

转基因哺乳动物细胞自合成多不饱和脂肪酸*

孔 平 杜 茁 汤 波 孟庆勇 李 宁**

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 亚油酸、亚麻酸是哺乳动物体内的必需脂肪酸, 但哺乳动物由于缺乏 $\Delta 12$ 和 ω -3 脂肪酸脱氢酶而自身不能合成。 $\Delta 12$ 和 ω -3 脂肪酸脱氢酶存在于真菌、植物和一些低等动物中。 为了实现哺乳动物细胞亚油酸的自身合成, 克隆了线虫编码 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶的 *FAT-2* 基因 cDNA 序列, 通过优化密码子, 构建真核表达载体, 稳定转染细胞, 经抗生素筛选获得稳定整合 *FAT-2* 基因的 CHO 细胞。 PCR 和 RNA 印迹(Northern blot)验证了基因的整合和表达。 气相色谱分析细胞的脂肪酸含量表明, *FAT-2* 基因的表达显著提高了转基因细胞中亚油酸的含量, 亚油酸含量为阴性对照细胞的 2.4 倍。 研究结果表明, 低等动物 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶可以重建哺乳动物多不饱和脂肪酸合成途径, 并利用细胞中的油酸合成亚油酸。 上述研究为进一步利用转基因技术促进农业动物合成多不饱和脂肪酸从而提高食品营养价值奠定基础。

关键词 亚油酸, 多不饱和脂肪酸, 必需脂肪酸, $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶, 转基因

学科分类号 Q81, Q813

亚油酸、亚麻酸是哺乳动物体内必需但自身不能合成的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs), 因而被称为必需脂肪酸(essential fatty acids)。 多不饱和脂肪酸对人类的营养和健康非常重要。 多不饱和脂肪酸是细胞膜的组成成分, 对于维持细胞膜的结构和功能起着重要的作用^[1]。 表皮中的亚油酸参与形成正常皮肤的屏障^[2]。 此外, 亚油酸还是许多多不饱和脂肪酸如花生四烯酸, 类二十烷酸等的前体物质。 类二十烷酸是有生物活性的一类家族, 参与酶的合成、信号传导等生命活动^[3]。 多不饱和脂肪酸的合成需要一系列的脂肪酸脱氢酶在碳链特定位置引入双键(图 1)。 真菌、植物和一些低等动物能够合成多不饱和脂肪酸^[4, 5], 哺乳动物由于缺乏 $\Delta 12$ 和 ω -3 脂肪酸脱氢酶而不能自身合成多不饱和脂肪酸, 因而动物肉制品和奶制品中含有较多的饱和脂类, 过多的摄入不利于人体健康。 目前已有许多研究利用转基因成功地使哺乳动物合成多不饱和脂肪酸^[6, 7]。 但是, 以往的转基

因动物中表达的 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶使亚油酸含量提高有限, 由图 1 可知, 亚油酸是合成其他多不饱和脂肪酸的底物, 为使哺乳动物能够自身合成多不饱和脂肪酸, 亚油酸含量的提高至关重要。 在本研究中, 我们克隆了线虫(*Caenorhabditis elegans*) *FAT-2* 基因的编码区序列, 优化了密码子并构建了真核表达载体, 获得了 *FAT-2* 基因的稳定整合和表达的转基因 CHO 细胞。 气相色谱分析细胞的脂肪酸组成表明, 线虫 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶显著提高了哺乳动物细胞内的亚油酸含量。 本研究为改善肉制品或奶制品品质而生产转基因家畜奠定了基础。

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2002AA206111)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62733323, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2008-03-20, 接受日期: 2008-05-21

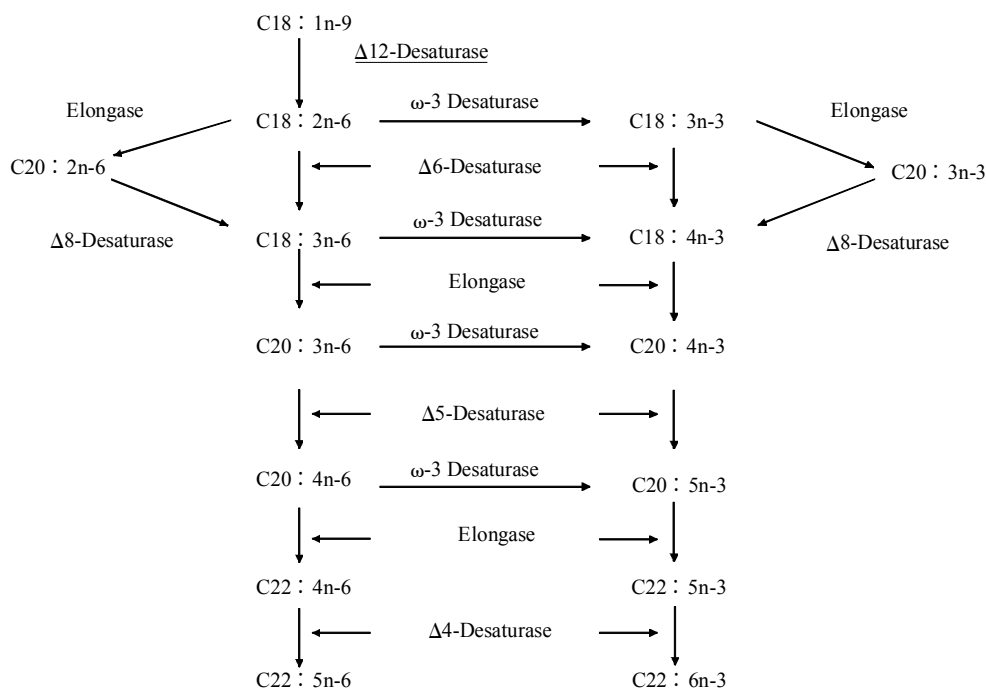


Fig. 1 Biosynthesis pathway of PUFAs

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和表达载体. CHO 细胞由本实验室保存, 真核表达载体 pBudCE4.1 购自 Invitrogen 公司.

1.1.2 试剂及来源. Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Hind* III、*Xba* I 和 *Nhe* I 购自 Takara 公司; T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 质粒纯化试剂盒、RNeasy 小量提取试剂盒购自 Qiagen 公司; DMEM 培养基购自北京钮因公司; 胎牛血清购自 Gibco 公司; 转染试剂 FuGENE HD Transfection Reagent 购自 Roche 公司; β -半乳糖苷酶原位染色试剂盒购自上海碧云天生物研究所.

1.2 载体构建

根据 GenBank 序列(NM_070159)设计特异引物, 通过 RT-PCR 方法获得线虫 *FAT-2* 基因的编码区序列. 所用引物为 P1-F 和 P3-R, 见表 1. 上游和下游引物分别加 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点(加粗表示)以及数个保护碱基. 反应条件: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 80 s, 35 个循环, 72℃ 最后延伸 7 min. PCR 产物回收并测序鉴定后, 进一步设计引物(表 1), 通过重叠 PCR 技

术, 对基因中的 2 个密码子进行了改变(下划线), 经密码子优化的 PCR 产物通过 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切后连接至 pBudCE4.1 载体上, 得到表达载体 pBudCE-*FAT2*.

1.3 细胞培养

CHO 细胞培养使用 DMEM 培养基, 含有 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 硫酸链霉素. 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养.

1.4 细胞转染

细胞以 3×10^5 个/ml 接种于 6 孔板中, 细胞汇合度达到 80%~90% 进行转染, 细胞培养液换成无抗生素的 DMEM 培养基, 2 μ g DNA 稀释到 100 μ l DMEM 培养基中, 然后加入 6 μ l Roche FuGENE HD Transfection Reagent, 剧烈震荡混匀, 室温诱导 15 min, 将转染复合物加到待转染细胞的培养皿中, 轻轻混匀. 转染 6 h 后, 更换含 10% 胎牛血清的完全培养基. pBudCE4.1 和 pBudCE-*FAT2* 载体线性化后转染细胞, 设置 2 个平行重复(即每个质粒独立进行 2 次转染和筛选实验).

1.5 β -半乳糖苷酶染色

使用 β -半乳糖苷酶原位染色试剂盒对细胞染色, 吸除细胞培养液, 加入 1 ml β -半乳糖苷酶染色固定液, 室温固定 10 min. 吸除细胞固定液,

PBS 洗涤细胞 3 次，每次 3 min。每孔加入 1 ml 染色工作液，37℃ 孵育 2 h，直至部分细胞的颜色变蓝。

1.6 RNA 印迹

利用 Qiagen 公司的 RNeasy Mini Kit 提取细胞总 RNA，测 $A_{260/280}$ 值，取 20 μg 总 RNA 甲醛变性电泳后，碱性条件下转移至 Hybond-N⁺ 尼龙膜上 (Amersham 公司)，同样的方法制作 2 张膜，分别用于 *FAT-2* 和 β -actin 的杂交。*Hind* III 和 *Xba* I 酶切质粒 pBudCE-*FAT2* 并回收约 1.1 kb 片段，得到 *FAT-2* 基因探针，据 β -actin cDNA 序列 (GenBank U20114) 设计引物 (表 1 中 ActbF, ActbR)，通过 RT-PCR 扩增得到 β -actin 的杂交探针 (643 bp)。探针以 [α -³²P]-dCTP 标记后进行杂交反应。

1.7 脂肪酸分析

收集细胞，加入 1 ml 2.5% H₂SO₄ 的甲醇溶液，80℃ 孵育 1 h，待冷却至室温，加入 0.2 ml 正己烷和 1 ml 水，震荡混匀，低速离心，取上层正己烷氮气吹干后进行气相色谱分析。

2 结 果

2.1 基因克隆、密码子优化及表达载体构建

利用线虫 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶基因 (*FAT-2*) cDNA 特异性引物，通过 RT-PCR 方法获得 *FAT-2* 编码区全序列，测序结果表明获得序列与参考序列完全一致。*FAT-2* 基因编码区全长 1 131 bp，编码 377 个氨基酸的蛋白质。为了实现 *FAT-2* cDNA 的高效表达，根据哺乳动物密码子偏好特性，利用重叠 PCR 方法对编码区 2 个密码子进行了优化 (20 位的 Pro: CCG→CCC，202 位的 Arg: CGT→CGC) (图 2a，表 1)。

Table 1 Primers used for *FAT-2* codon modification and Northern blot

Name	Sequences
P1-F	5' CCAGAAAGCTTAAGATGACAATCGCTACAA 3'
P1-R	5' ACTGATGGAA GCTCGGGTAC 3'
P2-F	5' ACAATCAAGGTACCCGAGCT 3'
P2-R	5' TGCACACTTGACGCGATCCT 3'
P3-F	5' ACTACTGAGGATCGCGTCAA 3'
P3-R	5' CCACTCTAGATTATTGAGCC TTCTTAGCCT 3'
Actb F	5' GTCGTACCACTGGCATTGTG 3'
Actb R	5' TGCTTGCTGATCCACATCTC 3'

利用引物上添加的 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点，最后将目的片段连至真核表达载体 pBudCE4.1 (Invitrogen 公司) 构建成 pBudCE-*FAT2* 载体 (5 692 bp)，*FAT-2* 由 CMV 启动子驱动表达 (图 2b)。

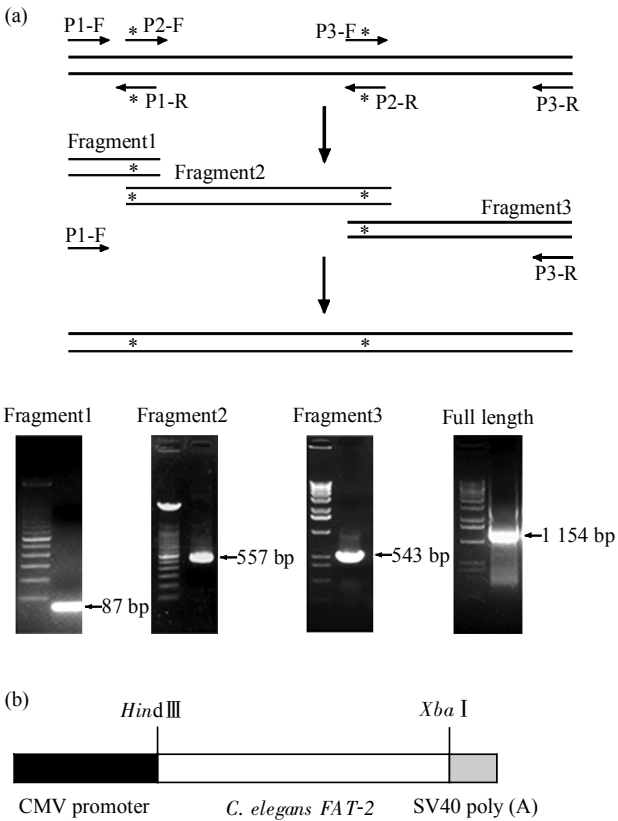


Fig. 2 Modification of codon usage and construction of eukaryotic expression vector pBudCE-*FAT2*

(a) Modification of codon usage using overlapping PCR. Synonymous mutations were introduced in primers, three fragments were amplified with three pairs of primers (see Table 1). Fragments were purified and then assembled by overlapping PCR. (b) *FAT-2* gene was fused to pBudCE4.1 vector under the control of CMV promoter.

2.2 细胞转染和筛选

真核表达载体 pBudCE-*FAT2* 经限制性内切酶 *Nhe* I 线性化后转染细胞。转染 3 天后，用 500 mg/L 的 Zeocin 筛选细胞 9 天，筛选后增殖细胞，获得阳性细胞克隆群。pBudCE4.1 空载体和连有报告基因的载体 pBudCE4.1/lacZ/CAT 分别作为阴性和阳性对照载体同步转染。为了判断细胞的转染效率和筛选效率，我们在细胞转染后和筛选增殖后用 X-gal 对 pBudCE4.1/lacZ/CAT 转染的细胞进行染色。阳性细胞表达的 β -半乳糖苷酶可以将 X-gal 转化为蓝色的产物，转染后 3 天，对 pBudCE4.1/lacZ/CAT 转染细胞进行 X-gal 原位染色 (图 3)，由图 3 可知，线

性 DNA 转染效率低于 20%，但 pBudCE4.1/lacZ/CAT 转染细胞经 Zeocin 筛选并增殖后进行 X-gal 原位染色，大部分细胞(大于 95%)染成蓝色，未变蓝的细胞可能是被抗生素杀死的细胞残骸。X-gal 染色结果显示，线性 DNA 转染效率非常低，但是 500 mg/L 的 Zeocin 筛选 9 天后，阴性细胞全部杀死，能够得到接近 100% 阳性细胞群。

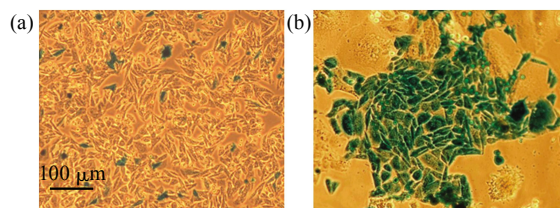


Fig. 3 Photomicrographs showing gene-transfer efficiency CHO cells transfected with positive control pBudCE4.1/lacZ/CAT, (a) X-Gal staining of cells three days posttransfection. (b) X-Gal staining of propagated cells after selection with 500 mg/L Zeocin for 9 days.

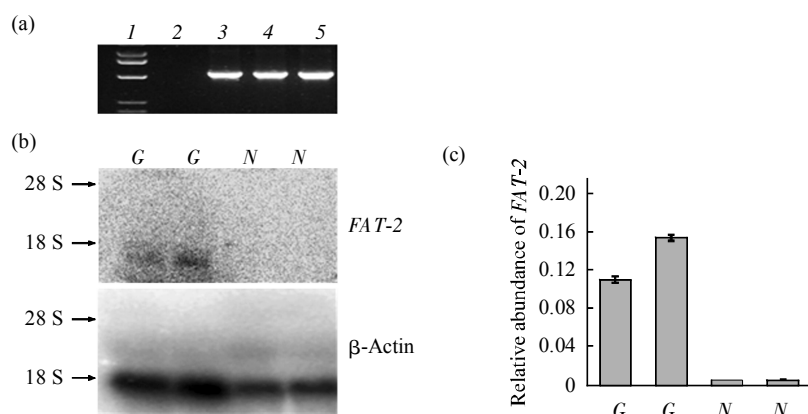


Fig. 4 Expression of *FAT-2* in CHO cells

(a) PCR screen of transfected cells with *FAT-2* specific primers. 1: DNA molecular marker; 2: Genome of pBudCE4.1 transfected cells; 3, 4: Genome of pBudCE-*FAT-2* transfected cells; 5: Positive control. (b) Northern blot analysis of the expression of *FAT-2* in transfected cells. G: pBudCE-*FAT-2* transfected cells, N: pBudCE4.1 transfected cells. (c) Relative abundance of *FAT-2* was determined by densitometry values obtained by three scanning of each lane of the Northern blot.

2.4 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶催化亚油酸的合成

$\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶催化油酸(18:1n-9)在 $\Delta 12$ 位上脱氢生成亚油酸(18:2n-6)(图 1)，为了验证表达的 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶是否具有活性，我们分析了阳性细胞和正常细胞的脂肪酸组成及含量(表 2) (2 次不同转染重复，4 次细胞脂肪酸提取和气相色谱分析)。气相色谱分析结果表明：pBudCE-*FAT-2* 转染细胞中亚油酸(C18:2n-6)含量极显著提高($P < 0.01$)(图 5)。pBudCE4.1(空载体)转染的对照细胞，其亚油酸含量为 3.1%，而 *FAT-2* 转染的细胞中亚油酸含量提高到 7.5%，是对照组的 2.4 倍。相应

2.3 *FAT-2* 基因的整合与表达

通过细胞稳定转染并筛选获得阳性细胞群后，为了鉴定稳定转染细胞中 *FAT-2* 基因是否整合并转录，我们进行了 PCR 分析和 RNA 印迹鉴定。*FAT-2* 基因 cDNA 特异引物扩增细胞基因组并测序，结果显示 pBudCE-*FAT-2* 转染细胞的基因组整合了 *FAT-2* cDNA (图 4a)。对于 2 次重复转染的细胞进一步提取细胞总 RNA，进行 RNA 印迹分析，以 β -actin 作内参(图 4b, c)。2 次 RNA 印迹结果显示，pBudCE-*FAT-2* 转染细胞中有 *FAT-2* mRNA 的转录(约 1.4 kb)，而在 pBudCE4.1 空载体转染细胞中没有检测到信号(每次结果均有 2 个样品重复，每个样品总计 4 个重复，本文中只显示了一次代表性结果)。上述结果表明，pBudCE-*FAT-2* 转染的 CHO 细胞中，*FAT-2* cDNA 稳定整合至细胞基因组上，并且表达。

地，转基因细胞中油酸含量降低。为了判断载体骨架是否对细胞脂肪酸含量产生影响，我们分析了普通 CHO 细胞的脂肪酸组成，结果显示，普通 CHO 细胞和 pBudCE4.1(空载体)转染细胞的脂肪酸含量除肉豆蔻油酸(C14:1)外，其他各种脂肪酸均无极显著差异，结果说明转染空载体对细胞脂肪酸组成没有影响，阳性细胞亚油酸含量的增加是由于 *FAT-2* 在细胞中表达并起作用。上述实验结果证明，线虫 *FAT-2* cDNA 可以在 CHO 细胞中表达并具有酶的催化活性，*FAT-2* 的表达显著提高了哺乳动物细胞中的亚油酸含量。

Table 2 Fatty acid composition of lipids in transfected cells

Total fatty acids	CHO(mol%)	Vector control(mol%)	FAT-2(mol%)	Post hoc significant between groups
C14 : 0	3.44±0.18	3.08±0.04	2.99±0.12	
C14 : 1	0.04±0.00	0.06±0.00	0.05±0.00	C-V
C16 : 0	26.82±0.49	24.86±0.23	24.46±1.55	
C16 : 1	3.25±0.04	4.49±0.51	2.65±0.16	V-F
C18 : 0	17.22±0.16	16.29±0.40	18.64±1.55	
C18 : 1n-9	29.49±0.09	27.86±1.49	25.38±0.71	
C18 : 2n-6	3.02±0.03	3.11±0.01	7.51±0.43	C-F, V-F
C18 : 3n-6	0.42±0.00	0.46±0.00	0.38±0.03	V-F
C18 : 3n-3	0.17±0.02	0.50±0.24	0.37±0.03	
C20 : 0	0.53±0.01	0.43±0.01	0.59±0.12	
C20 : 1n-9	1.19±0.03	1.09±0.04	1.61±0.21	
C20 : 2n-6	0.20±0.02	0.23±0.04	0.57±0.04	C-F, V-F
C20 : 3n-3	0.93±0.04	0.99±0.04	0.98±0.12	
C20 : 4n-6	5.57±0.17	6.58±0.55	5.41±0.58	
C20 : 5n-3	0.91±0.01	1.06±0.05	0.66±0.11	V-F
C22 : 4n-6	1.16±0.04	1.71±0.21	1.78±0.38	
C22 : 5n-3	2.82±0.17	3.60±0.39	3.03±0.57	
C22 : 6n-3	2.81±0.15	3.58±0.45	2.96±0.44	

Values for four measurements are expressed as the $\bar{x} \pm s$. The data obtained from each experiment were subjected to an ANOVA, which was followed by LSD. Statistically significant ($P < 0.01$) of Post hoc comparisons between groups are showing. C, CHO; V, vector control; F, FAT-2 transgenic cells.

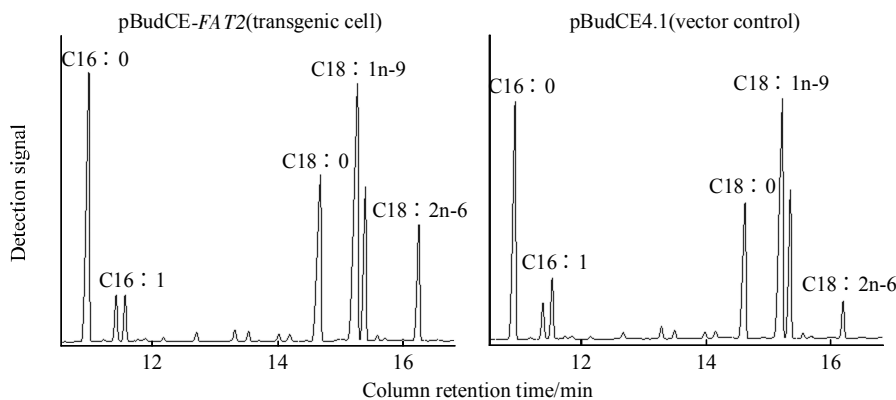


Fig. 5 Partial gas chromatograph traces showing fatty acid profiles of total cellular lipids extracted from the control cells transfected with pBudCE4.1 and the cells transfected with pBudCE-FAT2

3 讨 论

亚油酸是合成许多长链多不饱和脂肪酸的前体物质，但是哺乳动物由于缺乏 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶而不能合成亚油酸，亚油酸必需从食物中获得。本实验在哺乳动物细胞中表达了线虫的 *FAT-2* cDNA，基因的表达导致细胞中亚油酸含量显著提高。线虫能把从大肠杆菌中摄取的饱和脂肪酸转化成成长链多不饱和脂肪酸^[8,9]，具有长链多不饱和脂

肪酸合成所需的全部脂肪酸脱氢酶。编码 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶的基因 *FAT-2* 已被克隆并在酵母中表达^[9]，*FAT-2*脂肪酸脱氢酶具有脂肪酸脱氢酶所共有的 3 个保守的组氨酸簇，C 端的 KAKKAQ 结构和许多内质网膜上的蛋白质一致。 *FAT-2*脂肪酸脱氢酶和拟南芥 *FAD2*、*FAD3* 以及线虫的 *FAT-1* 脂肪酸脱氢酶结构类似，*FAD2*、*FAD3* 脂肪酸脱氢酶以 acyl-lipid 为底物，据催化产物推测 *FAT-1* 也是以 acyl-lipid 为底物^[10~12]，研究发现，异源表达

的脂肪酸脱氢酶对膜上的磷脂具有更直接的作用, 脂肪酸变化最大, 由此推测脂肪酸脱氢酶可能催化膜上的磷脂, 磷脂通过 acyl-CoA 转化为甘油三脂, 所以甘油三脂的脂肪酸变化比磷脂小. FAT-2 和 FAT-1 来源相同, 推断其作用底物相同.

为了分析空载体转染是否对细胞的脂肪酸组成有影响, 我们比较了 CHO 细胞和空载体转染细胞的脂肪酸含量, 结果表明, 除肉豆蔻油酸外其他各种脂肪酸均无显著差异, 肉豆蔻油酸含量非常低, 易于产生测定系统误差, 因而不具有统计意义. 脂肪酸分析结果说明载体转染细胞没有改变细胞的脂肪酸组成. 哺乳动物细胞自身不能合成亚油酸, 但是细胞培养液中的成分可以改变细胞的脂肪酸组成^[13~15], 胎牛血清中含有少量的亚油酸, 马血清含有大量的亚油酸^[16], 为了保证实验结果的准确性, 我们采用同一批次的胎牛血清, 并严格按照 10% 的浓度添加到培养基中.

本实验 RNA 印迹结果显示, 相对于 β -actin 的表达丰度, FAT-2 的表达量相对较低. 一方面可能是由于不同探针杂交效率的差异所致, 另一方面可能是由于转入基因是以 cDNA 形式转入, 缺乏一些基因高效表达的调控元件, 从而导致基因表达量不高. 但是, 线虫 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶的转入及其表达的确使细胞中亚油酸(C18: 2n-6)含量有了极显著提高, 而油酸含量相应降低. FAT-2 脂肪酸脱氢酶可能也受到反馈抑制调节^[17], 在底物和产物会有一个平衡状态, 因而转基因细胞中仍然含有大量的油酸. 亚油酸经 Δ -9 延伸酶催化生成 C20: 2n-6, 从而提高了 C20: 2n-6 的含量. 亚油酸在细胞中的增多抑制了 Δ -6 脂肪酸脱氢酶活性^[18], 所以虽然亚油酸底物增加, C20: 4n-6 的含量却降低了. Kao 等^[11]研究发现, $\Delta 12$ 和 ω -3 脂肪酸脱氢酶主要改变了磷脂中脂肪酸的含量. 细胞膜脂肪酸的改变影响细胞膜的流动性, 因而细胞膜上磷脂的变化只能维持数天^[19], 可以通过互相转化而长期处于稳定状态. 磷脂中亚油酸不断累积并转化为甘油三脂, 有利于 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶的催化反应, 这也是稳定表达 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶之有利之处.

pBudCE4.1 具有 2 个启动子, 可以连接 2 个基因并同时表达, FAT-2 的表达可使哺乳动物合成亚油酸(ω -6 脂肪酸), 载体还可以连接一个 ω -3 脂肪酸脱氢酶基因, 使其同时在哺乳动物中表达, 从而能使哺乳动物自身合成更有利于人体健康的 ω -3 多不饱和脂肪酸. 本实验中, 线虫 FAT-2 cDNA 在哺

乳动物细胞中稳定表达, 进一步证明低等动物脂肪酸脱氢酶能利用哺乳动物体内的底物催化合成多不饱和脂肪酸, 为将来生产自合成长链多不饱和脂肪酸的转基因家畜奠定了基础.

致谢 感谢北京生命科学研究所的孙银燕博士赠送线虫 RNA.

参 考 文 献

- 1 Stubbs C D, Smith A D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **779**(1): 89 ~ 137
- 2 Elias P M, Brown B E, Ziboh V A. The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function. *J Invest Dermatol*, 1980, **74**(4): 230 ~ 233
- 3 Funk C D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 2001, **294**(5548): 1871 ~ 1875
- 4 Spychalla J P, Kinney A J, Browse J. Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(4): 1142 ~ 1147
- 5 Peyou-Ndi M M, Watts J L, Browse J. Identification and characterization of an animal delta(12) fatty acid desaturase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, 2000, **376**(2): 399 ~ 408
- 6 Saeki K, Matsumoto K, Kinoshita M, *et al.* Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(17): 6361 ~ 6366
- 7 Lai L, Kang J X, Li R, *et al.* Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2006, **24**(4): 435 ~ 436
- 8 Hutzell P A, Krusberg L R. Fatty acid compositions of *Caenorhabditis elegans* and *C. Briggsae*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1982, **73**(3): 517 ~ 520
- 9 Satouchi K, Hirano K, Sakaguchi M, *et al.* Phospholipids from the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lipids*, 1993, **28**(9): 837 ~ 840
- 10 Spychalla J P, Kinney A J, Browse J. Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(4): 1142 ~ 1147
- 11 Kao B T, Lewis K A, DePeters E J, *et al.* Endogenous production and elevated levels of long-chain n-3 fatty acids in the milk of transgenic mice. *J Dairy Sci*, 2006, **89**(8): 3195 ~ 3201
- 12 Morimoto K C, Van Eenennaam A L, DePeters E J, *et al.* Endogenous production of n-3 and n-6 fatty acids in mammalian cells. *J Dairy Sci*, 2005, **88**(3): 1142 ~ 1146
- 13 Wisniewski B J, Williams R E, Fox C F. Manipulation of fatty acid composition in animal cells grown in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70**(12): 3669 ~ 3673
- 14 Glaser M, Ferguson K A, Vagelos P R. Manipulation of the phospholipid composition of tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci*

- USA, 1974, **71**(10): 4072~4076
- 15 Williams R E, Wisnieski B J, Rittenhouse H G, *et al.* Utilization of fatty acid supplements by cultured animal cells. *Biochemistry*, 1974, **13**(9): 1969~1977
- 16 Stoll L, Spector A. Changes in serum influence the fatty acid composition of established cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 1984, **20**(9): 732~738
- 17 Bossie M A, Martin C E. Nutritional regulation of yeast $\Delta 9$ fatty acid desaturase activity. *J Bacteriol*, 1989, **171** (12): 6409~6413
- 18 Brenner R R. Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Prog Lipid Res*, 1981, **20**: 41~47
- 19 Spector A, Denning G, Stoll L. Retention of human skin fibroblast fatty acid modifications during maintenance culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1980, **16**(11): 932~940

Transgenic Production of Polyunsaturated Fatty Acids in Mammalian Cells*

KONG Ping, DU Zhuo, TANG Bo, MENG Qing-Yong, LI Ning**

(China Agricultural University, State Key Laboratory of Agrobiotechnology, Beijing 100193, China)

Abstract Linoleic acid (C18 : 2n-6) and α -linolenic acid (C18 : 3n-3) are found widely in fungi, plants and some lower animals. However, they can not be synthesized in mammals due to lack of $\Delta 12$ and ω -3 fatty acid desaturases. To enable endogenous production of essential fatty acids in mammalian cells, here the stable expression of a *Caenorhabditis elegans* gene *FAT-2* encoding $\Delta 12$ fatty acid desaturase in CHO cells was reported. First, the *FAT-2* coding sequence was cloned by RT-PCR. To facilitate high level synthesis of heterogeneous protein, the codon usage of the fatty acid desaturase genes was optimized according to the codon preference of mouse by site-directed mutagenesis, 2 synonymous mutations were introduced into *FAT-2* gene by overlapping PCR. The codon-modified gene was finally fused to pBudCE4.1 vector (Invitrogen) under the control of CMV promoter. The expression vector pBudCE-*FAT2* was linearized with *Nhe* I , and then transfected CHO cells, the cells were under Zeocin selection for nine days and then propagated, then the transfected cells were harvested. The genome and total RNA were isolated for PCR and Northern blot analysis. The results revealed that *FAT-2* gene has been integrated into the genome of CHO cells and expressed properly. Fatty acids of total cellular lipids were analyzed by gas chromatography. The results indicate that the expression and function of Δ -12 fatty acid desaturase resulted in accumulation of linoleic acid. The levels of linoleic acid in transgenic cells were 2.4-fold higher than those in wild-type cells. The moderate linoleic acid in CHO cells was derived from cell culture media uptaken by cell membrane. The results demonstrate that a heterogenous desaturase gene can function well in mammalian cells and prove that transgenic approach is an efficient strategy for changing fatty acid composition of mammals.

Key words linoleic acid, polyunsaturated fatty acids, essential fatty acids, $\Delta 12$ fatty acid desaturase, transgene

*This work was supported by a grant from The National High Technology Research and Development Program of China (2002AA206111).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62733323, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

Received: March 20, 2008 Accepted: May 21, 2008