

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105331686 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 17

(21) 申请号 201510689431. 8

(22) 申请日 2015. 10. 21

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 孔瑞瑞 朱笠 刘江红

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页

序列表10页 附图2页

(54) 发明名称

Myosin9b 蛋白特异性抗体的制备及 Myosin9b 基因家族变化在肿瘤诊断及预后中的应用

(57) 摘要

本发明公开了 Myosin9b 蛋白特异性抗体的制备及 Myosin9b 基因家族变化在肿瘤诊断及预后中的应用。本发明所提供的 Myosin9b 蛋白特异性抗体的制备及 Myosin9b 基因家族变化在肿瘤诊断及预后中的应用中, Myo9b 的序列如序列表中序列 1 所示; Myo9b 基因的核苷酸序列如序列 2 所示。实验证明, Myo9b 在不同肿瘤组织中高表达, 肺癌组织中的 Myo9b 及 Myo9b 基因的表达水平明显高于非肿瘤肺组织, 并且肺癌患者的肺癌组织中 Myo9b 基因的 RNA 表达水平与肺癌的恶性程度正相关。Myo9b 的表达水平与肺癌患者的生存时间相关, Myo9b 可以作为肺癌患者肿瘤诊断及预后检测标志物。

1. 检测 Myo9b 是否改变或表达水平是否变化或 Myo9b 基因表达水平的系统在制备诊断或辅助诊断肿瘤和 / 或预后或辅助预后产品中的应用 ;

所述 Myo9b 的序列如序列表中序列 1 所示 ;

所述 Myo9b 基因的核苷酸序列如序列 2 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于 : 所述检测 Myo9b 表达水平的系统为通过免疫组织化学染色法或酶联免疫反应检测所述 Myo9b 表达水平所需的试剂和 / 或仪器 ;

所述检测 Myo9b 基因表达水平的系统为通过定量 PCR 检测所述 Myo9b 基因表达水平所需的试剂和 / 或仪器。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用, 其特征在于 : 所述检测 Myo9b 表达水平的系统为抗 Myo9b 的抗体 ;

所述检测 Myo9b 基因表达水平的系统为由序列表中序列 3 和序列 4 所示的两条单链 DNA 组成的引物对。

4. 根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于 : 所述抗 Myo9b 的抗体为以序列 1 的第 1691-1916 位氨基酸所示的蛋白质为抗原得到的抗体。

5. A1)-A3) 在制备诊断或辅助诊断肿瘤和 / 或预后或辅助预后产品中的应用 :

A1) 用于制备抗 Myo9b 的单克隆抗体的免疫原 ;

A2) 用于制备抗 Myo9b 的多克隆抗体的免疫原 ;

A3) 产生所述单克隆抗体的细胞系统和 / 或细胞外或无细胞表达系统。

6. 根据权利要求 5 所述的应用, 其特征在于 : 所述免疫原为序列 1 所示的蛋白质或序列 1 所示蛋白质的部分片段。

7. 下述 X1 或 X2 的应用 :

X1、与权利要求 3 或 4 所述抗 Myo9b 的抗体相关的生物材料在制备诊断或辅助诊断肿瘤和 / 或预后或辅助预后产品中的应用 ;

与权利要求 3 或 4 所述抗 Myo9b 的抗体相关的生物材料为下述 A1)-A18) 中的任一种 :

A1) 编码权利要求 3 或 4 所述抗 Myo9b 的抗体的核酸分子 ;

A2) 含有 A1) 所述核酸分子的表达盒 ;

A3) 含有 A1) 所述核酸分子的重组载体 ;

A4) 含有 A2) 所述表达盒的重组载体 ;

A5) 含有 A1) 所述核酸分子的重组微生物 ;

A6) 含有 A2) 所述表达盒的重组微生物 ;

A7) 含有 A3) 所述重组载体的重组微生物 ;

A8) 含有 A4) 所述重组载体的重组微生物 ;

A9) 含有 A1) 所述核酸分子的转基因动物细胞系 ;

A10) 含有 A2) 所述表达盒的转基因动物细胞系 ;

A11) 含有 A3) 所述重组载体的转基因动物细胞系 ;

A12) 含有 A4) 所述重组载体的转基因动物细胞系 ;

A13) 含有 A1) 所述核酸分子的转基因植物细胞系 ;

A14) 含有 A2) 所述表达盒的转基因植物细胞系 ;

A15) 含有 A3) 所述重组载体的转基因植物细胞系 ;

A16) 含有 A4) 所述重组载体的转基因植物细胞系；
A17) 含有 A3) 所述重组载体的无细胞蛋白或多肽表达系统；
A18) 含有 A4) 所述重组载体的无细胞蛋白或多肽表达系统；
X2、与权利要求 5 或 6 所述免疫原相关的生物材料在制备诊断或辅助诊断肿瘤和 / 或预后或辅助预后产品中的应用；

所述与权利要求 5 或 6 所述免疫原相关的生物材料为下述 B1)-B16) 中的任一种：

- B1) 编码权利要求 5 或 6 所述免疫原的核酸分子；
- B2) 含有 B1) 所述核酸分子的表达盒；
- B3) 含有 B1) 所述核酸分子的重组载体；
- B4) 含有 B2) 所述表达盒的重组载体；
- B5) 含有 B1) 所述核酸分子的重组微生物；
- B6) 含有 B2) 所述表达盒的重组微生物；
- B7) 含有 B3) 所述重组载体的重组微生物；
- B8) 含有 B4) 所述重组载体的重组微生物；
- B9) 含有 B1) 所述核酸分子的转基因动物细胞系；
- B10) 含有 B2) 所述表达盒的转基因动物细胞系；
- B11) 含有 B3) 所述重组载体的转基因动物细胞系；
- B12) 含有 B4) 所述重组载体的转基因动物细胞系；
- B13) 含有 B1) 所述核酸分子的转基因植物细胞系；
- B14) 含有 B2) 所述表达盒的转基因植物细胞系；
- B15) 含有 B3) 所述重组载体的转基因植物细胞系；
- B16) 含有 B4) 所述重组载体的转基因植物细胞系。

8. 以权利要求 1 所述 Myo9b 作为标志物在制备诊断或辅助诊断肿瘤和 / 或预后或辅助预后产品中的应用。

9. 根据权利要求 1-8 中任一所述应用,其特征在於:所述肿瘤为肺癌、胃癌、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、头颈部癌、肾癌、卵巢癌、黑色素瘤、骨髓瘤或肉瘤。

10. 下述 P1-P4 中任一产品：

- P1、权利要求 1-4 中任一所述检测 Myo9b 表达水平或 Myo9b 基因表达水平的系统；
- P2、权利要求 7 所述与所述抗 Myo9b 的抗体相关的生物材料；
- P3、权利要求 5 或 6 所述免疫原；
- P4、权利要求 7 所述与所述免疫原相关的生物材料。

Myosin9b 蛋白特异性抗体的制备及 Myosin9b 基因家族变化在肿瘤诊断及预后中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学领域中 Myosin9b 蛋白特异性抗体的制备及 Myosin9b 基因家族变化在肿瘤诊断及预后中的应用。

背景技术

[0002] 各种肿瘤在全世界各国仍然是首要的疾病致死原因,严重威胁人类健康 (Cooke et al., 2014)。世界卫生组织 (WHO) 公布的数据表明:在世界范围内,现在发病率最高的癌症是肺癌,2012 年新增肺癌病例 180 万,死亡人数 159 万 (Chen et al., 2014)。肺癌的死亡率以每年 1~5% 的速度逐年增长,而且在发展中国家这一趋势尤为明显。根据美国 SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) 的资料显示:美国肺癌患者确诊后的 5 年生存率为 12%~15%;欧洲为 8~12%;发展中国家为 5~12% (Chen et al., 2014)。随着吸烟人数的不断上升和环境的持续恶化,肺癌发病率呈现出逐渐增高的趋势。目前,肺癌已成为我国首位恶性肿瘤死亡原因,占全部恶性肿瘤死亡的 22.7% (She et al., 2013)。且发病率和死亡率仍在继续迅速上升。根据卫生部全国肿瘤防治办公室提供的资料显示:目前我国肺癌发病率每年增长 26.9%。如不及时采取有效控制措施,预计到 2025 年我国肺癌患者将达到 100 万,成为世界第一肺癌大国 (She et al., 2013)。肺癌的病因至今尚不完全明确。

[0003] 肺癌是一种发病率高,致死性强的恶性肿瘤 (Nasarre et al., 2010; Spiro and Silvestri, 2005)。由于传统的肺癌检测方法特异性和灵敏性有限,因此并没有降低肺癌的病死率。近年来,肿瘤标志物由于其特异性和灵敏度高等特点,对肿瘤的诊断,治疗及预后判断提供了指导意义 (Chaffer and Weinberg, 2011; Friedl and Alexander, 2011; Spiro and Silvestri, 2005)。由于肿瘤发生发展过程的复杂性,肿瘤诊断及预后的检测还有待发展和完善。特别是高特异性的肿瘤标志物及其抗体介导的肿瘤诊断急需发展。

[0004] Myosin9 是非常规肌球蛋白家族 (non-conventional myosin family) 的一个成员。在无脊椎动物中只含有单个 Myosin9 基因;而在脊椎动物中 Myosin9 含有两个剪切体形式:Myosin9a (Myo9a) 和 Myosin9b (Myo9b)。Myosin9 蛋白含有头,颈和尾三部分 (附图 3 中 A)。头部是一个单头的 motor 结构域,含有 extension 和 insertion 模序。Motor 结构域具有 ATP 酶活性,与 ATP 结合后,使 ATP 转化成 ADP,释放能量的同时促使 Myosin9 沿着 F-actin 向前运动 (Liao et al., 2010; van den Boom et al., 2007)。颈部含有 IQ 结构域,是 Myosin 轻链的结合位点,在 Myosin9 运动中起着杠杆作用。Myosin9 尾部有一个脯氨酸富集区,一个锌指模序和一个 RhoGAP (GTPase activation domain) 结构域 (Post et al., 1998)。Myosin9 通过 RhoGAP 区域下调 Rho 依赖的信号通路。Myo9a 主要在脑和睾丸组织中表达,在上皮细胞分化中起重要作用 (Heasman and Ridley, 2008)。而 Myo9b 在更广泛的组织中表达。有文献报道,在巨噬细胞中,Myo9b 调节巨噬细胞的形态和运动 (Hanley et al., 2010; Parsons et al., 2010; Wirth et al., 1996)。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是如何应用申请人新发现的 Myo9b 基因及其有关技术及产品对与 Myo9b 基因有变化肿瘤患者进行诊断检测及预后分析,包括如何预测肿瘤患者预后及相应靶向治疗。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明首先提供了检测 Myo9b 基因是否改变或表达水平是否变化或 Myo9b 基因表达水平的系统在制备诊断或辅助诊断肿瘤和 / 或预后或辅助预后产品中的应用;

[0007] 所述 Myo9b 的序列如序列表中序列 1 所示;

[0008] 所述 Myo9b 基因的核苷酸序列如序列 2 所示。

[0009] 上述应用中,所述检测 Myo9b 基因是否改变或表达水平是否变化可包括检测外周血,体液,痰液,粪便,尿液或组织分泌物或肿瘤组织中 Myo9b 基因的是否改变或表达水平是否变化,检测 Myo9b 基因是否改变或表达水平是否变化可采用以下技术:DNA 测序、RNA 测序、基因芯片 (microarray) 分析或 PCR 一偶联的核酸测序。

[0010] 上述应用中,所述检测 Myo9b 表达水平的系统可包括检测 Myo9b 表达水平的试剂和 / 或仪器,如通过免疫组织化学染色或酶联免疫反应检测 Myo9b 表达水平所需的试剂和仪器。具体来说,检测 Myo9b 表达水平的系统可包括抗 Myo9b 的抗体和进行免疫组织化学染色所需要的其它试剂和仪器,上述检测 Myo9b 表达水平的系统可只由所述抗 Myo9b 的抗体组成,所述抗 Myo9b 的抗体和进行免疫组织化学染色所需要的其它试剂均可独立包装;检测 Myo9b 表达水平的系统可包括所述 Myo9b、所述抗 Myo9b 的抗体和进行酶联免疫反应所需要的其它试剂和仪器,上述检测 Myo9b 表达水平的系统可只由所述 Myo9b 和所述抗 Myo9b 的抗体组成,也可只由所述 Myo9b 组成,也可只由所述抗 Myo9b 的抗体组成,所述 Myo9b、所述抗 Myo9b 的抗体和进行酶联免疫反应所需要的其它试剂均可独立包装。

[0011] 上述应用中,所述抗 Myo9b 的抗体可为 Myo9b 单克隆抗体和 / 或 Myo9b 多克隆抗体。所述抗 Myo9b 的抗体可识别序列表中 SEQ ID No. 1 的蛋白质。所述抗 Myo9b 的抗体可为以序列 1 的第 1691-1916 位氨基酸所示的蛋白质为抗原得到的抗体。所述抗 Myo9b 的抗体可利用所述抗原免疫动物得到。所述动物可为兔 (如新西兰白兔) 或鼠 (如大鼠或小鼠),豚鼠或其他大动物如驴,马,猪,羊等。所述抗 Myo9b 的抗体也可通过人源或人源化抗体表达系统得到。

[0012] 上述应用中,所述抗 Myo9b 的抗体可为生物素或其他标记物标记 [包括生物影像标记物 (可为生物荧光标记物),放射性物质标记,纳米产物标记,生物毒素等 (如 lymphotoxin 等)] 的抗 Myo9b 的抗体。所述 Myo9b 的抗体也可为没有生物素或其他标记物标记的抗 Myo9b 的抗体。所述抗 Myo9b 的抗体可为标记物标记的抗 Myo9b 的抗体。

[0013] 上述应用中,所述检测 Myo9b 表达水平可为检测所述 Myo9b 绝对表达水平或所述 Myo9b 相对表达水平;所述 Myo9b 绝对表达水平为肿瘤组织中所述 Myo9b 的表达水平;所述 Myo9b 相对表达水平为所述肿瘤组织中所述 Myo9b 的绝对表达水平与非肿瘤组织中所述 Myo9b 的绝对表达水平的比值。

[0014] 上述应用中,所述检测 Myo9b 基因表达水平的系统可包括检测 Myo9b 基因是否改变或表达水平是否变化的试剂和 / 或仪器,如通过定量 PCR 检测 Myo9b 基因表达水平所需

的试剂和 / 或仪器。具体来说,检测 Myo9b 基因表达水平的系统可包括扩增所述 Myo9b 基因全长或片段的引物对和定量 PCR 所需要的其它试剂和仪器,上述检测 Myo9b 基因表达水平的系统可只由所述引物对组成,所述引物对和进行定量 PCR 所需要的其它试剂均可独立包装。

[0015] 所述引物对可为由序列表中序列 3 和序列 4 所示的两条单链 DNA 组成的引物对。

[0016] 定量 PCR 所需要的其它试剂可包括 Trizol、DNA 酶 I、寡聚引物 (dT) 和 / 或逆转录酶 (M-MLV RT)。所述 Trizol 具体可为 Invitrogen 产品,货号为 15596018。所述 DNA 酶 I 具体可为 NEB 公司产品,货号为 M0303S。所述寡聚引物具体可为 Fermentas 公司产品,货号为 #S0131。所述逆转录酶具体可为 Invitrogen 产品,货号为 RTC28025-D11。定量 PCR 所需要的仪器可为实时定量 PCR 仪和 / 或分光光度计。所述实时定量 PCR 仪可为 ABI 公司的 StepOne 实时定量 PCR 仪。所述分光光度计具体可为 Ultraspec 5300 分光光度计 (GE 公司)。

[0017] 上述应用中,所述检测 Myo9b 基因表达水平可为检测肿瘤组织中所述 Myo9b 基因相对于内参基因的相对表达量或所述肿瘤组织中所述 Myo9b 基因表达水平与非肿瘤组织中所述 Myo9b 基因表达水平的比值。

[0018] 所述内参基因可为不同组织和细胞中的表达相对恒定的基因,如 GAPDH 基因或 actin 基因。

[0019] 为解决上述技术问题,本发明还提供了下述 A1)-A3) 中任一种制备抗 Myo9b 的抗体所需的生物材料在制备诊断或辅助诊断肿瘤和 / 或预后或辅助预后产品中的应用:

[0020] A1) 用于制备抗 Myo9b 的单克隆抗体的免疫原;

[0021] A2) 用于制备抗 Myo9b 的多克隆抗体的免疫原;

[0022] A3) 产生所述单克隆抗体的细胞系统和 / 或细胞外或无细胞 (cell-free protein expression) 表达系统。

[0023] 上述应用中,所述免疫原可为序列 1 或序列 1 的第 1691-1916 位氨基酸所示的蛋白质。所述免疫原可为在 Myo9b 蛋白或其任一片段或其修饰物在制备过程中得到的纯化的 Myo9b 蛋白或其任一片段或其修饰物,或未纯化的包含 Myo9b 蛋白或其任一片段或其修饰物的混合物;所述免疫原也可为与 Myo9b 相关的合成多肽或其修饰物在制备过程中得到的纯化的与 Myo9b 相关的合成多肽或其修饰物,或未纯化的包含与 Myo9b 相关的合成多肽或其修饰物的混合物。所述免疫原可采用原核表达系统或真核表达系统制备。

[0024] 上述应用中,所述产生所述单克隆抗体的细胞系统可为原核表达系统或真核表达系统。

[0025] 上述应用中,所述抗 Myo9b 的单克隆抗体可为人源化单克隆抗体。

[0026] 为解决上述技术问题,本发明还提供了下述 X1 或 X2 的应用:

[0027] X1、与所述抗 Myo9b 的抗体 (包括人源化单克隆抗体) 相关的生物材料在制备诊断或辅助诊断肿瘤和 / 或预后或辅助预后产品中的应用;

[0028] 与所述抗 Myo9b 的抗体 (包括人源化单克隆抗体) 相关的生物材料为下述 A1)-A18) 中的任一种:

[0029] A1) 编码所述抗 Myo9b 的抗体的核酸分子;

[0030] A2) 含有 A1) 所述核酸分子的表达盒;

- [0031] A3) 含有 A1) 所述核酸分子的重组载体；
- [0032] A4) 含有 A2) 所述表达盒的重组载体；
- [0033] A5) 含有 A1) 所述核酸分子的重组微生物；
- [0034] A6) 含有 A2) 所述表达盒的重组微生物；
- [0035] A7) 含有 A3) 所述重组载体的重组微生物；
- [0036] A8) 含有 A4) 所述重组载体的重组微生物；
- [0037] A9) 含有 A1) 所述核酸分子的转基因动物细胞系；
- [0038] A10) 含有 A2) 所述表达盒的转基因动物细胞系；
- [0039] A11) 含有 A3) 所述重组载体的转基因动物细胞系；
- [0040] A12) 含有 A4) 所述重组载体的转基因动物细胞系；
- [0041] A13) 含有 A1) 所述核酸分子的转基因植物细胞系；
- [0042] A14) 含有 A2) 所述表达盒的转基因植物细胞系；
- [0043] A15) 含有 A3) 所述重组载体的转基因植物细胞系；
- [0044] A16) 含有 A4) 所述重组载体的转基因植物细胞系；
- [0045] A17) 含有 A3) 所述重组载体的无细胞 (cell-free) 蛋白或多肽表达系统；
- [0046] A18) 含有 A4) 所述重组载体的无细胞 (cell-free) 蛋白或多肽表达系统；
- [0047] X2、与所述免疫原相关的生物材料在制备诊断或辅助诊断肿瘤和 / 或预后或辅助预后产品中的应用；
- [0048] 所述与所述免疫原相关的生物材料为下述 B1)-B16) 中的任一种：
- [0049] B1) 编码所述免疫原的核酸分子；
- [0050] B2) 含有 B1) 所述核酸分子的表达盒；
- [0051] B3) 含有 B1) 所述核酸分子的重组载体；
- [0052] B4) 含有 B2) 所述表达盒的重组载体；
- [0053] B5) 含有 B1) 所述核酸分子的重组微生物；
- [0054] B6) 含有 B2) 所述表达盒的重组微生物；
- [0055] B7) 含有 B3) 所述重组载体的重组微生物；
- [0056] B8) 含有 B4) 所述重组载体的重组微生物；
- [0057] B9) 含有 B1) 所述核酸分子的转基因动物细胞系；
- [0058] B10) 含有 B2) 所述表达盒的转基因动物细胞系；
- [0059] B11) 含有 B3) 所述重组载体的转基因动物细胞系；
- [0060] B12) 含有 B4) 所述重组载体的转基因动物细胞系；
- [0061] B13) 含有 B1) 所述核酸分子的转基因植物细胞系；
- [0062] B14) 含有 B2) 所述表达盒的转基因植物细胞系；
- [0063] B15) 含有 B3) 所述重组载体的转基因植物细胞系；
- [0064] B16) 含有 B4) 所述重组载体的转基因植物细胞系。
- [0065] 上述应用中,所述核酸分子可以是 DNA,如 cDNAs、基因组 DNA 或重组 DNAs ;所述核酸分子也可以是 RNAs,如 mRNAs 或 shRNAs 或 siRNAs 等。
- [0066] 上述应用中,A2) 所述的含有编码所述抗 Myo9b 的抗体的核酸分子的表达盒 (抗 Myo9b 的抗体基因表达盒),是指能够在宿主细胞中表达所述抗 Myo9b 的抗体的 DNA,该 DNA

不但可包括启动所述抗 Myo9b 的抗体基因转录的启动子,还可包括终止所述抗 Myo9b 的抗体基因转录的终止子。进一步,所述表达盒还可包括增强子序列。

[0067] 上述应用中, B2) 所述的含有编码所述免疫原的核酸分子的表达盒(所述免疫原基因表达盒),是指能够在宿主细胞中表达所述免疫原的 DNA,该 DNA 不但可包括启动所述免疫原基因转录的启动子,还可包括终止所述免疫原基因转录的终止子。进一步,所述表达盒还可包括增强子序列。

[0068] 可用现有的表达载体构建含有所述免疫原基因表达盒的重组载体;可用现有的表达载体构建含有所述抗 Myo9b 的抗体基因表达盒的重组载体。

[0069] 上述应用中,所述载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。

[0070] 上述应用中, A5)-A8) 与 B5)-B8) 所述的微生物均可作为酵母、细菌、藻或真菌。

[0071] 上述应用中, A9)-A12) 与 B9)-B12) 所述的转基因植物细胞系和转基因动物细胞系均不包括繁殖材料。

[0072] 为解决上述技术问题,本发明还提供了以所述 Myo9b 作为标志物的诊断或辅助诊断肿瘤和/或预后或辅助预后的系统在制备诊断或辅助诊断肿瘤和/或预后或辅助预后产品中的应用。

[0073] 为解决上述技术问题,本发明还提供了下述 P1-P4 中任一产品:

[0074] P1、所述检测 Myo9b 表达水平或 Myo9b 基因表达水平的系统。

[0075] P2、与所述抗 Myo9b 的抗体相关的生物材料;

[0076] P3、所述免疫原;

[0077] P4、与所述免疫原相关的生物材料。

[0078] 本发明中,所述肿瘤可为肺癌、胃癌、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、头颈部癌、肾癌、卵巢癌、黑色素瘤、骨髓瘤或肉瘤。

[0079] 本发明中,所述肿瘤可为世界范围内(如欧洲、亚洲、南美洲、北美洲或大洋洲)的肿瘤。

[0080] 本发明中,所述肿瘤的预后可为预测所述肿瘤患者的生存质量和/或生存时间。

[0081] 本发明中,可按照以下方法诊断或辅助诊断肿瘤:检测待测组织和相应的非肿瘤组织中 Myo9b 的表达水平,所述待测组织中 Myo9b 的表达水平高于非肿瘤组织中 Myo9b 的表达水平,所述待测组织为或候选为肿瘤组织;所述待测组织中 Myo9b 的表达水平低于或等于非肿瘤组织中 Myo9b 的表达水平,所述待测组织为或候选为非肿瘤组织。

[0082] 本发明中,可按照以下方法预后或辅助预后:检测待测患者肿瘤组织中 Myo9b 的表达水平,所述待测患者肿瘤组织中 Myo9b 的表达水平越低,所述检测待测患者的生存时间越长或候选越长。申请人的实验表明,Myo9b 在不同肿瘤组织中高表达,肺癌组织中的 Myo9b 及 Myo9b 基因的表达水平明显高于非肿瘤肺组织,在 70% 的肺癌患者中,Myo9b 蛋白的表达增加,并且肺癌患者的肺癌组织中 Myo9b 基因的 RNA 表达水平与肺癌的恶性程度正相关。Myo9b 的表达水平与肺癌患者的生存时间相关,Myo9b 表达越高肺癌患者的生存时间越短,Myo9b 高表达的肺癌患者的生存时间高于 Myo9b 低表达的肺癌患者的生存时间,Myo9b 可以作为肺癌患者预后检测标志物。

附图说明

[0083] 图 1 为 Myo9b 在肿瘤组织数据库中的表达水平。具体分析了 Myo9b 在乳腺癌,肺癌,胃癌,结直肠癌,食管癌和脑肿瘤中的表达水平。

[0084] 图 2 为肺癌组织和非肿瘤肺组织中 Myo9b 蛋白及 RNA 的表达水平及肺癌患者的预后。其中, A 为免疫组化染色方法检测肺癌组织和非肿瘤肺组织样本中 Myo9b 的蛋白表达水平,其结果显示在 70% 的肺癌患者中, Myo9b 蛋白的表达增高 ;B 为不同 Myo9b 蛋白表达水平的百分比 ;C 为肺癌组织和非肿瘤肺组织样本中 Myo9b 的 RNA 的表达水平 ;D 为不同分期肺癌组织中 Myo9b 的 RNA 的表达水平 ;E 为 KM-Plotter 数据库中肺癌组织不同 Myo9b 的表达水平肺癌患者的预后。Ctr 与对照均表示非肿瘤肺组织, LuCa 与肺癌均表示肿瘤肺组织 ;low 表示 Myo9b 低表达组, high 表示 Myo9b 高表达组。

[0085] 图 3 为 Myo9b 的序列分析。

具体实施方式

[0086] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0087] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0088] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0089] 下述实施例中的 Myo9b 抗体为 Myo9b 多克隆抗体, Myo9b 多克隆抗体的制备方法如下:以序列 1 的第 1691-1916 位氨基酸所示的蛋白质为抗原免疫新西兰白兔 (Sino Biological Inc 产品),2-3 月后取兔的腹水,进行纯化得到 Myo9b 多克隆抗体。在裸鼠皮下异植的人肺癌细胞形成的肿瘤中,通过免疫组化实验发现该抗体可以识别内源表达的 Myo9b 蛋白。当 Myo9b 抗体与 Myo9bGAP 蛋白孵育之后,该抗体不能识别 Myo9b 蛋白。因此, Myo9b 多克隆抗体能特异性地识别 Myo9b 蛋白。同时 Western blot 证明 Myo9b 多克隆抗体特异性地识别细胞的 Myo9b 蛋白。

[0090] 实施例 1、Myo9b 在肿瘤组织中高表达

[0091] 一、Myo9b 在多种肿瘤组织中高表达

[0092] Myo9b 的氨基酸序列如序列表中序列 1 所示, Myo9b 基因的核苷酸序列如序列 2 所示。对 Oncomine 数据库中肺癌、胃癌、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、头颈部癌、肾癌、卵巢癌、黑色素瘤、骨髓瘤和肉瘤 Myo9b 表达谱的数据集进行分析 (<http://www.oncomine.org/>),结果如图 1 中 A 所示, Myo9b 在不同肿瘤组织中高表达。以乳腺癌,肺癌,胃癌,结直肠癌,食管癌和脑肿瘤为例,根据数据库具体分析了在肿瘤中与对照组相比较 Myo9b 的 mRNA 表达水平,表明 Myo9b 在乳腺癌,肺癌,胃癌,结直肠癌,食管癌和脑肿瘤中高表达 (图 1 中 B)。

[0093] 二、Myo9b 在肺癌组织中高表达并可以用于检测患者的预后

[0094] 1、实验材料来源及处理

[0095] 肺癌组织和非肿瘤肺组织来自第四军医大学唐都医院病理室诊断后收集的 60 例中国人肺癌患者样本,所有样本均获得患者知情同意并遵照相关机构和国家的指导方针。将手术切除的肿瘤组织样本切成两部分,一部分迅速用液氮冻存,用以提取 RNA。另一部分经 10% 中性福尔马林溶液固定过夜,石蜡包埋切片,根据标准方案进行免疫组化分析。

[0096] 2、肿瘤组织中 Myo9b 表达水平的检测

[0097] 2.1 蛋白质水平

[0098] 通过免疫组织化学染色法检测 60 例肺癌患者的肺癌组织和非肿瘤肺组织样本中 Myo9b 的蛋白表达水平,实验重复三次。

[0099] 将经 10%福尔马林固定、石蜡包埋并切片得到的 4 微米厚的肺癌组织和非肿瘤肺组织样本切片进行免疫组织化学染色分析,具体操作步骤如下:脱蜡,再水化,柠檬酸 (pH 值 6.0) 微波炉中加热 10 分钟进行抗原修复。用 3%过氧化氢处理 10 分钟,封闭内源性过氧化物酶活性,接着用山羊血清 30 分钟阻塞性孵育。将 Myo9b 抗体稀释后与样本切片在 4℃下孵育过夜,洗去 Myo9b 抗体,将生物素抗体(北京中山金桥生物技术有限公司产品;货号为 SP9002)稀释后与样本切片在室温下孵育 30 分钟。最后,样本切片经 3,3'-二氨基联苯胺染色观察(图 2 中 A)。

[0100] 根据样本切片的染色状况判断 Myo9b 的表达水平,将样本切片按照染色由浅至深划分为以下四个等级:-、+、++ 和 +++, - 表示样本中无 Myo9b 表达,+、++ 和 +++ 分别表示样本中 Myo9b 的表达水平由低至高。统计这四个等级的样本各占总样本的百分比(图 2 中 B)。

[0101] 结果显示,非肺癌组织 -、+、++ 和 +++ 这四个等级的样本占总样本的百分比分别为 77%、22%、1%和 0%;肿瘤肺组织中 -、+、++ 和 +++ 这四个等级的样本占总样本的百分比分别为 7%、22%、53%和 18%。在这 60 例肺癌患者中,肿瘤肺组织中 Myo9b 水平高表达(+++/++) 的患者占 71%;肿瘤肺组织中 Myo9b 水平低表达(+/-) 的患者占 29%。表明肺癌组织中的 Myo9b 表达水平明显高于非肿瘤肺组织 ($p < 0.001$)。

[0102] 2.2 RNA 表达水平

[0103] 通过定量 RT-PCR 方法检测 25 例肺癌患者的肺癌组织和非肿瘤肺组织中 Myo9b 基因的 RNA 表达水平,实验重复三次。用 Trizol (Invitrogen 产品,货号为 15596018) 提取肺组织总 RNA,并利用 Ultraspec 5300 分光光度计 (GE 公司) 对 RNA 的量和纯度进行测定;用消化 DNA 酶 I (NEB 公司产品,货号为 M0303S) 从肺组织总 RNA 中除去基因组 DNA,以 5 微克肺组织总 RNA 为模板用寡聚引物 (dT) (Fermentas 公司产品,货号为 #S0131) 和逆转录酶 (M-MLV) (Invitrogen;RTC28025-D11) 合成 cDNA 第一链,利用 ABI 的 StepOne 实时定量 PCR 仪进行扩增。检测 Myo9b 基因的 RNA 表达水平的引物为 5' -CGAGAAGTTCAGGAGCAACA-3' 和 5' -GACCAGGTTGGTGTCTTCT-3',内参为 GAPDH,内参的引物为 5' -GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3' 和 5' -GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。利用 ABI 的 StepOne 实时定量 PCR 仪 (ABI 公司) 检测 Myo9b 基因的 RNA 表达水平的扩增条件为:95℃ 15 秒,60℃ 30 秒,72℃ 30 秒,共 40 个循环。

[0104] 结果显示,肺癌患者的肺癌组织中 Myo9b 的 RNA 表达水平显著高于肺癌患者的非肿瘤肺组织中 Myo9b 基因的 RNA 表达水平(图 2 中 C)。对不同分期肺癌患者肺癌组织样本中 Myo9b 基因的 RNA 表达水平进行分析(图 2 中 D),恶性程度越高的肺癌患者肺癌组织样本中 Myo9b 基因的 RNA 表达水平越高,III 和 IV 期肺癌患者肺癌组织样本中 Myo9b 基因的 RNA 表达水平显著高于 I 和 II 期肺癌患者肺癌组织样本中 Myo9b 基因的 RNA 表达水平,表明肺癌患者的肺癌组织中 Myo9b 基因的 RNA 表达水平与肺癌的恶性程度正相关。

[0105] 三、Myo9b 的表达水平与肺癌患者的预后

[0106] 为了研究 Myo9b 的表达水平与临床之间的关系,发明人根据 KM-Plotter 数据库探

索 Myo9b 表达水平与患者生存期之间的关系。依据 Myo9b 基因的表达水平,将 KM-Plotter 数据库中的肺癌患者分为两组,即 Myo9b 高表达组和 Myo9b 低表达组。利用 Kaplan-Meier 分析 Myo9b 高表达组和 Myo9b 低表达组肺癌患者的生存时间差异。结果显示:Myo9b 高表达组肺癌患者的生存时间短于 Myo9b 低表达组肺癌患者的生存时间(图 2 中 E)。

[0107] 表明,Myo9b 的表达水平与肺癌患者的生存时间相关,Myo9b 可以作为肺癌患者预后检测标志物。

[0108] 四、Myo9b 蛋白 GAP 结构域晶体结构分析

[0109] Myo9b 的空间结构由头部的 Motor 结构域、颈部的 IQ 模序和尾部的 GAP 结构域三个部分组成(图 3 中 A)。发明人对人 (*Homo sapiens*)、小家鼠 (*Mus musculus Linnaeus*)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 和斑马鱼 (*Barchydanio rerio var.*) 的 Myo9b GAP 结构域的序列进行比对,发现 Myo9b GAP 结构域具有高度保守性(图 3 中 B)。发明人通过纯化 Myo9b GAP 结构域(序列 1 的第 1691-1916 位氨基酸)并进行结构分析,发现 Myo9b GAP 结构域含有 9 个 α 螺旋(图 3 中 C 和 D)。可以以 Myo9b GAP 结构域为抗原制备抗 Myo9b 蛋白的单克隆抗体,该抗 Myo9b 蛋白的单克隆抗体可以用于肿瘤治疗或肿瘤药物的制备。

[0001]

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> Myosin9b 蛋白特异性抗体的制备及 Myosin9b 基因家族变化在肿瘤诊断及预后中的应用

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2157

<212> PRT

<213> 人 (*Homo sapiens*)

<400> 1

```

Met Ser Val Lys Glu Ala Gly Ser Ser Gly Arg Arg Glu Gln Ala Ala
1          5          10          15
Tyr His Leu His Ile Tyr Pro Gln Leu Ser Thr Thr Glu Ser Gln Ala
          20          25          30
Ser Cys Arg Val Thr Ala Thr Lys Asp Ser Thr Thr Ser Asp Val Ile
          35          40          45
Lys Asp Ala Ile Ala Ser Leu Arg Leu Asp Gly Thr Lys Cys Tyr Val
          50          55          60
Leu Val Glu Val Lys Glu Ser Gly Gly Glu Glu Trp Val Leu Asp Ala
65          70          75          80
Asn Asp Ser Pro Val His Arg Val Leu Leu Trp Pro Arg Arg Ala Gln
          85          90          95
Asp Glu His Pro Gln Glu Asp Gly Tyr Tyr Phe Leu Leu Gln Glu Arg
          100         105         110
Asn Ala Asp Gly Thr Ile Lys Tyr Val His Met Gln Leu Val Ala Gln
          115         120         125
Ala Thr Ala Thr Arg Arg Leu Val Glu Arg Gly Leu Leu Pro Arg Gln
          130         135         140
Gln Ala Asp Phe Asp Asp Leu Cys Asn Leu Pro Glu Leu Thr Glu Gly
145         150         155         160
Asn Leu Leu Lys Asn Leu Lys His Arg Phe Leu Gln Gln Lys Ile Tyr
          165         170         175
Thr Tyr Ala Gly Ser Ile Leu Val Ala Ile Asn Pro Phe Lys Phe Leu
          180         185         190
Pro Ile Tyr Asn Pro Lys Tyr Val Lys Met Tyr Glu Asn Gln Gln Leu
          195         200         205
Gly Lys Leu Glu Pro His Val Phe Ala Leu Ala Asp Val Ala Tyr Tyr
          210         215         220
Thr Met Leu Arg Lys Arg Val Asn Gln Cys Ile Val Ile Ser Gly Glu
225         230         235         240
Ser Gly Ser Gly Lys Thr Gln Ser Thr Asn Phe Leu Ile His Cys Leu
          245         250         255
Thr Ala Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ala Ser Gly Val Glu Arg Thr Ile

```


625					630					635				640	
Lys	Tyr	Gln	Ile	Lys	Asp	Phe	Arg	Glu	Lys	Asn	Met	Asp	Tyr	Met	Arg
					645					650				655	
Pro	Asp	Ile	Val	Ala	Leu	Leu	Arg	Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Tyr	Val	Arg
					660					665				670	
Glu	Leu	Ile	Gly	Met	Asp	Pro	Val	Ala	Val	Phe	Arg	Trp	Ala	Val	Leu
					675					680				685	
Arg	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Met	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	Ala	Gly	Arg	Leu
					690					695				700	
Arg	Ala	Glu	Arg	Ala	Glu	Lys	Ala	Ala	Gly	Met	Ser	Ser	Pro	Gly	Ala
					705					710				715	
Gln	Ser	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Pro	Arg	Gly	Ala	Ser	Thr	Pro	Ser	Glu
					725					730				735	
Lys	Leu	Tyr	Arg	Asp	Leu	His	Asn	Gln	Met	Ile	Lys	Ser	Ile	Lys	Gly
					740					745				750	
Leu	Pro	Trp	Gln	Gly	Glu	Asp	Pro	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser
					755					760				765	
Arg	Leu	Gln	Lys	Pro	Arg	Ala	Phe	Ile	Leu	Lys	Ser	Lys	Gly	Ile	Lys
					770					775				780	
Gln	Lys	Gln	Ile	Ile	Pro	Lys	Asn	Leu	Leu	Asp	Ser	Lys	Ser	Leu	Lys
					785					790				795	
Leu	Ile	Ile	Ser	Met	Thr	Leu	His	Asp	Arg	Thr	Thr	Lys	Ser	Leu	Leu
					805					810				815	
His	Leu	His	Lys	Lys	Lys	Lys	Pro	Pro	Ser	Ile	Ser	Ala	Gln	Phe	Gln
					820					825				830	
Thr	Ser	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Lys	Ala	Glu	Pro	Phe
					835					840				845	
Phe	Ile	Arg	Cys	Ile	Arg	Ser	Asn	Ala	Glu	Lys	Lys	Glu	Leu	Cys	Phe
					850					855				860	
Asp	Asp	Glu	Leu	Val	Leu	Gln	Gln	Leu	Arg	Tyr	Thr	Gly	Met	Leu	Glu
					865					870				875	
Thr	Val	Arg	Ile	Arg	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ala	Lys	Tyr	Thr	Phe	Gln
					885					890				895	
Asp	Phe	Thr	Glu	Gln	Phe	Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Lys	Asp	Ala	Gln	Pro
					900					905				910	
Cys	Arg	Glu	Val	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Glu	Lys	Met	Lys	Ile	Asp	Lys
					915					920				925	
Arg	Asn	Tyr	Gln	Ile	Gly	Lys	Thr	Lys	Val	Phe	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu
					930					935				940	
Arg	Gln	Ala	Leu	Gln	Glu	Thr	Leu	His	Arg	Glu	Val	Val	Arg	Lys	Ile
					945					950				955	
Leu	Leu	Leu	Gln	Ser	Trp	Phe	Arg	Met	Val	Leu	Glu	Arg	Arg	His	Phe
					965					970				975	
Leu	Gln	Met	Lys	Arg	Ala	Ala	Val	Thr	Ile	Gln	Ala	Cys	Trp	Arg	Ser
					980					985				990	
Tyr	Arg	Val	Arg	Arg	Ala	Leu	Glu	Arg	Thr	Gln	Ala	Ala	Val	Tyr	Leu

[0004]

995					1000					1005				
Gln	Ala	Ser	Trp	Arg	Gly	Tyr	Trp	Gln	Arg	Lys	Leu	Tyr	Arg	His
1010					1015					1020				
Gln	Lys	Gln	Ser	Ile	Ile	Arg	Leu	Gln	Ser	Leu	Cys	Arg	Gly	His
1025					1030					1035				
Leu	Gln	Arg	Lys	Ser	Phe	Ser	Gln	Met	Ile	Ser	Glu	Lys	Gln	Lys
1040					1045					1050				
Ala	Glu	Glu	Lys	Glu	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	Gly
1055					1060					1065				
Ala	Glu	Glu	Gly	Gly	Gln	Gly	Gln	Ala	Ala	Gly	Gly	Gln	Gln	Val
1070					1075					1080				
Ala	Glu	Gln	Gly	Pro	Glu	Pro	Ala	Glu	Asp	Gly	Gly	His	Leu	Ala
1085					1090					1095				
Ser	Glu	Pro	Glu	Val	Gln	Pro	Ser	Asp	Arg	Ser	Pro	Leu	Glu	His
1100					1105					1110				
Ser	Ser	Pro	Glu	Lys	Glu	Ala	Pro	Ser	Pro	Glu	Lys	Thr	Leu	Pro
1115					1120					1125				
Pro	Gln	Lys	Thr	Val	Ala	Ala	Glu	Ser	His	Glu	Lys	Val	Pro	Ser
1130					1135					1140				
Ser	Arg	Glu	Lys	Arg	Glu	Ser	Arg	Arg	Gln	Arg	Gly	Leu	Glu	His
1145					1150					1155				
Val	Lys	Phe	Gln	Asn	Lys	His	Ile	Gln	Ser	Cys	Lys	Glu	Glu	Ser
1160					1165					1170				
Ala	Leu	Arg	Glu	Pro	Ser	Arg	Arg	Val	Thr	Gln	Glu	Gln	Gly	Val
1175					1180					1185				
Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Lys	Lys	Glu	Ser	Arg	Glu	Asp	Glu	Thr	Leu
1190					1195					1200				
Leu	Val	Val	Glu	Thr	Glu	Ala	Glu	Asn	Thr	Ser	Gln	Lys	Gln	Pro
1205					1210					1215				
Thr	Glu	Gln	Pro	Gln	Ala	Met	Ala	Val	Gly	Lys	Val	Ser	Glu	Glu
1220					1225					1230				
Thr	Glu	Lys	Thr	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser	Pro	Arg	Pro	Gly	Gln	Leu
1235					1240					1245				
Glu	Arg	Pro	Thr	Ser	Leu	Ala	Leu	Asp	Ser	Arg	Val	Ser	Pro	Pro
1250					1255					1260				
Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Pro	Glu	Thr	Pro	Glu	Asp	Lys	Ser	Lys	Pro
1265					1270					1275				
Cys	Gly	Ser	Pro	Arg	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Asp	Ser	Pro	Gly	Gly
1280					1285					1290				
Ser	Thr	Gln	Ile	Gln	Arg	Tyr	Leu	Asp	Ala	Glu	Arg	Leu	Ala	Ser
1295					1300					1305				
Ala	Val	Glu	Leu	Trp	Arg	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Ser
1310					1315					1320				
Pro	Ser	Ala	Met	Leu	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Asp	Arg	His
1325					1330					1335				
Arg	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Leu	Thr	Pro	Thr	Glu	Glu	Arg	Arg	Thr

[0005]

1340	1345	1350
Ser Phe Ser Thr Ser Asp Val Ser Lys Leu Leu Pro Ser Leu Ala		
1355	1360	1365
Lys Ala Gln Pro Ala Ala Glu Thr Thr Asp Gly Glu Arg Ser Ala		
1370	1375	1380
Lys Lys Pro Ala Val Gln Lys Lys Lys Pro Gly Asp Ala Ser Ser		
1385	1390	1395
Leu Pro Asp Ala Gly Leu Ser Pro Gly Ser Gln Val Asp Ser Lys		
1400	1405	1410
Ser Thr Phe Lys Arg Leu Phe Leu His Lys Thr Lys Asp Lys Lys		
1415	1420	1425
Tyr Ser Leu Glu Gly Ala Glu Glu Leu Glu Asn Ala Val Ser Gly		
1430	1435	1440
His Val Val Leu Glu Ala Thr Thr Met Lys Lys Gly Leu Glu Ala		
1445	1450	1455
Pro Ser Gly Gln Gln His Arg His Ala Ala Gly Glu Lys Arg Thr		
1460	1465	1470
Lys Glu Pro Gly Gly Lys Gly Lys Lys Asn Arg Asn Val Lys Ile		
1475	1480	1485
Gly Lys Ile Thr Val Ser Glu Lys Trp Arg Glu Ser Val Phe Arg		
1490	1495	1500
Gln Ile Thr Asn Ala Asn Glu Leu Lys Tyr Leu Asp Glu Phe Leu		
1505	1510	1515
Leu Asn Lys Ile Asn Asp Leu Arg Ser Gln Lys Thr Pro Ile Glu		
1520	1525	1530
Ser Leu Phe Ile Glu Ala Thr Glu Lys Phe Arg Ser Asn Ile Lys		
1535	1540	1545
Thr Met Tyr Ser Val Pro Asn Gly Lys Ile His Val Gly Tyr Lys		
1550	1555	1560
Asp Leu Met Glu Asn Tyr Gln Ile Val Val Ser Asn Leu Ala Thr		
1565	1570	1575
Glu Arg Gly Gln Lys Asp Thr Asn Leu Val Leu Asn Leu Phe Gln		
1580	1585	1590
Ser Leu Leu Asp Glu Phe Thr Arg Gly Tyr Thr Lys Asn Asp Phe		
1595	1600	1605
Glu Pro Val Lys Gln Ser Lys Ala Gln Lys Lys Lys Arg Lys Gln		
1610	1615	1620
Glu Arg Ala Val Gln Glu His Asn Gly His Val Phe Ala Ser Tyr		
1625	1630	1635
Gln Val Ser Ile Pro Gln Ser Cys Glu Gln Cys Leu Ser Tyr Ile		
1640	1645	1650
Trp Leu Met Asp Lys Ala Leu Leu Cys Ser Val Cys Lys Met Thr		
1655	1660	1665
Cys His Lys Lys Cys Val His Lys Ile Gln Ser His Cys Ser Tyr		
1670	1675	1680
Thr Tyr Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Val Glu Pro Gly His Phe		

[0006]

1685	1690	1695
Gly Val Cys Val Asp Ser	Leu Thr Ser Asp Lys	Ala Ser Val Pro
1700	1705	1710
Ile Val Leu Glu Lys Leu	Leu Glu His Val Glu	Met His Gly Leu
1715	1720	1725
Tyr Thr Glu Gly Leu Tyr	Arg Lys Ser Gly Ala	Ala Asn Arg Thr
1730	1735	1740
Arg Glu Leu Arg Gln Ala	Leu Gln Thr Asp Pro	Ala Ala Val Lys
1745	1750	1755
Leu Glu Asn Phe Pro Ile	His Ala Ile Thr Gly	Val Leu Lys Gln
1760	1765	1770
Trp Leu Arg Glu Leu Pro	Glu Pro Leu Met Thr	Phe Ala Gln Tyr
1775	1780	1785
Gly Asp Phe Leu Arg Ala	Val Glu Leu Pro Glu	Lys Gln Glu Gln
1790	1795	1800
Leu Ala Ala Ile Tyr Ala	Val Leu Glu His Leu	Pro Glu Ala Asn
1805	1810	1815
His Asn Ser Leu Glu Arg	Leu Ile Phe His Leu	Val Lys Val Ala
1820	1825	1830
Leu Leu Glu Asp Val Asn	Arg Met Ser Pro Gly	Ala Leu Ala Ile
1835	1840	1845
Ile Phe Ala Pro Cys Leu	Leu Arg Cys Pro Asp	Asn Ser Asp Pro
1850	1855	1860
Leu Thr Ser Met Lys Asp	Val Leu Lys Ile Thr	Thr Cys Val Glu
1865	1870	1875
Met Leu Ile Lys Glu Gln	Met Arg Lys Tyr Lys	Val Lys Met Glu
1880	1885	1890
Glu Ile Ser Gln Leu Glu	Ala Ala Glu Ser Ile	Ala Phe Arg Arg
1895	1900	1905
Leu Ser Leu Leu Arg Gln	Asn Ala Pro Trp Pro	Leu Lys Leu Gly
1910	1915	1920
Phe Ser Ser Pro Tyr Glu	Gly Val Leu Asn Lys	Ser Pro Lys Thr
1925	1930	1935
Arg Asp Ile Gln Glu Glu	Glu Leu Glu Val Leu	Leu Glu Glu Glu
1940	1945	1950
Ala Ala Gly Gly Asp Glu	Asp Arg Glu Lys Glu	Ile Leu Ile Glu
1955	1960	1965
Arg Ile Gln Ser Ile Lys	Glu Glu Lys Glu Asp	Ile Thr Tyr Arg
1970	1975	1980
Leu Pro Glu Leu Asp Pro	Arg Gly Ser Asp Glu	Glu Asn Leu Asp
1985	1990	1995
Ser Glu Thr Ser Ala Ser	Thr Glu Ser Leu Leu	Glu Glu Arg Ala
2000	2005	2010
Gly Arg Gly Ala Ser Glu	Gly Pro Pro Ala Pro	Ala Leu Pro Cys
2015	2020	2025
Pro Gly Ala Pro Thr Pro	Ser Pro Leu Pro Thr	Val Ala Ala Pro

[0007]

2030	2035	2040
Pro Arg Arg Arg Pro Ser Ser Phe Val Thr Val Arg Val Lys Thr		
2045	2050	2055
Pro Arg Arg Thr Pro Ile Met Pro Thr Ala Asn Ile Lys Leu Pro		
2060	2065	2070
Pro Gly Leu Pro Ser His Leu Pro Arg Trp Ala Pro Gly Ala Arg		
2075	2080	2085
Glu Ala Ala Ala Pro Val Arg Arg Arg Glu Pro Pro Ala Arg Arg		
2090	2095	2100
Pro Asp Gln Ile His Ser Val Tyr Ile Thr Pro Gly Ala Asp Leu		
2105	2110	2115
Pro Val Gln Gly Ala Leu Glu Pro Leu Glu Glu Asp Gly Gln Pro		
2120	2125	2130
Pro Gly Ala Lys Arg Arg Tyr Ser Asp Pro Pro Thr Tyr Cys Leu		
2135	2140	2145
Pro Pro Ala Ser Gly Gln Thr Asn Gly		
2150	2155	

<210> 2

<211> 6474

<212> DNA

<213> 人 (*Homo sapiens*)

<400> 2

```

atgagtgtga aagaggcagg cagctcgggc cgeccgggagc aggcggccta ccacctgcac      60
atctaccccc agetgtccae caccgagagc caggectcgt gecgegtga c tgcaccaag      120
gacageacca ectcggacgt catcaaggac gccattgcca gectgcggct ggacggcacc      180
aaatgttatg tgctggtgga ggtcaaagag tggggaggcg aggaatgggt gctggacgcc      240
aacgaetgca ctgtgcaccg ggtgetgcta tggccccggc gggcacagga cgageaccct      300
caggaggatg gctactactt cctgctgcag gagcgcaacg cagatggaac catcaagtac      360
gtgcataatg agctggtggc gcaggceaca gccacccegge gcctagtgga gegtggcctc      420
ctgccacggc agcaggcgga ctttgatgac ctgtgtaacc tccccgaget aaccgagggc      480
aacctcctga agaacctcaa gcaccgettc ctgeaacaaa agatctacac gtacgcgggg      540
agcctcctgg tggccatcaa cccctttaag ttectgecca tctacaacce caagtaactg      600
aagatgtatg agaaccagca gctgggcaag ctggagccae acgtcttege gctggccgac      660
gtggcetaet acaccatgct caggaagegc gtgaaccagt gcatoctgat ctgggtgag      720
ageggetccg geangaccea gageaccaac tteetcatcc actgcctcac cgecctcagc      780
cagaagggct acgceagcgg cgtcgagagg accatcctgg gtgctggccc tgtgetggag      840
gcttttgaa atgccaagac agcccacaac aacaactcca gccggttg gaaattcctc      900
caagtcagct acctagagag tggcatcgtg agaggagctg tcgtcgagaa atatctgett      960
gaaaagtctc gcctggtgtc tcaggagaag gatgagagga actaccatgt gttttattat     1020
ttgttacttg gggtcagega ggaagagegc caagaattte agctcaagca gctgaagat     1080
tattctace tcaaccagca taacttgaag attgaagatg gggaggacct gaagcatgac     1140
tttgagagge tcaagcagge catggagatg gtgggettcc tccccgecac caagaagcag     1200
atttttgcog tectctegge catcctgtae ctgggcaacg tcaattataa gaagagagct     1260
acaggccgag aggaagggtt ggaggtcggg ccacccgagg tgctggacac cctgtcgcag     1320
cttctgaagg tgaagcgaga aatcttggtg gaggttctga ccaaagaaa aacggtgacc     1380

```

[0008]

gtcaacgaca	agcttatect	tecctacage	ctcagegagg	ccatcaactgc	ccgcgaetec	1440
atggccaagt	ctctgtacag	cgcctgttc	gactggattg	tgtctgggat	caaccacgca	1500
ctctcaaca	agaaggacgt	ggaagaggea	gtctctgtcc	tgtccattgg	ggctctggac	1560
atctctgggt	ttgaagaact	cgagaggaac	agctttgagc	agttctgeat	caactacgce	1620
aatgagcagc	tgcaagtatta	cttcaaccag	cacatcttca	agctggagca	ggaggaatat	1680
cagggcgagg	ggatcacgtg	gcacaacatc	ggetacacag	acaatgtcgg	ctgcatccat	1740
ctcatcagca	agaaacceac	ggcctcttc	tacctgctgg	acgaggagag	caactteccc	1800
cacgccacga	gccagaccct	gctggccaag	ttcaaacage	aacatgagga	caataagtac	1860
ttctctggga	ccccggtcat	ggagccaget	tteatcatcc	agcacttcgc	agggaaagtg	1920
aaatacaga	teaaggactt	ccgggagaag	aacatggact	acatgcggcc	agacatcgtg	1980
gcctctgtgc	ggggcagtga	cagctcttac	gtcggggagc	tcatcggcat	ggaccccggtg	2040
gcctgttcc	getgggccc	gctccggget	gctatecggg	ccatggcagt	gcttcgggag	2100
gccggacgcc	tgcgggcccga	gagggccgaa	aaggctgcag	gtatgagcag	ccctgggtgcc	2160
caaagtcacc	cagaagagct	gccaaagagg	gccagcacc	cttcggaaaa	actttaccgc	2220
gatttgata	accaaatgat	caagagcacc	aaaggattgc	cctggcaggg	cgaggacccc	2280
cgtagccttc	tccagtcct	cagtcggctc	cagaaacccc	gctccttcat	cctgaaaagt	2340
aaaggtatca	aacaaaagca	gatcattcca	aagaacctac	tggactecaa	gtccctgaaa	2400
ctcateatea	geatgaetct	gcacgaccgc	accaccaagt	ccctactgca	cctgcacaag	2460
aagaaaaagc	caccaagcat	cagcgcceag	tccagacat	cccttaacaa	gctcttgag	2520
gcactgggga	aggcggagcc	cttctttatc	cgctgcatec	gttccaatgc	tgaaaagaaa	2580
gagctgtgct	ttgacagcga	gctggctctg	cagcagetgc	getacacegg	catgctggag	2640
accgtgcgca	tccggaggtc	agggtacagc	gccaaagtaca	cgttccagga	ttcaccgag	2700
cagttccagg	tgtctctgce	caaggatgce	cagccctgca	gggaggteat	ctccaccctc	2760
ctggagaaaa	tgaagataga	caagaggaac	taccagatcg	ggaagaceaa	ggtcttctctg	2820
aaggagacgg	agcggcaagc	cctgcaggag	acgctgcacc	gggaggtggt	goggaaaatc	2880
ctgctgctgc	agagctggtt	ccggatggtg	ctggagcgtc	ggcacttctc	gcagatgaag	2940
cgggcccgcg	tcaccatcca	ggcctgctgg	cggtcttacc	gggtccggag	ggcctggag	3000
aggagcagg	ctgccgtgta	cctccaggcc	tcattggagg	gctactggca	gcggaagctc	3060
taccggcacc	agaaacagag	catcatecgc	ctgcagagcc	tgtgtcgggg	gcacctgcag	3120
cgcaagagct	tcagccagat	gatctcggag	aagcagaagg	cagaagagaa	ggagagggaa	3180
gccttggaag	ccgcaagagc	aggtgctgag	gagggcggac	agggtcaggc	ggctggaggg	3240
cagcaggtag	ctgagcaggg	gccggagcca	gaggagatg	gagggcacct	ggcatcggag	3300
cctgaggtgc	agccaagtga	caggtcccc	ctagagcact	cctcacctga	gaaggaggcc	3360
ccaagcccag	agaagaetct	cccaccccag	aaaaccgtgg	cggtgaaag	tcacgagaaa	3420
gtccccagca	gccgggagaa	gcgtgagtcg	cgctggcaaa	gagggtgga	gcacgtcaag	3480
ttcagaaca	aacacatcca	gtctgcaag	gaggagatg	ccctcagaga	acctccaga	3540
agggtcacc	aggagcaagg	ggtgagtctc	ctggaagaca	aaaaggagag	cagagaagat	3600
gaaacccttc	tagtcgtaga	gacggaggct	gagaacacat	ctcaaaagca	gccacagag	3660
caaccacagg	ccatggcagt	tggcaaggtc	tctgaagaaa	ctgagaagac	gtgcccagt	3720
gggagcccca	ggcctggcca	gcttgagcgg	ccgaccagcc	tggccctgga	cagcagggtc	3780
agcccaccgg	cccctggcag	cgcccccgag	accccagagg	acaagagcaa	accatgtggc	3840
agcccaaggg	ttcaggaaaa	gccccacagc	cccggaggct	ccacgcagat	ccagcggtac	3900
ctggacgccg	agcggctggc	cagcgcctgt	gaactgtggc	ggggcaagaa	gctggtggcc	3960
gcgcgcagcc	ctagtgccat	gctcagccag	tccctggacc	tcagcagcag	acaccgggcc	4020
acaggggccc	ccctcagccc	cacagaggag	agggcaccct	ccctctccac	gagcagcgtc	4080
tccaagctcc	tcccgtccct	ggccaaggct	cagcctgcag	cagaaaccac	ggacggagag	4140

[0009]

cgaagtgcga	aaaagccagc	tgtccagaag	aagaagccag	gcgaegcatc	ctccctceca	4200
gacgcagggc	tgtccccggg	ctctcaggtc	gaetctaaat	ccacgtttaa	gaggettitt	4260
ctgcataaaa	ccaaggataa	aaaatacagc	ctggagggcg	cagaggagct	ggagaatgca	4320
gtgtccgggc	acgtggtget	ggaagccacc	accatgaaga	agggcctgga	agccccctcc	4380
ggacagcagc	atgccacgc	tgcaggtgag	aagcgcacca	aggaaccagg	aggcaaaugg	4440
aagaagaacc	gaaatgtcaa	gattgggaag	atcacagtgt	cagagaagtg	gcgggaatcg	4500
gtgttccgce	agatcaccaa	cgccaatgag	ctcaagtacc	tggacgagtt	cttgetcaac	4560
aagataaatg	acctccgttc	ccagaagacg	cccattgaga	gcttgtttat	cgaagccacc	4620
gagaagttca	ggagcaacat	caaaacgatg	tactctgtcc	cgaacgggaa	gatccaegtg	4680
ggetacaagg	atctgatgga	gaactaecag	atctctgtca	gcaacctgga	cactgagcgt	4740
ggccagaagg	acaccaacct	ggtcctcaac	ctcttccagt	cactgctaga	tgagttcacc	4800
ctgtgctaca	ccaagaacga	cttcgagcca	gtgaagcaga	gcaangetca	gaagaagaag	4860
cggaaagcagg	agcgtgctgt	ccaggagcac	aacggggcag	tgctcgcag	ctaccagggt	4920
agcatcccgc	agctgtgcga	gcagtgcctc	tcctatatct	ggctcatgga	caaggccctg	4980
ctctgcagcg	tgtgcaagat	gacctgccac	aagaagtgeg	tgcaacaagat	tcagagccac	5040
tgctcctaca	cctacgggag	gaagggcgag	ccaggcgttg	agcctggcca	cttcggcgtg	5100
tgegtagaca	gectgaccag	cgacaaggcc	tcggtgcca	tcgtgctgga	gaagctctctg	5160
gaacacgtgg	agatgcacgg	cctgtacacc	gagggcctct	accgcaagtc	gggtgctgce	5220
aaccgcactc	gggagctccg	gcaggegtg	cagacagacc	ccgcagcagt	caagetggag	5280
aacttcccca	tcacgccat	cacaggggtg	ctgaagcagt	ggctgcggga	gtgcccagag	5340
ccctcatga	ccttcgcaca	gtacggcgac	ttctctcgag	ccgtcgagct	gccggagaag	5400
caggagcagc	tggtgceat	ctatgccgtc	ctggagcacc	ttccagaagc	caaccacaac	5460
tccttgagga	gactcatctt	ccacctgtc	aaggtgccc	tgctcgagga	tgcaaccgc	5520
atgtcacctg	gggcgtggc	cattatcttc	gcaccctgcc	tcctgcgctg	ccctgacaac	5580
tcggaccgc	tgaccagcat	gaaggacgtc	ctcaagatca	ccacgtgctg	ggagatgctg	5640
atcaaggagc	agatgaggaa	atacaaagtg	aagatggagg	agatcagcca	actggaggct	5700
gcagagagta	tcgcttccg	caggettctg	ctcttgcgac	aaaatgctcc	atggctctct	5760
aaactggggt	ttctgtctcc	ctatgagggg	gtcttgaaca	agagcccaaa	gaccceggac	5820
atccaggagg	aggagctgga	ggtgctgctg	gaggaggagg	cagccggcgg	cgatgaggac	5880
cgggaaaagg	agattctcat	tgaacggatc	cagtcacatc	aggaggagaa	ggaggacatc	5940
acctaccggc	tgccggagct	ggacccaagg	ggctcggacg	aggagaacct	ggactcggag	6000
acgtcggcca	gcaccgagag	cctgctggag	gagcgggccc	ggcggggggc	ctcgaagggg	6060
ccccctgegc	ctgetctccc	ttgccccggc	gcgcccacc	cgagccccct	ccccaccgtg	6120
gcgcccctc	cacgacgaag	gccgtctctc	ttctgaacgg	tcagagtga	gaccccccg	6180
cggaccccca	tcctgcccac	ggccaacatc	aagctcccac	caggcctgcc	ctcccacctg	6240
ctctgctggg	caccgggtgc	ccgggagggc	gctgccccag	tgccggcggc	ggagccacct	6300
gcccgcgcgc	cggaccagat	acattctctg	tacatcacgc	ccggggcaga	cttcccagtg	6360
cagggcgcgc	tggagcccct	agaagaggat	ggccagccac	ctggggccaa	gaggaggctac	6420
tcggatcccc	caacgtactg	cctgcccccc	gcctcgggcc	agaccaatgg	ctga	6474

- <210> 3
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223>

[0010]

<400> 3	
cgagaagttc aggagcaaca	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 4	
gaccaggttg gtgtccttet	20

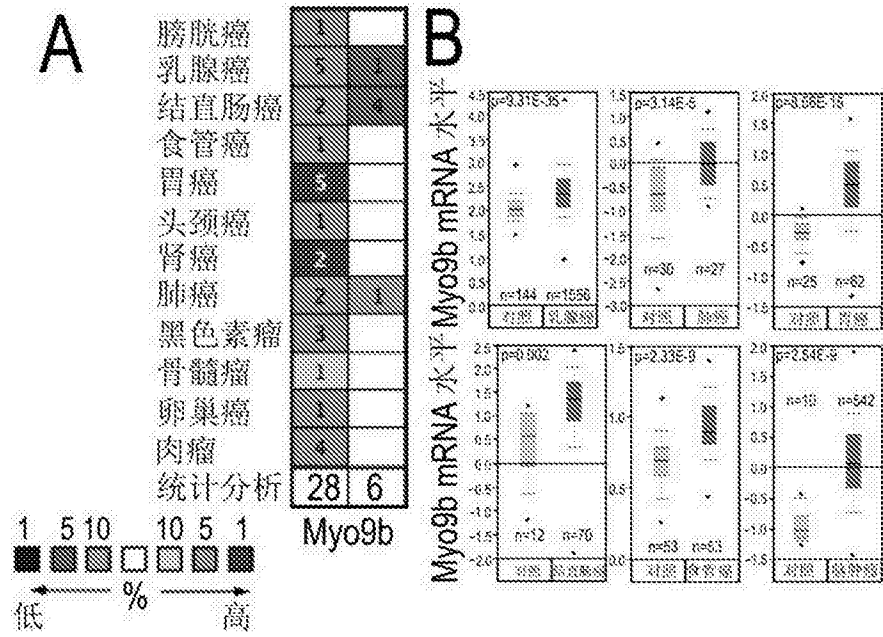


图 1

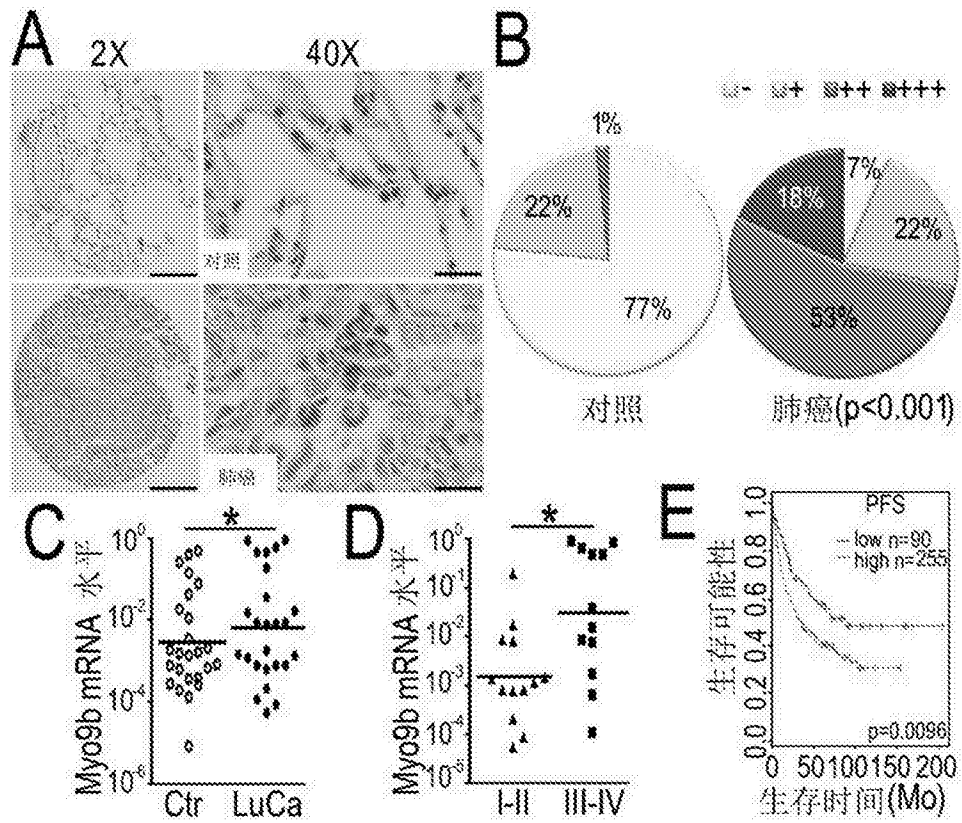


图 2

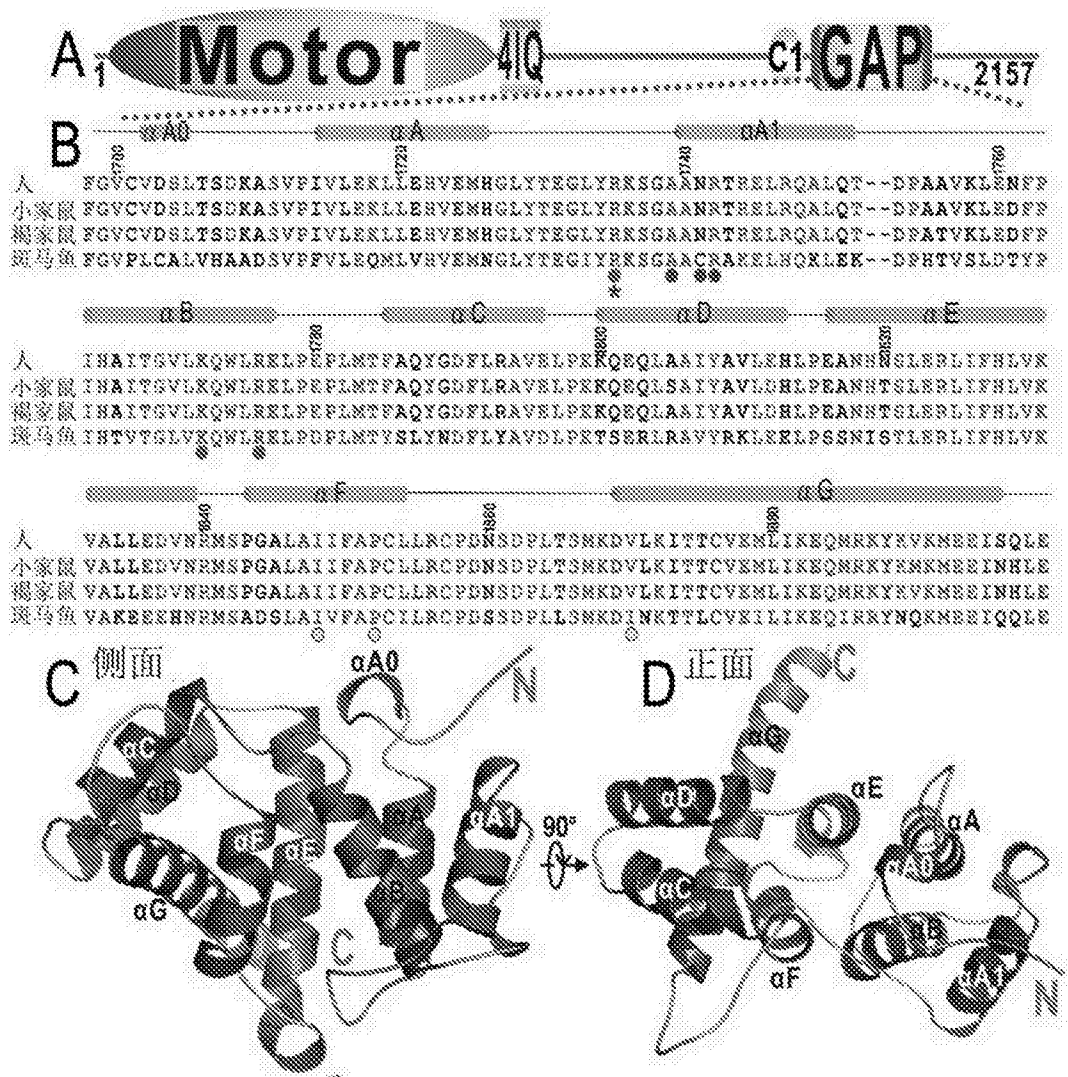


图 3