

野油菜黄单胞菌中烯脂酰 ACP 还原酶的功能鉴定*

余永红^{1,2)} 马建荣¹⁾ 王海洪^{2)**}

(¹⁾ 广东食品药品职业学院, 广州 510520; ²⁾ 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 烯脂酰 ACP 还原酶是细菌脂肪酸合成的关键酶之一。本研究通过生物信息学分析发现, 野油菜黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* (*Xcc*) 8004 基因组中 XC_0119 (*XccfabV*) 注释为反-2-烯脂酰 CoA 还原酶基因。但其编码产物与铜绿假单胞菌的烯脂酰 ACP 还原酶 FabV 具有较高的同源性, 并含有相同的催化活性中心 Tyr-(Xaa)₈-Lys 序列。用携带 *XccfabV* 的质粒载体互补大肠杆菌 *fabI* 温度敏感突变株 JP1111, 转化子能在 42℃ 生长, 表明 *XccfabV* 能遗传互补大肠杆菌 *fabI* 突变。体外重建脂肪酸合成反应表明, *XccFabV* 能催化不同链长的烯脂酰 ACP 还原为脂酰 ACP, 且催化活性不受三氯森抑制。遗传学研究表明, *XccfabV* 是必需基因, 不能获得 *XccfabV* 基因敲除突变株。将携带大肠杆菌 *fabI* 的外源质粒导入野生菌后, 可敲除染色体上的 *fabV* 基因, 获得的替换突变株生长特性和脂肪酸组成未发生显著变化, 但替换突变株对三氯森敏感。上述结果证实, 野油菜黄单胞菌 *fabV* 是必需基因, 编码烯脂酰 ACP 还原酶, 参与脂肪酸从头合成反应, 且 FabV 是 *Xcc* 对三氯森耐受的根本原因。

关键词 野油菜黄单胞菌, 脂肪酸合成, 烯脂酰 ACP 还原酶, 三氯森耐受性

学科分类号 Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0343

细菌采用 II 型脂肪酸合成系统从头合成脂肪酸, 每步反应都由独立的酶催化^[1]。烯脂酰 ACP 还原酶(ENR)催化脂肪酸合成循环的最后一步反应, 是脂肪酸合成的关键酶, 已作为抗菌药物筛选靶标, 用于新型抗菌药物的筛选^[2-3]。目前已报道的烯脂酰 ACP 还原酶有四种类型: I 型(FabI)^[4]、II 型(FabK)^[5]、III 型(FabL)^[6]和 IV 型(FabV)^[7]。不同类型的酶学特征存在差异, 表现出较为复杂的多样性。

黄单胞菌属是植物病原菌中较大的类群, 能侵染近 400 种单子叶或双子叶植物。该属主要的致病菌包括野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)、水稻白叶枯菌(*X. oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)和柑橘溃疡病菌(*X. axonopodis* pv. *citri*, *Xac*)等, 引起水稻、豆类等重要农作物疾病, 造成重大经济损失^[8]。*Xcc* 能侵染几乎所有十字花科植物, 引起危害严重的黑腐病^[9]。*Xcc* 产生的多种 DSF 类群体感应信号分子, 通过多级分层调控网络, 调节致病相关基因的表达, 在致病过程中发挥重要作用^[10-11]。通过阻断 DSF 信号分子的合成, 干扰病原菌的致病过程, 是黑腐病防控的新方向。

研究表明, DSF 合成的前体来源于脂肪酸合成途径^[12-13], 但关于 *Xcc* 脂肪酸合成的报道不多^[14], 合成途径还不清楚。研究 *Xcc* 的脂肪酸合成代谢, 阐明 DSF 信号合成途径, 对防控黑腐病具有重要的意义。为此, 本课题组采用异体遗传互补、体外酶学分析和基因突变等手段, 研究了 *Xcc*8004 中烯脂酰 ACP 还原酶(ENR)在脂肪酸合成代谢等方面的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基

本研究所用到的大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株有 MG1655、S17-1、DH-5 α 、BL21 (DE3)、

* 国家自然科学基金(31200028, 31471743), 广东省自然科学基金(2014A030313455)和广东食品药品职业学院院级课题(2015ZY006)资助项目。

** 通讯联系人。

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

收稿日期: 2015-10-27, 接受日期: 2016-03-14

JP1111(*fabI*(ts)), 野油菜黄单胞菌 *Xcc*8004. 使用的质粒有 pK18mobsacB、pSRKGm^[15]、pBAD24m 和 pET28b, 其他载体均为上述质粒的衍生质粒(具体构建过程见下文). LB 用作培养大肠杆菌的丰富培养基, NYG 为野油菜黄单胞菌及突变株的丰富培养基. 抗生素的使用浓度如下: 50 mg/L 利福平(Rif)、100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)、30 mg/L 卡那霉素(Km)、10 mg/L 庆大霉素(Gm). 诱导剂 L- 阿拉伯糖(Ara)浓度为 0.02%, 异丙基-β-D- 硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)浓度为 1 mmol/L.

1.1.2 试剂

限制性内切酶、T4 连接酶、Taq 和 Pfu DNA 聚合酶、Marker DL2000、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; 利福平、氨苄青霉素、卡那霉素、庆大霉素、IPTG、三氯森(triclosan)、阿拉伯糖、蔗糖、各种脂肪酸等试剂购自 Sigma 公司; PCR 扩增引物的合成以及核酸序列测定由上

海 Sangon 公司完成.

1.2 DNA 重组技术

以 *Xcc*8004 基因组为模板, 以表 1 中 *XccfabV* *Nde* I 和 *XccfabV* *Hind* III 为引物, PCR 扩增 *XccfabV* 基因. 扩增产物纯化后连入 pMD19-T 载体, 通过测序验证获得质粒 pYYH-1. 将 pYYH-1 用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后回收基因片段, 分别克隆到表达载体 pBAD24m 上, 获得互补质粒 pYYH-2; 克隆到 pET28(b)上获得 pYYH-3; 克隆到 pSRKGm 载体上获得 pYYH-4.

1.3 野油菜黄单胞菌 *XccfabV* 替换突变株的构建

以 *Xcc*8004 基因组为模板, PCR 扩增 *XccfabV* 基因上下游各约 500 bp 片段(Up, Down)(表 1), 回收后通过融合 PCR 技术将上下游片段融合获得 *XccfabV* (UpDn), 连接到 pMD19-T, 送样测序验证后获得 pYYH-5. 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切后将 *XccfabV* (UpDn)连接到 pK18mobsacB 上, 获得质粒 pYYH-6.

Table 1 Sequences of the PCR primers used in this work

Primers	Sequence
<i>XccfabV</i> <i>Nde</i> I	TATATACCATATGATCATCCATCCCAAAGTGCG
<i>XccfabV</i> <i>Hind</i> III	AATTAAGCTTCCTAATCCCGACAATCAACCCA
<i>XccfabV</i> Up1	AATTGAATTCCTTGACTACCGGTCGTACAGC
<i>XccfabV</i> Up2	CCTAATCCCTAATCCCGACAACGTGGACTCCTGGTCAGCA
<i>XccfabV</i> Down1	CTTGCTGACCAGGAGTCCACGTTGTCGGGATTAGGGATTAGGG
<i>XccfabV</i> Down2	AATTAAGCTTCTGAGCGCGCGCTACCT
<i>P_{lac}</i> -V*1	CATAGAATTCGGGCAGTGAGCGCAACG
<i>P_{lac}</i> -V*2	AATTAAGCTTCCTTGTGGTGTGCGATGGC
<i>XccfabV</i> Check Up	CGGAGGGACATTCGCTTGA
<i>XccfabV</i> Check Down	CGATTTTCGATGCGGTGCTG

将质粒 pYYH-6 转化大肠杆菌 S17-1 后, 与 *Xcc*8004 在 NYG 平板上 30℃ 共培养 36 h, 然后用 1 ml NYG 培养基将培养物悬浮, 稀释到 10⁻² 后涂布于含有 Rif、Km 的 NYG 平板, 30℃ 培养 48~72 h 获得单菌落. 选取单菌落培养后提取总 DNA, 用引物 *XccfabV* Up1 和 *XccfabV* Down2 进行 PCR 检测, 获得一次重组菌株 *Xcc*YH1. 将 *Xcc*YH1 在添加 Rif 的 NYG 中培养 24 h 后, 涂布于含有 Rif 和 10%蔗糖的 NYGS 平板, 筛选对 Km 敏感的菌株.

以 pYYH-4 为模板, 以 *P_{lac}*-V*1 和 *P_{lac}*-V*2 为引物(表 1), 扩增获得含有 *P_{lac}* 启动子和 *XccfabV* 基

因 5'端约 500 bp 的片段, 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切后将其连接到 pK18mobsacB 上, 获得质粒 pYYH-7. 将 pYYH-7 转化大肠杆菌 S17-1 后, 与野生菌 *Xcc*8004 接合(步骤同上), 获得具有 Km 抗性的接合子 *Xcc*YH2. 进一步通过接合作用将质粒 pSRKGm 导入 *Xcc*YH2, 获得具有 Km 和 Gm 抗性的接合子 *Xcc*YH3(*fabV*::*P_{lac}*-*fabV*).

将互补质粒 pYYH-4 或 pMYH-1 (携带大肠杆菌 *fabI* 基因)转化大肠杆菌 S17-1 后, 与一次重组菌株 *Xcc*YH1 接合后, 涂布于含有 Rif、Km 和 Gm 的 NYG 平板, 30℃ 培养 48~72 h 后获得单菌落,

PCR 验证后获得 *Xcc*YH1/pYYH-4 和 *Xcc*YH1/pMYH-1. 将其分别在添加 Rif 和 Gm 的 NYG 中培养后, 涂布于含有 Rif 和 Gm 的 NYGS 平板, 筛选获得染色体 *XccFabV* 基因被敲除的二次重组菌株 *Xcc*YH4 ($\Delta fabV$ /pYYH-4) 和 *Xcc*YH5 ($\Delta fabV$ /pMYH-1).

1.4 蛋白质的表达与分离纯化

将表达质粒 pYYH-3 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 后, *Xcc*8004 的 FabV 蛋白表达与分离纯化参照文献[16-17]进行. 同时参照文献[16-17]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、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, 并且体外合成反 -2- 己烯酰 ACP、反 -2- 辛烯酰 ACP 和反 -2- 癸烯酰 ACP.

1.5 烯脂酰 ACP 体外功能检测与催化常数测定

体外检测 FabV 在脂肪酸合成起始中的功能以及对长链烯脂酰 ACP 的还原功能参照文献[17]进行. 烯脂酰 ACP 还原酶催化时以 NADH 为辅因子, 在 340 nm 处可检测到反应体系中 NADH 被逐渐消耗. 100 μ l 反应体系含 200 μ mol/L NADH、700 ng *Xcc*FabV、0.1 mol/L 磷酸缓冲液, 加入不同浓度的丁烯酰 -CoA 后, 测定 340 nm 处吸收值的

下降速率, 并计算 FabV 的催化常数.

1.6 脂肪酸组成分析

在 NYG 中分别培养 *Xcc*8004、*Xcc*YH4 和 *Xcc*YH5, 离心收集菌体, 按照文献[16-17]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

野油菜黄单胞菌 8004 的全基因组测序已完成^[18]. 分别利用大肠杆菌烯脂酰 ACP 还原酶 FabI、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)烯脂酰 ACP 还原酶 FabK、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)烯脂酰 ACP 还原酶 FabL 和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)烯脂酰 ACP 还原酶 FabV (PaFaV) 的蛋白序列, 同源比对 *Xcc*8004 基因组, 发现烯脂酰 ACP 还原酶 *fabV* 的同源基因: XC_0119, 注释为反 -2- 烯脂酰 CoA 还原酶, 处于功能未知的基因簇中 XC_0119 编码产物与 PaFaV 的相似性为 74%, 一致性达 59%, 且含有相同的催化活性中心 Tyr-(Xaa)₈-Lys 序列^[19](图 1). 根据生物信息学分析结果, 推测 XC_0119 (命名为 *XccfabV*)编码烯脂酰 ACP 还原酶, 参与 *Xcc*8004 的脂肪酸合成. 为验证这一观点, 本课题组对其进行了以下研究.

PaFaV	M I K P R V R G F I C V T T H P A G C E A N V K Q Q I D Y V E A K G P V V N G P K K V L V I G S S T G Y G L A A R I T	60
XccFabV	M I H P K V R G F I C T T T H P L G C E R N V L D Q I A A T R A R G V R N D G P K K V L V I G A S S G Y G L A S R I T	60
PaFaV	A A F G S G A D T L G V F F E R P G S E S K P G T A G W Y N S A A F E K F A H E K G L Y A R S I N G D A F S D E V K R L	120
XccFabV	A A F G F G A D T L G V F F E K P G S D K K A G T A G W Y N S A A F D T H A K A A G L Y S K S I N G D A F S D E A R A K	120
PaFaV	T I E T I K R D L G K V D L V V Y S L A A P R R T H P K S G E V F S S T L K P I G K S V S F R G L D T D K E V I K D V	179
XccFabV	V I E L I K T D M G G Q V D L V V Y S L A S P V R K L P S T G E V K R S A L K P I G N T Y T A T A I D T N K D T I I Q A	180
PaFaV	V L E A A S D Q E V A D T V A V M G G E D W Q M W I D A L L E A D V L A D G A K T T A F T Y L G E K I T H D I Y W N G S	239
XccFabV	S I E P A T E Q E I E D T I T V M G G Q D W E L W I D A L D S A G V L A K G A R S V A F S Y I G T E I T W P I Y W H G A	240
PaFaV	I G A A K K D L D Q K V L G I R D K L A P L G G D A R V S V L K A V V T Q A S S A I P M M P L Y L S L F K V M K E Q G	299
XccFabV	L G K A K V D L D H T A Q R L D A R L Q A S G G G A N V A V L K S V V T Q A S A A I P V M P L Y I S M V Y K I M K E K G	300
PaFaV	T H E G C I E Q V D G L Y R E S L Y - - G A E P R L D E E G R L R A D Y K E L Q P E V Q S R V E E L W D K V T N E N L	356
XccFabV	L H E G T I E Q L D R L F R E R L Y R E D G Q P A E V D E Q N R L R L D D W E L R D D V Q D A C K A L W P Q V T T E N L	360
PaFaV	Y E L T D F A G Y K S E F L N L F G F E V A G V D Y E Q D V N P D V Q I A N L I Q A	398
XccFabV	F A L T D Y A G Y K H E F L K L F G F E R K D V D Y D A D V D P D V K F	396

Fig. 1 Alignment of *Xcc*FabV with *P. aeruginosa* FabV (PaFaV)

The catalytic triad Tyr-(Xaa)₈-Lys is underlined.

2.2 遗传互补大肠杆菌 *fabI*温度敏感突变株

在大肠杆菌中, *fabI*基因编码烯脂酰 ACP 还原酶, 是其生长的必需基因^[20]. 菌株 JP1111 是大肠杆菌 *fabI*基因的温度敏感突变株, 在 30℃培养时能正常生长, 而在 42℃时缺乏烯脂酰 ACP 还原酶, 菌体无法生长^[4]. 为验证 *XccfabV* 的功能, 将其克隆到受阿拉伯糖诱导的表达载体 pBAD24m 上, 获得质粒 pYYH-2. 将 pYYH-2 转化 JP1111, 并检测转化子的生长情况, 结果如图 2a 所示. 在 30℃培

养时, 转化子都能正常生长, 而 42℃培养时, 在添加 Ara 的平板上, JP1111 以及空载体 pBAD24m 转化子都不能生长, 而 pYYH-2 和 pHW1 (pBAD24m 载体上携带有野生型大肠杆菌 *fabI*基因)的转化子能正常生长. 生长曲线测定结果也证明了这一点, *XccfabV* 能恢复 JP1111 菌株 42℃时的生长(图 2b). 以上结果说明 *XccfabV* 基因编码产物具有烯脂酰 ACP 还原酶活性, 能互补大肠杆菌 *fabI* 的突变.

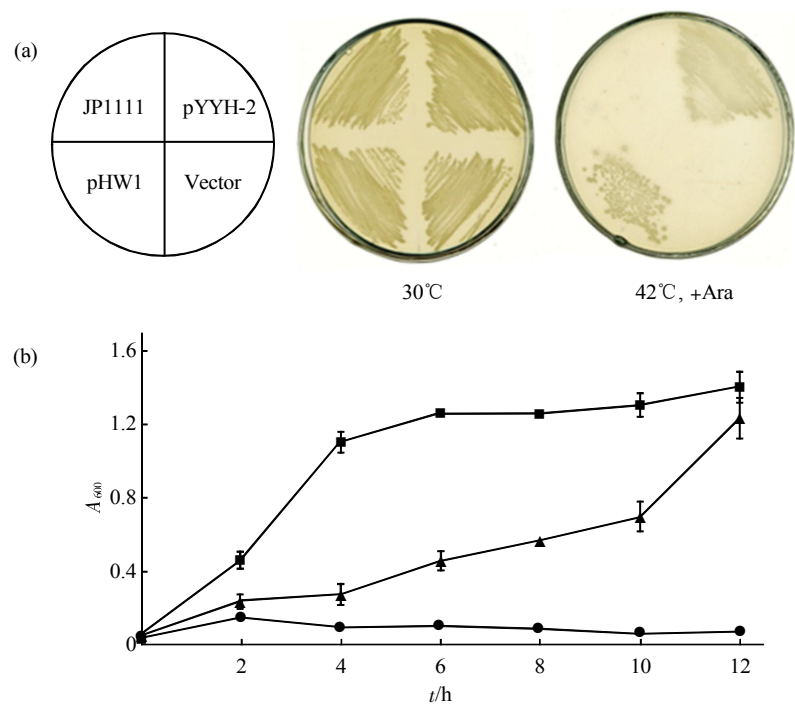


Fig. 2 Complementation of *E. coli fabI* (ts) mutant JP1111 with *XccfabV* or *EcfabI*
(a) Complementation of *E. coli* JP1111 with pYYH-2 or pHW1. (b) The growth of transformants of JP1111 restored by pYYH-2 or pHW1. ■—■: pYYH-2; ▲—▲: pHW1; ●—●: pBAD24M.

三氯森(triclosan)能抑制烯脂酰 ACP 还原酶 *FabI*的活性^[21], 但不能抑制铜绿假单胞菌 *FabV* 的活性^[19]. 为检测野油菜黄单胞菌 *FabV* 对三氯森的敏感性, 将质粒 pYYH-2 转化大肠杆菌 MG1655, 并在添加 Ara 以及不同浓度三氯森的培养基上观察转化子的生长情况(表 2). 结果显示, 三氯森对 pHW1 或空载体转化子的最低抑菌浓度(MIC)是 1.0 mg/L, 对 pYYH-2 转化子的 MIC 超过 1 000 mg/L. 表明野油菜黄单胞菌 *FabV* 对三氯森有极高的抗性, 与铜绿假单胞菌 *FabV* 类似.

Table 2 Triclosan tolerance of <i>E. coli</i> and <i>Xcc</i> strains		
Strain	Clone	ρ (Triclosan MIC)/ (mg·L ⁻¹)
<i>E. coli</i>		
MG1655/pBAD24m	Empty vector	1.0
MG1655/pHW1	<i>EcfabI</i>	1.0
MG1655/pYYH-2	<i>XccfabV</i>	> 1000
<i>Xcc</i>		
8004	None	500
YH4/pYYH-4	<i>XccfabV</i>	1 000
YH5/pMYH-1	<i>EcfabI</i>	6

2.3 野油菜黄单胞菌 FabV 的表达纯化与酶学分析

为进一步研究 XccFabV 在体外的生物学功能, 将 *XccfabV* 基因克隆到 pET28(b) 上, 获得表达质粒 pYYH-3. 将其转化大肠杆菌 BL(DE3) 后, 在 37°C 诱导蛋白质表达, 结果显示 XccFabV 能高效可溶性表达(结果未列). 采用 Ni-NTA 亲和层析, 纯化获得 N 端融合有 His-tag 标签的 XccFabV. 经 SDS-PAGE 检测为单一条带, 分子质量为 45.8 ku. 与推测的分子质量相符, 表明纯化成功(结果未列).

首先检测了 XccFabV 在脂肪酸合成起始反应中的功能(图 3a). 反应体系中加入大肠杆菌 FabD、FabH 后, 将丙二酸单酰 ACP 与乙酰-CoA 聚合后生成 3-酮基丁酰 ACP, 并在 FabG 催化下生成 3-羟基丁酰 ACP, 添加 FabA 后, 进一步脱水生成反-2-丁烯酰 ACP. 但由于 FabA 催化的 3-羟基丁酰 ACP 脱水反应为可逆反应, 平衡向 3-羟基丁酰 ACP, 因此凝胶上只显示 3-羟基丁酰 ACP (泳道 1)^[22]. 在添加大肠杆菌 FabD/H/G/A 体系中, 分别添加大肠杆菌 FabI 或 XccFabV, 都生成丁酰 ACP(泳道 2 和 3). 这表明 XccFabV 与大肠杆菌 FabI 类似, 能催化脂肪酸合成的起始反应.

其次进行了 XccFabV 在脂肪酸延伸反应中活性的检测. 首先检测 XccFabV 对反-2-己烯酰 ACP 的还原. 利用哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶 (AasS), 以反-2-己烯酸和 holo-ACP 为底物, 合成反-2-己烯酰 ACP. 而后添加 NADH 以及大肠杆菌 FabI 或 XccFabV, 反应 1 h 后电泳检测反应产物(图 3b). 结果显示, 泳道 2(EcFabI)和泳道 3(XccFabV)的反应产物均为己酰 ACP, 表明反-2-己烯酰 ACP 被还原. 同样的方法检测了 XccFabV 对反-2-癸烯酰 ACP 的还原, 结果表明也生成癸酰 ACP(图 3c). 以上结果再次证明, XccFabV 具有烯脂酰 ACP 还原酶活性, 参与不同链长的延伸反应.

将 *XccfabV* 表达质粒转化大肠杆菌后, 转化子对三氯森的抗性显著增加. 为检测转化子对三氯森抗性是否由 XccFabV 引起, 在体外以反-2-辛烯酰 ACP 为底物, 添加不同浓度的三氯森(10~1000 mg/L), 检测了 XccFabV 对三氯森的耐受性(图 3d). 结果显示测试浓度的三氯森均不能抑制 XccFabV 的烯脂酰 ACP 还原酶活性. 这一结果说明, 野油菜黄单胞菌 FabV 是一种具有三氯森抗性的烯脂酰 ACP 还原酶.

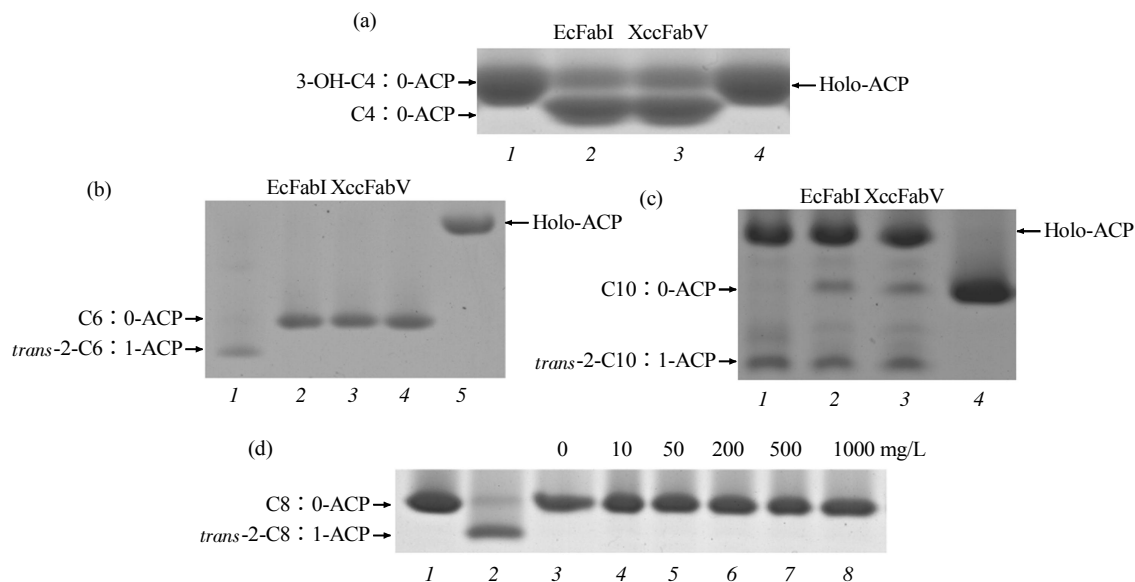


Fig. 3 Enzymatic characterization of *X. campestris* FabV in fatty acid biosynthesis

(a) Activity assay of XccFabV in the initial reaction *in vitro*. (b) Assay of XccFabV ENR activity *in vitro*. EcFabI and XccFabV were added to a reaction mixture containing NADH and *trans*-2-hexanoyl-ACP. Completion of the acyl-ACP synthesis reaction was determined by conformationally sensitive gel electrophoresis. The migration positions of *trans*-2-hexanoyl-ACP and hexanoyl-ACP on gel are shown (lane 1 and 4). (c) Assay of XccFabV ENR activity *in vitro* with similar procedure as above. The migration positions of *trans*-2-capryl-ACP and capryl-ACP on gel are shown (lane 1 and 4). (d) Effect of triclosan on the activity of XccFabV. The appropriate amounts of triclosan solution were added to reaction mixture containing NADH and *trans*-2-octanoyl-ACP, and reaction products were determined by conformationally sensitive gel electrophoresis. The migration positions of octanoyl-ACP and *trans*-2-octanoyl-ACP on gel are shown (lane 1 and 2).

烯脂酰 ACP 还原酶(ENR)催化还原反应时, 按 1 : 1 比例氧化辅因子 NADH, 而 NADH 在 340 nm 处有特异性吸收^[7]. 因此, 可通过测定 340 nm 处 NADH 吸光值下降, 来定量测定烯脂酰 ACP 还原酶活性. 根据这一原理, 本课题组以丁烯酰 -CoA 为底物, 测定了 XccFabV 对 NADH 的氧化活性. 在添加不同浓度的丁烯酰 -CoA 时, XccFabV 氧化 NADH 的活性变化见图 4. 根据酶活性, 计算了 XccFabV 对丁烯酰 -CoA 的动力学参数: K_m 和 V_m 值, 分别为 $(161.2 \pm 51.6) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(114.7 \pm 21.8) \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ng}^{-1}$.

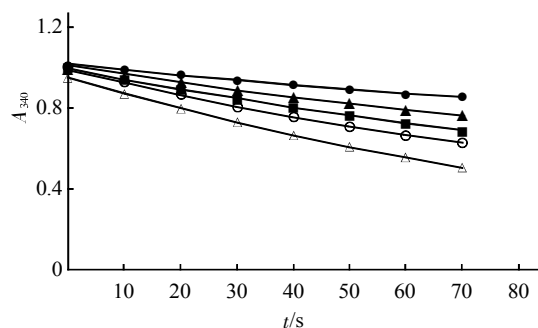


Fig. 4 Reductase activity of XccFabV with crotonyl-CoA

The 100 μl reaction mixtures contained 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 200 $\mu\text{mol/L}$ NADH, 700 ng XccFabV, and different concentrations of crotonyl-CoA. The activity was determined using a UV-visible light (Vis) spectrophotometer at 25°C. $\Delta-\Delta$: 300 $\mu\text{mol/L}$; $\circ-\circ$: 200 $\mu\text{mol/L}$; $\blacksquare-\blacksquare$: 150 $\mu\text{mol/L}$; $\blacktriangle-\blacktriangle$: 100 $\mu\text{mol/L}$; $\bullet-\bullet$: 50 $\mu\text{mol/L}$.

2.4 野油菜黄单胞菌 *fabV* 基因突变菌株的构建

以上异体遗传互补、体外酶学分析都证明了野油菜黄单胞菌 *fabV* 编码烯脂酰 ACP 还原酶. 为进一步研究 *XccfabV* 的生理功能, 我们首先构建了 *fabV* 基因的自杀性载体 pYYH-6, 转化大肠杆菌 S17-1 后, 通过接合作用导入野生菌 *Xcc8004*, 在含有 Rif 和 Km 的平板筛选获得一次重组菌株 *XccYH1*. 但多次筛选都不能获得 *XccfabV* 的敲除突变株(结果未列). 推测 *XccfabV* 为野油菜黄单胞菌生长的必需基因, 敲除后将导致细菌死亡.

为验证以上推测, 以 pYYH-4 为模板, 扩增获得含有启动子 P_{lac} 和 *XccfabV* 基因 5'端约 500 bp 序列的片段 P_{lac} -*XccfabV**, 连入 pK18mobsacB 获得质粒 pYYH-7, 转化大肠杆菌 S17-1 后接合导入 *Xcc8004*, 在 Rif 和 Km 的平板筛选获得重组菌株 *XccYH2*, 其基因组中含有 $\Delta XccfabV$ 和由 P_{lac} 启动的 *XccfabV* 基因. 由于 *Xcc8004* 中没有 *lacI* 基因, P_{lac} 启动 *XccfabV* 基因表达, 因此 *XccYH2* 能正常生长(结果未列). 进一步将携带 *lacI* 基因的 pSRKGm 质粒通过接合作用导入 *XccYH2*, 获得 *XccYH3*. 平板检测 *XccYH3* 生长情况, 结果显示在添加诱导剂 IPTG 时, 解除了 LacI 对 P_{lac} 启动子的抑制, *XccYH3* 生长良好, 而在无 IPTG 的培养基中, *XccYH3* 生长很弱, 推测为渗漏表达引起的(图 5). 这一结果充分说明 *fabV* 是野油菜黄单胞菌生长的必需基因.

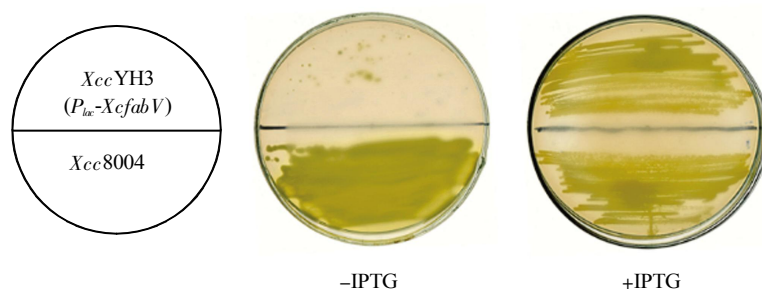


Fig. 5 The growth of XccYH3 on NYG plate with or without IPTG

为此, 进一步构建了基因替换突变株. 将表达质粒 pYYH-4 (*XccfabV*) 和 pMYH-1 (*EcfabI*) 分别导入一次重组菌株 *XccYH1* 后, 在含有 10% 蔗糖、Rif 和 Gm 平板上, 筛选出对 Km 敏感的备选菌株, 用引物 *XccfabV* Check Up 和 Check Down 进行 PCR 检测, 筛选到只扩增出 1.2 Kb 特异条带的菌

株, 并对其基因组 *fabV* 区域进行测序. 结果显示染色体上 *fabV* 被成功敲除, 获得基因替换突变株, 分别命名为 *XccYH4* ($\Delta fabV$ /pYYH-4) 和 *XccYH5* ($\Delta fabV$ /pMYH-1). 这一结果再次证明 *XccfabV* 是关键基因, 只有导入类似功能基因后, 才能被敲除.

2.5 野油菜黄单胞菌 *fabV* 基因替换突变株性状分析

FabI 和 *FabV* 属于不同类型的烯脂酰 ACP 还原酶, 两者分子质量、催化中心以及三氯森抗性等方面都有明显差异. 为研究替换突变株的生理功能变化, 首先测定野生菌与突变株的生长曲线(图 6). 结果显示, 在添加 IPTG 时, 替换突变株 *XccYH4* 和 *XccYH5* 与野生菌 *Xcc8004* 的生长无明显差异, 表明 *XccfabV* 和 *EcfabI* 的编码产物在细菌细胞内功能类似, 都能维持菌体的正常生长.

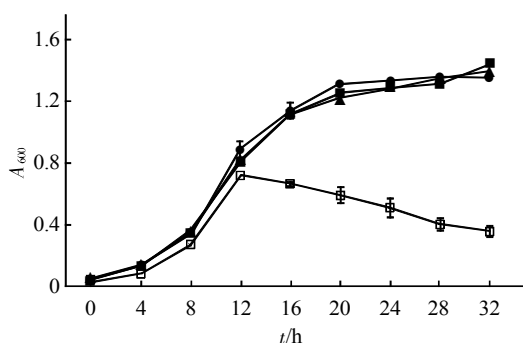


Fig. 6 Growth phenotype of *Xcc8004*, *XccYH4* (*XccfabV*) and *XccYH5* (*EcfabI*)

■—■: *Xcc8004*; ▲—▲: *XccYH4* (*XccfabV*); ●—●: *XccYH5* (*EcfabI*);
○—○: *XccYH5* (*EcfabI*) with triclosan (10 mg/L) when A_{600} reached 0.7.

为检测替换突变株的脂肪酸组成, 我们抽提了野生菌 *Xcc8004* 以及替换突变株 *XccYH4* (*XccfabV*)、*XccYH5* (*EcfabI*) 的脂肪酸, 甲酯化后通过 GC-MS 测定各菌株的脂肪酸组成, 结果如表 3 所示. 野油菜黄单胞菌产生大量的异构(iso-)和反异构(anteiso-)两种类型的支链脂肪酸(BCFA), 总含量超过 50%, 以异构十五烷酸 ($\text{isoC}_{15:0}$) 和反异构十五烷酸 ($\text{anteisoC}_{15:0}$) 两种组分为主. 野生菌 *Xcc8004* 还合成不饱和脂肪酸(UFA), 总含量超过 30%, 以棕榈油酸($\text{n-C}_{16:1}$)为主要组分. 替换突变株 *XccYH4* (*XccfabV*) 和 *XccYH5* (*EcfabI*) 的脂肪酸组成总体上与野生菌没有显著性差异, 也产生了大量的支链脂肪酸, 以及较高含量的不饱和脂肪酸, 组分和含量差异不大, 其中 *XccYH5* (*EcfabI*) 中 $\text{isoC}_{15:0}$ 组分的含量较野生菌提高了约 3%, 而 *XccYH4* (*XccfabV*) 中 $\text{isoC}_{15:0}$ 组分和 $\text{n-C}_{16:1}$ 组分都较野生菌降低了 3%, 推测 *FabI* 和 *FabV* 对底物选择性稍有不同.

进一步测定了突变株对三氯森的敏感性(表 2). 结果显示, 三氯森对野生菌 *Xcc8004* 的 MIC 为

Table 3 Fatty acid compositions of *Xcc8004*, *XccYH4* (*XccfabV*) and *XccYH5* (*EcfabI*)

Fatty acids	<i>Xcc8004</i> (Wild-type)	<i>XccYH4</i> (<i>XccfabV</i>)	<i>XccYH5</i> (<i>EcfabI</i>)
$\text{isoC}_{14:0}$	1.36 ± 0.58	1.17 ± 0.16	1.43 ± 0.87
$\text{isoC}_{15:0}$	27.20 ± 3.15	24.78 ± 3.31	30.21 ± 2.99
$\text{anteisoC}_{15:0}$	20.17 ± 1.33	19.94 ± 1.27	19.67 ± 1.61
$\text{isoC}_{16:0}$	6.51 ± 0.89	5.29 ± 0.57	7.22 ± 1.59
$\text{n-C}_{16:1}$	25.72 ± 3.30	24.94 ± 2.37	24.07 ± 4.30
$\text{n-C}_{16:0}$	8.02 ± 0.93	$4.99 \pm 0.35^{\text{b}}$	8.21 ± 1.63
$\text{n-C}_{17:1}$	2.56 ± 0.73	3.73 ± 0.31	3.43 ± 1.73

^b $P < 0.05$, compared with wild type.

500 mg/L, 而对 *EcfabI* 基因替换突变株 *XccYH5* 的 MIC 仅为 6 mg/L, 而 *XccYH4* (*XccfabV*) 恢复了对三氯森的抗性(MIC 为 1 000 mg/L). 测定生长曲线也显示类似的结果, 在 *XccYH5* 培养基中, 添加 10 mg/L 的三氯森, 菌体停止生长, 并逐渐衰亡(图 6). 综合以上结果, 说明 *FabV* 是野油菜黄单胞对三氯森耐受的根本原因.

3 结论与讨论

野油菜黄单胞菌 *Xcc* 能侵染几乎所有十字花科植物, 引起黑腐病, 在全球范围内造成重大的经济损失. *Xcc* 作为植物与病原微生物相互作用的模式细菌, 产生群体感应(QS)信号分子 DSF. DSF 通过多级分层调控网络, 调控致病相关基因的表达, 影响 *Xcc* 的致病性. 研究认为, DSF 的合成前体来源于 *Xcc* 脂肪酸合成系统. 因此, 研究 *Xcc* 的脂肪酸合成代谢, 有助于阐明 DSF 信号的合成和调控机制, 对防控 *Xcc* 引起的病害提供新的思路.

但 *Xcc* 脂肪酸合成代谢研究报道较少. 本课题组通过比较发现, *Xcc8004* 基因组中 *fabF1* (*Xc3225*) 与 *fabG*、*fabD*、*fabH* 在同一区域, *fabB* (*Xc3652*) 与 *fabA* 在同一区域, 而 *fabF2* 单独在一个区域. 虽然 *FabF1*、*FabF2* 和 *FabB* 都含有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶的催化中心 Cys-Cys-His, 但研究结果显示 *FabF1* 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 的活性, *FabB* 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 的活性, 而 *FabF2* 不具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性, 推测参与其他代谢途径^[14].

烯脂酰 ACP 还原酶(ENR)催化脂肪酸合成循环的最后一步, 将反-2-烯脂酰 ACP 还原为脂酰 ACP. 细菌的烯脂酰 ACP 还原酶具有广泛的多样

性, 包括 FabI、FabK、FabL 和 FabV 等, 其结构和特性各不相同. 研究表明, 大肠杆菌(FabI)、肺炎链球菌(FabK)和霍乱弧菌(FabV)都只含有一种烯脂酰 ACP 还原酶, 而枯草芽孢杆菌(FabI和 FabL)、铜绿假单胞菌(FabI和 FabV)^[19]、粪肠球菌(FabI和 FabK)^[17]和流产布氏杆菌^[22]等含有两种不同的烯脂酰 ACP 还原酶. 生物信息学分析结果显示, 野油菜黄单胞菌 *Xcc8004* 中只有一个 *fabV* 同源基因, 没有其他三种类型烯脂酰 ACP 还原酶的同源序列, 因此我们推测 *XccfabV* 是脂肪酸合成的重要基因并开展了深入研究.

本课题组首先对 *XccfabV* 进行异体遗传互补, 结果表明能恢复大肠杆菌 *fabI* 温度敏感突变株 JP1111 在 42℃ 时生长. 同时在大肠杆菌中表达 *XccfabV* 基因后, 对三氯森的耐受性显著增加. 体外重建脂肪酸合成反应, 结果显示 *XccFabV* 参与不同链长的反-2-烯脂酰 ACP 还原, 且活性不受到三氯森抑制. 研究结果显示 *XccfabV* 是 *Xcc* 生长的必需基因. 因此, *XccFabV* 可以作为新型抗菌药物筛选的靶标.

野生菌 *Xcc8004* 菌株对三氯森有较高的抗性. 研究显示, 用大肠杆菌 *fabI* 基因替换 *XccfabV* 后, 虽然生长和脂肪酸组成基本与野生菌株一致, 但突变菌株对三氯森十分敏感, 其 MIC 仅为 6 mg/L, 这表明 FabV 是赋予野油菜黄单胞菌对三氯森高抗性的主要原因.

为了解 *Xcc* 致病机理, 寻找防治黑腐病新的切入点, 筛选出新的药物作用靶点, 其脂肪酸的合成机制及与信号分子 DSF 代谢的相互关系等, 都需深入研究. 目前, 本课题组还在对 *Xcc* 中其他与脂肪酸合成相关的酶, 以及与 DSF 合成相关的调控机制进行研究, 相关结果将另行发表.

参 考 文 献

- [1] Marrakchi H, Zhang Y M, Rock C O. Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**(6): 1050-1055
- [2] Massengo-Tiasse R P, Cronan J E. Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66**(9): 1507-1517
- [3] Heath R J, Rock C O. Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials. *Curr Opin Investig Drugs*, 2004, **5**(2): 146-153
- [4] 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
- [5] 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
- [6] 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
- [7] 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
- [8] Schaad N W, Postnikova E, Lacy G H, et al. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*, 2005, **28**(6): 494-518
- [9] Chan J W, Goodwin P H. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol Adv*, 1999, **17**(6): 489-508
- [10] He Y W, Zhang L H. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, **32** (5): 842-857
- [11] O'Connell A, An S Q, McCarthy Y, et al. Proteomics analysis of the regulatory role of Rpf/DSF cell-to-cell signaling system in the virulence of *Xanthomonas campestris*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2013, **26**(10): 1131-1137
- [12] Zhou L, Yu Y, Chen X, et al. The multiple DSF-family QS signals are synthesized from carbohydrate and branched-chain amino acids via the FAS elongation cycle. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 13294
- [13] Bi H, Christensen Q H, Feng Y, et al. The *Burkholderia cenocepacia* BDSF quorum sensing fatty acid is synthesized by a bifunctional crotonase homologue having both dehydratase and thioesterase activities. *Mol Microbiol*, 2012, **83**(4): 840-855
- [14] 董会娟, 余永红, 王海洪, 等. 野油菜黄单胞菌中链 3-酮脂酰 ACP 合成酶的鉴定. *华南农业大学学报*, 2015, **36**(2): 49-54
Dong H J, Yu Y H, Wang H H, et al. *Journal of South China Agricultural University*, 2015, **36**(2): 49-54
- [15] 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
- [16] Mao Y, Ma J, Li F, et al. *Ralstonia solanacearum* RSp0194 encodes a novel 3-Keto-Acyl Carrier Protein synthase III. *Plos One*, 2015, **10**(8): e0136261
- [17] Zhu L, Bi H, Ma J, et al. The two functional enoyl-Acyl Carrier Protein reductases of *Enterococcus faecalis* do not mediate triclosan resistance. *mBio*, 2013, **4**(5): e00613-13
- [18] Qian W, Jia Y, Ren S, et al. Comparative and functional genomic

- analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res*, 2005, **15**(6): 757–767
- [19] 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
- [20] 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
- [21] Heath R J, Rock C O. A triclosan-resistant bacterial enzyme. *Nature*, 2000, **406**(6792): 145–146
- [22] 雷 鸣, 马金成, 王海洪. 流产布氏杆菌烯脂酰 ACP 还原酶的鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2012, **39**(5): 464–471
- Lei M, Ma J C, Wang H H. *Prog Biochem Biophys*, 2012, **39**(5): 464–471

Identification and Function Research of The Enoyl-ACP Reductase in *Xanthomonas campestris**

YU Yong-Hong^{1,2)}, MA Jian-Rong¹⁾, WANG Hai-Hong^{2)**}

¹⁾ Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;

²⁾ College of Life Sciences, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, Guangzhou 510642, China)

Abstract Enoyl-ACP reductase (ENR) is one of the key enzymes in bacterial fatty acids biosynthesis. Through sequence alignment, gene XC_0119, annotated as trans-2-enoyl CoA reductase, was found in the genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) 8004. However, the protein encoded by XC_0119 shows 59% identity with *fabV*, the ENR from *Pseudomonas aeruginosa*, and contains the same catalytic triad Tyr-(Xaa)₈-Lys. Expression of *XccfabV* restored the growth of the *E. coli fabI* temperature sensitive mutant JP1111 under non-permissive condition. *In vitro* assay identified that XccFabV catalysed enoyl-ACP with variable chain lengths to acyl-ACP, and the activity was not inhibited by triclosan. Furthermore, genetic research proved that *XccfabV* is an essential gene, and none of *XccfabV* deletion mutants was obtained. However, *XccfabV* in the chromosome could be deleted when plasmid expressing *E. coli fabI* was introduced into *Xcc*8004. And the *fabI* replaced mutant showed similar growth characteristic and fatty acid compositions with wild type, but changed to be sensitive to triclosan. These results demonstrated *XccfabV* is essential for growth, encodes ENR involved in fatty acid *de novo* biosynthesis, and FabV confers triclosan resistance on *Xcc*.

Key words *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), fatty acid biosynthesis, enoyl-ACP reductase, triclosan resistance

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0343

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31200028, 1471743), The Natural Science Foundation of Guangdong Province (2014A030313455) and Science Foundation of Guangdong Food & Drug Vocational College (2015YZ006).

**Corresponding author.

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

Received: October 27, 2015 Accepted: March 14, 2016