

转座元件 *mariner*

张 卉, 王小珂, 马世俊

(北京实验动物研究中心, 北京 100012)

摘要:自 *mariner* 转座元件在 *Drosophila mauritiana* 中首次发现至今已经在包括人类在内的多种生物体中证实了 *mariner* 及类 *mariner* 元件(MLEs)的存在。MLEs 属于 *mariner/Tc1* 超家族-II 型转座元件中分布最广、种类最多的超家族之一。MLEs 的转座酶都具有“D₁D₂(34)D₃”的结构,并能催化 MLEs 通过“剪切和粘贴”机制进行转座。它们的宿主广泛和多样,能够进行种系传递,这都表明 MLEs 的转座不需要宿主特异元件的参与。MLEs 对多种生物尤其对脊椎动物的成功转化更支持了它们的不依赖宿主的转座机制,而且让人们看到了它们作为转基因载体的巨大潜能。

关键词: *mariner*; MLEs; 转座元件; 种系转化; 转化载体

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2004)05-0756-07

Transposable Element *mariner*

ZHANG Hui, WANG Xiao-Ke, MA Shi-Jun

(Beijing Laboratory Animal Research Center, Beijing 100012)

Abstract: *Mariner* and *mariner*-like elements (MLEs) have been found in a wide range of organisms including human since its discovery in *Drosophila mauritiana*. MLEs belong to the *mariner/Tc1* superfamily, one of the most diverse and widespread Class II transposable elements. MLEs have a conserved “D₁D₂(34)D₃” motif in their transposases and they transpose by cut-and-paste mechanisms. Their extraordinarily wide host range and horizontal transmission in distantly related species indicate that they do not need additional host-specific factors for transposition. The evidence that MLEs could transform a wide variety of organisms especially the vertebrates supported the host-independent mechanism and suggested the availability as a kind of potential transforming vector.

Key words: *mariner*; MLEs; transposable element; germline transformation; transforming vector

转座子是一类能够在染色体上“跳越”的 DNA 片段,是发现新基因和基因功能分析的有效工具。转座子作为插入突变原或分子标签已被广泛用于基因的分离和克隆^[1],一些转座子还作为转化载体用于制备转基因动植物。最早的动物转座子是从果蝇 *Drosophila melanogaster* 中分离出来的 P 元件,但 P 元件的转座需要宿主的参与,这就极大地限制了 P 元件在其他物种中的应用^[2]。hAT 家族的 *hermes* 来自家蝇 *Musca domestica*,是第一个能够有效转化远缘物种的非果蝇转座子^[3]。然而,众多转座

子中最引起注意的还是 *mariner/Tc1* 超家族的成员,它们转座不需要宿主相关因子的存在^[2],而且超家族中来自果蝇的 *mariner* 转座元件能有效转化果蝇及其他昆虫,以及包括禽类、鱼类在内的多种生物。*mariner* 对大量的非宿主生物体的转化让人们看到它作为转基因载体的优势和潜力^[4],这个领域的研究也更加活跃起来。

1 *mariner* 元件概述

转座元件 *mariner* 最初是在研究果蝇 *Drosoph-*

ila mauritiana 的一个不稳定的突变时发现的^[5]。突变是由于 1.3 kb 的转座元件插入到 *white* 基因的 5' 非编码区, 结果导致果蝇眼从鲜红色变为桃色 (peach)^[5,6]。后经证实为 *white* 的等位基因, 并命名为 *white-peach*、*wpch* 或 *w^{pch}*^[7]。这个转座元件从体细胞基因组跳离, 会使果蝇眼呈桃色和红色夹杂; 若从生殖细胞基因组跳离, 则使果蝇后代眼回复突变成野生型的红色^[5,6,8]。这个首次发现的 *mariner* 转座元件就被命名为 *peach*。后来发现 *peach* 虽然能以很高的频率转座, 其自身产生的转座酶却没有活性^[5~8]。接着从 *Drosophila mauritiana* 又分离出了自主性 *mariner* 元件 *Mos1*, 证实是 *Mos1* 产生的有功能的转座酶催化了 *peach* 的转座^[5]。后来又在非洲果蝇 *Zaprionus tuberculatus* 和惜古比天蚕 *Hyalophora cecropia* 中发现了 *mariner* 元件^[4]。目前已经知道 *mariner* 元件不仅存在于果蝇等多种昆虫和其他无脊椎动物如蜈蚣 *Scutigera coleoptrata*、螨、线虫 *Caenorhabditis elegans*、涡虫 *Dugesia tigrina* 和家蚕 *Bombyx mori* 中^[8]; 也存在于人类等脊椎动物中; 在真菌^[5] 和植物中^[4,9] 也有发现。

mariner 家族的转座元件 (*mariner*-like elements, MLEs), 属于 *mariner/Tc1* 超家族, 而 *mariner/Tc1* 又是 II 型转座元件中在真核生物分布最广、种类最多的超家族之一。根据序列的相似性, *mariner* 元件主要可分为五个亚族 (分别以最早发现其存在的物种命名): *mauritiana*、*cecropia*、*mellifera*、*irritans* 和 *capitata*, 不同的亚族在核苷酸序列上约有 40%~56% 是相同的。在人类基因组中已确认了 *cecropia*、*irritans* 和 *mellifera* 3 个亚族, 但是否有功能还不清楚^[8]。

2 *mariner* 元件的结构特征

转座元件 *mariner/Tc1* 超家族成员的共同点是它们的转座酶或整合蛋白的序列上都有一个“D, D(35)E”的结构, 即有两个天冬氨酸残基和一个谷氨酸残基 (有的第三个也是天冬氨酸残基), 两个天冬氨酸残基间隔约为 90 个氨基酸, 谷氨酸残基在羧基端方向上与天冬氨酸间隔 34 或 35 个氨基酸残基。这个结构是转座酶催化中心的一部分, 能够结合催化所必需的二价阳离子 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} ^[8]。在转座酶的 N 端有一个“螺旋-转角-螺旋” (helix-turn-helix, HTH) 结构, 是 DNA 结合区, 能够识别相应的

反向末端重复序列 (ITR)^[5]。此“D, D(35)E”的结构还存在于真核生物反转录转座子、反转录病毒 (HIV) 整合蛋白以及原核生物转座子中, 如噬菌体 Mu, 转座子 Tn7, 和一些大肠杆菌的插入序列: IS2、IS3、IS4 和 IS30^[5,8] 中。但 *mariner* 元件的转座酶稍有不同, 是“D, D(34)D”的结构; 类 *Tc1* 元件 (*Tc1*-like elements, TLEs) 的转座酶的结构为“D, D(34)E”^[7]。如果将第三个天冬氨酸 (D) 改为谷氨酸 (E), 转座酶就会完全失活^[7]。*mariner* 元件的转座酶除具有一个特殊的 D, D(34)D 标志性结构外, 还有两个保守序列 Try-Val-Pro-His-Glu-Leu (WVPHLE) 和 Tyr-Ser-Pro-Asp-Leu-Ala-Pro (YSPDLAP), 两序列间隔约 150 个氨基酸残基^[9]。典型的 *mariner* 元件是来自果蝇 *D. mauritiana* 的自主性转座元件 *Mos1* (见图 1)。*Mos1* 的 DNA 序列全长 1286 bp, 包括两个

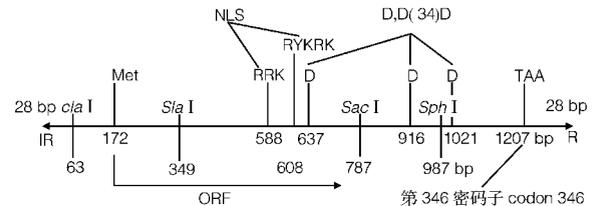


图 1 *Mos1* 元件序列模式图^[8]

Met: 转录的起始甲硫氨酸; IR, R: 反向重复序列;

TAA: 终止密码子; ORF: 可译框;

NLS: 核定位信号; D: 天冬氨酸。

Fig. 1 Sequence organization of the *Mos1* element

Met; the first amino acid of transcription;

IR, R: inverted repeats; TAA: termination codon;

ORF: open reading frame; NLS: nuclear localization signal; D: Asn.

28 bp 的反向重复序列、一个编码含 345 个氨基酸的转座酶可译框 (ORF)。此外 *Mos1* 序列中还有一些单的限制酶酶切位点, 如 *Cla* I (63~68)、*Sal* I (349~354)、*Sac* I (787~792) 和 *Sph* I (987~992)^[4]。*Mos1* 转座酶的氨基酸序列中有一个二分核定位信号序列 (bipartite nuclear localization signal): RYKRRK 和 RRK, 这个序列与斑马鱼的一些 TLE 的核定位信号序列是相似的。“RRK”中间的 R 在 MLE 和 TLE 中都是保守的, 而且遗传学研究显示这个“R”是关键, 如果将“R”改为“H”, *Mos1* 的转座酶就完全没有了活性^[8]。核定位信号的存在使转座酶能够定位在核区, 从而保证了转座元件的转座。非自主性 *mariner* 元件 *peach*, 也具有全长序列和

可译框,与 *Mos1* 有 11 个核苷酸不同,且没有 *Cla* I 位点,产生的转座酶有 4 个氨基酸不同(见图 2),也丧失了活性,只能在反式(*trans-*,即来自其他区域)转座酶的作用下转座^[4,7,8,10]。

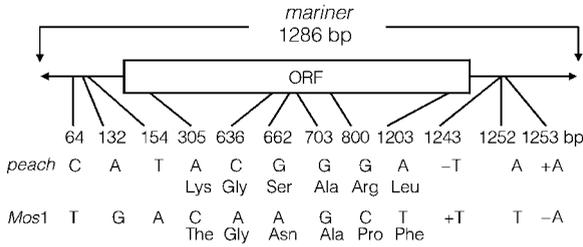


图 2 *Mos1* 与 *peach* 元件转座酶氨基酸序列比较^[10]

Fig.2 Sequence differences between the *Mos1* transposase and *peach* transposase

3 *mariner* 元件的转座机制

mariner 元件的转座与 *E. coli* 转座子 Tn7、Tn5 和 Tn10 以及果蝇中的 *P* 元件类似,也是“剪切和粘贴”(cut-and-paste)的过程^[5]。转座时转座酶识别并与转座元件两端的重序列结合,形成一个联会复合体,然后在转座元件与侧翼 DNA 的接合处进行单链切割,将转座元件 DNA 序列两端的 3'OH 暴露出来,5'端的切点位于元件序列内部 3nt 处^[5],切离的转座元件插入到新的位点,3'OH 与插入位点的 5'P 结合^[8]。*mariner* 元件的插入位点常有 TA 二聚体^[8],它的切离和插入都会形成缺口(gap),经宿主酶的修复,产生转座元件特有的二倍体插入序列。*Mos1* 转座酶催化的 *peach* 元件的转座(见图 3)在

转出位点会留下 5'-TACCATA-3' 或 5'-TATGATA-3' 的“痕迹”,这表明 *peach* 元件剪切时两端都留下 3 个碱基的 3' 突出末端。对 20 个独立的 *mariner* 剪切事件的分析显示,有 10 种留下了 5'-TACCATA-3' “痕迹”,有 8 种留下了 5'-TATGATA-3' “痕迹”,还有两种修复机制比较复杂^[8]。

4 *mariner* 元件的相关研究

mariner 元件分布广泛,却很随机,且拷贝数在不同的物种中变化很大(表 1)。某一特定的 *mariner* 元件可能只在近缘物种的某些种类中存在;可能在某些远缘物种中同时存在;也可能在一个物种中达到数千拷贝,而在另一物种中只存在几个拷贝^[12]。很多因素都可能影响和决定着 *mariner* 元件的分配方式和存在数量,是什么起着主导作用还不很清楚。其中有 3 个因素研究的比较清楚:(1)水平传递;(2)突变;(3)随机丢失^[8,12]。

表 1 不同物种中 *mariner* 的拷贝数^[8]

Table 1 The copy numbers of MLE in different species

<i>mariner</i> 拷贝数	<i>mariner</i> 种类	物种 Species
~2	<i>mauritiana</i>	果蝇的一种 <i>D. sechellia</i>
~30	<i>mauritiana</i>	果蝇的一种 <i>D. mauritiana</i>
~100	<i>mellifera</i>	果蝇的一种 <i>D. erecta</i>
~1000	<i>cecropia</i>	惜古比天蚕 <i>Hyalophora cecropia</i>
~8000	<i>cecropia</i>	涡虫 <i>Dugesia tigrina</i>
~17,000	<i>irritans</i>	角蝇 <i>Haematobia irritans</i>

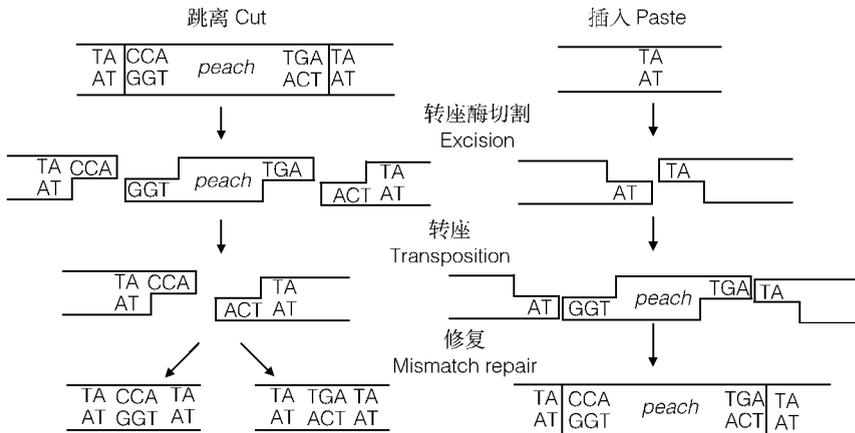


图 3 *Mos1* 存在下的 *peach* 的转座^[11]

Fig.3 Transposition of the *Peach* element catalysed by functional transposase of *Mos1*

4.1 水平传递

水平传递是指 *mariner* 元件从宿主传递到不同的、生殖隔离的物种种系的能力,最初是在比较来自 *Zaprionus* 和 *Drosophila* 的 *mariner* 元件时最先注意到的。对大量的昆虫基因组的研究也发现,有的物种在系统发育中相距很远,但 *mariner* 元件序列很相似,序列的高度同一性为 *mariner* 元件的水平传递提供了证据(见表 2),然而水平传递的发生率还不确定。

表 2 *mariner* 元件水平传递的证据^[8]Table 2 Horizontal transmission of *mariner* element

所在物种 Species	序列同一性 Sequence identity
非洲果蝇 <i>Zaprionus tuberculatus</i> / 果蝇 <i>D. mauritiana</i>	97%
果蝇 <i>D. erecta</i> / 蚤 <i>Ctenocephalides felis</i>	96% ~ 99%
角蝇 <i>Haematobia irritans</i> / 按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	>90%
蜈蚣 <i>Forficula auricularia</i> / 蜜蜂 <i>honey bee</i>	>90%
涡虫 <i>Dugesia tigrina</i> / 蚁 <i>ant</i>	>70%

介导 *mariner* 元件发生水平传递的原始载体还在研究中,有报道称一种螨虫可能介导了它在两种果蝇间的传递。还有其他一些可能的载体:外来的寄生虫、胞内的寄生或共生物、DNA 和 RNA 病毒、反转录病毒等^[8]。

4.2 突变失活

虽然 *mariner* 元件在很多物种基因组中存在,但它们绝大多数都是没有功能的假基因。它们的序列中含有多重终止信号、缺失及移码突变,使可译框被破坏,不能编码转座酶;有的是可译框中的个别碱基错误,产生无活性的转座酶;如 *peach*、*Ma310*、*Ma311*、*Ma331*;还有的即使产生了有活性的转座酶,其活性也非常有限。目前证实为有功能的 *mariner* 元件只有来自 *D. mauritiana* 的 *Mos1* 和来自 *D. simulans* 的部分转座元件^[8]。

为什么大多数的 *mariner* 元件没有活性?目前有几种推测:(1)可能是突变选择压力的存在,使得 *mariner* 元件趋向于靠反式转座酶作用以获得较稳定的转座;(2)可能是转座行为本身造成了突变;(3)可能存在正选择的压力,无活性的元件参与了转座的调控,它们可以充当转座的底物,却不会增加转座酶,有助于缓解转座酶活性过度或转座太多造成的不利影响,它们还可以干扰有功能的转座酶,竞争其结合位点,或使转座酶失活^[7,8]。

4.3 随机丢失

mariner 元件的亚族有随机丢失的现象。这是由于在进化过程中,随机遗传漂移引起的转座元件丢失的速率超过了通过转座获得此元件的速率,最终导致转座元件从基因组中消失。过度的序列趋异也会引起随机丢失^[8]。最典型的例子来自对果蝇的研究。对组成 *melanogaster* 亚目的八个种的序列分析表明,其中的 *D. mauritiana*、*D. simulans*、*D. sechellia*、*D. yakuba* 和 *D. teissieri* 基因组中都

存在多拷贝的 *mariner* 元件,另外三个种 *D. erecta*、*D. orena* 和 *D. melanogaster* 基因组中却不存在,系统发育的研究数据显示存在于它们祖先基因组中的 *mariner* 元件分别在向 *D. erecta*、*D. orena* 一支和 *D. melanogaster* 一支的进化过程中丢失了^[8,13]。

5 *mariner* 元件的自我调节

高拷贝的 *mariner* 元件对宿主是不利的,因为它们过多的存在会影响甚至破坏宿主基因的功能。为防止太多不利的转座事件的发生,*mariner* 元件有其自身的调节方式,目前研究得比较清楚的主要有两种,即过量抑制(overproduction inhibition, OPI)和显性失活(dominant negative complementation, DNC)^[14]。

5.1 转座酶的过量抑制

这种调节方式是在 *Mos1* 的转座酶以高水平表达时观察到的。将 *hsp70* 启动子融合部分 *Mos1* 启动子构成双启动子来启动 *Mos1* 转座酶的转录,并通过检测 *peach* 元件在种系的转座(导致果蝇眼色回复突变成红色)效率来评价 *Mos1* 转座酶的活性,结果发现提高 *Mos1* 在载体中的拷贝数在 25℃ 时会降低 25% 的转座效率,在热激条件下降低 45%;对于一个拷贝和两拷贝的 *Mos1*,热激条件下分别会降低 13% 和 37% 的转座效率^[8]。

5.2 显性失活

此调节方式是在 *Mos1* 转座酶基因的错义突变体中观察到的。对 *wpch* 种系中转座的测定发现:错义突变体的存在会降低野生型转座酶的活性,但不是所有的错义突变体都有这种效应。在研究的 18 个错义突变体中,有 7 个对 *wpch* 中的转座率没有影响,这些属于典型的没有功能的突变,例如敲除了起始密码子 Met 的突变;有 8 个对野生型转座酶的活性有影响,使 *wpch* 中的转座率降低了一半;还有 3 个突变体的突变位点都在 D(34)D 附近,对野生型转座酶的活性作用最强,抑制了 75%。错义突变体在自然物种中保留着,可能是正选择的结果也可能是抑制正常转座酶活性以调控转座的需要^[8]。

6 *mariner* 元件的种系转化

mariner 元件存在的广泛性、宿主的多样性,以及它们明显的不依赖宿主的转座机制,让研究者们

看到了它们作为转化载体的潜能^[8]。近来的研究证明 *mariner* 的一些成员不仅能够对果蝇不同种系的种系转化,而且还能转化其他非宿主生物,从原生动

物利士曼原虫 (*Leishmania major*)、无脊椎动物果蝇、蚊到脊椎动物的禽类和鱼^[9]。其中 *mariner* 对脊椎动物斑马鱼和鸡的转化尤其值得注意。

表 3 *mariner* 元件已成功转化的生物
Table 3 Organisms transformed by *mariner* element

生物种类		元件	参考文献
Species		<i>Mariner</i>	References
细菌 <i>Bacteria</i>	埃希氏菌属 <i>Escherichia</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	Himar1 15
	分支杆菌属 <i>Mycobacterium</i>	耻垢分枝杆菌 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Himar1 15
	螺杆菌属 <i>Helicobacter</i>	幽门螺杆菌 <i>Helicobacter pylori</i>	MLE 16
	弧菌属 <i>Vibrio</i>	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	MLE 17
	奈瑟氏双球菌属 <i>Neisseria</i>	脑脊髓膜炎双球菌 <i>Neisseria meningitidis</i>	Himar1 18
原生动物 <i>Protozoan</i>	利士曼原虫属 <i>leishmania</i>	巨大利士曼原虫 <i>Leishmania major</i>	<i>Mos1</i> 19
	果蝇属 <i>Drosophila</i>	黄果蝇 <i>D. melanogaster</i>	<i>Mos1</i> 20
无脊椎动物 <i>Invertebrate</i>		黑果蝇 <i>D. virilis</i>	<i>Mos1</i> 21
	蚊 <i>mosquito</i>	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	<i>Mos1</i> 22, 23
	蚕 <i>silk worm</i>	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	<i>Mos1</i> 24
	家蝇 <i>housefly</i>	家蝇 <i>Musca domestica</i>	<i>Mos1</i> 25
脊椎动物 <i>Vertebrate</i>	鱼类 <i>Fish</i>	斑马鱼 <i>zebrafish</i>	<i>Mos1</i> 2
	鸟类 <i>Bird</i>	禽 <i>chicken</i>	<i>Mos1</i> 26

6.1 *mariner* 元件导入斑马鱼^[9]

斑马鱼适应力强、产卵量大、繁殖周期短、胚胎透明,已经成为一种重要的胚胎组织学和基因组学的模式生物^[2]。多年前,已利用显微注射技术成功制备出转基因斑马鱼,而且转基因实现了种系传递,只是种系传递的效率只有 0%~20%,转基因的表达也不稳定。后来,利用假型反转录病毒作载体大大提高了外源基因的转化效率(可达到 100%)和种系传递的效率,且已用于斑马鱼胚胎发生的相关基因的克隆和突变。近几年的研究发现 *mariner*/*Tc1* 家族的元件也可转化脊椎动物,例如在秀丽线虫中发现的 *Tc3* 转座元件已经成功转化了斑马鱼,1998 年 Fadool 等将 *mariner* 元件成功地转入了斑马鱼中,并实现了种系传递^[2]。

Fadool 等设计了特异的 PCR 引物,从 *D. mauritiana* 的基因组中克隆出 1.3kb 的非自主性的 *peach* 元件并插入到 pBluescript II 载体的 *EcoR* I 位点,构建了载体 pWE1。以构建有 1.45kb *Mos1* (缺少 5'端反向重复序列不能转座)的载体 pAD31 作模板, T7 RNA 聚合酶催化,得到 *Mos1* 转座酶的体外转录产物 mRNA。将单独的 pWE1 质粒 DNA 以及 pWE1 与自主元件 *Mos1* 转座酶 mRNA 的混合物(1:1)分别注入 1~2 细胞期的斑马鱼胚胎中。注

入 pWE1 及 mRNA 混合物的胚胎有 64 个,有 12 对在成熟期成功交配,用 PCR 方法对子一代进行筛选,结果显示有 33%的亲本将 *peach* 元件传递到了子一代,*peach* 从子一代向子二代的传递符合孟德尔分配,而且用 PCR 方法和 Southern 印迹都没有检测到载体 pWE1 的序列,说明 *peach* 是在 *Mos1* 提供的转座酶的作用下发生了转座,而非随机整合。仅注入 pWE1 质粒 DNA 的个体未检测到转基因,进一步证明转座酶对整合起了关键的作用,并支持了 *mariner* 元件转座的不依赖宿主机制^[2]。

6.2 *mariner* 元件导入禽类

近年来,禽蛋生物反应器以其自身的优势和不可限量的前景渐渐成为一个新的研究热点,但转基因禽类的制备一直以来都缺少一种有效的、非病毒介导的基因转化系统,这使得这个系统发展非常缓慢。Roslin 研究所的研究人员报道了一种利用 *mariner* 转座元件将外源基因高效导入鸡基因组的方法^[27],提高了外源基因在鸡基因组的整合效率,展示了制备转基因禽类的新前景^[28]。

1998 年, Sang 等用来自果蝇 *D. mauritiana* 的自主性 *mariner* 元件 *Mos1* 成功地对鸡进行了种系转化。他们将构建有 *Mos1* 元件的质粒 *pMos1* 注入鸡受精卵胚盘的细胞质中(有的受精卵还同时注入

了纯化的转座酶蛋白),对存活 12 天的胚胎提取 DNA,用 PCR 法检测 *Mos1* 及载体序列的存在,结果显示含 1 拷贝 *Mos1* 的胚胎占 27% (12/44),这与 *mariner* 对其天然宿主果蝇的转化率相当,比其他基因构件物的随机整合率高 20 多倍(用鸡溶菌酶基因的载体转化率还不到 1%),且 79% (23/29)的 *Mos1* 阳性个体都未检测到载体序列。G1 代个体基因组中 *Mos1* 元件的阳性率达 29% (27/93),是一般基因构建物种系传递效率的 10 倍。从 G1 代鸡基因组中克隆出单拷贝的 *Mos1* 片段,通过分析鉴定证明插入鸡基因组的是完整的 *Mos1* 元件,且在插入位点有 *mariner* 转座所产生的特征性的 TA 重复序列,说明 *Mos1* 元件已离开质粒载体与鸡基因组整合。G2 代中 *mariner* 元件的阳性率接近 50%,且两拷贝的 *mariner* 元件从 G1 代稳定地传到 G2 代说明 *mariner* 元件与基因组整合后是比较稳定的,*mariner* 元件在转入 *D. melanogaster* 基因组后同样也是稳定的,其转座概率低于 0.1%。而且发现与 *mariner* 一同注入的转座酶并未提高转座率,如果用 Tet^r 插入 *mariner* 元件阻断转座酶基因的表达,却使转座率明显下降,说明 *mariner* 元件的转座主要是转座酶基因表达产物催化的^[26]。

mariner 元件对斑马鱼和禽类种系转化的成功将其适用范围扩大到了脊椎动物,同时也为转基因动物的制备提供了新的有效的基因导入方法。

6.3 *mariner* 元件载体稳定性研究

Hartl 等构建了一系列的 *mariner* 表达载体,分单一插入载体和复合载体,单一插入载体上只构建有一个拷贝的 *mariner* 元件,外源基因的方向有的与 *mariner* 同向,有的反向。复合载体上外源基因的两侧是 *mariner* 元件的部分或完整的两个拷贝。这两部分的 *mariner* 有的同向,有的反向。分别将这些载体导入果蝇的基因组中来检测它们在转座酶作用下的转座效率。转座酶由构建有 *hsp70*:*Mos1* 双启动子的另一载体 *Mr182* 表达,在 *Mr182* 载体的存在下未插入任何外源基因的 *peach* 元件从体细胞基因组切离频率为 100%,即所有的果蝇眼都呈杂色,从生殖细胞基因组切离的频率为 14.7%。结果显示带有外源基因的 *mariner* 元件插入果蝇的基因组后非常稳定,再从基因组切离的频率都远远低于未插入外源基因的 *mariner* 元件。而复合载体较单一插入载体的转座频率又稍高一些,复合载体中外

源基因两侧是完整、同向的 *mariner* 二倍体的切离率最高,达到了 10.2%^[4]。

这样的结果提示:具有一定间隔和方向的内部序列对 *mariner* 元件的有效转座是至关重要的,在任何位点插入外源基因都有可能使其失去转座能力。而且对 *peach* 元件的 20 种缺失的研究表明至少存在着三个区域,保持它们的完整性和适当的间隔对转座是关键,这三个区域是核苷酸序列的 229~586,735~765 和 939~1066^[6]。

mariner 元件对种系转化是有效的,与基因组整合后又是非常稳定的,这可能是因为 *mariner* 在质粒载体上和染色体中环境不同造成的^[4]。

6.4 其他转化系统

以昆虫的转座元件建立的种系转化系统还有 *P* 元件、*hobo*、*Hermes*、*Tc1*、*Minos*、*piggyBac*^[4]。其中类 *Tc1* 元件中来自鱼类并经过改造的 *Sleeping Beauty* 转化了哺乳动物小鼠的胚胎干细胞^[11]和人的细胞^[29]。*Mos1* 系统在介导外源基因方面与其他系统不相上下,即使是用带有外源基因的单插入载体,它们的种系转化效率都在同一个数量级上^[4]。

6.5 *mariner* 转化系统的存在问题

mariner 可在不同物种间传递,这虽然对转基因技术十分有利,但也使这个系统的应用存在风险。带有重组基因的 *mariner* 如果流失到自然界,将会造成污染,后果不堪设想^[30],因此该系统的应用,尤其用于转基因作物和鱼类等开放培养的物种时要万分谨慎,而对一些可以在封闭条件下培养的生物如禽类,则更安全。

7 研究方向

尽管 *mariner* 元件已经在多种生物体上应用成功,但其转座机制、影响因素、调控机制,以及内部序列的相互作用等等还有待于进一步研究。它能否转化更广泛的物种尤其是哺乳动物,也需要不断尝试加以证实。此外,国外的研究人员不仅在开发转座子作为基因载体方面的用途,用于制备遗传修饰动物,而且还希望转座子可以用于基因治疗,成为治疗人类遗传缺陷症有价值的工具^[31]。如果能够成功,将对整个生物技术领域造成革命性的影响。

参考文献(References):

[1] LIAO Ming-Juan, DONG Ai-Hua, WANG Zheng-Dong, ZHU Mu-

- Yuan. Plant transposon and the application in functional genomics. *Hereditas (Beijing)*, 2000, 22(5): 345~348
- 廖鸣娟, 董爱华, 王正栋, 朱睦元. 植物转座子及其在功能基因组学中的应用. *遗传*, 2000, 22(5): 345~348.
- [2] Fadool J M, Hartl D L, Dowling J E. Transposition of the *mariner* element from *Drosophila mauritiana* in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5182~5186.
 - [3] O'brochta D A, Warren W D, Saville K J, Atkinson P W. Hermes, a functional non-drosophilid insect gene vector from *Musca domestica*. *Genetics*, 1996, 142: 907~914.
 - [4] Lozovskaya E R, Nurminsky D L, Wimmer E A, Hartl D L. Unexpected stability of *mariner* transgenes in *Drosophila*. *Genetics*, 2002, 160: 527~535.
 - [5] Zhang L, Dawson A, Finnegan D J. DNA-binding activity and subunit interaction of the *mariner* transposase. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29: 3566~3575.
 - [6] Lohe A R, Hartl D L. Efficient mobilization of *mariner* in vivo requires multiple internal sequences. *Genetics*, 2002, 160: 519~526.
 - [7] Hartl D L. Discovery of the transposable element *mariner*. *Genetics*, 2001, 157: 471~476.
 - [8] Hartl D L, Lohe A R, Lozovskaya E R. Modern thoughts on an ancient *mariner*: function, evolution, regulation. *Annu Rev Genet*, 1997, 31: 337~358.
 - [9] Prasad M D, Nurminsky D L, Nagaraju J. Characterization and molecular phylogenetic analysis of *mariner* elements from wild and domesticated species of silkworms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2002, 25: 210~217.
 - [10] Medhora M, Maruyama K, Hartl D L. Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element *Mos1* in *Drosophila*. *Genetics*, 1991, 128: 311~318.
 - [11] Luo G B, Ivics Z, Izsvak Z, Bradley A. Chromosomal transposition of a *Tc1/mariner*-like element in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 10769~10773.
 - [12] Lohe A R, Moriyama E N, Lidholm D A, Hartl D L. Horizontal transmission, vertical inactivation, and stochastic loss of *mariner*-like transposable elements. *Mol Biol Evol*, 1995, 12(1): 62~72.
 - [13] Maruyama K, Hartl D L. Evolution of the transposable element *mariner* in *Drosophila* species. *Genetics*, 1991, 128(2): 319~329.
 - [14] <http://biology.anu.edu.au/rsbweb/annualreport/1997/114.shtml>
 - [15] Rubin E J, Akerley B J, Novik V N, Lampe D J, Husson R N, Mekalanos J J. In vivo transposition of *mariner*-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1645~1650.
 - [16] Guo B P, Mekalanos J J. *Helicobacter pylori* mutagenesis by *mariner* in vitro transposition. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2001, 30: 87~93.
 - [17] Chiang S L, Mekalanos J J. Construction of a *Vibrio cholerae* vaccine candidate using transposon delivery and FLP recombinase-mediated excision. *Infect Immun*, 2000, 68: 6391~6397.
 - [18] Pelicic V, Morelle S, Lampe D, Nassif X. Mutagenesis of *Neisseria meningitidis* by in vitro transposition of *Himar1*. *J Bacteriol*, 2000, 182: 5391~5539.
 - [19] Gueiros-Filho F J, Beverley S M. Trans-kingdom transposition; mobilization of the *Drosophila* element *mariner* within the protozoan *Leishmania*. *Science*, 1997, 276: 1716~1719.
 - [20] Lidholm D A, Lohe A R, Hartl D L. The transposable element *mariner* mediates germline transformation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1993, 134: 859~868.
 - [21] Lohe A R, Hartl D L. Germline transformation of *Drosophila virilis* with the transposable element *mariner*. *Genetics*, 1996b, 143: 365~374.
 - [22] Coates C J, Jasinskiene N, Miyashiro L, James A A. *Mariner* transposition and transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3748~3751.
 - [23] Moreira L A, Edwards M J, Adhami F, Jasinskiene N, James A A, Jacobs-Lorena M. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 10895~10898.
 - [24] Wang W, Swevers L, Iatrou K. *Mariner* (*Mos1*) transposase and genomic integration of foreign gene sequences in *Bombyx mori* cells. *Insect Mol Biol*, 2000, 9: 145~155.
 - [25] Yoshiyama M, Honda H, Kimura K. Successful transformation of the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with the transposable element, *mariner*. *Appl Entomol Zool*, 2000, 35: 321~325.
 - [26] Sherman A, Dawson A, Mather C, Gilhooley H, Li Y, Mitchell R, Finnegan D, Sang H. Transposition of the *Drosophila* element *mariner* into the chicken germ line. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 1050~1053.
 - [27] <http://www.isb.vt.edu/news/1998/news98.dec.html#dec9802>
 - [28] Verrinder-Gibbins A M. The chicken, the egg, and the ancient *mariner*. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 1013~1014.
 - [29] Ivics Z, Hackett P B, Plasterk R H, Izsvak Z. Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 1997, 91: 501~510.
 - [30] <http://bio.uivnet.hu/SALVE/00news/gene/ns-gen-00-06-jumping-genes.html>
 - [31] http://www.bizspacebiotechnology.com/H0102/designer_animals.htm