

Tc1/Mariner 转座子超家族的研究进展

沈丹, 陈才, 王赛赛, 陈伟, 高波, 宋成义

扬州大学农业与农产品安全国际合作联合实验室, 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009

摘要: 随着高通量测序技术的迅猛发展, 越来越多的生物基因组注释结果表明: 转座子几乎存在于所有生物的基因组中, 是大多数生物基因组的重要组分。其中, *Tc1/Mariner* 转座子是自然界中分布最广泛的一类 DNA 转座子超家族, 在自然界已经发现 14 个有活性的 *Tc1/Mariner* 转座子(如 *Minos*, *Mos1* 等), 另外通过分子重构也获得高活性的人工转座子, 如睡美人转座子(*Sleeping Beauty*, *SB*)。SB 和 *Mos1* 等转座子作为基因转移载体已被广泛应用于转基因、基因捕获和基因治疗等领域的研究中, 并取得了很好的应用效果。本文将重点综述 *Tc1/Mariner* 转座子的结构、分类、分布、转座机制、活性转座子的挖掘, 及其在转基因、基因捕获和基因治疗等研究领域的应用。

关键词: *Tc1/Mariner* 转座子; 转基因; 基因治疗; 基因捕获

Research progress of *Tc1/Mariner* superfamily

Dan Shen, Cai Chen, Saisai Wang, Wei Chen, Bo Gao, Chengyi Song

Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-product Safety, College of Animal Science & Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: With the rapid improvement of sequencing techniques, more and more genome annotations reveal the transposons are the important components of most genomes and present on almost all organisms. Among them, the *Tc1/Mariner* superfamily represents the most widespread DNA transposons. Until now, fourteen active *Tc1/Mariner* transposons (*Minos*, *Mos1*, etc.) have been identified and some highly active artificial transposons have been created through molecular reconstruction, such as *Sleeping Beauty* (*SB*). The transposons such as *SB* and *Mos1* have been widely used as gene transfer vectors in the fields of transgenesis, gene trapping and gene therapy. In this review, we summarize the structure, classification, distributions, transposition mechanism and excavations of active members of *Tc1/Mariner* as well as its application in the fields of transgenesis, gene trapping and gene therapy.

Keywords: *Tc1/Mariner* transposon; transgenesis; gene trapping; gene therapy

转座子(transposon)是一段在宿主基因组中可以自由移动或跳跃的 DNA 序列, 转座子移动或跳跃的

过程被称为转座(transposition)。转座子最早是 20 世纪 40 年代由美国科学家 Barbara McClintock 在进行

收稿日期: 2016-05-05; 修回日期: 2016-11-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31671313, 31572364)和扬州现代农业项目(编号: YZ2016040)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31671313, 31572364) and Yangzhou Modern Agriculture Project (No. YZ2016040)]

作者简介: 沈丹, 博士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: shendan2009@hotmail.com

通讯作者: 宋成义, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物转座子基因资源挖掘及其应用。E-mail: cysong@yzu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-160

网络出版时间: 2016/11/15 15:56:54

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20161115.1556.002.html>

玉米的遗传学研究时发现的,并被命名为“Ac/Ds”元件^[1]。之后又陆续在细菌、真菌及昆虫等各种生物中被发现。近年来的研究表明,转座子几乎存在于所有生物的基因组中,可以发生转座并不断扩张,是基因组扩张的决定性因素,同时也对生物基因组结构和进化有重要影响^[2,3]。有研究表明转座子是脊椎动物和非脊椎动物基因组的重要组分,是哺乳动物基因组中的最大组分,使用生物信息学的方法注释发现转座子几乎占到了人类基因组的 1/2(表 1),在玉米基因组中比重更大,约占到 80%^[3]。因此,在基因组水平上对转座成分(现在也被人们称为转座组)进行研究成为后基因组时代的研究热点。

转座子根据不同的转座机制可以分为两大类:第 I 类转座子通过 RNA 转座,称为逆转录转座子(retrotransposon);第 II 类转座子通过 DNA 转座,称为 DNA 转座子。DNA 转座子又可以被分为三大亚类:“剪切-粘贴”机制 DNA 转座子、“滚环式”复制机制 DNA 转座子(Helitrons)、和自身复制机制

DNA 转座子(Polintons)^[4]。“剪切-粘贴”类转座子家族分布非常广泛,根据转座酶相似性、末端反向重复序列的结构特征等分为 *Tc1/Mariner*、*hobo*、*MITEs*、*hAT* 和 *PiggyBac(PB)*等几个超家族。转座子成员众多,其中最引人注意的是来自 *Tc1/Mariner* 超家族的鲑鱼 *SB* 转座子、来自 *PiggyBac(PB)*超家族的 *PB* 转座子和 *hAT* 超家族的 *Tol2* 转座子。它们可以广泛应用于基因治疗、基因捕获和转基因研究。相关研究表明转座子作为斑马鱼、小鼠、青鳞鱼等模式生物的高效转基因载体有巨大的优势和潜能^[5-9]。本文将重点围绕 *Tc1/Mariner* 转座子的结构、分类、分布、转座机制、活性转座子的挖掘,及其在转基因、基因捕获和基因治疗等研究领域的应用进行综述,以便人们更充分全面了解 *Tc1/Mariner* 超家族转座子的研究进展。

1 *Tc1/Mariner* 转座子结构

Tc1/Mariner 转座子超家族成员的全长一般为 1300~2400 bp,其中包含一个单基因编码的转座酶,侧翼为反向末端重复序列(inverted terminal repeats, ITRs)。根据 ITRs 的长度可将 *Tc1/Mariner* 转座子分为 4 类:第一类,ITRs 长为 200~300 bp,含同向重复(direct repeats, DR)(图 1, A-a);第二类,ITRs 长为 200~300 bp,不含 DR(图 1, A-b);第三类,ITRs 长度小于 100 bp,含 DR(图 1, A-c);第四类,ITRs 长度小于 100 bp,不含 DR(图 1, A-d)^[10]。另外,ITRs 长度在同一物种和不同物种间均存在差异。

当转座酶与 ITRs 结合时,可以促进转座的发生,转座酶蛋白包括“螺旋-转角-螺旋”结构(helix-turn-helix, HTH),“DDE/D”的结构和核定位信号(nuclear localization signal, NLS)3 个保守结构域^[11](图 1B):(1)在转座酶的 N 端有 2 个 HTH,该区域是 DNA 结合区,能够识别相应的 ITRs。(2)转座酶的 C 端有 1 个“DDE/D”的结构^[12],即有 2 个天冬氨酸残基和 1 个谷氨酸残基(第 3 个也可能是天冬氨酸残基)。“DDE/D”的结构是催化活性中心的一部分,能够结合催化所必需的阳离子,如 Mg^{2+} 或者 Mn^{2+} ^[13,14]。在 *Mariner* 和 *pogo* 转座子中含“DDD”结构,当改变“DDD”结构为“DDE”结构时,转座酶失去活性^[15]。(3)除了 DNA 结合结构域和转座催化结构域外,NLS

表 1 转座子在不同生物基因组中的分布

Table 1 Transposon compositions among different species

物种	转座子占基因组比重(%)
人(<i>Homo sapiens</i>)	48.49
黑猩猩(<i>Pan troglodytes</i>)	48.79
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	41.73
大鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)	39.18
微型蝙蝠(<i>Pteropus vampyrus</i>)	35.51
羊驼(<i>Vicugna pacos</i>)	34.74
奶牛(<i>Bos taurus</i>)	47.98
虎鲸(<i>Orcinus orca</i>)	43.23
海豚(<i>Tursiops truncatus</i>)	41.24
猪(<i>Sus scrofa</i>)	43.10
猫(<i>Felis catus</i>)	41.48
熊猫(<i>Aliuropoda melanoleuca</i>)	39.20
鸡(<i>Gallus gallus</i>)	9.74
热带爪蟾(<i>Xenopus tropicalis</i>)	31.88
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)	46.40
黑腹果蝇(<i>Drosophila melanogaster</i>)	20.44
线虫(<i>Caenorhabditis elegans</i>)	10.31
广杆属线虫(<i>Caenorhabditis briggsae</i>)	16.02

注:表格中涉及的数据均来源于 RepeatMasker 数据库(<http://www.repeatmasker.org>)。

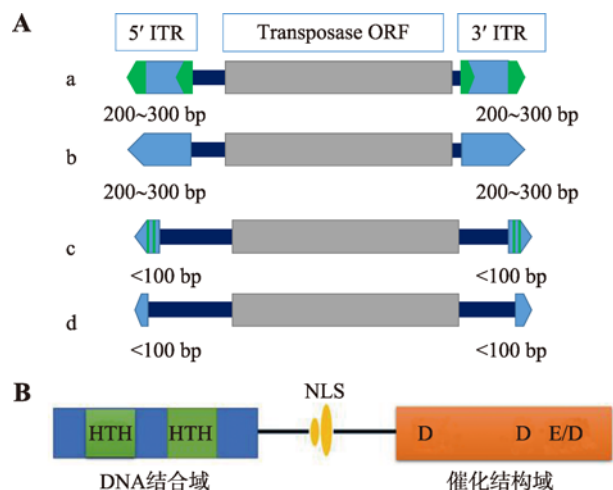


图 1 *Tc1/Mariner* 转座子和转座酶结构

Fig. 1 The structure of *Tc1/Mariner* transposon and transposase

A: 转座子结构, a~d: *Tc1/Mariner* 转座子的 4 种结构; B: 转座酶结构, N 端为 DNA 结合域, 包含 2 个螺旋-转角-螺旋 (HTH), 中间为核定位信号 (NLS), C 端为催化结构域, 包含“DDE/D”结构。

也是转座酶的重要组成部分之一。转座酶识别转座序列介导转座中需要转座元件本身和宿主特殊因子的参与, 这些因子是分子水平调控转座频率的重要因素。

2 *Tc1/Mariner* 的转座机制

Tc1/Mariner 转座子超家族属于第 II 类转座子, 转座机制属于“剪切-粘贴”的转座模式(图 2), 转座

过程主要分为 4 步: (1) 转座时两个转座酶分子识别转座元件两端的 ITRs, 并通过转座酶的 HTH 结构与 ITRs 结合; (2) 突触复合物的形成。在转座酶亚基的相互作用下与转座子两端的 ITRs 配对、结合形成突触复合物; (3) 在转座酶的作用下, 将转座元件从原整合位点切离; (4) 切离的转座元件插入到新的靶位点。*Tc1/Mariner* 转座子偏好插入 TA 双核苷酸区^[16~19], 即宿主基因组上散在的 TA 双核苷酸位点均有可能被转座子随机插入。在完成一个转座的过程中, 需要宿主细胞修复断裂的双链 DNA, 有两个可能的修复途径, 分别是同源重组和非同源末端连接的方法。同源重组的方法是以同源染色体或者同一染色体的同源序列作为模板重新合成一个新的副本, 或者通过单链退火进行修复, 那么这种方式会在切除位点产生缺失。通过非同源末端连接的修复方法则会产生末端重复的末端核苷酸, 从而留下 2~4 bp 的“足迹”^[20~23]。

3 *Tc1/Mariner* 转座子超家族的分类及分布

Tc1/Mariner 转座子可能是自然界中分布最为广泛的 DNA 转座子^[24], 目前已经在线形动物、扁形动物、节肢动物、脊索动物乃至真菌基因组中被发现, 其中鱼类和两栖类动物中分布最为丰富^[2,25]。根据转座酶的“DDE/D”催化结构域进行多重比较后

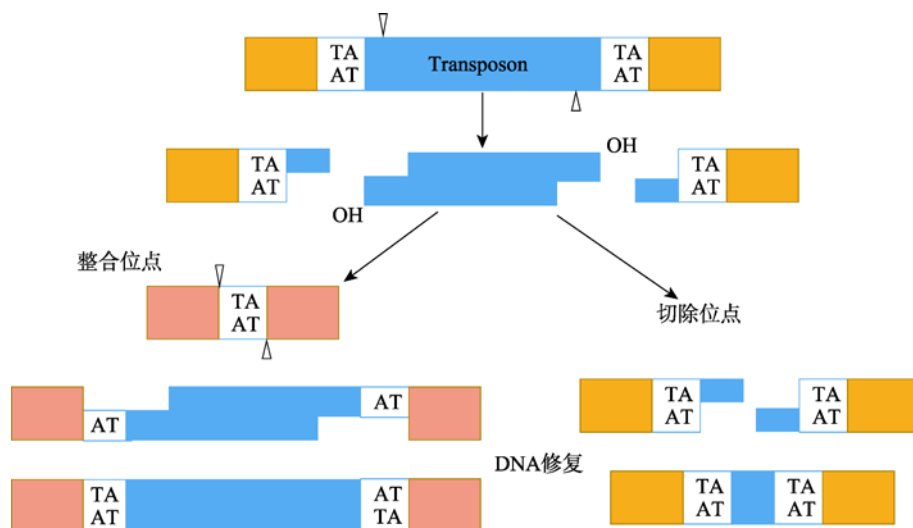


图 2 *Tc1/Mariner* 转座机制

Fig. 2 Mechanism of transposition of *Tc1/Mariner* transposon

转座子的整合和切除发生在 TA 双核苷酸位点。在整合位点形成的单链间隙以及供体 DNA 的双链被破坏后, 依赖宿主的 DNA 修复机制进行修复。修复后, 整合位点的目标 TA 将会被复制, 而在切除的位置将会留下一个小的足迹^[24]。

生成 Neighbor-Joining(NJ)进化树, 至少可将 *Tc1/Mariner* 超家族细分为 7 个亚类(图 3): 第 I 类, *Mariner* 家族(DD34D), 该家族可能是自然界分布最广泛的 *Tc1/Mariner* 转座子家族^[12], 分布在不同的类群如真菌、轮虫、昆虫、线虫、植物、鱼类和哺乳动物等生物中^[8,24,26~28]; 第 II 类为在植物中分离得到

的 DD39D 元件; 第 III 类为从轮虫和蚊虫中分离到的 DD37E 元件^[29]; 第 IV 类是从昆虫、线虫和脊椎动物中分离到 *Tc1* 元件(DD34E)^[30]; 第 V 类是从家蚕、广杆属线虫和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中分离的 *maT* 元件(DD37D); 第 VI 类是 DD×E 元件, 如从蚊子中分离得到 *Gambol* 转座子(DD34E), 在系

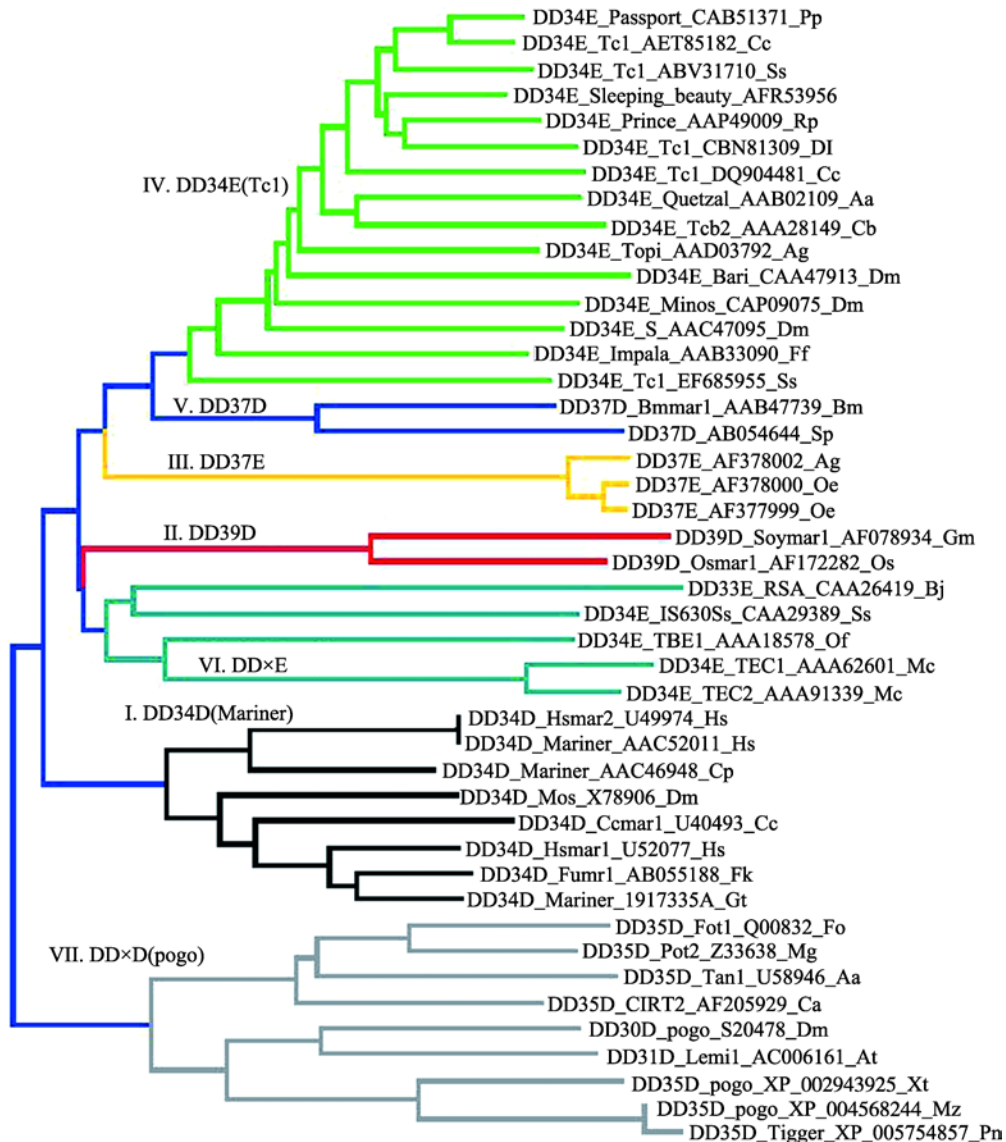


图 3 基于不同物种 *Tc1/Mariner* 转座酶 DDE/D 催化结构域氨基酸序列构建的 NJ 系统发生树

Fig. 3 Neighbor-Joining phylogenetic tree of *Tc1/Mariner* transposases from various species based on the domain of DDE/D

以转座酶保守的 DDE/D 结构域氨基酸序列(150~200 个氨基酸(amino acid, aa))为基础, 利用 MEGA6 程序构建 NJ 进化树, 详细方法参照文献^[2]。涉及的数据均来源于 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 系统发生树中的字母(I-VII)分别代表 *Tc1/Mariner* 超家族细分的 7 个亚类名称, 每个序列(除 DD37E 亚类外)含转座子名称, 转座子对应的基因序列号以及转座子所在物种的拉丁文缩写。例如, “DD34E_Passport_CAB51371_Pp”中“DD34E”为从昆虫、线虫和脊椎动物中分离到 *Tc1* 元件, 属于 *Tc1/Mariner* 超家族中的第 IV 类转座子, “Passport”为转座子名称, “CAB51371”为 *Passport* 对应的基因序列号, “Pp”为物种“*Pleuronectes platessa*”的拉丁文缩写。

统发育上不同于上文所述的 IV 类(DD34E/Tc1); 第 VII 类为 DD×D 元件(*pogo* 家族)^[10,31,32]。另外, 近期在海洋微藻等生物上发现有 DD41D、DD43D 和 DD45D 家族的存在, 但尚未得到进一步验证^[10]。

4 活性 *Tc1/Mariner* 转座子的挖掘及活性验证

Tc1/Mariner 超家族在自然界中分布广泛, 包括细菌、无脊椎动物和脊椎动物^[33-36]。在脊椎动物中, *Tc1/Mariner* 转座子在硬骨鱼类中分布最为广泛^[37]。由于转座子可能造成基因组的不稳定, 因此在进化中转座子会积累突变, 逐渐失去活性^[38], 特别是在高等动物(如哺乳动物)中发现的 *Tc1/Mariner* 超家族转座子大部分由于转座酶开放阅读框中存在缺陷(如突变、移码、插入、缺失或存在终止密码子)而失去转座活性^[39], 但在自然界仍然存在自主活性的 *Tc1/Mariner* 超家族转座子。通过生物信息学和实验验证等手段, 目前在自然界至少发现了 14 个存在自然活性的 *Tc1/Mariner* 超家族转座子成员, 分别是 *Tc1*^[40]、*Tc3*^[41]、*Minos*^[42]、*Mos1*^[43]、*Bari3*^[44]、*Fot1*^[45]、*impala*^[46]、*Famar1*^[47]、*Osmar5*^[48]、*ISY100*^[49]、*Mboumar-9*^[50]、*Passport*^[51]、*Tana1*^[52]和 *Thm3*^[53]转座子。

活性 *Tc1* 转座子最早是 Emmons 等在线虫基因组中发现的^[40]。*Tc1* 转座子全长约 1.7 kb, 可将自身副本插入到基因组的新位点, 而且还可以从插入位点精确地切除^[40]。Collins 等^[41]在研究 *Tc3* 转座子家族时发现了高活性的 *Tc3* 转座子, *Tc3* 转座子全长 2.5 kb, 除了末端重复序列外, 其余序列与 *Tc1* 转座子无关。*Tc3* 转座子末端有约 70 bp 的反向重复序列, *Tc3* 转座子末端的 8 个核苷酸序列与 *Tc1* 末端 9 个核苷酸序列中的 8 个相一致。之后, 陆续有新的转座子在果蝇基因组中被挖掘, 如在海得氏果蝇(*Drosophila hydei*)中被发现的 *Minos* 转座子, 由于其 ORF 与 *Tc1/Mariner* 类转座子家族其他成员具有高度同源性, 因此推测其为新的 *Tc1/Mariner* 转座子家族成员^[42]。Medhora 等^[43]从马里塔亚果蝇(*Drosophila Mauritiana*)中发现了 *Mariner* 类天然活性转座子(*Mos1*)。 *Mos1* 转座子全长 1286 bp, 具有 28 bp 的末端反向重复序列和特异性的 TA 目标结合位点, 现已成为埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、利什曼虫(*Leishmania major*)等动物的转基因工具^[47,48]。 *Bari3* 也是

在研究果蝇中 *Tc1/Mariner* 类转座子时发现的, *Bari3* 存在一个长的末端重复序列, 且不存在缺陷^[44,54,55]。随后, 研究者还在其他物种中发现了一些活性转座子, 如在植物病原真菌尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)中发现了 *Fot1* 和 *impala* 转座子。 *Fot1* 转座子全长 1928 bp, ITRs 长 44 bp, 包含 1 个长 ORF, 且末端为 TA 双核苷酸序列。此外, 其结构与 *Tc1* 转座子极为相似, 因此, 推测 *Fot1* 转座子可能为真菌中的新一类转座子^[45]。 *impala* 转座子全长 1280 bp, ITRs 长 27 bp, 其插入位点为 TA 区, 且在切除后会留下足迹。比较 *impala*、*Tc1* 和 *mariner* 转座子后发现它们的 ORF 高度同源, 因此推测它们属于同一个超家族^[46]。

近年来, 通过对欧洲蠖蛾(*European earwing*)全基因组分析, 获得高度保守序列, 进而分离得到了又一个天然存在的 *Tc1/Mariner* 转座子, 即 *Famar1* 转座子^[47]。此外, 在水稻(*Oryza sativa*)基因组中发现了 *Osmar5* 转座子。 *Osmar5* 转座子也属于 *Tc1/Mariner* 超家族, 在水稻基因组中有多个完整拷贝, 由此推测其具有潜在的转座活性。在酵母中的验证结果显示 *Osmar5* 转座子可以进行转座子切除, 同时结果还表明, 与大多数 *Tc1/mariner* 转座子类似, *Osmar5* 转座子在切除后会留下转座子的足迹, 并且会在 TA 双核苷酸发生重新插入, 其中插入和切除的位置存在紧密联系^[48]。随后, 在集胞藻 6803 (*Synechocystis* sp. PCC6803)中发现了 *ISY100* 转座子。 *ISY100* 转座子通过 N 端的两个 HTH 的 DNA 结构域与其末端的 ITRs 特异结合可以促进转座的发生。进一步的研究发现, 细菌和高等真核生物的 *Tc1/Mariner* 转座子的转座机制之间没有区别^[49]。2008 年, 在蚂蚁收获蚁属(*Messor bouvieri*)的卫星 DNA 中发现了 *Mboumar* 转座子。在几个 *Mboumar* 拷贝中包含全长的 ORF, 其中 *Mboumar-9* 与 *Mos1* 转座子有 64% 的同源性。通过构建转座子和转座酶表达载体, 证明了 *Mboumar-9* 有转座活性, 且它的转座效率可以与 *Mos1* 转座子相媲美, 并可以精准地插入到侧翼为 TA 双核苷酸区^[50]。

在硬骨鱼类中也发现了 3 个活性转座子, *Passport*, *Tana1* 和 *Thm3* 转座子。Clark 等^[51]在欧洲鳊鱼(*Pleuronectes platessa*)中分离到了一个天然的、有

自主转座活性的转座子,命名为 *Passport*。*Passport* 在脊椎动物中具有转座活性,该转座子能将稳定细胞转基因技术的整合率提高 40 倍,并具有明显的位点插入偏好性,偏好插入到基因内部。*Passport* 结构完整,是第一个有自主转座活性的脊椎动物 *Tc1/Mariner* 转座子超家族成员。Pujolar 等^[52]在鲟中鉴定出完整的 *Tc1/Mariner* 转座子成员(*Tana1*),推测其可能具有自然活性,*Tana1* 全长 1588 bp,ITRs 长 210 bp。Guo 等^[53]证实白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*; *Cyprinidae*)的 *Tc1/Mariner* 转座子(*Thm3*)具有自然活性,并能够介导基因转移。*Thm3* 转座酶为 335 aa 编码,在银鲫基因组中存在 3~5 个拷贝,左右侧翼长分别为 367 bp 和 230 bp。

另外,已有的研究报道表明通过分子重构分别获得了 3 个复活的活性 *Tc1/Mariner* 转座子,包括 *Sleeping Beauty (SB)*, *Frog Prince (FP)* 和 *Hsmar1*, 并已经成功应用于鱼类、青蛙、小鼠和大鼠等的转基因和基因捕获研究^[38,56-61]。

Sleeping Beauty (SB) 是基于生物信息学基础上第一个人为分子重构的转座子,是 1997 年由美国明尼苏达州大学科学家 Ivics 等构建,他们基于累计的系统发生数据,用生物信息学的方法对 8 种鱼中的 12 个鲑鱼亚家族的 *Tc1* 类元件进行了多重序列比对,并对 5 个保守的结构域进行了重建,从而获得了有活性的转座子元件,命名为“睡美人”转座子^[38]。*SB* 转座子全长 1.6 kb,类似于其他 *Tc1/Mariner* 转座子,由转座酶基因和两端的 ITRs 组成。转座酶基因的开放式阅读框编码 340 个氨基酸的蛋白质,ITRs 大约长为 230 bp,由外侧的 32 bp 反向重复序列(inverted Inverted repeat, IR)、内侧与 IR 相似的 DR 及两者间相距的 165~166 bp 碱基序列三个部分组成。*SB* 可以在多种脊椎动物细胞系,胚胎干细胞、体细胞和生殖细胞,以及小鼠体内的细胞发生高效的转座^[56,59,62-64]。转座子应用的主要瓶颈是转座子的整体转座活性。因此,科学家们尝试通过优化其末端重复序列和转座酶序列来提高 *SB* 的转座效率^[59,64,65]。这些优化后的组合效果在人类细胞中的效率比第一代转座子系统几乎提高了 100 倍。且末端重复结构的优化显著提高了转座子载体的容量^[64]。另外,*SB* 可以携带基因捕获元件,显著增强 *SB* 在功能基因组

学研究中的应用^[16]。

2003 年,Miskey 等^[60]用一种新的开放阅读框捕获方法从蛙(*Rana pipiens*)分离到了完整转座酶编码区。分离得到的克隆与从非洲爪蟾上预测的转座酶基因序列比对,其同源性达 90%。然而,这些天然存在的转座子是没有活性的,因此,完整将转座酶基因进行克隆,并和转座子的末端重复序列一起构成了一个新的转座子系统,并称之为 *Frog Prince (FP)*。*FP* 与 *SB* 的序列仅有 50% 的相似性,但 *FP* 能够介导外源基因在鱼类,两栖类和哺乳动物细胞系中以“剪切和粘贴”方式进行高效转座。后续实验证明 *FP* 转座子系统可以在人类细胞中发生高效的基因捕获,并且在斑马鱼细胞中的效率比 *SB* 高约 70%^[33]。

Hsmar1 是从黑角蝇属中分离得到的一种古老的 *Mariner* 转座子,是在 5000 万年前进入到灵长类的基因组中^[61]。在人类细胞中有活性,但是转座效率较低。2007 年,Miskey 等^[61]利用生物信息学的系统方法重构了 *Hsmar1* 转座酶基因,并命名为 *Hsmar1-Ra*。*Hsmar1-Ra* 改造的方法类似于 *SB* 转座子。将 *Hsmar1* 的转座酶中的非保守氨基酸替换成 4 个预测的保守氨基酸(*C53R*、*P167S*、*L201V* 和 *A219C*),经过转座活性试验表明人工改造的 *Hsmar1-Ra* 可以在人 HeLa 细胞和鱼类胚胎中有效转座^[66]。

不同生物基因组上潜在的活性转座子可能还有很多,随着基因组序列的完善和生物技术的发展,发现和挖掘新的高活性转座子会变得更加容易,将会进一步推动转基因、功能基因组学和人类基因治疗的研究进展。

5 *Tc1/Mariner* 转座子应用研究

Tc1/Mariner 作为一种重要的基因工程工具,利用它们的转座序列和转座酶可以分离的特征去构建二元转座子系统,该转座子系统具有高载量、高转座效率、高安全性等突出优点,可将其应用于转基因、基因功能研究、基因治疗等领域。

5.1 转基因

转座子技术的重要应用之一就是高效介导体细胞和生殖细胞的转基因。转座子介导的转基因技术

广泛应用于各类细胞的基因转移。转座子能够将 *NEO*、*GFP* 和 *Lac Z* 等外源基因有效整合进入多个物种的细胞系中, 包括 MEF、3T3、PEF、HeLa、ES、T 细胞等^[67-71], 并可以稳定表达。最近, 诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的发现给未来的再生医学带来了巨大的希望。通过只表达 4 种基因(*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc*), 可以将体细胞转化成类似于胚胎干细胞的多能状态。最初, 这只能通过反转录或者慢病毒转导来实现。然而, 由于安全问题, 永久的病毒插入限制了其所得的 iPSCs 的临床应用。转座子系统的两个特殊特征使它们成为一个有前景的替代。首先, 能与病毒转导相媲美的 *SB* 转座子的基因整合效率。其次, 因为转座子切除后并不一定插入到一个新的位置, 转座的“切除”组件在重新变成后能移除转基因。转座子可介导小鼠和人的 iPSCs 整合, 并能无痕迹地从已经实现多功能细胞中移除重编程因子^[72,73]。但仍需注意的是在切除的过程中转座子存在跳跃至新位置的可能性。

此外, 转座子在制备转基因模式生物、或者对于农业和生命科学研究重要的动物具有巨大的应用潜力。传统转基因是注射线性化质粒 DNA 到受精卵, 经外源基因的整合遗传给子代, 这种方法的转基因效率非常低, 大量外源质粒拷贝的存在会使得受精卵发育异常, 后代大量畸形, 研究表明大约只有 5% 显微注射斑马鱼受精卵能产生转基因子代^[74], 而且整合效率低, 相比于传统显微注射方法, 转座子介导基因转移的方法制备转基因动物就体现出很多优点: 转基因效率高, 转座的外源基因可以稳定整合到染色体中, 并能通过生殖细胞传递给子代且能够长期稳定的表达。转座子可以作为插入基因的序列标签, 用反向 PCR 的方法检测外源基因插入位点, 结合 Cre/loxP 技术可以在随机插入 loxP 位点后实现高效的定点操作。与逆转录病毒和慢病毒介导的转基因相比, 转座子对插入片段的长度限制较小, 且相对更安全^[56]。

SB 转座子已经广泛应用于鱼类、哺乳动物(猪、兔、鼠)、两栖类动物(蛙)、家禽等动物转基因研究中^[75-78]。将 *SB* 的 mRNA 和带荧光蛋白标记的转座子共注射斑马鱼受精卵^[79], 获得的转基因效率为

30%, 在所有的整合事件中约有 80% 是由转座子介导的, 至少 80% 表达了标记基因。同样的方法在青鳉鱼中检测 *SB* 的转座效率^[80], 结果显示 *SB* 的末端重复单独存在时能够增强在 F_0 代鱼中启动子依赖性的瞬时表达, 转座酶存在和不存在的转基因效率十分相似(分别为 31% 和 29%)。这种情况的发生可能是青鳉鱼体内存在内源性同源转座酶有关。除了 *SB* 转座子之外, *Minos*、*FP* 等也已经成功地应用于鼠、鱼类和脊椎动物细胞等转基因中^[51,81-83], 表明高活性转座子系统可以开发成为一种简单而有效的动物转基因工具。

5.2 基因捕获

由于转座子可以在宿主基因组上高效插入, 利用转座子介导, 开展基因捕获, 进行突变体筛选, 具有广阔的应用前景。典型的转座子介导的基因捕获载体通常包含剪切受体(splice acceptor, SA), 荧光报告基因 *GFP* 和多聚腺苷酸(PolyA, PA)。当启动子捕获载体整合到表达基因中, 报告基因和上游外显子之间就会发生拼接, 从而表达报告基因(图 4)。此外, 还有 PolyA 捕获载体, 或者启动子和 PolyA 双捕获载体, 增强子捕获载体等^[84]。

Geurts 等^[85]利用 *SB* 转座子在小鼠的研究中证实基因捕获可以作为检测内源基因表达的手段, 并且可以和生物发光检测相结合来鉴定具有组织特异性表达模式的内源基因。另外, 转座子可用于癌症基因的捕获研究。如 *SB* 介导的 *T2/Onc* 转座子被用于鉴定与肿瘤形成相关的插入位点, 认为转座子介导的方法可以成为鉴定肿瘤基因的有效工具^[86]。

近年来在模式动物小鼠上产生一种新的转座子介导精子突变体库技术。该技术首先制备两个转基因鼠品系, 一个为公鼠睾丸生精细胞中特异表达转座酶的转基因鼠, 另一个为携带转座子的转基因鼠, 将两个转基因鼠交配就可以产生一个携带转座子和转座酶的双转基因公鼠, 由于同时携带转座子和转座酶转基因构件, 公鼠睾丸组织特异表达的转座酶可以介导生殖细胞发生重新转座。从而在基因组中发生新的转座子插入, 这样双转基因公鼠能够源源不断地产生重新转座的精子, 成为精子突变体库, 与野生型母鼠交配可以制备大量的突变体(图 5)。这

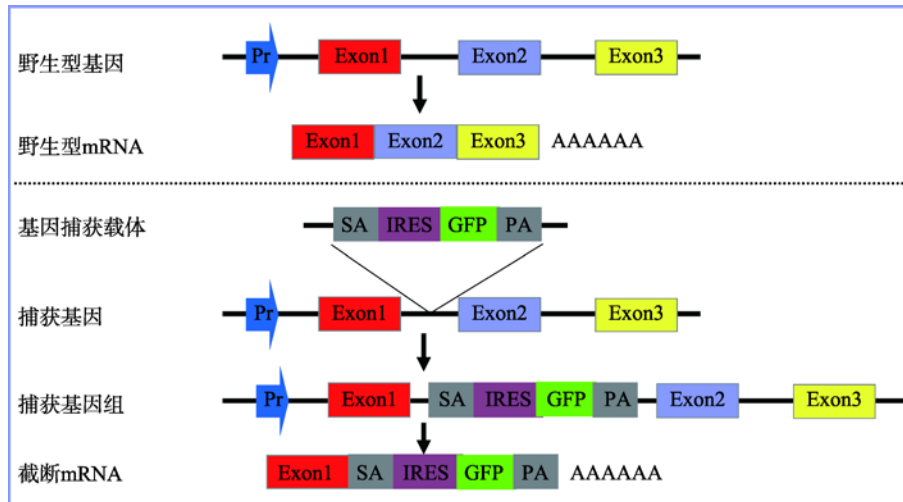


图 4 转座子介导的基因捕获示意图

Fig. 4 The schematic of gene trapping mediated by transposons

基因捕获载体不包含启动子,在报告基因(*GFP*)前面含有一个剪切受体(SA),后面含有多聚腺苷酸(PA)。如果载体整合到表达基因中,报告基因和上游外显子之间就会发生拼接,从而表达报告基因。

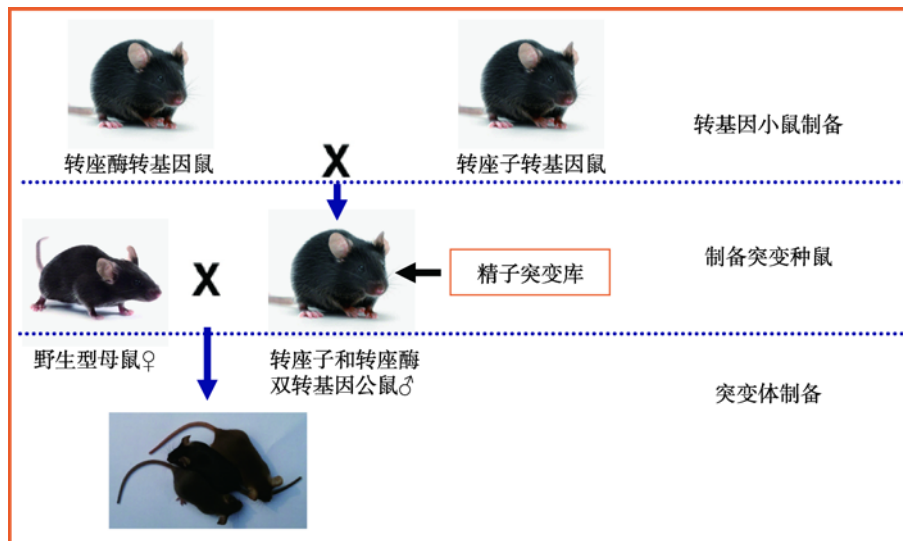


图 5 转座子介导鼠突变体库构建过程示意图

Fig. 5 The process of transposon-mediated sperm mutagenesis in mice

一技术是转座子介导基因捕获技术的进一步发展,其基因捕获效率进一步提高。研究表明,雄性首建鼠和野生型母鼠杂交产生转座事件,后代携带转座子插入的效率高达 80%~90%,首建鼠的单个精子平均包含 1~3 个插入事件^[57,63,87]。

这些年来,转座子介导的增强子捕获研究也受到了很大关注,特别是利用该技术在斑马鱼上鉴定了大量的增强子。Balciunas 等^[85]利用 *SB* 转座子在斑马鱼中进行增强子捕获研究,建立了 9 个在不同

组织和器官表达报告基因的家系。最有效的增强子捕获的方法之一就是利用 *Gal4-UAS* 系统,Takeuchi 等^[88]和 Asakawa 等^[89]分别成功利用 *Tol2* 转座子介导 *Gal4-UAS* 系统在斑马鱼上进行神经元功能和行为相关的基因捕获和增强子捕获研究。

除了 *SB* 转座子外,其他转座子(如 *Mos1*、*Minos* 等)也被应用于突变体制备^[90]。Boulin 等^[91]用 *Mos1* 转座子介导制备突变体后证实,转座子介导的方法虽然比传统方法的诱变效率低,但是,后期检测时

前者比后者更方便、更快速,筛选时更有效。Evangelinos 等^[19]用 *Minos* 转座子制备了两种突变体,并能有效地分析基因功能,他们发现形态突变中的一些是由于某些特定基因过表达引起的,而非基因失活。其他 DNA 转座子也被应用于基因捕获和增强子捕获中,如 *PB* 转座子已有效应用于小鼠的 PolyA 元件捕获^[92]。

5.3 基因治疗

转座子介导的体细胞基因转移的最终目的是人类基因治疗。事实上,大量的研究工作已经在小鼠中开展,用于探索转座子介导人类基因治疗的可能性。基因治疗要求治疗工具能够有效地将目的基因特异地导入相关靶细胞内,能够长时间表达,并且无毒副作用。虽然在基因治疗中有广泛应用的是病毒载体(主要是 γ -逆转录病毒和慢病毒),但是由于病毒载体的安全性和操作的复杂性限制其在基因治疗方面的应用^[93]。相比于病毒载体,转座子具有高容量、高效率和高安全性等优点,在基因治疗中具有十分诱人的前景^[93,94]。转座子系统可以结合不同的治疗方法,用以改善癌症的治疗。转座子已经在白血病和淋巴瘤临床试验中得到了应用。如 *SB* 转座子介导血管抑素-内皮抑素融合基因转移的系统,已经被应用于治疗 CT26 小鼠模型的研究中,该模型为结肠癌细胞(colorectal cancer cell, CRC)转移至肝脏的小鼠模型。这项研究表明,*SB* 转座子可以有效应用于转移性 CRC 的基因治疗中^[95]。Mario 等^[96]通过 *PB* 转座子介导肝脏定向因子 IX(FIX)治疗血友病模型小鼠,研究发现转座子介导的载体在肝脏细胞中可以形成稳定的 FIX 活性蛋白,且 *PB* 转座子在肝癌易感的小鼠模型中不诱发癌症的发生。因此他们认为转座子是有效且相对安全的基因治疗工具。虽然转座子在基因治疗方面的潜力巨大,但是它们的非特异整合性仍是一个不利因素^[97-99]。因此,有学者尝试研究新方法以提高转座子整合的特异性,例如在 *SB* 转座酶中嵌入锌指 DNA 结合结构域,以提高 *SB* 转座系统的转座效率和特异性^[100,101]。这种将 DNA 的特异性结合结构域与转座酶相融合的方法,有可能解决转座子系统的非特异性整合问题^[97,101]。

目前,转座子介导转基因的技术在斑马鱼、鼠、

鸡、大型哺乳动物(如牛、猪等)上的应用越来越广泛。近年来在国际权威技术杂志 *Nature Protocol* 上连续报道了多篇转座子介导的转基因鼠、兔子和猪等转基因动物的制备技术流程^[75,102,103],提示该技术已日臻成熟,是将来转基因研究的重要平台。而在基因功能研究中,利用转座子介导的基因捕获技术也已经在小鼠、斑马鱼等模式生物中发现了大量的功能基因和增强子调控元件等,显示了很大的应用潜力,且随着人类对基因组中基因调控知识理解需求的不断增强,这一技术将变得更加重要。此外,转座子已经成功应用于白血病和淋巴瘤等的临床基因治疗试验研究中,并取得了很好的研究进展。因此,继续加强对生物界分布广泛的 *Tc1/Mariner* 转座子高活性成员的挖掘,并进行开发应用研究仍具有重要的学术意义和应用价值,转座子领域的相关研究也会进一步推动生命科学的研究进展。

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] Gao B, Shen D, Xue SL, Chen C, Cui HM, Song CY. The contribution of transposable elements to size variations between four teleost genomes. *Mob DNA*, 2016, 7: 4. [DOI]
- [3] Huang CR, Burns KH, Boeke JD. Active transposition in genomes. *Annu Rev Genet*, 2012, 46: 651-675. [DOI]
- [4] Jurka J, Kapitonov VV, Kohany O, Jurka MV. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2007, 8: 241-259. [DOI]
- [5] Lohe AR, De Aguiar D, Hartl DL. Mutations in the *mariner* transposase: the D, D(35)E consensus sequence is nonfunctional. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(4): 1293-1297. [DOI]
- [6] Voigt F, Wiedemann L, Zuliani C, Querques I, Sebe A, Mátés L, Izsvák Z, Ivics Z, Barabas O. Sleeping Beauty transposase structure allows rational design of hyperactive variants for genetic engineering. *Nat Commun*, 2016, 7: 11126. [DOI]
- [7] Ivics Z, Izsvák Z. The expanding universe of transposon technologies for gene and cell engineering. *Mob DNA*, 2010, 1: 25. [DOI]
- [8] Munoz-Lopez M, Garcia-Perez JL. DNA transposons:

- nature and applications in genomics. *Curr Genomics*, 2010, 11(2): 115–128. [DOI]
- [9] Palazzoli F, Testu FX, Merly F, Bigot Y. Transposon tools: worldwide landscape of intellectual property and technological developments. *Genetica*, 2010, 138(3): 285–299. [DOI]
- [10] Nguyen DH, Hermann D, Caruso A, Tastard E, Marchand J, Rouault JD, Denis F, Thiriet-Rupert S, Casse N, Morant-Manceau A. First evidence of mariner-like transposons in the genome of the marine microalga *Amphora acutiuscula* (Bacillariophyta). *Protist*, 2014, 165(5): 730–744. [DOI]
- [11] Tellier M, Bouuaert CC, Chalmers R. Mariner and the ITm Superfamily of Transposons. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(2): MDNA3-0033-2014. [DOI]
- [12] Fernández-Medina RD, Granzotto A, Ribeiro JM, Carareto CMA. Transposition burst of mariner-like elements in the sequenced genome of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 69: 14–24. [DOI]
- [13] Kulkosky J, Jones KS, Katz RA, Mack JP, Skalka AM. Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(5): 2331–2338. [DOI]
- [14] Mizuuchi K. Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of mu and other elements. *Annu Rev Biochem*, 1992, 61: 1011–1051. [DOI]
- [15] Hartl D. Discovery of the transposable element *mariner*. *Genetics*, 2001, 157(2): 471–476. [DOI]
- [16] Ivics Z, Izsvák Z. Sleeping beauty transposition. *Microbiol Spectrum*, 2015, 3(2): MDNA3-0042-2014. [DOI]
- [17] van Luenen HGAM, Colloms SD, Plasterk RHA. The mechanism of transposition of Tc3 in *C. elegans*. *Cell*, 1994, 79(2): 293–301. [DOI]
- [18] Dornan J, Grey H, Richardson JM. Structural role of the flanking DNA in mariner transposon excision. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(4): 2424–2432. [DOI]
- [19] Evangelinos M, Anagnostopoulos G, Karvela-Kalogeraki I, Stathopoulou PM, Scazzocchio C, Diallinas G. Minos as a novel Tc1/mariner-type transposable element for functional genomic analysis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 2015, 81: 1–11. [DOI]
- [20] Arcà B, Zabalou S, Loukeris TG, Savakis C. Mobilization of a Minos transposon in *Drosophila melanogaster* chromosomes and chromatid repair by heteroduplex formation. *Genetics*, 1997, 145(2): 267–279. [DOI]
- [21] Lampe DJ, Churchill ME, Robertson HM. A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition in vitro. *EMBO J*, 1996, 15(19): 5470–5479. [DOI]
- [22] Luo GB, Ivics Z, Izsvák Z, Bradley A. Chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like element in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(18): 10769–10773. [DOI]
- [23] Ivics Z, Izsvák Z, Minter A, Hackett PB. Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(10): 5008–5013. [DOI]
- [24] Plasterk RHA, Izsvák Z, Ivics Z. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends Genet*, 1999, 15(8): 326–332. [DOI]
- [25] Leaver MJ. A family of Tc1-like transposons from the genomes of fishes and frogs: evidence for horizontal transmission. *Gene*, 2001, 271(2): 203–214. [DOI]
- [26] Shao H, Tu Z. Expanding the diversity of the IS630-Tc1-mariner superfamily: discovery of a unique DD37E transposon and reclassification of the DD37D and DD39D transposons. *Genetics*, 2001, 159(3): 1103–1115. [DOI]
- [27] Feschotte C, Wessler SR. Mariner-like transposases are widespread and diverse in flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(1): 280–285. [DOI]
- [28] Benjamin B, Yves B, Corinne AG. Assembly of the Tc1 and mariner transposition initiation complexes depends on the origins of their transposase DNA binding domains. *Genetica*, 2007, 130(2): 105–120. [DOI]
- [29] Yang GJ, Fattash I, Lee CN, Liu K, Cavinder B. Birth of three stowaway-like MITE families via microhomology-mediated miniaturization of a Tc1/Mariner element in the yellow fever mosquito. *Genome Biol Evol*, 2013, 5(10): 1937–1948. [DOI]
- [30] Liu Y, Yang GJ. Tc1-like transposable elements in plant genomes. *Mob DNA*, 2014, 5: 17. [DOI]
- [31] Bire S, Casteret S, Piégu B, Beauclair L, Moiré N, Arensbuger P, Bigot Y. Mariner transposons contain a silencer: possible role of the polycomb repressive complex 2. *PLoS Genet*, 2016, 12(3): e1005902. [DOI]
- [32] Smith A, Rutherford K, Benkel B. Characterization of a *Tigger1* element from the genome of the American mink (*Neovison vison*). *Gene*, 2012, 498(2): 164–168. [DOI]
- [33] Izsvák Z, Ivics Z, Hackett PB. Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol Gen Genet*, 1995, 247(3): 312–322. [DOI]
- [34] Goodier JL, Davidson WS. Tc1 transposon-like sequences are widely distributed in salmonids. *J Mol Biol*, 1994, 241(1): 26–34. [DOI]
- [35] Radice AD, Bugaj B, Fitch DH, Emmons SW. Widespread occurrence of the Tc1 transposon family: Tc1-like transposons from teleost fish. *Mol Gen Genet*, 1994, 244(6): 606–612. [DOI]
- [36] Ivics Z, Kaufman CD, Zayed H, Miskey C, Walisko O, Izsvák Z. The Sleeping Beauty transposable element:

- evolution, regulation and genetic applications. *Curr Issues Mol Biol*, 2004, 6(1): 43–55. [DOI]
- [37] Kuraku S, Qiu H, Meyer A. Horizontal transfers of *Tc1* elements between teleost fishes and their vertebrate parasites, lampreys. *Genome Biol Evol*, 2012, 4(9): 929–936. [DOI]
- [38] 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]
- [39] Wallau GL, Capy P, Loreto E, Hua-Van A. Genomic landscape and evolutionary dynamics of mariner transposable elements within the *Drosophila* genus. *BMC Genomics*, 2014, 15: 727. [DOI]
- [40] Emmons SW, Yesner L, Ruan KS, Katzenberg D. Evidence for a transposon in *Caenorhabditis elegans*. *Cell*, 1983, 32(1): 55–65. [DOI]
- [41] Collins J, Forbes E, Anderson P. The *Tc3* family of transposable genetic elements in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1989, 121(1): 47–55. [DOI]
- [42] Franz G, Savakis C. Minos, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the *Tc1*-like family of transposons. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(23): 6646. [DOI]
- [43] Medhora M, Maruyama K, Hartl DL. Molecular and functional analysis of the mariner mutator element *Mos1* in *Drosophila*. *Genetics*, 1991, 128(2): 311–318. [DOI]
- [44] Palazzo A, Moschetti R, Caizzi R, Marsano RM. The *Drosophila* *mojavensis* *Bari3* transposon: distribution and functional characterization. *Mob DNA*, 2014, 5: 21. [DOI]
- [45] Daboussi MJ, Langin T, Brygoo Y. *Fot1*, a new family of fungal transposable elements. *Mol Gen Genet*, 1992, 232(1): 12–16. [DOI]
- [46] Langin T, Capy P, Daboussi MJ. The transposable element *impala*, a fungal member of the *Tc1-mariner* superfamily. *Mol Gen Genet*, 1995, 246(1): 19–28. [DOI]
- [47] Barry EG, Witherspoon DJ, Lampe DJ. A bacterial genetic screen identifies functional coding sequences of the insect mariner transposable element *Famar1* amplified from the genome of the earwig, *Forficula auricularia*. *Genetics*, 2004, 166(2): 823–833. [DOI]
- [48] Yang G, Weil CF, Wessler SR. A rice *Tc1*/mariner-like element transposes in yeast. *Plant Cell*, 2006, 18(10): 2469–2478. [DOI]
- [49] Feng XF, Colloms SD. *In vitro* transposition of *ISY100*, a bacterial insertion sequence belonging to the *Tc1*/mariner family. *Mol Microbiol*, 2007, 65(6): 1432–1443. [DOI]
- [50] Muñoz-López M, Siddique A, Bischerour J, Lorite P, Chalmers R, Palomeque T. Transposition of *Mboumar-9*: identification of a new naturally active mariner-family transposon. *J Mol Biol*, 2008, 382(3): 567–572. [DOI]
- [51] Clark KJ, Carlson DF, Leaver MJ, Foster LK, Fahrenkrug SC. Passport, a native *Tc1* transposon from flatfish, is functionally active in vertebrate cells. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(4): 1239–1247. [DOI]
- [52] Pujolar JM, Astolfi L, Boscari E, Vidotto M, Barbisan F, Bruson A, Congiu L. *Tana1*, a new putatively active *Tc1*-like transposable element in the genome of sturgeons. *Mol Phylogenet Evol*, 2013, 66(1): 223–232. [DOI]
- [53] Guo XM, Zhang QQ, Sun YW, Jiang XY, Zou SM. *Tc1*-like transposase *Thm3* of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) can mediate gene transposition in the genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *G3*, 2015, 5(12): 2601–2610. [DOI]
- [54] Caizzi R, Caggese C, Pimpinelli S. *Bari-1*, a new transposon-like family in *Drosophila melanogaster* with a unique heterochromatic organization. *Genetics*, 1993, 133(2): 335–345. [DOI]
- [55] Moschetti R, Chlamydas S, Marsano RM, Caizzi R. Conserved motifs and dynamic aspects of the terminal inverted repeat organization within *Bari*-like transposons. *Mol Genet Genomics*, 2008, 279(5): 451–461. [DOI]
- [56] 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]
- [57] Horie K, Kuroiwa A, Ikawa M, Okabe M, Kondoh G, Matsuda Y, Takeda J. Efficient chromosomal transposition of a *Tc1*/mariner-like transposon *Sleeping Beauty* in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16): 9191–9196. [DOI]
- [58] 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]
- [59] Carlson CM, Dupuy AJ, Fritz S, Roberg-Perez KJ, Fletcher CF, Largaespada DA. Transposon mutagenesis of the mouse germline. *Genetics*, 2003, 165(1): 243–256. [DOI]
- [60] Miskey C, Izsvák Z, Plasterk RH, Ivics Z. The Frog Prince: a reconstructed transposon from *Rana pipiens* with high transpositional activity in vertebrate cells. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(23): 6873–6881. [DOI]
- [61] tra C, Papp B, Mátés L, Sinzelle L, Keller H, Izsvák Z, Ivics Z. The ancient *mariner* sails again: transposition of the human *Hsmar1* element by a reconstructed transposase and activities of the SETMAR protein on transposon ends. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(12): 4589–4600. [DOI]
- [62] Fischer SEJ, Wienholds E, Plasterk RHA. Regulated

- transposition of a fish transposon in the mouse germ line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6759–6764. [DOI]
- [63] Dupuy AJ, Fritz S, Largaespada DA. Transposition and gene disruption in the male germline of the mouse. *Genesis*, 2001, 30(2): 82–88. [DOI]
- [64] Geurts AM, Yang Y, Clark KJ, Liu GY, Cui ZB, Dupuy AJ, Bell JB, Largaespada DA, Hackett PB. Gene transfer into genomes of human cells by the *Sleeping Beauty* transposon system. *Mol Ther*, 2003, 8(1): 108–117. [DOI]
- [65] Cui Z, Geurts AM, Liu G, Kaufman CD, Hackett PB. Structure-function analysis of the inverted terminal repeats of the sleeping beauty transposon. *J Mol Biol*, 2002, 318(5): 1221–1235. [DOI]
- [66] Claeys Bouuaert C, Chalmers R. Transposition of the human *Hsmar1* transposon: rate-limiting steps and the importance of the flanking TA dinucleotide in second strand cleavage. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(1): 190–202. [DOI]
- [67] Talluri TR, Kumar D, Glage S, Garrels W, Ivics Z, Debowski K, Behr R, Kues WA. Non-viral reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells by Sleeping Beauty and piggyBac transposons. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 581–587. [DOI]
- [68] Sebe A, Ivics Z. Reprogramming of Human fibroblasts to induced pluripotent stem cells with *Sleeping Beauty* transposon-based stable gene delivery. In: Garcia-Pérez JL, ed. *Transposons and Retrotransposons: Methods and Protocols*. New York: Springer, 2016, 1400: 419–427. [DOI]
- [69] Gogol-Döring A, Ammar I, Gupta S, Bunse M, Miskey C, Chen W, Uckert W, Schulz TF, Izsvák Z, Ivics Z. Genome-wide profiling reveals remarkable parallels between insertion site selection properties of the MLV retrovirus and the *piggyBac* transposon in primary human CD4⁺ T cells. *Mol Ther*, 2016, 24(3): 592–606. [DOI]
- [70] Talluri TR, Kumar D, Glage S, Garrels W, Ivics Z, Debowski K, Behr R, Niemann H, Kues WA. Derivation and characterization of bovine induced pluripotent stem cells by transposon-mediated reprogramming. *Cell Reprogram*, 2015, 17(2): 131–140. [DOI]
- [71] Turchiano G, Latella MC, Gogol-Döring A, Cattoglio C, Mavilio F, Izsvák Z, Ivics Z, Recchia A. Genomic analysis of Sleeping Beauty transposon integration in human somatic cells. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112712. [DOI]
- [72] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovskiy M, Hämmäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu PT, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. *piggyBac* transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 766–770. [DOI]
- [73] 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]
- [74] Amsterdam A, Lin S, Hopkins N. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev Biol*, 1995, 171(1): 123–129. [DOI]
- [75] Ivics Z, Garrels W, Mátés L, Yau TY, Bashir S, Zidek V, Landa V, Geurts A, Pravenec M, Rüllicke T, Kues WA, Izsvák Z. Germline transgenesis in pigs by cytoplasmic microinjection of *Sleeping Beauty* transposons. *Nat Protoc*, 2014, 9(4): 810–827. [DOI]
- [76] Tschida BR, Largaespada DA, Keng VW. Mouse models of cancer: *Sleeping Beauty* transposons for insertional mutagenesis screens and reverse genetic studies. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 27: 86–95. [DOI]
- [77] Mátés L. Rodent transgenesis mediated by a novel hyperactive *Sleeping Beauty* transposon system. In: Hadlaczký G, ed. *Mammalian Chromosome Engineering: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, 2011, 738: 87–99. [DOI]
- [78] Carlson DF, Garbe JR, Tan WF, Martin MJ, Dobrinsky JR, Hackett PB, Clark KJ, Fahrenkrug SC. Strategies for selection marker-free swine transgenesis using the *Sleeping Beauty* transposon system. *Transgenic Res*, 2011, 20(5): 1125–1137. [DOI]
- [79] Davidson AE, Balciunas D, Mohn D, Shaffer J, Hermanson S, Sivasubbu S, Cliff MP, Hackett PB, Ekker SC. Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the *Sleeping Beauty* transposon. *Dev Biol*, 2003, 263(2): 191–202. [DOI]
- [80] Grabher C, Henrich T, Sasado T, Arenz A, Wittbrodt J, Furutani-Seiki M. Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. *Gene*, 2003, 322: 57–66. [DOI]
- [81] Zagoraiou L, Drabek D, Alexaki S, Guy JA, Klinakis AG, Langeveld A, Skavdis G, Mamalaki C, Grosveld F, Savakis C. *In vivo* transposition of Minos, a Drosophila mobile element, in mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20): 11474–11478. [DOI]
- [82] Drabek D, Zagoraiou L, deWit T, Langeveld A, Roumpaki C, Mamalaki C, Savakis C, Grosveld F. Transposition of the Drosophila hydei Minos transposon in the mouse germ line. *Genomics*, 2003, 81(2): 108–111. [DOI]
- [83] Kaufman CD, Izsvák Z, Katzer A, Ivics Z. Frog Prince transposon-based RNAi vectors mediate efficient gene knockdown in human cells. *J RNAi Gene Silencing*, 2005, 1(2): 97–104. [DOI]

- [84] Zambrowicz BP, Friedrich GA. Comprehensive mammalian genetics: history and future prospects of gene trapping in the mouse. *Int J Deve Biol*, 1998, 42(7): 1025–1036. [DOI]
- [85] Geurts AM, Wilber A, Carlson CM, Lobitz PD, Clark KJ, Hackett PB, McIvor RS, Largaespada DA. Conditional gene expression in the mouse using a *Sleeping Beauty* gene-trap transposon. *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 30. [DOI]
- [86] Temiz NA, Moriarity BS, Wolf NK, Riordan JD, Dupuy AJ, Largaespada DA, Sarver AL. RNA sequencing of *Sleeping Beauty* transposon-induced tumors detects transposon-RNA fusions in forward genetic cancer screens. *Genome Res*, 2016, 26(1): 119–129. [DOI]
- [87] Keng VW, Ryan BJ, Wangenstein KJ, Balciunas D, Schmedt C, Ekker SC, Largaespada DA. Efficient transposition of Tol2 in the mouse germline. *Genetics*, 2009, 183(4): 1565–1573. [DOI]
- [88] Takeuchi M, Matsuda K, Yamaguchi S, Asakawa K, Miyasaka N, Lal P, Yoshihara Y, Koga A, Kawakami K, Shimizu T, Hibi M. Establishment of Gal4 transgenic zebrafish lines for analysis of development of cerebellar neural circuitry. *Dev Biol*, 2015, 397(1): 1–17. [DOI]
- [89] Asakawa K, Suster ML, Mizusawa K, Nagayoshi S, Kotani T, Urasaki A, Kishimoto Y, Hibi M, Kawakami K. Genetic dissection of neural circuits by *Tol2* transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(4): 1255–1260. [DOI]
- [90] Pavlopoulos A, Oehler S, Kapetanaki MG, Savakis C. The DNA transposon Minos as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertebrates and invertebrates. *Genome Biol*, 2007, 8 (Suppl. 1): S2. [DOI]
- [91] Williams DC, Boulton T, Ruaud AF, Jorgensen EM, Besereau JL. Characterization of *Mos1*-mediated mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*: a method for the rapid identification of mutated genes. *Genetics*, 2005, 169(3): 1779–1785. [DOI]
- [92] Li LM, Liu P, Sun LL, Bin Z, Fei J. PiggyBac transposon-based polyadenylation-signal trap for genome-wide mutagenesis in mice. *Sci Rep*, 2016, 6: 27788. [DOI]
- [93] Izsvák Z, Chuah MK, VandenDriessche T, Ivics Z. Efficient stable gene transfer into human cells by the *Sleeping Beauty* transposon vectors. *Methods*, 2009, 49(3): 287–297. [DOI]
- [94] Mirzaei H, Sahebkar A, Jaafari MR, Hadjati J, Javanmard SH, Mirzaei HR, Salehi R. PiggyBac as a novel vector in cancer gene therapy: current perspective. *Cancer Gene Ther*, 2016, 23(2–3): 45–47. [DOI]
- [95] Belur LR, Podetz-Pedersen KM, Sorenson BS, Hsu AH, Parker JB, Carlson CS, Saltzman DA, Ramakrishnan S, McIvor RS. Inhibition of angiogenesis and suppression of colorectal cancer metastatic to the liver using the *Sleeping Beauty* Transposon System. *Mol Cancer*, 2011, 10: 14. [DOI]
- [96] Di Matteo M, Samara-Kuko E, Ward NJ, Waddington SN, McVey JH, Chuah MKL, VandenDriessche T. Hyperactive piggyBac transposons for sustained and robust liver-targeted gene therapy. *Mol Ther*, 2014, 22(9): 1614–1624. [DOI]
- [97] Wilson MH, Kaminski JM, George AL Jr. Functional zinc finger/sleeping beauty transposase chimeras exhibit attenuated overproduction inhibition. *FEBS Lett*, 2005, 579(27): 6205–6209. [DOI]
- [98] Grabundzija I, Wang JC, Sebe A, Erdei Z, Kajdi R, Devaraj A, Steinemann D, Szuhai K, Stein U, Cantz T, Schambach A, Baum C, Izsvák Z, Sarkadi B, Ivics Z. *Sleeping Beauty* transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(3): 1829–1847. [DOI]
- [99] Maragathavally KJ, Kaminski JM, Coates CJ. Chimeric *Mos1* and *piggyBac* transposases result in site-directed integration. *FASEB J*, 2006, 20(11): 1880–1882. [DOI]
- [100] Urschitz J, Kawasumi M, Owens J, Morozumi K, Yamashiro H, Stoytchev I, Marh J, Dee JA, Kawamoto K, Coates CJ, Kaminski JM, Pelczar P, Yanagimachi R, Moisyadi S. Helper-independent piggyBac plasmids for gene delivery approaches: strategies for avoiding potential genotoxic effects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(18): 8117–8122. [DOI]
- [101] VandenDriessche T, Ivics Z, Izsvák Z, Chuah MK. Emerging potential of transposons for gene therapy and generation of induced pluripotent stem cells. *Blood*, 2009, 114(8): 1461–1468. [DOI]
- [102] Ivics Z, Hiripi L, Hoffmann OI, Mátés L, Yau TY, Bashir S, Zidek V, Landa V, Geurts A, Pravenec M, Rülcke T, Bösze Z, Izsvák Z. Germline transgenesis in rabbits by pronuclear microinjection of *Sleeping Beauty* transposons. *Nat Protoc*, 2014, 9(4): 794–809. [DOI]
- [103] Ivics Z, Mátés L, Yau TY, Landa V, Zidek V, Bashir S, Hoffmann OI, Hiripi L, Garrels W, Kues WA, Bösze Z, Geurts A, Pravenec M, Rülcke T, Izsvák Z. Germline transgenesis in rodents by pronuclear microinjection of *Sleeping Beauty* transposons. *Nat Protoc*, 2014, 9(4): 773–793. [DOI]