



董会娟, 余永红, 王海洪, 等. 野油菜黄单胞菌中长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶的鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(2): 49-54.

野油菜黄单胞菌中长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶的鉴定

董会娟¹, 余永红², 王海洪¹, 马金成¹

(1 华南农业大学 生命科学院/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;

2 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520)

摘要:【目的】研究野油菜黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* 8004 基因组中 3 个标注为 3-酮脂酰 ACP 合成酶的基因 *XcfabF1*、*XcfabF2* 和 *XcfabB* 在脂肪酸合成过程中的功能。【方法】将这 3 个基因分别克隆到表达载体 pBAD24M, 然后转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* 的 *fabB* 和 *fabF* 温敏型突变株 CY242 和 CY244, 同时利用体外无细胞抽提物酶学分析 FabF1、FabF2 和 FabB 蛋白活性。【结果和结论】*XcfabF1* 和 *XcfabB* 基因分别能遗传互补大肠埃希菌 *fabF* 和 *fabB* 突变, 而 *XcfabF2* 基因则不能互补大肠埃希菌 *fabF* 或 *fabB* 突变。体外无细胞抽提物酶学分析表明 FabF1 和 FabB 都能完成辛脂酰-ACP 的延伸, 但 FabF2 则不能完成该酶促反应。*XcfabB* 基因编码 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I, *XcfabF1* 基因编码 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II, 而 *fabF2* 基因不参与中长链脂肪酸的合成。

关键词:野油菜黄单胞菌; 3-酮脂酰 ACP 合成酶; 遗传互补

中图分类号:Q93

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2015)02-0049-06

Characterization of long chain 3-ketoacyl-ACP synthase in *Xanthomonas campestris*

DONG Huijuan¹, YU Yonghong², WANG Haihong¹, MA Jincheng¹

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

2 Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

Abstract:【Objective】The functions of the three genes *XcfabF1*, *XcfabF2* and *XcfabB*, which were annotated as encodes putative 3-ketoacyl-ACP synthase in fatty acid synthesis in *Xanthomonas campestris* 8004 genome, were studied. 【Method】Three genes colonized into expression plasmid pBAD24M separately were transformed into the *fabB* and *fabF* temperature sensitive mutant CY242 and CY244 of *Escherichia coli*. The activity of XcFabF1, XcFabF2 and XcFabB *in vitro* was assayed by cell-free extracts. 【Result and conclusion】The genetic complementary revealed that *XcfabB* and *XcfabF1* genes could restore the growth of mutant CY242 and CY244 respectively, but *XcfabF2* could not restore the growth of mutant CY242 or CY244. The cell-free extracts of XcFabF1 and XcFabB could elongate octanoyl-ACP to longer acyl-ACP, while XcFabF2 could not catalyse the elongation *in vitro* assay. The above results demonstrate that *XcfabB* and *XcfabF1* encode 3-ketoacyl-ACP synthase I and 3-ketoacyl-ACP synthase II respectively, but *XcfabF2* is not involved in long chain fatty acid synthesis in *X. campestris*.

Key words:*Xanthomonas campestris*; 3-ketoacyl-ACP synthase; genetic complementary

收稿日期:2014-01-01 优先出版时间:2015-01-21

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150121.0918.001.html>

作者简介:董会娟(1986—), 男, 硕士研究生, E-mail: 997180752@qq.com; 通信作者:马金成(1979—), 男, 讲师, 博士, E-mail: majincheng@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(31200028); 高等学校博士学科点专项科研基金(20104404110005); 广东省高校优秀青年创新创业人才培养计划(LYM10038)

黄单胞菌属是植物病原菌中较大的类群,能侵染超过 11 科 70 属 124 种单子叶植物和 57 科 170 属 268 种双子叶植物. 该属几种主要的致病菌有野油菜黄单胞菌 *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,能造成包括十字花科作物、水稻、豆类作物、番茄和柑橘等的重大经济损失^[1]. 随着分子生物学和细菌基因组学的发展,多种黄单胞菌的基因组得到测序,这为深入研究黄单胞菌的致病机理、开发新的防治药物或手段提供了有力条件.

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热点领域^[2-3]. 细菌以酰基载体蛋白 (Acyl carrier protein, ACP) 为载体,利用Ⅱ型脂肪酸合成酶系通过聚合、还原、脱水和再还原,从头合成脂肪酸,其特点是每一步反应均由独立的酶催化^[4]. 在模式细菌大肠埃希菌中聚合反应由 3-酮脂酰 ACP 合成酶 (KAS) 催化^[5]. 根据生理功能的差异,大肠埃希菌 *Escherichia coli* 的 3-酮脂酰 ACP 合成酶可分为 3 种类型:3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ (FabH) 在脂肪酸合成的起始反应中起作用,而 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅰ和Ⅱ (FabB 和 FabF) 则是脂肪酸合成循环反应中的关键酶,被称做长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶^[6-7],其中 FabB 是大肠埃希菌合成不饱和脂肪酸的关键酶之一,参与不饱和脂肪酸的从头合成^[8], FabF 能将棕榈油酸延伸为顺-11-十八烯

酸,参与受温度控制的脂肪酸组成调节^[9].
植物病原菌野油菜黄单胞菌 *X. campestris* 8004 脂肪酸合成代谢的研究尚未完全展开,通过比对发现,其基因组中有 *XcfabF1* (*Xc3225*)、*XcfabF2* (*Xc4087*) 和 *XcfabB* (*Xc3652*) 这 3 个基因标注为 3-酮脂酰 ACP 合成酶,其功能尚未得到鉴定. 本论文主要通过遗传互补和体外分析等手段,研究以上 3 个基因在野油菜黄单胞菌脂肪酸合成代谢中的作用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基 所用细菌菌株和质粒见表 1. LB 用作培养大肠埃希菌的丰富培养基, RB 作为检测脂肪酸合成突变菌株的培养基. 培养基中的常用试剂和抗生素有 100 mg · L⁻¹ 氨苄青霉素、30 mg · L⁻¹ 卡那霉素、0.2 g · L⁻¹ 的 L-阿拉伯糖、1 mmol · L⁻¹ 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG). 体积分数为 20% 的油酸 (Oleate) 用无水乙醇配制,并用 KOH 将 pH 调至中性,在 RB 培养基中油酸的最终体积分数为 0.1 mL · L⁻¹.
1.1.2 主要试剂来源 限制性内切酶、T4 连接酶、*Taq*、*pfu* DNA 聚合酶、DNA 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 TaKaRa 公司;氨苄青霉素、卡那霉素、

表 1 试验相关的菌株和质粒

Tab.1 The strains and plasmids used in this work

菌株或质粒	名称	相关的基因型或特征	来源
大肠埃希菌菌株	DH5α	F ⁻ deoR endA1 gyrA96 hsdR17 (r _k ⁻ mK ⁺) recA1 relA1 supE44 thi-1 Δ (lacZYA-argF) U169 (φ80lacZ Δ M15)	本实验室保藏
	MG1655	Wild-type strain	本实验室保藏
	BL21 (DE3)	F ⁻ dcm omp T hsdS (r _B - m _B -) gal (λDE3)	本实验室保藏
	CY244	<i>fabB15</i> (ts) <i>fabF</i>	文献 [8]
	CY242	<i>fabB15</i> (ts)	文献 [10]
	CL28	<i>fabF</i> :: <i>kan</i> of MG1655	文献 [11]
质粒	pMD19	Amp ^r ; T-vector	TaKaRa 公司
	pBAD24M	Amp ^r ; <i>NcoI</i> site of expression vector pBAD24 changed to an <i>NdeI</i> site	Novagen 公司
	pET28 (b)	Km ^r ; expression vector	Novagen 公司
	pHJ1	Amp ^r ; <i>XcfabF1</i> in pMD19	本研究构建
	pHJ2	Amp ^r ; <i>XcfabF2</i> in pMD19	本研究构建
	pHJ3	Amp ^r ; <i>XcfabB</i> in pMD19	本研究构建
	pHJ4	Amp ^r ; <i>XcfabF1</i> in pBAD24M	本研究构建
	pHJ5	Amp ^r ; <i>XcfabF2</i> in pBAD24M	本研究构建
	pHJ6	Amp ^r ; <i>XcfabB</i> in pBAD24M	本研究构建
	pHJ7	Km ^r ; <i>XcfabF1</i> in pET28 (b)	本研究构建
	pHJ8	Km ^r ; <i>XcfabF2</i> in pET28 (b)	本研究构建
	pHJ9	Km ^r ; <i>XcfabB</i> in pET28 (b)	本研究构建

IPTG、*L*-阿拉伯糖、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.

1.2 方法

1.2.1 质粒构建和重组 DNA 技术 以野油菜黄单胞菌基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *XcfabF1*、*XcfabF2* 和 *XcfabB*. 扩增 *XcfabF1* 的引物为: 5'-CAAT-CATATGAGTCGTCGTGTTG-3' 和 5'-CTTGAAGCTTT-CAGATGCGCTTGAACA-3';扩增 *XcfabF2* 的引物为: 5'-CAATCATATGCCCCCGGTGCCAT-3'和 5'-CAATA-AGCTTTAGCGTGCCTGCCCGA-3';扩增 *XcfabB* 的引物为: 5'-CTTACATATGCGCCGTGTTGTC-3'和 5'-CT-TGAAGCTTTTACAGGCCGAACA-3'(下划线处分别代表限制性内切酶 *NdeI* 和 *HindIII* 酶切位点). PCR 扩增产物分别连接至 pMD19-T 载体,通过测序验证获得的质粒 pHJ1 (*fabF1*)、pHJ2 (*fabF2*) 和 pHJ3 (*fabB*). 使用 *NdeI* 和 *HindIII* 分别消化 pHJ1 (*fabF1*)、pHJ2 (*fabF2*) 和 pHJ3 (*fabB*),获得的基因片段分别克隆到用阿拉伯糖诱导表达的载体 pBAD24M 上,得到互补载体 pHJ4 (*fabF1*)、pHJ5 (*fabF2*) 和 pHJ6 (*fabB*). 用同样的方法将 3 个基因分别克隆到 pET28(b) 上,得到表达载体 pHJ7 (*fabF1*)、pHJ8 (*fabF2*) 和 pHJ9 (*fabB*).

所采用的 DNA 操作,包括 DNA 的酶切、片段回收、连接、转化等方法,参照文献[12].

1.2.2 制备无细胞抽提物 根据 Heath 等^[13]的方法制备脂肪酸合成无细胞提取物. 用 Bradford 方法,以牛血清白蛋白为标准,确定蛋白质浓度. 分装并添加甘油至体积分数为 10%, -80 °C 条件下保存备用.

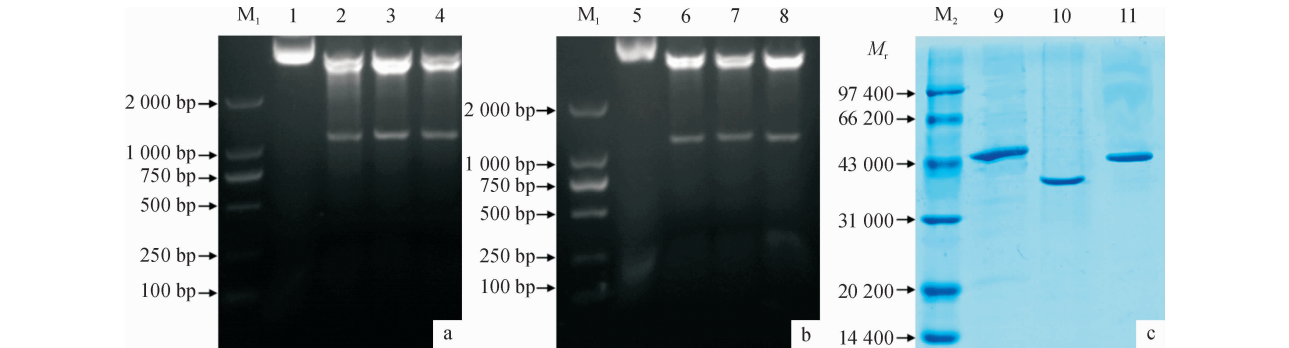
1.2.3 蛋白质的表达与分离纯化 将表达载体 pHJ7 (*fabF1*)、pHJ8 (*fabF2*) 和 pHJ9 (*fabB*) 分别转化大肠埃希菌 BL21 (DE3) 后,野油菜黄单胞菌的 FabF1、FabF2 和 FabB 蛋白的表达和纯化参考文献[14-15]进行. 同时分离纯化哈氏弧菌脂酰 ACP 合成

酶(AasS)和大肠埃希菌 holo-ACP 蛋白^[14-15].
1.2.4 3-酮脂酰 ACP 合成酶体外活性分析 体外检测野油菜黄单胞菌 FabF1、FabF2 和 FabB 蛋白在细菌脂肪酸合成延伸中的功能,参照文献[14-15]. 具体做法:总反应体系为 50 μL,其中含有 100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0), 20 μmol · L⁻¹ ACP, 10 mmol · L⁻¹ ATP, 10 mmol · L⁻¹ MgSO₄, 5 mmol · L⁻¹ DTT, 300 μmol · L⁻¹ 脂肪酸,脂酰 ACP 合成酶 1 μg, 100 μmol · L⁻¹ 丙二酸单酰 CoA,再添加 100 μmol · L⁻¹ NADH 和 100 μmol/L NADPH,加入无细胞抽提物 0.2 μg,根据不同反应需要加入 0.2 μg 酶蛋白,37 °C 保温培养 2 ~ 3 h. 反应结束后,用 20% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (含 2.5 mol · L⁻¹ 尿素) 电泳分析脂酰 ACP^[16].
1.2.5 脂肪酸组成分析 在合适的条件下培养细菌 10 mL,离心收集菌体,按照文献[15]的方法,提取细菌的脂肪酸,并转化为脂肪酸甲酯. 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 野油菜黄单胞菌 *XcfabF1*、*XcfabF2* 和 *XcfabB* 基因的克隆及酶蛋白表达与纯化

通过 PCR 扩增获得野油菜黄单胞菌 *XcfabF1*、*XcfabF2* 和 *XcfabB* 基因,并克隆到受外源阿拉伯糖诱导调控的质粒载体 pBAD24M (图 1a),得到功能检测质粒 pHJ4 (*fabF1*)、pHJ5 (*fabF2*) 和 pHJ6 (*fabB*). 同时将上述基因克隆到表达载体 pET-28(b) 上,构建能在大肠埃希菌 BL21 (DE3) 菌株中高效表达的载体:pHJ7 (*fabF1*)、pHJ8 (*fabF2*) 和 pHJ9 (*fabB*) (图 1b). 可溶性表达分析显示,3 个蛋白均为可溶性蛋白 (结果未列). 然后采用 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 FabF1、FabF2 和 FabB 蛋白,如图 1c 所示.



M₁: DNA marker DL 2000; 1: pBAD24M/*NdeI*&*HindIII*; 2: pHJ4/*NdeI*&*HindIII*; 3: pHJ5/*NdeI*&*HindIII*; 4: pHJ6/*NdeI*&*HindIII*; 5: pET28(b)/*NdeI*&*HindIII*; 6: pHJ7/*NdeI*&*HindIII*; 7: pHJ8/*NdeI*&*HindIII*; 8: pHJ9/*NdeI*&*HindIII*; M₂: 蛋白 marker; 9: XcFabF1; 10: XcFabF2; 11: XcFabB.

a: 构建 pHJ4 (*fabF1*)、pHJ5 (*fabF2*) 和 pHJ6 (*fabB*) 质粒载体; b: 构建 pHJ7 (*fabF1*)、pHJ8 (*fabF2*) 和 pHJ9 (*fabB*) 质粒载体; c: 纯化 *Xanthomonas campestris* 8004 FabF1、FabF2 和 FabB 蛋白.

图1 表达质粒的构建与 FabF1、FabF2 和 FabB 蛋白的纯化

Fig. 1 Construction of expression vector and purification of *Xanthomonas campestris* 8004 FabF1, FabF2 and FabB

<http://xuebao.scau.edu.cn>

2.2 野油菜黄单胞菌 *XcfabF1*、*XcfabF2* 和 *XcfabB* 基因互补大肠埃希菌突变株

为了检测野油菜黄单胞菌 *fabF1*、*fabF2* 和 *fabB* 基因的功能, 首先用质粒 pHJ4 (*fabF1*)、pHJ5 (*fabF2*) 和 pHJ6 (*fabB*) 分别转化大肠埃希菌 *fabB* 温度敏感突变株 CY242 (*fabB*(ts)). 该菌株在 30 ℃ 时, 能够正常生长(图 2a), 42 ℃ 时由于 FabB 蛋白失活, 成为 *fabB* 的营养缺陷型菌株, 因此如果外源基因能够在不添加油酸的条件下恢复 CY242 菌株 42 ℃ 的生长表型, 表明该基因编码的蛋白具有大肠埃希菌 FabB 活性, 即 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 的活性. 遗传互补检测结果(图 2b、2c)表明, 质粒 pHJ6 (*fabB*) 能够互补 CY242, 说明黄单胞菌 *XcfabB* 编码的蛋白具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 的活性, 而 pHJ4 (*fabF1*) 和 pHJ5 (*fabF2*) 不能恢复 CY242 的生长性状, 则表明 *XcfabF1* 和 *XcfabF2* 编码的蛋白不具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 的活性. 接着用质粒 pHJ4 (*fabF1*)、pHJ5 (*fabF2*) 和 pHJ6 (*fabB*) 分别转化大肠埃希菌 *fabBfabF* 双突变菌株 CY244 (*fabF fabB*(ts)). 在 30

℃ 时, 虽然该菌株的 *fabF* 发生突变, 但是 *fabB* 基因编码的蛋白仍具有长链 3-酮脂酰 ACP 聚合酶活性, 故能正常生长(图 2d). 在 42 ℃ 条件下, *fabB* 基因编码的蛋白也失去活性, 此时即使培养基中添加油酸, 菌株也无法生长(图 2e). 因此, 在 42 ℃ 条件下, 如果外源基因在添加油酸平板上, 能够恢复 CY244 的生长, 表明该基因编码的蛋白具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF) 的活性; 如果外源基因在不添加油酸平板上, 能够恢复 CY244 的生长, 表明该基因具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 的活性. 结果如图 2 所示, 42 ℃ 条件下, 在只添加有阿拉伯糖的 RB 平板上, pHJ6 (*fabB*) 能使大肠埃希菌 CY242 和 CY244 恢复生长(图 2c、2f); 而在添加有阿拉伯糖和体积分数为 0.1% 油酸的 RB 平板上, pHJ4 (*fabF1*) 能使大肠埃希菌 CY244 恢复生长(图 2e). 这再次表明野油菜黄单胞菌的 FabB 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 的活性, 同时表明 FabF1 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 的活性, 而 FabF2 则不具有以上活性.

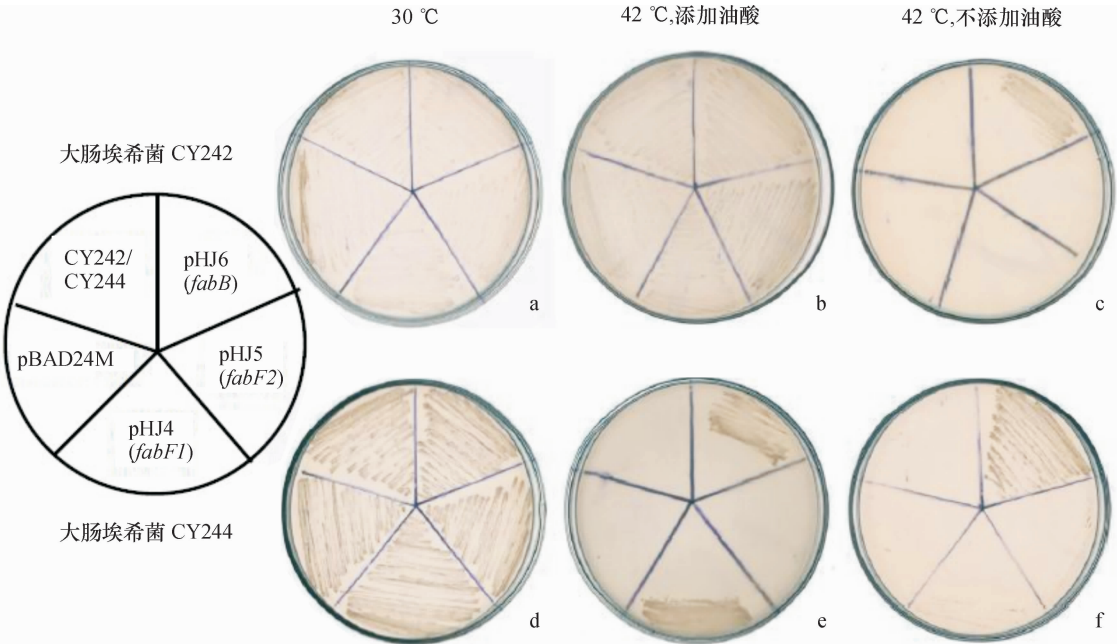


图 2 野油菜黄单胞菌 *XcfabF1*、*XcfabF2* 和 *XcfabB* 基因互补大肠埃希菌转化子生长表型分析

Fig. 2 Growth of transformants of *Escherichia coli* mutants with plasmids carrying *XcfabF1*, *XcfabF2* and *XcfabB* genes

2.3 野油菜黄单胞菌 *FabF1*、*FabF2* 和 *FabB* 蛋白体外活性检测

体内互补试验表明野油菜黄单胞菌 *XcfabF1* 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, 即两者均具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性. 为了确定上述结论, 对 *XcfabB*、*XcfabF1* 和 *XcfabF2* 基因编码的蛋白进行了体外酶活性检测. 首先制备大肠埃希菌 CY244 菌株携带不同质粒 [pBAD24M、pHJ4 (*fabF1*)、pHJ5 (*fabF2*) 和 pHJ6 (*fabB*)] 和野生型 MG1655 的无细胞抽提物, 并在体

外进行脂肪酸合成反应. 结果如图 3 所示, 含有 pHJ4 (*fabF1*) 和 pHJ6 (*fabB*) 的 CY244 无细胞抽提物与阳性对照 MG1655 类似, 能以辛脂酰-ACP (C8-ACP) 为底物延伸, 产生长链脂酰-ACP (LC-ACP), 说明 *FabF1* 和 *FabB* 具有 3-酮脂酰-ACP 合成酶活性, 而含有 pHJ5 (*fabF2*) 的 CY244 无细胞抽提物与阴性对照类似, 不能催化辛脂酰-ACP 的延伸, 这表明 *FabF2* 不具有酮脂酰-ACP 合成酶活性, 与体内遗传互补的试验结果相印证.

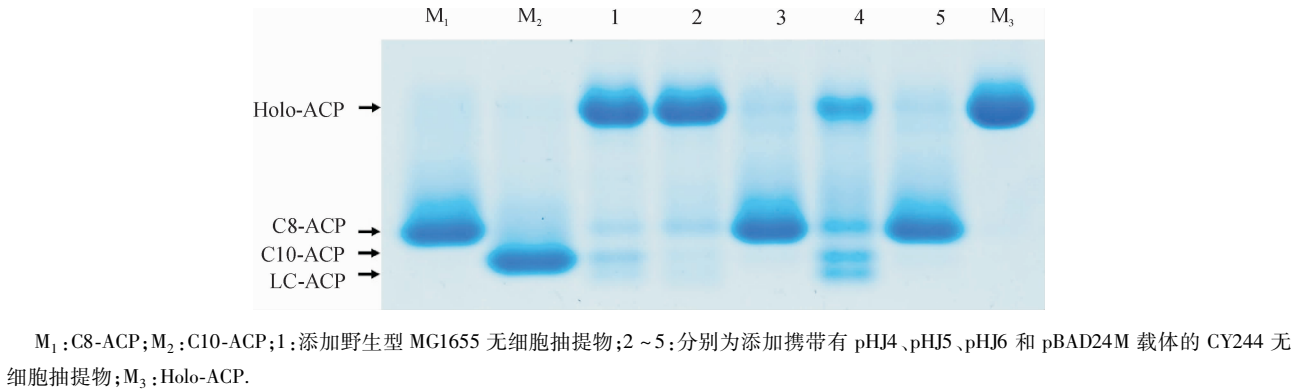


图3 表达 *XcfabF1*、*XcfabF2* 和 *XcfabB* 的 CY244 菌株无细胞抽提物的 KAS 酶活性检测

Fig. 3 Analyses of long-chain KAS activities of cell-free extracts from strain CY244 carrying plasmids harboring *XcfabF1*, *XcfabF2* or *XcfabB*

为进一步体外验证活性,将“2.1”纯化获得的野油菜黄单胞菌 FabF1、FabF2 和 FabB 蛋白分别加入 CY244 无细胞抽提物中,体外进行脂肪酸合成反应.非变性凝胶电泳(图4)显示,添加了 FabF1 和 FabB 的无细胞抽提物能将辛脂酰-ACP(C8-ACP)延伸为癸脂酰-ACP(C10-ACP)(图4泳道2和4),而添加 FabF2 则不能完成延伸反应(图4泳道3).这一结果同样表明 FabF1 和 FabB 具有 3-酮脂酰-ACP 合成酶活性,而 FabF2 不具有 3-酮脂酰-ACP 合成酶活性,与体内互补试验结果一致。

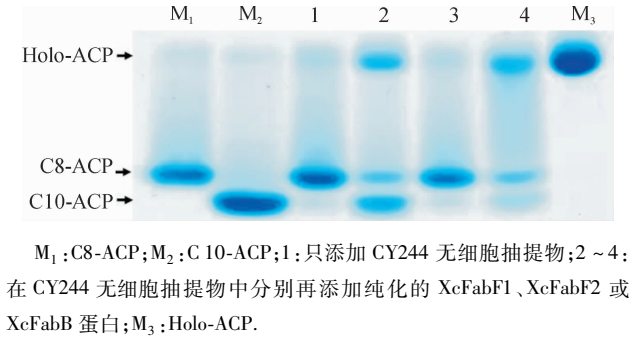


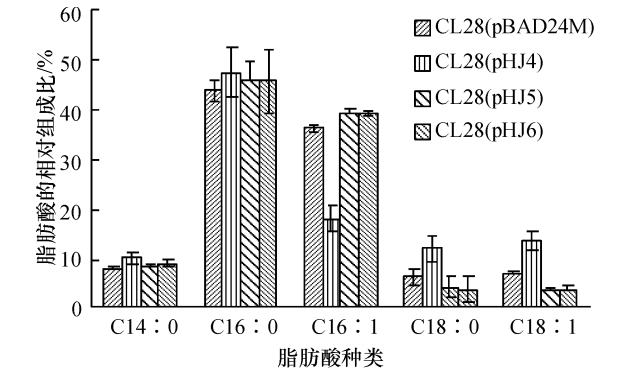
图4 野油菜黄单胞菌 FabF1、FabF2 和 FabB 蛋白的 KAS 酶活性检测

Fig. 4 Analyses of the enzymatic activities of XcFabF1, XcFabF2 or XcFabB within cell-free extracts from strain CY244

2.4 脂肪酸组成分析

3-酮基脂酰 ACP 聚合酶 II 的显著特点是能够延伸棕榈油酸为顺-11-十八烯酸.为了进一步确定野油菜黄单胞菌 FabF1 的活性,将 pHJ4(*fabF1*)、pHJ5(*fabF2*)和 pHJ6(*fabB*)分别转化大肠埃希菌 *fabF* 突变菌株 CL28(*fabF*: kan),并提取了大肠埃希菌 CL28 携带不同质粒[pBAD24M、pHJ4(*fabF1*)、pHJ5(*fabF2*)和 pHJ6(*fabB*)]的细菌脂肪酸,利用 GC-MS 测定各菌株脂肪酸的组成,结果如图5所示。

与 CL28(pBAD24M)相比,CL28[pHJ4(*fabF1*)]的脂肪酸中棕榈油酸(C16:1)含量明显下降,而顺-11-十八烯酸含量明显上升,说明野油菜黄单胞菌的 FabF1 具有将棕榈油酸延伸为顺-11-十八烯酸的活性,具有典型的 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 的功能,而 CL28[pHJ5(*fabF2*)]和 CL28[pHJ6(*fabB*)]的脂肪酸中棕榈油酸含量没有下降,说明野油菜黄单胞菌的 FabF2 和 FabB 都不具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 的功能。



C14:0 为十四碳正酸;C16:0 为十六碳正酸;C16:1 为十六碳烯酸;C18:0 为十八碳正酸;C18:1 为十八碳烯酸。

图5 携带不同质粒的大肠埃希菌 CL28 脂肪酸组成

Fig. 5 Fatty acid composition of *Escherichia coli* CL28 carrying pHJ4(*fabF1*), pHJ5(*fabF2*) or pHJ6(*fabB*)

3 讨论与结论

生物信息学分析表明,野油菜黄单胞菌基因组中脂肪酸合成酶系基因集中在 3 个区域,其中 *fabB* 与 *fabA* 在同一区域,*fabF1*、*fabG*、*fabD* 和 *fabH* 在同一区域,而 *fabF2* 单独在一区域.相似性比较发现,野油菜黄单胞菌 XcFabF1 与大肠埃希菌的 EcFabF 蛋白相似性达到 60.1%,而 XcFabF2 只有 36.3%,野油菜黄单胞菌 XcFabB 与 EcFabB 具有 62.1% 的相

似性. 此外, 大肠埃希菌长链 3-酮基脂酰 ACP 合成酶 (FabF 和 FabB) 拥有的催化活性位点 Cys163/His303/His340 在野油菜黄单胞菌 XcFabF1、XcFabB 和 XcFabF2 中也同样保守^[17-22]. 因此, 推测 *XcfabF1*、*XcfabF2* 和 *XcfabB* 基因编码的蛋白可能具有长链 3-酮基脂酰 ACP 合成酶活性. 然而研究结果表明在野油菜黄单胞菌中只有 XcFabF1 和 XcFabB 具有长链 3-酮基脂酰 ACP 合成酶活性, XcFabF2 不拥有 3-酮基脂酰 ACP 合成酶活性. 进一步研究表明野油菜黄单胞菌的 XcFabF1 具有 3-酮基脂酰 ACP 聚合酶 II 的活性, 而 XcFabB 具有 3-酮基脂酰 ACP 聚合酶 I 的活性. 另外, 野油菜黄单胞菌的 XcFabF2 是否具有其他方面功能, 如参与次级代谢产物聚酮体合成或影响菌体生长等方面, 还有待进一步研究. 此研究也为深入研究黄单胞菌的致病机理, 开发新的防治药物提供了一定的理论依据.

参考文献:

- [1] CHAN J W, GOODWIN P H. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*[J]. Biotechnol Adv, 1999, 17(6): 489-508.
- [2] HEATH R J, ROCK C O. Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2004, 5(2): 146-153.
- [3] ZHANG Y M, WHITE S W, ROCK C O. Inhibiting bacterial fatty acid synthesis[J]. J Biol Chem, 2006, 281(26): 17541-17544.
- [4] WHITE S W, ZHENG J, ZHANG Y M, et al. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis[J]. Annu Rev Biochem, 2005, 74: 791-831.
- [5] HEATH R J, WHITE S W, ROCK C O. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents[J]. Prog Lipid Res, 2001, 40(6): 467-497.
- [6] HEATH R J, ROCK C O. Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*[J]. J Biol Chem, 1996, 271(18): 10996-11000.
- [7] ROCK C O, CRONAN J E. *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1302(1): 1-16.
- [8] DE MENDOZA D, KLAGES U A, CRONAN J E Jr, et al. Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*; Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I[J]. J Biol Chem, 1983, 258(4): 2098-2101.
- [9] GARWIN J L, KLAGES A L, CRONAN J E Jr. Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of *Escherichia coli*: Evidence for function in the thermal regulation of fatty acid synthesis[J]. J Biol Chem, 1980, 255(8): 3263-3265.
- [10] 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]. J Bacteriol, 1983, 154(1): 221-230.
- [11] LAI C Y, CRONAN J E. Isolation and characterization of beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (fabG) mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. J Bacteriol, 2004, 186(6): 1869-1878.
- [12] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [13] HEATH R J, ROCK C O. Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*[J]. J Biol Chem, 1996, 271(4): 1833-1836.
- [14] ZHU L, CHENG J, LUO B, et al. Functions of the *Clostridium acetobutylicum* FabF and FabZ proteins in unsaturated fatty acid biosynthesis[J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 119.
- [15] 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[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(2): 689-698.
- [16] 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]. J Biol Chem, 1996, 271(44): 27795-27801.
- [17] 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]. J Biol Chem, 1995, 270(44): 26538-26542.
- [18] HUANG W, JIA J, EDWARDS P, et al. Crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E. coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes[J]. EMBO J, 1998, 17(5): 1183-1191.
- [19] MOCHE M, SCHNEIDER G, EDWARDS P, et al. Structure of the complex between the antibiotic cerulenin and its target, beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase[J]. J Biol Chem, 1999, 274(10): 6031-6034.
- [20] OLSEN J G, KADZIOLA A, VON WETTSTEIN-KNOWLED P, et al. The X-ray crystal structure of beta-ketoacyl [acyl carrier protein] synthase I[J]. FEBS Lett, 1999, 460(1): 46-52.
- [21] DAVIES C, HEATH R J, WHITE S W, et al. The 1.8 Å crystal structure and active-site architecture of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) from *Escherichia coli*[J]. Structure, 2000, 8(2): 185-195.
- [22] MOCHE M, DEHESH K, EDWARDS P, et al. The crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *Synechocystis* sp. at 1.54 Å resolution and its relationship to other condensing enzymes[J]. J Mol Biol, 2001, 305(3): 491-503.

【责任编辑 李晓卉】