

来源于线虫 *Caenorhabditis briggsae* 的 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因的合成及其功能分析

The Synthesis and Function Analysis of ω -3 Fatty Acid Desaturase Gene from *Caenorhabditis briggsae*

朱贵明^{1,2} 陈宏^{2,3} 周艳荣¹ 卢建申¹ 吴晓洁¹ 陈红星¹ 邓继先^{1*}

ZHU Gui-Ming^{1,2}, CHEN Hong^{2,3}, ZHOU Yan-Rong¹, LU Jian-Shen¹, WU Xiao-Jie¹, CHEN Hong-Xing¹ and DENG Ji-Xian¹

1 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

2 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100

3 徐州师范大学细胞与分子生物学研究所, 徐州 221116

1 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

3 Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China

摘要 ω -3 多不饱和脂肪酸(ω -3 PUFAs)是一类被广泛研究和关注的脂肪酸,对人类及其他哺乳动物的正常发育和保持良好的健康状况极其重要,并且对于人类的多种疾病的预防和治疗亦有着明显的作用。在人和哺乳动物体内, ω -3 PUFAs 的含量与 ω -6 PUFA(其代谢方式和功能与前者不同,通常其作用也相反)相比很低。而对于人体,无论 ω -3 PUFAs 的过低还是 ω -6 PUFAs 的过高都会带来极为不利的影响。所以人们一直在努力寻求提高人体中 ω -3 PUFAs 含量的途径或者大量生产 ω -3 PUFAs 的方法。本研究经过密码子优化后,用化学合成的方法获得了 *C. briggsae* 的 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 *sFat-1*,并构建了哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1-sFat1-EGFP,通过脂质体转染了 CHO 细胞系并对其进行抗性筛选获得稳定转染细胞株。对稳定转染 *sFat-1* 细胞株的 RT-PCR 分析及脂肪酸组成的 GC-MS 分析表明,*sFat1* 基因完全能够在 CHO 细胞中表达和发挥其 ω -3 去饱和酶的作用,即使使 ω -6 系列不饱和脂肪酸转变为相应的 ω -3 系列不饱和脂肪酸(从十八碳到二十二碳)。 ω -6 不饱和脂肪酸总量从 48.97% 下降到 35.29%,而 ω -3 不饱和脂肪酸总量则相应地从 7.86% 上升到 24.02%。 ω -6 多不饱和脂肪酸和 ω -3 多不饱和脂肪酸的比值从正常细胞中的 6.23 下降到转染细胞中的 1.47。这说明 *C. briggsae* 的 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 *sFat-1* 的合成是成功的,试验所获得的结果为今后的进一步的研究或应用其大量生产 ω -3 PUFAs 奠定了基础。

关键词 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因,多不饱和脂肪酸,基因合成,脂肪酸分析

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)05-0763-09

Abstract Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have been broadly investigated and shown to exert many preventive and therapeutic actions besides their important role in maintenances human health and normal development. In mammals, the level of ω -3 PUFAs is relatively too low compared with ω -6 PUFAs, which metabolically and functionally distinct from ω -3 PUFAs and often have important opposing physiological functions. Either the inefficiency of ω -3 PUFAs or the excess of ω -6 PUFAs will cause many healthy problems. So methods have been sought to increase the amount of ω -3 PUFAs and to improve the ω -6/ ω -3

Received: April 5, 2006; Accepted: May 5, 2006.

* Corresponding author. E-mail: dengjx56@yahoo.com.cn

1 和 2 并列为第一署名单位。

ratio in body. In this study, the *sFat-1* gene, which putatively encodes a ω -3 fatty acid desaturase, was chemically synthesized according to the sequence from *Caenorhabditis briggsae* (with codon usage modified), and constructed into a mammal expression vector pcDNA3.1-sFat1-EGFP. This vector was introduced into CHO cells by lipid-mediated transfection, and its expression quickly and effectively elevated the cellular ω -3 PUFAs (from 18-carbon to 22-carbon) contents and dramatically improved the ratio of ω -6/ ω -3 PUFAs. Cellular lipids extracts from stably selected cells were analyzed with GC-MS and the results showed that amount of total ω -6 PUFAs dropped from 48.97% (in GFP cells) to 35.29% (in *sFat-1* cells), whereas the amount of total ω -3 PUFAs increased from 7.86% to 24.02%, respectively. The ω -6/ ω -3 ratio also dropped from 6.23 to 1.47. These data demonstrates the *Caenorhabditis briggsae* ω -3 Fatty Acid Desaturase gene, *sFat-1*, was synthesized successfully and can produce ω -3 PUFAs by using the corresponding ω -6 PUFAs as substrates, which shows its potential for use in the production of ω -3 PUFAs in transgenic animals.

Key words ω -3 fatty acid desaturase gene, polyunsaturated fatty acids, gene synthesis, lipids analysis

多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids; PUFAs) 是指十六碳以上并含有两个以上双键的脂肪酸, 它包括 ω -3 PUFAs 和 ω -6 PUFAs 两种类型, 这些脂肪酸在人和哺乳动物体内均不能合成或合成极少。其中 ω -3 PUFAs 如 EPA (eicosapentaenoic acid; 20:5n-3^{**})、DHA (Docosahexaenoic Acids; 22:6n-3) 等对人类及哺乳动物更为重要, 它们是细胞膜磷脂中必不可少的组分, 使细胞膜结构保持适宜的柔性、流动性和选择通透性, 并作为类花生酸如前列腺素、白细胞三烯和血栓烷的前体分子^[1]。 ω -3 PUFAs 还与特定的细胞蛋白的伴随受体相结合, 作为介导发热、发炎、血管扩张、血压及疼痛等细胞应答的信号分子^[2]。在临床上, ω -3 PUFAs 在预防和治疗心血管疾病、关节炎、炎性皮肤病、溃疡性结肠炎、创伤感染、自身免疫性疾病、肾脏疾病、癌症以及与一些代谢综合症有关的疾病有着重要意义^[3-6]。 ω -3 PUFAs 被认为是大脑、视网膜和神经系统发育所必需的, 在婴幼儿营养中不可缺少, 并且对于预防和治疗老年痴呆症等一些神经性疾病有较好的效果^[7]。更多情况下, 人们将其作为功能性食品使用以维持身体的正常发育及健康。例如 DHA 被称为“脑黄金”而备受人们青睐, EPA 则作为一种“血管清道夫”而受推崇^[2,8]。 ω -6 PUFAs 在代谢上和功能上与 ω -3 PUFAs 却刚好相反。 ω -6 PUFAs 如 AA (Arachidonic acid; 20:4n-6) 的过量会引起前凝血反应 (prothrombotic) 等生理效应, 并导致炎症和心血管等疾病^[4,5]。另外还有研究表明, ω -6 PUFAs 具有促进癌症如乳腺癌的发育^[2,9]。人体 ω -6 PUFAs 的含量远远高于 ω -3 PUFAs (比例为数倍甚至数 10 倍)^[2]。因此, 增加人体 ω -3 PUFAs 的摄入量对于人类健康具有极其重要

的意义。然而, 自然界中 ω -3 PUFAs 的来源稀缺, 深海鱼油仍然是 ω -3 PUFAs 的主要来源。但事实上该来源正在不断地下降, 而且鱼油中的 DHA 和 EPA 的构成和含量随着鱼的种类、季节、地理位置等变化而变化。鱼油制剂还带有腥味, 影响了产品的品质。此外, 从鱼油中提取的 DHA 含胆固醇多, 可能含有因环境污染所致的重金属等物质^[1,10]。因此通过其他途径来获取更大量 ω -3 PUFAs 以满足人们的需求已成研究的热点。海洋真菌和微藻等低等生物具有合成 EPA、DHA 的能力, 它们是 DHA 的原始生产者, 而海洋鱼类等动物主要通过吞食藻类及浮游生物积累 EPA、DHA 等不饱和脂肪酸^[6,11-15]。因此, 各国先后开展了从海洋微藻和真菌中提取 EPA、DHA 的研究。虽然这些途径前景广阔, 但目前还存在不少问题, 离真正广泛的实际应用还有一定的距离。随着对脂肪酸代谢在基因水平的不断深入的认识和研究, 通过基因工程及转基因技术使人类千百年来食用的作物或畜禽能自行产生 EPA、DHA 等不饱和脂肪酸已经逐渐成为现实。

ω -3 脂肪酸去饱和酶 (ω -3 Fatty Acid Desaturase) 是合成 ω -3 PUFAs 的关键酶, 它以 ω -6 PUFAs 为底物合成相应的 ω -3 PUFAs。在一些藻类、真菌以及高等植物中已经发现和克隆了其相应的 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因, 但这些基因几乎都只能以 LA (linoleic acid; 18:2n-6) 为底物合成 ALA (α -linolenic acid; 18:3n-3), 而不能合成二十碳以上更长链的 ω -3 PUFAs^[1,10,15]。令人振奋的是, 近几年的研究发现有两种真菌 *Saprolegnia diclina* 和 *Mortierella alpina* 1S-4 以及一种线虫 *Caenorhabditis elegans* 的 ω -3 脂肪酸去饱和酶能够以二十碳的 ω -6 PUFAs 为底物合成二十碳的 ω -3

* * 20:5n-3 表示该脂肪酸为二十碳, 含 5 个不饱和键, 且不饱和键起始于脂肪酸碳链甲基端的第三个碳原子, 其余的脂肪酸依此类推。

PUFAs, 后者同时还均能以十八碳的 ω -6 PUFAs 为底物合成十八碳的 ω -3 PUFAs^[9,16,17]。此外, 线虫 *C. elegans* 的 ω -3 去饱和酶基因 (*fat-1*) 被转入哺乳动物细胞以及小鼠能使其 ω -3 PUFA(从十八碳到二十二碳)的含量显著提高^[18,19]。由此可以预见, 如果制备带有 ω -3 去饱和酶基因的转基因家畜(禽)以生产富含 ω -3 PUFAs 的肉蛋奶等食品, 将大大提高生产 ω -3 PUFAs 的效率和降低成本。我国目前很少开展类似的研究, 而线虫 *C. elegans* 的 ω -3 去饱和酶基因已经被申请专利保护, 因此如何获得这类基因进而开展研究对于我国在将来生产和利用 EPA、DHA 等多不饱和脂肪酸具有重要意义。本研究经过检索和文献调研, 发现线虫 *C. briggsae* 具有类似 *fat-1* 基因的基因组序列(为 *C. briggsae* 基因组测序结果, GenBank 登录号 CAAC01000009), 其氨基酸编码较 *C. elegans* 少了两个氨基酸。二者的核苷酸序列同源为 71.5%, 氨基酸同源为 86.1%。而且未见其在基因功能研究报道, 也未涉及专利保护方面的问题。所以我们决定对其做进一步的功能研究和开发利用。本文报道了该基因的密码子优化、人工合成及功能的分析研究, 为今后的研究和应用提供实验支持。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、RT-PCR 试剂盒购于(大连)宝生物公司。质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒均购于 V-gene 公司; 高糖 DMEM、双抗、丙酮酸钠、非必需氨基酸、Geneticin、胎牛血清均购于 Gibco 公司, 脂质体 LipofectamineTM2000 购于 Invitrogen 公司, 亚油酸(LA; 18:2n-6)和花生四烯酸(AA; 20:4n-6)购于 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 *sFat-1* 基因的人工合成设计:参照 *C. briggsae* 的 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因的序列设计人工合成该基因的方案: 1200bp 的序列中找到三个天然的酶切位点 AGATCT(*Bgl* II); CATATG(*Nde* I); CGATCG(*Pvu* I), 将其割分为四大段即 FS1(231bp); FS2(339bp); FS3(368bp); FS4(306bp); 各段再设计为 60~68bp 的小段进行人工合成。此外, 在起始密码子 ATG 的前面加入了一段序列 GTTGGCGCCGCCACC, 其中包含了有利于基因表达的 Kozak 序列。

经过 PCR 反应拼接, 最后酶切连接为完整的基因 *sFat-1*。*sFat-1* 的两端引入酶切位点 *Not*I, *Kpn*I, 由此酶切后克隆到表达载体 pcDNA3.1(-)上。连接产物经过转化大肠杆菌 DH5 α 、涂 LB 平板、挑选克隆、摇菌、提取质粒和酶切初步鉴定后再测序鉴定而获得正确插入了目的基因的克隆。

1.2.2 哺乳动物细胞系表达载体的构建:为了使后续实验更为方便, 在测序获得的正确克隆即质粒 pcDNA3.1-sFat1 上加上 GFP 标签, 得到用于哺乳动物细胞系表达质粒 pcDNA3.1-sFat1-GFP, 即将 pcDNA3.1-sFat-1 用内切酶 *Bst*1107I 切开(平端)去磷酸化处理和经过 *Ase* I、*Afl* II 从质粒 pEGFP-N1 双切并补平的 EGFP 片段通过平末端连接而得。

1.2.3 细胞培养及转染 CHO 细胞系:CHO 细胞用添加有 10% 胎牛血清、20mmol/L 谷氨酰胺和青链霉素的 DMEM 培养基, 培养于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度下。待瓶中细胞单层长满后进行消化传代。

本实验采用阳离子脂质体法转染 CHO 细胞。转染前用 *Sca* I 酶切表达载体 pcDNA3.1-sFat1-EGFP 琼脂糖电泳, 回收待用。转染操作按转染试剂提供的方法进行, 简述如下(1)在转染的前一天, 将培养的 CHO 细胞分散至 6 孔板, 待其生长至 70%~90% 汇合时使用(2)向 1.5mL Eppendorf 管中加入 500 μ L DMEM, 再加入 6 μ L 脂质体 LipofectamineTM2000, 混合均匀, 记做 A 液(3)向 1.5mL Eppendorf 管中加入 500 μ L DMEM, 再加入 1~2 μ g 线性化的表达载体, 混合均匀, 记做 B 液(4)A 液与 B 液在室温下放置 5min, 集中到一个 Eppendorf 管中, 记做 C 液, 室温静置 20min(5)吸弃 CHO 细胞的培养基, 用新鲜的 DMEM 洗涤两遍, 加入新鲜的 DMEM 500 μ L, 将 C 液加到每个孔中, 轻轻混匀(6)置于 37℃的 CO₂ 培养箱中, 3h 后, 每 0.5h 观察一次细胞, 待细胞形状由梭形变为稍圆形时, 吸弃孔中的液体, 换上 DMEM 基础培养基, 继续培养 6~8h, 然后用 0.25% 胰蛋白酶消化每个孔的细胞, 分别传至 90mm 培养皿中, 用含 800g/mL Geneticin 的 DMEM 基础培养基进行培养, 筛选抗性细胞。待抗性细胞长满后进行传代和冻存以满足试验需求。

1.2.4 RT-PCR 初步鉴定:将上述经抗性筛选的转染细胞传至 10cm 培养皿继续培养, 待细胞长满至 90%, 用于提取 RNA。具体方法按照 TRIzol 试剂说明书操作。最后将 RNA 沉淀室温干燥 10min, 用 20 μ L DEPC 处理水溶解并 60℃加热 10min 助溶。

书进行 RT-PCR 实验 :按说明书要求配制反转录反应液 ,经过反转录反应(45℃ ,25min ;99℃ ,5min ;5℃ 5min 1 个循环)将 RNA 反转录为 cDNA ,再以之为模板进行 PCR ,引物为 PFS1F (GTTGCGGCCGCCACCATGGTCGCTCATTCCTCTG) ,PFS4R (CAAGGTACCTTACTTTGGCTTTAGCCTTCTC TTC)。 PCR 反应条件为 :94℃ 预变性 4min ;94℃ 变性 30s ,68℃ 退火 30s ,72℃ 延伸 45s ,35 个循环 ;72℃ 10min ,4℃ 保存。 PCR 反应结束后进行电泳、观察。

1.2.5 脂肪酸提取及 GC-MS 分析 :将上述经抗性筛选的转染细胞传至直径 10cm 培养皿继续培养 ,同时添加 10 μ mol/L 的亚油酸和花生四烯酸进行培养 ,待细胞完全长满后 ,用胰蛋白酶消化和收集细胞。细胞用去离子水离心洗涤 ,加入 2.5% H₂SO₄/甲醇溶液 1mL ,80℃ 加热 90min ,待冷却至室温 ,加入 1.5mL 0.9% NaCl 溶液和 1mL 正乙烷 ,震动、低速离心(2000 ~ 3000r/min)将脂肪酸提取到有机相。吸取上清(0.8mL)经氮气吹干后用于 GC-MS 分析 ,使用

仪器为 GC-TOF 高分辨气质联用仪 ,分析工作由军事医学科学院生物医学分析中心完成。

2 结果与分析

2.1 *sFat-1* 基因人工合成和的 PCR 拼接

sFat-1 基因人工合成的 PCR 拼接过程可用如下示意图(图 1)说明。第一轮 PCR 时 ,用 4 个反应体系完成 ,每个体系分别一起加入 4、7、7、6 个已经用化学合成好的小片段及相应的引物经过反应被拼接起来 ,如图 2(A)所示 ,产物大小从右到左依次为 231bp、339bp、368bp 和 306bp。第二轮 PCR 用 2 个反应体系完成 ,即分别将图中片段 1 和 2 用 *Bgl* II 酶切 ,3 和 4 用 *Pvu* I 酶切后连接 ,分别以连接产物及相应的引物做 PCR 而拼接成为 2 个大段 ,最后这两大段再经过 *Nde* I 酶切并连接 ,进行第三轮 PCR 反应后即获得 1200bp 的全长基因如图 2(B)所示 ,其中第一、二泳道分别为 570bp 和 674bp 两个产物 ,第三泳道为 1200bp 的全长基因。

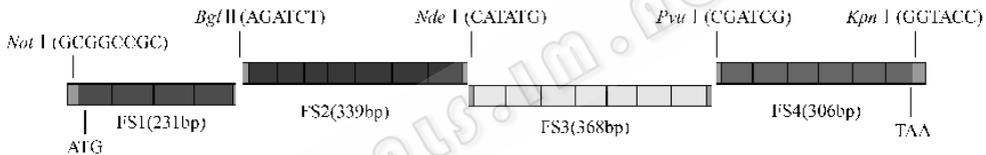


图 1 *sFat-1* 基因人工合成示意图

Fig.1 The design of chemical synthesis of *sFat-1* gene

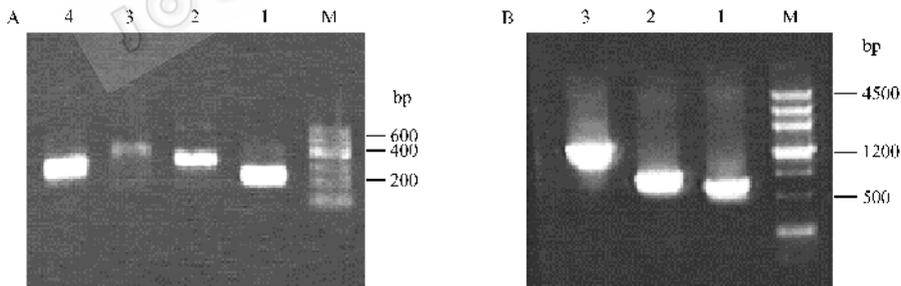


图 2 PCR 拼接

Fig.2 Ligation of chemical synthesized fragments by PCR and restriction sites

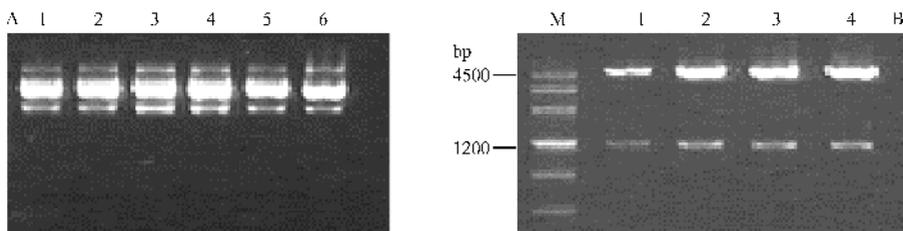


图 3 质粒 pcDNA3.1-sFat1 的质粒大小鉴定 (A) 和酶切鉴定 (B)

Fig.3 Confirmation of vector pcDNA3.1-sFat1 by agarose gel electrophoresis

A : extracted plasmid recombinant ; B : restriction analysis by double cut with *Xho* I and *Hind* III .

全长基因经过酶切与载体 pcDNA3.1 连接并转化到 DH5 α , 在 LB 平板上长出克隆经过提取质粒鉴定和酶切鉴定 结果如图 3 所示 (A) 为质粒大小鉴定 所有质粒大小均一致 , 应该都是连入了目的片段 随机选择其中 4 个用 *Xho* I 和 *Hind* III 进行双酶切 即从载体两端再切下来的 1200bp 的 *sFat-1* 基因 证明它们确实连入了目的片段 (见图 3(B))。最后测序获得质粒 pcDNA3.1-*sFat1* 的正确克隆。

2.2 带有表达 GFP 的表达质粒 pcDNA3.1-*sFat1*-EGFP 的构建

连接前 , pcDNA3.1-*sFat1* 载体和 EGFP 片段经过电泳鉴定大小正确。其中 , 从载体 pEGFP-N1 切下来的 EGFP 片段还包括其前端的 CMV 启动子和后

端的 SV40 PolyA。用平末端的连接条件进行连接 , 构建的载体如图 4(A) 所示。这样 , 该表达质粒中目的基因 *sFat-1* 和标记基因 GFP 各自带有一套完整的启动子和 PolyA, 形成两个各自独立的表达单元。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 后最终获得克隆。提取质粒电泳鉴定可见 , 一部分为目的片段连入载体 , 一部分则为载体本身自连接 , 一部分则为载体之间的相连接如图 4(B)。将属于第一种情况的克隆用 *Sma* I 酶切鉴定 , 结果见图 4(C) 部分 , 其中一些为正连接 (如第 3、4 泳道 , 从右起 , 下同) , 切下来的 6403bp 和 1810bp 大小的两个片段 , 一些为反连接 (如第 1 泳道) 较小片段大于 1810bp , 还有连入了 2 个片段的情况 (如第 2 泳道)。

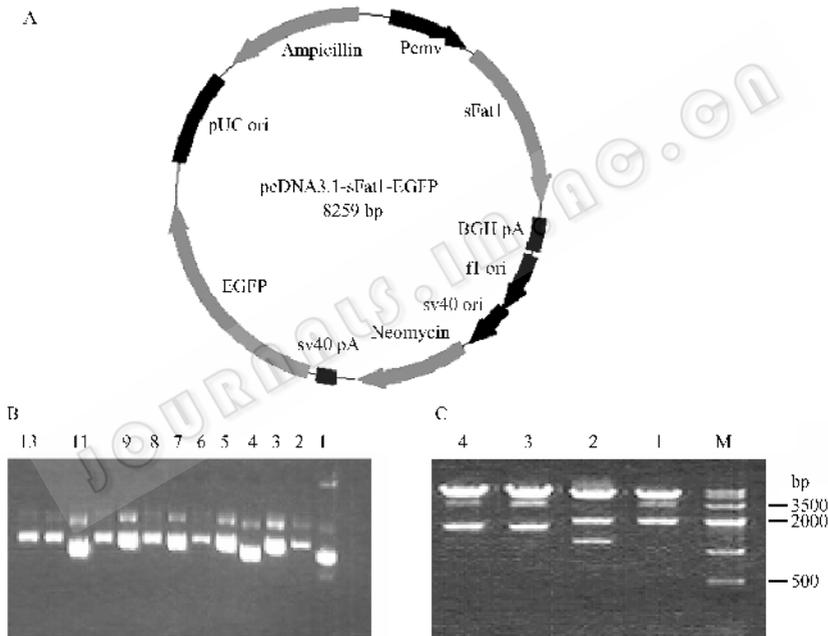


图 4 质粒 pcDNA3.1-*sFat1*-EGFP 结构示意图 (a), 质粒的大小鉴定 (b) 和 *Sma* I 酶切鉴定 (c)

Fig.4 The structure of expression vector pcDNA3.1-*sFat1*-EGFP (a); Confirmation of the vector by agarose gel electrophoresis with extracted plasmid recombinant and By restriction analysis with *Sma* I (b)

2.3 pcDNA3.1-*sFat1*-EGFP 在 CHO 细胞系的表达

构建哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1-*sFat1*-EGFP 线性化后用脂质体转染 CHO 细胞系 , 同时用空载体 pEGFP-N1 以及未转染的 CHO 细胞作对照。经过 3 W 的抗性 Genectin 筛选后获得转染细胞系 , 载体 pcDNA3.1-*sFat1*-EGFP 在 CHO 细胞中表达了绿色荧光蛋白 (如图 5 所示) , 荧光的强度在筛选的各个时期都低于空载体 pEGFP-N1。显然是因为目的基因 *sFat-1* 也在同时表达的缘故。试验过程中也发现 , 转染 *sFat1* 基因的 CHO 细胞系经过 6~7 次的传代后 , GFP 基因的表达并没有明显的减弱。

2.4 *sFat1* 基因的表达及其对 CHO 细胞的脂肪酸组成影响

同时 , 我们提取转染细胞的总 RNA , 进行了 RT-PCR , 其结果也证实了在转染细胞中 *sFat-1* 基因的 mRNA 的存在 (如图 6 所示) 。其中第 1~3 条泳道分别为阳性 (质粒) 对照、试验组和阴性对照 , RT-PCR 产物大小为 1200bp。显然 , CHO 细胞系中的转染 *sFat-1* 基因已经转录了 mRNA。

为了确切证实 *sFat-1* 在 CHO 细胞的表达产物是否具有 ω -3 脂肪酸去饱和酶的正常功能 , 实验测定了细胞中脂肪酸的变化情况 (如图 7 所示) 。

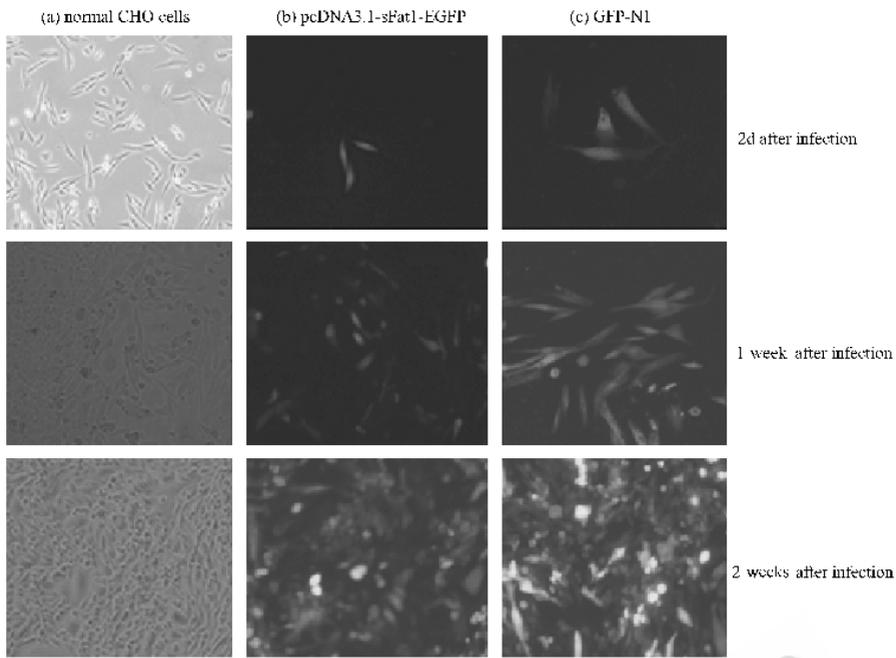


图5 EGFP在转染的CHO细胞中表达

Fig.5 Photomicrographs showing EGFP expression in CHO cells

(a) normal CHO cells (b) CHO cells transfected with pcDNA3.1-sFat1-EGFP (c) CHO cells transfected with pEGFP-N1.

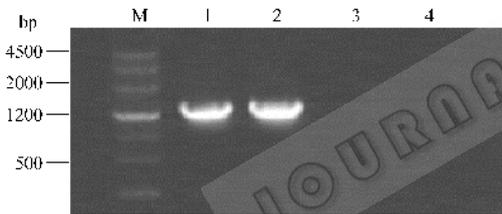


图6 RT-PCR鉴定

Fig.6 Detecting *sFat-1* in CHO cells infected with pcDNA3.1-sFat1-EGFP by RT-PCR

M: molecular marker; 1: CHO cells transfected with pcDNA3.1-sFat1-EGFP; 2: positive control; 3: negative control (CHO cells infected with pEGFP-N1); 4: RNA extracted from CHO cells transfected with pcDNA3.1-sFat1-EGFP used as template.

MS测定的脂肪酸百分含量如表1所示,为更加直观起见,将表1的结果生成了相应的柱状图(图8)。GC-MS实验在对照组(转染 pEGFP-N1 空载体)实验组(转染 pcDNA3.1-sFat1-EGFP)中均检测出来16种脂肪酸,包括3种饱和脂肪酸、3种单不饱和脂肪酸和10种多不饱和脂肪酸。在2个组别间,不饱和脂肪酸总含量(按百分比计,下同)以及多不饱和脂肪酸总含量差异均不显著,但是二者间 ω -6 PUFAs和 ω -3 PUFAs总含量存在显著的差异,即 ω -6 PUFAs在对照组最高(48.97)在实验组最低(35.29),而 ω -3 PUFAs则刚好相反,在对照组最低(7.86)在实验组最高(24.02)。具体到每一种脂肪酸,其含量在2

表1 不同脂肪酸的百分含量

Table 1 Fatty acids composition of total cellular lipids from the control CHO cells infected with pEGFP-N1 and CHO cells infected with pcDNA3.1-sFat1-EGFP

| Fatty acids | Mol % total fatty acids | |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------|
| | pEGFP-N1 | pcDNA3.1-sFat1-EGFP |
| 14 | 3.31 | 3.69 |
| 16 | 17.63 ^a | 9.98 ^b |
| 18 | 7.41 | 7.65 |
| 16:1n-5 | 2.47 | 2.77 |
| 18:1n-9 | 6.54 | 6.62 |
| 18:2n-6 | 28.43 ^a | 19.99 ^b |
| 18:3n-3 | 3.10 ^b | 4.50 ^a |
| 18:3n-6 | 0.48 | 0.53 |
| 20:1n-9 | 0.17 ^b | 0.50 ^a |
| 20:2n-7 | 5.19 ^b | 6.94 ^a |
| 20:3n-7 | 0.40 ^b | 2.71 ^a |
| 20:4n-6 | 18.19 ^a | 4.91 ^b |
| 20:5n-3 | 4.48 ^b | 11.57 ^a |
| 22:4n-6 | 1.87 ^b | 9.98 ^a |
| 22:5n-3 | 0.09 ^b | 5.98 ^a |
| 22:6n-3 | 0.19 ^b | 1.97 ^a |
| Total ω -6 PUFAs | 48.97 ^a | 35.29 ^b |
| Total ω -3 PUFAs | 7.86 ^b | 24.02 ^a |
| ω -6/ ω -3 PUFAs | 6.23 ^a | 1.47 ^b |

个组别间的情况与此也基本一致。此外, ω -6 PUFAs和 ω -3 PUFAs的比值在2个组别间也明显存在差异,在对照组中高达6.23,而在实验组里已降低至

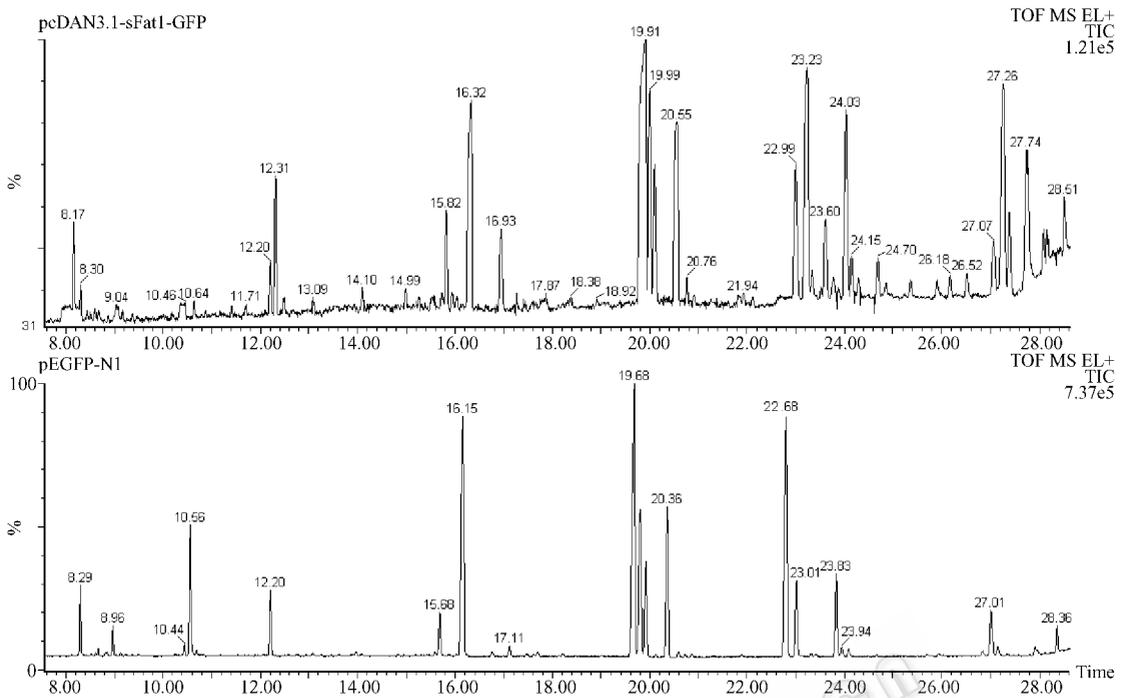


图7 GC-MS分析

Fig.7 Results of gas chromatograph-mass spectra showing fatty acids profiles of total cellular lipids extracted from the control CHO cells transfected with pEGFP-N1 and CHO cells transfected with pcDAN3.1-sFat1-EGFP

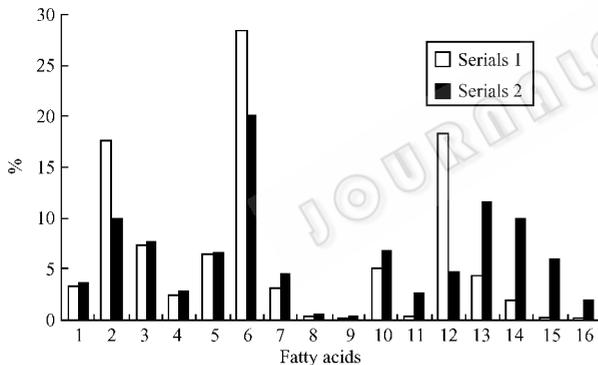


图8 不同脂肪酸的百分含量柱状图

Fig.8 Relative percentage of each fatty acid between CHO cells transfected with pEGFP-N1(Serials 1) and CHO cells transfected with pcDAN3.1-sFat1-EGFP(Serials 2)

Fatty acids 1 ~ 16 refer to 14 :16 ,18 ,16 :1n-5 ,18 :1n-9 ,18 :2n-6 ,18 :3n-3 ,18 :3n-6 ,20 :1n-9 ,20 :2n-7 ,20 :3n-7 ,20 :4n-6 ,20 :5n-3 ,22 :4n-6 ,22 :5n-3 ,22 :6n-3 respectively.

1.47. ω -6 与 ω -3 PUFAs 之间此消彼长的这种关系正是因为 *sFat-1* 基因的 ω -3 去饱和酶的作用,它是合成 ω -3 PUFAs 时最后一个步骤的关键酶,在 ω -3 位置上发生去饱和作用而增加一个不饱和键(烯键)而该酶的底物主要就是 ω -6 PUFAs。这样使得 ω -6 PUFAs 转变为相应的 ω -3 PUFAs,既 18 :2n-6 \rightarrow 18 :3n-3 ,20 :2n-6 \rightarrow 20 :3n-3 ,20 :3n-6 \rightarrow 20 :4n-3 ,20 :4n-6 \rightarrow 20 :5n-3 ,22 :4n-6 \rightarrow 22 :5n-3。从图表中还有一

组数据,即 22 :4n-6 在实验组反而比对照组的含量高,这可能与 CHO 细胞内其他去饱和酶以及碳链延长酶有关。

3 讨论

线虫 *C. briggsae* 属于真核生物,但是其基因的编码方式更接近原核生物,因此直接采用其天然序列的基因在哺乳动物表达是不利的^[16,20]。故本研究采用了化学合成方法,根据基因的天然序列(蛋白质编码)而进行密码子优化,获得有利于哺乳动物细胞表达的基因。在基因合成设计方面,实验采用了 PCR 法拼接小片段后利用基因序列中天然酶切位点连接大片的策略,使合成工作得以快速地完成。而目的基因克隆到强真核表达载体 pcDNA3.1(-) 并再插入带有一套完整表达元件的 GFP 报告基因,则使细胞转染及表达分析的工作更加容易进行。

本研究证明了采用化学合成法合成的来源于线虫 *C. briggsae*、并经过密码子优化的基因 *sFat1* 完全能够表达和发挥其 ω -3 脂肪酸去饱和酶的作用,即促使 ω -6 PUFAs 转变为相应的 ω -3 PUFAs。 ω -6 PUFAs 总量从 48.97%(转染 GFP 的 CHO 细胞)下降到 35.29%(转染 *sFat1* 的 CHO 细胞),而 ω -3 PUFAs 总量则相应地从 7.86% 上升到 24.02%。这说明合成基因是成功的。与此相似的是 Zhao B, Kang 等用

来源于线虫 *C. elegans* 的 ω -3 去饱和酶基因 *fat1* 转入大鼠心肌细胞,使其 ω -6 PUFAs 总量从 36.8%(对照细胞)下降到 15.0%(转基因细胞),而 ω -3 PUFAs 总量则相应地从 2.5% 上升到 17.4%^[19]。从表面看来,本研究合成的基因在 *sFat1* 在 CHO 细胞中表达所获得的 ω -3 PUFAs 总量(24.02%)大大高于后者(17.4%),而转化效率则不如后者。事实上,这很可能是因为所采用的细胞系不同所致,而并不是因为基因功能强弱的差别。证实合成基因成功地发挥了作用,保证了该基因完全可以用来进一步的研究即用于基因工程合成 ω -3 PUFAs。本实验也揭示了该基因在 CHO 细胞系表达及其作用特性。

CHO 细胞系来源于中国仓鼠卵巢细胞,是最常用的用来表达重组蛋白产品的细胞系。它具有良好的体外培养生物学特性如代谢效率高,生长速度快,又能稳定高效地表达目的产物。而本研究中表达的重组蛋白是 ω -3 脂肪酸去饱和酶,其表达水平的高低直接影响着最终需要获得的产物即 ω -3 PUFAs,所以试验选择了 CHO 细胞系。当然, ω -3 脂肪酸去饱和酶的作用不仅依赖其本身浓度的高低,还与其作用底物 ω -6 PUFAs 含量、以及细胞中其他一些类型的去饱和酶、脂肪酸延长酶密切相关^[1,21]。细胞中 ω -6 PUFAs 含量显然与细胞的生物学特性相关,如细胞从外界如培养基中摄取和积累 ω -6 PUFAs 的能力。所谓的其他一些类型的去饱和酶则包括 Δ 6、 Δ 5、 Δ 4 等几种,这 3 种脂肪酸去饱和酶皆参与各种 PUFAs 的合成^[10]。例如 Δ 4 脂肪酸去饱和酶可催化 22:4n-6 转化为 22:5n-6,催化 22:5n-3 转化为 22:6n-3。脂肪酸延长酶则能够催化脂肪酸碳链加长。例如,斑马鱼的 *ZfELO* 基因编码一种脂肪酸延长酶可以将 18:3n-3 依次催化合成为 20:5n-3 以及 22:6n-3(此步还经过一个二十四碳的中间体)。这 3 个步骤仅由同一个酶完成^[22]。类似的脂肪酸延长酶在人、鼠等哺乳动物中也被发现^[17,23]。所以, ω -3 脂肪酸去饱和酶的作用与以上因素密切相关是解释本研究与以往类似的研究中 ω -3 PUFAs 转化水平差异不等的根据。

自然界 ω -3 PUFAs 的分布极不平衡^[10]。植物(油脂)中 PUFAs 通常能达到 40%~90% ω -3 PUFAs 达到 4%~6% 左右,但两者均以短链(从十六碳到二十碳)的 PUFAs 为主,少有长链 PUFAs;海洋生物如海洋真菌和微藻等低等生物以及吞食藻类及浮游生物的海洋鱼类则含有 EPA、DPA、DHA 等丰富的 ω -3 PUFAs,含量从 10% 到 50% 不等。哺乳动物合成

PUFAs 的能力有限,而合成 ω -3 PUFAs 的能力更差。其原因与哺乳动物自身没有 ω -3 脂肪酸去饱和酶有极大的联系^[1]。因为哺乳动物(尤其是人类)的膳食中以及体内都含有过多的 ω -6 PUFAs 如 LA、AA 等,若在 ω -3 脂肪酸去饱和酶存在的条件下就能将其中很大一部分转变为 ω -3 PUFAs,使 ω -3 PUFAs 达到足够丰富的量并与 ω -6 PUFAs 达到一个平衡的比例,而寻求 ω -6 与 ω -3 PUFAs 之间在量上的平衡乃是人体保持健康的一个重要方面^[24]。显然,本研究的结果与前人的结果^[9,25]同时证明了这样的可能:利用 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因通过转基因技术将其导入各种家畜(禽)从而广泛而大量地获得 ω -3 PUFAs 产品。

总而言之, *C. briggsae sFat-1* 基因的获得以及其功能的分析对于今后进一步的研究和应用都具有重要的现实意义。以后的研究重点将是将该基因用来制作转基因动物实验以及实践。

REFERENCES (参考文献)

- [1] James G. Wallis, Jennifer L. Watts, John Browne. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2002, 27(9): 467-473
- [2] Siddiqui RA, Shaikh SR, Sech LA *et al.* Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. *Mini Rev Med Chem.* 2004, 4(8): 859-871
- [3] Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Adamis T *et al.* n-6 polyunsaturated fatty acids enhance the activities of ceftazidime and amikacin in experimental sepsis caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(12): 4713-4717
- [4] Kris-Etherton PM, Hecker KD, Binkoski AE. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health. *Nutr Rev*, 2004, 62(11): 414-426
- [5] Mozaffarian D, Ascherio A, Hu FB *et al.* Interplay Between Different Polyunsaturated Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease in Men. *Circulation*, 2005, 3: 759-771
- [6] Nicola Gaibazzi, Vigilio Ziacchi. Reversibility of stress-echo induced ST-segment depression by long-term oral n-3 PUFAs supplementation in subjects with chest pain syndrome, normal wall motion at stress-echo and normal coronary angiogram. *BMC Cardiovascular disorders*, 2004, 4: 514-526
- [7] DeMar JC Jr, Ma K, Bell JM *et al.* Half-lives of docosahexaenoic acid in rat brain phospholipids are prolonged by 15 weeks of nutritional deprivation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem*, 2004, 91(5): 1125-1137
- [8] Ruxton CH, Reed SC, Simpson MJ *et al.* The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J*

- [9] Ge Y, Chen Z, Kang ZB *et al.* Effects of adenoviral gene transfer of *C. elegans* n-3 fatty acid desaturase on the lipid profile and growth of human breast cancer cells. *Anticancer Res*, 2002, **22** (2A) 537 – 543
- [10] Tocher DR, leaver MJ, Hodgson PA. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturase. *Prog Lipid Res*, 1998, **37** 73 – 117
- [11] Napier JA, Beaudoin F, Michaelson LV *et al.* The production of long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plants by reverse-engineering. *Biochimie*, 2004, **86** (11) 785 – 792
- [12] Pereira SL, Leonard AE, Huang YS *et al.* Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid. *Biochem J*, 2004, **384** (Pt 2) : 357 – 366
- [13] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*. 2004, **86** (11) 807 – 815
- [14] Suzette L Pereira, Yung-Sheng Huang, Emil G. Bobik *et al.* A novel ω -3 fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Biochem J* 2004, **378** 665 – 671
- [15] Takahiro Oura, Susumu Kajiwara, Saccharomyces Kluyveri. FAD3 encodes an ω -3 fatty acid desaturase. *Microbiology*, 2004, **150** : 1983 – 1990
- [16] James PS, Anthony JK, John Broese. Identification of an animal ω -3 fatty acid desaturase by heterologous expression in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** : 1142 – 1147
- [17] Inagaki K, Aki T, Fukuda Y, Kawamoto S *et al.* Identification and expression of a rat fatty acid elongase involved the biosynthesis of C18 fatty acids. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002, **66** 613 – 620
- [18] Jing X Kang, Jingdong Wang, Lin Wu *et al.* Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature*, 2004, **427** (5) 504
- [19] Kang ZB, Ge YL, Chen ZH, *et al.* Adenoviral gene transfer of *Caenorhabditis elegans* n-3 fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (7) 4050 – 4054
- [20] Dauenpen Meesapyodsuk, Darwin W Reed, Christopher K, *et al.* Characterization of the Regiochemistry and Cryptoregiochemistry of a *Caenorhabditis elegans* Fatty Acid Desaturase (FAT-1) Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 2000, **39** (39) : 11948 – 11954
- [21] Huang YS, Pereira SL, Leonard AE. Enzymes for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochimie*, 2004, **86** (11) 793 – 798
- [22] Morris Agoba, Douglas R. Tocher, Cathrm A Dickson *et al.* Zebrafish cDNA encoding multifunctional fatty acid elongase involved in production of eicosapentaenoic (20 : 5n-3) and docosahexaenoic (22 : 6n-3) acid. *Mar. Biotechnol* 2004, **6** 251 – 261
- [23] Leonard AE, Bobic EG, Dorado J *et al.* Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long chain polyunsaturated fatty acids. *Biochem*, 2000, **350** 765 – 770
- [24] Kang JX. The importance of omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cell function. The gene transfer of omega-3 fatty acid desaturase. *World Rev Nutr Diet*, 2003, **92** 23 – 36
- [25] Ge Yinlin, Wang Xiaoying, Chen Zhihong *et al.* Gene transfer of the *Caenorhabditis elegans* n-3 fatty acid desaturase inhibits neuronal apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 2002, **82** (6) : 1360 – 1367