 诱导, 24 $^{\circ}$ C、100 r/min 培养 12–16 h 后, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体。加入 5–10 倍体积的

0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)重悬菌体,超声(500 W, 超声 2 s 间隔 2 s, 共 20 min)破碎后 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min 收集上清得到蛋白粗提液。因为所表达的目标蛋白 N-端含有组氨酸标签,应用镍亲和柱对重组蛋白进行纯化,用 0.1 mol/L 咪唑洗脱目的蛋白,洗脱体积为 10 mL。利用 SDS-PAGE 电泳检测目标蛋白的纯度。最后所洗脱的蛋白组分经 2 次透析去除咪唑,经 0.22 μ m 滤膜抽滤灭菌后分装保存于-20 $^{\circ}$ C 待用。

1.6 *M. luteus* IAM 14879 的休眠状态诱导、RPF 生理活性验证及不同浓度 RPF 对复苏促进活力的影响

Micrococcus luteus IAM 14879 休眠状态诱导采用 Puspita 等^[15]方法,在限制溶氧条件下诱导细胞进入不分裂状态:首先将 *Micrococcus luteus* IAM 14879 甘油保存菌液接种到含有 LMM 培养基(Lactate minimal medium)的微量培养瓶中,拧紧瓶盖使其密封, 30 $^{\circ}$ C、140 r/min 振荡培养 10 d,随后静置 50 d。将 100 μ L 缺氧状态的菌液分别接种到 10 mL LMM 培养基中,实验组添加终浓度为 5 μ g/mL 纯化的重组 *MIRPF* 蛋白,对照组添加等量高温失活的重组 *MIRPF* 蛋白, 30 $^{\circ}$ C、140 r/min 培养 120 h,期间每间隔 24 h 在 LMM 固体平板上测定 CFU,每组平行测定 3 次。

将缺氧诱导进入休眠状态的 *M. luteus* IAM 14879 等量接种到分别含有终浓度为 5 μ g/mL (0.19 pmol/L)、5 ng/mL (0.19 nmol/L)、5 μ g/mL (0.19 μ mol/L)纯化的 *MIRPF* 的 10 mL LMM 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、140 r/min 培养。每间隔 24 h 测定 OD_{600} ,监测 *M. luteus* 生长情况,每组平行测定 3 次,以添加灭菌的去离子水作为对照。

1.7 RPF 复苏活性污泥样品中潜在休眠细菌及其对垃圾渗滤液废水的强化处理

活性污泥样品采自杭州市某垃圾渗滤液处理厂好氧池,取 1 mL 泥水混合样品, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 2 min 后弃上清,用 1 mL 灭菌去离子水涡旋混匀洗涤, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 2 min 后得上清。

利用 MPN (Most probable number) 计数法培养: 实验共分为两组(RPF 处理组和 RPF 对照组), 每组 3 个平行实验。取 100 μL 污泥上清液接种于装有 LB 液体培养基的微量培养瓶中, 记为 10^{-1} , 摇匀后再从 10^{-1} 瓶取 100 μL 混合液到下一个培养瓶中, 记为 10^{-2} , 依次类推至 10^{-6} 瓶, 最后逐个培养瓶中添加终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 重组 M/RPF 蛋白; 另外一组同样操作添加等量高温失活的 M/RPF 蛋白作为对照。30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养, 期间观察培养液澄清度, 测定菌液密度, 每组 3 个平行实验。然后通过平板划线法对培养瓶中的菌液进行分离纯化,

根据菌落形态特征初步判断菌种的种属, 挑取单个菌落扩大培养后将菌液送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rRNA 基因鉴定分析。

该垃圾渗滤液处理厂采用生物转盘偶联 A/O 工艺, 现场采取该生物转盘出水, 在连续流小型 A/O 装置中评估 RPF 对该废水的强化处理效果, 设置 2 组, 分别为对照组和处理组(图 1)。厌氧和好氧反应器内径均为 140 mm, 高度为 200 mm, 有效容积约为 3 L, 其中填充聚氨酯填料, 将现场二沉池采取的活性污泥分别等量接种到 2 套小试装置中, 装置进水取自现场生物转盘出水, 调节进水流

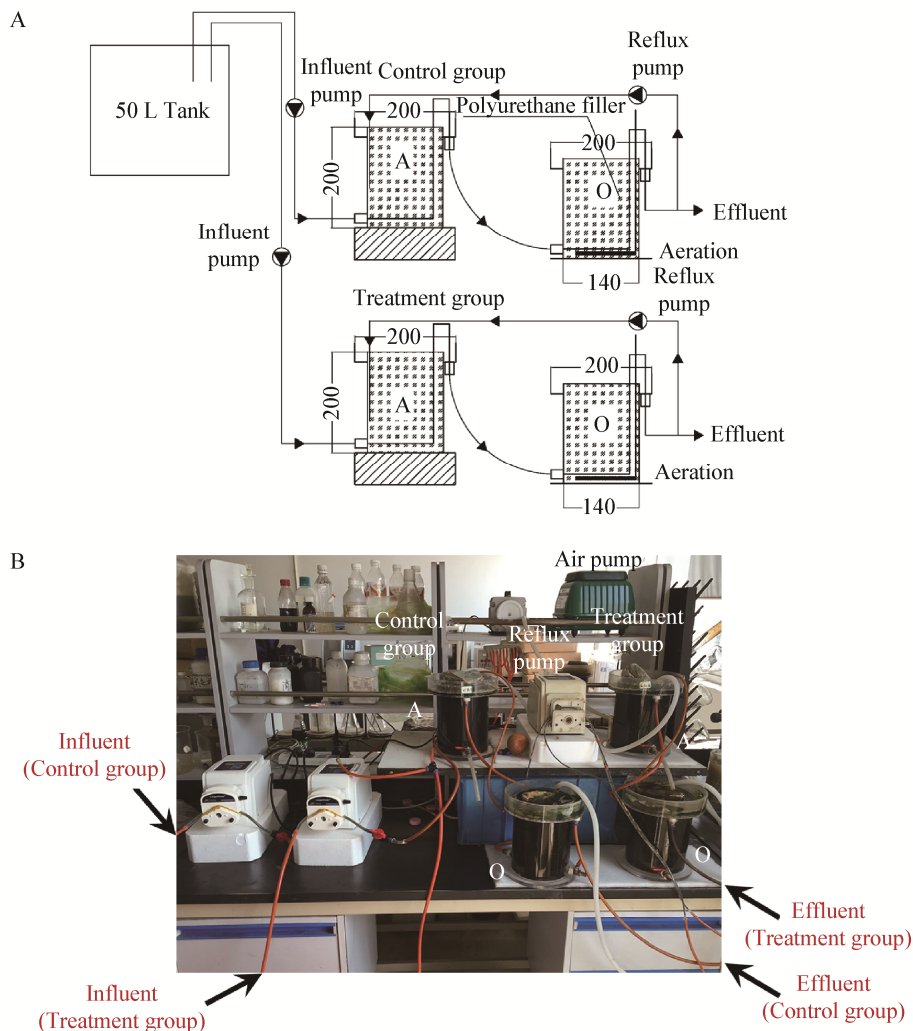


图 1 本研究所使用的 A/O 装置

Figure 1 The A/O equipment used in this study

注: A: 流程图; B: 实物图.

Note: A: Schematic illustration; B: Actual equipment.

速, 使 2 套装置停留时间均为 24 h, 好氧反应器溶解氧浓度控制在 1–2 mg/L, 温度为室温, 连续运行 30 d, 其中前 10 天为污泥驯化阶段, 系统内循环, 处理组添加终浓度为 10%(体积比)的 RPF 粗提液(制备方法同 1.5), 对照组添加等量高温灭活的 RPF 粗提液, 随后 20 d 连续进水, 期间定期取样, 分别测定进出水的 COD_{Cr}、NH₃-N 和 TN, 测定方法参照标准方法^[16]。

2 结果与讨论

2.1 RPF 同源序列比对及结构分析

系统进化树表明 *MIRPF* 与来源于 *Glutamicibacter nicotianae* 的复苏促进因子(蛋白登录号为 ABB51647)

处于同一分支(图 2), 二者序列相似性为 93%, 而一致性为 34%, 亲缘关系较近, 而远离其它 RPF 家族成员; 与来源于 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 的 5 个同源蛋白 Rpf A–E 具有较低的序列一致性(序列一致性为 10.2%–23.5%), 进化树分析表明不同细菌来源的 RPF 在序列长度、遗传结构及宿主种类存在较大差异。

虽然在不同细菌来源的 RPF 蛋白序列长度存在较大差异, 但这些序列 N 末端具有一段保守区域, 称为“RPF 结构域”, 长度约 75 个氨基酸, 所有的 RPF 结构域与 C 型溶菌酶家族具有同源性, 活性中心均具有高度保守谷氨酸残基(图 3), 该谷氨酸残基对于复苏活性至关重要^[17–18]。

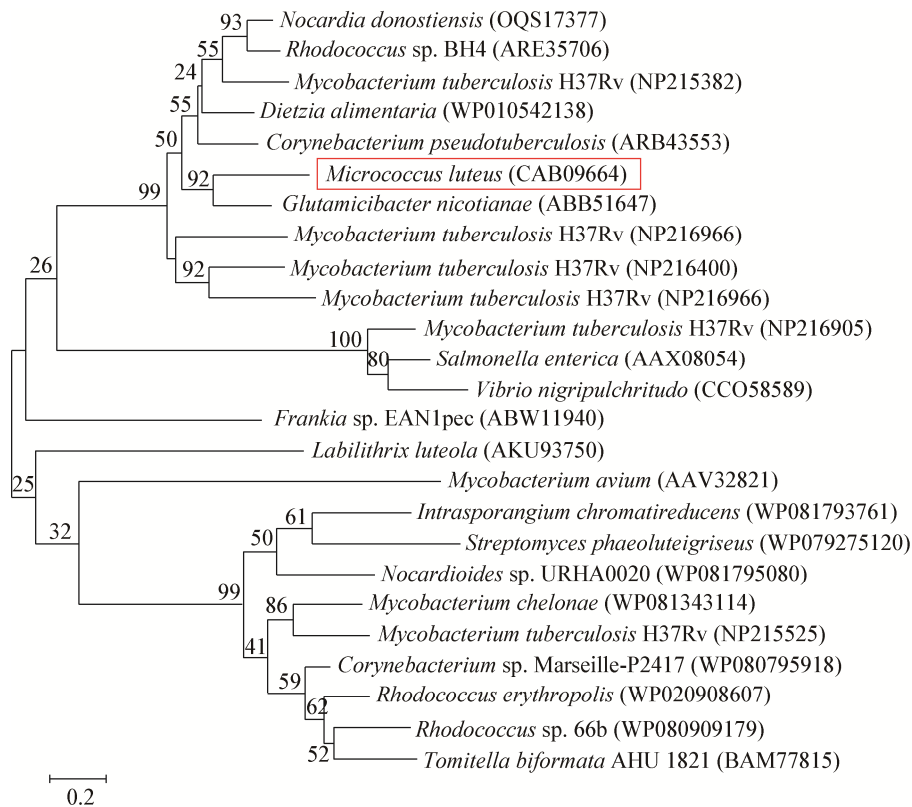


图 2 来源于 *M. luteus* RPF (*MIRPF*)及其同源蛋白的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of *M. luteus* RPF (*MIRPF*) and other RPF homology proteins

注: 方框内为 *MIRPF*; 括号内编号为 GenBank 中蛋白序列登录号; 节点上的数字为 Bootstrap 值(1 000 次重复抽样的百分比); 比例尺代表遗传距离为 0.02, 每 100 个氨基酸有两个不同。

Note: The *MIRPF* is indicated in square; Numbers in bracket are the protein sequences accession number in GenBank; Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are given at nodes; The scale bar represents the genetic distance is 0.02, indicates two differences per 100 amino acids.

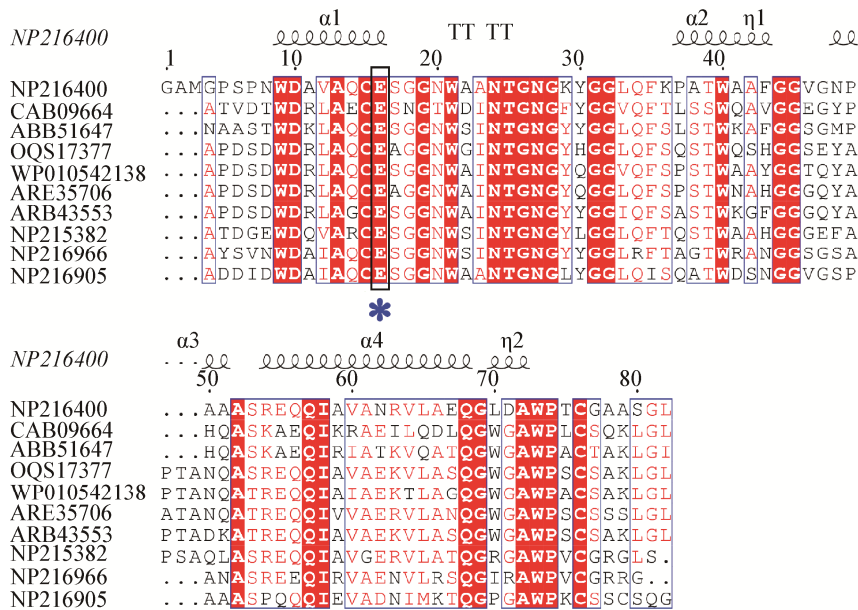


图3 *MIRPF* 及其同源蛋白“RPF 结构域”区域多序列比对

Figure 3 The “RPF-domain” region of the multiple sequence alignment of *MIRPF* with other homology proteins

注：星号标注了 RPF 家族高度保守的谷氨酸残基。NP216400: RpfC (PDB ID: 2N5Z), 来源于 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; CAB09664: *MIRPF*, 来源于 *M. luteus*; ABB51647: 来源于 *Glutamicibacter nicotianae*; OQS17377: 来源于 *Nocardia donostiensis*; WP010542138: 来源于 *Dietzia alimentaria*; ARE35706: 来源于 *Rhodococcus* sp. BH4; ARB43553: 来源于 *Corynebacterium pseudotuberculosis*; NP215382: RpfA, 来源于 *M. tuberculosis* H37Rv; NP216966: RpfE, 来源于 *M. tuberculosis* H37Rv; NP216905: RpfD, 来源于 *M. H37Rv*.

Note: Conserved glutamate residues in RPF family are labeled in asterisk. NP216400: RpfC (PDB ID: 2N5Z) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; CAB09664: *MIRPF* from *M. luteus*; ABB51647 from *Glutamicibacter nicotianae*; OQS17377 from *Nocardia donostiensis*; WP010542138 from *Dietzia alimentaria*; ARE35706 from *Rhodococcus* sp. BH4; ARB43553 from *Corynebacterium pseudotuberculosis*; NP215382: RpfA from *M. tuberculosis* H37Rv; NP216966: RpfE from *M. tuberculosis* H37Rv; NP216905: RpfD from *M. H37Rv*.

对该区域(Ala42–Leu120)进行同源建模, 结果表明 *MIRPF* 的“Rpf 结构域”由 4 个 α -螺旋组成, 活性中心 54 位谷氨酸位于其中一个 α -螺旋上(图 4A); 结构比对发现 *MIRPF* 与 *Mycobacterium tuberculosis* RpfC (PDB ID: 2N5Z)具有极其相似的空间结构, 主链碳原子均方根偏差(Root-mean-square Deviation, RMSD)值为 2.23 Å, 活性中心谷氨酸残基在空间位置上几乎重叠(图 4B); 而与典型的 C 型溶菌酶空间结构比对表明建模的 *MIRPF* 与 C 型溶菌酶具有相似的空间结构(图 4C), 主链碳原子的 RMSD 为 7.806 Å, 这表明这 2 种蛋白具有相似的生物学功能, 即具有溶菌酶活性, 这有助于进一步解释 RPF 的复苏促进机制。

2.2 重组 *MIRPF* 蛋白的异源表达和纯化

由于 *M. luteus* IAM 14879 自身分泌的复苏促进因子含量极低、提取困难, 因此不利于直接利用培养藤黄微球菌来制备复苏促进因子。我们将 *rpf* 基因插入到表达质粒 pET-28a(+)中, 该质粒可使表达的目的蛋白在 N 端带有组氨酸标签, 能够与特异亲和和组氨酸标签的镍离子亲和柱相结合, 方便纯化。测序验证正确的重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus, 工程菌株诱导表达后, 全细胞破碎液利用镍亲和柱纯化, 最后经 Washing buffer (含 0.1 mol/L 咪唑)洗脱, 可以得到高纯度的目的蛋白, 在 20–30 kD 之间获得均一蛋白条带(图 5), 且与理论预测分子量相符, 这表明来源于 *M. luteus* 的复

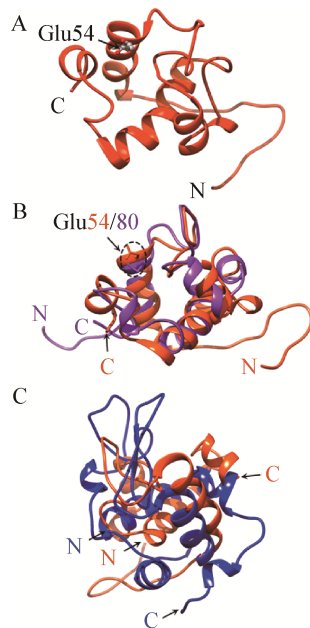


图4 复苏促进因子结构

Figure 4 The structure of the “RPF-domain”

注: A: *MIRPF* 模建结构, 箭头指示了活性中心 54 位谷氨酸; B: *MIRPF* 模建结构(桔色), 与来源于 *Mycobacterium tuberculosis* RpfC (PDB ID: 2N5Z) (紫色) 结构比对; C: *M. luteus* 模建结构(桔色), 与来源于 *Oncorhynchus mykiss* 的 C 型溶菌酶(PDB ID: 1LMQ) (蓝色) 结构比对。

Note: A: Structure of modeled *MIRPF*, the arrow indicates the Glu of active center at position 54; B: Structural superimposed between modeled *MIRPF* (orange) and RpfC (purple) from *Mycobacterium tuberculosis* (PDB ID: 2N5Z); C: Structural superimposed between modeled *MIRPF* (orange) and C-type lysozyme (blue) from *Oncorhynchus mykiss* (PDB ID: 1LMQ).

苏促进因子基因在大肠杆菌中实现了可溶性表达, 1 L 培养液中大约能获得 100 mg 的目的蛋白。构建了表达 *MIRPF* 的基因工程菌, 至此可以简单、快速地进行 *MIRPF* 制备。

2.3 重组 *MIRPF* 复苏活性研究

为了验证大肠杆菌异源表达所制备的重组 *MIRPF* 复苏促进活性, 将 *Micrococcus luteus* IAM 14879 经过 60 d 缺氧诱导, 此时细菌总数低至 3.28×10^3 CFU/mL。考察了 *MIRPF* 对缺氧条件诱导的 *M. luteus* 促生长效果, 如图 6A 所示, 培养 72 h 后, *MIRPF* 处理组细菌总数开始增长, 并进入到对数生长期, 对数期相比对照组(添加失活 *MIRPF*)显著缩短; 培养 120 h 后, 添加 *MIRPF* 的培养液中

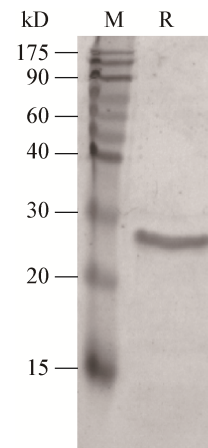


图5 SDS-PAGE 分析 *MIRPF* 蛋白在大肠杆菌中表达
Figure 5 SDS-PAGE analysis of recombinant *MIRPF* expressed in *E. coli*

注: M: 蛋白分子量标准; R: 镍亲和柱纯化获得的重组 *MIRPF* 组分(0.1 mol/L 咪唑洗脱)。

Note: M: Protein molecular weight standard; R: Purified *MIRPF* fractions by Ni-NTA affinity column (eluted with 0.1 mol/L imidazole).

细菌总数达到 1.01×10^8 CFU/mL, 而对照细菌总数为 2.22×10^7 CFU/mL, 提高 4.5 倍。这一结果表明利用大肠杆菌异源表达所制备的重组 *MIRPF* 维持了其生理活性, 即能够促进休眠状态 *M. luteus* 生长。Puspita 等^[15]的研究也表明来源于 *Tomitella biformata* AHU1821 的复苏促进因子(经大肠杆菌表达系统制备获得)对不分裂状态的 *T. biformata* 具有明显促生长效果, 且随着添加复苏促进因子浓度的提高, 菌体生长加快, 进入对数生长期的时间显著缩短。另外不同来源的复苏促进因子促生长活力存在显著差异, *M. luteus* 的 RPF 极其灵敏, 作用浓度限为皮摩尔(pmol/L)^[11], 而 *T. biformata* 的 RPF 作用浓度限为那摩尔(nmol/L)^[15], 不同细菌来源的 RPF 复苏活性差异可能与蛋白质氨基酸序列及空间结构相关。

进一步考察了不同浓度量级(分别为 pmol/L、nmol/L 和 μ mol/L)的 *MIRPF* 对复苏活性的影响, 如图 6B 所示, 添加不同浓度量级的 *MIRPF* 对于休眠状态的 *M. luteus* 均具有显著的复苏活性, 且随着浓度提高复苏活性增强, 在 pmol/L、nmol/L

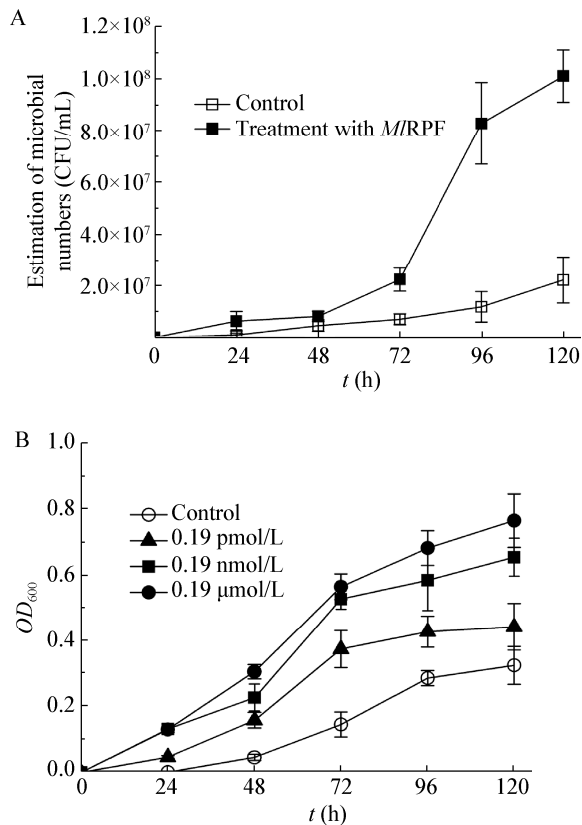


图6 MIRPF对缺氧诱导的*M. luteus* IAM 14879的复苏活性

Figure 6 The growth-promoting activity of MIRPF on *M. luteus* IAM 14879 with induced under oxygen-limited culture conditions

注: A: MIRPF对休眠态*M. luteus* IAM 14879的促生长曲线; B: 不同浓度MIRPF处理对休眠态的*M. luteus* IAM 14879的影响。
Note: A: The growth-promoting curves of dormant *M. luteus* IAM 14879 after treatment with MIRPF; B: Effect of different MIRPF protein concentrations on dormant *M. luteus* IAM 14879.

和 $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度下, 相比对照复苏活性分别提高 1.4、2.0 和 2.4 倍, 该结果进一步验证了 *M. luteus* 的 RPF 具有极其敏感的作用浓度, 这种敏感性可能取决于蛋白质活性中心氨基酸种类及独特的空间结构, 该假设需要今后做更深入地研究验证。

2.4 MIRPF对活性污泥中休眠细菌的复苏促进作用

利用 MIRPF 复苏促进作用发掘污水生物处理系统中潜在的土著微生物类群, 最大限度地激发土著微生物对污染基质的降解效率, 用于污水的强化

处理和生物修复。采集了某垃圾渗滤液处理厂的活性污泥样品, 利用纯化的 MIRPF 对其中菌群开展了复苏促生长研究, 利用 MPN 计数法培养, 如图 7 所示, RPF 处理组和对照组在低稀释浓度(10^{-1} – 10^{-3}) 情况下都存在明显混浊现象; 而在 10^{-4} 稀释浓度下, 对照组仅有轻微浑浊现象, RPF 处理组呈现明显浑浊现象; 在 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释浓度下对照组都表现澄清无混浊现象; 而在同一稀释段的 RPF 处理组中的两个培养瓶均呈现明显浑浊。这些结果表明 MIRPF 对供试污泥样品中的菌群有较明显的促进作用, 在高稀释浓度下, 添加活性 MIRPF 处理的培养瓶中菌

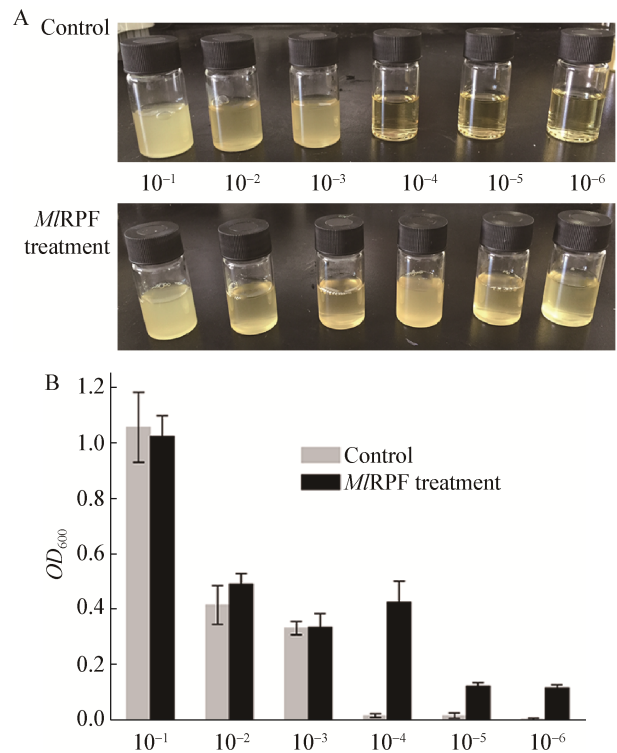


图7 活性污泥样品经 MIRPF 处理培养 120 h 后的菌密度分析

Figure 7 Analysis of bacterial density of activated sludge sample by treatment with MIRPF after 120 h culture

注: A: 不同稀释度培养瓶中菌密度观察; B: 经 MIRPF 处理活性污泥培养 120 h 后细菌光密度对比。

Note: A: Observation of bacterial density in different dilution bottles; B: Comparison of the bacterial optical density of activated sludge sample by treatment with MIRPF after 120 h culture.

液密度明显比对照组高, 即菌液浓度高, 说明供试污泥样品中可能存在一定数量的休眠(或不占优势生长较为缓慢)的细菌种属。随后进一步对培养瓶中的细菌进行了分离和纯化, 通过反复划线分离培养后, 对不同形态的菌种分离纯化。经 16S rRNA 基因鉴定, 结果见表 1, 经 RPF 处理所获得的 4 个菌株分别为 *Dietzia*、*Paracoccus*、*Rhodococcus*、*Brevundimonas*; 而其余菌株在对照组和 MIRPF 处理组均分离获得。虽然我们没有对这些菌株逐一进行性质表征, 但这些菌属在废水处理及生态修复领域均具有较好的应用前景, 其中最近相似株 *D. sp.* ZQ-4 可以高效降解中长链烷烃^[19]; *P. pantotrophus* 具有高效异养硝化好氧反硝化功能^[20]; *R. sp.* ZH8 可以降解芳香族化合物^[21]及长链烷烃^[22]; *B. sp.* YIM KMY42-2 能够吸收重金属^[23]、降解有机磷杀虫剂^[24]。我们将 16S rRNA 基因测序所获得的序列构建了系统进化树, 如图 8 所示, 经 RPF 复苏所获得

表 1 MIRPF 复苏活性污泥样品中休眠细菌的 16S rRNA 基因鉴定结果

Table 1 The results of 16S rRNA gene identification of dormant bacteria from activated sludge sample after treatment with MIRPF

编号 Number	最近相似细菌 The most similar bacteria	GenBank 登录号 GenBank No.	一致性 Identity (%)
1*	<i>Dietzia sp.</i> ZQ-4	JQ809512.1	97
2*	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	AB681113.1	98
3*	<i>Rhodococcus sp.</i> ZH8	EU167912.1	98
4 [#]	<i>Bacillus firmus</i> strain PAN MC15	HQ285922.1	99
5*	<i>Brevundimonas sp.</i> YIM KMY42-2	DQ358649.1	99
6 [#]	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain LS401	U26417.1	99
7 [#]	<i>Bacillus sp.</i> CMJ1-20	KC119106.1	99
8 [#]	<i>Microbacterium sp.</i> JCM28704	LC133735.2	100
9 [#]	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KU922448.1	100

注: *: 仅在 MIRPF 处理组中分离获得; [#]: 在对照组和 MIRPF 处理组均分离获得。

Note: *: Only obtained in the MIRPF treatment group; [#]: Both the control group and the MIRPF treatment group are isolated.

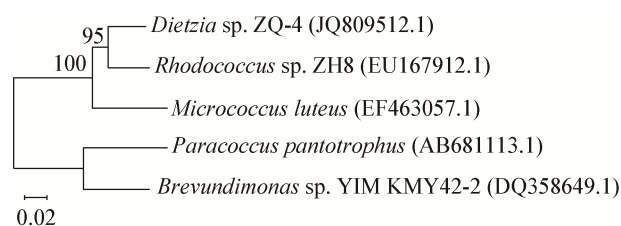


图 8 基于 16S rRNA 基因序列从活性污泥中分离获得细菌的系统进化树

Figure 8 Phylogenetic tree of bacteria strains from activated sludge sample based on 16S rRNA gene

注: 括号内编号为 GenBank 中基因序列登录号; 节点上的数字为 Bootstrap 值(1 000 次重复抽样的百分比); 比例尺代表遗传距离为 0.02, 每 100 个核苷酸有两个不同。

Note: Numbers in bracket are the nucleotide sequences accession number in GenBank; Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are given at nodes; The scale bar represents the genetic distance is 0.02, indicates two differences per 100 nucleotides.

的 1 号 *Dietzia* 和 3 号 *Rhodococcus* 菌株与 *M. luteus* 处于同一分支, 与 2 号 *Paracoccus* 和 5 号 *Brevundimonas* 距离较远, 这些结果表明 MIRPF 对除自身宿主(*M. luteus*)以外的某些微生物类群同样具有复苏促进效果, 具有广谱性。

随后我们利用两套平行连续流小试 A/O 装置, 模拟取样现场的废水处理工艺, 进一步表征 MIRPF 对废水的强化处理效果, 处理组添加 MIRPF 粗提液, 对照组添加等量高温灭活的 MIRPF 粗提液, 两组装置活性污泥经过 10 d 的驯化后连续进水, 两套装置出水的 COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 TN 曲线变化相似, 即前 10 天缓慢下降, 随后稳定(图 9 A-C): 现场采取水样的 COD 平均值为 505.61 ± 36.82 mg/L, 经小试装置处理后, 污泥驯化期间(前 10 天)两套装置 COD 缓慢下降, 随后稳定(图 9A), 对照组运行后 20 d 出水 COD 平均值为 170.06 ± 20.44 mg/L, 而处理组出水 COD 平均值为 145.81 ± 12.60 mg/L, 相比对照组 COD 处理效率提高 7.2%; 现场采取水样的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 平均值为 27.96 ± 0.81 mg/L, 对照组运行后 20 d 的出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 平均值为 11.67 ± 1.02 mg/L, 而处理组平均值为 10.55 ± 0.97 mg/L, 相比对照组 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 处理效率提高 6.9%; 现场采取水样的 TN

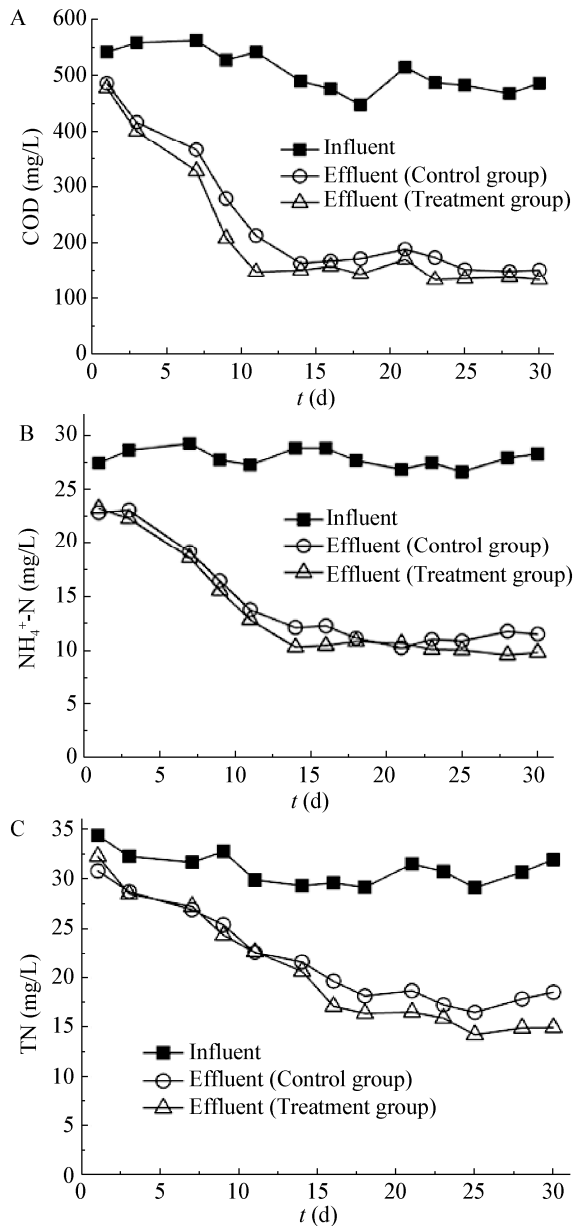


图9 两套平行 A/O 装置连续运行 30 d 期间的水质变化
Figure 9 The variations of water quality from two sets of lab-scale A/O equipment during continuous running for 30 days

注: A: 化学需氧量; B: 氨氮; C: 总氮.

Note: A: Chemical oxygen demand, COD; B: Ammonia nitrogen; C: Total nitrogen, TN.

平均值为 31.07 ± 1.61 mg/L, 对照组运行后 20 d 出水 TN 平均值为 18.98 ± 1.87 mg/L, 而处理组出水平均值为 17.05 ± 2.64 mg/L, 相比对照组 TN 处理效率提高 16.0%, Liu 等^[25]研究也表明利用 *M. luteus* 培养上清所制备的 RPF 粗提液(SRpf)可以使小型序批

式反应器对于人工模拟废水 TN 的去除效率提高 8%。我们的研究结果进一步表明活性污泥经 MIRPF 驯化后可极大地激发污水生化处理系统中土著微生物对污染基质的降解效率, 进而为基于 MIRPF 的废水生物强化处理及生物修复技术研发提供理论依据。

3 结论

对来源于 *Micrococcus luteus* 的复苏促进因子 (MIRPF) 的蛋白序列进行了生物信息学分析及结构建模, 结果表明 MIRPF 具有与 C 型溶菌酶相似的空间结构, 这有助于进一步理解复苏促进因子的作用机制。

克隆了来源于 *M. luteus* 的 *rpf* 基因, 在大肠杆菌中实现了可溶性表达, 经大肠杆菌表达系统所制备的纯化 MIRPF 保持了其复苏活性, 它可以使经缺氧诱导进入休眠状态的 *M. luteus* 群落总数提高 4.5 倍。

利用 MIRPF 对活性污泥样品潜在的微生物菌群开展了复苏研究, 验证了污水生化处理系统中存在一定数量的休眠细菌, 在经 MIRPF 处理的污泥样品中分离获得了 *Dietzia*、*Paracoccus*、*Rhodococcus*、*Brevundimonas* 菌株, 表明 MIRPF 对除自身宿主 (*M. luteus*) 以外的某些微生物类群同样具有复苏促进效果, 具有广谱复苏活性, 这有助于极大地激发污水生化处理系统中土著微生物对污染基质的降解效率。这些结果一方面为环境样品中微生物多样性研究及特殊微生物资源的发掘提供新的途径。另一方面为 MIRPF 在废水生物强化处理及生物修复领域的应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, et al. A bacterial cytokine[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(15): 8916-8921
- [2] Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, et al. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(3): 623-635
- [3] Hartmann M, Barsch A, Niehaus K, et al. The glycosylated cell surface protein Rpf2, containing a resuscitation-promoting factor motif, is involved in intercellular communication of

- Corynebacterium glutamicum*[J]. Archives of Microbiology, 2004, 182(4): 299-312
- [4] Ravagnani A, Finan CL, Young M. A novel firmicute protein family related to the actinobacterial resuscitation-promoting factors by non-orthologous domain displacement[J]. BMC Genomics, 2005, 6: 39
- [5] Schroeckh V, Martin K. Resuscitation-promoting factors: distribution among actinobacteria, synthesis during life-cycle and biological activity[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2006, 89(3/4): 359-365
- [6] Ding LX, Zhang PH, Hong HC, et al. Cloning and expression of *Micrococcus luteus* IAM 14879 Rpf and its role in the recovery of the VBNC state in *Rhodococcus* sp. DS471[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(1): 77-82 (in Chinese)
丁林贤, 张萍华, 洪华嫦, 等. 藤黄微球菌 Rpf 活性蛋白的制备及其对红球菌 VBNC 菌体的复苏作用[J]. 微生物学报, 2012, 52(1): 77-82
- [7] Mukamolova GV, Murzin AG, Salina EG, et al. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(1): 84-98
- [8] Kana BD, Mizrahi V. Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2010, 58(1): 39-50
- [9] Li SH, Jin Y, Cheng J, et al. *Gordonia jinhuaensis* sp. nov., a novel actinobacterium, isolated from a VBNC (viable but non-culturable) state in pharmaceutical wastewater[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2014, 106(2): 347-356
- [10] Su XM, Liu YD, Hashmi MZ, et al. *Rhodococcus biphenylivorans* sp. nov., a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 107(1): 55-63
- [11] Su XM, Shen H, Yao XY, et al. A novel approach to stimulate the biphenyl-degrading potential of bacterial community from PCBs-contaminated soil of e-waste recycling sites[J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 27-34
- [12] Su XM, Zhang Q, Hu JX, et al. Enhanced degradation of biphenyl from PCB-contaminated sediments: the impact of extracellular organic matter from *Micrococcus luteus*[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2015, 99(4): 1989-2000
- [13] Puspita ID, Kitagawa W, Kamagata Y, et al. Increase in bacterial colony formation from a permafrost ice wedge dosed with a *Tomitella biformata* recombinant resuscitation-promoting factor protein[J]. Microbes and Environments, 2015, 30(2): 151-156
- [14] Kelley LA, Sternberg MJ. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server[J]. Nature Protocols, 2009, 4(3): 363-371
- [15] Puspita ID, Uehara M, Katayama T, et al. Resuscitation promoting factor (Rpf) from *Tomitella biformata* AHU 1821T promotes growth and resuscitates non-dividing cells[J]. Microbes and Environments, 2013, 28(1): 58-64
- [16] Wei FS. Water and Wastewater Monitoring and Analysis Method[M]. 4th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 210-462 (in Chinese)
魏复盛. 水和废水监测分析方法[M]. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 210-462
- [17] Cohen-Gonsaud M, Keep NH, Davies AP, et al. Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2004, 29(1): 7-10
- [18] Cohen-Gonsaud M, Barthe P, Bagn ris C, et al. The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes[J]. Nature Structural and Molecular Biology, 2005, 12(3): 270-273
- [19] Wang XB, Chi CQ, Nie Y, et al. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6-C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 7755-7761
- [20] Robertson LA, van Niel EWJ, Torremans RAM, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(11): 2812-2818
- [21] Martinkov L, Uhnkov B, Ptek M, et al. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*[J]. Environment International, 2009, 35(1): 162-177
- [22] Whyte LG, Hawari J, Zhou E, et al. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(7): 2578-2584
- [23] Resmi G, Thampi SG, Chandrakaran S. *Brevundimonas vesicularis*: A novel bio-sorbent for removal of lead from wastewater[J]. International Journal of Environmental Research, 2010, 4(2): 281-288
- [24] Dumas DP, Caldwell SR, Wild JR, et al. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(33): 19659-19665
- [25] Liu YD, Su XM, Lu L, et al. A novel approach to enhance biological nutrient removal using a culture supernatant from *Micrococcus luteus* containing resuscitation-promoting factor (Rpf) in SBR process[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(5): 4498-4508