

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00485

DNA 转座子在小鼠基因功能研究中的应用

刘琳, 张美丽, 黄粤

中国医学科学院/北京协和医学院基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

摘要: 近年来, 转座子介导的插入突变在哺乳动物的分子遗传学研究中得到了广泛的应用。转座子作为一种简便高效的遗传学操作工具, 在构建转基因动物模型、基因治疗、细胞水平和动物整体水平的基因功能研究等方面发挥了重要的作用。文章重点介绍 DNA 转座子的结构、功能及其应用于小鼠分子遗传学领域的最新研究进展。

关键词: 转座子; 插入突变; 转基因; *Sleeping Beauty*; *piggyBac*

Applications of DNA transposons to the study of gene function in mice

LIU Lin, ZHANG Mei-Li, HUANG Yue

State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS & PUMC, Beijing 100005, China

Abstract: In the past decade, transposon-mediated insertional mutagenesis has been widely used in mammalian molecular genetics. As a convenient and efficient tool for genetic manipulation, transposon has played an important role in making transgenic animal models, performing gene therapy, and annotating gene function at the cellular level and by animal studies *in vivo*. This review focuses on the structure, function and latest research progress of DNA transposons applied in mouse genetics.

Keywords: transposon; insertional mutagenesis; transgene; *Sleeping Beauty*; *piggyBac*

转座子(Transposon)是一类可在基因组中发生位置移动的 DNA 片段, 其移动过程被称为转座(Transposition)。1950 年, 美国科学家 Barbara McClintock 首次在玉米中发现转座子, 并将其命名为“转座元件”(Transposable elements)^[1]。这一重大发现, 开创了遗传学研究的新领域, 而且转座子也成为分子遗传学研究的新手段和工具。随后, 转座子逐渐被成功应用于原核生物、多种植物以及酵母、线虫、果蝇等无脊椎动物。但是, 由于脊椎动物体内的转座子多已失去活性, 直到 1997 年睡美人(*Sleeping Beauty*)转座子被成功改造才开始了转座子在脊椎动物中的应用^[2]。近

10 年, 一些在小鼠等哺乳动物中有活性的转座系统陆续被开发出来。转座子开始作为小鼠分子遗传学的重要工具而在基因功能分析中得到广泛应用。

目前在哺乳动物分子遗传学研究中应用较为广泛的是以下几种 DNA 转座子: *Sleeping Beauty*(SB)、*piggyBac*(PB)^[3]和 *Tol2*^[4]。

1 转座子

1.1 转座子的分类和结构

根据转座机制的不同, 转座子可分为两类: 类(逆转录转座子)和 类(DNA 转座子)。

收稿日期: 2010-11-16; 修回日期: 2011-01-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30971670)资助

作者简介: 刘琳, 硕士研究生, 专业方向: 分子遗传学。Tel: 010-65296462; E-mail: murongyan9840@163.com

通讯作者: 黄粤, 研究员, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: huangyue@pumc.edu.cn

网络出版时间: 2011-04-02 10:11:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110402.1011.001.html>

逆转录转座子使用“复制和粘贴”的转座机制(图 1a): 先借助转录形成RNA中间产物, 再逆转录产生新的DNA拷贝, 最后插入基因组的其他位置而实现转座, 而原位点的转座子保持不变。逆转录转座子可分为两类: LTR逆转座子、非LTR逆转座子。LTR逆转座子具有长末端重复子(Long terminal repeats, LTRs), 并具有中心蛋白编码区。在哺乳动物中最丰富的可移动元件是非LTR逆转座子, 它们缺乏LTRs。非LTR逆转座子中的大部分可归为两类中度重复顺序: 长散布元件(Long interspersed elements, LINEs)(图 1c)和短散布元件(Short interspersed elements, SINEs)。此类转座子中最常见的是短散布元件(SINEs)^[5]。LINEs和SINEs在鼠中有内在的转座活性, 但是, 由于这些逆转座子的转座效率太低, 人工构建工程化的逆转座子十分困难, 从而限制了逆转座子在鼠分子遗传学中的应用。

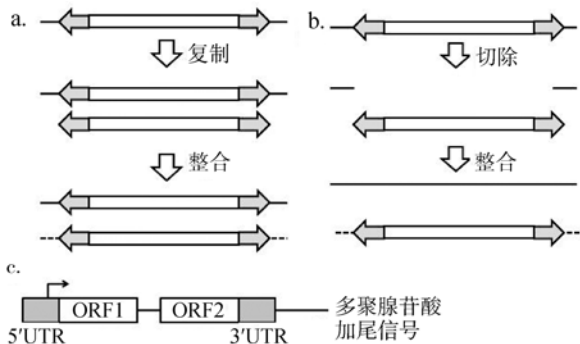


图 1 转座子的结构和转座机制

a: 逆转录转座子使用“复制和粘贴”的转座机制。b: DNA 转座子使用“剪切和粘贴”的转座机制。实线和虚线分别表示转座子发生转座前和转座后所在的 DNA 分子。c: LINE 的一般结构。5'非翻译区(Untranslated region, UTR)具有启动子活性(箭头所示), 可驱动编码基因的转录。LINE 包含两个开放阅读框(Open reading frame, ORF), ORF1 编码一个 RNA 结合蛋白, ORF2 编码的蛋白具有逆转录酶和 DNA 外切酶双重活性。

DNA转座子使用“剪切和粘贴”的转座机制(图 1b): 在转座酶的作用下, 转座子从原位置切除下来并整合到新的位点。天然DNA转座子中通常含有转座酶编码序列, 其两侧为反向末端重复序列(Inverted terminal repeats, ITR)。自身编码的转座酶识别转座子两端的ITR, 介导转座子从原位置切除, 并插入宿主基因组的新位置^[5]。经人工改造, DNA转座子中间的转座酶编码序列可被替换成其他外源DNA序列, 在细胞中存在转座酶的情况下仍然可以

发生转座, 从而将外源DNA插入基因组上新的位置, 实现转基因操作或介导插入突变效应(图 2)。由于DNA转座子具有可被人为改造的优势, 及在哺乳动物中高效转座的特点, 目前它已被广泛应用于小鼠分子遗传领域, 在基因功能研究中发挥重要作用。

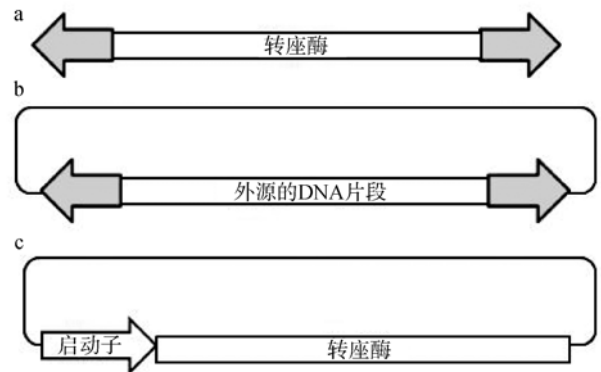


图 2 利用 DNA 转座子进行转基因操作或插入突变的机制
a: 野生型 DNA 转座子的结构。b: 进行人工修饰后的转座子载体。
c: 转座酶表达载体的结构。

1.2 DNA 转座子的特性

1.2.1 负载容量

DNA转座子发生转座时所能携带的外源DNA片段大小是有限的, 若片段过大会导致转座效率下降甚至不发生。不同的转座子有不同的负载容量上限: SB转座子对外源片段的上限是 10 kb左右, 并且随着片段长度的增加, 转座效率呈指数下降^[6]。为了提高SB转座子的负载能力, 人们将其进行了改造, 在负载片段的两侧分别设置一对反向重复序列, 产生被称为“三明治样”的转座子, 可携带大于 10 kb 的DNA片段^[7]。PB、Tol2 等转座子的负载容量相对较大, 如PB已被证实可携带十几kb以上的DNA片段^[3]。最新的研究表明, Tol2 可在制作转基因小鼠时携带约 70 kb的片段^[8]。

1.2.2 转座效率

在早期使用的转座酶作用下, 单拷贝SB转座子在小鼠细胞中的转座效率较低。在某些研究中可以使用含有多个转座子的串联供体来解决这一问题, 然而新的转座位点和供体之间可能会发生重组, 导致无法预料的基因重排^[9]。最新发展的SB100 转座酶可使SB单拷贝的转座效率提高至野生型转座酶的 120 倍, 接近了病毒载体的效率^[10], 极大地提高了

SB转座子的可用性。PB转座子的转座效率相对较高,与病毒载体的整合效率相似^[11]。

1.2.3 整合位点偏好性

研究表明,大部分转座子的整合不是随机的,而是具有各自不同的偏好性,可以从识别序列和基因组结构两方面来认识。转座子的识别序列具有特异性,例如SB和PB的靶位点分别为TA和TTAA,而Tol1和Tol2的靶位点为8个碱基对的异质性序列。但这些靶位点在基因组中的分布是相对广泛的,从整个基因组角度看靶位点的不同并不构成整合的偏好性。在基因组结构方面,某些转座子(如PB)倾向于插入活性转录区,从而保证其自身携带转座酶基因的正常转录与翻译,使转座子能够不断地在转座酶的催化下发生移动^[12]。这在产生基因插入突变的研究中是有利的,然而却不利于基因治疗的开展。为了尽量避免转座子插入造成的内源基因异常过表达,在基因治疗中通常使用SB等对转录区无明显偏好性的转座子^[13]。

1.2.4 足迹

在大多数转座子的转座过程中,转座子并不是完全精确地从原位点切除,通常会在切除后留下几个碱基的“足迹”(Footprint)。在已进行研究的转座子中,只有PB转座子可以精确切除而不产生足迹^[14]。值得注意的是,当转座子插入基因的编码序列时,即使转座子再次发生转座而被切除,由于足迹可能造成该基因读码框的变化,该基因的产物仍然异常,进而造成基因所控制的表型变异。这种现象可能会对转座子插入诱变的分析造成干扰。

1.2.5 局部跳跃

已经插入基因组的转座子发生再次转座时,总是倾向于插入原来位点的附近位置,此现象被称为“局部跳跃”(Local hopping),以SB转座子较为典型。在进行全基因组范围的插入诱变文库建立时,转座子的这种特性会降低基因组覆盖率。Takeda研究组对116例SB二次转座的插入位点进行了分析,78%的插入发生于同一条染色体上,42%的插入位于转座子供体位点附近1.5 Mb范围内^[15]。然而,如果能够巧妙地利用这一特性,则可以在染色体某一局部研究中发挥重要作用,比如在某些基因的远程调

控元件功能研究^[15]或基因局部饱和诱变研究^[16]中的应用。

2 DNA 转座子在小鼠分子遗传学中的应用

2.1 DNA 转座子作为分子遗传学工具的独特优势

作为一种分子遗传学工具,DNA转座子具有一些显著的优点。除去上文所述的特性以外,它还具有“可示踪性”(Trackable)和“可逆性”(Revertible)。

2.1.1 可示踪性

在病毒载体和转座子载体被用于分子遗传学领域之前,对小鼠基因组进行大范围随机诱变的方法主要是物理或化学诱变法,即利用放射线或化学诱变剂乙基亚硝基脲(N-ethyl-N-nitrosourea, ENU)等处理细胞或动物,使基因组发生突变。然而此类诱变方法存在一个显著的缺陷,其突变位点的数量和位置检测过程十分复杂,需要借助基因组序列标签位点进行绘图,逐步缩小突变所在的范围,最后进行测序以及序列比对,确定突变所在的位置^[17]。基于转座子的插入诱变法可完全解决这一问题,转座子末端的重复序列可作为寻找插入位点的标签,利用反式PCR方法可迅速而精确地进行突变位点的检测,为高通量的功能基因筛选工作提供了可靠的技术支持。

2.1.2 可逆性

与其他诱变方法相比,转座子的可逆性使其在分子遗传学研究中具有不可替代的优越性。虽然目前有多种方法可以在基因组中导入外源目的基因或造成人为突变,但这些改变多是永久性的,会增加实验结果分析的复杂性。整合入基因组的转座子可通过转座酶的作用而被切除,使基因组结构恢复正常,排除了影响内源基因表达的干扰因素和安全隐患,在功能基因筛选和基因治疗等领域具有重要意义。

2.2 DNA 转座子在转基因领域的应用

2.2.1 转基因小鼠

传统的转基因技术主要包括受精卵原核DNA显微注射法、病毒载体法等。显微注射法的基因整合率低(<10%)、部分产物为嵌合体^[18],且容易形成串联重复结构而导致基因沉默^[19]。病毒载体法整合率

较高, 但只能携带小片段DNA (≤ 10 kb), 还有可能激活内源性原癌基因或其他有害基因, 安全性令人担忧^[13]。转座子可携带较大的外源基因片段在动物体内实现高效的转座, 解决了目前转基因动物制作领域存在的基因整合率低、表达效率低、随机整合、制作成本高等技术瓶颈问题。

基于转座子的转基因技术已被成功应用于小鼠中。2005 年, *PB* 首次被用于培育转基因小鼠, 通过在受精卵原核中注射携带 *PB* 转座子和 *PB* 转座酶基因的质粒, 成功地在小鼠体内表达了外源性的酪氨酸酶和红色荧光蛋白基因^[3]。此外, *SB*、*Tol2* 等转座子均已被证明能在小鼠中高效转座并表达外源基因^[8, 20~22]。转座子在制作转基因小鼠领域有着广阔的应用前景。Carlson 等^[23]的研究表明, 在原核注射前对 *SB* 转座子进行甲基化修饰, 可提高外源基因生殖系整合率和遗传率; 将 *Tol2* 转座子与细菌人工染色体(BAC)联合应用, 可以更容易地获得单拷贝的转基因小鼠, 使传统的 BAC 转基因技术得到了优化^[8]。采用外源性转座酶 mRNA 与转座子 DNA 共注射的方法可明显提高转座效率^[24]。2010 年, Sumiyama 等^[25]开发了一种简便而高效的转基因方法, 将 *Tol2* 转座子载体携带的外源基因与转座酶 mRNA 共注射入受精卵细胞质(而不是传统的原核注射)中, 使显微注射法的整合效率从 3% 提高到 20% 以上。

2.2.2 基因治疗

用于基因治疗的载体可分为病毒载体和非病毒载体。病毒载体存在制作耗时、成本高、安全性低、具有免疫原性、可携带片段较小等问题, 使基因治疗一度陷入低谷。传统的质粒载体虽然优于病毒载体, 但其进入靶细胞核及整合入基因组的效率较低, 且外源基因表达不稳定^[26]。DNA 转座子作为一种安全高效的非病毒载体, 具有其独特的优势。与病毒载体整合时倾向于插入活性转录单位不同, 转座子的插入是广泛分布的, 且不会引起附加的重组或缺失事件, 保持了细胞基因组的稳定性。转座的发生依赖于转座酶的存在, 当去除外源性转座酶时, 导入的基因可以实现稳定的整合和表达。目前已经通过实验证明 *SB*^[10] 和 *PB*^[27] 转座子可介导外源基因在细胞水平和动物整体水平的稳定表达。2009 年, Mátés 等^[10]证明 *SB* 转座子和 *SB100* 转座酶可在人类

CD34⁺造血干细胞或造血祖细胞中实现稳定的基因转移, 整合率为 35%~50%。将此细胞植入免疫缺陷小鼠体内, 可实现多系造血重建。此外, 聚乙烯亚胺可以介导转座子载体进入动物体内并发挥作用, 实现了个体水平的基因治疗。Liu 等^[28]使用此方法将携带内皮细胞一氧化氮合酶基因 *eNOS* 的转座子导入肺动脉高压大鼠模型中, Ohlfest 等^[29]将凝血因子基因 *F* 导入因子缺乏的血友病小鼠模型中, 均取得成功, 显示出转座子在未来基因治疗领域的潜在应用价值。

2.2.3 诱导多潜能性干细胞(iPSCs)

诱导多潜能性干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPSCs)是通过在分化的体细胞中表达特定的几个转录因子, 以诱导体细胞重编程而获得的可不断自我更新(Self-renewal)且具有多向分化潜能的细胞^[30]。2006 年, Takahashi 和 Yamanaka^[31]通过逆转录病毒转导的方法将 4 个转录因子(*Oct4*、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4*)导入小鼠成纤维细胞中, 首次诱导形成了 iPSC 细胞。由于 iPSC 细胞避免了免疫排斥、伦理学限制等问题, 在再生医学、发育生物学、药理学等研究领域极具应用价值。然而传统的病毒转染方法造成了永久的病毒基因插入, 安全性较低, 限制了此方法在临床上的应用。转座子在制作 iPSC 细胞中有着独特的优越性。利用转座子精确的“剪切-粘贴”机制, 可在形成稳定的 iPSC 细胞克隆后, 再次表达转座酶将导入的外源基因切除(“可逆性”), 而不影响内源基因的表达。2009 年, 3 个独立的研究组成功地利用 *PB* 转座系统将转录因子导入小鼠^[32~34]和人^[32, 33]的成纤维细胞, 实现了高效重编程, 产生了稳定的 iPSC 细胞, 而且 *PB* 转座子的精确切离特性可以确保外源基因的无痕移除。转座子作为介导产生 iPSC 细胞的新的有效手段, 为将来基于细胞的临床治疗开辟了新的途径。

2.3 运用 DNA 转座子的插入诱变功能进行功能基因及基因表达调控研究

DNA 转座子在基因组的随机插入性质为使用正向遗传学方法开展全基因组范围的功能基因研究提供了新的方法。首先使转座子整合入基因组并造成相应的基因突变体, 再从中筛选出具有某种特异表型的细胞或个体, 进一步通过反式 PCR 技术检测转座子的插入位点, 从而研究被突变基因的功能。

2.3.1 细胞水平功能基因研究

2.3.1.1 基因捕获技术

传统的基因打靶技术已经不能满足全基因组范围功能基因研究的需要,而单纯的转座子插入有可能不引起表型的变化(转座子可能插入内含子中,并被mRNA剪接过程所除去),考虑到基因组中的蛋白编码序列只有2%左右,突变的效率会很低。“基因捕获”方法在转座子载体的基础上加入了启动子、报告基因、剪接供体(Splice donor, SD)、剪接受体(Splice acceptor, SA)和polyA加尾信号等元件,可显著提高基因突变体的筛选效率。根据报告基因的表达方式,基因捕获可分为增强子捕获、启动子捕获、poly(A)捕获等类型^[35](图3)。通过高通量的基因捕获技术与各种转座子及报告基因的联合应用,可构建全基因组范围的小鼠胚胎干细胞基因突变体文库,为大规模的基因功能研究提供了良好的公共资源基础。相对于传统的逆转录病毒载体,转座子对整合位点的偏好性较低,更有利于进行覆盖全基因组范围的诱变^[36]。

2.3.1.2 利用转座子介导的插入突变进行功能基因筛选

在进行转座子插入诱变后将细胞连续传代,使

其在分裂过程中自发地产生杂合性丢失(Loss of heterozygosity, LOH),即可获得较多的纯合突变体,从得到的大量突变细胞中筛选出具有感兴趣异常表型的细胞,再通过反式PCR测定转座子在基因组中的插入位点,即可推断出引起异常表型的相关基因,进一步研究被突变基因的功能。2009年, Wang等^[36]利用PB转座子的插入诱变构建了小鼠胚胎干细胞的全基因组突变体库,并利用此文库进行了DNA错配修复(Mismatch repair, MMR)相关基因功能的研究。此研究使用*Blm*基因缺陷的小鼠胚胎干细胞,提高了细胞有丝分裂重组率,可通过较高水平的LOH(图4),配合药物筛选,获得纯合突变细胞,以用于隐性基因功能研究。2010年, Guo等^[37]通过PB转座子的插入随机地激活内源基因表达,筛选出两个与外胚层干细胞(Epiblast stem cells, EpiSCs)的重编程相关的基因: *Nr5a1* 和 *Nr5a2*。

2.3.2 动物整体水平功能基因研究

要进行动物整体水平的功能基因研究,首先需要获得大量含有不同位置转座子插入的小鼠模型。目前常用的策略分为4种。

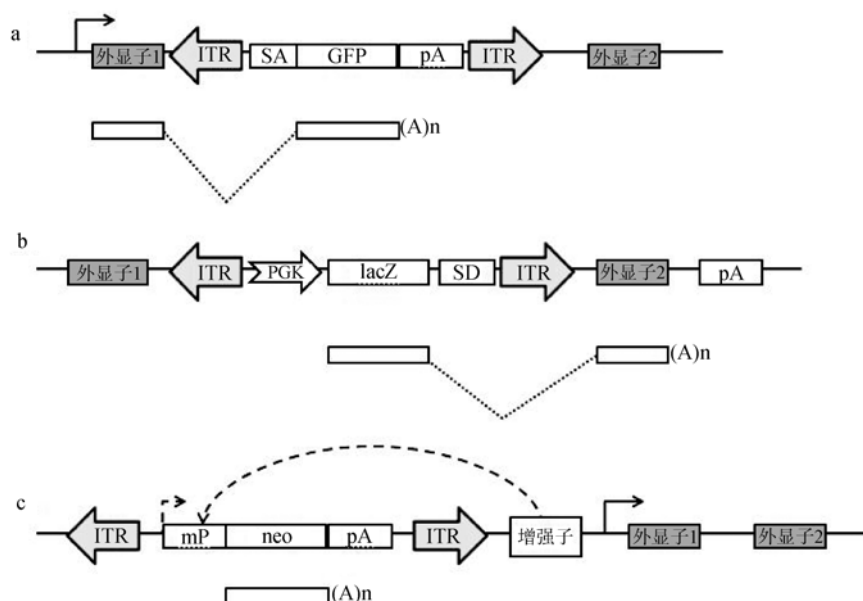


图3 基因捕获原理图

a, b, c 分别为启动子捕获、poly(A)捕获、增强子捕获的DNA及其所转录的mRNA结构。ITR: 反向末端重复序列; SA: 剪接受体; GFP: 绿色荧光蛋白报告基因; pA: poly(A)加尾信号; (A)_n: mRNA的多聚腺苷酸尾; PGK: 磷酸甘油激酶启动子; lacZ: β-半乳糖苷酶报告基因; SD: 剪接供体; mP: 最小启动子; Neo: 新霉素(neomycin)抗性基因。

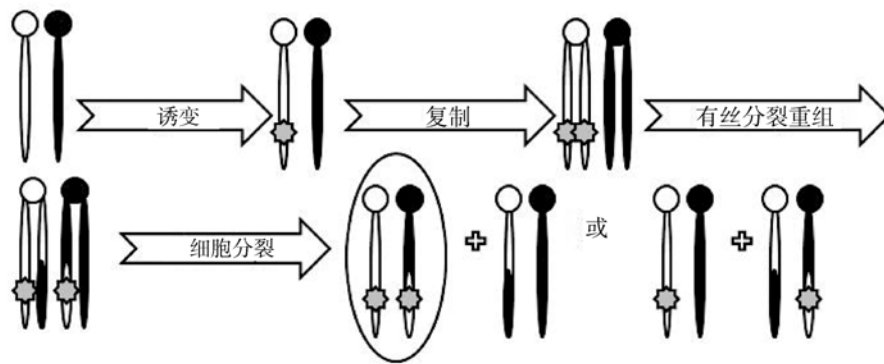


图 4 通过杂合性丢失形成纯合突变体原理图

星形符号表示转座子在染色体上的插入突变位点, 经过杂合性丢失(LOH)后形成的纯合突变体细胞以圆圈标出。

2.3.2.1 嵌合体小鼠

利用脂质体转染或电穿孔技术将转座子与转座酶质粒导入小鼠胚胎干细胞, 再将发生转座子插入突变的胚胎干细胞注射入囊胚中, 使其发育成部分体细胞突变的嵌合体小鼠, 最后通过进一步的杂交与回交可得到纯合突变的小鼠, 这和传统的构建基因敲除小鼠技术类似。

2.3.2.2 整体突变小鼠

将含有转座子的小鼠品系与含有相应转座酶的品系进行杂交, 得到的子一代双转基因雄鼠继续与野生型雌鼠杂交, 可以将其生殖细胞中发生的各种转座事件分散传递到子二代小鼠中, 产生全部体细胞均携带有稳定插入突变的个体, 再将这些突变体小鼠回交或杂合交配, 得到纯合突变小鼠, 实现大批量制作基因突变小鼠^[12](图 5)。PB 已经被用来大规模制作基因失活小鼠模型, 目前已经建立了基于 PB 转座子插入诱变的小鼠突变体品系数据库——PBmice, 其中包含转座子插入位点、插入的基因名称、基因表达水平、突变表型等信息, 并可通过网络进行免费检索^[38]。Wu 等^[39]利用 PB 转座系统和 Cre-loxP 重组酶系统开发了一种多功能诱变策略, 可制作插入突变、大范围染色体缺失/重复或具有可回复突变的小鼠模型。

2.3.2.3 体细胞突变小鼠

含有转座子与转座酶的子一代双转基因小鼠的体细胞中将发生转座子在全基因组范围内的随机插入事件, 可通过表型来分析被突变的基因, 或应用组织特异性表达 Cre 重组酶的小鼠进行组织器官特异性的癌基因/抑癌基因研究。由于逆转录病毒的整合位点具有较强的偏好性, 仅能够引起血液系统和乳腺组织的肿瘤发生, 而转座子可诱导实体肿瘤形

成, 对传统的病毒筛选方法进行了有效的补充。目前已经证明, 经过“癌基因捕获”方法诱变后, *p19Arf* 基因缺失遗传背景的小鼠^[40]和野生型小鼠^[41]的肿瘤形成速度加快。将不同肿瘤组织中的插入位点进行鉴定与统计学分析, 即可筛选出一批在肿瘤中出现频率较高的共有整合位点(Common integration sites, CIS), 这些插入位点处的基因即被确定为可能的癌基因或抑癌基因。Starr 等^[42]将含有 SB 转座子序列的小鼠与可在肠组织中特异表达 Cre 重组酶的小鼠进行杂交, 检出了 60 种与人类结肠直肠癌相关的癌基因和抑癌基因。应用类似的方法, Keng 等^[43]对小鼠肝癌的相关基因进行了研究。通过高通量的 splinkerette-PCR 方法(反式 PCR 的一种)^[44]可以精确检测转座子的插入位置, 从而确定与肿瘤发生或其他异常表型相关联的基因。PB 与 SB 转座子的整合位点偏好性有所不同, 为了尽可能多地发现肿瘤相关基因, Rad 等^[45]将 PB 和 SB 联合使用, 构建出一种具有 PB 和 SB 双重特性的“ATP”转座子, 通过对大量小鼠肿瘤的分析, 发现了许多未知的癌基因, 如 *Spic*、*Hdac7* 等。为了验证癌基因在肿瘤形成中的作用, Su 等^[46]利用 SB 转座子将人类癌基因的 cDNA 整合入小鼠基因组中, 使其在不同类型的细胞中表达, 实验证明过表达癌基因的小鼠在出生后早期阶段即可出现广泛的肿瘤形成。Carlson 等^[22]将携带癌基因 *NRAS* 的转座子导入小鼠肝细胞中, 发现形成的肿瘤组织中存在此基因的高表达。Zhu 等^[47]利用 PB 和 Cre-loxP 系统发明了诱导姐妹染色单体重组和杂合性丢失的新方法, 并将其应用于小鼠淋巴细胞中, 解决了纯合突变导致早期胚胎发育缺陷而造成表型研究困难的问题。

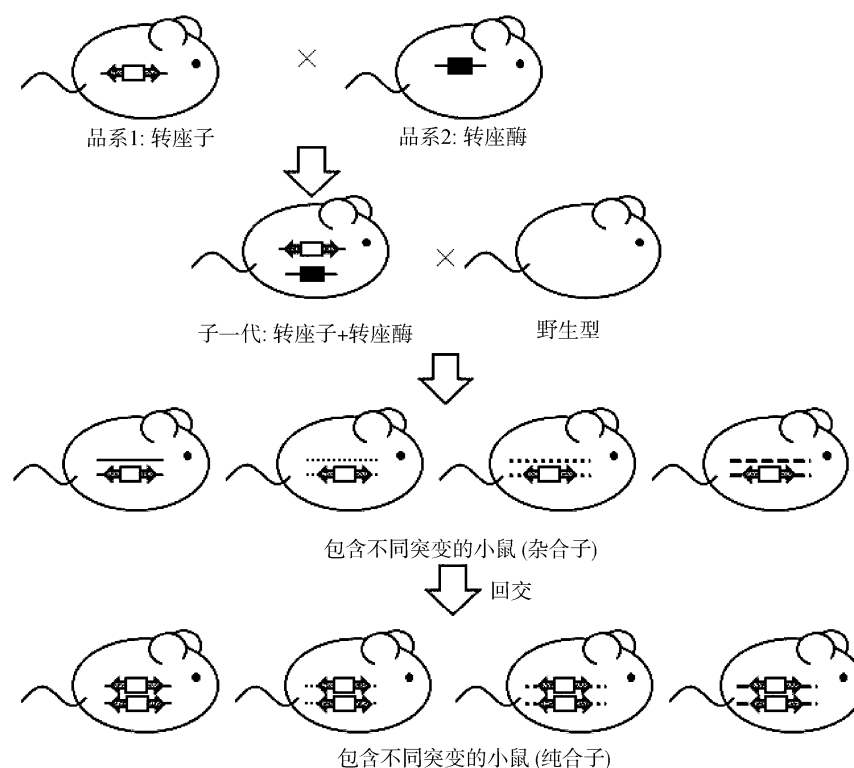


图5 制作转座子插入突变小鼠流程图

不同的线型代表小鼠基因组中不同的位置。

2.3.2.4 基因远程调控元件的研究

随着分子遗传学研究的深入,人们开始意识到基因表达调控元件在生命活动中的重要作用。当增强子、隔离子、基因座控制区(Locus control region, LCR)等远程调控元件发生突变时,即使基因编码序列完全正常,也可能对基因的正常表达造成严重的阻碍,从而出现一系列异常表型。因此,研究基因远程调控元件功能具有重要的意义。2009年,Takeda研究组将基因打靶技术与SB转座子的局部跳跃特性以及Cre-loxP系统联合应用,成功构建出一系列小鼠胚胎干细胞Pax1基因附近的插入突变体,并在细胞中导入Cre重组酶,形成染色体大片段的缺失突变,随后利用四倍体补偿技术制作出完全胚胎干细胞来源的小鼠胚胎并对其进行了报告基因表达谱的研究,发现了两个位于Pax1基因下游200~350 kb区域内的增强子^[15]。

3 DNA 转座子应用于分子遗传领域的前景和展望

DNA 转座子在制作转基因动物、基因治疗、细胞及整体水平的基因功能研究等领域均有重要的应

用价值。与病毒载体相比,转座子具有整合位点广泛、安全性高、可精确进行插入和切除、易于检测和控制等优点,结合基因捕获和Cre-loxP位点特异性重组等技术,可进行大规模的转基因动物制作和功能基因筛选,具有广阔的应用前景。基于转座子的大规模小鼠胚胎干细胞突变体库的建立,克服了传统基因打靶技术实验条件、技术水平等限制,有效地促进了基因功能研究的广泛开展。在基因治疗方面,转座子具有精确、稳定、安全的整合特性,有望替代病毒载体而成为基因治疗的首选载体。总之,转座子作为一种新兴的基因工程载体,必将在未来的科研和生产实践中发挥不可限量的作用。

参考文献(References):

- [1] McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1950, 36(6): 344-355. DOI
- [2] Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z. Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 1997, 91(4): 501-510. DOI

- [3] Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 2005, 122(3): 473–483. [DOI](#)
- [4] Kawakami K, Noda T. Transposition of the *Tol2* element, an *Ac*-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells. *Genetics*, 2004, 166(2): 895–899. [DOI](#)
- [5] Lewin B. Genes IX. Boston, Toronto, London, Singapore: Jones and Bartlett Publishers, 2008.
- [6] Izsvák Z, Ivics Z, Plasterk RH. *Sleeping Beauty*, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol*, 2000, 302(1): 93–102. [DOI](#)
- [7] Zayed H, Izsvák Z, Walisko O, Ivics Z. Development of hyperactive *Sleeping Beauty* transposon vectors by mutational analysis. *Mol Ther*, 2004, 9(2): 292–304. [DOI](#)
- [8] Suster ML, Sumiyama K, Kawakami K. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice. *BMC Genomics*, 2009, 10: 477. [DOI](#)
- [9] Geurts AM, Collier LS, Geurts JL, Oseth LL, Bell ML, Mu D, Lucito R, Godbout SA, Green LE, Lowe SW, Hirsch BA, Leinwand LA, Largaespada DA. Gene mutations and genomic rearrangements in the mouse as a result of transposon mobilization from chromosomal concatemers. *PLoS Genet*, 2006, 2(9): e156.
- [10] Mátés L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker K, Mairai J, Ma L, Samara-Kuko E, Gysemans C, Pryputniewicz D, Miskey C, Fletcher B, VandenDriessche T, Ivics Z, Izsvák Z. Molecular evolution of a hyperactive *Sleeping Beauty* transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet*, 2009, 41(6): 753–761. [DOI](#)
- [11] Cadiñanos J, Bradley A. Generation of an inducible and optimized *piggyBac* transposon system. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(12): e87. [DOI](#)
- [12] Ivics Z, Li MA, Mátés L, Boeke JD, Nagy A, Bradley A, Izsvák Z. Transposon-mediated gene manipulation in vertebrates. *Nat Methods*, 2009, 6(6): 415–422. [DOI](#)
- [13] VandenDriessche T, Ivics Z, Izsvák Z, Chuah MKL. Emerging potential of transposons for gene therapy and generation of induced pluripotent stem cells. *Blood*, 2009, 114(8): 1461–1468. [DOI](#)
- [14] Dupuy AJ. Current applications of transposons in mouse genetics. *Methods Enzymol*, 2010, 477: 53–70. [DOI](#)
- [15] Kokubu C, Horie K, Abe K, Ikeda R, Mizuno S, Uno Y, Ogiwara S, Ohtsuka M, Isotani A, Okabe M, Imai K, Takeda J. A transposon-based chromosomal engineering method to survey a large *cis*-regulatory landscape in mice. *Nat Genet*, 2009, 41(8): 946–952. [DOI](#)
- [16] Keng VW, Yae K, Hayakawa T, Mizuno S, Uno Y, Yusa K, Kokubu C, Kinoshita T, Akagi K, Jenkins NA, Copeland NG, Horie K, Takeda J. Region-specific saturation germline mutagenesis in mice using the *Sleeping Beauty* transposon system. *Nat Methods*, 2005, 2(10): 763–769. [DOI](#)
- [17] Kile BT, Hilton DJ. The art and design of genetic screens: mouse. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(7): 557–567. [DOI](#)
- [18] Nagy A, Gertszenstein M, Vintersten K, Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. 3rd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2003.
- [19] Henikoff S. Conspiracy of silence among repeated transgenes. *Bioessays*, 1998, 20(7): 532–535. [DOI](#)
- [20] Dupuy AJ, Clark K, Carlson CM, Fritz S, Davidson AE, Markley KM, Finley K, Fletcher CF, Ekker SC, Hackett PB, Horn S, Largaespada DA. Mammalian germ-line transgenesis by transposition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4495–4499. [DOI](#)
- [21] Wilber AC, Frandsen JL, Geurts JL, Largaespada DA, Hackett PB, McIvor RS. RNA as a source of transposase for *Sleeping Beauty*-mediated gene insertion and expression in somatic cells and tissues. *Mol Ther*, 2006, 13(3): 625–630. [DOI](#)
- [22] Carlson CM, Frandsen JL, Kirchhof N, McIvor RS, Largaespada DA. Somatic integration of an oncogene-harboring *Sleeping Beauty* transposon models liver tumor development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(47): 17059–17064. [DOI](#)
- [23] Carlson DF, Geurts AM, Garbe JR, Park CW, Rangel-Filho A, O'Grady SM, Jacob HJ, Steer CJ, Largaespada DA, Fahrenkrug SC. Efficient mammalian germline transgenesis by *cis*-enhanced *Sleeping Beauty* transposition. *Transgenic Res*, 2011, 20(1): 29–45. [DOI](#)
- [24] Shinohara ET, Kaminski JM, Segal DJ, Pelczar P, Kolhe R, Ryan T, Coates CJ, Fraser MJ, Handler AM, Yanagimachi R, Moisyadi S. Active integration: new strategies for transgenesis. *Transgenic Res*, 2007, 16(3): 333–339. [DOI](#)
- [25] Sumiyama K, Kawakami K, Yagita K. A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the *Tol2* transposon system and cytoplasmic microinjection. *Genomics*, 2010, 95(5): 306–311. [DOI](#)
- [26] Hackett PB, Largaespada DA, Cooper LJ. A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 674–683. [DOI](#)
- [27] Nakanishi H, Higuchi Y, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. *PiggyBac* transposon-mediated long-term gene expression in mice. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 707–714.

[DOI](#)

- [28] Liu L, Liu H, Visner G, Fletcher BS. *Sleeping Beauty*-mediated *eNOS* gene therapy attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *FASEB J*, 2006, 20(14): 2594–2596. [DOI](#)
- [29] Ohlfest JR, Frandsen JL, Fritz S, Lobitz PD, Perkinson SG, Clark KJ, Nelstuen G, Key NS, McIvor RS, Hackett PB, Largaespada DA. Phenotypic correction and long-term expression of factor VIII in hemophilic mice by immunotolerization and nonviral gene transfer using the *Sleeping Beauty* transposon system. *Blood*, 2005, 105(7): 2691–2698. [DOI](#)
- [30] 陈凌懿, 刘林. 诱导性多潜能干细胞(iPS)的研究现状和展望. 中国科学 C 辑(生命科学), 2009, 39(7): 621–635.
- [31] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676. [DOI](#)
- [32] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. *PiggyBac* transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 766–770. [DOI](#)
- [33] Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009, 458(7239): 771–775. [DOI](#)
- [34] Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the *piggyBac* transposon. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 363–369. [DOI](#)
- [35] Friedel RH, Soriano P. Gene trap mutagenesis in the mouse. *Methods Enzymol*, 2010, 477: 243–269. [DOI](#)
- [36] Wang W, Bradley A, Huang Y. A *piggyBac* transposon-based genome-wide library of insertionally mutated *Blm*-deficient murine ES cells. *Genome Res*, 2009, 19(4): 667–673. [DOI](#)
- [37] Guo G, Smith A. A genome-wide screen in EpiSCs identifies Nr5a nuclear receptors as potent inducers of ground state pluripotency. *Development*, 2010, 137(19): 3185–3192. [DOI](#)
- [38] Sun LV, Jin K, Liu YM, Yang WW, Xie X, Ye L, Wang L, Zhu L, Ding S, Su Y, Zhou J, Han M, Zhuang Y, Xu T, Wu XH, Gu N, Zhong Y. PBmice: an integrated database system of *piggyBac* (PB) insertion mutations and their characterizations in mice. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database issue): D729–D734.
- [39] Wu S, Ying G, Wu Q, Capecchi MR. Toward simpler and faster genome-wide mutagenesis in mice. *Nat Genet*, 2007, 39(7): 922–930. [DOI](#)
- [40] Collier LS, Carlson CM, Ravimohan S, Dupuy AJ, Largaespada DA. Cancer gene discovery in solid tumours using transposon-based somatic mutagenesis in the mouse. *Nature*, 2005, 436(7048): 272–276. [DOI](#)
- [41] Dupuy AJ, Akagi K, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA. Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic *Sleeping Beauty* transposon system. *Nature*, 2005, 436(7048): 221–226. [DOI](#)
- [42] Starr TK, Allaei R, Silverstein KAT, Staggs RA, Sarver AL, Bergemann TL, Gupta M, O'Sullivan MG, Matise I, Dupuy AJ, Collier LS, Powers S, Oberg AL, Asmann YW, Thibodeau SN, Tessarollo L, Copeland NG, Jenkins NA, Cormier RT, Largaespada DA. A transposon-based genetic screen in mice identifies genes altered in colorectal cancer. *Science*, 2009, 323(5922): 1747–1750. [DOI](#)
- [43] Keng VW, Villanueva A, Chiang DY, Dupuy AJ, Ryan BJ, Matise I, Silverstein KA, Sarver A, Starr TK, Akagi K, Tessarollo L, Collier LS, Powers S, Lowe SW, Jenkins NA, Copeland NG, Llovet JM, Largaespada DA. A conditional transposon-based insertional mutagenesis screen for genes associated with mouse hepatocellular carcinoma. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(3): 264–274. [DOI](#)
- [44] Uren AG, Mikkers H, Kool J, van der Weyden L, Lund AH, Wilson CH, Rance R, Jonkers J, van Lohuizen M, Berns A, Adams DJ. A high-throughput splinkerette-PCR method for the isolation and sequencing of retroviral insertion sites. *Nat Protoc*, 2009, 4(5): 789–798. [DOI](#)
- [45] Rad R, Rad L, Wang W, Cadinanos J, Vassiliou G, Rice S, Campos LS, Yusa K, Banerjee R, Li MA, de la Rosa J, Strong A, Lu D, Ellis P, Conte N, Yang FT, Liu P, Bradley A. *PiggyBac* transposon mutagenesis: a tool for cancer gene discovery in mice. *Science*, 2010, 330(6007): 1104–1107. [DOI](#)
- [46] Su Q, Prosser HM, Campos LS, Ortiz M, Nakamura T, Warren M, Dupuy AJ, Jenkins NA, Copeland NG, Bradley A, Liu P. A DNA transposon-based approach to validate oncogenic mutations in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19904–19909. [DOI](#)
- [47] Zhu Y, Kim YM, Li S, Zhuang Y. Generation and analysis of partially haploid cells with *Cre*-mediated chromosome deletion in the lymphoid system. *J Biol Chem*, 2010, 285(34): 26005–26012. [DOI](#)