

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12Q 1/68

G01N 33/50 A61K 48/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99803923.3

[43]公开日 2002年12月4日

[11]公开号 CN 1383452A

[22]申请日 1999.1.11 [21]申请号 99803923.3

[30]优先权

[32]1998.1.12 [33]US [31]60/071146

[32]1998.3.11 [33]US [31]60/077644

[86]国际申请 PCT/US99/00601 1999.1.11

[87]国际公布 WO99/35292 英 1999.7.15

[85]进入国家阶段日期 2000.9.12

[71]申请人 新生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 索尔克学院

[72]发明人 G·M·瓦尔 H·M·舍帕德

N·施米朱

特鲁·坎达

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 王其灏

权利要求书 4 页 说明书 45 页 附图 14 页

[54]发明名称 治疗含有双微体 DNA 的细胞的组合物及方法

[57]摘要

本发明提供筛选测试物质的方法,通过该方法筛选能抑制、增强或除去细胞中微核化形成的双微体(DM)或额外染色体 DNA。本发明也提供一种方法,诱导能产生微核的细胞成熟或死亡。本发明也提供给患病的受试者治疗的方法,所治疗的细胞与具有 DM 和额外染色体 DNA 并能产生微核以捕捉它们的疾病相关。进一步提供一种检测细胞中染色体和额外染色体 DNA 的方法。

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

1. 一种鉴定方法，用来鉴定可诱导细胞成熟或细胞死亡的治疗药剂，该方法包括：

5 将测试细胞与潜在的治疗药剂相接触，其中该测试细胞含有确定水平的 DM 或额外染色体 DNA，并且能够经历微核形成；以及

测定所述测试细胞的 DM 或额外染色体 DNA 的水平，由此确定 DM 或额外染色体 DNA 可减少或从细胞内消除，则表明该药剂是一种可促进微核形成从而导致细胞成熟或细胞死亡的治疗药剂。

10 2. 权利要求 1 的方法，其中的测试细胞缺乏功能性肿瘤抑制蛋白。

3. 权利要求 1 的方法，其中的测试细胞含有一种癌基因。

4. 权利要求 1 的方法，其中的测定是通过 FISH、流式细胞术、离心分步分离、或组蛋白-GFP 标记来进行。

5. 由权利要求 1 的方法鉴定的一种治疗药剂。

15 6. 一种诱导适当细胞成熟或死亡的方法，该方法包括将适当细胞与能够通过微核形成来诱导或加强该适当细胞内 DM 或额外染色体 DNA 消除的药剂相接触。

7. 权利要求 6 的方法，其中的细胞缺乏功能性肿瘤抑制蛋白。

20 8. 权利要求 6 的方法，其中的适当细胞含有一种扩增的癌基因。

9. 权利要求 6 的方法，其中的适当细胞在体外、来自体内或在体内进行接触。

25 10. 一种对患有疾病的受试者进行治疗的方法，该疾病涉及受试者中存在含有 DM 或额外染色体 DNA，并能够通过额外的微核形成消除 DM 或 DNA 的细胞，该方法包括给受试者施用有效剂量的一种药剂，该药剂可通过微核形成诱导或加强细胞内 DM 或额外染色体 DNA 消除。

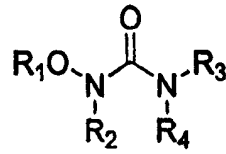
11. 权利要求 10 的方法，其中的细胞缺乏功能性肿瘤抑制蛋白。

12. 权利要求 10 的方法，其中的细胞含有一种扩增的癌基因。

30 13. 权利要求 10 的方法，其中的药剂为羟基脲或其衍生物。

14. 权利要求 6 或 10 的方法，其中该制剂为一种具下式的化合

物:



其中 R_1 为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基、酰基或 $-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$, 其中 n 为 1-4 的整数, X 为取代的烷基、烯基或炔基, 并且取代基选自下列一组, 包括卤素、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}$ 、酰胺和酰基, 其中 R 为 H、烷基或芳基;

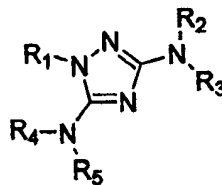
R_2 为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 或 $-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$, 其中 n 为 1-4 的整数, X 为取代的烷基、烯基或炔基, 并且其中的 R' 为烷基或芳基, 取代基则如上文定义;

R_3 为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基、 OR'' 、 NR''_2 或 $-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$, 其中 n 为 1-4 的整数, X 为取代的烷基、烯基或炔基, 并且取代基选自下列一组, 包括 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NR}''_2$ 、 $-\text{OR}''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}''$ 、酰胺和酰基, 其中 R'' 为 H、烷基或芳基; 并且

R_4 为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基或 $-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$, 其中 n 为 1-4 的整数, X 为取代的烷基、烯基或炔基, 并且取代基的选自下列一组, 包括 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NR}'''_2$ 、 $-\text{OR}'''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'''$ 、酰胺和酰基, 其中 R''' 为 H、烷基或芳基。

15. 权利要求 6 或 10 的方法, 其中该制剂为下式的化合物:

20



其中 R_1 为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基、酰基或 $-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$, 其中 n 为 1-4 的整数, X 为取代的烷基、烯基或炔基, 并且取代基选自下列一组, 包括卤素、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、

-OC(O)R、酰胺和酰基，其中 R 为 H、烷基或芳基；

R₂ 和 R₄ 各自独立地为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基、OR'、NR'₂ 或 -(CH₂)_n-X，其中 n 为 1-4 的整数，X 为取代的烷基、烯基或炔基，并且取代基选自下列一组，包括 -OH、-NR'₂、-OR'、

5 -C(O)OR'、-OC(O)R'、酰胺和酰基，其中 R' 为 H、烷基或芳基；并且

R₃ 和 R₅ 各自独立地为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基或 -(CH₂)_n-X，其中 n 为 1-4 的整数，n 为 1-4 的整数；X 为取代的烷基、烯基或炔基，并且取代基选自下列一组，包括 -OH、-NR''₂、-OR''、-C(O)OR''、-OC(O)R''、酰胺和酰基，其中 R'' 为 H、烷基或芳基。

10

16. 一种检测细胞内 DM 或额外染色体 DNA 的方法，该方法包括步骤：

将一种可检测的标记蛋白插入细胞，其中该蛋白能够与细胞内的 DM 和额外染色体 DNA 特异结合；以及

15

检测标记蛋白和/或 DM 或额外染色体 DNA 复合物，从而表明细胞内 DM 和额外染色体 DNA 的压力。

17. 权利要求 16 的方法，其中的蛋白为组蛋白或其类似物。

18. 权利要求 16 的方法，其中的可检测标记为一种荧光标记。

20

19. 权利要求 18 的方法，其中的荧光标记为多管水母属绿色荧光蛋白、多管水母属红色荧光蛋白或多管水母属黄色荧光蛋白。

20. 权利要求 16 的方法，其中的标记蛋白通过将细胞与一种载体相接触而被引入细胞，该载体含有经可检测标记的组蛋白融合蛋白的编码 DNA。

21. 权利要求 20 的方法，其中的组蛋白融合蛋白为 H2B-GFP。

25

22. 权利要求 20 的方法，其中的载体为一种逆转录病毒载体。

23. 一种监控细胞内染色体 DNA 物质移动的方法，包括：

将一种经可检测标记的蛋白引入细胞，其中该蛋白能够与胞内染色体 DNA 特异结合而产生一种标记复合物；

检测标记复合物，从而检测细胞内染色体 DNA；以及

30

将标记复合物与未复合染色体的位置进行比较。

24. 权利要求 23 的方法，其中能够与细胞内染色体 DNA 特异结

合的蛋白为着丝粒结合蛋白或 lac 操纵子。

25. 权利要求 23 的方法，其中染色体移动的选自下列现象，包括染色体凝集、染色体去凝集、核仁形成、异染色质移动、染色体断裂、染色体桥形成、微核形成、基因扩增、非整倍性形成、染色体丢失和染色体易位。

26. 一种检测病理细胞表型的方法，该方法包括：

- 将一种经可检测标记的蛋白引入细胞，其中该蛋白能够与 DM 和额外染色体 DNA 特异结合而产生一种标记复合物；
- 10 检测标记复合物，从而检测与病理性表型相关的 DM 和额外染色体 DNA；以及
- 将病理性表型与参照细胞的表型进行比较。

27. 权利要求 26 的方法，其中的病理性表型为癌症或肿瘤病。

治疗含有双微体 DNA 的细胞的组合物及方法

联邦政府资助研究项目的发明权利声明

- 5 本发明是经美国陆军部批准在政府支持下完成，批准号 DAMD17-94-J4359。因此，美国政府拥有本发明的必然权利。

技术领域

- 10 一般而言，本发明涉及用于治疗癌症等肿瘤病的新型治疗药物的筛选方法以及该药物在癌症治疗中的应用。

发明背景

- 15 引用出版物贯穿该申请的整个范围，其文献目录中的全部引文均可在该申请的正文或紧接权利要求书前的说明书结尾处找到。为了能更充分地描述与本发明相关的技术发展水平，这些出版物的公开内容和发表的专利说明书、著作以及发行的专利均在文中作为参考引入该公开内容中。

- 20 众所周知，在一种先导组分被发现之前和被发现之后，导致新药鉴定的药物研究通常涉及对极大量的待选物质进行筛选。这是导致药物研究投资大、周期长的因素之一，因此一种可辅助筛选的方法将会具有相当大的商业价值和实用性。

- 25 许多药物通过与细胞内 DNA 相互作用而发挥其疗效。一些药物则以矫正遗传异常为目标，遗传异常的积累可导致某种患病状态。例如，在癌症发展期间通常会产生基因突变，它会大大提高碱基替换或大规模染色体重排的频率。举例来说，涉及 p53 肿瘤抑制基因的细胞周期调控途径出现缺陷会形成一种允许环境，处在该环境中的细胞将对代谢物或癌基因过表达所造成的压力产生应答，从而高频率地出现非整倍性、染色体易位和基因扩增 (Livingstone, et al. (1992); Yin, et al. (1992) and Denko, et al. (1994))。

- 30 修复及细胞周期调控功能有缺陷的细胞内所产生的异常染色体结构类型可能受核结构的限制。例如，具有很长的臂的染色体会倾向

于产生核突起物,该突起物在不同情况下被称为“泡”或“芽”(Ruddle (1962); Lo and Fraccaro (1974); Toledo, et al. (1992) and Pedeutour, et al. (1994))。最近在豌豆中进行的一项实验表明,单染色体臂内的过量 DNA 产生了一种核突起物,该突起物在末期后细胞分裂板形成时被切除 (Schubert and Oud (1997))。在微核内经常会检测到该突起物所包含的序列,提示突起物可能是微核的前体 (Toledo, et al. (1992) and Pedeutour, et al. (1994)) , 并且其包含的染色体序列可能从核中丢失。这些数据表明,特定细胞类型的核内的每个染色体臂存在一个最大容许长度。

10 癌细胞中还经常产生如双微染色体 (DMs) 等自主复制的环状 DNA 片段 (Barder (1982); Cowell (1982) and Benner, et al. (1991))。由这些结构编码的蛋白可在体内提供生存优势,或在体外抵抗多种化学治疗药物 (见 Wahl (1989); Brison (1993); Von Hoff, et al. (1992); Shimizu, et al. (1994) and Eckhardt, et al. (1994))。DMs 采用细胞起源的复制起点进行复制 (Carroll, et al. (1993)) , 但它们缺乏着丝粒,不能利用与染色体相同的机制进行分离。因此,DMs 在缺乏选择的情况下自然丢失。诸如羟基脲等药物可显著提高人类和啮齿类细胞系内 DMs 的丢失率 (Snapka and Varshavsky (1983); Von Hoff, et al. (1991); Von Hoff, et al. (1992); Eckhardt, et al. (1994) and Canute, et al. (1996))。DMs 的丢失可导致药物敏感性增加、致肿瘤性降低、或导致分化,这取决于 DM 编码基因所表达的蛋白 (Snapka and Varshavsky (1983); Snapka (1992); Von Hoff, et al. (1992); Eckhardt, et al. (1994) and Shimizu, et al. (1994))。为此,确定 DMs 丢失的机制将能够发展出崭新的或更具选择性的化学治疗策略,因为 DMs 仅能够在癌细胞中发现,这种治疗将不会导致染色体丢失。

另有报导,DMs 与异常长染色体臂一样,可被优先掺入到将从胞内去除的微核内 (VonHoff, et al. (1992) and Shimizu, et al. (1996))。很明显,仅靠尺寸小是不能保证 DNA 片段被选择性封装在微核内的,因为具有典型 DM 大小的着丝点微染色体被选择性排斥在微核之外 (Shimizu, et al. (1996))。这一观察结果与小核形

成的经典机制相符, 该过程涉及在有丝分裂末期核膜重组时封装滞后的无着丝点染色体片段 (Heddle and Carrano (1977) and Heddle, et al. (1983))。由此, 可认为 DMs 是在有丝分裂后被封装在微核内的, 因为它们通常不具有功能性着丝粒 (Levan, et al. (1976))。

5 但 DMs 似乎能够与染色体或核仁结合, 使它们大多能够逃避这种有丝分裂后机制。DMs 这种通过与有丝分裂染色体或核仁结合而“搭便车”的能力可提供一种解释, 来说明为何在含有大量 DMs 的细胞系内几乎检测不到中间体中有微核 (Levan and Levan (1978)) , 而且它们在某些细胞系中能够以惊人的效率分配到子细胞中 (Levan and Levan

10 (1978) and Hamkalo, et al. (1985))。但正常染色体与 DMs 的间期行为可能不同, 因为 DMs 缺乏着丝粒和/或端粒, 而着丝粒和端粒能够使染色体定位于限定区域并产生一套设计好的 S 期染色体移动线路 (De and Mintz (1986) and Cremer et al. (1993))。目前还未能确定间期时无着丝点 DM DNA 所占据的位置是否与染色体有所不同, 以及这是否能使它们通过与异常长染色体的观测结果相类似的

15 出芽过程而从核中去除 (Ruddle (1962) ; Jackson and Clement (1974) ; Lo and Fraccaro (1974) ; Miele, et al. (1989) and Toledo, et al. (1992))。

20

发明内容

本发明涉及从待选物质中筛选潜在的药制剂。更详细而言, 本发明提供一种方法, 通过该方法可就测试物通过微核形式而抑制、增强或消除细胞内双微体 DM 或额外染色体 DNA 的能力而对其进行筛选。

25

本发明还提供一种方法, 用于诱导具有 DM DNA 或额外染色体 DNA 的细胞的成熟或死亡。将适当细胞与文中定义的一种药剂相接触, 从而利用微核形成的方法将 DM DNA 或额外染色体 DNA 从细胞内消除。

本发明进而提供一种治疗方法, 通过将文中定义的一种药剂以有效剂量向受试者给药来治疗受试者所患的疾病。

30

本发明还进一步提供一种检测细胞内染色体 DNA 及额外染色体 DNA 的方法。本方法需要将一种经可检测标记的蛋白插入细胞, 其中

该蛋白能够与细胞内染色体 DNA 特异结合，然后检测标记，从而检测细胞内的染色体 DNA 和额外染色体 DNA。

附图简述

5 图 1A-D'' 显示选择性包载 DMs 的核出芽过程。经甲醇/醋酸固定的 COLO 320DM 细胞用 RNase 处理，用来自纯化微核的生物素标记 DNA 杂交，再用偶联 FITC 的抗生蛋白链菌素检测杂交探针。细胞核用碘化丙锭 (PI) 复染。图 1A 为前中期图，说明 DM 着色探针的特异性并证明前中期染色体周围的 DMs 周边定位。箭头指明一个与染色体整合的 HSR 区域。这些 DMs 被选择性掺入间期核形成的核芽内 (图 1B 至 10 1D, 箭头所示)。核芽似乎以很高的选择性俘获 DM, 因为核芽内明显有三个强烈的 PI 阳性信号 (图 1D), 它们均被 FITC FISH 探针强烈标记 (图 1D'), 以及合并图像 (图 1D'')。

图 2A-2F 显示 COLO 320DM 细胞同步培养物中微核及核芽的形成。利用下文所述的两步法将 COLO 320DM 细胞同步于 G1/S 交界。将培养物分为两部分, 并在不加入任何药物 (图 2A、2C 和 2E), 或加入 0.4 mg/ml 诺考达唑 (图 2B、2D 和 2F) 的情况下释放。分别测定 [3H]胸腺嘧啶掺入 (实心圆) 和有丝分裂细胞指数 (空心圆) 以分别 15 监控同步穿越 S 期和 M 期的进程 (图 2A 和 2B)。在经 DAPI 染色的玻片上测定总微核数 (实心圆) 和总核芽数 (空心圆) (图 2C 和 2D)。在经纯化微核探针杂交的玻片上测定 DM+微核数 (实心圆) 或 DM+核芽数 (空心圆) (图 2E 和 2F)。这些值均以相对于间期核计数的出现频率形式表示 (每个点的采样数均大于 1000)。

图 3A 和 3B 显示各种药物对微核诱导及细胞周期分布的影响。25 COLO 320DM 细胞用所示浓度的 DNA 复制抑制剂 (阿非迪霉素 ("APH"); 去铁胺 ("Def"); 胍唑 ("Gua"); 羟基脲 ("HU"); 及 PALA)、DNA 修复抑制剂 (香豆素 ("Cou"); 烟酰胺 ("NA")) 或膜活化剂 DMSO 处理 3 天。在图 3A 中, 经处理的细胞用甲醇/醋酸固定并用 c-myc 粘粒探针杂交。计算被 c-myc 探针明亮染色的微核数并以相对于间期核计数的 "c-myc⁺微核出现频率 (%)" 形式表示 (每个点的采样数均大于 30 1000)。在图 3B 中, 细胞在药物处理末期用 BrdU 进行脉冲标记 (30

分钟), 并通过下述的流式细胞光度计方法进行分析, 以确定 G1、S 和 G2/M 期的细胞数。

图 4A-4F 显示 DMs 在 COLO 320DM 间期核内的定位。由 COLO 320DM 细胞培养物分离的核用 PFA 固定, 并用 DM-染色探针进行杂交, 然后用 PI 复染。每个核中心附近的光截面是利用共焦激光扫描显微镜获得。图中显示来自快速生长培养物的三个代表性细胞核图像(见图 4A 至 4C)和来自 100 μ M 羟基脲处理 3 天的培养物的三个代表性图像(见图 4D 至 4F)。如箭头所示, 未处理培养物中的 DMs 只优先定位于核膜下。而 HU 处理培养物的核内则极少观察到周边 DMs, 并且图中显示大多数信号都很好地位于细胞核内部。

图 5A-5C 显示 DMs 和随染色体扩增的序列的核定位定量分析。由 COLO 320DM 细胞(见图 5A)、100 μ M HU 处理 3 天的 COLO 320DM 细胞(见图 5B)和具有随染色体扩增 c-myc 序列的快速生长 COLO 320 细胞(COLO 320HSR)(见图 5C)的快速生长培养物分离出的核用识别 c-myc 扩增子的探针进行杂交。图 4 显示所获得的每类细胞核的中心截面。测定每个截面中各杂交信号的位置和强度。各分析结果代表对 100 个随机选定的核的测量结果。横坐标表示距核中心的距离数(0 为中心, 1 为周边), 纵座标表示在 100 个核中观测到的各位置的信号数。曲线图显示每核体积内各位置信号的理论随机分布曲线, 图下方为更详细的说明。

图 6A-6C 显示 DM DNA 复制与 COLO-320DM 细胞凋亡的分析。在图 6A 和 6B 中, 快速生长 COLO-320DM 细胞培养物用 10 μ M BrdU 脉冲标记 1 小时。分离出细胞核, 并用 PFA 固定, 再用生物素标记的 DM 染色探针杂交, 按图 4 中的方法用结合 FITC 的抗生蛋白链菌素检测。结合 BrdU 的位点先用小鼠抗-BrdU 单克隆抗体再用结合罗丹明的抗小鼠免疫球蛋白进行检测。用共焦激光扫描显微镜检测双标记的核。图中显示两个典型视野的 BrdU 图像、FISH 图像以及合并图像(红伪色代表 BrdU, 绿伪色代表 FISH)。箭头指明选择性包载 DMs 的核芽, 三角箭头指明脉冲标记(BrdU-)时不处于 S 期的细胞。图 6C 概括了利用下文所述 TUNEL 法进行的 COLO 320DM 细胞凋亡分析的结果。在获得该典型照片的实验中, COLO 320DM 细胞用 100 μ M HU 处理 3 天。

箭头指明一个非凋亡细胞内的核芽，三角箭头指明同一视野内的一个凋亡细胞。

图 7A-7D 说明 p53 缺乏可使正常人二倍体成纤维细胞的 S 期出芽及微核形成增加。通过逆转录病毒转导产生野生型 (wt) WS1 人二倍体成纤维细胞、或表达新霉素抗性基因 (neo) 的转化体或既表达 neo 又表达人乳头状瘤病毒 E6 蛋白 (E6) 的转化体。在不加入或以所示浓度加入 HU 或 PALA 的情况下将这些细胞培养 3 天。图 7A 显示在盖片上生长的经上述方法处理并固定和 DAPI 染色的细胞。计算微核数，并以相对于间期核计数的微核出现频率 (%) 形式表示 (每个点的采样数均大于 1000)。图 7B 显示按图 2B 方法检查的这些药物对细胞周期的影响。在图 7C 和 7D 中，利用下文所述方法将 WS1 neo (三角形) 或 WS1 E6 (圆形) 培养物同步于 G1/S 交界，并在生长培养基中释放。在图 7C 中，通过加入 [³H]胸腺嘧啶来监控穿越 S 期或 M 期的进程 (实心符号)，或通过中期细胞数的显微检测方法确定有丝分裂细胞数 (空心符号)。图 7D 中，将盖片上的细胞固定，DAPI 染色，并计算相对于间期核数的微核出现频率。每个点计算的核数均大于 500，并且结果表示为 WS1 neo 及 WS1-E6 细胞的平均 ± S. D 形式 (每种细胞株独立测定 3 次; WS1 neo 数据点的误差范围小于符号的大小)。测定同一玻片上的核出芽频率，以确定微核形成系数 (每个点的核采样数均大于 1000)。

图 8 显示 H2B-GFP 嵌合肽的示意图。H2B 肽 (239 个氨基酸残基) 结合在 GFP 肽 (126 个氨基酸残基) 的 C-端 (H2B-G) 或 N-端 (G-H2B)。图中给出 H2B 肽和 GFP 肽连接处的额外氨基酸数。N-端的组蛋白尾加阴影框显示。

图 9 显示表达 H2B-GFP 的细胞。图为组成型表达 H2B-GFP 的 HeLa 活细胞的共焦显微图像。H2B-GFP 荧光显示为反射模式图像。

图 10A-10D 说明，H2B-GFP 结合到单核小体内部。图 10A 显示 HeLa 细胞核及表达 H2B-GFP 的 HeLa 细胞核的细球菌核酸酶消化结果。将分离的核消化 0、1、5、10、15、30 和 60 分钟。纯化通过结合核小体核心蛋白而免受消化的 DNA，并按照材料与方法中的详细描述进行分析。图 10B 显示单核小体群体的蔗糖梯度分析。由细球菌核酸酶消

化制得的单核小体蛋白-DNA复合物用5-30%平行蔗糖梯度进行纯化。提取各部分的蛋白并通过15% SDS-PAGE及考马斯染色加以分析。图中显示H2B-GFP蛋白(约45kDa)及天然核心组蛋白。图10C中,相同的蛋白等分试样经电泳并利用抗人H2B抗体进行蛋白免疫印迹分析。图中显示H2B-GFP蛋白及天然H2B蛋白。图10D中,提取各组分内的DNA并用1.5%琼脂糖凝胶加以分析。

图11A和11B说明H2B-GFP的表达不影响细胞周期的进程。图11A为HeLa细胞和表达H2B-GFP的细胞的GFP直方图。图11B为图11A的相同细胞经PI染色确定的DNA直方图。

图12A-12E显示H2B-GFP蛋白的定位。图为表达H2B-GFP的HeLa活细胞不同时期的共焦显微图像。分别显示间期(图12A)、前期(图12B)、中期(图12C)和后期(图12D)的细胞。各图板的左侧显示绿色GFP信号,右侧为反射模式图。图12E显示表达H2B-GFP的HeLa细胞的固定铺展染色体。图中显示GFP定位(左)和DAPI染色(右)。

15

发明实施方式

本发明发现,称为双微染色体(DMs)的自主复制的无着丝点额外染色体结构常介导人肿瘤内的癌基因扩增。据本发明人显示,通过S期核膜出芽启动的微核形成作用将DMs由核中去除可促进细胞的成熟、分化和死亡。

20

因此,本发明提供一种用于鉴定潜在治疗制剂的筛选方法和一种用于诱导适当细胞成熟或死亡的方法。实施本发明时所采用的适当测试细胞或细胞包括那些具有DM或额外染色体DNA并且能够通过微核形成过程消除该DNA的细胞。这些细胞包括,但并不限于,诸如细菌细胞或酵母细胞等原核细胞。另外还包括真核细胞,如大鼠、鸟类、鼠科、猿、哺乳动物,包括宠物和家畜、或人类的细胞。

25

就本发明而言,“药剂”将包括,但并不限于,有机小分子、复合物、组合物、DNA分子、RNA分子、蛋白、多肽、或融合蛋白。尽管没有始终明确声明,但应了解的是,该药剂可单独使用,或与其它在生物活性方面与本发明所述筛选方法确定的药剂相同或不同的药剂一同使用。这些药剂及方法也可与其它疗法相结合。

30

文中所用术语“诱导细胞的成熟或死亡”将包括凋亡、坏死或防止细胞分裂、致肿瘤性降低、抗药性丧失、成熟、分化或细胞的肿瘤表型回复的其它任何方法。如上文所述，该方法适当于处理具有 DM 或额外染色体 DNA 的细胞。这些细胞的识别可采用该领域熟知的任何用于鉴定扩增的染色体 DNA 或额外染色体 DNA 的方法。这些方法包括，但并不限于，DNA 杂交（见下文实施例 II D 以及 Sambrook et al. (1988)）、FISH（见下文实施例 II B, U.S. Patent Nos. 5,665,549; 5,633,365; 及 5,545,524）、荧光激活细胞分类技术（FACS）（见下文实施例 II C）、离心分部分离以及组蛋白-GFP 标记（见下文实施例 I）。已知某些类型的细胞中含有微核，如肿瘤抑制蛋白缺失或缺陷的细胞以及肿瘤或瘤细胞。肿瘤抑制蛋白缺陷的存在与否可由肿瘤抑制基因缺陷来决定。由于肿瘤抑制基因的突变可导致功能丧失，因此这些基因被称为“隐性”基因。在肿瘤形成之前，两个等位基因必需均丧失或失效，但单个等位基因的突变可导致人类群体形成可遗传的癌症易感体质。

该方法可在体外、来自体内或在体内实施。当在体外实施时，该方法可提供一种强有力的测定和筛选手段，来确定一种药剂或组合药剂是否能调节以及如何调节胞内 DM 或额外染色体 DNA 的减少或消除。在某些情况下，它有望使 DM 或额外染色体 DNA 的消除得到加强，而在另一些情况下，如希望抑制细胞凋亡时，它可通过微核形成的方法减少或抑制 DM 或额外染色体 DNA 的消除。因此，通过首先提供一种适当细胞的实例，本发明还提供一种筛选潜在药物的方法。该细胞在能够促进药剂插入细胞的适当条件下与潜在药物相接触。在经过适当时间后，对细胞或细胞培养物或上清液中的 DM 和/或额外染色体 DNA 的存在状况加以测定。在一项实施方案中，DM 或额外染色体 DNA 的减少或消除肯定地表明该药剂可作为一种潜在的治疗方法。在另一项实施方案中，则有望减少或抑制微核的消除。

因此，为在体外实施该方法而首先提供一种适当的细胞培养物或组织培养物。所用细胞为培养的细胞或经遗传修饰的细胞。作为选择，也可使用取自活检组织的细胞。将细胞在一定条件（温度、培养基及气体（CO₂））下培养适当时间，获得不存在密度依赖性抑制的指

数增长期。另外还需单独保留一份额外的细胞培养物；作为不接受药剂的对照加以测试。

5 正如对该领域的技术人员显而易见的，适当细胞可在微量滴定板中培养，并通过记录表型变化或细胞死亡来对不同的药剂进行同时测定。

当确定一种潜在药剂具有所需生物活性时，可将该药剂加入细胞，以诱导细胞的成熟或死亡。因此，本发明还提供一种诱导细胞成熟或死亡的方法，其中该细胞含有 DM 或额外染色体 DNA，并能够经历微核形成。该方法包括将细胞与一种可通过微核形成来诱导或增强胞内 DM 或额外染色体 DNA 消除的药剂相接触。该药剂在能够促进细胞成熟或死亡的条件下与细胞相接触。若该药剂是除 DNA 或 RNA 核酸分子外的一种组合物，则可将适当条件直接加到细胞培养物或培养基内。正如该领域的专家所了解的，必须加入“有效的”剂量，该有效剂量可根据经验加以确定。

15 当药剂为核酸时，可利用该领域熟知的方法将其加入细胞培养物，这些方法包括，但并不限于，磷酸钙沉淀法、显微注射法或电穿孔法。作为可选的或附加的方法，也可将核酸结合到一种用于掺入细胞的表达载体或插入载体内。包含一个启动子和一个经操作可接入多核苷酸的克隆位点的载体已为该领域的专家所熟知。这些载体能够在体外或体内转录 RNA，并且能够以商品形式从诸如 Stratagene (La Jolla, CA) 和 Promega Biotech (Madison, WI) 等供应商那里购得。为使表达和/或体外转录尽可能完善，或许有必要去除、加入或改变克隆的 5'和/或 3'非翻译区，以消除那些可能导致错误翻译的额外起始密码子或那些可在转录或翻译水平阻碍或降低表达的其它序列。作为选择，也可在紧接起始密码子的 5'端插入共有核糖体结合位点以增加表达。载体的实例有病毒，如杆状病毒和逆转录病毒，和噬菌体、粘粒、质粒、真菌载体，以及其它已证明可在多种真核及原核宿主内表达，并可用于基因治疗和单纯蛋白表达的该领域常用的重组载体。

25 其中有一些非病毒性载体，如 DNA/脂质体复合物，和特定病毒蛋白 DNA 复合物。为加强向细胞的输送，可将本发明的核酸或蛋白与结合 TCR、CD3 或 CD4 等细胞表面抗原的抗体或结合片段相结合。含有

导向抗体或其片段的脂质体也可在本发明所述方法中使用。本发明还规定在本文公开的方法中使用的导向复合物。

利用该领域所熟知的方法将多核苷酸插入载体基因组。例如，可在适当条件下使插入 DNA 和载体 DNA 接触，利用限制性内切酶在各分子上产生可相互配对的互补末端，并由连接酶连接。作为选择，也可将合成的核酸连接子连接在限制性多核苷酸的末端。这些合成连接子中可含有与载体 DNA 的特定限制酶切位点相对应的核酸序列。此外，还可连接含有终止密码子和适当限制酶切位点的寡核苷酸，以用于插入载体，所述的载体可含有，例如，如下所列的部分或全部成分：一种可筛选标记基因，如用于筛选哺乳动物细胞中稳定型或短暂型转染子的新霉素基因；人类 CMV 的立早基因中用于高水平转录的增强子/启动子；来自 SV40 中用于稳定 mRNA 的转录终止信号和 RNA 加工信号；用于游离基因正确复制的 SV40 多瘤复制起始点和 ColE1；通用多克隆位点；以及用于体外转录有义和反义 RNA 的 T7 和 SP6 RNA 启动子。该领域中还有许多众所周知的其它方法可以采用。

文中使用的“表达”是指多核苷酸转录成 mRNA 并翻译成肽、多肽或蛋白的过程。若多核苷酸起源于基因组 DNA，并已选定一种适当的真核宿主，则表达可能还包括 mRNA 剪切。表达所需的调控元件包括结合 RNA 聚合酶的启动子序列和结合核糖体的转录起始序列。例如，细菌表达载体就包含有一个启动子，如 lac 启动子，和 Shine-Dalgarno 转录起始序列以及起始密码子 AUG (Sambrook et al., 见上文)。同样，真核表达载体含有可被 RNA 聚合酶 II 识别的异源或同源启动子，以及下游多腺苷酸化信号、起始密码子 AUG 和用于核糖体脱离的终止密码子。这些载体能够以商品形式购得，或利用该领域熟知的方法中所描述的序列组装而成，如上文描述的构建载体的一般方法。表达载体可用于产生表达本发明所述受体的细胞。

通过减少细胞寿命、细胞分化或凋亡测定可确定是否已实现该方法的目标，即通过微核形成来减少或消除细胞中的 DM 或额外染色体 DNA。细胞分化的监控可利用组织学方法或通过监控与未分化表型相关的细胞表面特定标记，如初级造血干细胞上的 CD34，的出现或消失来加以实现。

为监控细胞凋亡，可将细胞以 2.5×10^5 细胞/孔的浓度平铺在玻璃盖片上。约两天后，当细胞铺展并粘连时将其固定，再用碘化丙锭染色并封固。利用荧光显微技术根据核的形态测定凋亡细胞和非凋亡细胞的数量，并计算非凋亡细胞的损失百分率。每个样品至少计算 100 个细胞，每次实验应至少重复一次。由于在任何正常生长的细胞培养物中均有一小部分细胞产生凋亡，因此还需确定未处理样品或处理样品中自发性凋亡的数量。然后用未处理样品中自发性凋亡的频率进行校正，使非凋亡细胞的百分率标准化。电镜观测则按照电镜技术的每个标准步骤来固定和处理细胞。还可使用该领域所熟知的细胞死亡第二

种测定方法，如 MTT 转化测定和结晶紫染色等。

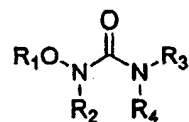
利用 U. S. Patent No. 5, 399, 346 中描述的修正方法，还可来自体内实施本发明所述方法。

含有实施文中所述筛选方法和体外方法所必需的药剂和说明的试剂盒亦被要求专利保护。

本发明还提供一种治疗疾病的方法，其中该疾病的特征在于受试者中存在含有 DM 或额外染色体 DNA 的细胞，并能够通过微核形成消除这些 DNA。该方法是给受试者施用有效剂量的药剂，该药剂可通过微核形成诱导或加强这些 DNA 的消除。

当受试者为大鼠或小鼠等动物时，该方法提供一种便利的动物模型系统，可在临床测试该药剂前使用。如果与具有此种病理细胞的未处理动物相比，通过细胞测试被确定可在该系统中减少或消除 DM 或额外染色体 DNA，或可改善与含有 DM 或额外染色体 DNA 的细胞的出现相联系或相关的症状，则该候选药剂为一种潜在药物。健康并且未经处理的细胞或动物的独立阴性对照组还可用于提供一种对比依据。施用一种选自羟基脲或胍唑的药剂，可用作体内和体外的阳性对照。

在一项实施方案中，文中所述方法中采用的药剂选自一个集合，其中包括羟基脲、胍唑或其衍生物。例如，该药剂具有结构：



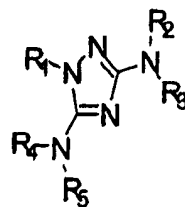
其中 R_1 为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基、酰基或 $-(CH_2)_n-X$, 其中 n 为 1-4 的整数, X 为取代的烷基、烯基或炔基, 并且取代基的选自下列一组, 它们是卤素、 $-OH$ 、 $-NR_2$ 、 $-OR$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、酰胺和酰基, 其中 R 为 H、烷基或芳基;

- 5 R_2 为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基、 $-C(O)R'$ 或 $-(CH_2)_n-X$, 其中 n 为 1-4 的整数, X 为取代的烷基、烯基或炔基, 并且其中的 R' 为烷基或芳基, 取代基则如上文定义;

- R_3 为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基、 OR'' 、 NR''_2 或 $-(CH_2)_n-X$, 其中 n 为 1-4 的整数, X 为取代的烷基、烯基或炔基, 10 并且取代基的选自下列一组, 它们是 $-OH$ 、 $-NR''_2$ 、 $-OR''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-OC(O)R''$ 、酰胺和酰基, 其中 R'' 为 H、烷基或芳基; 并且

- R_4 为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基或 $-(CH_2)_n-X$, 其中 n 为 1-4 的整数, X 为取代的烷基、烯基或炔基, 并且取代基的选择集合包括 $-OH$ 、 $-NR'''_2$ 、 $-OR'''$ 、 $-C(O)OR'''$ 、 $-OC(O)R'''$ 、酰胺和 15 酰基, 其中 R''' 为 H、烷基或芳基。

在一种替代方法中, 该药剂具有结构:



- 其中 R_1 为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基、酰基或 $-(CH_2)_n-X$, 其中 n 为 1-4 的整数, X 为取代的烷基、烯基或炔基, 20 并且取代基选自下列一组, 它们是卤素、 $-OH$ 、 $-NR_2$ 、 $-OR$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、酰胺和酰基, 其中 R 为 H、烷基或芳基;

- R_2 和 R_4 分别为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基、 OR' 、 NR'_2 或 $-(CH_2)_n-X$, 其中 n 为 1-4 的整数, X 为取代的烷基、烯基 25 或炔基, 并且取代基选自下列一组, 它们是 $-OH$ 、 $-NR'_2$ 、 $-OR'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、酰胺和酰基, 其中 R' 为 H、烷基或芳基; 并且

R_3 和 R_5 分别为 H、烷基、芳基、取代芳基、杂芳基、取代杂芳基

或 $-(CH_2)_n-X$ ，其中 n 为 1-4 的整数， X 为取代的烷基、烯基或炔基，并且取代基选自下列一组，它们是 $-OH$ 、 $-NR''_2$ 、 $-OR''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-OC(O)R''$ 、酰胺和酰基，其中 R'' 为 H、烷基或芳基。

羟基脲或胍唑能够以商品形式购得，并用作衍生物的原材料。利用 U.S. Patent Nos. 5,549,974; 5,639,603 和 5,679,773 中描述的修正方案，可通过本发明所述方法合成并测定这些有机小化合物的衍生物的生物活性。

本发明的这些药剂以及上文指出的化合物及其衍生物均可用于制备文中所述方法中使用的药剂。

文中确定可有效用于其预定用途的药剂均可向易于产生或可能产生某种与细胞中出现 DM 和/或额外染色体 DNA 相关的疾病，如癌症，的受试者或个体给药。当该药剂向小鼠、大鼠或人类患者等受试者给药时，可在药剂中加入药学上容许的载体，并对受试者进行全身或局部给药。为确定能够从治疗中受益的患者，可从患者中采集肿瘤样本，并测定细胞内 DM、额外染色体 DNA 或微核的存在情况。治疗剂量主要通过经验确定，并随所处理的病状、受试者以及药剂疗效和毒性的不同而改变。当向动物给药时，该方法可用于进一步确定药剂的疗效。作为动物模型的一个实例，对多组裸鼠 (Balb/c NCR nu/nu 雌性, Simonsen, Gilroy, CA) 各皮下注射约 10^5-10^9 个文中定义的过增殖癌细胞或靶细胞。当肿瘤形成时，将该药剂给药，例如可利用在肿瘤周围的皮下注射方式。用游标卡尺对肿瘤进行二维测量，以确定肿瘤减小的尺寸，每周测量两次。也可采用其它适当的动物模型。

体内给药可通过整个疗程内的单次、连续或间歇给药方式加以实现。确定给药的最有效方式和剂量的方法对该领域的专家而言是众所周知的，该方法随治疗所用组合物、治疗目的、处理的靶细胞、以及处理的受试者的不同而不同。由治疗医师选定的剂量和方式可进行单次或多次给药。适当剂量的制剂以及药剂的给药方法将在下文给出。

本发明所述药剂和组合物可用于药物的生产，并可通过常规的给药方法，如作为药用组合物中的活性成分，而用于人类和其它动物的治疗。

药用组合物可通过口服、鼻内、胃肠外或吸入疗法方式给药，并

且可采取片剂、锭剂、颗粒、胶囊、丸剂、针剂、栓剂或喷雾剂形式。另外也可采取将活性成分溶于水性或非水性稀释剂而制成的悬浮液、溶液和乳剂形式，或采取糖浆、颗粒或粉末形式。药用组合物中除可以含有本发明的一种药剂外，还可含有其它具有药学活性的复合物或多种本发明的复合物。

更详细而言，本发明所述药剂，也就是此处提到的活性成分，可通过任何适当的途径进行治疗性给药，如通过口、直肠、鼻、局部（包括透皮、喷雾剂、口腔及舌下方式）、阴道、胃肠外（包括皮下、肌内、静脉内及皮内方式）以及肺等途径。还应该了解的是，优选的途径将随接受者的状况和年龄以及治疗疾病的不同而不同。

理想的药剂给药方式应能够使活性复合物在疾病部位达到最高浓度值。其实现方式有，例如，将该药剂，或溶于生理盐水的该药剂，进行静脉内注射，或将，例如，包含活性成分的片剂、胶囊或糖浆通过口服给药。该药剂的所需血液水平可通过连续注入加以维持，以在患病组织部位提供治疗剂量的活性成分。有效组合物的使用可使治疗性组合物所需的各抗病毒药剂成分的总剂量低于单独使用各治疗性复合物或药物时所需的剂量，从而可减少副作用。

尽管可以将该药剂单独给药，但优选的是将其以药学制剂形式给药，该药学制剂中包含至少一种上文定义的活性成分和为此加入的一种或多种药学上容许的载体以及任选的其它药学制剂。各种载体必须是“容许的”，其含义是能够与制剂中的其它成分相容并且对患者无害。

制剂中可含有那些适合于通过口、直肠、鼻、局部（包括透皮、口腔及舌下方式）、阴道、胃肠外（包括皮下、肌内、静脉内及皮内方式）以及肺途径给药的成分。制剂能够以单位剂量形式方便地提供，并可通过制药领域中熟知的任何方法进行制备。这些方法包括将活性成分与构成一种或多种副组分的载体相结合的步骤。制剂的制备一般是将活性成分与液态载体或细碎的固态载体或二者均包括在内进行均匀而又密切地结合，如果需要可再将产品整形。

本发明中适合口服给药的制剂的提供方式可以是各含有预定剂量活性成分的胶囊剂、扁囊剂或片剂等不连续单元形式；粉末或颗粒

形式；溶于水或非水性流体的溶液或悬浮液形式；或水包油或油包水乳剂形式。活性成分的提供还可采用大丸剂、药糖剂或药膏剂形式。

片剂的制造可采用压缩法或模塑法，其中可选择加入一种或多种副组分。压缩片剂的制备是在适当机器中将粉末状或颗粒状等易流动形式的活性成分进行压缩，并与粘结剂（如聚烯吡酮、明胶、羟丙基甲基纤维素）、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂（如淀粉羟乙酸钠、交联的聚烯吡酮、交联的羧甲基纤维素钠）、表面活性剂或分散剂进行任意混合。模塑片剂的制备是在适当机器中将粉状复合物与一种惰性稀释液浸湿后所得的混合物模制成型。片剂可被任意包被或修整，并可配方化以使其活性成分缓慢释放或受控释放，例如，可利用不同比例的羟丙基甲基纤维素以获得所需的释放曲线。也可选择在片剂外加一层肠衣，使其在肠道部分释放，而不是在胃内释放。

适合于口内局部给药的配方包括，在调味基质，通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄耆胶，中含有活性成分的药糖块；在惰性基质，如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯胶，中含有活性成分的锭剂；以及在适当液态载体中含有活性成分的漱口剂。

本发明所述用于局部给药的药用组合物可配制成软膏、乳膏、悬浮液、洗剂、粉末、溶液、糊剂、凝胶、喷剂、气雾剂或油剂。作为选择，配方中还可包含浸有活性成分的绷带或橡皮胶等帖剂或敷料，并可任意包含一种或多种赋形剂或稀释剂。

如果需要，乳膏基质的水相中还可含有，例如，至少约 30% w/w 的一种多元醇，即具有两个或多个羟基的醇，如丙二醇、1,3-二醇丁烷、甘露醇、山梨醇、丙三醇和聚乙二醇，以及其混合物。局部制剂中还可包含能促进皮肤或其它受影响区域对药剂的吸收或穿透的复合物。这些皮肤穿透增强剂的实例有二甲砒及相关类似物。

本发明所述乳剂的油相可由已知方式的已知成分构成。尽管油相可以只包含一种乳化剂（或在其它地方称为成乳剂），但理想的油相为混合物，其中含有至少一种乳化剂和一种脂或一种油或既有脂又有油。优选而言，可将一种亲水性乳化剂与一种作为稳定剂的亲脂性乳化剂一同包含在内。既包含一种油又包含一种脂的方案为优选方

案。总之，包含或不包含稳定剂的乳化剂构成通常所说的乳化蜡，而乳化蜡加上油和/或脂构成通常所说的乳化软膏基质，乳化软膏基质则形成乳膏制剂的分散油相。

适合于在本发明所述制剂中使用的乳化剂和乳化稳定剂包括
5 Tween 60、Span 80、十八醇十六醇混合物、肉豆寇醇、单硬脂酸甘油酯和十二烷基硫酸钠。

由于活性复合物在大多数可用于药用乳剂的油中的溶解性非常低，因此适用于该制剂的油或脂的选择依据是要能够实现所需的装饰特性。因此，优选的乳膏剂产品应该是无油腻性、非污染性以及可清洗的，并且应具有适当的粘稠度以避免从软管或其它容器中泄露。可
10 使用的有直链或支链烷基的单价或二价酸酯，如二异己二酸酯、异十六基硬脂酸酯、椰子脂肪酸的丙二醇二酯类、豆蔻酸异丙酯、油酸癸酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酸丁酯、2-乙基己基棕榈酸酯，或称为 Crodamol CAP 的支链酯混合物，最后三种则为优选的酯。它们按所需特性的不同可单独或结合使用。作为选择，也可使用高熔点液体，
15 如白色软石蜡和/或液体石蜡或其它矿物油。

适合于对眼进行局部给药的制剂还包括眼药水，其中活性成分溶解或悬浮在适合于该药剂的载体，尤其是水性溶剂中。

用于直肠给药的制剂可作为含有可可脂或水杨酸酯等适当基质的栓剂形式提供。
20

适合于阴道给药的制剂可作为阴道栓剂、卫生棉条、乳膏剂、凝胶、糊剂、泡沫剂或喷雾剂形式提供，其中除药剂外还含有该领域所熟知的适当载体。

载体为固体的适合于鼻部给药的制剂包括颗粒大小范围约为，例如，
25 如，20-500 微米的粗粉，其给药方式需用鼻子使劲地吸，即把含有粉末的容器置于鼻子附近并通过鼻孔快速吸入。载体为流体的适合于以，例如，鼻内喷雾、滴鼻液、或用喷雾器喷雾给药等方式进行给药的制剂包括药剂的水性或油性溶液。

适合于胃肠外给药的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射液，其中
30 中可含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂以及使制剂与预定接受者的血液等渗的溶质；以及水性和非水性无菌悬浮液，其中可含有悬浮剂和增

稠剂以及可使复合物定向于血液成分或一种或多种器官的脂质体或其它微粒系统。该制剂可置于安瓿和小药水瓶等单剂量或多剂量密封容器中提供，并可在冷冻干燥（冻干）状态下储存，在使用前只需加入无菌液态载体，例如加入水即可用于注射。临时注射液和悬浮液可由上述种类的无菌粉末、颗粒和片剂制得。

所含药剂的量为一日剂量或一日单位、或如上文所述的日亚剂量、或其适当部分的制剂为优选的单位剂量制剂。

应当了解的是，就所述制剂的类型而言，除上文特别提到的成分外，本发明的制剂还可含有该领域的其它传统药剂，如适合于口服给药的制剂中可进一步含有甜味剂、增稠剂和调味剂等药剂。此外还将把其它适当的组合物和疗法结合到本发明的药剂、组合物和方法中。

本发明还进一步提供一种检测细胞内染色体 DNA 和额外染色体 DNA 的方法。该方法步骤是首先在细胞内插入一种可检测的标记蛋白，其中该蛋白能够与细胞内的染色体 DNA 和额外染色体 DNA 特异结合，然后检测标记，从而检测胞内的染色体 DNA 和额外染色体 DNA。在一项实施方案中，该蛋白为组蛋白或具有保守氨基酸取代的类似物，以及融合蛋白。在一项实施方案中，可检测标记为荧光标记，如多管水母属绿色荧光蛋白，它可经修饰产生红色或黄色荧光。作为选择，也可使用抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素或生物素。在一项可选实施方案中，插入步骤包括将细胞与一种载体接触，其中该载体中含有经可检测标记的组蛋白融合蛋白的编码 DNA。

上述方法还可用于分析体内染色体行为、监控染色体运动，即细胞内染色体片段的丢失或易位、检测以胞内含有 DM 或额外染色体 DNA 为特征的病理细胞，以及监控患者体内该病理的进展状况。所有这些方法均包括在细胞内插入一种可检测的标记蛋白，其中该蛋白能够与细胞内的染色体 DNA 和额外染色体 DNA 特异结合，然后检测标记，从而检测胞内的染色体 DNA 和额外染色体 DNA。然后可将所测染色体区域的存在、缺失或定位情况与以前的样品分析结果或正常细胞进行对比，从而完成染色体畸变和/或变化的分析和监控。也可通过该方法对病理细胞进行检测，其中该病理细胞含有扩增 DNA 或额外染色体 DNA。诸如前列腺癌等癌细胞和/或肿瘤细胞均可检测。

以下实例用来对本发明进行说明，但不是限制本发明。

实验实例

I. DM 和额外染色体 DNA 与表型丧失的关系

5 细胞培养

人类 COLO 320DM (ATCC Accension No. CCL 220) 和 COLO 320HSR (ATCC Accension No. CCL 220,1) 神经内分泌肿瘤细胞来自美国典型培养保藏中心, 12301 Parklawn Drive, Rockville Maryland, 20853, 美国并通过有限稀释法获得单细胞亚克隆 (Von Hoff, et al. 10 (1988))。利用 c-myc 粘粒 DNA 经 FISH 确定 c-myc 扩增基因对 DMs 或 HSRs 的定位。细胞在补加有 10%胎牛血清 (FBS) 的 RPMI1640 培养基中增殖。由美国模式培养收集所 (CRL 1502) 获得的 WS1 人胚胎皮肤成纤维细胞培养于 Dulbecco's 改进型 Eagle's 培养基 (DMEM) 中, 该培养基补加有 10%经热灭活并透析的 FBS 以及 1×MEM 非必需氨基酸。WS1neo 和 WS1E6 来自 S. Linke 博士的惠赠, 并分别由表达新 15 霉素抗性蛋白编码基因或新霉素抗性蛋白和 E6 蛋白编码基因的逆转录病毒载体感染 WS1 而产生 (E6 蛋白来自人乳头瘤病毒 16) (Linke, et al. (1996))。RPE-h (正常的人视网膜色素上皮细胞) 及其 neo 和 E6 衍生物同样由 S. Linke 博士惠赠, 其亲代细胞来自 Cell 20 Genesys, Inc. (Foster City, CA)。上皮细胞的培养方法与 WS1 相同。

B. 化学制剂

阿非迪霉素、5-溴-2'-脱氧尿苷 (BrdU)、香豆素 (1,2-苯并吡 25 喃酮)、去铁胺甲磺酸 (甲磺酸去铁胺)、DMSO、羟基脲 (HU)、烟酰胺、胸腺嘧啶以及诺考达唑 (5-(2-噻吩基羰基)-1H-苯异咪唑-2-yl-基甲酚) 均由 Sigma (St. Louis, MO) 购得。胍唑 (3,5-二氨基-1,2,4-三唑) 来自 Aldrich (Milwaukee, WI), PALA (N-脯乙酰-L-天冬氨酸) 则由药物生物合成和化学分部, 治疗开发项目, 30 癌症治疗部, 国立癌症研究院 (Bethesda, MD) 提供。

C. 细胞周期分析

按前人所述 (Yin, et al. (1992) and Di Leonardo, et al. (1994)), 用流式细胞术对细胞周期的分布进行分析。经特定浓度的药物处理了特定时间的细胞用 $10\mu\text{M}$ BrdU 标记 30 分钟。收集细胞, 5 用 70%乙醇固定, 含有 0.5% Triton X-100 的 0.1N HCl, 然后煮沸 10 分钟, 再迅速制冷使 DNA 变性。然后将核与结合 FITC 的抗 BrdU 抗体 (Boehringer Mannheim) 共保温, 并用含有 RNase ($200\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 碘化丙锭 (PI) 复染。利用 Becton Dickinson FACScan 对样品进行分析。每份样品收集 1 万个数据。按前人所述 (Yin, et al. 10 (1992) and Di Leonardo, et al. (1994)) 用 Sun Display 对数据进行分析。

D. 微核定量

利用在标准低渗膨胀条件下 (Lawce and Brown (1991)) 制备的铺展染色体, 来检测 COLO 320DM 细胞中含有 DM 序列的微核, 然后 15 按前人所述 (Shimizu, et al. (1996)) 的方法用生物素标记的 c-myc 粘粒探针进行杂交。用 DAPI (Sigma; $1\mu\text{g}/\text{ml}$ in VectaShield, Vector Inc.) 对铺展染色体进行染色, 并由此确定总微核数 (图 3)。将贴壁细胞 (WS1、RPE-h 及其衍生物) 培养于盖片上, 用冷丙酮固定 (-20C , 5 分钟), 再用冷甲醇固定 (-20C , 5 分钟), PBS 重新水化, 20 并用 DAPI ($1\mu\text{g}/\text{ml}$ in VectaShield) 染色。用 $60\times$ 或 $100\times$ 的物镜和配有适当表荧光滤片的 Zeiss 荧光显微镜计算总微核或富含 DM 的微核的数量。结果以相对于间期核计数的“微核出现频率 (%)”形式表示 (每个点的最小采样数为 1000)。

25

E. 细胞同步化

按前人所述 (Stein, et al. (1994)) 进行同步化。首先用过量胸腺嘧啶 (2mM) 处理 17 小时, 使快速生长的 COLO 320DM 细胞抑制于早 S 期。然后用培养基清洗细胞, 并在含有 $25\mu\text{M}$ 2'-脱氧胞苷的生长培养基中置 12 小时 (以逆转胸腺嘧啶的毒性), 然后在 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 30 阿非迪霉素中培养 17 小时, 使细胞在进入 S 期时被抑制。用培养基

清洗被抑制的细胞，然后置于不含药物，或含有诺考达唑(0.4 μ g/ml)的培养基中。通过加入 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶来监控细胞周期的进展(Stein, et al. (1994))。为检测有丝分裂过程的进展，用多聚甲醛(PFA; 2%)固定一部分培养物(1ml)并用DAPI染色。利用荧光显微镜计算有丝分裂期细胞的出现率。WS1 E6细胞的同步化是通过将其接种于具有或不具有盖片(18 \times 18mm)的15cm培养皿中而实现。在传代后第二天，去除原培养基并替换为含有0.1% FCS的培养基，再培养48小时。将通过血清缺失而被抑制在G0期的细胞置入含有5 μ g/ml阿非迪霉素的生长培养基中培养15小时，使其抑制于S期起始阶段。把培养基替换为不含药物的新鲜培养基，使细胞释放并进入S期。通过加入 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶来监控进入S期的进展情况(Stein, et al. (1994))。同时，移取盖片，用丙酮和甲醇染色，DAPI固定，并按照上文所述计算微核、核出芽以及有丝分裂细胞的出现率。

15 F. TUNEL 测定

TUNEL 测定是根据前人发表的一套步骤(Gavrieli, et al. (1992))按下列所述的修改方法。简单地说，即用2%的PFA固定COLO 320DM细胞(室温10分钟)，并利用细胞甩片机离心到玻片上。细胞用冷甲醇进一步固定(-20 $^{\circ}\text{C}$ ，5分钟)，再用冷丙酮固定(-20 $^{\circ}\text{C}$ ，5分钟)。玻片用PBS重新水化，然后在室温下用反应缓冲液(200 mM 二甲胂酸钠，1 mM MgCl_2 ，1 mM β -巯基乙醇，pH7.2)平衡15分钟。末端标记反应采用将玻片在37 $^{\circ}\text{C}$ 下与含有10 μM 生物素-dUTP(Boehringer Mannheim GmbH, 德国)和0.3单位/ μl 末端脱氧核苷酸转移酶(Toyobo Co., Osaka, 日本)的反应缓冲液保温60分钟。将玻片广泛清洗，用20% FCS封闭，并利用结合FITC的抗生蛋白链菌素按照FISH规程中的描述(见下文)检测结合的生物素。玻片用RNase A处理(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ ，20分钟)，PI复染，并在用于观测FISH的条件下观察。

30 G. 探针制备及FISH

除利用BioPrime DNA标记系统(Life Technologies Inc.

Gaithersburg, MD) 直接将纯化微核中的 DNA 用于生物素标记之外, 其余均按照文献所述 (Shimizu, et al. (1996)) 从纯化微核中制备探针。按照前人所述 (Shimizu, et al. (1996)) 利用经甲醇/醋酸标准化固定的核进行 FISH。用共焦显微镜评测 DM 的定位时需采用以下方法来保持核的球形。该规程以用于人淋巴细胞而开发的规程 (Ferguson and Ward (1992) and Vourc'h, et al. (1993)) 为基础, 但由于核的严重聚集而不能将其直接用于 COLO 320DM。改进方法包括在 $260 \times g$ 下离心 5 分钟使 10 ml COLO 320DM 细胞沉淀, 再完全去除上清液。将细胞温和悬浮于 50 μ l 生长培养基, 并缓慢加入 10 ml 预热 (37°C) 的 75 mM KCl, 2 mM CaCl_2 。利用上述条件立即将悬浮液离心, 并完全去除上清。温和地使细胞沉淀松散, 并悬浮于 1ml 4°C 的 75 mM KCl 和 2 mM CaCl_2 中, 再加入 1ml 4°C 的 75 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 0.5% Triton X-100。悬浮液在冰上置 10 分钟, 然后进行 Dounce 匀浆 (松配杵, 5 分钟, 4°C)。悬浮液中加入 1.5 倍体积溶于 PBS 的 5% PFA, 并在室温下保温 10 分钟, 并偶尔温和摇动。保温后, 再加入 1/10 体积含有 1% BSA 的 1M Tris-HCl (pH7.4), 并于室温下再保温 10 分钟并温和摇动。固定的核用含有 1% FCS 的 PBS 洗两次, 并在 4°C 下保存一周。在进行 FISH 杂交前, 通过细胞甩片将固定的核沉淀于涂有多聚 L-赖氨酸的玻璃片上 (Matsunami Glass Ind., Ltd., 日本)。玻璃片用 RNase A 处理 (Sigma, 100 μ g/ml 溶于 $2 \times \text{SSC}$, 37°C , 60 分钟), 再用 $2 \times \text{SSC}$ 清洗两次, 每次 3 分钟, 然后用溶于 PBS 的 3% BSA 封闭并在 37°C 下放置 30 分钟。玻璃片于室温下在溶于 $2 \times \text{SSC}$ 的 50% 甲酰胺中保温 30 分钟, 以使缓冲液达到平衡, 再加入含有标记探针的杂交液 (按 FISH 的标准方法制备 (Shimizu, et al. (1996)))。用盖片覆盖样品, 并用橡胶泥完全密封, 在 85°C 下变性, 并通过 37°C 保温过夜完成杂交。杂交探针的清洗与检测均按照前人所述 (Shimizu, et al. (1996)) 进行。图像是利用 BioRad MRC600 共焦系统在 Zeiss Axiovert 135 显微镜上获得 (图 6 的方法可参考下文)。多数图像是利用 $\times 63$ 物镜 (Zeiss, 复消色差物镜, 1.40, 油镜) 获得, 并且放大比为 2。所得数字图像用伪彩色表示, 图像的合并采用 Adobe Photoshop (Adobe systems Inc., Mountain View,

CA)。

H. 间期核内的 DMs 定位

以相应核的直径为单位长度测量各杂交信号与核中心的距离，由此确定共焦核切面中 DMs 的定位。PI (DNA) 和 FITC (杂交信号) 的核中心共截面图像来自随机选定的核。数字图像的合并采用 COMOS 软件 (BioRad, Hercules, CA)。为能够精确地测量距离，而将各 FITC 信号的阈值降低，直至每个代表了一个或多个 DMs 区域的信号成为单一点。确定该点到核中心的距离以及核的直径。用前一数字除以后一数字来表示各信号在核中的位置。按照这种表示方法，核的中心为 0，核膜的外边界为 1。同时，利用任意单位标度测定各信号的密度。确定每个核切面中各信号的该密度值时，每个样品至少随机选定 100 个核。由这一过程得出各二维焦平面中的 DM 信号分布。每个核的高度和宽度近似相等，提示文中所述的固定方法确实保持了核的球状形态。假定每个核体积内的信号分布与我们在 2D 空间的相应半径内检测的信号数量相符。将信号数量对各径向位置加以修正，使其代表在相应半径的球形体积内所应出现的数量。

I. 通过加入 FISH 和 BrdU 掺入来同时确定 DM 位置和 DNA 复制

快速生长的 COLO 320DM 培养物用 10 μ M BrdU (Sigma) 脉冲标记 1 小时，然后立即收集细胞。按上文所述将核分离，用 PFA 固定，并利用纯化的微核探针进行 FISH。在 FISH 后确定 BrdU 的掺入情况，方法是将玻片与溶于含有 0.1% BSA 的 PBS 中的终浓度为 10 μ g/ml 的小鼠抗 BrdU 单克隆抗体 (Pharmlngen, San Diego, CA) 共保温。玻片于 37 $^{\circ}$ C 保温 60 分钟后，用 PBS 清洗 3 次，每次 5 分钟。然后用终浓度为 10 μ g/ml、溶于含有 0.1% BSA 的 PBS 中的罗丹明标记的抗小鼠 Ig (Boeringer-Mannheim) 处理玻片。玻片于 37 $^{\circ}$ C 保温 60 分钟，再用 PBS 清洗 3 次，每次 5 分钟。利用 Axiovert 135M 显微镜 (Zeiss) 上配备的 MRC 1024 (BioRad) 共焦系统观察未经复染的细胞核，所得数字图像按上文所述进行处理。

J. 间期时的核出芽可选择性包载 DMs

DMs 等无着丝点染色体片段从细胞中丢失的传统机制涉及末期后将其封装在重新形成核膜内(综述可参考 Heddle, et al. (1991))。但有报告称, 经 γ 射线照射后可在间期产生类似微核的核异常现象 (Duncan, et al. (1985))。这里采用一种具有 c-myc 扩增基因的细胞系来评定有丝分裂期后结构及间期结构对 DM 微核形成的相对影响。

图 1 显示 COLO 320DM, 一种神经内分泌起源的结肠癌细胞系, 的荧光原位杂交 (FISH) 分析。特异识别 COLO 320 细胞中 c-myc 扩增子的生物素标记 FISH 探针, 来自 COLO 320DM 细胞的纯化微核 (Shimizu, et al. (1996))。利用该探针所得的 FISH 分析结果表明, 群体中 95% 以上的细胞只含有 DMs, 其余细胞则含有 DMs 以及一种染色体内扩增区域(图 1A 箭头所示)。前中期铺展染色体中的 DMs (图 1A) 似乎并非随机分布, 因为其中有很多是位于前中期环的边缘, 这与前人的报导 (Levan and Levan (1978)) 相一致。另外还利用共焦显微技术观测了间期核中的周边核定位(见下文)。

由 COLO 320DM 细胞的指数增长培养物所得的分析结果均显示出具有突起或“芽”的间期核。约 40-80% 的核芽含有高度浓缩的 DM 序列(图 1, B-D 图板显示典型的含有 DMs 的芽; C 图板显示两个微核和一个核芽)。图 1D 显示的核芽高度富含扩增序列, 因为它含有三个可被 PI 染色的簇区(红色信号表示 DNA 染色, 因为这些样品首先用 RNase 进行广泛处理), 而每个 PI 阳性簇区均能够与微核 DNA FISH-探针强烈杂交(图 1D'; 合并显示于图 1D'')。偶尔会观测到不与 DM 探针杂交的 PI-阳性芽, 这表明与 DM 序列不相关的 DNA 也能够掺入核芽内。但含有 DM 序列的核芽相对而言似乎含有极少的不与 FISH 探针杂交的 PI 反应物质, 这表明核芽的 DNA 俘获对 DMs 有高度选择性。采用由包含 c-myc 的粘粒所获得的 FISH 探针、或不同的固定方法(如多聚甲醛, 见图 6)或采用核分离所使用的等渗方法, 均同样很容易地表明核芽对 DMs 的选择性包载(数据未显示)。

30

K. 核芽与微核均在 S 期时形成

产生核芽的核显示出间期细胞所具有的典型形态，而不是有丝分裂期时的形态。因此测定微核与核芽的形成动力学，以确定这些结构是否可产生于 S 期。利用两步法将 COLO 320DM 细胞同步于 G1/S 交界，该方法包括用高浓度的胸腺嘧啶处理细胞，使其阻滞于 S 期，再将抑制解除 12 小时，使细胞周期的进程能够穿过并脱离 S 期，然后与 DNA 聚合酶抑制剂阿非迪霉素保温，使细胞阻滞于下一 S 期的起始点 (Stein, et al. (1994))。去除阿非迪霉素，使细胞快速进入 S 期，并在 4 小时后达到 DNA 合成的高峰，在 10 小时后达到有丝分裂的高峰 (图 2A)。细胞在抑制解除 19 小时后进入同步性较差的第二个周期。

利用 DNA 特异性染料 4',6-二脒-2-苯吡啶 (DAPI) 确定微核与核芽的发生率 (图 2C 和 2D)。所有样品用来自微核的 DM 着色探针杂交，以确定这些结构是否包含扩增序列。具有核芽的核的发生率在 G1/S 交界处 (即 $t=0$) 几乎为零，并在细胞步入早 S 期时 ($t=0-5$ 小时) 显著增加，在 S 期后期时又减小，然后当细胞进入并穿过第二个 S 期时又逐渐增加 (图 2C)。FISH 分析说明核芽内含有 DMs (图 2E)。重要的是，总微核或含有 DMs 的微核的数量的增加和减少与核芽数量的增加和减少非常吻合 (图 2C)。

在 S 期发展过程中，核芽与微核可再次出现，并且对其形成而言并非必须经历 M 期。

出芽与微核形成的动力学分析及核形态分析结果表明，这两个事件均可发生于 S 期。由于减慢复制叉进程可导致 DNA 断裂 (Eki, et al. (1987) and Linke, et al. (1996))，并且微核可优先俘获无着丝点的片段 (Von Hoff, et al. (1992) and Shimizu, et al. (1996))，因此对这些抑制因素是否能增加 S 期的微核形成效率进行了测定。测试的药物包括核糖核苷酸还原酶抑制剂 (HU、去铁胺、胍唑)、可催化嘧啶再次生物合成前三个步骤的 CAD 酶复合物的抑制剂 (PALA)、以及阿非迪霉素。DNA 合成抑制剂导致微核形成的显著增加，它通常与处 S 期细胞的增加相关 (图 3A 和 3B)。在能够严重抑制 S 期的浓度下使用去铁胺和 PALA 时发现，这些药物导致了微核形成效率的急剧下降 (图 3B)。这些数据表明，能够阻滞复制叉进程并使 S 期延长

的抑制剂可导致微核形成。

对不影响 DNA 合成的抑制剂的效应进行分析，以确定阻碍诸如 DNA 修复等其它 DNA 事务或扰乱膜结构是否会导致微核形成。由于 DNA 修复过程包括 ADP 的核糖基化 (Sato and Lindahl (1992))，并且抑制修复可使无着丝点染色体片段产生的概率增加，因此测试采用了多聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (ADP-核糖) 聚合酶的两种抑制剂 (烟碱和香豆素)。据前人报导，膜活化极性复合物 DMSO 可减少某些肿瘤细胞系内 DM 拷贝数 (Shima, et al. (1989) and Eckhardt, et al. (1994))，在此对 DMSO 的效应也进行了测试。DMSO 使微核形成增加，但不使 S 期延长 (图 3A 和 3B)。香豆素对微核形成没有影响，而烟碱在胞内损伤量明显增加的条件下使微核形成稍有增加，因为处于 G2 期的细胞显著增加 (图 3A 和 3B)。这些数据与至少有两种机制可提高微核形成效率的观点相符合，一个可能涉及到复制叉进程的干扰，另一个可能涉及到 S 期外所发生的事件。

15

L. DMs 的核周边定位与其通过出芽而被消除相关

利用共焦显微技术了解 DMs 被选择性包含在核芽内的机制以及这些结构的形成机制。为能够最好地保持核的形态而用 PFA 对核进行固定 (Manuelidis and Borden (1988))。

图 4A-C 显示分离自未处理的快速生长 COLO 320DM 细胞的三个代表性核的共焦面。FISH 结果显示，显著的杂交强度表明大多数 DM 序列优先定位于核周边，并且显示出 DM 信号在细胞核最边缘的群集及数量。注意 DM 序列在核周边随机分布的基本偏差 (图 5A 显示测量的 100 个间期核内相对于每个核中心的 DM 位置的定量结果)。相反，近亲细胞系 COLO 320HSR 内随染色体扩增的序列几乎在整个核内随机分布 (图 5C)。用 HU 处理优先减少核周边的 DMs (图 4D-F，定量结果显示于图 5B)，竞争性 PCR 扩增的测定结果表明 HU 处理使每个细胞内的 DM 含量减少了约三倍 (方法见 Shimizu, et al. (1996)，数据未给出)。综合以上数据，这些结果表明，定位于核周边的 DM 序列可优先掺入核芽，然后通过微核形成从核内去除。

30

M. 将复制的 DM 序列掺入核芽

上文所述的 S 期进程、核出芽和微核形成之间的相关性，致使本发明人去研究是否进行复制的 DM 序列可被定向包含在核芽内。用 BrdU 脉冲标记 COLO 320DM 细胞，然后用 DM FISH 探针对分离的核进行杂交。随后用抗 BrdU 抗体和荧光素标记的二级抗体进行反应，使核、核芽以及含有在短暂标记间隙进行 DNA 复制的 DMs 的微核可被同时检测。两个代表性共焦面的 FISH 分析结果（图 6A-A''，B-B''）显示，这些细胞内的核芽（箭头所示）内含有高度浓缩的 DM 序列。核、核芽以及每个核的外周区域均与 BrdU 结合，表明形成这些核芽的核在核芽形成时正在进行 DNA 合成。表 1 显示，BrdU⁺, DM⁺核芽（1, 1'型）占整个含 DM 核芽群体的 48%。也有一些核与 BrdU 结合，但其产生的核芽却不被标记（2, 2'型；35%）。这些核芽中也有一些产生于 S 期（与前一周相反），并且它们未显示出可与 BrdU 结合，因为其 DNA 在短暂的 BrdU 温育期间不进行复制。

从表面上看，此处描述的 S 期微核形成过程类似于 γ 射线照射（Duncan, et al. (1985)）或秋水仙素处理（Duncan and Heddle (1984)）后由凋亡机制诱导的“核异常”。但是由核产生的核芽中不含有高度浓缩的 DNA，表明它们在形成核芽时并没有发生凋亡。为确定是否能把出芽和微核形成与凋亡分开，而对核芽中是否含有凋亡细胞特征性 DNA 浓缩片段进行测定。DNA 片段的检测采用 TUNEL 测定法，在该方法中利用末端转移酶将 BrdU 加到凋亡 DNA 片段产生的 3'-OH 基团上（Gavrieli, et al. (1992)）。为观测所有的核及核芽，细胞同样用 PI 染色。图 6C-C''显示由该 COLO 320DM 细胞分析所获得的数据实例。TUNEL 测定结果显示一个具有叶状细胞核的细胞，细胞核具有强烈的 TUNEL 反应，并且特征性含有在凋亡细胞中观测到的 DNA 浓缩片段（Cohen (1993)）。中间图板的 PI 染色结果显示一个细胞，该细胞产生的核芽不被 TUNEL 测定染色，并且不具有凋亡核的固缩结构。同步化实验显示，在 S 期高峰期时约有 5% 的细胞产生核芽（例如，见图 2C），但只有 0.5-1% 为 TUNEL 阳性。

N. 微核形成在正常细胞内很少发生，而一旦 p53 失活则发生率

上升

正常细胞内出现微核形成的几率明显低于肿瘤细胞系(Roser, et al. (1989) and Bondy, et al. (1993))。由于染色体断裂可诱导微核形成(Heddle and Carrano (1977))，因此在肿瘤细胞内观
5 测到的微核形成的增加可能是由可增加 DNA 断裂概率的突变所导致。肿瘤抑制因子 p53 控制着 G1 检验点，该检验点可被经 PALA 处理而导致的 DNA 断裂和 rNTP 损耗所激活，而在 PALA 处理时进入 S 期的 p53-缺陷细胞系中可发生 DNA 断裂(Livingstone, et al. (1992); Yin, et al. (1992) and Linke, et al. (1996))。如上所述，PALA
10 也能够诱导 COLO 320 细胞内的 S 期微核形成。这些数据致使我们去研究是否正常二倍体成纤维细胞内的 p53 失活可导致 S 期出芽及微核形成的增加。

所使用的有人 WS1 正常二倍体成纤维细胞和两种通过新霉素磷酸转移酶基因的逆转录病毒转导而产生的几乎同源的衍生物(WS1-
15 neo)或一种含有人乳头状瘤病毒 E6 基因的致癌衍生物(WS1-E6)。E6 基因产物可通过泛素依赖性途径促进 p53 的降解(Scheffner, et al. (1990) and Crook, et al. (1991))。细胞周期检验点调节装置可在存在 DNA 损伤或 rNTP 浓度有限的情况下控制细胞进入 S 期，它在表达突变 p53 和 E6 致癌蛋白的人类细胞以及敲除 p53 的纯合小
20 鼠胚胎成纤维细胞内似乎被同等程度地灭活(Kastan, et al. (1992); Kuerbitz, et al. (1992); Livingstone, et al. (1992); Yin, et al. (1992); White, et al. (1994); Linke, et al. (1996) and Linke, et al. (1997))。此前的文献显示，在 p53^{-/-}MEFs 内由 γ 射线照射诱导的微核发生率要高于野生型 MEFs 的频率(Huang, et al. (1996))。因此，在 E6 致癌蛋白表达时观测到的对微核形
25 成的影响很可能与 p53 的灭活相关，而不是与其它可被 E6 影响的蛋白相关。

图 7 显示的数据表明，E6 基因的表达可提高 WS1 细胞的微核形成率。HU 或 PALA 不能使 WS1 细胞显示的低微核形成率有所提高(图
30 7A)。PALA 可导致细胞周期阻滞于 G1 期，但 HU 在所用浓度下不能显著影响 S 期 WS1 细胞的比例(图 7B)，这与以前的研究(Linke, et

a1. (1996)) 相一致。相反, E6 的表达可提高这些在正常条件下生长的细胞的微核形成率, 并且 HU 和 PALA 均可导致微核形成率的进一步显著提高 (图 7A), 而处于 S 期的细胞数量也相应地显著增加 (图 7B)。在其它细胞类型中, E6 的作用对象, 这里推断是 p53, 在限制
5 微核形成方面具有明显的重要性, 因为采用正常视网膜色素上皮细胞 (RPE-h) 及其表达 E6 的衍生物时获得了类似的结果。

HU 和 PALA 在 COLO 320DM 细胞和 WS1 E6 细胞内均可使 S 期延长并诱导微核产生, 这致使我们去评价 S 期出芽是否是 WS1-E6 细胞内微核形成的主要机制。利用血清缺乏将 WS1-neo 和 WS1-E6 细胞阻滞
10 于 G0 期, 然后在存在阿非迪霉素的情况下释放, 使细胞阻滞于 G1/S 交界 (图 7C)。利用血清缺乏进行的同步化不提高 WS1-neo 细胞内的微核形成率, 并且 S 期的微核形成率及出芽率均没有增加 (图 7D)。相反, 当 WS1-E6 细胞发展至 S 期时去除其中的阿非迪霉素可导致核出芽率及微核形成率均显著提高 (图 7D)。由于 DNA 损伤不会诱导
15 WS1 或 WS1-E6 细胞的凋亡 (Di Leonardo, et al. (1994); Linke, et al. (1996) and Linke, et al. (1997)), 因此在这些细胞中观测到的 S 期微核形成的增加与凋亡程序无关。

0. 在 S 期出芽和微核形成前无需产生凋亡程序; 但它们可导致
20 凋亡

凋亡可产生核泡 (Dini, et al. (1996)), 并且推测可产生与微核类似的“核异常” (Duncan and Heddle (1984) and Duncan, et al. (1985))。但本文报导的分析结果表明, 产生核芽的核并不象
25 凋亡核那样呈固缩及碎裂状。处于单一 S 期的 COLO 320DM 细胞所产生的核芽及微核均不呈 TUNEL 阳性, 这表明它们不含有破碎的 DNA。尽管在 HU 处理的 COLO 320DM 培养物中, 凋亡细胞的确有所增加, 但这需要延长培养时间, 并且在 c-myc 扩增基因的基本部分被去除之后才发生。此外, 经历出芽和微核形成的细胞还可存活数天, 而这对微核形成前已激活凋亡程序的细胞而言是不可想象的。与上文所述相类
30 似的时程实验 (如图 2) 表明, 单一 S 期内的出芽增加, 而经历凋亡的细胞数量大体保持不变, 并且产生核芽的那些核中大多数不呈

TUNEL 阳性。最后，尽管它不是在正常成纤维细胞中所观测到的凋亡（Di Leonardo et al. (1994)），并且 p53 功能的丧失通常会使细胞对可导致 DNA 损伤的生长条件所引起的凋亡更具有抗性（White (1994)），但推测由 p53 功能丧失而引起的乳头状瘤病毒 E6 致癌基因的表
5 达，可诱导正常二倍体成纤维细胞内的 S 期出芽及微核形成。

表 1: 出芽及微核形成的定量结果

BrdU 标记			
类型	DM+核芽内	核内	各种类型的 DM+核芽的比例
1	+	+	26/60 (43%)
1'	±	+	3/60 (5%)
2	-	+	9/60 (15%)
2'	-	±	12/60 (20%)
3	-	-	10/60 (17%)

用 BrdU 对 COLO 320DM 的核进行脉冲标记，然后按图 6 所述对 BrdU 结合及 DMs 进行分析。利用表荧光显微技术对核进行观测。将 60 个具有 DM+核芽的核根据 DM+核芽是否被 BrdU 标记（1, 1'类）、DM+核芽所附属的核是否被 BrdU 标记（2, 2'类）、或核芽与核是否均未被 BrdU 标记（3 类）进行分类。计算分属于各种类型的核的数量并表示为该类型的核数/总记数的形式。

10 总之，许多癌细胞内均可产生诸如双微染色体（DMs）等自主复制的环形 DNA 片段（Barker (1982)；Cowell (1982) and Benner, et al. (1991)）。这些结构所编码的蛋白可在体内提供生存优势，或对多种化学治疗药剂具有抗性。在 S 期出芽结构中，DMs 优先定位于间期细胞核的周边，并且被选择性封装在核芽内，然后在 DNA 复制时，核芽被夹断而形成微核。这一过程是微核产生的有丝分裂期后经
15 典机制的替代途径。含有 DMs 的微核从细胞内排出或 DM DNA 在胞内

微核中降解均可实现 DM 含量的降低。无论在哪种情况下，细胞核中 DM 序列的丧失都可导致肿瘤表型、分化或凋亡的逆转。

II. 染色体 DNA 及额外染色体 DNA 的检测与分析

5 A. H2B-GFP 表达载体的构建

利用 PCR 从人胎盘基因组 DNA 中扩增出人 H2B 基因，所用引物可在 H2B 序列的两个末端引入 Kpn I 和 Bam HI 位点 (Zhong, et al. (1983))。

引物 1: 5'-CGGGTACCGCCACCATGCCAGAGCCAGCGAAGTCTGCT-3'

10 引物 2: 5'-CGGGATCCTTAGCGCTGGTGTACTTGGTGAC-3'

引物 1 在起始密码子前部引入 Kozak 共有序列。PCR 反应参数如下: 95℃ 10 分钟, 在 94℃ 1 分钟, 50℃ 1 分钟, 72℃ 2 分钟下循环 25 次, 然后是 72℃ 5 分钟。PCR 产物用 Kpn I 和 Bam HI 消化, 并将消化片段亚克隆到经 KpnI 和 BamHI 消化的 pEGFPN1 或 pEGFPC1 载体
15 (Clontech, Palo Alto, CA) 内 (Yang, et al. (1996)), 分别制成 C 端标记的 H2B 和 N 端标记的 H2B。这些载体的 CMV 启动子用一种哺乳动物细胞内的强启动子 EF1 α 启动子替代 (Mizushima and Nagata (1990))。把 EF1 α 启动子启动的 H2B-GFP 表达盒亚克隆到含有由 SR α 启动子 (Takebe, et al. (1988)) 启动的杀稻瘟菌素 S-
20 抗性基因 (Izumi, et al. (1991)) 的主链载体中。

B. 细胞系及转染

在补加有 10% FCS 的 DMEM 培养基中单层培养 HeLa 细胞。通过改进的磷酸钙沉淀法 (Chen, et al. (1987)) 用 20 μ g H2B-GFP 表达
25 载体 (H2B-G 或 G-H2B) 转染将要铺满的细胞。转染 48 小时后将转染细胞重新铺平板培养, 并在转染 72 小时后加入 5 μ g/ml 的杀稻瘟菌素 S (Calbiochem, La Jolla, CA)。在药物筛选 15 天后, 在荧光显微镜下检验存活的细胞, 并分离出 GFP-阳性克隆。挑选一些克隆并扩大培养成细胞系, 用于进一步的分析。

30

C. 单核小体制备

单核小体的纯化是按照前人所述 (Dubochet and Noll (1978) and Laybourn and Kadonaga (1991)) 进行并有少量修改。胰蛋白酶消化 HeLa 细胞和稳定表达 H2B-GFP 的细胞 (3×10^7)，收集细胞并用 $1 \times$ RSB 缓冲液 (10 mM Tris pH 7.6, 15 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$) 清洗两次。离心后，将细胞沉淀重悬于含有 1% Triton-X 100 的 RSB 缓冲液中，用松配杵瞬时匀浆 5 次以释放细胞核。核通过离心收集，并用 1 ml 缓冲液 A (15 mM Tris pH 7.5, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0.34 M 蔗糖, 0.5 mM 亚精胺, 0.15 mM 精胺, 0.25 mM PMSF and 0.1% β -巯基乙醇) 清洗两次。最后将核重悬于 1 ml 缓冲液 A 中，并加入 $10 \mu l$ 的 0.1M $CaCl_2$ 。

制备核小体梯带的方法是在 $37^\circ C$ 下加入 $2 \mu l$ 细球菌核酸酶 (Sigma, 200 单位/ml) (终浓度为 0.4 单位/ml 缓冲液 A) 并保温 1、5、10、15、30 和 60 分钟。在每个时间点取出 $100 \mu l$ 等分试样并加入 $2.5 \mu l$ 的 0.5 M EDTA 以终止反应。每管加入 $30 \mu l$ 蒸馏水、 $20 \mu l$ 的 10% SDS 和 $40 \mu l$ 的 5M NaCl。混合物用苯酚/氯仿抽提，并取 $5 \mu l$ 上清进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

为制备单核小体，在 1.5 ml 悬浮于缓冲液 A 的核 (终浓度为 2 单位/ml 缓冲液 A) 中加入 $15 \mu l$ 细球菌核酸酶 (200 单位/ml) 进行限制性消化。 $37^\circ C$ 消化 2 小时后，加入 $30 \mu l$ 的 0.5M EDTA 以终止反应。消化产物在 10000rpm 下离心 10 分钟，去除上清。沉淀重悬于 $450 \mu l$ 的 10mM EDTA，加入 $50 \mu l$ 的 5M NaCl 以溶解染色质。14000 rpm 离心 5 分钟后，上清用 Beckman SW41 转子在 5-30% 的蔗糖梯度上 26K rpm 分级分离 18 小时。离心后收集 1 ml 组分，并取少量等分试样 ($50 \mu l$) 用于 DNA 分析。剩余样品 ($950 \mu l$) 用 $280 \mu l$ 含有脱氧胆酸的 100% TCA 沉淀并置于冰上 10 分钟。然后将样品在 3000rpm 下离心 5 分钟，沉淀用丙酮清洗，再用 70% 冷乙醇清洗。沉淀经空气干燥后重悬于 $20 \mu l$ 的 $1 \times$ SDS 样品缓冲液中，并通过 15% SDS-PAGE 及 Coomassie 染色加以分析。取同样的等分试样用 15% SDS-PAGE 进行分析，并以抗人 H2B 抗体 (Chemicon) 为一抗，结合辣根过氧化物酶的抗兔 IgG 为二抗进行蛋白免疫印迹测定。按照厂商说明用鲁米诺增强试剂 (NEN Life Science Products) 检测信号。

D. FACS 分析

通过胰蛋白酶消化收集 HeLa 细胞和表达 H2B-GFP 的 HeLa 细胞，在 4℃ 下用 70%乙醇固定 3 小时。细胞用含有 RNase 的 20μg/ml 碘化丙锭 (PI) 染色。细胞荧光的测量采用 Becton Dickinson FACScan。用 FACScan 标准光学器件区别并测量每个细胞的红色 (PI) 及绿色 (GFP) 发射光。为消除由 PI 发射和 GFP 发射重叠所造成的假象而进行补色。细胞碎片和固定假象均被滤掉。数据分析采用 Cell Quest, G1、S 和 G2/M 部分的定量则采用 Multicycle。

10

E. 荧光显微镜检查

铺展染色体: 表达 H2B-GFP 的 HeLa 细胞用秋水仙胺处理 60 分钟, 胰蛋白酶消化, 收集, 并重新在低渗缓冲液 (10 mM Tris pH 7.4, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) 中悬浮 10 分钟 (1.5 × 10⁶ 细胞/ml)。通过细胞甩片 (90 秒) 将 50μl 膨胀的细胞附着在涂有多聚 L-赖氨酸的玻璃片上, 用 3.7% 的甲醛固定 5 分钟, 溶于 PBS 的 0.1% NP40 固定 10 分钟, 再用 DAPI (1μg/ml) 复染。图像收集采用配有 DAPI (激发 360 nm/发射 460 nm) 或 FITC (激发 460 nm/发射 535 nm) 滤光装置的 Nikon 荧光显微镜。

20 免疫荧光: 细胞置 12 mm 盖片上生长, 并按照前人所述 (Sullivan et al. (1994)) 用抗着丝粒抗血清进行免疫荧光处理。简单地说, 即细胞用溶于 PBS 的 4% 甲醛固定, 用含有 0.1% Triton-X 100 并溶于 PBS 的 1% BSA (PBS-TX-BSA) 封闭。一抗以 1:2000 的比例用 PBS-TX-BSA 稀释, 加在盖片上并于 37℃ 保温 30 分钟。盖片用 PBS-TX 清洗 4 次, 每次 4 分钟, 然后用 1:200 稀释于 PBS-TX-BSA 的罗丹明偶联羊抗人 IgG (Southern Biotechnologies, Birmingham, AL) 共保温。盖片在 37℃ 下保温 30 分钟, 然后用蒸馏水清洗 4 次, 再空气干燥。然后用 Slow Fade (Molecular Probes, Eugene, OR) 将其封固在载玻片上。显微检查用建在 Zeiss Axiovert 100 上的
25
30 BioRad 1024 共焦显微镜进行, 物镜采用 63×1.4 NA Zeiss 平场消色差。

活细胞：细胞置 25 mm 盖片上生长，并用预热的培养基封固在 Dvorak-Stotler 盒内（Nicholson Precision Instruments, Gaithersburg, MD）。用上述的 BioRad 1024 共焦显微镜采集图像，物镜为 63× 或 40× 1.3 NA Neofluar，产生 GFP 荧光的激光功率为 0.3-1%。用 DIC 光学器件采集透见光图像。利用 Adobe Photoshop 将荧光图像叠加在 DIC 图像上。

F. 用 H2B-GFP 标记染色体

用共焦显微镜观测表达 H2B-GFP 的活细胞，以确定在间期及有丝分裂期细胞内染色质着色的模式。如图 12 所示，H2B-GFP 能够高灵敏度地检测细胞周期中所有时期的染色质。获得该图像时无需对细胞进行固定和渗透，它们可能会造成胞内结构的人为改变。H2B-GFP 对核染色质具有高度特异性，因为在细胞质中观测不到任何的荧光。此外，H2B-GFP 可提供非常高的灵敏度。例如，可清晰地观测到正在靠近赤道板的后随姐妹染色单体。间期核内荧光强度的变化表明了染色质分布的不均一性。由 H2B-GFP 观测到的核内染色质精细结构与此前报导的用 4',6-二脒苯吡啶（DAPI）染色所获得的去褶合光截面图像（Belmont, et al. (1994)）相符。表达 H2B-GFP 的细胞的铺展染色体也说明 GFP 与 DAPI 的染色模式相同（图 12E）。

在一些间期核内的核仁外周观测到密集的 GFP 染色，这表明可能存在核仁外周异染色质区域（图 12A）。确定着丝粒的位置，以查明其定位是否与 H2B-GFP 浓染色区域相符。表达 H2B-GFP 的细胞被固定，用抗着丝粒的抗体染色，然后通过共焦显微镜观察。如前人所述（Moroi, et al. (1981)），在某些间期核中有许多着丝粒位于核仁外周区域。这些着丝粒与 H2B-GFP 浓染色区域重叠。其它不位于核仁外周区域的着丝粒也往往与 H2B-GFP 浓染色区域相关。在核被膜的内表面同样观测到 H2B-GFP 浓染色区域，表明也存在外周异染色质。

G. 活细胞中双微染色体显像

H2B-GFP 的可能应用之一是作为有丝分裂期时染色体分离的详细分析手段。构建可高效转移并表达 H2B-GFP 的逆转录病毒载体。构建

并采用的是一种水泡性口膜炎病毒 G 糖蛋白 (VSV-G) 假型化逆转录病毒载体 (载体的构建可参考 U.S. Patent No. 5,512,421 和 PCT/US95/11892), 因该系统可提供目前最高的病毒效价。将含有扩增 c-myc 和 DMs 的 COLO 320DM 细胞用 H2B-GFP 逆转录病毒感染, 两天后, 几乎 100% 的细胞均表达 H2B-GFP 蛋白。利用配有 CCD 照相机的表荧光显微镜能够很容易地观测到有丝分裂细胞内小荧光点的形态存在的 DMs。

H. HeLa 细胞内 H2B-GFP 的稳定表达

通过对人胎盘基因组 DNA 的 PCR 扩增而获得人 H2B 基因。由于组蛋白 H2B 为多拷贝基因 (Baxevanis, et al. (1997)), 所以该 PCR 扩增获得了若干克隆。利用与报导的 H2B 序列 (基因库登记号 X00088) (Zhong, et al. (1983)) 有最高同源性的扩增序列构建 H2B-GFP 载体。将 H2B 基因连接在经密码子优化的增强型 GFP (EGFP) (Yang, et al. (1996)) 的 C 末端 (H2B-G) 或 N 末端 (G-H2B) (图 8), 并将这些嵌合基因克隆到哺乳动物表达载体内。通过转染将构建体引入 HeLa 细胞, 荧光显微镜观测结果表明 H2B-G 和 G-H2B 蛋白均定位在间期核及有丝分裂期染色体上。

为进一步描述 H2B-GFP 蛋白的特征, 制备稳定表达 H2B-GFP 的细胞系。在转染细胞中加入杀稻瘟菌素并培养 2 周, 并利用荧光显微镜分析抗药性克隆, 以识别出 GFP 阳性克隆。利用 H2B-G 或 G-H2B 抗杀稻瘟菌素克隆产生 GFP 阳性克隆的频率相等 (~10%)。尽管有报导称, 分离稳定表达 GFP 的细胞系非常困难 (Shima, et al. (1997)), 但还是观测到数个可稳定表达 H2B-G 或 G-H2B 的细胞系。

25

I. H2B-GFP 掺入核小体

为确定 H2B-GFP 是否是核小体核心颗粒的组成部分, 利用生物化学方法将核小体核心颗粒分步分离, 并对 H2B-GFP 的存在情况进行分析。将分离出的表达 H2B-GFP 的核用细球菌核酸酶进行广泛消化而产生单核小体 (图 10A), 再通过含有以解离组蛋白 H10.5 M NaCl 的蔗糖梯度离心进行分步分离, (Dubochet and Noll (1978) and

30

Laybourn and Kadonaga (1991))。DNA 的电泳分析结果显示, 级分 2-4 (主要为级分 3) 中含有与核小体核心颗粒预定大小 (146bp) 相同的 DNA (图 10D)。通过 15% SDS-PAGE 分析样品中的蛋白含量。图 10B 显示整个梯度上的蛋白分布。用抗人 H2B 抗体通过蛋白免疫印迹分析方法特异检测出了 H2B 和 H2B-GFP, 这表明 H2B-GFP 融合蛋白存在于单核小体组分中, 并且它在梯度中的分布与组蛋白相同 (图 10C)。

J. H2B-GFP 的掺入不影响细胞周期的进程

10 将非同步化 HeLa 细胞和表达 H2B-GFP 的转化体固定, 碘化丙锭 (PI) 染色, 并利用 FACS 进行分析。与亲代 HeLa 细胞相比, GFP 标记细胞的绿色发射光约产生三个对数级的迁移 (图 11A)。通过测量 PI 的红色发射光确定 DNA 的含量 (图 11B)。结果显示, 表达 H2B-GFP 的非同步化 HeLa 细胞与亲代 HeLa 细胞的细胞周期分布没有什么区别。该结果清晰地表明, H2B-GFP 蛋白对细胞周期进程的影响即便有也是非常小。此外, 与亲代细胞相同, 利用胸腺嘧啶双阻断策略可使表达 H2B-GFP 的细胞成功地同步化。

K. 讨论

20 这些数据表明, H2B-GFP 为荧光法标记活细胞内染色体提供了一个新的策略。尽管 GFP 标记的体积较大 (239 个氨基酸残基), 但在许多实例中都表明, 被标记的蛋白仍具有功能并且可正确定向 (Cubitt, et al. (1995) and Gerdes and Kaether (1996))。显然, C 端标记 (H2B-G) 和 N 端标记 (G-H2B) 的组蛋白均标记出瞬时转染细胞内的染色体, 而利用 C 端标记组蛋白还成功地建立了稳定的细胞系。根据组蛋白八聚体的 X 射线晶体结构 (Arents, et al. (1991)), 组蛋白 H3/H4 四聚体负责组织核小体内 DNA 的中心旋转路线, 而 H2A/H2B 二聚体则结合在 H3/H4 四聚体的两边。由于早已了解增加离子强度可导致核小体解离成 DNA 和组蛋白组分 (Wolffe 25 (1995)), 因此负责核小体稳定性的初级相互作用是静电力。0.5 M NaCl 可使组蛋白 H1 和非组蛋白从核小体上解离, 但组蛋白 H2A/H2B 30

和 H3/H4 只有在盐浓度分别达到 0.8 M NaCl 和 1.2 M NaCl 以上时才解离 (Ohlenbusch, et al. (1967))。实验数据表明, H2B-GFP 能够在高离子强度 (0.5 M NaCl) 下与单核小体共分离。因此, 很可能 H2B-GFP 蛋白是结合到核小体核心颗粒内部, 而不是仅连接在核小体
5 核心颗粒的外侧。

用于活细胞内染色体分析的 H2B-GFP 策略与其它方法相比具有明显的优势。尽管已有实验说明可采用 Hoechst 33342 进行哺乳动物染色体的活体荧光标记 (Belmont, et al. (1989) and Hiraoka and Haraguchi (1996)), 但要使暴露于药物的时间和药物的浓度得到
10 优化, 则必须对每个细胞系进行单独分析 (Arndt-Jovin, et al. (1989))。此外, 由于 Hoechst 33342 的最大激发峰接近 350 nm, 而高强度的 UV 照射可损伤细胞并导致细胞周期延迟或停止, 因此必须小心控制 UV 激发的强度。DNA 药物, 如二氢乙啡啶, 的加入可通过干扰 DNA 复制而引起 DNA 突变 (Arndt-Jovin, et al. (1989))。
15 显微注射罗丹明标记的组蛋白曾成功地用于果蝇属染色体的活体染色 (Hiraoka, et al. (1989) and Minden (1989)), 但它不适合于对大量哺乳动物细胞进行分析。与这些方法相比, 文中采用的增强 GFP 方法 (Yang, et al. (1996)) 的激发光为蓝光 (490 nm), 与激发 Hoechst 所需的 UV 光激发相比, 它所造成的伤害较小。GFP 的
20 圆柱桶状结构可保护内部的发色团, 它可减少由系统间交联形成的单态氧所造成的光化学损伤 (Yang, et al. (1996) and Ormo (1996))。由于 DNA 非常容易遭受光损伤, 因此 GFP 是一种标记 DNA 的理想蛋白标记。此外还进行了长时间的延时成象, 在不产生光褪色的 17 小时
25 时间内每分钟采集一个图像。由于稳定细胞系内的 H2B-GFP 蛋白通过转基因整合而进行组成型表达, 因此该细胞系尤其适合于长期分析。如文中所示, 表达 H2B-GFP 的稳定细胞系与亲代 HeLa 细胞的细胞周期分布没有什么区别。由于不同物种中组蛋白的一级结构非常保守 (Wells (1986)), 因此文中所述的 H2B-GFP 可用于不同物种的细胞。

30 GFP 标记蛋白能够与特定染色体区域结合, 加上 H2B-GFP 的通用修饰能力, 使这种蛋白推动了体内染色体行为的动力学分析。例如,

通过与 GFP 融合的着丝粒结合蛋白 (CENP-B) 的表达, 可对 HeLa 细胞内的着丝粒进行荧光标记。这使我们能够分析有丝分裂期和间期细胞内的着丝粒运动 (Shelby, et al. (1996))。最近, 利用与染色体整合的 lac 操纵子以及在 CHO (Robinett, et al. (1996)) 和芽殖酵母 (Straight, et al. (1996)) 内表达 lac 阻抑物-GFP 融合蛋白的方法对一种特定染色体区域进行了荧光标记。如果能够实现用不同光谱的 GFP 变异体标记特定染色体区域, 并结合 H2B-GFP, 我们将能够同时检测总染色体上多个特定位点的行为。例如, 在固定细胞中观测到的着丝粒与异染色质空间共定位的现象可通过用不同光谱的 GFP 变异体标记 CENP-B 而直接在活细胞核内得到证实。

H2B-GFP 载体及其使用方法可在许多方面得到应用。由于 H2B-GFP 的强度代表了染色体的凝集状况, 因此我们可以研究染色体凝集和去凝集 (Hiraoka, et al. (1989))、细胞核形成、以及间期核内的异染色质移动。此外, 染色体分离的活体显像使我们能够详细地分析异常染色体的动力学运动。例如, 已分别在活细胞内显现了染色体桥的形成和微核形成, 它们通常代表了双着丝点染色体和无着丝点染色体 (Shimizu, et al. (1996))。在活细胞内同样鉴别出了带有扩增序列的双微染色体, 尽管它们的大小要小于正常染色体。H2B-GFP 系统有助于基因组不稳定性的分析, 如非整倍性的形成、基因扩增、以及染色体丢失等, 而利用固定铺展染色体方法难以对这些问题加以分析。

这些结果表明, H2B-GFP 融合蛋白可结合到核小体核心颗粒内部, 并能够在保持核及染色体结构的情况下进行染色体的高分辨率成像。这使我们能够对染色体动力学的多个方面进行研究, 如染色体凝集、核内染色质结构以及有丝分裂期间的分离等。

应该了解的是, 尽管连同以上实施方案对本发明进行了描述, 但前面的描述以及后面的实例均是用来说明, 而不是限定, 本发明的范围。处在本发明范围内的其它方面、优点和修改对该领域的专家而言是显而易见的, 它们都将从属于本项发明。

参考文献

- Arents, G., R.W. Burlingame, B.C. Wang, W.E. Love, E.N. Moudrianakis. 1991. “3.1 A 分辨率下的核小体核心组蛋白八聚体: 由三种蛋白组装的左手超螺旋” PNAS USA 88:10148-52.
- 5 Arndt-Jovin, D. J., T.M. Jovin Eds. 1989. DNA 的荧光标记及显微观察, pp 417-448.
- Barker, P.E. 1982. “人类肿瘤细胞内的双微体” Cancer Genet Cytogenet. 5:81-94.
- 10 Baxevanis, A. D., D. Jandsman. 1997. “组蛋白与组蛋白折叠序列和结构: 数据库” Nucleic Acids Res. 25:272-3.
- Belmont, A. S., M.B. Braunfeld, J.W. Sedat, D.A. Agard. 1989. “有丝分裂期及间期染色体内的体内及体外大型染色质结构域” Chromosoma 98:129-43.
- 15 Belmont, A. S. and K. Bruce. 1994. “G1 染色体观察: 间期染色单体结构的折叠缠绕状超螺旋染色丝模型” J Cell Biol 127:287-302.
- Benner, S.E., G.M. Wahl and D.D. Von Hoff. 1991. “直接取自患者的肿瘤与人肿瘤细胞系中的双微染色体及均染区比较”
- 20 Anti-Cancer Drugs. 2:11-25.
- Bondy, M.L., M.R. Spitz, S.Halabi, J.J. Fueger, S.P. Schantz, D. Sample and T.C. Hsu. 1993. “上呼吸道和上消化道癌症患者的癌症家族史与诱变敏感性之间的联系” Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2:103-6.
- 25 Brison, O. 1993. “基因扩增与肿瘤发展” Biochem Biophys Acta 1155:25-41.
- Canute, G.W., S.L. Longo, J.A. Longo, J.A. Winfield, B.H. Nevaldine and P.J. Hahn. 1996. “羟基脲可促进人类多形性成胶质细胞瘤中以双微染色体形式扩增的表皮生长因子受体基因的丧失”
- 30 Neurosurgery 39:976-83.
- Carroll, S.M., M.L. DeRose, J.L. Kohnan, G.H. Nonet, R.E. Kelly and G.M. Wahl. 1993. “天然基因座与游离扩增的鼠腺苷脱

- 氨酶基因座中 DNA 双向复制区的定位” *Mol Cell Biol* 13:2971-81.
- Chen, C. and H. Okayama. 1987. “质粒 DNA 对哺乳动物细胞的高效转化” *Mol Cell Biol* 7:2745-52.
- Cohen. 1993. “凋亡” *Immunology Today* 14:126-130.
- 5 Cowell, J.K. 1982. “双微体和均染区: 哺乳动物细胞内的基因扩增” *Ann. Rev. Gen.* 16:21-59.
- Cremer, T., A. Kurz, R. Zirbel, S. Dietzel, B. Rinke, E. Schrock, M.R. Speicher, U. Mathieu, A. Jauch and P. Emmerich. 1993. “染色体区在细胞核功能区域化中的作用” *Cold Spring Harbor*
- 10 *Symp. Quant. Biol.* 8:777-92.
- Crook, T., J.A. Tidy and K.H. Vousden. 1991. “与结合 p53 及反式激活所需序列不同的 HPV E6 序列可定向降解 p53” *Cell* 67:547-56.
- Cubitt, A.B., R. Heim, S.R. Adams, A.E. Boyd, L.A. Gross,
- 15 R.Y. Tsien. 1995. “绿色荧光蛋白的了解、改进及应用” *Trends Biochem Sci* 20:448-55.
- De, B.U. and A.H. Mintz. 1986. “神经元间期细胞核内染色质区域及核仁的三维曲线运动” *Science*. 234:863-6.
- Denko, N.C., J. Giaccia, J.R. Stringer and P.J. Stambrook.
- 20 1994. “人 Ha-ras 致癌基因可在一个细胞周期内引起鼠成纤维细胞的基因组不稳定” *PNAS (USA)* 91:5124-8.
- Di Leonardo, A., S.P. Linke, K. Clarkin and G.M. Wahl. 1994. “DNA 损伤可引起人正常成纤维细胞内 p53 依赖性 G1 阻滞的延长及 Cip1 的长期诱导” *Genes Dev.* 8:2540-51.
- 25 Dini, L., S. Coppola, M.T. Ruzittu and L. Ghibelli. 1996. “导致凋亡核碎裂的多种途径” *Exp Cell Res.* 223:340-7.
- Dubochet, J. and M. Noll. 1978. “核小体弧与螺旋” *Science* 202:280-6.
- Duncan, A.M. and J.A. Heddle. 1984. “三种非致癌制剂在小鼠结肠隐窝中诱导凋亡的频率及分布” *Cancer Lett* 23:307-11.
- 30 Duncan, A.M., J.A. Heddle and D.H. Blakey. 1985. “ γ 辐射诱导小鼠结肠上皮细胞核异常的机制” *Cancer Res.* 45:250-2.

- Eckhardt, S. G., A. Dai, K. K. Davidson, B. J. Forseth, G. M. Wahl and D. D. Von Hoff. 1994. “随额外染色体扩增的 c-myc 的减少对 HL60 细胞分化的诱导” PNAS (USA) 91:6674-6678.
- Eki, T., T. Enomoto, Y. Murakami, F. Hanaoka and M. Yamada. 5 1987. “含有热不稳定 DNA 聚合酶的小鼠温度敏感性 tsFT20 突变株中由限定温度诱导的染色体畸变的特性” Cancer Res. 47:5162-5170.
- Ferguson, M. and D. C. Ward. 1992. “前有丝分裂人类 T 淋巴细胞核中的细胞周期依赖性染色体运动” Chromosoma 101:557-65.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman and S. S. Ben. 1992. “通过核 DNA 10 碎片的特异标记对细胞程序性死亡进行原位鉴定” J Cell. Biol. 119:493-501.
- Gerdes, H. H. and C. Kaether. 1996. “绿色荧光蛋白: 在细胞生物学中的应用” Febs Lett 389:44-7.
- Hamkalo, B. A., P. J. Farnham, R. Johnston and R. T. Schimke. 15 1985. “氨甲喋呤抗性小鼠 3T3 细胞系中的微小染色体超结构特性” PNAS (USA) 82:1026-30.
- Heddle, J. A. and A. V. Carrano. 1977. “ γ 辐射在小鼠骨髓中诱导的微核的 DNA 内容物: 微核源于无着丝粒染色体片段的证据” Mutat. Res. 44:63-9.
- 20 Heddle, J. A., M. C. Cimino, M. Hayashi, P. Romagna, M. D. Shelby, J. D. Tucker, P. Vanparys and J. T. MacGregor. 1991. “微核作为细胞遗传损伤的指标: 过去、现在与未来” Environ Mol Mutage 18:277-91.
- Heddle, J. A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. T. 25 MacGregor, G. W. Newell and M. F. Salamone. 1983. “以微核诱导作为生殖毒性的度量标准”美国环保局 Gene-Tox 计划的报告 Mutat Res, 123:61-118.
- Hiraoka, Y. and T. Haraguchi. 1996. “哺乳动物活细胞的荧光成像” Chromosome Res 4:173-6.
- 30 Hiraoka, Y., J. S. Minden, J. R. Swedlow, J. W. Sedat, D. A. Agard. 1989. “三维在体延时显微技术显示的染色体凝聚与去凝聚的焦点” Nature 342:293-6.

Huang, L.-C., K. c. Clarkin and G.M. Wahl. 1996. “在缺乏 DNA 激活的蛋白激酶的小鼠成纤维细胞中保持 p53 依赖性细胞周期阻滞” *Cancer Res.* 56:2940-2944.

Izumi, M., H. Miyazawa, T. Kamakura, I. Yamaguchi, T. Endo,
5 F. Hanaoka. 1991. “杀稻瘟菌素 S 抗性基因 (bsr): 一种新的哺乳动物细胞可选物” [出版勘误发表于 *Exp Cell Res* 1993 Feb;204(2):388] *Exp Cell Res* 197:229-33.

Jackson, J.F, and E.G. Clement. 1974. “Letter Nuclear Projections 与染色体异常” *Lancet* 2:1270-1.

10 Kastan, M. B., Q. Zhan, W. S. El-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W. V. Walsh, B. S. Plunkett, B. Vogelstein and A. J. Fonace. 1992. “利用 p53 和 GADD45 的哺乳动物细胞周期检验点途径在毛细血管扩张失调症中有缺陷” *Cell.* 7:587-97.

Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, W. V. Walsh and M. B. Kastan.
15 1992. “野生型 p53 是辐射后的一种细胞周期检验点决定子” *PNAS (USA)* 89:7491-5.

Lawce, H. J. and G. Brown. 1991. 染色体的采集、玻片制备及延长技术 Raven Press, Ltd. New York.

Laybourn, P. J. and J. T. Kadonaga. 1991. “核小体核心与
20 H1 组蛋白在涉及 RNA 聚合酶 II 的转录调控中的作用” *Science* 254:238-45.

Levan, A. and G. Levan. 1978. “双微体具有功能性着丝点吗?” *Hereditas.* 83:83-90.

Linke, S. P., K. C. Clarkin, A. DiLeonardo, A. Tsou and G. M.
25 Wahl. 1996. “一种在没有可检测的 DNA 损伤的情况下由核苷酸缺失引起的可逆的 p53 依赖性 G0/G1 细胞周期阻滞” *Genes and Dev.* 10:934-947.

Linke, S. P., K. C. Clarkin and G. M. Wahl. 1997. “p53 可
30 随 γ 辐射而介导历经多个细胞周期的持久阻滞” *Cancer Res.* 7:1171-1179.

Livingstone, L. R., A. White, J. Sprouse, E. Livanos, T. Jacks and T. D. Tlsty. 1992. “野生型 p53 丧失伴随细胞周期阻

滞的改变以及可能的基因扩增” Cell 70:923-35.

Lo, C.F. and M. Fraccaro. 1974. “肿瘤细胞中的 Letter Nuclear 计划” Lancet. 2:847.

5 Manuelidis, L. and J. Borden. 1988. “原位杂交及三维重建显示人 CNS 细胞中单个染色体区域的可重复性区域化” Chromosoma. 96:397-410.

Miele, M., S. Bonatti, P. Menichini, L. Ottaggio and A. Abbondandolo. 1989. “扩增区域的存在可影响抗药性中国仓鼠细胞中染色体的稳定性” Mutat Res. 219:171-8.

10 Mizushima, S. and S. Nagata. 1990. “pEF-BOS, 一种强有力的哺乳动物表达载体” Nucleic Acids Res 18:5322.

Moroi, Y., A.L. Hartman, P.K. Nakane, E.M. Tan. 1981. “动粒(着丝粒)抗原在哺乳动物细胞核中的分布” J Cell Biol 90:254-9.

15 Ohlenbusch, H.H., B.M. Olivera, D. Tuan, N. Davidson. 1967. “组蛋白从小牛胸腺核蛋白中的选择性解离” J Mol Biol 25:299-315.

Ormo, M., A.B. Cuitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, S.J. Remington. 1996. “Aequorea victoria 绿色荧光蛋白的晶体结构” [见注释] Science 273:1392-5.

20 Pedoutour, F., R.F. Suijkerbuijk, A. Forus, G.J. Van, Van, de, Klundert, W.J.M. Coindre, G. Nicolo, F. Collin, H.U. Van, K. Huffermann. 1994. “完全分化脂肪肉瘤的环状及巨杆状标记染色体中 SAS 与 MDM2 的复合物及共同扩增” Genes Chromosom Cancer 10:85-94.

25 Robinett, C.C., A. Straight, G. Li, C. Willhelm, G. Sudlow, A. Murray, A.S. Belmont. 1996. “利用 lac 操纵子/阻抑物识别进行 DNA 序列的体内定位以及大型染色质结构的显像” J Cell Biol 135:1685-700.

30 Roser, M., A. Bohm, M. Oldigs, K. Weichenthal., U. Reimers, P.U. Schmidt, E.W. Breitbart and H.W. Rudiger. 1989. “在培养的皮肤恶性黑素瘤患者的成纤维细胞中由紫外诱导的微核形成以及姐妹染色单体交换” Cancer Gene Cytogenet. 41:129-37.

- Ruddle, F.H. 1962. “核泡: 体外建立的细胞系中的一种稳定间期标记” *J. Nat'l Cancer Inst.* 28:1247-1251.
- Satoh, M. S, and T. Lindahl. 1992. “DNA 修复中形成多聚(ADP-核糖)的作用” *Nature* 356:356-8.
- 5 Scheffner, M., B.A. Werness, J.M. Huibregtse, A.J. Levine and P.M. Howley. 1990. “由 16 和 18 型人乳头状瘤病毒编码的 E6 癌蛋白可促进 p53 降解” *Cell* 63:1129-36.
- Schubert, I. And J.L. Oud. 1997. “正常发育有机体的染色体大小有一个上限” *Cell* 88:515-520.
- 10 Shelby, R. D., K.M. Hahn, K.F. Sullivan. 1996. “在人类活细胞内原位显像的 α 卫星 DNA 区域的动力学弹性行为” *J Cell Biol* 135:545-57.
- Shima, D. T., K. Haldar, R. Pepperkok, R. Watson, G. Warren. 1997. “有丝分裂期间 HeLa 活细胞的高尔基体分区” *J Cell Biol*
- 15 137:1211-28.
- Shima, H., M. Nakayasu, S. Aonuma, T. Sugimura and M. Nagao. 1989. “经多聚(ADP-核糖)聚合酶抑制剂或二甲亚砜处理后人 HL-60 细胞内扩增的 MYC 基因的丧失” *PNAS (USA)* 86:7442-7445.
- Shimizu, N., T. Kanda and G.M. Wahl. 1996. “微核对无着丝点片段的的选择性捕获为随额外染色体扩增的 DNA 的纯化提供了一种快速的方法” *Nature Genetics* 12:65-71.
- 20 Shimizu, N., H. Nakamura, T. Kadota, K. Kitajima, T. Oda, T. Hirano and H. Utiyama. 1994. “自然分化的 HL-60 细胞内的扩增 c-myc 基因的丧失” *Cancer Res.* 54:3561-3567.
- 25 Snapka, R.M. 1992. “以基因扩增作为癌症化学疗法的目标” *Oncol. Res.* 4:145-50.
- Snapka, R.M, and A. Varshavsky. 1983. “羟基脲可大幅度加快小鼠细胞内二氢叶酸还原酶基因的丧失” *PNAS (USA)* 80:7533-7.
- Stein, S. J., S.L. Stein, J.B. Lian, T.J. Last, T. Owen and
- 30 L. McCabe. 1994. 哺乳动物的正常二倍体细胞及转化细胞的同步化 *Academic Press, San Diego.*
- Straight, A.F., A.S. Belmont, C.C. Robinett, A.W. Murray.

1996. “芽殖酵母染色体的 GFP 标记表明蛋白-蛋白相互作用可介导姐妹染色单体凝聚” *Curr Biol* 6:1599-608.
- Sullivan, et al. 1994. “人类 CENP-A 含有一种定向于着丝点所需的组蛋白 H3 相关组蛋白折叠区” *J. Cell Biol.* 127:581-92.
- 5 Takebe, Y, M. Seiki, J. Fujisawa, P. Hoy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida, N. Arai. 1988. “SR α 启动子: 一种包含猿猴空泡病毒 40 早期启动子和人类 T 细胞白血病病毒 1 型长末端重复的 R-U5 片段的通用哺乳动物 CDNA 高效表达系统” *Mol Cell Biol* 8:466-72.
- 10 Toledo, F., R.D. Le, G. Buttin and M. Debatisse. 1992. “在含有上百万个碱基的长染色体反向重复中的共扩增标记可发生改变并在哺乳动物基因扩增的早期步骤于间期核内独自成簇” *Embo J.* 11:2665-73.
- Von Hoff, D., D. Needham-VanDevanter, J. Yucel, B. Windle and G. Wahl. 1988. “扩增的人类 MYC 癌基因定位于复制的环状 DNA 分子” *PNAS (USA)* 85:4804-4808.
- 15 Von Hoff, D.D., J.R. McGill, B.J. Forseth, K.K. Davidson, T.P. Bradley, D.R. Van Devanter and G. M. Wahl. 1992. “人类肿瘤细胞中随额外染色体扩增的 MYC 基因的消除可降低其致肿瘤性” *PNAS (U. S. A.)* 89:8165-8169.
- 20 Von Hoff, D.D., T. Waddelow, B. Forseth, K. Davidson, J. Scott and G.M. Wahl. 1991. “羟基脲可加快肿瘤细胞中随额外染色体扩增的基因的丧失” *Cancer Research.* 51:6273-6279.
- Vourc'h, C., D. Tarusico, A.L. Boyle and D.C. Ward. 1993. “端粒、着丝粒和染色体特异性亚随体区在间期小鼠淋巴细胞核中的细胞周期依赖性分布” *Exp Cell Res.* 205:142-51.
- 25 Wahl, G.M. 1989. “环状 DNA 在哺乳动物基因扩增中的重要性” *Cancer Res.* 49:1333-1340.
- Wells, D.E. 1986. “组蛋白与组蛋白基因的编码分析” *Nucleic Acids Res* 14:119-49.
- 30 White, A.E., E.M. Livanos and T.D. Tlsty. 1994. “HPV 癌蛋白差异破坏正常人成纤维细胞中的基因组完整性及细胞周期调

- 控” *Genes and Development* 8:666-77.
- White, E. 1994. “肿瘤生物学. p53, Rb 的守护者” *Nature* 371:21-2.
- Wolffe, A. 1995. 染色质结构与功能, 第二版; Academic Press
- 5 Yang, F., L.G. Moss, J.G.N. Phillips. 1996. “绿色荧光蛋白的分子结构” *Nat Biotechnol* 14:1246-1251.
- Yang, T.T., L. Cheng, S.R. Kain. 1996. “密码子选择的优化及发色团突变可提高绿色荧光蛋白的灵敏度” *Nucleic Acids Res* 24:4592-3.
- 10 Yin, Y., M.A. Tainsky, F.Z. Bischoff, L.C. Strong and G.M. Wahl. 1992. “野生型 p53 可重建细胞周期调控并能够抑制具有突变 p53 等位基因的细胞内的基因扩增” *Cell*. 70:937-48.
- Zhong, R., R.G. Roeder, N. Heintz. 1983. “四种人类组蛋白克隆基因的一级结构及表达” *Nucleic Acids Res* 11:7409-25.

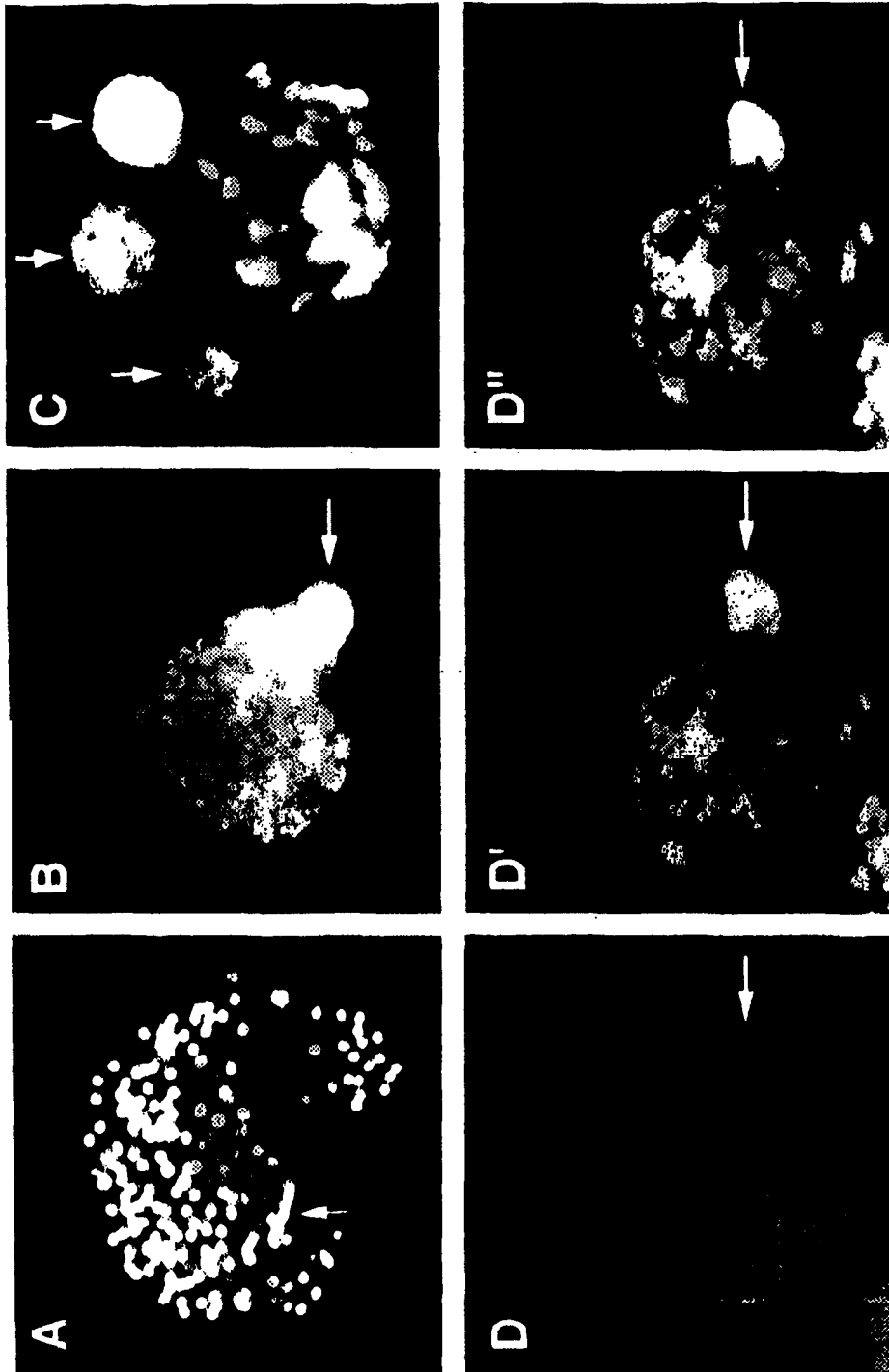


图 1A-1D

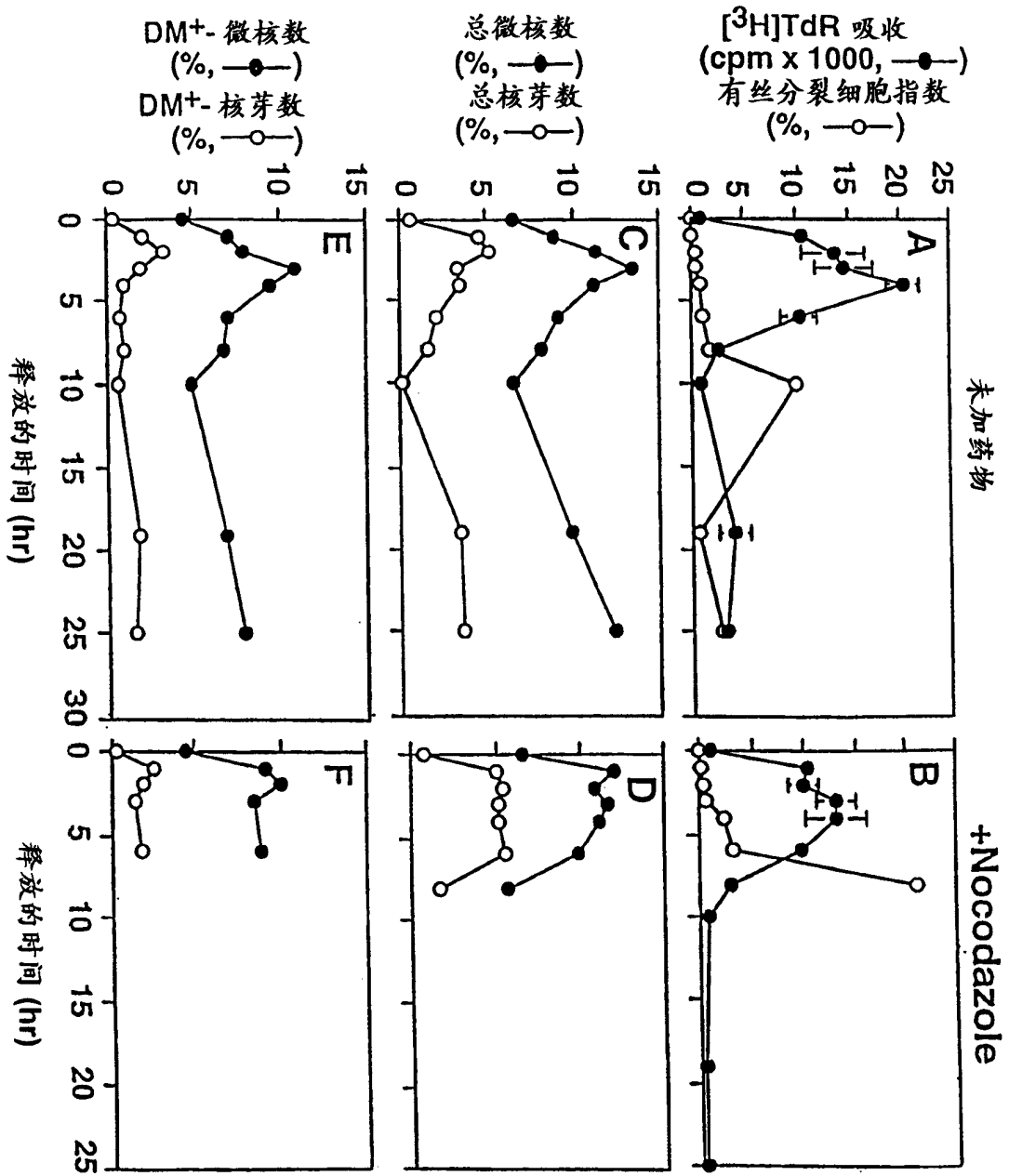


图 2A-2F

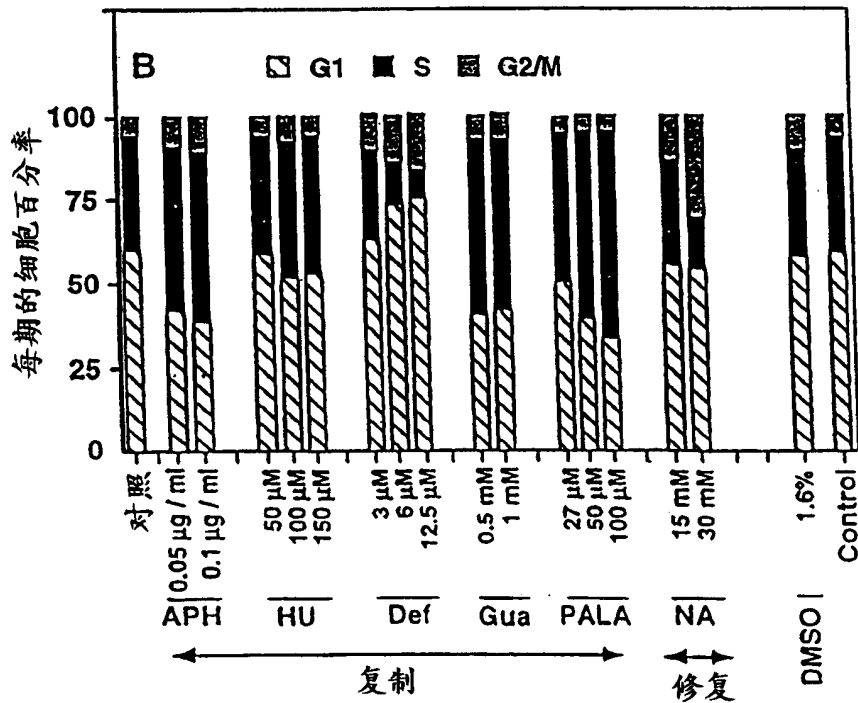
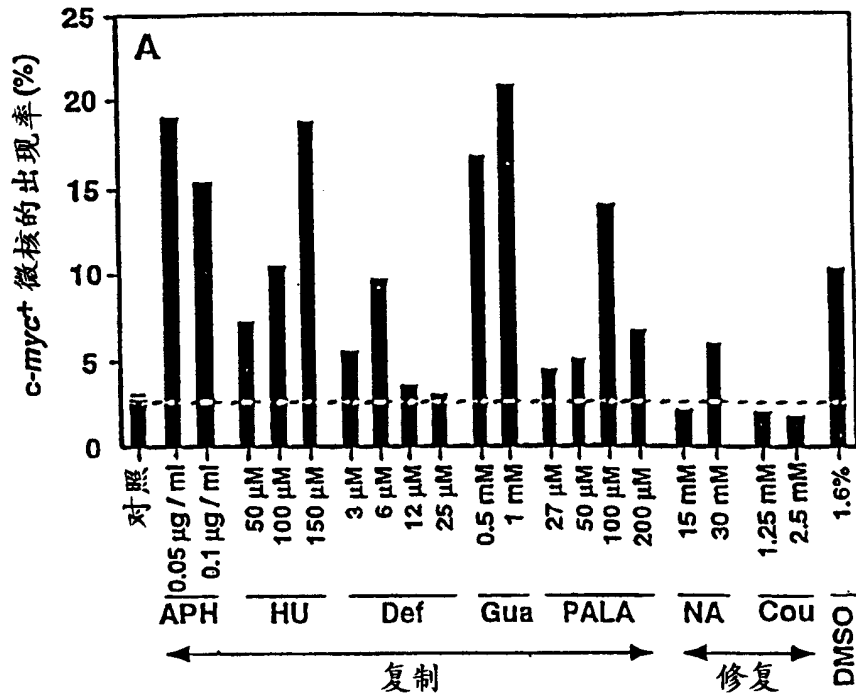
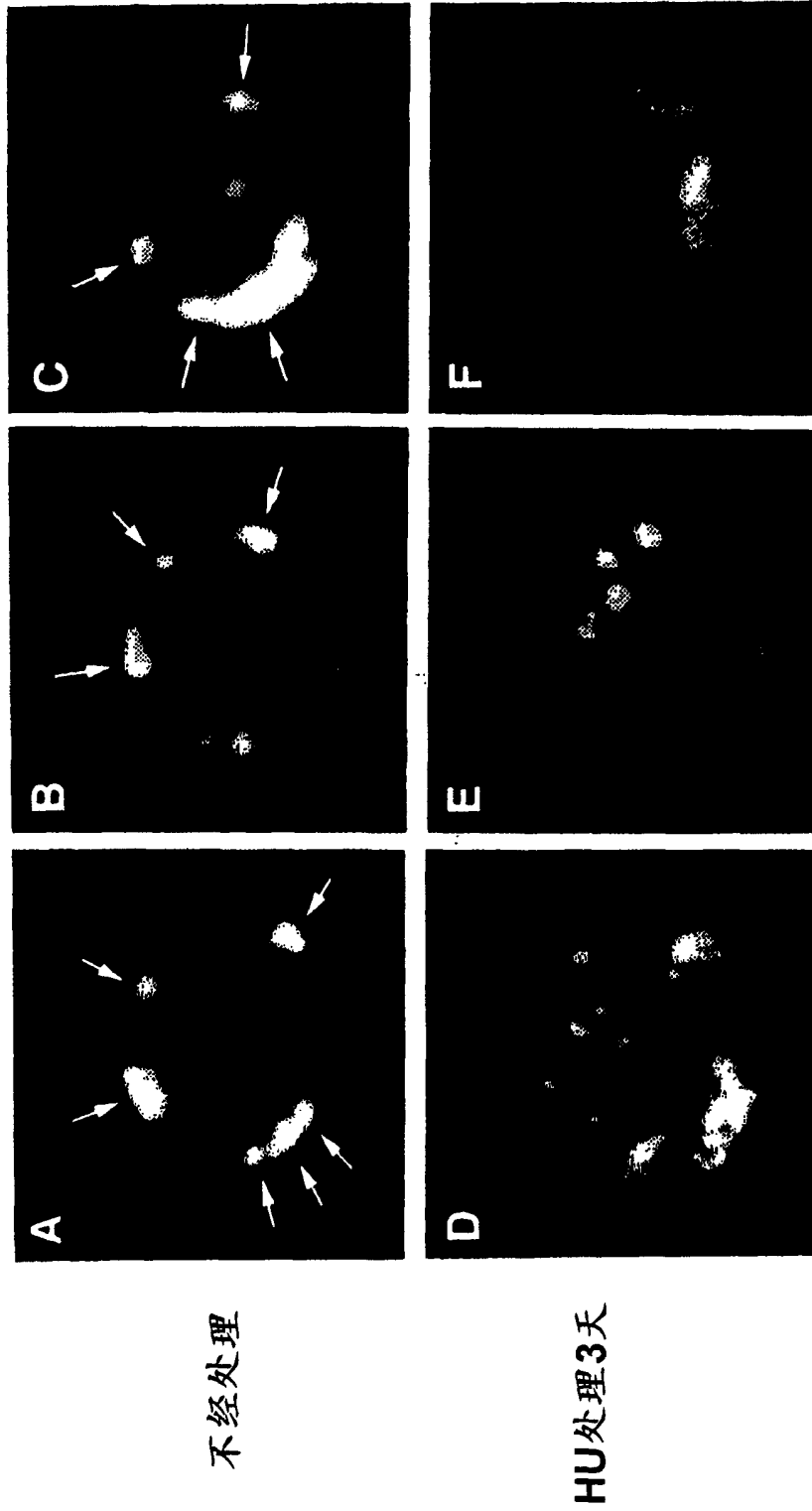


图 3A-3B



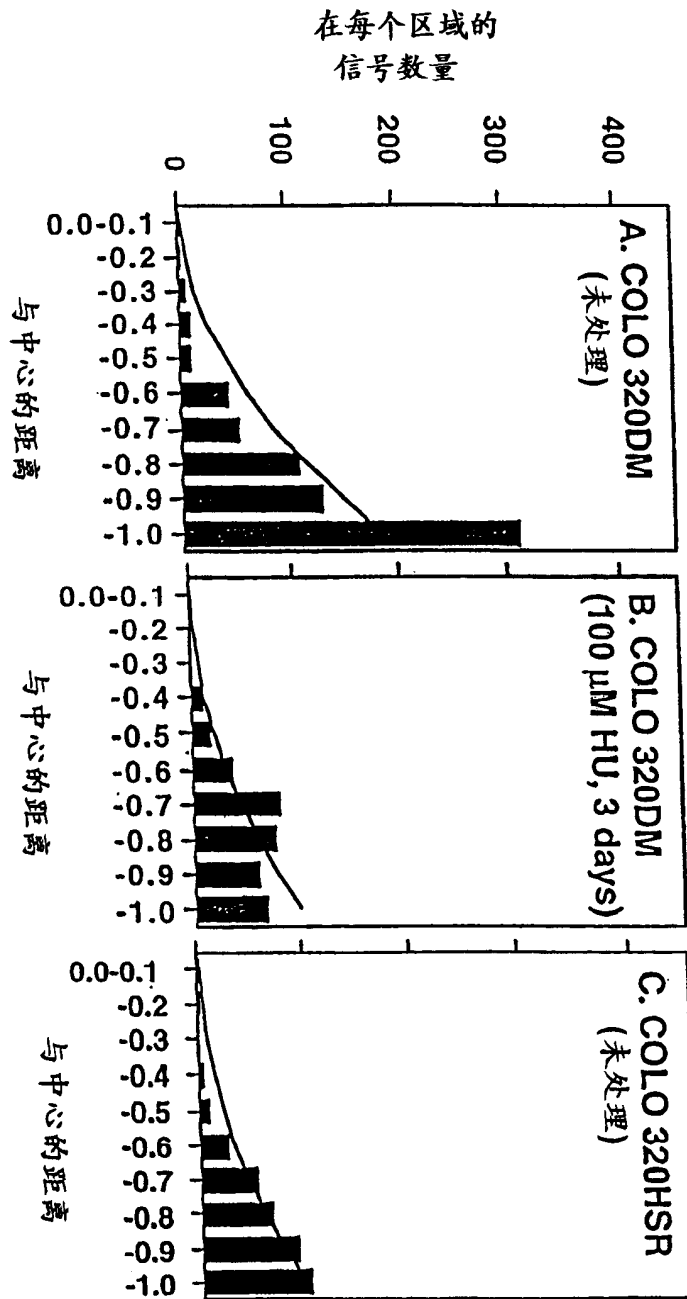


图 5A-5C

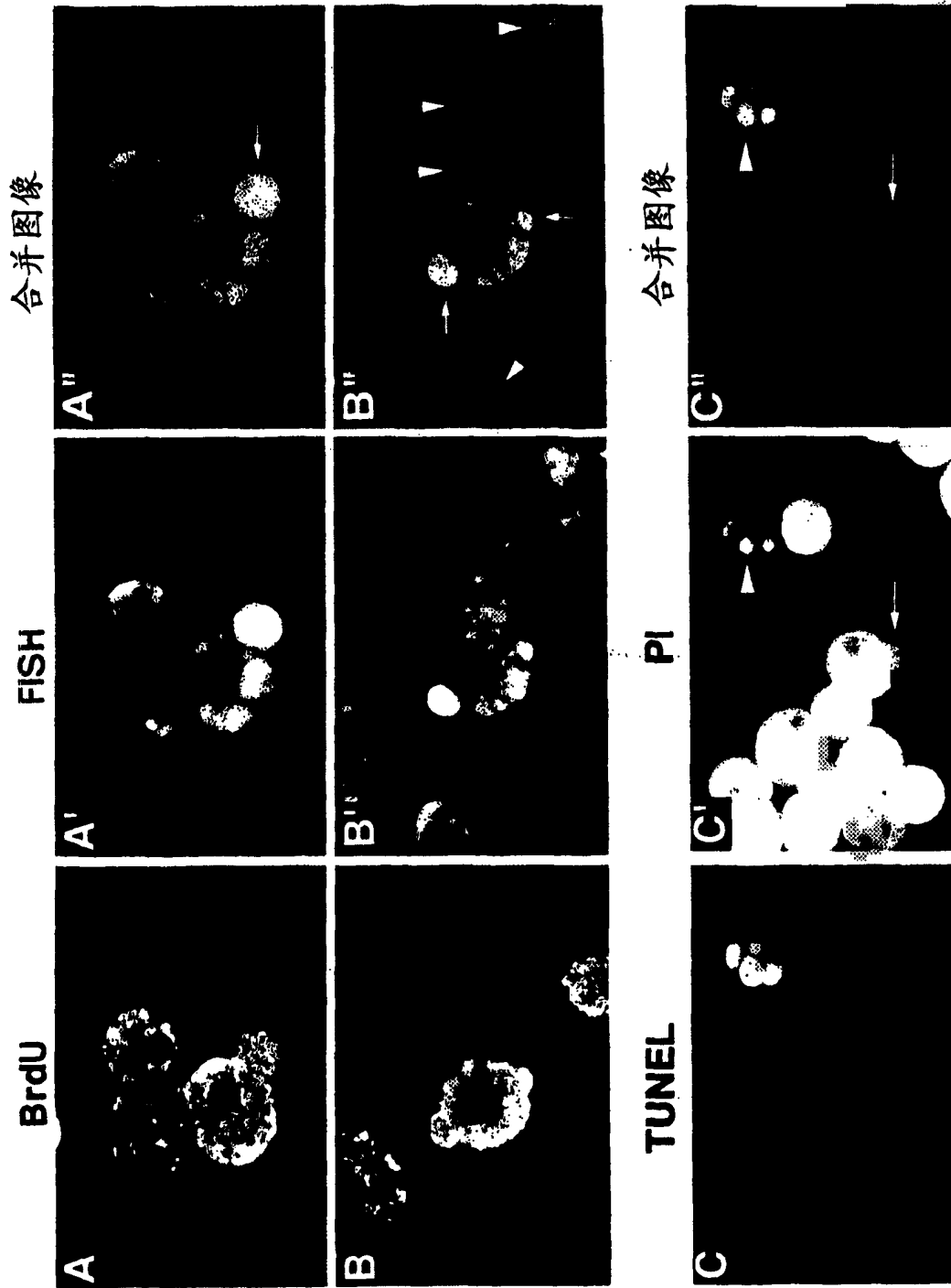


图 6A-6C

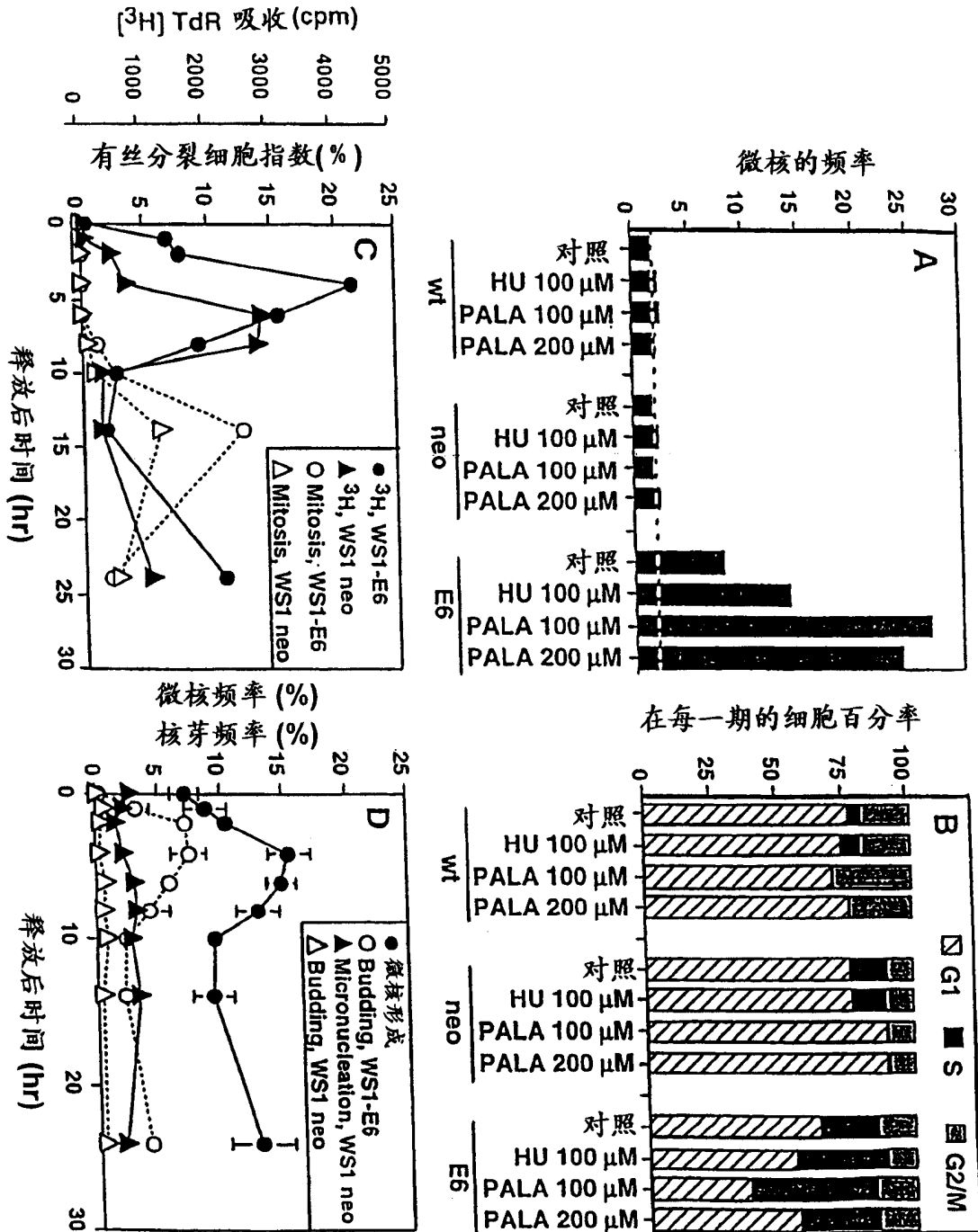


图 7A-7D

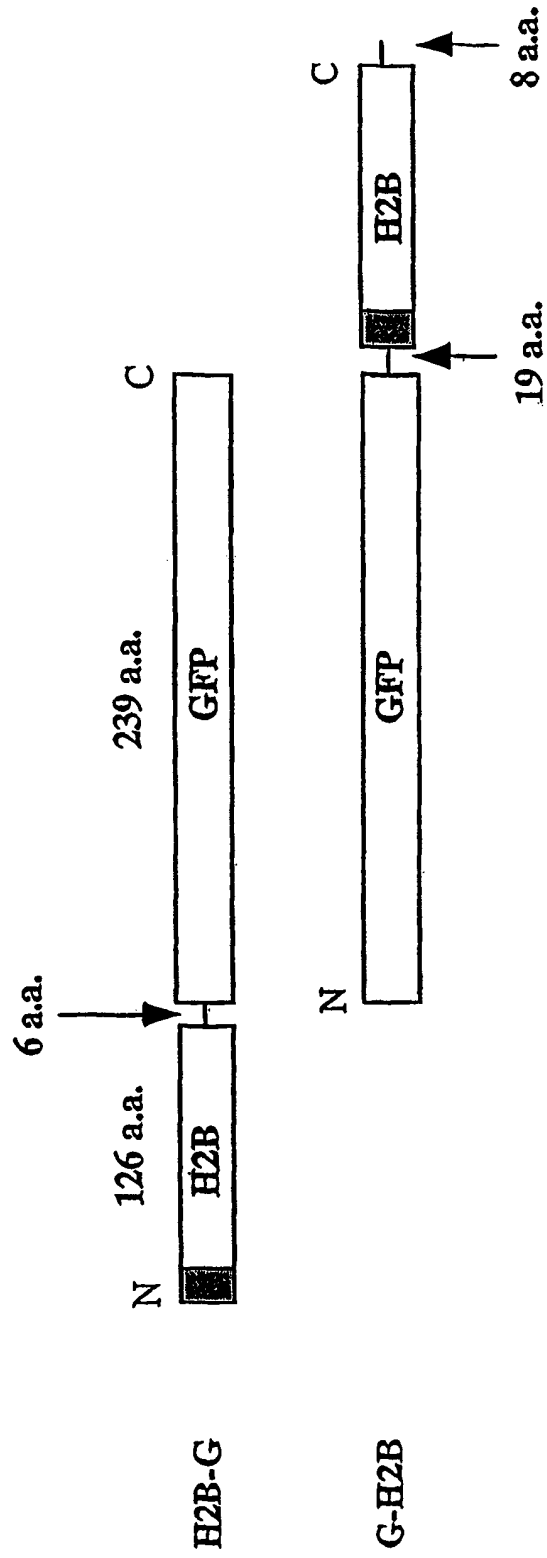
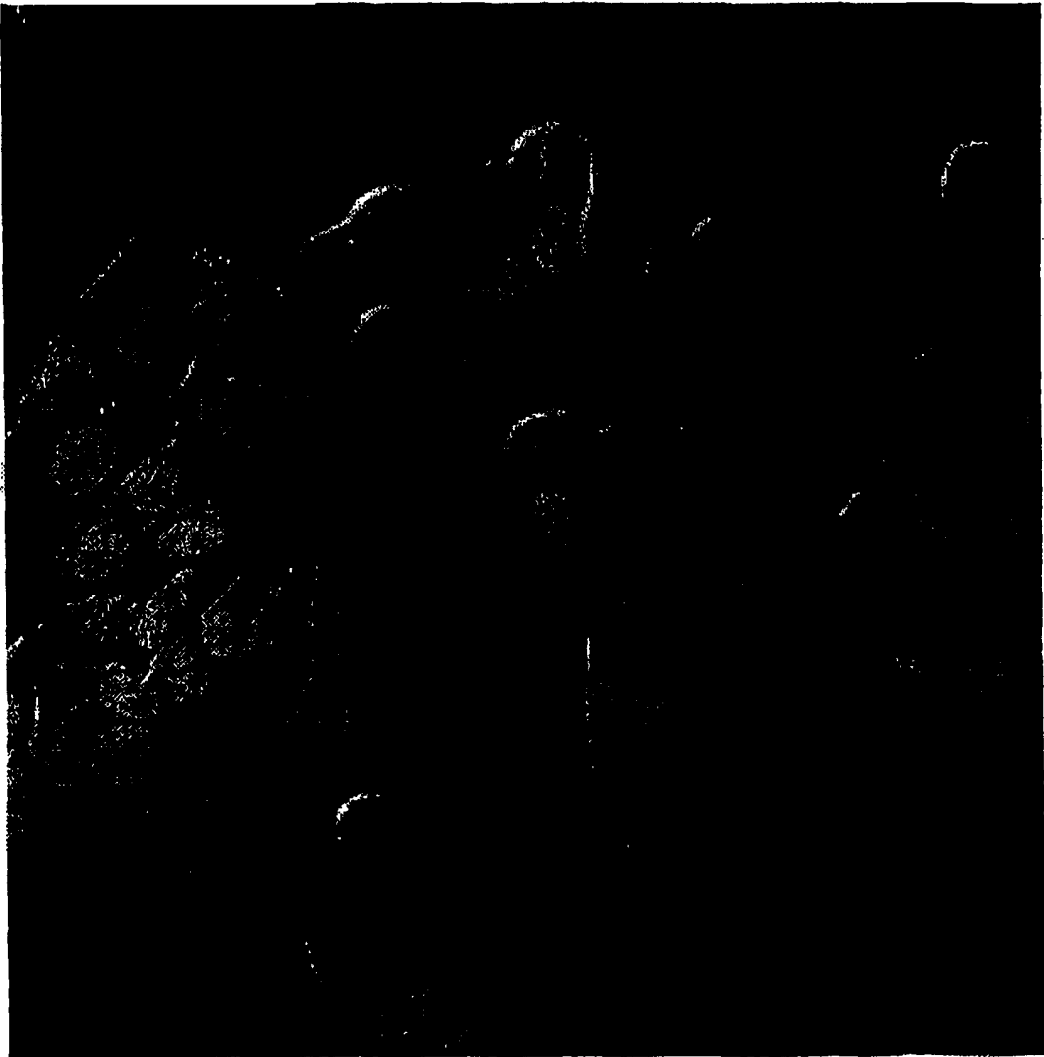


图 8

图 9



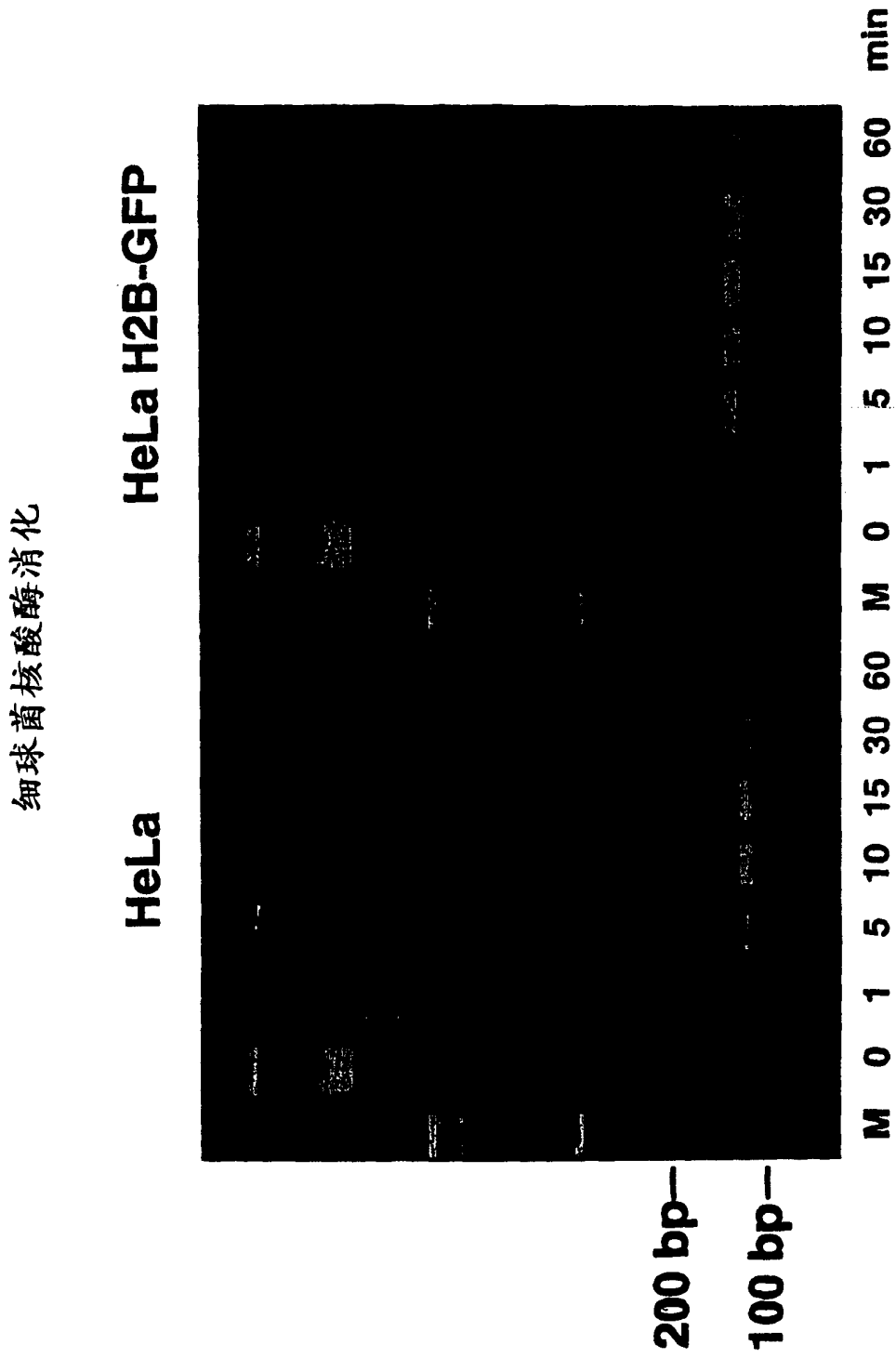


图 10A

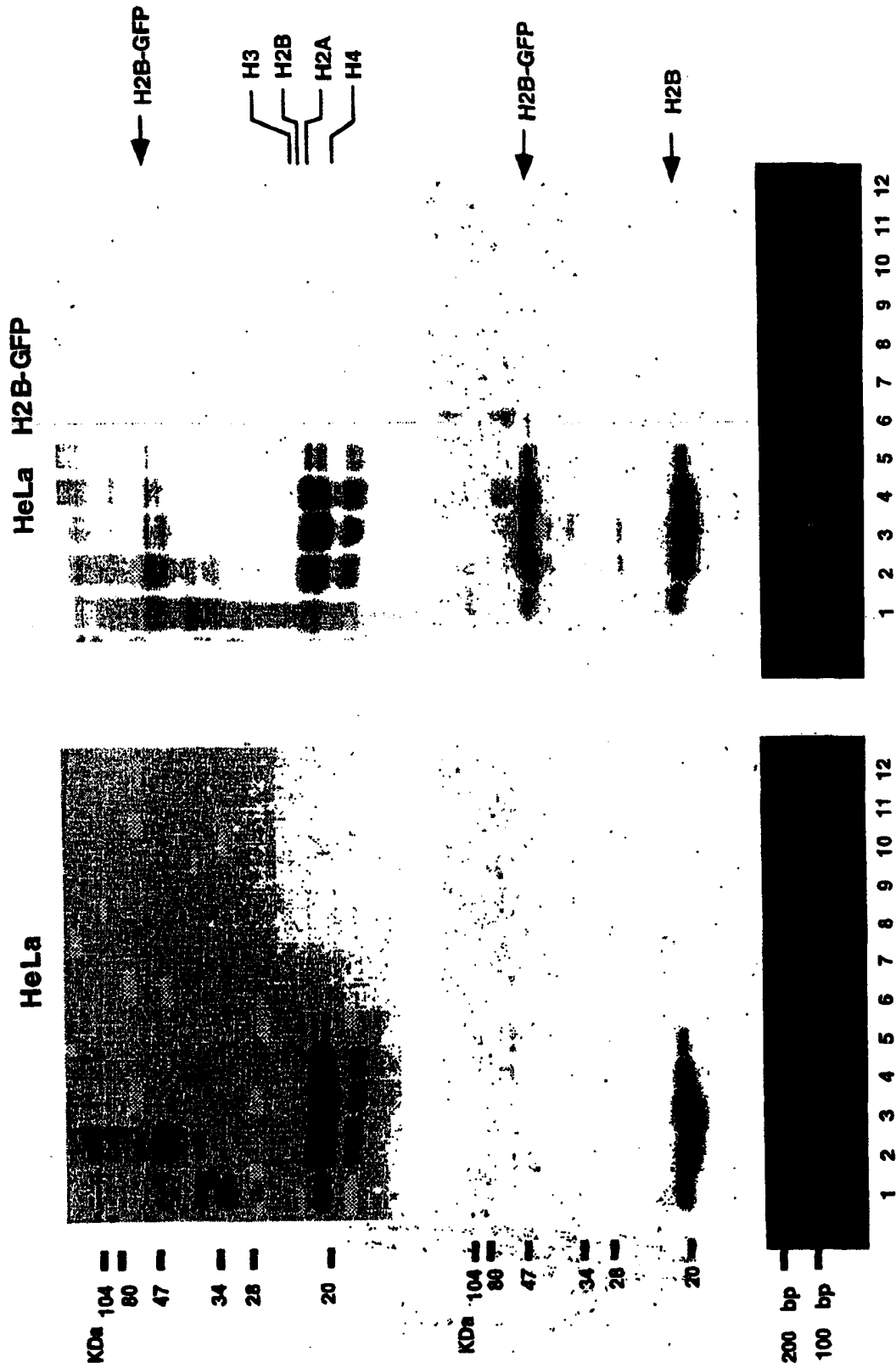


图 10B-10D

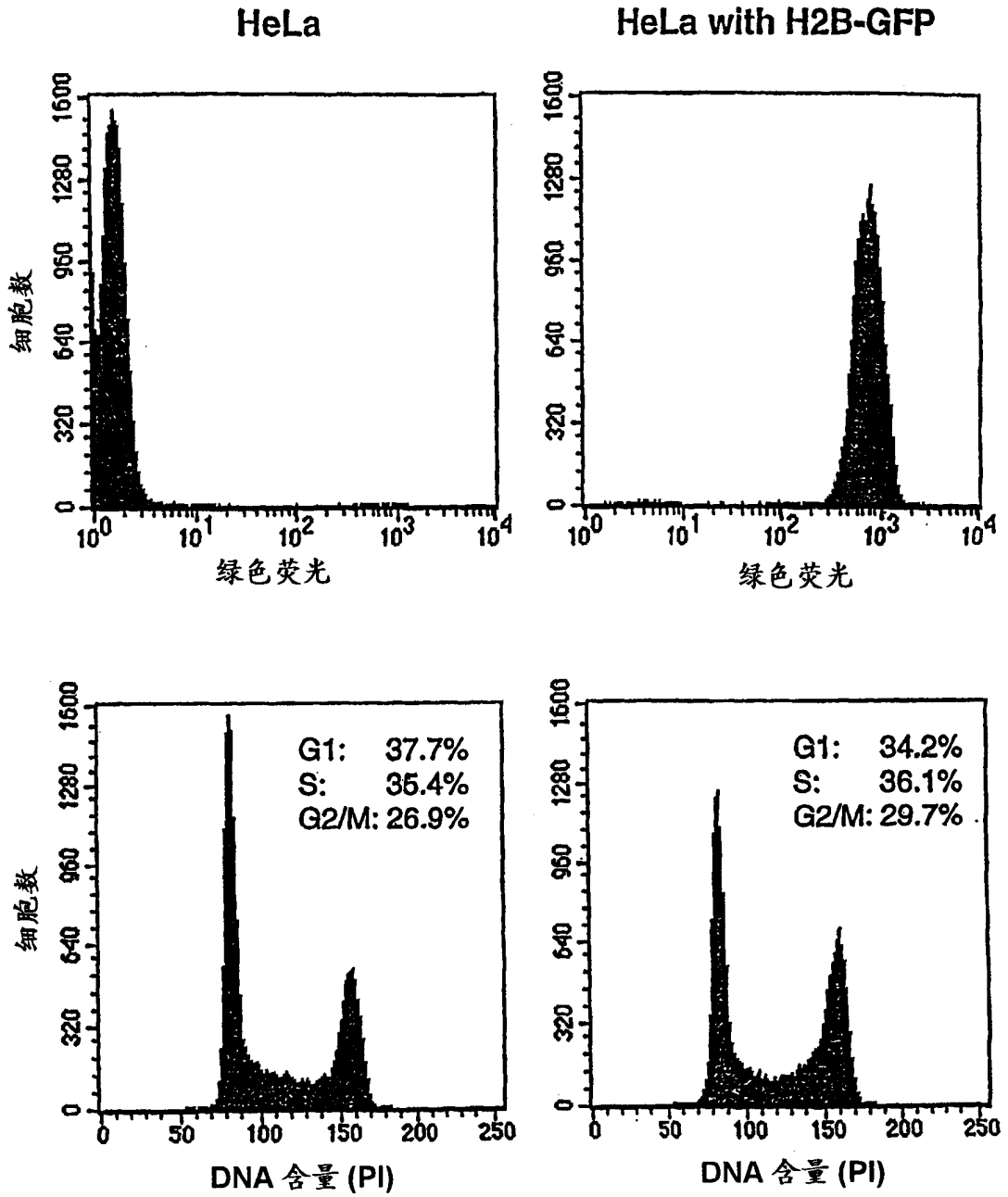


图 11A-11B

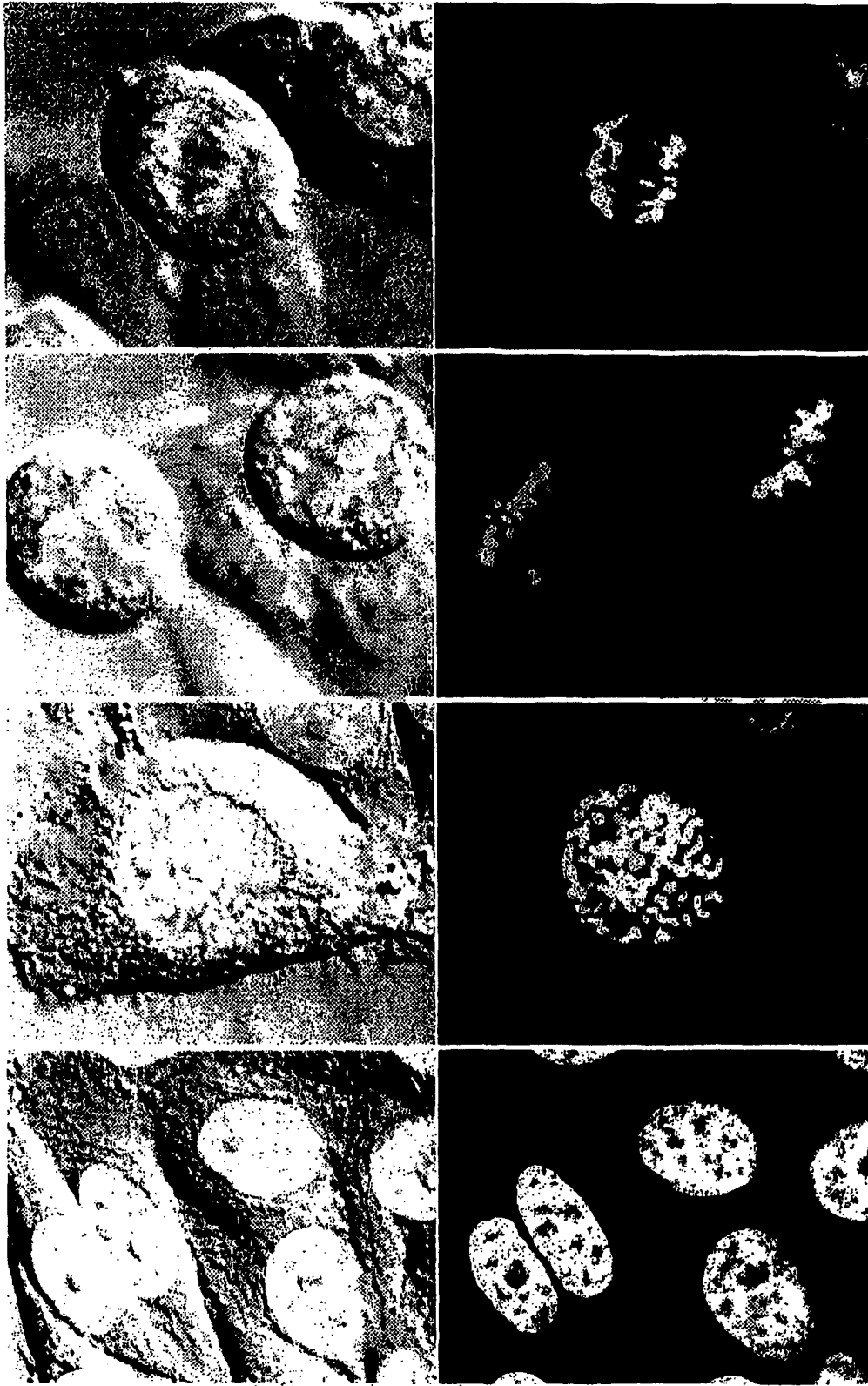


图 12A-12D

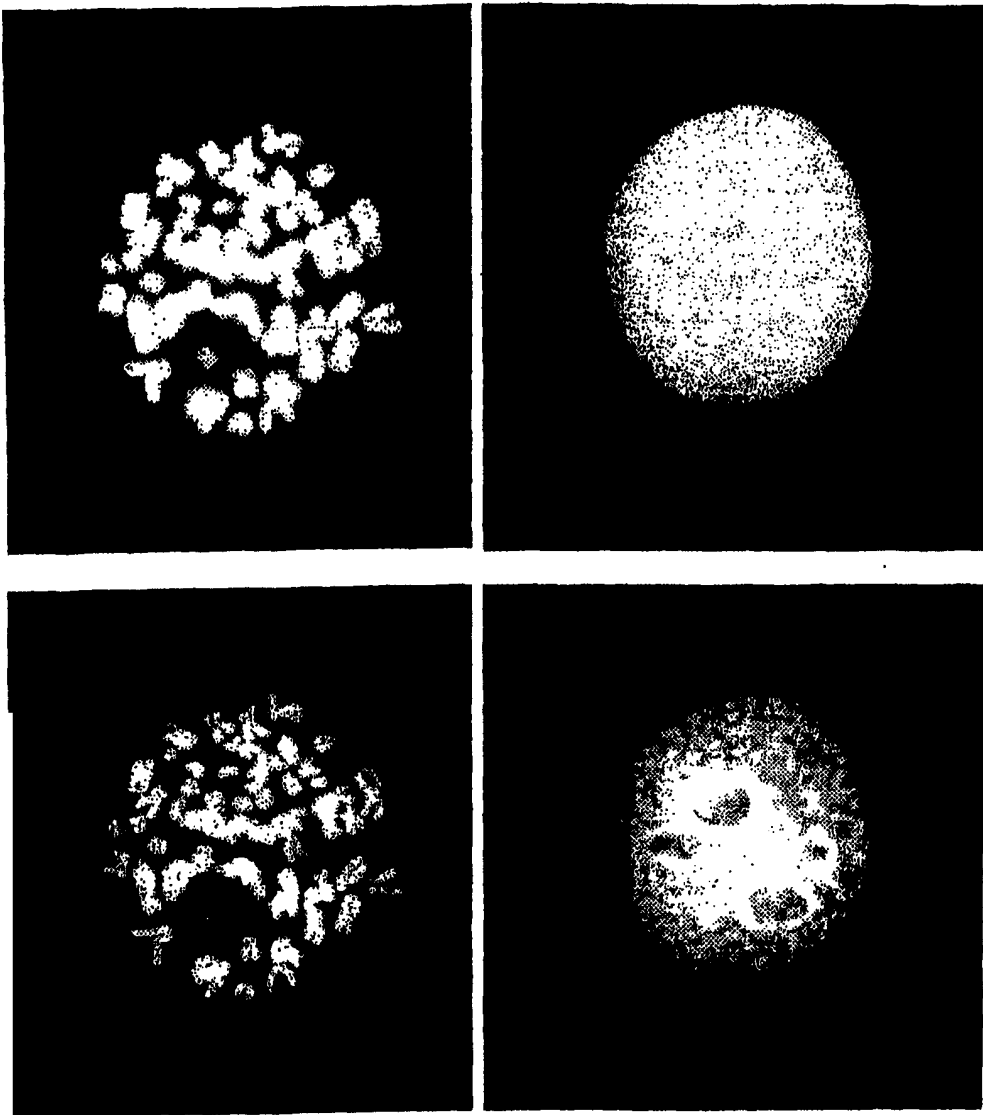


图 12E