

• 动物及兽医生物技术 •

利用 PiggyBac 转座子系统构建表达 $\Delta 15$ Des 酶活性的转基因小鼠

王颖¹, 杨仕赛¹, 赵瑄¹, 李亚², 吕露露², 朱贵明^{1,2}

1 贵州医科大学 生物与工程学院 生物与医学工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025

2 贵州医科大学 生物与工程学院 医药生物技术工程研究中心, 贵州 贵阳 550025

王颖, 杨仕赛, 赵瑄, 李亚, 吕露露, 朱贵明. 利用 PiggyBac 转座子系统构建表达 $\Delta 15$ Des 酶活性的转基因小鼠. 生物工程学报, 2022, 38(1): 196-206.

WANG Y, YANG SS, ZHAO X, LI Y, LÜ LL, ZHU GM. Construction of transgenic mice with $\Delta 15$ Des enzyme activity by using a PiggyBac transposon. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 196-206.

摘要: 必需脂肪酸为人体健康和生命所必需, 但机体自身不能合成, 研究表明 ω -3 族脂肪酸对人体的生理功能有更加积极的影响。哺乳动物体内缺乏 ω -3 去饱和酶的基因, 来自线虫 *Caenorhabditis elegans* 的 $\Delta 15$ -脂肪酸去饱和酶 ($\Delta 15$ Des) 可以将体内 ω -6 多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 转化为 ω -3 PUFAs。利用 PiggyBac 转座子 (PB) 系统构建表达 $\Delta 15$ Des 酶活性的转基因小鼠可以在较短时间内繁育出稳定遗传的纯合子转基因小鼠, 整合率高达 35.1%。饲料中添加 6% ω -6 PUFAs 饲喂小鼠, 通过气相色谱 (gas chromatography, GC) 检测小鼠体内脂肪酸的变化, 荧光定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 和蛋白免疫印迹 (Western blotting, WB) 来检测 $\Delta 15$ Des 在小鼠体内的表达水平。从 qPCR 和 GC 结果分析, 阳性小鼠的基因活性率为 61.53%, 与传统方法相比, $\Delta 15$ Des 的转入效率及活性都显著提高, 且纯合子比杂合子表达更高的活性, 进一步验证了 PiggyBac 转座子系统高效的转导效率和安全稳定性。

关键词: 多不饱和脂肪酸; $\Delta 15$ 脂肪酸去饱和酶; 转座子; 转基因

Received: March 15, 2021; **Accepted:** June 18, 2021; **Published online:** July 16, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31960205); Guizhou Provincial Department of Education Major Research Group for Innovation Groups, China (Qian Jiao He KY[2016]031)

Corresponding author: ZHU Guiming. Tel: +86-851-88174043; E-mail: zgm926@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31960205); 贵州省教育厅创新群体重大项目 (黔教合 KY 字[2016]031)

Construction of transgenic mice with $\Delta 15$ Des enzyme activity by using a PiggyBac transposon

WANG Ying¹, YANG Shisai¹, ZHAO Xuan¹, LI Ya², LÜ Lulu², ZHU Guiming^{1,2}

1 Key Laboratory of Biology and Medical Engineering, College of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 Engineering Research Center of Medical Biotechnology, College of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: Essential fatty acids are those that could not be synthesized by the body itself but crucial for health and life. Studies have shown that ω -3 fatty acids may facilitate human physiological functions. Mammals lack ω -3 desaturase gene, and the $\Delta 15$ fatty acid desaturase ($\Delta 15$ Des) from *Caenorhabditis elegans* can transform the ω -6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) into ω -3 PUFAs. Transgenic mice expressing $\Delta 15$ Des enzyme activity was constructed by using a PiggyBac transposon (PB). Homozygous transgenic mice with stable inheritance was bred in a short time, with a positive rate of 35.1% achieved. The mice were fed with 6% ω -6 PUFAs and the changes of fatty acids in mice were detected by gas chromatography (GC). The expression level of $\Delta 15$ Des in mice was detected by quantitative PCR (qPCR) and Western blotting (WB). qPCR and GC analysis revealed that the percentage of positive mice harboring the active gene was 61.53%. Compared with traditional methods, the transformation efficiency and activity of $\Delta 15$ Des were significantly improved, and homozygotes showed higher activity than that of heterozygotes. This further verified the efficient transduction efficiency of the PiggyBac transposon system.

Keywords: PUFAs; $\Delta 15$ fatty acid desaturase; PiggyBac transposon; transgenic

在制备转基因小鼠的过程中通常使用质粒 DNA 和慢病毒载体法来构建转基因载体, 通过慢病毒载体制备转基因动物的过程可能会激活有害基因, 存在安全问题。因此转座子系统作为一个新的转基因载体被研究者熟知。其中 PiggyBac 转座子^[1]以其独特的“剪切-粘贴”机制, 在转座酶的作用下精准地把外源基因从原位解离下来重新整合到新的染色体上。研究表明^[2], PB 转座子作为目前常用的哺乳动物基因工程的研究工具, 在癌基因的发现、基因修饰及转基因动物制备等有重要意义。PB 具有较高的转导效率和运载能力, 这一特性使得 PB 能够实现转入基因的高效表达, 达到制作转基因动物的目的。

多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 是一类双键 (亦称烯键) 含量大于等于 2 且碳链长度多于 18 个碳原子的脂肪酸, 参与人体多种生理反应, 其中以 ω -6 系和 ω -3 系最为重要。常见的 ω -6 系脂肪酸有亚油酸 (18:2n-6, LA) 和花生四烯酸 (20:4n-6, ARA), ω -3 系有 α -亚麻酸 (18:3n-3, ALA)、二十碳五烯酸 (20:5n-3, EPA) 和二十二碳六烯酸 (22:6n-3, DHA) 等。多不饱和脂肪酸因其独特的生物学特性被广泛研究者关注并普遍应用于实际生活中, 其中消费者普遍认同了 ALA、ARA 以及 DHA 的功能^[3-4]。然而有研究表明, 过多地食用 ω -6 不饱和脂肪酸会引起肥胖、脂质代谢紊乱等一系列问题^[5-6], 其中 ARA 参与

一些炎症机制的反应。随着研究的深入,有大量研究证实, ω -3 系多不饱和脂肪酸在人体发挥着更加积极的作用,它不仅在促进大脑等组织器官的发育和功能维持等方面有着重要的作用^[7-8],而且在预防和治疗心血管疾病 (CVD)、脂代谢疾病、癌症预后及预防椎间盘突出等多种疾病方面也有着特殊的功效^[9-13]。膳食中合理添加 ω -3 多不饱和脂肪酸会使体重减轻,改善某些疾病的预后,癌症病人饮食添加 ω -3 PUFAs 会协同提高抗癌药物的疗效^[14]。然而人体不能自身合成只能从食物中摄取多不饱和脂肪酸,食物来源的 ω -3 PUFAs 又仅存在于藻类和深海鱼类中,导致现代人类 ω -6 PUFAs 与 ω -3 PUFAs 的摄入量比严重不均衡,最终出现大量的肥胖和脂类代谢相关的疾病。如何平衡人体内 ω -6 PUFAs 与 ω -3 PUFAs 是研究者重点关注的问题。

2004 年 Kang 等^[15]首次在线虫 *Caenorhabditis elegans* 体内发现的 Δ 15 去饱和酶基因 (该基因能表达 ω -3 脂肪酸去饱和酶的活性,哺乳动物体内不含有该基因) 通过显微注射法转入小鼠体内,可以将小鼠体内 ω -6 PUFAs 有效地转化为 ω -3 PUFAs^[16]。因此 Δ 15 Des 转基因小鼠是一个研究 ω -3 PUFAs 的生物学功能的重要型动物模型。刘晶等^[17]构建了基于乳腺特异性表达的转基因载体 pBC1-Fat-1 获得了转 Δ 15 Des 的转基因小鼠,而刘晓蕾等^[18]采用构建 pEF-Fat-1 重组质粒的方法制备了表达 Δ 15 Des 的转基因小鼠,但阳性率较低,注射的 738 只小鼠,存活 42 只且只有 11 只阳性小鼠,其中阳性小鼠只有 4 只是有基因活性的,基因活性只有 36%。与前人的制备方法不同的是本研究利用 PiggyBac 转座子构建的载体将来源于线虫的 Δ 15-脂肪酸去饱和酶基因导入受精卵,培育获得 G0 代小鼠,通过 PCR 筛选出 F1 代阳性小鼠后将小鼠多次回交、侧交,通过气相色谱和荧光

定量 PCR 和蛋白免疫印迹检测 Δ 15 Des 在小鼠体内的活性。最终在较短时间内繁育出稳定遗传的纯合子转基因小鼠。我们发现随着筛选次数的增加, Δ 15 Des 的活性也逐渐增加,即纯合子比杂合子表达更高的活性,进一步验证了 PiggyBac 转座子系统高效的转导效率和安全性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

质粒 piggyBac-CeN3 (实验室保存)、C57BL/6A 小鼠、显微注射器、红花籽油、花生四烯酸、定制小鼠饲料 (6% ARA)、DNA/RNA 共提取试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司)、TB-Green (TaKaRa)、2**T3* super PCR Mix (TaKaRa 公司)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (索莱宝科技 (北京) 有限公司)、 Δ 15 Des 多克隆抗体 (爱必信 (上海) 生物科技有限公司定制)、HP5890 气相色谱仪 (昆山塞特科学仪器有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 Δ 15 Des 转基因小鼠的制备

将质粒 piggyBac-CeN3 与转座子载体 piggyBac 连接 (具体操作见载体连接试剂盒说明书),目的基因用 *EcoR* I / *Bgl* II 插入,元件顺序为 CAG promoter-Kozak-CeN3-polyA。本实验所用动物为 C57BL/6A 小鼠,饲养条件:日平均温度 22–26 °C,湿度 60%–80%,光照周期 12 L : 12 D。选取 4 周龄左右的雌鼠作超排卵供体,腹腔注射 5 IU 孕马血精 (PMS)。相隔 48 h 后,再注射 5 IU 人绒毛膜促性腺激素 (hCG)。待到公母鼠交配后,将去除颗粒细胞的胚胎转至 M16 培养液,37 °C、5% CO₂ 中培养。从受精母鼠胚胎输卵管中取得的原核期受精卵用固定吸量管固定,将纯化的载体和 PiggyBac 质粒混合注射入受精卵的原核中,注入时见原核膨大即为成功。最后将注射完成的胚胎重新

送入母鼠输卵管中,若在输卵管内看到气泡则说明移植成功。繁育成功的小鼠 14 d 左右剪尾提取 DNA,操作步骤参照组织基因组 DNA 提取试剂盒, DNA 溶液储存于 -20°C 冰箱。配制 25 μL 的 PCR 体系,上下游引物各 1 μL , 目的基因检测引物见表 1 (其中引物 BactinG-s 和引物 Bactin-a 用于基因组内参基因的检测;引物 Bactin-s 和引物 Bactin-a 用于反转录产物内参基因的检测)。模板 1 μL , 2 \times super PCR Mix 10 μL , ddH₂O 12 μL 。PCR 条件为:预变性 98°C 30 s, 变性 98°C 10 s, 退火 62°C 10 s, 延伸 72°C 2 min, 35 个循环, 目的片段为 320 bp。取 10 μL 的 PCR 产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2 $\Delta 15$ Des 转基因小鼠的筛选

PCR 鉴定为阳性的首建鼠与野生型 C57 小鼠进行杂交得到 F1 子代小鼠,小鼠饲料为添加 6%ARA 的定制饲料,喂养 8 周以上。麻醉处死小鼠后取肝脏组织进行组织 DNA 提取,提取步骤、反应体系、引物序列和 PCR 反应条件同上。筛选出的阳性小鼠继续回交、与野生型小鼠侧交,直到后代小鼠 PCR 检测全部为阳性,判断该小鼠为纯合子。

1.2.3 qPCR 鉴定 $\Delta 15$ Des 的表达

小鼠麻醉处死后取适量肝脏、肌肉组织冻

存 -80°C 用于后续试验 (动物实验获得贵州医科大学实验动物伦理委员会批准, 编号: 1900255)。我们取肝脏组织进行总 RNA 的提取, 总 RNA 提取和 reverse transcription PCR (RT-PCR) 实验操作步骤均按照天根生化科技 (北京) 有限公司相关试剂说明书进行, 提取的总 RNA 用 NanoDrop™ One/OneC 超微量紫外分光光度计评估其质量和浓度, 从 260/280 的吸光度比率来看, RNA 的纯度均在 1.90 到 2.00 之间。将 RNA 溶液分装储存在 -80°C 备用。将总 RNA 中的 mRNA 反转录成为 cDNA, 定量到 2 μg , 每种反转录样品取 1 μL 用于 QPCR 检测。20 μL 的 qPCR 体系为上下游引物各 1 μL , TB Green 10 μL , 模板 1 μL , 其余用 DEPC 水补齐。qPCR 条件为: 预变性 95°C 30 s, 变性 95°C 5 s, 退火 60°C 30 s, 延伸 72°C 30 s, 40 个循环, 引物序列见表 1。目的片段为 320 bp。统计学软件使用 SPSS, 以 $P < 0.05$ 作为统计学差异显著性的判断标准, 绘图采用 GraphPad Prism 软件。来观察 $\Delta 15$ Des 在小鼠体内的表达情况。

1.2.4 Western blotting 鉴定 $\Delta 15$ Des 的表达

提取肝脏组织, 总蛋白提取用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度, 具体方法参照试剂盒说明书。100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 进行蛋白变性后,

表 1 目的基因及内参引物序列

Table 1 Sequences of target gene and internal reference primers

Primers	Primer sequences (5'→3')	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	Size (bp)
BactinG-s	GATGACCCAGATCATGTTTGTAGACC	63.7	281
Bactin-a	TGTCACGCACGATTTCCCTCTC	64.6	
Bactin-s	TGTGCTGTCCCTGTATGCCTCTG	64.8	
Bactin-a	TGTCACGCACGATTTCCCTCTC	64.6	221
TgN3-R1	CTCTCCTGAAGGCGTCCACTG	64.7	
TgN3-F1	GTTCCGGCTTCTGGCGTGTGTG	63.0	255
TgN3-R2	ATATGTCCTTCCGAGTGAGAGACAC	60.8	
TgN3-F2	TCAGGACCACACTGGAAGAGAAG		320
snD-s	ACGTGAACGCCAACACCAAGC	65.4	
snD-a	TGTCACGCACGATTTCC	66.0	234

-20 °C 冰箱备用。配制 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳: 80 V, 30 min, 120 V, 90 min。转膜使用 0.45 μm 的 PVDF 膜, 转膜条件(湿转): 250 mA 恒流转膜 2 h (冰浴)。转好的膜在 TBST 中快速洗脱 2 次, 每次 5 min; 加 5% 的脱脂牛奶室温封闭 2 h, 洗脱 3 次, 每次 10 min; 1% 的脱脂奶粉按照 1 : 1 000 配制一抗, 4 °C 孵育过夜; 回收一抗, 用 TBST 快速洗膜 3 次, 每次 10 min; 按照 1 : 5 000 的比例配制 HRP 标记的二抗, 室温下孵育 40 min; 用 TBST 快速洗膜 3 次, 每次 10 min; 配制 ECL 发光液进行曝光。选择合适的图片保存用 Photoshop 整理去色, Image J 软件处理系统测定目标带的光密度值。

1.2.5 脂肪酸的提取与 GC 分析

取黄豆大小的肝脏组织置于反应瓶, 充分研磨后加入 1 mL 14% 三氟化硼/甲醇试剂 (含 0.005% BHT 抗氧化剂) 充分混匀, 100 °C 加热 1 h; 冷却后加 1 mL ddH₂O 和 1 mL 正己烷, 剧烈混匀; 将上述液体转移至 5 mL 玻璃离心管, 3 000 r/min 离心 5 min; 吸取上清保存于 -20 °C 用于后续试验。GC 检测之前对样品进行吹氮气浓缩。使用 HP5890 气相色谱仪进行检测。图像采集处理: 采用 N2000 色谱数据工作站采集图谱, 并处理分析所采集的谱图数据。色谱峰采用多不饱和脂肪酸标准品来进行鉴定。采用面积归一法求每个峰的面积, 最后得出样品中各种脂肪酸的含量。

2 结果与分析

2.1 Δ15 Des 转基因小鼠的构建

含有 Δ15 Des 编码基因的 PiggyBac-CeN3 载体 (图 1) 被注射到 200 枚原核期小鼠受精卵, 注射卵移植到代孕母鼠, 出生 37 只 F0 代幼崽 (编号 1#-37#), 37 只小鼠存活, 其中 13 只经 PCR 鉴定为整合阳性小鼠。13 只整合鼠中雄性小鼠有 6 只 (4#、7#、13#、15#、16# 和 21#), 雌性小鼠有 7 只 (1#、3#、11#、12#、14#、17# 和 23#)。PCR 鉴定结果如图 2 所示。对整合小鼠 DNA 的 PCR 扩增产物进行产物测序, 部分测序结果如图 3 所示, 通过数据库比对, 测序结果与原基因组序列相一致。

2.2 Δ15 Des 基因在小鼠体内表达成功

13 只 F0 代小鼠分别与野生型小鼠杂交, 后代通过 PCR 检测鉴定转基因小鼠 (杂合子), 进一步通过杂合子转基因小鼠间交配、繁殖获得纯合子小鼠。在繁殖过程, 取各品系 PCR 阳性后代小鼠 (例如 F0 代的 4# 小鼠 F1 代称为 N3-4 品系) 的肝脏组织提取 RNA, 逆转录得到 cDNA, 对进一步得到的 cDNA 进行 PCR 和凝胶电泳检测, 13 只 F0 代小鼠中 8 只有 Δ15 Des 基因转录产物的表达, 结果如图 4 所示, 阳性表达率高达 61.5%, 占存活小鼠的 21.62%。进一步利用气相色谱分析小鼠肝脏中 EPA 的含量确定转基因小鼠 Δ15 Des 活性。通

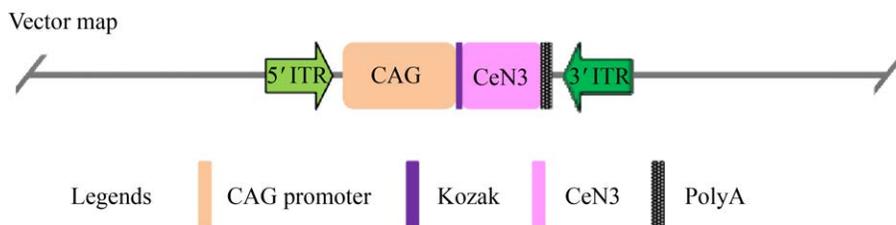


图 1 PiggyBac-CeN3 元件顺序图谱

Figure 1 Schematic diagram of the PiggyBac-CeN3 element, shown in an original order of 5'→3'.

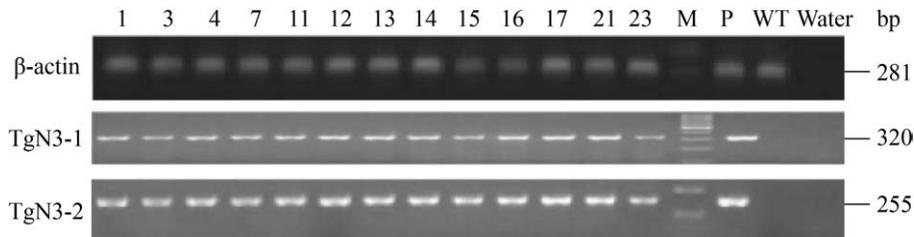


图 2 转基因小鼠的 PCR 鉴定

Figure 2 PCR identification of transgenic mice. The upper part shows the internal reference, the middle part shows the first pair of primers (TgN3-F1/TgN3-R1), and the lower part shows the detection results of the second pair of primers (TgN3-F2/TgN3-R2).

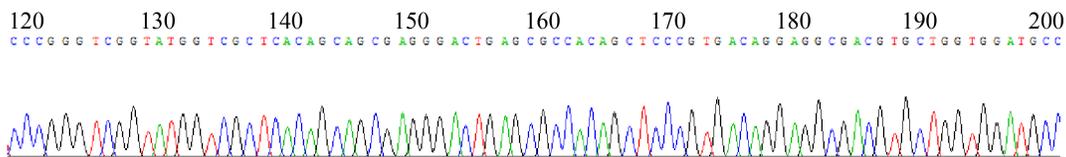


图 3 PiggyBac-CeN3 重组载体部分测序峰图

Figure 3 Partial sequencing peak diagram of the PiggyBac-CeN3 recombinant vector.

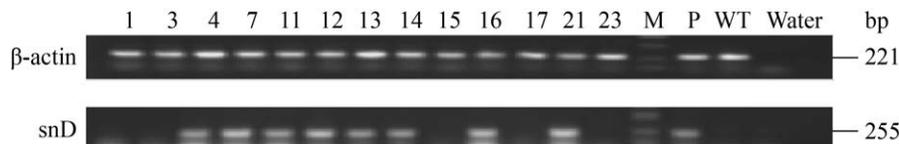


图 4 转基因小鼠的 RT-PCR 鉴定

Figure 4 Identification of transgenic mice by RT-PCR.

过 GC 分析后最终确定 13 只 F0 代小鼠中 4#、7#、11#、12#、13#、14#、16#和 21#的后代 PCR 阳性小鼠具有 $\Delta 15$ Des 活性，能够将 ω -6 多不饱和脂肪酸转化为 ω -3 多不饱和脂肪酸；而 1#、3#、15#、17#和 23#的后代 PCR 阳性小鼠未检测到 $\Delta 15$ Des 活性，不能将 ω -6 多不饱和脂肪酸转化为 ω -3 多不饱和脂肪酸。其中 GC 结果如图 5 所示，图 5A 和图 5B 为我们选取的 GC 结果典型图谱，其中图 5A 为野生型小鼠 (WT)，图 5B 为 4#小鼠 (转基因小鼠)，对比图 5A 和图 5B 发现，WT 小鼠肝脏组织中没有 ω -6 多不饱和脂肪酸的转化，转基因小鼠体内的 ARA ($20:4n-6$) 转化为 EPA ($22:5n-3$)，且 EPA

进一步转化为 DHA ($22:6n-3$)。图 5C-J 为转基因后不同品系小鼠肝脏组织中 ARA 转化为 EPA 等重要脂肪酸含量变化部分，从图中可以看出每个品系的小鼠转化能力有所不同，其中除了图 5A 为 WT 小鼠，图 5C 为代表阴性小鼠的 3#小鼠以外，其余全部为 GC 阳性小鼠。

2.3 纯合的转基因小鼠在脂肪转化方面表现出更强的活性

通过筛选出的纯合子小鼠与野生型小鼠侧交后代进行 PCR 检测，图 6 为 N3-16 品系小鼠的 PCR 电泳图，后代 PCR 结果全部为阳性。随机选取 8 周左右的 WT 小鼠 (对照组)、杂合子小鼠 (HE 组)、纯合子小鼠 (HO 组) 各 5 只，共

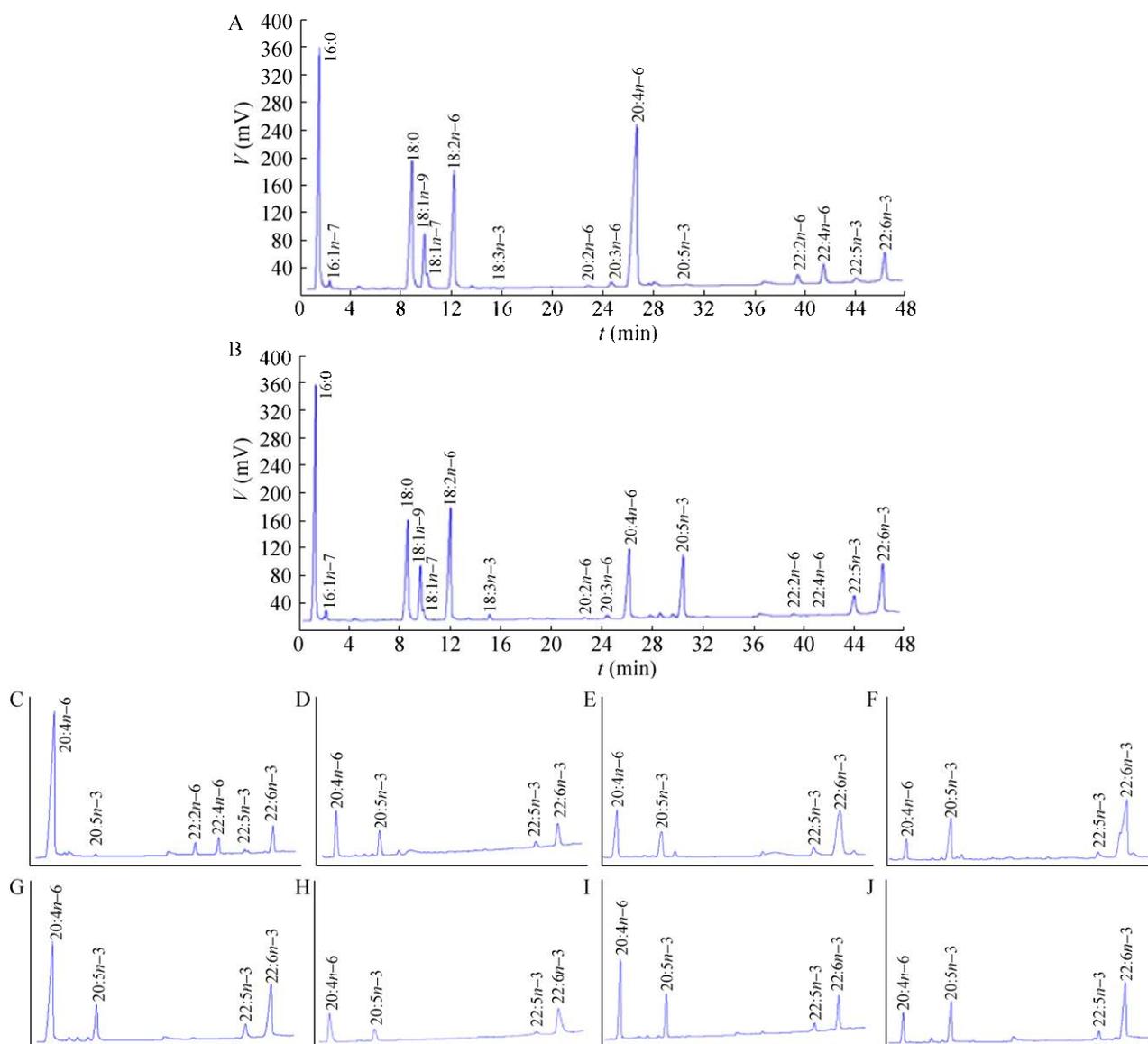


图5 各品系转基因小鼠肝脏GC鉴定结果

Figure 5 GC identification results of transgenic mice of various strains. (A) WT mice. (B) 4# mouse. (C) 3# mouse. (D) 7# mouse. (E) 11# mouse. (F) 12# mouse. (G) 13# mouse. (H) 14# mouse. (I) 16# mouse. (J) 21# mouse. A and B are typical maps of mouse GC, while C–J only show significant changes of important fatty acids after transgenic operation. Except that A is wild type mouse and C is 3# mouse representing negative mouse, all the other mice are GC positive mice.

15只,通过qPCR和WB分析小鼠体内 $\Delta 15$ Des的表达水平。qPCR结果显示如图7所示,与对照组相比,HE组和HO组的 $\Delta 15$ Des表达水平均上调,HO组与HE组相比, $\Delta 15$ Des表达水平更高。WB结果显示如图8所示, β -actin和 $\Delta 15$ Des目的

蛋白的分子量分别为57 kDa和37 kDa,1、2、3号条带分别为WT、HE、HO小鼠,其中WT没有条带,即没有 $\Delta 15$ Des的表达,HE和HO均有条带,且HO的光密度值更大,与qPCR结果相一致。进一步通过GC分析WT、HE、HO组



图 6 纯合子转基因小鼠侧交后代的 PCR 鉴定
Figure 6 PCR identification of lateral cross progeny of homozygous transgenic mice. There are 4 offspring in lanes 1–4 respectively.

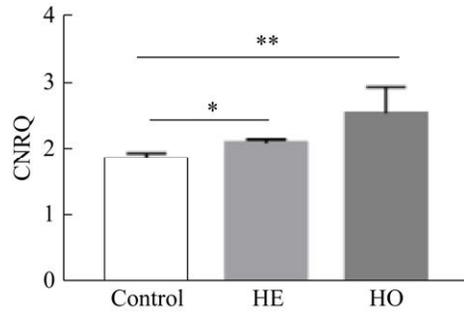


图 7 qPCR 检测 $\Delta 15$ Des 在小鼠肝脏组织中的转录表达 * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$
Figure 7 Detection of transcription and expression of $\Delta 15$ Des in mouse liver by qPCR. The abscissa is the group, and the ordinate is the standardized value (* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$).

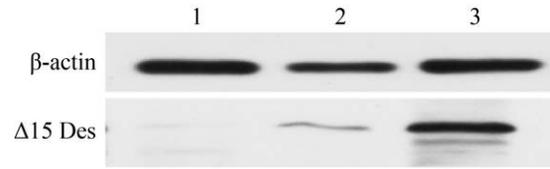


图 8 小鼠肝脏组织 Western blotting 图
Figure 8 Western blotting analysis of mouse liver tissue. 1: WT; 2: HE; 3: HO.

小鼠体内脂肪酸的变化, 结果如图 9 所示, 色谱图中横坐标为各个脂肪酸出现的保留时间, 根据保留时间将不同脂肪酸区分开来, 与标准样品比对分析判定各个峰值所代表的是哪种脂肪酸。计算峰高 \times 峰面积, 进而得出每 1 种脂肪酸的百分含量, 结果如表 2 所示。图 9 为 WT 组、HE 组和 HO 组小鼠肝脏 GC 图, 对比分析, WT 组几乎没有 EPA 的转化, HE 组和 HO 组存在从 ARA 到 EPA 的转化, 且 HO 组转化得更完全, 体内几乎没有 ARA。去除饲料中

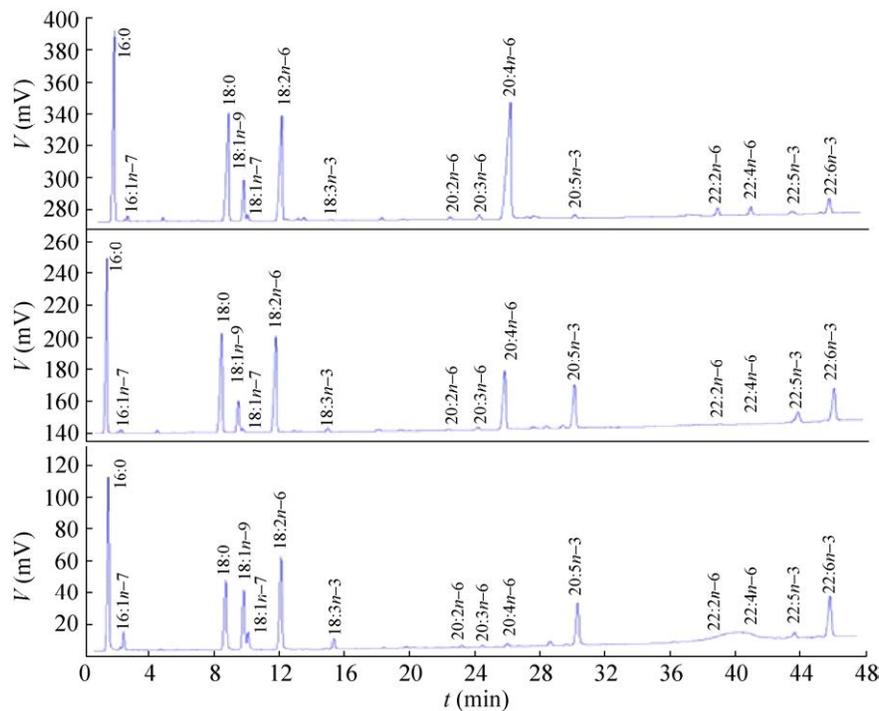


图 9 小鼠肝脏组织中多不饱和脂肪酸检测色谱图
Figure 9 Chromatogram of polyunsaturated fatty acids in liver tissue. (A) WT. (B) HE. (C) HO.

表 2 $\Delta 15$ Des 转基因小鼠肝脏脂肪酸的成分和含量 (%)Table 2 Composition and content of fatty acids in liver of $\Delta 15$ Des transgenic mice (%)

Fatty acid type	Control (WT)	Heterozygote (HE)	Homozygote (HO)
16:0	21.55±1.33 ^b	22.46±1.07 ^b	25.68±1.96 ^a
16:1 n -7	0.54±0.17 ^b	0.47±0.04 ^b	2.82±0.39 ^a
18:0	16.85±2.81 ^a	18.28±1.94 ^a	13.73±1.01 ^b
18:1 n -9	4.72±0.69 ^b	5.15±0.36 ^b	11.23±1.76 ^a
18:1 n -7	0.67±0.50 ^b	0.70±0.12 ^b	3.24±0.41 ^a
18:2 n -6	17.37±0.62	17.34±1.26	17.93±0.66
18:3 n -3	0.12±0.05 ^c	0.64±0.07 ^b	1.98±0.14 ^a
20:2 n -6	0.40±0.23	0.31±0.15	0.43±0.09
20:3 n -6	0.63±0.29	0.54±0.10	0.42±0.17
20:4 n -6	30.05±2.73 ^a	12.99±1.47 ^b	0.77±0.13 ^c
20:5 n -3	0.52±0.09 ^b	9.50±0.82 ^a	9.94±0.84 ^a
22:2 n -6	0.41±0.05 ^a	0.15±0.02 ^b	0.03±0.01 ^c
22:4 n -6	1.34±0.17 ^a	0.23±0.02 ^b	0.07±0.02 ^c
22:5 n -3	0.71±0.06 ^c	2.94±0.38 ^a	1.70±0.13 ^b
22:6 n -3	2.62±0.14 ^c	8.17±0.83 ^b	10.16±1.04 ^a
Total n -6	50.20±4.11 ^a	31.56±3.03 ^b	19.65±1.08 ^c
Total n -3	3.97±0.35 ^b	21.25±2.13 ^a	23.78±3.22 ^a
n -6/ n -3	12.64±1.13 ^a	1.49±0.15 ^b	0.83±0.09 ^c

Note: the data in the table are the percentage of fatty acid content in the liver of three groups of mice, and the value is the average of repeated experiments in the liver of five mice, which is expressed as the average standard deviation. The letters after the data indicate significant differences between the numerical values ($P < 0.05$) (one-way ANOVA, Duncan's test). 14:0-myristic acid; 16:0-palmitic acid; 16:1 n -7-palmitoleic acid; 18:0-stearic acid; 18:1 n -9-oleic acid; 18:1 n -7-octadecenoic acid; 18:2 n -6-linoleic acid, LA; 18:3 n -3- α -linolenic acid, ALA; 20:2 n -6-eicosadienoic acid; 20:3 n -6-eicosatrienoic acid; 20:4 n -6-ARA; chidonic acid, ara; 20:5 n -3-eicosapentaenoic acid, EPA; 22:2 n -6-docosadienoic acid; 22:4 n -6-docosatetraenoic acid; 22:5 n -3-docosapentaenoic acid, DPA; 22:6 n -3-docosahexaenoic acid, DHA.

ω -3 PUFAs 的影响, 根据表 2 计算每组小鼠 EPA/ARA 的比值, WT 组为 0%, HE 组为 14%, HO 组为 25%, HO 组比 HE 组的 EPA 转化率高 11%, 且 EPA 转化为更长链的 DHA, 因此我们得出结论 $\Delta 15$ Des 能将小鼠体内 ARA 转化为 EPA 进而转化为 DHA, 并且纯合的小鼠比杂合小鼠转化效率更高。

3 讨论

转基因动物的制备泛指用特定的途径和方法将外源基因直接导入动物体内并稳定遗传给后代的技术, 目前转基因动物在研究人类基因结构和功能之间的关系、细胞生长和发育的潜力、基因编辑、生物反应器的载体等方面具有重要的

意义和作用^[19-21]。研究人员分析发现, 目前对于一些传统转基因研究方法还存在一些困难, 比如利用质粒的随机整合获得转基因动物在其基因传代途中可能会出现多种遗传信号丢失、位置突变效应等, 这会直接导致外源基因的表达效率大大减弱。慢病毒载体制备法过程操作烦琐, 同时安全问题值得人们警觉^[22]。新型的 PiggyBac 转座子系统是指在原核和真核生物基因组上可以进行位置转换的 DNA 片段。相较于传统转座子系统, 有多种优点, 例如: 更高的整合效率、更高的目的基因表达概率、更大的目的片段的插入、更“精确”拷贝数的插入, 以及可自由移除插入片段, 已广泛应用于转基因及功能基因研究中。

哺乳动物体内通过延长酶和去饱和酶将短链脂肪酸转化为更长链的脂肪酸^[23], 然而缺乏将 ω -6 PUFAs 转化为 ω -3 PUFAs 的酶, 来源于线虫的 $\Delta 15$ Des 能表达 ω -3 脂肪酸去饱和酶的活性^[13], 将 ω -6 PUFAs 转化为 ω -3 PUFAs。因此, 本研究所构建的 $\Delta 15$ Des 转基因小鼠模型自身可以将体内 ω -6 PUFAs 转化为 ω -3 PUFAs, 从而使动物的组织和器官中富含 ω -3 PUFAs。 $\Delta 15$ Des 转基因小鼠模型可以减少因长期喂养不同饲料所带来的麻烦, 节省时间与经费, 为研究 PUFAs 的功能和代谢提供了一种良好的动物模型。我们检测新生小鼠和衰老小鼠发现, $\Delta 15$ Des 的基因表达持续发生在整个小鼠的生命周期。

本研究是采用显微注射法将 PiggyBac 转座子构建的 $\Delta 15$ Des 载体直接注入小鼠受精卵的原核内, 并且导入代孕母鼠体内, 最终产下 $\Delta 15$ Des 转基因小鼠。我们共注射了 200 只小鼠, 最终获得 37 只阳性小鼠, 在 37 只存活小鼠中, 其中 13 只经 PCR 鉴定为阳性转基因小鼠, 阳性率为 35.1%。在 13 只阳性小鼠中, 有 8 只小鼠有转基因活性, 基因活性率高达 61.53%。通过阳性小鼠回交、侧交, 多次传代筛选出杂合和纯合的转基因小鼠, 发现杂合子和纯合子 $\Delta 15$ Des 表达均上调, 纯合子与杂合子相比, $\Delta 15$ Des 表达水平高 11%。与质粒构建的载体在阳性率和基因活性方面都有极大的提高, 并且转 $\Delta 15$ Des 基因后对小鼠的表型和行为学并无明显改变, 因此我们得出结论: 与一般转基因载体相比, PB 转座子具有周期短、安全、高效、负载容量大的特点, 我们利用 PB 所构建的 $\Delta 15$ Des 转基因小鼠在杂合和纯合时表现不同的性状, 纯合子表现出更高的基因活性。因此 PiggyBac 转座子系统是一个良好的构建转基因动物模型的方法, $\Delta 15$ Des 转基因小鼠也在研究 PUFAs 与疾病的关系中发挥重要作用。

REFERENCES

- [1] Yusa K, Rad R, Takeda J, et al. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 363-369.
- [2] Qian QJ, Che JQ, Ye LP, et al. The improvement and application of piggyBac transposon system in mammals. *Hereditas*, 2014, 36(10): 965-973.
- [3] Morimoto KC, Van Eenennaam AL, et al. Endogenous production of n-3 and n-6 fatty acids in mammalian cells. *Dairy Sci*, 2005, 88(3): 1142-1146.
- [4] Pai VJ, Wang B, Li X, et al. Transgenic mice convert carbohydrates to essential fatty acids. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97637.
- [5] Maqdasy S, Baptissart M, Vega A, et al. Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted? *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 368(1/2): 30-46.
- [6] Furland NE, Luquez JM, Oresti GM, et al. Mild testicular hyperthermia transiently increases lipid droplet accumulation and modifies sphingolipid and glycerophospholipid acyl chains in the rat testis. *Lipids*, 2011, 46(5): 443-454.
- [7] Wang Y, Botolin D, Xu J, et al. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res*, 2006, 47(9): 2028-2041.
- [8] Whelan J. Dietary stearidonic acid is a long chain (n -3) polyunsaturated fatty acid with potential health benefits. *J Nutr*, 2009, 139(1): 5-10.
- [9] He C, Qu X, Cui L, et al. Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *PNAS*, 2009, 106(27): 11370-11375.
- [10] Lebbadi M, Julien C, Phivilay A, et al. Endogenous conversion of *Omega*-6 into *Omega*-3 fatty acids improves neuropathology in an animal model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2011, 27(4): 853-869.
- [11] Korenfeld Y, Mendoza-Bastidas C, Saavedra L, et al. Current status of cardiac rehabilitation in Latin America and the Caribbean. *Am Heart J*, 2009, 158(3): 480-487.
- [12] Hohos NM, Elliott EM, Cho KJ, et al. High-fat diet-induced dysregulation of ovarian gene expression

- is restored with chronic *Omega-3* fatty acid supplementation. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 499: 110615.
- [13] NaPier Z, Kanim LEA, Arabi Y, et al. *Omega-3* fatty acid supplementation reduces intervertebral disc degeneration. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 9531-9537.
- [14] 朱升龙. ω -3 多不饱和脂肪酸对两种抗癌药物在乳腺癌细胞中抗肿瘤效果的增强作用及其机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
Zhu SL. The enhancement effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids on the antitumor effect of two anticancer drugs in breast cancer cells and its mechanism[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018 (in Chinese).
- [15] Kang JX, Wang JD, Wu L, et al. Transgenic mice: fat-1 mice convert $n-6$ to $n-3$ fatty acids. *Nature*, 2004, 427(6974): 504.
- [16] Kang JX. Fat-1 transgenic mice: a new model for *Omega-3* research. *Prostag Leukot Essent Fatty Acids*, 2007, 77(5/6): 263-267.
- [17] 刘晶. Fat-1 转基因小鼠模型的构建[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
Liu J. Construction of Fat-1 transgenic mouse model[D]. Changchun: Jilin University, 2011 (in Chinese).
- [18] 刘晓蕾, 侯琳, 蒋正尧, 等. fat-1 转基因小鼠的构建与鉴定. *青岛大学医学院学报*, 2007, 43(1): 12-14.
Liu XL, Hou L, Jiang ZY, et al. Construction and identification of fat-1 transgenic mice. *J Qingdao Univ Med Coll*, 2007, 43(1): 12-14 (in Chinese).
- [19] Ding S, Wu XH, Li G, et al. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 2005, 122(3): 473-483.
- [20] Wu S, Ying G, Wu Q, et al. Toward simpler and faster genome-wide mutagenesis in mice. *Nat Genet*, 2007, 39(7): 922-930.
- [21] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 766-770.
- [22] Wang Y, Botolin D, Xu J, et al. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *Lipid Res*, 2006, 47(9): 2028-2041.
- [23] Nakamura MT, Nara TY. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr*, 2004, 24: 345-376.

(本文责编 郝丽芳)