

1. 一种分离和纯化了的ALT2蛋白质，含有对应于序列编号2中氨基酸序列。

5 2. 如权利要求1所述的蛋白质，其中，分离和纯化的编码ALT2蛋白质的核酸。

3. 如权利要求2所述的蛋白质，其中，所述分离和纯化的核酸，其核苷酸序列为序列编号1之序列。

10

4. 如权利要求1所述的蛋白质，其中，含有与分离和纯化的ALT2特异性结合的抗体。

15 5. 一种ALT2表达载体，其中，将分离和纯化的编码ALT2蛋白质的核酸序列与表达序列功能性结合。

6. 一种检测样本中含有权利要求1所述编码ALT2蛋白质的信使核糖核酸的方法，该方法包括：

20 (1) 将核酸探针与标本接触，核酸探针与所要检测的信使核糖核酸在严格洗涤杂交条件下有特异性的结合；

 (2) 检测核酸探针与信使核糖核酸结合的杂交体。

7. 一种检测生物体液中权利要求1所述ALT2蛋白质的方法，包括：

(1) 体液标本与至少一种特异性结合ALT2蛋白质的抗体结合；

25 (2) 检测样本中与ALT2结合的抗体。

8. 一种诊断或测定可疑生物是否患有含ALT2蛋白质的组织的疾病或损伤的方法，包括：

(1) 从可疑生物来的体液标本与至少一种与ALT2蛋白质特异性结合的第一抗体接触；

5 (2) 检测与ALT2蛋白质结合的第一抗体；

(3) 体液标本与至少一种与ALT1蛋白质特异性结合的第二种抗体结合；

(4) 检测与ALT1蛋白质结合的第二抗体；

(5) 比较与第一抗体结合的ALT2及与第二抗体结合的ALT1的量，
10 当ALT2的量足以超过ALT1的量时，提示该生物存在含ALT2的组织的疾病或损伤。

9. 如权利要求7或8所述的方法，其中，所述体液包括血液、血清、
15 淋巴液、尿液、汗液、粘液、痰液、唾液、精液、脑脊液、肠液、关节液、齿龈液、阴道液和胸腔液等。

10. 如权利要求8所述的方法，其中，所述组织包括肝、脑、肌肉、
心脏、脂肪和肾脏。

20 11. 一种诊断或测定可疑生物是否患有含ALT2蛋白质的组织的疾病或损伤的方法，包括：

(1) 从可疑生物来的体液标本与至少一种与ALT2蛋白质特异性结合的第一抗体接触；

(2) 检测与ALT2蛋白质结合的第一抗体；

25 (3) 比较该待测可疑体液样本中ALT2含量与已知从无含ALT2组织损伤或疾病的生物样本中ALT2含量，当待测样本中ALT2水平高于正常样本中ALT2水平时，提示待测样本的生物患有含ALT2组织的疾病或损伤。

12. 如权利要求11所述的方法，其中，所述体液样本包括血液、血清、淋巴液、尿液、汗液、粘液、痰液、唾液、精液、脑脊液、肠液、关节液、齿龈液、阴道液和胸腔液等。

5

13. 如权利要求11所述的方法，其中，所述组织包括肝、脑、肌肉、心脏、脂肪和肾脏。

14. 一种用于诊断含ALT2的组织的损伤和疾病的试剂盒，包括：

10

(1) 检测体液中ALT2蛋白质的测定剂；

(2) 判定上述 (1) 中所测定的结果是否与含ALT2组织的损伤或疾病相关的指引。

15. 如权利要求14所述的诊断试剂盒，其中，进一步包括：

15

(3) 检测体液中ALT1蛋白质的测定剂；

(4) 判定上述 (4) 中所测定的结果是否与相关组织的损伤或疾病相关的指引。

16. 如权利要求14或15所述的试剂盒，其中，所述试剂盒的测定法包括生物学分析、基于抗体的分析法、酶联免疫吸附分析法、蛋白质免疫印迹分析法、快速免疫分析法和放射免疫分析法。

20

17. 一种用于诊断含ALT2或ALT1的组织的疾病或损伤的试剂盒，包括：

25

(1) 分装的特异性结合ALT2的抗体；

(2) 免疫分析试剂；

(3) 用于决定所测定的ALT2结果是否提示患有含ALT2或ALT1组织的损伤或疾病的标准。

18. 如权利要求17所述的试剂盒，其中，所述试剂盒中的标准包括判定ALT2升高或降低是否可诊断为含ALT2或ALT1组织的损伤或疾病的指引。

5

19. 如权利要求17所述的试剂盒，其中，进一步包括：

(1) 分装的特异性结合ALT1的抗体；

(2) 用于决定所测定的ALT1结果是否提示患有含ALT1组织的损伤或疾病的标准。

10

20. 如权利要求19所述的试剂盒，其中，所述试剂盒中的标准包括判定ALT1升高或降低是否可诊断为含ALT2或ALT1组织的损伤或疾病的指引。

15

21. 一种用于有体液中ALT2水平改变的相关状况的诊断试剂盒，其中，包括：

(1) 检测体液中ALT2蛋白质的测定剂；

(2) 判定上述 (1) 中所测定的结果是否在诊断该相关状况的范围

20

内。

22. 一种用于有体液中ALT1水平改变的相关状况的诊断试剂盒，包括：

(1) 检测体液中ALT2蛋白质的测定剂；

(2) 判定上述 (1) 中所测定的结果是否在诊断该相关状况的范围

25

内。

23. 一种用于有体液中ALT1和/或ALT2水平改变的相关状况的诊断

试剂盒，包括：

- (1) 检测体液中ALT2蛋白质的测定剂；
- (2) 检测体液中ALT1蛋白质的测定剂；
- (3) 判定上述 (1) 和 (2) 中所测定的结果是否在诊断该相关状况的
5 范围内的指引。

24. 一种诊断可疑生物与体液中ALT2水平改变相关之特定状况的方法，包括：

- (1) 从可疑生物来的体液标本与至少一种与ALT2蛋白质特异性结
10 合的抗体接触；
- (2) 检测与ALT2蛋白质结合的该抗体；
- (3) 比较待测样本中该抗体水平与已知从无该状况的生物样本中该
抗体水平，当待测样本中该抗体水平明显不同于正常样本中该抗体水平
时，提示待测样本的生物存在该特定的状况。

15

25. 一种诊断可疑生物与体液中ALT1水平改变相关之特定状况的方法，包括：

- (1) 从可疑生物来的体液标本与至少一种与ALT1蛋白质特异性结
合的抗体接触；
- 20 (2) 检测该样本中与ALT1蛋白质结合的该抗体；
- (3) 比较待测样本中该抗体水平与已知从无该状况的生物样本中该
抗体水平，当待测样本中该抗体水平明显不同于正常样本中该抗体水平
时，提示待测样本的生物存在该特定的状况。

25

26. 如权利要求24和25中所述的方法，其中，所述体液样本包括血液、血清、淋巴液、尿液、汗液、粘液、痰液、唾液、精液、脑脊液、肠液、关节液、齿龈液、阴道液和胸腔液等。

27. 如权利要求21、22和23所述的试剂盒，其中，所述的测定方法包括生物学分析、基于抗体的分析法、酶联免疫吸附分析法、蛋白质免疫印迹分析法、快速免疫分析法和放射免疫分析法剂等。

5 28. 一种制备序列编号2的ALT2蛋白质的方法，包括：

- (1) 将ALT2核酸序列引入到一种表达载体中；
- (2) 将该表达载体引导进入宿主细胞中而形成重组宿主细胞；
- (3) 将该重组宿主细胞置于可表达ALT蛋白质的条件下。

10 29. 如权利要求28所述的方法，其中，所述ALT2聚核苷酸序列为序列编号1之序列。

新型丙氨酸转氨酶及其应用方法

相关申请

本发明由美国国立卫生院糖尿病、消化病及肾病研究院基金
5 (R21DK57835-01)资助,美利坚合众国政府拥有该发明的一定权益。

本申请要求 2001 年 5 月 14 日提交的美国专利申请 60/290,829 的
优先权,后者可作为本申请的参考文件。

技术领域

10 本发明是相关于人类丙氨酸转氨酶 (ALT) 的一种新型同功酶,
ALT2, 及其应用该酶作为预测和监测组织损伤和/或功能异常的标记。
本发明与应用检测 ALT2 作为诊断包括各种病因引起的组织损伤和/或
功能异常, 这些病因包括, 但不限于肝炎、非酒精性肝脂肪变性
(NASH)、脂肪肝、肝硬化、药物性肝炎及肌肉、脑、肾及脂肪等组织
15 的异常。

背景技术

丙氨酸转氨酶 (ALT) [EC2.6.1.2., 也称谷氨酰丙酮酸氨基转移酶
(GPT) 或丙氨酸氨基转移酶] 是可逆行催化丙氨酸与 α 酮戊二酸反应
20 生成谷氨酸及丙酮酸的一种吡哆醛酶。很多组织包括肝、肌肉、肾、
心脏和脑组织均有 ALT 活性。ALT 通过调节以上四种主要中间代谢产
物之间的相互转换在葡萄糖异生和氨基酸代谢中起重要作用。在肌肉
及某些其它组织, 当氨基酸分解作为能量来源时, 谷氨酰作为氨基供
体, ALT 将谷氨酰的 α 氨基基团转移至丙酮酸生成丙氨酸, 后者是饥饿
25 时血液中的主要氨基酸。丙氨酸被肝脏摄取, 通过 ALT 作用转化为丙
酮酸, 进而用于合成葡萄糖, 形成所谓的丙氨酸葡萄糖循环 (Felig, The
glucose-alanine cycle, *Metabolism* 22:179-207 (1973))。该循环在骨骼肌

进行剧烈耗氧运动时亦非常重要，因为这一过程中不但有由蛋白质分解产生氨基，而且还通过糖酵解产生大量丙酮酸。此外，亦有发现丙氨酸转氨作用在脑神经递质谷氨酰胺的合成中起重要作用 (Peng, et al., Utilization of alpha-ketoglutarate as a precursor for transmitter glutamine
5 in cultured cerebellar granule cells, *Neurochem. Res.* 16:29-34 (1991))。在培养的脑颗粒细胞中， α 酮戊二酸与氨基供体（丙氨酸）相结合作为谷氨酰库的前体，在钾诱导细胞去极化时，释放谷氨酰。转氨抑制剂氨基乙醇酸可抑制谷氨酰的合成，提示 ALT 参与这一重要抑制性神经递质的合成。

10 ALT 已被作为肝功能的血清学标记应用于临床医学。当药物毒性、感染（细菌、病毒、真菌、原虫或其它有核生物）、酒精或肝脂肪变性等原因引起肝损害时，血清 ALT 水平明显升高 (Dufour, et al., Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use for laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring, *Clin. Chem.* 46:
15 2050-2068 (2000); Sherman, K.E., Alanine aminotransferase in clinical practice, *Arch. Intern. Med.* 151:260-265 (1991))。

由于细胞更新，正常周围血循环中存在很低 ALT 水平。普遍认为肝脏含有最高 ALT 水平 (Pratt and Kaplan, supra)。肝脏中 ALT 水平与血循环中 ALT 水平相差约 2000 到 3000 倍 (Lott, J. A., Alanine and
20 aspartate aminotransferase (ALT and AST), Year Book Medical Publisher, Chicago, 111-138 (1986))。因此血清、血浆或全血中 ALT 水平升高被认为是肝脏损伤时肝细胞 ALT “漏出”到血循环的一种标记。通常，不同性质肝脏损伤导致不同程度的血 ALT 升高 (Dufour, et al., Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of
25 laboratory tests, *Clin. Chem.*, 46:2027-2049 (2000); Dufour, II, supra; and Sherman, supra)。血转氨酶活性明显升高（高于正常 8 到 10 倍）提示有病毒性肝炎或药物引起的肝损害。血清 ALT 慢性轻度升高（高于正常 2 到 8 倍）提示由慢性肝炎、脂肪肝或肝脂肪变性。但是血清 ALT

水平与肝脏损伤的原因之间相关的机制仍然不明。

尽管血清 ALT 已广泛应用于临床生化，但由于其在某些情况并不能正确地预示疾病，该检测仍然存在一系列不足。最新研究质疑血清 ALT 检测对诊断肝病的特异性。很多其它疾病如肥胖、肌肉疾病、心力衰竭、血色病、Wilson 氏病、 $\alpha 1$ 抗糜蛋白酶缺乏症等亦常有血清 ALT 活性升高 (参见 Asayama, et al., Relationships between an index of body fat distribution (based on waist and hip circumferences) and stature, and biochemical complications in obese children, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 22:1209-16 (1998); Strauss, et al., Prevalence of abnormal serum aminotransferase values in overweight and obese adolescents [see comments], *J. Pediatr.* 136:727-33 (2000); Rutledge, et al., Persistent hypertransaminasemia as the presenting finding of childhood muscle disease, *Clin. Pediatr. (Phila.)*, 24:500-503 (1985); Lin, et al., Persistent hypertransaminasemia as the presenting findings of muscular dystrophy in childhood, *Taiwan Erh Ko I Hsueh Hui Tsa Chih.* 40:424-429 (1999); Lott and Landesman, The enzymology of skeletal muscle disorders, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 20:153-190 (1984); Friedman, et al., Evaluation of blood donors with elevated serum alanine aminotransferase levels, *Ann. Intern. Med.*, 107:137-44 (1987); Lozano, et al., Study of serum alanine-aminotransferase levels in blood donors in Spain, *Haematologica*, 83:237-239 (1998))。血清 ALT 活性受年龄、性别、饮食及药物的影响，其升高也见于无任何症状病人或“健康”者 (Sherman, *supra*; Pratt and Kaplan, Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients, *N. Engl. J. Med.*, 342:1266-1271 (2000); Blanc and Redlich, Elevated liver enzymes in asymptomatic patients, *N. Engl. J. Med.*, 343:662; discussion 663 (2000))。

曾有推论存在 ALT 同功酶，但迄今未有人成功分离到该同功酶。既往研究应用层析法分离细胞浆与线粒体，提示存在两种 ALT 活性，

即细胞浆 ALT 和线粒体 ALT (Ziegenbein, R., Two different forms of glutamic pyruvic transaminase in rat heart and their intracellular localization, *Nature*, 212:935 (1966))。近期文献一般认为 ALT 是一种胞浆酶 (Asayama, et al., Relationships between an index of body fat distribution (based on waist and hip circumferences) and stature, and biochemical complications in obese children, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 22:1209-1216 (1998))。然而, 生物化学及细胞遗传学研究都提示有两种人类 ALT 存在。应用经典层析方法发现人类肝、肾、骨骼肌和心肌组织都存在具有不同生化动力学特性的细胞质和线粒体 ALT 活性 (Gubern, et al., Partial characterization of the alanine aminotransferase isoenzymes from human liver, *Biochem. Soc. Trans.*, 18:1288-1289 (1990); Sakagishi, Y., [Alanine aminotransferase (ALT)], *Nippon Rinsho*, 53:1146-1150 (1995))。Kielty 等应用细胞遗传学方法研究由大鼠肝癌细胞株与不同人类非肝源性细胞的杂交体, 将肝细胞浆 ALT 基因定位于第 8 号染色体 (Kielty, et al., Regulation of expression of liver-specific enzymes. II. Activation and chromosomal localization of soluble glutamate-pyruvate transaminase, *Ann. Hum. Genet.*, 46:135-143 (1982))。可是, Wijnen 等通过研究人白细胞与中国地鼠纤维母细胞杂交体将细胞浆 ALT 基因定位于第 16 号染色体 (Wijnen, Assignment of GPT to human chromosome 16, *Cytogenet. Cell Genet.* 32:327 (1982))。Sohocki 等在肝细胞浆 ALT 氨基酸序列基础上 (Ishiguro, et al., Complete amino acid sequence of human liver cytosolic alanine aminotransferase (GPT) determined by a combination of conventional and mass spectral methods, *Biochemistry*, 30:10451-10457 (1991)), 应用经典方法与大规模光谱学方法相结合, 克隆了一种人类 ALT 基因 (由于本发明的缘故, 将此基因称为 ALT1 基因) 并将其定位于第 8 号染色体 (Sohocki, et al., Human glutamate pyruvate transaminase (GPT): localization to 8q24.3, cDNA and genomic sequences, and polymorphic sites, *Genomics*, 40:247-252

(1997))。

有关 ALT 的检测和产品信息可参见美国专利第 5,952,211 号和第 5,804,402 号。但是这两项专利均未提及可能导致改进目前用于肝损害的诊断分析方法的自然存在的人类 ALT 同工酶。

5

发明内容

本发明目标之一是含有序列编号 2 的氨基酸序列的 ALT2 蛋白质。

本发明的另一目标是编码 ALT2 多肽链的聚核苷酸序列，即序列编号 1 之序列及其该序列的类似体。

10 本发明的另一目标是与 ALT2 特异性结合的抗体。该抗体特异性结合 ALT2 而不结合 ALT1。进一步，该抗体结合于序列编号 2 中 ALT2 序列和 ALT2 特异性片段或类似体，或者序列编号 1 之 DNA 序列所编码的蛋白质或 ALT2 特异性片段。

15 本发明的另一目标是 ALT2 的表达载体。该表达载体可以是质粒、科氏体、或者将编码 ALT2 的 DNA 序列与表达序列如启动子有效结合的其它形式载体。该 ALT2 的 DNA 序列包括序列编号 1 之序列、编码序列编号 2 之中氨基酸的相应 DNA 序列或编码序列编号 2 之氨基酸的类似物的相应 DNA 序列。

20 本发明的另一目标是检测样本中存在 ALT2 和/或 ALT1 信使核糖核酸的方法，该样本指生物（包括但不限于人和其它哺乳动物）的组织或体液。本发明宗旨也包括应用于检测样本中存在 ALT2 和/或 ALT1 信使核糖核酸的聚核苷酸探针。

25 本发明的另一目标为检测样本中存在 ALT2 和/或 ALT1 蛋白质的方法，该样本指生物（包括但不限于人和其它哺乳动物）的组织或体液。本发明宗旨也包括应用与 ALT2 或 ALT1 特异性结合的单克隆或多克隆抗体检测样本中存在 ALT2 和/或 ALT1 蛋白质。该样本包括各种体液如血液、血清、淋巴液、尿液、汗液、粘液、痰液、唾液、精液、脑脊液、肠液、关节液、齿龈液、阴道液和胸腔液。该样本也包括各

种组织如肝、脑、肌肉、脂肪和肾组织等。

本发明的另一目标是诊断和检测含 ALT2 之组织的损伤或疾病的方法。该方法包括应用与 ALT2 特异性结合的单克隆或多克隆抗体检测生物体液中 ALT2 的含量,应用与 ALT1 特异性结合的单克隆或多克隆抗体检测生物体液中 ALT1 的含量以及比较 ALT2 与 ALT1 的相对含量。当检测样本 ALT2 水平高于 ALT1 水平达一定程度或 ALT2 水平升高达到某一特定范围时,可诊断该生物患有特定的疾病或损伤。该样本包括各种体液如血液、血清、淋巴液、尿液、汗液、粘液、痰液、唾液、精液、脑脊液、肠液、关节液、齿龈液、阴道液和胸腔液。该样本也包括各种组织如肝脏、脑、肌肉、脂肪、心脏和肾组织等。

本发明另一宗旨是一种用于诊断含 ALT2 组织损伤或疾病的试剂盒,该试剂盒含有检测体液中 ALT2 水平的检测剂及其判定所测定的 ALT2 水平是否与含 ALT2 组织损伤或特定的疾病相关的指引。该试剂盒也可能含有检测体液中 ALT1 水平的检测剂及其判定所测定的 ALT1 水平是否与含 ALT2 组织损伤或特定的疾病相关的指引。检测 ALT2 及 ALT1 的方法包括生物学分析法、基于抗体的分析方法、酶联免疫吸附分析、蛋白质免疫印迹法和放射免疫分析等方法。

本发明另一宗旨为一种用于诊断含 ALT2 和/或 ALT1 的组织损伤或疾病的试剂盒,该试剂盒包括与 ALT2 特异性、免疫试剂、阳性及阴性对照等。该试剂盒也可能包括与 ALT1 特异性结合的多克隆或单克隆抗体及判定所测定的 ALT2 和/或 ALT1 是否可诊断含 ALT2 和/或 ALT1 组织的损伤或疾病的指引。

本发明的另一目标是一种用于测定体液中 ALT2 水平改变(高于或低于正常)的试剂盒。该试剂盒包括体液中 ALT2 水平的检测剂及其判定所测的 ALT2 水平是否在与某一特定情形相关的范围的指引。本发明也可能包括一种测定体液中 ALT1 改变(高于或低于正常)的试剂盒,该试剂盒含有检测体液中 ALT1 水平的试剂及其判定所测得的 ALT1 水平在与某一特定情形相关的范围的指引。该试剂盒也可能

比较 ALT1 和 ALT2 的水平以及判定该 ALT1 和 ALT2 水平是否在与某一特定情形相关的范围的指引。检测 ALT1 和 ALT2 的方法可能是以下方法的其中之一：生物学分析法、基于抗体的分析方法、酶联免疫吸附分析、蛋白质免疫印迹法、快速免疫分析法或放射免疫分析等。

5 本发明的另一宗旨是一种制备 ALT2 的方法，所生产的 ALT2 可以是与序列编号 2 之 DNA 序列所编码的氨基酸序列相同或相类似物、部分片段或衍生物。该方法包括克隆编码 ALT2 的 DNA 序列到表达载体、引导该表达载体进入宿主细胞而产生重组宿主细胞和将重组宿主细胞置于可表达 ALT2 的任何状态。该发明宗旨之一也包括分离和纯化表
10 达的 ALT2。重组质粒中的 DNA 序列包括序列编号 1 之序列及其任何编码 ALT2 片段、类似物或衍生物的 DNA 序列。

本发明的目标之一包括一种诊断生物（包括但不限于人类和哺乳类动物）与体液中 ALT2 和/或 ALT1 改变相关的状况的方法。该方法包括应用至少一种特异性结合 ALT2 的抗体与体液标本相结合，进而
15 检测与 ALT2 结合的 ALT2 抗体的量，并与已知的无该特定状况的生物（包括但不限于人类和哺乳类动物）体液中 ALT2 抗体量比较，当待测体液样本结合的 ALT2 抗体含量与已知的无该特定状况的生物体液中 ALT2 抗体量有明显差异时，将提示该生物存在该特定状况。此外，该方法也包括应用至少一种特异性结合 ALT1 的抗体与体液标本相结
20 合，进而检测与 ALT1 结合的 ALT1 抗体的量，并与已知的无该特定状况的生物体液中 ALT1 抗体量比较，当待测体液样本结合的 ALT1 抗体含量与已知并与已知的无该特定状况的生物体液中 ALT1 抗体量有明显差异时，将提示该生物存在该特定状况。该方法可进一步比较所检测到的 ALT2 抗体量与总抗体量和/或 ALT1 抗体量，和/或比较所测定的
25 的 ALT1 抗体量与总抗体量和/或与所测定的 ALT2 抗体量。当所测定的抗 ALT2 抗体量与 ALT1 抗体量或总抗体量的比值在某一特定范围时，提示该特定状况的存在。与此相似，当所测定的抗 ALT1 抗体量与 ALT2 抗体量或总抗体量的比值在某一特定范围时，提示该特定状

况的存在。该方法中所指体液可以是以下其中之一：血液、血清、淋巴液、尿液、汗液、粘液、痰液、唾液、精液、脑脊液、肠液、关节液、齿龈液、阴道液和胸腔液。

5 附图说明

图 1 示出 ALT2 之 cDNA 序列（序列编号 1）。

图 2 示出推论的 ALT2 氨基酸序列（序列编号 2）与既往已发表的人类 ALT (ALT1) 的氨基酸序列（序列编号 3）的比较。

10 具体实施方式

本发明包括 ALT2 的核酸及氨基酸序列、ALT2 及 ALT1 的特异性抗体以及应用上述蛋白质、核酸和抗体来诊断含 ALT2 组织的不同疾病和状况如脂肪肝、代谢综合症 X，以及用于鉴别诊断不同原因所致的肝损害，包括脂肪肝（肝脂变）、酒精、创伤、感染、中毒及其它原因所致的肝损害。

本发明也包括 ALT2 的类似物和功能片段及其含有 ALT2 核酸序列的表达载体和含有 ALT2 核酸序列表达载体的宿主细胞。

本申请中，应用序列分析软件如 Wisconsin 大学的 GCG 序列分析软件包或 NCBI 的 BLAST 等程序来衡量类似物类似程度。这类软件通过对不同替代、缺失和其它修饰的类似体之间的相似序列的匹配比较而判定其相似程度。

“功能片段”包括保持有 ALT2 功能、活性或生物免疫特征的序列编号 2 中的片段和与 ALT2 有相似氨基酸序列的其它蛋白质。这里描述的以全长的 ALT2 为例的有关筛选某一片段的功能的方法也可加以修饰使其同样适用于 ALT2 片段。

“本质相同的蛋白”指在不损害该蛋白的功能情况下的某些氨基酸序列改变，包括保守性氨基酸替代即同一类别的其它氨基酸（如缬氨酸替代甘氨酸、精氨酸替代赖氨酸等）或有一个或多个非保守性氨

基酸被替代、缺失或插入某些氨基酸。通常指与序列编号 2 之序列的相似度在 85%以上，特别是达从 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 到 100% 的相似度。

“纯蛋白质”指已从其自然存在的混合物中分离出来 ALT2 蛋白质。其重量比达到至少 60% 以上时可认为是纯化蛋白，较好者指 ALT2 重量达 75%、80%、90%、95%，甚至 99% 以上。本质上纯化的 ALT2 蛋白质可通过从含 ALT2 的自然物质中提取，或通过表达重组编码 ALT2 的核酸而产生，或通过化学合成。其纯度可通过适当的方法来检测如柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相层析法。

当蛋白质从其自然存在的混合物中分离出来时，它实质上已游离于其自然相关的其它组分，因而，与从自然来源的蛋白质不同，应用化学合成或从细胞系统生产的蛋白质实质上也已经游离于其自然相关的其它组分。因此，实质上纯化的蛋白质也包括了那些来源于真核细胞但是在细菌或其它原核细胞中合成的蛋白质。

本描述中的核酸在有调节序列、载体时，可根据该领域中已知的方法在不同的原核和真核细胞中表达。

根据这些方法产生的 ALT2 可通过一系列成熟的方法进行纯化，例如应用抗 ALT2 抗体偶联的固相亲和层析。ALT2 与抗原性标记蛋白的融合蛋白也可应用抗标记蛋白的抗体进行纯化，应用经典的纯化方法如液相层析、梯度离心、凝胶电泳等方法可得到进一步纯化。各种蛋白质的纯化方法均可用于重组 ALT2 蛋白质的纯化。以下将更具体描述 ALT2 蛋白质的纯化。

组建 ALT2 融合蛋白也是本发明的目标之一。融合蛋白包括将适当的融合伙伴蛋白的氨基酸加入、替代或和置换 ALT2 的一个或多个相邻的氨基酸。该融合蛋白可通过应用目前所知的 DNA 重组技术而获得。简言之，编码所要的 ALT2 杂交体蛋白的 DNA 分子可通过 PCR 突变、点突变和/或限制性核酸内切酶消化和连接反应而获得，然后将此杂交体插入表达载体并导入适当的宿主细胞中。

含全部或部分 ALT2 的重组表达载体可通过各种不同形式的已知方法来构建，常用表达载体为质粒和科氏体。表达载体包括一个或多个 ALT2 片段，典型表达载体包括序列编号 1 之 ALT2 核酸序列。

本文中，“可操作性编码”指一个或多个蛋白质编码区及其表达该编码序列所编码的蛋白质所需的调节序列，如启动子结合序列、增强子序列、核蛋白结合序列等类似序列。本文中有关目前可用于筛选调节序列并将其引入重组表达载体的现有基本技术将不再详述。例如，用于原核及真核系统的适当调节序列可参见 1997 年由纽约 John Wiley 父子出版社出版 Ausubel 等编著的第三版“分子生物学简要方法”。

用于 ALT2 的表达载体通常含有与其表达宿主细胞种系相适应的调节序列，例如，在以大肠杆菌作为宿主细胞时，可用大肠杆菌来源的质粒 pBR322 转化宿主细胞 (Bolivar 等, *Gene*, 2:95, 1977)，pBR322 含有氨卞青霉素 (AMPR) 和四环素抗性基因，从而提供一种简易的筛选转化细胞的方法。

适合于原核宿主细胞表达的启动子包括 β 半乳糖酶和半乳糖启动子系统 (Chang 等, *Nature*, 275:615, 1978; Goeddel 等, *Nature*, 281:544, 1979)，硷性磷酸酶色氨酸启动子系统 (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057, 1980) 和像 *taq* 启动子的杂合启动子系统 (de Boer 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25, 1983)。其它的功能性细菌启动子系统也可应用。通常目前技术已知这些启动子的核酸序列，因而，技术人员可通过应用某些提供所需核酸限制性内切酶序列的连接序列将其与编码所感兴趣蛋白质的核酸序列相连接 (Siebenlist 等, *Cell*, 20:269, 1980)。

除原核生物外，某些真核微生物如酵母菌也可以作为调节序列的来源，酿酒酵母是常用的真核宿主微生物之一，用于酵母宿主的适当启动子序列包括 3 磷酸甘油激酶 (Hitzeman 等, *J. Biol. Chem.*, 255:2073, 1980) 或其它糖原降解酶，如磷酸丙酮酸水合酶、3 磷酸甘油醛脱氢酶、

己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、6 磷酸葡萄糖异构酶、3 磷酸甘油酯歧化酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶等 (Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; Holland, Biochemistry, 17:4900, 1978)。

- 5 其它一些在生长条件控制方面具有更优越性的可诱导的酵母启动子有酒精脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、氮代谢降解酶系、金属硫酶、3 磷酸甘油醛脱氢酶、与麦芽糖及乳果糖利用相关的酶系等。酵母增强子常常可增强酵母启动子的活性。

另一方法是将重组病毒用作表达载体, 例如腺病毒、腺病毒相关
10 病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、或 RNA 病毒如逆转录病毒或 α 病毒。较好的逆转录病毒包括从鼠类或鸟类来源的逆转录病毒, 较好的 α 病毒载体为来源于 Sindbis 或 Semliki 森林病毒。所有这些载体均能转移或进入含有某一选定标记的基因, 因而可构建可识别的转染细胞。

通过将一或多个感兴趣的基因序列及另一编码某一特定靶细胞
15 受体的配基的基因序列同时插入病毒载体中, 则该载体将作用于该特定的靶细胞。例如, 逆转录病毒载体可通过插入编码糖、糖脂、或糖蛋白的 DNA 序列而成为针对某一特定靶细胞的病毒载体。应用针对逆转录病毒的抗体如可完成较好的靶定作用, 如针对其粘膜感应器周围部分, 可应用 MALT 特异性抗体。该领域发展的新技术或已确认的方法
20 也可能引用用于本发明中, 可插入逆转录病毒基因组的特异性核酸序列将引导含有该核酸序列的逆转录病毒特异性作用于靶细胞。

标准的连接反应技术常用于构建包括所需的编码、非编码及控制序列的适当载体, 纯化的质粒或 DNA 片段被酶切、末端补齐、再连接成所需的质粒结构。

- 25 以质粒载体为例, 为了证实所构建质粒的序列正确性, 可将连接反应混合物转化宿主细胞, 通过适当的抗生素筛选被转化的细胞, 从被转化的细胞提取质粒, 通过限制性核酸内切酶或序列测定加以分析 (方法见 Messing 等, Nucleic Acids Res., 9:309, 1981; Maxam 等,

Methods in Enzymology, 65:499, 1980), 也可用目前文献中已有的其它方法。酶切后的 DNA 片段通过经典的凝胶电泳分离 (Maniatis 等, 1982 版, 分子克隆, 第 133-134 页)。

上述表达载体可转化宿主细胞并在合适于诱导其启动子的传统营
5 养培养基中培养以筛选转染细胞或扩增该基因, 培养条件如温度、酸
硷度等的与前述用于表达的宿主细胞培养一样, 也可见于相关的文献
中。

克隆 ALT2

10 应用聚合酶链反应 (PCR) 及核酸测序方法从人类脂肪组织 cDNA
文库产生表达序列片段 (ESTs)。用于产生 ESTs 的 PCR 和序列测定的
引物来自于用于构建人类脂肪组织 cDNA 文库的载体 TripEX。引物
P922 (5'-AATACGACTCACTATAGGGCGAATTGG-3' 序列编号 4) 及引
物 P923 (5'-CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT-3', 序列编号 5)
15 用于 PCR 扩增反应, 引物 P927 (5'-GTTGGTACCCGGGAATTC-3', 序
列编号 6) 用于 DNA 序列测定。PCR 反应条件为 94°C 2 分钟后, 94
°C 15 秒, 58°C 30 秒及 68°C 4 分钟, 共 10 个循环, 以后接着 20 个循
环中, 每增加一个循环, 增加延伸时间 5 秒, 最后在 72°C 反应 7 分钟。
ALT2 5' 端部分通过应用一连接引物 (AP1) 及 ALT2 特异性引物 P1106
20 5'-TAGGTGCATAGTGCCATCAC-3' [AY029173 中核苷酸 447-428, (序
列编号 7)] 从 BD 生物科技公司人脂肪组织 Marathon cDNA 试剂盒之
cDNA 中采用 5' cDNA 快速扩增法而得, PCR 反应条件为 94°C 30 秒,
56°C 30 秒及 72°C 1 分钟, 共 30 个循环。

应用 BigDye 序列测定试剂测定所得 PCR 产物的序列。测序反应
25 条件为: 总体积为 20µl 中含 100ng PCR 产物、5pmol 引物、4µl BigDye
序列测定混合物, 反应条件为 96°C 15 秒, 50°C 10 秒及 60°C 4 分钟,
共 25 个循环。将反应产物通过 Sephdex-G50 层析柱纯化, 真空离心干
燥后, 在 ABI PRISM 377 测序仪进行序列测定。进而得到完整全长 DNA

序列，证实该 cDNA 编码一种新的 ALT 类似物，将其命名为 ALT2。该 3,957 碱基对的 cDNA 含有一 1,569 碱基对的开放读码区，编码含 459 个氨基酸残基的蛋白质。ALT1 及 ALT2 核糖核酸序列均有两个可能的起始编码 ATG，在其编码的蛋白质中分别相隔 51 个氨基酸残基 (ALT2) 及 24 个氨基酸残基 (ALT1)。在 ALT2，其两个起始编码均无 Kozak 序列，因而，哪个起始编码作为的翻译起点更为有效或长氨基端的 ALT2 是否含有靶定信号有待进一步确定。第二个起始编码后的序列有明显的保守性，提示从第二个 ATG 后编码的蛋白质可能对其功能更为重要。

10 图 1 示出 ALT2 的 cDNA 序列 (序列编号 1)，该核酸及氨基酸序列已于 2001 年 4 月 16 日存于基因库中 (基因库编号 AY029173)，但文章直到 2002 年 3 月 1 日才发表。应用 GCG10 的序列最佳匹配程序检测发现所推论得到的人类 ALT2 的 459 个氨基酸序列与人 ALT1 氨基酸序列 (序列编号 3) 相比较有 69% 的一致性和 78% 的相似性 (图 2)。
15 在氨基端 ALT2 比 ALT1 长 27 个氨基酸残基，ALT2 及 ALT1 的推算分子量分别为 59kDa 和 55kDa，推算等电点分别为 6.42 和 7.11。

保守性功能基团分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 显示 ALT2 含有完整的 I 类转氨酶 (aminotrans_2, pfam00155)，结构 (该结构包括天门冬氨酸转氨酶和酪氨酸转氨酶) 和部分 II 类转氨酶 (aminotrans_2, pfam00222) 结构，不同的转氨酶包括天门冬氨酸、酪氨酸及磷酸组氨酰氨基转移酶中均含有这些结构。

用 ALT2 cDNA 作为探针去查询基因库高产出基因组序列 (High Throughput Genomic Sequences, HTGS) 发现其与第 16 号染色体的 3 个 (基因库序列编号 AC007225、AC018845 和 AC007338) 相互连接的
25 尚未完成序列测定的人类基因组人工细菌克隆 (BAC) 有非常好的匹配。含有 ALT2 的 BAC 克隆由新墨西哥州的 Los Alamos 实验室提供。通过比较 ALT2 cDNA 序列与基因库中基因组 DNA 序列，并应用 PCR 扩增在基因库中序列尚不清楚的部分和 DNA 序列测定，从而得出

ALT2 基因结构。包括外显子 1 到外显子 4、外显子 5 到外显子 12 分别位于两部分连续的基因组 DNA 序列中，应用 PCR 进一步确定其正确性。外显子 4 到外显子 5 之间的缺失部分通过以 BAC 克隆 BP11-169E6 为模板，用来源于外显子 4 及外显子 5 的引物 P1145：5'-CAGGTGATGGC ACTATGCACCT-3' [AY029173 中核苷酸 425-446, 序列编号 8] 和 P1090：5'-CTCCCGTCCTCAGGTAGATGTTGT-3' [AY029173 中核苷酸 653-630, 序列编号 9] 进行 PCR 扩增反应。PCR 反应条件已于上述。PCR 产物通过序列测定加以证实。通过合并所有序列后，得到含有 12 个外显子、长度约 50kb 的 ALT2 基因序列，其剪接位点和外显子内含子交接部分序列见表一。除 ALT1 基因较短，仅约 3kb，ALT2 与 ALT1 之间的基因结构非常相似。

表一

外显子 编号	外显子大小 (bp)	5'-剪接部分	内含子 大小 (kb)	3'-剪接部分
1	~72	CGACAGgacacgt (序列编号 10)	0.2	tgccagGGTTTC (序列编号 11)
2	265	CAGCGGgtgagc (序列编号 12)	12.7	gcccagGGTATC (序列编号 13)
3	90	CGGCAGgtgagc (序列编号 14)	2.9	ccccagGTGATG (序列编号 15)
4	109	GCCTGGgtgagg (序列编号 16)	6.1	ttacagGGTCCT (序列编号 17)
5	134	ATTTCTgtacgt (序列编号 18)	2.7	ttgcagACGATC (序列编号 19)
6	244	CCACAGgtctgc	6.7	ttatagGCCAGG

		(序列编号 20)		(序列编号 21)
7	80	GATGAGgtaaga (序列编号 22)	1.9	ccgcagGTGTAC (序列编号 23)
8	137	GGGCGAgtacgt (序列编号 24)	3.5	ctccagGTGTGG (序列编号 25)
9	175	AGCCGAgtagt (序列编号 26)	2.0	catcagGAGAAG (序列编号 27)
10	156	GCTCAGgtctgg (序列编号 28)	2.4	ccatagGCCCAT (序列编号 29)
11	113	CTTCAGgtatga (序列编号 30)	1.9	tgccagGATGAC (序列编号 31)
12	2382			

由于基因库中 HTGS 数据库并非最终确定序列, 还可能存在错误, ALT2 基因染色体定位也通过筛选人与地鼠放射性杂交方阵而确定。应用来源于 ALT2 cDNA 3' 非翻译部分序列的一对引物:

5 5'-GGCAGGATGTTGCACTAGCTT-3' (序列编号 32) 以及
5'-GGCTGCACTATGTGTCAGTGA-3' (序列编号 33), 采用 Stanford GeneBridge 3 放射性杂交基因芯片 (Research Genetics, Invitrogen, Carlsbad, CA) 进行 ALT2 基因的染色体定位 (Gong, et al., Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin, *J. Biol. Chem.*, 272:24129-24132
10 (1997))。所用的 PCR 反应条件为 94°C 30 秒, 56°C 30 秒及 72°C 30 秒, 共 30 个循环。结果分析通过 Stanford 大学网址 (<http://www-shgc.Stanford.edu/RH/>) (Stanford, CA)) 进行。

编码结果,

15 000000100000000010000010000000000011000010010000010001000000

20011100000010000100000 被定位于 16 号染色体 (26 cRs, LOD 值等于 8.5)。该结果与前述应用人白细胞与中国地鼠纤维母细胞杂交体而将 ALT 活性定位于 16 号染色体相一致, 但与 ALT1 不同, 后者位于 第 8 号染色体。

5 ALT2 及 ALT1 的组织分布采用 Northern 方法测定, 应用 Trizol 从人及恒河猴的脂肪组织中提取总核糖核酸 (Gong, et al, Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene, *J. Biol. Chem.*, 271:3971-3974 (1996); Hotta, et al, Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced
10 insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys, *Diabetes*, 50:1126-1133 (2001))。简言之, 将脂肪组织在 Trizol 中匀浆 (每 100mg 组织加 1 ml Trizol) 后, 短暂离心 (12,000 转/分, 10 分钟), 除去上层油脂部分后, 每 ml Trizol 加入 0.2 μ l 氯仿, 混匀后离心, 将含有核糖核酸的水相转移至新的试管, 用异丙醇沉淀 RNA。其
15 余 RNA 购于 BD 生物科技公司。RNA 印迹杂交中, 每泳道含 15 微克 RNA, 人 ALT2 探针为相应于基因库编号 AY029173 中核苷酸 615 到 3957 的 DNA 片段, 人 ALT1 探针来源于 IMAGE 克隆 2129833 (Research Genetics, Invitrogen) 中的 2.1kb 的插入片段。采用随机标记法进行放射性 32 P-dCTP 标记探针, 在 Amersham Pharmacia 生物科技
20 公司的 Rapid-hyb 缓冲液中于摄氏 65 $^{\circ}$ C 进行杂交, 应用 0.5 X SSC/1% SDS 缓冲液在摄氏 65 $^{\circ}$ C 洗膜两次, 进行显影。

可见约 3.9kb 的 ALT2 信使核糖核酸在肌肉、肾、脑及脂肪组织有高水平表达, 在肝脏和乳房组织中有低水平表达。与此相反, 约 1.4kb 的 ALT1 信使核糖核酸在肾、肝、脂肪和心脏中有中等水平的表达。
25 猴脂肪组织中也有高水平的 ALT2 表达, 但没有 ALT1 表达。ALT2 与 ALT1 的大小与预计的大小相一致。两种 ALT 均只检测到一条带, 提示该两种基因均无其它剪接形式。ALT2 表现为主要的 ALT, 其信使核糖核酸比 ALT1 表达分布更广泛。该结果与基因库中 ALT 转录程度

相一致,在2百50万总的表达序列片断 (EST) 中,ALT2 EST有228个,但ALT1 EST 仅有11个 (GenBank Builder #130)。

在细菌中表达 ALT1 和 ALT2

5 应用人肌肉 cDNA 作为模板,采用 PCR 扩增 ALT2 的编码序列部分,PCR 反应条件为 94℃ 30 秒,56℃ 30 秒及 72℃ 1 分 30 秒,28 个循环后,72℃ 延伸 7 分钟,反应采用 Roche 公司的高保真 PCR 反应系统,引物为含有 NdeI 连接序列的引物 P1266: 5'-acctgaattcatATGCAGCGGGCGGCGGCGCT-3' (基因库编号 AY029173 中第 95 到 114 核苷酸序列,序列编号 34) 和含有 HindIII 连接序列的引物 P1117: 10 5'-ggctcagaagcttTCACGCGTACTTCTCCAGCAA-3' (基因库编号 AY029173 中第 1666 到 1646 核苷酸序列,序列编号 35)。所得 PCR 产物应用 NdeI 和 HindIII 酶切后,亚克隆于质粒 pPET28a 的聚组氨酸标记后,构建成表达质粒 pPET28_ALT2,通过 DNA 序列测定证实插入的 ALT2 序列无突变。 15

采用相同的方法构建 ALT1 的表达质粒 pPET28_ALT1,其引物为 P1118: 5'-ctgggtagacatATGGCCTCGAGCACAGGTGAC-3' (基因库编号 NM_005309 中第 268 到 288 核苷酸序列,序列编号 36) 和 P1119: 5'-ccccagctgaagcttTCAGGAGTACTCGAGGGTGAAC-3' (基因库编号 20 NM_005309 中第 1158 到 1137 核苷酸序列,序列编号 37),模板为含有 ALT1 的质粒 (IMAGE 克隆 2129833)。

为了表达 ALT2 及 ALT1 蛋白质,将质粒 pPET28_ALT2、pPET28_ALT1 或 pPET28a (作为阴性对照) 分别转化大肠杆菌,分别挑取一个转化细菌菌落在 50 毫升含 30 微克/毫升卡那霉素的 LB 液中 25 培养至 OD₆₀₀ 为 0.7 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 毫摩尔以诱导产生重组蛋白。分别收集来自 20ml 加入 IPTG 前及加入 IPTG 3 小时后的培养液中的细菌,重新悬浮在 5 毫升磷酸缓冲液中,短暂超声波破碎三次,每次 10 秒钟,将细胞裂解液在摄氏 4℃ 10,000g 离心 15 分钟,收集上

清作 SDS-PAGE 电泳及酶活性测定。

ALT 活性测定采用 Sigma 公司的 GPT 优化丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒。简述之，在摄氏 25 度将 2.5 毫升含有左旋丙氨酸、还原型辅酶 I (NADH)、乳酸脱氢酶和酮戊二酸的试剂 A 与试剂 B 混合物与 0.5 毫升细胞裂解上清液混合，于 340nm 波长处测定混合后 1、2、3 分钟的吸光度，该吸光度降低的斜率与其 ALT 活性成比例。细胞裂解上清液蛋白质浓度的测定采用考马斯亮蓝 G250 方法，标准品为牛血清白蛋白。1 单位 ALT 活性定义为在摄氏 25 度时每分钟催化生成 1 微摩尔辅酶 I (NAD) 的酶量。

在非诱导条件下，转化了 pPET28_ALT2 和 pPET28_ALT1 质粒的大肠杆菌的细胞裂解液含有明显的 ALT 活性（转化 pPET28_ALT2 的细菌为 121 单位/毫克蛋白，转化 pPET28_ALT1 的细菌为 86 单位/毫克蛋白），而转化质粒 pPET28 的细菌仅含有较低的 ALT 活性（16 单位/毫克蛋白），这可能是由于前二者在细菌中的“溢出”表达所致。IPTG 诱导后，含 pPET28_ALT2 细菌 ALT 活性升高了 2.8 倍，含 pPET28_ALT1 的细菌 ALT 活性升高了 2 倍，而含阴性对照细菌 ALT 活性无明显增加。

如上所述，准备 IPTG 诱导前后分别转化了 pPET28_ALT2、pPET28_ALT1 或 pPET28a 的细菌裂解上清液，进行 SDS_PAGE 电泳分析，应用 10% SDS_PAGE 胶，采用考马斯亮蓝染色及应用抗组氨酸抗体进行免疫印迹检测，IPTG 诱导后，可分别见约 62kDa 及 58kDa 大小蛋白质带，与 ALT2（推算分子量为 58kDa）及 ALT1（推算分子量为 54kDa）相一致。这些结果证实 ALT2 cDNA 编码功能性丙氨酸转氨酶。

25 脂肪肝中 ALT2 的表达

由于 ALT2 在脂肪组织中表达很高，我们检测了肥胖状态时脂肪肝的 ALT2 的表达水平。肥胖小鼠已被认为是非常好的非酒精性脂肪肝的动物模型，非酒精性脂肪肝与肥胖及糖尿病有很强的相关性

(Koteish and Diehl, Animal models of steatosis, *Semin. Liver. Dis.*, 21(1):89-104 (2001))。4 个月大小的肥胖小鼠 (ob/ob) 或非肥胖小鼠 (ob/+) 被处死后,立即取出其肝组织,应用上述 Trizol 方法提取总 RNA。每泳道加入 15 微克总 RNA 在琼脂糖胶中进行电泳并行 RNA 印迹分析,应用 ^{32}P -dCTP 通过随机引物标记法标记鼠 ALT1 cDNA 探针 (对应于氨基酸 106 至 294, 来源于 EST, IMAGE 克隆 521920, 基因库编号 AA106294), 在 Amersham Pharmacia 生物科技公司的 Rapid-hyb 缓冲液中于 65°C 进行杂交, 用 0.5 X SSC 及 1% SDS 缓冲液在摄氏 65 度洗膜两次, 应用 PhosphorImager 进行杂交信号定量分析, 统计学处理采用学生 t 检验。结果显示与非肥胖小鼠相比较, 肥胖小鼠肝脏 ALT2 信使核糖核酸表达高 1.9 倍 ($p < 0.05$), 而 ALT1 表达无改变。因而, 脂肪肝时, ALT2 特异性升高。

ALT2 作为产生 ALT2 组织的疾病或损伤的标志

如前所述, 目前 ALT 活性测定不能区分 ALT1 与 ALT2。由此, 其用于检测肝损害的准确性受到很大的限制。肝脏含有两种 ALT, 在脂肪肝的动武模型中只有 ALT2 信使核糖核酸表达升高, 而 ALT1 信使核糖核酸的表达无改变。分别检测 ALT1 及 ALT2 的不同改变对鉴别由于脂肪肝或其它原因如酒精、药物、化学毒物、创伤、感染或其它类型的肝损害将十分有用。

进一步而言, 脂肪组织之 ALT2 比 ALT1 高, 检测 ALT2 或同时测定 ALT2 与 ALT1 将可用于代谢紊乱综合症和其它脂肪组织异常的诊断。

最后, 建立能区别血液或组织中 ALT1 与 ALT2 的检测方法可能用于诊断产生或含有 ALT2 之组织的损伤或疾病。

可用针对 ALT 的抗体测定血液及体液中 ALT 蛋白质的总量来诊断某一生物 (人、哺乳动物或其它) 肝脏损伤或疾病 (见下文), ALT 活性等于或超过 40 国际单位/升时提示有肝脏损伤或疾病。另一方面,

当某一生物的血清或其它体液中总 ALT 蛋白质量超过无肝损伤或肝疾病生物的血清 ALT 总量的最高限的 1.5 到 2 倍以上时，提示该生物有肝损伤或肝疾病。

5 为了确定肝损伤的原因，应该应用 ALT1 及 ALT2 特异性抗体测定血清或其它体液中 ALT2 与 ALT1 蛋白质的相对含量(见下文)。ALT2 及 ALT1 的相对量也可用酶学分析法或已知可区分 ALT1 与 ALT2 活性的其它方法。当血清或其它体液中 ALT2 的量超过 ALT1 量的 1.5 倍以上时，其肝损伤很可能由脂肪肝所致，当血清或其它体液中 ALT2 的量低于 ALT1 量的 1.5 倍时，其肝损伤常由感染、中毒或创伤所致。

10 对那些除肝脏以外的产生 ALT2 的组织的疾病或状况来说，也可采取相似的策略。当某一生物的血清或其它体液中 ALT2 蛋白质量超过无损伤或疾病的生物之 ALT2 的最高限的 1.5 到 2 倍以上时，则可诊断该组织有损伤或疾病。ALT2 特异性抗体可用于检测血清或其它体液中 ALT2 的量（见下文）。

15 当某一生物血清或其它体液的 ALT2 蛋白质量比 ALT1 蛋白质量高出 0.5 倍，如同时有高低密度脂蛋白血症、高甘油三酯、高血压及超重时，该生物就很可能患有代谢紊乱综合症。

20 与此相似，应用组织作为诊断标本时，如组织中 ALT2 信使核糖核酸水平比 ALT1 信使核糖核酸水平高出 1.5 倍，其肝损伤常常由于脂肪肝所致。同样，如果脂肪组织中 ALT2 信使核糖核酸水平为 ALT1 信使核糖核酸水平 3 倍以上，支持代谢紊乱综合症的诊断，当然，对诊断代谢紊乱综合症还需要结合其它指标如低密度脂蛋白、甘油三酯、血压水平及其是否肥胖等。对其它产生 ALT2 的组织，当某一组织 ALT2 信使核糖核酸水平超过已知无疾病或损伤的组织之 ALT2 信使核糖核酸水平的 1.5 至 2 倍以上时，则可诊断该生物存在该产生 ALT2 组织的疾病或损伤。

25 有关 ALT1 和/或 ALT2 的检测可以是检测某一组织中 ALT1 和/或 ALT2 的信使核糖核酸水平，也可以是组织和体液中 ALT1 和/或 ALT2

蛋白质的量，这些体液包括血液、血清、淋巴液、尿液、汗液、粘液、痰液、唾液、精液、脑脊液、肠液、关节液、齿龈液、阴道液和胸腔液等。采用检测体液中的 ALT 蛋白质或其片断的方法优于采用检测组织中 ALT 蛋白质或其片断或信使核糖核酸的方法。

5

信使核糖核酸分析

ALT1 和/或 ALT2 信使核糖核酸的方法需要从组织和/或体液标本中分离信使核糖核酸，一些液态的生物标本如血浆、血清、组织切片或提取液、淋巴细胞、组织培养细胞、组织培养细胞的培养液可不需
10 要纯化而直接用于该检测，也可先纯化、或部分纯化后进行分析。纯化步骤包括分离、提取、破坏细胞或匀浆组织或体液。纯化时也可加入一些与探针不起反应的载体核酸以减少非特异性的核酸结合。

其次，标本可用去污剂或蛋白酶处理以利所检测的核酸的释放和稳定，加入部分蛋白酶是较理想的方法，因为该处理可使核酸更稳定的可容状态。在一系列蛋白酶中，可用于本方法的有蛋白酶 K、胰蛋白酶、糜蛋白酶、硷性蛋白酶、溶菌酶和枯草杆菌蛋白酶。分离和纯化信使核糖核酸时另一种很有用的酶是 DNA 酶。常采用加热法使信使核糖核酸变性以破坏其形成的二级结构。
15

破坏信使核糖核酸的二级结构后，在适合探针结合到特异性目的信使核糖核酸的条件下应用标记探针进行杂交反应，杂交反应和探针合成的常规方法可参见冷泉港实验室 T. Maniatis, E. F. Fritsch 和 J. Sambrook 于 1982 年编著的“分子克隆”一书。杂交反应可在不同的酸硷度、盐浓度和不同的温度条件下进行。pH 可在 6 到 9 范围，较适 pH 范围为 6.8 到 8.5；盐浓度可从 0.15M 钠盐到 0.9M 钠盐不等。也可使用
25 与以上钠盐离子强度相当的其它阳离子。杂交温度可从摄氏 30 度到摄氏 80 度不等，较好的温度范围为摄氏 45 度到摄氏 70 度。也可加入一些其它化合物以促进在较低的温度如接近室温下进行特异性杂交，在这些添加的化合物中，甲酰胺可降低温度的需求。

检测 ALT2 信使核糖核酸的探针实例之一是能与 ALT2 信使核糖核酸互补并特异性结合的聚核苷酸,聚核苷酸的长度可从 10 硷基到 4,000 个硷基以上,较好长度为 20 到 3,500 个硷基。用于 ALT2 信使核糖核酸印迹杂交的一个较好的探针为对应于基因库中编号 AY029173 之 615 到 3,957 硷基对的约 3300 硷基的聚核苷酸。

检测 ALT1 信使核糖核酸的探针实例之一是能与 ALT1 信使核糖核酸互补并特异性结合的聚核苷酸,其长度可从 10 硷基到 4,000 个硷基以上,较好者长度为 20 到 3,500 个硷基。

检测核糖核酸的常用方法为 RNA 印迹杂交、RNA 酶保护反应和 10 逆转录 PCR (RT-PCR),所有这些方法已为人们熟知。

值得指出的另一点是聚核苷酸探针的标记是用一些可与核酸探针共价结合或紧密相连的以致可进行检测和定量分析探针的物质,这些物质中包括放射性同位素如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{14}C 和 ^{35}S ; 化学发光分子如丫啶类物质或发光胺、荧光物质如萤光素、藻色蛋白、稀 15 土元素螯合剂、若丹明等; 酶底物和抑制剂如辣根过氧化酶、葡萄糖氧化酶、6 磷酸果糖脱氢酶、 β 半乳糖苷酶、丙酮酸激酶、硷性磷酸酶、乙先胆硷酯酶等; 金属颗粒或其它辐射不穿透分子如胶体金、磁性粒子; 含有以上任何一种物质的脂质体; 抗原如蛋白质、碳水化合物或半抗原分子及其与这些抗原特异性结合的抗体; 和作为成对结合单位 20 的糖脂或糖蛋白。

杂交后,将结合到 ALT2 的信使核糖核酸,标记探针与未结合的探针分离,检测结合的杂交探针的量,从而得知样本中 ALT 信使核糖核酸的含量。非杂交的探针与杂交的探针的分离可用凝胶分子筛或亲和层析方法。与 ALT2 相似,杂交后,将 ALT1 信使核糖核酸结合的标记探针与非杂交上的标记探针分离后,检测杂交后标记抗体的量,从而测定样本中 ALT1 信使核糖核酸的量。同样,凝胶分子筛或亲和层析方法可用于非杂交的探针与杂交的探针的分离。凝胶分子筛层析法常作为该分离的优选的方法,分离的基本条件在分离过程中目的基因

核酸与探针保持于相互结合。分离的试剂中可含有核酸酶抑制剂和添加与探针无反应的载体核酸。

在分离杂交与未杂交的标记探针的方法中，较好者为采用以聚丙烯酰胺、葡聚糖、交联葡聚糖、琼脂糖、交联琼脂糖及其类似材料为基质的凝胶分子筛层析法。适宜于该方法的产品有 Pharmacia 公司的 Sephadex 系列 G50、G100 和 G200 及 Sepharose 系列 CL2B, 4B, 6B, S-200, S-400 和 S-1000。其它适用产品有 BioRad 公司的 P-20, P-60, P-100, P-200, A-0.5m 和 A-1.5m 等。

将杂交上的探针与未杂交的探针分离后，需要检测杂交探针的存在或对其进行定量，该测定方法取决于探针的标记种类，用放射性同位素标记时，可用 γ 计数器或液体闪烁计数器或其它检测方法如放射性自显影或其它显像技术。当探针用分别用抗体或其中部分片段或抗原、受体或配基、酶或酶底物、或与某一物质相结合的另一物质来标记时，则可分别用抗体或其中部分片段或抗原、受体或配基、酶或酶底物、或与某一物质相结合的另一物质来进行检测和定量。进一步，结合于与探针相连分子的物质本身可含有可检测的标志如某种酶或同位素。如果用某种酶或酶抑制剂标记探针，可用测定是否存在该酶活性来检测探针的存在与否，较好者为那些可产生用分光光度计可测定的光能量变化的酶反应。其它标记包括辐射透不过的物质应用电磁辐射测定、磁粒子用磁场检测、用于检测抗体与特异性抗原的免疫学方法、荧光及化学发光标记法和其它任何检测特异性成对结合物质如糖脂或糖蛋白等。

为了精确测定未知样本中 ALT2 或 ALT1 信使核糖核酸的量，可同时应用含已知量的目的核酸序列的样本作为阳性或阴性对照来标准化检测结果。

通过比较未知样本与已知量的正常健康组织中信使核糖核酸的量，通常在相同的组织之间比较如肝组织与肝组织、脂肪组织与脂肪组织比较。如果所测得的未知样本中的信使核糖核酸量在某一预先设

定的范围，可判断该个体患有特定的疾病、损伤或一些可影响样本组织的其它情况。

制备 ALT1 及 ALT2 特异性抗体

- 5 应用上述 pPET28-ALT1 和 pPET28-ALT2 质粒及 IPTG 诱导转化细菌产生 ALT1 及 ALT2 蛋白质，如上所述，制备细菌裂解物及其无细胞上清液，将此上清液通过用含有足以使蛋白质变性的尿素的缓冲液平衡好的镍亲和层析柱，搜集流出的各组分，通过凝胶电泳，应用抗组氨酸标记肽的抗体证实纯化的蛋白质。
- 10 含纯化的蛋白质的洗出组分在适当缓冲液中透析后，将纯化蛋白质注入兔体内以诱导产生多克隆抗体，注射纯化蛋白质前及注射后 30 天取血样储存于摄氏负 20 度。应用纯化的蛋白质通过 ELISA 或蛋白质免疫印迹方法检测血样中是否存在多克隆抗体，并检测 ALT1 多克隆抗体是否与 ALT2 蛋白质有交叉反应，以及 ALT2 多克隆抗体是否与
- 15 ALT1 蛋白质有交叉反应。选择那些含有仅对一种 ALT 特异性结合的多克隆抗体的动物，分离其脾脏细胞。将该脾脏细胞悬浮液与 HGPRT 阴性骨髓瘤细胞混合，加入 35%甘油，将细胞于含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶的培养液中生长 10 到 14 天后，将存活的杂交瘤细胞种植于 96 孔培养板中培养。
- 20 另一种生产 ALT1 或 ALT2 特异性抗体的方法是将编码 ALT2 的 cDNA (序列编号 1) 连接到 pGEX-4T-1 表达质粒中，从而 ALT2 与 GST (谷光甘肽-S-转移酶) 相融合。应用 0.8mM IPTG 诱导 BL21 (DE3) 大肠杆菌产生重组融合蛋白，收集细胞后，用 B-Per 试剂裂解细胞，在摄氏 4 度时，将裂解液与谷光甘肽琼脂糖载体混合，2 小时后于 3000
- 25 转/分钟离心 10 分钟，用磷酸缓冲液将其洗两次后，用含 10 mM 还原型谷光甘肽的 50mM Tris 盐酸缓冲液洗出蛋白质。

得到的纯化 ALT2-GST 可用 Amersham Pharmacia 生物科技公司 ECL 蛋白质生物素化试剂盒将其与生物素连接。简而言之，将 1mg 蛋

白质溶解在 1ml pH 8.6 的碳酸氢盐缓冲液中, 与每毫克蛋白 30 μ l 生物素反应试剂孵育 30 分钟后, 应用 Sephadex G25 层析柱纯化, 用 5ml 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 将蛋白质洗出, 搜集含 ALT2-GST 的组分。

生物素化后的 ALT2-GST 蛋白谱可用 12% SDS-PAGE 和银染色进行分析。用 1:1000 稀释的抗 GST 抗体及含 1:12,000 稀释的 HRP 标记抗羊 IgG 检测 ALT2-GST 蛋白。ALT2-GST 蛋白可被 1:6,000 稀释在 PBST 的链球菌抗生物素蛋白偶联的辣根过氧化酶检测到, 该免疫检测应用 ECL 蛋白质免疫印迹检测试剂盒 (Amersham Pharmacia 生物科技公司)。

10 将纯化的 ALT2-GST 注射到豚鼠、兔、大鼠、小鼠或其它合适的动物, 从而产生 ALT2 抗体。经过多次注射后, 分离动物的脾脏, 如前述方法制备脾脏细胞及杂交瘤细胞。

然后, 检测杂交瘤细胞培养液中抗 ALT2 抗体。将生物素化的 ALT2-GST 加入链球菌抗生物素蛋白包被的 96 孔板中, 然后加入杂交瘤细胞培养液, 通过洗板去除未结合的抗体及生物素标记的 ALT2-GST 15 后, 加入针对第一抗体的辣根过氧化酶标记的特异性第二抗体, 然后, 洗去未结合的抗体, 加入辣根过氧化酶的底物试剂, 在摄氏 25 度下反应 15 分钟, 加入 0.5mM 硫酸终止反应, 测定其在波长为 450 纳米的吸光度, 从而知道哪些孔含有 ALT2 抗体。然后将该抗 ALT2 的抗体用于检测含有纯化 ALT2 的 SDS-PAGE 胶以再次证实该抗体结合 ALT2, 20 最后将抗 ALT2 的抗体加入含有纯化 ALT1 的 SDS-PAGE 胶以筛选只特异性结合 ALT2 的抗体。

除采用 ALT1 代替 ALT2 外, 采用相同的策略产生抗 ALT1 特异性抗体。

25 如果需要, 将用目前熟知的方法制备针对多克隆抗体的单克隆抗体。

合成的 ALT2 片段或 ALT1 片段也可作为免疫原用于制备抗体。

值得指出的是 ALT2 核酸序列也可用于构建重组细胞株、重组微

生物、表达载体等类似重组体，这些重组体可用于表达 ALT2 蛋白。另一方面，这些重组体可用于筛选抑制或增加 ALT2 活性的试剂。

当用 ALT2 的编码序列构建表达载体或其它载体时，ALT2 的编码序列将被插入载体之编码序列后，并在可被诱导、阻滞，或组织特异性表达的启动子的控制下。此外，也可能含有一些其它组分如适用于不同分子生物学技术的载体中的调节序列。

在另一具体方法中，提供含有编码 ALT2 蛋白质的 DNA 的载体，优先考虑将序列编号 2 中的 DNA 分子插入适当的表达载体，从而用其来转染或转化适当的宿主细胞。例行的表达载体包括能够引导插入宿主细胞中的核酸序列转录的启动子，表达载体的代表包括质粒和/或病毒载体序列。适当的载体包括逆转录病毒载体，牛痘病毒载体、CMV 病毒载体、BLUESCRIPT 载体、杆状病毒载体等。另一方面能够引导克隆的基因或 cDNA 转录的启动子可以是能被诱导和阻滞的启动子，包括病毒或细胞的启动子。

在某些具体方法中，趋于采用可选择性标志来筛选含有克隆基因的细胞，选择性标志通常与要克隆的目的基因 DNA 分子同时引入细胞，通常包括编码对氨卞青霉素、新酶素、潮酶素和氨甲喋呤等药物产生抵抗性的蛋白的基因。其它一些选择性标记可提供可检测的信号，如 β 半乳糖苷酶可用于鉴定含有插入目的基因 DNA 分子的细胞。

20

抗体分析

有关 ALT1 的抗体分析法包括将分装的样本(体液或组织)与 ALT1 特异性抗体结合，然后用目前熟知的相关技术测定与抗体结合的 ALT1 的量，通过与已知的健康生物标准样本相比较，如果测定的 ALT1 的量在一特定的范围，则可诊断该生物患有某一疾病、损伤或某一特定状况。

有关 ALT2 的抗体分析法包括将分装的样本(体液或组织)与 ALT2 特异性抗体混合，然后用已知的相关技术测定与抗体结合的 ALT2 的

量，通过与已知的健康生物标准样本相比较，如果测定的 ALT2 的量在一特定的范围，则可诊断该生物患有某一疾病、损伤或某一特定状况。由于 ALT2 主要在肝脏、肌肉、肾脏、脑及脂肪组织表达，其检测可用于诊断肝脏损伤、肝脏疾病或有肝脏、肌肉、肾脏、脑及脂肪组织相关的疾病或特定状况。

以测定血液样本为例，从生物个体（人、哺乳动物或其它动物）取出血液后，于摄氏 4 度离心 20 分钟以分离血清，将血清储存于摄氏负 20 度直至进行检测。

将上述血浆与 ALT1 或 ALT2 特异性抗体于室温下孵育 1.5 小时或于摄氏 4 度下孵育过夜，然后于摄氏 4 度离心 20 分钟，将所得沉淀悬浮于缓冲液中，在 10% 的 SDS-PAGE 胶中电泳后，将胶在含有种系特异性的 ALT1 和 ALT2 抗体的缓冲液中孵育并检测。应用蛋白质免疫印迹分析的优点是其利用 ALT1 与 ALT2 的分子量不同来区分二者，以得到特异性的检测。

本发明中的抗体或其片段非常适用于不同的免疫分析，可用于快速免疫分析、蛋白质免疫印迹分析、放射免疫分析、酶联免疫吸附分析、免疫荧光显微镜、免疫电镜或其它类型的免疫分析。该抗体或其片段可用于液相或结合于固相载体。

抗体或其片段可被任何标记物及采用任何标记方法进行标记。可用于本发明的标记物包括但不限于酶标记物、放射性同位素标记物、非放射性同位素标记物、荧光标记物及化学发光标记物等。

适用的标记酶包括，但不限于马来酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -5-类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 α 甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、过氧化物酶、硷性磷酸酶、天冬酰氨酶、葡萄糖氧化酶、 β 半乳糖苷酶、核糖核酸酶、尿激酶、过氧化氢酶、6 磷酸葡萄糖脱氢酶、淀粉酶和乙先胆硷酯酶等。

适合的放射性同位素标记物包括，但不限于 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{57}To 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{152}Eu 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{21}Ci 、 ^{211}At 、

^{212}Pb 、 ^{47}Sc 和 ^{109}Pd 。

适合的非放射性同位素标记物包括,但不限于 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Tr 和 ^{46}Fe 。

适合的荧光标记物包括,但不限于 ^{152}Eu 标记物、荧光素标记物、
5 异硫氰酸标记物、硷性蕊香红标记物、藻红蛋白标记物、异藻青蛋白
标记物和荧光氨标记物等。

适合的化学发光标记物包括,但不限于芳香丫啶酯标记物、咪唑
标记物、丫啶盐标记物、草酸酯标记物、虫荧光素标记物及虫荧光素
酶标记物等。

10 本发明亦可能采用适用于本发明的其它的相关的新标记物,可用文献
中常规的标准方法将这些标记物与抗体或其片段相连接。典型的方法
可参见有关蛋白与蛋白质偶联反应及偶联蛋白的应用及酶免疫分析文
献 (Kennedy, J. H., et al., Protein-protein coupling reactions and the
applications of protein conjugates, *Clin. Chim Acta*, 70:1-31 (1976);
15 *Schuurs and Van Weemen, Enzyme-immunoassay, Clin.Chim Acta*,
81:1-40 (1977))。在后者提到的偶联方法如戊二醛法、过碘酸盐法、二
马来酸氨法等其它方法均可能用作本申请的参考。

本发明中抗体或其片段的检测可通过应用载体而得以改进,熟知的
载体有玻璃、聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、
20 自然或合成纤维素、聚丙烯酰氨、琼脂糖和磁铁。本发明中的载体属
性可为可溶性,也可为不溶性物质,这些支持材料可有任何可能的结
构构象,只要其能与 ALT2 或 ALT1 相结合,因而,支持材料可以是像
连珠样的球形、像试管内面或木竿外表面一样的圆柱形,也可能其表
面平展如纸张和试剂条。相关技术领域中被确认可用于常规实验的其
25 它适合于结合单克隆抗体的新载体也可能用于该发明中。

ALT2 或 ALT1 抗体或其片段可能用于 ALT2 或 ALT1 的定性或定
量分析,该类分析可通过应用任何目前在相关领域采用的免疫分析法
来完成,这些方法包括放射免疫分析、免疫测定法、免疫 PCR 法和蛋
白质免疫印迹检测等。采用已知的标准方法学技术,可将 ALT2 或 ALT1

特异性抗体包被于如微滴定板或膜（如硝酸纤维膜）的载体物质（固相载体）表面，将其与体液标本如可疑有产生 ALT2 的组织的损伤或疾病的动物血清相接触，通过任何已知的测定方法如荧光抗体光谱测定或比色法等检测血中 ALT2 与 ALT2 抗体形成的复合物。也可用 1978 年纽约 North Holland 出版社出版、由 Work 等编著的“分子生物学中实验室技术和生物化学”一书中描述的放射免疫分析及 Wide 发表在 1970 年由爱丁堡 Kirkham 和 Hunter 编辑的“放射免疫分析方法学”第 199 到 206 页。

ALT1 和 ALT2 抗体也将用于对肝脏疾病或状况的进展追踪，即在病程不同时间进行 ALT1 或 ALT2 测定，通过比较不同时间之 ALT 水平来量化该疾病或状况的好转或加重的程度。

试剂盒 (Kits)

上述方法可能用于本发明中应用上述 ALT1 和/或 ALT2 特异性抗体检测生物标本中 ALT1 和/或 ALT2 的试剂盒。该检测 ALT1 和/或 ALT2 的试剂盒可能包括上述分别特异性结合 ALT1 或 ALT2 的单克隆或多克隆抗体或其片段（这些抗体可能偶联于荧光素、磷光体、酶、放射性标记物等）、适当的酶联抗体的底物如过氧化物酶的底物过氧化氢、封闭试剂如正常羊或兔血清或溶于生理盐水中的 3%牛血清白蛋白等和其它试剂诸如如 Tris 盐酸缓冲液、磷酸缓冲液、EDTA 等或两种或以上的混合缓冲液等。试剂盒可能包括有一个或多个试剂容器。趋向于将 ALT1 特异性抗体放于一个试剂瓶，而 ALT2 特异性抗体放于另一试剂瓶，但并非一定需要如此。其它试剂容器可包括用于检测与抗体结合的 ALT1 或 ALT2 的必需试剂。应用该试剂盒时，需将含有 ALT1 和/或 ALT2 的样本加入含有抗体的容器使其与 ALT1 特异性抗体或 ALT2 特异性抗体接触适当时间后，洗涤并加入特异性针对 ALT1 或 ALT2 的标记抗体，再次洗涤以除去未结合的标记抗体，检测结合的标记抗体而完成检测。该试剂盒中可能包括如何判定样本中 ALT1 和/或

ALT2 的量以及该测定的量所提示的相关诊断的指引。该试剂盒也可能包括有阴性和阳性对照品。

此处提供的样本仅作说明之用，并不意味限制本发明的范围。有关本申请的方法学的详细描述中提及的参考文献方法，在实际应用时

5 将有可能在不改变其基本精神前提下作不同的变化或修饰。

<110> 马里兰大学, 巴尔的摩
Gong, Da-Wei
Shuldiner, Alan R.

<120> 新型丙氨酸转氨酶及其应用方法

<130> DG-2001-032

<150> US 60/290,829
<151> 2001-05-14

<160> 37

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 3768
<212> DNA
<213> 人类

<300>
<301> Yang, R.Z., Blaileanu, G., Hansen, B.C., Shuldiner, A.R. and Gong, D.W.
<302> 新型丙氨酸转氨酶 cDNA 克隆、基因结构、染色体定位和功能性表达

<303> Genomics
<304> 79
<305> 3
<306> 445-450
<307> 2002
<308> GenBank/AY029173
<309> 2001-04-16

<400> 1
ggcggtgctc aaggtgcggc ccgagcgcag ccggcgcgag cgcatacctca cgctggagtc 60
catgaacccg caggtgaagg cggaggagta cgccgtgcgg ggacccatcg tgctcaaggc 120
cggcgagatc gagctcgagc tgcagcgggg tatcaaaaag ccattcacag aggtcatccg 180
agccaacatc ggggacgccc aggctatggg gcagcagcca atcaccttcc tccggcaggt 240
gatggcacta tgcacctacc caaacctgct ggacagcccc agcttcccag aagatgctaa 300
gaaacgtgcc cggcggatcc tgcaggcttg tggcgggaac agcctggggc cctacagtgc 360
tagccagggt gtcaactgca tccgtgaaga tgtggctgcc tacatcacca ggagggatgg 420
cgggtgtgctt gcggaccccg acaacatcta cctgaccacg ggagctagtg acggcatttc 480
tacgatcctg aagatcctcg tctccggggg cggcaagtca cggacaggtg tgatgatccc 540
catcccacaa tatcccctct attcagctgt catctctgag ctcgacgcca tccaggtgaa 600
ttactacctg gacgaggaga actgctgggc gctgaatgtg aatgagctcc ggcgggcggt 660
gcaggaggcc aaagaccact gtgatcctaa ggtgctctgc ataatcaacc ctgggaaccc 720

cacaggccag	gtacaaagca	gaaagtgcac	agaagatgtg	atccactttg	cctgggaaga	780
gaagctcttt	ctcctggctg	atgaggtgta	ccaggacaac	gtgtactctc	cagattgcag	840
attccactcc	ttcaagaagg	tgctgtacga	gatggggccc	gagtactcca	gcaacgtgga	900
gctgcctcc	ttccactcca	cctccaaggg	ctacatgggc	gagtgtggtt	acagaggagg	960
ctacatggag	gtgatcaacc	tgcaccctga	gatcaagggc	cagctggtga	agctgctgtc	1020
ggtgcgctg	tgccccccag	tgtctgggca	ggccgccatg	gacattgtcg	tgaaccccc	1080
ggtggcagga	gaggagtcct	ttgagcaatt	cagccgagag	aaggagtcgg	tcctgggtaa	1140
tctggccaaa	aaagcaaagc	tgacggaaga	cctgtttaac	caagtcccag	gaattcactg	1200
caacccttg	cagggggcca	tgtacgcctt	ccctcgatc	ttcattcctg	ccaagctgt	1260
ggaggctgct	caggcccatc	aatggctcc	agacatgttc	tactgcatga	agctcctgga	1320
ggagactggc	atctgtgtcg	tgcccggcag	tggctttggg	cagagggag	gcacttacca	1380
cttcaggatg	actatcctcc	ctccagtgga	gaagctgaaa	acggtgctgc	agaaggtgaa	1440
agacttcac	atcaacttcc	tggagaagta	cgctgagga	cgctgagcc	ccagcgggag	1500
acctgtcctt	ggctcttct	cccaatgcc	gtcaggctga	actgcctcc	cccgtgactc	1560
tgctcgggc	ctcgcagagg	ccgctggta	cttcgtcatc	atcttgcccc	tggagacgtc	1620
tttctttgtg	ccttgatggt	gagagcgct	ctcttttgag	caaacaagca	ttctatatgc	1680
aaccagagta	gaggggacct	gctcagcagg	tgtgaccagg	gttctctgaa	tctgttattg	1740
tttttgcttc	tggaaagtcc	atttggggtt	tacaacaact	aggatgtggt	gggtgagatg	1800
tttcagatct	ggagaaatga	gcaggtgtcg	ggaaatgtgt	gacttaaccg	tggtgagggc	1860
tggaaatcca	aactcaccac	catgatctgt	gaaataaagc	ccttagcggg	gtgaagcatc	1920
cggtcctttg	aacagaaggg	cctggaaggc	ccctggggct	gagaaagggg	ccgcccgggtg	1980
gcctggaggc	aggcggggg	agcgcagtag	cacgtggact	gggcaggatg	ttgcactagc	2040
ttggggtaga	tgctgggggc	tgccggccacg	gtcagagggc	cccactgtga	ggcgtgggtg	2100
tgagccaggc	tgcaggagga	actgggcctc	cgcttcccag	caacgcagcc	aggcctgaga	2160
attctgtgcg	cccggcgggc	tttgggaatg	aggggttccc	ttgaacatgc	gtaggctgga	2220
acccgtctg	agaggtctcc	ctgaatttca	gtgacacata	gtgcagcccg	gcagtgtccc	2280
acttccgtgg	agagagccgc	tggaatggtg	tggaccatc	ccgcgggtga	ccggtgcctg	2340
ttctcccctg	accgagcctg	tgagcacatc	gccccctgct	ggcgacagcg	gggaaatgag	2400
ggctgaaaaat	atcctcccca	caagggcaat	ccccgggacc	tgccgagcag	ccaaggccct	2460
gtcctttctt	gaatggtggc	gagctgaatc	tggctgggtt	cctagctttt	aggtggtaaa	2520

```

agtgcctggc agcttggtg cctgggagga gtcagtcgtg gttggaggtt cattgccgtg 2580
ctttcatgca gagtgttttg ccttcatggt agcttccggc tcccctcca ggctgcagac 2640
tctgacctgt ggcacagggc ttctcccagt acaggagggt gccatcccc agcatgcggc 2700
ttctctgcca ttagcagccc tgggcgggcc gaccacactc gaggctgcgg tgctacgggc 2760
ttagccctcg cctccctcac tgggagcttc cccatcctcc ctgccttccc cagtgggaag 2820
ttagggaagc tcaggagcct gggaccccc atgtcccaaa atgggattgg agaagctgga 2880
gagaaagcag aagaggccga ggagtgaggc agcagcctct atgcttgatt tccacaccgg 2940
gtccgtgcag aggaaacaga aactcccaac tgtccttacc caccgacatc acagccccta 3000
tgaagaaagt agccacaatc tcaaataaca aaagggaatg ttctaaaact ttttcttct 3060
taaaaaatgg agaaaattgc acttgtgctt gctgtgtggt atataacca ggattagtcc 3120
cagggtcgtg aggtttctgg tgaaaagggt aaatcgtaga agctagtata tttttatat 3180
ttttgtaaca attgcttttt tcatggggga ggcggggtta gtatttatag tccatacaag 3240
tccagtaatt tttataaat cttcagatta taaacagccc ctaaaaactt tacaacgttt 3300
acacagtttt ttaaaaagag actgtataca cttgatttgc tttcaaaata aataaggtca 3360
gctagtctag gaggttaacg tcgggtagga atgctgatca tgataggttt ggttttctac 3420
agattctggt ccggtgcctt tcctatccag gcaccacctg agaaagttgt catttgaggt 3480
cgcacttggg agttacatct gtgaagtttc tgtcattcgt ccagatctgt gtgtgtagca 3540
tgtgctgagg aagcacgtgc tgggctgtgc ctcagacagt gcatcaccgg gcaccagag 3600
gcttgccctg ctattcctgt tctggtgtgt gtggagtgtt ggggaggaac agatgcagat 3660
caacctgtgg ctgttttccc gtctaggttc tcacaggtat ctcctgacag aggtacttaa 3720
caatggctct gctggaaatt tctataaata aaatgtccaa aatggaaa 3768

```

<210> 2
<211> 523
<212> PRT
<213> 人 类

<300>

<301> Yang, R.Z., Blaileanu, G., Hansen, B.C., Shuldiner, A.R. and Gong, D.W.
<302> 新型丙氨酸转氨酶 cDNA 克隆、基因结构、染色体定位和功能性表达

<303> Genomics

<304> 79

<305> 3

<306> 445-450

<307> 2002

<308> GenBank/AY029173

<309> 2001-04-16

<400> 2

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

225					230					235					240
Trp	Ala	Leu	Asn	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Arg	Ala	Val	Gln	Glu	Ala	Lys
				245					250					255	
Asp	His	Cys	Asp	Pro	Lys	Val	Leu	Cys	Ile	Ile	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro
			260					265					270		
Thr	Gly	Gln	Val	Gln	Ser	Arg	Lys	Cys	Ile	Glu	Asp	Val	Ile	His	Phe
		275					280					285			
Ala	Trp	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Leu	Leu	Ala	Asp	Glu	Val	Tyr	Gln	Asp
	290					295					300				
Asn	Val	Tyr	Ser	Pro	Asp	Cys	Arg	Phe	His	Ser	Phe	Lys	Lys	Val	Leu
305					310					315					320
Tyr	Glu	Met	Gly	Pro	Glu	Tyr	Ser	Ser	Asn	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Phe
				325					330					335	
His	Ser	Thr	Ser	Lys	Gly	Tyr	Met	Gly	Glu	Cys	Gly	Tyr	Arg	Gly	Gly
			340					345					350		
Tyr	Met	Glu	Val	Ile	Asn	Leu	His	Pro	Glu	Ile	Lys	Gly	Gln	Leu	Val
		355					360					365			
Lys	Leu	Leu	Ser	Val	Arg	Leu	Cys	Pro	Pro	Val	Ser	Gly	Gln	Ala	Ala
	370					375					380				
Met	Asp	Ile	Val	Val	Asn	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Glu	Glu	Ser	Phe	Glu
385					390					395					400
Gln	Phe	Ser	Arg	Glu	Lys	Glu	Ser	Val	Leu	Gly	Asn	Leu	Ala	Lys	Lys
				405					410					415	
Ala	Lys	Leu	Thr	Glu	Asp	Leu	Phe	Asn	Gln	Val	Pro	Gly	Ile	His	Cys
			420					425					430		
Asn	Pro	Leu	Gln	Gly	Ala	Met	Tyr	Ala	Phe	Pro	Arg	Ile	Phe	Ile	Pro
		435					440					445			
Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Gln	Ala	His	Gln	Met	Ala	Pro	Asp	Met
	450					455					460				
Phe	Tyr	Cys	Met	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Thr	Gly	Ile	Cys	Val	Val	Pro

100					105					110					
Gln	Ala	Cys	Gly	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ala	Tyr	Ser	Val	Ser	Ser	Gly
		115					120					125			
Ile	Gln	Leu	Ile	Arg	Glu	Asp	Val	Ala	Arg	Tyr	Ile	Glu	Arg	Arg	Asp
	130					135					140				
Gly	Gly	Ile	Pro	Ala	Asp	Pro	Asn	Asn	Val	Phe	Leu	Ser	Thr	Gly	Ala
145					150					155					160
Ser	Asp	Ala	Ile	Val	Thr	Val	Leu	Lys	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Glu	Gly
				165					170					175	
His	Thr	Arg	Thr	Gly	Val	Leu	Ile	Pro	Ile	Pro	Gln	Tyr	Pro	Leu	Tyr
			180					185					190		
Ser	Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Val	Asp	Tyr	Tyr	Leu
		195					200					205			
Asp	Glu	Glu	Arg	Ala	Trp	Ala	Leu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Ala
	210					215					220				
Leu	Gly	Gln	Ala	Arg	Asp	His	Cys	Arg	Pro	Arg	Ala	Leu	Cys	Val	Ile
225					230					235					240
Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Thr	Gly	Gln	Val	Gln	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Glu
				245					250					255	
Ala	Val	Ile	Arg	Phe	Ala	Phe	Glu	Glu	Arg	Leu	Phe	Leu	Leu	Ala	Asp
			260					265					270		
Glu	Val	Tyr	Gln	Asp	Asn	Val	Tyr	Ala	Ala	Gly	Ser	Gln	Phe	His	Ser
		275					280					285			
Phe	Lys	Lys	Val	Leu	Met	Glu	Met	Gly	Pro	Pro	Tyr	Ala	Gly	Gln	Gln
	290					295					300				
Glu	Leu	Ala	Ser	Phe	His	Ser	Thr	Ser	Lys	Gly	Tyr	Met	Gly	Glu	Cys
305					310					315					320
Gly	Phe	Arg	Gly	Gly	Tyr	Val	Glu	Val	Val	Asn	Met	Asp	Ala	Ala	Val
				325					330					335	
Gln	Gln	Gln	Met	Leu	Lys	Leu	Met	Ser	Val	Arg	Leu	Cys	Pro	Pro	Val

```

                340                345                350
Pro  Gly  Gln  Ala  Leu  Leu  Asp  Leu  Val  Val  Ser  Pro  Pro  Ala  Pro  Thr
      355                360                365
Asp  Pro  Ser  Phe  Ala  Gln  Phe  Gln  Ala  Glu  Lys  Gln  Ala  Val  Leu  Ala
      370                375                380
Glu  Leu  Ala  Ala  Lys  Ala  Lys  Leu  Thr  Glu  Gln  Val  Phe  Asn  Glu  Ala
385                390                395                400
Pro  Gly  Ile  Ser  Cys  Asn  Pro  Val  Gln  Gly  Ala  Met  Tyr  Ser  Phe  Pro
      405                410                415
Arg  Val  Gln  Leu  Pro  Pro  Arg  Ala  Val  Glu  Arg  Ala  Gln  Glu  Leu  Gly
      420                425                430
Leu  Ala  Pro  Asp  Met  Phe  Phe  Cys  Leu  Arg  Leu  Leu  Glu  Glu  Thr  Gly
      435                440                445
Ile  Cys  Val  Val  Pro  Gly  Ser  Gly  Phe  Gly  Gln  Arg  Glu  Gly  Thr  Tyr
      450                455                460
His  Phe  Arg  Met  Thr  Ile  Leu  Pro  Pro  Leu  Glu  Lys  Leu  Arg  Leu  Leu
465                470                475                480
Leu  Glu  Lys  Leu  Ser  Arg  Phe  His  Ala  Lys  Phe  Thr  Leu  Glu  Tyr  Ser
      485                490                495

```

<210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(27)
 <223> 引物 P922 来源于载体 TripEX

<400> 4
 aatacgactc actatagggc gaattgg

27

<210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>

<221> primer_bind
 <222> (1)..(26)
 <223> 引物 P923 来源于载体 TripEX

<400> 5
 ctcggaagc gcgccattgt gttggt 26

<210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(18)
 <223> 引物 P927 来源于载体 TripEX

<400> 6
 gttggtaccc gggaattc 18

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(20)
 <223> ALT2 特异性引物 p1106 (AY029173 第 447-428 位核苷酸序列)

<400> 7
 taggtgcata gtgccatcac 20

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(22)
 <223> ALT2 特异性引物 P1145 (AY029173 第 425-446 位核苷酸序列)

<400> 8
 caggtgatgg cactatgcac ct 22

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>

<221> primer_bind
 <222> (1)..(24)
 <223> 引物 P1090 (AY029173 第 653~630 位核苷酸序列)

<400> 9
 ctcccgtcct caggtagatg ttgt 24

<210> 10
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 5' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 1 外显子/内含子交界处 5' 端剪接序列

<400> 10
 cgacaggcac gt 12

<210> 11
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 3' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 1 内含子/外显子交界处 3' 端剪接序列

<400> 11
 tgccagggtt tc 12

<210> 12
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 5' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 2 外显子/内含子交界处 5' 端剪接序列

<400> 12
 cagcgggtga gc 12

<210> 13
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>

<221> 3' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 2 内含子/外显子交界处 3' 端剪接序列

<400> 13
 gccccagggtgta tc 12

<210> 14
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 5' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 3 外显子/内含子交界处 5' 端剪接序列

<400> 14
 cggcaggtga gc 12

<210> 15
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 3' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 3 内含子/外显子交界处 3' 端剪接序列

<400> 15
 ccccaggtga tg 12

<210> 16
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 5' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 4 外显子/内含子交界处 5' 端剪接序列

<400> 16
 gcctgggtga gg 12

<210> 17
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>

<221> 3' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 4 内含子/外显子交界处 3' 端剪接序列

<400> 17
 ttacagggtc ct 12

<210> 18
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 5' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 5 外显子/内含子交界处 5' 端剪接序列

<400> 18
 atttctgtac gt 12

<210> 19
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 3' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 4 内含子/外显子交界处 3' 端剪接序列

<400> 19
 ttgcagacga tc 12

<210> 20
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 5' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 6 外显子/内含子交界处 5' 端剪接序列

<400> 20
 ccacaggtct gc 12

<210> 21
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>

<221> 3' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 6 内含子/外显子交界处 3' 端剪接序列

<400> 21
 ttataggcca gg 12

<210> 22
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 5' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 7 外显子/内含子交界处 5' 端剪接序列

<400> 22
 gatgaggtaa ga 12

<210> 23
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 3' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 7 内含子/外显子交界处 3' 端剪接序列

<400> 23
 ccgcaggtgt ac 12

<210> 24
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> 5' clip
 <222> (1)..(12)
 <223> ALT2 外显子 8 外显子/内含子交界处 5' 端剪接序列

<400> 24
 gggcgagtac gt 12

<210> 25
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>

<221> 3' clip	
<222> (1)..(12)	
<223> ALT2 外显子 8 内含子/外显子交界处 3' 端剪接序列	
<400> 25	
ctccaggtgt gg	12
<210> 26	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<221> 5' clip	
<222> (1)..(12)	
<223> ALT2 外显子 9 外显子/内含子交界处 5' 端剪接序列	
<400> 26	
agccgagtga gt	12
<210> 27	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<221> 3' clip	
<222> (1)..(12)	
<223> ALT2 外显子 9 内含子/外显子交界处 3' 端剪接序列	
<400> 27	
catcaggaga ag	12
<210> 28	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<221> 5' clip	
<222> (1)..(12)	
<223> ALT2 外显子 10 外显子/内含子交界处 5' 端剪接序列	
<400> 28	
gctcaggtct gg	12
<210> 29	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	

<221> 3' clip	
<222> (1)..(12)	
<223> ALT2 外显子 10 内含子/外显子交界处 3' 端剪接序列	
<400> 29	
cctataggccc at	12
<210> 30	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<221> 5' clip	
<222> (1)..(12)	
<223> ALT2 外显子 11 外显子/内含子交界处 5' 端剪接序列	
<400> 30	
cttcaggtat ga	12
<210> 31	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<221> 3' clip	
<222> (1)..(12)	
<223> ALT2 外显子 11 内含子/外显子交界处 3' 端剪接序列	
<400> 31	
tgccaggatg ac	12
<210> 32	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	
<221> primer_bind	
<222> (1)..(21)	
<223> 用于染色体定位的 ALT2 引物	
<400> 32	
ggcaggatgt tgcactagct t	21
<210> 33	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人类	
<220>	

- <221> primer_bind
 <222> (1)..(21)
 <223> 用于染色体定位的 ALT2 引物
- <400> 33
 ggctgcacta tgtgtcactg a 21
- <210> 34
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人类
- <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(32)
 <223> 用于 ALT2 的 NdeI 连接引物 p1266 (对应于 AY029173 第 95~114 位核苷酸序列)
- <400> 34
 acctgaattc atatgcagcg ggcggcggcg ct 32
- <210> 35
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人类
- <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(34)
 <223> 用于 ALT2 的 HindIII 连接引物 p1117 (对应于 AY029173 第 1666~1646 位核苷酸序列)
- <400> 35
 ggctcagaag ctttcacgcg tacttctcca gcaa 34
- <210> 36
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人类
- <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(33)
 <223> 用于 ALT1 的引物 p1118 (对应于 NM_005309 第 268 ~288 位核苷酸序列)
- <400> 36
 ctgggtagac atatggcctc gagcacaggt gac 33
- <210> 37
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 人类
- <220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(37)

<223> 用于ALT1的引物p1119(对应于NM_005309第1158~1137位核苷酸序列)

<400> 37

ccccagctga agctttcagg agtactcgag ggtgaac

37

图 1

1 ggcggtgctc aaggtgcggc ccgagcgcag ccggcgcgag cgcatcctca
 51 cgctggagtc catgaaccgc caggtgaagg cggtaggagta cgccgtgcgg
 101 ggacccatcg tgctcaaggc cggcgcgagc gagctcgagc tgcagcgggg
 151 tatcaaaaag ccattcacag aggtcatccg agccaacatc ggggacgccc
 201 aggctatggg gcagcagcca atcaccttcc tccggcaggt gatggcacta
 251 tgcacctacc caaacctgct ggacagcccc agcttcccag aagatgctaa
 301 gaaacgtgcc cggcggatcc tgcaggcttg tggcgggaac agcctggggg
 351 cctacagtgc tagccagggt gtcaactgca tccgtgaaga tgtggctgcc
 401 tacatcacca ggagggatgg cggtagctcc gcggaccccc acaacatcta
 451 cctgaccacg ggagctagtg acggcatttc tacgatcctg aagatcctcg
 501 tctccggggg cggcaagtca cggacaggtg tgatgatccc catcccacaa
 551 tateccctct attcagctgt catctctgag ctgcagccca tccaggtgaa
 601 ttactacctg gacgaggaga actgctgggc gctgaatgtg aatgagctcc
 651 ggcgggcggg gcaggaggcc aaagaccact gtgatcctaa ggtgctctgc
 701 ataatcaacc ctgggaaccc cacaggccag gtacaaagca gaaagtgcac
 751 agaagatgtg atccactttg cctgggaaga gaagctcttt ctccctggctg
 801 atgaggtgta ccaggacaac gtgtactctc cagattgcag attccactcc
 851 ttcaagaagg tgctgtacga gatggggccc gagtactcca gcaacgtgga
 901 gctcgcctcc ttccactcca cctccaaggg ctacatgggc gagtgtgggt
 951 acagaggagg ctacatggag gtgatcaacc tgcaccctga gatcaagggc
 1001 cagctggtga agctgctgtc ggtgcgcctg tgccccccag tgtctgggca
 1051 ggccgccatg gacattgtcg tgaacccccg ggtggcagga gaggagtcc
 1101 ttgagcaatt cagccgagag aaggagtccg tccctgggtaa tctggccaaa
 1151 aaagcaaagc tgacggaaga cctgtttaac caagtcccag gaattcactg
 1201 caacccttg cagggggcca tgtacgcctt ccctcggatc ttcattctg
 1251 ccaaagctgt ggaggctgct caggcccatc aatggctcc agacatgttc
 1301 tactgcatga agctcctgga ggagactggc atctgtgtcg tgcccggcag
 1351 tggttttggg cagaggggaag gcacttacca cttcaggatg actatcctcc
 1401 ctccagtgga gaagctgaaa acggtgctgc agaaggtgaa agacttccac
 1451 atcaacttcc tggagaagta cgcgtgagga cgcctgagcc ccagcgggag
 1501 acctgtcctt ggctcttctt cccaatgccc gtcaggctga actcgcctcc

1551 cccgtgactc tgcctcgggc ctgcagagg ccgctggcca cttcgtcatc
1601 attttgcccc tggagacgtc tttctttgtg ccttgatggt gagagcgct
1651 ctcttttgag caaacaagca ttctatatgc aaccagagta gaggggacct
1701 gctcagcagg tgtgaccagg gttctctgaa tctgttattg tttttgcttc
1751 tggaaagtgc atttggggtt tacaacaact aggatgtggt gggtagatg
1801 tttcagatct ggagaaatga gcagggtgctg ggaaatgtgt gacttaaccg
1851 tggtagagggc tggaaatcca aactcaccac catgatctgt gaaataaagc
1901 ccttagcggg gtgaagcatc cggtcctttg aacagaaggg cctggaaggg
1951 ccctggggct gagaaagggc ccgcccgggt gcctggaggc aggcgccggg
2001 agcgcagtag cacgtggact gggcaggatg ttgcactagc ttgggtaga
2051 tgctgggggc tgcggccacg gtcagagggc cccactgtga ggcgtgggtg
2101 tgagccaggc tgcaggagga actgggcctc cgcttcccag caacgcagcc
2151 aggcctgaga attctgtgcg cccggcgggc tttgggaatg aggggttccc
2201 ttgaacatgc gtaggctgga acccgtctg agaggctctc ctgaatttca
2251 gtgacacata gtgcagcccg gcagtgtccc acttccgtgg agagagccgc
2301 tggaatggtg tggaccatc ccgcgggtga ccgggtgctg ttctcccctg
2351 accgagcctg tgagcacatc gcccctgct ggcgacagcg gggaaatgag
2401 ggctgaaaat atcctcccca caagggcaat ccccgggacc tgccgagcag
2451 ccaaggccct gtcctttctt gaatggtggc gagctgaatc tggtcggttt
2501 cctagctttt aggtggtaa agtgcctggc agcttggctg ccgtggagga
2551 gtcagtcgtg gttggagggt cattgccgtg ctttcatgca gagtgttttg
2601 ccttcatggt agcttccggc tcccctcca ggctgcagac tctgacctgt
2651 ggcacagggc ttctcccagt acaggagggt gccatcccc agcatcgggc
2701 ttctctgcca ttagcagccc tgggcgggccc gaccacactc gaggtcggg
2751 tgctacgggc ttagccctcg cctccctcac tgggagcttc cccatcctcc
2801 ctgccttccc cagtgggaag ttagggaagc tcaggagcct gggaccccg
2851 atgtccaaa atgggattgg agaagctgga gagaaagcag aagaggccga
2901 ggagtgaggc agcagcctct atgcttgatt tccacaccgg gtccgtgcag
2951 aggaaacaga aactcccaac tgccttacc caccgacatc acagccccta
3001 tgaagaaagt agccacaatc tcaaaataaca aaagggaatg ttctaaaact
3051 ttttcttctt taaaaaatgg agaaaattgc acttgtgctt gctgtgtggt

3101 atataaacca ggattagtcc cagggtcgtg aggtttctgg tgaaaaggtt
3151 aaatcgtaga agctagtata tttttatat ttttgtaaca attgcttttt
3201 tcatggggga ggcgggggta gtatttatag tctaacaag tccagtaatt
3251 ttttataaat cttcagatta taaacagccc ctaaaaactt tacaacgttt
3301 acacagtttt ttaaaaagag actgtataca cttgatttgc tttcaaaata
3351 aataaggtca gctagtctag gaggttaacg tcgggtagga atgctgatca
3401 tgataggttt ggttttctac agattctgtt cgggtgcctt tcctatccag
3451 gcaccacctg agaaagtgtt catttgaggt cgcacttggga agttacatct
3501 gtgaagtttc tgcattcgt ccagatctgt gtgtgtagca tgtgctgagg
3551 aagcacgtgc tgggctgtgc ctcagacagt gcatcaccgg gcaccagag
3601 gcttgctgg ctattcctgt tctgggtgtgt gtggagtgtt ggggaggaac
3651 agatgcagat caacctgtgg ctgttttccc gtctaggttc tcacaggtat
3701 ctctgacag aggtacttaa caatggctct gctggaatt tctataaata
3751 aaatgtccaa aatggaaa

ALT2 MQRRAALVRRGCGPRTSPMSRQSSAAAEASAVLKVRRPERRRRRLITLESNIPQKAVRYAVRGPVIVLKAGEIELELQRIKIKKPFTEVIRANIGDAQA 100
 ALT1 MASSTGDRSQAVRHGLRAKVLTLDGMNPRVRRVEYAVRGPVIVORALELEQSRQGVKKEPFEVIRANIGDAQA 73

 ALT2 MGQQTTELARQVMAALCTYFMLLDPSFPEDAKRRARRILQACGNSLSGYSASQGVNCRREDVAAVTTRRDGGVRA DFDNIVLITGASDGLSTLKIIVS 200
 ALT1 MGQRFTFTRQVIALCVNFDLLSNFPPDDAKKRAERILQACGSHSLGAYSVSSGIQLIREDVARYTERRDGGI PADPNVFLSTGASDAIVTVVKLLVA 173

 ALT2 GGGKSRHGVMIPQIPLYSAVISEHDAIQVNYLIDRENCHALVNEIARAVQKDHCDPKVLCIINFGNFGQVQSRKCTEDVIHFANWEEKLFLLADE 300
 ALT1 GEGHTRKGVLIPIPOPLYSATLAEIAGVQVYVYLDSEERAWALDVAKLARALQARDBHCRPRALCVINFGNFGVQVTRFECLEAVLRFAPFEERLFLLADE 273

 ALT2 VYQDNVYSPDCRPHSFKKVLYEMGPEYSSNVELASFHSTKNGYMGECGRGGYMEV INLHPETIKGQLVILSVLRCIPVSGQAAMDIVWNPVAGESSEFS 400
 ALT1 VYQDNVYAAGSQPHSFKKVLMEGPPYAGQQELASFHSTKNGYMGECGRGGYVEVWNRDRAVQQQKGLMSVRLCIPVFGQALLDLDVVSPFAPFDPSFA 373

 ALT2 QFSREKBSVLGNLAKAKLTEDLFNQVFGIHCNPLQAMYAFPRILFIPAKAVEAAQAHOMAPDMFVCMKLESTNGICVWPGSGFGQREGTVHFRTLILPP 500
 ALT1 QFOAKQAVLAEHLAAKAKLAEQVFNESAPGISCNFVQGANYSFRVQLPFRAVENAEQELGLAPDMFVCLRLLESTNGICVWPGSGFGQREGTVHFRTLILPP 473

 ALT2 VEKLVTLQKVKDFHINFLKRYA 523
 ALT1 LEKLRLLLEKLSRFRHAKFTLEYS 496

图 2

专利名称(译)	新型丙氨酸转氨酶及其应用方法		
公开(公告)号	CN1636058A	公开(公告)日	2005-07-06
申请号	CN02809770.X	申请日	2002-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	龚大为 艾伦·舒尔迪纳		
申请(专利权)人(译)	龚大为 杨荣泽		
当前申请(专利权)人(译)	龚大为 杨荣泽		
[标]发明人	龚大为 艾伦·舒尔迪纳 杨荣泽		
发明人	龚大为 艾伦·舒尔迪纳 杨荣泽		
IPC分类号	A61K38/00 C07H21/04 C12N9/10 C12N9/64 C12N15/00 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/537 G01N33/543		
CPC分类号	C12N9/1096 A61K38/00		
代理人(译)	刘国平		
优先权	60/290829 2001-05-14 US		
其他公开文献	CN1636058B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种新的丙氨酸转氨酶基因(ALT2)已从人类组织中分离出来, ALT2特异性核酸、蛋白质及其抗体已描述如上。ALT2主要在肝脏、肾脏、脑、肌肉和脂肪组织中表达。ALT2可用作产生ALT2的组织的损伤和疾病的诊断。

