

五个 3-酮脂酰 ACP 合成酶同源蛋白的功能鉴定*

马金成 邓丽婷 童文华 朱 磊 王海洪**

(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 大肠杆菌的 FabB 和 FabF 均具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性. 除参与长链饱和脂酰链的延伸外, FabB 还是合成不饱和脂肪酸的关键酶之一, 参与不饱和脂酰 ACP 的从头合成, 最终生成顺-9-十六烯脂酰 ACP. 而 FabF 只能将顺-9-十六烯脂酰 ACP 延伸为顺-11-十八烯脂酰 ACP, 不参与不饱和脂酰 ACP 的从头合成. 有研究表明, 粪肠球菌、乳酸乳球菌、丙酮丁醇梭菌和茄科雷尔氏菌等细菌的 FabF 同源蛋白, 具有类似大肠杆菌 FabB 和 FabF 的双功能. 为证实该现象是否普遍存在, 本研究选取了枯草芽孢杆菌 *BsfabF*、中华苜蓿根瘤菌 *SmfabF*、霍乱弧菌 *VcfabF*、铜绿假单胞菌 *PafabF1* 和 *PafabF2* 5 个同源基因进行功能鉴定, 体外酶学分析表明, 5 个 FabF 同源蛋白均具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性, 异体互补大肠杆菌 CL28 的脂肪酸组分分析显示, *SmfabF*、*VcfabF*、*PafabF1* 和 *PafabF2* 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF) 活性, 遗传互补大肠杆菌温度敏感突变株 CY242 和 CY244 的研究显示, 仅有 *PafabF2* 编码的蛋白拥有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 活性, 能互补大肠杆菌 *fabB* 的突变. 这表明不是所有的 FabF 同源蛋白均具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 和 II 的双重活性.

关键词 细菌脂肪酸合成, 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I, 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II, 遗传互补

学科分类号 Q93

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00044

脂肪酸合成是细菌主要的基础代谢之一, 与细菌的生命活动密切相关^[1]. 研究证明细菌的脂肪酸合成机理高度保守, 一般均采用 II 型脂肪酸合成途径. 其特点是每一步生化反应均由独立的酶蛋白催化^[1-2]. 其中, 3-酮脂酰 ACP 合成酶催化脂酰 ACP (或乙酰 CoA) 与丙二酸单酰 ACP 的聚合, 是细菌脂肪酸合成关键酶^[3]. 在不同细菌中该合成酶的蛋白质序列同源性较高, 但在存在类型和脂酰链的延伸功能上也表现出多样性^[2, 4].

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 有 3 个 3-酮脂酰 ACP 合成酶 (KAS): 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB)、3-酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF) 和 3-酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH)^[5]. 其中 FabH 以乙酰 CoA 和丙酰 CoA 为底物, 起始脂肪酸的合成反应, 而 FabB 和 FabF 均能缩合丙二酸单酰 ACP 与脂酰 ACP, 完成长链脂酰链的延伸. 虽然 FabB 和 FabF 均具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性, 但是它们的生理功能有着质的差异. 大肠杆菌的 FabB 是合成不饱和脂肪酸的关键酶之一, 直接参与不饱和脂酰 ACP 的从头合成, 最终生成顺-9-十六烯脂

酰 ACP. 而 FabF 不参与不饱和脂酰 ACP 的从头合成, 但能将顺-9-十六烯脂酰 ACP 延伸为顺-11-十八烯脂酰 ACP, 在随温度变化调节细胞脂肪酸组成中起关键作用^[6-7]. FabB 同源蛋白仅存在于变形菌门 (Proteobacteria) 的 α 和 γ 类群中, 而 FabF 的同源蛋白却在细菌中普遍存在^[3], 且表现出与大肠杆菌 FabF 不同的功能. 如粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 具有 2 个 FabF 类酶 (FabF like enzyme), FabF1 (又称 FabO) 和 FabF2, 其中 FabF1 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 活性, 而 FabF2 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF) 和 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 的双重活性^[3, 8]. 在肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)^[9]、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)^[10] 和丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium*

* 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) 和广东高校优秀青年创新人才培养计划 (LYM10038) 资助项目.

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2014-02-20, 接受日期: 2014-05-23

acetobutylicum)^[11]中的 FabF 同源蛋白也都具有类似大肠杆菌 FabB 和 FabF 的双功能。最近的研究发现, 革兰氏阴性细菌中也存在 FabF 同源蛋白具有大肠杆菌 FabB 和 FabF 双重功能的现象, 如茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)中存在 4 个 FabF 同源蛋白 RsFabF1、RsFabF2、RsFabF3、RsFabF4 和 1 个 FabB 的同源蛋白 RsFabB, 其中 RsFabF1 兼具有长链 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 FabB 和 FabF 的活性, 是茄科雷尔氏菌脂肪酸合成中的必需基因^[12]。从前人的研究中可以看出这些细菌脂肪酸合成过程中 FabF 同源蛋白均同时承担 3- 酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF) 和 3- 酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 的双功能。那么这一现象是否普遍存在呢? 有待验证。

为了证明上述推测, 本研究选取了具有代表性的革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)以及阴性细菌中华苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)为研究对象, 利用大肠杆菌 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 II (EcFabF) 蛋白序列, 同源比对这 4 个细菌的基因组, 结果发现了 5 个与

FabF 蛋白相似性较高的同源基因, 分别命名为 *BsfabF*、*SmfabF*、*VcfabF*、*PafabF1* 和 *PafabF2*, 与 EcFabF 蛋白相似性分别达到 56.3%、50.2%、74.7%、66.2% 和 46.9%, 且都具有长链 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶保守的 Cys-His-His 活性中心。本研究克隆了这 5 个 3- 酮脂酰 ACP 合成酶基因, 采用体外酶活性检测、异体遗传互补及脂肪酸组成分析等技术分析了其在细菌脂肪酸合成代谢中的功能。现报道如下。

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有 DH5 α 、BL21 (DE3)、CL28^[13]、CY242 (*fabB*(ts))^[14] 和 CY244 (*fabB*(ts)*fabF*)^[15]。使用的质粒载体有 pMD19-T、pBAD24M^[3] 和 pET28(b), 其他载体均为上述质粒的衍生质粒(具体构建见下文), 具体细菌菌株和质粒见表 1。LB 用作培养大肠杆菌的丰富培养基, RB 作为检测脂肪酸合成突变菌株的培养基^[14]。油

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strains/Plasmid	Relevant genotype or characteristics	Sources or reference
<i>E. coli</i> Strains		
DH5 α	ϕ 80d lacZ Δ M15 endA1recA1hsdR17(rK ⁻ , mK ⁺)	Laboratory collection
Top10	mcrA Δ (mrrhsdRMS ⁻ mcrBC) ϕ 80d lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697	Laboratory collection
BL21(DE3)	<i>ompT hsdS B</i> (rB ⁻ mB ⁻) (DE3)	Laboratory collection
CL28	<i>E. coli fabF</i> ⁻ Km ^r	[13]
CY242	<i>fabB</i> (ts)	[14]
CY244	<i>fabB</i> (ts) <i>fabF</i>	[15]
Plasmids		
pMD19-T	TA cloning vector, Amp ^r	Takara
pBAD24m	Expression vector, Amp ^r	[3]
pET28b	Expression vector, Km ^r	Laboratory collection
pT1	<i>fabF</i> of <i>B. subtilis</i> in pMD19-T, Amp ^r	This work
pT2	<i>fabF</i> of <i>S. meliloti</i> in pMD19-T, Amp ^r	This work
pT3	<i>fabF</i> of <i>V. cholera</i> in pMD19-T, Amp ^r	This work
pT4	<i>fabF1</i> of <i>P. aeruginosa</i> in pMD19-T, Amp ^r	This work
pT5	<i>fabF2</i> of <i>P. aeruginosa</i> in pMD19-T, Amp ^r	This work
pM1	<i>fabF</i> of <i>B. subtilis</i> in pBAD24m, Amp ^r	This work
pM2	<i>fabF</i> of <i>S. meliloti</i> in pBAD24m, Amp ^r	This work
pM3	<i>fabF</i> of <i>V. cholera</i> in pBAD24m, Amp ^r	This work
pM4	<i>fabF1</i> of <i>P. aeruginosa</i> in pBAD24m, Amp ^r	This work
pM5	<i>fabF2</i> of <i>P. aeruginosa</i> in pBAD24m, Amp ^r	This work
pB1	<i>fabF</i> of <i>B. subtilis</i> in pET28b, Km ^r	This work
pB2	<i>fabF</i> of <i>S. meliloti</i> in pET28b, Km ^r	This work
pB3	<i>fabF</i> of <i>V. cholera</i> in pET28b, Km ^r	This work
pB4	<i>fabF1</i> of <i>P. aeruginosa</i> in pET28b, Km ^r	This work
pB5	<i>fabF2</i> of <i>P. aeruginosa</i> in pET28b, Km ^r	This work

酸(Ole)用无水乙醇配成 20%油酸储液, 并用氢氧化钾调 pH 至中性. 在 RB 培养基中油酸的最终添加浓度是 0.1%. 常用的试剂和抗生素的使用浓度如下: 100 mg/L 氨苄青霉素, 30 mg/L 卡那霉素, 0.02% L- 阿拉伯糖(Ara), 1 mmol/L 异丙基 -β-D- 硫代吡喃半乳糖苷(IPTG).

1.1.2 试剂

限制性内切酶、T4 连接酶、*Taq*、*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; 氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素、氯仿、丙烯酰胺、N, N- 亚甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、考马斯亮蓝 G-250 等购自北京鼎国公司; IPTG、油酸和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; [1-¹⁴C]乙酸钠(1.92×10¹² Bq/mol) 购自 American Radiolabeled Chemicals 公司; 蛋白胨、酵母提取物、琼脂糖均为 OXOID 原装试剂; 其余试剂和药品均为国产分析纯.

1.2 重组 DNA 技术

本研究所使用的 PCR 引物见表 2, 分别以枯草芽孢杆菌、中华苜蓿根瘤菌、霍乱弧菌和铜绿假单胞菌基因组 DNA 为模板, 使用 *pfu* DNA 聚合酶, PCR 扩增 *BsfabF*、*SmfabF*、*VcfabF*、*PafabF1* 和 *PafabF2* 基因. 回收 PCR 扩增产物, 经 *Taq* DNA 聚合酶催化末端加尾后, 分别连接至

pMD19-T 载体, 并转化大肠杆菌 DH5α, 筛选阳性克隆, DNA 序列测定验证 T 载体上携带的基因序列, 得到质粒 pT1(*BsfabF*), pT2(*SmfabF*), pT3(*VcfabF*), pT4 (*PafabF1*) 和 pT5 (*PafabF2*). 使用 *Nde* I 和 *Hind* III 分别消化 pT1、pT2、pT3、pT4 和 pT5, 回收酶切产物并分别克隆到载体 pBAD24M 上, 得到表达载体 pM1、pM2、pM3、pM4 和 pM5. 用类似的策略, *Nde* I 和 *Hind* III 分别消化 pT1、pT2、pT3、pT4 和 pT5, 回收酶切产物并分别克隆到 pET28(b)上得到表达载体 pB1、pB2、pB3、pB4 和 pB5.

1.3 FabFs 蛋白表达与分离纯化

将表达体质粒 pB1、pB2、pB3、pB4 和 pB5 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, FabFs 蛋白的表达和分离纯化参考文献[11, 16]进行. 同时参考文献[17]的方法, 分别分离纯化大肠杆菌 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶 II (FabD)、3- 酮脂酰 ACP 还原酶 (FabG)、3- 羟基脂酰 ACP 脱水异构酶(FabA)、哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶 (AasS) 和大肠杆菌 holo-ACP 蛋白, 并且体外合成了丙二酸单酰 ACP (Mal-ACP)、辛脂酰 ACP、反 -2- 癸烯酰 ACP.

1.4 FabFs 体外功能检测

体外检测 FabFs 是否具有长链 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶的活性参考文献[16]. 具体做法如下: 反应体积 50 μl, 其中含有 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0); 50 μmol/L NADPH; 50 μmol/L NADH; 50 μmol/L Mal-ACP; 50 μmol/L 辛脂酰 ACP; 大肠杆菌脂肪酸合成酶: FabG 和 FabA 各 0.1 μg. 反应在添加 0.1 μg 纯化的 FabF 蛋白(或大肠杆菌 EcFabB)后开始计时, 37℃ 保温 1 h. 分别用辛脂酰 ACP 和反 - 2- 癸烯酰 ACP 作为对照, 使用分离胶浓度为 17.5%, 且含有 3 mol/L 尿素的非变性蛋白质凝胶电泳进行分析.

1.5 脂肪酸组成成分测定

将构建好的 pBAD24M 系列互补载体: pM1、pM2、pM3、pM4、pM5 和 pBAD24M 空载分别转化至大肠杆菌的 *fabF* 突变株 CL28. 通过 Ara 诱导质粒表达, 抽提各菌株的磷脂^[3], 通过 GC-MS 分析脂肪酸组成成分.

1.6 异体遗传互补分析

将构建好的 pBAD24M 系列互补载体: pM1、pM2、pM3、pM4、pM5 和 pBAD24M 空载分别转化至大肠杆菌的 *fabB* 温度敏感突变株 CY242 中, 涂布于 LB 培养基平板上(含 Amp), 30℃ 静置培养

Table 2 Sequences of the PCR primers used in this work

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGGG
pBAD forward	CGCAACTCTCTACTGTTTCTC
pBAD reverse	GCTGAAAATCTTCTCTCATCC
M13 forward	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC
M13 reverse	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
<i>BsfabF</i> <i>Nde</i> I	GAGGTGCACACCATATGACTAAAAAAGAG
<i>BsfabF</i> <i>Hind</i> III	CATGAAGCTTATCCCATGATGCTGAAGATG
<i>SmfabF</i> <i>Nde</i> I	TCACGCATATGAGACGTGTCGTTATCAC
<i>SmfabF</i> <i>Hind</i> III	TATGAAGCTTATGCAGATCGGAAGATGTG
<i>VcfabF</i> <i>Nde</i> I	GAATATTCATATGTCCAAGCGTC
<i>VcfabF</i> <i>Hind</i> III	CACTAAGCTTACGCCGTTGACCATTGACC
<i>PafabF1</i> <i>Nde</i> I	ACTGTCATATGTCGCTAGACGCGTCGTCAT
<i>PafabF1</i> <i>Hind</i> III	TAGTAAGCTTTCAGTCGGCGAACCTGCGGAAC
<i>PafabF2</i> <i>Nde</i> I	ACGTAGCATATGAGCAAACGTATCGTCGTCA
<i>PafabF2</i> <i>Hind</i> III	TATGAAGCTTCTACACCCAGCGCCGGAACAAC

过夜, 筛选转化子, 将转化子分别划线转接在 RB 培养基上(含 Amp)并按需要添加油酸和 L- 阿拉伯糖, 并于 30℃ 和 42℃ 培养过夜, 观察细菌生长情况, 进行表型互补鉴定。

异体遗传互补大肠杆菌温度敏感突变株 CY244 的方法同 CY242, 将 pM1、pM2、pM3、pM4、pM5 和 pBAD24M 空载分别转化 CY244 中, 涂布于 LB 培养基平板上(含 Amp), 30℃ 静置培养过夜, 筛选转化子, 将转化子分别划线转接在 RB 培养基上(含 Amp、油酸和 L- 阿拉伯糖), 并于 30℃ 和 42℃ 培养过夜。由于 CY244 菌株表型的不稳定性, 划线培养获得的生长表型不明显。故本研究采用稀释点板的办法, 将上述互补 CY244 的各菌株, 液体摇菌培养到 A_{600} 至 0.8 后, 将菌液梯度稀释 10^{-1} 倍、 10^{-2} 倍、 10^{-3} 倍, 然后取 5 μ l 在 RB 培养基上(含 Amp、油酸和 L- 阿拉伯糖)点板培养, 进行生长表型互补鉴定。

1.7 脂肪酸组成薄层层析

将上述遗传互补分析的大肠杆菌接种在 5 ml LB 培养液中, 30℃ 条件下培养过夜。接种 200 μ l 过夜培养液到 5 ml RB 培养基中, 30℃ 条件下培养 4 h, 菌液培养到 A_{600} 至 0.6; 42℃ 培养 2 h 添加 20% L- 阿拉伯糖 5 μ l 和 $[1-^{14}\text{C}]$ 乙酸钠 5 μ l, 继续培养 2~3 h; 4000 r/min 离心 10 min 去除上清, 并采用 NaOH 甲醇 / 盐酸甲醇的方法抽提各菌株的磷脂^[3]; 脂肪酸组成采用薄层层析, 用磷屏成像系统检测放射性信号^[4, 14, 18]。

2 结果与分析

2.1 FabF 同源蛋白的蛋白质表达纯化和体外功能检测

为体外研究 5 个 FabF 同源蛋白的功能, 我们首先克隆 *BsfabF*、*SmfabF*、*VcfabF*、*PaFabF1*、*PaFabF2* 基因, 然后将质粒 pT1 (*BsfabF*), pT2 (*SmfabF*), pT3 (*VcfabF*), pT4 (*PaFabF1*) 和 pT5 (*PaFabF2*) 上携带的 *fabF* 基因分别克隆到 pET28(b) 质粒上, 构建了能在大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株中高效表达的载体 pB1、pB2、pB3、pB4、pB5。热激转化大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株, 在 37℃ 进行蛋白质表达, 结果显示 FabFs 在 BL21(DE3) 菌株中均能高效表达, 且主要以可溶性形式存在(结果未列)。根据这一结果, 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 BsFabF、SmFabF、VcFabF、PaFabF1 和 PaFabF2 蛋白。经检测纯化的 FabFs 蛋白在 15% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上均为单一条带(图 1a), 分别为 44.0、44.2、43.2、43.5 和 43.5 ku。与推测的 FabF 蛋白的大小相符, 表明蛋白质纯化成功。

为了确定上述纯化的 FabFs 蛋白是否具有长链 3- 酮基脂酰 ACP 合成酶活性, 体外重建大肠杆菌脂肪酸合成体系, 通过分析合成产物来明确纯化的 FabFs 在脂肪酸延伸反应中的功能。反应体系中以辛脂酰 ACP 和丙二酸单酰 ACP 为底物, 合成较底物多 2 个碳原子的 3- 酮脂酰 ACP, 该产物在 3- 酮

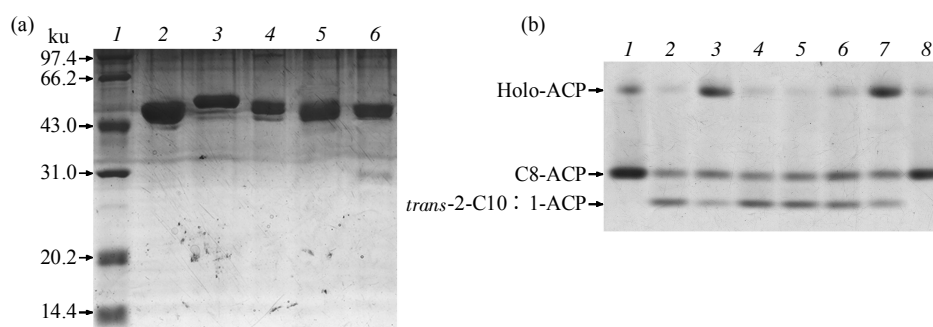


Fig. 1 Purification of FabFs and Enzymatic characterization of FabFs in fatty acid biosynthesis

(a) Purification of FabFs. 1: Protein marker; 2: BsFabF; 3: SmFabF; 4: VcFabF; 5: PaFabF1; 6: PaFabF2. (b) Assay of FabFs KAS activities *in vitro*. Fatty acid biosynthesis was reconstructed by the sequential addition of each purified enzyme to a reaction mixture containing Tris-HCl, NADH, Mal-ACP and octanoyl-ACP. The octanoyl-ACP was elongated an acetate unit with malonyl-ACP by 3-ketoacyl-ACP synthase (EcFabB or FabFs), and then the condensation product, 3-keto-*cis*-5-decenoyl-ACP, was reduced by FabG to 3-hydroxyacyl-ACP. The resulting product is dehydrated by FabA to form enoyl-ACP. The reaction products were resolved by conformational sensitive gel electrophoresis on 15% polyacrylamide gels containing concentrations of urea optimized to effect the separation. The migration positions of octanoyl-ACP and *trans*-2-decanoyl-ACP on gel are shown. 1: The standard octanoyl-ACP; 2: EcFabB; 3~7: BsFabF, SmFabF, VcFabF, PaFabF1 and PaFabF2, respectively; 8: Octanoyl-ACP without EcFabB or FabFs.

脂酰 ACP 还原酶(FabG), 3-羟脂酰 ACP 脱水酶(FabA)的作用下产生反-2-癸烯酰 ACP, 由于辛脂酰 ACP 和反-2-癸烯酰 ACP 的构象不同, 在非变性蛋白质凝胶电泳时因迁移速率不同而呈现不同的条带. 结果如图 1b 所示, 在含有 EcFabG 和 EcFabA 的反应体系中, 由于 EcFabB 具有延伸功能, 底物辛脂酰 ACP(C8:0-ACP)被延伸 2 个碳原子, 形成反-2-癸烯酰 ACP(泳道 2). 在泳道 3~7 中当反应体系中添加纯化的 FabF 后生成了与泳道 2 一致的条带, 即 *BsfabF*、*SmfabF*、*VcfabF*、*PafabF1* 和 *PafabF2* 5 个基因编码的蛋白产物均能将 C8-ACP 和丙二酸单酰 ACP 缩合形成癸脂酰 ACP, 并通过 FabG 还原和 FabA 脱水最终生成稳定的反-2-癸烯酰 ACP, 起到延伸饱和脂肪酸链的作用.

2.2 *fabF* 同源基因遗传互补菌株的脂肪酸组成分析

为了在体内验证这 5 个 FabF 同源蛋白具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 的活性, 本研究将 5 个同源基因分别克隆到 pBAD24M 互补载体, 然后转化至大肠杆菌的 *fabF* 突变株 CL28. 通过提取互补菌株全细胞脂肪酸并且利用 GC-MS 技术分析其脂肪酸组成成分. 分析结果如表 3 所示, 与对照菌株 CL28 (pBAD24M) 相比 CL28/pM2、CL28/pM3、CL28/pM4 和 CL28/pM5 菌株主要的不饱和脂肪酸

C16:1 占总脂肪酸的比例均有所下降, 而饱和脂肪酸 C18:1 所占比例均提高了, 其中最明显的是 CL28/pM2(*SmfabF*)和 CL28/pM5(*PafabF2*), C16:1 占总脂肪酸的比例由对照的 19.94%分别下降到 3.08%和 5.06%; C18:1 所占的比例由对照的 2.85%分别提高到 16.80%和 17.78%. 上述研究结果表明 *SmfabF* 和 *PafabF2* 编码的蛋白具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 的活性, 类似大肠杆菌 EcFabF 能将不饱和脂肪酸顺-9-十六烯酸延伸为顺-11-十八烯酸, 而 *VcfabF* 和 *PafabF1* 编码的同源蛋白在此延伸反应中作用不强, 表现为顺-11-十八烯酸所占的比例未有大幅度增加, 主要的不饱和脂肪酸仍是顺-9-十六烯酸. 从表 4 中我们可以看出, CL28/pM1 菌株相比对照其 C16:1 占总脂肪酸的比例虽然下降了, 但在总脂肪酸中检测不到顺-11-十八烯酸, 这说明枯草芽孢杆菌 *BsfabF* 基因编码的 3-酮脂酰 ACP 合成酶不参与 C16:1 到 C18:1 的延伸, 具有与大肠杆菌 EcFabF 不同的酶学特性, 这可能跟枯草芽孢杆菌不需要从头合成不饱和脂肪酸有关. 综合前面的体外酶学实验结果, 我们可以推断虽然 *BsfabF*、*SmfabF*、*VcfabF*、*PafabF1* 和 *PafabF2* 5 个基因编码的蛋白均具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性, 但在体内的功能存在着种属差异性.

Table 3 Fatty acid composition analysis of CL28 strains transformed with plasmids pM1, pM2, pM3, pM4 or pM5

Fatty acid	CL28/pBAD24M	CL28/pM1	CL28/pM2	CL28/pM3	CL28/pM4	CL28/pM5
C12:0	2.90%	4.47%	4.30%	2.68%	3.72%	4.03%
C14:0	12.67%	24.57%	12.89%	15.30%	12.23%	15.21%
C16:1	19.94%	11.71%	3.08%	15.31%	17.80%	5.06%
C16:0	40.46%	41.16%	43.68%	41.43%	42.99%	32.48%
C18:1	2.85%	0.00%	16.80%	8.76%	9.36%	17.78%
C18:0	21.19%	18.08%	19.24%	16.51%	13.90%	25.43%

2.3 *fabF* 同源基因遗传互补大肠杆菌突变菌株

为了证明 FabF 同源蛋白是否同时拥有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 活性, 我们将互补载体 pM1 (*BsfabF*)、pM2 (*SmfabF*)、pM3 (*VcfabF*)、pM4 (*PafabF1*)、pM5 (*PafabF2*)和 pBAD24M 空载分别转化至大肠杆菌的 *fabB*(ts)突变株 CY242 和 *fabB*(ts) *fabF* 双突变菌株 CTY244 中, 在添加 L-阿拉伯糖或油酸的 RB 平板上检测转化子的生长状况. 这两

个突变株在 30℃ 正常生长, 但在 42℃ 时, 由于 FabB 失去活性, 不饱和脂肪酸合成途径受阻, 菌体不能生长^[9].

异体遗传互补 CY242 菌株的结果表明: 不添加油酸和 L-阿拉伯糖的条件下, 携带外源 *fabF* 基因的 CY242 菌株同携带载体质粒 pBAD24M 的菌株均不能在 42℃ 生长, 而体外添加油酸和 L-阿拉伯糖或者单独添加油酸后, 各遗传互补 CY242 菌

株均能恢复生长表型(图 2). 如果在 RB 培养基中仅添加 L- 阿拉伯糖诱导 pBAD24M 上基因的表达, 则只有来自铜绿假单胞菌的 *PafabF2* 能部分恢复 CY242 菌株的生长表型, 但长势较弱(图 2). 由此说明 *BsfabF*、*SmfabF*、*VcfabF*、*PafabF1* 均不能互

补大肠杆菌 *fabB* 突变, 即它们的基因产物不具有 3- 酮脂酰 ACP 合成酶 I 活性, 而 *PafabF2* 则具有微弱的 3- 酮脂酰 ACP 合成酶 I 活性, 即具有部分大肠杆菌 *FabB* 的功能.

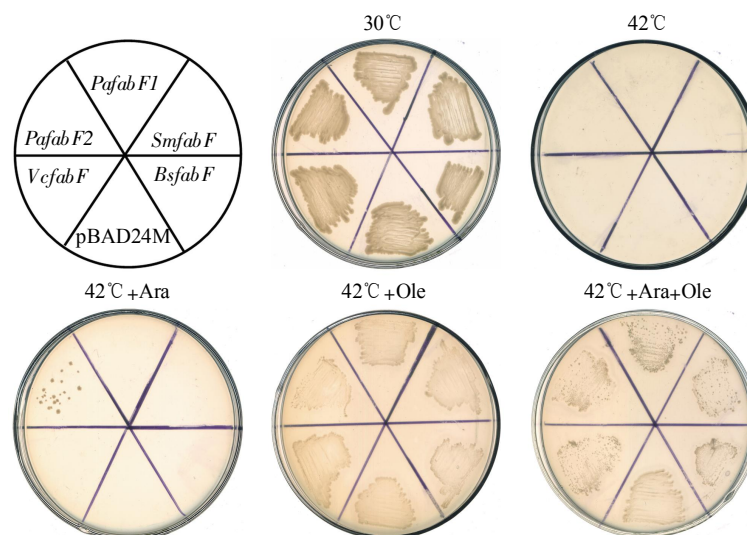


Fig. 2 Growth of transformants of *E. coli fabB(ts)* mutant CY242 with plasmid carrying homologous *fabF* gene

E. coli strains CY242 carrying the pBAD24M or pBAD24M-derived plasmid pM1 (*BsfabF*), pM2 (*SmfabF*), pM3 (*VcfabF*), pM4 (*PafabF1*) and pM5 (*PafabF2*) were grown at 30°C and 42°C on RB medium containing arabinose and oleic acid.

异体遗传互补 CY244 菌株的结果表明, 在 30°C 时, 不添加油酸, 各菌株都正常生长(结果未展示). 在 42°C 条件下, 添加 L- 阿拉伯糖诱导后只有含 pM5(*PafabF2*)质粒的互补菌株才能恢复生长表型(图 3), 这印证了上述对 CY242 的遗传互补结果, 只有 *PafabF2* 具有互补大肠杆菌 *fabB* 突变的

功能. 从图 3 我们还可以看出, 在 42°C 条件下添加油酸后含 pM1、pM2、pM3、pM4、pM5 质粒的互补菌株均可以在 RB 培养基上恢复生长, 该实验再次说明了 *BsfabF*、*SmfabF*、*VcfabF*、*PafabF1* 和 *PafabF2* 均能互补大肠杆菌 *fabF* 突变的功能.

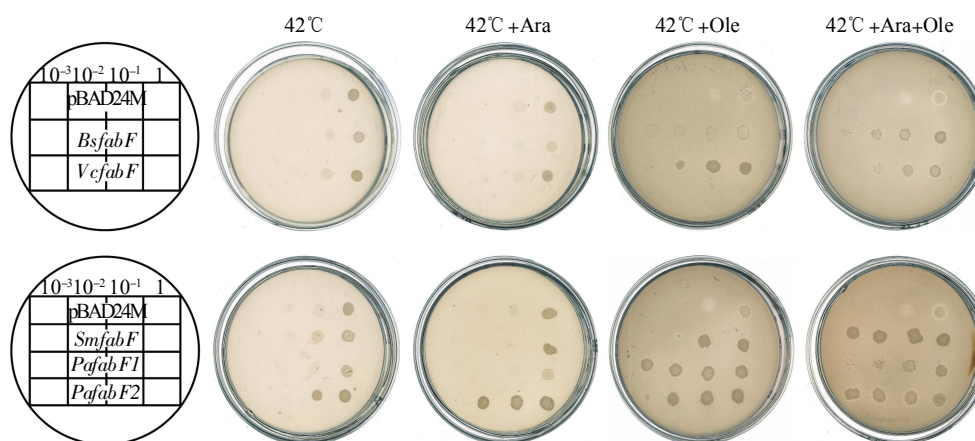


Fig. 3 Growth of transformants of *E. coli fabB(ts)fabF* mutant CY244 with plasmid carrying homologous *fabF* gene

Complementary experiments of *E. coli* strains CY244 carrying the pBAD24M or pBAD24M-derived plasmid pM1 (*BsfabF*), pM2 (*SmfabF*), pM3 (*VcfabF*), pM4 (*PafabF1*) and pM5 (*PafabF2*) were grown at 42°C on RB medium containing arabinose and oleic acid.

综合上述, 遗传互补实验表明, *BsfabF*、*SmfabF*、*VcfabF*、*PqfabF1* 编码的蛋白具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 活性, 而 *PqfabF2* 编码蛋白具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 和 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 的双重活性, 能互补大肠杆菌 *fabB* 和 *fabF* 双重突变的功能。

2.4 *fabF* 同源基因遗传互补菌株的薄层层析分析

如果上述结论是正确的, 那么含 pM5 质粒的互补菌株其脂肪酸组成中应有不饱和脂肪酸成分。因此, 我们用[1-¹⁴C]乙酸钠标记各转化菌株, 提取磷脂并转化为脂肪酸甲酯后通过薄层层析分析菌株磷脂中的脂肪酸组成。结果如图 4 所示。转化 pBAD24M 空载体的 CY242 菌株不能合成不饱和脂肪酸, 仅有痕迹量的棕榈油酸(图 4a, 泳道 1), 而 CY242/pM5(*PqfabF2*)菌株在添加 Ara 诱导时, 能够合成棕榈油酸和十八碳烯酸(图 4a, 泳道 6), 而含 pM1、pM2、pM3 和 pM4 质粒的 CY242 互补菌株则未见有不饱和脂肪酸的条带或仅有痕迹量的条带(图 4a, 泳道 2~5)。同时我们也检测了转化大肠杆菌 *fabB(ts)fabF* 双突变菌株 CY244 各转化子的层析结果, 同样只有 CY244/pM5(*PqfabF2*)菌株的层析板上有两条不饱和脂肪酸的条带(图 4b, 泳道 6)。上述实验结果进一步证明了这 5 个 FabF 同源蛋白中只有 PaFabF2 具有 3-酮基脂酰 ACP 合成酶 I 活性, 能够恢复大肠杆菌不饱和脂肪酸的合成。

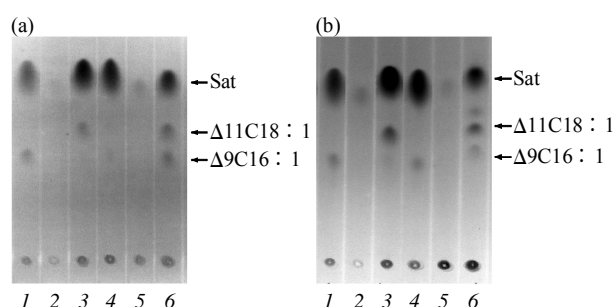


Fig. 4 Thin-layer chromatographic analysis of fatty acid composition of strains CY242 (a) or CY244 (b) carrying plasmids with homologous *fabF* gene

(a) Argentation thin-layer chromatographic analysis of [1-¹⁴C]acetate labeled *E. coli* CY242 strains carrying plasmids pM1, pM2, pM3, pM4 and pM5. The migration positions of the methyl esters of the fatty acids species are shown. Lane 1 is CY242/pBAD24M; lane 2~6 are CY242 carrying plasmid pM1, pM2, pM3, pM4 and pM5, respectively. (b) Argentation thin-layer chromatographic analysis of CY244 carrying plasmid pM1, pM2, pM3, pM4 and pM5. Strategy is similar to CY242 as shown in (a).

3 讨 论

大肠杆菌的 FabA-FabB 途径被认为是细菌厌氧不饱和脂肪酸合成的经典途径^[20]。但是随着大量细菌基因组测序的完成, 研究发现, 这一途径并不普遍存在, 已经鉴定了多条不同于 FabA-FabB 的缺氧不饱和脂肪酸合成途径, 如革兰氏阳性细菌肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)的 FabM-FabF 途径^[9]和粪肠球菌(*E. faecalis*)的 FabN-FabO 途径^[9], 在这些缺少 FabB 同源蛋白的细菌中, 其 FabF 类酶也都具有类似大肠杆菌 FabB 和 FabF 的双功能。革兰氏阴性细菌中茄科雷尔氏菌(*R. solanacearum*)虽然存在 FabB 同源蛋白, 但 RsFabB 没有参与脂肪酸的合成, 而 RsfabF1 兼具有 FabB 和 FabF 的活性^[12]。本课题组通过体外重建脂肪酸合成反应、异体遗传互补和脂肪酸组成分析研究了枯草芽孢杆菌、中华苜蓿根瘤菌、霍乱弧菌和铜绿假单胞菌中 5 个 FabF 同源蛋白的生物学特性, 结果显示虽然这 5 个 FabF 同源蛋白都具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性, 但是仅 PaFabF2 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 和 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 的双重活性, 能互补大肠杆菌 *fabB* 和 *fabF* 双重突变的功能, 这表明不是所有的 FabF 同源蛋白均具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 和 II 双重活性。我们注意到前人对 FabF 同源蛋白的研究均取自不以 FabA-FabB 途径合成不饱和脂肪酸的细菌, 如粪肠球菌、肺炎链球菌、丙酮丁醇梭菌和茄科雷尔氏菌等, 这些细菌基因组中均没有 *fabA* 和 *fabB* 的同源基因(茄科雷尔氏菌有 *fabB* 同源基因, 但不参与不饱和脂肪酸合成), 而本研究选取的细菌除枯草芽孢杆菌(该菌的不饱和脂肪酸是由 $\Delta 5$ 脂酰脂质去饱和酶将磷脂中的棕榈酸氧化脱饱和产生, 不具有从头合成不饱和脂肪酸的能力^[21])外, 均以 FabA-FabB 途径合成不饱和脂肪酸^[4, 22-23], 其中只有铜绿假单胞菌的 PaFabF2 具有双重功能, 因此, 细菌 FabF 同源蛋白具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 和 II 双重活性是否与该菌合成不饱和脂肪酸的途径有关, 需要进一步探究。

将顺-9-十六烯酸延伸为顺-11-十八烯酸被认为是 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 的特性之一, 但异体遗传互补菌株的脂肪酸组成分析表明, 枯草芽孢杆菌、中华苜蓿根瘤菌、霍乱弧菌和铜绿假单胞菌中的 5 个 FabF 同源蛋白在将顺-9-十六烯酸延伸为顺-11-十八烯酸的反应中表现出了活性上的差异, BsFabF 不能将顺-9-十六烯酸延伸为顺-11-十八烯

酸(表 3), VcFabF 和 PaFabF1 的延伸能力较弱, 而 PaFabF2 和 SmFabF 具有较强的延伸活性. 枯草芽孢杆菌 BsFabF 不具有延伸能力, 可能与该菌不能从头合成不饱和脂肪酸有关^[21], 其他 FabF 同源蛋白所表现的活性差异可能展示出了细菌 FabF 同源蛋白生物特性的多样性.

大肠杆菌的 FabB 和 FabF 均为长链 3- 酮脂酰 ACP 合成酶. 研究表明, 在大肠杆菌中过量表达 *fabF* 致死大肠杆菌, 无法纯化到 FabF 蛋白^[24], 故本研究中仅采用 EcFabB 蛋白作为阳性对照用于分析其他细菌 FabF 同源蛋白的 3- 酮脂酰 ACP 合成酶的活性(图 1b). 另外, 我们也发现, 添加阿拉伯糖诱导 *PafabF1* 表达会抑制对 CY244 突变株的生长表型恢复(图 3), 此抑制现象还表现在遗传互补菌株的脂肪酸组成分析中(图 4, 泳道 5), 猜测这可能与过表达 FabF 致死有关.

参 考 文 献

- [1] Zhang Y M, Rock C O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2008, **6**(3): 222–233
- [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): 145–155
- [3] 王玉琪, 孙益嵘, 陈艺彩, 等. 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) β 酮脂酰 ACP 合成酶 II 同源蛋白功能分析. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(08): 844–850
Wang Y Q, Sun Y R, Chen Y C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(08): 844–850
- [4] Wang H, Cronan J E. *Haemophilus influenzae* Rd lacks a stringently conserved fatty acid biosynthetic enzyme and thermal control of membrane lipid composition. *J Bacteriol*, 2003, **185** (16): 4930–4937
- [5] Campbell J W, Cronan J E, Jr. *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the *fabB* fatty acid biosynthetic gene. *J Bacteriol*, 2001, **183**(20): 5982–5990
- [6] 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
- [7] Garwin J L, Klages A L, Cronan J E. Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of *Escherichia coli*. Evidence for function in the thermal regulation of fatty acid synthesis. *J Biol Chem*, 1980, **255**(8): 3263–3265
- [8] 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
- [9] 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
- [10] Morgan-Kiss R M, Cronan J E. The *Lactococcus lactis* FabF fatty acid synthetic enzyme can functionally replace both the FabB and FabF proteins of *Escherichia coli* and the FabH protein of *Lactococcus lactis*. *Arch Microbiol*, 2008, **190**(4): 427–437
- [11] Zhu L, Cheng J, Luo B, *et al.* Functions of the *Clostridium acetobutylicum* FabF and FabZ proteins in unsaturated fatty acid biosynthesis. *BMC Microbiol*, 2009, **9**: 119
- [12] Cheng J, Ma J, Lin J, *et al.* Only one of the five *Ralstonia solanacearum* long-chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase homologues functions in fatty acid synthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2012, **78**(5): 1563–1573
- [13] 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 Bacteriol*, 2004, **186**(6): 1869–1878
- [14] 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 Bacteriol*, 1983, **154**(1): 221–230
- [15] de Mendoza D, Klages Ulrich A, Cronan J E. Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I. *J Biol Chem*, 1983, **258**(4): 2098–2101
- [16] 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
- [17] 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, **35**(8): 954–963
Feng S X, Zhu L, Luo B, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(8): 954–963
- [18] Wang H, Cronan J E. Only one of the two annotated *Lactococcus lactis* *fabG* genes encodes a functional beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase. *Biochemistry*, 2004, **43**(37): 11782–11789
- [19] 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
- [20] Campbell J W, Cronan J E. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. *Annu Rev Microbiol*, 2001, **55**: 305–332
- [21] Aguilar P S, Cronan J E, de Mendoza D. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J Bacteriol*, 1998, **180**(8): 2194–2200
- [22] 胡 喆, 马金成, 蒋晶晶, 等. 苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 基因功能的鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **40**(11): 1148–1159
Hu Z, Ma J C, Jiang J J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(11): 1148–1159
- [23] Hoang T T, Schweizer H P. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas*

aeruginosa: cloning and characterization of the fabAB operon encoding beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabA) and beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). J Bacteriol, 1997, **179**(17): 5326-5332

[24] 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

Identification and Function Research of Five 3-Ketoacyl-ACP Synthase Homologues*

MA Jin-Cheng, DENG Li-Ting, TONG Wen-Hua, ZHU Lei, WANG Hai-Hong**

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

Abstract FabB and FabF are two key long-chain 3-ketoacyl-ACP synthase in *Escherichia coli*. In addition to participating synthesis of long acyl chains, FabB is a key enzyme responsible for a condensation reaction in *de novo* unsaturated fatty acid synthesis and to form palmitoleoyl-ACP. While the FabF was found to be required for the elongation of *cis*-9-hexadecenoyl-ACP to *cis*-11-octadecenoyl-ACP and not involved in *de novo* unsaturated fatty acid synthesis. It has been reported previously that FabF homologues were found to have both KAS I and II activity just like FabB and FabF of *E. coli* in *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Clostridium acetobutylicum* and *Ralstonia solanacearum*. To test if this phenomenon is prevalent, we have carried out functional identification of five *fabF* homologous genes, *Bacillus subtilis* *BsfabF*, *Sinorhizobium meliloti* *SmfabF*, *Vibrio cholera* *VcfabF*, *Pseudomonas aeruginosa* *PafabF1* and *PafabF2*. Our data revealed that five FabF homologues all have the long-chain 3-ketoacyl-ACP synthase activities *in vitro*. Analysis of phospholipid compositions show that *SmfabF*, *VcfabF*, *PafabF1* and *PafabF2* possessed 3-ketoacyl-ACP synthase II (FabF) activity when complemented the *E. coli fabF* mutation CL28. The results of genetic complementation and thin-layer chromatographic analysis show that only *PafabF2* gene could complement *E. coli fabB* mutation and *PaFabF2* possessed partial function of 3-ketoacyl-ACP synthase I (FabB). These results demonstrated that not all FabF homologues have dual activity of KAS I and KAS II.

Key words bacterial fatty acid synthesis, 3-Ketoacyl-ACP synthase I, 3-Ketoacyl-ACP synthase II, genetic complementation, FabB, FabF

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00044

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31200028), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education(20104404110005) and Foundation for Distinguished Young Talents in Higher Education of Guangdong (LYM10038).

**Corresponding author.

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

Received: February 20, 2014 Accepted: May 23, 2014