



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106754759 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611255438.X

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2016.12.30

(71)申请人 北京市肝病研究所

地址 100069 北京市丰台区右安门外西头
条8号

申请人 首都医科大学附属北京佑安医院

(72)发明人 陈德喜 刘晓霓 李庆 王爽
许坚吉

(74)专利代理机构 北京华科联合专利事务所
(普通合伙) 11130

代理人 王为 孟旭

(51)Int.Cl.

C12N 7/01(2006.01)

C12N 15/861(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

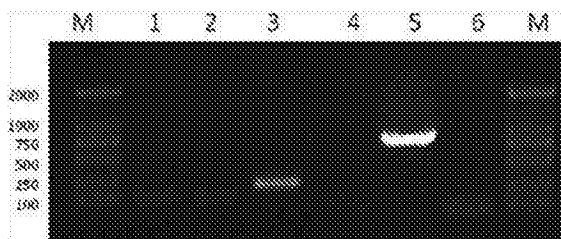
权利要求书1页 说明书8页 附图9页

(54)发明名称

人ASPP2重组腺病毒制备及其抗肿瘤应用

(57)摘要

本发明涉及一种人ASPP2重组腺病毒制备及其抗肿瘤应用,所述重组腺病毒包含ASPP2全长基因序列,本发明将ASPP2基因与穿梭质粒(pAdTrack-CMV)相连接,构建重组穿梭质粒pAdTrack-CMV-ASPP2;再将重组穿梭质粒线性化后与骨架质粒pAdEasy-1在大肠杆菌BJ5183中同源重组,构建重组腺病毒载体Ad-ASPP2;将该重组腺病毒Ad-ASPP2在293T细胞中大量扩增,纯化后制备成一种抗肿瘤制剂。



1. 一种ASPP2重组腺病毒,所述重组腺病毒包含ASPP2全长基因序列。

2. 根据权利要求1所述的重组腺病毒,其制备方法如下:

步骤1、将ASPP2基因与穿梭质粒(pAdTrack-CMV)相连接,构建重组穿梭质粒pAdTrack-CMV-ASPP2;

步骤2、再将重组穿梭质粒线性化后与骨架质粒pAdEasy-1在大肠杆菌BJ5183中同源重组,构建重组腺病毒载体Ad-ASPP2;

步骤3、将重组腺病毒载体Ad-ASPP2在293T细胞中扩增,经过提取分离纯化得到。

3. 根据权利要求2所述的重组腺病毒的制备方法,其特征在于,步骤如下:

1 构建重组穿梭质粒pAdTrack-CMV-ASPP2

Pcr3.1-ASPP2质粒经KpnI和XbaI双酶切出Kb的目的基因,琼脂糖凝胶电泳,glassmilk法凝胶回收目的片段,亚克隆至经同样酶切的腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV,形成pAdTrack-CMV-ASPP2;

2 细菌内同源重组构建重组腺病毒载体Ad-ASPP2

pAdTrack-CMV-ASPP2用PmeI线性化后,琼脂糖凝胶电泳,凝胶回收目的片段,用牛小肠碱性酶去磷酸化,乙醇沉淀备用。制备BJ5183点穿孔菌,pAdTrack-CMV-ASPP2和pAdEasy-1质粒电穿孔法共转染,电穿孔后取适量的细胞在50mg/L卡那霉素的培养板中,在37℃培养16-20h,挑取克隆,抽提的质粒即为重组病毒质粒Ad-ASPP2;

3 Ad-ASPP2扩增、纯化

用重组腺病毒Ad-ASPP2感染293细胞,在48-72h左右出现CPE效应后收集细胞。细胞反复冻融裂解细胞,12000rpm离心,小心取上清,装入超速离心管,取1.25g/mlCsCl溶液,缓慢注入超速离心管底,65000rpm离心3h。在病毒带处收集液体,将液体加入超速浓缩离心管中,并加入等体积的2×病毒缓冲液(10mM Tris-HCl pH8.0,100mM NaCl),5000rpm离心2次,收集病毒。

4. 权利要求1所述的重组腺病毒在制备抗肿瘤的药物中的应用。

5. 权利要求4所述的应用,所述肿瘤为肝癌。

6. 权利要求5所述的应用,所述肿瘤为肝癌转移癌。

7. 权利要求4所述的应用,所述肿瘤为结肠癌。

8. 含有权利要求1所述的重组腺病毒的药物制剂。

9. 权利要求1所述的药物制剂,其中还含有药学上可接受的载体。

人ASPP2重组腺病毒制备及其抗肿瘤应用

【技术领域】

[0001] 本发明属于医药领域,涉及一种重组腺病毒,具体涉及重组腺病毒在抗肿瘤方面的应用。

【背景技术】

[0002] ASPP2 (apoptosis stimulating protein of p53 2), 又被称为53BP2L, 是p53结合蛋白家族的一个促凋亡成员。ASPP2蛋白全长含有1128个氨基酸, 包含了多个结构和功能区: N端具有 β -Grasp泛素样折叠和 α 螺旋结构域, 中间部分是脯氨酸富含区, C末端部分是Ank-SH3结构域, 包含4个Ankyrin重复序列和1个SH3结构域 (Src同源3结构域)。ASPP2的不同结构域都有相互作用蛋白, 其中C末端介导了P53、Bcl-2等大部分的蛋白间相互作用。ASPP2最被熟知的功能即调节p53及其家族成员 (p63和p73) 的促凋亡能力。ASPP2增强p53家族成员的活力并特异性促进促凋亡靶基因而不是细胞周期抑制基因的表达。体外研究证实ASPP2通过p53或非p53介导通路抑制细胞生长, 促进细胞凋亡, ASPP2能够以p53依赖和非依赖途径, 增强药物促凋亡和治疗的敏感性, 说明ASPP2可以通过促进药物诱导的凋亡作用来抑制肿瘤。动物实验发现ASPP2等位基因敲除小鼠模型易于造成自发肿瘤和 γ 射线诱导肿瘤的形成, ASPP2限制癌基因Ras的入侵前特性并抑制体内肿瘤转移。临床研究显示ASPP2在人类癌症组织中常常表达下调, 这种表达受抑与肿瘤的发生进展以及不良预后密切相关。提示ASPP2是一个肿瘤抑制基因, 在肿瘤的发生中起重要作用, 可能是肿瘤治疗的重要靶点, 也可能是基因治疗的重要切入点。

【发明内容】

[0003] 本发明提供一种ASPP2重组腺病毒, 所述重组腺病毒包含ASPP2全长基因序列。本发明所述的重组腺病毒, 其制备方法如下:

[0004] 步骤1、将ASPP2基因与穿梭质粒 (pAdTrack-CMV) 相连接, 构建重组穿梭质粒pAdTrack-CMV-ASPP2;

[0005] 步骤2、再将重组穿梭质粒线性化后与骨架质粒pAdEasy-1在大肠杆菌BJ5183中同源重组, 构建重组腺病毒载体Ad-ASPP2;

[0006] 步骤3、将重组腺病毒载体Ad-ASPP2在293T细胞中扩增, 经过提取分离纯化得到。

[0007] 以下具体说明本发明腺病毒的制备方法:

[0008] 材料来源

[0009] Pcr3.1-ASPP2质粒由北京市肝病研究所构建; 大肠杆菌BJ5183、穿梭质粒pAdTrack-CMV和腺病毒骨架质粒pAdEasy-1购自Stratagene公司。293细胞购自ATCC。

[0010] 制备方法及结果

[0011] 1 构建重组穿梭质粒pAdTrack-CMV-ASPP2

[0012] Pcr3.1-ASPP2质粒经KpnI和XbaI双酶切出Kb的目的基因, 琼脂糖凝胶电泳, glassmilk法凝胶回收目的片段, 亚克隆至经同样酶切的腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV, 形

成pAdTrack-CMV-ASPP2。

[0013] 2 细菌内同源重组构建重组腺病毒载体Ad-ASPP2

[0014] pAdTrack-CMV-ASPP2用PmeI线性化后,琼脂糖凝胶电泳,凝胶回收目的片段,用牛小肠碱性酶去磷酸化,乙醇沉淀备用。制备BJ5183点穿孔菌,pAdTrack-CMV-ASPP2和pAdEasy-1质粒电穿孔(电穿孔条件:2500V,280 Ω ,200 μ F)法共转染,电穿孔后取适量的细胞在50mg/L卡那霉素的培养板中,在37 $^{\circ}$ C培养16-20h,挑取克隆,抽提的质粒即为重组病毒质粒Ad-ASPP2。

[0015] 3 Ad-ASPP2扩增、纯化

[0016] 用重组腺病毒Ad-ASPP2感染293细胞,在48-72h左右出现CPE效应后收集细胞。细胞反复冻融裂解细胞,12000rpm离心,小心取上清,装入超速离心管,取1.25g/mlCsCl溶液,缓慢注入超速离心管底,65000rpm离心3h。在病毒带处收集液体,将液体加入超速浓缩离心管中,并加入等体积的2 \times 病毒缓冲液(10mM Tris-HCl pH8.0,100mM NaCl),5000rpm离心2次,收集病毒。

[0017] 4 Ad-ASPP2鉴定

[0018] 提取病毒基因组DNA,对重组腺病毒载体结构基因E2B和目的基因ASPP2进行PCR扩增。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分子量鉴定。E2B区引物序列为:上游引物5'-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3',下游引物5'-CATCTGAAGCTCAAAGCGTGG-3';扩增片段大小为880bp;扩增条件为:94 $^{\circ}$ C变性5min;94 $^{\circ}$ C变性20s,55 $^{\circ}$ C复性30s,72 $^{\circ}$ C延伸1min,共40个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5min。ASPP2的引物序列为:上游引物

[0019] 5'-AGCTGCCATGGAGACCATCT-3',下游引物5'-ACTGTTCTCCGTACTGGCAC-3';扩增片段大小为220bp;扩增条件为:95 $^{\circ}$ C变性3min;94 $^{\circ}$ C变性1min,55 $^{\circ}$ C复性1min,72 $^{\circ}$ C延伸1min,共3个循环;94 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C复性45s,72 $^{\circ}$ C延伸45s,共27个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5min。

[0020] 本发明还包括含有本发明所述的重组腺病毒的药物制剂。所述的药物制剂,其中还含有药学上可接受的载体,所述制剂优选为注射剂。

[0021] 本发明还包括,本发明的重组腺病毒在制备抗肿瘤的基因药物中的应用。

[0022] 本发明所述肿瘤包括:肝癌、结肠癌、乳腺癌、胰腺癌、皮肤癌、宫颈癌、胃癌、结肠癌、白血病、淋巴瘤、鼻咽癌等。特别是,本发明的ASPP2重组腺病毒在治疗肝癌方面具有非常好的效果,尤其对P53突变和P53野生肝癌效果好。

[0023] 本发明所述腺病毒可以高效感染肝癌细胞,体外抑制肝癌细胞增殖,体内瘤体内直接注射抑制肝癌组织生长并具有协同P53、奥沙利铂和索拉菲尼的作用。

[0024] 本发明所述的重组腺病毒的抗肿瘤活性,所采用的肿瘤细胞为人肝癌hepG2,Huh7,Hep3B细胞株。

[0025] 以下通过实验数据进一步说明本发明腺病毒的抗肿瘤活性:

[0026] 一、Ad-ASPP2体外对肝癌细胞的抑制作用

[0027] 1 Ad-ASPP2体外对肝癌细胞的抑制作用

[0028] MTT法结果显示:与阴性对照相比,Ad-ASPP2在不同时间段(24-72h)都存在不同程度的生长抑制作用。当Ad-ASPP2在 1×10^8 pfu/mL滴度下作用Huh7细胞72h时的生长抑制率为61.69%;当Ad-ASPP2在 5×10^7 pfu/mL滴度下作用HepG2细胞72h时的生长抑制率为50.5%;当Ad-ASPP2在 1×10^8 pfu/mL滴度下作用Hep3B细胞72h时的生长抑制率为73.06%,

说明Ad-ASPP2对肝癌HepG2、Huh7和Hep3B细胞都具有明显的生长抑制作用。

[0029] 平板克隆形成能力方面:与阴性对照相比 180.33 ± 30.00 , Ad-ASPP2可以明显抑制HepG2细胞形成的细胞克隆数 95.66 ± 11.59 。

[0030] 2 Ad-ASPP2体外联合Ad-p53对肝癌细胞的抑制作用

[0031] Ad-ASPP2联合Ad-p53作用时,三种细胞表现出不同的反应。

[0032] HepG2和Huh7细胞:在作用48-72h, Ad-ASPP2对细胞抑制作用大于Ad-p53,二者具有协同抑制细胞生长的作用。说明Ad-ASPP2对于P53野生和突变的细胞作用大于Ad-p53。

[0033] Hep3B细胞:Ad-ASPP2对细胞抑制作用小于Ad-p53,二者协同抑制细胞生长的作用不显著。说明Ad-ASPP2对于P53缺失的细胞作用不明显。

[0034] 3 Ad-ASPP2体外联合索拉菲尼对肝癌细胞的抑制作用

[0035] HepG2和Hep3B细胞:索拉菲尼能够以剂量依赖性方式抑制HepG2和Hep3B细胞的增殖。我们在不同浓度梯的索拉菲尼作用下时给予滴为 1×10^7 pfu/mL的ASPP-rAd干预,MTT实验结果显示,ASPP2-rAd可以促进索拉菲尼在 $1.56 \mu\text{M}$ 、 $3.12 \mu\text{M}$ 和 $6.25 \mu\text{M}$ 三个浓度下对HepG2细胞的增殖抑制作用。

[0036] 3 Ad-ASPP2体外联合奥沙利铂对肝癌细胞的抑制作用

[0037] HepG2和Hep3B细胞:Ad-ASPP2 (1.25×10^8 , 6.125×10^7 pfu/mL) 可以增强奥沙利铂 ($10, 20 \mu\text{g/ml}$) 的对肝癌细胞的抑制作用 oxa1: $20 \mu\text{g/ml}$; oxa2: $10 \mu\text{g/ml}$; ASPP2-1: 1.25×10^8 pfu/ml Ad-ASPP2; ASPP2-2: 6.125×10^7 pfu/ml Ad-ASPP2。

[0038] 二、Ad-ASPP2体内对肝癌移植瘤的抑制作用

[0039] 1 单纯Ad-ASPP2肝癌移植瘤的抑制作用

[0040] Ad-ASPP2 (1×10^8 pfu/次) 可以明显抑制HepG2 (p53野生型) 移植瘤和Huh7 (p53突变型) 移植瘤的生长,相对肿瘤增殖率 (T/C%) 分别为37.27%和53.77% (评判标准T/C < 60%), 说明对具有明显的体内抑制肝癌移植瘤的作用。HepG2^{p53^{-/-}}和Hep3B (p53缺失型) 的移植瘤具有一定的移植趋势。

[0041] 2 Ad-ASPP2联合Ad-P53对肝癌移植瘤的抑制作用

[0042] 对于HepG2和Huh7肝癌移植瘤, Ad-ASPP2的抑制作用大于Ad-P53; 但Ad-ASPP2和Ad-P53协同作用不显著。

[0043] 3 Ad-ASPP2联合索拉菲尼对肝癌移植瘤的抑制作用

[0044] Ad-ASPP2和索拉菲尼单独对hepG2^{p53^{-/-}}移植瘤抑制作用不显著,但二者联合对hepG2^{p53^{-/-}}移植瘤的抑制作用显著。

[0045] 4 Ad-ASPP2联合奥沙利铂对肝癌移植瘤的抑制作用

[0046] Ad-ASPP2和奥沙利铂单独对hep3B移植瘤抑制作用不显著,但二者联合对hep3B移植瘤的抑制作用显著。

[0047] 本发明和现有同类重组腺病毒相比,具有以下优越性:

[0048] 制备方法采用Pcr3.1-ASPP2质粒,表达率高于现有技术15%。

[0049] 具有优良的抗肝癌的作用。

[0050] 具有优良的抗肝癌转移癌的作用。

[0051] 对其他肿瘤的作用均逊于上述本发明实验的瘤株。如对肺癌效果不佳,对胃癌效果不佳,对乳腺癌效果不佳。

【附图说明】

[0052] 图1, ASPP2和E2B基因的PCR产物图:其中, 1-3为ASPP2的基因扩增产物, 1: 阴性对照; 2: 293T细胞; 3: 纯化后的Ad-ASPP2, 4-6为E2B的基因扩增产物, 4: 293T细胞; 5: 纯化后的Ad-ASPP2; 6: 阴性对照; M: DNA marker 2000。

[0053] 图2A, Ad-ASPP2体外对肝癌细胞Huh7的抑制作用,

[0054] 图2B, Ad-ASPP2体外对肝癌细胞hepG2的抑制作用,

[0055] 图2C, Ad-ASPP2体外对肝癌细胞Hep3B的抑制作用,

[0056] 与阴性对照相比 180.33 ± 30.00 , Ad-ASPP2可以明显抑制HepG2细胞形成的细胞克隆数 95.66 ± 11.59 。

[0057] 图3A, Ad-ASPP2体外联合Ad-p53对HepG2细胞相对生存率影响

[0058] 图3B, Ad-ASPP2体外联合Ad-p53对HepG2细胞生长状态影响(白光, 40倍) 图3C, Ad-ASPP2体外联合Ad-p53对Huh7细胞相对生存率影响

[0059] 图3D, Ad-ASPP2体外联合Ad-p53对Huh7细胞生长状态影响(白光, 40倍)

[0060] 图3E, Ad-ASPP2体外联合Ad-p53对Hep3B细胞相对生存率影响

[0061] 图3F, Ad-ASPP2体外联合Ad-p53对Hep3B细胞生长状态影响(白光, 40倍) 活细胞百分率(Cell survival rate, %) = 处理组OD值/对照组OD值 $\times 100\%$ 。

[0062] 图4A, Ad-ASPP2体外联合索拉菲尼对肝癌细胞hepG2的抑制作用

[0063] 图4B, Ad-ASPP2体外联合索拉菲尼对肝癌细胞Hep3B的抑制作用

[0064] 图5A, Ad-ASPP2体外联合奥沙利铂对肝癌细胞hepG2的抑制作用(24H)

[0065] 图5B, Ad-ASPP2体外联合奥沙利铂对肝癌细胞hepG2的抑制作用(48H)

[0066] 图5C, Ad-ASPP2体外联合奥沙利铂对肝癌细胞Hep3B的抑制作用(24H)

[0067] 图5D, Ad-ASPP2体外联合奥沙利铂对肝癌细胞Hep3B的抑制作用(48H)

[0068] 其中, oxa1: $20\mu\text{g}/\text{ml}$; oxa2: $10\mu\text{g}/\text{ml}$; ASPP2-1: 1.25×10^8 pfu/ml Ad-ASPP2; ASPP2-2: 6.125×10^7 pfu/ml Ad-ASPP2。

[0069] 图6A, Ad-ASPP2对HepG2皮下移植瘤的抑制作用

[0070] 图6B, Ad-ASPP2对Huh7皮下移植瘤的抑制作用

[0071] 图6C, Ad-ASPP2对HepG2^{p53^{-/-}}皮下移植瘤的抑制作用

[0072] 图6D, Ad-ASPP2对Hep3B皮下移植瘤的抑制作用

[0073] 图7A, Ad-ASPP2联合Ad-P53对HepG2皮下移植瘤相对肿瘤体积的影响

[0074] 图7B, Ad-ASPP2联合Ad-P53对HepG2皮下移植瘤裸鼠体重的影响

[0075] 图7C活体成像法观测Ad-ASPP2联合Ad-P53对HepG2皮下移植瘤的影响

[0076] 图7D, Ad-ASPP2联合Ad-P53对HepG2移植瘤的相对肿瘤增殖率的影响

[0077] 图8A, Ad-ASPP2联合Ad-P53对Huh7皮下移植瘤相对肿瘤体积的影响

[0078] 图8B, Ad-ASPP2联合Ad-P53对Huh7皮下移植瘤裸鼠体重的影响

[0079] 图8C, 活体成像法观测Ad-ASPP2联合Ad-P53对Huh7皮下移植瘤的影响

[0080] 图8D, Ad-ASPP2联合Ad-P53对Huh7移植瘤的相对肿瘤增殖率的影响

[0081] 图9A, Ad-ASPP2联合索拉菲尼对HepG2^{p53^{-/-}}皮下移植瘤相对肿瘤体积的影响

[0082] 图9B, Ad-ASPP2联合索拉菲尼对HepG2^{p53^{-/-}}皮下移植瘤裸鼠体重的影响

- [0083] 图9C,活体成像法观测Ad-ASPP2联合索拉菲尼对HepG2^{p53^{-/-}}皮下移植瘤的影响
- [0084] 图9D,Ad-ASPP2联合索拉菲尼对HepG2^{p53^{-/-}}皮下移植瘤总光密度的影响
- [0085] 图10A,大体观测Ad-ASPP2联合奥沙利铂对Hep3B皮下移植瘤的影响
- [0086] 图10B,小动物B超观测Ad-ASPP2联合奥沙利铂对Hep3B皮下移植瘤内部血供的影响
- [0087] 图10C,Ad-ASPP2联合奥沙利铂对Hep3B皮下移植瘤裸鼠体重的影响
- [0088] 图10D,Ad-ASPP2联合奥沙利铂对Hep3B皮下移植瘤相对肿瘤体积的影响

【具体实施方式】

[0089] 以下通过具体实施例进一步说明本发明

[0090] 实施例1

[0091] 制备方法详述

[0092] 本发明腺病毒的制备方法,原材料来源,产物的鉴定等内容:

[0093] 材料来源

[0094] Pcr3.1-ASPP2质粒由北京市肝病研究所构建;大肠杆菌BJ5183、穿梭质粒pAdTrack-CMV和腺病毒骨架质粒pAdEasy-1购自Stratagene公司。293细胞购自ATCC。

[0095] 制备方法及结果

[0096] 1 构建重组穿梭质粒pAdTrack-CMV-ASPP2

[0097] Pcr3.1-ASPP2质粒经KpnI和XbaI双酶切出Kb的目的基因,琼脂糖凝胶电泳,glassmilk法凝胶回收目的片段,亚克隆至经同样酶切的腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV,形成pAdTrack-CMV-ASPP2。

[0098] 2 细菌内同源重组构建重组腺病毒载体Ad-ASPP2

[0099] pAdTrack-CMV-ASPP2用PmeI线性化后,琼脂糖凝胶电泳,凝胶回收目的片段,用牛小肠碱性酶去磷酸化,乙醇沉淀备用。制备BJ5183点穿孔菌,pAdTrack-CMV-ASPP2和pAdEasy-1质粒电穿孔(电穿孔条件:2500V,280Ω,200μF)法共转染,电穿孔后取适量的细胞在50mg/L卡那霉素的培养板中,在37℃培养16-20h,挑取克隆,抽提的质粒即为重组病毒质粒Ad-ASPP2。

[0100] 3 Ad-ASPP2扩增、纯化

[0101] 用重组腺病毒Ad-ASPP2感染293细胞,在48-72h左右出现CPE效应后收集细胞。细胞反复冻融裂解细胞,12000rpm离心,小心取上清,装入超速离心管,取1.25g/mlCsCl溶液,缓慢注入超速离心管底,65000rpm离心3h。在病毒带处收集液体,将液体加入超速浓缩离心管中,并加入等体积的2×病毒缓冲液(10mM Tris-HCl pH8.0,100mM NaCl),5000rpm离心2次,收集病毒。

[0102] 4 Ad-ASPP2鉴定

[0103] 提取病毒基因组DNA,对重组腺病毒载体结构基因E2B和目的基因ASPP2进行PCR扩增。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分子量鉴定。E2B区引物序列为:上游引物5'-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3',下游引物5'-CATCTGAACTCAAAGCGTGG-3';扩增片段大小为880bp;扩增条件为:94℃变性5min;94℃变性20s,55℃复性30s,72℃延伸1min,共40个循环;72℃延伸5min。ASPP2的引物序列为:上游引物

[0104] 5'-AGCTGCCATGGAGACCATCT-3', 下游引物5'-ACTGTTCTCCGTA CTGGCAC-3'; 扩增片段大小为220bp; 扩增条件为: 95℃变性3min; 94℃变性1min, 55℃复性1min, 72℃延伸1min, 共3个循环; 94℃变性30s, 55℃复性45s, 72℃延伸45s, 共27个循环; 72℃延伸5min。

[0105] 本发明所述ASPP2是已知产物, 其蛋白序列如下:

[0106] MMPMFLTVYLSNNEQHFTEVPVTPETICRDVVDLCKEPGESDCH

[0107] LAE V W C G S E R P V A D N E R M F D V L Q R F G S Q R N E V R F F L R H E R P P G R D I V S G P R S Q D P S L K R N G V K V P G E Y R R K E N G V N S P R M D L T L A E L Q E M A S R Q Q Q Q I E A Q Q Q L L A T K E Q R L K F L K Q Q D Q R Q Q Q V A E Q E K L K R L K E I A E N Q E A K L K K V R A L K G H V E Q K R L S N G K L V E E I E Q M N N L F Q Q K Q R E L V L A V S K V E E L T R Q L E M L K N G R I D S H H D N Q S A V A E L D R L Y K E L Q L R N K L N Q E Q N A K L Q Q Q R E C L N K R N S E V A V M D K R V N E L R D R L W K K K A A L Q Q K E N L P V S S D G N L P Q Q A A S A P S R V A A V G P Y I Q S S T M P R M P S R P E L L V K P A L P D G S L V I Q A S E G P M K I Q T L P N M R S G A A S Q T K G S K I H P V G P D W S P S N A D L F P S Q G S A S V P Q S T G N A L D Q V D D G E V P L R E K E K V R P F S M F D A V D Q S N A P P S F G T L R K N Q S S E D I L R D A Q V A N K N V A K V P P P V P T K P K Q I N L P Y F G Q T N Q P P S D I K P D G S S Q Q L S T V V P S M G T K P K P A G Q Q P R V L L S P S I P S V G Q D Q T L S P G S K Q E S P P A A A V R P F T P Q P S K D T L L P P F R K P Q T V A A S S I Y S M Y T Q Q Q A P G K N F Q Q A V Q S A L T K T H T R G P H F S S V Y G K P V I A A A Q N Q Q Q H P E N I Y S N S Q G K P G S P E P E T E P V S S V Q E N H E N E R I P R P L S P T K L L P F L S N P Y R N Q S D A D L E A L R K K L S N A P R P L K K R S S I T E P E G P N G P N I Q K L L Y Q R T T I A A M E T I S V P S Y P S K S A S V T A S S E S P V E I Q N P Y L H V E P E K E V V S L V P E S L S P E D V G N A S T E N S D M P A P S P G L D Y E P E G V P D N S P N L Q N N P E E P N P E A P H V L D V Y L E E Y P P Y P P P P Y P S G E P E G P G E D S V S M R P P E I T G Q V S L P P G K R T N L R K T G S E R I A H G M R V K F N P L A L L L D S S L E G E F D L V Q R I I Y E V D D P S L P N D E G I T A L H N A V C A G H T E I V K F L V Q F G V N V N A A D S D G W T P L H C A A S C N N V Q V C K F L V E S G A A V F A M T Y S D M Q T A A D K C E E M E E G Y T Q C S Q F L Y G V Q E K M G I M N K G V I Y A L W D Y E P Q N D D E L P M K E G D C M T I I H R E D E D E I E W W W A R L N D K E G Y V P R N L L G L Y P R I K P R Q R S L A ”

[0108] 编码ASPP2蛋白的基因也是已知序列, 序列如下:

1 gtcacgagcgtcgaagagacaaagccgcgtcagggggcccgccggggcgggggagcccg
61 gggettggttggtgccccagcccgcgcggaggggccttcggaceccgcgcgccgccgetgee
121 gcgcccgcgcctcgcaacaggtccggggcgccctcgtctctccgctccccctccccgcate
181 cgcgacctccggggcacctcagctcggccggggccgcagctctggccaccgccttccatg
241 cggttcgggtccaagatgatgccgatgtttcttaccgtgtatctcagtaacaatgagcag
301 cacttcacagaagttccagttactccagaaacaatatgcagagacgtggtggatctgtgc
[0109] 361 aaagaacccggcgagagtgattgccatttggtgaagtgtggtgtggetctgaacgtcca
421 gttgcggataatgagcgaatgtttgatgttcttcaacgatttggaaagtcagaggaacgaa
481 gttcgtcttcttcttctcgtcgaacgccccctggcagggacattgtgagtggaaccaaga
541 tctcaggatccaagtttaaaaagaaatggtgtaaaagttcctggtgaatatcgaagaaag
601 gagaacggtgttaatagtcctaggatggatctgactcttgctgaacttcaggaaatggca
661 tctcgccagcagcaacagattgaageccagcaacaattgctggcaactaaggaacagcgc
721 ttaaagttttgaaacaacaagatcagcgacaacagcaacaagttgctgagcaggagaaa

[0110]

781 cttaaaaggctaaaagaaatagctgagaatcaggaagctaaagctaaaaaagtgagagca
841 cttaaaggccacgtggaacagaagagactaagcaatgggaaacttgtggaggaaattgaa
901 cagatgaataatttgttccagcaaaaacagaggagctcgtcctggctgtgtcaaaagta
961 gaagaactgaccaggcagctagagatgctcaagaacggcaggatcgacaccaccatgac
1021 aatcagctctgcagfggctgagcttgcctctataaggagctgcagctaaagaaacaaa
1081 ttgaatcaagagcagaatgccaaagctacaacaacagagggagtggttgaataagcgtaat
1141 tcagaagtggcagctcatggataagcgtgttaatgagctgagggaccggctgtggaagaag
1201 aaggcagctctacagcaaaaagaaaatctaccagtttcatctgatggaaatcttccccag
1261 caagccgctcagcccccaagccgtgtggctgcagtaggtccctatatccagctcgtctact
1321 atgcctcggatgccctcaaggcctgaattgctgggtgaagccaccctgccggatggttcc
1381 ttggtcattcaggcttcagaggggcccgatgaaaatacagacactgcccaacatgagatct
1441 ggggctgcttcacaaaactaaaggctctaaaatccatccagttggccctgatggagtct
1501 tcaaatgcagatcttttcccagccaaggctctgcttctgtacctcaaaagcactgggaat
1561 gctctggatcaagttgatgatggagaggttccgctgagggagaaagagaagaaagtgcgt
1621 ccgttctcaatgtttgatgcagtagaccagtcctaatgccccaccttcttttggtactctg
1681 aggaagaaccagagcagtgaaagatcttgcgggatgctcaggttgcaataaaaaatgtg
1741 gctaaagtaccacctccctgctcccaaaaacaaaacagallaaatllgcttallllgga
1801 caaactaatcagccacctcagacattaagccagacggaagtctcagcagttgtcaaca
1861 gttgttccgctccatgggaactaaacccaaaaccagcagggcagcagccgagagtgcigtca
1921 tctcccagcataccttccggtggccaagaccagaccctttctccaggttctaagcaagaa
1981 agtccacctgctgctgcccgtccggccctttactccccagccttccaaagacaccttactt
2041 ccaccttcagaaaaccccagaccgtggcagcaagttcaatataatccatgtatacgcaa
2101 cagcagggcccaggaaaaaacttccagcaggtgtgcagagegcgttgaccaagactcat
2161 accagagggccacacttttcaagtgtatatggtaagcctgtaattgctgctgccagaat
2221 caacagcagcaccagagaacatttattccaatagccagggcaagcctggcagtcagaa
2281 cctgaaacagagcctgtttcttcagttcaggagaacctgaaaacgaaagaattctctgg
2341 ccactcagcccaactaaattactgccttttcttactaatcttaccgaaaccagagtgat
2401 gctgacctagaagccttacgaaagaaactgctaacgcaccaagccctctaaagaaacgt
2461 agttctattacagageccagagggtcctaattgggccaatattcagaagcttttatatcag
2521 aggaccaccatagcggccatggagaccatctctgtccateataccatccaagtcagct
2581 tctgtgactgccagctcagaaagcccagtagaaaatccagaatccatatttacatgtggag
2641 cccgaaaaggaggtggtctctctggttccctgaatcattgtcccagaggatgtggggaat
2701 gccagtacagagaacagtgacatgccagctccttctccagccttgattatgagcctgag
2761 ggagtcacagacaacagcccaatctccagaataaccagaagaaccaaaccagaggct
2821 ccacatgtgcttgatgtgtaccctggaggagtaccctccataccacccccaccataacca
2881 tctggggagcctgaagggcccgagaagactcggtagcatgcgccgctgaaatcacc
2941 gggcaggtctctctgctcctgggtaaaaggacaaacttgcgtaaaactggctcagagcgt
3001 atcgtcatggaatgaggggtgaattcaaccccccttgccttactgctagattcgtctttg
3061 gagggagaatttgacctgtacagagaattatttatgaggttgatgaccaagcctcccc
3121 aatgatgaaggcatcacgctcttcacaatgctgtgtgtgcagggccacacagaaatcgtt
3181 aagttcctggtagctttgggtgaaatgtaaatgctgctgatagtgatggatggactcca
3241 ttacattgtgtgcctcatgtaacaacgtccaagtgtgtaagtttttgggtggagtcagga
3301 gccgctgtgtttgccatgacctacagtgacatgcagactgctgcagafaaagtcgaggaa
3361 atggaggaaggctacactcagtgctcccaatttctttatggagttcaggagaagatgggc

3421 ataatgaataaaggagtcatttatgcgctttgggattatgaacctcagaatgatgatgag
3481 ctgccccatgaaagaaggagactgcatgacaatcatccacaggaagacgaagatgaaatc
3541 gaatggtggtgggcgccttaataagataaggaggatattgtccacgtaacttgctggga
3601 ctgtacccaagaattaaccaagacaaaaggagcttggcctgaaacttccacacagaattt
3661 tagtcaatgaagaattaatctctgttaagaagaagtaatacagattattttggcaaaaat
3721 ttcacaagacttattttaatgacaatgtagetttgaaagcgatgaagaatgtctctagaag
3781 agaatgaaggattgaagaattcaccattagaggacatttagcgtgatgaaataaagcatc
3841 tacgtcagcaggccatactgtgttggggcaagggtgtcccgtagcactcagataagta
[0111] 3901 tacagcgacaatcctgttttctacaagaatcctgtctagtaaataaggatcattttattggg
3961 cagttgggaaatcagctctctgtctgtttagtggttttcagcagctgtctctaaaccagt
4021 cctcctgccagaaaggaccagtgccgctcacatcgctgtctctgattgtcccgccaccag
4081 caggccttggggctcactgaaggetcgaaggcactgcacaccttgatatgtcagtgaa
4141 gaacgtagttggttgcagtgacaataactttattatagagtttttagcatctta
4201 agaattatacatatgtttgaaatattgaaactaagctacagtaccagtaattagatgtag
4261 aatcttgtttagctgaattttaatctgtatttattgtcttttgtatctcagaaatta
4321 gaaacttgctacagacttaccgtaataatttgcagatcatagctgactttaaaacag
4381 ttgtaataaaactttttgatgct

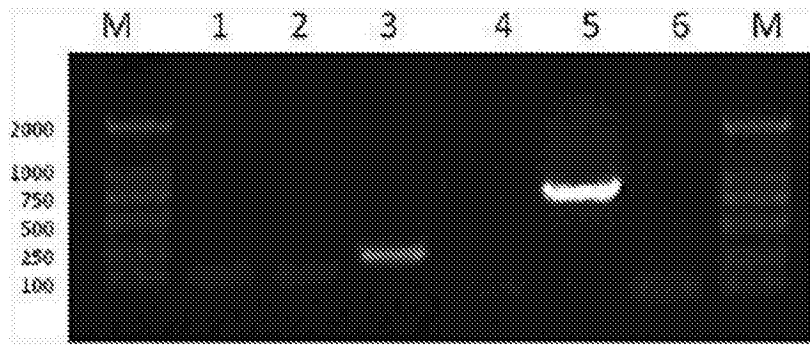


图1

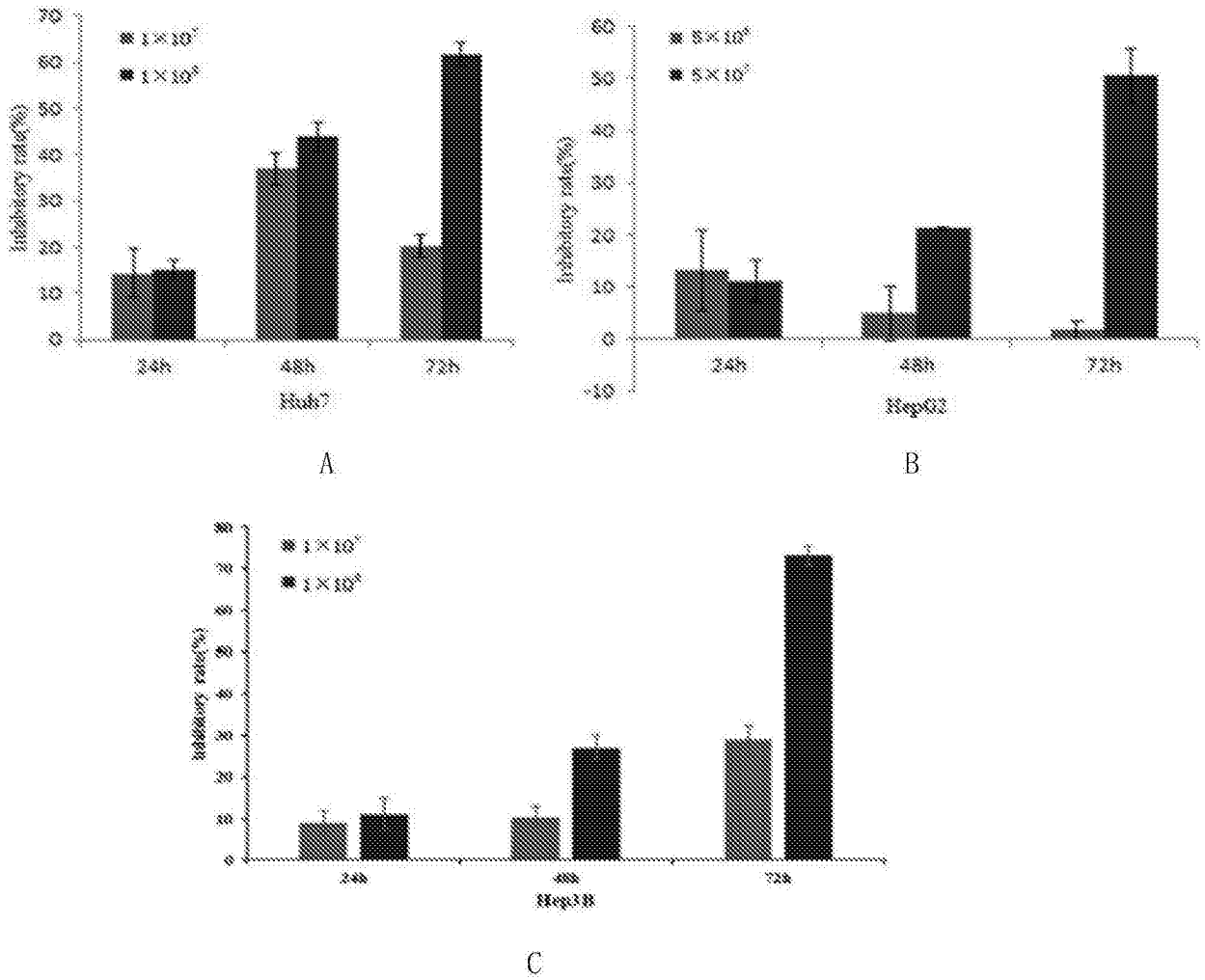


图2

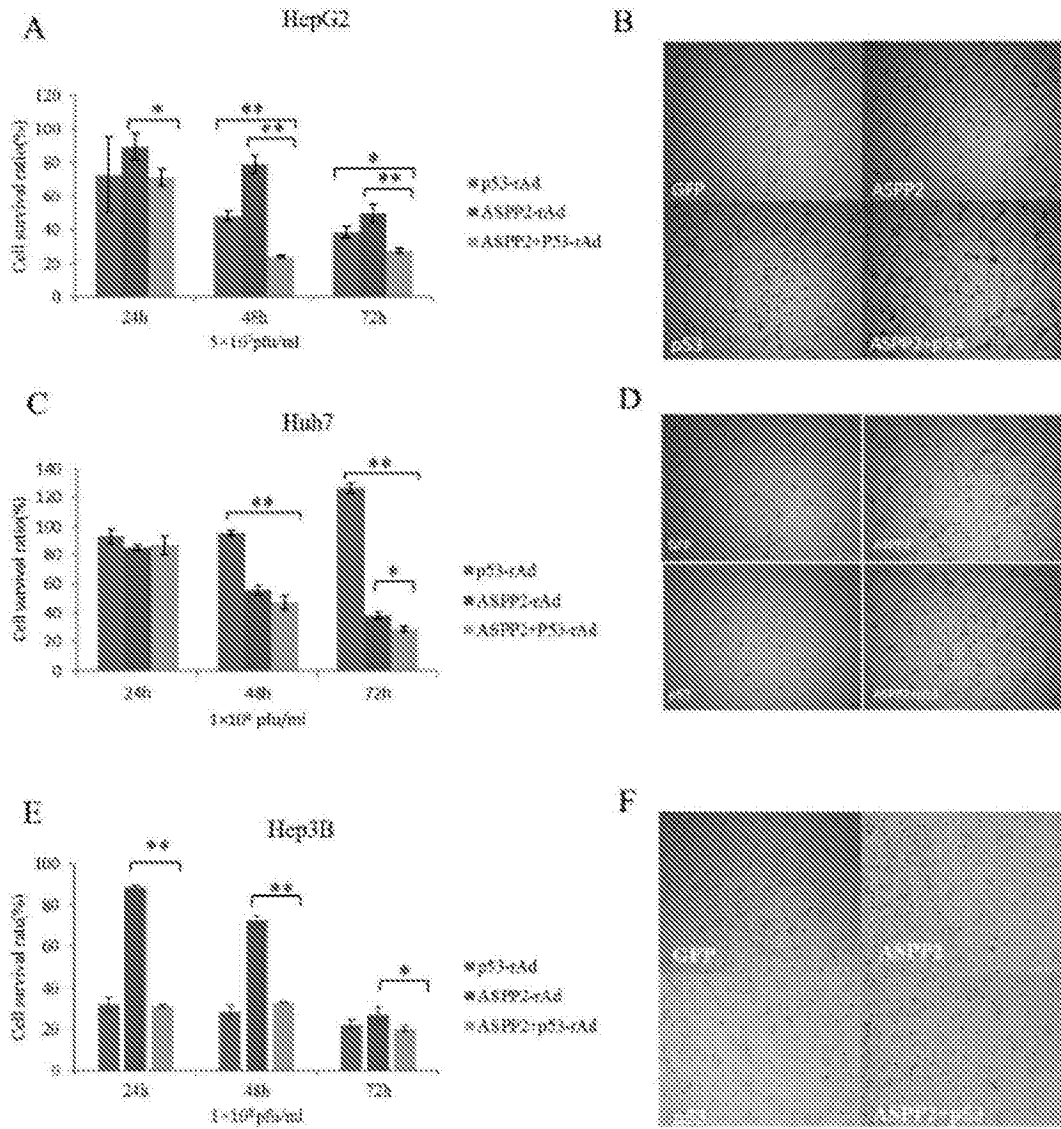


图3

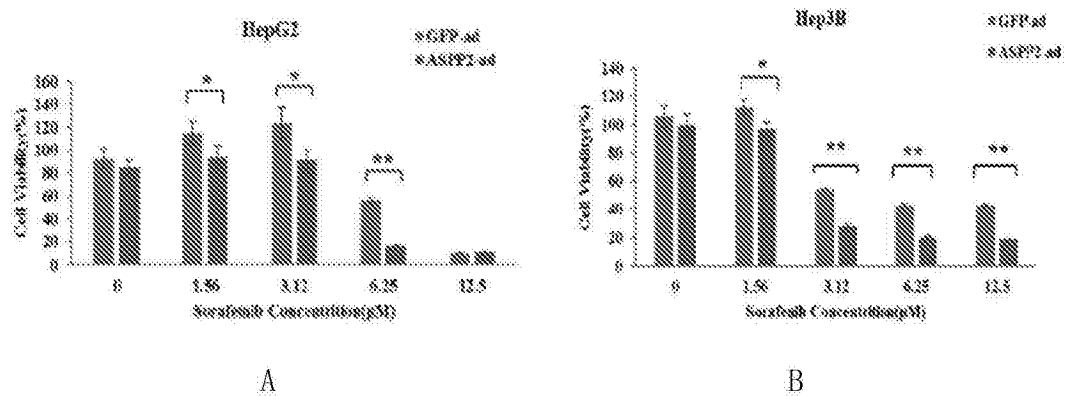


图4

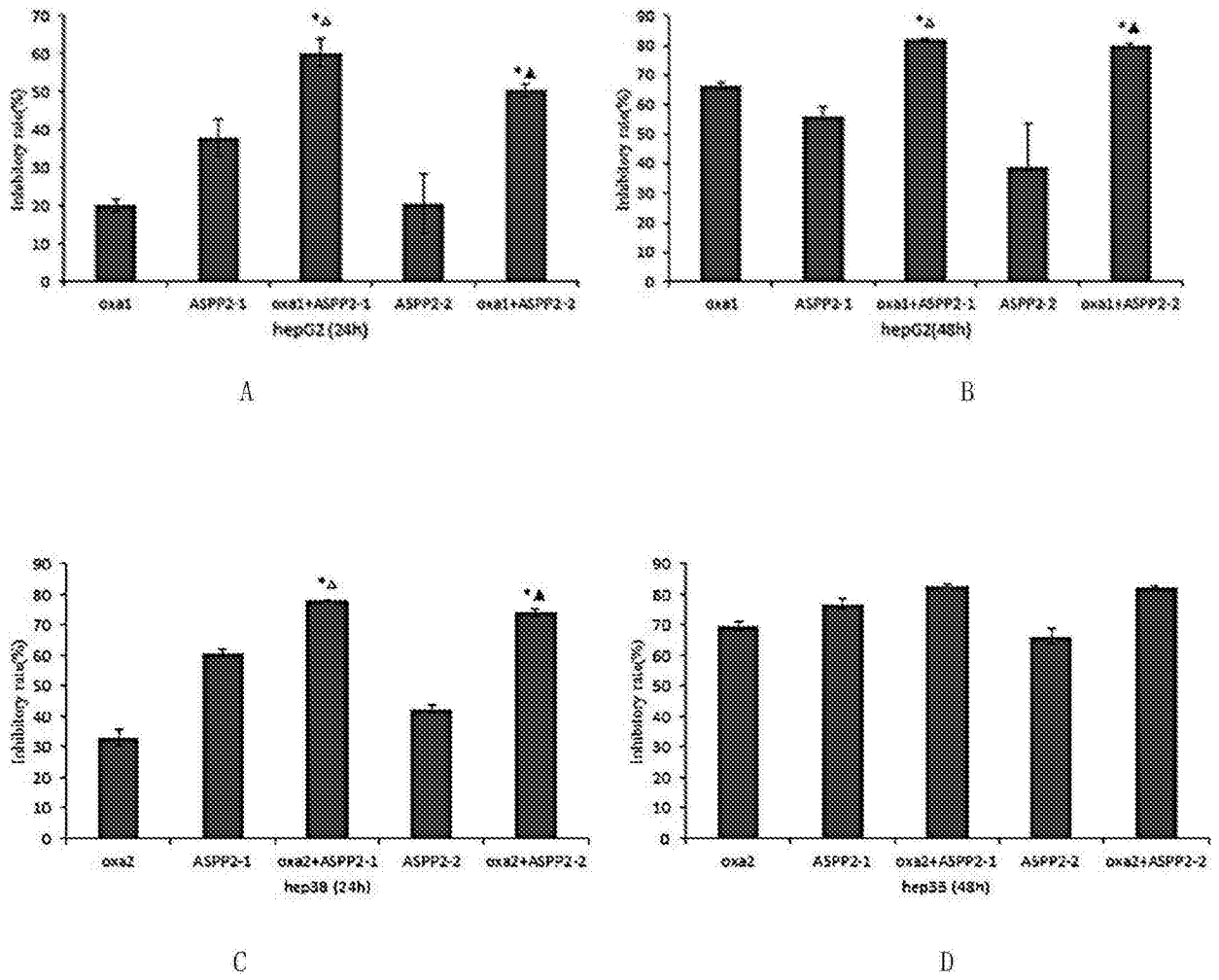


图5

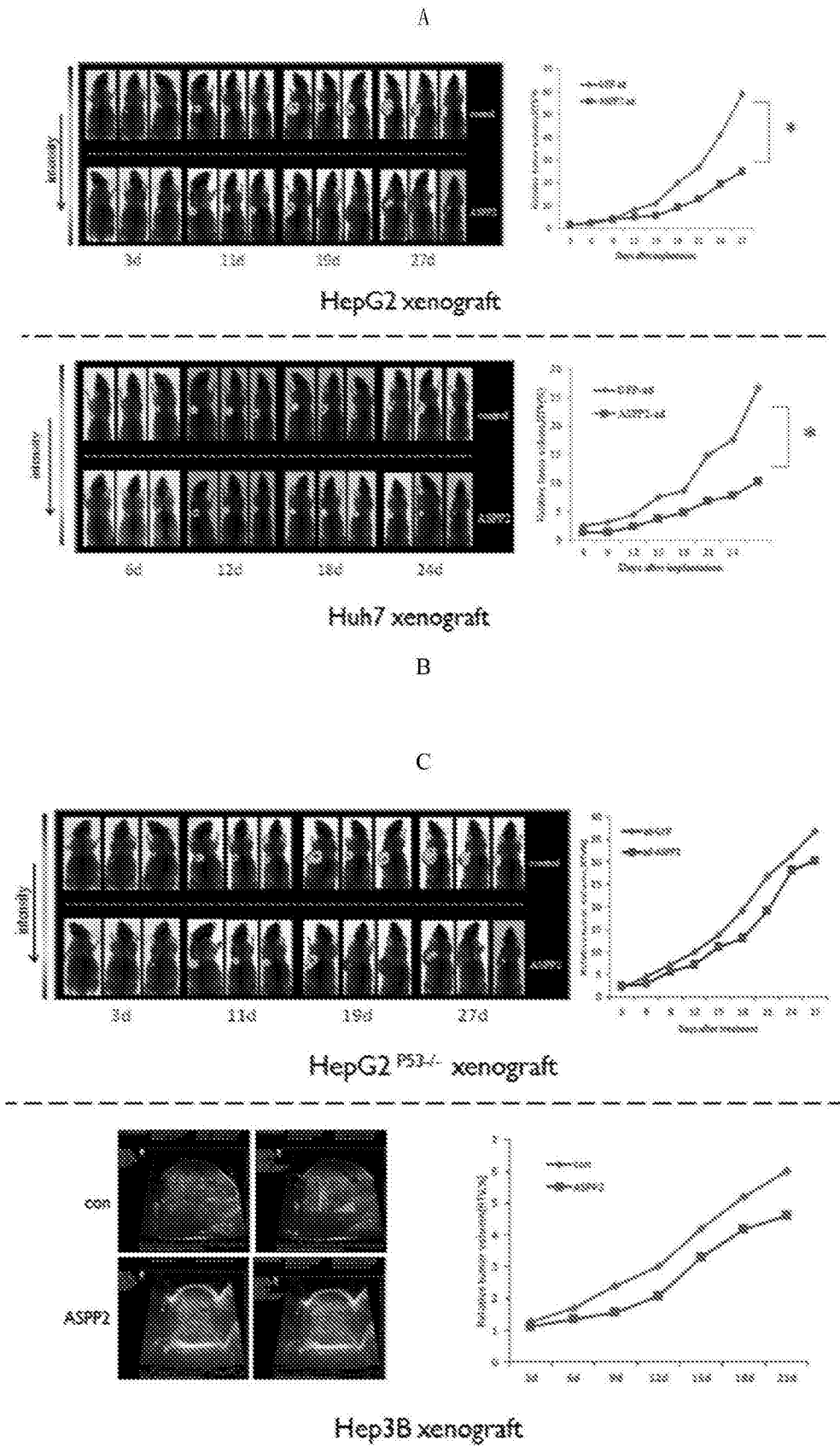


图6

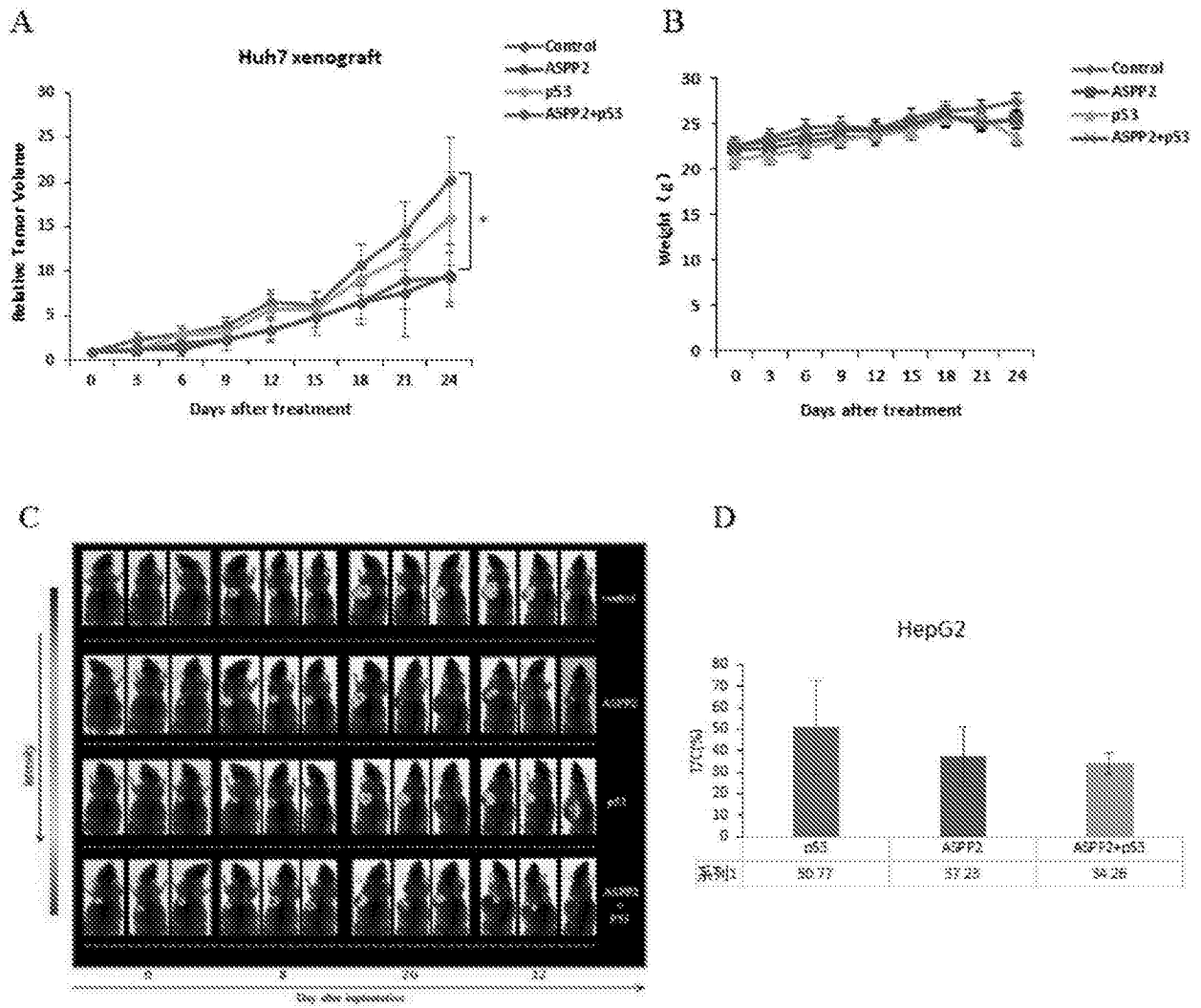


图7

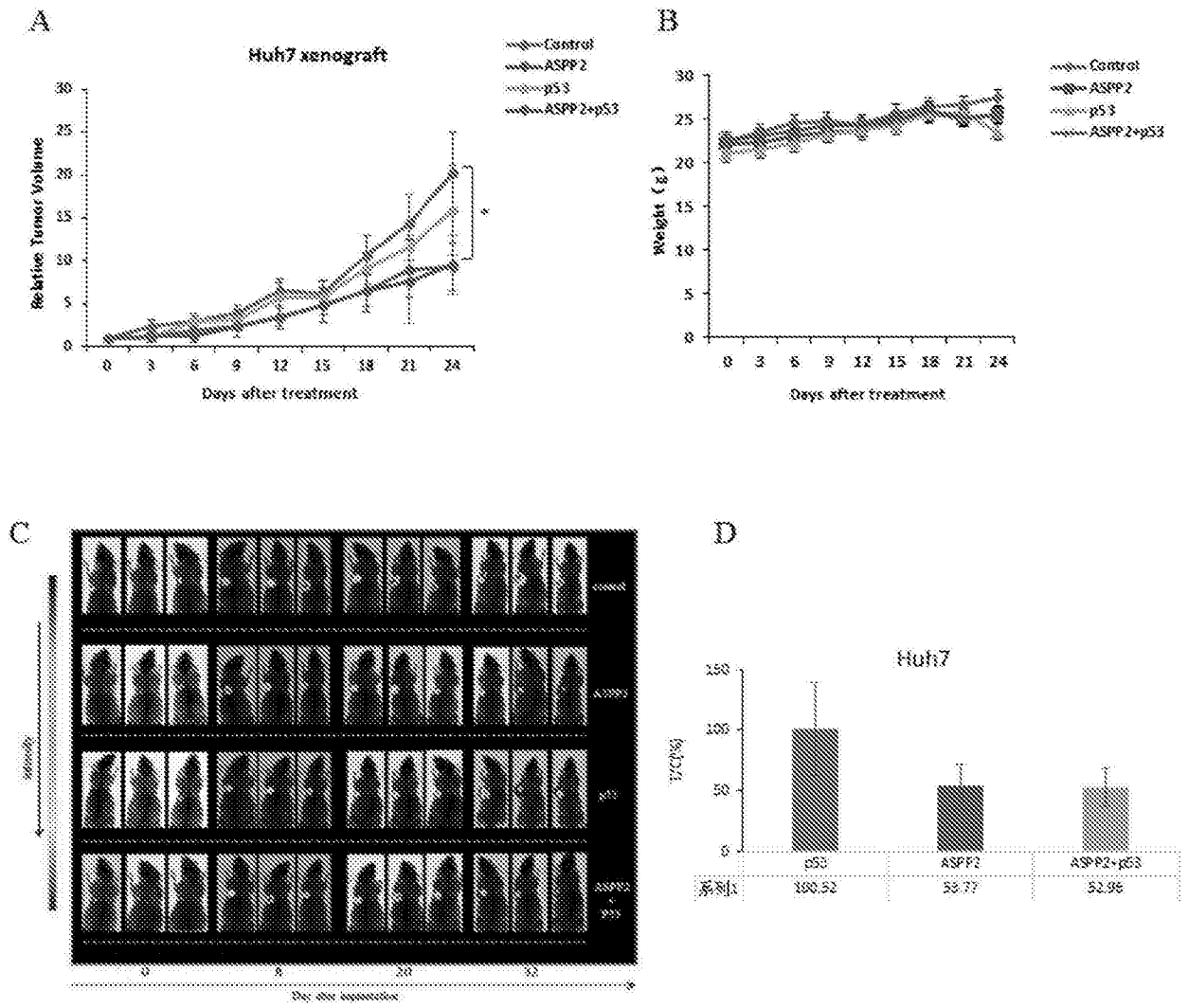


图8

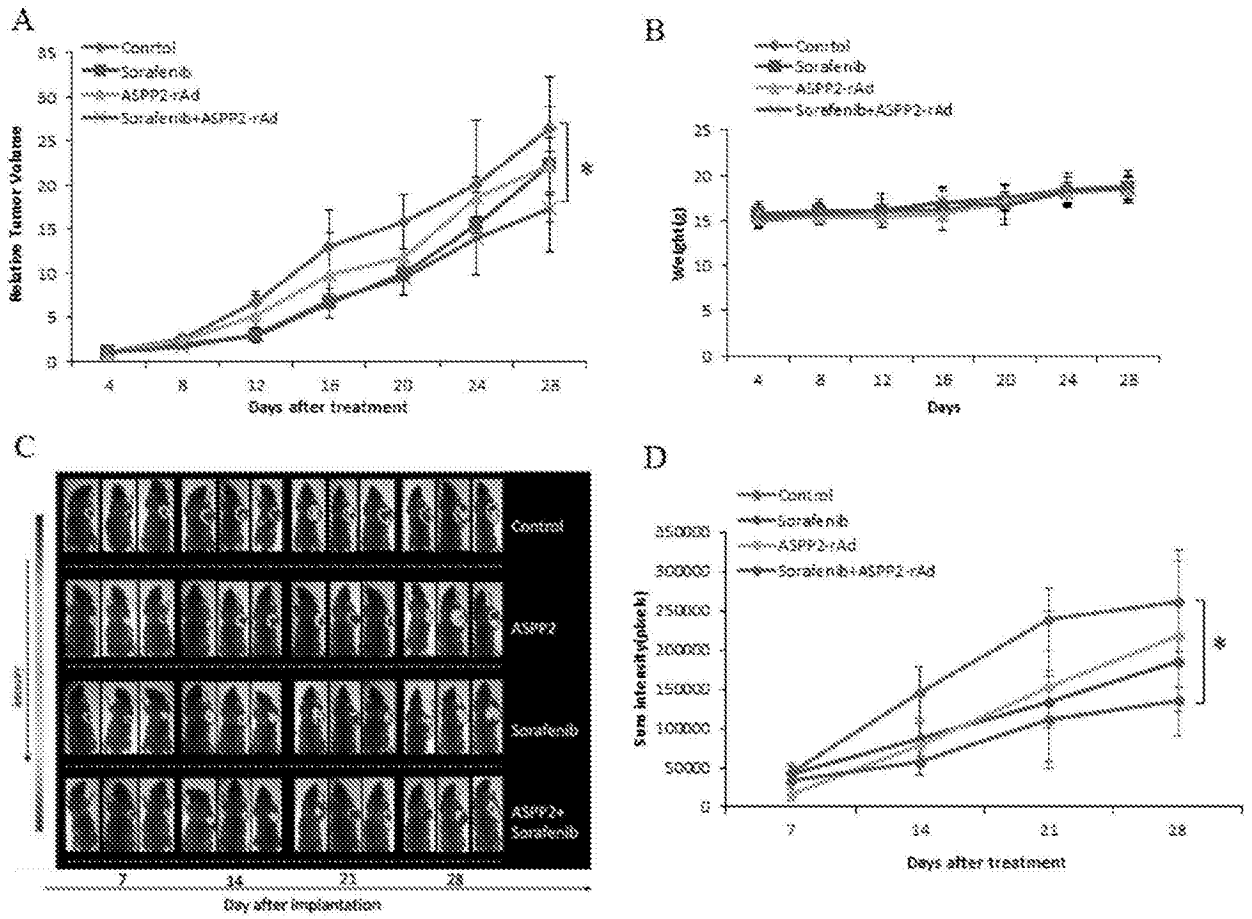
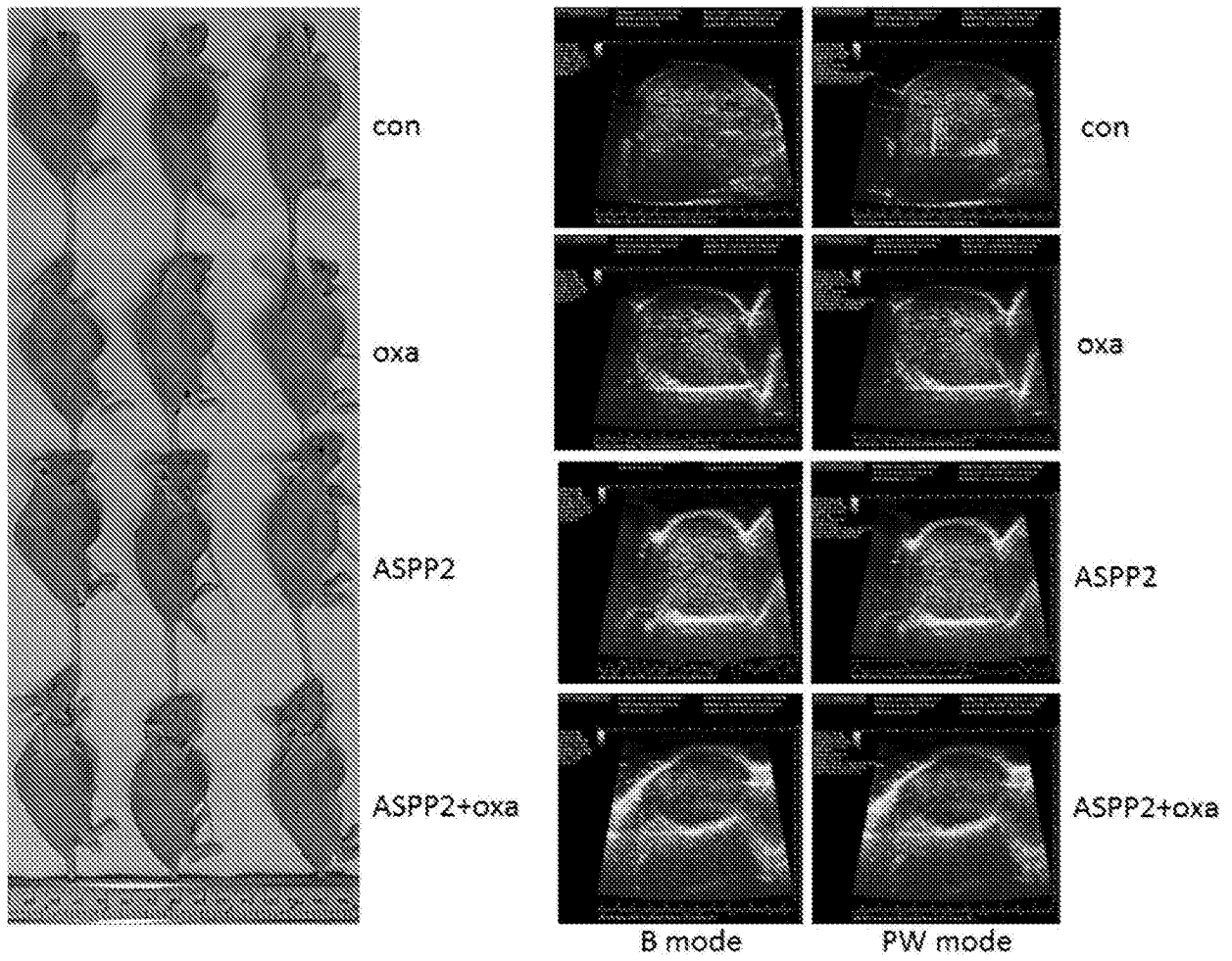
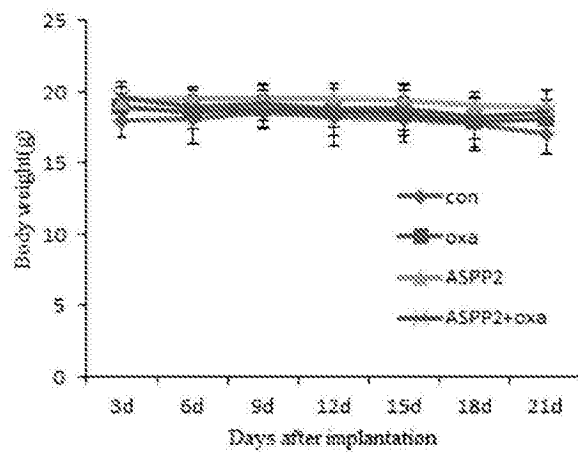


图9



A

B



C

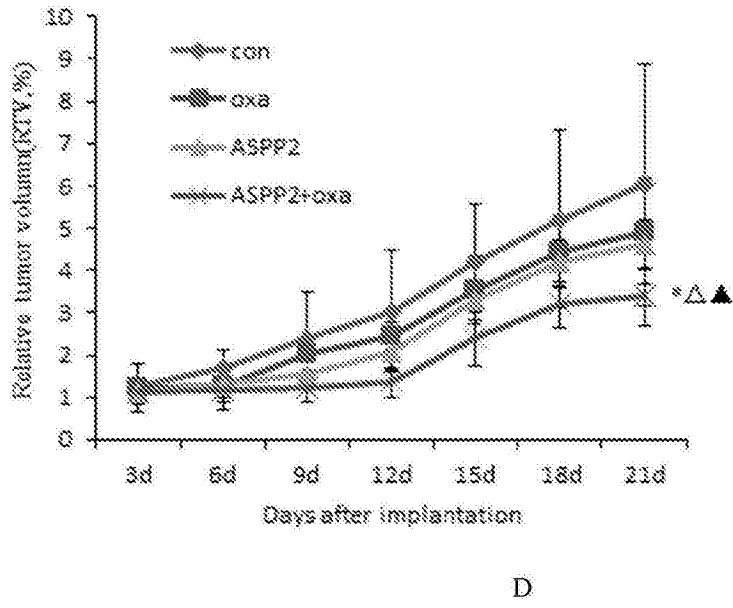


图10