

PiggyBac转座子及其在家蚕中的应用

赵岩龙¹ 沈兴家^{1,2*}

(¹ 江苏科技大学生物技术学院; ² 中国农业科学院蚕业研究所, 农业部家蚕生物技术重点开放实验室 212018)

转座子可以由染色体的一个位置移动到另外位置,改变原有基因的结构和排序,从而导致基因改变。转座子可分为2大类,第1类转座子又有多种类型,这类转座子能以染色体DNA转录形成的RNA为模板,经反转录酶作用合成DNA并插入到基因组中;第2类转座子则直接在基因组中来回移动,不形成RNA,也与反转录酶的作用无关。用于昆虫重组的转座子几乎都是第2类转座子,其末端具有反向重复序列,中间部分为转座酶基因,此基因可产生转座酶,使末端重复序列与其内侧的目标序列移动,即将目标序列部分切出,并重组到染色体的其它部位上。因此,可利用这类转座子进行转基因操作。目前已知的可作为鳞翅目昆虫转基因载体的转座子主要有P-转座子、Hermes转座子、minos转座子、hobo转座子、mariner转座子和PiggyBac转座子,它们都可作为转座载体获得转基因昆虫,但除了PiggyBac外,大多存在着一定的局限性。PiggyBac转座子能够在生物体染色体中准确地切出和转座,适用范围较广,可在鳞翅目等昆虫中作为基因转移载体发挥作用。本文简要介绍昆虫来源的PiggyBac转座子的特性及其在家蚕转基因和基因功能分析等研究中的应用。

1 PiggyBac转座子的结构与转座机制

1.1 转座子的结构 来源于鳞翅目昆虫粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)的转座子PiggyBac,属于真核生物的第2类转座子,其结构如图1所示。PiggyBac是一个自主因子,全长2.476kbp,含有1个RNA聚合酶II启动子区和1个聚腺苷酸信号,该信号的侧面是1个约2.1kb开放读码框(ORF),编码1个68kD的转座酶,该转座酶是转座子高频率的切出和转座所需的。PiggyBac转座子的末端是长13bp的反向重复序列(ITR),两端还不对称地分布着19bp长的内部反向重复序

列(IR)。PiggyBac转座子反向重复序列的5'末端以2~3个C碱基结束,3'末端的G碱基在切出位点的选择过程中起作用。该转座子转座频率较高,且总是在TTAA核苷酸目标位点处插入,因而被归入TTAA特殊的可转移因子家族。



图1 PiggyBac转座子结构示意图(引自Handler等)

1.2 转座机制 PiggyBac转座子转座机制与P-转座子相似,也是遵循“剪切-粘贴”(cut-and-paste)机制。与P-转座子不同的是PiggyBac转座子能在包括鳞翅目在内的多种昆虫染色体中进行准确的切出和转座,切出和插入时都需要其本身编码的转座酶的作用,并发生在特征性TTAA核苷酸序列目标位点。其转座机理(图2)PiggyBac转座子在转座酶的作用下从供体染色体上切下,供体染色体被切断成为两段,然后在DNA连接酶的作用下重新连接起来;目标染色体的特定位置(TTAA位点)被切开,末端为粘性末端。切下的PiggyBac转座子在转座酶的作用下与切开的目标染色体末端连接并补齐末端。这样在转移到目标染色体上的PiggyBac转座子两侧就出现了TTAA重复序列。

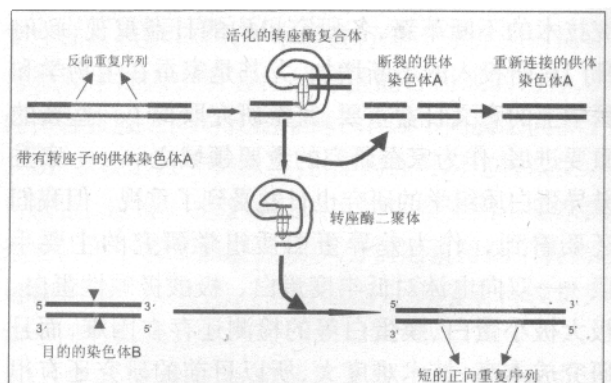


图2 PiggyBac转座子的转座机制

(Cut-and-paste DNA transposition)

作者简介: 赵岩龙(1979~), 男, 硕士研究生。

*通讯作者: 沈兴家, 男, 研究员, 硕士研究生导师。

2 PiggyBac转座子在转基因昆虫研究中的应用

利用P iggyB ac转座子能够在染色体中准确的切出和插入的特性,通过对P iggyB ac转座子的改造,使其在转座时携带外源基因进入基因组中,并且允许这些新的基因表达或使某个基因失活,从而达到对

昆虫的基因组进行改造的目的,获得转基因昆虫。目前利用P iggyB ac转座子已成功地获得了多种的转基因昆虫(表1)。国内代红久等(2005)也利用鳞翅目来源的转座子P iggyB ac建立了高效稳定的转基因家蚕技术。

表1 利用piggyBac转座子获得的转基因昆虫

宿 主 昆 虫 种 类	标 记 基 因
埃及伊蚊(<i>Aedes aegypti</i>)	Dm cinnabar
加勒比实蝇(<i>Anastrepha suspensa</i>)	PUBnlsEGFP, PUBnls- dsRed1
淡色按蚊(<i>Anopheles albimanus</i>)	PUBnlsEGFP
冈比亚按蚊(<i>Anopheles gambiae</i>)	hr5- iel- EGFP
斯氏按蚊(<i>Anopheles stephensi</i>)	actin 5C- dsRed, 3xp3- EGFP
桔小实蝇(<i>Bactrocera dosalis</i>)	Cc white, PUBnlsEGFP
家蚕(<i>Bombyx mori</i>)	Bm actin A3- EGFP, 3xp3- EGFP
地中海果蝇(<i>Ceratitis capitata</i>)	Cc white, PUBnlsEGFP, PUBnls- DsRed1
黑尾果蝇(<i>Drosophila melanogaster</i>)	White, white/ PUBnlsEGFP, 3xp3- EGFP, 3xp3- EYFP, 3xp3- dsRed, Pub- dsRed1
铜绿蝇(<i>Lucilia cuprina</i>)	PUBnlsEGFP
家蝇(<i>Musca domestica</i>)	3xp3- EGFP
棉红铃虫(<i>Pectinophora gossypiella</i>)	Bm actin A3- EGFP
赤拟谷盗(<i>Tribolium cassaneum</i>)	3xp3- EGFP, 3xp3- EYFP, 3xP3- dsRed1, Tc vermilion

3 PiggyBac转座子在家蚕研究中的应用

P iggyB ac转座子作为载体的限制性比较少,能应用的昆虫种类广泛,而且已作为转基因昆虫载体成功地获得了转基因昆虫,尤其是1999年日本学者成功获得转基因家蚕,为转基因家蚕的研究找到了一个合适的载体。家蚕是鳞翅目昆虫,生活周期短,容易饲养,不仅是一种重要的经济昆虫,更是研究真核基因表达调控的理想模式之一。有了合适高效的转座载体,将外源基因导入家蚕,使其稳定地表达并且遗传,可使家蚕在作为生物反应器的领域中发挥更大作用。利用P iggyB ac转座子所构建的转座载体已经或正在进行以下几方面的工作。

3.1 制作新一代家蚕生物反应器生产有用蛋白质 家蚕可进行人工饲料大规模饲育,个体大,成本低廉。而且成虫不能飞翔逃逸,可在实验室中隔离饲养,对人和环境安全。家蚕蛋白合成效率高,血淋巴具有储存蛋白的能力,淋巴内含有蛋白分解酶的抑制物——蛋白酶抑制剂,对目的蛋白起到保护作用。家蚕可以食用或作为饲料,可以将家蚕直接磨碎用作药物、食品或饲料添加剂。因此,用家蚕生物反应器生产有用蛋白具有很大的优越性。

目前,家蚕生物反应器的研究和开发主要是以家蚕核型多角体病毒(Bm NPV)为载体,在家蚕体液中表达多种有用蛋白,其表达量比其它生化微生物高出许多倍。但是利用家蚕Bm NPV表达系统生产有

用蛋白,每一批家蚕都要接种病毒,且目的蛋白分离和纯化比较困难,所以目前该系统用于高纯度药用蛋白的生产时很难形成产业化。因此,提高目的蛋白的表达量、减少分离纯化的步骤和成本将是开发家蚕生物反应器最为关键的一步。丝心蛋白基因可在5龄家蚕的后部丝腺中特异而高效地表达。如能将外源基因置于丝心蛋白启动子的调控下,利用家蚕丝腺细胞表达外源基因,其表达量将几十倍的高于家蚕Bm NPV表达系统,且表达的外源蛋白的纯度高,可以减少许多繁琐的下游浓缩和提纯处理。因此,家蚕丝腺生物反应器的研究具有非常大的开发前景。

P iggyB ac转座子的出现有力地促进了家蚕丝腺生物反应器的研发。我们可以利用该转座载体将丝素蛋白基因替换为人类所需的其它蛋白基因,如药用蛋白基因、食用蛋白基因等,让其稳定表达,使家蚕生产出人类企望的目的蛋白。家蚕丝腺可合成大量的蛋白质,每头蚕可合成0.5g丝蛋白,如果做成好的转基因家蚕,可以大量生产作为医药试剂的蛋白质。日本Tom ita等(2003)利用P iggyB ac转座子将人的III型胶原蛋白整合到家蚕丝素蛋白基因中,成功地培育了能分泌人胶原蛋白的转基因蚕。

3.2 改良家蚕品种性状提高蚕丝品质 将缺失转座酶的带有外源目的基因的P iggyB ac转座子与能提供转座酶的辅助质粒组成双转座子系统,依靠转座

酶激活PiggyBac转座子使其在家蚕早期卵的胚胎细胞内发生转座,其携带的外源基因将整合到家蚕染色体DNA中,并得到稳定的遗传和表达,从而可以通过筛选获得转基因家蚕,或者造成稳定的基因突变。从中选取具有经济价值的突变个体,改良品种性状,育成新的突变品种,从而提高蚕丝品质,或改变生理性状提高家蚕的抗病、抗逆性。Isobe等利用PiggyBac转座载体首次建立了rBmN-lef1细胞,该细胞能够产生双链RNA(dsRNA)干扰家蚕杆状病毒必需基因lef-1的表达,从而提高了家蚕抗病毒感染的能力。

3.3 家蚕基因功能分析 2004年中国科学家完成了家蚕全基因组的测序工作,并对家蚕的各种基因进行了初步注释,但要最终鉴定家蚕各种基因的功能还有大量的工作要做。研究家蚕基因功能最理想的方法,是将分离的基因导入家蚕体内,在个体水平上验证其是否具有功能。特别是对于功能基因组学研究来说,不仅要确定序列的编码区和非编码区,还要鉴定相关的生物功能。利用PiggyBac转座子作成转基因家蚕,是进行家蚕基因功能研究的一种有效的方法。利用PiggyBac转座子转座的功能,可以通过破坏家蚕染色体上的DNA序列,造成基因功能改变,研究目标基因改变后对家蚕生理生化的影响;再利用PCR扩增技术延伸PiggyBac转座子两端的序列,利用DNA测序技术测得相应的序列,这样就可以推测出该段DNA序列对应的生物学功能。有些基因的表达具有时空特异性,它们在不同的细胞、组织或者不同时期的表达通常是不同的。利用转基因技术可以研究某个基因在不同时期、不同组织中的表达或者某些基因在同一时期、同一组织中的表达,这是基因功能研究的一个有效途径。目前已经利用果蝇的热激蛋白70基因(hsp70)启动子在果蝇中完成了好几个异位表达实验,在转基因家蚕品系中也获得了成功。

用化学诱变方法筛选出的新基因,一般不易获得其分子信息。一种新的以转座子为基础的非物种特异性的插入诱变和增强子检测方法最近已经发展起来,该方法依赖于起跳因子和突变因子。起跳因子编码转座酶,以使突变因子移动,在基因组上随机整合并引起突变,但这2种类型的转座子不能交叉移动。只要突变因子含有一个由基础启动子驱

动的报告基因,插入诱变和增强子检测就能够同时应用到相同的筛选中。当突变因子在一个特殊的增强子附近整合时,基础启动子便会应答,报告基因将会在一个增强子独立的部分被启动表达,在某一时期或特定组织特别活跃的新基因就能够被识别出来。目前已经建立了一个以PiggyBac转座子为基础的插入诱变和增强子选择系统,并在黑腹果蝇中进行了功能验证。这种方法将序列数据直接和生物功能联系起来,是一个有效的昆虫功能基因组学研究的工具,可应用于各种昆虫基因功能的研究。

因此,PiggyBac转座子的发现和成功应用,为转基因家蚕的构建、抗病抗逆等家蚕品种的培育和家蚕基因功能分析提供了一条有效的途径。

参 考 文 献

- 1 田村俊树 转基因昆虫研究[J].蚕学通讯,2001,21(4):17~21
- 2 O Brochta DA Atkinson P W. Transposable elements and gene transformation in non-drosophilid insects[J]. Insect Biochem Mol Biol, 1996, 26(8-9):739~753
- 3 Elick TA Bauser CA Fraser M J. Excision of the piggyBac transposable element in vitro is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase [J]. Genetica, 1996, 98(1):33~41
- 4 Handler AM Use of the PiggyBac transposon for germ-line transformation of insects [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(10):1211~1220
- 5 Molecular Biology of the Cell [M], 4th edition, 2002
- 6 代红久,王铸钢,费俭,等.利用鳞翅目来源的转座子PiggyBac建立高效稳定的转基因家蚕技术[J].科学通报,2005,50(14):1470~1474
- 7 李卫党,何家禄,许化溪,等.家蚕基因工程表达系统的安全性研究.中国人兽共患病杂志,1999(6):41~43
- 8 李宏,钱永华.家蚕丝腺生物反应器的研究现状[J].北方蚕业,2003,24(98):15~16
- 9 Tomita M, Munetsuna H, Yoshizato K, et al. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(1):34~35
- 10 Isobe R, Kojima K, Bando H, et al. Use of RNAi technology to confer enhanced resistance to BmNPV on transgenic silkworms[J]. Arch Virol, 2004, 149(10):1931~1940
- 11 Qingyou Xia, Zeyang Zhou, Zhonghuai Xiang, et al. A draft sequence for the genome of the Domesticated Silkworm (Bombyx mori)[J]. Science, 2004, 306(10):1937~1940
- 12 颜海燕,钟伯雄.昆虫转基因载体——piggyBac转座子[J].蚕业科学,2000,26(增刊):98~101
- 13 夏庆友,徐汉福.昆虫转基因研究进展、应用和展望[J].蚕学通讯,2004,24(4):19~26