

大肠杆菌(*Escherichia coli*)体外脂肪酸合成反应的重建*

冯赛祥** 朱磊** 罗彪 孙益嵘 王海洪***

(华南农业大学生命科学学院, 广州 510642)

摘要 PCR 扩增大肠杆菌参与脂肪酸合成的 7 个主要酶基因: *fabD*、*fabG*、*fabH*、*fabA*、*fabZ*、*fabB* 和 *fabI*, 并构建相应的表达载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中分别诱导表达酶蛋白, 并使用 Ni-NTA 琼脂糖纯化到 7 种酶蛋白. 体外添加所需酶蛋白和辅因子, 在不使用[2-¹⁴C]丙二酸单酰 CoA 的条件下, 成功地实现了脂肪酸合成反应的重建, 另外还建立了数个鉴定有关酶蛋白功能的标准反应, 并用其鉴定了丙酮丁醇梭菌 FabZ 的功能.

关键词 细菌脂肪酸合成, 脂酰 ACP, 非变性聚丙烯酰胺凝胶
学科分类号 Q93

细菌的脂肪酸合成酶属于 II 型脂肪酸合成酶系, 即脂肪酸的合成以 ACP(acyl carrier protein)为载体, 每一步生化反应均由独立的酶催化, 与高等哺乳动物拥有的 I 型脂肪酸合成酶系有本质的差别^[1~3]. 正是这一差别使得细菌脂肪酸合成酶系成了当今新型抗菌药物筛选的靶位点之一^[4,5]. 虽然细菌的脂肪酸合成体系高度保守, 但是随着大量细菌全基因组测序的完成, 越来越多的基因注释表明细菌脂肪酸合成存在着广泛的多样性^[2,6]. 目前在细菌中已经发现了 4 种结构不同的烯脂酰 ACP 还原酶^[7~10]和 3 条不同的在厌氧条件下合成不饱和脂肪酸的途径^[11~13]. 细菌特别是病原细菌脂肪酸合成的多样性, 为筛选专一性的抗菌药物提供了可能^[5,14]. 因此, 研究细菌脂肪酸合成的多样性有着重要的实际意义.

人们对大肠杆菌(*Escherichia coli*)的脂肪酸合成途径已有了深入的研究, 往往把大肠杆菌的脂肪酸合成途径当做类型 II 脂肪酸合成酶系的模型^[2,3]. 大肠杆菌饱和脂肪酸的合成可分为三步进行. 第一步是原料合成, 由丙二酸单酰 CoA: ACP 转酰基酶 (FabD)催化, 将丙二酸单酰 CoA 转变成丙二酸单酰 ACP. 第二步为起始反应, 由 β -酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH)将丙二酸单酰 ACP 与乙酰 CoA 缩合成乙酰乙酰 ACP. 第三步为循环反应,

有多种酶催化, 依次进行. 每一次循环脂酰碳链增加两个 CH₂ 基团, 直到形成棕榈脂酰 ACP. 循环反应首先由 NADPH 依赖的 β -酮脂酰 ACP 还原酶 (FabG)催化 β -酮脂酰 ACP 还原, 生成 β -羟脂酰 ACP. 接着产物脱水, 生成反-2-烯酰 ACP. 这一反应 β -羟脂酰 ACP 脱水酶 (FabZ 或 FabA)催化. 循环反应的最后一步是反-2-烯酰 ACP 还原, 由 NADPH 依赖烯酰 ACP 还原酶 (FabI)催化, 生成脂酰 ACP. 接着开始下一循环, 丙二酸单酰 ACP 和脂酰 ACP 在 β -酮脂酰 ACP 合成酶 I 或 II (FabB 或 FabF)缩合成 β -酮脂酰 ACP, 然后依次被还原 (FabG)、脱水 (FabZ 或 FabA)和再还原 (FabI). 大肠杆菌不饱和脂肪酸的合成是按以下方式进行: 当脂酰链延伸至 10 个碳时, 即形成 β -羟基癸脂酰 ACP 时, 该产物经 FabA 或 FabZ 脱水, 生成反-2-癸烯酰 ACP, 由于 FabA 还具有异构酶活性, 2-反式-癸烯酰 ACP 同时被异构化, 产生顺-3-癸烯酰 ACP, 该产物不能被 FabI 还原, 只能作为 FabB 的

* 华南农业大学校长基金资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2008-01-09, 接受日期: 2008-03-06

底物, 与丙二酸单酰 ACP 缩合成顺-5- β -酮基十二碳烯酰 ACP, 然后, 该产物进入脂肪酸合成的循环反应, 最终产生棕榈油酰 ACP.

目前研究细菌脂肪酸合成多样性的方法主要有以下 3 种: a. PCR 扩增有关基因, 异体互补大肠杆菌相应突变株, 确定基因功能^[12]; b. 表达纯化有关酶蛋白, 重组体外脂肪酸合成反应, 鉴定酶蛋白的特异性活性^[14]; c. 基因敲除有关基因, 体内验证其在脂肪酸合成中的作用^[7]. 以上 3 种方法互为验证, 互为补充, 在确定相关基因功能方面均起到独特的作用. 其中重建体外脂肪酸合成反应尤为重要, 它不仅能够验证酶功能, 而且可以直接检测酶反应的产物. 该方法已经被成功地用于证明肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)FabM^[11]和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)FabN^[13]的功能, 并在研究其他细菌脂肪酸合成酶的功能中也发挥了重要作用^[15, 16], 同时还被应用到革兰氏阴性细菌群体感应信号分子合成等众多细菌代谢的研究中^[17].

虽然体外重建细菌脂肪酸合成反应在研究细菌脂肪酸合成和其他代谢中应用广泛, 但是总体来看, 目前所报道的各种具体方法存在某些缺点, 不仅方法没有统一, 而且使用 [2-¹⁴C]丙二酸单酰 CoA 和长链脂酰 CoA^[11, 13, 15, 16, 18, 19]. 首先 ¹⁴C 同位素价格昂贵, 且有放射性污染, 不利于多样品的分析; 其次细菌脂肪酸合成以脂酰 ACP 为中间产物, 使用长链脂酰 CoA 不能反映体内的反应环境, 同时长链脂酰 CoA 的种类也会限制重组反应的应用. 针对上述体外重组细菌脂肪酸合成反应的弊端, 本课题分离纯化了大肠杆菌主要的脂肪酸合成酶和哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的脂酰 ACP 合成酶, 建立了一套不使用 [2-¹⁴C]丙二酸单酰 CoA 和长链脂酰 CoA 的较为完整的体外脂肪酸合成体系, 并使用该系统验证了丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)FabZ 的功能. 该反应体系与之前各方法相比, 更加完整简洁准确. 该体系的建立对统一体外重建细菌脂肪酸合成反应的研究方法具有积极作用.

1 材料与方法

1.1 实验材料、菌株及培养条件

1.1.1 实验材料. 总 DNA 提取纯化试剂盒、质粒提取纯化试剂盒和 DNA 片段琼脂糖凝胶纯化试剂盒由天根公司提供. DNA 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶和 T 载体试剂盒从 TaKaRa 公司(大连)购买. IPTG、L-阿拉伯糖、丙二酸单酰 CoA、乙酰 CoA、 β -羟基癸酸、浅蓝菌素(Cerulenin)、三氯生(Triclosan)和各种抗生素从 Sigma 公司购买. 强阴离子交换树脂(UNOsphere Q)和蛋白质浓度测定试剂盒从 Bio-Rad 公司购买. Ni-NTA 琼脂糖从上海英俊公司购买. 其他化学试剂均为分析纯.

1.1.2 菌株及培养条件. 本研究使用的菌株均为大肠杆菌 K12 菌株的衍生株. 质粒载体 pYFJ84 由美国伊利诺依大学微生物系 Cronan 教授赠送. 菌株的构建均采用 CaCl_2 处理受体菌株, 制备感受态细胞, 质粒热激转化的方法构建. 培养基为丰富培养基 LB, 培养条件是 37℃ 恒温培养. 抗生素工作浓度如下: 100 mg/L 氨苄青霉素; 30 mg/L 卡那霉素; 30 mg/L 氯霉素. IPTG 和 L-阿拉伯糖工作浓度分别为 200 mg/L 和 2 g/L.

1.2 大肠杆菌脂肪酸合成酶基因的克隆及表达载体的构建

使用总 DNA 提取纯化试剂盒, 按照试剂盒说明书的要求, 提取大肠杆菌 MG1655 菌株的总 DNA. 以总 DNA 为模板, 表 1 所列的寡核苷酸为引物, PCR 扩增各脂肪酸合成酶基因, 用 pMD19-T 克隆载体分别进行 TA 克隆. 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆, 经 PCR 及酶切初步检测正确后, 送往上海生物工程技术公司进一步确定 T 载体上携带的 DNA 序列. 利用 PCR 引物中设计的酶切位点, 使用相应的限制性内切酶, 将 7 种脂肪酸合成酶基因片段从 pMD19-T 载体上克隆至表达载体 pET28b 上, 构建重组质粒: pFSD

Table 1 Oligonucleotides used as primers in this work

Genes	Up-stream primers(5'~3')	Down-stream primers(5'~3')
<i>fabA</i>	AGCATATGGTAGATAAACGCGAATC(Nde I)	ATAAGCTTCAGAAGGCAGACGTATC(Hind III)
<i>fabB</i>	ATCATATGAAACGTGCAGTGATTAC(Nde I)	AGGATCCTTAATCTTTAGCTTGCG(BamH I)
<i>fabD</i>	AACATATGACGCAATTTGCATTTGT(Nde I)	GCCACGGGATCCGAGCGTTTC(BamH I)
<i>fabG</i>	AACATATGAATTTTGAAGGAAAAAT(Nde I)	AAAGCTTGGTCAGACCATGTACATC(Hind III)
<i>fabH</i>	CGCATATGTATACGAAGATTATTGG(Nde I)	AAGCTTAGGGAACACAAATGCAAAT(Hind III)
<i>fabI</i>	ACATATGGGTTTCTTTCCGGTAAG(Nde I)	CAGAATTCTTATTTTCAGTTTCGAGTT(EcoR I)
<i>fabZ</i>	GTCATATGACTACTAACACTCATAC(Nde I)	GAAGCTTTTGACGCGCCCTCTTCC(Hind III)

(*fabD*), pFSH (*fabH*), pFSG (*fabG*), pFSB (*fabB*), pFSA (*fabA*), pFSZ (*fabZ*) 和 pFSI (*fabI*).

1.3 大肠杆菌脂肪酸合成酶的表达及纯化

将各用作表达的重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 株, 挑选单菌落, 在含有相应抗生素的 LB 培养液中 37℃ 振荡过夜培养. 转接 1% 的过夜培养液于新鲜的 LB (含相应抗生素) 中, 37℃ 振荡培养 4 h 后, 添加 IPTG, 继续诱导 4 h, 收集菌体. 之后蛋白质纯化的各步操作均在 4℃ 进行. 使用裂解缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L imidazole, pH 8.0) 悬浮菌体, 超声波破碎细胞, 在 15 000 *g* 的离心力条件下 4℃ 离心 20 min, 收集上清, SDS-PAGE 检测蛋白质表达. 上清液与 1 ml Ni-NTA 琼脂糖 4℃ 混合结合 1 h, 过柱收集流出液, 接着用预冷的洗涤缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L imidazole, pH 8.0) 洗涤层析柱, 再用预冷的洗脱缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L imidazole, pH 8.0) 洗脱并收集洗脱液. 将收集的蛋白质液装入透析袋中, 置于 1 000 ml 透析液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, pH 8.0, 1 mmol/L β -巯基乙醇) 中, 4℃ 透析过夜. 使用 Bradford 方法, 以牛血清白蛋白作为标样测定蛋白质浓度. 蛋白质样品置于 -80℃ 冰箱中备用.

1.4 大肠杆菌 ACP 的纯化

使用本课题组构建的大肠杆菌 ACP 表达菌株 DH5 α /pBAD-ACP&pBAD-ACPS (待发表) 分离纯化 ACP. 具体方法如下: 挑取单菌落, 置于含有适当抗生素的 LB 液体中, 37℃ 恒温过夜培养. 取 1% 过夜培养物转接于新鲜的 LB 液体中, 37℃ 培养 4 h, 添加诱导剂 (IPTG 和阿拉伯糖) 后继续培养 4 h. 离心收集菌体. 使用原菌液体积 2% 的 MES (50 mmol/L, pH 6.1) 溶液悬浮菌体, 超声波破碎菌体, 添加等体积预冷的异丙醇, 0℃ 混合 1 h, 离心 (40 000 *g*, 20 min) 除去沉淀蛋白质. 上清置于真空蒸发器中, 旋转蒸发异丙醇, 补足水分, 再次离心 (40 000 *g*, 20 min) 除去沉淀. 将蛋白质样品加到预先用 50 ml MES (50 mmol/L, pH 6.1) 溶液平衡的装有 10 ml 强阴离子交换树脂 (UNOsphere Q) 的层析柱中, 用 150 ml 含有 LiCl (0~1 mol/L) 的 MES (25 mmol/L, pH 6.1) 溶液梯度洗脱 ACP 蛋白, 使用部分收集器收集蛋白质样品, 并在 280 nm 波长下测定样品 A 值; 根据洗脱峰取样, 使用含有 0.5 mol/L 尿素的 13% 非变性聚丙烯酰胺凝胶分析

样品的 ACP 含量. 收集 ACP 样品, 添加 0.02% 脱氧胆酸和 5% 三氯乙酸沉淀蛋白质, 离心 (13 000 *g*, 10 min) 收集沉淀蛋白, 用少许 Tris-HCl (0.5 mol/L, pH 8.0) 溶液溶解沉淀, 并将蛋白质溶液注入透析袋中, 在含有 1 mmol/L DTT 的 Tris-HCl (10 mmol/L, pH 8.0) 1 000 ml 溶液中 4℃ 透析过夜. 使用 Bradford 方法, 以牛血清白蛋白作为标样测定蛋白质浓度. ACP 样品置于 -20℃ 冰箱中备用.

1.5 哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 脂酰 ACP 合成酶的纯化及脂酰 ACP 的合成

哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶的分离纯化使用脂酰 ACP 合成酶表达载体 pYFJ84^[20], 具体步骤参考文献 [20] 中的方法进行. 脂酰 ACP 合成的方法如下: 总反应体系为 50 μl , 其中含有 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 $\mu\text{mol/L}$ ACP, 10 mmol/L ATP, 10 mmol/L MgSO_4 , 5 mmol/L DTT, 300 $\mu\text{mol/L}$ 脂肪酸, 脂酰 ACP 合成酶 1 μg , 37℃ 保温 2 h. 脂肪酸的预处理: 取脂肪酸溶液 (10 mmol/L) 3 μl 于 0.2 ml 离心管中, 添加 1 μl NaOH (10 mmol/L), 将离心管置于真空蒸发器干燥. 反应结束后, 用 20% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (含 2.5 mol/L 尿素) 电泳分析脂酰 ACP.

1.6 体外重建大肠杆菌脂肪酸合成系统

1.6.1 丙二酸单酰 ACP 合成及脂肪酸合成起始反应的重建.

丙二酸单酰 ACP 的合成: 反应体系 50 μl , 其中 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 $\mu\text{mol/L}$ ACP, 1 mmol/L DTT, 100 $\mu\text{mol/L}$ 丙二酸单酰 CoA 和 0.2 μg FabD. 先将 Tris-HCl 缓冲液, ACP, DTT, 丙二酸单酰 CoA 混匀, 在 37℃ 保温培养 30 min, 后添加 FabD 蛋白, 37℃ 继续作用 1 h.

脂肪酸合成起始反应的重建: 反应体系 50 μl , 其中 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 $\mu\text{mol/L}$ ACP, 1 mmol/L DTT, 100 $\mu\text{mol/L}$ 丙二酸单酰 CoA, 100 $\mu\text{mol/L}$ NADH, 100 $\mu\text{mol/L}$ NADPH, 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰 CoA, 0.2 μg FabD, 0.2 μg FabH, 0.2 μg FabG 和 0.2 μg FabI. 先将 Tris-HCl 缓冲液, ACP, DTT, 丙二酸单酰 CoA 混匀, 在 37℃ 保温培养 30 min, 后添加 100 $\mu\text{mol/L}$ NADH, 100 $\mu\text{mol/L}$ NADPH 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰 CoA, 并根据需要添加不同的酶蛋白, 37℃ 继续作用 1 h.

上述反应产物用 13% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (含 0.5 mol/L 尿素) 电泳检测.

1.6.2 脂酰 ACP 的延伸.

总反应体系为 50 μ l, 具体如下: 先分别合成丙二酸单酰 ACP 和脂酰 ACP 各 20 μ l, 然后混合这两种反应液, 再添加 100 μ mol/L NADH 和 100 μ mol/L NADPH, 根据需要同时加入 0.2 μ g 各种酶蛋白, 继续 37 $^{\circ}$ C 保温培养 1 h. 为检测浅蓝菌素(100 mg/L)和三氯生(0.1 mg/L)分别对 FabB 和 FabI 的抑制, 可在加入其他酶蛋白之前, 先加入抑制剂和相应的酶, 室温作用 5 min.

上述反应产物用 20%非变性聚丙烯酰胺凝胶(含 2.5 mol/L 尿素)电泳检测.

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌脂肪酸合成酶基因克隆与酶蛋白分离纯化

使用 *Pfu* DNA 聚合酶, PCR 扩增了大肠杆菌

中参与脂肪酸合成的 7 种主要酶基因(*fabD*, *fabH*, *fabG*, *fabB*, *fabZ*, *fabA* 和 *fabI*), 经 T- 载体克隆, 限制性酶切及 DNA 序列测定, 验证 7 个基因完全正确. 随后将这 7 个基因克隆到蛋白表达载体 pET28b 上, 分别构建了 7 种表达载体: pFSD (*fabD*)、pFSH (*fabH*)、pFSG (*fabG*)、pFSB (*fabB*)、pFSA (*fabA*)、pFSZ (*fabZ*)和 pFSI (*fabI*) (图 1a). 将这些表达载体分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株, 在含有 IPTG 的 LB 培养液中, 诱导相应基因的表达并检测, 结果表明, 7 基因均可在 BL21(DE3)中过量表达相应的酶蛋白(结果未列). 为纯化这 7 种酶蛋白, 大量培养并收集经诱导的各菌体, 低温超声波破碎, 并使用 Ni-NTA 琼脂糖进行纯化, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析各种酶蛋白的纯度, 结果见图 1b.

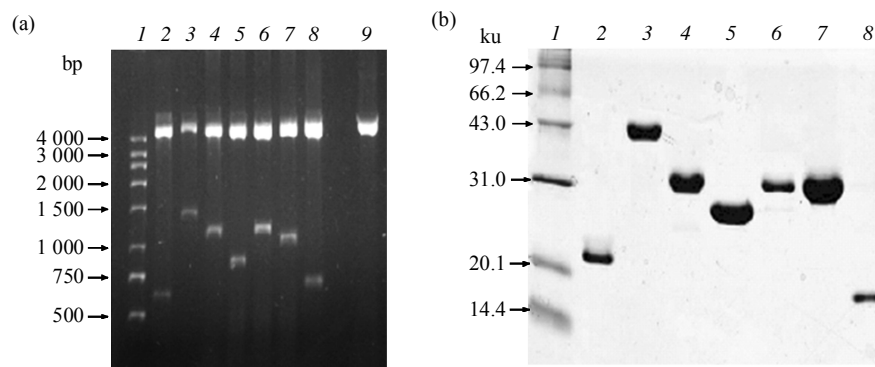


Fig. 1 Construction of expression vectors of fatty acid synthetic genes and purification of enzymes of *E. coli*

(a) 1: DNA marker; 2: pFSZ / *Nde* I & *Hind* III; 3: pFSB / *Nde* I & *Bam* HI; 4: pFSD / *Nde* I & *Bam* HI; 5: pFSG / *Nde* I & *Hind* III; 6: pFSH / *Nde* I & *Hind* III; 7: pFSI / *Nde* I & *Eco* RI; 8: pFSA / *Nde* I & *Hind* III; 9: pET28b / *Nde* I & *Bam* HI. (b) 1: Protein marker; 2: FabA; 3: FabB; 4: FabD; 5: FabG; 6: FabH; 7: FabI; 8: FabZ.

2.2 体外重建细菌脂肪酸合成反应

2.2.1 丙二酸单酰 ACP 的合成与脂肪酸合成起始反应的体外重建.

丙二酸单酰 ACP 是脂肪酸合成的二碳原料. 细菌通过丙二酸单酰 CoA : ACP 转酰基酶 (FabD) 的转酰基作用使丙二酸单酰 CoA 中的丙二酸单酰基团向 ACP 转移, 产生丙二酸单酰 ACP. 体外反应中添加 ACP、丙二酸单酰 CoA 和 FabD 蛋白实现了丙二酸单酰 ACP 的合成(图 2, lane 2). 在含有 0.5 mol/L 尿素的 13%非变性聚丙烯酰胺凝胶上, 由于电荷差异, 丙二酸单酰 ACP 迁移率较 holo-ACP 慢, 条带略微滞后, 这一现象与文献报道的一致^[19].

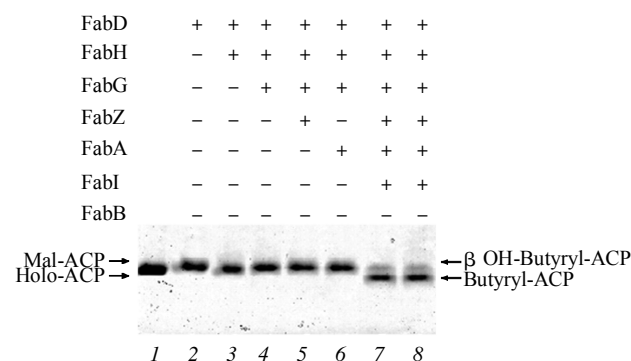


Fig. 2 Synthesis of malonyl-ACP and reconstitution of initial reactions of fatty acid biosynthesis *in vitro*

在合成丙二酸单酰 ACP 后, 细菌脂肪酸合成进入起始和第一次循环反应阶段. 参与这一阶段反应的底物包括丙二酸单酰 ACP, 乙酰 CoA, NADPH 和 NADH, 反应由 FabH, FabG, FabZ(或 FabA)和 FabI 逐步催化, 生成产物为丁酰 ACP. 体外反应的过程如下: 首先, 在生成丙二酸单酰 ACP 的体系中添加辅因子(乙酰 CoA, NADPH 和 NADH)和 FabH 酶蛋白. FabH 催化丙二酸单酰 ACP 与乙酰 CoA 缩合, 产生乙酰乙酰 ACP. 由于乙酰乙酰 ACP 不稳定, 易在碱性条件裂解, 因此在凝胶上只显示 ACP(图 2, lane 3). 在使用 $[2-^{14}\text{C}]$ 丙二酸单酰 CoA 进行的反应中同样很难观察到乙酰乙酰 ACP 的生成^[18]. 接着反应体系中添加 FabG, 乙酰乙酰 ACP 被还原形成 β -羟基丁酰 ACP, 泳道中出现略微比 holo-ACP 滞后的新条带(图 2, lane 4). 继续添加 FabZ 或 FabA, 理论上应该产生反-2-丁烯酰 ACP, 但实际研究表明在 β -羟基丁酰 ACP 脱水反应中, 平衡偏向 β -羟基丁酰 ACP, 产生的反-2-丁烯酰 ACP 很少^[15], 故凝胶上仅能观察到 β -羟基丁酰 ACP(图 2, lane 5 和 lane 6), 这也与用 $[2-^{14}\text{C}]$ 丙二酸单酰 CoA 的实验结果一致^[18]. 最后在添加 FabI 后, 反-2-丁烯酰 ACP 被还原, 产生丁酰 ACP(图 2, lane 7 和 lane 8), 产物条带明显在前.

2.2.2 长链脂肪酸的合成.

长链脂酰 ACP 的合成是个循环反应, 由 FabB、FabG、FabA 或 FabZ 和 FabI 催化, 每一次

循环碳链增加两个 CH_2 基团, 直至产生棕榈酰 ACP. 为了便于观察, 本研究使用己酰 ACP 为底物进行脂酰链的延伸, 并采用含有 2.5 mol/L 尿素的 20%聚丙烯酰胺凝胶分离脂酰 ACP.

首先使用哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶合成己酰 ACP, 然后以此为底物, 添加酶蛋白(FabD、FabB、FabG、FabZ 或 FabA 和 FabI)以及辅助因子(NADPH 和 NADH), 结果见图 3. 其中, 图 3 的 lane 2, lane 9 和 lane 10 中新增的条带分别为己酰 ACP, 辛酰 ACP 和癸酰 ACP, 由脂酰 ACP 合成酶合成. 图 3 显示, 添加 FabD 和 FabB 后, 己酰 ACP 与丙二酸单酰 ACP 缩合, 形成 β -酮辛酰 ACP. β -酮辛酰 ACP 在碱性条件下不稳定, 易分解^[19], 泳道中仅留下 holo-ACP(图 3, lane 3). 加入 FabG 后, β -酮辛酰 ACP 被及时还原, 产生新条带 β -羟辛酰 ACP(图 3, lane 4)(其迁移率与己酰 ACP 相近). 添加 FabZ 或 FabA, β -羟辛酰 ACP 脱水, 产生反-2-辛烯酰 ACP, 泳道中出现新条带, 而 β -羟辛酰 ACP 条带变浅(图 3, lane 5 和 lane 6). 继续添加 FabI 后, 泳道中出现了多种条带, 它们从上至下分别是辛酰 ACP、癸酰 ACP、月桂酰 ACP 和豆蔻酰 ACP(图 3, lane 7 和 lane 8). 这表明循环反应在进行, 脂酰链不断延伸. 然而凝胶上未显示有棕榈酰 ACP 的产生, 造成这一现象的原因主要是 FabZ 和 FabA 对 β -羟豆蔻酰 ACP 脱水活性较低^[16]和体系 β -羟豆蔻酰 ACP 量少.

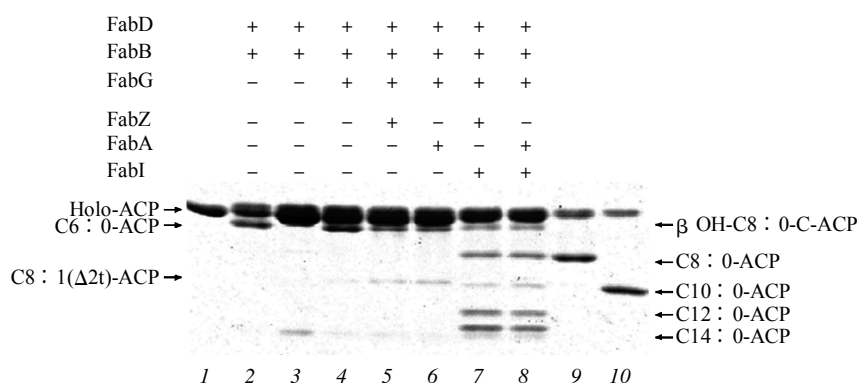


Fig. 3 Elongation of acyl-ACP from caproyl-ACP

为了进一步验证能否产生棕榈酰 ACP, 本课题组进行了由豆蔻酰 ACP 合成棕榈酰 ACP 的反应. 结果见图 4. 首先使用脂酰 ACP 合成酶合成的豆蔻酰 ACP(图 4, lane 2)为底物, 在添加 FabD、

FabB 和 FabG 后产生新的条带, 为 β -羟基棕榈酰 ACP(图 4, lane 3), 再加入 FabZ 脱水, 生成反-2-棕榈烯酰 ACP(图 4, lane 4), 又经 FabI 还原形成棕榈酰 ACP(图 4, lane 5), 棕榈酰 ACP 条带的迁

移率明显较豆蔻酰 ACP 快. 结果表明在有足够的底物时该反应体系也能够合成棕榈酰 ACP.

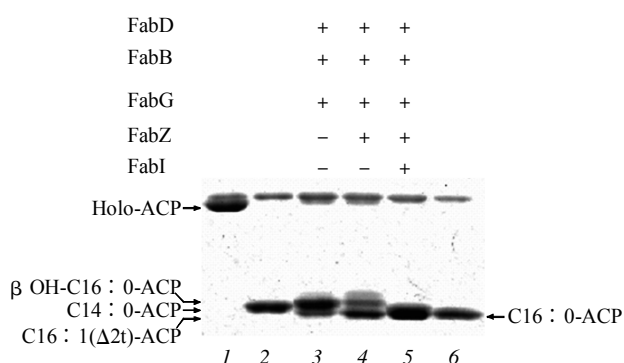


Fig. 4 Synthesis of palmitoyl-ACP from myristoyl-ACP

上述结果表明: a. 体外重组脂肪酸合成反应可以在不使用 ^{14}C 标记的情况下完成各种长链饱和脂酰 ACP 的合成. b. 通过用不同浓度的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离脂酰 ACP, 能达到与同位素标记相同的分辨率.

2.3 脂肪酸合成酶功能的鉴定

脂肪酸合成反应的体外重建, 验证了大肠杆菌 FabD, FabH, FabG, FabZ(或 FabA)和 FabI 的基本功能, 实现了不同脂酰 ACP 的合成. 然而, 体外重组脂肪酸合成反应的目的是为了研究细菌脂肪酸合成的多样性, 因此, 本课题组用 7 种大肠杆菌的脂肪酸合成酶建立了几个研究个别细菌脂肪

酸合成酶功能的模型, 并鉴定了丙酮丁醇梭菌中 FabZ 的脱水功能. 具体过程如下:

2.3.1 FabZ 和 FabA 的脱水活性及 FabI 还原功能的鉴定. FabZ 和 FabA 是大肠杆菌中的两个 β -羟基脂酰 ACP 脱水酶, 催化 β -羟基脂酰 ACP 脱水, 产生反-2-烯脂酰 ACP, 而 FabI 是烯脂酰 ACP 还原酶, 催化反-2-烯脂酰 ACP 还原成脂酰 ACP. 本研究利用 β -羟基癸酰 ACP 为底物建立反应模型检测它们的功能. 在这一过程中, 使用哈氏弧菌的脂酰 ACP 合成酶先合成 β -羟基癸酰 ACP, 然后添加酶蛋白和 NADH. 当体系中分别只含有 FabZ 或 FabA 蛋白(图 5, lane 1 和 lane 4)时, β -羟基癸酰 ACP 的浓度下降, 并产生了两条迁移率较快的条带, 其中最快的一条是由 β -羟基癸酰 ACP 脱水产生的反-2-癸烯酰 ACP, 而另一条为癸脂酰 ACP, 是由反-2-癸烯酰 ACP 部分自发还原生成(反应体系中含有 NADH). 当体系中添加 FabI 时(图 5, lane 2 和 lane 5), β -羟基癸酰 ACP 和反-2-癸烯酰 ACP 条带完全消失, 仅生成癸脂酰 ACP, 表明反-2-癸烯酰 ACP 已被还原生成癸脂酰 ACP. 但是当体系中添加有 FabI 的抑制剂 Triclosan 时, FabI 活性被抑制被抑制, 癸脂酰 ACP 浓度下降, 反-2-癸烯酰 ACP 和 β -羟基癸酰 ACP 重新出现(图 5, lane 3 和 lane 6). 从以上结果中可以证明 FabA 和 FabZ 都具有脱水功能, FabI 具有还原功能, 且 FabI 受 Triclosan 的抑制.

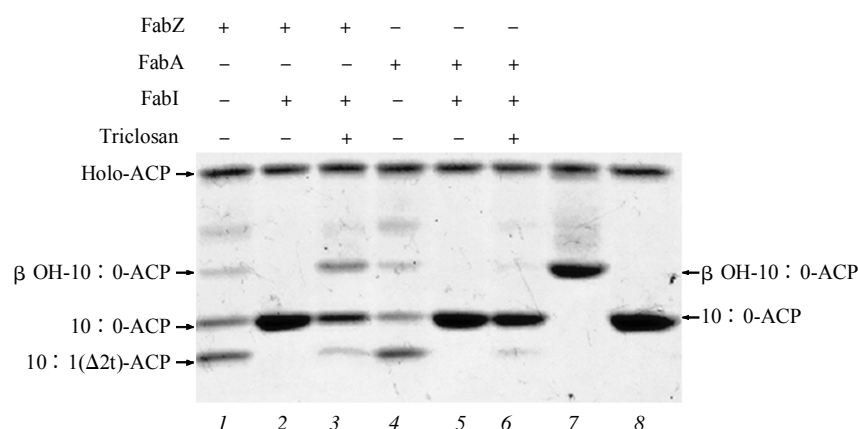


Fig. 5 Dehydration of β -hydroxyacyl-ACP by FabA or FabZ and reduction of enoyl-ACP by FabI

2.3.2 FabA 异构功能的鉴定.

FabA 是大肠杆菌不饱和脂肪酸合成的关键酶之一. 它除了具有催化羟基脂酰 ACP 脱水的活性外, 还具有将反-2-癸烯酰 ACP 异构, 生成顺-3-癸烯酰 ACP 的活性. 而顺-3-癸烯酰 ACP 不能被

FabI 还原, 只能作为 FabB 的底物被延伸, 合成不饱和脂酰 ACP. 检测 FabA 的异构功能按参考文献[11, 13, 16]介绍的方法, 使用由辛酰 ACP 合成癸酰 ACP 的反应来进行. 首先用哈氏弧菌的脂酰 ACP 合成酶先合成辛酰 ACP, 然后逐步添加各种

酶蛋白完成反应. 用 20%非变性聚丙烯酰胺凝胶(含 2.5 mol/L 尿素)电泳检测, 结果显示: 在添加 FabD 和 FabB 后辛酰 ACP 消失(图 6, lane 3), 泳道中仅残留 ACP 和少量的辛酰 ACP. 当添加 FabG 后, 泳道中出现了一条新的 β -羟基癸酰 ACP 条带(图 6, lane 4). β -羟基癸酰 ACP 所处的位置与辛酰 ACP 相近, 但略微偏上. 这与用脂酰 ACP 合成酶合成的辛酰 ACP 和 β -羟基癸酰 ACP 产生的条带一致(待发表数据). 分别添加 FabA(图 6, lane 5)和 FabZ(图 6, lane 6)后, 产生电泳条带明显不同(图 6, lane 5 和 lane 6). 其中图 6 的 lane 5 中出现了一条略低于 β -羟基癸酰 ACP 的条带, 该条带为顺-5-反-2-豆蔻双烯脂酰 ACP. 因 FabA 具有脱水 and 异构双重活性, 所以 β -羟基癸酰 ACP 经 FabA 脱水后产生的反-2-癸烯酰 ACP 作为 FabA 的底物被异构成顺-3-癸烯酰 ACP, 然后被 FabB 的延长成顺-5-单烯- β -酮脂酰豆蔻脂酰 ACP. 该产物被 FabG 还原生成顺-5-单烯- β -羟基十二脂酰 ACP 后又被 FabA 脱水, 形成顺-5-反-2-豆蔻双烯脂酰 ACP. 当体系中添加有 FabI 时(图 6, lane 7)反-2-癸烯酰 ACP 被还原, 由于体系中各种脂肪酸合成酶均存在, 脂酰基链被延长, 因此形成了不同长度的脂酰 ACP, 而癸酰 ACP 仅是其中一

种. lane 6 的条带是 β -羟基癸酰 ACP 经 FabZ 脱水后产生的反-2-癸烯酰 ACP. 由于 FabZ 仅具有 β -羟基脂酰 ACP 脱水功能, 同时体系中没有 FabI, 反-2-癸烯酰 ACP 不能被还原, 只能被积累起来. 上述结果同使用 ^{14}C 标记的丙二酸单酰 CoA 所做的体外实验一致^[13,16].

丙酮丁醇梭菌基因组中仅有一个 *fabZ* 同源基因, 缺少 *fabA* 或 *fabM* 同源基因, 但该菌仍能像大肠杆菌一样合成不饱和脂肪酸^[21]. 因此, 长期以来人们一直怀疑丙酮丁醇梭菌的 FabZ 可能也拥有异构活性, 参与该菌不饱和脂肪酸的合成. 然而遗传学的初步研究显示, 丙酮丁醇梭菌的 FabZ 仅具有脱水功能(待发表数据). 为了进一步确定丙酮丁醇梭菌 FabZ 的功能, 我们利用体外重建脂肪酸合成反应, 对它的功能进行了研究. 用丙酮丁醇梭菌的 FabZ 替代大肠杆菌的 FabZ 进行体外脂肪酸合成反应, 其结果见图 6(lane 9), 由图 6 可知丙酮丁醇梭菌 FabZ 反应的蛋白质条带(图 6, lane 9)的分布与大肠杆菌 FabZ 的反应条带(图 6, lane 6)一致, 表明丙酮丁醇梭菌的 FabZ 具有与大肠杆菌 FabZ 相同的活性, 不具有反-2-癸烯酰 ACP 异构的能力, 该结论与遗传分析得到的一致.

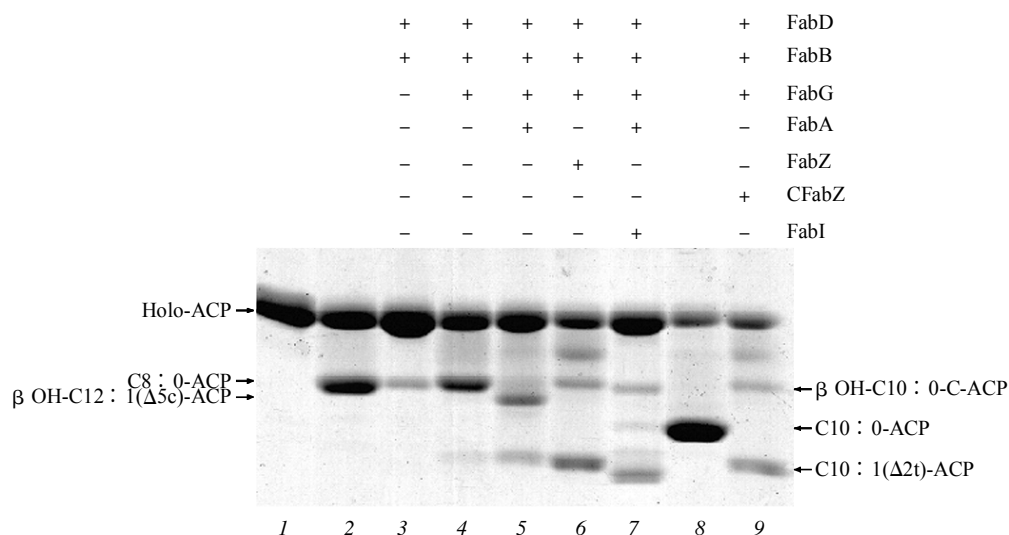


Fig. 6 Isomerization of trans-2-decenoyl-ACP by FabA

2.3.3 FabB 功能的鉴定. 浅蓝菌素是长链酮酯酰 ACP 聚合酶的天然抑制剂. 本课题组通过构建的体外脂肪酸合成体系, 以 β -羟基癸酰 ACP 为底物, 成功地检测了浅蓝菌素对大肠杆菌 FabB 的抑制. 结果见图 7. 图 7 中 Lane 1 和 lane 3 的反应体系中均含有 FabD、FabG 和 FabB, 其中图 7 lane 1

的反应中添加有 FabA, 图 7 lane 2 反应中有 FabZ, 两个泳道均产生反-2-癸烯酰 ACP. 由于 lane 1 的反应体系中有 FabA、FabB 和 FabG, 使得部分反-2-癸烯酰 ACP 异构化, 形成顺-3-癸烯酰 ACP, 经 FabB 聚合和 FabG 还原, 生成顺-5-反-2-豆蔻双烯脂酰 ACP. 添加 FabI 后(图 7, lane 2 和 lane 4),

反-2-癸烯酰 ACP 被还原, 生成癸脂酰 ACP, 且部分产物在 FabB、FabG、FabA 或 FabZ 和 FabI 的作用下进一步延伸, 形成月桂酰 ACP. 但是当反应体系中加入有浅蓝菌素时, FabB 活性被抑制,

FabA 和 FabZ 一样只能将 β -羟基癸酰 ACP 脱水, 产生反-2-癸烯酰 ACP(图 7, lane 5 和 lane 7). 有 FabI 存在时反-2-癸烯酰 ACP 被还原, 仅生成癸脂酰 ACP(图 7, lane 6 和 lane 8), 且不能被延伸.

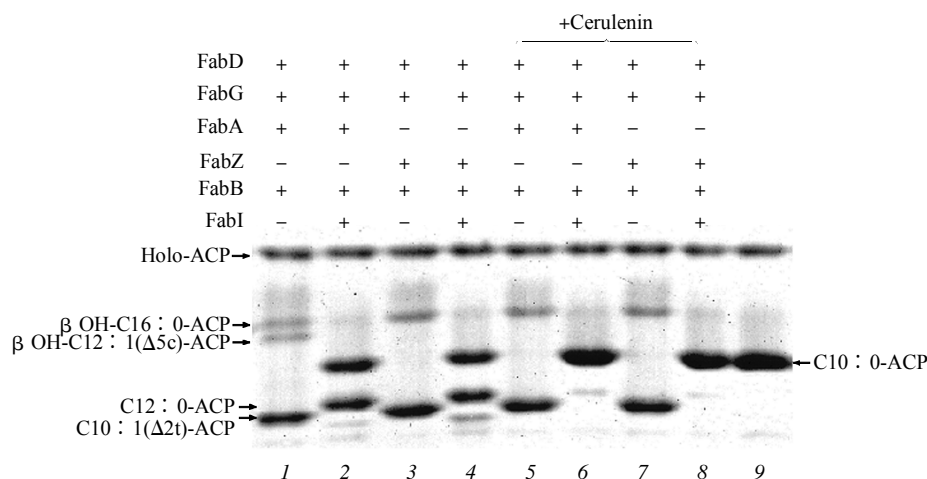


Fig. 7 Inhibition of FabB by Cerulenin

3 讨 论

体外重建细菌脂肪酸合成反应的体系是指在体外向一定的反应缓冲体系中按次序添加各种酶蛋白 (FabD、FabH 或 FabB、FabZ 或 FabA、FabG 和 FabI) 和辅因子 (丙二酸单酰 CoA、NADH、NADPH、ACP 和乙酰 CoA 或脂酰 ACP), 在一定的温度条件下, 合成各种脂酰 ACP 的过程. 根据各种脂酰 ACP 在凝胶上迁移率的差异, 用非变性聚丙烯酰胺凝胶分离各种脂酰 ACP, 鉴定相应的脂酰 ACP 种类. 该反应体系的建立为我们更加简洁深入地进行以下研究提供了巨大的方便: a. 根据特征性脂酰 ACP 的形成, 确定某些脂肪酸合成酶的功能和脂肪酸合成抑制剂的作用位点^[7,11,13,16,18,19]. b. 用于合成不同链长或不同取代基团的脂酰 ACP, 为研究类脂 A、硫辛酸和酯酰高丝氨酸内脂等代谢提供底物^[17].

以往的体外重组细菌脂肪酸合成反应一般使用 [^{14} C]丙二酸单酰 CoA 为底物, 同时采用放射性自显影技术, 在胶片上得到各种脂酰 ACP 特征性条带^[13]. 这样操作的主要目的是增加脂酰 ACP 条带的分辨率. 但同时使用同位素也存在着实验成本高、放射性污染严重、操作繁琐和不宜分析大量样品等弊端. 针对上述弊端, 本课题组对体外重建脂肪酸合成反应进行了一系列改进, 建立了一套易操

作、无放射性污染、适于大量样品分析的方法. 改进之处有: a. 使用非同位素标记的丙二酸单酰 CoA 和脂酰 ACP 合成酶合成的脂酰 ACP 为底物. b. 采用考马斯亮蓝染色凝胶, 直接在凝胶图谱上分析脂酰 ACP 的特征条带. c. 对不同链长的脂酰 ACP 采用不同浓度聚丙烯酰胺凝胶, 且添加不同浓度的尿素进行分离, 例如, 对短链(C2~C4)的脂酰 ACP 使用含有 0.5 mol/L 尿素的 13%聚丙烯酰胺凝胶分离, 长链脂酰 ACP(C6~C16)采用含有 2.5 mol/L 尿素的 20%聚丙烯酰胺凝胶分离. 实际证明采用改进后的体外脂肪酸合成反应体系同样能够合成不同链长或不同取代基的脂酰 ACP, 能够根据各种酶的特征反应, 鉴定酶的功能. 例如本课题组使用该反应系统成功地鉴定了丙酮丁醇梭菌 FabZ 的功能, 得到了与遗传分析一致的结论.

大肠杆菌参与脂肪酸合成的酶主要有 FabD、FabH、FabZ、FabA、FabG、FabF、FabB 和 FabI 八种. 由于过量表达 FabF 严重抑制大肠杆菌生长^[22], 同时 FabB 和 FabF 均属于长链酮酯脂酰 ACP 合成酶, 实践证明缺少 FabF 不会影响体外脂酰 ACP 的合成^[16], 故本研究未纯化 FabF.

致谢 感谢美国 Illinois 大学 Cronan 教授提供的哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶表达载体.

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 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): 145~55
- 3 White S W, Zheng J, Zhang Y M, *et al.* The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 2004, (74): 791~831
- 4 Heath R J, White S W, Rock C O. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog Lipid Res*, 2001, **40**(6): 467~497
- 5 Zheng C J, Yoo J S, Lee T G, *et al.* Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett*, 2005, **579**(23): 5157~5162
- 6 Marrakchi H, Zhang Y M, Rock C O. Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**(Pt 6): 1050~1055
- 7 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
- 8 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
- 9 Heath R J, Rock C O. A triclosan-resistant bacterial enzyme. *Nature*, 2000, **406**(6792): 145~146
- 10 Marrakchi H, Dewolf W E, Quinn C, *et al.* Characterization of streptococcus pneumoniae enoyl- (acyl-carrier protein) reductase (FabK). *Biochem J*, 2003, **370**(Pt 3): 1055~1062
- 11 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): p. 44809~44816
- 12 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
- 13 Lu Y J, White S W, Rock C O. Domain swapping between *Enterococcus faecalis* FabN and FabZ proteins localizes the structural determinants for isomerase activity. *J Biol Chem*, 2005, **280**(34): 30342~30348
- 14 Zhang Y M, White S W, Rock C O. Inhibiting bacterial fatty acid synthesis. *J Biol Chem*, 2006, **281**(26): 17541~17544
- 15 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
- 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 Biol Chem*, 1996, **271**(44): 27795~27801
- 17 Hoang T T, Sullivan S A, Cusick J K, *et al.* Beta-ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths. *Microbiology*, 2002, **148**(Pt 12): 3849~3856
- 18 Heath R J, Rock C O. Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1996, **271**(4): 1833~1836
- 19 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 Biol Chem*, 1996, **271**(18): 10996~11000
- 20 Jiang Y, Chan C H, Cronan J E. The soluble acyl-acyl carrier protein synthetase of *Vibrio harveyi* B392 is a member of the medium chain acyl-CoA synthetase family. *Biochemistry*, 2006, **45** (33): 10008~10019
- 21 Campbell J W, Cronan J E. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. *Annu Rev Microbiol*, 2001, **55**: 305~332
- 22 Subrahmanyam S, Cronan J E. Overproduction of a functional fatty acid biosynthetic enzyme blocks fatty acid synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1998, **180**(17): 4596~4602

Reconstitution of *Escherichia coli* Fatty Acid Biosynthesis Reaction *In vitro**

FENG Sai-Xiang**, ZHU Lei**, LUO Biao, SUN Yi-Rong, WANG Hai-Hong***

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

Abstract Seven genes (*fabD*, *fabG*, *fabH*, *fabA*, *fabZ*, *fabB* and *fabI*) of *E.coli* fatty acid biosynthetic enzymes were cloned by PCR amplifying and appropriate expression vectors were constructed. Under induction assay expression of plasmid encoded proteins was carried out in strain BL21 (DE3) and seven enzymes were purified using Ni-NTA agarose resin. In the absence of [2-¹⁴C] malonyl-CoA fatty acid synthetic reaction was reconstituted *in vitro* by adding seven enzymes and co-factors. And several model reactions were established for identification of special fatty acid biosynthetic enzymes. Meanwhile *Clostridium acetobutylicum* FabZ function was characterized by this method.

Key words fatty acid synthesis of bacteria, acyl-ACP, native polyacrylamide gels

*This work was supported by a grant from the President Foundation of South China Agricultural University.

**FENG Sai-Xiang and ZHU Lei contributed equally to this work.

***Corresponding author.

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

Received: January 9, 2008 Accepted: March 6, 2008