

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00803447.8

C12N 15/87 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 7 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1262668C

[22] 申请日 2000.1.3 [21] 申请号 00803447.8

[30] 优先权

[32] 1999. 1. 8 [33] DE [31] 19900513.3

[32] 1999. 7.20 [33] DE [31] 19933939.2

[86] 国际申请 PCT/DE2000/000061 2000.1.3

[87] 国际公布 WO2000/040742 德 2000.7.13

[85] 进入国家阶段日期 2001.8.3

[71] 专利权人 阿马克萨有限公司

地址 德国科隆

[72] 发明人 G·希本科顿 R·克里斯汀

审查员 彭郁葱

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李 瑛

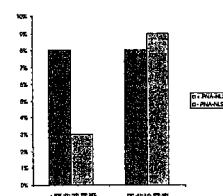
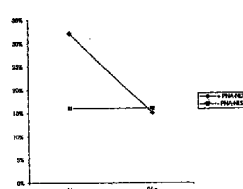
权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 4 页

[54] 发明名称

转移核酸通过核被膜的细胞转运系统的用途

[57] 摘要

本发明涉及一种核转运剂、一种含有所述核转运剂的基因转移系统、一种使用所述核转运剂将 DNA 转运到真核细胞核中的方法以及所述核转运剂在治疗癌症、病毒感染、神经系统疾病、移植排斥和单基因或多基因遗传疾病的基因疗法中的用途。



1. 一种用于将核酸从真核细胞的细胞质转运到细胞核中的核转运剂，由两个模件 A 和 B 组成，其中模件 A 与 DNA 序列特异性结合，并且不导致形成含一个以上 DNA 分子的复合物，所述模件 A 是以序列特异性方式结合核酸的肽、蛋白质或肽核酸，并且其中模件 B 含有延长的核定位信号，该延长的核定位信号因其大致中性的净电荷不介导该核转运剂与该 DNA 非特异性结合。

2. 根据权利要求 1 的核转运剂，其中模件 A 是与 DNA 末端序列特异性地结合的逆转录病毒整合酶。

3. 根据权利要求 1 的核转运剂，其中延长的核定位信号含有核定位信号和 2-40 个侧翼带负电荷的氨基酸。

4. 根据权利要求 1 的核转运剂，其中模件 B 含有不是延长的核定位信号一部分的序列，其中所述序列使该延长核定位信号具有较好的空间定位，所述较好的空间定位是与 DNA 分子的距离增加，或其中所述序列用于引入预定的断裂点。

5. 根据权利要求 1 的核转运剂，其中模件 B 除了含有延长的核定位信号之外还含有非核定位信号。

6. 一种基因转移系统，含有权利要求 1-5 任一项的核转运剂和阳离子脂质、肽、多胺或阳离子聚合物。

7. 一种将 DNA 转运到真核细胞的核中的体外方法，其中所述细胞同时用待转运的 DNA 和权利要求 1-5 任一项所述的核转运剂转染，并且所述 DNA 与所述核转运剂相互作用。

8. 如权利要求 7 的方法，其中所述真核细胞为初级细胞。

转移核酸通过核被膜的细胞转运系统的用途

本发明涉及一种核转运剂、一种含有所述核转运剂的基因转移系统、一种使用所述核转运剂将 DNA 转运到真核细胞核中的方法以及所述核转运剂在治疗癌症、病毒感染、神经系统疾病、移植排斥和单基因或多基因遗传疾病的基因疗法中的用途。

向核中的主动转运是将遗传材料转移到在打算表达遗传材料之前的时间内不分裂的所有细胞中必不可少的。由于核酸的核转运系统有利于有效地将 DNA 转移到很少分裂或根本不分裂的这些细胞中，因此核酸的核转运系统非常重要(Dowty 等人, 1995, Wilke 等人, 1996)。大多数初级细胞属于这一类。初级细胞在科学上最感兴趣有两个原因。首先，刚从生物体中分离的所述细胞反映的细胞类型的功能状态比由此获得的细胞系的好得多。其次，它们是基因疗法的靶细胞。此外，核转运系统通过使这些细胞也能表达转移的遗传材料增加了 DNA 向建立的细胞系转移的效率，它们在转移开始和分析之间的时间内尚未分裂。

遗传材料在细胞核中有活性。其中的转运或者可以在核被膜在有丝分裂过程中临时分裂时在细胞分裂期间同时进行或者它必须主动地进行。

1) 通过核定位信号将核蛋白转运到该细胞核中。

包封该核的双层膜具有孔。小分子可以经扩散通过这些孔。为了能够进入核，大于约 50kDa 的蛋白质需要一核定位信号(NLS)，该信号必须通过转运机器识别。典型地，足够的信号由 4-8 个氨基酸组成，富含正氨基酸精氨酸和赖氨酸并含有脯氨酸。它在进化中强烈地保守，这样哺乳动物 NLS 也在酵母中起作用。异源 NLS 还可以用作将靶分子转运到核中的工具。为此，NLS 可以相对随机的位置加入到胞质蛋白质的序列中，或者可以化学偶联到蛋白质或者甚至金颗粒上(参见 Görlich, 1998)。

2) 许多病毒使用其细胞的核蛋白转运机将其 DNA 转运到其核中。

能够感染静息细胞的 HIV 和其它慢病毒使用病毒蛋白和细胞转运机器将其 DNA 转运到其核中。Vpr 中的 NLS 和 HIV 预整合复合物中的基质蛋白 (Gallay 等人, 1996) 是感染不分裂的细胞所必需的 (Naldini 等人, 1996)。尽管几乎不知道病毒是如何将其基因组转移到其核中的, 但是含有 NLS 的病毒结构蛋白的帮助甚至可能是一般原理。通过以下观察也暗示了这一点: 在 HSV 衣壳蛋白中的特异性突变防止了病毒 DNA 向其核中的转运 (Batterson 等人, 1983)。腺病毒 DNA 与分裂衣壳的六邻体蛋白一起转运到核中 (Greber 等人, 1993)。SV40 DNA 向核中的转运由保持与 DNA 结合的病毒蛋白 (可能是 Vp3) 介导 (Nakanishi 等人, 1996)。含有 NLS 的两种细菌蛋白负责根癌土壤杆菌 T-DNA 向植物细胞核的输入 (Citovsky 等人, 1994)。

由于一些病毒能够感染静息细胞, 因此将例如 HIV、腺病毒和疱疹病毒的突变体变体用作开发基因疗法方案的 DNA 转移载体。首先, 这涉及与病毒组分的免疫反应的危险 (Friedmann 1994, 1996), 其次, 将辅助细胞系用于这些系统, 为此不能排除突变较少的病毒基因组的释放。而且, 这些系统难以操纵。

已描述了通过含有核定位信号的肽或蛋白质推断提高转染效率的几个人工系统。

A) 蛋白质

Kaneda 等人 (1989) 以及 Dzau 和 Kaneda (1997, US5, 631, 237) 描述了一种基因转移系统, 它是以使用仙台病毒、脂质体和意思是支持 DNA 的核转运的加入的蛋白为基础。为此, 该组使用 HMG-1 (“高迁移率组 1 蛋白”), 一种与 DNA 结合的碱性非组蛋白的染色质蛋白质。HMG-1 通过一长碱性区与 DNA 结合。它位于核内, 但没有已知的 NLS。在体外, HMG-1 蛋白质与载体 DNA 形成复合物。纯化 HMG-1 的生产费用高且为劳动密集型。

Mistry 等人 (1997) 描述了与 HMG-1-介导的核转运有关的实验。由于作为复合 DNA 的转染试剂的其正电荷 HMG-1 在这里用于使 DNA 通过细胞膜。Wako BioProducts 公司 (Richmond, VA, USA) 作为介导核转运的脂转染试剂的添加剂销售 (1997) 蛋白质 HMG-1 和-2。

Fritz 等人(1996)用小牛胸腺组蛋白或由 SV40 NLS 和人组蛋白 H1 组成的重组蛋白进行了一相似试验。这两种蛋白都明显地与 DNA 形成大的复合物, 正如出版物中所示, 它们适宜通过细胞膜, 但不适宜核转运。

B) 由于含有 NLS 序列的合成肽生产简单且费用较低, 因此也使用它们。

P. Aleström 的小组(Collas 等人, 1996, Collas 和 Aleström, 1996, 1997a, b)使用来自 SV40 的 NLS 肽复合 DNA, 并通过该细胞将其转运到核中。该 DNA 的结合仅通过对其功能必不可少的 NLS 的正电荷氨基酸发生。只要 DNA 与肽复合, 这将导致遮蔽核转运蛋白的实际信号。在由海胆精子在体外形成的分离雄性原核中, 当它们在斑马鱼受精卵的溶胞产物中培养时, 能观察到荧光标记的 DNA 的 NLS 依赖性转运。在摩尔比 $\geq 100:1$ (NLS 肽:载体)和载体拷贝/细胞 ≥ 1000 时, 在斑马鱼胚胎中, 当将载体 DNA 微量注射到细胞的细胞质中时, 观察到荧光素酶表达增加。(在 100 个肽/载体和 1000 个注射载体下与 0 个肽比较获得了六倍增加。)由于其密度高, 可能并非所有 NLS 都与该 DNA 完全结合, 并且因此部分仍是转运机器可及的; 这可能是为什么完全可以观察到作用的原因(参见 Sebastyén 等人, 1998)。转运机器可能能够识别由两个肽序列组成的信号(Boulikas, 1993)。

Sebastyén 等人(1998)共价地偶联了成千上百的 DNA 分子的 SV40 NLS 肽, 并在该 DNA 链的全长上对 NLS 进行了扫描。由于其大量修饰, 该 DNA 不再能被转录。正如该文章中所讨论的, 由于空间原因, 当如此之多的 NLS 肽结合, 致使它们中间不是所有都通过与 DNA 的负电荷相互作用遮蔽时, DNA 明显地仅被转运到核中。

Gopal (US5670347)描述了一种由 DNA 结合碱性区、弹性铰链区和 NLS 组成的肽。由于在这种情况下 DNA 结合也是由氨基酸正电荷完成的, 因此试剂与 DNA 形成意味着同时用于穿过细胞膜转运的复合物。NLS 序列为什么不应参与 DNA 结合, 以致只要肽偶联其上, 核转运蛋白的实际信号就可能再被 DNA 遮蔽的原因并不清楚。而且, 产生的复合物可以变得非常大(Emi 等人, 1997, Niidome 等人, 1997, Wadhwa 等人, 1997,

Trubetskoy 等人, 1998), 这将会减少通过核孔转运 (Lanford 等人, 1986, Yoneda 等人, 1987, 1992)。还未证明起超出多阳离子肽作为转染试剂的已知功能的作用, 它支持 DNA 通过细胞膜 (Sorgi 等人, 1997, 参见 Hawley-Nelson 等人, 1997)。

Gerhard 等人 (DE-OS 19541679) 提出了用于基因转移的 NLS 多赖氨酸缀合物。在这种情况下, 由阳离子多赖氨酸、阳离子 NLS 和 DNA 组成的呈现复合物也确实遮蔽该核转运信号, 只要其与该 DNA 偶联。

Szoka (PCT1993, 权利要求 23-27) 通过一嵌入剂将 NLS 肽与 DNA 偶联。在预培养载体和肽 (比例为 1:300) 之后, 脂转染的效率增加 4-5 倍。由于其高的正电荷, 所用的 SV40 肽能够复合 DNA。DNA 与阳离子肽的复合导致通过提高穿过细胞膜的效率的脂转染效率增加 (Sorgi 等人, 1997, 参见 Hawley-Nelson 等人, 1997)。由此使核转运稍有减少, 至少当生成大的复合物时 (参见上面)。由于所用的 NLS 肽因其电荷与 DNA 结合, 因此削弱了核转运机器对转运信号的识别 (参见上面)。使用该实施例中所述的诱变嵌入剂限制其应用。Szoka 提出, 非共价且非特异性, 但是, 如上所述, 结合的转染用的其它分子也与 DNA 不能防止 NLS 肽本身与该 DNA 结合和复合。没有讨论 NLS 肽与 DNA 直接结合的问题。

Hawley-Nelson 等人 (US5736392) 描述了一种类似系统。将一 NLS 肽与载体 DNA 或者直接混合或者在与 DNA-结合分子共价偶联之后混合。然后将生成的复合物用于脂转染 (或其它转染)。在该系统中, 加入没有 NLS 的多阳离子肽增加转染效率, 甚至比加入阳离子 NLS 多。亚精胺与 NLS 肽偶联不会使转染效率进一步增加。因此, 同样在这种情况下, 经阳离子肽的 DNA 的复合仅解释了扩增作用。由于 NLS 的存在没有进一步增加转染效率, 因此可以假定核转运机器的识别序列在这种情况下也被遮蔽了。

TIB Molbiol 公司 (传单 1998) 描述了 PNA 寡核苷酸和 C-端 NLS 肽一起转运以特异性地抑制选择基因的表达。该 NLS 用于将这些 PNA 寡核苷酸转运到核中, 以便它们然后可以与其靶序列杂交。

迄今, 将 DNA 转运到核中的已知试剂的缺陷是效率非常低。该低效

率不足以使静息细胞成为可转染的。

因此，本发明的问题在于提供一种核转运剂，它可将 DNA 有效转运到核中，从而静息或仅非常缓慢分裂的细胞也变为可在有用程度上转染的。

该问题通过一由两个模件 A 和 B 组成的核转运剂得到解决，其中模件 A 特异性地与 DNA 结合，不会导致通过非特异性结合形成含一个以上 DNA 分子的复合物，并且模件 B 含有不与 DNA 非特异性结合的核定位信号或非 NLS 信号。本发明的优选核转运剂含有与 DNA 序列特异性地结合和/或与 DNA 端特异性结合的模件 A。特别优选的是其中模件 A 为一合成肽、蛋白质或肽核酸 (PNA) 的核转运剂。

在本发明核转运剂的另一实施方案中，模件 B 含有一因其电荷不与 DNA 形成复合物的延长核定位信号。优选核转运剂中模件 B 含有一具有几乎中性净电荷的延长核定位信号。特别优选核转运剂中模件 B 含有一含核定位信号和侧翼带负电荷的氨基酸的延长核定位信号。NLS 序列不必与天然存在的 NLS 序列相同，但是也可以为基于理论考虑的氨基酸序列，只要它起 NLS 的作用。而且，模件 B 可以含有肽序列或不直接属于核定位信号或延长核定位信号的非肽组分。优选为增加核定位信号与模件 A 之间距离的组分。

而且，本发明涉及一种含本发明核转运剂和阳离子脂质、肽、多胺或阳离子聚合物的基因转移系统。

而且，本发明涉及一种将 DNA 转运到真核细胞，优选初级细胞的核中的方法，其中使用待转运的 DNA 和本发明核转运剂通过本领域已知的方法转染这些细胞。

另一实施方案涉及本发明的核定位剂在基因疗法，特别是治疗癌症、病毒感染、神经系统疾病、移植排斥和单基因或多基因遗传疾病中的用途。

本发明所用的词语“核定位信号与 DNA 的非特异性结合”是指防止核定位信号对于核转运机器是完全可识别的结合。

本发明所用的词语“模件 A 与 DNA 的特异性结合”，首先是指序列

特异性的结合，其中 DNA 核苷酸的序列对这种相互作用起着决定性作用，其次是指与由 DNA 单或双链端介导的 DNA 的共价结合。

本发明所用的词语“延长核定位信号”是指核定位信号具有附加的侧翼氨基酸。优选延长核定位信号具有 2-40，优选 4-20 个附加的侧翼氨基酸。

本发明所用的词语“因其电荷不与 DNA 形成复合物的延长核定位信号”是指模件 B 含有其电荷以如下方式分布的核定位信号：它与 DNA 非特异性地相互作用，因此对于核转运机器来说仍是完全可及的。

本发明所用的词语“几乎中性净电荷”是指核定位信号的延长部分具有与实际核定位信号的正电荷平衡的带负电荷的氨基酸，这样在延长核定位信号的整个区域中存在不超过 3 个剩余正电荷。

本发明的核转运剂具有不引起 DNA 复合的优点。另一优点是该核定位信号可以自由靠近核转运机器。避免形成削弱核转运的大的 DNA 复合物以及当使用本发明的核定位剂时核定位信号对核转运机器的可接近性，使得 DNA 向核中的转运明显更有效。

根据本发明，DNA-结合部分(模件 A)或核定位信号(模件 B)都不会导致形成大的 DNA 复合物。

模件 A

模件 A 特异性地结合 DNA，并且不引起具有一个以上 DNA 分子的复合物的形成。模件 A 序列特异性地(即仅因正电荷不是非特异性地)或者共价地与 DNA 端结合。

模件 A 可以是不同长度的肽或者蛋白质或者 PNA 序列(Nielson 等人, 1991)或者以序列特异性的方式与核酸结合的另一种物质。而且，模件 A 可以是特异性地与 DNA 结合的重组蛋白，作为例如 lac 阻抑物或其高亲和突变体(Kolkhof, 1992, Fieck 等人, 1992)、或者序列特异性地与 DNA 端(具有 LTR 核心序列)结合的逆转录病毒整合酶(Ellison 和 Brown, 1994)。

如果线性 DNA 链端具有为“自杀底物”的序列并可经拓扑异构酶裂解但不驱逐的话，那么与 DNA 链端的共价结合可以例如经痘病毒的拓扑

异构酶 1 生物介导 (Shuman, 1994)。

模件 B

模件 B 为不与 DNA 非特异性结合的核定位信号或非 NLS 信号。

本发明的术语“非 NLS 信号”是指不是核定位信号，但就转染、基因疗法或 DNA 接种而言用于将 DNA 转运到细胞中或在细胞内转运 DNA 的信号。

以下属于非 NLS 信号：细胞表面结构的配体，它能够介导 DNA 摄取，例如受体介导的 DNA 摄取；例如为了促使内体中的 DNA 过早出来而使膜去稳定化的肽；在细胞中介导与转运结构结合以利于向核中的胞内转运的信号。

核定位信号优选为因其电荷或对 DNA 结合模件 A 的空间定向不与 DNA 形成复合物的延长核定位信号(如上所定义的)。核定位信号可以经合成产生或者可以为蛋白质的一部分。

在本发明的核转运剂中使用的核定位信号中，不通过其正电荷与 DNA 结合的信号序列-有和没有侧翼区-以如下方式使用：作为大多数核定位信号的主要部分的这些电荷作为核转运机器的信号被遮蔽。

除了核定位信号或非 NLS 信号之外，模件 B 可以含有肽序列和非肽组分，它们不是核定位信号或延长核定位信号的一部分。优选它们能较好地立体定位该核定位信号，尤其是增加与 DNA 分子之间的距离。

经典的 NLS 的延长序列是完全适宜的，条件是肽的净电荷几乎能够被侧翼带负电荷的氨基酸平衡。这些氨基酸可以天然地存在于蛋白质的这些位置或者可能已在结构考虑的基础上引入。最初，将负电荷氨基酸定位与许多 NLS 核心序列相邻(Xiao 等人, 1997)。可以证明 SV40 的 NLS 作为最彻底调查过的 NLS，这些侧翼序列可明显提高核转运效率(Rihs 和 Peters, 1989, Rihs 等人, 1991, Chen 等人, 1991, Jans 等人, 1991, Xiao 等人, 1997)。仅在将其化学地偶联到已由相邻序列延长的 SV40 NLS 之后，但是不在将其与 SV40 核心 NLS 肽偶联之后，将大蛋白质(IgM)转运到核中(Yoneda 等人, 1992)。

如果 NLS 为序列特异性地与 DNA 结合的蛋白质的一部分时，这些序

列被 DNA 遮蔽的危险性相对较低。但是由于其高效率,在这种情况下也可以使用延长的 NLS 序列。

也可以使用非经典的 NLS,例如作为来自流感病毒核蛋白的 NLS (Wang 等人, 1997, Neumann 等人, 1997), 它们没有大量过量的正电荷或者不经过常规转运途径到达核中。

T. Boulikas (1993, 1996, 1997) (不完全)概述了打算用于本文的 NLS。

最后,可以使用得自核转运机器本身组分的核转运信号,作为例如输入素(importin) α 的输入素 β 结合结构域(IBM)。经过该结构域, NLS 结合蛋白输入素 α 与核转运机器的剩余部分相连(Görlich 等人, 1996, Weiss 等人, 1996)。

在另一优选实施方案中,使非 NLS 信号经 PNA (作为模件 A)与现有载体序列结合。PNA 和载体之间的结合为序列特异性的。这使得这些非 NLS 信号可以与几乎所有常规表达载体偶联,而不需要对它们进行修饰。

就 PNA 与 DNA 的序列特异性结合而言,仅使用载体的那些 DNA 序列,经 PNA 的这种遮蔽基本上不削弱 DNA 的预期目的。

在表达载体的情况下,特别是使用质粒主链中的序列,尤其是存在于大多数常规表达载体中的序列(例如氨苄青霉素抗性基因的启动子)。然而,在表达区的非编码链中结合也是可能的。序列特异性结合的优点是 PNA-肽-杂种与 DNA 简单而快速的结合。实施例 2 证实了例如 PNA-肽-杂种与双链 DNA 的简单而快速的结合反应(5 分钟, 65°C)。在 PNA 部分和实际信号之间可能有一间隔。该间隔可以增加信号与 DNA 之间的距离,从而例如减少位阻。该间隔还可用于引入预定断裂点,从而例如使内体环境中的配体分离,由此使 DNA 结合到胞吞的细胞表面受体上。

本发明首次使静息细胞或缓慢分裂细胞可转染至允许以后分析的百分数。刚从动物体或人体分离的大多数细胞(初级细胞)根本不分裂,或者难得分裂,以致在 DNA 成功地通过细胞膜转运之后,在其到达核并能够被表达之前它被失活。至此这使得初级细胞不能转染,除非它们经人工刺激培养增殖。这种不可避免的后果是这些细胞然后偏离其原始状态。

一种转染初级细胞的方法允许在体细胞的最初条件下分析遗传材料。这对于遗传机理的调查和在体细胞内加工的研究是至关重要的。

使初级细胞可转染的本发明的教导对基因疗法的完全人造的基因转移系统也是一个重要的步骤。这种基因转移系统必需具有 3 个功能性组分：一种使 DNA 通过细胞膜的组分，为此已证实阳离子脂类和其它阳离子聚合物相对适合。它必须含有将 DNA 转移到靶细胞（通常是非分裂性的）的核中的另一组分，以及介导 DNA 整合到基因组中的第三组分。在本发明中，首次描述了可以用作第二组分的有效试剂。可用于基因疗法的完全人造的基因转移载体可望比目前使用的病毒系统更容易地生产，成本更低，更易操作，并且它不易遭受这些系统的内在危险。例如已提出基因治疗方案用于治疗癌症、AIDS 和各种遗传疾病，并将在医学中发挥重要作用。

在这些至今已可转染的培养细胞中通过使那些在 DNA 通过细胞膜与分析之间的时间内不分裂的细胞可以用于摄取 DNA，本发明所述的核转运剂也可增加转染效率。由于甚至对许多建立的细胞系而言转染效率的增加将会有利于分析并且因所需细胞材料的量降低而有助于降低成本，由此这是很重要的。当然，这对于初级细胞和建立的细胞系之间的所有阶段也是如此。

以下实施例用于说明本发明，但并不打算限制本发明的范围。

实施例 1: PNA-肽-杂种

使用 NLS PNA 核转运剂。使用能够侵入 DNA 双链的 PNA 序列 (Nielson 等人, 1991, Nielson, US5, 539, 082)。

在几乎所有表达载体的质粒主链中，完全适合与 PNA 高亲和相连的两个序列位于氨苄青霉素抗性基因和复制起点中。

作为肽组分，所用的肽含有：或者

1) "SV21": $\text{NH}_2\text{-GKPTADDQHSTPPKKKRKVED-COOH}$ (肽 1; SEQ ID NO: 1),
或者

2) "SV27" $\text{NH}_2\text{-GKPSSDDEATADSQHSTPPKKKRKVED-COOH}$ (肽 2; SEQ ID NO: 2)。

以下 PNA 序列位于每个肽的 N-端。或者

A) "ori" $\text{NH}_2\text{-CCTTTCTCCCTTC-肽}$ (SEQ ID NO: 3), 或者

B) "ssp" $\text{NH}_2\text{-CTCTTCCTTTTTC-肽}$ (SEQ ID NO: 4), 或者

C) 肽-PNA 杂种序列 $\text{NH}_2\text{-CCTTT-GGGGGGG-TTCC-肽}$ (SEQ ID NO: 5), 在平均表达载体 (5kb) 中它具有约 30 个结合位点 (G=氨基酸甘氨酸)。

将 $5\mu\text{g}$ 溶于水中的载体 DNA 在 $10\mu\text{l}$ $25\mu\text{M}$ NLS-PNA 中在 60°C 下培养 10 分钟。然后用 RPMI 将该反应混合物调整至 $250\mu\text{l}$ 。

将 60-80%铺满的 5×10^6 个中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞用 5mM EDTA 脱附, 在 15ml PBS 中洗涤 (在 $50\times g$ 下离心 10 分钟)。将该颗粒再次悬浮在 $250\mu\text{l}$ RPMI 中并与预培养的 DNA 混合, 转移到电穿孔杯 (间隙宽 0.4cm) 并在室温下培养 10 分钟。电穿孔 (210V , $975\mu\text{F}$, BioRad GenePulser) 之后, 将该电穿孔杯在 37°C 下培养另外 10 分钟, 之后将这些细胞接种于预热培养基中。

为了明确地显示在实验开始和分析之间还未分裂的这些细胞被转染, 按照所述方法用 pMACS 4.1 (人 CD4 的表达载体) 转染细胞, 并且对细胞分裂的评价如下: 转染之前, 通过在 $1\mu\text{M}$ 羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯 (CFDA, SE) (Molecular Probes, Eugene, USA) 中培养将细胞标记上绿色荧光。通过细胞分裂使细胞亮度降低至 50%。使用流式细胞器 (FACSCalibur) 在单细胞水平上测得, 未分裂的细胞 (100%绿色荧光) 也表达转染的基因 (用与 Cy5 偶联的抗-CD4 抗体染色之后为暗红色荧光)。

实施例 2: PNA-NLS 与现有载体序列的快速结合

将 PNA-肽-杂种与双链 DNA 偶联。

现有载体序列可以经 PNA 用 NLS-肽几乎定量地 (90%) 标记 5 分钟。为了实现经 PNA 的热不稳定性组分的结合, 在 37°C 下培养 1 小时就足够标记大多数 DNA (表 1)。

将 100ng 表达载体在 TE ($\text{pH}7.8$) 中用 $25\mu\text{M}$ 的不同 PNA-肽-杂种在 65°C 或者 37°C 下培养 5 分钟-3 小时。这里所用的 PNA 序列 $\text{NH}_2\text{-CTCTTCCTTTTTC-COOH}$ (SEQ ID NO: 6) 与氨苄青霉素抗性基因的启动子结合。

在其 C-端定位一 21 个氨基酸的肽(肽 1)或一 27 个氨基酸的肽(肽 2)或者一 10AEEA-单位的间隔(Fmoc-AEEA-OH 间隔, PerSeptive 生物系统公司, Framingham, USA), 之后是一 27 个氨基酸的肽(肽 3)。接着用限制性核酸内切酶 Ear1 进行结合测定。限制酶切 DNA 用 YOYO (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) 染色, 在琼脂糖凝胶上分离并用荧光扫描器 (Image Plate Reader FLA 2000, 分析软件 L-Process, 1.6 版, 东京富氏胶卷有限公司) 定量。DNA 经限制性核酸内切酶 Ear1 的裂解在 PNA 结合位点受到抑制。其它 Ear1 限制位点用作该反应的内部控制。

℃	分钟	肽 1	肽 2	肽 3
65	5	94%	96%	91%
	10	96%	97%	95%
	15	96%	97%	95%
37	60	85%	90%	74%
	120	91%	91%	76%
	180	94%	94%	90%

表 1: 以输入 DNA 的百分数显示的肽标记 DNA 的部分

PNA 与 DNA 的结合反应简单、强烈且快速。这种结合几乎不可逆, 并且因此适合细胞转运过程。与蛋白质比较, 肽和 PNA 合成的费用不会太高并且可以容易且长时间地贮藏。

实施例 3: 使用 PNA-NLS 转染

在分裂细胞系中, 与未经转运的 DNA 相比, 转染 DNA 的主动核转运诱发其较快的表达。假如该转染 DNA 在细胞质中存活时间足够长, 则转染 DNA 在有和没有核转运试剂的快速分裂细胞中的表达速度应逐渐地接近。其原因是留在细胞质中的转染 DNA 在细胞分裂过程中可以到达其核中。使用阿非迪霉素可以大大降低细胞的分裂活性和转染能力。主动核转运可消除这种转染效率降低的影响。

为了电穿孔, 将 5 μ g 溶于水中的线性化载体-DNA 在有或者没有 25 μ M PNA-NLS(肽 3: NH₂-(AEEA)₁₀-GKPSSDDEATADSQHSTPPKKKRKVED-COOH) 的最终体积 10 μ l 中在 65 $^{\circ}$ C 下培养 10 分钟。下面的步骤如实施例 1 中所述。

为了脂转染, 将 3 μ g 溶于水中的载体-DNA 在有或者没有 25 μ M PNA-NLS(肽 3)的最终体积 10 μ l 中在 65 $^{\circ}$ C 下培养 10 分钟。按照厂家说明用脂转染胺试剂(Life Technologies GmbH, Karlsruhe)进行转染。

为了基本上抑制 CHO 细胞的分裂, 在没有血清情况下将细胞培养 24 小时, 之后用血清和 20 μ g/ml 阿非迪霉素(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)培养 12 小时。所有随后的脂转染步骤都是在有 20 μ g/ml 阿非迪霉素的情况下进行的。转染结果示于图 1 中。

虽然仅有几个细胞分裂, 但是与存在于大多数表达载体中的序列偶联的两个电中性 NLS 在转染之后早期能够使转染细胞的百分数加倍。因使用阿非迪霉素细胞分裂速度降低而引起的转染效率的降低可以以这种方式消除。

实施例 4: 序列特异性结合 NLS-融合蛋白

使用大肠杆菌 lac 阻抑物的高亲和结合突变体作为序列特异性 DNA-结合蛋白。该突变体对 lac 操纵基因序列具有 10⁻¹⁵M 的结合常数(Kolkhof, 1992)。该高亲和力是通过丝氨酸 61 被亮氨酸替换实现的。

这里所用的核转运蛋白缺失最后 30 个 C-端氨基酸(位置 331-360)并且位置 330 的亮氨酸被丝氨酸替换。这些突变蛋白形成同型二聚体, 而不是同型四聚体, 因此含有单个 DNA-结合位点, 而不是两个位点。但是也可以使用四聚体作为本发明的核转运剂。

这些二聚体变体各自在 N-端延伸作为一个 NLS:

“N1D” NLS1: MPKKKRKV-MKPVTLYDVA...

“N2D” NLS2: MEEDTPPKKKRKVEDL-KPVTLYDVA...

(这些 NLS-序列以黑体显示并且分别相应于 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9。序列 MKPVTLYDVA... 和 KPVTLYDVA... 表示上述大肠杆菌 lac 阻抑物。)

NLS1 相应于 SV40 病毒大 T 抗原的 NLS。NLS2 代表具有中性净电荷且

由 SV40-NLS 和来自多瘤病毒 VP2-蛋白的 NLS 的 N-端侧翼区组成的杂种。

lac-操纵基因-序列可以在大量表达载体中发现并且能够容易地与任意序列相连作为 PCR 引物的突出端。

实施例 5: 含有 NLS 的 lac-阻抑物突变体的 DNA 结合

将以下 lac-操纵基因-序列用于结合测定:

天然存在的操纵基因: AATTGTGAGC GGATAACAATT 和一完全回文操纵基因-序列: AATTGTGAGC GCTCACAATT.

将 0.7ng 长 1kb 的放射性标记 DNA-片段经限制性核酸内切酶裂解成 914bp 和 86bp 长的片段, 然后在室温下分别用 lac-阻抑物 NLS-1-二聚体或 NLS-2-二聚体培养 30 分钟。然后在聚丙烯酰胺凝胶上将这些片段分离(图 2)。含有 lac-操纵基因的 86bp-片段因特异性结合而受到阻碍。非特异性结合导致缺乏 lac-操纵基因的 914bp-片段受到阻碍。在完全特异性结合的情况下, 几乎观察不到任何非特异性结合。

其它实验证实, 使用不同条件, 例如在细胞培养基 RPMI、150mM 氯化钠或由 10mM Tris/HCl (pH 7.2)、10mM 氯化钾和 3mM 乙酸镁的缓冲液中用两个测定的操纵基因-序列都达到了稳定的结合。

实施例 6: DNA 通过 lac-阻抑物-NLS 的核转运

将约 8 μ g (100pmol) lac-阻抑物-NLS-突变体用 2 μ g (100pmol) 长 30bp 的双链 DNA 培养, 在两端用荧光染料 Cy5 在室温下在总体积 300 μ l 的 10mM Tris/HCl (pH 7.2)、10mM KCl、3mM 乙酸镁和 50 μ g/ml BSA 中标记 30 分钟。通过一 Microcon-filter (Amicon) 离心将未结合的 DNA 分离。然后将样品缓冲液改变为细胞注射缓冲液 (76mM K_2HPO_4 , 17mM KH_2PO_4 , 14mM NaH_2PO_4 (pH 7.2))。

将一由与 lac-阻抑物-突变体结合的 DNA 和荧光素标记的 BSA (BSA-FITC) 组成的混合物分别微量注射 (带 Femtotips 的 Eppendorf Transjektor 5246, 直径为 0.5 μ m, 注射压力为 55hPa, 注射时间为 0.5 秒) 到 50 个 NIH3T3-细胞中。注射 10-15 分钟之后, 经荧光显微镜检查分析细胞(图 3)。在成功注射到细胞质中之后, 仅 BSA-FITC 留在细胞质中(1a、2a 和 3a)。与 lac-阻抑物-NLS-突变体结合导致可以分析的几乎

所有细胞, 在少于 15 分钟(NLS1-二聚体, 2b)和少于 10 分钟(NLS2-二聚体, 3b)内分别将 DNA 转运到核中时, 几乎没有 DNA 留在细胞质中。对照证实, 没有结合蛋白质的标记 DNA 留在细胞质中(1b)。

实施例 7: 用 lac-阻抑物-NLS 转染

将 1 μ g 长 1.1kb 且含有一完全表达基因盒和后接一完全回文 lac-操纵基因-序列的多腺苷酸序列的线性 DNA 在 50 μ l 等渗 0.5 x RPMI (用于脂转染)或 150mM NaCl(用于使用聚乙烯亚胺的转染)中与不同浓度的 lac-阻抑物-蛋白质(分别为约 2.5 μ g、0.3 μ g 和 0.15 μ g 二聚体, 以及 5 μ g、0.6 μ g 或 0.3 μ g 四聚体)一起在室温下培养 30 分钟。按照厂家说明将样品与脂转染胺试剂(Life Technologies)或聚乙烯亚胺(PEI、ExGen 500、Fermentas)复合并添加到融合 NIH3T3-细胞中。结果示于图 4。

转染后 4 小时测定的转染效率可以由 lac-阻抑物-NLS 增加 3-4 倍。在本文所述的实施例中, 转染前, 培养粘着 NIH3T3 细胞至融合, 使得细胞分裂大大受到抑制。转染后 4 小时, 仅有几个细胞分裂。另外, 由于以下事实使在本实施例中无论如何受到限制的分裂速度对转染有关的时间减少: 经胞吞作用摄取的转染 DNA 不得不留在胞内体和随后与阳离子转染试剂的复合物中, 之后它可被转运到待表达的核中。脂转染胺试剂-DNA-复合物的存留时间可能要比与聚乙烯亚胺的 DNA-复合物的存留时间明显长, 这使得使用脂转染胺试剂的 lac-阻抑物-NLS 的作用不太清楚。24 小时后大多数细胞分裂一次, 此后有和没有核转运试剂的转染 DNA 的表达速度渐渐接近。

参考文献

Batterson, W.、Furlong, D.和 Roizman, B. (1983) “单纯疱疹病毒的分子遗传学。VIII.在释放病毒 DNA 和病毒再生循环的其它阶段有缺陷的温度敏感性突变体的进一步表征。”《病毒学杂志》45: 397

Boulikas, T. (1993) “核定位信号(NLS)。”*Crit. Rev. Euk. Gene Expr.* 3: 193

Boulikas, T. (1996) “蛋白激酶和细胞周期蛋白的核输入。”《细胞生物化学杂志》60: 61

Boulikas, T. (1997) “DNA 修复蛋白的核输入。”《抗癌研究》17: 843

Chen, Y.-R.、Lees-Miller, S. P.、Tegtmeyer, P.和 Anderson, C. W. (1991) “在氨基和羧基末端位置人 DNA 激活的蛋白激酶磷酸化猿猴病毒 40T 抗原。”《病毒学杂志》65: 5131

Citovsky, V.、Warnick, D.和 Zambryski, P. (1994) “土壤杆菌 VirD2 和 VirE2 蛋白在玉米和烟草中的核输入。”《美国国家科学院院报》91: 3210

Collas, P.、Husebye, H.和 Aleström, P. (1996) “SV40 T 抗原的核定位序列促进转基因摄取以及在斑马鱼胚胎核中的表达。”《突变研究》5: 451

Collas, P.和 Aleström, P. (1996) “SV40 T 抗原的核定位信号在体外指导质粒 DNA 输入到海胆雄性原核中。”*Mol. Repr. Dev.* 45: 431

Collas, P.和 Aleström, P. (1997a) “通过 SV40 T 抗原的核定位信号将质粒 DNA 快速导向斑马鱼胚胎核中。”*Mol. Mar. Biol. Biotech.* 6: 48

Collas, P.和 Aleström, P. (1997b) “核定位信号: 在斑马鱼中核转运质粒 DNA 的驱动力。”*Biochem. Cell. Biol.* 75: 633

Dowty, M. E.、Williams, P.、Zhang, G.、Hagstrom, J. E.和 Wolff, J. A. (1995) “质粒进入原始大鼠肌管的分裂期后核中。”《美国国家科学院院报》92: 4572

Ellison, V.和 Brown, P. O. (1994) “在整合酶和病毒 DNA 端之间的

一稳定复合物在体外介导人免疫缺陷病毒整合。”《美国国家科学院院报》91: 7316

Emi, N.、Kidoaki, S.、Yoshikawa, K.、Saito, H. (1997) “经多精氨酸介导的基因转移需要形成 DNA 聚集体的大载体-复合物。” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 421-424

Fieck, A.、Wyborski, D.L. 和 Short, J.M. (1992) “用于在真核细胞中表达的大肠杆菌 Lac 阻抑物的修饰: 核信号序列对蛋白质活性和核累积的影响。”《核酸研究》20: 1785

Friedmann, T. (1994) “神经病症的基因疗法。”《遗传学趋势》10: 210

Friedmann, T. (1996) “人基因疗法-一种未成熟基因, 但是一定不在瓶中。”《天然药物》2: 144

Fritz, J.D.、Herweijer, H.、Zhang, G. 和 Wolff, J.A. (1996) “使用组蛋白凝聚的质粒 DNA 将基因转移到哺乳动物细胞中。”《人基因疗法》7: 1395

Gallay, P.、Stitt, V.、Mundy, C.、Oettinger, M. 和 Trono, D. (1996) “karyopherin 途径在 I 型人免疫缺陷病毒核输入中的作用。”《病毒学杂志》70: 1027

Greber, U.F.、Willetts, M.、Webster, P. 和 Helenius, A. (1993) “腺病毒 2 在进入细胞过程中逐步分解。”《细胞》75: 477

Görlich, D.、Henklein, P.、Laskey, R.A. 和 Hartmann, E. (1996) “输入素-a 中的一 41 个氨基酸基元能与输入素-b 结合, 由此转运到核中。”《EMBO 杂志》15: 1810

Görlich D. (1998) “向细胞核中转运和从细胞核中运出。”《EMBO 杂志》17: 2721

Jans, D.A.、Ackerfmann, M.J.、Bischoff, J.R.、Beach, D.H. 和 Peters, R. (1991) “在 T^{124} 的 $p43^{cdc2}$ -介导的磷酸化抑制了 SV-40 T 抗原蛋白的核输入。”《细胞生物学杂志》115: 1203

Kaneda, Y.、Iwai, K. 和 Uchida, T. (1989) “在成年大鼠肝脏中与

核蛋白共引入的 DNA 的增量表达。”《科学》243: 375

Kolkhof, P. (1992) “3 个牢固结合的 Lac 阻抑物的特异性。”《核酸研究》20: 5035

Lanford, R.E.、Kanda, P.、Kennedy, R.C. (1986) “用与 SV40 T 抗原转运信号同源的合成肽诱导核转运。”《细胞》46: 575-582

Mistry, A.R.、Falciola, L.、Monaco, L.、Tagliabue, R.、Acerbis, G.、Knight, A.、Harbottle, R.P.、Soria, M.、Bianchi, M.E.、Coutelle, C. 和 Hart, S.L. (1997) “在巴斯德毕赤氏酵母中产生的重组 HMG1 蛋白: 一种非病毒基因转运剂。”《生物技术》22: 718

Nakanishi, A.、Clever, J.、Yamada, M.、Li, P.P. 和 Kasamatsu, H. (1996) “与衣壳蛋白结合启动猿猴病毒 40 DNA 核导向。”《美国国家科学院院报》93: 96

Naldini, L.、Blömer, U.、Gallay, P.、Ory, D.、Mulligan, R.、Gage, F.H.、Verma, I.M.、Trono, D. (1996) “通过慢病毒载体在体内转运基因和稳定转导非分裂性细胞。”《科学》272: 263

Neumann, G.、Castrucci, M.R. 和 Kawaoka, Y. (1997) “流感病毒核蛋白的核输入和输出。”《病毒学杂志》71: 9690

Nielson, P.、Egholm, M.、Berg, R.H. 和 Buchardt, O. (1991) “通过用一胸腺嘧啶取代的聚酰胺的链替换序列选择性地识别 DNA。”《科学》254: 1497

Niidome, T.、Ohmori, N.、Ichinose, A.、Wada, A.、Mihara, H.、Hirayama, T.、Aoyagi, H. (1997) “阳离子 α -螺旋肽与质粒 DNA 的结合及其向细胞中的基因转移能力。”《生物化学杂志》272:15307-15312

Rihs, H.-P. 和 Peters, R. (1989) “核转运动力学取决于含磷酸化位点且侧翼有猿猴病毒 40 T 抗原的亲核序列。”《EMBO 杂志》8: 1479

Rihs, H.-P.、Jans, D.A.、Fan, H. 和 Peters, R. (1991) “通过侧翼有 SV40 T-抗原的核定位序列的酪蛋白激酶 II 位点测定核细胞质蛋白转运的速度。”《EMBO 杂志》10: 633

Shuman, S. (1994) “使用牛痘 DNA 拓扑异构酶分子克隆和多核苷酸

合成的新方案。”《生物化学杂志》269: 32678

Sebastyen, M. G.、Ludtke, J. J.、Bassik, M. C.、Zhang, G.、Budker, V.、Lukhtanov, E. A.、Hagstrom, J. E. 和 Wolff, J. A. (1998) “DNA 载体化学: 信号肽与质粒 DNA 的共价结合。”《天然生物技术》16: 80

Sorgi, F. L.、Bhattacharya, S.、Huang, L. (1997) “硫酸鱼精蛋白促进脂类介导的基因转移。”《基因疗法》4: 961-968

Trubetskoy, V. S.、Budker, V. G.、Hanson, L. J.、Slattum, P. M.、Wolff, J. A.、Hagstrom, J. E. (1998) “利用模板聚合作用自装配 DNA-聚合物复合物。”《核酸研究》26: 4178-4185

Wadhwa, M. S.、Collard, W. T.、Adami, R. C.、McKenzie, D. L.、Rice, K. G. (1997) “肽介导的基因转运: 肽结构对基因表达的影响”《生物缀合化学》8: 81-88

Wang, P.、Palese, P. 和 O'Neill, R. E. (1997) “在 A 型流感病毒核蛋白上的 NPI-1/NPI-3 (Karyopherin α) 结合位点为一非常规核定位信号。”《病毒学杂志》71: 1850

Weiss, K.、Ryder, U. 和 Lamond, A. I. (1997) “hSRP1 α 的保守氨基端结构域对核蛋白输入是必不可少的。”《EMBO 杂志》15: 1818

Wilke, M.、Fortunati, E.、van den Broek, M.、Hoogeveen, A. T. 和 Scholte, B. J. (1996) “肽基转运系统的功效取决于有丝分裂活性。”《基因疗法》31: 1133-1142

Xiao, C.-Y.、Hübner, S. 和 Jans, D. A. (1997) “通过侧翼有核定位序列的双链 DNA-依赖性蛋白激酶位点(丝氨酸 120)调节 SV40 大肿瘤抗原核输入。”《生物化学杂志》272: 22191

Yoneda, Y.、Arioka, T.、Imamoto-Sonobe, N.、Sugawa, H.、Shimonishi, Y.、Uchida, T. (1987) “在核定位中所涉及的含 SV 40 大 T-抗原区的合成肽指导蛋白质向核中转运。”《细胞研究实验》170: 439-452

Yoneda, Y.、Semba, T.、Kaneda, Y.、Noble, R. L.、Matsuoka, Y.、Kurihara, T.、Okada, Y. 和 Imamoto, N. (1992) “含有核定位信号及其

SV40 T-抗原的侧翼序列的长合成肽有效地指导 IgM 向核中转运。”《细胞研究实验》201: 313

引证的专利

Dzau, V. J. 和 Kaneda, Y. (1997) “通过脂质体在体内转运治疗剂的方法。” N no.: 5631237

Gerhard, F. 、 Kuhn C-S. 、 Mittenbühler, K 和 Appel K. (Offenlegungsschrift vom 1997 年 5 月 15 日) DE19541679A1

Gopal, T. V. (1997) “肽介导的基因转移” US5670347

Hawley-Nelson, P.、Lan, J.、Shih, P. J.、Jessee, J. A. 和 Schifferli, K. P. (1998) “肽强化的阳离子脂转染” US5736392

Nielson, P. E. 、 Buchardt, O. 、 Egholm, M. 和 Berg, R. H. (1996) “肽核酸” US5539082

Szoka, F. C. Jr. “自装配的多核苷酸转运系统” (PCT, 1993 年 10 月 14 日) W093/19768, 其中的权利要求 23-27

序列表

<110> AMAXA GmbH

<120> 转运核酸通过核被膜的细胞转运系统的用途

<130> 201-1(1)

<140>

<141>

<150> DE 199 00 513.3

<151> 1999-01-08

<150> DE 199 33 939.2

<151> 1999-07-20

<160> 9

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$ $\langle 223 \rangle$

<400> 1

Gly Lys Pro Thr Ala Asp Asp Gln His Ser Thr Pro Pro Lys Lys Lys
1 5 10 15

Arg Lys Val Glu Asp
20

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$ $\langle 223 \rangle$

<400> 2

Gly Lys Pro Ser Ser Asp Asp Glu Ala Thr Ala Asp Ser Gln His Ser
1 5 10 15

Thr Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp
20 25

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> DNA 为 PNA (肽核酸)

<400> 3

cctttctccc ttc

<210> 4
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DNA 为 PNA (肽核酸)

<400> 4
 ctcttccttt ttc 13

<210> 5
 <211> 17
 <212> DNA/PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DNA 为 PNA; 混合肽/PNA 序列

<400> 5
 ccttt Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly tttcc 17

<210> 6
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DNA 为 PNA

<400> 6
 ctcttccttt ttc 13

<210> 7
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223>

<400> 7
 Gly Lys Pro Ser Ser Asp Asp Glu Ala Thr Ala Asp Ser Gln His Ser
 1 5 10 15
 Thr Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp
 20 25

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列相应于 SV40 病毒大 T 抗原的 NLS

<400> 8
 Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5

<213> 人工序列

<223> 序列相应于由 SV40 NLS 和来自多瘤病毒 VP2 蛋白的 NLS 的 N-端侧翼区组成的中性杂种

Met Glu Glu Asp Thr Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Leu
1 5 10 15

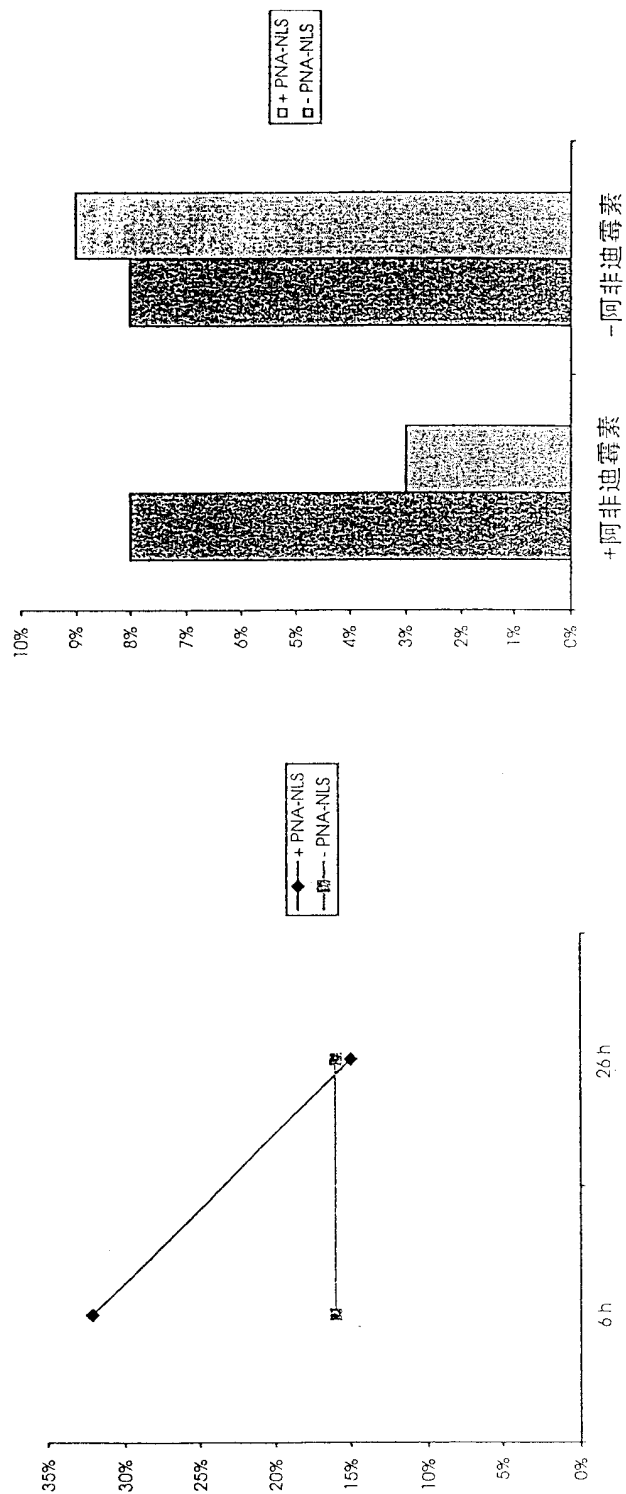


图 1

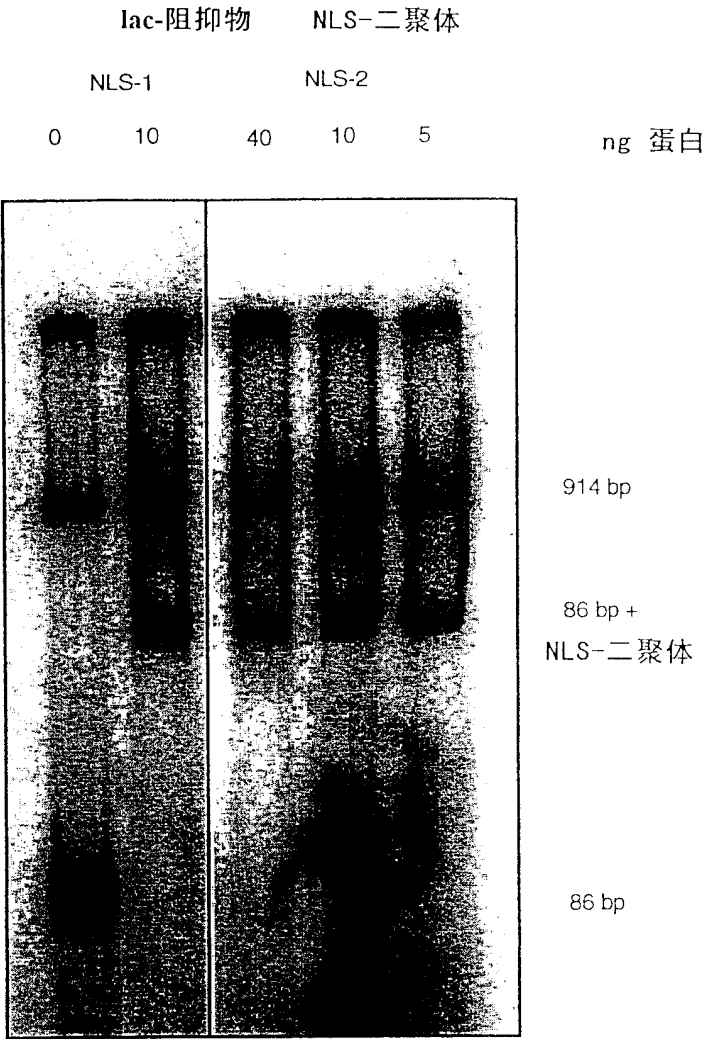
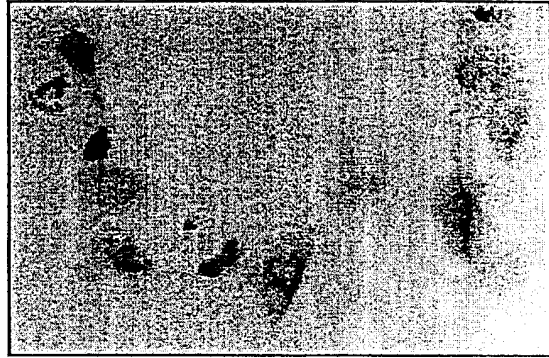


图 2



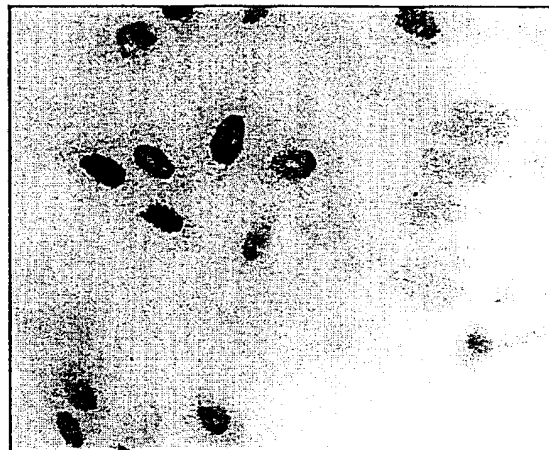
1a



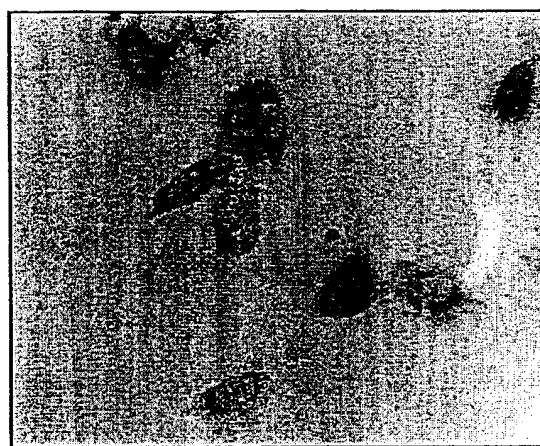
1b



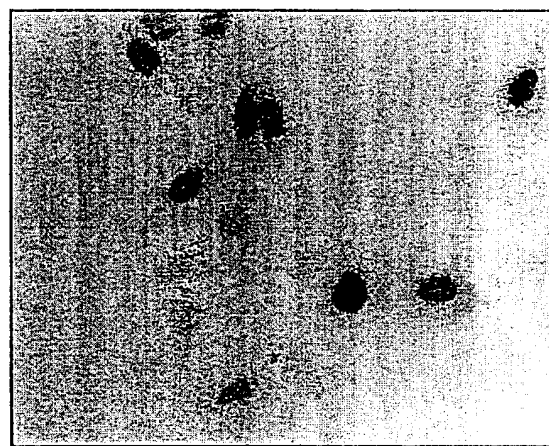
2a



2b



3a



3b

图 3

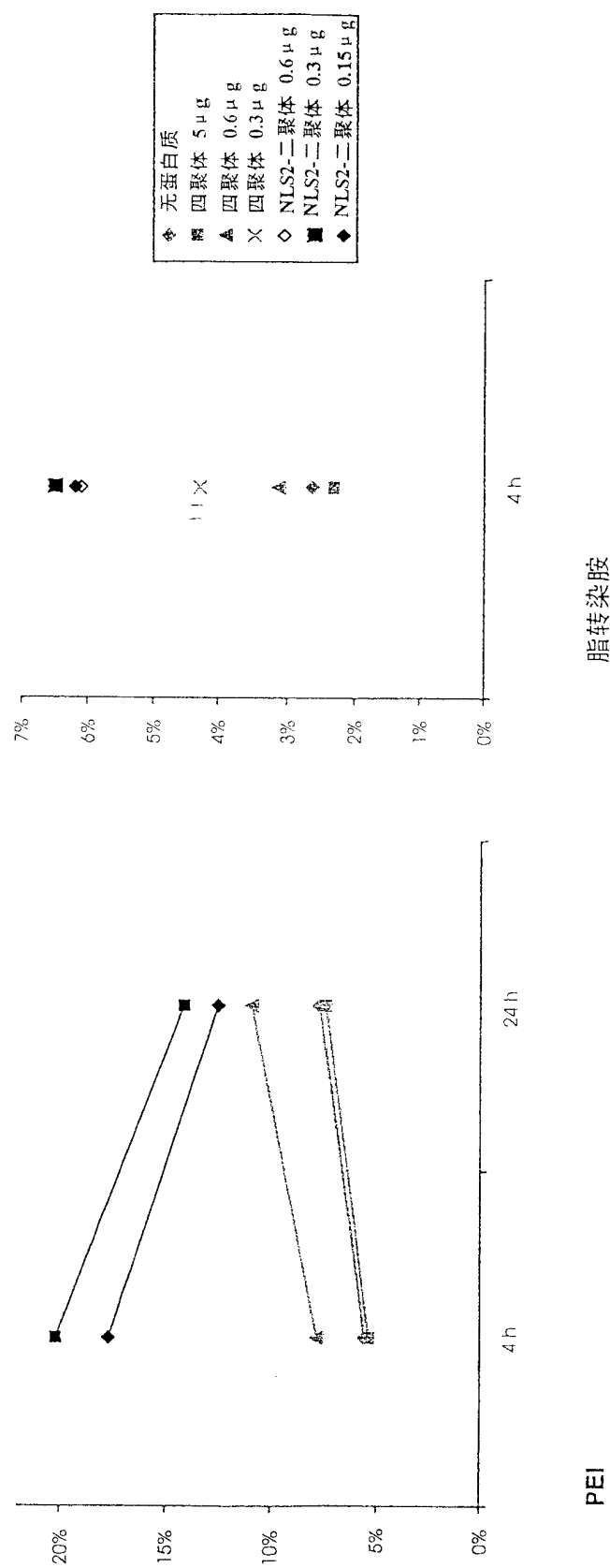


图 4