

## 研究报告

# 水稻白叶枯病菌 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶基因 *XoofabZ* 的功能鉴定

鄢明峰<sup>#</sup>, 李信申<sup>#</sup>, 孙杨, 华菊玲, 黄水金<sup>\*</sup>

江西省农业科学院植物保护研究所, 江西 南昌 330299

鄢明峰, 李信申, 孙杨, 华菊玲, 黄水金. 水稻白叶枯病菌 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶基因 *XoofabZ* 的功能鉴定[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4687-4698.

YAN Mingfeng, LI Xingshen, SUN Yang, HUA Juling, HUANG Shuijin. Functional identification of 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase gene *XoofabZ* in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4687-4698.

**摘要:**【背景】由水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)引起的白叶枯病是水稻生产中最严重的细菌性病害。脂肪酸合成是细菌最重要的基础代谢之一, 对细胞生长、膜磷脂和生物活性物质合成尤为重要, 但对于该菌脂肪酸合成相关基因的功能知之甚少。【目的】鉴定 *Xoo* PXO99A 基因组中 PXO\_01118 (*XoofabZ*) 基因是否编码 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶并参与脂肪酸的从头合成, 为防治水稻白叶枯病害提供新思路。【方法】通过异体遗传互补和体外酶学活性检测分析 *XooFabZ* 的蛋白活性; 进一步利用同源重组原理进行 *XoofabZ* 基因的遗传学分析。通过剪叶法检测替换突变株对寄主水稻的致病力。【结果】利用异体遗传互补和体外酶学活性检测手段相结合证明了 *XooFabZ* 能在脂肪酸合成的起始反应和脱水反应中发挥 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性。本研究无法直接获得 *XoofabZ* 基因敲除突变株, 证明 *XoofabZ* 是必需基因。大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) *EcfabZ* 基因替换突变株对寄主水稻的致病性显著降低。【结论】*XoofabZ* 是水稻白叶枯病菌必需基因, 编码 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶, 参与 *Xoo* 脂肪酸从头合成反应和致病力的形成。

**关键词:** 水稻白叶枯病菌; 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶; 脂肪酸合成

资助项目: 国家自然科学基金(32060602); 江西省农业科学院基础研究与人才培养专项(JXSNKYJCRC202430)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060602), and the Basic Research and Talent Training Project of Jiangxi Academy of Agricultural Sciences (JXSNKYJCRC202430).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: sjhuang@aliyun.com

Received: 2024-03-19; Accepted: 2024-05-06; Published online: 2024-05-30

## Functional identification of 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase gene *XoofabZ* in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

YAN Mingfeng<sup>#</sup>, LI Xingshen<sup>#</sup>, SUN Yang, HUA Juling, HUANG Shuijin<sup>\*</sup>

Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330299, Jiangxi, China

**Abstract:** [Background] Bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) is the most serious bacterial disease in rice production. Fatty acid synthesis is one of the most important basic metabolisms in bacteria, essential for cell growth, and the synthesis of membrane phospholipid and bioactive substances. However, little is known about the functions of fatty acid synthesis-related genes in *Xoo*. [Objective] This study aims to investigate whether the gene PXO\_01118 (*XoofabZ*) in the genome of *Xoo* strain PXO99A encodes 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase and participates in de novo fatty acids synthesis, providing new insights into the prevention and control of bacterial leaf blight in rice. [Methods] The protein activity of *XooFabZ* was analyzed through allogeneic genetic complementation and *in vitro* enzyme activity detection. Further, genetic analysis of *XoofabZ* was conducted using homologous recombination principles. The pathogenicity of the replacement mutant strains to the host rice (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica* cultivar *Nipponbare*) was detected by leaf clipping. [Results] Combining allogeneic genetic complementation and *in vitro* enzyme activity detection to demonstrate that *XooFabZ* exhibits 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase activity in the initiation and dehydration reactions of fatty acid synthesis. It was not possible to directly obtain *XoofabZ* gene knockout mutants, indicating that *XoofabZ* is an essential gene in *Xoo*. The pathogenicity of *Escherichia coli* *EcfabZ* gene replacement mutant strains on the host rice was significantly reduced. [Conclusion] *XoofabZ* is an essential gene in *Xoo*, encoding 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase, participating in de novo fatty acids synthesis reactions, and the formation of pathogenicity in *Xoo*.

**Keywords:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase; fatty acid synthesis

细菌以酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)为载体, 利用简单的前体能源物质乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)和 II 型脂肪酸合成酶系(type II fatty acid synthesis, FAS II)通过聚合、还原、脱水、再还原四步循环酶学催化反应从头合成脂肪酸<sup>[1-3]</sup>。FAS II 每一步合成步骤均由一系列各自独立的小分子可溶酶催化特定的酶促反应构成<sup>[1]</sup>。FAS II 是细菌体内最重要的基础物质代谢之一, 其产物不仅是构成细胞膜磷脂、脂多糖的重要成分, 中间代谢产物还可用于多种生

物活性物质的合成, 如扩散信号因子(diffusible signal factor, DSF)类信号、N-酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactones, AHL)、生物素、类脂 A 和硫辛酸等<sup>[4-8]</sup>。

在细菌 II 型脂肪酸合成中研究最为透彻的模式菌株大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)中, 关键的脱水反应由 2 种 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶(3-hydroxyacyl-ACP dehydratase) *FabZ* 或 *FabA* 催化完成, 催化 3-羟基脂酰 ACP 脱水生成反-2-烯脂酰 ACP, 随后进入还原反应生产脂酰 ACP<sup>[9]</sup>。

大肠埃希氏菌中 *EcfabZ* 和 *EcfabA* 都是生长必需基因,不同的是 *EcfabA* 编码产物还具有 3-羟基脂酰 ACP 异构酶活性,能将脱水生成的反-2-癸烯脂酰 ACP 进一步异构化生成顺-3-癸烯脂酰 ACP,因该产物含有烯键不能被进一步还原并最终保留碳碳双键生成不饱和脂肪酸,而 *EcFabZ* 对不饱和脂肪酸及饱和脂肪酸均有脱水酶催化活性<sup>[10-11]</sup>。

3-羟基脂酰 ACP 脱水酶是细菌脂肪酸合成的关键酶,在不同细菌中体现出酶学功能的复杂多样性。粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)基因组中缺乏 *fabA* 基因,但其 *fabZ* 基因编码蛋白同时具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶和异构酶双重活性,直接参与体内不饱和脂肪酸合成<sup>[12]</sup>。同样地,在乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)基因组中虽也缺乏 *fabA* 基因,但存在 2 个 *fabZ* 基因,分别单独具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶或异构酶活性,并且 2 个 *fabZ* 基因均为乳酸乳球菌生长必需基因<sup>[13]</sup>。然而,在浅绿气球菌(*Aerococcus viridans*)基因组只有 1 个 *fabQ* 基因,该基因编码产物具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶和异构酶双重活性,并且该基因为其生长必需基因<sup>[14]</sup>。

水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)侵染所引起的白叶枯病是水稻生产过程中危害最为严重的细菌性病害之一,与稻瘟病、纹枯病并称为水稻的“三大病害”<sup>[15-16]</sup>。*Xoo* 在定殖侵染水稻的过程中,产生多种不同类型的 DSF 类家族群体感应信号分子,全局性调控 *Xoo* 的致病性<sup>[17-18]</sup>,而 DSF 合成的前体来源于水稻白叶枯病菌的脂肪酸合成途径<sup>[19]</sup>,所以研究 *Xoo* 脂肪酸合成代谢机制为开发防控水稻白叶枯病的特异性抗菌剂提供了可能。然而对于 *Xoo* 脂肪酸合成与功能方面的研究较少,国内外尚无关于水稻白叶枯病菌 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶的报道。因此,本课题组采用异体遗传互补、

体外酶学活性检测及基因敲除突变株生理性状分析等方法,研究 *Xoo* 基因组中 *XoofabZ* 编码的产物是否具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性及其在脂肪酸合成、致病性等方面的生物学功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

水稻品种日本晴 (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica* cultivar *Nipponbare*)由本实验室保藏。本研究所用到的大肠埃希氏菌菌株有 MG1655、DH5 $\alpha$ 、CY57、HW7 和 BL21(DE3),以及水稻白叶枯病菌包括野生型 *Xoo* PXO99A、*Xoo*MF1/pMF-3 和 *Xoo*MF1/pMF-4。使用的质粒有 pBAD24M、pSU18、pSRK-Gm、pET28(b)和 pK18mobsacB,以上述质粒载体骨架构建了本文所用的衍生质粒,其他相关菌株和质粒见表 1。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,氯化钠 10.0,琼脂粉 15.0;NA 培养基(g/L):牛肉膏 3.0,蛋白胨 5.0,酵母粉 1.0,蔗糖 10.0,琼脂粉 15.0;NB 培养基:NA 培养基中去掉酵母粉。LB 为培养大肠埃希氏菌的丰富培养基,NA 为水稻白叶枯病菌及突变株的丰富培养基。抗生素使用的工作浓度为:10  $\mu$ g/mL 庆大霉素(Gm)、30  $\mu$ g/mL 卡那霉素(Kan)、100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素(Amp)。诱导剂 L-阿拉伯糖(Ara)浓度为 0.02%,异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)的工作浓度为 1 mmol/L。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶, TaKaRa 公司; 2 $\times$ Taq PCR Master Mix、DL2000 DNA Marker、T4 DNA 连接酶、标准蛋白 Marker, 以及 DNA 切胶回收和质粒提取等试剂盒,生工生物工程(上海)股份

表 1 本研究使用的菌株与质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	Relevant characteristic	Source or reference
<i>E. coli</i> strains		
MG1655	Wild-type	Lab collection
DH5 $\alpha$	$\phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15endA1recA1hsdR17 (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> )	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>	[12]
BL21(DE3)	<i>ompT hsdS B</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) (DE3)	Lab collection
<i>Xoo</i> strains		
PXO99A	Wild-type	Lab collection
<i>Xoo</i> MF1	Kan <sup>r</sup> , pMF-6 integrated in PXO99A genome	This study
<i>Xoo</i> MF1/pMF-3	Kan <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , $\Delta$ <i>XoofabZ</i> /pMF-3	This study
<i>Xoo</i> MF1/pMF-4	Kan <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , $\Delta$ <i>XoofabZ</i> /pMF-4	This study
Plasmids		
pET28(b)	Kan <sup>r</sup> , expression plasmid	Lab collection
pK18mobsacB	Kan <sup>r</sup> , suicide plasmid	Lab collection
pSRK-Gm	Gm <sup>r</sup> , expression plasmid	Lab collection
pBAD24M	Amp <sup>r</sup> , expression plasmid	Lab collection
pSU18	Gm <sup>r</sup> , expression plasmid	Lab collection
pMF-1	Amp <sup>r</sup> , <i>XoofabZ</i> in pBAD24M	This study
pMF-2	Gm <sup>r</sup> , <i>XoofabZ</i> in pSU18	This study
pMF-3	Gm <sup>r</sup> , <i>XoofabZ</i> in pSRK-Gm	This study
pMF-4	Gm <sup>r</sup> , <i>EcfabZ</i> in pSRK-Gm	This study
pMF-5	Kan <sup>r</sup> , <i>XoofabZ</i> in pET28(b)	This study
pMF-6	Kan <sup>r</sup> , <i>XoofabZ</i> knockout cassette in pK18mobsacB	This study

有限公司；庆大霉素(Gm)、卡那霉素(Kan)、氨基青霉素(Amp)、L-阿拉伯糖(Ara)、IPTG 及各种脂肪酸等试剂，Sigma 公司；PCR 扩增引物的合成以及核酸序列测定委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。恒温光照培养箱和恒温金属浴，上海一恒科学仪器有限公司；紫外分光光度计，岛津公司；自动微生物生长曲线测定仪，OY Growth Curves 公司。

## 1.2 *XoofabZ* 基因克隆与质粒的构建

本研究所使用的 PCR 引物见表 2。利用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取 *Xoo* PXO99A 总 DNA，以 *Xoo* PXO99A 总 DNA 为

模板，使用 *XoofabZ* F/R 引物对扩增 *XoofabZ* 基因片段。PCR 反应体系：2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25  $\mu$ L，*XoofabZ* F/R (10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L，模板 DNA (10 mg/L) 2  $\mu$ L，ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu$ L。PCR 反应条件：95  $^{\circ}$ C 5 min；94  $^{\circ}$ C 30 s，56  $^{\circ}$ C 30 s，72  $^{\circ}$ C 1 min，35 个循环；72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后分别克隆至表达载体 pBAD24M、pSU18 和 pSRK-Gm 上，获得互补质粒 pMF-1、pMF-2 和 pMF-3；用类似的策略将大肠埃希氏菌 MG1655 的 *EcfabZ* 克隆至 pSRK-Gm 上获得互补质粒 pMF-4，将 *XoofabZ* 克隆至 pET28(b)上获得蛋白表达质粒 pMF-5。

表 2 本研究所用的引物信息

Table 2 Sequences of PCR primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>XoofabZ</i> F	AACAGCATATGAGCCACCCCGCTTAC
<i>XoofabZ</i> R	ATCGATAAGCTTTATTCCCTCGCGGGCGGCGC
<i>XoofabZ</i> P1	ACTGAATTC AAGCGGTGCGCATCCAC
<i>XoofabZ</i> P2	ACCGAGCTGGGTATCACGTAAGCGGGGTGGCTCAT
<i>XoofabZ</i> P3	ATGAGCCACCCCGCTTACGTGATGACCCAGCTCGGT
<i>XoofabZ</i> P4	ATCGGATCCGCGAATCACGTTGTGCGTC
<i>XoofabZ</i> P5	TGGACGACGGCAGCGAACTG
<i>XoofabZ</i> P6	AACACGCAGTGGTTGCCACAT

The under lined sequences are the introduced restriction sites.

### 1.3 异体遗传互补大肠埃希氏菌突变株

将构建好的 pMF-1 互补质粒及 pBAD24M 空载体分别热激转化至大肠埃希氏菌的 *EcfabA* 温敏突变菌株 CY57 中, 涂布于含有 Amp 抗生素的 LB 平板上, 筛选阳性转化子, 在不同培养温度(30 °C和 42 °C)、不同诱导剂(Ara 和 IPTG)条件下检测转化子的生长情况。进一步将 pMF-2 互补质粒及 pSU18 空载体分别热激转化至大肠埃希氏菌的 *EcfabZ* 条件突变菌株 HW7 中, 涂布于含有 100 µg/mL Amp 和 10 µg/mL Gm 的 LB 平板上, 筛选阳性转化子, 将转化子分别划线在添加 IPTG 诱导剂的 LB 培养基上培养过夜, 检测各转化子的生长情况。

### 1.4 *XooFabZ* 蛋白纯化与体外酶学功能的检测

将构建好的表达质粒 pMF-5 热激转化至大肠埃希氏菌 BL21(DE3), 随后参考文献[20-21]进行蛋白质的表达和分离纯化。同时参考文献[20-21]分别纯化了大肠埃希氏菌 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶(*EcFabZ*)、丙二酸单酰 CoA:ACP 转移酶(*EcFabD*)、3-酮脂酰 ACP 合成酶 III (*EcFabH*)、烯脂酰 ACP 还原酶(*EcFabI*)、3-酮脂酰 ACP 还原酶(*EcFabG*)、*holo*-ACP 蛋白和哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶(AasS), 并且体外合成丙二酸单酰 ACP (Mal-ACP)和 3-羟基癸酰 ACP (3-OH-C<sub>10</sub>-ACP)<sup>[21-22]</sup>。

水稻白叶枯病菌 *XooFabZ* 的体外活性检测参照文献[13,23]进行。首先检测 *XooFabZ* 参与起始反应的功能活性, 具体做法如下: 起始反应体系 50 µL, 含有 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1 mmol/L β-巯基乙醇、50 µmol/L NADPH、50 µmol/L NADH、100 µmol/L 乙酰 CoA、100 µmol/L 丙二酸单酰 CoA, 大肠埃希氏菌 *EcFabD*、*holo*-ACP、*EcFabH*、*EcFabG*、*EcFabI* 各 0.1 µg, 0.1 µg 不同宿主来源的 *FabZ*。反应体系在 37 °C 孵育 1 h 后, 用分离胶浓度为 17.5%且含有 0.5 mol/L 尿素的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(urea-polyacrylamide gel electrophoresis, UREA-PAGE)进行分析。

检测 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶功能的具体方法如下<sup>[13]</sup>: 反应体积 50 µL, 含有 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1 mmol/L β-巯基乙醇、50 µmol/L 3-羟基癸酰 ACP、50 µmol/L NADH、0.1 µg *EcFabI*、0.1 µg 不同宿主来源的 *FabZ*。反应体系在 37 °C 孵育 1 h 后, 用分离胶浓度为 17.5%且含有 2 mol/L 尿素的 UREA-PAGE 进行分析。

### 1.5 基因敲除与替换突变株的构建

以 *Xoo* PXO99A 总 DNA 为模板, 分别采用表 2 中的 *XoofabZ* P1/P2、*XoofabZ* P3/P4 引物对扩增 *XoofabZ* 基因上、下游各约 600 bp 片段, 并利用重叠延伸 PCR 技术将上、下游片段融合。将所获得的 DNA 片段经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶

切后克隆至 pK18mobsacB 上, 获得敲除质粒 pMF-6。

将敲除质粒 pMF-6 电击转化至 *Xoo* PXO99A 菌株中, 获得一次重组菌株 *Xoo*MF1。进一步分别将互补质粒 pMF-3 (携带 *XoofabZ* 基因) 和 pMF-4 (携带 *EcfabZ* 基因) 电击转化至一次重组菌株 *Xoo*MF1 中, 30 °C 培养 48 h 获得单菌落。分别挑取单菌落在含有 Gm 的 5 mL NB 培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养过夜后, 稀释涂布于含有 15% 蔗糖的 NA 平板中。挑取蔗糖耐受并对 Kan 敏感的菌株, 再用 *XoofabZ* P5/P6 引物对验证 *XoofabZ* 基因敲除突变菌株的正确性。按照上述基因敲除突变菌株筛选策略获得了 *XoofabZ* 基因敲除替换突变菌株 *Xoo*MF1/pMF-3 和 *Xoo*MF1/pMF-4。

### 1.6 生长曲线的测定

各待测菌株富集培养后按 1% 的接种量转接至 5 mL 新鲜 NB 培养基中, 30 °C、200 r/min 继续培养 72 h 至稳定期; 转接 10  $\mu$ L 菌液至 1 mL 新鲜 NB 培养基中, 充分吸打混匀后, 转接 300  $\mu$ L 悬浮液于微生物生长测定板中, 30 °C、200 r/min 振荡培养, 重复 3 次, 每 6 h 测定  $OD_{600}$  值, 绘制生长曲线。

### 1.7 病原菌致病性的测定

参考文献[24]进行水稻叶片致病性的检测。将野生菌 *Xoo* PXO99A、2 种替换突变菌株 *Xoo*MF1/pMF-3 和 *Xoo*MF1/pMF-4 于 30 °C、200 r/min 富集培养 24 h 至对数生长期, 使用磷酸缓冲盐溶液调至  $OD_{600}$  约为 0.5, 用无菌剪刀蘸取菌液, 在水稻的第二、第三片生长叶的叶尖端 1.0–2.0 cm 左右进行剪切并做好标记。将接种后的水稻移至 28 °C 温室培养, 定期观察, 接种 14 d 后随机选取 25 片叶片进行病斑长度测量。

### 1.8 统计分析

使用 GraphPad Prism 7 进行数据分析和单

因素 ANOVA 检验, 差异的显著性定义为 \* $P < 0.05$  代表差异显著, \*\* $P < 0.01$  代表差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Xoo*FabZ 生物信息学分析

水稻白叶枯病菌 *Xoo* PXO99A 的基因组测序和注释工作已经完成<sup>[25]</sup>, PXO\_01118 (*Xoo*FabZ) 注释为 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶, PXO\_03138 (*Xoo*FabA) 注释为 3-羟基脂酰 ACP 脱水/异构酶。将大肠埃希氏菌 *Ec*FabZ 蛋白序列与 *Xoo* PXO99A 基因组进行 BLAST 比对, 结果显示仅 *Xoo*FabZ 与 *Ec*FabZ 蛋白序列具有同源性, 两者的氨基酸序列一致性达到 45.8%, 并且 *Xoo*FabZ 还具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶保守的 2 个  $\alpha$  螺旋结构(图 1), 推测其参与 *Xoo* 的脂肪酸合成代谢。将大肠埃希氏菌 *Ec*FabA 蛋白序列与 *Xoo*FabZ 进行比对, 发现 *Ec*FabA 与 *Xoo*FabZ 的序列一致性仅为 22.1%, 并且 2 个保守的  $\alpha$  螺旋结构区域内的氨基酸序列差异较大(图 1), 表明 *Xoo*FabZ 可能仅具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性。

### 2.2 水稻白叶枯病菌 *XoofabZ* 遗传互补大肠埃希氏菌突变株

在大肠埃希氏菌中, 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶 (*Ec*FabZ) 和 3-羟基脂酰 ACP 脱水/异构酶 (*Ec*FabA) 是参与脂肪酸合成的 2 个关键酶, *EcfabZ* 和 *EcfabA* 都是生长必需基因<sup>[10-11]</sup>。大肠埃希氏菌 CY57 是 *EcfabA* 的温敏突变菌株, 在 30 °C 正常生长, 在 42 °C 时由于 FabA 功能缺失, 造成不饱和脂肪酸合成缺陷, 菌株不能正常生长<sup>[26]</sup>。为了研究 *XoofabZ* 基因编码蛋白是否具有大肠埃希氏菌 *Ec*FabA 的类似功能, 首先以水稻白叶枯病菌 *Xoo* PXO99A 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 PXO\_01118 (*XoofabZ*) 基因, 酶切连接到受外源阿拉伯糖(Ara)诱导表达的质粒载体 pBAD24M

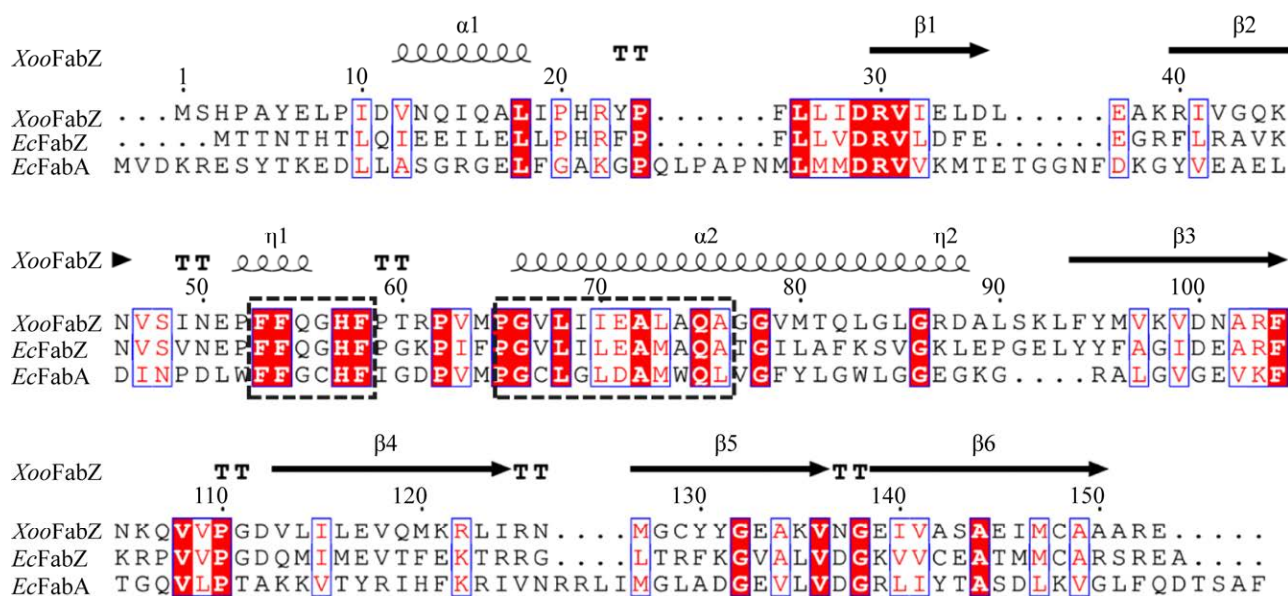


图 1 水稻白叶枯病菌 *XoofabZ* 与大肠埃希氏菌 *EcFabA*、*EcFabZ* 蛋白的序列比对分析 方框内为保守的  $\alpha$  螺旋结构区域

Figure 1 The alignment of *XoofabZ*, *EcFabA* and *EcFabZ* proteins. The conservative  $\alpha$  helix regions are in the boxes.

后获得互补质粒 pMF-1,热激转化至菌株 CY57 中,在不同培养温度条件下检测转化子的生长情况。结果显示,在 42 °C含有添加 IPTG 的培养基上,携带 *EcfabA* 表达质粒能恢复菌株 CY57 的正常生长,而 *XoofabZ* 不能恢复菌株 CY57 的正常生长(图 2A)。

大肠埃希氏菌 HW7 是卡那霉素抗性基因替换 *EcfabZ* 基因后的条件突变菌株,而缺失 *FabZ* 功能由 pBAD24 表达质粒携带丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)的 *fabZ* 基因提供,但该基因受外源 Ara 诱导表达,因此 HW7 菌株在无外源 Ara 诱导条件下不能正常生长<sup>[12]</sup>。为研究 *XoofabZ* 基因编码蛋白是否具有大肠埃希氏菌 *EcFabZ* 的类似功能,将 *XoofabZ* 酶切连接到受 IPTG 诱导的质粒表达载体 pSU18 后获得互补质粒 pMF-2,分别将空载体 pSU18 和 pMF-2 转化至菌株 HW7 中,在不同培养条件下

检测各转化子的生长情况。结果发现,在含有 Ara 的培养基上,各菌株均能正常生长;但在不添加 Ara 而添加 IPTG 的培养基上,只有携带 *XoofabZ* 基因的转化子能够正常生长(图 2B)。以上互补结果充分表明 *XoofabZ* 编码的蛋白产物能替代大肠埃希氏菌 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶功能,但不具有 3-羟基脂酰 ACP 异构酶活性。

### 2.3 *XoofabZ* 的表达纯化和体外酶学活性分析

异体遗传互补实验表明 *XoofabZ* 具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性。为进一步确定上述结论,采用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析进行蛋白纯化,最后成功纯化了氨基端融合有 His-tag 标签的 *XoofabZ* 蛋白。检测发现 *XoofabZ* 蛋白在 12%的 SDS-PAGE 凝胶上为单一条带(图 3A),与推测的 *XoofabZ* 蛋白分子量(约为 20 kDa)相符,表明 *XoofabZ* 蛋白分离纯化成功。

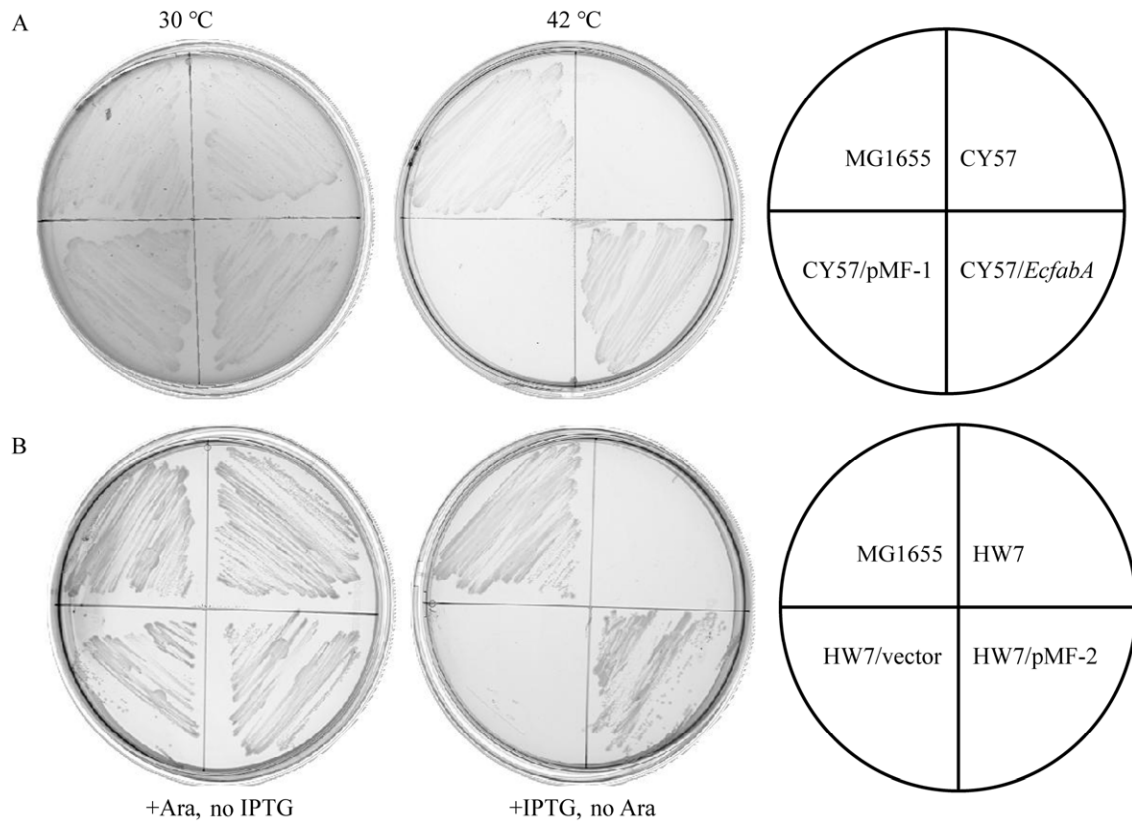


图 2 水稻白叶枯病菌 *XooFabZ* 遗传互补大肠埃希氏菌 CY57 (A)和 HW7 (B)  
Figure 2 Complementation of *E. coli* CY57 (A) and HW7 (B) strains.

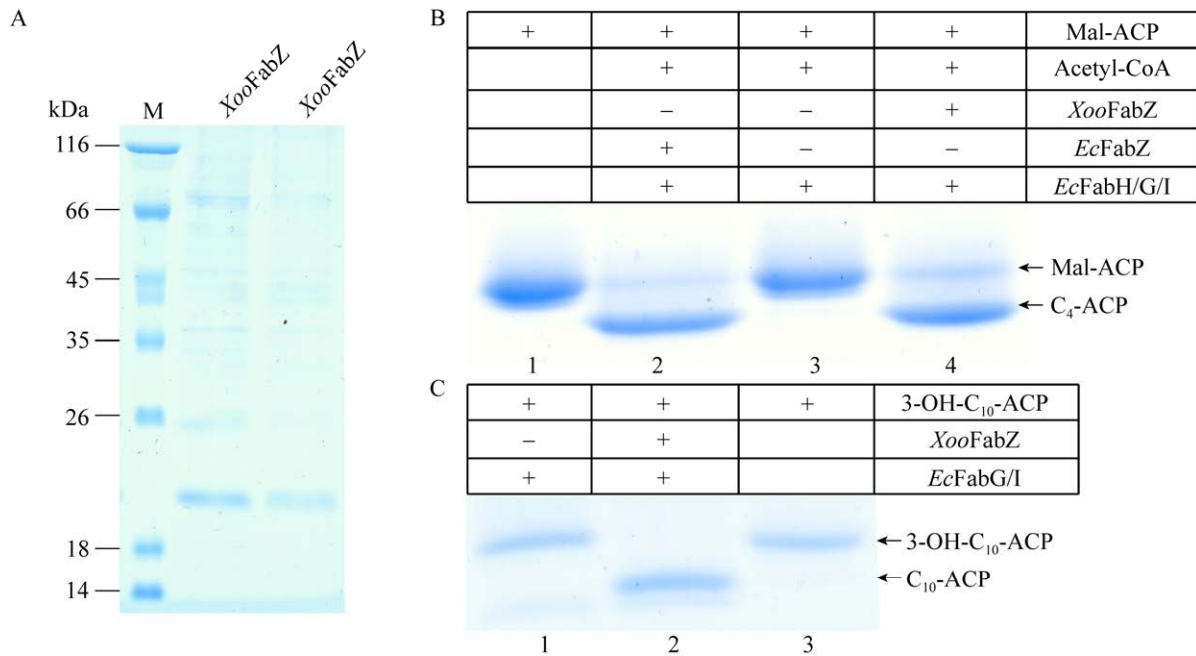
体外重建大肠埃希氏菌脂肪酸合成体系, 通过分析合成产物来明确 *XooFabZ* 蛋白的体外活性。首先, 检测 *XooFabZ* 是否具有参与大肠埃希氏菌脂肪酸合成起始反应的功能活性。利用以乙酰 CoA 和丙二酸单酰 ACP 为底物在大肠埃希氏菌 *EcFabH* 的缩合催化下生成 3-酮基丁酰 ACP, 再添加还原酶 *EcFabG* 催化生成 3-羟基丁酰 ACP, 但该产物在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移位置与丙二酸单酰 ACP 无显著性差异, 而继续添加 *XooFabZ* 和还原酶 *EcFabI* 后, 催化生成了终产物丁酰 ACP (图 3B, 泳道 4), 证明 *XooFabZ* 能催化 3-羟基丁酰 ACP 脱水, 具有脱水酶活性。仅添加大肠埃希氏菌 *EcFabH*、*EcFabG* 和 *EcFabI* 时, 也不能生成丁酰 ACP (图 3B, 泳道 3)。其次, 进一步构建了

*XooFabZ* 参与的以 3-羟基癸酰 ACP 为底物的脱水反应。3-羟基脂酰 ACP 脱水酶能催化 3-羟基癸酰 ACP 脱水生成反-2-烯脂酰 ACP, 而继续添加还原酶 *EcFabI*, 催化还原生成癸脂酰 ACP, 由于 3-羟基癸酰 ACP 和癸脂酰 ACP 在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移位置存在差异, 以此来检测脱水酶的活性。结果显示, *XooFabZ* 能将 3-羟基癸酰 ACP 脱水生成反-2-烯脂酰 ACP, 并在 *EcFabI* 的作用下进一步还原生成癸脂酰 ACP (图 3C, 泳道 2), 再次证明 *XooFabZ* 具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性。

#### 2.4 *XooFabZ* 基因替换突变菌株的构建

上述异体遗传互补和体外酶学活性检测结果都表明, 水稻白叶枯病菌 *XooFabZ* 基因编码蛋白具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性。





**图 3** *XoofabZ* 的纯化与体外酶学活性检测 A: *XoofabZ* 纯化. B: 起始反应, 其中泳道 2 和泳道 3 分别生成了丁酰 ACP ( $C_4$ -ACP) 和丙二酸单酰 ACP (Mal-ACP) 条带. C: 以 3-羟基癸酰 ACP 为底物的脱水反应, 其中泳道 1 和泳道 2 分别生成了 3-羟基癸酰 ACP (3-OH- $C_{10}$ -ACP) 和癸酰 ACP ( $C_{10}$ -ACP) 条带. Figure 3 Purification and enzymatic characterization of *XoofabZ* in fatty acid biosynthesis. A: *XoofabZ* purification. M: Protein marker. B: The initial reaction. The migration positions of butyryl-ACP ( $C_4$ -ACP, lane 2) and malonyl-ACP (Mal-ACP, lane 3) on gel are shown. C: Dehydration reaction with 3-hydroxydecanoyl-ACP as substrate. The migration positions of 3-hydroxydecanoyl-ACP (3-OH- $C_{10}$ -ACP, lane 1) and decanoyl-ACP ( $C_{10}$ -ACP, lane 2) on gel are shown.

为进一步研究水稻白叶枯病菌 *XoofabZ* 的生物学功能, 本研究采用重叠延伸 PCR 技术, 利用 pK18mobsacB 质粒构建了 *XoofabZ* 自杀性敲除质粒 pMF-6, 电击转化至野生菌 *Xoo* PXO99A 中, 筛选获得了一次重组菌株 *Xoo*MF1。然而经过多次独立实验并重复进行 *XoofabZ* 突变菌株筛选, 却始终无法成功获得 *XoofabZ* 基因敲除突变菌株, 推测该基因为 *Xoo* 生长必需基因。因此, 本研究利用筛选获得的一次重组菌株 *Xoo*MF1 为出发菌株, 分别电击转化表达质粒 pMF-3 (携带 *XoofabZ* 基因) 和 pMF-4 (携带 *EcfabZ* 基因), 在含有 Gm 和 15% 蔗糖的 NA 平板上筛选 Kan 敏感的 *XoofabZ* 基因敲除突变株, 最后经过 PCR 验证和测序验证顺利获得了

*XoofabZ* 敲除替换突变菌株 *Xoo*MF1/pMF-3 和 *Xoo*MF1/pMF-4。上述结果也进一步表明了 *XoofabZ* 基因是 *Xoo* 生长必需基因, *XoofabZ* 对细胞的正常生长至关重要。随后测定各突变菌株在 NB 培养基上的生长曲线, 发现 2 个 *XoofabZ* 敲除替换突变菌株 *Xoo*MF1/pMF-3 和 *Xoo*MF1/pMF-4 在生长速率方面无显著性差异, 但两者都比野生菌株 *Xoo* PXO99A 生长慢(图 4)。这也说明了 *EcfabZ* 能在体内替换 *XoofabZ* 的基因功能, 推测 *Xoo* 的正常生长与胞内 *fabZ* 基因表达量密切相关。

## 2.5 *XoofabZ* 敲除替换突变菌株对寄主水稻的致病性分析

为研究 *XoofabZ* 基因替换后对水稻白叶枯病菌致病力的影响, 以野生型菌株 *Xoo* PXO99A

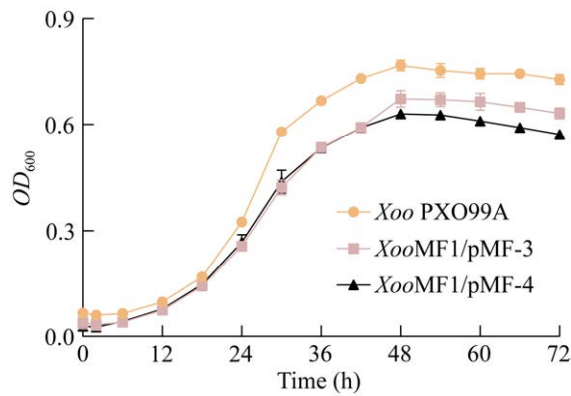


图4 不同菌株在NB培养基中的生长曲线  
Figure 4 The growth curves of different strains in NB medium.

作为对照, 将获得的2个 *XoofabZ* 敲除替换突变菌株 *Xoo*MF1/pMF-3 和 *Xoo*MF1/pMF-4 通过剪叶法接种在寄主水稻上进行致病力测定。结果显示, 接种14 d后各菌株均能引起寄主水稻叶片

上产生感染病斑(图5A), 野生型菌株 *Xoo* PXO99A 在水稻叶上形成的病斑长度平均10.6 cm, 而菌株 *Xoo*MF1/pMF-4 所形成的病斑长平均仅为8.3 cm, 与野生菌相比致病力显著降低(图5B)。而 *Xoo*MF1/pMF-3 的病斑长度显著大于 *Xoo* PXO99A 对照菌株, 平均值达到了12.4 cm, 说明2种 *XoofabZ* 敲除替换突变菌株的致病力差异显著, *XoofabZ* 参与了 *Xoo* 致病力的形成。

### 3 讨论与结论

本研究通过序列比对发现, 在 *Xoo* PXO99A 中, PXO\_01118 基因被注释为3-羟基脂酰 ACP 脱水酶, 与大肠埃希氏菌 *EcFabZ* 的一致性为45.8%, 还具有3-羟基脂酰 ACP 脱水酶保守的2个  $\alpha$  螺旋结构。为鉴定其功能, 本研究首先将 *XoofabZ* 分别异体遗传互补大肠埃希氏菌

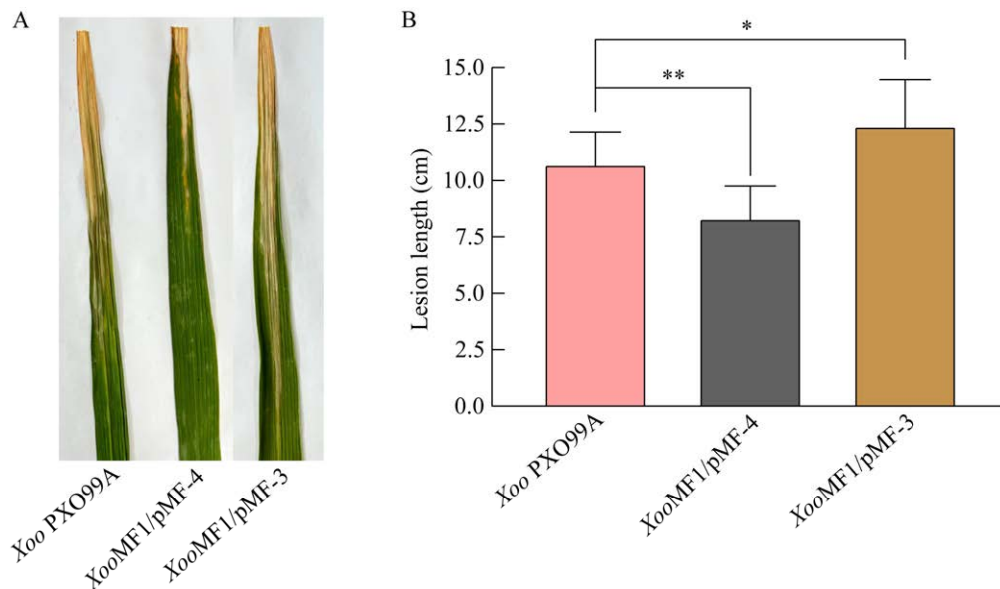


图5 野生菌株和突变菌株的致病性检测 A: 不同菌株侵染引起的病斑叶片. B: 通过测量病斑长度来统计菌株致病力

Figure 5 Pathogenicity test on *Oryza sativa* L. ssp. *Japonica* cultivar *Nipponbare* with the *Xoo* wild type and mutants. A: Rice leaves (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica* cultivar *Nipponbare*) with lesion caused by different strains. B: Calculated lesion lengths were recorded from the *Xoo* strains inoculated rice leaves in a growth chamber. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

*EcfabA* 温敏突变菌株 CY57 和 *EcfabZ* 条件突变菌株 HW7, 结果显示互补 *XoofabZ* 基因只能恢复 HW7 突变株的正常生长, 初步说明 *XoofabZ* 编码的蛋白能够替代大肠埃希氏菌 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶功能, 但不具有 3-羟基脂酰 ACP 异构酶活性。进一步体外酶学活性分析也证明了 *XooFabZ* 具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶活性参与 *Xoo* 脂肪酸的合成。

在大肠埃希氏菌中 *EcfabA* 和 *EcfabZ* 均为其生长必需基因<sup>[11]</sup>。与大肠埃希氏菌类似, *Xoo* 基因组中也存在 2 个编码 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶的基因 *XoofabA* 和 *XoofabZ*。本研究利用同源重组原理尝试敲除 *Xoo* 基因组上的 *XoofabZ* 基因, 经多次独立重复实验均无法获得该基因突变菌株, 仅在导入携带 *XoofabZ* 或大肠埃希氏菌 *EcfabZ* 基因的表达质粒时成功获得了敲除突变菌株。充分说明了 *XoofabZ* 对 *Xoo* 细菌脂肪酸的合成和生长的必需性。

水稻白叶枯病菌中 *RpfF* 为 DSF 类信号合成酶, 具有脂酰 ACP 脱水/硫酯酶双重活性, 可将多种主链含有 12 个碳原子的 3-羟基脂酰 ACP 脱水和硫解转化为 DSF 类信号<sup>[17,27]</sup>。而在本研究中 *XooFabZ* 能催化 3-羟基脂酰 ACP 脱水生成烯脂酰 ACP, 由此推测 *XooFabZ* 与 *RpfF* 在体内存在酶学底物的竞争关系, *XooFabZ* 的催化效率也影响着 *Xoo* 的 DSF 类信号合成。本研究发现 *XoofabZ* 基因参与水稻白叶枯病菌致病力的形成。为此, 本课题组后续将进一步检测 *XoofabZ* 替换后对 DSF 信号的合成及致病因子的产生所构成的影响, 以期阐明 2 种 *XoofabZ* 敲除替换突变菌株存在致病力差异的原因。

本研究揭示了 PXO\_01118 (*XoofabZ*) 是水稻白叶枯病菌 *Xoo* PXO99A 的必需基因, 该基因编码有活性 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶, 在水稻白叶枯病菌的正常生长、脂肪酸从头合成和致

病力的形成等方面具有重要作用。以上研究结果为探究 *XoofabZ* 的生理功能提供了前期证据, 为开发以脂肪酸合成途径为靶点的抗水稻白叶枯病防控药剂提供了理论依据。

## REFERENCES

- [1] CRONAN JE, ROCK CO. Biosynthesis of membrane lipids[J]. *EcoSal Plus*, 2008, 3(1): 1-44.
- [2] ROCK CO, CRONAN JE. *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1996, 1302(1): 1-16.
- [3] CRONAN JE, THOMAS J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways[J]. *Methods in Enzymology*, 2009, 459: 395-433.
- [4] CRONAN JE. Advances in synthesis of biotin and assembly of lipoic acid[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2018, 47: 60-66.
- [5] CRONAN JE. Assembly of lipoic acid on its cognate enzymes: an extraordinary and essential biosynthetic pathway[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(2): 429-450.
- [6] YU YH, HU Z, DONG HJ, MA JC, WANG HH. *Xanthomonas campestris* FabH is required for branched-chain fatty acid and DSF-family quorum sensing signal biosynthesis[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 32811.
- [7] LAM MN, DUDEKULA D, DURHAM B, COLLINGWOOD N, BROWN EC, NAGARAJAN R. Insights into  $\beta$ -ketoacyl-chain recognition for  $\beta$ -ketoacyl-ACP utilizing AHL synthases[J]. *Chemical Communications*, 2018, 54(64): 8838-8841.
- [8] DU J, ZHANG A, HAO J, WANG J. Biosynthesis of di-rhamnolipids and variations of congeners composition in genetically-engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(7): 1041-1048.
- [9] ROCK CO, JACKOWSKI S. Forty years of bacterial fatty acid synthesis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 292(5): 1155-1166.
- [10] FENG Y, CRONAN JE. *Escherichia coli* unsaturated fatty acid synthesis: complex transcription of the *fabA* gene and *in vivo* identification of the essential reaction catalyzed by FabB[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(43): 29526-29535.

- [11] HEATH RJ, ROCK CO. Roles of the FabA and FabZ  $\beta$ -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratases in *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(44): 27795-27801.
- [12] WANG H, CRONAN JE. Functional replacement of the FabA and FabB proteins of *Escherichia coli* fatty acid synthesis by *Enterococcus faecalis* FabZ and FabF homologues[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(33): 34489-34495.
- [13] 马金成, 罗彪, 胡喆, 王海洪. 乳酸乳球菌 *fabZ1* 和 *fabZ2* 基因功能的鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(8): 777-786.  
MA JC, LUO B, HU Z, WANG HH. Identification and function reasearch of *fabZ1* and *fabZ2* of *Lactococcus lactis*[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2014, 41(8): 777-786 (in Chinese).
- [14] BI H, WANG H, CRONAN JE. FabQ, a dual-function dehydratase/isomerase, circumvents the last step of the classical fatty acid synthesis cycle[J]. Chemistry & Biology, 2013, 20(9): 1157-1167.
- [15] 王华弟, 陈剑平, 严成其, 沈颖. 中国南方水稻白叶枯病发生流行动态与绿色防控技术[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(12): 2051-2059.  
WANG HD, CHEN JP, YAN CQ, SHEN Y. Occurrence, epidemics dynamic, green prevention and control technology of rice bacterial leaf blight in Southern China[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2017, 29(12): 2051-2059 (in Chinese).
- [16] 陈功友, 徐正银, 杨阳阳, 邹丽芳, 朱勃. 我国水稻白叶枯病菌致病型划分和水稻抗病育种中应注意的问题[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2019, 37(1): 67-73.  
CHEN GY, XU ZY, YANG YY, ZOU LF, ZHU B. Classification of pathotypes of Chinese *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and resistance breeding strategies for bacterial blight[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2019, 37(1): 67-73 (in Chinese).
- [17] ZHOU L, YU Y, CHEN X, DIAB AA, RUAN L, HE J. The multiple DSF-family QS signals are synthesized from carbohydrate and branched-chain amino acids via the FAS elongation cycle[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 13294.
- [18] ZHOU L, WANG X Y, ZHANG W, SUN S, HE YW. Extraction, purification and quantification of diffusible signal factor family quorum-sensing signal molecules in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Bio-Protocol, 2017, 7(6): e2190.
- [19] YAN M, YU Y, LUO L, HUANG M, ZHANG Y, SU J, ZHANG W, MA J, HU Z, WANG H. 3-Ketoacyl-ACP synthase III FabH1 is essential for branched-chain DSF family signals in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Phytopathology Research, 2023, 5(1): 26.
- [20] ZHU L, LIN J, MA J, CRONAN JE, WANG H. 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.
- [21] 冯赛祥, 朱磊, 罗彪, 孙益嵘, 王海洪. 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)体外脂肪酸合成反应的重建[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(8): 954-963.  
FENG SX, ZHU L, LUO B, SUN YR, WANG HH. Reconstitution of *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis reaction *in vitro*[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2008, 35(8): 954-963 (in Chinese).
- [22] HU Y, CRONAN JE.  $\alpha$ -proteobacteria synthesize biotin precursor pimeloyl-ACP using BioZ 3-ketoacyl-ACP synthase and lysine catabolism[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 5598.
- [23] CHENG J, MA J, LIN J, FAN ZC, CRONAN JE, WANG H. 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.
- [24] RAY SK, RAJESHWARI R, SONTI RV. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(4): 394-401.
- [25] SALZBERG SL, SOMMER DD, SCHATZ MC, PHILLIPPY AM, RABINOWICZ PD, TSUGE S, FURUTANI A, OCHIAI H, DELCHER AL, KELLEY D, MADUPU R, PUIU D, RADUNE D, SHUMWAY M, TRAPNELL C, APARNA G, JHA G, PANDEY A, PATIL PB, ISHIHARA H, et al. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 1-16.
- [26] JOHN E, CRONAN JR. Regulation of the fatty acid composition of the membrane phospholipids of *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1974, 71(9): 3758-3762.
- [27] RYAN RP, AN SQ, ALLAN JH, MCCARTHY Y, DOW JM. The DSF family of cell-cell signals: an expanding class of bacterial virulence regulators[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(7): e1004986.