



专论与综述

Rpf 蛋白：一种激活休眠状态放线菌的复苏促进因子

张宇帆¹ 刘彤彤¹ 周鹏¹ 孟子诺¹ 张雨佳¹ 张秀敏^{*1,2,3,4}

1 河北大学生命科学学院 河北 保定 071002

2 河北大学生命科学与绿色发展研究院 河北 保定 071002

3 河北省微生物育种与保育工程实验室 河北 保定 071002

4 河北省微生物多样性研究与应用实验室 河北 保定 071002

摘要：放线菌能产生多样性丰富的小分子化合物，但大多数放线菌因为处于“活的尚未培养”状态而无法分离培养。造成“活的尚未培养”状态的原因之一可能是由于一些环境因素，例如有机物、重金属、抗生素等胁迫使细胞处于休眠保护状态，直到遇到适宜的条件才能继续复苏生长。复苏促进因子(Resuscitation-Promoting Factor, Rpf)是由某些放线菌分泌的一类蛋白质，首次在藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)中发现，之后人们对 Rpf 蛋白的功能和分布给予了更多的关注。Rpf 蛋白能促进一些休眠的革兰氏阳性细菌复苏，这为“活的尚未培养”放线菌的分离培养提供了可能性。同时，针对一些致病放线菌物种，开发 Rpf 蛋白抑制物为相关疾病的治疗也提供了一条新的途径。基于此，本文对 Rpf 蛋白的结构组成、特征功能、作用机制及应用前景进行了简要的概述。

关键词：放线菌，复苏促进因子，休眠

Rpf protein: a resuscitation-promoting factor for reactivating dormant actinomycetes

ZHANG Yufan¹ LIU Tongtong¹ ZHOU Peng¹ MENG Zinuo¹ ZHANG Yujia¹
ZHANG Xiumin^{*1,2,3,4}

1 College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China

2 Life Science and Green Development Discipline Institute, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China

3 Engineering Laboratory of Microbial Breeding and Preservation of Hebei Province, Baoding, Hebei 071002, China

4 Key Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, Baoding, Hebei 071002, China

Abstract: Actinomycetes can produce a rich diversity of small molecule compounds, but most of the actinomycetes have not been isolated and cultured because they are in a “viable but unculturable” state. One of the causes of “viable but unculturable” may be due to some environmental stresses, such as organic matter, heavy metal, antibiotics. These environmental factors make the cell form a dormant state, until they

Foundation items: Key Research and Development Program of Hebei Province (20326614D); Natural Science Foundation of Hebei Province (C2020201005); National Natural Science Foundation of China (31270053); National Science and Technology Basic Resources Investigation Program of China (2017FY100300)

***Corresponding author:** E-mail: zhxiumin1106@126.com

Received: 05-01-2021; **Accepted:** 05-03-2021; **Published online:** 30-03-2021

基金项目：河北省重点研发计划(20326614D)；河北省自然科学基金(C2020201005)；国家自然科学基金(31270053)；国家科技基础资源调查专项(2017FY100300)

***通信作者：**E-mail: zhxiumin1106@126.com

收稿日期：2021-01-05；**接受日期：**2021-03-05；**网络首发日期：**2021-03-30

meet the suitable conditions for recovery growth. Resuscitation-promoting factor (Rpf) is a type of protein secreted by some actinomycetes. It was first discovered in *Micrococcus luteus*. Since then, more attention has been paid to the function and distribution of Rpf protein. Rpf protein can promote the recovery of some dormant Gram-positive bacteria and provide the possibility for “viable but unculturable” actinomycetes to be cultured in the laboratory. At the same time, the development of Rpf protein inhibitors for some pathogenic actinomycetes also provides a new way for the treatment of related diseases. Based on this premise, the structural composition, characteristics of the function, mechanism of action, and application prospect of Rpf protein were briefly reviewed.

Keywords: actinomycetes, resuscitation-promoting factor, dormancy

放线菌是一类革兰氏阳性细菌,可产生氨基酸等初级代谢产物和抗生素等次级代谢产物^[1]。一些种类的放线菌能产生各种酶制剂(蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶等)、维生素(B12)、有机酸和抗生素等。而且临床上常用的抗生素,70%以上都由放线菌产生,如链霉素、土霉素和抗肿瘤的博来霉素、丝裂霉素及抗真菌的制霉菌素、抗结核的卡那霉素等^[2]。就新抗生素而言,目前发现的几率越来越低,原因之一是由于产生菌的重复发现,而90%以上的放线菌处于“活的尚未培养”状态^[3],在人工条件下无法获得。因此,如何获得这些“活的尚未培养”的菌株是需要解决的科学问题,复苏促进因子(Resuscitation-Promoting Factor, Rpf)的应用也许有助于这一难题的解决。

据报道,藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)分泌的一种 Rpf 可以促进一些高 GC 含量的革兰氏阳性菌的复苏生长^[4],而且在天蓝色链霉菌(*Streptomyce coelicolor*)中发现的 Rpf 蛋白对孢子萌发和菌丝生长有较重要的作用^[5]。本实验室通过将藤黄微球菌(*M. luteus*)在 LMM 液体培养基中培养至对数生长后期,离心并过滤除菌得到培养液上清并将其添加到改良的 VL55 培养基中,对 3 份土壤样品进行了细菌的分离,结果表明实验组分离得到的微生物物种多样性较对照组丰富^[6]。之后对藤黄微球菌的 *rpf* 基因进行了克隆和在大肠杆菌中异源表达^[7],并研究了异源表达的藤黄微球菌 Rpf 蛋白对低温且贫营养诱导的 *M. luteus* 和滨海红球菌(*Rhodococcus marinonascens*)

休眠状态的复苏,结果表明藤黄微球菌 Rpf 蛋白能显著促进休眠细胞的复苏生长。同时将藤黄微球菌 Rpf 蛋白添加到培养基中,研究了其对土壤中微生物可培养性的影响,发现添加 Rpf 蛋白的实验组要比不添加 Rpf 蛋白的对照组显示出了更丰富的物种多样性,并分离得到了许多稀有放线菌,包括放线动孢菌属(*Actinokineospora*)、顶孢菌属(*Acrocarpospora*)、多形孢菌属(*Polymorphospora*)、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、纤维菌属(*Cellulosimicrobium*)、糖霉菌属(*Glycomyces*)、白蚁菌属(*Isoptericola*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、伦茨氏菌属(*Lentzea*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、类诺卡氏属(*Nocardioides*)、野野村菌属(*Nonomuraea*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、链孢囊菌属(*Streptosporangium*)和黄英菌属(*Yinghuangia*)。以上研究均为休眠状态放线菌的分离提供了新的思路。

放线菌在给人们带来益处的同时也有少数可引起人和动植物的病害。如结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)是最重要也是传播最广的病原菌之一,并会对人类造成致命的威胁^[8]。根据世界卫生组织的数据,到2022年约有3500万人将死于结核病^[9-10],因此,对于结核病的防治始终是困扰人类的难题^[11]。结核病之所以难以防治,是因为结核分枝杆菌在患者体内可以以休眠状态长期潜伏,当患者免疫力降低时又可以恢复生长。Rpf 蛋白的主要功能是刺激休眠状态细菌恢复生长

繁殖, 并且作为一种分泌蛋白^[12-15], 它也可以被宿主的免疫系统识别并引起抗 Rpf 的免疫反应^[16], 从而抑制结核分枝杆菌的复苏。

因此无论是从有益菌的开发还是病原菌的防治角度来说, 研究 Rpf 的结构、功能、作用机制以及应用都具有非常重要的意义。

1 Rpf 蛋白的发现及其在放线菌物种中的分布

第一个 Rpf 蛋白是 1998 年由俄罗斯科学家 Mukamolova 等在 *Mi. luteus* 中发现的^[4]。研究表明, 在寡营养培养基上生长的细胞通常会进入休眠状态, 其中 99.99% 的细胞失去了在固体营养培养基上生长的能力。然而, 通过添加从活跃生长的 *Mi. luteus* 细胞培养中获得的无菌过滤上清, 细胞可以复苏并恢复生长^[4]。在随后的研究中, 人们发现 *Mi. luteus* 向培养基中释放了一种蛋白质, 这种蛋白质能够使休眠细胞复苏, 并在一定的条件下刺激正常细胞增殖。随后发现该蛋白也可以刺激其他一些高 GC 含量的革兰氏阳性细菌的生长, 包括鸟型分枝杆菌(*My. avium*)^[17]、牛型分枝杆菌(*My. bovis*, BCG)、堪萨斯分枝杆菌(*My. kansasii*)、耻垢分枝杆菌(*My. smegmatis*)和结核分枝杆菌(*My. tuberculosis*)。该蛋白在皮摩尔浓度(pmol/L)下即有活性, 被命名为微生物休眠形式的复活因子或复苏促进因子(Rpf)^[18]。

由 *Mi. luteus* 细胞分泌的 Rpf 是一种耐热、对胰蛋白酶敏感、分子量约为 19 kD 的蛋白^[18]。大量细菌的基因组测序结果表明, *Mi. luteus* 的 Rpf 是许多高 GC 革兰氏阳性细菌——放线菌分泌的 Rpf 样蛋白的家族成员之一。我们通过在 EzBioCloud 搜索放线菌基因组的 CDS, 发现编码 Rpf 蛋白的基因主要分布在放线菌门的 6 个目 20 个科的不同属中, 包括微球菌属(*Micrococcus*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、拟诺卡菌属(*Nocardiopsis*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、放线菌属(*Actinomyces*)等。而且每个物种的 *rpf* 基因拷贝数从 1 个到 5 个不等, 所有这些蛋白都有一个氨基酸序列相似的保守域(大约 70 个氨基酸残基), 这与文献中报道的结果^[19]相一致。如图 1 中, 不同细菌的 Rpf 催化域的氨基酸序列是相对保守的, 这些蛋白都含有大约 70 个氨基酸保守结构域。

基于不同放线菌物种 Rpf 保守域相似性构建的进化分支图表明, Rpf 蛋白在不同放线菌门的物种中广泛分布且具有一定的相关性(图 2)。此外, 也有一些关于厚壁菌门(*Firmicutes*)^[20]和革兰氏阴性菌^[21-22], 如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中存在 Rpf 样蛋白的报道, 但是它们的氨基酸序列与放线菌中 Rpf 蛋白有明显的差异^[23]。Rpf 蛋白的广泛分布及其生理功能得到了众多学者对该蛋白家族的关注。

Rpf *Micrococcus luteus*
Rv1009 RpfB *M. tuberculosis*
Rv0867c RpfA *M. tuberculosis*
Rv2450c RpfA *M. tuberculosis*
Rv2389c RpfA *M. tuberculosis*
Rv1884c RpfA *M. tuberculosis*
MSMEG 5439 RpfB *M. smegmatis*
MSMEG 5700 RpfA *M. smegmatis*
MSMEG 4643 RpfE *M. smegmatis*
MSMEG 4640 RpfC *M. smegmatis*
HCU77 15465 RpfA *S. coelicolor*
HCU77 15715 RpfB *S. coelicolor*
HCU77 15470 RpfC *S. coelicolor*
HCU77 04690 RpfD *S. coelicolor*
HCU77 37545 RpfE *S. coelicolor*
RERY 10400 RpfA *R. erythropolis*
RERY 25210 RpfB *R. erythropolis*
RERY 34220 RpfE *R. erythropolis*
BK816 06480 RpfA *C. tangfeijanii*
UL81 03925 RpfB *C. camporealeensis*
Rpf N. *kunsanensis*



图 1 放线菌 Rpf 蛋白催化结构域氨基酸序列的比较

Figure 1 Comparison of amino acid sequences in catalytic domains of actinobacterial Rpf proteins

Note: *M.*: *Mycobacterium*; *S.*: *Streptomyces*; *R.*: *Rhodococcus*; *A.*: *Actinomyces*; *C.*: *Corynebacterium*; *N.*: *Nocardiopsis*

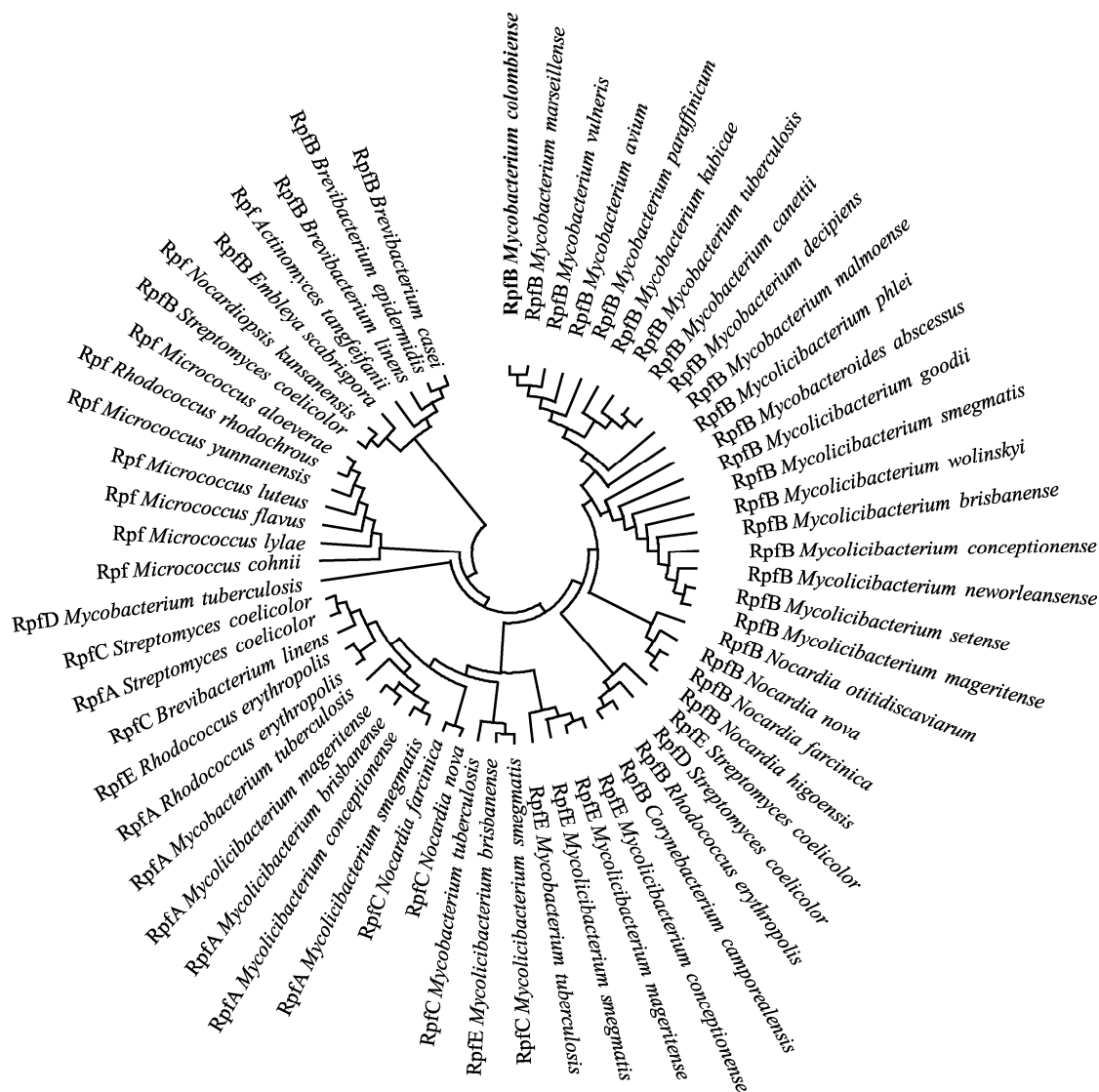


图 2 放线菌不同物种间保守 Rpf 域相似性的进化分支图
Figure 2 Cladogram of the conservative Rpf domain distributing among different species of Actinobacteria

2 Rpf 蛋白家族的结构特征

2.1 藤黄微球菌(*Mi. luteus*)中 Rpf 的结构

藤黄微球菌(*Mi. luteus*) Rpf 蛋白 N 端保守区由 75 个氨基酸残基组成(图 3)，具有与溶菌酶相似的三级结构折叠(图 4)，能与寡聚糖结合，在第 54 位点存在一个保守的谷氨酸残基,Rpf 蛋白家族均具有该位点，其可能具有催化作用(图 1)。在接近 N 端的位置有一段信号肽序列,这个分泌信号序列与休眠细胞结合重组，使休眠细胞恢复活性，C 端是含有 109 个氨基酸残基的可变区，该区含有一个 LysM 结构域^[24] (图 5)，

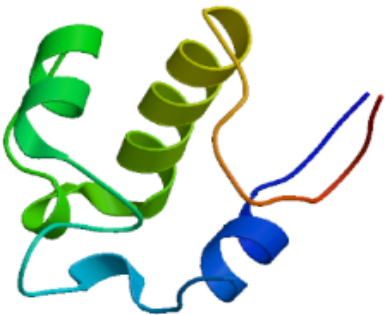


图 3 藤黄微球菌 Rpf 蛋白的三级结构
Figure 3 Structure of Rpf in *Micrococcus luteus*

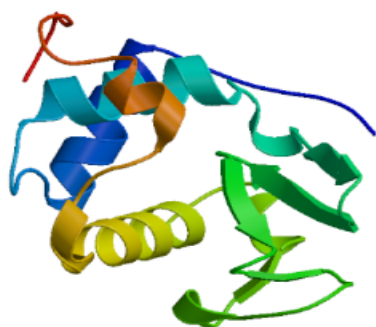


图4 溶菌酶 C 的三级结构

Figure 4 Structure of lysozyme C



图5 藤黄微球菌 Rpf 蛋白的结构域

Figure 5 Spatial organization of the Rpf domains in *Micrococcus luteus*

注: SP: 信号肽; RPF: 保守域及催化域

Note: SP: Signal protein; RPF: Conservative domain/Catalytic domains

可与细胞壁肽聚糖结合。此外, 一个链内二硫键, 由第 53 位点和第 114 位点的半胱氨酸残基形成, 具有稳定自身二级结构及调节活性作用^[25]。

2.2 结核分枝杆菌(*My. tuberculosis*)中 Rpf 的结构

结核分枝杆菌(*My. tuberculosis*)中存在 5 种功

能部分重叠的 Rpf 样蛋白, 即 RpfA、RpfB、RpfC、RpfD 和 RpfE (图 6)。RpfA 是一种相对较大的蛋白质, 其片段由大量脯氨酸-丙氨酸的重复序列(残基 146–320)组成, RpfC、RpfD 和 RpfE 仅包括一个 Rpf 保守域, 而 RpfB 是结核分枝杆菌中唯一且必需的复苏促进因子。

RpfB 是结核分枝杆菌中最复杂的一种复苏促进因子, 利用高分辨核磁共振研究结核分枝杆菌 RpfB 蛋白保守域的结构时发现, RpfB 中由 6 个 α -螺旋和 1 个 β -片层空间结构组成的 Rpf 保守域(图 7)与溶菌酶 C (图 4)和细菌中参与细胞壁代谢的一些细胞壁溶解酶的 α -螺旋部分结构相似^[26]。RpfB 蛋白含 5 个结构域 362 个氨基酸, 除了由 75 个氨基酸组成的催化域, 它还包含一个 G5 域(因其结构中有 5 个保守的甘氨酸残基而得名)和 3 个未知功能域(DUF348)。G5 结构域是许多蛋白质参与细胞壁降解和生物膜形成的重要组成部分; 其功能作用与 *Mi. luteus* Rpf 的 LysM 域相近^[27-28]。2016 年, Ruggiero 等通过研究结核分枝杆菌 RpfB 的晶体结构描述了第一个 DUF348 结构域, 并揭示了这些结构域和泛素结构域之间存在结构相似性^[27]。RpfB, 也被称为 Δ DUF348RpfB, 从其晶体结构发现它是由一个溶菌酶样球形催化结构域和一个延长的 G5 结

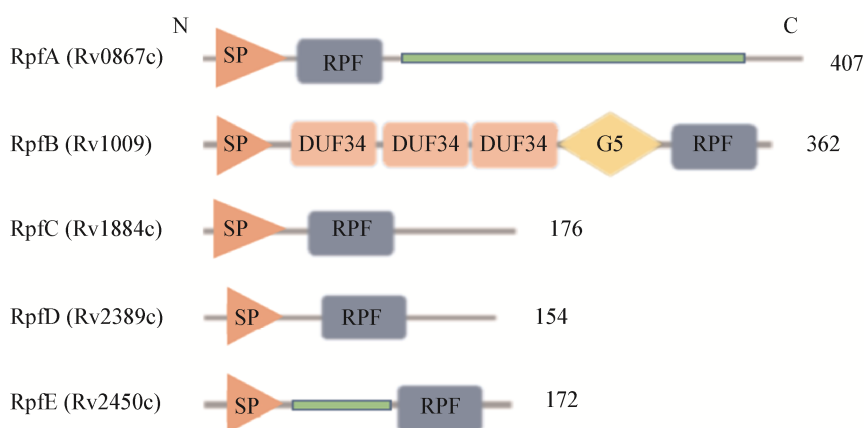


图6 结核分枝杆菌 Rpf 蛋白的结构域

Figure 6 Spatial organization of the Rpf domains in *Mycobacterium tuberculosis*

注: SP: 信号肽; RPF: 保守域及催化域; 绿色区域: Pro/Ala 丰富区域

Note: SP: Signal protein; RPF: Conservative domain/Catalytic domains; Green: Pro/Ala-enriched regions

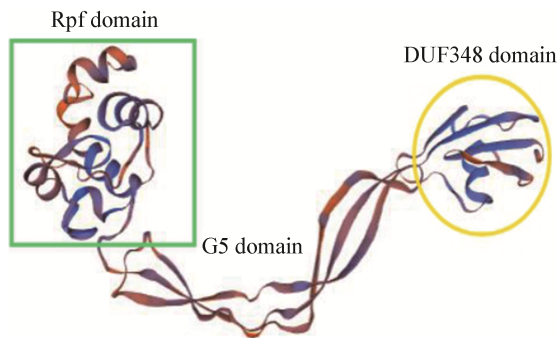


图 7 结核分枝杆菌 RpfB 三级结构

Figure 7 Structure of RpfB in *Mycobacterium tuberculosis*

构域构成的“逗号”样结构^[29]。G5 结构域在细胞表面结合蛋白中广泛存在, 位于逗号的尾部, 由一个特殊的超二级结构单元构成, 基本结构含有推测的三重螺旋互相连接的 2 个 β 折叠片^[10]。G5 结构域的功能是黏附细胞壁, 使得催化结构域暴露而恰好发挥催化功能。

另一方面, RpfB 也与大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[30]中的一些溶解性转糖苷酶(Lytic Transglycosylases) (Slt35)具有同源性(图 8)。因此, Rpf 蛋白的保守域可能是溶菌酶(动物源酶)和细菌

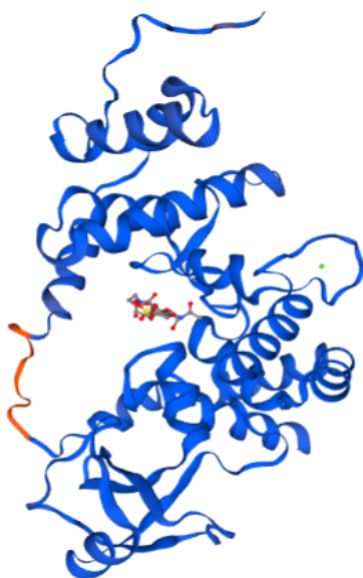


图 8 大肠杆菌可溶性转糖基化酶 Slt35 三级结构

Figure 8 Structure of lytic transglycosylase Slt35 in *E. coli*

溶解性转糖苷酶的混合^[31]。这一结构意味着 Rpf 蛋白具有酶的特征。

2.3 Rpf 冗余现象

在放线菌中, *Mi. luteus* 编码一种对生存能力至关重要的 Rpf 蛋白。链霉菌和分枝杆菌可以编码 4 种或更多的 Rpf, 而且在实验室条件下, 这些编码 Rpf 的基因都可以在不影响生存能力的情况下被删除^[31]。

在研究结核分枝杆菌的慢性结核病模型中发现, 删除编码 RpfB (与 *S. coelicolor* 中 RpfB 同源) 的基因可以延迟慢性结核病中结核分枝杆菌(*Mi. tuberculosis*)的复苏, 而单独删除任何编码其他 Rpf 的基因都无明显效果^[5]。然而, 双重或多重突变会导致更严重的表型变化, 表现为在体外复苏休眠细胞以及在体内建立慢性感染的能力均减弱。

在天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)中, 发现单独的 Rpf 缺失导致了中度的孢子萌发缺陷, 其严重程度各不相同。表明这些 Rpf 蛋白可能对孢子发芽和菌丝营养生长有较重要的作用, 这一推测得到了 Sexton 等^[5]实验的证实, 即每个 Rpf 具有不同的功能域, 在某些情况下, 在不同的时间其表达水平不同; 然而, 当多个 *rpf* 基因被单独删除时, 不能直接观察到明显的表型变化, 这表明这些 Rpf 蛋白有一定程度的功能冗余。

3 Rpf 的功能

(1) Rpf 蛋白在休眠细胞复苏中的作用

复苏促进因子最初是根据它们在藤黄微球菌中能够促进休眠细胞复苏的能力而命名。Maione 等^[26]认为 Rpf 蛋白是一种类似于溶菌酶或者溶解性转糖苷酶的水解酶, 可以裂解位于细菌肽聚糖 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4 糖苷键。通过使 Rpf 作用于底物 4-甲基伞形酮- β -D-N,N',N'-乙酰葡萄糖胺(细胞壁成分类似物), 或直接作用于肽聚糖的实验, 都证实了从藤黄微球菌(*Mi. luteus*)分离得到的 Rpf 蛋白存在水解肽聚糖的酶活性^[19,26,32]。

Rpf 蛋白的生物学功能似乎与它们对菌生长的必要性有关, Rpf 对 *Mi. luteus* 的分裂是必要的, 因为 *rpf* 基因失活的突变细胞是不可存活的。与 *Mi. luteus* 不同的是, 链霉菌和分枝杆菌可以编码 4 种或更多的 Rpf。在影响 *S. coelicolor* 孢子萌发的研究中, 当单个 *rpf* 基因缺失时, RpfA 突变体的萌发缺陷最严重, 而 RpfB 和 RpfC 突变体的表型与野生型最为相似。对于 RpfB 突变体, 部分原因可能是 RpfB 的体外裂解活性在所有 Rpfs 中最低; 相比之下, RpfC 在孢子萌发过程中无常规转录, 估计其可能几乎无酶活性, 因为与其他 Rpfs 不同, 它缺少关键的底物结合残基, 用 Ala 取代了 Ser/Thr (图 9); 而 RpfE 与之前在 *Mi. luteus* 中观察到的情况相一致, 在极低浓度下, 单独的 Rpf 可以恢复活性生长^[5]。根据蛋白质三级结构的模型, Rpf 保守域空间结构与溶菌酶的三级结构类似。这些酶对肽聚糖的重构必须严格控制, 以保持细胞壁的结构完整性^[19]。

(2) 促进生物膜的形成

Christopher 等通过研究缺失 *rpf* 基因的耻垢分枝杆菌(*My. smegmatis*)菌株形成生物膜的能力, 发现了耻垢分枝杆菌中的 5 种 Rpf 蛋白, RpfA 的缺失导致生物膜形成的边际减少, 但在后期时间点与野生型相似, 另外 4 种缺失 RpfB、RpfC、RpfD、RpfE 菌株产生的生物膜与野生菌株相当^[33]。通过在 24 孔微量滴定板上用结晶紫法进一步研究了生物膜形成的缺陷, 对生物膜黏附能力和生物膜生物量的评估发现并无显著变化。耻垢分枝杆菌(*My. smegmatis*)生物膜的形成需要复苏促进因子 Rpf 且外源 Rpf 以培养滤液的形式补充不能恢复生物膜的

形成, 实验过程中任何缺失 RpfA 和 RpfB 的菌株对利福平、万古霉素、SDS 的敏感性均增加, 最终证明在耻垢分枝杆菌(*My. smegmatis*)中 *rpf* 基因的逐步缺失会阻碍生物膜的发育, 降低菌体药物耐受性^[33]。

4 Rpf 的作用机制

有关 Rpf 和复苏能力之间的作用机制尚不明确, 目前关于 Rpf 蛋白作用机制有 3 个假说:

(1) Rpf 可能作为一种水解酶, 在休眠细胞中引起修饰肽聚糖的限制性水解, 从而促进休眠细胞中细胞壁的合成和生长, 刺激细胞分裂过程的开始^[16]。分枝杆菌的肽聚糖由 N-乙酰葡萄糖胺和胞壁酸(N-乙酰或 N-乙醇基)与五肽侧链相互结合的残基组成^[34-35]。在转入休眠状态时, 肽聚糖结构中分子间键的数量增加, 肽聚糖变得更密集和更厚^[36]。同时, 生长活跃细胞的分枝杆菌肽聚糖是一个动态的结构, 在生长过程中不断增加并被重塑^[37]。因此, 肽聚糖的限制性水解是启动细胞分裂的关键。

(2) 关于 Rpf 作用机制的第 2 个假设是基于重组 Rpf 的水解活性, 认为 Rpf 有分散细菌聚集体的能力^[34]。早前发现, *Mi. luteus* 细胞的聚集对于培养的起始阶段的生长以及在 *My. tuberculosis* 重新激活的初始阶段是非常重要的; 似乎 Rpf 蛋白可以在细胞分裂开始前参与这些聚集物的分散^[38], 推测 Rpf 参与了细胞内相互作用的调节和生物膜的形成。

(3) 根据“信号传递假说”, 在细菌细胞壁肽聚糖水解释过程中, Rpf 释放低分子量的分子, 将复苏信号传递到细胞本身并作用于邻近细胞表面的受体上^[34]。

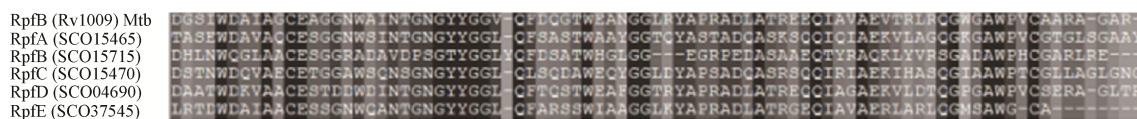


图 9 天蓝色链霉菌 Rpf 蛋白与结核分枝杆菌 RpfB 蛋白结构域的多序列比较

Figure 9 Multiple-sequence alignment of the Rpf protein of *Streptomyces coelicolor* and the RpfB protein of *Mycobacterium tuberculosis*

注: 关键催化(Glu)和底物结合残基(Ser/Thr 和 Trp)用星号表示

Note: Key catalytic (Glu) and substrate-binding residues (Ser/Thr and Trp) are indicated with asterisks

Rpf 蛋白水解细菌肽聚糖的 β -1,4 糖苷键。然而, 截至目前, 还不清楚水解过程中生成了什么产物, 因为尚不知 Rpf 属于哪一组酶——溶菌酶组还是溶解性转糖苷酶组。因此, 这一问题还有待进一步研究。在肽聚糖的合成和降解过程中, 有多种酶与其他酶共同起作用。通过酵母双杂交系统的筛选发现, 结核分枝杆菌的 RpfB 有一个伴侣——内肽酶 RipA (复苏促进因子相互作用蛋白)^[39]。RipA 或 L,D-Endopeptidase 是一种蛋白水解酶, 能够在肽链上裂解肽键——水解 D-谷氨酰胺-二氨基戊二酸为同谷氨酰胺(D-iGln)和中二氨基戊二酸(m-DAP), 并且 RipA 还可以与 RpfE 相互作用。RipA 是一种分泌蛋白, 在包括致病菌在内的许多分枝杆菌中都有发现, 在红球菌和棒状杆菌中也有发现。RipA 的催化域在其“核心”70 个氨基酸中, 与 NlpC/P60 家族的半胱氨酸蛋白酶有 35% 的相似性。这 2 种蛋白(RpfB 和 RipA)在分裂细胞间隔上的定位表明, 这些酶在细胞分裂过程中的作用方式是协调的。研究还发现, RipA 编码基因的缺失会导致细胞的生长速度下降和形态异常(分枝和链的形成)。长枝链的形成可以解释由于不完整的隔膜的形成, 从而增加细胞对 β -Lactam 抗生素的敏感性。因为 RpfB 可以水解 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸残基之间的糖苷键, 而肽链内切酶 RipA 在分枝杆菌肽聚糖肽链的 D-Glu-meso-DAP 位点有活性, 它们的相互作用将导致细菌细胞壁的协同水解。

事实上, 不能排除几种机制同时运行的可能性。例如, 在 Rpf 的影响下, 细菌聚集体的分散可能先于随后产生的多肽类触发的复苏。然而这些过程也可能同时发生, 因为休眠细菌的复苏是一个很复杂的现象, 所以具体的作用机制尚需多方面的研究。

5 Rpf 蛋白的应用及发展前景

(1) 药物的开发

Rpf 蛋白与潜伏型结核病向活动型结核病的转变有关^[13]。在免疫抑制治疗中, 潜伏型结核病的问题

非常紧迫, 因为潜伏型结核病的复苏可能会出现副作用^[40]。鉴于上述 Rpf 蛋白在休眠细胞复苏中的作用, 抑制 Rpf 活性的方法似乎有望对抗潜伏型结核病的激活。结核分枝杆菌(*My. tuberculosis*)所产生的 5 种 Rpf, 可以作为结核病防治的靶抗原^[41-42]。

(2) 对“活的尚未培养”状态菌的复苏研究^[43]

自然环境中的微生物具有多样性高的特点, 但 90% 以上的微生物使用传统的方法仍然是不能培养的, 因此能被培养的小部分微生物不能够代表微生物的多样性^[44]。虽然随着分离、检测能力不断提升, 越来越多的放线菌种类被人类认识了解, 但据统计, 从自然界中的分离到放线菌种类仍仅为实际种类的 0.1%~0.5%, 大多数放线菌只能在自然环境下生存, 无法分离培养^[45-46]。因此, 确定新的微生物物种和功能仍然是目前的重要任务, 而 Rpf 促进细菌复苏的作用使得休眠状态放线菌的分离培养成为可能。

(3) 免疫方面

结核分枝杆菌(*My. tuberculosis*)的 Rpf 是分泌型蛋白质, 能引起有效的免疫保护, 作为疫苗有保护作用, 可以作为亚单位疫苗的成分用于预防结核感染^[47-48]。

(4) Rpf 用于结核病患者样本的诊断^[40,49]

Rpf 相对于休眠分枝杆菌的复苏特性已被应用于诊断研究。在结核病患者痰液的微生物学检查中, 假阴性结果经常出现, 即病菌在标准培养基上未生长。这可能是由于在痰中存在不可培养状态的结核分枝杆菌(*My. tuberculosis*)细胞造成的, 因此 Rpf 可用于结核病患者样本的诊断。

(5) Rpf 的复苏作用可用于解决环境污染等问题^[50-51]

利用 Rpf 的复苏作用使污染物中有降解污染物功能的休眠菌复苏, 以加快污染物的降解, 如增加降解多氯联苯^[52-53]、苯酚^[32,54]、染料^[40,46]等污染物^[55-56]和具有脱氮除磷能力^[45,57]的功能菌, 甚至可以利用 Rpf 的复苏作用研究使污染物变废为宝的方法。

6 总结与展望

来自藤黄微球菌(*M. luteus*)的 Rpf 蛋白是被发现的第一个对细胞具有复苏活性的促进因子,之后很多学者对棒状杆菌、分枝杆菌、链霉菌等革兰氏阳性菌中的 *rpf* 基因进行了研究。我们前期的工作也发现编码 Rpf 蛋白的基因广泛存在于放线菌中,但不同物种的 *rpf* 基因拷贝数从 1 个到 5 个不等,这些基因编码的蛋白都有一个氨基酸序列相似的保守域(大约 70 个氨基酸残基),基于结构推测,认为该家族蛋白的保守域应该是溶菌酶和细菌溶转糖基酶的混合,提示 Rpf 蛋白中存在酶学特征。然而不同放线菌物种的 Rpf 蛋白功能如何? *rpf* 基因的拷贝数对不同物种的生存能力有何影响? 能否将 Rpf 蛋白及编码 Rpf 蛋白的基因作为一个系统发育分子标记来探索放线菌物种进化关系? 以及 Rpf 蛋白刺激休眠体复苏的机制到底如何? 这一系列问题仍有待人们进一步探索和研究。

针对以上问题,今后我们的工作将从以下几个方面开展:

(1) 探究不同放线菌物种其 Rpf 蛋白的复苏活性。选择不同的放线菌物种,对其 Rpf 蛋白进行异源表达,研究纯化的 Rpf 蛋白的复苏活性,并对编码 Rpf 蛋白的基因进行敲除,比较敲除菌株与野生菌株的生长情况。

(2) 探索放线菌物种进化关系。以不同放线菌物种中编码 Rpf 蛋白的核苷酸序列与 Rpf 蛋白的氨基酸序列构建系统发育树,看能否从中找到进化规律。对于该部分内容,本实验室已进行了初步研究。

(3) 发掘新的放线菌物种资源。利用不同物种来源的 Rpf 蛋白对未培养放线菌进行复苏,这是一种开发环境中尚未培养放线菌的有力工具,以发掘新的放线菌物种资源,为开发放线菌来源的新天然产物奠定基础。

REFERENCES

- [1] Tang YQ, Xu YR, Cai XL, Wu H, Zhang BC. Biological function and regulation mechanism of leucine responsive regulatory proteins in actinomycetes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(7): 1335-1344 (in Chinese) 唐雅倩, 许玉荣, 蔡新露, 吴杭, 张部昌. 放线菌中亮氨酸应答调控蛋白的生物学功能及其调控机理[J]. 微生物学报, 2020, 60(7): 1335-1344
- [2] Liu H, Lu ML, Chen YJ. Functional study on P450 enzymes in the biosynthetic pathways of natural products derived from actinomycetes[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2019, 26(5): 449-454 (in Chinese) 刘晗, 陆美玲, 陈依军. 放线菌来源天然产物生物合成途径中 P450 酶的功能研究进展[J]. 药物生物技术, 2019, 26(5): 449-454
- [3] Kan YM, Jiang N, Bai KH, Li JQ, Luo LX. Research progress on viable but non-culturable state of bacteria[J]. Microbiology China, 2020, 47(3): 880-891 (in Chinese) 阚玉敏, 蒋娜, 白凯红, 李健强, 罗来鑫. 细菌有活力但不可培养状态及其机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 880-891
- [4] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, Young M, Kell DB. A bacterial cytokine[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(15): 8916-8921
- [5] Sexton DL, St-Onge RJ, Haiser HJ, Yousef MR, Brady L, Gao C, Leonard J, Elliot MA. Resuscitation-promoting factors are cell wall-lytic enzymes with important roles in the germination and growth of *Streptomyces coelicolor*[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(5): 848-860
- [6] Li YQ, Wang YH, Li XJ, Sun JP, Jing FX, Zhang XM. Effects of Rpf factor of *Micrococcus luteus* on the isolation of soil culturable species[J]. Journal of Hebei University: Natural Science Edition, 2019, 39(1): 63-68 (in Chinese) 李云琪, 王宇辉, 李小锦, 孙健鹏, 景凤霞, 张秀敏. 藤黄微球菌 Rpf 因子对土壤细菌可培养物种分离效果的影响[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2019, 39(1): 63-68
- [7] Zhang XM, Jing FX, Wang HQ, Zhao RW, Zhang YF. Cloning and expression of *Micrococcus luteus rpf* gene and structure prediction of Rpf protein[J]. Journal of Hebei University: Natural Science Edition, 2016, 36(4): 402-411 (in Chinese) 张秀敏, 景凤霞, 王海强, 赵若玮, 张艳芬. 藤黄微球菌 *rpf* 基因的克隆表达及其结构预测[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2016, 36(4): 402-411
- [8] Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, Besra GS, Lee OYC, Gernaey AM, Galili E, Eshed V, Greenblatt CL, Lemma E, et al. Detection and molecular characterization of 9,000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean[J]. PLoS One, 2008, 3(10): e3426
- [9] Dusthacker A, Balasubramanian M, Shanmugam G, Priya

- S, Nirmal CR, Sam Ebenezer R, Balasubramanian A, Mondal RK, Thiruvankadam K, Hemanth Kumar AK, et al. Differential culturability of *Mycobacterium tuberculosis* in culture-negative sputum of patients with pulmonary tuberculosis and in a simulated model of dormancy[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2381
- [10] Mattos AMM, Chaves AS, Franken KLMC, Figueiredo BBM, Ferreira AP, Ottenhoff THM, Teixeira HC. Detection of IgG1 antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* DosR and Rpf antigens in tuberculosis patients before and after chemotherapy[J]. *Tuberculosis*, 2016, 96: 65-70
- [11] Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2012, 65(8): 385-395
- [12] Arroyo L, Marín D, Franken KLMC, Ottenhoff THM, Barrera LF. Potential of DosR and Rpf antigens from *Mycobacterium tuberculosis* to discriminate between latent and active tuberculosis in a tuberculosis endemic population of Medellín Colombia[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2018, 18(1): 26
- [13] Rosser A, Stover C, Pareek M, Mukamolova GV. Resuscitation-promoting factors are important determinants of the pathophysiology in *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, 43(5): 621-630
- [14] Loraine J, Pu FF, Turapov O, Mukamolova GV. Development of an *in vitro* assay for detection of drug-induced resuscitation-promoting-factor-dependent *Mycobacteria*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(10): 6227-6233
- [15] Demina GR, Nikitushkin VD, Shleeva MO, Riabova OB, Lepioshkin AY, Makarov VA, Kaprelyants AS. Benzoylphenyl thiocyanates are new, effective inhibitors of the mycobacterial resuscitation promoting factor B protein[J]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2017, 16(1): 69
- [16] Vakili B, Eslami M, Hatam GR, Zare B, Erfani N, Nezafat N, Ghasemi Y. Immunoinformatics-aided design of a potential multi-epitope peptide vaccine against *Leishmania infantum*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 1127-1139
- [17] Kavitha R, Verma R. Cloning and molecular characterisation of resuscitation promoting factor-like gene from *Mycobacterium avium* subspecies *avium*[J]. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2016, 34(1): 52-59
- [18] 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[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 46(3): 611-621
- [19] Nikitushkin VD, Demina GR, Kaprelyants AS. Rpf proteins are the factors of reactivation of the dormant forms of actinobacteria[J]. *Biochemistry: Moscow*, 2016, 81(13): 1719-1734
- [20] 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
- [21] Zhao R, Chen J, Wang Y, Li Y, Kong X, Han Y. Proteolytic activity of *Vibrio harveyi* YeaZ is related with resuscitation on the viable but non-culturable state[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2020, 71(2): 126-133
- [22] Li Y, Chen J, Zhao M, Yang Z, Yue L, Zhang X. Promoting resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio harveyi* by a resuscitation-promoting factor-like protein YeaZ[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 122(2): 338-346
- [23] Panutdaporn N, Kawamoto K, Asakura H, Makino SI. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella typhimurium* strain LT2[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 106(3): 241-247
- [24] Sexton DL, Herlihey FA, Brott AS, Crisante DA, Shepherdson E, Clarke AJ, Elliot MA. Roles of LysM and LytM domains in resuscitation-promoting factor (Rpf) activity and Rpf-mediated peptidoglycan cleavage and dormant spore reactivation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(27): 9171-9182
- [25] Li L, Xu CB, Li Y. The progress of resuscitation-promoting factor[J]. *Letters in Biotechnology*, 2009, 20(5): 703-705 (in Chinese)
- 李伦, 许崇波, 李元. 复苏促进因子研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(5): 703-705
- [26] Maione V, Ruggiero A, Russo L, De Simone A, Pedone PV, Maligneri G, Berisio R, Isernia C. NMR structure and dynamics of the resuscitation promoting factor RpfC catalytic domain[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142807
- [27] Ruggiero A, Squeglia F, Romano M, Vitagliano L, De Simone A, Berisio R. The structure of resuscitation promoting factor B from *M. tuberculosis* reveals unexpected ubiquitin-like domains[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - General Subjects*, 2016, 1860(2): 445-451
- [28] Vollmer W. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(2): 287-306
- [29] Ruggiero A, Tizzano B, Pedone E, Pedone C, Wilmanns M, Berisio R. Crystal structure of the resuscitation-promoting factor ΔDUFRpfB from *M. tuberculosis*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 385(1): 153-162
- [30] Cohen-Gonsaud M, Barthe P, Bagnérès C, Henderson B, Ward J, Roumestand C, Keep NH. The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12(3): 270-273
- [31] Gupta RK, Srivastava R. Resuscitation promoting factors: a

- family of microbial proteins in survival and resuscitation of dormant *Mycobacteria*[J]. Indian Journal of Microbiology, 2012, 52(2): 114-121
- [32] Su XM, Wang YY, Xue BB, Zhang YG, Mei RW, Zhang Y, Hashmi MZ, Lin HJ, Chen JR, Sun FQ. Resuscitation of functional bacterial community for enhancing biodegradation of phenol under high salinity conditions based on Rpf[J]. Bioresource Technology, 2018, 261: 394-402
- [33] Christopher E, Binayak R, James C, Lethabo M, Melissa C, Lusanda M, Germar B, Edith M, Joon KS, Baves K. Resuscitation-promoting factors are required for *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(22): 1-18
- [34] Nikitushkin VD, Demina GR, Kaprelyants AS. Effect of secreted Rpf protein on intracellular contacts in *Micrococcus luteus* and *Mycobacterium smegmatis* cultures[J]. Microbiology, 2011, 80(2): 143-149
- [35] Kaprelyants AS, Mukamolova GV, Ruggiero A, Makarov VA, Demina GR, Shleeva MO, Potapov VD, Shramko PA. Resuscitation-promoting factors (Rpf): in search of inhibitors[J]. Protein & Peptide Letters, 2012, 19(10): 1026-1034
- [36] Voloshin SA, Kaprelyants AS. Cell aggregation in cultures of *Micrococcus luteus*, studied by dynamic light scattering[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2005, 41(6): 570-573
- [37] Bateman A, Holden MTG, Yeats C. The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation[J]. Bioinformatics, 2005, 21(8): 1301-1303
- [38] Gupta RK, Srivastava BS, Srivastava R. Comparative expression analysis of *rpf*-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under different physiological stress and growth conditions[J]. Microbiology, 2010, 156(Pt 9): 2714-2722
- [39] Nikitushkin VD, Demina GR, Shleeva MO, Guryanova SV, Ruggiero A, Berisio R, Kaprelyants AS. A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant *Mycobacteria*[J]. The FEBS Journal, 2015, 282(13): 2500-2511
- [40] Seidi K, Jahanban-Esfahlan R. A novel approach to eradicate latent TB: based on resuscitation promoting factors[J]. Journal of Medical Hypotheses and Ideas, 2013, 7(2): 69-74
- [41] Pourazar Dizaji S, Taala A, Masoumi M, Ebrahimzadeh N, Fateh A, Siadat SD, Vaziri F. Sub-minimum inhibitory concentration of rifampin: a potential risk factor for resuscitation of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2017, 6(1): 116
- [42] Uhia I, Krishnan N, Robertson BD. Characterising resuscitation promoting factor fluorescent-fusions in *Mycobacteria*[J]. BMC Microbiology, 2018, 18(1): 30
- [43] Ayrapetyan M, Oliver JD. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety[J]. Current Opinion in Food Science, 2016, 8: 127-133
- [44] Zhang S, Ding LX, Su XM. Formation and resuscitation of the viable but non-culturable state in microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(8): 1331-1339 (in Chinese)
张硕, 丁林贤, 苏晓梅. 微生物 VBNC 状态形成及复苏机制[J]. 微生物学报, 2018, 58(8): 1331-1339
- [45] Xu LN, Wang YY, Xue BB, Mei RW, Zhang Y, Ding LX, Su XM. Resuscitation of aerobic denitrifying bacteria in the VBNC state and their nitrogen conversion capacity[J]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2019, 36(4): 545-551 (in Chinese)
徐璐宁, 王宇洋, 薛彬冰, 梅荣武, 张宇, 丁林贤, 苏晓梅. VBNC 菌群中好氧反硝化菌种的复苏培养及其脱氮特性[J]. 中国科学院大学学报, 2019, 36(4): 545-551
- [46] Jin Y, Gan GJ, Yu XY, Wu DD, Zhang L, Yang N, Hu JD, Liu ZH, Zhang LX, Hong HC, et al. Isolation of viable but non-culturable bacteria from printing and dyeing wastewater bioreactor based on resuscitation promoting factor[J]. Current Microbiology, 2017, 74(7): 787-797
- [47] Romano M, Aryan E, Korf H, Bruffaerts N, Franken CLMC, Ottenhoff THM, Huygen K. Potential of *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factors as antigens in novel tuberculosis sub-unit vaccines[J]. Microbes and Infection, 2012, 14(1): 86-95
- [48] Yousefi Avarvand A, Khademi F, Tafaghodi M, Ahmadipour Z, Moradi B, Meshkat Z. The roles of latency-associated antigens in tuberculosis vaccines[J]. Indian Journal of Tuberculosis, 2019, 66(4): 487-491
- [49] Huang W, Qi YJ, Diao YJ, Yang F, Zha XD, Ren CP, Huang DK, Franken KL, Ottenhoff TH, Wu QS, et al. Use of resuscitation-promoting factor proteins improves the sensitivity of culture-based tuberculosis testing in special samples[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2014, 189(5): 612-614
- [50] Ye Z, Li HX, Jia YY, Fan JH, Wan JX, Guo L, Su XM, Zhang Y, Wu WM, Shen CF. Supplementing resuscitation-promoting factor (Rpf) enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by *Rhodococcus biphenylivorans* strain TG9^T[J]. Environmental Pollution, 2020, 263: 114488
- [51] Liu YD, Su XM, Lu L, Ding LX, Shen CF. 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
- [52] Murugan K, Vasudevan N. Intracellular toxicity exerted by

- PCBs and role of VBNC bacterial strains in biodegradation[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 157: 40-60
- [53] Su XM, Li S, Xie MQ, Tao LQ, Zhou Y, Xiao YY, Lin HJ, Chen JR, Sun FQ. Enhancement of polychlorinated biphenyl biodegradation by resuscitation promoting factor (Rpf) and Rpf-responsive bacterial community[J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128283
- [54] Yu CN, Liu YD, Jia YY, Su XM, Lu L, Ding LX, Shen CF. Extracellular organic matter from *Micrococcus luteus* containing resuscitation-promoting factor in sequencing batch reactor for effective nutrient and phenol removal[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 727: 138627
- [55] Luo D, Chen JX, Xie G, Yue L, Wang YG. Enzyme characterization and biological activities of a resuscitation promoting factor from an oil degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* KB₁[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6951
- [56] Ke Q, Zhang YG, Wu XL, Su XM, Wang YY, Lin HJ, Mei RW, Zhang Y, Hashmi MZ, Chen CJ, et al. Sustainable biodegradation of phenol by immobilized *Bacillus* sp. SAS19 with porous carbonaceous gels as carriers[J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 222: 185-189
- [57] Su XM, Xue BB, Wang YY, Hashmi MZ, Lin HJ, Chen JR, Mei RW, Wang Z, Sun FQ. Bacterial community shifts evaluation in the sediments of Puyang River and its nitrogen removal capabilities exploration by resuscitation promoting factor[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 179: 188-197