

# 人类人工染色体(HACs)研究进展

马毅<sup>1</sup>,舒建洪<sup>2,3</sup>,李向臣<sup>3</sup>,丁伯良<sup>1</sup>,张金龙<sup>1</sup>,陈永福<sup>1,4</sup>

(1 天津市畜牧兽医研究所,天津 300112;2 浙江理工大学 生命科学院,浙江 杭州 310018;

3 西北农林科技大学 生物工程研究所,陕西 杨凌 712100;4 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室,北京 100094)

[摘要] 人类人工染色体(HACs)由着丝粒、端粒和复制起点组成。通过对天然染色体的改造或者从头构建的方法可以获得多种类型 HACs。HACs 可以携带大片段基因组 DNA,是建立转基因动物模型的重要手段,在基因治疗方面也有着广阔的应用前景。文章从 HACs 的结构及各组成元件的功能、HACs 的不同构建方法、HACs 在转基因研究及基因治疗中的应用等方面,对 HACs 的最新研究进展进行了综述,同时指出了 HACs 研究中存在的问题,并对 HACs 的应用前景进行了展望。

[关键词] 人工染色体;转基因;生物反应器;基因功能

[中图分类号] Q343.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)09-0039-06

## Advance in human artificial chromosome research

MA Yi<sup>1</sup>,SHU Jian-hong<sup>2,3</sup>,LI Xiang-chen<sup>3</sup>,DING Bo-liang<sup>1</sup>,

ZHANG Jin-long<sup>1</sup>,CHEN Yong-fu<sup>1,4</sup>

(1 Tianjin Institute of Animal Science and Veterinary, Tianjin 300112, China;

2 College of Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China;

3 Institution of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

4 State Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Human artificial chromosomes (HACs) are composed of a functional kinetochore, a telomere and an origin of replication. Many kinds of HACs can be generated by two different approaches, either by fragmenting a natural chromosome or generating de novo chromosomes. HACs can carry large DNA fragments, which offer an important way not only for producing transgenic animal model but also for gene therapy. The structural requirements for HACs, the approaches to constructing HACs, the applications of HACs in transgenic research and gene therapy are reviewed in this article. Technological problems and perspectives are also mentioned.

**Key words:** artificial chromosome; transgene; bioreactor; gene function

自 1983 年, Murray 和 Szostak 成功构建了酵母人工染色体以来<sup>[1]</sup>, 关于人工染色体的研究获得了迅速发展, 并相继出现了酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)、噬菌体人工染色体(PAC)、哺乳动物人工染色体(MAC)和人类人工

染色体(HACs)等。其中, HACs 采用了人类染色体结构的必需组分, 可以象正常染色体一样复制和分裂, 并避免了整合入宿主染色体的可能及位置效应。因此, 在转基因研究及基因治疗等方面具有无可比拟的优势。

[收稿日期] 2006-07-20

[基金项目] 天津市农业科学院院长基金项目(06001)

[作者简介] 马毅(1976-),男,天津市人,助理研究员,博士后,主要从事动物基因工程研究。

[通讯作者] 丁伯良(1948-),男,上海市人,研究员,博士,博士生导师,主要从事预防兽医研究。

目前, HACs 已成为国内外转基因领域的研究热点。对 HACs 的研究主要集中在 HACs 的各种组成元件及其生物学功能、各种 HACs 的不同特点及构建方法、HACs 在转基因动物模型的制备和基因治疗中的应用等方面<sup>[2-5]</sup>。目前,国内尚未系统开展对 HACs 的研究工作。有鉴于此,本文从 HACs 的结构、HACs 的不同构建方法、HACs 在转基因研究及基因治疗中的优势及不足等方面,对 HACs 的研究进展进行了综述,旨在为国内研究者开展 HACs 的研究提供参考。

## 1 HACs 的结构

人工染色体可以分为 2 类,一类为原核生物人工染色体,如 BAC 和 PAC 等,其结构及复制等符合原核生物特性;另一类为真核生物染色体,如 YAC、MAC 和 HACs 等,具有相应真核生物染色体的着丝粒、端粒和复制起点等必需组分或与其功能相同的替代成分,以维持染色体结构的稳定。

具体而言,人类人工染色体(HACs)也是一类真核生物染色体,具有人类染色体的着丝粒、端粒和复制起点或其替代成分<sup>[2]</sup>。由于这 3 个成分是维持染色体正常功能所必需的,因而对其结构特性进行深入研究是获得理想 HACs 的前提。目前,关于 HACs 的研究也主要集中在这一方面。

### 1.1 端粒

在上述 3 种染色体结构中,目前对端粒的了解最为清楚,也最容易在体外进行操作<sup>[3]</sup>。对哺乳动物和鸟类而言<sup>[4]</sup>,端粒 DNA 是由核心序列为 TTAGGG 的 DNA 单体重复排列构成。将长度超过 1 kb 的(TTAGGG)<sub>n</sub> 重复序列,导入体外培养的人类细胞后,可在 70% 的转染细胞中发挥端粒功能<sup>[5]</sup>。但也有研究指出,在线状 HACs 结构中,1 kb 的(TTAGGG)<sub>n</sub> 重复序列并不一定在人类细胞中发挥作用<sup>[6]</sup>。这表明需要对端粒的结构做进一步研究。

### 1.2 复制起点

复制起点的情况比较复杂,许多不同的序列均可在人成纤维细胞中充当复制起点。目前,尚不清楚构造哺乳动物人工染色体时,是否要求特定的复制起点序列。如果其功能可以由其他顺式元件或选择标记基因来完成,将为 HACs 的应用提供很大方便。

### 1.3 着丝粒

着丝粒的情况最为复杂,目前尚不清楚着丝粒

的精确 DNA 序列。此外,具有着丝粒功能的 DNA 序列难以在体外进行操作<sup>[7]</sup>。基于这两点原因,着丝粒结构已成为当前 HACs 研究中的一大难点和热点。

人类染色体上存在一种称为  $\alpha$ -卫星 DNA 的重复序列<sup>[8]</sup>。这种序列属于灵长目动物所特有的一种重复序列家族,是人类着丝粒的主要组成元件,171 bp 的该序列单体可以不同方式排列成超过几 Mb 的片段<sup>[9]</sup>。由于人类染色体均含有一定数量的  $\alpha$ -卫星 DNA<sup>[8]</sup>,且大多数人类染色体  $\alpha$ -卫星 DNA 均具有着丝粒功能<sup>[10]</sup>,因此可以认为,着丝粒功能是以这种重复序列为结构基础的。目前,还不清楚染色体进行正确分裂所需的  $\alpha$ -卫星 DNA 长度,但含有 90 kb  $\alpha$ -卫星 DNA 序列的微型染色体可以在有丝分裂时正确分离<sup>[11]</sup>。但这并不能说明 90 kb  $\alpha$ -卫星 DNA 足以构成新的着丝粒。此外,Saffrey 等<sup>[12]</sup>用无  $\alpha$ -卫星 DNA 序列转染的超过 450 个 HT1080 细胞(雄性纤维瘤细胞系)中未出现着丝粒。相反,用含 70 kb 21 号染色体  $\alpha$ -卫星 DNA 序列的 DNA 或 1 个 85 kb 含 X 染色体来源的  $\alpha$ -卫星 DNA 序列的结构进行转染,则可以有效地形成 HACs,进一步证实了  $\alpha$ -卫星 DNA 在构造人工染色体中的重要作用。

不同  $\alpha$ -卫星 DNA 重复序列的长度不同,其着丝粒功能也有差异,这可能是由于着丝粒结合蛋白 B(CENP-B)的结合能力不同而引起的<sup>[13]</sup>。已有研究表明,仅含有 CENP-B 结合位点的  $\alpha$ -卫星 DNA 序列,在 HACs 中具有着丝粒的功能。CENP-B 结合位点存在于除 Y 染色体外的所有人类染色体  $\alpha$ -卫星 DNA 序列中<sup>[14]</sup>。近年来的研究还表明,17 号染色体上的  $\alpha$ -卫星 DNA 序列合成 HACs 的能力,(32%~79%)远远高于 Y 染色体  $\alpha$ -卫星 DNA 序列(40%)<sup>[15]</sup>。Y 染色体  $\alpha$ -卫星 DNA 序列由 M 型卫星 DNA 序列单体组成,虽然这种单体序列也存在于 13,14,15,21 和 22 号染色体上,但这些染色体还含有 D 和 R 型在内的  $\alpha$ -卫星 DNA 序列。这些 Y 染色体  $\alpha$ -卫星 DNA 序列的独特构成与 Y 染色体的特性有关,也与由于缺乏同源配对染色体而导致的重组频率较低有关。

目前,还不完全清楚 CENP-B 的生物学作用,其在哺乳动物中高度保守<sup>[16]</sup>。然而,敲除 CENP-B 的小鼠除出现雌性生殖道缺陷、体形变小、雄性睾丸增重等异常外,其他表型均正常<sup>[17]</sup>。CENP-B 可能通过激活重组而在  $\alpha$ -卫星 DNA 序列内产生均一

性。除去 CENP-B 盒,17 号染色体其他序列的 DNA 甲基化等过程同  $\gamma$ -卫星 DNA 序列不同。这些都提示  $\gamma$ -卫星 DNA 序列是构建 HACs 所必需的。

#### 1.4 新着丝粒

在构建微型染色体的过程中还出现了新着丝粒结构。新着丝粒是指在标记染色体中发现的一种无  $\gamma$ -卫星 DNA 序列的着丝粒,其具有正常或接近正常的着丝粒活性和结合 CENP-A、CENP-C、CENP-E、CENP-F 的特性<sup>[18]</sup>。然而,新着丝粒发生概率很小,其序列可能并不具有从头构造染色体的能力<sup>[19]</sup>。现在有 40 多种新着丝粒,这些着丝粒主要重叠于某些人类染色体区域<sup>[20]</sup>,暗示这些区域具有比其他序列更易形成新着丝粒的潜能。

对新着丝粒的研究表明,细胞在分裂过程中可以逐步建立和保持新着丝粒功能。组蛋白脱乙酰化、DNA 甲基化或 CENP-A 在细胞周期 S 期中的结合,均可影响着丝粒复合体的形成。Saffrey 等<sup>[12]</sup>在 HT1080 细胞系中应用端粒辅助染色体片段法,对来源于人 10 号染色体的含有新着丝粒的标记染色体进行了片段化,获得了长度为 0.7~1.8 Mb 的微型染色体。这些微型染色体在减数分裂中能够保持稳定,在缺乏选择压力时,其损失率接近含  $\gamma$ -卫星 DNA 序列的 HACs。为了确定新着丝粒 DNA 序列是否能够在 YAC 中形成新着丝粒,Saffrey 等<sup>[20]</sup>筛选了许多稳定传代的细胞,但并未检测到从头合成人工染色体的形成。然而,结合免疫沉淀法和 DNA 矩阵分析表明,新着丝粒实际上位于 10q25.3 附近。Lo 等<sup>[21]</sup>在 CENP-A 结合区附近确定了一个曾被当作新着丝粒的 330 kb 区域。

Lo 等<sup>[22]</sup>对来源于人 20 号染色体短臂的标记染色体进行了研究,确定了 20p12 处 460 kb 长的 CENP-A 结合区域。CENP-A 是着丝粒组蛋白的同源蛋白,DNA 序列分析并未在此区域找到与新着丝粒区域有关的特定模式,而在其他染色体上的分布也限于着丝粒部分,这提示 CENP-A 结合区可能是着丝粒结构的组成部分,因而对其着丝粒功能具有重要作用。

#### 1.5 HACs 的长度

构建人工染色体的另一问题,是如何确定保持染色体稳定的最小长度。由于哺乳动物染色体较大,因而利用传统的方法难以对其进行方便的操作。最小的人类染色体-22 号染色体约为 55 Mb。对酵母而言,YAC 的最小长度为最小天然染色体的 1/5。

如果人类染色体同酵母染色体一样,在其长度与稳定性之间存在着某种对应关系的话,其长度最小要求为 10 Mb。事实上,长仅为 5 Mb 的微型染色体可在体外培养体细胞中保持稳定,如果将其长度降为 2.5 Mb 后会出现不稳定现象<sup>[23]</sup>。虽然这一长度在大多数克隆系统中不能进行方便的操作,但通过同源重组在酵母中对 YAC 进行修饰后,获得了 2.3 Mb 的大分子,随后可将其共转染人成纤维细胞<sup>[24]</sup>。然而,这一方法存在 YAC 在酵母中结构不稳定的问题。

## 2 HACs 的构建方法

大多数 HACs 可通过 2 种不同的方法获得。一种方法是对天然染色体的改造,另一种是从头构造人工染色体。通常将由前者获得的 HACs 称为微型染色体,与后者进行区别<sup>[25]</sup>。

### 2.1 天然染色体的改造

天然染色体的改造最早产生于 1991 年,可以称为端粒辅助染色体片段法(TACF)或端粒指导截断法(TDT)<sup>[26]</sup>。这种方法通过含有端粒片段和选择标记,有时也通过含有靶染色体同源片段的打靶载体将特定染色体连续截为更小的微型染色体,所获得的微型染色体是自由的,也是可以正常分离的。

Farr 等<sup>[27]</sup>和 Heller 等<sup>[28]</sup>成功地应用此方法改造了人 X 和 Y 染色体。X 来源的微型染色体为 0.5 Mb,含  $\gamma$ -卫星 DNA 序列。构建人 Y 染色体来源的微型染色体所需的  $\gamma$ -卫星 DNA 序列最小为 100 kb。TACF 微型染色体最早产生于人类细胞和人-仓鼠杂交细胞系。然而利用同源重组进行打靶时效率较低,这促使研究者在 DT40 细胞里构建微型染色体。DT40 是经过造血细胞组织增生病毒诱导的前 B 细胞系,在该细胞系里可以发生较高频率的同源重组,所获得的微型染色体可以转入哺乳动物细胞做进一步研究。

### 2.2 从头构造人工染色体

从头构造人工染色体可以称为组装法或从下到上法,即通过将已成功克隆的着丝粒和端粒 DNA 导入人类培养细胞来形成从头构造的 HACs,所获 HACs 的长度为 1~10 Mb。在 1997 年,Harrington 等<sup>[29]</sup>将合成的人  $\gamma$ -卫星序列、端粒、人类基因组 DNA 和一个选择标记在体外进行混合,然后共转染人 HT1080 细胞系,结果观察到了几个染色体被截断而形成的微型染色体,而且在其中一个被转染细胞中观察到了从头形成的人工染色体。随后,其他

研究小组利用 HT1080 细胞导入含有人  $\gamma$ -卫星序列结构的环状 YAC、PAC 或 BAC 结构和端粒序列,这些细胞中产生了从头构造的环状人工染色体,这些染色体由  $\gamma$ -卫星 DNA 序列和载体序列构成<sup>[30]</sup>。通过改造含有 70 kb  $\gamma$ -卫星 DNA 序列,但不含有端粒的环状 PAC 也可获得 HACs,这表明在 HT1080 细胞系中从头构建 HACs 时, $\gamma$ -卫星 DNA 序列是必需的,而端粒序列是非必需的。

### 3 HACs 的应用

#### 3.1 在基因治疗和基因表达研究中的应用

基因治疗被提出以来,已经经过了 30 余年的发展,虽然在有些病例中已经取得了成功,但总体而言效果并不理想。究其原因,在过去的基因治疗方案中,所用载体在转染宿主细胞后,目的基因可能会出现不表达,或通过非同源重组而插入宿主细胞染色体,造成宿主细胞的癌化等结果,这严重影响了基因治疗的效果<sup>[31]</sup>。而 HACs 作为载体则可以避免对宿主细胞染色体的负面影响,并由于其具有携带大片段基因的优点,可以将目的基因调控序列一并导入细胞内,从而实现目的基因时空特异性的表达,大大提高了基因治疗的有效性和安全性,显示出了良好的应用前景。

人类人工染色体可以作为表达载体,通过在人类细胞中表达目的蛋白以修补有缺陷的基因,从而达到治疗由基因缺陷所致疾病的目的<sup>[32]</sup>。有研究表明,携带有全长 40 kb、含调控区域、编码次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT1) 基因的 HACs,可以补偿 HPRT 缺陷型 HT1080 细胞的代谢缺陷<sup>[30]</sup>。另一研究小组共转染多个 PAC,其中 1 个 PAC 含 70 kb 21 号染色体  $\gamma$ -卫星 DNA 序列,另 1 个 PAC 含 140 kb 基因组 HPRT1 序列<sup>[33]</sup>。该研究中获得的 20%~80% HT1080 克隆中,出现了附加体形式的环形 HACs。在缺乏选择压力的情况下 HACs 相对稳定,在几个月中的损失率为 0.004 9~0.017,这表明在超过 98% 的减数分裂中, HACs 发生了正确的分离。这些结构稳定的 HACs,含有变异  $\gamma$ -卫星 DNA 序列和 HPRT1 基因序列,细胞表型变为 HPRT1<sup>+</sup>,表明至少 1 个拷贝的 HPRT1 基因发挥了作用。

重复序列可以抑制其附近基因的表达<sup>[33]</sup>。然而, $\gamma$ -卫星 DNA 序列并未导致其附近 HPRT1 基因的沉默<sup>[30]</sup>。尽管这一结果还有待于验证,但仍表明 HACs 具有作为大片段基因表达载体的潜能。与以

cDNA 为基础的载体相比,大的基因组片段含有转基因表达的必需元件,诸如隔离子、启动子、增强子及基因座控制区等,因而更有优势。

由于 HELA 细胞系与 HT1080 细胞系一样呈端粒酶阳性。因此,已有研究者从 HELA 细胞系中获得了从头构造的 HACs<sup>[28]</sup>。这表明可以从其他类型细胞中获得 HACs,以进行基因功能互补和基因表达研究。

#### 3.2 在小鼠胚胎干细胞研究和生产转基因小鼠中的应用

目前,基因工程染色体已被用于生产转基因小鼠,以进行基因表达及相关基础研究。Tomizuka 等<sup>[34]</sup>利用截短的人 2 号染色体和含有 Ig 位点的 14 号染色体转染 IgH 和 Ig 双敲除小鼠,以补偿 Ig 重链和  $\kappa$  轻链的表达,结果产生了功能性抗体反应。然而,其在不同染色体之间以及雌雄小鼠间传递效率并不相同。

Kuroiwa 等<sup>[35]</sup>应用同源位点特异性 Cre-LoxP 重组,在鸡 DT40 细胞中将 10 Mb 含 Ig 位点的人 22 号染色体片段,连接到截断的人 14 号染色体上,随后将其转入小鼠胚胎干细胞,获得了可表达人 Ig 的嵌合体小鼠。这提示 HACs 技术,将会成为制备人类抗体的一种有效途径。

人的 4~15 Mb Y 微型染色体在仓鼠和鸡细胞中保持稳定,但在小鼠 ES 细胞中并不稳定<sup>[36]</sup>,这说明人 Y 染色体的着丝粒在小鼠 ES 细胞中并不发挥作用。在其他研究中,有学者成功地利用以卫星 DNA 为基础的人工染色体 (SATAC) 和 1 段人 21 号染色体片段生产出了转染色体小鼠<sup>[37]</sup>,这段人 21 号染色体片段是从患者成纤维细胞分离的,并用 Cre 酶介导的 HPRT1 基因打靶的人小型染色体。这些研究表明,在小鼠中建立人微型染色体表达目的基因,以弥补小鼠遗传缺陷是可能的。尽管影响人类染色体在不同宿主细胞中稳定性的因子尚未得到阐明,但以上研究结果仍提示,可以将基因工程染色体充当功能基因表达载体,并使其在生殖系中进行传递是可行的。在此基础上,可以生产转染色体小鼠作为人类疾病的动物模型。

### 4 小 结

对 HACs 的研究已经取得了巨大的进展。然而,在这一领域也还存在许多问题有待进一步研究。首先,目前对人类染色体结构与功能的关系尚未彻底研究清楚,在构建微型染色体时会出现 DNA 重

排等现象,从而导致所获得的微型染色体结构不稳定,所要表达的基因也因此而处于一个不可预测的环境中,最终影响了基因治疗的效果<sup>[38]</sup>。其次,在用各元件共转染后会形成 HACs,但当转染 DNA 未形成新的染色体时,会经常发生染色体的重排,端粒序列经常会整合入宿主细胞染色体而导致大片段的丢失。第三,人工染色体形成的绝对效率非常低,仅为  $5 \times 10^{-5}$ <sup>[39]</sup>。这些问题均影响了 HACs 的使用。

过去十几年中,虽然 HACs 技术面临许多困难,也还有许多问题尚待进一步研究和解决,但总的说来仍然获得了一定的发展,取得了一定的成果。这些研究结果对于阐明染色体的结构和功能,进而生产转染染色体动物及在基因治疗等方面均展示了其良好的应用前景。然而遗憾的是,国内尚未对这一具有广阔应用前景的新技术进行系统研究。因此,很有必要在我国尽快开展对 HACs 的基础研究,寻找应用 HACs 进行基因治疗的有效途径,从而填补我国在这一领域的空白。

#### [参考文献]

- [1] Murray A W, Szostak J W. Construction of artificial chromosomes in yeast[J]. Nature, 1983, 305(5931): 189-193.
- [2] Ren X, Katoh M, Hoshiya H, et al. A novel human artificial chromosome vector provides effective cell lineage-specific transgene expression in human mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2005, 23(10): 1608-1616.
- [3] Basu J, Compitello G, Stromberg G, et al. Efficient assembly of de novo human artificial chromosomes from large genomic loci[J]. BMC Biotechnol, 2005, 5: 21.
- [4] Hanish J P, Yanowitz J L, De Lange T. Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(19): 8861-8865.
- [5] Barnett M A, Buckle V J, Evans E P, et al. Telomere directed fragmentation of mammalian chromosomes[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(1): 27-36.
- [6] Ebersole T A, Ross A, Clark E, et al. Mammalian artificial chromosome formation from circular alphoid input DNA does not require telomere repeats[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(11): 1623-1631.
- [7] Brown W R, Mee P J, Hong S M, et al. Artificial chromosomes: ideal vectors? [J]. Trends Biotechnol, 2000, 18(2): 218-223.
- [8] Rudd M K, Schueler M G, Willard H F. Sequence organization and functional annotation of human centromeres [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2003, 68: 141-149.
- [9] Willard H F, Wevrick R, Warburton P E. Human centromere structure: organization and potential role of alpha satellite DNA [J]. Prog Clin Biol Res, 1989, 318: 9-18.
- [10] Du Sart D, Cancilla M R, Earle E, et al. A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA [J]. Nat Genet, 1997, 16(2): 144-153.
- [11] Nakano M, Okamoto Y, Ohzeki J, et al. Epigenetic assembly of centromeric chromatin at ectopic alpha-satellite sites on human chromosomes [J]. J Cell Sci, 2003, 116(19): 4021-4034.
- [12] Saffery R, Wong L H, Irvine D V, et al. Construction of neo-centromere-based human minichromosomes by telomere-associated chromosomal truncation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(10): 5705-5710.
- [13] Suzuki N, Nakano M, Nozaki N, et al. CENP-B interacts with CENP-C domains containing Mif2 regions responsible for centromere localization [J]. J Biol Chem, 2004, 279(7): 5934-5946.
- [14] Schueler M G, Higgins A W, Rudd M K, et al. Genomic and genetic definition of a functional human centromere [J]. Science, 2001, 294(5540): 109-115.
- [15] Mejia J E, Alazami A, Willmott A, et al. Efficiency of de novo centromere formation in human artificial chromosomes [J]. Genomics, 2002, 79(3): 297-304.
- [16] Kotzamanis G, Cheung W, Abdulrazzak H, et al. Construction of human artificial chromosome vectors by recombinering [J]. Gene, 2005, 351: 29-38.
- [17] Fowler K J, Hudson D F, Salamonsen L A, et al. Uterine dysfunction and genetic modifiers in centromere protein B-deficient mice [J]. Genome Res, 2000, 10(1): 30-41.
- [18] Choo K H A. Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation [J]. Am J Hum Genet, 1997, 61(6): 1225-1233.
- [19] Depinet T W, Zackowski J L, Earnshaw W C, et al. Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA [J]. Hum Mol Genet, 1997, 6(8): 1195-1204.
- [20] Saffery R, Irvine D V, Griffiths B, et al. Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of > 20 functionally important kinetochore-associated proteins [J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(2): 175-185.
- [21] Lo A W, Craig J M, Saffery R, et al. A 330 kb CENP-A binding domain and altered replication timing at a human neocentromere [J]. EMBO J, 2001, 20(8): 2087-2096.
- [22] Lo A W, Magliano D J, Sibson M C, et al. A novel chromatin immunoprecipitation and array (CIA) analysis identifies a 460-kb CENP-A-binding neocentromere DNA [J]. Genome Res, 2001, 11(3): 448-457.
- [23] Mills W, Critcher R, Lee C, et al. Generation of an approximately 2.4 Mb human X centromere-based minichromosome by targeted telomere-associated chromosome fragmentation in DT40 [J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(5): 751-761.
- [24] Larin Z, Taylor S S, Tyler-Smith C. A method for linking yeast artificial chromosomes [J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(21): 4192-4196.

- [25] Suzuki N, Nishii K, Okazaki T, et al. Human artificial chromosomes constructed using the bottom-up strategy are stably maintained in mitosis and efficiently transmissible to progeny mice[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(36):26615-26623.
- [26] Itzhaki J E, Barnett M A, MacCarthy A B, et al. Targeted breakage of a human chromosome mediated by cloned human telomeric DNA[J]. *Nat Genet*, 1992, 2(4):283-287.
- [27] Farr C J, Bayne R A, Kipling D, et al. Generation of a human X-derived minichromosome using telomere-associated chromosome fragmentation[J]. *EMBO J*, 1995, 14(21):5444-5454.
- [28] Heller R, Brown K E, Burgdorf C, et al. Mini-chromosomes derived from the human Y chromosome by telomere directed chromosome breakage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(14):7125-7130.
- [29] Harrington J J, Van Bokkelen G, Mays R W, et al. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes [J]. *Nat Genet*, 1997, 15(4):345-355.
- [30] Mejia J E, Willmott A, Levy E, et al. Functional complementation of a genetic deficiency with human artificial chromosomes[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 69(2):315-326.
- [31] Kawahara M, Inoue T, Ren X, et al. Antigen-mediated growth control of hybridoma cells via a human artificial chromosome [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770(2):206-212.
- [32] Basu J, Willard H F. Human artificial chromosomes: potential applications and clinical considerations[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2006, 53(5):843-853.
- [33] Grimes B R, Schindelbauer D, McGill N I, et al. Stable gene expression from a mammalian artificial chromosome[J]. *EMBO Rep*, 2001, 2(10):910-914.
- [34] Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, et al. Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(2):722-727.
- [35] Kuroiwa Y, Tomizuka K, Shinohara T, et al. Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(10):1086-1090.
- [36] Shen M H, Yang J, Loupart M L, et al. Human mini-chromosomes in mouse embryonal stem cells[J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(8):1375-1382.
- [37] Co D O, Borowski A H, Leung J D, et al. Generation of transgenic mice and germline transmission of a mammalian artificial chromosome introduced into embryos by pronuclear microinjection[J]. *Chromosome Res*, 2000, 8(3):183-191.
- [38] Auriche C, Donini P, Ascenzi F. Molecular and cytological analysis of a 5.5 Mb minichromosome[J]. *EMBO Rep*, 2001, 2(2):102-107.
- [39] Ren X, Tahimic C G, Katoh M, et al. Human artificial chromosome vectors meet stem cells: new prospects for gene delivery [J]. *Stem Cell Rev*, 2006, 2(1):43-50.

### (上接第 38 页)

- [8] 程容懿. 甜菜碱预防小鼠高脂血症和脂肪肝的试验研究[J]. *中国药师*, 2004, 7(6):411-413.
- [9] 杨季, 唐瑛, 左娟, 等. 硫代巴比妥酸法测定血清脂质过氧化物方法的改进[J]. *华国防医学杂志*, 2004, 18(1):30-32.
- [10] 周婷婷. 巯基物质对大鼠颅脑外伤后的胃细胞保护作用[J]. *北京医学*, 2004, 26(4):232-235.
- [11] Chobot V, Kremenak J, Opletal L. Phytotherapeutic aspects of diseases of the circulatory system[J]. *Chitin and Chitosan Ceska Slov Farm*, 1995, 44(4):190.
- [12] Girotti A W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems[J]. *J Lipid Res*, 1998, 39:1529-1542.
- [13] 金焕荣, 张越, 刘军, 等. 乙二醛对小鼠谷胱甘肽过氧化物酶活力及巯基含量的影响[J]. *工业卫生与职业病*, 2004, 30(1):25-28.