

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03816154.0

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100558410C

[22] 申请日 2003.5.7 [21] 申请号 03816154.0

[30] 优先权

[32] 2002. 5. 7 [33] US [31] 10/141,647

[32] 2002. 7. 23 [33] US [31] 10/200,148

[86] 国际申请 PCT/US2003/014049 2003.5.7

[87] 国际公布 WO2003/095613 英 2003.11.20

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.7

[73] 专利权人 森尼斯科技术公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 C·泰勒 T·-W·王

L·佩特罗夫 J·C·卡尔森

R·纳拉延辛 J·E·汤姆普森

D·克利彻 M·考普

[56] 参考文献

CN1173897A 1998.2.18

Deoxyhypusine synthase from rat testis: purification and characterization. . WOLFF 等人. Journal of Biological Chemistry, Vol. 270 No. 15. 1995

Sequence determination and cDNA cloning of eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine - containing protein. Smit. McBride Z 等人. J Biol Chem, Vol. 264 No. 3. 1989

审查员 邢云龙

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 王景朝

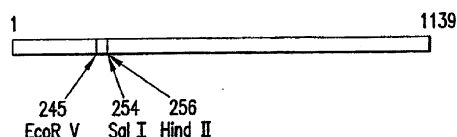
权利要求书 1 页 说明书 66 页 附图 44 页

[54] 发明名称

调节凋亡的核酸,多肽,以及方法

[57] 摘要

本发明涉及分离的和/或纯化的大鼠凋亡特异性真核起始因子-5A(eIF-5A)以及脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸合成酶(DHS)核酸和多肽。本发明还涉及利用凋亡特异性 eIF-5A 和 DHS 调节凋亡的方法,以及可用于所述方法中的凋亡特异性 eIF-5A 和 DHS 的反义寡核苷酸和表达载体。



1. 真核起始因子 5A 在制备用于调节细胞的凋亡的药物中的用途。
2. 如权利要求 1 的用途，其中，所述真核起始因子 5A 由表达载体表达，所述表达载体包括可操作地与编码大鼠凋亡特异性真核起始因子 5A 多肽的核苷酸序列连接的启动子序列。
3. 如权利要求 2 的用途，其中，所述核苷酸序列由 SEQ ID NO: 1 组成。
4. 如权利要求 1 的用途，其中，所述细胞包含在动物体内。
5. 如权利要求 4 的用途，其中，所述药物是给动物施用的。
6. 一种鉴定凋亡的调节的方法，包括：
 - (i) 提供测试细胞；
 - (ii) 让所述测试细胞与药物候选物接触；和
 - (iii) 测定在存在所述药物候选物的情况下，所述测试细胞中大鼠增殖性真核起始因子 5A 与大鼠凋亡特异性真核起始因子 5A 的比例是否改变，其中，大鼠增殖性真核起始因子 5A 与大鼠凋亡特异性真核起始因子 5A 的比例的改变是凋亡调节的指标。

调节凋亡的核酸，多肽，以及方法

发明领域

本发明涉及凋亡特异性真核起始因子-5A (eIF-5A)和脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸合成酶 (DHS)核酸和多肽，以及利用凋亡特异性 eIF-5A 和 DHS 调节细胞的凋亡的方法。

发明背景

凋亡是遗传学编程的细胞事件，它的特征在于明确的形态学特点，如细胞皱缩，染色质浓缩，细胞核断裂，以及细胞膜起泡。Kerr 等 (1972) *Br. J. Cancer*, 26, 239-257; Wyllie 等 (1980) *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306。它在正常的组织发育和体内稳态中发挥重要作用，并且，凋亡程序的缺陷被认为导致了从神经变性和自身免疫性疾病到肿瘤的多种人类疾病。Thompson (1995) *Science*, 267, 1456-1462; Mullauer 等 (2001) *Mutat. Res*, 488, 211-231。尽管业已充分表征了凋亡细胞的形态学特征，调节这一过程的分子途径才刚刚开始阐明。

被认为在凋亡中发挥关键作用的一组蛋白是半胱氨酸蛋白酶家族，它被称为 caspases，它似乎是大部分凋亡途径所必须的。Creagh & Martin (2001) *Biochem. Soc. Trans*, 29, 696-701; Dales 等 (2001) *Leuk. Lymphoma*, 41, 247-253。Caspases 反应于凋亡刺激，通过裂解各种细胞蛋白而启动凋亡，所述裂解导致了凋亡的典型的表现，包括细胞皱缩，细胞膜起泡和 DNA 断裂。Chang & Yang (2000) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 821-846。

促凋亡蛋白，如 Bax 或 Bak 也在所述凋亡途径发挥关键作用，它是通过释放 caspase-激活分子，如线粒体细胞色素 c，以便通过凋亡促进细胞的死亡而发挥作用的。Martinou & Green (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2, 63-67; Zou 等 (1997) *Cell*, 90, 405-413。诸如 Bcl-2 的抗凋亡蛋白，能通过拮抗促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 的活性而促进细胞的存活。Tsujimoto (1998) *Genes Cells*, 3, 697-707; Kroemer (1997) *Nature Med.*, 3, 614-620。Bax: Bcl-2 的比例，被认为是决定细胞命运的一条途径；过量的 Bax 能促进凋亡，而过量的 Bcl-2 能促

进细胞存活。Salomons 等 (1997) *Irasc. J. Cancer*, 71, 959-965; Wallace-Brodeur & Lowe (1999) *Cell Mol. Life Sci.*, 55, 64-75.

与凋亡相关的另一种关键的蛋白,是由肿瘤抑制基因 p53 编码的蛋白。该蛋白是能调节细胞生长的转录因子,并且诱导受到损伤和遗传学上不稳定的细胞的凋亡,一般认为是通过上调 Bax 进行的。Bold 等 (1997) *Surgical Oncology*, 6, 133-142; Ronen 等, 1996; Schuler & Green (2001) *Biochem. Soc. Trans.*, 29, 684-688; Ryan 等 (2001) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13, 332-337; Zörnig 等 (2001) *Biochem. Biophys. Acta*, 1551, F1-F37.

表征发生凋亡的细胞的独特的形态学特征,业已产生了多种用于评估凋亡的发生和发展的方法。可用于它们的检测的凋亡细胞的一个这样的特征是 flippase 的激活,它导致了磷脂酰丝氨酸——通常定位于质膜内小叶的磷脂的外在化。Fadok 等 (1992) *J. Immunol.*, 149, 4029-4035。具有外在化的磷脂酰丝氨酸的凋亡的细胞,可以通过用荧光染料偶联的磷脂酰丝氨酸-结合蛋白——膜联蛋白 V 染色进行检测。可以通过用荧光素-标记的脱氧核苷酸标记 DNA 片段的暴露的 3'-OH 末端,检测在凋亡过程中发生的特征性 DNA 断裂。可以将诸如 Hoechst 33258 的能结合核酸的荧光染料,用于检测凋亡细胞中的染色质浓缩和细胞核断裂。还可以通过存在于细胞提取物中的 caspase 蛋白裂解活性的程度,了解细胞群的凋亡的程度。

作为遗传学上确定的方法,像任何其他发育程序一样,凋亡可以通过突变中断。凋亡途径的改变,被认为在包括癌症的多种疾病过程中发挥关键作用。Wyllie 等 (1980) *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306; Thompson (1995) *Science*, 267, 1456-1462; Sen & D'Ignazio (1992) *FEBS Letters*, 307, 122-127; McDonnell 等 (1995) *Seminars in Cancer and Biology*, 6, 53-60。对癌症发生和进展的研究,传统上一直集中在细胞增殖方面。不过,凋亡在肿瘤发生中的重要作用最近业已明确。实际上,对凋亡的了解,大多是利用肿瘤模型获得的,因为在肿瘤细胞中凋亡的控制总是以某种方式改变的。Bold 等 (1997) *Surgical Oncology*, 6, 133-142.

在肿瘤发生期间,凋亡可以通过多种信号启动。细胞外信号包括

生长或存活因子消耗, 缺氧和离子化辐射。可以启动凋亡的内部信号包括 DNA 损伤, 缩短的端粒, 以及致癌突变。它们能产生不适当的增殖信号。Lowe & Lin (2000) *Carcinogenesis* 21, 485-495。离子化辐射以及几乎所有用于治疗恶性肿瘤的细胞毒性化疗试剂, 都被认为通过启动内源凋亡机制而起到诱导细胞死亡的作用。Rowan & Fisher (1997) *Leukemia*, 11, 457-465; Kerr 等 (1994) *Cancer*, 73, 2013-2026; Martin & Schwartz (1997) *Oncology Research*, 9, 1-5。

有证据表明, 在癌症进展的早期, 肿瘤细胞对能诱导凋亡的试剂(如离子化辐射或化疗药物)是敏感的。不过, 随着肿瘤的进展, 所述细胞产生了对凋亡刺激的抗性。Naik 等 (1996) *Genes and Development*, 10, 2105-2116。这可以解释为什么早期癌症对治疗的反应比晚期病变的反应好。晚期癌症产生的对化疗和放疗的抗性, 似乎与所述凋亡途径的改变相关, 这种改变限制了肿瘤细胞对凋亡刺激反应的能力。Reed 等 (1996) *Journal of Cellular Biology*, 60, 23-32; Meyn 等 (1996) *Cancer Metastasis Reviews*, 15, 119-131; Hannun (1997) *Blood*, 89, 1845-1853; Reed (1995) *Toxicology Letters*, 82-83, 155-158; Hickman (1996) *European Journal of Cancer*, 32A, 921-926。化疗的抗性分别与慢性淋巴细胞白血病和结肠癌中的抗凋亡基因 *bcl-2* 的超量表达和促凋亡 *bax* 基因的缺失或突变相关。

肿瘤细胞成功地建立播散性转移瘤的能力, 似乎与所述凋亡途径的改变相关。Bold 等 (1997) *Surgical Oncology*, 6, 133-142。例如, 肿瘤抑制基因 *p53* 的突变被认为出现在 70% 的肿瘤中。Evan 等 (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 825-834。使 *p53* 失活的突变, 限制了细胞反应于 DNA 损伤而诱导凋亡的能力, 使所述细胞容易发生进一步的突变。Ko & Prives (1996) *Genes and Development*, 10, 1054-1072。

因此, 凋亡与肿瘤转化和肿瘤转移的发生和进展密切相关, 并且对相关的凋亡途径的更好的理解, 可能导致用于通过基因治疗方法调节凋亡途径而治疗癌症的新的潜在目标。Bold 等 (1997) *Surgical Oncology*, 6, 133-142。

已知脱氧 8-羟-2, 7, 10-三氨基癸酸合成酶 (DHS) 和含有 8-羟-2, 7, 10-三氨基癸酸真核翻译起始因子-5A (eIF-5A), 在包括细

胞生长和分化的很多细胞过程中发挥重要作用。Hypusine——一种独特的氨基酸，存在于所有检查过的真核细胞和古细菌中，但不存在于真细菌中，而 eIF-5A 是唯一已知的含有 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸的蛋白。Park (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 7447-7449; Schümann & Klink (1989) *System. Appl. Microbiol.*, 11, 103-107; Bartig 等 (1990) *System. Appl. Microbiol.*, 13, 112-116; Gordon 等 (1987a) *J. Biol. Chem.*, 262, 16585-16589。活性 eIF-5A 是通过两个翻译后步骤形成的：第一个步骤是，通过脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸合成酶的催化，将亚精胺的 4-氨基丁基部分转移到前体 eIF-5A 的特殊赖氨酸的 α -氨基上，形成脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸残基；第二个步骤包括通过脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸羟化酶使该 4-氨基丁基部分羟基化，以便形成 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸。

eIF-5A 的氨基酸序列在不同物种之间是相当保守的，并且在 eIF-5A 中的 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸残基周围的氨基酸序列存在严格的保守性，这表明，这种修饰对于存活来说可能是重要的。Park 等 (1993) *Biofactors*, 4, 95-104。这一假设得到了有关发现的进一步支持，即到目前为止，均存在于酵母中的 eIF-5A 的两种同工型的失活，或 DHS 基因的失活，能催化它们的失活的第一个步骤，阻断细胞分裂。Schnier 等 (1991) *Mol. Cell. Biol.*, 11, 3105-3114; Sasaki 等 (1996) *FEBS Lett.*, 384, 151-154; Park 等 (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 1677-1683。不过，消耗酵母中的 eIF-5A 蛋白，仅仅导致了总体蛋白合成的小的减弱，这表明 eIF-5A 可能是 mRNA 的特定亚型的翻译所必须的，而不是蛋白总体合成所必须的。Kang 等 (1993)，“起始因子 eIF-5A 消耗对细胞增殖和蛋白合成的影响”，Tuite, M. (ed.), *Protein Synthesis and Targeting in Yeast*, NATO Series H. 最近有关能结合 eIF-5A 的配体拥有高度保守的基序的发现，也支持了 eIF-5A 的重要作用的观点。Xu & Chen (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 2555-2561。另外，发现修饰过的 eIF-5A 的 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸残基是与 RNA 的序列特异性结合所必须的，并且结合不会提供对核糖核酸酶的保护作用。

eIF-5A 的第一种 cDNA 是在 1989 年由 Smit-McBride 等克隆的，从这时候起，业已从包括酵母，大鼠，鸡胚胎，苜蓿和番茄在内的各种

真核生物中克隆了 eIF-5A 的 cDNA 或基因。Smit-McBride 等 (1989a) *J. Biol. Chem.*, 264, 1578-1583; Schnier 等 (1991) (酵母); Sano, A. (1995) in Imahori, M. 等 (eds), *Polyamine, Basic and Clinical Aspects*, VNU Science Press, The Netherlands, 81-88 (大鼠); Rinaudo & Park (1992) *FASEB J.*, 6, A453 (鸡胚胎); Pay 等 (1991) *Plant Mol. Biol.*, 17, 927-929 (苜蓿); Wang 等 (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 17541-17549 (番茄)。

另外, eIF-5A 的细胞内消耗, 导致了特定 mRNAs 在细胞核中的明显积累, 它表明 eIF-5A 可能负责特殊类型的 mRNAs 从细胞核到细胞质的穿梭运输。Liu & Tartakoff (1997) *Supplement to Molecular Biology of the Cell*, 8, 426a. Abstract No. 2476, 37th American Society for Cell Biology Annual Meeting. eIF-5A 在核孔相关的核内丝上的积累, 以及它与一般细胞核输出受体的相互作用, 进一步暗示了 eIF-5A 是核质穿梭蛋白, 而不是多核糖体的成分。Rosorius 等 (1999) *J. Cell Science*, 112, 2369-2380。

业已在各种人类组织和哺乳动物细胞系中研究了 eIF-5A mRNA 的表达。例如, 业已在血清剥夺之后, 在添加血清之后, 在人类成纤维细胞中观察到了 eIF-5A 表达的改变。Pang & Chen (1994) *J. Cell Physiol.*, 160, 531-538。另外, 业已在衰老的成纤维细胞中观察到了脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸合成酶活性和前体 eIF-5A 的丰度的与衰老相关的减弱, 不过, 尚未确定这种现象体现了同工型的不同改变的平均效果的可能性。Chen & Chen (1997b) *J. Cell Physiol.*, 170, 248-254。

研究业已表明, eIF-5A 可能是诸如 1 型人类免疫病毒 Rev 蛋白和 1 型人类 T 细胞白血病病毒 Rex 蛋白的病毒蛋白的细胞目标。Ruhl 等 (1993) *J. Cell Biol.*, 123, 1309-1320; Katahira 等 (1995) *J. Virol.*, 69, 3125-3133。初步研究表明, eIF-5A 可能通过与诸如 Rev 的其他 RNA-结合蛋白相互作用靶定 RNA, 这表明了这些病毒蛋白可能募集 eIF-5A, 进行病毒 RNA 加工。Liu 等 (1997) *Biol. Signals*, 6, 166-174。

已知脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸合成酶和 eIF-5A 在包括细胞生长和衰老在内的关键的细胞过程中发挥重要的作用。例如, 脱氧 8

-羟-2,7,10-三氨基癸酸合成酶表达在植物中的反义减弱,导致了叶片和果实的衰老延缓,这表明在植物中存在衰老诱导的eIF-5A的同工型。参见W0 01/02592; PCT/US01/44505; 美国申请号09/909, 796。在酵母中编码脱氧8-羟-2,7,10-三氨基癸酸合成酶或eIF-5A的基因的失活,导致了细胞分裂的抑制。Schnier等(1991) *Mol. Cell. Biol.*, 11, 3105-3114; Sasaki等(1996) *FEBS Lett.*, 384, 151-154; Park等(1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 1677-1683。

业已将亚精胺类似物成功地用于体外抑制脱氧8-羟-2,7,10-三氨基癸酸合成酶,并且用于在体内抑制8-羟-2,7,10-三氨基癸酸的形成,它伴随着蛋白合成和细胞生长的抑制。Jakus等(1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 13151-13159; Park等(1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 27827-27832。多胺本身,特别是腐胺和亚精胺似乎同样在细胞增殖和分化中发挥重要作用。Tabor & Tabor (1984) *Annu. Rev. Biochem.*, 53, 749-790; Pegg (1988) *Cancer Res.*, 48, 759-774。例如,其中的多胺生物合成途径业已被阻断的酵母突变体,是不能生长的,除非提供外源多胺。Cohn等(1980) *J. Bacteriol.*, 134, 208-213。

业已证实多胺能保护细胞免受凋亡的诱导。例如,业已通过亚精胺和精胺处理阻断了胸腺细胞的凋亡,这种作用的机制,似乎是抑制内切内切酶激活。Desiderio等(1995) *Cell Growth Differ.*, 6, 505-513; Brune等(1991) *Exp. Cell Res.*, 195, 323-329。另外,业已证实外源多胺能阻遏B细胞受体介导的凋亡,以及在单细胞寄生虫——克氏锥虫中的凋亡。Nitta等(2001) *Exptl. Cell Res.*, 265, 174-183; Piacenza等(2001) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98, 7301-7306。业已发现,低浓度的精胺和亚精胺能减少在新生大鼠的正常发育期间神经细胞减少的数量,并且在脑局部缺血期间保护脑免受神经原的损伤。Gilad等(1985) *Brain Res.*, 348, 363-366; Gilad & Gilad (1991) *Exp. Neurol.*, 111, 349-355。多胺还能抑制衰老,它是植物组织的编程的细胞死亡的一种形式。业已证实,亚精胺和腐胺能延缓康乃馨花和脱落的萝卜叶在收获后的衰老。Wang & Baker (1980) *Hort Science*, 15, 805-806 (康乃馨花); Altman (1982) *Physio. Plant.*, 54, 189-193 (脱落的萝卜叶)。

不过,在其他研究中,业已观察到了反应于外源多胺出现的凋亡的诱导。例如,人类乳腺癌细胞系通过诱导凋亡对多胺类似物作出反应,并且业已证实了过量的腐胺能诱导 DH23A 细胞的凋亡。McCloskey 等 (1995) *Cancer Res.*, 55, 3233-3236; Tome 等 (1997) *Biochem. J.*, 328, 847-854.

来自用多胺进行的以上实验的结果总体上表明, eIF-5A 的特殊同工型的存在在凋亡诱导中发挥作用。具体地讲,以上数据与存在通过 DHS 激活的 eIF-5A 的凋亡特异性同工型的观点一致。这种 DHS 反应需要亚精胺这一事实与业已证实多胺能诱导凋亡相关的蛋白水解的关键执行者 caspase 的激活的发现一致。Stefanelli 等 (2000) *Biochem. J.*, 347, 875-880; Stefanelli 等 (1999) *FEBS Lett.*, 451, 95-98. 在类似的静脉中,多胺合成的抑制剂可以延缓凋亡。Das 等 (1997) *Oncol. Res.*, 9, 565-572; Monti 等 (1998) *Life Sci.*, 72, 799-806; Ray 等 (2000) *Am. J. Physiol.*, 278, C480-C489; Packham & Cleveland (1994) *Mol. Cell Biol.*, 14, 5741-5747.

有关外源多胺能抑制和促进凋亡的发现,可以通过以下事实解释:根据所使用的水平,它们能够抑制导致 eIF-5A 激活,并因此阻碍凋亡的 DHS 反应,或通过毒性作用诱导凋亡。有关低浓度的外源多胺能阻断植物和动物系统的凋亡的发现,与低浓度的多胺以及它们的类似物起着 DHS 反应的竞争抑制剂的作用这一事实吻合。实际上,甚至是外源亚精胺——它是 DHS 反应的底物——也能通过底物阻碍所述反应。Jakus 等 (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 13153-13159.

不过,所有多胺以及它们的类似物在高浓度下都是有毒的,并且能够诱导凋亡。这是由于两种原因而出现的结果,尽管它们能够抑制 eIF-5A 的推测的凋亡特异性同工型的激活。首先,激活的 eIF-5A 具有长的半衰期。Torrelío 等 (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 145, 1335-1341; Dou & Chen (1990) *Biochim. Biophys. Acta.*, 1036, 128-137. 因此,通过抑制脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸合成酶活性而导致的激活的凋亡特异性 eIF-5A 的缺失,可能不会及时出现以阻断通过亚精胺的毒性作用所导致的凋亡。其次,多胺是脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸反应的竞争性抑制剂,因此即使是在有毒的浓度下,也不太可能完全阻断所述反应。

本发明涉及在即将诱导凋亡之前上调的 eIF-5A cDNA 的克隆。这种凋亡特异性 eIF-5A, 可能是介入导致凋亡的疾病状态的合适的目标, 因为它似乎在与凋亡途径相关的下游效应物和转录因子的转录后调节水平上起作用。具体地讲, 凋亡特异性 eIF-5A, 似乎能选择性地促进编码下游效应物的 mRNAs 和凋亡的转录因子从细胞核转运到细胞质中, 它们随后在细胞质中翻译。启动凋亡的最终决定, 似乎源于内部和外部促凋亡和抗凋亡信号之间的复杂的相互作用。Lowe & Lin (2000) *Carcinogenesis*, 21, 485-495。通过它的促进下游凋亡效应物和转录因子的翻译的能力, 所述凋亡相关的 eIF-5A 似乎能调整以上信号之间的平衡, 以便有利于凋亡。

正如前面所披露的, 业已明确的是, 抗肿瘤试剂能诱导凋亡, 并且凋亡途径的改变, 可以减弱药物诱导的细胞死亡。Schmitt & Lowe (1999) *J Pathol.*, 187, 127-137。例如, 很多抗癌药物能上调 p53, 并且业已丧失了 p53 的肿瘤细胞会产生对这些药物的耐药性。不过, 几乎所有的化疗剂都能不依赖于 p53 而诱导凋亡, 如果使用的剂量足够, 表明即使是耐药性肿瘤, 通向凋亡的途径也没有完全阻断。Wallace-Brodeur & Lowe (1999) *Cell Mol. Life Sci.*, 55, 64-75。这表明, 凋亡 eIF-5A 的诱导——尽管它可能不会纠正突变的基因——可能也能够避开 p53 依赖性途径, 并且通过促进其他途径诱导凋亡。

与凋亡相关的 eIF-5A 的诱导具有选择性地靶定癌细胞的潜力, 同时对正常的相邻的细胞少有或没有作用。这是由于在肿瘤细胞中表达的促有丝分裂致癌基因的表达, 提供了不存在于正常细胞中的特殊类型的 mRNA 形式的凋亡信号。Lowe 等 (1993) *Cell*, 74, 954-967; Lowe & Lin (2000) *Carcinogenesis*, 21, 485-495。例如, 野生型 p53 在 p53-突变型肿瘤细胞中的恢复, 可能直接诱导凋亡, 以及提高肿瘤细胞系和异种移植物的药物敏感性 (Spitz 等, 1996; Badie 等, 1998)。

凋亡-eIF-5A 的选择性源于以下事实: 即它能够通过介导从细胞核到细胞质的转运, 选择性地促进编码下游凋亡效应物和转录因子的 mRNAs 的翻译。因此, 为了使凋亡 eIF-5A 能发挥作用, 必须转录编码所述效应物和转录因子的 mRNAs。由于 mRNAs 能在癌细胞中转录, 而不能在相邻的正常细胞中转录, 可以预计凋亡 eIF-5A 能够促进癌细胞中的凋亡, 但是对正常细胞少有 (如果有) 影响。因此, 用凋亡相关的 eIF-

5A 恢复肿瘤细胞的凋亡潜力,可能通过选择性地靶定肿瘤细胞减轻癌症患者所经受的毒性和副作用。诱导凋亡 eIF-5A,还具有加强肿瘤细胞对抗癌药物的反应的潜力,并因此改善这些试剂对耐药性肿瘤的效果。后者又会导致较低剂量的抗癌药物对患者的效力和较低的毒性。

发明概述

本发明提供了分离的和/或纯化的大鼠凋亡特异性 eIF-5A 和 DHS 核酸和多肽,以及凋亡特异性 eIF-5A 和 DHS 的反义寡核苷酸和表达载体。本发明还提供了分离的和/或纯化的人 eIF-5A2 (在这里又被称为增殖性 eIF-5A)。本发明还提供了利用凋亡特异性 eIF-5A 和 DHS 调节凋亡的方法。

附图简述

图 1 表示大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 3' 末端的核苷酸序列和导出的氨基酸序列。

图 2 表示大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 5' 末端的核苷酸序列和导出的氨基酸序列。

图 3 表示大鼠黄体凋亡特异性 eIF-5A 全长 cDNA 的核苷酸序列。

图 4 表示大鼠凋亡特异性 DHS cDNA 的 3' 末端的核苷酸序列和导出的氨基酸序列。

图 5 是大鼠黄体凋亡特异性 eIF-5A cDNA 的全长核苷酸序列与人 eIF-5A 的核苷酸序列 (获取号 BC000751 或 NM_001970, SEQ ID NO: 3) 的比对。

图 6 是大鼠黄体凋亡特异性 eIF-5A cDNA 的全长核苷酸序列与人 eIF-5A 的核苷酸序列 (获取号 NM-020390, SEQ ID NO: 4) 的比对。

图 7 是大鼠黄体凋亡特异性 eIF-5A cDNA 的全长核苷酸序列与小鼠 eIF-5A 的核苷酸序列 (获取号 BC003889) 的比对。小鼠核苷酸序列 (获取号 BC003889) 是 SEQ ID NO: 5。

图 8 是大鼠黄体凋亡特异性 eIF-5A 的导出的全长氨基酸序列与人 eIF-5A 的导出的氨基酸序列 (获取号 BC000751 或 NM_001970) 的比对。

图 9 是大鼠黄体凋亡特异性 eIF-5A 的导出的全长氨基酸序列与人

eIF-5A 的导出的氨基酸序列 (获取号 NM-020390) 的比对。

图 10 是大鼠黄体凋亡特异性 eIF-5A 的导出的全长氨基酸序列与小鼠 eIF-5A 的导出的氨基酸序列 (获取号 BC003889) 的比对。

图 11 是大鼠黄体凋亡特异性 DHS cDNA 的部分长度的核苷酸序列与人 DHS 的核苷酸序列 (获取号 BC000333, SEQ ID NO: 8) 的比对。

图 12 是大鼠黄体凋亡特异性 eIF-5A cDNA 的限制图。

图 13 是部分长度的大鼠黄体凋亡特异性 DHS cDNA 的限制图。

图 14 是用 ^{32}P -dCTP-标记的大鼠黄体凋亡特异性 eIF-5A cDNA 的 3'-末端探测的总 RNA 的 Northern 印迹 (图 14A) 和溴化乙锭染色的凝胶 (图 14B)。

图 15 是用 ^{32}P -dCTP-标记的大鼠黄体凋亡特异性 DHS cDNA 的 3'-末端探测的总 RNA 的 Northern 印迹 (图 15A) 和溴化乙锭染色的凝胶 (图 15B)。

图 16 表示 DNA 序列梯实验, 其中, 在注射 PGF-2 α 之后, 检查了超数排卵的大鼠黄体中凋亡的程度。

图 17 是从凋亡的大鼠黄体中分离的基因组 DNA 分离的琼脂糖凝胶, 表示用 PGF-2 α 处理大鼠之后的 DNA 序列梯。

图 18 表示 DNA 序列梯实验, 其中, 在暴露于前列腺素 F-2 α (PGF-2 α) 之前用亚精胺处理过的大鼠中检查了超数排卵的大鼠黄体的分散细胞中的凋亡的程度。

图 19 表示 DNA 序列梯实验, 其中, 在用亚精胺和/或 PGF-2 α 处理过的大鼠中检查了超数排卵的大鼠黄体中凋亡的程度。

图 20 是用 ^{32}P -dCTP-标记的部分长度大鼠黄体凋亡特异性 eIF-5A cDNA 探测的大鼠基因组 DNA 的 Southern 印迹。

图 21 表示 pHM6, 它是哺乳动物表位标记表达载体 (Roche Molecular Biochemicals)。

图 22 是 ^{32}P -dCTP-标记的大鼠黄体凋亡特异性 DHS cDNA 的 3' 非翻译区探测的通过血清剥夺而诱导凋亡之后, 从 COS-7 细胞中分离的总 RNA 的 Northern 印迹 (图 22A) 和溴化乙锭染色的凝胶 (图 22B)。

图 23 是表示 COS-7 细胞的瞬时转染方法的流程图。

图 24 是在用 pHM6 转染之后, 在 COS-7 细胞中的外源蛋白的瞬时表达的 Western 印迹。

图 25 表示在用含有有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染 COS-7 细胞时, 通过 caspase 活性增强所体现的凋亡增强。

图 26 表示在用含有有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染 COS-7 细胞时, 通过 DNA 断裂增强所体现的凋亡增强。

图 27 表示在用含有有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染 COS-7 细胞时, 通过细胞核断裂增强所体现的凋亡增强。

图 28 表示在用含有有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染 COS-7 细胞时, 通过细胞核断裂增强所体现的凋亡增强。

图 29 表示在用含有有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染 COS-7 细胞时, 通过磷脂酰丝氨酸暴露所体现的凋亡增强。

图 30 表示在用含有有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染 COS-7 细胞时, 通过增强了的磷脂酰丝氨酸暴露体现的增强了的凋亡。

图 31 表示在用含有有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染 COS-7 细胞时, 通过细胞核断裂增强所体现的凋亡增强。

图 32 表示在用含有有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染 COS-7 细胞时凋亡增强。

图 33 表示在用含有有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染 COS-7 细胞时 Bcl-2 的下调。图 33A 是考马斯亮兰染色的蛋白印迹; 图 33B 是相应的 Western 印迹。

图 34 是用 Bcl-2 作探针检测的, 用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的 COS-7 细胞的考马斯亮兰染色的蛋白印迹 (图 34A) 和相应的 Western 印迹 (图 34B)。

图 35 是用 c-Myc 作探针检测的, 用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的 COS-7 细胞的考马斯亮兰染色的蛋白印迹 (图 35A) 和相应的 Western 印迹 (图 35B)。

图 36 是用 p53 作探针检测的, 用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的 COS-7 细胞的考马斯亮兰染色的蛋白印迹 (图 36A) 和相应的 Western 印迹 (图 36B)。

图 37 是用抗-[HA]过氧化物酶探针检测的在 COS-7 细胞中 pHM6-

全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 表达的考马斯亮兰染色的蛋白印迹 (图 37A) 和相应的 Western 印迹 (图 37B), 以及用 p53 作探针检测的在 COS-7 细胞中 pHM6-全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A 表达的考马斯亮兰染色的蛋白印迹 (图 37C) 和相应的 Western 印迹 (图 37D)。

图 38 是从 RK0 细胞中分离的人 eIF5A2 与人 eIF5A2 的序列 (Genbank 获取号 XM_113401) 的比对。

图 39 是表示在瞬时转染之后, 在 RK0 和 RK0-E6 细胞中出现的凋亡百分比的曲线图。用 pHM6-LacZ 或 pHM6-eIF5A1 瞬时转染 RK0 和 RK0-E6 细胞。相对于没有用放线菌素 D 处理过的 pHM6-LacZ 转染的细胞, 用放线菌素 D 处理过的, 并且用 pHM6-eIF5A1 转染的 RK0 细胞表现出凋亡增强了 240%。相对于没有用放线菌素 D 处理过的, 用 pHM6-LacZ 转染的细胞, 用放线菌素 D 处理过的, 并且用 pHM6-eIF5A1 转染的 RK0-E6 细胞表现出凋亡增加了 105%。

图 40 是表示在瞬时转染之后, 在 RK0 细胞中出现的凋亡的百分比的曲线图。用 pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A1, pHM6-eIF5A2, 或 pHM6-截短的 eIF5A1 瞬时转染 RK0 细胞。相对于 pHM6-LacZ 转染的对照细胞, 用 pHM6-eIF5A1 转染的细胞表现出凋亡增加了 25%。对于用 pHM6-eIF5A2 或 pHM6-截短的 eIF5A1 转染的细胞来说, 这种增加不明显。

图 41 是表示在瞬时转染之后出现在 RK0 细胞中的凋亡的百分比的曲线图。不对 RK0 细胞进行转染, 或者用 pHM6-LacZ 或 pHM6-eIF5A1 瞬时转染。在对转染效率进行校正之后, 60 % 的用 pHM6-eIF5A1 转染的细胞是凋亡的。

图 42 提供了在瞬时转染之后, RK0 细胞凋亡的流式细胞术分析的结果。RK0 细胞是未转染过的, 或是用 pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A1, pHM6-eIF5A2, 或 pHM6-截短的 eIF5A1 瞬时转染过的。该表表示了根据每一个门的峰下面的面积计算的发生凋亡的细胞的百分比。在对未转染过的细胞中的背景凋亡和转染效率进行校正之后, 80% 的用 pHM6-eIF5A1 转染的细胞表现出凋亡。用 pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A2 或 pHM6-截短的 eIF5A1 转染的细胞, 仅表现出背景水平的凋亡。

图 43 提供了在用 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 的放线菌素 D 处理 0, 3, 7, 24, 和 48 小时之后, 从 RK0 细胞中提取的蛋白的 Western 印迹。上部的图

片表示用抗-p53 作为第一抗体的 Western 印迹。中间的图片表示用抗-eIF5A1 作为第一抗体的 Western 印迹。底部的图片表示在化学发光检测之后，用考马斯亮兰染色的用于抗-eIF5A1 印迹的膜，用于证实相同的加样量。通过放线菌素 D 处理使 p53 和 eIF5A1 都得到了上调。

发明详述

本发明部分基于编码参与凋亡的(凋亡特异性)从大鼠黄体中分离的 eIF-5A 的全长 cDNA 的发现和表征。因此，在一种实施方案中，本发明提供了包括编码大鼠凋亡特异性 eIF-5A 多肽的核苷酸序列的分离的核酸。本发明还提供了包括大鼠凋亡特异性 eIF-5A 多肽的氨基酸序列的纯化的多肽。大鼠凋亡特异性 eIF-5A 多肽表示大鼠特异性的任何以下多肽，它在进行凋亡的细胞中的表达有所不同，并且是由于脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸残基的形成导致的，这种脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸残基的形成是通过在脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸合成酶的催化作用下将亚精胺的 4-氨基丁基部分转移到前体 eIF-5A 的特殊的保守赖氨酸的 α -氨基上，以及通过脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸羟化酶使 4-氨基丁基部分羟化形成 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸，从而激活 eIF-5A。

另外，可以将本发明的核酸和多肽-大鼠凋亡特异性 eIF-5A 序列用于从其他细胞，组织，器官，或动物中分离凋亡特异性核酸和多肽，其中使用本发明所提供的说明以及本领域技术人员所熟知的技术。本发明还提供了适合用作检测编码本发明的大鼠凋亡特异性 eIF-5A 多肽的核酸的引物或杂交探针的核酸分子。

本发明的核酸可以是 DNA，RNA，DNA/RNA 双链体，蛋白-核酸(PNA)，或它们的衍生物。在本文中，当核酸或多肽基本上不含细胞材料或不含化学前体或其他化学物质时，就被说成是“分离的”或“纯化的”。应当理解的是，术语分离的或纯化的不表示含有大量其他序列片段的文库类型的制剂。可以将本发明的核酸或多肽纯化到均匀或达到其他纯度。纯化的水平基于预期的用途。关键特征是该制剂可以实现所述核酸或多肽的理想的功能，即使在存在大量其他成分的情况下也是如此。

所述分离的多肽可以从天然表达它的细胞中纯化，从业已改变成

能表达它的（重组的）细胞中纯化，或利用已知的蛋白合成方法合成。例如，蛋白的重组生产包括将编码诱导凋亡性 eIF-5A 或 DHS 的核酸分子克隆到表达载体上。将所述表达载体导入宿主细胞，并且在所述宿主细胞中表达所述蛋白。然后可以采用标准的蛋白纯化技术，通过任何合适的纯化方案，从所述细胞中分离所述蛋白。

编码本发明的大鼠凋亡特异性 eIF-5A 多肽的分离的核酸，优选具有 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列，而本发明的纯化的多肽具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。本发明的大鼠凋亡特异性 eIF-5A 核酸和多肽还包括分别与 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 具有显著序列同一性或同源性的序列，以及它的功能性衍生物和变体。

在本文中，术语“显著的序列同一性”或“显著的同源性”被用于表示与另一种序列具有显著的结构或功能同一性的序列。具有显著的序列同一性或显著的同源性序列之间的任何结构或功能上的差别都是微不足道的；就是说，它们不会影响所述序列在所需要的用途中发挥指定作用的能力。例如，差别可能是由于不同物种之间密码子使用上的固有的变化所导致的。如果在两种或两种以上不同序列之间存在大量的序列重叠或类似性，或者如果即使是在序列长度或结构不同的情况下不同的序列也表现出类似的生理学特征，就认为结构差别是微不足道的。例如，所述特征包括在特定条件下杂交的能力，或者对于蛋白来说，免疫学交叉反应性，类似的酶促活性等。技术人员可以通过本领域已知的方法方便地确定每一种这样的特征。

另外，如果在两种核苷酸序列之间具有至少大约 70% 或更高，更优选 80% 或更高，甚至更优选大约 90% 或更高，最优选大约 95% 或更高的序列相似性，就认为这两种核苷酸序列是“基本上互补的”。如果多肽的活性，或功能上相关的部分之间具有至少 50%，优选至少 70%，更优选至少 80%，甚至更优选至少 90%，最优选至少 95% 的相似性，就认为这两种氨基酸序列是基本上同源的。

为了确定两种序列的百分同一性，出于最佳比较目的对所述序列进行比对（例如，可以在第一种或第二种氨基酸或核酸序列中之一或两者上引入空位，以便进行最佳比对，并且出于比较的目的可以忽略非同源性序列）。在优选实施方案中，出于比较目的，对参考序列的至少 30%，40%，50%，60%，70%，80%，或 90% 或更大的长度进行了比对。然后比

较了在相应的氨基酸位置或核苷酸位置上的氨基酸残基或核苷酸。当第一种序列上的位置被第二种序列上的相应位置上的相同的氨基酸残基或核苷酸所占据时，这两个分子在该位置上就是相同的（在本文中，氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”）。两种序列之间的百分同一性是这两个序列之间所共有的相同位置数量的函数，考虑到了为了两个序列的最佳比对需要引入的空位的数量和每一个空位的长度。

两个序列之间的序列比较和百分同一性和相似性的确定，可以用数学算法完成。（Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and sequence Analysis primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991）。

还可以将本发明的核酸和蛋白序列用作“查询序列”对序列数据库进行检索，例如，鉴定其他家族成员或相关的序列。所述检索可以用 Altschul 等（(1990) J. Mol Biol. 215: 403-10）的 NBLAST 和 XBLAST 程序（2.0 版）进行。BLAST 核苷酸检索可以用 NBLAST 程序进行。BLAST 蛋白检索可以用 XBLAST 程序进行，以便获得与本发明的蛋白同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的带空位的比对，可以采用披露于以下文献中的带空位的 BLAST: Altschul 等（1997）Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402。在采用 BLAST 和带空位的 BLAST 程序时，可以采用相应程序（例如，XBLAST 和 NBLAST）的默认参数。

术语核酸的“功能性衍生物”，在本文中被用于表示基因或核苷酸序列的同源物或类似物。功能性衍生物能够保留特定基因的至少一部分功能，使它能够用于本发明。本文所披露的凋亡特异性 eIF-5A 多肽的“功能性衍生物”是凋亡特异性 eIF-5A 的片段，变体，类似物，或化学衍生物，它保留了至少一部分凋亡特异性 eIF-5A 活性或与对凋亡特异性 eIF-5A 特异的抗体的免疫交叉反应性。凋亡特异性 eIF-5A 多肽

的片段表示该分子的任何亚型。

功能性变体还可以包含类似氨基酸的取代，它不会导致功能上的改变或导致不明显的改变。对功能重要的氨基酸可以通过本领域所公知的方法鉴定，如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham 等 (1989) *Science* 244: 1081-1085)。后一种方法能够在分子的每一个残基上导入单个丙氨酸突变。然后检查所得到的突变分子的生物学活性，如激酶活性或将其用于诸如体外增殖活性的分析。还可以通过诸如结晶，核磁共振或光亲和标记的结构分析，确定对结合配偶体/底物结合重要的位点(Smith 等 (1992) *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; de Vos 等 (1992) *Science* 255: 306-312)。

“变体”表示与完整的基因或它的片段基本上相似的分子，如具有一个或多个取代的核苷酸的核苷酸取代变体，不过，它保留了与特定基因杂交或编码能与天然 DNA 杂交的 mRNA 转录物的能力。“同源物”表示来自不同的动物属或种的片段或变体序列。“类似物”表示基本上类似于或相对整个分子或它的变体或片段起作用的非天然分子。

变体肽包括天然存在的变体，以及通过本领域众所周知的方法生产的变体。所述变体可以利用分子技术和本文所披露的序列信息方便地鉴定/制备。另外，可以根据与本发明的 eIF-5A 或 DHS 蛋白的序列和/或结构同源性，方便地从其他蛋白中区分所述变体。所存在的同源性/同一性程度主要取决于该蛋白是功能性变体或是非功能性变体，存在于共生同源物家族中的趋异量，以及直向同源物之间的进化距离。

本发明的 eIF-5A 或 DHS 蛋白的非天然存在的变体，可以利用重组技术方便地制备。所述变体包括，但不局限于所述蛋白的氨基酸序列上的缺失，添加和取代。例如，一种类型的取代是保守性氨基酸取代。所述取代是通过具有类似特征的另一种氨基酸取代蛋白上的特定氨基酸。通常被认为是保守性取代的是脂族氨基酸 Ala, Val, Leu 和 Ile 之间的彼此取代；羟基残基 Ser 和 Thr 的相互交换；酸性残基 Asp 和 Glu 的交换；酰胺残基 Asn 和 Gln 之间的取代；碱性残基 Lys 和 Arg 之间的交换；以及芳族残基 Phe 和 Tyr 之间的取代。有关哪一种氨基酸改变可能在表型上是沉默的指导，披露于以下文献中：Bowie 等，*Science* 247: 1306-1310 (1990)。

另外，但同样优选的是，编码本发明的大鼠凋亡特异性 eIF-5A 多

肽的核酸，能在高严格条件下与互补于 SEQ ID NO: 1 的核苷酸杂交。本文所使用的术语“杂交”通常被用于表示在适当严格条件下的核酸杂交，这种条件是本领域技术人员根据探针序列和靶序列的性质很容易得出的。杂交和洗涤条件为本领域技术人员所熟知，并且条件的调整取决于需要的严格性，可以通过改变孵育时间，温度，和/或溶液的离子强度方便地实现。例如，参见 Sambrook, J. 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989。

条件的选择是通过被杂交的序列的长度，特别是探针序列的长度，核酸的相对 G-C 含量以及允许的错配量决定的。当需要在具有较低程度的互补性的两条链之间具有部分杂交时，低严格性条件是优选的。当需要完美的或接近完美的互补性时，高严格性条件是优选的。对典型的高严格性条件来说，所述杂交溶液含有 6×S. S. C., 0.01 M EDTA, 1×Denhardt's 溶液和 0.5% SDS。对于克隆 DNA 的片段来说，杂交大约在 68℃ 下进行大约 3-4 小时，而对于总的真核 DNA 来说，杂交进行大约 12-16 小时。对于较低严格性来说，将杂交温度降低到低于双链体的解链温度 (T_m) 大约 42℃。已知 T_m 是 G-C 含量和双链体长度以及溶液的离子强度的函数。

在本文中，短语“与相应部分杂交的”DNA 或 RNA 分子表示杂交的分子，例如，寡核苷酸，多核苷酸或任何分子序列（有义或反义方向）能够识别另一个核酸分子上的具有大致相同的大小并且具有能够在合适条件下实现杂交的与其足够的序列相似性的序列，并且与其杂交。例如，长度为 100 个核苷酸的有义分子能够识别核苷酸序列的大约 100 个核苷酸的部分，并且与其杂交，只要在两个序列之间存在大约 70% 或更高的序列相似性就行。应当理解的是，“相应部分”的大小，允许在杂交中存在某些错配，因此，“相应部分”可能小于或大于与它杂交的分子，例如，大或者小 20-30%，优选大或小不超过大约 12-15%。

另外，多肽的功能性变体，还可以包括类似氨基酸的取代，它不会导致功能上的改变或导致不明显的改变。对功能重要的氨基酸可以通过本领域所公知的方法鉴定，如定点诱变或丙氨酸扫描诱变 (Cunningham 等, *Science* 244: 1081-1085 (1989))。后一种方法在分子的每一个残基上引入一个丙氨酸突变。然后检测所得到的突变分

子的生物学活性或用于分析。

例如，凋亡特异性 eIF-5A 的类似物表示基本上类似于完整蛋白或它的片段的非天然存在的蛋白或肽模拟物。凋亡特异性 eIF-5A 的化学衍生物，包括正常情况下不是所述肽或肽片段的一部分的其他化学部分。可以通过让所述肽的靶定的氨基酸残基与有机衍生化试剂起反应，将修饰导入肽或它的片段，所述有机衍生化试剂能够与选定的侧链或末端残基起反应。

从大鼠黄体中分离的编码凋亡特异性 eIF-5A 的全长 cDNA 的最初发现和表征，导致了编码 DHS 的部分长度的 cDNA 克隆的发现和表征，后者也是从大鼠黄体中分离的，并且与凋亡相关。因此，在其他实施方案中，本发明提供了包括编码大鼠凋亡特异性 DHS 多肽的核苷酸序列的分离的核酸。还提供了包括大鼠凋亡特异性 DHS 多肽的氨基酸序列的纯化的多肽。大鼠凋亡特异性 DHS 多肽，表示对大鼠特异的任何合适的多肽，它在凋亡细胞中的表达不同，并且它能催化脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸残基的形成，这是通过将亚精胺的 4-氨基丁基部分转移到失活的 eIF-5A 的特殊的保守性赖氨酸的 α -氨基上形成脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸，从而激活 eIF-5A。

编码本发明的大鼠凋亡特异性 DHS 多肽的分离的核酸优选具有 SEQ ID NO: 6 的核苷酸序列，而本发明的纯化的多肽具有 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列。本发明的大鼠凋亡特异性 DHS 核酸和多肽还包括分别与 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7 具有显著序列同一性或同源性的序列，以及前面业已披露过的它们的功能性衍生物和变体。另外，并且同样优选的是，本发明的分离的核酸具有能够在严格条件下与 SEQ ID NO: 6 的互补体杂交的核苷酸序列，该序列同样在前面披露过。

就本文所披露的大鼠凋亡特异性 eIF-5A 序列的核酸和多肽而言，可以将本发明的大鼠凋亡特异性 DHS 序列的核酸和多肽用于从包括人类在内的其他动物中分离凋亡特异性 DHS 核酸和多肽。从动物和人类体内分离所述 DHS 序列，可以通过本领域公知的方法和本文所提供的指导，根据物种之间至少 80% 的序列同一性实现。本发明还提供了适合作为用于检测编码本发明的大鼠凋亡特异性 DHS 多肽的引物或杂交探针的核酸分子。

凋亡特异性 eIF-5A 和 DHS 是用于调节凋亡，包括造成疾病过程

的凋亡的合适的目标，因为它可能在参与凋亡途径的下游效应物和转录因子的转录后调节方面发挥作用。因此，本发明还提供了通过给所述细胞施用能够调节凋亡特异性 eIF-5A 和/或 DHS 功能的试剂而调节细胞的凋亡的方法。本领域技术人员应当理解的是，所述试剂可以是仅仅调节凋亡特异性 eIF-5A 功能的试剂，仅仅调节凋亡特异性 DHS 功能的试剂，或调节凋亡特异性 eIF-5A 和 DHS 功能这两者的试剂。

可以通过细胞中凋亡特异性 eIF-5A 和/或 DHS 功能的正常水平的任何合适的改变而调节凋亡。正如本文所的目的所在，修饰或改变可以是完整的或部分的，并且可以包括转录或翻译控制的改变或改变所述细胞中的凋亡特异性 eIF-5A 和/或 DHS 功能的其他改变。凋亡特异性 eIF-5A 或 DHS 功能表示与脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸残基形成相关的任何活性，该残基的形成是通过以下过程实现的：将亚精胺的 4-氨基丁基部分转移到前体 eIF-5A 特殊的保守性赖氨酸的 α -氨基上，这一过程是通过 DHS 催化的，并且通过脱氧 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸羟化酶羟化该 4-氨基丁基部分，以便形成 8-羟-2,7,10-三氨基癸酸，从而激活 eIF-5A。

在本发明的一种实施方案中，所述试剂能够抑制凋亡特异性 eIF-5A 和/或 DHS 功能，从而抑制凋亡。抑制凋亡，表示在强度和/或数量方面的任何减少，和/或在凋亡所特有的任何或全部业已明确的形态学特征，例如，细胞皱缩，染色质浓缩，细胞核断裂，和细胞膜起泡发作的推迟。

能够抑制凋亡特异性 eIF-5A 和/或 DHS 功能的一种试剂是反义寡核苷酸。所述反义寡核苷酸优选具有编码凋亡特异性 eIF-5A 多肽和/或凋亡特异性 DHS 多肽的一部分的核苷酸序列。很多编码凋亡特异性 eIF-5A 多肽和/或 DHS 多肽的合适的核酸序列为本领域所熟知。例如，SEQ ID NOS: 1, 3, 4, 5, 11, 15, 19, 20, 和 21 (凋亡特异性 eIF-5A 核酸序列)，SEQ ID NOS: 6 和 8 (凋亡特异性 DHS 核酸序列)，SEQ ID NOS: 12 和 16 (凋亡特异性 eIF-5A 多肽序列)，和 SEQ ID NO: 7 (凋亡特异性 DHS 多肽序列)，或它的一部分，提供了合适的序列。其他合适的序列可以使用已知序列作探针，按照本文所披露的方法发现。

因此，本发明还提供了编码凋亡特异性 eIF-5A 多肽和/或凋亡特异性 DHS 多肽的一部分，或其互补体的反义寡核苷酸。本发明的反义

寡核苷酸可以是 RNA 或 DNA 形式的, 例如, cDNA, 基因组 DNA, 或合成的 RNA 或 DNA。所述 DNA 可以是双链的或单链的, 并且如果是单链, 可以是编码链或非编码链。寡聚化合物与它的靶核酸的特异性杂交, 导致了对所述核酸正常功能的干扰, 通常被称为“反义的”。要干扰的 DNA 的功能包括复制和转录。例如, 要干扰的 RNA 的功能包括将 RNA 转运到蛋白翻译位点, 由 RNA 翻译成蛋白, 剪接 RNA 以便形成一种或多种 mRNA 类型, 以及可以通过 RNA 进行或促进的催化活性。所述反义寡核苷酸的总体效果是抑制凋亡特异性 eIF-5A 和/或 DHS 的表达, 和/或所产生的活化的凋亡特异性 eIF-5A 的数量。

另外, 可以通过施用能够抑制 DHS 酶促反应的化学试剂而抑制凋亡特异性 DHS 对凋亡特异性 eIF-5A 的激活。例如, 当在通过注射 PGF-2 α 诱导凋亡之后, 用亚精胺, 即一种 DHS 反应的抑制剂处理所述动物时, DNA 序列梯的出现反映出在大鼠黄体中的凋亡被推迟(图 18-19)。Jakus 等, (1993) J. Biol. Chem. 268: 13151-13159。

还可以通过添加能降解凋亡特异性 eIF-5A DNA, RNA, 或蛋白, 或能降解凋亡特异性 DHS DNA, RNA, 或蛋白的试剂, 抑制或显著减弱凋亡, 从而防止通过凋亡特异性 DHS 激活凋亡特异性 eIF-5A。在本发明的另一种实施方案中, 内源哺乳动物凋亡特异性 DHS, 凋亡特异性 eIF-5A, 或这两者的表达的抑制, 是通过使用核酶影响的。合适药物的例子包括能通过凋亡特异性 DHS 抑制凋亡特异性 eIF-5A 激活的药物, 能通过脱氧 8-羟-2, 7, 10-三氨基癸酸羟化酶抑制凋亡特异性 eIF-5A 激活的药物, 能抑制凋亡特异性 DHS 的转录和/或翻译的药物, 能抑制凋亡特异性脱氧 8-羟-2, 7, 10-三氨基癸酸羟化酶的转录和/或翻译的药物, 以及能抑制凋亡特异性 eIF-5A 的转录或翻译的药物。能通过凋亡特异性 DHS 抑制 eIF-5A 激活的药物的例子包括亚精胺, 1, 3-二氨基-丙烷, 1, 4-二氨基-丁烷(腐胺), 1, 7-二氨基-庚烷, 或 1, 8-二氨基-辛烷。

还可以通过灭活细胞中的编码凋亡特异性 eIF-5A 的基因, 抑制凋亡特异性 eIF-5A。所述灭活可以通过去除所述细胞中的基因, 或通过向所述基因中导入缺失或突变, 以便灭活所述基因而实现。所述基因还可以通过在该基因中插入另一个 DNA 片段而灭活, 从而不发生内源凋亡特异性 eIF-5A 蛋白的表达。同样, 可以通过灭活细胞中的编码凋亡特

异性 DHS 的基因，抑制凋亡特异性 eIF-5A 的激活。用于将突变，如缺失和插入导入真核细胞的基因的方法为本领域所公知，例如，美国专利号 5, 464, 764。可用于细胞中基因突变的寡核苷酸和表达载体，可以按照本领域所公知的方法和本文所提供的指导制备；例如，用于制备和表达反义寡核苷酸的方法，可用于制备用于在细胞中使基因突变的寡核苷酸和表达载体。

还可以通过抑制细胞中编码凋亡特异性 eIF-5A 的基因的表达，抑制凋亡特异性 eIF-5A 的表达。所述灭活可以通过共抑制实现，例如，通过将编码凋亡特异性 eIF-5A 的核苷酸序列导入细胞，以便发生共抑制。同样，可以通过共抑制而抑制细胞中编码凋亡特异性 DHS 的基因的表达，抑制凋亡特异性 eIF-5A 的激活。用于共抑制的寡核苷酸和表达载体可以按照本领域所公知的方法和本文所提供的指导制备；例如，用于制备和表达反义寡核苷酸的方法可用于制备用于共抑制的寡核苷酸和表达载体。用于共抑制的方法为本领域所公知，例如，参见美国专利号 5, 686, 649。

抑制（例如，通过反义，突变或共抑制）的一个结果是，减少了内源可翻译的凋亡特异性 eIF-5A 或 DHS-编码 mRNA 的量。因此，减少了所产生的凋亡特异性 DHS 蛋白的数量，从而减少了激活的 eIF-5A 的量，后者又减少了凋亡特异性蛋白的翻译。由于从头开始的蛋白合成是凋亡开始所必须的，由此抑制或延缓了凋亡。

在本发明的另一种实施方案中，所述试剂能够诱导凋亡特异性 eIF-5A 或 DHS 功能，从而诱导凋亡。诱导凋亡，表示任何或所有业已明确的凋亡所特有的形态学特征出现的强度或数量方面的任何增加或加速，所述形态学特征例如，细胞皱缩，染色质浓缩，细胞核断裂，以及细胞膜起泡。

任何能诱导凋亡特异性 eIF-5A 和/或 DHS 功能的合适的试剂都可以使用。本领域技术人员可以理解的是，可以施用失活的和活性形式的凋亡特异性 eIF-5A。如果施用失活形式的，或 8-羟-2, 7, 10-三氨基癸酸-未修饰形式，天然的凋亡特异性 DHS 将会激活 eIF-5A。编码凋亡特异性 eIF-5A 多肽和/或 DHS 多肽的很多合适的核酸序列为本领域所公知。例如，SEQ ID NOS: 1, 3, 4, 5, 11, 15, 19, 20, 和 21 (凋亡特异性 eIF-5A 核酸序列)，SEQ ID NOS: 6 和 8 (凋亡特异性 DHS 核

酸序列), SEQ ID NOS: 12 和 16 (凋亡特异性 eIF-5A 多肽序列), 和 SEQ ID NO: 7 (凋亡特异性 DHS 多肽序列), 或它们的部分, 提供了合适的序列。其他合适的序列可以利用所述已知序列作探针, 按照本文所披露的方法去发现。

例如, 可以给细胞施用裸露的核酸(裸露的 DNA 载体, 如寡核苷酸或质粒), 或多肽, 包括重组生产的多肽。重组生产的多肽表示将编码 eIF-5A 或 DHS 蛋白的 DNA 序列置于合适的表达载体中, 下面将对此作详细说明。用所述表达载体转染所述宿主, 然后生产所需要的多肽。然后从所述宿主细胞中分离所述多肽。例如, 重组凋亡诱导性 eIF-5A 蛋白, 可以由本领域技术人员用中国仓鼠卵巢(CHO)细胞制备, 并且通过重组 DHS 激活。Wang 等 (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 17541-17549; Eriksson 等, (2001) *Semin. Hemato.*, 38, 24-31。所述多肽还可以是合成的, 它是使用公知的蛋白合成方法合成的。

多肽摄取可以使用配体, 例如, 源于炭疽的配体而加速, 所述配体介导将它吸收到多种细胞中。Liu 等 (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 46326-46332。还可以使用脂质体将重组蛋白施用于哺乳动物的靶细胞, 组织或器官。包含所述蛋白的脂质体是通过静脉内途径施用的。可以通过将特定细胞受体的配体掺入到所述脂质体中实现靶向。例如, 参见 Kaneda, *Adv Drug Delivery Rev* 43: 197-205 (2000)。

能够诱导凋亡特异性 eIF-5A 或 DHS 功能的一种优选的试剂是表达载体。因此, 本发明提供了具有可操作地与编码凋亡特异性 eIF-5A 多肽和/或 DHS 多肽的核酸连接的表达载体。本发明的表达载体可以是 RNA 或 DNA 形式的, 例如, cDNA, 基因组 DNA, 或合成的 RNA 或 DNA。所述 DNA 可以是双链的或单链的, 并且如果是单链, 它可以是编码链或非编码链。任何合适的表达载体(例如, 参见 Pouwels 等, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (Elsevier, N. Y.: 1985)) 都可以使用。所述表达载体优选具有可操作地连接在编码凋亡特异性(相关的) eIF-5A 多肽和/或凋亡特异性(相关) DHS 多肽的核苷酸序列上的启动子序列。

在所述表达载体中, 需要的核酸和启动子是可操作地连接的, 以便所述启动子能够驱动所述核酸的表达。只要所述核酸能够表达, 任何合适的启动子都可以使用。所述合适的启动子的例子包括各种病毒启动子, 真核启动子, 以及组成型活性启动子。只要保持这种可操作地连接,

所述表达载体可以包括一种以上核酸（例如，编码凋亡特异性 eIF-5A 和/或 DHS 的核酸）。所述表达载体可任选包括其他因子，如聚腺苷酸化序列，核糖体进入位点，转录调节因子（例如，增强子，沉默子等），用于增强载体或转录物在细胞内的稳定性或需要的转录物的在细胞内的翻译或加工的其他序列（例如，分泌信号，前导序列等），或其他任何合适的因子。

表达载体可来自源于病毒，如腺病毒，腺伴随病毒，疱疹病毒，逆转录病毒或慢病毒。可以将本发明的表达载体转染到宿主细胞中，所述宿主细胞包括，但不局限于细菌物种，哺乳动物或昆虫宿主细胞系统，包括杆状病毒系统（例如，参见 Luckow 等，Bio/Technology, 6, 47 (1988)），和建立的细胞系，如 293, COS-7, C127, 3T3, CHO, HeLa, BHK 等。

腺病毒是优选的，这是因为与质粒和其他病毒载体（例如，单纯疱疹病毒）不同，腺病毒载体能够在分裂的和非分裂的细胞中实现基因转移，能够在诸如心肌的心血管相关部位，血管内皮，和骨骼肌中实现高水平的蛋白表达。另外，通过腺病毒载体转移的基因在染色体外部位起作用，因此，具有较小的将转移的基因不适当地插入宿主基因组的重要部位的风险。同样理想的是，所述腺病毒载体缺乏至少一种病毒复制所需要的基因功能。所述腺病毒载体优选缺乏腺病毒基因组的 E1, E2, 和/或 E4 区的至少一种必须基因功能。更优选的是，所述载体还缺乏腺病毒基因组的 E3 区的至少一部分（例如，E3 区的 XbaI 位点缺失）。

可以通过简单地将病毒添加到培养基中，将重组腺病毒递送到培养的细胞中。可以通过将病毒颗粒直接注射到血流或注射到需要的组织中，实现宿主动物/人类的感染。通过让所述病毒与脂质体（例如，Lipofectin, Life Technologies）或聚乙二醇复合，延长所述病毒在血清中的半衰期。所述腺病毒载体通常是通过病毒纤维蛋白的按钮结构域与柯萨奇病毒和腺病毒受体 CAR 之间的相互作用进入细胞的。可以通过遗传工程改造使所述病毒能表达对特定细胞受体特异的配体，将所述病毒载体导向于特殊细胞或不能表达 CAR 的细胞。

在另一种实施方案中，可以通过用化学物质化学上调内源凋亡特异性 eIF-5A 或凋亡特异性 DHS，或这两者的转录，或通过化学增强凋亡特异性 eIF-5A 的激活，启动或增强凋亡。在一种这样的实施方案中，

给所述动物/人的癌细胞或肿瘤施用 $\text{PGF-2}\alpha$ ，以便上调 DHS 和 eIF-5A 的转录。

凋亡特异性 eIF-5A 是调节凋亡的合适目标，包括导致疾病过程的凋亡，因为它可能在参与凋亡途径的下游效应物和转录因子的转录后调节中起作用。本发明的单独或组合调节凋亡特异性 eIF-5A 和凋亡特异性 DHS 的方法，可以在动物细胞中进行，导致了凋亡的诱导或增强，并且产生了用于治疗 and 预防疾病的新方法和组合物，所述疾病是由与细胞不能够发生凋亡相关的病原学的原因导致的。

很多重要的人类疾病是由凋亡控制的异常导致的。这些异常可能导致细胞数量（例如，癌）的病理学增加或细胞的损伤性丧失（例如，变性疾病）。作为非限定性例子，本发明的方法和组合物可用于预防和/或治疗以下与凋亡相关的疾病和失调：神经学/神经变性疾病（例如，阿尔茨海默病，帕金森氏病，亨廷顿氏病，肌萎缩性脊髓侧索硬化症（Lou Gehrig's 病），自身免疫病（例如，类风湿性关节炎，系统性红斑狼疮（SLE），多发性硬化，杜兴肌营养不良（DMD），运动神经元病，局部缺血，慢性心力衰竭，中风，婴儿脊肌萎缩，心脏骤停，肾衰竭，特异性皮炎，脓毒症和脓毒性休克，AIDS，肝炎，青光眼，糖尿病（1 型和 2 型），哮喘，色素性视网膜炎，骨质疏松，异种移植排斥，以及烧伤。

本发明的方法可用于治疗性处理具有癌细胞或患有肿瘤的动物，其处理量分别足以杀死癌细胞或抑制肿瘤的进展，足以实现这一目的的剂量，被定义为治疗有效剂量。能实现这一用途的量取决于疾病的严重程度，以及动物自身的免疫系统的一般状态。

肿瘤生长的抑制，意味着抑制或减弱肿瘤的进展，例如，肿瘤的生长，入侵，转移和/或复发。本发明的方法可用于治疗任何合适的肿瘤，例如，包括乳腺，心脏，肺，小肠，结肠，脾，肾脏，膀胱，头和颈，卵巢，前列腺，脑，胰腺，皮肤，骨骼，骨髓，血液，胸腺，子宫，睾丸，子宫颈或肝脏的肿瘤。动物，优选哺乳动物，更优选人类，可以利用本发明的组合物和方法进行治疗。因此，本发明的方法可以在体外，离体或体内实施。

用药方案还可以根据疾病状态和所述动物的状况改变，并且通常从单一的药团剂量或连续的输液到每天多次施用（例如，每隔 4-6 小时施用一次）之间变化，或根据治疗和动物的状况确定。不过，应当指

出的是，本发明并不局限于任何特定剂量。

在本发明中，任何合适的方法或途径都可用于施用，例如，口服，静脉内，腹膜内，皮下，或肌肉内施用。所施用的拮抗剂的剂量取决于多种因素，例如，包括所施用的分子的类型，要治疗的肿瘤的类型和严重程度以及施用途径。不过，应当强调是，本发明不局限于任何特定的施用方法或途径。

在一种替代实施方案中，本发明的方法可以与一种或多种传统治疗方法组合使用。例如，可以使用合适的抗肿瘤试剂，如化疗试剂或放疗。在另一种替代实施方案中，本发明的方法可以与一种或多种合适的佐剂组合使用，例如，细胞因子（例如，IL-10 和 IL-13），或其他免疫刺激剂。

在另一种替代实施方案中，可以用凋亡特异性 eIF-5A 和增殖性 eIF-5A 进行与凋亡相关的疾病诊断，增殖性 eIF-5A 与凋亡特异性 eIF-5A 的差别在于，它们是通过不同的启动子从不同的部位转录的；不过，这两种成分在结构上是同源的，在羧基末端存在差别。本发明的诊断方法包括比较存在于特定细胞中的增殖性 eIF-5A 的量，和存在于相同细胞中的凋亡特异性 eIF-5A 的量。在正常发挥作用期间，细胞所具有的增殖性 eIF-5A（本文还称之为 eIF-5A2）的量，大于凋亡特异性 eIF-5A（本文还称之为 eIF-5A1）的量。不过，在某些癌细胞中，正常的调节机制出错，并且，凋亡特异性 eIF-5A 的量，相对增殖性 eIF-5A 的量发生了改变。这种改变，使得有可能在所述细胞发生任何表型变化之前诊断细胞为癌细胞。

在另一种实施方案中，可以将增殖性 eIF-5A 与凋亡特异性 eIF-5A 的比例用于药物筛选。这种方法还涉及比较存在于特定细胞中的增殖性 eIF-5A 的量，和存在于相同细胞中的凋亡特异性 eIF-5A 的量。将增殖性 eIF-5A 与凋亡特异性 eIF-5A 的正常比例，与在所述细胞接触药物候选物之后增殖性 eIF-5A 与凋亡特异性 eIF-5A 的比例进行比较。在接触之后增殖性 eIF-5A 与凋亡特异性 eIF-5A 的比例的改变，可用于鉴定具有凋亡调节活性的所述候选物。可以将具有凋亡调节活性的候选物用于治疗与凋亡相关的疾病，通过抑制或诱导凋亡实现这一目的。另外，可以将增殖性 eIF-5A 与凋亡特异性 eIF-5A 的比例的改变，用于调节凋亡，还可将它用于治疗本文所披露的与异常凋亡相关的任何状况。

使用这种方法，可以有效筛选大量的潜在候选物，即文库，以便确定该文库中的能调节凋亡的成员。任何候选物或候选物的文库都可以利用该方法筛选。例如，生物学反应调节物已表现出作为凋亡调节剂的前景，包括能改变信号传导途径的单克隆抗体，诸如 TRAIL 的细胞因子 (Apo2 配体)，类维生素 A/类固醇家族核受体的配体，和能结合并且抑制蛋白激酶的小分子化合物，可以利用本发明的方法筛选它们的确定的凋亡调节活性。

一种合适的候选物是蛋白激酶 C- α 反义寡核苷酸，ISIS 3521 (ISIS Pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, CA)，它具有抗肿瘤活性。其他特异性候选物包括 caspases (Idun Pharmaceuticals, San Diego, CA)，已知它在导致癌和神经变性疾病的多种细胞类型中在凋亡的启动和执行方面发挥关键作用；GENA SENSE™ (Genta, Inc., Berkeley Heights, NJ)，它是能阻断 Bcl-2 产生的反义药物；INGN 241 (Introgen Therapeutics, Inc., Houston, TX)，它是基因治疗导向 P53；rituximab (IDEC Corporation, Osaka, Japan)，它是抗-CD20 单克隆抗体；以及心血管疾病和癌症的一般凋亡驱动治疗 (Egera Therapeutics Inc., Quebec, Canada)。

应当理解的是，当本发明的核酸和多肽用于动物的预防或治疗目的时，应当还包括可以药用的载体的组合物形式施用。例如，合适的可以药用的载体包括下列成分中一种或多种：水，盐水，磷酸缓冲的盐溶液，葡萄糖，甘油和乙醇等，以及它们的组合。可以药用的载体还可以包括微量的辅助物质，如湿润剂或乳化剂，防腐剂或缓冲物，它们能增加所述结合蛋白的保质期或效果。正如本领域所熟知的，可以配制注射的组合物，以便在给动物施用之后提供所述活性成分的快速，持续或延迟的释放。

本发明的组合物可以是多种形式的。其中包括，例如，固体，半固体和液体剂型，如片剂，药丸，粉末，液体溶液，分散液或悬浮液，脂质体，栓剂，可注射的和可输液的溶液。优选的剂型取决于预期的施用方式和治疗用途。

所述组合物能够以药理学领域所熟知的方式制备。在制备所述组合物时，所述活性成分通常与载体混合，或用载体稀释，和/或包在载体内，例如，所述载体可以是胶囊，药袋，纸或其他溶剂形式的。在所

述载体被用作稀释剂时，它可以是固体，半固体，或液体材料，它起着活性成分的媒介物，赋形剂或介质的作用。因此，所述组合物可以是片剂，锭剂，药袋，扁胶囊，酏剂，悬浮液，气溶胶（固体或存在于液体介质中），例如，含有重量百分比为多达 10% 的活性化合物的软膏，软的和硬的明胶胶囊，栓剂，注射液，悬浮液，无菌包装的粉末以及外用膏贴。

现在已经对本发明进行了总体上的说明，通过参考以下实施例可以更好地理解本发明，这些实施例是以说明形式提供的。提供这些实施例是为了帮助理解本发明，而不是要，并且不应当被理解成以任何方式限定本发明的范围。这些实施例不包括对常规方法的详细说明。这些方法为本领域普通技术人员所熟知，并且披露于多种文献中。常规方法，如用于构建载体和质粒的方法，将编码多肽的核酸插入所述载体和质粒的方法，将质粒导入宿主细胞的方法，以及表达和测定基因和基因产物的方法的详细说明，可以从多种文献中获得，包括 Sambrook, J. 等，(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 本文中所提到的所有文献都以它们的整体形式收作本文参考。

实施例

实施例 1

本实施例证明了编码具有细胞凋亡特异性表达的大鼠 eIF-5A 核酸的全长 cDNA 的分离和表征。

超数排卵和大鼠黄体中凋亡的诱导

用 50 IU 的 PMSG（怀孕母马的血清促性腺激素）进行皮下注射并且在 60-65 小时之后用 50 IU 的 HCG（人绒毛膜促性腺激素）进行皮下注射，使不成熟的（21-30 日龄）的雌性大鼠超数排卵。在用 HCG 处理 7 天之后，通过皮下注射 500 mg 的 PGF-2 α 诱导黄体凋亡。在 PGF-2 α 处理之后的各个时间点（例如 1, 8, 和 24 小时，处死大鼠），并且将黄体取出，放置在液氮中。通过在即将用 PGF-2 α 处理之前处死大鼠，获得对照黄体组织。

大鼠卵巢黄体细胞的分散

在超数排卵后 6-9 天, 通过多位点皮下注射 500 mg 的 PGF-2 α 处理大鼠。15-30 分钟之后, 将所述卵巢从超数排卵的大鼠体内取出, 放入放置在冰上的 EBSS (Gibco) 中, 吸水干燥, 并且称重。修剪掉结缔组织, 并且用剃须刀片将所述卵巢切碎, 用 2 倍 EBSS 洗涤 2 次。通过在 5ml 的 EBSS 中涡旋搅拌 6.5 mg 的胶原酶 (Sigma, Catalogue #C 5138) 制备胶原酶溶液。将来自 8 个卵巢的切碎的组织添加到装在 50 ml 锥形烧瓶中的 5ml 的溶解在 EBSS 中的胶原酶中, 并且通过吸入 Diamed 吸液管中若干次, 进行柔和地搅拌。然后将装有切碎的组织烧瓶放入 37℃ 的水浴中 20 分钟, 在 95% 的空气, 5% 的二氧化碳中轻柔振荡 (GFL 培养箱上的位置 45)。

在进行该解育之后, 将所述烧瓶放置在冰上, 并且用塑料吸液管将细胞悬浮液转移到装有 Swiss Nitex Nylon Monofilament (75 m) 的 Nitex 过滤器上。将滤液收集到 15 ml Falcon 试管中。将胶原酶溶液 (6.5 mg 胶原酶/5ml EBSS) 的第二份等分样品 (2.5 ml) 添加到留在 50 ml 锥形烧瓶中的切碎的组织中, 用吸液管轻柔地搅拌, 解育 10 分钟, 并且按上述方法过滤。合并这两种滤液, 并且在室温下, 在临床离心机上离心 (大约 200g) 5 分钟。除了大约 2ml 上清液之外, 用吸液管吸出所有的上清液, 并且弃去, 将沉淀的细胞重新悬浮在所述剩余的 2 ml 上清液中。

通过添加 5 ml MEM 洗涤所述细胞 2 次, 并且按上述方法离心和重新悬浮。将洗涤过的细胞重新悬浮在装在 50 ml 锥形烧瓶中的 30 ml 含有 10 mM 谷氨酰胺的 MEM 中, 并且在 37℃ 下, 在 95% 的空气, 5% CO₂ 中解育 1 小时, 不进行振荡。然后按照上述方法使所述细胞沉淀, 并且重新悬浮在含有 10 mM 谷氨酰胺的 MEM 中。

用血细胞计数器测定分散的细胞的浓度, 并且利用台盼兰染料评估存活力。将 2-5 $\times 10^5$ 细胞的等分样品放入 12 $\times$ 75 mm 的试管中, 并且在 37℃ 下, 在 95% 的空气, 5% CO₂ 中不进行振荡地解育 2-5 小时。通过评估 DNA 序列梯的程度, 监测在此期间的凋亡的发展。

通过 DNA 序列梯观察大鼠黄体中的凋亡

通过 DNA 序列梯确定凋亡的程度。使用 QIAamp DNA Blood 试剂

盒(Qiagen),按照生产商的说明,从分散的黄体细胞或从切除的黄体组织中分离基因组DNA。在通过PGF-2 α 处理而诱导凋亡之前,在诱导凋亡之后1和24小时,切除黄体组织。通过在室温下将500 ng的DNA与0.2 μ Ci [α - 32 P] dCTP, 1mM Tris, 0.5 mM EDTA, 3单位的Klenow酶,和dATP, dGTP, 和dTTP各0.2 pM一起温育30分钟,对分离的DNA进行末端标记。按照Sambrook等的方法,通过让样品通过1ml的Sepadex G-50柱,除去未掺入的核苷酸。然后通过Tris-乙酸-EDTA(1.8%)凝胶电泳分离所述样品。在室温下,在真空中让所述凝胶干燥30分钟,并且在-80℃下曝光于X-光胶片24小时。

在一个实验中,在超数排卵的大鼠黄体中的凋亡的程度,是在注射PGF-2 α 之后0, 1, 或24小时检测的,在0小时的对照中,在不注射PGF-2 α 的情况下取出卵巢。体现与凋亡相关的核酸酶活性的低分子量DNA片段的序列梯,在用PGF-2 α 处理之前切除的对照黄体组织中没有出现,不过,在诱导凋亡后1小时之内可以分辨,并且在诱导凋亡后24小时很明显,所述结果如图16所示。在该附图中,上部图片是用 32 P-dCTP-标记的大鼠黄体凋亡特异性DHS cDNA的3'-非翻译区探测的Northern印迹的放射自显影图。下部图片是溴化乙锭染色的总RNA的凝胶。每一个泳道含有10 μ g RNA。数据表明,在血清剥夺之后,存在eIF-5A转录物的下调。

在另一个实验中,相应的对照动物用盐水取代PGF-2 α 进行处理。在用盐水或PGF-2 α 处理15分钟之后,将黄体从动物体内取出。在从动物体内取出所述组织之后3小时和6小时,从黄体中分离基因组DNA。在从PGF-2 α 处理过的动物体内取出所述组织之后6小时,出现了DNA序列梯和增强了的基因组DNA的末端标记,而在取出组织之后3小时没有出现。参见图17。在用PGF-2 α 处理15分钟之后切除的黄体中,也出现了反映凋亡的DNA序列梯,并且在体外条件下,在EBSS(Gibco)中保持了6小时时间。在基因组DNA的更广泛的末端标记中,也出现了与凋亡相关的核酸酶活性。

在另一个实验中,通过皮下注射500 μ g的PGF-2 α 诱导了超数排卵。对照大鼠用等体积的盐溶液处理。15-30分钟之后,将卵巢取出,并且用胶原酶分解。将来自用PGF-2 α 处理的大鼠的分散的细胞,在10 mm 谷氨酰胺 + 10 mm 亚精胺中孵育1小时,在不含亚精胺的10 mm 谷

胺酰胺中再孵育 5 小时(泳道 2), 或在 10 mm 谷胺酰胺 + 10 mm 亚精胺中孵育 1 小时, 并且在 10 mm 谷胺酰胺 + 1 mm 亚精胺中再孵育 5 小时(泳道 3)。用胶原酶分散来自用盐水处理的大鼠的对照细胞, 并且仅在谷胺酰胺中孵育 1 小时, 以及再孵育 5 小时(泳道 1)。使用 Klenow 酶, 用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ 对来自每一种样品的 500ng DNA 进行标记, 在 1.8% 的琼脂糖凝胶上分离, 并且对胶片曝光 24 小时, 结果如图 18 所示。

在另一种实施方案中, 按照每 100 g 体重使用 1 mg 亚精胺的用量, 对超数排卵的大鼠进行皮下注射, 在用 500 μg PGF-2 α 进行皮下注射之前 24, 12, 和 2 小时, 递送 3 个相等的 0.333 mg/100 g 体重的剂量。将对照大鼠分成三组: 不注射, 三次注射亚精胺, 但没有 PGF-2 α ; 以及在 PGF-2 α 处理之前三次注射等体积的盐水。在前列腺素处理之后 1 小时 35 分钟或 3 小时 45 分钟, 从所述大鼠的正面取出卵巢, 并且用于分离 DNA。利用 Klenow 酶, 用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ 标记来自每一种样品的 500ng DNA, 在 1.8% 的琼脂糖凝胶上分离, 并且对胶片曝光 24 小时: 泳道 1, 无注射 (在与泳道 3-5 相同的时间处死动物); 泳道 2, 用亚精胺注射 3 次 (在与泳道 3-5 相同的时间处死动物); 泳道 3, 用盐水注射三次, 然后注射 PGF-2 α (在用 PGF-2 α 处理之后 1 小时 35 分钟处死动物); 泳道 4, 用亚精胺注射 3 次, 然后注射 PGF-2 α (在用 PGF-2 α 处理之后 1 小时 35 分钟处死动物); 泳道 5, 用亚精胺注射 3 次, 然后注射 PGF-2 α (在用 PGF-2 α 处理之后 1 小时 35 分钟处死动物); 泳道 6, 用亚精胺注射 3 次, 然后注射 PGF-2 α (在用 PGF-2 α 处理之后 3 小时 45 分钟处死动物); 泳道 7, 用亚精胺注射 3 次, 然后注射 PGF-2 α (在用 PGF-2 α 处理之后 3 小时 45 分钟处死动物)。结果如图 19 所示。

RNA 分离

从在 PGF-2 α 诱导凋亡之后不同时间的大鼠体内取出的黄体组织中分离总 RNA。简单地讲, 在液氮中研磨所述组织 (5 g)。将研磨的粉末与 30 ml 胍盐缓冲液 (4 M 异硫氰酸胍, 2.5 mM NaOAc, pH 8.5, 0.8% β -巯基乙醇) 混合。通过四层米拉布对所述混合物进行过滤, 并且在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 10,000g 的速度离心 30 分钟。然后以 11,200g 的速度对上清液进行氯化铯密度梯度离心 20 小时。用 75% 的乙醇漂洗沉淀的 RNA, 重新悬浮在 600 ml DEPC-处理过的水中, 并且在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 下, 用 1.5 ml 的 95%

乙醇和 60 ml 的 3M NaOAc 使 RNA 沉淀。

基因组 DNA 分离和序列梯

使用 QIAamp DNA Blood 试剂盒 (Qiagen), 按照生产商的说明, 从提取的黄体组织或分散的黄体细胞中分离基因组 DNA。通过将 500 ng DNA 与 0.2 μ Ci [α - 32 P] dCTP, 1 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 3 个单位的 Klenow 酶, 以及 dATP, dGTP, 和 dTTP 各 0.2 pM 一起在室温下孵育 30 分钟, 对所述 DNA 进行末端标记。按照 Maniatis 等披露的方法, 通过让样品通过 1ml Sephadex G-50 柱, 除去未结合的核苷酸。然后通过 Tris-乙酸-EDTA (2 %) 凝胶电泳分离所述样品。在室温下, 在真空条件下, 让所述凝胶干燥 30 分钟, 并且在 -80℃ 下曝光于 X-光胶片 24 小时。

质粒 DNA 分离, DNA 测序

将上文的 Sambrook 等所披露的碱性裂解方法用于分离质粒 DNA。利用双脱氧测序方法对全长阳性 cDNA 克隆进行测序。Sanger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467。利用 BLAST 检索 (GenBank, Bethesda, MD), 编辑并且分析开放读框, 利用 BCM Search Launcher 完成序列比对: Multiple sequence Alignments Pattern-Induced Multiple Alignment Method (参见 F. Corpet, Nuc. Acids Res., 16: 10881-10890, (1987))。序列和序列比对如图 5-11 所示。

大鼠黄体 RNA 的 Northern 印迹杂交

在 1% 变性的甲醛琼脂糖凝胶上, 从处于凋亡的各个阶段的大鼠黄体中分离 20mg 总 RNA, 并且固定在尼龙膜上。利用随机引物试剂盒 (Boehringer), 用 32 P-dCTP 标记的全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A cDNA (SEQ ID NO: 1) 检测膜 7×10^7 。另外, 利用随机引物试剂盒 (Boehringer), 用 32 P-dCTP 标记的全长大鼠凋亡特异性 DHS cDNA (SEQ ID NO: 6) 检测所述膜 (7×10^7 cpm)。在室温下, 用 $1 \times$ SSC, 0.1% SDS 洗涤所述膜 1 次, 在 65℃ 下用 $0.2 \times$ SSC, 0.1% SDS 洗涤 3 次。干燥所述膜, 并且在 -70℃ 下曝光于 X-光胶片过夜。

正如可以看到的, 在凋亡的黄体组织中, eIF-5A 和 DHS 都得到了

上调。在通过 PGF-2 α 处理诱导凋亡之后, 凋亡特异性 eIF-5A 的表达明显增强——在零时间较低, 在处理 1 小时之内显著提高, 在处理 8 小时之内进一步提高, 并且在处理 24 小时之内略有提高(图 14)。在零时间, DHS 的表达较低, 在处理 1 小时之内显著提高, 在处理 8 小时之内仍然进一步提高, 并且在处理 24 小时之内再次略有提高(图 15)。

利用基于酵母、真菌和人类 eIF-5A 序列的引物, 制备凋亡的大鼠黄体 RT-PCR 产物

利用根据酵母, 真菌和人类 eIF-5A 序列设计的一对寡核苷酸引物, 通过 RT-PCR, 用凋亡的大鼠黄体 RNA 模板制备相当于所述基因 3' 末端的部分长度的凋亡特异性 eIF-5A 序列 (SEQ ID NO: 11)。用于分离大鼠 eIF-5A 基因的 3' 末端的上游引物是具有 20 个核苷酸的简并引物: 5' TC SAARACHGGNAAGCAYGG 3' (SEQ ID NO: 9), 其中, S 选自 C 和 G; R 选自 A 和 G; H 选自 A, T, 和 C; Y 选自 C 和 T; 而 N 是任何核酸。用于分离大鼠 eIF-5A 基因的 3' 末端的下游引物是具有 42 个核苷酸的引物: 5' GCGAAGCTTCCATGG CTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3' (SEQ ID NO: 10)。进行逆转录酶聚合酶链式反应 (RT-PCR)。简单地讲, 使用 5 mg 下游引物, 合成了 cDNA 的第一条链。然后, 使用上游和下游引物, 将所述第一条链用作 RT-PCR 模板。

在琼脂糖凝胶上对 RT-PCR 产物进行分离, 发现了 900 bp 片段的存在, 通过平端连接, 将它亚克隆到 pBluescript™ (Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA) 上, 并且测序 (SEQ ID NO: 11)。所述 3' 末端的 cDNA 序列是 SEQ ID NO: 11, 所述 3' 末端的氨基酸序列是 SEQ ID NO: 12。参见图 1-2。

通过 RT-PCR, 用凋亡的大鼠黄体 RNA 模板, 制备了相当于所述基因的 5' 末端并且与 3' 末端重叠的所述部分长度的凋亡特异性 eIF-5A 序列 (SEQ ID NO: 15)。所述 5' 引物是具有以下序列的 24-聚体, 5' CAGGTCTAGAGTTGGAATCGAAGC 3' (SEQ ID NO: 13), 该引物是根据人 eIF-5A 序列设计的。3' 引物是具有以下序列的 30-聚体, 5' ATATCTCGAGCCTT GATTGCAACAGCTGCC 3' (SEQ ID NO: 14), 它是根据所述 3' 末端 RT-PCR 片段设计的。进行逆转录酶-聚合酶链式反应 (RT-PCR)。简单地讲, 使用 5 mg 下游引物, 合成了 cDNA 的第一条链。然后使用所述上游和下游引物, 将所述第一条链用作 RT-PCR 的模板。

在琼脂糖凝胶上分离所述 RT-PCR 产物, 发现了 500 bp 片段的存在, 利用分别存在于上游和下游的 XbaI 和 XhoI 克隆位点, 将该片段亚克隆到 pBluescript™ (Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA) 上, 并且测序 (SEQ ID NO: 15)。5' 末端的 cDNA 序列是 SEQ ID NO: 15, 而 5' 末端的氨基酸序列是 SEQ ID NO: 16。参见图 2。

叠加大鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 3' 和 5' 末端的序列 (分别为 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 15), 并且得到了全长 cDNA 序列 (SEQ ID NO: 1)。对该全长序列进行比对, 并且与 GeneBank 数据库中的序列进行比较。参见图 1-2。所述 cDNA 克隆编码具有 154 个氨基酸的多肽 (SEQ ID NO: 2), 它的计算分子量为 16.8 Kda。在图 3 中示出了通过 RT-PCR 获得的大鼠凋亡特异性黄体 eIF-5A 基因的全长 cDNA, 并且相应的导出的氨基酸序列是 SEQ ID NO: 9。将 eIF-5a 的导出的全长氨基酸序列与人和小鼠 eIF-5A 序列进行比对。参见图 7-9。

利用基于人 DHS 序列的引物制备凋亡的大鼠黄体 RT-PCR 产物

使用根据人 DHS 序列设计的一对寡核苷酸引物, 通过 RT-PCR, 用凋亡的大鼠黄体 RNA 模板, 制备相当于所述基因的 3' 末端的部分长度的凋亡特异性 DHS 序列 (SEQ ID NO: 6)。所述 5' 引物是具有以下序列的 20-聚体, 5' GTCTGTGTATTATTGGGCCC 3' (SEQ ID NO: 17); 所述 3' 引物是具有以下序列的 42-聚体, 5' GCCAAGCTTCCATGGC TCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3' (SEQ ID NO: 10)。进行逆转录酶-聚合酶链式反应 (RT-PCR)。简单地讲, 使用 5 mg 下游引物, 合成了 cDNA 的第一条链。然后使用所述上游和下游引物, 将所述第一条链用作 RT-PCR 的模板。

在琼脂糖凝胶上分离所述 RT-PCR 产物, 发现了 606 bp 片段的存在, 通过平端连接将该片段亚克隆到 pBluescript™ (Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA) 上, 并且测序 (SEQ ID NO: 6)。在图 4 中示出了通过 RT-PCR 获得的大鼠凋亡特异性黄体 DHS 基因的部分长度的 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 6), 并且, 相应的导出的氨基酸序列是 SEQ ID NO: 7。

基因组 DNA 的分离和 Southern 分析

从切除的大鼠卵巢中分离基因组 DNA, 用于 Southern 印迹。将大约 100 mg 的卵巢组织分割成小片, 并且放入 15 ml 的试管中。用 1 ml 的 PBS 洗涤所述组织 2 次, 柔和地振荡所述组织悬浮液, 然后用吸液管除去 PBS。将所述组织重新悬浮在 2.06 ml 的 DNA-缓冲液 (0.2 M Tris-HCl pH 8.0 和 0.1 mM EDTA) 中, 并且添加 240 μ l 的 10 % SDS 和 100 μ l 的蛋白酶 K (Boehringer Mannheim; 10 mg/ml)。将所述组织放入振荡的水浴中, 在 45℃ 下过夜。第二天, 再加入 100 μ l 的蛋白酶 K (10 mg/ml), 并且, 再将所述组织悬浮液放置 45℃ 的水浴中再孵育 4 小时。在所述孵育之后, 用等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 提取所述组织悬浮液 1 次, 用等体积的氯仿: 异戊醇 (24: 1) 提取 1 次。在所述提取之后, 添加 1/10 体积的 3M 乙酸钠 (pH 5.2) 和 2 倍体积的乙醇。将通过 Bunsen 燃烧器密封并且制成钩子形状的玻璃吸液管, 用于将 DNA 丝从溶液中拉出, 并且将所述 DNA 转移到干净的微量离心管中。用 70% 的乙醇洗涤所述 DNA 1 次, 并且风干 10 分钟。将所述 DNA 沉淀溶解在 500 μ l 的 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中, 添加 10 μ l 的 RNase A (10 mg/ml), 并且在 37℃ 下孵育所述 DNA 1 小时。用苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 提取所述 DNA 1 次, 并且通过添加 1/10 体积的 3 M 乙酸钠 (pH 5.2) 和 2 倍体积的乙醇使 DNA 沉淀。通过在 4℃ 下以 13,000 $\times$ g 的速度离心 10 分钟, 使所述 DNA 沉淀。用 70% 的乙醇洗涤所述 DNA 沉淀, 并且通过在 4℃ 下旋转所述 DNA 过夜, 将它溶解在 200 μ l 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)。

为了进行 Southern 印迹分析, 用各种限制酶消化从大鼠卵巢中分离的基因组 DNA, 所述酶不能裂解内源基因或者只能裂解 1 次。为了实现这一目的, 让 10 μ g 基因组 DNA, 20 μ l 10 $\times$ 反应缓冲液和 100 U 的限制酶在 200 μ l 的总反应体积中反应 5-6 小时。将消化的 DNA 加样到 0.7 % 的琼脂糖凝胶上, 并且以 40 伏的电压电泳 6 小时, 或以 15 伏的电压电泳过夜。在电泳之后, 在 0.2 N HCl 中对所述凝胶进行 10 分钟的脱嘌呤处理, 然后用变性溶液 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 进行 2 次 15 分钟的洗涤, 并且用中和缓冲液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.4) 进行 2 次 15 分钟的洗涤。将所述 DNA 转移到尼龙膜上, 并且使所述膜在杂交溶液 (40 % 甲酰胺, 6 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhart's 溶液 (1 $\times$ Denhart's 溶液是 0.02 % Ficoll, 0.02 % PVP, 和 0.02 % BSA),

0.5 % SDS, 和 1.5 mg 的变性鲑鱼精子 DNA) 中预杂交。通过随机引发用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP 标记大鼠 eIF-5A cDNA 的 3' UTR 的 700 bp 的 PCR 片段 (650 bp 的 3' UTR 和 50 bp 的编码区), 并且以 1×10^6 cpm/ml 的用量添加到所述膜上。

类似地, 用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP 对大鼠 DHS cDNA 的 606 bp 的 PCR 片段 (450 bp 的编码区和 156 bp 的 3' UTR) 进行随机引发的标记, 并且以 1×10^6 cpm/ml 的用量添加到第二个相同的膜上。在 42℃ 下让所述印迹杂交过夜, 然后在 42℃ 下用 2 X SSC 和 0.1 % SDS 洗涤 2 次, 并且在 42℃ 下用 1 X SSC 和 0.1 % SDS 洗涤 2 次。然后让所述印迹对胶片曝光 3-10 天。

按图 20 所示, 用限制酶裂解大鼠黄体基因组 DNA, 并且用 ^{32}P -dCTP-标记的全长 eIF-5A cDNA 检测。在严格条件下进行的杂交, 发现了全长 cDNA 探针与每一种限制酶消化的 DNA 样品的若干个限制片段的杂交, 这表明了若干种 eIF-5A 的同工型的存在。特别要指出的是, 在用 EcoRV 消化大鼠基因组 DNA 时, 它在凋亡特异性 eIF-5A 的开放读框中具有限制位点, 在 Southern 印迹中可以检测到 eIF-5A 的凋亡特异性的同工型的两个限制片段。在图 20 中, 这两个片段用双箭头标明。相当于 eIF-5A 的凋亡特异性的同工型的限制片段, 在标有 EcoRI 和 BamHI 的泳道中通过单箭头标出, 这些限制酶在它们的开放读框内没有裂解位点。以上结果表明, 所述凋亡特异性 eIF-5A 在大鼠体内是单拷贝基因。如图 5-13 所示, eIF-5A 基因在物种之间是高度保守的, 因此, 可以预料的是, 在任何物种内的同工型之间存在显著的保守性。

图 21 表示用 ^{32}P -dCTP-标记的部分长度的大鼠黄体凋亡特异性 DHS cDNA 探测的大鼠基因组 DNA 的 Southern 印迹。用 EcoRV 裂解所述基因组 DNA, 这种限制酶不能裂解用作探针的所述部分长度的 cDNA。出现了两个限制片段, 表明了存在两个拷贝的所述基因, 或者所述基因包括具有 EcoRV 位点的内含子。

实施例 2

本实施例证实了用凋亡特异性 eIF-5A 和 DHS 对凋亡的调节。

COS-7 细胞的培养和 RNA 的分离

将编码野生型 T 抗原的 SV40 的突变体转化过的非洲绿猴肾成纤维细胞样细胞系 COS-7 用于所有基于转染的实验。在 Dulbecco's 改进的 Eagle's 培养基 (DMEM) 中培养 COS-7 细胞, 所述培养基每升含有 0.584 克 L-谷氨酰胺, 每升含有 4.5 g 葡萄糖, 和 0.37 % 的碳酸氢钠。所述培养基补充有 10% 的胎牛血清 (FBS) 和 100 个单位的青霉素/链霉素。让所述细胞在 37℃ 下在 5 % 二氧化碳和 95 % 空气的潮湿环境中生长。每隔 3-4 天, 通过用 0.25 % 胰蛋白酶和 1 mM EDTA 的溶液分离贴壁细胞, 对所述细胞进行继代培养。以 1: 10 的分流比, 将分离的细胞分配到装有新鲜培养基的新的培养皿中。

在 150-mm 组织培养处理过的培养皿 (Corning) 中生长用于分离 RNA 的 COS-7 细胞。通过用胰蛋白酶-EDTA 溶液分离, 收获所述细胞。将所述分离的细胞收集到离心管中, 并且通过以 3000 rpm 的速度离心 5 分钟使所述细胞沉淀。除去上清液, 并且在液氮中对所述细胞沉淀进行快速冷冻。使用 GenElute 哺乳动物总 RNA 微量制备试剂盒 (Sigma), 按照生产商的说明, 从所述冷冻的细胞中分离 RNA。

重组质粒的构建和 COS-7 细胞的转染

利用哺乳动物表位标记表达载体 pHM6 (Roche Molecular Biochemicals) 构建携带沿有义方向的大鼠凋亡 eIF-5A 的全长编码序列和沿反义方向的大鼠凋亡 eIF-5A 的 3' 非翻译区 (UTR) 的重组质粒, 如图 21 所示。所述载体包括以下部分: CMV 启动子-人巨细胞病毒立即早期启动子/增强子; HA-来自流感血细胞凝集素的九肽表位标记; BGH pA-牛生长激素聚腺苷酸化信号; f1 ori-f1 起点; SV40 ori-SV40 早期启动子和起点; 新霉素-新霉素抗性 (G418) 基因; SV40 pA - SV40 聚腺苷酸化信号; Col E1-Col E1 起点; 氨苄青霉素-氨苄青霉素抗性基因。通过 PCR, 由 pBluescript 上的原始大鼠 eIF-5A RT-PCR (SEQ ID NO: 1) 扩增大鼠凋亡 eIF-5A 的全长编码序列和大鼠凋亡 eIF-5A 的 3' UTR。为了扩增所述全长 eIF-5A, 使用了以下引物: 正向引物 5' GCCAAGCTTAATGGCAGATGATTTGG3' (SEQ. ID NO: 18) (Hind3), 和反向引物 5' CTGAATTCCAGT TATTTTGCCATGG 3' (SEQ. ID NO: 22) (EcoR1)。为了扩增所述 3' UTR 大鼠 eIF-5A, 使用了以下引物: 正向引物 5' AATGAATTCCGCCATGACAGAGGAGGC 3' (SEQ. ID NO: 23)

(EcoR1) , 和 反 向 引 物 5'
GCGAAGCTTCCATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3' (SEQ. ID NO:
10) (Hind3).

在琼脂糖凝胶电泳之后分离的全长大鼠 eIF-5A PCR 产物的长度为 430 bp, 而 3' UTR 大鼠 eIF-5A PCR 产物的长度为 697 bp. 将这两种 PCR 产物亚克隆到 pHM6 的 Hind 3 和 EcoR1 位点上, 以便制备 pHM6-全长 eIF-5A 和 pHM6-反义 3' UTR eIF-5A. 按读框亚克隆全长大鼠 eIF-5A PCR 产物, 使来自流感血细胞凝集素 (HA) 的九肽表位标记存在于多克隆位点的上游, 以便可以利用抗-[HA]-过氧化物酶抗体检测所述重组蛋白. 表达是由人巨细胞病毒立即早期启动子/增强子启动的, 以便确保在哺乳动物细胞系中的高水平表达. 所述质粒的特征还在于新霉素抗性 (G418) 基因, 它允许选择稳定的转化体, 以及 SV40 早期启动子和起点, 它允许在诸如 COS-7 的能表达 SV40 大 T 抗原的细胞中进行附加体复制.

对于用于蛋白提取的细胞来说, 将用于转染实验的 COS-7 细胞在 24 孔细胞培养平板 (Corning) 中培养, 或者对于用于染色的细胞来说, 放在 4 腔室的培养载玻片 (Falcon) 中培养. 让所述细胞在补充了 10% FBS, 但缺乏青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中生长到 50-70% 的汇合度. 通过将 0.32 μ g 的质粒 DNA 稀释在 42.5 μ l 的无血清的 DMEM 中, 制备足够 24 孔平板或培养载玻片的一个孔使用的转染培养基, 并且, 在室温下孵育所述混合物 15 分钟. 将 1.6 μ l 的转染试剂——LipofectAMINE (Gibco, BRL) 稀释在 42.5 μ l 的无血清的 DMEM 中, 并且在室温下孵育 5 分钟. 在 5 分钟之后, 将所述 LipofectAMINE 混合物添加到所述 DNA 混合物中, 并且在室温下一起孵育 30-60 分钟. 用无血清 DMEM 洗涤要转染的细胞, 然后在顶部覆盖转染培养基, 并且将所述细胞放回所述生长室 4 小时.

在孵育之后, 向所述细胞中添加 0.17 ml 的 DMEM + 20 % FBS. 在染色或者收获进行 Western 印迹分析之前诱导凋亡前, 将所述细胞再培养 40 小时. 作为对照, 还进行了模拟转染, 其中, 将所述质粒 DNA 从转染介质中省去.

蛋白提取和 Western 印迹

从转染过的细胞中分离用于 Western 印迹的蛋白,这是通过用 PBS (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na₂HPO₄, 和 0.24 g/L KH₂PO₄) 洗涤所述细胞 2 次,然后添加 150 μ l 的热的 SDS 凝胶加样缓冲液 (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM 二硫苏糖醇, 2 % SDS, 0.1 % 溴酚蓝, 和 10%甘油) 而进行的。将所述细胞裂解液收集到微量离心管中,在 95 $^{\circ}$ C 下加热 10 分钟,然后以 13,000 $\times$ g 的速度离心 10 分钟。将上清液转移到新的离心管中,并且在 -20 $^{\circ}$ C 下保存待用。

为了进行 Western 印迹,在 12 % SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离 2.5 或 5 μ g 的总蛋白。将分离的蛋白转移到聚偏 1,1-二氟乙烯膜上。然后将所述膜在封闭溶液(溶解在 PBS 中的 5 %脱脂奶粉, 0.02% 叠氮化钠)中孵育 1 小时,并且用 PBS-T (PBS + 0.05 % Tween-20) 洗涤 3 次,每次 15 分钟。在 4 $^{\circ}$ C 下,在 PBS-T 中保存所述膜过夜。第二天,在室温下在回温之后,用 1 μ g/ml 聚乙烯醇封闭所述膜 30 分钟。用去离子水漂洗所述膜 5 次,然后在溶于 PBS 的 5 %的牛奶中封闭 30 分钟。在与所述膜一起培养之前,在 5%的牛奶中用第一抗体与培养 30 分钟。

使用了若干种第一抗体。以 1: 5000 的稀释比例使用抗 [HA]-过氧化物酶抗体 (Roche Molecular Biochemicals), 以便检测所述重组蛋白的表达。由于这种抗体偶联在过氧化物酶上,不需要第二抗体,洗涤所述印迹,并且通过化学发光进行显影。所使用的其他第一抗体是来自 Oncogene 的,能识别 p53 (Ab-6), Bcl-2 (Ab-1), 和 c-Myc (Ab-2) 的单克隆抗体。p53 的单克隆抗体是以 0.1 μ g/ml 的稀释比例使用的,而 Bcl-2 和 c-Myc 的单克隆抗体都是以 0.83 μ g/ml 的稀释比例使用的。在用第一抗体孵育 60-90 分钟之后,用 PBS-T 洗涤所述膜 3 次,每次 15 分钟。然后再用溶于 PBS 的 1%的牛奶稀释第二抗体,并且孵育所述膜 60-90 分钟。在将 p53 (Ab-6) 用作第一抗体时,所使用的第二抗体是以 1: 1000 的比例稀释的与碱性磷酸酶 (Rockland) 偶联的山羊抗-小鼠 IgG。在将 Bcl-2 (Ab-1) 和 c-Myc (Ab-2) 用作所述第一抗体时,以 1: 5000 的稀释比例使用与过氧化物酶 (Sigma) 偶联的兔抗-小鼠 IgG。在用所述第二抗体孵育之后,用 PBS-T 洗涤所述膜 3 次。

使用了两种检测方法,以便对所述印迹进行显影,这两种方法是比色方法和化学发光方法。只有当 p53 (Ab-6) 被用作第一抗体,同时使用所述碱性磷酸酶偶联的第二抗体时才使用所述比色方法。通过在黑

暗下在以下溶液中孵育所述印迹观察结合的抗体, 该溶液包括 0.33 mg/mL 氮蓝四唑, 0.165 mg/mL 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸酯, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 和 100 mM Tris-HCl (pH 9.5). 通过在溶于 PBS 的 2 mM EDTA 中孵育所述印迹, 终止所述颜色反应. 将化学发光检测方法用于所有其他的第一抗体, 包括抗- [HA] 过氧化物酶, Bcl-2 (Ab-1), 和 c-Myc (Ab-2). 将 ECL Plus Western 印迹检测试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech) 用于检测过氧化物酶-偶联的结合抗体. 简单地讲, 将所述膜轻微地吸水干燥, 然后, 在黑暗中用试剂 A 和试剂 B 的 40:1 的混合物孵育 5 分钟. 将所述膜吸干, 放置在乙酸酯片材之间, 并且曝光于 X-光胶片 10 秒到 10 分钟.

在 COS 7 细胞中诱导凋亡

将两种方法用于诱导转染过的 COS 7 细胞的凋亡: 血清剥夺和用放线菌素 D, 链霉菌 (Calbiochem) 处理. 对这两种处理来说, 在转染之后 40 小时除去培养基. 对于血清饥饿实验来说, 用无血清和无抗生素 DMEM 取代所述培养基. 将在补充了 10 % FBS 的无抗生素的 DMEM 中生长的细胞用作对照. 对于凋亡的放线菌素 D 诱导来说, 用补充了 10 % FBS 和溶解在甲醇中的 1 μ g/ml 放线菌素 D 的无抗生素的 DMEM 取代所述培养基. 对照细胞是在补充了 10 % FBS 和等体积的甲醇的无抗生素的 DMEM 中生长的. 在这两种方法中, 凋亡的细胞的百分比是在 48 小时之后通过用 Hoescht 或膜联蛋白 V-Cy3 染色测定的. 如图 22 所示, 还通过 Northern 印迹分析, 证实了凋亡的诱导.

Hoescht 染色

将细胞核染料 Hoescht 用于标记转染过的 COS-7 细胞的细胞核, 以便根据诸如细胞核断裂和浓缩的形态学特征, 鉴定凋亡的细胞. 在即将使用之前, 制备由无水甲醇和冰醋酸的 3:1 的混合物组成的固定剂. 将等体积的固定剂添加到生长在培养载玻片上的 COS-7 细胞的培养基中, 并且孵育 2 分钟. 将所述培养基/固定剂混合物从所述细胞上除去, 并且弃去, 并且将 1 ml 的固定剂添加到所述细胞上. 在 5 分钟之后, 将所述固定剂弃去, 并且将 1 ml 新的固定剂添加到所述细胞上, 并且孵育 5 分钟. 将所述固定剂弃去, 并且将所述细胞风干 4 分钟, 然后

添加 1ml 的 Hoescht 染料 ($0.5\ \mu\text{g/ml}$ Hoescht 33258, 溶解在 PBS 中)。在黑暗中孵育 10 分钟之后, 将染色溶液弃去, 并且用去离子水洗涤 3 次, 每次 1 分钟。在洗涤之后, 将 1 ml 的 McIlvaine's 缓冲液 ($0.021\ \text{M}$ 柠檬酸, $0.058\ \text{M}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 5.6) 添加到所述细胞上, 并且在黑暗中孵育 20 分钟。弃去所述缓冲液, 并且在黑暗中将所述细胞风干 5 分钟, 并且除去分隔所述培养载玻片的孔的腔室。将数滴用于发出荧光的 Vectashield 封固剂 (Vector Laboratories) 添加到所述载玻片上, 并且用盖玻片覆盖。染色的细胞在荧光显微镜下观察, 使用紫外线过滤器。将染成亮的或断裂的细胞核, 统计为凋亡的细胞。

膜联蛋白 V-Cy3 染色

将膜联蛋白 V-Cy3 凋亡检测试剂盒 (Sigma) 用于对凋亡的细胞上的外化了的磷脂酰丝氨酸进行荧光标记。按照生产商的方法使用该试剂盒, 进行了以下改进。简单地讲, 用 PBS 将生长在四个腔室的培养载玻片上的转染过的 COS-7 细胞洗涤 2 次, 用 $1\times$ 结合缓冲液洗涤 3 次。添加 $150\ \mu\text{l}$ 染色溶液 ($1\ \mu\text{g/ml}$ AnnCy3, 溶解在 $1\times$ 结合缓冲液) 中, 并且将所述细胞在黑暗中孵育 10 分钟。然后除去染色溶液, 并且用 $1\times$ 结合缓冲液洗涤所述细胞 5 次。将所述腔室的壁从所述培养载玻片上除掉, 并且将若干滴 $1\times$ 结合缓冲液放置在所述细胞上, 并且用盖玻片覆盖。通过荧光显微镜分析所述染色的细胞, 使用绿色滤光器观察所述阳性染色的 (凋亡的) 细胞的红色荧光。通过在可见光下统计所述细胞的数量, 确定总的细胞群。

实施例 3

本实施例证实了用凋亡特异性 eIF-5A 和 DHS 对凋亡的调节

使用在前面的实施例中所披露的通用方案和方法, 图 23 是说明用于瞬时转染 COS-7 细胞的方案的流程图, 其中, 无血清培养基中的细胞与 lipofectAMINE 中的质粒 DNA 一起孵育 4 小时, 添加血清, 并且将所述细胞再孵育 40 小时。然后, 在分析之前 (即不做进一步的处理), 将所述细胞放在含有血清的常规培养基中孵育 48 小时, 剥夺血清 48 小时, 以便在分析之前诱导凋亡, 或者用放线菌素 D 处理 48 小时, 以便在分析之前诱导凋亡。

图 22 表示在用 pHM6 转染之后在 COS-7 细胞中外源蛋白的瞬时表达的 Western 印迹。在模拟转染, 或者用 pHM6-LacZ, pHM6-反义 3' rF5A (pHM6-反义 3' UTR 大鼠凋亡 eIF-5A), 或 pHM6-有义 rF5A (pHM6-全长大鼠凋亡 eIF-5A) 转染 48 小时之后, 从 COS-7 细胞中分离蛋白。通过 SDS-PAGE 分级分离来自每一种样品的 5 μ g 的蛋白, 转移到 PVDF 膜上, 并且用抗-[HA]-过氧化物酶进行 Western 印迹。通过化学发光检测结合的抗体, 并且曝光于 X-光胶片 30 秒。LacZ (泳道 2) 和有义大鼠凋亡 eIF-5A (泳道 4) 的表达清晰可见。

如上文所述, COS-7 细胞是模拟转染的或用 pHM6-有义 rF5A 转染的 (pHM6-全长大鼠 eIF-5A) 转染。转染 40 小时之后, 通过血清剥夺 48 小时, 诱导所述细胞发生凋亡。使用荧光测定均匀 caspase 分析试剂盒 (Roche Diagnostics) 测定转染过的细胞提取物中 caspase 的蛋白水解活性。还利用 FragEL DNA 断裂凋亡检测试剂盒 (Oncogene) 测定了 DNA 断裂, 该试剂盒能用荧光素标记的脱氧核苷酸标记 DNA 片段的暴露的 3'-OH 末端。

其他 COS-7 细胞是模拟转染或用 pHM6-有义 rF5A 转染的 (pHM6-全长大鼠 eIF-5A)。转染 40 小时之后, 让所述细胞在含有血清的正规培养基 (未做进一步的处理) 中再生长 48 小时, 通过血清剥夺 48 小时, 诱导进行凋亡, 或通过用 0.5 μ g/ml 的放线菌素 D 处理 48 小时诱导进行凋亡。所述细胞用 Hoescht 33258 染色, 它表示伴随凋亡的细胞核断裂, 或用膜联蛋白 V-Cy3 染色, 它表示磷脂酰丝氨酸暴露伴随的凋亡。还通过荧光显微镜, 使用绿色滤光器观察染色的细胞, 并且统计数量, 以便确定发生凋亡的细胞的百分比。在可见光下计数总的细胞群。

图 25 表示通过 caspase 活性增强体现的凋亡增强, 此时, COS-7 细胞是用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的。大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的表达, 导致 caspase 活性增加了 60%。

图 26 表示通过 DNA 断裂增加体现的凋亡增强, 此时, COS-7 细胞是用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的。大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的表达, 导致 DNA 断裂增加了 273%。图 27 表示通过细胞核断裂增加体现的凋亡的检测, 此时, COS-7 细胞是用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的。

在表达大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的细胞中, 断裂的细胞核的出现率较高。图 28 表示通过细胞核断裂增加体现的凋亡增强, 此时, COS-7 细胞是用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的。与非血清饥饿和血清饥饿的样品对照相比, 大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的表达导致细胞核断裂分别增加了 27 % 和 63 %。

图 29 表示通过磷脂酰丝氨酸暴露体现的凋亡的检测, 此时, COS-7 细胞是用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的。图 30 表示通过磷脂酰丝氨酸暴露的增加体现的凋亡增强, 此时, COS-7 细胞是用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的。与非血清饥饿和血清饥饿的样品对照相比, 大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的表达, 分别导致了磷脂酰丝氨酸暴露增加了 140 % 和 198 %。

图 31 表示通过细胞核断裂增加体现的凋亡增强的检测, 此时, COS-7 细胞是用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的。与未处理的和处理过的样品对照相比, 大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的表达, 导致细胞核破裂分别增加了 115 % 和 62 %。图 32 表示在以下条件下凋亡增强的比较, 其中, COS-7 细胞是用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的, 对所述细胞不进行进一步的处理, 或进行处理, 以便诱导凋亡。

实施例 4

本实施例证实了在施用凋亡特异性 eIF-5A 和 DHS 之后对凋亡活性的调节。

另外, 对 COS-7 细胞进行模拟转染, 用 pHM6-LacZ 转染或用 pHM6-有义 rF5A (pHM6-全长大鼠 eIF-5A) 转染, 并且孵育 40 小时。通过 SDS-PAGE 分离从每一种样品中提取的 5 μ g 的蛋白样品, 转移到 PVDF 膜上, 并且用能识别 Bcl-2 的单克隆抗体进行 Western 印迹。将与过氧化物酶偶联的兔抗-小鼠 IgG 用作第二抗体, 并且通过化学发光和对 X-光胶片进行曝光检测结合的抗体。结果如图 32 所示。与用 pHM6-LacZ 转染的细胞相比, 在用 pHM6-有义 rF5A 转染的细胞中可检测的 Bcl-2 较少; 因此, Bcl-2 被下调了。

另外, 对 COS-7 细胞进行模拟转染, 用 pHM6-反义 3' rF5A (大

鼠凋亡特异性 eIF-5A 的 pHM6-反义 3' UTR) 转染或用 pHM6-有义 rF5A (pHM6-全长大鼠凋亡特异性 eIF-5A) 转染。在转染之后 40 小时, 通过血清剥夺 48 小时, 诱导所述细胞发生凋亡。通过 SDS-PAGE 分离从每一种样品中提取的 5 μ g 的蛋白样品, 转移到 PVDF 膜上, 并且用能识别 Bcl-2 的单克隆抗体进行 Western 印迹。将与过氧化物酶偶联的兔抗-小鼠 IgG 用作第二抗体, 并且通过化学发光和对 X-光胶片进行曝光检测结合的抗体。

另外, 对 COS-7 细胞进行模拟转染, 用 pHM6-LacZ 转染或用 pHM6-有义 rF5A (pHM6-全长大鼠 eIF-5A) 转染, 并且培养 40 小时。通过 SDS-PAGE 分离从每一种样品中提取的 5 μ g 的蛋白样品, 转移到 PVDF 膜上, 并且用能识别 p53 的单克隆抗体进行 Western 印迹。将与碱性磷酸酶偶联的兔抗-小鼠 IgG 用作第二抗体, 并且通过比色分析检测结合的抗体。

最后, 对 COS-7 细胞进行模拟转染, 用 pHM6-LacZ 转染或用 pHM6-有义 rF5A (pHM6-全长大鼠 eIF-5A) 转染, 并且孵育 40 小时。通过 SDS-PAGE 分离从每一种样品中提取的 5 μ g 的蛋白样品, 转移到 PVDF 膜上, 并且用能识别 p53 的单克隆抗体检测。用抗[HA]-过氧化物酶探测相应的蛋白印迹, 以便确定大鼠凋亡特异性 eIF-5A 表达的水平。将与碱性磷酸酶偶联的山羊抗-小鼠 IgG 用作第二抗体, 并且通过化学发光检测结合的抗体。

图 33 表示 Bcl-2 的下调, 此时, COS-7 细胞是用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的。上部图片表示考马斯亮兰染色的蛋白印迹; 下部图片表示相应的 Western 印迹。与用 pHM6-LacZ 转染的细胞相比, 在用 pHM6-有义 rF5A 转染的细胞中可检测的 Bcl-2 较少。

图 34 表示 Bcl-2 的上调, 此时, COS-7 细胞是用含有沿反义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的。上部图片表示考马斯亮兰染色的蛋白印迹; 下部图片表示相应的 Western 印迹。与用模拟转染或用含有 pHM6-有义 rF5A 的 pHM6-LacZ 转染的细胞相比, 在用 pHM6-反义 3' rF5A 转染的细胞中可检测的 Bcl-2 较多。

图 35 表示 c-Myc 的上调, 此时, COS-7 细胞是用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的。上部图片表示考

马斯亮兰染色的蛋白印迹；下部图片表示相应的 Western 印迹。与用 pHM6-LacZ 或模拟对照转染的细胞相比，在用 pHM6-有义 3' rF5A 转染的细胞中，可检测的 Bcl-2 更多。

图 36 表示 c-Myc 的上调，此时，COS-7 细胞是用含有沿有义方向的全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的 pHM6 瞬时转染的。上部图片表示考马斯亮兰染色的蛋白印迹；下部图片表示相应的 Western 印迹。与用 pHM6-LacZ 或模拟对照转染的细胞相比，在用 pHM6-有义 3' rF5A 转染的细胞中可检测的 p53 更多。

图 37 表示 p53 上调对 COS-7 细胞中 pHM6-全长大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的表达的依赖性。在用抗[HA]-过氧化物酶探测的 Western 印迹上，上部图片表示考马斯亮兰染色的蛋白印迹，而下部图片表示相应的 Western 印迹。与第二种转染相比，在第一种转染中有更多可检测的大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A。在用抗-p53 探测的 Western 印迹中，上部图片表示相应的考马斯亮兰染色的蛋白印迹，而下部图片表示使用 p53 的对于第一种转染来说，与 pHM6-LacZ 转染或模拟对照转染的细胞相比，在用 pHM6-有义 rF5A 转染的细胞中可检测的 p53 更多。对于第二种转染来说，其中，大鼠凋亡-诱导的 eIF-5A 的表达较少，而在用 pHM6-有义 rF5A，pHM6-LacZ 或模拟对照转染的细胞之间 p53 的水平没有可检测的差别。

实施例 5

本实施例证实了凋亡特异性 eIF-5A 能够在具有活性 p53 的细胞 (RX0 细胞) 和没有活性 p53 的细胞 (RX0-E6 细胞) 中诱导凋亡，这表明，凋亡特异性 eIF-5A 可以通过除了 p53 途径以外的途径启动凋亡。这还支持了我们的论点：即它能在多种不同类型的癌的上游起作用，而且有可能杀死这些癌细胞。

本实施例证实了 eIF-5A 的活性位点是所述蛋白的 5' 末端 (即参见使用截短的 eIF-5A1 的实验)，它最有可能包括 RNA 结合结构域。

另外，本实施例证实了人 eIF-5A2 最有可能是增殖性 eIF-5A，因为它不能够诱导凋亡。因此，人们认为在人类数据库中的两个 eIF-5A 基因凋亡特异性 eIF-5A1 是凋亡基因，而 eIF-5A2 是增殖基因。

RKO 和 RK0-E6 细胞的培养

将 RK0 (美国典型培养物保藏中心 CRL-2577)——能表达野生型 p53 的人结肠癌细胞系, 和 RK0-E6 (美国典型培养物保藏中心 CRL-2578)——源于 RK0 的, 包括稳定整合了人类乳头瘤病毒 E6 癌基因, 能导致正常的 p53 水平和功能减弱的细胞系, 用于基于转染的实验。在含有非必需氨基酸, Earle's 盐, 和 L-谷氨酰胺的最低必需培养基 Eagle (MEM) 中培养 RK0 和 RK0-E6 细胞。在该培养基中补充了 10 % 的胎牛血清 (FBS) 和 100 单位的青霉素/链霉素。让所述细胞在 37 °C 下, 在 5 % 二氧化碳和 95 % 空气的潮湿环境中生长。每隔 3-4 天对所述细胞进行继代培养, 包括用 0.25 % 胰蛋白酶和 1 mM EDTA 的溶液分离贴壁细胞。以 1: 10-1: 12 的分流比将分离的细胞分配到装有新的培养基的培养皿中。

人 eIF5A2 的克隆

使用针对可以从 GenBank 获得的人 eIF5A2 的序列 (ACCESSION XM113401) 设计的引物, 通过 RT-PCR, 用从 RK0 中分离的 RNA 分离人 eIF5A2。图 38 提供了从 RK0 细胞中分离的 eIF-5A 与人 eIF-5A2 的序列的比对。RNA 是用 GenElute 哺乳动物总 RNA 微量制备试剂盒 (Sigma) 从 RK0 细胞中分离的。用于扩增 eIF5A2 的正向引物具有以下序列 5' AAACCTACCATCTCCCCTGCC 3' (SEQ. ID 24), 而反向引物具有以下序列 5' TGCCCTACACAGGCTGAAAG 3' (SEQ ID NO: 25)。将所得到的 936 bp 的 PCR 产物亚克隆到 pGEM-T Easy 载体 (Promega) 上, 并且测序。

然后将 pGEM-T Easy-eIF5A2 构建体用作模板, 制备 eIF5A2 PCR 片断, 将该片断亚克隆到所述哺乳动物表达载体 pHM6 (Roche) 的读框内。用于扩增人 eIF5A2 的正向引物是 5' ATCAAGCTTGCCCAACCATGGCAGACG 3' (SEQ ID NO: 26), 而反向引物是 5' AACGAATTCCATGCCTGATGTTTCCG 3' (SEQ ID NO: 27)。所得到的 505 bp 的 PCR 产物用 Hind 3 和 EcoR 1 消化, 并且亚克隆到 pHM6 的 Hind 3 和 EcoR1 位点上。

pHM6-截短的 eIF5A1 的构建

为了确定 eIF5A1 的羧基末端区对于它的凋亡-诱导活性是否重

要, 构建了羧基末端缺失的 eIF5A1 . 编码 1-127 号氨基酸的截短的 eIF5A1 是使用 pBS-大鼠 eIF5A1 作模板通过 PCR 制备的。正向 PCR 引物是 5' GCCAAGCTTAATGGCAGATGATTTGG 3' (SEQ ID NO: 18), 而反向引物是 5' TCCGAATTCGTACTTCTGCTCAATC 3' (SEQ ID NO: 28)。用 EcoR 1 和 Hind 3 消化所得到的 390 bp 的 PCR 产物, 并且亚克隆到 pHM6 的 EcoR 1 和 Hind 3 位点上。

转染

对于要用于 Hoescht 染色的细胞来说, 将用于转染实验的 RK0 或 RK0-E6 细胞放在 8 孔腔室培养载玻片 (Falcon) 上培养, 或对于要通过流式细胞术分析的细胞来说, 放入 6 孔平板上培养。让所述细胞在补充了 10 % FBS, 但缺少青霉素/链霉素的 MEM 培养基中生长到 70-80 % 的汇合度。足够 8 孔培养载玻片的 1 个孔的转染培养基是通过以下方法制备的: 将 0.425 μ g 的质粒 DNA 稀释在 22 μ l 的无血清的 MEM 中, 并且在室温下孵育该混合物 15 分钟。将 0.85 μ l 的转染试剂 LipofectAMINE (Gibco, BRL) 稀释在 22 μ l 的无血清的 MEM 中, 并且在室温下孵育 5 分钟。5 分钟之后, 将 LipofectAMINE 混合物添加到所述 DNA 混合物中, 并且在室温下孵育 30-60 分钟。用无血清的 MEM 洗涤要转染的细胞 1 次, 然后将 44 μ l 的 MEM 添加到所述转染培养基中, 并且将该培养基覆盖在所述细胞上。将所述细胞放回到所述生长室中 4 小时。在所述孵育之后, 向所述细胞中添加 88 μ l 的 MEM + 20 % FBS。然后将所述细胞再培养 44 小时, 并且按照前面所述的方法, 用 Hoescht 33258 染色。在另一组实验中, 在转染之后用 0.25 μ g/ml 放线菌素 D 处理 8 孔培养载玻片上的 RK0 或 RK0-E6 细胞 24 小时, 并且随后用 Hoescht 染色 20 小时。在 6 孔平板上进行的转染, 是以相同的方式进行的, 所不同的是, 所有的试剂都增加了 4.81 倍。在转染之后 48 小时, 收获 6 孔平板上的转染过的 RK0 细胞, 并且固定, 以便按上述方法通过流式细胞术分析。

转染效率的确定

通过用 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖吡喃糖苷 (X-GAL) 对 pHM6-LacZ-转染的细胞进行染色, 确定转染效率。染成兰色的细胞是表

达 LacZ 的转染的细胞, 并且, 转染效率是通过染成兰色的细胞的数量除以总细胞数量计算的。在转染之后, 对转染的细胞进行 48 小时的染色。用 PBS 洗涤所述细胞 2 次, 然后在室温下, 在 0.5 % 戊二醛/PBS 中固定 10 分钟。用 1 mM MgCl_2 /PBS 洗涤所述细胞 3 次, 然后用染色溶液[溶解在 PBS 中的 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1 mM MgCl_2 , 0.1 % X-GAL]洗涤, 直到出现染成兰色的细胞。

Hoescht 染色

将细胞核染料 Hoescht 用于标记转染过的 RK0 和 RK0-E6 细胞的细胞核, 以便根据细胞核的断裂和浓缩, 鉴定凋亡的细胞。在即将使用之前制备由无水甲醇和冰醋酸的 3: 1 的混合物组成的固定剂。将等体积的固定剂添加到生长在培养载玻片上的细胞培养基中, 并且孵育 2 分钟。将所述培养基/固定剂混合物从细胞上除去, 并且弃去, 将 1 ml 固定剂添加到所述细胞上。5 分钟之后弃去所述固定剂, 并且将 1 ml 新的固定剂添加到所述细胞上, 并且孵育 5 分钟。将所述固定剂弃去, 并且将所述细胞风干 4 分钟, 然后添加 1 ml 的 Hoescht 染料 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoescht 33258, 溶解在 PBS 中)。在黑暗中孵育 10 分钟之后, 将所述染色溶液弃去, 并且用去离子水洗涤所述载玻片 3 次, 每次 1 分钟。在洗涤之后, 将 1 ml 的 McIlvaine's 缓冲液 (0.021 M 柠檬酸, 0.058 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 5.6) 添加到所述细胞上, 并且在黑暗中孵育 20 分钟。将所述缓冲液弃去, 并且在黑暗中将所述细胞风干 5 分钟, 除去分隔所述培养载玻片的孔的腔室。将若干滴 Vectashield 荧光封固剂 (Vector Laboratories) 添加到所述载玻片上, 并且用盖玻片覆盖。在荧光显微镜下使用 UV 滤光器观察染色的细胞。将被染亮的细胞或具有断裂的细胞核统计为凋亡细胞。

通过流式细胞术检测 DNA 断裂

在凋亡期间产生的 DNA 片断是用荧光素-FragEL™ DNA 断裂检测试剂盒 (Oncogene Research Products), 用荧光素标记的脱氧核苷酸标记的。在转染之后, 通过胰蛋白酶处理 48 小时, 收获在 6 孔培养平板上用各种构建体转染的细胞, 并且按照生产商的说明固定和标记。简单地讲, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 以 1000 $\times g$ 的速度使所述细胞沉淀 5 分钟, 并且用

PBS (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na_2HPO_4 , 和 0.24 g/L KH_2PO_4) 洗涤 1 次。将所述细胞重新悬浮在 4% 甲醛 (PBS) 中, 并且在室温下孵育 10 分钟。再次使所述细胞沉淀, 重新悬浮在 1 ml 80 % 的乙醇中, 并且在 4 °C 下保存。在分析的当天, 将 1 ml 的固定细胞 (浓度为 1×10^6 细胞/ml) 转移到微量离心管中, 并且通过以 $1000 \times g$ 的速度离心 5 分钟使细胞沉淀。将沉淀的细胞重新悬浮在 200 μl 的 1×TBS (20 mM Tris pH 7.6, 140 mM NaCl), 并且在室温下孵育 10-15 分钟。然后再次使所述细胞沉淀, 并且重新悬浮在 100 μl 的 20 g/ml 蛋白酶 K 中, 并且在室温下孵育 5 分钟。使所述细胞沉淀, 并且重新悬浮在 100 μl 的 1×TdT 平衡缓冲液中, 并且在室温下孵育 10-30 分钟。然后通过离心使所述细胞沉淀, 并且重新悬浮在 60 μl 的 TdT 标记反应混合物中, 并且在黑暗中孵育 1-1.5 小时。在培养之后, 通过离心使所述细胞沉淀, 并且在 200 μl 的 1×TBS 洗涤 2 次。将所述细胞重新悬浮在最终体积为 0.5 ml 的 1×TBS 中, 并且在装配有 488 nm 氩离子激光光源的流式细胞计上分析。

蛋白提取和 Western 印迹

从转染的细胞中分离蛋白进行 Western 印迹, 包括用 PBS 洗涤所述细胞 2 次, 然后添加 150 μl 热的 SDS 凝胶加样缓冲液 (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM 二硫苏糖醇, 2 % SDS, 0.1 % 溴酚蓝, 和 10 % 甘油)。将所述细胞裂解液收集到微量离心管中, 在 95 °C 下加热 10 分钟, 然后以 $13,000 \times g$ 的速度离心 10 分钟。将上清液转移到新的微量离心管中, 并且在 -20 °C 下保存待用。

为了进行 Western 印迹, 在 12 % SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离 5 μg 或 10 μg 的总蛋白。将分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上。然后在封闭溶液 (5 % 脱脂奶粉, 0.02 % 叠氮化钠, 溶解在 PBS 中) 培养所述膜, 并且用 PBS-T (PBS + 0.05 % Tween-20) 洗涤 3 次, 每次 15 分钟。将所述膜放置在 PBS-T 中, 在 4 °C 下保存过夜。在第二天, 在回温到室温之后, 用 1 $\mu\text{g/ml}$ 的聚乙烯醇封闭所述膜 30 秒。用去离子水漂洗所述膜 5 次, 然后, 用溶于 PBS 的 5% 的牛奶封闭 30 分钟。在与所述膜培养之前, 在溶于 PBS/0.025% Tween-20 的 5 % 牛奶溶液中将所述第一抗体预孵育 30 分钟。

所述膜用购自 Oncogene 的能识别 p53 的单克隆抗体 (Ab-6), 或在鸡体内制备的针对与人 eIF5A1 的 c-末端同源的合成肽 (氨基-CRLPEGDLGKEIEQKYD-羧基) 的多克隆抗体吸印所述膜。p53 的单克隆抗体是以 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 的稀释液形式使用的, 并且抗 eIF5A1 的抗体是以 1:1000 的稀释比例使用的。在用第一抗体孵育 60-90 分钟之后, 用 PBS-T 洗涤所述膜 3 次, 每次 15 分钟。然后用溶于 PBS/0.025 % Tween-20 的 1% 的牛奶稀释第二抗体, 并且与所述膜一起孵育 60-90 分钟。在将 p53 (Ab-6) 用作第一抗体时, 所使用的第二抗体是稀释比例为 1:1000 的与碱性磷酸酶偶联的山羊抗小鼠 IgG (Rockland)。在将抗-eIF5A1 用作第一抗体时, 与过氧化物酶偶联的兔抗鸡 IgY (Gallus Immunotech) 是以 1:10000 的稀释比例使用的。在用所述第二抗体孵育之后, 用 PBS-T 洗涤所述膜 3 次。

用两种检测方法显现所述印迹: 比色方法和化学发光方法。只有在将 p53 (Ab-6) 用作第一抗体, 同时使用碱性磷酸酶偶联的第二抗体时才使用比色法。通过在黑暗中以 0.33 mg/mL 氮蓝四唑, 0.165 mg/mL 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸酯, 100 mM NaCl , 5 mM MgCl_2 , 和 100 mM Tris-HCl (pH 9.5) 的溶液中培养所述印迹, 观察结合的抗体。通过在溶于 PBS 的 2 mM EDTA 中孵育所述印迹终止颜色反应。将化学发光检测方法用于所有其他的第一抗体, 包括抗-[HA]-过氧化物酶和抗-eIF5A1。将 ECL Plus Western 印迹检测试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech) 用于检测过氧化物酶-偶联的结合抗体。简单地讲, 将所述膜轻微地吸水干燥, 然后在黑暗中用试剂 A 和试剂 B 的 40:1 的混合物中孵育 5 分钟。将所述膜吸干, 放置在两层乙酸酯之间, 并且曝光于 X-光胶片 10 秒到 30 分钟。

图 39 表示表明在瞬时转染之后出现在 RK0 和 RK0-E6 细胞中的凋亡的百分比的曲线图。用 pHM6-LacZ 或 pHM6-eIF5A1 瞬时转染 RK0 和 RK0-E6 细胞, 24 小时之后, 用 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 放线菌素 D 或等体积的甲醇 (对照) 处理所述细胞。随后用 Hoechst 20 对所述细胞进行 20 小时染色, 并且在荧光显微镜下用 UV 滤光器观察。将由于浓缩的染色质而染亮的细胞统计为凋亡。与用 pHM6-LacZ 转染的没有用放线菌素 D 处理过的细胞相比, 上面的实验揭示了用放线菌素 D 处理过的并且用 pHM6-eIF5A1 转染的 RK0 细胞表现出凋亡提高了 240%。与用 pHM6-LacZ

转染过的没有用放线菌素 D 处理过的细胞相比, 用放线菌素 D 处理过的并且用 pHM6-eIF5A1 转染的 RK0-E6 细胞表现出凋亡提高了 105%。

图 40 提供了表示在瞬时转染之后在 RK0 细胞中出现的凋亡的百分比的曲线图。用 pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A1, pHM6-eIF5A2, 或 pHM6-截短的 eIF5A1 瞬时转染 RK0 细胞。44 小时后用 Hoescht 对所述细胞进行染色, 并且在荧光显微镜下用 UV 滤光器观察。将由于浓缩的染色质而染亮的细胞统计为凋亡。与用 pHM6-LacZ 转染过的对照细胞相比, 用 pHM6-eIF5A1 转染的细胞表现出凋亡增加了 25%。对于用 pHM6-eIF5A1 或 pHM6-截短的 eIF5A1 转染的细胞来说, 这种增加不明显。

图 41 提供了表示在瞬时转染之后出现在 RK0 细胞中的凋亡的百分比的曲线图。不对 RK0 细胞进行转染, 或者用 pHM6-LacZ 或 pHM6-eIF5A1 进行瞬时转染。44 小时后用 Hoescht 对所述细胞进行染色, 并且在荧光显微镜下用 UV 滤光器观察。将由于浓缩的染色质而染亮的细胞统计为凋亡的细胞。在对转染效率进行校正之后, 用 pHM6-eIF5A1 转染的 60% 的细胞是凋亡的细胞。

图 42 提供了在瞬时转染之后 RK0 细胞凋亡的流式细胞术分析。不对细胞进行转染或者用 pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A1, pHM6-eIF5A2, 或 pHM6-截短的 eIF5A1 进行瞬时转染。48 小时之后, 收获所述细胞并且固定。用荧光素偶联的脱氧核苷酸标记体现凋亡的断裂的 DNA, 并且在装配有 488 nm 氩离子激光光源的流式细胞计上进行分析。出现在门 E 下面的荧光来自非-凋亡的细胞, 而出现在门 F 下面的荧光来自发生凋亡的细胞。该表示出了根据每一个门的峰下面的面积计算的发生凋亡的细胞的百分比。在对未转染的细胞中的背景凋亡和转染效率进行校正之后, 用 pHM6-eIF5A1 转染的 80% 的细胞表现出凋亡。用 pHM6-LacZ 转染, pHM6-eIF5A2 或 pHM6-截短的 eIF5A1 转染的细胞仅表现出背景水平的凋亡。

图 43 提供了从用 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 放线菌素 D 处理 0, 3, 7, 24, 和 48 小时的 RK0 细胞中提取的蛋白的 Western 印迹。在 12 % SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离 5 μg (对于抗-eIF5A1 来说) 或 10 μg (对抗-p53 来说) 总蛋白, 并且转移到聚偏二氟乙烯膜上。上部图片表示用抗 p53 作为第一抗体的 Western 印迹。中间的图片表示抗-eIF5A1 作为第一抗体的 Western 印迹。下部的图片表示用于用考马斯亮兰对抗-eIF5A1 印

迹进行染色的膜，然后进行化学发光检测，以便证实加样量相等。在用放线菌素 D 处理之后，p53 和 eIF5A1 都得到了上调。

序列表

<110> SENESCO, INC.

<120> 调节凋亡的核酸, 多肽, 以及方法

<130> 10799/83

<140> PCT/US03/14049

<141> 2003-05-07

<150> 10/141,647

<151> 2002-05-07

<150> 10/200,148

<151> 2002-07-23

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1139

<212> DNA

<213> 大鼠 (Rattus sp.)

<220>

<221> CDS

<222> (33).. (494)

<400> 1

```

caggtctaga gttggaatcg aagcctctta aa atg gca gat gat ttg gac ttc 53
                                   Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe
                                   1             5

```

```

gag aca gga gat gca ggg gcc tca gcc acc ttc oca atg cag tgc tca 101
Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser
      10             15             20

```

```

gca tta cgt aag aat ggt ttt gtg gtg ctc aag ggc cgg oca tgt aag 149
Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys
      25             30             35

```

```

atc gtc gag atg tct act tgc aag act ggc aag cat ggc cat gcc aag 197
Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala Lys
      40             45             50             55

```

```

gtc cat ctg gtt ggt att gat att ttt act ggg aag aaa tat gaa gat 245

```

Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp
 60 65 70
 atc tgc cgc tgc act cat aac atg gat gtc ccc aac atc aaa agg aat 293
 Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn
 75 80 85
 gat ttc cag ctg att ggc atc cag gat ggg tac cta tcc ctg etc cag 341
 Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln
 90 95 100
 gac agt ggg gag gta cga gag gac ctt cgt ctg cct gag gga gac ctt 389
 Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu
 105 110 115
 ggc aag gag att gag cag aag tat gac tgt gga gaa gag atc ctg atc 437
 Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile
 120 125 130 135
 aca gtg ctg tcc gcc atg aca gag gag gca gct gtt gca atc aag gcc 485
 Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala
 140 145 150
 atg gca aaa taactggcct ccagggtggc ggtggtggca gcagtgatec 534
 Met Ala Lys
 atgagcctac agaggccct cccccagctc tggotgggccc cttggctgga ctccatcca 594
 atttatttga cgttttattt tggttttcct cacccttcca aactgtcggg gagaccctgc 654
 ccttcacctc gctcccttgg ccaggcatga gggagccatg gccttgggtga agctacctgc 714
 ctcttctctc gcagccotga tgggggaaag ggagtgggta ctgcctgttg tttaggttcc 774
 cctctccctt tttcttttta attcaatttg gaatcagaaa gctgtggatt ctggcaaattg 834
 gtcttgtgtc ctttatccca ctcaaaccca totggtcccc tgtttcccat agtccttcac 894
 cccaagcac cactgacaga ctggggacca gccccttccc ctgcctgtgt ctcttcccaa 954
 acccctctat aggggtgaca agaagaggag ggggggaggg gacacgatcc ctctcaggc 1014
 atctgggaag gccttgcccc catgggcttt accctttcct gtgggcttcc tcctgacac 1074
 atttgtaaaa aatcaaacct gaataaaact acaagtttaa tatgaaaaaa aaaaaaaaaa 1134
 aaaaaa 1139

<210> 2
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 2

Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala
 1 5 10 15

Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val
 20 25 30

Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr
 35 40 45

Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe
 50 55 60

Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp
 65 70 75 80

Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp
 85 90 95

Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu
 100 105 110

Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp
 115 120 125

Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu
 130 135 140

Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys
 145 150

<210> 3
 <211> 462
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 3

atggcagatg acttggactt cgagacagga gatgcagggg cctcagccac cttcccaatg 60
 cagtgtctcag cattacgtaa gaatggcttt gtggtgtctca aaggccggcc atgtaagatc 120
 gtcgagatgt ctacttcgaa gactggcaag caaggccacg ccaaggtcca tetggttggt 180

```

attgacatct ttactgggaa gaaatatgaa gatatctgcc cgtcaactca taatatggat 240
gtccccaaca tcaaaaggaa tgacttcag ctgattggca tccaggatgg gtacctatca 300
ctgctccagg acagogggga ggtacgagag gaccttcgtc tccctgaggg agaccttgge 360
aaggagattg agcagaagta cgactgtgga gaagagatcc tgatcacggt gctgtctgcc 420
atgacagagg aggcagctgt tgcaatcaag gccatggcaa aa 462

```

<210> 4

<211> 462

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (455).. (456)

<223> a, t, c 或 g

<400> 4

```

atggcagacg aaattgattt cactactgga gatgccgggg cttccagcac ttacctatg 60
cagtgtctcg ccttgogcaa aaacggcttc gtggtgctca aaggacgacc atgcaaaata 120
gtggagatgt caacttccaa aactggaaag catggtcatt ccaaggttca ccttggttga 180
attgatattt tcacgggcaa aaaatatgaa gatatttgtc cttctactca caacatggat 240
gttccaaata ttaagagaaa tgattatcaa ctgatatgca ticaagatgg ttacctttcc 300
ctgctgacag aaactgggtga agttcgtgag gatottaac tgccagaagg tgaactagge 360
aaagaaatag agggaaaata caatgcaggt gaagatgtac aggtgtctgt catgtgtgca 420
atgagtgaag aatatgtctgt agccataaaa ccctnngcaa at 462

```

<210> 5

<211> 462

<212> DNA

<213> 大鼠

<400> 5

```

atggcagatg atttggactt cgagacagga gatgcagggg cctcagccac cttcccaatg 60
cagtgtctag cattacgtaa gaatggtttt gtggtgctca aaggccggcc atgtaagatc 120
gtcgagatgt ctacttcgaa gactggcaag catggccatg ccaaggttca tctggttggc 180
attgacattt ttactgggaa gaaatatgaa gatatctgcc cgtcgactca taatatggat 240
gtccccaaca tcaaaoggaa tgacttcag ctgattggca tccaggatgg gtacctatcc 300
ctgctccagg acagtgggga ggtacgagag gaccttcgtc tgcctgaagg agaccttgge 360
aaggagattg agcagaagta tgactgtgga gaagagatcc tgatcacagt gctgtctgcc 420
atgacagagg aggcagctgt tgcaatcaag gccatggcaa aa 462

```

<210> 6

<211> 606

<212> DNA

<213> 大鼠

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (453)

<400> 6

```

gct gtg tat tat tgg gcc cat aag aac cac ata cct gtg ctg agt cct 48
Ala Val Tyr Tyr Trp Ala His Lys Asn His Ile Pro Val Leu Ser Pro
1 5 10 15

gca ctc aca gac ggc tca ctg ggt gac atg atc ttt ttc cat tcc tat 96
Ala Leu Thr Asp Gly Ser Leu Gly Asp Met Ile Phe Phe His Ser Tyr
20 25 30

aaa aac cca ggc ttg gtc ctg gac atc gtt gaa gac ctg cgg ctc atc 144
Lys Asn Pro Gly Leu Val Leu Asp Ile Val Glu Asp Leu Arg Leu Ile
35 40 45

aac atg cag gcc att ttc gcc aag ogc act ggg atg atc atc ctg ggt 192
Asn Met Gln Ala Ile Phe Ala Lys Arg Thr Gly Met Ile Ile Leu Gly
50 55 60

gga ggc gtg gtc aag cac cac atc gcc aat gct aac ctc atg cgg aat 240
Gly Gly Val Val Lys His His Ile Ala Asn Ala Asn Leu Met Arg Asn
65 70 75 80

gga gct gac tac gct gtt tat atc aac aca gcc cag gag ttt gat ggc 288
Gly Ala Asp Tyr Ala Val Tyr Ile Asn Thr Ala Gln Glu Phe Asp Gly
85 90 95

tca gac tca gga gcc cgg cca gat gag gct gtc tcc tgg ggc aag atc 336
Ser Asp Ser Gly Ala Arg Pro Asp Glu Ala Val Ser Trp Gly Lys Ile
100 105 110

cgg atg gat gca cag cca gta aag gtc tat gct gat gca tct ctg gtt 384
Arg Met Asp Ala Gln Pro Val Lys Val Tyr Ala Asp Ala Ser Leu Val
115 120 125

ttc ccc ttg ctg gtg gct gag aca ttc gcc caa aag gca gat gcc ttc 432
Phe Pro Leu Leu Val Ala Glu Thr Phe Ala Gln Lys Ala Asp Ala Phe
130 135 140

aga gct gag aag aat gag gac tgagcagatg ggtaaagacg gaggtctctg 483
Arg Ala Glu Lys Asn Glu Asp
145 150

ccacacottt atttattatt tgcataccaa cccctcctgg gccctctcct tggtcagcag 543

```

catottgaga ataatggcc ttttgttgg tttctgtaa aaaaggaatt taaaaaaaa 603

aaa

606

<210> 7

<211> 151

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 7

Ala Val Tyr Tyr Trp Ala His Lys Asn His Ile Pro Val Leu Ser Pro
1 5 10 15

Ala Leu Thr Asp Gly Ser Leu Gly Asp Met Ile Phe Phe His Ser Tyr
20 25 30

Lys Asn Pro Gly Leu Val Leu Asp Ile Val Glu Asp Leu Arg Leu Ile
35 40 45

Asn Met Gln Ala Ile Phe Ala Lys Arg Thr Gly Met Ile Ile Leu Gly
50 55 60

Gly Gly Val Val Lys His His Ile Ala Asn Ala Asn Leu Met Arg Asn
65 70 75 80

Gly Ala Asp Tyr Ala Val Tyr Ile Asn Thr Ala Gln Glu Phe Asp Gly
85 90 95

Ser Asp Ser Gly Ala Arg Pro Asp Glu Ala Val Ser Trp Gly Lys Ile
100 105 110

Arg Met Asp Ala Gln Pro Val Lys Val Tyr Ala Asp Ala Ser Leu Val
115 120 125

Phe Pro Leu Leu Val Ala Glu Thr Phe Ala Gln Lys Ala Asp Ala Phe
130 135 140

Arg Ala Glu Lys Asn Glu Asp
145 150

<210> 8

<211> 453

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 8

```
tccgtgtatt actgggcccga gaagaaccac atccctgtgt ttagtccgcg acttacagac 60
ggctcgtctgg gcgacatgat cttcttccat tctacaaga acccgggcct ggtcctggac 120
atcggttgagg acctgagget catcaacaca caggccatct ttgccaaagt cactgggatg 180
atcattcttg gcggggggcgt ggtoaagcac cacattgcca atgccaacct catgcggaac 240
gggggcgact acgctgttta catcaacaca gccaggagt ttgatggctc tgactcaggt 300
gcccaccag acgaggetgt ctctggggc aagatccggg tggatgcaca gcccgtaag 360
gtctatgctg acgcctccct ggtcttcccc ctgcttgtgg ctgaaacctt tgcccagaag 420
atggatgcct tcatgcata gaagaacgag gac 453
```

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (12)

<223> a, t, c 或 g

<400> 9

```
tcsaarachg gnaagcaygg 20
```

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 10

```
gogaagcttc catggetoga gttttttttt tttttttttt tt 42
```

<210> 11

<211> 972

<212> DNA

<213> 大鼠

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

<400> 11
 tcg aag acc ggt aag cac ggc cat gcc aag gtc cat ctg gtt ggt att 48
 Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile
 1 5 10 15

 gat att ttt act ggg aag aaa tat gaa gat atc tgc ccg tcg act cat 96
 Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His
 20 25 30

 aac atg gat gtc ccc aac atc aaa agg aat gat ttc cag ctg att ggc 144
 Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly
 35 40 45

 atc cag gat ggg tac cta tcc ctg ctc cag gac agt ggg gag gta cga 192
 Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg
 50 55 60

 gag gac ctt cgt ctg cct gag gga gac ctt ggc aag gag att gag cag 240
 Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln
 65 70 75 80

 aag tat gac tgt gga gaa gag atc ctg atc aca gtg ctg tcc gcc atg 288
 Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met
 85 90 95

 aca gag gag gca got gtt gca atc aag gcc atg gca aaa taactggctt 337
 Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys
 100 105

 ccagggtggc ggtggtggca gcagtgatcc atgagcctac agaggccccc cccccagctc 397

 tggetgggccc cttggetgga ctccatccca atttatttga cgttttattt tggttttcct 457

 ccccccttca aactgtcggg gagaccctgc ccttcacctg gctcccttgg ccaggcatga 517

 gggagccatg gccttggtga agctacctgc ctctctctc gcagccctga tgggggaaag 577

 ggagtgggta ctgcctgtgg tttaggttcc cctctccctt tttcttttta attcaatttg 637

 gaatcagaaa gotgtggatt ctggcaaatg gtcttgtgtc ctttatccca ctcaaaccga 697

 tctggtcccc tgtttccat agtccttcac cccaagcac cactgacaga ctggggacca 757

 gcccccttcc ctgcctgtgt ctcttcccaa accctctat aggggtgaca agaagaggag 817

 ggggggaggg gacacgatcc ctccctcagc atctgggaag gccttgcccc catgggcttt 877

accctttcct gtgggettto tccctgacac atttggttaa aatcaaacct gaataaaact 937

acaagtttaa tatgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 972

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 12

Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile
1 5 10 15

Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His
20 25 30

Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly
35 40 45

Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg
50 55 60

Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln
65 70 75 80

Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met
85 90 95

Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys
100 105

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 13

caggtctaga gttggaatcg aagc 24

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 14

atatctcgag ccttgattgc aacagctgcc 30

<210> 15

<211> 489

<212> DNA

<213> 大鼠

<220>

<221> CDS

<222> (33)..(485)

<400> 15

caggtctaga gttggaatcg aagcctctta aa atg goa gat gat ttg gac ttc 53

Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe

1

5

gag aca gga gat gca ggg gcc tca gcc acc ttc cca atg cag tgc tca 101

Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser

10

15

20

gca tta cgt aag aat ggt ttt gtg gtg ctc aag ggc cgg cca tgt aag 149

Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys

25

30

35

atc gtc gag atg tct act tcg aag act ggc aag cat ggc cat gcc aag 197

Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala Lys

40

45

50

55

gtc cat ctg gtt ggt att gat att ttt act ggg aag aaa tat gaa gat 245

Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp

60

65

70

atc tgc ccg tcg act cat aac atg gat gtc ccc aac atc aaa agg aat 293

Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn

75

80

85

gat ttc cag ctg att ggc atc cag gat ggg tac cta tcc ctg ctc cag 341

Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln

90

95

100

```

gac agt ggg gag gta cga gag gac ctt cgt ctg cct gag gga gac ctt 389
Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu
105 110 115

ggc aag gag att gag cag aag tat gac tgt gga gaa gag atc ctg atc 437
Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile
120 125 130 135

aca gtg ctg tcc gcc atg aca gag gag gca gct gtt gca atc aag gct 485
Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala
140 145 150

cgag 489

<210> 16
<211> 151
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 16
Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala
1 5 10 15

Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val
20 25 30

Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr
35 40 45

Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe
50 55 60

Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp
65 70 75 80

Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp
85 90 95

Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu
100 105 110

Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp
115 120 125

Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu
130 135 140

```

Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala
145 150

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 17
gtctgtgtat tattgggcc 20

<210> 18
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 18
gogaagcttc catggetoga gttttttttt tttttttttt tt 42

<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 19
ttgaaggggt gagga 18

<210> 20
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 20
ttgagtggga taaag 15

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 21
aatcatctgc cattttaa 18

<210> 22
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 22
gccaaagctta atggcagatg atttgg 26

<210> 23
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 23
ctgaattcca gttattttgc catgg 25

<210> 24
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 引物

<400> 24 aatgaattcc gccatgacag aggagge	27
<210> 25 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列说明: 引物	
<400> 25 aaactaccat ctccccctgcc	20
<210> 26 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列说明: 引物	
<400> 26 tgcctacac aggctgaaag	20
<210> 27 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列说明: 引物	
<400> 27 atcaagcttg cccaccatgg cagacg	26
<210> 28 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列说明: 引物	

<400> 28

aacgaattcc atgootgatg ttcccg

26

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物

<400> 29

tcogaattcg tacttetgct caatc

25

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 合成肽

<400> 30

Cys Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr
1 5 10 15

Asp

TCGAAGACCGGTAAGCACGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTGATATTTTACTGGGAAGAAATAT
S K T G K H G H A K V H L V G I D I F T G K K Y
GAAGATATCTGCCCCTCGACTCATAACATGGATGTCCCAACATCAAAGGAATGATTTCCAGCTGATTGGC
E D I C P S T H N M D V P N I K R N D F Q L I G
ATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCTGCCTGAGGGA
I Q D G Y L S L L Q D S G E V R E D L R L P E G
GACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCACAGTGCTGTCCGCCATG
D L G K E I E Q K Y D C G E E I L I T V L S A M
ACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAATAACTGGCTTCCAGGGTGGCGGTGGTGGCAGCA
T E E A A V A I K A M A K
GTGATCCATGAGCCTACAGAGGCCCTCCCCAGCTCTGGCTGGGCCCTTGGCTGGACTCCTATCCAATTTA
TTTGACGTTTTATTTTGGTTTTCTCACCCCTTCAAAGTGTGGGGAGACCCTGCCCTTACCTAGCTCCCT
TGGCCAGGCATGAGGGAGCCATGGCCTTGGTGAAGCTACCTGCCTCTTCTCTCGCAGCCCTGATGGGGGAAA
GGGAGTGGGTACTGCCTGTGGTTTAGGTTCCCTCTCCCTTTTTCTTTTAATTCAATTTGGAATCAGAAAG
CTGTGGATTCTGGCAAATGGTCTTGTGTCTTTATCCCACTCAAACCCATCTGGTCCCCTGTTCTCCATAGT
CCTTCACCCCCAAGCACCCTGACAGACTGGGGACCAGCCCCCTTCCCTGCCTGTGTCTTCCCAAACCCC
TCTATAGGGGTGACAAGAAGAGGAGGGGGGAGGGGACACGATCCCTCCTCAGGCATCTGGGAAGGCCTTGC
CCCCATGGGCTTTACCCTTTCTGTGGGCTTCTCCCTGACACATTTGTTAAAAATCAAACCTGAATAAAAC
TACAAGTTTAATATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
(972 NT, 109 aa)

图 1

CAGGTCTAGAGTTGGAATCGAAGCCTCTTAAAATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGG
M A D D L D F E T G D A G
CCTCAGCCACCTTCCCAATGCAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGGCCAT
A S A T F P M Q C S A L R K N G F V V L K G R P
GTAAGATCGTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTG
C K I V E M S T S K T G K H G H A K V H L V G I
ATATTTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCGTCGACTCATAACATGGATGTCCCAACATCAAAA
D I F T G K K Y E D I C P S T H N M D V P N I K
GGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAG
R N D F Q L I G I Q D G Y L S L L Q D S G E V R
AGGACCTTCGTCTGCCTGAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCC
E D L R L P E G D L G K E I E Q K Y D C G E E I
TGATCACAGTGCTGTCCGCCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCTCGAG
L I T V L S A M T E E A A V A I K A

(488 NT, 151 aa)

图 2

```

CAGGTCTAGAGTTGGAATCGAAGCCTCTTAAATGGCAGATGATTTGGAAGCTTCGAGACAGGAGATGCAGGGG
                                M A D D L D F E T G D A G      13
CCTCAGCCACCTTCCCAATGCAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGGCCAT      144
A S A T F P M Q C S A L R K N G F V V L K G R P
GTAAGATCGTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTG
C K I V E M S T S K T G K H G H A K V H L V G I      61
ATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCGTCGACTCATAACATGGATGTCCCAACATCAAAA      288
D I F T G K K Y E D I C P S T H N M D V P N I K
GGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAG
R N D F Q L I G I Q D G Y L S L L Q D S G E V R      109
AGGACCTTCGTCTGCCTGAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCC      432
E D L R L P E G D L G K E I E Q K Y D C G E E I
TGATCACAGTGCTGTCCGCCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAATAACTGGCTT
L I T V L S A M T E E A A V A I K A M A K *      154
CCAGGGTGGCGGTGGTGGCAGCAGTGATCCATGAGCCTACAGAGGCCCTCCCCAGCTCTGGCTGGGCCCT      576
TGGCTGGACTCCTATCCAATTTATTTGACGTTTTATTTTGGTTTTCTCACCCCTTCAAAGTGTGGGGAGA
CCCTGCCCTTACCTAGCTCCCTTGGCCAGGCATGAGGGAGCCATGGCCTTGGTGAAGCTACCTGCCTCTTC      720
TCTCGCAGCCCTGATGGGGGAAAGGGAGTGGGTACTGCCTGTGGTTTAGGTTCCCCTCTCCCTTTTCTTTT
TAATTC AATTTGGAATCAGAAAGCTGTGGATTCTGGCAAATGGTCTTGTGTCCTTTATCCCACTCAAACCCA      864
TCTGGTCCCCTGTTCTCCATAGTCCTTCACCCCAAGCACCCTGACAGACTGGGGACCAGCCCCCTTCCCT
GCCTGTGTCTCTTCCCAACCCCTCTATAGGGGTGACAAGAAGAGGAGGGGGGAGGGGACACGATCCCTCC      1008
TCAGGCATCTGGGAAGGCCTTGCCCCATGGGCTTTACCCTTTCCTGTGGGCTTCTCCCTGACACATTTGT
TAAATCAACCTGAATAAACTACAAGTTTAATATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA      1139

```

(1139 NT, 154 aa)

图 3

GCTGTGTATTATTGGGCCCATAGAACCACATACCTGTGCTGAGTCCTGCACTCACAGACGGCTCACTGGGT
A V Y Y W A H K N H I P V L S P A L T D G S L G
GACATGATCTTTTTCCATTCCCTATAAAAACCCAGGCCTGGTCCTGGACATCGTTGAAGACCTGCGGCTCATC
D M I F F H S Y K N P G L V L D I V E D L R L I
AACATGCAGGCCATTTTCGCCAAGCGCACTGGGATGATCATCCTGGGTGGAGGCGTGGTCAAGCACCATC
N M Q A I F A K R T G M I I L G G G V V K H H I
GCCAATGCTAACCTCATGCGGAATGGAGCTGACTACGCTGTTTATATCAACACAGCCCAGGAGTTTGATGGC
A N A N L M R N G A D Y A V Y I N T A Q E F D G
TCAGACTCAGGAGCCCGGCCAGATGAGGCTGTCTCCTGGGGCAAGATCCGGATGGATGCACAGCCAGTAAAG
S D S G A R P D E A V S W G K I R M D A Q P V K
GTCTATGCTGATGCATCTCTGGTTTTCCCTTGCTGGTGGCTGAGACATTCGCCAAAAGGCAGATGCCTTC
V Y A D A S L V F P L L V A E T F A Q K A D A F
AGAGCTGAGAAGAATGAGGACTGAGCAGATGGGTAAAGACGGAGGCTTCTGCCACACCTTTATTTATTATT
R A E K N E D
GCATACCAACCCCTCCTGGGCCCTCTCCTTGGTCAGCAGCATCTTGAGAATAAATGGCCTTTTTGTTGGTTT
CTGTAAAAAAGGACTTTAAAAA

(606 NT, 151 aa)

图 4

大鼠与人(BC000751 或 NM_001970) 96.5% 同一性(编码)

	10	20	30	40	50	60
大鼠	ATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGGCCTCAGCCACCTTCCCAATG					
						
人	ATGGCAGATGACTTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGGCCTCAGCCACCTTCCCAATG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
大鼠	CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGCCATGTAAGATC					
						
人	CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGCTTTGTGGTGCTCAAAGGCCGCCATGTAAGATC					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
大鼠	GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT					
						
人	GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCACGCCACGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
大鼠	ATTGATATTTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCCTCGACTCATAACATGGAT					
						
人	ATTGACATCTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCCTCAACTCATAATATGGAT					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
大鼠	GTCCCCAACATCAAAAGGAATGATTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC					
						
人	GTCCCCAACATCAAAAGGAATGACTTCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCA					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
大鼠	CTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCTGCCTGAGGGAGACCTTGGC					
						
人	CTGCTCCAGGACAGCGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCTCCCTGAGGGAGACCTTGGC					
	310	320	330	340	350	360
	370	380	390	400	410	420
大鼠	AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCACAGTGCTGTCCGCC					
						
人	AAGGAGATTGAGCAGAAGTACGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCACGGTGCTGTCTGCC					
	370	380	390	400	410	420
	430	440	450	460		
大鼠	ATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA					
						
人	ATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA					
	430	440	450	460		

图 5

大鼠与小鼠 (BC003889) 98.3% 同一性(编码)

	10	20	30	40	50	60
大鼠	ATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGGCCTCAGCCACCTTCCCAATG					
	::					
小鼠	ATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGGCCTCAGCCACCTTCCCAATG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
大鼠	CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGGCCATGTAAGATC					
	::					
小鼠	CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTTGTGGTGCTCAAGGGCCGGCCATGTAAGATC					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
大鼠	GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT					
	::					
小鼠	GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGC					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
大鼠	ATTGATATTTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCCTCGACTCATAACATGGAT					
	::::: ::					
小鼠	ATTGACATTTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCCCTCGACTCATAATATGGAT					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
大鼠	GTCCCCAACATCAAAAGGAATGATTTCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC					
	:::::::::::::::::::: :::::::::: ::					
小鼠	GTCCCCAACATCAAACGGAATGACTTCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
大鼠	CTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCTGCCTGAGGGAGACCTTGGC					
	::					
小鼠	CTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCTGCCTGAAGGAGACCTTGGC					
	310	320	330	340	350	360
	370	380	390	400	410	420
大鼠	AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCACAGTGCTGTCCGCC					
	::					
小鼠	AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCACAGTGCTGTCTGCC					
	370	380	390	400	410	420
	430	440	450	460		
大鼠	ATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA					
	::					
小鼠	ATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA					
	430	440	450	460		

图 7

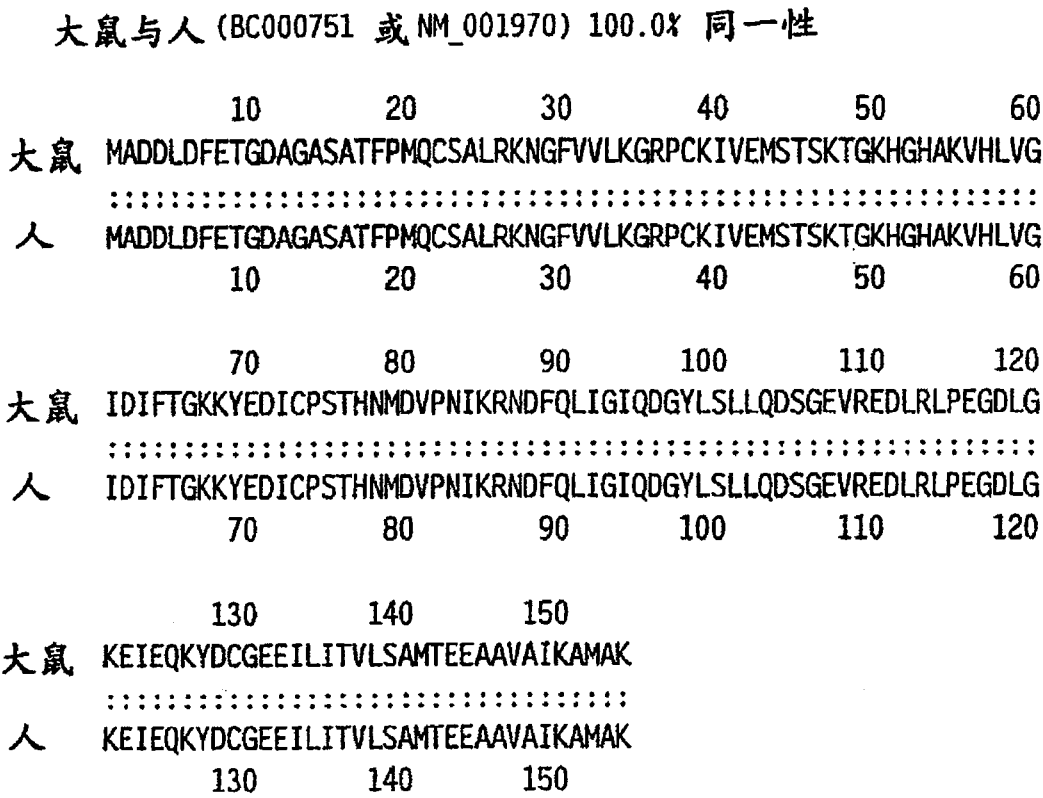


图 8

大鼠与人 (NM_020390) 82.5% 同一性

	10	20	30	40	50	60
大鼠	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
						
人	MADEIDFTTGDAGASSTYPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
大鼠	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDYQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
						
人	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDYQLICIQDGYLSLLTETGEVREDLKLPEGELG					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150			
大鼠	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA A VAIKAMAK					
	:::: ::. :::: :::: :					
人	KEIEGKYNAGEDVQVSMCAMSEEY A VAIKP-CK					
	130	140	150			

图 9

大鼠与小鼠 (BC003889)100.0% 同一性

	10	20	30	40	50	60
大鼠	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	::					
小鼠	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
大鼠	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	::					
小鼠	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150			
大鼠	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA AVAIKAMAK					
	::					
小鼠	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA AVAIKAMAK					
	130	140	150			

图 10

大鼠与人 (BC000333) 87.4% 同一性(编码)

	10	20	30	40	50	60
大 鼠	GCTGTGTAATTATTTGGGCCCATAAAGAACACATAACCTGTGCTGAGTCCTGCCTCACAGAC					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
人	TCCGTGTATTACTGGGCCCAGAAGAACCACATCCCTGTGTTTTAGTCCCAGCACTTACAGAC					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
大 鼠	GGCTCACTGGGTGACATGATCTTTTTTCATTCCCTATAAAAACCCAGGCTTGCTCCTGGAC					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
人	GGCTCGCTGGGCGACATGATCTTCTTCCATTCCCTACAAGAACCCGGGCTGGTCCTGGAC					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
大 鼠	ATCGTTGAAGACCTGCGGCTCATCAACATGCAGGCCATTTTCGCCAAGCGCACTGGGATG					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
人	ATCGTTGAGGACCTGAGGCTCATCAACACACAGGCCATCTTTGCCAAGTGCCTGGGATG					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
大 鼠	ATCATCTGCGGTGGAGGCGTGGTCAAGCACCACATCGCCAATGCTAACCTCATGCGGAAT					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
人	ATCATTCTGGGCGGGGCGTGGTCAAGCACCACATTGCCAATGCCAACCTCATGCGGAAC					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
大 鼠	GGAGCTGACTACGCTGTTTATATCAACACAGCCCAGGAGTTTGATGGCTCAGACTCAGGA					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
人	GGGGCCGACTACGCTGTTTACATCAACACAGCCCAGGAGTTTGATGGCTCTGACTCAGGT					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
大 鼠	GCCCCGCCAGATGAGGCTGTCTCCTGGGGCAAGATCCGGATGGATGCACAGCCAGTAAAG					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
人	GCCCCGACCAGACGAGGCTGTCTCCTGGGGCAAGATCCGGGTGGATGCACAGCCCGTCAAG					
	310	320	330	340	350	360
	370	380	390	400	410	420
大 鼠	GTCTATGCTGATGCATCTCTGGTTTTCCCTTGCTGGTGGCTGAGACATTGCCCCAAAAAG					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :	: : : : :
人	GTCTATGCTGACGCCTCCCTGGTCTTCCCTTGCTTGCTGGCTGAAACCTTTGCCAGAAAG					
	370	380	390	400	410	420
	430	440	450			
大 鼠	GCAGATGCCTTCAGAGCTGAGAAGAATGAGGAC					
:	: : : : :	: : : : :	: : : : :			
人	ATGGATGCCTTCATGCATGAGAAGAACGAGGAC					
	430	440	450			

图 11

图 11

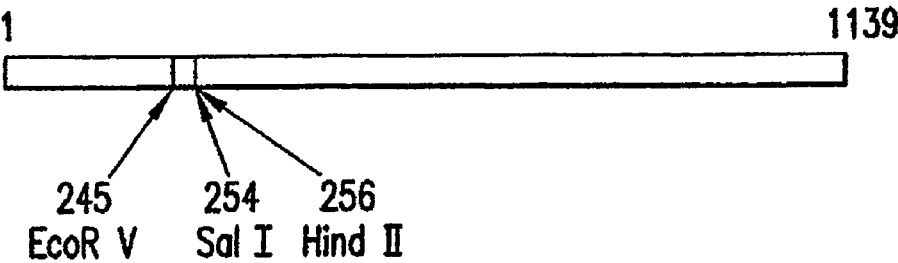


图 12

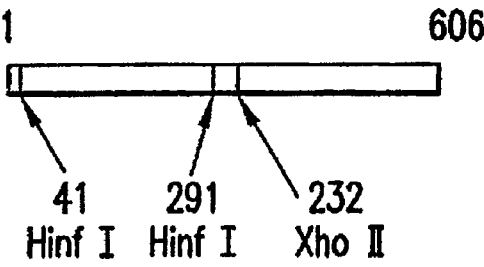


图 13

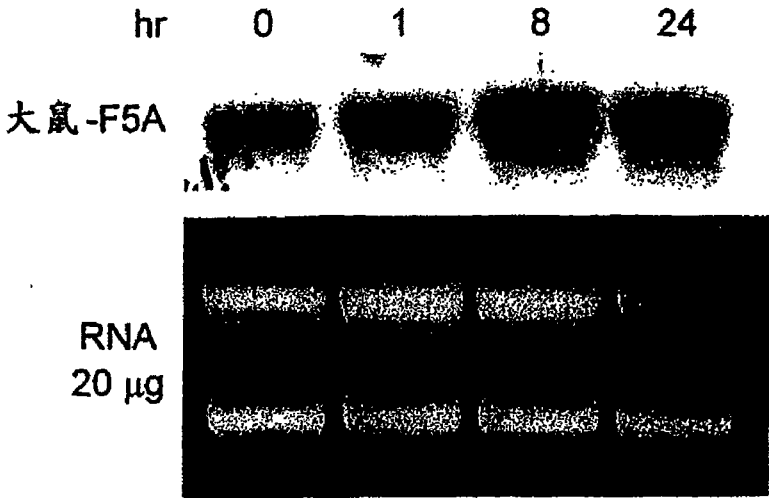


图 14

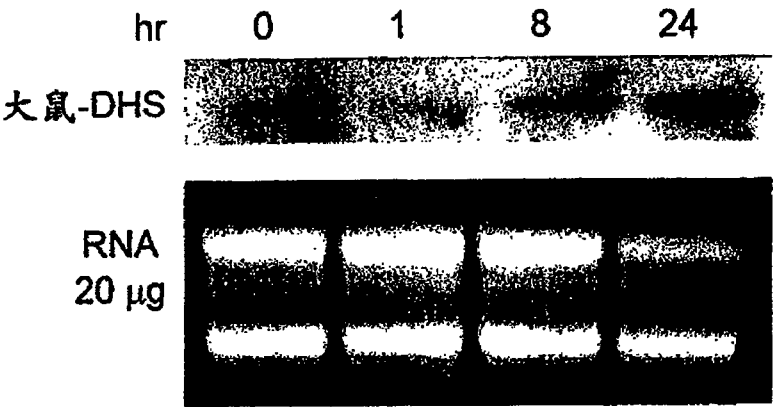


图 15

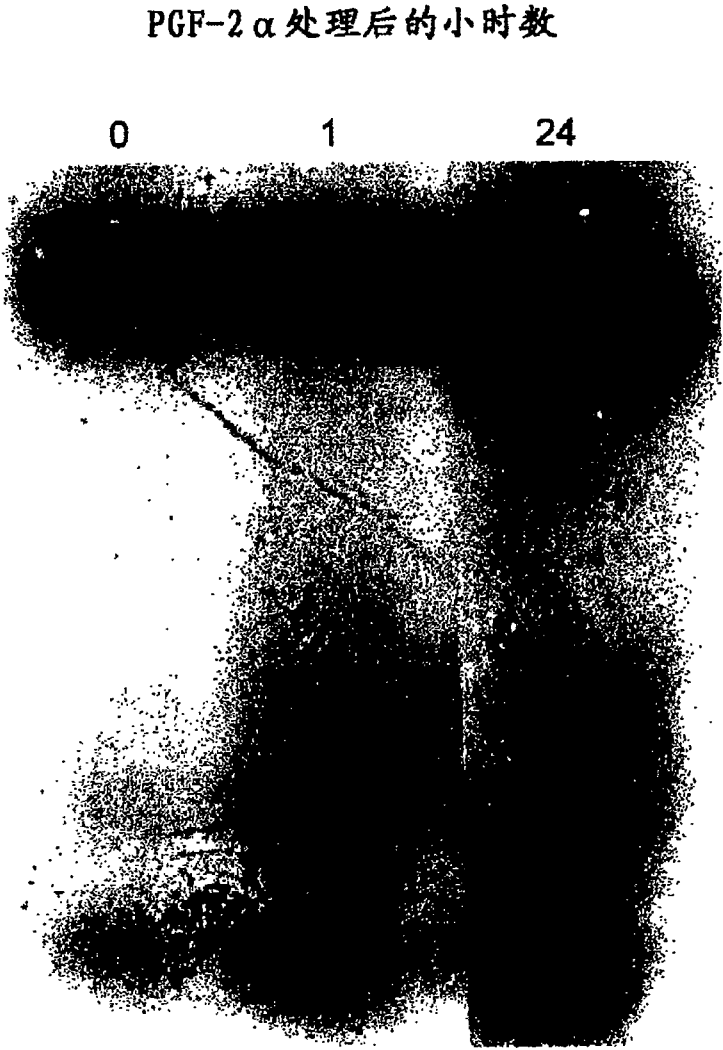


图 16



图 17

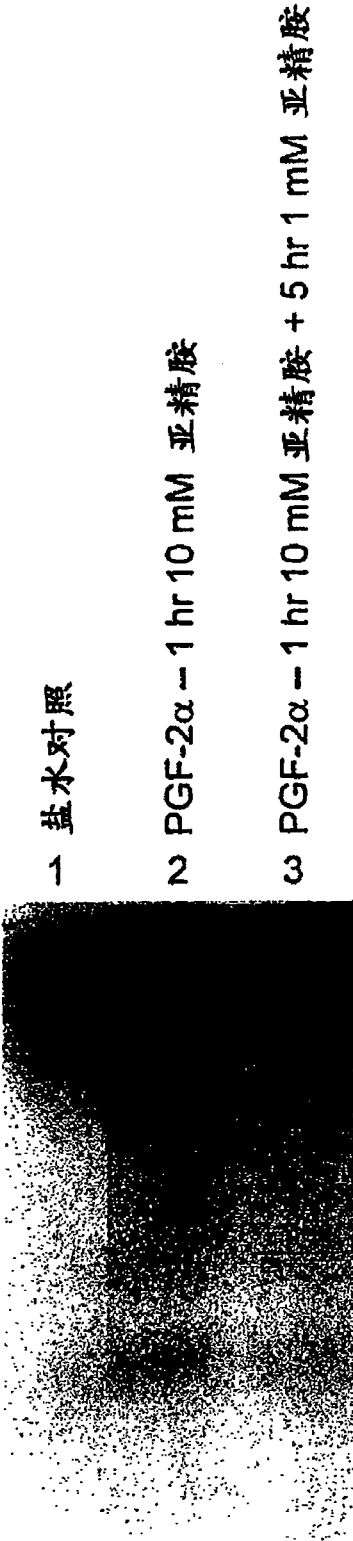
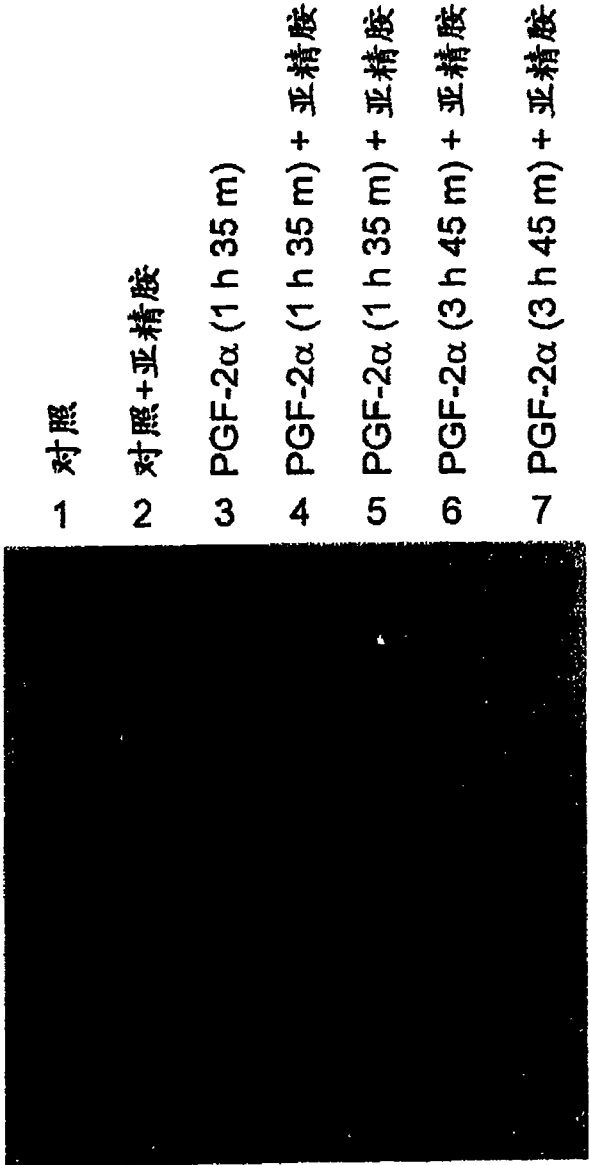


图 18



1 对照

2 对照+亚精胺

3 PGF-2 α (1 h 35 m)

4 PGF-2 α (1 h 35 m) + 亚精胺

5 PGF-2 α (1 h 35 m) + 亚精胺

6 PGF-2 α (3 h 45 m) + 亚精胺

7 PGF-2 α (3 h 45 m) + 亚精胺

图 19

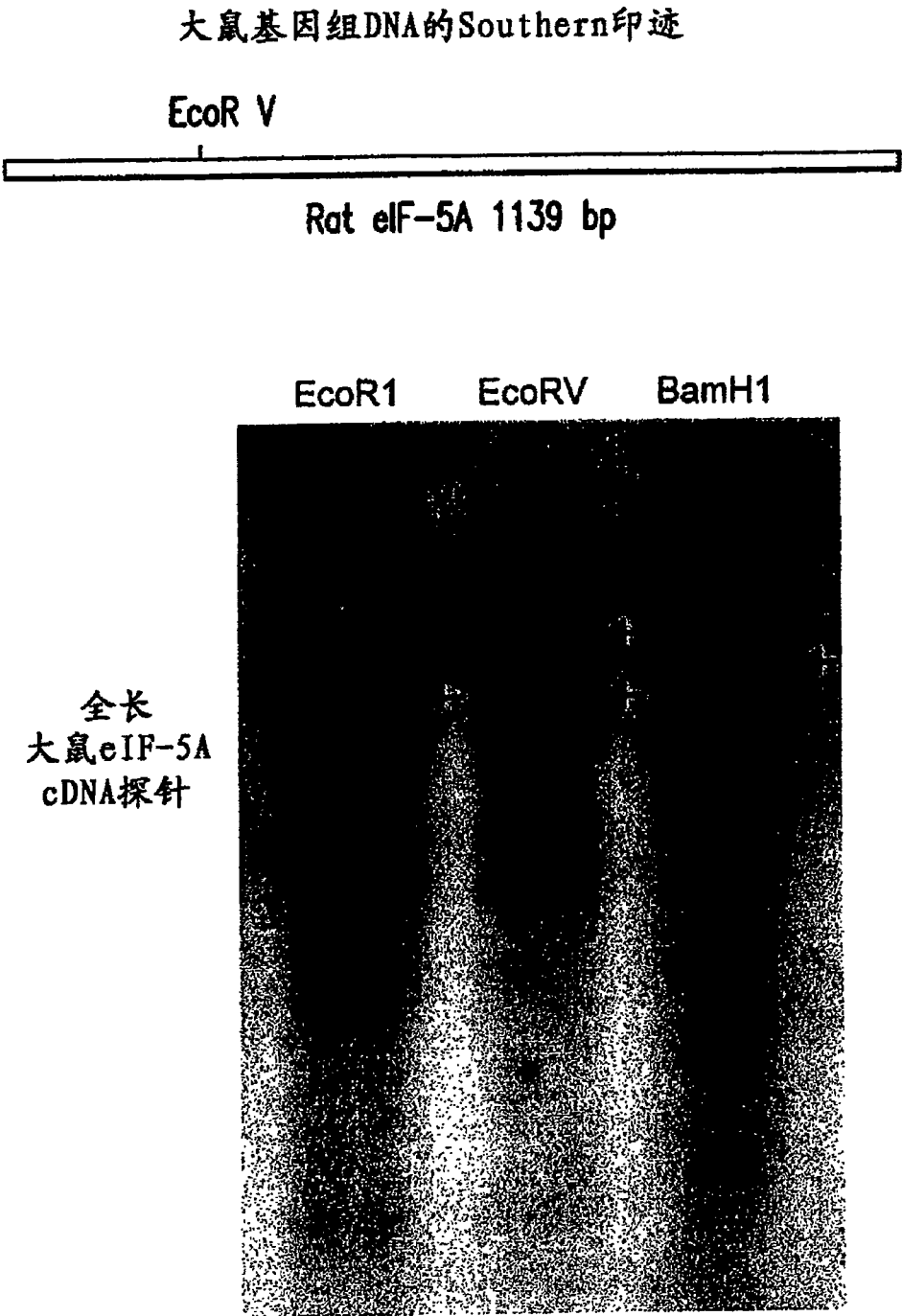


图 20

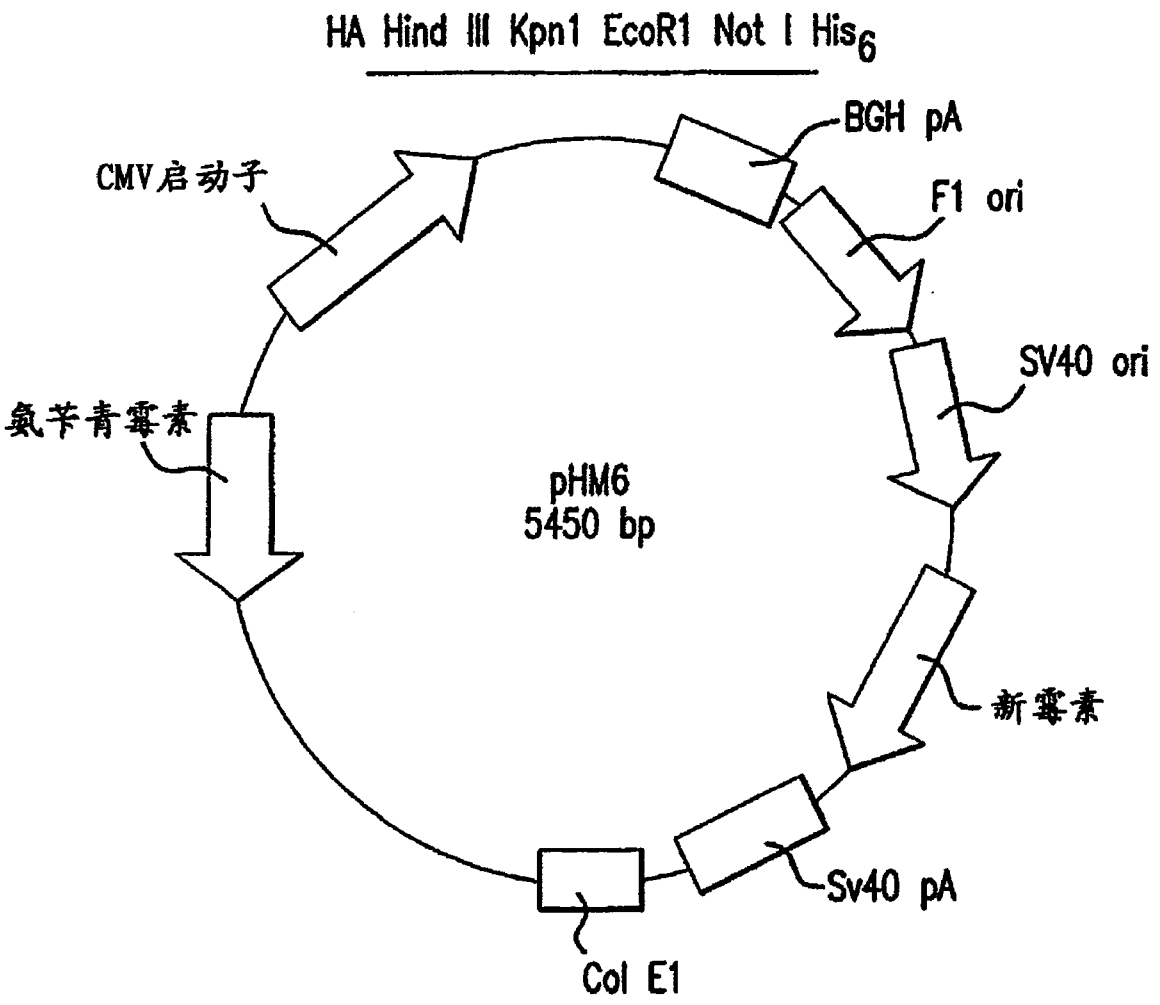


图 21

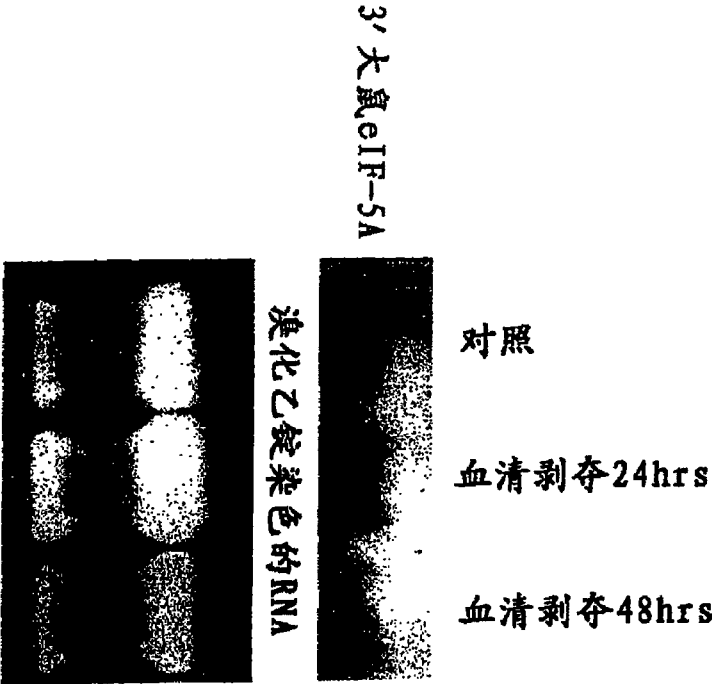


图 22

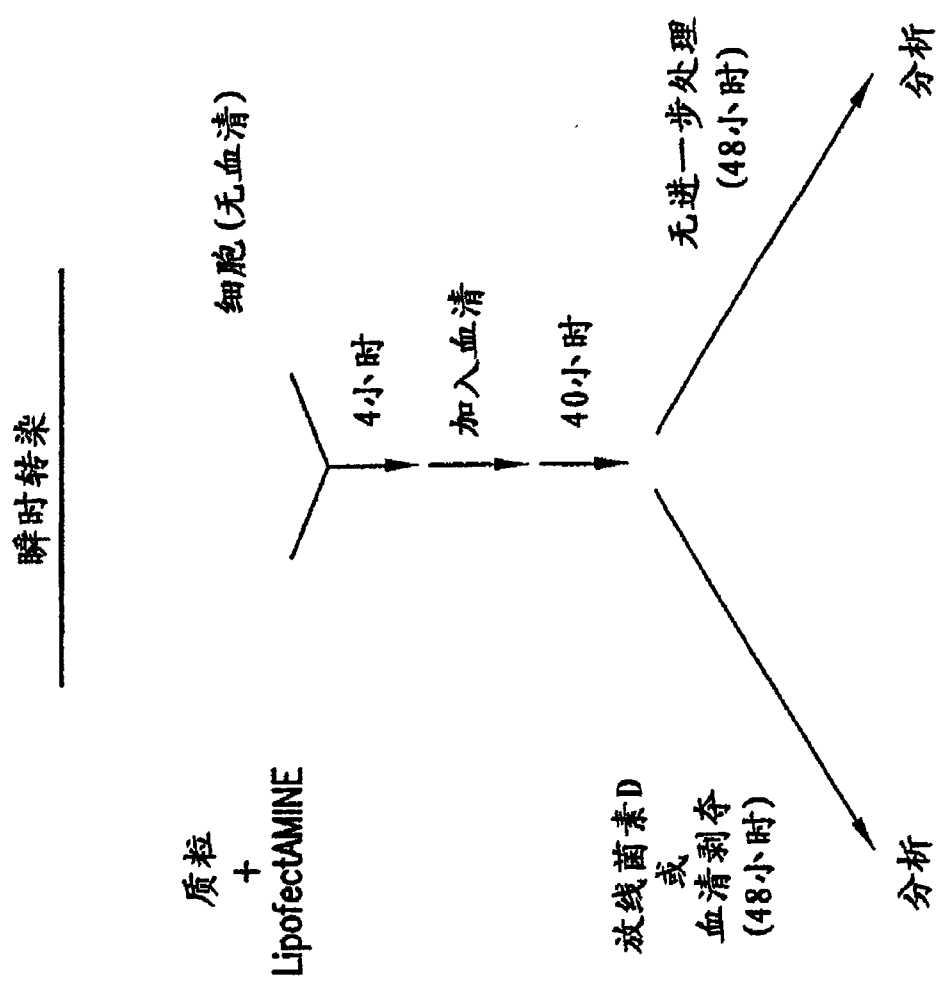


图 23

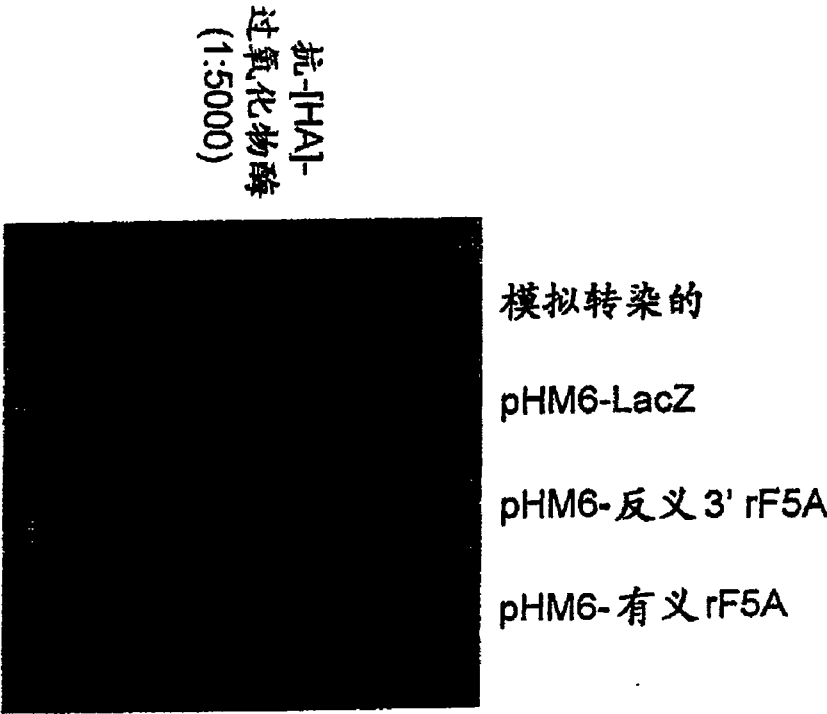


图 24

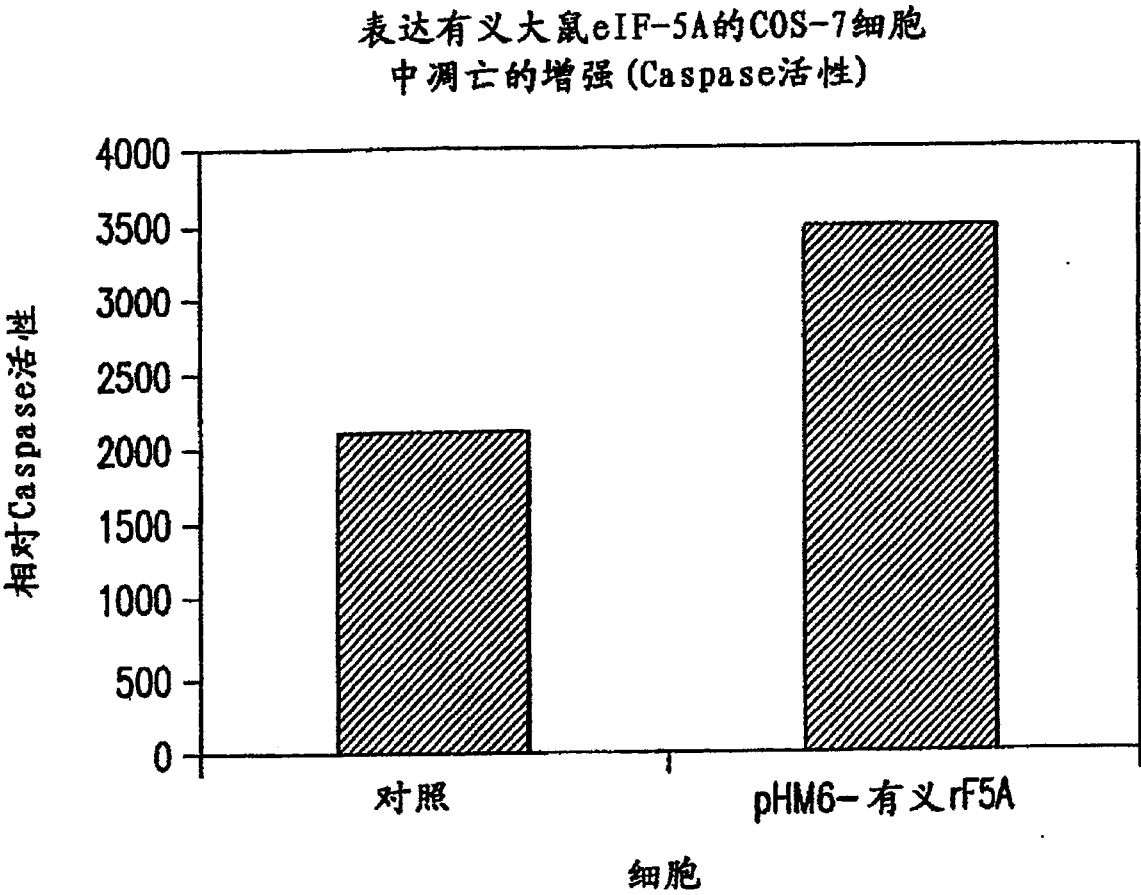


图 25

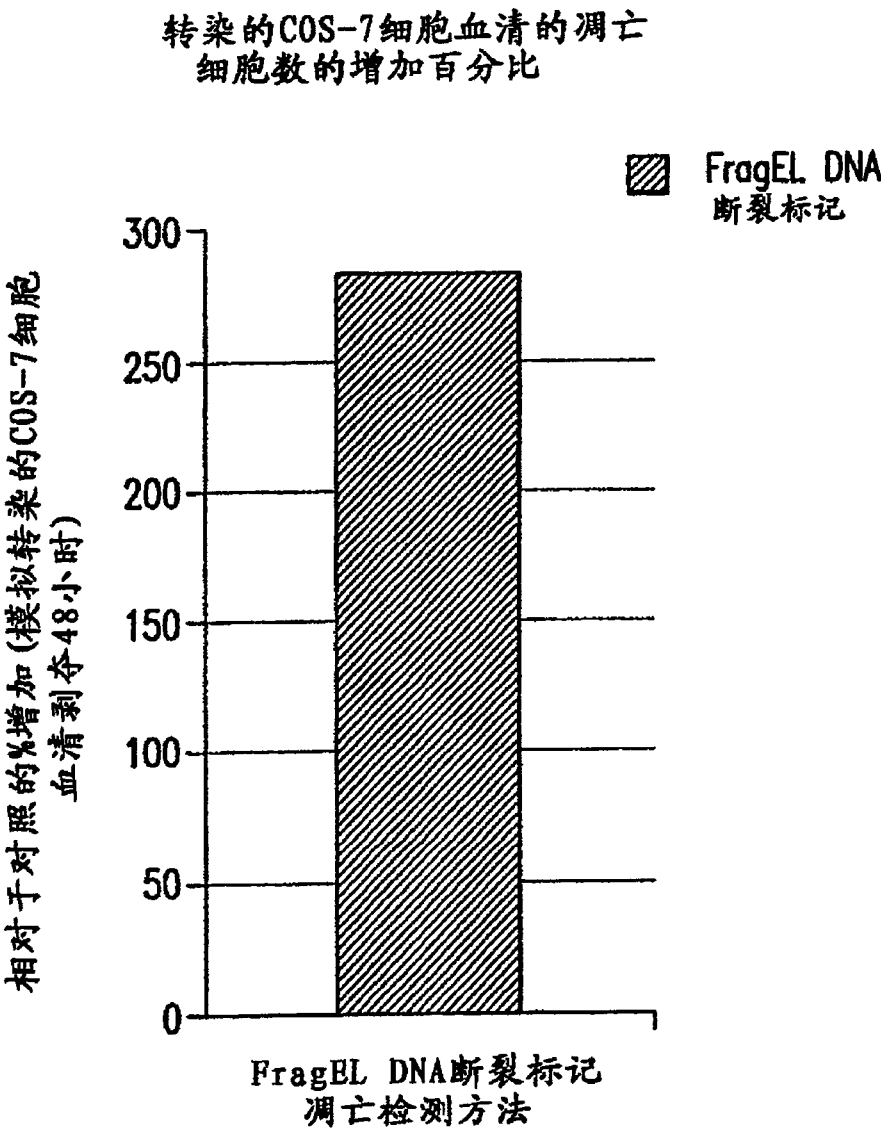
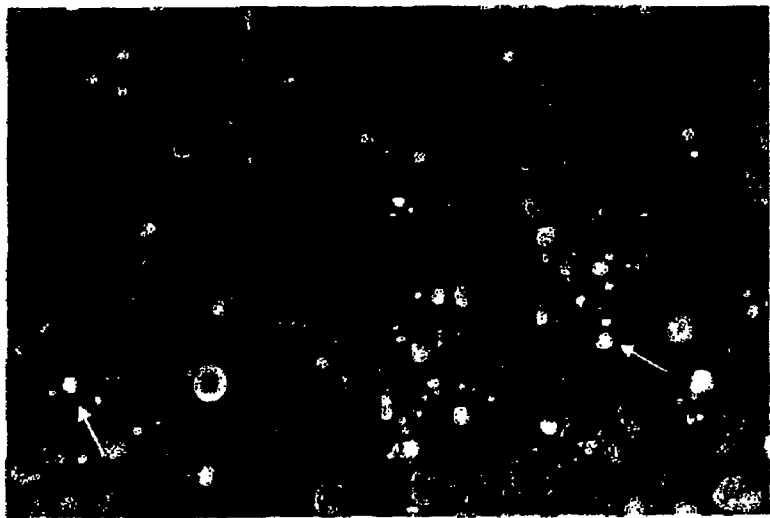


图 26

剥夺了血清的转化的COS-7
细胞的Hoescht染色



模拟转化的



pHM6-有义大鼠F5A

图 27

瞬时转染的COS-7细胞的血清剥夺48小时后的凋亡百分比

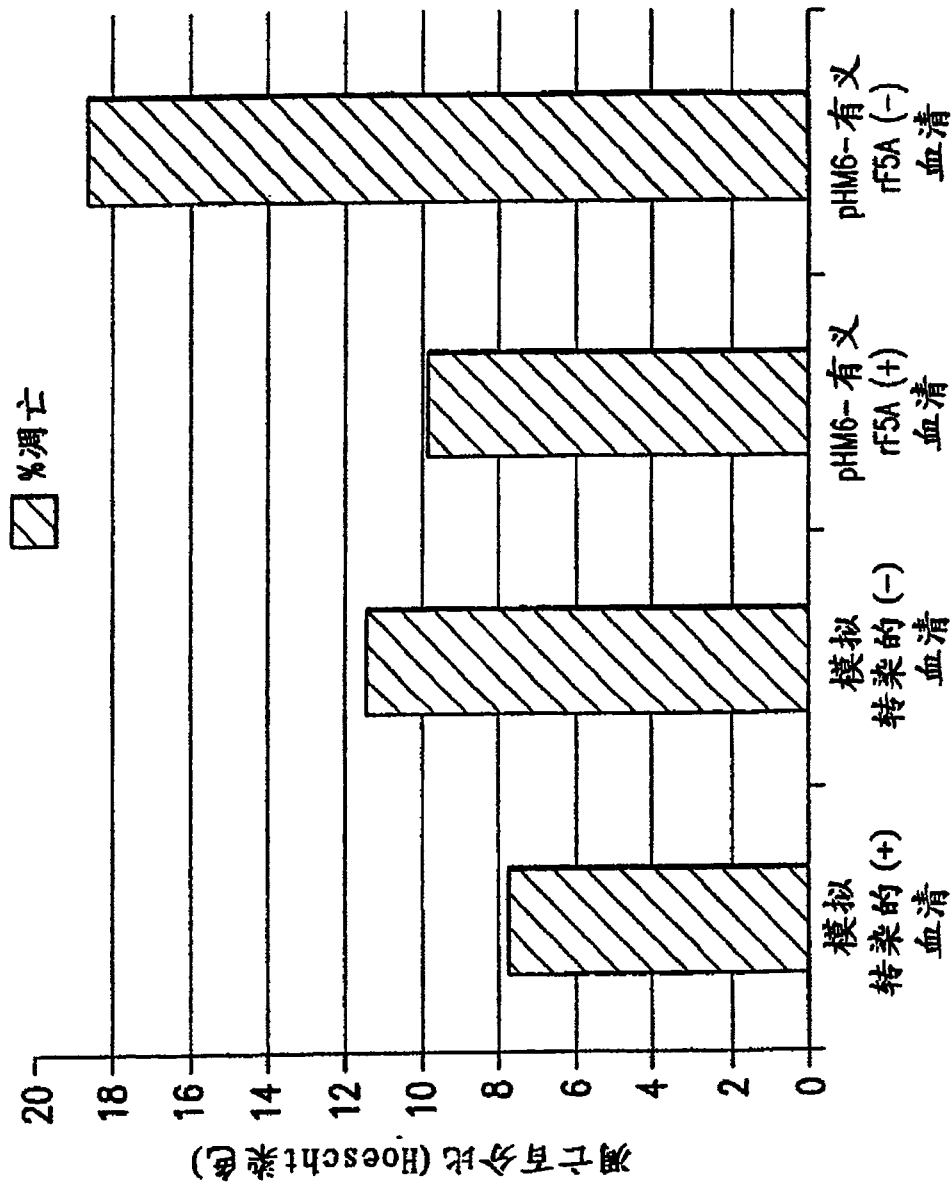


图 28

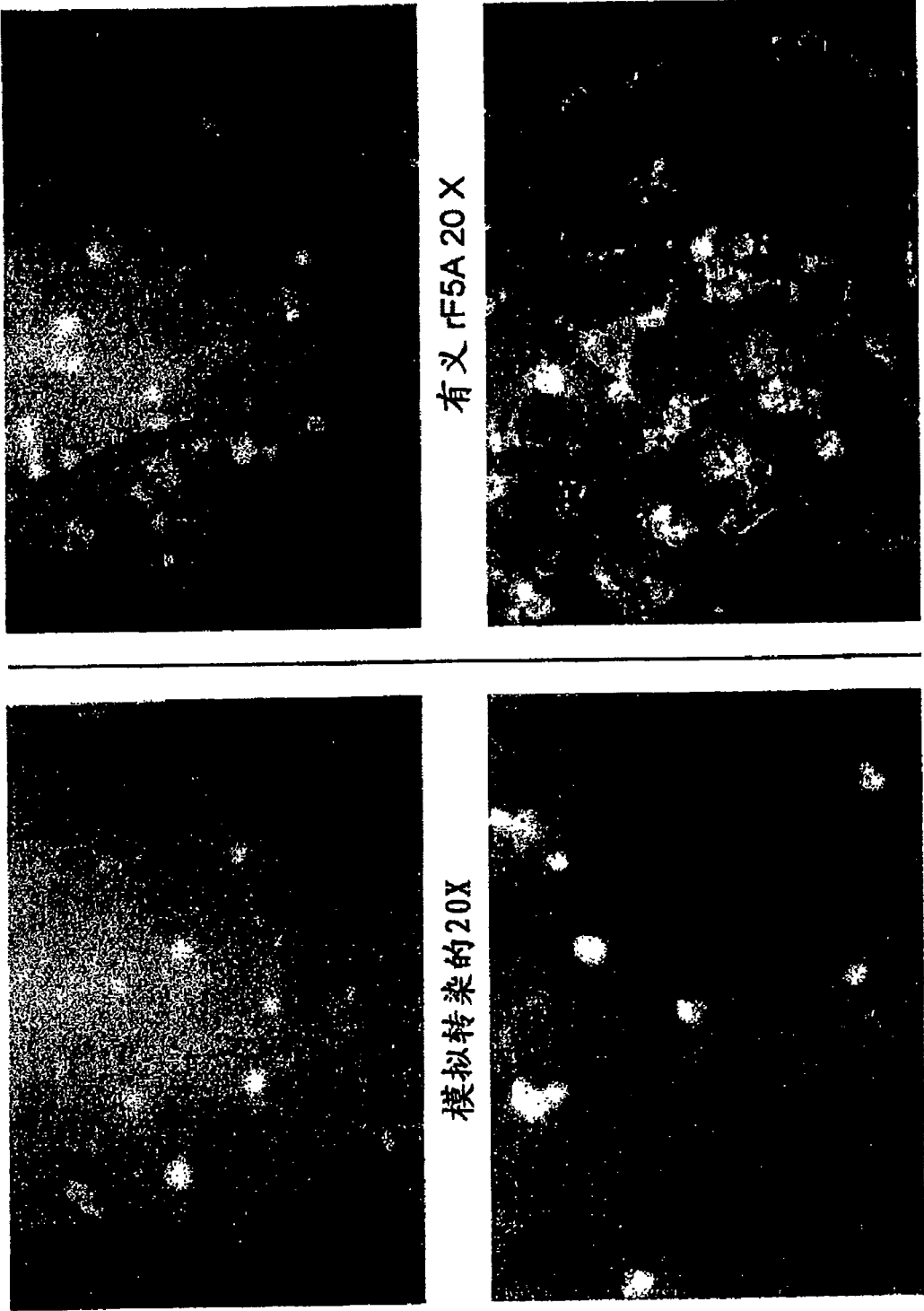
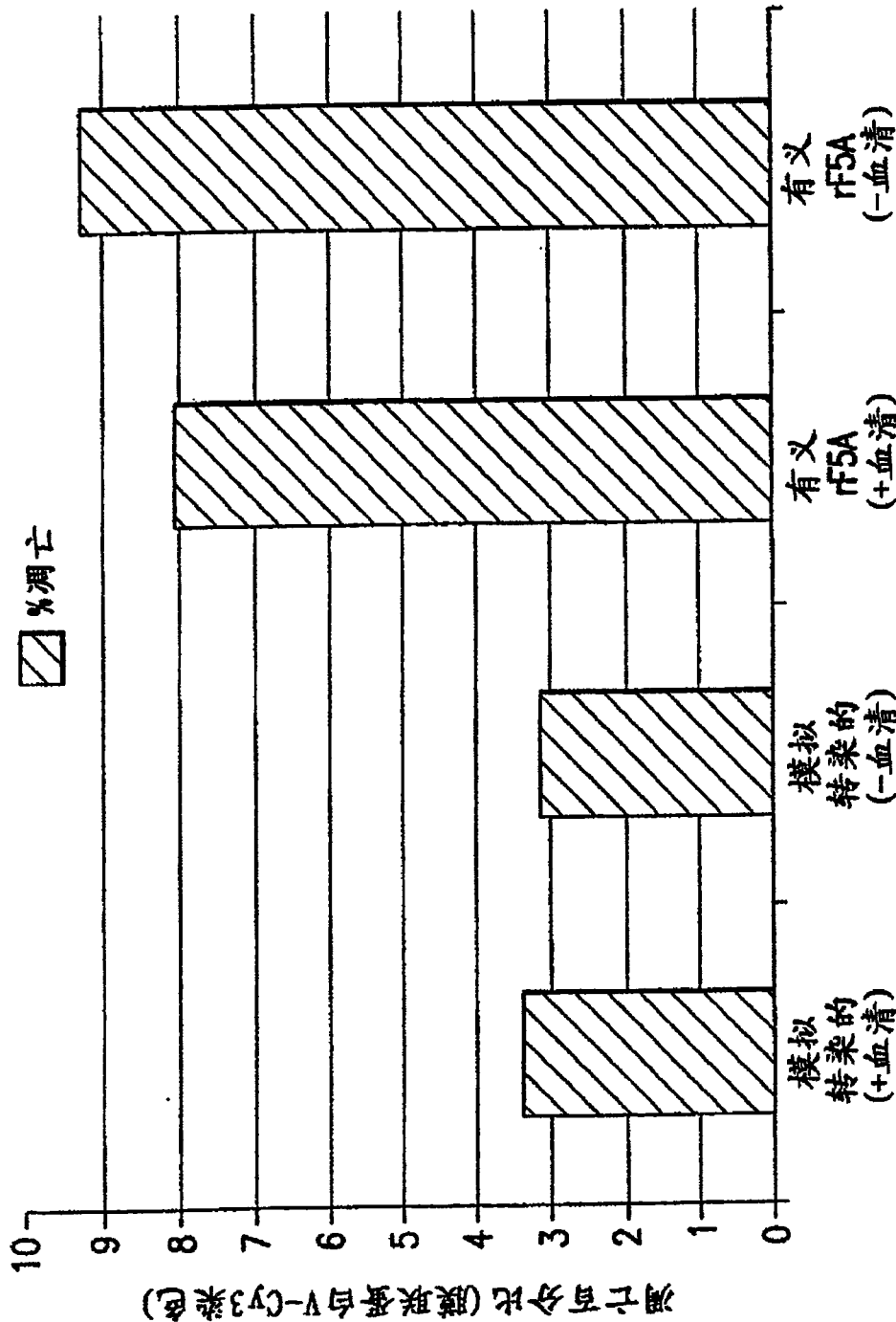


图 29

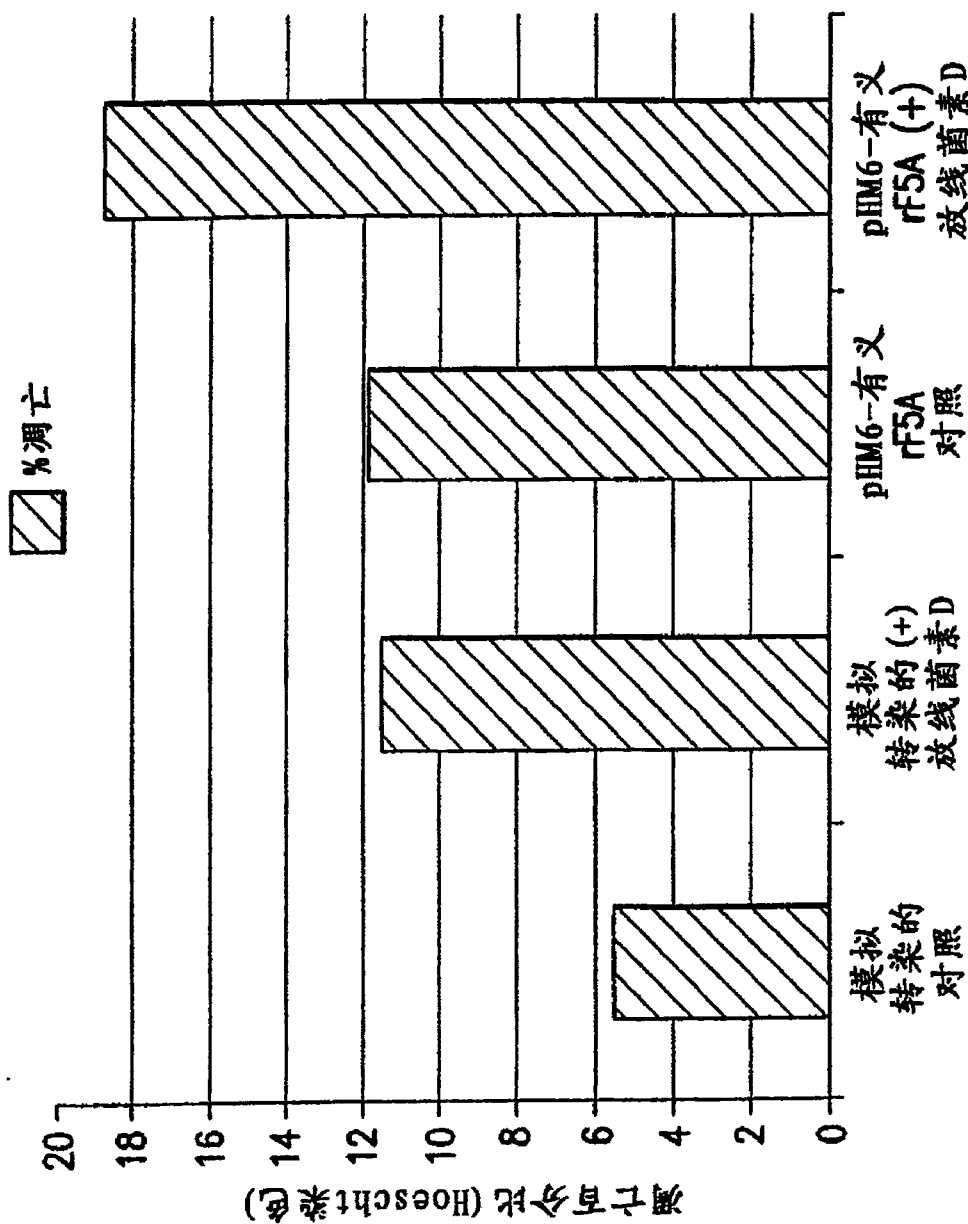
瞬时转染的COS-7细胞的血清剥夺48小时后的凋亡百分比



转染的质粒

图 30

瞬时转染的COS-7细胞在放线菌素D
处理48小时后的凋亡百分比



转染的质粒

图 31

用pHM6-有义F5A瞬时转染的COS-7细胞
相对于模拟转染的对照细胞/凋亡百分比的增加

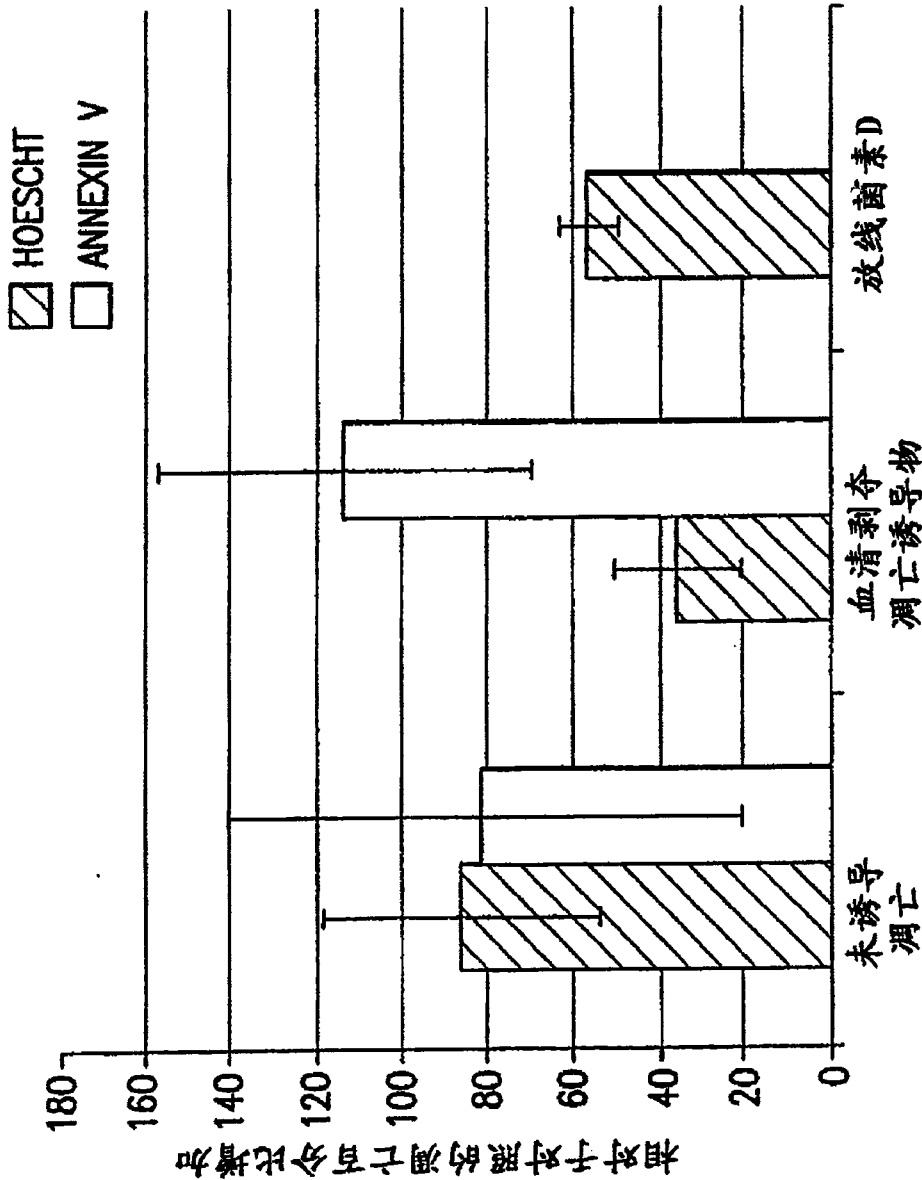


图 32

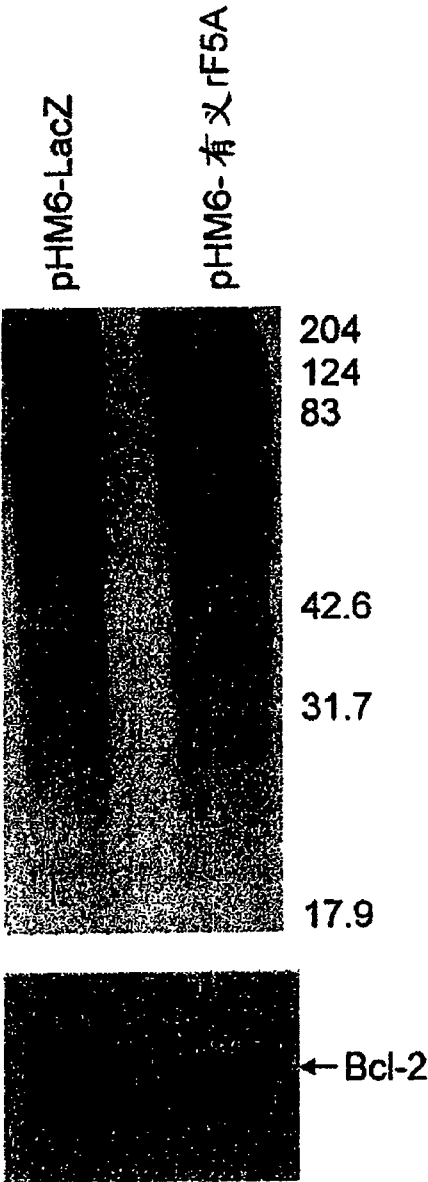


图 33

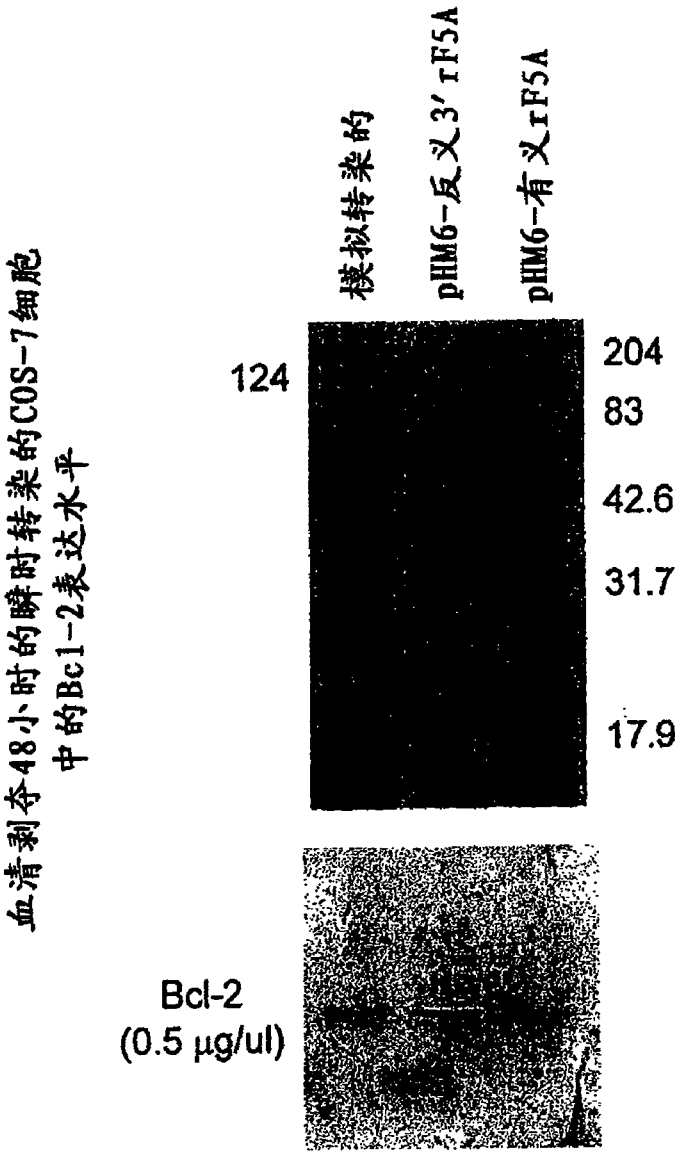


图 34

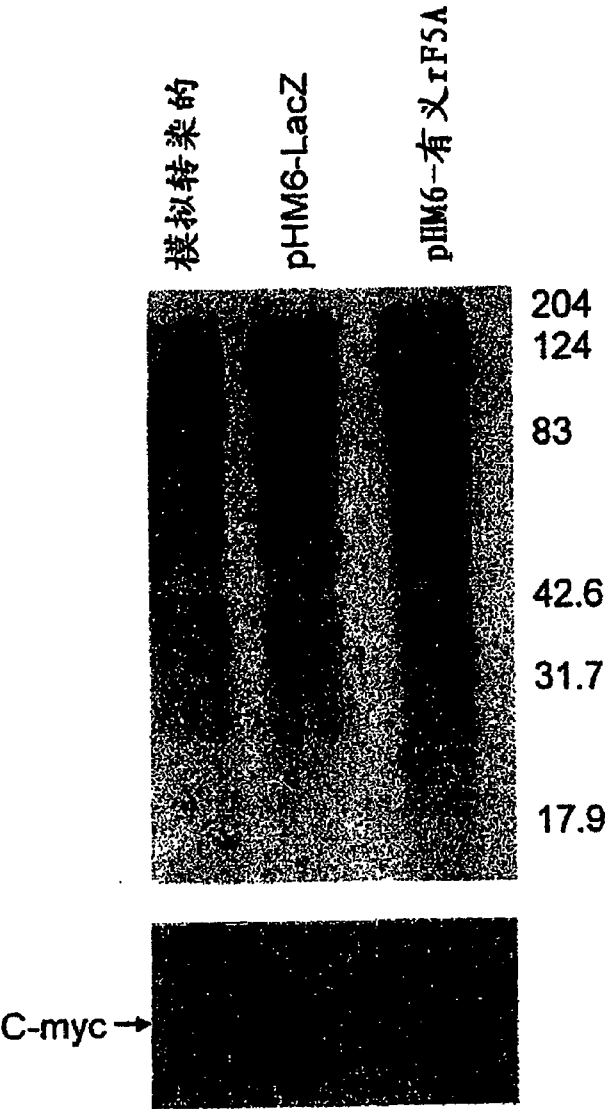


图 35

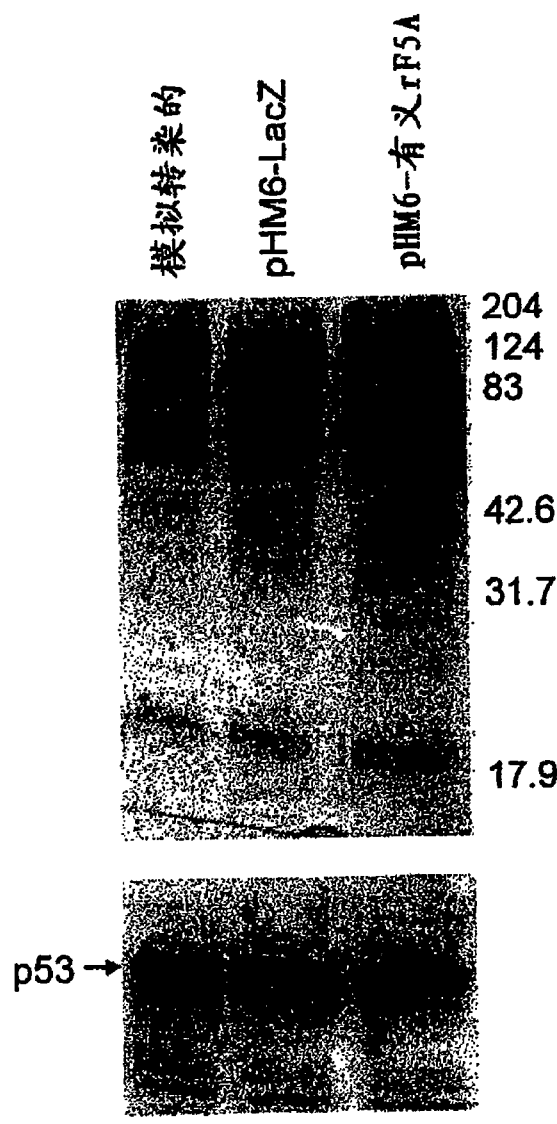


图 36

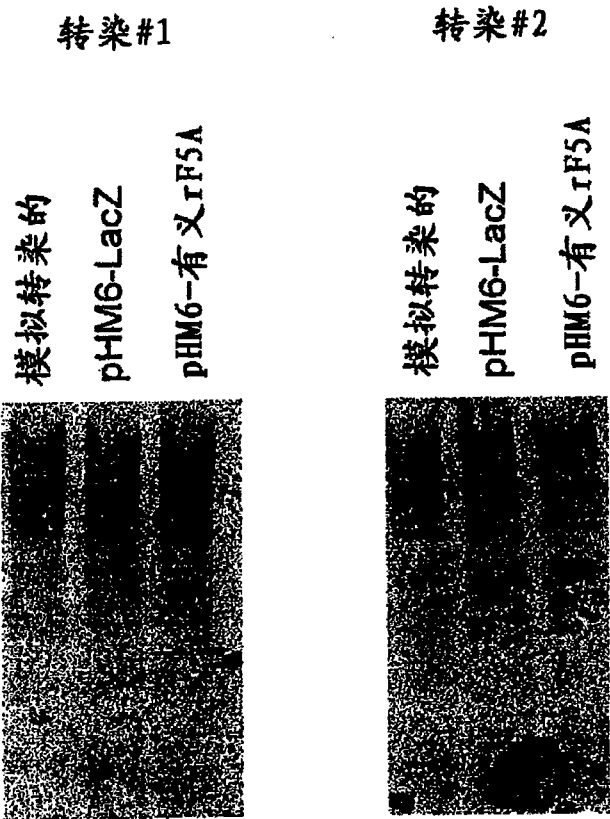
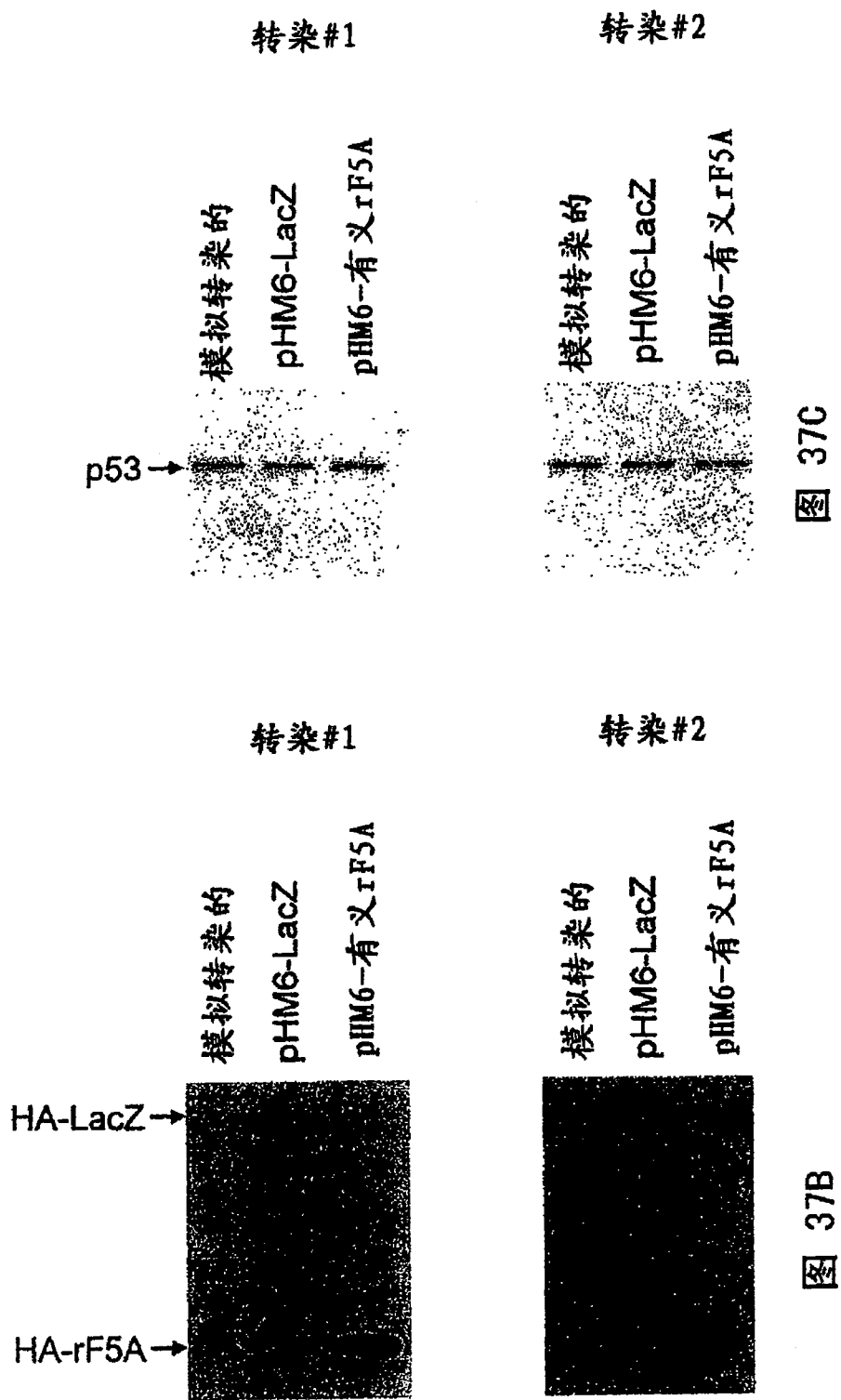


图 37A



从RK0细胞分离的人eIF5A2的序列以及它与
Genbank中的人eIF5A2的序列 (获取号XM_113401) 的比对

XM_113401	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRKNGF	VVLKGRPCKI	VEMSTSKTGK
PCR	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRKNGF	VVLKGRPCKI	VEMSTSKTGK
Consensus	MADEIDFTTG	DAGASSTYPM	QCSALRKNGF	VVLKGRPCKI	VEMSTSKTGK
	51				100
XM_113401	HGHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHNMD	VPNIKRNDYQ	LICIQDGYLS
PCR	HGHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHNMD	VPNIKRNDYQ	LICIQDGCLS
Consensus	HGHAKVHLVG	IDIFTGKKYE	DICPSTHNMD	VPNIKRNDYQ	LICIQDGcLS
	101				150
XM_113401	LLTETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSMCA	MSEEYAVAIK
PCR	LLTETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSMCA	MSEEYAVAIK
Consensus	LLTETGEVRE	DLKLPEGELG	KEIEGKYNAG	EDVQVSMCA	MSEEYAVAIK
	151				
XM_113401	PCK				
PCR	PCK				
Consensus	PCK				

图 38

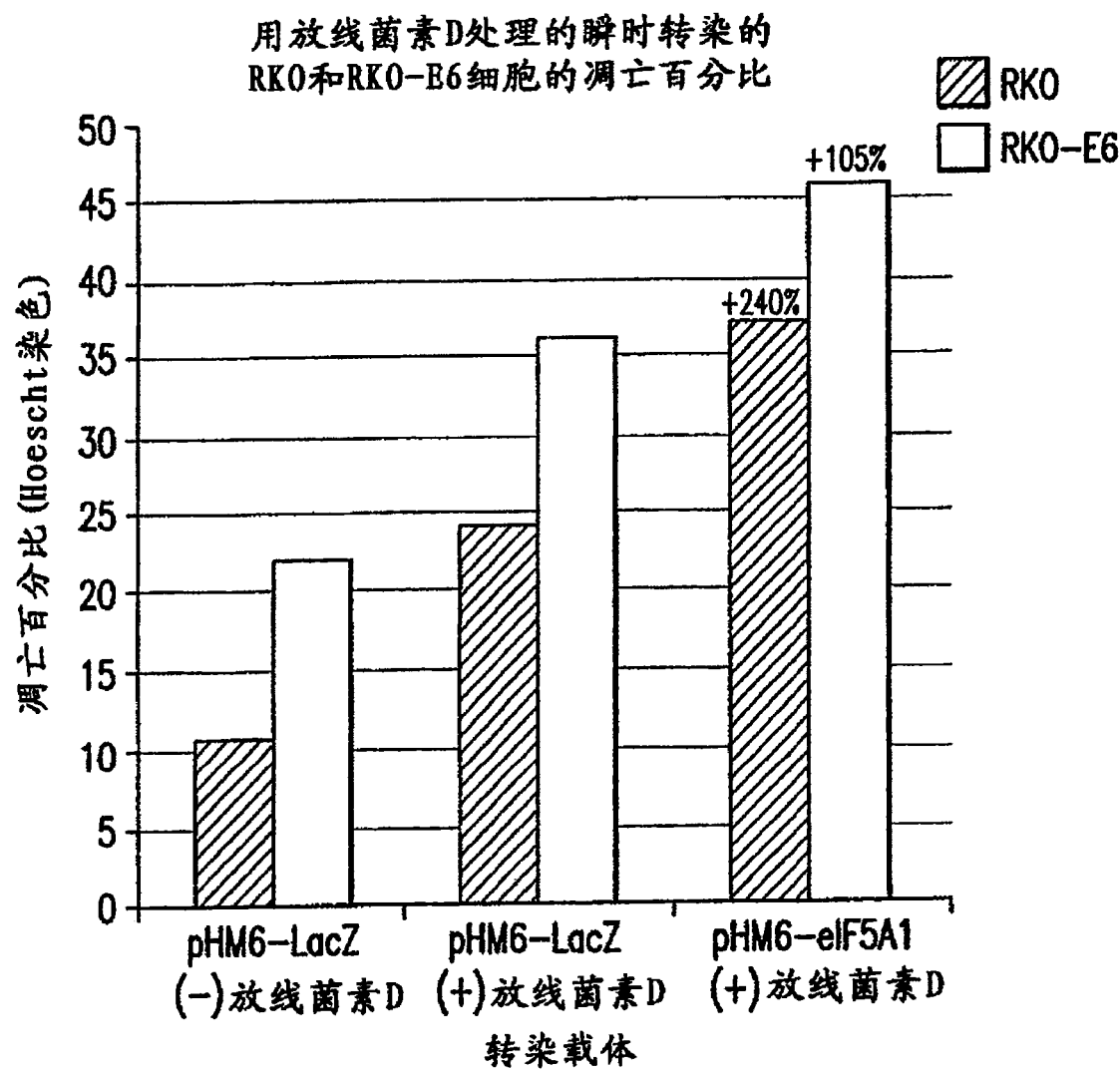


图 39

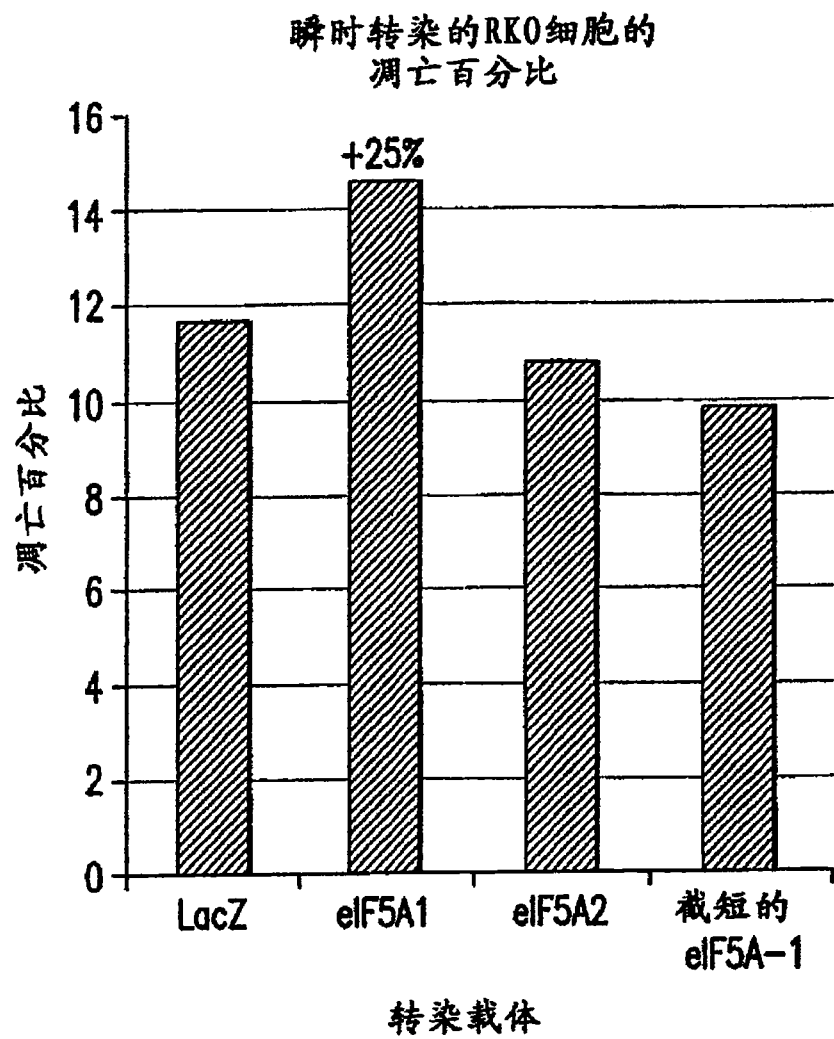


图 40

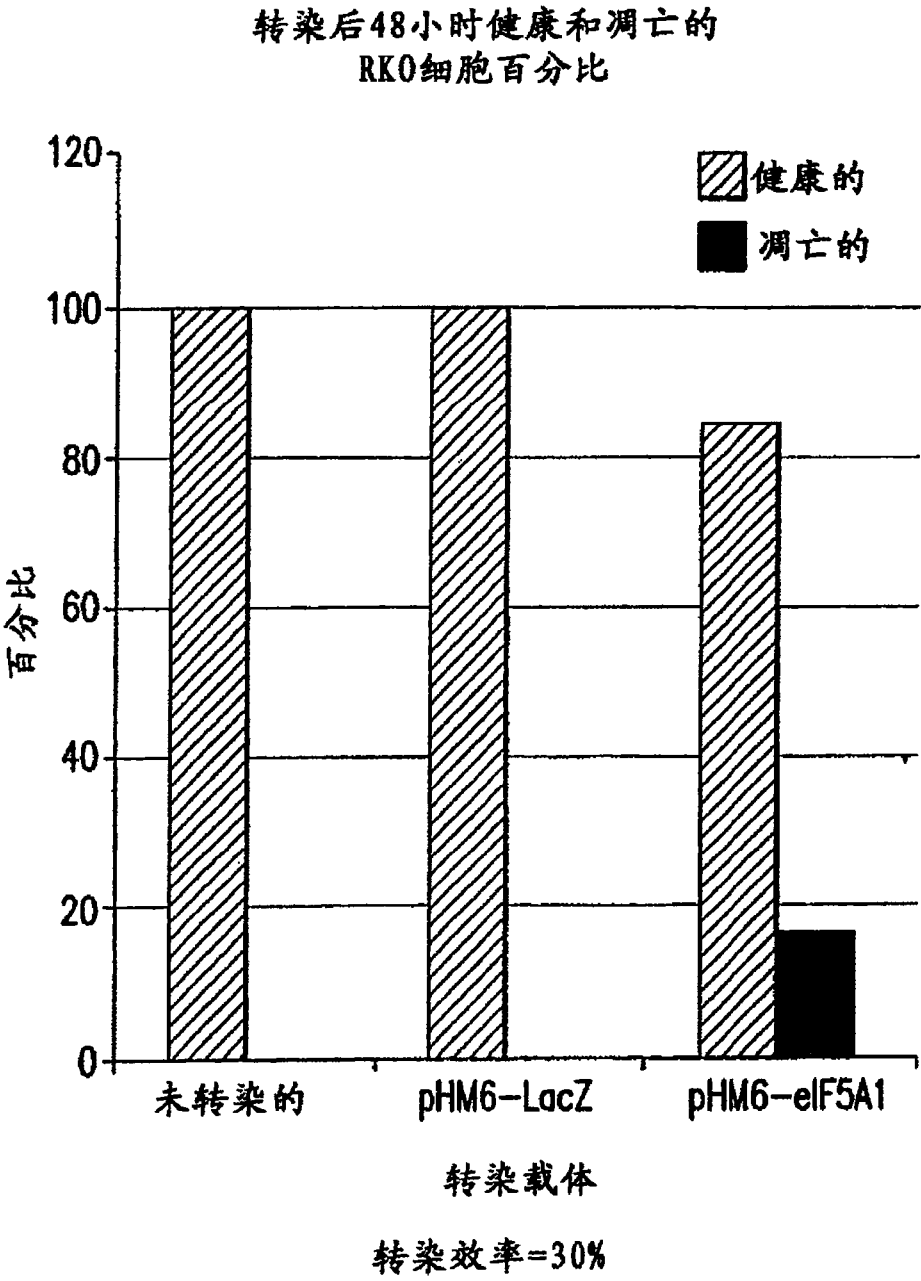


图 41

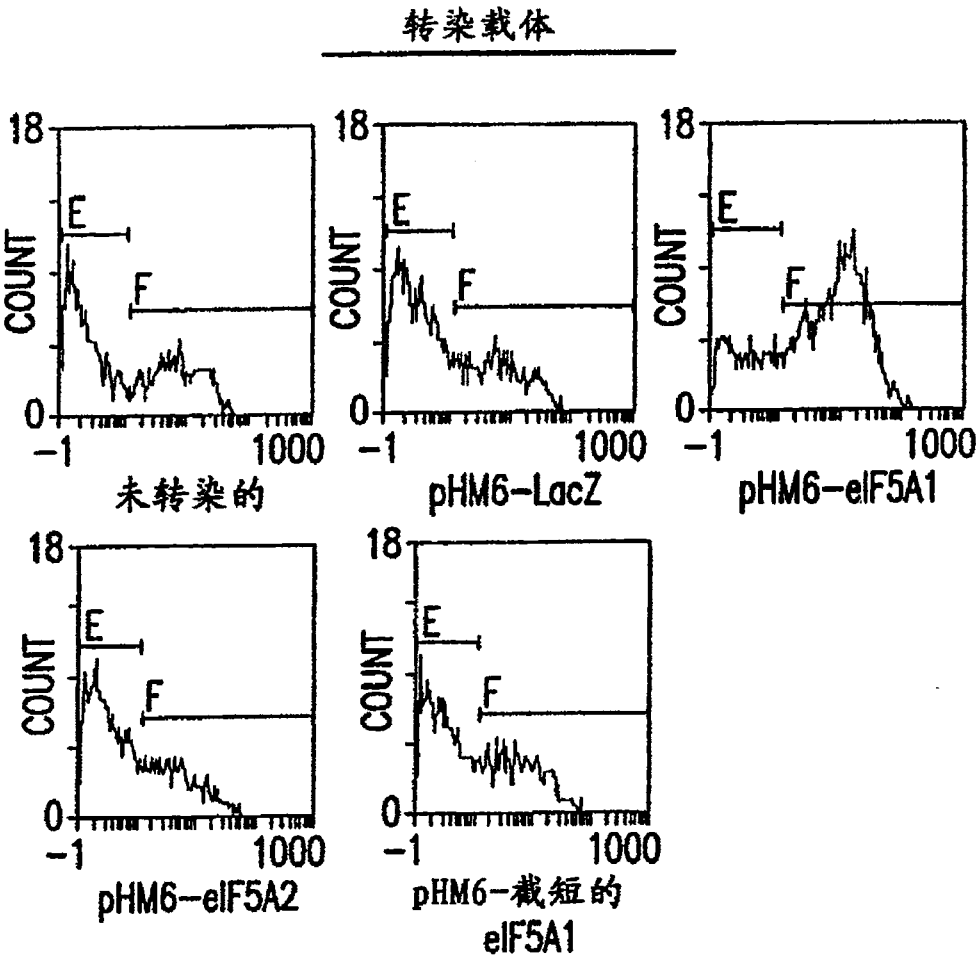


图 42A

转染的质粒	凋亡百分比
未转染的	21.2%
pHM6-Lac Z	21.7%
pHM6-eIF5A1	60.7% (80%)*
pHM6-eIF5A2	20.5%
pHM6-截短的eIF5A1	24.1%

*对未转染细胞中的背景凋亡和对转染效率进行了校正

图 42B

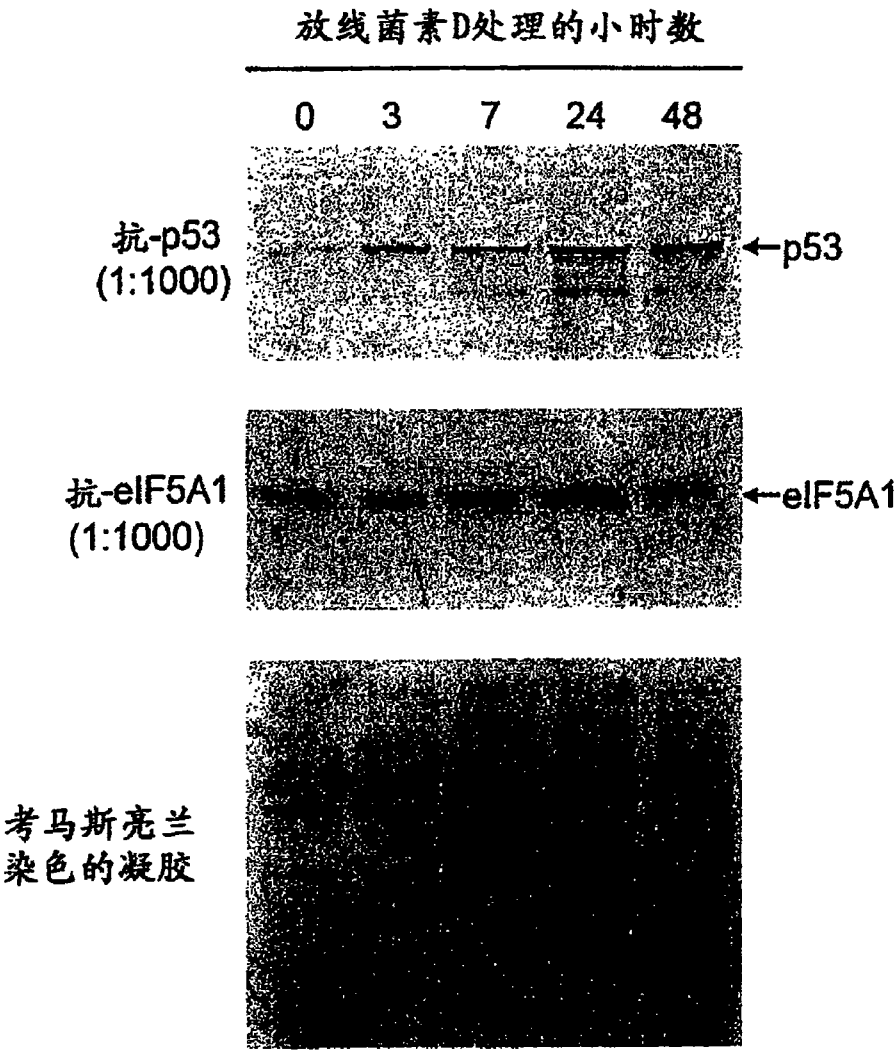


图 43