

硬脂酰-辅酶 A 脱氢酶基因在食品级乳酸菌中的表达

王腊梅^{1,2}, 李世丽², 苟克勉², 罗玉柱¹

1 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业大学生物学院 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

王腊梅, 李世丽, 苟克勉, 等. 硬脂酰-辅酶 A 脱氢酶基因在食品级乳酸菌中的表达. 生物工程学报, 2012, 28(9): 1106-1117.
Wang LM, Li SL, Gou KM, et al. Heterologous expression of stearoyl-CoA desaturase-1 in *Lactococcus lactis* NZ3900. Chin J Biotech, 2012, 28(9): 1106-1117.

摘 要: 为了实现硬脂酰-辅酶 A 脱氢酶 1 编码基因在乳酸乳球菌中的表达, 采用 PCR 技术扩增获得人类 *scd1* 的编码序列。Nco I 和 Xba I 双酶切后定向插入到食品级表达载体 pNZ8149 中, 构建表达载体 pNZ8149-*scd1*。电转化乳酸乳球菌 NZ3900, 经菌落 PCR 和测序鉴定 *scd1* 基因成功插入到乳酸乳球菌中。在乳链菌肽诱导下进行 *scd1* 的表达, 转化株提取脂肪酸, 进行脂肪酸含量的气相色谱分析。结果显示, SCD1 转化菌株中的 C16: 1n-7 和 C18: 1n-7 脂肪酸组分比转化 pNZ8149 的对照组乳酸菌分别提高了 92%~169% 和 53%~127%。文中以 *scd1* 基因为例, 尝试并证明了脂肪酸脱氢酶类基因能够在食品级乳酸菌中有效表达, 为后续研究奠定了基础。

关键词: 硬脂酰-CoA 脱氢酶, 乳酸乳球菌, 脂肪酸

Heterologous expression of stearoyl-CoA desaturase-1 in *Lactococcus lactis* NZ3900

Lamei Wang^{1,2}, Shili Li², Kemian Gou², and Yuzhu Luo¹

1 College Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: The possibility of heterologous expression of human Stearoyl-CoA Desaturase (*scd1*) was investigated. The *scd1*

Received: February 20, 2012; **Accepted:** April 17, 2012

Supported by: National Major Special Project on New Varieties Cultivation for Transgenic Organisms in China (Nos. 2008ZX08008-003, 2009ZX08006-011B), Chinese Universities Scientific Fund (No. 2011JS106).

Corresponding author: Yuzhu Luo. Tel: +86-93-17631870; E-mail: luoyz@gsau.edu.cn

国家转基因生物新品种培育重大专项 (Nos. 2008ZX08008-003, 2009ZX08006-011B), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. 2011JS106) 资助。

encoding sequence was inserted into the pNZ8149 to generate the pNZ8149-*scd1* expression plasmids. Then we introduced the pNZ8149-*scd1* construct into the *Lactococcus lactis* NZ3900 to investigate its enzyme activity. The results show that heterologous expressed SCD1 enzyme resulted in a 92%–169% increase in the C16:1 n -7 and a 53-127% increase in the C18:1 n -7 ($P<0.05$). The SCD1 enzyme was capable of producing n -7 fatty acids in *Lactococcus lactis* efficiently. It also suggests that the fatty acid desaturases can be heterologous expressed in *Lactococcus lactis* to produce the helpful fatty acids.

Keywords: stearyl-CoA desaturase-1, *Lactococcus lactis*, fatty acid

硬脂酰-辅酶 A 脱氢酶 (Stearoyl-coenzyme A desaturase, SCD) 属于 Δ -9 脱氢酶, 位于内质网上, 是一种膜结合蛋白。SCD 是脂肪代谢过程中的关键酶, 它催化饱和脂肪酰基辅酶 A 在 Δ -9 顺式位置上脱氢, 生成单不饱和脂肪酸, 是脂肪酸脱氢反应的限速酶之一^[1]。最早分离纯化的 SCD 来自大鼠的肝^[2]。此后, 高山被孢霉 *M. alpine*、酿酒酵母 *S. cerevisiae*、嗜热四膜虫 *Tetrahymena thermophila* 和荚膜组织胞浆菌 *Histoplasma capsulatum* 中也已分离得到了 Δ -9 脱氢酶^[3-5]。SCD 的主要功能是催化硬脂酰 CoA 和软脂酰 CoA 形成油酰 CoA 和棕榈油酰 CoA, 生成的油酰 CoA 和棕榈油酰 CoA 是细胞内合成甘油三酯、磷脂质和胆甾醇酯的主要来源。*scd* 的表达还涉及对细胞增殖、细胞程序凋亡、衰老和脂质调解的细胞毒作用^[6], 同时, SCD 也可影响膜流动性和 SCD1 的缺失导致身体脂肪的减少, 增加胰岛素的敏感性和抑制由饮食引起的肥胖^[7-9]。提高 *scd1* 在骨骼肌的表达可引起脂质的不正常代谢和肥胖的加速^[10]。SCD1 缺失的小鼠在饮食中提供鱼油可以防止动脉粥样硬化的加速^[11]。目前, *scd1* 基因在动物模型实验中, 主要研究 *scd1* 基因在脂质生成、肥胖和胰岛素耐受性中的作用。*scd* 基因敲除小鼠不易肥胖并且对胰岛素有耐受性, 以及脂质氧化的增加^[6]。另外, 在反刍动物

瘤胃或乳腺组织中 SCD 可以通过其 Δ -9 脱氢酶的作用, 将反式十八碳一烯酸(*tl1*-C18:1)转化为 *c9,tl1* 共轭亚油酸 (*c9,tl1*-CLA)^[12-13]。大鼠的 *scd1* 基因成功地在羊的乳腺细胞中得到表达^[14]; 人的 *scd1* 基因转入人胚肾 293 细胞过量表达把油酸转化成 *c9tl1*-CLA^[15]。

乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 是一类在食品中应用最广泛的重要工业菌株。它包括乳酸球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌等十几个属。这类菌种在防治食物腐败、提高免疫力以及改善风味等方面有重要作用。目前, 乳酸菌食品级高效表达系统的构建及应用则是该领域研究的前沿和热点。食品级表达系统要求宿主菌、选择标记基因和诱导物均为食品级, 这为异源基因表达产物的直接应用提供了基础^[16]。在这些食品级的表达系统中乳链菌肽控制表达系统 (The nisin controlled expression, NICE) 是应用最广泛的。该系统是可控制蛋白质生产的最理想的系统, 同时具有良好的安全性, 故可用于目的蛋白在乳酸菌中的高效表达。控制目的代谢物的生产, 其工程菌及表达产物可直接制成口服制剂, 可直接应用于食品、医药和保健品等领域^[17]。

本文主要研究把 *scd1* 基因转入食品级的乳酸乳球菌表达系统, 利用 NICE 控制 *scd1* 基因表达产生单不饱和脂肪, 脂类中饱和脂肪酸与单不

饱和脂肪酸的比例又往往影响着脂蛋白代谢、生物膜的流动性和信号传导等,同时还与糖尿病、动脉粥样硬化、癌症、肥胖症等多种疾病相关,因此,这些工程菌可直接用于食品工业,这对人类健康非常有益。

1 材料与方法

1.1 材料

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Tris 饱和酚、DNA 限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xba* I 及 DNA 标准分子量及预染蛋白标准分子量均购自宝生物工程(大连)有限公司;普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;M17 培养基购自青岛海博生物技术有限公司;引物合成和 DNA 测序分别由 Invitrogen 公司和北京六合华大基因科技股份有限公司完成;SDS、 β -巯基乙醇、溶菌酶、考马斯亮蓝 G250、三氟化硼/甲醇(BF_3/MeOH)试剂和脂肪酸分析所用标准品 Polyunsaturated Fatty Acid Mix No.2 购自 Sigma/Aldrich 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 质粒、菌种和生长条件

含有人 *scd1* 的 cDNA 质粒 pCAGGS-*scd1* 由本实验室保存。克隆和表达载体 pNZ8149,基因克隆和表达宿主乳酸乳球菌 NZ3900 均购自北京拜尔迪生物技术有限公司,NZ3900 是营养缺陷型菌株。食品级克隆和表达载体 pNZ8149 由 *Pnis* 启动子控制表达,载体携带 *recC* 和 *recA* 复制子和原核生物表达所需的 SD 序列,以及食品级选择标记基因 *lacF*。

NZ3900 培养在补加 0.5% 葡萄糖的 M17 培养基中,菌株在 30 °C、5% CO_2 的恒温培养箱静置培养。Elliker 包含 0.5% 的乳糖、0.004% 溴

甲酚紫溶液用作乳糖利用表型 (*lacF*) 指示培养基^[18],培养基中诱导表达剂 Nisin 的浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ 。

1.3 PCR 扩增目的基因

根据人 *scd1* 基因的 cDNA 序列 (GenBank Accession No. BC062303) 和表达载体 pNZ8149 的序列分析,用 primer premier 5.0 设计 *SCD-F* 和 *SCD-R* 引物 (表 1),向上游引物 *SCD-F* 引入 *Nco* I 酶切位点,向下游引物 *SCD-R* 引入 *Xba* I 酶切位点,分别用下划线标出;*SCD-F1* 和 *SCD-R1* 引物是在目的基因 *scd1* 内部设计;pNZ8149-F 和 pNZ8149-R 为菌落 PCR 的引物;pNZ8149-F1 和 pNZ8149-R1 为测序引物。

酚-氯仿常规方法^[19]提取质粒 pCAGGS-*scd1*,并以其为模板进行 PCR 扩增。PCR 条件为:94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定后进行回收和纯化。

1.4 乳酸乳球菌表达载体的电击转化

pNZ8149 用电击转化 NZ3900,电击条件:2.0 kV、25 μF 、200 Ω ,使用 2 mm 的电转杯,电击时间是 4.4 ms。用选择培养基 Elliker 和菌落 PCR 选择阳性菌落。提取阳性转化子质粒,测序鉴定。

1.5 质粒 DNA 从乳酸乳球菌的分离

采用修改的碱变性法提取乳酸乳球菌的质粒 pNZ8149。方法如下:5 mL 培养菌液;12 000 r/min 离心 2 min,收集菌液;菌液用 250 μL THMS 缓冲液 (30 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 3 mmol/L MgCl_2 , 25% 的蔗糖) 和 2 g/L 溶菌酶重悬,在 37 °C 下孵育 10 min;加 500 μL

表 1 本研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Enzyme included
SCD-F	CATGCC <u>ATGG</u> CAATGCCGCCCCACTTGCTG	<i>Nco</i> I
SCD-R	GCTCTAGATCAGCCACTCTTGTAGTTTCCATCTCC	<i>Xba</i> I
SCD-F1	GACTTGGGAGCCCTGTATGCC	—
SCD-R1	CCTACCTCCTCTGGAACATCACG	—
pNZ8149-F	AGCATAATAAACGGCTCTG	—
pNZ8149-R	CTCCTCCTCCAACCGAAATAG	—
pNZ8149-F1	TCGAAGGAAC TACAAAAT	—
pNZ8149-R1	CCACCTCTAAAAGGTGAT	—

Note: single underlining of the primer sequence indicates the restriction enzyme cut site of *Nco* I and *Xba* I.

0.2 mol/L NaOH 和 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 在冰上孵育 5 min; 加 375 μL 冰预冷 pH 5.5 的 3 mol/L 的乙酸钾后冰上孵育 5 min; 离心 5 min, 吸取上层到新的离心管, 离心管加满异丙醇, 在室温孵育 5~10 min; 离心 10 min, 用 70% 乙醇洗 DNA; 离心 2 min; 弃上清, 室温下干燥 DNA, 加 50 μL 的超纯水溶解 DNA。

1.6 乳酸乳球菌的转化

回收 PCR 产物, 用 *Nco* I 和 *Xba* I 对回收的 PCR 产物和质粒 pNZ8149 分别进行双酶切。凝胶电泳, 用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (天根生化科技有限公司) 回收目的片段。酶切后的目的片段和乳酸乳球菌表达质粒 pNZ8149 用快速连接试剂盒 (宝生物工程 (大连) 有限公司) 16 °C 连接 1 h, 构建重组质粒 pNZ8149-*scdI*。

连接液先用乙醇沉淀纯化之后再做转化, 纯化的连接液 1 μL (浓度大约 100 ng/μL) 电击转化乳酸乳球菌 NZ3900 感受态, 电击用以下条件: 2 000 V、25 μF、200 Ω 和 2 mm 的电转杯, 电击时间是 4.4 ms。电击的转化液涂布在以溴甲酚紫

为指示剂、0.5% 的乳糖为唯一碳源的 Elliker 培养基上, 30 °C 静置厌氧培养。一般培养 1~2 d。载体 pNZ8149 携带 *lacF*, 表达宿主 NZ3900 缺少 *lacF*, 互补筛选阳性菌落。选择培养基 Elliker 上出现黄色菌落为阳性菌。用相同的方法转化空载体作为对照。

1.7 阳性转化子的 PCR 鉴定

选择阳性转化子进行菌落 PCR 鉴定。菌落 PCR 模板的制备, 采用如下方法: 取 200 μL 过夜培养的菌液, 12 000 r/min 离心 2 min; 弃上清, 加 50 μL 盐酸胍, 沸水浴 15 min; 离心弃上清, 用 100 μL 超纯水洗 2 遍; 加 10 μL 双蒸水溶解, 取 2 μL 菌液为菌落 PCR 的模板。选用载体 pNZ8149 通用引物进行 PCR 扩增。

PCR 条件是: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。菌落 PCR 鉴定后的阳性转化子, 进一步用 *Nco* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定构建的重组质粒。鉴定后的阳性质粒由北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.8 重组质粒 pNZ8149-*scd1* 在乳酸乳球菌中的诱导表达

选取 PCR 鉴定正确的乳酸乳球菌重组子单菌落接种到 5 mL M17 液体培养基中, 添加 0.5% 的乳糖。30 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱静置培养过夜, 接种 1 mL 培养液到 10 mL 相同的培养液。当 $OD_{600}=0.4\sim0.5$; 10 mL 的培养液添加 50 ng/mL 的诱导剂 Nisin, 诱导重组体乳酸乳球菌的表达。同时, 0.5 mg/mL 的反式十八碳烯酸 (*tlh*-C18 : 1, Sigma V1 131)、0.1 mg/mL 的 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 分别添加到 10 mL 培养液中, 孵化 48 h。菌体离心收集在 20 mL 的甲酯化玻璃管, 抽提脂肪酸进行气相色谱分析。

1.9 SDS-PAGE 检测硬脂酰 Co-A 脱氢酶的表达情况

取重组菌新鲜单克隆, 分别接种于 5 mL 含 0.5% 乳糖的 M17 培养基, 30 °C 静置培养过夜。同时做 pNZ8149 载体对照, 方法同重组菌; 过夜培养物 5 mL, 12 000 r/min 室温离心 2 min, 弃上清, 沉淀用 500 μ L TES 裂解液 (pH 8.0 的 1 mol/L Tris-HCl, 1 mL; pH 8.0 的 0.5 mol/L EDTA, 0.2 mL; 蔗糖 25 g; 加超纯水至 100 mL) 洗涤 2 次, 然后用 100 μ L 含有 1.0 mg/mL 溶菌酶的 TES 重悬菌体, 加 1 μ L 0.2 mol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 37 °C 水浴 2 h。再加 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液 (pH 6.8 的 1 mol/L Tris-HCl 1 mL; 10% 甘油 2 mL; 10% SDS 4 mL; 1% 溴酚蓝 0.05 mL; 2- β 巯基乙醇 1 mL; 加超纯水至 10 mL) 100 μ L, 沸水浴 5 min, 离心后取 15 μ L 上清进行 SDS-PAGE。

1.10 脂肪酸分析确定目的片段的功能性表达

鉴定为阳性的乳酸乳球菌接种于 5 mL M17 的液体培养基, 添加 0.5% 的乳糖。30 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱静置过夜培养, 接种 1 mL 培养液到 10 mL 的新鲜培养液。当 $OD_{600}=0.4\sim0.5$ 时, 10 mL 的培养液添加 50 ng/mL 的诱导剂 Nisin, 0.5 mg/mL 的 *tlh*-C18 : 1, 0.1 mg/mL 的 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 分别添加入 10 mL 培养液中, 孵化 48 h。菌液离心收集在 20 mL 的甲酯化玻璃管, 脂肪酸抽提方法如下: 孵化 24 h 的菌液离心, 6 000 r/min 离心 5 min; 弃上清, 加 200 μ L 的菌液重悬, 移入 20 mL 甲酯化玻璃管; 加 1 mL 的正己烷和 1 mL 的 BF₃ 到甲酯化玻璃管; 甲酯化玻璃管吹 1 min 的 N₂; 之后, 涡旋振荡 30 s; 沸水浴 1 h; 加 1 mL 的双蒸水在沸水浴的甲酯化玻璃管; 3 000 r/min 离心 1 min; 取上清到 1 mL 的玻璃管, 用 N₂ 吹干, 加 500 μ L 的正己烷。用全自动 HP6 890 气相色谱仪定量脂肪酸甲酯。测量的结果可用气相色谱的 ChemStation 软件 (Agilent Technologies) 分析。

1.11 重组菌生长曲线的测定和 pH 值的变化

挑取空载 pNZ8149 菌株和 3 株阳性菌株平板上的单菌落, 用 2 mL 补加 0.5% 乳糖的 M17 液体培养基, 30 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱静置培养 12 h。之后, 每株菌吸取 1 mL 菌液在 20 mL M17 培养液中, 平均分配培养液到 2 个新的培养管, 每株菌做 2 个重复, 10 mL 的培养液添加 50 ng/mL 的诱导剂 Nisin。于培养后的第 0、3、6、10、12、15 h, 分别用无菌培养管从各管中吸取培养液 2 mL, 以 1 cm 比色皿比浊, 以空载为参比, 在 OD_{600} 下分别测定其吸光度 A 值。

同时，用 Sartorius PB-10 pH 湿度计测量发酵液 pH 值。

1.12 统计分析

实验重复了 4 次，测量的数据用统计分析软件 SAS (1999)。平均数通过 MEANS 语句列出，分析结果 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 硬脂酰-辅酶 A 脱氢酶的克隆和载体 pNZ8149-*scd1* 的构建

从 pCAGGS-*scd1* 质粒 PCR 扩增得到 1 100 bp 的 *scd1* 基因片段，用 *Nco* I 和 *Xba* I 内切酶导入空载体 pNZ8149，构建成重组表达质粒 pNZ8149-*scd1*，转化乳酸乳球菌 NZ3900 后的阳性重组质粒如图 1 所示，菌落 PCR 表明该重组质粒插入了 1 100 bp 的目标基因 (图 2)，*Nco* I 和 *Xba* I 双酶切获得 2 515 bp 和 1 095 bp 的条带 (图 3)，测序证明目的基因读码正确。上述鉴定都表明重组质粒 pNZ8149-*scd1* 成功地转入乳酸乳球菌 NZ3900。

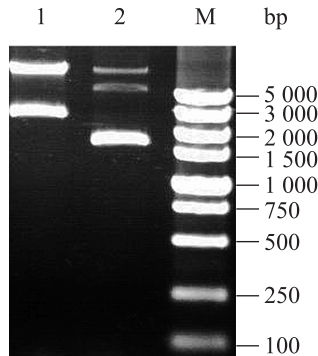


图 1 质粒 pNZ8149-*scd1* 的琼脂糖凝胶电泳检测
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the pNZ8149-*scd1* gene. 1: plasmid pNZ8149-*scd1*; 2: plasmid pNZ8149; M: DNA marker DL5 000.

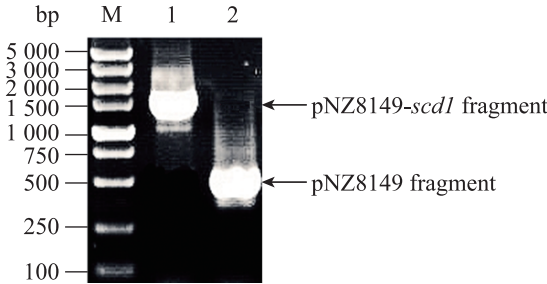


图 2 菌落 PCR 法鉴定重组表达质粒结果
Fig. 2 Direct PCR of bacterial colonies for identification of recombinant expression plasmids. 1: PCR product of pNZ8149-*scd1*; 2: PCR product of pNZ8149; M: DNA marker DL5 000.

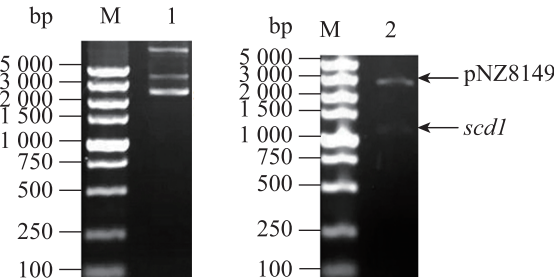


图 3 质粒 pNZ8149-*scd1* 酶切的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of the pNZ8149-*scd1* digested with restriction enzymes. M: DNA marker DL5 000; 1: plasmid pNZ8149-*scd1*; 2: pNZ8149-*scd1* digested with *Nco* I and *Xba* I.

2.2 SDS-PAGE 分析硬脂酰 CoA 脱氢酶的表达

重组菌经 Nisin 诱导，则可高效表达 SCD1，该重组菌全蛋白提取物经 10% SDS-PAGE，考马斯亮蓝染色后观察到外源蛋白的表达，其表观分子量约为 37 kDa，与报道的 SCD1 表观分子量结果一致。重组菌 pNZ8149-*scd1* 和空载体 pNZ8149 的 SDS-PAGE 结果如图 4 所示，空载体在 37 kDa 位置未见明显条带，而重组菌 pNZ8149-*scd1* 在 37 kDa 有明显的条带，说明硬脂酰 CoA 脱氢酶在重组菌中表达成功。

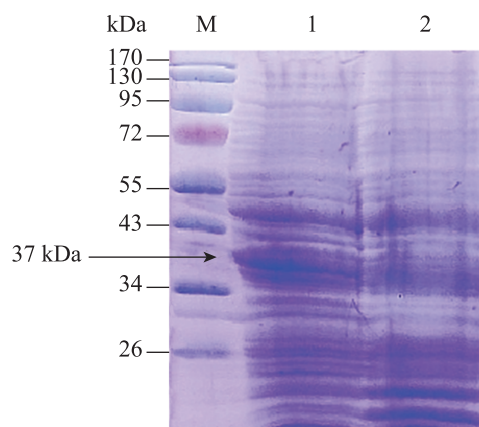


图4 硬脂酰 CoA 脱氢酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of stearyl-CoA desaturase-1. M: protein marker; 1: pNZ8149-*scd1*/NZ3900; 2: pNZ8149/NZ3900.

2.3 硬脂酰-辅酶 A 脱氢酶的诱导表达和脂肪酸分析

将重组质粒 pNZ8149-*scd1* 转化至乳酸菌 NZ3900, 经 50 $\mu\text{g/L}$ Nisin 诱导表达, 同时添加

0.5 g/L 的 *t11*-C18:1、0.1 g/L 的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 分别添加到 10 mL 培养液中, 孵化 48 h。获得的乳酸菌抽提脂肪酸, 分析乳酸菌的脂肪酸组分。随机选择了 A~C 三株 *scd1* 转化菌, 检验 *scd1* 基因表达是否可以提高单不饱和脂肪酸的含量。转化株产生的脂肪酸用气相色谱分析 (图 4)。

结果表明 *scd1* 转化株的棕榈油酸 (C16:1 n -7) 和十八碳烯酸 (C18:1 n -7) 的含量提高了 92%~169% 和 53%~127%, 显著地高于对照组 ($P<0.05$, 表 1), 而 *c9,t11*-CLA 并没有变化。以上结果表明 *scd1* 在乳酸菌中成功表达。

2.4 重组菌的生长曲线和 pH 值测量

以培养时间为横坐标、600 nm 处测定的 OD 值为纵坐标, 绘制不同时间菌株浓度的生长曲线 (图 5)。统计结果分析表明: 随着时间的推移, 对照组和重组菌培养 15 h 的生长速度和产酸能力相比无显著变化 (表 2~3), 这有利于重组菌应

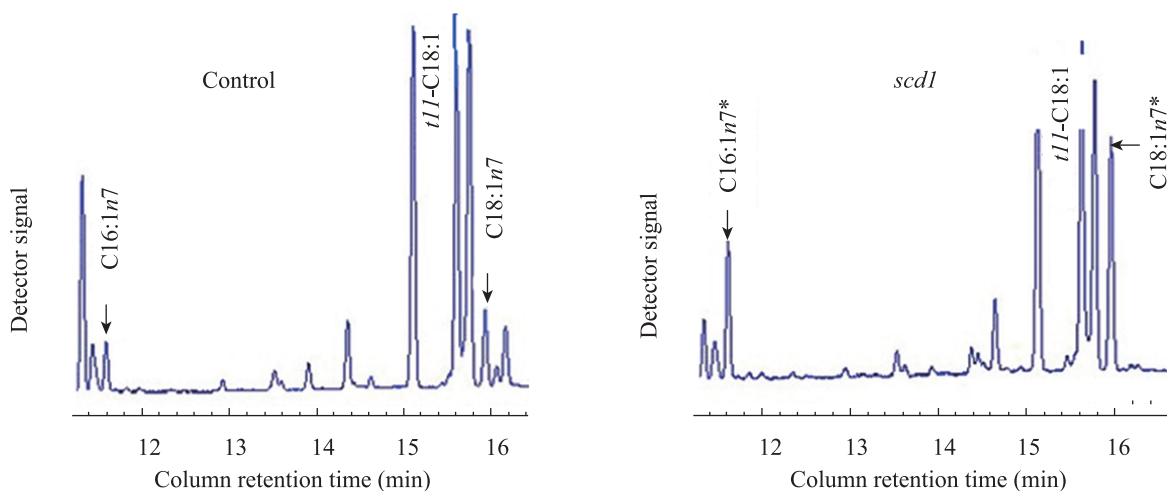


图5 对照组和 *scd1* 转化株抽提的总脂肪酸的部分气相色谱图 (* $P<0.05$)

Fig. 5 Partial gas chromatogram traces showing fatty acid profiles of total lipids extracted from *scd1*-transformed and control. Both the control and *scd1* line A are fed with 0.5 g/L *t11*-C18:1 for 48 h prior to fatty acid analysis. The lipid profiles show that the levels of palmitoleic acid (C16:1 n -7), and *cis*-vaccenic acid (C18:1 n -7) are markedly increased. (* $P<0.05$).

表 1 对照组 pNZ8149 和转化株 pNZ8149-*scd1* 在乳酸乳球菌 NZ3900 表达的 *n*-7 脂肪酸
Table 1 *n*-7 fatty acid composition in *Lactococcus lactis* NZ3900 transfected with pNZ8149 control and pNZ8149-*scd1*

Fatty acids	Control	<i>scd1</i> lines		
		A	B	C
C12:0	0.10±0.01	0.08±0.02	0.09±0.02	0.09±0.01
C14:0	0.96±0.19	0.84±0.19	1.13±0.06	1.67±0.16
C14:1	0.01±0.01	0.01±0.01	ND	0.02±0.02
C16:0	1.42±0.31	1.27±0.28	1.16±0.06	2.62±0.32
C16:1	0.13±0.02	0.25±0.01*	0.30±0.03**	0.35±0.03**
C18:0	0.48±0.04	0.48±0.06	0.50±0.04	0.58±0.06
<i>tl1</i> -C18:1	95.24±0.80	95.41±0.64	95.36±0.28	92.08±0.98
C18:1 <i>n</i> -9	0.15±0.02	0.16±0.01	0.17±0.01	0.19±0.02
C18:1 <i>n</i> -7	0.81±0.02	1.41±0.07**	1.24±0.01**	1.84±0.09**
C18:2 <i>n</i> -6	0.19±0.04	0.18±0.03	0.13±0.01	0.28±0.04
C18:3 <i>n</i> -6	0.03±0.03	0.02±0.02	ND	0.29±0.16
C18:3 <i>n</i> -3	ND	ND	ND	ND
<i>c9,tl1</i> -CLA	0.06±0.02	0.05±0.02	0.02±0.02	0.14±0.03
<i>tl0,c12</i> -CLA	ND	ND	ND	ND
C16:1 <i>n</i> -7 + C18:1 <i>n</i> -7)/(C16:0 + C16:1 <i>n</i> -7 + C18:1 <i>n</i> -7)	0.55±0.07	0.46±0.01	0.56±0.01	0.43±0.01
C18:1 <i>n</i> -9/ (C18:0 + C18:1 <i>n</i> -9)	0.63±0.03	0.73±0.03**	0.70±0.01	0.74±0.01

Fatty acid composition is presented as a percentage of the total *Lactococcus lactis* lipids from the control (pNZ8149 transformed) and *scd1* (pNZ8149-*scd1* transformed) lines, A–C. Each value represents the $\bar{x} \pm s$ from four independent measurements of each line. Statistical significance in fatty acid composition is assessed by Student’s t-test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ND: not detectable.

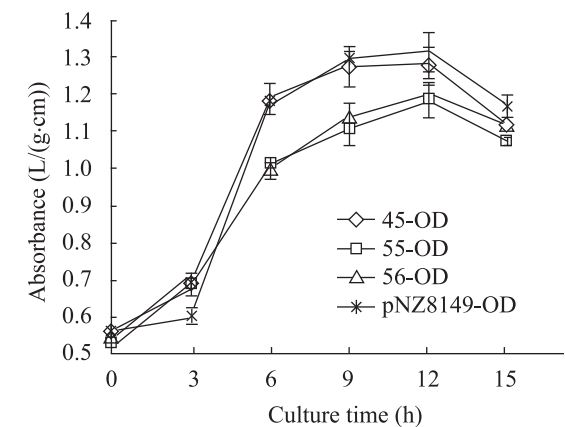


图 6 对照组和 *scd1* 转化株生长曲线图
Fig. 6 Growth curve from *scd1*-transformed and control. NZ3900: the original strain; pNZ8149: load vector; 45, 55, 56: *scd1*-transformed.

用于食品工业。培养 15 h 后，乳酸菌生长将要达到平台期，继续检测 *OD* 值和 *pH* 值差异无统计学意义。

3 讨论

脂肪酸的生物活性越来越引起人们的兴趣。高含量的单不饱和脂肪酸和癌细胞的转化是呈正相关的，与对照组相比棕榈油酸使 *SCD* 缺失细胞对细胞凋亡更敏感^[20]。*SCD1* 的表达可以调控 β -细胞、脂肪细胞、巨噬细胞、内皮细胞和肌细胞中炎症和应激反应。*SCD1* 完全缺失可以导

表 2 对照组 pNZ8149 和转化株 pNZ8149-*scd1* 的 OD 值分析Table 2 OD value analysis in pNZ8149 control and pNZ8149-*scd1*

Time (h)	OD value ($\bar{x} \pm s$)			
	<i>scd1</i> -negative line	45	55	56
0	0.58±0.01	0.58±0.02	0.54±0.01	0.56±0.01
3	0.62±0.02	0.69±0.02	0.70±0.01	0.72±0.01
6	1.17±0.01	1.18±0.04	1.01±0.01	1.00±0.03
9	1.28±0.02	1.26±0.05	1.10±0.04	1.13±0.04
12	1.30±0.05	1.27±0.04	1.17±0.04	1.19±0.03
15	1.16±0.03	1.11±0.01	1.07±0.01	1.11±0.01

表 3 对照组 pNZ8149 和转化株 pNZ8149-*scd1* 的 pH 值分析Table 3 pH value analysis in pNZ8149 control and pNZ8149-*scd1*

Time (h)	pH value ($\bar{x} \pm s$)			
	<i>scd1</i> -negative line	45	55	56
0	7.17±0.08	7.15±0.09	7.42±0.03	7.42±0.04
3	7.06±0.08	6.93±0.02	7.09±0.01	6.96±0.01
6	6.61±0.06	6.49±0.06	6.79±0.03	6.77±0.09
9	6.11±0.01	6.03±0.04	6.46±0.06	6.41±0.13
12	6.00±0.01	5.89±0.05	6.20±0.06	6.16±0.11
15	5.93±0.11	5.76±0.01	5.83±0.02	5.81±0.04

致肝脏功能的紊乱和炎症疾病^[21]。但是, SCD1 缺失的瘦素不足肥胖小鼠可以促进心脏的功能, 人类胃癌的异种移植模型中 SCD 抑制可以延迟肿瘤的生长^[22-23], 临床研究发现, *n-3* 脂肪酸可以显著地影响 *scd1* 的 mRNA 在肝脏的表达和活性^[24]。然而, SCD 在食品级乳酸菌的表达尚未见报道。

本研究把 *scd1* 基因转入食品级乳酸乳球菌得到阳性表达系, 实验数据显示添加的底物 *tl1*-C18 : 1 并没有显著地转化为 *c9,tl1*-CLA。*scd1* 的表达只引起了 *n-7* 脂肪酸家族 (C16 : 1*n-7*, C18 : 1*n-7*) 的含量升高, C16 : 1*n-7* 和

C18 : 1*n-7* 脂肪酸的含量分别提高了 92%~169% 和 53%~127%。这为调控 *scd1* 的合成和单不饱和脂肪酸在食品工业的利用提供了研究基础。

SCD 与所有的膜结合脂肪酸脱氢酶一样, 是一种氧依赖型含铁的跨膜蛋白, 结合乙酰辅酶 A 或甘油酯作为底物。该跨膜蛋白含有 4 次跨膜结构, 并且有 3 个保守的组氨酸富集区, 这 3 个组氨酸保守区与二价铁离子结合参与形成酶的活性中心。在哺乳动物体中, SCD 反应是一个需氧过程, 需要分子氧和铁离子的辅助作用, 可以在长链脂肪酸 $\Delta 9,10$ 位置引入一个双键。因此, 单不饱和脂肪酸的合成是由饱和脂肪酸前体经过

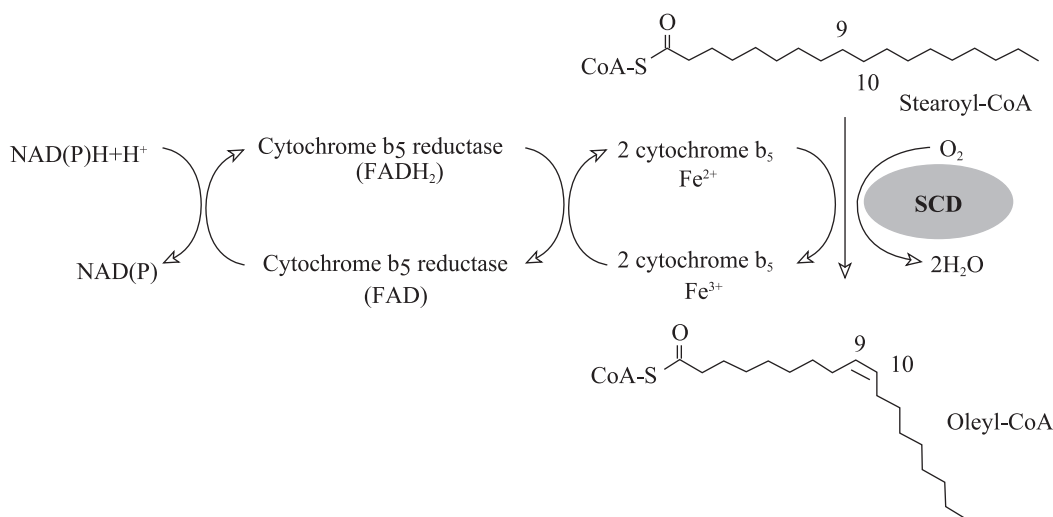


图7 SCD对脂肪酸去饱和的电子传递途径^[6]

Fig. 7 The pathway of electron transfer in the desaturation of fatty acids by stearoyl-CoA desaturase (SCD)^[6].

一个有氧反应, 3个复合物组成的酶系统催化形成^[25]。这个复合物酶系统包括依靠黄素蛋白-NADH的细胞色素 b_5 还原酶、细胞色素 b_5 和SCD(图6)。本实验在乳酸乳球菌的菌液中加了0.1 g/L的铁离子, 而乳酸乳球菌NZ3900是革兰氏阳性菌, 它的生长环境是厌氧, 这对酶的活性有一定的影响。另外, 乳酸菌不生产酶反应所需的细胞色素 b_5 , 这些都可能降低酶的活性, 影响 $t11$ -C18:1转化为 $c9,t11$ -CLA。

本研究通过对 $scd1$ 进行原核表达, 对重组体的脂肪酸组分进行了分析, 表明 $scd1$ 基因在乳酸菌中成功表达。通过转基因技术, Reh等把大鼠的 scd 基因整合到奶山羊基因组中并在乳腺中进行表达, 产生的转基因山羊与对照组山羊乳脂肪酸组成相比, 饱和脂肪酸含量降低, 不饱和脂肪酸含量增加, $c9,t11$ -CLA的含量在第7天时有显著差异, 但这种作用在泌乳第30天开始削弱^[14]。Wu等把人的 $scd1$ 基因转到人肾胚293细胞, 得到稳定表达的细胞系, CLA

含量显著提升, 底物 $t11$ -C18:1的转化率达到16.49%~20.06%^[15]。另外, 乳酸乳球菌转化株表达人的 $scd1$ 基因, SCD作为内质网膜上的不饱和酶系统, 它不会扰乱其他内源性多不饱和脂肪酸的正常代谢。与对照相比包括 $n-6$ 和 $n-3$ 系列与 $n-6/n-3$ 的比值都不会改变。虽然 $scd1$ 在人体的表达可能和家族的高血脂和人类的代谢病相关联^[26-27], 但是, 目前研究 $scd1$ 在乳酸乳球菌中的表达并没有危害效应。

SCD1是脂肪生成的关键酶, 它可以催化单不饱和脂肪酸的生成, 主要是C18:1 $n-9$ 和C16:1 $n-7$ 。因此, C18:1 $n-9$ 和C16:1 $n-7$ 增加2个碳原子分别延长 $n-9$ 和 $n-7$ 系列的长链脂肪酸。在最近的研究中, 我们发现 $scd1$ 的表达仅仅能够显著增加 $n-7$ 系列的脂肪酸, 比如C16:1 $n-7$ 和C18:1 $n-7$ 。相反的, 在本实验中预期的 $n-9$ 产物, 比如C18:1 $n-9$ 没有增加。相应地, $scd1$ 菌株与对照组相比较 $n-7$ 系列的产物显著地增加。这样的变化是SCD1的 $\Delta-9$ 脱氢酶

功能所不能解释的。C18 : 1 n -7 的含量增加极有可能是由于 C16 : 1 n -7 脂肪酸含量升高后, 体内的延长酶通过在碳链末端加入二碳原子单位引起的。已经有许多研究证实 *t10,c12*-CLA 能够强烈抑制 SCD 酶的活性^[28-31], 但具体的机制并不清楚。添加 CLA 的人肝癌细胞 (HepG2) 中棕榈酸的合成不受影响, 但油酸的合成显著下降^[32]。由此我们猜想在 *scd1* 菌株里可能是 CLA 抑制了 C18 : 1 n -9 脂肪酸的合成。

乳酸乳球菌能在人小肠中短暂生活, 对人体有益无害的食品级微生物。本实验应用 pNZ8149/NZ3900 表达系统以 *lacF* 基因为选择标记基因, 利用以乳糖为唯一碳源的培养基进行筛选。受体菌、选择标记基因以及诱导物 Nisin 均为食品级, 因此, 乳酸乳球菌的食品级表达系统 pNZ8149-*scd1*/NZ3900 表达有活性的 SCD1, 提升饱和脂肪酸的含量。油酸可以调节人体血浆中高、低密度脂蛋白胆固醇的浓度比例, 防止心血管疾病的发生。而且, 重组菌的生长速度和产酸能力与对照组相比没发生显著变化, 未来我们进一步把重组菌用于动物实验, 以期对功能性食品的研制和生产提供美好前景。

致谢: 气相色谱分析由中国农科院饲料研究所范志影老师协助完成。

REFERENCES

- [1] Sampath H, Ntambi JM. The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Ann NY Acad Sci*, 2011, 1243(1): 47-53.
- [2] Strittmatter P, Spatz L, Corcoran D, et al. Purification and properties of rat liver microsomal stearoyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71(11): 4565-4569.
- [3] Tocher DR, Leaver MJ, Hodgson PA. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog Lipid Res*, 1998, 37(2/3): 73-117.
- [4] Sakuradani E, Kobayashi M, Shimizu S. Δ 9-fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing fungus. Unique gene sequence and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Eur J Biochem*, 1999, 260(1): 208-216.
- [5] Laoteng K, Anjard C, Rachadawong S, et al. *Mucor rouxii* Δ 9-desaturase gene is transcriptionally regulated during cell growth and by low temperature. *Mol Cell Biol Res Commun*, 1999, 1(1): 36-43.
- [6] Paton CM, Ntambi JM. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(1): E28-E37.
- [7] Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, et al. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science*, 2002, 297(5579): 240-243.
- [8] Ntambi JM, Miyazaki M, Stoeckl JP, et al. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(17): 11482-11486.
- [9] Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(17): 6409-6414.
- [10] Hulver MW, Berggren JR, Carper MJ, et al. Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab*, 2005, 2(4): 251-260.
- [11] Brown JM, Chung S, Sawyer JK, et al. Combined therapy of dietary fish oil and Stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition prevents the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(1): 24-30.
- [12] Palmquist DL, Lock AL, Shingfield KJ, et al. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Adv Food Nutr Res*, 2005, 50: 179-217.
- [13] Santora JE, Palmquist DL, Roehrig KL. *Trans*-vaccenic acid is desaturated to conjugated

- linoleic acid in mice. *J Nutr*, 2000, 130(2): 208–215.
- [14] Reh WA, Maga EA, Collette NMB, et al. *Hot topic*: using a stearoyl-CoA desaturase transgene to alter milk fatty acid composition. *J Dairy Sci*, 2004, 87(10): 3510–3514.
- [15] Wu ZF, Li DF, Gou KM. Overexpression of stearoyl-CoA desaturase-1 results in an increase of conjugated linoleic acid (CLA) and *n*-7 fatty acids in 293 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(3): 473–476.
- [16] Wei WZ, Xiang H, Tan HR. Food-grade expression of human Cu/Zn-superoxide dismutase gene in *Lactococcus lactis*. *Acta Microbiol Sin*, 2003, 43(3): 347–353.
卫文仲, 向华, 谭华荣. 人铜锌超氧化物歧化酶基因在乳酸乳球菌中的食品级表达. *微生物学报*, 2003, 43(3): 347–353.
- [17] Xu B, Cao YS, Chen Y, et al. Construction of NICE system food-grade vector prnb48 for *Lactococcus lactis*. *Food Sci Technol*, 2006(10): 22–26.
徐波, 曹郁生, 陈燕, 等. 乳酸乳球菌 NICE 系统食品级载体 pRNB48 的构建. *食品科技*, 2006(10): 22–26.
- [18] Molecular biotechnology GmbH. Vector-systems: NICE® Expression System for *Lactococcus lactis* [EB/OL]. [2012-02-20]. Molecular biotechnology website: <http://www.mobitec.com/int/index.html>.
- [19] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 27–30.
- [20] Scaglia N, Ariel Igal R. Stearoyl-CoA Desaturase is involved in the control of proliferation, Anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells. *J Biol Chem*, 2005, 280(27): 25339–25349.
- [21] Liu XQ, Strable MS, Ntambi JM. Stearoyl CoA desaturase 1: role in cellular inflammation and stress. *Adv Nutr*, 2011, 2: 15–22.
- [22] Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, et al. Loss of Stearoyl-CoA desaturase 1 rescues cardiac function in obese leptin-deficient mice. *J Lipid Res*, 2010, 51(8): 2202–2210.
- [23] Roongta UV, Pabalan JG, Wang XY, et al. Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates Stearoyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(11): 1551–1561.
- [24] Hofacer R, Magrisso IJ, Jandacek R, et al. Omega-3 fatty acid deficiency increases Stearoyl-CoA desaturase expression and activity indices in rat liver: positive association with non-fasting plasma triglyceride levels. *Prostag Leukot Essent Fatty Acids*, 2012, 86(1/2): 71–77.
- [25] Heinemann FS, Ozols J. Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. *Prostag Leukot Essent Fatty Acids*, 2003, 68(2): 123–133.
- [26] Mar-Heyming R, Miyazaki M, Weissglas-Volkov D, et al. Association of stearoyl-CoA desaturase 1 activity with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(6): 1193–1199.
- [27] Popeijus HE, Saris WHM, Mensink RP. Role of stearoyl-CoA desaturases in obesity and the metabolic syndrome. *Int J Obes*, 2008, 32(7): 1076–1082.
- [28] Park Y, Storkson JM, Ntambi JM, et al. Inhibition of hepatic stearoyl-CoA desaturase activity by *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1486(2-3): 285–292.
- [29] Gervais R, McFadden JW, Lengi AJ, et al. Effects of intravenous infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 2009, 92(10): 5167–5177.
- [30] Lin XB, Looor JJ, Herbein JH. *Trans*10, *cis*12-18: 2 is a more potent inhibitor of de novo fatty acid synthesis and desaturation than *cis*9, *trans*11-18: 2 in the mammary gland of lactating mice. *J Nutr*, 2004, 134(6): 1362–1368.
- [31] Smith SB, Kawachi H, Choi CB, et al. Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. *J Anim Sci*, 2009, 87(14): E72–E82.
- [32] Yee JK, Mao CS, Hummel HS, et al. Compartmentalization of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 activity in HepG2 cells. *J Lipid Res*, 2008, 49(10): 2124–2134.