

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/51

C12N 15/09

C12P 19/34 C12P 21/08

G01N 33/574 G01N 33/577

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 90110448.5

[45]授权公告日 2002 年 3 月 6 日

[11]授权公告号 CN 1080305C

[22]申请日 1990.12.19 [24]颁证日 2002.3.6
[21]申请号 90110448.5
[30]优先权
[32]1989.12.19 [33]US [31]451,953
[32]1990.8.31 [33]US [31]575,524
[73]专利权人 美国政府(由卫生及人群服务部部长代表)
地址 美国哥伦比亚特区
[72]发明人 杨 素
[56]参考文献
CHEMICAL ABSTRACTS VOL. 109. NO. 15 1988. 10. 10 AB-
STRACT WO. 129009H
JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE VOL. 679 1964. 1.
l t. pyl et al; vber bicydische heterocyclen mit gemeinsamtn
stuckstoffatom,ixxur kenntnis dre inido20
审查员 曾繁辉

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 汪 洋

权利要求书 1 页 说明书 29 页 附图页数 11 页

[54]发明名称 制备致癌蛋白的方法

[57]摘要

本发明涉及一种对肝细胞癌有特异性的致癌蛋白质和一种编码了这种蛋白质的核苷酸序列。本发明还涉及使用该癌蛋白(或它的特异抗体)和核苷酸序列的筛选和诊断方法和根据该方法而建立的药盒。

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

权 利 要 求 书

1. 一种制备蛋白的方法，所述蛋白由一段 DNA 片段编码，该 DNA 片段具有图 1 所示核苷酸 79 至 1479 的核酸序列，或所述核酸序列的等位变异体，所述方法包括以下步骤：

a) 在一定条件下培养用重组 DNA 分子转化的宿主细胞，使所述 DNA 片段表达，并由此产生所述蛋白，所述重组 DNA 分子包含含有所述 DNA 片段的载体；

b) 分离所述蛋白。

2. 一种制备蛋白的方法，所述蛋白具有图 1 所示起始于核苷酸 79 至 81 所对应的 Met，终止于核苷酸 1477 至 1479 所对应的 His 的氨基酸序列，所述蛋白由一段具有图 1 所示核苷酸 79 至 1479 的核酸序列的 DNA 片段编码，所述方法包括以下步骤：

a) 在一定条件下培养用重组 DNA 分子转化的宿主细胞，使所述 DNA 片段表达，并由此产生所述蛋白，所述 DNA 分子包含含有所述 DNA 片段的载体；

b) 分离所述蛋白。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中步骤 a) 中的重组 DNA 分子还包含与所述 DNA 片段可操作连接的启动子序列。

4. 根据权利要求 1、2 或 3 的方法，其中步骤 a) 中的宿主细胞是原核细胞。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中所述宿主细胞是大肠杆菌细胞。

6. 根据权利要求 5 的方法，其中所述大肠杆菌细胞是大肠杆菌 pN^rpM-1，其保藏号为 CCTCC No.M90069。

制备致癌蛋白的方法

本发明总的来说，涉及一种肝癌细胞的蛋白质，具体地说本发明涉及一种致癌蛋白质，它是肝癌细胞的一种放大的基因表达产物。本发明还涉及到编码这种致癌蛋白质的核苷酸片段、包含这种片段的重组分子和用它转化的细胞。本发明还涉及到检查病人体内肝癌存在的方法以及在此基础上的药盒。

流行病学表明人类的某些癌症和其他疾病的发生与几种 DNA 病毒有很密切的病因学相关性。这些病毒包括颈部癌症 (HPV 16) 和疣状表皮发育障碍中 (HPV 3 和 8) 的乳头状瘤病毒；非洲淋巴瘤中的 EB 病毒；和人肝细胞癌中的乙型肝炎病毒 (HBV)

(Beasley et al, In: Vyas GN, Dienstag J.L, Hoofnagle JH, eds. “病毒性肝炎和肝脏疾病”

Orlando, FL, Grune and Stratton, 1984, 209—224)。这些发现，以及逆转录病毒的感染如 HTLV-1 在成熟的 T 细胞中白血病的相关性表明传染性病毒在上述人类肿瘤和疾病的发病机理中可能起着转导因子的作用。

根据该机制，相信传染性病毒是通过与宿主细胞 DNA 进行 DNA 重组而产生影响的。哺乳动物基因组中含有某些基因（被称为致癌基因前体），在被转移到急性转化逆转录病毒基因组中时，它能获得致癌性质 (Bishop, Ann. Rev. Biochem. 1983, 52: 301; Bishop, Cell 1985, 42: 23)。在特定的人类癌症中（如，T24 和 EJ 人膀胱癌），已经证实鉴定出的转化基

因 (H—ras—1 位点) 与 Harvey 鼠肉瘤病毒的 V—ras H 有关。在致癌基因前体和致癌基因中, 该 ras 族已经被完全表征, 并且对在人类肝癌中的活化和表达进行了研究。当一种致癌基因前体经过点突变 (如 C—rasH) 或者重排 (如 n—myc), 这种改变可以引起分化和生长过程中细胞调节的丧失, 并且最终产生致癌性。

最近, 从人 (Mahlavu) 肝细胞癌中得到的一种转化 DNA 顺序, hhc^M 已被鉴别并且被分子克隆成为一种大片段的部分片段 (Yang et al, J. Gen. Virol. 1982, 63: 25; Yang et al, Environmental Health Perspectives 1985, 62: 231)。从另外几种人肝细胞癌中分离出一些对 NIH/3T3 细胞适度转化活性显示为零的, hhc^M 相关 DNA 克隆。已经有两种被部分地表征, 它们是从 Mahlavu 肝细胞癌中得到的适当地细胞—转化基因 (hhc^M) 和一种从正常人体肝脏 DNA 中分离的, 推断的细胞同系物 (C—hhc) 它不具有细胞转化活性。已经表明了二种 hhc^M 和一种 Korean hhc^{K3} 的分子克隆与 C—hhc 的生物活性特征并加以比较 (Yang et al, 白血病 1988, 2 (12 增刊): 1025)。观察了 hhc^M 序列在来源于 2 个中国人, 1 个非洲人和 17 个朝鲜人肝细胞癌的几种基因组 DNA S 中的放大反应, 并且与在相同肝细胞癌中整合的 HBV DNA 序列的分布进行了比较, 以便对 hhc^M 的可能的作用提供一些了解。

本发明涉及到一种肝细胞癌特异的癌蛋白和一种编码这种蛋白质的核苷酸顺序。本发明还涉及到利用该癌蛋白 (或它的特异抗体) 和核苷酸顺序进行诊断和筛选的方法 (在此基础上建立的药盒)。

本发明的一个目的是提供一种肝细胞癌蛋白和一种编码它的核苷酸序列。

本发明的另一个目的是提供一种肝细胞癌的存在和肝脏癌前或病理状态的诊断检查。

该技术中的熟练人员通过下面的描述可以清楚地知道本发明的其它目的和优点。

在一个优选方案中，本发明涉及到一种编码了图 1 中的氨基酸序列或该序列的一种等位基因变异体或该序列的一个特定部分的 DNA 片段。

在另一个优选方案中，本发明涉及一种重组体 DNA 分子，它们含有：

- i) 一种载体，和
- ii) 上述 DNA 片段

在另一个优选方案中，本发明涉及到用上述重组 DNA 分子转化的宿主细胞。

在另一个优选方案中，本发明涉及到与上述 DNA 片段充分互补并与之杂化的一种核苷酸片段。

在还有一个优选方案中，本发明涉及到一种具有图 1 中氨基酸序列或该序列的一种等位基因变异体或该序列的一个特定部分的蛋白质。

在另一个优选方案中，本发明涉及到上述蛋白质的特异抗体（多克隆的和/或单克隆的）。

在另一个优选方案中，本发明涉及到一种产生上述蛋白质的方法，包括在可以表达 DNA 片段的条件下培养一种用上述重组 DNA 分子转化的宿主细胞，从而产生该蛋白质；并分离该蛋白质。

在另一个实施例中，本发明涉及到一种检查样本中上述蛋白质存在的检查方法，包括：

i) 在可以使抗体与蛋白质结合的条件下将样本与该蛋白质特异性抗体接触，从而形成一种复合物；和

ii) 检测该复合物的存在。

在另一个实施例中，本发明涉及到一种检查样本中存在编码上述蛋白质的核苷酸序列的方法，包括：

i) 在可以进行杂化反应的条件下将样本与该核苷酸序列充分互补的核苷酸片段接触，使它们发生杂化，从而形成一种复合物；和

ii) 检测该复合物的存在。

在另一个实施例中，本发明涉及到一种病人肝细胞癌存在的诊断方法，包括：

i) 将从病人的生物学样本与上述抗体在使得抗体与样本中蛋白结合的条件下进行接触，从而形成一种复合物；和

ii) 检测这种复合物的存在。

在另一个实施例中，本发明涉及到一种诊断病人肝细胞癌存在的方法，包括：

i) 将从病人的细胞样本中获得的核酸序列与上述核苷酸片段在可以进行杂化反应的条件下接触，从而形成一种复合物；和

ii) 检测这种复合物的存在。

在另一个实施例中，本发明涉及到用于检查样本中存在上述蛋白质的一种诊断药盒，它包括一种盛有该蛋白质特异性抗体的容器。

在另一个实施方案中，本发明涉及到一种用于检查一种核酸序列的存在的诊断药盒，这种核酸序列编码了一种具有图 1 所描述的氨基

酸序列或该序列的一种等位基因变异体，或它的一个特定部分的蛋白质，这种药盒包含有一个盛有上述核苷酸片段的容器。

图 1 表示 hhCM 的完整核苷酸序列，和一种编码了其开放阅读框架中的 52, 000 道尔顿蛋白质的氨基酸序列。

图 2 表示产生 hhCM 52 KD 蛋白质的 hhCM—LacZ 嵌合质粒的结构。

图 3 表示结合到从人肝细胞癌 (Mahlavu)，人正常肝和从鼠 (NIH/3T3) 成纤维细胞中制备的大分子量 DNAs 上的黄曲霉素 B₁ 环氧化物。

图 4 表示用一种改良的 Maxam—Gilbert 定序法来识别在 hhCM (PM—1) DNA 中的 AFB₁ 环氧化物结合的 dG。在一旁列出了核苷酸序列。左侧的谱带表示对应于全部四种 6 脱氧核苷酸和 AFB₁—dG 的梯形谱带；右侧的另外三个谱带中只给出了天然 dG 和 AFB₁—dG。在全部时间过程中 aG = AFB₁ 结合的 dG；⁰G = 不与 AFB₁ 反应的 dG；而 °G = 适度优选的 dG。

图 5 表示在含有 pJZ102 的大肠杆菌细胞中产生的蛋白质的动态分析。将质粒 pJZ102 和对照质粒 pJZ101 在大肠杆菌细胞中进行培养，直到细胞密度的 Klett 读数达到 80，此时，加入诱导剂 IPTG (最终浓度， 10^{-3} mol)，以激活从 lac 启动子开始的转录，制备嵌合 hhCM—lac 52—KD 蛋白质。在特定时间取一毫升培养物样品，通过离心沉淀，并使之溶解，然后在 Laemmli 缓冲液中煮沸使蛋白质变性。取各种样本等量的等分试样，通过参考文献中所述的 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳方法进行分析 (Somerville 等人, Structural and

Organizational Aspects of Metabolic Regulation; UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series, Vol. 133, P. 181—197. New York; Alan R. Liss Inc. 1990)。这些谱带代表: (a) 在时间为0时的pJZ102+IPTG; (b) 在时间为0时的pJZ102-IPTG; (c) 在时间为20小时的pJZ102-IPTG; 其它分别是在30分钟时(d)、4小时(e)、7小时(f)和20小时(g)的pJZ102+IPTG。在0时(a')、30分钟(b')、4小时(e')、7小时(f')和20小时(g')时pJZ102转化的大肠杆菌细胞+IPTG的暗背景显微图。预先染色的分子量标记(m)以KD计算是130(顶部的浅色谱带), 94, 75, 50, 39, 27, 17。

图6A和6B表示在细菌中产生的纯化的hnc^M融合蛋白质p52(图6A)和一种多克隆抗-p52 IgG的特异性(图6B)。图6A表示细菌表达的p52的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。嵌合hnc^M-lac融合蛋白质的细菌表达的全部条件如图5所述。谱带d, e, 和e' 代表被IPTG诱导的带有pJZ102的大肠杆菌细胞(以各种各样的量)的总细胞提取物, 而谱带f代表带有pJZ101的大肠杆菌细胞的阴性对照的总细胞提取物。谱带a(5 μ l), b(15 μ l)和c(1 μ l)代表用于免疫兔子的凝胶纯化的p52的不同量。谱带m代表预先染色的分子量标记, 以KD计为75, 57, 50, 39, 27, 17。

图6B代表一种多克隆抗-p52的反应活性。通过对兔子进行

免疫可以产生抗-p52多克隆IgG。用惯用技术、用SDS聚丙烯酰胺凝胶纯化的p52在各为0.8到1.0mg的量对新西兰白兔进行免疫。给予两次辅助加强注射。将去垢剂(0.2%SDS)溶解的相当于0.2ml封装的人肝癌细胞(1/3:V/V)的样本,包括Mahlavu肝细胞癌、Hp3p21.7和HPG2, pB⁺pM-1转染的BRL-1肿瘤细胞以及对照BRL-1细胞和p52以每种10μl加到样品孔中,并使之扩散,与多克隆抗-p52IgG进行交叉反应过夜。在48小时记录结果。

图7表示与³²P-hhC^M DNA进行的DNA-DNA杂化反应。

本发明涉及到一种由于肝细胞癌的核苷酸序列转化而编码的致癌蛋白以及这种转化序列本身。本发明还涉及这种癌蛋白的特定部分(即至少5个氨基酸),和编码这种多肽的核苷酸序列(片段)。本发明还涉及与上述核苷酸序列(片段)充分互补的核苷酸片段,这种片段被用作探针来检查这种核苷酸序列(片段)的存在。本发明也涉及到用于检查温血动物肝细胞癌(和肝脏的癌前或病理状态)存在的诊断和筛选方法。

本发明的这种癌蛋白是一种与肝癌特异相关的肝癌细胞的放大基因表达产物。这种蛋白质可以具有图1所给出的完整顺序,在这种情况下它被称为hhC^M。这种蛋白质也可以具有与图1所给分子特性(如免疫学特性)基本相同的分子的氨基酸序列(如图1序列的等位基因形式)。另外,本发明的这种蛋白质(或多肽)可以具有与图1所给序列的某一特定部份(或它的等位基因形式)相一致的氨基酸序列。

该蛋白质可以基本纯化的形式存在,也就是基本上不含有在肝脏

内通常结合在一起的蛋白质和核酸。本发明的癌蛋白，包括用相应的 mRNA 在无细胞的提取物中制备的和用重组技术制备的，可以使用现有技术中的已知方法纯化。可用本领域的已知方法将这种癌蛋白或它的特定部份用作为一种抗原来产生它的单克隆和多克隆抗体。

在另一实施方案中，本发明还涉及到如上所述的编码了图 1 所给完整氨基酸序列（图 1 所给的具体的 DNA 序列只是一个实施例），或它的任何特定部份的核苷酸序列（片段）（包括 cDNA 序列）。本发明所涉及的核苷酸序列还包括那些编码了具有与 hhCM 多肽基本相同特性（如免疫学特性）的蛋白质（或多肽）的序列（例如图 1 的等位基因形式的氨基酸顺序）。本发明还涉及到与上述核苷酸序列（片段）充份互补并与之杂化（如在严格条件下）的核苷酸片段。

在另一个实施方案中，本发明涉及到一种包括一种载体和一个如上所述核苷酸序列（片段）（最好是一种编码了图 1 所示分子或具有其特性的分子的 DNA 序列）的重组分子。这种载体可以是一种病毒或者一种质粒载体。该序列可以存在于这种载体中并能被可操纵地连接到调节元件，包括例如一种启动子（如 LacZ 启动子）上。这种重组分子适用于转化原核或真核细胞，最好是蛋白酶缺乏大肠杆菌细胞。

本发明一种重组分子的具体实例如图 2 所示。在该实例中，通过合适的重组 DNA 操作，用原核生物 LacZ 表达/翻译序列加上 11 个氨基酸的密码子来取代 hhCM_{p52KD} 的原始的 N-末端 18 个氨基酸的密码子，从而将 hhCM 核苷酸序列置于一个嵌合结构中（Yang et al. Proc. of the XIV Inter. Symp. Sponsored by the International Association for Comparative Research on

Leukemia and Related Diseases Nov. 1989
(Vale, Colorado))。在 lacZ 启动子的驱动下, 所得到的嵌合基因在一种蛋白酶缺乏大肠杆菌突变体中于 30 °C 下进行高水平表达。在另一个实施方案中, 本发明涉及一种用上述重组分子转化的宿主细胞。该宿主可以是原核生物 (例如, 细菌 (最好是大肠杆菌))、低级真核生物 (即真菌, 包括酵母菌) 或高级真核生物 (即哺乳动物, 包括人类)。可以利用本领域的已知方法进行有效地转化。这些转化的宿主细胞即可作为上述核苷酸序列的来源 (这些序列构成重组分子的部份)。如果重组分子是一种表达系统的形式 (见上述具体结构), 这种转化细胞即可作为癌蛋白的来源。

本发明的癌蛋白和核酸顺序既可以用于研究 (如促进对肝细胞癌为什么以及怎样发生的理解), 也可以用于临床, 例如诊断 (和/或筛选) 肝细胞癌 (以及肝脏的癌前或病理状态) 的存在和/或发展。

可以使用抗本发明癌蛋白 (或它的特定部分) 的抗血清或单克隆抗体 (用已知技术产生) 来完成上述的诊断/筛选方法。例如, 这种诊断方法可以采取免疫检测的形式用于高度怀疑肝细胞癌的病人 (如慢性肝炎患者) 和/或肝癌地理位置高发区 (如中国江苏省的启东区) 人群的尿或血清样本。这种筛选免疫检测可以是简单的浸棒型法, 该方法是粘在棒上的抗原/抗体对中的一种成员与样本中的另一成员结合时, 出现颜色改变 (这种浸棒型检测方法用于各种不同的结合对已被描述)。这种简单的试验可以容易和广泛地用于不容易得到分析电泳仪 (用于检查病人血清中的甲胎蛋白含量, 该含量水平目前用来筛选和诊断肝细胞癌的存在) 的地区的人群。

本发明的诊断方法也可以是一种包括了利用抗本发明蛋白质或多

肽的抗体而进行的组织化学诊断检查。为了能够更准确地诊断肝癌，该试验可使用冷冻或预先固定的肝脏薄切片样本。

本发明的诊断方法也可以用作与本发明的部份核酸顺序充份互补并与之杂化的核酸探针，这种探针可用于例如，在时间合适的限制酶消化的基因组 DNA 进行电泳后，检查内源性序列的存在，该探针可以用例如 ^{32}P 标记，以便进行检测。

本发明还涉及用来实现上述方法的诊断/筛选药盒。这种药盒可以包括例如本发明癌蛋白（或多肽）的上述特异性抗体，或者，也可以包括上述核酸探针，以及完成该检查所必须的任何辅剂（例如，缓冲液，可检测的标记物，酶底物等）。

在下列非限制性实例中，本发明被进一步详细地描述。

在下面的实施例中参考了下列方案：

hhc^M 分子克隆化：

用 Hind III 限制性核酸内切酶，按照下述方法，对从人体正常肝脏和 Mahlavu（非洲人）肝细胞癌（HH C）中纯化的基因组 DNA 进行完全消化。（为了克隆 HH C DNA 序列还尝试使用了其他的限制性核酸内切酶，包括 Bam HI，Eco RI 和 Pst I，从 HH C 和肝脏 DNA 中分离基因组 DNA 片段，而用这些手段分离的克隆在转染过程研究方面是不成功的）。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳将 [^3H] 黄曲霉毒素 B₁（AF B₁）—环氧化物结合的（如下所述）和未结合的 DNA 样本分离成 180 个组份。测定每 μg DNA 的 [^3H] AF₁ B—环氧化物特异性。将具有明显 [^3H] AF B₁—环氧化物特异活性的组分用于如下所述的对 NIH 3 T 3 细胞进行 DNA 转染测定。识别那些能够显示阳性细胞转化的阳性聚焦组份，并平行地将

未结合DNA的组份联结到pBR322, pBR325和/或Puc8质粒DNA的Hind III位点上进行分子克隆化,使其进行如其他文献所描述的大肠杆菌HB101细胞的转化。(Yang et al., J. Gen. Virol. 1982, 63:25)。对所得克隆的初级选择是根据:(1)对四环素的敏感性,和/或与含有该质粒的半乳糖苷酶编码序列的LacZ操纵子的破坏相关的颜色改变;和(2)在有或没有AFB₁结合的NIH3T3细胞的转染测定中细胞的转化能力;(3)在对从人Alu序列中制备的(³²P)探针(Lawn et al., Cell 1978, 15:1157)和(³²P)标记的Hind III切割的MAH、HHC、DNA片段进行的菌落杂交反应和DNA-DNA杂化反应中人类序列的存在;和(4)(³H)AFB₁—环氧化物与该DNA的结合。通过包括(³H)AFB₁的结合、NIH3T3细胞的转染测定和对(³²P)Alu和(³²P)Hind III MAH, HHC, DNA探针的DNA-DNA杂化反应在内的这些三联技术的运用,对30,000个克隆进行筛选后,可以分离出三个克隆,一个特定3.1Kb DNA限制片段构成了该hhc^M DNA。

质粒DNA和AFB₁结合的制备

用于这些研究的克隆一直被称为PM-1。通过Holmes方法,即快速加热法,然后以180,000×g转速通过CsCl₂—溴化乙锭等密度离心20小时来制备质粒DNA(Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 1982)。通过异丙醇提取和用TEN缓冲液彻底透析,去除

溴化乙锭, 纯化带状PM-1 DNA。一般可以获得每5 ml培养物25到50 μ g总质粒DNA的产率。通过用Hind III核酸内切酶消化PM-1 DNA, 然后进行琼脂凝胶电泳, 并电洗脱该分离的3.1 Kb谱带。将3.1 Kb hhc^M DNA从PUC8 DNA和其他污染物中分离出来。将所得到的3.1 Kb hhc^M DNA进行同源纯化, 并将其用于AFB₁ 激活实验。

也可以将 hhc^M 3.1 Kb DNA克隆到一个除了带有新霉素对抗基因外还带有一种鼠逆转录病毒 (Moloney) LTR, SV40 启动子和部份T抗原的pSVneo载体当中。当被转染到细胞中时, 这种克隆, rpMpN-1, 以非常高的水平进行表达, 并且对于转染测定具有特别的优越性。

从Morales 实验室, 可以获得大约1.5 Ci/ μ mole 特异性的(³H) AFB₁。通过HPLC将其进一步纯化到同源化。所得到的(³H) AFB₁ 单峰具有9,250 cpm/ μ mole 的特异活性。它可以与从肝微粒体新鲜制备的或者通过用如前所述的氯代过苯甲酸和二氯甲烷进行化学过氧化反应而新鲜制备的混合功能氧化酶一起用于激活反应 (Bennett et al., Cancer Res. 1981, 41: 650; Garner et al., Chem. Biol. Interact. 1979, 26: 57)。通过动态分析对(³H) AFB₁ 环氧化物与大分子量HH C或质粒DNA的结合进行监测 (Yang et al., Environmental Health Perspective 1985, 62: 231 and Modali and Yang, Monitoring of Occupational Genotoxigants P.P. 147-158 (1986))。对每

个时间点采取的样本用氯仿冲涤去除未结合的(^3H) AFB₁ 环氧化物, 在将(^3H) AFB₁—DNA再次溶解在Tris—EDTA—NaCl (TEN)缓冲液中之前用乙醇进行沉淀, 用于转染测定或序列分析。

细胞组织培养和转染测定

将6到11代NIH/3T3细胞和用于转染测定的Buffalo鼠肝脏细胞(BRL-1)保持在含有10%热灭活胎牛血清, 青霉素(50单位 ml^{-1})和链霉素(25 $\mu\text{g ml}^{-1}$)的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中, 置于37℃, 5%CO₂的环境中。

按照如前所述的方法进行DNA转染(见Yang et al., 1985 and Modali and Yang 1986, 上文已参考)。通过细心地滴定DNA—磷酸钙复合物的混合物的PH曲线可以获得最佳条件, 通常发现PH 6.75可以保证良好的复合物沉淀。

组织培养细胞和癌组织DNA和RNA的制备

按照其他文献所述的方法以组织培养细胞和癌组织中提取和纯化全部大分子量(HMW)DNA。(Yang et al., 1985, 上文已参考)。对这样纯化的HMW DNA进行蛋白酶K消化, 用苯酚—甲酚, 氯仿—异戊醇、乙醚和乙醇—NaCl沉淀进行第一次有序化学纯化, 然后进行RNase消化和第二次有序化学纯化。然后用TEN缓冲液对纯化的DNA进行透析以便用于实验。按照前面所述的方法, 从组织培养细胞中提取和制备总RNA

(Maniatis et al., 1982, 上文已参考)。通过用寡dT纤维素(Collaborative Research, MA.)柱洗

脱进行亲和分离来获得富RNA的多聚腺核苷酸。

肿瘤发生

将从转染的细胞培养物中通过克隆柱方法或终端洗脱方法克隆出的转化细胞进行扩大，并以 10^4 到 10^6 个细胞的剂量接种到无胸腺Swiss nu/nu小鼠皮下。对该激发小鼠体内的肿瘤发生进行密切监测。

核苷酸序列分析和靶位点致突变

运用“酶学”1980, 65:499中的标准Maxam—Gilbert方法和Sanger (M13)双脱氧定序法 (Maniatis et al., 1982, 上文已参考)对hhc^M 3.1 Kb和通过靶位点致突变产生的变异体进行核苷酸定序。

用实用生物系统寡聚核苷酸合成仪来合成带有定靶为dG...>T突变体的20聚物的特定寡聚核苷酸序列。在产生的突变克隆中用这些序列作为模板，按照Amersham (Arlington Hts., I.L.)提供的方法，运用Amersham的寡聚核苷酸控制体外系统产生突变DNA克隆，通过核苷酸定序来验证该突变克隆的DNA。通过对NIH/3T3细胞转染测定中细胞转化的增强和对用BRL园点印迹法在转染细胞中RNA的表达来分析这些靶位点致突变DNA的效果 (Bethesda Research Laboratory, Rockville, MD)。

实施例 1

AFB₁ 结合的剂量和在NIH/3T3细胞中

hhc^M 细胞转化能力的增强

使AFB₁ 环氧化物与从人肝细胞癌、人肝脏和小鼠NIH/

3 T 3 细胞中制备的大分子量 DNA 进行有效结合 (图 3)。每个结合动力学的起始率非常快。在结合反应一分钟之后, AFB₁ 一环氧化物与人正常肝脏或肝癌 DNA 以及鼠 NIH/3 T 3 细胞 DNA 结合的速度则出现显著差异。MAH HHC DNA 比正常肝脏 DNA 表现出较快的结合速度, 并且全部 dG 靶位较早地变得饱和。而 AFB₁ 环氧化物结合的正常肝脏 DNA 的速度较慢, 但是全部 dG 最终以稍低水平饱和。人 DNA 比鼠 NIH/3 T 3 细胞表现出较高的 AFB₁ 结合水平。发现在这些大分子量双链 DNA 中, 总的 AFB₁ 特异活性, 即 AFB₁-dG 加合, 大约是每 10 个核苷酸有一个 dG 结合。这种总特异性也要考虑到大分子量 DNA 二级或三级结构的存在。与这种观点一致的发现是 AFB₁ 环氧化物与线性 3.1 Kb 双链 hhc^M DNA 的结合为每 10⁴ 个核苷酸有 4 到 8 个 dG 结合。这种较高的结合能力反映了在线性双链 PM-1 DNA 中 AFB₁ 环氧化物可以相对容易地与 dG 结合, 而且不能与大分子量天然双链 DNA 的 AFB₁-dG 结合物形成率相比。

正如从表 1 所述的实验中所见, 在一种有限的剂量测定法表明 AFB₁ 环氧化物与 dG 的结合使 hhc^M 的细胞转化能力增加了 10 到 20 倍。

表1 PM-1 DNA 在NUB/3T3细胞转化中的
AFB₁ 剂量依赖性激活

DNA来源	AFB ₁ 毫微微摩尔		聚焦数/
	/100 ng	DNA	100 ng DNA
hhc ^M (PM-1)	0		15×10^{-1}
C-Ha-ras-1	0		4 6 5
C-K-ras-1	0		0
c-hhc	0		0
(人肝脏同源染色体)			
<u>E. coli</u>	0		0
hhc ^M (PM-1)	0		15×10^{-1}
hhc ^M (PM-1)	5		1 8
	1 4		2 6
	2 4		6 6
	3 5		3
c-hhc	0		0
	8		0
	1 5		0
	3 0		0
	4 0		0

AFB₁ 结合与转染测定如方法中所述。数据计算以每100 ng为基础。在未结合的hhc^M DNA测定中,用500 ng至1.5 μg的DNA进行转染测定以获得NIH/3T3细胞的合理聚集形成。以50至500 ng DNA的范围进行AFB₁—环氧化物结合

DNA 的转染。将数据标准化以表明 AFB₁ 一环氧化物激活对 hhc^M 细胞转化能力的增强。

观察到未结合的 PM-1 在转化 NIH/3T3 细胞时的效率一般是大约 15 FFU/μg DNA, 而 AFB₁ 环氧化物激活的 PM-1 DNA 的理想转化率是 66 FFU/100 ng DNA, 增加了 20 倍。这种增强作用的原因可考虑由于非特异性诱变带来的。在合适的对照实验中表明, 在相同剂量测定法中, 正常肝脏或大肠杆菌 DNA 的活性缺乏激活任何细胞转化的能力, 因此早已排除了这种增强作用是由于扩散到细胞中的游离 AFB 或 AFB₁ 结合物的再环化所致 (Yang et al. 1985, 上文已参考)。而且在用从 c-rask-1 或 c-hhc 中得到的 AFB₁ 激活的 DNA 实验中, 以一种 hhc^M 的正常人体肝脏同源染色体作为合适的对照物, 没有获得 NIH/3T3 细胞的细胞转化。这表明了 AFB₁ 环氧化物激活的 PM-1 DNA 不是一种随机的现象。再者, PM-1 DNA 在细胞转化效率中的 AFB₁ 剂量依赖性 (表 1) 进一步证实了 AFB₁ 环氧化物的结合在增强细胞转化方面的特异性。尽管最佳剂量测定为 24 毫微微摩尔 AFB₁/100 ng 的 PM-1 DNA, 但是在超过 45 毫微微摩尔/10.0 ng 的 PM-1 DNA 的剂量测定时, 观察到了过多杀伤作用。虽然人 DNA 以降解的方式被结合到 NIH/3T3 细胞中, 但是在用 AFB₁ 环氧化物结合的 PM-1 DNA 转染的 NIH/3T3 细胞中没有获得转化的聚焦点 (Yang et al. 1985 and Modali and Yang, 1986, 上文已作参考)。这一发现表明, PM-1 DNA 的过度激活不仅产生

分子的分裂,而且可能会发生降解,导致生物活性的丧失。该结果还表明,在 hhc^M DNA 的生物活性受损和该活性的幸存有危险之前,每个 $PM-1$ DNA 分子中没有一个或者至多只有几个 AFB_1 - dG 结合物能够被 hhc^M DNA 接受。而且, hhc^M DNA 在细胞转化中的增强作用可能不需要或者至多需要有限量的 AFB_1 结合。

实施例 2

$PM-1$ DNA 在 dG 上 AFB_1 环氧化物结合的特异性

天然 DNA 中的脱氧鸟嘌呤核苷酸被 AFB_1 环氧化物结合后则变成碱,从而能通过六氢吡啶切割后而被识别,而在同样的天然 DNA 中未结合的脱氧鸟嘌呤核苷酸如果不经二甲硫(碱)处理则不能分裂。图 4 表示在饱和条件下结合时 $PM-1$ DNA 中的 dG 靶位点。在一系列四核苷酸中评价靶序列时,根据 AFB_1 环氧化物与 $PM-1$ DNA 中的 dG 的结合方式可以推断出一种经验分子式。表 2 概括了被 AFB_1 环氧化物所识别和攻击的一系列四核苷酸系列的核苷酸序列。如图 4 所示,下列四核苷酸 $AGAG$, $AGTT$, $TGTT$, $TGAT$ 或 $AGAA$ 中任何一种序列中的 dG 不受 AFB_1 环氧化物攻击。因而在没有预先经 DMS 处理的情况下不会出现序列分裂。 AFB_1 环氧化物攻击 $GGGC$, $CGGC$, $AGGC$, $TGGC$ 或 $CGCG$ 的序列中的 dG 后产生明显的 dG 分裂证实了这一观点。根据可以被 AFB_1 环氧化物接近的 dG 靶的各种序列的评价,可以断定在一种双链 DNA 中,可能性最小的 dG 靶位是两侧为 dA 和 dT 的位点即 III 型。最适当的 dG 靶的两侧是 dG 和 $/$ 或 dC , 即 I 型。而 dG 之前接有 dA 或 T 而其后接有 dG 和 dC 的四核苷酸序列是 AFB_1 环氧化物的适度优选靶位。也即 II 型位点。由于这种

分析是根据线性双链 DNA 而作的，当然就没有考虑 DNA 处于天然状态下的二级或三级结构。还应当指出的是尽管在双链 PM-1 DNA 中 AFB₁ 一环氧化物的 dG 结合亲和性在很大程度上受到邻位核苷酸的影响。但是没有发现 AFB₁ 一环氧化物与单链 DNA 中的 dG 结合的特异性。Modali 和 Yang 的发现 (1986, 上文已引用) 与有关 AFB₁ 与 OX 174 和 pBR322 DNA 结合的其他研究基本一致 (Misra et al., Biochemistry, 1983, 22: 3351)。

在过去两年中，一直是将 Maxam-Gilbert 核苷酸定序法和利用 BRL 千碱基定序系统的 M13 双脱氧方法结合使用来分析 hhc^M 的核苷酸序列。将这些经验规律用于 hhc^M 3.1 Kb 核苷酸序列的计算机分析，已推断出 hhc^M 的各种位点中最佳和适度优选 dG 靶位 (表 3)。虽然在 AFB₁ 一环氧化物与线性 3.1 Kb hhc^M DNA 结合研究基础上推断出了 dG 靶位点的最大数目 60 个，但是，通过对 hhc^M 序列可能的二级结构和三级结构的研究表明，能够被 AFB₁ 一环氧化物结合的 dG 靶位的量却要小得多。而且，只有少数这样导致的突变可以产生幸存价值的作用。

表2 邻近的核苷酸顺序支配 A F B₁ 一环氧化物
结合的 d G 靶位

I 类 最佳靶位	Ⅲ类 最不利的靶位
*	*
G G G G	A G A G
G G G C	A G T G
G G G A	A G A A
G G G T	A G A C
	A G A T
C G G G	T G A G
A G G G	T G A C
T G G G	T G A A
	T G A C
C G G C	T G T G
A G G C	T G T A
T G G C	T G T C
	T G T T
C G G A	
A G G A	
T G G A	
C G G T	
A G G T	
T G G T	

* 本表代表在用线性双链 P M—1 DNA 进行研究所观察到的 AFB₁—环氧化物结合的 d G 靶位。本表没有列出适度优选的 d G 靶位点，即 II 型，但在其他文献中已有记载 (Modali and Yong, 1986)。

表3 在 hhc^M 核苷酸顺序中 AFB₁ 一环氧化物优选
攻击的推断的 d G 靶位

*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CGCC	CGGC	GGCC	GGGC	GGGA	AGGA	TGCC	TGCG	TGGA	TGGG	GGAC
	*			*	*			*	*	
	CGGC			GGGA	AGGA			TGGA	TGGG	
					73					
					74					
						84				
								97		
				125				98		
				126						
									140	
								221		
				223						
				224						
				307						
				308						
								371		
								391		
		472								
									481	
									492	
			494							
			495							
				539						
										550

表3 (续)

*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CGCC	CGGC	GGCC	GGGC	GGGA	AGGA	TGCC	TGCG	TGGA	TGGG	GGAC
	*			*	*			*	*	
	CGGC			GGGA	AGGA			TGGA	TGGG	
				560						
				561						
			577							
				692						
									60	
					901					
					1125					
				1320						
				1321						
								1330		
									1354	
									1404	
		1405								
				1431						
		1543								
		1588								
									1637	
						1652				
				1765						
					1815					

表3 (续)

*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CGCC	CGGC	GGCC	GGGC	GGGA	AGGA	TGCC	TGCG	TGGA	TGGG	GGAC
	*			*	*			*	*	
	CGGC			GGGA	AGGA			TGGA	TGGG	

1853

1862

1868

1878

1986

2064

2094

2205

2315

2331

2352

2352

2460

2482

2718

2797

2884

2926

为了对这种 AFB₁ 诱导的 dG → T 突变的可能效应进行分析, 使用带有一个推断的 dG → T 点突变, 假定是由 AFB₁ 一环氧化物诱变所致的 20 聚物的多核苷酸对 hhc^M DNA 进行靶位点致突变研究。迄今为止, 只分析了几个推断的 dG → T 致突变位点, 这些位点总结在表 4 中, 在这种研究中使用了带有 SV 40 T 抗原载体中的 hhc^M 序列加上一种抗新霉素标记物, rpn^rpm-1 的重组结构, 因为它提供了通过它对硫酸庆大霉素 (G 418) (新霉素的一种类似物) 的抗性来选择转染细胞的优点。使用 hhc^M 特异的 mRNA 的表达作为标准, 我们通过 Northern 印迹反应, 在半定量分析 mRNA, 即富 RNA 的聚 A, 分析了用致突变的 hhc^M 序列转染后的抗 G 418 的 NIH/3T3 细胞中的表达。对这些细胞中的点转化监测 4 到 6 周。

从可以确定其核苷酸序列的七个突变克隆中所得的结果表明, 迄今为止, 未见到引起结构蛋白改变的突变对 hhc^M 的细胞转化的增强 (表 4)。另外, 导致氨基酸取代的诱导 dG → T 的突变迄今也没有改变细胞转化或 mRNA 水平的表达。这包括可以引起 Gly → Val 氨基酸取代的 577 位突变和由于摇摆编码而不引起氨基酸取代的 1005 位的突变。

在 hhc^M 核苷酸序列中, 存在着一种编码了一种大约 467 个氨基酸多肽的明显开放阅读码, ORF。这与 55—57 KD 蛋白质和某些包括用 hhc^M 特异的 mRNA 在兔网状细胞溶解物系统中进行无细胞蛋白合成过程中观察到的一种 53 KD 蛋白质在内的较小多肽具有良好的一致性。尽管 hhc^M 特异的 mRNA 水平没有不同, 但是正好在 5' 的第一个蛋氨酸密码子前带有与核糖 RNA 结合位点

一致的序列的5'末端上73和74位核苷酸的dG $\rightarrow$ T突变阻遏细胞转化。这可能是阻遏蛋白质合成的结果。同样,由于在每种情况下都插入了一个终止密码子(UGA)以过早地终止了蛋白合成,因此认为是在492和550处的突变也可以阻遏细胞转化。

有意义的是要注意到在626位的dG $\rightarrow$ T突变产生一种与RNA聚合酶II的强化因子序列类似的序列,据报道,它甚至在编码序列中可以有功能作用(表4的脚注)。mRNA水平增加了1.5倍,而细胞转化似乎是每 μ g DNA只有少数的聚焦点增加。这种发现表明,在本身就是一种适度转化DNA序列的hhc^M中,AFB₁诱导的突变是通过增强hhc^M表达来增加其转化的可能。这类似于其他发现所说的由一种含有启动子和强化因子序列的鼠LTR序列所驱动的小区ras致癌基因前体的加强表达也可以在原先倾向于不变化的组织培养细胞中引起细胞转化。

表4 在 hhc^M DNA 序列中由靶位点致突变的 d G → d T 突变的效果

# on hhc ^M	序 列	mRNA 合成	细胞转化
	*		
7 3	AGGA → ATGA	+	— @ 1
	*		
7 4	AGGA → AGTG	+	— @ 1
	*		
4 9 2	TGGG → TGTG	+	— @ 2
	*		
5 5 0	GGAG → GTAG	+	— @ 2
	*		
5 7 7	GGGC → GTGC	+	+
	*		
6 2 6	GGGG → GTGG	++	++ @ 3
	*		
1 0 0 5	TGCA → TTCA	+	+

@1 核糖体RNA (16S) 结合位点: AGGA 的分裂

@2 终止密码子UGA的产生

@3 生产一种强化因子序列GGTGTGGTAAAG (Watson et al., 1987, Dynan and Tjian, 1985, Schaffner et al., 1985) 和加强表达。

通过方法中所述的转染分析测定细胞转化并通过Northern 印迹反应分析用 [³²P] 3.1 Kb hhc^M DNA 测定转染细胞中的mRNA 合成。

实施例 3

Hhc^M—p 5 2 和抗—p 5 2 以及它们在人类肝细胞癌和涉及肝脏肿瘤前病理状态中作为筛选和诊断剂的应用。

通过上述的细菌系统以高水平产生融合蛋白 Hhc^M—p 5 2 (图 5)。用这种蛋白质产生一组抗涉及人肝细胞癌蛋白的单克隆和多克隆抗体 (见图 6 A 和 6 B)。产生了一种抗 hhc^M—p 5 2 的一种多价抗体, 抗—p 5 2, 并且在抗非洲人 (Mahlavu) 肝细胞癌和费城 (Philadelphia) 肝细胞癌方面它具有高度特异性 (图 6 A 和图 6 B)。

肿瘤样本提取物必须与具有或不具有放射活性或免疫荧光标记的抗—p 5 2 反应进行扩散和免疫沉淀来测定癌样本中肝细胞癌特异蛋白 p 5 2 的存在。还可以将用放射活性化合物或发色团标记的抗—p 5 2 分别用于 R I P A 或颜色变化测定试验来检查病人脱落在血清和尿样本中的肝细胞癌相关蛋白的存在。还可以使用与一种荧光化合物或其他合适的化合物结合在一起的抗 p 5 2 进行系统造影, 通过荧光成像分析扫描来就地确定癌前或癌瘤部位。确定了损害部位则可以进行外科激光切除和/或其他治疗。

适当标记的 Hhc^M—p 5 2 核苷酸序列可用于活组织样本中肝细胞癌的诊断。在怀疑有癌前结节或肝癌的病人穿刺活检组织样本中可以检出 Hhc^M 相关核酸序列。这项工作的完成是通过使用 hhc^M—p 5 2 序列片段作为引物通过聚合酶链反应使 “hhc^M—类似” 序列放大, 然后用标记的 hhc^M—p 5 2 作为 D N A—D N A 杂化反应的探针来检查活检组织样本中 hhc^M—类似序列的存在。这种举例见图

7 所示。

本发明涉及的转化大肠杆菌细胞 pN⁺pM-1 已于 1990 年 12 月 19 日保藏于中国武汉的中国典型培养物保藏中心，保藏号 CCTCC No: M90069。

在本文中引用的所有参考文献的全部内容通过参考被结合在本文中。

为了清楚易懂本发明已被详细地描述。本领域的熟练人员通过阅读本发明说明书，可以在不超出本发明实际范围的情况下对本发明在形式上和细节上作出各种不同的改变。

说明书附图

81	* 54									
	ATA TAA AAT ACC ACT TAA ACA TAA GGA AAA ATG MET									
27	AAG CTT AAT AGA AAA TAT GAG CAA CAT ACA CAA ACA TTA GCA ACA ATG ATA TAA AAT ACC ACT TAA ACA TAA GGA AAA ATG MET									
108	TTG CCC TTC ACT TGT GGA AGA AAT GCA AAT GAA AAC AGC CCT AGG GAT GTT GAC GTT GGG GTG GCA CCT GCT GCA GAG GGT	135								
	Leu Pro Phe Thr Cys Gly Arg Asn Ala Asn Glu Asn Ser Pro Arg Asp Val Asp Val Gly Val Ala Pro Ala Ala Glu Gly									
189	AAC GTG CAG CAT GTC GAG GGC AGC ACT GCC AAG GCT GGT TTG AGC TCA AGG TCA GGT GGA GGT AGT CTC TCC CAT CTC	216								
	Asn Val Gln His Val Glu Gly Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu Ser Ser Arg Ser Gly Gly Gly Ser Leu Ser His Leu									
270	TTC TGC GAG TGC AGC TCT AAA CCC TGC CTG AAA CAC CAC GTG GAG AAG CTA TCT GAG CTG CCT CCA GGA CAC ATG CAA ATG GAC	297								
	Phe Cys Glu Cys Ser Ser Lys Pro Cys Lys Lys His Val Glu Lys Leu Ser Ser Arg Ser Gly Glu Leu Pro Pro Gly His MET Gln MET Asp									
351	ACT CTG ATC ATA AAA TTA TCA GGA AGA TTG AGA AAT AAG ACA AAA ATG GAG GTG CCA CCA AAC CAG TGG AAA TTT TTC CCC	378								
	Thr Leu Ile Ile Lys Leu Ser Gly Arg Leu Arg Asn Lys Thr Lys MET Glu Val Pro Pro Asn Gln Trp Lys Phe Phe Pro									
432	TTT TCA TTC CTC TGG CAT TCC CTG GCC TTG ACT CAA GGC AGC CCA CAC TCT AGG AGC AGA CAC CAG GGC ACA GGT GGG GAG	459								
	Phe Ser Phe Leu Trp His Ser Leu Ala Leu Thr Gln Gly Ser Pro His Ser Arg Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Gly Glu									
513	CTC TGG GGG ACC CTC CAG GCT TAC TCA GTG AAT GGG TTA GCA GCA GCC ACA GGA GCC ACC ATG GAG CCT GCA GGG ACC CAC	540								
	Leu Trp Gly Thr Leu Gln Ala Tyr Ser Val Asn Gly Leu Ala Ala Thr Gly Ala Thr MET Glu Pro Ala Gly Thr His									

594 AAC ACT GAG GGC AGG GAT CTT GCC TCT AAT CAG ATA AGC TGT GAT TCC CGA GAG GGT GGG GTA AAG GCC ACG GGT CTT TTT 648
 Asn Thr Glu Gly Arg Asp Leu Ala Ser Asn Gln Ile Ser Cys Asp Ser Arg Glu Gly Val Lys Ala Thr Gly Leu Phe
 675 CTC TCC ACA TCT TCC CAC GTC ATG ACC CCA GAG GGT CGA AGA GGG AGA AAG TGT GAG CAC CGT GAC ATA ATG AGC CGC AGC 729
 Leu Ser Thr Ser Ser His Val MET Thr Pro Glu Gly Arg Arg Gly Arg Lys Cys Glu His Arg Asp Ile MET Ser Arg Ser
 756 CTT CTG ACT AGA TGC CCC AAA GAA GAA TCC CAG GTG ACC ACA CAG CAT CAG AGA AAC TGC AGG GTA ATG AGG AAC TTT GGA 810
 Leu Leu Thr Arg Cys Pro Lys Glu Glu Ser Lys Gln Val Thr Thr Gln His Gln Arg Asn Cys Arg Val MET Arg Asn Phe Gly
 837 AAG CAA TCC ATC GTG TTG TCA AAA CCT CTG GCT CAC TCC CGA GCT GGG CAT GCA TGG ATG GTG ACC CTC GAT GGA ATA 891
 Lys Gln Ser Ile Val Leu Ser Val Lys Pro Leu Ala His Ser Arg Ala Gly His Ala Trp MET Val Thr Leu Asp Gly Ile
 918 GAC TAT GAG GAA CCA GGT GAG GGG ATC TAC CTC CAC CGA GAC GTG AGA GTG ACC TGC ATA CCC AAA CAC CAT GAG GCT TTA 974
 Asp Tyr Glu Glu Pro Gly Glu Gly Ile Tyr Leu His Arg Asp Val Arg Val Thr Cys Ile Pro Lys His His Glu Ala Leu
 999 AAG ACT GAG CTG ATG TGG AAG CCA CAG CCT CTG CAG GTT GCT CTG CAC TTG CAA CAT AAG CCC AAC CAC ATC AAT TGC TGC 1053
 Lys Thr Glu Leu MET Trp Lys Pro Gln Pro Leu Gln Val Ala Leu His Leu Gln His Lys Pro Asn His Ile Asn Cys Cys
 1080 AAA ACA AAA CTA CAG CAT TCT CCA TAC CAC TTA AAT AAG ACA CAG AGT CTC ACA ACA TTC AAA ACG CCC AGG ACA CAA TCC 1134
 Lys Thr Lys Leu Gln His Ser Pro Tyr His Leu Asn Lys Thr Gln Ser Leu Thr Thr Phe Lys Thr Pro Arg Thr Gln Ser

1161
 AAA ATT ACT TCT ACA AAA AAT CAG GAA AAT CTC AAT GAG CAA GGA AAA TGG CAA TCA GTA GCT GCC AGT GCT GAG ATG ACA
 Lys Ile Thr Ser Thr Lys Asn Gln Glu Asn Leu Asn Leu Asn Gln Glu Lys Trp Gln Ser Val Ala Ala Ser Ala Glu MET Thr 1215

1188
 ATG AGG GTT GGA ATC ATC AAC ATC TTT AAA GTA ATT ATC ATA AGC ATT CTC CAG CAA GTA ATG GCA AAC ACT CTT GAG ATA
 MET Arg Val Gly Ile Ile Asn Ile Phe Lys Val Ile Ile Ser Ile Leu Glu Gln Val MET Ala Asn Thr Leu Glu Ile 1296

1270
 AAT GGA AAG ATA AGA AGG CTC AGG GAG AAA GTG GAA TGT ACA AAG AAT GAC CAA GTG GGA ATT GCA CCA CTG GAA ACA AAT
 Asn Gly Lys Ile Arg Arg Leu Arg Glu Lys Val Glu Cys Thr Lys Asn Asp Gln Val Gly Ile Ala Pro Leu Glu Thr Asn 1377

1350
 CAC CAG GAT AAA GCA GTC TCT GGC TGG GCC AAC AGG AGA ATG GAA ATG AAA AGG GAA AGA GTT GTT ATG GCA GTT GTC CAA
 His Gln Asp Lys Ala Val Ser Gly Trp Ala Val Asn Arg Arg MET Glu MET Lys Arg Glu Arg Val Val MET Ala Val Val Gln 1458

1404
 TTT GAA CAA CAC AAA AGA CAC TGA TTT AAA AAA AAA TGA GGC AGG GCT CAG TGG CTC ACA CCA ATA ATC CCA ATA CCT TGG
 Phe Glu Gln His Lys Arg His 1539

1485
 GAG GCC GAG GCA ATG TAT CAC CTG AGG TCA GGA GTT CAA GAC TAC CCT GGC CAA CAT GGC AAA ATC CCA TCT CTA CTG AAA
 1593
 1620
 ATA CAA GAA TTA GCT GGG CAT GGT GGC AGG TGC CTG CAA TCC CAG CTA CTC AGG AGG CTG AGG CAG GAG AAT CAC TTG AAC
 Ile Gln Glu Leu Ala Gly His Gly Gly Arg Cys Leu Gln Ser Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg Gln Glu Asn His Leu Asn 1701

TCG GGA GGT AGA GGG TGC AGT GAG CCA AAA TCG CAC CTC TGC ATT CCA GCC TGG GTG ACA GAG GGA GAC TCT GTC TCA AAA Ser Gly Gly Arg Gly Cys Ser Glu Pro Lys Ser His Leu Cys Ile Pro Ala Trp Val Thr Glu Gly Asp Ser Val Ser Lys	1728	1755	1782
CAA AAC AAA ACA AAA AAT GAA CAG CAC CTC AGG AAC AAT ACC AAA AAG TCC AAC AGC TGT ATA ATT GGT GGC CCA GAA GGA Gln Asn Lys Lys Thr Lys Asn Glu Gln His Leu Arg Asn Asn Thr Lys Lys Ser Asn Ser Cys Ile Ile Gly Gly Pro Glu Gly	1809	1836	1863
GAG GAG AAA GAG TGG AGT ACA GAA ATG AGA TCT GAA GAA CTA ATG ACT GAT AAT GTT TCA ATT TTG AAA AAG GAC ATA AAC Glu Glu Lys Lys Glu Trp Ser Thr Glu MET Arg Ser Glu Glu Leu MET Thr Asp Asn Val Ser Ile Leu Lys Lys Asp Ile Asn	1890	1917	1944
CTA AAG ATT ATA GAT TCA AAA GCC CAG CTG AAT TCA AAT AGG ATA AAT ACA GAT GCA GAT ATA TTA TCA TTA AAC TGT GAA Leu Lys Ile Ile Asp Ser Lys Ala Gln Leu Asn Ser Asn Arg Ile Asn Thr Asp Ala Asp Ile Leu Ser Leu Asn Cys Glu	1971	1998	2024
ATA AAT TGG TTT TGT CAC AAG CCA GCA TTG TCA CTG TGG GAG AAA AGA GAT CAA AAG TAC ACA AGG AAG GAA GGA AAT ACA Ile Asn Trp Phe Cys His Lys Pro Ala Leu Ser Leu Trp Glu Lys Arg Asp Gln Lys Tyr Thr Arg Lys Glu Gly Asn Thr	2052	2079	2106
GAA TAT TAT GGC CAT GGG AAA GAG GTG TCA GTG TGA ATA CAT AGA ACA GCA CAC TTA AGC AAC AAC CCC AAA TGA TGG GGC Glu Tyr Tyr Gly His Gly Lys Glu Val Ser Val • Ile His Arg Thr Ala His Leu Ser Asn Asn Pro Lys • Trp Gly	2133	2160	2187
TTC CTA CAA AAC AGT TGG CCT TTA CTC TTC AAA AGT GTC AGG TCA CGA AAT AAA TCC ATG CTG AGG ACC CGT TCC AGG TTA Phe Leu Gln Asn Ser Trp Pro Leu Leu Phe Lys Ser Val Arg Ser Arg Asn Lys Ser MET Leu Arg Thr Arg Ser Arg Leu	2214	2241	2268

AAG CAG ACT AAA GGG GCT GGA CAA CAC AGT GAA ACG TGT GAG CTT GGA TTA GAT ATA TGC TGG ACT AGA GAA GGC TGT GAG Lys Gln Thr Lys Gly Ala Gly Gln Pro Ser Glu Thr Cys Glu Leu Gly Asp	2295	2322	2349
GGG GAC AAT GGC TGA AAT GTG AAT GAG GTT ACT ATA GTT ATG AAA AAT GTT AAG ACT TGG AAA ATC TAT ATA AAG CAG ACG	2376	2457	2484
GCA TAA TTC TTG TAC TTT TTT TGC AAC TTT TTA ATA AAC CTG AAA CTA TTT CAA AAT GAA AAG TTA ATC CAA GCT GTC TTG	2511	2538	2565
AGT AGA AGT TAA AAC AAC AAC AAA AGA AAA TTG AAA AGT TAA AAA TGA ACC CCC AAC AGA ATG TTC CCC TTT ATT TTT	2592	2619	2646
CTT TCA TGT AAG GAC GCA GGA TAT GCA TTT TGC TCA GCT ACC ACC CTT CAC TGC ATC CCA TTT TGA GAA GTG GTA TTT TCT	2673	2700	2727
ICA TTC ATC TGT TCT AGG TTT TTA AAA AAA TAT TTA AGA TCT TCT CTT TTT AAA GAA TCT GTT CAT TTG GAA TGT ACT TTT	2754	2781	2808
TGC ATT TTT ACT TGT GAA AAT ATG TAT TTA TCC TTT TTG TTA TGA ATG TAT GAC TTC ACT GTG TCA GAG AAT ATG GTC TTA	2835	2862	2889
AGA GAT ACA GAA AAC TTT TGA GAA TGA TAA GAT CTG GAC ATG CTG GAT GAA ATC AAA GCC CTG GAT GTC CTT GTT CAA GCT T	2916	2943	

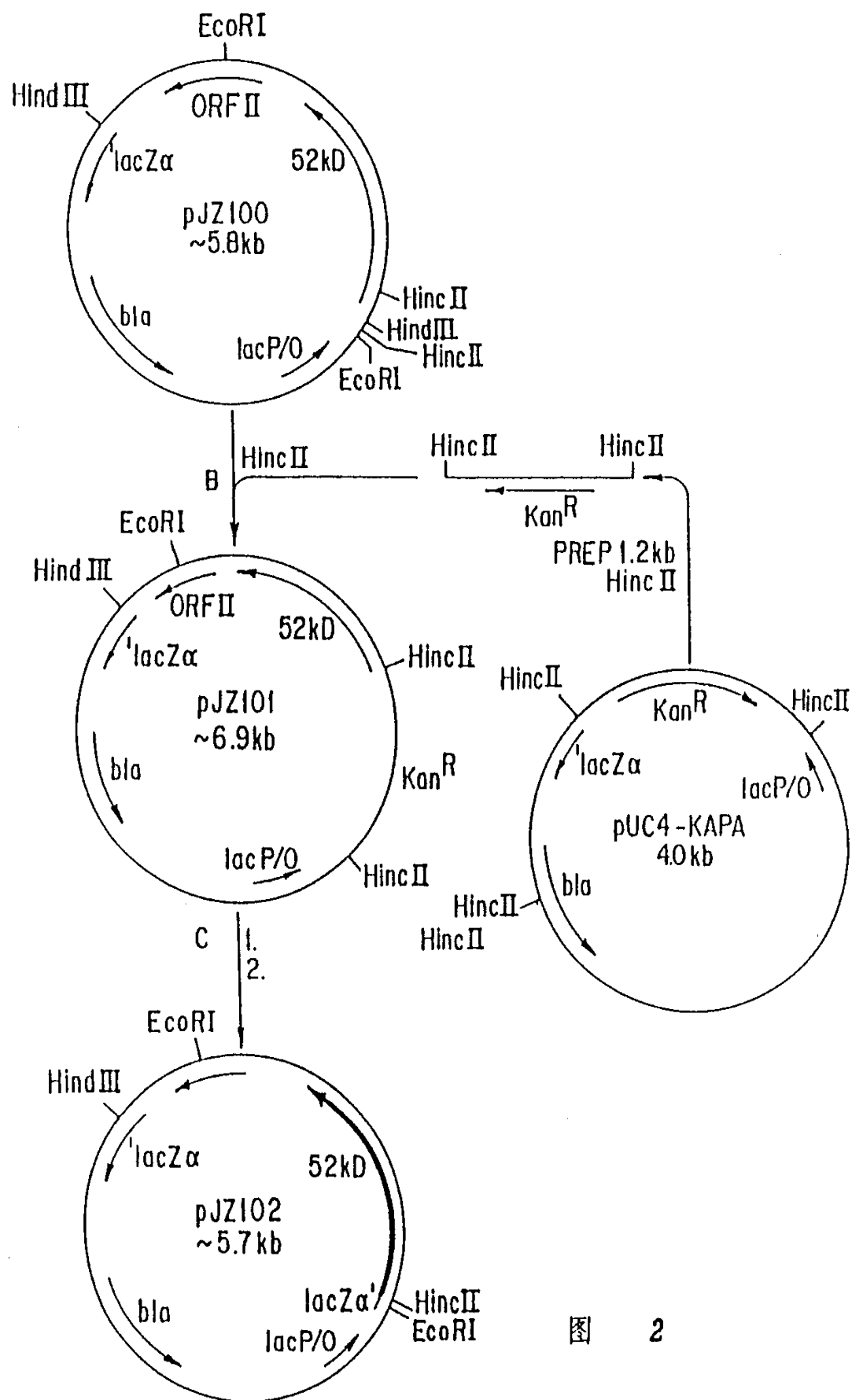


图 2

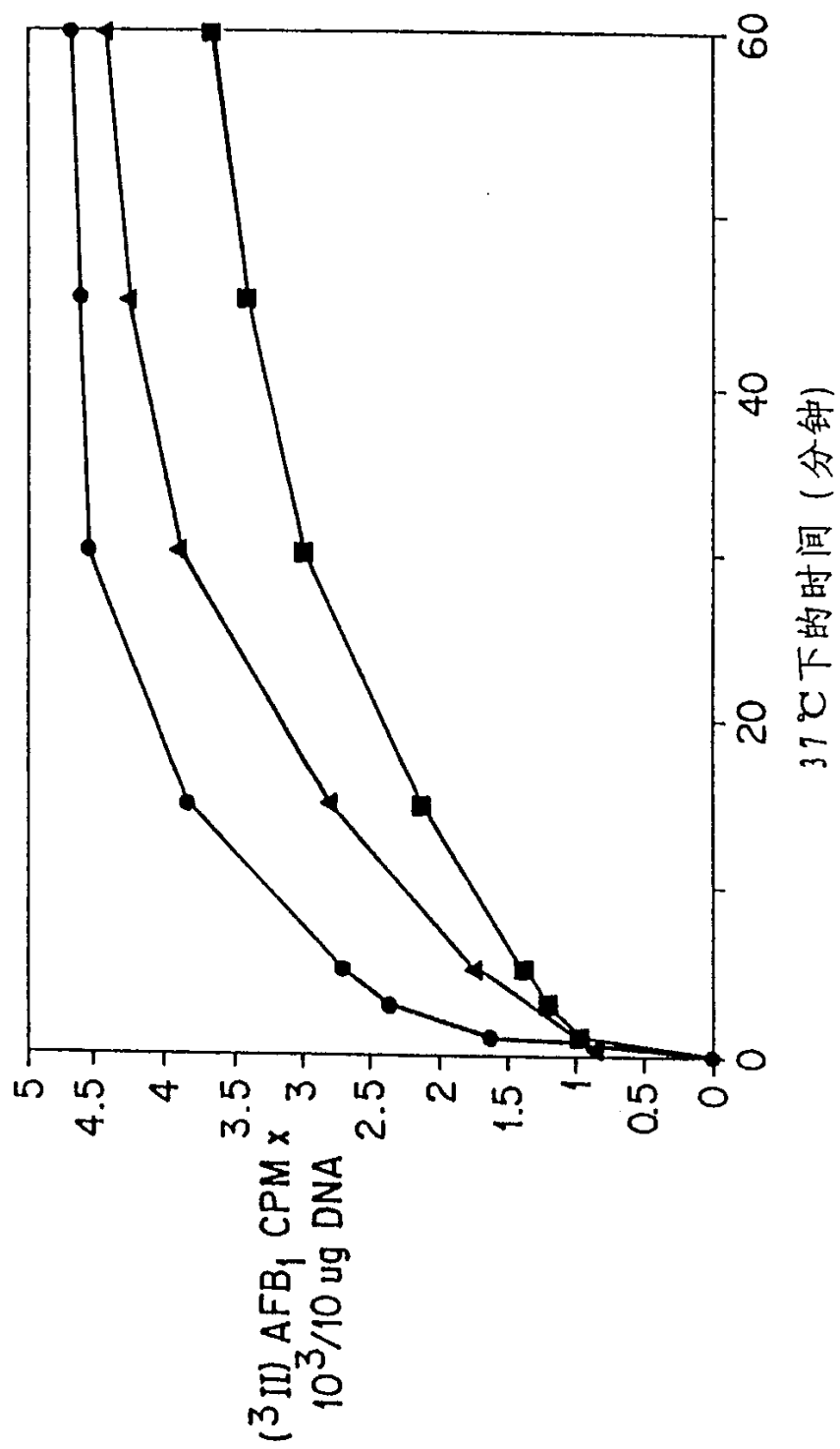
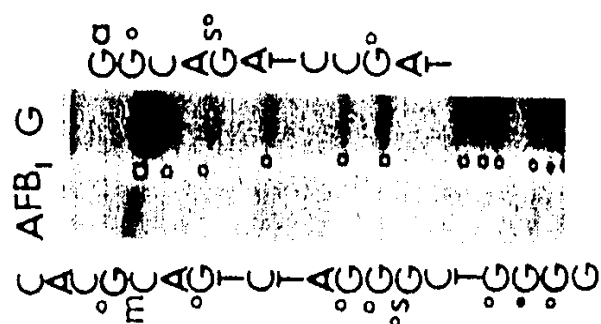
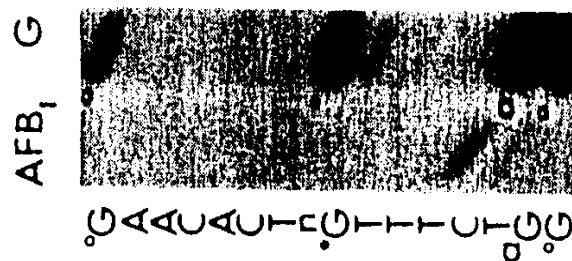
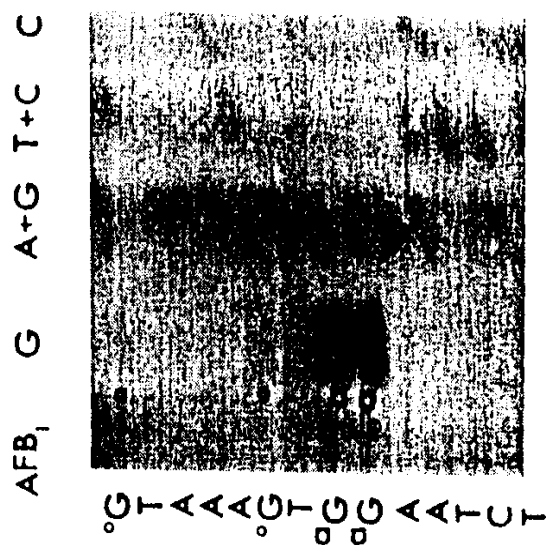


图 3

图 4



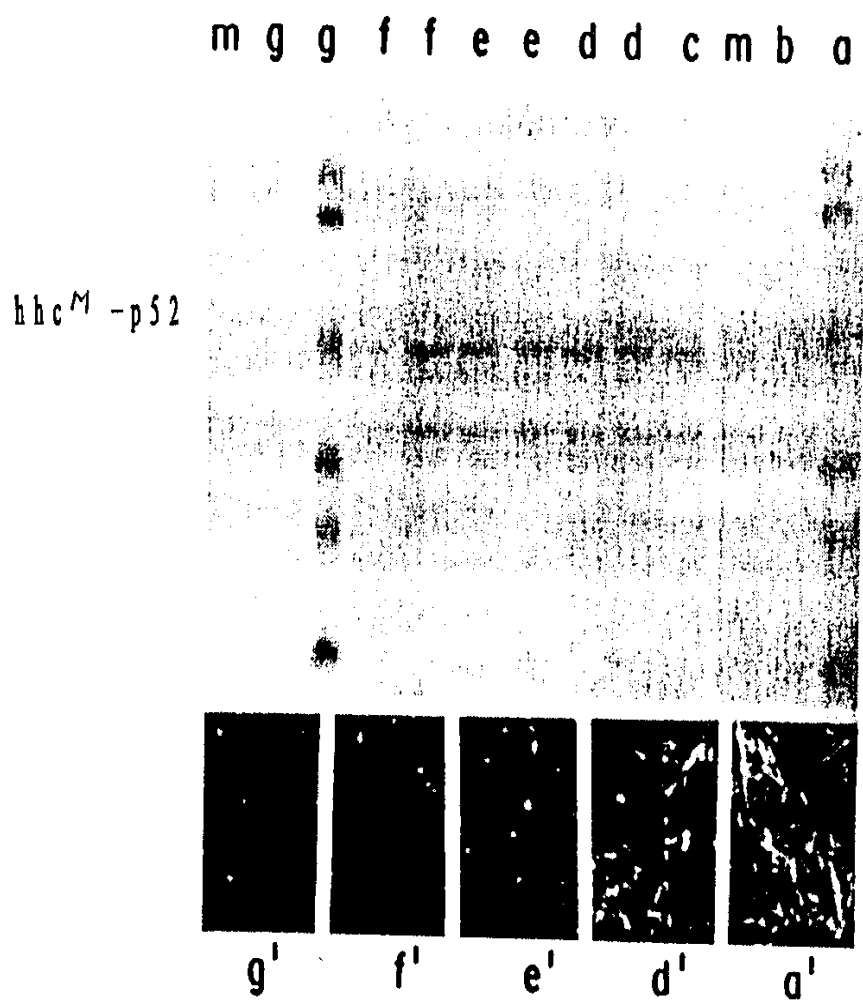
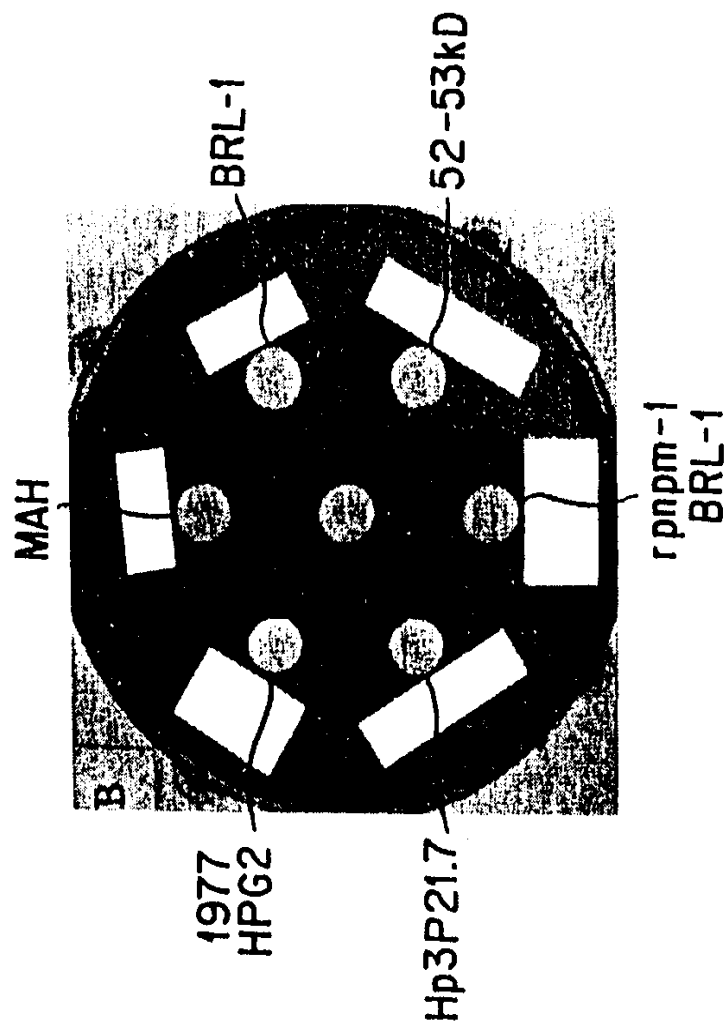


图 5

图 6B



与肝细胞癌蛋白反应的抗-P52

图 6A

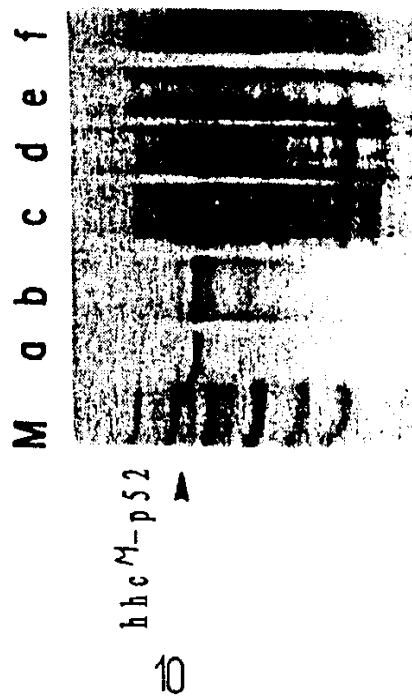
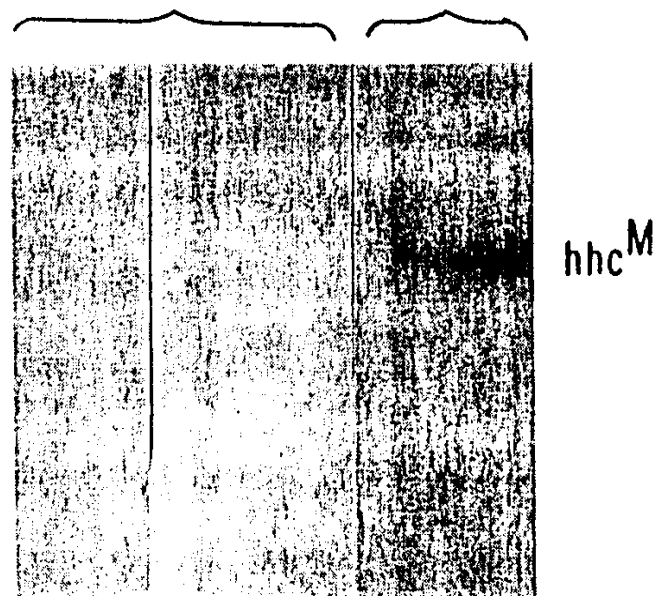


图 7



PCR 放大的肝细胞癌样本与
³²P-hhc^M DNA 进行DNA-DNA 杂交反应。