

野油菜黄单胞菌中3-羟基脂酰ACP脱水酶
功能研究*马建荣^{1)**} 陈程^{2)**} 鄢明峰²⁾ 李先其²⁾ 张文彬²⁾ 余永红^{1)***}⁽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 细菌采用II型脂肪酸系统合成脂肪酸, 其中3-羟基脂酰ACP脱水酶催化唯一的脱水反应, 是细菌生长的关键酶之一。野油菜黄单胞菌(*Xcc*)引起几乎所有十字花科植物的黑腐病, 在全球范围内造成广泛的经济损失。为研究*Xcc*中3-羟基脂酰ACP脱水酶, 本研究利用大肠杆菌3-羟基脂酰ACP脱水酶FabZ序列同源比对时, 发现其与XC_2876(*XcfabZ*)编码蛋白具有同源性, 序列一致性达到46.1%, 同时还具有保守的 α 螺旋结构和活性位点。将*XcfabZ*异体遗传互补大肠杆菌*fabZ*(*EcfabZ*)条件突变株HW7, 结果显示添加IPTG能恢复突变株的生长, 初步表明XcFabZ具有3-羟基脂酰ACP脱水酶活性。而体外活性分析显示, XcFabZ能在脂肪酸合成的起始反应和延伸反应中发挥3-羟基脂酰ACP脱水酶活性作用。本研究不能直接获得*XcfabZ*基因敲除突变株, 但将携带*EcfabZ*或*XcfabZ*的表达质粒导入后, 获得基因替换突变株, 证明*XcfabZ*是必需基因。*EcfabZ*替换突变株的脂肪酸组成与野生菌有差异, 对逆境条件(高盐、低pH、H₂O₂和SDS)的耐受性显著下降, 运动性也显著降低, 但*XcfabZ*替换突变株恢复到野生菌水平, 表明XcFabZ与EcFabZ虽然都具有3-羟基脂酰ACP脱水酶活性, 但在细胞中生理功能可能有一些差别。

关键词 野油菜黄单胞菌, 3-羟基脂酰ACP脱水酶, 脂肪酸合成
中图分类号 Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0310

脂肪酸是细胞膜的重要组成部分, 真核细胞利用脂肪酸合酶催化脂肪酸合成, 其脂肪酸合酶为含有多重酶活性和一个酰基载体蛋白(ACP)的多功能多肽链, 称为I型脂肪酸合成系统^[1]。但细菌细胞中脂肪酸从头合成反应每一步都由独立的酶催化, 包括聚体、还原、脱水和再还原4个步骤, 而ACP携带脂酰基团在不同酶之间传递中间产物, 称为II型脂肪酸合成系统^[2-3]。脂肪酸合成作为最重要的初级代谢之一, 其合成产物不仅用于细胞膜合成, 合成中间代谢产物还作为其他生物活性分子(如生物素、硫辛酸等)、外膜类脂A、群体感应信号分子扩散信号分子(DSF)、高丝氨酸内酯(AHL)等合成提供原料^[4-7]。

细菌脂肪酸合成中关键的脱水反应由3-羟基脂酰ACP脱水酶催化, 生成反-2-烯脂酰ACP再进行第二步还原反应, 并最终生成脂酰ACP^[8]。模式生物大肠杆菌编码2种3-羟基脂酰ACP脱水酶FabZ和FabA, 但FabA还具有异构酶活性, 能将生成的

反-2-烯脂酰ACP进一步异构化生成顺-3-烯脂酰ACP, 使得烯键不能被还原并最终生成不饱和脂肪酸^[9]。而FabZ对短链和长链的饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸都具有脱水酶催化活性, 但大肠杆菌的*fabA*和*fabZ*都编码脂肪酸合成的关键酶, 两者都是生长的必需基因^[10-11]。

不同细菌来源的3-羟基脂酰ACP脱水酶具有多样性。在乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中, FabZ1同时具有脱水酶和异构酶功能(类似于大肠杆菌FabA), 而FabZ2则只有3-羟基脂酰ACP脱水酶

* 广州市科技计划项目(202002030422), 国家自然科学基金(31601601), 广东食品药品职业学院院级课题(2019ZR13, 2019ZR17), 广东大学生科技创新培育专项资金(“攀登计划”专项资金)(pdjh2020b1010)和广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室开放课题(PFRAO201804)资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 020-29164616, E-mail: yuyh@gdyzy.edu.cn

收稿日期: 2020-08-26, 接受日期: 2020-12-16

活性^[12]. 而粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 编码的 FabN (FabZ 同源蛋白) 具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶和异构酶的双重活性^[13]. 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 和变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) 基因组都只编码唯一的 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶 FabZ, 而通过异构酶 FabM 特异性催化反-2-癸烯脂酰 ACP 化生成顺-3-癸烯脂酰 ACP, 最终合成不饱和脂肪酸^[14-15]. 绿浅气球菌 (*Aerococcus viridans*) 基因组只有一个 FabZ/FabA 同源蛋白 FabQ, 也同时具有脱水酶和异构酶的双功能^[16].

黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 是植物病原菌中较大的类群, 能侵染 400 多种植物, 包括许多重要的农作物和经济作物, 其中野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 能侵染几乎所有的十字花科植物, 引起的黑腐病是一种世界性植物病害, 不仅造成减产, 而且严重影响蔬菜的品质, 在全球范围内引起重大经济损失^[17-18]. *Xcc* 在侵染植物过程中, 产生多种 DSF 类群体感应信号分子, 并严格调控胞外多糖、胞外酶 (纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶等) 等多种致病因子的产量, 而 DSF 合成前体来源于脂肪酸合成中间产物, 因此研究 *Xcc* 脂肪酸合成途径有利于黑腐病的防控^[19-20]. 目前本课题组对 *Xcc* 的脂肪酸合成途径已经进行多方面的研究, 深入研究了 3-酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH)^[6]、3 个 3-酮脂酰 ACP 还原酶 (FabG1~FabG3)^[21-22] 和烯脂酰 ACP 还原酶 (FabV)^[23] 的生物学功能, 也完成长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶的初步鉴定, 但 *Xcc* 中 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶还未见报道. 为此, 本研究利用异体互补、体外活性分析和基因替换等方法, 研究了 *Xcc* 基因组中 XC_2876 编码的 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶在脂肪酸合成、致病因子产生、抗逆性等方面的生物学功能.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基

本研究使用的大肠杆菌菌株包括 DH-5 α 、S17-1、BL21 (DE3)、CY57 和 HW7, 野油菜黄单胞菌 *Xcc*8004. 使用的质粒有 pK18mobsacB、pBAD24M、pSU18、pET-28 (b) 和 pSRK-Gm^[24], 其他载体均为上述质粒的衍生质粒 (构建过程见下文), 具体菌株和质粒见表 1. LB 用作大肠杆菌培养基, NYG 用作野油菜黄单胞菌培养基. 抗生素

的使用浓度如下: 100 mg/L 氨苄青霉素 (Amp)、30 mg/L 庆大霉素 (Gm)、30 mg/L 卡那霉素 (Km). 诱导剂异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 浓度为 1 mmol/L, L-阿拉伯糖 (Ara) 浓度为 0.02%.

1.1.2 试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PCR mix、DNA Marker 等试剂, DNA 凝胶回收和质粒提取等试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司; 卡那霉素、庆大霉素、氨苄青霉素、L-阿拉伯糖、IPTG、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生工公司完成.

1.2 基因克隆与质粒构建

以野油菜黄单胞菌 *Xcc* 8004 总 DNA 为模板, 以表 2 中 *XcfabZ* Nde I 和 *XcfabZ* Hind III 为引物对, 使用高保真 PCR mix 扩增 *XcfabZ* 基因片段. 回收 PCR 扩增产物, 经 Nde I 和 Hind III 酶切后, 分别连接入 pBAD24M 和 pSU18 载体, 并转化大肠杆菌 DH-5 α , 筛选的阳性克隆经测序验证后, 依次得到互补质粒 pJR-1 和 pJR-2. 同时用类似的方法, 通过 Nde I 和 Hind III 位点, 将 *XcfabZ* 基因连入表达载体 pET-28 (b) 和 pSRK-Gm, 测序验证后获得 pJR-2 和 pJR-6. 本文还将 *EcfabZ* 基因连入 SRK-Gm 获得 pJR-5.

1.3 基因敲除与替换

以野油菜黄单胞菌 *Xcc* 8004 总 DNA 为模板, 分别以表 2 中 *XcfabZ* P1 和 *XcfabZ* P2、*XcfabZ* P3 和 *XcfabZ* P4 为引物, PCR 扩增 *XcfabZ* 基因上下游各约 500 bp 片段, 并利用融合 PCR 技术获得基因敲除片段. 回收并酶切后连接到 pK18mobsacB 中 *EcoR* I 和 *Hind* III 位点上, 获得基因敲除质粒 pJR-4, 并测序验证正确.

敲除质粒 pJR-4 转化大肠杆菌 S17-1 后, 与野油菜黄单胞菌 *Xcc* 8004 在 NYG 平板上 30 $^{\circ}$ C 共培养 36 h, 然后用 1 ml 无菌水培养物悬浮, 适当稀释后涂布于含有利福平 (Rif) 和卡那霉素 (Km) 的平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 48 h 获得单菌落. 分别选取单菌落培养后提取总 DNA, 用 P1 和 P4 进行 PCR 检测, 获得一次重组菌株 *Xcc* JR1. 进一步将 *Xcc* JR1 在含有 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, 再用 PCR 验证基因敲除突变株.

按照类似方法, 分别将 pJR-5 (*EcfabZ*) 和 pJR-6 (*XcfabZ*) 导入大肠杆菌 S17-1 后, 与一次重

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strains/Plasmids	Relevant genotype or characteristics	Sources or reference
<i>E. coli</i> strains		
DH-5 α	$\phi 80\Delta lacZ\Delta M15\ endA1\ recA1\ hsdR17^-$ (r_K^- , m_K^+)	Lab collection
S17-1	$Tp^f\ Sm^r\ recA^-$, thi^- , pro^- , $hsdR-M^+$ RP4::2-Tc::Mu:Km::Tn7, λ_{pir}	Lab collection
BL21 (DE3)	$ompT\ hsdS\ B^-$ ($r_B^- m_B^-$) (DE3)	Lab collection
CY57	<i>E. coli fabA</i> (Ts)	Lab collection
HW7	<i>E. coli</i> DY330 <i>fabZ::kan</i> transformed with pBAD24 carrying <i>Clostridium acetobutylicum fabZ</i>	[13]
<i>Xcc</i> strains		
8004	Rif ^R , wild type	Lab collection
JR1	Rif ^R , Km ^R , pJR-4 integrated in <i>Xcc</i> 8004 genome	This study
JR2	Rif ^R , Km ^R , Gm ^R , <i>Xcc</i> JR-1 harboring pJR-5	This study
JR3	Rif ^R , Km ^R , Gm ^R , <i>Xcc</i> JR-1 harboring pJR-6	This study
JR4	Rif ^R , Gm ^R , $\Delta XcfabZ$ /pJR-5	This study
JR5	Rif ^R , Gm ^R , $\Delta XcfabZ$ /pJR-6	This study
Plasmids		
pET-28 (b)	Km ^r , expression vector	Lab collection
pBAD24M	Amp ^r , expression vector	Lab collection
pBAD- <i>EcfabA</i>	Amp ^r , <i>E. coli fabA</i> in pBAD24M	Lab collection
pSU18	Cm ^r , cloning vector	Lab collection
pJR-1	Amp ^r , <i>XcfabZ</i> in pBAD24M	This study
pJR-2	Cm ^r , <i>XcfabZ</i> in pSU18	This study
pJR-3	Km ^r , <i>XcfabZ</i> in pET-28b	This study
pJR-4	Km ^r , <i>XcfabZ</i> in-frame deletion fragment inserted to pK18mobsacB between <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> sites	This study
pJR-5	Gm ^r , <i>EcfabZ</i> in pSRK-Gm	This study
pJR-6	Gm ^r , <i>XcfabZ</i> in pSRK-Gm	This study

Table 2 Sequences of the PCR primers

Primer name	Sequence (5' $\rightarrow$ 3')
<i>XcfabZ</i> P1	AATTGAATTCATCGGCGACGATTGCGAAATT
<i>XcfabZ</i> P2	ATGTTGCGGATCAGGCCGTCGATCGGCAGCTCGTAAATGG
<i>XcfabZ</i> P3	AGCTGCCGATCGACGGCCTGATCCGCAACATGGGATGCTATT
<i>XcfabZ</i> P4	AATTAAGCTTGCGTACTTCTGTGCTCGCGGT
<i>XcfabZ</i> checkup	ACTGGATCAAGGTGCCGCA
<i>XcfabZ</i> checkdown	TTGCCGATCACCAGTTCGGT
<i>XcfabZ</i> Nde I	AATTATGCATATGAGTCACCCCATTTACGAG
<i>XcfabZ</i> Hind III	AATTAAGCTTGTTATTCCCTGGCGC

The underlined sequences are the introduced restriction sites.

组菌株 *Xcc* JR1 结合, 利用 Rif、Km、Gm 抗性筛选分别获得 *Xcc* JR2 和 *Xcc* JR3. 分别将其在 NYG (Rif 和 Gm) 中培养后, 涂布于含有 Rif 和 Gm 的 NYGS 平板, 利用 Km 敏感和 PCR 验证方法, 筛选获得基因组上 *XcfabZ* 被敲除的二次重组菌株 *Xcc* JR4 ($\Delta fabZ/EcfabZ$) 和 *Xcc* JR5 ($\Delta fabZ/XcfabZ$).

1.4 XcFabZ 蛋白表达与体外功能检测

将构建好的表达质粒 pJR-3 (*XcfabZ*) 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 蛋白质的表达和分离纯

化参照文献进行. 同时参照文献的方法, 分别纯化大肠杆菌丙二酸单酰 CoA : ACP 转移酶 (FabD)、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, 并且体外合成丙二酸单酰 ACP (Mal-ACP) 和辛脂酰 ACP (C₈-ACP).

野油菜黄单胞菌 XcFabZ 的体外活性检测参照文献 [25]. 具体做法如下: 起始反应体系 50 μ l, 含有 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 μ mol/L

NADH, 50 μmol/L NADPH, 1 mmol/L β-巯基乙醇, 100 μmol/L 丙二酸单酰-CoA; 50 μmol/L holo-ACP; 100 μmol/L 乙酰-CoA, 大肠杆菌 FabD、FabH、FabG、FabI 各 0.1 μg, 反应在添加不同的 0.1 μg FabZ 后; 延伸反应体系类似, 添加辛脂酰 ACP, 茄科雷尔氏菌 FabW^[26]、大肠杆菌 FabG 和 FabI, 以及不同来源的 FabZ. 反应体系 37℃保温 1 h 后, 用分离胶浓度为 17.5%, 且含有 1~3 mol/L 尿素的非变性蛋白质凝胶电泳进行分析.

1.5 脂肪酸组成分析

在 30℃时 NYG 中分别培养不同的野油菜黄单胞菌菌株, 收集菌体后, 按照文献 [6, 21] 的方法提取脂肪酸, 并转化为脂肪酸甲酯 (每种样品做 3 个重复) 后, 利用 GC-MS 法测定并分析不同菌株的肪酸组组分.

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

为研究野油菜黄单胞菌 (*Xcc*) 中 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶, 本研究利用大肠杆菌 FabZ (EcFabZ) 序列与 *Xcc* 8004 基因组^[27] 进行 Blast 比对, 结果显示 XC_2876 编码蛋白与 EcFabZ 具有同源性, 两者的氨基酸序列一致性达到 46.1%, XC_2876 也标注为 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶, 还具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶两个保守的 α 螺旋结构, 以及活性关键位点 His (图 1), 推测其参与 *Xcc* 的脂肪酸合成代谢, 并将其命名为 XcFabZ. 大肠杆菌基因组还编码 3-羟基脂酰 ACP 脱水/异构酶 FabA (EcFabA), 但 XcFabZ 与 EcFabA 的序列一致性仅为 24.5%, 而且两个保守的 α 螺旋区域氨基酸序列也差异较大, 说明 XcFabZ 与 EcFabA 相差较大, 推测 XcFabZ 不

具有异构酶活性. 而利用大肠杆菌 FabA (EcFabA) 序列与 *Xcc* 8004 比对, 也发现同源性较高的蛋白质 (相关研究结果将另文发表), 表明 XcFabZ 可能仅有脱水酶活性.

2.2 XcfabZ遗传互补大肠杆菌突变株

大肠杆菌 CY57 是 *fabA* 的温度敏感突变株, 30℃正常生长, 但在非允许温度 (42℃) 时由于 FabA 功能缺失, 不能合成不饱和脂肪酸, 菌体不能生长^[28]. 为研究 *XcfabZ* 基因是否具有大肠杆菌 *fabA* 的类似功能, 本研究将 *XcfabZ* 连接到表达质粒 pBAD24M 后, 转化 CY57 菌株, 并检测转化子在 42℃的生长情况. 结果显示, *XcfabZ* 不能恢复 CY57 的正常生长 (结果未列).

大肠杆菌 HW7 是 *fabZ* 基因的条件突变菌株, 该菌株基因组中 *fabZ* 被卡那霉素抗性基因 (*kan*) 替换, 而缺失 FabZ 的功能由 pBAD24 质粒携带的丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 来源的 *fabZ* 基因提供, 但该基因需要外源添加阿拉伯糖诱导 (Ara) 表达^[13]. 为研究 *XcfabZ* 基因是否具有大肠杆菌 *fabZ* 的类似功能, 本研究将 *XcfabZ* 连接到受 IPTG 诱导的表达质粒 pSU18 后获得互补质粒 pJR-2, 分别将 pJR-2 和空载体 pSU18 转化 HW7 菌株, 30℃筛选转化子, 并在不同培养条件下检测转化子的生长表型. 结果如图 2 所示, 在培养基中添加阿拉伯糖诱导 (Ara) 时, 两种转化子都能生长. 但在培养基中不添加 Ara, 而添加 IPTG 时, 只有含 *XcfabZ* 的转化子能正常生长. 以上结果说明, *XcfabZ* 具有大肠杆菌 *fabZ* 类似的功能, 编码产物具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性, 但与大肠杆菌 FabA 不同, XcFabZ 不具有异构酶活性, 此结果与生物信息学分析相符合.

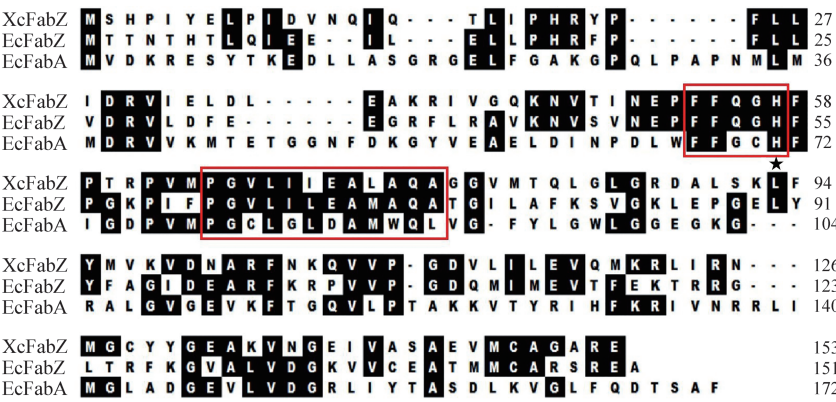


Fig. 1 The alignment of XcFabZ, EcFabZ and EcFabA proteins

Identical residues are indicated by white letters. Residue marked with ★ is the conserved active site, and the conservative α helix regions are in the boxes.

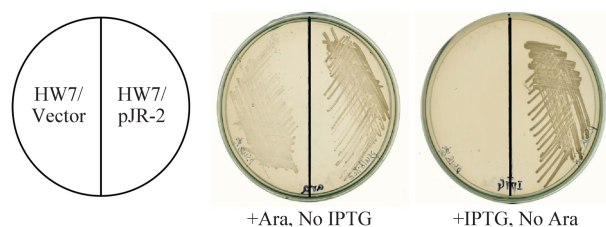


Fig. 2 Complementation of *E. coli* HW7 strain with *XcfabZ*

2.3 XcFabZ的表达纯化与体外活性测定

为进一步研究 XcFabZ 在体外的生物功能, 将 *XcfabZ* 克隆到 pET-28(b) 上, 获得表达质粒并转化大肠杆菌 BL21(DE3) 后, 在 37°C 诱导表达, 并采用 Ni-NTA 亲和层析法纯化获得 N 端融合有 His-tag 的 XcFabZ 蛋白. 经 SDS-PAGE 检测为单一条带, 分子质量 (约 20 ku) 与理论分子质量相符, 表明纯化成功 (图 3a).

首先, 体外重建 XcFabZ 参与的脂肪酸合成起始反应 (图 3b). 利用大肠杆菌 FabH 催化乙酰-

CoA 前体与丙二酸单酰 ACP 聚合, 生成 3-酮基丁酰 ACP, 再添加还原酶 FabG 催化下生成 3-羟基丁酰 ACP, 但该产物在 NO SDS-PAGE 中迁移位置与丙二酸单酰 ACP 无显著差异 (泳道 2), 而继续添加 XcFabZ 和大肠杆菌还原酶 FabI 后, 催化生成了终产物丁酰 ACP, 证明 XcFabZ 能催化 3-羟基丁酰 ACP 脱水, 具有脱水酶活性 (泳道 3). 而仅添加大肠杆菌 FabH、FabG 和 FabI 时, 也不能生成丁酰 ACP (泳道 4).

其次, 进一步构建了 XcFabZ 参与的脂肪酸合成延伸反应 (图 3c). 哈氏弧菌来源的脂酰 ACP 合成酶 (AasS) 能以正辛酸 (C_8) 和 holo-ACP 为底物, 合成辛脂酰 ACP. 再利用茄科雷尔氏菌中 FabW (RSp0194) [26] 催化辛脂酰 ACP 与丙二酸单酰 ACP 聚合, 生成 3-酮基脂酰 ACP, 而后继续被 3-酮脂酰 ACP (FabG)、3-羟基脂酰 ACP 脱水酶、烯酰 ACP 还原酶 FabI 催化生成癸脂酰 ACP. 结果显示, XcFabZ (泳道 2) 或 EcFabZ (泳道 3) 都生成了癸脂酰 ACP, 再次证明 XcFabZ 具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶, 参与脂肪酸合成的延伸反应.

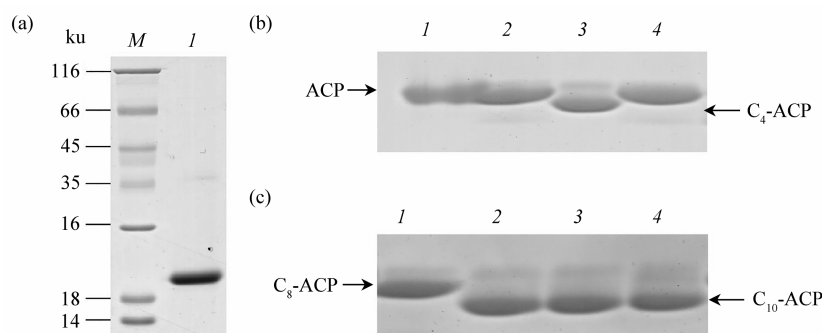


Fig. 3 Purification and enzymatic characterization of XcFabZ in fatty acid biosynthesis

(a) XcFabZ purification. M: Protein marker; I: Purified XcFabZ. (b) The initial reaction. In the initial reaction, fatty acid biosynthesis was reconstructed by adding each purified XcFabZ to a reaction mixture containing Tris-HCl, NADH, NADPH, Mal-ACP, *E. coli* FabH/FabG/FabI and acetyl-CoA primer. The migration positions of holo-ACP and butyryl-ACP on gel are shown. 1: holo-ACP; 2: EcFabH/FabG; 3: XcFabZ; 4: No XcFabZ. (c) The elongation reaction. In the elongation reaction, each purified FabZ was added to the mixture containing Tris-HCl, NADH, NADPH, Mal-ACP, octanoyl-ACP, RsFabW, *E. coli* FabG/FabI. The reaction products were resolved by conformational sensitive gel electrophoresis on 17.5% polyacrylamide gels containing concentrations of urea optimized to effect the separation. The migration positions of octanoyl-ACP and capryl-ACP on gel are shown. 1: octanoyl-ACP; 2: EcFabZ; 3: XcFabZ; 4: capryl-ACP.

2.4 野油菜黄单胞菌 *XcfabZ* 基因突变株的构建

异体遗传互补大肠杆菌突变株和体外活性检测结果都显示, 野油菜黄单胞菌 *XcfabZ* 编码蛋白具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性. 为进一步研究 *XcfabZ* 在细胞内的生物学功能, 本研究尝试采用同源重组的方式构建基因敲除突变株. 首先采用

PCR 融合技术, 利用自杀质粒 pK18mobsacB 构建了 *XcfabZ* 的敲除质粒, 导入大肠杆菌 S17-1 菌株后, 与野生菌 *Xcc* 8004 接合, 筛选获得一次重组菌株 *Xcc* JR1. 进一步利用抗性筛选结合 PCR 验证的方法, 以期获得 *XcfabZ* 基因删除的二次重组菌株, 但多次筛选后都不能获得 *XcfabZ* 敲除菌株, 推测

其为野油菜黄单胞菌生长的必需基因, 该基因敲除后引起菌体死亡。

为此, 本研究构建了 *XcfabZ* 基因的替换突变株. 分别将 pJR-5 (*EcfabZ*) 和 pJR-6 (*XcfabZ*) 质粒导入一次重组菌株 *Xcc* JR1 后, 在含有 Gm、Rif 和 10% 蔗糖的 NYGS 平板上筛选卡那霉素敏感的菌落, 并利用 *XcfabZ* checkup 和 *XcfabZ* checkdown 引物进行 PCR 验证, 进一步测序确认后, 获得基因组上 *XcfabZ* 被敲除的替换突变株 *Xcc* JR4 (*EcfabZ*) 和 *Xcc* JR5 (*XcfabZ*). 这一结果也证明 *XcfabZ* 是必需基因, 只有细胞内质粒携带并表达 *fabZ* 时才能被敲除. 测定不同菌株在 NYG 培养基中的生长曲线, 结果显示, *Xcc* JR4 (*EcfabZ*) 和 *Xcc* JR5 (*XcfabZ*) 两个替换突变株生长无差异, 但两者都较野生菌 *Xcc* 8004 生长慢 (图 4), 说明 *EcfabZ* 能替换 *XcfabZ* 的基因功能, 推测细胞内过量表达 *fabZ* 基因可能会影响菌体的生长。

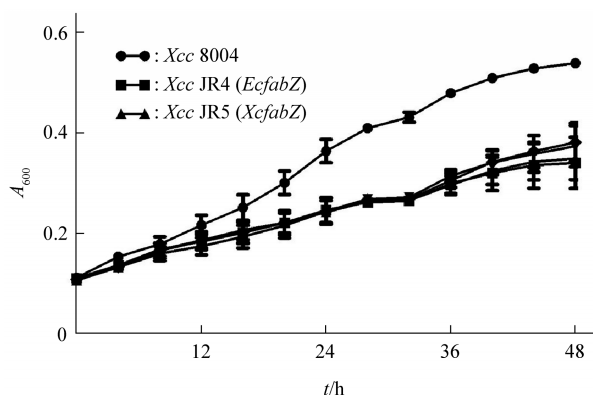


Fig. 4 The growth curves of different strains in NYG medium

2.5 野油菜黄单胞菌 *XcfabZ* 替换突变株脂肪酸组成分析

为研究 *fabZ* 基因替换后对野油菜黄单胞菌的影响, 本研究首先提取不同菌株的脂肪酸, 并甲酯化后利用 GC-MS 法分析了脂肪酸组成. 结果显示, 野生菌 *Xcc* 8004 和两个替换突变株的脂肪酸组成中主要组分都相同, 含有异构十五烷酸 (*iso*-C_{15:0})、反异构十五烷酸 (*anteiso*-C_{15:0}) 和十六碳烯酸 (*n*-C_{16:1}) 等, 但不同菌株中不同脂肪酸组分的相对含量有差别. *EcfabZ* 替换突变株 *Xcc* JR4 中没有检测到十七碳烯酸 (*n*-C_{17:1}) 和十八碳烷酸 (*n*-C_{18:0}) 两种组分, 而 *iso*-C_{15:0}、*anteiso*-C_{15:0} 较野生

菌分别降低了约 2.4% 和 3.1%, 总支链脂肪酸含量也有所下降, 但 *Xcc* JR4 (*EcfabZ*) 中 *n*-C_{16:1} 和 *n*-C_{16:0} 都有所上升. *XcfabZ* 替换突变株 *Xcc* JR5 的脂肪酸组分含量与野生菌接近, 但总支链脂肪酸含量较野生菌略有上升. 以上结果说明, 替换突变株中都能正常合成脂肪酸, 但两种替换突变株的脂肪酸组分相对含量有差异, 推测 *XcFabZ* 和 *EcFabZ* 对不同链长的底物催化活性有差异。

Table 3 Fatty acid composition of *Xcc* 8004 and mutant strains grown in NYG medium

Fatty acids	Composition/%		
	<i>Xcc</i> 8004	<i>Xcc</i> JR4 (<i>EcfabZ</i>)	<i>Xcc</i> JR5 (<i>XcfabZ</i>)
<i>n</i> -C _{11:0}	0.96 ± 0.87	1.64 ± 0.22	1.12 ± 0.58
<i>iso</i> -C _{14:0}	0.97 ± 0.07	0.42 ± 0.37	0.66 ± 0.08
<i>n</i> -C _{14:0}	1.34 ± 0.09	1.27 ± 0.15	0.76 ± 0.09
<i>iso</i> -C _{15:0}	27.68 ± 0.15	25.28 ± 1.43	29.29 ± 1.09
<i>anteiso</i> -C _{15:0}	21.63 ± 0.58	18.55 ± 0.86	20.4 ± 1.10
<i>cyclo</i> -C _{17:0}	1.55 ± 0.15	1.16 ± 0.11	1.28 ± 0.22
<i>n</i> -C _{15:0}	4.12 ± 0.11	6.77 ± 0.54	3.84 ± 0.09
<i>iso</i> -C _{16:0}	5.26 ± 0.09	5.88 ± 0.18	6.36 ± 0.25
<i>n</i> -C _{16:1}	17.16 ± 0.25	19.08 ± 0.61	15.31 ± 0.67
<i>n</i> -C _{16:0}	9.45 ± 0.87	11.83 ± 0.66	6.81 ± 0.39
<i>iso</i> -C _{17:0}	4.59 ± 0.08	7.09 ± 0.33	8.09 ± 0.85
<i>anteiso</i> -C _{17:0}	0.93 ± 0.12	0.34 ± 0.59	1.66 ± 0.36
<i>n</i> -C _{17:1}	2.82 ± 0.56	0 ± 0	2.15 ± 2.00
<i>n</i> -C _{18:1}	1.24 ± 0.44	0.69 ± 1.19	1.73 ± 0.84
<i>n</i> -C _{18:0}	0.24 ± 0.21	0 ± 0	0.44 ± 0.42
Total BCFAs	61.05 ± 1.08	57.55 ± 3.75	66.45 ± 3.73
Total UFAs	22.77 ± 1.4	20.93 ± 1.92	20.47 ± 3.73

2.6 替换突变株生理性状分析

本研究进一步分析了野生菌与替换突变株对不同逆境条件的耐受性. 结果显示, *Xcc* JR4 (*EcfabZ*) 对高盐条件 (2.0%~3.0%) 的耐受性要显著弱于野生菌株 *Xcc* 8004, 而 *Xcc* JR5 (*XcfabZ*) 仅稍弱于野生菌 (图 5 a). 三个菌株在 pH=5.5 的培养基上生长无差异 (图 5 b), 但在 pH=5.0 时 *Xcc* JR4 (*EcfabZ*) 的生长受到显著抑制, 而 *Xcc* JR5 (*XcfabZ*) 与野生菌无差异 (图 5 b). *Xcc* JR4 (*EcfabZ*) 对 H₂O₂ 和 SDS 的敏感性也明显提高, 而 *Xcc* JR5 (*XcfabZ*) 和野生菌对两者的耐受性无显著性差异 (图 5 c, d).

本研究还分析了两种替换突变株和野生菌在含

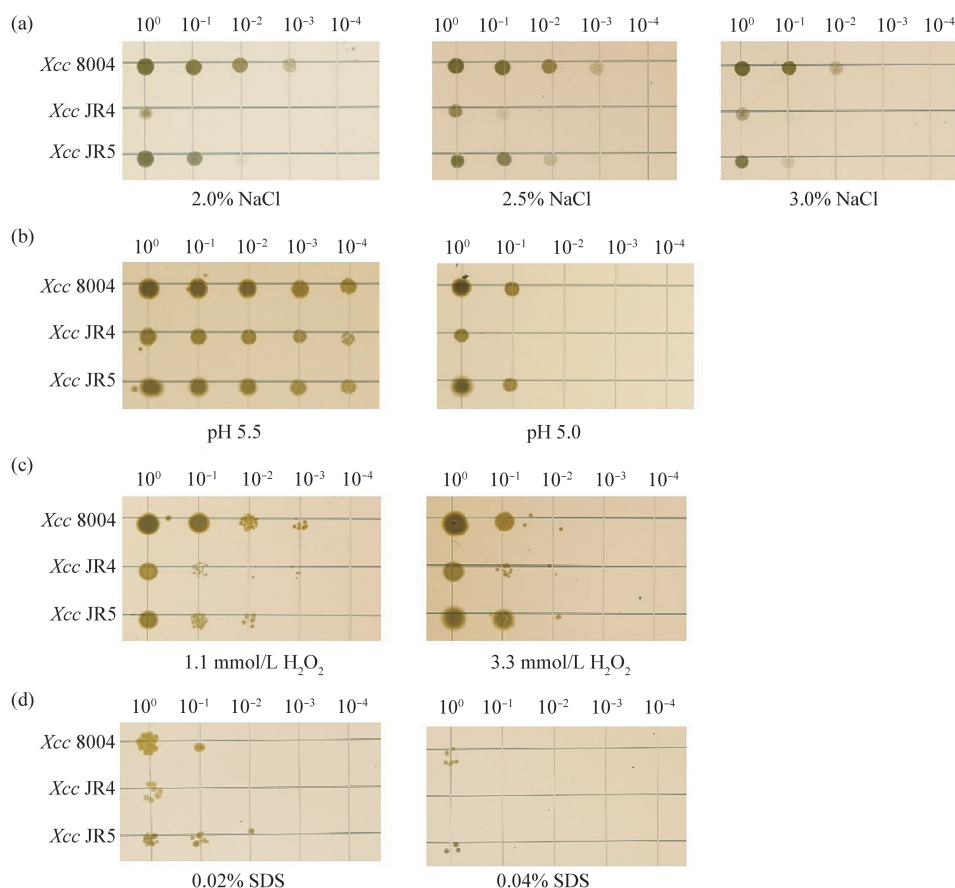


Fig. 5 Growth of different *Xcc* strains with various conditions

有0.6%琼脂糖平板上的运动性(图6)。两种替换突变株的运动性都与野生菌差异显著,含有*EcfabZ*的突变株*Xcc* JR4运动直径为(7.36 ± 0.28) mm,迁

移率仅为野生菌(直径为(16.91 ± 0.57) mm)的43.5%,而*Xcc* JR5(*XcfabZ*)突变株的运动直径为(19.37 ± 0.04) mm,迁移率略大于野生菌。以上结果说明,*XcfabZ*基因在菌体的运动性中发挥重要作用,而该功能不能被*EcfabZ*替代。

3 结论与讨论

脂肪酸合成是细菌细胞中重要的基础代谢之一,合成产物与其他初级代谢以及多种次级代谢有紧密联系,具有重要的生物学功能^[29]。细菌脂肪酸合成系统中,3-羟基脂酰 ACP脱水酶催化循环反应中唯一的脱水反应,是脂肪酸合成的关键酶,在不同细菌中存在差异,表现出多样性。野油菜黄单胞菌(*Xcc*)引起十字花科植物黑腐病(包括重要的经济植物),在全球范围内引起广泛的经济损失,对*Xcc*脂肪酸合成机制及其与致病力的相关性,值得深入研究。但*Xcc*的脂肪酸合成机制还不完全清楚,本课题组前期完成了3-酮脂酰 ACP合

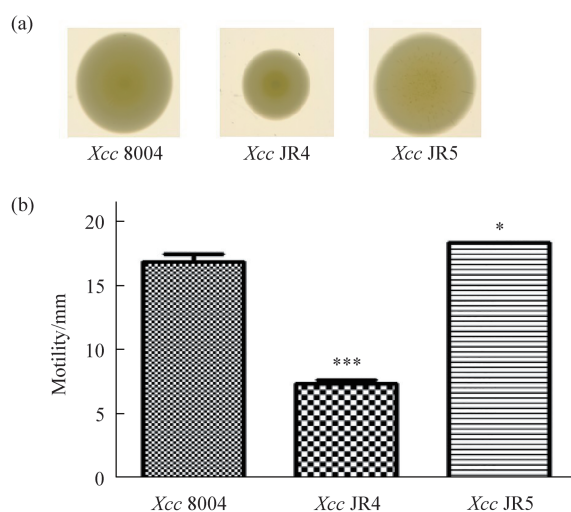


Fig. 6 Motility assay of different *Xcc* strains

(a) Phenotypic character on NYG plate with 0.6% agarose. (b) The diameter of different strains on plates (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

成酶 III (FabH)、3-酮脂酰 ACP 还原酶 (FabG) 和烯脂酰 ACP 还原酶 (FabV) 的功能研究, 但 3-羟脂酰 ACP 脱水酶还未见报道.

本研究通过生物信息学方法, 利用大肠杆菌 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶 FabZ 序列同源性比对在 *Xcc* 8004 基因组中发现 *XC_2876* (*XcfabZ*) 基因, 氨基酸序列序列具有较高的一致性, 还具有保守的 α 螺旋结构和活性位点, 推测具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性. 将 *XcfabZ* 互补大肠杆菌 *fabZ* 条件突变株 HW7, 结果显示, 能恢复突变株的正常生长, 初步说明 XcFabZ 与 EcFabZ 类似, 也具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性. 而后在体外酶活性分析也证明 XcFabZ 能参与脂肪酸的合成起始反应和延伸反应, 对不同链长的底物都具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性.

进一步尝试在 *Xcc* 8004 基因组利用同源重组方法敲除 *XcfabZ*, 但不能获得基因敲除突变株, 而在分别导入携带有大肠杆菌 *EcfabZ* 或 *XcfabZ* 基因的表达质粒后成功获得敲除突变株, 证明 *XcfabZ* 是 *Xcc* 生长的必需基因. 此现象与大肠杆菌类似, *fabZ* 是生长必需基因, 尽管基因组中还存在 3-羟基脂酰 ACP 脱水/异构酶编码基因 *fabA*^[11]. 本研究发现, *EcfabZ* 替换突变株与 *XcfabZ* 替换突变株的脂肪酸组分差异明显, 两个菌株对高盐、低 pH、H₂O₂ 和 SDS 等逆境条件的耐受性差异显著, 两个菌株的运动性也有显著性差异, 以上结果证明, XcFabZ 与 EcFabZ 虽然功能类似, 但也不完全相同, 可能通过改变了替换株的脂肪酸组分改变菌体的生理性状.

不同细菌中 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶具有多样性, 大肠杆菌基因组含有脱水酶基因 *fabZ* 和脱水/异构酶基因 *fabA*, 本研究通过异体遗传互补、体外活性分析和体内基因替换都证实 *XcfabZ* 编码产物只具有脱水酶活性, 而不具有异构酶活性. 本课题组前期利用类似策略, 已经发现了 *Xcc* 基因组与大肠杆菌 *fabA* 的同源基因, 并开展了体外活性、体内活性等方面的研究, 都证明该基因编码蛋白具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水/异构酶活性, 相关研究结果将另文发表.

参 考 文 献

- [1] Rock C O, Cronan J E. *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1302**(1): 1-16
- [2] Cronan J E, Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods Enzymol*, 2009, **459**: 395-433
- [3] Parsons J B, Rock C O. Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Prog Lipid Res*, 2013, **52**(3): 249-276
- [4] Cronan J E. Advances in synthesis of biotin and assembly of lipoic acid. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, **47**: 60-66
- [5] Cronan J E. Assembly of lipoic acid on its cognate enzymes: an extraordinary and essential biosynthetic pathway. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, **80**(2): 429-450
- [6] Yu Y H, Hu Z, Dong H J, *et al.* *Xanthomonas campestris* FabH is required for branched-chain fatty acid and DSF-family quorum sensing signal biosynthesis. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 32811
- [7] Nhu Lam M, Dudekula D, Durham B, *et al.* Insights into beta-ketoacyl-chain recognition for beta-ketoacyl-ACP utilizing AHL synthases. *Chemical Communications*, 2018, **54**(64): 8838-8841
- [8] Rock C O, Jackowski S. Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **292**(5): 1155-1166
- [9] Iram S H, Cronan J E. The beta-oxidation systems of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are not functionally equivalent. *J Bacteriol*, 2006, **188**(2): 599-608
- [10] 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
- [11] Heath R J, Rock C O. Roles of the FabA and FabZ beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratases in *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis. *J Biol Chem*, 1996, **271**(44): 27795-27801
- [12] 马金成, 罗彪, 胡喆, 等. 乳酸乳球菌 *fabZ1* 和 *fabZ2* 基因功能的鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2014, **41**(8): 777-786
- [13] Ma J C, Luo B, Hu Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2014, **41**(8): 777-786
- [14] 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
- [15] Fozo E M, Quivey R G, Jr. 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
- [16] 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
- [17] Bi H, Wang H, Cronan J E. FabQ, a dual-function dehydratase/isomerase, circumvents the last step of the classical fatty acid synthesis cycle. *Chem Biol*, 2013, **20**(9): 1157-1167
- [18] Mansfield J, Genin S, Magori S, *et al.* Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 2012, **13**(6): 614-629
- [19] Bonas U, Van Den Ackerveken G, Buttner D, *et al.* How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

- conquers the host. Mol Plant Pathol, 2000, **1**(1): 73-76
- [19] Torres P S, Malamud F, Rigano L A, *et al.* Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. Environ Microbiol, 2007, **9**(8): 2101-2109
- [20] Barber C E, Tang J L, Feng J X, *et al.* A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. Mol Microbiol, 1997, **24**(3): 555-566
- [21] Yu Y, Ma J, Guo Q, *et al.* A novel 3-oxoacyl-ACP reductase (FabG3) is involved in the xanthomonadin biosynthesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol Plant Pathol, 2019, **20**(12): 1696-1709
- [22] Hu Z, Dong H, Ma J C, *et al.* Novel *Xanthomonas campestris* long-chain-specific 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase involved in diffusible signal factor synthesis. MBio, 2018, **9**(3): e00596-00518
- [23] 余永红, 马建荣, 王海洪. 野油菜黄单胞菌中烯脂酰 ACP 还原酶的功能鉴定. 生物化学与生物物理进展, 2016, **43**(5): 514-522
Yu Y H, Ma J R, Wang H H. Prog Biochem Biophys, 2016, **43**(5): 514-522
- [24] 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
- [25] 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, (8): 954-963
Feng S X, Zhu L, Luo B, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2008, (8): 954-963
- [26] Mao Y H, Mao J C, Li F, Hu Z, *et al.* *Ralstonia solanacearum* RSp0194 encodes a novel 3-keto-acyl carrier protein synthase III. Plos One, 2015, **10**(8): e0136261
- [27] Qian W, Jia Y, Ren S X, *et al.* Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Genome Res, 2005, **15**(6): 757-767
- [28] 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
- [29] 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

Biological Function Research of 3-Hydroxylacyl-ACP Dehydratase in *Xanthomonas campestris**

MA Jian-Rong^{1)**}, CHEN Cheng^{2)**}, YAN Ming-Feng²⁾, LI Xian-Qi²⁾,
ZHANG Wen-Bin²⁾, YU Yong-Hong^{1)***}

⁽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 In bacteria fatty acids are synthesized by type II fatty acid synthase system, in which 3-hydroxylacyl - ACP dehydratase is one of the key enzymes for bacterial growth. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) causes black rot disease to all cruciferous plants, and great economic losses to the world. To study the 3-hydroxylacyl-ACP dehydratase in *Xcc*, *XC_2876* (*XcfabZ*) was found based on the sequence alignment with *E. coli* FabZ. Moreover, XcFabZ shows 46.1% amino acid sequence identity with EcFabZ, and contains the conservative α -helix structure and active residue. *XcfabZ* was able to genetically complement the *EcfabZ* knock out mutant *E.coli* HW7 to restore the growth with inducer IPTG. *In vitro* assay also identified XcFabZ was able to dehydrated 3-hydroxyacyl-ACP in the initial and elongation reactions. However, *XcfabZ* in the chromosome could not be deleted directly, indicating *XcfabZ* is essential for growth. When expression plasmids harboring *EcfabZ* or *XcfabZ* was introduced, respectively, *XcfabZ* deletion mutants were constructed. The *EcfabZ* replaced mutant showed different fatty acid compositions, much lower tolerance to stressful conditions (high salty, low pH, H₂O₂ and SDS), and decreased motility compared to the wild-type. While mutant with *XcfabZ* in the plasmid showed similar phenotype to wild-type. These data demonstrated both XcFabZ and EcFabZ show 3-hydroxylacyl-ACP dehydratase activity, but they may contains different biological function *in vivo*.

Key words *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), 3-hydroxylacyl-ACP dehydratase, fatty acid synthesis

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0310

* This work was supported by grants from the Guangzhou Science and Technology Plan Project (202002030422), The National Natural Science Foundation of China (31601601), Special Fund for Scientific and Technological Innovation Cultivation of Guangdong University Students (Climbing plan) (pdjh2020b1010), Science Foundation of Guangdong Food & Drug Vocational College (2019ZR13, 2019ZR17) and Open Research of Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms (PFRAO201804).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-20-29164616, E-mail: yuyh@gdyzy.edu.cn

Received: August 26, 2020 Accepted: December 16, 2020