

# Tol1 转座子研究进展

靳涛 伍莎 张薪 许莉佳 Oscar Ortegon 叶勤 李云

(西南大学动物科技学院 教育部淡水鱼类资源与生殖发育重点实验室, 重庆 400715)

**摘要:** Tol1 和 Tol2 是在青鳉基因组中发现的具有自主活性的 DNA 转座子, 而 Tol1 转座子的自主活性是新近才发现的, 因此对它的报道较少。较之 Tol2, Tol1 可以携带更大片段的 DNA 进行转座, 且 Tol1 的转座不受转座酶“过量表达抑制”的影响。研究已证实, Tol1 转座子在秀丽线虫、斑马鱼、爪蟾和人等多种生物中具有转座活性。因此, 在动物转基因和基因功能研究等方面有重要的应用前景。从 Tol1 转座子的结构特征、转座机制和作为基因转移载体的优点, 以及应用研究等方面进行了简要的综述。

**关键词:** 青鳉 转座子 基因操作

## Advance of Tol1 Transposable Element Study

Jin Tao Wu Sha Zhang Xin Xu Lijia Oscar Ortegon Ye Qin Li Yun

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715)

**Abstract:** Tol1 and Tol2 are autonomous DNA-based transposable element found in medaka fish *Oryzias latipes*, compared with Tol2, the autonomy of Tol1 transposable element is identified recently, and the reports about it is limit, main advantages were that Tol1 was capable of carrying longer DNA fragment into chromosomes; and the transposition of Tol1 was not affected by the “overexpression inhibition” of transposase. Studies have convinced that Tol1 was active in *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis* and *Homo sapiens*, thus Tol1 was anticipated to have important applications in animal transgenic and gene functional study. The present paper gave a brief review of the structure of Tol1 transposable element, its transposition mechanism, the advantages as gene transfer vector and applied research.

**Key words:** Medaka fish Transposon Genetic manipulation

转座子 (transposon, Tn), 又称跳跃因子, 是存在于染色体 DNA 上可自主复制和移位的基本单位, 其实质是一定长度的 DNA 片段。因为其可以在生物基因组中从一条染色体转移到另一条染色体而得名。Tn 最初由 McClintock<sup>[1]</sup> 于 20 世纪 40 年代在玉米的遗传学研究中发现。数十年的研究结果表明转座子存在于所有的生物体内。

转座子分为两个主要的种类: RNA 转座子和 DNA 转座子。RNA 转座子包括长插入重复序列 (long interspersed repeated sequences, LINEs), 短插入重复序列 (short interspersed repeated sequences, SINEs) 和反转录病毒样的元件, 目前在脊椎动物基因组中已经鉴定到了很多有活性的 RNA 转座子<sup>[2-4]</sup>。DNA

转座子, 也被称为末端反向重复元件, 是诸如基因转移、诱变、基因/启动子/增强子捕获等遗传操作的有力工具。相对于其它的转座子, DNA 转座子一个重要的优势是其使用的简单性和安全性。但脊椎动物中 DNA 转座子除了青鳉的 Tol2 转座元件外, 大多数的转座元件是没有活性的。青鳉的另外一个转座元件 Tol1 在最初发现的时候, 由于它没有新的切除或者插入, 一直认为它是没有自主活性的<sup>[5]</sup>。但最近在一个实验室的青鳉品系中鉴定出了一个自主的 Tol1 元件, 因此, 青鳉的基因组中隐匿了两个具有自主活性的 DNA 转座子, 这在脊椎动物中是特有的。Tol2 转座子作为基因转移载体可以携带 11.7 kb 的 DNA 片段, 而新发现的自主活性的 Tol1 转座

收稿日期: 2011-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30670226), 国家重大科学研究计划“973”项目 (2009CB941200), 中国长江三峡集团公司资助项目

作者简介: 靳涛, 男, 硕士研究生, 研究方向: 分子发育生物学; E-mail: mufoever@163.com

通讯作者: 李云, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 水产生物技术、鱼类发育遗传学; E-mail: aquatics@swu.edu.cn

子在携带大片的 DNA 方面有更大的潜力,其最大可以携带 22 kb 的 DNA 片段。因此,自主的 Tol1 转座子很有可能成为遗传学和分子生物学研究中一个强有力的工具,特别在利用转座原理研究基因功能方面有广阔的应用前景。

### 1 Tol1 转座元件的结构特征及其转座机制

Tol1 元件插入到酪氨酸酶基因的第一个外显子中,导致基因失去了功能。在酪氨酸酶基因中发现的独立的 Tol1 拷贝被称为 Tol1-tyr,其长度为 1 855 bp,它是非自主的转座元件,因其不能编码具有功能的转座酶<sup>[5]</sup>。其后各种试验手段都未能找到 Tol1 元件自主的拷贝。2007 年,Koga 等在鳉的品系中幸运地发现了 Tol1 的自主拷贝。一条青鳉黑色素基因中插入了一个自主的拷贝和一个非自主的拷贝,这种共存导致了一个明显的、高频率白变株的反向突变,最后成功的鉴定了一个 4 355 bp 的自主 Tol1 拷贝 Tol1-L1<sup>[6,7]</sup>。Tol1 的结构特征,如图 1 所示。

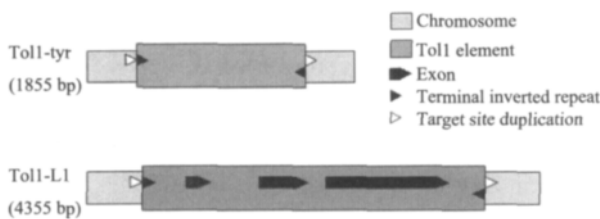


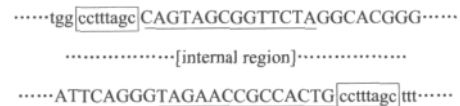
图 1 非自主和自主的 Tol1 转座子的总体结构<sup>[7]</sup>

#### 1.1 末端倒位重复序列

青鳉基因组中大约有 80 个 Tol1 拷贝<sup>[5]</sup>。Tol1 拷贝最显著的特征是末端倒位重复序列 (terminal inverted repeats),这种序列是 DNA 转座子的标志,它是转座酶识别的关键序列。Tol1 携带的末端倒位重复序列为 14 bp<sup>[5]</sup>,两端分别为 CAGTAGCGGTTCTA 和 TAGAACCGCCACTG。如图 2 所示。

#### 1.2 靶位重复序列

靶位重复序列 (target repeats sequence) 是 Tol1 转座子两端的正向重复序列。Tol1 的靶位重复序列的长度为 8 bp<sup>[5]</sup>,它不是 Tol1 本身的序列,是在专门的插入位点插入过程中产生的。Tol1 的靶位重复序列两端都为 cctttagc,如图 2 所示。



Tol1 末端区域的核苷酸序列用大写字母表示;Tol1 的末端倒位重复序列为 14 bp (下划线字母);靶位重复序列为 8 bp (方框内)

图 2 Tol1 末端区域的核苷酸序列<sup>[5]</sup>

### 1.3 转座酶

4 355 bp 的自主的 Tol1 拷贝携带的转座酶基因包含 3 个外显子,通过 mRNA 分析,发现其具有一个 2.9 kb 的转录本,编码 851 个氨基酸。这个转录本的蛋白质产物能催化一个非自主的 Tol1 拷贝在人类和小鼠培养细胞中的转座<sup>[7]</sup>。Tol1 和 Tol2 都是 hAT 转座元件家族的成员,并且它们的自主拷贝在结构上是相似的。但是这两个元件的转座酶-底物系统是相互独立的,Tol1 转座酶不能催化 Tol2 的转座,Tol2 转座酶也不能催化 Tol1 的转座<sup>[8]</sup>。

#### 1.4 Tol1 转座元件的转座机制

Tol1 转座子是 hAT 转座子家族的一员,其转座主要由转座酶以一种剪切-粘贴的方式进行催化。“剪切”是转座元件从它所存在的染色体或者 DNA 分子上切除,“粘贴”是切除的元件重新整合到同一个或者其它的 DNA 分子上。这个种类的元件的转座发生或者以一种自发的拷贝完成,该拷贝中包含一个产生转座酶的功能基因;或者以一种非自发的拷贝完成,它不能产生转座酶,除非由共存在同一个细胞中的一个自发的拷贝提供转座酶,否则它不能转座。

### 2 Tol1 转座子作为基因转移载体的优势

#### 2.1 Tol1 的转座仅需要很短的末端区域

Koga 等<sup>[6]</sup>移除了 Tol1-tyr 中对转座不必要的 1 592 bp 的中间区域,构建了一个仅包含 157 bp 左臂和 106 bp 右臂的基本质粒。转座试验表明,包含 157 bp 左臂和 106 bp 右臂的克隆的转座频率和 Tol1-tyr 克隆的转座频率相当。但进一步的截短左臂或右臂到 26 bp 将导致转座活性明显降低或丢失。这些已有报道说明,Tol1 转座子实现转座只需要很短的末端区域,并且移除不必要的中间片段可去除可能会与插入 DNA 或者宿主细胞相互作用的信号。

## 2.2 Tol1可以携带大片段DNA

转座元件随着插入片段长度的增加而使转座频率降低。Koga 等<sup>[6]</sup>构建的最长的 Tol1 元件为 22.1 kb, 它的转座频率大约只有 2.1 kb 元件的 1/5。尽管如此, 这个频率也要明显高于随机的 DNA 整合到染色体上的频率。Sleeping Beauty 元件的大小超过 9.1 kb 时将会丢失转座效率<sup>[9]</sup>。PiggyBac 元件充当基因转移载体时最大的长度为 14.3 kb<sup>[10]</sup>。至于 Tol2 元件, 目前为止所报道的最长的元件容量为 11.7 kb<sup>[11]</sup>。现在 22.1 kb 的 Tol1 元件是所报道的最长的 DNA 转座元件。此外, 22.1 kb 的 Tol1 元件中只有 0.3 kb 被 Tol1 臂占据, 因此这个基本质粒可以携带 21.8 kb 的 DNA 片段到染色体中。因此, Tol1 可以作为一个优良的携带大片段的基因转移载体。

## 2.3 Tol1不受“过量表达抑制”效应的影响

不同的转座元件类群间一个重要的不同是“过量表达抑制”效应: 过量的转座酶会降低 Sleeping Beauty<sup>[12]</sup>和 piggyBac<sup>[13]</sup>的转座频率。但哺乳动物细胞中 Tol1 的转座频率随着转座酶浓度的增加而呈线性的提高<sup>[7]</sup>, 因此可以通过优化试验设计来实现转座频率的提高。

# 3 Tol1 在多种生物中转座及应用的研究

## 3.1 Tol1在秀丽线虫中的应用

在秀丽线虫中发现的 Tc1 元件可以高效的转座, 并且可以应用于插入诱变<sup>[14]</sup>。然而使用固有的 Tc1 元件进行诱变有一些缺点: Tc1 转座子的移动不会限制在单一的元件种类中; 而且秀丽线虫的基因组隐藏了大量的 Tc1 拷贝, 使插入诱变的鉴定更加复杂。2008 年, Kodama 等<sup>[15]</sup>将 Tol1 转座子应用于秀丽线虫的研究中, 将带有 Tol1 结构的供体质粒、提供转座酶催化切除和插入的辅助质粒和使线虫产生扭曲体型的标记质粒注射到雌雄同体的生殖腺中, 通过 PCR、测序等方法证实了 Tol1 通过转座插入到染色体中。因此, Tol1 可以作为秀丽线虫一个优良的基因转移载体。

## 3.2 Tol1在斑马鱼转基因中的应用

当前应用于斑马鱼转基因的 DNA 转座元件, 包括来源于青鳉的自然发生的 Tol2 元件<sup>[16]</sup>, 从鲑鱼基因组中分子改造和复活的 Sleeping Beauty 元件<sup>[17]</sup>

和从甘蓝蝇度尺蛾中鉴定的 piggyBac 元件<sup>[18]</sup>。最近发现的自主的 Tol1 元件极可能成为另外一个应用于斑马鱼的潜在的 DNA 转座工具。

Koga 等<sup>[8]</sup>将带有 Tol1 转座子的供体质粒与 Tol1 转座酶 mRNA 共注入受精卵中, 在 88% 的 G0 受精卵中观察到 GFP 的表达, 并且在整个 G0 世代中 GFP 的表达是持续的, 表明 GFP 基因有效的整合到体细胞中。将 24 个 GFP 阳性成鱼与未注射的鱼杂交, 其中 11 个交配产生了 GFP 阳性后代。这 11 个转基因鱼产生 GFP 阳性的 G1 后代的频率介于 2.8%-81% 之间。将达到性成熟的两个转基因 G1 鱼杂交, 分别产生了 41% 和 62% 的 GFP 阳性 G2 后代。

## 3.3 Tol1在爪蟾中的应用

爪蟾是脊椎动物遗传和发育研究的重要的模式生物。Hikosaka 等<sup>[19]</sup>将携带 Tol1 转座元件和 GFP 基因的指示质粒和一个编码全长 Tol1 转座酶的辅助质粒共同注射到 2 到 4 细胞期的胚胎中, 在发育到尾芽期的 112 个胚胎中, 有 64 个表达 GFP 基因, 频率为 57%。从这些胚胎中挑选 12 个强烈表达 GFP 的胚胎并且回收质粒 DNA, 对这些质粒进行 PCR, 克隆和测序分析表明 Tol1 元件从质粒中切除。这表明 Tol1 元件在爪蟾中是移动的, 可以作为这种模式动物一个基因操作的工具。

## 3.4 Tol1在人和小鼠细胞中的应用

Koga 等<sup>[7]</sup>构建了一个携带 1.9 kb Tol1-tyr 元件和嵌入新霉素抗性基因的供体质粒, 以及一个由 CMV 启动子启动的 Tol1 ORF 和多腺苷酸信号稳定的辅助质粒。供体质粒和辅助质粒 DNA 导入到人类 HeLa 和小鼠 NIH/3T3 细胞, 筛选 G418 抗性的转化体。随后克隆了 G418 抗性细胞的包含染色体 DNA 片段的 Tol1, 并对 Tol1 的末端和侧面区域进行了测序。对 8 个克隆所携带的侧面区域进行分析表明, 它们与供体质粒以及它们之间不同, 并且在 8 个克隆中检测到了 8 个碱基对的靶位重复, 表明供体质粒的 Tol1 部分通过转座整合到染色体。

# 4 展望

青鳉的 Tol2 转座子已经成功应用于斑马鱼的转基因<sup>[20]</sup>, 增强子捕获<sup>[21]</sup>, 以及瞬时表达研究中<sup>[22]</sup>, 而青鳉的另外一个自主的转座子 Tol1 的发现将开创

转座子应用方面的新局面。首先, Tol1 转座子在几种模式生物中具有转座活性, 表明 Tol1 的转座不依赖或较少依赖物种特异性的因子, 所以 Tol1 很有可能成为一个通用的转座元件。其次, Tol1 转座子最大的优势是可以携带大片段的 DNA 和仅需要很短的末端区域, 其在基因操作中有重要的应用价值。最后, 由于 Tol1 转座子和 Tol2 转座子都具有转座酶的特异性, 我们可以将这两个转座子联合应用, 一个可能的应用是连续或者同时的转移两个不同的基因, 随后的任何一个基因的移除可以通过合适的转座酶来实现。总之, 对 Tol1 转座子的研究利用才刚刚起步, 其应用和发展前景非常广阔。

#### 参考文献

- [ 1 ] McClintock B. Chromosome organization and gene expression. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1951, 16 ( 3 ) : 13-17.
- [ 2 ] Dombroski BA, Mathias SL, et al. Isolation of an active human transposable element. Science, 1991, 254 : 1805-1808.
- [ 3 ] Li X, Scaringel WA, et al. Frequency of recent retrotransposition events in the human factor IX gene. Hum Mutat, 2001, 17 : 511-519.
- [ 4 ] Burden AF, Manley NC, Clark AD, et al. Hemimethylation and non-CpG methylation levels in a promoter region of human LINE-1 ( L1 ) repeated elements. J Biol Chem, 2005, 280 : 14413-14419.
- [ 5 ] Koga A, Inagaki H, Bessho Y, Hori H. Insertion of a novel transposable element in the tyrosinase gene is responsible for an albino mutation in the medaka fish, *Oryzias latipes*. Mol Gen Genet, 1995, 249 : 400-405.
- [ 6 ] Koga A, Higashide I, et al. The Tol1 element of medaka fish is transposed with only terminal regions and can deliver large DNA fragments into the chromosomes. J Hum Genet, 2007a, 52:1026-1030.
- [ 7 ] Koga A, Shimada A, Kuroki T, et al. The Tol1 transposable element of the medaka fish moves in human and mouse cells. J Hum Genet, 2007b, 52 : 628-635.
- [ 8 ] Koga A, Cheah FS, Hamaguchi S, et al. Germline transgenesis of zebrafish using the medaka Tol1 transposon system. Dev Dyn, 2008, 237 : 2466-2474.
- [ 9 ] Karsi A, Moav B, Hackett P, Liu Z. Effects of insert size on transposition efficiency of the sleeping beauty transposon in mouse cells. Mar Biotechnol, 2001, 3 ( 3 ) : 241-245.
- [ 10 ] Ding S, Wu X, Li G, et al. Efficient transposition of the piggyBac ( PB ) transposon in mammalian cells and mice. Cell, 2005, 122 : 473-483.
- [ 11 ] Urasaki A, Morvan G, Kawakami K. Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. Genetics, 2006, 174 : 639-649.
- [ 12 ] Geurts AM, et al. Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. Mol Ther, 2003, 8 : 108-117.
- [ 13 ] Wu SC, et al. piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to sleeping beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 : 15008-15013.
- [ 14 ] Bessereau JL. Transposons in *C. elegans* [ M ] . In : The *C. elegans* Research Community ( ed ) . WormBook, 2006 : 1-13.
- [ 15 ] Kodama K, Takagi S, Koga A. The Tol1 element of the medaka fish, a member of the hAT transposable element family, jumps in *Caenorhabditis elegans*. Heredity, 2008, 101 : 222-227.
- [ 16 ] Koga A, Suzuki M, Inagaki H, et al. Transposable element in fish. Nature, 1996, 383 : 30.
- [ 17 ] Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z. Molecular reconstruction of sleeping beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. Cell, 1997, 91 : 501-510.
- [ 18 ] Fraser MJ, Ciszczon T, Elick T, Bauser C. Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyback ( IFP2 ) and tagalong ( TFP3 ) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. Insect Mol Biol, 1996, 5 : 141-151.
- [ 19 ] Hikosaka A, Koga A. PCR detection of excision suggests mobility of the medaka fish Tol1 transposable element in the frog *Xenopus laevis*. Genet Res, 2007, 89 : 201-206.
- [ 20 ] Suster ML, Kikuta H, Urasaki A, et al. Transgenesis in zebrafish with the Tol2 transposon system. Methods in Molecular Biology, 2009, 561 : 41-63.
- [ 21 ] Nagayoshi S, Hayashi E, Abe G, et al. Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes : *tcf7* and *synembryn*-like. Development, 2008, 135 ( 1 ) : 159-169.
- [ 22 ] Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, et al. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. Dev Cell, 2004, 7 : 133-144.

( 责任编辑 狄艳红 )