论文

猪中间端粒序列的保守性和特征

纪光臻^①, 刘楷^①, 陈成彬^①, 阮卫民^②, GLYTSOU Christina^③, 杨洋^①,
OKUKA Maja^④, 宋文芹^①, GAGOS Sarantis^③, 李宁^②, 刘林^{①*}

① 南开大学生命科学学院, 医学生物化学国家重点实验室, 天津 300071;

② 中国农业大学生命科学学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193;

③ Genetics Division, Center of Basic Research II, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens Greece (BRFAA), Athens 11527, Greece;

④ Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, University of South Florida, Tampa, FL 33612, USA

* 联系人, E-mail: liutelom@yahoo.com

收稿日期: 2012-09-08; 接受日期: 2012-11-02

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2009CB941000, 2011CBA01002)资助项目

摘要 哺乳动物包括小鼠和人的端粒由位于染色体末端的 TTAGGG 重复序列组成, 对维持染色体的稳定有重要作用. TTAGGG 重复序列也出现在染色体末端以外的其他部位, 称为中间端粒序列. 异常的中间端粒被用来研究染色体的不稳定性, 并且在癌细胞中也发现有异常的中间端粒. 通过端粒荧光原位杂交, 并与不同的物种进行比对, 实验表明, 猪的 6 号染色体着丝粒区有植物的 TTTAGGG 端粒重复序列 (plant telomere sequences of TTTAGGG, bITSs), 它与脊椎动物的 TTAGGG 序列 (vertebrate telomere sequences TTAGGG, vITSs) 并存于同一区域. 通过对不同细胞系端粒长度的分析, ITS 的端粒长度是动态变化的, 它的变化趋势与末端端粒长度的变化趋势呈正相关. 同时, 猪的端粒末端有很高频率的双端粒信号 (doublets), 可能与染色体的不稳定性和 ITSs 端粒的动态性有关. 总之, 猪染色体的 ITS 区含有植物和动物的保守端粒序列, 对 ITS 功能和调节机制的进一步研究可能为进化和染色体不稳定性的研究提供新的依据.

关键词

进化
端粒
中间端粒序列
猪

端粒是位于染色体末端的重复序列, 保护染色体的稳定性^[1]. 在脊椎动物中, 端粒由 (TTAGGG)_n 的保守重复序列组成, 包括从鱼、两栖类、爬行动物、到包括小鼠、人及猪在内的脊椎动物^[2]; 与此不同, 多数的植物端粒序列为 (TTTAGGG)_n 保守重复序列^[3,4]. (TTTAGGG)_n 序列也出现在染色体的内部, 包括着丝粒区和间隙位点, 例如, 位于着丝粒区和末端端粒区域之间的端粒重复序列, 称为中间端粒 (interstitial telomeric sequences, ITSs)^[5-7]. 在许多物种中都有

ITSs, 包括鱼^[8-11]、鸡^[12]、小鼠^[13,14]、中国仓鼠^[15,16]、灵长类^[17]、拟南芥 (*Arabidopsis*)^[18]、小麦^[19] 及人类^[20,21]. ITSs 可能来源于原始的染色体内部重组 (倒位和融合), 及核型和基因组进化过程中的染色体交叉或双链断裂修复^[7,20,22-24]. 根据它们的序列特点或来源和在染色体上的位置, ITSs 分为 2 类: (i) 异染色质 ITSs (heterochromatic ITSs, het-ITSs), 主要在着丝粒区, 含有大片段 (达到几千 kb) 的类似于端粒的 DNA 序列; (ii) 短 ITSs (short ITSs, s-ITSs), 分布于染色体内部

英文版见: Ji G Z, Liu K, Chen C B, et al. Conservation and characterization of unique porcine interstitial telomeric sequences. *Sci China Life Sci*, in press

的短端粒序列^[25]. Het-ITSs 在一些脊椎动物中有发现, 可能是进化过程中染色体重排的产物, 但是 s-ITSs 似乎存在于所有的哺乳类基因组中^[25].

ITSs 起源和功能的研究对生物医学领域具有重要的意义. ITS 位点具有多态性, 并且内部端粒序列的延伸就像微卫星一样具有高度的不稳定性^[26]. 在某些胃癌细胞中, ITS 位点无论是在含有不稳定微卫星(microsatellite instability, MSI)的区域还是在无 MSI 的区域都不稳定^[26]. 细胞遗传学的研究表明, ITSs 位点与染色体脆性位点有关^[17]. 值得注意的是, 端粒相关蛋白也结合在 ITSs 上. ITSs 位点上 TRF1 和 TRF2 的结合也许有利于双链断裂时依赖 Ku 蛋白的非同源末端连接^[27,28]. 最近的研究发现, 端粒相关蛋白结合在 ITSs 区影响基因转录^[29,30].

猪的 ITSs 序列在 6 号染色体近着丝粒区, 这一区域序列与人的 1 号和 19 号染色体的部分片段同源^[31], 所以也可以被称作 het-ITSs. 由于猪 ITSs 只在 6 号染色体的着丝粒区, 本实验以此作为模型, 进一步研究 ITSs 的起源及长度调控机制. 除线虫和节肢动物, (TTAGGG)_n 序列在后生动物门中是保守的^[2]. 本实验发现, 脊椎动物和植物的端粒序列(vertebrate 和 botanic interstitial telomeric sequences, 分别称为 vITSs 和 bITSs)同时存在于猪的 6 号染色体上. 植物的 TTTAGGG 重复序列存在于哺乳类的染色体上, 为端粒在物种进化中的作用提供了新的线索, 同时也解释了猪的端粒的特殊性. 进一步的研究表明, vITS 长度的变化与 TTSs 长度的变化有关, 并具有多态性和不稳定性.

1 材料与方法

1.1 细胞分离和培养

实验中使用的动物已获得南开大学动物管理和使用中心的批准. 成纤维细胞来自约克夏猪, 采用标准的贴壁法分离, 猪的组织分别来源于胎儿(胚胎 50 天)、新生猪(出生后 8 天)和成年猪(出生后 3~4 个月). 组织被剪成 1 mm² 左右的小块, 平均分布于细胞培养板上, 采用高糖培养基培养(DMEM; Gibco, USA), 其中含有 10% 胎牛血清(FBS; Thermo, USA). 骨间充质细胞在无菌环境中分离, 来自于胎儿或者新生小猪的胫骨. 骨头的两端被剪开, 然后利用高糖培养基冲出骨头中的细胞, 离心后重悬并铺在细胞培养板

里培养, 培养基采用含有 15% 血清的 DMEM, 隔天换液. 细胞长到约 90% 的密度时传代, 每 3~4 天传代 1 次. 太湖成纤维细胞由中国科学院广州生物医药与健康研究所的赖良学老师提供.

诱导多能性干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)细胞系 JN1 和 JN2 来源于新生儿的间充质细胞(new born mesenchymal cells, NM). 5×10⁴ 个细胞每孔(6 孔板)转染 pMXs 骨架的逆转录病毒(pMXs-Sox2, Klf4, Oct4, c-Myc)^[32]. 转染后细胞更换为 iPS 培养基: knock-out DMEM 培养基添加 20% 胎牛血清, 1000 U/mL 白细胞抑制因子, 4 ng/mL 成纤维细胞生长因子(bFGF), 0.1 mmol/L β-巯基乙醇, 1 mmol/L L-谷氨酸和 0.1 mmol/L 非必须氨基酸. 感染后第 3 天, 细胞被传代到小鼠成纤维细胞制作的饲养层上并且每天换液. 胚胎干细胞样克隆的筛选和传代采用常规的方法.

1.2 核型分析和端粒定量荧光原位杂交(quantitative fluorescence *in situ* hybridization, Q-FISH)

细胞用 0.2 μg/mL 的噻氮酯啉(nocodazole Sigma, St. Louis, MO, USA)处理 3 h, 使细胞停留在有丝分裂中期, 不同细胞系的核型制备都采用了常规的方法. 细胞首先采用 75 mmol/L 氯化钾低渗处理, 然后用甲醇和乙酸按 3:1 的比例混合后固定细胞, 最后把细胞滴到洗净的玻片上使核型分散. 除下面用来检测和定量端粒的探针: 5'FAM-(TTTAGGG)₃ 和 5'TAMRA-(TTAGGG)₃ 和 FITC 标记的(CCCTAA)₃ 核酸肽(PNA), 端粒定量荧光原位杂交的流程和分析方法与已发表的文章描述相同^[33]. 端粒在 80℃ 下变性 3 min 后和探针杂交(0.5 μg/mL)(Panagene, Daejeon, Korea). 染色体用 0.5 μg/mL DAPI 染色. 染色体和端粒的 FITC/DAPI 荧光图片利用 Zeiss 荧光显微镜软件 AxioCam 和 AxioVision software 4.6 采集, 端粒长度的定量测量和端粒荧光亮度分析采用软件 TFL-TELO 程序(提供者 P. Lansdorp, Terry Fox Laboratory, Vancouver, Canada). 每个细胞系都有 30 个以上的中期核型被检测和定量分析.

1.3 染色单体定向荧光原位杂交(chromatid orientation-fluorescence *in situ* hybridization, CO-FISH)

条带特异性 CO-FISH 采用了 Bailey 等人^[34]报道的方法, 并做了微小修改. 细胞生长到快要汇聚时,

利用 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5'-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)孵育 8 h, 之后用 Nocodazole 处理 4 h. 细胞收集和核型制备与 1.2 相同. 染色体用 Hoechst 33258 (0.5 $\mu\text{g/mL}$)染色, 2 $\times$ 柠檬酸钠(SSC, Invitrogen)室温处理 20 min 后 365 nm 紫外线(UV light, Stratilinker 1800 UV irradiator)照射 40 min. 由 5-溴脱氧尿嘧啶核苷替代的 DNA 被核酸外切酶III(Promega)消化后, 玻片利用冰乙醇脱水数次后晾干. 用荧光探针 FITC-(CCCTAA)₃(Bio-Synthesis Inc, Texas USA)进行核酸荧光原位杂交(PNA-FISH). 玻片经过杂交、洗片、脱水, 然后用抗荧光淬灭剂(VectaShield antifade medium, Vector)和核染料(0.1 $\mu\text{g/mL}$, DAPI)封片. 图像用 Zeiss CCD 相机(Germany)采集, 用 Metasystems Isis 软件分析实验结果.

1.4 统计学分析

作图及线性回归分析采用软件 SigmaPlot 8.0, 数据用软件 Stat View 进行分析. 显著性差异被定义为 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$.

2 结果

2.1 脊椎动物和植物的端粒序列同时存在于猪 6 号染色体的着丝粒区域

不同细胞系的中期核型样品首先进行 G-带分析(G-banding), 之后进行端粒荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH), 分别使用 5'FAM-(TTTAGGG)₃(植物端粒序)和 5'TAMRA-(TTAGGG)₃(脊椎动物的端粒序列)DNA 探针进行杂交. 脊椎动物的端粒序列(TTAGGG)可以杂交在染色体的末端和间区(图 1B), 而植物的端粒序列 TTTAGGG 只在猪 6 号染色体的间区(图 1A). 这 2 种不同的中间端粒序列分别称为 vITSs(vertebrate ITSs)和 bITSs(botanic ITSs). 在高清晰的 FISH 和 G-banding 图中可以清楚地观察到猪 6 号染色体长臂的不同带区((图 1C~E), vITSs 大约位于 q21-22 区, 与已发表文章的结果相同^[31,35], 而 bITSs 位于同一染色体的 q22-23 区(图 1E). vITSs 和 bITSs 在 6 号染色体上的位置很清晰, 二者之间有小部分重叠(图 1E). 多数植物端粒为 TTTAGGG 重复序列^[3,4], 脊椎动物的 TTAGGG 序列只是偶尔出现^[4], 例如天门冬目^[36,37]和拟南芥^[38]. 这种现象可能是由于端粒合成过程中端粒酶模板的突变引起的^[39]. 目

前为止, 植物的 TTTAGGG 重复序列还没有在后生动物中被报道过^[2,40]. 为进一步验证实验结果, 我们又检测了太湖猪的样品. 结果表明, 植物的端粒序列确实存在于猪的 6 号染色体上, 并且与 vITS 同时存在(图 2). 作为一个特殊的例子, 植物的端粒序列第一次在猪的基因组中发现.

2.2 猪的端粒同时具有植物和动物端粒的特点

多数植物端粒序列为(TTTAGGG)_n重复序列, 而没有脊椎动物的 TTAGGG 序列, 例如蚕豆, 蚕豆的端粒有 doublets(图 3A). 天门冬目风信子(Hyacinthaceae)的染色体上同时有 bITS 和 vITS, 但 ITSs 区的 TTAGGG 端粒信号要比末端强(图 3B). 相反, 其他正常哺乳动物细胞中几乎没有端粒 doublets. 以小鼠为例, TTSs 上 doublets 很少(图 3C), 且小鼠的端粒没有 vITSs(图 3C). 在猪的染色体上可以很明显地观察到 bITS 和 vITS(图 3D), 并且猪的端粒上也有端粒 doublets(图 3D). 在植物的进化过程中, 一个端粒序列的转变点就是天门冬目的端粒由典型的植物端粒 TTTAGGG 变为典型的脊椎动物端粒 TTAGG^[36,37]. bITS 的发现表明猪的端粒具有动物和植物的特点, 这可能与端粒进化有关.

2.3 vITSs 序列长度的动态变化与 TTSs 长度的变化趋势相一致

通过 Q-FISH 分析, 对不同样品端粒的长度进行相对定量, 同时也观察到, 猪细胞中 vITSs 具有多态性. 在不同类型不同来源的各种猪细胞中, vITSs 长度的变化与对应的 TTSs 长度变化趋势一致(图 4). 在胎儿成纤维细胞中(fetal fibroblast, FF), vITSs 长度为 15.8~46.35 T.F.U.(约 11.7~34.2 kb, 通过 TRF 检测分析). 猪的 ITSs 长度比人的长, 人 6p 区 ITS 区的端粒长度大约为 500~700 bp^[26], 但比仓鼠的短(约 250~500 kb)^[16]. 在同一类型的细胞中, 虽然 ITSs 的长度要比 TTSs 长, 但它具有和 vITSs 相同的长度变化趋势(图 4). 本实验通过 Q-FISH 分析了猪 17 细胞系的 vITSs 和 TTSs 长度变化, 包括不同个体不同品种细胞的成纤维细胞和间充质细胞及不同代次的诱导性多干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSs). 为进一步验证以上结论, 本实验选择了胎儿间充质细胞(fetal mesenchymal cells, FM)、新生儿间充质细胞(newborn mesenchymal cells, NM)和成体成纤维细胞(adult

图 1 在猪 6 号染色体的间区同时检测到植物和脊椎动物的端粒序列

细胞的中期染色体样品, 首先进行 G-带分析, 之后用两种 DNA 探针进行免疫荧光原位杂交, 分别为 FAM-(TTTAGGG)₃ 和 TAMRA-(TTAGGG)₃. A: 荧光原位杂交; 植物的端粒探针为 5'FAM-(TTTAGGG)₃, 绿色荧光; B: 荧光原位杂交; 动物的探针 5'TAMRA-(TTAGGG)₃, 红色荧光; C: 图 A 和 B 合并在一起; 绿色的点为植物端粒序列; 红色的点为脊椎动物的端粒序列; 蓝色为被 DAPI 染色的染色体; D: 典型的 G-带和 FISH 分析图; E: 高度清晰的 6 号染色体图片显示了 bITSs 及 vITSs 的位置. 间断的直线表示 bITSs 和 vITSs 的位置, bITS 大约在 q22-23(绿色线条)而 vITS 在 q21-22(红色线条)

图 2 在太湖猪的 6 号染色体间区检测到了植物和动物的端粒序列

中期染色体分别用植物 FAM-(TTTAGGG)₃(绿色)和动物 TAMRA-(TTAGGG)₃(红色)DNA 探针进行荧光原位杂交

图 3 猪的端粒具有植物和动物的端粒特点

蚕豆、天门冬目的风信子、小鼠及猪的中期染色体样品分别用 5'FAM-(TTTAGGG)₃ 和 5'TAMRA-(TTAGGG)₃ DNA 探针进行杂交。A: 蚕豆的核型; 染色体的末端可以观察到 (TTTAGGG)_n 的植物端粒重复序列; 粉红色箭头: 端粒 doublets; B: 天门冬目风信子中期染色体核型; 没有观察到典型的末端端粒, bITSs 和 vITSs 都出现在 ITS 位点, 同时也观察到了端粒 doublets; C: 典型的小鼠端粒图片; 动物 (TTAGGG)_n 探针可以杂交在小鼠染色体的末端; D: 典型的猪端粒; 动物 TTAGGG 重复序列可以杂交在染色体的末端和间区, 而植物 TTTAGGG 重复序列只杂交在脉间区。红色的点为脊椎动物的端粒序列; 蓝色为被 DAPI 染色的染色体。黄色箭头: 植物和动物的端粒; 粉红色箭头: 端粒 doublets

fibroblast cells, AF) 进行传代培养, 实验结果表明, vITSs 的长度随着传代次数的增加逐渐缩短 (图 4A~C), 而在 iPS 中, vITSs 长度变长 (图 4D 和 E), 且 vITSs 的长度随着 TTSs 长度的变化而变化 (图 4D 和 E)。来自 3 个不同个体的 5 个不同细胞系进一步证实了以上结论 (图 4F)。线性相关性分析表明, ITSs 的长度与相应的 TTSs 的长度呈高度正相关 (图 4G~I)。总之, 猪 ITSs 的长度呈动态变化, 并与 TTSs 的长度变

化呈正相关。

2.4 猪 ITSs 区的端粒 doublets 及姊妹染色单体交换 (telomere sister chromatid exchange, T-SCE) 分析

通过染色单体定向荧光原位杂交 (CO-FISH), 本实验分析了 T-SCE 的频率^[34,41]。新合成的 DNA 链可以标记上 BrdU, 进而被消化掉。在中期染色体上, 观

图4 定量荧光原位杂交分析末端端粒和中间端粒的相关性

A: 胎儿间充质细胞传代过程中端粒的变化. FMP6, 12, 18(fetal mesenchymal cells at passage 6, 12 or 18)胎儿间充质细胞第6, 12或18代. 平均端粒长度用TFU±SE表示; B: 新生儿间充质细胞在长期培养过程中端粒分析. NMP4, 13, 19(newborn mesenchymal cells at passage 4, 13 or 19), 新生儿间充质细胞第4/11/20代; C: 不同代次的成体成纤维细胞端粒长度分析. AFP2/11/17(adult fibroblast cells 2, 10, 16), 成体成纤维细胞第P2, 10或16代; D和E: 诱导多能性干细胞的端粒长度分析(induced pluripotent stem cells, iPS, 命名为JN细胞系). 前体细胞是第4代的新生儿间充质细胞(new born mesenchymal cells at passage 4, NMP4), 分别分析了第4, 14和23代的JN1(D)和JN2(E)细胞系; F: 不同细胞系早代的vITS和TTS端粒长度分析. FFP6(fetal fibroblasts at passage 6): 胎儿成纤维细胞第6代; FMP6(fetal mesenchymal cells at passage 6): 胎儿间充质细胞第6代; NFP4(newborn fibroblasts at passage 4): 新生儿成纤维细胞第4代; NMP4: 新生儿间充质细胞第4代; AFP2(adult fibroblasts at passage 2): 成体成纤维细胞第2代; G: 不同细胞系vITS和TTS端粒长度相关性分析; H: 不同个体的vITS和TTS端粒长度具有很高的相关性; I: 所有样品的vITS和TTS端粒长度相关性分析; $P < 0.001$; T.F.U.(telomeric fluorescence unit): 端粒荧光单位

察到的带有较弱端粒信号的姊妹染色单体即为T-SCE. 本实验选择了几个系进行T-SCE分析, 包括新生儿成纤维细胞(newborn fibroblasts, NF)、NM及

iPSs. TTSs的T-SCEs频率较高(图5A~D). 在6号染色体的ITSs区也有T-SCE, 尽管频率很低(图5C).

与此相一致, 在猪的ITSs区和TTSs区都有端粒

图 5 通过 CO-FISH 和 Q-FISH 分析姊妹染色单体交换和端粒 doublets

A: 通过 CO-FISH 实验, 在 NFP5, NMP5 及 JN1P10 中检测到了 T-SCE; 同时通过 Q-FISH, 在它们的 TTS 和 ITS 区都观察到了端粒 doublets. 蓝色: 被 DAPI 染色的染色体; 绿点: 脊椎动物的端粒序列; 黄色箭头: T-SCEs; 白色箭头: CO-FISH 中的端粒 doublets; 紫色箭头: 端粒 doublets; B: A 图中 6 号染色体的放大图片; a: 通过 FISH 检测到的 ITS 区典型的端粒(紫色箭头); b 和 c: 通过 CO-FISH 观察到的末端和 ITS 区典型的 T-SCE(黄色箭头); d: CO-FISH 检测中 doublets 仍然存在(白色箭头); C: 通过 CO-FISH 在猪的 iPS 细胞 ITS 位点检测到的典型 T-SCE; D: 每条染色体的 T-SCE 的百分率(%); *: 与 NFP5 比, $P < 0.05$; E: 每条染色体末端 doublets 出现的频率; F: 每条 6 号染色体的 ITS 区 ITS 的百分率(%)

doublets(图 5A, B, E, F). 在 CO-FISH 实验中, 经过消化和杂交, 端粒 doublets 仍然存在于 ITS 区域(图 5B). 端粒 doublets 可能与 ITS 和 TTS 的不稳定性有关.

3 讨论

实验表明, 猪的 6 号染色体着丝粒区存在脊椎动物和植物的典型端粒序列. vITSs 的端粒长度不是固

定不变的, 而是呈动态变化, 它的长度变化趋势与 TTSs 的变化呈正相关。

在进化过程中, 除线虫和节肢动物门外, 典型的端粒(TTAGGG)_n 序列在后生动物中是保守的。它们的端粒序列分别为(TTAGC)_n 和(TTAGG)_n 重复序列^[2]。像其他脊椎动物一样, 猪的端粒为 TTAGGG 重复序列^[31,42]。多数植物的端粒序列为 TTTAGGG 重复序列, 如拟南芥是典型的植物端粒序列代表, 所以植物的端粒又称为拟南芥型端粒序列^[3,4]。在单子叶植物天门冬目中, 植物的端粒序列由 TTTAGGG 转变成人的端粒序列 TTAGGG^[4]。这种变化与端粒酶有关, 可能是由于端粒酶的 RNA 模板发生突变^[37]。端粒酶具有低保真度, 可能与端粒相关蛋白的结合有关^[4]。本实验在猪的 6 号染色体上发现了植物的端粒重复序列, 这在后生动物门中是第一次。有趣的是, vITSs 和 bITSs 也同时存在于风信子的许多不同染色体上, 不同于猪的 ITSs, 仅在 6 号染色体中可以检测到。

猪的不同细胞 vITSs 的长度不同, 并且与 TTSs 的长度变化相关。在普通细胞的传代过程中, ITSs 的长度逐渐缩短, 而在 iPSs 中却增加。vITSs 的长度与 TTSs 相同, 在前体细胞和 iPS 细胞中均有所变化。端粒 doublets 经常被认为是染色体的脆性位点^[43,44]。doublets 也可能与 t-circles(telomeric repeat-containing DNA circles)有关^[4]。通过 CO-FISH 检测到 T-SCE, 表明可能有端粒重组^[45]。尽管不同细胞系的频率不同, 猪细胞的 TTSs 上有端粒 doublets 和 T-SCEs。端粒 doublets 和 T-SCEs 也同时出现在 ITSs 区。与此相反, 端粒 doublets 和 T-SCEs 几乎不存在于人和小鼠的普通细胞端粒中。在 aphidiclon 诱导或端粒结合蛋

白 TRF1 缺失的小鼠细胞中, 染色体脆性位点或 doublets 增加^[43]。TRF1 的损伤导致端粒断裂和融合。但是, 即使在 12~19 代以后, 尽管伴随着 doublets 的增加, 在猪的细胞中并没有观察到这种现象。正常的蚕豆和风信子的染色体上也有端粒 doublets。巧合的是, 植物的端粒重复序列也出现在猪的 ITS 区。曾经有报道推测, het-ITSs 的脆性与它倾向于形成促进重组的第二结构有关^[46]。在一些植物中, 如 *Sessia*, *Vestia* 和夜香树属(*Cestrum*), 典型的末端端粒并没有被检测到, 它们可能依靠旁路途径来维持端粒长度, 包括 t-loops, t-circles, 滚环复制及重组^[4]。由此推测, 猪的细胞可能使用部分植物端粒调控机制来维持 ITSs 的长度。维持 ITSs 动态性的具体机制还需要进一步的研究。

在一些可以遗传的疾病中, 从 ITS 拷贝数和序列改变引起 ITS 的多样性可以推断 ITS 的功能^[26]。这是研究 ITS 最吸引人的地方, 因为它可以作为遗传连锁研究、法医学应用癌细胞中基因组不稳定性检测的新的和有用的标志。有趣的是, 在风信子中, ITSs 的长度明显比 TTSs 长。所以, 一些植物虽然在 TTSs 上没有足够的端粒但是仍然生长很快, 由此推测, ITSs 具有较长的端粒可能与维持细胞的增殖有关。het-ITSs 的出现可能与端粒的不稳定性有关^[45]。实际上, 在胃癌细胞^[26]和损伤的中国仓鼠细胞^[46,47]中观察到了 ITS 位点的增加。而且, 植物^[4]和没有末端端粒的永生细胞^[47]也许用相同的机制来维持端粒的长度, 如猪的 ITSs。对猪 ITS 动态性维持机制及意义的研究也许可以为进化、染色体的不稳定性及癌症的发生提供新的线索。

致谢 感谢中国科学院广州生物医药与健康研究所的赖良学老师提供的太湖猪成纤维细胞。

参考文献

- 1 Blackburn E H. Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 2001, 106: 661–673
- 2 Gomes N M, Shay J W, Wright W E. Telomere biology in Metazoa. *FEBS Lett*, 2010, 584: 3741–3751
- 3 Riha K, Shippen D E. Telomere structure, function and maintenance in *Arabidopsis*. *Chromosome Res*, 2003, 11: 263–275
- 4 Fajkus J, Sykorova E, Leitch A R. Telomeres in evolution and evolution of telomeres. *Chromosome Res*, 2005, 13: 469–479
- 5 Meyne J, Ratliff R L, Moyzis R K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 7049–7053
- 6 Meyne J, Baker R J, Hobart H H, et al. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, 1990, 99: 3–10

- 7 Lin K W, Yan J. Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutat Res*, 2008, 658: 95–110
- 8 Abuin M, Martinez P, Sanchez L. Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)_n in four salmonid species. *Genome*, 1996, 39: 1035–1038
- 9 Garrido-Ramos M A, de la Herran R, Rejon C R, et al. A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, 83: 3–9
- 10 Perez J, Moran P, Garcia-Vazquez E. Cloning and physical mapping of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) telomeric sequences. *Heredity*, 1999, 82: 409–414
- 11 Chew J S, Oliveira C, Wright J M, et al. Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)_n repetitive sequences in the *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosoma*, 2002, 111: 45–52
- 12 Nanda I, Schmid M. Localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in chicken (*Gallus domesticus*) chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 1994, 65: 190–193
- 13 Castiglia R, Gornung E, Corti M. Cytogenetic analyses of chromosomal rearrangements in *Mus minutoides/musculoides* from North-West Zambia through mapping of the telomeric sequence (TTAGGG)_n and banding techniques. *Chromosome Res*, 2002, 10: 399–406
- 14 Yen C H, Pazik J, Zhang Y, et al. An interstitial telomere array proximal to the distal telomere of mouse chromosome 13. *Mamm Genome*, 1997, 8: 411–417
- 15 Bertoni L, Attolini C, Faravelli M, et al. Intrachromosomal telomere-like DNA sequences in Chinese hamster. *Mamm Genome*, 1996, 7: 853–855
- 16 Faravelli M, Moralli D, Bertoni L, et al. Two extended arrays of a satellite DNA sequence at the centromere and at the short-arm telomere of Chinese hamster chromosome 5. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, 83: 281–286
- 17 Ruiz-Herrera A, Garcia F, Azzalin C, et al. Distribution of intrachromosomal telomeric sequences (ITS) on *Macaca fascicularis* (Primates) chromosomes and their implication for chromosome evolution. *Hum Genet*, 2002, 110: 578–586
- 18 Uchida W, Matsunaga S, Sugiyama R, et al. Interstitial telomere-like repeats in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Genes Genet Syst*, 2002, 77: 63–67
- 19 Dobrzansak M, Kraszevska E, Bucholc M, et al. Molecular cytogenetic analysis of DNA sequences with flanking telomeric repeats in *Triticum aestivum* cv. Begra. *Genome*, 2001, 44: 133–136
- 20 Azzalin C M, Nergadze S G, Giulotto E. Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma*, 2001, 110: 75–82
- 21 Weber B, Allen L, Magenis R E, et al. Intrachromosomal location of the telomeric repeat (TTAGGG)_n. *Mamm Genome*, 1991, 1: 211–216
- 22 Hastie N D, Allshire R C. Human telomeres: fusion and interstitial sites. *Trends Genet*, 1989, 5: 326–331
- 23 JW I J, Baldini A, Ward D C, et al. Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9051–9055
- 24 Rossi E, Floridia G, Casali M, et al. Types, stability, and phenotypic consequences of chromosome rearrangements leading to interstitial telomeric sequences. *J Med Genet*, 1993, 30: 926–931
- 25 Ruiz-Herrera A, Nergadze S G, Santagostino M, et al. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res*, 2008, 122: 219–228
- 26 Mondello C, Pirzio L, Azzalin C M, et al. Instability of interstitial telomeric sequences in the human genome. *Genomics*, 2000, 68: 111–117
- 27 Krutilina R I, Oei S, Buchlow G, et al. A negative regulator of telomere-length protein trf1 is associated with interstitial (TTAGGG)_n blocks in immortal Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280: 471–475
- 28 Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 1659–1668
- 29 Yang D, Xiong Y, Kim H, et al. Human telomeric proteins occupy selective interstitial sites. *Cell Res*, 2011, 21: 1013–1027
- 30 Simonet T, Zaragosi L E, Philippe C, et al. The human TTAGGG repeat factors 1 and 2 bind to a subset of interstitial telomeric sequences and satellite repeats. *Cell Res*, 2011, 21: 1028–1038
- 31 de la Sena C, Chowdhary B P, Gustavsson I. Localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequences in chromosomes of some domestic animals by fluorescence in situ hybridization. *Hereditas*, 1995, 123: 269–274
- 32 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663–676
- 33 Herrera E, Samper E, Martin-Caballero J, et al. Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J*, 1999, 18: 2950–2960

- 34 Bailey S M, Brenneman M A, Goodwin E H. Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 3743–3751
- 35 Gu F, Hindkjaer J, Gustavsson I, et al. A signal of telomeric sequences on porcine chromosome 6q21-q22 detected by primed in situ labelling. *Chromosome Res*, 1996, 4: 251–252
- 36 Adams S P, Leitch I J, Bennett M D, et al. Aloe L.—a second plant family without (TTAGGG)_n telomeres. *Chromosoma*, 2000, 109: 201–205
- 37 Adams S P, Hartman T P, Lim K Y, et al. Loss and recovery of Arabidopsis-type telomere repeat sequences 5'-(TTAGGG)_n-3' in the evolution of a major radiation of flowering plants. *Proc Biol Sci*, 2001, 268: 1541–1546
- 38 Weiss H, Scherthan H. Aloe spp.—plants with vertebrate-like telomeric sequences. *Chromosome Res*, 2002, 10: 155–164
- 39 Sykorova E, Lim K Y, Kunicka Z, et al. Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 1893–1904
- 40 Traut W, Szczepanowski M, Vitkova M, et al. The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosome Res*, 2007, 15: 371–382
- 41 Bailey S M, Williams E S, Cornforth M N, et al. Chromosome orientation fluorescence *in situ* hybridization or strand-specific FISH. *Methods Mol Biol*, 2010, 659: 173–183
- 42 Fradiani P A, Ascenzioni F, Lavitrano M, et al. Telomeres and telomerase activity in pig tissues. *Biochimie*, 2004, 86: 7–12
- 43 Sfeir A, Kosiyatrakul S T, Hockemeyer D, et al. Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell*, 2009, 138: 90–103
- 44 McNeese C J, Tejera A M, Martinez P, et al. ATR suppresses telomere fragility and recombination but is dispensable for elongation of short telomeres by telomerase. *J Cell Biol*, 2010, 188: 639–652
- 45 Bolzan A D, Bianchi M S. Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutat Res*, 2006, 612: 189–214
- 46 Balajee A S, Oh H J, Natarajan A T. Analysis of restriction enzyme-induced chromosome aberrations in the interstitial telomeric repeat sequences of CHO and CHE cells by FISH. *Mutat Res*, 1994, 307: 307–313
- 47 Slijepcevic P, Bryant P E. Absence of terminal telomeric FISH signals in chromosomes from immortal Chinese hamster cells. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, 69: 87–89