



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02827488.1

[43] 公开日 2005 年 5 月 11 日

[11] 公开号 CN 1615369A

[22] 申请日 2002. 11. 25 [21] 申请号 02827488. 1
 [30] 优先权
 [32] 2001. 11. 29 [33] DE [31] 10158517. 9
 [86] 国际申请 PCT/EP2002/013214 2002. 11. 25
 [87] 国际公布 WO2003/046214 德 2003. 6. 5
 [85] 进入国家阶段日期 2004. 7. 23
 [71] 申请人 富卡斯吉诺米克斯有限责任公司
 地址 德国泰尔托
 [72] 发明人 克里斯托弗·查尔

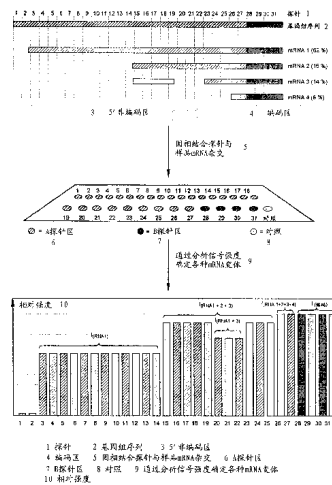
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 4 页 说明书 28 页 附图 1 页

[54] 发明名称 分析翻译调控的基因表达的方法

[57] 摘要

本发明涉及分析基因表达的方法，它使得考虑存在于细胞类型、组织或生物体中的翻译状态成为可能，以便将由待研究基因转录的 mRNA 的含量与由该 mRNA 翻译的蛋白的含量可靠地关联起来。由待研究基因转录的以及编码特定蛋白所有 mRNA 变体的翻译效率的确定，使得有可能与其它方法一起鉴定在特定细胞类型、组织或生物体中优先翻译的 mRNA 变体。根据优先翻译的编码待研究蛋白的 mRNA 变体的含量以及翻译效率，有可能可靠地预测在细胞类型、组织或生物体中表达的蛋白的含量。



ISSN 1008-4274

1. 一种固相基质，其上多点固定有至少两种不同的单链核酸（探针），所述探针具有来自特定基因的部分基因组核苷酸序列的 10 到 40 个连续核苷酸，特征在于：
- 5 第一探针与所述基因第一 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补，
- 第一探针不与所述基因第二 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补，
- 10 第二探针与所述基因第一 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补，和
- 第二探针与所述基因第二 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补。
2. 如权利要求 1 中所述的固相基质，特征在于它包括第三探针，所述
- 15 第三探针
- 与所述基因第一 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补，
- 与所述基因第二 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补，
- 20 与所述基因第三 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补，其中
- 第一和第二探针不与所述基因第三 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补。
3. 如前述权利要求中任一项所述的固相基质，特征在于至少一个固定在所述固相基质上的探针包括待分析基因部分编码区的核苷酸序列。
- 25 4. 如前述权利要求中任一项所述的固相基质，特征在于固相基质上的探针基本上包括了待分析基因 5' 或 3' 非编码区的完整基因组核苷酸序列。
5. 如前述权利要求中任一项所述的固相基质，特征在于固相基质上的探针基本上包括了待分析基因非编码区的完整基因组核苷酸序列。
- 30 6. 如前述权利要求中任一项所述的固相基质，特征在于固相基质上的探针基本上包括了待分析基因的完整基因组核苷酸序列。

7. 如前述权利要求中任一项所述的固相基质, 特征在于另有一个或多个各自具有 10 到 40 个连续核苷酸的探针固定在所述固相基质上, 其中每一个探针都是从由样品起源生物体的持家基因、细菌基因或植物基因组成组中选择的基因之部分核苷酸序列。
- 5 8. 如前述权利要求中任一项所述的固相基质, 特征在于所述固相基质配置为 DNA 阵列。
9. 分析编码样品中蛋白的至少一个基因的表达的方法, 特征在于
- a) 确定样品中存在的待分析基因的各种 mRNA 变体的合适数目和同一性;
- 10 b) 确定样品中存在的待分析基因的各种 mRNA 变体各自的量;
- c) 根据步骤 b) 中确定的量以及所述各种 mRNA 变体各自的翻译效率, 可确定样品中存在的由所述基因编码的蛋白的量。
10. 如权利要求 1 中所述的方法, 特征在于
- aa) 提供了从样品获得的或由其制备的组合物, 其包括 mRNA 或者由其衍生的核酸;
- 15 bb) 提供了如权利要求 1 到 8 中任一项所述的固相基质;
- cc) 使来自 aa) 的组合物与所述固相基质接触,
- dd) 确定存在于来自 aa) 的组合物中的、由待分析基因编码的核酸的各种变体的合适数目和同一性;
- 20 ee) 确定存在于来自 aa) 的组合物中的、由待分析基因编码的核酸的各种变体各自的量;
- ff) 根据步骤 ee) 中确定的量以及待分析基因的各种 mRNA 变体各自的翻译效率, 可确定由样品获得的或者制备的组合物中存在的由所述基因编码的蛋白的量。
- 25 11. 如权利要求 9 或 10 中所述的方法, 特征在于所述样品起源于哺乳动物细胞培养物, 哺乳动物组织或器官。
12. 如权利要求 9 到 11 中任一项所述的方法, 特征在于所述步骤 aa) 中由样品获得或者制备的组合物包括总 RNA、polyA⁺ RNA、cRNA 和/或 cDNA。
- 30 13. 如权利要求 9 到 12 中任一项所述的方法, 特征在于在实施步骤 cc) 前, 标记来自步骤 aa) 的组合物中存在的核酸。

14. 如权利要求 9 到 13 中任一项所述的方法, 特征在于至少有 2 个不同的 RNA 变体自待分析基因转录。
15. 如权利要求 14 中所述的方法, 特征在于不同的 mRNA 变体在 5' 末端不同、在 3' 末端不同和/或代表了所述基因的不同剪接形式。
- 5 16. 如权利要求 9 到 15 中任一项所述的方法, 特征在于步骤 ff) 通过数据库模块和分析模块实施。
17. 如权利要求 16 中所述的方法, 特征在于所述数据库模块包括贮存介质, 其上贮存有待分析基因的各种 mRNA 变体各自的翻译效率。
18. 如权利要求 16 或 17 中所述的方法, 特征在于分析模块包括处理器
10 和存储器。
19. 分析样品中至少一个基因的表达的试剂盒, 包括:
- a) 作为组件 1 的如权利要求 1 到 8 中任一项所述的固相基质;
- b) 作为组件 2 的贮存介质, 其上贮存有待分析基因的各种 mRNA 变体各自的翻译效率。
- 15 20. 如权利要求 19 中所述的试剂盒, 特征在于它额外包括在含核酸组合物与所述固相基质进行接触后, 测定与各探针结合的核酸的各自量的装置。
21. 如权利要求 19 或 20 中任一项所述的试剂盒, 特征在于组件 2 额外包括来源于样品细胞、组织或生物体的转录特征。
- 20 22. 如权利要求 19 到 21 中任一项所述的试剂盒, 特征在于组件 2 额外包括因疾病改变了的细胞、组织或生物体的转录特征。
23. 如权利要求 22 中所述的试剂盒, 特征在于所述疾病选自包括神经退行性变紊乱、癌症、自身免疫病、老年人慢性病、心血管病、病毒病或药物抗性的组。
- 25 24. 如权利要求 19 到 23 中任一项所述的试剂盒, 特征在于组件 2 额外包括已用一种或多种治疗制剂治疗的肿瘤细胞的转录特征。
25. 确定或分析紊乱的方法, 特征在于将通过如权利要求 1 到 8 中任一项所述的固相基质产生的转录特征与病理学改变的细胞、组织或生物体的转录特征进行比较。
- 30 26. 确定或分析外部影响对待研究细胞的效应的方法, 特征在于将通过如权利要求 1 到 8 中任一项所述的固相基质产生的并且是由细胞、组织或

生物体产生的转录特征与相同的细胞或者由相同的组织或生物体在暴露于外部影响之后的转录特征进行比较。

27. 确定 RNA 二级结构的方法,特征在于使所述 RNA 经受部分 RNase 消化, 并随即与如权利要求 1 到 8 中任一项所述的固相基质进行接触。

5 28. 如权利要求 1 到 8 中任一项所述的固相基质在确定样品中蛋白质浓度中的应用。

29. 如权利要求 1 到 8 中任一项所述的固相基质在确定或分析疾病中的应用。

10 30. 如权利要求 1 到 8 中任一项所述的固相基质在确定或分析外部影响对待研究细胞的效应中的应用。

31. 如权利要求 1 到 8 中任一项所述的固相基质在确定 RNA 分子二级结构中的应用。

分析翻译调控的基因表达的方法

5 本发明涉及转录分析领域的方法，且尤其包括分析翻译调控的基因表达的方法和试剂盒。所述方法基于对由待研究的一个或多个基因转录的 mRNA 变体 5' UTR 的翻译效率的分析。有关由待研究的一个或多个基因转录的多种 mRNA 变体翻译效率的数据优选是数据库系统的一部分，所述数据连同特别设计的转录分析工具，通过鉴定并定量由一个或多个基因转录的多种 mRNA 变体，能够就待研究细胞类型、组织或生物体中蛋白质的含量进行精确的预测。

基因表达产物 - 蛋白质 - 是细胞功能的承担者。已经可以证明基因表达调控在生物过程如胚胎发生、组织修复、老化或致瘤性转化中起着必不可少的作用。真核细胞的基因表达在转录水平、转录后 (RNA 多聚腺苷酸化、mRNA 剪接、成熟 mRNA 自核向胞质的输出以及 RNA 的靶向降解)、
15 翻译或翻译后水平受到调控[0]。翻译水平的表达调控代表了新的调控基因表达的关键性调控机制[1]。已经证明了多种生长因子、细胞因子、激素受体、蛋白激酶、转录因子、翻译机器元件以及细胞周期和凋亡调节子表达的翻译调控[2、3、4、5 和 6]。编码表达处于翻译调控之下的基因的 mRNA 以不寻常的结构而著名。多数 mRNA 的 5'非翻译区 (5'UTR)正常为 10 个核苷酸 (N)到 200 N 之间的长度[7、8]。大约三分之二编码原癌基因或者参与细胞分裂的因子的 mRNA 具有长于 200 N 的 5' UTR 和/或包括不止一个起始密码子。迄今为止已知的在 mRNA 5' UTR 的帮助下调控蛋白质生物合成起始的机制在下文详细描述。

25

长的结构性 5' UTR 的翻译调控: 根据核糖体扫描模型，当包含高比例鸟嘌呤和胞嘧啶碱基的稳定的二级结构和序列片断存在于 mRNA 5' UTR 时，能够非常有效地抑制蛋白质生物合成的帽-依赖性起始[1]。体外研究已证明具有 30-70 kcal/mol 自由能的 mRNA 5' UTR 中的发夹结构能够有效地
30 抑制翻译。因而，也有可能证明编码特定蛋白且具有表现出此类结构的 5'

UTR 的 mRNA 仅仅非常被微弱地翻译，而编码同一蛋白且具有不稳固（weaker）结构的较短 5' UTR 的 mRNA 被相当更为有效地翻译 [5, 9]。

上游开放读框(uORF)的翻译调控：翻译起始的核糖体扫描模型表明蛋白质合成起始于 5'-最接近的起始密码子[10, 11]。许多具有长 5' UTR 的 mRNA 在编码区首个起始密码子上游包含一个或多个额外的起始密码子或者一个或多个 uORF，对下游编码区的翻译具有抑制效果[6]。与编码同一蛋白且其长 5' UTR 包含一个或多个额外的起始密码子或 uORF 的 mRNA 相比，编码特定蛋白并且其 5' UTR 相当短且不含额外的起始密码子或者 uORF 的 mRNA 被相当更为有效地翻译[1,2,3,6,12 和 13]。

内部核糖体进位 (IRES) 的翻译调控：翻译的内部起始最初发现于细小核糖核酸病毒中，其 mRNA 没有 5'帽结构，并具有长约 1000 N 且额外包含大量 uORF 的结构性 5' UTR。尽管存在这种根据核糖体扫描模型有效抑制翻译起始的 5' UTR 结构[11]，细小核糖核酸病毒的 RNA 在体外和体内被有效地翻译。细小核糖核酸病毒 RNA 5' UTR 的二级结构利于核糖体亚基的结合以及翻译的帽-依赖性起始（内部核糖体进位→ IRES）。在多种其它病毒的 RNA 中也已经发现了具有相似结构的 5' UTR [14, 15]。同样也已经可能检测在真核细胞中转录的各种细胞 mRNA 5' UTR 中的一个或多个 IRES [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 和 24]。其 5' UTR 包含 IRES 的 mRNA 能够不依赖于 5'-7 甲基-G 帽结构而在过表达真核起始因子 eIF 4E 的细胞中翻译 [6, 11]。就这点而言，也有可能证明与编码同一蛋白但其 5' UTR 包含 IRES 的 mRNA 相比，编码特定蛋白且具有不稳固结构的短 5' UTR 的 mRNA 被相当更为有效地翻译[24]。mRNA 5' UTR 中的一个或多个 IRES 元件使得该 mRNA 在病毒感染后或在 eIF4E 过表达细胞中能够有效翻译。在正常状态下，具有此长度的结构性 5' UTR 妨碍帽-依赖性翻译起始。

有可能证明多个 mRNA 变体自表达在翻译水平调控的基因转录。自特定基因转录的所有 mRNA 变体具有完全相同的编码区序列。在多数研究案例中，主转录本具有长的结构性 5' UTR，而次转录本具有结构不稳固的较短 5' UTR。这些 mRNA 变体的起源可归因于不同转录起始位点的使用以及前-mRNA 的选择性剪接 [2, 12, 24]。

例如，由 bcl-2 基因转录两个 mRNA 变体。bcl-2 基因的主转录本具有长度大于 1000 N 且包含多个 uORF 的 5' UTR。而 bcl-2 次转录本具有长约 80 N 且结构不稳固的 5' UTR，而且被优先翻译。次转录本的比例约为 bcl-2 mRNA 总量的 5% [2, 12]。通过外部影响例如辐照、化学制品、细胞生长抑制剂、激素、细胞因子、生长因子或胁迫诱导，使优先翻译的 bcl-2 转录本的转录速率加倍，导致蛋白浓度的加倍。bcl-2 mRNA 的总量整体增加 5%。利用传统的转录分析方法[26, 29]，不可能充分准确地测定这些变化以预测蛋白含量的变化。

蛋白质例如生长因子、细胞因子、激素受体、蛋白激酶、转录因子、翻译器(apparatus)元件以及细胞周期和细胞凋亡调节剂，在神经退行性变紊乱、自身免疫病或癌症的发展和发病机理中起着关键性作用。肿瘤细胞多药物抗性以及某些所谓的免疫逃逸区域的发展同样受上述蛋白的影响 [25]。编码这些蛋白的许多基因的表达是在翻译水平调控的 [1, 6]。这些蛋白含量的变化可借助于术语“蛋白质组学”所概括的方法分析 [30]。然而，所有已知的分析和/或定量蛋白质的方法受到包括例如 2D 凝胶的有效分辨率、蛋白染色方法的选择性或者抗体的可获得性的限制。另外，几乎所有分析蛋白的方法耗时、费力，且在有些情况下与相当大的仪器开销有关，以至于它们不能够直接地在临床路径或者高通量的操作中使用。

为避免与蛋白质组学相关的问题，通常特定蛋白含量的变化是借助于编码该蛋白的 mRNA 的含量变化预测的。在其帮助下有可能测定由一个或多个基因转录的 mRNA 的含量的方法包括 Northern 印迹、条形及斑点杂交、核酸酶保护测定法、PCR 以及 DNA 阵列[26]。特别是基于 PCR 的方法和用于转录分析的 DNA 阵列使得分析大量样品成为可能，因为它们的操作相对不复杂并且能够自动化。在当前的实验室实践中，由基因转录的 mRNA 的含量是通过检测该 mRNA 的编码区确定的。已经有可能证明编码特定蛋白的 mRNA 的含量不是实际存在的相应蛋白含量十分准确的指标，因为在多于 50%的调查基因中，检测到的蛋白含量与所检测到的 RNA 的含量不相关 [29]。如果特定基因的表达在翻译水平上调控，则有可能利用上文详述的方法仅确定由该基因转录的所有变体的总量。

存在于组织或细胞类型中的蛋白含量相对精确的估计可以通过分析结合到多核糖体上的转录本实现，因为它们代表了活跃翻译的 mRNA [29, 31,

32 和 33]。多核糖体结合的 mRNA 分子的数目是可信的相应蛋白翻译速率的指标，因为通常公认翻译控制主要是发生在起始阶段期间[29, 34]。分离多核糖体结合的 mRNA 需要在防止 RNA-蛋白复合体或者 RNA-核糖体复合体解离的条件下分离胞质 RNA。然后从单体和未结合的 mRNA 中通过蔗糖梯度由超速离心分离多核糖体[29, 31, 32 和 33]。分离核 RNA 和胞质 RNA [36]以及随后的超速离心步骤难以自动化，因而要并行处理大量样品。

在诸如临床诊断或工业药物研究领域中，有赖于自动化方法以确保高样品通量，需要使得可信地预测蛋白表达量成为可能的实现有利的表达分析的方法。通过转录分析精确预测蛋白含量使得描述细胞、组织或生物体的功能关系成为可能，这使得测定药物的作用、副作用及靶分子成为可能。然而，现有技术中可整合到自动化系统或高通量路径中的表达分析方法未考虑细胞的翻译状态，因为编码一个或多个待研究蛋白的 mRNA 仅仅通过它们的编码区进行检测。这些系统因而不允许对蛋白含量进行任何可信的预测，或者描述待研究细胞、组织或生物体的功能关系。尽管考虑了待研究细胞、组织或生物体翻译状态的表达分析方法，例如象多核糖体和非多核糖体 RNA 的比较分析，允许对蛋白含量进行可信的预测，但由于它们费力的性质，它们不适合用于高通量的操作或者常规的临床诊断。

本发明的一个目的在于提供基因表达分析的有利方法。

本发明涉及分析基因表达的方法，所述方法在考虑了存在于细胞类型、组织或生物体中的翻译状态时，使得能够在自待研究基因转录的 mRNA 的含量与自该 mRNA 翻译的蛋白含量之间进行可信的关联。确定自待研究基因转录的以及编码特定蛋白的所有 mRNA 变体的翻译效率，使得其中鉴定在特定细胞类型、组织或生物体中优先翻译的 mRNA 变体成为可能。有可能根据编码待研究蛋白的优先翻译的 mRNA 变体的含量和翻译效率，对在细胞类型、组织或生物体中表达的蛋白含量进行可信的预测。该方法使得能够同时分析多个基因的翻译调控表达，从而分析细胞类型、组织或生物体的功能关系。该方法使得通过测定优先翻译的 mRNA 的翻译速率预测一种或多种待研究蛋白的含量成为可能。

本发明因而涉及分析编码样品中蛋白的至少一个基因的表达的方法，其包括适用时确定样品中存在的待分析基因的多种 mRNA 变体的数目和同一性；确定样品中存在的待分析基因的多种 mRNA 变体各自的含量；并根

据确定的含量以及所述多种 mRNA 变体各自的翻译效率，可确定样品中存在的由待分析基因编码的蛋白的含量。

样品通常是组合物，包括细胞、组织或器官的部分。例如它可以是活组织切片或者细胞培养物中的细胞。样品优选来自于哺乳动物细胞培养物，
5 来自于哺乳动物组织或器官。

通常不直接分析样品本身；相反，从中获取或制备包含 mRNA 核酸或者由其衍生的组合物。所述组合物优选是制剂，由总 RNA 或 polyA+ RNA 样品获得或制备。组合物中存在的核酸同样可以是 cRNA 或 cDNA。这些类型的制剂可以简单地从包含 mRNA 的组合物中制备。分析组合物，而且根据组合物中待分析基因多种核酸变体的数目、同一性和/或含量数值，有可能推断样品中待分析基因多种核酸变体的数目、同一性和/或含量。
10

优选存在固相基质的原始供应，其上在基质的多个点上固定有至少两个不同的单链核酸 (= 探针)。这些探针优选分别包括 10 到 40 个连续核苷酸，或者由 10 到 40 个连续核苷酸组成，其分别为待分析基因的部分核苷酸序列，第一探针与所述基因第一 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补，但所述第一探针不与所述基因第二 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补。另外，第二探针与所述基因第一 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补，且该第二探针同样与所述
15 基因第二 mRNA 变体的部分核苷酸序列或该变体所对应的 cDNA 的部分核苷酸序列互补。这意味着第一探针是第一 mRNA 或 cDNA 变体特异性的，但第二探针能够与第一及第二 mRNA 或 cDNA 变体杂交。
20

下一步，固相基质能够与由样品获得或制备的组合物进行接触，在这种情况下可发生组合物中的核酸分子与一个或多个探针的杂交反应。下一步，适用时，则组合物中存在的由待分析基因编码的核酸的多种变体的数目和同一性(identity)得以确定。同样地，组合物中存在的由待分析基因编码的核酸的多种变体的各自的含量得以确定。最后一步，根据由这种方式确定的含量以及待分析基因的多种 mRNA 变体各自的翻译效率，获得或者制备所述组合物的样品中存在的由所述基因编码的蛋白含量得以确定。
25

固相基质也可以包括第三探针，其能够与第三 mRNA 变体或相应的 cDNA 杂交，因为它与之互补。它也可以因互补性而与第一及第二 mRNA
30

变体或相应的 cDNA 杂交。然而，所述第三 mRNA 变体或相应的 cDNA 不被第一和第二探针识别。如此限定探针，从而第一 mRNA 变体被所有三个探针识别，第二 mRNA 变体只被第二和第三探针识别，而第三 mRNA 只被第三探针识别。区分更多不同的 mRNA 变体所需的探针数目相应更高。对技术人员显而易见的是，可以使用比区分所述多种 mRNA 变体理论上所需要的更多的探针。

正常地，至少一个固定在所述固相基质上的探针包括待分析基因部分编码区的核苷酸序列。固定在基质上的探针在不同的实施方案中可以“覆盖”3'非编码区、5'非编码区或者待分析基因全部非编码区的完整基因组核苷酸序列。最后，探针也可以涵盖待分析基因的完整基因组核苷酸序列。而且，个体探针的核苷酸序列可能重叠。

也优选将各自包括了细菌基因、植物基因和/或样品起源生物体的持家基因的部分核苷酸序列的一个或多个探针固定在固相基质上。这些探针正常地具有 10 到 40 个核苷酸的长度。持家基因的实例有，例如编码 β -肌动蛋白、GAPDH 或 L32 的基因。

尤其优选固相基质配置为 DNA 阵列，探针以斑点的形式固定于其上。

由待分析基因可能转录出 2 个不同的 mRNA 变体；不过，也有可能转录出 3 个或更多个变体。不同的变体也可能在 5'端和/或在 3'端不同和/或代表了所述基因的不同剪接形式。

本发明也涉及如本发明的方法中所述的固相基质。

本发明的另一方面是用于样品中至少一个基因的表达分析的试剂盒。所述试剂盒包括作为组件 1 的如前所述的固相基质以及作为组件 2 的贮存介质，其上贮存有待分析基因的多种 mRNA 变体各自的翻译效率。它可以额外包括在含核酸组合物与所述固相基质进行接触后，测定与相应探针结合的核酸的各自含量的装置。组件 1 固相基质的优选实施方案对应于所述方法中基质的优选实施方案。组件 2 中可存在更多的转录特征。就此而言的转录特征(profile)可以优先来自于因疾病而改变的细胞、组织或生物体。此类疾病的实例有癌症、神经退行性变紊乱、自身免疫病、老年人慢性病、心血管病、病毒病和药物抗性。

转录特征尤其可能来自于已用一种或多种治疗制剂治疗的肿瘤细胞。组件 2 中更多的转录特征可与翻译效率贮存于同一贮存介质，但它们也可能贮存在一个或多个不同的贮存介质上。

本发明的另一方面是所述的固相基质在测定样品中的蛋白浓度、测定或分析紊乱、测定或分析外部影响对待研究细胞的效应或者测定 RNA 分子的二级(secondary)结构中的应用。

实施所述方法的系统正常地包括两个元件。组件 1 通常是 DNA 阵列，用于鉴定和定量从一个或多个待研究基因转录的所有 mRNA 变体。除了定量测定不同基因的转录，借助于组件 1 中所含的特别设计的 DNA 阵列，可分析并定量测定这些基因中选择性使用的转录起始点，以及由这些基因转录的 mRNA 变体 5' UTR 和 3' UTR 中的剪接变体。组合核酸酶保护测定法、Northern 印迹和定量 RT-PCR 的信息[26]可通过 DNA 阵列成为可能。组件 2 可以是由数据库模块和分析模块组成的软件包。在所述数据库中，适用时在贮存介质上，组织了在多种条件下由待研究基因转录的所有 mRNA 变体的翻译效率的数值。该数据库含有使得根据转录特征可信地预测特定细胞类型、组织或生物体内表达的蛋白含量成为可能的所有必要数据。植入组件 2 中的分析模块根据由组件 1 和数据库所产生的转录模式，确定特定条件下细胞类型、组织或生物体中优先翻译的 mRNA 变体或者由一个或多个待研究基因转录的 mRNA 变体的含量。

在一个实施方案中，所述系统涉及测定和分析外部影响对待研究细胞类型、组织或生物体的效应及继发效应的方法。这些外部影响除其它以外可以包括药物（医药品）、细胞因子、激素、生长因子、环境影响（温度、大气压力、化学制品）或者营养供应。将 Poly A⁺ mRNA、总细胞 RNA 或者由来自细胞、组织或生物体的这些 RNA 群制备的 cDNA 暴露于一种或多种上述影响物，并用组件 1 分析。将这些转录特征与未暴露于上述外部影响的相同或相似细胞、组织或生物体的转录特征进行比较。该系统可用于药物研究中，以便例如研发新的肿瘤治疗制剂、分析对细胞的效应以及发展多药物抗性表型的潜力。

该系统可额外包括分析病理状态的方法，其除其它以外包括神经退行性变并发症、癌症、自身免疫病、老年人慢性疾病、心血管紊乱、病毒病和/或药物抗性。在肿瘤病诊断领域，该系统旨在用于分析和评价肿瘤转移

和攻击的潜在性，以及分析和评价肿瘤的多药物抗性，以便在治疗效应方面取得改善，以及使得设计个性型治疗成为可能。组件 2 的数据库模块在这种情况下由包括用组件 1 产生的肿瘤细胞转录特征的数据记录以及肿瘤细胞的临床数据扩充。另外，这些数据记录包括用组件 1 产生的有关已用
5 各种肿瘤治疗制剂处理的培养的肿瘤细胞的转录特征，以及有关这些细胞对治疗制剂的应答（应答特征）的数据（例如，分裂速率、凋亡速率等）。

在另一实施方案中，本发明涉及确定 mRNA 分子二级结构的方法。它尤其有可能可信地确定具催化活性称之为核酶的、或者具 mRNA 调控区例如象内部核糖体进位(IRES)的 RNA 的二级结构。DNA 阵列（组件 1）的具体涉及代表了普通实验室实践中所用的核酸酶保护测定法[26]的完全替换。
10 在常规核酸酶保护测定法中并不总是可能不含糊地确定探针靶双链体的哪个区域是双链的，也就是核酸酶保护的。本发明相当大的优点就是“保护区”的确切序列得以显示。将待研究的 RNA 分子置于部分 RNase 消化，并随后与 DNA 阵列杂交。结合计算核酸二级结构的通用算法[24]，这些数据
15 可用来产生待研究 RNA 分子折叠的可信模型。因而首次使得不利用光谱分析法或者 X-射线结构分析而产生 IRES 元件、酶学活性 RNA (核酶)或其它 RNA 结构的三维模型成为可能。

发明优选实施方案的说明

20 组件 1 (DNA 阵列)

组件 1 优选是应系统的需求而特别改造并设计的 DNA 阵列，而且在它的协助下，有可能在一定量的样品核酸（其可能是总 RNA、polyA⁺ mRNA 或 cDNA）中鉴定并定量由待研究的一个或多个基因转录的 mRNA 变体。DNA 阵列将包括探针核酸，用以检测分析、诊断和诠释一种或多种特定的
25 外部影响对待研究细胞类型、组织或生物体的效应所必需的所有 mRNA 变体。这些外部影响除其它以外可能包括氧局部压力、营养供应、温度、大气压力的改变，和细胞因子、激素、细胞生长抑制剂或其它药物的作用，以及病理性变化例如癌症、神经退行性变并发症、自身免疫病、心血管病、病毒感染以及药物抗性。

30

DNA 阵列的设计和诠释

在一个实施方案中,将单链核酸(它可以是DNA、RNA或者核酸类似物如PNA(肽核酸)[27],并且它的碱基序列与待研究基因的5'非编码区(5' NCR)、编码区(CR)以及适用时与3'非编码区(3' NCR)的碱基序列一致)分成长度为 L_x 的至少10个至多40个核苷酸的寡核苷酸。所有寡核苷酸的平衡解链温度应当相同(T_m =常量)。个体寡核苷酸的确切长度 L_x 为给定的平衡解链温度(T_m)及其碱基组成(%GC)的函数,即 $L_{x(T_m=*\#)}=f_{(T_m:\%GC)}$ [37, 38, 39, 40, 41 和 42] 并且是

$$L_{x(T_m=*\#)}=10+n \text{ 个核苷酸。}$$

10

该方法的分辨率取决于片断(下文称之为探针核酸)的长度 L_x 。探针核酸的长度 L_x 从而沿着待研究序列的分辨率,根据待研究序列内GC核苷酸的含量而变化。该方法的分辨率A可以通过与平行于第一片断集合固定在固相基质上的片断除了一个核苷酸之外重叠而提高($A = L_x/n$,其中 $n=1 \rightarrow$ 15 L_x)。

将与待研究基因的碱基序列对应的合成寡核苷酸(下文称之为探针核酸)结合(优选共价结合)到固相基质上。该固相基质可以是平面(DNA阵列)、纤维或者由塑料(如聚丙烯、尼龙)组成的微颗粒的表面[45]、聚丙烯酰胺、硝化纤维或玻璃。寡核苷酸探针与固相基质的共价键合一方面可通过原位寡核苷酸合成进行[46, 47, 48 和 49]或者向活化的表面施加修饰的寡核苷酸(其可以是DNA、RNA或PNA)进行[50, 51]。印制DNA阵列的设备由许多供应商生产和出售[57]。探针核酸通过标准生物工艺学实验室方案合成[52]。共价键合的探针核酸以与待研究基因的碱基序列对应的顺序排列,从而持有待研究基因的碱基序列的DNA链在基质上模拟(重建)5'-3' 25 的方向(“平铺阵列”)。以这种方式固定在基质上的探针核酸被分成三个区域。

图1显示了由待研究基因转录的多种mRNA变体的探针、固相结合探针(阵列)以及杂交数据分析的图解说明。

A区、B区或C区含有其碱基序列与待研究基因的5'非编码区(5' NCR)、 30 编码区(CR)或者3'非编码区(3' NCR)的碱基序列完全一致的全部探针核酸。

基质结合的探针核酸与单链样品核酸(其可以是 mRNA、cRNA 或 cDNA [26]) 在允许通过互补单链核酸杂交形成双链体的条件下进行接触。如果使用 cDNA 作为样品核酸, 则探针核酸的碱基序列与待研究基因的密码基因链(有义链)完全一致。如果使用 mRNA 或 cRNA 作为样品核酸, 则探针核酸的碱基序列与待研究基因的非密码基因链(反义链)完全一致。为检测杂交事件, 或者是样品核酸被放射性标记或由荧光团或者结合对一方(生物素、链霉抗生物素蛋白)标记[26], 或者是探针核酸由荧光团或者结合对一方(生物素、链霉抗生物素蛋白)标记[27, 28]。

不存在于由该基因转录的 mRNA 变体的碱基序列中的待研究基因的序列片断不与固相结合的探针核酸杂交(见图 1)。这些序列片断包括内含子序列、位于特定 mRNA 变体独特转录起点上游的待研究基因 5' NCR 的序列片断(A 探针区), 以及位于特定 mRNA 变体 3' 末端下游的待研究基因 3' NCR 中的序列片断(C 探针区)。由待研究基因转录的所有 mRNA 变体的编码区与其碱基序列与待研究基因的编码区完全一致的探针核酸(B 探针区)杂交。

B 探针区可检测的杂交信号的信号强度 ($I_{B(CR)}$) 等于可检测的由待研究基因转录的独特 mRNA 变体的杂交信号的信号强度的总和($\sum(I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}, \dots, I_{(RNA_n)})$)。

$$I_{B(CR)} = (\sum(I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}, \dots, I_{(RNA_n)}))$$

20

A 探针区或者 C 探针区可检测的杂交信号($I_{A(5'-NTR)}$ 或 $I_{C(3'-NTR)}$)显示了与 B 探针区可检测的杂交信号($I_{B(CR)}$)相同的信号强度, 对应于编码区外侧的序列基序, 其存在于由待研究基因转录的所有 mRNA 变体中。

离编码区上游最远的转录起点(在 5' 方向)由 A 探针区中与样品核酸 ($^1I_{A(1)}$)杂交后表现出可检测的杂交信号的第一探针核酸指示。如果自该转录起点仅转录了一个 mRNA 变体, 则

$$^1I_{A(1)} = I_{B(CR)},$$

如果 A 探针区中所有探针核酸表现出与 B 探针区杂交信号的信号强度完全相同的相同强度的杂交信号。则如下适用:

$${}^1I_{A(1)} = {}^1I_{A(2)} = {}^1I_{A(3)} \dots = {}^1I_{A(n)} = I_{B(CR)}$$

5 为了补偿 A、B 或 C 探针区中杂交信号强度的差异，并使得估计测量误差（标准偏差、均值偏差）成为可能，计算了所测信号强度的平均数或中值：

$$({}^1I_{A(1)} + {}^1I_{A(2)} + {}^1I_{A(3)} + \dots + {}^1I_{A(n)})/n = \emptyset {}^1I_A = I_{B(CR)} = \emptyset I_{B(n)} = (I_{B(1)} + I_{B(2)} + I_{B(3)} + \dots + I_{B(n)})/n$$

10

如果额外的 mRNA 变体自位于第一转录起点下游的起点转录，则 A 探针区中自第一转录起点转录的 mRNA 变体 1 的杂交信号强度小于 B 探针区中杂交信号的信号强度。如下适用：

$$15 \quad {}^1I_{A(1)} = {}^1I_{A(2)} = {}^1I_{A(3)} = \dots = {}^1I_{A(n)} < I_{B(CR)}, \text{或者}$$

$$({}^1I_{A(1)} + {}^1I_{A(2)} + {}^1I_{A(3)} + \dots + {}^1I_{A(n)})/n = \emptyset {}^1I_A < I_{B(CR)} = \emptyset I_{B(n)}$$

20 位于第一转录起点(转录起点 1)下游的下一个(转录起点 2) 转录起点的位置由 A 探针区中的第一探针核酸(${}^2I_{A(1)}$)指示，其在与样品核酸杂交后，与特异性地与自转录起点 1 转录的 mRNA 变体(RNA 1)杂交的探针相比，显示出更高强度的杂交信号。如果两个 mRNA 变体自待研究基因的两个不同转录起点转录，也就是具有不同长度的 5' UTR，则：

$$25 \quad {}^2I_{A(1)} = I_{B(CR)},$$

在这种情况下，A 探针区中所有特异性地与 RNA 2 杂交的探针核酸表现出与 B 探针区杂交信号的信号强度完全相同的相同强度的杂交信号。如下适用：

$$30 \quad {}^2I_{A(1)} = {}^2I_{A(2)} = {}^2I_{A(3)} = \dots = {}^2I_{A(n)} = I_{B(CR)}, \text{或者}$$

$$({}^2I_{A(1)} + {}^2I_{A(2)} + {}^2I_{A(3)} + \dots + {}^2I_{A(n)})/n = \emptyset {}^2I_A = I_{B(CR)} = \emptyset I_{B(n)}$$

B 探针区可检测的杂交信号的信号强度 ($I_{B(CR)}$) 等于由待研究基因转录的独特 mRNA 变体的可检测杂交信号的信号强度的总和 ($\sum(I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}, \dots, I_{(RNA_n)})$), 则:

5

$$I_{B(CR)} = \sum(I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}, \dots, I_{(RNA_n)})$$

根据 A 和 B 探针区中的杂交信号, 这导致:

10

$$I_{B(CR)} = \emptyset I_{B(n)} = \emptyset^2 I_A = \sum(I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}), \text{ 其中}$$

$$I_{(RNA1)} = ({}^1I_{A(1)} + {}^1I_{A(2)} + {}^1I_{A(3)} + \dots + {}^1I_{A(n)})/n = \emptyset^1 I_A \text{ 和}$$

$$I_{(RNA2)} = [({}^2I_{A(1)} + {}^2I_{A(2)} + {}^2I_{A(3)} + \dots + {}^2I_{A(n)}) - ({}^1I_{A(1)} + {}^1I_{A(2)} + {}^1I_{A(3)} + \dots + {}^1I_{A(n)})]/n = \emptyset^2 I_A - \emptyset^1 I_A$$

15

如果 n 个 mRNA 变体自待研究基因这位于第一转录起点下游的 n-1 个起点转录, 则 A 探针区中自除了编码区第一起始密码子之前的倒数第一个之外的所有起点转录的 mRNA 变体的杂交信号强度小于 B 探针区中杂交信号的信号强度 (见上文)。如下适用:

20

$$\emptyset^1 I_A, \emptyset^2 I_A, \emptyset^3 I_A, \dots, \emptyset^{(n-1)} I_A < \emptyset^n I_A = I_{B(CR)} = \emptyset I_{B(n)} = \sum(I_{(RNA1)}, I_{(RNA2)}, I_{(RNA3)}, \dots, I_{(RNA_n)})$$

其中

25

$$I_{(RNA1)} = ({}^1I_{A(1)} + {}^1I_{A(2)} + {}^1I_{A(3)} + \dots + {}^1I_{A(n)})/n = \emptyset^1 I_A$$

$$I_{(RNA2)} = [({}^2I_{A(1)} + {}^2I_{A(2)} + {}^2I_{A(3)} + \dots + {}^2I_{A(n)}) - ({}^1I_{A(1)} + {}^1I_{A(2)} + {}^1I_{A(3)} + \dots + {}^1I_{A(n)})]/n = \emptyset^2 I_A - \emptyset^1 I_A$$

$$I_{(RNA3)} = [({}^3I_{A(1)} + {}^3I_{A(2)} + {}^3I_{A(3)} + \dots + {}^3I_{A(n)}) - ({}^2I_{A(1)} + {}^2I_{A(2)} + {}^2I_{A(3)} + \dots + {}^2I_{A(n)})]/n = \emptyset^3 I_A - \emptyset^2 I_A$$

$$I_{(RNA_n)} = [({}^nI_{A(1)} + {}^nI_{A(2)} + {}^nI_{A(3)} + \dots + {}^nI_{A(n)}) - ({}^{n-1}I_{A(1)} + {}^{n-1}I_{A(2)} + {}^{n-1}I_{A(3)} + \dots + {}^{n-1}I_{A(n)})]/n = \emptyset^n I_A - \emptyset^{n-1} I_A$$

30

每种 mRNA 变体在由待研究基因转录的多种 mRNA 变体总量中的比例可根据杂交强度确定。

5 如果因前-mRNA 选择性剪接而出现的两个 mRNA 变体自待研究基因的一个转录起点转录，两个 mRNA 变体的转录起点由 A 探针区中与样品核
酸($^1I_{A(1)}$)杂交后表现出可检测的杂交信号的第一核酸探针指示。杂交信号强度对应于两个 mRNA 变体(剪接的 mRNA 及未剪接的 mRNA)的强度总和，并且等于 B 探针区中的杂交信号强度。

$$10 \quad {}^1I_{A(1)} = ({}^1I_{A(1)} + {}^1I_{A(2)} + {}^1I_{A(3)} + \dots + {}^1I_{A(n)})/n = \emptyset^1I_A = I_{B(CR)} = \sum(I_{(RNAS)}, I_{(RNA)})$$

在剪接位点区域，杂交信号强度(${}^{1s}I_{A(1)}$)低于：

$$15 \quad \begin{aligned} & ({}^{1s}I_{A(1)} + {}^{1s}I_{A(2)} + {}^{1s}I_{A(3)} + \dots + {}^{1s}I_{A(n)})/n = \emptyset^{1s}I_A < \emptyset^1I_A = I_{B(CR)} = \sum(I_{(RNAS)}, I_{(RNA)}) \\ & I_{(RNAS)} = ({}^{1s}I_{A(1)} + {}^{1s}I_{A(2)} + {}^{1s}I_{A(3)} + \dots + {}^{1s}I_{A(n)})/n = \emptyset^{1s}I_A \\ & I_{(RNA)} = [({}^1I_{A(1)} + {}^1I_{A(2)} + {}^1I_{A(3)} + \dots + {}^1I_{A(n)}) - ({}^{1s}I_{A(1)} + {}^{1s}I_{A(2)} + {}^{1s}I_{A(3)} + \dots + {}^{1s}I_{A(n)})]/n = \\ & \emptyset^1I_A - \emptyset^{1s}I_A \end{aligned}$$

20 是否有必要通过 A 和 C 探针区的探针核酸呈现/改造待研究的整个基因组序列，或者仅仅是侧接转录起点和剪接位点的序列区域，取决于组件 1 的应用领域。如果要测量由一个或多个待研究基因转录的已知 mRNA 变体的表达，仅仅需要将鉴定和定量独特 mRNA 变体必需的探针核酸数目固定到 A 或 C 探针区。如果旨在借助于组件 1 鉴定新的 mRNA 变体或阐释 mRNA 的二级结构，有必要使 A 和 C 探针区的呈现待研究的整个基因组序列。DNA 25 阵列也可以包括另外的区域，所述区域包括特异性地与许多持家基因的 mRNA、可选的是与质粒、细菌或植物 RNA 杂交的探针核酸。这个探针区首要地起着使 A、B 和 C 探针区中的杂交信号标准化的作用，以及控制杂交的严谨性。

DNA 阵列的杂交

30 在另外的实施方案中，利用寡聚-dT 或 p(dN)₆ 作为起始寡核苷酸通过反转录由总 RNA 或 polyA⁺ mRNA 合成标记的 cDNA。由反转录酶酶促合成

cDNA 是实验室操作中的标准生物技术学[26]。样品 RNA 的反转录在偶联于可检测基团（优选为荧光团或结合对一方）的 dNTP 存在时实施。另一种可能性是通过反转录将分离的 mRNA 转换为双链 cDNA，并在偶联于可检测基团的 rNTP 的存在时通过体外转录由后者合成标记的 cRNA [26, 53]。

5 在另一个优选的实施方案中，固定在 DNA 阵列中的探针被标记。这种标记可以是一种或多种荧光团或者结合对部分。该阵列在与未标记的总 RNA、polyA⁺ mRNA、cRNA 或 cDNA 杂交和随后的洗涤步骤之后，未杂交的(单链)探针核酸通过酶促反应从阵列中除去，并测量保留在阵列上的探针核酸的含量[28]。

10 许多荧光团可用于标记样品和探针核酸，例如象荧光素、lissamine、藻红蛋白、罗丹明(Perkin Elmer Cetus)、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、FluorX (Amersham) [53]。除了此处所列的荧光团，也可能使用此处未列的其它荧光团用于标记。这包括能够与核酸共价交联且其激发和发射极限处于光谱红外区、可见区或者 UV 区的所有荧光团。如果样品或探针核酸用结合对如生物素或地高辛一方标记，杂交后，偶联于可检测标记的所述结合对第二方（链霉抗生物素或抗-地高辛 Ab）与所述杂交体温育。所述结合对第二方的可检测标记可以是荧光团或者能转化发光（化学发光或者化学荧光）底物的酶（碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶等）[54, 55]。

20 调整杂交和洗涤条件从而样品核酸特异性与固定在固相基质上的特定探针核酸结合，或者能够特异性地与该探针核酸杂交。这意味着样品核酸与具有互补于样品核酸的序列的固定的探针核酸（而不是与具有非互补碱基序列的固定的探针核酸）结合、杂交或形成双链体。就此而言的多核苷酸序列被称之为彼此互补，如果两个多核苷酸杂交体中较短的(探针核酸)最长 25 N，根据碱基配对的标准法则在所述较短多核苷酸全长范围内未显示 25 示出碱基错配的话。另外，根据碱基配对的标准法则，两个多核苷酸中较短的长于 25 N 的两多核苷酸的杂交体必须不能含有大于 5%的错配。优选多核苷酸彼此完美地互补；杂交体不含错配。最佳杂交条件首先取决于固定在固相基质上的探针(DNA、RNA、PNA)的长度和类型，以及所用的样品核酸(DNA 或 RNA)的类型。通常特异性（即严谨）杂交的有效参数描述在 30 客户手册以及核酸杂交的方案中[26, 56]。

信号检测

如果使用荧光团标记的探针和样品核酸检测组件 1 中 DNA 阵列上的杂交事件，荧光发射可优选通过共焦激光扫描显微镜在各样品点（斑点）处测量。通过化学发光或化学荧光检测杂交事件可通过利用具有根据共焦激光扫描显微镜原理工作的设备的合适的滤波器或者类似的检波器实施。用于生物芯片信号检测的设备由许多制造商研发和出售[57]。

组件 2 (数据库和分析)

系统的组件 2 优选由数据库模块和分析模块组成。数据库包括自其表达在翻译水平上调控的基因转录的所有 mRNA 变体翻译效率的数据。组织在数据库模块中的数据描述了，例如，5' UTR、编码区和 3' UTR 以及细胞类型、组织或生物体对由一个或多个基因转录的多种 mRNA 变体的翻译效率的影响。另外的数据记录可以描述外部影响对待研究 mRNA 变体翻译效率的效应。这些外部影响除其它以外可能包括氧局部压力、营养供应、温度、大气压力的改变，以及细胞因子、激素、细胞生长抑制剂或其它药物的作用。自翻译调控表达的基因转录的、且优先在各种细胞类型、组织或生物体中翻译的 mRNA 变体同样是组件 2 中数据库模块的组分。

数据获取

20 翻译调控表达的基因的鉴定

许多具有相同编码区但其 5' UTR 和/或 3' UTR 长度和碱基序不同的 mRNA 变体是由翻译调控表达的基因转录的。为了能够确定由一个基因转录的不同 mRNA 变体以及优先在细胞类型、组织或生物体中表达的 mRNA 变体各自的含量，有必要知晓转录起点、剪接变体、由待研究基因转录的 mRNA 变体的数目、在细胞类型、组织或生物体中转录的 mRNA 变体的含量以及个体 mRNA 变体的翻译效率。

借助于核酸酶保护测定法、PCR 法或与 DNA 阵列的杂交(组件 1)[26] 鉴定并定位了细胞类型、组织或生物体所用的待研究基因 5'非编码区中的转录起点。剪接位点绘图，即待研究 mRNA 的 5' UTR 或 3' UTR 区的内含子-外显子连接通过核酸酶保护测定法、PCR 法或与 DNA 阵列的杂交(组件 1) 实施[26]。核酸酶保护测定中所用的用以研究转录起点以及待研究基

因的剪接变体的杂交探针的碱基序列对应于待研究基因的碱基序列。总细胞 RNA [26, 36]或 polyA⁺ mRNA [26, 43]从待研究细胞类型、组织或生物体中分离并与标记探针杂交,所述探针可能是 cDNA 或 cRNA。消化杂交体中的单链区,并通过标准生物技术学的实验室方案进行所得片断的凝胶电泳分级分离 [26, 44]。为通过 PCR 方法(RT-PCR)绘制待研究基因 5'非编码区或 3'非编码区的转录起点和剪接位点,从待研究细胞类型、组织或生物体中分离总细胞 RNA [26, 36]或 polyA⁺ mRNA [26, 43],并通过反转录转录为 cDNA [26]。PCR 引物是寡脱氧核苷酸,利用它可实现代表待研究基因的编码区 5'部分和 5'非编码区以及由该基因转录 mRNA 变体 5'UTR 编码区的片断的特异性扩增。如果需要绘制由待研究基因转录的 mRNA 变体的 3'UTR,则所使用的 PCR 引物是利用它有可能扩增代表待研究基因的编码区 3'部分和 3'非编码区或者由该基因转录 mRNA 变体的片断的那些引物。为测定 5'UTR 碱基序列不同的 mRNA 变体,将一种或多种 3'引物(3'引物与待扩增 DNA 片断的 3'端结合)置于待研究基因编码区的 5'区。5'引物群(5'引物与待扩增 DNA 片断的 5'端结合)自待研究基因第一转录起点远处编码区的起点延伸。选择 5'引物的位置和序列,从而连同 3'引物,在每种情况下的片断扩增长度自编码区第一引物对向前增加,通常在每种情况下为 30-60 bp。为了能够利用 3'引物绘制存在于待研究基因 5'区 2000 bp 区域内的转录起点和剪接位点,需要 35 到 70 之间的相应 5'引物,取决于分辨力。反应利用基因组 DNA 或者包含基因、来自待研究细胞、组织或生物体的 mRNA 的必要区域的质粒进行。有可能通过比较片断大小和含量鉴定转录起点和剪接位点。

定量测定由待研究基因转录的 mRNA 变体

25 每种独特 mRNA 变体在由待研究基因转录的多种 mRNA 变体总量中的比例通过定量 PCR 方法(TaqMan® 或分子灯塔[58, 59])、多探针核酸酶保护测定法或者 DNA 阵列(组件 1) [26]确定。PCR 引物与用于鉴定由一个或多个待研究基因转录的 mRNA 变体的那些相对应。用于定量测定的是 TaqMan®探针或分子灯塔 (beacon) [58, 59],利用它们多种变体通过其各自的 5'UTR 而被特异性地检测和定量。额外使用的是 PCR 引物以及 30 TaqMan®探针或分子灯塔,利用它们可选的持家基因被特异性地检测。使

用的模板是通过反转录由总细胞 RNA [26, 36]或 polyA⁺ mRNA [26]合成的 cDNA。在多探针核酸酶保护测定中使用的杂交探针可以是 cDNA 或 cRNA, 具有不同的长度, 从而它们能够通过聚丙烯酰胺凝胶电泳[26]容易地令人满意地彼此区分开来。杂交探针的核苷酸序列互补于待研究的多种 mRNA 变体 5' UTR 的核苷酸序列, 并且互补于选择的持家基因的 mRNA 的编码序列。

5 定量 PCR 以及多探针核酸酶保护测定通过标准生物技术学实验室方案实施。优选地, 由一个或多个待研究基因转录的 mRNA 变体的翻译速率通过使总细胞 RNA、polyA⁺ mRNA 或标记的 cDNA 与系统组件 1 (DNA 阵列)(见上文)杂交实施。将利用所述方法确定的由一个或多个待研究基因转录的

10 mRNA 变体的翻译速率对照一种或多种持家基因(例如象 β -肌动蛋白、GAPDH、L32)的翻译速率标准化。在各种细胞类型、组织或生物体中自翻译调控表达的基因转录的 mRNA 变体的定量测定优选利用系统组件 1 的 DNA 阵列进行。所用的 DNA 阵列与分离自待研究细胞的总细胞 RNA、polyA⁺ mRNA 或标记的 cDNA 杂交。存在于 NCI-60 仪表盘[35]中且已被非

15 常利于理解地描述了特征的细胞系在这里作为本底。另外, 确定临床样品及其它已建立的细胞系中 mRNA 变体自翻译调控表达的基因的转录。

测定优先在细胞类型、组织或者生物体中翻译的 mRNA 变体

由一个或多个基因转录的 mRNA 变体翻译速率的变化, 以及相应蛋白

20 表达速率的变化通常作为各种外部影响的函数检测。这些外部影响除其它以外包括氧局部压力、营养供应、温度、大气压力的改变, 以及细胞因子、激素、细胞生长抑制剂或其它药物的作用。作为外部影响函数的转录或表达速率的变化通过将已在理想生长条件下培养的细胞、组织或生物体中待研究的一个或多个基因的转录或表达速率与暴露于一种或多种上述外部影

25 响的细胞进行比较测定。总细胞 RNA 或 polyA⁺ mRNA 从待研究的细胞类型、组织或生物体中分离。由待研究的一个或多个基因转录的 mRNA 变体的翻译速率通过定量 RT-PCR、多探针核酸酶保护测定或者优选借助于上文所述的 DNA 阵列(组件 1)测定(见上文)。相应基因的表达速率通过免疫化学方法例如蛋白质印迹、免疫沉淀或者 ELISA 通过检测相应蛋白的浓度进行

30 [65, 66 和 67]。由于普遍公认翻译控制主要地发生在起始阶段期间[29, 34], 细胞类型、组织或生物体中可检测的蛋白的含量与相应 mRNA 变体的含量

- 直接成比例。其翻译速率作为外部影响的函数与相应蛋白的表达速率相符的 mRNA 变体使优先在特定细胞类型、组织或生物体中翻译的 mRNA。除了所述 mRNA 变体 5' UTR 序列之外，哪个转录自待研究基因的 mRNA 变体优先翻译取决于影响翻译起始的细胞、组织或生物体特异性表达的因子。
- 5 在各种细胞类型、组织或生物体中由翻译调控表达的基因转录的 mRNA 变体的定量测定优选利用系统组件 1 的 DNA 阵列实施。该 DNA 阵列与分离自待研究细胞的总细胞 RNA、polyA⁺ mRNA 或标记的 cDNA 杂交。借助于标准免疫化学方法测定自 mRNA 变体翻译的蛋白的含量。存在于 NCI-60 仪表盘[35]中且已被非常利于理解地描述了特征的细胞系在这里作为本底。
- 10 另外，确定临床样品及其它已建立的细胞系中 mRNA 变体自翻译调控表达的基因的转录以及这些基因的表达。

由待研究基因转录的各种 mRNA 变体翻译效率的测定

- 蛋白质合成的限速(rate-determining)步骤是起始。起始因子、核糖体亚基的复合以及完整核糖体向开放读框的第一起始密码子的迁移主要地取决于长度和结构，即最终分析中待研究 mRNA 5' UTR 的碱基序列。由待研究的一个或多个基因转录的多种 mRNA 变体的翻译效率通过报告基因测验确定。由待研究的一个或多个基因翻译的多种 mRNA 5' UTR 借助于反转录酶 PCR [26]自总 RNA 或 polyA⁺ mRNA 或者借助于 PCR 自 cDNA 文库[26]扩增并分离。选择 PCR 引物从而 3'引物的 5'核苷酸对应于编码区起始密码子前 5' UTR 的最后一个核苷酸。相应的 5'引物分布尽可能地接近待研究 mRNA 变体的转录起点。可将限制性内切酶的识别序列整合到 PCR 引物的 5'区，以促进所述片断与合适的报告基因载体(基础 pGL3 等; Promega)的连接[26]。使用了在其帮助下除其它以外也可能测定编码区对待研究 mRNA 变体翻译效率的影响的各种系统。
- 15
- 20
- 25

- 检测兔子网织红细胞裂解物中的翻译效率：待研究的多种 5' UTR 借助于 PCR 扩增，并连接到质粒载体 (pGL-3/T7) T7 启动子 3'端以及编码萤火虫 (*photinas pyralis*) 荧光素酶的基因的 5'末端之间[68, 69]。存在标准生物技术学实验室方案用于在合适的大肠杆菌 (*E. coli*) 宿主菌株中转染和复制质粒载体以及从该宿主生物体中分离质粒 DNA [26]。质粒载体借助于合适
- 30

的限制性内切酶在荧光素酶基因的 3'末端开环。线性化的质粒 DNA 作为模板用在由噬菌体编码的 RNA 聚合酶(T7、T3 或 SP6 RNA 聚合酶)催化的体外转录反应中[26]。具有 5'帽结构的 mRNA 可通过向转录反应中添加帽类似物[Boehringer Mannheim] 在体外合成。萤火虫(*Photinus pyralis*)荧光素酶

5 借助于体外翻译系统(兔网织红细胞裂解物)由体外合成的萤火虫荧光素酶 mRNA 变体合成。体外翻译中使用了等摩尔量的待研究的具有 5' UTR 的各种萤火虫荧光素酶 mRNA 变体。各种混合物中荧光素酶的活性由发光计测定[26, 70]。所有检测中所用的基值(100%)是其中 5' UTR 独一无二地包括 Kozak 保守序列的萤火虫荧光素酶 mRNA 得以翻译的体外翻译混合物中的

10 荧光素酶活性[7, 8]。各种待研究 5' UTR 在体外对 mRNA 翻译的影响通过这些测量测定。有可能通过改变实验参数确定待研究的 mRNA 是否能够独立于 5'帽结构翻译, 即该 mRNA 的 5' UTR 是否包括 IRES 元件。为研究翻译效率对 5'帽结构的依赖性, 将具有特定 5' UTR 和 5' 帽结构的 mRNA 的翻译效率与具有相同 5' UTR 但没有 5' 帽结构的 mRNA 的翻译效率进行比较。

15 为了鉴定待研究 mRNA 5'区中可能的 IRES 元件, 将能够形成稳定发夹环的 DNA 片断连接到上述报告基因载体 T7 启动子 3' 端和待研究 5' UTR 5'端之间。当该质粒 DNA 作为模板用于体外转录反应中时, 合成的 mRNA 5'端具有稳定的发夹结构。根据核糖体扫描模型[1], 这种结构非常有效地阻止翻译的起始。形成了具有特定 5' UTR 和 5' 发夹结构的 mRNA 的翻译效率与

20 具有该 5' UTR 但没有 5' 发夹结构的 mRNA 的翻译效率的比率。如果该比率大于 1, 则所述 mRNA 的翻译可以通过内部核糖体进位起始。通过体外翻译和随后报告基因的测定来确定特定 mRNA 的翻译效率, 提供了有关待研究的一种或多种 mRNA 变体的翻译效率的基本数据。在此检测系统中, 不考虑各种细胞类型、组织或生物体对待研究 mRNA 翻译效率的具体影响。

25

检测体内翻译效率: 为了研究细胞因子对作为细胞类型、组织或生物体函数的待研究的一种或多种 mRNA 翻译效率的影响, 将在标记基因的 5' 端包含待研究 mRNA 变体 5' UTR 的真核细胞表达载体转染到培养的细胞、组织或生物体中。如果目的是研究作为各种细胞类型、组织或生物体函数的

30 具有不同 5' UTR 的报告基因-mRNA 的翻译效率, 则报告基因构建物如下设计。将待研究 mRNA 的 5' UTR 连接到病毒启动子 (CMV、RSV 或 SV40

启动子) 3'端以及报告基因编码区 5'端之间 (萤火虫荧光素酶、*renilla reniformis* 荧光素酶、氯霉素转移酶(CAT)、 β -半乳糖苷酶、GFP 等)。该表达构建物在培养的细胞、组织或生物体中表达。为了补偿翻译效率的差异, 共转染了另外的报告基因。双元荧光素酶系统 (Promega)适用于此, 因为实际检测 (萤火虫荧光素酶) 和对照构建物 (*renilla reniformis* 荧光素酶) 的表达都可以利用此系统在一个混合物中进行[71, 72]。各种混合物中的荧光素酶活性以发光计测定 (Luciferase Assay, Promega, 26]。所有检测中所用的基值(100%)包括转染了报告基因载体的细胞裂解物、组织或生物体的混合物中的荧光素酶活性, 所述载体编码萤火虫荧光素酶 mRNA, 其 5' UTR 独一无二地包括 Kozak 保守序列[7, 8]。在特定细胞、组织或生物体中表达的细胞因子对待研究 mRNA 翻译的影响通过比较待研究的一种或多种 mRNA 的体外和体内翻译效率测定。影响各种 mRNA 的帽-依赖性和帽-非依赖性翻译的因子包括翻译起始因子[60, 61]、肿瘤抑制剂例如 p53 [62, 63]和许多其它蛋白 [64, 65]。

5' UTR 和编码区对待研究的 mRNA 翻译效率的联合影响不能通过报告基因测定检测, 其中表达速率通过报告蛋白的酶促活性检测。氨基末端一半由待研究蛋白组成而羧基末端一半由报告蛋白组成的融合蛋白的折叠通常不同于未融合的两个蛋白。融合蛋白中报告蛋白部分的酶促活性因此取决于与该报告蛋白融合的蛋白。为避免这个问题, 将待研究蛋白融合于短标记肽的羧基末端。这个标记肽除其它以外可以是 CBP 标签(钙调素-结合肽; Stratagene), FLAG 标签(Sigma-Aldrich)或 His 标签 (5-7 个 连续的组氨酸残基) [73, 74]。待研究的由一个或多个基因转录的 mRNA 变体借助于 RT-PCR [26]扩增并分离。所用的 5'引物的 5'末端对应于各种 5' UTR 的 5'末端, 而所用的 3'引物对应于 3'末端, 也就是待研究 mRNA 编码区的最后一个密码子(忽略终止密码子)。将 PCR 产物连接到表达质粒病毒启动子 (CMV、RSV、SV40 等)3'端和编码标记肽的序列的 5'端之间, 从而待研究 mRNA 的编码区融合于编码标记肽的序列。表达如上所述的融合蛋白的质粒载体在商业上可获得(Qiagen、Clontech、Stratagene)。由这些质粒转染大肠杆菌宿主菌株、复制所述质粒以及分离质粒 DNA 按照标准生物技术学实验室方案进行[26]。待研究的各种细胞类型、组织或生物体用如上所述的表达构建物转染, 所述构建物包含由一个或多个基因转录的多种 mRNA 变体

5' UTR 及编码区的 cDNA 序列。为测定转染效率，共转染表达萤火虫荧光素酶或者 *renilla reniformis* 荧光素酶的报告基因质粒。通过表达质粒表达的各种 mRNA 变体的翻译效率通过蛋白质印迹或者狭线印迹方法测定[65, 66]。

- 5 融合蛋白借助于与标记肽特异性结合的抗体或蛋白检测。蛋白的定量检测通过标准生物技术学实验室方案进行。所有检测中所用的基值(100%)包括转染了表达构建物的细胞裂解物、组织或生物体的混合物中的可检测的融合蛋白的含量，所述构建物持有待研究 mRNA 变体的 cDNA 序列，其 5' UTR 独一无二地包括 Kozak 保守序列[7, 8]。除了 5' UTR 和细胞因子对待
- 10 研究 mRNA 翻译的影响，另外，编码区序列对待研究 mRNA 翻译的影响通过将具有由一个或多个基因转录的待研究 mRNA 5' UTR 的报告基因-mRNA 的翻译效率，与完整 mRNA 变体的翻译效率进行比较测定。利用与上述相同的表达构建物测定各种外部影响下待研究 mRNA 变体的翻译效率。待研究 mRNA 变体翻译效率的检测通过测量报告基因的酶促活性或者免疫活学
- 15 检测与标记肽融合的蛋白进行（见上文）。将用表达质粒转染的细胞暴露于各种外部影响，其除其它以外包括氧局部压力、营养供应、温度、大气压力的改变，以及细胞因子、激素、细胞生长抑制剂或其它药物的作用。此处描述的测量在 NCI-60 仪表盘[35]中存在的并且已被非常易于理解地描述了特征的细胞系中进行。另外，测定临床样品和其它已建立的细胞系中待
- 20 研究 mRNA 变体的翻译效率。

检测外部影响对细胞功能例如生长、细胞凋亡或增殖的效应

- 外部影响对待研究细胞、组织或生物体的效应根据许多参数测定，所述参数除其它以外可以包括细胞凋亡速率、增殖速率和细胞生长。本文所
- 25 述外部影响除其它以外可以包括氧局部压力、营养供应、温度、大气压力的改变，以及细胞因子、激素、细胞生长抑制剂或其它药物的作用。待研究的细胞、组织或生物体在培养中维持并暴露于一种或多种限定的外部影响 24-48 小时。为测定待研究的不同剂量水平的外部影响的效应，在处理的细胞中测定了除其它以外的细胞生长、细胞凋亡速率和/或增殖速率。培养
- 30 细胞中生长速率、增殖速率和/或细胞凋亡速率的测定按照标准生物工艺学实验室方案进行[75, 76, 77, 78 和 79]。例如，抑制 50%细胞生长的外部影响

的含量(GI_{50} → 生长抑制) [35]通过对不同剂量水平的一种或多种外部影响作用下一种或多种细胞类型、组织或生物体的生长速率、细胞凋亡速率或增殖速率进行外推确定。根据细胞凋亡速率或增殖,可确定诱发 50%待研究细胞凋亡(AI_{50} → 凋亡诱导)或抑制 50%增殖 (PI_{50} → 增殖抑制) 的外部影响的剂量。

临床数据整合

如果系统被用于诊断肿瘤病,则组件 2 的数据库模块可以包括有关所用药物治疗类型、药物剂量、治疗使用的药物的耐受或效应、初始紊乱和出现复发或转移的时间间隔、以及由系统组件 1 产生的有关研究的肿瘤的一种或多种表达特征的数据。如果需要分析病理状态例如神经退行性变并发症、自身免疫病、心血管病、病毒感染或药物抗性,则组件 2 的数据库模块优选包括有关所用药物治疗类型、药物剂量、使用的药物的耐受或效应、以及由系统组件 1 产生的诊断学相关组织样品的一种或多种表达特征的数据。

分析和诠释

分析和诠释由组件 1 (DNA 阵列)产生的表达数据在两个水平上借助于组件 2 中存在的数据库和分析模块进行。在第一诠释水平,将翻译效率分配至借助于组件 1 鉴定和定量的每一个 mRNA 变体。在第二诠释水平,将由组件 1 产生的全部表达特征与组件 2 中存在的其它表达特征进行比较,并分配至特定的表达类型。这种特定表达类型的分配使得测定在第一诠释水平作为细胞因子的函数鉴定和定量的所有 mRNA 变体的翻译效率以及鉴定在研究的细胞类型、组织或生物体中优先翻译的 mRNA 成为可能。

25

蛋白浓度的预测

所述检测需要预测待研究细胞类型、组织或生物体中存在的一种或多种蛋白的含量,包括编码一种或多种特定蛋白的 mRNA 变体的总转录速率,以及编码这些蛋白的独特 mRNA 变体的转录速率,且由系统组件 1 (DNA 阵列)确定。一种或多种特定 mRNA 的转录速率在组件 1 (DNA 阵列)中根据待研究 mRNA 特异性的杂交信号强度确定。为使待研究 mRNA 变体与组件

1 中相应探针核酸的杂交信号标准化, 测量了在所有细胞类型、组织或生物体 (称之为持家基因) 中转录的 mRNA 的杂交信号强度。用于标准化杂交信号的持家基因的表达不能在翻译水平检查。将包括与由相同和/或其它基因转录的 mRNA 变体相对照的 mRNA 变体的翻译效率、翻译效率对细胞因子的依赖性、以及在特定细胞类型、组织或生物体中优先翻译的 mRNA 变体的数据记录分配至组件 1 (DNA 阵列) 中每个探针核酸以及代表特定 mRNA 变体的每组探针核酸。将由组织样品产生的表达特征与组件 2 数据库模块中存在的表达特征进行比较, 使得将研究的样品分配至特定细胞或组织类型成为可能, 从而可评价研究的细胞或组织的翻译状态。一个或多个 mRNA 变体的细胞类型特异性或组织特异性翻译效率($P_{(\text{RNA-Var.1x})}$)与借助于组件 1 检测的待研究 mRNA 变体的转录速率($T_{(\text{RNA-Var.1x})}$)的乘积, 给出的值 ($C_{\text{Prot.x}}$)对应于所研究组织中存在的与 mRNA 变体相应的蛋白的含量。因此如下适用:

$$15 \quad \frac{I_{(\text{RNA-Var.1x})}}{I_{(\text{持家})}} = T_{(\text{RNA-Var.1x})}$$

$$T_{(\text{RNA-Var.1x})} \times P_{(\text{RNA-Var.1x})} = C_{\text{Prot.x}}$$

参考文献

- [0] Lewin, B.: "Genes VI" 1997 Oxford University press
- [1] Willis, A.E.: "Translational control of growth factor and proto-oncogene expression", 1999, Int. J. Biochem. Cell Biol., vol. 31
- [2] Harigan, M. et al.: "A cis-acting element in the *bcl-2* gene controls expression through translational mechanisms", 1996 Oncogene, vol. 12
- [3] Jagus, R. et al.: "PKR, apoptosis and cancer", 1999, Int. J. Biochem. Cell Biol., vol. 31
- [4] Ewen, M.E. & Miller, S.J.: "p53 and translational control", 1996, Biochim. Biophys. Acta, vol. 1242
- [5] Landers, J.E. et al.: "Translational enhancement of *mdm2* oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein", 1997, Cancer Res. vol. 57
- [6] Clemens, M.J. & Bomer, A.U.: "Translational control: The cancer connection", 1999, Int. J. Biochem. Cell Biol., vol. 31

- [7] Kozak, M.: "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs", 1987, *Nuc. Acids Res.* vol. 15
- [8] Kozak, M.: "An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control", 1991, *J. Cell Biol.*, vol. 115
- [9] El-Deiry, W.S.: "Regulation of p53 downstream genes", 1998, *Seminars in CANCER BIOLOGY*, vol. 8
- [10] Kozak, M.: "Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first", 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 92
- [11] van der Velden, A.W. & Thomas, A.A.M.: "The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development", 1999, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, vol. 31
- [12] Tsujimoto, Y. & Croce C.M.: "Analysis of the structure, transcripts, and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma", 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 83
- [13] Seto, M. et al.: "Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the *Bcl-2*-*Ig* fusion gene in lymphoma", 1988, *EMBO J.*, vol. 7
- [14] Kamoshita, N. et al.: "Genetic analysis of internal ribosome entry site on Hepatitis C virus RNA: Implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors", 1997, *Virology*, vol. 233
- [15] Jang, S.K. et al.: "Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosome entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein", 1990, *Genes Dev.*, vol. 4
- [16] Soo-Kyung, O.H. et al.: "Homeotic gene *Antennapedia* mRNA contains 5'-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding", 1992, *Genes Dev.*, vol. 6
- [17] Huez, I. et al.: "Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA", 1998, *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18; 11
- [18] Vagner, S. et al.: "Alternative translation of human *Fibroblast Growth Factor 2* mRNA occurs by internal entry of ribosomes", 1995, *Mol. Cell Biol.*, vol. 15; 1
- [19] Macejak, D.G. & Sarnow, P.: "Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA", 1991, *Nature*, vol. 353
- [20] Yang, Q. & Sarnow, P.: "Location of the internal ribosome entry site in the 5' non-coding region of the immunoglobulin *heavy-chain binding protein (BiP)* mRNA: evidence for specific RNA-protein interactions", 1997, *Nuc. Acids Res.*, vol. 25; 14

- [21] Bernstein, J. et al.: "PDGF2/c-sis mRNA leader contains a differentiation linked internal ribosome entry site (D-IRES)", 1997, J. Biol. Chem., vol. 272; 14
- [22] Gan, W. & Rhoads, R.E.: "Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the mRNA for eIF4G, a Factor involved in the Picornavirus-induced switch from Cap-dependent to internal initiation", 1996, J. Biol. Chem., vol. 271; 2
- [23] Nanbru, C. et al.: "Alternative translation of proto-oncogene *c-myc* by an internal ribosome entry site", 1997, J. Biol. Chem., vol. 272; 51
- [24] M. Zuker, M. et al.: "Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide", In RNA Biochemistry and Biotechnology, 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999)
- [25] Links, M. & Brown, R.: "Clinical relevance of the molecular mechanisms of resistance to anti-cancer drugs", 1999, Expert Reviews in Molecular Medicine, ISSN 1462-3994
- [26] Sambrook, J. et al.: "Molecular Cloning" 2001, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory
- [27] Nielsen, P.E. et al.: "Peptide nucleic acids: Protocols and Applications", 1999, Horizon Scientific Press
- [28] Kumar, R. et al.: "Nuclease protection assays", US-Pat. 5,770,370; WO 97/47640
- [29] Pradet-Balade, B. et al.: "Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics?", 2001, TIBS, vol. 26; 4
- [30] Celis, J.E. et al.: "Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics", 2000, FEBS Lett., vol. 480
- [31] Hentze, M. W.: "Improved predictive power of RNA analysis for protein expression", WO 00/68423
- [32] Einat, P. et al.: "Method for identifying translationally regulated genes", US-Pat. 6,013,437; WO 98/21321
- [33] Einat, P. et al.: "Method for identifying genes", WO 99/58718
- [34] Martinez-Salas, E. et al.: "Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements", 2001, J. Gen. Virol., vol. 82
- [35] Scherf, U. et al.: "A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer", 2000, Nature genetics, vol. 24
- [36] Qiagen: RNeasy Midi/Maxi Handbook 06/2001
- [37] Wallace, R. B. et al.: "Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch", 1979, Nuc. Ac. Res., Vol. 6

- [38] Howley, P. M. et al.: "A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. Evaluation of polyomavirus genomes", 1979, J. Biol. Chem., Vol. 254
- [39] Breslauer, K. J. et al.: "Predicting DNA duplex stability from the base sequence", 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 83
- [40] Freier, S. M. et al.: "Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability", 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 83
- [41] Sugimoto, N. et al.: "Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes", 1996, Nuc. Ac. Res., Vol. 24, No. 22
- [42] SantaLucia Jr., J. et al.: "Improved nearest neighbor parameters for predicting DNA duplex stability", 1996, J. Biol. Chem., Vol. 35
- [43] Qiagen and others, polyA+mRNA isolation
- [44] Boehringer Mannheim: RNase Protection kits
- [45] Steemers, F. J. et al.: "Screening unlabeled DNA targets with randomly ordered fiber-optic gene arrays", 2000, Nature Biotech., Vol. 18
- [46] Fodor, S. P. A. et al.: "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis", 1991, Science, Vol. 251
- [47] Lipshutz, R. J. et al.: "High density synthetic oligonucleotide arrays", 1998, Nature Genet., Vol. 21
- [48] Blanchard, A. P. et al.: "High density oligonucleotide arrays", 1996, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 11
- [49] Fodor, S.P.A. et al. US Pat. 5,424,186;
- [50] Schena, M.: "DNA-Microarrays: A practical approach", 1999, Oxford University Press
- [51] Schena, M. et al.: "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes", 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 93
- [52] Gaitt, M. J.: "Oligonucleotide-synthesis: A practical approach", 1984, Oxford University Press
- [53] Kricka, L.: "Non isotopic DNA probe techniques", 1992, Academic Press, San Diego
- [54] "Fluorescent and Luminescent Probes for biological activity", 1999, 2nd Edition, Mason, W.T. ed.
- [55] Worley, J.M. et al., 1994, Molecular Dynamics Application Note #57
- [56] Anderson, M.L.M.: "Nucleic acid Hybridization", 1998, Springer-Verlag Telos
- [57] Bowtell, D. D. L.: "Options available-from start to finish. for obtaining expression data by microarray", 1999, Nature Genet., Vol. 21

- [58] Gelfand, D.H. et al.: "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA-polymerase", 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 88 and US Pat. 5,210,015 (1993)
- [59] Tyagi, S. et al.: "Molecular Beacons: probes that fluoresce upon hybridization", 1996, Nature Biotech., Vol. 14
- [60] Hayashi, S. et al.: "Increase in Cap- and IRES-Dependent Protein Synthesis by Overproduction of Translation Initiation Factor eIF4G", 2000, Biochem. Biophys. Res. Com., Vol. 277
- [61] Gingras, A.-C., et al.: "eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation", 1999, Annu. Rev. Biochem., Vol. 68
- [62] Miller, S. J., et al.: "p53 Binds Selectively to the 5' Untranslated Region of cdk4, an RNA Element Necessary and Sufficient for Transforming Growth Factor β - and p53-Mediated Translational Inhibition of cdk4", 2000, Mol. Cell. Biol., Vol. 20, No. 22
- [63] Ewen, M. E. et al.: "p53 and translational control", 1996, Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1242
- [64] Holcik, M. et al.: "Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death" 2000, Trends Genet., Vol 16, No. 10
- [65] Laemmli, U.K.: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", 1975, Nature, Vol. 227
- [66] Towbin, H.: et al.: "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications", 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 76
- [67] Harlow, E. et al.: "Antibodies: A Laboratory Manual", 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [68] deWet, J.R. et al.: "Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*", 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 82
- [69] Alam, J. et al.: "Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription", 1990, Anal. Biochem., Vol. 188
- [70] Wood, K.V.: "Firefly luciferase: a new tool for the molecular biologists", 1990, Promega Notes 28, 1
- [71] Farr, a. et al.: "A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency", 1991, Nuc. Acids, Res., Vol. 20
- [72] Sherf, B.A. et al.: "Dual-Luciferase® reporter-assay: an advanced co-reporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays", 1996, Promega Notes 57, 2

-
- [73] Janknecht, R. et al.: "Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus", 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 88
- [74] Pogge von Strandmann, E. et al.: "Highly specific and sensitive detection of 6xHis tagged proteins using MRGS.His Antibody", 1996, QIAGEN News, No. 1, 9
- [75] Spector, D.L. et al.: "Cells: A Laboratory Manual", 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [76] Van Furth, R. et al.: "Immuno-cytochemical detection of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation in individual cells", 1988, J. Immunol. Methods, Vol. 108
- [77] Gold, R. et al.: "Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques", 1994, Lab. Invest., Vol. 71
- [78] Vermes, I. et al.: "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V", 1995, J. Immunol. Methods, Vol. 184
- [79] Scudiero, E. A. et al.: "Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines", 1988, Cancer Res., Vol. 48
- [80] Cory, A. H. et al.: "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture", 1991, Cancer Commun., Vol. 3

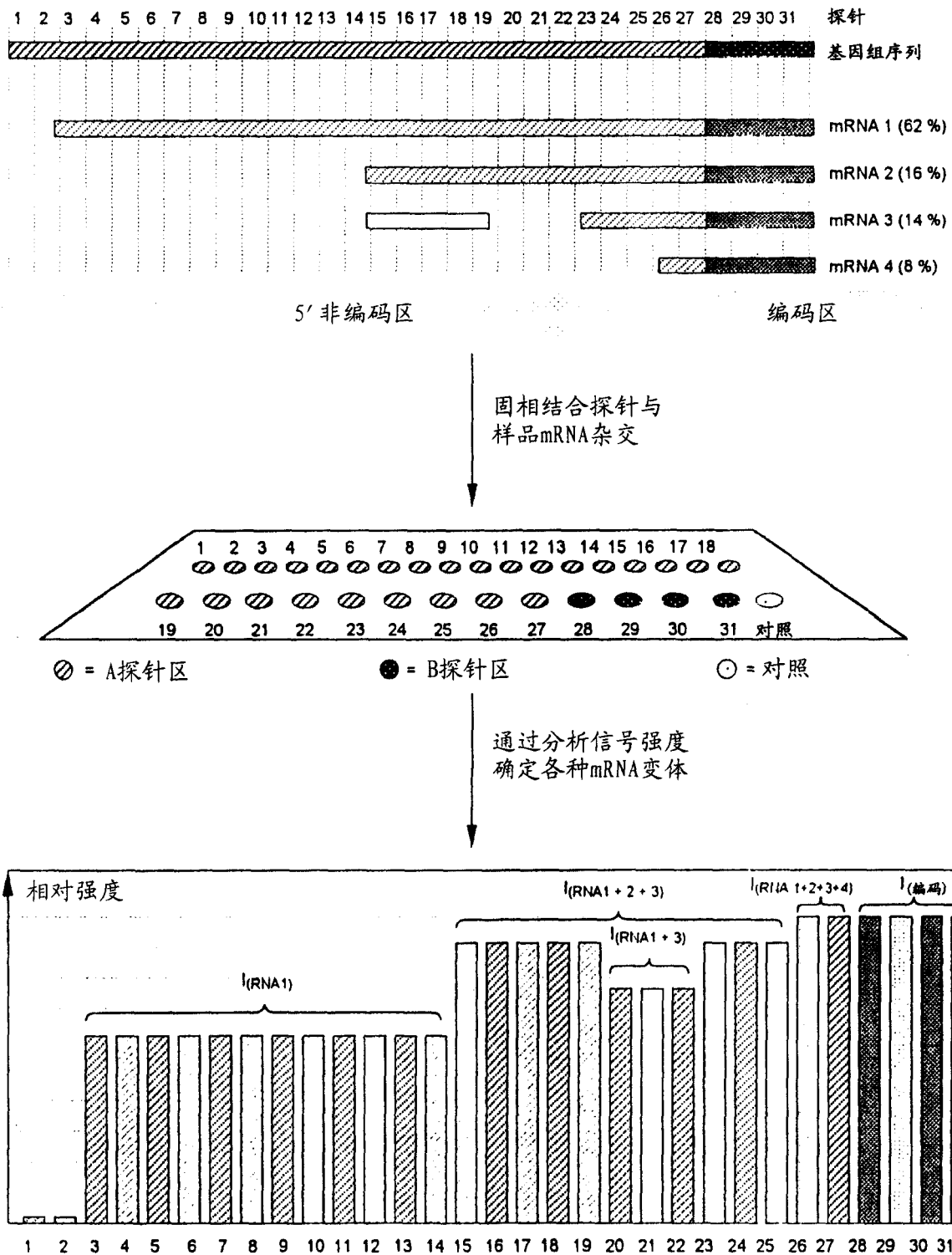


图 1

专利名称(译)	分析翻译调控的基因表达的方法		
公开(公告)号	CN1615369A	公开(公告)日	2005-05-11
申请号	CN02827488.1	申请日	2002-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	富卡斯吉诺米克斯有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	富卡斯吉诺米克斯有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	富卡斯吉诺米克斯有限责任公司		
[标]发明人	克里斯托弗查尔		
发明人	克里斯托弗·查尔		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N33/58 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/158		
优先权	10158517 2001-11-29 DE		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及分析基因表达的方法，它使得考虑存在于细胞类型、组织或生物体中的翻译状态成为可能，以便将由待研究基因转录的mRNA的含量与由该mRNA翻译的蛋白的含量可靠地关联起来。由待研究基因转录的以及编码特定蛋白所有mRNA变体的翻译效率的确定，使得有可能与其它方法一起鉴定在特定细胞类型、组织或生物体中优先翻译的mRNA变体。根据优先翻译的编码待研究蛋白的mRNA变体的含量以及翻译效率，有可能可靠地预测在细胞类型、组织或生物体中表达的蛋白的含量。

