

茄科雷尔氏菌脂酰-CoA 合成酶的功能鉴定

余永红^{1,3} 段园园^{2,3} 董会娟³ 马建荣¹ 王海洪^{3*}

(1. 广东食品药品职业学院 广东 广州 510520)

(2. 河南省三门峡市卢氏县第一高级中学 河南 三门峡 472200)

(3. 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 广东 广州 510642)

摘要:【目的】茄科雷尔氏菌是一种常见的农作物致病菌,引起植物青枯病。研究其脂肪酸代谢途径将有助于寻找新的抗菌药物靶点,为防治青枯病害提供新的思路。【方法】利用大肠杆菌 FadD 序列,进行同源比对发现茄科雷尔氏菌 GMI1000 中 RSc2857(RsFadD)具有较高的相似性,推测其具有脂酰-CoA 合成酶活性。采用 PCR 扩增方法获得 *RsfadD* 基因,连入表达载体 pBAD24M 后互补大肠杆菌 *fadD* 突变株,并检测转化子的生长情况。*RsfadD* 与 pET-28b 连接后,在大肠杆菌 BL(DE3)中表达,并利用 Ni-NTA 纯化获得带有组氨酸标签的 RsFadD,体外测定 RsFadD 的活性。利用同源重组方法,获得 *RsfadD* 敲除突变株,分析突变株的生长性状。【结果】*RsfadD* 异体互补大肠杆菌 *fadD* 突变株,恢复突变株在以脂肪酸为碳源的基础培养基上生长。体外活性测定 RsFadD 具有脂酰-CoA 合成酶活性,对不同链长的脂肪酸都具有活性,但活性低于大肠杆菌 FadD。*RsfadD* 突变株在添加不同链长脂肪酸的基础培养基上仅能微弱生长,而在丰富培养基上生长无差异。【结论】茄科雷尔氏菌中 *RsfadD* 编码脂酰-CoA 合成酶,在脂肪酸利用过程中发挥重要作用。但 *RsfadD* 突变株在基础培养基上微弱生长,说明茄科雷尔氏菌基因组中还有其他的脂酰-CoA 合成酶基因。以上研究结果为进一步研究茄科雷尔氏菌中脂酰-CoA 合成酶以及脂肪酸利用机制奠定了基础。

关键词: 茄科雷尔氏菌,脂肪酸代谢,脂酰-CoA 合成酶

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31601601, 31671987); Science Foundation of Guangdong Food & Drug Vocational College (No. 2015YZ006)

***Corresponding author:** Tel: 86-20-85281389; E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

Received: September 26, 2016; **Accepted:** November 24, 2016; **Published online** (www.cnki.net): December 05, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31601601, 31671987); 广东食品药品职业学院院级课题资助项目 (No. 2015YZ006)

***通讯作者:** Tel: 86-20-85281389; E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

收稿日期: 2016-09-26; **接受日期:** 2016-11-24; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-12-05

Identification and function research of the fatty acyl-CoA synthetase in *Ralstonia solanacearum*

YU Yong-Hong^{1,3} DUAN Yuan-Yuan^{2,3} DONG Hui-Juan³ MA Jian-Rong¹
WANG Hai-Hong^{3*}

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

(2. The First Senior High School of Lushi County, Sanmenxia, He'nan 472200, China)

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

Abstract: [Objective] *Ralstonia solanacearum*, a devastating, soil-borne plant pathogen, causes a bacterial wilt disease in diverse plants. Studies on the metabolic mechanisms of fatty acids will facilitate the discovery of novel methods or biopesticides to efficiently control the bacterial wilt disease. [Methods] *RSc2857 (RsfadD)* gene was found in the genome of *Ralstonia solanacearum* GMI1000 through sequence alignment with *Escherichia coli* FadD, which was annotated to encode a fatty acyl-CoA synthetase (FACS). For complementation analysis, *RsfadD* gene was amplified by PCR, and was ligated into an expression vector pBAD24M, which was subsequently transferred into an *E. coli fadD* mutant JW1794. The growth of transformant was analyzed. *RsfadD* was also fused in-frame to pET-28b, and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The hexahistidine-tagged RsFadD was purified by Ni-NTA, and the activity was analyzed *in vitro*. *RsfadD* deletion mutant was obtained by homologous recombination, and the mutant growth was also analyzed. [Results] *RsfadD* conferred the *E. coli fadD* mutant to grow on the minimal medium with fatty acids as the sole carbon source. *In vitro* enzymatic analysis demonstrated that RsFadD has FACS activity, and could utilize fatty acids of different chain lengths as substrates to form fatty acyl-CoAs. While the activity of RsFadD was lower than that of *E. coli* FadD. *RsfadD* deletion mutant grew well on nutritional medium, but grew weak on the minimal medium with fatty acids as the sole carbon source. [Conclusion] All of above suggested that *RsfadD* encodes a FACS, which plays an important role in fatty acids utilization. The weak growth of *RsfadD* deletion mutant on the minimal medium indicated other genes encoding FACS may exist in the genome. This study will contribute to further research about FACS and fatty acids utilizing mechanism in *R. solanacearum*.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, Fatty acid metabolism, Fatty acyl-CoA synthetase

脂肪酸氧化分解产生能量是生物体主要能量来源之一,其中主要的氧化形式是 β -氧化。外源及内源性的脂肪酸进入 β -氧化前必须进行活化,生成脂酰辅酶A (CoA)^[1]。脂酰-CoA 合成酶(Fatty acyl-CoA synthetase, FACS)在 CoA 和 ATP 存在的条件下催化游离脂肪酸合成脂酰-CoA,反应分两步进行,首先 FACS 催化游离脂肪酸与 ATP 结合生成脂酰-AMP,然后催化脂酰-AMP 与 CoA 结合生成脂酰-CoA^[2]。在细菌细胞内,长链脂酰-CoA 可参与磷脂的合成,或直接进入氧化分解过程,产生的乙酰-CoA 和 NADH,进入三羧酸循环和电子传递链,供应机体所需的大量能量^[3]。

在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, *fadD* 基因编码

唯一的脂酰-CoA 合成酶,将跨膜转运的外源脂肪酸活化生成脂酰-CoA^[4]。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)基因组中含有 6 个 *fadD* 同源基因 *fadD1*–*fadD6*,都能互补大肠杆菌 *fadD* 突变株,参与不同链长脂肪酸的氧化分解,但不同 *FadD* 的底物专一性不同,其中 *FadD4* 在脂肪酸氧化分解中起关键作用^[5-6]。恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)基因组编码两个脂酰-CoA 合成酶 *FadD1* 和 *FadD2*,其中 *FadD1* 在脂肪酸代谢中起主要作用,而 *FadD2* 只有在 *FadD1* 失活时才表现功能^[7]。苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) *FadD* 还参与菌体的运动性、生物被膜的形成以及植物根部定殖等过程^[8]。

茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)又名青

枯菌,一种常见的农作物致病菌,引起细菌性青枯病^[9]。茄科雷尔氏菌寄主范围极为广泛,可侵染54个科的450余种植物,其中马铃薯、番茄、烟草等茄科作物受害最为严重,在世界范围引起重大经济损失^[9-10]。茄科雷尔氏菌引起植株萎蔫的致病机制十分复杂,其脂肪酸代谢途径为群体感应信号分子等致病相关因子的合成提供前体。因此,研究脂肪酸代谢途径将有助于寻找新的抗菌药物靶点,为抵抗植物青枯病害提供新的思路^[11-12]。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,研究了茄科雷尔氏菌 GMI1000 中脂酰-CoA 合成酶 RsFadD 在脂肪酸代谢等方面的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 研究所用到的大肠杆菌菌株有 BW25113 (野生型)、S17-1、DH-5 α 、BL21(DE3)、*fadD* 突变株 JW1794 和茄科雷尔氏菌 GMI1000。使用的质粒有 pSRK-Km^[13]、pBAD24M、pET-28b 和 pK18mobsacB,其他载体均为上述质粒的衍生质粒(具体构建过程见下文),具体细菌菌株和质粒见表 1。BG (g/L: 细菌酪蛋白 10.0, 酵母提取物 1.0, 水解酪蛋白酸 1.0, 葡萄糖 5.0)用作培养茄科雷尔氏菌的丰富培养基, M9 (g/L: Na₂HPO₄ 6.0, KH₂PO₄ 3.0, NaCl 0.5, NH₄Cl 0.1, CaCl₂ 0.007 5,

表 1 菌株及质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株及质粒 Strains or plasmids	特征 Characteristics	来源 Source
<i>E. coli</i> strains		
BL21(DE3)	<i>ompT hsdS B</i> (rB ⁻ mB ⁻) (DE3)	Lab collection
DH-5 α	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1recA1hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺)	Lab collection
S17-1	Tc ^r Sm ^r , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> ⁻ M ^r RP4::2-Tc::Mu: Km::Tn7, <i>λpir</i>	Lab collection
BW25113	Wild type strain of <i>E. coli</i> K-12	Lab collection
JW1794	BW25113 <i>fadD</i> ::Km, <i>fadR</i> ⁻	Lab collection
JW-HB1	JW1794 complemented with pDY03	This study
JW-HB2	JW1794 complemented with pDY04	This study
JW-HB3	JW1794 complemented with pBAD24M	This study
<i>R. solanacearum</i> strains		
GMI1000	Wide type	Lab collection
RsYH1	Cm ^r , Km ^r , pDY07 in GMI1000	This study
RsYH2	Cm ^r , GMI1000 Δ <i>fadD</i>	This study
RsYH3	Cm ^r , Km ^r , GMI1000 Δ <i>fadD</i> /pDY08	This study
Plasmids		
pMD19	Amp ^r , T-vector	TaKaRa
pBAD24M	Amp ^r , expression vector	Lab collection
pET-28b	Km ^r , expression vector	Lab collection
pK18mobsacB	Km ^r , conjugation vector	Lab collection
pSRK-Km	Km ^r , broad-host-range expression vector containing <i>lac</i> promoter and <i>lacI</i> ^r , <i>lacZ</i> ⁺	[13]
pDY01	Amp ^r , <i>E. coli fadD</i> gene in T-vector	Lab collection
pDY02	Amp ^r , <i>R. solanacearum fadD</i> gene in T-vector	This study
pDY03	Amp ^r , <i>EcfadD</i> in pBAD24M	This study
pDY04	Amp ^r , <i>RsfadD</i> in pBAD24M	This study
pDY05	Km ^r , <i>EcfadD</i> in pET-28b	This study
pDY06	Km ^r , <i>RsfadD</i> in pET-28b	This study
pDY07	Km ^r , <i>RsfadD</i> in-frame deletion fragment inserted to pK18mobsacB between <i>EcoR</i> I/ <i>Hind</i> III sites	This study
pDY08	Km ^r , <i>RsfadD</i> in pSRK-Km	This study

MgSO₄ 0.12, 水解酪蛋白酸 1.0)作为检测茄科雷尔氏菌脂肪酸合成缺陷菌株的基础培养基, 脂肪酸添加浓度为 0.2% (质量体积比), 同时添加 1% (质量体积比)聚氧乙烯醚(Brij-58)作为助溶剂。抗生素的使用浓度如下: 30 mg/mL 氯霉素(Cm)、100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)、30 mg/L 卡那霉素(Km)。诱导剂 L-阿拉伯糖(Ara)使用浓度为 0.02%, 异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)使用浓度为 1 mmol/L。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 和 *Pfu* DNA 聚合酶、Marker DL2000、标准蛋白质、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; 氯霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG、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生物工程(上海)股份有限公司完成。恒温摇床、恒温培养箱、超净工作台, 上海智城分析仪器制造有限公司; PCR 仪、电泳仪, 北京东胜创新生物科技有限公司; 分光光度计、气相色谱质谱联用仪, 日本岛津公司。

1.2 DNA 重组技术

分别以大肠杆菌 BW25113 和茄科雷尔氏菌 GMI1000 基因组为模板, 以表 2 中所列引物 PCR 分别扩增获得大肠杆菌 *fadD* (*EcfadD*)和茄科雷尔氏菌 *fadD* (*RsfadD*)基因。扩增产物纯化后分别连入 pMD19-T 载体, 通过测序验证获得质粒 pDY01(*EcfadD*)和 pDY02(*RsfadD*)。而后用 *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 pDY03(*EcfadD*)、pDY04(*RsfadD*); 克隆到 pET-28b 上获得 pDY05(*EcfadD*)、pDY06(*RsfadD*)。 *RsfadD* 还克隆到 pSRK-Km 载体上获得 pDY08。

1.3 茄科雷尔氏菌 *fadD* 突变株的构建

以茄科雷尔氏菌 GMI1000 基因组 DNA 为模板, 分别 PCR 扩增 *RsfadD* 基因上下游约 500 bp 片段, 回收后通过融合 PCR 技术将各自上下游片段融合, 获得 *RsfadD* (UpDn), 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后连接到 pK18mobsacB 上, 获得质粒 pDY07。

表 2 所用引物序列		
Table 2 Sequences of the PCR primers		
引物名称	序列	长度
Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>RsfadD Nde</i> I	AGG <u>CATATG</u> GAGAAACCG	32
	TGGCTGAAGCACTA	
<i>RsfadD Hind</i> III	CCCAAGCTTTTGCCTTACG	30
	CGCGCTTCTTCA	
<i>EcfadD Nde</i> I	AGG <u>CATATG</u> AAGGTTTGG	25
	CTTAACCG	
<i>EcfadD Hind</i> III	AATA <u>AAGCTT</u> TTCAGGCTTTA	30
	TTGTCCACTTTG	
<i>RsfadD P1 EcoR</i> I	TA <u>GGAATT</u> CATGGAGAAA	29
	CCGTGGCTGAA	
<i>RsfadD P2</i>	CCTGCGGACGCGTGGCCA	30
	CGACGATGTGCT	
<i>RsfadD P3</i>	CTGGGCCAGCGGTCCGCA	30
	GGTCATGGCCGG	
<i>RsfadD P4 Hind</i> III	ACTA <u>AAGCTT</u> ACGCGCGCT	26
	TCTTCATCG	
<i>RsfadD</i> check up	TGTCTGGTGACGCGTGCC	18
<i>RsfadD</i> check down	ATCGACATTGCCAGGAGA	19

注: 引物中下划线序列为引入的酶切位点。
Note: The underlined sequences are the introduced restriction sites.

将 pDY07 分别转化大肠杆菌 S17-1 后, 与茄科雷尔氏菌 GMI1000 在 BG 平板上 30 °C 共培养 48 h, 然后用 1 mL BG 培养基将培养物悬浮, 稀释到 10⁻² 后涂布于含有 Cm、Km 的 BG 平板, 30 °C 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 *RsfadD* P1 和 P4 进行 PCR 检测, 获得一次重组菌株 *RsYH1*。进一步将一次重组菌株在添加 BG (Cm)中培养 36 h 后, 涂布于含有 Cm 和 10%蔗糖的 BGS 平板, PCR 筛选出 *RsfadD* 被敲除的二次重组菌株 *RsYH2*。

1.4 蛋白质的表达与分离纯化

将表达质粒 pDY05(*EcfadD*)和 pDY06(*RsfadD*) 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, *FadD* 蛋白表达与分离纯化参照文献[14-15]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 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, 以及茄科雷尔氏菌 *Rsp1094*, 并且体外合成己酰 ACP、辛酰 ACP、

癸酰 ACP 以及月桂酰 ACP。

1.5 脂酰-CoA 合成酶体外功能检测与催化活性测定

体外检测 FadD 是否具有脂酰-CoA 合成酶活性参照文献[15]。具体做法如下：反应体系 50 μ L，含有 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)，50 μ mol/L NADH，50 μ mol/L NADPH，1 mmol/L β -巯基乙醇，100 μ mol/L 丙二酸单酰-CoA，1 mmol/L CoA，50 μ mol/L Holo-ACP，25 mmol/L $MgCl_2$ ，25 mmol/L ATP，100 μ mol/L 不同链长脂肪酸，大肠杆菌 FabD、FabG、FabA、FabI 各 0.1 μ g，反应在添加不同来源的 0.1 μ g FadD 后 37 $^{\circ}C$ 保温 1 h，用分离胶浓度为 17.5%，且含有 2.5 mol/L 尿素的非变性蛋白质凝胶电泳进行分析。

脂酰-CoA 合成酶活性测定参照文献[5]进行，检测反应体系中辅酶 A (CoA-SH) 的减少量。反应体系为 0.15 mol/L Tris-HCl (pH 7.2)，1 mmol/L 辅酶 A (CoA)，10 mmol/L $MgCl_2$ ，2 mmol/L EDTA，0.1% Triton X-100，1 mmol/L 脂肪酸，1 μ g FadD，37 $^{\circ}C$ 孵育。每 20 s 取 75 μ L 反应体系加入到 600 μ L 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB，0.4 mmol/L) 溶液中，测定 412 nm 处吸光值。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

脂酰-CoA 合成酶(FACS)催化脂肪酸的羧基连

上辅酶 A (CoA)，形成脂酰-CoA (图 1A)，是脂肪酸利用的关键步骤。茄科雷尔氏菌 GMI1000 基因组已完成测序^[18]。利用大肠杆菌脂酰-CoA 合成酶 (EcFadD) 序列同源比对 GMI1000 基因组，结果发现 *RSc2857* (命名为 *RsfadD*) 为大肠杆菌 *fadD* 的同源基因，注释为脂酰-CoA 合成酶，处于功能未知的基因簇中。*RsFadD* 含有 569 个氨基酸残基，与 EcFadD 的序列相似性为 72%，一致性为 57%。EcFadD 含有两个高度保守的序列元件，ATP/AMP 识别位点和脂肪酸结合位点^[19]。进一步序列分析发现 *RsFadD* 也含有这两个保守元件，仅有个别氨基酸差异(图 1B、1C)。根据生物学信息学分析结果，推测 *RsfadD* 编码脂酰-CoA 合成酶，在脂肪酸代谢过程中具有重要作用。为验证这一观点，本课题组对其进行了以下研究。

2.2 遗传互补大肠杆菌 *fadD* 突变株

大肠杆菌 JW1794 是野生菌 BW25113 中 *fadD* 的插入失活突变株，该菌株在基础培养基中需添加油酸才能恢复生长^[20]。为验证 *RsfadD* 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 pDY04(*RsfadD*)。将 pDY03(*EcfadD*) 和 pDY04(*RsfadD*) 转化大肠杆菌 JW1794，并检测转化子在添加油酸的基础培养基上的生长情况，结果如图 2 所示。大肠杆菌 JW1794 以及空载体 pBAD24M 转化子都不能生长，pDY03(*EcfadD*) 的转

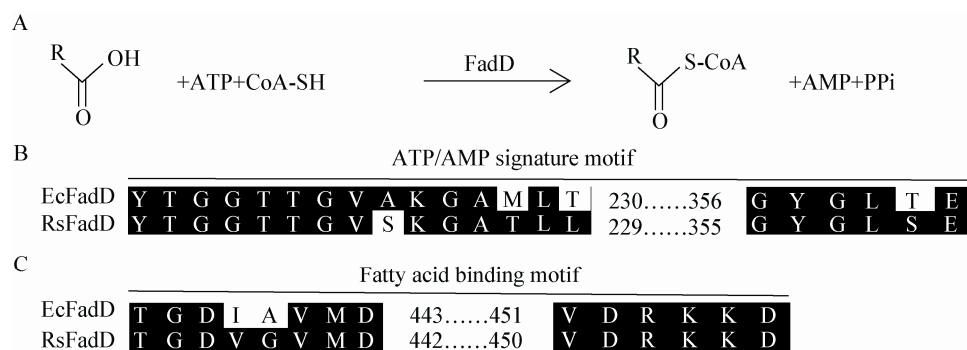


图 1 脂酰-CoA 合成酶催化反应以及 *RsFadD* 保守元件比对

Figure 1 FACS catalyzed reaction and alignment of *RsFadD* conserved motifs

注：A：脂酰-CoA 合成酶催化的反应；B：ATP/AMP 识别位点序列比对；C：脂肪酸结合位点序列比对。

Note: A: FACS catalyzed reaction; B: Alignment of ATP/AMP signature motif; C: Alignment of fatty acid binding motif.

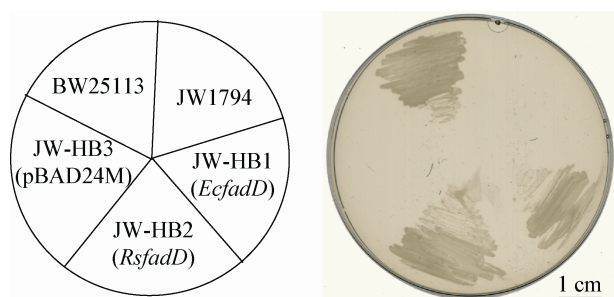


图2 *RsfadD* 基因互补大肠杆菌 *fadD* 突变株 JW1794
Figure 2 Complementation of *E. coli fadD* mutant JW1794 with *RsfadD*

化子能正常生长, 而 pDY04(*RsfadD*)的转化子也能生长, 但生长弱于野生菌。以上结果说明 *RsfadD* 基因编码产物具有脂酰-CoA 合成酶活性, 能互补大肠杆菌 *fadD* 的突变。

2.3 茄科雷尔氏菌 *FadD* 的表达纯化与酶学分析
为进一步研究 RsFadD 在体外的生物学功能, 将 *RsfadD* 克隆到 pET-28b 上, 获得表达质粒 pDY06(*RsfadD*)。将 pDY06 转化大肠杆菌 BL(DE3)

后, 在 37 °C 诱导蛋白质表达, 结果显示 RsFadD 能可溶性表达(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 RsFadD。经 SDS-PAGE 检测为单一条带, 分子量为 63.3 kD。与推测的分子量相符, 表明纯化成功(图 3A)。

大肠杆菌 *FadD* (*EcFadD*)能以中长链脂肪酸和辅酶 A (CoA)为底物, 催化生成脂酰-CoA。为检测 RsFadD 是否有具有类似功能, 本课题组首先以不同链长的脂肪酸为底物, 添加 RsFadD 合成脂酰-CoA, 但产物不容易检测。茄科雷尔氏菌中 *FabW*(RSp0194)为一种新型的 3-酮脂酰 ACP 合成酶 III, 能催化不同链长的脂酰-CoA 和丙二酸单酰 ACP (Malonyl-ACP)聚合, 合成 3-酮脂酰 ACP, 可进一步被 3-酮脂酰 ACP 还原酶(*FabG*)、3-酮脂酰 ACP 脱水异构酶(*FabA*)、烯脂酰 ACP 还原酶(*FabI*)催化生成延长两个碳原子的脂酰 ACP^[16]。利用该策略, 我们以合成的脂酰-CoA 为底物, 体外重建脂肪酸合成体系(图 3B)。由图 3 可见, RsFadD 能

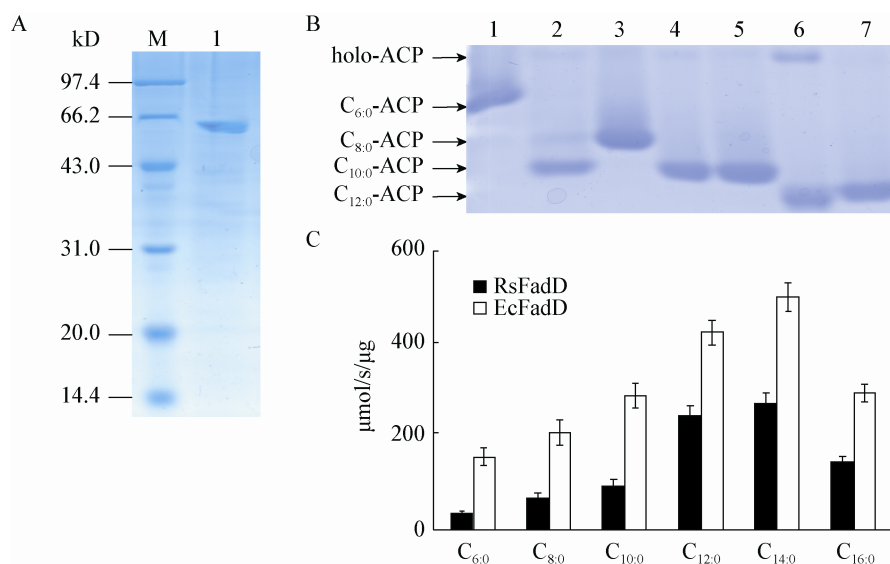


图3 RsFadD 对不同链长脂肪酸的酶活性分析

Figure 3 Enzymatic characterization of RsFadD with fatty acids of different chain length

注: A: RsFadD 纯化; B: RsFadD 催化产物电泳分析。1、3、5、7 分别为己脂酰 ACP (C_{6:0}-ACP)、辛脂酰 ACP (C_{8:0}-ACP)、癸脂酰 ACP (C_{10:0}-ACP)、月桂酰 ACP (C_{12:0}-ACP), 2、4、6 分别以正己酸(C_{6:0})、正辛酸(C_{8:0})、正癸酸(C_{10:0})为底物催化生成的产物; C: 测定 RsFadD 对不同链长脂肪酸催化活性。

Note: A: RsFadD purification. M: Protein marker, 1: RsFadD; B: Electrophoretic analysis of products catalyzed by RsFadD. The migration positions of hexanoyl-ACP (C_{6:0}-ACP), octanoyl-ACP (C_{8:0}-ACP), capryl-ACP (C_{10:0}-ACP) and lauryl-ACP (C_{12:0}-ACP) are shown in lane 1, 3, 5, 7 respectively; C: Activity determination of RsFadD with fatty acids of different chain length.

以正辛酸($C_{8:0}$)为底物合成辛脂酰-CoA ($C_{8:0}$ -CoA), 进一步被 RsFabW/G/A/I 催化延伸生成癸脂酰 ACP ($C_{10:0}$ -ACP) (lane 4)。与此类似, RsFadD 催化生成癸脂酰-CoA ($C_{10:0}$ -CoA), 而后被催化延伸生成月桂酰 ACP ($C_{12:0}$ -ACP) (lane 6); RsFadD 也能催化生成己脂酰-CoA ($C_{6:0}$ -CoA), 进一步催化延伸生成辛脂酰 ACP ($C_{8:0}$ -ACP), 但由于 RsFabW 能继续催化辛脂酰 ACP 与丙二酸单酰 ACP 缩合, 最终生成癸脂酰 ACP ($C_{10:0}$ -ACP) (lane 2)。以上结果再次证明, RsFadD 具有脂酰-CoA 活性。

本课题组进一步利用分光光度法测定了 RsFadD 对不同链长脂肪酸的催化活性, 结果如图 3 C 所示。与 EcFadD 类似, RsFadD 对中长链脂肪酸($C_{6:0}$ - $C_{16:0}$)都具有活性, 且活性随着链长的增加而升高, 对肉豆蔻酸($C_{14:0}$)活性最高, 而后对棕榈酸($C_{16:0}$)的催化活性稍有下降。但 RsFadD 对不同链长脂肪酸($C_{6:0}$ - $C_{16:0}$)的催化活性较低, 约为 EcFadD 催化活性的 50%。

2.4 茄科雷尔氏菌 *RsfadD* 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茄科雷尔氏菌 *fadD* 编码脂酰-CoA 合成酶。为进一步

在细胞内研究 *RsfadD* 的生理功能, 我们按照图 4A 的策略构建 *RsfadD* 敲除突变株。首先构建了含有 *RsfadD* 上下游序列的自杀性载体 pDY07, 转化大肠杆菌 S17-1 后, 通过接合作用导入茄科雷尔氏菌 GMI1000, 在 BG (Cm 和 Km) 平板筛选获得一次重组菌株 RsYH1。将 RsYH1 培养后涂布于含有 10% 蔗糖的 BG (Cm) 平板, 筛选出对 Km 敏感的备选菌株, 用引物 *RsfadD* Check Up 和 Check Down (表 1) 进行 PCR 检测, 筛选到只扩增出约 1.0 kb 特异条带的菌株, 并对其基因组 *fadD* 上下游区域进行测序(图 4B、4C)。结果显示染色体上 *fadD* 被成功敲除, 获得基因敲除突变株 RsYH2。进一步将 *RsfadD* 表达质粒 pDY08 导入突变株 RsYH2, 获得回补菌株 RsYH3。

2.5 茄科雷尔氏菌 *RsfadD* 突变株性状分析

首先测定了 *RsfadD* 突变株 RsYH2 在丰富培养基 BG 上的生长情况, 结果显示 RsYH2 生长与野生菌 GMI1000 无明显差异(结果未列), 对盐、酸的敏感性以及运动性等方面, 都与野生菌无差异(结果未列)。进一步检测了野生菌与突变株在以不同链长脂肪酸作为唯一碳源的培养基上的生长情况, 结果如表 3 所示。野生菌 GMI1000 能利用不同链长的脂

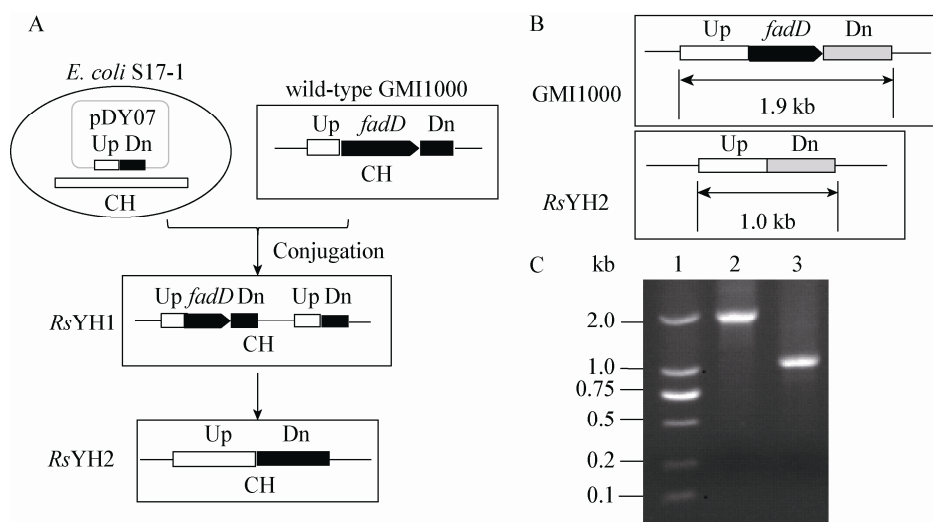


图 4 *RsfadD* 敲除突变株 RsYH2 的构建

Figure 4 Construction of *RsfadD* deletion mutant RsYH2

注: A: *RsfadD* 突变株的构建策略; B: 野生菌与突变株中 *fadD* 区域分析; C: 野生菌与突变株 *fadD* 区域 PCR 扩增。

Note: A: Strategy of RsYH2 isolation; B: Genetic organization of the *fadD* region in GMI1000 or RsYH2; C: PCR analysis of genomic DNA from GMI1000 (lane 2) and RsYH2 (lane 3). CH: Chromosome; Up: The upstream fragment of *RsfadD*; Dn: The downstream fragment of *RsfadD*.

表 3 茄科雷尔氏菌在不同碳源培养基上的生长情况
Table 3 Growth of *R. solanacearum* strains on different carbon sources

Strains	C _{6:0}	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:1}
GMI100	+4	+4	+5	+3	+3	+2	+5
<i>RsYH2</i>	+1	+2	+2	+1	+1	—	—
<i>RsYH3</i>	+2	+3	+3	+2	+2	+1	+2

注: —: 平板上没有生长; +: 培养 6 d 后能生长。其中+1 为极微弱生长, +5 为生长良好。

Note: —: No growth on a plate; +: Growth after 6 days. +1: Very little growth; +5: Heavy growth.

肪酸作为碳源, 能正常生长, 但 *RsfadD* 突变株 *RsYH2* 生长显著减弱, 在添加棕榈酸(C_{16:0})或异油酸(C_{18:1})的平板上不能生长。回补菌株 *RsYH3* 生长较突变株 *RsYH2* 有一定程度的恢复, 但仍生长较弱。这一结果证明 *RsfadD* 编码脂酰-CoA 合成酶, 在脂肪酸的利用中起重要作用, 但突变株 *RsYH2* 还能微弱生长, 说明茄科雷尔氏菌中可能还有其他编码脂酰-CoA 合成酶的基因。

3 结论与讨论

在模式生物大肠杆菌中, 外膜蛋白 FadL 将长链脂肪酸转运进入细胞质后, 脂酰-CoA 合成酶(FadD)将其催化形成脂酰-CoA, 进入 β -氧化产生大量的乙酰-CoA 和 ATP, 因此 FadD 在脂肪酸利用中具有重要功能。茄科雷尔氏菌能侵染广泛的寄主, 引起危害巨大的青枯病, 在世界范围造成重大经济损失, 因而开发针对性的抗菌药物是防控黑腐病的重要途径。脂肪酸在茄科雷尔氏菌的信号分子合成与致病性等方面都具有重要作用, 本课题组已对其脂肪酸合成相关多个基因功能进行了深入研究^[21-22], 但国内外还没有关于茄科雷尔氏菌脂酰-CoA 合成酶的报道。

本文利用生物信息学方法, 同源比对发现茄科雷尔氏菌 *RSc2857(RsfadD)* 为大肠杆菌 *fadD* 的同源基因, 编码蛋白具有较高的序列相似性, 以及保守的 ATP/AMP 识别位点和脂肪酸结合位点。异体遗传互补实验结果显示 *RsfadD* 能恢复大肠杆菌 *fadD* 突变株在以脂肪酸为唯一碳源的基础培养基上的

生长; 体外活性检测也证明 *RsFadD* 为脂酰-CoA 合成酶; *RsfadD* 突变株在以脂肪酸为唯一碳源的基础培养基上生长较野生菌显著变弱。以上结果都证明, *RsfadD* 编码脂酰-CoA 合成酶, 在脂肪酸利用过程中发挥重要作用。

大肠杆菌 *fadD* 是其基因组中唯一的脂酰-CoA 合成酶基因, *fadD* 突变株不能在以脂肪酸为唯一碳源的基础培养基上生长。但 *RsfadD* 突变株在该培养基上能微弱生长, 表明茄科雷尔氏菌可能在含有其他的脂酰-CoA 合成酶突变株中发挥作用。在铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌中都已报道了多个脂酰-CoA 合成酶基因^[6-7], 也印证了上述推测。因此综合利用多种生物学方法, 研究茄科雷尔氏菌中其他脂酰-CoA 合成酶生物功能, 将是进一步研究的方向。

体外活性测定结果显示, *RsFadD* 对不同链长脂肪酸的活性都要低于大肠杆菌 *FadD* (*EcFadD*)。文献报道, *EcFadD* 的 ATP/AMP 识别位点中第 361 位谷氨酸是活性关键位点^[2], 而 *RsFadD* 在第 360 位(按照 *EcFadD* 序列, 图 1B)苏氨酸突变为丝氨酸, 推测一定程度上影响了催化活性。

野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)中 *RpfB* 为脂酰-CoA 合成酶, 对不同链长的脂肪酸具有催化活性, 在信号分子 DSF (Diffusible signal factor)降解以及短链脂肪酸利用中发挥重要作用^[20,23]。本文测定结果显示, *RsFadD* 对不同链长脂肪酸也都具有活性, 推测 *FadD* 还可能参与 β -氧化之外的其他途径。催化生成的长链脂酰-CoA (>C_{10:0})在细胞内可进行 β -氧化, 或参与膜磷脂的合成, 而中短链长的脂酰-CoA (C_{6:0}—C_{10:0})可作为茄科雷尔氏菌 *FabW* 的底物, 重新与丙二酸单酰-ACP (Malonyl-ACP)聚合, 生成长链脂肪酸或其他生物活性分子, 因此, 我们推测 *RsFadD* 还参与短链脂肪酸的回收利用。

参 考 文 献

- [1] Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 232 (in Chinese)

- 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 232
- [2] Weimar JD, Dirusso CC, Delio R, et al. Functional role of fatty acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(33): 29369-29376
- [3] Li M, Zhang XJ, Agrawal A, et al. Effect of acetate formation pathway and long chain fatty acid CoA-ligase on the free fatty acid production in *E. coli* expressing acy-ACP thioesterase from *Ricinus communis*[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(4): 380-387
- [4] Black PN, Dirusso CC, Metzger AK, et al. Cloning, sequencing, and expression of the *fadD* gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(35): 25513-25520
- [5] Kang Y, Zarzycki-Siek J, Walton CB, et al. Multiple FadD acyl-CoA synthetases contribute to differential fatty acid degradation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13557
- [6] Zarzycki-Siek J, Norris MH, Kang Y, et al. Elucidating the *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid degradation pathway: identification of additional fatty acyl-CoA synthetase homologues[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64554
- [7] Olivera ER, Carnicero D, García B, et al. Two different pathways are involved in the β -oxidation of *n*-alkanoic and *n*-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications[J]. Molecular Microbiology, 2001, 39(4): 863-874
- [8] Pech-Canul Á, Nogales J, Miranda-Molina A, et al. FadD is required for utilization of endogenous fatty acids released from membrane lipids[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(22): 6295-6304
- [9] Hayward AC. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*[J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29(1): 65-87
- [10] Mole BM, Baltrus DA, Dangel JL, et al. Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria[J]. Trends in Microbiology, 2007, 15(8): 363-371
- [11] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2001, 55(1): 165-199
- [12] Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, et al. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*[J]. Molecular Microbiology, 1997, 26(2): 251-259
- [13] Khan SR, Gaines J, Roop II RM, 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16): 5053-5062
- [14] Yu YH, Hu Z, Dong HJ, et al. *Xanthomonas campestris* FabH is required for branched-chain fatty acid and DSF-family quorum sensing signal biosynthesis[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32811
- [15] Mao YH, Li F, Ma JC, et al. *Sinorhizobium meliloti* functionally replaces 3-oxoacyl-Acyl Carrier Protein reductase (FabG) by overexpressing NodG during fatty acid synthesis[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2016, 29(6): 458-467
- [16] Mao YH, Ma JC, Li F, et al. *Ralstonia solanacearum* RSp0194 encodes a novel 3-keto-Acyl Carrier Protein Synthase III[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136261
- [17] Zhu L, Bi HK, Ma JC, et al. The two functional enoyl-Acyl Carrier Protein reductases of *Enterococcus faecalis* do not mediate triclosan resistance[J]. mBio, 2013, 4(5): e00613-13
- [18] Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. Nature, 2002, 415(6871): 497-502
- [19] Gulick AM. Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase[J]. ACS Chemical Biology, 2009, 4(10): 811-827
- [20] Bi HK, Yu YH, Dong HJ, et al. *Xanthomonas campestris* RpfB is a fatty Acyl-CoA ligase required to counteract the thioesterase activity of the RpfF diffusible signal factor (DSF) synthase[J]. Molecular Microbiology, 2014, 93(2): 262-275
- [21] Feng SX, Ma JC, Yang J, et al. *Ralstonia solanacearum* fatty acid composition is determined by interaction of two 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductases encoded on separate replicons[J]. BMC Microbiology, 2015, 15(1): 223
- [22] Cheng JL, Ma JC, Lin JS, et al. Only one of the five *Ralstonia solanacearum* long-chain 3-ketoacyl-Acyl Carrier Protein synthase homologues functions in fatty acid synthesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(5): 1563-1573
- [23] Zhou L, Wang XY, Sun S, et al. Identification and characterization of naturally occurring DSF-family quorum sensing signal turnover system in the phytopathogen *Xanthomonas*[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(11): 4646-4658