

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 15/12
C07K 14/47 G01N 33/574
C12Q 1/68 A61K 38/17



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00811779.9

[43] 公开日 2003 年 2 月 26 日

[11] 公开号 CN 1399680A

[22] 申请日 2000.6.19 [21] 申请号 00811779.9
[30] 优先权
[32] 1999. 6. 18 [33] US [31] 60/139,995
[86] 国际申请 PCT/US00/16900 2000.6.19
[87] 国际公布 WO00/78955 英 2000.12.28
[85] 进入国家阶段日期 2002.2.19
[71] 申请人 生物治疗股份有限公司
地址 美国密执安州
[72] 发明人 P·R·小欧文

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 32 页 附图 10 页

[54] 发明名称 上皮细胞生长抑制剂
[57] 摘要

上皮细胞生长抑制剂在正常和癌性上皮细胞中差异表达。可采用 ECGI 蛋白及编码该蛋白的核酸序列来诊断和治疗上皮细胞癌，例如前列腺、卵巢、结肠癌等。

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

上皮细胞生长抑制剂

5

发明领域

本发明涉及用于诊断和治疗上皮细胞癌的上皮细胞生长抑制剂家族。

发明背景

10 上皮细胞癌，例如前列腺癌、乳房癌、结肠癌、肺癌、胰癌、卵巢癌、脾癌、睾丸癌、胸腺癌等是以上皮细胞异常加速生长为特征的疾病。这种加速生长最初引起肿瘤形成。最后，肿瘤还会转移到不同的器官部位。尽管在各种癌症的诊断和治疗方面已有进展，但这些疾病仍然导致显著的死亡率。

15 早期检测可大大增强癌症的治疗。然而，早期检测疾病存在困难。例如，含有上皮组织的器官(如前列腺、卵巢和其它器官)不易触摸。没有频繁的筛检和合适的标记物，很难检测到这些器官中异常的肿瘤生长。现有的癌症诊断试验的很大缺点是假阳性和假阴性结果的比例很高，从而使现有试验的可靠性比所希望的低。出于这个原因，非常需要鉴定出新的诊断试剂和新的治疗剂来改善癌症(前列腺癌、乳房癌、结肠癌、肺癌、胰癌、卵巢癌、脾癌、睾丸癌、胸腺癌等)的诊断和治疗。

20 一种新的特异性乳房细胞生长抑制剂乳房抑制素(Mammastatin)最近已得到鉴定，并作了特性分析。该乳房抑制素可由下列各克隆表达：MammA(PCT/US97/18026, ATCC#97451, 1996年2月22日保藏)；MammB(PCT/US97/27147, ATCC#PTA-2091, 2000年6月15日保藏)；和 Mammc，在与本申请同日提交的待批 PCT 申请 PCT/US00/16900 中有所描述(ATCC#PTA-2090, 2000年6月15日保藏)。

25 乳房抑制素由正常乳房细胞产生和分泌，可在正常个体的血样中检测到。在乳房癌患者中，该乳房细胞生长抑制剂(具体是乳房抑制素的活性磷酸化形式)的血浓度降低或没有。给予含有活性乳房抑制素(由正常人乳房癌细胞分泌)的蛋白能有效地减小肿瘤大小和数目，并能阻止晚期癌症患者的肿瘤生长。

30 与乳房抑制素相似的上皮细胞生长抑制剂已被发现、分离和特性鉴定。这些抑制剂在序列的5'端与乳房抑制素有部分序列同性，而在分子的3'端具有很少或没有同性。和乳房抑制素一样，新发现的上皮细胞生长抑制剂(ECGI)家族在正常上皮细胞组织中有差异表达，但在癌上皮细胞组织中不表达。另外，和乳房抑制素一样，新发

1. 一种乳房抑制素样上皮细胞生长抑制剂，该分子的至少三分之一与乳房抑制素有显著的序列相同性。
- 5 2. 根据权利要求 1 所述的抑制剂，其中上皮细胞是中枢神经系统、心脏、小肠、大肠、阑尾、直肠、淋巴细胞、骨髓细胞、肺和气道、膀胱、子宫、前列腺、睾丸、卵巢、肝、胰、肾上腺、唾液腺和乳腺。
3. 一种编码上皮细胞生长抑制剂的核酸序列，该抑制剂抑制非乳房上皮细胞的生长，其中该核酸序列可用乳房抑制素衍生获得的内部 PCR 引物从正常非乳房上皮
- 10 细胞扩增得到。
4. 根据权利要求 3 所述的核酸序列，其中上皮细胞是结肠、卵巢、前列腺、脾、睾丸或胸腺细胞。
5. 一种检测上皮细胞癌的方法，该方法包括：
- 分析体液中是否存在权利要求 1 所述的蛋白质或权利要求 3 所述的核酸序列或其
- 15 含量；和
- 将所述蛋白质或所述核酸序列的减少或缺失与上皮细胞癌相关联。
6. 一种治疗患者上皮细胞癌的方法，该方法包括：
- 给予患者权利要求 1 所述的蛋白质或权利要求 3 所述的核酸。
7. 一种诊断试剂盒，它包含：
- 20 权利要求 1 所述的蛋白质和/或权利要求 4 所述的核酸序列；以及任选的特异性结合权利要求 1 所述的蛋白质的抗体。

现的上皮细胞生长抑制剂家族在正常个体的血样中可被检测到,但在上皮细胞癌患者血液中不能检测到(如下文实施例所示)。

发明概述

5 目前已经在许多不同的上皮细胞中鉴定到上皮细胞生长抑制剂(ECGI)家族。这些 ECGI 在正常上皮细胞中呈差异性表达,但在上皮癌细胞中不表达。如下文实施例所示,已经在各种上皮细胞组织(包括前列腺、结肠、卵巢、肺、脾、睾丸、胸腺和其它上皮细胞组织)中发现了乳房抑制素样 ECGI 蛋白。

10 本发明的 ECGI 在正常上皮细胞中表达,但在癌上皮细胞中不表达。使编码乳房抑制素样 ECGI 蛋白的核酸序列与编码乳房抑制素的核酸序列杂交。ECGI 蛋白也能与抗乳房抑制素抗体结合。前列腺细胞中编码 ECGI 的氨基酸序列(PRT-6, SEQ ID NO: 4)已被分离并作了特性鉴定(PRT-6, ATCC#PTA-2092, 2000 年 6 月 15 日保藏),这在下文实施例中有所描述。

15 由于本发明的 ECGI 在正常上皮细胞中差异表达且在癌上皮细胞中不表达,因此可分析 ECGI 的存在或其含量,以此来诊断癌症和/或监测治疗效果。本发明的 ECGI 蛋白及编码该蛋白的核酸还提供了抑制上皮细胞生长、防止肿瘤形成和治疗癌症的有用治疗剂。

附图简述

20 图 1A 是显示所分析的特异性组织 mRNA 位置的 mRNA 测试面板示意图。

图 1B 是 Northern 印迹的计算机扫描图象,它显示了乳房抑制素核酸序列与图 1A 所示方案的各种组织的 mRNA 杂交。

25 图 2 是斑点印迹试验的计算机扫描图,它显示了用抗乳房抑制素抗体 7G6 检测对照、乳房抑制素标准蛋白、乳房癌患者血清样品、正常和癌性人前列腺细胞的条件(conditioned)培养液(的结果)。

图 3 是 Western 印迹试验的计算机扫描图象,它显示了用抗乳房抑制素抗体 7G6 检测正常人乳房细胞裂解液(A)、人前列腺癌 LnCap 细胞裂解液(B)、MCF7 乳房癌细胞裂解液(C)和正常人前列腺细胞裂解液(D)的结果。

30 图 4 是 Western 印迹试验的计算机扫描图象,它显示了用抗乳房抑制素抗体 7G6 检测正常前列腺细胞(A)、LnCap 前列腺癌细胞(B)、正常结肠细胞(C)和结肠癌细胞(D)的细胞裂解液的结果。

图 5 是 Western 印迹试验的计算机扫描图,它显示了用抗乳房抑制素抗体 7G6 检

测人卵巢癌细胞(B)、正常人卵巢细胞(C)和正常人乳房细胞(D)的细胞裂解液的结果。泳道 A 为分子量标准品。

图 6 是斑点印迹试验的计算机扫描图象, 它显示了用抗乳房抑制素抗体 7G6 检测健康成年男性(A, C, D)以及前列腺癌患者(B)的血清样品的结果。

5 图 7 是含有推定的前列腺 ECGF DNA 克隆的 DNA 凝胶的计算扫描图象。

图 8 是前列腺 ECGI 的图表示意及其与其它序列的结构关系。

发明详述

本发明的蛋白:

10 本发明的“上皮细胞生长抑制剂(ECGI)蛋白”在本文中定义为由正常上皮细胞产生的具有抑制其生长活性的乳房抑制素样蛋白。本发明的活性抑制性 ECGI 蛋白在癌上皮细胞中较少或没有。本文公开的 ECGI 蛋白家族看来包括对各上皮组织有特异性、而对组织类型没有或有很小抑制活性的抑制剂。如下文所更详细描述的那样, 预计每种 ECGI 蛋白含有生长抑制性结构域和组织特异性结构域。

15 本发明的 ECGI 蛋白表现出与乳房抑制素显著同源, 后者是一种由正常人乳房细胞产生的乳房细胞生长抑制剂, 其已被证实可用于诊断和治疗乳房癌(PCT/US97/18026)。ECGI 蛋白可与一种或多种抗乳房抑制素抗体如 7G6(Neomarkers, Freemont, CA)结合, 编码它的核酸序列与编码乳房抑制素的核酸序列具有显著同源性。

20 下文实施例中报道的研究证实了 ECGI 蛋白在正常上皮细胞组织中差异表达, 但在癌上皮细胞组织(包括乳房、前列腺、卵巢和结肠)中不表达。和乳房抑制素一样, 本发明的 ECGI 蛋白看来在例如 Western 印迹中呈两个或三个条带: 一个主要条带和一个或两个较小的不太显著的条带。已经证明, 乳房抑制素的这种表达模式是由于该蛋白质的磷酸化。当在两处磷酸化时, 乳房抑制素的分子量大约为 53 千道尔顿。较小的乳房抑制素(49 和 44 千道尔顿)对应于一个部位或没有部位被磷酸化。乳房抑制素蛋白的磷酸化与其抑制活性有关。

30 用抗乳房抑制素抗体 7G6 检测 ECGI 的 Western 印迹显示了各种上皮细胞组织产生的 ECGI 的大约大小。如下文实施例更完整的显示(例如参见图 4-5), 前列腺细胞的 ECGI 在 Western 印迹中移动至大约 55 千道尔顿处, 不太显著的、较小的条带在 51 和 46 千道尔顿处, 提示其磷酸化形式与乳房抑制素所见相似。结肠细胞的 ECGI 迁移至约 50KD 处, 不太显著的条带在大约 47 和 43KD 处。卵巢细胞的 ECGI 迁移至大约 60KD 处。

编码 ECGI 的核酸序列

本发明的核酸序列在本文中定义为编码上述定义的 ECGI 蛋白的核酸序列。编码 ECGI 蛋白的核酸序列与编码乳房抑制素的核酸序列有显著的序列同源性，它们能在高度严谨的条件下与编码乳房抑制素的核酸序列杂交。

- 5 乳房抑制素样上皮细胞生长抑制剂优选在编码乳房抑制素的核酸序列的大约 1000 个毗连的核苷酸内具有基本上的相同性(至少有 90%，较佳的有至少 95%相同)。编码乳房抑制素的核酸包括 MammA(PCT/US97/18026, ATCC#97451, 1996 年 2 月 22 日保藏); MammB(PCT/US97/27147, ATCC#PTA-2091, 2000 年 6 月 15 日保藏); 和本文描述的 MammC(ATCC#PTA-2090, 2000 年 6 月 15 日保藏)的 DNA 插入物。已知乳
- 10 房抑制素克隆所测得的共有序列显示在下文序列对比表 5 以及 SEQ ID NO:1(MammA); SEQ ID NO: 2(MammB); SEQ ID NO: 3(MammC)中。前列腺 ECGI 核酸序列(SEQ ID NO: 4)显示在表 1、2 和 5 中。

- ECGI 可从特异性上皮细胞核酸文库扩增得到，例如采用内部乳房抑制素引物和/或在严谨条件下与乳房抑制素杂交。如下文所更详细描述的那样，与乳房抑制素杂交
- 15 的核酸序列已经显示存在于许多上皮组织(包括中枢神经系统、心脏、小肠、大肠、阑尾、直肠、淋巴细胞、骨髓细胞、肺和气道、膀胱、子宫、前列腺、睾丸、卵巢、肝、胰、肾上腺、唾液腺和乳腺)中(见图 1)。

- 从例如前列腺细胞中分离出的 ECGI 的核酸序列与乳房抑制素在分子 5'端有 95 %以上的相同性，然而，在 3'端有很少或没有序列相同性。预计与乳房抑制素有相同
- 20 性的 5'端含有该分子的生长抑制性结构域，而与乳房抑制素相同性很少的 3'端含有组织特异性结构域。

诊断方法

- 本发明还提供一种检测患者样品(包括组织、细胞和体液)中活性抑制性 ECGI 的体外试验。通过将患者样品中 ECGI 蛋白的存在及类型与正常或癌性人上皮细胞相关
- 25 联，可诊断上皮细胞癌和晚期转移性疾病。分析患者血液或组织样品中的 ECGI 蛋白，例如分析 ECGI 蛋白的丰度和/或其分子量形式。如下所述，ECGI、尤其是较高分子量的磷酸化形式的缺少或丢失与表明晚期转移性疾病的特异性上皮细胞相关联。

- 用各种已知的分析工具和方法(包括免疫试验、杂交、PCR 技术等)可分析 ECGI。较佳的方法是用抗 ECGI 抗体通过免疫试验(包括 ELISA、Western 印迹和斑点印迹)
- 30 来分析患者样品。优选采用重组 ECGI 标准品来提供标准曲线，以可靠地定量检测抑制剂的水平。在下文实施例中，列举了斑点印迹试验和 Western 印迹试验作为这些免疫试验的典型。在本发明的另一个较佳的实施方案中，用免疫组织化学法或通过培养

患者肿瘤细胞并检测培养物的 ECGI 表达来分析组织样品(如肿瘤活检物)。

在一个特别佳的实施方案中, 诊断上皮细胞癌的试验包括至少两种特异性抗体: 一种鉴定取样组织为上皮组织的抗体, 如抗细胞角蛋白抗体, 和一种抗 ECGI 特异性抗体。例如, 利用免疫印迹形式, 将怀疑含有前列腺癌细胞的前列腺组织匀浆, 在
5 SDS/PAGE 凝胶上分离, 转移到膜上, 用抗角蛋白抗体和抗前列腺 ECGI 抗体检测。用与合适标记系统(如过氧化物酶或碱性磷酸酶)偶联的同种型特异性二抗来检测结合的抗体。然后用已知的比色技术或荧光技术使含有结合的第一和第二抗体的膜显影, 并用已知方法定量测定。

在最佳的实施方案中, 用抗 ECGI 抗体通过例如 Western 印迹来分析样品中 ECGI
10 的大小和/或磷酸化形式。高分子量 ECGI 蛋白形式的减少或缺失与晚期癌症相关联。

本发明的诊断试剂盒包括 ECGI 蛋白或编码 ECGI 的核酸序列(例如作为对照)。该诊断试剂盒任选地含有能与待检测或待定量测定的上皮细胞 ECGI 结合的一种或多种抗体。抗体能结合乳房抑制素样结构域(例如 7G6), 或可以是组织特异性的 ECGI 抗体。或者, 诊断试剂盒包括用来扩增和/或检测编码上皮细胞 ECGI 的核酸序列的一
15 种或多种扩增引物或杂交探针(例如用于下文实施例的探针)。

治疗用途

用于治疗用途的 ECGI 蛋白由上皮细胞培养物在无血清条件下或通过重组方法产生。较佳的, ECGI 蛋白在酵母或较高等的真核细胞中产生, 以实现该蛋白的磷酸化。重组蛋白由宿主细胞产生或通过合成方法产生。

20 功能性 ECGI 可通过已知的磷蛋白给药方法来给药, 较佳的是注射给药, 以提高血液中的抑制剂水平, 增加抑制剂与所需上皮的相互作用。

该蛋白可用磷酸化蛋白质药物输送领域已知的方法输送给患者。通常, 将该抑制剂与输送赋形剂混合, 然后注射给药。

抑制剂的给药剂量可由本领域技术人员决定, 它因治疗的类型和疾病严重程度而
25 异。由于乳房抑制素在体外以 10 毫微克/毫升浓度能抑制大约 50% 乳房癌细胞生长, 以 20-25 毫微克/毫升浓度能使乳房癌细胞生长停止, 因此 ECGI 的有用治疗剂量范围为每日给予约 2.5 微克至 250 微克。较佳的是每日给予约 125 微克的剂量。给药的目的是使最终的体剂量在生理范围(例如 15-50 毫微克/毫升)或稍高的范围(例如 25-75 毫微克/毫升)内。对于临床使用, 较佳的剂量范围是对转移性疾病的最初治疗为大约 500
30 毫微克/毫升, 然后维持剂量约为 50 毫微克/毫升。在采用乳房抑制素的临床研究中, 每日给药量约为 50-750 毫微克/毫升就足以诱导 IV 期乳房癌患者的缓解。

由于活性 ECGI 是磷酸化蛋白, 预计需要多剂量的该抑制剂, 以维持患者血液中

ECGI 的生长抑制水平的 ECGI。另外，由于 ECGI 通常起细胞抑制剂作用而不是杀细胞剂作用，因此预计该抑制剂的最大效应需要经常维持上皮细胞癌患者的抑制剂水平。

在此较佳的应用中，ECGI 以高剂量(大于 50 毫微克/毫升，较佳的约为 50-500 毫微克/毫升)给予，以诱导肿瘤退变。较低的维持剂量(小于 50 毫微克/毫升，较佳的为 20-50 毫微克/毫升)用来预防癌细胞生长。

将乳房抑制素给予 IV 期乳房癌患者的临床实验提示了维持血液中乳房抑制素生理水平的有用剂量。给药宜每日进行，但是可以是例如通过慢释点滴连续输液，或每 2-3 日注射一次。证据提示，连续给药可能诱导反馈抑制。因此，较佳的给药方案是给予日剂量的乳房抑制素，持续大约 25-28 天，然后 2-5 天内不给药。

诊断试验

本发明检测人组织和血清中起作用的抑制剂的存在与否的试验可用来筛检上皮细胞癌患者，筛检具有发展成上皮细胞癌的高度危险的人群，检测上皮癌的早期发作，以及在治疗期间监测患者的抑制剂水平。例如，分析患者的血液 ECGI 可能会显示，与正常对照或患者以前的前列腺 ECGI 分布情况相比，高分子量的磷酸化的前列腺 ECGI 的含量降低。这种变化与前列腺癌的危险性增加、前列腺癌的早期发作以及晚期转移性前列腺癌相关。磷酸化的具有活性的 55kD 的前列腺 ECGI 的诊断试验宜是采用特异性抗 ECGI 抗体的 Western 印迹免疫试验或是 ELISA。例如，血清筛检宜用免疫试验(如 ELISA、Western 印迹或斑点印迹试验)来进行。

对于最佳的结果，患者样品应在取样后短时间内(1 周内)进行试验，保藏于 4℃ 下(少于 1 年)，或长期冷冻保藏。最佳的是，将样品冷冻至进行试验。

实施例

参考下列实施例将能更好地理解本发明，但本发明并不以任何方式局限于这些实施例。

实施例 1

ECGI 的多组织表达

在多组织表达阵列(Clontech, Inc. #7775-1)上进行 Northern 印迹分析，以证实 ECGI 在各种上皮细胞组织中的表达。用含有 pMammC 3'区域的大约 1800 碱基对(SEQ ID NO: 3, 大约核苷酸 359-末端)的地高辛标记的乳房抑制素 EcoR1 片段作为探针。使 DIG 标记的乳房抑制素 cDNA 在 10 毫升 easy HYB 溶液(Roche)中与该阵列 65℃ 杂交 16 小时，65℃ 洗涤，按照生产商说明书，与抗 DIG 抗体杂交，用 CSPD 显影。然

正常前列腺细胞裂解液(D)含有能被抗乳房抑制素抗体识别的蛋白质,而前列腺癌细胞(LnCap)(B)和乳房癌细胞(MCF7)(C)没有该蛋白。前列腺细胞裂解液(D)中识别的蛋白质其大小与乳房抑制素(A)相似。

5 结肠和前列腺

如上述实施例 2 所述,培育正常前列腺细胞(Clonetech, Inc.)、LnCap 前列腺癌细胞(ATCC)、Sw 948 结肠癌细胞(ATCC)和正常结肠上皮细胞(从患者外科手术组织获得)。在加样缓冲液中制备细胞裂解液,用抗乳房抑制素抗体 7G6 作为探针,用 Western 印迹分析 ECGI 的表达。

- 10 如图 4 所示,正常前列腺(A)和正常结肠(C)上皮细胞表达了可被抗乳房抑制素抗体识别的一种蛋白质,而这些组织的癌细胞(B, D)不能表达该蛋白质。蛋白质的差异性表达与乳房组织中乳房抑制素所显示的相似。另外,正常前列腺和结肠组织 Western 印迹显示的条带图案与正常人乳房细胞产生的乳房抑制素所见的磷酸化图案相似。图中显示一条较大的主条带和两条较小较模糊的条带。该图案与乳房抑制素的磷酸化有
- 15 关。

Western 印迹分析(图 4)显示出前列腺 ECGI 具有大约 51 千道尔顿的分子量;结肠 ECGI 显示具有大约 50 千道尔顿的分子量。

卵巢

- 20 如以上实施例 2 所述,培育 OvCar-卵巢癌细胞(ATCC)、正常人卵巢细胞(患者外科手术组织)和正常人乳房细胞(患者外科手术组织)。培育至少 48 小时后,除去生长培养基,用盐水和 SDS-PAGE 加样缓冲液清洗细胞直至粘稠,制得直接的裂解液。收集裂解液,在 10%SDS-PAGE 上分离,电泳转移到硝化纤维素膜上,用 7G6 抗乳房抑制素抗体检测。数据显示在图 5 中,其中泳道 A 含有分子量标准品;B 是 OvCar
- 25 卵巢癌细胞裂解液;C 是正常人卵巢细胞裂解液;D 是正常人乳房细胞裂解液。

图 5 证明该乳房抑制素样 ECGI 蛋白由正常人卵巢组织产生,并被抗乳房抑制素抗体识别。该蛋白在所分析的卵巢癌细胞中不表达。卵巢 ECGI 的分子量大约为 60 千道尔顿。

30

实施例 4

血液中前列腺 ECGI 的差异性检测

分析了三位健康男性志愿者的血清样品中前列腺 ECGI 的存在,并将其与前列腺

后将印迹室温曝光 Kodak X-OMAT 膜 30 分钟。

多组织表达阵列的组织平面图显示在图 1A 中。乳房抑制素 cDNA 与该阵列的 mRNA 杂交显示在图 1B 中，该图显示了表达乳房抑制素样 ECGI 序列的上皮细胞组织的种类。与乳房抑制素 cDNA 杂交的特异性组织包括：中枢神经系统、心脏、小肠、
5 大肠、阑尾、直肠、淋巴细胞、骨髓细胞、肺和气管、膀胱、子宫、前列腺、睾丸、卵巢、肝、胰、肾上腺、唾液腺和乳腺。

实施例 3

正常的前列腺细胞和癌性前列腺细胞

10 培育外科样品所得正常的前列腺细胞和从美国典型培养物保藏中心(ACTT)获得的癌性前列腺细胞 LnCap，分析前列腺 ECGI 的产生。细胞在含有 40 μ M 钙、添加了 5%Chelex 处理过的马血清、10 毫微克/毫升 EGF、10 微克/毫升胰岛素、100 毫微克/毫升霍乱毒素和 1 微克/毫升氢化可的松的 DMEM/F12 培养液中培养 4 天。然后收集条件培养液样品并分析。

15 使患者样品获得的正常人乳房细胞在相同培养基中培育，采用分泌到培养液中的乳房抑制素作为对照。另外分析乳房癌患者获得的血清并用作对照。

收集液体样品，通过抽吸加载到斑点印迹装置上的硝化纤维素膜上。然后用抗乳房抑制素抗体 7G6 检测该膜，用碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠抗体检测抗体结合。用 NBT/BCIP 底物系统(Life Technologies)显色。结果显示在图 2 中。

20 抗乳房抑制素抗体能识别正常前列腺细胞产生而癌性前列腺细胞不能产生的一种蛋白质。这与该抗体能识别由正常乳房细胞产生而乳房癌细胞不能产生的乳房细胞生长抑制剂乳房抑制素相似。该数据结合实施例 1 中的数据，证明在其它上皮细胞组织中、尤其是前列腺细胞中产生了乳房抑制素样 ECGI。

25 实施例 3

ECGI 在前列腺、结肠和卵巢中的差异性表达

前列腺

如上述实施例 2 所述，培育正常前列腺细胞(Clonetech, Inc.)、LnCap 前列腺癌细胞(ATCC)、MCF7 乳房癌细胞(ATCC)和正常人乳房细胞(从医院组织获得)。培育至少
30 48 小时后，使细胞在加样缓冲液中裂解，用抗乳房抑制素抗体 7G6 作为探针，用 Western 印迹分析 ECGI 的存在。用正常人乳房细胞蛋白(NHMC)裂解液(1 毫克/毫升)作为乳房抑制素对照(A)。数据显示在图 3 中。

癌患者的血清比较。血清样品以 400 微升和 200 微升样品加样，一式两份。利用真空将样品吸到 96 孔斑点印迹装置中的硝化纤维素膜上。然后用抗乳房抑制素抗体 7G6 检测滤膜，用 NBT/BCIP 底物显色。数据显示在图 6 中。

正常人乳房细胞(NHMC)培养物产生的标准品条件培养液用来比较。一式两份的

5 标准品含有 400、200、100、50、25、12 和 6 微升 NHCM 培养液。对健康成年男性(A, C, D)以及前列腺癌成年患者(B)的血清样品进行试验，采用 400 和 200 微升血清样品。正常血清(A, C, D)有明显的信号表明存在前列腺 ECGI，而前列腺癌患者的血清显示只有微弱的信号。

10

实施例 5

前列腺 ECGI 的抑制活性

将正常前列腺细胞(Clonetech, Inc.)、PC3 和 LnCap 前列腺癌细胞(ATCC)以每毫升 5.0×10^4 细胞的密度接种于含 10%胎牛血清的 RPMI 培养基的 12 孔板中。24 小时后，在培养物中添加 10%条件培养液。每个样品一式三份进行。平板于 37℃、5%CO₂ 下

15 培育 6 天，培养期末，用溴棕三甲铵(Cetrimide)使细胞裂解，用 Colter 计数器计数。比较经处理的和未经处理的孔，计算抑制百分数，数据显示在下表中。雄激素不敏感的 PC3 细胞未被正常前列腺细胞培养液或正常前列腺细胞所得的条件培养液所抑制。相反，LnCap 细胞被加入的生长培养液所抑制，正常前列腺获得的培养液的抑制程度一定程度上大于癌细胞获得的培养液。

细胞类型	正常前列腺培养液的抑制%	前列腺肿瘤培养液的抑制%
LnCap #1	22.5+/-3.3	8.3+/-0.4
LnCap#2	22.7+/-0.6	16.7+/-15.8
PC3	0	0

20

实施例 6

前列腺 ECGI DNA 的分离和鉴定

从正常前列腺细胞(患者外科手术组织)以及 LnCap 前列腺肿瘤细胞(ATCC)的 mRNA 产生核酸文库。

25 将正常前列腺细胞和前列腺癌细胞文库的核酸序列插入载体中，用来转化细菌。如上所述，通过在严谨条件下与地高辛标记的乳房抑制素核酸探针杂交，筛选出能表达正常的和癌性前列腺细胞核酸序列的细菌菌落。

选出阳性菌落，在 LB 肉汤中生长。纯化从阳性菌落获得的质粒，用 ECO R1 和

XhoI 消化, 以释放出 cDNA 插入物。然后在 1%琼脂糖凝胶(见图 7A)上分离经消化的 DNA, 用地高辛标记的乳房抑制素片段作为探针, 对分离的 DNA 进行 Southern 印迹分析。如图 7 所示, 分离出两个前列腺 ECGI 克隆, 每个克隆具有大约 2kb 的大小; 一个克隆从正常前列腺组织文库(PRN2.1)中分离得到, 一个从 LnCap 前列腺肿瘤细胞文库(PRT-6)分离得到。

对 PRT-6 作进一步特性鉴定, 测定其核酸序列。如下表 1 所示, 编码前列腺 ECGI 的核酸序列在分子 5'端与乳房抑制素基本相同(大于 90%), 而在分子的 3'端有很少的或没有相同性。这些相似和不同的区域用图表显示在图 8 中。

10

实施例 7

前列腺 ECGI DNA 的分离和特性鉴定

从正常前列腺细胞(从患者外科手术组织获得)以及 LnCap 前列腺肿瘤细胞(ATCC)的 mRNA 构建核酸文库。用文库 cDNA 来转化大肠杆菌, 并接种进行菌落杂交。采用下列外部 PCR 引物 M200 和 M2200

15

[SEQ ID NO: 5]M200: GCGCCGGCCGGGCGCGACCCG

[SEQ ID NO: 6]M2200: GCAATCTCAGCGCACTGCTGC

作 PCR 产生地高辛标记的乳房抑制素 C 片段来筛选菌落。

如上所述, 表达前列腺 ECGI 克隆的细菌菌落在严谨杂交条件下能与标记的乳房抑制素探针杂交。

20

实施例 8

前列腺 ECGI 的同源性

将前列腺 ECGI 序列对照 GenBank 中的核酸序列进行分析。28SmRNA 和 Hip55 这两个分子的一部分显示出与前列腺 ECGI 序列中的结构域有一些相似性。

25

28SmRNA 的同源性已被鉴定存在于许多重要的生长调节基因序列中(Hu 等人, 1999, PNAS 96:1339-1344; Mauro 等人, 1997, PNAS 94:422-427)。Hip55 是一种能与造血先祖 1 型激酶(一种参与 src 信号转导通道的蛋白质)结合的蛋白质(Ensenada 等人, 1999, J. Biol. Chem. 274:33945-50)。

30

利用 Hip55 的已知开放读框, 推定出该前列腺克隆的推定氨基酸序列。如下表 3 所示, 该翻译物包括几个内部中止密码子。

另外, 利用 Hip55 ORF, 推定出 MammB 和 MammC 序列的推定氨基酸序列, 如表 4 和 5 所示。

14

共有序列 (1401) TCTAC GA C C A GGT CAG CAAG T C
1451 1500

pMamm C (1350) TACAGACAAATTCATATTGAAATTTGTGCATAAGAGGCACAGATTTTA-
前列腺 GIP (1406) TCTGAGCCTATGGACCAAC--CACTTCAGGGCCAGGGGCTCAGTGGGCAA
共有序列 (1451) T CA ATTGA A A TTC G AG GGC CAG A
1501 1550

pMamm C (1399) GGATTGAAAG----TTGTATGAAGAAGGACAAGTGCTCTAGGCACTTGCA
前列腺 GIP (1454) GGGCTGTGTGCCCGTGCCCTGTAGGCTAGCAGGCAGCCGACCA--CA
共有序列 (1501) GG TC G T TG AC A AC AG C GAC CA
1551 1600

pMamm C (1445) AATCTGGAAATGGTAATGTCAGATGAATATAGATTTCTAGTGTACCACCA
前列腺 GIP (1502) GAAATCTCCCTTTT--GCTCTG--GATCCTGATCAGGGGATCGAGGTGA
共有序列 (1551) AG T TT GA C C GA GAA CAT C G A A
1601 1650

pMamm C (1495) GGATATATTTTACCTGAATTGGCTTTGTGATCATCATTAAACCTAGTTA
前列腺 GIP (1548) TCGACGAGGGCTGGTGGCTGGGTATGGCCGGATGGCCATTTTGGGATG
共有序列 (1601) C A A CT TG TGGCT TG G AT C T
1651 1700

pMamm C (1544) TTAAAACTAATGAAAAGGCTTTATATCAAAATATACTTTAAGGTATAAAAA
前列腺 GIP (1598) TTCCCTGCCACTACGTGGAGCTCATTGAGTGAGGCTGAGGGCACTCTT
共有序列 (1651) TT A A GG AT A T T A GG A A
1701 1750

pMamm C (1594) TCAAAATATAGCTAAGGCTGTTTCTTTAGCATTTTAATTTCAAAAGAT
前列腺 GIP (1648) GGCTTCCCTCTCTGAGATGGCTTCTTATTGCTGGAGAGGGAGGGCTG
共有序列 (1701) C T T A C TG TTC TTA T AA A C
1751 1800

pMamm C (1643) AATATAGCTACGTCTAAGGGCTTTATATGTATCCAG--AGATGTCTT
前列腺 GIP (1698) GGGCTTGA--C--ATCAGCTCTCTCCAGGATAGGACCCCACTG
共有序列 (1751) A T G C ATT GCA T T C G A AG AC C GT
1801 1850

pMamm C (1692) TGTCACATTTCAAAATGTTCTCATGGTAATGTTTCAATAATTTCTAG
前列腺 GIP (1741) AGG-ATGAGGCTCAGGGCTCCCTCCGGCTTGG-CAGACTCAGCCCTGCA
共有序列 (1801) G A C A G TC C G TG CA A T A CTGT
1851 1900

pMamm C (1742) GGTGAGAAATAGTCTTACCGTAGTAAGACT-ATTTCAGTAAAG--GAAAG
前列腺 GIP (1789) CCCCAGATGCAAGCAATGGCCCTGGTATTCACACATCCTTCTCTGATCC
共有序列 (1851) A A AG T C T GT A C A CA C G A CC
1901 1950

pMamm C (1789) TCTGAACCTTGGAGTTCTACTTGGCGAAAGTTAGTATGAGCACTAGGACT
前列腺 GIP (1839) CCCGACCTCCCAAG-CAAGTTGGCTCTTGGCCCTGACAGGATACTGAGC
共有序列 (1901) C GA CCT AG CA CTG G T ACAGGA GA
1951 2000

pMamm C (1839) TGAACCTGAACCATCAG--ACTCCAGATCTCTCCATACCAACATGCTAGC
前列腺 GIP (1888) CAAGCCCTGCTGTGGCCAGCCCTGAGTGGCCACTGCCAGGCTGGGGG
共有序列 (1951) A CC C T C A CC GA C T CCA CTGC G
2001 2050

pMamm C (1887) ACATGTGCTGTCTCTTATTCCTGGCTCCGTTATTTCCCTTTTATT
前列腺 GIP (1938) AAGGCTCTGAGGAGGGGCATGTGGAGGCTGGCTGGCTTCTGCACTT
共有序列 (2001) A GT C CA TC GG CT T T CC T T ATTT
2051 2100

pMamm C (1937) CCTTCCCTCCCAACCCCTTTTCCCCCAATTTCTTTCTTCTTCT
前列腺 GIP (1988) A-TTGGCTT-----TTT-TGTT-----TTTCTCTTGGCTTCT
共有序列 (2051) TTT CCTT TTT TC TTTCT TT TTCT
2101 2150

pMamm C (1987) TTTTAATTCTTAATTACATAACTAATACATGCTTATCAGAAGCAATGATA
前列腺 GIP (2018) AAGGGGTGGTGGCCACCACTGTTTAGAATGACCCTGGGATCAGTGAACG
共有序列 (2101) T GT CA T A A C T GAACA T A
2151 2200

pMamm C (2037) TAGCACAAAGGAATAAAGTACGGCTGAGTGAT--AGCTCATCCCTGTA
前列腺 GIP (2068) TAG---AGATTGTTTATTAGCA-GAGTTTGTAACCAAGTCAAGAGTGG--
共有序列 (2151) TAG A AA T T AG A G GT GTGA A TCA G

```

2201
pMamm C (2085) ATGCTAGCACTTTTGAAGGCCAAGGCAGGCAGATCACTTGAGTTCAGAGT 2250
前列腺 GIP (2112) ATGATGGTGGTTTGGCAG--CAGGGATTTGTCTTGTGGAGCCT---GC
共有序列 (2201) ATC T G TTTGG AG CA GG A T T GAG C G
2251
pMamm C (2135) TGGAGACCAGCCTGGGCAACATGGTGAAACCCGTCTCTAGAAAAATA 2300
前列腺 GIP (2157) TGTGTGCTCCCCACTCCATTCTCTGTCCCTCTGCTGGGGTATGGGGAG
共有序列 (2251) TC C CC CA TG C CTG CT C A A
2301
pMamm C (2185) CAAAAATTTAGCCGGGGGTGCTGGCAGACACCTGTAGTCTCAGCTATCT 2350
前列腺 GIP (2207) TGGGGATGCAGATGGCCTAAGCTCCAG---GGTGGGTATTGAAAAAG---
共有序列 (2301) AT AG GG C GCT CAC CCTG TCA AC
2351
pMamm C (2235) GAGGGCTGAGGTGGGAAGATTGATTGAGCCAGGAGGTGGTAAAGGTGCAGG 2400
前列腺 GIP (2251) ---GAGAGACACAACATG--TTCCCTCCACGGGGCTCACTCCTGCTG---CTGG
共有序列 (2351) GGC GA A G TT T A C T GA GC C GC
2401
pMamm C (2285) AGTGCGCTGAGATTGGGCCATTGCACTCCAGCCTGGGTGAGAGAGAGAGA 2450
前列腺 GIP (2295) AGGCCCCAGTGTGTGGCTCAACTGATCTGACTTCAGGAAAGTAAAT--A
共有序列 (2401) AG C C G G TGC CA A TC C T G A AG A A A
2451
pMamm C (2335) CCCTGTCTCAAAAAAAAAA----- 2498
前列腺 GIP (2344) A-----AAAAAAAAAACTCGAGAAGCTTTGGACTTCTTCGCCA
共有序列 (2451) AAAAAAAAAA

```

表 2
前列腺 ECGI 同源性

28SmRNA	1	50
pMammB	(1)	CTTTGGGAGGCCGAGGCCGTAGGATCCCTCGAGGAATCGCCTAACCCCTGG
前列腺	(1)	-----
Hip55	(1)	-----
28SmRNA	51	100
pMammB	(51)	GGAGGTTGAGGTTGCAGTGAGTGAGCCATAGTTGTGTCACTGTGCTCCAG
前列腺	(1)	-----
Hip55	(1)	-----
28SmRNA	101	150
pMammB	(101)	TCTGGGCGAAAGACAGAATGAGGCCCTGCCACAGGCAGGCAGGCAGGCAG
前列腺	(1)	-----
Hip55	(1)	-----GCACGAG
28SmRNA	151	200
pMammB	(151)	GCAGGAGAAAGACAGCAGCTGTATTGTGTTCTTCTCAGGGTGGAGGAA
前列腺	(1)	-----
Hip55	(8)	ATTCCACTGTCCCTCCTACTATCCAGCGAAACACAGCCAAGGCAGG
	(1)	-----
28SmRNA	201	250
pMammB	(201)	AAAAAATAAATAAATACAGCACTTAATTAAATTTTCTTTTTCCTCGGAC
前列腺	(1)	-----
Hip55	(58)	GGCTGGGGAATAGCGGGGAGAGAGACCCGTTGAGATTGACTATA
	(1)	-----
28SmRNA	251	300
pMammB	(251)	SAGTTTCAGTCTTGGTCCCCTGGTGGAGTCACTGSCACCCCTCCTCCT
前列腺	(4)	CACGASCAC-----GGTGAAGAGACATGAGAGGTGTAGAATAAGTGGGAG
Hip55	(107)	CTCTGSCAC-----GGTGAAGAGACATGAGAGGTGTAGAATAAGTGGGAG
	(1)	-----
28SmRNA	301	350
pMammB	(301)	CACCGAACTCCACCTCCCTTAAACCGATTCTCCTCCTTACCTC
前列腺	(49)	CCCCCGGGGGCCCCCGCGGTCTCCCGCGAGGGGGCCCGCG-----GGTC
Hip55	(152)	CCCCCGGGGGCCCCCGCGGTCTCCCGCGAGGGGGCCCGCGGGGGGGTTC
	(1)	-----
28SmRNA	351	400
pMammB	(351)	CTGASTAGC--TSGGATTACAGGAGGAGACACACACCCAGGTGATTT
前列腺	(93)	CGCCCGGCC--CCGGGC--CCCGGTGAAATACCACTACTCTGATCGTTTTT
Hip55	(200)	CGCCCGGCCCTCCGGGC--CCCGGTGAAATACCACTACTCTGATCGTTTTT
	(1)	-----
28SmRNA	401	450
pMammB	(399)	GTAATGTTASTAGAGGACATTTCATGTTGGGTAGCTGGTCTCTA
前列腺	(141)	CACTGACCCGGGTGAGGGGGGGG-----GAGCCCGGAGGGGCTCTG
	(250)	CACTGACCCGGGTGAGGGGGGGG-----GAGCCCGGAGGGGCTCTG

Hip55	(1)	-----ATGTCGGCAAACCT-----G-GCCGGAACGGG-CAGGG-	
		451	500
28SmRNA	(449)	A-CGCGGACCCACTGATCTGCCCCGCGCGGCTCCAAAGTGCTGGG	
pMammB	(185)	TTCTGGCG--CGAAGCG-----CGCGCCGCGCGCGCG--GCGGCG	
前列腺	(295)	TTCTGGCG--CGAAGCG-----CGCGCCGCGCGCGCG--GCGGCG	
Hip55	(35)	TGCAAGAG--GGCTAG-----TGCGGGTGGTACCAGAAAGTC	
		501	550
28SmRNA	(498)	-GTGAGAGCGTGAACCTCTCTACGGCCGCTACGTTATTTATTAT	
pMammB	(221)	CGCGAGTCCTCCCGGGACAGTCCG--ATGCGGAGTTTTCATGGGC---	
前列腺	(331)	CGCGAGTCCTCCCGGGACAGTCCG--AGGTGGGAGTTTTCATGGGC---	
Hip55	(72)	CCGAGGAGTGGCTCTCTTTTACCATTAAGCTACAGCAATACAA---	
		551	600
28SmRNA	(547)	TTTATTATTAATTATTTTCTTTGATTATTTATTTATTTAT	
pMammB	(266)	CGGTACCCCTGTCAACCGGTAAAGCGAGTTGTG--TAGGCCAGCTGAG	
前列腺	(377)	CGGTACCCCTGTCAACCGGTAAAGCGAGTTGTG--TAGGCCAGCTGAG	
Hip55	(120)	CCCGTGGCTGGCAGGCGG--G--GTTGGG--TGGAG--GAGATGGT	
		601	650
28SmRNA	(597)	TATTTACATTTTATTATTATTTTATTATTATTATTATTAT	
pMammB	(313)	GGAGGACCTGAACCTCCCGTGGAGCAGAAAGGGCAAAATTTATCT	
前列腺	(424)	GGAGGACCTGAACCTCCCGTGGAGCAGAAAGGGCAAAATGCTCGCTTATCT	
Hip55	(162)	GGAGGAGCTCA-------AGGCG--AAG-----TATG--	
		651	700
28SmRNA	(647)	AACAGAGTCTCGCTCTCTCTCAGCTGCACTCAAGGGGTGTAIC--	
pMammB	(355)	TGATTCTGAGTACGAAATACAGACCGTGAAGCGG--CTCTG--GATC--	
前列腺	(474)	TGATTCTGAGTACGAAATACAGACCGTGAAGCGG--CTCTG--GATC--	
Hip55	(191)	ACGCCTCTCTG--GAGTGAAGGACCCCACTCTG--AGTGGCCATA--	
		701	750
28SmRNA	(695)	TGGCTTAC-TCAACG-CGCTCCCGGGTTACGCCCTTCTCCCTGCT	
pMammB	(401)	TCTGACCTTTTGGGTTTA-AGCAGGAGGCTGAGAAAAGT----TACCA	
前列腺	(522)	TCTGACCTTTTGGGTTTA-AGCAGGAGGCTGAGAAAAGT----TACCA	
Hip55	(235)	TTGTCTCACTCAACAGGACAGGCGAGGGCTGACCATCT--GCGG	
		751	800
28SmRNA	(744)	GAGCCTCCCAGAACGCGGACTACAGGCGCGGCCCTCGTGGCGGTT	
pMammB	(446)	GAGCGAT--AACTCGGTTG-----GCGCGG--AGCGTTG--AGGA	
前列腺	(567)	GAGCGAT--AACTCGGTTG-----GCGCGG--AGCGTTG--AGGA	
Hip55	(281)	-AGGGT-----GACG--GCPA--CG--CG--TCA--GAC	
		801	850
28SmRNA	(794)	ACCTTTTGTATTGAGTAAAGAGGGGGTTTCACTGGGTAACAGGATG	
pMammB	(486)	CGTGGCTTTTATCTTCTGAGTCCGCTCTTCCCTATCATTTGGTAAG	
前列腺	(607)	CGTGGCTTTTATCTTCTGAGTCCGCTCTTCCCTATCATTTGGTAAG	
Hip55	(309)	CATGGCCAGCT--TCT--GAGGGGCGCAAGTG-CAATCA--ACG	
		851	900
28SmRNA	(844)	GTCTG-TCTCTTACC-CGTTGATCCCTCCACCTCGGCTCCCA--G	
pMammB	(533)	--G--G--ATTACACAGCGCTGATCTTCAACCCACTA--TAGGGAACTG	
前列腺	(654)	--G--G--ATTACACAGCGCTGATCTTCAACCCACTA--TAGGGAACTG	
Hip55	(350)	--CAGGGGCGGAGGATGTGGAGCCTGAGTGCA--CATGTAAGGTC	
		901	950
28SmRNA	(891)	TCCTGGTTG--CAAGGCTG--GCCACC--GCTCCGGCTA--T-TAT	
pMammB	(580)	AGCTGGTTTACAGCGTCTG--GAGAGGTTTCT--TACCCCTACTGATCA	
前列腺	(701)	AGCTGGTTTACAGCGTCTG--GAGAGGTTTCT--TACCCCTACTGATCA	
Hip55	(397)	GCTAAAGCTT-----GAGGTGCTTACACAGTTTAAAT--GAGAG	

19

28SmRNA	(1906)	AAATAATCAATACAACCTCATTACAAATAAATAAGAAACGATACGATGGG	
pMammB	(1576)	ATAGTAATAAAGCTTTTCTTTTTCGATTTTAATTTTGAATAACAATAAT	
前列腺	(1625)	GAGTGAG--GCTGAGGGGA-CATG-TGGCCCT--ICCCCTCTCAGAC	
Hip55	(1288)	GAGTGAG--GCTGAGGGGGGGCCSC-TAGACTA--GCTAGAGAAATAA	
2001			
28SmRNA	(1956)	ATCGGTAGGATCGAATACGATACAATACAAATAGSATACGATACAATAACA	2050
pMammB	(1622)	TACCTACCGTCTTAT--TGCGCATTTTACCTGTACCAGACACGCTTTT	
前列腺	(1667)	TGCTTCTCTTA--TGCTCGGAAGAGGAGGCCGGGGCT	
Hip55	(1331)	C-----	
2051			
28SmRNA	(2006)	ATACAAATACATACAAATACATACAAATACAAATACAAATACAAATACAAAT	2100
pMammB	(1670)	-CACATTTCATAAAGTTCTC-ATGGTAATGTTTCA--CAATG--	
前列腺	(1703)	-TGACATTCAGCACTCTTCCG-GGAATAGGAGCCG--CAGTG--	
Hip55	(1332)	-----	
2101			
28SmRNA	(2056)	ATACCCGGGGGGGTTGCTCATGCCTGTCTATCCCGTCACTTTGGGTTC	2150
pMammB	(1709)	TCTCTAGGGTGGCAAA-----ATAGTCTTACCGTACTTACAA	
前列腺	(1742)	GGATG-AGGC-TACG-----CTCCCTC-GGCTTGCCGGA	
Hip55	(1332)	-----	
2151			
28SmRNA	(2106)	TGCGGTGACGATACCT--AAAGTCGAGAGTTGGAGCAATCCGAGCC	2200
pMammB	(1746)	CTTTTAAAGAGCAACCTCTAACCTTGAGAGTTCACTGCGCAATGT	
前列腺	(1778)	TCAGCTTCTACCCATAA--ACAGCAATGCGCTGGTATTCACAG-ATA	
Hip55	(1332)	-----	
2201			
28SmRNA	(2154)	ATCAAGGAGAAATCCCGTCTCAATTGAAAATACAAACTAGCCGGGCGCG	2250
pMammB	(1795)	TAGTAAAGGACTAGGACTTGAACCTGAACCTCAGACT--CCAGATCT	
前列腺	(1825)	TCCTCTCTCTCCCGACCTCCGAGACAGTTGGCT--CTTCTCTC	
Hip55	(1332)	-----	
2251			
28SmRNA	(2204)	GTGGCAGATGCCTTAACTCCAGCTGCTAGGAAGGCTGAGCCAGGAGAA	2300
pMammB	(1842)	CT--CCATACG-ACACCTGCTAGCAAT--GTGCCCTGTATCTT-TT	
前列腺	(1872)	TG--ACAGAT-ACTGAGCCCAAGCCT--CTGTGTGGCAAGCCCT	
Hip55	(1332)	-----	
2301			
28SmRNA	(2254)	CGCTTAAACCTGGGAGCGAAAGTTCAGTGAAGCGAGATTCCGCACTC	2350
pMammB	(1883)	CTGCTCTCCCTKYTTTCTTCT-TTCCCTTCTCTCCGCAACCTTTTC	
前列腺	(1913)	GAGTGGCACTGCCCAGCTGCC-GGAAAGGCTCTGAGCAGGAGCACTC	
Hip55	(1332)	-----	
2351			
28SmRNA	(2304)	CACTCCAGTCTGAGCAACAAGAGCGAAACCTCCCTCTCAATAAATAAATAG	2400
pMammB	(1932)	CCCTCAATTTCTTTTCTT-----TCTTTTAAATTTGTAATACCT	
前列腺	(1962)	GGAGGCTCTGGCTGCC-----TCTGCAATTAATTGCCCTTTT	
Hip55	(1332)	-----	
2401			
28SmRNA	(2354)	TAAATAATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACAT	2450
pMammB	(1970)	TAACTAT-----TACATCTTATCAGACCT	
前列腺	(2000)	TCTTTTT-----CTTTGCTTCTAAGGGGT	
Hip55	(1332)	-----	
2451			
28SmRNA	(2404)	CACTAAATACAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA	2500
		ATATAAATGGCCCTTCTCTCTG	

28SmRNA	(1410)	1451	T T T C G G T T T G A C C T T G A T T G A A G G A T T C C A G T C G G T T C T C G T C T C T	1500
pMammB	(1104)		- T C C G T A G T S G G A T T G C T - G A T C A C C T C G I A G T T G T A T T C G T G G T T T A T	
前列腺	(1221)		- C C G C T T - - - - - T T G C C A G A G A G C C A C T G C T G C C A T C T C A A G G C C A	
Hip55	(884)		- C C G C T T - - - - - T T G C C A G A G A G C C A C T G C T G C C A T C T C A A G G C C A	
28SmRNA	(1460)	1501	G A G G A G A G A T T C A A A G A T C C G A T G G G T G G G A C T T A G G C G G G T C C G	1550
pMammB	(1153)		T G A G A A A T C T T C A A A T A T T T C C A T A G A G G T T G T A A A T T A C A T G C C G	
前列腺	(1263)		G G C A G A G C T C C T G C T A G - - - - - S A G C C G C G C C - - - - - S A G G A G	
Hip55	(926)		G G C A G A G C T C C T G C T A G - - - - - S A G C C G C G C C - - - - - S A G G A G	
28SmRNA	(1510)	1551	C C A G G G C C T E G T C G T T A T T T G G G A T C C C T T G G A G G C G C G G T	1600
pMammB	(1203)		A A C A A G T A T T T T T T T - - - - - A A T A T G A A G A T E G C H G G A A A T - - - -	
前列腺	(1300)		T C C C C A T G T C T G T T C A - - - - - G C A G A A G A G A C C T G C T A T G A G - - - -	
Hip55	(963)		T C C C C A T G T C T G T T C A - - - - - G C A G A A G A G A C C T G C T A T G A G - - - -	
28SmRNA	(1560)	1601	G A G G A C T G T G C T G G G A G C - - - - - C T E C A T C C T T C C C C C A C C C T C C C C	1650
pMammB	(1247)		G C C C C A T T A G T A T C C C C C T T T T G C C C C T G T A A T A T G A C T T T A A	
前列腺	(1343)		G A A G C C A G A G C G G A A - - - - - G G C C T G - - - - - S A G C A G C C C A	
Hip55	(1006)		G A A G C C A G A G C G G A A - - - - - G G C C T G - - - - - S A G C A G C C C A	
28SmRNA	(1608)	1651	A G G G A T C C C A A T T C A T C G G G C T A G C C G T C A C T E G G A G G G G T C C G	1700
pMammB	(1297)		G G G A A - - - - - A A G G A T T T A A A C T T T - - - - - T T A A - A C A A A T - - - - - A T T G	
前列腺	(1382)		C T G G T G - - - - - A A G C A A - - - - - G A G C T T - - - - - C T G G C T - - - - - C A T T G A	
Hip55	(1045)		C T G G T G - - - - - A A G C A A - - - - - G A G C T T - - - - - C T G G C T - - - - - C A T T G A	
28SmRNA	(1658)	1701	G A T C A C C T A G C G G T C A C T G T T A C T T T G A A A C G G A G G C T G C C A G A G A	1750
pMammB	(1339)		A T A T G A A A T T T T G G A T A G - A S C A A A A T T T T T G G A T T A A A G T T T	
前列腺	(1420)		C C A - - - - - C C A G A T C A - - - - - G G G - - - - - G A C - - - - - S C G C T A - - - - - G T	
Hip55	(1083)		C C A - - - - - C C A G A T C A - - - - - G G G - - - - - G A C - - - - - S C G C T A - - - - - G T	
28SmRNA	(1708)	1751	A G G G A G C C C C G C C C G G G A C A C C T G G G A A C I G T G T T T C T C C	1800
pMammB	(1388)		A - - - - - A G A C A - - - - - G G A C A G T C C C A G E G A T T G A A A C T G G A T T G G A	
前列腺	(1448)		- - - - - G C C A G G C C C T G C C C G G C C C T G T A C G A C T A C C A C	
Hip55	(1111)		- - - - - G C C A G G C C C T G G C C C G T G C C C T G T A C C A C T A C C A C	
28SmRNA	(1758)	1801	A C C G C C C C C - - - - - C C C C C C A A G T C C T C C C T T G T T G C C T A A C A	1850
pMammB	(1435)		A T T G A A A A A A T C H T T T T A G A G T C G A C C C A T A A T C T A C T	
前列腺	(1487)		G A C C G A C C A C A C A G A T A C C T T T G A C C G A G A C T A T G A G G G	
Hip55	(1150)		G A C C G A C C A C A C A G A T A C C T T T G A C C G A G A C T A T G A G G G	
28SmRNA	(1807)	1851	A A T C C C A C T T C A C G A C C G G T C T G A T T A C T T G A T C A G G C A A A A C	1900
pMammB	(1485)		A A T T G C T T C T T C A T T A T T A T A C C T A C T T A T T - - - - - A A A A C	
前列腺	(1537)		C A T T G G - - - - - T G A T C G A C A A G C C T G G T C C G G G - - - - - C T A T G	
Hip55	(1200)		C A T T G G - - - - - T G A T C G A C A A G C C T G G T C C G G G - - - - - C T A T G	
28SmRNA	(1857)	1901	A A A A A C A G A T A A A A A T A A A A A G A C A A C T A A A A A	1950
pMammB	(1526)		T A A T A A A A G G G T T A A T A A A A T A G T T A A G G T A A A A A A T C A A A T	
前列腺	(1575)		G C C G G A G C C A T T T G C C A T G T T C C C T G C C A C T A C G I G G A C T C A T	
Hip55	(1238)		G C C G G A G C C A T T T G C C A T G T T C C C T G C C A C T A C G I G G A C T C A T	
		1951		2000

pMammB	(1995)	ATIGATCTAGCTCAAAAGATATAAATGATC-----GGG---TGACTGATA	
前列腺	(2025)	GGTGGCCCTCCACITGTTTAAATGACCCCTTG-----GGA---ACAGTGAAC	
Hip55	(1332)	-----	
28SmRNA		2501	2550
pMammB	(2454)	GCTCAAGCCTGTATCCCTCACTTGGGAGGCCAA---GGCCG---GTGC	
前列腺	(2037)	GCTCATCCCTGTAAATG---TAGCACTTTGGAAGGCCAAGGCAGGCAGATCAC	
Hip55	(2067)	GTAGAGAATTGTTTT---TAGCAGAGTTTCTAACCAG---AGTCAGAGTGG	
Hip55	(1332)	-----	
28SmRNA		2551	2600
pMammB	(2499)	ATCAAAGCTCGTCAGACCAAGAGGCTAGTATGGTGAAACCCCTCTCTG	
前列腺	(2086)	TIGATCCAGATTCGAGACCAAGCTCGGCAATATGGTGAAACCCCTCTCTG	
Hip55	(2112)	ATCATGGTCTTTTGCAGGGAATTTGTATTGTTCGAGGCTGCTCTG	
Hip55	(1332)	-----	
28SmRNA		2601	2650
pMammB	(2548)	TACTCAG---AATACCAAGATAGCCGGGCGGTGCTGTCTGTCTGACTTCT	
前列腺	(2136)	TACAAATAAATACAAATAATTAGCCGGGCGGTGCTG---GCACAC---ACC	
Hip55	(2161)	TGCTCCCTCTCTATTCTCTGTCTCTCTCTCTG---GCTATG---AGA	
Hip55	(1332)	-----	
28SmRNA		2651	2700
pMammB	(2597)	TGTAAATCTAGCTACTCTG---GGCCGAGCTCAGGCAAGACAAATCTCTGA	
前列腺	(2180)	TGTAGTCTTAGCTACTCTTAGGCTTAGGTC---GCAAGATTGATTGA	
Hip55	(2205)	ATTGAGGATGCAGATGGCCAGCTCCAAC---TGTATTCTAAAT	
Hip55	(1332)	-----	
28SmRNA		2701	2750
pMammB	(2647)	AGCTGAGAGGCTGAGCTTGG---AGTGAAGCTAGATCTCGCCACTGCAAC	
前列腺	(2225)	GCCAGGAGGTGGAAGCTGAGAGTCTGCTGAGATTCGCCCATTCGACT	
Hip55	(2250)	CGGAGACACAACATCTCTCTCTACGCGCTCTCTCGATGCT---TGCAAG	
Hip55	(1332)	-----	
28SmRNA		2751	2800
pMammB	(2694)	CCAGCCTGGGCTACAGAGCTAGACTCTCTCTCAAAAAATGAAATGAAA	
前列腺	(2275)	CCAGCCTGGGTGAGAGAGAGAGACCTGTCTTCAAAAAAATAAAAAAA	
Hip55	(2298)	CCCCAGTGTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
Hip55	(1332)	-----	
28SmRNA		2801	2850
pMammB	(2744)	GTGAAACGCTACAAATATATAAAGTGAGTTT---TGGGGAAAAAGAAGA	
前列腺	(2325)	GA---	
Hip55	(2347)	AAAAAAATACTCGAGAGCTTTGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
Hip55	(1332)	-----	
28SmRNA		2851	2900
pMammB	(2794)	AAAGAAAAAAGAAAAAACAAACAGAACACCCACCGTGACATAC	
前列腺	(2327)	-----	
Hip55	(2384)	-----	
Hip55	(1332)	-----	
28SmRNA		2901	2950

表 3
推定的前列腺 ECGI 氨基酸序列

		H	E	I	P	T	V	P	T	Y	Y	P	A	K	P	Q
1		GCACGAGATT	CCCACTGTCC	CTACCTACTA	TCCAGCGAAA	CCACAGCCAA										
		CGTGCTCTAA	GGGTGACAGG	GATGGATGAT	AGGTCGCTTT	GGTGTCGGTT										
		· E R A	W R N	Q R G	K K T	L L S										
51		GGGAACGGGC	TTGGCGGAAT	CAGCGGGGAA	AGAAGACCCT	GTTGAGCTTG										
		CCCTTGCCCG	AACCGCCTTA	GTCGCCCTT	TCTTCTGGGA	CAACTCGAAC										
		T L V W	H G E	E T *	E V *	N K W										
101		ACTCTAGTCT	GGCACGGTGA	AGAGACATGA	GAGGTGTAGA	ATAAGTGGGA										
		TGAGATCAGA	CCGTGCCACT	TCTCTGTACT	CTCCACATCT	TATTACCCCT										
		· A P G	A P P V	S P R	G A R	G G										
151		GGCCCCCGGC	GGCCCCCGG	TGTCCCCGCG	AGGGGCCCCG	GGCGGGGTCC										
		CCGGGGGGCCG	CGGGGGGGCC	ACAGGGGCGC	TCCCCGGGCC	CCGCCCCAGG										
		· R P C	G P P	V K Y	H Y S	D R F										
201		GCCGGCCCTG	CGGGCCGCG	GTGAAATACC	ACTACTCTGA	TCGTTTTTTC										
		CGGCCGGGAC	GCCCGCGGC	CACTTTATGG	TGATGAGACT	AGCAAAAAAG										
		T D P V	R R G	G E P	R G A	L A S										
251		ACTGACCCGG	TGAGGCGGGG	GGGCGAGCCC	CGAGGGGCTC	TCGCTTCTGG										
		TGACTGGGCC	ACTCCGCCCC	CCCGCTCGGG	GCTCCCCGAG	AGCGAAGACC										
		· A K R	P A A R	R P G	A T R	S G										
301		CGCCAAGCGC	CCGGCCGCGC	GCCGGCCGGG	CGCGACCCGC	TCCGGGGACA										
		GCGGTTGCGG	GGCCGGGCGG	CGGCCGGCCC	GCGCTGGGCG	AGGCCCCCTG										
		· A R W	G V *	L G R	Y T C	Q T V										
351		GTGCCAGGTG	GGGAGTTTGA	CTGGGGCGGT	ACACCTGTCA	AACGGTAACG										
		CACGGTCCAC	CCCTCAAAC	GACCCCGCCA	TGTGGACAGT	TTGCCATTGC										
		Q V S *	G E L	R E D	R N L	P W S										
401		CAGGTGTCCT	AAGGCGAGCT	CAGGGAGGAC	AGAAACCTCC	CGTGGAGCAG										
		GTCCACAGGA	TTCCGCTCGA	GTCCCTCCTG	TCTTTGGAGG	GCACCTCGTC										
		· R A K	A R L I	L I F	S T N	T D										
451		AAGGGCAAAA	GCTCGCTTGA	TCTTGATTTT	CAGTACGAAT	ACAGACCGTG										
		TTCCCGTTTT	CGAGCGAACT	AGAATAAAA	GTCATGCTTA	TGTCTGGCAC										
		· S G A	S R S	F * P	F G F *	A G										
501		AAAGCGGGGC	CTCACGATCC	TTCTGACCTT	TTGGGTTTTA	AGCAGGAGGT										
		TTTCGCCCCG	GAGTGCTAGG	AAGACTGGAA	AACCCAAAAT	TCGTCTCTCA										
		V R K V	T T G	I T G	L W R	P S V										
551		GTCAGAAAAG	TTACCACAGG	GATAACTGGC	TTGTGGCGGC	CAAGCGTTCA										
		CAGTCTTTTC	AATGGTGTCC	CTATTGACCG	AACACCGCCG	GTTGCAAGT										
		· S D V	A F *	S F D	V G S	S Y H										
601		TAGCGACGTC	GCTTTTTGAT	CCTTCGATGT	CGGCTCTTCC	TATCATTGTG										
		ATCGCTGCAG	CGAAAACTA	GGAAGCTACA	GCCGAGAAGG	ATAGTAACAC										
		· A E F	T K R	W I V	H P L	I G N										
651		AAGCAGAATT	CACCAAGCGT	TGGATTGTTT	ACCCACTAAT	AGGGAACGTG										
		TTCGTCTTAA	GTGGTTTCGA	ACCTAACAAG	TGGGTGATTA	TCCCTTGCAC										
		S W D *	T V V	R Q V	S F T	L L M										
701		AGCTGGGATT	AGACCGTCGT	GAGACAGGTT	AGTTTTACCC	TACTGATGAT										
		TCGACCCTAA	TCTGGCAGCA	CTCTGTCCAA	TCAAAATGGG	ATGACTACTA										
		· C C C	H G N P	A Q Y	E R N	R R										
751		GTGTTGTTGC	CATGGTAATC	CTGCTCAGTA	CGAGAGGAAC	CGCAGGTTCA										
		CACAACAACG	GTACCATTAG	GACGAGTCAT	GCTCTCCTTG	GCGTCCAAGT										
		· H L V	Y V L	G * G	A N G	A K L										
801		GACATTTGGT	GTATGTGCTT	GGCTGAGGAG	CCAATGGGGC	GAAGCTACCA										

```

CTGTAAACCA CATAACGAA CCGACTCCTC GGTTACCCCG CTTCGATGGT
S V G L * L N A S K S E S R P G
851 TCTGTGGGAT TATGACTGAA CGCCTCTAAG TCAGAAATCCC GCCCAGGCGG
AGACACCCTA ATACTGACTT GCGGAGATTC AGTCTTAGGG CGGGTCCGCC
* T I R Q R R G A S V G L G * P
901 AACGATACGG CAGCGCCGCG GAGCCTCGGT TGGCCTCGGA TAGCCGGTCC
TTGCTATGCC GTCGCGGCGC CTCGGAGCCA ACCGGAGCCT ATCGGCCAGG
* R L S P P A G R P P L H A P R
951 CCCGCTGTCT CCCGCCGGCG GGCCGCCCCC CCCTCCACGC GCCCGCGCGC
GGGCGGACAG GGGCGGCCGC CCGGCGGGGG GGGAGGTGCG CGGGGCGCGC
R G R A R A P P R A G T G V R C
1001 CGCGGGAGGG CGCGTGCCCC GCCGCGCGCC GGGACCGGGG TCCGGTGGCG
GCGCCCTCCC GCGCACGGGG CGGCGCGCGG CCCTGGCCCC AGGCCACGCC
* V P F V L G N G A R P E R R P
1051 AGTGCCCTTC GTCCTGGGAA ACGGGGCGCG GCCGGAAAGG CGGCCGCCCC
TCACGGGAAG CAGGACCCTT TGCCCCGCGC CGGCCTTTCC GCCGGCGGGG
* R P S R T A R S W G T W R T
1101 CTCGCCCCGTC ACGCACCGCA CGTTCGTGGG GAACCTGGCG CTAAACCACC
GAGCGGGCAG TGCGTGGCGT GCAAGCACCC CTTGGACCGC GATTTGGTGG
S I S S P Q P G K L R S P F L Q
1151 TCCATCTCCA GTCCTCAGCC TGGCAAGCTG AGGAGCCCCC TCCTGCAGAA
AGGTAGAGGT CAGGAGTCGG ACCGTTTCGAC TCCTCGGGGA AGGACGTCTT
* Q L T Q P E T H F G R E P A A
1201 GCAGCTCACC CAACCAGAGA CCCACTTTGG CAGAGAGCCA GCTGCTGCCA
CGTCGAGTGG GTTGGTCTCT GGGTGAACCC GTCTCTCGGT CGACGACGGT
* S R P R A D L P A E E P A P S
1251 TCTCAAGGCC CAGGGCAGAT CTCCCTGCTG AGGAGCCGGC GCCCAGCACT
AGAGTCCCGG GTCCCGTCTA GAGGGACGAC TCCTCGGCCG CGGGTCGTGA
P P C L V Q A E E E A V Y E E P
1301 CCTCCATGTC TGGTGCAGGC AGAAGAGGAG GCTGTGTATG AGGAACCTCC
GGAGGTACAG ACCACGTCCG TCTTCTCCTC CGACACATAC TCCTTGAGAG
* E Q E T F Y E Q P P L V Q Q Q
1351 AGAGCAGGAG ACCTTCTACG AGCAGCCCCC ACTGGTGCAG CAGCAAGGTG
TCTCGTCCTC TGGAAGATGC TCGTCGGGGG TGACCACGTC GTCGTTCCAC
* G S E H I D H H I Q G Q G L S
1401 CTGGCTCTGA GCACATTGAC CACCACATTC AGGGCCAGGG GCTCAGTGGG
GACCGAGACT CGTGTAAGT GTGGTGTAAG TCCCGTCCC CGAGTCACCC
Q G L C A R A L Y D Y Q A A D D
1451 CAAGGGCTCT GTGCCCCTGC CCTGTACGAC TACCAGGCAG CCGACGACAC
GTTCCCGAGA CACGGGCACG GGACATGCTG ATGGTCCGTC GGCTGCTGTG
* E I S F D P E N L I T G I E V
1501 AGAGATCTCC TTTGACCCCG AGAACCTCAT CACGGGCATC GAGGTGATCG
TCTCTAGAGG AAAGTGGGGC TCTTGAGTA GTGCCGTA GCTCCACTAGC
* E G W W R G Y G P D G H F G M
1551 ACGAAGGCTG GTGGCGTGGC TATGGGCCGG ATGGCCATTT TGGCATGTTC
TGCTTCCGAC CACCGCACCG ATACCCGGCC TACCGTAAA ACCGTACAAG
P A N Y V E L I E * G * G H I L
1601 CCTGCCAANT ACGTGGAGCT CATTGAGTGA GGCTGAGGGC ACATCTTGCC
GGACGGTTGA TGCACCTCGA GTAACACT CCGACTCCCG TGTAAGACGG
* F P S Q T W L P Y C W K R R P
1651 CTCCCTCT CAGACATGGC TTCCTTATTG CTGGAAGAGG AGGCCTGGGA
GAAGGGGAGA GTCTGTACCG AAGGAATAAC GACCTTCTCC TCCGGACCCT
* * H S A L F Q E * D P Q * G *
1701 GTTGACATTC AGCACTCTTC CAGGAATAGG ACCCCAGTG AGGATGAGGC
CAACTGTAAG TCGTGAGAAG GTCCTTATCC TGGGGGTCAC TCCTACTCCG
L R A P S G L A D S A C H P K C
1751 CTCAGGGCTC CCTCCGGCTT GGCAGACTCA GCCTGTCACC CCAAATGCAG
GAGTCCCGAG GGAGGCCGAA CCGTCTGAGT CGGACAGTGG GGTTTACGTC
* N G L V I P T H P S C I P R P
1801 CAATGGCCTG GTGATTCCCA CACATCCTTC CTGCATCCCC CGACCCTCCC
GTTACCGGAC CACTAAGGGT GTGTAGGAAG GACGTAGGGG GCTGGGAGGG

```

```

      T A W   L L P   L T G Y   * A K   P C
1851 AGACAGCTTG GCTCTTGCCC CTGACAGGAT ACTGAGCCAA GCCCTGCCTG
      TCTGTCGAAC CGAGAACGGG GACTGTCCTA TGACTCGGTT CGGGACGGAC
      W P S P   E W P   L P S   C G E G   S *
1901 TGGCCAAGCC CTGAGTGGCC ACTGCCAAGC TGCGGGGAAG GGTCTTGAGC
      ACCGGTTCGG GACTCACC GG GACTGTCCTA TGACTCGGTT CGGGACGGAC
      · G A S   G R L W   L P S   A F I   C L
1951 AGGGGCATCT GGGAGGCTCT GGCTGCCTTC TGCATTTATT TGCCTTTTTT
      TCCCCGTAGA CCCTCCGAGA CCGACGGAAG ACGTAAATAA ACGGAAAAAA
      · F S L   A S K   G W W P   P L F   R M
2001 CTTTTTCTCT TGCTTCTAAG GGGTGGTGGC CACCACTGTT TAGAATGACC
      GAAAAAGAGA ACGAAGATTC CCCACCACCG GTGGTGACAA ATCTTACTGG
      L G N S   E R R   E L F   L A E F   V T
2051 CTTGGGAACA GTGAACGTAG AGAATTGTTT TTAGCAGAGT TTGTGACCAA
      GAACCCTTGT CACTTGATC TCTTAACAAA AATCGTCTCA AACACTGGTT
      · V R V   D H G G   L A A   G N L   S C
2101 AGTCAGAGTG GATCATGGTG GTTTGGCAGC AGGGAATTTG TCTTGTTGGA
      TCAGTCTCAC CTAGTACCAC CAAACCGTCG TCCCTTAAAC AGAACAACCT
      · L L C   A P H   S I S L   S L C   L G
2151 GCCTGCTCTG TGCTCCCCAC TCCATTTCTC TGTCCTCTG CCTGGGCTAT
      CGGACGAGAC ACGAGGGGTG AGGTAAAGAG ACAGGGAGAC GGACCCGATA
      G K W G   C R W   P S S   H P G Y   S K
2201 GGGAAGTGGG GATGCAGATG GCCAAGCTCC CACCCTGGGT ATTCAAAAAC
      CCCTTCACCC CTACGTCTAC CGGTTCGAGG GTGGGACCCA TAAGTTTTTG
      · A D T   T C S S   T R L   T R C   L Q
2251 GGCAGACACA ACATGTTCTT CCACGCGGCT CACTCGATGC CTGCAGGCCC
      CCGTCTGTGT TGTACAAGGA GGTGCGCCGA GTGAGCTACG GACGTCCGGG
      · V C A   S T D   S D F R   K S K   K K
2301 CAGTGTGTGC CTCAACTGAT TCTGACTTCA GGAAAAGTAA AAAAAAAAAA
      GTCACACACG GAGTTGACTA AGACTGAAGT CCTTTTCATT TTTTTTTTTT
      K K L E   K L W   T S S
2351 AAAAAACTCG AGAAGCTTTG GACTTCTTCG CCA
      TTTTTTGAGC TCTTCGAAAC CTGAAGAAGC GGT

```

表 4

推定的 MannC 氨基酸序列

	I R H E H G E E T * E V * N K
1	GAATTCGGCA CGAGCACGGT GAAGAGACAT GAGAGGTGTA GAATAAGTGG CTTAAGCCGT GCTCGTGCCA CTTCTCTGTA CTCTCCACAT CTTATTACCC E A P G A P P V S P R G A R G G
51	GAGGCCCCCG GCGCCCCCCC GGTGTCCCCG CGAGGGGGCC GGGGCGGGGT CTCCGGGGGC CGCGGGGGGG CCACAGGGGC GCTCCCCGGG CCCC GCCCA · R R P C G P P V K Y H Y S D R
101	CCGCCGGCCC TCGGGGCGC CGGTGAAATA CCACTACTCT GATCGTTTTT GGCGGCCGGG ACGCCCGGCG GCCACTTTAT GGTGATGAGA CTAGCAAAAA · T D P V R R G G E P R G A L A
151	TCACTGACCC GGTGAGGCGG GGGGCGGAGC CCCGAGGGGC TCTCGCTTCT AGTGACTGGG CCACTCCGCC CCCCCTCG GGGCTCCCCG AGAGCGAAGA G A K R P A A R R P G A T R S G
201	GGCGCCAAGC GCGCGGCCG GCGCGGCCG GGCGCGACCC GCTCCGGGGA CCGCGGTTCC CGGGCCGGCG CGCGGCCGGC CCGCGCTGGG CGAGGCCCT · S A R W G V * L G R Y T C Q T
251	CAGTGCCAGG TGGGGAGTTT GACTGGGCG GTACACCTGT CAAACGGTAA GTCACGGTCC ACCCTCAAA CTGACCCCG CATGTGGACA GTTTGCCATT · Q V S * G E L R E D R N L P W
301	CGCAGGTGTC CTAAGGCGAG CTCAGGGAGG ACAGAAACCT CCCGTGGAGC GCGTCCACAG GATTCCGCTC GAGTCCCTCC TGTCTTTGGA GGGCACCTCG R R A K A R L I L I F S T N T D
351	AGAAGGGCAA AAGCTCGCTT GATCTTGATT TTCAGTACGA ATACAGACCG TCTTCCCGTT TTCGAGCGAA CTAGAATAA AAGTCATGCT TATGTCTGGC · E S G A S R S F * P F G F * A
401	TGAAAGCGGG GCCTCACGAT CCTTCTGACC TTTTGGGTTT TAAGCAGGAG ACTTTTCGCC CGGAGTGCTA GGAAGACTGG AAAACCCAAA ATTCGTCCTC · V R K V T T G I T G L W R P S
451	GTGTCAGAAA AGTTACCACA GGGATAACTG GCTTGTGGCG GCCAAGCGTT CACAGTCTTT TCAATGGTGT CCCTATTGAC CGAACACCGC CGGTTCCGAA H S D V A F * S F D V G S S Y H
501	CATAGCGACG TCGCTTTTGG ATCCTTCGAT GTCGGCTCTT CCTATCATTG GTATCGCTGC AGCGAAAAAC TAGGAAGCTA CAGCCGAGAA GGATAGTAAC · E A E F T K R W I V H P L I G
551	TGAAGCAGAA TTCACCAAGC GTTGGATTGT TCACCCACTA ATAGGGAACG ACTTCGTCTT AAGTGGTTCG CAACCTAACA AGTGGGTGAT TATCCCTTGC · S W V * T V V R Q V S F T L L
601	TGAGCTGGGT TTAGACCGTC GTGAGACAGG TTAGTTTAC CCTACTGATG ACTCGACCCA AATCTGGCAG CACTCTGTCC AATCAAAATG GGATGACTAC M C C C H G N P A Q Y E R N R R
651	ATGTGTTGTT GCCATGGTAA TCCTGCTCAG TACGAGAGGA ACCGCAGGTT TACACAACAA CGGTACCATT AGGACGAGTC ATGCTCTCCT TGGCGTCCAA · R H L V Y V L G * G A N G A K
701	CAGACATTTG GTGTATGTGC TTGGCTGAGG AGCCAATGGG GCGAAGCTAC GTCTGTAAAC CACATACAG AACCAGCTCC TCGGTTACCC CGCTTCGATG · S V G L * L N A S K S E S R P
751	CATCTGTGGG ATTATGACTG AACGCCTCTA AGTCAGAATC CCGCCAGGC GTAGACACCC TAATACTGAC TTGCGGAGAT TCAGTCTTAG GGCGGGTCCG G T I R Q R R G A S V G L G * P
801	GGAACGATAC GGCAGCGCCG CGGAGCCTCG GTTGGCCTCG GATAGCCGGT CCTTGCTATG CCGTCGCGGC GCCTCGGAGC CAACCGGAGC CTATCGGCCA

```

      · P R L S P P A G R P P P S T R
851  CCCCCGCGCTG TCCCCGCGCGG CGGGCCGCGCC CCCCCCCTCC ACGCGCCCCG
      GGGGGCGGGAC AGGGGCGGGC GCCCGGCGGG GGGGGGGAGG TGCGCGGGGGC
      · R A G G R V P R R A P G P G S
901  CGCGCGCGGG AGGGCGCGTG CCCCGCGCGC CGCCGGGACC GGGGTCCGGT
      GCGCGCGCCC TCCCGCGCAC GGGGCGGCGC GCGGCCCTGG CCCCAGGCCA
      A E C P S S W E T G R G R K G G
951  GCGGAGTGCC CTTCGTCCTG GGAAACGGGG CGCGGCCGGA AAGGCGGGCG
      CGCCTCACGG GAAGCAGGAC CCTTTGCCCC GCGCCGGCCT TTCCGCCGGC
      · P L A R H A P H V R A R A E F
1001 CCCCCTCGCC CGTCACGCAC CGCACGTTTC TGCTCGTGCC GAATTCGGCA
      GGGGGAGCGG GCAGTGCGTG GCGTGCAAGC ACGAGCACGG CTTAAGCCGT
      · S S T I H N R H T S A C I F M
1051 CGAGTAGCAC CATTACAAT AGACATACAA GTGCATGTAT CTTTATGATA
      GCTCATCGTG GTAAGTGTTA TCTGTATGTT CACGTACATA GAAATACTAT
      * I L F L W V D I Q * W D C *
1101 TAATGAATTC TTTTCCTTTG GGTAGATATC CAGTAGTGGG ATTGCTAGAT
      ATTACTTAAG AAAAGGAAAC CCATCTATAG GTCATCACCC TAACGATCTA
      · T W * F Y F W F I E K S S Y *
1151 CACCTGGTAG TTCTATTTCT GGTATTATGA GAAATCTTCA TACTGATTTT
      GTGGACCATC AAGATAAAGA CCAAATAACT CTTTAGAAGT ATGACTAAAG
      · * R L Y K F T S L P S D F F K
1201 CATAGAGGTT GTACAAATTT ACATCCCTAC CAAGTGATTT TTTTAAATAT
      GTATCTCAA CATGTTTAAA TGTAGGGATG GTTCACTAAA AAAATTTATA
      E R M V W R N A P H * Y P P F T
1251 GAAAGAATGG TCTGGAGAAA TGCCCCCTCAT TAGTATCCCC CTTTTACCTC
      CTTTCTTACC AGACCTCTTT ACGGGGAGTA ATCATAGGGG GAAAATGGAG
      · L L Q N D F K G Y R Y L Q V S
1301 TCTACTGCAG AATGACTTCA AGGGGTACAG GTATTTACAA GTTTCATTAT
      AGATGACGAC TTAAGTGAAGT TCCCCATGTC CATAAATGTT CAAAGTAATA
      · R Q I E Y * N F C I R G T D F
1351 ACAGACAAAT TGAATATTGA AATTTCTGCA TAAGAGGCAC AGATTTTAGG
      TGTCTGTTTA ACTTATAACT TTAAAGACGT ATTCTCCGTG TCTAAATCC
      I Q S C M N K D K C S R D L Q S
1401 ATTCAAAGTT GTATGAACAA GGACAAGTGC TCTAGGGACT TGCAAAGCTG
      TAAGTTTCAA CATACTTGTT CCTGTTACAG AGATCCCTGA ACGTTTCGAC
      · N W K S Q M K Y I S S S T T S
1451 GAATTGGAAA TCTCAGATGA AATACATTTT TAGTAGTACC ACCAGCATAT
      CTTAACCTTT AGAGTCTACT TTATGTAAAG ATCATCATGG TGGTCGTATA
      · S T E L A L * S S L I P T Y *
1501 ATTCTACTGA ATTGGCTTTG TGATCATCAT TAATACCTAC TTATTTAAAC
      TAAGATGACT TAACCGAAAC ACTAGTAGTA ATTATGGATG AATAATTTTG
      * * K G F I S N I L * G I K I K
1551 TAATGAAAAG GGTTTATATC AAATATACTT TAAGGTATAA AAATCAAATT
      ATTACTTTTC CCAAATATAG TTTATATGAA ATTCCATATT TTTAGTTTAA
      · * V K L F S L A F * F Q N I K
1601 ATAGGTAAAG CTGTTTTCTT TAGCATTTTA ATTTCAAAC ATAAAATAGC
      TATCCATTTT GACAAAAGAA ATCGTAAAT TAAAGTTTTG TATTTTATCG
      · P S I G H L Y C T R H C V C H
1651 TACCGTCTAT TGGGCATTTA TACTGTACCA GACACTGTGT TTGTCACATT
      ATGGCAGATA ACCCGTAAAT ATGACATGGT CTGTGACACA AACAGTGTA
      S K M F S W * C S Q * F C R V R
1701 TCAAAAATGT TCTCATGGTA ATGTTTCAAA TAATTCTGTA GGGTGAGAAA
      AGTTTTTACA AGAGTACCAT TACAAGTGT ATTAAGACAT CCCACTCTTT
      · S L T V V R L F S K R N L * T
1751 TAGTCTTACC GTAGTAAGAC TATTCAGTAA ACGAAACCTC TGAACCTTGG
      ATCAGAATGG CATCATTTCTG ATAAGTCATT TGCTTTGGAG ACTTGAACCC
      · F N L R K V S N R T R T * T *
1801 AGTTCAACTT GCGCAAAGTT AGTAACAGGA CTAGGACTTG AACCTGAACC
      TCAAGTTGAA CGCGTTTCAA TCATTGTCCT GATCCTGAAC TTGACTTGG
      I T L Q I S P Y H T A S T C A C

```

```

1851 ATCACACTCC AGATCTCTCC ATACCACACT GCTAGCACAT GTGCCTGTCA
TAGTGTGAGG TCTAGAGAGG TATGGTGTGA CGATCGTGTA CACGGACAGT
· L I P G S C Y F P F Y F L S L
1901 TCTTATTCCT GGCTCCTGTT ATTTCCCTTT TTATTTCTTT TCCCTTCCTC
AGAATAAGGA CCGAGGACAA TAAAGGGAAA AATAAAGGAA AGGGAAGGAG
· T T P F S P H F F S F F L I V
1951 CCACAACCCC TTTTTCCTTT CATTCTTTT CTTTCTTTT AATTGTTAAT
GGTGTGGGG AAAAAGGGG GTAAAGAAAA GAAAGAAAA TTAACAATTA
Y I T N T C L S E Q L I * H K R
2001 TACATAACTA ATACATGCTT ATCAGAACAA TTGATATAGC ACAAAGGAT
ATGTATTGAT TATGTACGAA TAGTCTTGTT AACTATATCG TGTTTTCTTA
· * S T G E * * L I P V I L A L
2051 ATAAAGTACG GGTGAGTGAT AGCTCATCCC TGTAACTCTA GCACTTTGGA
TATTTTCATGC CCACTCACTA TCGAGTAGGG ACATTAGGAT CGTGAAACCT
· A K A G R S L E S R V R D Q P
2101 AGGCCAAGGC AGGCAGATCA CTTGAGTCCA GAGTTCGAGA CCAGCCTGGG
TCCGGTTCCG TCCGTCTAGT GAACTCAGGT CTCAAGCTCT GGTGCGACCC
Q H G E T L S L Q K N T K I * P
2151 CAACATGGTG AAACCCTGTC TCTACAAAAA AATACAAAAA TTTAGCCGGG
GTTGTACCAC TTTGGGACAG AGATGTTTTT TTATGTTTTT AAATCGGCCC
· V L A H T C S L S Y S E G * G
2201 CGTGCTGGCA CACACCTGTA GTCTCAGCTA CTCTGAGGGC TGAGGTGGGA
GCACGACCGT GTGTGGACAT CAGAGTCGAT GAGACTCCCG ACTCCACCCT
· I D * A Q E V E A A A V R * D
2251 AGATTGATTG AGCCCAGGAG GTGGAAGCTG CAGCAGTGCG CTGAGATTGC
TCTAACTAAC TCGGGTCCTC CACCTTCGAC GTCGTCACGC GACTCTAACG
A I A L Q P G * E R E T L S Q K
2301 GCCATTGCAC TCCAGCCTGG GTGAGAGAGA GAGACCCTGT CTCAAAAAAA
CGGTAACGTG AGGTCGGACC CACTCTCTCT CTCTGGGACA GAGTTTTTTT
· K
2351 AAAAA
TTTTT

```

MannA. MammB. MannC. 前列腺

29

		401	450
pMamm A	(359)		
pMamm B	(290)		
pMamm C	(303)		
pPros	(401)		
		451	500
pMamm A	(409)		
pMamm B	(339)		
pMamm C	(353)		
pPros	(451)		
		501	550
pMamm A	(459)		
pMamm B	(382)		
pMamm C	(403)		
pPros	(501)		
		551	600
pMamm A	(509)		
pMamm B	(430)		
pMamm C	(453)		
pPros	(551)		
		601	650
pMamm A	(559)		
pMamm B	(480)		
pMamm C	(503)		
pPros	(601)		
		651	700
pMamm A	(609)		
pMamm B	(530)		
pMamm C	(553)		
pPros	(651)		
		701	750
pMamm A	(659)		
pMamm B	(580)		
pMamm C	(603)		
pPros	(701)		
		751	800
pMamm A	(709)		
pMamm B	(629)		
pMamm C	(653)		
pPros	(751)		
		801	850
pMamm A	(759)		
pMamm B	(679)		
pMamm C	(703)		
pPros	(801)		
		851	900
pMamm A	(809)		
pMamm B	(729)		
pMamm C	(753)		
pPros	(851)		

31

32

33

34

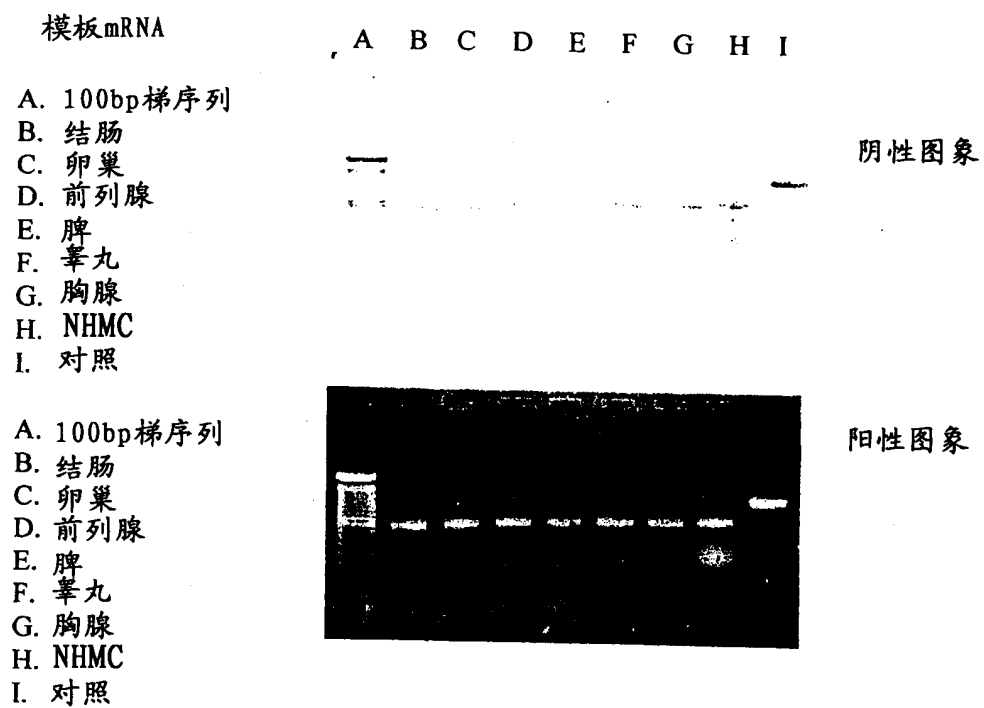


图 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
全脑	左小脑	黑质	心脏	食管	横结肠	肾	肺	肝	白血病 HL-60	胎儿 脑	酵母总 RNA
大脑 皮层	右小脑	横核	主动脉	胃	降结肠	骨骼肌	胎盘	胰	海拉细 胞, S3	胎儿 心脏	酵母 tRNA
额叶	胼胝体	丘脑	左心房	十二 指肠	直肠	脾	膀胱	肾上 腺	白血病 k-562	胎儿 肾	大肠 杆菌 rRNA
顶叶	扁桃体	脑垂体	右心房	空肠		胸腺	子宫	甲状 腺	白血病 MOLT-4	胎儿 肝	大肠 杆菌 DNA
枕叶	尾状核	脊髓	左心室	回肠		外周血 液白 细胞	前列 腺	唾液 腺	伯基特 淋巴瘤 Haj1	胎儿 脾	聚 r(A)
颞叶	海马		右心室	回盲肠		淋巴结	睾丸	乳腺	伯基特 淋巴瘤 Ozudi	胎儿 胸腺	人Cot -1DNA
大脑皮 层的 p. g.*	延髓		室间隔	阑尾		骨髓	卵巢		结肠直 肠腺癌	胎儿 肺	人DNA 100ng
脑桥	核壳		心尖	升结肠		气管			肺癌, A549		人DNA 500 ng

* 旁中央脑回

NOT FOR

仅用于研究目的。未经CLONTECH Laboratories, Inc. 书面许可, 不能用于药物或诊断目的, 其产品也不能再次出售、修饰后用于再次出售, 或用来生产商业产品。

CLONTECH Laboratories, Inc

INTERNET: www.clontech.com

CLONTECH Labor

图

1A

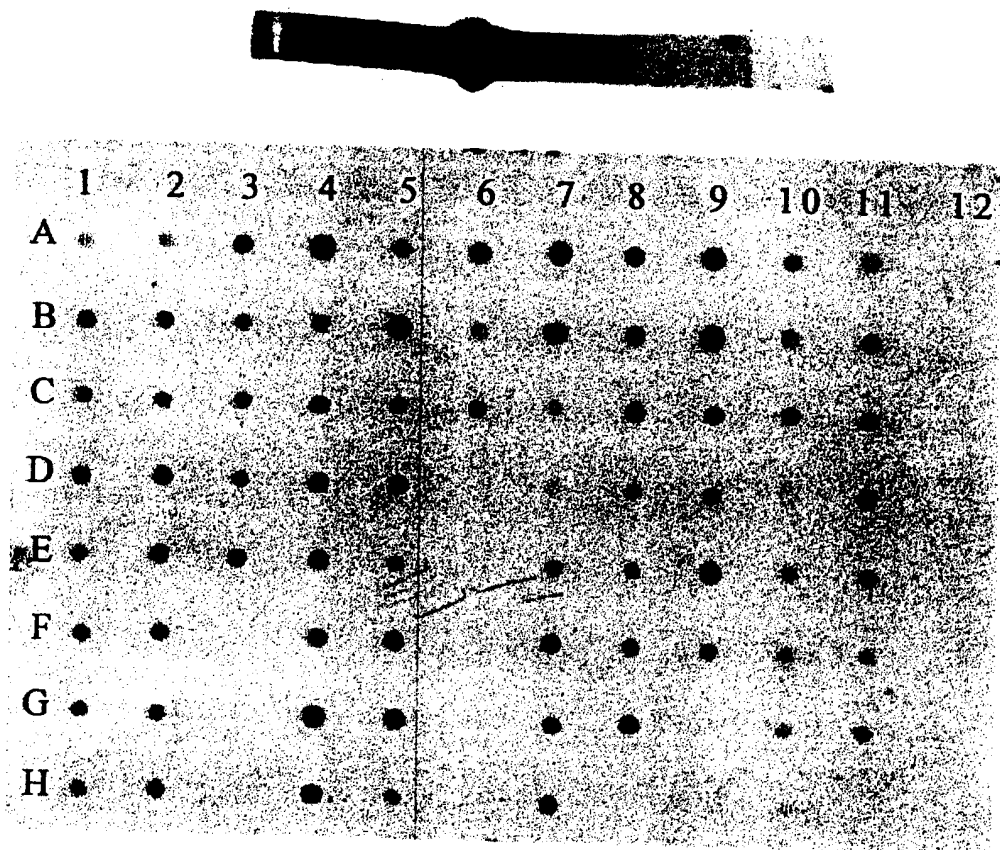


图 1B

乳房抑制素条件培养液体积	乳房抑制素对照	患者血清前列腺样品	体积血清和前列腺条件培养液
500 μ l			500 μ l
250 μ l			250 μ l
125 μ l			125 μ l 乳房癌患者血清
75 μ l			75 μ l
50 μ l			前列腺培养基
25 μ l			500 μ l 正常
10 μ l			500 μ l 癌
0 μ l			

图 2

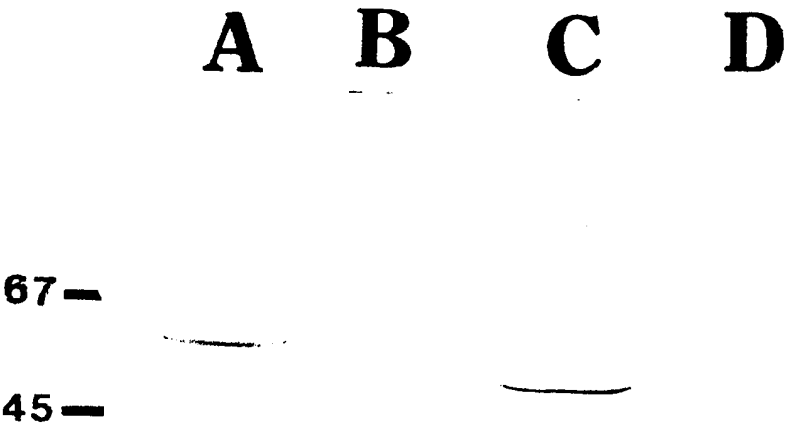


图 4

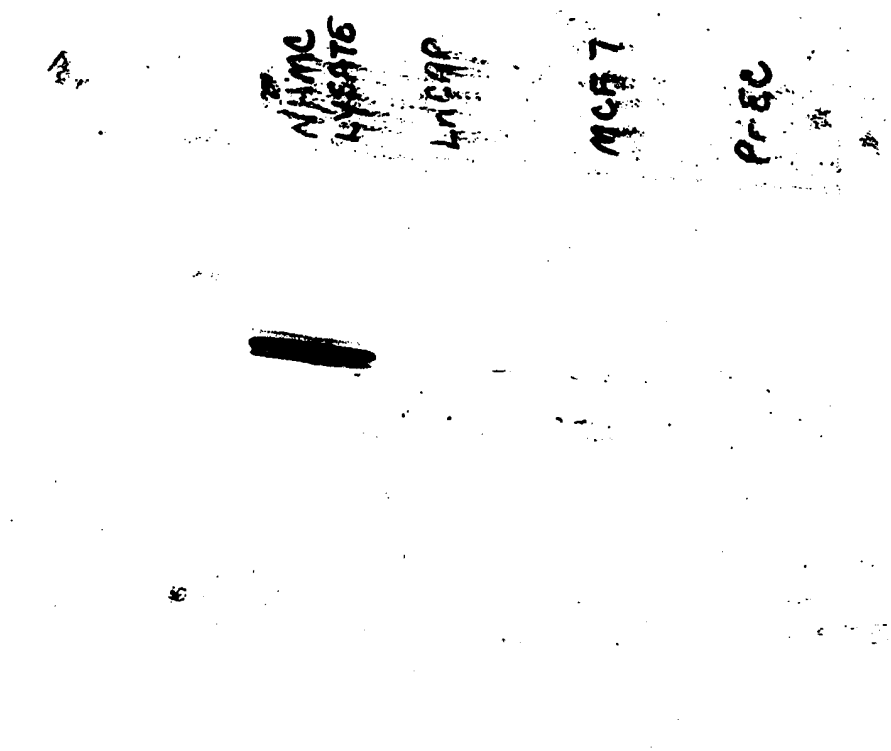


图 3

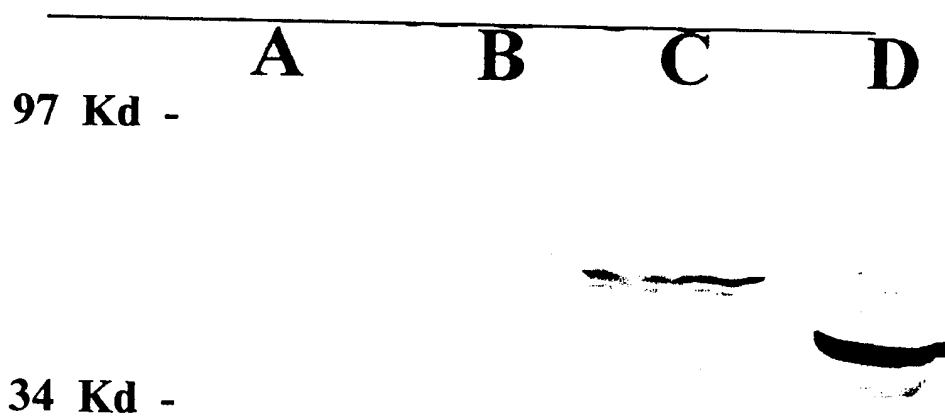
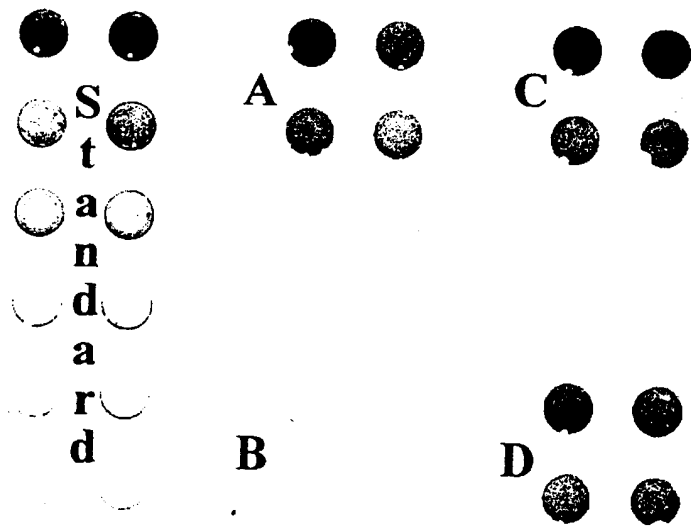


图 5



图

6

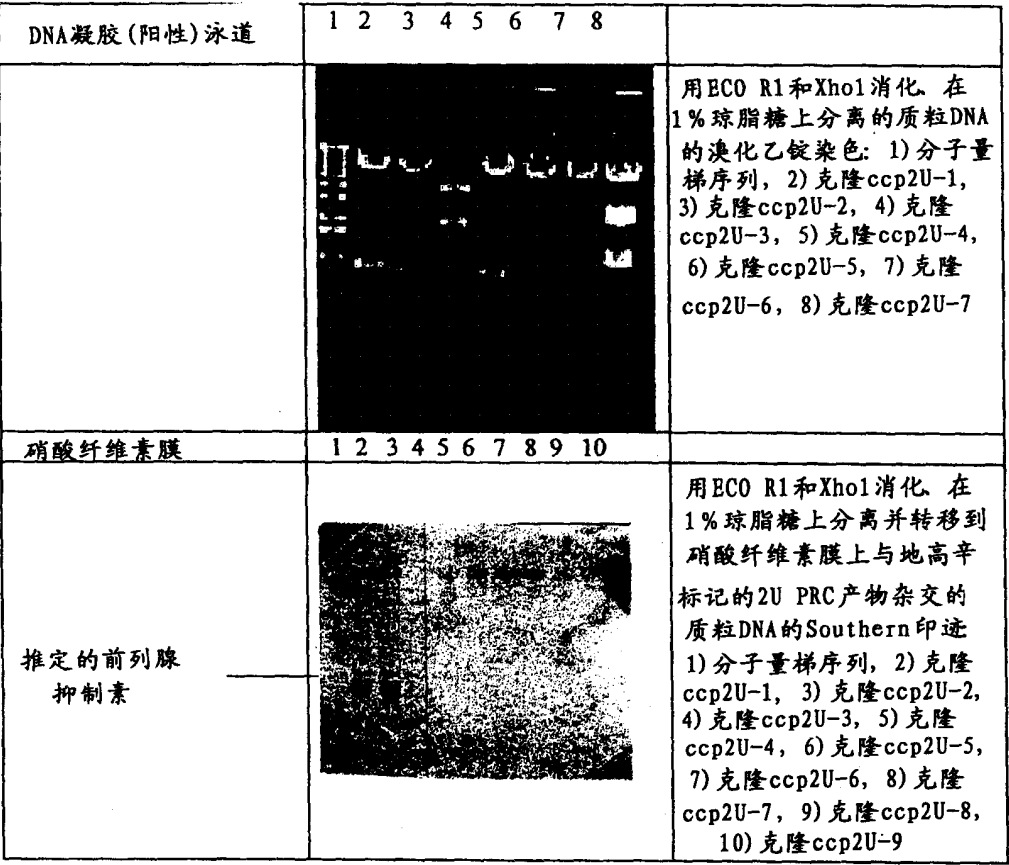


图 7

乳房抑制素和有关的基因结构

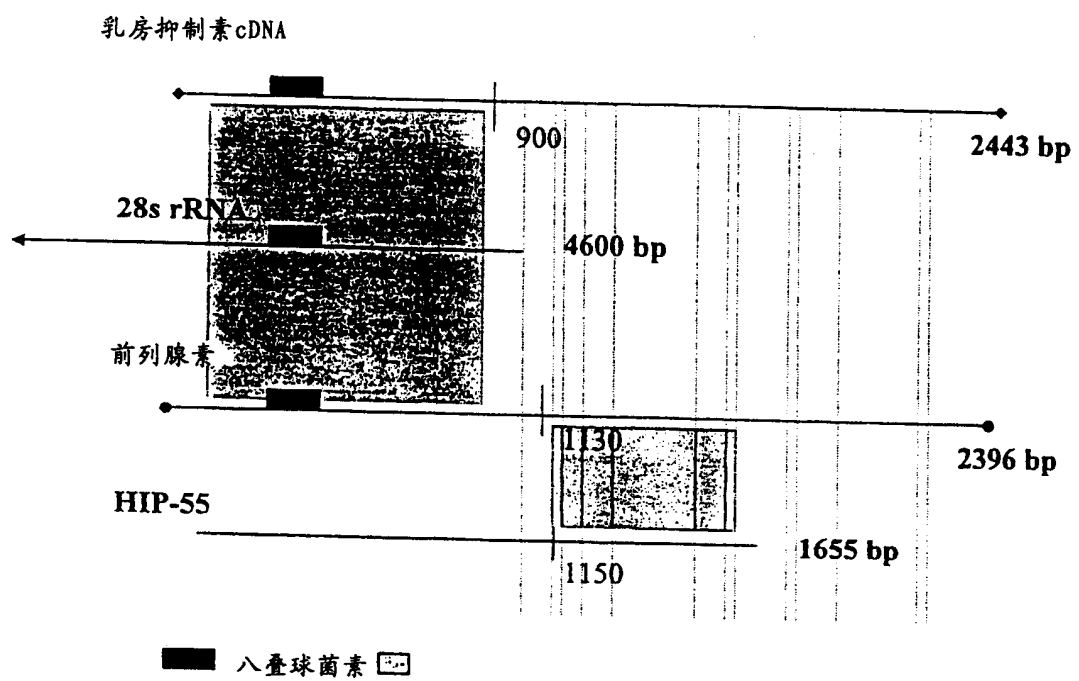


图 8