

流产布氏杆菌烯脂酰 ACP 还原酶的鉴定*

雷 鸣** 马金成** 王海洪***

(华南农业大学生命科学学院, 广州 510642)

摘要 烯脂酰 ACP 还原酶是细菌脂肪酸合成的关键酶之一。流产布氏杆菌基因组有 2 个注释为烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabI* 的同源基因: *fabI1* 和 *fabI2*。由这 2 个 *fabI* 同源基因编码的蛋白质分别与大肠杆菌 FabI 有 50% 和 51% 的同源性, 且都拥有与大肠杆菌 FabI 一样的催化中心 Tyr-(Xaa)₆-Lys 序列。分别用携带这 2 个同源基因的质粒载体转化大肠杆菌 *fabI* 温度敏感突变菌株 JP1111。转化子能在 42℃ 生长, 表明这 2 个基因均能遗传互补大肠杆菌 *fabI* 突变, 并使此菌株恢复脂肪酸的合成。另外, 体外酶学分析显示, 由这 2 个同源基因编码的蛋白质都拥有烯脂酰 ACP 还原酶活性, 均能参与细菌脂肪酸合成。上述结果证实, 流产布氏杆菌同时拥有 2 个同种类型的烯脂酰 ACP 还原酶, 是一种新的烯脂酰 ACP 多样性的表现。

关键词 流产布氏杆菌, 细菌脂肪酸合成, 烯脂酰 ACP 还原酶

学科分类号 Q93

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00463

布氏杆菌病是由布氏杆菌引起的严重危害人类健康和畜牧业发展的人兽共患的传染病^[1-3]。《中华人民共和国传染病防治法》将其归为乙类传染病^[4]。布氏杆菌病流行广泛, 几乎遍布世界各地。近年来, 随着养殖业和畜牧业的迅速发展, 发病人数有逐年增多的趋势^[1,3]。

流产布氏杆菌(*Brucella abortus*)是人患布氏病的主要病原菌之一。随着分子生物学和细菌基因组学的发展, 已经有多种布氏杆菌的基因组序列得到测定, 其中包括流产布氏杆菌^[5]。这为全面、深入地研究布氏杆菌的发病机理, 发展更为有效的防治布氏杆菌病的技术手段提供了有力条件。

细菌的脂肪酸合成代谢与高等哺乳动物有本质差别。研究细菌脂肪酸合成代谢, 寻找新的抗菌药物作用靶点, 开发新的抗菌药物是微生物学研究的热点领域^[6-7]。

比较流产布氏杆菌与其他细菌的基因组序列, 发现流产布氏杆菌基因组中有 2 个注释为烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabI* 的同源基因: *fabI1* 和 *fabI2*^[5], 我们推测该菌的脂肪酸合成代谢与其他细菌有一定的差异。为此, 本课题组采用遗传互补和酶活性分析等技术手段, 研究流产布氏杆菌这 2 个同源蛋白

在细菌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。本研究使用的大肠杆菌菌株有 MG1655、DH5 α 、JP1111(*fabI*(ts))^[8]和 BL21(DE3), 使用的质粒载体有 pMD19-T、pBAD24M 和 pET28(b), 其他载体均为上述三质粒的衍生质粒(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^[9]。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、0.02% L-阿拉伯糖、异丙基 - β -D- 硫代吡喃半乳糖苷(IPTG) 1 mmol/L。

1.1.2 试剂。限制性内切酶、T4 连接酶、*Taq*、*pfu* DNA 聚合酶、Marker DL2000、标准蛋白质等

* 国家自然科学基金资助项目(30870036), 高等学校博士学科点专项科研基金(20104404110005)和广东省自然科学基金资助项目(10451064201005431)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

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

收稿日期: 2011-10-18, 接受日期: 2011-12-14

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、IPTG、三氯森(triclosan)、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; 流产布氏杆菌(*Brucella abortus* 2308)基因组 DNA 由美国蒙塔那州立大学(Montana State University)杨兴洪博士馈赠。

1.2 重组 DNA 技术

以流产布氏杆菌 2308 基因组 DNA 为模板, 使用 *pfu* DNA 聚合酶, PCR 扩增 *fabI1* 和 *fabI2* 基因. *fabI1* 扩增引物: 5' ACCCCATATGACCGC-ACAGTCTGGTTTG 和 5' GTATTAGAAGCTTCA-GTCTTTCAC; *fabI2* 扩增引物: 5' GGATCATATG-GAAGGTTTGATGCAAG 和 5' GTTTAAGCTTAT-TCTCCGCGTTC(下划线处分别代表限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点). 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 pLM1(*fabI1*)和 pLM2(*fabI2*). 使用 *Nde* I 和 *Hind* III 分别消化 pLM1(*fabI1*)和 pLM2(*fabI2*), 回收酶切产物并分别克隆到载体 pBAD24M 上, 得到表达载体 pLM4(*fabI1*)和 pLM5(*fabI2*). 用同样的方法将 *fabI1* 和 *fabI2* 克隆到 pET28(b)上, 得到表达载体 pLM6(*fabI1*)和 pLM7(*fabI2*).

1.3 蛋白质的表达与分离纯化

将表达载体质粒 pLM6(*fabI1*)和 pLM7(*fabI2*)分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, 流产布氏杆菌 FabI1 和 FabI2 蛋白的表达和分离纯化参照文献[10-11]进行. 同时参照文献[10-11]中的方法, 分别分离纯化大肠杆菌丙二酸单酰 CoA: ACP 转移酶(FabD)、3-酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH)、3-酮脂酰 ACP 还原酶(FabG)、3-羟基脂酰 ACP 脱水酶/异构酶(FabA)、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, 并且体外合成了反-2-己烯酰 ACP、反-2-癸酰 ACP 和 3-羟基豆蔻酰 ACP.

1.4 烯脂酰 ACP 还原酶体外功能检测

体外检测 FabI1 和 FabI2 在细菌脂肪酸合成起始反应中的功能参照文献[10]. 具体做法如下: 反应体积 50 μ l, 其中含有 0.1 mol/L 磷酸钠、50 μ mol/L NADH、50 μ mol/L NADPH、1 mmol/L β -巯基乙醇、100 μ mol/L 乙酰 CoA、100 μ mol/L

丙二酸单酰 CoA、50 μ mol/L holo-ACP; 大肠杆菌脂酰合成酶: FabD、FabH、FabG 和 FabA 各 0.1 μ g. 反应在添加 0.1 μ g 烯脂酰 ACP 还原酶(流产布氏杆菌 FabI1、FabI2 或大肠杆菌 FabI)后开始计时, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h. 使用分离胶浓度为 15%, 且含有 0.5 mol/L 尿素的非变性蛋白凝胶电泳分析反应产物.

体外检测 FabI1 和 FabI2 对长链烯脂酰 ACP 的还原功能同样参照文献[10]. 具体做法如下: 反应体积 50 μ l, 其中含有 0.1 mol/L 磷酸钠、1 mmol/L β -巯基乙醇、50 μ mol/L NADH、50 μ mol/L 脂酰 ACP(反-2-己烯酰 ACP、反-2-癸酰 ACP 或 3-羟基豆蔻酰 ACP, 以 3-羟基豆蔻酰 ACP 为底物的还原反应, 体系中还需添加 0.1 μ g 大肠杆菌 FabA 酶蛋白). 反应在添加 0.1 μ g 烯脂酰 ACP 还原酶(流产布氏杆菌 FabI1、FabI2 或大肠杆菌 FabI)后开始计时, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h. 反应产物用含有 2.5 mol/L 尿素的非变性蛋白凝胶电泳进行分析.

1.5 烯脂酰 ACP 还原酶活性测定

烯脂酰 ACP 还原酶活性测定参照文献中的方法^[9]. 酶活性单位(U)定义为每纳克酶蛋白每分钟氧化 NADH 的量($\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

1.6 脂肪酸组成分析

在合适的条件下培养细菌 10ml, 离心收集菌体, 按照文献[10-11]的方法, 提取细菌的脂肪酸, 并转化为脂肪酸甲酯(每种样品做 3 个重复). 样品送华南农业大学测试中心, 进行脂肪酸组成 GC-MS 分析.

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

烯脂酰 ACP 还原酶(ENR)催化烯脂酰 ACP 还原为脂酰 ACP(图 1a), 处于细菌脂肪酸合成循环反应的最后一步, 也是细菌脂肪酸合成代谢的关键酶之一^[6], 已经作为新型抗菌药物的作用靶标, 用于新的抗菌药物的筛选^[7].

流产布氏杆菌基因组序列已经测定完成, 利用大肠杆菌烯脂酰 ACP 还原酶 FabI 的蛋白质序列, 同源比对流产布氏杆菌基因组^[9], 发现该细菌基因组中有 2 个注释为烯脂酰 ACP 还原酶 *fabI* 的同源基因: *fabI1*(UniProt AC: Q57EU5)和 *fabI2*(UniProt AC: Q57A95), 其中 *fabI2* 与 *fabA* 和 *fabB* 同源基因为一个基因簇, 位于流产布氏杆菌一号染色体, 而 *fabI1* 位于一号染色体的另一基因簇. 这 2

个 *fabI* 同源基因编码的蛋白质分别与大肠杆菌 FabI 有 50% 和 51% 的同源性, 且都拥有与大肠杆菌 FabI 一样的保守催化中心 Tyr-(Xaa)₆-Lys 序列^[6] (图 1b). 根据生物信息学的分析推测, 这 2 个 *fabI*

基因编码的蛋白质可能具有烯脂酰 ACP 还原酶活性, 并参与该菌的脂肪酸合成. 为了验证这一观点, 本课题组对这 2 个 *fabI* 基因做了以下研究.

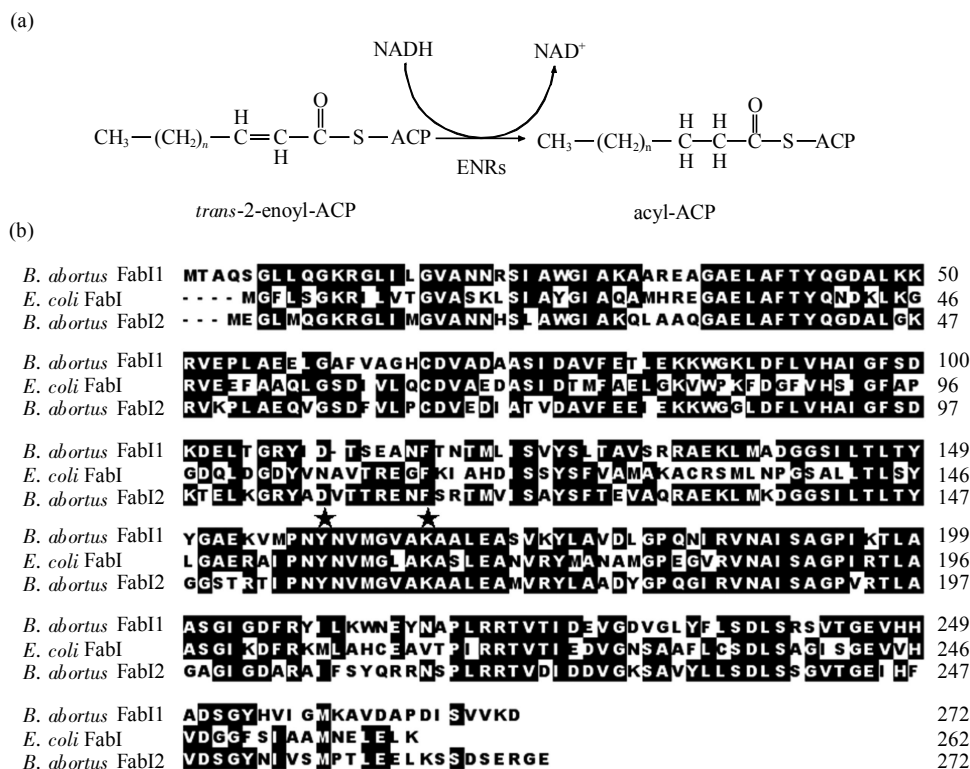


Fig. 1 The ENR reaction and alignment of *B. abortus* FabIs with *E. coli* FabI

(a) The ENR reaction. (b) The alignment of bacteria FabIs. The active-site tyrosine and lysine residues are asterisked.

2.2 遗传互补大肠杆菌 *fabI* 温度敏感突变菌株

在大肠杆菌中, 烯脂酰 ACP 还原酶由 *fabI* 基因编码, 已经证明 *fabI* 基因是大肠杆菌生长必需基因^[12-13]. 菌株 JP1111 是大肠杆菌 *fabI* 的温度敏感突变株, 该菌株能在 30℃ 正常生长, 但在 42℃ 时, 由于烯脂酰 ACP 还原酶失活, 菌株不能生长^[8]. 为了验证流产布氏杆菌 *fabI1* 和 *fabI2* 的功能, 首先以流产布氏杆菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增获得了这 2 个基因, 并分别克隆到 T- 载体上得到质粒 pLM1(*fabI1*) 和 pLM2(*fabI2*). 序列测定正确后 (2 个基因均为 819 bp), 将这 2 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 2 个表达载体: pLM4(*fabI1*) 和 pLM5

(*fabI2*) (图 2a). 用这 2 个质粒分别转化大肠杆菌 JP1111, 并在 42℃ 检测转化子的生长状况, 结果见图 2b-c. 结果显示 (图 2b), 在 42℃ 条件下, 不添加阿拉伯糖的 RB 平板上所有的转化子均不生长, 而在添加有阿拉伯糖的 RB 平板上, 除空载体 pBAD24M 外, pLM4 与 pLM5 质粒和 pHWI (pBAD24M 载体携带野生型大肠杆菌 *fabI* 基因) 一样均能互补大肠杆菌 JP1111 菌株. 生长曲线的测定结果 (图 2c) 也证明了这点. 另外, 用液体培养时, 携带 pLM4 与 pLM5 的 JP1111 菌株明显较携带 pHWI 的菌株生长快. 这表明流产布氏杆菌的 *fabI1* 和 *fabI2* 基因编码的蛋白质具有烯脂酰 ACP 还原酶活性, 能互补大肠杆菌 *fabI* 突变.

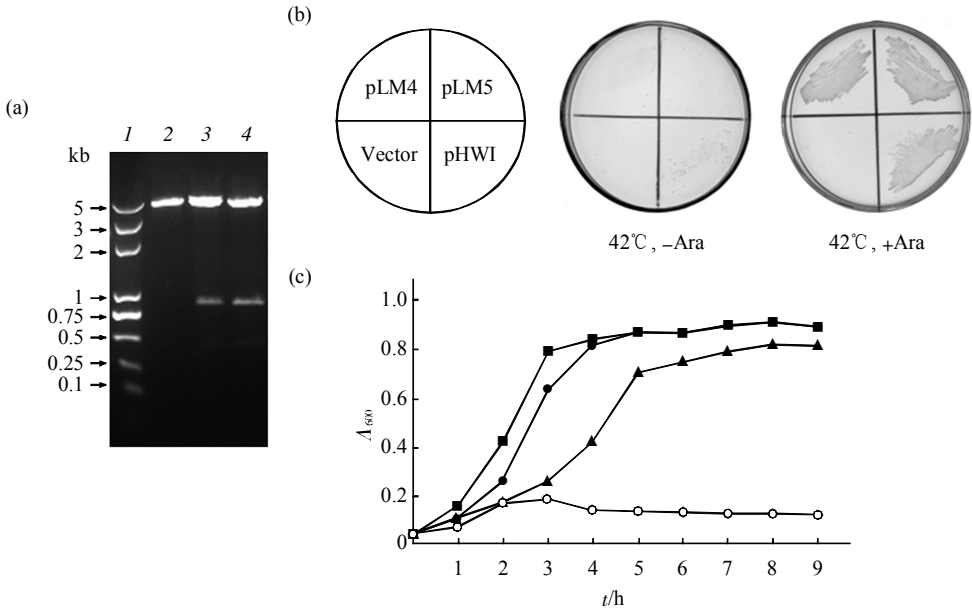


Fig. 2 Construction of *B. abortus fabI* or *fabI2* expression vector and complementation of *E. coli fabI*(ts) mutant JP1111
(a) Construction of pLM4 (*fabI*) and pLM5 (*fabI2*). 1: DNA marker; 2: pBAD24M/*Nde* I & *Hind* III; 3: pLM4/*Nde* I & *Hind* III; 4: pLM5/*Nde* I & *Hind* III. (b) Complementation of *E. coli* JP1111 with pLM4 or pLM5. (c) The growth of transformants of JP1111 by pLM4 or pLM5. ■—■: pLM4; ●—●: pLM5; ▲—▲: pHWI; ○—○: pBAD24M.

同时测定转化子的脂肪酸组成, 结果显示, 携带 pLM4 或 pLM5 的 JP1111 菌株和携带 pHWI 的 JP1111 菌株一样能合成脂肪酸(表 1), 且所含的脂肪酸种类相同, 比例相近. 这再次证明了 *fabI* 和 *fabI2* 均编码烯脂酰 ACP 还原酶, 参与细菌脂肪酸合成.

Table 1 Fatty acid composition of total lipid extracts from *E. coli fabI* mutant carrying plasmid encoding *B. abortus fabI* homologues

Fatty acid	JP1111/pLM4	JP1111/pLM5	JP1111/pHWI
n-C14 : 0	5.1%	4.5%	4.9%
n-C14 : 0 3-OH	11.1%	11.1%	13.2%
n-C16 : 1 <i>cis</i> 9	7.7%	8.9%	7.7%
n-C17 : 0 cyclo	15.8%	12.4%	13.0%
n-C16 : 0	28.3%	27.9%	26.2%
n-C18 : 1 <i>cis</i> 11	25.0%	26.7%	26.8%
n-C18 : 0	6.9%	8.5%	8.3%

三氯森(triclosan)是烯脂酰 ACP 还原酶 FabI 的抑制剂^[14-15], 为检测流产布氏杆菌 FabI1 和 FabI2

对三氯森的敏感性, 将质粒 pLM4(*fabI*)和 pLM5 (*fabI2*)分别转化大肠杆菌 MG1655, 并在添加阿拉伯糖和不同浓度三氯森的 RB 培养基上观察转化子的生长. 经测定三氯森对 pLM4 和 pHWI 转化子的最小抑制浓度为 0.5 mg/L(结果未列), 对 pLM5 转化子的最小抑制浓度为 3 mg/L. 表明流产布氏杆菌烯脂酰 ACP 还原酶 FabI2 对三氯森有一定的抗性, 而 FabI1 和大肠杆菌 FabI 对三氯森敏感.

2.3 流产布氏杆菌 FabI1 和 FabI2 蛋白的表达与纯化

为了进一步在体外研究 BaFabI1 和 BaFabI2 的生物功能, 将 pLM1 和 pLM2 上携带的 *fabI* 和 *fabI2* 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: pLM6(*fabI*)和 pLM7(*fabI2*)(图 3a). 热激转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株, 在 37℃ 进行 2 个蛋白质的表达, 结果显示 FabI1 和 FabI2 在 BL21(DE3)菌株中均能高效表达, 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 FabI1 和 FabI2 蛋白. 经检测 2 种蛋白质在 15%的

SDS 聚丙烯酰胺凝胶上均为单一条带(图 3b), 表明纯化成功. 携带 His-tag 标签的 FabI1 和 FabI2 融合蛋白的理论分子质量分别为 31 389 u 和 31 481 u, 而 SDS 凝胶上显示的分子质量分别为 32 ku 和 35 ku, 明显大于理论值. DNA 序列测定表明, *fabI1* 和 *fabI2* 的序列及克隆位置正确(结果未列). 造成这种差异的原因, 笔者认为主要是 FabI1 和 FabI2 两个蛋白质所带的电荷不同. 这一现象在其他文献中也有报道^[13].

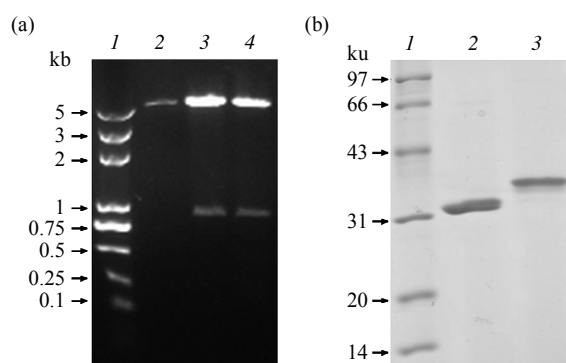


Fig. 3 Construction of expression vector pLM6 or pLM7 and purification of *B. abortus* FabI1 or FabI2

(a) Construction of expression vector pLM6 and pLM7. 1: DNA marker; 2: pET28 (b)/*Nde* I & *Hind* III; 3: pLM6/*Nde* I & *Hind* III; 4: pLM7/*Nde* I & *Hind* III. (b) Purification of *B. abortus* FabI1 and FabI2. 1: Protein marker; 2: Ba FabI1; 3: Ba FabI2.

2.4 流产布氏杆菌 FabI1 和 FabI2 体外活性检测

首先检测 FabI1 和 FabI2 在脂肪酸合成起始反应中的功能(图 4a). 泳道 1 的反应由大肠杆菌 FabD 催化将丙二酸单酰 CoA 和 holo-ACP 转化为丙二酸单酰 ACP, 由于丙二酸单酰 ACP 的迁移率与 holo-ACP 的接近, 在非变性凝胶上未出现新的条带; 泳道 2 的反应由大肠杆菌 FabH 催化, 产生 3- 酮基丁酰 ACP, 由于 3- 酮基丁酰 ACP 在碱性条件下, 不稳定, 易分解, 故凝胶上仅显示 holo-ACP 的条带; 泳道 3 的反应由大肠杆菌 FabG 和 FabA 催化, 应产生 *trans*-2- 丁烯酰 ACP, 由于 FabA 催化的 3- 羟基丁酰 ACP 脱水的反应为可逆反应, 平衡向 3- 羟基丁酰 ACP, 故凝胶上仅显示 3- 羟基丁酰 ACP; 泳道 4 的反应由 FabI1 催化, 使得 *trans*-2- 丁烯酰 ACP 还原, 产生丁酰 ACP. 同样泳道 5 和 6 的反应, 分别由 FabI2 和大肠杆菌 FabI 催化, 也产生了丁酰 ACP. 这表明流产布氏杆菌的 FabI1 和 FabI2 与大肠杆菌 FabI 一样能催化脂肪酸合成的起始反应.

接着进行了 FabI1 和 FabI2 在细菌脂肪酸延伸反应中活性的检测. 首先检测这 2 个酶对 *trans*-2- 己烯酰 ACP 的还原(图 4b). 用哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶(AasS), 以 *trans*-2- 己烯酸和 holo-ACP 为底物, 合成 *trans*-2- 己烯酰 ACP, 然后添加 NADH

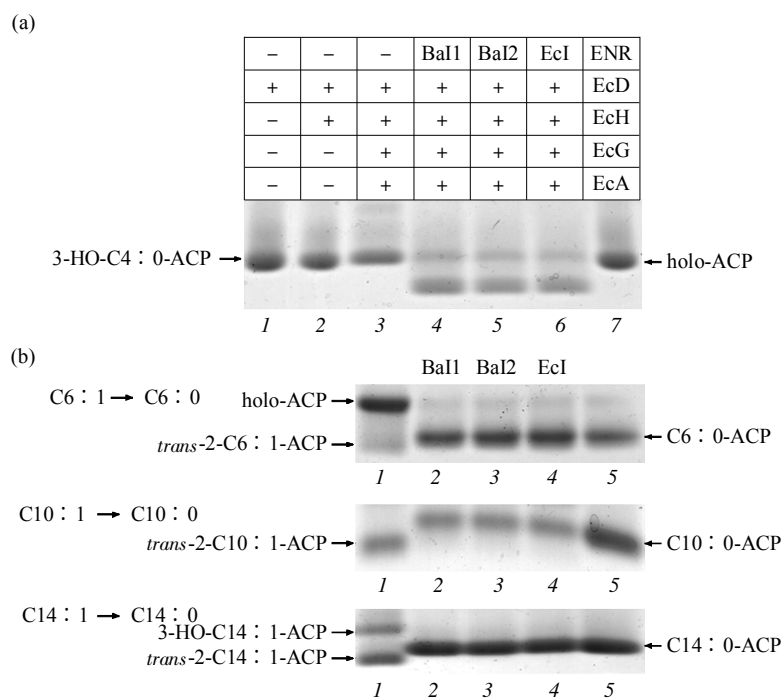


Fig. 4 Reconstitution of fatty acid biosynthesis *in vitro*

(a) Initial reaction of fatty acid biosynthesis. EcD: *E. coli* FabD; EcH: *E. coli* FabH; EcG: *E. coli* FabG; EcA: *E. coli* FabA; ENR: Enoyl-acyl carrier protein reductase; EcI: *E. coli* FabI; BaI1: *B. abortus* FabI1; BaI2: *B. abortus* FabI2. (b) Reduction of long-chain *trans*-2-enoyl-acyl carrier protein by ENR.

和 3 种烯脂酰 ACP 还原酶(BaFabI1、BaFabI2 和 EcFabI). 在添加烯脂酰 ACP 还原酶 BaFabI1(泳道 2)、BaFabI2(泳道 3)或 EcFabI(泳道 4)后, *trans*-2- 己烯酰 ACP 被还原, 产生了己酰 ACP. 同样的方法, 检测了这 3 个烯脂酰 ACP 还原酶对 *trans*-2- 癸烯酰 ACP 的还原(图 4b). 对 *trans*-2- 豆蔻烯酰 ACP 的还原, 以 3- 羟基豆蔻酰 ACP 为底物, 先添加大肠杆菌 FabA, 进行脱水产生 *trans*-2- 豆蔻烯酰 ACP, 然后再添加 NADH 和 3 种烯脂酰 ACP 还原酶. 结果显示 3 种烯脂酰 ACP 还原酶均能够还原 *trans*-2- 豆蔻烯酰 ACP 为豆蔻酰 ACP(图 4b). 综合上述结果, 说明流产布氏杆菌的 2 种烯脂酰 ACP 还原酶和大肠杆菌 FabI 一样, 对不同链长的烯脂酰 ACP 均有还原能力, 是参与脂肪酸合成的酶.

以 *trans*-2- 癸烯酰 ACP 为底物, 测定流产布氏杆菌烯脂酰 ACP 还原酶 FabI1 和 FabI2 对 NADPH 的氧化活性(图 5a), 结果显示 FabI1 的氧化活性比 FabI2 的活性高. 经测定 FabI1 和 FabI2 的活性分别为: 0.49U 和 0.76U, 均比大肠杆菌的 FabI 活性(4.5U)低. 体内研究表明, 流产布氏杆菌的 2 个烯脂酰 ACP 还原酶对三氯森有不同的敏感性, 为证明这一点, 课题组通过检测三氯森对 *trans*-2- 癸烯酰 ACP 还原的抑制, 进一步分析. 结果显示,

20 mg/L 三氯森对 FabI1 有明显的抑制作用, 而对 FabI2 的抑制浓度为 100 mg/L, 这一结果与体内检测的一致(图 5b). 表明流产布氏杆菌的 2 个烯脂酰 ACP 还原酶对三氯森有不同的敏感性.

3 讨 论

烯脂酰 ACP 还原酶催化反-2- 烯脂酰 ACP 还原为脂酰 ACP, 为细菌脂肪酸合成循环反应的最后一步^[6-7]. 研究表明, 细菌的烯脂酰 ACP 还原酶存在着广泛的多样性^[9]. 到目前为止, 在不同的细菌中一共发现了 4 种结构和特性不同的烯脂酰 ACP 还原酶: FabI、FabL、FabV 和 FabK, 并证明大肠杆菌(FabI)^[8, 16]、肺炎球菌(FabK)^[14, 17]和霍乱弧菌(FabV)^[18]只有一种烯脂酰 ACP 还原酶, 而枯草芽孢杆菌(FabI 和 FabL)^[19]、铜绿假单胞菌(FabI 和 FabV)^[10]和粪肠球菌(FabI 和 FabK)(本课题组未发表数据)有 2 种不同类型的烯脂酰 ACP 还原酶. 生物信息学分析显示根瘤菌和布氏杆菌基因组有 2 个编码烯脂酰 ACP 还原酶 FabI 的同源基因(*fabI1* 和 *fabI2*)^[5], 这是否代表着一种新的细菌烯脂酰 ACP 还原酶的多样性呢? 生物信息学分析仅提供了存在这种多样性的可能性, 仍需要大量实验证据证明. 2009 年, 刘影等^[20]通过突变研究了苜蓿中华根瘤菌 *fabI1* 基因的部分生理功能, 并发现 *fabI2* 基因不能互补 *fabI1* 的突变, 但是这些细菌中 2 个 *fabI* 同源基因编码的蛋白质是否具有烯脂酰 ACP 还原酶活性、是否参与细菌脂肪酸的合成, 尚未有相关的报道.

本课题组对流产布氏杆菌基因组中 2 个 *fabI* 同源基因进行了研究. 遗传互补分析表明, 这 2 个 *fabI* 同源基因均能互补大肠杆菌 *fabI* 温度敏感突变菌株 JP1111, 且恢复 JP1111 菌株的脂肪酸合成. 体外重建细菌脂肪酸合成反应研究也显示, 这 2 个 *fabI* 基因编码的蛋白质均能参与不同链长的反-2- 烯脂酰 ACP 还原, 只是酶活性存在一定的差异. 另外, 研究表明 *fabI1* 编码的蛋白质同大肠杆菌 FabI 一样对三氯森敏感, 而由 *fabI2* 编码的蛋白质对三氯森有一定的抗性. 综上所述, 流产布氏杆菌具有 2 个同源性较高的烯脂酰 ACP 还原酶 FabI, 是一种新的细菌烯脂酰 ACP 还原酶多样性.

前期的研究表明, 虽然布氏杆菌基因组有编码不饱和脂肪酸合成酶 *fabA* 和 *fabB* 的同源基因, 但是发现这 2 个基因不能互补相应的大肠杆菌 *fabA* 或 *fabB* 突变菌株. 由于布氏杆菌 *fabA*、*fabB* 同源基

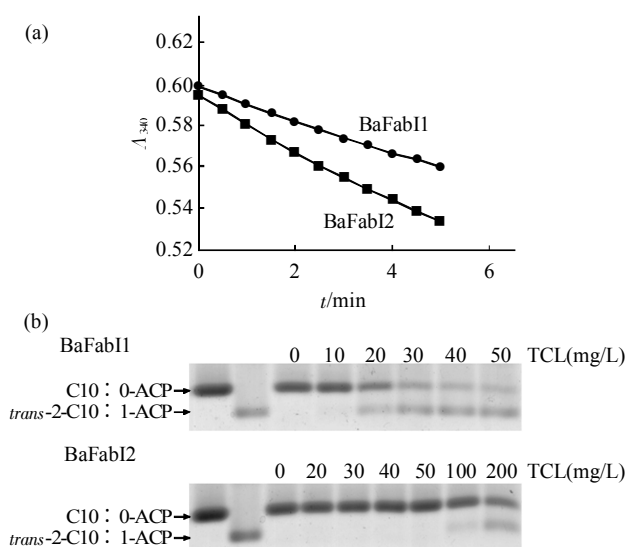


Fig. 5 Oxidation of NADPH catalyzed by *B. abortus*

FabI1 or FabI2 and inhibition of FabI1 or FabI2 activities by triclosan *in vitro*

(a) Oxidation of NADPH by *B. abortus* FabI1 or FabI2. (b) Inhibition of FabI1 or FabI2 activities by triclosan *in vitro*.

因与 *fabI2* 基因组成一个基因簇, 因此, 推测 *fabI2* 基因可能在不饱和脂肪酸合成中起一定的作用. 为了证明这一推论, 用携带流产布氏杆菌 *fabA* 基因的质粒和携带 *fabI2* 基因的质粒 pLM5(*fabI2*) 共转化大肠杆菌 *fabA* 温度敏感突变菌株 CY57. 结果显示 (结果未列) 由 2 种质粒共转化的大肠杆菌 CY57 在 42℃ 条件下, 不能在未添加油酸的 RB 平板上生长. 初步表明, 流产布氏杆菌的 *FabI2* 不同于肺炎球菌 *fabK* 基因编码的烯脂酰 ACP 还原酶^[14, 17], 它与 *FabA* 酶蛋白之间无协调作用, 不能完成不饱和脂肪酸的合成.

虽然流产布氏杆菌编码 2 个有活性的 *FabI*, 本课题组也对它们的生理功能做了些初步的探讨, 但是这 2 个 *FabI* 的生理功能有待进一步的研究. 最理想策略是采用基因敲除, 获得这 2 个基因的突变菌株, 通过比较突变菌株的生理特性, 来确定其生理功能. 但是由于流产布氏杆菌是致病菌, 一般实验室无法开展这方面的研究. 为此本课题组正在与华南农业大学兽医学院的同行协作, 开展这方面的工作.

致谢 流产布氏杆菌基因组 DNA 由美国蒙塔那州立大学杨兴洪博士馈赠. 在此表示感谢.

参 考 文 献

- [1] Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J*, 2010, **51**(4): 296–305
- [2] Al Dahouk S, Nockler K, Scholz H C, *et al.* Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella* infections. *J Immunol Methods*, 2006, **309**(1–2): 34–47
- [3] Watarai M. Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains. *Microbes Infect*, 2004, **6**(1): 93–100
- [4] 孙美艳. 布氏杆菌病 38 例临床特征分析. 疑难病杂志, 2011, (02): 145–146
Sun M Y. Chin J Difficult and Complicated Cases, 2011, (02): 145–146
- [5] Halling S M, Peterson-Burch B D, Bricker B J, *et al.* Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriology*, 2005, **187**(8): 2715–2726
- [6] Massengo-Tiasse R P, Cronan J E. Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66**(9): 1507–1517
- [7] Heath R J, Rock C O. Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials. *Curr Opin Investig Drugs*, 2004, **5**(2): 146–153
- [8] Bergler H, Wallner P, Ebeling A, *et al.* Protein EnvM is the NADH-dependent enoyl-ACP reductase (*FabI*) of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1994, **269**(8): 5493–5496
- [9] 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 Bacteriology*, 1983, **154**(1): 221–230
- [10] 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
- [11] 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
- [12] Bergler H, Fuchsbichler S, Hogenauer G, *et al.* The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (*FabI*) of *Escherichia coli*, which catalyzes a key regulatory step in fatty acid biosynthesis, accepts NADH and NADPH as cofactors and is inhibited by palmitoyl-CoA. *European J Biochemistry/FEBS*, 1996, **242**(3): 689–694
- [13] Heath R J, Rock C O. Enoyl-acyl carrier protein reductase (*FabI*) plays a determinant role in completing cycles of fatty acid elongation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1995, **270**(44): 26538–26542
- [14] Heath R J, Rock C O. A triclosan-resistant bacterial enzyme. *Nature*, 2000, **406**(6792): 145–146
- [15] McMurry L M, Oethinger M, Levy S B. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature*, 1998, **394**(6693): 531–532
- [16] Turnowsky F, Fuchs K, Jeschek C, *et al.* envM genes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriology*, 1989, **171**(12): 6555–6565
- [17] Marrakchi H, Dewolf W E Jr, Quinn C, *et al.* Characterization of *Streptococcus pneumoniae* enoyl- (acyl-carrier protein) reductase (*FabK*). *Biochem J*, 2003, **370**(Pt 3): 1055–1062
- [18] Massengo-Tiasse R P, Cronan J E. *Vibrio cholerae* *FabV* defines a new class of enoyl-acyl carrier protein reductase. *J Biol Chem*, 2008, **283**(3): 1308–1316
- [19] Heath R J, Su N, Murphy C K, *et al.* The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductases *FabI* and *FabL* from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 2000, **275**(51): 40128–40133
- [20] 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 *fabI1* 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

Identification of Two Enoyl-ACP Reductase FabI1 and FabI2 in *Brucella abortus**

LEI Ming**, MA Jin-Cheng**, WANG Hai-Hong***

(College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract There are two genes, *fabI1* and *fabI2* (UniProt AC: Q57A95 and Q57EU5), annotated as encodes putative enoyl-ACP reductase in *Brucella abortus* genome. Sequence alignment found that BaFabI1 and BaFabI2 are 50% and 51% identical to *E. coli* FabI, respectively. Further analysis identified that the catalytically active triad (Tyr-(Xaa)₆-Lys) of *E. coli* FabI are present in both BaFabI1 and BaFabI2. Expression of either of the two proteins restores the growth and the fatty acid synthesis of the *E. coli fabI* temperature sensitive mutant JP1111 under nonpermissive condition. *In vitro* assay identifies that both proteins restore the fatty acid synthetic ability and are active with substrates of all fatty acid chain lengths. These results demonstrated that *B. abortus* possesses two FabI-like enoyl-ACP reductases and it represents a new kind of diversity of bacterial enoyl-ACP reductase.

Key words *Brucella abortus*, bacterial fatty acid synthesis, enoyl-ACP reductase

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00463

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30870036), The Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20104404110005) and The Natural Science Foundation of Guangdong Province (10451064201005431).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

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

Received: October 18, 2011 Accepted: December 14, 2011