[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C12Q 1/68

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 96198364.7

[43]公开日 1998年12月16日

[11]公开号 CN 1202206A

[22]申请日 96.11.14

[30]优先权

[32]95.11.16[33]DE[31]19542795.5

[86]国际申请 PCT/DE96/02183 96.11.14

[87]国际公布 WO97/18322 德 97.5.22

[85]进入国家阶段日期 98.5.15

[71]申请人 M·W·达姆

地址 联邦德国布施来格-斯比德林根

[72]发明人 M·W·达姆

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 4 页 说明书 17 页 附图页数 15 页

[54]发明名称 用于定量测定体液中肿瘤细胞的方法和适于此方法的试验试剂盒

[57]摘要

本文公开了在体液中定量分析肿瘤细胞的方法，该方法需要首先用待测样品进行反应，在这一反应中，端粒酶的RNA组分被特异性地扩增，然后定量测定被扩增的核酸的量，本文还公开了适用于该方法的试验试剂盒。

权 利 要 求 书

1.一种在体液中定量分析肿瘤细胞的方法，该方法包括:

(a)用待测样品进行反应，端粒酶的 RNA 组分在这一反应中被特异地扩增，和

(b)定量测定扩增的核酸的量。

2.如权利要求 1 所要求的方法，其中在用待测样品进行扩增反应之前进行反转录反应，包含在样品中的 RNA 在这一反应中被转录成 cDNA 。

3.如权利要求 1 或 2 所要求的方法，其中在 RNA 转录成 cDNA 之前，利用待测样品进行 DNA 酶反应。

4.如权利要求 1 － 3 之任一所要求的方法，其中所说的待测样品是纯化的，优选地是通过离子交换层析，特别是在硅胶上的层析纯化的。

5.如权利要求 1 － 4 之任一所要求的方法，其中，为了定量测定编码端粒酶的核酸，共扩增至少一种（优选地是三种）标准核酸，并以不同的浓度添加到待测样品中。

6.如权利要求 5 所要求的方法，其中共扩增的标准核酸具有图 7， 8 和/或 9 显示的序列。

7.如权利要求 1 － 6 之任一所要求的方法，其中直接定量或通过标记（优选地，通过放射性标记、生物素标记，荧光标记或电化学发光标记）定量扩增产物。

8.如权利要求 1 － 6 之任一所要求的方法，其中通过与标记的寡核苷酸的杂交检测扩增产物，这里所说标记优选地是放射性标记，生物素标记，荧光标记或电化学发光标记。

9.如权利要求 5 － 8 之任一所要求的方法，其中，为了定量待测编码端粒酶的核酸，将共扩增的核酸或核酸的量和编码端粒酶的核酸的量比较。

10.如权利要求 1 － 9 之任一所要求的方法，其中待测样品是外周血，并且其中用待测样品作为阳性对照进行反应，在这一反应中，出现在外周血中的核酸（优选地是编码β － 珠蛋白或甘油醛磷酸脱氢酶的

mRNA）被特异地扩增和检测。

11.如权利要求 1 或 3 - 10 之任一所要求的方法，其中，作为阴性对照，在用待测样品进行扩增反应之前，无反转录反应进行和/或用水替代体液。

12.如权利要求 1 - 11 之任一所要求的方法，其中将下面的寡核苷酸引物用于扩增:

5′ GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3′（TM1）和/或

5′ CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3′（TM2）

其中 TM1 和/或 TM2 在合适时包含 RNA 聚合酶的启动子序列。

13.如权利要求 1 - 12 之任一所要求的方法，其中将 DNA 聚合酶或 RNA 聚合酶用于扩增。

14.如权利要求 1 - 13 之任一所要求的方法，其中，就使用 DNA 聚合酶的扩增来说，进行聚合酶链反应（PCR）；就使用 RNA 聚合酶来说，进行等温的基于核酸序列的扩增反应（NASBA）。

15.如权利要求 1 - 14 之任一所要求的方法，其中待测的样品是血液，并且其中待测血样在干细胞和/或激活的免疫细胞中被排除，优选地通过免疫吸附排除。

16.如权利要求 1 - 15 之任一所要求的方法，其中待测样品是血液，并且来自待测血样的肿瘤细胞被浓缩，优选地，通过免疫吸附浓缩。

17.如权利要求 1 - 16 之任一所要求的方法，其中待测样品是血液，并且，一方面用所说的方法测定静脉血样，另一方面用所说的方法测定动脉血样，然后比较两者的结果。

18.如权利要求 1 - 17 之任一所要求的方法，其中待测样品是血液，并且，一方面用所说的方法测定指垫血样，另一方面用所说的方法测定静脉或动脉血样，然后比较两者的结果。

19.如权利要求 1 - 18 之任一所要求的方法，其中所说的肿瘤细胞来源于恶性肿瘤的转移，优选地是微转移。

20.如权利要求 1 - 19 之任一所要求的方法，其中所说的肿瘤细胞选自来自 T - 细胞淋巴母细胞、T - 细胞白血病细胞、慢性骨髓白血病

细胞、急性淋巴白血病细胞、慢性淋巴白血病细胞的转移肿瘤和/或瘤，畸胎癌、黑素瘤、肺瘤、大肠癌、胸癌、肝细胞癌、肾肿瘤、肾上腺肿瘤、前列腺癌、成神经细胞癌、脑神经瘤、肺小细胞瘤、弹状肌瘤，平滑肌肉瘤和/或淋巴瘤的细胞。

21.一种寡核苷酸引物，其具有序列:

5′ GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3′(TM1)

5′ CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3′(TM1)

5′ ATAAGAATGC GGCCGCGGGT TGCGGAGGGT GGGCCTGGGA GGG3′(TMK1)

5′ CCCAAGCTTG TGGGGGTTAT ATCCTA 3′(TMK2)

5′ CGCGGATCCA CTTAGGTCAT CGATCTGCCA ATTTGCAGCA CACT3′(TMK3); 和/或

5′ CGCGGATCCG ACTTGG TACC ATGAATGGGC AGTGAGCCGG 3′(TMK4)

22.一种寡核苷酸，其具有序列:

5′ CCATCGATTC CCGTCGCCAA ATCGAGCGGG TACCCC 3′ (Kb)

3′ GGTAGCTAAG GGCAGCGGTT TAGCTCGCCC ATGGGG 5′，和/或

5′ CCATCGATCG TCCAATCGCT ATACTCTCGG TACCCC 3′(Kc)

3′ GGTAGCTAGC AGGTTAGCGA TATGAGAGCC ATGGGG 5′

23.一种用于与图7、8及9所示的序列及其相应的cDNA共扩增的标准核酸。

24.一种如图5a和5b所示的核酸构建体pGEM-hTR。

25.一种如图6a和6b所示的核酸构建体pGEM-hTR(Ka)。

26.一种用于在体液中定量测定肿瘤细胞的试剂盒，其包含:

(a)用于共扩增的标准核酸，和

(b)一种用于特异性扩增编码端粒酶的核酸和在(a)中限定的核酸的

寡核苷酸引物对。

27.如权利要求 26 所要求的试剂盒，其中，在(a)中限定的标准核酸具有如图 7、8 和/或 9 所示的序列。

28.如权利要求 26 或 27 所要求的试剂盒，其中，在(b)中限定的寡核苷酸引物对具有下列序列:

5′ GACT CGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3′ (TM1)和

5′ CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3′ (TM2)

其中 TM1 和/或 TM2 在合适时包含 RNA 聚合酶的启动子序列。

29.如权利要求 26 - 28 之任一所要求的试剂盒，该试剂盒还包含用于检测待测样品的扩增的核酸的标记的寡核苷酸和/或用于检测共扩增的标准核酸的一个或多个标记的寡核苷酸，特别是具有以下序列的寡核苷酸:

5′ CGACTTTGGA GGTGCCTTCA 3′ O(Wt)

5′ AAGTCGGATC CACTTAGGTC 3′ O(Ka)

5′ CGCTCGATTT GGCGACGGGA 3′ O(Kb)

5′ GAGAGTATAG CGATTGGACG 3′ O(Kc)

和其相应的反向互补序列。

30.如权利要求 26 - 29 之任一所要求的试剂盒，该试剂盒还包含反转录酶、DNA 聚合酶（优选的是 Taq 聚合酶），DNA 酶和/或合适的缓冲液和（在适当时的）标记的核苷酸以及（在适当时的）适于排除干细胞和/或激活的免疫细胞和/或适于浓缩肿瘤细胞的方法。

31.如权利要求 26 - 29 之任一所要求的试剂盒，该试剂盒还包含反转录酶，RNA 聚合酶（优选的是 T7RNA 聚合酶）、RNA 酶 H、DNA 酶和/或合适的缓冲液和（在适当时的）标记的核苷酸，以及（在适当时的）适于排除干细胞和/或激活的免疫细胞和/或适于浓缩肿瘤细胞的方法。

说　　明　　书

用于定量测定体液中肿瘤细胞的方法和适于此方法的试验试剂盒

本发明涉及用于定量测定体液中肿瘤细胞的方法，在这种方法中，首先用待测样品进行反应，在这一反应中端粒酶的 RNA 组分被特异地扩增，随后定量测定被扩增的核酸的量；本发明还涉及适于此方法的试验试剂盒。

实际上，所有实体恶性肿瘤都有形成转移的潜在趋势。这种转移过程包括恶性细胞的微转移扩散（它通常通过血液或淋巴到达远处的器官）以及自身次级肿瘤的发展。转移的程度决定了癌形成的征兆。

肿瘤预防及治疗方案需要早期诊断原发性肿瘤、复发或转移，甚至在转移前使得在临床上是明显的。这一目的还不能满足可利用的仪器技术的需要；特别是，在器官中循环肿瘤细胞和转移初始信息之间有一条诊断灰带。循环恶性肿瘤细胞（例如正在经受肿瘤治疗的病人外周血液中的）的早期诊断，使得使用免疫疗法及多化学疗法成为可能，这在早期可能是有疗效的，也就是说即使在器官转移之前也是明显的。在治疗前和治疗后，外周血中的转移的定量分析提供了对这种症状的重要的对照。

例如， GB2260811 提出了一种检测恶性肿瘤的诊断方法，这种恶性肿瘤与特定身体组织的正常细胞相关联，这种组织的正常细胞形成至少一种对这一组织特异性的基因产物。在这种检测方法中，健康人的体液（例如血液）通常不产生这种细胞，从病人取得血液，扩增和检测所说特定基因产物的 mRNA 。提到的一个例子是在外周血液中检测黑素瘤细胞的酪氨酸酶。然而，这种方法的不利处在于，它与组织特异性基因产物相联系，使得不能定量测定黑素瘤细胞，进而给出假阳性结果。

Kim 等描述了一种测定的结果，运用该结果在肿瘤组织中确定端粒酶活性是可能的[Kim 等(1994), 科学 266： 2011]。这种端粒酶活性以约 1 个无限增殖细胞/104 个正常细胞的敏感性在 98 % 的癌细胞培养物和

90/101 的恶性肿瘤中以及在胚组织中检测到，但是，在 22 个正常体细胞培养物中却没能检测到。

端粒酶是最新报道的具有反转录酶活性的核糖核蛋白 [Shippen-Lentz 等(1990), 科学 247： 546]，这种蛋白以整合的 RNA 序列作为模板来独立地进行 DNA 合成[Greider 等(1989), 自然 337： 331]，由此在染色体末端合成新的端粒 DNA。端粒由高度保守的（ TTAGGG)n（长度约为 5 - 15 千个碱基(kb)/细胞基因组的串联序列）组成，端粒具有在核膜上稳定染色体和保护编码基因组 DNA 不受到无限制地重组和降解的任务[Mehle 等(1994),癌研究 54： 236[。而低等真核生物要求在缩短染色体末端与通过端粒酶从头合成端粒序列之间保持动力学平衡，而正常的人类体细胞表现出低的或不能被检测的端粒酶活性。另外，与其它 DNA 酶相比，端粒酶没有生长调节功能，因为没有有效的增殖细胞培养物显示出可检测的端粒酶活性。只有胚细胞和几乎所有肿瘤细胞系[Ohyashiki 等(1994), Cancer Genet Cytogenet 78： 64; Rogalla 等(1994) Cancer Genet Cytogenet 77： 19; Schwartz 等(1995), 癌 75： 1094]和癌组织(肺, [Hiyama 等(1995)癌基因 10： 937； Shirotani 等(1994), 肺癌 11： 29]; 肾[Mehle 等(1994), 癌研究 54： 236]; 卵巢[Chadeneau 等(1995), 癌研究 55： 2533]和血液[Counter 等(1995), 血液 85： 2315]显示出可测量的端粒酶活性和恒定的端粒长度，并且经过无穷多次细胞分裂后仍保持不变。此外，端粒酶的激活与端粒长度的稳定性相关，因此它在体细胞无限增殖化的方向上被认为是关键性步骤。

Feng 等能够克隆出人类端粒酶(hTR)整合 RNA 序列，这段序列编码在染色体 3 的远侧区段（ q)上。通过竞争性的聚合酶链反应（ PCR ），作者能够证实，与正常体细胞相比，在肿瘤组织和胚组织中，端粒酶的表达有很大的提高。[Feng 等(1995), 科学 269： 1236]。hTR 序列的反义构建体在转染的 Hela 细胞中导致细胞死亡（编程性细胞死亡）。这些数据证实了在体组织中端粒酶的应急表达，以及恶性生长依靠无限增殖细胞的存在和端粒酶的激活这一事实。

因而，本发明的目的是开发一种使定量测定体液中的肿瘤细胞成为可能的方法。

因此，本发明涉及定量测定体液中肿瘤细胞的方法，其中第一步反应是用待测样品进行的，在这一步反应中，端粒酶的 RNA 组分被特异地扩增，随后，定量测定被扩增的核酸的量；本发明还涉及适用于此方法的试剂盒。对本发明的目的而言，体液指例如，血液，尿或者粪便，溢泌物及体腔溢出物，特别是外周血。

例如，外周血通过刺穿动脉、静脉或指垫从受治疗者取得，它被转移到 RNA 降解缓冲液中，这种缓冲液包括如尿素或更优选的异硫氰酸胍（为了变性各种现存的 RNA 酶和从细胞中释放出的核酸）[参见，例如，Chomczynski 等(1987), 分析生物化学 162， 156]，这种核酸能从 RNA 降解缓冲液的强盐介质中分离出来，例如通过二氧化硅颗粒，所有的核酸都能够结合于其上[Boom 等(1990), J. Clin Microbiol. 29, 495]。因此，用合适的缓冲液多次洗涤这些二氧化硅颗粒，结合核酸就被洗脱下来。所以，在合适的缓冲液中，用无 RNA 酶的 DNA 酶水解各种存在于样品中的基因组 DNA 是有利的，以致于没有假阳性结果或由于过量的背景噪音而出现的不真实的扩增信号，因为在后面端粒酶的 RNA 组分的扩增中， DNA 可能仍然存在。一般情况下，随后是 DNA 酶的失活，例如，通过苯酚抽提和/或热变性。在用 DNA 酶处理样品前，或者优选地在处理后，进一步纯化存在于样品中的 RNA （例如，通过层析法(如离子交换层析)，优选地是在硅胶上的层析）是可能和有利的。

为了检查可能干扰的 DNA 是否仍存在于样品中，利用下文描述的端粒酶特异性寡核苷酸引物进行扩增反应是可能的，在这种情况下，样品中现存的 RNA 不能通过事先的反转录反应转录成 cDNA 。只有在样品中无端粒酶特异性 DNA 的情况下确实没有扩增发生，其结果是没有扩增的 DNA 可以测量到。

接着样品中现存的 RNA 转录成 cDNA ，一般利用反转录反应，例如，用 AMV 反转录酶。这种方法一般是已知的并且在，例如 Sambrook 等，分子克隆: 实验室手册，纽约 · 冷泉港出版社， 1989 中有描述。在一种反转录的优选的实施方案中，使用一种在 WO 90/07641 描述的热稳定的依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶是可能的。适合于反转录酶的多核苷酸引物是例如下文描述的有用的多核苷酸引物以及具有特定长度的随机引

物。

例如，可以利用如 DNA 聚合酶通过聚合酶链反应（ PCR ）进行随后的扩增[参见，例如，美国专利 4,683,195; 4,683,202; 4,965,188]或者，优选地，利用 RNA 聚合酶，如通过等温的基于核酸序列的扩增（ NASBA ）来进行。特异多核苷酸引物来源于待扩增的核酸，这种引物是每种情况下的扩增所需的。在本发明中使用各种用于合成寡核苷酸引物的端粒酶 RNA 组分的序列片段都是可能的，这种寡核苷酸引物优选的长度约 20 到约 30 个核苷酸，更优选地，约 20 到 25 个核苷酸。一般地，扩增产物长约 100 到约 2000 个碱基，更优选地，长约 200 到约 1500 个碱基，特别是长约 300 到 350 个碱基。对所述的新方法而言，下面的寡核苷酸引物（来源于图 1 的序列）是特别优选的:

5′ GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3′（ TM1 ），和/或

5 ′ CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3 ′（ TM2 ）。

其中 TM1 和/或 TM2（合适时）还可以包含 RNA 聚合酶的启动子序列。寡核苷酸引物 TM1 相应于 5′ 引物， TM2 相应于 3′ 引物。扩增产物长为 327bp 。这种引物可用例如三酯法合成制备[Matteucci 等(1981), 美国化学会杂志 103, 3185-3191]。能被使用的 DNA 聚合酶是例如，象 T4DNA 聚合酶、 TTDNA 聚合酶、大肠杆菌聚合酶 I 及大肠杆菌 Klenow 片段这类非热稳定 DNA 聚合酶和诸如 Taq 聚合酶之类的热稳定聚合酶（参见，例如，美国专利 4,889,818 ）。

PCR 的一般原理包括，在几个重复的反应循环中，热变性 DNA 和在合适的具有相反取向的寡核苷酸引物存在下使用 DNA 聚合酶使单链恢复成双链。然后重复这种循环，直到形成用于下文描述的一种定量方法的足够的 DNA 为止。一般来说，大约 20 到约 40 个循环，优选地约 30 到约 35 个循环就足够了。

在 NASBA 方法（也叫 3SR 系统）中，至少使用一个寡核苷酸引物，优选地是 TM2 ；其包含 RNA 聚合酶启动子，优选地， T7RNA 聚合酶的引物[参见，例如， Guatelli 等(1990), 美国国家科学院院报， 87,

1874-1878 或者 Kievits 等(1991), J. Virol, Methods, 35, 273-286]。首先，如前文已经详细描述过的，借助于一个前文描述过的寡核苷酸引物和一种反转录酶（优选地是 AMV 反转录酶），将 RNA 反转录成 cDNA。反应产物为一条 RNA: DNA 双链，然后用 RNA 酶（优选地， RNA 酶 H）降解其 RNA 组分，得到一条 DNA 单链。使用了一个前文描述的寡聚核苷酸引物，用 DNA 聚合酶将这条 DNA 单链补成 DNA 双链。 AMV 反转录酶又一次成为合适的优选的 DNA 聚合酶，因为这种转录酶不仅有依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶活性，而且还有依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶活性。反应产物是包括如 T7RNA 聚合酶启动子的 DNA 双链。然后这种 RNA 聚合酶又一次合成一条“反义” RNA 链，这样，循环可以重新开始。一般地，大约 20 到 40 个循环（优选地约 30 到约 35 个循环）就足够提供充足的用于接下来的定量的扩增产物（优选地是“反义” RNA）。

例如，在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶中，通过用溴化乙锭染色，可以直接检测和确定这些扩增产物的量。然而在扩增期间，对于已经标记的扩增产物来说是有利的，因为这获得了更高的敏感性。合适的标记的例子有放射性标记、生物素标记、荧光的及电化学发光标记。一般说来，这些标记物被用作由 DNA 或者 RNA 聚合酶扩增的起始物质的核苷酸携带。放射性标记的扩增产物（例如 PCR 或 NASBA 产物）能够通过测量放射性检测，生物素标记的扩增产物能够通过携带亲和素或链霉亲和素的染料检测，荧光标记的扩增产物能够通过荧光计检测，而电化学发光标记的扩增产物能够通过 ECL 检测器检测。然而，最优选的检测方法是在体外与互补于扩增产物的事先标记的寡核苷酸进行杂交。寡核苷酸一般携带前文所述的标记，并且与 NASBA 扩增方法有关，杂交探针携带有电化学发光标记，优选地是， tris〔2，2－二吡啶〕钌[II]复合标记〔参见，例如， Van Gemen 等(1994), J. Virol. Methods, 49, 157-168〕。

一个或多个已知的核酸（标准核酸）的限定量的共扩增能够有利地实现扩增产物既精确又灵敏的定量[参见，例如， van Gemen 等(1993), 病毒学方法杂志,43, 177-188]。在这种情况下，向未知量的待测样品中以例如稀释系列形式加入不同但确切已知量的共扩增标准核酸，在独立的混合物中定量测定样品扩增产物和一个或多个共扩增标准核酸。测量结

果的比较能够揭示出样品中被测定的端粒酶 RNA 组分的量。

当待测样品和扩增产物也有本质上相同的长度时，用同样的寡核苷酸引物扩增共扩增的标准核酸是有利的。特别优选地是共扩增核酸具有与待测样品的扩增产物相同的序列（除在寡核苷酸引物结合位点之间的大约 20 个核酸外）其具有任意的但却是已知的序列。因此，在共扩增的扩增产物样品中，独立地定量待测扩增产物是可能的，例如通过详细描述的使用合适的互补标记寡核苷酸进行杂交，如 Sambrook 等（上述）。

如果多个（优选地为 3 个）不同共扩增核酸以不同浓度加到样品中，那将是特别有利的，因为这使减少个体扩增反应（本可能发生）的数目成为可能[参见 Van Gemen 等(1994), 病毒学方法杂志 49, 157-168]。把共扩增核酸加到前文所述的 RNA 降解缓冲液也是特别优选的，因为在随后的样品的病情检查中，排除可能的核酸损耗是可能的。

本发明中，合适而有利的共扩增标准核酸是来自从构建体体外转录的 RNA 单链序列，例如利用 Sp6 或 T7 RNA 聚合酶，所说的构建体包含待测样品的 DNA 或 cDNA 并且在任何情况下都提供约 10 到约 30 个（优选地， 20 个）核苷酸的序列的随机交换。

构建体优选地由一个转录载体组成，这个转录载体在“多克隆位点”之间有供 Sp6 或 T7 RNA 聚合酶的结合位点，在“多克隆位点”上，扩增样品的 DNA 或 cDNA 被克隆。克隆序列能被限制性内切酶的选择性水解打开，优选地是被两种不同的限制性内切酶打开；并且，限定长度的片段能被切除或被等长的片段置换（例如，使用 T4 连接酶）。克隆片段可以包括各种长度序列的置换，例如从大约 10 到约 30 个，更优选地约 20 个核酸；这些克隆片段优选地定位在寡核苷酸引物结合位点。为了在同一位点插入另外的核酸序列可以重复这一步骤。如果没有找到合适的切割位点，如因为也切割了载体，那么产生人工切割位点是必要的。这一点能够发生，例如通过本质上如 Higuchi 等描述的[Higuchi, R(1988). 核酸研究 16： 7351 - 7367; Higuchi, R. (1990). M. Innis A 等 eds. 圣地亚哥，纽约，柏林，波士顿，伦敦，悉尼，东京，多伦多， Academic Press, Inc. 177-183]和在本发明的实验部分描述的重组 PCR 。

为了本发明的目的优先使用的序列是构建体的体外转录的 RNA 单

链序列，所述构建体

a)包含人类端粒酶 RNA 组分的全部 cDNA 和

b)其中已引入了约 20 个核苷酸的序列的随机交换。

这些构建体来源于图 5a 和 5b 显示的构建体 pGEM-hTR 和图 6a 和 6b 显示的构建体 pGEM-hTR(Ka)。

通过具有 Sp6 RNA 聚合酶的构建体的体外转录来制备标准的 RNA 核酸是可能的，这些标准 RNA 核酸各自长为 975 个碱基对，并且有序列 hTRKa（示于图 7）hTRKb（示于图 8）、htRKc（示于图 9）。

标准核酸在随机序列上不同于野生型 RNA，本例中的随机序列被定位在位置 591 - 610（见图 5a），它的长度为 20 碱基对。

因为在这个例子中仅仅在长为 20 个碱基对的随机和已知序列上标准核酸相互不同和与野生型序列不同，所以可以通过在四种分离的混合物中标记的寡核苷酸的互补结合检测标准核酸和野生型序列的扩增产物。通过本发明，特别适合端粒酶 RNA 组分(wt)和标准核酸(hTRKa)、(hTRKb)及(hTRKc)的扩增 cDNA 的特异性检测的寡核苷酸具有以下的序列（这些序列来源于图 7 - 9 显示的序列）：

5′ C GACTTTGGA GGTGCCTTCA 3′ O（Wt）

5′ A AGTCGGATC CACTTAGGTC 3′ O（Ka）

5′ CGCTCGATTT GGCGAGGGA 3′ O（Kb）

5′ GAGAGTATAG CGATTGGACG 3′ O（Kc）

相应的反向互补序列被用于检测扩增的“反义” RNA。

在这之后，测定野生型和标准核酸的各自扩增的量。通过比较标准核酸（起始数量是已知的）的不同扩增数量来计算野生型序列的未知起始数量（例如 hTRKa:10^2, hTRKb: 10^4 和 hTRKc:10^6 分子）。于是，从这推断出移去的体液的转移的数量是可能的。

正如所述方法和待测样品的内部阳性对照一样，额外地扩增和检测核酸（一般总在体液中产生）是可能的。合适核酸的例子是编码β - 珠蛋白或甘油醛磷酸脱氢酶（GAPDH）的 mRNA（参见，例如，GB2 260811），它们总在体液细胞中出现。例如，对于人类β - 珠蛋白 mRNA，合适的寡核苷酸具有序列：5′ ACCCAGAGGT TCTTTGA GTC 3′

和5′ TCTGATAGGC AGCCTGCACT 3′，其中寡核苷酸引物在合适时还可以包含RNA聚合酶的启动子序列。

为了避免或减少假阳性结果或所谓的背景噪音（这些背景噪音由可能在非肿瘤细胞中存在的端粒酶活性引起），因而，在新测定之前纯化取得的体液是有益的。具体地说，意图是在待测样品中排除干细胞和/或激活的免疫细胞，以及浓缩肿瘤细胞。因为一般说来，个体细胞有特异性表面标记，所以通过免疫吸附进行细胞的排除和浓缩是特别有用的。合适方法的例子是磁体（ MACS ）或荧光激活细胞分选（ FACS ）[参见，例如， Gottlinger 和 Radbruch (1993) mta. 8, 530-536, No.5]. 因而，例如，造血干细胞能够通过它们的CD34表面标记利用MACS方法从血样中除去[Kato 和 Radruch (1993)细胞计量术， 14,384-392]. 例如， B细胞能够通过它们的CD10， CD19和/或CD20表面标记除去；T细胞能够通过CD45RA和/或CD7表面标记除去。肿瘤细胞能够通过它们的特异性肿瘤标记（例如CEA）浓缩。除了MACS和FACS之外，对于恰当细胞的排除或浓缩，也特别合适的是抗特异表面标记的抗体，其是特别地结合到市售的磁珠（例如动珠450， Dynal公司）上的。

因为为了肿瘤细胞测定目的，与100％的动脉血样中细胞相比，测定仅约20％的静脉血样中的所有细胞是可能的，所以单独或组合前文所述的纯化方法以比较静脉血与动脉血的端粒酶 RNA 组分的量也是特别有益的[Koop, S.等 (1995), 癌研究 55, 2520-2523]。它同样地适用于比较指垫的血与静脉或动脉的血。

样品中端粒酶RNA组分的定量测定使测定恶性肿瘤的肿瘤细胞(尤其是转移，特别是微转移的）是否在体液中存在和在数量上有多大成为可能。这对早期临床诊断恶性肿瘤转移的形成和监测肿瘤治疗具有特别重要的用途。能用本发明检测的肿瘤细胞特别是来自转移（优选的是微转移）的肿瘤细胞及来自恶性肿瘤的肿瘤细胞，尤其是来自例如T－细胞淋巴母细胞、 T－细胞白血病细胞、慢性骨髓白血病细胞、急性淋巴白血病细胞和慢性淋巴白血病细胞转移肿瘤和/或癌，畸胎癌，黑素瘤，肺瘤，大肠癌，胸癌，肝细胞癌，肾肿瘤，肾上腺肿瘤，前列腺癌，成神经细胞瘤，脑肿瘤，肺小细胞瘤，弹状肌瘤，平滑肌肉瘤和/或淋巴瘤

的细胞。

本发明进一步涉及具有以下序列的寡核苷酸引物:

5′ GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3′ （TM1），

5′ CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3′（TM2），

5′ ATAAGAATGC GGCCGCGGGT TGCGGAG GGTGGGCC TGGGA GGG3′（TMK1）

5′ CCCAAGCTTG TGGGGGTTAT ATCCTA 3′（TMK2）

5′ CGCGGATCCA CTTAGGTCAT CGATCTGCCAATTTGC AGCA CACT 3′(TMK3)

和/或 5′ CGCGGATCCGAC TTGGTACC ATGAATGGGCAG TGAGCCGG3′（TMK4）

其中 TM1 和/或 TM2 在合适时还包含 RNA 聚合酶的启动子序列;

本发明还涉及具有下列序列的寡核苷酸:

5′ CCATCGATTC CCGTCGCCAA ATCGAGCGGG TACCCC 3′（Kb）

3′ GGTAGCTAAG GGCAGCGGTT TAGCTCGCCC ATGGGG5′ 或

5′ CCATCGATCG TCCAATCGCT ATACTCTCGG TACCCC 3′(Kc)

3′ GGTAGCTAGC AGGTTAGCGA TATGHGAGCC ATGGGG5′；

和图 5a 和 5b 所显示的核酸构建体 pGEM-hTR 或图 6a 和 6b 所显示的核酸构建体 pGEM-hTR(Ka); 具有下列序列的共扩增标准 RNA 核酸; 图 7 显示的(hTRKa), 图 8 显示的(hTRKb), 图 9 显示的(hTRKc)和它们的 cDNA；用于检测野生型核酸和 hTRKa, hTRKb 及 hTRKc 标准核酸的 cDNA 的扩增的 cDNA 的寡核苷酸，其具有下列序列:

5′ CGACTTTGGA GGTGCCTTCA 3′ O(wt)

5′ AAGTCGGATC CACTTAGGTC 3′ O(Ka)

5′ CGCTCGATTT GGCGACGGGA 3′ O(Kb)

5′ GAGAGTATAG CGATTGGACG3′ O(Kc);

和用于检测扩增的“反义” RNA 的寡核苷酸的相应的反向互补序列。

本发明还涉及在体液中定量肿瘤细胞的试剂盒，所述体液例如血液、尿及其它粪便、溢泌物及体腔的分泌物，尤其是外周血，该试剂盒包含:

(a)用于共扩增的核酸和

(b)寡核苷酸引物对，这些引物对用于特异性扩增编码端粒酶的核酸和(a)中限定的核酸，在（ a ）中提到的用于共扩增的标准 RNA 核酸具有下列序列: 图 7 显示的(hTRKa)、图 8 显示的(hTRKb)，图 9 显示的(hTRKc),

和/或优选地具有下列序列的寡核苷酸引物对:

5′ GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3′（ TM1 ）和/或

5′ CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC3′（ TM2 ）

其中 TM1 和/或 TM2 在合适时还可以包含 RNA 聚合酶的启动子序列。

另外，正如前文详细描述的一样，所述新试剂盒可以还包含作为特异性检测野生型序列的扩增的 cDNA 的杂交探针的标记寡核苷酸和/或多个作为特异检测标准核酸的扩增的 cDNA 的杂交探针的标记寡核苷酸，此外，用于 PCR 扩增的新试剂盒可以还包含前文详细描述的酶，在合适时可以包含标记的核苷酸和/或合适的缓冲液，例如，反转录酶（优选的是 AMV 反转录酶）， DNA 聚合酶（优选的是 Taq 聚合酶）和/或 DNA 酶，并且在合适时可以包含如前文详细描述，用于干细胞和/或激活的免疫细胞的排除和/或肿瘤细胞的浓缩的方法。

供 NASBA 用的其它新试剂盒，除包含前面详细描述的标准核酸外，同样可以包含用作特异性检测野生型序列的扩增的“反义” RNA 之杂交探针的标记的寡核苷酸和/或多个用作特异检测标准核酸的扩增的“反义” RNA 之杂交探针的标记的寡核苷酸。还可以同样地包含前文所述的酶，在合适时可以包含标记的核苷酸和/或合适的缓冲液，例如，反转录酶（优选的是 AMV 反转录酶）， RNA 聚合酶（优选的是 T7RNA 聚合酶）， RNA 酶 H 和/或 DNA 酶，在合适时可以包含如上文描述的，用于干细胞和/或激活免疫细胞的排除和/或肿瘤细胞的浓缩的方法。

下列实施例和附图用于详细描述本发明，然而不用来限制本发明。

附图描述

图 1 显示了人类端粒酶 RNA 组分和设计的寡核苷酸引物的位置：具有 327 个碱基对(bp)的扩增产物的 5′ 引物 TM1（位置 428 - 452）和 3′ 引物 TM2（位置 728 - 754）或具有 981bp 的扩增产物的 5′ 引物 TMK1（[16bp]+1 - 27）和 3′ 引物 TMK2（位置 940 - 962 + [3bp]。限制性内切酶 Not I 和 Hind III 的水解给出了 962bp 的片段 hTR。

图 2 显示了对肿瘤细胞系 cDNA 的 PCR 扩增。

带 1： MT_4，T - 细胞淋巴母细胞系；带 2： C8166，T - 细胞白血病细胞系；带 3： K562，慢性骨髓白血病（CML）细胞系；带 4： Molt4，急性淋巴白血病（ALL）细胞系和带 5：畸胎瘤细胞系；M：100bp 标记。hTR：具有 TM1 和 TM2 引物的 RT - PCR；hTR/4RT：不具反转录（RT）反应的对照 PCR；GAPDH：用甘油醛磷酸脱氢酶（GAPDH）引物的对照 RT - PCR。

图 3 显示了用引物 TM1 和 TM2 对肿瘤组织和健康参照组织 cDNA 的 PCR 扩增。M： 100bp 的标记；带 1：肾肿瘤，带 2：健康肾组织；带 3：甲状腺癌，带 4：健康甲状腺组织；带 5：胸癌，带 6：健康胸组织；带 7：结肠癌，带 8：健康大肠癌；带 6：H_2O 对照反应。

图 4 显示了用 TM1 和 TM2 引物对正常受试者和白血病病人外周血中的 cDNA 的 PCR 扩增。M： 100bp 的标记；带 1 - 3：健康血液供体；带 4 - 8：患急性骨髓白血病的病人；带 9： H_2O 对照反应。

图 5a 和 5b 显示了具有转录载体 pGEM - 13Zf(+)和在图 1 中显示的片段 hTR(Not I/HindIII)的构建体 pGEM-hTR，它包含人类端粒酶 RNA 组分的 cDNA（碱基 1 - 956：位置 12 - 975）。点线显示了经寡核苷酸引物 TMK1 的 Not I 添加的位置（位置： 12 - 17）。

图 6a 和 6b 显示了具有 Cla I-BamHI-Kpn I 盒（位置： 585 - 616）的构建体 pGEM-hTR (Ka) (4118 bp)和具有 606bp 的扩增

产物的设计的寡核苷酸引物的位置（ 5′ 引物 TMK1 ： 位置 [16bp]+1-27, 3′ 引物 TMK_3: 位置 565 - 605 + 〔 24bp 〕）以及具有 387bp 的扩增产物的设计的寡核甘酸引物的位置（ 5′ 引物 TMK_4: 位置 601 - 636 + 〔 20bp 〕， 3′ 引物 TMK2: 位置 940 - 962 + [3bp]）, 限制性内切酶 Not I 和 Bam HI 或 BamHI 和 Hind III 的水解分别给出 588 或 375bp 的产物。在 pGEM-13 Zf(+)中的片段连接反应给出 963 bp 的产物。

图 7 显示了在对构建体 pGEM-hTRKa 用 Sp6RNA 聚合酶体外转录之后的标准 RNA hTRKa(975 bp)，其已由 HindIII 线性化；并且显示了 20bp 随机序列的位置（位置 591 - 610 ）。

图 8 显示了对构建体 pGEM-hTRKb 用 Sp6RNA 聚合酶体外转录之后的标准 RNA hTRKb(975 bp)，其已由 HindIII 线性化；并且显示了 20bp 随机序列的位置（位置 591 - 610 ）。

图 9 显示了对构建体 pGEM-hTRKc 用 Sp6 RNA 聚合酶体外转录后的标准 RNA hTRKc (975 bp)，其已由 HindIII 线性化；并且显示了 20bp 随机序列的位置（位置 591 - 610 ）。

实施例

除非有其它说明，按照标准方法（例如 Sambrook 等(1989)所描述的）或按照所使用的试剂盒和酶的制造商的说明完成下面的实施例。

1.外周血，组织和细胞的培养与分离

按 ATCC （美国典型培养物保藏中心）推荐的方法培养肿瘤细胞系，如 MT_4（ T - 细胞淋巴母细胞）， C8166（ T - 细胞白血病细胞）， K562（慢性骨髓白血病细胞（ CML ））， Molt 4（急性淋巴白血病细胞（ ALL ））和畸胎瘤细胞。用 EDTA - monovets® (Saarsted)刺穿白血病（急性骨髓白血病）病人和健康对照受试者的前臂静脉取得静脉血。切除人类肿瘤组织和健康参照组织后，立即在液氮中进行震荡冰冻(shock-frozen),然后在 - 70 ℃保藏。

2.细胞 RNA 的分离

用标准方法分离总细胞 RNA[Chomczynski 等(1987), 分析生物化学 162， 156； Sambrook, J 等, (1989), 冷泉港, 纽约, 美国, 冷泉港出版社]。除去外周血后，将它立即转移到 RNA 降解缓冲液（ 4M 异硫氰酸胍； 0.1MTris-HCl pH7.5, 1%巯基乙醇）中，利用 Ultra-Turrax T_{25} 分散装置(Laborreaktor-Systeme, IKA)在 RNA 降解缓冲液中使组织和细胞混匀。这种混合物要么立即进一步加工，要么贮藏在－ 70 ℃。

3.反转录和聚合酶链反应（ RT － PCR ）

如制造商详细描述的那样，利用 GeneAmp® RNA － PCR 试剂盒进行 RT － PCR。将外周血中分离的总 RNA 分成若干等份，这些等份、细胞系和组织在每种情况下都应先用 20U DNA 酶（ Boehringer, Mannheim)在 10μl 混合物（ 50mMKCl ； 10mMTris-HCl, pH8.3 和 2.5mM $MgCl_2$ ）中在 37 ℃下水解 60 分钟，然后在 95 ℃下放置 30 分钟使 DNA 酶失活。为了从蛋白质和 DNA 片段中彻底纯化 RNA ，在每种情况下，再在硅胶基质（ RNeasy®,Qiagen)中纯化 DNA 水解酶，然后用测光计进行测量。

下面两个寡核苷酸引物:

TM1 5′ GACTCGGCTC ACACATGCAG TTCGC 3′

TM2 5′ CTGGTCGAGA TCTACCTTGG GAGAAGC 3′

是按照 Feng 等公布的人类端粒酶 RNA 组分的序列设计的） Feng 等(1995), 科学 269： 1236 － 41 ）（图 1 ），并且使用应用生物系统 380A 合成器合成出这两个引物。通过使用 BLASTN 1.4.9 MP 对 GenBank, EMBL, DDBJ 和 PDB 数据库中的核酸序列的计算机辅助同源性分析检查 TM1 和 TM2 引物的特异性[Altschul, S.F.等(1990). J Mol Biol 215： 403-410]。

为了让扩增数量保持一致，在每次实验中，对 RT 反应应使用相同数量的 RNA。为了消除基因组 DNA 对 RNA 制品的污染，每个用 RNA 酶水解的包含 RNA 的样品首先必须进行后文描述的 PCR 和有关扩增的检测。对于随后的 cDNA 合成和 PCR 使用包含 RNA 的样品，在这些样品中没有扩增产物是可检测的， GAPDH

的寡核苷酸用作中间标准参照物。

按照下面的说明，在5μl cDNA反应物或1：50的分离的质粒DNA的稀释液中进行PCR（95℃：2分钟，预热）；（94℃：30秒，60℃：30秒，72℃：30秒，35个循环）；（72℃：7分钟，最终延伸）。在1.5％TAE琼脂糖凝胶上经凝胶电泳分级分离扩增产物，用溴化乙锭染色然后在紫外光下进行显示和记录（参见图2－4）。

4.标准RNA核酸hTRKa, hTRKb和hTRKc的制备

所使用的酶，如Sp6RNA聚合酶，T_4连接酶和限制性内切酶，特别是来自Boehringer Mannheim, Biolabs和Promega的酶，象制造商介绍的那样使用。在1.5％TAE琼脂糖上经凝胶电泳并洗脱分级分离预期的供克隆的PCR扩增产物(Qiagen)。经苯酚/氯仿抽提，在乙醇和盐液中进行沉淀或者利用DNA纯化法(Qiagen)纯化限制性水解产物。通过用T4连接酶将所述片段连接到在克隆和转录载体pGEM-13Zf(+)中的相应的切割位点来克隆所说的构建体。这种载体允许选用Sp6或者T7RNA聚合酶体外转录克隆片段。经电穿孔（BioRad)转化活性细菌（XL－1 Blue, Stratagene)。用质粒纯化试剂盒(Qiagen)纯化质粒DNA。用载体或序列特异寡核苷酸引物通过PCR来证实阳性克隆。经半自动序列分析进行对构建体的序列证实。

构建体pEGM-hTR(图5a和5b)作为构建体pGEM-hTR(Ka)（图6a和6b），pGEM-hTR(Kb)和pGEM-hTR(Kc)的原初构建体产生。pGEM－hTR(Ka)不同于pGEM-hTR之处在于在位置585－616上序列的随机交换，构建体pGEM-hTRKb和pGEM-hTRKc也不同于pGEM-hTR之处在于在位置587－615上序列的随机交换。所说的构建体用于使用标准核酸：hTRKa（图7），hTRKb（图8）和hTRKc（图9）的Sp6RNA聚合酶的体外转录。为了形成构建体pGEM-hTR，将人类端粒酶hTR（图1）的RNA组分的cDNA克隆到pGEM-13Zf(+)的Not I和Hind III切割位点。利用后面的寡核苷酸引物采用RT－PCR能够达到这个目的，

这些引物来源于在上文描述过的条件下，在预先从肿瘤细胞或细胞系分离的 RNA 中的序列 hTR（图 1）：

5′ ATAAGAATGC GGCCGCGGGT TGCGGAGGGT GGGCCTGGGA GGG 3′（TMK1）

5′ CCCAAGCTTG TGGGGGTTAT ATCCTA 3′（TMK2）

寡核苷酸引物 TMK1（位置 1 - 27，图 1）包含一个附加的 16bp 的 5′ 突出端和一个 Not I 切割位点，寡核苷酸引物 TMK2（位置 940 - 962，图 2）包含一个附加的 3bp 突出端和一个 Hind III 切割位点。TMK1 和 TMK2 引物对扩增一个 979 bp 的片段。用 Not I 和 HindIII 限制性水解后，963bp 的片段 hTR (NotI+HindIII)（位置 1 - 957，图 5）被克隆到 pGEM-B Zf(+) 相应的切割位点（位置 12 和 38），并且 4118bp 的构建体 pGEM-hTR 也被产生。通过在构建体 pGEM-hTR（位置 585 - 616）中由一个 32bp 的 ClaI-BamHI-KpnI 盒置换一个 32bp 的序列构建 pGEM-hTR(Ka)，这个 ClaI-BamHI-KpnI 盒为：

5′ ATCGATGACC TAAGTGGATC CGACTTGGTA CC 3′

3′ TAGCTACTGG ATTCACCTAG GCTGAACCAT GG 5′

经重组 PCR 进行这种置换反应，这种反应是 Higuchi 等描述的方法的改进[Higuchi, R. (1988). 核酸研究 16： 7351 - 7367, Higuchi, R. (1990). M. Innis A. 等 eds. 圣地亚哥，纽约，柏林，波士顿，伦敦，悉尼，东京，多伦多，学术出版社 177 - 183]。在第一步中，在 pGEM-hTR 上进行两个独立的 PCR 反应：

第一个 PCR 反应用下面的寡核苷酸引物进行，这个引物来源于序列 hTR（图 1）：

5′ ATAAGAATGC GGCCGCGGGT TGCGGAGGGT GGGCCTGGGA GGG3′（TMK1）

5′ CGCGGATCCA CTTAGGTCAT CGATCTGCCA ATTTGCAGCA CACT 3′（TMK3）

寡核苷酸引物 TMK3（位置 565 - 605，图 6）包含一个附

加的 24bp 具有一个 BamHI 和 ClaI 切割位点的 5′ 突出端，它编码 21bp 的 ClaI-BamHI-Kpn I 盒。来自第一次 PCR 反应的扩增产物给出 606bp 的 5′ 片段，并且用 Not I 和 Bam HI 酶切消化后得到一个 588 bp 的 5′ 片段。

第二个 PCR 反应用下面的寡核苷酸引物进行，这个引物来源于序列 hTR（图 1）：

5′ CGCGGATCCG ACTTGGTACC ATGAATGGGC AGTGAGCCGG 3′ （TMK4）

5′ CCCAAGCTTG TGGGGGTTAT ATCCTA 3′ （TMK2）

寡核苷酸引物 TMK4（位置 599 - 618，图 6）包含一个附加的 20bp 具有一个 BamHI 和 ClaI 切割位点的 5′ 突出端，它编码 17bp 的 ClaI-BamHI-KpnI 盒。来自第二个 PCR 反应的扩增产物给出 387bp 的 3′ 片段，并且用 BamHI 和 HindIII 水解后得到 375 bp 的 3′ 片段。T4 连接酶用于连接 5′ 和 3′ 的 BamHI 切割位点，得到 963 bp 的 NotI-HindIII 片段，这个片段被克隆进 pGEM - 13Zf(+)的相应切割位点（位置 13 和 38）产生 4118bp 的构建体 pGEM-hTR(Ka)（图 6）。通过在构建体 pGEM-hTR(Ka)中用 29bp 的随机序列置换 29bp 的序列构建 pGEM-hTR(Kb)和 pGEM-hTR(Kc)。在构建体 pGEM-hTR(Ka)用 ClaI 和 KpnI 选择性限制消化和下面的寡核苷酸 Kb 和 Kc 之后，在两个 T4 连接酶反应中，将寡核苷酸 Kb 和 Kc 的 ClaI-KpnI 片段克隆到 pGEM-hTR(Ka)的相应切割位点中，产生 4118bp 的构建体 pGEM-hTR(Kb)和 pGEM-hTR(Kc):

ClaI KpnI

5′ CCATCGATTC CCGTCGCCAA ATCGAGCGGGTAC CCC 3′ Kb

3′ GGTAGCTAAG GGCAGCGGTT TAGCTCGCCC ATGGGG 5′

ClaI KpnI

5′ CCATCGATCG TCCAATCGCT ATACTCTCGGTACC CC 3′ Kc

3′ GGTAGCTAGC AGGTTAGCGA TATGAGAGCC ATGGGG 5′

在体外，用 Sp6RNA 聚合酶从 pGEM-hTR(Ka)(hTRKa,图 7),pGEM－hTR(Kb) (hTRKb, 图 8)和[pGEM-hTR(Kc) (hTRKc, 图 9)产生长度为 975 bp 的 RNA。用标准方法进行 RNA 的进一步加工如 DNA 酶切消化，纯化和标定。

5.结果:

肿瘤细胞系的研究揭示，人类端粒酶 RNA 组分在所有肿瘤细胞系（在 GAPDH 对照反应中具有相同量的扩增）中可以以不同的量被检测到。在每种情况下，通过不加入反转录酶的对照反应，排除基因组 DNA 的污染是可能的。

肿瘤组织和健康组织的比较研究揭示，不但在肿瘤组织，而且在健康参照组织中，人类端粒酶 RNA 组分都可以明确地检测出来（图 3）。从肿瘤组织中获得的 RNA 个体的量能够解释扩增产物的强度变化。

静脉血液的研究揭示，健康受试者和白血病病人血液中的端粒酶活性的不同水平是可检测的，并且发现，与癌症病人比较，对照受试者的端粒酶活性明显较低（图 4）。

用 Sp6 RNA 聚合酶体外转录构建体 pGEM-hTR(Ka), pGEM(Kb)和 pGEM-hTR(Kc)揭示出在每种情况下的长度为 975 个碱基的所需 RNA 转录物 hTRKa, hTRKb 和 hTRKc。

hTR

```
1     GGGTTGCGGA GGGTGGGCCT GGGAGGGGTG GTGGCCATTT TTTGTCTAAC
51    CCTAACTGAG AAGGGCGTAG GCGCCGTGCT TTTGCTCCCC GCGCGCTGTT
101   TTTCTCGCTG ACTTTCAGCG GGCGGAAAAG CCTCGGCCTG CCGCCTTCCA
151   CCGTTCATTC TAGAGCAAAC AAAAAATGTC AGCTGCTGGC CCGTTCGCCT
201   CCCGGGGACC TGCGGCGGGT CGCCTGCCCA GCCCCCGAAC CCCGCCTGGA
251   GCCGCGGTCG GCCCGGGGCT TCTCCGGAGG CACCCACTGC CACCGCGAAG
301   AGTTGGGCTC TGTCAGCCGC GGGTCTCTCG GGGGCGAGGG CGAGGTTCAC
351   CGTTTCAGGC CGCAGGAAGA GGAACGGAGC GAGTCCCGCC GCGGCGCGAT
401   TCCCTGAGCT GTGGGACGTG CACCCAGGAC TCGGCTCACA CATGCAGTTC
451   GCTTTCCTGT TGGTGGGGGG AACGCCGATC GTGCGCATCC GTCACCCCTC
501   GCCGGCAGTG GGGGCTTGTG AACCCCCAAA CCTGACTGAC TGGGCCAGTG
551   TGCTGCAAAT TGGCAGGAGA CGTGAAGGCA CCTCCAAAGT CGGCCAAAAT
601   GAATGGGCAG TGAGCCGGGG TTGCCTGGAG CCGTTCCTGC GTGGGTTCTC
651   CCGTCTTCCG CTTTTTGTTG CCTTTTATGG TTGTATTACA ACTTAGTTCC
701   TGCTCTGCAG ATTTTGTTGA GGTTTTTGCT TCTCCCAAGG TAGATCTCGA
751   CCAGTCCCTC AACGGGGTGT GGGGAGAACA GTCATTTTTT TTTGAGAGAT
801   CATTTAACAT TTAATGAATA TTTAATTAGA AGATCTAAAT GAACATTGGA
851   AATTGTGTTC CTTTAATGGT CATCGGTTTA TGCCAGAGGT TAGAAGTTTC
901   TTTTTTGAAA AATTAGACCT TGGCGATGAC CTTGAGCAGT AGGATATAAC
951   CCCCACAAGC TT
```

图 1

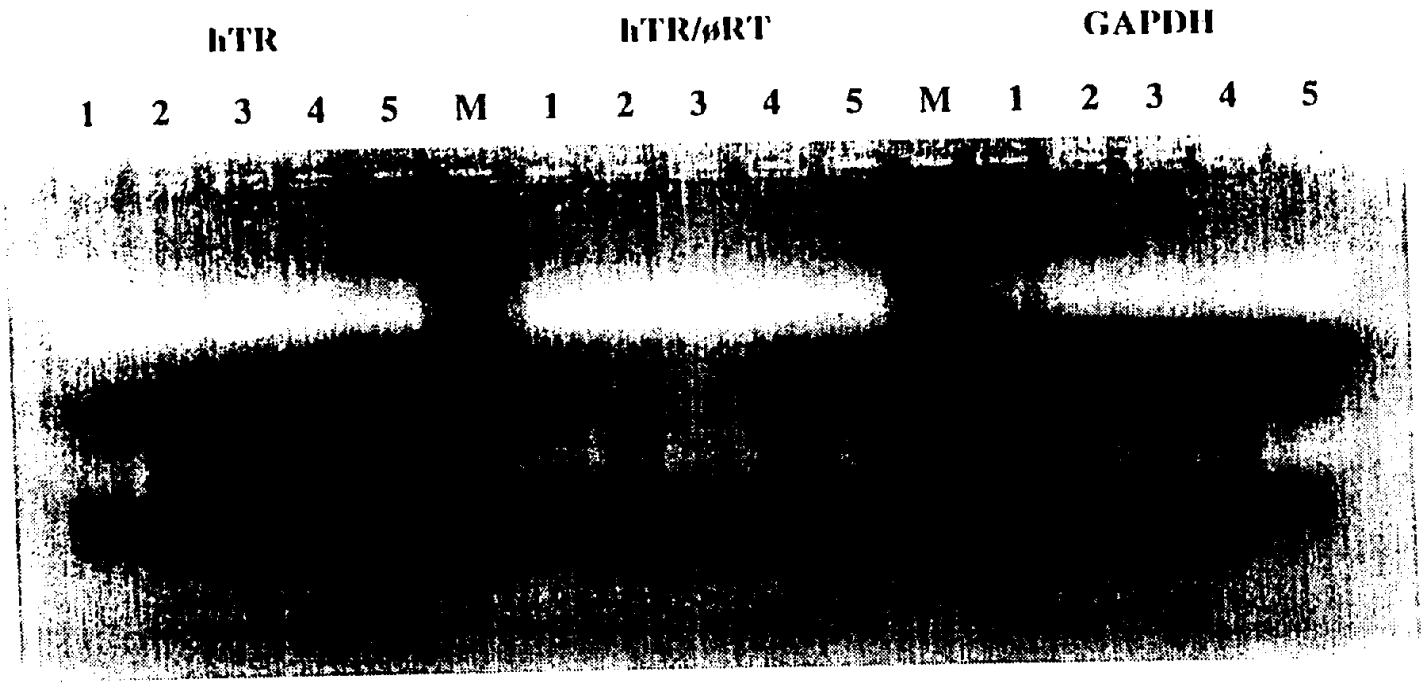


图 2

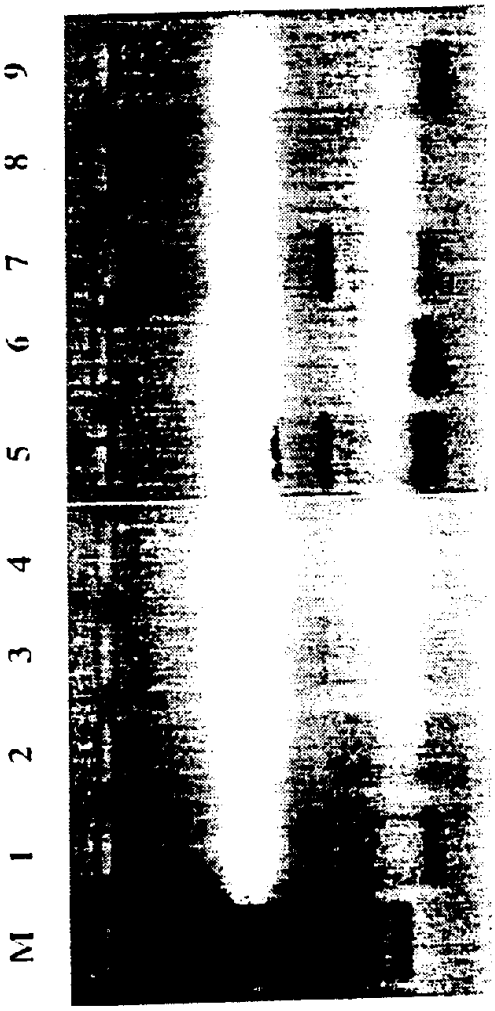


图 3

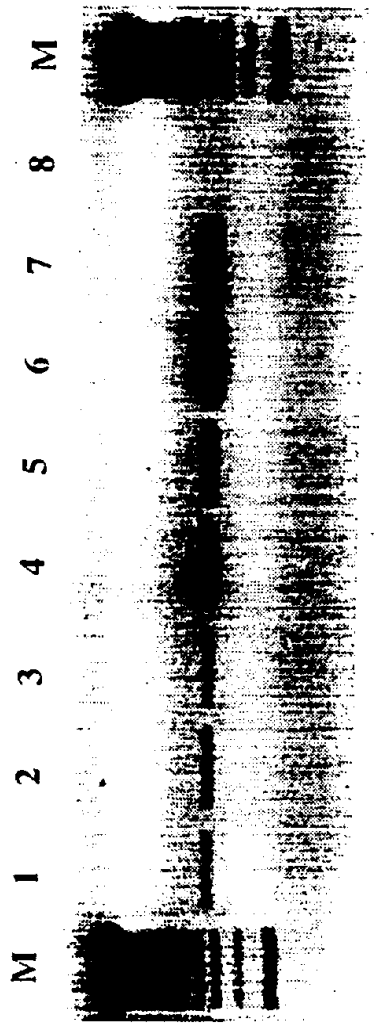


图 4

pGEM-hTR

```
1       GGGCGAATTG GCGGCCGCGG GTTGCGGAGG GTGGGCCTGG GAGGGGTGGT
51      GGCCATTTTT TGTCTAACCC TAACTGAGAA GGGCGTAGGC GCCGTGCTTT
101     TGCTCCCCGC GCGCTGTTTT TCTCGCTGAC TTTCAGCGGG CGGAAAAGCC
151     TCGGCCTGCC GCCTTCCACC GTTCATTCTA GAGCAAACAA AAAATGTCAG
201     CTGCTGGCCC GTTCGCCTCC CGGGGACCTG CGGCGGGTCG CCTGCCCAGC
251     CCCCGAACCC CGCCTGGAGC CGCGGTCGGC CCGGGGCTTC TCCGGAGGCA
301     CCCACTGCCA CCGCGAAGAG TTGGGCTCTG TCAGCCGCGG GTCTCTCGGG
351     GGCGAGGGCG AGGTTCACCG TTTCAGGCCG CAGGAAGAGG AACGGAGCGA
401     GTCCCGCCGC GGCGCGATTC CCTGAGCTGT GGGACGTGCA CCCAGGACTC
451     GGCTCACACA TGCAGTTCGC TTTCCTGTTG GTGGGGGGAA CGCCGATCGT
501     GCGCATCCGT CACCCCTCGC CGGCAGTGGG GGCTTGTGAA CCCCCAAACC
551     TGACTGACTG GGCCAGTGTG CTGCAAATTG GCAGGAGACG TGAAGGCACC
601     TCCAAAGTCG GCCAAAATGA ATGGGCAGTG AGCCGGGGTT GCCTGGAGCC
651     GTTCCTGCGT GGGTTCTCCC GTCTTCCGCT TTTTGTTGCC TTTTATGGTT
701     GTATTACAAC TTAGTTCCTG CTCTGCAGAT TTTGTTGAGG TTTTTGCTTC
751     TCCCAAGGTA GATCTCGACC AGTCCCTCAA CGGGGTGTGG GGAGAACAGT
801     CATTTTTTTT TGAGAGATCA TTTAACATTT AATGAATATT TAATTAGAAG
851     ATCTAAATGA ACATTGGAAA TTGTGTTCCT TTAATGGTCA TCGGTTTATG
901     CCAGAGGTTA GAAGTTTCTT TTTTGAAAAA TTAGACCTTG GCGATGACCT
951     TGAGCAGTAG GATATAACCC CCACAAGCTT GAGTATTCTA TAGTGTCACC
1001    TAAATAGCTT GGCGTAATCA TGGTCATAGC TGTTTCCTGT GTGAAATTGT
```

图 5a

pGEM-hTR

```
1051    TATCCGCTCA CAATTCCACA CAACATACGA GCCGGAAGCA TAAAGTGTAA
1101    AGCCTGGGGT GCCTAATGAG TGAGCTAACT CACATTAATT GCGTTGCGCT
1151    CACTGCCCGC TTTCCAGTCG GGAAACCTGT CGTGCCAGCT GCATTAATGA
1201    ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG CGTATTGGGC GCTCTTCCGC
1251    TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG
1301    TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
1351    AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG
1401    TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG
1451    AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA
1501    CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC
1551    TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG
1601    GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
1651    TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC
1701    CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA
1751    GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA
1801    GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA
1851    CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG
1901    TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
1951    GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA
2001    AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC
2051    AGTGGAACGA AAACTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA
```


图 5a

```
2101    AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT
2151    CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA
2201    GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTCATC CATAGTTGCC
2251    TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG
2301    CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT
2351    TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT
2401    GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAGCTAG
2451    AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTA
2501    CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
2551    GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA
2601    AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG
2651    CAGTGTTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC
2701    ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC
2751    ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA
2801    TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
2851    GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG
2901    ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT
2951    TTACTTTCAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC
3001    GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT
3051    CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG
3101    GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC
```

图 5b

```
3151    ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT
3201    GACATTAACC TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTCGCGC
3251    GTTTCGGTGA TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG
3301    GTCACAGCTT GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG
3351    CGCGTCAGCG GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CTGGCTTAAC TATGCGGCAT
3401    CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TGCGGTGTGA AATACCGCAC
3451    AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGAAATTGTA AACGTTAATA
3501    TTTTGTTAAA ATTCGCGTTA AATATTTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAC
3551    CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGACCGA
3601    GATAGGGTTG AGTGTTGTTC CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA
3651    ACGTGGACTC CAACGTCAAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC
3701    CCACTACGTG AACCATCACC CAAATCAAGT TTTTTGCGGT CGAGGTGCCG
3751    TAAAGCTCTA AATCGGAACC CTAAAGGGAG CCCCCGATTT AGAGCTTGAC
3801    GGGGAAAGCC GGCGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA
3851    GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC GCGTAACCAC
3901    CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTCC ATTCGCCATT
3951    CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT
4001    TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA
4051    ACGCCAGGGT TTTCCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT
4101    GTAATACGAC TCACTATA
```

图 5b

pGEM-hTR (Ka)

```
1       GGGCGAATTG GCGGCCGCGG GTTGCGGAGG GTGGGCCTGG GAGGGGTGGT
51      GGCCATTTTT TGTCTAACCC TAACTGAGAA GGGCGTAGGC GCCGTGCTTT
101     TGCTCCCCGC GCGCTGTTTT TCTCGCTGAC TTTCAGCGGG CGGAAAAGCC
151     TCGGCCTGCC GCCTTCCACC GTTCATTCTA GAGCAAACAA AAAATGTCAG
201     CTGCTGGCCC GTTCGCCTCC CGGGGACCTG CGGCGGGTCG CCTGCCCAGC
251     CCCCGAACCC CGCCTGGAGC CGCGGTCGGC CCGGGGCTTC TCCGGAGGCA
301     CCCACTGCCA CCGCGAAGAG TTGGGCTCTG TCAGCCGCGG GTCTCTCGGG
351     GGCGAGGGCG AGGTTCACCG TTTCAGGCCG CAGGAAGAGG AACGGAGCGA
401     GTCCCGCCGC GGCGCGATTC CCTGAGCTGT GGGACGTGCA CCCAGGACTC
451     GGCTCACACA TGCAGTTCGC TTTCCTGTTG GTGGGGGGAA CGCCGATCGT
501     GCGCATCCGT CACCCCTCGC CGGCAGTGGG GGCTTGTGAA CCCCCAAACC
551     TGACTGACTG GGCCAGTGTG CTGCAAATTG GCAGatcgat gacctaagtg
601     gatccgactt ggtaccATGA ATGGGCAGTG AGCCGGGGTT GCCTGGAGCC
651     GTTCCTGCGT GGGTTCTCCC GTCTTCCGCT TTTTGTTGCC TTTTATGGTT
701     GTATTACAAC TTAGTTCCTG CTCTGCAGAT TTTGTTGAGG TTTTTGCTTC
751     TCCCAAGGTA GATCTCGACC AGTCCCTCAA CGGGGTGTGG GGAGAACAGT
801     CATTTTTTTT TGAGAGATCA TTTAACATTT AATGAATATT TAATTAGAAG
851     ATCTAAATGA ACATTGGAAA TTGTGTTCCT TTAATGGTCA TCGGTTTATG
901     CCAGAGGTTA GAAGTTTCTT TTTTGAAAAA TTAGACCTTG GCGATGACCT
951     TGAGCAGTAG GATATAACCC CCACAAGCTT GAGTATTCTA TAGTGTCACC
1001    TAAATAGCTT GGCGTAATCA TGGTCATAGC TGTTTCCTGT GTGAAATTGT
1051    TATCCGCTCA CAATTCCACA CAACATACGA GCCGGAAGCA TAAAGTGTAA
```

图 6a

pGEM-hTR (Ka)

```
1101    AGCCTGGGGT GCCTAATGAG TGAGCTAACT CACATTAATT GCGTTGCGCT
1151    CACTGCCCGC TTTCCAGTCG GGAAACCTGT CGTGCCAGCT GCATTAATGA
1201    ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG CGTATTGGGC GCTCTTCCGC
1251    TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG
1301    TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
1351    AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG
1401    TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG
1451    AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA
1501    CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC
1551    TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG
1601    GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
1651    TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC
1701    CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA
1751    GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA
1801    GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA
1851    CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG
1901    TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
1951    GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA
2001    AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC
2051    AGTGGAACGA AAACTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA
```

图 6a

```
2101    AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT
2151    CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA
2201    GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTCATC CATAGTTGCC
2251    TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG
2301    CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT
2351    TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT
2401    GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAGCTAG
2451    AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTA
2501    CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
2551    GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA
2601    AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG
2651    CAGTGTTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC
2701    ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC
2751    ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA
2801    TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
2851    GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG
2901    ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT
2951    TTACTTTCAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC
3001    GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT
3051    CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG
3101    GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC
3151    ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT
```

图 6b

```
3201    GACATTAACC TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTCGCGC
3251    GTTTCGGTGA TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG
3301    GTCACAGCTT GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG
3351    CGCGTCAGCG GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CTGGCTTAAC TATGCGGCAT
3401    CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TGCGGTGTGA AATACCGCAC
3451    AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGAAATTGTA AACGTTAATA
3501    TTTTGTTAAA ATTCGCGTTA AATATTTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAC
3551    CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGACCGA
3601    GATAGGGTTG AGTGTTGTTC CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA
3651    ACGTGGACTC CAACGTCAAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC
3701    CCACTACGTG AACCATCACC CAAATCAAGT TTTTTGCGGT CGAGGTGCCG
3751    TAAAGCTCTA AATCGGAACC CTAAAGGGAG CCCCCGATTT AGAGCTTGAC
3801    GGGGAAAGCC GGCGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA
3851    GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC GCGTAACCAC
3901    CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTCC ATTCGCCATT
3951    CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT
4001    TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA
4051    ACGCCAGGGT TTTCCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT
4101    GTAATACGAC TCACTATA
```

图 6b

hTRKa

1	GGGCGAAUUG	GCGGCCGCGG	GUUGCGGAGG	GUGGGCCUGG	GAGGGGUGGU
51	GGCCAUUUUU	UGUCUAACCC	UAACUGAGAA	GGGCGUAGGC	GCCGUGCUUU
101	UGCUCCCCGC	GCGCUGUUUU	UCUCGCUGAC	UUUCAGCGGG	CGGAAAAGCC
151	UCGGCCUGCC	GCCUUCCACC	GUUCAUUCUA	GAGCAAACAA	AAAAUGUCAG
201	CUGCUGGCCC	GUUCGCCUCC	CGGGGACCUG	CGGCGGGUCG	CCUGCCCAGC
251	CCCCGAACCC	CGCCUGGAGC	CGCGGUCGGC	CCGGGGCUUC	UCCGGAGGCA
301	CCCACUGCCA	CCGCGAAGAG	UUGGGCUCUG	UCAGCCGCGG	GUCUCUCGGG
351	GGCGAGGGCG	AGGUUCACCG	UUUCAGGCCG	CAGGAAGAGG	AACGGAGCGA
401	GUCCCGCCGC	GGCGCGAUUC	CCUGAGCUGU	GGGACGUGCA	CCCAGGACUC
451	GGCUCACACA	UGCAGUUCGC	UUUCCUGUUG	GUGGGGGGAA	CGCCGAUCGU
501	GCGCAUCCGU	CACCCCUCGC	CGGCAGUGGG	GGCUUGUGAA	CCCCCAAACC
551	UGACUGACUG	GGCCAGUGUG	CUGCAAAUUG	GCAGAUCGAU	GACCUAAGUG
601	GAUCCGACUU	GGUACCAUGA	AUGGGCAGUG	AGCCGGGGUU	GCCUGGAGCC
651	GUUCCUGCGU	GGGUUCUCCC	GUCUUCCGCU	UUUUGUUGCC	UUUUAUGGUU
701	GUAUUACAAC	UUAGUUCCUG	CUCUGCAGAU	UUUGUUGAGG	UUUUUGCUUC
751	UCCCAAGGUA	GAUCUCGACC	AGUCCCUCAA	CGGGGUGUGG	GGAGAACAGU
801	CAUUUUUUUU	UGAGAGAUCA	UUUAACAUUU	AAUGAAUAUU	UAAUUAGAAG
851	AUCUAAAUGA	ACAUUGGAAA	UUGUGUUCCU	UUAAUGGUCA	UCGGUUUAUG
901	CCAGAGGUUA	GAAGUUUCUU	UUUUGAAAAA	UUAGACCUUG	GCGAUGACCU
951	UGAGCAGUAG	GAUAUAACCC	CCACA		

图 7

hTRKb

```
1     GGGCGAAUUG GCGGCCGCGG GUUGCGGAGG GUGGGCCUGG GAGGGGUGGU
51    GGCCAUUUUU UGUCUAACCC UAACUGAGAA GGGCGUAGGC GCCGUGCUUU
101   UGCUCCCCGC GCGCUGUUUU UCUCGCUGAC UUUCAGCGGG CGGAAAAGCC
151   UCGGCCUGCC GCCUUCCACC GUUCAUUCUA GAGCAAACAA AAAAUGUCAG
201   CUGCUGGCCC GUUCGCCUCC CGGGGACCUG CGGCGGGUCG CCUGCCCAGC
251   CCCCGAACCC CGCCUGGAGC CGCGGUCGGC CCGGGGCUUC UCCGGAGGCA
301   CCCACUGCCA CCGCGAAGAG UUGGGCUCUG UCAGCCGCGG GUCUCUCGGG
351   GGCGAGGGCG AGGUUCACCG UUUCAGGCCG CAGGAAGAGG AACGGAGCGA
401   GUCCCGCCGC GGCGCGAUUC CCUGAGCUGU GGGACGUGCA CCCAGGACUC
451   GGCUCACACA UGCAGUUCGC UUUCCUGUUG GUGGGGGGAA CGCCGAUCGU
501   GCGCAUCCGU CACCCCUCGC CGGCAGUGGG GGCUUGUGAA CCCCCAAACC
551   UGACUGACUG GGCCAGUGUG CUGCAAAUUG GCAGAUCGAU UCCCGUCGCC
601   AAAUCGAGCG GGUACCAUGA AUGGGCAGUG AGCCGGGGUU GCCUGGAGCC
651   GUUCCUGCGU GGGUUCUCCC GUCUUCCGCU UUUUGUUGCC UUUUAUGGUU
701   GUAUUACAAC UUAGUUCCUG CUCUGCAGAU UUUGUUGAGG UUUUUGCUUC
751   UCCCAAGGUA GAUCUCGACC AGUCCCUCAA CGGGGUGUGG GGAGAACAGU
801   CAUUUUUUUU UGAGAGAUCA UUUAACAUUU AAUGAAUAUU UAAUUAGAAG
851   AUCUAAAUGA ACAUUGGAAA UUGUGUUCCU UUAAUGGUCA UCGGUUUAUG
901   CCAGAGGUUA GAAGUUUCUU UUUUGAAAAA UUAGACCUUG GCGAUGACCU
951   UGAGCAGUAG GAUAUAACCC CCACA
```

图 8

hTRKc

```
1      GGGCGAAUUG GCGGCCGCGG GUUGCGGAGG GUGGGCCUGG GAGGGGUGGU
51     GGCCAUUUUU UGUCUAACCC UAACUGAGAA GGGCGUAGGC GCCGUGCUUU
101    UGCUCCCCGC GCGCUGUUUU UCUCGCUGAC UUUCAGCGGG CGGAAAAGCC
151    UCGGCCUGCC GCCUUCCACC GUUCAUUCUA GAGCAAACAA AAAAUGUCAG
201    CUGCUGGCCC GUUCGCCUCC CGGGGACCUG CGGCGGGUCG CCUGCCCAGC
251    CCCCGAACCC CGCCUGGAGC CGCGGUCGGC CCGGGGCUUC UCCGGAGGCA
301    CCCACUGCCA CCGCGAAGAG UUGGGCUCUG UCAGCCGCGG GUCUCUCGGG
351    GGCGAGGGCG AGGUUCACCG UUUCAGGCCG CAGGAAGAGG AACGGAGCGA
401    GUCCCGCCGC GGCGCGAUUC CCUGAGCUGU GGGACGUGCA CCCAGGACUC
451    GGCUCACACA UGCAGUUCGC UUUCCUGUUG GUGGGGGGAA CGCCGAUCGU
501    GCGCAUCCGU CACCCCUCGC CGGCAGUGGG GGCUUGUGAA CCCCCAAACC
551    UGACUGACUG GGCCAGUGUG CUGCAAAUUG GCAGAUCGAU CGUCCAAUCG
601    CUAUACUCUC GGUACCAUGA AUGGGCAGUG AGCCGGGGUU GCCUGGAGCC
651    GUUCCUGCGU GGGUUCUCCC GUCUUCCGCU UUUUGUUGCC UUUUAUGGUU
701    GUAUUACAAC UUAGUUCCUG CUCUGCAGAU UUUGUUGAGG UUUUUGCUUC
751    UCCCAAGGUA GAUCUCGACC AGUCCCUCAA CGGGGUGUGG GGAGAACAGU
801    CAUUUUUUUU UGAGAGAUCA UUUAACAUUU AAUGAAUAUU UAAUUAGAAG
851    AUCUAAAUGA ACAUUGGAAA UUGUGUUCCU UUAAUGGUCA UCGGUUUAUG
901    CCAGAGGUUA GAAGUUUCUU UUUUGAAAAA UUAGACCUUG GCGAUGACCU
951    UGAGCAGUAG GAUAUAACCC CCACA
```

图 9