

轉位在跨物種上的研究與應用

主講人：戴宏光

指導教授：常玉強老師

報告地點：農藝館 112R

報告時間：93 年 4 月 8 日

一、前言：

1983 年 Barbara McClintock 因發現轉位子獲得諾貝爾生醫獎的殊榮。她從玉米中發現了會跳躍的基因，跳躍的行為導致了基因的重組，而使植株產生變異。轉位子這樣的特性所以被當作尋找有興趣基因的方法之一。往後轉位子的應用非常廣泛，在許多創造突變體的方法中，利用轉位子產生突變的效率較好且避免大量轉殖工作。然而轉位子並不是只存在玉米中，在其他的植物、動物、甚至是細菌都存在有轉位子，只因形式的不同而有所不同。自從發現 *Ac/Ds* 系統後，其他不同系統的轉位子陸續被發現，像是 *En/Spm*、*Mutator*、*P element* 等。而由於 *bz1* 基因被 *Ac* 轉位子釣取出來後，超過 60 個牽涉到植物發育的基因也被一些轉位子所釣取出來，所利用的轉位子包括從玉米得到的 *Supressor-mutator* (*Spm*)、*Muator* (*Mu*)，從阿拉伯芥得到的 *Tag1*。

轉位子為一個 DNA 或 RNA 片段，它可以從染色體中的基因跳離並隨機的插入到其他染色體基因中。這樣的結果可能會導致細胞不正常發展。由於科學家不斷的研究，轉位子的發現也越來越多，轉位子依照轉位機制大體上可以分為兩種，一種是 copy-and-paste；另一種為 cut-and-paste。若以物種來劃分，在植物中的轉位子系統有：*Ac/Ds*、*En/Spm*、*Mutator*、*Tam3*、*Tos17*；在動物中的轉位子系統有 *P element*、*Tc1/mariner*；在低等生物中的轉位子系統有 insertion sequence (IS) 系列、Tn 系列。例如細菌有兩種轉位子：simple insertion sequence 和 complex insertion sequence。simple insertion sequence 顧名思義就只有轉位子；而 complex insertion sequence 不僅有轉位子還有一些可抗抗生素的基因，可幫助寄主在有抗生素的環境下仍可以生長。

以上都是 DNA 形式的轉位子，另外還有一種是 RNA 形式的轉位子叫做反轉錄轉位子 (retrotransposon)。其轉位機制與病毒感染寄主細胞相似，病毒的遺傳物質為 RNA，當一段 RNA 轉譯出反轉錄酶後，會作用在另一段 RNA 上進行反轉錄成一股 DNA 最後再以該 DNA 為模板複製另外一股 DNA，此雙股 DNA 便可以插入到寄主的染色體中執行任務。然而病毒與 retrotransposon 的轉位機制相似，唯一的差別在於病毒 RNA 還會轉譯成外鞘蛋白將 RNA 包裹起來，繼續感染其他寄主，而 retrotransposon 不會轉譯出外鞘蛋白，只能在寄主內不斷的以 copy-and-paste 的形式進行轉位。Retrotransposon 存在於酵母菌、果蠅、哺乳類動物中，了解比較透徹的是酵母菌的 *Ty1* (The Cell p.289)。

本次專題討論不著重於 RNA 形式的轉位子，故在接下的敘述，只介紹 DNA 形式的轉位子。(表一)

二、轉位子種類介紹：

1. *Insertion sequence (IS)*：

一種在細菌中最簡單的轉位子稱之為 Insertion Sequence。在細菌中的轉位子有很多種，例如 *IS1*、*IS3*、*IS4*、*IS30*、*IS91* 等，其中以 *IS1* 和 *IS3* 研究的較為透徹。

IS1：

全長 768 bp，兩端各有 30 bp 的重複端點。*IS1* 可以轉譯出兩條 ORF(open reading frame)，分別是 *INSA* 和 *INSB*，這兩條有一部分是相重疊的而只有當完整的 *INSA* 和 *INSB* 完整的表達出來才具有轉位酶的功能。*INSA* 單獨表達一共有 91 個胺基酸而 *INSB* 有 125 個胺基酸。

IS1 的轉位行爲：

IS1 的轉位有兩種形式。一種是(simple insertion)(copy-and paste)，另一種是(cointegration)(copy-and-paste)。simple insertion 指的是一條轉位子插入；而 cointegration 指的是轉位子會複製兩份插入寄主染色體中。(transposable element p.5)

IS3：

全長 1258 bp，兩端的重複端點為 39 bp。*IS3* 有兩條 ORF，分別為 *ORFA* 和 *ORFB*。*ORFA* 有 99 個胺基酸而 *ORFB* 有 288 個胺基酸。

IS3 的轉位行爲：

IS3 只有 simple insertion，而沒有 cointegration。

2. *Ac/Ds*：

自動轉位子 *Ac(Activator)*與被動轉位子 *Ds(Dissociation)*是由 Barbara McClintock 在玉米中所發現的。自動轉位子 *Ac* 全長 4656 bp，兩端各有 11 bp 的重複端點。*Ac* 具有 5 個顯子(exon)和 4 個隱子(intron)，能轉錄出 3500bp 的 mRNA，最後轉譯出 92 kD 的蛋白質。

Ac/Ds 的轉位行爲：

根據研究發現 *Ac/Ds* 的轉位行爲 cut-and-paste，在阿拉伯芥中較偏好於插入原轉位子所在的染色體 (Transposon-mediated Gene Tagging in a Small Grain Cereal)。另外 Kuromori T 等人利用 *Ac/Ds* 系統創造阿拉伯芥突變體株，從 7566 株含有 *Ds* 轉殖系中分析，發現有一半的轉位子插入一號染色體，另外一半的轉位子遍佈其他四條染色體，此外作者還發現 *Ds* 在阿拉伯芥中喜歡插到染色體端點的位置 (2)

3. *En/Spm*：

轉位子 *En(Enhancer)*、*Spm(suppressor-mutator)*分別 Peter peterson 和 Barbara McClintock 在玉米中所發現命名，但實際上兩者轉位子是相同的。

En/Spm 全長 8287 bp，兩端各有 13 bp 的重複端點。它可以轉譯出兩種蛋白質：

TNPA 和 TNPD。TNPA 有 67 kD，TNPD 有 131 kD。轉位子的轉位需要靠蛋白質 (*trans-acting factor*) 和轉位子的端點 (*cis-determinants*) 作用完成。*En/Spm* 依照轉位的性質可以分為兩種：自動轉位子 (*En/Spm*) 和被動轉位子 (*I/dSpm*)。自動轉位子有完整的端點，5' 有 200 bp 而 3' 有 300 bp，另外還包含一個啟動子，可以驅動 TNPA 和 TNPD 的生成。而被動轉位子雖有完整端點，但無轉位酶基因。

***En/Spm* 的轉位行爲：**

En/Spm 系統的轉位子轉位為 cut-and-paste 比較偏好於插入原轉位子存在之染色體。基因經由轉譯出的 TNPA 以兩個為一個單位鍵結到轉位子上，共有四個單位。另外有兩個單獨 TNPA 鍵結到轉位子上。而 TNPD 以兩個一組的方式鍵結到轉位子端點上，其目的為切斷轉位子。

4. *P* element：

從果蠅中發現。自動轉位子 *P* 全長 2907 bp，兩端各有 31 bp 的重複端點。*P* element 有四個 exon，可以轉錄出 4 條 ORF (1)。*P* element 亦有被動轉位子，例如 KP、D50。*P* element 的轉位酶大小為 87kD。

P element 的轉位是 cut-and-paste，而且不需要透過 RNA。首先 *P* element 的兩端切斷，插入到同源染色體的某一位置，斷裂的部分由同源的另一條染色體上的 *P* element 經由染色體分裂並經過交換後修補完成。在這樣的情況下原跳離的 *P* element 位置會重新複製完成，並沒有消失。*P* element 在很多的染色體 DNA 都中有插入點，儘管範圍很廣，還是有一些喜好，譬如染色體有轉錄區域 (heterochromatin 註 1) 及很多重複 DNA 但沒有功能的區域 (euchromatic 註 2)，*P* element 較喜歡 euchromatic 的插入點。另外 *P* element 還有一項特性就是喜歡插入非轉譯編碼區。*P* element 的轉位活性是有組織專一性的，它在生殖細胞有活性，但在體細胞是沒有活性的，原因是當 *P* element 在體細胞中進行轉錄時會把前兩個 intron 切除，最後轉譯出 66kD 的蛋白質，這個蛋白質會抑制轉位子的轉位活性。而當 *P* element 在生殖細胞時除了會把前兩個 intron 切除外，也會把第三個 intron 切除，最後轉譯出的蛋白質為 87kD 也就是轉位酶。

註 1：Euchromatin: actively transcribed regions.

註 2：Heterochromatin: contains many repeats and no functional genes; structural function.

5. *Mutator*：

Mutator 的發現來自玉米。*Mutator* 有很多種，例如 *MuDR*、*Mu1*、*Mu2* (*Mu1.7*)、*Mu3*、*Mu4*、*Mu5*、*Mu6/7*、*Mu8* 等，全長大約 1000 bp~2200 bp 左右。兩端的重複端點序列 171 bp，而所有的 *Mutator* 幾乎 90% 的重複端點序列都相同 (Bennetzen, 1996)。儘管端點序列相似，但不同的 *Mutator* 其內部的序列差異相當大。這裡以最具代表性的 *MuDR* 作說明。*MuDR* 是由 Donald Robertson 所發現。*MuDR* 全長 4942 bp，兩端各有 17 bp 重複端點。*MuDR* 可以轉錄出兩條

mRNA。一條長1000 bp，有三個intron，可轉譯出207個胺基酸；另一條長2800 bp，可轉譯出823個胺基酸。

***Mutator* 的轉位行爲：**

經由前人研究 *Mutator* 發現這類轉位子喜歡插入到未甲基化的 DNA 中，而 *Ac/Ds* 及 *En/Spm* 也是喜歡插入未甲基化的 DNA 中。另外又有研究發現 *Mutator* 喜歡插入到基因的啓動子中，以及喜歡插入到非自己轉位子所在的染色體。所辨識的序列具有保守性，5'-G-T-T-G/C-A-G-G/A-G-3' (Cresse et al., 1994)。而與其他轉位子比較，*Mutator* 插入的專一性是比較低的，因此對於要產生各式各樣的突變體來說，使用 *Mutator* 當作插入行突變劑較有效率。

6. *Tc1/mariner*

在動物中，很多的突變體都是由轉位子的插入發生的。*Caenorhabditis elegans* 含有轉位子 *Tc1* (Transposon *C.elegans* numbr 1)，在其他物種也有類似的 *Tc1* 轉位子。譬如在 *Drosophila mauritiana* 中就有與 *Tc1* 同源的 *mariner* 轉位子。由於他們具有一定的相似性，故歸於同一個家族。到目前為止，*Tc1/mariner* 的成員遍佈整個動物圈，包括線蟲、節肢動物門、脊椎動物、渦蟲、纖毛蟲甚至真菌。在 *Tc1/mariner* 家族中研究比較透徹的是 *Tc1* 和 *Tc3*，所以這裡就介紹 *Tc1* 和 *Tc3*。這種轉位子包含完整的端點重複序列以及一個基因。

Tc1 的端點重複有 54 bp 而 *Tc3* 有 462 bp。*Tc1* 和 *Tc3* 所轉譯出的轉位酶 *Tc1A* 和 *Tc3A* 包含了兩個辨識 DNA 的區域，一個是在 N 端的序列 *Tc1* 是 1~69 個胺基酸而 *Tc3* 是 1~65 個胺基酸。而第二個辨識位置在 *Tc1* 是 71~207 而 *Tc3* 是 98~192。這兩種的轉位具有專一性，也就是說 *Tc1* 的轉位酶不能使 *Tc3* 序列轉位，反之亦然。此類轉位酶具有外切能力，能精準的切斷轉位子 5'。比較 *Tc1/mariner* 家族的端點重複，發現每一種都不太一樣，但是有 4 bp 是相當保守的。

***Tc1* 的轉位行爲：**

Tc1 的轉位也是以雙股切斷的形式切斷，不同的地方在於修補過程。染色體上的同源染色體其中一條的 *Tc1* 跳離後，缺空的部分會有兩種方式進行修補，一種是以另一條同源染色體上的 *Tc1* 當模板進行複製，修補完的染色體又會含有 *Tc1*。另一種是比較少進行的就是不完整修補，導致修飾後的染色體僅僅含有部分的 *Tc1* 轉位子。*Tc1* 轉位子能應用在人類細胞 (Schouten et al., 1998)

***Tc3* 的轉位行爲：**

首先轉位子兩端的 CA 序列被轉位酶辨識後以雙股斷裂的方式切斷，5'少了兩個鹼基，而 3'則接上 OH。跳離後插入另一條有 TA 序列的 DNA，此時會產生 4 個單股鹼基區域，這樣的缺空會由寄主來進行修補的動作。而原來斷裂的 DNA 會進行修補但已不含有 *Tc3* 轉位子。*Tc3* 轉位子能用於斑馬魚 Raz (1997)

***mariner* 的轉位行爲：**

mariner 的轉位與 *Tc3* 相似，不同的地方在於轉位子切斷後 5'少了三個鹼基。簡單介紹完各轉位子的特色後，接者我們來探討轉位子的應用。

三、轉位子的應用：

今天我們知道利用轉位子從事基因轉殖以及基因的分析是不可或缺的過程。隨著從玉米得到的 *Suppressor-mutator (Spm)*、*Muator (Mu)* 和從 *Antirrhinum majus* 得到的 *Tam3*，這些已知的轉位子序列可以當做一個很好用的標籤，並且廣泛的應用在基因組中。(Pohlman et al., 1984; Pereira et al., 1985; Coen et al 1986; Hershberger et al., 1991)。第一個被 *Ac* 釣取出來的基因是 *brn1* 基因(Fedoroff et al., 1984)。如轉位子插入到某個基因，而使的外表表現有缺陷，則可以分析轉位子的側翼 DNA 序列了解該基因。此基因可以單獨的釣取出來，根本不需知道它是哪一種蛋白質或是哪些核酸序列組成。轉位子有這樣強大的標示功能，通通反映在重要基因的研究上(Tables 1, 2, and 3)。現今熱門的功能基因體學，主要研究基因與性狀的關係。而爲了要了解哪個基因是影響到哪一個性狀，因此需要創造突變體植株。創造突變體的方法在上學期的專討有提到，分爲四種：自然突變法、物理突變法、化學突變法以及生物性突變法。尤其以生物性突變法較常爲今天的科學家所用。而生物性突變法又可分爲兩種：T-DNA 和轉位子。T-DNA 是來自農桿菌質粒上的一段 DNA，它可以插入寄主的染色體中，而它的限制在於一但插入後就不會改變位置；反觀轉位子它只要有轉位酶助其轉位就可以隨機插入染色體中。而如果他插入的位置剛好是有功能基因的位置就會破壞功能最後產生突變株。用轉位子當作插入型突變法既省時有省力，是許多科學家常用來創造突變體。雖然有許多有關代謝或其他過程的基因被釣取出來，但它的數量預計在 17 年後還不是很高，因爲有些特殊的基因它的突變體會經過大自然的作用而恢復原來的狀態。這樣一來就無法藉由觀察外表型的變異去研究相關的基因。因此爲了解決這樣的困難，有兩種策略解決。一種是直接釣取，利用具有目標基因的植株與含有主動轉位子的植株雜交觀察突變現象 (McClintock 1953)。另一種是利用間接的方法先創造出大量的具有轉位子而且是自交的植株，然後再篩選表現異常突變株。直接釣取的好處是只集中單一基因並且只要經過一個世代便可看到結果，而它的缺點是需要創造大量的族群供篩選之用。間接釣取則是可以讓很多的基因從單一族中分離，但是它需要從自交植株製造出的家族足跡，而且要從任何一個基因得到插入轉位子的機率並不高。繼利用單一轉位子釣取之後，最近幾年在基因定序上面有革命性的轉變。有龐大的可利用序列是因爲 map-based (positional)轉殖的建立。只要手上有圖譜，那麼我們就可以從已知序列去推測一些可能基因的特性，並且預測在突變體中的改變。過去傳統的一步步將未知染色體定序的方式到了今天變成用 PCR 來解決。由於有很多基因都是從阿拉伯芥中得到，因此大部分的 map-based 轉殖都是從阿拉伯芥中獲得。舉例來說包括 *FRIGIDA* (開花的調節者) (Johanson et al., 2000)；*TOC1* 和 *GIGANTEA* (整日時間基因) (Park et al., 1999, Strayer et al., 2000)；*ASYMMETRIC*和 *LEAVES1* (分生組織基因的調節者) (Byrne and Taylor, 1996)；*EMBRYONIC FLOWER2* (像梳子

一樣的抑制劑，抑制生殖基因表現的) (Yoshida et al., 2001)。

這裡要提醒一點，關於轉位子的插入位置對基因的影響。有的轉位子插入到intron會導致基因表現不正常；有的轉位子縱使插入到基因中，也不必然影響被插入基因的功能。例如像*Ac*、*Spm*、*Tam3*等轉位子它們是否會影響到基因的表現在於轉位子轉錄方向是否與基因表象方向一致 (Moreno et al., 1992; Bradley et al., 1993)。倘若轉位子方向與基因方向相反，那麼基因的轉錄就會跳過轉位子繼續正常轉錄。如果轉位子是插入到隱子的部分，對於基因的表現產物影響不大，但插入到顯子有可能會破壞該基因的功能，不過有研究發現*Ac*和*Spm*具有切斷自己兩端點的能力，因此頂多在基因裡留下幾個鹼基其他部分都會離開基因(Menssen et al., 1990; Giroux et al., 1994)。*Mu*同樣的也發現在5'端及內部基因都有切斷的能力(Ortiz and Strommer, 1990)。若是兩個方向相同，那麼基因會轉錄到轉位子的端點為止。因此不管是轉位子插入到隱子或顯子，都會影響到基因的表現。再舉出一個例子說明轉位子插入位置之影響。一位愛荷華州立大學學者Laura Walters利用*Mutator*插入玉米的*P-wr*基因來建立*P-wr*基因的序列。結果發現*Mutator*插入的專一性很低，從她的資料得知*Mutator*會插入到啟動子、顯子I、顯子II、隱子I和隱子II，幾乎所有位置都能插入，並不會有特別的偏好。而當*Mutator*插入到啟動子時，會改變該基因的表現(Bennetzen, 1996)。另外也有可能因破壞原有啟動子，自己的基因反而變成了新的啟動子。作者實驗發現這樣的情形會使*myb*基因的調節者過量表現，導致一些該植物的組織會有色素沉澱的現象。另外如果*Mutator*插入到顯子時，就會破壞該基因的表現，最後會產生沒有功能的蛋白質。若*Mutator*插入到隱子，會影響到蛋白質辨識的切位，最後該基因會合成出與正常的蛋白質構造上有所不同。這樣的結果導致玉米穗上沒有色素的沉澱。因此到底轉位子插入的位置是否影響到基因的表現，端視於該物種的基因表現區域 (domain) 是否被轉位子破壞。

另外還有一個課題也是相當重要的，那就是「到底有多少基因是存在的？」舉例來說*Caenorhabditis elegans*有19000個基因(The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998)，*Drosophila melanogaster*有 13600個基因 (Adams et al., 2000)、*Arabidopsis thaliana* 有25000個基因 (The Arabidopsis Genome Initiative 2000)。在阿拉伯芥中有很多Knockout 突變體都沒有明顯的外表型，表示多拷貝數基因的突變並不會產生很大的影響(Bouche and Bouchez,2001)。譬如阿拉伯芥有超過92個*R2R3 MYB* 基因而玉米有超過100個*R2R3 MYB* 基因(Romero et al., 1998; Meissner et al., 1999; Rabinowicz et al., 1999)。而從果蠅的研究發現如果突變只發生在少數保守的基因，那麼就不會有表現型存在(Ashburner et al., 1999)。這裡作者認為有一部分可以用基因過剩來解釋。因為過多的基因可以降低基因複製後發生的突變。(Wagner, 2000)。從酵母菌的基因圖譜可以發現過多的基因可以影響酵母菌的適應性(reviewed in Zeyl, 2000)。從Thatcher et al. (1998)發現27個植物表現基因如果沒有突變那麼當它與野生型競爭時只有5%會存活。

其實尋找突變體的問題只在於我們知道基因的序列但是它卻不能影響外表

型的改變，使我們難以觀察因此需要更新的技術去找到答案。這個技術就是逆向遺傳學（reverse genetics）。逆向遺傳學有別於傳統的順向遺傳學（forward genetics），即先把基因全部定序出來，再利用分子技術創造出突變體。酵母菌 (Scherer and Davis, 1979) 和家鼠(Thomas and Capecchi, 1986)就是利用同源染色體重組來改變基因。科學家藉由knockout的方式破壞基因表現，再與野生型比較有何不同。可是有人研究發現利用染色體重組的方式進行knockout的效率不高 (Miao and Lam, 1995; Kempin et al., 1997)。所以轉位子的應用因此興盛起來。轉位子不僅可用於基因鈎取，應用在逆向遺傳學也是相當理想的。轉位在維持自己序列完整性的同時或多或少會隨機的插入染色體中。植物基因中如果含有轉位子，我們就可以用南方雜合和PCR分析。我們知道轉位子的插入不受控制的，是隨心所欲的插入到任何染色體，因此科學家可以藉由這一個特性去創造出大量各式各樣的突變體，就好像建立一座圖書館一樣的資料庫。這個概念首先應用在果蠅上(Ballinger and Benzer, 1989; Kaiser and Goodwin, 1990) 和*Caenorhabditis elegans*上(Zwaal et al., 1993)。由於有時候基因的改變不會影響到外表型的改變，我們要如何知道轉位子插入到哪個基因呢？科學家利用 β -glucuronidase (GUS)的特性應用在確認轉位子存在的位置或者是影響到植物的哪一部分。除了隨意插入的轉位子外，對於一些特定基因的分析也需要用PCR及定序的方式，此對於建立整個圖書館是有幫助的。隨者科技的發達，電腦使用越來越普遍，基因庫的建立已經可藉由電腦來快速處理大量的資訊。

在前面已經說過轉位子根據他們的轉位機制大致區分為兩類，這裡在進一步說明：

第一種轉位子是以DNA為基礎的Type II轉位子。這一類是最常用於插入型突變劑。如果轉位子可以轉譯出轉位酶，那麼轉位酶可以在辨識轉位子序列後將轉位子雙股切斷（cut-and-paste），並離開原來的位置後插入到新的位置。假如轉位酶只切斷單股轉位子，那麼原轉位子會複製一條新的轉位子，新的轉位子再插入到新的位置（copy-and-paste）。如果轉位子只有跳離和插入的現象，轉位子的拷貝數仍然是增加的。原因在於即將進行DNA複製的轉位子有能力跳離到複製點之前的未複製的DNA區域(Chen et al., 1987); (Chen et al., 1992)。然後雙股斷裂轉位子是靠著一股DNA複製以後進行修補(Peronnet et al., 2000)。總之，基因組的轉位子數量會因為轉位子的複製和轉位子的跳離達到一種平衡狀態。另外一種轉位子種類就是以RNA為基礎的反轉錄轉位子（retrotransposon），屬於Type I轉位子。它是在第一類轉位子之後才發現的，反轉錄轉位子的行為機制很像retrovirus。這類的轉位子很少應用於插入型突變劑，不過有些基因組比較大的植物都含有反轉錄轉位子(SanMiguel et al., 1996)。反轉錄轉位子同樣的會在基因組中因為轉位子的複製和轉位子因為同源染色體重組而消失達成平衡。(Shirasu et al., 2000)。幾乎所有以DNA為基礎的轉位子包含兩種形式的轉位子：主動轉位子和被動轉位子。主動轉位子是包含可以轉譯出轉位酶的DNA序列；而被動轉位子僅含有DNA兩端的重複端點序列，並沒有轉位酶序列。所以被動轉位子的轉

位需要靠主動轉位子的幫忙才可以進行轉位。如果一種植物的基因了解的越清楚，越容易找到新的轉位子。以阿拉伯芥為例子，它的基因組已經完全被解密了(The Arabidopsis Genome Initiative 2000)。從裡面就發現了*Activator*(Ac)、*Suppressor-mutator* (*Spm*)、*Mutator* (*Mu*)和*Enhancer* (*En*) 等轉位子。而這些轉位子都可以當作創造突變體的工具。其他還有矮牽牛的*dTph1*(Koes et al., 1995; van Houwelingen et al., 1998) 和水稻的*Tos17* (Hirochika, 1997)也都用來創造大量的突變體。雖然上述轉位子都可以用來當做插入型突變劑，但是會因轉位子的活性以及插入的目標不同，使用的策略也不同。例如利用*Mutator*轉位子可以快速的製造玉米的突變株。主動轉位子*MuDR*可以轉譯出兩種蛋白：可轉譯出轉位酶的MURA和目前尚未了解的MURB。例外至少有七種被動轉位子存在：*Mu1*, *Mu2* (*Mu1.7*), *Mu3*, *Mu4*, *Mu5*, *Mu6/7*, *Mu8*(Barker et al., 1984; Taylor and Walbot, 1987; Oishi and Freeling, 1988; Schnable et al., 1989; Fleenor et al., 1990)。*Mutator*轉位子喜歡插入到非自己本身存在的其他染色體位置 (Lisch et al., 1995)。這種突變方式比起自然發生的突變多了20~50倍(Robertson, 1978; Alleman and Freeling, 1986)。但是如此高的突變率在某些情況來說是不好的。例如有些數目較小的植物如果要回復一個特殊的突變株，此突變株會因為在胚跳離時期容易進行複製導致很多轉位子的累積，這樣一來在分析上就會有困難 (Raizada et al., 2001b; Raizada et al., 2001a)。相反的，*Ac/Ds* 和 *Spm/dSpm*轉位子比較傾向於插入到原位置所在的染色體。例如玉米的*Ac*轉位子在新插入的位置有一半都在原位置的10cM之間 (Greenblatt, 1984, Dooner and Belachew, 1989; Dooner et al., 1994)。而阿拉伯芥中*Ds*轉位子在新插入位置中有一半都是在原位置的1.7Mb之間(Machida et al., 1997)。因此*Ac*通常都用在分析玉米的*P*基因座(Athma et al., 1992; Moreno et al., 1992)，和阿拉伯芥的第五條染色體(Ito et al., 1999; Seki et al., 1999)。同樣的，*Spm*也是喜歡插入到原位置所在的染色體中，因此被用來分析阿拉伯芥的第四條染色體(Speelman et al., 2000)。使用這些轉位子的好處是可以釣取一些未知的基因。例如有人利用轉位子釣出玉米的*indeterminate*基因 (Colasanti et al., 1998) 和 *Tasselseed2*基因 (DeLong et al., 1993)。也有人將*Ac*轉入阿拉伯芥中去創造突變株。James et al. (1995)便利用*Ac*在阿拉伯芥中創造突變株，而*Ac*存在的範圍不超過15cM。另外，假如有一個受到EMS作用突變的植株，發現突變的缺陷就是不能進行脂肪酸的延長，那麼我們可以利用轉位子的插入創造相同的突變體來回復被破壞的基因。

另外關於突變發生的課題就是轉位子到底是偏向插入基因中還是非基因區域？根據研究發現玉米中的*Ac*偏向於轉位到低拷貝數DNA(Chenet et al., 1992)，而在阿拉伯芥則是喜歡插入靠近5'的基因位置(Parinov et al., 1999)。 *Spm*也是偏向於轉位到低拷貝數DNA(Bennetzen et al., 1988; Cone et al., 1988)，而在阿拉伯芥則是喜歡插入多AT存在的DNA，像這樣的DNA大部分都存在於隱子 (intron) 以及基因與基因之間(Speelman et al., 1999)。 *Mutator* 轉位子喜歡低拷貝數DNA(Cresse et al., 1995; Hanley et al., 2000)。由於可以跳過高拷貝數的DNA，所以利用轉位子

建立飽和的突變體庫不在是件困難的工作。

反轉錄轉位子的研究比較不透徹，知道在玉米(SanMiguel et al., 1996)及大麥(Shirasu et al., 2000)中有發現拷貝的反轉錄轉位子或其他種類的反轉錄轉位子。另外菸草的反轉錄轉位子*Tto1*有轉殖到阿拉伯芥中做研究，結果發現165個可轉譯出蛋白質的基因中有123個基因有轉位的行爲(Okamoto and Hirochika, 2000)。儘管有研究發現它會在組織培養之後，快速的失去活性，但是有這麼廣泛的插入範圍，相信是一個很好用的插入型突變體劑。水稻也有一個內生的反轉錄轉位子*Tto17*，它喜歡插入到低拷貝數的DNA (Yamazaki et al., 2001)，因此被用來創造大量水稻的突變體庫(Hirochika, 2001)。

這裡選擇常用的 *Ac/Ds*、*En/Spm* 和 *Mutator* 轉位子來介紹實際的例子。*Ac/Ds* 是最早發現的轉位子，因為研究的很透徹，被廣泛的應用在創造突變體株。例如 Singh 等人將 *Ac/Ds* 系統插入大麥中，大麥是屬於禾穀類作物，為雙倍染色體。該作者最後的結論是 *Ac/Ds* 系統可以提供大麥或小麥基因序列的篩選一個很好的技術平台。另外 Thomas 等人也是將 *Ac/Ds* 系統插入到大麥中。作者將 *Ac* 基因後面接上一個篩選基因 *codA*，以供篩選帶有 *Ac* 轉位酶基因的大麥植株。另一個轉植則是將 *Ds* 後面則接上一段 *bar* 基因，也是作為篩選用，轉殖到大麥中。將兩種植株雜交後分析它的轉位情形。結果作者發現 F1 世代不管是體細胞或是胚轉位的頻率都非常的低。接著作者將 F1 自交後產生的 F2 做分析發現轉位頻率相當高，達 70%。作者進一步分析 F3 世代發現有 75%的 *Ds* 從原來插入的位置在插到與自己同一條的染色體，而有 25%的 *Ds* 從原來的地方插入到不同於自己所在的染色體上。最後作者的結論為含有 *Ds* 轉位子的植株可經由含有 *Ac* 轉位子的植株雜交後產生轉位的現象。利用轉位子系統可以作為我們做基因鈎取和基因轉殖的一個工具。除了大麥之外，*Ac/Ds* 系統也可應用在胡蘿蔔。Ahmet 等人將 *Ac*、*Ds* 先後利用農桿菌轉殖到胡蘿蔔的癒合組織。不一定兩個基因都會同時存在於癒合組織中，因此會有只有 *Ac*、只有 *Ds*、兩個都有或兩個都沒有的再生植株，經由作者分析後發現單單只有 *Ds* 存在是不會有跳離的現象，只有在有 *Ac* 的存在下才會有跳離的現象。另外作者將跳離後兩旁的 DNA 去定序分析發現很多的 *Ds* 已經跳離了。因此作者認為利用 *Ac/Ds* 系統來研究胡蘿蔔染色體是一個不錯的方法。Henrik H Albert 等人利用 *Ac/Ds* 系統轉殖到甘蔗中分析。

En/Spm 也是從玉米中發現的。這裡舉出 S. TRAVELLA 等人將 *En/Spm* 插入到小麥(*Triticum monococcum*)。其方法是利用微體注射的方式將包含 *En/Spm* 的 DNA 質粒注射到未成熟的胚中，之後再發育為植株分析轉位行爲，也發現有轉位子跳離的現象。除了小麥，另外一個重要的禾穀作物稻米也被拿來研究。根據 R.C. Greco 的資料，*En/Spm* 在稻米中雖然可以正確的進行 RNA 隱子的切割，但是所轉錄出來的 mRNA 仍不足以進行轉位，可能的原因是轉位酶的製造受到了該寄主的控制及影響，導致轉位不頻繁。此外轉位效率效果不彰也可能是由於 *I/dSpm* 缺少了重要的轉位必須的 DNA 序列。總之 *En/Spm* 在水稻中的轉位並不是很成功。再來我們看一下再菸草中的轉位。Cardon GH 將 *En/Spm* 系統轉入菸

草中，在轉位子構築方面做了一些修改。在 En 前面接上 35S 啓動子加強表現，而在 *Spm* 做了兩種修改。一個接上 bar 基因，稱爲 Spm-S，使得轉植成功的植株可以透過 L-PPT-containing medium 的篩選，或者是在植株上噴灑 Basta 篩選。另一種是在 *Spm* 接上 DHFR 篩選基因，稱爲 Spm-DHFR，可以透過 methotrexate 來篩選。作者比較這兩種的轉位效率，Spm-S 的胚跳離頻率是 10.1%，而 Spm-DHFR 的轉位效率遠比 Spm-S 低的很多。最後作者認爲利用此系統作爲異質寄主的基因鈎取是可行的。

Mutator 同樣的在玉米中發現，它至少在 6、7 千萬年前就存在於玉米的染色體中(Bennetzen, 1996)。剛剛有提到 *myb* 基因，這裡要介紹一篇該作者引進新的方法來研究 *mutator* 插入到 *myb* 基因的行爲。Pablo D.Rabinowicz 等人設計了 SIMF(Systematic Insertional Mutagenesis of Family)，這個方法可以同時確定轉位子插入到不同基因。

四、結論：

隨者水稻的基因組解碼幾近完成，接下來就要研究該基因對水稻生理上和性狀上的影響。但水稻定序的完成只是生物界中的冰山一角，世界上還有無數的物種其基因仍是未知。因此利用轉位子當作插入性突變劑來幫助科學家更了解整個生命的奧妙是一個有效率而且是不可或缺的工具。未來會有更多的科學家投入尋找基因的行列，轉位子的應用會更廣泛，跨物種的轉位技術也會在不斷改良下更容易操作！

五、參考資料：

1. http://www.insanbilimleri.com/makaleler/biyoloji/p_element_in_the_drosophila_mela.htm
2. Plant J. 2004 Mar;37(6):897-905
3. <http://www.bb.iastate.edu/~chitnis/joe/papers/walters.html>
4. Mol Genet Genomics. 2001 Apr;265(2):336-44.
5. Bruce P. May and Robert A. Martienssen*Transposon Mutagenesis in the Study of Plant Development *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(1):1 – 35 (2003)
6. Steven R. Scofield, Kate Harrison, Steven J. Nurrish, and Jonathan D. G. Jones 'Promoter Fusions to the Activator Transposase Gene Cause Distinct Patterns of Dissociation Excision in Tobacco Cotyledons' *The Plant Cell*, Vol. 4, 573-582, May 1992
7. Shulu Zhang^{1,y}, Niels Sandal², Patricia L. Polowick¹, Jiri Stiller^{2,z}, Jens Stougaard² and Pierre R. Fobert¹, Proliferating Floral Organs (Pfo), a Lotus japonicus gene required for specifying floral meristem determinacy and organ identity, encodes an F-box protein *The Plant Journal* (2003) 33, 607–619
8. June Swinburne,^a Lluís Balcells,^a Steven R. Scofield^b and Jonathan D. G. Jones,^b and George Coupland^a 'Elevated Levels of *Activator* Transposase mRNA Are Associated with High Frequencies of *Dissociation* Excision in Arabidopsis' *The Plant Cell*, Vol. 4, 583-595, May 1992
9. Greco A P. B. F. Ouwerkerk A A. J. C. Taal C. Sallaud A E. Guiderdoni A A. H. Meijer J. H. C. Hoge A A. Pereira 'Transcription and somatic transposition of the maize En/Spm transposon system in rice' *Mol Gen Genomics* (2004) 270: 514 – 523
10. Gregory J. Lawrence,^a E. Jean Finnegan,^b Michael A. Ayliff^b and Jeffrey G. Ellis^a 'The *L6* Gene for Flax Rust Resistance 1s Related to the Arabidopsis Bacterial Resistance Gene *RPSP* and the Tobacco Vir1 Resistance Gene *N*' *The Plant Cell*, Vol. 7, 1195-1206, August 1995
11. Shin-nosuke Hashida, Ken Kitamura, Tetsuo Mikami, and Yuji Kishima* 'Temperature Shift Coordinately Changes the Activity and the Methylation State of Transposon Tam3 in *Antirrhinum majus*
12. Transposon Elements, Edited by H. Saedler and A. Gierl

六、附圖：

表一 各種轉位子長度與末端倒轉重複比較。

轉位子	長度	TIR
Insertion sequence	768	30
<i>Ac/Ds</i>	4656	11
<i>En/Spm</i>	8287	13
<i>Mutator</i>	4942	17
<i>Tam3</i>	3630	12
<i>Tos17</i>	4300	138
<i>P element</i>	2907	31
<i>Tc1/mariner</i>	1610	54

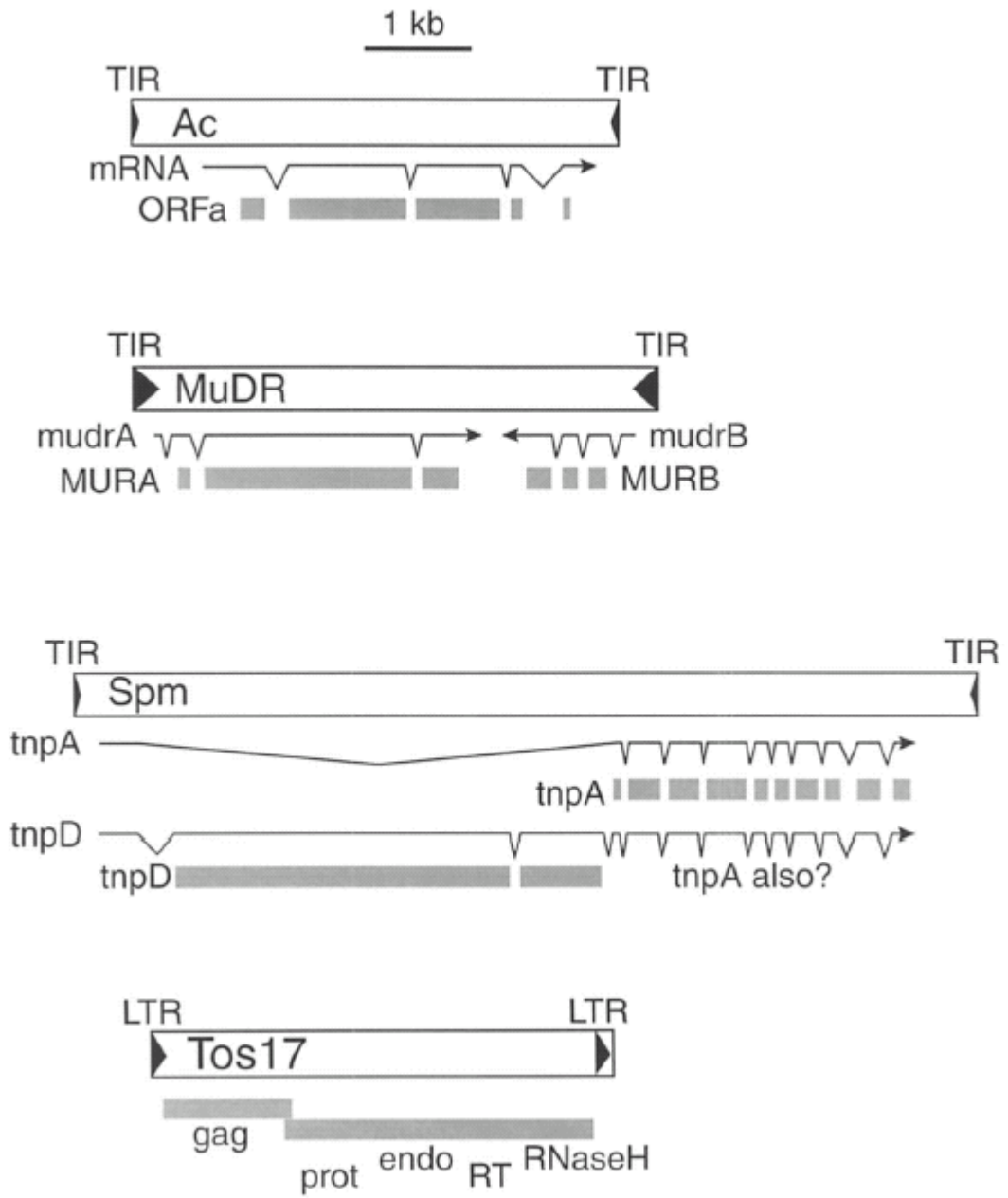
表二 各種轉位子基本特性介紹。

轉位子	轉位機制	目標鹼基重復(bp)	應用於其他物種	linked/unlinked
<i>Ac/Ds</i>	Cut-and-paste	8	大麥、小麥、胡蘿蔔、菸草、阿拉伯芥、馬鈴薯、蕃茄、大豆、水稻、亞麻、白楊樹、矮牽牛 <i>Lotus japonicus</i> 、酵母菌	linked
<i>En/Spm</i>	Cut-and-paste	3	小麥、稻米、菸草、馬鈴薯、阿拉伯芥、 <i>Orychophragmus violaceus (L.)</i> 、苜蓿	linked
<i>Mutator</i>	Cut-and-paste	9 (3)	-	unlinked
<i>Tam3</i>	Cut-and-paste	8	-	-
<i>P element</i>	Cut-and-paste	8 (1)	鼠	-
retrotransposon(<i>Tos17</i>)	Copy-and-paste RNA mediated	5 (4)	為水稻內生轉位子。	all
<i>IS1</i>	Copy-and-paste non RNA mediated	9	-	-

表三 Ac/Ds、En/Spm、Mutator 應用於各物種與活性比較。

轉位子	物種	活性	參考文獻
Ac/Ds	菸草	44%	Baker (1986)
		27-70%	Baker (1987)
		36%	Haring (1989)
		(10%)sectors	Finnegan (1989)
		33%	Rommens (unpublish)
		ND	Spena (1989)
		1-9%	Jones (1989)
		>20%	Taylor (1989)
		>5%(higher)	Jones (1991)
		0.09%pod nos::TPase	Steven (1992)
	0.38%pod sAc	Steven (1992)	
	0.87%pod ocs::TPase	Steven (1992)	
	6.83%pod 35S::TPase	Steven (1992)	
	紅蘿蔔	28%	Van Sluys (1987)
		ND	Van Sluys (1989)
矮牽牛	可執行	Backer(1992)	
阿拉伯芥	30%	Van Sluys (1987)	
	51%	Schmidt (1989)	
	0.2-0.5%	Schmidt (1989)	
		Swinburne (1992)	
馬鈴薯	50%	Knapp (1988)	
蕃茄	80%	Yoder (1988)	
	ND	Belzile (1989)	
大豆	45%	Zhang (1987)	
水稻	35%	Jones (1990)	
大麥	F1：低 植株	Thomas (2001)	
	F2：70%		
	F3：100%		
白楊(aspen)	high number of light-green spots	Fladung (1997)	
亞麻(Flax)	gene tagging	Gregory (1995)	
<i>Lotus japonicus</i>	gene tagging	Shulu (2003)	
酵母菌	可執行	Clifford (2000)	
小麥	可執行	Takumi (1999)	

<i>En/Spm</i>	菸草	7% 5%sectors 10%sectors ND	Pereira (1989) Pereira (1989) Masson (1989) Masson (1989)
	馬鈴薯	ND	Frey (1989)
	阿拉伯芥	gene tagging	Kirsten(2001)
	小麥	可執行	Travella (2002)
	水稻	活性低	Greco (2004)
	<i>Orychophragmus violaceus</i> (L.)	可執行	Sakhno (2002)
	苜蓿	活性低	d'Erfurth I (2003)
<i>Mutator</i>	番茄	無活性	Zhang (1987)



圖一 各種轉位子的基因產物

Retrtransposon(*Tos17*)

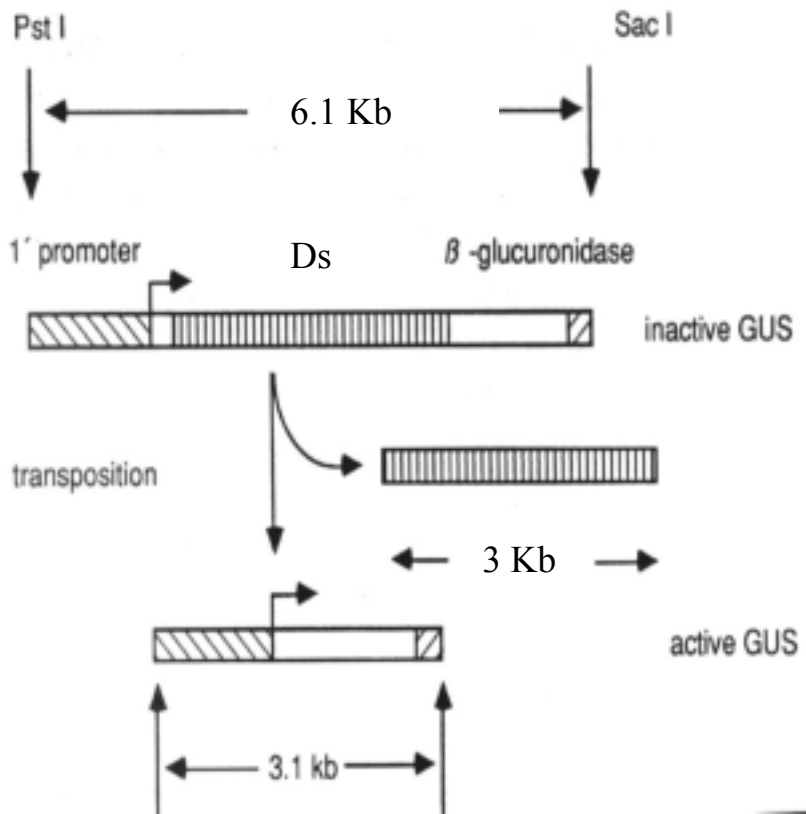


retrovirus

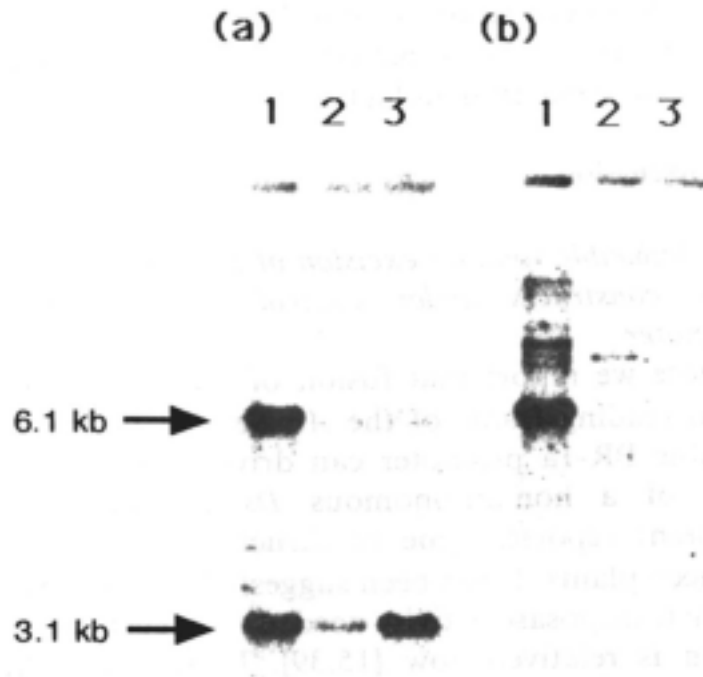


圖二 病毒與 retrotransposon 之 RNA 比較圖

(A) 此構築全長 6.1 Kb，當 Ds(3 Kb)跳離後，剩下 3.1 Kb 構築。



(B) (a) 使用 GUS probe 雜合。
(b) 使用 Ds probe 雜合。



圖三 (A)Ds跳離示意圖。(B) 利用南方雜合分析法檢測菸草中轉位子Ds是否跳離及轉位。