

人工染色体

孙 砚,孟金陵

(华中农业大学 作物遗传改良国家重点实验室,中国湖北 武汉 430070)

摘 要:着丝粒、端粒和复制起点是保持染色体在有丝分裂时稳定性的重要组分,利用酵母染色体的这些组分,1983年人们首次成功地构建了酵母人工染色体(YAC).此后,生物学家对于构建以人类为代表的哺乳动物的人工染色体产生了极大的兴趣,并于1997年成功地构建了第一条人类人工染色体(HAC).人工染色体具有极其重要的理论和实际意义,不仅可以作为研究必需组分的基础,还为基因治疗开辟了一条新的途径.目前,人们正致力于人工染色体的实际应用的研究,并期望在包括绿色植物的更多物种中构建人工染色体,前景十分广阔.

关键词:人工染色体;着丝粒;端粒;复制起点;YAC;HAC

中图分类号:Q813.4

文献标识码:A

文章编号:1007-7847(2002)S0-0034-06

Artificial Chromosome

SUN Yan, MENG Jing-lin

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China)

Abstract: Centromere, telomere and origins of replication are important elements to maintain the mitotic stability of chromosome. The Yeast Artificial Chromosome (YAC) was firstly built in 1983 triumphantly by using these elements of yeast. After this, biologists devoted in building mammals' especially human's Artificial Chromosome and the first Human Artificial Chromosome (HAC) was successfully built in 1997. Artificial Chromosome has significant academic and pragmatic sense. It not only can be used as the base to study the essential elements of chromosome, but also exploit a new way for gene therapy. At present, practical usage of Artificial Chromosome are developed. Men expect to build Artificial Chromosomes in more species including green plant. The foreground of Artificial Chromosome is great.

Key words: artificial chromosome; centromere; telomere; YAC; HAC

(Life Science Research, 2002, 6(Suppl.): 34 ~ 39)

真核生物的染色体由DNA与多种特异的蛋白质结合组成,是遗传物质的载体.所谓人工染色体,就是利用已知染色体结构和功能的必须组分,人工构建的小于天然染色体但能在宿主细胞中象正常染色体一样复制、分离和传递的DNA结构.

着丝粒、端粒和复制起点是维持染色体稳定和保证细胞分裂时染色体行为正确的必须组分.

无论是多细胞生物还是单细胞生物,其繁殖都是以细胞分裂为基础的.在细胞分裂过程中,染色体首先需要进行DNA复制,产生染色单体,凝缩并排列于赤道板上,然后在纺锤丝的牵引下染色单体两两分离,移向细胞两极.在减数分裂过程中还涉及同源染色体之间的联会、交换和分离.正是着丝粒、端粒和复制起点保障了生物体内这一复杂

收稿日期:2002-03-12;修回日期:2002-04-26

作者简介:孙砚(1979-),女,湖北武汉人,华中农业大学硕士研究生,主要从事植物人工染色体的构建和研究, E-mail: sunyaninbox@sohu.com.

过程的正常进行,因此人工染色体必须具备上述3个成分(或功能相同的替代成分),才有可能在宿主细胞中稳定存在并有效遗传。

人工染色体的构建最初是在酵母中完成的,酵母人工染色体早已成为克隆大片段外源基因的常用载体。随着人类人工染色体的成功构建,人工染色体在基因治疗、动植物遗传改良和遗传设计等方面的巨大应用前景展现在人们的面前,人工染色体及其必须组分的研究已成为当今生物学的热点,本文将对这方面的研究进展作一综述。

1 着丝粒

在细胞分裂中期,纺锤丝微管结合到染色体着丝粒区域的着丝点上,牵动染色体有规律地分配到子细胞中。纺锤丝为什么能附着着丝粒区域?着丝粒区域的DNA序列有何特异性?这些问题困扰了生物学家近半个世纪。

最早对着丝粒DNA的结构和功能的研究是在酵母中进行的。酵母的每个着丝粒只与一根纺锤丝微管相连,着丝粒两侧邻近都有基因。通过分离与着丝粒相连的已知基因,进行染色体步查,并通过功能验证,可以得到酵母的着丝粒。1980年克隆得到了来自酵母第三条染色体区域的着丝粒(CEN3)^[1,2]。之后科学家们相继分离出了酵母所有16条染色体的着丝粒。对这16条染色体着丝粒DNA结构和序列分析表明,酵母着丝粒DNA由约120 bp保守的DNA序列构成,称为着丝粒DNA序列(centromere DNA element, CDE)。CDE分为I、II、III三个区域。

CDEI是一段较为保守包含8个核苷酸的序列(RTCACRTG, R表示嘌呤)。CDEII是一段78~86 bp的富含AT的DNA序列。CDEIII是一段非常保守包含26个核苷酸的序列(TGTYYTGNITTC-CGAAANNNAAAAA, Y表示嘧啶, N表示A、G、C、T)^[3,4]。

继酵母之后人们把有关着丝粒的研究逐步深入和扩展到哺乳动物。其中在老鼠中发现的小卫星区(minor satellite)^[5],猪的染色体着丝粒区的约为400 bp的延伸片段^[6],以及人和其它灵长类的 α -卫星DNA^[7],被认为是行使着丝粒功能的区域。人类的 α -卫星DNA,是唯一已知的人类着丝粒专一的DNA序列,由171 bp的单体串联重复序列排列成200~9 000 kb不等的高度重复区域。人类着丝粒区域重复单元的拷贝数、插入的基因以及

DNA长度在23对染色体中存在较大的差异。

利用人工合成的 α -卫星DNA片段和包含有 α -卫星DNA的人的第21条染色体的YAC克隆的研究表明, α -卫星DNA的重复序列足够完成着丝粒功能^[8,9]。但是缺少 α -卫星DNA的着丝粒同样能完成正常的功能,至少发现了17条缺少 α -卫星DNA的人类染色体,这些染色体在非 α -卫星DNA区形成了新的着丝粒,并与着丝粒蛋白结合。进一步的分析表明这些区域的DNA结构并没有发生变化,只不过是同一序列的两种不同的功能状态^[10]。由此看来, α -卫星DNA对着丝粒的功能并不是必须的。既然着丝粒并不要求特定的DNA序列,拥有较大的可塑性,那么如何解释着丝粒总是持续并有效地在同一区域形成呢?有人认为机体中存在着丝粒激活的机制,激活可能偏向于 α -卫星DNA这样有特定的二级结构、富含AT的重复序列。其它的DNA序列也可被激活,只不过频率相对较小^[11]。

与酵母和哺乳动物相比,关于高等植物着丝粒的分子结构的报道相对较少,在玉米、水稻等物种中有少量报道^[12]。随着模式植物拟南芥基因组测序完成^[13],关于高等植物着丝粒区域的DNA结构的研究,也正在逐步深入。在拟南芥的五条着丝粒区域都存在与人类着丝粒区域 α -卫星DNA大小和组成相似的178 bp的串联重复序列(被称为Atcon)。Atcon的总长度均在1 000 kb以上,为中度重复序列,占基因组的2%~5%,只比占基因组8%的18 S~25 S rDNA少。Atcon区域同人类的 α -卫星DNA组成相似(都富含AT),并且Atcon序列内重组率大大降低,因此有可能是着丝粒的功能组分。除Atcon外,在拟南芥着丝粒区域还发现了其它的DNA重复序列,如反转座子、转座子和微卫星DNA等,甚至还有功能基因^[14,15]。

虽然目前还没有发现各物种间着丝粒序列明显的同源性,但对真菌、哺乳动物和植物着丝粒区域的DNA序列研究表明,真核生物的着丝粒区域存在一些共性:都含有大量的串联重复序列,富含AT,含有类似端粒的序列^[16]等,这些共性可能与着丝粒的功能和来源密切相关。人们根据已有的资料推测高等真核生物着丝粒的功能和属性也许并不依赖于DNA的碱基序列,而是与三级结构或少数核苷酸产生的曲度有关^[17]。但是要正确解释着丝粒的结构与功能的关系,了解其作用的机理,仍需对各物种着丝粒序列进行深入的研究。

2 端粒

端粒是真核生物染色体必需组分中研究得最为清楚的结构.真核生物端粒的结构极为相似,都是由5~8 bp的串联重复序列及其相关的蛋白质因子组成的复合体.如拟南芥的端粒由CCCTA-AA7个碱基的重复序列组成,延伸致2~3 kb^[18].端粒位于染色体DNA的末端,一条链富含C,一条链富含G,富G链的3'端指向染色体末端,呈单链伸出,通过非Watson-Crick方式G=C链内配对,在其它蛋白质因子(如端粒结合蛋白)的稳定作用下,折叠成四棱结构.

端粒具有保持染色体的稳定性、保证染色体的精确复制从而维持染色体长度的完整性的功能.以前一般认为是端粒酶的作用保持了端粒的完整性,这是因为端粒的结构和端粒酶的作用解决了在DNA复制时由于后随链的不连续复制和引物的切割所造成的末端的缩短.端粒酶上存在1.5个单位的与端粒串联重复序列互补的RNA序列,以这一序列作为模板,在端粒酶(具逆转录酶活性)的作用下可以使缩短的端粒延长.近几年的研究表明,端粒的长短及端粒酶的活性同细胞的衰老和肿瘤的发生有密切关系.哺乳动物胚原细胞端粒酶的活性较高,端粒的长度也未因细胞分裂的周而复始而缩短.而成熟的体细胞内几乎没有端粒酶的活性,染色体的端粒随着细胞的分裂逐渐缩短,细胞因此失去增殖能力.在一些肿瘤细胞里端粒酶重新获得了活性,这些细胞在有丝分裂过程中端粒不至于缩短,染色体结构稳定,因此细胞能维持旺盛的分裂能力,成为永生细胞^[19].

最近科学家们发现除端粒酶外,与端粒单链结合的蛋白(如纤毛虫的TEBP蛋白,人的Pot蛋白)对于保持端粒的完整性也有很大的作用.对于人类端粒的研究表明,至少在哺乳动物中端粒存在三个相互转化的过程:t-环(t-loops),Pot1p圈(Pot1p-bound)以及端粒酶结合期^[20,21].另外并非所有生物的端粒都是由简单的端粒重复DNA组成.在果蝇及其它双翅目的昆虫中不存在特异的端粒DNA,而是由蛋白质结合在染色体的顶端,象帽子一样,保护双链DNA末端免受核酸酶的攻击或发生染色体之间的连接反应.端粒的另一功能,即维持染色体长度的稳定性,则由反转录转座子HeT-A和TART来实现^[22].因此,研究端粒结合蛋白对

理解端粒的结构和功能具有重大意义,这一领域的研究必将深入下去.

3 复制起点

几乎所有真核生物和原核物的染色体,无论其形状是线状的还是环状,DNA的复制都是由处在双螺旋结构内部的特定的起始部位开始的,这一特定的部位称为复制起点(Origin).原核生物由于染色体很小,通常一个复制起点就可以完成DNA的复制.而真核生物由于拥有庞大的基因组和染色体,不可能由单一的复制起点完成DNA的复制,因此有多个复制起点,并且复制起点的数目往往超过完成染色体复制的需要^[23].在真核生物中,起点识别复合体(origin recognition complex)识别并与复制起点相结合,在起始活化因子(如MCM)的作用下,DNA双链解开形成复制环,之后由引物、DNA聚合酶与模板结合启动复制.

有关真核生物复制起点的研究是以酵母的自主复制序列(Automatic Replication Sequence, ARS)的研究为基础的.利用质粒可以分离得到酵母的ARS片段,含有ARS的质粒在酵母细胞中可以自主复制^[24].典型的ARS(如ARS1)包含4个DNA序列区:A、B₁、B₂、B₃^[25].其中A区在不同的起点间高度保守,包含绝对必需的中心序列(A/TTT-TATG/ATTTA/T),而B区在不同的起点间变化较大.

继酵母之后,在其它的物种如脉孢菌、黏菌、线虫、果蝇、玉米、水稻中也分离出了ARS,它们在酵母细胞中具有相应的功能.利用其它方法,在豌豆和果蝇中确定的复制起始区含有与ARS中心区相似的富含AT的序列^[26,27].但是,有人认为高等真核生物对复制起始序列的要求并不像酵母那样严格,甚至可能没有序列上的要求,而主要与染色体的结构特征相关^[28-30].

遗传物质的复制是细胞生命周期的基本环节,这一过程的物理化学特征早在1958年就得到了确定^[31].但是关于真核生物复制的生化过程的研究仍在进行当中.随着基因组时代的来临,人们对于真核生物染色体DNA复制起始的研究逐步深入,了解并控制复制的机理和过程被认为是新世纪生物学家面临的巨大挑战.

4 酵母的人工染色体

1983年,Murray和Szostak在大肠杆菌质粒

pBR322 中加入酵母的着丝粒、ARS 序列及四膜虫核糖体 RNA 基因 rDNA (Tr) 末端序列(这一序列结构上与端粒相似,具有简单串联重复序列并且能保持染色体末端不被降解和重组,同时使染色体末端复制完全),构建了长度为 10.7 kb 的短着丝粒的环状质粒.用这一质粒转化酵母菌,质粒变为线状(YLP4),成为第一个酵母人工染色体(Yeast Artificial Chromosome, YAC).这一构建的人工染色体在有丝分裂时稳定性较差,丢失率为每代 39%,而自然的染色体在有丝分裂中的丢失率为每代 2×10^{-5} 左右.

之后, Murray 和 Szostak 又以大肠杆菌 lamda 噬菌体为基础,加上酵母着丝粒、ARS 和四膜虫 Tr 末端及基因 TRP1 和 HIS3,构建成长度为 55 ~ 56 kb 的 YAC 质粒 YLP21 和 YLP22.新构建的 YAC 有丝分裂的稳定程度上升,后代传递率大于 99%.但与天然的酵母染色体相比,其稳定性还是低了 2 个数量级,而且减数分裂的分离比率也与期望值有很大偏差.这可能是由于染色体的结构序列在 YAC 中不如它们在天然染色体中协调.如 Tr 末端可能不能完全像真正的酵母端粒那样发挥作用; CEN 的片段还不够大;只有一臂有 ARS 等等^[32].

YAC 的成功构建为我们理解着丝粒、端粒等功能组分在酵母染色体中的作用提供了依据,同时也对有关有丝分裂、染色体断裂机制的研究、细胞同步研究和染色体进化等方面的研究有着重大的意义.不仅如此, YAC 的出现还为基因克隆提供了新型载体,为构建高等生物的基因组文库提供了技术支持.在传统的克隆载体中,基因插入的容量是有限的: λ 噬菌体载体的最大容量为 25 kb,粘粒(cosmid)系列载体最大容量为 50 kb,噬菌体 P1 系列载体最大容量为 100 kb,因此这些载体的克隆容量在分析较大的基因或对某些疾病进行“步查”时就显得微不足道了,因为那些基因可能长达 1 ~ 2 Mb. YAC 可以允许大至 1 Mb 的 DNA 插入,并能在酵母菌中稳定地复制传代.目前, YAC 已广泛地应用于基因克隆和基因组文库的构建上,在人类、小鼠、果蝇、拟南芥、水稻等高等生物中均构建了高质量的 YAC 文库.在构建 YAC 文库的基础上,1992 年 10 月美国科学家完成了人 Y 染色体及 21q 的物理图并随后完成了相应的测序工作^[33],2000 年完成的水稻的物理图谱也是采用了 YAC 克隆^[34].由于 YAC 在稳定性等方面存在不

足,因此人们又构建了基于单拷贝质粒 F 因子的细菌人工染色体(BAC)和基于噬菌体 P1 的人工染色体(PAC). BAC 和 PAC 不仅具有较大的克隆容量(300 kb 左右),可以通过电击高效转化,而且比 YAC 更稳定,因此具有广阔的应用前景.2001 年公布的人类基因组序列的草图,就是以构建全基因组的 BAC 库为基础进行测序的^[35,36].

5 人工染色体研究的新纪元

YAC 虽然在文库构建、基因克隆和细胞分裂机制的研究等领域起了巨大的作用,但 YAC 却只能在低等单细胞生物酵母中稳定存在,难以用来转化高等生物.随着对基因组学研究的深入,对多细胞生物细胞分裂机制的了解,以及对高等动植物着丝粒、端粒和自主复制因子的克隆和序列分析,自 20 世纪末人们逐渐把注意力放在了对动植物尤其是对人类的人工染色体(Human Artificial Chromosome, HAC)的研究上,从而使人工染色体的研究进入一个新纪元.

人类人工染色体将为基因治疗提供有效的手段.目前的基因治疗都是把目标基因用脂质体包被或用重组病毒转入受体,由于细胞总是在不断地分裂当中,要保持外源基因在细胞中的稳定性和长期的效果十分困难.另一方面载体病毒的基因可能对人体产生危害,而病毒蛋白还有可能诱使病人机体产生免疫反应的危险^[37].而 HAC 的组成成分都是来源于人类自身的基因组,因此可以同细胞中正常的染色体一样复制、分裂、稳定遗传,并且不会对受体产生毒害.因此应用 HAC 有可能解决基因治疗中的难题.

1997 年,美国 Eric 湖畔的 Cleveland 城的 Case Western Reserve 公布他们已构建成功第一代 HAC,这是第一条构建成功的哺乳动物的人工染色体.他们采用来源于人类 17 号染色体的 2.7 kb 的 α -卫星 DNA 的克隆进行体外连接,得到与自然染色体相似长度的串联重复序列.然后将这长于 1 Mb 的 α -卫星 DNA 的串联重复序列与人类端粒重复序列(TTAGGG)以及高分子量的基因组 DNA 混合,将这些裸露的外源 DNA 用脂质体转入培养的癌细胞.结果在培养细胞中发现了微小染色体(minichromosome).多数情况下细胞中只存在单个的微小染色体,这些微小染色体在有丝分裂时丢失率小于 0.5%,说明人工染色体能够保持拷贝数的精确稳定^[8].

随后 Ikeno 等采用另一种方法得到了人类人工染色体. 他们用两个 100 kb 的含有 α -卫星 DNA 的 YAC 克隆在酵母的重组缺陷株中繁殖, 然后利用重组蛋白的瞬时表达得到了与端粒和选择标记相连的 YAC 克隆. 转化培养的癌细胞, 发现只有一个 YAC 克隆能在癌细胞中形成人工染色体, 表明不是所有的 α -卫星 DNA 的片段都具有着丝粒功能^[9]. Henning 等人用 1 Mb 的包含 α -卫星 DNA 和其他单拷贝 DNA 的 YAC 克隆与端粒重复序列和推测的复制起点连接, 转化培养的癌细胞, 也成功地得到了人类的人工染色体^[38,39].

除了人类人工染色体之外, 在锥虫、果蝇等生物中也有应用人工染色体技术研究着丝粒或基因表达的报道^[40,41]. 植物作为人类赖以生存的基础, 其人工染色体的构建也具有十分重要的意义, 但与 HAC 相比, 植物人工染色体的研究起步较晚, 直至 20 世纪的最后一年, 才报道了在拟南芥、玉米和水稻中开展人工染色体的研究. 美国芝加哥大学 Preuss 博士领导的实验室在精细分析拟南芥着丝粒区 DNA 序列的基础上, 正在构建各种组合的微染色体 (minichromosome), 以确定着丝粒区的功能序列^[42]. 日本国家遗传所的研究人员采用了几个包含着丝粒区域的水稻 YAC 克隆同已被克隆的端粒序列和 ARS 进行同源重组 (含选择标记), 正在把筛选到的重组产物转化培养的水稻细胞以期得到水稻的人工染色体^[43].

随着拟南芥基因组测序的完成, 构建植物人工染色体被郑重地提到议事日程上. 在 2000 年的“第十一届国际拟南芥”会议上确定的 2000~2010 拟南芥十年发展计划中, 提出将构建植物的人工染色体, 作为植物功能基因组研究和构建虚拟植物的重要基础和技术手段^[44,45]. 植物人工染色体可以作为载体搭载所有功能未知的基因, 从而可以研究这些基因在植物生长、发育等方面的功能. 因此, 植物人工染色体将为最终创造出计算机模拟下的虚拟植物奠定基础. 与其它转基因方法相比, 搭载在人工染色体上的外源基因可能避免目前遗传转化随机插入带来的基因沉默和受体植株生活力下降等弊端, 这将给植物转基因产业带来无限商机. 染色体是基因的载体, 基因组是染色体的集合. 在对功能基因组深入研究和虚拟植物发展的基础上, 人们还可以采用人工染色体作为元件, 在上面装载完成植物正常生理功能所必须的基因、人们希望高效表达的功能基因和相应的调

控序列, 从而组装成各式各样新型的“人造”植物.

人工染色体极其必需组分的分子生物学研究, 已经被越来越多的生物学家所关注. 相信在不久的将来, 人工染色体的研究与应用将日趋完善, 从而推动细胞生物学、分子生物学乃至整个生命科学向纵深发展, 将生物技术引至出神入化的境地.

参考文献 (References):

- [1] CLAKE L, CARBON J. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosome [J]. *Nature*, 1980, 287: 504-509.
- [2] CARBON J. Yeast Centromeres: Structure and Function [J]. *Cell*, 1984, 37: 351-353.
- [3] BECHERT T, HECK S, FLEIG U, *et al.* All 16 centromere DNAs from *Saccharomyces cerevisiae* show DNA curvature [J]. *Nucl Acids Res*, 1998, 27: 1444-1449.
- [4] COPENHAVER G P, NICKEL K, KUROMORI T, *et al.* Genetic Definition and Sequence Analysis of Arabidopsis Centromeres [J]. *Science*, 1999, 286: 2468-2474.
- [5] WONG A K, RATTNER J B. Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse [J]. *Nucl Acids Res*, 1988, 16: 11645-11661.
- [6] MÜLLER J R, HINDKAER J, THOMSEN P D. A chromosomal basis for differential organization of a porcine centromere-specific repeat [J]. *Cell Genet*, 1993, 62: 37-41.
- [7] WILLARD H F, WEVRICK R, WARBURTON P E. Human centromere structure: organization and potential role of alpha satellite DNA. In *Mechanisms of Chromosome Distribution and Aneuploidy* [J]. Alan R Liss, 1989, 9-18.
- [8] HARRINGTON J J, VAN B G, MAYS R W, *et al.* Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes [J]. *Nature Genetics*, 1997, 15: 345-355.
- [9] IKENO M, GRIMES B, OKAZAKI T, *et al.* Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes [J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 431-439.
- [10] ZDEPINET T W, ZACKOWSKI J L, EARNSHAW W C, *et al.* Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA [J]. *Human Molecular Genetics*, 1997, 8: 1195-1204.
- [11] MURPHY T D, KARPEN G H. Centromeres take flight: Alpha satellite and the quest for the human centromere [J]. *Cell*, 1998, 93: 317-320.
- [12] ALFENITO M R, BIRCHLER J A. Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence [J]. *Genetics*, 1993, 135: 589-597.
- [13] THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 2000, 408: 796-815.
- [14] ROUND L K, FLOWERS S K, RICHARDS E J. *Arabidopsis thali-*

- ana centromere regions: genetic map positions and repetitive DNA structure[J]. *Genome Research*, 1997, 7: 1045-1053.
- [15] HESLOP-HARRISON J S, MURATAA M, OGURAA Y, *et al.* Polymorphisms and genomic organization of repetitive DNA from centromeric regions of *Arabidopsis* chromosomes[J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 31-42.
- [16] RICHARDS E J, COODMAN H M, AUSUBEL F M. The centromere region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences[J]. *Nucl Acids Res*, 1991, 19: 3351-3357.
- [17] VIC B K. Do nucleotide sequences constitute the centromere? [J]. *Mutat Res*, 1994, 309: 1-10.
- [18] RICHARDS E J, AUSUBEL F M. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Cell*, 1998, 53: 127-136.
- [19] CHEN H L. Structure and Function of Biomacromolecules[M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1999. 415-416.
- [20] BAUMANN P, CECH T R. Pot1, the Putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans[J]. *Science*, 2001, 292: 1171-1175.
- [21] DE I. T. Cell biology, Telomere capping--one strand fits all[J]. *Science*, 2001, 292: 1075-1076.
- [22] LIU D J. Cell Genetics[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1991. 200-204.
- [23] STILLMAN B. Cell cycle control of DNA replication[J]. *Science*, 1996, 274: 1659-1663.
- [24] SINCHCOMB D T, THOMAS M, KELLY J, *et al.* Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980, 77: 4559-4563.
- [25] MARAHRENS Y, STILLMAN B. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements[J]. *Science*, 1992, 255: 817-823.
- [26] HERNÁNDEZ P, BJERKNES C A, LAMM S S, *et al.* Proximity of an ARS consensus sequence to a replication origin of pea [J]. *Plant Molecular Biology*, 1988, 10: 413-422.
- [27] AUSTIN R J, ORR-WEAVER T L, BELL S P. *Drosophila* ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element[J]. *Genes and Development*, 1999, 13: 2639-2649.
- [28] BOCAN J A, NATALE D A, DEPAMPHILIS M L. Initiation of eukaryotic DNA replication: conservative or liberal? [J]. *Journal of Cell Physiology*, 2000, 184: 39-150.
- [29] GILLESPIE P J, BLOW J J. Nucleoplasmin-mediated chromatin remodelling is required for *Xenopus* sperm nuclei to become licensed for DNA replication[J]. *Nucl Acids Res*, 2000, 28: 472-480.
- [30] GILBERT D M. Replication origins in yeast versus metazoa: separation of the haves and have nots[J]. *Current Opinion in Genetics and Development*, 1998, 8: 194-199.
- [31] MESELSON M, STAHL F W. The replication of DNA in *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1958, 44: 671-682.
- [32] MURRAY A W, SZOSTAK J W. Construction of artificial chromosomes in yeast[J]. *Nature*, 1983, 305: 189-193.
- [33] KUANG D R. Yeast Artificial Chromosome. The Corpus of Microorganism Genetics Reviews [C]. Shanghai: Fudan University Press, 1994. 192-202.
- [34] SAKATA K, ANTONIO B A, MUKAI Y, *et al.* INE: a rice genome database with an integrated map view[J]. *Nucl Acids Res*, 2000, 28: 97-101.
- [35] OLIVIER M, AGGARWAL A, ALLEN J, *et al.* A high-resolution radiation hybrid map of the human genome draft sequence[J]. *Science*, 2001, 291: 1298-1302.
- [36] International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome [J]. *Nature*, 2001, 409: 860-921.
- [37] WILLARD H F. Artificial chromosomes coming to life[J]. *Science*, 2000, 290: 1308-1309.
- [38] EBERSOLE T A, ROSS A, CLARK E, *et al.* Mammalian artificial chromosome formation from circular alphoid input DNA does not require telomere repeats[J]. *Human Molecular Genet*, 1999, 9: 1623-1631.
- [39] HENNING K A, NOVOTNY E A, COMPTON S T, *et al.* Human artificial chromosome generated by modification of yeast artificial chromosome containing both human alpha satellite and single copy DNA sequence[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 592-597.
- [40] LEE M G, E Y, AXELROD N. Construction of trypanosome artificial mini-chromosomes[J]. *Nucl Acids Res*, 1995, 23: 4893-4899.
- [41] BENDER J, KAMPFER M, KLEIN A. Faithful expression of a heterologous gene carried on an artificial macronuclear chromosome in *Euplotes crassus* [J]. *Nucl Acids Res*, 1999, 27: 3168-3172.
- [42] KEITH K C, COPENHAVER G P, LUO S, *et al.* *Arabidopsis* Centromeres: Minichromosome Analysis of Functional Centromere Domains [C]. Madison, Wisconsin, USA: Abstract of 11th *Arabidopsis* Meeting, 2000. 41-49.
- [43] ONOMURA, KEN I, KURATA N. Construction of rice artificial chromosome [C]. Montreal, Quebec, Canada: 6th International Congress of Plant Molecular Biology, 2000.
- [44] CHORY J. The Multinational Coordinated *Arabidopsis* 2010 Project? Functional Genomics and the Virtual Plant: A blueprint for understanding how plants are built and how to improve them [R]. San Diego: The Salk Institute for Biological Studies, 2000. 1-15.
- [45] SOMERVILLE C, DANGLE J. *Plant Biology in 2010* [J]. *Science*, 2000, 290: 2077-2078.