

藤黄微球菌 Rpf 活性蛋白的制取及其对红球菌 VBNC 菌体的复苏作用

丁林贤¹, 张萍华², 洪华嫦¹, 林红军¹, 横田明^{1,3}

浙江师范大学,¹ 地理与环境科学学院,² 化学与生命科学学院, 金华 321004

³ 日本东京大学分子细胞生物学研究所, 东京 113-0032

摘要: 【目的】克隆藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* IAM 14879 (= NCIMB 13267) 的复苏促进因子 Rpf (resuscitation promoting factor) 的基因, 在大肠杆菌中表达获取基因重组蛋白, 考察对近缘高 GC 革兰氏阳性菌红球菌 *Rhodococcus* sp. DS471 活的非可培养 VBNC (viable but non-culturable) 菌体的复苏促进生长能力。【方法】抽提制备藤黄微球菌的 DNA, 确定 *rpf* 基因引物进行 PCR 扩增, 利用 pET15b 质粒载体并转化大肠杆菌 DE3 表达, 以 SDS-PAGE 检验获取纯化重组蛋白; 在培养基中添加 Rpf, 以 MPN (most probable number) 法计数、评价对 VBNC 状态菌体的复苏促进生长效果。【结果】基因测序证实获得藤黄微球菌的 *rpf* 基因并在大肠杆菌中表达; SDS-PAGE 分析表明获得 *rpf* 基因的重组蛋白; 该蛋白对处于 VBNC 状态的红球菌具有近 100 倍的复苏促进生长能力。【结论】成功克隆了藤黄微球菌的 *rpf* 基因, 在大肠杆菌中获得了表达, 表明了 Rpf 蛋白对处于 VBNC 状态的红球菌具有复苏促进生长效果。

关键词: 藤黄微球菌, Rpf, 克隆与表达, VBNC, 红球菌

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0077-06

Mukamolova 等^[1]报道了藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* (NCIMB 13267) 在长期静置培养中, 其细胞进入类似休眠的 VBNC 状态; 研究发现该菌在对数期后期能分泌一种使自身处于 VBNC (viable but non-culturable) 状态细胞复苏促进生长的因子 Rpf (Resuscitation promoting factor), 并成功克隆了 *rpf* 基因, 在大肠杆菌中进行了表达, 获得了活性蛋白; Rpf 也能使处于 VBNC 状态的近缘高 GC 革兰氏阳性分支杆菌属 (*Mycobacterium*) 的结核分支杆菌 (*M. tuberculosis*) 等菌种复苏生长; 同时指出 Rpf 类似基因也存在于其他近缘高 GC 革兰氏阳性细菌中^[2-4]。十数年来, 有关 Rpf 的研究主要集中在对

人体 VBNC 菌体如分支杆菌属的部分菌种的复苏、抗体和免疫学等方面研究, 对于土壤、水域等自然环境中处于 VBNC 状态微生物是否具有复苏促进生长作用等相关研究很少见有报道。为考察 Rpf 对其他相关领域中处于 VBNC 状态的高 GC 革兰氏阳性细菌的作用, 我们通过克隆藤黄微球菌的 *rpf* 基因, 在大肠杆菌中表达以获取基因重组蛋白; 利用 Rpf 考察对源于土壤的近缘高 GC 革兰氏阳性菌红球菌 *Rhodococcus* sp. DS471^[5] 的 VBNC 菌体的复苏生长能力, 旨在以利用 Rpf 为研究手段, 针对土壤生态环境中占 90% - 99.9% 即绝大部分处于难培养以及 VBNC 状态的细菌是否同样具有复苏促进作用, 为

基金项目: 浙江省钱江人才计划 (2011R10031); 浙江师范大学教授科研基金 (ZC304009160)

作者简介: 丁林贤 (1957 -), 男, 浙江省义乌市人, 博士, 研究方向为环境微生物学。Tel: +86-579-82282273; E-mail: linxian@zjnu.cn

收稿日期: 2011-09-12; **修回日期:** 2011-11-04

解明 VBNC 菌体的形成、复苏活性化机理,揭示土壤生态环境中难培养、VBNC 状态微生物多样性,未知微生物资源的开发利用提供新的研究思路与途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料:供试菌种藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* IAM 14879 (= NCIMB 13267) 由东京大学分子细胞生物学研究所菌种保藏中心提供;红球菌 *Rhodococcus* sp. DS471 由本文第一作者分离自土壤中处于 VBNC 状态、使用 Rpf 复苏后成为可培养化的菌种(-80℃保存),在 Nutrient Broth (美国 Difco No. 234000) 培养基上维持培养。

1.1.2 主要试剂和仪器:Proteinase K (Sigma P6556, 1 mg/mL); BL buffer (实验室制备, pH8 Tris 40mol/L, Tween20 1%, Nonidet P-40 0.2%, EDTA 0.2 mol/L); PCR 扩增 Taq 酶与引物由 TaKaRa Bio Inc. 生产提供,其中 *rpf* 基因 PCR 引物碱基组成为: Rpf-F: 5'-GTCAGAAATTCATATGGCCA CCCTGGACACCTGGG-3', Rpf-R: 5'-TGACGGAT-CCTATTAGGCCTGCGGCAGGACGAG-3', 质粒载体 pET15b 的 T7 启动子引物序列为: T7-pro: 5'-TAATACGACTCACTATAG-3' (Size = 18, Tm = 48); T7-ter: 5'-CTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (Size = 18, Tm = 54); Spin (JETQUICK PCR Purification Spin Kit 和 GFXTMP CR DNA and Gel Band Purification Kit) 由 Amersham Pharmacia Biotech 生产提供;重组蛋白抽提试剂盒 BugBuster Protein Extraction reagent and Benzonase 由德国 Merck Chemicals 生产提供;蛋白纯化试剂盒 Ni-NTA Spin Kit, Cat. No. 31314 由 QIAGEN Japan 生产提供。PCR 仪采用 PCR Express (HYBAID);电泳仪、凝胶成像分析系统、离心机、测序仪分别采用日本的 ADVANCE (Mupid® -2plus), TAITEC 落射式荧光摄影装置 (Epi-LightUV FA500 EU-500M), TOMY (MX-100) 和 ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer, PerkinElmer Japan (东京大学分子细胞生物学研究所生物资源研究室自备);重组蛋白电泳确认与纯化精制采用日本第一化学药品株式会社生产的“第一”微型二联式 (PAG 微型专用电泳仪) 及搭载 SDS-PAGE (Polyacrylamide Gel) 装置进行。

1.2 藤黄微球菌 DNA 的调制

Micrococcus luteus IAM 14879 在 Nutrient Broth 培养基上培养至对数期,用 11000 × g 离心 5min 收集菌体细胞。DNA 的抽提、纯化与制备采用平石法^[6]。细胞用灭菌 MilliQ 水洗 3 次后,添加 Proteinase K 50 μL 和 BL buffer 250 μL 充分混合,60℃ 水浴 20 min 静置。在 100℃ 沸水中维持 5 min 让蛋白酶失活。冷却至室温后用 11000 × g 离心 5 min,上清液作为基因组 DNA 抽取液。

1.3 *rpf* 基因扩增引物与 PCR

rpf 基因 PCR 扩增程序参照 Mukamolova^[1] 方法。

PCR 反应液组成为: Deionized water 7.8 μL, dNTP 5.0 μL (2.5 mol/L), 2 × Buffer 25.0 μL, Primer (Rpf-F) 5.0 μL, Primer (Rpf-R) 5.0 μL, *M. luteus* 模板 DNA 2.0 μL, La Taq 0.2 μL, Total 50.0 μL。

PCR 反应程序: 94℃ 2 min 预热; 94℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 1.5 min, 30 个循环,再经 72℃ 10 min 后于 4℃ 保持。完成 PCR 扩增后,其扩增结果 PCR 产物的长度经浓度为 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳予以确认。依据 Purification Kit 的使用方法对 PCR 产物进行精制。

1.4 *rpf* 基因的克隆、表达与蛋白精制

将精制后的 PCR 产物与限制性双切酶 *Bam*H1 和 *Nde*I 以及质粒载体 pET15b, 在 37℃ 温度下反应 60 min 后,温度调至 70℃ 使双切酶失活,反应液经 Spin 试剂盒精制,琼脂糖凝胶电泳确认载体从靶位酶切后的 DNA 长度以及 Rpf 基因插入载体后 DNA 的长度是否正确。基于限制性双切酶修饰的质粒载体与 Rpf (pET15bp-Rpf), 经质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞进行融合反应,在含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上 37℃ 过夜培养。选取白色菌落,采用 pET15b 质粒载体专用引物 (T7 启动子引物) 以直接法进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物长度,确认标靶基因 *rpf* 是否正确插入融合,并经测序仪测序对比检验 *rpf* 基因与 pET15b 质粒载体整体序列是否一致。经确认融合成功的质粒转化细胞前菌浓度 $OD_{600} = 0.9$, 在含 IPTG 0.4 mmol/L 的 LB 液体培养基里 37℃、8 h 诱导摇床培养^[1], 获取重组蛋白培养菌液。经重组蛋白抽提以及纯化试剂盒进行蛋白纯化精制,确认 Rpf 重组

蛋白的生成。抽提纯化的 Rpf 蛋白在 -20°C 保存。

1.5 红球菌 *Rhodococcus* sp. DS471 的 VBNC 状态菌体的形成

Rhodococcus sp. DS471 是分离自土壤中处于 VBNC 状态经复苏活化的土壤细菌^[7]。该菌经 30°C 培养 48 h 至稳定期后, 转移至 10°C 条件下进行长期静置培养观察。每间隔一定时间抽取培养液采用平板稀释分离法确定 CFU, 并以显微镜下直接计数 (direct viable counts, DC) 法^[8] 与 CFU 进行对比, 评判 VBNC 状态菌的形成状况。

1.6 Rpf 蛋白对 VBNC 状态菌体的复苏促进作用

为探讨纯化获取的 Rpf 蛋白对 *Rhodococcus* sp. DS471 的 VBNC 菌体的复苏促进生长能力, 分别设定处理组、阳性组和阴性组, 并以 *Rhodococcus* sp. DS471 和 *Micrococcus luteus* IAM 14879 两菌种进行对比试验。即以添加 10% (v/v, 下同) Rpf (在前项 1.4 中所述, 以培养菌液抽提浓缩纯化的蛋白质为实验用 Rpf) 作为处理组, 以添加 10% *Micrococcus luteus* IAM14879 培养上清^[9] 作为阳性对照组, 以高压灭菌锅 121°C , 15 min 对活性 Rpf (纯化蛋白以及 *Micrococcus luteus* IAM 14879 培养上清液) 高温失活, 并分别添加 10% 至培养基中作为阴性组。每组重复 5 次, 采用 MPN (most probable number) 最大或然数法查得对照组与处理组的 MPN 值^[10], 并以平板法对呈现阳性的处理培养菌液进行可培养性确认, 确定 MPN 法相应的可培养细菌总数。用处理组的 MPN 值除以对照组 MPN 值之比确定作为评价 Rpf 对 VBNC 菌体的复苏促进生长能力的基准。选择经 180 d 静置处理的 *Rhodococcus* sp. DS471 和 *Micrococcus luteus* IAM 14879 为供试菌进行实验观察。

2 结果

2.1 *Micrococcus luteus* IAM 14879 的 *rpf* 基因碱基序列与 PCR 产物

Micrococcus luteus IAM 14879 复苏促进因子 *rpf* 基因碱基序列长度为 672 bp (登录号为 Z96935.2, 包含在长度为 2454 bp 的基因编码区内, 起始序列位点 920, 终止序列位点 1591), 设定引物在基因编码区 DNA 中扩增, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物碱基序列长度为 700 – 800 bp 之间, 并经测序确认, 表明 PCR 扩增获取了藤黄微球菌复苏促

进因子的 *rpf* 基因。

2.2 *rpf* 基因克隆与蛋白诱导表达

扩增后 Rpf 的基因片段与质粒载体 pET15b 经限制性双切酶 *Bam*H1 和 *Nde*1 的内切修饰, 用琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切结果显示包含 *rpf* 基因 672 bp 与 pET15b 载体 5802 bp 的 DNA 长度相符。

质粒载体与 Rpf (pET15bp-Rpf) 重组质粒, 经质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞进行融合反应, 经 T7 启动子引物扩增, Rpf 基因插入质粒载体的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶鉴定、测序比较。结果显示 pET15b 载体在大肠杆菌受体细胞中表达的特异性 T7 启动子序列扩增的结果与 pET15bp-Rpf 长度相符。测序结果表明 T7 启动子调控表达了 Rpf 蛋白所在氨基端携带的 6 个连续组氨酸残基, 其基因水平的克隆与正向表达相一致。

2.3 SDS-PAGE 检验 Rpf 蛋白的获得

经确认融合成功的质粒转化细胞, 诱导培养以及经蛋白抽提试剂盒、纯化与精制试剂盒, 获得了 Rpf 重组蛋白, SDS-PAGE 法检验结果见图 1。提纯精制的 Rpf 蛋白经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后在 -20°C 冷柜保存备用。

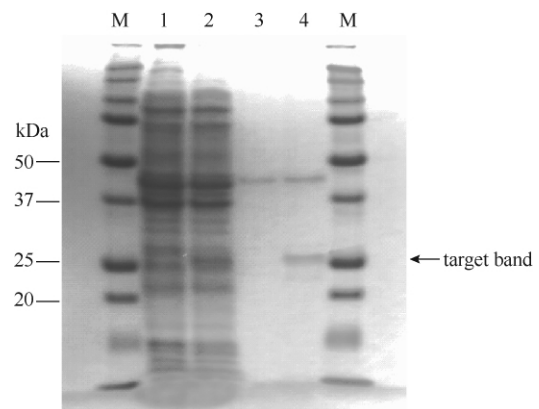


图 1 藤黄微球菌 Rpf 结构域 *rpf* 基因在大肠杆菌 (DE3) 融合表达蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the fusion protein of *Micrococcus luteus* IAM 14879. Rpf domain *rpf* gene expressed in *Escherichia coli* (DE3). M: protein markers; Lane 1: crude extract from *Escherichia coli* containing pET15b vector; Lane 2: crude extract from *Escherichia coli* containing *rpf*; Lane 3: negative purified recombinant Rpf; Lane 4: positive purified recombinant Rpf.

2.4 红球菌 *Rhodococcus* sp. DS471 的 VBNC 菌体形成以及对 Rpf 的应答

Rhodococcus sp. DS471 是土壤中处于 VBNC 状

态经应用 Rpf 复苏活性化取得、其数量处于土壤中优势的高 GC 革兰氏阳性细菌。经实验设置长期静置培养后,该菌具有与藤黄微球菌类似的再度进入 VBNC 状态的特性。静置培养的 CFU 变化情况见图 2。图 2 可以看到,该菌从起始的 3.95×10^8 CFU,经 180 d 静置培养后,显微镜下 DVC 计数结果为 4.95×10^7 ,而经 Nutrient broth 平板培养 CFU 为 4.2×10^4 ,其可培养细胞数下降为原来的 0.01%,绝大部分细胞处于 VBNC 状态。

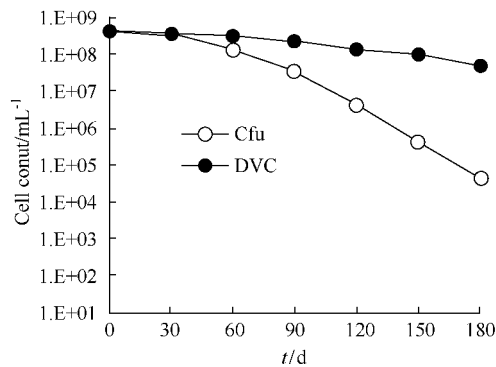


图 2 红球菌 *Rhodococcus* sp. DS471 在 Nutrient broth 培养基中 10°C 静置培养菌数的变化

Fig. 2 Changes in the number of *Rhodococcus* sp. DS471 cultured in nutrient broth medium at 10°C static condition.

处理组 (Rpf 活性蛋白添加)、阴性组 (失活 Rpf 蛋白添加) 与阳性组 (*Micrococcus luteus* IAM 14879 培养上清添加) 的 *Rhodococcus* sp. DS471 和 *Micrococcus luteus* IAM 14879 两种供试菌的 VBNC 状态菌体对 Rpf 的应答结果见图 3。图 3 为 MPN 值所代表的细菌总数 (即浑浊的培养菌液判断为阳性管,以平板分离培养确认混浊物为可培养细菌,查 MPN 表确定细菌总数,置信水平为 95%)。图中可见阴性对照组的失活 Rpf 没有复苏活性,红球菌 *Rhodococcus* sp. DS471 处理组的可培养菌数恢复至 3.98×10^6 , rpf 基因重组蛋白复苏效果达 94.8 倍, *Micrococcus luteus* IAM 14879 培养上清的复苏效果为 90.5 倍;藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* IAM 14879 处理组的可培养菌数恢复至 3.1×10^6 , rpf 基因重组蛋白复苏效果达 93.9 倍, *Micrococcus luteus* IAM 14879 培养上清的复苏效果为 94.2 倍。实验证实克隆表达获得的 Rpf 蛋白与 *Micrococcus luteus* IAM 14879 培养上清对红球菌 *Rhodococcus* sp. DS471 和藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* IAM 14879 的 VBNC 菌体具有相近的复苏活性化效果。

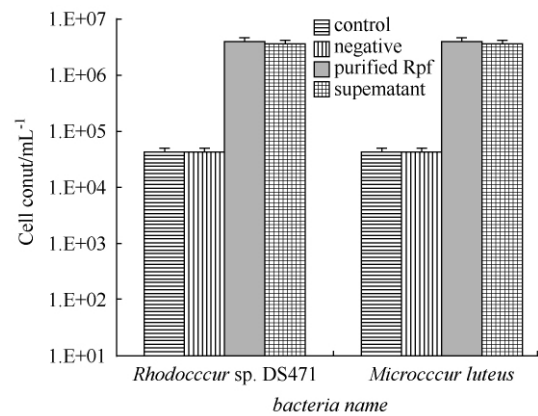


图 3 Rpf 重组蛋白对红球菌和藤黄微球菌 VBNC 菌体的复苏效果

Fig. 3 The resuscitation and promoting results of recombinant Rpf to the VBNC cells of *Rhodococcus* sp. DS471 and *Micrococcus luteus* IAM 14879.

3 讨论

藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* NCIMB 13267 分泌的 Rpf 是世界上首次报道的对其自身以及近缘处于 VBNC 状态的高 GC 革兰氏阳性分支杆菌属 (*Mycobacterium*) 等部分菌种具有复苏活化促进作用的生长因子,是已明确基因碱基序列并能在大肠杆菌中成功表达的活性蛋白。本文着重在对藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* IAM 14879 (= *Micrococcus luteus* NCIMB 13267) 2454 bp 基因编码区域 (登录号为 Z96935.2) 内含 672 bp (碱基序列自 920 至 1591,对应 223 个氨基酸残基) 的 rpf 基因进行克隆与表达,成功获取了 Rpf 的重组蛋白。利用该 Rpf 蛋白,显示了对分离自土壤的红球菌 *Rhodococcus* sp. DS471 在经长期静置培养条件下形成的 VBNC 状态菌体及其藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* IAM 14879 的 VBNC 状态菌体的复苏促进生长作用。实验证明了克隆的 Rpf 基因所表达的活性蛋白与其培养过程中分泌于培养基上清中的活性蛋白,两者对 VBNC 菌体具有同样的复苏促进生长的能力。这些结果可为进一步研究 VBNC 菌的形成、复苏与活化机理,以及藤黄微球菌与其相应的应用开发研究提供参考依据。

藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* NCIMB 13267 的 Rpf 至少包含 672 bp 与另一个 182 bp 的 rpf 基因片段 (后者在本次实验中未进行克隆表达与复苏活性的

研究), 自 1998 年 Mukamolova 研究团队发现原核生物同样具有类似自分泌与旁分泌作用的 Rpf 以来, 主要集中在医学流行病学和免疫学^[11-12] 对分支杆菌属的部分菌种的生长刺激, 抗体形成, 类似基因克隆, 机理机能等方面成为研究热门, 表明该生长因子以及在近缘菌种中存在的类似基因是细菌繁殖不可或缺的生长因子^[13]。土壤是微生物生息的重要场所, 土壤中能分离到与 Rpf 产生菌 *Micrococcus luteus* IAM 14879 近缘相关的高 GC 革兰氏阳性菌的放线菌类 (*Actinomycetes*), 如 *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Leifsonia*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Kitasatospora* 等属细菌^[7,14]。研究指出土壤中可培养细菌只占总量的 0.01% - 4%^[15], 绝大部分细菌处于难培养或 VBNC 状态。有关土壤中 VBNC 细菌的种类、存在实态以及能否复苏生长的研究, 特别是自然生态环境条件下土壤中的 VBNC 细菌对复苏促进因子 Rpf 的应答研究报道不多。在这项实验研究中, 我们通过克隆藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* IAM 14879 的复苏促进因子 Rpf, 在大肠杆菌中表达获得了 *rpf* 基因重组蛋白, 利用活性蛋白对经人工调制处于 VBNC 状态的土壤细菌红球菌 *Rhodococcus* sp. DS471 的菌体进行复苏考证, 报道了藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* IAM 14879 的 Rpf 对源自土壤的 VBNC 近缘高 GC 革兰氏阳性菌同样具有复苏促进生长的能力, 揭示对于土壤生态环境中 VBNC 状态菌的形成机理、分析近缘菌种间在生态环境中的消长规律以及有望作为未知资源细菌的开发利用是一种新的方法和途径, 将为多角度认识和评价微生物多样性、以及应用微生物学所涉及的相关领域的研究提供新的科学依据, 显示出新的开发应用前景。

参考文献

- [1] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, Young M, Kell DB. A bacterial cytokine. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 1998, 95: 8916-8921.
- [2] Shleeva MO, Bagramyan K, Telkov MV, Mukamolova GV, Young M, Kell DB, Kaprelyants AS. Formation and resuscitation of 'nonculturable' cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology*, 2002, 148: 1581-1591.
- [3] Mukamolova GV, Kormer SS, Kell DB, Kaprelyants AS. Stimulation of the multiplication of *Micrococcus luteus* by an autocrine growth factor. *Archives of Microbiology*, 1999, 172 (1): 9-14.
- [4] Mukamolova GV, Turapov OA, Kazarian K, Telkov M, Kaprelyants AS, Kell DB, Young M. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Molecular Microbiology*, 2002, 46 (3): 611-621.
- [5] Ding LX. Studies on the isolation of viable but non-culturable bacteria and the phylogenetic analysis of the genus *Aquaspirillum*. 2004, PhD Thesis, The University of Tokyo.
- [6] Hiraishi A. Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacteria cultures without DNA purification. *Letters in Applied Microbiology*, 1992, 15: 210-213.
- [7] 丁林贤, 苏晓梅, 横田明. 活的但非可培养 (VBNC) 状态菌的研究进展. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2011, 51 (7): 858-862.
- [8] Kogure K, Shimizu U, Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal Microbiology*, 1979, 25: 415-420.
- [9] Kaprelyants AS, Kell DB. Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992, 72: 410-422.
- [10] de Man JC. The probability of most probable numbers. *European Journal Applied Microbiology*, 1975, 1: 67-78.
- [11] Nikitushkin VD, Demina GR, Kaprelyants AS. Effect of secreted Rpf protein on intracellular contacts in *Micrococcus luteus* and *Mycobacterium smegmatis* cultures. *Microbiology*, 2011, DOI: 10.1134/S0026261711020123.
- [12] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 2010, 34 (4): 415-425.
- [13] Young M, Artsatbanov V, Beller HR, Chandra G, Chater KF, Dover LG, Goh EB, Kahan T, Kaprelyants AS, Kyrpides N, Lapidus A, Lowry SR, Lykidis A, Mahillon J, Markowitz V, Mavromatis K, Mukamolova GV, Oren A, Rokem JS, Smith MCM, Young DI, Greenblatt CL. Genome Sequence of the Fleming Strain of *Micrococcus luteus*, a Simple Free-Living Actinobacterium. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (3): 841-860.
- [14] 谭悠久, 彭祎, 黄永春. 土壤放线菌的选择性分离及其代谢产物抗菌活性评价. *植物保护 (Plant Protection)*, 2011, 37 (1): 120-123.

- [15] Faegri A, Torsvik V, Goksoyr J. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biology Biochemistry*, 1997, 9: 105-112.

Cloning and expression of *Micrococcus luteus* IAM 14879 Rpf and its role in the recovery of the VBNC state in *Rhodococcus* sp. DS471

Linxian Ding^{1*}, Pinghua Zhang², Huachang Hong¹, Hongjun Lin¹, Akira Yokota^{1,3}

¹ College of Geography and Environmental Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

² College of Chemical and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

³ Laboratory of Bioresources, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

Abstract: [Objective] The purpose of the present study was to produce the Rpf (resuscitation promoting factor) protein by cloning and expressing the *rpf* gene, secreted by *Micrococcus luteus* IAM 14879, in *Escherichia coli* and to evaluate its role in the recovery of the VBNC (viable but non-culturable) state in high-GC Gram-positive bacteria. [Methods] Genomic DNA was extracted from *Micrococcus luteus* IAM 14879 and the *rpf* gene was amplified by PCR using specific primers. The PCR products was purified, cloned into a pET15b expression vector, and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). Then the pET15b plasmid expression vector was used to confirm the purification of the recombinant proteins via SDS-PAGE. The VBNC state cells from the high-GC Gram-positive bacteria, *Rhodococcus* sp. DS471, were used to confirm the promotion and recovery of growth capacity. *Rhodococcus* sp. DS471 were isolated from soil and closely related to *Micrococcus luteus* IAM 14879. [Results] The gene sequences confirmed that the *rpf* gene from *Micrococcus luteus* IAM 14879 that was expressed in *Escherichia coli*, was 672 bp. SDS-PAGE analysis showed that the recombinant Rpf protein was obtained successfully, and further studies showed it capable of promoting the recovery of the VBNC state by about 100-fold relative to the control. [Conclusion] Rpf of *Micrococcus luteus* IAM 14879 can be successfully cloned and expressed in *Escherichia coli* and shows a strong ability to promote the recovery of the VBNC state of cells of *Rhodococcus* sp. DS471. **Keywords:** *Micrococcus luteus* IAM 14879, Rpf, cloning and expression, VBNC, *Rhodococcus* sp. DS471

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Qianjiang Talents Project of Technology Office in Zhejiang Province (2011R10031) and by the Professor Scientific Research Foundation (ZC304009160)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-579-82282273; E-mail: linxian@zjnu.cn

Received: 12 September 2011 / Revised: 4 November 2011