



野油菜黄单胞菌中 LipB-LipA 是唯一的硫辛酰化途径

马建荣¹, 刘安娜², 张文彬², 毛雅慧³, 余永红^{1*}

¹广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520

²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

³湖北工程学院, 特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室, 湖北 孝感 432000

摘要:【目的】硫辛酸是细胞内重要的辅因子, 参与多种基础代谢过程。野油菜黄单胞菌(*Xcc*)是十字花科植物黑腐病的病原菌, 在全球范围内引起植物病害, 引起重大经济损失。为此研究 *Xcc* 中硫辛酸的合成途径, 为防治黑腐病提供新思路。【方法】利用大肠杆菌硫辛酸合成关键酶 LipA 和 LipB 序列, 同源比对发现 *Xcc* 基因组中 XC_0713 (*XccLipA*)和 XC_0712 (*XccLipB*)具有较高的同源性。采用 PCR 方法分别扩增 *XccLipA* 和 *XccLipB* 基因, 并连入表达载体 pBAD24M 后分别互补大肠杆菌突变株, 并检测转化子生长表型。利用同源重组方法, 获得替换突变株, 分析其生长性状, 并利用剪叶法检测替换突变株对寄主植物甘蓝的致病力。【结果】*XcclipA* 和 *XcclipB* 能分别恢复大肠杆菌 *lipA* 和 *lipB* 突变株在基础培养上生长。*XcclipA* 和 *XcclipB* 都是菌体生长的必需基因, 不能直接被敲除。但导入 pSRK-*EclipA* 后, 成功分别获得 *XcclipA* 和 *XcclipB* 敲除突变株。两种 *EclipA* 替换后的敲除突变株在基础培养上都不能生长, 添加硫辛酸后能恢复生长表型。在丰富培养基上, *XcclipB* 敲除突变株能正常生长, 而 *XcclipA* 敲除突变株不能生长, 添加硫辛酸后生长也能恢复。分别测定不同培养条件下生长曲线, 也得到同样的结果。寄主植物侵染结果显示, 与野生菌相比, *XcclipA* 敲除突变株致病性几乎丧失, 而 *XcclipB* 敲除突变株的致病性与野生菌无显著性差异。【结论】*Xcc* 中 *lipA* 编码硫辛酸合成酶, *lipB* 编码辛酰转移酶, 两者都是必需基因。*Xcc* 中 LipB-LipA 途径是唯一的硫辛酰化途径, 而没有外源性的硫辛酸途径。*lipA* 敲除后显著影响 *Xcc* 的致病性, 可作为抗菌药物筛选的靶点。

关键词: 野油菜黄单胞菌, 硫辛酸合成, 硫辛酸合成酶 LipA, 致病性分析

基金项目: 广州市科技计划项目(202002030422); 广东省医学科学技术研究基金(A2018409); 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室开放课题基金(PFRAO201804); 广东食品药品职业学院院级课题(2019ZR13, 2019ZR17)

*通信作者。Tel: +86-20-28194616; E-mail: yuyh@gdyzy.edu.cn

收稿日期: 2020-01-07; 修回日期: 2020-02-12; 网络出版日期: 2020-03-23

硫辛酸(lipoic acid)是在 6 位和 8 位碳原子之间插入硫原子的八碳饱和脂肪酸,其化学名称为 1,2-二硫代戊环-3-戊酸^[1]。硫辛酸属于维生素 B 类化合物,作为天然的抗氧化剂广泛分布于动植物体内,能直接清除活性氧,对人类糖尿病、肝损伤、动脉粥样硬化治疗以及抗衰老等方面都具有较好的应用前景^[2]。硫辛酸在细胞内作为辅因子参与 2-酮酸脱氢酶(OGDH)复合体的催化反应,包括丙酮酸脱氢酶(PDH)、 α -酮戊二酸脱氢酶(KGDH)、分支酮酸脱氢酶(BCDH)、3-羟基丁酮脱氢酶(ADH)和甘氨酸裂解系统(GCV)等 5 种复合酶体,参与生物体的能量代谢和一碳单位形成,并为脂肪酸和氨基酸的合成提供前体物质^[3-4]。2-酮酸脱氢酶复合体都含有三种亚基: E1, E2 和 E3, 每种亚基都催化部分反应,而硫辛酸的羧基与 E2 亚基中的赖氨酸残基的 ϵ -氨基共价结合,催化反应中硫辛酸起在多酶复合体的各个活性中心之间传递中间产物的作用^[5]。

在模式生物大肠杆菌中,研究表明存在两种互补的硫辛酰化途径: ① 依赖于硫辛酰蛋白连接酶(LplA)的外源性途径。该途径分两步进行,首先 LplA 催化硫辛酸与 ATP 结合生成硫辛酰-AMP,然后催化硫辛酰基团从硫辛酰-AMP 上转移到 E2 亚基中保守的赖氨酸残基的 ϵ -氨基上,并伴随 AMP 的释放^[6]。② 内源性硫辛酰化途径。从细菌脂肪酸合成途径来源的辛酰 ACP,在辛酰转移酶(LipB)的催化下,将辛酰基团转移到 2-酮酸脱氢酶 E2 亚基中的硫辛酸结构域上,进一步在硫辛酸合成酶(LipA)的催化下插入硫原子形成硫辛酰化蛋白亚基^[7-9]。但不同细菌的硫辛酸合成途径具有多样性。在革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌中,脂肪酸途径来源的辛酰 ACP 首先在辛酰转移酶 LipM

的催化下,将辛酰基团转移至甘氨酸裂解系统 H 亚基中的赖氨酸残基上,而后再在酰胺转移酶 LipL 的催化下,将辛酰基团转移到 E2 亚基中的硫辛酸结构域上,最后在 LipA 催化下生成硫辛酰化蛋白亚基^[10-11]。而在金黄色葡萄球菌中,辛酰基团在 H 亚基上被 LipA 催化生成硫辛酰化,而后 LipL 再将硫辛酰基团转移到 E2 亚基上^[12-13]。

由于硫辛酸作为重要的辅因子和抗氧化剂,其合成途径可作为潜在的抗菌药物作用靶点,用于新型抗菌药物的筛选^[14]。此外,细菌的硫辛酸合成途径与致病性还紧密相关^[12]。野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)是引起十字花科植物黑腐病的病原菌,侵染寄主包括甘蓝、白菜、花椰菜、萝卜、芥菜等多种重要蔬菜,全球范围内引起重大经济损失,迫切需要开发新的针对性防控措施^[15-17]。但 *Xcc* 中硫辛酸合成途径还未见报道。因此,本研究通过生物信息学分析、异体遗传互补和体内基因敲除等方法,研究了 *Xcc* 中硫辛酸的合成途径以及在植物致病中的功能,为开发新型抗菌药物、防治黑腐病病害提供新的思路。

1 材料和方法

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(*Escherichia coli*)菌株有 MG1655、DH-5 α 、S17-1、BL21 (DE3)、Tm131 和 Tm136,野油菜黄单胞菌 *Xcc*8004。质粒载体有 pK18mobsacB、pSRK-Gm^[18]和 pBAD24m^[19],其他载体均为上述质粒的衍生质粒(具体构建见下文),具体的菌株和质粒见表 1。LB 用作培养大肠杆菌的丰富培养

表 1. 菌株及质粒
Table 1. Strains and plasmids

Strains/Plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> strains		
MG1655	Wild type	
DH-5 α	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1recA1hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺)	Lab collection
S17-1	Tc ^r Sm ^r , RP4::2(Tc::Mu) (Km::Tn7), <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR</i> ⁻ M ⁺ , <i>λpir</i>	Lab collection
TM131	<i>rpsLlipA150::Tn1000dKnlplA148::Tn10dTc fadE</i>	[6]
TM136	<i>rpsLlipB150::Tn1000dKnlplA148::Tn10dTc fadE</i>	[6]
<i>Xcc</i> Strains		
8004	Rif ^R , wild type	Lab collection
L1	Rif ^R , Km ^R , pL3 integrated in <i>Xcc</i> 8004 genome	This study
L2	Rif ^R , Km ^R , pL4 integrated in <i>Xcc</i> 8004 genome	This study
L3	Rif ^R , Δ <i>lipA</i> /pSRK- <i>EclpA</i>	This study
L4	Rif ^R , Δ <i>lipB</i> /pSRK- <i>EclpA</i>	This study
Plasmids		
pBAD24M	Amp ^r , expression vector	Lab collection
pK18mobsacB	Km ^r , conjugation vector	Lab collection
pSRK-Gm	Gm ^r , expression vector	Lab collection
pSRK- <i>EclpA</i>	Gm ^R , <i>EclpA</i> in pSRK-Gm	Lab collection
pL1	Amp ^R , <i>XcclipA</i> in pBAD24M	This study
pL2	Amp ^R , <i>XcclipB</i> in pBAD24M	This study
pL3	Km ^R , <i>XcclipA</i> in-frame deletion fragment inserted to pK18mobsacB between <i>EcoR</i> I/ <i>Hind</i> III sites	This study
pL4	Km ^R , <i>XcclipB</i> in-frame deletion fragment inserted to pK18mobsacB between <i>EcoR</i> I/ <i>Hind</i> III sites	This study

基, 培养条件 37 °C。NYG 和 XOG 分别作为野油菜黄单胞菌及突变株的丰富培养基和基础培养基。抗生素的使用浓度如下: 50 mg/L 利福平(Rif)、100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)、30 mg/L 卡那霉素(Km)、10 mg/L 庆大霉素(Gm)。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 试剂:核酸限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶、Marker DL2000 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; 利福平、氨苄青霉素、卡那霉素、

庆大霉素、IPTG、硫辛酸、阿拉伯糖、蔗糖等试剂购自 Sigma 公司; PCR 扩增引物的合成以及核酸序列测定由上海 Sangon 公司完成。

1.2 互补质粒构建

以野油菜黄单胞菌 *Xcc*8004 的总 DNA 为模板, 以表 2 中 *XcclipA* *Nde* I 和 *XcclipA* *Hind* III 引物 PCR 扩增 *XcclipA* 基因, 以 *XcclipB* *Nde* I 和 *XcclipB* *Hind* III 引物扩增 *XcclipB* 基因。两种扩增产物纯化并经 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切后, 分别连入 pBAD24M 表达载体上, 转化并筛选阳性菌落, 经测序验证后获得互补质粒 pL1 和 pL2。

表 2. 所用引物列表
Table 2. Sequences of the PCR primers

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>XcclipA</i> P1	AATTGAATTCGGAAGTGAAGTGGACGCTGT
<i>XcclipA</i> P2	ACACCGATGCAGTTGGGCGACGGTACGGGCGCTCA
<i>XcclipA</i> P3	TGAGCGCCCGTACCGTCGCCCAACTGCATCGGTGT
<i>XcclipA</i> P4	AATTAAGCTTAGTTGCTTGTCTCGTGGCT
<i>XcclipA</i> checkup	AGTTCGACTCCGCGCATCA
<i>XcclipA</i> checkdown	GCAGCCAGTCGTTTCATCACC
<i>XcclipA</i> Nde I	TATATACCATATGACCCAGCCTATCGCCC
<i>XcclipA</i> Hind III	AATTAAGCTTCACACACCGATGCAGTTGG
<i>XcclipB</i> P1	AATTGAATTCACACCGATATCGTCAGCCAGT
<i>XcclipB</i> P2	GTGGGCTGCAACACGAGTCTAGACACCGGGGCCACGACAG
<i>XcclipB</i> P3	CGTGGCCCCGGTGTCTAGACTCGTGTTCAGCCCACC
<i>XcclipB</i> P4	AATTAAGCTTGGATCGCCGAGATGCAGTC
<i>XcclipB</i> checkup	GCTGGCGTATCTGCAGGC
<i>XcclipB</i> checkdown	CCGGGGTCAGGATCTCGATC
<i>XcclipB</i> Nde I	TATATTACATATGGTGGACGCTGTAGCGGC
<i>XcclipB</i> Hind III	AATTAAGCTTGGTTCATGACGGTACGGGC

Note: The underlined sequences are the introduced restriction sites.

1.3 构建基因替换突变株

以 *Xcc8004* 基因组为模板, 分别以表 2 中的引物 P1、P2 和 P3、P4 分别扩增 *XcclipA* 基因和 *XcclipB* 基因的上下游片段(P1P2 片段和 P3P4 片段), 电泳回收后通过融合 PCR 方法将上下游片段融合为 P1P4 片段, 并利用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后克隆到自杀性载体 pK18mobsacB 的相同位点上, 经测序验证后分别获得 *XcclipA* 基因的敲除质粒 pL3 和 *XcclipB* 基因的敲除质粒 pL4。

将 pL3 和 pL4 转化大肠杆菌 S17-1 后, 分别与 *Xcc8004* 在 NYG 平板上 30 °C 共培养 36 h 后, 稀释涂布于含有 Rif 和 Km 的 NYG 平板, 继续培养后获得单菌落。进一步提取总 DNA, 分别用 *XcclipA* P1 和 *XcclipA* P4 引物以及 *XcclipB* P1 和 *XcclipB* P4 引物进行 PCR 检测, 确认获得 *XcclipA* 敲除的一次重组菌株 *Xcc* L1 和 *XcclipB* 敲除的一

次重组菌株 *Xcc* L2, 而后在添加 Rif 的 NYG 中培养后, 涂布于含有 10% 蔗糖的 NYGS 平板, 筛选 Km 敏感的菌落。

将质粒 pSRK-*EclpA* 导入大肠杆菌 S17-1 后, 分别与一次重组菌株 *Xcc* L1 和 *Xcc* L2 接合, 涂布于含有 Rif、Km 和 Gm 的 NYG 平板上, 30 °C 培养后获得单菌落, 进一步 PCR 验证后分别获得 *Xcc* L1/pSRK-*EclpA* 和 *Xcc* L2/pSRK-*EclpA* 菌株。再将其分别在含有 Rif 和 Gm 的 NYG 中培养后, 涂布于含有 10% 蔗糖的 NYGS 平板, 用 checkup 和 checkdown 引物 PCR 筛选后分别获得 *XcclipA* 被敲除的 *Xcc* L3 ($\Delta XcclipA$ /pSRK-*EclpA*) 以及 *XcclipB* 被敲除的 *Xcc* L4 ($\Delta XcclipB$ /pSRK-*EclpA*)。

1.4 替换突变株生长表型分析

通过平板接种和生长曲线两种方法分析替换突变株的生长表型。将野生菌和突变株分别接种

到 NYG 液体培养基中(突变株培养添加 5 mmol/L 硫辛酸), 30 °C 摇床培养 24 h 后离心收集菌体, 并用相同体积的 XO 盐溶液(不含有碳源)悬浮后, 30 °C 摇床继续培养 24 h, 再次离心后重悬菌体浓度至 OD_{600} 均约为 1.0。而后等量菌液划线到不同平板上继续培养观察生长, 同时按 1% 接种量分别接种到不同的液体培养基中, 并测定生长曲线。

1.5 替换突变株致病性分析

Xcc 菌株侵染寄主植物参考文献[20–21]进行。将不同菌株接种到 NYG 中(突变株培养添加 5 mmol 硫辛酸), 30 °C 摇床培养 24 h 后, 调整不同菌株浓度至 OD_{600} 均约为 1.0, 剪叶法分别接种到 4 片叶龄的甘蓝叶片上, 继续培养 2 周后, 测定并统计叶片病斑长度。

2 结果和分析

2.1 生物信息学分析

为研究野油菜黄单胞菌(*Xcc*)中硫辛酸的合成机制, 根据模式生物大肠杆菌中硫辛酸合成的关键酶硫辛酸合成酶(EcLipA)^[9]和辛酰转移酶(EcLipB)^[8], 分别同源性比对 *Xcc* 基因组, 发现同源性较高的 XC_0713 和 XC_0712。其中 XC_0713 编码蛋白与 EcLipA 的氨基酸序列一致性为 60%, 注释为硫辛酸合成酶(lipoic acid synthetase), 还具有保守的铁-硫簇结合位点 CXXXCXXC 和对底物结合具有辅助功能的 CX₄CX₅C 簇^[4](图 1-A), 因此将其命名为 XccLipA。而 XC_0712 编码的氨基酸序列与 EcLipB 的一致性为 56%, 注释为硫辛酰转移酶(lipoyl transferase), 因此将其命名为 XccLipB (图 1-B)。根据生物信息学分析推测, XccLipA 和 XccLipB 是 *Xcc* 中硫辛酸合成的关键

途径。但同源性比对在 *Xcc* 基因组中没有发现大肠杆菌硫辛酰蛋白连接酶(EcLplA)的同源基因, 推测 *Xcc* 不具有硫辛酸利用的外源性途径。为验证以上观点, 本课题组对野油菜黄单胞菌中 *XcclipA* 和 *XcclipB* 作了以下研究。

2.2 异体遗传互补

大肠杆菌可以利用 LipB-LipA 途径内源性合成硫辛酸, 也可以通过 LplA 利用外源性硫辛酸。大肠杆菌 Tm131 菌株是 *lipA* 和 *lplA* 基因双敲除突变株, 而 Tm136 菌株是 *lipB* 和 *lplA* 基因的双敲除菌株, 因此两个菌株不能从头合成硫辛酸, 也不能利用外源硫辛酸, 只能在添加乙酸盐(acetate)和琥珀酸盐(succinate)的培养基上生长^[6]。为研究 *XcclipA* 的功能, 我们首先将其遗传互补大肠杆菌 Tm131 菌株。结果显示, 在基础培养基 M9 中添加乙酸盐和琥珀酸盐时, 大肠杆菌野生菌 MG1655、Tm131 菌株以及互补 *XcclipA* 的转化子都能正常生长, 但不添加乙酸盐和琥珀酸盐时, Tm131 由于不能合成硫辛酸, 不能正常生长, 而互补 *XcclipA* 的转化子能微弱生长, 添加诱导剂 Ara 后恢复正常生长, 初步显示 *XcclipA* 编码蛋白具有硫辛酸合成酶活性(图 2-A)。

按照类似策略, 将 *XcclipB* 遗传互补大肠杆菌 Tm136 菌株。结果也显示 Tm136 菌株不能在基础培养基 M9 上生长, 而只能在添加有乙酸盐和琥珀酸盐的培养基上生长, 但互补 *XcclipB* 的转化子则能恢复 Tm136 菌株在 M9 上生长, 初步显示 *XcclipB* 编码蛋白具有辛酰转移酶活性(图 2-B)。

2.3 *XcclipA* 和 *XcclipB* 是生长的必需基因

为进一步研究 *XcclipA* 和 *XcclipB* 在细胞内的生理功能, 我们首先构建了含有 *XcclipA* 基因上下

游片段的自杀性载体 pL3, 以及含有 *XcclipB* 上下游片段的自杀性载体 pL4。分别转化大肠杆菌 S17-1 后, 利用接合转移方法将 pL3 和 pL4 分别导入到野生菌 *Xcc8004* 中, 在 NYG (Rif 和 Km)

平板上分别筛选获得一次重组菌株 *Xcc L1* 和 *Xcc L2*。但将一次重组菌株在含有 10%蔗糖的 NYGS 平板培养后, 通过多次筛选都不能获得 *XcclipA* 或 *XcclipB* 基因的敲除突变株, 而在培养基中添加硫



图 1. *XccLipA* 和 *XccLipB* 序列比对分析

Figure 1. Sequences alignments of *XccLipA* and *XccLipB*. A: the Fe-S cluster binding site CXXXCXXC and substrate binding site CX₄CX₅C are underlined. B: the key site cysteine (C) asterisked.

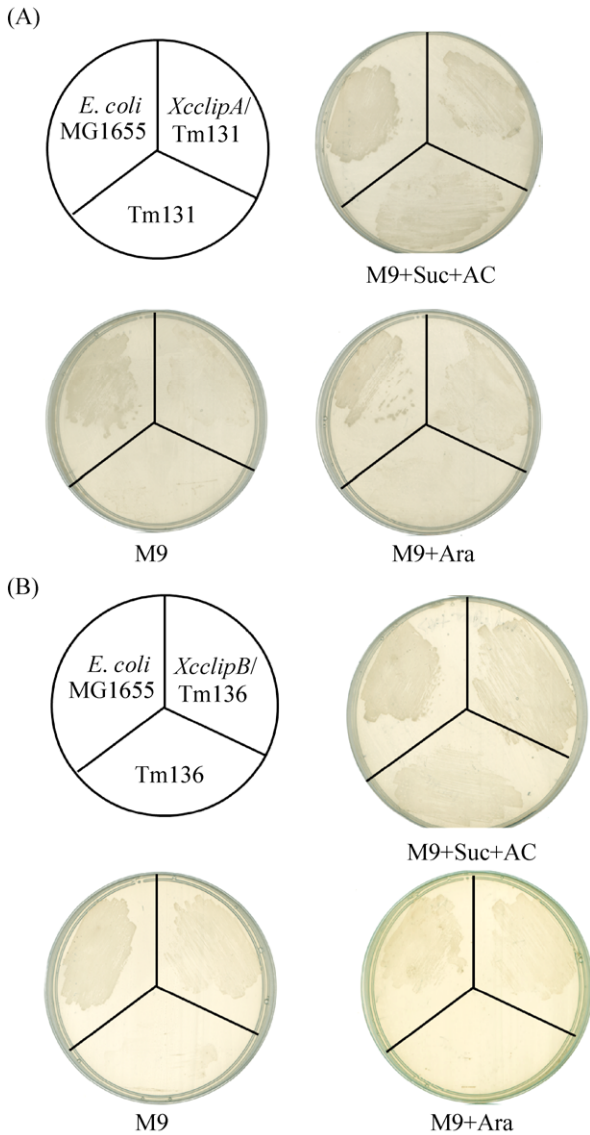


图 2. *XcclipA* 和 *XcclipB* 基因分别互补大肠杆菌突变株 Tm131 (A)和 Tm136 (B)

Figure 2. Complementation of *E. coli* mutants Tm131 and Tm136 with *XcclipA* and *XcclipB*, respectively. Suc: sucrose; Ac: acetate salt; Ara: arabinose; M9: minima medium.

辛酸也同样不能获得基因敲除突变株，推测 *XcclipA* 和 *XcclipB* 都是 *Xcc* 生长的必需基因，*XccLipB*-*XccLipA* 参与的硫辛酸从头合成途径是 *Xcc* 获得硫辛酸的唯一途径，而不能吸收外源性硫辛酸。这一推测与生物信息学分析结果相吻合。

为验证以上推测，将 pSRK-*EclpA* 表达质粒分别导入一次重组菌株 *Xcc* L1 和 *Xcc* L2，而后在含有 Rif 和 Gm 抗性并添加硫辛酸的 NYGS 平板上，筛选出对 Km 敏感的菌株，并利用验证引物 Check up 和 Check down 进一步 PCR 筛选，并对扩增片段进行测序验证。结果显示，染色体上的 *XcclipA* 和 *XcclipB* 分别被删除，获得基因替换突变株 *Xcc* L3 ($\Delta XcclipA/pSRK-EclpA$)和 *Xcc* L4 ($\Delta XcclipB/pSRK-EclpA$)。这一结果证明 *Xcc* 中硫辛酸从头合成途径是获得硫辛酸的唯一途径，只有导入外源途径的硫辛酰蛋白连接酶基因 *lplA* 后，才能敲除 *XcclipA* 或 *XcclipB* 基因。

2.4 基因替换突变株生长性状分析

首先分析了两个替换突变株 *Xcc* L3 和 *Xcc* L4 在营养丰富培养基 NYG 上的生长情况。结果显示，*Xcc* L3 ($\Delta XcclipA/pSRK-EclpA$)在 NYG 平板上不能生长，而 *Xcc* L4 ($\Delta XcclipB/pSRK-EclpA$)能生长，但与野生菌 *Xcc*8004 相比生长较弱，而在添加硫辛酸(lip)的 NYG 培养上时，两种替换突变株都能恢复到野生菌的生长状态(图 3-A)。进一步测定了不同菌株在两种培养条件下的生长曲线，结果也显示，*Xcc* L3 在 NYG 中不能生长，而 *Xcc* L4 能生长(图 3-B)，但在添加硫辛酸后，*Xcc* L3、*Xcc* L4 和野生菌的生长无差异(图 3-C)。

其次，分析了两个替换突变株 *Xcc* L3 和 *Xcc* L4 在基础培养基 XOG 上的生长情况。结果显示，野生菌 *Xcc* 8004 能正常生长，但 *Xcc* L3 和 *Xcc* L4 突变株都不能生长(图 4-A)。但在 XOG 培养基中添加 50 nmol/L 硫辛酸(lip)后，*Xcc* L3 和 *Xcc* L4 替换突变株都能恢复到野生菌的生长水平(图 4-A)。进一步测定不同条件下的生长曲线，结果也显示类似结果，*Xcc* L3 和 *Xcc* L4 只能在添加有硫辛酸

的 XOG 培养基中才能恢复生长(图 4-B 和 C)。以上结果说明, *XcclipA* 或 *XcclipB* 基因被大肠杆菌 *lplA* 基因替换后, 都直接影响了菌株的生长, 但在不同培养条件下, 两种替换突变株出现了不同的生长性状。

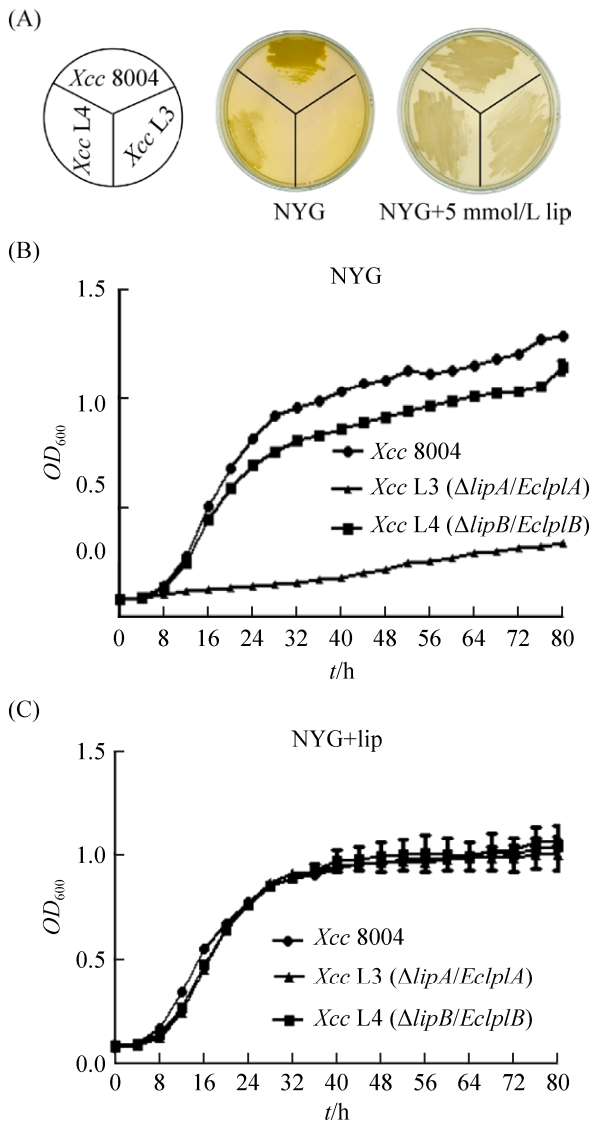


图 3. *Xcc* L3 和 *Xcc* L4 替换突变株在丰富培养基上的生长表型检测

Figure 3. Growth phenotype of *Xcc* L3 and *Xcc* L4 on nutritional media. A: growth on NYG plates; B: growth curves in NYG. C: growth curves in NYG with lipoic acid. lip: lipoic acid. Data are mean \pm one standard deviation of three independent assays.

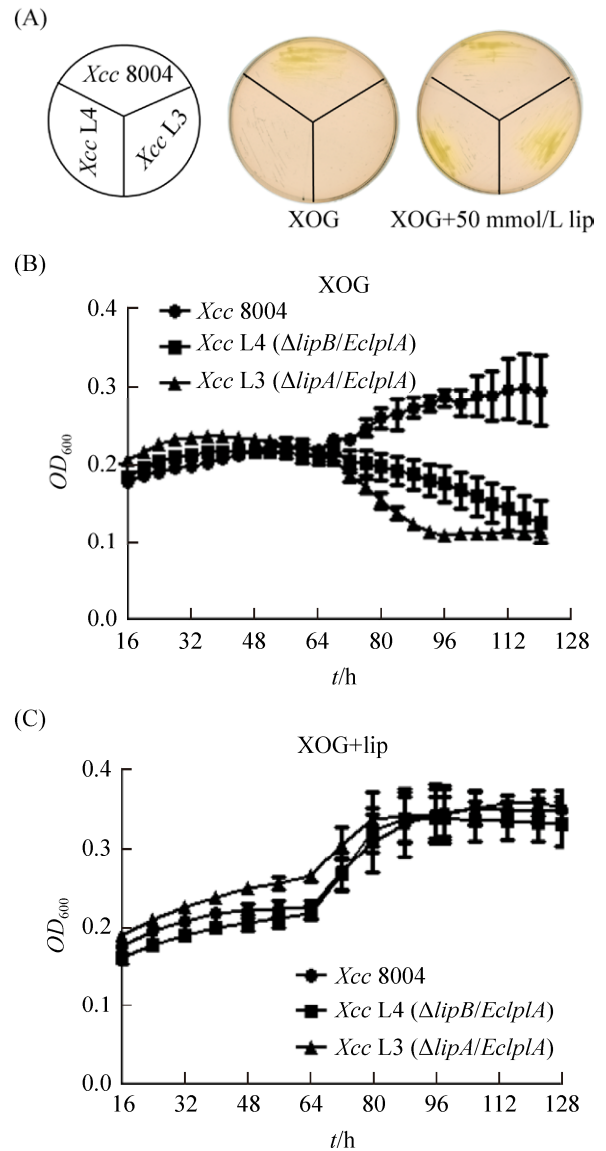


图 4. *Xcc* L3 和 *Xcc* L4 替换突变株在基础培养基上的生长表型检测

Figure 4. Growth phenotype of *Xcc* L3 and *Xcc* L4 on minimal media. A: Growth on XOG plates. B: Growth curves in XOG. C: Growth curves in XOG with lipoic acid. lip: lipoic acid. Data are mean \pm one standard deviation of three independent assays.

2.5 基因替换突变株致病性分析

为了解硫辛酸合成关键基因被替换后是否影响 *Xcc* 的致病性, 本研究进一步利用剪叶法, 分析了野生菌株和两种替换突变株对寄主植物甘蓝

的致病性。结果显示, 野生菌 *Xcc*8004 能引起寄主植物病斑, 但两种替换突变株出现不同的侵染结果, 其中 *Xcc* L4 ($\Delta XcclipB/pSRK-EcIplA$) 菌株也能引起植物病斑, 而 *Xcc* L3 ($\Delta XcclipA/pSRK-EcIplA$) 几乎不能导致植物病斑(图 5-A)。进一步统计叶片病斑长度显示, *Xcc*8004 引起的平均病斑长度为 6.6 mm, 而 *Xcc* L3 引起的平均病斑长度仅为 0.3 mm, 与野生菌有极其显著性差异, 但 *Xcc* L4 引起的平均病斑长度达到 4.5 mm, 与野生菌的病斑长度无显著性差异(图 5-B)。

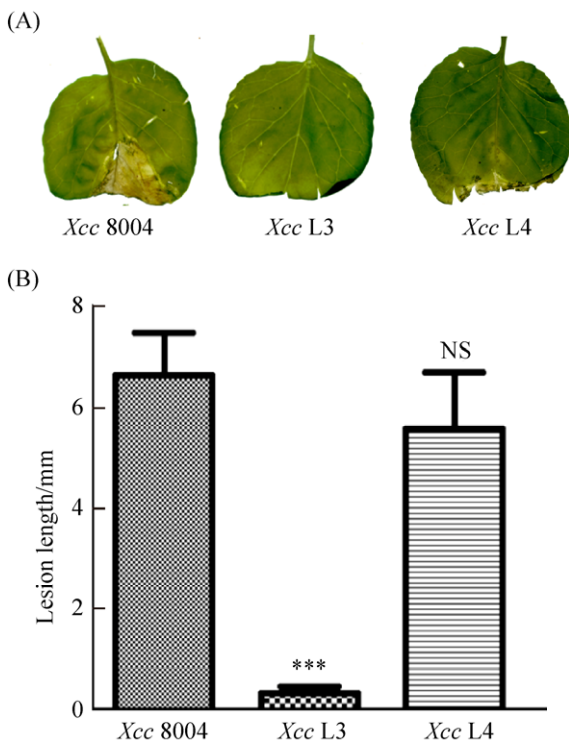


图 5. *Xcc* L3 和 *Xcc* L4 替换突变株致病力检测

Figure 5. Virulence assay of *Xcc* L3 and *Xcc* L4. A: black rot symptoms caused by different strains on cabbage leaves inoculated by leaf-clip method. B: average lesion lengths caused by different strains. Values are expressed as the means and standard deviations of triplicate measurements, each comprised of 10 leaves. The asterisk (***) indicates $P < 0.001$, NS means no significant difference.

3 讨论

B 族维生素硫辛酸作为一种抗氧化剂被广泛使用, 其医用价值和应用领域不断扩展。而在细菌中硫辛酸作为辅因子参与 2-酮酸脱氢酶复合体的催化反应, 涉及细胞的能量代谢、一碳单位生成以及脂肪酸和氨基酸合成等许多重要的代谢过程, 因此干扰硫辛酸合成或吸收可作为新型抗菌药物的筛选策略^[22-24]。野油菜黄单胞菌(*Xcc*)能引起几乎所有的十字花科植物黑腐病, 包括许多的经济类蔬菜等。黑腐病不仅影响产量, 也影响品质, 在全球范围内引起重大经济损失, 当前的抗性品种选育或化学药物处理方法都效果不佳, 亟需寻找新的黑腐病防控策略。但 *Xcc* 的硫辛酸合成机制还未见报道。

本研究首先通过生物信息学分析的方法, 通过同源性比对在 *Xcc* 基因组中发现 *XcclipA* 和 *XcclipB* 基因, 但没有发现与大肠杆菌硫辛酰蛋白连接酶(*EcLplA*)具有同源性的基因, 推测 *Xcc* 中 *LipA-LipB* 合成途径是其获得硫辛酸的唯一途径。而后分别将 *XcclipA* 和 *XcclipB* 分别异体遗传互补大肠杆菌 *lipA* 和 *lipB* 基因突变株, 结果显示都能恢复突变株在基础培养基上的生长, 初步证明 *XcclipA* 编码蛋白具有硫辛酸合成酶活性, 而 *XccLipB* 具有辛酰转移酶活性。进一步尝试在基因组中分别敲除 *XcclipA* 和 *XcclipB*, 但在多种条件下都不能获得基因敲除突变株, 而在导入大肠杆菌 *lplA* 基因并添加硫辛酸后成功获得敲除突变株, 证明 *XcclipA* 和 *XcclipB* 都是 *Xcc* 生长的必需基因, *Xcc* 不能利用环境中的硫辛酸而只能从头合成。

本研究还分析了两种 *EcIplA* 替换突变株的生长性状。在丰富培养基中, *XcclipA* 敲除菌株不能

生长,但 *XcclipB* 敲除菌株能生长,而在基础培养基中, *XcclipA* 和 *XcclipB* 敲除菌株都不能生长。但在培养基中添加硫辛酸后两种替换突变株均能恢复到野生菌的生长表型。由于大肠杆菌 *EcLplA* 不仅可将硫辛酸转移到脱氢酶的 E2 亚基上,也可以将辛酸连接到脱氢酶的 E2 亚基上,即可部分取代 *LipB* 的功能^[6]。因此在丰富培养基中,可能含有少量的辛酸, *EclpA* 替换的 *XcclipB* 敲除菌株可以生长,而在贫瘠的基础培养上由于没有辛酸, *XcclipB* 突变株也不能生长,只有添加硫辛酸后才能恢复生长。进一步分析两种 *EclpA* 替换突变株对寄主植物甘蓝的致病力,结果显示 *XcclipA* 敲除株几乎丧失了致病力,而 *XcclipB* 突变株感染的病斑长度与野生菌无显著性差异。

硫辛酸作为辅因子在基础代谢中发挥重要作用,但细胞对硫辛酸的需求浓度并不高。本研究在基础培养基中添加 50 nmol/L 硫辛酸,即能完全满足突变菌株的生长,而提高硫辛酸含量至 1 μ mol/L 时显著抑制 *Xcc* 的生长。此现象与文献报道类似,极低浓度即可满足菌株生长^[4, 25–26]。但在丰富培养基中,硫辛酸浓度即使提高到 5 mmol/L 时也不抑制 *Xcc* 的生长,但具体原因还有待继续探索。

不同来源的细菌中硫辛酸合成及吸收途径都具有较高的多样性,也为开发特异性的抗菌药物提供了可能性。大肠杆菌同时具有 *LipB-LipA* 合成途径和 *LplA* 参与的外源硫辛酸吸收途径,而枯草芽孢杆菌具有 *LipM-LipL-LipA* 合成途径和 *LplJ* 吸收途径^[10],金黄色葡萄球菌具有 *LipM-LipA-LipL* 合成途径和 *LplA1/LplA2* 共参与的吸收途径,而单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)不具有硫辛酸合成能力,只能利用 *LplA1* 从寄主细胞中吸收硫辛酸^[27]。本研究发现 *Xcc* 只具有 *LipB-LipA* 合

成途径,不能直接吸收利用外源硫辛酸,而 *XcclipA* 敲除株的致病力几乎丧失,表明 *XccLipA* 可能是一个良好的防控黑腐病药物的筛选靶点。

参考文献

- [1] Reed KE, Cronan JE Jr. Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: sequencing and functional characterization of the *lipA* and *lipB* genes. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(5): 1325–1336.
- [2] Sun YR, Zhang WB, Ma JC, Pang HS, Wang HH. Overproduction of α -lipoic acid by gene manipulated *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169369.
- [3] Cronan JE Jr. Advances in synthesis of biotin and assembly of lipoic acid. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2018, 47: 60–66.
- [4] Cronan JE Jr. Assembly of lipoic acid on its cognate enzymes: an extraordinary and essential biosynthetic pathway. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(2): 429–450.
- [5] Spalding MD, Prigge ST. Lipoic acid metabolism in microbial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(2): 200–228.
- [6] Morris TW, Reed KE, Cronan JE Jr. Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lplA* and *lipB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(1): 1–10.
- [7] Cronan JE Jr. Biotin and lipoic acid: synthesis, attachment and regulation. *Ecosal Plus*, 2014, 6(1). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2012.
- [8] Jordan SW, Cronan JE Jr. The *Escherichia coli lipB* gene encodes lipoyl (octanoyl)-acyl carrier protein: protein transferase. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(5): 1582–1589.
- [9] Cronan JE Jr. The structure of lipoyl synthase, a remarkable enzyme that performs the last step of an extraordinary biosynthetic pathway. *Biochemical Journal*, 2014, 464(1): e1–3.
- [10] Martin N, Christensen QH, Mansilla MC, Cronan JE Jr, de Mendoza D. A novel two-gene requirement for the octanoyltransfer reaction of *Bacillus subtilis* lipoic acid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 2011, 80(2): 335–349.
- [11] Martin N, Lombardia E, Altabe SG, de Mendoza D, Mansilla MC. A *lipA* (*yutB*) mutant, encoding lipoic acid synthase, provides insight into the interplay between branched-chain

- and unsaturated fatty acid biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(24): 7447–7455.
- [12] Zorzoli A, Grayczyk JP, Alonzo F III. *Staphylococcus aureus* tissue infection during sepsis is supported by differential use of bacterial or host-derived lipoic acid. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(10): e1005933.
- [13] Mashruwala AA, Roberts CA, Bhatt S, May KL, Carroll RK, Shaw LN, Boyd JM. *Staphylococcus aureus* SufT: an essential iron-sulphur cluster assembly factor in cells experiencing a high-demand for lipoic acid. *Molecular Microbiology*, 2016, 102(6): 1099–1119.
- [14] Lanz ND, Lee KH, Horstmann AK, Pandelia ME, Cicchillo RM, Krebs C, Booker SJ. Characterization of lipoyl synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 2016, 55(9): 1372–1383.
- [15] Yu YH, Ma JC, Guo QQ, Ma JC, Wang HH. A novel 3-oxoacyl-ACP reductase (FabG3) is involved in the xanthomonadin biosynthesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(12): 1696–1709.
- [16] Hu Z, Dong HJ, Ma JC, Yu YH, Li KH, Guo QQ, Zhang C, Zhang WB, Cao XY, Cronan JE, Wang HH. Novel *Xanthomonas campestris* long-chain-specific 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase involved in diffusible signal factor synthesis. *mBio*, 2018, 9(3): e00596–18.
- [17] 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. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32811.
- [18] Khan SR, Gaines J, Roop RM II, Farrand SK. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(16): 5053–5062.
- [19] Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Bechwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(14): 4121–4130.
- [20] Wei K, Tang DJ, He YQ, Feng JX, Jiang BL, Lu GT, Chen B, Tang JL. *hpaR*, a putative marR family transcriptional regulator, is positively controlled by HrpG and HrpX and involved in the pathogenesis, hypersensitive response, and extracellular protease production of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(5): 2055–2062.
- [21] Liu YF, Liao CT, Chiang YC, Li CE, Hsiao YM. *WxcX* is involved in bacterial attachment and virulence in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Basic Microbiology*, 2018, 58(5): 403–413.
- [22] Grayczyk JP, Harvey CJ, Laczkovich I, Alonzo F III. A lipoylated metabolic protein released by *Staphylococcus aureus* suppresses macrophage activation. *Cell Host & Microbe*, 2017, 22(5): 678–687.e9.
- [23] Tort F, Ferrer-Cortés X, Ribes A. Differential diagnosis of lipoic acid synthesis defects. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2016, 39(6): 781–793.
- [24] Lu WF, Cao JJ, Guo YJ, Zhong K, Zha GM, Wang LF, Yang GY. Expression of the porcine lipoic acid synthase (LIAS) gene in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(3): 5369–5377.
- [25] Zhang HM, Luo QX, Gao HC, Feng YJ. A new regulatory mechanism for bacterial lipoic acid synthesis. *MicrobiologyOpen*, 2015, 4(2): 282–300.
- [26] Hermes FA, Cronan JE Jr. The role of the *Saccharomyces cerevisiae* lipoate protein ligase homologue, Lip3, in lipoic acid synthesis. *Yeast*, 2013, 30(10): 415–427.
- [27] Christensen QH, Hagar JA, O'riordan MXD, Cronan JE. A complex lipoate utilization pathway in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(36): 31447–31456.

LipB-LipA is the only lipoyl acylation pathway in *Xanthomonas campestris*

Jianrong Ma¹, Anna Liu², Wenbin Zhang², Yahui Mao³, Yonghong Yu^{1*}

¹ Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, Guangdong Province, China

² Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

³ Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] Cofactor lipoic acid participates in many basic cellular metabolic processes. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) is the pathogen of black rot of cruciferous plants, causing plant disease all over the world. Studies on the synthetic mechanism of lipoic acid in *Xcc* will facilitate the discovery of novel methods to control the disease. [Methods] XC_0713 (*XccLipA*) and XC_0712 (*XccLipB*) in *Xcc* were found based on the sequence alignments with *E. coli* LipA and LipB, the key enzymes for lipoic acid synthesis. For complementation analysis, *XcclipA* and *XcclipB* were amplified and ligated into expression vector pBAD24M, which were further transferred into *E. coli* mutants, respectively. The growth of transformants was analyzed. With the aid of *E. coli* *lplA* expression, *XcclipA* and *XcclipB* were deleted in the genome by homologous recombination, respectively. The growth and virulence of the two mutants were analyzed. [Results] *XcclipA* and *XcclipB* complemented the growth of *E. coli* *fabA* and *fabB* mutants on the minimal media, respectively. Both *XcclipA* and *XcclipB* are essential genes, which cannot be deleted directly. However, *XcclipA* and *XcclipB* could be deleted when pSRK-*EclpA* was introduced. The two mutants could not grow on the minimal medium, but grew well when lipoic acid supplemented. *XcclipB* mutant could grow on the nutritional medium. *XcclipA* mutant almost abolished the virulence to the host plant, but *XcclipB* mutant showed similar virulence with wild-type strain. [Conclusion] *XcclipA* codes lipoyl synthase, and *XcclipB* codes octanoyl transferrase, both are essential genes for *Xcc* growth. The LipB-LipA is the only lipoic acylation pathway in *Xcc*. *XcclipA* deletion mutant showed no virulence to host plant, indicating *XccLipA* is a promising target for anti-bacteria agent selection.

Keywords: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), lipoic acid synthesis, lipoyl synthase LipA, virulence analysis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Guangzhou Science and Technology Plan Project (202002030422), by the Medical Science and Technology of Guangdong Province (A2018409), by the Open fund of Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms (PFRAO201804) and Science Foundation of Guangdong Food & Drug Vocational College (2019ZR13, 2019ZR17)

*Corresponding author. Tel: +86-20-28194616; E-mail: yuyh@gdyzy.edu.cn

Received: 7 January 2020; Revised: 12 February 2020; Published online: 23 March 2020