

文章编号: 1004-0374(2011)03-0255-06

piggyBac转座系统在哺乳动物及其细胞中的研究进展

谢 飞^{1,2}, 蒋世忠^{1,2}, 马晴雯^{1,2*}

(1 上海市儿童医院医学遗传研究所, 上海 200040; 2 上海交通大学医学院, 上海 200025)

摘要: piggyBac(PB)转座系统来源于昆虫鳞翅目, 属于真核生物的第二类转座系统, 主要采取“剪切粘帖”机制发生转座。PB系统转座效率高, 宿主范围广, 广泛应用于昆虫等低等生物的基因转移及突变筛选。近年来, 研究发现PB系统在哺乳动物及其细胞中也具有高效的转座活性, 已在动物基因组功能研究、基因转移及诱导多能干细胞等领域得到了广泛应用。本文就PB系统近年来在哺乳动物及其细胞中的研究进展、应用前景及存在问题进行了综述。

关键词: piggyBac; 转座; 哺乳动物; 转基因

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A

Current advance of piggyBac in mammals and mammalian cells

XIE Fei^{1,2}, JIANG Shi-Zhong^{1,2}, MA Qing-Wen^{1,2*}

(1 Institution of Medical Genetics of Shanghai Children's Hospital, Shanghai 200040, China; 2 Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: piggyBac (PB) transposon, a TTAA-specific transposon firstly isolated from the genome of cabbage looper moth, is a member of class II transposon family, which jumps via a “cut and paste” mechanism. PB transposon has been widely used for insertion mutagenesis and carrying gene in lower organism. Recent studies demonstrate that PB transposon system possesses high activity of delivering large pieces of DNA in mammals and cultured mammalian cells and can remobilize efficiently without any track. These new findings accelerate the investigation about PB transposon system in transgenesis, gene therapy, functional genomics and generation of induced pluripotent stem cell (iPSC). In this review, we summarized the recent progresses of PB in mammalian and cultured mammalian cells, and discussed the obstacles in application of piggyBac system.

Key words: piggyBac; transposon; mammalian; transgenesis

转座子又称可移动基因、跳跃基因, 是一种可在基因组内插入和切离并能改变自身位置的DNA序列, 其变更插入位置的过程称为转座(transposition)。根据转座方式的不同, 转座子可分为DNA转座子(DNA transposon)和逆转录转座子(retrotransposon)两大类。DNA转座子的转座遵循“切离—粘帖(cut and paste)”机制, 即在转座酶(transposase)的催化下, DNA转座子从原始位置切离并插入到新的基因组位置。逆转录转座子采用“复制—粘帖(copy and paste)”机制进行转座, 即原始的转座子DNA保持不动, 仅转录出RNA分子作为中间体, RNA分子在转座子编码的逆转录酶催

化下逆转录成DNA, 并在转座子编码的整合酶作用下插入到新的基因组位置。

自然存在于细菌、真菌、植物和无脊椎动物中的转座子均具有生物活性, 但脊椎动物中的转座子在长期进化中都已失去活性。长期以来, 作为基因转移和表达系统的转座子, 一般在低等生物中应用

收稿日期: 2010-08-09; 修回日期: 2010-09-27

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2010CB529902)

*通讯作者: E-mail: maqingwen@hotmail.com; Tel: 021-34205968

较多,在哺乳动物中鲜有报道。1997年, Ivics等^[1]利用生物信息学方法对来源于鲑鱼亚家族的转座保守序列进行重建,首次获得在哺乳动物体内具有转座活性的SB转座(sleeping beauty transposon, SB)系统。随后Ding等^[2]研究表明,来源于昆虫中的piggyBac系统在哺乳动物体内也具有较高的转座活性。近年来发现的Tol2及Mos1等系统在哺乳动物体内也具有转座活性^[3,4]。

piggyBac来源于鳞翅目昆虫,最初是在研究杆状病毒(Baculovirus)侵染粉纹夜蛾细胞系TN-368时首次发现并分离得到了DNA转座子^[5]。piggyBac转座子的准确切离总是伴随着转座,并且在转座时可携带外源基因整合进宿主基因组中并稳定表达^[2,3]。目前利用piggyBac系统作为转座载体已获得多种转基因昆虫^[6-8]。

PB转座子具有广泛的转座活性,较少地依赖于宿主因子即可实现高效转座。研究表明PB转座子在体外培养的哺乳动物细胞和哺乳动物体内均具有较高的转座活性,提示PB转座子在基因组功能研究和基因转移等领域具有较好的应用前景^[2]。

1 PB系统结构

PB全长2 472 bp,两端各有一个13 bp和19 bp的反向末端重复序列(inverted terminal repeat, ITR),中间编码一个长594个氨基酸残基的转座酶^[3]。根据转座酶的转录方向来区分转座子的两个末端,两端最外侧各有长13 bp并且对称的ITR,内侧各有一段间隔区(spacer),但并不对称(左端长3 bp,右端长31 bp),再靠内侧是各长19 bp且对称的亚末端反向重复序列(sub-terminal inverted repeat, STR)(图1)。反向重复序列的5'有2~3个C碱基,对应3'端的G碱基在选择剪切位点过程中均起作用^[9-11]。Li等^[12]发现只有左侧LTR长于311 bp,并且右侧LTR长于235 bp的PB转座子才具有转座活性。转座子左右两个末端组合研究表明仅有“左+右”及“右+左”具有转座活性,前者转座活性为后者的4.6倍,该研究还发现在昆虫中具有启动子作用的左末端重复序列在哺乳

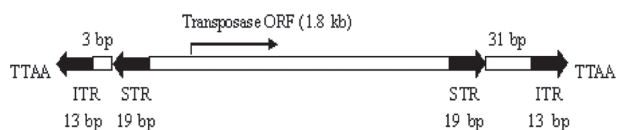


图1 PB转座系统的结构

动物中也具有类似功能^[13]。还有研究发现PB转座子的右末端重复序列具有增强子功能^[14]。

对PB转座酶的268、346、447及450位置的天冬氨酸进行定点突变研究表明,四个天冬氨酸均是PB转座剪切所必需的,但是450位置的天冬氨酸突变对转座酶的活性影响较小^[15]。Cadinanos和Bradley^[13]对PB转座酶进行鼠源密码子优化,转座活性提高了近10倍,还通过转座酶与雌激素应答原件(ERT2)融合实现了对PB转座事件的可控性。

2 转座机制

转座时转座酶通过与转座子末端结合形成短暂的发夹结构,转座子完全切离后,通过其3'OH末端攻击靶DNA序列中TTAA位点的5'末端,转座子5'序列的TTAA悬垂与靶DNA打开的单链TTAA相配对,与整合位置两侧的空隙重新连接,连接过程不需要合成DNA(如图2)。PB转座酶的这种转座方式表明,虽然它与DDE(两个天冬氨酸和一个谷氨酸组成的具有转座酶活性的区域)重组酶家族没有序列同源性,但是类似的转座机制仍表明它是该家族中的一员^[16]。

3 特性

3.1 整合位点

PB转座系统的插入位点为TTAA,但不是AT富含区^[17]。对100只小鼠的PB整合位点进行研究,发现67%的整合位点位于基因内部或预测基因内^[2]。在小鼠ES细胞中的研究表明,PB具有较高的转座效率,且PB系统发生再次转座后更倾向于插入基因内部,无local hopping现象^[18]。

3.2 精确切离

绝大多数的转座系统转座后会在原位置缺失或增加几个碱基,不能使原位置突变的基因完全恢复至原始状态,而PB转座系统则能实现准确切离。最近,利用PB系统将*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*及*Myc*四种基因转移至体细胞中,成功获得了iPS,再通过转座酶的再次转座将四种基因从染色体中精确切离,得到了不含任何外源基因的iPSC,解决了多能干细胞的安全性问题^[19,20]。

3.3 甲基化抑制PB转座子活性

Yusa等^[21]发现在SB转座系统中,将甲基化的转座子和无甲基化的转座子分别重组到染色体的相同区域,导入转座酶质粒后发现前者比后者的转座效率提高了100倍。而PB转座子经过甲基化后,

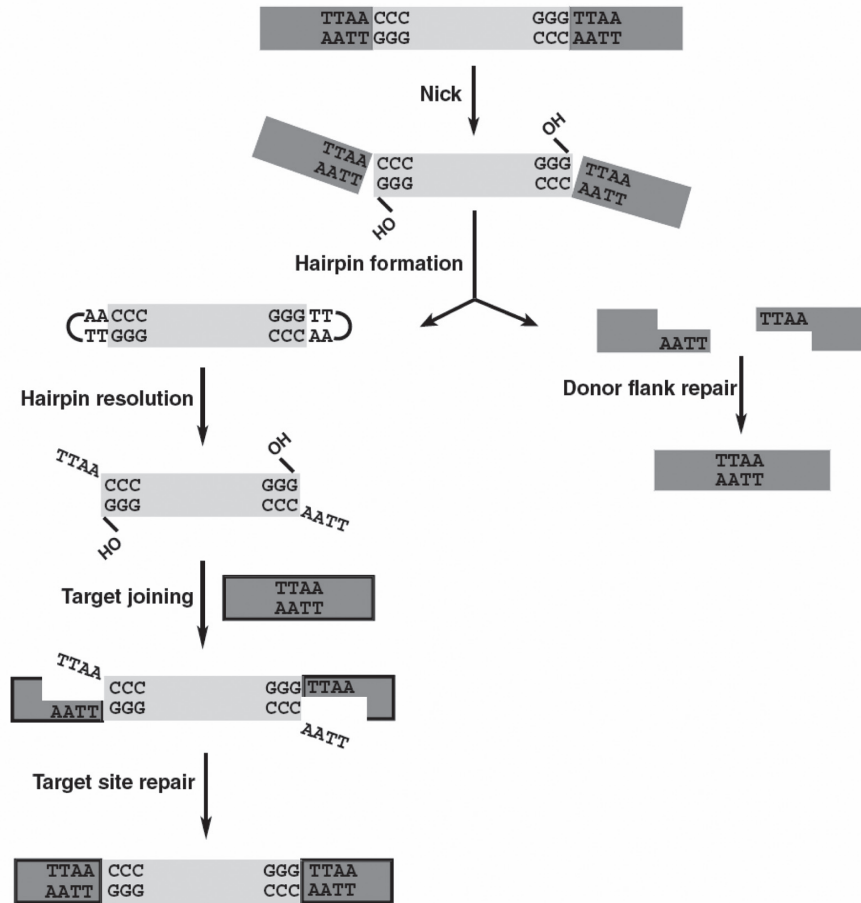


图2 PB转座及切离修复机制^[16]

CpG甲基化的转座子对于从质粒到基因组的转座活性下降了12倍^[22]。

3.4 转座酶的可塑性

转座子元件发生转座时可将外源基因带入宿主基因组中, 实现外源基因的稳定整合和表达, 这种特征为转基因动物的制备或基因治疗提供了条件, 但转座子整合位点的不可预见性给基因治疗的安全应用带来了巨大障碍。有人尝试对转座酶进行修饰, 期望实现特异位点的整合, 将Gal4的DNA结合域通过一段18~21个氨基酸的linker链接分别与SB11、PB及Tol2系统转座酶的N端相融合, 发现PB转座系统仍然具有92.2%的转座活性, 而Tol2系统几乎丧失了转座能力, 仅有原转座活性的0.267%, SB融合系统则完全失去转座活性^[23], 这为PB系统的定向整合提供了可能。

4 PB系统的进化

在现有的基因组和EST序列中发现了50余种与PB相似的序列, 来源涵盖了真菌、植物、昆虫、甲

壳纲、尾索动物、两栖类、鱼类和哺乳动物等, 这些序列有的已经被内化成为宿主的一部分, 有的两侧带有TTAA四碱基重复^[24]。在人类基因组中发现了五个含有相似序列的基因及MER85和MER75家族等^[25]。虽然仅凭这些序列与PB的相似性还无法确定它们与PB转座子的亲缘关系, 但这表明PB系统的进化历史远比我们原先想象的要复杂。

最近对灵长类基因组中的piggyBac家族进行研究表明, PB家族并非在3 700万年前就失去了活性, 而是自4 000万年以来就有活性, 可能失活不久; 此外在猴亚目基因组中还发现了新的PB家族成员, 这表明PB家族可能主要是通过水平传递方式在此基因组内进化^[26]。

5 应用前景

5.1 非病毒转基因载体

PB是一种较为理想的非病毒转基因载体, 其优势在于: (1)与病毒载体相比有安全性高、操作方便、成本低等优点; (2)载体容量较大, 可实现多基

因的共表达^[27]；(3)提高外源基因的整合效率及稳定表达^[28]；(4)再次转座后可实现精确切离；(5)转座后没有引起染色体重排等不稳定现象^[29]；(6)宿主范围广，转座效率高，且基本不依赖于宿主因子(如表1)。

5.2 基因治疗

PB转座系统在Hela、HEK293、CHO及H1299等细胞中高效转座，且携带的基因稳定表达，因而成为很有吸引力的基因治疗候选载体之一^[23]。Nakanishi等^[30]利用PB转座系统进行小鼠的体内转

表1 几种非病毒载体的比较

系统	特点	载体容量	整合位点	是否依赖宿主因子	回复切除	有无整合热点
Sleeping Beauty		10 k左右	整合进入已知基因和EST的比列小于40%	依赖	不完全切离	无
piggyBac		20 k以内	67%的整合位点位于基因内部或内部预测基因组内	较少依赖	完全切离	无
phiC31		几十k	基因组中假attP位点	不依赖	不发生回复切除	有热点

移，发现报告基因可在肝脏和肺脏中稳定表达，为利用PB转座系统进行基因治疗奠定了基础。对卵巢肿瘤细胞进行HSV-tk/ganciclovir (GCV)靶向性治疗，结果表明PB转座系统介导的HSV-tk表达水平提高10倍左右，明显提高了靶向治疗的效果^[31]。Kang等^[32]也利用PB系统介导的HSV-tk/ganciclovir(GCV)进行卵巢癌的靶向治疗，效果提高了近一倍。

5.3 突变工具

近年来发展较快的转座系统诱变法，就是通过“剪切—粘帖”机制将外源DNA单拷贝插入基因组中获得突变，其遗传背景清晰且容易追踪。PB系统的转座效率较高，负载容量较大，切离完全，偏向整合于基因内部且插入位点分布较广，为哺乳动物的基因组功能研究提供较好的研究平台。Wang等^[33]利用PB转座系统实现了对*Blm*缺陷型小鼠ES细胞系的随机突变，共获得了14 000个阳性克隆，为研究小鼠缺陷型表型与基因突变之间的关系奠定了基础。最近，Kong等^[34]基于PB转座子建立了一种Slingshot系统，在它莫西芬(tamoxifen)诱导后，转座酶随即失活，实现了某些染色体区域的高效转座，降低了PB在整个基因组内随机转座的背景；转座整合位点稳定且易于追踪，为利用转座系统诱变法研究基因组功能提供了有效方案。

基于PB系统在基因组研究功能研究中的巨大作用，Sun等^[35]还建立了一个PB系统诱变信息中心(<http://www.idmshanghai.cn/PBmice> or <http://www.scbio.org/PBmice/>)，该中心可以提供PB插入位点的旁侧序列、被插入基因的功能、小鼠基因型及表型等信息。最近，该中心又对该平台进行了改进，建立了MP-PBmice database system，新系统以广泛应

用的Struts-Spring-Hibernate为框架，具有更加强大的信息处理能力，为研究者利用PB系统进行基因组功能分析提供了信息分享和交流合作的平台^[36]。

6 展望

源于昆虫的PB系统，可在多种动物体内发生转座，相同的条件下转座效率明显高于其他转座系统；在外源基因转移、诱导突变及基因治疗等领域发挥了巨大的作用，但PB系统本身还有很多问题需要回答：如PB是如何做到精确切离；剩余过剩抑制以及local hopping现象是否存在并具有普遍性；能否利用进化分子生物学手段对转座子和转座酶进行改造，使PB系统的转座活性得到大幅提高等问题。此外，利用PB系统进行基因治疗也有一些问题有待解决。

6.1 转座酶的给予形式

PB系统在基因治疗中，转座酶与转座子双质粒共转染细胞时，通过优化转座子与转座酶的比例可以有效地提高转座效率^[23]。但是作为辅助质粒的转座酶载体若发生随机整合，则细胞内的转座事件可能会持续发生，因而造成基因组的不稳定甚至诱使细胞癌化。通过控制PB转座酶活性或使转座酶以RNA/蛋白质的形式发挥作用，可减少这种安全性隐患。最近，Urschitz等^[37]将转座酶与转座子构建入同一个载体中，在目的基因转座后转座酶随即失去活性，消除了转座酶整合后持续表达带来的负面效应。

6.2 靶向性

PB转座系统倾向于插入基因内部，这对于基因治疗或制备转基因动物不利。能否通过引入某种

特定序列结合的蛋白(如E2C)与转座酶相融合^[38], 或者引入与基因组序列和转座酶都结合的蛋白质实现位点特异整合, 以消除PB系统插入基因内部的不利影响, 值得进一步研究。

6.3 体内激活

PB系统在人基因组中存在近2 000个相似序列, 且广泛分布于人类染色体上, 这些类似于PB转座子的较长片段可能含有转座所必需的顺式序列。最近在基因组中发现的两大DNA转座家族MER85和MER75^[23], 大多以短拷贝存在, 没有编码转座酶的序列, 也没有任何证据表明PB类序列在过去的4 000万年发生过转座。目前研究发现人类基因组中确实存在少数看起来完整的转座酶类序列^[39]。尽管人与飞蛾的进化距离较远, 但是不能排除一些内源性转座酶类序列编码的蛋白质对转座介导的外源基因进行切除或转移的可能, 抑或外源性转座酶作用于内源性PB转座子类似序列, 使之转座。总之, PB系统安全用于人类基因治疗还有很长的一段路要走。

作为一种非病毒基因转移工具, PB系统具有负载容量较大、转座效率高等优点。它不仅在转基因昆虫及其基因组功能研究领域发挥着重要的作用^[40], 而且在哺乳动物基因转移载体及基因组功能研究中也具有重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, et al. Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 1997, 91: 501-10
- [2] Ding S, Wu XH, Li G, et al. Efficient transposition of the *piggyBac* resource (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 2005, 122(3): 473-83
- [3] Kawakami K, Shima A, Kawakami N. Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(21): 11403-8
- [4] Medhora M, Maruyama K, Hartl DL. Molecular and functional analysis of the mariner mutator element Mos1 in *Drosophila*. *Genetics*, 1991, 128(2): 311-8
- [5] Fraser MJ, Cary L, Boonvisudhi K, et al. Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA. *J Virol*, 1995, 211 (2): 397-407
- [6] Handler AM, Maccombs SD, Fraser MJ, et al. The lepidopteran transposon vector, *piggyBac*, mediates germline transformation in the Mediterranean fruit fly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, (95): 7520-5
- [7] Handler AM, Harrell RA. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. *Insect Mol Biol*, 1999, 8(4): 449-57
- [8] Handler AM, Harrell III RA. Transformation of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a *piggyBac* vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. *Insect Biochem Mol Biol*, 2001, 31(2): 199-205
- [9] Elick TA, Lobo N, Fraser MJ. Analysis of cis-acting DNA elements required for *piggyBac* transposable element excision. *Mol Gen Genet*, 1997, 255(6): 605-10
- [10] Cary LC, Goebel M, Corsaro BG, et al. Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology*, 1989, 172: 156-69
- [11] Toshiki T, Chantal T, Corinne R, et al. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 81-4
- [12] Li X, Harrell RA, Handler AM, et al. *piggyBac* internal sequences are necessary for efficient transformation of target genomes. *Insect Mol Biol*, 2005, 14(1): 17-30
- [13] Cadinanos J, Bradley A. Generation of an inducible and optimized *piggyBac* transposon system. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(12): e87
- [14] Shi X, Harrison RL, Hollister JR, et al. Construction and characterization of new *piggyBac* vectors for constitutive or inducible expression of heterologous gene pairs and the identification of a previously unrecognized activator sequence in *piggyBac*. *BMC Biotechnol*, 2007, 7: 5
- [15] Keith JH, Schaeper CA, Fraser TS, et al. Mutational analysis of highly conserved aspartate residues essential to the catalytic core of the *piggyBac* transposase. *BMC Mol Bio*, 2008, 9: 73
- [16] Mitra R, Fain J, Craig NL. *piggyBac* can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition. *EMBO J*, 2008, 27(7): 1097-109
- [17] Galvan DL, Nakazawa Y, Kaja A, et al. Genome-wide mapping of *piggyBac* transposon integrations in primary human T cells. *J Immunother*, 2009, 32(8): 837-44
- [18] Liang Q, Kong J, Stalker J, et al. Chromosomal mobilization and reintegration of *Sleeping Beauty* and *piggyBac* transposons. *Genesis*, 2009, 47(6): 404-8
- [19] Yusa K, Rad R, Takeda J, et al. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the *piggyBac* transposon. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 363-9
- [20] Woltjen K, Michael IP, Mohseni, et al. *piggyBac* transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458: 766-70
- [21] Yusa K, Takeda J, Horie K. Enhancement of *Sleeping Beauty* transposition by CpG methylation: possible role of heterochromatin formation. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(9): 4004-18
- [22] Wang W, Lin CY, Lu D, et al. Chromosomal transposition of *piggyBac* in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(27): 9290-5
- [23] Wu SC, Meir YJ, Coates CJ, 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(41): 15008-13
- [24] Maragathavally KJ, Kaminski JM, Coates CJ. Chimeric *Mos1* and *piggyBac* transposases result in site-directed integration. FASEB J, 2006, 20(11): 1880-2
- [25] Sarkar A, Sim C, Hong YS, et al. Molecular evolutionary analysis of the widespread *piggyBac* transposon family and related “domesticated” sequences. Mol Genet Genomics, 2004, 270(2): 173-80
- [26] Pagan HJ, Smith JD, Hubley RM, et al. *PiggyBac*-ing on a primate genome: novel elements, recent activity and horizontal transfer. Genome Biol Evol, 2010, 12(2): 293-303
- [27] Kahlig KM, Saridey SK, Kaja A, et al. Multiplexed transposon-mediated stable gene transfer in human cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(4): 1343-8
- [28] Saridey SK, Liu L, Doherty JE, et al. *piggyBac* transposon-based inducible gene expression *in vivo* after somatic cell gene transfer. Mol Ther, 2009, 17(12): 2115-20
- [29] Manuri PV, Wilson MH, Maiti SN, et al. *piggyBac* transposon/transposase system to generate CD19-specific T cells for the treatment of B-lineage malignancies. Hum Gene Ther, 2010, 21(4): 427-37
- [30] Nakanishi H, Higuchi Y, Kawakami S, et al. *piggyBac* transposon-mediated long-term gene expression in mice. Mol Ther, 2010, 18(4): 707-14
- [31] Kan Y, Zhang XY, Jian W, et al. The *piggyBac* transposon is an integrating non-viral gene transfer vector that enhances the efficiency of GDEPT. Cell Biol Int, 2009, 33(4): 509-15
- [32] Kang Y, Zhang X, Jiang W, et al. Tumor-directed gene therapy in mice using a composite nonviral gene delivery system consisting of the *piggyBac* transposon and polyethylenimine. BMC Cancer, 2009, 27(9): 126
- [33] Wang W, Bradley A, Huang YA. *piggyBac* transposon-based genome-wide library of insertionally mutated Blm-deficient murine ES cells. Genome Res, 2009, 19(4): 667-73
- [34] Kong J, Wang F, Brenton JD, et al. Slingshot: a *piggyBac* based transposon system for tamoxifen-inducible ‘self-inactivating’ insertional mutagenesis. Nucleic Acids Res, 2010, 38(18): e173
- [35] Sun LV, Jin K, Liu Y, et al. PBmice: an integrated database system of *piggyBac* (PB) insertional mutations and their characterizations in mice. Nucleic Acids Res, 2008, 36: D729-34
- [36] Yang W, Jin K, Xie X, et al. Development of a database system for mapping insertional mutations onto the mouse genome with large-scale experimental data. BMC Genomics, 2009, 10(Suppl 3): S7
- [37] Urschitz J, Kawasumi M, Owens J, et al. Helper-independent *piggyBac* plasmids for gene delivery approaches: strategies for avoiding potential genotoxic effects. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(18): 8117-22
- [38] Wilson MH, George AL Jr. Designing and testing chimeric zinc finger transposases. Methods Mol Biol, 2010, 649: 353-63
- [39] Sarkar A, Sim C, Hong YS, et al. Molecular evolutionary analysis of the widespread *piggyBac* transposon family and related “domesticated” sequences. Mol Genet Genomics, 2003, 270(2): 173-80
- [40] Zhuang LF, Wei H, Lu CD, et al. The relationship between internal domain sequences of *piggyBac* and its transposition efficiency in BmN cells and *Bombyx mori*. Acta Biochim Biophys Sinica, 2010, 42(6): 426-31