

Elov15 转基因果蝇产生更长链的脂肪酸

王蓝晨, 唐勤敏, 何宇锋, 王颖, 杨仕赛, 朱贵明

贵州医科大学 生物与工程学院, 贵州 贵阳 550025

王蓝晨, 唐勤敏, 何宇锋, 等. *Elov15* 转基因果蝇产生更长链的脂肪酸. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2171–2180.

Wang LC, Tang QM, He YF, et al. Transgenesis of *Drosophila melanogaster* with an *Elov15* gene enables the production of longer-chain fatty acids. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2171–2180.

摘要: 大多数昆虫体内的多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 主要是碳链长为 18 个碳原子的多不饱和脂肪酸 (C18-PUFAs), 几乎不含价值更高、生物活性更强的 C20、C22 等长链的多不饱和脂肪酸。文中利用黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Fruit fly) 作为生物模型, 将来源于小鼠的 $\Delta 6$ -脂肪酸延长酶 *Elov15* 基因优化后转移到果蝇中使其表达。结果表明通过显微注射法成功将含有 *Elov15* 基因的载体导入果蝇胚胎中, 在荧光显微镜下检测到在果蝇整个发育阶段均有增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 表达, 同时 *Elov15* 基因的表达显著地促使果蝇体内 C18 多不饱和脂肪酸向着更长链多不饱和脂肪酸的生物合成方向转化。使用转基因技术得到体内富含 C20、C22 等长链多不饱和脂肪酸的转基因果蝇模型, 将为进一步开展果蝇多不饱和脂肪酸生物合成的机制提供研究基础。

关键词: 多不饱和脂肪酸, 果蝇, 脂肪酸延长酶, 转基因, 气相色谱

Transgenesis of *Drosophila melanogaster* with an *Elov15* gene enables the production of longer-chain fatty acids

Lanchen Wang, Qinmin Tang, Yufeng He, Ying Wang, Shisai Yang, and Guiming Zhu

School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: In most insects, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are mainly polyunsaturated fatty acids with a carbon-chain length less than 18 carbon atoms, hardly any long-chain polyunsaturated fatty acids such as C20 and C22 that are more valuable and bioactive. This study, by using *Drosophila melanogaster* (Fruit fly) as a model organism, optimized the $\Delta 6$ -fatty acid elongase enzyme *Elov15* gene from mice and transferred it to fruit flies for expression. Vectors containing *Elov15* gene were successfully injected into drosophila embryo through the microscopic injection. There were enhanced green fluorescent proteins expressed in the whole developmental stage of *Drosophila* be means of fluorescence microscope. At the same time, expression of *Elov15* gene significantly contributed to the transformation of fruit flies C18-polyunsaturated fatty acids in the

Received: February 5, 2020; **Accepted:** May 11, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No.31560253), Guizhou Provincial Department of Education Major Research Group for Innovation Groups (No. Qian Jiao He KY[2016]031), Guizhou Medical University Doctoral Research Startup Fund (No. Qian J2014 Bohe 001).

Corresponding author: Guiming Zhu. E-mail: zgm926@sina.com

国家自然科学基金 (No. 31560253), 贵州省教育厅创新群体重大项目 (No. 黔教合 KY 字[2016]031), 贵州医科大学博士科研启动基金 (No. 黔 J2014 博合 001) 资助。

网络出版时间: 2020-05-27

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200526.1517.001.html>

body towards the biosynthesis of longer-chain polyunsaturated fatty acids. The transgenic fruit fly model rich in long-chain polyunsaturated fatty acids such as C20 and C22 were obtained, providing a basis for further research on biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in fruit flies.

Keywords: polyunsaturated fatty acid, fruit fly, fatty acid elongase, transgenic, gas chromatography

多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 为一独特的生物活性物质, 因其特殊的分子结构及重要的生物学作用而受到广泛的关注和研究^[1-2]。其生物学功能以及生物合成机制在哺乳动物中已有较深刻的阐释^[3], 但在昆虫类生物中的研究较为稀缺, 而实际上大多数昆虫所含有的多不饱和脂肪酸为 C18-PUFAs, 即亚油酸或 α -亚麻酸, 其含量最高可达到 45% 左右 (如鞘翅目昆虫 *Oryctes owariensis* 等)^[4-6]。因此, 昆虫来源的脂肪酸具有潜在的开发优势。

果蝇 *Drosophila melanogaster* 作为一种经典的模式生物已经有 100 多年的历史, 果蝇具有繁殖能力强、体积小、生命周期短 (约两周)、易于培养以及便于作表型分析等特点, 在发育生物学、遗传学、营养学和神经科学等领域研究中都得到了广泛的应用^[7]。果蝇具有类似脂肪的身体组织和脂质运输系统, 在生理上更接近人体, 同时果蝇的脂肪体是一个代谢中心, 类似于脊椎动物的肝脏^[8-9]。因此, 果蝇是研究多不饱和脂肪酸非常理想的模型^[10]。相关研究表明, 果蝇体内不需要也不合成 18C 以上的多不饱和脂肪酸^[11], 但果蝇能从含有多不饱和脂肪酸的食物中吸收多不饱和脂肪酸并将其进行转化^[12]。因此, 利用果蝇研究 PUFAs 及其衍生物, 或许可以提供新的视角, 拓宽对 PUFAs 及其代谢产物对生物体生理功能的了解。

脂肪酸的碳链延长反应的一类延长酶, 是参与 C18-C22 PUFAs 合成的关键酶, 它催化供体的两个碳原子引入 PUFAs 碳链中增加其碳链长度。生物体的膜脂与贮脂都包含有特定组成的脂肪酸, 而其链长的不同就是由催化不同链长延伸反应的脂肪酸延长酶所控制的。哺乳动物的 ELOVL 基因家族高度保守, 表达产物为微粒体酶^[13]。在该

基因家族中, *Elovl5* 参与延长 C16、C18 单不饱和脂肪酸 (Monounsaturated fatty acids, MUFAs) 和 C18、C20、C22 PUFAs 的碳链, 是高不饱和脂肪酸 (Highly unsaturated fatty acids, HUFAs) 生物合成途径中的关键酶^[14-15]。在昆虫中, 迄今也没有发现这些与多不饱和脂肪酸合成代谢相关的去饱和酶和延长酶, 故一般均认为昆虫自身并无代谢合成多不饱和脂肪酸的能力^[10]。我们通过 GenBank 中现有的昆虫基因组测序数据分析, 包括果蝇等昆虫体内都不存在这些去饱和酶和延长酶的编码基因。

本研究通过基因工程的方法, 在果蝇中重新建立多不饱和脂肪酸生物合成代谢的途径, 即利用转基因技术将 $\Delta 6$ -脂肪酸延长酶 *Elovl5* 基因 (GenBank ID: 68801) 转移到果蝇体内, 添加底物后使其不仅能够内源性合成亚油酸以及 α -亚麻酸等短链多不饱和脂肪酸, 也能够合成 C20、C22 等长链多不饱和脂肪酸, 进而研究清楚转基因果蝇对 C20 及更长链 PUFAs 的代谢特性, 可为果蝇及其他昆虫油脂资源尤其是多不饱和脂肪酸的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

研究所用果蝇为黑腹果蝇 (W1118), 饲养、保种于本实验室昆虫人工气候箱中, 培养条件为恒温 25 °C、湿度 60%、光照周期 12L : 12D。

Q5[®]超保真 2 \times 预混液、限制性内切酶、小牛肠碱性磷酸酶 (CIP)、T4 DNA 连接酶购自 NEB。DNA Marker、2 \times Taq PCR MasterMix II、纯化回收试剂盒、DNA/RNA 共提试剂盒、质粒提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、大肠杆菌 *Escherichia coli*

DH5 α 、氨苄青霉素 (Ampicillin) 购于天根生化科技 (北京) 有限公司。14% 三氟化硼 (BF₃)、正己烷、丙酸购于 Sigma-ALDRICH。氯化钠、酵母粉及胰蛋白胨购于 Oxoid 公司。琼脂糖购于 Biosharp 公司, 果蝇培养基购于海博生物。脂肪酸甲酯标准品 PUFA No.3、Supelco 37 Component FAME Mix 等购于 Sigma-Aldrich 公司, α -亚麻酸使用紫苏籽油(α -亚麻酸含量为 66.7%) 代替, 购于长春长白工坊。二氧化碳、氮气购于市场供应商。引物合成及基因测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

果蝇培养基配制: 称取海博生物果蝇培养基 20.87 g, 加热溶解于 100 mL 蒸馏水中, 待稍冷加入 0.65 mL 丙酸混匀, 趁热将培养基装入已灭菌的培养瓶中, 备用。

1.2 方法

1.2.1 *Elovl5* 基因表达载体构建

构建含有来源于小鼠的 $\Delta 6$ -脂肪酸延长酶基因 (*Elovl5*, 编码 300 个氨基酸) 表达载体, 利用 PCR 技术从本实验室保存的 pcDNA3.1-*Elovl5* 质粒中扩增其 *Elovl5* 基因片段, 以 E5-s/E5-a 为引物, 片段大小为 900 bp, 程序为: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 64 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 进行 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 2 min, 4 °C 保存。扩增产物经凝胶电泳检测后进行回收, 回收后使用 *Sma* I 与 *Sal* I 进行双酶切, T4 DNA 连接酶连入由本实验室前期构建的中间质粒 pUC57-Prom A4-SV40 polyA, 该载体含有家蚕 BmActin 启动子, 可用于克隆各个待表达的目的基因。连接后得到 pUC57-Prom A4-*Elovl5*-SV40 polyA, 酶切并测序, Blast 程序比对后再从该片段中扩增其 PromA4-*Elovl5*-SV40 polyA 片段, 以 pBA-s/pBA-a 为引物, 扩增程序为: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s; 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 50 s, 进行 30 个循环; 72 °C 延伸 2 min, 4 °C 保存。扩增产物经凝胶电泳检测后纯化回收, *Asc* I 单酶切后使用小牛肠碱性磷酸酶 (CIP) 去磷酸

化, 连入带有绿色荧光蛋白的转座子载体 piggyBac-[3 \times P3-EGFP], 得到果蝇转座子载体 pBac[3 \times P3-EGFP]-Prom A4-*Elovl5*-SV40 polyA, 经筛选和酶切鉴定后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 序列分析利用 Blast 程序完成。引物序列见表 1。

1.2.2 转基因荧光分析及饲养

将构建成功的带有 *Elovl5* 片段的转座子载体 pBac[3 \times P3-EGFP]-Prom A4-*Elovl5*-SV40 polyA、转座酶辅助质粒 pH A3PIG, 送至中国科学院生物化学与细胞生物学果蝇资源与技术平台在果蝇胚胎中进行显微注射。孵化后为 G₀ 代转基因果蝇, 将其分出单只雌、雄蝇与野生型果蝇杂交, 产生杂交的转基因果蝇, 培育至稳定遗传。随机挑取上述 *Elovl5* 转基因果蝇的卵、幼虫及成蝇, 成蝇期果蝇使用 CO₂ 麻醉, 使用倒置荧光显微镜, 采用波长 460–490 nm 的激发光, 筛选出在眼睛或其他部位特异激发绿色荧光的转基因阳性个体, 并观察果蝇各个时期的荧光表达, 对基因的转入与否进行初步分析。同时将转基因果蝇与对照组果蝇培养基中均添加含有浓度为 0.5% 的 α -亚麻酸 (ALA, C18-PUFAs) 的紫苏籽油作为底物, 经果蝇摄食后进行后续多不饱和脂肪酸 GC 检测。

1.2.3 RT-PCR 鉴定目的基因表达

收集转基因果蝇与对照组果蝇各 100 只用于 RT-PCR 实验。总 DNA/RNA 提取按照天根生化科技 (北京) 有限公司相关说明书进行。果蝇 RNA 提取后先进行定量, 再将 RNA 中的 mRNA 反转录成 cDNA, 取 1 μ L 反转录产物与果蝇总 DNA 进行 PCR 检测, 使用引物为 E5-s/E5-a, 扩增程序为: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 64 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 30 s, 进行 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 2 min, 4 °C 保存。RNA 内参引物为 mGapd-s/mGapd-a, 扩增程序同上, PCR 反应结束后, 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 观察目的基因的整合情况及其表达。引物序列见表 1。

表 1 PCR 实验中使用的引物

Table 1 Primers used in PCR experiments

| Primer name | Primer sequence (5'-3') |
|-------------|--|
| E5-s | ATTCCCGGATGGAACATTTTGATGCAT CACTTAG |
| E5-a | TTAGTCGACTCAATCCTTCCGCAGCTT CC |
| pBA-s | TTAGGCGCGCCTCATCTTGTCACACCT ACATCTTACTA |
| pBA-a | TTAGGCGCGCCATTACGCGTTAAGAT ACATTGATG |
| mGapd-s | CTTGAACGGTAAACTCACTGGTATGG |
| mGapd-a | TGGAGACGACTTCTTCATCGGTGTAG |

1.2.4 果蝇多不饱和脂肪酸的提取和甲脂化

取摄食 4 周 0.5% 的 α -亚麻酸 (ALA, C18-PUFAs) 的果蝇, 未进行性别区分, *Elovl5* 转基因型果蝇与对照组果蝇各 150 只, 置于微量反应瓶, 进行组织匀浆。加入 1 mL 14% 的三氟化硼 (含 0.005% BHT), 充分混匀并充入氮气, 盖紧盖子 100 °C 加热反应 1 h, 冷却后加 1 mL 双蒸水和 1 mL 正己烷, 充分混匀, 将反应瓶中液体转移至 5 mL 玻璃离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清, 使用氮气吹干浓缩, -20 °C 保存, 每组进行 3 次重复试验。

1.2.5 GC 分析

本研究使用的分析仪器为 HP5890 气相色谱仪, 色谱柱为 Omegawax 毛细管柱 (Supelco 30 m \times 0.25 mm I.D.), 检测器: FID; 进样器: 分流进样分流比为 20:1; 柱温: 200 °C; 进样器温度: 260 °C; 检测器温度为 280 °C。运行程序升温条件, 初始炉温为 200 °C, 以 1.5 °C/min 升温至 260 °C, 载气为氮气 (99.999%)。进样量: 1 μ L; 将样品与标准品在同一根色谱柱上用相同色谱条件进行分析, 获得二者色谱图后进行对照定性定量分析, 单个样品检测运行时间约为 40 min, 检测使用参数参考 Kang 等的报道^[16]。

1.2.6 图像采集及统计分析

图像采集处理: 用 N2000 色谱工作站采集图谱, 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甲酯标准样品来进行鉴定。采用

面积归一法求各色谱法的面积, 得出样品中各脂肪酸的含量, 每一种脂肪酸百分含量按其峰面积比所有脂肪酸面积总和而计算获得。脂肪酸含量等结果采用 $\bar{x} \pm s$ (算术平均值 \pm 标准方差) 表示。组间数据比较采用 Student's *t*-test, 以 $P < 0.05$ 作为统计学差异显著性的判断标准。

2 结果与分析

2.1 *Elovl5* 表达载体的构建

如图 1 所示, 从本实验室保存的 pcDNA3.1-*Elovl5* 质粒中扩增出 *Elovl5* 目的片段, PCR 产物长度 900 bp (图 2A)。纯化回收后同本实验室前期构建的中间质粒 pUC57-Prom A4-SV40 polyA 同时使用 *Sma* I 与 *Sal* I 进行双酶切, 后连接得到 pUC57-Prom A4-*Elovl5*-SV40 polyA, 大小为 4 594 bp, 经双酶切、测序鉴定, 后将其 Prom A4-*Elovl5*-SV40 polyA 扩增出来, PCR 产物小大为 1 884 bp, 纯化回收先进行 *Asc* I 单酶切后用小牛肠碱性磷酸酶 (CIP) 进行去磷酸化, 连入转座子表达载体 piggyBac-[3 \times P3-EGFP], 经过筛选和酶切鉴定获得阳性克隆, 测序比对目的基因未发生突变, 最终得到 piggyBac-[3 \times P3-EGFP]-Prom A4-*Elovl5*-SV40 polyA, 该载体大小为 8 384 bp (图 2B)。

2.2 转基因果蝇荧光分析

将构建的 piggyBac 转座子载体 pBac[3 \times P3-EGFP]-Prom A4-*Elovl5*-SV40 polyA 与辅助质粒 pHA3PIG 送至果蝇资源与技术平台进行显微注射后, 共获得 9 个转基因果蝇品系 (A0711-A0719), 将其培育至稳定遗传后, 分别挑选阳性果蝇个体, 于胚胎发育后期开始进行连续的荧光检测, 该载体中含有眼部特异性表达 3 \times P3 启动子, 观察发现在果蝇胚胎期时整个果蝇卵发出明显的绿色荧光 (图 3A、E), 幼虫的整个时期均有绿色荧光的表达 (图 3B、C、F、G), 到达果蝇成蝇期时只在其眼部观察到明显的绿色荧光 (图 3D、H), 结果表明该表达载体中增强型绿色荧光蛋白可在果蝇的整个生长阶段表达。

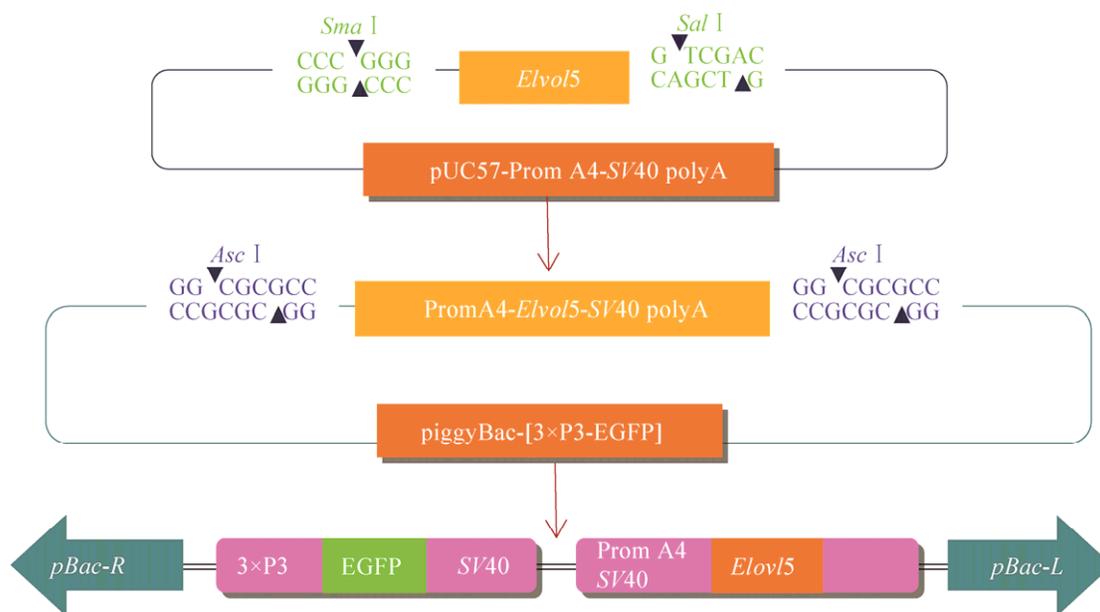


图 1 *Elov15* 表达载体构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the construction of *Elov15* transgene expression vector.

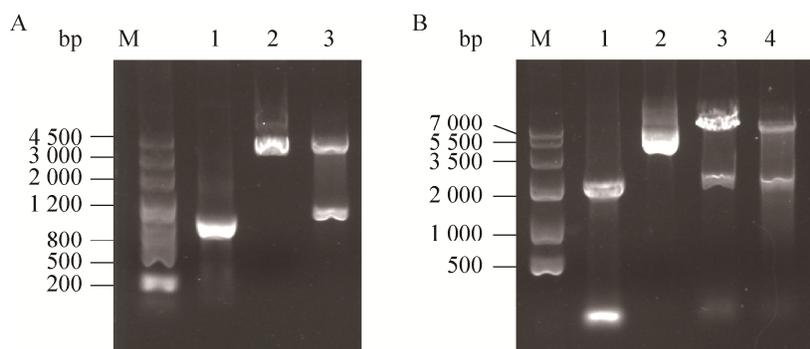


图 2 *Elov15* 转基因表达载体构建电泳图

Fig. 2 *Elov15* transgenic expression vector construction gel electrophoresis. (A) M: marker III; 1: PCR amplification of *Elov15* gene; 2: extracted plasmid recombinant; 3: restriction analysis by double cut with *Sma* I and *Sal* I. (B) M: marker IV; 1: PCR amplification of Prom A4-*Elov15*-SV40 polyA gene; 2: extracted plasmid recombinant; 3: restriction analysis by *Asc* I.

2.3 分子水平检测目的基因的整合及其表达

将果蝇培育至稳定遗传后,在荧光显微镜下已观察到明显的绿色荧光,说明表达载体已成功转入果蝇体内,此时收集 9 个品系转基因果蝇(A0711-A0719)与对照组果蝇(野生黑腹果蝇W1118)各取 100 只,同时提取总 DNA 与 RNA,用于 RT-PCR 分析。结果表明,在 9 个转基因品

系中, DNA 水平全部检测到目的基因,大小为 900 bp (图 4A),同阳性对照一致,外源基因已成功整合进入果蝇体内,由于昆虫转座系统的遗传效果存在不稳定性,本试验中在 RNA 水平只有 2 个转基因品系果蝇(A0712、A0718)成功表达目的基因,凝胶电泳检测与阳性对照大小一致(图 4B)。

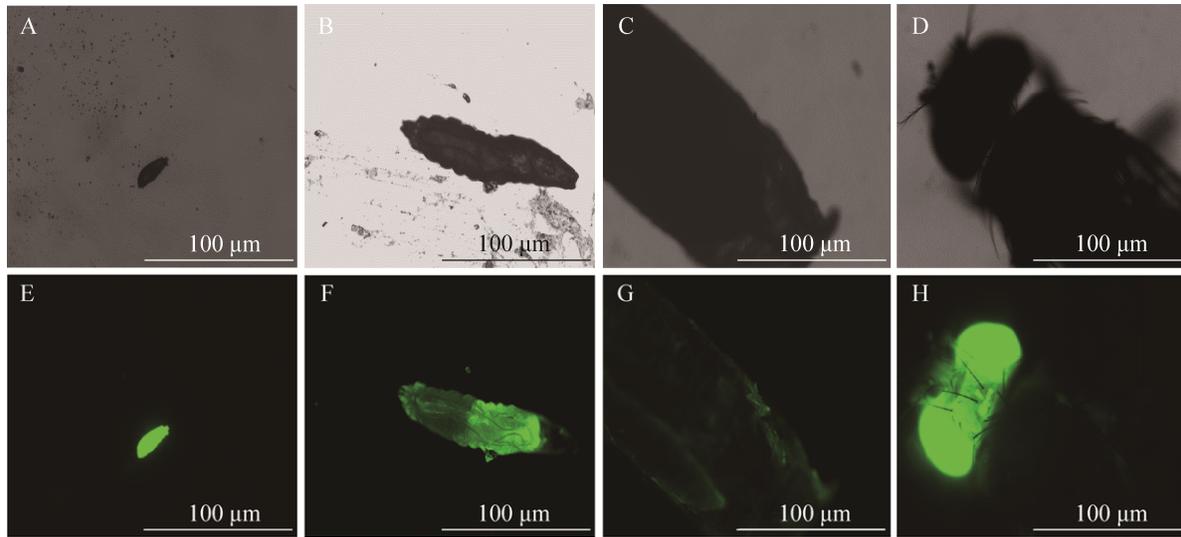


图3 转基因果蝇的绿色荧光蛋白检测

Fig. 3 Green fluorescent protein detection of transgenic fruit flies. A–D (under white light): Transgenic *Drosophila* eggs; transgenic *Drosophila* larva; transgenic *Drosophila* 3rd instar larva; transgenic *Drosophila* adult fly. E–H (under fluorescence): Transgenic *Drosophila* eggs; Transgenic *Drosophila* larva; Transgenic *Drosophila* 3rd instar larva; Transgenic *Drosophila* adult fly.

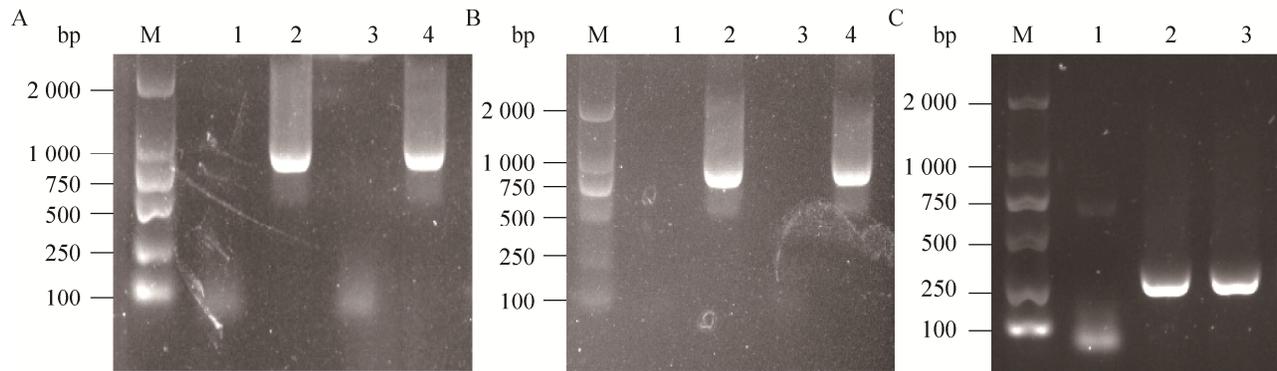


图4 目的基因在果蝇中的整合情况及其表达

Fig. 4 Integration and expression of target genes in *Drosophila*. (A) M: DNA marker D2000; 1: negative control; 2: positive control; 3: wild-type *Drosophila* DNA; 4: genetically modified *Drosophila* (A0712) DNA. (B) M: DNA marker D2000; 1: negative control; 2: positive control; 3: wild-type *Drosophila* RNA; 4: genetically modified *Drosophila* (A0712) RNA. (C) M: DNA marker D2000; 1: negative control; 2: wild-type *Drosophila* internal control; 3: transgenic *Drosophila* (A0712) internal control.

2.4 外源基因的表达提高果蝇体内 18C-PUFAs 向更长链脂肪酸转化

在分子水平通过 RT-PCR 的检测后, 确认 *Elovl5* 基因在转基因果蝇体内获得表达。提取摄食 4 周 0.5% 的 α -亚麻酸 (C18-PUFAs) 的转基因果蝇与对照组果蝇脂肪酸, 不分性别随机挑选,

利用 GC 进行检测并统计分析。结果如图 5 所示, 色谱图中横坐标为各种脂肪酸出现的保留时间, 不同的脂肪酸出现的时间不一样, 由此可将每种脂肪酸在 GC 图谱中区分开来 (图 5), 通过与标准样品对比就可以准确判定各个色谱峰所代表的不同脂肪酸的具体种类。GC 检测需具备已知标准

品, 将样品与标准品在同一根色谱柱上用相同色谱条件进行分析, 获得二者色谱图后进行对照定性定量分析, 每种色谱峰的高低则表明该脂肪酸的含量, 按照峰面积计算出它的含量, 进而可计算出每一种脂肪酸的百分含量 (表 2)。表中这些数据表明, 转基因果蝇 (A0712) 与野生型果蝇 (A0772) 相比, 转基因型果蝇 (A0712) 体内的 18C-PUFAs 相对减少 3%–4%, 而 C20-PUFAs 与更长链的 22C-PUFAs 出现从无到有的改变, 分别较对照组增加 2.8%、1.94%, 该结果表明在转基因果蝇中 *Elov15* 基因的表达显著地促使其体内 18C 多不饱和脂肪酸向着更长链多不饱和脂肪酸的生物合成方向转化。

3 总结与讨论

多不饱和脂肪酸是人体生命活动中不可或缺的重要物质, 尽管人体自身能够利用食物中的亚油酸 (18:2n-6) 和 α -亚麻酸 (18:3n-3) 分别合成花生四烯酸 (Arachidonic Acid, ARA)、二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic Acid, EPA) 以及二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 等长链 PUFAs, 但合成效率极低, 仅能满足人体最基本的需求^[17-18]。在当今广泛的、不当的食物结构模式 (即摄入过多的高度饱和的动物油脂和富含亚油酸的植物油脂) 下, 人体中 ω -3PUFAs 尤其是 DHA 以及 EPA 成为了营养短板, 从食物来源中

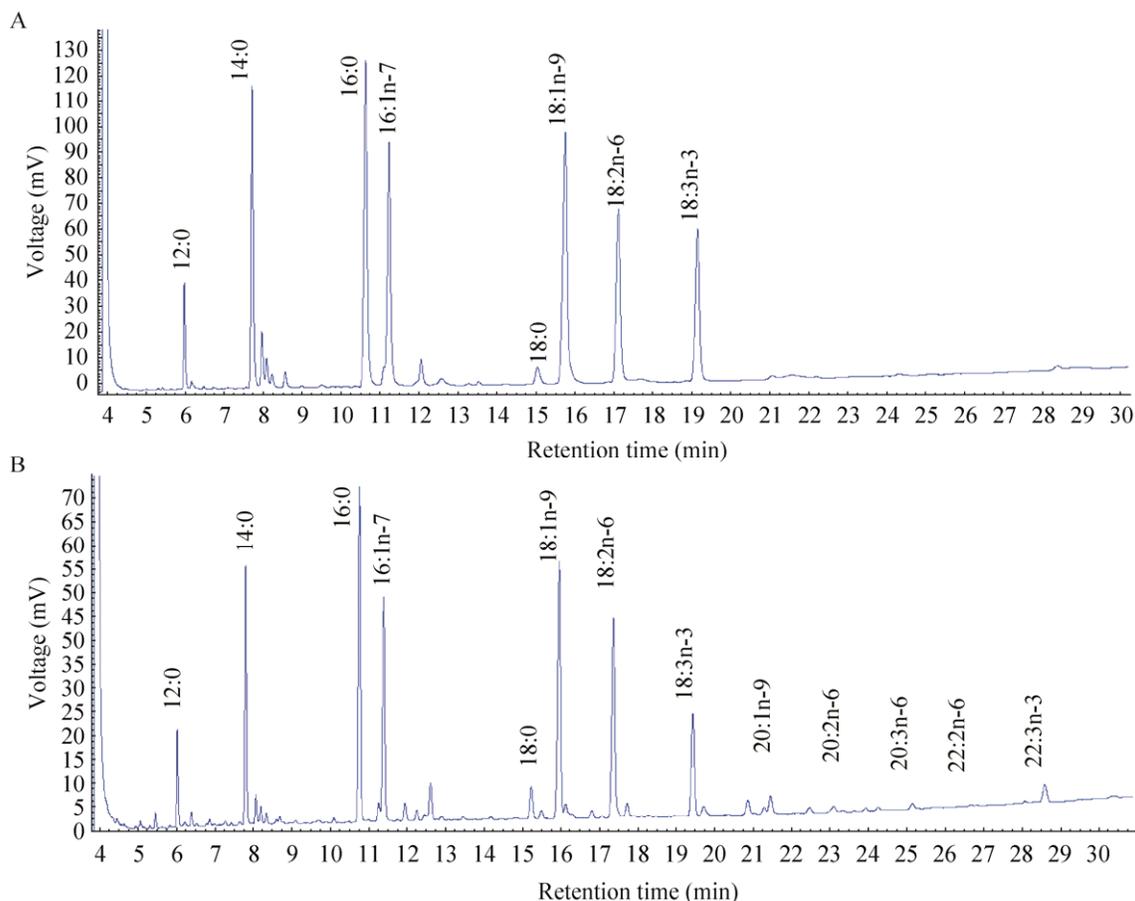


图 5 *Elov15* 转基因果蝇体内脂肪酸 GC 分析

Fig. 5 GC analysis of fatty acids in *Elov15* transgenic *Drosophila*. (A) Wild-type *Drosophila* (0.5% ALA) active. (B) A0712 *Elov15* transgenic *Drosophila* (0.5% ALA) active.

表 2 *Elov15* 转基因果蝇体内脂肪酸组成及含量变化
Table 2 Changes in fatty acid composition and content in *Elov15* transgenic *Drosophila*

| PUFAs | Control group | Test group |
|---------|-------------------------|-------------------------|
| 12:00 | 3.18±0.23 ^b | 3.85±0.27 ^a |
| 14:00 | 12.17±0.72 | 11.83±0.55 |
| 16:00 | 19.29±1.04 | 19.12±0.98 |
| 16:1n-7 | 15.16±0.62 ^a | 13.38±0.57 ^b |
| 18:00 | 1.74±0.16 ^b | 2.39±0.21 ^a |
| 18:1n-9 | 21.38±1.32 | 19.68±1.03 |
| 18:2n-6 | 14.24±0.81 ^b | 16.31±0.85 ^a |
| 18:3n-3 | 12.85±0.65 ^a | 8.70±0.59 ^b |
| 20:1n-9 | 0 | 1.60±0.22 ^a |
| 20:2n-6 | 0 | 0.68±0.21 ^a |
| 20:3n-3 | 0 | 0.52±0.09 ^a |
| 22:2n-6 | 0 | 0.15±0.05 ^a |
| 22:3n-3 | 0 | 1.79±0.24 ^a |

Notes: values are means of three measurements; values for each fatty acid with different superscript differ significantly ($P<0.05$) between wild-type *Drosophila* (Control group) and A0712 *Elov15* transgenic *Drosophila* (Test group).

补充 DHA、EPA 对于健康如防止心血管疾病、大脑的保健、防癌、抗炎症等非常重要^[19-20]。此外，加上在婴幼儿食品中添加应用这个广大的市场需要，DHA、EPA 以及 ARA 等长链多不饱和脂肪酸的资源开发已成为研究的热点^[21]。目前，C20-PUFAs 及更长链的多不饱和脂肪酸主要来源是深海鱼油，由于渔业资源正在逐步耗竭，海洋污染加剧，从鱼油中获得的方法已经不能满足市场和食品安全的需求。

随着世界人口的不断增长，食物的生产速度已经开始落后于人口的增长速度。可食性昆虫的高营养和高生物量使其成为了一种优良的可再生自然资源。以昆虫作为食品已经在一些国家和地区被人们所接受^[22-23]。目前，昆虫食品的关注点往往在于其高含量的蛋白质，而忽视了其中所含有的对人体必需的另一营养成分——不饱和脂肪酸^[24]。研究表明，昆虫含有丰富的不饱和脂肪酸，尤其是碳链长度为 18 的亚油酸、亚麻酸等^[6]。由于昆虫体内缺乏合成类固醇类物质的酶，昆虫脂肪所含的类固醇类物质很少，其脂肪酸组成非常

接近于鱼油，可作为天然的优质营养调和食用油。同样，昆虫体内缺少催化合成 18C 以上脂肪酸的延长酶以及相应的延长酶^[11]，因此昆虫中脂肪酸的合成同高等植物中一样止于 C18-PUFAs，而不能继续合成 EPA 和 DHA 等^[25-26]。随着转基因技术的出现，果蝇等昆虫由于具有独特的生物学优势以及在转基因技术操作上的优势^[27]，昆虫中缺少其他生物来源的多不饱和脂肪酸生物合成相关基因（包括数种脂肪酸去饱和酶和脂肪酸延长酶）将会得到解决。

自从 1982 年转基因果蝇首次成功以来，转基因昆虫的研究已经取得了很大的进展，随着转座子、遗传标记以及转基因技术的进步，研究领域也由传统的经济昆虫饲养、农林害虫和致病的媒介昆虫的防治扩展到物种进化分析、基因功能分析、昆虫生理学、昆虫生物反应器等方面^[28]。研究表明昆虫中的脂肪酸含量尤其是 18C-PUFAs 含量丰富，昆虫来源的脂肪酸具有潜在的开发优势^[10]。与此同时，与昆虫脂肪酸代谢有关去饱和酶基因与延长酶的鉴定、克隆和功能研究也取得了一定的进展^[24]。本研究则将果蝇作为生物模型，通过将来源于小鼠的 $\Delta 6$ 脂肪酸延长酶 *Elov15* 基因进行克隆、优化连接到 piggyBac 转座子载体上，再进行显微注射转移到果蝇胚胎中，成功获得转基因果蝇品系。因载体上的眼部特异性启动子 3×P3 整合进入果蝇体内，在转基因果蝇成蝇期眼部会出现明显的增强型绿色荧光，观察到在果蝇的胚胎期与幼虫期也显示出绿色荧光蛋白基因的表达，可使 CO₂ 麻醉筛选转基因成蝇果蝇的方法更为简便。然而，在昆虫转基因技术中，目前存在着不容忽视的问题。由于昆虫转基因技术通常是通过转座子介导的转座作用实现的，所以不可避免地存在着转基因遗传稳定性的问题，本实验共获得 9 个转基因果蝇品系，通过 RT-PCR 检测其转录情况最终只有 2 个品系成功表达目的基因。

由于酶的催化作用具有高效性,在本研究中,较对照组果蝇相比,GC 检测 *Elovl5* 转基因果蝇多不饱和脂肪酸的含量有着很大的变化,从只有 18C-PUFAs 延长到出现 20C 甚至 22C 高不饱和长链脂肪酸,结果显示 C20-PUFAs 含量增加 2.8%, C22-PUFAs 含量增加 1.94%,使得利用果蝇转基因技术生产 18C 以上的多不饱和脂肪酸成为可能。进而以此种转基因果蝇为模型动物,既可以用于研究多不饱和脂肪酸对果蝇的生长发育、繁殖、变态及 PUFAs 增多引起的免疫反应等生物学特性的影响,也可以用于研究该模型在 C20、C22-PUFAs 水平中脂肪酸合成的作用及调控模式、机制,使直接利用哺乳动物来研究多不饱和脂肪酸代谢和调控的传统做法大大简化,也为蝇类及其他资源型昆虫多不饱和脂肪酸功能研究提供一定的参考。

REFERENCES

- [1] Mozaffarian D, Wu JHY. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am College Cardiol*, 2011, 58(20): 2047–2067.
- [2] Venegas-Calderón M, Sayanova O, Napier JA. An alternative to fish oils: Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Progr Lipid Res*, 2010, 49(2): 108–119.
- [3] Yanai H, Masui Y, Katsuyama H, et al. An improvement of cardiovascular risk factors by Omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Clin Med Res*, 2018, 10(4): 281–289.
- [4] Rumpold BA, Schlüter OK. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(5): 802–823.
- [5] Raksakantong P, Meeso N, Kubola J, et al. Fatty acids and proximate composition of eight Thai edible terri-colous insect. *Food Res Int*, 2010, 43(1): 350–355.
- [6] Hwangbo J, Hong EC, Jang A, et al. Utilization of house fly-maggots, a feed supplement in the production of broiler chickens. *J Environ Biol*, 2009, 30(4): 609–614.
- [7] Rubin GM, Lewis EB. A Brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. *Science*, 2000, 287(5461): 2216–2218.
- [8] Mckechnie SW, Geer BW. Long-chain dietary fatty acids affect the capacity of *Drosophila melanogaster* to tolerate ethanol. *J Nutr*, 1993, 123(1): 106–116.
- [9] Ruden DM, de Luca M, Garfinkel MD, et al. *Drosophila* nutrigenomics can provide clues to human gene-nutrient interactions. *Ann Rev Nutr*, 2005, 25: 499–522.
- [10] Shen LR, Lai CQ, Feng X, et al. *Drosophila* lacks C20 and C22 PUFAs. *J Lipid Res*, 2010, 51(10): 2985–2992.
- [11] Stanley-Samuelson DW, Jurenka RA, Cripps C, et al. Fatty acids in insects: composition, metabolism, and biological significance. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1988, 9(1): 1–33.
- [12] Yang Y, Luo K, Jiang C, et al. Accumulation and metabolism of polyunsaturated fatty acids from food in *Musca domestica* larvae and the effects on their growth. *Acta Entomol Sin*, 2019, 62(5): 578–585 (in Chinese).
杨阳, 罗坤, 江超, 等. 食物中多不饱和脂肪酸在家蝇幼虫体内的富集与代谢及对其生长的影响. *昆虫学报*, 2019, 62(5): 578–585.
- [13] Zank TK, Zähringer U, Beckmann C, et al. Cloning and functional characterisation of an enzyme involved in the elongation of $\Delta 6$ -polyunsaturated fatty acids from the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J*, 2002, 31(3): 255–268.
- [14] Vasconcelles MJ, Jiang YD, McDaid K, et al. Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes: implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes. *J Biol Chem*, 2001, 276(17): 14374–14384.
- [15] Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta Mol Cell*

- Biol Lipids, 2000, 1486(2/3): 219–231.
- [16] Kang JX, Wang JD. A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. *BMC Biochem*, 2005, 6: 5.
- [17] Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, et al. Long-chain conversion of [¹³C] linoleic acid and α -linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *J Lipid Res*, 2004, 46(2): 269–280.
- [18] Wallis JG, Watts JL, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(9): 467–473.
- [19] Larsen SV, Holven KB, Ottestad I, et al. Plasma fatty acid levels and gene expression related to lipid metabolism in peripheral blood mononuclear cells: A cross-sectional study in healthy subjects. *Genes Nutr*, 2018, 13: 9.
- [20] Farimani AR, Hariri M, Azimi-Nezhad M, et al. The effect of n-3 PUFAs on circulating adiponectin and leptin in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Acta Diabetol*, 2018, 55(7): 641–652.
- [21] Tai EKK, Wang XB, Chen ZY. An update on adding docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA) to baby formula. *Food Funct*, 2013, 4(12): 1767–1775.
- [22] Raheem D, Carrascosa C, Oluwole OB, et al. Traditional consumption of and rearing edible insects in Africa, Asia and Europe. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 59(14): 2169–2188.
- [23] Stull V, Patz J. Research and policy priorities for edible insects. *Sustain Sci*, 2019, 15(2): 633–645.
- [24] Yu XB, Li J, Huang XZ, et al. Functional properties and future trends in biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Sericult Scie*, 2014, 40(1): 153–160 (in Chinese).
于新波, 李竞, 黄先智, 等. 长链多不饱和脂肪酸的功能特性及生物合成前景展望. *蚕业科学*, 2014, 40(1): 153–160.
- [25] Gregory MK, James MJ. Functional characterization of the duck and turkey fatty acyl elongase enzymes ELOVL5 and ELOVL2. *J Nutr*, 2014, 144(8): 1234–1239.
- [26] Petrie JR, Singh SP. Expanding the docosahexaenoic acid food web for sustainable production: engineering lower plant pathways into higher plants. *AoB Plants*, 2011, 2011: plr011.
- [27] McMeniman CJ, Lane AM, Fong AWC, et al. Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in Mosquito cell lines. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(22): 6963–6969.
- [28] Tang LL, Chen B, He ZB, et al. Application of piggybac transposon and its transgenic insects. *J Anhui Agric Sci*, 2010, 38(6): 2809–2811, 2814.
唐丽莉, 陈斌, 何正波, 等. piggyBac 转座子及其转基因昆虫的应用. *安徽农业科学*, 2010(6): 59–61, 64.

(本文责编 陈宏宇)