[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]

C12N 15/54
C12N 9/12 C12Q 1/48
C12Q 1/68 G01N 33/50
C12N 15/11 C07K 16/40
A61K 48/00 //C07K14/39

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96198060.5

[43]公开日 1998 年 12 月 9 日

[11] 公开号 CN 1201492A

[22]申请日 96.9.6

[30]优先权

[32]95.9.6 [33]GB[31]9518220.0

[86]国际申请 PCT/GB96/02197 96.9.6

[87]国际公布 WO97/09433 英 97.3.13

[85]进入国家阶段日期 98.5.4

[71]申请人 艾科斯有限公司

地址 美国华盛顿州

[72]发明人 A·M·卡尔

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 齐曾度

权利要求书 2 页 说明书 35 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 细胞周期关卡基因

[57]摘要

本发明涉及一类在真核细胞中控制细胞周期进程的关卡基因及其多肽产物。本发明尤涉及粟酒裂殖酵母 rad3 基因，及其人类同源物（ATR）和它们编码的蛋白。本发明进一步涉及用于选择调控这些关卡基因的蛋白产物活性化合物的试验方法，及所选化合物在抗肿瘤治疗中的应用。

权　利　要　求　书

1. 能够选择性与序列号 No.1 或其互补链杂交的处于基本分离形式的多核苷酸。

2. 权利要求 1 的包括序列号 No.1 的多核苷酸或其片段。

3. 包括权利要求 1 或 2 限定的寡核苷酸中至少 15 个核苷酸片段的寡核苷酸探针。

4. 包括序列号 No.3 或其互补链的处于基本分离形式的多核苷酸。

5. 包括序列号 No.2 或 4 列出多肽的基本同源序列，或序列号 No.2 多肽的片段的处于基本分离形式的多肽。

6. 处于基本分离形式的编码权利要求 5 的多肽的寡核苷酸。

7. 运载权利要求 1，2 或 6 限定的寡核苷酸的载体。

8. 能够结合序列号 No.2 的多肽或其片段的抗体。

9. 用于测定人类或动物体样品中权利要求 1 限定的寡核苷酸存在或缺如的方法，包括:

使含有 DNA 或 RNA 的人类或动物体样品和含有权利要求 1 限定的寡核苷酸或引物的探针在杂交调节下接触；并

检测样品中核酸和探针间形成的任何复合物。

10. 检测生物样品中权利要求 6 限定的多肽存在的方法，包括:

（a）提供权利要求 7 的抗体;

（b）在允许抗原-抗体复合物形成的条件下孵育生物样品和所述抗体；并

（c）确认是否形成包含所述抗体的抗原-抗体复合物。

11. 筛选用于抗肿瘤治疗的候选物的试验方法，包括:

（a）提供具有脂激酶活性的本发明的多肽和所述激酶的底物，提供有某试剂并处于某条件以便激酶活性可作用于底物;

（b）使所述多肽与底物和候选物接触;

（c）测量多肽的激酶活性降低程度；并

（d）选择能降低活性的候选物。

12. 筛选用于抗肿瘤治疗的候选物的试验方法，包括:

（a）(1) 将本发明的多肽和与第一多肽相同或不同的本发明另一多肽在允许第一多肽结合第二多肽形成复合物的条件下一起孵育;

(2) 将形成的复合物和候选物接触;

或

（a）将本发明的多肽和与第一多肽相同或不同的本发明另一多肽在允许第一多肽结合第二多肽形成复合物并存在候选物的条件下一起孵育;

并

（b）测定是否候选物抑制第一多肽和第二多肽的结合并

（c）选择抑制第一多肽和第二多肽的结合的候选物。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述第一多肽可与第二多肽区别。

14. 治疗病人癌症的方法，包括给予所述病人有效治疗量的根据权利要求 11 到 13 中任一方法选得的候选物。

15. 增加病人癌症细胞对化疗和/或放疗敏感性的方法，包括给予所述病人有效治疗量的根据权利要求 11 到 13 中任一方法选得的候选物。

16. 用根据权利要求 11 到 13 中任一方法选得的候选物治疗癌症。

17. 用根据权利要求 11 到 13 中任一方法选得的候选物增加癌症细胞对化疗和/或放疗敏感性。

说　明　书

细胞周期关卡基因

本发明涉及一类在真核细胞中控制细胞周期进程的关卡基因及其多肽产物。

发明背景

控制细胞周期是从酵母到哺乳动物的真核生物存在和生长的基础。真核生物已进化出控制途径，称为“关卡”，它能确保细胞周期的每一步在下一步发生前完成。作为 DNA 损伤的反应，细胞可以通过直接的 DNA 修复机制和细胞周期进程的减缓来增加细胞存活。依据细胞受辐射时在细胞周期中所处的位置，哺乳动物细胞中的损伤能阻止（ a ）由 G1 期进入 S 期，（ b ）整个 S 期进行或（ c ）从 G2 期进入有丝分裂期。认为这样的关卡能够阻止有丝分裂过程中的有害事件，如损伤 DNA 的复制和成为片段的染色体的分离（ Hartwell 和 Kastan, 1994 ）。

粟酒裂殖酵母 rad3 基因是作为 DNA 损伤和复制受阻反应的关卡所必需， Rad3 是激酶的脂激酶亚类中一员，所述激酶含有与酶磷脂酰肌醇－ 3 激酶 (PI － 3 激酶)的 P110 亚单位的脂激酶区序列同源的区域。这一亚类也包括共济失调－毛细血管扩张症的病人中 ATM 蛋白缺陷。来自共济失调－毛细血管扩张症的病人的细胞(AT 细胞)失去了辐射后的 S 期延迟，据说显示了抗辐射的 DNA 合成（ Painter and Young, 1989 ）。S 期受辐射的 AT 细胞由于致命损伤在 G2 期积聚，可能是试图复制受损 DNA 的结果。 G2 期受辐射的 AT 细胞显示不同的表现型： DNA 受损后其有丝分裂并不受阻，以损伤 DNA 完成整个有丝分裂进程（ Beamish and Lavin 1994 ）。 ATM 基因已被定位其中的 A － T 基因座的突变导致了对离子化辐射做出适当反应所需的几个关卡的破坏。这一脂激酶亚类的其它成员包括： Tel1p （ Greenwell 等 1985 ），涉及啤酒酵母中维持端粒长度的一个基因； ESr1p； Mec1p 和黑胃果蝇 mei － 41 关卡基因的产物（ Heri 等 1995 ）。

发明内容

我们分析了 sS rad3 基因并发现它有 2386 个氨基酸的全长氨基酸序列，而不是 Seaton 等 1992 所描述的 1070 个氨基酸。我们已肯定这是啤酒酵母 Esr1p 的直接同源物，并和 ATM 基因具有同样的大致结构。 rad3

蛋白的羧基末端含有脂激酶区，是 Rad3 的功能所必需。我们已显示 Rad3 能自我结合。我们已发现了一种与 Rad3 相关的蛋白激酶活性。

进一步我们找到了 rad3 的人类同源物。这个我们称为 ATR（共济失调和辐射相关）的基因和 rad3 的同源性显著高于和 ATM 基因的同源性。

人类 ATR cDNA 序列如序列号 No.1 列出。从核苷酸 80 和 8011 的 ORF 氨基酸序列如序列号 No.2 列出。

rad3de 开放读码框架的 DNA 序列如序列号 No.3 所示。基因（序列号 No.3 的核苷酸 585 到 7742）所翻译的 2386 个氨基酸如序列号 No.4 所示。

因此，一方面本发明提供了序列号 2 的 ATR 蛋白及其同源物，及其多肽片段，及其能结合 ATR 蛋白或多肽片段的抗体。本发明下文的多肽表示 ATR 蛋白，同源物及其片段。

另一方面，本发明提供了能选择性地与序列号 1 或其互补链（即，相反链）杂交的完全分离状态的寡核苷酸。还提供了编码本发明多肽的寡核苷酸。这些寡核苷酸将被称为本发明的寡核苷酸。

本发明的一种寡核苷酸包括能和该基因选择性杂交的序列号 1 的 DNA 及其片段。

进一步的方面，本发明提供了携带本发明寡核苷酸的重组载体，包括表达载体，此载体在合适的宿主细胞中生长的方法，例如本发明的序列编码的蛋白或多肽能够表达的条件。另一方面，本发明提供包括本发明的寡核苷酸，多肽和抗体的试剂盒及用这种试剂盒诊断 ATR 和其同源物，或其变体包括有害的 ATR 突变存在与否的方法。

本发明进一步提供了筛选用作抑制或激活 ATR 活性，或关卡活性缺陷的 ATR 突变形式活性化合物的候选物试验方法。本发明也提供了筛选作为抑制 ATR 和其它与 ATR 相互作用的化合物，包括 ATR 本身，间相互作用的化合物的试验方法。

相关方面，本发明还提供了基本分离形式的序列号 3 的寡核苷酸序列，和基本分离形式的序列号 4 的蛋白，和新片段及其变种。

发明详述

A. 多核苷酸

本发明的多核苷酸可包括 DNA 或 RNA。还可包括其中有合成或修饰核苷酸的多核苷酸。本领域已知许多不同类型修饰的寡核苷酸。包括

甲基磷酸酯和硫代磷酸酯骨架，分子的 3 ‘和/或 5’ 末端加入吖啶或聚赖氨酸。考虑到本发明的目的，可以理解本文所述的寡核苷酸可通过本领域现有的任何方法进行修饰。实施这些修饰旨在改善本发明的寡核苷酸的体内活性或寿限。

能选择性的与序列号 1 的 DNA 杂交的本发明的寡核苷酸通常至少有 70%，优选至少 80%或 90%，更优选至少 95%与相应的序列号 1 的 DNA 同源，在至少 20 个核苷酸，优选至少 25 或 30 个，例如至少 40， 60 或 100 或更多个的连续核苷酸的区域。

可以理解技术人员用常规技术构建核苷酸替代物而不影响本发明核苷酸编码的多肽序列，反映在其中本发明的多肽可表达的任何特异生物中的编码作用。

任何具有上面提到的同源性程度和最小大小的组合可用来定义本发明的寡核苷酸，优选更严格的组合（即具更长长度的更高的同源性）。例如具有至少 25 个核苷酸，优选 30， 80%同源的一条寡核苷酸构成本发明的一个方面，具有至少超过 40 个核苷酸的 90%同源性的寡核苷酸也同样。

本发明的寡核苷酸可用于产生引物，例如 PCR 引物，用于选择性放大反应的引物，如用放射性或非放射性标记物通过适当方法标记的探针，或该寡核苷酸可克隆入载体。这些引物，探针和其他片段至少 15 个核苷酸，优选至少 20，例如至少 25， 30 或 40 核苷酸长，并被此处所用的本发明的所称寡核苷酸围绕。

按照本发明如 DNA 寡核苷酸核的寡核苷酸和引物可重组，合成或其他本领域技术熟练人员可用的任何方法产生。它们可用标准技术克隆。

引物一般用合成方法产生，涉及一步每次用一个核苷酸得到目的核苷酸序列的明智制法。这种利用自动化完成的技术在本领域已可实现。

较长的寡核苷酸一般可用重组方法产生，如用 PCR（聚合酶链反应）克隆技术。这将涉及制造一对和要克隆的 ATR 基因对应的引物（如 15 - 30 个核苷酸），将引物和从人类细胞（例如象外周血白细胞一类的分裂细胞）获得的 mRNA 或 cDNA 接触，在能扩增目的区域的条件下进行聚合酶链反应，分离扩增片段(例如在琼脂糖凝胶上纯化反应混合物)并回收扩增片段。引物可设计为含有适当的限制性内切酶识别位点以便将扩增的 DNA 克隆进合适的克隆载体。

此技术可用于获得所述的 ATR 序列的全部或部分。包括 ATR 基因和其内含子及启动子区的基因组克隆也可用类似方法获得，从人类细胞如肝细胞来源的基因组 DNA 开始。

尽管此处提到的技术在本领域一般广为人知，可具体参考 Sambrook 等（分子克隆：试验室手册，1989）。

和本发明的序列并不 100%同源但在本发明范围内的寡核苷酸可用多种方法得到。

其他所述的 ATR 序列的人类等位变异体可用筛选来自广泛个体，如来自不同人群的个体，的基因组文库获得。

此外，其他动物，特别是哺乳动物（如小鼠，大鼠和兔），更特别是灵长类，可获得 ATR 的同源物，并且所述的同源物和片段一般能和序列号 No.1 选择性杂交。此序列可用筛选来自其他动物种类的基因组 DNA 文库或来自分离细胞和组织的 cDNA 文库获得，用包括序列号 1 的全部或部分的探针在中高度严格的条件下（例如 0.03M 氯化钠和 0.03M 柠檬酸钠 50 ℃到 60 ℃）筛选。

等位基因变异体和物种同源物可用简并 PCR 获得，该法利用设计定靶于变异体和同源物中编码保守氨基酸序列的引物。保守序列可根据 ATR 氨基酸序列和 *rad3* 序列的排列预测。引物含有一个或多个简并位点并在比针对已知序列用单一引物克隆序列低的严格条件使用。

另外，此寡核苷酸可通过 ATR 序列或等位基因突变体的定点突变获得。这种技术在例如需要对序列进行沉默密码子改变，以优化多核苷酸序列在其中表达的具体宿主细胞的密码子偏好时是有用的。其他序列改变可期望用于引入限制性内切酶切点，或改变寡核苷酸编码的多肽的功能和特性。可期望进一步改变以体现ATR 中特殊的编码改变，这种改变产生失去关卡功能的突变的 ATR 基因。基于这些改变的探针可用作检查此类 ATR 突变体的诊断探针。

本发明更提供包含本发明的寡核苷酸及其互补链的双链寡核苷酸。

本发明的寡核苷酸和引物携带显露标记物。合适的标记物包括放射性同位素如 ^{32}P 和 ^{35}S，酶标记或其他的蛋白标记如生物素。这些标记物可加在本发明的寡核苷酸和引物上并可用已知的技术检测。

标记或未标记的本发明的寡核苷酸或引物或其片段可由本领域的熟练人员用于基于核苷酸的试验以在人类或动物体内检测或测序 ATR。

此检测试验一般包括将人或动物体含有 DNA 或 RNA 的样品和包含本发明的寡核苷酸或引物的探针在杂交条件下接触，并检测样品中探针和核苷酸之间的任何双螺旋形成。此检测可用一些技术获得，这些技术有例如 PCR 或将探针固定于固相支持物上，除去样品中不和探针杂交的核苷酸，然后检测和探针杂交的核苷酸。或者是样品核苷酸可固定于固相支持物上，结合于此支持物上的探针数量可以检测。其他形式的适合的试验方法可在如 WO 89/03891 和 WO 90/13667 中找到。

测序 ATR 的试验包括使包含 DNA 或 RNA 的人或动物体的样品和本发明包含寡核苷酸或引物的探针在杂交条件下接触，并用例如 Sanger 双脱氧链终止法（参见 Sambrook 等）测定序列。

此方法一般包括，存在适合试剂情况下，通过合成和靶 DNA 或 RNA 互补链而延伸引物，并选择性在 A,C,G,T/U 残基的一个或多个处终止延伸反应；允许链延伸和终止反应发生；按照大小分离延伸产物确定选择性终止发生处的核苷酸的序列。适合的试剂包括 DNA 聚合酶，脱氧核苷酸 dATP， dCTP， dGTP 和 dTTP，缓冲液和 ATP。双脱氧核苷酸用于选择性终止。

检测或测序人或动物体内的 ATR 试验可用于测定含有或怀疑含有突变 ATR 基因个体细胞中的 ATR 序列，例如肿瘤细胞包括白血病细胞和实体瘤如乳腺，卵巢，肺，结肠，胰腺，睾丸，肝，脑，肌肉和骨骼肿瘤。

此外 ATR 的发现使用类似 ATM 基因的方式研究此基因在遗传疾病中的作用可以实现。这一般涉及 ATR（如用 PCR 序列分析）在细胞中的地位的确定，此细胞来自有细胞复制受损相关疾病的病人，例如家族肿瘤素质，染色体断裂或不稳定表现型或损伤修复敏感表现型。

本发明的探针可以用适当容器方便地以试验试剂盒包装。在此试剂盒中探针结合于固相支持物，其中试剂盒设计用于的试验要求这样的结合。试剂盒还可包括适当的试剂用于待查样品的处理，使探针和样品中的核苷酸杂交，对照，说明书，诸如此类。

本发明也提供编码下文描述的本发明多肽的寡核苷酸。由于该寡核苷酸将用作重组产生本发明多肽的序列，所以它不需要和序列号 No.1 的序列选择性杂交，尽管一般期望如此。另一方面若需要该寡核苷酸可按上文描述制造，标记和使用。本发明的多肽下文描述。

本发明的寡核苷酸特别优选来自 ATR 的脂激酶区，其等位基因变异体和物种同源体。脂激酶区由序列号 1 的核苷酸 7054 到 8011 代表。特别优选包括此区的本发明的寡核苷酸。所称“脂激酶区”指由序列排列决定和其他已知脂激酶同源的区域，特别和 PI - 3 激酶的 P110 亚单位同源。

其他本发明优选的寡核苷酸是编码包括据信为一公认的蛋白 - 蛋白作用点亮氨酸拉链的序列号 No.2 的 181 到 302 氨基酸序列（序列号 No.1 的核苷酸 620 到 985 ）的寡核苷酸，和另一保守区氨基酸序列 1358 到 1366（核苷酸 4151 到 4177 ）。

另一方面，本发明的寡核苷酸包括序列号 No.3 和能和此序列选择性杂交的片段而不是包含核苷酸 2482 到 6599 的片段，其中发生如下改变：缺失 2499， 2501， 2507 和 2509 残基； 5818/5819 间插入 C 。

特别优选包括残基 6826 到 7334 （脂激酶区）和亮氨酸拉链区 1476 到 1625 和 2310 到 2357 的片段。此外优选包括保守区 3891 到 3917 的片段。此多肽和片段可按上文描述制造和使用。

B. 多肽.

本发明的多肽包括包含序列号 NO.2 列出序列的基本上分离形式的多肽。

多肽还包括该序列的变异体，包括基本上与所述多肽同源的自然发生的等位基因变异体和合成变异体。在本文中，基本同源是指序列超过 30 个氨基酸有至少 70 %，例如 80 % 或 90 % 的氨基酸和脂激酶区和羧基端部分（残基 2326 到 2644 ）除外的序列号 No.2 序列同源（一致），除外部分中基本上同源是指超过 50 个氨基酸有至少 80 %，优选 90 % 同源（一致）。

多肽也包括其他编码其他物种的 ATR 的同源物和其上文定义的变异体，其他物种包括动物如哺乳动物（例如小鼠，大鼠或兔），特别是灵长类。

本发明的多肽还包括上文提到的全长多肽和其变异体的片段，包括序列号 No.2 列出序列的片段。

优选片段包括含有抗原决定簇的片段，特别是抗原决定簇。合适的片段至少约 5 个氨基酸，例如 10， 12， 15 或 20 个氨基酸大小。 ATR 蛋白及其等位基因和物种变异体的多肽片段可含有 1 个或多个（例如 2，

3， 5，或 10）取代，缺失或插入，包括保守取代。

保守取代可按照下表所列保守取代获得，其中第二列同一区的氨基酸和优选第三列同一行的氨基酸可互相取代。

脂肪族的	非极性	GAP
		ILV
	极性不带电	CSTM
		NQ
	极性带电	DE
		KR
芳香族的		HFWY
其他		NQDE

本发明的多肽的变异体还可以包括一个或多个特异的（即，天然编码的）氨基酸缺失或被取代的多肽，或一个或多个非特异的氨基酸加入的多肽：（1）不丢失本发明多肽特异的激酶活性；或（2）失去本发明多肽特异的激酶活性；或（3）丧失与细胞周期关卡通路的成员或调节剂相互作用的能力。

抗原决定簇可以通过如 Geysen 等，分子免疫学，23；709 - 715（1986）描述的多肽扫描技术之类的技术来决定。

本发明的多肽可处于基本上分离的形式。可以理解，可将多肽与不干扰其目的的载体或稀释剂混合而仍被认为是基本上游离的。本发明的多肽也可处于基本上纯化的形式，在此情况下通常包括其中多于 90%，如 95%，98%或 99%的多肽是本发明的多肽的多肽制剂。本发明的多肽可以修饰，例如加入组氨酸残基以利于纯化或加入信号序列来增加其从细胞中分泌。

本发明的多肽可用可见的标记物标记。可见的标记物可为任何允许多肽被检测的适当标记物。适当的标记物包括放射性同位素，如 ^{125}I，酶，抗体，多肽和连接物如生物素。本发明标记的多肽可用于诊断过程中如免疫试验来确定样品中本发明的多肽的量。本发明的多肽或标记的多肽还可用于血清学或细胞介导的免疫试验，用标准的方法检测动物和

人类对所述多肽的免疫反应性。

本发明的多肽或标记的多肽或其片段也可固定于一固相，例如免疫试验孔的表面或量尺上。

这些标记的和/或固定化的多肽可于适当的容器中和适当的试剂，对照，说明书等一道包装成试剂盒。

这些多肽和试剂盒可用于通过免疫试验检测ATR蛋白或等位基因或其物种变异体的抗体方法中。

本领域熟知免疫学试验方法，通常包括:

（a）提供包括可被所述蛋白质的抗体结合的抗原决定簇的多肽;

（b）在允许形成抗原抗体复合物的条件下将生物样品与所述多肽孵育；及

（c）测定是否形成了包含所述多肽的抗原抗体复合物。

本发明的多肽可通过如下所述的合成方法（如Geysen等所述）或重组获得。

本发明特别优选的多肽包括跨越或包含于脂激酶区的多肽，脂激酶区即序列号2中从2326到2644的氨基酸或基本上和其同源的序列。特别优选上文定义的源于此区的片段。这些多肽和片段可包含上文定义的氨基酸变更，包括和下文举例描述的rad3取代位置对应的位置2475，2480和2494中一个或多个取代。优选取代包括D2475A，N2480K和D2494E。

本发明的多肽可用于体内或体外细胞培养系统来研究ATR作为关卡基因的表现。例如，截短或修饰（如修饰脂激酶区）的ATRs可引入细胞以破坏细胞中发生的正常关卡功能。

本发明的多肽可通过重组表达载体（见下）原位表达多肽来引入细胞。表达载体带有一任选的可诱导的启动子来控制多肽的表达。

期望应用哺乳动物宿主细胞株提供翻译后修饰（例如，十四烷基化，糖基化，截断，Lapidation及酪氨酸，丝氨酸或苏氨酸的磷酸化），这可能是本发明的重组表达产物获得最适的生物活性所需要的。

表达本发明多肽的细胞培养系统可用于识别细胞中干扰或增强关卡功能的候选物质的试验系统中（见下）。

另一方面，本发明的多肽包括序列号4的蛋白及其来自除包括氨基酸713至1778片段外其它区的片段。尤其优选包括残基2082至2386（脂

激酶区）和亮氨酸拉链区 298 至 347 及 576 至 591 的片段。另外，优选包括保守区 1103 至 1111 的片段。这些多肽和片段可通过上述方法制备和使用。

本发明还提供了与序列号 4 的蛋白及其片段基本上同源的多肽。在此，基本上同源代表多于 30 个氨基酸的，除脂激酶区和 C - 末端部分（残基 2082 至 2386）外，至少 70 %，如 80 % 或 90 % 的氨基酸与序列号 4 蛋白序列同源（相同）的序列，而在脂激酶区和 C - 末端部分基本上同源表示多于 50 个氨基酸的，至少 80 %，优选至少 90 % 同源（相同）。

C. 载体

本发明的多肽可插入重组的可复制的载体中。可用载体在相容的宿主细胞中复制核酸。因此，在更进一步的方案中，本发明提供了通过将本发明的多肽引入可复制的载体，将载体引入相容的宿主细胞，使宿主细胞在能使载体复制的条件下生长来制备本发明的多肽的方法。载体可由宿主细胞回收。以下描述了适当的宿主细胞其表达载体。

D. 表达载体

载体中本发明的多肽优选可行地连于控制区，宿主细胞能提供其编码区的表达，即，载体为一表达载体。

术语“可行地连接”是指一个邻近位置，其中所述组分处于能行使其预期功能的关系。“可行地连接”于编码序列的控制序列的这种连接使编码序列在与控制序列相容的条件下得以表达。

这些载体可如上述转入合适的宿主细胞来提供本发明多肽的表达。因此，本发明进一步提供了一种按照本发明制备多肽的方法，包括在提供编码多肽的编码序列的载体表达的条件下，培育如上述以表达载体转染或转化的宿主细胞及回收表达多肽。

载体可以是，例如，具有复制起点的质粒，病毒或噬菌体载体，任选地表达所述多肽所需启动子，或启动子的调节子。载体可包括一个或多个可选择的标记基因，如细菌质粒的抗氨苄青霉素基因或哺乳动物载体的抗新霉素基因。载体可体外使用，例如用来产生 RNA 或用于转化或转染宿主细胞。载体也可适用于体内，例如在基因治疗的方法中。

本发明进一步的方案提供了以载体转化或转染的用于复制和表达本发明多肽的宿主细胞。选择与所述载体相容的细胞，可以是如细菌的，酵母，昆虫，或哺乳动物的。

本发明的多肽也可以反义的方式插入载体中，以提供产生反义RNA。反义RNA或其它反义寡核苷酸还可以合成方法获得。这些反义寡核苷酸可用于控制ATR或其变种或种同系物水平的方法中。

选择启动子和其它表达调控信号与宿主细胞相容，表达载体为宿主细胞设计。例如，酵母启动子包括啤酒酵母GAL4及ADH启动子，粟酒裂殖酵母和adh启动子。哺乳启动子包括metallothionein启动子，后者涉及对重金属如，镉的应答。病毒启动子如SV40大T抗原启动子或腺病毒启动子也可使用。所有这些启动子在本领域均易得。

E. 抗体

本发明亦提供本发明多肽或其片段的单克隆或多克隆抗体。本发明进一步提供产生本发明多肽的单克隆或多克隆抗体的方法。单克隆抗体可用本发明的多肽或其肽片段作为免疫原通过传统的杂交瘤技术制备。多克隆抗体也可通过传统的方法制备，包括以本发明的多肽或其肽片段接种一个宿主动物，例如大鼠或兔，回收免疫血清。

为了制备这些抗体，本发明还提供了将本发明的多肽或其片段半抗原化于另一个多肽，在动物或人体中用作免疫原。

本发明优选的抗体能够选择性地结合于人ATR蛋白，即具有至少10倍，优选至少100倍于rad3蛋白亲合力。该抗体可通过常规方法获得，如，选择与rad3蛋白相应区序列不同的ATR蛋白区，制备包含这些序列的肽，以这些肽为免疫原。抗体产生后，测定所述抗体的结合。本发明优选能够选择性结合于人类ATR蛋白脂激酶区（如上定义）的抗体。另外，能够以相似地亲合力结合于人和酵母（粟酒裂殖酵母）脂激酶区，而不与ATM家族蛋白区结合的抗体形成本发明的另一方面。这些抗体可由来自脂激酶区的肽获得，这些区在酵母和人类基因中发现完全相同或基本上相同。

鉴于本发明的目的，术语“抗体”，除非特殊声明，包括保留了与肿瘤靶抗原结合活性的整个抗体片段。这些片段包括，Fv，F（ab′）和$F(ab')_2$片段，及单链抗体。而且，抗体及其片段可为人源化的抗体，如，EP－A－239400所述。

抗体可用于检测生物样品中本发明的多肽的存在，所用方法包括：

（a）提供本发明的抗体；

（b）将所述抗体和生物样品在能形成抗原－抗体复合物的条件下

孵育；并

（c） 检测是否形成包含所述抗体的抗原－抗体复合物。

适合样品包括分离细胞的提取物，例如淋巴细胞或包括白血病细胞和成形肿瘤如乳腺，卵巢，肺，结肠，胰腺，睾丸，肝，脑，肌肉和骨骼肿瘤的肿瘤细胞。

本发明的抗体可结合于固相支持物并/或和适合的试剂，对照，说明书等在适当的容器中包装成试剂盒。

F. 试验.

取消细胞周期关卡是可用于发展和设计抗肿瘤治疗的药物的潜在策略，可以做为新的治疗方法或联合治疗的一部分以提高现有化疗药物的特异毒性。例如如氮芥的烷化剂可用作化疗药物破坏快速分裂细胞中的DNA，引起细胞死亡。这类药物的毒性可被DNA修复和关卡机制减弱。取消此类机制增强设计用于破坏DNA的治疗化合物的效果。由于其他基因可在非肿瘤细胞中弥补ATR功能的缺失，取消ATR关卡将对失去其他关卡或破坏反应基因的肿瘤细胞特别有用，导致化疗药物效果大更大增强。

ATR的脂激酶活性是抗肿瘤化合物的靶点，因为下面例子中的结果提示ATR功能需要激酶区。本发明提供的筛选用于抗肿瘤治疗的候选化合物的试验方法包括:

（a） 提供具有激酶活性的本发明的多肽和所述激酶的底物，在试剂存在和某种条件下激酶活性可作用于底物;

（b） 将所述底物和多肽于候选物质接触;

（c） 测量多肽激酶活性的降低程度；并

（d） 选择能使活性降低的活性物质。

试验可在体外进行，例如在微量盘的孔中。这样的形式适合自动化，允许筛选大量的候选物质。

底物可以是蛋白或天然脂底物或本发明的多肽可作用的合成的起点。通常本发明的多肽将磷酸化底物。

本领域技术熟练人员可通过任何合适的试验形式完成试验。通常，具有脂激酶活性的本发明的多肽在底物及活性所需的细胞和其它组分的存在下结合于固体物上。标记的磷酸酯和候选底物同时或以任一顺序依次加入混合物中。适当的反应时间后(通常几分钟，但无候选底物的任何

情况下，应足够底物发生磷酸化），通过如沉淀磷酸酯，测定游离的磷酸酯的量。抑制激酶活性的候选底物将抑制游离的磷酸酯插入底物，因此，发现游离磷酸酯的地方表明有抑制。

本领域技术熟练人员还可用其它试验方式。

候选底物可用于每个反应 10 个化合物的批量初筛，然后将这些批中显示抑制的化合物单独测试。

合适的候选底物包括基于激酶区序列的肽，尤其 5 到 20 个氨基酸大小，或其中一个或多个残基被如上所述取代的这些肽的变种。也可使用来自包括任意序列的肽或序列发生了一致改变以产生最大不同的肽。进一步的候选底物包括小分子的激酶抑制剂如 cyclosporin 样和 staurosporin 样化合物，或其它可买到的小分子抑制剂。

如上所述体外筛选有活性的候选底物可再在体内系统中测试，如酵母或哺乳细胞，将其暴露于抑制剂，测定关卡活性。

我们还显示了 Rad3 具有蛋白激酶活性。Rad3 蛋白激酶活性的靶底物可通过将测试化合物插入激酶活性试验中确定。Rad3 蛋白再悬浮于激酶缓冲液中，在测试化合物（如酪蛋白，组蛋白 H1,或适当的底物蛋白）在或不存在下培育。激酶转化给测试化合物的磷酸酯的摩尔数通过放射自显影或闪烁计数测得。磷酸酯转化酯测试化合物表明所测试的化合物为激酶底物。

调节 Rad3/ATR 脂激酶活性或 Rad3 蛋白激酶活性的试剂可以确认如下，将待测化合物和天然表达 Rad3/ATR 的细胞免疫纯化得到的 Rad3/ATR 一起孵育，和表达该酶的重组原核或真核细胞重获得的 Rad3/ATR 一起孵育，或和纯化的 Rad3/ATR 一起孵育，然后决定所测化合物对 Rad3/ATR 活性的效果。Rad3/ATR 脂激酶活性或 Rad3 蛋白激酶活性区可以通过测定激酶从 γ - ^{32}P - ATP 到其自身（自身磷酸化）或到如脂或蛋白之类的外源底物转移的 ^{32}P - 磷酸摩尔数来测量。掺入底物的磷酸量可用放射自显影或闪烁计数来测量。有测试化合物存在情况下转移到底物的磷酸摩尔数比无测试化合物存在情况下转移到底物的磷酸摩尔数增加表明测试化合物是所述激酶活性的激活剂。相反，有测试化合物存在情况下转移到底物的磷酸摩尔数比无测试化合物存在情况下转移到底物的磷酸摩尔数减少表明调节物是所述激酶活性的抑制剂。

在现在的优选试验中，连于琼脂珠的 Rad3/ATR 抗体和来自表达

Rad3/ATR 的宿主细胞的细胞裂解液一起孵育。从琼脂珠洗去非特异结合到珠上的蛋白并将珠重悬于激酶缓冲液(如 25mM K - HEPES pH 7.7, 50mM 氯化钾, 10mM 氯化镁, 0.1 % NP - 40 , 20 % 甘油, 1mMDTT)。加入 100μM γ - ^{32}P - ATP (4Ci/mM) 和如脂或肽的外源底物开始反应, 反应在 30 ℃进行 10 分钟。通过测量转移到激酶自身或外加底物的 ^{32}P - 磷酸摩尔数来测定激酶的活性。在优选方案中宿主细胞缺乏内源的 Rad3/ATR 激酶活性。化合物调节 Rad3/ATR 脂激酶活性的选择性可通过比较其对 Rad3/ATR 活性和对, 例如, 其他已知磷脂酰肌醇 - 3 (PI - 3) - 相关激酶的活性来评价。本发明的重组 Rad3/ATR 产物合其他重组 PI - 3 - 相关激酶产物在一系列独立试验中的结合提供了发展 Rad3/ATR 激酶活性选择性调节剂的系统。类似的, 化合物调节 Rad3 的蛋白激酶活性的选择性可通过参考其他蛋白激酶, 例如 DNA 依赖的蛋白激酶或 ATM 来决定。

另外, rad 突变 rad.D2249E (见实施例) 可作为显性负性突变的显示提示一个或多个都能复合物的介入, 此复合物本身可为治疗性介入所定靶。我们已显示, 例如, Rad3 可自我配对或和 ATR 配对。因此可能 rad/ATR 作为多聚分子起作用。突变酵母 rad 或人类 ATR 基因, 或其也缺乏 rad/ATR 活性的衍生物可导入细胞作为显性负性突变。例如如果在肿瘤细胞内表达显性负性突变 (例如 ATR D2475A , N2480K 或 D2494E) 导致辐射敏感性增加, 这表明自身 ATR 仍起作用并可作为治疗药物的靶点。

包括涉及 Rad3 或 ATR 的多聚蛋白复合物的组分的相互作用蛋白可用以下试验分辨。

本发明第一个考虑的试验是双杂交筛选。双杂交系统源自酵母 (Chien 等 (1991)) 基于激活报告基因的转录因子在体外的功能重构建。特别是, 编码与 Rad3 / ATR 相互作用蛋白的寡核苷酸可通过以下分离: 用包含报告基因的 DNA 构建物转化或转染适合宿主细胞, 该报告基因在受含一 DNA 结合区和一激活区的转录因子调节的启动子控制下; 在宿主细胞中表达编码部分或全部 Rad3 / ATR 和转录因子的激活区或结合区第一融合物的第一 DNA 杂交序列; 在宿主细胞中表达编码部分或全部假定的 Rad3 / ATR 结合蛋白和未包含在第一融合物的转录因子的结合区或激活区的第二融合物的第二杂交 DNA 序列文库; 通过检测宿主细胞中

报告基因产物的产生来检测Rad3 / ATR作用蛋白和Rad3 / ATR在特殊宿主细胞中的结合。目前优选用于试验的是 lexA 启动子来使报告基因表达， lacZ 报告基因，包含 lexA DNA 结合区合 GAL4 激活区的转录因子，酵母宿主细胞。

确认和Rad3或ATR相互作用蛋白的其他方法可涉及固定Rad3/ATR或受试蛋白，可检测地标记非固定的结合配偶体，一起孵育结合配偶体并检测标记结合的量。结合标记表明受试蛋白和 Rad3/ATR 相互作用。

另一种确认和Rad3或ATR相互作用蛋白的方法涉及固定Rad3/ATR或其片段于一包被（或充满）荧光试剂的固体支持物上，用能激活荧光试剂的化合物标记受试蛋白，使固定的 Rad3 / ATR 和受试蛋白接触，检测荧光试剂的发光，将导致荧光试剂发光的受试蛋白确定为相互作用蛋白。或者试验中可固定假定相互作用的蛋白而标记 Rad3 / ATR 。

调节 Rad3 / ATR 和其它细胞组分相互作用的化合物可用于治疗癌症的方法中。例如，若由非 ATR 基因，如 P53 突变导致的特异形式的肿瘤，可用抑制转录或 ATR 酶活性，并因而抑制 G2 细胞周期关卡的试剂使癌症细胞对放疗或化疗更敏感。这种试剂治疗的价值在于以下事实，多数情况下现有的放疗或化疗不能克服 p53 突变癌细胞的觉察并纠正治疗所导致的 DNA 损伤的能力。结果，肿瘤细胞能轻易地修复 DNA 损伤。因此本发明的调节试剂可作为放疗和化疗的辅助或本身直接作为化疗药物。

确认调节 Rad3 / ATR 和其他蛋白相互作用的化合物的试验可涉及：用包含报告基因的 DNA 构建物转化或转染适合宿主细胞，该报告基因在受含一 DNA 结合区和一激活区的转录因子调节的启动子控制下；在宿主细胞中表达编码部分或全部 Rad3 / ATR 和转录因子的激活区或结合区第一融合物的第一 DNA 杂交序列；在宿主细胞中表达编码部分或全部和 Rad3/ATR 相互作用的蛋白和未包含在第一融合物的转录因子的结合区或激活区的第二融合物的第二杂交 DNA 序列文库；通过检测宿主细胞中报告基因产物在受试化合物存在或不存在时的产生来检测相互作用蛋白和 Rad3/ATR 在特殊宿主细胞中的结合，以此评价受试化合物对 Rad3/ATR 和相互作用蛋白间相互作用的效果；并通过比较在无调节化合物存在时报告基因产物的产量和受试化合物对报告基因产物的产量的改变来辨别调节化合物。目前优选用于试验的是促使报告基因表达的 lexA

启动子，lacZ 报告基因，包含 lexA DNA 结合区和 GAL4 激活区的转录因子，及酵母宿主细胞。

确认调节 Rad3/ATR 和涉及固定 Rad3/ATR 或天然 Rad3/ATR 相互作用蛋白间的相互作用的化合物的另一类试验，可检测地标记非固定结合配偶体，一起孵育结合配偶体并测定受试化合物对标记结合量的影响，其中有受试化合物存在时标记结合比无受试化合物存在标记结合量少提示受试试剂是 Rad3/ATR 和蛋白相互作用的抑制剂。相反，有受试化合物存在时标记结合比无受试化合物存在标记结合量多提示候选调节剂是 Rad3/ATR 和蛋白相互作用的激活剂。

本发明考虑的确认调节 Rad3/ATR 和相互作用蛋白结合的化合物的另一方法涉及将 Rad3/ATR 或其片段固定于包被（或充满）荧光剂的固相支持物上，用能够激活荧光剂的化合物标记相互作用蛋白，通过比较无受试化合物存在时荧光剂发出的荧光确认调节化合物为影响荧光剂发光的受试化合物。或者，试验中固定 Rad3/ATR 相互作用蛋白并标记 Rad3/ATR。

我们已显示 Rad3 和 ATR 相互作用。因此以上提到的试验也可用于确认调节 Rad3 和 ATR 相互作用的化合物，其中试验方法中描述的相互作用蛋白可以是 Rad3 或 ATR。

我们也已显示了 Rad3 可结合自身，强烈提示 ATR 也可结合自身。因此以上提到的试验也可用于确认调节 Rad3 - Rad3 相互作用和 ATR - ATR 相互作用的化合物。

此化合物可治疗性用于扰乱 ATR - ATR 相互作用并增加肿瘤细胞对化疗和/或放疗的敏感性。本发明提供筛选抗肿瘤候选物的试验方法包括:

（a）(1) 将本发明的多肽和与第一多肽相同或不同的本发明另一多肽在允许第一多肽结合第二多肽形成复合物的条件下一起孵育;

(2) 将形成的复合物和候选物接触;

或

（a）将本发明的多肽和与第一多肽相同或不同的本发明另一多肽在允许第一多肽结合第二多肽形成复合物并存在候选物的条件下一起孵育;

并

（b）测定是否候选物抑制第一多肽和第二多肽的结合并

（c）选择抑制第一多肽和第二多肽的结合的候选物。

优选第一和第二多肽能彼此分辨。例如第一多肽和第二多肽都是ATR，或都是Rad3，或一个是ATR且一个是Rad3或有结合活性的ATR或Rad3的衍生物。当两个多肽都是ATR或Rad3时，优选两个可分辨的ATR/Rad3形式用于这些试验。它们可以通过，例如，标记任一多肽来分辨。标记物的例子包括放射性标记物，抗原决定簇标记，或其它多肽标记物如谷氨酸-S-转移酶。例如，一种形式的Rad3有一种形式的抗原决定簇，另一种形式有不同的抗原决定簇，使其能被免疫学分辨，如一个结合到另一个可被定性或定量的确定。在优选的方法中第一多肽可被固定到例如琼脂珠或固相支持物上，第二多肽可在游离溶液中。结合即可用上文描述的熟练人员熟知的方法测定。

本发明也考虑抗体产物（例如，单克隆和多克隆抗体，单链抗体，融合抗体，CDR－移植抗体等等）和对Rad3蛋白激酶区或Rad3/ATR脂激酶区特异的其它结合蛋白（如以上试验确认的）。结合蛋白可用分离得到的天然或重组酶发展。结合蛋白，反过来，用于纯化重组和天然产生的酶并确认产生这些酶的细胞。细胞或液体中蛋白的检测和定量试验涉及单一的抗体或以“三文治”试验形式的多个抗体物质。结合蛋白也可明显用于调节（即，阻断，抑制，刺激）酶/底物或酶/调节剂的相互作用。

Rad3/ATR的调节剂可影响其激酶活性，其细胞内定位，和/或其与细胞周期关卡途径中成员相互作用。选择性调节剂可包括，例如，多肽或特异结合Rad3/ATR或Rad3/ATR核酸的肽，和/或其它特异作用于Rad3/ATR或Rad3/ATR核酸的非肽化合物（例如，分离或合成的有机分子）。本发明也考虑影响酶活性或野生型Rad3/ATR细胞内定位的Rad3/ATR突变形式。

进一步，重组库，肽和肽类似物，精选的化学物质，寡核苷酸，和天然产物库可用上文描述的试验用来筛选Rad3/ATR激酶活性和Rad3/ATR相互作用的调节剂。

F. 治疗应用

Rad3/ATR活性调节剂，包括其脂激酶和蛋白激酶活性抑制剂，可用

于抗癌治疗。特别是，它们可以通过扰乱 Rad3/ATR 的细胞周期调节功能增加癌细胞对化疗和/或放疗的敏感性。

本发明提供通过上文描述的筛选试验分离得到调节 Rad3/ATR 活性的化合物可用于癌症治疗的方法。在一个实施方案中，所述化合物能抑制 Rad3/ATR 脂激酶和/或 Rad3 蛋白激酶活性。在另一实施方案中，所述化合物能抑制 ATR 与其自身间和/或与，例如，其它可正常形成多聚蛋白复合物的相互作用蛋白间的相互作用。

应当理解本文所称“化合物”也指以上描述试验中所选的候选物。

化合物一般通过将其与可药用的载体或稀释剂混合配制成临床制剂。例如，它们可被配制成局部的，胃肠道外的，静脉内的，肌肉内的，皮下的，眼内的或透皮的制剂。优选，化合物以可注射形式应用。由于使治疗效果能集中于受累组织水平，直接注射入病人肿瘤是更有利的。因此它可合任何注射剂可药用的载体混合，优选直接注射于待治疗部位。药用载体或稀释剂可以是，例如，无菌或等渗溶液。

化合物使用的剂量可根据不同参数调整，特别根据所用化合物，年龄，体重和受治病人情况，所用给药形式，肿瘤病理和所需临床安排。推荐，注射给药的化合物量从 0.01mg/kg 到 30mg/kg 是适合的，优选从 0.1mg/kg 到 10mg/kg 。

所描述的给药途径和剂量仅作为推荐考虑，因为熟练的操作者能依据任何特异的病人和情况决定最优给药途径和剂量。

给药化合物可包括多肽和核酸。核酸可编码多肽或可编码抑制细胞基因表达的反义构建物。核酸可通过，例如，脂质体转染或病毒载体给药。例如核酸可形成病毒载体如腺病毒的一部分。用病毒载体时，通常给药剂量在 10^4 - 10^{14} pfu/ml 间，优选 10^6 - 10^{104} pfu/ml 。术语 pfu（“空斑形成单位”）对应于病毒溶液的感染力，通过感染适当的细胞培养液测得，通常在感染 48 小时后测定感染细胞的空斑数目得到。文献中详细阐明了测定病毒溶液的 pfu 滴度的技术。

任何癌症形式都可用这些方法治疗，例如白血病，和成体瘤如乳腺，卵巢，肺，结肠，胰腺，睾丸，肝，脑，肌肉和骨骼肿瘤。优选，肿瘤具有正常的 ATR 功能。

附图简述

图 1

ATR， rad3， mei - 41， MEC1， TEL1 及 ATM 间的关系

A. ATR， rad3， mei - 41， Mec1p， Tel1p 及 ATM 的全结构标志：开放区 - Rad3 区；划出的框 - 激酶区

B. 基于用 DNA 星软件通过 Clustal 方法（ PAM250 ）产生的序列排列图。 rad3/ESR1/mei - 41/ATR 彼此间比与 ATR 和 TEL1 更近地关联。在 EMBL 数据库中有 rad3 和 ATM 序列。

以下实施例论证了本发明。

实施例 1

粟酒裂殖酵母的 rad3 基因是粟酒裂殖酵母中 DNA 结构关卡绝对必须的六个基因之一（ Al - Khodairy 和 Carr， 1992;; Al - Khodairy 等， 1994 ）。 Seaton 等（ 1992 ）报导了代表部分 rad3 基因的一个序列。为试图阐明这个基因的内含子/外显子结构，我们确认了 5′和 3′末端的序列反常。我们曾对整个基因测序（见试验步骤）发现 rad3 能编码一个 2386 个氨基酸的产物。 C 末端区包括激酶的亚类，称做脂激酶的典型的一致序列，其构建成员为 PI3 激酶的 p110 催化亚单位（ Hiles 等， 1992 ）。

已有关于缺少氨基末端和激酶区的截断的 rad3 克隆报导补充了 rad3::pR3H1.0 基因损害的 rad3 突变体（ Jmenez 等， 1992 ）。这一损害的突变体并未除去激酶区。为阐明该区的作用，通过基因取代，我们制备了一个缺失突变体。该突变体具有 rad3 的 1477 - 2271 氨基酸，包括激酶区为 $ura4^{+}$取代。这一菌株， rad3. d. 与 rad3. 136 突变体（ Nasim 和 Smith， 1975)及原始的 rad3::pR3H1.0 损害突变体（ Jmenez 等， 1992; Seaton 等 1992 ）具有相同的关卡缺陷和射线/羟基脲敏感性（未显示数据）。我们在假定的 rad3 激酶区制造了三个独立的点突变，用于基因取代试验中来构建具有确定激酶缺失突变的菌株。所有三个菌株， rad3. D2230A， rad3. N2235K 或 rad3. D2249E 均具有与 rad3. d 缺失突变体相同的基因型（未显示数据），提示激酶活性为 Rad3 功能所必须。鉴于我们的发现， Seaton 等（ 1992 ） 和 Jmenez 等（ 1992 ）的结果的一个解释为部分克隆可显示质粒产生的截枝基因和保留激酶功能的基因组的部分缺失间的基因内的互补作用。这样的解释与 rad3 作为二聚体或多聚体

作用一致。

当激酶缺失的变异株 rad3. D2249E 在野生型细胞中，在修饰的 nmtI 启动子的控制下中等程度过度表达时（ Maundrell， 1990 ），通过紫外研磨（ UV strip ）测试试验表明，造成对射线的极度敏感性，成为显性等位基因阴性的突变体（未显示数据）。同一激酶缺失的构建物高水平表达时，抑制生长（未显示数据）。检查细胞表明分化很慢地继续，更小的细胞中，野生型细胞和含空载体以约 15 微粒的速率分化，而 rad3 和 rad3. D2249E 过度表达细胞约 12 微粒分化（未显示数据）。粟酒裂殖酵母中，这确实表明有丝分裂的推进。

人类 rad3 同源物， ATR

为确认人类 rad3 的形式，结合应用了一系列方法。通过这些方法，我们克隆了人类整个基因的编码区(见材料与方法), 将其定义为 ATR( )。ATR 能够编码一个 2644 个氨基酸的蛋白，后者与粟酒裂殖酵母的产物 rad3，酿酒酵母菌 ESR1 （ Kato 和 Ogawa， 1994 ）及 D. melanogaster mei - 41 基因（ Hari 等， 1995 ）的相关比与人类 ATM 和酿酒酵母菌 Tell 蛋白（ Savitsky 等， 1995； Greenwell 等 1995 ）更近，似乎是 rad3 真正的同源物。 ESR1 与 mec1/sad3 关卡突变体等位（ Allen 等 1994； Weinert 等 1994 ），后者具有与 rad3 价的基因型。 ATR 与包含 C 末端假定的脂激酶活性区和具有类似的全结构的人类关卡基因 ATM 相关较少。序列排列明显表明 rad3/ ESR1 （ mec1/sad3 ）/ mei - 41/ ATR 基因间彼此相关比对 ATM 或 TEL1 更近， ATM 与 TEL1 更同源（图 1 ）。

ATM 基因在许多组织中表达（ Savitsky 等， 1995 ）。酿酒酵母中. ESR1 在有丝分裂细胞中低水平表达，但在减数分裂 I 期迅速诱导（ **Kato** 和 Ogawa， 1994 ）。利用 Northern 印迹分析，我们论证了 ATR 在多数组织中亦微弱表达，但在睾丸中高度表达(未显示数据)。考虑到 ATR，Rad3 和 Esr1p 蛋白彼此间比与 ATM 间更相关，在睾丸中 ATR 较高水平的表达与观察到的 Esr1p 对减数分裂重组有作用一致（ Kato 和 Ogawa， 1994 ）。利用 FISH 及 PCR 分析，我们定位 ATR 于染色体 3q22 - 3q25（未显示数据）。这一区与已知的肿瘤预兆症状无关。

为进一步研究 Rad3 作为多聚体的可能性，我们建造了存在于基于 pREP 的可诱导载体中的两个独立全长 rad3 的标记构建物。其中一个中，Rad3 的 N 末端转译入两个 myc 抗原决定簇，而另一个中，以三链的 HA

抗原决定簇标签取代之。在野生型细胞中同时表达两个构建物时，有可能将 HA 标记的 Rad3 与 myc 特异的抗体同时沉淀，及将 myc 标记的 Rad3 与 HA 特异的抗体同时沉淀（未显示数据）。这表明体内 Rad3 蛋白能够自身相连，与 Jimenez 等（ 1992 ）的补充数据完全一致。

尽管 ATR 基因不能与 rad3 突变体的基因型互补，我们通过在同样的酵母细胞中表达 ATR 和 myc - 标记的粟酒裂殖酵母 Rad3 以研究 ATR 与粟酒裂殖酵母 Rad3 形成蛋白复合物的可能性。利用抗 ATR 抗体（它不沉淀粟酒裂殖酵母 Rad3，见材料与方法）我们能够共沉淀酵母蛋白。我们还能用识别粟酒裂殖酵母 Rad3 的 myc 特异抗体沉淀人类 ATR 蛋白（未显示数据）。这些数据表明人和酵母的蛋白可形成异体复合物，后者支持基于序列相似性，这些同源物间相近的功能关系之论点。

Rad3 蛋白具有相关的激酶活性

既然致突变试验表明体内 Rad3 蛋白的激酶活性对其功能似乎是必须的，我们进一步研究了这一活性。用表达 HA 标记的粟酒裂殖酵母 Rad3 的粟酒裂殖酵母 Rad3::ura4 细胞，我们能够检测到显著的蛋白激酶活性，后者仅在 Rad3 被诱导时与 HA 特异的抗体沉淀，而照射后不改变（未显示数据）。这种 Rad3 或共沉淀激酶特异的活性，似乎反映了 rad3 本身的磷酸化，因为磷酸化的大于 200kD 的主要带可用抗 HA 抗体通过 Western 分析检测到（未显示数据）。目前试图体外确认如髓磷脂基蛋白，RP - A 和一些纯化的粟酒裂殖酵母关卡蛋白等方便底物还未成功。用过度表达“激酶缺失”的 Rad3 D2249E 的细胞进行体外 IP 的激酶试验时，被 HA 特异抗体沉淀的相关激酶活性显著降低（未显示数据）。对此有许多可能的解释。测出的激酶活性可直接反映 rad3 活性。在此情况下死性 Rad3 激酶残存活性能反映以下事实，已知在其它蛋白激酶中等价的 D 到 E 的突变可产生有体外残存生化活性的生物学惰性蛋白。另外磷酸化 Rad3 的激酶活性可能取决于相关蛋白，这些蛋白可能与 D2249E 突变蛋白相互作用不太有效。

讨论

DNA 损伤或组成周期的某个事件被干扰后，调控细胞周期进程的关卡通路在维持基因稳定性中具有相当的重要性，可认为是抑制肿瘤发生的途径。许多肿瘤抑制剂基因最初参与了关卡通路分支（ Hartwell 和 Kastan 综述， 1994 ），尤其是 G1 向 S 期的转化，调控细胞周期。两个

关卡酵母模型系统的会聚明显提示参与这些通路的基因是保守的。我们的工作将该保守性扩展至后生动物细胞，阐明了 rad3/ ESR1（ mec1/sad3 ）/ mei - 41 和 ATR 基因间的关系。

本发明证明 rad3 基因的正确序列将其产物跻身于 ATM 蛋白质/脂激酶的家族中。在 S. pombe 中激酶缺陷型 rad3 突变体的过量表达造成占优势的阴性表型，这一事实提示 Rad3 作为其完整性为关卡功能所必需的蛋白质复合物的成员。这与 rad1 rad3， rad9， rad17， rad26 和 hus1 缺失突变体均有不同于 rad3:d 的表型的观察结果相一致（ Sheldrick 和 Carr，1993 ），出乎意料的是，不同于其他关卡 rad 基因，野生型或突变体 rad3 等位基因的高水平过量表达抑制细胞生长，引起有丝分裂在减小的细胞尺寸下发生，表明早熟进入有丝分裂。在无表面标志突变体中未观察到这种“ semi wee ”表型，可能提示在其功能与 Rad3 重叠的第二途径中的干扰并且起到抑制有丝分裂的作用。这一途径中的一个候选者是 ATM/TEL 1 途径，其表明与 ESR1 （ MEC1/SAP1 ）途径具有某些重叠功能（ Morrow 等 1995 ）。

ATM 结构最密切地与 Tellp 相关，后者参予了保持端粒长度（ Greenwell 等， 1995 ）。然而， ATM 功能看来与 Rad3/Esrlp/mei - 41 产物相关。在最初发现 ATM 基因和其序列与 rad3/Esr1 基因和与 TEL1 基因的关系之后，并不清楚基因在酵母中是重复的和多样化的，还是这两种酵母蛋白质局限于密切相关基因的保守的亚群，正如酵母中的许多情形。本工作的有意义的发现是鉴定了一种人基因 ATR ，其与 rad3/ESR1/mei - 41 更密切相关。这一工作定义了在整个真核生物进化中保守的蛋白/脂激酶的两个结构不同的关卡相关亚群。虽然这两个亚群的蛋白质可能具有重叠的功能，它们可能控制不同的进程。例如，在酵母中， rad3 亚群控制所有应答紫外和离子化放射损伤的 G1 和 G2 DNA 损伤关卡，和阻断复制抑制之后有丝分裂的 S 期关卡（ AL - Khodairy 和 Carr， 1992； Allen 等， 1994； Weinert 等， 1994 ）。相反， A - T 细胞对于少数几个 DNA 损伤剂有不正常应答，包括离子化辐射，博莱霉素和 neocarzinostatin，其产生了作为基团攻击的结果的 DNA 链损伤对于紫外线和多数化学致癌剂的应答是正常的，正如对 DNA 合成抑制的应答。很可能一些或所有余留的 DNA 损伤关卡或 S 期关卡为 ATR 所控制。

试验步骤

菌株，质粒及介质

Gutz 等（ 1974 ）描述了对于粟酒裂殖酵母标准的基因技术，生长条件及介质。粟酒裂殖酵母菌株 sp011 （ ura4. D18， leu .32 ade6.704 h ）亦已被描述（ Murray 等 1992 ）。质粒 pSUB41 由 S. Subtamani （ Seaton 等 1992 ）赠送。

粟酒裂殖酵母 rad3 的克隆

从 pSUB41 中切出 4.0kb 的 Kpn1 片段，双向测序得到 5′ rad3 序列。利用从公开的 rad3 序列得到的 1kb 的 3′探针进行克隆杂交将 3′克隆出基因文库（ Barbet 等 1992 ）中确认，并双向测序。通过这种方法，组装起了整个 rad3 基因的序列。

无及“激酶死性” rad3 突变体

用 Barbet 等所述方法（ 1992 ）制备了氨基酸 1477 至 2271 间的 794 个氨基酸（包括激酶区）为 ura4$^+$基因取代的 rad3 的构建物。用其线性片段将 sp011 转化成尿嘧啶原养型，并以 Southern 印迹检查 rad3 位置上的单拷贝整合。为产生这样位点特异的激酶缺失突变，用任一序列

（ A： GTTTTCGCCATGGCGCGCTCCCAAACCCAA，

B： TTCATCAAACAATATCTTTTCGCCATGGCG，或

C： CAAAAAGACAGTTGAATTCGACATGGATAG ）突变 rad3 的 3.01kb BamHI － alI 片段从而将 D2230A,N2235K 或 D2249E 引入激酶区。过去曾将类似的改变用于酿酒菌的 PI3 激酶 VPS34 分析中（ chu 等， 1993 ），再用这些片段转化 rad3 缺失突变体，根据在含 FOA 介质上的生长能力选择基因取代（ Grimm 等 1988 ）。所有菌株以 Southern 印迹检查。 rad3 D2230A，构建物的全长表达在 pREP1 和 pREP41 （ Maundrell， 1990 ）中 ATG 上引入 NdeI 位点和三个内在的 NdeI 位点缺失后通过标准的亚克隆产生。

UV 照射敏感 strip 试验

在 pREP1 （高）和 pREP41 （中等）中的表达由平板接种前硫胺缺乏 18 小时诱导。根据 Stratagene Stratalinker 之方法，以梯度的紫外剂量，从 0 到 300jm^{-2} 自平皿下照射平皿。

ATR 的克隆和表达

为分离用于确认相应于人类 rad3 同系物的 cDNA 的探针，设计针对

Rad3/Esr1p 的氨基酸 LGLGDRH（ 5′寡核苷酸； oDH18 ）及 HVDF[D/N]（ 3′寡核苷酸； oDH - 16 ）的简并寡核苷酸。次黄嘌呤插入在 4 倍简并的位置，引物加以 BamHI （ oDH18 ）和 EcoRI （ oDH16 ）的尾以便于克隆。得自外周血白细胞 cDNA 扩增的约 100kbPCR 产物 DNA 序列分析证明与 MECI/rad3 显著类似。该序列用于合成 PCR 的未简并引物（ oDH - 23； GACGCAGAATTCACCAGTCAAAGAATCAAAGAG ），另一个简并引物针对 Rad3/Esr1p 的氨基酸序列 KFPP[I/V][L/F]Y[Q/E]WF 设计。这一反应的 174bp 产物直接用于筛选巨嗜细胞的 cDNA 文库。分离到了四个阳性克隆（最大的约 3kb ）。

平行的，如果 233bp 的序列中允许单一的移码，用来自人 cDNA 克隆 EMBL 数据的全长粟酒裂殖酵母 rad3 查找数据 HSAAADPDG 作为潜在的 rad3 同源物。此 233bp 的序列包含在一个 1.6kb 的克隆内，该克隆获自 Dr. N. Affara，人类分子遗传研究组，剑桥大学，英国。整个克隆（ 1.6kb ）已被测序并位于通过简并 PCR 和筛选文库获得的 cDNA 克隆内。为鉴别整个基因，对来自胎盘和胸腺 mRNA 的 cDNA 按照 Clontech Marathon 试剂盒的说明书进行 RACE PCR 实验。基因特异引物源自 cDNA 克隆。通过这些实验，具有内部 2644 氨基酸开放读码框架的 8239bp cDNA 序列得以组建， 79bp 5′非编码区， 194bp 3′非编码区和一聚腺苷酸尾。部分序列仅通过 PCR 确认。为避免错误，至少 3 个 PCR 反应来源的克隆进行了双向测序。

除去 6942 位的单个碱基缺失， 233bp 序列对应于序列号 No.1 的 6809 到 7042（ 共 234 核苷酸）核苷酸序列。此序列编码序列号 No.2 的 2244 到 2320 氨基酸。

“1.6kb”插入序列对应于序列号 No.1 的 5725 到 7104（ 1353 核苷酸）苷酸，并编码序列号 No.2 的 1892 到 2340 氨基酸。

Northern 印迹杂交：一个 1.3kb 的 PCR 产物用引物 279 - 3（ TGGATGATGACAGCTGTGTC ）和 279 - 6（ TGTAGTCGCTGCTCAATGTC ）在 ^{32}P - dCTP 存在时被扩增。用探针杂交含有 2μg 不同人类组织来源片段聚 A+RNA （ Clontech 实验室）的尼龙膜，除最终清洗时为最小化与相关序列的杂交交连采用 55 ℃而非 50 ℃外均按生产者推荐实施。

ATR 定位

通过荧光原位杂位和基于聚合酶链式反应（ PCR ）测试的组合将 ATR 基因定于染色体 3 上。使用 cDNA FISH 分析将 ATR 基因定位于染色体 3，大约 q22 - 23 位置。PCR 分析亦将 ATR 定位于染色体 3。能够扩增 ATR 基因的 257bp 片段的两个引物（ oATR23 : GACGCAGAATTCACCAGTCAAAGAATCAAAGAG 和 oATR26 : TGGTTTCTGAGAACATTCCCTGA ）被用于衍生自可从 NIGMS 人类遗传突变体细胞保藏中心得到的、含有不同人类染色体组的人/啮齿类杂种体细胞。用同样引物进行的 PCR 被用于将 ATR 亚定位于染色体 3 上具体的区域。用于这些扩增的模板由来自具有沿染色体 3 截断的病人的 DNA 样品组成。（ Leach 等， 1994 ）。

用 Rad3 进行免疫沉淀和激酶测试

S. pombe rad3 和人 ATR 基因被克隆到 pREP41 表达载体以用于互补作用实验。为了标记蛋白质，这些含有阅读框内 N 末端标记序列的这些载体的版本，无论是双重 mgc 或三重 HA 标记均被采用（ Griffiths 等 1995 ）。标记的蛋白通过在不含硫胺素的培养基中生长而表达（ Maundrell， 1990 ）酵母细胞在溶胞缓冲液（ 25mM Tris. Cl pH 7.5， 60mM B - 磷酸甘油酯， 0.1mM Na_3VO_4， 1%Triton X - 100， 50mM NaCl， 2mM EDTA， 50mM NaF， 1mM 苯甲磺酰氟〔 PMSF 〕， 5μg/ml leupeptin， 5μg/ml aprotinin， 1mM DTT ）中溶胞，其步骤是加入玻璃珠后在破膜仪处理 2 分钟。为进行 IP， 300μg 总蛋白提取物与适量抗体冰浴 30 分钟，通过与蛋白 G 玻璃珠混合，于 4 ℃保温 30 分钟，沉淀免疫复合物。为进行激酶试验，将免疫复合物用溶胞缓冲液洗涤 4 次，用激酶缓冲液（ 25mM Hepes pH 7.7； 50mM KCl； 10mM $MgCl_2$； 0.1 % NP - 40； 2 % 甘油； 1mM DTT ），并在激酶缓冲液中与 10μM ATP〔 50Ci/mmol 〕于 30 ℃温孵 15 分钟。在用 6 % 聚丙烯酰胺凝胶分离之前，用 20μl 2X SDS 样品缓冲液中止反应。 Rad3 IP 含有几种磷酸化产物，包括一种在 Western 分析中与 Rad3 共迁移的产物。

参考文献

Al - Khodairy, F,. 和 Carr, A. M.（ 1992 ），粟酒裂殖酵母中限定 G2 关卡途径的 DNA 修复突变体。 EMBO 杂志 11, 1343 - 1350 。

Al - Khodairy, F,. Fotou, E., Sheldrick, K. S., Griffiths, D. J.

F., Lehmann, A. R. 和 Carr, A. M.（1994），分裂酵母中参与关卡及反馈调控的新元件的识别和确认。分子生物学细胞 5, 147 - 160。

Allen, J. B.，Zhou, Z., Siede, W., Friedberg, E. C. 和 Elledge, S. J.（1994）SAD1/RAD53 蛋白激酶调控多个关卡及酵母中 DNA 损伤诱导的转录。基因学方法 8，2416 - 2428。

Barbet, N. C., Muriel, W. J., 和 Carr, A. M.（1992）用于粟酒裂殖酵母基因的通用的穿梭载体及基因组文库。基因 114, 59 - 66。

Beamish, H. 和 Lavin, M. F.（1994）共济失调 - 毛细管扩张中的放射敏感性：射线诱导的细胞周期延迟中的异常点。国际放射生物学杂志 65，175 - 184。

Carr, A. M. 和 Hoeksura, M. F.（1995），DNA 损伤的细胞反应。细胞生物学趋势 5，32 - 40。

Chien 等（1991）美国国家科学院院刊 88，9578 - 9582。

Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. 和 Leder, P. J.（1995）缺乏 $p21^{CIP1/WAF1}$ 的鼠正常发展，但缺乏 G1 关卡调控细胞（印刷中）。

Drwinga, H. L., Tojia, L. H., Kim, C. H., Greene, A. E., 和 Mulovor, R. A.（1993）。NIGMS 人/啮齿动物体细胞杂交制图组 1 及 2。基因学 16：311 - 314。

El - Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parson, R., Trent, J. M., Lin. D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. 和 Vogelstein, B.（1993）WFE1，p53 肿瘤抑制作用的潜在媒介。细胞 75，817 - 825。

Enoch, T., Carr, A. M. 和 Nurse, P.（1992），参与偶联有丝分裂与 DNA 复制完成的分裂酵母基因。基因学方法 6，2035 - 2046。

Greenwell, P. W., Kronmal, S. L., Porter, S. E., Gassenhuber, J., Obermaier, B. 和 Petes, T. D.（1995）TEL1，参与调控酿酒酵母端粒长度的一个基因，与人 ATM 基因同源。细胞（已接受）。

Grimm, C., Kholi, J. Murray, J. M. 和 Maundrell, K.（1988）粟酒裂殖酵母的基因工程：以 ura4 基因作为可选择性标记物进行基因破坏和取代的系统。分子基因遗传学 215，81 - 86。

Gutz, H., Heslot, H. Leupold, U. 和 Loprieno, N.

（1974）。基因学手册，King，R. C.，编，Plenum 出版社，纽约，Vol. 1, 395 - 446。

Hari，K. L.，Santerre，A.，Sekelsky，J. J., McKim，K. S., Boyd, J. B. 和 Hawley，R. S.（1995）黑腹果蝇的 mei - 41 基因与人类共济失调 - 毛细血管扩张功能上同源。

Harper，J. W., Adami，G., Wei，N., Keyomarsi, K. 和 Elledge，S. J.（1993）与 Cip1 蛋白相互作用的 21KD 的 Cdk 是 G1 细胞素依赖的激酶的潜在抑制剂。细胞 75，805 - 816。

Hartwell，L. H.，和 Kastan，M. B.（1994）。细胞周期调控与肿瘤。科学 266，1821 - 1828。

Hiles，I. D.，Otsu，M.，Volinia，S.，Fry，M. J.，Gout，L.，Dhand，R.，Panayotou，G.，Ruiz - Larrea，F.，Thompson，A.，Totty，N. F.，Hsuan，J. J.，Courtneidge，S. A.，Parker，P. J. 和 Waterfield M. D.（1992）磷脂酰肌醇 3 - 激酶：结构及 110 Kd 催化亚单位的表达。细胞 70，419 - 429。

Jimenez，G.，Yucel，J.，Rowley，R. 和 Subramani S.（1992）rad3+基因参与多个关卡的功能及 DNA 修复。美国国家科学院院刊 87，4952 - 4956。

Kato，R. 和 Ogawa，H.（1994）ESR1，一种必需基因，有丝分裂细胞生长，DNA 修复及减数重组所必需。核酸研究 22，3104 - 3112。

Lamb，J. R.，Petit - Frere，C.，Broughton，B. C.，Lehmann，A. R. 和 Green，M. H. L.（1989）离子射线对 DNA 复制的抑制由一反向作用因素介导。国际放射生物学杂志 56，125 - 130。

Leach，R. J.，Chinn，R.，Reus，B. E.，Hayes，S.，Schantz, L.，Dubois，B.，Overhauser，J.，Ballabio，A.，Drabkin，H.，Lewis，B. T.，Mendgen，G.，和 Naylor，S. L.（1994）188 序列标记位点在人类染色体 3 的体细胞杂交制图簿上的区域定位。基因学 24，549 - 556。

Maundrell，K.（1990）。分裂酵母的 nmt1，一高度转录基因被硫胺完全抑制。生物化学杂志 265，10857 - 10864。

Morrow，D. M.，Tagle，D. A.，Shiloh，Y.，Collins F. S. 和

Hieter, P. （1995）HAT1/TEL1，一酿酒酵母的人类突变基因同源物，功能上与酵母关卡基因 MEC1/ESR1 相关。细胞（已接受）。

Murray, J. M., Doe, C. Schenk, P. Carr, A. M., Lehmann. A. R. 和 Watts, F. Z. （1992）粟酒裂殖酵母 rad15 基因的克隆和确认。酿酒酵母 RAD3 和人 ERCC2 基因的一个同源物。核酸研究 20， 2673 - 2678。

Nasim, A. 和 Smith, B. P.（1975） 粟酒裂殖酵母中射线敏感性的基因调控。基因学 79， 573 - 582。

Painter, R. B.和 Young, B. R. （1980）共济失调 - 毛细血管扩张症中的放射敏感性：一种新解释。美国国家科学院院刊 77， 7315 - 7317。

Rowley, R., Subramani, S. 和 Young, P. G.（1992）。rad1，粟酒裂殖酵母中的关卡调控。EMBO 杂志 11， 1335 - 1342。

Savitsky, K., Bar - Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv. Y., Vanagaite L., Tagle, D. A., Smith, S., Uziel, T., Sfez. S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S. R., Simmons, A., Clines, G. A., Sartiel, A., Gatti. R. A., Chessa, L., Sanal, O., Lavine, M. F., Jaspers, N. G. J. Taylor, M. R., Arlett, C. F., Miki, T., Weissman, S. M., Lovett, M., Collins, F. S. 和 Shiloh, Y.（1995）。具有与 PI - 3 激酶相似产物的单个共济失调 - 毛细血管扩张症基因。科学 286， 1749 - 1753。

Seaton, B. L., Yucel, J., Sunnerhagen P. 和 Subramani, S.（1992）。参与 DNA 损伤和 DNA 合成关卡的粟酒裂殖酵母 rad3 基因的分离和确认。基因 119， 83 - 89。

Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H.. Waterfield, M. D. 和 Emr, S. D.（1993）蛋白分类所必需的由酵母 VPS34 基因编码的磷脂酰肌醇 3 - 激酶。科学 260， 88 - 91。

Sheldrick, K. S. 和 Carr, A. M.（1993）。反馈调控和 G2 关卡分裂酵母作为模型系统。生物试验 15， 775 - 782。

Walworth, N., Davey, S. 和 Beach, D.（1993）。分裂酵母 chk1 激酶将 rad 关卡途径与 cdc2 相连。自然 363， 368 - 371。

Weinert, T. A., 和 Hatwell, L. H. （1988）。RAD 组基因调控酿酒酵母中细胞周期对 DNA 损伤的应答。科学 241，317 - 322。

Weinert, T. A., Kiser, G. L. Harwell, L. H. （1994）。芽生酵母中有丝分裂关卡基因及有丝分裂对 DNA 复制和修复的依赖。基因学方法 8，652 - 665。

序列

序列号 1： ATR 序列

```
   1 GCGCTCTTCCGGCAGCGGTACGTTTGGAGACGCCGGGAACCCGCGTTGGCGTGGTTGACTAGTGCCTCGCAGCCT  75
  76 CAGCATGGGGGAACATGGCCTGGAGCTGGCTTCCATGATCCCCGCCCTGCGGGAGCTGGGCAGTGCCACACCAGA 150
 151 GGAATATAATACAGTTGTACAGAAGCCAAGACAAATTCTGTGTCAATTCATTGACCGGATACTTACAGATGTAAA 225
 226 TGTTGTTGCTGTAGAACTTGTAAAGAAAACTGACTCTCAGCCAACCTCCGTGATGTTGCTTGATTTCATCCAGCA 300
 301 TATCATGAAATCCTCCCCACTTATGTTTGTAAATGTGAGTGGAAGCCATGAGCGCAAAGGCAGTTGTATTGAATT 375
 376 CAGTAATTGGATCATAACGAGACTTCTGCGGATTGCAGCAACTCCCTCCTGTCATTTGTTACACAAGAAAATCTG 450
 451 TGAAGTCATCTGTTCATTATTATTTCTTTTTAAAAGCAAGAGTCCTGCTATTTTTGGGGTACTCACAAAAGAATT 525
 526 ATTACAACTTTTTGAAGACTTGGTTTACCTCCATAGAAGAAATGTGATGGGTCATGCTGTGGAATGGCCAGTGGT 600
 601 CATGAGCCGATTTTTAAGTCAATTAGATGAACACATGGGATATTTACAATCAGCTCCTTTGCAGTTGATGAGTAT 675
 676 GCAAAATTTAGAATTTATTGAAGTCACTTTATTAATGGTTCTTACTCGTATTATTGCAATTGTGTTTTTTAGAAG 750
 751 GCAAGAACTCTTACTTTGGCAGATAGGTTGTGTTCTGCTAGAGTATGGTAGTCCAAAAATTAAATCCCTAGCAAT 825
 826 TAGCTTTTTAACAGAACTTTTTCAGCTTGGAGGACTACCAGCACAACCAGCTAGCACTTTTTTCAGCTCATTTTT 900
 901 GGAATTATTAAAACACCTTGTAGAAATGGATACTGACCAATTGAAACTCTATGAAGAGCCATTATCAAAGCTGAT 975
 976 AAAGACACTATTTCCCTTTGAAGCAGAAGCTTATAGAAATATTGAACCTGTCTATTTAAATATGCTGCTGGAAAA 1050
1051 ACTCTGTGTCATGTTTGAAGACGGTGTGCTCATGCGGCTTAAGTCTGATTTGCTAAAAGCAGCTTTGTGCCATTT 1125
1126 ACTGCAGTATTTCCTTAAATTTGTGCCAGCTGGGTATGAATCTGCTTTACAAGTCAGGAAGGTCTATGTGAGAAA 1200
1201 TATTTGTAAAGCTCTTTTGGATGTGCTTGGAATTGAGGTAGATGCAGAGTACTTGTTGGGCCCACTTTATGCAGC 1275
1276 TTTGAAAATGGAAAGTATGGAAATCATTGAGGAGATTCAATGCCAAACTCAACAGGAAAACCTCAGCAGTAATAG 1350
1351 TGATGGAATATCACCCAAAAGGCGTCGTCTCAGCTCGTCTCTAAACCCTTCTAAAAGAGCACCAAAACAGACTGA 1425
1426 GGAAATTAAACATGTGGACATGAACCAAAAGAGCATATTATGGAGTGCACTGAAACAGAAAGCTGAATCCCTTCA 1500
1501 GATTTCCCTTGAATACAGTGGCCTAAAGAATCCTGTTATTGAGATGTTAGAAGGAATTGCTGTTGTCTTACAACT 1575
1576 GACTGCTCTGTGTACTGTTCATTGTTCTCATCAAAACATGAACTGCCGTACTTTCAAGGACTGTCAACATAAATC 1650
1651 CAAGAAGAAACCTTCTGTAGTGATAACTTGGATGTCATTGGATTTTTACACAAAAGTGCTTAAGAGCTGTAGAAG 1725
1726 TTTGTTAGAATCTGTTCAGAAACTGGACCTGGAGGCAACCATTGATAAGGTGGTGAAAATTTATGATGCTTTGAT 1800
1801 TTATATGCAAGTAAACAGTTCATTTGAAGATCATATCCTGGAAGATTTATGTGGTATGCTCTCACTTCCATGGAT 1875
1876 TTATTCCCATTCTGATGATGGCTGTTTAAAGTTGACCACATTTGCCGCTAATCTTCTAACATTAAGCTGTAGGAT 1950
1951 TTCAGATAGCTATTCACCACAGGCACAATCACGATGTGTGTTTCTTCTGACTCTGTTTCCAAGAAGAATATTCCT 2025
2026 TGAGTGGAGAACAGCAGTTTACAACTGGGCCCTGCAGAGCTCCCATGAAGTAATCCGGGCTAGTTGTGTTAGTGG 2100
2101 ATTTTTTATCTTATTGCAGCAGCAGAATTCTTGTAACAGAGTTCCCAAGATTCTTATAGATAAAGTCAAAGATGA 2175
2176 TTCTGACATTGTCAAGAAAGAATTTGCTTCTATACTTGGTCAACTTGTCTGTACTCTTCACGGCATGTTTTATCT 2250
2251 GACAAGTTCTTTAACAGAACCTTTCTCTGAACACGGACATGTGGACCTCTTCTGTAGGAACTTGAAAGCCACTTC 2325
2326 TCAACATGAATGTTCATCTTCTCAACTAAAAGCTTCTGTCTGCAAGCCATTCCTTTTCCTACTGAAAAAAAAAAT 2400
2401 ACCTAGTCCAGTAAAACTTGCTTTCATAGATAATCTACATCATCTTTGTAAGCATCTTGATTTTAGAGAAGATGA 2475
2476 AACAGATGTAAAAGCAGTTCTTGGAACTTTATTAAATTTAATGGAAGATCCAGACAAAGATGTTAGAGTGGCTTT 2550
2551 TAGTGGAAATATCAAGCACATATTGGAATCCTTGGACTCTGAAGATGGATTTATAAAGGAGCTTTTTGTCTTAAG 2625
2626 AATGAAGGAAGCATATACACATGCCCAAATATCAAGAAATAATGAGCTGAAGGATACCTTGATTCTTACAACAGG 2700
2701 GGATATTGGAAGGGCCGCAAAAGGAGATTTGGTACCATTTGCACTCTTACACTTATTGCATTGTTTGTTATCCAA 2775
2776 GTCAGCATCTGTCTCTGGAGCAGCATACACAGAAATTAGAGCTCTGGTTGCAGCTAAAAGTGTTAAACTGCAAAG 2850
2851 TTTTTTCAGCCAGTATAAGAAACCCATCTGTCAGTTTTTGGTAGAATCCCTTCACTCTAGTCAGATGACAGCACT 2925
2926 TCCGAATACTCCATGCCAGAATGCTGACGTGCGAAAACAAGATGTGGCTCACCAGAGAGAAATGGCTTTAAATAC 3000
3001 GTTGTCTGAAATTGCCAACGTTTTCGACTTTCCTGATCTTAATCGTTTTCTTACTAGGACATTACAAGTTCTACT 3075
```

3076 ACCTGATCTTGCTGCCAAAGCAAGCCCTGCAGCTTCTGCTCTCATTCGAACTTTAGGAAAACAATTAAATGTCAA 3150
3151 TCGTAGAGAGATTTTAATAAACAACTTCAAATATATTTTTTCTCATTTGGTCTGTTCTTGTTCCAAAGATGAATT 3225
3226 AGAACGTGCCCTTCATTATCTGAAGAATGAAACAGAAATTGAACTGGGGAGCCTGTTGAGACAAGATTTCCAAGG 3300
3301 ATTGCATAATGAATTATTGCTGCGTATTGGAGAACACTATCAACAGGTTTTTAATGGTTTGTCAATACTTGCCTC 3375
3376 ATTTGCATCCAGTGATGATCCATATCAGGGCCCGAGAGATATCATATCACCTGAACTGATGGCTGATTATTTACA 3450
3451 ACCCAAATTGTTGGGCATTTTGGCTTTTTTTAACATGCAGTTACTGAGCTCTAGTGTTGGCATTGAAGATAAGAA 3525
3526 AATGGCCTTGAACAGTTTGATGTCTTTGATGAAGTTAATGGGACCCAAACATGTCAGTTCTGTGAGGGTGAAGAT 3600
3601 GATGACCACACTGAGAACTGGCCTTCGATTCAAGGATGATTTTCCTGAATTGTGTTGCAGAGCTTGGGACTGCTT 3675
3676 TGTTCGCTGCCTGGATCATGCTTGTCTGGGCTCCCTTCTCAGTCATGTAATAGTAGCTTTGTTACCTCTTATACA 3750
3751 CATCCAGCCTAAAGAAACTGCAGCTATCTTCCACTACCTCATAATTGAAAACAGGGATGCTGTGCAAGATTTTCT 3825
3826 TCATGAAATATATTTTTTACCTGATCATCCAGAATTAAAAAAGATAAAAGCCGTTCTCCAGGAATACAGAAAGGA 3900
3901 GACCTCTGAGAGCACTGATCTTCAGACAACTCTTCAGCTCTCTATGAAGGCCATTCAACATGAAAATGTCGATGT 3975
3976 TCGTATTCATGCTCTTACAAGCTTGAAGGAAACCTTGTATAAAAATCAGGAAAAACTGATAAAGTATGCAACAGA 4050
4051 CAGTGAAACAGTAGAACCTATTATCTCACAGTTGGTGACAGTGCTTTTGAAAGGTTGCCAAGATGCAAACTCTCA 4125
4126 AGCTCGGTTGCTCTGTGGGGAATGTTTAGGGGAATTGGGGGCGATAGATCCAGGTCGATTAGATTTCTCAACAAC 4200
4201 TGAAACTCAAGGAAAAGATTTTACATTTGTGACTGGAGTAGAAGATTCAAGCTTTGCCTATGGATTATTGATGGA 4275
4276 GCTAACAAGAGCTTACCTTGCGTATGCTGATAATAGCCGAGCTCAAGATTCAGCTGCCTATGCCATTCAGGAGTT 4350
4351 GCTTTCTATTTATGACTGTAGAGAGATGGAGACCAACGGCCCAGGTCACCAATTGTGGAGGAGATTTCCTGAGCA 4425
4426 TGTTCGGGAAATACTAGAACCTCATCTAAATACCAGATACAAGAGTTCTCAGAAGTCAACCGATTGGTCTGGAGT 4500
4501 AAAGAAGCCAATTTACTTAAGTAAATTGGGTAGTAACTTTGCAGAATGGTCAGCATCTTGGGCAGGTTATCTTAT 4575
4576 TACAAAGGTTCGACATGATCTTGCCAGTAAAATTTTCACCTGCTGTAGCATTATGATGAAGCATGATTTCAAAGT 4650
4651 GACCATCTATCTTCTTCCACATATTCTGGTGTATGTCTTACTGGGTTGTAATCAAGAAGATCAGCAGGAGGTTTA 4725
4726 TGCAGAAATTATGGCAGTTCTAAAGCATGACGATCAGCATACCATAAATACCCAAGACATTGCATCTGATCTGTG 4800
4801 TCAACTCAGTACACAGACTGTGTTCTCCATGCTTGACCATCTCACACAGTGGGCAAGGCACAAATTTCAGGCACT 4875
4876 GAAAGCTGAGAAATGTCCACACAGCAAATCAAACAGAAATAAGGTAGACTCAATGGTATCTACTGTGGATTATGA 4950
4951 AGACTATCAGAGTGTAACCCGTTTTCTAGACCTCATACCCCAGGATACTCTGGCAGTAGCTTCCTTTCGCTCCAA 5025
5026 AGCATACACACGAGCTGTAATGCACTTTGAATCATTTATTACAGAAAAGAAGCAAAATATTCAGGAACATCTTGG 5100
5101 ATTTTTACAGAAATTGTATGCTGCTATGCATGAACCTGATGGAGTGGCCGGAGTCAGTGCAATTAGAAAGGCAGA 5175
5176 ACCATCTCTAAAAGAACAGATCCTTGAACATGAAAGCCTTGGCTTGCTGAGGATGCCACTGCTTGTTATGACAG 5250
5251 GGCTATTCAGCTAGAACCAGACCAGATCATTCATTATCATGGTGTAGTAAAGTCCATGTTAGGTCTTGGTCAGCT 5325
5326 GTCTACTGTTATCACTCAGGTGAATGGAGTGCATGCTAACAGGTCCGAGTGGACAGATGAATTAAACACGTACAG 5400
5401 AGTGGAAGCAGCTTGGAAATTGTCACAGTGGGATTTGGTGGAAAACTATTTGGCAGCAGATGGAAAATCTACAAC 5475
5476 ATGGAGTGTCAGACTGGGACAGCTATTATTATCAGCCAAAAAAAGAGATATCACAGCTTTTTATGACTCACTGAA 5550
5551 ACTAGTGAGAGCAGAACAAATTGTACCTCTTTCAGCTGCAAGCTTTGAAAGAGGCTCCTACCAACGAGGATATGA 5625
5626 ATATATTGTGAGATTGCACATGTTATGTGAGTTGGAGCATAGCATCAAACCACTTTTCCAGCATTCTCCAGGTGA 5700
5701 CAGTTCTCAAGAAGATTCTCTAAACTGGGTAGCTCGACTAGAAATGACCCAGAATTCCTACAGAGCCAAGGAGCC 5775
5776 TATCCTGGCTCTCCGGAGGGCTTTACTAAGCCTCAACAAAAGACCAGATTACAATGAAATGGTTGGAGAATGCTG 5850
5851 GCTGCAGAGTGCCAGGGTAGCTAGAAAGGCTGGTCACCACCAGACAGCCTACAATGCTCTCCTTAATGCAGGGGA 5925
5926 ATCACGACTCGCTGAACTGTACGTGGAAAGGGCAAAGTGGCTCTGGTCCAAGGGTGATGTTCACCAGGCACTAAT 6000
6001 TGTTCTTCAAAAAGGTGTTGAATTATGTTTTCCTGAAAATGAAACCCCACCTGAGGGTAAGAACATGTTAATCCA 6075
6076 TGGTCGAGCTATGCTACTAGTGGGCCGATTTATGGAAGAAACAGCTAACTTTGAAAGCAATGCAATTATGAAAAA 6150
6151 ATATAAGGATGTGACCGCGTGCCTGCCAGAATGGGAGGATGGGCATTTTTACCTTGCCAAGTACTATGACAAATT 6225
6226 GATGCCCATGGTCACAGACAACAAAATGGAAAAGCAAGGTGATCTCATCCGGTATATAGTTCTTCATTTTGGCAG 6300
6301 ATCTCTACAATATGGAAATCAGTTCATATATCAGTCAATGCCACGAATGTTAACTCTATGGCTTGATTATGGTAC 6375
6376 AAAGGCATATGAATGGGAAAAAGCTGGCCGCTCCGATCGTGTACAAATGAGGAATGATTTGGGTAAAATAAACAA 6450
6451 GGTTATCACAGAGCATACAAACTATTTAGCTCCATATCAATTTTTGACTGCTTTTTCACAATTGATCTCTCGAAT 6525
6526 TTGTCATTCTCACGATGAAGTTTTTGTTGTCTTGATGGAAATAATAGCCAAAGTATTTCTAGCCTATCCTCAACA 6600

```
6601 AGCAATGTGGATGATGACAGCTGTGTCAAAGTCATCTTATCCCATGCGTGTGAACAGATGCAAGGAAATCCTCAA 6675
6676 TAAAGCTATTCATATGAAAAAATCCTTAGAGAAGTTTGTTGGAGATGCAACTCGCCTAACAGATAAGCTTCTAGA 6750
6751 ATTGTGCAATAAACCGGTTGATGGAAGTAGTTCCACATTAAGCATGAGCACTCATTTTAAAATGCTTAAAAAGCT 6825
6826 GGTAGAAGAAGCAACATTTAGTGAAATCCTCATTCCTCTACAATCAGTCATGATACCTACACTTCCATCAATTCT 6900
6901 GGGTACCCATGCTAACCATGCTAGCCATGAACCATTTCCTGGACATTGGGCCTATATTGCAGGGTTTGATGATAT 6975
6976 GGTGGAAATTCTTGCTTCTCTTCAGAAACCAAAGAAGATTTCTTTAAAAGGCTCAGATGGAAAGTTCTACATCAT 7050
7051 GATGTGTAAGCCAAAAGATGACCTGAGAAAGGATTGTAGACTAATGGAATTCAATTCCTTGATTAATAAGTGCTT 7125
7126 AAGAAAAGATGCAGAGTCTCGTAGAAGAGAACTTCATATTCGAACATATGCAGTTATTCCACTAAATGATGAATG 7200
7201 TGGGATTATTGAATGGGTGAACAACACTGCTGGTTTGAGACCTATTCTGACCAAACTATATAAAGAAAAGGGAGT 7275
7276 GTATATGACAGGAAAAGAACTTCGCCAGTGTATGCTACCAAAGTCAGCAGCTTTATCTGAAAAACTCAAAGTATT 7350
7351 CCGAGAATTTCTCCTGCCCAGGCATCCTCCTATTTTTCATGAGTGGTTTCTGAGAACATTCCCTGATCCTACATC 7425
7426 ATGGTACAGTAGTAGATCAGCTTACTGCCGTTCCACTGCAGTAATGTCAATGGTTGGTTATATTCTGGGGCTTGG 7500
7501 AGACCGTCATGGTGAAAATATTCTCTTTGATTCTTTGACTGGTGAATGCGTACATGTAGATTTCAATTGTCTTTT 7575
7576 CAATAAGGGAGAAACCTTTGAAGTTCCAGAAATTGTGCCATTTCGCCTGACTCATAATATGGTTAATGGAATGGG 7650
7651 TCCTATGGGAACAGAGGGTCTTTTTCGAAGAGCATGTGAAGTTACAATGAGGCTGATGCGTGATCAGCGAGAGCC 7725
7726 TTTAATGAGTGTCTTAAAGACTTTTCTACATGATCCTCTTGTGGAATGGAGTAAACCAGTGAAAGGGCATTCCAA 7800
7801 AGCGCCACTGAATGAAACTGGAGAAGTTGTCAATGAAAAGGCCAAGACCCATGTTCTTGACATTGAGCAGCGACT 7875
7876 ACAAGGTGTAATCAAGACTCGAAATAGAGTGACAGGACTGCCGTTATCTATTGAAGGACATGTGCATTACCTTAT 7950
7951 ACAAGAAGCTACTGATGAAAACTTACTATGCCAGATGTATCTTGGTTGGACTCCATATATGTGAAATGAAATTAT 8025
8026 GTAAAAGAATATGTTAATAATCTAAAAGTAATGCATTTGGTATGAATCTGTGGTTGTATCTGTTCAATTCTAAAG 8100
8101 TACAACATAAATTTACGTTCTCAGCAACTGTTATTTCTCTCTGATCATTAATTATATGTAAAATAATATACATTC 8175
8176 AGTTATTAAGAAATAAACTGCTTTCTTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 8239
```

序列号 2： ATR 蛋白

```
   1 MGEHGLELASMIPALRELGSATPEEYNTVVQKPRQILCQFIDRILTDVNVVAVELVKKTDSQPTSV   66
  67 MLLDFIQHIMKSSPLMFVNVSGSHERKGSCIEFSNWIITRLLRIAATPSCHLLHKKICEVICSLLFLFKSKSPAI 141
 142 FGVLTKELLQLFEDLVYLHRRNVMGHAVEWPVVMSRFLSQLDEHMGYLQSAPLQLMSMQNLEFIEVTLLMVLTRI 216
 217 IAIVFFRRQELLLWQIGCVLLEYGSPKIKSLAISFLTELFQLGGLPAQPASTFFSSFLELLKHLVEMDTDQLKLY 291
 292 EEPLSKLIKTLFPFEAEAYRNIEPVYLNMLLEKLCVMFEDGVLMRLKSDLLKAALCHLLQYFLKFVPAGYESALQ 366
 367 VRKVYVRNICKALLDVLGIEVDAEYLLGPLYAALKMESMEIIEEIQCQTQQENLSSNSDGISPKRRRLSSSLNPS 441
 442 KRAPKQTEEIKHVDMNQKSILWSALKQKAESLQISLEYSGLKNPVIENLEGIAVVLQLTALCTVHCSHQNMNCRT 516
 517 FKDCQHKSKKKPSVVITWMSLDFYTKVLKSCRSLLESVQKLDLEATIDKVVKIYDALIYMQVNSSFEDHILEDLC 591
 592 GMLSLPWIYSHSDDGCLKLTTFAANLLTLSCRISDSYSPQAQSRCVFLLTLFPRRIFLEWRTAVYNWALQSSHEV 666
 667 IRASCVSGFFILLQQQNSCNRVPKILIDKVKDDSDIVKKEFASILGQLVCTLHGMFYLTSSLTEPFSEHGHVDLF 741
 742 CRNLKATSQHECSSSQLKASVCKPFLFLLKKKIPSPVKLAFIDNLHHLCKHLDFREDETDVKAVLGTLLNLMEDP 816
 817 QKDVRVAFSGNIKHILESLDSEDGFIKELFVLRMKEAYTHAQISRNNELKDTLILTTGDIGRAAKGDLVPFALLH 891
 892 LLHCLLSKSASVSGAAYTEIRALVAAKSVKLQSFFSQYKKPICQFLVESLHSSQMTALPNTPCQNADVRKQDVAH 966
 967 QREMALNTLSEIANVFDFPDLNRFLTRTLQVLLPDLAAKASPAASALIRTLGKQLNVNRREILINNFKYIFSHLV 1041
1042 CSCSKDELERALHYLKNETEIELGSLLRQDFQGLHNELLLRIGEHYQQVFNGLSILASRASSDDPYQGPRDIISP 1116
1117 ELMADYLQPKLLGILAFFNMQLLSSSVGIEDKKMALNSLMSLMKLMGPKHVSSVRVKMMTTLRTGLRFKDDFPEL 1191
1192 CCRAWDCFVRCLDHACLGSLLSHVIVALLPLIHIQPKETAAIFHYLIIENRDAVQDFLHEIYFLPDHPELKKIKA 1266
1267 VLQEYRKETSESTDLQTTLQLSMKAIQHENVDVRIHALTSLKETLYKNQEKLIKYATDSETVEPIISQLVTVLLK 1341
1342 GCQDANSQARLLCGECLGELGAIDPGRLDFSTTETQGKDFTFVTGVEDSSFAYGLLMELTRAYLAYADNSRAQDS 1416
1417 AAYAIQELLSIYDCREMETNGPGHQLWRRFPEHVREILEPHLNTRYKSSQKSTDWSGVKKPIYLSKLGSNFAEWS 1491
1492 ASWAGYLITKVRHDLASKIFTCCSIMMKHDFKVTIYLLPHILVYVLLGCNQEDQQEVYAEIMAVLKHDDQHTINT 1566
1567 QDIASDLCQLSTQTVFSMLDHLTQWARHKFQALKAEKCPHSKSNRNKVDSMVSTVDYEDYQSVTRFLDLIPQDTL 1641
```

1642 AVASFRSKAYTRAVMHFESFITEKKQNIQEHLGFLQKLYAAMHEPDGVAGVSAIRKAEPSLKEQILEHESLGLLR 1716
1717 DATACYDRAIQLEPDQIIHYHGVVKSMLGLGQLSTVITQVNGVHANRSEWTDELNTYRVEAAWKLSQWDLVENYL 1791
1792 AADGKSTTWSVRLGQLLLSAKKRDITAFYDSLKLVRAEQIVPLSAASFERGSYQRGYEYIVRLHMLCELEHSIKP 1866
1867 LFQHSPGDSSQEDSLNWVARLEMTQNSYRAKEPILALRRALLSLNKRPDYNEMVGECWLQSARVARKAGHHQTAY 1941
1942 NALLNAGESRLAELYVERAKWLWSKGDVHQALIVLQKGVELCFPENETPPEGKNMLIHGRAMLLVGRFMEETANF 1016
2017 ESNAIMKKYKDVTACLPEWEDGHFYLAKYYDKLMPMVTDNKMEKQGDLIRYIVLHFGRSLQYGNQFIYQSMPRML 2091
2092 TLWLDYGTKAYEWEKAGRSDRVQMRNDLGKINKVITEHTNYLAPYQFLTAFSQLISRICHSHDEVFVVLMEIIAK 2166
2167 VFLAYPQQAMWMMTAVSKSSYPMRVNRCKEILNKAIHMKKSLEKFVGDATRLTDKLLELCNKPVDGSSSTLSMST 2241
2242 HFKMLKKLVEEATFSEILIPLQSVMIPTLPSILGTHANHASHEPFPGHWAYIAGFDDMVEILASLQKPKKISLKG 2316
2317 SDGKFYIMMCKPKDDLRKDCRLMEFNSLINKCLRKDAESRRRELHIRTYAVIPLNDECGIIEWVNNTAGLRPILT 2391
2392 KLYKEKGVYMTGKELRQCMLPKSAALSEKLKVFREFLLPRHPPIFHEWFLRTFPDPTSWYSSRSAYCRSTAVMSM 2466
2467 VGYILGLGDRHGENILFDSLTGECVHVDFNCLFNKGETFEVPEIVPFRLTHNMVNGMGPMGTEGLFRRACEVTMR 2541
2542 LMRDQREPLMSVLKTFLHDPLVEWSKPVKGHSKAPLNETGEVVNEKAKTHVLDIEQRLQGVIKTRNRVTGLPLSI 2616
2617 EGHVHYLIQEATDENLLCQMYLGWTPYM 2664

序列号 3： rad3 序列

1 GGTACCAAGTAAAAACTGCTTAGTAAGTATAAAACACAGAAGAATCCGCGATCTAGTGAACCAATGCCCTGCGTA 75
76 TGACGCTCCACTGACGCTATAGTCAATGAGAACTAGGATGTGCGATTATAACTTATCTTTTCAATATTTTCTTAT 150
151 TATTTATTTAAGAAATAATTGAATTAAAACTCATTTCTTCTTTTATTAGCCGTAAAATAGCTTATTTTCTCTCCT 225
226 ACTACCTTTCAACAATAACTTTTTTTTTTGTTTATTGACCATTATAATCACATCAAAAGTCAAAAAATTCAATCA 300
301 TTATCAGAAACATCCAGCCTAATATTACTTAAAAGTTAGTTTCCTCTGAAAATTCAGTATCACAAAAGCTCGTTA 375
376 ATTAGCATCGCTCGATACTTAGTGCACCATGCATCTTCCTTTACCTCGTGAGTGGAAATCGATTTGATAATCGAT 450
451 TGCCACTTTTCGCATAATTCTATTGAGATATTTTATTACTTACAATCGTCTTTTATAAATGCTCAAGACTTTGAA 525
526 CGCGCGTGTTGCGTTTTAAAAAGGCCTTTTTTTGAATTGAATCAATGGTTTGATATAGTATGAGCCAACACGCAA 600
601 AAAGGAAAGCTGGGTCACTCGATCTTTCACCCAGAGGCTTAGATGACAGACAGGCTTTCGGACAGCTTTTGAAAG 675
676 AAGTATTAGCATTAGACAAAGAACATGAGTTAGGTAGAAGTAATTCTTTACCATCTATGACCTCCGAGCTTGTTG 750
751 AAGTTTTAATTGAAGTTGGTCTTCTAGCTTTTAAACATGATGATTCAAAATCTGAATTTATCTCTCCTAAGATGC 825
826 TAAAAGAAGCCCATCTCTCTCTACAAGCGTTAATGCTAATCTTAAAAAGGTCTCCGACAGTTTTGCGGGAGATTA 900
901 AATCATCTGTTACTCTTTTGGATTGGATTTTACCCAGGACTATATCATTGTTTGCTGATATTCGTTTTATTAAGT 975
976 TATTTGACTCATTAAAAGAGTTTCATAAGCTAATTTATCAGCTAATCAGTGAAAAGTCATTCCTATGGGACTTAT 1050
1051 ATGCTTCGTTTATGCGTTATTGGAAATATTATATTACAAACGTTTCTTCTATAGTTCTCCAAATCACTAATGCTA 1125
1126 CATTCCCTTACAAGATGCCCTCACCCAATTCTCAACCATTGCAGAGTATCTCCCCAAATTATCCAACCCATCGAG 1200
1201 AGGACAAATTTGATTTACTTATCATTAATATAGAGGAGGCTTGTACATTTTTCTTTGAAAGTGCCCATTTTTTTG 1275
1276 CACAATGCTCATATTTAAAGAAATCCAATTTTCCTAGTCCACCTCTCTTTACAGCGTGGACTTGGATCAAGCCAT 1350
1351 GTTTTTTTAATTTTGTTATTTTATTAAAACGAATCAGCATCGGAGACTCACAGCTCTTTCTACATTTGCATTCAC 1425
1426 GTATAGTCCAAACTTTATGCTGTTTTTCCTTGAATTTTATATATCATGGCCTTCCCATTTGTGAAAAATCTAAAC 1500
1501 ATATTTTAATGTCCTCCATCAACTTAACATTGGGATCATTGAAGAAAACTTATACAGTTGCTAATACTGCTATAT 1575
1576 CTCTTTTTTTTCTCTCTTTATTTGTTTTACCCAAAACTGTAGCTGGTCTATTCTATCCTTTTGGGGTTTCCTTAC 1650
1651 TTTCTGACTTCAAGGTATTAGAGCAACTTGAACCAGATTCTGATCTCAAAAAGGCAATAATATTATTTAAGTGCA 1725
1726 GATACCAAAGTTCAGAAATAGATCAAACAACTCTCCGTGCTTTTGGCGAAATTTGTACTGGTAAACTTGAAAACA 1800
1801 CGTTGTTTTCTAACTCTGAATTAAACCTTTTTCTTTTACATTATCTTTCCTTGGACAATGACTTGTCAAATATTC 1875
1876 TTAAAGTGGATTTCCAGAATGGTCATAACATATGTACATTTGCAAAATGGTGTATAAACAACAACTTAGATGAAC 1950
1951 CGTCTAATTTAAAGCACTTTCGTGAAATGTTAGATTATTATAGCTCTCATAATGTTACAATAAGTGAGGACGACC 2025
2026 TGAAGAACTTCTCTTTAGTTTTGTGTACTCATGTTGCAAAGGTGAATGAGAAAACAAATAGTATTTTCCGCACAT 2100
2101 ATGAAGTACATGGTTGTGAAGTTTGTAACTCATTTTGTTTACTATTTGATGAGCGGTCGCCTTTTAAAATTCCTT 2175
2176 ATCACGAATTGTTTTGTGCATTGCTAAAAAATCCCGACATAATTTCCTCTTCTGTTAAACAATCATTGTTGCTTG 2250

2251 ATGGCTTTTTTCGGTGGAGCCAGCATTGCTCAAACTTTAATAAAGAATCAATGTTAAGTTTAAGAGAATTTATTA 2325
2326 TGAAAGCATTAGCCAGTACTTCAAGATGTTTACGTGTTGTTGCTGCAAAAGTTTTGCCCATTTTCATTAAGGGAC 2400
2401 CTAATAATCTTGATATAGTTGAATTTCACAAGGAAAGTAAAGCCTTGATTTTTAATACGTTGAAAATATTGGCGG 2475
2476 TGGAAAATACAGCTATTTTAGAAACGGTCATTCTTTCCTGGATCTCCTTATCTAGAGTGGTAGAAGAAGAAGAAT 2550
2551 TACATTTTGTACTATTGGAAGTTATATCTTCTGTGATAAACAGCGGAATATTTTATCAAGGCATTGGTCTCAGCG 2625
2626 CTCTGCAACAAATTGCCTCGACGCGTCATATATCCGTTTGGCAATTACTTTCTCCATATTGGCCAACAGTGTCCG 2700
2701 TTGCGATTGTCCAAGGTATGGGTAAAAAACCGAACATAGCCAGTTTATTTGCTCAGCTTATGAATATTTCCGAGG 2775
2776 GCGATTTTCTTATTCGAACACAGGCGTACACTTTACCATTCCTTGTACTTACTAAAAACAAAGCGTTAATAGTAC 2850
2851 GTATAGCTGAACTTTCACAAAGTGATGTTGCTACTTTGTGCCTTACCAATATGCATAAAATCCTTGCTTCGCTAC 2925
2926 TTACTACGGATCATCCTAATTTGGAAGAGAGTGTGATGCTTCTTCTTTCACTGGCCACTTCTGATTTTGAAAAAG 3000
3001 TTGATTTAACGTCTTTGTTACGCTCTGATCCTATTTCTATTACTGTGGAGTTGTTACAGCTTTATCAGAATGATG 3075
3076 TTCCTCATGAAAAAATTGAAAATGCTTTAAGAAAGGTAGCAATGATTGTCTCTCAAGTGGTTAATGACGAAGACT 3150
3151 TGAGCAATAAGGAATTACTTTATGATTTTTTTAATAATCACATTTTGGGTATCTTAGCAGAATTTTCTAATATCC 3225
3226 TTAACGACCTGAAAGGAAAGACTTCAATTAATGAAAAGATTAAGACAATTGTCGGCATTGAAAAAATGTTATCTT 3300
3301 TATGTGGAGGTGCAGTCAAACTTGGATTACCACAGATACTTTCTAATTTACAAAGTGCTTTTCAAAATGAGCACT 3375
3376 TAAGGTTTTATGCAATCAAAGCTTGGTTCAGTTTGATATTAGCAACCAAGGAGCCCGAGTATAGTTCAATTGCTG 3450
3451 GTTTAAGTCTTGTAATTTTACCTCCTTTATTCCCTTATTTAGAACCACAAGAAGCAGAGCTAGTAATTCAAATAT 3525
3526 TTGATTTTATTTCTTCTGACACACACAAGTGCCTACAAGGATTAAAGTGGGCTATCCCCACCAGTCTGGATTCAG 3600
3601 CGTGCTTTAGCCTTAAGGCTAAAGAAATATTCTGTTCGCTTCAAAATGAAGATTTTTACTCTGAGCTTCAAAGTA 3675
3676 TAATTAAGTGTTTAACTAACGAAAATGAGCCAGTTTGTTATTTAGGTTTACAAAAATTAGAACTTTTTTTTCAAG 3750
3751 CCAAGGTGGACGAGTTACATGACACACTAAATTTGGACATATCCAACGAAGTTCTGGACCAATTACTAAGATGCC 3825
3826 TTTTAGATTGTTGTGTAAAATATGCTTCAACAAATATGCAAATATCATATCTTGCTGCAAAAAATCTTGGTGAAT 3900
3901 TGGGTGCGATAGATCCCAGCCGCGCCAAGGCTCAACATATTATTAAAGAAACAGTTGTTCTTGATAACTTTGAAA 3975
3976 ACGGAGAAGAAAGTTTGAAGTTTATTCTAGATTTTATGCAATCGCAGTTAATTCCAGCTTTCCTTGTTACTACTG 4050
4051 ATACTAAAGCACAAGGTTTTCTTGCCTATGCTCTGCAAGAGTTTCTAAAGCTTGGTGGATTCAAGTCCGCAGTGA 4125
4126 TTAATAAAAAAAAGGGACTAACTGTGGTAACAGAACATTGGATGTCTTTGCCTGATTTATCCAAACGTGTGCTTA 4200
4201 TACCATTTTTAACTTCCAAGTATCATTTAACACCAATCCCCAAAATTGACATTCGGTACCCTATTTATAAAGAAA 4275
4276 ATGTTACTATTCATACTTGGATGCAGTTGTTTTCTCTTAAATTGATGGAGTACGCCCATTCGCAAAACGCTGAAA 4350
4351 AAATATTTGGTATTTGTTCGAAAGTAGTGAAAGACCAAGAGGTTAACATTCCCTGTTTTCTTCTTCCCTTTCTTG 4425
4426 TTTTAAATGTTATTTTAACCGAGTCAGAACTGGAAGTTAATAAAGTCATTGAAGAATTCCAGCTTGTTATTAATC 4500
4501 AACCGGGACCTGATGGATTAAATTCCGTGGGGCAACAAAGATACACCTCATTTGTAGATGTATTTTTTAAGATTG 4575
4576 TGGATTACCTTAACAAATGGCTTCGCATGCGAAAGAAGAGGAATTGGGATAGACGTTCTGCCATTGCAAGGAAAG 4650
4651 AGAACCGTTATATGTCGGTGGAAGATGCTACCTCTCGAGAATCATCGATCTCAAAAGTTGAGTCATTTCTTTCTC 4725
4726 GATTTCCTTCAAAAACATTAGGTATTGTCTCTTTAAATTGTGGATTTCATGCTCGTGCATTGTTTTATTGGGAGC 4800
4801 AACACATACGTAATGCTACAGCTCCATATGCAGCTTTAGAGTCCGATTATAGAGTTTTGCAGGAAATATATGCTG 4875
4876 GAATTGATGATCCAGATGAAATCGAAGCAGTGTCTTTAAATTTCCATGATTACTCGTTTGATCAACAACTCCTTT 4950
4951 TACATGAAAATTCAGGAACATGGGACTCGGCTTTGAGTTGTTACGAAATTATTATTCAAAAGGATCCTGAAAATA 5025
5026 AAAAGGCGAAAATCGGTTTGCTTAACAGCATGCTGCAATCGGGGCATTATGAATCTCTTGTTTTGAGTTTAGATT 5100
5101 CTTTTATAATCAATGACAACCACGAGTATTCGAAGATGTTAAATTTGGGTATTGAAGCTTCATGGCGTTCGCTAT 5175
5176 CTATTGATTCGTTAAAAAAGTGTCTTTCAAAAAGCAACTTGGAATCTTTCGAAGCTAAATTGGGTAGCATATTTT 5250
5251 ACCAATACCTACGGAAGGATTCTTTTGCTGAATTGACGGAGCGGCTGCAACCCTTGTACGTTGATGCTGCTACAG 5325
5326 CAATTGCAAACACAGGCGCCCATTCAGCCTATGATTGTTATGATATTTTATCTAAGCTGCACGCAATTAATGACT 5400
5401 TTAGTAGGATTGCTGAAACTGACGGAATTGTTTCCGACAATCTTGATATTGTTCTTCGCCGTCGGCTTAGCCAAG 5475
5476 TAGCTCCGTACGGTAAATTCAAGCACCAAATCCTGTCCACTCACTTAGTTGGCTATGAAAAATTTGAAAACACGA 5550
5551 AGAAAACTGCTGAAATATATCTCGAGATTGCAAGAATATCTCGAAAAAATGGTCAATTTCAAAGAGCCTTCAATG 5625
5626 CCATCCTCAAAGCAATGGATTTAGATAAACCGCTAGCAACAATAGAGCACGCACAATGGTGGTGGCATCAAGGGC 5700
5701 AACATCGTAAAGCTATTTCTGAATTGAATTTTTCGCTTAATAACAACATGTTTGATTTGGTTGATGAGCATGAAG 5775

5776 AAAGACCTAAAAATCGTAAAGAAACTTTAGGAAATCCACTTAAAGGAAAAGTGTTCTTGAAACTTACAAAATGGC 5850
5851 TCGGAAAAGCTGGCCAACTGGGATTGAAGGATTTGGAGACGTATTATCATAAAGCGGTAGAGATTTACTCAGAAT 5925
5926 GTGAGAATACGCATTATTATCTTGGCCATCATCGAGTTTTAATGTATGAAGAAGAACAAAAGCTCCCAGTTAATG 6000
6001 AACAGAGCGAACGATTTTTAAGTGGTGAGTTAGTAACTCGCATAATTAACGAATTTGGTCGATCTTTGTACTATG 6075
6076 GTACAAATCATATATATGAAAGTATGCCAAAATTGCTCACACTGTGGCTTGATTTTGGGGCCGAAGAACTTCGCT 6150
6151 TATCTAAAGATGACGGCGAAAAGTACTTTCGTGAACACATTATCTCTTCGAGAAAAAAATCTTTGGAACTTATGA 6225
6226 ATTCGAATGTTTGTCGCCTTTCTATGAAAATTCCTCAATACTTTTTTCTGGTTGCATTATCCCAAATGATATCCA 6300
6301 GAGTATGCCATCCAAATAATAAAGTTTATAAAATTTTGGAACATATAATTGCAAACGTTGTAGCATCTTATCCTG 6375
6376 GGGAGACGCTATGGCAATTAATGGCAACAATAAAATCGACTTCTCAAAAGCGCTCGCTTCGTGGAAAAAGCATTT 6450
6451 TAAATGTTTTACATTCTAGGAAGCTTTCTATGTCTTCCAAAGTTGATATAAAAGCACTCAGTCAATCTGCAATTC 6525
6526 TCATTACTGAAAAGTTAATCAATTTGTGCAATACAAGGATTAACAGTAAATCTGTAAAAATGAGCTTAAAGGATC 6600
6601 ATTTTCGGCTTTCTTTTGATGATCCGGTAGATTTAGTCATTCCTGCTAAATCATTTTTAGACATTACTTTACCAG 6675
6676 CTAAAGATGCTAACAGAGCTAGTCATTATCCATTTCCAAAAACTCAGCCTACTCTGTTGAAATTTGAGGATGAGG 6750
6751 TGGATATAATGAACTCTCTTCAAAAACCAAGAAAAGTGTACGTTAGAGGTACGGATGGCAACTTATACCCATTCT 6825
6826 TGTGCAAACCCAAAGATGATCTTCGTAAGGATGCTAGATTGATGGAATTTAATAATCTTATTTGTAAAATATTGA 6900
6901 GGAAAGATCAAGAAGCGAACAGAAGGAACTTGTGTATTAGAACTTATGTTGTTATTCCTTTAAATGAAGAATGCG 6975
6976 GATTTATCGAATGGGTAAATCATACTCGTCCATTTAGAGAAATTTTGTTAAAAAGCTATAGACAGAAAAACATTC 7050
7051 CCATATCATATCAAGAAATCAAAGTTGATTTAGACTTTGCACTGCGAAGTCCTAACCCTGGTGATATATTTGAAA 7125
7126 AGAAAATCTTACCGAAATTTCCTCCAGTTTTTTATGAGTGGTTTGTTGAATCTTTCCCAGAACCAAATAATTGGG 7200
7201 TTACTAGTAGACAAAACTATTGCCGAACTTTAGCAGTAATGTCAATAGTTGGCTACGTTTTGGGTTTGGGAGATC 7275
7276 GCCATGGCGAAAACATATTGTTTGATGAATTTACAGGTGAAGCTATCCATGTCGATTTCAACTGTCTTTTTGATA 7350
7351 AAGGTCTTACTTTTGAAAAACCTGAAAAGGTGCCGTTCAGATTAACTCATAATATGGTAGATGCAATGGGTCCGA 7425
7426 CAGGTTATGAAGGGGGTTTCAGGAAAGCTAGCGAAATAACGATGCGGCTTCTTCGCTCAAACCAAGATACATTGA 7500
7501 TGAGCGTACTAGAGTCTTTCCTACATGATCCTTTAGTCGAGTGGAATAGAAAGAAGTCGTCAAGCAAGTACCCGA 7575
7576 ATAATGAAGCAAATGAAGTTTTGGATATAATTCGCAAAAAATTTCAAGGCTTTATGCCAGGGGAGACGATACCTT 7650
7651 TATCTATTGAAGGGCAAATTCAAGAATTGATCAAATCTGCTGTCAACCCAAAAAACCTGGTAGAAATGTACATTG 7725
7726 GTTGGGCTGCTTATTTCTAGCATTTTACTAACAAAAATTTCAATGAACAAGCTACCCATTATTAAACTTATGATT 7800
7801 TGAATCGAAGATATTTTATTTATTAATCCGATGAAGAATTCTCGCTGAGTTGTTCAATTTCTTGTAATTTTCCTT 7875
7876 CCATTTCTAAATCGTCGATTCGCTTAAATAGGGCACTGGCTTTTTGTGCATTTTTCTCTCGTAAAGCAGCTTCTG 7950
7951 ATTGAAAAAAAGCTATATCTGTTTCTGAGTCATCATCCGAATCAACAATATATTTTGCAGATCGACCTGCAG 8022

斜体字由 Seaton 等测序。

粗笔的为 Seaton 等删除的碱基（ 2499， 22501， 2507， 2509 ）

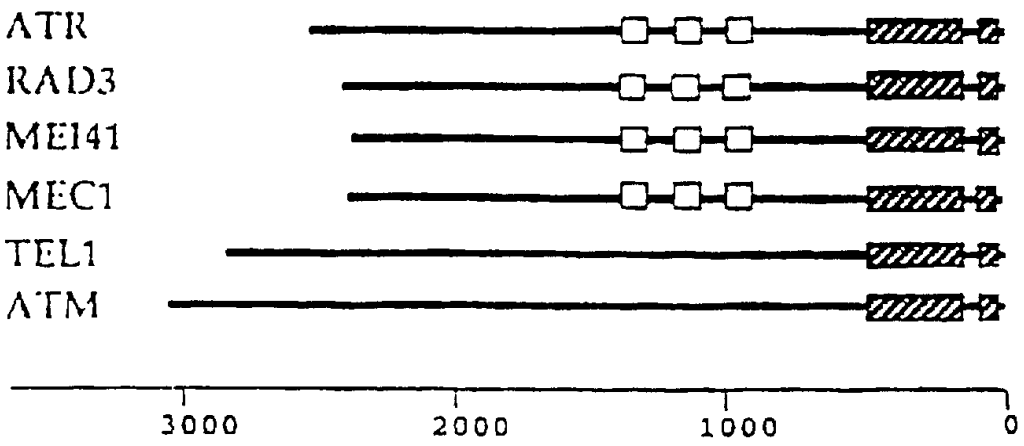
下划线的为单个的 C 插入物任一侧的两个碱基（ 5918/5919 ）， Seaton 等。（即未显示错误碱基，但显示了两边的残基）。

序列号 4： rad3 蛋白

1 MSQHAKRKAGSLDLSPRGLDDRQAFGQLLKEVLALDKEHELGRSNSLPSMTSELVEVLIEVGLLAFKHDQSKSEF 75
76 ISPKMLKEAHLSLQALMLILKRSPTVLREIKSSVTLLDWILPRTISLFADIRFIKLFDSLKEFHKLIYQLISEKS 150
151 FLWDLYASFMRYWKYYITNVSSIVLQITNATFPYKMPSPNSQPLQSISPNYPTHREDKFDLLIINIEEACTFFFE 225
226 SAHFFAQCSYLKKSNFPSPPLFTAWTWIKPCFFNFVILLKRISIGDSQLFLHLHSRIVQTLCCFSLNFIYHGLPI 300
301 CEKSKHILMSSINLTLGSLKKTYTVANTAISLFFLSLFVLPKTVAGLFYPFGVSLLSDFKVLEQLEPDSDLKKAI 375
376 ILFKCRYQSSEIDQTTLRAFGEICTGKLENTLFSNSELNLFLLHYLSLDNDLSNILKVDFQNGHNICTFAKWCIN 450
451 NNLDEPSNLKHFREMLDYYSSHNVTISEDDLKNFSLVLCTHVAKVNEKTNSIFRTYEVHGCEVCNSFCLLFDERS 525
526 PFKIPYHELFCALLKNPDIISSSVKQSLLLDGFFRWSQHCSNFNKESMLSLREFIMKALASTSRCLRVVAAKVLP 600

601 IFIKGPNNLDIVEFHKESKALIFNTLKILAVENTAILETVILSWISLSRVVEEEELHFVLLEVISSVINSGIFYQ 675
676 GIGLSALQQIASTRHISVWQLLSPYWPTVSVAIVQGMGKKPNIASLFAQLMNISEGDFLIRTQAYTLPFLVLTKN 750
751 KALIVRIAELSQSDVATLCLTNMHKILASLLTTDHPNLEESVMLLLSLATSDFEKVDLTSLLRSDPISITVELLQ 825
826 LYQNDVPHEKIENALRKVAMIVSQVVNDEDLSNKELLYDFFNNHILGILAEFSNILNDLKGKTSINEKIKTIVGI 900
901 EKMLSLCGGAVKLGLPQILSNLQSAFQNEHLRFYAIKAWFSLILATKEPEYSSIAGLSLVILPPLFPYLEPQEAE 975
976 LVIQIFDFISSDTHKCLQGLKWAIPTSLDSACFSLKAKEIFCSLQNEDFYSELQSIIKCLTNENEPVCYLGLQKL 1050
1051 ELFFQAKVDELHDTLNLDISNEVLDQLLRCLLDCCVKYASTNMQISYLAAKNLGELGAIDPSRAKAQHIIKETVV 1125
1126 LDNFENGEESLKFILDFMQSQLIPAFLVTTDTKAQGFLAYALQEFLKLGGFKSAVINKKKGLTVVTEHWMSLPDL 1200
1201 SKRVLIPFLTSKYHLTPIPKIDIRYPIYKENVTIHTWMQLFSLKLMEYAHSQNAEKIFGICSKVVKDQEVNIPCF 1275
1276 LLPFLVLNVILTESELEVNKVIEEFQLVINQPGPDGLNSVGQQRYTSFVDVFFKIVDYLNKWLRMRKKRNWDRRS 1350
1351 AIARKENRYMSVEDATSRESSISKVESFLSRFPSKTLGIVSLNCGFHARALFYWEQHIRNATAPYAALESDYRVL 1425
1426 QEIYAGIDDPDEIEAVSLNFHDYSFDQQLLLHENSGTWDSALSCYEIIIQKDPENKKAKIGLLNSMLQSGHYESL 1500
1501 VLSLDSFIINDNHEYSKMLNLGIEASWRSLSIDSLKKCLSKSNLESFEAKLGSIFYQYLRKDSFAELTERLQPLY 1575
1576 VDAATAIANTGAHSAYDCYDILSKLHAINDFSRIAETDGIVSDNLDIVLRRRLSQVAPYGKFKHQILSTHLVGYE 1650
1651 KFENTKKTAEIYLEIARISRKNGQFQRAFNAILKAMDLDKPLATIEHAQWWWHQGQHRKAISELNFSLNNIMFDL 1725
1726 VDEHEERPKNRKETLGNPLKGKVFLKLTKWLGKAGQLGLKDLETYYHKAVEIYSECENTHYYLGHHRVLMYEEEQ 1800
1801 KLPVNEQSERFLSGELVTRIINEFGRSLYYGTNHIYESMPKLLTLWLDFGAEELRLSKDDGEKYFREHIISSRKK 1875
1876 SLELMNSNVCRLSMKIPQYFFLVALSQMISRVCHPNNKVYKILEHIIANVVASYPGETLWQLMATIKSTSQKRSL 1950
1951 RGKSILNVLHSRKLSMSSKVDIKALSQSAILITEKLINLCNTRINSKSVKMSLKDHFRLSFDDPVDLVIPAKSFL 2025
2026 DITLPAKDANRASHYPFPKTQPTLLKFEDEVDIMNSLQKPRKVYVRGTDGNLYPFLCKPKDDLRKDARLMEFNNL 2100
2101 ICKILRKDQEANRRNLCIRTYVVIPLNEECGFIEWVNHTRPFREILLKSYRQKNIPISYQEIKVDLDFALRSPNP 2175
2176 GDIFEKKILPKFPPVFYEWFVESFPEPNNWVTSRQNYCRTLAVMSIVGYVLGLGDRHGENILFDEFTGEAIHVDF 2250
2251 NCLFDKGLTFEKPEKVPFRLTHNMVDAMGPTGYEGGFRKASEITMRLLRSNQDTLMSVLESFLHDPLVEWNRKKS 2325
2326 SSKYPNNEANEVLDIIRKKFQGFMPGETIPLSIEGQIQELIKSAVNPKNLVEMYIGWAAYF 2386

A


ATR
RAD3
MEI41
MEC1
TEL1
ATM
3000
2000
1000
0

B

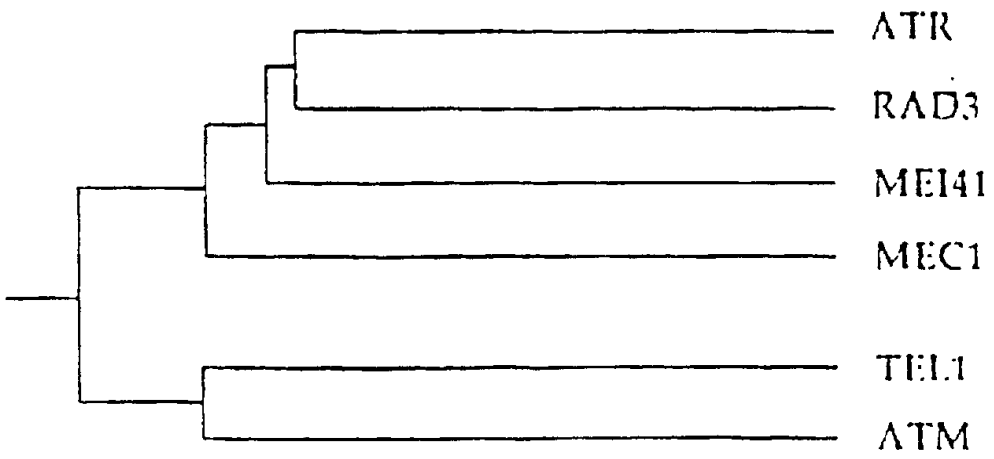

ATR
RAD3
MEI41
MEC1
TEL1
ATM

图 1