



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113785072 A

(43) 申请公布日 2021.12.10

(21) 申请号 202080025188.9

(22) 申请日 2020.03.26

(30) 优先权数据

62/825,559 2019.03.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/025055 2020.03.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/198525 EN 2020.10.01

(71) 申请人 欧陆迪斯卡沃爱克斯制品有限责任
公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 P.沙皮罗 V.查里 J.林-琼斯
J.拉默丁

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 易方方

(51) Int.Cl.

C12Q 1/54 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

权利要求书2页 说明书49页

序列表21页 附图19页

按照条约第19条修改的权利要求书2页

(54) 发明名称

启动子区域分析方法和用于实施该方法的
细胞

(57) 摘要

提供了评估启动子区域活性的方法。所述方法包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码可操作地偶联至启动子区域的酶供体(ED)的区域,在其中当所述启动子区域有活性时表达所述ED的条件下培养。所述方法还包括如果表达将所述ED与酶受体(EA)接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物。所述方法还包括检测所述酶活性的水平以评估所述启动子区域的活性。所述启动子区域的活性可以是指示性的,因此可以用于评估目标细胞信号转导通路和/或目标内源性或外源性(例如,引入的)转录因子的活性。还提供了可用于例如实施本公开内容的方法的细胞、组合物和试剂盒。

1. 一种评估启动子区域活性的方法,包括:

在一定条件下培养包含核酸的细胞,所述核酸包含可操作地偶联至启动子区域的编码酶供体 (ED) 的区域,在所述条件中当所述启动子区域有活性时表达所述ED;

如果表达,将所述ED与酶受体 (EA) 接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物;

检测所述酶活性的水平以评估所述启动子区域的活性;和

基于所检测的所述酶活性的水平评估转录因子的激活水平。

2. 根据权利要求所述的方法,其中所述启动子区域包含针对目标转录因子的转录因子应答元件 (TFRE),并且其中所述启动子区域的所述活性指示所述转录因子的活性。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述启动子区域包含至少一个TFRE。

4. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括将编码所述转录因子的表达载体引入所述细胞,并且在其中表达所述转录因子的条件下培养所述细胞。

5. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括使所述细胞与试剂接触,并且基于所检测的所述酶活性的水平评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的所述活性水平。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述启动子区域的所述活性指示目标细胞信号转导通路的活性。

7. 根据权利要求5所述的方法,其中使所述细胞与所述试剂接触包括在存在所述试剂的条件下培养所述细胞。

8. 根据权利要求5所述的方法,其中评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的所述活性水平包括对在不存在所述试剂的条件下检测的所述酶活性水平与在存在所述试剂的条件下检测的所述酶活性水平进行比较。

9. 根据权利要求5所述的方法,其中所述试剂是小分子。

10. 根据权利要求5所述的方法,其中所述试剂是检测试剂。

11. 根据权利要求5所述的方法,其中使所述细胞与超过一种检测试剂接触。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述核酸还编码与所述ED融合的载体蛋白,以使得当所述启动子区域具有活性时表达ED-载体蛋白融合物。

13. 根据权利要求14所述的方法,其中所述载体蛋白表现出与所述ED-EA复合物的酶活性不同的酶活性。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中检测所述酶活性的所述水平包括提供针对所述ED-EA复合物的底物,其中在所述底物被所述ED-EA复合物水解后产生可检测的信号。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述ED包含SEQ ID NO:30中所示的氨基酸序列或其变体,所述变体与所述EA复合以形成ED-EA复合物。

16. 一种评估启动子区域活性的方法,包括:

在一定条件下培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码与酶供体 (ED) 融合形成ED-载体蛋白融合物的载体蛋白的区域,其中所述ED-载体蛋白融合物可操作地偶联至启动子区域,在所述条件中当所述启动子区域有活性时表达所述ED-载体蛋白融合物;

如果表达,将所述ED与酶受体 (EA) 接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物;

检测所述酶活性的水平以评估所述启动子区域的活性;和

基于所检测的所述酶活性的水平评估转录因子的激活水平。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述启动子区域包含针对目标转录因子的转录因子应答元件 (TFRE), 并且其中所述启动子区域的所述活性指示所述转录因子的活性。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述载体蛋白包含经选择以影响所述ED-载体蛋白融合物的稳定性的结构域。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述结构域经选择以与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白融合物相比增加所述ED-载体蛋白融合物的所述稳定性。

20. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述结构域经选择以与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白相比使所述ED-载体蛋白脱稳定化。

21. 根据权利要求16所述的方法, 其进一步包括将编码所述转录因子的表达载体引入所述细胞, 并且在其中表达所述转录因子的条件下培养所述细胞。

22. 根据权利要求16所述的方法, 其包括使所述细胞与试剂接触, 并且基于所检测的所述酶活性的水平评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的所述活性水平。

23. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述启动子区域的所述活性指示目标细胞信号转导通路的活性。

24. 根据权利要求22所述的方法, 其中评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的所述活性水平包括对在不存在所述试剂的条件下检测的所述酶活性水平与在存在所述试剂的条件下检测的所述酶活性水平进行比较。

25. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述试剂是小分子。

26. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述试剂是检测试剂。

27. 一种试剂盒, 其包含:

包含核酸的细胞, 所述核酸包含可操作地偶联至启动子区域的编码酶供体 (ED) 的区域; 和

使用所述细胞以进行根据权利要求1至26中任一项所述方法的说明书。

28. 根据权利要求27所述的试剂盒, 其进一步包含以下说明书: 基于所检测的所述酶活性的水平评估所述转录因子的所述激活水平, 或者激活所述转录因子的通路; 在所述培养过程中将所述细胞与试剂接触; 以及基于所检测的所述酶活性的水平评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的激活。

启动子区域分析方法和用于实施该方法的细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年03月28日提交的美国临时申请系列号62/825,559的优先权，其全部内容在此通过引用并入本文。

[0003] 关于政府自助的声明

[0004] 无。

发明领域

[0005] 本发明一般地涉及评估启动子区域活性的方法，更具体地，启动子区域偶联至检测试剂，以使得启动子区域的表达指导测量启动子区域活性的检测试剂的表达。所公开的方法评估细胞信号转导通路的活性以及待测化合物对细胞信号转导通路的影响。

[0006] 对序列表的引用

[0007] 本申请包含序列表，该序列表已作为ASCII文本文件提交，并且通过引用整体并入本文。该文本文件创建于2020年03月22日，名称为“PBH_010_1Seq_List.txt”，大小为49,795字节。

背景技术

[0008] 对探索细胞信号转导通路的各个方面以及不同化合物或分子对细胞信号转导通路调节的影响的兴趣一直是了解疾病和寻找治疗方法的关键驱动力。随着越来越多的细胞信号转导通路中的蛋白及其功能被确定，寻找调节这些蛋白活性的分子的兴趣正在急剧增长。通路蛋白的表达或抑制有助于了解待测化合物或测试条件对信号转导通路的影响，并找到新的药用药物。

发明内容

[0009] 以下简要概述并不旨在包括本发明的所有特征和方面，也不意味着本发明必须包括本概述中讨论的所有特征和方面。

[0010] 本发明的很多实施方式提供了一种评估启动子区域活性的方法。在很多其他实施方式中，公开了一种评估启动子区域活性的方法，包括培养包含核酸的细胞，所述核酸包含编码可操作地偶联至启动子区域的第一 β -半乳糖苷酶片段的区域，在其中当所述启动子区域有活性时表达所述第一 β -半乳糖苷酶片段的条件下培养。在其他实施方式中，所述方法还包括如果表达将所述第一 β -半乳糖苷酶片段与第二 β -半乳糖苷酶片段接触以形成活性酶复合物，并且检测酶活性的水平以评估所述启动子区域的活性。在其他实施方式中，所述启动子区域的活性可以是指示性的，因此可以用于评估细胞信号转导通路和/或内源性或外源性（例如，引入的）转录因子的活性。

[0011] 在很多实施方式中，本发明提供了一种评估启动子区域活性的方法，包括培养包含核酸的细胞，所述核酸包含编码可操作地偶联至启动子区域的酶供体（ED）的区域，在其中当所述启动子区域有活性时表达所述ED的条件下培养。在很多其他实施方式中，所述方

法还包括如果表达将所述ED与酶受体(EA)接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物,并检测所述酶活性水平以评估所述启动子区域的活性。在更进一步的实施方式中,所述ED片段包含SEQ ID NO:30中所示的氨基酸序列或其变体。在其他实施方式中,所述启动子区域的活性可以是指示性的,因此可以用于评估细胞信号转导通路和/或内源性或外源性(例如,引入的)转录因子的活性。

[0012] 在其他实施方式中,公开了一种评估启动子区域活性的方法,其中所述方法包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码与载体蛋白融合的第一 β -半乳糖苷酶片段的区域,其中所述第一 β -半乳糖苷酶片段可操作地偶联至启动子区域,在其中当所述启动子区域具有活性时表达第一 β -半乳糖苷酶片段-载体蛋白融合物的条件下培养。在某些实施方式中,所述方法还包括如果表达将所述第一 β -半乳糖苷酶片段与第二 β -半乳糖苷酶片段接触以形成活性酶复合物,并检测所述酶活性的水平以评估所述启动子区域的活性。在很多实施方式中,所述启动子区域的活性可以是指示性的,因此可以用于评估细胞信号转导通路和/或内源性或外源性(例如,引入的)转录因子的活性。在很多其他实施方式中,所述载体蛋白包含经选择以影响所述ED-载体蛋白融合物的稳定性的结构域,其中与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白融合物相比经选择的所述结构域增加所述ED-载体蛋白融合物的所述稳定性,或者与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白相比经选择的所述结构域使所述ED-载体蛋白不稳定。此外,所述载体蛋白结构域靶向所述ED-载体蛋白融合物进行蛋白酶体降解。所述结构域包含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)(PEST)降解信号或CL1降解信号。

[0013] 在其他实施方式中,公开了一种评估启动子区域活性的方法,其中所述方法包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码融合至载体蛋白的酶供体(ED)片段的区域,其中所述ED片段可操作地偶联至启动子区域,在其中当所述启动子区域具有活性时所述ED表达的条件下培养。在某些实施方式中,所述方法还包括如果表达将ED与酶受体(EA)片段接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物,并检测所述酶活性水平以评估所述启动子区域的活性。在很多其他实施方式中,所述载体蛋白包含经选择以影响所述ED-载体蛋白融合物的稳定性的结构域,其中与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白融合物相比经选择的所述结构域增加所述ED-载体蛋白融合物的所述稳定性,或者与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白相比经选择的所述结构域使所述ED-载体蛋白不稳定。

[0014] 在很多实施方式中,所述载体蛋白可以具有与 β -半乳糖苷酶酶活性的酶活性不同的可检测的酶活性,其中当所述载体蛋白如所公开的方法中所述表达时,可以使用已知的酶活性检测方法所述检测载体蛋白的酶活性。在很多其他实施方式中,所述载体蛋白在其中所述启动子区域具有活性的条件下表达,以使得可以施用所述检测方法检测所述载体蛋白的酶活性,以评估所述启动子区域的活性。在其他实施方式中,当所述启动子区域具有活性时所述载体蛋白与ED片段的表达是共表达的,其中所述ED片段与所述EA片段形成复合物以形成具有酶活性的活性酶复合物,并且检测这两种载体蛋白与 β -半乳糖苷酶复合物的酶活性水平以评估所述启动子区域的活性。在其他实施方式中,所述启动子区域的活性可以是指示性的,因此可以用于评估细胞信号转导通路和/或内源性或外源性(例如,引入的)转录因子的活性。

[0015] 在各种实施方式中,载体蛋白可以是天然蛋白、突变蛋白、合成蛋白,其中通过针

对此类蛋白载体的公知检测方法检测所述载体蛋白酶活性。在其他实施方式中,载体蛋白是突变的,以使得所述突变赋予所述载体蛋白的酶活性失活。在更进一步的实施方式中,突变的载体蛋白可以仅作为与 β -半乳糖苷酶片段融合的载体蛋白起作用,所述 β -半乳糖苷酶片段可操作地连接至目标启动子区域,但当目标启动子区域具有活性时其不表现出任何可检测的酶活性。

[0016] 在一个实施方式中,本发明提供了一种评估启动子区域活性的方法,其中所述方法包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码与ED融合的载体蛋白的区域,其中ED-载体蛋白融合物可操作地偶联至启动子区域,在其中当所述启动子区域有活性时ED片段与载体蛋白的表达一起表达的条件下培养。在另一个实施方式中,所述方法还包括将ED片段与EA片段接触以形成具有酶活性的活性酶复合物,并检测酶活性的水平以评估启动子区域的活性。在又一个实施方式中,所述方法检测载体蛋白的非 β -半乳糖苷酶的酶活性和ED-EA酶复合物的 β -半乳糖苷酶酶活性,以使得结果是两点检测方法,其给出了载体蛋白的酶活性和ED-EA片段复合物的酶活性。

[0017] 在很多实施方式中,本发明提供了一种评估启动子区域活性的方法,其中所述方法包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码与ED片段融合的突变载体蛋白的区域,其中ED-突变载体蛋白融合物可操作地偶联至启动子区域,其中所述突变载体蛋白缺乏可检测的酶活性。所述细胞是在其中当所述启动子区域具有活性时ED片段表达的条件下培养的。在某些实施方式中,所述方法还包括如果表达将ED与EA接触以形成具有酶活性的活性酶复合物,并检测酶活性水平以评估启动子区域的活性。

[0018] 在很多实施方式中,本发明提供了一种评估启动子区域活性的方法,其中所述方法包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码与ED片段融合的无任何内在酶活性的载体蛋白的区域,其中ED-载体蛋白融合物可操作地偶联至启动子区域,其中所述载体蛋白缺乏可检测的酶活性。所述细胞是在其中当所述启动子区域具有活性时ED片段表达的条件下培养的。在某些实施方式中,所述方法还包括如果表达将ED与EA接触以形成具有酶活性的活性酶复合物,并检测酶活性水平以评估启动子区域的活性。

[0019] 在很多实施方式中,本发明提供了一种评估启动子区域活性的方法。在其他实施方式中,公开了一种评估启动子区域活性的方法,包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码可操作地偶联至启动子区域的第一 β -半乳糖苷酶片段的区域,向培养物中引入检测试剂,其中当所述启动子区域具有活性时表达所述第一 β -半乳糖苷酶片段。在其他实施方式中,所述方法还包括如果表达将第一 β -半乳糖苷酶片段与第二 β -半乳糖苷酶片段接触以形成具有酶活性的活性酶复合物,并检测酶活性的水平以评估启动子区域的活性。在另一个实施方式中,所述启动子区域的活性可以是指示性的,因此可以用于评估细胞信号转导通路和/或内源性或外源性(例如,引入的)转录因子的活性。

[0020] 在很多实施方式中,所述方法还包括将细胞与一种以上检测试剂接触,并通过评估响应于所述检测试剂的启动子区域的活性检测检测试剂的作用。在很多其他实施方式中,所述方法还包括将细胞与第一试剂接触,其中首先使所述细胞与影响目标启动子区域活性的第一试剂接触,通过检测ED-EA复合物的酶活性评价所述活性;使所述细胞与第二试剂接触,其中所述第二试剂影响所述第一试剂的活性,通过检测ED-EA复合物的酶活性并将其与当细胞仅与第一试剂接触时所述启动子区域的活性进行比较评价所述活性。在各种实

施方式中,所述第一试剂可以是激动剂,和所述第二试剂可以是拮抗剂。

[0021] 在各种实施方式中,可以将细胞与一种以上试剂接触。可以将所公开的一种以上试剂依次引入细胞中,如引入第一试剂和引入第二试剂,或者组合的,如在同时将一种以上试剂引入细胞培养物中,以确定不同检测试剂对目标启动子活性的影响。所述试剂可以是检测试剂、小分子、激动剂、拮抗剂、生物制品、获批药物、研究药物、肽、蛋白、抗体、细胞、表达异源蛋白的细胞、表达内源蛋白的细胞、由细胞分泌的产物、毒素、天然产物、启动子、抑制剂或反向激动剂。

[0022] 在某个实施方式中,所述启动子区域包含针对目标转录因子的至少一个转录因子应答元件(TFRE),其中所述启动子区域的活性指示所述转录因子的活性。在某些更多实施方式中,基于所检测的当启动子区域具有活性时表达的第一 β -半乳糖苷酶片段的酶活性水平评估转录因子的激活水平。

[0023] 在某些实施方式中,所述启动子区域包含第一TFRE和第二TFRE。在某些其他实施方式中,所述启动子区域包含第一TFRE和第二TFRE,其中所述第一TFRE和所述第二TFRE是针对相同转录因子的TFRE。在更进一步的实施方式中,所述启动子区域包含第一TFRE和第二TFRE,其中所述第一TFRE和所述第二TFRE是针对不同转录因子的TFRE。

[0024] 在各种实施方式中,所述启动子区域包含至少一个TFRE。此外,根据很多实施方式,所述启动子区域包含两个或多于两个TFRE。在所述启动子区域中包含的TFRE可以是相同的TFRE,以使得所述TFRE是针对相同转录因子的,或者可以是不同TFRE,以使得在启动子区域中的不同TFRE是针对不同转录因子的。

[0025] 在某个实施方式中,所述启动子区域包含针对目标基因的内源性启动子区域。在某些更多实施方式中,基于所检测的当启动子区域具有活性时表达的第一 β -半乳糖苷酶片段的酶活性水平评估激活所述启动子区域的一个或多个通路的激活水平。

[0026] 在其他实施方式中,所公开的方法包括将编码转录因子的表达载体引入细胞,并在表达所述转录因子的条件下培养所述细胞,其中所述启动子区域与所述第一 β -半乳糖苷酶片段偶联。在某些更多实施方式中,基于所检测的当所述启动子区域具有活性时表达的所述第一 β -半乳糖苷酶片段的酶活性水平评估表达载体编码的转录因子的激活水平。

[0027] 在其他实施方式中,所述启动子区域的活性指示目标细胞信号转导通路的活性,其中基于所检测的酶活性水平评估所述细胞信号转导通路的活性水平。在很多其他实施方式中,所述目标转录因子的活性指示目标细胞信号转导通路的活性,其中基于所检测的酶活性水平评估所述细胞信号转导通路的活性水平。

[0028] 在很多实施方式中,本发明提供了一种评估启动子区域活性的方法,包括使细胞与试剂(例如,检测试剂)接触,并且基于所检测的载体蛋白的酶活性水平评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的活性水平。在更多实施方式中,本发明提供了一种评估启动子区域活性水平的方法,包括使细胞与试剂(例如,检测试剂)基础;并且基于所检测的ED-EA复合物的酶活性水平,并且对在存在所述检测试剂的条件下检测的酶活性水平与在不存在所述检测试剂的条件下的ED-EA复合物的酶活性水平进行比较评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的活性水平。

[0029] 在其他实施方式中,本发明提供了一种评估启动子区域活性的方法,包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码可操作地偶联至启动子区域的第一 β -半乳糖苷酶片段的

区域,在其中当所述启动子区域有活性时表达所述第一 β -半乳糖苷酶片段的条件下培养;将所述细胞与试剂(例如,检测试剂)接触;如果表达将所述第一 β -半乳糖苷酶片段与第二 β -半乳糖苷酶片段接触以形成具有酶活性的活性酶复合物,并检测所述酶活性的水平以评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的活性,并且对在存在所述检测试剂的条件下检测的酶活性水平与不存在检测试剂或对照条件下的酶活性水平进行比较。

[0030] 在更进一步的实施方式中,本发明提供了一种评估启动子区域活性的方法,包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码可操作地连接至启动子区域的酶供体(ED)片段的区域,在其中当所述启动子区域具有活性时表达所述ED片段的条件下培养;将所述细胞与试剂(例如,检测试剂)接触;如果表达将所述ED与EA片段接触以形成具有酶活性的活性酶复合物,并检测ED-EA复合物的酶活性水平以评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的活性,并对在存在所述试剂的条件下检测的酶活性水平与不存在所述试剂的条件下的酶活性水平进行比较。

[0031] 因此,在很多实施方式中,所述方法公开了编码与所述ED融合的载体蛋白的核酸,以使得当所述启动子蛋白是活性的时表达ED-载体蛋白融合物。在一个实施方式中,所述载体蛋白显示出与所述ED-EA复合物的酶活性不同的酶活性。在另一个实施方式中,所述载体蛋白是突变蛋白,当与野生型载体蛋白比较时其显示出无可检测的酶活性。在又一个实施方式中,将缺乏任何内在酶活性的载体蛋白与ED片段融合,以使得当所述启动子片段是活性的时表达ED-载体蛋白融合物。

[0032] 在更多实施方式中,所述试剂是小分子、蛋白、肽、抗体、细胞表面蛋白、检测试剂、细胞、来自细胞的产物(例如,由细胞分泌的产物)、激动剂、反向激动剂、部分激动剂或拮抗剂。在很多更多实施方式中,细胞上存在的细胞表面蛋白不包含核酸,所述核酸包含编码 β -半乳糖苷酶的ED片段的区域。在其他实施方式中,细胞上存在的细胞表面蛋白包含核酸,所述核酸包含编码 β -半乳糖苷酶的ED片段的区域。

[0033] 在很多实施方式中,所述方法还包括检测酶活性的水平,其包括提供针对ED-EA复合物的底物,其中在通过ED-EA复合物水解底物后产生可检测的信号。在很多其他实施方式中,可检测的信号是化学发光信号或生物化学发光信号。在其他实施方式中,ED和EA是 β -半乳糖苷酶片段,其中所述ED片段包含SEQ ID NO.30中所示的序列或其变体,其与EA复合以形成具有糖苷酶水解酶活性的ED-EA复合物。

[0034] 在其他实施方式中,所述细胞是哺乳动物细胞、啮齿类动物细胞、人细胞、免疫细胞、T细胞、Jurkat细胞、癌细胞、癌瘤细胞、HepG2细胞、肉瘤细胞或其他公知细胞类型。

[0035] 在各种实施方式中,核酸是质粒、细胞染色体、核染色体、线粒体染色体。在其他实施方式中,核酸还编码与ED融合的载体蛋白,以使得当启动子区域是活性的时表达ED-载体蛋白融合物。

[0036] 在更多实施方式中,具有可检测酶活性的载体蛋白可以是荧光素酶、经修饰的荧光素酶、 β -内酰胺酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶、荧光蛋白或具有可检测活性的其他载体蛋白。

[0037] 在很多实施方式中,本发明提供了针对各种通路和启动子区域的研究激动剂、拮抗剂、激活剂和抑制剂的测定法。

[0038] 在更进一步的实施方式中,本发明还公开了可用于例如实施本公开内容的方法的

细胞、组合物和试剂盒。

[0039] 其他特征将从附图和随后的详细描述中变得明显。

附图说明

[0040] 示例实施方式在表格和附图中通过示例而非限制的方式进行说明，相同的附图标记表示相似的元件并且其中：

[0041] 图1:活化T细胞核因子(NFAT)酶片段互补(EFC)报告基因构建体的质粒图谱。

[0042] 图2:在U2OS NFAT EFC报告细胞中表达NFAT EFC报告基因构建体,其响应于佛波醇12-肉豆蔻酸13-醋酸酯(PMA)和离子霉素的细胞刺激混合物。

[0043] 图3:NF-kB EFC报告基因构建体的质粒图谱。

[0044] 图4:U2OS NF-kB EFC报告细胞的单细胞克隆对细胞因子TNF α 的应答。

[0045] 图5:使用基于U2OS NFkB EFC报告细胞的测定筛选抑制剂。

[0046] 图6:使用NFkB EFC报告基因测定检测两个修美乐[®]批次的TNF α 活性和效力。

[0047] 图7:NFkB EFC报告基因检测细胞中的内源性CD40受体对CD40配体(CD40L)有强烈应答。

[0048] 图8:在共培养测定中,Jurkat NFAT EFC报告细胞对CHO-K1细胞表面表达和呈递的OKT3配体产生应答。

[0049] 图9:IL2-启动子-EFC报告基因构建体的质粒图谱。

[0050] 图10:Jurkat IL2-启动子EFC报告细胞系检测通过不同信号转导通路激活的多种不同应答元件的刺激情况。

[0051] 图11:IL2-启动子EFC报告基因构建体(包含具有多个不同应答元件的复杂天然启动子)对两种不同信号转导通路的细胞内模拟物的应答。

[0052] 图12:在表达ROR γ T转录因子和ROR γ T EFC报告基因质粒的U2OS细胞中通过反向激动剂GSK805降低ROR γ T转录因子的活性。

[0053] 图13:基于EFC的NFkB转录报告基因测定对CD40L/CD40受体显示出比荧光素酶系统更好的灵敏度。

[0054] 图14:基于EFC的NFkB转录报告基因测定对TNF α 显示出比荧光素酶系统更好的灵敏度。

[0055] 图15:根据本公开内容的一个实施方式的NFkB通路报告细胞系的测定结果。RLU=相对光单位。

[0056] 图16:根据本公开内容的一个实施方式的NFAT通路报告细胞系的测定结果。RLU=相对光单位。

[0057] 图17:根据本公开内容的一个实施方式的STAT3通路报告细胞系的测定结果。RLU=相对光单位。

[0058] 图18:根据本公开内容的一个实施方式的NFAT通路报告细胞系的测定结果。RLU=相对光单位。

[0059] 图19:根据本公开内容的一个实施方式的PD1通路报告基因测定的测定结果,其表明可以对通路报告基因测定进行进一步修订以产生针对其他靶点的测定。RLU=相对光单位。

[0060] 图20:根据本公开内容的一个实施方式的使用与启动子偶联的载体蛋白的NF- κ B通路报告测定的测定结果。

[0061] 图21:根据本公开内容的一个实施方式的U2OS RANK NF- κ B通路报告基因测定的测定结果。

[0062] 图22:根据本公开内容的一个实施方式的HEK NF- κ B通路报告基因测定的测定结果。

[0063] 图23:根据本公开内容的一个实施方式的HEK CD27-NF- κ B通路报告基因测定的测定结果。

[0064] 图24a和图24b:根据本公开内容的一个实施方式的,分别针对U2OS NF- κ B报告细胞和U2OS RANK-NF- κ B报告细胞系的测定结果。

[0065] 根据附图和随后的详细描述,本实施方式的其他特征将是显而易见的。

具体实施方式

[0066] 提供了评估启动子区域活性的方法。所述方法包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码可操作地偶联至目标启动子区域的第一 β -半乳糖苷酶片段的区域,其在其中当所述启动子区域是活性的时表达所述第一 β -半乳糖苷酶片段的条件下培养,其中所述启动子区域可以响应于所述细胞培养条件而变得有活性。所述方法还包括如果表达将所述第一 β -半乳糖苷酶片段与第二 β -半乳糖苷酶片段接触以形成活性酶复合物;检测酶活性水平提供了所述启动子区域活性的评估。所述启动子区域的活性可以是指示性的,并且因此可以用于评估目标细胞信号转导通路和/或内源性或外源性(例如,引入的)转录因子的活性。

[0067] 此外,所述方法包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码可操作地偶联至目标启动子区域的酶供体(ED)的区域,其在其中当所述启动子区域是活性的时表达所述ED的条件下培养。所述方法还包括如果表达将所述ED与酶受体(EA)接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物。所述方法还包括检测所述酶活性的水平以评估所述启动子区域的活性。所述启动子区域的活性可以是指示性的,并且因此可以用于评估细胞信号转导通路和/或内源性或外源性(例如,引入的)转录因子的活性。还提供了方法,其包括使所述细胞与试剂(例如,检测试剂)接触,并且基于所检测的酶活性的水平评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的活性水平。还提供了可用于例如实施本公开内容的方法的细胞、组合物和试剂盒。

[0068] 本发明还提供了一种评估细胞中启动子区域活性的方法,其中所述细胞包含核酸,所述核酸包含与酶供体(ED)片段融合的载体蛋白,其中所述载体蛋白-ED融合物可操作地偶联至目标启动子区域。所述方法还包括在其中当所述启动子区域是活性的时表达所述ED的条件下培养所述细胞;如果表达使所述ED与酶受体(EA)接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物,并检测所述酶活性的水平以评估目标启动子区域的活性,其中所述启动子区域的活性可以指示目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路的活性。

[0069] 在更详细地描述本公开内容的方法、细胞、组合物和试剂盒之前,应理解方法、细胞、组合物和试剂盒不限于所描述的特定实施方式,因此当然可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,而非旨在限制,因为方法、细胞、组合物和试剂盒的范围将仅受所附权利要求的限制。

[0070] 在提供值范围的情况下,应理解每个中间值,到下限单位的十分之一,除非上下文另有明确规定,该范围的上限和下限与该范围内的任何其他规定或中间值之间的值包括在方法、细胞、组合物和试剂盒内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内并且也包括在方法、细胞、组合物和试剂盒内,受所述范围内的任何具体排除的限制。当所述范围包括一个或两个限度时,方法、细胞、组合物和试剂盒中也包括不包括其中一个或两个限度的范围。

[0071] 某些范围在本文中呈现,数值前有术语“约”。术语“大约”在本文中用于为其前面的确切数字以及接近或近似于该术语前面的数字的数字提供字面支持。在确定数字是否接近或近似于具体列举的数字时,接近的或近似的未列举数字可以是在其呈现的上下文中提供具体列举的数字的实质等价物的数字。

[0072] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语与方法、细胞、组合物和试剂盒所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管与本文所述的那些相似或等效的任何方法、细胞、组合物和试剂盒也可用于方法、细胞、组合物和试剂盒的实践或检测,但现在描述代表性的说明性方法、细胞、组合物和试剂盒。

[0073] 本说明书中引用的所有出版物和专利均以引用方式并入本文,就好像每个单独的出版物或专利都被明确地和单独地指出以引用方式并入本文以公开和描述与引用出版物相关的材料和/或方法。任何出版物的引用都是在申请日期之前公开的,不应被解释为承认本方法、细胞、组合物和试剂盒无权早于此类出版物,因为所提供的出版日期可能与实际出版日期不同,可能需要独立确认。

[0074] 应注意,如本文中和所附权利要求书中所用,除非上下文另外清楚指示,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括多个指示物。还应该注意的是,权利要求可以撰写成排除任何可选的元素。因此,该陈述旨在用作与权利要求要素的陈述或“否定”限制的使用有关的“仅仅”、“仅”等的专有术语的先行基础。

[0075] 应当理解,为了清楚起见,在单独实施方式的上下文中描述的方法、细胞、组合物和试剂盒的某些特征也可以在单个实施方式中组合提供。相反,为了简洁起见,在单个实施方式的上下文中描述的方法、细胞、组合物和试剂盒的各种特征也可以单独提供或以任何合适的子组合提供。实施方式的所有组合都被本公开具体地包括并且在本文中公开,就好像每个和每个组合被单独地和明确地公开一样,在这样的组合包括到可操作的过程和/或组合物的程度上。此外,在描述这些变量的实施方式中列出的所有亚组合也被本方法、细胞、组合物和试剂盒具体地包括并且在本文中公开,就好像每个这样的亚组合在本文中被单独和明确地公开一样。

[0076] 在阅读本公开内容后,本领域技术人员将显而易见的是,本文描述和示出的每个单独实施方案具有分立组分和特征,其可以容易地与其它几个实施方案中的任何一个的特征分离或组合,而不背离本发明的范围或精神。任何所陈述方法均可以所陈述事件的顺序或以逻辑上可能的任何其他顺序进行。

[0077] 方法

[0078] 如上文所总结的,本公开内容提供了评估启动子区活性的方法。所述方法包括培养包含核酸的细胞,所述核酸包含编码可操作地偶联至目标启动子区域的酶供体(ED)的区域,其在其中当所述启动子区域是活性的时表达所述ED的条件下培养。所述方法还包括如

果表达将所述ED与酶受体(EA)接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物。所述方法还包括检测所述酶活性水平以评估目标启动子区域的活性。所述启动子区域的活性可以指示目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路的活性。因此,所述方法可以还包括基于所检测的酶活性水平评估目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路的活性。

[0079] 评估启动子区域活性的方法可用于多种情况。例如,当细胞处于目标条件下时,所述方法可用于确定启动子区域的活性水平。目标条件包括但不限于pH、温度、细胞的遗传条件(例如,在细胞的一个或多个染色体中的一个或多个突变(例如,点突变、缺失、插入和/或等))、其中所述细胞与试剂(例如,检测试剂)接触的条件等。在一些实施方式中,评估启动子区域活性的方法包括在培养期间使所述细胞与试剂(例如,检测试剂)接触,并且基于所检测的酶活性水平评估响应于所述细胞与所述试剂接触的启动子区域(以及任选地,目标基因的转录活性和/或目标细胞信号转导通路的活性)的活性。此类方法可用于例如确定所述试剂是否影响启动子区域(以及任选地,目标基因的转录活性和/或目标细胞信号转导通路的活性)的活性水平。评估启动子区域活性的方法还可以用于评估激动剂、拮抗剂、检测试剂、转录因子、细胞信号转导通路激活剂或细胞信号转导通路抑制剂的作用。

[0080] 还提供了评估检测试剂是否影响目标细胞信号转导通路的活性水平的方法。此类方法包括在存在检测试剂的条件下培养细胞,其中所述细胞包含核酸,所述核酸包含编码可操作地偶联至启动子区域的ED的区域,在其中当所述启动子区域是活性时表达所述ED的条件下培养,其中所述启动子区域的活性指示目标细胞信号转导通路的活性水平。所述方法还包括如果表达将所述ED与EA接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物,并检测所述酶活性的水平以评估是否所述检测试剂影响目标细胞信号转导通路的活性水平。

[0081] 所述方法部分基于出乎意料的发现,即本公开内容的基于酶片段互补(EFC)的报告基因测定/系统与现有报告基因系统相比显示出增加的灵敏度,现有报告基因系统依赖于以下的表达:1)全长(单一多肽)酶,如全长荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶(CAT);和2)荧光蛋白。此外,所述方法进一步证明,例如,如下文的实验部分所证明的,与依赖全长(单一多肽)荧光素酶表达的对应的基于荧光素酶的测定相比,本公开内容的基于EFC的报告基因测定观察到对配体刺激的灵敏度增加。因此,本公开内容的测定构成对现有报告基因测定的改进,例如,在试剂(例如,检测试剂)在测定中表现更有效的能力方面,在一些实施方式中,这导致测定在生理上更相关,也就是说,更准确地反映试剂(例如,检测试剂)在自然环境中对细胞的影响更类似于体内环境。

[0082] 在一些实施方式中,所述方法的灵敏度根据半数最大有效浓度(EC_{50})值表示,在本公开内容的上下文中,其是在细胞暴露于药剂一段特定暴露时间后,介于基线和最大值之间的诱导细胞中应答(如酶活性水平所示)的试剂(例如,检测试剂)的浓度。根据一些实施方式,本公开内容的方法(例如,一种评估检测试剂对目标启动子区域或细胞信号转导通路的影响的方法)显示出100 μ g/mL或更低、10 μ g/mL或更低、1 μ g/mL或更低、100ng/mL或更低、10ng/mL或更低、1ng/mL或更低、100pg/mL或更低或者10pg/mL或更低的 EC_{50} 值。根据一些实施方式,本公开内容的方法(例如,一种评估检测试剂对目标启动子区域或细胞信号转导通路的影响的方法)显示出10 μ M或更低、1 μ M或更低、100nM或更低、10nM或更低、1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低或者1pM或更低的 EC_{50} 值。

[0083] 根据一些实施方式,与依赖于以下表达的现有报告基因系统相比,本公开内容的

方法表现出更大的效力:1) 全长(单一多肽)酶,如全长荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶(CAT);和/或2) 荧光蛋白。如上所述, EC_{50} 的较小值表示较大的效力。在某些实施方式中,本公开内容的方法显示出2:1或更大、5:1或更大、10:1或更大、15:1或更大、20:1或更大、25:1或更大、30:1或更大、35:1或更大、40:1或更大、45:1或更大或者50:1或更大的效力。

[0084] 如本文所用,“启动子区域”是一个核酸(例如,DNA)区域,其包含已知调控转录的至少一个元件(例如,核苷酸序列,如转录因子应答元件(TFRE))。例如,启动子区域可以包含已知被转录因子的DNA结合结构域结合的至少一个元件。在某些实施方式中,所述至少一个元件已知调控一个或多个基因的表达,其取决于是否活化的转录因子与所述元件结合。以这种方式,启动子区域与ED-EA报告基因系统的组合能够询问启动子区域的活性水平,这反过来有助于鉴定影响一种或多种已知由启动子区域中的至少一个元件调控的基因表达的条件。应当理解,启动子区域的活性水平可以指示目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路的活性水平(例如,一个或多个基因的转录上调和/或下调可能是目标信号转导通路的下游结果,例如,信号转导通路可以通过磷酸化、乙酰化、泛素化和/或其他共价修饰对其进行翻译后修饰来调控转录因子的活性),以使得启动子区域和ED-EA报告系统能够询问目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路的活性水平,这反过来又有助于鉴定影响目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路活性水平的条件。根据一些实施方式,例如条件包括使所述细胞与试剂(例如,检测试剂)接触。

[0085] 信号转导通路可以调控转录因子活性的另一种方式是通过改变其合成、降解和/或其亚细胞定位来调控与ED表达相关的启动子位点处活性转录因子的浓度,所有这些都可能影响转录因子调控启动子区域的能力。

[0086] 目标转录因子包括但不限于:内源性转录因子(即,由细胞从细胞的天然/非引入核酸(例如,细胞的野生型染色体)表达的转录因子);异源、转染的天然转录因子(即,细胞不表达的转录因子的野生型形式);异源、转染的重组嵌合转录因子(即,包含两个或更多个异源结构域的转录因子,例如,与异源DNA结合结构域(例如,GAL4 DNA结合结构域)融合的目标转录因子的激活结构域,用于与核酸的通用TFRE(例如,GAL4/UAS)结合);异源转染的组成型活性转录因子;或者两种或更多种此类转录因子的任意组合。根据任何此类实施方式,转录因子可以被内源性或工程化细胞信号转导通路激活或失活,并且可以反映其活性。

[0087] 在某些实施方式中,细胞通路或信号转导通路的一种或多种蛋白可以被基因改变(例如,过表达、敲低或敲除),以便更好地研究该通路,回答特定的机制问题或者作为阳性或阴性实验对照。在某些实施方式中,根据预期实验目的的需要,基因改变的细胞通路或信号转导通路可以是组成型活性或非活性的。

[0088] 如上所述,本公开内容的方法可以包括评估目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路的活性,其中所述启动子区域的活性水平(以及ED的相应表达水平)提供了目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路活性水平的读取。在一些实施方式中,所述方法包括基于所检测的酶活性的水平评估响应于所述细胞与试剂(例如,对照试剂、检测试剂等)的目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路的活性水平。“检测试剂”指在细胞与所述试剂接触之前,所述细胞与所述试剂接触是否会改变目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路的活性水平是未知的试剂(小分子、肽、多肽、核酸等)。检测试剂可以进一步指但不限于小分

子、激动剂、拮抗剂、生物制品、获批药物、研究药物、肽、蛋白、抗体、细胞、表达异源蛋白的细胞、表达内源蛋白的细胞、由细胞分泌的产物、毒素、天然产物、启动子、抑制剂或反向激动剂。

[0089] 根据本公开内容的方法的所使用的检测试剂可以是细胞不可渗透的(例如,以询问是否检测试剂通过与细胞表面上的分子相互作用(例如,结合)改变目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路的活性水平)或细胞可渗透的,例如,以询问是否检测试剂通过与细胞表面上的分子或细胞内或其隔室的分子,例如,细胞质内的分子、细胞器表面的分子、细胞器内的分子等相互作用(例如,结合)改变细胞信号转导通路的活性水平。

[0090] 如本文所用,“细胞信号转导通路”包含细胞的分子或细胞的一系列分子(例如,一个或多个细胞表面分子和/或一个或多个细胞内分子),其对外部信号产生应答,以使得所述外部信号导致一种或多种基因表达的上调和/或一种或多种基因表达的下调。一种或多种基因表达的上调和/或下调对应于一种或多种基因启动子活性水平的增加和/或降低。因此,可以基于启动子区域(或其亚区域)的活性水平评估细胞信号转导通路的活性水平,所述启动子区域是通过细胞信号转导通路进行信号转导的下游靶点(阳性或阴性)。

[0091] 应当意识到的是,可以根据信号转导通路中存在的分子来命名/表征特定的信号转导通路。例如,可以根据在与外部信号结合时启动信号转导的受体(例如,细胞表面受体、胞质受体等)来命名信号转导通路。又例如,可以根据外部信号受体的“下游”分子和信号通路中转录因子的“上游”分子来命名/表征特定信号转导通路。作为另一个实例,可以根据信号转导通路中的转录因子(例如,NF κ B、NFAT、STAT3等)来命名/表征特定信号转导通路。

[0092] 在很多实施方式中,可以评估其活性水平的细胞信号转导通路(例如,以确定待测化合物是否影响信号转导通路的活性水平)包括但不限于Akt信号转导通路、AMP活化蛋白激酶(AMPK)信号转导通路、凋亡信号转导通路、表皮生长因子受体(EGFR)信号转导通路、雌激素信号转导通路、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)信号转导通路、生长因子受体信号转导通路、胰岛素信号转导通路、JAK-STAT信号转导通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路、雷帕霉素机械靶点(mTOR)信号转导通路、NF- κ B信号转导通路、Notch信号转导通路、活化T细胞核因子(NFAT)信号转导通路、p53信号转导通路、转化生长因子 β (TGF- β)信号转导通路、Toll样受体(TLR)信号转导通路、血管内皮生长因子(VEGF)信号转导通路和Wnt信号转导通路。根据一些实施方式,所述细胞信号转导通路是NF κ B信号转导通路。在某些实施方式中,所述细胞信号转导通路是STAT(例如,STAT3和/或STAT5)信号转导通路。根据一些实施方式,所述细胞信号转导通路是NFAT信号转导通路。

[0093] 所述细胞可以与之接触的试剂(例如,检测试剂)包括但不限于小分子、多肽(包括肽)、核酸等。在一些实施方式中,所述试剂是激动剂、反向激动剂(即,与激动剂结合相同分子(例如,受体),但具有与激动剂相反作用的试剂)、部分激动剂(即,与激动剂结合相同分子(例如,受体),并具有与激动剂相同作用,但作用程度较低的试剂)或拮抗剂(即,与激动剂结合相同分子(例如,受体)并阻止所述激动剂与所述分子结合的试剂,例如,不影响所述分子的活性)。“小分子”指分子量为1000原子质量单位(amu)或更低的化合物。在一些实施方式中,小分子是750amu或更低、500amu或更低、400amu或更低、300amu或更低或者200amu或更低。在某些方面中,小分子不是由如存在于聚合物中的重复分子单元构成的。

[0094] 术语“多肽”、“肽”或“蛋白”在本文中可以互换使用,以指代通过相邻残基的 α -氨

基和羧基之间的肽键相互连接的一系列线性氨基酸残基。氨基酸可以包括20个“标准”遗传可编码氨基酸、氨基酸类似物或其组合。在一些实施方式中,当检测试剂是蛋白时,所述蛋白是可溶性蛋白,例如,不与细胞关联(结合至或作为其一部分)。在其他实施方式中,检测试剂可以是不溶性蛋白。目标不溶性蛋白的实例包括但不限于细胞表面蛋白。这样,在一些实施方式中,所述方法可以包括将所述细胞暴露于第二种细胞,并且在将所述细胞与细胞表面蛋白接触后,评估在第二种细胞表面上的蛋白是否影响所述细胞中的目标细胞信号转导通路的活性水平。在一些实施方式中,所述细胞可以与所述第二种细胞共培养,以使得所述细胞与所述第二种细胞的细胞表面蛋白接触。根据一些实施方式,所述第二种细胞的细胞表面蛋白(例如,细胞表面配体)可以从第二种细胞分离和纯化的,并且以可溶的、可溶和交联形式,或者当包被到固体支持物(例如,小珠或组织培养板表面)上时与所述细胞(应答细胞)接触。

[0095] 在一些实施方式中,当所述试剂是核酸时,所述试剂是寡核苷酸。如本文所用,“寡核苷酸”是2至500个核苷酸(例如,2至200个核苷酸)的核苷酸单链多聚体。寡核苷酸可以是合成的,或者可以是酶促制备的,并且在一些实施方式中的长度为5至50个核苷酸(例如,长度为9至50个核苷酸)。寡核苷酸可以包含核糖核苷酸单体(即,可以是寡核糖核苷酸或“RNA寡核糖核苷酸”)或者脱氧核糖核苷酸单体(即,可以是寡脱氧核糖核苷酸或“DNA寡核苷酸”)。例如,寡核苷酸的长度可以是5至9、10至20、21至30、31至40、41至50、51至60、61至70、71至80、80至100、100至150或150至200个,可达500个或更多个核苷酸。在一些实施方式中,当所述试剂是核酸时,所述试剂是短干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、吗啉和/或等。设计和递送用于靶向特定mRNA的siRNA、miRNA、吗啉等的方法是公知的,并且在例如Monsoori等,(2014) *Adv Pharm Bull* 4(4):313-321;Xin等,(2017) *Mol Cancer* 16:134;Chakraborty等,(2017) *Mol Ther Nucleic Acids* 8:132-143;和Ahmadzada等,(2018) *Biophys Rev* 10(1):69-86中进行了描述。siRNA、miRNA、吗啉等可以基于待靶向的mRNA的已知需要并使用可用工具来设计,例如,来自Invivogen的siRNA Wizard、来自Dharmacon的siDESIGN Center、来自Invitrogen的BLOCK-iT™ RNAi Designer、可在microrna.osumc.edu/mir-synth获得的miR-Synth、WMD3-Web MicroRNA Designer、由Gene Tools提供的吗啉设计工具等。

[0096] 在一些实施方式中,所述细胞与试剂(例如,检测试剂)接触,其中所述试剂是试剂文库的一部分,例如,小分子文库、多肽文库、siRNA文库等。此类方法可以进一步包括以高通量进行所述方法,其中将细胞提供到组织培养板的孔中(例如,4、6、8、12、24、48、96、384、1536孔组织培养板等等),将细胞与来自检测试剂文库(例如,小分子文库、多肽文库、siRNA文库等)的一种或一组检测试剂接触,并且所述方法包括基于所检测的酶活性水平鉴定影响目标信号转导通路活性水平的试剂。

[0097] 根据一些实施方式,所述启动子区域包括目标转录因子的转录因子应答元件(TFRE),并且所述启动子区域的活性指示所述转录因子的活性。在一些实施方式中,所述方法包括基于所检测的所述酶活性水平评估所述转录因子的激活水平。在某些实施方式中,天然存在的目标转录因子可以在细胞中表达或过表达(例如,如果不存在或者存在的水平低于测定的理想水平)。在某些实施方式中,所述转录因子是通用转录因子,其是一种具有组成性活性或无活性的突变转录因子。在某些实施方式中,转录因子可以被敲减或敲除。在

某些实施方式中,所述转录因子是嵌合转录因子,其包含与结合至TFRE的异源核酸结合结构域融合的目标转录因子的激活结构域。TFRE可以是目标野生型转录因子的DNA结合结构域与之结合的TFRE(例如,在包括评估STAT3活性水平的方法中,野生型STAT3结合TFRE)。在一些实施方式中,所述TFRE是“通用”TFRE,指TFRE是一种可用于评估天然的、结合至不同TFRE的各种转录因子活性水平的报告基因测定系统中的TFRE。例如,在一些实施方式中,所述细胞表达嵌合转录因子,其包含与结合至通用TFRE的异源核酸结合结构域融合的目标转录因子激活结构域。以这种方式,可以将相同核酸用于评估在自然界中不与相同TFRE结合的转录因子活性水平的EFC报告基因测定中。可以使用的通用TFRE的非限制性实例是GAL4/上游激活序列(GAL4/UAS),其中目标转录因子(例如,NF κ B、STAT3、NFAT、ELK1等)的激活结构域与GAL4 DNA结合结构域融合,其能够评估目标转录因子的激活情况,而不需要用于目标转录因子的天然TFRE。在一些实施方式中,所述方法包括向所述细胞引入编码所述转录因子的表达载体,并且在其中表达所述转录因子的条件下培养所述细胞。

[0098] 在某些实施方式中,所述启动子区域包含单个转录因子应答元件(TFRE)。所述单个TFRE可以是结合至并响应于单个转录因子(例如,A类,其是NF- κ B应答元件的实例)的激活的TFRE,如在下述实验部分的某些实例中所示例的。此类实施方式可用于例如分离特定目标TFRE,以确定影响分离中该TFRE活性的条件(即,不受其他TFRE干扰),和/或确定影响与TFRE结合并响应于其的转录因子激活或失活的条件。在某些其他实施方式中,所述启动子区域包含一种以上转录因子应答元件(TFRE)。

[0099] 根据一些实施方式,所述启动子区域包含至少一个TFRE。此外,根据很多实施方式,所述启动子区域包含两个或更多个TFRE。在所述启动子区域中包含的TFRE可以是相同TFRE,以使得所述TFRE针对相同转录因子,或者可以是不同TFRE,以使得在所述启动子区域中的不同TFRE针对不同转录因子。可以组合或顺序地将所述TFRE引入到所述细胞中。在某些实施方式中,所述启动子区域包含第一TFRE和第二TFRE,其中所述第一和第二TFRE是不同的,例如,TFRE结合至并响应于不同转录因子的激活和/或失活。可以使用包含两个或更多个TFRE的启动子区域,例如,启动子区域模拟天然存在的、具有多个TFRE的野生型启动子区域是理想的,所述TFRE结合至并响应于不同转录因子的激活和/或失活(例如,B类,其是具有至少6个不同转录因子特异性应答元件的IL-2基因启动子的实例)。如在下述实验部分的某些实例中所示例的。在一些实施方式中,所述启动子区域模拟一组在天然存在的、具有多个TFRE的野生型启动子区域中存在的所有TFRE,所述TFRE结合至并响应于不同转录因子的激活和/或失活。在一些实施方式中,所述启动子区域包含其是增强子的TFRE。“增强子”是指可以与一种或多种蛋白结合以增强基因转录的顺式作用DNA序列,并且其可以位于距编码ED的区域至多1Mb处。使用A类或B类不同特定启动子区域的能力允许将本方法广泛应用于不同生物学问题,以及筛选产生所需结果的条件,例如,目标启动子的激活或失活、目标基因表达的激活或失活、目标细胞信号转导通路的激活或失活等。

[0100] 如上文所总结的,所述方法包括在其中当所述启动子是活性的时表达所述ED的条件下培养细胞。“活性”是指所述启动子区域处于允许ED表达水平高于背景的可检测的升高状态。此类状态可以是“未结合”状态,其中当没有转录因子与所述启动子区域结合时,出现高于背景的可检测的ED表达水平升高。此类状态也可以是这样一种状态,其中当一个或多个转录因子与所述启动子区域结合时(例如,当一种或多种所述转录因子本身被激活时)出

现高于背景的可检测水平的ED表达,并且其中所述一个或多个转录因子的结合对于可检测地升高的ED表达水平是所需的;和/或与在未结合状态中的所述启动子区域时的ED表达水平相比ED表达的水平上调(诱导)或下调。

[0101] 培养所述细胞以使得当所述启动子是活性的时所述ED表达的条件可以改变。此类条件可以包括在适宜容器中(例如,细胞培养板或其孔),在适宜培养基中(例如,细胞培养基,如DMEM、RPMI、MEM、IMDM、DMEM/F-12等),在适宜温度(例如,32°C-42°C,如37°C)和pH(例如,pH 7.0-7.7,如pH 7.4)下,在具有适宜CO₂百分比(例如,3%至10%,如5%)的环境中培养所述细胞。在以下实验部分描述了可以使用的细胞培养条件的非限制性实例。

[0102] 在所述方法中使用的细胞可以是任何适宜的细胞。在某些实施方式中,基于目标生物过程选择细胞类型。例如,如果人们希望实施本方法来研究影响T细胞活化的条件,则所述细胞可以是可活化的T细胞,例如,Jurkat细胞。根据一些实施方式,所述细胞是本领域技术人员用来询问目标细胞信号转导通路的一类细胞。在某些实施方式中,所述细胞是本领域技术人员用来询问含有某些特定细胞和目标分子组分的细胞的一类细胞,如在目标通路中的某些受体或下游信号转导分子,例如,蛋白激酶、衔接子、转录因子等。

[0103] 根据一些实施方式,所述细胞是原代细胞。“原代细胞”指直接从活组织(例如,组织活检材料)获得并建立用于体外生长的细胞。在一些实施方式中,所述细胞来自细胞系。此类细胞系的非限制性实例包括Jurkat、U2OS、HepG2、HeLa、MCF-7、PC-12、PBMC、HUVEC、HEK-293、COS-7、BHK-21、HEp-2、HT-1080、MDCK等。根据一些实施方式,所述细胞是上皮细胞、间皮细胞或内皮细胞。在一些实施方式中,所述细胞是免疫细胞。可以使用的免疫细胞的非限制性实例包括T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。在某些实施方式中,所述免疫细胞是T细胞。T细胞的实例包括幼稚T细胞(T_N)、细胞毒性T细胞(T_{CTL})、记忆T细胞(T_{MEM})、T记忆干细胞(T_{SCM})、中央记忆T细胞(T_{CM})、效应记忆T细胞(T_{EM})、组织驻留记忆T细胞(T_{RM})、效应T细胞(T_{EFF})、调节性T细胞(T_{REG})、辅助T细胞(T_H、T_H1、T_H2、T_H17)、CD4+T细胞、CD8+T细胞、病毒特异性T细胞、αβT细胞(T_{αβ})和γδT细胞(T_{γδ})。

[0104] 根据一些实施方式,所述细胞是癌细胞。“癌细胞”指表现出肿瘤细胞表型的细胞,其特征可以是以下一种或多种,例如,异常细胞生长、异常细胞增殖、密度依赖性生长抑制的丧失、不依赖于贴壁的生长潜力、能够在免疫功能低下的非人动物模型中促进肿瘤生长和/或发展和/或细胞转化的任何适宜指示剂。“癌细胞”在本文中可以与“肿瘤细胞”、“恶性细胞”或“癌性细胞”互换使用,并且包括实体瘤、半实体瘤、原发性肿瘤、转移性肿瘤、癌细胞系等。在某些方面中,所述癌细胞是癌瘤细胞。目标癌瘤细胞包括但不限于HepG2细胞。在某些方面中,所述癌细胞是肉瘤细胞。肉瘤细胞的非限制性实例包括骨肉瘤细胞,如U2OS细胞。

[0105] 在本方法中使用的核酸可以是适于可操作地将所述启动子区域偶联至编码所述ED的区域的任何核酸。在一些实施方式中,所述核酸稳定地整合至所述细胞的染色体DNA中,例如,非特异性地或位点特异性地。在一些实施方式中,所述核酸是游离基因(或“游离基因的”)。“游离基因”或“游离基因的”指独立地复制细胞的染色体DNA的核酸(例如,DNA)分子。可以在本方法中使用的游离基因的非限制性实例是质粒。当所述核酸是游离基因(例如,质粒)时,除了所述启动子区域和编码所述ED的区域以外,所述游离基因可以包含一个

或多个元件。例如,质粒可以包含复制原点、编码赋予所述细胞抗生素抗性(例如,氨苄西林抗性(Amp^R)、潮霉素抗性等)的蛋白的一个或多个区域、一个或多个poly(A)信号、暂停信号、SV40晚期poly(A)信号、SV40增强子、SV40早期启动子等,以及此类元件的任何所需组合。引入用于游离或染色体整合表达的核酸的质粒可以与抗生素选择标记物相邻并遗传连接,所述标记物可以用于仅选择稳定表达所述核酸的细胞。可以通过病毒载体或者可以使用化学试剂通过电穿孔或任何其他适宜方法转染递送引入所述核酸的质粒。

[0106] 在下表1中提供了用于实施本公开内容的方法的质粒(包括在以下实验部分中使用的质粒)及其元件/子序列的核苷酸序列。

[0107] 表1-核苷酸序列

[0108]	ePL β -半乳糖苷酶ED (SEQ ID NO: 1)	AATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAC CCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTT TCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGC
	最小CMV	AGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAG
[0109]	启动子(SEQ ID NO: 2)	
	PEST蛋白去稳定序列(SEQ ID NO:3)	AATTCTCACGGCTTCCCTCCCGAGGTGGAGGAGCAGGCCGCC GGCACCCCTGCCCATGAGCTGCGCCCAGGAGAGCGGCATGGA TAGACACCCTGCTGCTTGCGCCAGCGCCAGGATCAACGTC
	hCL1蛋白去稳定序列(SEQ ID NO:4)	GCTTGCAAGAACTGGTTCAGTAGCTTAAGCCACTTTGTGATC CACCTT
	NFAT 应答元件 (SEQ IDNO:5)	GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT
	NFkB 应答元件 (SEQ IDNO:6)	GGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCGGGGACTTTCC GGGAATTTCC
	RORgT 应 答 元 件(SEQ IDNO:7)	GGTAAGTAGGTCAT
	干扰素(IFR1 GAS)应答元件 (SEQ IDNO:8)	AGCCTGATTTCCCCGAAATGACGGC
	STAT3 应答元件 (SEQ IDNO:9)	CATTTCCCGTAAATCGTCG

[0110]

STAT5应答元件 (SEQ IDNO:10)	AGTTCTGAGAAAAGT
IL-2启动子(SEQID NO:11)	CTTTTCTGAGTTACTTTTGTATCCCCACCCCCTTAAAGAAAGG AGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTTAATTGCATGAATT AGAGCTATCACCTAAGTGTGGGCTAATGTAACAAAGAGGGA TTTCACCTACATCCATTTCAGTCAGTCTTTGGGGGTTTAAAGAA ATTCCAAAGAGTCATCAGAAGAGGAAAAATGAAGGTAATGT TTTTTCAGACAGGTAAAGTCTTTGAAAATATGTGTAATATGT AAAACATTTTGACACCCCCATAATATTTTCCAGAATTAACA GTATAAATTGCATCTCTTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCT TTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCA
IL2启动子DNA应 答元件(SEQ ID NO:12)(NFAT & AP1)	ACCCCCTTAAAGAAAGGAGGAA
IL2启动子DNA应 答元件(SEQ ID NO:13)(NFAT)	GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT
IL2启动子DNA应 答元件(SEQ ID NO:14)(OCT)	AATTGCATGAA
IL2启动子DNA应 答元件 (SEQ ID NO:15)(NFκB)	GGGATTTACACC
IL2启动子DNA应 答元件(SEQ ID NO:16)(NFAT & AP1)	ATGAAGGTAATGTTTTTTCAG
IL2启动子DNA应 答元件(SEQ ID NO:17)(NFAT & AP1)	GTCTTTGAAAATATGTGTAAT

[0111]

IL2启动子DNA应答元件(SEQ ID NO:18)(OCT)	AAACATTTTG
IL2启动子DNA应答元件(SEQ ID NO:19)(NFAT)	TAATATTTTT
IL-2核心启动子(SEQ ID NO:20)(TATA盒以下划线表示)	CAGAATTAACAGT <u>TATAAATT</u> GCATCTCTTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCT
SEQ ID NO. 21	actcgtccttttcaatattattgaagcatttatcagggttactagtagctctcaaggataagtaagtaat attaaggtacgggagggtattggacaggccgcaataaaatatcttattttcattacatctgtgtgttggttt

[0112]

所使用的NFAT报告基因质粒是SEQ ID NO:21-XXX-SEQ ID NO. 33 (“XXX”表示编码目标载体蛋白的核苷酸序列)	ttgtgtgaatcgatagtagtactaacatagctctccatcaaaacaaaacgaaacaaaacaaactagcaaaa taggctgtccccagtgcaagtgaggtgccagaacatttcttgccctaacTGCCCGGTACC TGAGCTCGCTAGCGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGC GTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAA ACTGTTTCATACAGAAGGCGTAGATCTACTAGAGGGTATATA ATGGAAGCTCGACTTCCAGCTTGGCAATCCGGTACTGTTGGT AAAGCCACC -XXX-
SEQ ID NO. 33	AAATTCTCACGGCTTCCCTCCCGAGGTGGAGGAGCAGGCCGC CGGCACCCTGCCCATGAGCTGCGCCAGGAGAGCGGCATGG ATAGACACCCTGCTGCTTGCGCCAGCGCCAGGATCAACGTCT TCGAATTGGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCCTC GAGAGCTCCAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCA CATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCA CCGATCGCTAGTGAGGCCGgcegttcgagcagacatgataagatacattgatg agtttgacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgtaaatttgatgctattgctt tatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgttcagggtca gggggagggtgtgggagggtttttaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtaaatcgataaggatcc gtttcggtattggcgctcttccgctgatctgcgcagcaccatggcctgaaataacctctgaaagagga acttggttagctacctctgaggcggaagaaccagctgtggaatgtgtgtagttaggggtgtgaaa gtcccaggtctcccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtgt ggaaagtcccaggtcccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaacca tagtcccgcccctaactccgccatcccgccctaactccgccagttccgccattctccgcccatg gctgactaattttttatttatgcagaggccgaggccgcctctgcctctgagctattcagaagtagtga ggaggctttttggaggcctaggcttttgcaaaaagctcgattctctgacactagcgccaccatgaaga agccgaactaccgctaccagcgttgaaaaattctatcgagaagttcgacagtgtagcgacctga tcagttgtcggaggcggaagagagccgagccttcagcttcgatgtcggcgacgcggctatgta

[0113]

ctgcgggtgaatagctgcgctgatggcttctacaagaccgtacgtgtaccgccacttcgccagcgc
 tgactacccatcccgaagtgttgacatcgccgagttcagcgagagcctgacatactgcatcagta
 gacgcgcccaaggcggtactctccaagacctccccgaaacagagctgcctgtgtgttacagcctgtc
 gccgaagctatggatgctattgccgccgccgacctcagtcgaaccagcggttcggcccatcgggc
 cccaaggcatcgccagtacacaacctggcgggatttcatttgcgcattgtgatcccatgtctacc
 actggcagaccgtgatggacgacaccgtgtccgccagcgtagtcgaagccctggacgaactgatgc
 tgtgggccgaagactgtcccagggtgcgccacctcgtccatgccgacttcggcagcaacaacgtcct
 gaccgacaacggccgcatcaccgccgtaatcgactgggccgaagctatgttcggggacagtcagtac
 gaggtggccaacatcttcttggcgccctggctggcttgcattggagcagcagactcgtacttcga
 ggcgccgcatcccgagctggccggcagccctcgtctgcgagcctacatgctgcgcatcgccctgga
 tcagctctaccagagcctcgtggacggcaacttcgacgatgctgcctgggctcaaggccgctgcgat
 gccatcgtccgcagcggggccggcaccgtcggctcgacacaaaatcgctcgccggagcgcagccgt
 atggaccgacggctgcgtcgaggtgctggccgacagcggcaaccgccggcccagtacacgaccg
 cgcgctaaggaggtaggtcgagttaaactctagaaccggctatggccgcaataaaatattttttt
 attacatctgtgtgtgtgtttttgtgtgttcgaactagatgctgtcgaccgatcccttgagagccttaac
 ccagtcagctctcttcgggtgggcgcggggcatgactatcgtcgccgacttatgactgtcttcttcatca
 tgcaactcgtaggacaggtgcggcagcgcctcttcgcttctcgtcactgactcgtcgctcggt
 cgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtatcacaagaatcaggg
 gataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccg
 cgttgcgtgcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcaga
 ggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctggaagctcctcgtcgctc
 tcctgttccgacctgcgcttaccggatacctgtccgcctttctccttcgggaagcgtggcgcttctc
 atagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaac
 cccccgttcagcccagcgcgtgccttatccggtactatcgtcttgagccaaccggtaagacac
 gacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtatgtaggcgggtgcta
 cagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagattttggtatctgcgctcgtc
 gaagccagttaccttcgaaaaagagttgtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggtagc
 ggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctt
 ttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttggcatgagattatcaaaa
 aggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagttttaaataaatcaatcaagtatatatgagtaaactt
 ggtctgacagcggccgcaaatgctaaccactgcagtggtaccagtgccttgatcagtgaggcaccg

[0114]

	atctcagcgatctgcctatttcgttcgtccatagtggcctgactccccgtcgtgtagatcactacgattcgt gagggcttaccatcaggccccagcgcagcaatgatccgcgagagccggtcaccggccccga ttgtcagcaatgaaccagccagcaggaggccgagcgaagaagtggctctgtactttgtccgcc tccatccagtcctatgagctgctgtcgtgatgctagagtaagaagttgccagtgagtagtttcgaaga ggtgtggccattgtactggcatcgtggtatcacgctcgtcgttcggtatggcttcgtcaactctggttc cagcggtaagccgggtcacatgatcacccatattatgaagaaatgcagtcagctccttagggcctcc gatcgttgcagaagtaagttggccgcggtgtgtcgtcctatgtaatggcagcactacacaattctct accgtcatgccatccgtaagatgctttccgtgaccggcgagtactcaaccaagtcgtttgtgtagtagt gtatacggcgaccaagctgctcttgcggcggtctatacgggacaacaccgcgccacatagcagtagc ttgaaagtgtcatcatcgggaatcgttctcggggcggaagactcaaggatcttgcgcatttag atccagttcgatatagcccactcttgcacccagttgatcttcagcatcttttaccagcgttccggg gtgtgcaaaaacaggcaagcaaaaatccgcaagaagggaatgagtcgcacacgaaaatgttggat gctcat
SEQ ID NO. 22 IL-2报告基因质 粒是SEQ ID NO:22-XXX-SEQ ID NO. 34 (“XXX”表示编码 目标载体蛋白的核 苷酸序列)	actcgtcctttttcaatattattgaagcatttatcagggttactagtagctctcaaggataagtaaat attaaggtagggagggtattggacaggcccaataaaatctttattttcattacatctgtgtgtgtgtt ttgtgtgaatcgatagtagtactaacatacgtctccatcaaaacaaaacgaaacaaaacaaactagcaaaa taggctgtcccagtgcaagtgcagggtgccagaacattctctggcctaactggccggtacCTTTT CTGAGTTACTTTTGTATCCCCACCCCCTTAAAGAAAGGAGGA AAAAGTGTTCATACAGAAGGCGTTAATTGCATGAATTAGAG CTATCACCTAAGTGTGGGCTAATGTAACAAAGAGGGATTTC CCTACATCCATTTCAGTCAGTCTTTGGGGGTTTAAAGAAATTCC AAAGAGTCATCAGAAGAGGAAAAATGAAGGTAATGTTTTTTC AGACAGGTAAAGTCTTTGAAAATATGTGTAATATGTAAACA TTTTGACACCCCCATAAATTTTTTCCAGAATTAACAGTATAAA TTGCATCTCTTGTTCAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCA CTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCAgctag -XXX-
SEQ ID NO. 34	aagcttGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCCTCGAGAG CTCCAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA AAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCC

[0115]

CCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA
TCGCTAGggccggCCgcttcgagcagacatgataagatacattgatgagtttgacaaacca
caactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgtaaatttgatgctattgctttatttgtaaccattata
agctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtggg
aggtttttaagcaagtaaaacctctacaatgttgtaaaatcgataaggatccgttgcgtattggcg
ctcttcgctgatctgcgcagcaccatggcctgaataacctctgaaagaggaacttggttagctacctt
ctgaggcggaaagaaccagctgtggaatgtgtgcagttagggtgtgaaagtccccaggtcccca
gcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccaggtgtgaaagtccccaggt
ccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcgccgccctaact
ccgcccatccgccctaactccgccagttccgccattctccgcccatggctgactaatttttttatt
tatgcagaggccgagggccctctgcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggagg
cctaggcttttgcaaaaagctcgattctctgacactagcgccaccatgaagaagcccgaactcaccg
ctaccagcgttgaaaaattctcatcgagaagttcgacagtgtgagcgactgtatgcagttgtcggagg
gcgaaagagagccgagccttcagcttcgatgtcggcggacgcggctatgtactgcgggtgaatagct
gcgctgatggcttctacaagaccgtacgtgtaccgccacttcgccagcgctgactaccatcccc
gaagtgttgacatcggcgagttcagcgagagcctgacatactgcatcagtagacgcgccaaaggc
gttactctcaagacctccccgaaacagagctgcctgctgtgttacagcctgtcggcgaagctatggat
gctattgccgccgccacctcagcacaaccagcggcttcggcccatcgggcccaaggcatcggc
cagtacacaacctggcgggatttcatttgcgccattgctgatccccatgtctaccactggcagaccgtg
atggacgacaccgtgtccgccagcgtagctcaagccctggacgaactgatgtgtgggccgaagac
tgtcccaggtgcgccacctcgtccatgccgacttcggcagcaacaacgtcctgaccgacaacggc
cgcatcaccgccgtaatcgactggtcgaagctatgttcggggacagtcagtagaggtggccaaca
tcttcttctggcggccctggctggcttgcattggagcagcagactcgtacttcgagcgccggcatccc
gagctggccggcagccctcgtctgcgagcctacatgctgcgcatcggcctggatcagctctaccaga
gcctcgtggacggcaacttcgacgatgtgcctgggctcaaggccgctgcgatgccatcgtccgag
cggggccggcaccgtcggcgcacacaaatcgtcgcggagcgcagccgatggaccgacggct
gcgtcgaggtgctggccgacagcggcaaccgccggccagtacacgaccgcgcgctaaggaggt
aggtcgagtttaactctagaaccggctatggccgcaataaaatatctttatttcattacatctgtgttg
gtttttgtgttcgaactagatgtgtcgaccgatgcccttgagagcctcaacccagtcagctccttc
cggtgggcgccgggcatgactatcgtcggcacttatgactgtcttcttatcatgcaactcgtaggac
aggcgccggcagcgccttccgcttctcgtcactgactcgtcgcgtcggcgttcggctgcggc

[0116]

	gagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaa gaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccggttgctggcggtttt ccataggctccgccccctgacgagcatcacaatacgcgctcaagtcagagtgccgaaacc gacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctgtgcgtctcctgttccgacct gccgcttaccggatacctgtccgcttctccctcgggaagcgtggcgcttctcatagtcacgctgt aggatctcagttcggtaggtcgttcgctccaagctggcgctgtgtcacgaacccccgttcagccc gaccgctgcgccttatccggttaactatcgtcttgagtcacccggtaagacacgactatcgcactg gcagcagccactggttaacaggattagcagagcgagggtatgtaggcggtgctacagagttctgaag ggtggcctaactacggctacactagaagaacagtagtttggtatctgcgctcgtgaagccagttac cggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaacaacaccgctggtagcgggtggtttttgtttgc aagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacggggtctgac gtcagtggaacgaaaactcaggttaagggttttggtcatgagattatcaaaaggatctcaccatga tccttttaaatataaataaggttttaatacaatctaaagtataatagtagtaacttgggtgacagcggcc gcaaatgctaaccactgcagtggttaccagtgtgtgatcagtgaggcaccgatctcagcagatctgcct attcgttcgtccatagtggtcgtactcccgctgtgttagatcactacgattcgtgaggccttaccatcag gccccagcgcagcaatgatgccgcgagagccgcgttcaccggccccgattgtcagcaatgaacc agccagcagggaggggccgagcgaagaagtggtcctgctactttgcccctccatccagtcctatgag ctgctgtcgtgatgctagagtaagaagttcgccagtgagtagtttccgaagagttgtggccattgctact ggcatcgtggtatcacgctcgtcgttcggtatggcttcgttcaactctggttccagcggtcaagccgg gtcacatgatcaccatattatgaagaaatgcagtcagctccttagggcctccgatcgtgtcagaagta agttggccgcggtgtgtcgtcatggtaatggcagcactacacaattcttaccgtcatgccatccgt aagatgcttttcgtgaccggcgagtagtcaaccaagtcgtttgtgagtagtgatacggcgaccaag ctgctcttggccggcgtctatagggacaacaccgcgccacatagcagtagttgaaagtgtcatcat cgggaatcgttctcggggcggaagactcaaggatcttgccgctattgagatccagttcgatatagcc cactctgcaccagttgatcttcagcatctttactttaccagcggttcgggggtgtgcaaaaacaggca agcaaatgccgcaagaagggaatgagtgcgacacgaaaatgttggatgctcat
SEQ ID NO:23 干扰素 γ 报告基因 质粒是	actcgtccttttcaatattatgaagcattatcagggttactagtagctctcctcaaggataagtaagta attaaggtaggggaggtattggacaggccgcaataaaatatctttattttcattacatctgtgtgtggttt ttgtgtgaatcgatagtagtactaacatagctctccatcaaaacaaacgaacaaacaaactagcaaaa taggctgtccccagtgcaagtgagggtgccagaacattctctggcctaactggccggtacCAGC

[0117]

SEQ ID NO:23- XXX- SEQ ID NO. 35 (“XXX”表示编码 目标载体蛋白的核 苷酸序列)	CTGATTTCCCCGAAATGACGGCAGCCTGATTTCCCCGAAATG ACGGCAGCCTGATTTCCCCGAAATGACGGCAGCCTGATTTCC CCGAAATGACGGCAGATCTACTAGAGGGTATATAATGGAAG CTCGACTTCCAGCTTGGCAATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCA CC -XXX-
SEQ ID NO. 35	AATTCTCACGGCTTCCCTCCCGAGGTGGAGGAGCAGGCCGCC GGCACCCCTGCCCATGAGCTGCGCCCAGGAGAGCGGCATGGA TAGACACCCTGCTGCTTGCGCCAGCGCCAGGATCAACGTCTT CGAATTGGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCCTCG AGAGCTCCAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACT GGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC ATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCA CCGATCGCTAGTGAGGCCGGccgcttcgagcagacatgataagatacattgatga gtttggacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttggaaatttgtgatgctattgcttt atttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcagggtca gggggaggtgtgggaggtttttaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtaaaatcgataaggatc cgtttgcgtattggcgctcttccgctgatctgcgcagcaccatggcctgaataacctctgaaagagg aacttggttagctaccttctgaggcggaaagaaccagctgtggaatgtgtgagtgtaggtgtggaa agtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcattcattagtcagcaaccaggt gtggaagtgccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcattcattagtcagcaac catagtcgcccccctaactcggccatcccgcccctaactcggccagttcggccattctcggccc atggctgactaattttttatttatgcagaggccgaggccgctctgcctctgagctattccagaagtag tgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcaaaaagctcgattctctgacactagcggccaccatg aagaagcccgaactcaccgctaccagcggtgaaaaattctcatcgagaagtcgacagtgtagcg acctgatgcagttgtcggaggcggaagagagccgagccttcagcttcgatgtcggcggacggcggt atgtactcgggtgaatagctgcgctgatggctctacaaagaccgctacgtgtaccggcacttcgcc agcgctgcactaccatccccgaagtgttgacatcggcgagttcagcgagagcctgacatactgca tcagtagacgcgccaaggcggttactctcaagacctccccgaaacagagctgcctgctgtgttaca gcctgtcgcc

[0118]

gaagctatggatgctattgccgccgccacctcagtcacaccagcggcttcggccattcgggccc
 aaggcatcgccagtagacacacacctggcgggatttcatttgcgccattgctgatccccatgtctaccact
 ggcagaccgtgatggacgacaccgtgtccgccagcgtagctcaagccctggacgaactgatgctgt
 gggccgaagactgtcccagggtggccacctcgtccatgccgacttcggcagcaacaacgtcctga
 ccgacaacggccgcatcaccgccgtaatcgaactgggtccgaagctatgttcggggacagtcagtaga
 ggtggccaacatcttcttctggcggccctggctggcttgcattggagcagcagactcgtacttcgagc
 gccggcatcccgagctggccggcagccctcgtctgcgagcctacatgtgcgcatcggcctggatc
 agctctaccagagcctcgtggacggcaacttcgacgatgctgcctgggctcaaggccgctgcgatgc
 catcgtccgcagcggggccggcaccgtcggcgcacacaaatcgtcgcggagcgcagccgat
 ggaccgacggctgcgtcagggtgctggccgacagcggcaaccgccggcccagtagacgaccgagc
 cgtaaggaggtaggctcaggtttaaactctagaaccggctatggccgcaataaataatctttattttcatt
 acatctgtgtgttgggtttgtgttcgaactagatgctgtcgaccgatgcccttgagagccttcaacc
 agtcagctcctccgggtggcgcggggcagtagctatcgtccgacattatgactgtcttcttatcatg
 caactcgtaggacaggtgccggcagcgtcttccgcttctcgtcactgactcgtgcgctcggctc
 ttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaggcggtaatacgggtattccacagaatcaggggga
 taacgcaggaaagacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgcg
 ttgctggcggttttcctaggtccgccccctgacgagcaccacaaaaatcgacgtcaagtcagag
 gtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctggagctccctcgtgcgctc
 ctgttccgacctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctccctcgggaagcgtggcgcttctctat
 agctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccc
 cccgttcagcccagaccgtcgccttatccggtaactatcgtcttgagtcacacccggtaagacacga
 cttatcgccactggcagcagccactgtaacaggattagcagagcagggtatgtaggcgggtgctaca
 gagttcttgagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagttattggatctgcgctcgtctga
 agccagttaccttcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaacaaaccaccgctggtagcgggt
 gggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttct
 acgggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttggctatgagattatcaaaaag
 gatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagttttaaatcaatcaaaagtatatatgagtaaacctgggt
 ctgacagcggccgcaaatgctaaaccactgcagtggttaccagtgccttgatcagtgaggcaccgatct
 cagcgatctgcctatttctgttcgcatagtgccctgactccccgtcgtgtagatcactacgattcgtgag
 ggcttaccatcaggccccagcgcagcaatgatccgcgagagccgcgttcaccggcccccgatttgt
 cagcaatgaaccagccagcaggaggggccgagcgaagaagtggtcctgctactttgtccgcctcca

[0119]

	tccagtcctatgagctgctgtcgtgatgctagagtaagaagttcgccagtgagtagttccgaagagttgt ggccattgctactggcatcgtggtatcacgctcgtcgttcggtatggcttcgtcaactctggtcccagc ggtcaagccgggtcacatgacccatattatgaagaaatgcagtcagctccttagggcctccgac gttgtcagaagtaagttggccggtgtgtcgtcatggtaatggcagcactacacaattctctaccg tcatgccatccgtaagatgctttccgtgaccggcgagtactcaaccaagtcgttgtgagtagtgata cggcgaccaagctgctcttggccggcgtctatacgggacaacaccgcgccacatagcagtagcttga aagtgtcatcatcgggaatcgttctcggggcgaaagactcaaggatcttccgctattgagatcca gttcgatatagccactcttgaccacagtgatcttcagcatctttactttaccagcgttccgggtgtg caaaaacaggcaagcaaaatgccgaaagaagggaatgagtcgcacacgaaaatgttgatgctca t
SEQ ID NO:24 STAT3报告基因 质粒是SEQ ID NO:24-XXX-SEQ ID NO. 36 (“XXX”表示编码 目标载体蛋白的核 苷酸序列)	actcgtccttttcaatattattgaagcatttatcagggttactagtagctctcctcaaggataagtaaat attaggtacgggaggtattggacaggccgcaataaaatatctttatttcattacatctgtgtgtgtttt ttgtgtgaatcgatagtagtaacatacgtctccatcaaaacaaaacgaaacaaaacaaactagcaaaa taggctgtcccagtgcaagtgcagggtccagaacattctctgacctaaactggccggtacgtgagct cagcttcatttcccgtaaatcgtcgaagcttcatttcccgtaaatcgtcgaagcttcatttcccgtaaatc tcgaagcttcatttcccgtaaatcgtcgaagcttcatttcccgtaaatcgtcgaagcttcatttcccgtaaatc TCTACTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAGCTTGG CAATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACC -XXX-
SEQ ID NO. 36	AAATTCTCACGGCTTCCCTCCCGAGGTGGAGGAGCAGGCCGC CGGCACCCTGCCCATGAGCTGCGCCAGGAGAGCGGCATGG ATAGACACCCTGCTGCTTGCGCCAGCGCCAGGATCAACGTCT TCGAATTGGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCCTC GAGAGCTCCAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC ATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGC

[0120]

ACCGATCGCTAGTGAGGCCGGccgcttcgagcagacatgataagatacattgatg
 agtttgacaaaccacaactagaaatgcagtgaataaatgctttatttggaaatttggatgctattgctt
 tatttgaaccattataagctgcaataaacaagtaacaacaacaattgcattcattttatgttccagggtca
 gggggagggtgaggaggtttttaagcaagtaaacctctacaaatgtggtaaatcgataaggatcc
 gtttgcgtattggcgctcttccgctgatctgcgcagcaccatggcctgaaataacctctgaaagagga
 acttggtagctaccttctgaggcggaagaaccagctgtggaatgtgtcagttagggtgtggaaa
 gtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtg
 ggaaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaacca
 tagtcccgcccctaactccgccatcccgcccctaactccgccagttccgccattctccgcccatg
 gctgactaattttttatttatgcagaggccgaggccgctctgcctctgagctattcagaagtagtga
 ggaggctttttggaggccttaggcttttgaataagctcgattctctgacactagcgccaccatgaaga
 agcccgaaactaccgctaccagcggttgaataattctctatcgagaagttcgacagtgtagcgacctg
 atgcagttgtcggaggcggaagagagccgagccttcagcttcgatgtcggcgagcgcggctatgta
 ctgcgggtgaatagctgcgctgatggctctacaagaccgctacgtgtaccgccactctgccagcgc
 tgcactacccatccccgaagtgttggacatcggcgagttcagcgagagcctgacatactgcatcagta
 gacgcgccaaaggcgtaactctccaaagacctccccgaacagagctgcctgctgtgttacagcctgtc
 gccgaagctatggatgctattgccgccgccgacctcagtcacaccagcggtctcgcccatctgggc
 cccaaggcatcgccagtcacacacctggcggggatttcatttgcgccattgctgatccccatgtctacc
 actggcagaccgtgatggacgacaccgtgtccgccagcgtagctcaagccctggacgaactgatgc
 tgtgggccgaagactgtccgaggtgcgccacctcgtccatgccgacttcggcagcaacaacgtcct
 gaccgacaacggccgcatcaccgccgtaatcgactgggtccgaagctatgttcggggacagtcagtac
 gaggtggccaacatcttcttctgcgggccctggctggcttgcattggagcagcagactcgtactcga
 gcgccggcatcccgagctggccggcagccctcgtctgcgagcctacatgctgcgcatcggcctgga
 tcagctctaccagagcctcgtggacggcaacttcgacgatgctgctgggctcaaggccgctgcgat
 gccatcgtccgagcggggccggcaccgtcggcgcacacaaatcgctcgccggagcgcagccgt
 atggaccgacggctgcgtcgaggtgtggccgacagcggcaaccgccggccagtcacgaccg
 cgcgctaaggaggttaggtcgagttaaaactctagaaccggtcatggccgcaataaaatatcttattt
 attacatctgtgtgtgtgttttgtgtgttcgaactagatgctgtcgaccgatccccctgagagccttaac
 ccagtcagctcctccggtgggcgcggggcatgactatcgtcgccgacttatgactgtctcttattca
 tgcaactcgtaggacaggtgcggcagcgtcttccgcttctcgtcactgactcgtgcgtcgggt
 cgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaggcggtaatacgggttatccacagaatcaggg

[0121]

	gataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccg cgttgcggcggtttccataggtccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgtcaagtcaga ggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctcgtgcgtc tcctgtccgacctgccgttacccgatacctgtccgctttctcccttgggaagcgtggcgctttctc atagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtaggtcgttcgtccaagctgggctgtgtgcacgaac ccccggtcagccgaccgctgcgccttatccgtaactatcgtcttgagtccaaccggtgaagacac gacttatccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggatgtaggcggtgcta cagagttcttgagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggatctgcgctctgt gaagccagttacctcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggtagc ggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctt ttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttggcatgagattatcaaaa aggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagttttaaatacaatctaaagtatatagtaaactt ggtctgacagcgcccgcaaatgctaaccactgcagtggttaccagtgcttgatcagtgaggcaccg atctcagcgatctgcctatttctgttcgcatagtggtcgtactcccgctggtgtagtactacgattcgt gagggcttaccatcagggccagcgagcaatgatccgcgagagccgcttcaccggccccga ttgtcagcaatgaaccagccagcagggaggccgagcgaagaagtggtctgtactttgtccgcc tccatccagctctagagctgctgtcgtgatgctagagtaagaagttcgccagtgagtagtttcgaaga gttggtggccattgctactggcatcgtggtatcacgctcgtcgttcgggtatggctcgttcaactctggttc cagcgggtcaagccgggtcacatgatcacccatattatgaagaaatgcagtcagctccttagggcctcc gatcgttgtcagaagtaagttggccgcggtgtgtcgtcgtatggaatggcagcactacacaattctctt accgtcatgccatccgtaagatgctttccgtgaccggcgagtactcaaccaagtcgtttgtgagtagt gtatacggcgaccaagctgctcttggccggcgtctatacgggacaacaccgcgccacatagcagtac tttgaagtgctcatcgcgggaatgttcttggggcggaagactcaaggatcttggcgctattgag atccagttcgatatagcccactcttgcacccagttgatcttcagcatctttactttaccagcggttcggg gtgtgcaaaaacaggcaagcaaatgccgcaagaagggaatgagtgcgacacgaaaatgttggat gctcat
SEQ ID NO:25	actcgtccttttcaatattattgaagcatttatcagggttactagtagctctcctcaaggataagtaagtaat attaagggtacgggaggtattggacaggccgcaataaaatatctttattttcattacatctgtgtgttggtttt ttgtgtgaatcgatagtactaacatacgtctcctcatcaaaacaaaacgaacaaaacaaactagcaaaaat aggctgtccccagtgcaagtcagggtgccagaacatttctctggcctaacTGGCCGGTACct

STAT5报告基因 质粒是SEQ ID NO:25-XXX-SEQ ID NO. 37 ("XXX"表示编码 目标载体蛋白的核 苷酸序列)	gagctcagttctgagaaaagtagttctgagaaaagtagttctgagaaaagtagttctgagaaaagtagtt ctgagaaaagtctcaggatatcaaGATCTACTAGAGGGTATATAATGGAA GCTCGACTTCCAGCTTGGCAATCCGGTACTGTTGGTAAAGCC ACC -XXX-
SEQ ID NO. 37	AAATTCTCACGGCTTCCCTCCCGAGGTGGAGGAGCAGGCCGC CGGCACCCTGCCCATGAGCTGCGCCAGGAGAGCGGCATGG ATAGACACCCTGCTGCTTGCGCCAGCGCCAGGATCAACGTCT TCGAATTGGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCCTC GAGAGCTCCAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCA CATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCA CCGATCGCTAGTGAGGCCGGGccgcttcgagcagacatgataagatacattgatg agtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtatgctattgctt tatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttca gggggagggtgtggagggtttttaagcaagtaaaacctctacaatgttgtaaaatcgataaggatcc gtttgcgtattggcgctcttccgctgatctgcgcagcaccatggcctgaataaacctctgaaagagga acttggttagctaccctctgaggcggaagaaccagctgtggaatgtgtgcagttagggtgtggaaa gtccccaggctcccgagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtgt ggaaagtccccaggctcccgagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaacca tagtcccccccctaactccgcccatccgccctaactccgccagttccgccattctccgcccatg gctgactaatttttttatttatgcagaggccgaggccgcctctgctctgagctattccagaagtagtga ggaggctttttggaggcctaggcttttgcaaaaagctcgattctctgacactagcgccaccatgaaga agcccgaactcaccgctaccagcgttgaaaaatttctcatcgagaagttcgacagtgtagcgacctg atgcagttgtcgaggcggaagagagcggagccttcagcttcgatgtcgcgaggacgaggctatgtact gcgggtgaatagctgcgctgatggcttctacaagaccgctacgtgtaccgccacttcgccagcgc

[0123]

tgcactacccatccccgaagtgttgacatcggcgagttcagcgagagcctgacatactgcatcagta
 gacgcgcccgaaggcggtactctccaagacctccccgaacagagctgcctgtgtgttacagcctgtc
 gccgaagctatggatgctattgccgccgccgacctcagtcacaccagcggttcggcccattcgggc
 cccaaggcatcggccagtcacacaacctggcgggatttcatttgcgcattgtgatcccatgtctacc
 actggcagaccgtgatggacgacaccgtgtccgccagcgtagtcacagccctggacgaactgatgc
 tgtgggccgaagactgtcccagggtgcgccacctcgtccatgccgacttcggcagcaacaacgtcct
 gaccgacaacggccgcatcaccgccgtaatcgactgggccgaagctatgttcggggacagtcagtac
 gaggtggccaacatcttcttggcgccctggctggcttgcattggcagcagactcgtacttcga
 gcgccggcatcccgagctggccggcagccctcgtctgcgagcctacatgctgcgcatcgccctgga
 tcagctctaccagagcctcgtggacggcaacttcgacgatgctgctgggctcaaggccgctgcgat
 gccatcgtccgcagcggggccggcaccgtcggcgcacacaaatcgctcggcgagcgcagccgt
 atggaccgacggctgcgtcgaggtgctggccgacagcggcaaccggcgccagctacacgaccg
 cgcgctaaggaggtaggtcgagtttaactctagaaccggctatggccgcaataaaatattttttt
 attacatctgtgtgtgtgtgtgtgtgaactagatgctgtcgaccgatcccttgagagccttaac
 ccagtcagctccttcgggtgggcgcggggcatgactatcgtcggccacttatgactgtcttcttca
 tgcaactcgtaggacaggtgcggcagcgccttccgcttcctcgtcactgactcgtcgcgtcgggt
 cgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaggcggttaacggttatccacagaatcaggg
 gataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccg
 cgttgcgtgcgttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcaga
 ggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctcgtcgtc
 tcctgttccgacctgcgcgttacggatacctgtcgcctttctccctcgggaagcgtggcgcttttc
 atagctcacgctgtaggtatctcagttcgggttaggtcgttcgtccaagctgggctgtgtgcacgaac
 ccccggttcagcccagcgcgtgccttatccggtactatcgtcttgagccaaccggtaagacac
 gacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgta
 cagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagattttggtatctgcgctcgt
 gaagccagttaccttcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggtagc
 ggtgggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctt
 ttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcagtttaagggttttggtcatgagattatcaaaa
 aggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaactt
 ggtctgacagcggccgcaaatgctaaccactgcagtggtaccagtgcttgatcagtgaggcaccg
 atctcagcgatctgcctatttcgtcgtccatagtgccctgactccccgtcgtgtagatcactcagattcgt

[0124]

	gagggcttaccatcaggccccagcgcagcaatgatgccgcgagagccggttcaccggccccga ttgtcagcaatgaaccagccagcagggaggccgagcgaagaagtggctctgtactttgtccgc tccatccagtctatgagctgctgctgatgctagagtaagaagttcgccagtgaagtgttcgaaga gttggtgccattgctactggcatcgtggtatcacgctcgtcgtcggatggcttcgtcaactctggtcc cagcgggtcaagccgggtcacatgatcccatattatgaagaaatgcagtcagctccttagggcctcc gatcgtgtgcagaagtaagtggccgcgggtgtgtcgtcgtatggtaatggcagcactacacaattctct accgtcatgccatccgtaagatgcttttcgtgaccggcgagtactcaaccaagtcgtttgtgagtagt gtatcggcgaccaagctgctcttgcggcggtctatcgggacaacaccgcgccacatagcagtac ttgaaagtgtcatcatcgggaatcgttctcggggcggaagactcaaggatcttgcgctattgag atccagttcgatatagcccactcttgcacccagttgatcttcagcatcttttaccagcggttcggg gtgtgcaaaaacaggcaagcaaatgccgcaagaagggaatgagtcgcacacgaaaatgttggat gctcat
SEQ ID NO:26 ROR γ T报告基因 质粒是SEQ ID NO:26- XXX-SEQ ID NO. 38 (“XXX”表示编码 目标载体蛋白的核 苷酸序列)	actcgtccttttcaatattattgaagcatttatcagggttactagtagctctcctcaaggataagtaaat attaagggtacgggaggtattggacagccgcaataaaatatctttatttccattacatctgtgtgttggttt ttgtgtgaatcgatagtactaacatacgtctccatcaaaacaaaacgaacaaaacaaactagcaaaa taggctgtccccagtgcaagtgcaggtgccagaacatttctctggcctaacTGGCCGGTACct gagctcGGTAAGTAGGTCATGGTAAGTAGGTCATGGTAAGTAGG TCATGGTAAGTAGGTCATGGTAAGTAGGTCATCGTGACctcgag gatatcaaGATCTACTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCA GCTTGGCAATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACC -XXX-
SEQ ID NO. 38	AAATTCTCACGGCTTCCCTCCCGAGGTGGAGGAGCAGGCCGC CGGCACCCTGCCCATGAGCTGCGCCAGGAGAGCGGCATGG ATAGACACCCTGCTGCTTGCGCCAGCGCCAGGATCAACGTCT TCGAATTGGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCCTCG AGAGCTCCAATTCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC

[0125]

TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCA
 CATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGC
 ACCGATCGCTAGTGAGGCCGGccgcttcgagcagacatgataacattgat
 gagtttgacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgcttatttggaaatttgcgatgtattg
 ctttattgtaaccattataagctgcaataaacagttaacaacaacaattgcattctttatgtttcaggtt
 cagggggagggtgtgggagggtttttaagcaagtaaaacctctacaatgtggtaaaatcgataagga
 tccgtttgcgtattggcgctcttccgctgatctgcgcagcaccatggcctgaaataacctctgaaaga
 ggaacttggttagctaccttctgaggcggaagaaccagctgtggaatgtgttcagttagggtgtg
 aaagtcccaggctcccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccag
 gtgtggaaagtcccaggctcccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagc
 aaccatagtcgcccccctaactccgccatcccgcccctaactccgccagttccgccattctccgc
 cccatggctgactaattttttatttatgcagaggccgaggccgctctgcctctgagctattccagaa
 gtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcaaaaagctcgattctctgacactagcgccac
 catgaagaagcccgaactaccgctaccagcgttgaaaaattctcatcgagaagtctgcacagtgtg
 agcgacctgatgcagttgtcggaggcggaagagagccgagccttcagcttcgatgtcggcgagc
 cggtatgtactgcgggtgaatagctgcgctgatggcttctacaaagaccgtacgtgtaccgccat
 tcgccagcgtgcactaccatcccgaagtgttgacatcggcgagttcagcgagagcctgacat
 actgcatcagtagacgcgcccaggcgttactctccaagacctcccgaacagagctgcctgctgt
 gttacagcctgtcgcgaagctatggatgctattgccgccgccgacctcagtcacaccagcggttc
 ggcccattcgggcccgaaggcatcggccagtcacacacctggcgggatttcatttgcgccattgctg
 atccccatgtctaccactggcagaccgtgatggacgacaccgtgtccgccagcgtagctcaagccct
 ggacgaactgatgtgtgggccgaagactgtcccaggtgcgccacctcgtcatgccacttcgg
 cagcaacaacgtcctgaccgacaacggccgcatcaccgccgtaatcgactggctccgaagctatgttc
 ggggacagtcagtcagaggtggccaacatcttcttggcgccctggctggcttgcattggagcag
 cagactcgtacttcgagcgccggcatcccagctggccggcagccctcgtctgcgagcctacatg
 ctgcgcatcggcctggatcagctctaccagagcctcgtggacggcaacttcgacgatgtgcctgg
 gctcaaggccgctgcgatgccatgtccgcagcggggccggcaccgtcggtcgcacacaaatcg
 ctgcgggagcgagccgtatggaccgacggctgcgtcagagtgctggccgacagcggcaaccg
 ccggcccagtcacgaccgcgcgctaaggaggtaggtcaggtttaaactctagaaccggctatggc
 cgcaataaaatatttttatttattacatctgtgtgtgtgttttgtgtgttcgaactagatgctgcgacc
 gatgcccttgagagcctcaaccagtcagctcctccggtgggcgcggggcatgactatcgtcgc
 gcacttatgactgtcttctttatca

[0126]

	tgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtgcgctcggt cgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggttatccacagaatcaggg gataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccg cgttgcggcggttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaatacgcagctcaagtcaga ggtggcgaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctcgtgcgtc tctgttccgacctgccgttacgggatactgtccgctttctcccttgggaagcgtggcgctttct atagctcacgctgtaggtatcagttcgggtaggtcgttcgtccaagctgggctgtgtgcacgaac cccccgtcagccgaccgctgcgcttatccggtaactatcgtcttgagtccaaccggtaagacac gacttatccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggatgtagggcggtgta cagagttcttgaagtgtggcctaactacggctacactagaagaacagattttggtatctgcgctcgt gaagccagttaccttcggaagaaagagttgtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggtagc ggtgggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctt ttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcattgagattatcaaa aggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagttttaaatacaatctaaagtatatatagtaaactt ggtctgacagcgccgcgaatgctaaccactgcagtggttaccagtgcttgatcagtgaggcaccg atctcagcgatctgcctatttcgttcgtccatagtgccctgactccccgtcgtgtagatcactacgattcgt gagggcttaccatcagggcccgagcgcagcaatgatgccgcgagagccgcgttcaccggccccga tttgtcagcaatgaaccagccagcagggaggccgagcgaagaagtgtcctgctactttgtccgcc tccatccagctctatgagctgctgtcgtgatgctagagtaagaagttcgccagtgagtagtttcgaaga gttgtggccattgctactggcatcgtggtatcacgctcgtcgttcgggtatggcttcgtcaactctggttc cagcgggtcaagccgggtcacatgatcacccatattatgaagaaatgcagtcagctccttagggcctcc gatcgttgcagaagtaagttggccgcggtgtgtcgtcgtatgtaatggcagcactacacaattctctt accgtcatgccatccgtaagatgctttccgtgaccggcgagtactcaaccaagtcgtttgtgagtagt gtatacggcgaccaagctgctcttgcccggtctatacgggacaacaccgcgccacatagcagtac tttgaaagtgtcatcatcgggaatcgttctcggggcggaagactcaaggatcttgccgctattgag atccagttcgatatagcccactcttgaccagttgatcttcagcatctttactttaccagcggttcggg gtgtgcaaaaacaggcaagcaaatgccgcaaagaagggaatgagtgcgacacgaaaatgttggat gctcat
SEQ ID NO:27	actcgtccttttcaataattattgaagcatttatcagggttactagtagctctcctcaaggataagtaaat attaaaggtagcgggaggtattggacaggccgcaataaaatatctttattttcattacatctgtgtgttggttt

[0127]

5xGal4UAS报告基 因质粒是SEQ ID NO:27- XXX-SEQ ID NO. 39 (“XXX”表示编码 目标载体蛋白的核 苷酸序列)	ttgtgtgaatcgatagtactaacatacgtctccatcaaaacaaaacgaaacaaaacaaactagcaaaa taggctgtccccagtgcaagtcaggtgccagaacatttctctggcctaactggccgggtaccAAG ATTTctgcagCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCC GAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGC GGAGTACTGTCCTCCGCTCGAGGATATCaGATCTACTAGAGG GTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAGCTTGGCAATCCGGTAC TGTTGGTAAAGCCACC -XXX-
SEQ ID NO. 39	AAATTCTCACGGCTTCCCTCCCGAGGTGGAGGAGCAGGCCGC CGGCACCCTGCCCATGAGCTGCGCCAGGAGAGCGGCATGG ATAGACACCCTGCTGCTTGCGCCAGCGCCAGGATCAACGTCT TCGAATTGGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCCTC GAGAGCTCCAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCA CATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCA CCGATCGCTAGTGAGGCCGGccgcttcgagcagacatgataagatacattgatg agtttgacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgtaaattgtgatgctattgctt tatttgaaccattataagctgcaataaacagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttca gggggaggtgtgggaggtttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgttgtaaaatcgataaggatcc gtttgcgtattggcgctcttccgctgatctgcgcagcaccatggcctgaaataacctctgaaagagga acttggttagctaccttctgagcggaagaaccagctgtggaatgtgtgtagttaggggtgtgaaa gtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaagcatgcatctcaattagtcagcaaccaggtgt ggaaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaagcatgcatctcaattagtcagcaacca tagtcccgcccctaactccgccatcccgcccctaactccgccagttccgccattctccgcccatg gctgactaattttttatttatgcagaggccgaggccgcctctgctctgagctattccagaagtagtgagg aggctttttggaggcctaggcttttgcaaaaagctcgattctctgacactagcgccaccatgaaga

[0128]

agcccgaaactcaccgctaccagcgttgaaaaatttctcatcgagaagttcgacagtgtgagcgacctg
atgcagttgtcggaggcggaagagagccgagccttcagcttcgatgtcggcgagcgcggctatgta
ctcgggtgaatagctgcgtgatggcttctacaagaccgctacgtgtaccgccattcggcagcgc
tgcactaccatccccgaagtgttgacatcggcgagttcagcgagagcctgacatactgcatcagta
gacgcgcccgaaggcgttactctccaagacctccccgaaacagagctgcctgctgtgttacagcctgtc
gccgaagctatggatgctattgccgccgccacctcagtcacaccagcggttcggccattcgggc
cccgaaggcatcgccagtacacaacctggcgggatttcattgcgccattgctgatccccatgtctacc
actggcagaccgtgatggacgacaccgtgtccgccagcgtagtcacagccctggacgaactgatgc
tgtgggccgaagactgtcccagggtgcgccacctcgtccatgccgacttcggcagcaacaacgtcct
gaccgacaacggccgcatcaccgccgtaatcgactggctcgaagctatgttcggggacagtcagtac
gaggtggccaacatcttcttggcggccctggctggcttgatggagcagcagactcgtacttcga
ggccggcatcccgagctggccggcagccctcgtctgcgagcctacatgctgcgcatcggcctgga
tcagctctaccagagcctcgtggacggcaacttcgacgatgctgctgggctcaaggccgctgcgat
gccatcgtccgagcggggccggcaccgtcggctcgacacaaaatcgctcgccggagcgcagccgt
atggaccgacggctgcgtcgtgaggtgctggccgacagcggaaccgccggcccagtcacgaccg
cgcgctaaggaggtaggtcgagtttaactctagaaccggtcatggccgaataaaatattttttt
attacatctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgaactagatgctgtcgaccgatgcccttgagagccttaac
ccagtcagctccttcgggtgggcgcggggcatgactatcgtcgccgcaactatgactgtcttctatca
tgcaactgtaggacaggtgcggcagcgccttccgcttcctcgtcactgactcgtcgcgtcgggt
cgttcggctgcggcgagcggatcagctcactcaaggcggtataacggttatccacagaatcaggg
gataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccg
cgttgctgcggttttccataggctccgccccctgacgagcctacaaaaatcgacgctcaagtcaga
gggtggcgaacccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctggaagctcctcgtgcgtc
tctgttccgacctgcgcttaccggatcctgtcgccttctccttcgggaagcgtggcgcttctc
atagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaac
ccccgctcagccgaccgctgcgcttatccgtaactatcgtcttgagtcacaccggttaagacac
gacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgcta
cagagttctgaagtgggtgacctacggctacactagaagaacagattttggtatctgcgctcgtc
gaagccagttaccttcgaaaaagagttgtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggtagc
gggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctt
ttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggtttgtgcatgagattatcaaaa

[0129]

aggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagtitttaatacaatctaaagtataatagtaaactt
ggctgacagcggcgcaaatgctaaccactgcagtggttaccagtgcttgatcagtgaggcaccg
atctcagcgatctgcctattcgttcgtccatagtgccctgactccccgtcgtgtgatcactacgattcgt
gaggcgcttaccatcaggccccagcgcagcaatgatgccgcgagagccggttcaccggccccga
ttgtcagcaatgaaccagccagcagggaggggccgagcgaagaagtggctctgctacttttccgcc
tccatccagctatgagctgctgtcgtgatgctagtaagaagttcgccagtgtgagtagttccgaaga
gttgtggccattgctactggcatcgtggatcacgctcgtcgttcggatggcttcgttcaactcgttcc
cagcggtcaagccgggtcacatgacccatattatgaagaaatgcagtcagctccttagggcctcc
gatcgtgtgcagaagtaagttggccgcggtgtgtcgtcgtatgtaatggcagcactacacaattctctt
accgtcatgccatccgtaagatgctttccgtgaccggcgagttactcaaccaagtcgtttgtgagtagt
gtatacggcgaccaagctgctcttgcggcgctctatacgggacaacaccgcgccacatagcagtac
ttgaaagtgtcatcatcgggaatcgttctcggggcggaagactcaaggatcttgcgctattgag
atccagttcgatatagccactcttgcaccagttgatcttcagcatcttactttaccagcgtttcggg
gtgtgcaaaaacaggcaagcaaaatgccgcaaaagggaatgagtcgacacgaaaatgttggat
gctcat

[0130] 在某些实施方式中,所述核酸是所述细胞的染色体。例如,可以修饰所述细胞的染色体(例如,使用基因组编辑技术,如同源重组、CRISPR-Cas9、转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)等),以使得编码所述ED的所述区域插入所述染色体中。在一些实施方式中,将编码所述ED的所述区域插入所述细胞的基因组中,以使得编码所述ED的所述区域可操作地偶联至所述染色体的天然启动子区域。所述天然启动子区域可以是用于评估一个或多个目标基因的转录活性和/或一个或多个目标细胞信号转导通路的启动子区域。仅举一个实例,如果

希望评估细胞中NF κ B信号转导通路的活性,可以将编码ED的区域插入包含NF κ B结合位点的启动子区域的位点特异性下游。在某些实施方式中,将编码ED的区域与启动子区域(即,外源性启动子区域)一起插入染色体,其中编码所述ED的所述区域可操作地偶联至所述外源性启动子区域。在其中所述核酸是所述细胞的染色体的任何实施方式中,所述染色体可以是核染色体或线粒体染色体。

[0131] 在某些实施方式中,所述核酸还编码与所述ED融合的载体蛋白,以使得当所述启动子区域是活性的时表达ED-载体蛋白融合物。针对所述ED选择的载体蛋白可以赋予ED不同的所需物理或生物学性质(例如,稳定性、定位、生物惰性、通过不同于EFC的另一种方法检测等)。根据一些实施方式,所述载体蛋白包含选择以影响ED-载体蛋白融合物稳定性的结构域。在某些实施方式中,与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白融合物相比,所选择的所述结构域增加所述ED-载体蛋白融合物的稳定性。在其他实施方式中,与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白融合物相比,所选择的所述结构域稳定所述ED-载体蛋白融合物。例如,所述结构域可以是针对蛋白酶体降解(例如,泛素依赖性蛋白酶体降解)而靶向所述ED-载体蛋白融合物的结构域。可以使用以靶向针对蛋白酶体降解的所述ED-载体蛋白融合物的结构域的一个实例是脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T) (PEST)降解信号。此类结构域的另一个实例是CL1降解信号。在下表2中提供了示例性PEST和CL1降解信号的氨基酸序列。

[0132] 表2-降解信号的氨基酸序列

[0133]	PEST降解信号(SEQ ID NO:28)	SHGFPPEVEEQAAGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINV
	CL1降解信号(SEQ ID NO:29)	ACKNWFSSLSHFVIHL

[0134] 在某些实施方式中,所述载体蛋白包含选择以组合影响所述ED-载体蛋白融合物稳定性的两个或多个结构域。例如,载体蛋白可以包含PEST降解信号和CL1降解信号,以相对于使用单个此类信号实现的靶向增强所述ED-载体蛋白融合物针对蛋白酶体降解的靶向。

[0135] 在很多实施方式中,所述启动子还与载体蛋白偶联,以使得载体蛋白的存在增强了与依赖于(1)全长(单一多肽)的酶,如全长荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT);和2)荧光蛋白的表达的现有报告系统相比在更灵敏和高效的测定中得到的信号。所述载体蛋白可以可操作地与启动子区域偶联。所述载体蛋白可以具有可检测的活性,以使得可以通过公知的检测方法检测载体蛋白的表达。在很多其他实施方式中,所述载体蛋白的可检测活性与所述 β -半乳糖苷酶的酶活性是不同的。

[0136] 在其他实施方式中,载体蛋白可以与可操作地同启动子区域偶联的 β -半乳糖苷酶的ED酶片段融合。在很多实施方式中,当所述启动子区域是活性的时所述载体蛋白可以与所述ED酶片段共表达以增强输出信号或数据点。在本公开的方法中使用的载体蛋白可以具有与 β -半乳糖苷酶的酶活性不同的可检测的酶活性,其中当所述启动子区域是活性的时,可以使用针对所述酶活性公知的检测方法检测所述载体蛋白的酶活性。具有可检测的酶活性的载体蛋白可以是荧光素酶、经修饰的荧光素酶、荧光蛋白、天然蛋白或合成蛋白。

[0137] 此外,所述载体蛋白还可以是突变的载体蛋白,其中在所述载体蛋白中的突变使得所述载体蛋白的酶活性抑制,以使得当所述启动子区域具有活性时所述载体蛋白不表达

任何可检测的活性。具有此类突变的载体蛋白可以融合至可操作地与启动子区域偶联的ED酶片段,其中如果表达所述ED片段与EA酶片段组合以形成具有酶活性的ED-EA酶复合物,并测量所述酶活性以评估目标启动子区域的活性,从而评估转录因子的活性。因此,本发明公开了具有与 β -半乳糖苷酶不同的酶活性的载体蛋白的用途,还公开了突变的载体蛋白,其使所述载体蛋白的酶活性失活。

[0138] 在很多实施方式中,载体蛋白不具有任何内在的酶活性。所述载体蛋白还包含经选择以影响 β -半乳糖苷酶片段的稳定性的结构域,例如,酶供体(ED)片段-载体蛋白融合物,其中与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白融合物相比,经选择的结构域增加所述ED-载体蛋白融合物的稳定性。此外,载体蛋白还可以包含经选择以与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白融合物相比使所述ED-载体蛋白融合物不稳定的结构域。

[0139] 如上文所总结的,本公开内容的方法进一步包括检测酶活性的水平以评估所述启动子区域的活性。根据一些实施方式,检测所述酶活性的水平包括提供所述ED-EA复合物的底物,其中在通过所述ED-EA复合物水解所述底物后产生可检测的信号。在某些实施方式中,所述可检测的信号是化学发光信号。

[0140] 所述方法的方面包括使用亲和性降低的酶互补报告系统,如 β -半乳糖苷酶片段互补(EFC)报告系统。“亲和性降低的”酶互补报告系统指由两个或更多个酶的片段(即,报告亚基)组成的系统,这些片段本身缺乏在其亲本酶中观察到的任何可检测的活性(其可以直接或间接检测),但是当其足够接近时,例如,通过随机相互作用或结合成员介导的相互作用,产生可检测的量的亲本酶的活性。本发明的亲和性降低的酶互补报告系统的一个方面是在所述系统中使用的至少一个报告亚基是其野生型亲本酶中相应结构域的变体,以使得其与所述系统中其他亚基的相互作用在测定条件下是可逆的,缺乏由目标结合部分所介导的相互作用。在该系统中使用 β -半乳糖苷酶的小片段和 β -半乳糖苷酶的更大片段,其中这两个片段彼此之间具有较低的亲和性。 β -半乳糖苷酶的小片段酶供体(“ED”)可以具有天然存在的序列或突变的序列。根据一些实施方式,所述ED是 β -半乳糖苷酶的供体片段。可以使用各种 β -半乳糖苷酶片段ED。在某些实施方式中,当所述ED是 β -半乳糖苷酶供体片段时,所述ED包含在下表3中所示的氨基酸序列或其变体(例如,相对于表3中所示的氨基酸序列,具有10个或更少、8个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、2个或更少或者1个保守性氨基酸取代的其变体),其与EA复合以形成具有酶活性的酶。在下表3中提供了示例性 β -半乳糖苷酶供体片段ED的氨基酸序列。

[0141] 可以使用化学发光测定检测 β -半乳糖苷酶或者形成具有酶活性的活性 β -半乳糖苷酶复合物的ED-EA复合物的活性。例如,在包含来自Galactolight Plus测定试剂盒(Tropix, Bedford Mass.)的Galacton Plus底物的缓冲液混合物中裂解包含 β -gal融合物的细胞。Bronstein等, J. Biolumin. Chemilumin., 4:99-111 (1989)。添加光发射加速剂溶液后,在光度计或闪烁计数器中测量发光。在很多实施方式中,针对 β -半乳糖苷酶的酶活性的检测方法还包括裂解所述细胞并使用任何能够产生可检测产物(如直接显色、荧光或化学发光底物或者具有生物发光读取的偶联测定的底物)的任何 β -半乳糖苷酶底物检测。

[0142] 表3-示例性 β -半乳糖苷酶供体片段ED的氨基酸序列

[0143]	β-半乳糖苷酶供体片段 ED (SEQ ID NO:30)	NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR
	β-半乳糖苷酶供体片段 ED (SEQ ID NO:31)	MGVITDSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEE ARTDRPSQQL
	β-半乳糖苷酶供体片段 ED (SEQ ID NO:32)	MGVITDSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASYRNSEEA RTDRPSQQL

[0144] 如本文所用,“保守性取代”是其中一种氨基酸被具有像似性质的另一种氨基酸取代的取代,以使得肽/蛋白质化学领域的技术人员将能够预期所述肽/蛋白质或其结构域的二级结构和亲水性性质基本上不变。可以在特定实施方式中涉及的多核苷酸和多肽的结构中进行修饰,并且仍然获得编码具有所需特征的变体或衍生多肽的功能性分子,例如,与EA复合以形成具有糖苷水解酶活性的酶的能力。当需要改变ED、EA或其结构域的氨基酸序列以形成等效物或者甚至改善的变体ED或EA时,本领域技术人员,例如,可以改变一个或多个编码DNA序列的密码子。

[0145] “EA”指用于酶片段互补测定中的酶受体片段。在某些实施方式中,ED是β-半乳糖苷酶供体片段和EA是β-半乳糖苷酶受体片段。举例来说,ED可以是包含表3中所示的氨基酸序列的ED(或者与EA复合物以形成具有糖苷水解酶活性的酶的其变体),和EA是可商购的EA,其与ED复合以形成具有糖苷水解酶活性的酶。根据一些实施方式,在可以从Eurofins DiscoverX,Corporation购买的PathHunter® ProLabel®/ProLink™检测试剂盒中提供了此类EA。

[0146] 本公开内容的方法包括如果表达将ED与EA接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物。在一些实施方式中,当所述EA与所述EA接触时,所述细胞是完整的。例如,当所述细胞是活的时,当所述细胞被固定时等情况下,所述ED可以与所述EA接触。当所述EA与所述EA接触时所述细胞是完整的,所述EA通常是细胞可渗透的酶片段,以使得所述EA可以穿过细胞膜与在所述细胞中表达的所述ED接触。当使用基于β-半乳糖苷酶的EFC系统时,可以使用一系列方法来测量β-半乳糖苷酶的酶活性,包括使用活细胞流式细胞术以及使用显色底物5-溴-4-氯-3-吲哚基β-D-吡喃半乳糖苷(X-Gal)的组织化学染色。参见例如,Nolan等,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,85:2603-2607(1988);和Lojda,Z.,Enzyme Histochemistry: A Laboratory Manual, Springer, Berlin(1979)。可以用于活细胞的β-gal的重要底物也涵盖在本公开的方法和材料中。例如,已描述了荧光底物试卤灵β-半乳糖苷酶双氨基丙基聚乙二醇1900(RGPEG)。Minden(1996)BioTechniques 20(1):122-129。可以通过显微注射、电穿孔或各种批量负载技术将这种化合物递送到细胞中。一旦进入细胞,所述底物就无法通过质膜或间隙连接逸出。可以用于本公开的方法和材料中的另一种重要底物是荧光素二-β-D-吡喃半乳糖苷(FDG),其特别适于通过荧光激活细胞分选(FACS)和流式细胞术进行分析。Nolan等,Proc.Natl.Acad.Sci,USA,85:2603-2607(1988)和Rotman等,(1963)Proc.Natl.Acad.Sci,USA 50:1-6。

[0147] 在一些实施方式中,所述方法还包括裂解所述细胞,并将所述ED与所述EA接触,其包括将细胞裂解物与所述EA组合。可以将任何适宜的裂解试剂(例如,裂解缓冲液)用于裂解所述细胞。裂解缓冲液的非限制性实例包括NP-40裂解缓冲液、RIPA(放射免疫沉淀测定)裂解缓冲液、SDS(十二烷基硫酸钠)裂解缓冲液、ACK(氯化铵-钾)裂解缓冲液等。裂解缓冲

液可以包含缓冲盐(例如,Tris-HCl)和/或离子盐(例如,NaCl),以调节裂解物的pH和渗透压。可以添加去垢剂(如Triton X-100或SDS),以破坏细胞膜结构。裂解缓冲液可以包含另外的有用成分,如蛋白酶抑制剂等。当所述方法包括裂解细胞并使用基于 β -半乳糖苷酶的EFC系统时,可以使用化学发光测定检测活性重构 β -半乳糖苷酶。例如,可以在包含来自Galactolight Plus测定试剂盒(Tropix,Bedford Mass.)的Galacton Plus底物的缓冲液混合物中裂解(与或不与交联剂接触)包含重构 β -半乳糖苷酶(通过EFC)的细胞。Bronstein等,J.Biolumin.Chemilumin.,4:99-111(1989)。添加光发射加速剂溶液后,在光度计或闪烁计数器中测量发光。在一些实施方式中,当所述方法包括裂解细胞并使用基于 β -半乳糖苷酶的EFC系统时,可以使用从Eurofins DiscoverX Corporation购买获得的PathHunter[®] ProLabel[®]/ProLinkTMorKILR[®]检测试剂盒以通过化学发光检测酶活性。

[0148] 本公开内容还提供了细胞。所述细胞可用于实施本公开内容的方法。本公开内容的细胞可以包含本公开内容的任何核酸,其包含编码可操作地与启动子区域偶联的酶供体(ED)的区域,包括在上述本方法部分和下述实验部分描述的任何核酸,为简洁起见将这些内容并入本文但未在此重申。在一些实施方式中,所述细胞具有在上述本方法部分和下述实验部分描述的细胞的任何特征(例如,可以是任何细胞类型等),为简洁起见将这些内容并入本文但未在此重申。

[0149] 组合物

[0150] 如上文所总结的,本公开内容还提供了组合物。在某些实施方式中,所述组合物可用于例如实施本公开内容的方法。根据一些实施方式,本公开内容的组合物包括本公开内容的任何核酸和/或任何细胞,包括在上述方法部分和下述实验部分中描述的任何核酸和/或细胞,为简洁起见将这些内容并入本文但未在此重申。

[0151] 本公开内容的组合物可以包含存在于液体培养基中的本公开内容的任何核酸和/或任何细胞。所述液体培养基可以是水性液体培养基,如水、缓冲溶液、细胞培养基(例如,DMEM、RPMI、MEM、IMDM、DMEM/F-12)等。一种或多种添加剂,如抗生素、盐(例如,NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄)、缓冲剂(Tris缓冲剂、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉)丙磺酸(MOPS)、N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)等)、增溶剂、去垢剂(例如,非离子去垢剂,如吐温-20等)、核酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、甘油、螯合剂等可以存在于此类组合物中。

[0152] 在某些实施方式中,提供了一种组合物,其包含存在于缓冲的液体培养基中的本公开内容的任何细胞。根据一些实施方式,所述液体培养基是细胞培养基,例如,DMEM、RPMI、MEM、IMDM、DMEM/F-12等。在某些实施方式中,提供了一种组合物,其包含以冻干形式存在或在缓冲的液体培养基中存在的本公开内容的任何核酸。

[0153] 本公开内容的组合物可以存在于任何适宜容器中,如管、小瓶、安瓿、板的一个或多个孔,例如,4、6、8、12、24、48、96、384、1536孔组织培养板等。

[0154] 试剂盒

[0155] 本公开内容的方面还包括试剂盒。在某些实施方式中,所述试剂盒可用于例如实施本公开内容的方法。根据一些实施方式,本公开内容的试剂盒包含本公开内容的任何核酸、细胞和/或组合物,包括在上述方法和组合物部分和下述实验部分中描述的任何核酸、细胞和/或组合物,为简洁起见将这些内容并入本文但未在此重申。

[0156] 在某些实施方式中,提供了一种试剂盒,其包含含有核酸的细胞,所述核酸包含编码与启动子区域可操作地偶联的酶供体(ED)的区域,以及使用所述细胞以进行本公开内容的任何方法的说明书。例如,所述试剂盒可以包含用于评估所述核酸的所述启动子区域的活性的说明书。所述试剂盒可以包含用于在上述方法部分和下述实验部分中描述的任何培养、接触、检测等步骤中的说明书(和任何有用的试剂)。

[0157] 在很多实施方式中,提供了一种试剂盒,其包含含有核酸的细胞,所述核酸包含编码与可操作地偶联至启动子区域的ED融合的载体蛋白的区域,以及使用所述细胞以进行本公开内容的任何方法的说明书。

[0158] 本公开内容的试剂盒还可以包含用于在培养期间将所述细胞与试剂(例如,对照试剂、检测试剂和/或类似物)接触,并基于所检测的酶活性水平评估响应于所述细胞与所述试剂(例如,小分子、蛋白(例如,细胞表面蛋白)、核酸等)接触的所述启动子区域的活性水平的说明书。此类试剂盒还可以包含用于将所述细胞与对照激动剂接触的说明书,所述对照激动剂激活目标细胞信号转导通路。此类试剂盒还可以包含对照激动剂。可以将所述启动子区域的活性水平作为评估所述试剂对目标转录因子和/或目标细胞信号转导通路的影响的基础。所述说明书可以包括进行此类评估的说明。

[0159] 根据一些实施方式,由在所述试剂盒的细胞中存在的核酸编码的ED是 β -半乳糖苷酶供体片段ED。例如,所述ED可以包含表3中所示的示例性 β -半乳糖苷酶供体片段ED的氨基酸序列,或者能够与EA复合以形成具有糖苷水解酶活性的酶的其变体。在某些实施方式中,本公开内容的试剂盒包含EA。例如,当所述细胞的所述核酸编码 β -半乳糖苷酶供体片段ED时,在所述试剂盒中包含的所述EA可以是选择的 β -半乳糖苷酶受体片段EA,以使得所述ED-EA对通过EFC产生具有糖苷水解酶活性的功能性酶。

[0160] 根据一些实施方式,本公开内容的试剂盒还包含在使ED与EA接触前用于裂解细胞的说明书。在某些实施方式中,本公开内容的试剂盒包含裂解试剂。可以包含在本公开内容的试剂盒中的裂解缓冲液的非限制性实例包括NP-40裂解缓冲液、RIPA(放射免疫沉淀测定)裂解缓冲液、SDS(十二烷基硫酸钠)裂解缓冲液、ACK(氯化铵-钾)裂解缓冲液等。在其他实施方式中,本公开内容的试剂盒还包含当所述细胞是完整的时用于将ED与EA接触的说明书。此类试剂盒可以包含在活细胞中(并通过流式细胞术进行检测等),在固定的完整细胞中,将ED与EA接触的说明书。

[0161] 试剂盒的组分可以存在于单独的容器中,或者多个组分可以存在于单个容器中。适宜容器包括单独的管(例如,小瓶)、安瓿、一个或多个板的孔等。

[0162] 随试剂盒提供的说明书可以记录在适宜的记录介质上。例如,所述说明书可以印刷在基材上,如纸或塑料等。这样,所述说明书可以作为包装插页存在于所述试剂盒中,存在于所述试剂盒或其组分的容器标签中(即,与包装或子包装相关联)等。在其他实施方式中,所述说明书作为电子储存数据文件存在于适宜计算机可读存储介质上,例如,便携式闪存驱动器、DVD、CD-ROM、软盘等。在其他实施方式中,在所述试剂盒中不存在实际说明书,而是以从远程来源(例如,通过互联网)获得的方式提供。这种实施方式的实例是包含可以查看说明书和/或可以从其下载说明书的网址的试剂盒。与说明书一样,获得所述说明书的方式记录在适宜的基材上。

[0163] 提供以下实施例以进行说明而非限制。

[0164] 实验

[0165] 实施例1-NFAT EFC报告基因构建体

[0166] NFAT EFC报告基因构建体包含具有4个串联重复(4x) NFAT转录因子结合应答元件的启动子,每个元件具有以下序列:

[0167] GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT (SEQ ID NO:5)。PEST是蛋白去稳定序列(一种富含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)的肽序列),其增强蛋白酶体介导的报告基因增强ProLabel(ePL)蛋白的周转。ePL蛋白是 β -半乳糖苷酶无活性的~45个氨基酸的片段。之前已经证明减少载体蛋白的寿命可以缩短检测所需的应答时间,并可能增加对配体浓度的敏感性(Fan和Wood, Assay Drug Dev Technol. 2007Feb; 5(1):127-36)。

[0168] 图1显示了NFAT EFC报告基因构建体的质粒图谱,其用于基于EFC的NFAT转录因子激活和影响NFAT的信号转导通路激活的测定。可以将不同启动子元件(例如,在本实施例中的4x应答NFAT元件)、不同载体蛋白和不同去稳定基序(例如,在本实施例中的PEST)用于针对不同应用来靶向和调整这些构建体。

[0169] 图2显示了U2OS NFAT EFC报告细胞对佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)和离子霉素的“细胞刺激”混合物的剂量应答曲线(DRC)(数据表示为1x倍,其中1x混合物是81nM PMA/1.34 μ M离子霉素细胞刺激)。刺激细胞20h,然后通过PathHunter[®]FLASH检测试剂(+酶受体(EA))进行检测,细胞裂解1h。5K和10K指在384孔板的每孔中接种的细胞数。S/B是测定应答曲线的背景(底部)上的信号(顶部)。

[0170] 已知佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)和离子霉素的“细胞刺激”混合物可激活“NFAT信号转导通路”和NFAT转录因子。使用不同稀释度的PMA/离子霉素混合物(其中1X=81nM PMA/1.34 μ M离子霉素)刺激用NFAT EFC报告基因构建体(参见图1)稳定转染的U2OS细胞20h,揭示了NFAT EFC报告基因的剂量依赖性刺激,如添加+EA后EFC所证明的。使用5,000个细胞时,混合物的效力显示为0.047X(或3.8nMPMA/63nM离子霉素)。这些数据表明,U2OS NFAT EFC报告细胞适合开发用于激活或抑制“NFAT信号转导通路”和NFAT转录因子的测定。在刺激剂量的细胞刺激混合物或其他活化配体存在下,随着测试化合物的相对光单位(RLU)降低,可以检测到抑制作用。

[0171] 实施例2-NF κ B EFC报告基因构建体

[0172] NF- κ B EFC报告基因质粒包含具有5个串联重复NF- κ B转录因子结合应答元件的启动子,其中3个GGGAATTTC (SEQ ID NO:6)序列被2个交替的GGGGACTTTC (SEQ ID NO:6)序列散布。

[0173] 图3显示了NF- κ B EFC报告基因质粒的质粒图谱,其用于基于EFC的NF- κ B转录因子激活和NF- κ B信号转导通路激活的测定。可以将不同载体蛋白和不同去稳定基序(例如,在本实施例中的PEST)用于针对不同应用调整这些构建体。

[0174] 图4:U2OS NF- κ B EFC报告细胞的单细胞克隆对细胞因子TNF α 的应答。将来自稳定表达NF- κ B EFC报告基因构建体的U2OS细胞的5个单独单细胞克隆的2500个细胞/孔接种在384孔板中。使用所示浓度的TNF α 刺激细胞6h,随后通过PathHunter[®]FLASH检测试剂(+5x EA)检测细胞裂解物。

[0175] 已知TNF α 刺激“NF- κ B信号转导通路”和NF- κ B转录因子。使用不同稀释度的TNF α 刺

激活NF- κ B EFC报告基因构建体稳定转染的U2OS细胞6h揭示了NF- κ B EFC报告基因的剂量依赖性刺激,如添加+EA后EFC所证明的(图4)。针对不同克隆,TNF α 的效力显示为0.03-0.12nM。这些数据表明U2OS NF- κ B EFC报告细胞能够对细胞因子TNF α 做出敏感的应答,表明开发用于激活或抑制NF- κ B信号通路和NF- κ B转录因子的检测方法的可能性。可以通过在刺激剂量的TNF α 或其他激活配体存在下寻找测试化合物的RLU减少来开发抑制测定(参见图5)。

[0176] 图5:使用基于U2OS NF κ B EFC报告细胞的测定筛选抑制剂。使用2nM TNF α (激动剂)处理U2OS NF κ B EFC报告细胞,使用或不使用各种浓度(和3个批次)的抗TNF α 抑制剂阿达木单抗。在该实施例中,所检测的3个批次的修美乐均来自批号#1047318,通过强制降解方案来模拟特定活性降低或活性丧失,其中样品是未应激(例如,对照)、在70°C下应激15min和在70°C下应激30min。

[0177] U2OS NF- κ B EFC报告细胞还可以用于测量抑制以及研究NF- κ B信号转导抑制剂。将U2OS NF- κ B EFC报告测定用于证明阿达木单抗(修美乐[®])能够抑制TNF α 刺激的NF- κ B信号转导(图5)。这种抑制应答的剂量依赖性允许测量不同批次阿达木单抗的效力。图5中修美乐[®]显示了修美乐[®]样品在通过加热进行不同程度的强制降解后抑制效力的变化。值得注意的是,强制降解是一种用于开发生物制品(蛋白疗法)测定的方法,以模拟具有不同效力的批次,例如,用于QC/批次出厂测定,或者各种原因导致的效力丧失。U2OS NF- κ B EFC报告基因测定检测了在70°C下强制降解0、15或30min的修美乐[®]样品的效力分级丧失(右移)。还可以使用该测定研究随着时间的推移修美乐[®]的稳定性。可以看出,两批修美乐[®]储存在4°C(均为商业采购,因此在出厂时其效力基本相同),一批未过期(#1047318)和一批超过14个月过期(#1017235),其在TNF α 刺激的U2OS NF- κ B EFC报告基因测定中均显示具有相同的NF- κ B通路抑制效力(图6)。

[0178] 图6:NF κ B EFC报告基因测定表明,尽管批次#1017235已超过14个月过期(修美乐[®]批次#1047318未过期),但是所检测的两个修美乐[®]批次具有相同的TNF α 抑制活性和效力。在图5中所示的强制降解实验中,过期批次#1017235还与批次#1047318具有相同的稳定性。

[0179] 图7:NF κ B EFC报告基因检测细胞中的内源性CD40受体在孵育3h或6h后对CD40配体(CD40L)产生强烈应答。这些相同的细胞也内源性表达TNF受体并对可溶性TNF α 作出应答(如图4-6所示)。

[0180] 通常,通过不同细胞受体起作用的多种配体会刺激相同的信号通路,从而允许使用相同的EFC报告基因测定来研究这些多种配体的功能和功能抑制。例如,在图4-6中研究了TNF α 刺激的NF κ B信号转导和基因表达的刺激和抑制。使用相同测定,图7中的研究表明CD40L通过CD40受体作用也刺激了相同的转录因子和基因表达通路。

[0181] 实施例3-在共培养测定中的NFAT EFC报告细胞刺激

[0182] 具有当前研究兴趣的很多活性和抑制配体是可溶性胞外配体,如TNF α 、CD40L或可溶性胞内配体,如PMA和离子霉素。然而,基于这些相同细胞的EFC报告基因测定还可以用于研究呈递给另一个细胞表面测定细胞的细胞相关配体(例如,细胞-细胞或细胞间相互作用

用)。这种其他配体呈递细胞相对于测定细胞可以是异源或自体细胞。图8显示了在CHO-K1细胞表面上呈递的OKT3配体能够在Jurkat NFAT EFC报告细胞混合物中活化NFAT介导的基因表达。

[0183] 图8:在共培养测定中,Jurkat NFAT EFC报告细胞对CHO-K1细胞表面表达和呈递的OKT3配体作出应答。OKT3由与小鼠抗人T细胞受体CD3亚基的单链抗体片段融合的CD5前导肽组成,所述CD3亚基与无前导的人CD14融合;登录号HM208750.1。添加CHO OKT3细胞以分级方式刺激了NFAT EFC报告基因的载体蛋白表达,刺激OKT3细胞的EC₅₀为~700个细胞。

[0184] 实施例4-IL2-启动子-EFC报告基因构建体

[0185] 图9:IL2-启动子-EFC报告基因质粒的质粒图谱。在该报告基因构建体中,完整内源性IL2基因启动子(“IL2prom”),其包含融合到载体蛋白-ePL上游并驱动其表达的多个特异性转录因子结合位点,所述ePL与载体蛋白融合。IL2启动子中包含NFAT (1)、NFkB (2)、OCT (3)、ARRE-2 (4)和NFAT/AP1 (6)转录因子和IL2最小启动子 (7)的结合位点。

[0186] 所使用的IL2启动子的DNA序列是

[0187] gtacCTTTTCTGAGTTACTTTTGTATCCCCACCCCTTAAAGAAAGGAGGAAAACTGTTTCATACAG AAGGCGTTAATTGCATGAATTAGAGCTATCACCTAAGTGTGGGCTAATGTAACAAAGAGGGATTTACCTACATCC ATTCAGTCAGTCTTTGGGGGTTTAAAGAAATCCAAAGAGTCATCAGAAGAGGAAAAATGAAGGTAATGTTTTTTC AGACAGGTAAAGTCTTTGAAAATATGTGTAATATGTAAAACATTTTGACACCCCCATAATATTTTCCAGAATTAA CAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAGAGTTCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCT GCCAgctag (SEQ ID NO:11),并且包含8个不同转录因子结合位点和IL-2核心启动子,如 Weaver等(Molecular Immunology,06Mar 2007,44(11):2813-2819)所描述的。下述8个DNA 元件ACCCCTTAAAGAAAGGAGGAA (SEQ ID NO:12)、GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT (SEQ ID NO:13)、AATTGCATGAA (SEQ ID NO:14)、GGGATTTCCACC (SEQ ID NO:15)、 ATGAAGGTAATGTTTTTTCAG (SEQ ID NO:16)、GTCTTTGAAAATATGTGTAAT (SEQ ID NO:17)、 AAACATTTTG (SEQ ID NO:18)和TAATATTTT (SEQ ID NO:19)分别响应于转录因子NFAT&AP1、 NFAT、OCT、NFkB、NFAT&AP1、NFAT&AP1、OCT、NFAT,而IL-2核心启动子是

[0188] CAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAGAGTTCCTATCACTCT (SEQ ID NO:20),其中TATA盒以下划线表示。

[0189] 图10:Jurkat IL2启动子EFC报告细胞系可以通过激活不同的信号转导通路来检测多个不同应答元件的刺激。将5K Jurkat IL2启动子报告细胞接种在384孔板的孔中并且在37℃下使用OKT3细胞(方块)或OKT3细胞+CD28抗体(圆圈)刺激16h,然后添加FLASH检测试剂(+5x EA)和细胞裂解物(并读取EFC发光)。以每孔中OKT3呈递CHO-K1细胞的数量表示EC₅₀。

[0190] 携带OKT3的CHO-K1细胞刺激Jurkat细胞IL2启动子报告基因表达,这被认为主要通过激活NFAT应答元件而发生(图10,方块)。抗CD28抗体被认为主要通过NFkB应答元件起作用,增强了IL2启动子的OKT3刺激(图10,圆圈),如与仅OKT3细胞相比信号增加约2倍和EC₅₀降低约2倍所证实的。将OKT3+抗CD28的应答与单独OKT3的应答进行比较,证明了通过刺激多个应答元件和信号转导通路对IL2启动子EFC报告基因的相加(或协同)诱导。因此,这种更复杂的生理启动子可用于研究更复杂和整合的天然IL2启动子的调控,其更类似于体内IL2表达和分泌的调控。

[0191] 图11: IL2启动子EFC报告基因构建体(一种具有多种不同应答元件的复杂天然启动子)对两种不同信号转导通路(佛波酯和离子霉素)的细胞内模拟物的应答。将5K细胞接种在384孔板的孔中并刺激16h,随后添加FLASH检测试剂(+5x EA)和细胞裂解物(并读取发光)。S/B是通过RLU(含PMA/离子霉素)/RLU(不含PMA/离子霉素)来计算的。

[0192] 离子霉素和佛波酯PMA通过分别刺激NFAT和AP-1应答元件,增加了IL2启动子EFC报告基因构建体中不同元件的激活(图11)。与图10中显示的实例一样,这表明可以使用多个输入来研究更复杂和整合的天然IL2启动子的调控,其与体内IL2表达和分泌的调控更相似。

[0193] 实施例5-用于检测拮抗剂的启动子-EFC报告基因构建体

[0194] 图12:在表达ROR γ T转录因子和ROR γ T EFC报告质粒的U2OS细胞中,反向激动剂GSK805会降低ROR γ T转录因子的活性。使用GSK805 (Tocris) 处理细胞18h,然后通过添加EA和PathHunter[®] FLASH检测试剂检测载体蛋白-ePL的表达。

[0195] 可以将特定EFC报告基因构建体用于研究反向激动剂(反向激动剂是一种直接与转录因子或受体结合并将其活性降低到基础水平以下的配体)对转染的转录因子的活性。在这种情况下,反向激动剂GSK805显示可降低ROR γ T转录因子的活性,以刺激U2OS细胞中的ROR γ TEFC报告基因(图12)。

[0196] 实施例6-基于EFC的NF κ B转录报告基因测定显示出比荧光素酶系统更高的灵敏度

[0197] 图13:基于EFC的NF κ B转录报告基因测定显示出针对CD40L/CD40受体比荧光素酶系统更高的灵敏度。用编码NF κ B转录应答元件的质粒稳定转染的U2OS细胞驱动EFC报告基因(左图)或(萤火虫)荧光素酶-PEST的表达,用一系列浓度的CD40L刺激6h,然后细胞裂解,添加过量EA,孵育1h并测定发光(RLU)。检测到的发光表明CD40L对相应载体蛋白的诱导程度。

[0198] 基于EFC的NF κ B转录报告基因测定对CD40L的灵敏度比基于荧光素酶的测定高35倍以上。值得注意的是,用于制备稳定细胞系的报告基因质粒具有相同的元件,唯一的显著差异是载体蛋白的种类。具体而言,这两种质粒具有相同的启动子元件,并且均具有相同的蛋白去稳定元件(PEST序列)。因此,针对CD40L,报告基因测定检测EFC显著比检测荧光素酶活性更加灵敏。

[0199] 图14:基于EFC的NF κ B转录报告基因测定显示出比荧光素酶系统更高的灵敏度。用编码NF κ B转录应答元件的质粒稳定转染的U2OS细胞驱动EFC报告基因(左图)或(萤火虫)荧光素酶-PEST的表达,用一系列浓度的TNF α 刺激18h,然后细胞裂解,添加过量EA,孵育1h并测定发光(RLU)。检测到的发光表明TNF α 对相应载体蛋白的诱导程度。

[0200] 图14显示了基于EFC的NF κ B转录报告基因测定显示出对TNF受体配体TNF α 比荧光素酶系统更高的灵敏度。例如,配体TNF α 在EFC测定(左图)中的效力比荧光素酶测定(右图)强12-15倍,这在检测在筛选测定中对候选药物的弱应答方面可能是有利的。

[0201] 对于CD40L和TNF α ,观察到基于EFC的报告基因测定对配体刺激的灵敏度增加。这种增加的灵敏度是有益且重要的,因为其允许使用EFC报告基因测定来研究可能在化学抑制剂亲和性成熟早期发现的效力较弱的化合物(如在命中发现或药物发现的先导优化阶段的早期)。

[0202] 实施例7-用于NF κ B通路报告基因测定的细胞系

[0203] 将报告细胞系工程化以表达由通路诱导转录应答元件控制的酶供体 (ED) 标记的载体蛋白。通路激活导致ED标记蛋白的诱导表达。添加外源酶受体 (EA) 和缓冲液, 裂解细胞并迫使ED和EA酶片段互补。这导致形成功能性酶, 该酶水解底物以产生化学发光信号。

[0204] 在该实施例中, 所述细胞系是NFkB (核因子NF- κ -B p100亚基) 通路报告细胞系。该细胞是U2OS细胞, 其包含编码与包含NFkB应答元件的启动子区域可操作地偶联的具有氨基酸序列

[0205] NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR (SEQ ID NO:30) 的 β -半乳糖苷酶片段 (ED) 的核酸。

[0206] 将细胞接种在96孔板中并在37°C和5%CO₂下孵育, 以使得细胞贴壁和生长。然后, 使用对照激动剂 (此处为CD40L) 刺激细胞, 使用如下所述的测定条件。刺激之后, 根据推荐的方案使用 **PathHunter[®] ProLabel[®] ProLink[™]** 检测试剂盒 (Eurofins DiscoverX Corporation) 检测信号。

[0207] 测定条件

[0208]	细胞数/孔	5000
	细胞接种时间 (小时)	24
	对照激动剂	CD40L
	配体孵育时间 (分钟)	360
	配体孵育温度 (°C)	37

[0209] 结果如图15中所示。该报告细胞系显示出针对对照激动剂刺激的EC₅₀为225.4ng/mL和激动剂E_{MAX}的信号: 背景比为26.3。

[0210] 该细胞系经10次传代证实是稳定的, 测定窗口没有显著下降或EC₅₀变化。

[0211] 实施例8-用于NFAT通路报告基因测定的细胞系

[0212] 将报告细胞系工程化以表达由通路诱导转录应答元件控制的酶供体 (ED) 标记的载体蛋白。通路激活导致ED标记蛋白的诱导表达。添加外源酶受体 (EA) 和缓冲液, 裂解细胞并迫使ED和EA酶片段互补。这导致形成功能性酶, 该酶水解底物以产生化学发光信号。

[0213] 在该实施例中, 所述细胞系是NFAT (活化T细胞核因子) 通路报告细胞系。该细胞是Jurkat细胞, 其包含编码与包含NFAT应答元件的启动子区域可操作地偶联的具有氨基酸序列

[0214] NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR (SEQ ID NO:30) 的 β -半乳糖苷酶片段 (ED) 的核酸。

[0215] 将细胞接种在96孔板中并在37°C和5%CO₂下孵育, 以使得细胞贴壁和生长。然后, 使用对照激动剂 (此处为抗CD3抗体) 刺激细胞, 使用如下所述的测定条件。刺激之后, 根据推荐的方案使用 **PathHunter[®] ProLabel[®] ProLink[™]** 检测试剂盒 (Eurofins DiscoverX Corporation) 检测信号。

[0216] 测定条件

[0217]	细胞数/孔	20000
	细胞接种时间 (小时)	24
	对照激动剂	抗CD3抗体

配体孵育时间	过夜
配体孵育温度(°C)	37

[0218] 结果如图16中所示。该报告细胞系显示出针对对照激动剂刺激的 EC_{50} 为302.5ng/mL和激动剂 E_{MAX} 的信号:背景比为7.6。

[0219] 对于该测定,通过接种50L在PBS中制备的1:3系列稀释物并在4°C下将板孵育过夜在孔中预包被抗CD3抗体[OKT3]。在接种用于测定的细胞之前,从孔中除去抗体。

[0220] 该细胞系经10次传代证实是稳定的,测定窗口没有显著下降或 EC_{50} 变化。

[0221] 实施例9-用于STAT3通路报告基因测定的细胞系

[0222] 将报告细胞系工程化以表达由通路诱导转录应答元件控制的酶供体(ED)标记的载体蛋白。通路激活导致ED标记蛋白的诱导表达。添加外源酶受体(EA)和缓冲液,裂解细胞并迫使ED和EA酶片段互补。这导致形成功能性酶,该酶水解底物以产生化学发光信号。

[0223] 在该实施例中,所述细胞系是STAT3(信号转导和转录激活因子3)通路报告细胞系。该细胞是HepG2细胞,其包含编码与包含STAT3应答元件的启动子区域可操作地偶联的具有氨基酸序列

[0224] NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR (SEQ ID NO:30)的 β -半乳糖苷酶片段(ED)的核酸。

[0225] 将细胞接种在96孔板中并在37°C和5%CO₂下孵育,以使得细胞贴壁和生长。然后,使用对照激动剂(此处为IL-6)刺激细胞,使用如下所述的测定条件。刺激之后,根据推荐的方案使用 **PathHunter[®] ProLabel[®]/ProLink[™]** 检测试剂盒(Eurofins DiscoverX Corporation)检测信号。

[0226] 测定条件

[0227]	细胞接种试剂	CP5
	细胞数/孔	5000
	板类型	96孔
	细胞接种时间(小时)	4
	对照激动剂	IL-6
	配体孵育时间	16h
	配体孵育温度(°C)	37

[0228] 结果如图17中所示。该报告细胞系显示出针对对照激动剂刺激的 EC_{50} 为0.601ng/mL和激动剂 E_{MAX} 的信号:背景比为21.3。

[0229] 该细胞系经10次传代证实是稳定的,测定窗口没有显著下降或 EC_{50} 变化。

[0230] 用于HepG2 STAT3测定的细胞系使用HepG2细胞中的内源性IL-6受体来检测IL-6信号传导。

[0231] 实施例10-Jurkat NFAT通路报告基因测定

[0232] 将报告细胞系工程化以表达由NFAT通路诱导转录应答元件控制的酶供体(ED)标记的载体蛋白。NFAT通路激活导致NFAT转录因子的激活,该转录因子与NFAT通过诱导的转录应答元件结合并诱导带有ED标签的载体蛋白的表达。添加外源酶受体(EA)和缓冲液,裂解细胞并迫使无活性ED和EAB-半乳糖苷酶片段互补。这导致形成功能性 β -半乳糖苷酶,该

酶水解底物以产生化学发光信号。

[0233] 在该实施例中,所述细胞系是NFAT (活化T细胞核因子) 通路报告细胞系。NFAT通路激活导致NFAT转录因子的激活,该转录因子与NFAT通过诱导的转录应答元件结合并诱导带有ED标签的载体蛋白的表达。该细胞是Jurkat细胞,其包含编码与包含NFAT应答元件的启动子区域可操作地偶联的具有氨基酸序列

[0234] NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR (SEQ ID NO:30) 的 β -半乳糖苷酶片段(ED)的核酸。

[0235] 将细胞接种在96孔板中并在37℃和5%CO₂下孵育,以使得细胞贴壁和生长。然后,使用对照激动剂(此处为抗CD-3抗体)刺激细胞,使用如下所述的测定条件。刺激之后,根据推荐的方案使用PathHunter[®] ProLabel[®] ProLink[™]检测试剂盒(Eurofins DiscoverX Corporation)检测信号。

[0236] 测定条件

[0237]	细胞数/孔	20000
	细胞接种时间(小时)	N/A
	对照激动剂	抗CD3抗体
	配体孵育时间	过夜
	配体孵育温度(℃)	37

[0238] 结果如图18中所示。该报告细胞系显示出针对对照激动剂刺激的EC₅₀为3.025ng/mL和激动剂E_{MAX}的信号:背景比为7.6。

[0239] 对于该测定,通过接种10 μ g/ml并将板孵育20hr,在孔中预包被活化T细胞受体(TCR)抗体CD3抗体。在接种用于测定的细胞之前,从孔中除去抗体。

[0240] 该细胞系经10次传代证实是稳定的,测定窗口没有显著下降或EC₅₀变化。

[0241] 实施例11-可以进一步改进通路报告基因测定以产生针对其他靶点(如配体和受体)的测定

[0242] 将报告细胞系工程化以表达由通路诱导转录应答元件控制的酶供体(ED)标记的载体蛋白。通路激活导致ED标记蛋白的诱导表达。添加外源酶受体(EA)和缓冲液,裂解细胞并迫使ED和EA酶片段互补。这导致形成功能性酶,该酶水解底物以产生化学发光信号。

[0243] 在该实施例中,该测定包括将第一细胞系和第二细胞系共培养。在共培养测定中的第一细胞系是Jurkat PD1(程序性细胞死亡-1)通路报告细胞系,其衍生自在上述开发的Jurkat NFAT通路报告细胞中表达PD1。在其中加入PD1的细胞是Jurkat细胞,其包含编码与包含NFAT通路应答元件的启动子区域可操作地偶联的具有氨基酸序列

[0244] NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR (SEQ ID NO:30) 的 β -半乳糖苷酶片段(ED)的核酸。在PD1通路报告基因共培养测定中的第二细胞系是U2OS细胞系,其共表达PD-L1(程序性死亡配体1)和TCR(T细胞受体)激活剂分子。PD1结合至其配体PDL1(程序性死亡配体1)抑制TCR(T细胞受体)的活化,从而通过TCR(T细胞受体)激活剂分子抑制TCR诱导的NFAT通路激活。这种共培养测定可用于测定PDL1与PD1结合的抑制剂,因为这些抑制剂会阻断PD1介导的TCR诱导NFAT通路激活抑制。

[0245] 将Jurkat PD-1报告细胞与PD-1拮抗剂抗体(Ab)一起预孵育,然后加入U2OS PD-

L1/TCR激活剂细胞以激活TCR。PD-1Ab阻止PD-1的PD-L1激活并阻止TCR激活的PD-1衰减,最终结果是随着更高浓度的PD-1Ab增加TCR激活。

[0246] 图19显示Jurkat NFAT通路报告基因测定细胞系可用于生产PD-1通路报告基因细胞系,展示了如何进一步改进通路报告基因测定以生成针对其他靶点(其他受体和配体)的测定。

[0247] 实施例12-用于U2OS NF-κB通路报告基因测定的细胞系

[0248] 将报告细胞系工程化以表达由通路诱导转录应答元件控制的酶供体(ED)标记的载体蛋白。通路激活导致载体蛋白-ED标记蛋白的诱导表达。添加外源酶受体(EA)和缓冲液,裂解细胞并迫使ED和EA酶片段互补。这导致形成功能性酶,该酶水解底物以产生化学发光信号。

[0249] 在该实施例中,所述细胞系是NFκB(核因子NF-κ-B p100亚基)通路报告细胞系。该细胞是U2OS细胞,其包含编码与包含NFκB应答元件的启动子区域可操作地偶联的报告片段和具有氨基酸序列

[0250] NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR (SEQ ID NO:30)的β-半乳糖苷酶供体片段(ED)的核酸。该细胞还内源性表达CD40(受体)。

[0251] 将细胞接种在96孔板中并在37℃和5%CO₂下孵育,以使得细胞贴壁和生长。然后,使用对照激动剂(此处为CD40L)刺激细胞,使用如下所述的测定条件。刺激之后,根据推荐的方案使用 **PathHunter[®] ProLabel[®]/ProLink[™]** 检测试剂盒(Eurofins DiscoverX Corporation)检测信号。

[0252] 测定条件

[0253]	细胞接种试剂	CP3
	细胞数/孔	5000
	板类型	96孔
	细胞接种时间(小时)	过夜
	对照激动剂	CD40L
	配体孵育时间	6h
	配体孵育温度(℃)	37

[0254] 结果如图20中所示。该报告细胞系显示出针对对照激动剂刺激的EC₅₀为0.0886μg/mL和激动剂E_{MAX}的信号:背景比为102.8。

[0255] 通过NFκB通路发出信号的其他内源性受体和配体也已成功用于该测定(例如,TNFα和TNFR)。

[0256] 实施例13-U2OS RANK-NFκB通路报告基因测定

[0257] 将报告细胞系工程化以表达由通路诱导转录应答元件控制的酶供体(ED)标记的载体蛋白。通路激活导致载体蛋白-ED标记蛋白的诱导表达。添加外源酶受体(EA)和缓冲液,裂解细胞并迫使ED和EA酶片段互补。这导致形成功能性酶,该酶水解底物以产生化学发光信号。

[0258] 在该实施例中,所述细胞系是NFκB(核因子NF-κ-B p100亚基)通路报告细胞系。该细胞是U2OS细胞,其包含编码与包含NFκB应答元件的启动子区域可操作地偶联的报告片段

和具有氨基酸序列

[0259] NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR (SEQ ID NO:30) 的 β -半乳糖苷酶供体片段(ED)的核酸。为产生RANK-NF κ B报告基因测定,在上述开发的U2OS NF- κ B通路报告细胞中共表达RANK(核因子 κ B受体的受体激活剂)。

[0260] 将细胞接种在96孔板中并在37℃和5%CO₂下孵育,以使得细胞贴壁和生长。然后,使用对照激动剂(此处为sRANKL)刺激细胞,使用如下所述的测定条件。刺激之后,根据推荐的方案使用PathHunter[®] ProLabel[®]/ProLink[™]检测试剂盒(Eurofins DiscoverX Corporation)检测信号。

[0261] 测定条件

[0262]	细胞接种试剂	CP22
	细胞数/孔	5000
	板类型	96孔
	细胞接种时间(小时)	4
	对照激动剂	可溶性RANKL
	配体孵育时间	16h
	配体孵育温度(℃)	37

[0263] 结果如图21中所示。该报告细胞系显示出针对对照激动剂刺激的EC₅₀为4.034ng/mL和激动剂E_{MAX}的信号:背景比为24.0。

[0264] 实施例14-HEK NF- κ B通路报告基因测定

[0265] 将报告细胞系工程化以表达由通路诱导转录应答元件控制的酶供体(ED)标记的载体蛋白。通路激活导致载体蛋白-ED标记蛋白的诱导表达。添加外源酶受体(EA)和缓冲液,裂解细胞并迫使ED和EA酶片段互补。这导致形成功能性酶,该酶水解底物以产生化学发光信号。

[0266] 在该实施例中,所述细胞系是NF- κ B(核因子NF- κ -B p100亚基)通路报告细胞系。该细胞是HEK-293细胞(HEK),其包含编码与包含NF κ B应答元件的启动子区域可操作地偶联的报告片段和具有氨基酸序列

[0267] NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR (SEQ ID NO:30) 的 β -半乳糖苷酶供体片段(ED)的核酸。此外,将在HEK中内源性表达的TNF α (配体)和TNFR(受体)用于开发NF- κ B通路报告基因测定。

[0268] 测定条件

[0269]	细胞接种试剂	CP3
	细胞数/孔	2500
	板类型	384孔
	细胞接种时间(小时)	过夜
	对照激动剂	TNF α
	配体孵育时间	6h
	配体孵育温度(℃)	37

[0270] 测定结果如图22中所示。

[0271] 实施例15-HEK CD27-NF-κB通路报告基因测定

[0272] 将报告细胞系工程化以表达由通路诱导转录应答元件控制的酶供体 (ED) 标记的载体蛋白。通路激活导致表达载体-ED标记蛋白的诱导表达。添加外源酶受体 (EA) 和缓冲液,裂解细胞并迫使ED和EA酶片段互补。这导致形成功能性酶,该酶水解底物以产生化学发光信号。

[0273] 在该实施例中,所述细胞系是CD27-NF-κB通路报告细胞系。该细胞是HEK细胞,其包含编码与包含NFκB应答元件的启动子区域可操作地偶联的报告片段和具有氨基酸序列

[0274] NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR (SEQ ID NO:30) 的β-半乳糖苷酶供体片段 (ED) 的核酸。在上述开发的HEK NF-κB通路报告细胞系中共表达CD27 (受体)。测定结果如图23中所示。

[0275] 测定条件

[0276]	细胞接种试剂	CP7
	细胞数/孔	2500
	板类型	384孔
	细胞接种时间 (小时)	4
	对照激动剂	CD27L
	配体孵育时间	16h
	配体孵育温度 (°C)	37

[0277] 实施例16-NF-κB报告细胞系的测定结果与RANK-NF-κB报告细胞系测定结果比较

[0278] 将两个报告细胞系工程化以表达由通路诱导转录应答元件控制的酶供体 (ED) 标记的载体蛋白。通路激活导致载体蛋白-ED标记蛋白的诱导表达。添加外源酶受体 (EA) 和缓冲液,裂解细胞并迫使ED和EA酶片段互补。这导致形成功能性酶,该酶水解底物以产生化学发光信号。

[0279] 在该实施例中,第一个细胞系是U2OS-NF-κB通路报告细胞系和第二个细胞系是U2OS RANK-NF-κB细胞系。所述细胞是U2OS,其均是如在该实施例16中制备的细胞系。U2OS-NF-κB细胞系包含编码与包含NFκB应答元件的启动子区域可操作地偶联的报告片段和具有氨基酸序列

[0280] NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR (SEQ ID NO:30) 的β-半乳糖苷酶供体片段 (ED) 的核酸。U2OS RANK-NF-κB细胞系包含编码与包含NFκB应答元件的启动子区域可操作地偶联的报告片段和具有氨基酸序列

[0281] NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR (SEQ ID NO:30) 的β-半乳糖苷酶供体片段 (ED) 的核酸,其随后在上述开发的U2OS NF-κB通路报告细胞系中与RANK-CD27 (受体) 共表达。

[0282] 针对具有CD40L配体的U2OS NF-κB细胞系的测定结果如图24a中所示,以及针对具有sRANK配体的U2OS RANK NF-κB细胞系的测定结果如图24b中所示。如图24a和图26b中所示,针对U2OS RANK NF-κB的测定结果显示较低的EC₅₀和较大的信号:背景比。

[0283] 该测定表明RANK-NF-κB载体蛋白显示出比NF-κB载体蛋白更好的结果。因此,一种载体蛋白可以显示出比另一种载体蛋白更好的结果。

[0284] 因此,以上仅说明了本公开内容的原理。应当理解,本领域技术人员将能够设计出

各种排布, 尽管这里没有明确描述或示出, 但体现了本发明的原理并且包括在其主旨和范围内。此外, 本文中引用的所有实例和条件语言主要旨在帮助读者理解本发明的原理和发明人为促进本领域所贡献的概念, 并且将被解释为不限于这些具体列举的实例和条件。此外, 此处叙述本发明的原理、方面和实施方式及其具体实例的所有陈述旨在涵盖其结构和功能等效物。此外, 此类等效物旨在包括当前已知的等效物和未来开发的等效物, 即, 无论结构如何, 所开发的执行相同功能的任何元件。因此, 本发明的范围并不旨在限于此处所示和描述的示例性实施方式。

序列表

<110> 欧陆迪斯卡沃爱克斯制品有限责任公司

<120> 启动子区域分析方法和用于实施该方法的细胞

<130> PBH-010-PCT

<160> 39

<170> PatentIn3.5版本

<210> 1

<211> 126

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 1

aattcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt 60
aatgccttg cagcacatcc ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc 120
gatcgc 126

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 2

agagggtata taatggaagc tcgacttcca g 31

<210> 3

<211> 123

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 3

aattctcacg gcttccctcc cgaggtggag gagcaggccg ccggcaccct gcccatgagc 60
tgcgcccagg agagcggcat ggatagacac cctgctgctt gcgccagcgc caggatcaac 120
gtc 123

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 4

gcttgcaaga actggttcag tagcttaagc cactttgtga tccacctt 48

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 5
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 30
<210> 6
<211> 52
<212> DNA
<213> 合成的核苷酸
<400> 6
gggaattttcc ggggactttc cggaatttc cggggacttt ccggaattt cc 52
<210> 7
<211> 14
<212> DNA
<213> 合成的核苷酸
<400> 7
ggtaagtagg tcat 14
<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> 合成的核苷酸
<400> 8
agcctgattt ccccgaaatg acggc 25
<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> 合成的核苷酸
<400> 9
catttcccggt aaatcgtcg 19
<210> 10
<211> 15
<212> DNA
<213> 合成的核苷酸
<400> 10
agttctgaga aaagt 15
<210> 11
<211> 372
<212> DNA
<213> 合成的核苷酸
<400> 11
cttttctgag ttacttttgt atccccaccc ccttaaagaa aggaggaaaa actgtttcat 60
acagaaggcg ttaattgcat gaattagagc tatcacctaa gtgtgggcta atgtaacaaa 120

gagggatttc acctacatcc attcagtcag tctttggggg tttaaagaaa ttccaaagag 180
tcatcagaag aggaaaaatg aaggtaatgt ttttcagac aggtaaagtc ttgaaaata 240
tgtgtaatat gtaaaacatt ttgacacccc cataatat ttccagaatt aacagtataa 300
attgcatctc ttgttcaaga gttccctatc actctcttta atcactactc acagtaacct 360
caactcctgc ca 372

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 12

acccccttaa agaaaggagg aa 22

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 13

ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 30

<210> 14

<211> 11

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 14

aattgcatga a 11

<210> 15

<211> 11

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 15

gggatttcac c 11

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 16

atgaaggtaa tgttttttca g 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 17
gtctttgaaa atatgtgtaa t 21
<210> 18
<211> 10
<212> DNA
<213> 合成的核苷酸
<400> 18
aaacattttg 10
<210> 19
<211> 10
<212> DNA
<213> 合成的核苷酸
<400> 19
taatattttt 10
<210> 20
<211> 52
<212> DNA
<213> 合成的核苷酸
<400> 20
cagaattaac agtataaatt gcatctcttg ttcaagagtt ccctatcact ct 52
<210> 21
<211> 452
<212> DNA
<213> 合成的核苷酸
<400> 21
actcgtcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tactagtacg tctctcaagg 60
ataagtaagt aatattaagg tacgggaggt attggacagg ccgcaataaa atatctttat 120
tttcattaca tctgtgtgtt ggttttttgt gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc 180
atcaaaacaa aacgaaacaa aacaaactag caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag 240
gtgccagaac atttctcttg cctaactggc cggtagctga gctcgctagc ggaggaaaaa 300
ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa 360
ctgtttcata cagaaggcgt agatctacta gaggttatat aatggaagct cgacttccag 420
cttggcaatc cggtagctgt ggtaaagcca cc 452
<210> 22
<211> 653
<212> DNA
<213> 合成的核苷酸
<400> 22
actcgtcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tactagtacg tctctcaagg 60

ataagtaagt aatattaagg tacgggaggt attggacagg ccgcaataaa atatctttat 120
tttcattaca tctgtgtgtt ggTTTTTgt gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc 180
atcaaaacaa aacgaaacaa aacaaactag caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag 240
gtgccagaac atttctctgg cctaactggc cggtacctt tctgagttac tttgtatcc 300
ccacccccctt aaagaaagga ggaaaaactg tttcatacag aaggcgtaa ttgcatgaat 360
tagagctatc acctaagtgt gggctaagt aacaaagagg gatttcacct acatccattc 420
agtcagtctt tgggggttta aagaaattcc aaagagtcag cagaagagga aaaatgaagg 480
taatgttttt tcagacaggt aaagtctttg aaaatatgtg taatatgtaa aacattttga 540
cacccccata atatttttcc agaattaaca gtataaattg catctcttgt tcaagagttc 600
cctatcactc tctttaatca ctactcacag taacctcaac tctgccagc tag 653

<210> 23

<211> 449

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 23

actcgtcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tactagtacg tctctcaagg 60
ataagtaagt aatattaagg tacgggaggt attggacagg ccgcaataaa atatctttat 120
tttcattaca tctgtgtgtt ggTTTTTgt gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc 180
atcaaaacaa aacgaaacaa aacaaactag caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag 240
gtgccagaac atttctctgg cctaactggc cggtaccagc ctgatttccc cgaaatgacg 300
gcagcctgat ttccccgaaa tgacggcagc ctgatttccc cgaaatgacg gcagcctgat 360
ttccccgaaa tgacggcaga tctactagag ggtatataat ggaagctcga cttccagctt 420
ggcaatccgg tactgttgg aaagccacc 449

<210> 24

<211> 494

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 24

actcgtcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tactagtacg tctctcaagg 60
ataagtaagt aatattaagg tacgggaggt attggacagg ccgcaataaa atatctttat 120
tttcattaca tctgtgtgtt ggTTTTTgt gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc 180
atcaaaacaa aacgaaacaa aacaaactag caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag 240
gtgccagaac atttctctgg cctaactggc cggtacctga gctcagcttc atttcccgt 300
aatcgtcgaa gcttcatttc ccgtaaatcg tcgaagcttc atttcccgt aatcgtcgaa 360
gcttcatttc ccgtaaatcg tcgaagcttc atttcccgt aatcgtcgac tcgaggatat 420
caagatctac tagagggtat ataattggaag ctcgacttcc agcttggcaa tccggtactg 480
ttggtaaagc cacc 494

<210> 25

<211> 444

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 25

```
actcgtcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tactagtacg tctctcaagg 60
ataagtaagt aatattaagg tacgggaggt attggacagg ccgcaataaa atatctttat 120
tttcattaca tctgtgtgtt ggttttttgt gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc 180
atcaaaaaca aacgaaacaa aacaaactag caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag 240
gtgccagaac atttctctgg cctaactggc cggtacctga gctcagttct gagaaaagta 300
gttctgagaa aagtagttct gagaaaagta gttctgagaa aagtagttct gagaaaagtc 360
tcgaggatat caagatctac tagagggtat ataatggaag ctcgacttcc agcttggcaa 420
tccggtactg ttggtaaagc cacc 444
```

<210> 26

<211> 445

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 26

```
actcgtcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tactagtacg tctctcaagg 60
ataagtaagt aatattaagg tacgggaggt attggacagg ccgcaataaa atatctttat 120
tttcattaca tctgtgtgtt ggttttttgt gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc 180
atcaaaaaca aacgaaacaa aacaaactag caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag 240
gtgccagaac atttctctgg cctaactggc cggtacctga gctcggttaag taggtcatgg 300
taagtaggtc atggtaagta ggtcatggta agtaggtcat ggtaagtagg tcacgtgac 360
ctcgaggata tcaagatcta ctagagggtata tataatggaa gctcgacttc cagcttggca 420
atccggtact gttggtaaag ccacc 445
```

<210> 27

<211> 467

<212> DNA

<213> 合成的核苷酸

<400> 27

```
actcgtcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tactagtacg tctctcaagg 60
ataagtaagt aatattaagg tacgggaggt attggacagg ccgcaataaa atatctttat 120
tttcattaca tctgtgtgtt ggttttttgt gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc 180
atcaaaaaca aacgaaacaa aacaaactag caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag 240
gtgccagaac atttctctgg cctaactggc cggtaccaag atttctgcag cggagtactg 300
tcctccgagc ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc ctccgagcgg agtactgtcc 360
tccgagcggg gtactgtcct ccgctcgagg atatcagatc tactagaggg tatataatgg 420
aagctcgact tccagcttgg caatccggtg ctgttggtta agccacc 467
```

<210> 28

<211> 40

<212> PRT

<213> 合成的肽

<400> 28

```

Ser His Gly Phe Pro Pro Glu Val Glu Glu Gln Ala Ala Gly Thr Leu
1           5           10           15
Pro Met Ser Cys Ala Gln Glu Ser Gly Met Asp Arg His Pro Ala Ala
           20           25           30
Cys Ala Ser Ala Arg Ile Asn Val
           35           40

```

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> 合成的肽

<400> 29

```

Ala Cys Lys Asn Trp Phe Ser Ser Leu Ser His Phe Val Ile His Leu
1           5           10           15

```

<210> 30

<211> 42

<212> PRT

<213> 合成的肽

<400> 30

```

Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly
1           5           10           15
Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp
           20           25           30
Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg
           35           40

```

<210> 31

<211> 52

<212> PRT

<213> 合成的肽

<400> 31

```

Met Gly Val Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp
1           5           10           15
Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
           20           25           30
Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro
           35           40           45
Ser Gln Gln Leu

```

50
 <210> 32
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> 合成的肽
 <400> 32
 Met Gly Val Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp
 1 5 10 15
 Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
 20 25 30
 Pro Phe Ala Ser Tyr Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro
 35 40 45
 Ser Gln Gln Leu

50
 <210> 33
 <211> 4120
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的核苷酸
 <400> 33
 aaattctcac ggcttccctc ccgaggtgga ggagcaggcc gccggcaccc tgcccatgag 60
 ctgcgcccag gagagcggca tggatagaca ccctgctgct tgccgcagcg ccaggatcaa 120
 cgtcttcgaa ttgggaggtg gcggtagcgg aggtggcggt agcctcgaga gctccaattc 180
 actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacct aacttaatcg 240
 ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 300
 ctagtgaggc cggccgcttc gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac 360
 cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt 420
 atttghtaacc attataagct gcaataaaca agttaacaac aacaattgca ttcattttat 480
 gtttcaggtt cagggggagg tgtgggaggt tttttaaagc aagtaaaacc tctacaaatg 540
 tggtaaaatc gataaggatc cgtttgcgta ttgggcgctc ttccgctgat ctgcgcagca 600
 ccatggcctg aaataacctc tgaaagagga acttggttag ctaccttctg aggcggaag 660
 aaccagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt cccagcgctc cccagcaggc 720
 agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc 780
 tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg 840
 cccctaactc cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgcccatt 900
 ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc 960
 cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt gcaaaaagct cgattcttct 1020
 gacactagcg ccacatgaa gaagcccgaa ctcaccgcta ccagcgttga aaaatttctc 1080

```

atcgagaagt tcgacagtgt gagcgacctg atgcagttgt cggagggcga agagagccga 1140
gccttcagct tcgatgtcgg cggacgcggc tatgtactgc ggggtgaatag ctgcgctgat 1200
ggcttctaca aagaccgcta cgtgtaccgc cacttcgcca gcgctgcaact acccatcccc 1260
gaagtgttgg acatcggcga gttcagcgag agcctgacat actgcatcag tagacgcgcc 1320
caaggcggtta ctctccaaga cctccccgaa acagagctgc ctgctgtgtt acagcctgtc 1380
gccgaagcta tggatgctat tgccgccgcc gacctcagtc aaaccagcgg cttcggccca 1440
ttcgggcccc aaggcatcgg ccagtacaca acctggcggg atttcatttg cgccattgct 1500
gatcccccag tctaccactg gcagaccgtg atggacgaca ccgtgtccgc cagcgtagct 1560
caagccctgg acgaactgat gctgtgggcc gaagactgtc ccgaggtgcg ccacctcgtc 1620
catgccgact tcggcagcaa caacgtcctg accgacaacg gccgcatcac cgccgtaatc 1680
gactgggtccg aagctatgtt cggggacagt cagtacgagg tggccaacat cttcttcttg 1740
cggccctggc tggttgcgt ggagcagcag actcgtactc tcgagcgccg gcatcccag 1800
ctggccggca gccctcgtct gcgagcctac atgctgcga tcggcctgga tcagctctac 1860
cagagcctcg tggacggcaa cttcgacgat gctgcctggg ctcaaggccg ctgcgatgcc 1920
atcgtccgca gcggggccgg caccgtcggg cgcacacaaa tcgctcgccg gacgcagcc 1980
gtatggaccg acggctgcgt cgaggtgctg gccgacagcg gcaaccgccg gccagtaca 2040
cgaccgcgct ctaaggaggt aggtcgagtt taaactctag aaccggtcat ggccgcaata 2100
aaatatcttt attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgttcga actagatgct 2160
gtcgaccgat gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc cttccggttg gcgcggggca 2220
tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta ggacaggtgc 2280
cggcagcgct cttccgcttc ctgctcact gactcgtgc gctcggtcgt tcggctgcgg 2340
cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac 2400
gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 2460
ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca 2520
agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 2580
tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc 2640
ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgtgta ggtatctcag ttcggtgtag 2700
gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc 2760
ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgacttatc gccactggca 2820
gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtctctg 2880
aagtgggtgg ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg 2940
aagccagtta cttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct 3000
ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 3060
gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgtcagtc ggaacgaaaa ctcacgttaa 3120
gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 3180
tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag cggccgcaaa 3240
tgctaaacca ctgcagtgg taccagtgtc tgatcagtga ggcaccgatc tcagcgatct 3300
gcctatttctg ttcgtccata gtggcctgac tccccgtcgt gtagatcact acgattcgtg 3360
agggcttacc atcaggcccc agcgcagcaa tgatgccgcg agagccgcgt tcaccggccc 3420

```

ccgatttgtc agcaatgaac cagccagcag ggagggccga gcgaagaagt ggtcctgcta 3480
 ctttgtccgc ctccatccag tctatgagct gctgtcgtga tgctagagta agaagttcgc 3540
 cagtgagtag tttccgaaga gttgtggcca ttgctactgg catcgtggta tcacgctcgt 3600
 cgttcggatg ggcttcgttc aactctgggtt cccagcggtc aagccgggtc acatgatcac 3660
 ccatattatg aagaaatgca gtcagctcct tagggcctcc gatcgttgctc agaagtaagt 3720
 tggccgcggt gttgtcgtc atggtaatgg cagcactaca caattctctt accgtcatgc 3780
 catccgtaag atgcttttcc gtgaccggcg agtactcaac caagtcgttt tgtgagtagt 3840
 gtatacggcg accaagctgc tcttgcccgg cgtctatacg ggacaacacc gcgccacata 3900
 gcagtacttt gaaagtgtc atcatcggga atcgtttctt ggggcggaaa gactcaagga 3960
 tcttgccgct attgagatcc agttcgatat agcccactct tgcacccagt tgatcttcag 4020
 catcttttac tttcaccagc gtttcggggt gtgcaaaaac aggcaagcaa aatgccgcaa 4080
 agaagggaat gagtgcgaca cgaaaatgtt ggatgctcat 4120

<210> 34

<211> 3990

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的核苷酸

<400> 34

aagcttggag gtggcggtag cggaggtggc ggtagcctcg agagctccaa ttcactggcc 60
 gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta cccaacttaa tcgccttgca 120
 gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgctagggc 180
 cggccgcctt gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga 240
 atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgaacc 300
 attataagct gcaataaaca agttaacaac aacaattgca ttcattttat gtttcaggtt 360
 cagggggagg tgtgggaggt tttttaaac aagtaaaacc tctacaaatg tggtaaaatc 420
 gataaggatc cgtttgctga ttgggcgtc ttccgctgat ctgcgcagca ccatggcctg 480
 aaataacctc tgaaagagga acttggttag ctaccttctg aggcggaag aaccagctgt 540
 ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt cccaggtc cccagcaggc agaagtatgc 600
 aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag 660
 gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc 720
 cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgcccatt ggctgactaa 780
 ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc cagaagtagt 840
 gaggaggctt ttttgaggc ctaggtttt gcaaaaagct cgattcttct gacactagcg 900
 ccaccatgaa gaagcccgaa ctcaccgcta ccagcgttga aaaatttctc atcgagaagt 960
 tcgacagtgt gagcgacctg atgcagttgt cggagggcga agagagccga gccttcagct 1020
 tcgatgtcgg cggacgcggc tatgtactgc gggatgaatag ctgcgctgat ggcttctaca 1080
 aagaccgcta cgtgtaccgc cacttcgcca gcgctgcact acccatcccc gaagtgttgg 1140
 acatcggcga gttcagcgag agcctgacat actgcatcag tagacgcgcc caaggcgtaa 1200

```

ctctccaaga cctccccgaa acagagctgc ctgctgtgtt acagcctgtc gccgaagcta 1260
tggatgctat tgccgccgcc gacctcagtc aaaccagcgg ctteggccca ttcgggcccc 1320
aaggcatcgg ccagtacaca acctggcggg atttcatttg cgccattgct gatcccatg 1380
tctaccactg gcagaccgtg atggacgaca ccgtgtccgc cagcgtagct caagccctgg 1440
acgaactgat gctgtgggcc gaagactgtc ccgaggtgcg ccacctcgtc catgccgact 1500
tcggcagcaa caacgtcctg accgacaacg gccgcatcac cgccgtaatc gactggtccg 1560
aagctatgtt cggggacagt cagtacgagg tggccaacat cttcttctgg cggccctggc 1620
tggcttgcat ggagcagcag actcgtact tcgagcgccg gcatcccgag ctggccggca 1680
gccctcgtct gcgagcctac atgtgcgca tcggcctgga tcagctctac cagagcctcg 1740
tggacggcaa cttcgacgat gctgcctggg ctcaaggccg ctgcgatgcc atcgtccgca 1800
gcggggccgg caccgtcgtt cgcacacaaa tcgtcgcgg gagcgcagcc gtatggaccg 1860
acggctgcgt cgaggtgctg gccgacagcg gcaaccgccg gccagtaca cgaccgcgcg 1920
ctaaggaggt aggtcgagtt taaactctag aaccggtcat ggccgcaata aaatatcttt 1980
attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgttcga actagatgct gtcgaccgat 2040
gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc cttccggtgg gcgcggggca tgactatcgt 2100
cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta ggacaggtgc cggcagcgct 2160
cttccgcttc ctcgctcact gactcgtgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat 2220
cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 2280
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 2340
ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtcga agtcagaggt 2400
ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 2460
gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ctttcgggaa 2520
gcgtggcgct ttctcatagc tcacgtgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgt 2580
ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccgga ccgctgcgcc ttatccggtg 2640
actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc acgacttate gccactggca gcagccactg 2700
gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtcttg aagtgggtggc 2760
ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 2820
ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcgggtg 2880
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 2940
tgatcttttc tacgggttct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg 3000
tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 3060
aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag cgcccgcaaa tgctaaacca 3120
ctgcagtggg taccagtgtg tgatcagtga ggcaccgatc tcagcgatct gcctatttcg 3180
ttcgtccata gtggcctgac tccccgtcgt gtagatcact acgattcgtg agggcttacc 3240
atcaggcccc agcgcagcaa tgatgccgcg agagccgcgt tcaccggccc ccgatttgct 3300
agcaatgaac cagccagcag ggagggccga gcgaagaagt ggtcctgcta ctttgtegcg 3360
ctccatccag tctatgagct gctgtcgtga tgctagagta agaagttcgc cagtgagtag 3420
tttccgaaga gttgtggcca ttgctactgg catcgtggta tcacgctcgt cgttcggtat 3480
ggcttcgttc aactctggtt cccagcggtc aagccgggtc acatgatcac ccatattatg 3540

```

aagaaatgca gtcagctcct tagggcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcggt 3600
 gttgtcgctc atggtaatgg cagcactaca caattctctt accgtcatgc catccgtaag 3660
 atgcttttcc gtgaccggcg agtactcaac caagtcgttt tgtgagtagt gtatacggcg 3720
 accaagctgc tcttgcccgg cgtctatacg ggacaacacc gcgccacata gcagtacttt 3780
 gaaagtgtc atcatcggga atcgttcttc ggggcggaaa gactcaagga tcttgccgct 3840
 attgagatcc agttcgatat agcccactct tgcacccagt tgatcttcag catcttttac 3900
 tttcaccagc gtttcgggggt gtgcaaaaac aggcaagcaa aatgccgcaa agaagggaat 3960
 gagtgcgaca cgaaaatggt ggatgctcat 3990

<210> 35

<211> 4119

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的核苷酸

<400> 35

aattctcacg gcttccctcc cgaggtggag gagcaggccg ccggcaccct gcccatgagc 60
 tgcgccagg agagcgcat ggatagacac cctgctgctt gcgccagcgc caggatcaac 120
 gtcttcgaat tgggaggtgg cggtagcgga ggtggcggtg gcctcgagag ctccaattca 180
 ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc 240
 cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc 300
 tagtgaggcc ggccgcttcg agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc 360
 acaactagaa tgcagtga aaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta 420
 tttgtaacca ttataagctg caataaaca gttacaaca acaattgcat tcattttatg 480
 tttcaggttc agggggaggt gtgggaggtt ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt 540
 ggtaaaatcg ataaggatcc gtttgcgtat tgggcgctct tccgctgatc tgcgcagcac 600
 catggcctga aataacctct gaaagaggaa cttggttagc taccttctga ggcgaaaga 660
 accagctgtg gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca 720
 gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct 780
 cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc 840
 ccctaactcc gcccatccc cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg 900
 gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctctgcctct gagctattcc 960
 agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagctc gattcttctg 1020
 acactagcgc caccatgaag aagcccgaac tcaccgtac cagcgttgaa aaatttctca 1080
 tcgagaagtt cgacagtgtg agcgacctga tgcagttgtc ggagggcgaa gagagccgag 1140
 ccttcagctt cgatgtcggc ggacgcggct atgtactgcg ggtgaatagc tgcgtgatg 1200
 gcttctacaa agaccgtac gtgtaccgcc acttcgccag cgctgcacta cccatccccg 1260
 aagtgttgga catcggcgag ttcagcgaga gcctgacata ctgcatcagt agacgcgccc 1320
 aaggcggtac tctccaagac ctccccgaaa cagagctgcc tgctgtgtta cagcctgtcg 1380
 ccgaagctat ggatgctatt gccgccgccg acctcagtca aaccagcggc ttcggcccat 1440

```

tcgggccccca aggcacatcggc cagtacacaa cctggcggga tttcatttgc gccattgctg 1500
atccccatgt ctaccactgg cagaccgtga tggacgacac cgtgtccgcc agcgtagctc 1560
aagccctgga cgaactgatg ctgtgggccc aagactgtcc cgaggtgcgc cacctcgtcc 1620
atgccgactt cggcagcaac aacgtcctga ccgacaacgg ccgcatcacc gccgtaatcg 1680
actggtccga agctatgttc ggggacagtc agtacgaggt ggccaacatc ttcttctggc 1740
ggccctggct ggcttgcag gagcagcaga ctcgctactt cgagcgccgg catcccagac 1800
tggccggcag ccctcgtctg cgagcctaca tgctgcgcat cggcctggat cagctctacc 1860
agagcctcgt ggacggcaac ttcgacgatg ctgcctgggc tcaaggccgc tgcgatgcca 1920
tcgtccgcag cggggccggc accgtcggtc gcacacaaat cgctcgccgg agcgcagccg 1980
tatggaccga cggtgcgtc gaggtgctgg ccgacagcgg caaccgccgg cccagtacac 2040
gaccgcgcgc taaggaggta ggtcgagttt aaactctaga accggtcatg gccgcaataa 2100
aatatcttta ttttcattac atctgtgtgt tggttttttg tgtgttcgaa ctagatgctg 2160
tcgaccgatg cccttgagag cttcaaccc agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat 2220
gactatcgtc gccgcaacta tgactgtctt ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc 2280
ggcagcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcggt cggctgcggc 2340
gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg 2400
caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt 2460
tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa 2520
gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 2580
ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc 2640
cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg 2700
tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct 2760
tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca cgacttatcg ccaactggcag 2820
cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagttcttga 2880
agtggtaggc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggtatctgc gctctgtga 2940
agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacia accaccgtg 3000
gtagcggtgg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag 3060
aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagt gaacgaaaac tcacgttaag 3120
ggattttggg catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat 3180
gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagc ggccgcaaat 3240
gctaaaccac tgcagtgggt accagtgtt gatcagttag gcaccgatct cagcgatctg 3300
cctatttcgt tcgtccatag tggcctgact ccccgctgtg tagatcacta cgattcgtga 3360
gggcttacca tcaggcccc a gcgagcaat gatgccgcga gagccgcgtt caccggcccc 3420
cgatttgtca gcaatgaacc agccagcagg gagggccgag cgaagaagtg gtctgtctac 3480
tttgtccgcc tccatccagt ctatgagctg ctgtcgtgat gctagagtaa gaagtccgcc 3540
agtgagtagt ttccgaagag ttgtggccat tgctactggc atcgtgggtat cacgctcgtc 3600
gttcggtatg gcttcgttca actctggttc ccagcggtea agccgggtca catgatcacc 3660
catattatga agaaatgcag tcagtcctt agggcctccg atcgttgtca gaagtaagtt 3720
ggccgcggtg ttgtcgtca tggtaatggc agcactacac aattctctta ccgtcatgcc 3780

```

atccgtaaga tgcttttccg tgaccggcga gtactcaacc aagtcgtttt gtgagtagtg 3840
 tatacggcga ccaagctgct cttgcccggc gtctatacgg gacaacaccg cgccacatag 3900
 cagtactttg aaagtgctca tcatcgggaa tcgttcttcg gggcggaag actcaaggat 3960
 cttgccgcta ttgagatcca gttcgatata gccactctt gcacccagtt gatcttcagc 4020
 atcttttact ttcaccagcg tttcgggggtg tgcaaaaaca ggcaagcaaa atgccgcaaa 4080
 gaagggaatg agtgcgacac gaaaatgttg gatgctcat 4119

<210> 36

<211> 4120

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的核苷酸

<400> 36

aaattctcac ggcttccctc ccgaggtgga ggagcaggcc gccggcacc tgcccatgag 60
 ctgcgcccag gagagcggca tggatagaca ccctgctgct tgcgccagcg ccaggatcaa 120
 cgtcttcgaa ttgggaggtg gcggtagcgg aggtggcggg agcctcgaga gctccaattc 180
 actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacct aacttaatcg 240
 ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 300
 ctagtgaggc cggccgcttc gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac 360
 cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt 420
 atttgttaacc attataagct gcaataaaca agttaacaac aacaattgca ttcattttat 480
 gtttcagggt cagggggagg tgtgggaggt tttttaagc aagtaaaacc tctacaaatg 540
 tggtaaaatc gataaggatc cgtttgcgta ttgggcgctc ttccgctgat ctgcgcagca 600
 ccatggcctg aaataacctc tgaaagagga acttggttag ctaccttctg aggcggaaag 660
 aaccagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc ccagcaggc 720
 agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc 780
 tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccc 840
 cccctaactc cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat 900
 ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc 960
 cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt gcaaaaagct cgattcttct 1020
 gacactagcg ccaccatgaa gaagcccgaa ctcaccgcta ccagcgttga aaaatttctc 1080
 atcgagaagt tcgacagtgt gagcgacctg atgcagttgt cggagggcga agagagccga 1140
 gccttcagct tcgatgtcgg cggacgcggc tatgtactgc gggatgaatag ctgcgctgat 1200
 ggcttctaca aagaccgcta cgtgtaccgc cacttcgcca gcgctgcaact acccatcccc 1260
 gaagtgttgg acatcggcga gttcagcgag agcctgacat actgcatcag tagacgcgcc 1320
 caaggcgta ctctccaaga cctccccgaa acagagctgc ctgctgtgtt acagcctgtc 1380
 gccgaagcta tggatgctat tgccgccgcc gacctcagtc aaaccagcgg cttcggccca 1440
 ttcgggcccc aaggcatcgg ccagtaacac acctggcggg atttcatttg cgccattgct 1500
 gatcccatg tctaccactg gcagaccgtg atggacgaca ccgtgtccgc cagcgtagct 1560

```

caagccctgg acgaactgat gctgtgggcc gaagactgtc ccgaggtgcg ccacctcgtc 1620
catgccgact tcggcagcaa caacgtcctg accgacaacg gccgcatcac cgccgtaatc 1680
gactgggtccg aagctatgtt cggggacagt cagtacgagg tggccaacat cttcttcttg 1740
cggccctggc tggcttgcat ggagcagcag actcgctact tcgagcgccg gcatcccag 1800
ctggccggca gccctcgtct gcgagcctac atgctgcgca tcggcctgga tcagctctac 1860
cagagcctcg tggacggcaa cttcgacgat gctgcctggg ctcaaggccg ctgcgatgcc 1920
atcgctccgca gcggggccgg caccgtcggg cgcacacaaa tcgctcgccg gagcgagcc 1980
gtatggaccg acggctgcgt cgaggtgctg gccgacagcg gcaaccgccg gccagtaca 2040
cgaccgcgcg ctaaggaggt aggtcgagtt taaactctag aaccggtcac ggccgcaata 2100
aaatatcttt attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgttcga actagatgct 2160
gtcgaccgat gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc cttccggtgg gcgcggggca 2220
tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta ggacaggtgc 2280
cggcagcgct cttccgcttc ctcgtcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg 2340
cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac 2400
gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 2460
ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca 2520
agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 2580
tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcttttctc 2640
ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgtgtga ggtatctcag ttcggtgtag 2700
gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc 2760
ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgacttatc gccactggca 2820
gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtcttg 2880
aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg 2940
aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct 3000
ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 3060
gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa 3120
gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 3180
tgaagtttta aatcaatcta aagtataat gagtaaactt ggtctgacag cggccgcaaa 3240
tgctaaacca ctgcagtggg taccagtgtc tgatcagtga ggcaccgatc tcagcgatct 3300
gcctattttcg ttcgtccata gtggcctgac tcccgtcgt gtagatcact acgattcgtg 3360
agggcttacc atcaggcccc agcgcagcaa tgatgcccg agagccgct tcaccggccc 3420
ccgatttgtc agcaatgaac cagccagcag ggagggccga gcgaagaagt ggtcctgcta 3480
ctttgtccgc ctccatccag tctatgagct gctgtcgtga tgctagagta agaagtccgc 3540
cagtgagtag tttccgaaga gttgtggcca ttgctactgg catcgtggta tcacgctcgt 3600
cgttcggtat ggcttcgttc aactctggtt cccagcggtc aagccgggtc acatgatcac 3660
ccatattatg aagaaatgca gtcagctcct tagggcctcc gatcgttgct agaagtaagt 3720
tgcccgcggt gttgtcgtc atggtaatgg cagcactaca caattctctt accgtcatgc 3780
catccgtaag atgcttttcc gtgaccggcg agtactcaac caagtcgttt tgtgagtagt 3840
gtatacggcg accaagctgc tcttgcccgg cgtctatacg ggacaacacc gcgccacata 3900

```

gcagtacttt gaaagtgtc atcatcgga atcgttcttc ggggcgaaa gactcaagga 3960
 tcttgccgct attgagatcc agttcgatat agcccactct tgcacccagt tgatcttcag 4020
 catcttttac tttcaccagc gtttcggggt gtgcaaaaac aggcaagcaa aatgccgcaa 4080
 agaagggaat gagtgcgaca cgaaaatgtt ggatgctcat 4120

<210> 37

<211> 4120

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的核苷酸

<400> 37

aaattctcac ggcttcctc ccgaggtgga ggagcaggcc gccggcacc tgcccatgag 60
 ctgcgccag gagagcggca tggatagaca ccctgtctgt tgcgccagcg ccaggatcaa 120
 cgtcttcgaa ttgggaggtg gcggtagcgg aggtggcggt agcctcgaga gctccaattc 180
 actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc aacttaatcg 240
 ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 300
 ctagtgaggc cggccgcttc gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac 360
 cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt 420
 atttgtaacc attataagct gcaataaaca agttaacaac aacaattgca ttcattttat 480
 gtttcagggt cagggggagg tgtgggaggt tttttaagc aagtaaaacc tctacaaatg 540
 tggtaaaatc gataaggatc cgtttgctga ttgggcgctc ttccgctgat ctgcgcagca 600
 ccatggcctg aaataacctc tgaaagagga acttggttag ctaccttctg aggcggaag 660
 aaccagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt cccagggctc cccagcaggc 720
 agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaag gtccccaggc 780
 tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccc 840
 cccctaactc cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat 900
 ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc 960
 cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt gcaaaaagct cgattcttct 1020
 gacactagcg ccaccatgaa gaagcccgaa ctcaccgcta ccagcgttga aaaatttctc 1080
 atcgagaagt tcgacagtgt gagcgacctg atgcagttgt cggagggcga agagagccga 1140
 gccttcagct tcgatgtcgg cggacgcggc tatgtactgc ggggtgaatag ctgcgctgat 1200
 ggcttctaca aagaccgcta cgtgtaccgc cacttcgcca gcgctgcact acccatcccc 1260
 gaagtgttgg acatcggcga gttcagcgag agcctgacat actgcatcag tagacgcgcc 1320
 caaggcgta ctctccaaga cctccccgaa acagagctgc ctgctgtgtt acagcctgtc 1380
 gccgaagcta tggatgctat tgccgccgcc gacctcagtc aaaccagcgg ctteggccca 1440
 ttggggcccc aaggcatcgg ccagtacaca acctggcggg atttcatttg cgccattget 1500
 gatcccatg tctaccactg gcagaccgtg atggacgaca ccgtgtccgc cagcgtagct 1560
 caagccctgg acgaactgat gctgtgggcc gaagactgtc ccgaggtgcg ccacctcgtc 1620
 catgccgact tcggcagcaa caacgtcctg accgacaacg gccgcatcac cgccgtaatc 1680

gactgggtccg aagctatgtt cggggacagt cagtacgagg tggccaacat cttcttcttg 1740
 cggccctggc tggcttgcac ggagcagcag actcgctact tcgagcgccg gcatcccag 1800
 ctggccggca gccctcgtct gcgagcctac atgctgcgca tcggcctgga tcagctctac 1860
 cagagcctcg tggacggcaa cttcgacgat gctgcctggg ctcaaggccg ctgcgatgcc 1920
 atcgtccgca gcggggccgg caccgtcggg cgcacacaaa tcgctcgccg gagcgagcc 1980
 gtatggaccg acggctgcgt cgaggtgctg gccgacagcg gcaaccgccg gccagtaga 2040
 cgaccgcgcg ctaaggaggt aggtcgagtt taaactctag aaccgggtcat ggccgcaata 2100
 aaatatcttt attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgttcga actagatgct 2160
 gtcgaccgat gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc cttccgggtg gcgcggggca 2220
 tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta ggacaggtgc 2280
 cggcagcgct cttccgcttc ctgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg 2340
 cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac 2400
 gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 2460
 ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca 2520
 agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 2580
 tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc 2640
 ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag 2700
 gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc 2760
 ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgacttate gccactggca 2820
 gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtctctg 2880
 aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg 2940
 aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct 3000
 ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 3060
 gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa 3120
 gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 3180
 tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaacct ggtctgacag cggccgcaaa 3240
 tgctaaacca ctgcagtggg taccagtgtg tgatcagtga ggcaccgatc tcagcgatct 3300
 gcctatttcg ttcgtccata gtggcctgac tccccgtcgt gtagatcact acgattcgtg 3360
 agggttacc atcaggcccc agcgcagcaa tgatgccgag agagccgctg tcaccggccc 3420
 ccgatttgtc agcaatgaac cagccagcag ggagggccga gcgaagaagt ggtcctgcta 3480
 ctttgtccgc ctccatccag tctatgagct gctgtcgtga tgctagagta agaagtccgc 3540
 cagtgagtag tttccgaaga gttgtggcca ttgctactgg catcgtggta tcacgctcgt 3600
 cgttcggtat ggcttcgttc aactctggtt cccagcggtc aagccgggtc acatgatcac 3660
 ccatattatg aagaaatgca gtcagctcct tagggcctcc gatcgttgtc agaagtaagt 3720
 tggccgcggt gttgtcgtc atggtaatgg cagcactaca caattctctt accgtcatgc 3780
 catccgtaag atgcttttcc gtgaccggcg agtactcaac caagtcgttt tgtgagtagt 3840
 gtatacggcg accaagctgc tcttgcccgg cgtctatacg ggacaacacc gcgccacata 3900
 gcagtacttt gaaagtgtc atcatcgga atcgtttctt ggggcgaaa gactcaagga 3960
 tcttgccgct attgagatcc agttcgatat agcccactct tgcaccagat tgatcttcag 4020

catctttttac tttcaccagc gtttcggggt gtgcaaaaac aggcaagcaa aatgccgcaa 4080
agaaggggaat gagtgcgaca cgaaaatggt ggatgctcat 4120

<210> 38

<211> 4120

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的核苷酸

<400> 38

aaattctcac ggcttccctc ccgaggtgga ggagcaggcc gccggcaccc tgcccatgag 60
ctgcgcccag gagagcggca tggatagaca ccctgctgct tgcgccagcg ccaggatcaa 120
cgtcttcgaa ttgggaggtg gcggtagcgg aggtggcggt agcctcgaga gctccaattc 180
actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaacctt ggcgttacct aacttaatcg 240
ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 300
ctagtgaggc cggccgcttc gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac 360
cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt 420
atttgttaacc attataagct gcaataaaca agttaacaac aacaattgca ttcattttat 480
gtttcagggt cagggggagg tgtgggaggt tttttaagc aagtaaaacc tctacaaatg 540
tggtaaaatc gataaggatc cgtttgcgta ttgggcgctc ttccgctgat ctgcgcagca 600
ccatggcctg aaataacctc tgaaagagga acttggttag ctaccttctg aggcggaag 660
aaccagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt cccagggctc cccagcaggc 720
agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaac gtccccaggc 780
tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccc 840
cccctaactc cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat 900
ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc 960
cagaagtagt gaggaggctt ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct cgattcttct 1020
gacactagcg ccacatgaa gaagcccgaa ctcaccgcta ccagcgttga aaaatttctc 1080
atcgagaagt tcgacagtgt gagcgacctg atgcagttgt cggagggcga agagagccga 1140
gccttcagct tcgatgtcgg cggacgcggc tatgtactgc gggatgaatag ctgcgctgat 1200
ggcttctaca aagaccgcta cgtgtaccgc cacttcgccca gcgctgcact acccatcccc 1260
gaagtgttgg acatcggcga gttcagcgag agcctgacat actgcatcag tagacgcgcc 1320
caaggcgta ctctccaaga cctccccgaa acagagctgc ctgctgtgtt acagcctgtc 1380
gccgaagcta tggatgctat tgccgccgcc gacctcagtc aaaccagcgg cttcggccca 1440
ttcgggcccc aaggcatcgg ccagtaacac acctggcggg atttcatttg cgccattgct 1500
gatccccatg tctaccactg gcagaccgtg atggacgaca ccgtgtccgc cagcgtagct 1560
caagccctgg acgaactgat gctgtgggcc gaagactgtc ccgaggtgcg ccacctcgctc 1620
catgccgact tcggcagcaa caacgtcctg accgacaacg gccgcatcac cgccgtaatc 1680
gactgggtccg aagctatggt cggggacagt cagtacgagg tggccaacat cttcttcttg 1740
cggccctggc tggcttgcac ggagcagcag actcgctact tcgagcgccg gcatcccgag 1800

```

ctggccggca gccctcgtct gcgagcctac atgctgcgca tcggcctgga tcagctctac 1860
cagagcctcg tggacggcaa cttcgacgat gctgcctggg ctcaaggccg ctgcgatgcc 1920
atcgtccgca gcggggccgg caccgtcggg cgcacacaaa tcgctcgccg gagcgagcc 1980
gtatggaccg acggctgcgt cgaggtgctg gccgacagcg gcaaccgccc gccagtaca 2040
cgaccgcgcg ctaaggaggt aggtcgagtt taaactctag aaccggtcct ggccgcaata 2100
aaatatcttt attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgttcga actagatgct 2160
gtcgaccgat gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc cttccgggtg gcgcggggca 2220
tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta ggacaggtgc 2280
cggcagcgct cttccgcttc ctgcctcact gactcgtgc gctcggtcgt tcggctgcgg 2340
cgagcgggat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac 2400
gcaggaaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 2460
ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca 2520
agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 2580
tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcttttctc 2640
ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgtgta ggtatctcag ttcggtgtag 2700
gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc 2760
ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgacttata gccactggca 2820
gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtctctg 2880
aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg 2940
aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct 3000
ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 3060
gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgtcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa 3120
gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 3180
tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag cggccgcaaa 3240
tgctaaacca ctgcagtggg taccagtgtg tgatcagtga ggcaccgatc tcagcgatct 3300
gcctattttcg ttcgtccata gtggcctgac tccccgtcgt gtagatcact acgattcgtg 3360
agggcttacc atcaggcccc agcgcagcaa tgatgccgcg agagccgctg tcaccggccc 3420
ccgatttgtc agcaatgaac cagccagcag ggagggccga gcgaagaagt ggtcctgcta 3480
ctttgtccgc ctccatccag tctatgagct gctgtcgtga tgctagagta agaagtccgc 3540
cagtgagtag tttccgaaga gttgtggcca ttgctactgg catcgtggta tcacgtcgt 3600
cgttcgggat ggcttcgttc aactctggtt cccagcggtc aagccgggtc acatgatcac 3660
ccatattatg aagaaatgca gtcagctcct tagggcctcc gatcgttgct agaagtaagt 3720
tggccgcggt gttgtcgtc atggtaatgg cagcactaca caattctctt accgtcatgc 3780
catccgtaag atgcttttcc gtgaccggcg agtactcaac caagtcgttt tgtgagtagt 3840
gtatacggcg accaagctgc tcttgcccgg cgtctatacg ggacaacacc gcgccacata 3900
gcagtacttt gaaagtgtc atcatcgga atcgtttctt ggggcggaaa gactcaagga 3960
tcttgccgct attgagatcc agttcgatat agcccactct tgcaccagt tgatcttcag 4020
catcttttac tttcaccagc gtttcggggt gtgcaaaaac aggcaagcaa aatgccgcaa 4080
agaagggaat gagtgcgaca cgaaaatgtt ggatgctcat 4120

```

<210> 39

<211> 4120

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的核苷酸

<400> 39

```

aaattctcac ggcttcctc ccgaggtgga ggagcaggcc gccggcaccc tgcccatgag 60
ctgcgcccag gagagcggca tggatagaca ccctgctgct tgcgccagcg ccaggatcaa 120
cgtcttcgaa ttgggaggtg gcggtagcgg aggtggcggt agcctcgaga gctccaattc 180
actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaacct ggcgttaccc aacttaatcg 240
ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 300
ctagtgaggc cggccgcttc gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac 360
cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt 420
atttghtaacc attataagct gcaataaaca agttaacaac aacaattgca ttcattttat 480
gtttcagggt cagggggagg tgtgggaggt tttttaagc aagtaaaacc tctacaaatg 540
tggtaaaatc gataaggatc cgtttgcgta ttgggcgctc ttccgctgat ctgcgcagca 600
ccatggcctg aaataacctc tgaaagagga acttggttag ctaccttctg aggcggaag 660
aaccagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt cccagggctc cccagcaggc 720
agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaag gtccccaggc 780
tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccc 840
cccctaactc cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat 900
ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctatct 960
cagaagtagt gaggaggctt ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct cgattcttct 1020
gacactagcg ccacatgaa gaagcccgaa ctcaccgcta ccagcgttga aaaatttctc 1080
atcgagaagt tcgacagtgt gagcgacctg atgcagttgt cggaggcgga agagagccga 1140
gccttcagct tcgatgtcgg cggacgcggc tatgtactgc ggggtgaatag ctgcgctgat 1200
ggcttctaca aagaccgcta cgtgtaccgc cacttcgcca gcgctgcact acccatcccc 1260
gaagtgttgg acatcggcga gttcagcgag agcctgacat actgcatcag tagacgcgcc 1320
caaggcgta ctctccaaga cctccccgaa acagagctgc ctgctgtgtt acagcctgtc 1380
gccgaagcta tggatgctat tgccgccgcc gacctcagtc aaaccagcgg cttcggccca 1440
ttcgggcccc aaggcatcgg ccagtacaca acctggcggg atttcatttg cgccattgct 1500
gatccccatg tctaccactg gcagaccgtg atggacgaca ccgtgtccgc cagcgtagct 1560
caagccctgg acgaactgat gctgtgggcc gaagactgtc ccgaggtgcg ccacctcgtc 1620
catgccgact tcggcagcaa caacgtcctg accgacaacg gccgcatac cgccgtaatc 1680
gactgggtccg aagctatgtt cggggacagt cagtacgagg tggccaacat cttcttcttg 1740
cggccctggc tggcttgcac ggagcagcag actcgctact tcgagcgccg gcaccccgag 1800
ctggccggca gccctcgtct gcgagcctac atgctgcgca tcggcctgga tcagctctac 1860
cagagcctcg tggacggcaa cttcgacgat gctgcctggg ctcaaggccg ctgcgatgcc 1920

```

```

atcgtccgca gcggggccgg caccgtcggc cgacacaaaa tcgctcgccg gagcgagcc 1980
gtatggaccg acggctgcgt cgaggtgctg gccgacagcg gcaaccgccg gccagtaga 2040
cgaccgcgcg ctaaggaggt aggtcgagtt taaactctag aaccggtcac gcccgcaata 2100
aaatatcttt attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgttcga actagatgct 2160
gtcgaccgat gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc cttccgggtg gcgcggggca 2220
tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta ggacaggtgc 2280
cggcagcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg 2340
cgagcgggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 2400
gcaggaaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 2460
ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca 2520
agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 2580
tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc 2640
ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgtgta ggtatctcag ttcggtgtag 2700
gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagccccg ccgctgcgcc 2760
ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgacttatc gccactggca 2820
gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtctctg 2880
aagtgggtgg ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg 2940
aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct 3000
ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 3060
gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa 3120
gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 3180
tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaacct ggtctgacag cggccgcaaa 3240
tgctaaacca ctgcagtggc taccagtgtc tgatcagtga ggcaccgatc tcagcgatct 3300
gcctatttcg ttcgtccata gtggcctgac tccccgtcgt gtagatcact acgattcgtg 3360
agggcttacc atcaggcccc agcgcagcaa tgatgccgcg agagccgcgt tcaccggccc 3420
ccgatttgct agcaatgaac cagccagcag ggagggccga gcgaagaagt ggtcctgcta 3480
ctttgtccgc ctccatccag tctatgagct gctgtcgtga tgctagagta agaagttcgc 3540
cagtgagtag tttccgaaga gttgtggcca ttgctactgg catcgtggta tcacgctcgt 3600
cgttcgggat ggcttcgttc aactctggtt cccagcggtc aagccgggtc acatgatcac 3660
ccatattatg aagaaatgca gtcagctcct tagggcctcc gatcgttgct agaagtaagt 3720
tgcccgcggt gttgtcgtc atggtaatgg cagcactaca caattctctt accgtcatgc 3780
catccgtaag atgcttttcc gtgaccggcg agtactcaac caagtcgttt tgtgagtagt 3840
gtatacggcg accaagctgc tcttgcccgg cgtctatacg ggacaacacc gcgccacata 3900
gcagtacttt gaaagtgtc atcatcgga atcgtttctt ggggcggaag gactcaagga 3960
tcttgccgct attgagatcc agttcgatat agcccactct tgcaccagt tgatcttcag 4020
catcttttac tttcaccagc gtttcggggt gtgcaaaaac aggcaagcaa aatgccgcaa 4080
agaagggaat gagtgcgaca cgaaaatgtt ggatgctcat 4120

```

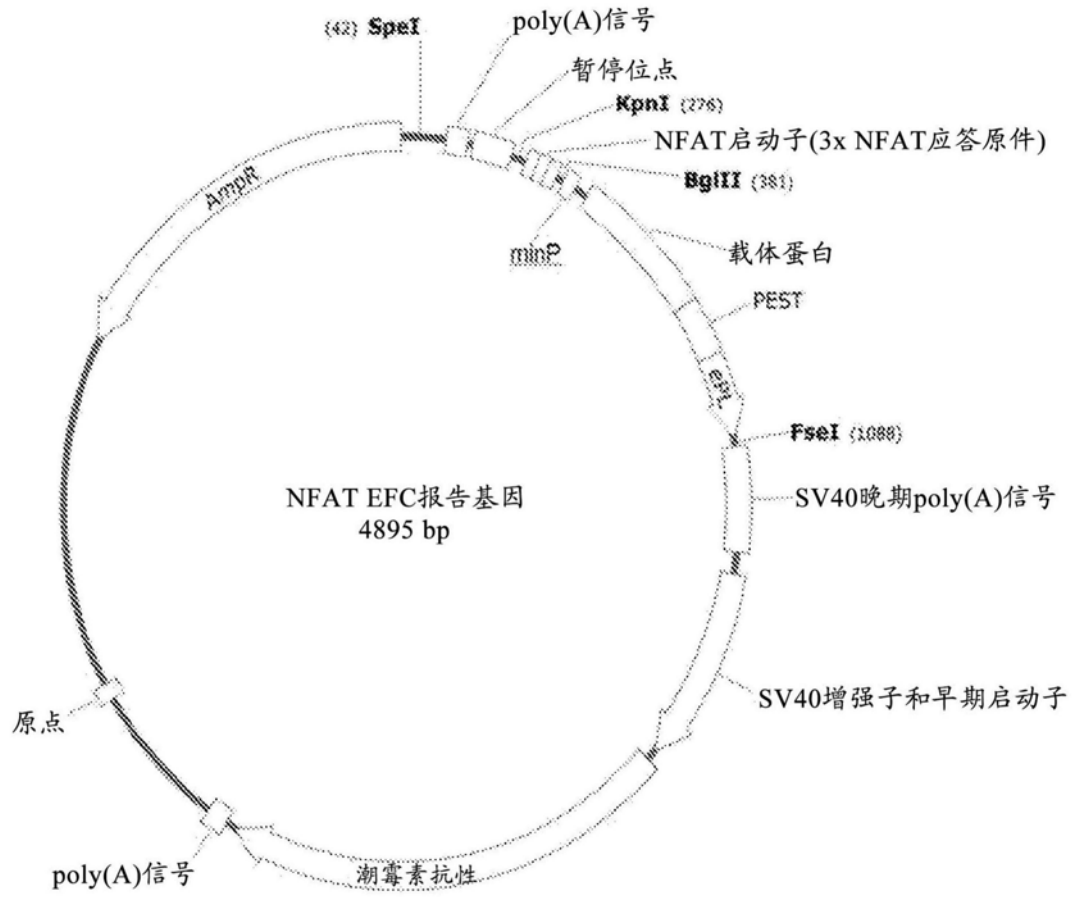


图1

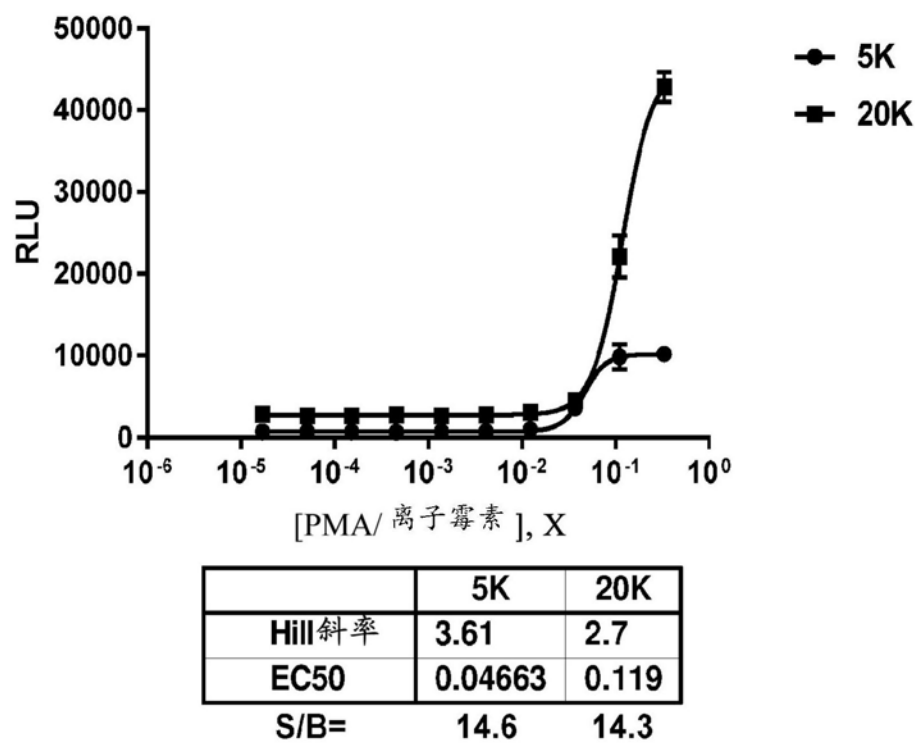


图2

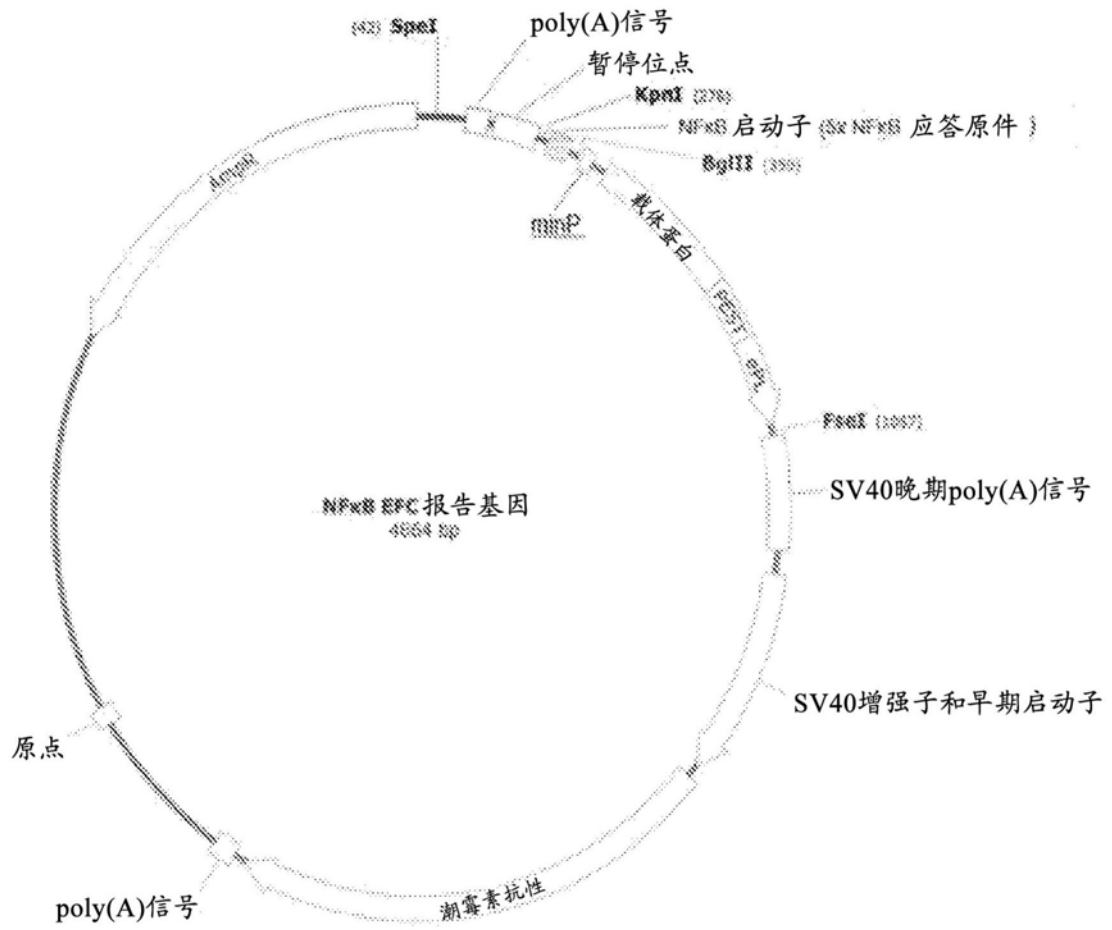
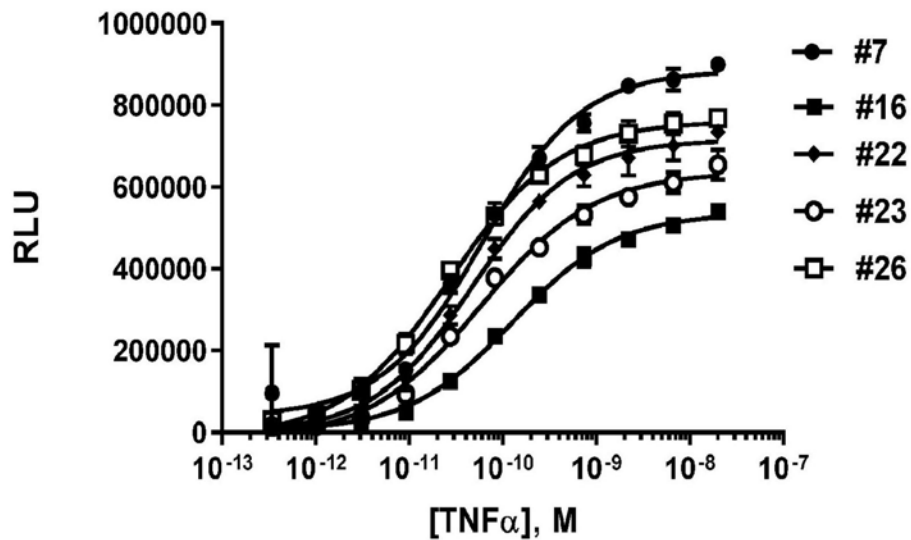
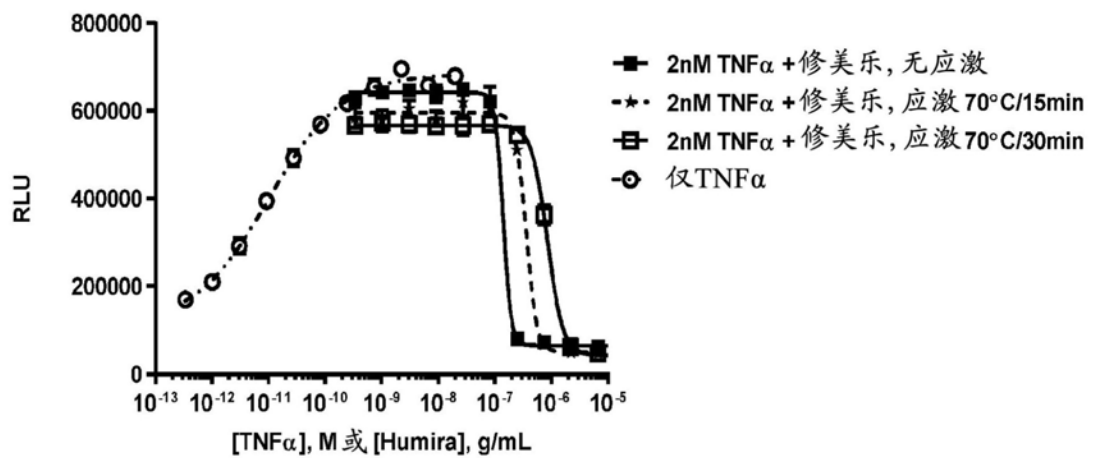


图3



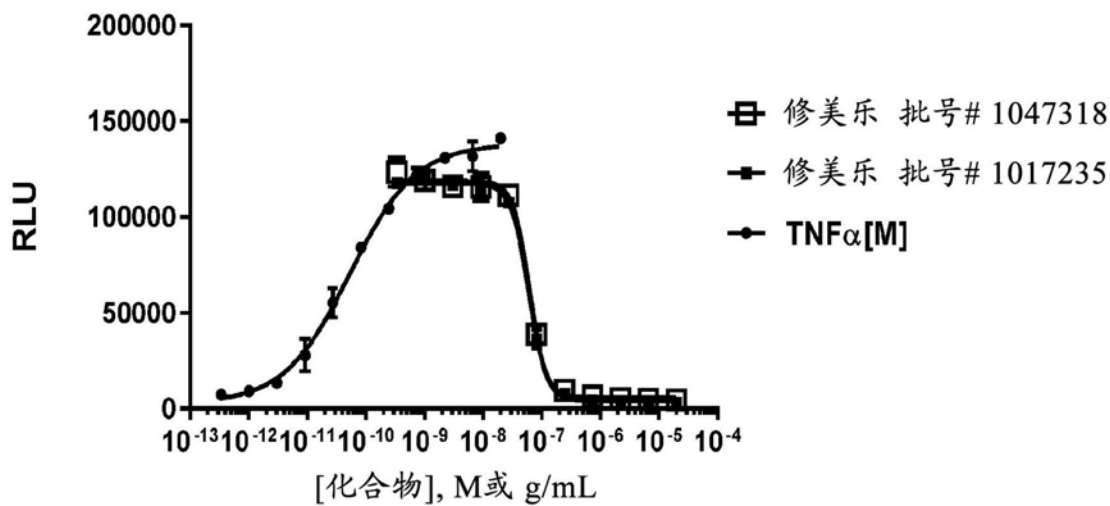
	#7	#16	#22	#23	#26
Hill斜率	0.81	0.78	0.81	0.71	0.74
EC50	6.0e-011	1.3e-010	4.8e-011	5.9e-011	2.7e-011
S/B	39.5	41.7	52.8	79.6	71.3

图4



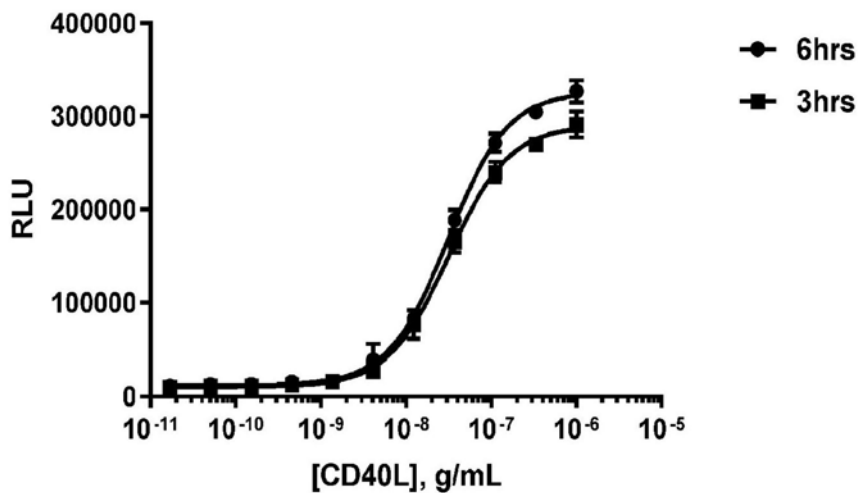
	修美乐, 无应激	修美乐, 应激 70°C/15min	修美乐, 应激 70°C/30min	仅TNFα
Hill斜率	-6.265	-4.583	-3.152	0.6676
EC50	1.403e-007	3.575e-007	8.48e-007	9.951e-012
S/B=	11.3	12.9	12.9	10.0

图5



	修美乐 批号# 1017235	修美乐 批号# 1047318
Hill斜率	-2.881	-3.119
EC50	6.031e-008	6.236e-008

图6



	3hrs	6hrs
Hill斜率	1.222	1.243
EC ₅₀	3.18E-08	3.15E-08
S/B	24	25

图7

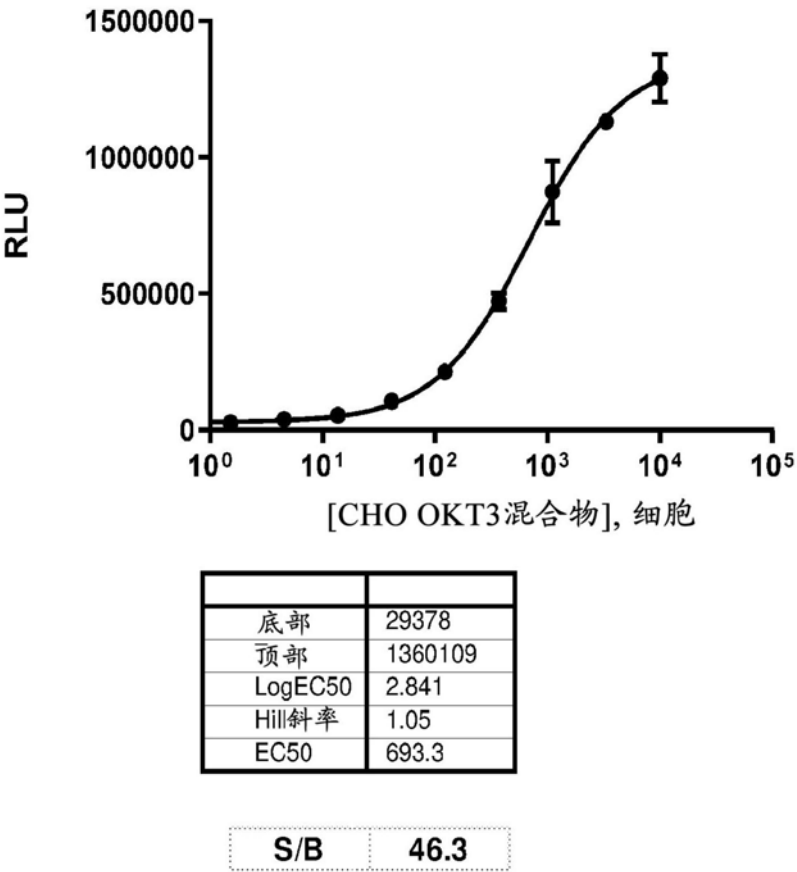


图8

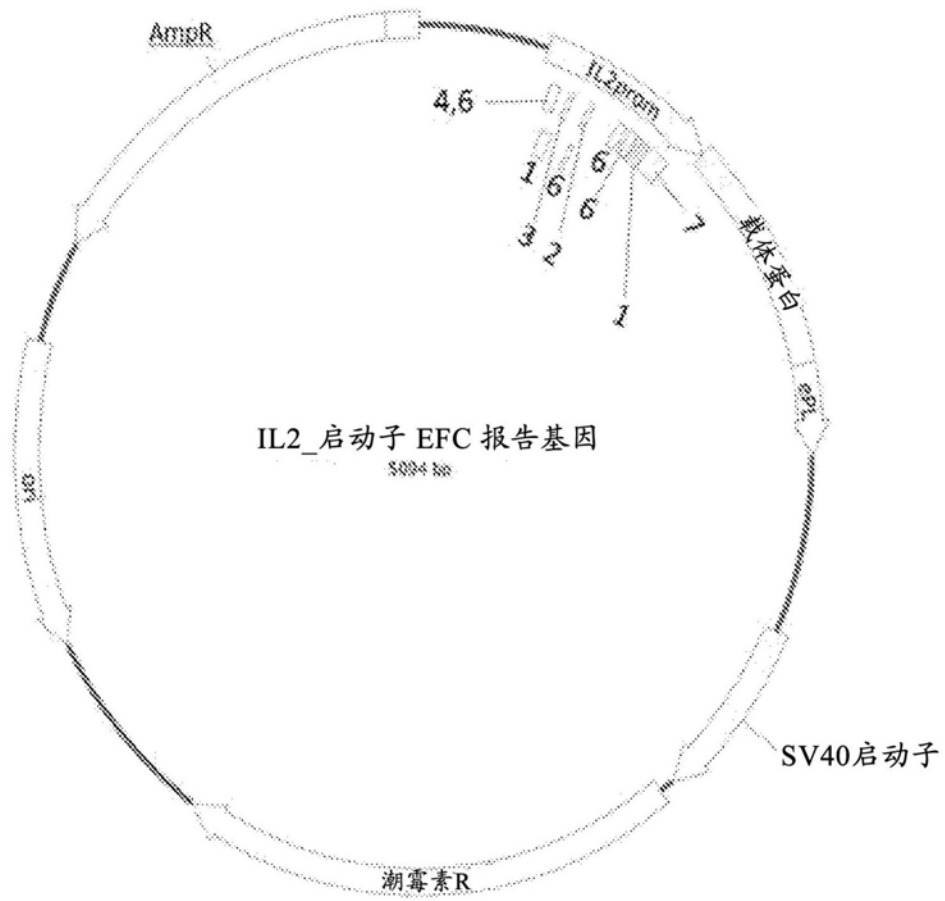


图9

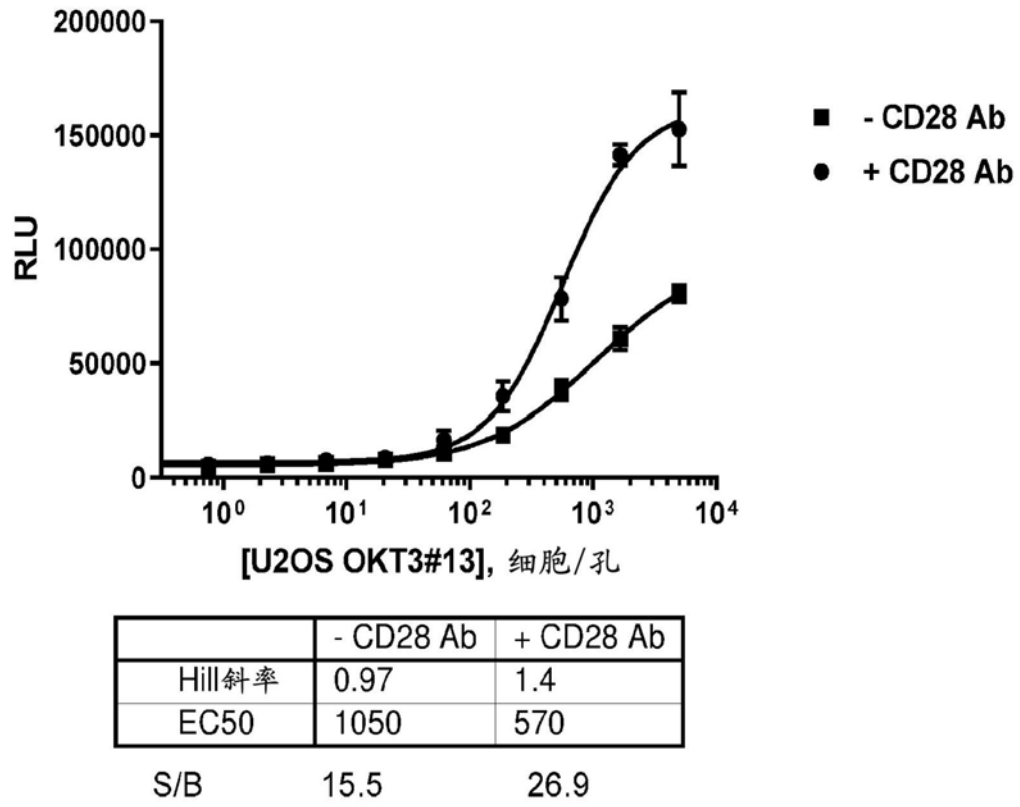


图10

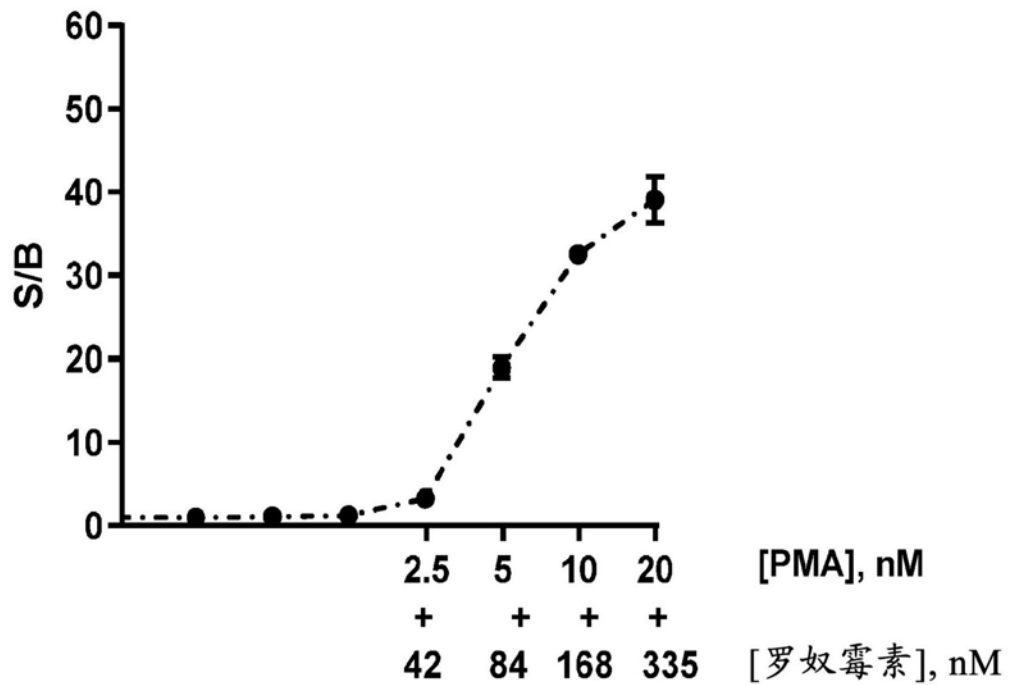


图11

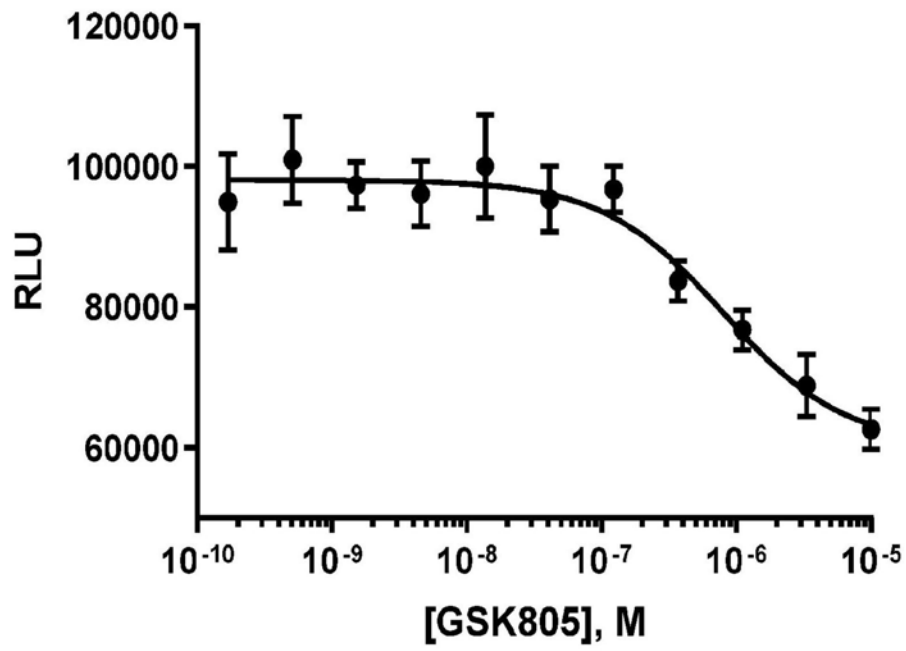
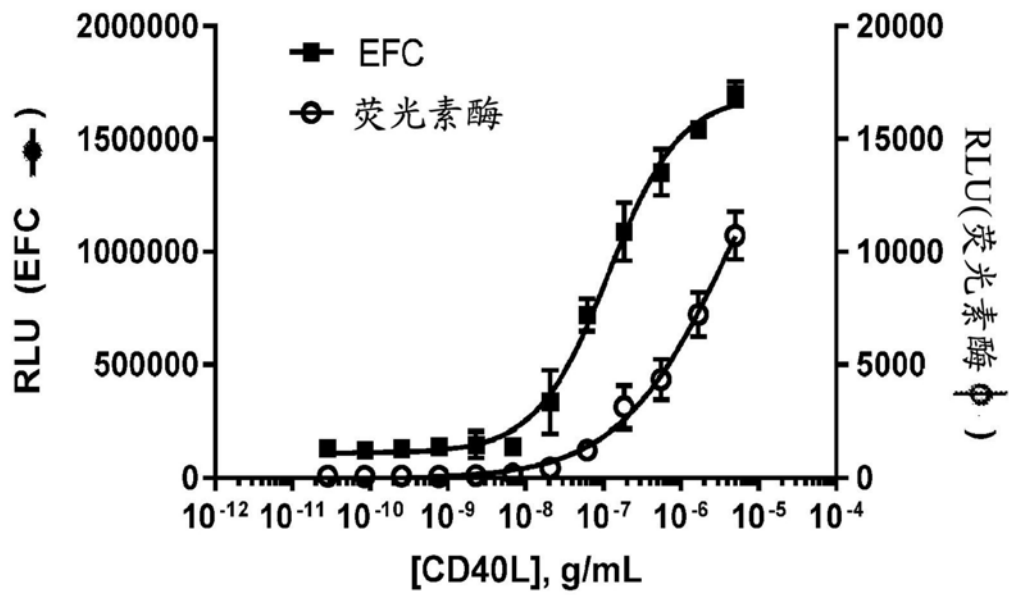


图12



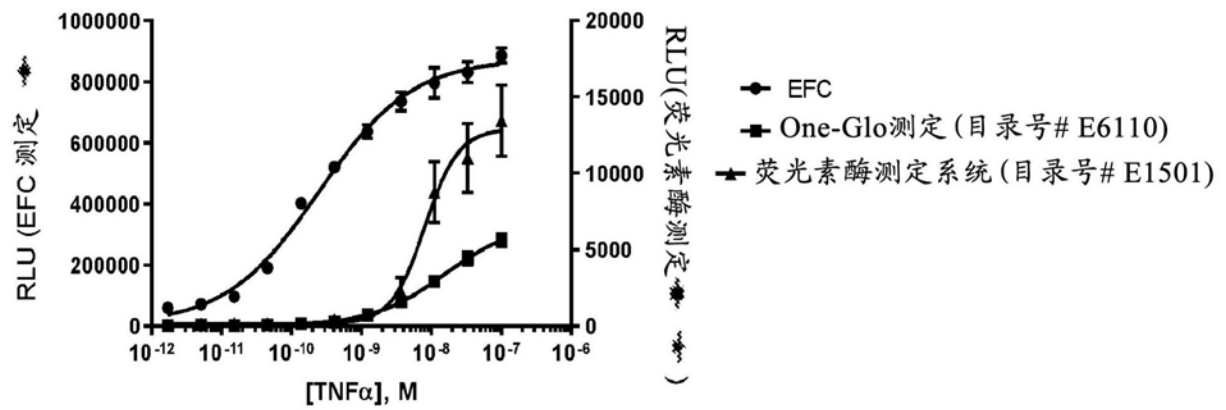
	EFC	荧光素酶
Hill斜率	0.9424	0.6104
EC50	1.17e-007	4.353e-006

S:B

14

119

图13

U2OS NF κ B-报告基因: EFC vs 荧光素酶

	EFC	One-Glo 荧光素酶 测定系统	荧光素酶 测定系统
EC ₅₀	0.3 nM	7.7 nM	3.6 nM
S/B	16	114	219
Z	0.87	0.47	0.77

图14

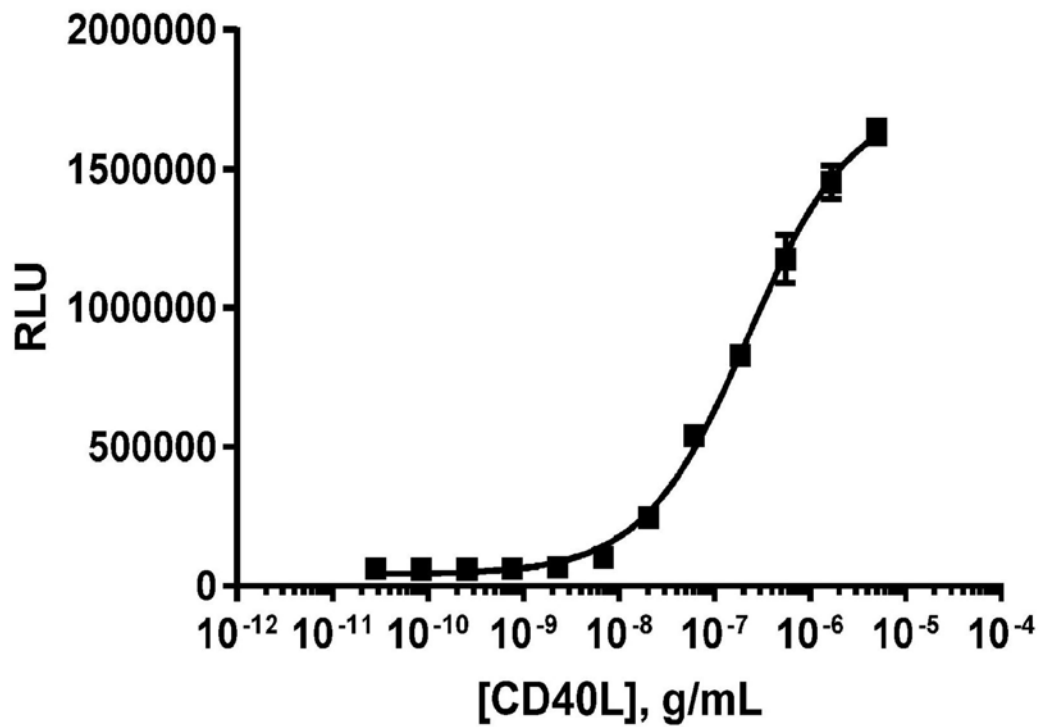


图15

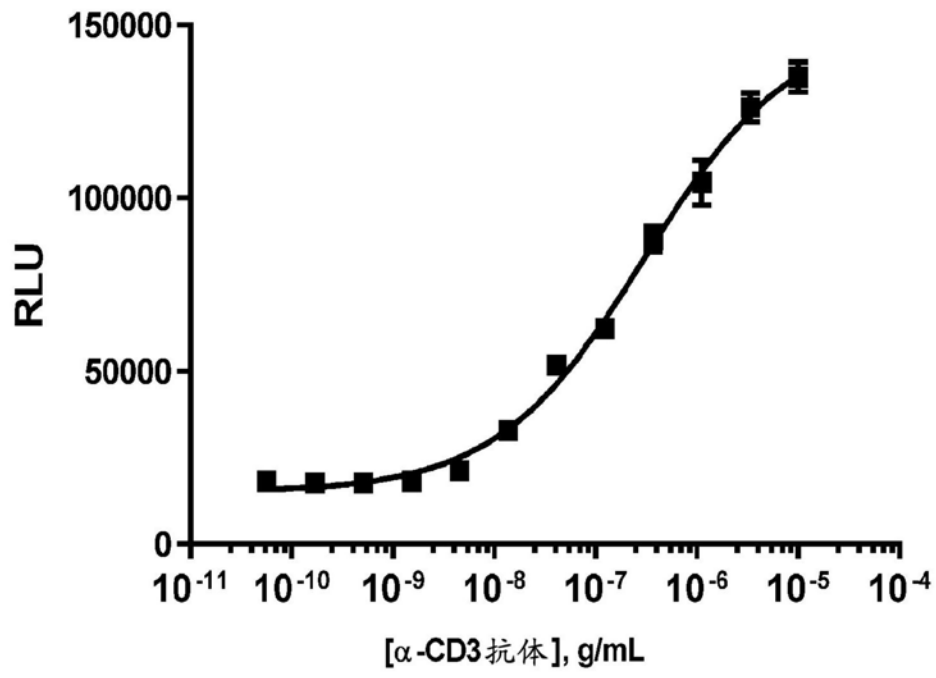


图16

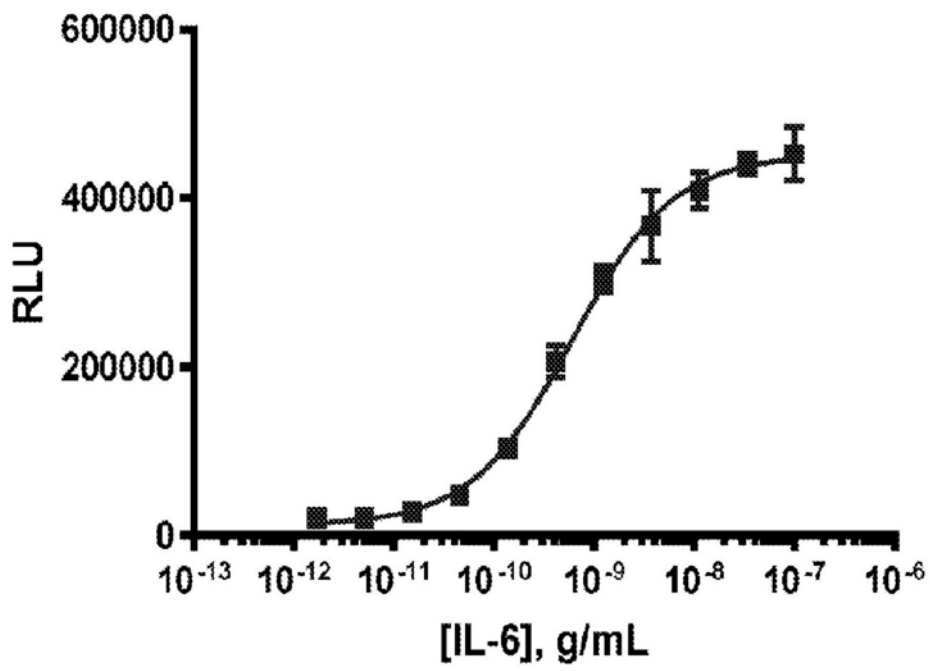


图17

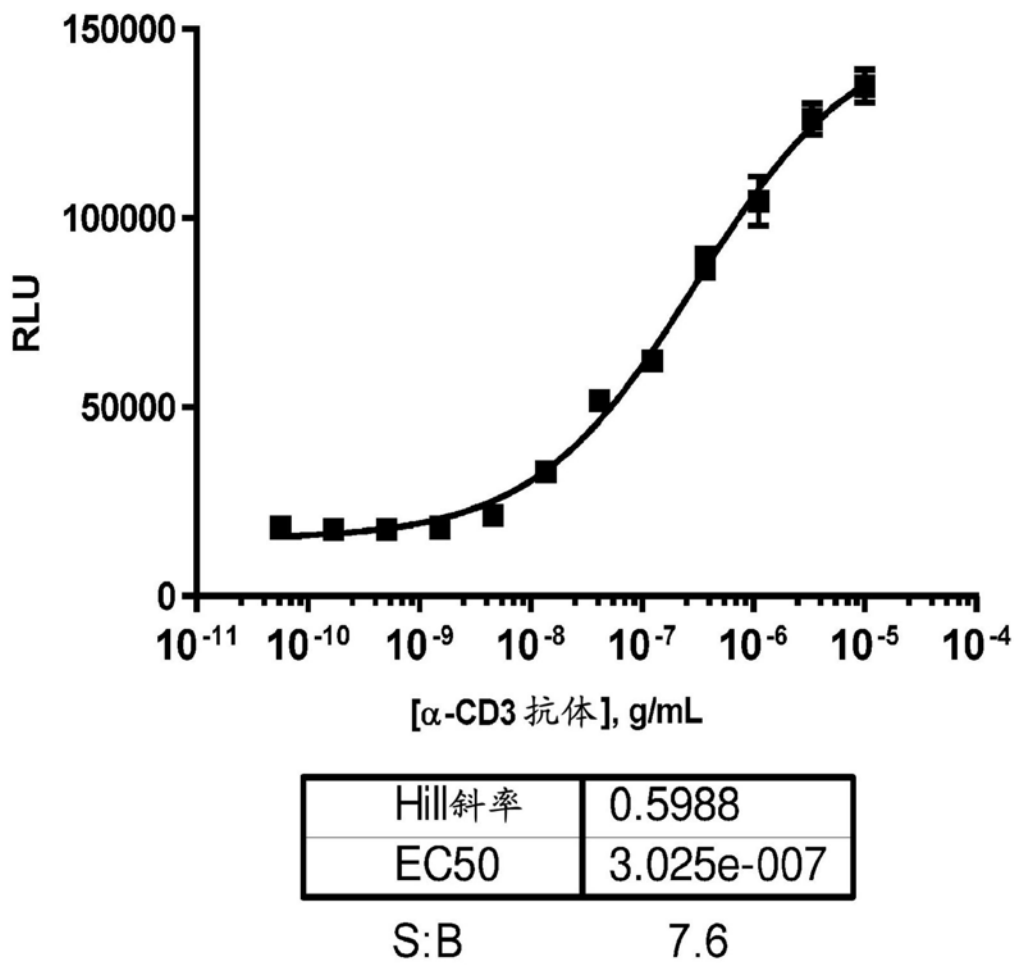


图18

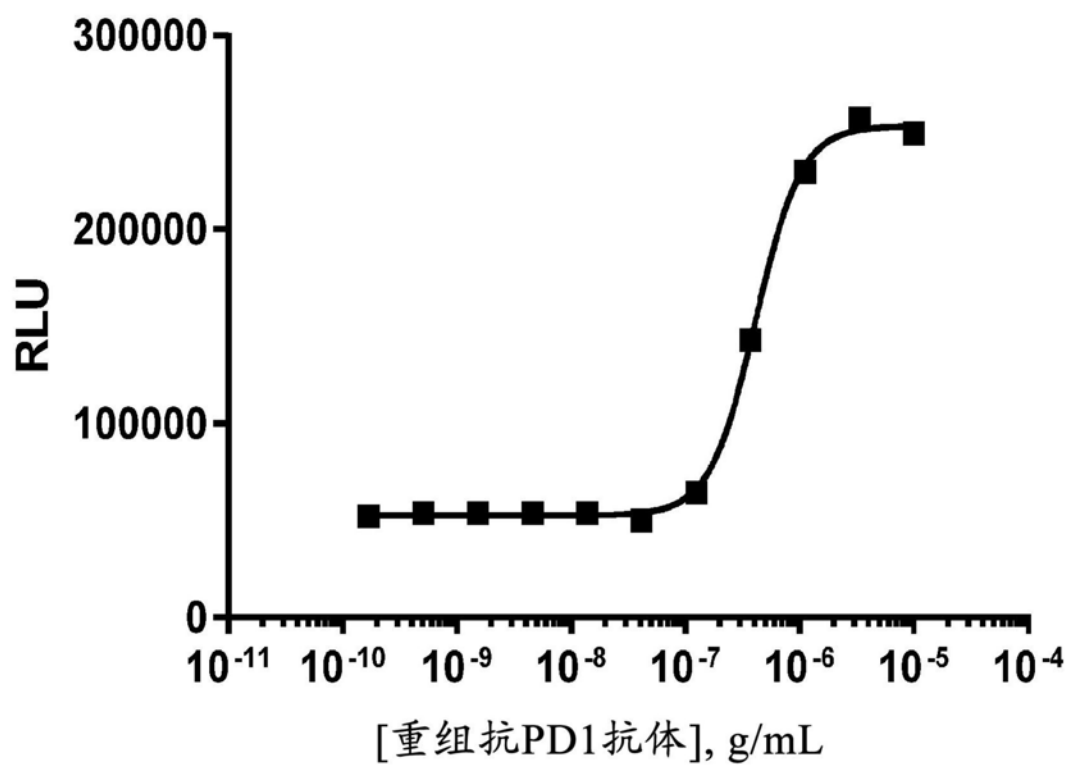
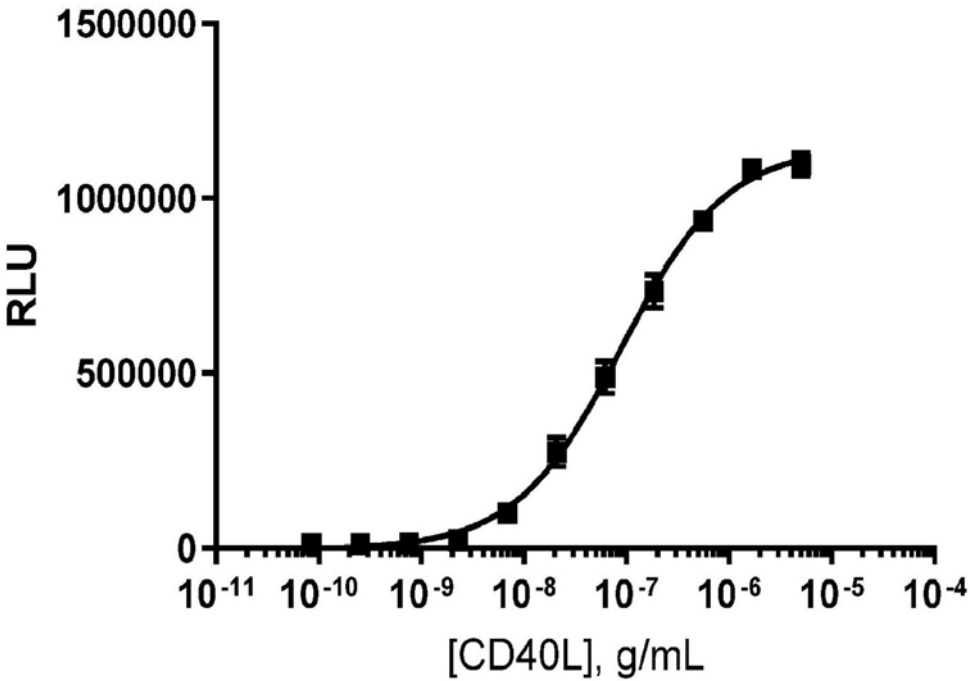


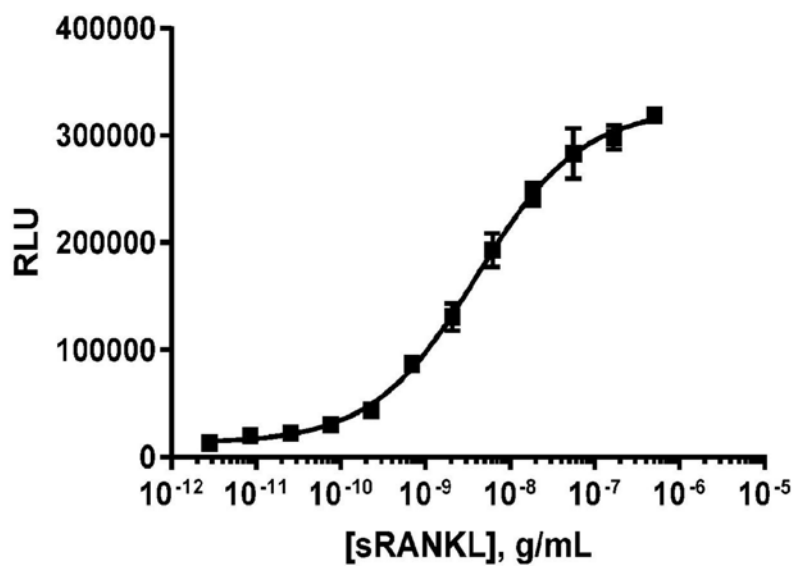
图19



底部	-4842
顶部	1146694
LogEC50	-7.052
Hill斜率	0.8464
EC50	8.867e-008

S/B= 102.8

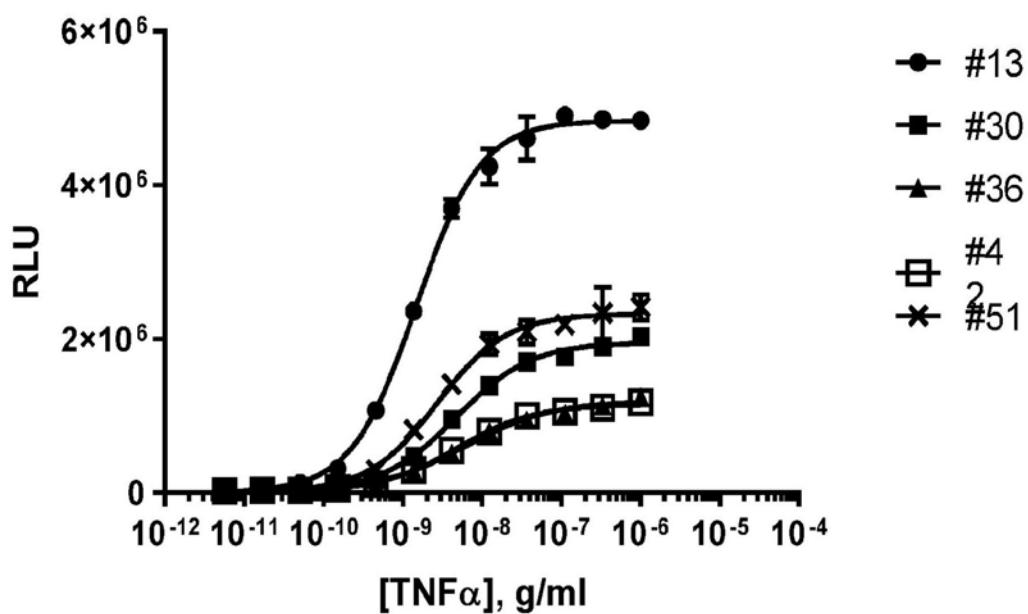
图20



	值
底部	12916
顶部	324727
LogEC50	-8.394
Hill斜率	0.7052
EC50	4.034e-009

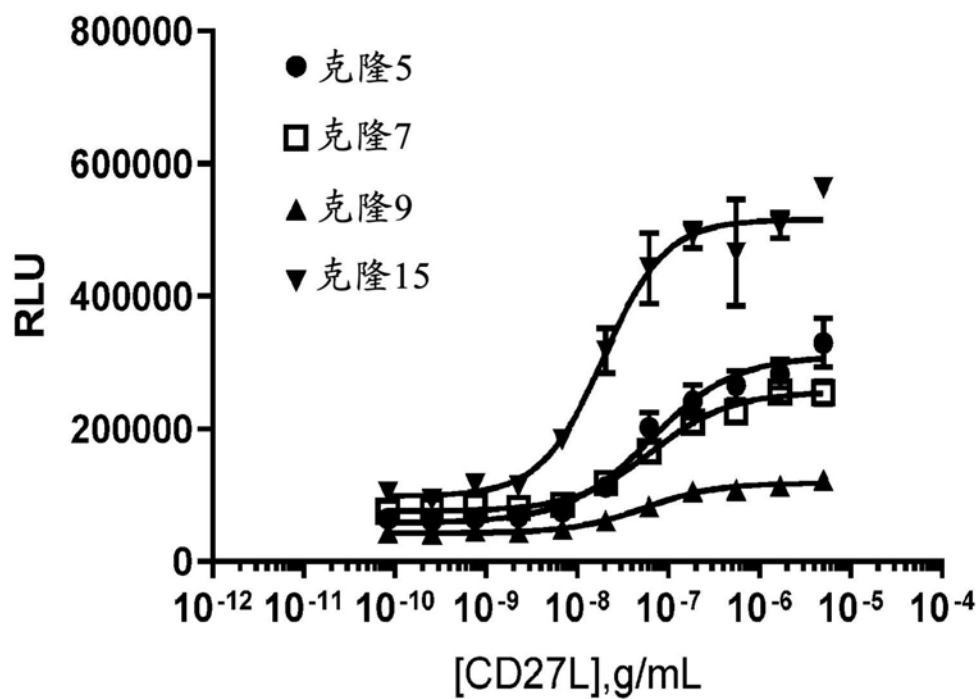
S/B 24.0

图21



	#13	#30	#36	#42	#51
Hill斜率	1.1	0.92	0.79	0.90	0.99
EC50	1.5e-009	4.8e-009	6.1e-009	4.9e-009	2.7e-009
S/B	71.0	52.5	39.0	39.5	59.6

图22



	克隆5	克隆7	克隆9	克隆15
底部	58173	75822	42875	98673
顶部	310144	255703	118282	515611
LogEC50	-7.2	-7.2	-7.3	-7.7
Hill斜率	0.94	1.0	1.1	1.3
EC50	6.4e-008	6.6e-008	5.5e-008	1.9e-008
S/B=	5.5	3.1	2.7	4.9

图23

A. 具有CD40L的U2OS NFκB报告基因细胞系

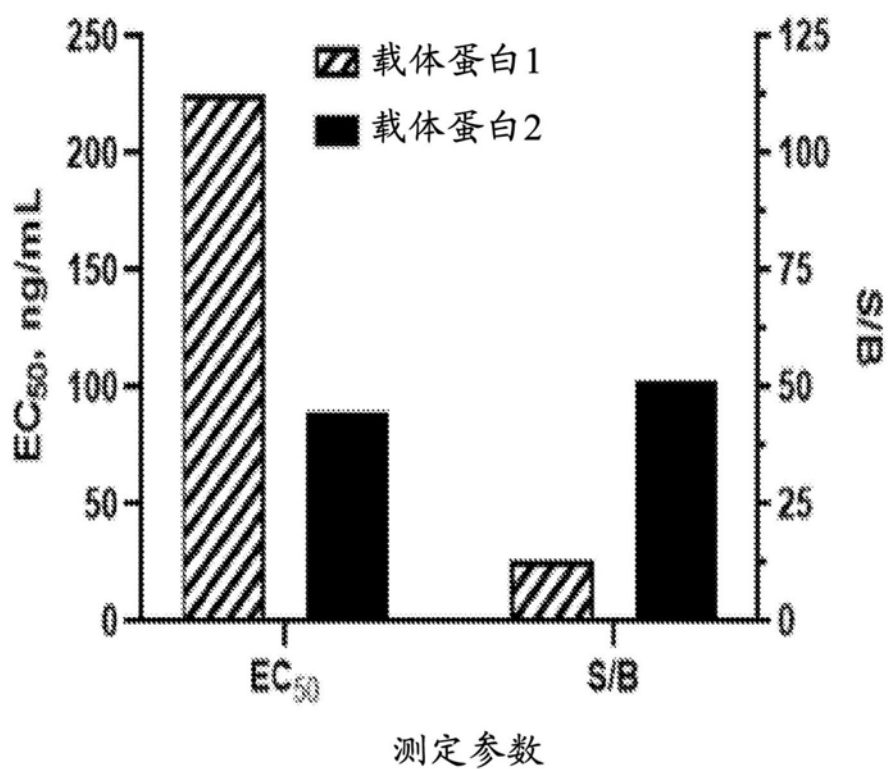


图24a

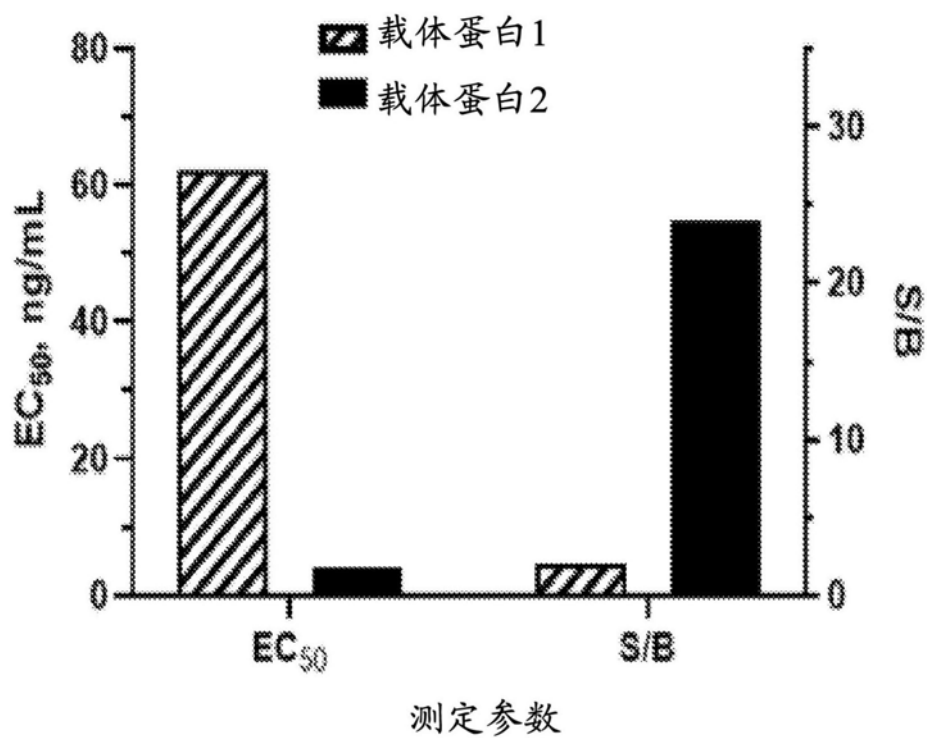
B. U2OS RANK-NF κ B报告基因细胞系

图24b

1. 一种评估启动子区域活性的方法, 包括:

在一定条件下培养包含核酸的细胞, 所述核酸包含可操作地偶联至启动子区域的编码酶供体 (ED) 的区域, 在所述条件中当所述启动子区域有活性时表达所述ED;

如果表达, 将所述ED与酶受体 (EA) 接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物;

检测所述酶活性的水平以评估所述启动子区域的活性; 和

基于所检测的所述酶活性的水平评估转录因子的激活水平。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述启动子区域包含针对目标转录因子的转录因子应答元件 (TFRE), 并且其中所述启动子区域的所述活性指示所述转录因子的活性。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述启动子区域包含至少一个TFRE。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其进一步包括将编码所述转录因子的表达载体引入所述细胞, 并且在其中表达所述转录因子的条件下培养所述细胞。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其进一步包括使所述细胞与试剂接触, 并且基于所检测的所述酶活性的水平评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的所述活性水平。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述启动子区域的所述活性指示目标细胞信号转导通路的活性。

7. 根据权利要求5所述的方法, 其中使所述细胞与所述试剂接触包括在存在所述试剂的条件下培养所述细胞。

8. 根据权利要求5所述的方法, 其中评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的所述活性水平包括对在不存在所述试剂的条件下检测的所述酶活性水平与在存在所述试剂的条件下检测的所述酶活性水平进行比较。

9. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述试剂是小分子。

10. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述试剂是检测试剂。

11. 根据权利要求5所述的方法, 其中使所述细胞与超过一种检测试剂接触。

12. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述核酸还编码与所述ED融合的载体蛋白, 以使得当所述启动子区域具有活性时表达ED-载体蛋白融合物。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述载体蛋白表现出与所述ED-EA复合物的酶活性不同的酶活性。

14. 根据权利要求1所述的方法, 其中检测所述酶活性的所述水平包括提供针对所述ED-EA复合物的底物, 其中在所述底物被所述ED-EA复合物水解后产生可检测的信号。

15. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述ED包含SEQ ID NO:30中所示的氨基酸序列或其变体, 所述变体与所述EA复合以形成ED-EA复合物。

16. 一种评估启动子区域活性的方法, 包括:

在一定条件下培养包含核酸的细胞, 所述核酸包含编码与酶供体 (ED) 融合形成ED-载体蛋白融合物的载体蛋白的区域, 其中所述ED-载体蛋白融合物可操作地偶联至启动子区域, 在所述条件中当所述启动子区域有活性时表达所述ED-载体蛋白融合物;

如果表达, 将所述ED与酶受体 (EA) 接触以形成具有酶活性的ED-EA复合物;

检测所述酶活性的水平以评估所述启动子区域的活性; 和

基于所检测的所述酶活性的水平评估转录因子的激活水平。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述启动子区域包含针对目标转录因子的转录因子应答元件 (TFRE), 并且其中所述启动子区域的所述活性指示所述转录因子的活性。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述载体蛋白包含经选择以影响所述ED-载体蛋白融合物的稳定性的结构域。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述结构域经选择以与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白融合物相比增加所述ED-载体蛋白融合物的所述稳定性。

20. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述结构域经选择以与缺乏所述结构域的ED-载体蛋白相比使所述ED-载体蛋白脱稳定化。

21. 根据权利要求16所述的方法, 其进一步包括将编码所述转录因子的表达载体引入所述细胞, 并且在其中表达所述转录因子的条件下培养所述细胞。

22. 根据权利要求16所述的方法, 其包括使所述细胞与试剂接触, 并且基于所检测的所述酶活性的水平评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的所述活性水平。

23. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述启动子区域的所述活性指示目标细胞信号转导通路的活性。

24. 根据权利要求22所述的方法, 其中评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的所述活性水平包括对在不存在所述试剂的条件下检测的所述酶活性水平与在存在所述试剂的条件下检测的所述酶活性水平进行比较。

25. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述试剂是小分子。

26. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述试剂是检测试剂。

27. 一种试剂盒, 其包含:

包含核酸的细胞, 所述核酸包含可操作地偶联至启动子区域的编码酶供体 (ED) 的区域; 和

使用所述细胞以进行根据权利要求1至26中任一项所述方法的说明书。

28. 根据权利要求27所述的试剂盒, 其进一步包含以下说明书: 基于所检测的所述酶活性的水平评估所述转录因子的所述激活水平, 或者激活所述转录因子的通路; 在所述培养过程中将所述细胞与试剂接触; 以及基于所检测的所述酶活性的水平评估响应于所述细胞与所述试剂接触的所述启动子区域的激活。