

苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 基因功能的鉴定*

胡 喆 马金成** 蒋晶晶 王海洪

(华南农业大学生命科学院, 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广州 510642)

摘要 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)脂肪酸合成酶体系中, *fabA* 基因编码有双功能的 3-羟基脂酰 ACP 脱水异构酶, 其异构产物能被 *fabB* 基因编码的 3-酮基脂酰 ACP 合成酶 I 延伸, 合成不饱和脂肪酸, 该 FabA-FabB 途径被认为是缺氧条件下不饱和脂肪酸合成的经典途径. 生物信息学分析发现, 苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)的 SmFabA 与 EcFabA 相似性达到 60.6%, 具有相同的保守活性位点和两个保守的 α 螺旋结构; SmFabB 与 EcFabB 相似性达到 61.1%, 具有相同的 Cys-His-His 活性中心. 用携带 *SmfabA* 和 *SmfabB* 的质粒载体遗传互补大肠杆菌温度敏感突变株 CY57 和 CY242, 在添加三氯森(TCL)抑制烯脂酰 ACP 还原酶活性的条件下, 转化子能在 42°C 恢复生长, 且放射性薄层层析能检测到转化子中不饱和脂肪酸棕榈油酸(Δ^9 C16:1)和十八碳烯酸(Δ^{11} C18:1)的合成. 体外重建脂肪酸合成反应表明, SmFabA 能催化羟脂酰 ACP 的脱水反应且能够使反 -2- 癸烯酰 ACP 异构化, SmFabB 能催化不同链长的脂酰 ACP 和丙二酸单酰 ACP 的聚合反应. 另外, 未得到 *SmFabA* 和 *SmFabB* 的突变株, 表明 SmFabA 和 SmFabB 可能是苜蓿中华根瘤菌脂肪酸合成酶系中必不可少的关键蛋白. 上述结果证实了苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 两个基因在不饱和脂肪酸合成中的功能.

关键词 苜蓿中华根瘤菌, 细菌脂肪酸合成, 3-羟基脂酰 ACP 脱水异构酶, 3-酮基脂酰 ACP 合成酶 I

学科分类号 Q93

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00579

细菌主要是通过 II 型脂肪酸合成系统进行脂肪酸的从头合成, 其中的每一个合成步骤均由独立的酶催化, 与高等哺乳动物拥有的 I 型脂肪酸合成酶系有本质的差别^[1]. 细菌厌氧条件下不饱和脂肪酸的合成是饱和脂肪酸合成的分支反应, 其分支点在羟基癸脂酸, 该理论由 Bloch 等^[2-3]首先在丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)研究中提出, 后来在大肠杆菌中得到证实. 大肠杆菌有参与不饱和脂肪酸合成的两个关键酶: FabA(3-羟基癸脂酰 ACP 脱水异构酶)和 FabB(3-酮基脂酰 ACP 合成酶 I). FabA 使 3-羟基癸脂酰 ACP 脱水, 形成反 -2- 癸烯酰 ACP, 部分反 -2- 癸烯酰 ACP 被烯脂酰 ACP 还原酶(FabI)还原, 用于饱和脂肪酸的合成, 最终生成棕榈酸或硬脂酸, 另一部分反 -2- 癸烯酰 ACP 则进一步被 FabA 异构化, 生成顺 -3- 癸烯酰 ACP. 顺 -3- 癸烯酰 ACP 不能被 FabI 还原, 只能作为 FabB 的底物, 与二碳底物缩合成顺 -5-3- 酮基十二碳烯酰 ACP 进入脂肪酸合成的循环反应, 最后合成棕榈油酸或十

八碳烯酸. 然而, 随着大量的细菌全基因组序列测序完成, 发现该 FabA-FabB 不饱和脂肪酸合成途径仅存在于变形细菌门(*Proteobacteria*)的 α 和 γ 类群中^[4-5]. 在革兰氏阳性细菌链球菌(*Streptococcus*)^[6]、肠球菌(*Enterococcus*)^[7]和芽孢杆菌(*Bacillus*)^[8]等的基因组中不存在 *fabA-fabB* 同源基因, 表明这些细菌中不饱和脂肪酸合成是由不同的酶催化完成. 另外, 研究发现虽然铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)属于变形细菌门 α 类群细菌, 但此菌中有三条不饱和脂肪酸合成的途径: FabA-FabB 途径、DesA 途径和 DesB 途径. 其中 FabA-FabB 是

* 国家自然科学基金(31200028)、高等学校博士学科点专项科研基金(20104404110005)和广东高校优秀青年创新人才培养计划(LYM10038)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 020-85281389, E-mail: majincheng@scau.edu.cn

收稿日期: 2013-01-19, 接受日期: 2013-05-15

与大肠杆菌类似的厌氧途径, 编码 FabA 和 FabB 的基因紧密连锁共同转录^[5]; DesA 和 DesB 均是有氧途径, 共同特点是在磷脂合成后被脂肪酸脱饱和酶催化生成不饱和脂肪酸, 差异之处是 DesA 酶是组成型表达而 DesB 酶是诱导型的^[9]. 可见不同细菌的脂肪酸合成机制存在差异, 这些差异体现了脂肪酸合成酶的多样性.

根瘤菌(*rhizobium*)是一种能在豆科植物上引发根瘤的形成, 并与其形成共生关系的革兰氏阴性细菌. 它能将空气中的游离 N₂ 转化为 NH₃ 供给植物生长^[10]. 苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) Rm1021 是已经被广泛认识的根瘤菌, 能与二倍体和四倍体的苜蓿植物建立共生关系^[11]. 基于苜蓿中华根瘤菌与豆科植物苜蓿之间的共生作用在农业上的重要性, 苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 全基因组测序已经完成, 这为研究根瘤菌与豆科植物共生固氮作用机制以及该菌的生理生化代谢提供了良好的基础^[12]. 刘影等^[10]研究表明, 苜蓿中华根瘤菌的脂肪酸组成与细菌的耐盐性相关, 烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabI* 突变导致该菌不能在高浓度氯化钠培养基上生长, 且细菌的泳动和结瘤固氮都受到影响. 另外, 脂肪酸中间代谢产物酰基高丝氨酸内酯(AHLs)是根瘤菌中广泛存在的一类自体诱导物, 由这种物质介导的群体感应系统与根瘤菌和植物的共生作用密切相关^[13]. 因此通过研究脂肪酸合成相关基因的功能可进一步了解苜蓿中华根瘤菌的生理生化代谢机理, 探究根瘤菌的群体感应调节和共生固氮作用机制, 为更加有效地利用苜蓿中华根瘤菌提供理论指导.

比较苜蓿中华根瘤菌与其他细菌的基因组序列, 发现苜蓿中华根瘤菌基因组中有注释为 3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水异构酶和 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 I 的同源基因: *fabA* 和 *fabB*. 但是迄今为止, 尚未见有关于苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 基因的研究报道, 为此本课题采用异体遗传互补、细胞膜磷脂组成分析和体外酶活性检测等技术手段研究苜蓿中华根瘤菌这两个同源蛋白在细菌不饱和脂肪酸合成代谢中的功能.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基. 本研究使用的菌株

有大肠杆菌菌株 MG1655、DH5 α 、BL21(DE3)、S17-1^[14]、CY57(*fabA*(Ts))^[15]、CY242(*fabB*(Ts))^[16]和 CY244(*fabB*(Ts), Δ *fabF*)^[17]和苜蓿中华根瘤菌菌株 Rm1021. 质粒载体有 pMD19-T、pBAD24M^[18]、pET28(b)、p34S-Gm^[19]和 pK18mobsacB^[20], 其他载体均为上述质粒的衍生质粒(具体构建见下文). LB 用作培养大肠杆菌的丰富培养基, RB 作为检测脂肪酸合成突变菌株的培养基^[16]. 油酸用无水乙醇配 20% 油酸储液, 并用氢氧化钾调 pH 至中性. 在 RB 培养基中油酸的最终添加浓度是 0.1%. TY 液体培养基: 5 g/L Trypton, 3 g/L Yeast Extract, 0.7 g/L CaCl₂, pH 7.0, 用来在 28 $^{\circ}$ C 培养根瘤菌和筛选 *fabA* 和 *fabB* 突变株, 需要时添加 5% 或 10% 的蔗糖做负筛选剂. 常用的试剂和抗生素的使用浓度如下: 100 mg/L 氨苄青霉素, 30 mg/L 卡那霉素, 30 mg/L 氯霉素, 30 mg/L 庆大霉素, 0.02% L-阿拉伯糖(Ara), 1 mmol/L 异丙基- β -D- 硫代吡喃半乳糖苷(IPTG), 0.1 mg/L 三氯森(Triclosan, TCL).

1.1.2 试剂. 限制性内切酶、T4 连接酶、*Taq*、*pfu* DNA 聚合酶、Marker DL5000、标准蛋白质等试剂、T- 载体克隆、质粒提取和 DNA 凝胶回收等试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司; 氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素和庆大霉素等购自北京鼎国公司; IPTG、三氯森、油酸和各种脂肪酸等试剂购自 Sigma 公司. PCR 扩增引物寡核苷酸由上海 Sangon 公司合成. [1-¹⁴C]乙酸钠(192 \times 10¹⁰ Bq/mol) 购自 American Radiolabeled Chemicals 公司.

1.2 重组 DNA 技术

本研究所使用的 PCR 引物见表 1, 以苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 基因组 DNA 为模板, 用 *pfu* DNA 聚合酶, PCR 扩增 *SmfabA* 和 *SmfabB* 基因. 回收 PCR 扩增产物, 经 *Taq* DNA 聚合酶催化末端加尾后, 分别连接至 pMD19-T 载体, 并转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆, DNA 序列测定验证 T 载体上携带的基因序列, 得到质粒 pJJ1(*fabA*)和 pJJ2(*fabB*). 用 *Nde* I 和 *Hind* III 分别消化 pJJ1(*fabA*)和 pJJ2(*fabB*), 回收酶切产物并分别克隆到载体 pBAD24M 上, 得到表达载体 pJJ3(*fabA*)和 pJJ4(*fabB*). 用同样的方法将 *SmfabA* 和 *SmfabB* 克隆到 pET28(b)上得到表达载体 pJJ5(*fabA*)和 pJJ6(*fabB*).

Table 1 Sequences of the PCR primers used in this work

Primer name	Primer sequence (5'~3')
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGGG
pBAD reverse	GCTGAAAATCTTCTCTCATCC
pBAD forward	CGCAACTCTCTACTGTTTCTC
M13 forward	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC
M13 reverse	GAGCGGATAACAATTTACACACAGG
<i>SmfabA</i> Nde I	GGAAGCAACCACATATGAACACC
<i>SmfabA</i> HindIII	TTCGGAAGCTTCAGTCGGCCTTTTCTG
<i>SmfabB</i> Nde I	GAAAAGGTCATCTCATATGAGACGGGTTG
<i>SmfabB</i> HindIII	CGTTCATCAAGCTTATCCGTTATAGC
<i>SmfabA</i> Up Nde I	CAGTtctagagagctcatatgGAATGGTTGCTTCCCGAGTCG
<i>SmfabA</i> Up EcoR I	CAAACCCGAAATcCGCAGCCTC
<i>SmfabA</i> Down Xba I	ATTCCatagagctctctagaACTGCGGGCGATCCCCGCACG
<i>SmfabA</i> Down Hind III	cttgaaGCTTCGGGCTGTTGTTCTTG
<i>SmfabB</i> Up Sph I	GTTCAACCGCATgcCCGACATTTCC
<i>SmfabB</i> Up Nde I	ATCGGtctagaggatccatagGTCAGATGACCTTTTCTTCGATTG
<i>SmfabB</i> Down Xba I	CTGACcatatggatcctctagaCCGATGAACGGATTGATGAAC
<i>SmfabB</i> Down Hind III	GTGCAGCGGAGCTtGATGAGC

1.3 苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 突变体的构建

pK18mobsacB 系列自杀性载体用于苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 基因缺失突变株的构建^[20]。以苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 分别扩增出 *fabA* 和 *fabB* 基因的上下游片段(Up, Down), 搭桥 PCR 将 *fabA* 或 *fabB* 上下游片段连接起来扩增得到 *fabA* (UpDn) 和 *fabB* (UpDn), 连接到 pMD19-T, 送测序。 *fabA* (UpDn) 和 *fabB* (UpDn) 用相应的限制性内切酶消化 DNA 片段后, 连接到 pK18mobsacB 载体上分别得到 pK18mobsacB-*fabA*UpDn 和 pK18mobsacB-*fabB*UpDn。用限制性内切酶 *Hind* III 酶切 p34S-Gm 回收 Gm 片段, 将其分别连接到 pK18mobsacB-*fabA*UpDn 和 pK18mobsacB-*fabB*UpDn 载体上, 得到 pK18mobsacB-*fabA*UpDnGm 和 pK18mobsacB-*fabB*UpDnGm, 并分别命名为 pJJ7 (*fabA*) 和 pJJ8 (*fabB*)。

将携带有敲除盒的载体质粒 pJJ7(*fabA*)和 pJJ8 (*fabB*)转化大肠杆菌 S17-1 菌株, 并分别与苜蓿中华根瘤菌野生型菌株 SM1021 在 TY 平板上 30℃ 共培养 24 h, 然后将接合物用 1 ml TY 液体培养基悬浮并稀释 10⁵ 倍后涂布于添加有 Km、Gm 和 Cm

抗性的 TY 平板上, 30℃ 培养 72~96 h 后得到单菌落。选取单菌落培养抽提细菌总 DNA。通过 *sacB* 引物和敲除盒引物进行 PCR 检测, 获得一次重组菌株(整个质粒整合到苜蓿中华根瘤菌基因组中)。将一次重组菌株在添加 Cm 的 TY 液体培养基中 30℃ 培养 72 h, 将培养物稀释涂布于添加 Cm 的 TY 固体培养基上, 将生长出来的单菌落分别转移到含有 10%蔗糖、Cm 和 Km、Gm 两种不同的 TY 固体培养基上, 进行二次重组菌落的筛选。挑取对蔗糖不敏感而对 Km 和 Gm 敏感的单菌落培养并抽提总 DNA, 对备选菌株进行 PCR 验证。

1.4 异体遗传互补分析和脂肪酸组成薄层层析

将构建好的 pBAD24M 系列互补载体: pJJ3 和 pBAD24M 分别转化至大肠杆菌的 *fabA* 基因温度敏感突变株 CY57 中, pJJ4 和 pBAD24M 分别转化至大肠杆菌的 *fabB* 基因温度敏感突变株 CY242 中, 涂布于 LB 营养培养基平板上(含 Amp 抗生素), 30℃ 静置培养过夜, 筛选转化子, 将转化子分别划线转接在 RB 培养基(含 Amp, Ara, TCL)上, 并于 30℃ 和 42℃ 培养过夜, 观察细菌生长情况。

将不同菌株的大肠杆菌接种在 5 ml LB 培养液

中, 30℃ 条件下培养过夜; 接种 200 μl 过夜培养液到 5 ml RB 培养基中, 30℃ 条件下培养 3 h, 添加 20%阿拉伯糖 5 μl , 继续培养 1 h; 当菌液培养到 A_{600} 为 0.6, 取 1 ml 菌液于新 15 ml 的离心管中, 加入三氯森培养 1 h, 然后添加[1- ^{14}C]乙酸钠 1 μl , 继续培养 1 h; 4 000 r/min 离心 10 min 去除上清, 加入 1 ml 没标记的菌液, 离心收集菌体, 培养到对数生长期, 抽提各菌株的磷脂^[18]; 脂肪酸组成采用薄层层析, 用磷屏成像系统检测放射性信号^[16, 21-22].

1.5 *fabA* 和 *fabB* 蛋白表达与分离纯化

将表达载体质粒 pJJ5(*fabA*)和 pJJ6(*fabB*)分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, 苜蓿中华根瘤菌 *SmFabA* 和 *SmFabB* 蛋白的表达和分离纯化参照文献[14, 23]进行. 同时参照文献[1]的方法, 分别分离纯化大肠杆菌 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 I (FabB)、3- 酮脂酰 ACP 还原酶(FabG)、3- 羟基脂酰 ACP 脱水酶(FabZ)、烯脂酰 ACP 还原酶(FabI)、哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶(AasS)和大肠杆菌 holo-ACP 蛋白, 并且体外合成了丙二酸单酰 ACP(Mal-ACP)、辛脂酰 ACP、癸脂酰 ACP、3- 羟基癸脂酰 ACP、反 -2- 癸烯酰 ACP、月桂酰 ACP 和豆蔻酰 ACP.

1.6 *FabA* 和 *FabB* 体外功能检测

体外检测 *SmFabA* 是否具有 3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水异构酶的功能参照文献[14]. 检测脱水酶功能的具体做法如下: 反应体积 50 μl , 其中含有 0.1 mol/L 磷酸钠、50 $\mu\text{mol/L}$ NADH、50 $\mu\text{mol/L}$ 3- 羟基癸脂酰 ACP、0.1 μg FabI. 反应在添加 0.1 μg 3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水酶(苜蓿中华根瘤菌 *SmFabA* 或大肠杆菌 *EcFabA*)后开始计时, 37℃ 保温 1 h. 用癸脂酰 ACP 和反 -2- 癸烯酰 ACP作为对照, 使用分离胶浓度为 17.5%, 且含有 2 mol/L 尿素的非变性蛋白质凝胶电泳分析反应产物. 检测异构酶功能的具体做法如下: 反应体积 50 μl , 其中含有 0.1 mol/L 磷酸钠、50 $\mu\text{mol/L}$ NADH、50 $\mu\text{mol/L}$ 3- 羟基癸脂酰 ACP、50 $\mu\text{mol/L}$ Mal-ACP、FabB 和 FabG 各 0.1 μg . 反应在添加 0.1 μg β - 羟基癸脂酰 ACP 脱水酶(苜蓿中华根瘤菌 *SmFabA* 或大肠杆菌 *EcFabA*)后开始计时, 37℃ 保温 1 h. 用癸脂酰 ACP 和反 -2- 癸烯酰 ACP 作为对照, 使用非变性蛋白质凝胶电泳分析反应产物.

体外检测 *SmFabB* 是否具有 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 I 的活性, 检测同样参照文献[14]. 具体做法如下: 反应体积 50 μl , 其中含有 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)、50 $\mu\text{mol/L}$ NADPH、50 $\mu\text{mol/L}$

NADH、50 $\mu\text{mol/L}$ Mal-ACP、50 $\mu\text{mol/L}$ 脂酰 ACP (辛脂酰 ACP 或月桂酰 ACP). 大肠杆菌脂酰合成酶: FabD、FabG 和 FabZ 各 0.1 μg (以月桂酰 ACP 为底物的反应, 体系中还需添加 0.1 μg FabI). 反应在添加 0.1 μg 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 I (苜蓿中华根瘤菌 *SmFabB* 或大肠杆菌 *EcFabB*)后开始计时, 37℃ 保温 1 h. 分别用辛脂酰 ACP 和反 -2- 癸烯酰 ACP 以及月桂酰 ACP 和豆蔻酰 ACP 作为对照, 使用分离胶浓度为 17.5%, 且含有 2 mol/L 尿素的非变性蛋白质凝胶电泳进行分析.

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

苜蓿中华根瘤菌基因组序列已经测定完成^[2], 利用大肠杆菌 3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水异构酶 (*EcFabA*)、3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 I (*EcFabB*)和 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 II (*EcFabF*)蛋白序列, 同源比对苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 基因组, 结果发现, *SmFabA* 与 *EcFabA* 的蛋白相似性达到 60.6%, 且都具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水异构酶保守的活性中心位点 His 残基和两个保守的 α 螺旋结构(图 1a), *SmFabB* 与 *EcFabB* 和 *EcFabF* 的相似性分别达到 61.1%和 37.8%, 且具有长链 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶保守的 Cys-His-His 活性中心(图 1b). 根据生物信息学的分析推测, 苜蓿中华根瘤菌 *SmfabA* 和 *SmfabB* 基因编码的蛋白可能具有与大肠杆菌 *FabA* 和 *FabB* 相似的酶活性, 并参与该菌的不饱和脂肪酸合成. 为了验证这一观点, 本课题组对苜蓿中华根瘤菌 *SmfabA* 和 *SmfabB* 基因做了以下研究.

2.2 *SmfabA* 和 *SmfabB* 遗传互补大肠杆菌突变菌株

在大肠杆菌中, *FabA*(3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水异构酶)和 *FabB*(3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 I)是参与不饱和脂肪酸合成的两个关键酶, 已经证明 *fabA* 和 *fabB* 基因是大肠杆菌生长必须基因^[7]. 菌株 CY57 和 CY242 分别是大肠杆菌 *fabA* 和 *fabB* 的温度敏感突变株, 这两个突变株在 30℃ 正常生长, 但在 42℃ 时, 由于 *FabA* 或 *FabB* 失去活性, 不饱和脂肪酸合成途径受阻, 菌体不能生长^[7]. 为了研究苜蓿中华根瘤菌 *SmfabA* 和 *SmfabB* 基因的功能, 首先以苜蓿中华根瘤菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增获得了这两个基因, 并将这两个基因分别克隆到受外源阿拉伯糖诱导调控的质粒载体 pBAD24M

上, 得到 pJJ3(*fabA*)和 pJJ4(*fabB*). 用这两个质粒分别转化大肠杆菌温度敏感突变株 CY57 和 CY242, 在添加有阿拉伯糖的 RB 平板上检测转化子的生长状况. 结果发现携带外源质粒的 CY57 和 CY242 菌株同携带载体质粒 pBAD24M 的菌株一样均不能在 42℃ 生长(图 2). 我们推测, *SmfabA* 和 *SmfabB* 不能互补大肠杆菌 *fabA* 或 *fabB* 突变菌株生

长的原因是 *SmFabA* 或 *SmFabB* 与寄主的烯脂酰 ACP 还原酶之间存在底物竞争作用, 从而使互补菌株不能合成足够的饱和脂肪酸, 用于维持细胞的生长. 为了验证这一观点, 本研究在 RB 培养基中添加了低浓度的三氯森(0.1 mg/L TCL)用于部分抑制寄主的烯脂酰 ACP 还原酶(*FabI*)的活性^[24-25], 同时检测互补菌株的生长. 结果显示, 在 42℃ 条

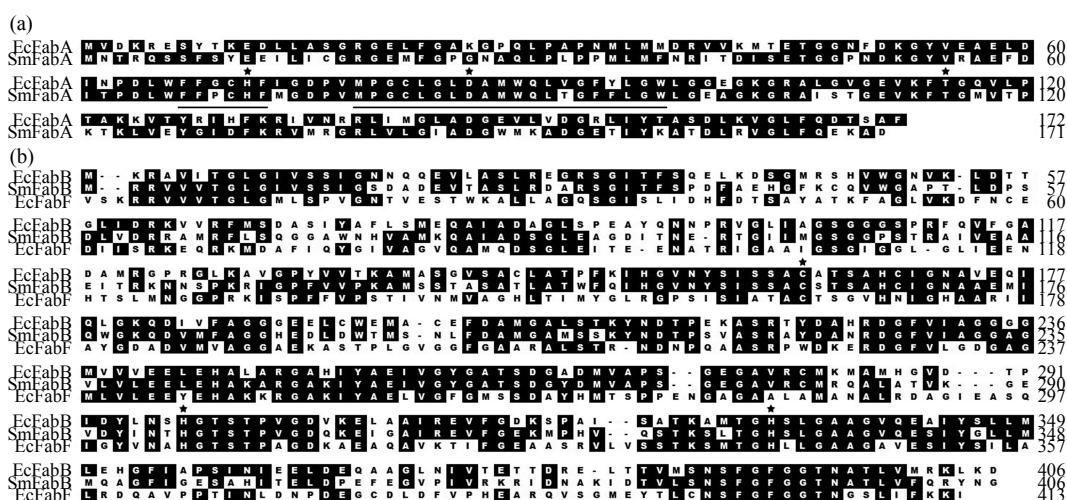


Fig. 1 The alignment of bacteria FabA and FabB proteins

Alignments of *S. meliloti* (Sm) FabA (a) and FabB (b) with their homologs from *E. coli* (Ec) are shown. Identical residues are indicated by white letters. The two α helix structure in FabA are underlined. The active-site residues, His-Asp-Thr in FabA and the Cys-His-His catalytic triads in FabB, are marked with asterisks. The homologies over the entire lengths of the proteins shown were as follows: FabA, 60.6% (Sm/Ec); FabB, 61.1% (Sm/Ec); FabB to FabF, 37.8% (Sm/Ec).

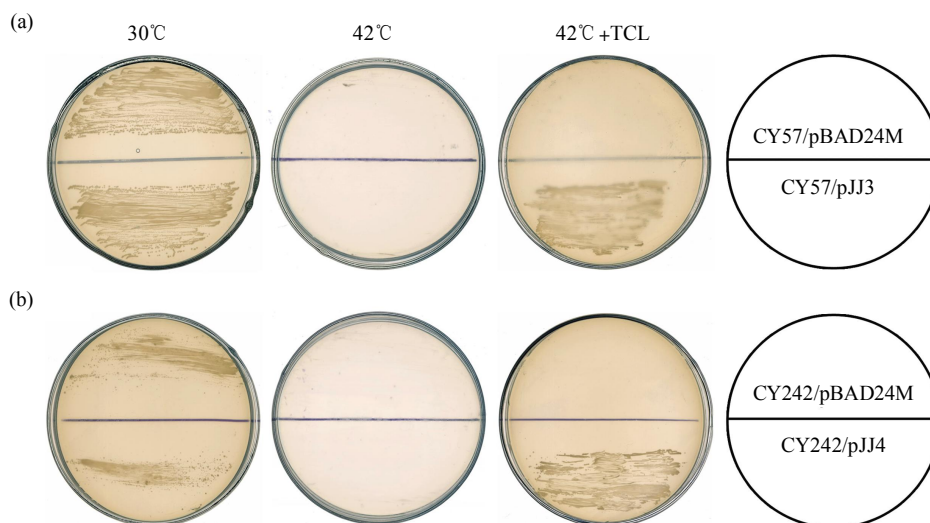


Fig. 2 Growth of transformants of *E. coli* mutants with plasmids carrying *S. meliloti fabA* or *fabB*

(a) *E. coli* strains CY57 carrying the pBAD24M or pBAD24M-derived plasmid pJJ3 (*fabA*) were grown at 30℃ and 42℃ on RB medium containing arabinose and triclosan. (b) *E. coli* strains CY242 carrying the pBAD24M or pBAD24M-derived plasmid pJJ4 (*fabB*) were grown at 30℃ and 42℃ on RB medium containing arabinose and triclosan.

件下, pJJ3 质粒能使 CY57 菌株恢复生长(图 2a), 而 pJJ4 也能使 CY242 生长(图 2b). 由此说明苜蓿中华根瘤菌 *SmfabA* 的基因产物具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水异构酶的活性, 而 *SmFabB* 具有 3- 酮脂酰 ACP 合成酶 I 活性.

2.3 *SmFabA* 和 *SmFabB* 参与不饱和脂肪酸合成

为验证上述结论, 用 $[1-^{14}\text{C}]$ 乙酸钠标记各转化菌株, 通过薄层层析分析菌株磷脂中的脂肪酸组成, 结果如图 3 所示. 转化 pBAD24M 空载体的 CY57 菌株, 由于其 3- 羟基脂酰 ACP 脱水异构酶失活, 故不能进行不饱和脂肪酸的合成, 层析板上仅有饱和脂肪酸的条带, 未见有不饱和脂肪酸的条带(图 3a). 对于携带 pJJ3 的 CY57 菌株, 在 Ara 未诱导或诱导未添加 TCL 的条件下, 也只有饱和脂肪酸的条带, 未见不饱和脂肪酸条带; 当在 Ara 诱导并添加 TCL 的条件下, 产生了两种不饱和脂肪酸的条带, 但是条带亮度比野生型菌株 MG1655 弱. 这再次证明了 *SmFabA* 的确具有 3- 羟基癸酰 ACP 脱水异构酶活性, 并参与不饱和脂肪酸的合成, 但其活性较低. 从图 3b 中可以看出, 转化 pBAD24M 空载体 CY242 菌株不能合成不饱和脂肪酸, 而 CY242/pJJ4 菌株在不加 Ara 诱导时(泳道

4)仅合成痕迹量的棕榈油酸和十八碳烯酸, 但是在添加 Ara 诱导时, 不论培养基中是否添加 TCL 都能够合成棕榈油酸和十八碳烯酸(泳道 5, 6). 这表明 *SmFabB* 具有 3- 酮脂酰 ACP 合成酶 I 活性, 也能够恢复大肠杆菌不饱和脂肪酸的合成.

大肠杆菌有两种长链 3- 酮脂酰 ACP 合成酶: *FabB*, 又称 3- 酮脂酰 ACP 合成酶 I, *FabF*, 又称 3- 酮脂酰 ACP 合成酶 II. 虽然两者均具有长链 3- 酮脂酰 ACP 合成酶活性, 但是它们的生理功能有着质的差异: *FabB* 能够以 *FabA* 的产物顺 -3- 癸烯酰 ACP 为底物, 参与不饱和脂肪酸的从头合成, 而 *FabF* 能够延伸棕榈油酰 ACP, 产生顺 -11- 十八碳烯酰 ACP, 在随温度变化调节细胞脂肪酸组成中起关键作用. 为进一步证明 *SmFabB* 拥有 3- 酮脂酰 ACP 合成酶 I 活性, 将 pJJ4 质粒转化大肠杆菌 *fabB(ts)fabF* 双突变菌株 CTY244^[17], 并用 $[1-^{14}\text{C}]$ 乙酸钠标记转化子, 薄层层析分析了菌体磷脂的脂肪酸组成, 结果表明, 在 Ara 诱导条件下, 无论是否添加 TCL, 磷脂中都含有大量的棕榈油酸, 但未见有顺 -11- 十八碳烯酸的合成(图 3c). 这再次表明 *SmfabB* 编码的蛋白的确是 3- 酮脂酰 ACP 合成酶 I.

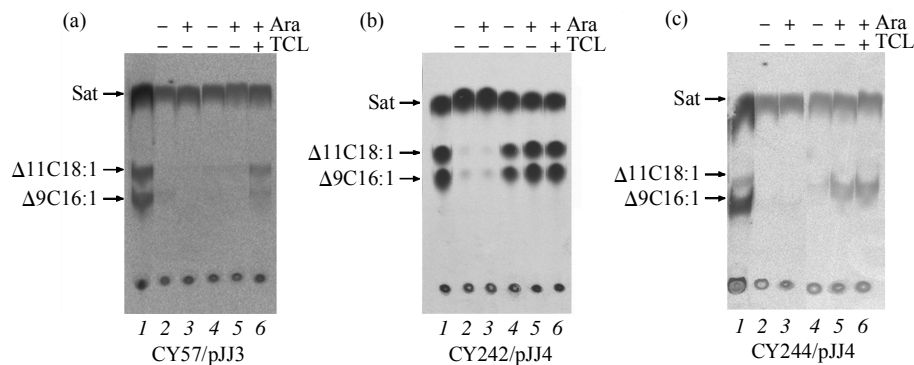


Fig. 3 Argentation thin-layer chromatographic analysis of $[1-^{14}\text{C}]$ acetate-labeled *E. coli* mutant strains carrying plasmids encoding *S. meliloti fabA* or *fabB*

(a) Argentation thin-layer chromatographic analysis of $[1-^{14}\text{C}]$ acetate labeled *E. coli* CY57 strain carrying plasmids pJJ3 encoding *S. meliloti fabA*. The migration positions of the methyl esters of the fatty acids species are shown. Lane 1 is the methyl esters of the wild type *E. coli* strain MG1655; lane 2 and 3 is the methyl esters of *E. coli* mutant strain CY57 carrying pBAD24M; lane 4~6 are the methyl esters of *E. coli* mutant strain CY57 carrying pJJ3. (b, c) Argentation thin-layer chromatographic analysis of $[1-^{14}\text{C}]$ acetate-labeled *E. coli* CY242 (b) or CY244 (c) carrying plasmid pJJ4 harboring *S. meliloti fabB*. Lane 1 is the methyl esters of the wild type *E. coli* strain MG1655; lane 2 and 3 is the methyl esters of *E. coli* mutant strain CY242 (b) or CY244 (c) carrying pBAD24M; lane 4~6 are the methyl esters of *E. coli* mutant strain CY242 (b) or CY244 (c) carrying pJJ4. Ara, arabinose; TCL, triclosan; Sat, saturated fatty acid esters; $\Delta 9\text{C}16:1$, methyl ester of *cis*-9-hexadecenoic; $\Delta 11\text{C}18:1$, methyl ester of *cis*-11-octadecenoic.

2.4 苜蓿中华根瘤菌 FabA 和 FabB 蛋白的表达与纯化

为了进一步在体外研究 SmFabA 和 SmFabB 的功能, 将 pJJ1 和 pJJ2 上携带的 *SmfabA* 和 *SmfabB* 基因分别克隆到 pET28(b)质粒上, 构建了能在大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中高效表达的载体: pJJ5 (*fabA*)和 pJJ6 (*fabB*)(图 4a). 热激转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株, 在 37°C 进行两个蛋白的表达, 结果显示 SmFabA 和 SmFabB 在 BL21(DE3)菌株中均

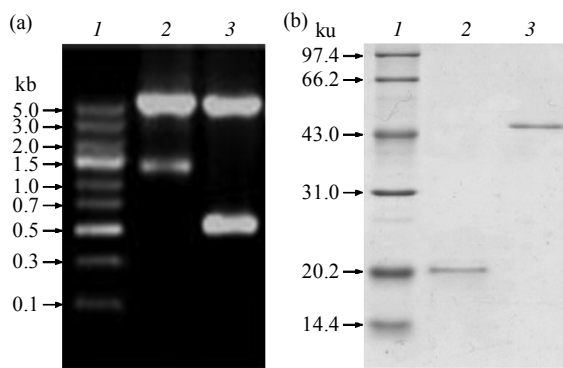


Fig. 4 Construction of expression vector pJJ5 or pJJ6 and purification of *S. meliloti* FabA or FabB

(a) Construction of expression vector pJJ5 and pJJ6. 1: DNA marker; 2: pJJ6/*Nde* I & *Hind* III; 3: pJJ5/*Nde* I & *Hind* III. (b) Purification of *S. meliloti* FabA and FabB. 1: Protein marker; 2: SmFabA; 3: SmFabB.

能高效表达, 且主要以可溶性形式存在(结果未列). 根据这一结果, 采用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析, 分别分离纯化了 N 端融合有 His-tag 标签的 SmFabA 和 SmFabB 蛋白. 经检测 FabA 和 FabB 蛋白在 15%的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上均为单一条带(图 4b), 分别为 21.3 和 45.1 ku, 与推测的 FabA 和 FabB 蛋白的大小相符, 表明蛋白质纯化成功.

2.5 苜蓿中华根瘤菌 FabA 蛋白体外活性检测

体外重建大肠杆菌脂肪酸合成体系, 通过分析合成产物来明确纯化 SmFabA 的体外活性. 首先检测了 SmFabA 是否具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水酶的活性. 以 3- 羟基脂酰 ACP 为底物, FabA 催化脱水生成反 -2- 烯脂酰 ACP, 然后 FabI(烯脂酰 ACP 还原酶)将反 -2- 烯脂酰 ACP 还原成脂酰 ACP, 由于脂酰 ACP 和羟脂酰 ACP 的构象不同, 在非变性蛋白凝胶电泳时因迁移速率不同而呈现不同的条带, 以此来检测脱水酶的活性. 结果显示(图 5a): 泳道 2 的反应由大肠杆菌 FabA 催化 3- 羟基脂酰 ACP 脱水生成反 -2- 烯脂酰 ACP; 泳道 3 中苜蓿根瘤菌 SmFabA 也能催化 3- 羟基脂酰 ACP 脱水生成反 -2- 烯脂酰 ACP; 泳道 4 和 5 的反应进一步由 FabI 催化, 使得反 -2- 烯脂酰 ACP 还原, 产生癸脂酰 ACP. 这表明苜蓿根瘤菌的 SmFabA 与大肠杆菌 FabA 一样具有脱水酶活性, 能催化 3- 羟基脂酰 ACP 脱水生成反 -2- 烯脂酰 ACP.

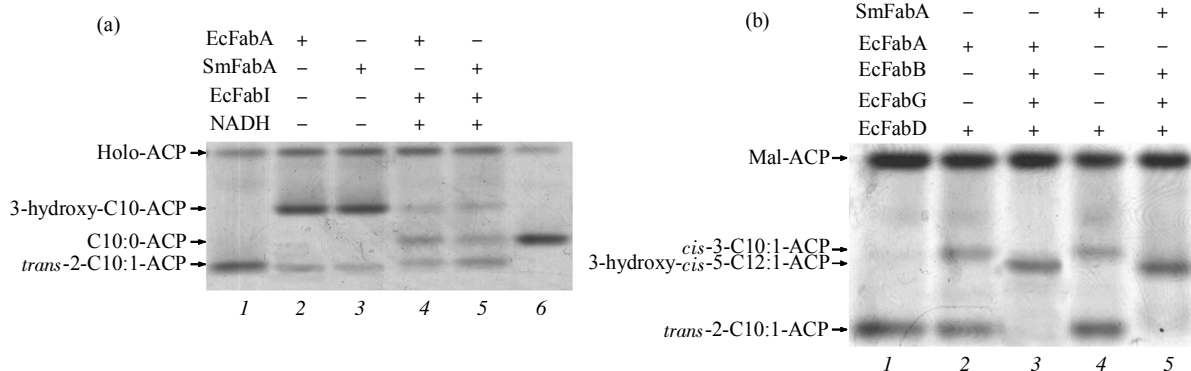


Fig. 5 Enzymatic characterization of *S. meliloti* FabA in fatty acid biosynthesis

(a) Assay of *S. meliloti* FabA dehydratase activities *in vitro*. Fatty acid biosynthesis was reconstructed by the sequential addition of each purified enzyme to a reaction mixture containing NADH and hydroxydecanoyl-ACP. Completion of the acyl-ACP synthesis reaction was determined by conformationally sensitive gel electrophoresis. The migration positions of octanoyl-ACP and *trans*-2-decanoyl-ACP on gel are shown (lane 1 and 6). (b) Assay of *S. meliloti* FabA isomerase activities *in vitro*. Fatty acid biosynthesis was reconstructed by the sequential addition of each purified enzyme to a reaction mixture containing NADH, Mal-ACP and *trans*-2-decenoyl-ACP. The *cis*-3-decenoyl-ACP product of FabA is a substrate for 3-ketoacyl-ACP synthase I (FabB) and thus becomes elongated with an acetate unit from malonyl-ACP. The resulting product, 3-keto-*cis*-5-dodecenoyl-ACP, is then reduced by FabG. The reaction products were resolved by conformational sensitive gel electrophoresis on 15% polyacrylamide gels containing concentrations of urea optimized to effect the separation. The migration position of *trans*-2-decanoyl-ACP was shown (lane 1).

用相似的策略检测了 SmFabA 是否具有 3- 羟基脂酰 ACP 异构酶的活性. 已经证明, 在大肠杆菌中 FabA 能使 3- 羟基脂酰 ACP 脱水, 形成反 -2- 癸烯酰 ACP, 同时能将不饱和双键异构化, 生成顺 -3- 癸烯酰 ACP. 顺 -3- 癸烯酰 ACP 不能被 FabI 还原, 只能作为 FabB 的底物, 被缩合成 3- 酮基 -5- 顺式十二碳烯酰 ACP, 进入脂肪酸合成的循环反应. 我们以反 -2- 癸烯酰 ACP 为底物, 首先 FabA 将反 -2- 癸烯酰 ACP 异构化为顺 -3- 癸烯酰 ACP, 接着 FabB 聚合顺 -3- 癸烯酰 ACP 和丙二酸单酰 ACP, 产生 3- 酮基 -5- 顺式月桂烯酰 ACP, FabG 将此产物还原, 生成 3- 羟基 -5- 顺式月桂烯酰 ACP. 从图 5b 的结果看出: SmFabA 和大肠杆菌的 EcFabA 一样能催化反 -2- 癸烯酰 ACP 异构生成顺 -3- 癸烯酰 ACP(泳道 2 和 4); 在反应体系中继续添加 Mal-ACP、EcFabB 和 EcFabG 后, 顺 -3- 癸烯酰 ACP 能生成延长 2 个碳原子的 3- 羟基顺 -5- 月桂烯酰 ACP(泳道 3 和 5). 即 SmFabA 具有顺 -3- 癸烯酰 ACP 异构酶活性, 能够将反 -2- 癸烯酰 ACP 异构化成顺 -3- 癸烯酰 ACP, 作为 FabB 的底物参与到不饱和脂肪酸链的延伸反应中去.

2.6 苜蓿中华根瘤菌 FabB 蛋白体外活性检测

在大肠杆菌中 FabB 是大肠杆菌合成不饱和脂肪酸的关键酶之一, 直接参与不饱和脂酰 ACP 的从头合成, 产生顺 -9- 十六烯脂酰 ACP^[26]. 为了确定 *SmfabB* 编码蛋白是否具有 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 I 的活性, 我们检测了 SmFabB 在体外脂肪酸

延伸反应中的功能, 以脂酰 ACP 和丙二酸单酰 ACP 为底物, 合成较底物多 2 个碳原子的 3- 酮脂酰 ACP, 该产物在 3- 酮脂酰 ACP 还原酶(FabG)、3- 羟基脂酰 ACP 脱水酶(FabZ)的作用下产生烯脂酰 ACP, 体系中若继续添加还原酶(FabI)则烯脂酰 ACP 还原为新的脂酰 ACP. 首先检测 SmFabB 对短链底物辛脂酰 ACP 的延伸, 结果如图 6a 所示, 在含有 EcFabB、EcFabG 和 EcFabZ 的反应体系中(泳道 3), 由于 EcFabB 具有延伸功能, 底物辛脂酰 ACP(C8:0-ACP)被延伸 2 个碳原子, 形成反 -2- 癸烯酰 ACP. 在含有 SmFabB、EcFabG 和 EcFabZ 的反应体系中(泳道 4), 生成了与泳道 3 一致的条带, 即底物辛脂酰 ACP 能生成延长 2 个碳原子的反 -2- 癸烯酰 ACP, 结果表明 SmFabB 与 EcFabB 一样具有延伸短链辛脂酰 ACP 功能. 对长链底物月桂酰 ACP 的延伸, 在体系中经 3- 酮脂酰 ACP 合成酶 I (SmFabB 或 EcFabB)缩合, 然后经 FabG 还原和 FabZ 脱水作用后, 底物月桂酰 ACP 延伸为豆蔻烯酰 ACP(图 6b, 泳道 3, 4). 由于 FabI 可以将豆蔻烯酰 ACP 生成豆蔻酰 ACP, 且反应不彻底, 因此在产物中出现了豆蔻烯酰 ACP 和豆蔻酰 ACP 两种条带(泳道 6, 7), 这表明 SmFabB 具有延伸长链月桂酰 ACP 的功能. 综合上述结果, 说明苜蓿根瘤菌 SmFabB 与大肠杆菌 FabB 一样, 对不同链长的脂酰 ACP 均有延伸能力, 是参与脂肪酸合成的酶.

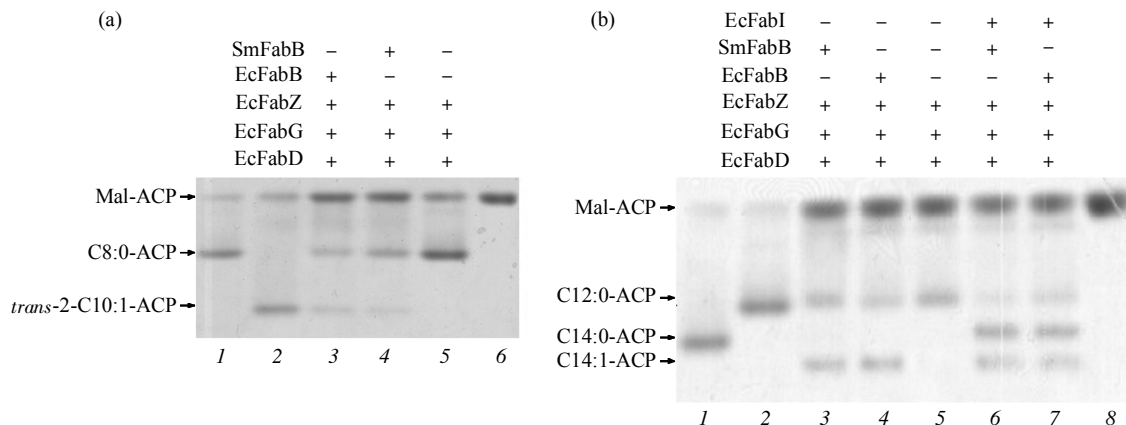


Fig. 6 Enzymatic characterization of *S. meliloti* FabB in fatty acid biosynthesis

(a) The short-chain KAS activities of *S. meliloti* FabB *in vitro*. The ability of *S. meliloti* FabB to synthesize fatty acids was determined by conformationally sensitive gel electrophoresis. The reactions shown above the gel were as in lane 3 except that *E. coli* FabB was replaced with *S. meliloti* FabB in lane 4. Lane 1 and 2 is the standard octanoyl-ACP and *trans*-2-decanoyl-ACP, respectively. (b) Assay of *S. meliloti* FabB long-chain KAS activities *in vitro*. The reactions shown above the gel were as in lane 4 except that *E. coli* FabB was replaced with *S. meliloti* FabB in lane 3. Lane 6~7 show the *E. coli* FabI was added into reactions. The migration positions of e-tridecanoyl-ACP (lane 1), dodecanoyl-ACP (lane 2) and mal-ACP (lane 8) on gel are shown.

2.7 苜蓿中华根瘤菌 *FabA* 和 *FabB* 基因突变分析

通过上述异体遗传互补、同位素标记细胞膜磷脂脂肪酸组成薄层层析和体外酶活性检测等实验证明了苜蓿中华根瘤菌 *SmfabA* 编码 3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水异构酶, *SmfabB* 编码 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 I. 为了进一步研究 *SmfabA* 和 *SmfabB* 的生理功能, 我们构建了 *fabA* 和 *fabB* 基因的 pK18mobsacB 系列自杀性载体 pJJ7(*fabA*)和 pJJ8(*fabB*), 转化大肠杆菌 S17-1, 试图通过接合转移敲除苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 的 *fabA* 和 *fabB* 基因, 但是通过筛选只得到一次重组菌株 SMJJA 和 SMJJB, 经多次筛选只得到二次重组后的野生型菌株不能得到 *SmfabA* 和 *SmfabB* 的突变株(结果未列). 这表明 *SmfabA* 和 *SmfabB* 可能是苜蓿中华根瘤菌生长所必需的基因, 这 2 个基因的突变将导致菌体脂肪酸和磷脂合成终止, 最终致使细菌死亡.

3 讨 论

生物信息学分析表明, 在苜蓿中华根瘤菌基因

组中, 编码脂肪酸合成酶系的基因集中在两个基因簇(图 7). 其中 *fabA*、*fabB* 和 *fabI₂* 位于一个基因簇, 其上游有一个调控基因 *irr*. 另一个主要的基因簇包含了 *fabD*、*fabG*、*acpP*、*fabF* 等基因. 同源比较分析显示, 苜蓿中华根瘤菌 *FabA* 和 *FabB* 与大肠杆菌同源蛋白的氨基酸序列相似性分别达到了 60.6%和 61.1%, 且大肠杆菌 *FabA* 和 *FabB* 所拥有的保守活性中心位点在苜蓿中华根瘤菌 *FabA*(His 残基)和 *FabB*(Cys162/His297/His332)中也存在. 由于细菌不饱和脂肪酸合成的 *FabA*-*FabB* 途径仅存在于变形细菌门(*Proteobacteria*)的 α 和 γ 类群中, 而苜蓿中华根瘤菌在细菌的系统发育体系中位于变形杆菌门的 α 类, 因此我们推测苜蓿中华根瘤菌基因组标注中的 *fabA* 和 *fabB* 基因很可能就是该细菌中负责不饱和脂肪酸合成的酶基因. 生物信息学的推断仍需要大量实验证据证明, 而苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 是否参与细菌脂肪酸的合成, 尚未有相关的报道.

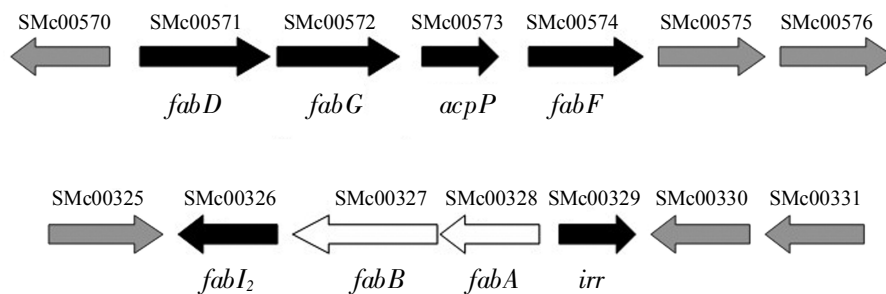


Fig. 7 The *S. meliloti* fatty acid biosynthetic gene clusters

本课题组对苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 同源基因进行了研究. 遗传互补分析表明, 在不添加油酸的 RB 平板上携带 *fabA* 的 pJJ3 的质粒不能恢复大肠杆菌的 *fabA* 基因温度敏感突变株 CY57 的生长, pJJ4(*fabB*)质粒也不能恢复 CY242 菌株在不添加油酸的培养基上生长(结果未列). 尽管苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 都不能互补大肠杆菌相应的同源蛋白突变株(CY57 和 CY242), 我们不能排除苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 参与了不饱和脂肪酸的

合成, 可能是两者编码的酶蛋白与寄主的烯脂酰 ACP 还原酶之间存在底物竞争作用, 故不能产生足够的饱和脂肪酸来维持突变菌株的生长. 为此我们在培养基中添加三氯森(TCL)抑制烯脂酰 ACP 还原酶 *FabI* 的活性, 让细胞积累更多的饱和酸合成的中间产物, 便于 *SmFabA* 和 *SmFabB* 发挥功能. 结果如图 2 所示, 在这样的条件下, 苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 能恢复突变株 CY57 和 CY242 的生长, 这一实验和后续的同位素标记薄层层析分

析(图 3)证明了我们的假设. 有关寄主烯脂酰 ACP 还原酶与外源脱水异构酶存在的竞争现象在以往本课题组和他人的研究中均有报道, 但具体机理有待深入研究^[7, 27]. 体外重建细菌脂肪酸合成反应研究显示, SmFabA 和大肠杆菌的 EcFabA 一样能催化反-2- 癸烯酰 ACP 异构生成顺-3- 癸烯酰 ACP, 作为 FabB 的底物参与不饱和脂肪酸链的延伸反应, *SmfabB* 基因编码的蛋白能缩合丙二酸单酰 ACP 与不同链长脂酰 ACP, 完成脂酰链的延伸(图 5, 6). 综上所述, 苜蓿中华根瘤菌的 *fabA* 和 *fabB* 同源蛋白是合成不饱和脂肪酸的关键酶, 直接参与不饱和脂酰 ACP 的从头合成.

本课题组从异体遗传互补和体外脂肪酸合成体系重建对苜蓿中华根瘤菌的 *fabA* 和 *fabB* 基因的功能做了初步探讨, 为了进一步研究这两个基因的生理功能, 最好的策略是采用基因敲除获得突变菌株和回复菌株, 比较突变菌株的生理特性来确定其功能. 本课题组利用同源重组方法试图获得 *SmfabA* 和 *SmfabB* 的插入突变菌株, 但经过多次筛选均未成功, 推测 *SmfabA* 和 *SmfabB* 是苜蓿中华根瘤菌的必需基因, 具有敲除致死性, 这在革兰氏阴性菌中并不常见. 为了验证这一推测, 本课题组正在进行 *SmfabA* 和 *SmfabB* 条件突变菌株的筛选, 相关实验数据将另行发表.

参 考 文 献

- [1] 冯赛祥, 朱 磊, 罗 彪, 等. 大肠杆菌(*Escherichia coli*)体外脂肪酸合成反应的重建. 生物化学与生物物理进展, 2008, **35**(8): 954-963
Feng S X, Zhu L, Luo B, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(8): 954-963
- [2] Scheuerbrandt G, Bloch K. Unsaturated fatty acids in microorganisms. J Biol Chem, 1962, **237**(7): 2064-2068
- [3] Campbell J W, Jr Cronan J E. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. Annu Rev Microbiol, 2001, **55**: 305-332
- [4] Lu Y J, Zhang Y M, Rock C O. Product diversity and regulation of type II fatty acid synthases. Biochem Cell Biol, 2004, **82**(1): 145-155
- [5] Hoang T T, Schweizer H P. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of the *fabAB* operon encoding beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabA) and beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). J Bacteriol, 1997, **179**(17): 5326-5332
- [6] Fozo E M, Quivey R G. The *fabM* gene product of *Streptococcus mutans* is responsible for the synthesis of monounsaturated fatty acids and is necessary for survival at low pH. J Bacteriol, 2004, **186**(13): 4152-4158
- [7] Wang H, Cronan J E. Functional replacement of the FabA and FabB proteins of *Escherichia coli* fatty acid synthesis by *Enterococcus faecalis* FabZ and FabF homologues. J Biol Chem, 2004, **279**(33): 34489-34495
- [8] Aguilar P S, Cronan J E, De Mendoza D. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. J Bacteriol, 1998, **180**(8): 2194-2200
- [9] Zhu K, Choi K H, Schweizer H P, *et al.* Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol, 2006, **60**(2): 260-273
- [10] 刘 影, 朱家璧, 俞冠翹, 等. 苜蓿中华根瘤菌烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabI* 的功能研究. 科学通报, 2009, **54**(24): 3830-3833
Liu Y, Zhu J B, Yu G Q, *et al.* Chin Sci Bull, 2009, **54**(24): 3830-3833
- [11] Meade H M, Long S R, Ruvkun G B, *et al.* Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. J Bacteriol, 1982, **149**(1): 114-122
- [12] Galibert F, Finan T M, Long S R, *et al.* The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science, 2001, **293**(5530): 668-672
- [13] 郑会明, 钟增涛, 陈一楠, 等. 根瘤菌与群体感应. 生态学杂志, 2005, **24**(5): 547-550
Zheng H M, Zhong Z T, Chen Y N, *et al.* Chinese J Ecology, 2005, **24**(5): 547-550
- [14] Zhu L, Lin J, Ma J, *et al.* Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase. Antimicrob Agents Chemother, 2010, **54**(2): 689-698
- [15] Cronan J E, Jr. Regulation of the fatty acid composition of the membrane phospholipids of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 1974, **71**(9): 3758-3762
- [16] Ulrich A K, De Mendoza D, Garwin J L, *et al.* Genetic and biochemical analyses of *Escherichia coli* mutants altered in the temperature-dependent regulation of membrane lipid composition. J Bacteriol, 1983, **154**(1): 221-230
- [17] De Mendoza D, Klages Ulrich A, Cronan J E. Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I. J Biol Chem, 1983, **258**(4): 2098-2101
- [18] 王玉琪, 孙益嵘, 陈艺彩, 等. 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) β 酮脂酰 ACP 合成酶 II 同源蛋白功能分析. 生物化学与生物物理进展, 2007, **34**(8): 844-850

- Wang Y Q, Sun Y R, Chen Y C, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2007, **34**(8): 844–850
- [19] Dennis J J, Zylstra G J. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. Appl Environ Microbiol, 1998, **64**(7): 2710–2715
- [20] Schafer A, Tauch A, Jager W, *et al.* Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene, 1994, **145**(1): 69–73
- [21] Wang H, Cronan J E. *Haemophilus influenzae* Rd lacks a stringently conserved fatty acid biosynthetic enzyme and thermal control of membrane lipid composition. J Bacteriol, 2003, **185**(16): 4930–4937
- [22] Wang H, Cronan J E. Only one of the two annotated *Lactococcus lactis* fabG genes encodes a functional beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase. Biochemistry, 2004, **43**(37): 11782–11789
- [23] Zhu L, Cheng J, Luo B, *et al.* Functions of the *Clostridium acetobutylicum* FabF and FabZ proteins in unsaturated fatty acid biosynthesis. BMC Microbiol, 2009, **9**: 119
- [24] Heath R J, Rock C O. A triclosan-resistant bacterial enzyme. Nature, 2000, **406**(6792): 145–146
- [25] McMurry L M, Oethinger M, Levy S B. Triclosan targets lipid synthesis. Nature, 1998, **394**(6693): 531–532
- [26] Feng Y, Cronan J E. *Escherichia coli* unsaturated fatty acid synthesis: complex transcription of the fabA gene and *in vivo* identification of the essential reaction catalyzed by FabB. J Biol Chem, 2009, **284**(43): 29526–29535
- [27] Marrakchi H, Choi K H, Rock C O. A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem, 2002, **277**(47): 44809–44816

Identification and Function Research of *fabA* and *fabB* of *Sinorhizobium meliloti**

HU Zhe, MA Jin-Cheng**, JIANG Jing-Jing, WANG Hai-Hong

(College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function
and Regulation in Agricultural Organisms, Guangzhou 510642, China)

Abstract In *E. coli*, FabA, a bifunctional enzyme, is the key enzyme of the classic anaerobic pathway of unsaturated fatty acid synthesis and introduces the *cis* double bond into a 10-carbon intermediate. This intermediate is then elongated by FabB (one of long chain 3-ketoacyl-ACP synthases) to form the unsaturated fatty acids found in the membrane phospholipids. Sequence alignments indicated that *Sinorhizobium meliloti* SmFabA and SmFabB are 60.6% and 61.1% identical to *E. coli* FabA and FabB, respectively. Further analysis showed that the conservative active-site histidine residue in EcFabA and the Cys-His-His catalytic triads in EcFabB, are also found in SmFabA and SmFabB. The genetic complementary revealed that *SmfabA* is able to restore the growth and the fatty acid synthesis of the *E. coli* temperature sensitive mutant CY57 at nonpermissive temperature under addition low concentration triclosan to inhibit enoyl-acyl carrier protein reductases. Moreover, *SmfabB* is able to complement temperature sensitive mutant CY242. *In vitro* assay identifies that *SmfabA*, like *E. coli* FabA, is able to introduce the *cis* double bond into a 10-carbon intermediate, and *SmfabB*, like FabB, is able to condense the acyl-ACPs with malonyl-ACP to long-chain acyl-ACPs. However, we also attempted to inactivate the *fabA* and *fabB* genes by allelic replacement but none of the *fabA* and *fabB* deletion mutant was obtained, and it seemed likely that *fabA* and *fabB* are essential genes in *S. meliloti*. These results demonstrated that SmFabA and SmFabB are key enzymes in unsaturated fatty acid synthesis in *S. meliloti*.

Key words *Sinorhizobium meliloti*, bacterial fatty acid synthesis, 3-ketoacyl-ACP synthase I, 3-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase/isomerase

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00579

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31200028), The Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20104404110005) and Foundation for Distinguished Young Talents in Higher Education of Guangdong (LYM10038).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-85281389, E-mail: majincheng@scau.edu.cn

Received: January 19, 2013 Accepted: May 15, 2013