

[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

[21] 申请号 03822151.9

C12Q 1/48

C12P 21/06

C12N 1/20

C12N 5/00

C07H 21/04

[43] 公开日 2005 年 10 月 12 日

[11] 公开号 CN 1681939A

[22] 申请日 2003.9.8 [21] 申请号 03822151.9

[30] 优先权

[32] 2002.9.19 [33] US [31] 60/412,078

[86] 国际申请 PCT/IB2003/003968 2003.9.8

[87] 国际公布 WO2004/027018 英 2004.4.1

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.18

[71] 申请人 辉瑞产品公司

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 沃尔特·G·罗伯茨

帕梅拉·M·惠伦

伊桑·J·T·昂

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 19 页 序列表 22 页  
附图 3 页

[54] 发明名称 可诱导的粘着斑激酶细胞试验

[57] 摘要

本发明以细胞为基础的试验利用可诱导的基因表达系统和 FAK 生物学，外源地控制 FAK 表达和在位点 397 的酪氨酸残基(Y<sup>397</sup>)的 FAK 磷酸化。本发明的以细胞为基础的试验是灵活的，它可测定在 Y397 位点的 FAK 磷酸化，全部 FAK 磷酸化，鉴定突变的 FAK 蛋白并测定蛋白和磷酸酪氨酸的组合。

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

1. 鉴定粘着斑激酶(FAK)的细胞-活性抑制剂的方法, 包括:
  - (a) 在哺乳动物细胞中加入诱导剂以诱导编码 FAK 的基因的表达, 其中所述哺乳动物细胞被所述基因稳定转染, 且所述基因在所述诱导剂存在时表达;
  - (b) 加入被测化合物;
  - (c) 利用 FAK 捕捉剂捕捉所表达的 FAK; 并
  - (d) 检测所述 FAK 的磷酸化。
- 10 2. 权利要求 1 所述的方法, 其中将所述哺乳动物细胞包被在第一固相上, 且其中通过将磷酸化的 FAK 与抗-磷酸-酪氨酸抗体接触并检测所述抗体的存在, 来检测 FAK 的磷酸化。
  3. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述 FAK 捕捉剂包括一种或多种类型的抗体。
- 15 4. 权利要求 3 所述的方法, 其中所述一种或多种类型的抗体包括抗磷酸-酪氨酸抗体。
  5. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述磷酸化与抗磷酸-酪氨酸抗体对所捕获的 FAK 的结合成比例。
  6. 权利要求 2 所述的方法, 其中所述细胞与第一固相天然附着, 且其中所述的细胞在捕捉表达的 FAK 之前用裂解缓冲液裂解。
- 20 7. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述诱导剂是编码 FAK 的基因的表达的激动剂。
  8. 权利要求 1 所述的方法, 其中所述被测化合物抑制 FAK 的激酶依赖性磷酸化。
- 25 9. 测定被测化合物细胞毒性的方法, 包括:
  - (a) 用编码 FAK 的基因稳定转染哺乳动物细胞, 其中所述基因在诱导剂存在时表达;
  - (b) 加入诱导剂来诱导所述编码 FAK 的基因表达;
  - (c) 加入被测化合物;
  - 30 (d) 将细胞毒性指示剂加至所述细胞; 并,
  - (e) 检测所述被测化合物的细胞毒性。

10. 用重组的核酸分子稳定转染的哺乳动物细胞,该重组的核酸分子编码包含选自 SEQ ID NO: 1, 2, 3 和 4 的序列的蛋白,其中所述蛋白的表达需要诱导剂的存在。

5 11. 用重组的核酸稳定转染的哺乳动物细胞,其可诱导性表达 FAK 蛋白。

12. 权利要求 11 所述的哺乳动物细胞,其中所述核酸编码选自下述的蛋白:人 FAK 剪接变体,人 FAK 催化域,大鼠 FAK,小鼠 FAK 和鸡 FAK。

10 13. 用重组的核酸分子稳定转染的哺乳动物细胞,其包含选自 SEQ ID NO: 5, 6, 7 和 8 的多核苷酸,且其中所述多核苷酸的表达需要诱导剂的存在。

14. 鉴定粘着斑激酶(FAK)的细胞-活性抑制剂的方法,包括下列步骤:

- (a) 用一群均一的哺乳动物细胞包被第一固相,使细胞粘附到第一固相上,其中所述细胞被编码 FAK 的基因稳定转染,且其中所述基因在诱导剂存在时表达;
- 15 (b) 加入诱导剂来诱导所述编码 FAK 的基因表达;
- (c) 加入被测化合物;
- (d) 溶解所述粘附的细胞来释放细胞裂解物;
- (e) 用 FAK 捕捉剂包被第二固相,使 FAK 捕捉剂附着到该第二固相上;
- (f) 使所述细胞裂解物与附着的 FAK 捕捉剂接触,从而让 FAK 捕捉剂
- 20 捕捉 FAK;
- (g) 使捕捉的 FAK 暴露于抗磷酸-酪氨酸抗体,并,
- (h) 检测抗磷酸-酪氨酸抗体与捕捉的 FAK 的结合,其中结合捕捉的 FAK 的抗磷酸-酪氨酸抗体量与所述 FAK 的磷酸化量成比例。

## 可诱导的粘着斑激酶细胞试验

5 发明背景

本发明涉及用于诱导粘着斑激酶(FAK)基因表达的方法和组合物,该粘着斑激酶(FAK)基因编码参与生长因子应答和细胞迁移的信号蛋白,并且还

与疾病相关。本发明还涉及FAK抑制剂的鉴定。

FAK是一种胞质非受体酪氨酸激酶。FAK转导来自不同种类的刺激(如

10 整合蛋白、细胞因子、趋化因子和生长因子)的信号,来控制包括细胞增殖、迁移、形态和细胞存活在内的多种细胞通路和过程。除了在多数组织类型表达外,已发现FAK在大多数人类癌症,尤其在高度侵袭性转移中水平升高。已证明人肿瘤细胞中显性失活的(dominant-negative)FAK相关非激酶(FRNK)的表达导致细胞成圆形,粘着斑不可逆丧失以及随后的细胞死亡。

15 此外,FRNK的可控表达使FAK的酪氨酸磷酸化减少,说明FAK磷酸化的抑制能产生治疗人类癌症的治疗指数。

虽然导致FAK活化的确切机制并不十分清楚,但认为导致Y397(位于

397位点的酪氨酸残基)磷酸化的FAK酶活性在整合蛋白信号转导中是关键

步骤(Guan,JL, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 29: 1085-96, 1997)。对于将胞外

20 基质(ECM)蛋白与细胞肌动蛋白细胞骨架和细胞核连接,从而调节细胞形态、组织结构和粘附介导的基因表达来说,跨膜整合蛋白受体是很重要的。整合蛋白受体和FAK同位于粘着斑位点将会导致FAK在Y397残基磷酸化,产生一个Src家族酪氨酸激酶的SH2停靠位点。Src与磷酸酪氨酸FAKY397的结合导致FAK在不同下游酪氨酸残基处,包括Y576、Y577、Y861和

25 Y925优先被磷酸化。FAK酪氨酸残基(Y576/Y577)的磷酸化使得FAK激酶活性增强,并转导信号来调节细胞骨架重组、细胞繁殖、细胞存活和细胞迁移。

由于参与整合蛋白信号级联的激酶和底物的多样性,需要设计对特定

激酶特异的试验。本发明的目的是设计并开发一种FAK药物发现途径,该

30 途径追踪FAK的生物化学机理。若干外源性刺激都能导致FAK磷酸化,如

1)整合蛋白与ECM配体结合(例如,整合蛋白 $\beta$ 1与纤连蛋白结合); 2)细胞

因子或趋化因子刺激(例如, 内皮素 1/2、铃蟾肽或 PMA); 3)酪氨酸激酶受体的生长因子刺激(例如, PDGFBB); 和 4)整合蛋白抗体交联(例如, 抗- $\beta$  1)。相反, 使 FAK 失活的最可行的外源性控制就是阻断细胞-细胞和细胞-ECM 的接触(例如, 细胞悬浮)。

5

### 发明概述

本发明涉及鉴定粘着斑激酶(FAK)的细胞-活性(cell-active)抑制剂的方法, 包括:

10 (a) 在哺乳动物细胞中加入诱导剂诱导编码 FAK 的基因表达, 其中所述哺乳动物细胞被所述基因稳定转染, 且所述基因在所述诱导剂存在时表达;

(b) 加入被测化合物;

(c) 利用 FAK 捕捉剂(capture agent)捕捉表达的 FAK; 并

(d) 检测所述 FAK 的磷酸化。

15 本发明的实施方式提供了一种测定被测化合物的细胞毒性的方法, 包括: 用编码 FAK 的基因稳定转染哺乳动物细胞, 其中所述基因在诱导剂存在时表达; 加入诱导剂诱导所述编码 FAK 的基因表达; 加入被测化合物; 将细胞毒性指示剂加至所述细胞; 并, 检测所述被测化合物的细胞毒性。在某些实施方式中, 通过细胞毒性指示剂的比色转化来确定被测化合物的  
20 细胞毒性, 其中细胞毒性指示剂的转化量与活细胞数成正比。

本发明的实施方式提供了一种用重组的核酸分子稳定转染的哺乳动物细胞, 其中所述重组的核酸分子选自 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8, 其中所述序列的表达需要诱导剂的存在。

25 本发明的实施方式提供了一种用重组的核酸分子稳定转染的哺乳动物细胞, 该重组的核酸分子编码含有选自 SEQ ID NO: 1、2、3 和 4 的序列的蛋白, 其中所述蛋白的表达需要诱导剂的存在。

### 附图说明

30 图 1 显示了利用辣根过氧化物酶-偶联的磷酸酪氨酸抗体(pY54<sup>HRP</sup>)检测磷酸化的 FAK 的示意图。

图 2 显示了利用未偶联的磷酸酪氨酸抗体(pY54), 之后使用鼠的辣根

过氧化物酶的第二抗体来检测磷酸化的 FAK 的示意图。

图 3 显示了本发明的 FAK 可诱导性以细胞为基础的试验的示意图。

### 发明详述

5 本发明涉及 FAK 可诱导性以细胞为基础的试验。所述以细胞为基础的试验利用了 FAK 的生物学和可诱导的基因表达系统，从而外源地控制 FAK 表达和在 397 位点处酪氨酸残基(Y397)的 FAK 磷酸化。通过利用 FAK<sup>Y397</sup>磷酸化-特异性的以细胞为基础的试验，而不是通常的磷酸酪氨酸系统，可以避免鉴定出假阳性抑制剂。本发明以细胞为基础的试验是灵活的，它能  
10 测定 Y397 位的 FAK 磷酸化、全部 FAK 磷酸化，鉴定突变的 FAK 蛋白并测定蛋白与磷酸酪氨酸的组合。

本发明 FAK 可诱导性以细胞为基础的试验具有优势，因为它严格控制了 FAK 的异位基础水平的表达，并通过外源性刺激使 FAK 基因表达快速地去抑制(de-repression)。以细胞为基础的试验是灵活的，这样如磷酸酪氨酸  
15 FAK<sup>Y397</sup>、全部 FAK 磷酸酪氨酸分布图、FAK 或突变蛋白、或蛋白和磷酸酪氨酸的一些组合的测定，最终读数与 FAK 的生物学机械相关。此外，已将本发明成功地用于鉴定若干 FAK 抑制剂。如本文中所示，“严格控制”是指在外源性刺激存在时出现的 FAK 基因的可控表达。换句话说，本发明提供了一种可诱导 FAK 性基因表达系统，在该系统中，在合适的诱导剂存在条件下可诱导 FAK 表达。本发明提供了一种可诱导 FAK 表达的方法，其中调节表达 FAK 基因并不对细胞的生存力产生不利影响。  
20

本发明的实施方式涉及一种筛选 FAK 抑制剂的以细胞为基础的试验。以细胞为基础的试验利用了 FAK 的生物学和可诱导的基因表达系统，从而外源性控制 FAK 表达以及在位点 397 处酪氨酸残基(Y397)的 FAK 磷酸化。  
25 所述以细胞为基础的试验与 FAK 的生物学机械地相关，并测定 FAK 磷酸化中的变化。通过使用 FAK<sup>Y397</sup>磷酸化-特异性的以细胞为基础的试验，而不是通常的磷酸酪氨酸系统，可避免鉴定出假阳性抑制剂。本发明的以细胞为基础的试验是灵活的，它能测定 FAK 磷酸化、全部 FAK 磷酸化，鉴定突变的 FAK 蛋白并测定蛋白与磷酸酪氨酸的组合。

30 本发明的实施方式提供了一种鉴定 FAK 的细胞-活性抑制剂的方法，包括：用编码 FAK 的基因稳定转染哺乳动物细胞，其中所述基因在诱导剂存

在时表达；加入诱导剂来诱导所述编码 FAK 的基因表达；加入被测化合物；利用 FAK 捕捉剂捕捉表达的 FAK；使捕捉的 FAK 暴露于抗-磷酸酪氨酸的抗体；并检测所述 FAK 的磷酸化。在一些实施方式中，所述 FAK 磷酸化的程度通过抗-磷酸-酪氨酸抗体与所捕捉 FAK 的结合来确定，其中结合所捕捉的 FAK 的抗-磷酸-酪氨酸抗体量与所述 FAK 的磷酸化量成比例。

在本发明的某些实施方式中，鉴定 FAK 的细胞-活性抑制剂的方法包括：将哺乳动物细胞包被在第一固相上的可选步骤。所述第一固相优选是第一微量滴定板的孔。在本发明的另一个实施方式中，在捕捉表达的 FAK 之前，用裂解缓冲液将包被在第一固相上的细胞裂解。所述裂解缓冲液可选包含可溶性去污剂。在某些实施方式中，FAK 捕捉剂被包被在第二固相上，该第二固相优选是第二微量滴定板的孔。

在某些实施方式中，被测化合物含抑制 Y397 处的 FAK 磷酸化。

本发明的实施方式提供了一种测定被测化合物细胞毒性的方法，包括：用编码 FAK 的基因稳定转染哺乳动物细胞，其中所述基因在诱导剂存在时表达；加入诱导剂来诱导所述编码 FAK 的基因的表达；加入被测化合物；将细胞毒性指示剂加至所述细胞；并，检测被测化合物的细胞毒性。在某些实施方式中，通过细胞毒性指示剂的比色转化来确定被测化合物的细胞毒性，其中细胞毒性指示剂的转化量与活细胞数成比例。

在本发明的某些实施方式中，测定被测化合物细胞毒性的方法包括：将哺乳动物细胞包被在固相上的可选步骤。该固相优选是第一微量滴定板的孔。

本发明的实施方式提供了一种鉴定粘着斑激酶(FAK)的细胞-活性抑制剂的方法，包括：在第一固相上包被一群均一的哺乳动物细胞，使细胞与第一固相粘附，其中所述细胞被编码 FAK 的基因稳定转染，且其中所述基因在诱导剂存在时表达；加入诱导剂来诱导所述编码 FAK 的基因表达；加入被测化合物；使粘附细胞溶解来释放细胞裂解物；用 FAK 捕捉剂包被第二固相，使所述 FAK 捕捉剂与第二固相附着；使细胞裂解物暴露于附着的 FAK 捕捉剂来使 FAK 捕捉剂捕捉 FAK；使捕捉的 FAK 暴露于抗-磷酸-酪氨酸的抗体；并，测定抗-磷酸-酪氨酸抗体与所捕捉的 FAK 的结合，其中与所捕捉的 FAK 结合的抗-磷酸-酪氨酸抗体量与所述 FAK 磷酸化的量成比例。

本发明的另一个实施方式提供了用重组的核酸分子稳定转染的哺乳动物细胞,其中所述重组的核酸分子选自 SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7 和 SEQ ID No: 8, 且其中所述序列的表达需要诱导剂的存在。

5 本发明的实施方式提供了用重组的核酸分子稳定转染的哺乳动物细胞, 该重组的核酸分子编码包含选自 SEQ ID No: 1, 2, 3 和 4 的序列的蛋白, 其中所述蛋白的表达需要诱导剂的存在。

FAK 还已知是蛋白-酪氨酸激酶 2, PTK2。任何活性 FAK 变体都能在上述测定中使用。还可在测定中使用无活性突变体作各种对照。可在上述测定中使用其他 FAK 变体, 包括: 具有 1052 个氨基酸(SEQ ID NO:1)的在 10 153012 的野生型(WT)人 FAK; FAK 接合变体, 如 Andre, E. &Becker-Andre, M. 脑中 N 末端截短形人粘着斑激酶的表达, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 140-147, 1993(描述了 AAA35819 的 879 个氨基酸的变体, PC1226 的 431 个氨基酸的变体和 PC1227 的 554 个氨基酸的变体)所描述; XP\_050337 的 FAK 的 570 催化域; NP\_032008.1 的小鼠 FAK, 它与人 FAK 15 有 1023/1053 个氨基酸的同一性(97%); AAH30180.1 的小鼠 FAK 羧基截短的变体, 它与人 FAK 的 1-903 氨基酸有 878/904 个氨基酸的同一性(97%); NP\_037213.1 的大鼠 FAK, 它与人 FAK 有 1020/1055 个氨基酸的同一性(96%); JC5494 的 FAK 变体, 它与人 FAK 有 1017/1055 个氨基酸的同一性(96%); Q00944 的鸡 FAK 变体, 它与人 FAK 有 988/1054 个氨基酸的同一性(93%); A45388 的鸡 FAK 变体, 它与人 FAK 有 965/1029 个氨基酸的同一性(93%); 合成的 FAK 突变体, 包括 FAK Y397F (SEQ ID NO: 2), K454R (SEQ ID NO: 3), FRNK(含有之前有启动子 MET 的 FAK 残基 694-1052 的氨基末端截短体)(SEQ ID NO: 4), 和各种磷酸化模拟物包括 FAK Y397D, Y397E, Y577D, Y577E, Y861D, Y861E, Y925D, Y925E 及其组合; CD2-FAK 25 融合体(构建的有活性的 FAK 和 CD2 的融合体), 如 Chan P 等 *J Biol. Chem.* (1994); 269 (32): 20567-74 所述。

在本文中, 术语“诱导剂”是一种产生至少 6 倍信噪比的介质(agent)、化合物或化学品。诱导剂的例子包括但不限于: 美服培酮(Mifepristone)(Ru486)和其他抗黄体酮, 如 Org31806 和 Org31376。参见 30 O'Malley 等, *Cell*, 69, 703-713. (1992)。在本文中, 术语捕捉剂是一种能捕捉任何形式粘着斑激酶的介质、化合物或化学品, 包括用组氨酸残基、



链霉抗生物素蛋白或其他有类似亲和性的标记来标记的 FAK。所述捕捉剂包括但不限于磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 特异性抗体、通常的磷酸酪氨酸抗体、抗 FAK 抗体、抗组氨酸标记抗体和能利于捕捉到抗生物素蛋白修饰的 FAK 的含有生物素的分子。在本发明的某些实施方式中，捕捉剂包括一种或多种

5 抗体的组合，包括但不限于山羊抗兔抗体和磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 特异性抗体的组合。

在本文中，术语“抗磷酸-酪氨酸抗体”包括但不限于磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 特异性抗体以及通常的磷酸酪氨酸抗体，其中后者能识别任何磷酸化的酪氨酸残基，包括但不限于在 FAK 位点 397 的酪氨酸残基。

10 在本文中，细胞毒性指示剂是用于评价细胞生存力的试剂、化学品或化合物。细胞毒性指示剂的例子包括但不限于尤其适合此种分析的四氮唑盐(例如 MTT、XTT、WST-1)。

MTT 是一种黄色四氮唑盐，它被代谢活性细胞切割为紫色甲臞(fornazan)晶体。利用 ELISA 读数器或其他分光光度计设备可以用分光光度法定量溶解的甲臞产品。如吸光度所测，活体量与形成的紫色甲臞晶体量

15 直接相关。

利用可诱导性 FAK 基因表达系统实施本发明的实施方式，该系统具有一致和紧密调节基因表达的能力。在本发明的实施方式中，提供了一种可诱导性 FAK 基因表达系统，其包括调节转基因即 FAK 表达的系统。当诱导剂不存在时，FAK 表达“关闭”，而当诱导剂存在时，FAK 表达“开启”。

20 该系统由两个基因组成：其中一个编码调节蛋白，另一个编码感兴趣的诱导转基因。表达所述调节蛋白由构建的启动子操纵。可诱导的 FAK 转基因含有启动子，该启动子由与能结合所述调节蛋白的结合位点的多拷贝连接的最小启动子组成。

25 在本发明的实施方式中，所述调节蛋白是转录因子，它由酵母 GAL4 DNA 结合区、截短的人黄体酮受体配体结合区和来自 NF- $\kappa$ B 的人 p65 活化区组成，利于在基础表达中紧密调节所述转基因。编码调节蛋白的质粒包含 GAL4 启动子，该启动子形成了正反馈环路(100p)来利于对配体处理产生迅速反应。利用小分子配体外源性控制调节蛋白的表达。通过所述调节蛋白与

30 所述转基因的启动子的物种选择性结合，并通过所述调节蛋白的配体依赖性构象活化来实现紧密调节。

因此，在某些实施方式中，发明具有以下优点：

- 利用可诱导系统在细胞中诱导 FAK，该系统在不被诱导时能紧密抑制基因表达，产生活细胞克隆。

- 可用磷酸化 FAK 的检测来鉴定 FAK 激酶活性的抑制剂。一些检测磷酸化 FAK 的方法包括：鉴定 FAK 抑制剂的基于聚丙烯酰胺凝胶电泳的分析和基于 ELISA 的分析。还可使用其他适合的检测系统。

- 试验可用于检测全部 FAK 蛋白，全部被磷酸化的 FAK 蛋白，或在给定酪氨酸处(例如，酪氨酸 397)被磷酸化的 FAK 蛋白。

- 可用以细胞为基础的系统体内筛选 FAK 抑制剂，由于被转染的细胞是致瘤性的，而且能通过给动物喂食美服培酮而在体内诱导 FAK。已经显示了此系统体内的效用。

#### 比较例

##### 比较例 1

为希望改善试验信号和噪音，在不同的细胞背景中，尝试产生稳定异位表达的 FAK 或 FAK 突变蛋白。但是，由于这些细胞大部分对 FAK 蛋白水平的变化显示了敏感性，而且从来不能形成开发以细胞为基础的试验的存活克隆，这些努力被证明是不成功的。表达从低到中等水平的内源 FAK 的细胞，如 NIH3T3 小鼠成纤维细胞或 A2058 人转移性黑色素瘤细胞耐受不多于两倍内源水平的 FAK 表达。这样，由于与前面描述的相似原因：刺激和再现性不良，高背景噪音和不益于药物发现，证明这些克隆并不适合试验开发。因此发现在含天然 FAK 的细胞中，FAK 的非诱导表达并不适合诱导 FAK 表达的研究。

##### 比较例 2

为了开发一种既有助于中通量和高通量筛选(ELISA 系统)，又能追踪 FAK 生物化学机理的以细胞为基础的 FAK 试验，已采取了大量措施来开发 FAK 生物。例如，通过在胞外基质蛋白(ECM)蛋白如纤连蛋白、或胶原蛋白，或其他 ECM 如 matrigel 上接种细胞，尝试模拟 FAK 的粘附细胞刺激，但该措施被证明并不有效，使 FAK 刺激不良而且完全由细胞类型决定。此外，通过 pY54<sup>HRP</sup>(辣根过氧化物酶(HRP)-偶联的磷酸酪氨酸抗体)检测测定 ECM-matrigel-诱导的细胞附着不会产生 FAK 磷酸化刺激，并且单独使用二级抗鼠<sup>HRP</sup>(2<sup>0</sup>M<sup>HRP</sup>)的对照检测使孔中的试验信号的非特异性增长，该孔中

5 孵育了来自在 matrigel 上刺激的细胞的裂解物。当使用 pY54<sup>HRP</sup> 和 2<sup>0</sup>M<sup>HRP</sup> 组合时, 信噪比(S/N)从 1.0 到 1.7, 而 pY54(未偶联磷酸酪氨酸抗体)和 2<sup>0</sup>M<sup>HRP</sup> 联合产生的信噪比为 1.0-2.4。这说明而且可以肯定, 试验信号的非特异性增长是由细胞裂解物中某些 matrigel 污染物的交叉反应性引起的。因此, 上述开发以细胞为基础的 FAK 试验的措施是不可行的。

10 结果还显示细胞附着 ECM matrigel 或纤连蛋白时, 微弱(modest)并且不太合适(suboptimal)的两倍至三倍的 FAK 磷酸化信噪比刺激。通过改变细胞数量、细胞-ECM 附着时间、检测和捕捉抗体的类型, 并利用内皮细胞素-1 和佛波醇 12-肉豆蔻酸 13-乙脂酸(PMA)的联合刺激对这些试验条件进行进一步优化, 显示这些 FAK 刺激的非可诱导法不可行, 不能再现而且不适合试验开发。

### 比较例 3

15 由于整合蛋白簇集使 FAK 磷酸化, 利用  $\beta 1$  整合蛋白特异性抗体对整合蛋白受体的抗体交联可行性进行了研究。但是, 因为 FAK 刺激的间接法导致高可变性和不可再现性, 这些努力也证明是不成功的。例如, 由于最佳刺激需要温度敏感性(temperature-sensitive)步骤, 该步骤消耗时间且难于管理, 整合蛋白  $\beta 1$  交联甚至对于高通量筛选来说都是非常繁琐的。另外, 由于 ECM 接触不良, 将细胞固定在聚苯乙烯平板上来降低背景噪音会使细胞生存力下降, 所以使得这些非诱导的表达系统不适合试验开发。

### 20 比较例 4

25 为了加快 FAK 的以细胞为基础的试验开发, 进行了产生稳定克隆的尝试, 这些克隆能在各种细胞背景中表达野生型或突变的 FAK 蛋白。产生的克隆含有 FAK cDNA 转录物, 该转录物编码组成型活性蛋白(CD2•FAK), 膜结合的酪氨酸-失效(dead)蛋白(CD2•FAK<sup>Y397F</sup>), 或失去关键下游酪氨酸残基的胞质 FAK 突变体(例如 FAK<sup>Y861F</sup>, FAK<sup>Y925F</sup> 和 FAK<sup>Y861F/Y925F</sup>)。在 FAK 生物学认识的基础上对这些生物工具进行有策略的设计, 以解决前面所描述的问题并开发有益于药物开发的强烈(robust)并可再现的以细胞为基础的试验。

30 即使获得了能表达载体构型或者 LacZ 蛋白的活的对照克隆, 尝试产生过表达 FAK<sup>WT</sup> 的稳定克隆也是不成功的。设计 FAK 突变体构型来切断下游 FAK 磷酸化而保留 Y397 位 FAK 磷酸化和激酶活性(FAK<sup>Y861F</sup>, FAK<sup>Y925F</sup> 和

FAK<sup>Y861F/Y925F</sup>), 或不再需要整合蛋白受体(CD2•FAK<sup>WT</sup> 和 CD2•FAK<sup>Y397F</sup>), 证明这些 FAK 突变体构型的转染都是不成功的。在表达低到中等水平的内源 FAK 如人转移性黑色素瘤 A2058 的细胞中鉴定活的克隆。但 A2058•FAK<sup>WT</sup> 克隆显示 FAK 水平只增加了约 2 倍, 这说明它不适合以细胞  
5 为基础的 FAK 试验开发。

除了进行外源性刺激, 控制基础 FAK 磷酸化, 并尝试异位表达 FAK 克隆之外, 使用 Tet-On/Tet-Off 可诱导系统用四环素控制 FAK<sup>WT</sup> 和酪氨酸-失效 FAK<sup>Y397F</sup> cDNA。但未检测到 FAK<sup>WT</sup> 或 FAK<sup>Y397F</sup> 转染子。由于未能鉴定到活克隆, 就不能确定在 FAK<sup>WT</sup> 或 FAK<sup>Y397F</sup> Tet-转染子中的“遗漏  
10 (leakiness)”, 即对基础表达调节不够的水平。Tet-On<sup>TM</sup>/Tet-Off<sup>TM</sup> 系统显示对靶蛋白表达的可变调控, 因此它不适合致死基因如 FAK 的调节。

#### 实施例

将野生型 FAK<sup>WT</sup> (SEQ ID NO: 5), 酪氨酸-失效 FAK<sup>Y397F</sup> (SEQ ID NO: 6), 激酶-失效 FAK<sup>K454R</sup> (SEQ ID NO: 7) 和显性失活的 FAK 相关非激酶(FRNK) (SEQ ID NO: 8) 作为 BamHI-Apal 或 KpnI-Apal 插入片段, 克隆到  
15 GeneSwitch<sup>TM</sup> pGeneV5/His A-载体骨架中去。如本文所用, 术语“基因编码的 FAK”包括但不限制到 SEQ ID NO: 1-4。这些构型以人 FAK 序列的公开 (GenBank 登录号 L13616) 为基础, 参见 Whitney, G. S. 等, DNA Cell Biol. 12 (9), 823-830 (1993), 而且每种构型都经测序确定, 并与公开序列比对。改造 DNA 结构来包括唯一且区别于现有技术的特异性 5'和 3'限制性位点。此外, 还改造某些构型的 3'末端来包括标记的表位如 V5 和组氨酸标记。

选择许多细胞系用于转染, 其包括 NIH Swiss Mouse 成纤维细胞 NIH3T3 (ATCC 登录号 CCL-92), 人表皮样癌 A431(ATCC 登录号 CRL1555) 和人恶性胶质瘤星形细胞瘤 U87MG(ATCC 登录号 HTB-14)。每种细胞系都  
25 显示了其适用于过表达 FAK 的独特特性。例如, NIH3T3 细胞使 FAK 种特异性过表达并且易于被转染, A431 细胞表达中等水平的内源 FAK 并提供更能代表 FAK 天然环境的肿瘤背景, U87MG 细胞缺少假定的 FAK 失活调节剂 PTEN(一种肿瘤抑制性磷酸酶(tumorsuppressor phosphatase))。利用 Stratagene 的 Gene Jammer<sup>TM</sup> 转染剂, 将 pSwitch 调节载体与 pGene<sup>Vector</sup>V5His, 或 pGeneFAK<sup>WT</sup>V5His, 或 pGeneFAK 突变体(pGeneFAK<sup>K454R</sup>V5His, 和 pGeneFAK<sup>Y397F</sup>V5His)共转染入 A431 细胞。相似地, 转化 NIH3T3 和 U87MG  
30

细胞来共表达 pSwitch 调节蛋白和感兴趣的特异性 pGene 构型。选出潮霉素和 Zeocin 抗性克隆，在培养基中增殖(extend)以通过 western 和 RT-PCR 分析进行筛选。将许多可诱导的克隆包括：A431:FAK<sup>WT</sup>V5His，A431:FAK<sup>Y397F</sup>V5His，A431:FAK<sup>K454R</sup>V5His，A431:载体，5 NIH3T3:FAK<sup>WT</sup>V5His，NIH3T3:FAK<sup>Y397F</sup>V5His，NIH3T3:载体，U87MG:FAK<sup>WT</sup>V5His 和 U87MG:FAK<sup>Y397F</sup>V5His 成功分离，选出，确定和证实。

本发明实施方式的 FAK 可诱导性试验测定了 Y397 位的 FAK 磷酸化。将 A431:FAK<sup>WT</sup>V5His 细胞(约  $1.0 \times 10^4$ - $1.0 \times 10^7$  个细胞)接种在 U 型底 96 孔板上，在用 0.1 nM 美服培酮过夜温育之前，在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 附着 4-6 小时。10 然后，将 A431:FAK<sup>WT</sup>V5His 诱导的细胞不经处理放置或者在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 用抑制化合物处理 30 分钟，并在 RIPA 裂解缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.4, 1% NP-40, 0.25% 脱氧胆酸钠, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM NaF 和每 50ml 溶液一粒(pellet)Complete<sup>TM</sup> 无 EDTA 蛋白酶抑制剂颗粒)15 中裂解。将约 45μg 的总蛋白(100μl)转移至用 0.35μg/孔抗 FAK 磷酸特异性 Y397 抗体包被的山羊抗兔平板，以捕捉和随后检测磷酸化的 FAK 蛋白(见图 3)。

在 T25 烧瓶中，接种 NIH3T3: FAK<sup>WT</sup>V5His 克隆和 NIH3T3: FAK<sup>Y397F</sup>V5His 克隆至汇合度约为 80%，不经处理放置或者在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 用 0.1 nM 美服培酮刺激约 16 小时。制备细胞裂解物，并用抗-FAK(UBI<sup>TM</sup>, Lake Placid, N.Y.)单克隆抗体免疫耗尽全部 FAK 蛋白。然后，对 FAK 免疫复合体进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，并用抗-FAK(A17)多克隆抗体进行免疫印迹。表 1 显示在放射自显影胶片以随机“band light”单位测定的光20 密度定量，和与未刺激细胞相比 FAK 蛋白水平的倍数变化。

25 表 1: 以光密度量测定的美服培酮诱导的 FAK 蛋白水平

克隆编号	FAKwt1		FAKwt 3		FAKwt 4		FAKwt 5	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Band Light	2.00E+06	1.00E+06	8.00E+05	5.00E+05	2.00E+0	5.00E+05	3.00E+06	5.00E+05
单位					6			
刺激倍数	2	1	2	1	4	1	6	1

观察到 FAK<sup>WT</sup> 可诱导细胞对美服培酮刺激反应强烈。

上述条件可以很容易地解释为 96 孔 ELISA 形式。表 2 显示了被诱导来表达 FAK<sup>WT</sup> 或 FAK<sup>Y397F</sup> 蛋白的 NIH3T3 克隆。捕捉 FAK<sup>WT</sup> 和 FAK<sup>Y397F</sup> 蛋白来测定由美服培酮诱导的全部 FAK 蛋白或磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397F</sup>。

5 表 2: 以光密度 450 测定得到的美服培酮诱导的 FAK 蛋白水平

	NIH3T3FAK wt		信(+)/噪 (-)比	NIH3T3FAK Y397F		信(+)/噪 (-)比	NIH3T3 载体		信(+)/噪 (-)比
	+	-		+	-		+	-	
美服培酮	+	-		+	-		+	-	
磷酸 FAKY397 捕获	1.69	0.23	7	0.1	0.12	1	0.08	0.04	2
FAK 蛋白 捕获	1.94	0.33	6	2.56	0.46	6	0.21	0.16	1

观察到 NIH3T3 克隆产生强烈的磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397F</sup>，并且 FAK 蛋白信噪比分别为 ~7 和 ~6。NIH3T3 酪氨酸失效克隆和载体 NIH3T3 转染子均证明试验对磷酸 FAKY397 的特异性。

10 表 3 显示在最优化条件下分析的 A431: FAK 克隆。

表 3: 以光密度 450 测定得到的美服培酮诱导的 FAK 蛋白水平

	A431:FAKwt		信(+)/噪 (-)比	A31:FAK Y397F		信(+)/噪 (-)比	A31:载体		信(+)/噪 (-)比
	+	-		+	-		+	-	
美服培酮	+	-		+	-		+	-	
磷酸 FAKY397 捕获	2.09	0.13	17	0.13	0.08	1.4	0.12	0.11	1.0
FAK 蛋白 捕获	2.22	0.21	11	2.31	0.22	11	0.19	0.17	1.0

在最优化条件下，所述 A431: FAK 克隆产生强烈的磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397F</sup>，并且 FAK 蛋白信噪比分别为 ~17 和 ~11。A431 酪氨酸失效克隆和载体 A431 转染子均证明试验对磷酸 FAKY397 的特异性。磷酸酪氨酸

15

Y397 和 FAK 蛋白的诱导通过改变试验条件来进行控制,如美服培酮温育时间,美服培酮浓度,细胞密度和抗体浓度。

在 A431 和其他细胞背景中,对 FAK 活化的机理进行了研究。将 A431: FAK<sup>WT</sup> 细胞不经处理放置或者用美服培酮刺激它。首先,洗脱实验(即,将  
5 用美服培酮刺激过夜(16 小时)的细胞随后在无美服培酮的新鲜生长培养基中培养一段时间)显示 FAK 蛋白和磷酸酪氨酸 Y397 水平呈时间依赖性降低。接着,分离美服培酮刺激的 A431: FAK<sup>WT</sup> 细胞,并使其悬浮在新鲜生长培养基中 15 分钟,然后,重新接种到用组织培养基处理的培养皿(Petri dish)  
10 light” 单位测定的光密度定量,和与未刺激对照相比 FAK 磷酸化的倍数变化。

表 4: 以光密度定量测定的 FAK 磷酸化

实验 A

A	A431FAKwt					
		4 小时	24 小时	48 小时	72 小时	
美服培酮	-	+	+	+	+	+
Band Light 单位	5.7534	57.832	77.375	71.033	27.719	92.834
与未诱导细胞相比的 倍数增长	1	10	13	12	5	16

15 实验 B

B	A431FAKwt					
		4 小时	24 小时	48 小时	72 小时	
美服培酮	-	+	+	+	+	+
Band light 单位	20723	44791	89444	65946	11473	82273
与未诱导细胞相比的 倍数增长	1	2	4	3	1	4

在实验 B 中，观察到比未处理细胞高 4 倍的微弱诱导。但是，在新鲜生长培养基中将刺激细胞悬浮 15 分钟之后与塑料附着 4 小时使得磷酸 FAK<sup>Y397</sup> 减少。另外，让悬浮的美服培酮-诱导的细胞再附着 24 小时，会使磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 再次活化，这说明 FAK 活化机制是完整的。与 FAK 蛋白水平的时间依赖性降低相一致，截止 72 小时，磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 降低至未经刺激的对照水平。

细胞悬浮导致 FAK 磷酸化失活。通过重新接种悬浮细胞来允许细胞附着可使 FAK 重新活化。表 4 说明在上述讨论的调节系统之下，FAK 活化机制是完整的。也就是说，美服培酮的外源性刺激导致机械相关的 FAK 活化。

10 本发明 FAK 可诱导性以细胞为基础的试验被成功地用于鉴定若干 FAK 抑制剂，包括 PP1 和星形孢菌素。此外，该试验被用于测定特定化合物对 FAK 表达细胞的细胞毒性。在这些实验中，使被测化合物与 FAK 诱导的细胞或未诱导的对照细胞接触。表 5 显示当用增加浓度的 FAK 抑制剂处理时，OD450 单位下的 FAK 磷酸化的变化。表 6 显示以放射自显影胶片的随机  
15 “band light” 单位测定的光密度定量，和 FAK 抑制剂浓度增加时 FAK 磷酸化的倍数变化。因此，本发明的试验可被方便用于 FAK 药物开发计划。

如图 3 所描述的，FAK 可诱导性以细胞为基础的试验可用于筛选 FAK 抑制剂。FAK 抑制剂的 10 $\mu$ m 曲线以如表 5 所示的 1/2 对数稀释进行。测定抑制百分比，并计算 50% (IC<sub>50</sub>) 时的抑制浓度。在 T25 烧瓶中接种 A431: FAK<sup>WT</sup> 细胞至密度为 ~80%，不经处理放置或者用 0.1nm 美服培酮刺激过夜。然后，用与表 5 相同的 FAK 抑制剂，以与 10 $\mu$ m 曲线相同的 1/2 对数浓度在 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 处理被刺激的细胞 30 分钟。然后制备细胞裂解产物并通过蛋白分析测定总蛋白浓度。使用磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 特异性抗体，通常的磷酸酪氨酸 pY20 抗体和抗 FAK(A17)抗体，对等量的完全蛋白进行  
25 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 western 分析，

表 5: 以光密度 450 量度得到的 FAK 磷酸化

	噪音	FAK 抑制剂+A431FAKwt					
		WT	10 $\mu$ M	3.3 $\mu$ M	1.1 $\mu$ M	0.37 $\mu$ M	0.12 $\mu$ M
美服培酮	-	+	+	+	+	+	+
磷酸 FAKY397	0.28	0.56	0.98	1.65	2.21	2.56	2.77



(OD450)							
减背景	0.000	0.28	0.70	1.37	1.93	2.28	2.49
%对照		11	28	55	78	92	100
%抑制		89%	72%	45%	22%	8%	0%

计算出的 FAK 抑制剂的 50%抑制浓度是  $\sim 0.93 \mu\text{M}$ 。

表 6 显示以放射自显影胶片的随机 “band light” 单位测定的光密度定量，和 FAK 抑制剂浓度增加时 FAK 磷酸化的倍数变化。这些实验进一步说明了本发明试验在 FAK 药物发现计划中的用途。

表 6: 以光密度定量测定的 FAK 磷酸化

A:	IB:抗 FAK(A17)						
	背景	FAK 抑制剂+A431FAKwt					
	WT	10 $\mu\text{M}$	3.3 $\mu\text{M}$	1.1 $\mu\text{M}$	0.37 $\mu\text{M}$	0.12 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$
美服培酮	-	+	+	+	+	+	+
BandLight 单位	30.501	119.6	100.2	108.3	128.1	90.087	82.4 14
减背景	0	89	70	78	98	60	52
%对照		172	134	150	188	115	100
%抑制		0%	0%	0%	0%	0%	0%

B:	IB:抗 FAKpY397						
	背景	FAK 抑制剂+A431FAKwt					
	WT	10 $\mu\text{M}$	3.3 $\mu\text{M}$	1.1 $\mu\text{M}$	0.37 $\mu\text{M}$	0.12 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$
美服培酮	-	+	+	+	+	+	+
BandLight 单位	0.34513	3.9238	10.44	20.21	45.27	64.56	68.022
减背景	0	4	10	20	45	64	68
%对照		5	15	29	66	95	100
%抑制		95%	85%	71%	34%	5%	0%

C:	IB:抗 pY20						
	背景	FAK 抑制剂+A431FAKwt					
	WT	10 $\mu$ M	3.3 $\mu$ M	1.1 $\mu$ M	0.37 $\mu$ M	0.12 $\mu$ M	0 $\mu$ M
美服培酮	-	+	+	+	+	+	+
Band light 单位	0.7577	5.2206	9.058	21.51	25.19	26.323	33.1 32
减背景	0	4	8	21	24	26	32
%对照		14	26	64	75	79	100
%抑制		86%	74%	36%	25%	21%	0

作为蛋白加样对照，实验 A 中的 FAK 蛋白量是相等的，而且与 FAK 抑制剂一起温育对 FAK 表达没有任何影响。在实验 B 中，与表 5 所报导的 IC<sub>50</sub> 相一致，抗 FAK-pY397 印迹显示估计的 IC<sub>50</sub> 值在 0.37-1.1 $\mu$ m 范围内，其中 50% 的浓度接近 1.1 $\mu$ m。如实验 C 所示，与 FAK 的生物学相似且一致，用抗 pY20 免疫印迹测定的全部 FAK 磷酸化被估计 IC<sub>50</sub> 范围在 1.1-3.3 $\mu$ m 的抑制剂所抑制，其中 50% 的抑制浓度较接近 3.3 $\mu$ m。

#### FAK 磷酸化的外源调控

10 通过在商购纤连蛋白(FN) 96 孔板或自制的 FN 96 孔板上每孔接种  $2.0 \times 10^5$  细胞获得 FAK 的 ECM 刺激。在 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 让细胞附着 15，30，60 或 90 分钟，从而诱导整合蛋白接合(engagement)和随后的 FAK 磷酸化。在 RIPA 裂解缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.4, 1% NP-40, 0.25% 脱氧胆酸钠, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM NaF 和每 50ml 溶液一粒

15 Complete<sup>TM</sup> 无 EDTA 蛋白酶抑制剂)中制备细胞裂解物，并转移至抗 FAK 包被的 96 孔板上以捕捉全部 FAK 蛋白。利用通常的磷酸酪氨酸抗体 Py54 测定磷酸酪氨酸 FAK 蛋白。相似地，在商购 matrigel 包被的平板上或自制的 matrigel 平板上刺激细胞。对于 western 分析，让细胞在商购的 ECM 包被的烧瓶或自制 ECM 包被的烧瓶上附着如上所示时间。在 RIPA 裂解缓冲液中

20 制备细胞裂解物，并利用抗 FAK 抗体或抗磷酸酪氨酸抗体沉降(pull-down)

或免疫检测全部和磷酸酪氨酸 FAK 蛋白。

在 96 孔板或 T25/T75 烧瓶上, 将细胞(如 A2058 人转移性黑素瘤)接种至生长培养基(DMEM 10% FBS, Pen/Strep/Glu)内, 并使其在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 粘附到组织培养基处理的塑料上约 5 小时。随后, 在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 使细胞在 0.1% FBS DMEM 饥饿培养基中饥饿过夜, 然后, 用(最多 100 μM 的)内皮细胞素 I, (最多 100 nM 的)铃蟾肽, 或(最多 800 nM 的)PMA 处理来刺激细胞。在 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 使细胞暴露于细胞因子从 10 分钟到长达 60 分钟不等。利用抗 FAK 特异性抗体, 以 ELISA 形式捕捉或免疫沉淀全部 FAK 蛋白。然后, 以 ELISA 或 Western 形式用通常的抗 FAK 磷酸酪氨酸抗体检测磷酸酪氨酸 FAK 蛋白。

在用不同浓度(200 μg/ml 原液浓度的 1:100, 1:330, 1:1000, 1:3,300 或 1:10,000)的 β 1 整合蛋白抗体(4°C, 30 分钟)培养饥饿细胞前, 将饥饿细胞(如 A2058)预冷藏在 4°C 30 分钟。在 4°C, 用 1: 500 稀释度的山羊抗鼠二抗诱导 β 1 整合蛋白簇集 30 分钟。然后, 在裂解缓冲液(10 mM Tris-HCl, 5 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2 mM 钒酸钠, 1% NP40, 蛋白酶抑制剂)中制备全细胞裂解物, 并利用抗 FAK 抗体使全部 FAK 蛋白免疫沉淀。利用抗磷酸酪氨酸抗体 Py54 测定磷酸酪氨酸 FAK 蛋白。

#### FAK<sup>WT</sup> 和 FAK 突变体(不可诱导性和 Tet-On<sup>TM</sup>/Tet-Off<sup>TM</sup> 系统)的克隆

在 RT-PCR 中, 利用引物 FAK5'Bam: GGATCCATGGCAGCTGCTT ACCTTGAC (SEQ ID NO: 9)和 FAK3'Bam: GGATCCTCACTCACTCAGTGT GGTCTCGTCTGCCCA (SEQ ID NO: 10)从 T 细胞 cDNA 文库中克隆全长 FAK<sup>WT</sup> cDNA, 并与登录号 L13616 对比确定序列。利用 Stratagene QuikChange<sup>TM</sup> 定点诱变试剂盒对 FAK<sup>WT</sup> 模板进行定点诱变。为了产生用于电穿孔入 Clontech 预先制备的 HeLa 或 HEK293 tet-On/tet-Off 细胞系的质粒, 将全长 FAK<sup>WT</sup>, 酪氨酸失效突变体(FAK<sup>Y397F</sup>)和激酶失效突变体(FAK<sup>K454R</sup>)cDNA 亚克隆入 pTRE:FLAG 载体的 BamHI 位点。制备下述构型, 并将其电穿孔入 HeLa Tet-Off, HeLa Tet-On, 或 293 Tet-On:pTRE:FLAG 载体, pTRE: FAK<sup>WT</sup>FLAG 和 pTRE:FAK<sup>Y397F</sup>FLAG。选出 G418 抗性克隆, 并在 DMEM+100 ug/ml G418 生长培养基中增殖。

#### FAK<sup>WT</sup> 和 FAK 突变体(GeneSwitch<sup>TM</sup> 系统)的克隆

在 RT-PCR 中, 利用上述引物从 T 细胞 cDNA 文库中克隆全长粘着斑

激酶(FAK<sup>WT</sup>)cDNA, 并与登录号 L13616 对比确认序列。利用 Stratagene QuikChange<sup>TM</sup> 定点诱变试剂盒对 FAK<sup>WT</sup> 模板进行定点诱变。将全长 FAK<sup>WT</sup>, 酪氨酸失活突变体(FAK<sup>Y397F</sup>)和激酶失活突变体(FAK<sup>K454R</sup>)cDNA 亚克隆入 pGeneV5/His-A 质粒的 BamHI-ApaI 位点。将显性失活的 FAK 相关性非激酶(FRNK)cDNA 作为 KpnI-ApaI 插入片段亚克隆入 pGeneV5/His A-载体盒内。通过 DNA 测序和限制性酶切分析确定这些质粒。接着, 利用 Stratagene 的 GeneJammer<sup>TM</sup> 转染试剂将这些构型与编码 GeneSwitch<sup>TM</sup> 蛋白的 pSwitch 构型共转染入 NIH3T3、A431 或 U87MG 细胞。转染子在掺有 750μg/ml Zeocin 和 50μg/ml 潮霉素抗生素的 DMEM 生长培养基(10% FBS, Pen/Strep/Glu)中生长并被选出。选出潮霉素和 Zeocin 抗性克隆, 并在培养基中增殖以用于在 Western 和 RT-PCR 中进行筛选。

#### A431•FAK 克隆的筛选

在 T25 烧瓶中, 接种 A431•FAK<sup>WT</sup> 和 A431•FAK<sup>Y397F</sup> 克隆至汇合度接近 80%, 未经处理放置或者用 0.1 nM 美服培酮配体处理过夜(~16 小时)。然后, 在 RIPA 裂解缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.4, 1% NP-40, 0.25% 脱氧胆酸钠, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM NaF 和每 50ml 溶液中一粒 Complete<sup>TM</sup> 无 EDTA 蛋白酶抑制剂)中裂解 A431 转染子, 并分析所述细胞裂解物的总蛋白浓度。利用标准 western 印迹技术, 用等量的总蛋白浓度对 FAK 或 FAK 突变体, 蛋白和磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 进行 western 免疫印迹分析。选出检测为阳性并表现出诱导比内源性 FAK 水平高至少 3 倍的克隆, 来最优化并开发 FAK 以细胞为基础的试验。

还通过 RT-PCR 对克隆进行筛选和确认。利用随机六聚物, 从 A431•FAK 野生型和突变克隆中分离并纯化胞质 mRNA 转录物用于 cDNA 合成。随后, 利用对 N 末端、内部 FAK 序列和 FAK C 末端特异的引物, 在衍生自 A431•FAK 转录物的 cDNA 文库进行聚合酶链式反应。也用对抗生素转录物 Zeocin 或潮霉素特异的引物和 GAPDH 扩增这些基因, 作为转染以及 cDNA 文库质量的内部对照。

#### FAK 可诱导性以细胞为基础的系统优化

在 T25 烧瓶中接种 A431•pGene<sup>Vector</sup>, A431•FAK<sup>WT</sup>, A431•FAK<sup>K454R</sup> 和 A431•FAK<sup>Y397F</sup> 克隆至汇合度接近 80%, 不经处理放置或者用 0.1, 10 或 100 nM 美服培酮配体处理过夜(~16 小时)。然后, 在 RIPA 裂解缓冲液(如上所

述)中裂解 A431 转染子, 并分析所述细胞裂解物的总蛋白浓度。利用标准的 western 印迹技术, 用等量的总蛋白浓度进行 FAK 或 FAK 突变体, 蛋白和磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 的 western 免疫印迹分析。为了确定最优化的美服培酮浓度从 western 格式被翻译为 ELISA 系统, 也在 ELISA 格式中最优化美服培酮浓度和培养时间。

在 96 孔 U 型底平板中, 以  $1.2 \times 10^6$  细胞/ml 的细胞密度接种 A431•pGene<sup>Vector</sup>, A431•FAK<sup>WT</sup> 和 A431•FAK<sup>Y397F</sup> 克隆。在用美服培酮配体诱导前, 将细胞置于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 6-8 小时。接着, A431 克隆不经处理放置或者在 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 用 0.1, 10, 100 或 1000nM 美服培酮处理 ~0.5, 1.0, 2.0, 4.0 或 24.0 小时。然后, 在 RIPA 裂解缓冲液中裂解细胞, 并将 100μl 细胞裂解物(45μg 总蛋白)转移至 96 孔板内。在分别用 FAK 特异性抗体或磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 抗体包被的山羊抗鼠或山羊抗兔平板上捕捉 FAK 或 FAK 突变蛋白和磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup>。为了捕捉 FAK 或 FAK 突变蛋白, 例如, 在用 100μl 细胞裂解物(45μg 总蛋白)孵育山羊抗鼠平板前, 将山羊抗鼠平板用 0.5μg/ml 抗 FAK(UBI)单克隆抗体包被。通过抗 FAK(A17)多克隆抗体测定捕获的 FAK 或 FAK 突变蛋白检测。相似地, 通过用 3.5μg/ml 抗 FAKp[Y397]多克隆抗体包被的山羊抗兔平板进行磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 蛋白的捕捉, 随后用抗 FAK(UBI)单克隆抗体进行检测。

可以最优化使用的特定高通量筛选系统的参数, 包括评价 96 孔板的类型(例如, 抗兔, 蛋白 A 或蛋白 G), 捕捉抗体浓度, 检测抗体浓度, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗浓度, 细胞密度, 封闭缓冲液(例如, SuperBlock Blocking TBS, 3%BSA 封闭)和化合物处理时间。

利用纯化的在 Y397 残基磷酸化的 GST•FAK 蛋白, 首先用浓度增加的抗 FAKp[Y397]磷酸特异性抗体包被的 96 孔抗兔平板来确定最优化的捕捉抗体浓度。制出捕获的磷酸特异性 GST•FAK<sup>Y397</sup> 对抗 FAKp[Y397]抗体浓度图表以确定最优化的捕捉抗体浓度。利用此初步抗 FAKp[Y397]捕捉浓度, 将其他参数(检测和二抗浓度, 细胞密度, 封闭缓冲液)最优化, 并格式化(formatted)用于高通量筛选(HTS)。这些参数大多数被优化, 或通过建立 96 孔矩阵或交叉比较大量变换(permutation)的信噪比变化进行同时评价。例如, 在用 3.5μg/ml 抗 FAKp[Y397]捕捉抗体包被的 96 孔抗兔平板上, 在 96 孔基质中建立浓度增加的检测和二抗<sup>HRP</sup>以检测捕捉的磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup>

蛋白，从而最优化这些抗体的浓度。可以在蛋白 A 平板上重复此实验和/或通过改变封闭缓冲液或其他参数来交叉比较大量变换的信噪比值，从而使系统最优化。

#### 确认 FAK 以细胞为基础的试验

- 5 在 T25 烧瓶中接种 A431•FAK<sup>WT</sup> 细胞至汇合度接近 80%，不经处理放置或者用 0.1 nM 美服培酮配体处理过夜(~16 小时)。在 37°C，5%CO<sub>2</sub>，用 10ml PBS 洗涤 A431•FAK<sup>WT</sup> 未诱导的和诱导的细胞并悬浮在 15ml 生长培养基(DMEM 10% FBS, Pen/Strep/Glu, 750µg/ml Zeocin, 50µg/ml 潮霉素)中 30, 60, 90 或 120 分钟。接着，在 RIPA 裂解缓冲液(如上所述)中裂解细胞
- 10 并分析所述细胞裂解物的总蛋白浓度。利用标准 western 印迹技术，用等量的总蛋白浓度进行 FAK 或磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 的 western 免疫印迹分析。

- 在 T25 烧瓶中接种 A431•FAK<sup>WT</sup> 和 A431•FAK<sup>Y397F</sup> 克隆至汇合度接近 80%，不经处理放置或者用 0.1 nM 美服培酮配体处理过夜(~16 小时)。接着，用浓度增加的 FAK 抑制剂(10µM 起始溶液的半对数稀释)处理 A431•
- 15 FAK<sup>WT</sup> 细胞，所述 FAK 抑制剂是用 FAK 可诱导性细胞为基础的试验鉴定的。然后，在 RIPA 裂解缓冲液中制备细胞裂解物，并分析总蛋白浓度。利用标准 western 印迹技术，用等量的总蛋白浓度进行 FAK，通常的磷酸酪氨酸 FAK 或磷酸酪氨酸 FAK<sup>Y397</sup> 蛋白的 western 免疫印迹分析。

<110> 辉瑞产品公司 (Pfizer Products Inc.)  
 Roberts, Walter Gregory  
 Ung, Ethan James Tekly  
 Whalen, Pamela Mathews

<120> 可诱导的粘着斑激酶细胞测试

<130> PC11699A

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1  
 <211> 1052  
 <212> PRT  
 <213> 人野生型 FAK (未包括 V5 表位和 His 标记)

<400> 1

Met Ala Ala Ala Tyr Leu Asp Pro Asn Leu Asn His Thr Pro Asn Ser  
 1 5 10 15

Ser Thr Lys Thr His Leu Gly Thr Gly Met Glu Arg Ser Pro Gly Ala  
 20 25 30

Met Glu Arg Val Leu Lys Val Phe His Tyr Phe Glu Ser Asn Ser Glu  
 35 40 45

Pro Thr Thr Trp Ala Ser Ile Ile Arg His Gly Asp Ala Thr Asp Val  
 50 55 60

Arg Gly Ile Ile Gln Lys Ile Val Asp Ser His Lys Val Lys His Val  
 65 70 75 80

Ala Cys Tyr Gly Phe Arg Leu Ser His Leu Arg Ser Glu Glu Val His  
 85 90 95

Trp Leu His Val Asp Met Gly Val Ser Ser Val Arg Glu Lys Tyr Glu  
 100 105 110

Leu Ala His Pro Pro Glu Glu Trp Lys Tyr Glu Leu Arg Ile Arg Tyr  
 115 120 125

Leu Pro Lys Gly Phe Leu Asn Gln Phe Thr Glu Asp Lys Pro Thr Leu  
 130 135 140

Asn Phe Phe Tyr Gln Gln Val Lys Ser Asp Tyr Met Leu Glu Ile Ala  
 145 150 155 160

Asp Gln Val Asp Gln Glu Ile Ala Leu Lys Leu Gly Cys Leu Glu Ile  
 165 170 175

Arg Arg Ser Tyr Trp Glu Met Arg Gly Asn Ala Leu Glu Lys Lys Ser  
 180 185 190

Asn Tyr Glu Val Leu Glu Lys Asp Val Gly Leu Lys Arg Phe Phe Pro  
 195 200 205

Lys Ser Leu Leu Asp Ser Val Lys Ala Lys Thr Leu Arg Lys Leu Ile  
 210 215 220

Gln Gln Thr Phe Arg Gln Phe Ala Asn Leu Asn Arg Glu Glu Ser Ile  
 225 230 235 240

Leu Lys Phe Phe Glu Ile Leu Ser Pro Val Tyr Arg Phe Asp Lys Glu  
 245 250 255

Cys Phe Lys Cys Ala Leu Gly Ser Ser Trp Ile Ile Ser Val Glu Leu  
 260 265 270

Ala Ile Gly Pro Glu Glu Gly Ile Ser Tyr Leu Thr Asp Lys Gly Cys  
 275 280 285

Asn Pro Thr His Leu Ala Asp Phe Thr Gln Val Gln Thr Ile Gln Tyr  
 290 295 300

Ser Asn Ser Glu Asp Lys Asp Arg Lys Gly Met Leu Gln Leu Lys Ile  
 305 310 315 320

Ala Gly Ala Pro Glu Pro Leu Thr Val Thr Ala Pro Ser Leu Thr Ile  
 325 330 335

Ala Glu Asn Met Ala Asp Leu Ile Asp Gly Tyr Cys Arg Leu Val Asn  
 340 345 350

Gly Thr Ser Gln Ser Phe Ile Ile Arg Pro Gln Lys Glu Gly Glu Arg  
 355 360 365

Ala Leu Pro Ser Ile Pro Lys Leu Ala Asn Ser Glu Lys Gln Gly Met  
 370 375 380

Arg Thr His Ala Val Ser Val Ser Glu Thr Asp Asp Tyr Ala Glu Ile  
 385 390 395 400

Ile Asp Glu Glu Asp Thr Tyr Thr Met Pro Ser Thr Arg Asp Tyr Glu  
 405 410 415



Ile Gln Arg Glu Arg Ile Glu Leu Gly Arg Cys Ile Gly Glu Gly Gln  
 420 425 430

Phe Gly Asp Val His Gln Gly Ile Tyr Met Ser Pro Glu Asn Pro Ala  
 435 440 445

Leu Ala Val Ala Ile Lys Thr Cys Lys Asn Cys Thr Ser Asp Ser Val  
 450 455 460

Arg Glu Lys Phe Leu Gln Glu Ala Leu Thr Met Arg Gln Phe Asp His  
 465 470 475 480

Pro His Ile Val Lys Leu Ile Gly Val Ile Thr Glu Asn Pro Val Trp  
 485 490 495

Ile Ile Met Glu Leu Cys Thr Leu Gly Glu Leu Arg Ser Phe Leu Gln  
 500 505 510

Val Arg Lys Tyr Ser Leu Asp Leu Ala Ser Leu Ile Leu Tyr Ala Tyr  
 515 520 525

Gln Leu Ser Thr Ala Leu Ala Tyr Leu Glu Ser Lys Arg Phe Val His  
 530 535 540

Arg Asp Ile Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Ser Ser Asn Asp Cys Val  
 545 550 555 560

Lys Leu Gly Asp Phe Gly Leu Ser Arg Tyr Met Glu Asp Ser Thr Tyr  
 565 570 575

Tyr Lys Ala Ser Lys Gly Lys Leu Pro Ile Lys Trp Met Ala Pro Glu  
 580 585 590

Ser Ile Asn Phe Arg Arg Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Met Phe  
 595 600 605

Gly Val Cys Met Trp Glu Ile Leu Met His Gly Val Lys Pro Phe Gln  
 610 615 620

Gly Val Lys Asn Asn Asp Val Ile Gly Arg Ile Glu Asn Gly Glu Arg  
 625 630 635 640

Leu Pro Met Pro Pro Asn Cys Pro Pro Thr Leu Tyr Ser Leu Met Thr  
 645 650 655

Lys Cys Trp Ala Tyr Asp Pro Ser Arg Arg Pro Arg Phe Thr Glu Leu

660	665	670
Lys Ala Gln Leu Ser Thr Ile Leu Glu Glu Glu Lys Ala Gln Gln Glu 675	680	685
Glu Arg Met Arg Met Glu Ser Arg Arg Gln Ala Thr Val Ser Trp Asp 690	695	700
Ser Gly Gly Ser Asp Glu Ala Pro Pro Lys Pro Ser Arg Pro Gly Tyr 705	710	715
Pro Ser Pro Arg Ser Ser Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Pro Gln His Met 725	730	735
Val Gln Thr Asn His Tyr Gln Val Ser Gly Tyr Pro Gly Ser His Gly 740	745	750
Ile Thr Ala Met Ala Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Gln Ala Ser Leu Leu 755	760	765
Asp Gln Thr Asp Ser Trp Asn His Arg Pro Gln Glu Ile Ala Met Trp 770	775	780
Gln Pro Asn Val Glu Asp Ser Thr Val Leu Asp Leu Arg Gly Ile Gly 785	790	795
Gln Val Leu Pro Thr His Leu Met Glu Glu Arg Leu Ile Arg Gln Gln 805	810	815
Gln Glu Met Glu Glu Asp Gln Arg Trp Leu Glu Lys Glu Glu Arg Phe 820	825	830
Leu Lys Pro Asp Val Arg Leu Ser Arg Gly Ser Ile Asp Arg Glu Asp 835	840	845
Gly Ser Leu Gln Gly Pro Ile Gly Asn Gln His Ile Tyr Gln Pro Val 850	855	860
Gly Lys Pro Asp Pro Ala Ala Pro Pro Lys Lys Pro Pro Arg Pro Gly 865	870	875
Ala Pro Gly His Leu Gly Ser Leu Ala Ser Leu Ser Ser Pro Ala Asp 885	890	895
Ser Tyr Asn Glu Gly Val Lys Leu Gln Pro Gln Glu Ile Ser Pro Pro 900	905	910

Pro Thr Ala Asn Leu Asp Arg Ser Asn Asp Lys Val Tyr Glu Asn Val  
 915 920 925

Thr Gly Leu Val Lys Ala Val Ile Glu Met Ser Ser Lys Ile Gln Pro  
 930 935 940

Ala Pro Pro Glu Glu Tyr Val Pro Met Val Lys Glu Val Gly Leu Ala  
 945 950 955 960

Leu Arg Thr Leu Leu Ala Thr Val Asp Glu Thr Ile Pro Leu Leu Pro  
 965 970 975

Ala Ser Thr His Arg Glu Ile Glu Met Ala Gln Lys Leu Leu Asn Ser  
 980 985 990

Asp Leu Gly Glu Leu Ile Asn Lys Met Lys Leu Ala Gln Gln Tyr Val  
 995 1000 1005

Met Thr Ser Leu Gln Gln Glu Tyr Lys Lys Gln Met Leu Thr Ala  
 1010 1015 1020

Ala His Ala Leu Ala Val Asp Ala Lys Asn Leu Leu Asp Val Ile  
 1025 1030 1035

Asp Gln Ala Arg Leu Lys Met Leu Gly Gln Thr Arg Pro His  
 1040 1045 1050

<210> 2

<211> 1052

<212> PRT

<213> 人 FAKY397F 突变体 (未包括 V5 表位和 His 标记)

<400> 2

Met Ala Ala Ala Tyr Leu Asp Pro Asn Leu Asn His Thr Pro Asn Ser  
 1 5 10 15

Ser Thr Lys Thr His Leu Gly Thr Gly Met Glu Arg Ser Pro Gly Ala  
 20 25 30

Met Glu Arg Val Leu Lys Val Phe His Tyr Phe Glu Ser Asn Ser Glu  
 35 40 45

Pro Thr Thr Trp Ala Ser Ile Ile Arg His Gly Asp Ala Thr Asp Val  
 50 55 60

Arg Gly Ile Ile Gln Lys Ile Val Asp Ser His Lys Val Lys His Val  
 65 70 75 80

Ala Cys Tyr Gly Phe Arg Leu Ser His Leu Arg Ser Glu Glu Val His  
85 90 95

Trp Leu His Val Asp Met Gly Val Ser Ser Val Arg Glu Lys Tyr Glu  
100 105 110

Leu Ala His Pro Pro Glu Glu Trp Lys Tyr Glu Leu Arg Ile Arg Tyr  
115 120 125

Leu Pro Lys Gly Phe Leu Asn Gln Phe Thr Glu Asp Lys Pro Thr Leu  
130 135 140

Asn Phe Phe Tyr Gln Gln Val Lys Ser Asp Tyr Met Leu Glu Ile Ala  
145 150 155 160

Asp Gln Val Asp Gln Glu Ile Ala Leu Lys Leu Gly Cys Leu Glu Ile  
165 170 175

Arg Arg Ser Tyr Trp Glu Met Arg Gly Asn Ala Leu Glu Lys Lys Ser  
180 185 190

Asn Tyr Glu Val Leu Glu Lys Asp Val Gly Leu Lys Arg Phe Phe Pro  
195 200 205

Lys Ser Leu Leu Asp Ser Val Lys Ala Lys Thr Leu Arg Lys Leu Ile  
210 215 220

Gln Gln Thr Phe Arg Gln Phe Ala Asn Leu Asn Arg Glu Glu Ser Ile  
225 230 235 240

Leu Lys Phe Phe Glu Ile Leu Ser Pro Val Tyr Arg Phe Asp Lys Glu  
245 250 255

Cys Phe Lys Cys Ala Leu Gly Ser Ser Trp Ile Ile Ser Val Glu Leu  
260 265 270

Ala Ile Gly Pro Glu Glu Gly Ile Ser Tyr Leu Thr Asp Lys Gly Cys  
275 280 285

Asn Pro Thr His Leu Ala Asp Phe Thr Gln Val Gln Thr Ile Gln Tyr  
290 295 300

Ser Asn Ser Glu Asp Lys Asp Arg Lys Gly Met Leu Gln Leu Lys Ile  
305 310 315 320

Ala Gly Ala Pro Glu Pro Leu Thr Val Thr Ala Pro Ser Leu Thr Ile

325					330					335					
Ala	Glu	Asn	Met	Ala	Asp	Leu	Ile	Asp	Gly	Tyr	Cys	Arg	Leu	Val	Asn
			340					345					350		
Gly	Thr	Ser	Gln	Ser	Phe	Ile	Ile	Arg	Pro	Gln	Lys	Glu	Gly	Glu	Arg
		355					360					365			
Ala	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Lys	Leu	Ala	Asn	Ser	Glu	Lys	Gln	Gly	Met
	370					375					380				
Arg	Thr	His	Ala	Val	Ser	Val	Ser	Glu	Thr	Asp	Asp	Phe	Ala	Glu	Ile
385					390					395					400
Ile	Asp	Glu	Glu	Asp	Thr	Tyr	Thr	Met	Pro	Ser	Thr	Arg	Asp	Tyr	Glu
				405					410					415	
Ile	Gln	Arg	Glu	Arg	Ile	Glu	Leu	Gly	Arg	Cys	Ile	Gly	Glu	Gly	Gln
			420					425					430		
Phe	Gly	Asp	Val	His	Gln	Gly	Ile	Tyr	Met	Ser	Pro	Glu	Asn	Pro	Ala
		435					440					445			
Leu	Ala	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Cys	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Asp	Ser	Val
	450					455					460				
Arg	Glu	Lys	Phe	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Thr	Met	Arg	Gln	Phe	Asp	His
465					470					475					480
Pro	His	Ile	Val	Lys	Leu	Ile	Gly	Val	Ile	Thr	Glu	Asn	Pro	Val	Trp
				485					490					495	
Ile	Ile	Met	Glu	Leu	Cys	Thr	Leu	Gly	Glu	Leu	Arg	Ser	Phe	Leu	Gln
			500					505					510		
Val	Arg	Lys	Tyr	Ser	Leu	Asp	Leu	Ala	Ser	Leu	Ile	Leu	Tyr	Ala	Tyr
		515					520					525			
Gln	Leu	Ser	Thr	Ala	Leu	Ala	Tyr	Leu	Glu	Ser	Lys	Arg	Phe	Val	His
	530					535					540				
Arg	Asp	Ile	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Ser	Ser	Asn	Asp	Cys	Val
545					550					555					560
Lys	Leu	Gly	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Arg	Tyr	Met	Glu	Asp	Ser	Thr	Tyr
				565					570					575	

Tyr Lys Ala Ser Lys Gly Lys Leu Pro Ile Lys Trp Met Ala Pro Glu  
580 585 590

Ser Ile Asn Phe Arg Arg Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Met Phe  
595 600 605

Gly Val Cys Met Trp Glu Ile Leu Met His Gly Val Lys Pro Phe Gln  
610 615 620

Gly Val Lys Asn Asn Asp Val Ile Gly Arg Ile Glu Asn Gly Glu Arg  
625 630 635 640

Leu Pro Met Pro Pro Asn Cys Pro Pro Thr Leu Tyr Ser Leu Met Thr  
645 650 655

Lys Cys Trp Ala Tyr Asp Pro Ser Arg Arg Pro Arg Phe Thr Glu Leu  
660 665 670

Lys Ala Gln Leu Ser Thr Ile Leu Glu Glu Glu Lys Ala Gln Gln Glu  
675 680 685

Glu Arg Met Arg Met Glu Ser Arg Arg Gln Ala Thr Val Ser Trp Asp  
690 695 700

Ser Gly Gly Ser Asp Glu Ala Pro Pro Lys Pro Ser Arg Pro Gly Tyr  
705 710 715 720

Pro Ser Pro Arg Ser Ser Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Pro Gln His Met  
725 730 735

Val Gln Thr Asn His Tyr Gln Val Ser Gly Tyr Pro Gly Ser His Gly  
740 745 750

Ile Thr Ala Met Ala Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Gln Ala Ser Leu Leu  
755 760 765

Asp Gln Thr Asp Ser Trp Asn His Arg Pro Gln Glu Ile Ala Met Trp  
770 775 780

Gln Pro Asn Val Glu Asp Ser Thr Val Leu Asp Leu Arg Gly Ile Gly  
785 790 795 800

Gln Val Leu Pro Thr His Leu Met Glu Glu Arg Leu Ile Arg Gln Gln  
805 810 815

Gln Glu Met Glu Glu Asp Gln Arg Trp Leu Glu Lys Glu Glu Arg Phe  
820 825 830

Leu Lys Pro Asp Val Arg Leu Ser Arg Gly Ser Ile Asp Arg Glu Asp  
           835                          840                          845

Gly Ser Leu Gln Gly Pro Ile Gly Asn Gln His Ile Tyr Gln Pro Val  
           850                          855                          860

Gly Lys Pro Asp Pro Ala Ala Pro Pro Lys Lys Pro Pro Arg Pro Gly  
           865                          870                          875                          880

Ala Pro Gly His Leu Gly Ser Leu Ala Ser Leu Ser Ser Pro Ala Asp  
                           885                          890                          895

Ser Tyr Asn Glu Gly Val Lys Leu Gln Pro Gln Glu Ile Ser Pro Pro  
                           900                          905                          910

Pro Thr Ala Asn Leu Asp Arg Ser Asn Asp Lys Val Tyr Glu Asn Val  
           915                          920                          925

Thr Gly Leu Val Lys Ala Val Ile Glu Met Ser Ser Lys Ile Gln Pro  
           930                          935                          940

Ala Pro Pro Glu Glu Tyr Val Pro Met Val Lys Glu Val Gly Leu Ala  
           945                          950                          955                          960

Leu Arg Thr Leu Leu Ala Thr Val Asp Glu Thr Ile Pro Leu Leu Pro  
                           965                          970                          975

Ala Ser Thr His Arg Glu Ile Glu Met Ala Gln Lys Leu Leu Asn Ser  
                           980                          985                          990

Asp Leu Gly Glu Leu Ile Asn Lys Met Lys Leu Ala Gln Gln Tyr Val  
           995                          1000                          1005

Met Thr Ser Leu Gln Gln Glu Tyr Lys Lys Gln Met Leu Thr Ala  
           1010                          1015                          1020

Ala His Ala Leu Ala Val Asp Ala Lys Asn Leu Leu Asp Val Ile  
           1025                          1030                          1035

Asp Gln Ala Arg Leu Lys Met Leu Gly Gln Thr Arg Pro His  
           1040                          1045                          1050

<210> 3

<211> 1052

<212> PRT

<213> 人 FAK K454R 突变体 (未包括 V5 表位和 His 标记)

&lt;400&gt; 3

Met Ala Ala Ala Tyr Leu Asp Pro Asn Leu Asn His Thr Pro Asn Ser  
1 5 10 15

Ser Thr Lys Thr His Leu Gly Thr Gly Met Glu Arg Ser Pro Gly Ala  
20 25 30

Met Glu Arg Val Leu Lys Val Phe His Tyr Phe Glu Ser Asn Ser Glu  
35 40 45

Pro Thr Thr Trp Ala Ser Ile Ile Arg His Gly Asp Ala Thr Asp Val  
50 55 60

Arg Gly Ile Ile Gln Lys Ile Val Asp Ser His Lys Val Lys His Val  
65 70 75 80

Ala Cys Tyr Gly Phe Arg Leu Ser His Leu Arg Ser Glu Glu Val His  
85 90 95

Trp Leu His Val Asp Met Gly Val Ser Ser Val Arg Glu Lys Tyr Glu  
100 105 110

Leu Ala His Pro Pro Glu Glu Trp Lys Tyr Glu Leu Arg Ile Arg Tyr  
115 120 125

Leu Pro Lys Gly Phe Leu Asn Gln Phe Thr Glu Asp Lys Pro Thr Leu  
130 135 140

Asn Phe Phe Tyr Gln Gln Val Lys Ser Asp Tyr Met Leu Glu Ile Ala  
145 150 155 160

Asp Gln Val Asp Gln Glu Ile Ala Leu Lys Leu Gly Cys Leu Glu Ile  
165 170 175

Arg Arg Ser Tyr Trp Glu Met Arg Gly Asn Ala Leu Glu Lys Lys Ser  
180 185 190

Asn Tyr Glu Val Leu Glu Lys Asp Val Gly Leu Lys Arg Phe Phe Pro  
195 200 205

Lys Ser Leu Leu Asp Ser Val Lys Ala Lys Thr Leu Arg Lys Leu Ile  
210 215 220

Gln Gln Thr Phe Arg Gln Phe Ala Asn Leu Asn Arg Glu Glu Ser Ile  
225 230 235 240

Leu Lys Phe Phe Glu Ile Leu Ser Pro Val Tyr Arg Phe Asp Lys Glu



245				250				255							
Cys	Phe	Lys	Cys	Ala	Leu	Gly	Ser	Ser	Trp	Ile	Ile	Ser	Val	Glu	Leu
			260					265					270		
Ala	Ile	Gly	Pro	Glu	Glu	Gly	Ile	Ser	Tyr	Leu	Thr	Asp	Lys	Gly	Cys
		275					280					285			
Asn	Pro	Thr	His	Leu	Ala	Asp	Phe	Thr	Gln	Val	Gln	Thr	Ile	Gln	Tyr
	290					295					300				
Ser	Asn	Ser	Glu	Asp	Lys	Asp	Arg	Lys	Gly	Met	Leu	Gln	Leu	Lys	Ile
305					310					315					320
Ala	Gly	Ala	Pro	Glu	Pro	Leu	Thr	Val	Thr	Ala	Pro	Ser	Leu	Thr	Ile
				325					330					335	
Ala	Glu	Asn	Met	Ala	Asp	Leu	Ile	Asp	Gly	Tyr	Cys	Arg	Leu	Val	Asn
			340					345					350		
Gly	Thr	Ser	Gln	Ser	Phe	Ile	Ile	Arg	Pro	Gln	Lys	Glu	Gly	Glu	Arg
		355					360					365			
Ala	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Lys	Leu	Ala	Asn	Ser	Glu	Lys	Gln	Gly	Met
	370					375					380				
Arg	Thr	His	Ala	Val	Ser	Val	Ser	Glu	Thr	Asp	Asp	Tyr	Ala	Glu	Ile
385					390					395					400
Ile	Asp	Glu	Glu	Asp	Thr	Tyr	Thr	Met	Pro	Ser	Thr	Arg	Asp	Tyr	Glu
				405					410					415	
Ile	Gln	Arg	Glu	Arg	Ile	Glu	Leu	Gly	Arg	Cys	Ile	Gly	Glu	Gly	Gln
			420					425					430		
Phe	Gly	Asp	Val	His	Gln	Gly	Ile	Tyr	Met	Ser	Pro	Glu	Asn	Pro	Ala
		435					440					445			
Leu	Ala	Val	Ala	Ile	Arg	Thr	Cys	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Asp	Ser	Val
	450					455					460				
Arg	Glu	Lys	Phe	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Thr	Met	Arg	Gln	Phe	Asp	His
465					470					475					480
Pro	His	Ile	Val	Lys	Leu	Ile	Gly	Val	Ile	Thr	Glu	Asn	Pro	Val	Trp
				485					490					495	

Ile Ile Met Glu Leu Cys Thr Leu Gly Glu Leu Arg Ser Phe Leu Gln  
 500 505 510  
 Val Arg Lys Tyr Ser Leu Asp Leu Ala Ser Leu Ile Leu Tyr Ala Tyr  
 515 520 525  
 Gln Leu Ser Thr Ala Leu Ala Tyr Leu Glu Ser Lys Arg Phe Val His  
 530 535 540  
 Arg Asp Ile Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Ser Ser Asn Asp Cys Val  
 545 550 555 560  
 Lys Leu Gly Asp Phe Gly Leu Ser Arg Tyr Met Glu Asp Ser Thr Tyr  
 565 570 575  
 Tyr Lys Ala Ser Lys Gly Lys Leu Pro Ile Lys Trp Met Ala Pro Glu  
 580 585 590  
 Ser Ile Asn Phe Arg Arg Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Met Phe  
 595 600 605  
 Gly Val Cys Met Trp Glu Ile Leu Met His Gly Val Lys Pro Phe Gln  
 610 615 620  
 Gly Val Lys Asn Asn Asp Val Ile Gly Arg Ile Glu Asn Gly Glu Arg  
 625 630 635 640  
 Leu Pro Met Pro Pro Asn Cys Pro Pro Thr Leu Tyr Ser Leu Met Thr  
 645 650 655  
 Lys Cys Trp Ala Tyr Asp Pro Ser Arg Arg Pro Arg Phe Thr Glu Leu  
 660 665 670  
 Lys Ala Gln Leu Ser Thr Ile Leu Glu Glu Glu Lys Ala Gln Gln Glu  
 675 680 685  
 Glu Arg Met Arg Met Glu Ser Arg Arg Gln Ala Thr Val Ser Trp Asp  
 690 695 700  
 Ser Gly Gly Ser Asp Glu Ala Pro Pro Lys Pro Ser Arg Pro Gly Tyr  
 705 710 715 720  
 Pro Ser Pro Arg Ser Ser Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Pro Gln His Met  
 725 730 735  
 Val Gln Thr Asn His Tyr Gln Val Ser Gly Tyr Pro Gly Ser His Gly  
 740 745 750

Ile Thr Ala Met Ala Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Gln Ala Ser Leu Leu  
 755 760 765

Asp Gln Thr Asp Ser Trp Asn His Arg Pro Gln Glu Ile Ala Met Trp  
 770 775 780

Gln Pro Asn Val Glu Asp Ser Thr Val Leu Asp Leu Arg Gly Ile Gly  
 785 790 795 800

Gln Val Leu Pro Thr His Leu Met Glu Glu Arg Leu Ile Arg Gln Gln  
 805 810 815

Gln Glu Met Glu Glu Asp Gln Arg Trp Leu Glu Lys Glu Glu Arg Phe  
 820 825 830

Leu Lys Pro Asp Val Arg Leu Ser Arg Gly Ser Ile Asp Arg Glu Asp  
 835 840 845

Gly Ser Leu Gln Gly Pro Ile Gly Asn Gln His Ile Tyr Gln Pro Val  
 850 855 860

Gly Lys Pro Asp Pro Ala Ala Pro Pro Lys Lys Pro Pro Arg Pro Gly  
 865 870 875 880

Ala Pro Gly His Leu Gly Ser Leu Ala Ser Leu Ser Ser Pro Ala Asp  
 885 890 895

Ser Tyr Asn Glu Gly Val Lys Leu Gln Pro Gln Glu Ile Ser Pro Pro  
 900 905 910

Pro Thr Ala Asn Leu Asp Arg Ser Asn Asp Lys Val Tyr Glu Asn Val  
 915 920 925

Thr Gly Leu Val Lys Ala Val Ile Glu Met Ser Ser Lys Ile Gln Pro  
 930 935 940

Ala Pro Pro Glu Glu Tyr Val Pro Met Val Lys Glu Val Gly Leu Ala  
 945 950 955 960

Leu Arg Thr Leu Leu Ala Thr Val Asp Glu Thr Ile Pro Leu Leu Pro  
 965 970 975

Ala Ser Thr His Arg Glu Ile Glu Met Ala Gln Lys Leu Leu Asn Ser  
 980 985 990

Asp Leu Gly Glu Leu Ile Asn Lys Met Lys Leu Ala Gln Gln Tyr Val  
 995 1000 1005

Met Thr Ser Leu Gln Gln Glu Tyr Lys Lys Gln Met Leu Thr Ala  
 1010 1015 1020

Ala His Ala Leu Ala Val Asp Ala Lys Asn Leu Leu Asp Val Ile  
 1025 1030 1035

Asp Gln Ala Arg Leu Lys Met Leu Gly Gln Thr Arg Pro His  
 1040 1045 1050

<210> 4

<211> 366

<212> PRT

<213> 人FRNK(野生型FAK第694-1052位氨基酸,包括起始子M;未包括V5表位和His标记)

<400> 4

Met Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Glu Ser Arg Arg Gln Ala Thr Val Ser  
 1 5 10 15

Trp Asp Ser Gly Gly Ser Asp Glu Ala Pro Pro Lys Pro Ser Arg Pro  
 20 25 30

Gly Tyr Pro Ser Pro Arg Ser Ser Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Pro Gln  
 35 40 45

His Met Val Gln Thr Asn His Tyr Gln Val Ser Gly Tyr Pro Gly Ser  
 50 55 60

His Gly Ile Thr Ala Met Ala Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Gln Ala Ser  
 65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Thr Asp Ser Trp Asn His Arg Pro Gln Glu Ile Ala  
 85 90 95

Met Trp Gln Pro Asn Val Glu Asp Ser Thr Val Leu Asp Leu Arg Gly  
 100 105 110

Ile Gly Gln Val Leu Pro Thr His Leu Met Glu Glu Arg Leu Ile Arg  
 115 120 125

Gln Gln Gln Glu Met Glu Glu Asp Gln Arg Trp Leu Glu Lys Glu Glu  
 130 135 140

Arg Phe Leu Lys Pro Asp Val Arg Leu Ser Arg Gly Ser Ile Asp Arg  
 145 150 155 160

Glu Asp Gly Ser Leu Gln Gly Pro Ile Gly Asn Gln His Ile Tyr Gln  
 165 170 175

Pro Val Gly Lys Pro Asp Pro Ala Ala Pro Pro Lys Lys Pro Pro Arg  
 180 185 190

Pro Gly Ala Pro Gly His Leu Gly Ser Leu Ala Ser Leu Ser Ser Pro  
 195 200 205

Ala Asp Ser Tyr Asn Glu Gly Val Lys Leu Gln Pro Gln Glu Ile Ser  
 210 215 220

Pro Pro Pro Thr Ala Asn Leu Asp Arg Ser Asn Asp Lys Val Tyr Glu  
 225 230 235 240

Asn Val Thr Gly Leu Val Lys Ala Val Ile Glu Met Ser Ser Lys Ile  
 245 250 255

Gln Pro Ala Pro Pro Glu Glu Tyr Val Pro Met Val Lys Glu Val Gly  
 260 265 270

Leu Ala Leu Arg Thr Leu Leu Ala Thr Val Asp Glu Thr Ile Pro Leu  
 275 280 285

Leu Pro Ala Ser Thr His Arg Glu Ile Glu Met Ala Gln Lys Leu Leu  
 290 295 300

Asn Ser Asp Leu Gly Glu Leu Ile Asn Lys Met Lys Leu Ala Gln Gln  
 305 310 315 320

Tyr Val Met Thr Ser Leu Gln Gln Glu Tyr Lys Lys Gln Met Leu Thr  
 325 330 335

Ala Ala His Ala Leu Ala Val Asp Ala Lys Asn Leu Leu Asp Val Ile  
 340 345 350

Asp Gln Ala Arg Leu Lys Met Leu Gly Gln Thr Arg Pro His  
 355 360 365

<210> 5

<211> 3334

<212> DNA

<213> 人 FAK (pGene/FAKwt/V5-His)

<400> 5

tgcaagtatct gttttttgct tagcagtaat actaacgggt ctttttttct cttcacaggc 60

accaagcctt ggtaccgagc tcggatccat ggcagctgct taccttgacc ccaacttgaa 120

tcacacacca aattcgagta ctaagactca cctgggtact ggtatggaac gttctcctgg 180

---

tgcaatggag cgagiattaa aggtctttca ttatittgaa agcaatagtg agccaaccac	240
ctgggccagt attatcaggc atggagatgc tactgatgtc aggggcatca ttcagaagat	300
agtggacagt cacaaagtaa agcatgtggc ctgctatgga ttccgcctca gtcacctgcg	360
gtcagaggag gttcactggc ttcacgtgga tatgggcgtc tccagtgtga gggagaagta	420
tgagcttgct caccaccag aggagtggaa atatgaattg agaattcgtt atttgccaaa	480
aggatttcta aaccagttta ctgaagataa gccaaactttg aatttcttct atcaacaggt	540
gaagagcgat tataatgtag agatagccga tcaagtggac caggaaattg ctttgaagtt	600
gggttgtcta gaaatacggc gatcactctg ggagatgctg ggcaatgcac tagaaaagaa	660
gtctaactat gaagtattag aaaaagatgt tggtttaaag cgatTTTTc ctaagagttt	720
actggattct gtcaaggcca aaacactaag aaaactgac caacaaacat ttagacaatt	780
tgccaacctt aatagagaag aaagtattct gaaattcttt gagatcctgt ctccagtcta	840
cagatttgat aaggaatgct tcaagtgtgc tcttggttca agctggatta tttcagtgga	900
actggcaatc ggcccagaag aaggaatcag ttacctaacg gacaagggt gcaatccac	960
acatcttgct gacttcactc aagtgcaaac cattcagtat tcaaacagtg aagacaagga	1020
cagaaaagga atgctacaac taaaaatagc aggtgcaccc gagcctctga cagtgcggc	1080
accatccctt accattgctg agaatatggc tgaccttaata gatgggtact gccggctggt	1140
gaatggaacc tcgcagtcatt ttatcatcag acctcagaaa gaaggatgaac gggctttgcc	1200
atcaatacca aagttggcca acagcgaaaa gcaaggcatg cggacacacg ccgtctctgt	1260
gtcagaaaca gatgattatg ctgagattat agatgaagaa gatacttaca ccatgccctc	1320
aaccagggat tatgagattc aaagagaaa aatagaactt ggacgatgta ttggagaagg	1380
ccaatttggg gatgtacatc aaggcattta tatgagtcca gagaatccag ctttggcgggt	1440
tgcaattaaa acatgtaaaa actgtacttc ggacagcgtg agagagaaat ttcttcaaga	1500
agccttaaca atgctcagtt ttgacctcc tcatattgtg aagctgattg gattcatcac	1560
agagaatcct gtctggataa tcatggagct gtgcacactt ggagagctga ggtcattttt	1620
gcaagtaagg aaatacagtt tggatctagc atctttgac ctgtatgcct atcagcttag	1680
tacagctctt gcatacttag agagcaaaa atttgtacac agggacattg ctgctcggaa	1740
tgttctggtg tcctcaaatg attgtgtaaa attaggagac ttggattat cccgatatat	1800
ggaagatagt acttactaca aagcttcaa aggaaaattg cctattaaat ggatggctcc	1860
agagtcaatc aattttcgac gttttacctc agctagtac gtatggatgt ttggtgtgtg	1920
tatgtgggag atactgatgc atgggtgtgaa gccttttcaa ggagtgaaga acaatgatgt	1980
aatcggtcga attgaaaatg gggaaagatt accaatgcct ccaaattgtc ctctacctt	2040

```

ctacagcctt atgacgaaat gctgggccta tgaccccagc aggcggccca ggtttactga 2100
acttaaagct cagctcagca caatcctgga ggaagagaag gctcagcaag aagagcgcat 2160
gaggatggag tccagaagac aggccacagt gtcttgggac tccggagggt ctgatgaagc 2220
accgcccgaag cccagcagac cgggttatcc cagtccgagg tccagcgaag gatTTTatcc 2280
cagcccacag cacatggtac aaaccaatca ttaccagggt tctggctacc ctggttcaca 2340
tggaatcaca gccatggctg gcagcatcta tccaggtcag gcatctcttt tggaccaaac 2400
agattcatgg aatcatagac ctcaggagat agcaatgtgg cagcccgaatg tggaggactc 2460
tacagtattg gacctgcgag ggattgggca agtgttgcca accatctga tggaaagcgc 2520
tctaatccga cagcaacagg aatggaaga agatcagcgc tggctggaaa aagaggaaag 2580
atttctgaaa cctgatgtga gactctctcg aggcagtatt gacaggagg atggaagtct 2640
tcagggtccg attggaacc aacatatata tcagcctgtg ggtaaaccag atcctgcagc 2700
tccaccaaag aaaccgctc gccctggagc tcccggtcat ctgggaagcc ttgccagcct 2760
cagcagccct gctgacagct acaacgaggg tgtcaagctt cagccccagg aatcagccc 2820
ccctcctact gccaacctgg accggtcgaa tgataagggt tacgagaatg tgacgggcct 2880
ggtgaaagct gtcatcgaga tgtccagtaa aatccagcca gccccaccag aggagtaigt 2940
ccctatgggt aaggaagtcg gcttggccct gaggacatta ttggccactg tggatgagac 3000
cattcccctc ctaccagcca gacccaccg agagattgag atggcacaga agctattgaa 3060
ctctgacctg ggtgagctca tcaacaagat gaaactggcc cagcagtatg tcatgaccag 3120
cctccagcaa gagtacaaaa agcaaatgct gactgctgct cacgccctgg ctgtggatgc 3180
caaaaactta ctgatgtca ttgaccaagc aagactgaaa atgcttgggc agacgagacc 3240
aactccctg gggcccttcg aaggaagcc tatccctaac cctctcctcg gtctcgatc 3300
tacgcgtacc ggtcatcatc accatcacca ttga 3334

```

<210> 6

<211> 3308

<212> DNA

<213> 人 FAK Y397F 突变体 (pGene/FAKY397F/V5-His)

<400> 6

```

taataactaac ggttcttttt ttctcttcac aggccaccaa gcttggtagc gagctcggat 60
ccatggcagc tgcttacctt gacccaact tgaatcacac accaaattcg agtactaaga 120
ctcacctggg tactggtatg gaacgttctc ctgggtgcaat ggagcgagta ttaaaggctc 180
ttcattattt taaaagcaat agigagccaa ccacctgggc cagtattatc aggcatggag 240
atgtactga tgtcaggggc atcattcaga agatagtgga cagtcacaaa gtaaagcatg 300
tggcctgcta tggattccgc ctcagtcacc tgcggtcaga ggaggttcac tggcttcacg 360

```

---

tggatatggg cgtciccagt gtgagggaga agtatgagct tgctcaccca ccagaggagt	420
ggaaatatga attgagaatt cgttatttgc caaaaggatt tctaaaccag ttactgaag	480
ataagccaac ttigaatttc ttctatcaac aggigaagag cgattatag ttagagatag	540
ccgatcaagt ggaccaggaa attgcttga agttgggttg tctagaaata cggcgaatcat	600
actgggagat gcggggcaat gcactagaaa agaagtctaa ctatgaagta ttagaaaaag	660
atgttggttt aaagcgattt ttccctaaga gtttactgga ttctgtcaag gccaaaaacac	720
taagaaaact gatccaacaa acatttagac aatttgccaa ccttaataga gaagaaagta	780
ttctgaaatt cttgagatc ctgtctccag tctacagatt tgataaggaa tgcttcaagt	840
gtgctcttgg ttcaagctgg attatttcag tggaactggc aatcggccca gaagaaggaa	900
tcagttacct aacggacaag ggctgcaatc ccacacatct tgctgacttc actcaagtgc	960
aaaccattca gtattcaaac agtgaagaca aggacagaaa aggaatgcta caactaaaaa	1020
tagcaggtgc acccgagcct ctgacagtga cggcaccatc cctaaccatt gcggagaata	1080
tggtgacct aatagatggg tactgccggc tggatgaatgg aacctcgag tcatttatca	1140
tcagacctca gaaagaaggt gaacgggctt tgccatcaat accaaagttg gccaacagcg	1200
aaaagcaagg catgctggaca cacgccgtct ctgtgtcaga aacagatgat ttgtctgaga	1260
ttatagatga agaagatact tacaccatgc cctcaaccag ggattatgag attcaaagag	1320
aaagaataga acttggacga tgtattggag aaggccaatt tggagatgia catcaaggca	1380
tttatatgag tccagagaat ccagctttgg cggttgcaat taaaacatgt aaaaactgta	1440
cttcggacag cgtgagagag aaatttcttc aagaagcctt aacaatgcgt cagtttgacc	1500
atcctcatat tgtgaagctg attggagtca tcacagagaa tcctgtctgg ataatcatgg	1560
agctgtgcac acttggagag ctgaggtcat ttttgcaagt aaggaaatac agtttggatc	1620
tagcatcttt gatccigtat gcctatcagc ttagtacagc tcttgcata ctagagagca	1680
aaagatttgt acacagggac attgctgctc ggaatgttct ggtgtcctca aatgattgtg	1740
taaaattagg agactttgga ttatccgat atatggaaga tagtacttac taaaagctt	1800
ccaaaggaaa attgcctatt aaatggatgg ctccagagtc aatcaatfff cgacgtttta	1860
cctcagctag tgacgtatgg atgtttgggt tgtgtatgtg ggagatactg atgcatgggtg	1920
tgaagccttt tcaaggagtg aagaacaatg atgtaatcgg tcgaattgaa aatggggaaa	1980
gattaccaat gcctccaaat tgcctccta ccctctacag ccttatgacg aaatgctggg	2040
cctatgacc cagcagggcg cccaggttta ctgaacttaa agctcagctc agcacaatcc	2100
tggaggaaga gaaggctcag caagaagagc gcatgaggat ggagtcagaa agacaggcca	2160
cagtgtcctg ggactccgga gggtctgatg aagcaccgcc caagcccagc agaccgggtt	2220
atcccagctc gaggtccagc gaaggatfff atcccagccc acagcacatg gtacaaacca	2280



atcattacca ggtttctggc taccctgggt cacatggaat cacagccatg gctggcagca 2340  
 tctatccagg tcaggcatct cttttggacc aaacagattc atggaatcat agacctcagg 2400  
 agatagcaat gtggcagccc aatgtggagg actctacagt attggacctg cgagggattg 2460  
 ggcaagtgtt gccaacccat ctgatggaag agcgtctaata cgcagagcaa caggaaatgg 2520  
 aagaagatca ggcctggctg gaaaaagagg aaagatttct gaaacctgat gtgagactct 2580  
 ctcgaggcag tattgacagg gaggatgga gttctcaggg tccgattgga aaccaacata 2640  
 tatatcagcc tgtgggtaaa ccagatcctg cagctccacc aaagaaaccg cctcgccctg 2700  
 gagctcccgg tcatctggga agccttgcca gcctcagcag cctgctgac agctacaacg 2760  
 aggggtgtcaa gcttcagccc caggaaatca gccccctcc tactgccaac ctggaccggt 2820  
 cgaatgataa ggtgtacgag aatgtgacgg gcctggtgaa agctgtcatc gagatgtcca 2880  
 gtaaaatcca gccagcccca ccagaggagt atgtccctat ggtgaaggaa gtcggcttgg 2940  
 cctgaggac attattggcc actgtggatg agaccattcc cctcctacca gccagcacc 3000  
 accgagagat tgagatggca cagaagctat tgaactctga cctgggtgag ctcatcaaca 3060  
 agatgaaact ggcccagcag taigtcatga ccagcctcca gcaagagtac aaaaagcaaa 3120  
 tgctgactgc tgctcacgcc ctggctgtgg atgccaaaaa ctactcgat gtcattgacc 3180  
 aagcaagact gaaaatgctt gggcagacga gaccacactc cctggggccc ttcgaaggta 3240  
 agcctatccc taacctctc ctcggctctg attctacgag taccggtcat catcaccatc 3300  
 accattga 3308

<210> 7  
 <211> 3323  
 <212> DNA  
 <213> 人 FAK K454R 突变体 (pGene/FAKK454R/V5His)

<400> 7  
 tatttttgct agcagtaata ctaacggttc ttttttctc ttcacaggcc accaagcttg 60  
 gtaccgagct cggatccatg gcagctgctt acctgacc caacttgaat cacacaccaa 120  
 attcgagtac taagactcac ctgggtactg gtatggaacg ttctcctggt gcaatggagc 180  
 gagtattaa ggtctttcat tattttgaaa gcaatagiga gccaacacc tgggccagta 240  
 ttatcaggca tggagatgct actgatgtca ggggcatcat tcagaagata gtggacagtc 300  
 acaaagtaaa gcatgtggcc tgctatggat tccgcctcag tcacctgagg tcagaggagg 360  
 ttcactggct tcacgtggat atgggcgtct ccagtgtgag ggagaagtat gagcttgctc 420  
 acccaccaga ggagtggaaa tatgaattga gaattcgtta tttgccaaa ggatttctaa 480  
 accagtttac tgaagataag ccaactttga atttcttcta tcaacagggtg aagagcgatt 540

atatgttaga gatagccgat caagtggacc aggaaattgc tttgaagttg ggttgtctag	600
aaatacggcg atcatactgg gagatgcggg gcaatgcact agaaaagaag tctaactatg	660
aagtattaga aaaagatgtt ggittaaagc gattttttcc taagagtta ctggattctg	720
tcaaggccaa aacactaaga aaactgatcc aacaaacatt tagacaattt gccaacctta	780
atagagaaga aagtattctg aaattctttg agatcctgtc tccagtctac agatttgata	840
aggaatgctt caagtgtgct ctgggttcaa gctggattat ttcagtggaa ctggcaatcg	900
gccagaaga aggaatcagt tacctaacgg acaagggtc caatcccaca catcttgctg	960
acttactca agtgcaaacc attcagtatt caaacagtga agacaaggac agaaaaggaa	1020
tgctacaact aaaaatagca ggtgcacccg agcctctgac agtgacggca ccatccctaa	1080
ccattgcgga gaatatggct gacctaatag atgggtactg ccggctggtg aatggaacct	1140
cgcagtcatt tatcatcaga cctcagaaag aagggtaacg ggctttgcca tcaataccaa	1200
agttggccaa cagcgaanaag caaggcatgc ggacacacgc cgtctctgtg tcagaaacag	1260
atgattatgc tgagattata gatgaagaag atacttacac catgccctca accagggatt	1320
atgagattca aagagaaaga atagaacttg gacgatgat tggagaaggc caatttggag	1380
atgtacatca aggcatttat atgagtccag agaatccagc ttggcggtt gcaattagaa	1440
catgtaaaaa ctgtacttcg gacagcgtga gagagaaatt tcttcaagaa gccttaacaa	1500
tgcgtcagtt tgaccatcct catatttga agctgattgg agtcatcaca gagaatcctg	1560
tctggataat catggagctg tgcacacttg gagagctgag gtcatttttg caagtaagga	1620
aatacagttt ggatctagca tctttgatcc tgtatgccta tcagcttagt acagctcttg	1680
catatctaga gagcaaaaga ttgttacaca gggacattgc tgctcggaat gttctgggtg	1740
cctcaaatga ttgtgtaaaa ttaggagact ttggattatc ccgatatatg gaagatagta	1800
cttactacaa agcttccaaa ggaaaattgc ctattaaatg gatggctcca gagtcaatca	1860
atcttcgacg ttttacctca gctagtacg tatggatgtt tgggtgtgtg atgtgggaga	1920
tactgatgca tgggtggaag ccttttcaag gagtgaagaa caatgatgta atcggtcgaa	1980
ttgaaaatgg ggaaagatta ccaatgcctc caaattgtcc tctaccctc tacagcctta	2040
tgacgaaatg ctgggcctat gaccccagca ggcgcccag gtttactgaa cttaaagctc	2100
agctcagcac aatcctggag gaagagaagg ctacagcaaga agagcgcgatg aggatggagt	2160
ccagaagaca ggccacagtg tcctgggact ccggagggtc tgatgaagca ccgccaagc	2220
ccagcagacc gggttatccc agtccgaggt ccagcgaagg attttatccc agcccacagc	2280
acatggtaca aaccaatcat taccagttt ctggctaccc tggttacat ggaatcacag	2340
ccatggctgg cagcatctat ccaggtcagg catctctttt ggaccaaaca gattcatgga	2400
atcatagacc tcaggagata gcaatgtggc agcccaatgt ggaggactct acagtattgg	2460

acctgcgagg gattgggcaa gtgttgccaa cccatctgat ggaagagcgt ctaatccgac 2520  
 agcaacagga aatggaagaa gatcagcgct ggctggaaaa agaggaaaga tttctgaaac 2580  
 ctgatgtgag actctctcga ggcagtattg acagggagga tggaaagtctt cagggtccga 2640  
 ttggaaacca acatatatat cagcctgtgg gtaaaccaga tcctgcagct ccaccaaaga 2700  
 aaccgcctcg ccctggagct cccggtcac tgggaagcct tgccagcctc agcagccctg 2760  
 ctgacagcta caacgaggggt gtcaagcttc agccccagga aatcagcccc cctcctactg 2820  
 ccaacctgga cgggtcgaat gataaggtgt acgagaatgt gacgggcctg gtgaaagctg 2880  
 tcatcgagat gtccagtaaa atccagccag ccccaccaga ggagtatgtc cctatgggtga 2940  
 aggaagtcgg cttggccctg aggacattat tggccactgt ggatgagacc attcccctcc 3000  
 taccagccag caccaccga gagattgaga tggcacagaa gctattgaac tctgacctgg 3060  
 gtgagctcat caacaagatg aaactggccc agcagtatgt catgaccagc ctccagcaag 3120  
 agtacaaaaa gcaaatgctg actgctgctc acgccctggc tgtggatgcc aaaaacttac 3180  
 tcgatgtcat tgaccaagca agactgaaaa tgcttgggca gacgagacca cactccctgg 3240  
 ggcccttcca aggtaagcct atccctaacc ctctcctcgg tctcgattct acgcgtaccg 3300  
 gtcacatca ccatcaccat tga 3323

<210> 8  
 <211> 1234  
 <212> DNA  
 <213> 称作 FRNK 的人 FAK 突变体 (pGene/FRNK/V5-His)

<400> 8  
 cggttctttt tttctcttca caggccacca agcttggtag cgccaccatg gactaccctt 60  
 atgatgtgga gtccagaaga caggccacag tgtcctggga ctccggaggg tctgatgaag 120  
 caccgcccaa gccagcaga ccgggttata ccagtccgag gtccagcga ggattttatc 180  
 ccagcccaca gcacatggtg caaaccaatc attaccaggt ttctggctac cctggttcac 240  
 atggaatcac agccatggct ggcagcatct atccaggta ggcatctctt ttggaccaa 300  
 cagattcatg gaatcataga cctcaggaga tagcaatgtg gcagcccaat gtggaggact 360  
 ctacagtatt ggacctgca gggattgggc aagtgttggc aaccatctg atggaagagc 420  
 gtctaaccg acagcaacag gaaatggaag aagatcagcg ctggctggaa aaagaggaaa 480  
 gatttctgaa acctgatgtg agactctctc gaggcagtat tgacaggag gatggaagtc 540  
 ttcagggtcc gattggaaac caacatatat atcagcctgt gggtaaacca gatcctgcag 600  
 ctccacaaa gaaaccgct cgccctggag ctccgggtca tctgggaagc cttgccagcc 660  
 tcagcagccc tgctgacagc tacaacgagg gtgtcaagct tcagcccag gaaatcagcc 720  
 cccctctac tgccaacctg gaccggtcga atgataaggt gtacgagaat gtgacgggcc 780

---

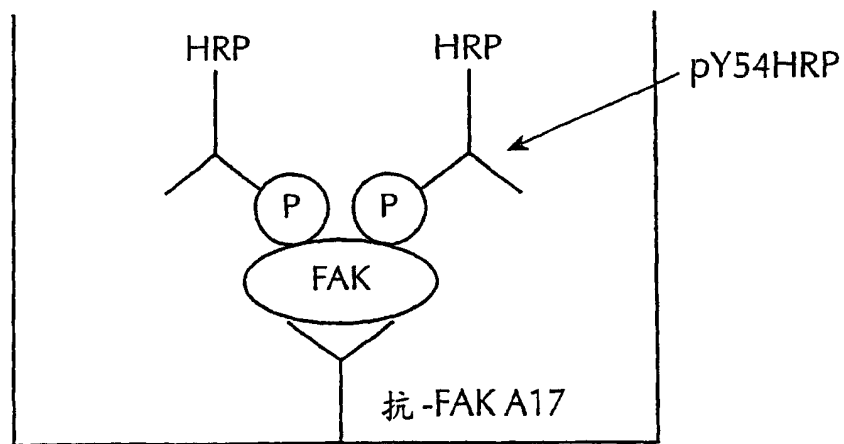
tggtgaaagc tgtcatcgag atgtccagta aaatccagcc agccccacca gaggagtatg	840
tccctatggt gaaggaagtc ggcttggccc tgaggacatt attggccact gtggatgaga	900
ccattcccct cctaccagcc agcaccacc gagagattga gatggcacag aagctattga	960
actctgacct gggtgagctc atcaacaaga tgaactggc ccagcagtat gtcatgacca	1020
gcctccagca agagtacaaa aagcaaatgc tgactgctgc tcacgccctg gctgtggatg	1080
ccaaaaactt actcgatgtc attgaccaag caagactgaa aatgcttggg cagacgagac	1140
cacactccct gggcccttcg aaggtaagcc tatccctaac cctctcctcg gtctcgattc	1200
tacgcgtacc ggtcatcatc accatcacca ttga	1234

<210> 9  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> FAK5 'Bam 引物

<400> 9	
ggatccatgg cagctgctta ccttgac	27

<210> 10  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> FAK3 'Bam 引物

<400> 10	
ggatcctcac tcactcagtg tggctcgcgc tgccca	36



蛋白 A

图 1

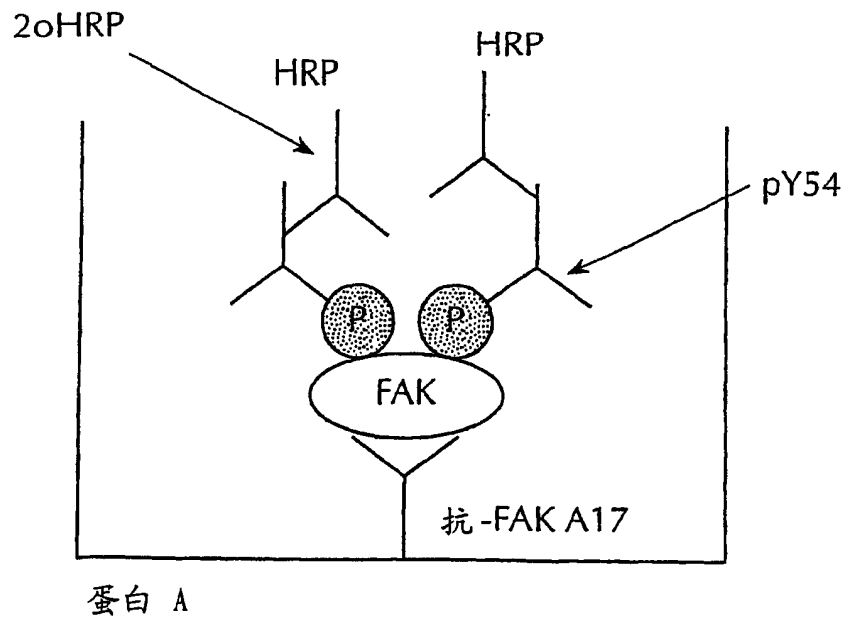


图 2

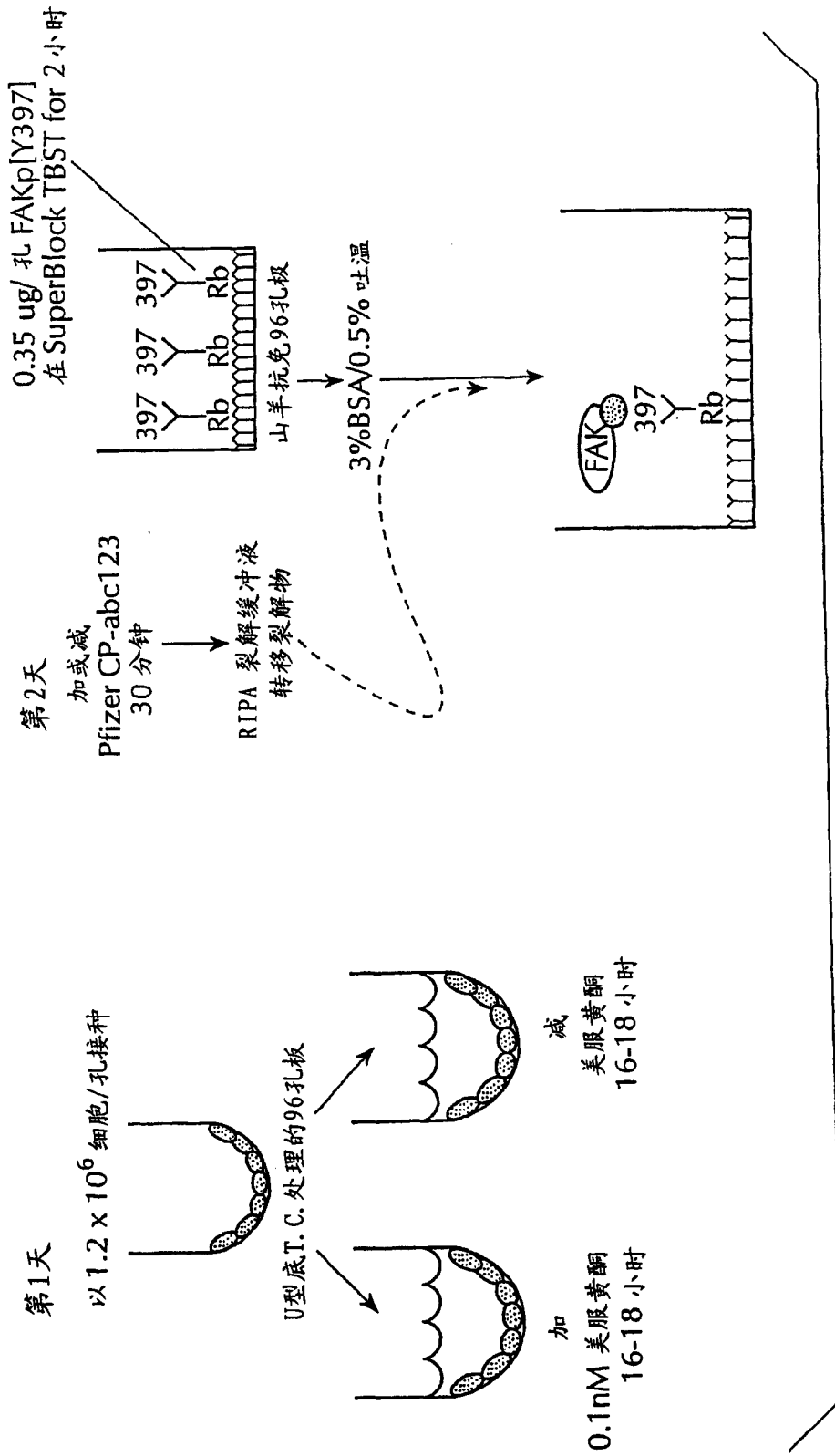


图 3