

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

# [12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/54  
C12N 15/70 C12N 9/12  
C12N 1/21 C12Q 1/48  
C07K 16/40

[21] 申请号 98801676.1

[43]公开日 2000年5月24日

[11]公开号 CN 1254377A

[22]申请日 1998.9.4 [21]申请号 98801676.1

[30]优先权

[32]1997.9.5 [33]GB [31]9718952.6

[86]国际申请 PCT/US98/18558 1998.9.4

[87]国际公布 WO99/11795 英 1999.3.11

[85]进入国家阶段日期 1999.7.5

[71]申请人 艾科斯有限公司

地址 美国华盛顿州

[72]发明人 A·M·卡尔

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 齐曾度

权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 哺乳动物 CHK1 效应物细胞周期关卡蛋白激酶材料与方法

[57]摘要

本发明总的是关于编码对于减数分裂、有丝分裂、和细胞内 DNA 损伤反应所必需的细胞周期关卡激酶有关的蛋白的基因及各个蛋白。这些激酶在 DNA 损伤后阻滞细胞周期以使 DNA 在有丝分裂、减数分裂或 DNA 复制起始前进行修复。更具体而言,本发明提供了一种新的周期关卡激酶, Chkl, 及编码 Chkl 的多核苷酸序列。还公开了鉴定 Chkl 调节剂的方法。调节剂在,譬如,化疗与放射治疗中是有用的。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种纯化和分离的编码人 Chk1 激酶的多核苷酸, 该激酶的氨基酸序列陈述于 SEQ ID NO.: 2。
2. 一种纯化和分离的编码小鼠 Chk1 激酶的多核苷酸, 该激酶的氨基酸序列陈述于 SEQ ID NO.: 4。
3. 权利要求 1 或 2 的多核苷酸, 是一种 DNA。
4. 权利要求 3 的 DNA, 是一种 cDNA。
5. 权利要求 3 的 DNA, 是基因组 DNA。
6. 权利要求 3 的 DNA, 是一种全部或部分化学合成的 DNA。
7. 一种人 Chk1 DNA, 包含 SEQ ID NO.: 1 所列出的 DNA 序列。
8. 一种小鼠 Chk1 DNA, 包含 SEQ ID NO.: 3 所列出的 DNA 序列。
9. 权利要求 3 的 DNA 的 RNA 转录物。
10. 一种 DNA, 编码全长的哺乳动物 Chk1 激酶, 选自以下:
  - (a) 一种 DNA, 在严格条件下与 SEQ ID NO.: 2 DNA 的非编码链杂交; 以及
  - (b) 一种 DNA, 在严格条件下与 SEQ ID NO.: 4 DNA 的非编码链杂交。
11. 一种包含权利要求 1, 2, 3 或 10 的 DNA 的载体。
12. 权利要求 11 的载体, 其中所述 DNA 与一个表达控制 DNA 序列可操纵地连接。
13. 一种宿主细胞, 用权利要求 1, 2, 3 或 10 的 DNA 稳定地转化或转染, 其转化或转染方式可使 Chk1 激酶在该宿主细胞中表达。
14. 生产 Chk1 激酶的方法, 该方法包括在适宜的营养培养基中生长权利要求 11 的宿主细胞及分离 Chk1 激酶。
15. 一种纯化和分离的多肽, 包含由 SEQ ID NO.: 2 组成的人 Chk1 激酶氨基酸序列。
16. 一种纯化和分离的多肽, 包含由 SEQ ID NO.: 4 组成的小鼠 Chk1 激酶氨基酸序列。
17. 一种多肽或肽, 能与哺乳动物 Chk1 激酶特异地结合。
18. 权利要求 17 的多肽, 是一种抗体。
19. 权利要求 18 的抗体, 是一种单克隆抗体。

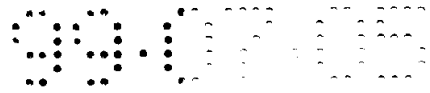
20. 一种生产权利要求 19 的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

21. 一种鉴定化合物为哺乳动物 Chk1 激酶调节剂的方法，包括以下步骤：

- 5
- a) 在存在和不存在该化合物的情况下测定 Chk1 激酶活力；
  - b) 比较步骤 ( a ) 中的激酶活力；以及
  - c) 根据在存在和不存在该化合物的情况下观察到的 Chk1 激酶活力的差别鉴定该化合物为调节剂。

22. 一种鉴定能抑制哺乳动物 Chk1 的化合物的方法，包括以下步骤：

- 10
- a) 在遗传变化细胞中表达哺乳动物 Chk1 ， 因而降低细胞对 DNA 损伤的敏感性，该敏感性是与基因变化有关联的；
  - b) 在待测试的调节剂化合物存在和不存在的情况下，将步骤 ( a ) 的遗传变化细胞暴露于 DNA 损伤处理；
  - c) 测量细胞对 DNA 损伤的敏感性；以及
- 15
- d) 将一种恢复细胞对 DNA 损伤的敏感性的化合物鉴定为 Chk1 活力的抑制剂。



# 说明书

## 哺乳动物 CHK1 效应物细胞周期 关卡蛋白激酶材料与amp;方法

5

### 发明领域

本发明总的是关于周期关卡蛋白激酶，它们对于细胞 DNA 损伤反应及协调细胞周期阻滞是不可缺少的。关卡激酶在对 DNA 损伤的监视和反应中发挥作用，这种 DNA 损伤可因复制错误、DNA 错配、辐射处理或化疗而引起。这些关卡激酶在 DNA 损伤后导向细胞周期阻滞及凋亡的调节途径中是必需的，给细胞一种信号和时间使之在 DNA 复制起始前或染色体分离前纠正损伤。更具体而言，本发明是关于新的哺乳动物效应物 ( Chk1 ) 关卡蛋白激酶、编码该酶的寡核苷酸以及测定和调节激酶活性的方法与材料。

15

### 背景

细胞周期的基本过程和调节方式在所有真核生物种属间在结构上和功能上是保守的。真核细胞生长和分裂的过程是体细胞 ( 有丝分裂 ) 细胞周期，由 4 个期构成，即 G1 期、S 期、G2 期和 M 期。M1，S 与 G2 期统称为细胞周期的间期。在 G1 ( gap, 间隙 ) 期，细胞进程的生物合成活性处于高速率。S ( synthesis, 合成 ) 期开始于 DNA 合成起始之时，而结束于细胞核的 DNA 含量已得到复制并形成了两套相同的染色体时。然后细胞进入 G2 ( gap, 间隙 ) 期，持续直到有丝分裂开始。有丝分裂中，染色体配对、分离、形成两个新核，在胞质分裂中细胞本身分裂成两个子细胞，每个子细胞得到一个核，含有两套染色体中的一套。有丝分裂 ( 细胞周期的 M 期 ) 之后紧接着发生胞质分裂。胞质分裂结束 M 期并标志着下一细胞周期的间期的开始。细胞周期中发生事件的顺序受到严格的调节，以使一个细胞周期事件的起始依赖于前一细胞周期事件的完成。这使得一代代体细胞的遗传物质的复制和分离是忠实的。

30

减数分裂是在高等真核生物中产生生殖细胞的细胞分裂形式。有丝分裂时产生遗传学上相同的细胞，含有每种染色体两个，与之相反，减数分裂所产生的细胞只含有每种染色体的一个拷贝。而且，在减数分裂



中同源染色体配对并交换遗传物质。减数分裂由两个期的细胞分裂组成，I与II。在减数分裂I期，母本和父本染色体复制，同源染色体配对在一起（联会）。然后细胞进行分裂，同源成对的两个染色体分离并进入各个细胞，生成两个双倍体的子细胞。子细胞进入减数分裂II期。5 在II期，染色体不再复制而排列，姊妹染色单体犹如在有丝分裂中那样分离，生成单倍体细胞。在减数分裂I及II中事件的顺序均为间期，前期，中期，后期及末期。

减数分裂I的第一阶段是间期I，此时每个染色体进行复制。复制染色体的两个拷贝称作姊妹染色单体。第一个减数分裂前期可分为连续的5期。在细线期，新复制的姊妹染色单体靠近地并列，使之可以联结并进行重组。在偶线期，在母本姊妹染色单体与父本姊妹染色单体之间形成一种叫联会复合体的蛋白结构，构成二价体（4个染色单体）。在粗线期，两个姊妹染色单体间开始重组（即在母本与父本染色体之间进行遗传物质的交换）。下一期，双线期，的特征是蛋白轴分解，两个姊妹染色单体开始分离。终变期，即最后一期的特征是染色体与核包膜分离，可以清楚地看到每一个二价体含有四个分离的染色单体，每对姊妹染色单体在其着丝粒上相联系。这样，在减数分裂的早期，姊妹染色单体配对，并在某些区域进行交互重组。程序DNA链断裂使重组起始。15 [Cao et al., Cell, 88: 375-384 (1997)]。在第一个减数分裂前期所观察到的变化有助于遗传重配、保证遗传活力。25

在发生DNA损伤时监测基因组的完整性并阻止细胞周期进行的过程被描述为“细胞周期关卡” [Hartwell and Weinert, Science, 246: 629-634 (1989); Weinert et al., Genes and Dev., 8: 652 (1994)]。细胞周期关卡由信号传导级联系统组成，后者将DNA损伤监测与细胞周期进程相偶联。减数分裂中细胞周期关卡控制程序的DNA断裂，保证一套完整的单倍体染色体很好地分离到每个配子中去。25

细胞周期关卡的障碍使个体具有以下疾病倾向或直接引起多种疾病状态，如癌、毛细血管扩张性共济失调症、胚胎异常及各种伴有B和T细胞发育异常的免疫缺陷。后者还伴有一些病理状态，如狼疮、关节炎及自身免疫疾病。因此，对鉴定细胞周期关卡及其功能所必需的蛋白进行了热烈的研究。30

文献报导，细胞周期关卡包括至少三种不同种类的多肽，它们对细

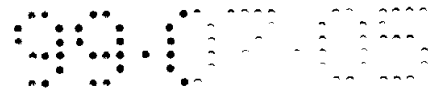


胞周期信号或染色体机制的缺陷起响应而连续地发挥作用。[ Carr A. M., Science, 271: 314-315 (1996)]. 第一类是测出或感知 DNA 损伤或细胞周期异常的蛋白家族。这些传感器包括 Atm 与 Atr [ Keegan et al; Genes and Devel., 10: 2423-2437 (1996)]. 第二类多肽将检测器测知的信号扩大并传递, 可以 Rad53 为例 [ Alen et al. (1994) Genes Dev. 8: 2416-2488]. 最后, 细胞周期关卡引起细胞反应, 如通过细胞周期效应物的有丝分裂/减数分裂阻滞, 凋亡。

通过对酵母粟酒裂殖酵母及酿酒酵母的遗传学分析鉴定了若干种对电离辐射下有丝分裂阻滞和 DNA 修复反应很重要的关卡基因。综述见 Carr 与 Hoekstra, Trends in Cell Biology, 5:32-40 (1995)。在酵母中得到鉴定的一个这种基因对于能引起 G2 阻滞的 DNA 损伤关卡以及对一个有关监测 DNA 合成的完成并实行 S 期阻滞的关卡是必需的。此基因在粟酒裂殖酵母中命名为 rad3 [Seaton et al., Gene, 119: 83-89 (1992) Bentley et al., (1996) EMBO J. 15: 6641-6651], 在酿酒酵母中为 MEC1/ESR1 [ Kato and Ogawa, Nuc. Acids. Res., 22 (15): 3104-3112 (1994)], 不过在下文都归入 rad3。具有 rad3 突变的细胞不能对 DNA 损伤感知或适当地反应, 以后在暴露于致畸变因子或事件时 (如, 电离辐射, DNA 损伤剂及影响染色体完整性的突变) 比野生型细胞更快地失去活力。参见 Weinert et al., Genes & Development, 8: 652-665 (1994) 及 Al-Khodairy et al., EMBO J., 11 (4): 1343-1350 (1992)。这样 Rad3 显示出是 DNA 损伤的一种关卡探测器 ( Carr, 1996 )。此外, rad3 还显示出在活体内作为多聚体起作用。 [Bentley et al., 1996]。

rad3 基因产物是一种约为 270 kD 的蛋白, 是正在增长的高分子量哺乳动物关卡激酶家族的成员。见 Hunter, Cell, 83: 1-4 (1995)中关于此激酶家族的讨论。这个家族包括 ecl1 ( 酿酒酵母 ) mei-41 ( 黑腹果蝇 ), tor1 ( 酿酒酵母 ), tor2 ( 酿酒酵母 ), Frap ( 人 ), tell1 ( 酿酒酵母 ), DNA-Pk ( 人 ) Atr ( 人 ) 及 Atm ( 人 )。基于序列同源性和互补研究这些蛋白被鉴定为一个家族的成员。

rad3 的人同源物, Atr ( 共济失调毛细血管扩张症及 rad3 有关的 ) 是由 Bently 等鉴定的, EMBO J., 15: 6641-6651 (1996)。Bently 等指出, 重组 Atr 在粟酒裂殖酵母中表达时能与 rad3 发生异源多聚化。此外, 重组 Atr 的表达能使酿酒酵母 mecl1 突变株得到互补。



这个激酶家族成员的催化域的一级结构与已鉴定清楚的磷脂酰肌醇激酶关系密切。这种结构关系起初曾提示：这些哺乳动物关卡激酶可能能使脂质磷酸化。然而，当检查哺乳动物关卡激酶的底物特异性时，这些酶似乎起蛋白激酶的作用，其使磷脂酰肌醇磷酸化的作用还需证实。

5           Atm ( Ataxia Telangiectasia Mutated )是此家族的另一个成员，通过分析人的毛细血管扩张性共济失调 ( AT ) 综合征得到鉴定[Savitsky et al., Science, 268: 1749-1753 (1995) Savitsky et al., Human Molecular Genetics, 4(11): 2025-2032 (1995)]. AT 患者表现多种多样的临床症状，包括多种肿瘤倾向。AT 患者的成纤维细胞对辐射敏感，在电离辐射处理后不能发生有丝分裂阻滞。缺乏 Atm 的突变小鼠表现生殖腺萎缩，减数分裂异常及重度染色体断裂[Ashley et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 93: 13084 (1996)]. 这使人想起 rad3 缺陷的粟酒裂殖酵母株，这种细胞不能感知 DNA 损伤并作出适当的反应。

10           因此这个激酶家族似乎对各种细胞周期转换缺陷起检测器的作用 [Carr, 1996].

          近来表明哺乳动物 Atm 和 Atr 蛋白在减数分裂前期的粗线期与染色体结合，并可能监测在减数分裂染色体联会和重组中发生的链断裂。Atm 与 Atr 激酶的定位显示在偶线期和粗线期位点的互补形式，相应于在监测减数分裂重组时的 DNA 结构中的不同作用[Keegan et al., Genes Dev., 10: 2423 (1996)].

          关卡蛋白显然在信号传导级联系统中起作用。检测器 Atm 和 Atr 是蛋白激酶，组成信号传导级联系统中的早期步骤。现认为信号被 Rad53 这样的蛋白激酶放大，Rad53 能将信号从检测器传导给效应物。

25           迄今，p53 和粟酒裂殖酵母 Chk1 与 wee1 被鉴定为效应物关卡蛋白。

          粟酒裂殖酵母 Chk1 基因已得到分离，是基于其与 cdc2. r4 等位基因的遗传学相互作用[Al-Khodairy et al., Mol. Biol. Cell., 5: 147-160 (1994)]以及对 rad27 突变株辐射敏感性的互补。cdc2 编码一种蛋白激酶亚单位，后者与细胞周期蛋白结合，形成活性蛋白激酶复合物，能诱导经有丝分裂的传代。[Broek et al. Nature, 349: 388-393 (1991)]. 粟酒裂殖酵母 Chk1 看来是在 DNA 损伤后引起有丝分裂阻滞，而粟酒裂殖



酵母 Chk1 缺失的突变株在照射后不能实行细胞周期阻滞[ Walworth et al., Nature, 363: 368 (1993), Al-Khodairy et al., Mol. Biol. Cell., 5:147-160 (1994), Carr, A. M., Semin. Cell Bid., 6: 65-72 (1995)]. 然而, 对于其它关卡蛋白介导的阻断 DNA 复制的 DNA 细胞反应, Chk1 是不需要的。

- 5 Walworth 与 Berards 在 Science, 271: 353-356 (1996)中阐明, 在活体内 Chk1 的活力受 Chk1 磷酸化的调节。通过检查具有关卡基因突变的各种粟酒裂殖酵母株的 Chk1 的磷酸化状况, Walworth 与 Bernards 于 Science, 271: 353-356 (1996)中指出, Chk1 作用于这些关卡蛋白的下游。在粟酒裂殖酵母 rad1, rad3, rad9, rad17 及 rad26 突变株中 Chk1 的磷酸化消失或大大减少。
- 10

此外, 粟酒裂殖酵母 Chk1 看来在有丝分裂的 G1 和 G2 期发挥作用。 Carr 等在 Curr. Biol., 5: 1179-1190 (1995)中表明, Chk1 缺陷细胞不能进入 S 期, 说明 Chk1 是一种 G1 关卡激酶。 O'Connell 等在 EMBO Journal, 16: 545-554 (1997)还表明, Chk1 使 weel 磷酸化, 后者是 G2 细胞周期阻滞中的一种关卡激酶。

15

在 Sibon et al., Nature, 388: 93-97 ( 1997 )一文中, 粟酒裂殖酵母 Chk1 的果蝇同源物被鉴定为“ Grp ”。在中 - 囊胚转换 ( MBT ) 的细胞周期调控中需要 Grp, 在该转换中 DNA 复制机器的母本组分使 DNA 合成减慢, 并诱导在胚胎发育细胞周期进程一种关卡依赖的迟延。

- 20 Chk1 的 C. elegans 同源物首次报告为一 EST, Genbank 登录号为 U44902。 Chk1 的酿酒酵母同源物已鉴定可能为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, Genbank 登录号为 585344。

迄今, 尚未鉴定出哺乳动物效应物关卡 ( Chk1 ) 蛋白激酶。因此, 需要建立一种鉴定参与细胞周期关卡的哺乳动物效应物蛋白的技术, 以发展对具有细胞周期关卡缺陷的人类疾病状态的治疗, 还需要分离编码此类蛋白的多核苷酸, 这类蛋白本身可能用作治疗药物, 或者能发展有治疗作用的多核苷酸编码蛋白的调节剂。

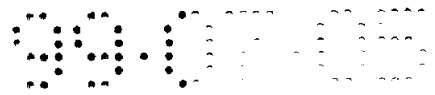
25

#### 发明概述

- 本发明提供新的人哺乳动物效应物细胞周期关卡, Chk1, 激酶及编码该激酶的多核苷酸。
- 30

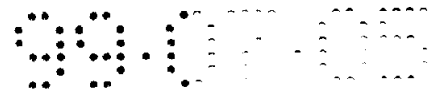
本发明一方面提供纯化分离的编码人和小鼠效应物细胞周期关卡激酶的多核苷酸 ( 如, DNAs 和 RNAs, 其编码链和非编码链 ), 以及





编码其它哺乳动物关卡激酶的多核苷酸，与编码人 Chk1 激酶域 ( SEQ ID NO.: 2 中氨基酸 14~264 ) 的多核苷酸区域有 50 % 或更高的氨基酸同一性。优选地，多核苷酸编码一种关卡激酶，与 SEQ ID NO.: 2 的氨基酸 14~264 有 70 % 或更高的氨基酸同一性，更为优选地，多核苷酸  
5 编码一种关卡激酶，显示与 SEQ ID NO.: 2 的氨基酸 14 - 264 有 90 % 或更高的氨基酸同一性。本发明所计划的多核苷酸包括基因组 DNAs, RNAs, cDNAs 以及整个或部分地化学合成的 DNAs。本发明优选的多核苷酸包括 SEQ ID NO.: 1 的人 Chk1 DNA 序列，SEQ ID NO.: 3 的小鼠 Chk1 DNA 序列，以及在严格条件下与非编码链杂交的 DNA 序列，  
10 或惟不与遗传密码冗余部分杂交的序列。典型的严格杂交条件如下：于 65 °C, 3 × SSC, 20mM NaPO<sub>4</sub> pH 6.8 中杂交，65 °C, 0.2 × SSC 漂洗。技术熟练者懂得，根据待杂交序列的长度和 GC 核苷酸碱基成分上述条件可发生变动。为确定准确的杂交条件技术的方案标准是适用的。见 Sambrook et al., 9.47-9.51 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor  
15 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)。编码人 Chk1 的一种多核苷酸载体 ( 质粒 pGEMT- Chk1hu ) 已于 1997 年 8 月 27 日保藏于 American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, 登记号 No. ATCC 98520。

本发明提供的 DNA 序列信息使得用熟知的如上描述的 DNA/DNA  
20 杂交及多聚酶链反应 ( PCR ) 克隆技术来鉴定和分离编码哺乳动物关卡有关分子的 DNAs 成为可能。作为一组例子，本发明关于编码一种哺乳动物 Chk1 的 cDNA 序列的知识使人们可以用 DNA/DNA 杂交技术分离编码激酶的基因组 DNA 序列及表达调控序列如启动子，操纵子等。与之相似，一种部分 cDNA 序列的知识使分离完整的 cDNA 成为可能。  
25 与本发明的 DNA 序列在严格条件下进行 DNA/DNA 杂交的方法同样也可期望得以分离 DNAs, 能编码与哺乳动物 Chk1 激酶同源的非人类激酶的等位基因变体以及其它结构上关联的蛋白，它们共有一种或多种酶活力，或有与哺乳动物 Chk1 所参加的细胞周期关卡途径中的成员或调节因子相互作用的能力。本发明的带有可检测的标记的多核苷酸对于在  
30 杂交测定中检测哺乳动物细胞合成本发明激酶的能力也是有用的。本发明提供的 DNA 序列信息也可借同源重组或“敲除”策略 [见 Capecchi, Science, 244: 1288-1292 (1989)], 使开发不能表达功能性激酶



或表达其变异体的啮齿动物成为可能。此类啮齿动物及其细胞对研究活体内小鼠及激酶调节剂的活性是有用的模型。本发明的多核苷酸也可以作为用于鉴定疾病状态下哺乳动物 Chk1 基因座的遗传学变化的诊断方法的基础。用本发明还可获得一些反义多核苷酸，它们是与通常表达 Chk1 细胞的 Chk1 表达调控有关联的。

例如，由 Chk1 cDNA 设计的引物可用于逆转录酶 PCR 分析，分析肿瘤细胞的 mRNA 样品以检测是否有 Chk1 mRNA 的存在。而且，Chk1 基因组克隆的序列信息可用于从肿瘤细胞制备的基因组 DNA 的单链构象多态性 (SSCP) 分析以检测 Chk1 基因的变化或突变。同样，Chk1 cDNA 和/或 Chk1 基因组克隆能用于荧光原位杂交 (FISH) 分析以检测 Chk1 基因的变化。

本发明也提供自主复制重组子构建物，如结合有本发明多核苷酸的质粒和病毒 DNA 载体，特别是将多核苷酸有功能地与一内源的或异源的表达控制 DNA 序列及一转录终止子相连接的载体。

本发明的另一方面，宿主细胞，特别是单细胞的原核和真核宿主细胞，能以本发明 DNAs 稳定转化或转染，并在其中表达哺乳动物 Chk1 激酶。本发明的宿主细胞对大规模地生产 Chk1 的方法特别有用，在该法中细胞生长于适当的培养基中，欲得的酶从细胞或细胞生长的培养基中分离出来。

本发明包括含有 SEQ ID NO.: 2 或 SEQ ID NO.: 4 中部分或全部氨基酸序列的 Chk1 产品。使用哺乳动物宿主细胞以期提供翻译后修饰（如，豆蔻酰化，糖基化，截短，脂化以及酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸磷酸化），这对本发明的重组子表达产品的最佳生物活性可能是必需的。本发明的酶产品可以是全长多肽、片段或变体。变体包括以下 Chk1 产品，其中一个或更多的特定（即自然编码的）氨基酸缺失了或被替代了，或其中增加了一个或更多的非特定氨基酸：（1）不失去 Chk1 特异的蛋白激酶活力；或（2）丧失 Chk1 特异的蛋白激酶活力；或（3）丧失与细胞周期关卡途径中成员或调节剂互相作用的能力。Chk1 的底物及与 Chk1 相互作用的蛋白可用各种测定方法鉴定。

Chk1 底物可在激酶活力测定中加入试验化合物来鉴定。Chk1 激酶重悬浮于激酶缓冲液中，在有或无试验化合物（如髓鞘碱性蛋白，酪蛋白，组蛋白 H1 或适宜的底物肽）的条件下温育。被激酶转移给试验



化合物的磷酸盐的量用放射自显影或闪烁计数测量。磷酸盐向试验化合物的转移指示该试验化合物是激酶的一种底物。

本发明的另一方面提供一种在生物样品中检测和定量 Chk1 的诊断方法。一种疑有 Chk1 的生物样品用于激酶测定。如此所述， Chk1 的存在用底物蛋白，如髓鞘碱性蛋白，的磷酸化，或检测自身磷酸化产物来鉴定。激酶反应的磷酸化产物可用，例如，放射自显影或闪烁计数来测定。

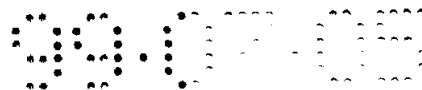
相互作用蛋白可用以下测定法鉴定。

本发明设计的第一种测定法是双杂合筛选。双杂合系统是在酵母中研制的 [Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9578-9582 (1991)], 基于在体内对激活报道基因的转录因子进行功能性重建。特别是，一种编码与 Chk1 相互作用蛋白的多核苷酸借以下步骤得到分离：用一种 DNA 构建物，其包括一个在启动子控制下、受具有一个 DNA 结合域和一个激活域的转录因子调节的报导基因，转化或转染适当的宿主细胞；在宿主细胞中表达第一杂合 DNA 序列，该序列编码部分或全部 Chk1 和转录因子的 DNA 结合域或激活域的第一融合体；在宿主细胞中表达第二杂合 DNA 序列文库，该序列编码部分或全部推定 Chk1 结合蛋白和未结合在第一融合体中的转录因子 DNA 结合域或激活域的第二融合体；在一特定宿主细胞中借检测报道基因产物在宿主细胞中的生成来检测 Chk1 相互作用蛋白与 Chk1 的结合；以及从特定宿主细胞中分离编码相互作用蛋白的第二杂合 DNA 序列。当前优选用于测定的是 lexA 启动子以驱动报道基因， lacZ 报道基因，包括 lexA DNA 结合域和 GAL4 反式激活域的转录因子，以及酵母宿主细胞。

鉴定 Chk1 相互作用蛋白的其它测定法包括：固定 Chk1 或测试蛋白，可检测地标记非固定的结合蛋白，将结合配对体在一起保温以及测定被结合的标记量。被结合的标记表示测试蛋白与 Chk1 相互作用。

鉴定 Chk1 相互作用蛋白的另一类测定包括：将 Chk1 或其片段固定在涂有（或浸透）荧光剂的固体支持物上，用能激发荧光剂的化合物标记测试蛋白，使固化 Chk1 与标记测试蛋白接触，检测荧光剂的光发射，以及鉴定能使荧光剂发生光发射的测试蛋白为相互作用蛋白。或者，可以在测定中固化推定的相互作用蛋白，而标记 Chk1。

本发明还包含抗体产品（如，单克隆和多克隆抗体，单链抗体，嵌



合抗体， CDR - 移植抗体及其抗原结合片段) 和对本发明 Chk1 激酶特异的其它结合蛋白(如在上文测定中所鉴定的)。用分离的天然或重组酶可以开发结合蛋白。结合蛋白，反过来，对纯化重组和天然存在的酶以及鉴定生成这种酶的细胞是很有用的。对细胞或液体中蛋白的检测方法可包括在一个“三明治”测定形式中用单一抗体物质或多抗体物质对 Chk1 蛋白水平作出细胞学分析。结合蛋白对调节(即，封闭，抑制，或刺激)酶/底物或酶/调节剂的相互作用也是明显有用的。也包括对哺乳动物关卡激酶结合蛋白特异的抗 - 独特型抗体。

进一步包括使抗 Chk1 抗体能用于 Atm 功能诊断。因为 AT 患者的 Chk1 蛋白水平低或缺如， Chk1 水平在开发抑制 Atm 功能的化合物中可用作一种标志。因为 AT 细胞中 Chk1 的表达低或不存在， Atm 功能抑制会使 Chk1 表达减少。这种减少可通过检查 Chk1 表达水平来监视。

本发明预期 Chk1 基因上引起 Chk1 基因产物正常功能丧失的突变是累及细胞周期关卡障碍的人类疾病的基础。旨在恢复 Chk1 活性的基因疗法可用于治疗这些疾病(例如， 睾丸癌)。将功能性的 Chk1 基因给予适当的细胞可借在体内或来自体内使用病毒载体(如腺病毒， 腺相关病毒， 或逆病毒)实现， 或来自体内使用物理的 DNA 转移方法(如， 脂质体或化学处理)实现。关于基因治疗技术综述， 见 Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); 及 Miller, Nature, 357: 455-460 (1992)。或者， 预期在其它种类人类疾病中， 阻止 Chk1 的表达或抑制其活力会对治疗有用。预期， 反义治疗或基因治疗可应用于 Chk1 表达的负调控。能与 Chk1 表达调控序列或 Chk1 RNA 特异结合的反义核酸(优选 10~20 碱基对的寡核苷酸)被导入细胞(如， 经由病毒载体或如脂质体的胶体分散系统)。反义核酸与细胞内 Chk1 靶序列结合， 阻止靶序列的转录或翻译。本发明专门设计了反义寡核苷酸的硫代磷酸盐和甲基磷酸盐用于治疗。反义寡核苷酸还可进一步在 5' 末端用聚 - L - 赖氨酸， 运铁蛋白聚赖氨酸， 或胆固醇组成成分修饰。

关卡信号传导引起转录调控。转录调控的一个例子是 MyoD 肌调控。 Chk1 表达抑制 MyoD 诱导肌基因转录的能力， 并抑制 MyoD 诱导肌细胞生成的能力(见例 7)。本发明的另一方面包括调节 Chk1 水平以影响干细胞的分化与增殖， 如同在肌细胞增殖中那样。



调节 Chk1 蛋白激酶活力的介质可用以下方法鉴定：将测试化合物与从天然表达哺乳动物关卡蛋白激酶细胞免疫纯化所得的 Chk1 保温，与从表达该酶的重组原核或真核宿主细胞中得到的 Chk1、或纯化的 Chk1 保温，然后测定测试化合物对 Chk1 蛋白激酶活力的影响。测量关卡蛋白激酶活力可借测定蛋白激酶从 $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP 转移到自身（自磷酸化）或外源底物如脂质或蛋白上的  $^{32}$ P - 磷酸盐的量来进行。掺入底物中磷酸盐的量用闪烁计数或放射自显影测量。在测试化合物存在下转移到底物上的磷酸盐的量比在没有测试化合物时转移到底物上的磷酸盐量增加则表明测试化合物是 Chk1 蛋白激酶的激活剂。相反，在测试化合物存在下的磷酸盐转移量比无测试化合物存在时减少表明此调节剂是 Chk1 蛋白激酶的抑制剂。

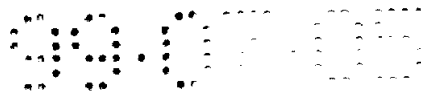
在一种当前优选的测定中，与琼脂糖珠相连接的 Chk1 特异抗体与从表达蛋白激酶宿主细胞制得的裂解物保温。珠经洗涤除去与珠作非特异性结合的蛋白，然后将珠重悬于激酶缓冲液中。加入 $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP 及适宜的外源底物如脂质或肽以起始反应。蛋白活性的测量采用测定转移到蛋白激酶自身或加入底物上的  $^{32}$ P - 磷酸盐的摩尔数来进行。

在一个优选实施方案中，宿主细胞缺乏内源性的 Chk1 和/或 ATM 蛋白激酶活力。对调节 Chk1 蛋白激酶活性的化合物的选择性可用比较其对 Chk1 的活性及其对其它已知哺乳动物关卡蛋白激酶的活性来评价。在一系列独立的测定中将本发明的重组 Chk1 产品与其它重组哺乳动物关卡激酶产品相组合可提供一个开发 Chk1 选择性调节剂的系统。

而且，组合文库、肽与肽模拟物、确定的化学实体、寡核苷酸及天然产物文库可在如下文描述的测定中筛选其调节剂活性。

例如，鉴定 Chk1 激酶活性调节剂的方法包括：将 Chk1 蛋白激酶制剂在激酶缓冲液中与  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP 及一种外源激酶底物保温，在加有或无测试化合物的两种情况下，测定转移到底物上的磷酸盐的量。在测试化合物存在下转移到底物上的磷酸盐的量比在没有测试化合物时转移到底物上的磷酸盐量增加则表明测试化合物是 Chk1 激酶的激活剂。相反，在测试化合物存在下的磷酸盐转移量比无测试化合物存在时减少表明此调节剂是上述 Chk1 蛋白激酶的抑制剂。

而且，鉴定能调节 Chk1 与其它蛋白相互作用的化合物的方法可包括：用一种 DNA 构建物，其包括一个在启动子控制下并受具有一个 DNA



结合域和一个激活域的转录因子调控的报道基因，转化或转染适当的宿主细胞；在宿主细胞中表达第一杂合 DNA 序列，该序列编码部分或全部 Chk1 与转录因子的 DNA 结合域或激活域的第一融合体；在宿主细胞中表达第二杂合 DNA 序列，该序列编码部分或全部与 Chk1 相互作用的蛋白和未结合于第一融合体内的转录因子的 DNA 结合域或激活域；评价测试化合物对 Chk1 与相互作用蛋白间相互作用的效应，通过测量宿主细胞在测试化合物存在或不存在的条件下报道基因产物的生成来检测一特定宿主细胞中相互作用蛋白与 Chk1 的结合；以测试化合物改变报道基因产物的生成与不存在调节化合物时报道基因产物生成的比较来鉴定调节化合物。当前优选在测定方法中使用的是：lexA 启动子以驱动报道基因的表达，lacZ 报道基因，包括 lexA DNA 结合域及 GAL4 反式激活域的转录因子，以及酵母宿主细胞。

另一种鉴定调节 Chk1 与相互作用蛋白间的相互作用的化合物的方法包括：固化 Chk1 或天然的 Chk1 相互作用蛋白，可检测地标记非固定的结合蛋白，将结合配对体在一起保温以及测定一种测试化合物对被结合的标记量的效应，在测试化合物存在下结合的标记比无测试化合物存在时被结合的标记量低表明测试物是 Chk1 与蛋白相互作用的抑制剂。相反，在测试化合物存在下比没有化合物存在时的标记结合量增高表明这推定的调节剂是 Chk1 与蛋白相互作用的激活剂。

本发明还包括鉴定调节 Chk1 与相互作用蛋白间结合的化合物的另一种方法，包括：将 Chk1 或其片段固定在涂有（或浸透）荧光剂的固体支持物上，用能激发荧光剂的化合物标记相互作用蛋白，在存在和没有测试化合物的条件下使固化 Chk1 与标记的相互作用蛋白接触，检测荧光剂的光发射，以及根据测试化合物对荧光剂光发射的影响与不存在测试化合物时的荧光剂光发射相比，鉴定调节化合物。或者，可在测定中固定 Chk1 相互作用蛋白，而标记 Chk1。

Chk1 调节剂可影响其蛋白激酶活力，其细胞中定位，及/或其与细胞周期关卡途径中成员的相互作用。Chk1 调节剂可配制为包括药学允许的载体的组合物。这种组合物里还可包括化疗制剂。指明的剂量足以产生在体内对 Chk1 活性的调节。选择性调节剂可包括，例如，与 Chk1 或 Chk1 核酸特异结合的肽或多肽，与 Chk1 或 Chk1 核酸特异结合的寡核苷酸，以及/或与 Chk1 或 Chk1 核酸起特异反应的其它非肽化合物（例

如，分离的或合成的有机分子)。本发明也包括影响酶活力或野生型 Chk1 细胞定位的 Chk1 突变型。

### 详述

5 本发明用以下例子加以说明。例 1 详述编码哺乳动物 Chk1 激酶的多核苷酸的分离以及人 Chk1 DNA 的染色体定位。例 2 描述编码哺乳动物 Chk1 的 DNAs 的重组表达。例 3 叙述 Chk1 抗体的制备。显示 Chk1 的组织 and 细胞分布的 Northern 印迹在例 4 中叙述。例 5 报告 Chk1 表达的免疫组织学和 Western 印迹研究结果。例 6 描述鼠 Chk1 的生化 and 生物学活性。

10

### 例 1

#### A. 人 Chk1 cDNA 的分离

通过筛选 EST 序列与粟酒裂殖酵母 Chk1 的相似性鉴定了一种 Chk1Hu cDNA。与 Chk1 COOH 末端有同源性的 EST ( H67490 ) 得到  
15 鉴定与克隆，并用于构建一个与 COOH 末端 120 个氨基酸显示有限同源性的毗连群，此毗连群用 RACE PCR 扩展为一个 1735 bp 的克隆。RACE PCR 片段用于探查 cDNA 文库以产生最终序列。用 RACE 衍生的序列信息以高严谨度、Express 杂交液 ( Clontech ), 从人睾丸 unizap 文库 ( Clontech ) 中筛选  $1 \times 10^6$  独立的 cDNA 克隆，得到 11 个重叠的序列，用来组装出 Chk1Hu 的全长。

20

全长的人 Chk1 cDNA 亚克隆在 pGEMT 中。含有全长人 cDNA 的质粒确定为 pGEMT-Chk1HU。pGEMT-Chk1HU 已于 1997 年 8 月 27 日保藏于 American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MX 20852, 登记号 No. ATCC 98520。人 Chk1 ( Chk1Hu ) 的全长 cDNA 及推断的氨基酸序列在 SEQ ID NOs: 2 及 4 中分别提供。  
25 人 Chk1 ( Chk1Hu ) 的全长 DNA 及推断的氨基酸序列在 SEQ ID NOs: 1 及 2 中分别提供。

#### B. 鼠 Chk1 cDNA 的分离

用简并人 Chk1 特异探针从小鼠睾丸 cDNA 文库中进行文库筛选鉴定了 Chk1Mo。小鼠 Chk1 ( Chk1Mu ) 的部分 cDNA 和推导的氨基酸  
30 序列分别提供于 SEQ ID NO.: 3 及 4。

#### C. Chk1Hu 及 Chk1Mu 的结构分析

Chk1Hu 及 Chk1Mu cDNAs 编码一种约 70 kD 的蛋白。Chk1Hu

的激酶域是 SEQ ID NO.: 2 的 161 ~ 264。 Chk1Mu 的激酶域包括 SEQ ID NO.:4 的 1 ~ 61 氨基酸。人和小鼠 Chk1 的蛋白激酶域公布于此，在氨基酸水平约有 90 % 的同一性。相对于 *C. elegan*，粟酒裂殖酵母和酿酒酵母 Chk1- 样蛋白，人蛋白与它们蛋白激酶域的同一性分别为 56%， 47%及 37%。图 1 比较了人、小鼠、 *C. elegan*，粟酒裂殖酵母及酿酒酵母的 Chk1 同源物的氨基酸序列。在图 1 中在各种属间均相同的氨基酸残基打上了框。罗马数字标出同源物中保守的亚域。亚域 V ~ IX 包括底物识别位点，含有最大频率的保守残基。这是根据与其它已知激酶的同源性确定的 ( Hanks et al., Science 241: 42-52, 1988 )。

#### 10 D. 分离鼠 Chk1 基因组克隆

编码 Chk1 的小鼠基因组克隆是用 PCR 筛选 P1 小鼠 129 文库而获得的。用于筛选小鼠 129 P1 文库的 PCR 引物为 mmChk2 ( ACG TGG ACA AAC TGG TTC AGG ) ( SEQ ID NO.: 5 ) 及 mmChk21: ( CTG ATA GCC CAA CTT CTC GAA SEQ ID NO.: 6 )。这些引物用于生成一个相当于 SEQ ID NO.: 4 核苷酸 X ~ X 的 208 bp 的扩增子。此扩增子用于鉴定一个约 81 - 100 kb 的克隆。基因组克隆用 EcoRI 进行限制性消化，限制性酶切产物亚克隆到一个载体内以 zeocin 作为选择标志。此载体得自 Invitrogen p. zero 1.1 ( 2.8 kb )。

20 EcoRI 限制消化物在 0.8% 琼脂糖凝胶上分离，按标准方法转移到硝酸纤维素上。硝酸纤维素印迹用 208 bp 扩增子探测以肯定一个基因组克隆已得到鉴定。

#### E. 人 Chk1 基因的染色体作图

用 Stanford G3 Radiation Hybrid 板对 Chk1 进行定位作图。用两个从人 cDNA 文库衍生的 Chk1 DNA 片段的 3' 非翻译区内的寡核苷酸，以引物 1 ( Chk1 30 mer 3'UT ) GGCTCTGGGGAATCCTGGTGAATATA GTGCTGC ( SEQ ID NO.: 7 ) 及引物 2 ( Chk1 30 mer 3'UT ) TCCCCTGAACTTGGTTTCCACCAGATGAG ( SEQ ID NO.: 8 ) 进行 PCR 反应，得到一个单一的扩增子。为了亚定位，分析了从 Research Genetics ( Huntsville, Alabama ) 得到的染色体 11 放射杂交 DNA 样品，结果由 RH 服务器 <http://shgc.stanford.edu/> 解码。 Chk1Hu 定位于标志 D1154610 处，后者已作用于 11q 23.3 的端粒区域。此区域已被确定为与卵巢、乳腺、肺、结肠及宫颈癌，黑色素瘤有关的肿瘤抑制基因





的位点。 [Gabra et. al., Cancer Research, 56: 950-954 (1996)].

## 例 2

Chk1 在重组子宿主细胞中表达

A. Chk1 谷胱甘肽 S - 转移酶融合蛋白的表达及激酶活力

5 制备了编码 Chk1 谷胱甘肽 S - 转移酶融合蛋白 ( GST-Chk1Hu )  
的 DNA 。利用引入到 Chk1Hu 中的 NdeI Sall 限制位点将编码 GST-  
Chk1Hu 的 DNA 克隆到 pGEX KGH 中,内在的 NdeI 位点用沉默诱变消  
除。以 GST- Chk1 转化的 E.coli F Dh5a 用于制备重组子蛋白。在 200 ml  
培养基中,加入 5 mM IPTG,细胞在 37 °C 下生长 4 小时。收集培养物,  
10 在 STE 缓冲液中洗 ( 10 mM Tris pH8, 150 mM NaCl 及 1mM EDTA )。  
细胞重悬浮于含 1 mM PMSF 和 100 mg 溶菌酶的 6 mol STE 中。培养物  
在冰上孵育 15 分钟,加入 5 mM DTT 和 1.5% Sarkosyl,细胞作超声处  
理。沉淀残渣,上清加 Triton X-100 至 2%。加入谷胱甘肽琼脂糖珠,  
用台式离心机沉淀珠,结合蛋白用洗脱缓冲液 ( 50 mM Tris pH 8.0, 150  
15 mM NaCl, 1 mM PMSF 及 10 mM 谷胱甘肽 ) 洗脱。

激酶测定是将 GST- Chk1Hu 在含有或不含 1 mg 底物蛋白的激酶缓  
冲液 ( 25 M HEPES, pH7.7, 50 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1% NP-40;  
2%甘油; 1 mM DTT, 50 μM ATP ) 中孵育,在含有 10 mCi [g-32P]ATP  
( 3000 Ci/mmol)的激酶缓冲液中于 37 °C 保温 20 分钟。在 6 % PAGE 分  
20 离之前用 20 μl 2 × SDS 样品缓冲液中止反应。然后将激酶反应物转移  
到 Immobilon 上,对片子曝光,然后接着探测沉淀蛋白。

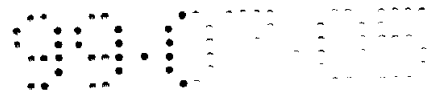
谷胱甘肽亲和纯化融合蛋白能够自身磷酸化并使底物蛋白如髓鞘  
碱性蛋白磷酸化表明 Chk1 具有蛋白激酶活性,不依赖于调节亚单位。

## 例 3

25 对哺乳动物 Chk1 蛋白特异的抗体按以下方法生成。

A. 生成多克隆抗体

多克隆抗体是对抗于小鼠 Chk1 多肽片段而生成的。  
CLKETFEKLG YQWKK ( SEQ ID NO.: 3 的氨基酸 191 ~ 203 ) 经 N -  
末端加上的半胱氨酸与匙孔血蓝蛋白 ( KLH ) 偶联,给家兔每次注射 150  
30 mg。为对兔血清进行亲和纯化,脱气 TEB ( 50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na,  
pH8.5 ) 平衡过的巯基偶联胶 ( TCGel Quality Controlled Biochemicals )  
( St. Louse, Missouri ) 3 ml 与 1.25 mg HPLC 纯化肽混合。偶联树脂装到



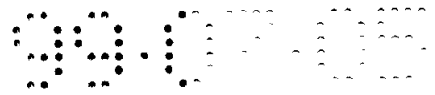
经济柱上 ( Bio Rad ) ( Hercules, California ), 用 10 个柱容 TEB 洗。树脂再用封闭缓冲液 ( 50 mM 半胱氨酸于 TEB 缓冲液中/ml 凝胶 ) 处理, 然后用 20 柱容的盐缓冲液洗。柱子用 20 柱容的盐缓冲液 ( 500 mM NaCl 于 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  中, pH6.5 ) 及 10 个柱容的磷酸缓冲液 ( 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH6.5 ) 洗。20 ml 的兔血清加载到柱上, 用 10 个柱容的盐缓冲液洗, 抗体随甘氨酸缓冲液 ( 100 mM 甘氨酸 - HCL, pH2.5 ) 而洗脱。以 1 ml 的分部收集于 50  $\mu\text{l}$  1.0 M Tris ( pH9.5 ) 中。含有抗体的分部收集在一起, 对储存缓冲液 ( 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM MgCl, pH7.0 ) 透析, 在  $-20^\circ\text{C}$  储存, 称作 aChk1#2-3。多克隆抗血清 aChk1#2-3 能对来自小鼠睾丸提取液中的小鼠 Chk1 蛋白发生免疫沉淀, 如例 6 所叙, 此外, aChk1#2-3 识别的重组人 Chk1 及 Chk1Hu 谷胱甘肽 S - 转移酶融合蛋白在 E. coli 中得到了表达。

#### B. 单克隆抗体的生成

单克隆抗体的制备是用溶于弗氏完全佐剂 ( CFA ) 的 Chk1, Gst-Chk1 或 Chk1 片段对 Balb/c 小鼠经皮下免疫。随后进行 CFA 中或不完全弗氏佐剂的免疫以增强免疫反应。

无菌取出免疫动物的脾脏, 置于两块显微镜玻璃载片的冰冻末端间研磨, 制成单细胞悬液, 玻片浸在无血清 RPMI 1640 中, 并补充有 2 mM L - 谷氨酰胺, 1 mM 丙酮酸钠, 100 单位/ml 青霉素及 100 mg/ml 链霉素 ( RPMI ) ( Gibco, Canada )。细胞悬液用无菌的 70 - 目 Nitex 细胞滤网 ( Becton Dickinson, Parsippany, New Jersey ) 过滤, 用 200 g 5 分钟离心、重悬沉淀于 20 ml 无血清 RPMI 的方法洗两次。从 Balb/c 幼鼠取得的胸腺细胞用同样方法制备。

$2 \times 10^8$  脾细胞与  $4 \times 10^7$  NS-1 细胞( 保持在对数期, 融合前在含 11% 胎牛血清 ( FBS ) 的 RPMI 中保持 3 天 ) 合在一起, 离心, 吸出上清。取出细胞沉淀, 在持续 1 分钟的搅拌下加入 2 ml  $37^\circ\text{C}$  PEG 1500 ( 75 mM HEPES 中 50 %, pH8.0 ) ( Boehringer Mannheim ), 再在 7 分钟内加入 14 ml 无血清 RPMI。可再增加一些 RPMI, 细胞以 200 g 离心 10 分钟。弃上清后, 沉淀再悬浮于 200 ml RPMI 中, 后者含有 15 % FBS, 100 mM 次黄嘌呤钠, 0.4 mM 氨基蝶呤, 16 mM 胸腺 ( HAT ) ( Gibco ), 25 单位/ml IL-6 ( Boehringer Mannheim ) 及  $1.5 \times 10^6$  胸腺细胞/ml。悬液以 200  $\mu\text{l}$ /孔的量分配到 10 个 96 孔平底组织培养板中



( Corning, United Kingdom )。细胞于融合后 2, 4 及 6 天给与饲养, 即用 18 G 针头 ( Becton Dickinson ) 从每孔吸出 100 ml, 并加入 100 ml/孔含 10 U/ml IL-6 而不含胸腺细胞的接种培养基。

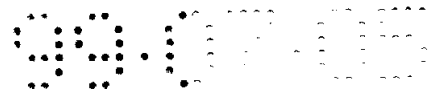
当细胞生长达到 60 - 80 % 汇合时 ( 8 - 10 天 ), 从每孔取出培养上清, 用 ELISA 筛选 Chk1 活性。ELISA 按以下方法进行。将 Immulon 4 板 ( Dynatech, Cambridge, Massachusetts ) 在 4 °C 下以 50 ml/孔, 100 ng/孔的溶于 50 mM 碳酸盐缓冲液 pH 9.6 中的 Chk1 包被。板用含 0.05% Tween 20 ( PBST ) 的 PBS 洗, 在 0.5 % 鱼皮胶 ( Fish Skin Gelatin ) 中封闭, 37 °C, 30 分钟。平板如上述洗毕后加入 50 ml 培养上清, 在 37 °C 孵育 30 分钟后, 加入与羊抗小鼠 Ig G ( fc ) 缀合的辣根过氧化物酶 50 ml ( Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania ) [在 PBST 中以 1:10,000 稀释]。平板于 37 °C 温育 30 分钟, 以 PBST 洗, 加入 100 ml 底物, 其组成为 1 mg/ml TMB ( Sigma ) 及 0.15 ml/ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶于 100 mM 柠檬酸盐中, pH4.5。加入 50 ml 15 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止颜色反应。A450 在平板读数仪 ( Dynatech ) 上读取。

#### 例 4

进行 Northern 分析以测定 Chk1 在小鼠和人组织中的组织分布。用寡核苷酸 mmChk1: GTTGAGACTCCATCATCAAGG ( SEQ ID NO.: 9 ) 及 mmChk1': TCTGGCTGGGAAGTAGAGAAC ( SEQ ID NO.: 10 ) 生成一个 220 bp 的扩增子, 鉴定为 mmChk1+1', mmChk+1' 及 mmChk2+2' ( 例 1 ) 用作 northern 分析的探针。PCR 的条件如下: 一个循环的 94 °C 8 分钟, 然后 40 循环的 94 °C 20 秒, 58 °C 20 秒, 72 °C 20 秒。产物用 4 % 琼脂糖凝胶分析。

扩增子以 <sup>32</sup>P-ATP 标记用于 Northern 分析。尼龙膜含有 2 mg 按大小分级的多聚(A)<sup>+</sup>RNA, 后者来自人与小鼠组织, 包括人心、脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾、胰、脾、胸腺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠、结肠和外周血白细胞, 以及小鼠心、脑、脾、肺、肝、骨骼肌、肾和睾丸 ( Clontech Laboratories, Palo Alto, California ), 按照制造厂商推荐的方法, 用标记扩增子探查, 只有最后一次洗在 55 °C 进行, 以使与相关序列交叉杂交的可能性降到最低。

在小鼠组织中, 在肺、脾和睾丸观察到 Chk1 的表达。在人组织中, 表达在胸腺、肺、前列腺及睾丸中见到。无论如何, 小鼠和人的睾丸



RNA 样品比其它组织中的 RNA 表达水平高出 2~4 倍。

为测定发育中小鼠胚胎中的 Chk1 表达, 在 7、11、15 及 17 天得到的整体胚胎的 mRNA 以标记的 mChk1 + 1' 和 mmChk2 + 2' 探查。

Northern 印迹表明, Chk1 的表达高峰是在胚胎发育的 11 天。

5

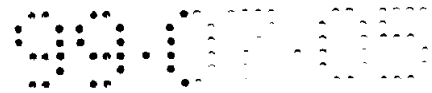
#### 例 5

由于 Atr 和 Atm 在减数分裂中的作用以及它们与减数分裂染色体的结合, 对小鼠睾丸切片用兔免疫组织学鉴定法检查了 Chk1Mo 蛋白的表达。睾丸中减数分裂前细胞围绕着细精管的表面, 对应于减数分裂的后期及精子成熟向小管内腔移行[Moens et al, J. Histochem. Cytochem, 10 25:480(1977)]。

正常及突变小鼠(见下文)的睾丸, 按 Heiner et al., Cancer Res., 57: 1664-1667 (1997) 所述取得, 并保存于 Tissue Tek OCT 复合物, 一种组织冰冻介质, 含有 10.24% w/w 聚乙烯醇、4.26% w/w 聚乙二醇及 85.50% w/w 惰性成分。野生与突变小鼠都作了检验, 用多克隆抗体 aChk1#2-3 进行免疫组化分析。6 微米的冷冻切片置于 50 °C 烘箱中干燥, 在 4 °C 丙酮中固定 2 分钟。载片用 1:100 稀释的 aChk1#2-3 抗血清保温 30 分。第二抗体, 羊抗兔生物素化的抗体以 1:200 加到每个切片上, 保温 37 °C 15 分。第三抗体, 羊抗生物素以 1:200 加到每个切片, 保温 37 °C 15 分。每次保温后, 载片都用 1 × TBS 淋洗。用 DAB 辣根过氧化物酶底物检测样品中的阳性信号。反应在水中停止, 用 Gill's 苏木精复染。20

Chk1Mo, atm+/+p53+/+(A), atm+/+p53+/- (B) atm-/p53+/+(C), atm-/p53+/- (D), 及 atm-/p53-/- (E) 的睾丸用抗 - Chk1 抗血清作免疫组织学鉴定。睾丸的冰冻切片用亲和纯化的抗 - Chk1 抗血清 (aChk1#2-3) 及 25 抗 - ATR 单克隆 (224C) 染色。通过检验免疫前血清及特异和非特异肽封闭试验肯定染色的特异性。用亲和纯化的 Chk1 多克隆抗血清 (例 3 的 Chk1#2-3) 测定定位。

与报告的 Atr 染色型不同, 正常小鼠核染色中 Chk1Mo 表现暂时的增加和减少。Chk1Mo 在初级精母细胞的粗线期表达最高, 表明 30 Chk1Mo 可能在减数分裂前期作用于 Atr 功能的下游, 在 Atr 之后, 而后者在偶线期作用较早。由于 Atm 及 p53 具有关卡性质, 可能作用于信号转导相对于 Chk1Hu/Mo 较早的时相, 对 atm-/p53+/+, atm-/p53-/-



及 atm<sup>-/-</sup>p53<sup>+/-</sup>小鼠用组织学分析测定了 Chk1Mo 的定位 [Donehower et al., *Nature*, 356:215 (1992); Kuerbitz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7491 (1992); Westphal et al., *Nat. Gen.*, 16: 397-401 (1997)]. Chk1Mo 的蓄积和定位不依赖于 p53 状态, 但依赖于 Atm, 说明 Chk1Mo 也作用于减数分裂前期 Atm 的下游。

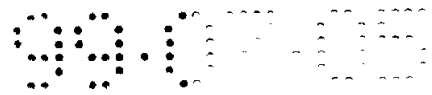
为进一步分析 Chk1 在哺乳动物减数分裂中的作用, 在精母细胞压片上测定了 Chk1 的时间与空间分布。

为减数分裂制片, 制备了 15 - 21 日龄小鼠 (C57-b1/6) 精母细胞的压片, 按 Ashley et al., *Chromosoma*, 104: 19 (1995) 描述的方法进行抗体保温和测定。这些方法是 Moens et al., 流程的改良, 如 Ashley 等先前所述。因为抗 Chk1 和 Scp3 (对照) 的抗体都由兔产生, 精母细胞标记了, 然后成象。检测使用羊-抗兔 IgG - 罗丹明缀合及羊-抗兔 IgG-FITC-缀合 (Pierce) 的第二抗体。所有制片用 4', 6'-二氨基-2-苯基吲哚 (DAPI, Sigma) 复染, 置于 DABCO (Sigma) 抗退色溶液中。用 Zeiss Axioskop (63-X 及 100-X, 1.2 Plan Neofluor 油浸物镜) 检查制片。每一个荧光 (FITC, 罗丹明及 DAPI) 象都用计算机支持的冷 CCD 相机 (Photometrics CH220) 分别捕捉为 8 - 比特源象, 以 TimRand [Ried et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1388 (1992)] 开发的商业软件将各影象以 24 比特假着色、吸收。

偶线期精母细胞用抗 Scp3 抗血清染色, Scp3 是在姊妹染色单体间形成的轴要素的组分。这些偶线期精母细胞还用 aChk1#2-3 标记。Chk1 沿联会同源染色体的联会复合体 (SC) 存在。处于联会过程的染色体具有 Chk1 染色, 但非联会轴要素上观察不到染色。当减数分裂进入粗线期时, Chk1Mo 仍以与 ATM 相似的灶染色型与常染色体联会复合物结合。

一个粗线期母细胞用抗 Chk1 及小鼠抗 Atr 单克隆抗体 (224C) 二者标记。虽然 Chk1 开始呈现为灶型, 而在粗线期 Chk1 看来沿 SCs 蓄积。此外, Chk1 灶在中粗线期 X 与 Y 染色体沿非联会轴要素出现, 与 Atr 在一起。在整个粗线期 Chk1 保持在 SCs 上, 而当同源染色体在双线期分离时消失。

p53<sup>-/-</sup>小鼠的减数分裂前期 I 的进程是正常的。在标记 Chk1 及 Scp3 的早期粗线期精母细胞, Chk1 沿 SCs 及性染色体的联会区存在。无论



如何, Chk1 不出现在早粗线期 X 染色体的非联会轴要素上。在 atm-/-小鼠, 当联会后 SCs 开始断裂时减数分裂的进程受到破坏。虽然同源染色体在 atm-/-精母细胞发生联会, 沿着联会二价体或分片段的 SCs 没有测到 Chk1。

5 如此, 在正常小鼠, Chk1 以灶型出现于偶线期联会同源染色体的联会复合体上, 与 Atm 的形式相似。当减数分裂进入粗线期时, Chk1 沿 SCs 蓄积, 在中-粗线期结束前 Chk1 复盖整个 SCs。在早粗线期, Chk1 沿 XY 二价体的联会区存在。然而在中-粗线期前, Chk1 灶也沿着 X 和 Y 染色体的非联会轴出现, 与 Atr 定位在一起。Atr 在早期发现  
10 以灶样存在于性染色体的非联会轴上, 以后在粗线期复盖整个 X 与 Y 轴上。

p53 缺陷小鼠的减数分裂看来不受影响, 如组织学分析和精母细胞压片对 Scp3 和 Chk1 免疫染色所显示。相反, atm-/-小鼠是不育的, 这是由于联会后减数分裂染色体进行性断裂引起凋亡的结果。对 atm-/-精  
15 母细胞 Chk1 免疫定位表明在 SCs 上缺乏 Chk1, 提示在哺乳动物减数分裂中 Atm 在 Chk1 下游起作用。为了确定在 atm-/-核中 Chk1 染色的缺乏及减数分裂前期染色质上 Chk1Mo 蛋白的缺乏是否是 Chk1Mo 水平的反映, 按 Keegan et al., Genes Dev., 10:2423 (1996) 的方法对睾丸提取物进行 Western 分析。Chk1 蛋白以 Atm-依赖的方式存在, 提示 Chk1Mo  
20 的合成或稳定依赖于 Atm 蛋白。缺乏 Atm 的小鼠 MTE 不能染出 Chk1 说明 atm-/-小鼠不表达 Chk1。相反, 野生型小鼠或 p53 表达障碍小鼠的 MTE 显示 Chk1 染色。

### 例 6

小鼠 Chk1 的激酶活力及其与 Atr 结合的能力也得到了证实。

#### 25 A. 鼠睾丸 Chk1 的激酶活力

用 aChk1#2-3 抗体从小鼠睾丸提取物 (MTE) 免疫沉淀 Chk1。约  
30 只去包膜睾丸加液氮在研钵中磨碎, 磨碎物转移至 15 ml dounce 匀浆器。加入 15 ml 裂解缓冲液 (50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH7.2, 0.5% Triton X-100, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 mM NaF, 25 mM 2-甘油磷酸盐, 1 mM  
30 PMSF, 1 mg/ml 亮抑酶肽, 1 mg/ml 抑胃酶肽 A 及 2 mM DTT), 将提取物打匀浆, 用松研杵打 30 次, 紧研杵打 20 次。低速离心后, 用 BCA 测上清蛋白浓度。



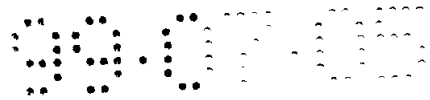
为免疫沉淀 Chk1, 400 mg MTE 提取物或与 10 mg 亲和纯化 Chk1#2-3, 或与约 10 mg 免疫前血清冰浴 30 分。加入蛋白 A - 琼脂糖浆液 (Pierce), 混合物在 4 °C 孵育 30 分。结合免疫复合物的浆液在 TSAT 中洗三次, 激酶缓冲液 (25 μM HEPES, pH7.7; 50 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1% NP-40; 2% 甘油; 1 mM DTT, 50 μM ATP) 洗一次, 在含有 10 mCi [γ-<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/mmol) 的激酶缓冲液中 37 °C 保温 20 分。在 6 % PAGE 分离前用 20 μl 2×SDS 样品缓冲液终止反应。激酶反应物转移到 Immobilon 上, 对片子曝光, 然后用探针检测沉淀蛋白。

10 为测定从 MTE 免疫沉淀的 Chk1 是否能自身磷酸化, 在免疫沉淀物中加入 2×激酶缓冲液及 10 mCi g<sup>32</sup>-P-data (3000 Ci/mM)。磷酸化反应物在 30 °C 孵育 15 分。反应物在 6 % PAGE 凝胶上电泳, 转移到 Immobilon P, 对 X 光片曝光。印迹表明免疫沉淀 Chk1 能与 Chk1-GST 融合蛋白 (例 2) 一样进行自身磷酸化。小鼠 IgG 及 Chk1 免疫前血清  
15 不能免疫沉淀 Chk1Mo。

### C. Chk1 与 Atr 的结合

为确定 Chk1 与 Atr 是否能在减数分裂细胞内结合, 460 mg MTE 用抗 Atr 单克隆抗体 (aAtr-224C) 在上述条件下进行免疫沉淀。Atr 免疫沉淀物在 6 % 或 8 % PAGE 上电泳, 电印迹到 immoblin P 膜上,  
20 用抗 - Chk1 抗体 (aChk1#2-3) 探查。印迹显示, Chk1 与 Atr 共沉淀, 表明 Atr 与 Chk1 在减数分裂细胞中结合。此外, 与 Atr 免疫共沉淀的 Chk1 能进行自身磷酸化。

在实施本发明中对于熟练技术者可以有多种多样的改进和变动。本发明仅由所附权利要求书限定。



## 序列表

### (1) 一般信息:

- (i) 申请人: Medical Research Council  
 (ii) 发明名称: 哺乳动物 CHK1 效应物细胞周期关卡蛋白激酶  
 材料与amp;方法

5

(iii) 序列数目: 10

(iv) 通讯地址:

(A) 收信人: Medical Research Council

(B) 街道: 20, Park Crescent

10

(C) 城市: 伦敦

(D) 州:

(E) 国家: UK

(F) ZIP: W1N 4AL

(v) 计算机阅读形式:

15

(A) 媒体形式: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) 现申请数据:

20

(A) 申请号:

(B) 提交日期:

(C) 分类:

### (2) SEQ ID NO.:1 的信息:

25

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1933 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

30

(ii) 分子类型: cDNA

“人 Chk1”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: CDS

(B) 定位: 34..1461

35

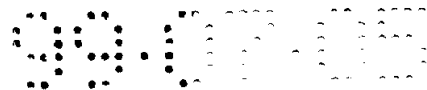
(xi) 序列描述: SEQ ID NO.: 1:

GCCGGACAGT CCGCCGAGGT GCTCGGTGGA GTC ATG GCA GTG CCC TTT GTG GAA 54  
 Met Ala Val Pro Phe Val Glu  
 1 5

40

GAC TGG GAC TTG GTG CAA ACC CTG GGA GAA GGT GCC TAT GGA GAA GTT 102  
 Asp Trp Asp Leu Val Gln Thr Leu Gly Glu Gly Ala Tyr Gly Glu Val  
 10 15 20





CAA CTT GCT GTG AAT AGA GTA ACT GAA GAA GCA GTC GCA GTG AAG ATT 150  
Gln Leu Ala Val Asn Arg Val Thr Glu Glu Ala Val Ala Val Lys Ile  
25 30 35

GTA GAT ATG AAG CGT GCC GTA GAC TGT CCA GAA AAT ATT AAG AAA GAG 198  
Val Asp Met Lys Arg Ala Val Asp Cys Pro Glu Asn Ile Lys Lys Glu  
40 45 50 55

ATC TGT ATC AAT AAA ATG CTA AAT CAT GAA AAT GTA GTA AAA TTC TAT 246  
Ile Cys Ile Asn Lys Met Leu Asn His Glu Asn Val Val Lys Phe Tyr  
60 65 70

GGT CAC AGG AGA GAA GGC AAT ATC CAA TAT TTA TTT CTG GAG TAC TGT 294  
Gly His Arg Arg Glu Gly Asn Ile Gln Tyr Leu Phe Leu Glu Tyr Cys  
75 80 85

AGT GGA GGA GAG CTT TTT GAC AGA ATA GAG CCA GAC ATA GGC ATG CCT 342  
Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Arg Ile Glu Pro Asp Ile Gly Met Pro  
90 95 100

GAA CCA GAT GCT CAG AGA TTC TTC CAT CAA CTC ATG GCA GGG GTG GTT 390  
Glu Pro Asp Ala Gln Arg Phe Phe His Gln Leu Met Ala Gly Val Val  
105 110 115

TAT CTG CAT GGT ATT GGA ATA ACT CAC AGG GAT ATT AAA CCA GAA AAT 438  
Tyr Leu His Gly Ile Gly Ile Thr His Arg Asp Ile Lys Pro Glu Asn  
120 125 130 135

CTT CTG TTG GAT GAA AGG GAT AAC CTC AAA ATC TCA GAC TTT GGC TTG 486  
Leu Leu Leu Asp Glu Arg Asp Asn Leu Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu  
140 145 150

GCA ACA GTA TTT CGG TAT AAT AAT CGT GAG CGT TTG TTG AAC AAG ATG 534  
Ala Thr Val Phe Arg Tyr Asn Asn Arg Glu Arg Leu Leu Asn Lys Met  
155 160 165

TGT GGT ACT TTA CCA TAT GTT GCT CCA GAA CTT CTG AAG AGA AGA GAA 582  
Cys Gly Thr Leu Pro Tyr Val Ala Pro Glu Leu Leu Lys Arg Arg Glu  
170 175 180

TTT CAT GCA GAA CCA GTT GAT GTT TGG TCC TGT GGA ATA GTA CTT ACT 630  
Phe His Ala Glu Pro Val Asp Val Trp Ser Cys Gly Ile Val Leu Thr  
185 190 195

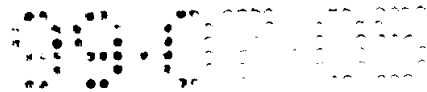
GCA ATG CTC GCT GGA GAA TTG CCA TGG GAC CAA CCC AGT GAC AGC TGT 678  
Ala Met Leu Ala Gly Glu Leu Pro Trp Asp Gln Pro Ser Asp Ser Cys  
200 205 210 215

CAG GAG TAT TCT GAC TGG AAA GAA AAA AAA ACA TAC CTC AAC CCT TGG 726  
Gln Glu Tyr Ser Asp Trp Lys Glu Lys Lys Thr Tyr Leu Asn Pro Trp  
220 225 230

AAA AAA ATC GAT TCT GCT CCT CTA GCT CTG CTG CAT AAA ATC TTA GTT 774  
Lys Lys Ile Asp Ser Ala Pro Leu Ala Leu Leu His Lys Ile Leu Val  
235 240 245

GAG AAT CCA TCA GCA AGA ATT ACC ATT CCA GAC ATC AAA AAA GAT AGA 822





TGCTGCTATG TTGACATTAT TCTTCCTAGA GAAGATTATC CTGTCCGCA AACTGCAAAT 1561  
 AGTAGTTCCT GAAGTGTTCA CTTCCCTGTT TATCCAAACA TCTTCCAATT TATTTTGTTT 1621  
 5 GTTCGGCATA CAAATAATAC CTATATCITA ATTGTAAGCA AAACCTTGGG GAAAGGATGA 1681  
 ATAGAATTCA TTTGATTATT TCTTCATGTG TGTTTAGTAT CTGAATTTGA AACTCATCTG 1741  
 GTGGAAACCA AGTTTCAGGG GACATGAGTT TTCCAGCTTT TATACACACG TATCTCAITT 1801  
 TTATCAAAAC ATTTTGTTTA ATTCAAAAAG TACATATTCC ATGTTGATTT AATTCTAAGA 1861  
 10 TGAACCAATA AAGACATAAT TCTTGIGACT TTTGGACAGT AGATTTATCA GTCTGTGAAG 1921  
 CGAAGCCAGC TT 1933

(2) SEQ ID NO.: 2 的信息:

(i) 序列特征:

- 15 (A) 长度: 476 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白

(xi) 序列描述: SEQ ID NO.: 2:

20

Met Ala Val Pro Phe Val Glu Asp Trp Asp Leu Val Gln Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ala Tyr Gly Glu Val Gln Leu Ala Val Asn Arg Val Thr Glu  
 20 25 30  
 Glu Ala Val Ala Val Lys Ile Val Asp Met Lys Arg Ala Val Asp Cys  
 35 40 45  
 Pro Glu Asn Ile Lys Lys Glu Ile Cys Ile Asn Lys Met Leu Asn His  
 50 55 60  
 Glu Asn Val Val Lys Phe Tyr Gly His Arg Arg Glu Gly Asn Ile Gln  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu Phe Leu Glu Tyr Cys Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Arg Ile  
 85 90 95  
 Glu Pro Asp Ile Gly Met Pro Glu Pro Asp Ala Gln Arg Phe Phe His  
 100 105 110  
 Gln Leu Met Ala Gly Val Val Tyr Leu His Gly Ile Gly Ile Thr His  
 115 120 125  
 Arg Asp Ile Lys Pro Glu Asn Leu Leu Leu Asp Glu Arg Asp Asn Leu  
 130 135 140  
 Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Phe Arg Tyr Asn Asn Arg





Leu Glu Phe Lys Arg His Phe Leu Lys Ile Lys Gly Lys Leu Ile Asp  
 450 455 460

Ile Val Ser Ser Gln Lys Val Trp Leu Pro Ala Thr  
 465 470 475

5 (2) SEQ ID NO.: 3 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 742 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单
- (D) 拓扑学: 线性

10

(ii) 分子类型: cDNA  
 “小鼠 Chk1”

(ix) 特征:

- (A) 名称/键: CDS
- (B) 定位: 1..742

15

(xi) 序列描述: SEQ ID NO.: 3:

48 GGA GAG TTG CCG TGG GAC CAG CCC AGT GAT AGC TGT CAG GAA TAT CTG  
 Gly Glu Leu Pro Trp Asp Gln Pro Ser Asp Ser Cys Gln Glu Tyr Leu  
 1 5 10 15

20 ATT GTA AAG AAA AAA ACC TAT CTC AAT CCT TGG AAA AAA ATT GAT  
 96 Ile Val Lys Lys Lys Lys Thr Tyr Leu Asn Pro Trp Lys Lys Ile Asp  
 20 25 30

TCT GCT CCT CTG GCT TTG CTT CAT AAA ATT CTA GTT GAG ACT CCA TCA 144  
 Ser Ala Pro Leu Ala Leu Leu His Lys Ile Leu Val Glu Thr Pro Ser  
 35 40 45

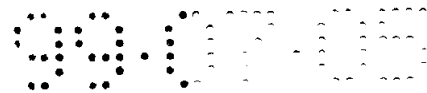
TCA AGG ATC ACC ATC CCA GAC ATT AAG AAA GAT AGA TGG TAC AAC AAA 192  
 Ser Arg Ile Thr Ile Pro Asp Ile Lys Lys Asp Arg Trp Tyr Asn Lys  
 50 55 60

CCA CTT AAC AGA GGA GCA AAG AGG CCA CGC GCC ACA TCA GGT GGT ATG 240  
 Pro Leu Asn Arg Gly Ala Lys Arg Pro Arg Ala Thr Ser Gly Gly Met  
 65 70 75 80

TCA GAG TCT TCT AGT GGA TTC TCT AAG CAC ATT CAT TCC AAT TTG GAC 288  
 Ser Glu Ser Ser Ser Gly Phe Ser Lys His Ile His Ser Asn Leu Asp  
 85 90 95

TTT TCT CCA GTA AAT AAT GGT TCC AGT GAA GAA ACC GTG AAG TTC TCT 336  
 Phe Ser Pro Val Asn Asn Gly Ser Ser Glu Glu Thr Val Lys Phe Ser  
 100 105 110

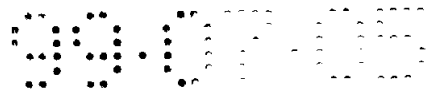
AGT TCC CAG CCA GAG CCG AGA ACA GGG CTT TCC TTG TGG GAC ACT GGT 384  
 Ser Ser Gln Pro Glu Pro Arg Thr Gly Leu Ser Leu Trp Asp Thr Gly



	115	120	125	
	CCC TCG AAC GTG GAC AAA CTG GTT CAG GGC ATC AGT TTT TCC CAG CCT			432
	Pro Ser Asn Val Asp Lys Leu Val Gln Gly Ile Ser Phe Ser Gln Pro			
	130	135	140	
5	ACG TGT CCT GAG CAT ATG CTT GTA AAC AGT CAG TTA CTC GGT ACC CCT			480
	Thr Cys Pro Glu His Met Leu Val Asn Ser Gln Leu Leu Gly Thr Pro			
	145	150	155	160
	GGA TCT TCA CAG AAC CCC TGG CAG CGC TTG GTC AAA AGA ATG ACG AGG			528
	Gly Ser Ser Gln Asn Pro Trp Gln Arg Leu Val Lys Arg Met Thr Arg			
10	165	170	175	
	TTC TTT ACT AAA TTG GAT GCG GAC AAG TCT TAC CAA TGC CTG AAA GAG			576
	Phe Phe Thr Lys Leu Asp Ala Asp Lys Ser Tyr Gln Cys Leu Lys Glu			
	180	185	190	
	ACC TTC GAG AAG TTG GGC TAT CAG TGG AAG AAG AGT TGT ATG AAT CAG			624
	Thr Phe Glu Lys Leu Gly Tyr Gln Trp Lys Lys Ser Cys Met Asn Gln			
15	195	200	205	
	GTT ACT GTA TCA ACA ACT GAT AGA AGA AAC AAT AAG TTG ATT TTC AAA			672
	Val Thr Val Ser Thr Thr Asp Arg Arg Asn Asn Lys Leu Ile Phe Lys			
	210	215	220	
	ATA AAT TTG GTG GAA ATG GAT GAG AAG ATA CTG GTT GAC TTC CGA CTT			720
	Ile Asn Leu Val Glu Met Asp Glu Lys Ile Leu Val Asp Phe Arg Leu			
20	225	230	235	240
	TCT AAA GGC GAC GGC TAC AAT T			742
	Ser Lys Gly Asp Gly Tyr Asn			
	245			

- 25 (2) SEQ ID NO.: 4 的信息:
- (i) 序列特征:
    - (A) 长度: 247 氨基酸
    - (B) 类型: 氨基酸
    - (D) 拓扑学: 线性
  - 30 (ii) 分子类型: 蛋白
  - (xi) 序列描述: SEQ ID NO.: 4:

Gly	Glu	Leu	Pro	Trp	Asp	Gln	Pro	Ser	Asp	Ser	Cys	Gln	Glu	Tyr	Leu
1				5				10					15		
Ile	Val	Lys	Lys	Lys	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Pro	Trp	Lys	Lys	Ile	Asp
		20						25					30		
Ser	Ala	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	His	Lys	Ile	Leu	Val	Glu	Thr	Pro	Ser
		35					40					45			
Ser	Arg	Ile	Thr	Ile	Pro	Asp	Ile	Lys	Lys	Asp	Arg	Trp	Tyr	Asn	Lys
		50				55					60				



Pro Leu Asn Arg Gly Ala Lys Arg Pro Arg Ala Thr Ser Gly Gly Met  
 65 70 75 80  
 Ser Glu Ser Ser Ser Gly Phe Ser Lys His Ile His Ser Asn Leu Asp  
 85 90 95  
 5 Phe Ser Pro Val Asn Asn Gly Ser Ser Glu Glu Thr Val Lys Phe Ser  
 100 105 110  
 Ser Ser Gln Pro Glu Pro Arg Thr Gly Leu Ser Leu Trp Asp Thr Gly  
 115 120 125  
 10 Pro Ser Asn Val Asp Lys Leu Val Gln Gly Ile Ser Phe Ser Gln Pro  
 130 135 140  
 Thr Cys Pro Glu His Met Leu Val Asn Ser Gln Leu Leu Gly Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Ser Gln Asn Pro Trp Gln Arg Leu Val Lys Arg Met Thr Arg  
 165 170 175  
 15 Phe Phe Thr Lys Leu Asp Ala Asp Lys Ser Tyr Gln Cys Leu Lys Glu  
 180 185 190  
 Thr Phe Glu Lys Leu Gly Tyr Gln Trp Lys Lys Ser Cys Met Asn Gln  
 195 200 205  
 20 Val Thr Val Ser Thr Thr Asp Arg Arg Asn Asn Lys Leu Ile Phe Lys  
 210 215 220  
 Ile Asn Leu Val Glu Met Asp Glu Lys Ile Leu Val Asp Phe Arg Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Lys Gly Asp Gly Tyr Asn  
 25 245

(2) SEQ ID NO.: 5 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述 /desc = "引物"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO.: 5:

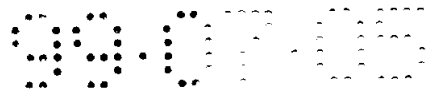
ACGTGGACAA ACTGGTTCAG G

(2) SEQ ID NO.: 6 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 碱基对

(B) 类型: 核酸



- (C) 链型: 单
  - (D) 拓扑学: 线性
  - (ii) 分子类型: 其它核酸
  - (A) 描述 /desc = “引物”
- 5 (xi) 序列描述: SEQ ID NO.: 6:

**CTGATAGCCC AACTTCTCGA A**

(2) SEQ ID NO.: 7 的信息:

- 10 (i) 序列特征:
- (A) 长度: 33 碱基对
  - (B) 类型: 核酸
  - (C) 链型: 单
  - (D) 拓扑学: 线性
- 15 (ii) 分子类型: 其它核酸
- (A) 描述 /desc = “引物”
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO.: 7:

**GGCTCTGGGG AATCCTGGTG AATATAGTGC TGC**

20

(2) SEQ ID NO.: 8 的信息:

- (i) 序列特征:
- (A) 长度: 30 碱基对
  - (B) 类型: 核酸
  - (C) 链型: 单
  - (D) 拓扑学: 线性
- 25 (ii) 分子类型: 其它核酸
- (A) 描述 /desc = “引物”
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO.: 8:

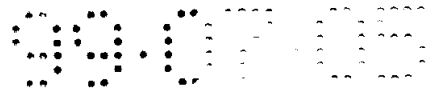
30

**TCCCCTGAAA CTTGGTTTCC ACCAGATGAG**

(2) SEQ ID NO.: 9 的信息:

- (i) 序列特征:
- (A) 长度: 21 碱基对
  - (B) 类型: 核酸
  - (C) 链型: 单
  - (D) 拓扑学: 线性
- 35 (ii) 分子类型: cDNA
- 40 (xi) 序列描述: SEQ ID NO.: 9:





GTTGAGACTC CATCATCAAG G

(2) SEQ ID NO.: 10 的信息:

- 5 (i) 序列特征:
- (A) 长度: 21 碱基对
  - (B) 类型: 核酸
  - (C) 链型: 单
  - (D) 拓扑学: 线性
- 10 (ii) 分子类型: cDNA
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO.: 10:

TCTGGCTGGG AACTAGAGAA C

15