

茄科雷尔氏菌脂酰 CoA 脱饱和酶和 环丙烷脂肪酸合成酶的鉴定*

董会娟 范志永 况承伟 李先其 王海洪**

(华南农业大学生命科学学院, 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 茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)是一种危害严重的土传植物致病菌, 其宿主范围广泛, 在世界各地严重影响重要经济作物的生产. 研究茄科雷尔氏菌的生理特性, 探索其致病机理, 有利于研发防治青枯病的技术与方法. 脂肪酸是细菌细胞重要的组成物质, 但是茄科雷尔氏菌脂肪酸合成的机制尚不清晰. 本文以茄科雷尔氏菌 GMI1000 为材料, 鉴定了该菌的脂酰 CoA 脱饱和酶和环丙烷脂肪酸合成酶, 并分析了这两种酶在不饱和脂肪酸和环丙烷脂肪酸合成中的作用. 结果显示, 茄科雷尔氏菌 RSc2450 编码脂酰 CoA 脱饱和酶, 参与其不饱和脂肪酸合成, 但是该菌还存在其他不饱和脂肪酸合成途径. 同时发现在茄科雷尔氏菌编码两个可能的环丙烷脂肪酸合成酶蛋白质中, 仅有 Cfa1(RSc0776)参与了该菌环丙烷脂肪酸的合成, 并在低 pH 和高渗透压的耐受中起作用. 该研究结果为深入研究茄科雷尔氏菌脂肪酸合成代谢特点及致病机理奠定了基础.

关键词 茄科雷尔氏菌, 脂酰 CoA 脱饱和酶, 环丙烷脂肪酸合成酶

学科分类号 Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0174

茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)属于变形杆菌门(*Proteobacteria*), β -变形杆菌纲(*β -Proteobacteria*), 伯克霍尔德氏菌目(*Burkholderiales*), 伯克霍尔德氏菌科(*Burkholderiaceae*), 雷尔氏菌属(*Ralstonia*), 为好氧、杆状、革兰氏阴性细菌, 能侵染 54 个科 450 多种植物^[1-2]. 茄科雷尔氏菌引起的植物土传细菌性青枯病, 是世界上危害最大、造成损失最严重的植物病害之一, 其中对茄科作物的危害最为严重. 青枯病一旦发生难以控制, 往往造成作物大面积死亡甚至绝收, 严重影响了许多重要经济作物, 比如番茄、茄子、马铃薯、香蕉等产量^[1, 3]. 因此, 探索茄科雷尔氏菌的生理特性, 探索其致病机理, 研发防治青枯病的技术与方法, 仍是当今生物科学研究的重要课题之一.

脂肪酸是细菌细胞的组成物质, 是构成膜磷脂、脂多糖的成分之一^[4-5]. 全细胞脂肪酸的分析显示, 茄科雷尔氏菌含有肉豆蔻酸($C_{14:0}$)、棕榈酸($C_{16:0}$)、棕榈油酸($C_{16:1}$)、硬脂酸($C_{18:0}$)、顺-11-十八

碳烯酸($C_{18:1}$)、顺-9, 10-亚甲基棕榈酸($C_{17:0}$ cyclo)和 3-羟基肉豆蔻酸($3-OH-C_{14:0}$)等组分^[6-7]. 每种细菌都具有特征性脂肪酸图谱, 可用于细菌的种属鉴定. 中国学者刘波团队根据特征性脂肪酸图谱, 对茄科雷尔氏菌菌种鉴定进行了深入的研究, 发现该菌的不饱和脂肪酸种类及含量与对植物致病性有密切的关系, 并根据不饱和脂肪酸的差异建立了茄科雷尔氏菌种下分化脂肪酸型的判别模型^[8-11]. 然而茄科雷尔氏菌不饱和脂肪酸的合成机制未见报道. 分析茄科雷尔氏菌模式菌株 GMI1000 基因组^[3], 未发现存在于革兰氏阴性细菌中典型的 FabA-FabB 不饱和脂肪酸合成途径^[4-5]中的同源基因, 仅编码一个与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)脱饱

* 国家自然科学基金(31671987, 31601601)和广东省自然科学基金(2014A030313455)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 020-85281389, E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

收稿日期: 2018-06-20, 接受日期: 2018-09-05

和酶^[12]高度同源的基因 *RSc2450*。因此, 茄科雷尔氏菌是否通过饱和脂肪酸脱饱和的方式合成不饱和脂肪酸, 有待进一步实验证明。

环丙烷脂肪酸(cyclopropane fatty acid, CFA)是细菌磷脂中常见的脂肪酸, 主要有两种类型: 顺-9, 10-亚甲基棕榈酸(*C*_{17:0} cyc)和顺-11, 12-亚甲基硬脂酸(*C*_{19:0} cyc)^[4]。环丙烷脂肪酸合成酶可以将膜磷脂中不饱和脂肪酸的双键打开, 然后利用 S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基, 将其环化, 形成环丙烷^[4], 这类特殊的脂肪酸可以提高细菌对不利生长环境的耐受性^[4, 13-15]。生物信息学分析显示茄科雷尔氏菌模式菌株 GMI1000 基因组中有 2 个编码环丙烷脂肪酸合成酶基因: *RSp1446* 和 *RSc0766*, 但其编码蛋白质的生物学功能仍不清楚。

本论文采用遗传互补、基因敲除等技术手段, 研究了脂肪酸脱饱和酶和环丙烷脂肪酸合成酶在茄科雷尔氏菌不饱和脂肪酸和环丙烷脂肪酸合成中的作用, 并分析了它们的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基

本研究使用的菌株包括茄科雷尔氏菌 GMI1000, 大肠杆菌 DH-5 α 、FT1^[15]、YYC1257^[15]、HW8^[16]、WM3064^[17]、希瓦氏菌 (*Shewanella*

oneidensis) MR-1 以及希瓦氏菌 *desAfabA* 突变株 HG0197-1856^[17]。使用的质粒载体有 pMD19-T、pBAD24M^[18]、pSRK^[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 作为检测大肠杆菌突变菌株的培养基^[21], BG 用作培养茄科雷尔氏菌的丰富培养基^[6], M63 作为检测茄科雷尔氏菌突变菌株的基础培养基^[6]。常用试剂和抗生素的使用浓度如下: 100 g/L 氨苄青霉素, 30 g/L 卡那霉素, 30 g/L 氯霉素, 20% L-阿拉伯糖, 1 mol/L 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)和 30 mmol/L 2, 6-二氨基庚二酸(DAR)。

1.1.2 生化试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶 Pfu 和 Taq、分子质量标准 DL2000、T-载体、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、卡那霉素和氯霉素等购自北京鼎国公司; L-阿拉伯糖、IPTG、DAR 和各种脂肪酸等试剂均购自 Sigma 公司; PCR 扩增寡核苷酸引物由上海生工合成; 蛋白胨、酵母提取物、琼脂糖均为 OXOID 原装试剂; 其余试剂和药品均为国产分析纯。

1.2 DNA 重组技术

本研究所使用的 PCR 引物见表 1。以茄科雷尔氏菌 GMI1000 基因组 DNA 为模板, 使用 *Pfu*

Table 1 Sequences of the PCR primers used in this work

Primer names	Primer sequence (5'→3')
pBAD forward	CGCAACTCTCTACTGTTTCTC
pBAD reverse	GCTGAAAATCTTCTCTCATCC
M13 forward	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC
M13 reverse	GAGCGGATAACAATTTCACACAGG
<i>desA</i> Nde I	AAGCATATGGTTGGTGTCGGTCCCT
<i>desA</i> Hind III	AACAAGCTTTCAGGCGTACCGGCGCAGG
<i>cfaI</i> Nde I	AAGCATATGAGCACTACCGAAAG
<i>cfaI</i> Hind III	AACAAGCTTTTATCGTGTCGTGGACA
<i>CfaI</i> Nde I	AAGCATATGTTTTTCCAACAGGC
<i>CfaI</i> Hind III	CAAAAGCTTTCAGCGATAGATATAGC
<i>desA</i> P1	CCGAAGCTTAGTCGTCACTGAGTGATTCT
<i>desA</i> P2	TTTCTGGATGGTCTCGCGGT
<i>desA</i> P3	ACCGCGAGACCATCCAGAAAAGGCACGCTTCGGCGACGTC
<i>desA</i> P4	AATGGATCCACGCTTGATGCGGGCTTT
<i>cfaI</i> P1	CCGAAGCTTGTAACTGACATCGTC
<i>cfaI</i> P2	GGACAGTGCATCCTCGACCG
<i>cfaI</i> P3	CGGTCGAGGATGCACTGTCCGACCCGCCGGCCCCCTAC
<i>cfaI</i> P4	AATGGATCCAACCTGGGCACGACCGGA
<i>CfaI</i> P1	AATAAGCTTCAGCGAGGTGCCCGACC
<i>CfaI</i> P2	GTCGATGCCTCCCGGTGCCA
<i>CfaI</i> P3	TGGCACCGGGAGGCATCGACACGCTTGACCACCGACG
<i>CfaI</i> P4	AATGGATCCCGCACACAGCCGCGGT

DNA 聚合酶, 分别 PCR 扩增 *RSc2450 (desA)*、*RSc0776 (cfa1)* 和 *RSp1446 (cfa2)* 基因, 利用 Taq DNA 聚合酶催化末端加尾后, 分别连接到 pMD19-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH-5 α 筛选阳性克隆, 测序验证, 获得 pHJ1(*desA*)、pHJ3(*cfa1*)和 pHJ2(*cfa2*)质粒载体, 然后将这些质粒携带的基因片段, 分别克隆到 pBAD24M 或 pSRK 表达载体, 获得质粒载体 pHJ4 (pBAD24M-*cfa2*)、pHJ5 (pBAD24M-*cfa1*)、pHJ6 (pSRK-*desA*)、pHJ7 (pSRK-*cfa2*)和 pHJ8(pSRK-*cfa1*)。

1.3 遗传互补希瓦氏菌和大肠杆菌脂肪酸合成突变菌株

将质粒载体 pHJ4 (pBAD24M-*cfa2*) 和 pHJ5 (pBAD24M-*cfa1*)热激转化大肠杆菌 *cfa* 突变菌株 YYC1257, 将质粒载体 pHJ6(pSRK-*desA*)热激转化大肠杆菌 *fabA* 突变菌株 HW8. 遗传互补希瓦氏菌 *desAfabA* 双突变菌株采用两亲本接合技术进行, 首先将质粒载体 pHJ6(pSRK-*desA*)热激转化大肠杆菌 WM3064, 获得转化子后, 与希瓦氏菌 *desAfabA* 双突变菌株等比例混合, 低速离心, 弃上清, 将菌体转移至含有 30 μ mol/L DAP 的 LB 固体平板上静置过夜, 将混合菌体适当稀释后涂布于含有 30 mg/L 卡那霉素且添加 0.1%油酸的 LB 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h。

大肠杆菌 *cfa* 突变菌株 YYC1257 转化子的性状分析采用生长曲线测定法, 即先在正常 pH 条件下将转化子菌株培养到稳定期前期, 然后按照 1% 的接种量转移至 100 ml, pH 4.5 液体 RB 中, 37 $^{\circ}$ C 进行转化子的生长曲线测定, 每个样品 3 个平行。大肠杆菌 HW8 转化子和希瓦氏菌 *desAfabA* 双突变菌接合子的性状分析在 RB 平板上进行, 即将上述转化子或接合子对应地接种在 RB 和含有 0.1%油酸的 RB 培养基上, 适当温度下培养后, 观察菌株的生长。

1.4 茄科雷尔氏菌突变株的构建与性状分析

以茄科雷尔氏菌 GMI1000 基因组 DNA 为模板, 使用 Pfu DNA 聚合酶, 首先分别 PCR 扩增 *desA*、*cfa1* 和 *cfa2* 基因上下游约 400 bp~700 bp 片段, 然后采用重叠延伸 PCR 技术将各自上下游片段连接, 并分别与 pMD19-T 载体连接, 获得 pHJ9(*cfa2* up-down)、pHJ10(*cfa1* up-down)和 pHJ11 (*desA* up-down)。将上述 T- 载体携带的 DNA 片段克隆到 pK18mobsacB 上, 获得自杀性质粒载体 pHJ12 (*cfa2* up-down)、pHJ13 (*cfa1* up-down) 和

pHJ14(*desA* up-down)。将这些质粒载体分别转化大肠杆菌 WM3064 后, 与茄科雷尔氏菌野生型菌株 GMI1000 进行接合共培养。培养物进行适当稀释后涂布于含有卡那霉素和氯霉素的 BG 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 48 h 获得单菌落, 选取单菌落培养并提取基因组 DNA, PCR 检测后获得一次重组菌株。将获得的一次重组菌株在添加氯霉素的 BG 中培养 24 h 后, 涂布于含有氯霉素和 10%蔗糖的 BG 平板上, 筛选对卡那霉素敏感的单菌落, PCR 验证后获得基因敲除突变株。

desA 突变菌株的性状分析采用平板接种法, 将突变菌株分别接种 BG 和含有 0.1%油酸的 BG 平板上, 培养后观察其生长。*cfa* 突变菌株的性状分析采用低 pH 条件下测定生长曲线, 先在正常 pH 条件下将突变菌株培养到稳定期前期, 然后按照 1%比例接种至 pH 5.0 的 BG 液体培养基中, 在 30 $^{\circ}$ C 测定菌株的生长曲线。另外, 渗透压、不同温度等其他环境因子对 *cfa* 突变菌株的胁迫生长, 采用平板接种方法进行。

1.5 细菌脂肪酸组成分析

细菌脂肪酸抽提的方法参照文献[7], 具体如下: 离心收集 5 ml 经培养的细菌菌体, 用 1 ml 的 NaOH-CH₃OH 溶液 (NaOH 45 g, CH₃OH 150 ml, H₂O 150 ml)悬浮细菌, 并于沸水浴中放置 1 h, 其间每隔 10 min 振荡菌液一次; 之后加入 2 ml 的 HCl-CH₃OH 溶液 (6 mol/L HCl 325 ml, CH₃OH 275 ml), 充分混匀后于 80 $^{\circ}$ C 水浴放置 30 min; 水浴结束后迅速冷却到 20 $^{\circ}$ C 以下, 加入 1 ml 石油醚, 充分混匀后 4 000 r/min 离心 5 min 使其分层, 取上层液体至新的离心管中; 重复萃取 3 次, 合并萃取液, 并置于旋转蒸发仪中, 蒸干石油醚; 用 100 μ l 正己烷溶解残留物, 过滤膜, 取 1 μ l 溶解物置于 Agilent 5975c 型气质联用设备中进行常规脂肪酸组分分析。

大肠杆菌突变菌株 ¹⁴C- 乙酸钠标记及薄层层析分析脂肪酸组成参照文献[21]进行。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

细菌采用不同方式合成不饱和脂肪酸, 包括厌氧的脱水异构途径(如大肠杆菌的 FabA-FabB 途径和肺炎链球菌的 FabM 途径)和好氧的饱和脂肪酸脱饱和途径(如铜绿假单胞菌的 DesA 途径)^[4, 12]。生物信息学分析显示茄科雷尔氏菌 GMI1000 基因组

中, 既没有编码 FabA-FabB 途径^[4-5]的同源基因, 也未见编码 FabM^[4]的同源基因, 仅有一个注释为脂酰 CoA 脱饱和酶(acyl-CoA desaturase)的编码基因 *RSc2450*(命名为 *desA*)。茄科雷尔氏菌 *DesA* 与铜绿假单胞菌 *DesA*^[12]同源, 一致性达到 50.4%, 且含有典型的脂酰 CoA 脱饱和酶的 3 个组氨酸保守基序^[12](结果未列), 表明茄科雷尔氏菌 *DesA* 可能参与不饱和脂肪酸的合成。

用大肠杆菌环丙烷脂肪酸合成酶 *Cfa* 序列^[20], 在 GMI100 基因组中进行同源检索, 发现 2 个环丙烷脂肪酸合成酶编码基因: *RSc0776*(命名为 *cfa1*)和 *RSp1446*(命名为 *cfa2*)。Cfa1 和 Cfa2 与大肠杆菌 *Cfa* 序列一致性分别是 31%和 51%, Cfa1 和 Cfa2 的一致性为 36%。分析显示 Cfa1 和 Cfa2 含有环丙烷脂肪酸合成酶家族特征性保守序列(V/L)L(E/D)XGXGXG 和 3 个保守的半胱氨酸活性位点^[20, 22](结果未列), 表明这 2 个 *Cfa* 蛋白可能参与了茄科雷尔氏菌的环丙烷脂肪酸合成。

2.2 茄科雷尔氏菌 *desA* 和 *cfa* 基因异体遗传互补分析

为验证茄科雷尔氏菌 *desA* 基因编码蛋白是否具有脱饱和酶活性, 本研究首先构建了 *desA* 表达载体 pHJ6(pSRK-*desA*), 并将其通过两亲本接合的方法转移到希瓦氏菌 *desAfabA* 双突变菌株中, 在 LB 培养基上检测结合子的生长。希瓦氏菌 *desAfabA* 双突变菌株是油酸营养缺陷型菌株^[17], 在 LB 培养基上不能生长。结果显示互补 pHJ6 后, 接合子能在 LB 培养基上生长, 但生长较野生菌及枯草芽孢杆菌 *desA* 互补株弱(图 1a), 表明茄科雷

尔氏菌 *desA* 编码脂酰 CoA 脱饱和酶, 但其催化活性较弱。生长曲线的测定也得到了相同的结果(结果未列)。为了进一步验证茄科雷尔氏菌 *DesA* 的活性, 本研究还将 pHJ6 导入大肠杆菌 *fabA* 突变菌株 HW8(该突变菌株为油酸营养缺陷型菌株)中, 并在 LB 培养基上检测了突变株的生长, 结果显示茄科雷尔氏菌 *desA* 基因不能恢复 HW8 的生长。为了确定茄科雷尔氏菌 *desA* 不能遗传互补大肠杆菌 HW8 的原因, 本研究用 ¹⁴C- 乙酸钠标记菌株, 采用薄层层析技术分析了互补菌株的不饱和脂肪酸的合成, 结果显示 HW8 携带空质粒的菌株只能产生饱和脂肪酸, 而互补 pSRK-*Rsd**desA* 后 HW8 菌株产生了不饱和脂肪酸(图 1b)。这表明茄科雷尔氏菌 *DesA* 的确具有脂酰 CoA 脱饱和酶活性, *desA* 之所以不能互补 HW8 生长是因为 *DesA* 活性低, 不能满足 HW8 生长对不饱和脂肪酸的需要。

采用类似的方法本研究检测了茄科雷尔氏菌 *cfa1* 和 *cfa2* 基因编码蛋白是否具有环丙烷脂肪酸合成酶的活性。首先将 *cfa1* 和 *cfa2* 克隆到 pBAD24M 载体上, 获得 pHJ5(*cfa1*) 和 pHJ4(*cfa2*) 两个互补表达载体, 并转化大肠杆菌环丙烷脂肪酸合成酶突变菌株 YYC1257^[15]。进一步提取了 YYC1257 转化子的脂肪酸, 并分析其脂肪酸组成。结果显示遗传互补 *cfa1* 的转化子恢复了环丙烷脂肪酸的合成, 而互补 *cfa2* 的转化子和携带空质粒载体的转化子都不能合成环丙烷脂肪酸(表 2)。初步表明 *cfa2* 编码的蛋白质没有环丙烷脂肪酸合成酶活性, 而 *cfa1* 编码的蛋白质具有环丙烷脂肪酸合成酶活性。

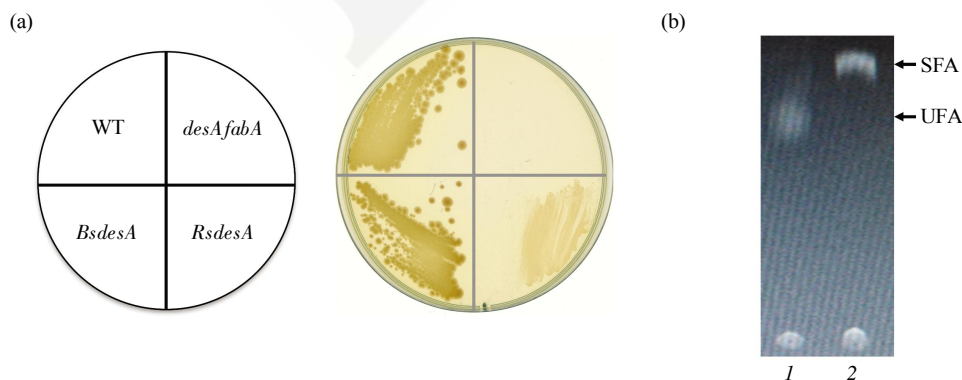


Fig. 1 Complementation of bacteria fatty acid biosynthetic mutant strains with *R. solanacearum desA*

(a) Complementation of *Shewanella oneidensis desA fabA* mutant with *R. solanacearum desA*. wt, *S. oneidensis* MR-1; *desA fabA*, *S. oneidensis desA* and *fabA* double mutant carrying empty vector (pSRK); *BsdA*, *desA fabA* mutant carrying plasmid pSRK-*BsdA* encoding *Bacillus subtilis desA*; *RsdA*, *desA fabA* mutant carrying plasmid pHJ6 (pSRK-*RsdA*) encoding *R. solanacearum desA*. (b) Expression of *R. solanacearum desA* restores UFA synthesis of *E. coli fabA* mutant strain HW8. The methyl esters of fatty acids were obtained from the phospholipids as described in **Methods**. Lane 1 is the esters of HW8 carrying *R. solanacearum desA* encoded plasmid pHJ6 (pSRK-*RsdA*). Lane 2 is the esters of HW8 carrying empty vector. SFA, saturated fatty acid esters; UFA, unsaturated fatty acid esters.

Table 2 Fatty acid compositions of *E. coli* YYC1257 transformants

Fatty acid	%			
	WT(FT1)	YYC1257	YYC1257/pHJ4	YYC1257/pHJ5
n-C _{14:0}	9.9 ± 0.19	9.1 ± 0.02	8.4 ± 0.37	6.9 ± 0.67
n-C _{16:1}	5.1 ± 0.14	18.8 ± 0.05	19.8 ± 0.28	15.6 ± 0.75
n-C _{16:0}	44.9 ± 0.71	42 ± 0.81	40.8 ± 0.69	42.1 ± 0.57
n-C _{18:1}	15 ± 0.39	20 ± 0.66	21.3 ± 0.49	22.4 ± 0.27
n-C _{18:0}	10.9 ± 0.27	10.1 ± 0.23	9.7 ± 0.19	9.4 ± 0.31
n-C _{17:0} cyc	14.2 ± 0.11	0	0	3.6 ± 0.17

Note: n-C_{14:0}, tetradecanoic acid; n-C_{16:1}, palmitoleic acid; n-C_{16:0}, palmitic acid; n-C_{18:1}, *cis*-11-octadecenoic acid; n-C_{18:0}, octadecanoic acid; n-C_{17:0} cyclo, *cis*-9,10-methylene palmitic acid.

大肠杆菌突变株 YYC1257 由于 *cfa* 缺失，在 pH 4.5 酸性条件下生长明显滞后^[15]。那么茄科雷尔氏菌的 *cfa* 基因能否恢复 YYC1257 在酸性条件下的生长表型？本研究在 pH 4.5 的酸性 LB 液体培养基中，测定了不同转化子的生长曲线。结果显示携带 *cfa1* 的转化子生长速度得到了一定程度的恢复，而携带 *cfa2* 的转化子的生长没有恢复，明显滞后于野生菌株(图 2)。这再次表明 *cfa1* 编码的蛋白质具有环丙烷脂肪酸合成酶活性。

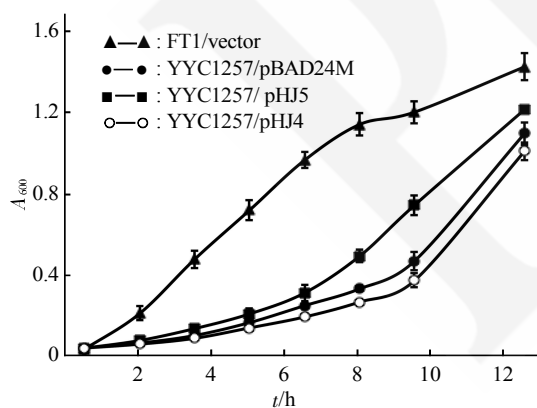


Fig. 2 Complementation of *E. coli* *cfa* mutant strain with *R. solanacearum* *cfa*s

Growth of *E. coli* YYC1257 strains carrying *R. solanacearum* *cfa* encoded plasmids in LB broth (pH 4.5). Filled circles, *E. coli* FT1 carrying empty vector (pBAD24M). Filled triangles, *E. coli* YYC1257 carrying empty vector (pBAD24M). Filled squares, *E. coli* YYC1257 carrying *cfa2* encoded plasmid pHJ4 (pBAD24M-*cfa2*). Empty circles, *E. coli* YYC1257 carrying *cfa1* encoded plasmid pHJ5 (pBAD24M-*cfa1*).

2.3 茄科雷尔氏菌 *desA* 和 *cfa* 基因突变菌株构建

为了研究 *desA* 和 *cfa* 基因在茄科雷尔氏菌不饱和脂肪酸和环丙烷脂肪酸合成中的作用，本研究

对 *RSc2450(desA)*、*RSc0766(cfa1)* 和 *RSp1446(cfa2)* 采用同源重组技术进行了基因敲除。首先构建了基因敲除自杀性质粒载体：pHJ12(*cfa2* up-down)、pHJ13(*cfa1* up-down)和 pHJ14(*desA* up-down)。接着采用两亲本接合方法将这些自杀质粒分别导入 GMI1000 中，通过抗药正筛选和蔗糖负筛选获得了 $\Delta desA$ 、 $\Delta cfa1$ 和 $\Delta cfa2$ 突变菌株。分别提取这些突变菌株的总 DNA，用图 3 所示的引物，进行 PCR 扩增验证，结果显示这些突变菌株的 PCR 扩增产物均符合预期结果。将 PCR 扩增产物进行 DNA 序列测定，测序结果证明目标基因均被成功敲除。同时也说明 *desA*、*cfa1* 和 *cfa2* 都不是茄科雷尔氏菌生长必需基因。在获得 *cfa1* 和 *cfa2* 单突变菌株的基础，采用类似的方法，本研究获得了 *cfa1* 和 *cfa2* 双突变菌株。之后将表达质粒载体 pHJ8 (pSRK-*cfa1*)、pHJ7 (pSRK-*cfa2*) 和 pHJ6 (pSRK-*desA*) 用两亲本接合方法分别导入相应的突变菌株中，获得了遗传互补菌株。

2.4 茄科雷尔氏菌 *desA* 和 *cfa* 基因突变菌株的性状分析

首先检测了茄科雷尔氏菌 *desA* 突变菌株 $\Delta desA$ 的生长性状。在 BG 培养基上 $\Delta desA$ 的生长明显较野生菌株弱，遗传互补 *desA* 菌株(Com *desA*)或添加油酸，均能恢复 $\Delta desA$ 的生长性状(图 4a)。这表明 *desA* 编码的蛋白质参与了茄科雷尔氏菌不饱和脂肪酸的合成，但推测茄科雷尔氏菌仍有 *desA* 之外的不饱和脂肪酸合成途径。为此，本研究分析了 $\Delta desA$ 的脂肪酸组成，结果显示 *desA* 突变后，棕榈油酸(C_{16:1})的含量显著下降(野生型菌株 C_{16:1} 的含量为 $20.86 \pm 0.3\%$)， $\Delta desA$ 为 $12.36 \pm 0.49\%$)，而顺-11-十八烯酸(C_{18:1})含量升高

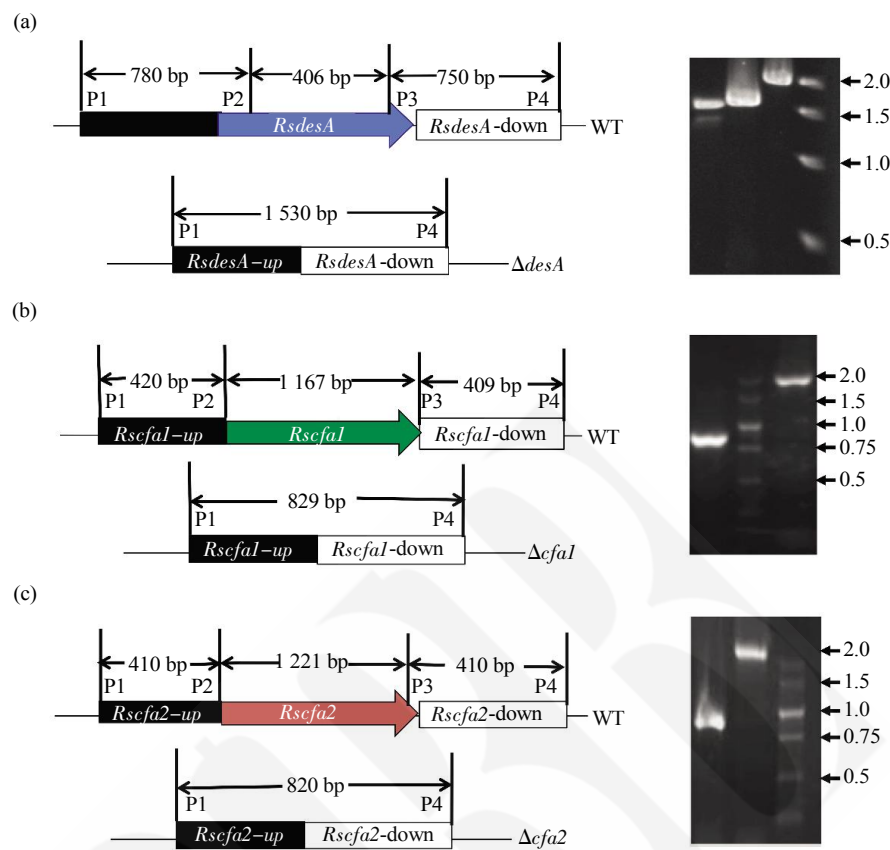


Fig. 3 Construction and identification of *R. solanacearum* mutants

(a) Construction of *R. solanacearum desA* mutant. (b) Construction of *R. solanacearum cfa2* mutant. (c) Construction of *R. solanacearum cfa1* mutant. P1, P2, P3 and P4, indicated primers used for identifying gene deletions by PCR.

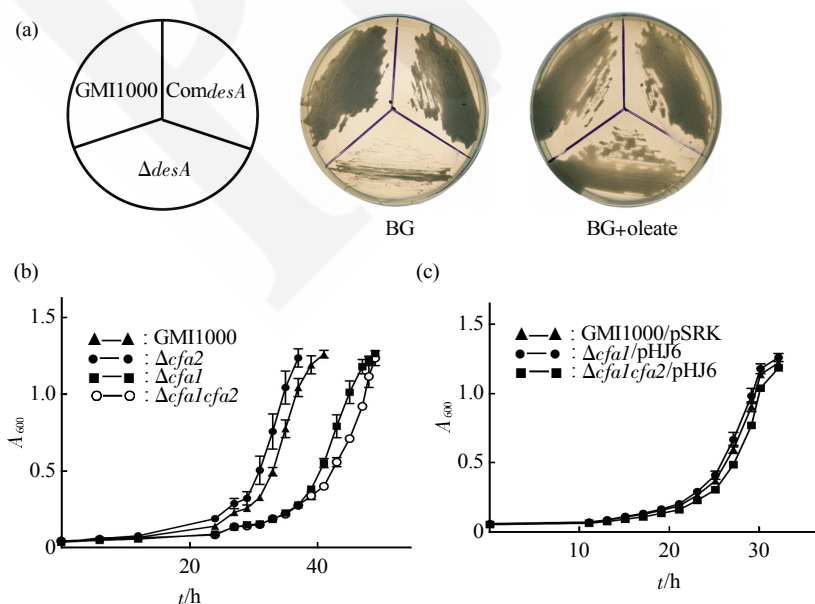


Fig. 4 Growth of *R. solanacearum desA* and *cfas* mutants

(a) Growth of *R. solanacearum desA* mutant on BG plus oleate plates. GMI1000, *R. solanacearum* wild type strain. $\Delta desA$, *R. solanacearum desA* mutant strain. Com *desA*, *R. solanacearum desA* mutant strain carrying wild type *desA* encoded plasmid pHJ6 (pSRK-*Rsd*). (b) Growth of *R. solanacearum cfas* mutants in pH5.0 liquid media. Filled triangles, *R. solanacearum* wild type strain GMI1000. Filled squares, *R. solanacearum cfa1* mutant strain. Filled circles, *R. solanacearum cfa2* mutant strain. Empty circles, *R. solanacearum cfa1* and *cfa2* double mutant strain. (c) Growth of *R. solanacearum cfas* mutants carrying *cfa1* encoded plasmid pHJ8 in pH5.0 liquid media. Filled circles, *R. solanacearum* wild type strain GMI1000. Filled triangles, *R. solanacearum cfa1* mutant strain carrying plasmid pHJ8(pSRK-*cfa1*). Filled squares, *R. solanacearum cfa1* and *cfa2* double mutant strain carrying plasmid pHJ8(pSRK-*cfa1*).

(野生型菌株 C_{18:1} 的含量为(28.86 ± 1.13)%, Δ*desA* 为(36.36 ± 1.17)%(表 3)。再次证明 *desA* 参与了茄

科雷尔氏菌的不饱和脂肪酸的合成, 而该菌还有其他的饱和脂肪酸合成途径。

Table 3 Fatty acid composition of *R. solanacearum desA* mutant

Fatty acid	%		
	GMI1000	Δ <i>desA</i>	Com <i>desA</i>
n-C _{14:0}	4.01 ± 0.32	3.54 ± 0.14	3.55 ± 0.17
n-C _{16:0}	29.12 ± 0.40	33.18 ± 0.34	29.19 ± 0.94
n-C _{16:1}	25.85 ± 0.30	15.05 ± 0.49	28.17 ± 0.22
n- C _{17:0} cyclo	4.20 ± 0.04	1.73 ± 0.10	1.66 ± 0.02
n-C _{18:0}	1.92 ± 0.12	2.24 ± 0.17	2.70 ± 0.14
n-C _{18:1}	34.89 ± 1.13	44.26 ± 1.17	28.05 ± 0.68

Note: n-C_{14:0}, tetradecanoic acid; n-C_{16:0}, palmitic acid; n-C_{16:1}, palmitoleic acid; n-C_{17:0} cyclo, *cis*-9,10-methylene palmitic acid; n-C_{18:0}, octadecanoic acid; n-C_{18:1}, *cis*-11-octadecenoic acid. GMI1000, *R. solanacearum* wild type strain; Δ*desA*, *R. solanacearum desA* mutant; Com *desA*, *R. solanacearum desA* mutant carrying plasmid pHJ6(pSRK-*R_{sdesA}*).

本研究还分析了 *cfa* 突变菌株的生长性状。结果显示, 在 BG 培养基中茄科雷尔氏菌的野生菌株、*cfa1* 和 *cfa2* 突变菌株生长无差异。为研究 *cfa1* 和 *cfa2* 是否参与茄科雷尔氏菌对酸性条件的耐受, 本研究测定了 *cfa* 突变菌株在 pH 5.0 条件下的生长曲线。结果显示野生菌株与 *cfa2* 单基因突变菌株(Δ*cfa2*)在酸性条件的生长基本一致, 而 *cfa1* 单基因突变株(Δ*cfa1*)和 *cfa1cfa2* 双突变株(Δ*cfa1*Δ*cfa2*)的延滞期明显延长, 遗传互补 *cfa1* 基因后, 两个突变菌株的生长恢复到野生菌株水平(图 4)。这表

明 *cfa1* 基因参与了茄科雷尔氏菌对酸性条件的耐受, 而 *cfa2* 基因无此功能。

进一步分析 *cfa* 突变菌株的脂肪酸组成, 结果显示 *cfa1* 突变后, 茄科雷尔氏菌丧失了环丙烷脂肪酸的合成能力, 而突变 *cfa2* 菌株仍然能够合成环丙烷脂肪酸, 遗传互补 *cfa1* 之后, *cfa1* 突变菌株恢复了环丙烷脂肪酸的合成(表 4)。这再次表明 *cfa1* 是茄科雷尔氏菌环丙烷脂肪酸合成的关键酶, 并且 *cfa1* 参与了该菌对酸性条件的耐受。

Table 4 Fatty acid composition of *R. solanacearum cfa* mutants

Fatty acid	%					
	GMI1000	Δ <i>cfa2</i>	Δ <i>cfa1</i>	Δ <i>cfa1</i> Δ <i>cfa2</i>	Δ <i>cfa1</i> /pHJ8	Δ <i>cfa1</i> Δ <i>cfa2</i> /pHJ8
C _{14:0}	6.71 ± 0.09	6.92 ± 0.07	7.82 ± 0.05	8.52 ± 0.17	6.21 ± 0.37	6.71 ± 0.32
C _{16:1}	24.21 ± 0.19	24.50 ± 0.43	21.12 ± 0.46	19.43 ± 0.29	23.50 ± 0.23	24.20 ± 0.29
C _{16:0}	24.13 ± 0.31	25.34 ± 0.86	28.25 ± 0.91	27.92 ± 0.70	24.30 ± 0.36	24.34 ± 0.21
C _{18:1}	35.83 ± 0.74	34.34 ± 0.54	40.15 ± 0.38	41.36 ± 0.65	37.32 ± 0.24	35.84 ± 0.33
C _{18:0}	4.91 ± 0.07	5.12 ± 0.04	2.80 ± 0.09	2.90 ± 0.01	4.91 ± 0.34	4.83 ± 0.31
C _{17:0} -cyc	4.10 ± 0.07	3.92 ± 0.04	0	0	3.81 ± 0.07	4.22 ± 0.36

Note: n-C_{14:0}, tetradecanoic acid; n-C_{16:0}, palmitic acid; n-C_{16:1}, palmitoleic acid; n-C_{17:0} cyclo, *cis*-9,10-methylene palmitic acid; n-C_{18:0}, octadecanoic acid; n-C_{18:1}, *cis*-11-octadecenoic acid.

另外, 本研究还分析了 *cfa* 突变菌株对其他逆境条件的耐受性。首先检测了温度和寡营养对 *cfa* 突变菌株生长的影响, 结果显示这两项逆境因子均

不影响突变株的生长(结果未列)。接着检测了渗透压对突变菌株生长的影响。在 M63 基础培养基中添加 0.05 mol/L Na₂SO₄, 各突变菌株的生长与野生

菌株无差别, 但添加 0.1 mol/L NaCl 后, $\Delta cfa1$ 的生长受到抑制. 同样将 0.1 mol/L NaCl 替换为 0.1 mol/L KCl 或 0.2 mol/L 蔗糖后, $\Delta cfa1$ 的生长均受到抑制(图 5a). 当遗传互补野生 *cfa1* 基因后, 突变菌株的生长抑制性状得到恢复. 以上结果表明 *cfa1* 参与了茄科雷尔氏菌对渗透压的耐受. 然而双突变菌株 $\Delta cfa1\Delta cfa2$ 对渗透压的耐受性与野生菌

株一样. 此外, 在 $\Delta cfa1\Delta cfa2$ 中互补 *cfa2* 基因, 突变株表现出与 $\Delta cfa1$ 一样的敏感性状, 而在 $\Delta cfa1\Delta cfa2$ 互补 *cfa1* 基因, 突变株表现为与野生菌株一样的耐受性状(图 5b). 这似乎说明 *cfa2* 的突变可以解除 *cfa1* 缺失所引起的渗透压耐受性降低的表型. 这一现象产生的具体机制有待进一步研究.

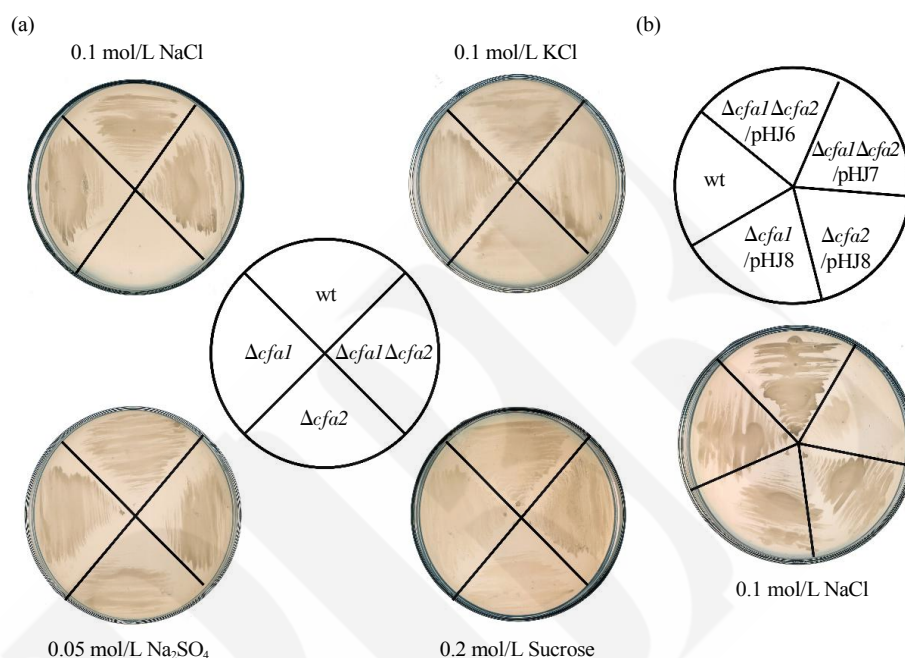


Fig. 5 Growth of *R. solanacearum* *cfa*s mutants under high osmotic pressure

3 讨 论

希瓦氏菌是一种海洋生细菌, 其 *desA* 和 *fabA* 双敲除菌株表现为不饱和脂肪酸营养缺陷型^[17]. 茄科雷尔氏菌 *desA* 能够异体遗传互补希瓦氏菌 *desAfabA* 双突变菌株, 使其恢复生长, 表明茄科雷尔氏菌 *DesA* 具有脂酰 CoA 脱饱和酶活性. 后续的研究发现, 敲除 *desA* 的茄科雷尔氏菌在 BG 培养基上生长变弱, 添加油酸或遗传互补野生 *desA* 基因可恢复其正常生长. 同时 *desA* 突变菌株的脂肪酸组成分析也显示, 该菌株的棕榈油酸含量下降. 这些都证明了虽然 *desA* 参与了茄科雷尔氏菌不饱和脂肪酸合成, 但是该菌还存在其他不饱和脂肪酸合成途径. 本实验室在研究茄科雷尔氏菌 3-酮脂酰 ACP 聚合酶 III (*FabH* 和 *FabW*) 时发现, 遗传互补哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶基因 *aasS* 的

fabHfabW 双突变菌株, 可在补充癸酸盐的 BG 培养基上生长^[23]. 表明茄科雷尔氏菌可能存在着一个类似于幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 不饱和脂肪酸合成酶 *FabX* 的酶蛋白, 可将癸酰 ACP 直接脱氢, 产生不饱和脂肪酸合成的关键中间产物顺-3-癸烯酰 ACP. 另外, 虽然茄科雷尔氏菌没有 *FabA-FabB* 脂肪酸合成途径的同源蛋白质, 但是该菌唯一的长链 3-酮脂酰 ACP 聚合酶 *FabF1* 具有 3-酮脂酰 ACP 聚合酶 I (*FabB*) 和 3-酮脂酰 ACP 聚合酶 II (*FabF*) 的双重活性^[6], 即 *fabF1* 不但能遗传互补大肠杆菌 *fabF* 突变菌株, 使其产生大量的顺-11-十八烯酸, 而且能够遗传互补大肠杆菌 *fabB* 突变, 使其恢复不饱和脂肪酸的合成. 根据上述研究, 我们推测在茄科雷尔氏菌可能存在一条由类似 *FabX* 蛋白与 *FabF1* 配合完成不饱和脂肪酸的合成途径. 生物信息学分析显示茄科雷尔氏菌基因组编码一个

与幽门螺旋杆菌 FabX 同源的蛋白质 RSc0114, 然而初步研究显示, RSc0114 并不参与茄科雷尔氏菌的不饱和脂肪酸合成. 因此, 茄科雷尔氏菌新的不饱和脂肪酸合成酶仍需进一步研究. 另外, 细菌的不饱和脂肪酸在维持细胞膜的流动性, 应对环境刺激中起着重要作用. *desA* 的突变改变了茄科雷尔氏菌的脂肪酸组成, 但是 *desA* 是否影响该菌对植物的致病性也是需要探讨的科学问题.

环丙烷脂肪酸是细菌磷脂中常见的脂肪酸, 虽然含量较低, 但是在应对不良环境(如低 pH、低温、高渗透压和有机溶剂等)中起到重要作用^[13-14]. 另外, 有研究显示结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的环丙烷脂肪酸与其致病性有一定的关系^[24]. 通过研究, 本实验室证明在茄科雷尔氏菌基因组编码的两个环丙烷脂肪酸合成酶的基因中, 仅有 *cfaI* 编码的蛋白质具有环丙烷脂肪酸合成酶活性, 且参与了该菌对低 pH 和渗透压的耐受. 土壤酸性在诱发植物青枯病中起着重要作用^[2], 因此, 我们推测通过控制 *cfaI* 表达, 抑制 CfaI 的活性, 可能有效地降低青枯病的发生. 有关这方面的工作, 本实验室将深入研究.

研究显示 *cfa2* 编码的蛋白质不具有环丙烷脂肪酸合成酶活性. 这一现象在其他革兰氏阴性细菌中也有报道. 恶臭假单胞菌^[14](*Pseudomonas putida*)和中华苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)^[13]基因组均有 2 个 Cfa 的编码基因, 研究表明只有其中之一具有环丙烷脂肪酸合成酶活性, 参与环丙烷脂肪酸的合成, 并在应对各自的不利环境起着关键作用. Cfa2 虽没有环丙烷脂肪酸合成酶活性, 但是发现 Cfa2 影响 Cfa1 在应对渗透压胁迫时的作用. 然而, Cfa2 的具体作用机制有待深入研究.

参 考 文 献

- [1] Mole B M, Baltrus D A, Dangel J L, *et al.* Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiol*, 2007, **15**(8): 363-371
- [2] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol*, 1991, **29**(1): 65-87
- [3] Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, *et al.* Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, 2002, **415**(6871): 497-502
- [4] Zhang Y M, Rock C O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2008, **6**(3): 222-233
- [5] Heath R J, White S W, Rock C O. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog Lipid Res*, 2001, **40**(6): 467-497
- [6] Cheng J L, Ma J C, Lin J S, *et al.* Only one of the five *Ralstonia solanacearum* long-chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase homologues functions in fatty acid synthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2012, **78**(5): 1563-1573
- [7] Stead D E. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *Int J Syst Bacteriol*, 1992, **42**(42): 281-295
- [8] 朱育菁, 苏明星, 黄素芳, 等. 培养条件对青枯雷尔氏菌脂肪酸组成的影响. *微生物学通报*, 2009, **36**(8): 1158-1165
Zhu Y J, Su M X, Huang S F, *et al.* *Microbiol China*, 2009, **36**(8): 1158-1165
- [9] 刘 波, 蓝江林, 车建美, 等. 青枯雷尔氏菌脂肪酸型与致病性的关系. *中国农业科学*, 2009, **42**(2): 511-522
Liu B, Lan J L, Che J M, *et al.* *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, **42**(2): 511-522
- [10] 朱育菁, 肖荣凤, 王秋红, 等. 茄科作物青枯病原菌的脂肪酸鉴定. *中国农学通报*, 2008, **24**(8): 392-395
Zhu Y J, Xiao R F, Wang Q H, *et al.* *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, **24**(8): 392-395
- [11] 王秋红, 陈 亮, 林营志, 等. 福建省青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性研究. *中国农业科学*, 2007, **40**(8): 1675-1687
Wang Q H, Chen L, Lin Y Z, *et al.* *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, **40**(8): 1675-1687
- [12] 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
- [13] Saborido Basconillo L, Zaheer R, Finan T M, *et al.* Cyclopropane fatty acyl synthase in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiol*, 2009, **155**(2): 373-385
- [14] Pini C V, Bernal P, Godoy P, *et al.* Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Microb Biotechnol*, 2009, **2**(2): 253-261
- [15] Chang Y Y, Cronan J E. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1999, **33**(2): 249-259
- [16] 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
- [17] Luo Q, Shi M, Ren Y, *et al.* Transcription factors FabR and FadR regulate both aerobic and anaerobic pathways for unsaturated fatty acid biosynthesis in *Shewanella oneidensis*. *Front Microbiol*, 2014, **5**(5): 736
- [18] Zhu L, Lin J S, Ma J C, *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
- [19] Khan S R, Gaines J, Roop R M II, *et al.* Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74** (16):

- 5053–5062
- [20] Wang A Y, Grogan D W, Cronan J E. Cyclopropane fatty acid synthase of *Escherichia coli*: deduced amino acid sequence, purification, and studies of the enzyme active site. *Biochemistry*, 1992, **31**(45): 11020–11028
- [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] Grogan D W, Cronan J E. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, **61**(4): 429–441
- [23] Mao Y H, Ma J C, Li F, *et al.* *Ralstonia solanacearum* RSp0194 encodes a novel 3-ketoacyl carrier protein synthase III. *Plos One*, 2015, **10**(8): e0136261
- [24] Yuan Y, Lee R E, Besra G S, *et al.* Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(14): 6630–6634

Identification of acyl-CoA Desaturase and Cyclopropane Fatty Acid Synthase in *Ralstonia solanacearum**

DONG Hui-Juan, FAN Zhi-Yong, KUANG Cheng-Wei, LI Xian-Qi, WANG Hai-Hong**

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

Abstract *Ralstonia solanacearum*, a soil-borne destructive plant pathogen, has an unusually wide host range, and causes a bacterial wilt that seriously affects the production of many economically important crops in the world. Thus, investigation of physiological metabolism in *R. solanacearum* will be helpful to develop new ways to control the bacterial wilt. Fatty acids are compulsory components of bacteria. However, the fatty acid biosynthetic mechanism is still unclear in *R. solanacearum*. In this paper, we identified acyl-CoA desaturase and cyclopropane fatty acid synthase of *R. solanacearum* GMI1000, and characterized their functions in biosynthesis of unsaturated fatty acid or cyclopropane fatty acid. First, *R. solanacearum* RSc2450 (*desA*) complemented *Shewanella oneidensis desA fabA* mutant growth on LB without supplemented oleic acid and caused *E. coli fabA* mutant to produce unsaturated fatty acid. Furthermore, deletion of *desA* caused *R. solanacearum* grows weak on BG plate and reduces the palmitoleic acid production. The results showed though *R. solanacearum* RSc2450 encodes an acyl-CoA desaturase and involves in unsaturated fatty acid biosynthesis, *R. solanacearum* might possess a novel unsaturated fatty acid biosynthetic pathway. Next, of the two putative cyclopropane fatty acid synthases encoded genes in *R. solanacearum*, only *cfaI* (RSc0776) restored *E. coli cfa* mutant YYC1257 growth in low pH medium and to produce *cis*-9, 10-methylene palmitic acid. And deletion *cfaI* mutant was sensitive to low pH and high osmotic pressure, and lost the ability to produce *cis*-9, 10-methylene palmitic acid. These indicated that *cfaI* involves in cyclopropane fatty acid synthesis in *R. solanacearum* and plays roles in adaption to low pH and high osmotic pressure. Moreover, Cfa2 (RSp1446) does not have cyclopropane fatty acid synthase activity, and its function needs further study.

Key words *Ralstonia solanacearum*, acyl-CoA desaturase, cyclopropane fatty acid synthase

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0174

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31671987, 31601601), The Natural Science Foundation of Guangdong Province (2014A030313455).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-85281389, E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

Received: June 20, 2018 Accepted: September 5, 2018