

人泛素启动子 UbB 介导 *Fat-1* 基因在绵羊成纤维细胞内的表达

毛志福^{1,2}, 王立民², 张银国^{1*}, 周平^{2*}

(1. 石河子大学动物科技学院, 石河子 832000;

2. 新疆农垦科学院, 新疆兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 石河子 832000)

摘要: 旨在构建不饱和脂肪酸脱氢酶基因 *Fat-1* 表达载体, 实现人泛素启动子 UbB 调控外源基因 *Fat-1* 在绵羊细胞内表达。PCR 扩增得到 UbB 序列, 秀丽隐杆线虫 *Fat-1* 基因密码子根据绵羊对同义密码子使用偏好性优化后, 由公司合成获得 *oFat-1* 基因序列, 以及 pcDNA3.1 中的 GBHpolyA 序列共同插入 pCMV-DsRed2-1 载体的多克隆位点(MCS), 得到重组真核表达载体 pUbB-*oFat-1*-polyA-CMV-DsRed, 载体序列经酶切测序鉴定。线性化的表达载体采用脂质体包裹后转染绵羊成纤维细胞, 经 G418 抗性和红色荧光标记筛选得到阳性细胞, 并对阳性细胞进行 PCR 和反转录 PCR 鉴定, HPLC 检测细胞中不饱和脂肪酸的变化。构建的真核表达载体序列正确, *Fat-1* 基因能够在绵羊成纤维细胞基因组中正常表达, 促进细胞 ω -6PUFAs 向 ω -3PUFAs 转化, ω -3PUFAs 占总量的百分比从 11.48% 增加到 24.41%, ω -6PUFAs 的百分比从 88.52% 下降到 75.59%, ω -6PUFAs/ ω -3PUFAs 比值从 7.82 ± 0.18 下降到 3.10 ± 0.03 , 差异极显著 ($P < 0.01$)。成功构建了 UbB 启动子介导的 *Fat-1* 真核表达载体, 筛选得到表达不饱和脂肪酸脱氢酶的绵羊细胞, 为进一步制备转基因克隆绵羊奠定了基础。

关键词: 人泛素启动子 UbB; *Fat-1*; 表达载体; 绵羊成纤维细胞; PUFAs

中图分类号: S826.8.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)04-0528-07

Expression of Unsaturated Fatty Acid Dehydrogenase Gene in Sheep Fibroblast Driven by Human Ubiquitin Promoter UbB

MAO Zhi-fu^{1,2}, WANG Li-min², ZHANG Yin-guo^{1*}, ZHOU Ping^{2*}

(1. College of Animal Science & Technology Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. The Breed & Biological Key Laboratory of Sheep, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Shihezi 832000, China)

Abstract: The aim of this study was to construct expression vector of *Fat-1* in sheep fibroblasts, encoding unsaturated fatty acid desaturase driven by UbB(human sapiens Ubiquitin gen B sufamily) constitutive promoter. UbB was obtained by PCR, *Fat-1* gene from *Caenorhabditis elegans* was optimized base on ovis aries codon, and GBHpolyA was from pcDNA3.1. These donor sequences were orderly inserted into MCS of pCMV-DsRed2-1 vector. The recombinant vector(pUbB-*oFat-1*-polyA-CMV-DsRed) was analysed by endonucleases digestion and sequencing. The linearized vector was transfected into sheep fibroblast with liposome. The positive cell was selected with G418 and red fluorescence signal, and furtherly confirmed by PCR and RT-PCR, components of PUFAs were detected by HPLC. The results showed that correct recombinant vector was obtained, and *Fat-1* gene could be properly expressed in sheep fibroblast. The ω -3 PUFAs were greatly in-

收稿日期: 2012-11-21

基金项目: 转 *Fat-1* 基因高品质肉羊新品种的培育(2009ZX08008-008B); 脂肪酸脱氢酶 1(FAD1)转基因羊的研究(2011BB014)

作者简介: 毛志福(1985-), 男, 甘肃武威人, 硕士生, 主要从事动物临床疾病方面研究, E-mail: maozify@sina.com

* 通信作者: 张银国(1956-), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事动物疾病诊疗与繁殖研究, E-mail: zyg@shzu.edu.cn; 周平(1974-), 副研究员, 硕士生导师, 主要从事动物繁殖育种研究, E-mail: zhpqxqf@163.com

creased from 11.48% to 24.41% and simultaneously the ω -6 PUFAs decreased from 88.52% to 75.59%. A significantly reduction of ω -6/ ω -3 PUFAs ratio was observed from 7.82 ± 0.18 to 3.10 ± 0.03 ($P < 0.01$). These results demonstrate that the expression vector was constructed successfully, and the sheep fibroblast line was obtained, which could encode unsaturated fatty acid desaturase, furthermore, this study may pave the way to generate transgenic sheep by somatic cell nuclear transfer technology.

Key words: human Ubiquitin promoter UbB; *oFat-1*; expression vector; sheep fibroblasts; PUFAs

人源性泛素启动子 UbB (GenBank: X04803) 和 UbC (GenBank: D63791) 启动子^[1], UbB 全长 1 100 bp 只有 1 个 TATA box 和 1 个内含子, UbC 全长 1 680 bp, 除了有 TATA box 和内含子以外, 还有多个转录因子, 这些元件富含 GC, 能够有效指导目的基因的表达^[2-3]。UbB 是一种非病毒性强启动子, 能够长期稳定地驱动目的基因的表达, 与同家族的 UbC 一起被广泛应用于驱动外源基因表达, 在基因治疗中有着重要作用。该启动子不受组织细胞的限制, 在绝大部分组织、细胞中表现出启动转录的高活性^[4]。泛素在生物体内能够调节细胞内错误折叠的蛋白或细胞程序性死亡中需要降解蛋白的降解, 并激活基因表达正确蛋白, 与病毒启动子的负反馈调节相比较, 泛素启动子 pUbB 属于正调节, 这样可以提高自身活性, 驱动目的基因持续表达^[5]。

Fat-1 基因来源于秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 四号染色体上, 编码产生的不饱和脂肪酸脱氢酶, 能够在 ω -6 多不饱和脂肪酸 (ω -6 Poly Unsaturated Fatty Acids, ω -6 PUFAs) 碳链甲基端第 3 个碳原子上催化氧化生成一个碳碳双键而转化成相应的 ω -3 PUFAs^[6-7], 从而改变细胞质膜 ω -6/ ω -3 PUFAs 的比例, ω -3 PUFAs 因增加双键而影响了细胞质膜脂类成分, 使胆固醇重新分配, 进而降低膜脂中胆固醇含量, 增加了细胞质膜的流动性^[8-10], 这对细胞正常生长、功能的维持和调节基因表达有至关重要的作用。然而哺乳动物体内缺乏合成 ω -3 PUFAs 前体的酶和能够将 ω -6 PUFAs 转化成 ω -3 PUFAs 的脱氢酶, 所以只能通过深海鱼油、部分蔬菜和坚果获得。因此, 通过转基因的方法在绵羊细胞表达 *Fat-1* 基因, 培育富含不饱和脂肪酸保健羊肉品种, 使肉品质得到改善, 从而提高人们 ω -3 PUFAs 日常摄入量就显得很有意义。

本研究旨在构建 *Fat-1* 基因真核表达载体, 检测 UbB 启动子在绵羊成纤维细胞内指导 *Fat-1* 基因的表达效率, 以及 *Fat-1* 基因的作用, 从而获得在

绵羊成纤维细胞内稳定表达不饱和脂肪酸脱氢酶 1 的细胞系, 为 UbB 启动子在分子生物学中的应用提供一定参考, 更进一步为生产表达 ω -3 PUFAs 脱氢酶的体细胞克隆羊提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 材料

秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) *Fat-1* 基因序列从 GenBank 上查询, 序列号: NM_001028389.3, 根据绵羊对同义密码子使用偏好性, 将 *Fat-1* 基因密码子优化后由 GenScript 公司合成, 命名为 *oFat-1*。核酸提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司, 限制性内切酶 *Ase I* 与 *Age I* 购自 Biolabs 公司, 其他酶和 T_4 DNA ligase 购自宝生物工程(大连)有限公司, T-easy Vector 购自 Promega 公司, LipofectamineTM LTX Reagent 购自 Invitrogen 公司, 载体 pCMV-DsRed2-1 和 pcDNA3.1 质粒由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 人泛素启动子 UbB 的克隆 利用 U_1 和 U_2 、 U_3 和 U_4 (表 1) 2 对引物从人基因组中分别 PCR 扩增获得 UbB-1 和 UbB-2 序列, 然后分别连接在 T-easy Vector 上, 再经 *Ase I* 和 *Age I*、*Ecor47 III* 和 *Hind III* 分别双酶切后回收, 片段大小均为 1.86 kb, 分别命名 UbB1 和 UbB2。

1.2.2 启动子检测 pEGFP-c1 质粒经限制性内切酶 *Ase I* 与 *Age I* 酶切后, 与 UbB1 片段相连, 命名 pEGFP-c1U (图 1)。按 LipofectamineTM LTX Reagent 转染试剂说明书转染细胞, 将 pEGFP-c1U 和带有 CMV 启动子的 pEGFP-c1 2 种质粒分别转染 HELLA 细胞和绵羊成纤维细胞, 18 h 后在荧光显微镜下检测并比较绿色荧光的表达情况。

1.2.3 *Fat-1* 表达载体构建 将 CMV-DsRed2-1 载体用 *Ecor47 III* 与 *Hind III* 双酶切后回收 4.1 kb 片段, 与 UbB2 片段相连接, 得到重组质粒 pUbB-

CMV-DsRed。该质粒用 *Kpn* I 单酶切, pcDNA3.1 质粒用 *Pvu* II 单酶切, 之后采用 PCR 方法补平粘性末端, 再将两者同时用 *Hind* III 单酶切后, 分别回收 5.9 kb 和 350 bp BGHpolyA 片段, 按照浓度 3:1 连接, 得到重组质粒 pUbB-polyA-CMV-DsRed。

将含有 *oFat-1* 基因的 pcDNA3.1 质粒和 pUbB-polyA-CMV-DsRed 质粒同时用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切, 分别回收 1.4 和 6.2 kb 片段, 然后将 2 个片段 16 °C 过夜连接、转化、摇菌、提取质粒后酶切和测序鉴定, 最终得到表达载体 pUbB-*oFat*-polyA-CMV-DsRed(图 1、2)。

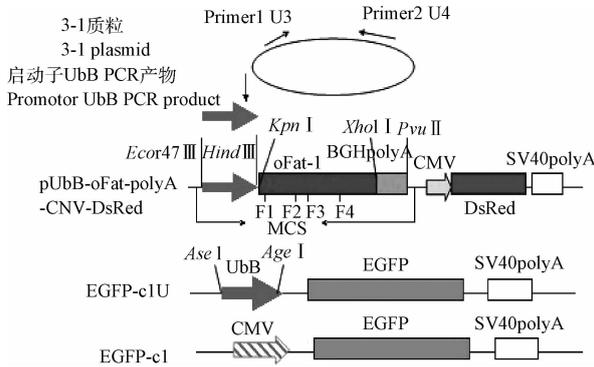


图 1 载体构建示意图

Fig. 1 Schematic illustration for the recombinant vectors

1.2.4 细胞转染 取 18 月龄成年萨福克公羊耳缘皮肤成纤维细胞, 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 条件原代培养约 7 d 后 0.25% 胰酶消化传代至 6 孔板, 调整细胞密度约 2×10^5 个 \cdot m L⁻¹, 12 h 后进行转染。将纯化后的 pUbB-*oFat*-polyA-CMV-DsRed 质

粒用 *Ecor*47 III 内切酶线性化后, 按 Lipofectamine™ LTX Reagent 试剂说明转染绵羊成纤维细胞, 经传代培养, 36 h 后换为含 $0.8 \text{ g} \cdot \text{m L}^{-1}$ G418 的 DMEM 完全培养液培养 8 d, 再利用红色荧光挑选阳性克隆细胞, 扩大培养后, 部分细胞冻存, 部分用于进一步检测。

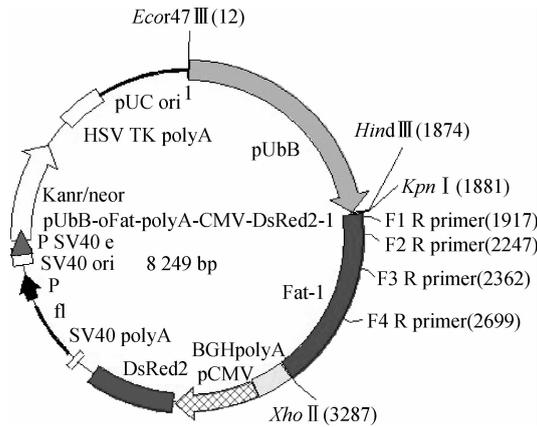


图 2 秀丽线虫 n-3 脂肪酸脱氢酶基因 *Fat-1* 表达载体 pUbB-*oFat*-polyA-CMV-DsRed

Fig. 2 The vector of pUbB-*oFat*-polyA-CMV-DsRed used to express the *Caenorhabditis elegans* ω-3 fatty acid desaturase gene *oFat-1*

1.2.5 基因水平检测 提取阳性细胞基因组, 用特异性引物 U₃ 和 U₄、F₁ 和 F₂ 进行 PCR、琼脂糖凝胶电泳检测。用 Trizol 法提取细胞 RNA 用 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-, TaKaRa Code: D2639A) 反转录得到 cDNA, 然后用 2 对特异性引物 F₁ 和 F₃、F₁ 和 F₄ (表 1) 进行 PCR 检测。

表 1 PCR 扩增引物及退火温度

Table 1 The primers and annealing temperature of PCR amplification

名称 Name	引物序列(5'-3') Primer	附加酶切位点 Extra restriction enzyme cutting site	退火温度/°C Annealing temperature	延伸时间/s Extend time
U ₁	CCGATTAATTGAACGGTGATCACACCACT	<i>Ase</i> I	68.0	120
U ₂	CTGACCGGTTCTCTTACCAAGCGTCCACA	<i>Age</i> I		
U ₃	CCGAGCGCTTGAACGGTGATCACACCACT	<i>Ecor</i> 47 III	60.0	120
U ₄	CTGAAGCTTTCTCTTACCAAGCGTCCACA	<i>Hind</i> III		
F ₁	GTCATAGTTCTGAAGGGCT	-	57.8	30
F ₂	AACAGGGCAAATCCGAACAC	-		
F ₁	GTCATAGTTCTGAAGGGCT	-	57.8	30
F ₃	CTTCTGCCAGGGAAAGTATG	-		
F ₁	GTCATAGTTCTGAAGGGCT	-	58.8	50
F ₄	AGAAGGACAGAGGCACCCAA	-		

1.2.6 不饱和脂肪酸含量检测 提取约 1.2×10^7 个细胞内总脂肪酸,利用高效液相色谱法检测细胞不饱和脂肪酸中 ω -6 PUFAs 和 ω -3 PUFAs 含量及比例的变化,对照细胞和转 *Fat-1* 基因细胞分别做 2 个平行测定(a 和 b、c 和 d),送由南京医科大学代谢疾病研究中心检测。数据用 *t* 检验法进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 启动子的克隆与活性检测

图 3 中 pEGFP-c1 质粒转染 HELLA 细胞(d)和绵羊成纤维细胞(h),18 h 后观察有绿色荧光显示,用 UbB 启动子替换 pEGFP-c1 中的 CMV 启动子分别转染 HELLA 细胞(b)和绵羊成纤维细胞(f)均能检测到绿色荧光信号,HELLA 细胞中 CMV 与 UbB 启动子驱动荧光蛋白表达基本相当,在绵羊

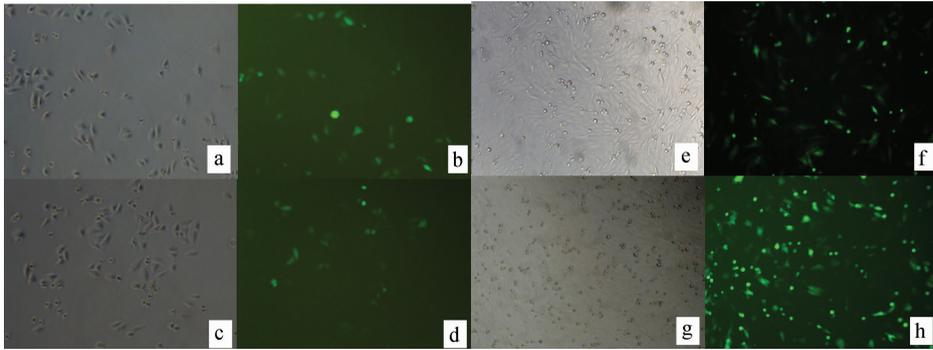
成纤维细胞中 UbB 启动子活性稍弱于 CMV 启动子,但均能启动荧光蛋白表达,表明克隆得到的 UbB 启动子序列能够作为外源目的基因的启动子。

2.2 阳性细胞的获得

图 4 所示,转染基因的绵羊成纤维细胞经 G418 筛选,挑选携带红色荧光的细胞团,经扩大培养得到了 G418 抗性和红色荧光双标记的阳性细胞。

2.3 载体构建与检测

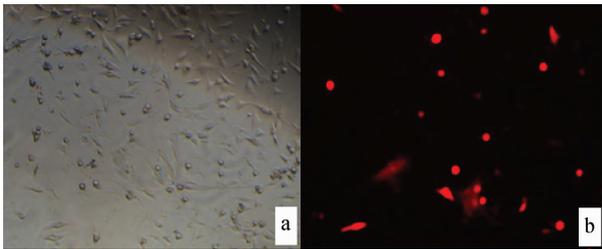
图 1 和图 2 为构建重组质粒 pUbB-oFat-polyA-CMV-DsRed 的线性和环状示意图。重组质粒酶切结果与理论值大小符合。如图 5 所示,经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切后得到 1 402 bp 和 6 846 bp 2 个片段。进一步测序比对,如图 6 所示,UbB 启动子区域比报道的序列少 4 个碱基,目的基因序列与预期序列一致。



a,b,c,d. HELLA 细胞;e,f,g,h. 绵羊成纤维细胞; b,f. pEGFP-c1U 转染细胞;d,h. pEGFP-c1 转染细胞
a,b,c,d. HELLA cells; e,f,g,h. Sheep fibroblasts; b,f. Transfected with pEGFP-c1U; d,h. Transfected with pEGFP-c1

图 3 HELLA 细胞和绵羊成纤维细胞中绿色荧光蛋白表达 50 \times

Fig. 3 Photomicrographs showing GFP expression in HELLA cell and sheep fibroblasts 50 \times



a. 正常绵羊成纤维细胞; b. pUbB-oFat-polyA-CMV-DsRed 转染后的肉羊成纤维细胞

a. Normal sheep fibroblasts; b. Sheep fibroblasts transfected with pUbB-oFat-polyA-CMV-DsRed

图 4 绵羊成纤维细胞中显示红色荧光信号 100 \times

Fig. 4 Photomicrographs showing DsRed expression in sheep fibroblasts 100 \times

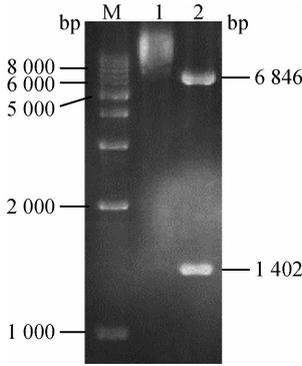
2.4 DNA 和 RNA 水平检测

提取阳性细胞基因组,2 对引物进行 PCR 电泳检测,均能得到预期大小的目的条带(图 7)。提取阳性细胞总 RNA 经反转录 PCR,如图 8 所示 2 对引物 PCR 结果均与预期大小一致,阴性对照没有特异性条带;质粒 PCR 阳性对照与反转录 PCR 的条带大小一致。

2.5 PUFAs 检测

表 2 所示, ω -3PUFAs 占总量的百分比从 11.48% 增加到 24.41%, ω -6PUFAs 的百分比从 88.52% 下降到 75.59%, ω -6PUFAs/ ω -3PUFAs 比值从对照组的 7.82 ± 0.18 下降到试验组 3.10 ± 0.03 ,差异极显著($P < 0.01$)。表明 *oFat-1* 基因在

绵羊细胞内编码合成的脱氢酶能够促进 ω -6 PU-FAs 向 ω -3 PUFAs 转化。



M. 1 kb DNA ladder DNA 相对分子质量标准;1. 重组质粒;2. 重组质粒 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切; M. 1 kb DNA ladder maker; 1. Recombinant plasmid;2. Digested products with *Kpn* I/*Xho* I ;

图 5 重组质粒酶切电泳分析

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of restriction enzymes digested products of pUbB-oFat-polyA-CNV-DsRed

```

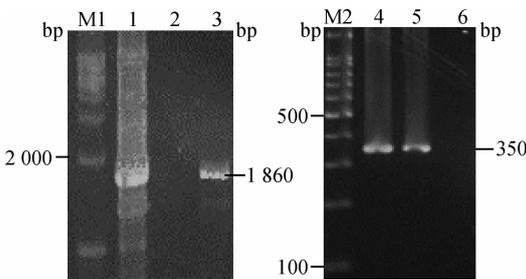
Upper line: 测序结果, from 1 to 611
Lower line: UbB序列, from 1 to 617
测序结果:UbB序列 identity=99.84%(610/611) gap=0.97%(6/617)
1 CTGGCCTTTTGTGGCCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTCGCGTTATCCCTGATTCGTG
1 CTGGCCTTTTGTGGCCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTCGCGTTATCCCTGATTCGTG
61 GATAACCGTATTACCGCCATGCATTAGTTATTACTAGCGCT...TGAACGGTGATCAC
61 GATAACCGTATTACCGCCATGCATTAGTTATTACTAGCGCTTAAGTGAACGGTGATCAC

Upper line: 测序结果, from 2 to 1688
Lower line: Fat-1序列, from 1 to 1687
测序结果:Fat-1序列 identity=100.00%(1688/1688) gap=0.06%(1/1689)
1 GGAGGGTCTCACAAGTTTGAGGTATGTTGGCTCATAGTCTGAAGGGCTCTCTGTACCCG
1 .GAGGGTCTCACAAGTTTGAGGTATGTTGGCTCATAGTCTGAAGGGCTCTCTGTACCCG
61 CTCCTGACCCGAGGTGACGTGCTCTGGACGCTCGGGCAAGTCTGGAAGAGAAGGAAG
60 CTCCTGACCCGAGGTGACGTGCTCTGGACGCTCGGGCAAGTCTGGAAGAGAAGGAAG

```

图 6 重组质粒测序结果比对

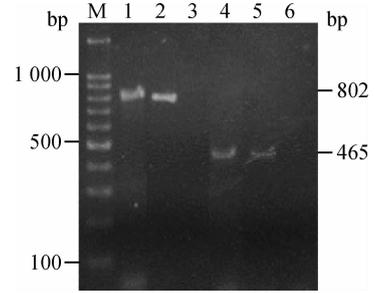
Fig. 6 Comparison sequence determination to UbB and oFat-1



M1. 1 kb DNA ladder DNA 相对分子质量标准; M2. 100 bp DNA ladder DNA 相对分子质量标准;1. 质粒阳性对照;3~5. 转 *oFat-1* 基因细胞;2,6. 未转 *oFat-1* 基因细胞 1. Positive recombinant plasmid; 3-5. Identification of transgenic; 2,6. Control with nontransgenic cell

图 7 细胞基因组 PCR 检测

Fig. 7 Identification of transgenic sheep fibroblasts by PCR



M. 100 bp DNA ladder DNA 相对分子质量标准;1~3. 引物 F_1/F_1 PCR;4~6. 引物 $F1/F3$ PCR;1,4. 质粒阳性对照; 2,5. 转 *oFat-1* 基因细胞;3,6. 未转 *oFat-1* 细胞; M. 100 bp DNA ladder marker; 1-3. Identification with F_1/F_1 ; 4-6. Identification with $F1/F3$; 1,4. Positive recombinant plasmid; 2,5. Identification of transgenic; 3,6. Control with nontransgenic cell

图 8 反转录 PCR 检测细胞中 ω -3 脂肪酸脱氢酶基因的表达

Fig. 8 Reverse transcription-PCR analysis expression of the n-3 fatty acid desaturase gene

3 讨论

目前转基因细胞的制备为转基因克隆动物的培育提供了细胞来源^[11]。本研究旨在通过构建合适的真核表达载体,得到转 *oFat-1* 基因的细胞系,为进一步制备转基因克隆绵羊奠定基础。本试验通过从人类基因组中获得的 UbB 启动子区域,利用 FirstEF 在线软件分析,克隆的序列中具有核心启动子区,以及多数脊椎动物启动子区所含有的高 CpG 岛。采用将克隆得到的启动子替代 pEGFP-c1 中 CMV 启动子的方法,比较了 UbB 和 CMV 2 种启动子在 HELLA 细胞和绵羊成纤维细胞内驱动 GFP 基因表达的情况。转染后 18 h 观测结果表明,在 HELLA 细胞和绵羊成纤维两种细胞中都有绿色荧光蛋白表达,表明克隆得到了 UbB 启动子区域并能够驱动外源基因 GFP 的正常表达。从序列比对结果表明,尽管得到的启动子部分序列与报道的序列存在 4 个碱基的差异,但没有影响绿色荧光蛋白的表达。在 HELLA 细胞中,通过荧光信号强度比较,UbB 启动子与 CMV 启动子效率相当,可能由于来源于人类的 UbB 启动子在 HELLA 细胞中不存在种属之间的差异;而在绵羊成纤维细胞中,UbB 启动子驱动的绿色荧光蛋白强度略低于 CMV 启动子。由于 CMV 启动子是巨细胞病毒启动子,没有种属特异性,能够在大多数真核细胞中有效驱动目的基因的表达,而 UbB 启动子来源于人类,可

能存在物种特异性,从而在羊的细胞中效率有所降低。B. Duan 等研究报道^[12]CMV 启动子在转 *Fat-1* 基因绵羊细胞和克隆胚胎中没有甲基化,而在克隆羊中却表现出高度甲基化,使得 *Fat-1* 在个体水平上表达沉默,所以认为 CMV 启动子不适合用于

制作转基因克隆动物的启动子。泛素启动子作为一种非病毒性启动子并且能够在大多数细胞广泛表达,可以有效驱动目的基因的表达。研究结果表明,克隆、验证获得的 UbB 启动子区序列可以作为目的基因的启动子。

表 2 绵羊成纤维细胞脂肪酸组分及含量

Table 2 Composition and content of fatty acids in sheep fibroblasts

脂肪酸 Fatty acids	对照组 Control group		试验组 Experimental group	
	a	b	c	d
C18:3 ω -3	1.427	1.415	2.187	2.145
C20:5 ω -3(EPA)	0.532	0.519	1.190	1.238
C22:5 ω -3(DPA)	1.342	1.255	2.128	2.278
C22:6 ω -3(DHA)	0.978	0.922	1.478	1.539
C18:2 ω -6	26.577	26.711	16.262	16.289
C20:4 ω -6(AA)	6.337	5.998	5.524	5.839
ω -3 PUFAs 总量 SUM of ω -3 PUFAs	4.279	4.111	6.983	7.200
ω -3 PUFAs 平均值 Average of ω -3 PUFAs	4.195		7.092	
ω -6 PUFAs 总量 SUM of ω -6 PUFAs	32.914	32.709	21.786	22.128
ω -6 PUFAs 平均值 Average of ω -6 PUFAs	32.812		21.957	
ω -6 PUFAs 相对百分率/% Relative percentage of ω -6 PUFAs	88.52		75.59	
ω -3 PUFAs 相对百分率/% Relative percentage of ω -3 PUFAs	11.48		24.41	
ω -6/ ω -3	7.692	7.956	3.120	3.073
ω -6/ ω -3 比值平均值 Average of ω -6/ ω -3	7.82 \pm 0.18 ^a		3.10 \pm 0.03 ^b	

同行数据后所标字母相异表示差异极显著($P < 0.01$)

Within the same line, different superscripts differ significantly ($P < 0.01$)

从表 2 中脂肪酸含量变化可以得出, ω -6 PUFAs 的总量下降了 1.5 倍, ω -3 PUFAs 总量增加 1.7 倍, 其中 EPA 和 DHA 含量分别增加了 2.31 倍和 2.6 倍, 证实了 *Fat-1* 基因能够在绵羊细胞内正确表达, 并能够有效促进细胞 ω -6 PUFAs 将其转变成 ω -3 PUFAs, 明显的降低了 ω -6/ ω -3 PUFAs 比值。Z. B. Kang 等^[6]在鼠心肌细胞转入 *Fat-1* 基因, 使细胞内 ω -6/ ω -3 PUFAs 比值从对照组的 15:1 下降到 1:1, 在转 *Fat-1* 基因猪中, 这个比值从 14.53 降低到 2.62^[13], 相比之下本试验中的比值 7.82~3.10, 可能是在不同类型细胞中脂肪酸长链的合成过程中有其他蛋白或酶的辅助作用而表达不同。另外, 培养液血清中可能存在 ω -3 PUFAs 被细胞直接吸收后, 增加了细胞中 ω -3 PUFAs 的基础水

平, 加上细胞自身可能存在的内在调节机制, 从而减小了脂肪酸脱氢酶 1 对 ω -6 PUFAs 转化作用, 这也提示人们在研究中可以人为添加 ω -6 PUFAs 来检测脱氢酶 1 的转化效率。

通过以上的研究, 得到了正确表达外源 *Fat-1* 基因的表达载体和细胞系, 为进一步生产转基因后代提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 赵慧, 郑文岭, 崔东, 等. 泛素启动子的研究进展 [J]. 广东医学, 2003, 24(12): 1376-1377.
- [2] NENOI M, MITA K, ICHIMURA S, et al. Heterogeneous structure of the polyubiquitin gene UbC of HeLa S3 cells [J]. *Gene*, 1996, 175: 179.

- [3] BIANCHI M, CRINELLI R, GIACOMINI E, et al. A potent enhancer element in the 5'-UTR intron is crucial for transcriptional regulation of the human ubiquitin C gene [J]. *Gene*, 2009,448(1): 88-101.
- [4] SCHORPP M, JÄGER R, SCHELLANDER K, et al. The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(9): 1787-1788.
- [5] CIECHANOVER A, ORIAN A, SCHWARTZ A. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction [J]. *Bioessays*, 2000, 22: 442.
- [6] KANG Z B, GE Y, CHEN Z, et al. Adenoviral gene transfer of *Caenorhabditis elegans* n-3 fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 4050-4054.
- [7] SPYCHALLA J P, KINNEY A J, BROWSE J. Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(4): 1142-1147.
- [8] SAWYER M B, FIELD C J. Possible mechanisms of ω -3 PUFA antitumour action [J]. *Diet Cancer*, 2010, 1: 3-38.
- [9] TERRY P D, ROHAN T E, WOLK A. In takes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence [J]. *Am J Clin Nutr*, 2003, 77(3): 532-543.
- [10] YAM D, PELED A, SHINITZKY M. Suppression of tumor growth and metastasis by dietary fish oil combined with vitamins E and C and cisplatin [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001, 47(1): 34-40.
- [11] 余大为, 张守峰, 朱化彬, 等. 转乳铁蛋白肽和 α 干扰素基因的牛胎儿成纤维细胞的制备 [J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(10): 1547-1553.
- [12] DUAN B, CHENG L, GAO Y, et al. Silencing of fat-1 transgene expression in sheep may result from hypermethylation of its driven cytomegalovirus (CMV) promoter [J]. *Theriogenology*, 2012, 78: 793-802.
- [13] REN H Y, ZHENG X M, CHEN H X, et al. Transgenic pigs carrying a synthesized fatty acid desaturase gene yield [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10(10): 1603-1608.

(编辑 程金华)