

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 10 月 16 日 (16.10.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/166429 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/62 (2006.01) C07K 2/00 (2006.01)
C12N 15/65 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/075216
- (22) 国际申请日: 2014 年 4 月 11 日 (11.04.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310128492.8 2013 年 4 月 12 日 (12.04.2013) CN
- (71) 申请人: 中国科学院上海生命科学研究院 (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区岳阳路 319 号, Shanghai 200031 (CN)。
- (72) 发明人: 胡荣贵 (HU, Ronggui); 中国上海市徐汇区岳阳路 320 号, Shanghai 200031 (CN)。于涛 (YU, Tao); 中国上海市徐汇区岳阳路 320 号, Shanghai 200031 (CN)。陶永辉 (TAO, Yonghui); 中国上海市徐汇区岳阳路 320 号, Shanghai 200031 (CN)。
- (74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958

号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(54) Title: METHOD FOR DETECTING PROTEIN STABILITY AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 检测蛋白质稳定性的方法及其应用

(57) Abstract: Provided in the present invention is a genetic construct having a structure as represented by 5'-A+B+C+D+E-3', wherein A indicates a promoter; B indicates a coding sequence of a fusion protein consisting of a target protein and a first labelled protein; C indicates a coding sequence of a connecting peptide; D indicates a coding sequence of a second labelled protein; and E indicates a terminator. Also provided in the present invention is a polypeptide having a structure as represented by B1+C1+D1, wherein B1 indicates the fusion protein consisting of the target protein and the first labelled protein; C1 indicates the connecting peptide; and D1 indicates the coding sequence of the second labelled protein. Also provided in the present invention are a vector containing the genetic construct, a mammalian cell containing the genetic construct or the vector, a library consisting of the cell and a method for detecting protein stability and uses thereof. The method of the present invention not only has a high sensitivity and specificity for detecting protein stability, but also is simple and convenient in operation.

(57) 摘要: 本发明提供结构如 5'-A+B+C+D+E-3' 所示的遗传构建物, 其中 A 表示启动子; B 表示由目标蛋白和第一标记蛋白构成的融合蛋白的编码序列; C 表示连接肽的编码序列; D 表示第二标记蛋白的编码序列; 和 E 表示终止子。本发明还提供结构如 B1+C1+D1 所示的多肽, 其中 B1 表示由目标蛋白和第一标记蛋白构成的融合蛋白; C1 表示连接肽; 和 D1 表示第二标记蛋白的编码序列。本发明还提供包含所述遗传构建物的载体, 包含所述遗传构建物或载体的哺乳动物细胞, 由所述细胞构成的文库以及检测蛋白质稳定性的方法和应用。本发明方法对蛋白质稳定性的检测不仅灵敏度和特异性高, 而且操作简便。

WO 2014/166429 A1

检测蛋白质稳定性的方法及其应用

技术领域

5 本发明涉及蛋白质检测领域。具体地说，本发明涉及检测蛋白质稳定性的方法及其应用。

背景技术

10 蛋白质水平的动态变化是细胞保持活力和进行生命活动的基本特征和必要前提。在任何时间点，细胞内特定蛋白质的水平取决于其合成与降解过程之间的动态平衡。蛋白质的合成主要在核糖体上进行，目前对蛋白质合成的及其调节的过程都了解得相对清楚。

15 人类对蛋白质降解过程的研究始于上世纪八十年代，近年来已经发展成为现代生物学的一个非常重要的研究领域。这是因为所有的蛋白都必须被适时的降解，细胞的基本生命过程例如细胞周期的进行才得以成为可能。无数证据表明，许多受到损伤的或者折叠错误的蛋白也都必须降解掉，否则正常的细胞功能就会受到影响，从而导致如癌症、神经退行性疾病等 (C. Raiborg 和 H. Stenmark, 2009; Christian Hirsch 等, 2009; Steven Bergink 和 Stefan Jentsch, 2009)。

20 因为很多疾病的病理过程都与蛋白质降解途径的不正常有关(Salvatore Oddo, 2008; Jeffrey H Kordower, 2008; Jianjun Wang, 2008)，许多肿瘤细胞与病毒也是利用泛素蛋白酶体系统扰乱蛋白质的降解，从而达到肿瘤细胞的扩散或对宿主细胞的入侵 (Daniela Hoeller 和 Ivan Dikic, 2009)。目前许多影响蛋白质降解途径的药物已经或正在开发之中。已有的研究结果和临床试验的数据都显示这类药物对很多目前难以治愈的疾病都具有极高的潜在药用价值 (Matthew D Petroski, 2008; Grzegorz Nalepa, 2006)。

25 因此，研究蛋白质稳定性的差异变化对于相应蛋白质受累疾病的预测、及发病、病因、治疗药物的筛选等均存在重要的提示作用，检测蛋白质稳定性的异常变化对于研究发病机制尤为重要。现在主要的方法是通过 Cycloheximide 时间梯度实验来检测蛋白质的稳定性。然而，这一方法不仅工作量大，而且对于研究蛋白质组学范围内的蛋白质差异变化无能为力。同时，该方法因实验的复杂性而不适用于高通量药物筛选。

30 蛋白质芯片技术可以一次性检测多种蛋白质的稳定性，但由于抗体的可用性，使得其通量有限，同时也极大的限制了该技术的实用性。利用质谱技术可以实现大规模样品，蛋白质组学范围内的蛋白质稳定性变化的检测，但是质谱技术识别能力有限，对于低丰度蛋白稳定性的变化无法检测。

35 在细胞生物学与分子生物学领域中，荧光蛋白分子具有广泛的应用。荧光蛋白常常会被用做报告基因，标识目标蛋白的细胞定位，同时可以结合 FACS 技术，

进行目标蛋白分子胞内丰度的相对定量。

因此，本领域急需能够实现广泛应用于全基因组范围内蛋白质稳定性的检测，并且易于应用于高通量小化合物筛选的新型检测方法。

5 发明内容

本发明的目的在于提供一种可用于检测蛋白质稳定性的融合蛋白以及编码所述融合蛋白的遗传构建物、包含所述遗传构建物的载体、包含所述遗传构建物或载体的细胞，以及由所述细胞构成的文库和检测蛋白质稳定性的方法和应用。本发明方法对蛋白质稳定性的检测不仅灵敏度和特异性高，而且操作简便。

10

在第一方面，本发明提供一种遗传构建物，其结构如下式所示：

$$5'-A + B + C + D + E-3',$$

其中，

A 表示启动子；

15

B 表示由目标蛋白和第一标记蛋白构成的融合蛋白的编码序列；

C 表示连接肽的编码序列；

D 表示第二标记蛋白的编码序列；和

E 表示终止子；

其中，B 和 D 可以互换。

20

在优选的实施方式中，所述启动子为 CMV 启动子。

在另一优选的实施方式中，B 中 5'-3' 依次包含目标蛋白的编码序列和第一标记蛋白的编码序列。

在另一优选的实施方式中，所述连接肽选自：泛素、泛素截短体、泛素突变体及类泛素、2A 短肽等；优选泛素；最优选 K(R) 饱和突变的泛素。

25

在优选的实施方式中，所述第一标记蛋白和第二标记蛋白是荧光蛋白。

在优选的实施方式中，所述荧光蛋白选自 EGFP 或 RFP；优选第一标记蛋白是 EGFP，第二标记蛋白是 RFP。

在优选的实施方式中，所述 EGFP 是 mEGFP，所述 RFP 是 mRFP。

在优选的实施方式中，所述荧光蛋白 C 端或 N 端融合有一个或多个标签蛋白，
30 例如 Flag 或 myc。

在另一优选的实施方式中，所述目标蛋白的编码序列包括人类基因组文库 human ORFeome V5.1 中所有基因。

在第二方面，本发明提供一种多肽，其结构如下式所示：

35

$$B1 + C1 + D1,$$

其中，

B1 表示由目标蛋白和第一标记蛋白构成的融合蛋白

C1 表示连接肽；和

D1 表示第二标记蛋白；

5 其中 B1 和 D1 可以互换。

在优选的实施方式中，所述多肽中各部分的顺序为目标蛋白、第一标记蛋白、连接肽和第二标记蛋白，或第二标记蛋白、连接肽、目标蛋白和第一标记蛋白。

在优选的实施方式中，所述多肽由权利要求 1 所述的遗传构建物编码。

10 在另一优选的实施方式中，所述连接肽选自：泛素、泛素突变体及类泛素、2A 短肽等；优选泛素；最优选 K(R)突变的泛素。

在另一优选的实施方式中，所述第一标记蛋白和第二标记蛋白是荧光蛋白。

在另一优选的实施方式中，所述荧光蛋白选自 EGFP 或 RFP；优选第一标记蛋白是 EGFP，第二标记蛋白是 RFP。

在另一优选的实施方式中，所述 EGFP 是 mEGFP，所述 RFP 是 mRFP。

15 在另一优选的实施方式中，所述荧光蛋白 C 端或 N 端融合有一个或多个标签蛋白，例如 Flag 或 myc。

在另一优选的实施方式中，所述目标蛋白包括人类细胞全基因组文库 human ORFeome V5.1 中的开放阅读框所编码的所有蛋白质。

20 在第三方面，本发明提供一种载体，其包含本发明第一方面所述的遗传构建物。

在优选的实施方式中，所述载体可以是逆转录病毒质粒、慢病毒质粒等可以整合到受体细胞基因组的质粒。

25 在第四方面，本发明提供一种细胞，其包含本发明第一方面所述的遗传构建物或本发明第三方面所述的载体。

在第五方面，本发明提供一种细胞文库，其由本发明第四方面所述的细胞构成。

在优选的实施方式中，所述的细胞是哺乳动物细胞；

30 在另一优选的实施方式中，所述的哺乳动物细胞是灵长类细胞或人细胞；优选地，所述哺乳动物细胞是人细胞。

在另一优选的实施方式中，所述哺乳动物细胞包括但不限于：293 细胞、293T 细胞、293FT 细胞、Hela 细胞、NIH3T3 细胞、癌细胞、干细胞等。

35 在第六方面，本发明提供一种检测一个或多个目标蛋白质稳定性的方法，包括以下步骤：

(1) 构建本发明第五方面所述的细胞文库；

(2) 在所述特定条件下和对照条件下培养(1)所得的细胞文库；

(3) 测定所述特定条件下和对照条件下培养的细胞文库中第一标记蛋白与第二标记蛋白之比；和

(4) 通过比较所述特定条件下和对照条件下培养的细胞系中第一标记蛋白与第二标记蛋白之比得出目标蛋白质稳定性是否变化的结论；或：

采用流式细胞仪技术按照第一标记蛋白与第二标记蛋白之比将细胞分成 n 个区间 (n 大于等于 2)，并通过 DNA 芯片技术检测每一区间中目标基因的各自表达量计算出目标基因在各个区间中的分布情况，并将所述特定条件下和对照条件下培养的细胞系中目标基因分布情况进行对比，得出目标基因所编码的蛋白质稳定性是否变化的结论。

在优选的实施方式中，所述特定条件可以是添加刺激与扰动，例如化学刺激，如药物等；也可以是基因过表达，基因敲除或 RNA 干扰；可以是病毒感染、稳转、质粒瞬转，也可以是对照条件本身。

在优选的实施方式中，所述特定条件是在接触待测化合物、应激、辐射等条件；优选地，所述特定条件是接触待测化合物。

在优选的实施方式中，采用流式细胞仪技术检测第一标记蛋白与第二标记蛋白之比；即，检测荧光蛋白的荧光强度之比。

在优选的实施方式中，所述的区间数量为 8 个。

在优选的实施方式中，所述目标蛋白质是人类细胞全基因组文库 human ORFeome V5.1 中所有 ORF 所编码的蛋白质。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图 1a 显示了双荧光质粒的结构示意图。

图 1b 显示了利用双荧光质粒系统检测蛋白质相对稳定性的原理。

图 1c 显示没有融合蛋白质 ORF 的 mEGFP 稳定性良好，与 mRFP 形成分子摩尔量稳定的 1:1 关系。

图 1d 显示双荧光质粒系统可以成功筛选出抗癌药物 Bortezomib (硼替佐米)的底物蛋白质 RGS4，阴性蛋白质未显示任何变化。且附有 Western 数据验证。

图 2a 显示利用双荧光细胞文库测定全基因组范围内蛋白质稳定性的试验流程图。

图 2b 显示利用双荧光细胞文库测定的全基因组范围内蛋白质相对稳定性的 PSI 数据分布图。

图 2c、d 显示随机挑选的基因 PSI 数据。

图 3a 显示抗癌药物 Bortezomib 的化学结构。

图 3b 显示双荧光全细胞文库经抗癌药物 Bortezomib 处理后整体变化。

图 3c 显示代表性数据。

5 图 3d 显示蛋白质相对稳定性变化值 Δ PSI 分布图。

图 3e、f、g、h 显示利用 FACS 与 Western Blot 技术对芯片结果的验证数据。

图 4a 显示利用生物信息学工具 DAVID 对稳定性变化剧烈的蛋白质进行 GO (Biological Pathway)分析。

图 4b 显示对图 4a 结果中 BP004 亚族进行细节分析。

10 图 4c 显示对图 4a 结果中 BP00179 亚族进行细节分析。

图 4d 显示利用生物信息学工具 STRING 与可视化工具 cytoscape 对响应蛋白质进行蛋白质-蛋白质相互作用关系(PPI)分析。

图 5 显示对照双荧光细胞系散点图。

图 6 显示含有 human ORFeome V5.1 的双荧光细胞文库。

15 图 7 以 TP53-mEGFPfu-mRFPf 为例展示了融合多肽在刚被翻译出时的原始条带, 以及被泛素化酶切割后形成的两条不同条带(TP53-mEGFP 融合蛋白条带和 mRFP 条带)的 western blot 电泳结果。

图 8 显示利用生物信息学工具 STITCH 与可视化工具 cytoscape 对响应蛋白质进行小化合物-蛋白质相互作用关系(CPI)分析。

20 图 9a、b 显示为针对 CZ-1 或 CZ-1/R 细胞, BTZ 与 17-AAG 的药物联用效果。

图 9c、d 显示为针对 CZ-1 或 CZ-1/R 细胞, BTZ 与 C75 的药物联用效果。

图 10a 显示 BTZ 与 C75 药物联用效果 CI 计算。

图 10b 显示 BTZ 与 17-AAG 药物联用效果 CI 计算。

25 具体实施方式

发明人经过广泛而深入的研究,出乎意料地发现利用本发明的双荧光质粒系统能够方便而准确地实现全基因组范围内蛋白质稳定性的同时检测,极大提高了双荧光技术的实用性,进而应用于影响致病基因蛋白质稳定性的小化合物的高通量筛选以及寻找参与疾病发生的未知关键基因。在此基础上完成了本发明。

30

在本发明中,发明人设计了一种双荧光质粒系统对蛋白质降解速率进行相对定量。本技术的核心在于共表达一个荧光报告蛋白分子(mEGFP)相融合的特定靶标蛋白与一个对照荧光蛋白分子(mRFP),二者通过特殊的连接蛋白连接,在翻译完成之后,将被有效切割而分离。mRFP 的表达水平充当了内参作用, mEGFP 则被融合到靶标蛋白 X 的 C 端,成为靶标蛋白 X 胞内丰度的测量尺,通过 mEGFP/ mRFP 的比值发明人

35 可以精确界定在单个细胞内特定蛋白 X 的稳定性。

同时，任何生物学事件(如删除或过表达调整特定蛋白 X 的 E3 连接酶)或者化学刺激(如药物处理)选择性改变融合蛋白 X-mEGFP 的稳定性时，都将会导致融合蛋白 X-mEGFP 丰度的变化，但是不会影响 mRFP 的丰度，进而导致 mEGFP/ mRFP 比值的改变。

5 因此，本发明可以有效的克服以往技术的缺陷，必将广泛的应用于全基因组范围内蛋白质稳定性的测定，以及高通量的小化合物筛选。

本发明采用在同一启动子下共表达目标蛋白、第一标记蛋白、连接肽和第二标记蛋白构成的融合蛋白，通过切割连接肽，形成目标蛋白与第一标记蛋白的融合蛋白以及第二标记蛋白，进而通过与目标蛋白相融合的第一标记蛋白与第二标记蛋白之比表
10 征目标蛋白的相对稳定性。

例如，在具体的实施方式中，本发明将荧光蛋白与目标基因或基因文库融合，利用荧光分子可以荧光定量的特性，根据荧光强度表征融合蛋白量，最终获得蛋白质稳定性的参数。结合 human ORFeome 文库基因，进而实现全基因组范围内所有蛋白质
15 稳定性的同时检测。

利用该技术，可以高通量筛选影响致病基因蛋白质稳定性的小化合物。同时，结合 human ORFemoe 文库，可以实现全基因组范围内蛋白质稳定性的检测，进而可以在全基因组范围内筛选疾病状态与正常状态下发生稳定性异常变化的蛋白质，以寻找未知的参与疾病发生的关键基因，以解决现在仍无法全面了解的症结所在。

20

在优选的实施方式中，本发明首先如下所述构建双荧光表达质粒：

在同一启动子启动下共表达对照蛋白((Red fluorescent protein (RFP))与荧光报告蛋白(enhanced green fluorescent protein (EGFP))相融合的特定靶标蛋白，二者通过泛素连接，在翻译完成后，细胞内上百种去泛素化酶有效切割泛素而形成分离的 RFP。RFP
25 的表达水平充当内参，EGFP 则被融合到靶标蛋白 X 的 C 端，成为靶标蛋白 X 胞内丰度的测量尺，通过 EGFP / RFP 的比值可以精确界定单个细胞内特定蛋白 X 的相对稳定性，并利用流式细胞术实现不同 EGFP/RFP 比值的细胞分选与检测。当进行高通量药物筛选时，只需将目标蛋白利用高效的同源重组技术 Gateway 反应重组到该双荧光表达载体上，然后构建细胞系，即可利用高通量技术进行筛选。当需要检测全基因
30 组范围内蛋白质稳定性的异常变化时，则利用同源重组技术 Gateway 反应将人类 ORFemoe 文库所有基因同源重组到双荧光表达质粒上，然后，通过超低的病毒滴度 (MOI~0.05) 感染细胞，维持一个细胞一个基因的频率构建整合有人类 ORFemoe 文库的细胞文库，利用该细胞文库，并结合 FACS，与芯片技术就可以一次性实现全基因组范围内所有蛋白质稳定性的检测。

35

因此，本发明首先提供了一种遗传构建物，其结构如下式所示：

5'-A + B + C + D + E-3',

其中, A 表示启动子; B 表示由目标蛋白和第一标记蛋白构成的融合蛋白的编码序列; C 表示连接肽的编码序列; D 表示第二标记蛋白的编码序列; 和 E 表示终止子; 其中 B 和 D 可以互换。

5 其中目标蛋白和第一标记蛋白编码序列的位置顺序可以互换。

鉴于本发明的教导和现有技术, 本领域技术人员应理解, 由于本发明是通过共表达目标蛋白、第一标记蛋白、连接肽和第二标记蛋白构成的融合蛋白, 通过切割连接肽, 形成目标蛋白与第一标记蛋白的融合蛋白以及第二标记蛋白, 进而通过与目标蛋白相融合的第一标记蛋白与第二标记蛋白之比表征目标蛋白的相对稳定性。因此, 上述遗传构建物中 B 和 D 可以互换而不影响功能或使用。

鉴于本发明的教导和现有技术, 本领域技术人员还应理解, B 中的目标蛋白和第一标记蛋白编码序列的位置顺序也可以互换而不影响使用或功能。

在优选的实施方式中, B 中 5'-3' 依次包含目标蛋白的编码序列和第一标记蛋白的编码序列。

15 本领域普通技术人员鉴于本发明的教导和现有技术, 应该明白, 本发明可利用各种连接肽, 只要所述连接肽能在胞内被切割, 从而形成分离的两种标记蛋白。例如, 在具体的实施方式中, 所述连接肽选自: 泛素(Ub)、泛素突变体及类泛素、2A 短肽等; 优选泛素; 最优选 K(R) 突变的泛素。K(R) 突变的泛素可以保证有效切割的同时自身不会成为泛素化位点, 因而不会影响目标蛋白的降解特性。

20 本领域技术人员还应该理解, 本发明可利用各种标记蛋白, 只要能够精确表征所述标记蛋白的量。例如, 在具体的实施方式中, 所述第一标记蛋白和第二标记蛋白是荧光蛋白; 优选地, 所述荧光蛋白是 EGFP 或 RFP; 更优选地, 第一标记蛋白是 EGFP, 第二标记蛋白是 RFP。在更优选的实施方式中, 所述 EGFP 是单体形 EGFP (mEGFP), 所述 RFP 是单体形式 RFP (mRFP)。

在另一优选实施方式中, 所述荧光蛋白 C 端或 N 端融合有一个或多个标签蛋白, 例如 Flag 或 myc。

在另一优选实施方式中, 所述启动子为 CMV 启动子。

在另一优选实施方式中, 所述目标蛋白的编码序列是人类基因组文库所有基因。

30 本发明还提供多肽, 其结构如下式所示:

B1 + C1 + D1,

其中,

B1 表示由目标蛋白和第一标记蛋白构成的融合蛋白

35 C1 表示连接肽; 和

D1 表示第二标记蛋白；

其中 B1 和 D1 可以互换。

如上所述，本领域技术人员应该理解，本发明多肽中的 B1 和 D1 可以互换而不影响功能或使用。而本发明多肽中 B1 的目标蛋白和第一标记蛋白的位置顺序也可以
5 互换而不影响使用或功能。

在优选的实施方式中，所述多肽由本发明的遗传构建物编码。

在优选的实施方式中，所述多肽的顺序为目标蛋白、第一标记蛋白、连接肽和第二标记蛋白，或第二标记蛋白、连接肽、目标蛋白和第一标记蛋白。

10 在本发明的遗传构建物的基础上，本发明还提供包含本发明遗传构建物的载体，包含所述遗传构建物或载体的哺乳动物细胞以及由所述哺乳动物细胞构成的哺乳动物细胞文库。

在具体的实施方式中，所述载体可以是逆转录病毒质粒、慢病毒质粒等可以整合到受体细胞基因组的质粒。所述哺乳动物细胞可以是灵长类细胞或人细胞；优选地，
15 所述哺乳动物细胞是人细胞。在具体的实施方式中，所述哺乳动物细胞包括但不限于：293 细胞，也可以是其他细胞，如 293t, hela, 3t3, 癌细胞，干细胞等。

在本发明遗传构建物、载体、多肽、细胞以及细胞文库的基础上，本发明进一步提供一种检测特定条件下目标蛋白质稳定性变化的方法，所述方法包括以下步骤：

- 20 (1) 构建本发明的细胞文库；
(2) 在所述特定条件下和对照条件下培养所得的细胞文库；
(3) 测定所述特定条件下和对照条件下培养的细胞文库中第一标记蛋白与第二标记蛋白之比；和
(4) 通过比较所述特定条件下和对照条件下培养的系统系中第一标记蛋白与第
25 二标记蛋白之比得出目标蛋白质稳定性是否变化的结论。

当获得细胞文库后，既可以添加刺激与扰动，例如化学刺激，如药物；也可以是基因过表达，或者是 RNA 干扰；可以是病毒稳转，亦可以是质粒瞬转。

在优选的实施方式中，所述特定条件是在接触待测化合物、应激、辐射等条件；优选地，所述特定条件是接触待测化合物。

30 在优选的实施方式中，采用 DNA 微阵列技术检测第一标记蛋白与第二标记蛋白之比，例如检测第一标记蛋白和第二标记蛋白的荧光强度之比。

在优选的实施方式中，所述目标蛋白质是人类细胞全基因组文库 human ORFeome V5.1 中所有的蛋白质。

35 在本发明中，涉及的全基因组范围内的基因，可以是 human ORF version5.1 版本，也可以是更高或是其他版本，也可以是其他物种的 ORF 文库版本。

本领域普通技术人员鉴于本发明的教导和现有技术应该理解,本发明可利用各种标记蛋白,只要能够精确表征所述标记蛋白的量。例如,本发明可利用各种荧光蛋白,包括但不限于 mEGFP 与 mRFP 或其突变体,也可以是其他荧光蛋白,只要两种荧光蛋白含有不同的激发光波长。

5 本发明的多肽中采用两种不同的荧光蛋白。优选的实施方式中,本发明的荧光蛋白是 mEGFP 与 mRFP。

作为示例,本发明可利用 SEQ ID NO: 1、2、3 或 4 所示的荧光蛋白 (SEQ ID NO: 1, atggtgagcaagggcgaggagctgttcacgggggtggtgcccacctcgtggtcgagctggacggcgacgtaa
acggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccacc
10 ggcaagctgcccgtgccctgccccaccctcgtgaccaccctgacctacggcggtgagtgcttcagccgctaccccgaccacatg
aagcagcagcacttctcaagtcgcccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactaca
agacccgcgcgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacgg
caacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaa
ggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcgggcg
15 acggccccgtgctgctgccccgacaaccactacctgagcaccagtcgcacctgagcaagaccccaacgagaagcgcgcatcac
atggtcctgctggagttcgtgaccgcccgggatcactctcgcatggacgagctgtacaag; SEQ ID NO: 2,
MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPV
PWPTLVTTLTYGTVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA
EVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNF
20 KIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSK(A)LSKDPNEKRDHM
VLLEFVTAAGITLGMDELYK; SEQ ID NO: 3, atggcctcctccgaggacgtcatcaaggagttcatgcgc
ttcaaggtgcgcatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcgccccctacgagggca
cccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggcgccccctgcccttcgctgggacatcctgtccccctcagttccagtacggctc
caaggcctacgtgaagcaccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgaggcgcgctgatg
25 aacttcgaggacggcggtggtgacctgacctcctcctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgc
ggcaccaactccccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggcctccaccgagcggatgtacccga
ggacggcgccctgaagggcgagatcaagatgaggtgaagctgaaggacggcgccactacgacgccgaggtcaagaccac
ctacatggccaagaagcccgtgcagctgccccggcgccctacaagaccgacatcaagctggacatcacctcccaaacgaggacta
caccatcgtggaacagtacgagcgcgccgagggcgccactccaccggcgcc; SEQ ID NO: 4, MASSEDVIKE
30 FMRFKVRMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQF
QYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIY
KVKLRGTNFPDGPVPMQKKTMGWEASTERMYPEDGALKGEIKMRLKLKDGGHY
DAEVKTTYMAKKPVQLPGAYKTDIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGA)。

35 本发明包括含有 SEQ ID NO: 2 或 4 所示氨基酸序列的荧光蛋白,以及与 SEQ ID NO:2 或 4 具有相同功能的、它们的变异形式,或者其它荧光蛋白分子。表 1 列举了可能的荧光蛋白分子,包括但并不局限于以下蛋白:

表 1

蛋白质 (首字母缩写)	Ex/nm	Em/nm	EC/10 ⁻³ M-1 cm ⁻¹	QY	四级结构	相对亮度 (% EGFP)
蓝色荧光蛋白						
Sirius	355	424	15	0.24	单体*	11
Azurite	384	448	26.2	0.55	单体*	43
EBFP	383	445	29	0.31	单体*	27
EBFP2	383	448	32	0.56	单体*	53
青色荧光蛋白						
ECFP	439	476	32.5	0.4	单体*	39
Cerulean	433	475	43	0.62	单体*	79
CyPet	435	477	35	0.51	单体*	53
SCFP	433	474	30	0.5	单体*	45
绿色荧光蛋白						
EGFP	488	507	56	0.6	单体*	100
Emerald	487	509	57.5	0.68	单体*	116
Superfolder avGFP	485	510	83.3	0.65	单体*	160
T-Sapphire	399	511	44	0.6	单体*	79
黄色荧光蛋白						
EYFP	514	527	83.4	0.61	单体*	151
Topaz	514	527	94.5	0.6	单体*	169
Venus	515	528	92.2	0.57	单体*	156
Citrine	516	529	77	0.76	单体*	174
YPet	517	530	104	0.77	单体*	238
SYFP	515	527	101	0.68	单体*	204
mAmetrine	406	526	45	0.58	单体	78
蓝色荧光蛋白						
mTagBFP	399	456	52	0.63	单体	98
青色荧光蛋白						
TagCFP	458	480	37	0.57	单体	63
AmCyan	458	489	44	0.24	四聚体	31
Midoriishi Cyan	472	495	27.3	0.9	二聚体	73
mTFP1	462	492	64	0.85	单体	162
绿色荧光蛋白						
Azami Green	492	505	55	0.74	单体	121
mWasabi	493	509	70	0.8	单体	167
ZsGreen	493	505	43	0.91	四聚体	117
TagGFP	482	505	58.2	0.59	单体	102
TagGFP2	483	506	56.5	0.6	单体	105
TurboGFP	482	502	70	0.53	二聚体	112
CopGFP	482	502	70	0.6	四聚体	125
AceGFP	480	505	50	0.55	单体	82
黄色荧光蛋白						
TagYFP	508	524	64	0.6	单体	118
TurboYFP	525	538	105	0.53	单体	169
ZsYellow	529	539	20.2	0.42	四聚体	25
PhiYFP	525	537	130	0.4	二聚体	158
橙色荧光蛋白						
Kusabira Orange	548	559	51.6	0.6	单体	92
Kusabira Orange2	551	565	63.8	0.62	单体	118
mOrange	548	562	71	0.69	单体	146

mOrange2	549	565	58	0.6	单体	104
dTomato	554	581	69	0.69	二聚体	142
dTomato-Tandem	554	581	138	0.69	伪-单体	283
DsRed	558	583	75	0.79	四聚体	176
DsRed2	563	582	43.8	0.55	四聚体	72
DsRed-Express (T1)	555	584	38	0.51	四聚体	58
DsRed-Express2	554	586	35.6	0.42	四聚体	45
DsRed-Max	560	589	48	0.41	四聚体	59
DsRed-单体	556	586	35	0.1	单体	10
TurboRFP	553	574	92	0.67	二聚体	187
TagRFP	555	584	100	0.48	单体	142
TagRFP-T	555	584	81	0.41	单体	99
红色荧光蛋白						
mRuby	558	605	112	0.35	单体	117
mApple	568	592	75	0.49	单体	109
mStrawberry	574	596	90	0.29	单体	78
AsRed2	576	592	56.2	0.05	四聚体	8
mRFP1	584	607	50	0.25	单体	37
JRed	584	610	44	0.2	二聚体	26
mCherry	587	610	72	0.22	单体	47
eqFP611	559	611	78	0.45	四聚体	106
tdRFP611	558	609	70	0.47	伪-单体	98
HcRed1	588	618	20	0.015	二聚体	1
mRaspberry	598	625	86	0.15	单体	38
远红荧光蛋白						
tdRFP639	589	631	90.4	0.16	伪-单体	43
mKate	588	635	31.5	0.28	单体	26
mKate2	588	633	62.5	0.4	单体	74
Katushka	588	635	65	0.34	二聚体	67
tdKatushka	588	633	132.5	0.37	伪-单体	146
HcRed-Tandem	590	637	160	0.04	伪-单体	19
mPlum	590	649	41	0.1	单体	12
AQ143	595	655	90	0.04	四聚体	11

注：在表中，峰值激发波长为 Ex，峰值发射波长为 Em，摩尔消光系数为 EC，量子产率为 QY。将摩尔消光系数与量子产率的乘积除以 EGFP 的值得到计算的亮度值。

5 作为示例，荧光蛋白，例如 mEGFP 可以 N 端与目标蛋白的 ORF 融合，即采用结构形式：ORF-mEGFP-Ub-mRFP，也可以 C 端与目标蛋白的 ORF 融合，即采用结构形式：mEGFP-ORF-Ub-mRFP；同时，也可以采用，例如 mRFP 与目标蛋白的 ORF 融合的方式。

10 本发明中荧光分子 C 端融合有 2 个 Flag 标签，可以不融合，也可以 1 个 Flag 标签或者更多，还可以换成其他标签蛋白，如 myc 等。标签融合的位置也可以在荧光分子的 N 端。

实际上，在本发明公开的基础上，结合本领域已知的荧光蛋白的氨基酸组成及其结构，根据具体的实验要求与目的，本领域技术人员可对荧光蛋白分子的种类自主选择，对 N 端融合或 C 端融合自主选择。

本发明包括应用各种文库 ORF 融合双荧光蛋白来检测蛋白质稳定性的文库。本发明所采用的文库可以是商业化的 ORF 文库，也可以是本领域技术人员自己构建的文库。可以是 human 的 ORF，也可以是其他物种的 ORF。也可以是 ORF 中的部分功能结构域中。也可以是本领域技术人员自己设计的序列片段。

5 文库基因重组与扩增在大肠杆菌中进行，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl_2 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。

一旦获得构建文库所需的文库基因序列，就可以构建融合有双荧光蛋白分子的基因文库。构建的方法可以是基因重组的方法，例如 Gateway 反应等，亦可以是其他重组
10 组反应。还可以是常规的重组 DNA 技术(Science, 1984; 224: 1431)，如传统酶切-连接酶链接的方法。

当获得了融合有双荧光蛋白分子的基因文库后，即可利用病毒包装的方法，构建整合有质粒基因的双荧光细胞文库，质粒可以是慢病毒质粒或者是其他可以整合基因组的质粒，构建双荧光细胞文库的细胞可以是 293 细胞，也可以是其他细胞，如 293T
15 细胞、Hela 细胞、NIH3T3 细胞、癌细胞、干细胞等。

构建的细胞文库用 FACS 进行分选，分选时基于 mEGFP/mRFP 的比值将文库分选为若干区间，区间数可以为 6、7、8、9 或更多，也可以将文库中部分 mEGFP/mRFP 比值的区间的细胞进行精细分选。区间数可以是 4、5、6、7 等或更多。

分选的细胞分别提取基因组，可采用常规的方法从细胞或组织提取基因组 DNA，
20 制备含基因组 DNA 的样品。然后以基因组 DNA 为模板，以质粒共同区段设计引物，对 ORF 进行 PCR 扩增，3'端引物添加 T7 启动子引物，进行 PCR 扩增的 tag 酶宜选择延伸能力强的酶，例如 Ex-tag 等。PCR 产物进行体外 RNA 扩增，扩增产物用于芯片杂交。芯片可采用 Agilent 双标芯片。芯片结果采用 Bioconductor 程序包 limma 中的 Composite loess normalization 进行归一化。

25 本发明提到的上述特征，或实施例提到的特征可以任意组合。本文所揭示的所有特征可以任何组合形式并用，说明书中所揭示的各个特征，可以任何提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。因此除非有特别说明，所揭示的特征仅为均等或相似特征的一般性例子。

30 本发明的优点：

1. 本发明极大提高检测蛋白质稳定性的实用性；
2. 本发明方法的检测准确度高，操作便捷，省时；
3. 本发明方法能高灵敏度和特异性地检测蛋白质稳定性的变化情况。

35 4. 本发明方法荧光蛋白分子融合在目标蛋白的 C 段，可以有效地暴露蛋白质 N 端的信号序列，真实模拟蛋白质的降解动态；

5. 本发明方法中荧光蛋白分子之间采用泛素 Ub 连接, 细胞内大量的去泛素化酶保证 Ub 的高效切割, 进而在蛋白质翻译水平上保证两个荧光分子 1: 1 的摩尔比例关系;

6. 本发明方法中采用单体形式的荧光分子, 可以有效的避免由于荧光分子聚集引起的蛋白质降解动态改变;

7. 本发明方法中采用的荧光分子, 具有快速的折叠速率, 保证了及时、动态的跟踪蛋白质稳定性的变化。

下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 例如 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明, 否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

除非另行定义, 文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外, 任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

实施例

材料与amp;方法

CZ-1 细胞和 CZ-1/R 细胞

CZ-1 细胞是从多发性骨髓瘤细胞系 (即, BTZ 药物敏感细胞系); 此细胞系在体外经小剂量间歇处理 BTZ 药物, 多代培养, 从而获得 BTZ 抗药性, 标记为 CZ-1/R (即, BTZ 药物抗性细胞系)。

CZ-1 细胞可以获自上海长征医院侯健实验室(Hou J, Lin FY, Zhang B, Zhang LZ, Ding SQ, Establishment and biological characteristics of human multiple myeloma cell line CZ-1. Chinese Medical Journal [2004, 117(1):115-119]), CZ-1/R 细胞系由发明人实验室构建, 可以获自发明人实验室 (<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=129>)。

293 细胞

293 细胞可以获自 ATCC (马里兰州, 美国)。

质粒构建

将设计的双荧光结构组装, 用 PCR 反应进行扩增并加上限制性内切酶位点。mEGFP 片段 C 端带上两个 Flag 标签, mRFP 片段 C 端带上两个 Flag 标签, Ub

蛋白 K(R)饱和突变,命名为 mEGFP_{fu}-mRFP_f, 三片段拼接在一起后, 经 Hind III 与 Xho I 酶切位点插入载体 pAG426GAL-ccdB-EGFP(Addgene), 利用 mEGFP-Ub-mRFP 结构替换 EGFP 结构, 得到质粒 pAG426GAL-ccdB-mEGFP_{fu}-mRFP_f。

5 其中 pAG426GAL-ccdB-mEGFP_{fu}-mRFP_f 质粒构建所需的引物如下:

HindIII-(a)-mGFPN1(5-3): ACA aagctta atggtgagca agggcgagga(SEQ ID NO: 5)

mGFPN1-FLAG2N1 (3-5): tggacgagct gtacaag ggatctgactacaag(SEQ ID NO: 6)

GWS3(5-3):

gggtctgactacaaggacgatgacgataagggcggagactacaaggacgatgacgataagggctct(SEQ ID NO:

10 7)

FLAG2C1-hUbN1(5-3): acgatgacgataagggctct atgcagatctttgtgaGg(SEQ ID NO:

8)

GWS5(5-3):

atgcagatctttgtgaGgacctcactggcaGaaccatcacccttgaggctcgagcccagtgacaccattgagaatgtcaG

15 agccaGaattcaagacaGgg(SEQ ID NO: 9)

GWS6(5-3):

gccaGaattcaagacaGggaggggtatccacctgaccagcagcgtctgatatttccggcaGacagctggaggatggc
cgactctctcagactacaac(SEQ ID NO: 10)

hUbK6RN3-mRFPN1(3-5):

20 cactctctcagactacaacatccagaGagagtccacctgcacctggtgttgccgctccgcggtggtatggcctct
ccgaggacgt(SEQ ID NO: 11)

GWS8(5-3): atggcctct ccgaggacgt(SEQ ID NO: 12)

GWS9(5-3): ccgc cactccaccg gcgcc ggAtctgactacaaggacgat(SEQ ID NO: 13)

GWS10(5-3): acaaggacgatgacgataag TAG taactcgagtca(SEQ ID NO: 14)

25 通过 speI 与 XhoI 两个限制性内切酶对 pAG426GAL-ccdB-mEGFP_{fu}-mRFP_f 质粒双酶切, 补平, 将载体 pCDH-CMV-MCS-EF1a-Puro (Addgene) 用 xbaI 单切, 然后补平, 再通过 T4 连接酶连接, 经测序鉴定正确。得到质粒 pCDH-CMV-ccdB-mEGFP_{fu}-mRFP_f。

30 人类基因文库的混合与扩增

利用 Biomek FX 自动化工作站, 完成人类基因文库的混合, 并检测滴度。采用原始文库的 100 倍的量来扩增。37℃ 培养 18~24 h 后。刮取平板上的克隆, 收集后充分混匀, 进行质粒大量提取。

35 人类基因文库 LR 反应及鉴定

人类基因文库存在于含有 attL 序列的 Entry 克隆中, 文库基因直接可以与发

明人的目标载体 pCDH-CMV-ccdB-mEGFP_{fu}-mRFP_f(含有 attR 序列)发生 LR 反应 (技术细节与所有操作参照 invitrogen 公司 GATEWAY™ Cloning Technology 技术), 获得存在于 pCDH-CMV-ORFs-mEGFP_{fu}-mRFP_f 的人类基因文库。刮取克隆, 收集后充分混匀, 然后质粒大量抽提。

5

双荧光细胞文库的构建

293FT 细胞系于含 10%胎牛血清, 10%NEAA 和 P/S 抗生素的 DMEM 培养基中, 37℃、5% CO₂ 孵箱培养。293FT 细胞转染 pCDH-CMV-ORFs-mEGFP_{fu}-mRFP_f 文库, 辅助质粒采用慢病毒表达系统(LV100A-1, SBI), 方法参照使用说明。

10

双荧光对照细胞系的构建

与 hORFome 文库中挑取 pENTRY-RGS4, pENTRY-TP53, pENTRY-ARC, pENTRY-AXNA1, pENTRY-NFKBIB, pENTRY-CDC25A 质粒, 与目标载体 pCDH-CMV-ccdB-mEGFP_{fu}-mRFP_f 做 gateway 反应, 分别得到目标质粒

15 pCDH-CMV-RGS4-mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-P53-mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-ARC- mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-AXNA1-mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-NFKBIB-mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-CDC25A-mEGFP_{fu}-mRFP_f。采用慢病毒表达系统(LV100A-1, SBI)分别包装病毒, 感染 293FT 细胞, FACS 分选, 分别得到 pCDH-CMV-RGS4-mEGFP_{fu}-mRFP_f,
20 pCDH-CMV-TP53-mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-ARC- mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-AXNA1-mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-NFKBIB- mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-CDC25A-mEGFP_{fu}-mRFP_f 双荧光过表达细胞系。

pCDH-CMV-RGS4-mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-TP53-mEGFP_{fu}-mRFP_f,
25 pCDH-CMV-ARC-mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-AXNA1-mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-NFKBIB-mEGFP_{fu}-mRFP_f, pCDH-CMV-CDC25A-mEGFP_{fu}-mRFP_f 双荧光过表达细胞系使用 Bortezomib(1 μM 终浓度)处理 6 h, 以 DMSO 为对照, FACS 检验 EGFP/RFP 比值变化, 然后裂解细胞, Western 检验蛋白质丰度变化。

双荧光细胞文库的 8 区间分选

30 将含有 Human ORFeome V5.1 基因的双荧光细胞文库细胞消化, 吹散为单细胞, 用培养基重悬, 然后经 40μm 滤器过滤, 细胞分选采用 BD 公司 FACSAriaII 细胞分选系统。细胞分选时, 首先选取高 RFP 信号的细胞群体, 然后将选取的细胞按照 mEGFP/mRFP 的荧光比值分选为 8 个区间。

35 区间细胞基因组 DNA 提取与芯片杂交

各个区间的细胞分别用裂解液裂解, 裂解液成分为 10 mM Tris-HCl (8.0), 10

mM EDTA, 0.5% SDS, 0.2 mg/ml 蛋白酶 K 和 25 μ g/ml RNA 酶 A, 55°C 裂解 16 h, 然后加入 0.2 M 氯化钠。基因组 DNA 经过酚氯仿抽提, 氯仿提纯, 乙醇沉淀, 然后溶解在 10 mM Tris-HCl (8.0) 和 0.1 mM EDTA 缓冲液中。为定量扩增整合在基因组上的 ORF-mEGFP_{full}-mRFP_{full} 结构, 以基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 进行扩增,

5 PCR 引物:

正向引物: CCTGGAGACGCCATCCACGCTG (SEQ ID NO: 15)

反向引物:

TAATACGACTCACTATAGGGAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTAAAGCT (SEQ ID NO: 16)

- 10 反向引物中含有 T7RNA 聚合酶启动子位点。采用 EX-Taq (Takara) 酶扩增。然后以 PCR 产物为模板进行体外 RNA 扩增, 体外 RNA 扩增采用 T7 MEGAscript (Ambion) 试剂盒, 扩增的 RNAs 使用 RNeasy mini kit 纯化, 经纯化的 RNA 标记 Cy3 和 Cy5 (Cat#PA13105, GE healthcare Bioscience, Pittsburgh, PA, US), 然后再用 RNeasy mini kit (Cat#74106, QIAGEN, GmbH, Germany) 纯化。
- 15 具体细节参照使用说明。

芯片杂交

- 然后, 根据用量进行芯片杂交 (Cat#5188-5242, Agilent technologies, Santa Clara, CA, US) in Hybridization Oven (Cat#G2545A, Agilent technologies, Santa Clara, CA, US), 杂交 17 小时后, 洗涤 (Cat#121, Thermo Shandon, Waltham, MA, US) (Cat#5188-5327, Agilent technologies, Santa Clara, CA, US), 固定、干燥 (Cat#121, Thermo Shandon, Waltham, MA, US) with Gene Expression Wash Buffer Kit (Cat#5188-5327, Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)。所有操作参照使用说明。相同探针信号合并求平均数, 对于每个 ORF, 八个区间的信号值的和被归一
- 20 化为 1, 然后计算 PSI 与 STDEV 值。具体计算细节参照文献 (Hsueh-Chi Sherry Yen 等, 2008, science)。
- 25

寻找受 Bortezomib 处理后稳定性被影响的体内重要生物学通路和关键蛋白

- 为需找 Bortezomib 敏感蛋白, ORFs-mEGFP_{full}-mRFP_{full} 细胞文库分为两组: 对
- 30 照组加入 DMSO; 实验组加入 Bortezomib (1 μ M 终浓度), 然后 FACS 进行 8 区间分选, 检测 Bortezomib 处理对全基因组范围内蛋白质稳定性的影响。

利用系统生物学进行数据深度挖掘

GO 注释分析

- 35 发明人计算每个 ORF 在 DMSO 与 Bortezomib 处理条件下, PSI 的变化值。发明人以 Δ PSI/PSI 进行排序, 然后取序列前 15% 基因进行 GO 富集分析, 发明人

以芯片上所有探针作为对照基因，GO 富集分析采用 DAVID 在线软件(Glynn Dennis Jr,2003; Da Wei Huang,2009)。

信号通路富集分析

- 5 利用 DAVID 在线软件搜索了 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and GO annotation,Biocarta pathway,BBID,PANTHER pathway 等 14 个功能注释数据库，去寻找显著性改变的信号通路。

蛋白-蛋白相互作用网络

- 10 为了更好的理解 Bortezomib 加入后对细胞整体信号网络的影响，发明人挑取 Δ PSI/PSI 排序在前 5%的基因进行蛋白质-蛋白质相互作用网络分析，发明人使用了在线工具 STRING 数据库(Snel B,2000)。

小化合物-蛋白质相互作用分析 (CPI)

- 15 蛋白质与小化合物的相互作用网络对于理解分子与细胞的功能具有重要的意义。利用 STITCH ('search tool for interactions of chemicals') (Kuhn 等., 2008) (2.0 版) (<http://stitch2.embl.de/>)在线数据库，分析化合物-蛋白质相互作用网络。

MTT 检测细胞活力

- 20 调整细胞悬液浓度，铺板使待测细胞调密度为 1000-10000 /孔，加入浓度梯度的药物 Bortezomib、17-AAG (Selleck Chemicals)或 C75 (Cayman Chemical)，每个浓度设置 4-6 个重复。孵育 24-72 小时。每孔加入 20 μ l MTT (3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑)溶液，继续培养 4 h。每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷，置摇床上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD 490 nm (570
- 25 nm)处测量各孔的吸光值。

相互作用参数 CI (Combination index)分析

- 药物 BTZ 与 17-AAG 或者 C75 的相互作用模式采用 CompuSyn 软件分析 (<http://www.combosyn.com/>)。相互作用方程采用 Chou-Talalay 原则 (T C Chou, P
- 30 Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation* 02/1984; 22:27-55.), 即当 $CI = 1$, >1 , 或 <1 时分别认为药物分别具有叠加,拮抗或协同作用。将 CZ-1 细胞于 96 孔板中每孔 5000 个细胞，分别添加相应浓度的 BTZ，同时添加联用药物 17-AAG 或 C75，24 h 后，使用 MTT 检测细胞活力。

35

实施例 1. 双荧光蛋白系统高效测定蛋白质相对稳定性

发明人设计构建了双荧光蛋白结构，其中 mEGFP 与目标蛋白的 C 端融合，中间 linker 蛋白为 K(R)饱和突变的泛素，内参荧光蛋白为 mRFP，三者组成 mEGFP_{fu}-mRFP_f 的结构，其中 mEGFP 参照序列 SEQ ID NO: 1, 2, mRFP 参照序列 SEQ ID NO: 3,4, Ub_{K0} 参照序列为 SEQ ID NO: 17, 18，其结构示意图如图 1a 所示，对目标蛋白质进行相对定量的原理如图 1b 所示，发明人将人工设计的重组双荧光蛋白结构构件在哺乳动物细胞表达质粒上，采用 CMV 启动子组成性表达。

发明人将没有融合任何外源基因的 mEGFP_{fu}-mRFP_f 构建入真核细胞表达载体中，通过慢病毒感染 293FT 细胞，成功构建融合有 mEGFP_{fu}-mRFP_f 稳转细胞系，通过 FACS 技术，发明人检测发现 mEGFP-UB_{K0} 与 mRFP 具有相同稳定性，且都十分稳定。见图 1c。其中低信号区的细胞为阴性对照细胞。

为了检测基因的相对稳定性，发明人通过 gateway 重组技术，将基因 ARC, TP53, CDC25A 与 mEGFP-UB_{K0}-mRFP 结构的 mEGFP 的 N 端融合，通过慢病毒感染 293FT 细胞，成功构建融合有 ARC-mEGFP_{fu}-mRFP_f, TP53-mEGFP_{fu}-mRFP_f, CDC25A-mEGFP_{fu}-mRFP_f 的稳转细胞系，通过 FACS 技术，发明人发现不同基因具有不同的蛋白质稳定性。见图 5。

为了验证双荧光蛋白系统被泛素化酶切割的情况，发明人以 TP53-mEGFP_{fu}-mRFP_f 载体表达蛋白为例进行了测试。该融合肽段在刚被翻译出时的原始条带，以及被泛素化酶切割后形成的两条较小的条带（分别为 TP53-mEGFP 融合蛋白条带和 mRFP 条带），通过 western blot 电泳均得到了验证，如图 7 所示。这表明本发明提供的融合多肽成功被泛素化酶进行了切割，且形成了预期的两段蛋白。

为了测试双荧光蛋白结构是否可以实时监测外源刺激扰动对蛋白质稳定性的影响，发明人构建 AXNA1-mEGFP_{fu}-mRFP_f 与 RGS4-mEGFP_{fu}-mRFP_f 细胞系，并检测细胞系对抗癌药物 Bortezomib 的反应，利用 FACS 技术与 western blotting 检测，证明发明人的双荧光系统可以敏感且特异的检测到蛋白质稳定性的变化。见图 1d。

实施例 2. mEGFP-UB_{K0}-mRFP 双荧光蛋白系统检测全基因组范围内蛋白质稳定性

发明人以 human ORFeome V5.1 为目标基因文库，利用 gateway 同源重组技术，将接近 15000 个 ORF 的 C 端融合上 mEGFP-UB_{K0}-mRFP 结构。利用融合有 mEGFP_{fu}-mRFP_f 结构的基因文库，采用慢病毒感染技术感染 293 细胞，构建整合有文库基因的双荧光细胞系。结果见图 6。然后利用 FACS 技术，基于 mEGFP/mRFP 的比值，将文库分选为 8 各区间，提取各个区间细胞基因组，利用 PCR 产物为模板进行体外 cRNA 扩增，然后进行芯片杂交，利用 Bioconductor 程序包 limma 中的 Composite loess normalization 程序进行数据处理，计算每个基因的相对稳定性

参数 PSI (Protein Stability Index)。其流程图见图 2a。蛋白质相对稳定性参数分布范围见图 2b，代表性数据见图 2c，d。图 2d 是图 2c 数据绘制的折线图，反应基因成单峰分布。

5 实施例 3. 利用双荧光细胞文库检测对抗癌药物 bortezomib 在蛋白质稳定性层面响应的候选基因

发明人利用含有 human ORFeome V5.1 基因文库的双荧光细胞文库，分别用 DMSO(对照处理)与 Bortezomib(实验处理)处理文库细胞，然后利用图 2a 所示的流程，分别计算每个文库基因在 DMSO 与 Bortezomib 状态下的 PSI 值，然后求的
10 $\Delta\text{PSI}=\text{PSI}_{\text{BTZ}}-\text{PSI}_{\text{DMSO}}$ ，进而利用 ΔPSI 对所有基因排序，对显著基因进行生物信息学分析。图 3a 为抗癌药物 Bortezomib 的化学结构，图 3c，d 为代表性数据与底物响应蛋白，图 4 为生物信息学分析结果。

实施例 4. ProTA 数据的 CPI 分析指导理性药物联用

15 蛋白质与小化合物的相互作用网络对于理解分子与细胞的功能具有重要的意义。因此，发明人利用 STITCH (search tool for interactions of chemicals)在线数据库，研究了 BTZ 效应蛋白显著性存在相互作用的小化合物，以其探讨 Bortezomib 药物细胞毒性与抗药性产生的细胞学机制。分别用 DMSO(对照处理)与 Bortezomib(实验处理)处理实施例 2 所得的文库细胞，然后利用图 2a 所示的流程，
20 分别计算每个文库基因在 DMSO 与 Bortezomib 状态下的 PSI 值，然后求的 $\Delta\text{PSI}=\text{PSI}_{\text{BTZ}}-\text{PSI}_{\text{DMSO}}$ ，进而利用 ΔPSI 对所有基因排序，对前 250 个击中的基因进行 CPI (化合物-蛋白质相互作用)分析。图 8 为 CPI 分析结果。CPI 分析的结果显示，发明人特异的富集到小化合物 adenosine diph (采用类似物 17-AAG 代替)与 coenzyme A (采用 FASN 抑制剂 C75)。

25 随后，发明人以 CZ-1 与 CZ-1/R 细胞系为验证细胞系，验证了 BTZ 与 17-AAG 或 C75 的药物联用效果，并计算了相互作用参数 CI (Combination index)，即，分析药物 BTZ 与 17-AAG 或者 C75 的相互作用模式，结果如图 9 和 10 所示。其中，图 9 显示 MTT 检测 BTZ 与 17-AAG 或 C75 的药物联用效果，结果显示：BTZ 与 17-AAG 或 C75 的药物联用对 BTZ 敏感细胞系 CZ-1 与 BTZ 抗药性细胞系 CZ-1/R
30 都具有明显的杀伤效果。图 10 显示 BTZ 在 5,10,15,20nM 的浓度下与 17-AAG 具有协同作用，BTZ 在所有测试浓度下与 C75 都具有协同作用。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本
35 领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种遗传构建物，其结构如下式所示：

$$5'-A + B + C + D + E-3',$$

其中，

A 表示启动子；

B 表示由目标蛋白和第一标记蛋白构成的融合蛋白的编码序列；

C 表示连接肽的编码序列；

D 表示第二标记蛋白的编码序列；和

E 表示终止子；

其中，B 和 D 可以互换。

2. 如权利要求 1 所述的遗传构建物，其特征在于，B 中 5'-3'依次包含目标蛋白的编码序列和第一标记蛋白的编码序列。

3. 如权利要求 1 所述的遗传构建物，其特征在于，所述连接肽选自：泛素、泛素截短体、泛素突变体及类泛素、2A 短肽等；优选泛素；最优选 K(R)饱和突变的泛素。

4. 如权利要求 1 所述的遗传构建物，其特征在于，所述第一标记蛋白和第二标记蛋白是荧光蛋白。

5. 如权利要求 1 所述的遗传构建物，其特征在于，所述目标蛋白的编码序列包括人类基因组文库 human ORFeome V5.1 中所有基因。

6. 一种多肽，其结构如下式所示：

$$B1 + C1 + D1,$$

其中，

B1 表示由目标蛋白和第一标记蛋白构成的融合蛋白

C1 表示连接肽；和

D1 表示第二标记蛋白；

其中 B1 和 D1 可以互换。

7. 一种载体，其包含权利要求 1-5 中任一项所述的遗传构建物。

8. 一种细胞，其包含权利要求 1-5 中任一项所述的遗传构建物或权利要求 7 所述的载体。

9. 一种细胞文库，其由权利要求 8 所述的细胞构成。

10. 一种检测一个或多个目标蛋白质稳定性的方法，包括以下步骤：

(1) 构建权利要求 9 所述的细胞文库；

(2) 在所述特定条件下和对照条件下培养(1)所得的细胞文库；

(3) 测定所述特定条件下和对照条件下培养的细胞文库中第一标记蛋白与第二

标记蛋白之比；和

(4) 通过比较所述特定条件下和对照条件下培养的细胞系中第一标记蛋白与第二标记蛋白之比得出目标蛋白质稳定性是否变化的结论；或：

- 5 采用流式细胞仪技术按照第一标记蛋白与第二标记蛋白之比将细胞分成 n 个区间 (n 大于等于 2)，并通过 DNA 芯片技术检测每一区间中目标基因的各自表达量计算出目标基因在各个区间中的分布情况，并将所述特定条件下和对照条件下培养的细胞系中目标基因分布情况进行对比，得出目标基因所编码的蛋白质稳定性是否变化的结论。

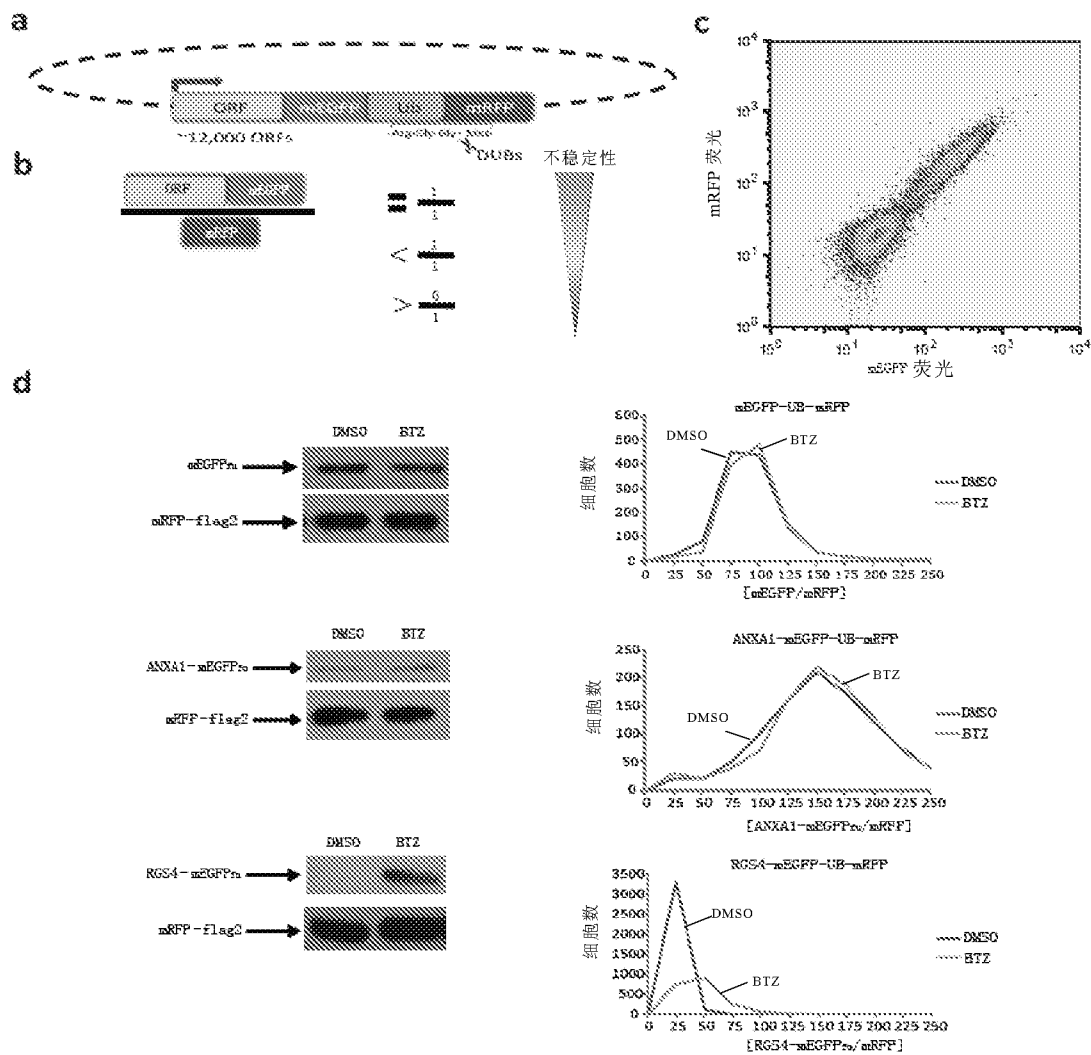
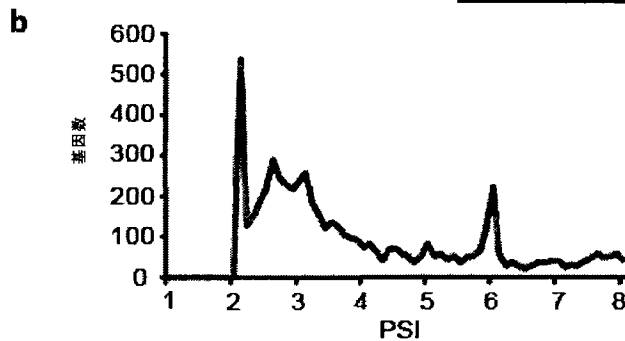
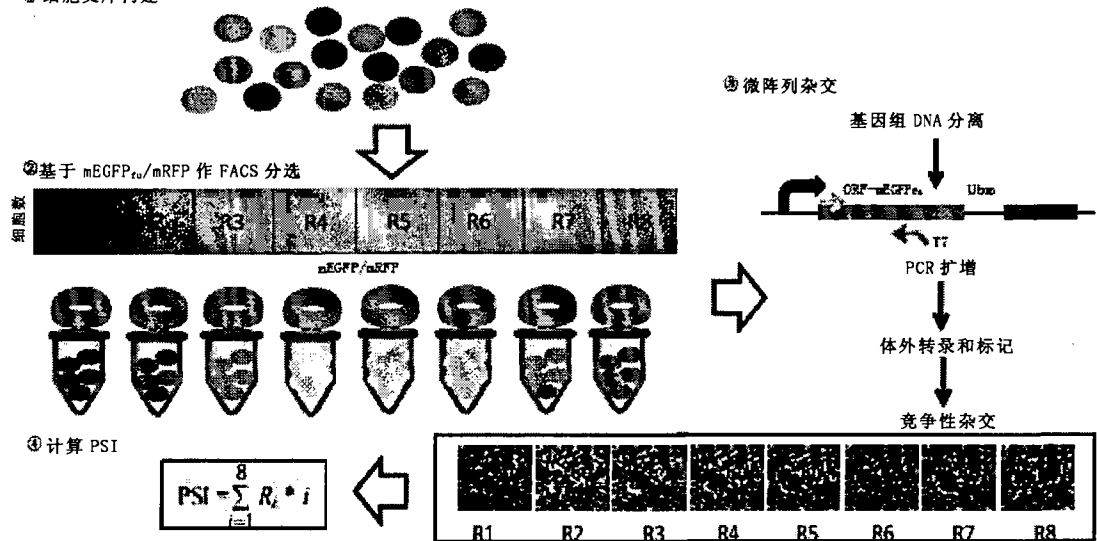


图 1

a ① 细胞文库构建



c

基因 ID	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	SUM	PSI	STDEV
80153	0.67	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.03	1.00	1.51	1.53
285533	0.00	0.79	0.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	2.21	0.42
255101	0.00	0.30	0.41	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	2.99	0.75
5082	0.00	0.00	0.22	0.67	0.00	0.05	0.00	0.06	1.00	4.10	1.13
2760	0.00	0.00	0.03	0.00	0.75	0.15	0.00	0.00	1.00	5.14	0.55
196051	0.00	0.00	0.03	0.00	0.37	0.33	0.00	0.00	1.00	5.53	0.71
440337	0.02	0.04	0.02	0.01	0.01	0.20	0.54	0.03	1.00	6.36	1.12

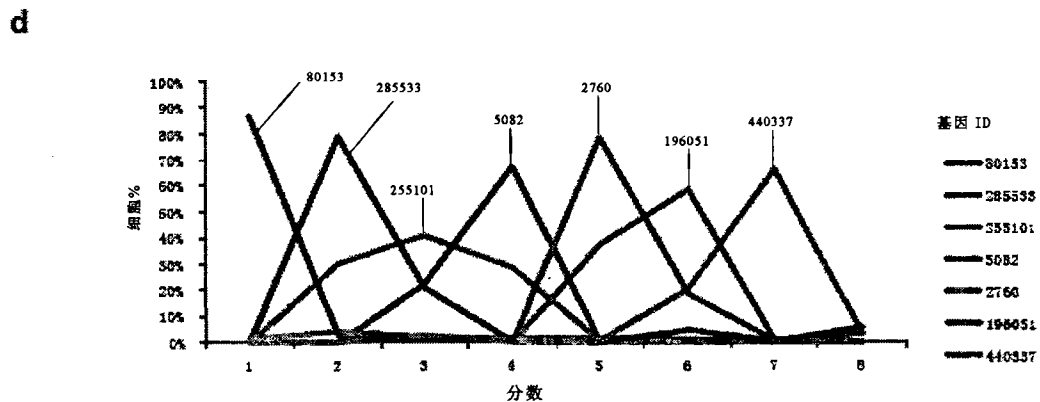
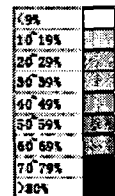
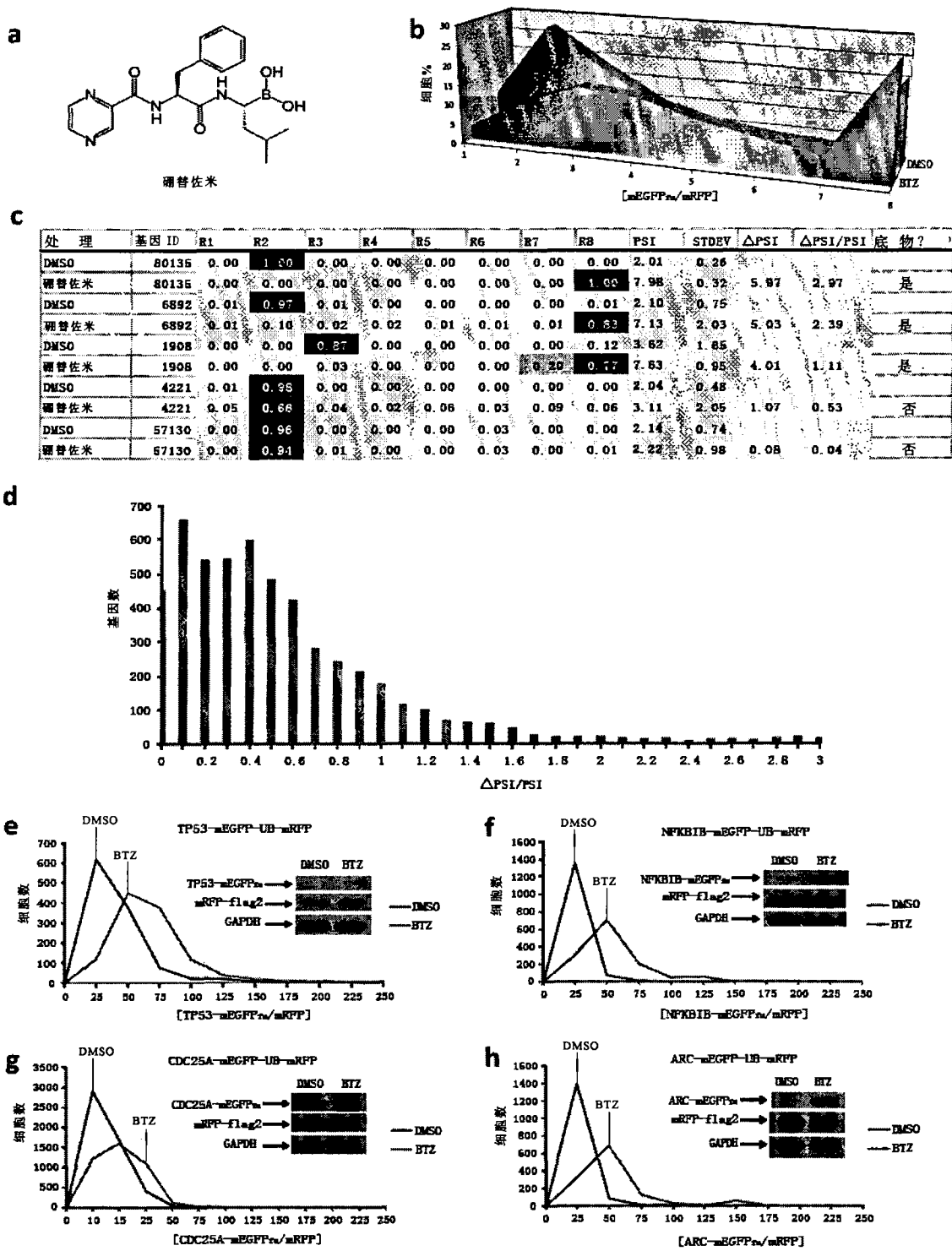


图 2



图

3

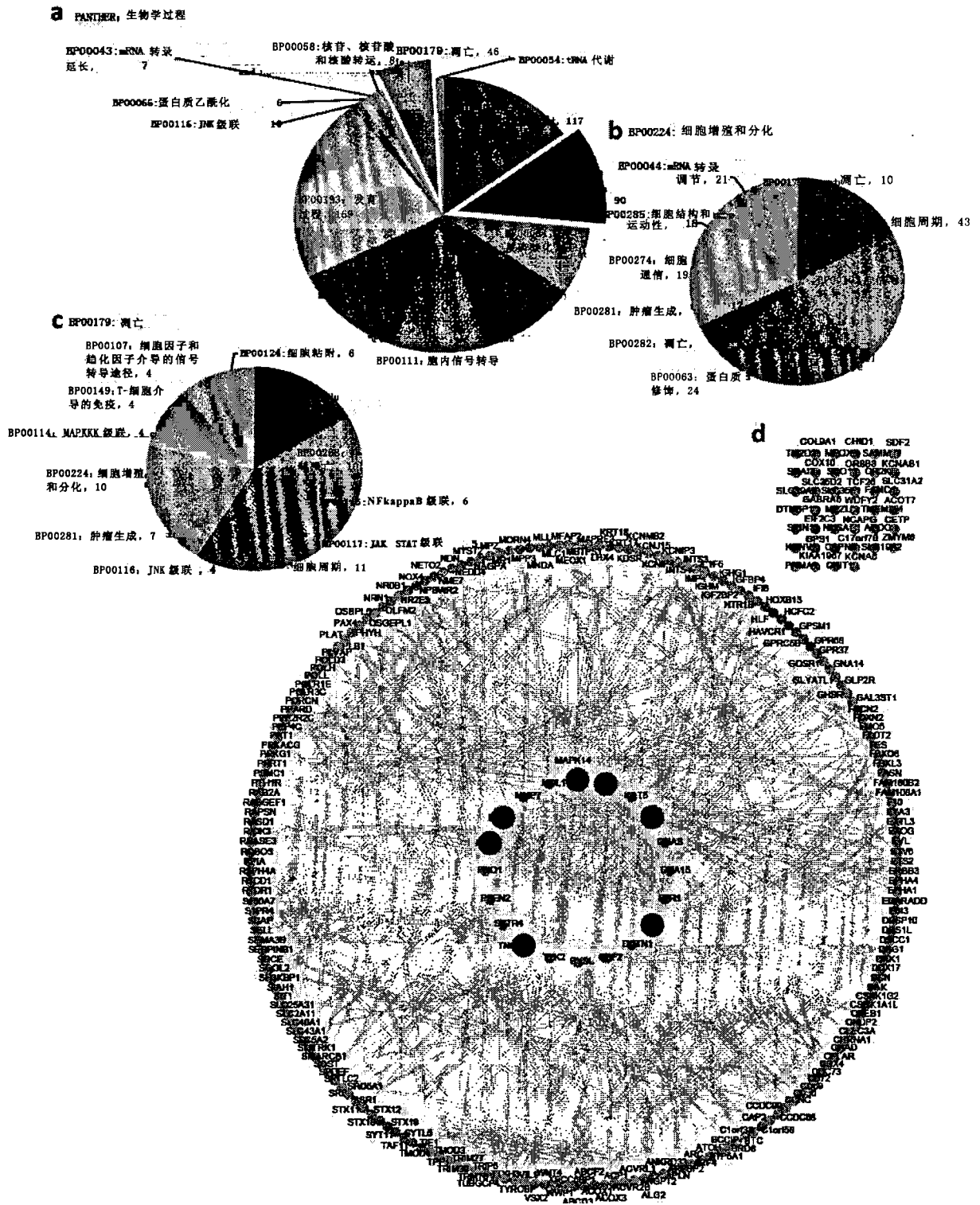


图 4

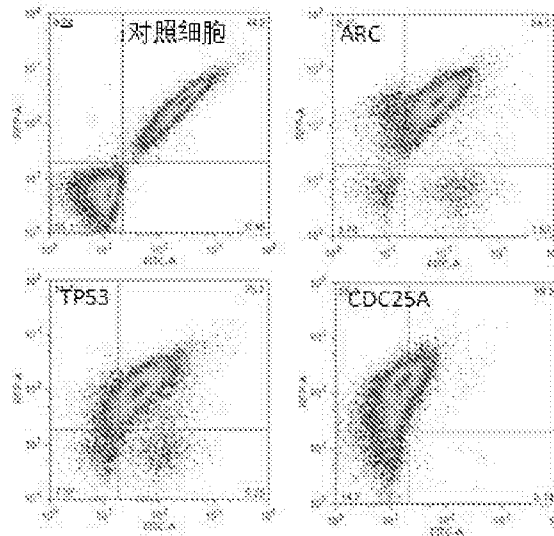


图 5

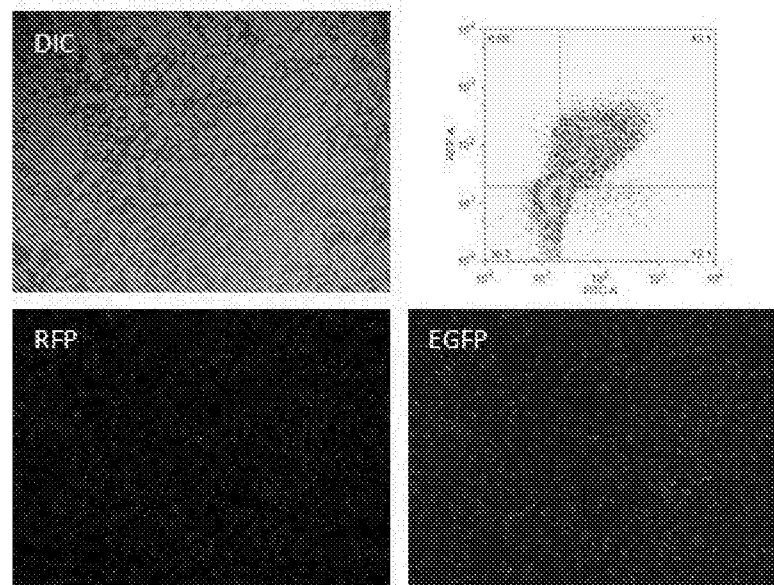


图 6

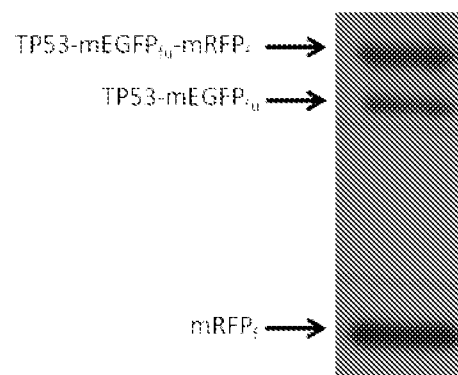


图 7

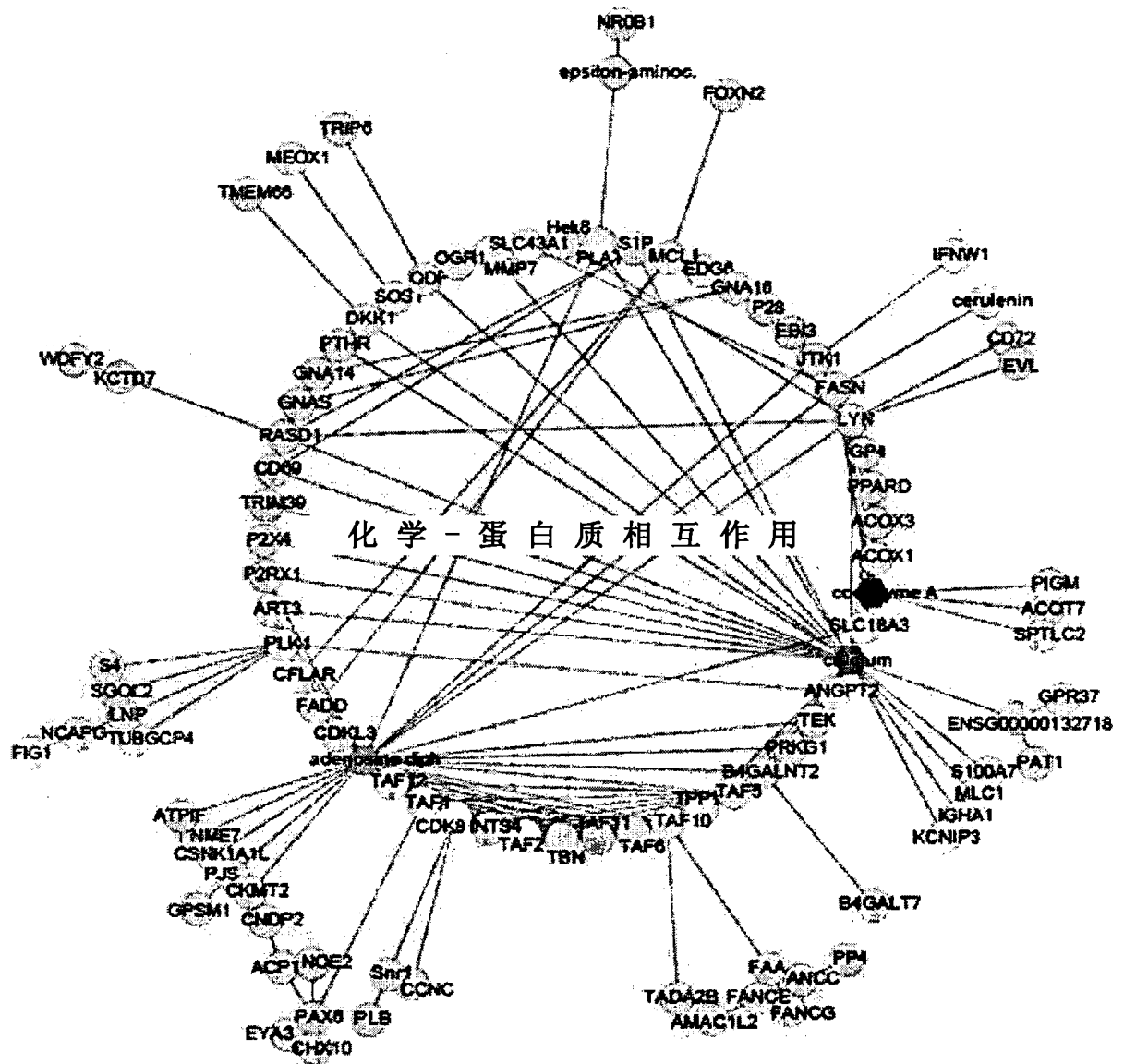


图 8

替换页(细则第26条)

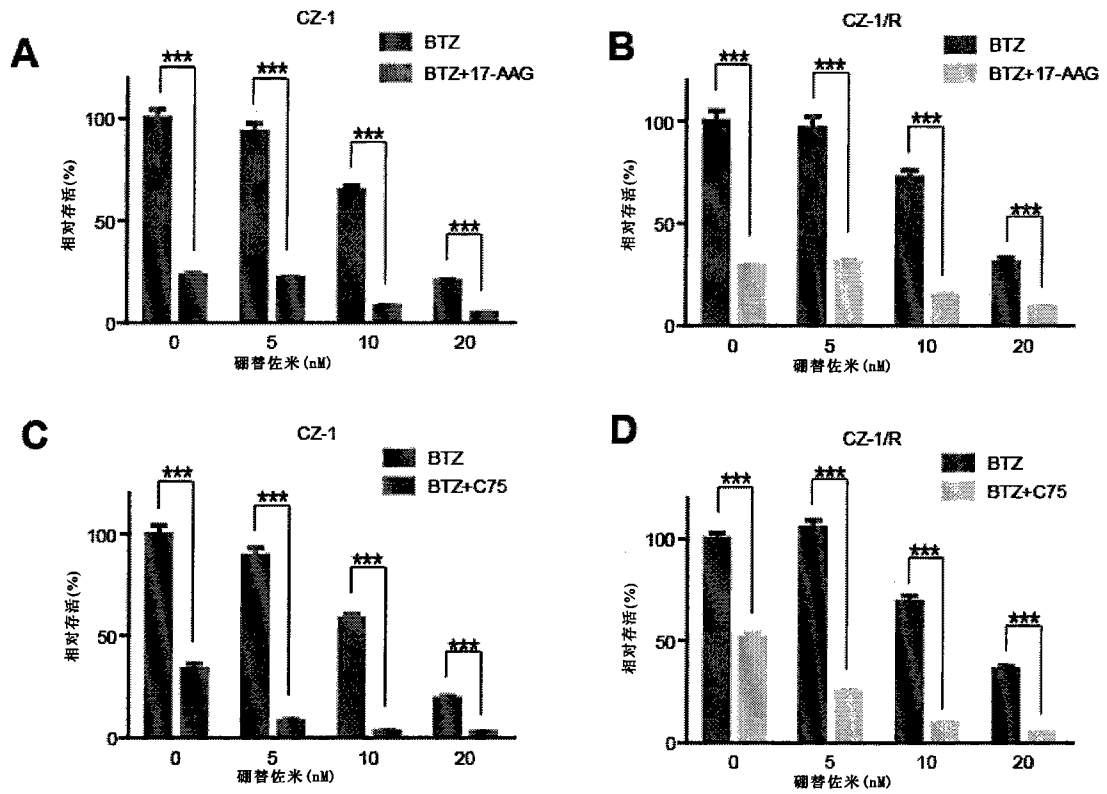
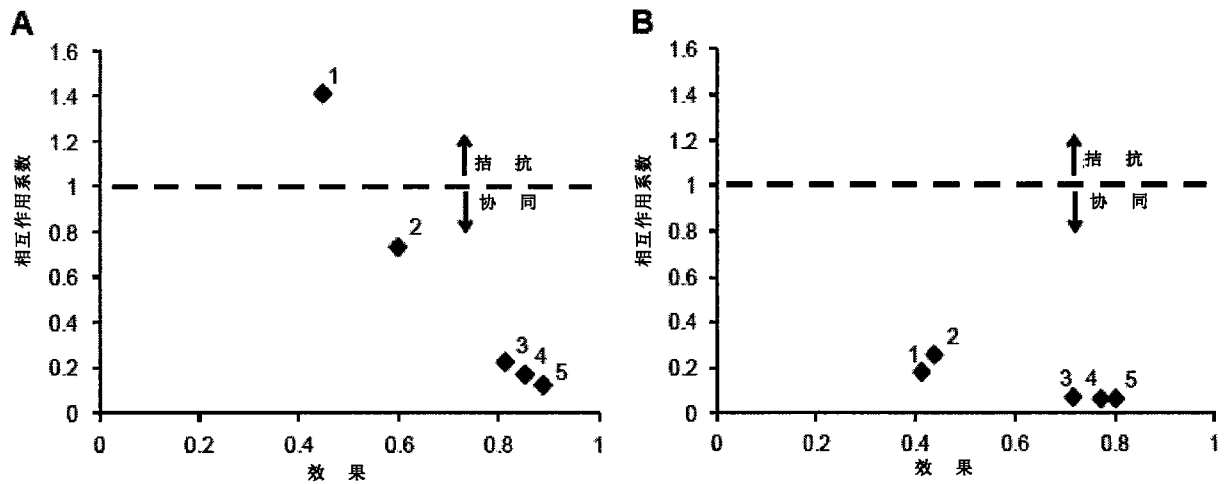


图 9



组	合 (CZ-1)	C75 (ug/ml)	BTZ (nM)	CI	组	合 (CZ-1)	17-AAG (uM)	BTZ (nM)	CI
1		10	1	1.414	1		50	1	0.195
2		10	5	0.732	2		50	5	0.270
3		10	10	0.223	3		50	10	0.084
4		10	15	0.168	4		50	15	0.077
5		10	20	0.121	5		50	20	0.078

图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/075216

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/62 (2006.01) i; C12N 15/65 (2006.01) i; C07K 2/00 (2006.01) i; G01N 21/64 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/-; C07K 2/-; G01N 21/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, Pubmed, ISI web of Knowledge, Elsevier Science Direct, SpringLink, Genbank, EBI, Chinese patent retrieval system of biological sequence: dual, double, multi, label+, report+, fluorescent, degradat+, stabl+, fusion, ubiquitin, cleav+, protease, Forster, resonance energy transfer, FRET, concatenation, enzyme digestion, each sequence, in series

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GANESAN, S. et al. "A dark yellow fluorescent protein (YFP)-based Resonance Energy-Accepting Chromoprotein (REACH) for Forster resonance energy transfer with GFP." PNAS., volume 103, number 11, 14 March 2006 (14.03.2006), pages 4089-4094	1-10
A	CN 1396265 A (THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 12 February 2003 (12.02.2003) the whole document	1-10
A	WO 2004/020458 A2 (RIGEL PHARMACEUTICALS, INC.) 11 March 2004 (11.03.2004) the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 29 June 2014	Date of mailing of the international search report 11 July 2014
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer CHEN, Zhongwei Telephone No. (86-10) 62414108

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/075216

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/075216

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1396265 A	12 February 2003	CN 1254546 C	03 May 2006
		US 7354735 B2	08 April 2008
		US 2004002128 A1	01 January 2004
WO 2004/020458 A2	11 March 2004	AU 2003265859 A1	19 March 2004
		EP 1540015 A2	15 June 2005
		AU 2003265859 A8	03 November 2005
		WO 2004/020458 A3	11 November 2004
		US 2004053324 A1	18 March 2004

A. 主题的分类 C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/65(2006.01)i; C07K 2/00(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N15/-; C07K2/-; G01N21/- 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, Pubmed, ISI web of Knowledge, Elsevier Science Direct, SpringerLink, Genbank, EBI, 中国专利生物序列检索系统: dual, double, multi, label+, report +, fluorescent, degradat+, stabl+, fusion, ubiquitin, cleav+, protease, Forster resonance energy transfer, FRET, 标记, 荧光, 报告, 融合, 双, 两, 串联, 多, 泛素, 酶切, 蛋白酶, 降解, 稳定, 荧光能量共振转移, 各序列		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	GANESAN, S. et al. "A dark yellow fluorescent protein (YFP)-based Resonance Energy-Accepting Chromoprotein (REACH) for Forster resonance energy transfer with GFP." PNAS., 第103卷, 第11期, 2006年 3月 14日 (2006 - 03 - 14), 第4089-4094页	1-10
A	CN 1396265 A (香港科技大学) 2003年 2月 12日 (2003 - 02 - 12) 全文	1-10
A	WO 2004/020458 A2 (RIGEL PHARMACEUTICALS, INC.) 2004年 3月 11日 (2004 - 03 - 11) 全文	1-10
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2014年 6月 29日		2014年 7月 11日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国		陈中伟
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62414108

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐

纸件形式

☒

电子形式

b. (提交时间)

☒

含在申请提交时的国际申请中

☐

以电子形式与国际申请一起提交

☐

为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/075216

检索报告引用的专利文件		公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	1396265A	2003年 2月 12日	CN 1254546C	2006年 5月 03日
			US 7354735B2	2008年 4月 08日
			US 2004002128A1	2004年 1月 01日
WO	2004/020458A2	2004年 3月 11日	AU 2003265859 A1	2004年 3月 19日
			EP 1540015 A2	2005年 6月 15日
			AU 2003265859 A8	2005年 11月 03日
			WO 2004/020458A3	2004年 11月 11日
			US 2004053324 A1	2004年 3月 18日