

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 14/47

[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/12 C12Q 1/68

C12N 5/00 C07K 16/18

G01N 33/53 A01K 67/027

[21] 申请号 00805486. X

[43]公开日 2002年6月19日

[11]公开号 CN 1354756A

[22]申请日 2000.1.27 [21]申请号 00805486. X

[30]优先权

[32]1999.1.29 [33]JP [31]21543/99

[86]国际申请 PCT/JP00/00413 2000.1.27

[87]国际公布 WO00/44783 日 2000.8.3

[85]进入国家阶段日期 2001.9.25

[71]申请人 宫田敏男

地址 日本神奈川县

共同申请人 黑川清

[72]发明人 宫田敏男

[74]专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 33 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 MEG-4 蛋白

[57]摘要

本发明提供了在肾小球膜细胞(mesangial cell)中以高频率表达的 DNA 以及该 DNA 编码的蛋白(Meg-4)。这些物质可用于,例如,鉴定肾小球膜细胞及检测肾小球膜细胞中的异常。而且,上述蛋白可能有助于阐明肾小球膜细胞的功能,并依次阐明肾小球膜细胞相关疾病的病因。预计,该蛋白可用于肾小球膜细胞相关疾病的治疗、诊断等。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的蛋白, 或包含将 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列中一个或多个氨基酸置换、删除、添加和/或插入后的氨基酸序列的蛋白, 并且该蛋白和包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的蛋白在功能上等价。
2. 权利要求 1 的蛋白, 其中该蛋白包含与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列至少有 90%同源性的氨基酸序列。
3. 权利要求 1 的蛋白, 其中该蛋白包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。
- 5 4. 一种 DNA, 其编码权利要求 1 的蛋白。
5. 权利要求 4 的 DNA, 其中该 DNA 包含与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列至少有 85%同源性的核苷酸序列。
6. 权利要求 5 的 DNA, 其中该 DNA 包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列中的蛋白编码区。
- 15 7. 一种编码权利要求 1 的蛋白的 DNA, 该 DNA 在严格条件下与包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列的 DNA 发生杂交。
8. 一种 DNA, 其与包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列的 DNA 或其互补链特异杂交, 该 DNA 有至少 15 个核苷酸的链长。
9. 针对权利要求 6 的 DNA 或其部分的的反义 DNA。
- 20 10. 载体, 其包含权利要求 4、5、6 和 7 中任一项的 DNA。
11. 转化体, 其携有权利要求 4、5、6 和 7 中任一项的 DNA 并可表达之。
12. 产生权利要求 1 的蛋白的方法, 该方法包括培养权利要求 11 的转化体、并收集权利要求 4、5、6 和 7 中任一项的 DNA 的表达产物。
- 25 13. 与权利要求 1 的蛋白结合的抗体。
14. 权利要求 13 的抗体, 其中该抗体识别包含从 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列中选出的氨基酸序列的蛋白。
15. 权利要求 14 的抗体, 其中该抗体是单克隆抗体。
16. 测量权利要求 3 的蛋白或其片段的免疫分析方法, 其基于权利要求 14 或 15 的抗体对权利要求 2 的蛋白或其片段的免疫结合。
- 30 17. 用于权利要求 3 的蛋白或其片段的免疫分析的试剂, 该试剂包含权

利要求 14 或 15 的抗体。

18. 检测肾小球膜增生性肾病的方法，该方法包括测量生物样品中含有的权利要求 3 的蛋白或其片段、并将该测量值与从正常样品得到的测量值比较。

5 19. 转基因非人脊椎动物，其中编码 Meg-4 的基因的表达水平被修饰。

20. 权利要求 19 的转基因非人脊椎动物，其中非人脊椎动物是小鼠。

21. 权利要求 20 的转基因非人脊椎动物，其中非人脊椎动物是基因剔除小鼠，该小鼠中编码 Meg-4 的基因的表达受到抑制。

说明书

MEG-4 蛋白

5 技术领域

本发明属于基因工程领域，具体地，涉及肾细胞中的基因的分离。

背景技术

10 体内 60 万亿个不同的细胞基本包含同样的基因组 DNA。对于其正常的生理功能而言，这些基因的表达严格地被细胞系和细胞接收的信号所控制。因此，阐明每一类细胞中的基因表达是非常重要的。

15 肾小球膜细胞在保持肾小球的结构和功能中起重要的作用，而且对于每一类型肾炎也有主要的病生理意义。例如，在一个患有各种肾小球疾病，如慢性肾炎和糖尿病性肾病的病人中，肾小球膜细胞的增生和细胞外肾小球膜基质的积聚，被认为是肾小球硬化的重要病理学发现。因此，识别在肾小球膜细胞中特异性表达的基因、并阐明其功能，有助于理解肾小球膜细胞的生物学特征以及与肾小球膜细胞相关的疾病的病因，并据此治疗或诊断与肾小球膜细胞相关的疾病。

20 已知 Thy1 抗原是大鼠肾小球膜细胞的一种标志物。可是，该基因不是肾小球膜细胞特异的，在人肾小球膜细胞中不表达(Miyata T. 等, 免疫学, 1989, 67: 531-533; 和 Miyata T. 等, 免疫学, 1990, 69: 391-395)。已知当肾小球膜细胞被激活后表达 α 平滑肌肌动蛋白，但该基因也不是肾小球膜细胞特异的。肾小球膜细胞特征性的任何基因都未见报道。

25 本发明人以前曾报告过 MEGSIN 是在肾小球膜细胞中特异表达的蛋白(临床研究杂志(J. Clin. Invest), 1998 Aug 15, 102: 4, 828-36)。本发明涉及一种新蛋白，它具有与 MEGSIN 明显不同的结构。

发明公开

本发明的目的是分离一种在肾小球膜细胞中高表达的基因。

30 本发明人从人肾小球膜细胞体外培养物中分离 mRNA，构建 3' 侧 cDNA 文库。在该 cDNA 文库中，随机测定众多克隆的序列，并与从不同器

官和细胞中得到的 3' 侧 cDNA 文库的已知核苷酸序列对比，从而确定在肾小球膜细胞中表达的克隆。选定其中一个克隆，该克隆以很高的频率在肾小球膜细胞中出现。进而，用该克隆的插入片段作为探针，筛选从肾小球膜细胞制备的 λ ZIPLox cDNA 文库，以确定阳性克隆的核苷酸序列。根据确定的 cDNA 核苷酸序列，阐明最长的开放阅读框架的氨基酸序列。在该氨基酸序列中发现了几个特征性的基序。因为已证明本氨基酸序列与一种已知蛋白，鼠 ATP 依赖性金属蛋白酶(ATP-MP)，存在同源性，可假定该氨基酸序列是本发明中的 cDNA 编码蛋白的氨基酸序列。本发明人将本发明中具有此氨基酸序列的蛋白命名为 Meg-4。人 Meg-4 cDNA 的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2。

在 SwissProt 数据库中，针对本氨基酸序列进行的氨基酸同源性搜索证实，Meg-4 是包含 AAA 蛋白家族(与不同细胞活性相关的 ATP 酶蛋白家族)的一个特征性 AAA 基序的新蛋白(Walker, J.E. 等, EMBO J. 1982, 8: 945-951; Swaffield, J. C. 等, 自然, 374: 88-91; Fry, D.C. 等, 美国国家科学院研究进展(Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)1997, 83: 907-911; Frohlich, K. U. 等, 细胞生物学杂志, 1991, 114: 443-453)。而且，当用 Northern 印迹法观察 Meg-4 的分布状况时，在人肺和肝脏中几乎观察不到 Meg-4 的表达，在肾脏以及其他组织，例如心、脑、胎盘、骨骼肌和胰腺中可观察到表达。在细胞水平，特别是肾小球膜细胞中特别高水平的表达是特征性的。在成纤维细胞和上皮细胞中也观察到有表达。本发明基于这些发现而完成。

本发明特别包含以下内容：

(1)包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的蛋白，或包含将 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸替换、删除、添加和/或插入后的序列的蛋白，并且该蛋白与包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的蛋白在功能上等价。

(2)(1)中的蛋白，其中蛋白包含与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列至少有 90%同源性的氨基酸序列。

(3)(1)中的蛋白，其中蛋白包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。

(4)编码(1)中的蛋白的 DNA。

(5)中的 DNA，其中 DNA 包含与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列至少有 85%同源性的核苷酸序列。

(6)中的 DNA，其中 DNA 包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列中的蛋白编

码区。

(7)编码(1)中蛋白的DNA,该DNA在严格的条件下可与包含SEQ ID NO: 1的核苷酸序列的DNA杂交。

5 (8)一种DNA,其与包含SEQ ID NO: 1的核苷酸序列的DNA或其互补链特异杂交,该DNA有至少15个核苷酸的链长。

(9)针对(6)中的DNA或其部分的反义DNA。

(10)包含(4)、(5)、(6)和(7)中中任一项DNA的载体。

(11)表达携有的(4)、(5)、(6)和(7)中中任一项DNA的转化体。

10 (12)产生(1)中的蛋白的方法,该方法包括培养(11)中的转化体以及收集(4)、(5)、(6)和(7)中任一DNA的表达产物。

(13)与(1)中的蛋白结合的抗体

(14)中的抗体,其中抗体识别包含从SEQ ID NO: 2的氨基酸序列中选出的氨基酸序列的蛋白。

(15)中的抗体,其中抗体是单克隆抗体。

15 (16)基于(14)或(15)中的抗体对(2)的蛋白或其片段的免疫结合来测量(3)中的蛋白或其片段的免疫分析方法。

(17)用于(3)的蛋白或其片段的免疫分析的试剂,该试剂包含(14)或(15)中的抗体。

20 (18)检测肾小球膜增生性肾病的方法,该方法包括检测生物样品中包含的(3)的蛋白或其片段,并将该检测值与从正常样品得到的值相比较。

(19)转基因非人脊椎动物,其中编码Meg-4的基因的表达水平被修饰。

(20)的转基因非人脊椎动物,其中非人脊椎动物是鼠。

(21)的转基因非人脊椎动物,其中非人脊椎动物是基因剔除鼠,该鼠中编码Meg-4的基因的表达被抑制。

25 为实现以上提到的各项内容,本发明人使用了3'导向的cDNA文库。该方法避免了cDNA的大小对克隆效率的影响。3'区的序列表示了每一个基因的特征,大约200到300bp的序列数据就足够证明该基因的特征。

30 本发明中,编码人Meg-4的DNA可以通过已知方法从肾小球膜细胞中制备mRNA再将其转变为双链cDNA而得到。例如,mRNA可以通过异硫氰酸胍-氯化铯方法(Chirwin,等,生物化学 18, 5294, 1979)制备,并在脱氧核糖核酸酶的存在下用表面活性剂和酚处理(Berger和Birkenmeier,生物化

学 18, 5143, 1979), 等。Poly(A)⁺RNA 可以从总 RNA 中制备, 例如, 通过使用诸如 Sepharose、纤维素、胶乳颗粒等与寡(dT)结合的载体进行亲和层析。由得到的 mRNA 和其互补 DNA(cDNA)组成的杂交链可以通过下列方法制备: 利用所述 mRNA 为模板, 用与 3' 端的 poly(A)链互补的寡(dT)作引物, 5 一个随机引物, 或与 Meg-4 氨基酸序列的一部分相应的合成寡核苷酸作为引物, 用逆转录酶处理该模板。这条 mRNA 链可以转变为一个双链 cDNA, 例如通过用大肠杆菌 RNA 酶 H、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 和大肠杆菌 DNA 连接酶处理该 mRNA 链, 并用一条 DNA 链替换所述 mRNA。

DNA 可以通过反转录 PCR 方法克隆, 该方法用来自肾小球膜细胞的 10 poly(A)⁺RNA 为模板, 和基于人 Meg-4 基因核苷酸序列而合成的引物。另外, 如果不用 PCR, 目标 cDNA 可以通过用一个基于人 Meg-4 基因核苷酸序列合成的探针直接筛选 cDNA 文库而得到。本发明中的基因可以通过证实从这些方法中得到的基因的核苷酸序列而选出。

另外, 例如, 如实施例 8 所示, 人肾小球膜细胞的 cDNA 文库可以用作 15 模板来分离如 SEQ ID NO: 7 所示的 Meg-4 表型。这一表型包含于本发明的 Meg-4 中。Meg-4 cDNA 在人类之外的其他种属, 如小鼠或大鼠中的同源序列可以通过使用类似方法得到。

而且, Meg-4 cDNA 的同源序列可以通过下列方法分离。编码 Meg-4 同源序列的 cDNA 可以通过利用菌落杂交和空斑杂交, 用上述的人 Meg-4 20 cDNA 的核苷酸序列作为探针, 筛选 cDNA 文库而分离。cDNA 文库可以通过利用从小鼠或大鼠组织、培养的肾小球膜细胞等中分离到的 mRNA 作为模板而合成。商业化的 cDNA 文库(Funakoshi 等)也可以使用。利用简并引物进行的 PCR 是另一种扩增 cDNA 同源序列的可能方法, 该引物可基于本发明的人 Meg-4 cDNA 而设计, 使之置于 ORF 前后。

25 虽然 AAA 蛋白家族共享 AAA 基序, 其他区域的序列却不是必须相似。但是, 例如, 在同源序列如将在后文提及的小鼠 ATP-MP 中, 在 AAA 基序之外的区域存在一定程度的相似性, 可通过 PCR 方法扩增。本发明人已证实, 除了用小鼠以外, 可大鼠中用简并引物扩增 Meg-4 同源 cDNA 片段。

人 Meg-4 基因组可以通过筛选基因组文库得到。基因组文库可以合成得 30 到, 例如, 通过从人 B 淋巴母细胞制备基因组, 用 Sau3 部分消化 DNA(血液学(Blood), 83 卷, 11 期, 1994: 3126-3131), 再将其插入噬菌体载体 EMBL3。

包含预期基因组的克隆可以通过对这一基因组文库进行空斑杂交(参见 Shin Saibou Kougaku Jikken(细胞生物技术新实验)方案, Shujun-sha, 79-92)而得到。Meg-4 cDNA 的完整开放阅读框架区(2322bp), 或通过用所述 cDNA 的一部分作引物、用 PCR 方法扩增人基因组 DNA 得到的每一外显子-内含子部分, 都可以作为探针。正如将要在后文提到的, 因为 Meg-4 基因定位于 10 号染色体短臂的 10p11.23-12.1 位, 人 Meg-4 基因组容易从包含该区的基因组克隆中分离。

调控区序列的 5' UTR 序列可以通过用来源于人培养肾小球膜细胞的 mRNA 或人肾 mRNA(从 Clontech 购买)作模板, 以 5' RACE 法(5' -Full RACE Core Set, 按 Takara 的方案)确定。

本发明的基因也可以通过下列利用核酸化学合成的标准方法产生, 如亚磷酸胺法(Mattencchi, M. D. & Caruthers, M. H. 美国化学协会杂志(J. Am. Chem. Soc.) 103, 3185, 1981)、亚磷酸三酯法(Hunkapiller, M. 等, 自然 3101, 105, 1984)。

真核基因经常表现多态性, 如人干扰素基因, 其中一个或多个氨基酸可以通过这种多态性被替换, 而一般仍保留蛋白的活性。一般情况下, 即使一个或多个氨基酸被修饰, 蛋白的活性仍经常可以被保留。因此, 通过对编码 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的基因进行人工修饰而得到蛋白编码基因, 只要该蛋白具有本发明中基因的典型功能, 则该基因也包括在本发明中。对 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列经过人工修饰得到的蛋白, 只要它具有本发明中的蛋白的特征, 就包括在本发明中。

本发明中的蛋白包括 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其中一个或多个氨基酸被置换、删除、添加和/或插入, 并且和本发明的 Meg-4 蛋白在功能上等价的氨基酸序列。在本发明中, “功能等价”意味着具有和 Meg-4 同样的生物学特性。例如, 本发明人已经发现 Meg-4 的下列生物学特性。

在结构上, Meg-4 属于 AAA 蛋白家族。在此, AAA 蛋白家族指的是具有 Mg^{2+} 依赖性 ATP 酶活性、高度保守的 230 到 250 个碱基的 AAA 基序(包括 ATP 结合基序, 最小 AAA 蛋白基序和步行者 B 基序)和一个金属结合基序(HEXXH)的蛋白。已知几个 ATP-MP 是 AAA 蛋白。可是, 它们的细胞定位不同。其不同功能已经有报道, 例如细胞周期调节、蛋白降解、细胞器的生物合成和蛋白运输。

Meg-4 表达的特征是在肾脏的肾小球膜细胞中高表达，这已经在如肾、心、脑、胎盘、骨骼肌和胰腺等组织中观察到，并且已经观察到在肺和肝脏中表达很弱。而且，在培养的癌细胞系中，没有观察到 Meg-4 的明显表达。Meg-4 在每一种组织中的表达可以通过 Northern 印迹实验得知，其中可以用从每一种组织中制备的 mRNA 为样品、用例如从 SEQ ID NO: 1 中选出的核苷酸序列为探针。

就上述生物学特性而言功能等价的所有蛋白构成了本发明的 Meg-4。因此，本发明不仅包括结构已被特别阐明的人 Meg-4，还包括其他结构或功能等价同源序列。

在本发明中，将 SEQ ID NO: 2 中一个或多个氨基酸置换、删除、添加和/或插入的氨基酸序列，优先指整体上与 SEQ ID NO: 2 至少有 90% 同源性的氨基酸序列。氨基酸序列的同源性可以通过 FASTA 确定。更特别地，序列中 1 至 50 个、优选 1 至 10 个氨基酸被其他氨基酸置换、被删除、添加或插入到 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列中。

本发明中的 DNA 包括编码这些功能等价蛋白的 DNA。编码这些蛋白的 DNA 可能是 cDNA、基因组 DNA 或合成 DNA。

编码预期的氨基酸的密码子本身是众所周知的，可以随意选择，并可以通过下列标准方法确定，例如，考虑密码子在所用宿主中的使用频率 (Grantham, R. 等 核酸研究(Nucleic Acid Res.)9, r43, 1981)。因此，本发明包括通过密码子简并性而被适当修饰的 DNA。通过以下位点特异的诱变方法 (Mark, D. F. 等, 美国国家科学院研究进展 1984, 81: 5662) 以及诸如用化学合成的编码预期修饰的寡核苷酸作引物，可以部分地改变这些核苷酸序列的密码子。

下述 DNA 也能包含在本发明的 DNA 中：它可以与包含 SEQ ID NO: 1 之核苷酸序列、并编码具有本发明 Meg-4 典型功能的蛋白的 DNA 发生杂交。一个序列能在严格条件下和特定的序列杂交，可以认为该序列与所述特定的序列编码的蛋白有相似活性。严格条件一般指下列条件。即，在 65℃ 下 4×SSC 中进行杂交，然后在 65℃ 用 0.1×SSC 洗涤一个小时。杂交和洗涤的温度，可以根据解链温度(T_m)调整，它们可以很大地影响严格性。T_m 根据组成型碱基占形成杂交碱基对的比例、杂交溶液的组成(盐浓度、甲酰胺和十二烷基硫酸钠的浓度)而变化。因此，通过试验，本领域的技术人员可以考虑上

述这些情况，以设定适当的条件来产生类似的严格性。本发明中的 DNA 包括这些 DNA：根据 FASTA 和 BLAST 的同源搜索，这些 DNA 包含的核苷酸序列和 SEQ ID NO: 1 中的核苷酸序列优选有至少 85%、更优选有至少 95% 的序列同源性。

5 本发明中 DNA 的核苷酸序列，包括突变体，可以根据已知技术用于不同的目的。

通过将按照上述方法克隆的编码 Meg-4 的基因插入到适当的表达载体 DNA 中，可以转化其他原核或真核宿主。此外，通过将适当的启动子和与表型表达相关的序列导入到表达载体中，可使所述基因在每一个宿主细胞中表
10 达。例如，用于大肠杆菌的 pET-3(Studier & Moffatt, 分子生物学杂志, 189, 113, 1986)等、用于 COS 细胞的 pEF-BOS(核酸研究 18, 5322, 1990)、pSV2-gpt(Mulligan & Berg, 美国国家科学院研究进展 78, 2072, 1981)等，以及用于 CHO 细胞的 pVY1(WO89/03874)等，都可以作为表达载体使用。目标蛋白能够以融合蛋白的形式表达，该融合蛋白来源于目标基因和编码其
15 他多肽的基因的融合基因。这样的融合蛋白能够容易地纯化、分离，得到预期蛋白。组氨酸标记、c-myc 标记、MBP 标记、GST 标记等都是已知的用于融合的蛋白。能够表达融合有这些标记的插入片段的载体可以通过商业途径得到。

例如，大肠杆菌可以作为本发明的表达系统中的原核宿主细胞使用。酿酒酵母等可以用作真核生物体中的微生物宿主细胞。哺乳动物宿主细胞的例子包括 COS 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞等。本发明的转化体可以在恰当选择的、适合宿主细胞的培养条件下培养。
20

正如上文提到的，通过培养用编码目标 Meg-4 基因转化的转化体、并从细胞或培养上清中回收，可以产生 Meg-4。可以被纯化为基本上纯的蛋白。
25 本发明的目标蛋白 Meg-4，可以通过常用于蛋白的分离和纯化方法进行分离和纯化，并且这些方法不受特别限制。例如，可以通过适当地选择并组合不同的层析方法来分离和纯化 Meg-4。

除了以上提到的方法，本发明的基因、包含该基因的重组载体、携带该载体的转化体以及通过基因操作产生的 Meg-4 可以通过在“分子克隆---实验手册” (冷泉港实验室, 纽约)中描述的标准方法进行操作。
30

另外，检测 Meg-4 基因的探针可以根据 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列而

设计。而且，也可以设计用于扩增包含这些核苷酸序列的 DNA 和 RNA 的引物。根据某一特定序列设计探针和引物，是本领域的技术人员日常工作。包含一段设计好的核苷酸序列的寡核苷酸可以用化学方法合成。这些寡核苷酸如果经过适当的标记，可以用于各种形式的杂交分析，或用于核酸的合成反应，如 PCR。用作探针或引物的寡核苷酸至少有 15 个碱基，优选有 25 到 50 个碱基。

而且，根据本发明公开的 Meg-4 编码基因的核苷酸序列，提供了能够调节 Meg-4 表达的反义核酸。本发明的反义核酸是用于证明肾小球膜细胞中 Meg-4 的作用的重要工具。它对于调节因 Meg-4 加速表达引起的疾病状况也有用。用反义核酸抑制目标基因表达的效果如下。它们通过形成三链抑制转录启动，因与 RNA 聚合酶所致局部开放环结构的部位杂交而抑制转录，与正在合成的 RNA 杂交而抑制转录，与内含子和外显子的连接处杂交而抑制剪接，与剪接体形成区域杂交而抑制剪接，与 mRNA 杂交从而抑制 mRNA 从细胞核到细胞质的转移，与加帽区和 poly(A)附着区杂交而抑制剪接，与翻译起始因子结合区杂交而抑制翻译，与起始密码子附近的核糖体结合区域杂交而抑制翻译，与 mRNA 翻译区和多聚核糖体结合区杂交从而干扰蛋白链的延伸，与核酸-蛋白相互作用区杂交从而抑制基因表达，等等。它们通过抑制转录、剪接或翻译过程而抑制了目标基因的表达(Hirashima 和 Inoue, Shin Seikagaku Jikken Koza 2 Kakusan IV Idenshi no Fukusei to Hatsugen(新生化实验室实验 2 核酸 IV 基因的复制与表达)，日本生物化学协会版，Tokyo Kagaku Dojin, 319-347, 1993)。

通过以上提及的任一种作用，在本发明中使用的反义序列可以抑制目标基因的表达。在一个实施方案中，如果设计一段反义序列，使之与位于所述基因的 mRNA 5' 端附近的非翻译区互补，则它可以有效抑制所述基因的翻译。但是，也可以使用与编码区或与 3' 端非翻译区的互补的序列。如此，本发明中使用的反义 DNA 包括即针对基因翻译区又针对非翻译区的反义序列的 DNA。把要用到的反义 DNA 插入适当启动子的下游，优选把含有转录终止信号的序列插入到 3' 端。以如此方式制备的 DNA 可以按已知方法转化到预定的宿主中。优选，反义 DNA 序列应该包含一段与将要转化的宿主的内源基因(或其同源基因)或其一部分互补的序列。但是，只要基因表达被有效抑制，就不必需要完全互补。

将用反义DNA作模板而转录的RNA设计成与目标基因的转录产物优选有90%互补，更优选有95%互补。可有效抑制目标基因表达的反义DNA的长度至少有15个核苷酸或更多，优选有100个核苷酸或更多更优选有500个核苷酸或更多。通常，使用的反义RNA的长度短于2.5kb。

5 基于本发明的Meg-4的cDNA核苷酸序列，可以得到基因组中Meg-4基因的启动子区和增强子区。原位杂交的结果显示，Meg-4基因位于10号染色体短臂的10p11.23-12.1区(图4)。因此，可以从包含该区上游区域的基因组克隆中，基于已知方法得到Meg-4基因的启动子区和增强子区。

具体地，通过在未审查已出版的日本专利申请(JP-A 平成6年-181767；
10 免疫学杂志，1995，155，2477-2486；美国国家科学院研究进展1995，92，3561-3565等中描述的同样方法，可以得到这些调控区。在此，启动子区指位于转录起始位点上游以调控基因表达的DNA区域，增强子区指位于内含子或3' UTR中以调控基因表达的DNA区域。

具体地，例如，可以通过下列方法得到启动子区。

15 (1)用Meg-4 cDNA的5'端位点作探针，从人基因组文库中克隆Meg-4的启动子区。

(2)用限制性内切酶消化Meg-4基因，得到包含位于上游区域(2到5kbp)中的启动子区域的DNA，所述上游区含有Meg-4基因的转录起始密码子，然后确定核苷酸序列。以从人肾小球膜细胞制备的poly(A)⁺RNA为模板，用
20 从Meg-4基因的5'端位点的cDNA序列中选出的引物DNA，利用引物延伸方法，确定转录起始位点(+1)。通过从核苷酸序列中搜索转录因子结合序列可预测可能包含启动子活性的位点。

(3)将从2)中得到的DNA中去除Meg-4基因的编码区，再将该DNA片段亚克隆进质粒中，并将氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因或萤光素酶基因作为
25 报道基因连接到该DNA片段的下游2至5kbp处，构成报道质粒。类似地，用限制性内切酶消化或用PCR制备与Meg-4基因上游不同位点相应的DNA片段以包括可能的启动子区域，其中5'和3'端位点被分步去除。

(4)通过检测用3)中制备的报道质粒转化的动物细胞中CAT或萤光素酶的活性，得到Meg-4基因上游的启动子区域。

30 以和上文对启动子所述的同样方式，用Meg-4 cDNA为探针，从人基因组文库中克隆人Meg-4基因组基因，得到3' UTR和内含子中的增强子区。

通过已知方法，可以得到调控 Meg-4 基因表达的转录因子，例如，那些在“Shin Seikagaku Jikken(细胞生物技术新实验)方案，Shujun-sha,”“生物手册系列 5Tensha Inshi Kenkyu-hou(关于转录因子的研究)，Yodo-sha,”“DNA 和细胞生物学，13，731-742，1994”描述的方法，如亲和层析、South-western 5 法、足迹法、凝胶移位法或一次杂交法。在此，转录因子是指调控 Meg-4 基因转录的因子，包括诱导转录起始反应的转录起始因子和上调或下调转录的转录调控因子。

亲和层析如下进行：将核提取物上样至亲和层析柱，使上述所获启动子和增强子区固化到 Sepharose 或胶乳珠上，洗柱、用含有和固化到柱子上的 10 同样序列的 DNA 洗脱结合的转录因子，再回收调控 Meg-4 基因表达的转录因子。

在 South-western 方法中，将 cDNA 插入到大肠杆菌表达载体如 λ gt11 中，合成与 β -半乳糖苷酶的融合蛋白。该融合蛋白被吸附到硝酸纤维素膜上，用放射性标记的启动子和增强子区的 DNA 片段作探针，筛选出合成具 15 有结合活性的融合蛋白的噬菌体，以得到调控 Meg-4 基因表达的转录因子。

凝胶移位法是基于这样的现象，当 DNA 与蛋白结合后，其在聚丙烯酰胺凝胶中的电泳迁移率将发生变化。用启动子区和增强子区的 DNA 片段作探针，和含有转录因子的样品(例如，核蛋白提取物)混合后，在低离子强度下电泳分析。与游离 DNA 有不同迁移率的条带，表示其结合了转录因子。 20 凝胶移位法可以允许高度灵敏地从蛋白混合物中分离转录因子。

当进一步用足迹法分析时，通过凝胶移位法获得的 DNA 转录因子复合物可以确定转录因子结合位点。足迹法利用了以下现象：当蛋白与 DNA 结合后，可保护 DNA 免于 DNA 酶 I 的消化。即，末端标记有 ^{32}P 的启动子区和增强子区的 DNA，在转录因子的存在下，可以被 DNA 酶 I 部分消化，然后 25 后通过用于确定核苷酸序列的变性聚丙烯酰胺凝胶进行分离。与没有转录因子的情况下进行的同样实验得出的结果进行比较，会显示转录因子结合带的消失，因此就可能估计结合区域。

本发明也提供了识别 Meg-4 的抗体。本发明的抗体包括，例如，抗包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的蛋白的抗体。用本发明的 Meg-4 或其部分肽， 30 或本发明的融合蛋白如 c-myc-(His)₆-Tag-Meg-4 或 MBP-Meg-4 作为抗原，通过已知的方法可以产生抗本发明中的 Meg-4 或 Meg-4 的部分肽的抗体(例

如，多克隆抗体，单克隆抗体)或抗血清。更具体地，与 AAA 家族其它蛋白有低序列同源性并包含亲水性氨基酸序列的肽可作为抗原。已如实施例部分所证实，氨基酸序列 KDKILMGPERRSVEIDNKNK(SEQ ID NO: 9) 在 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列中对应于 574-593 位并可用作抗原以得到 Meg-4 特异性抗体。单克隆抗体也可以，例如，通过下列方法产生。

5 将本发明中的 Meg-4 或 Meg-4 的部分肽和熟知的载体或稀释剂一起在温血动物能够产生抗体的部位给药。为了提高抗体的产生率，可以将完全弗氏佐剂或不完全弗氏佐剂与该抗原一起给药。一般地，每一至六周免疫一次，共进行大约 2 至 10 次。可用的温血动物有，例如，猴子、兔、狗、豚鼠、小鼠、大鼠、绵羊、山羊和家禽，优选小鼠和大鼠。

10 可以通过选择免疫的温血动物来制备单克隆抗体产生细胞，例如用小鼠，检测其中抗体的滴度，末次免疫后 2 至 5 天取动物的脾和淋巴结，将这些组织中包含的抗体产生细胞和骨髓瘤细胞融合，从而得到产生单克隆抗体的杂交瘤。可以通过一些方法检测抗血清中的抗体滴度，例如，用下文所述的标记 Meg-4 与抗血清反应，并检测与抗体结合的标记活性。细胞融合可以按已知方法操作，例如，Kohler 和 Milstein 的方法(自然, 256, 495, 1975)。聚乙二醇(PEG)、仙台病毒等可用作融合增强剂，优选 PEG。

骨髓瘤细胞的例子包括 X-63Ag8, NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1 等，优选 X-63Ag8。抗体产生细胞(脾细胞)与骨髓瘤细胞的数量之比为 1:20 到 20:1。20 通过加入 PEG(优选 PEG1000 至 PEG6000)至其浓度为大约 10 到 80%，并于 20 至 40℃ 孵育 1 至 10 分钟，优选 30 至 37℃，可以提高细胞的融合效率。可以用各种方法筛选产生抗 Meg-4 抗体的杂交瘤，例如，方法一：将杂交瘤培养上清加入直接或通过载体吸附了 Meg-4 抗原的固相(例如，微板)，再加入用放射活性物质标记的抗免疫球蛋白抗体，酶，等(当用于细胞融合的细胞来源于小鼠时，使用抗小鼠的免疫球蛋白抗体。)或蛋白 A，则可以检测结合于固相的抗 Meg-4 单克隆抗体；方法二：将杂交瘤培养上清加入吸附了抗免疫球蛋白抗体或蛋白 A 的固相，再加入用放射活性物质标记的 Meg-4，酶，等，则可以检测结合于固相的抗 Meg-4 的单克隆抗体。

30 可以用已知方法或改良方法选择抗 Meg-4 单克隆抗体，其中常用补充了 HAT(次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷)的动物细胞培养基。只要杂交瘤能够在其中生长，任何用于选择、克隆和培养的培养基都可以使用。例如，可以使用

1640培养基(Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.)包含1至20%、优选10至20%的胎牛血清, GIT培养基(Wako Pure Chemicals)包含1至10%的胎牛血清, 或用于杂交瘤的无血清培养基(SFM-101, Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.)。孵育温度通常为20至40℃, 优选约37℃。孵育时间通常为5天至3周, 优选1至2周。通常, 在5%的二氧化碳下培养。可以用上文所述的关于检测抗血清中抗Meg-4抗体滴度的同样方法, 确定杂交瘤培养上清的抗体滴度。通常可以用已知方法进行克隆操作, 例如, 半固体琼脂法, 或有限稀释法。克隆的杂交瘤优选在无血清培养基中培养, 由此可在上清中产生最佳量的抗体。优选, 目标单克隆抗体可以从腹水中获得。

10 通过选择性识别 Meg-4 特异表位, 本发明的单克隆抗体不和除 Meg-4 以外的其他蛋白发生交叉反应。一般地, 蛋白特异的表位包括蛋白质的氨基酸序列中至少7个或更多连续的氨基酸残基, 优选, 10至20个氨基酸。因此, 识别以下表位的单克隆抗体可以是本发明的 Meg-4 特异的单克隆抗体: 即, 该表位由含有选自 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的肽组成、并且至少由
15 7个连续的氨基酸残基组成。

通过常用于分离和纯化多克隆抗体的免疫球蛋白分离和纯化方法, 可以分离和纯化抗 Meg-4 单克隆抗体。已知的纯化方法包括, 例如, 盐析、乙醇沉淀、等电点沉淀、电泳、通过离子交换剂(例如, DEAE)的吸附和脱吸、超速离心、凝胶过滤、或只收集抗体的特异纯化方法, 例如, 通过一种抗原结
20 合性固相或活性吸附剂, 如蛋白 A 或蛋白 G 收集, 然后再解除结合而获得抗体。

通过这样的方式得到的、可识别本发明的 Meg-4 的单克隆抗体和多克隆抗体, 可用于诊断和治疗肾小球膜细胞相关疾病。用这些抗体检测 Meg-4 的方法的实例包括夹心试验, 其中用 Meg-4 与结合于不溶载体上的抗体以及标记抗体反应, 从而检测反应形成的夹心复合物中的 Meg-4, 或者竞争法, 其中使标记的人 Meg-4 和样品中的人 Meg-4 与抗体竞争反应, 然后根据与抗体反应的标记抗原的量测定样品中的人 Meg-4。

用夹心法测量人 Meg-4 可使用一些方法, 例如 2 步法, 其中, 固定化的抗体与 Meg-4 反应, 然后通过洗涤将未反应的物质全部去掉, 再加入标记抗体, 从而形成固定化的抗体- Meg-4-标记抗体的复合物, 或者一步法, 其中, 固定化的抗体、标记抗体和 Meg-4 同时混合。

用于测量的不溶载体的例子包括，例如，聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚氯乙稀、聚酯、聚丙烯酸酯、尼龙、聚缩醛、合成树脂例如氟化树脂等、多糖例如纤维素、琼脂糖等、玻璃、金属等。不溶载体的形式可以是多样的，包括盘、球、粒子、纤维、棒、板、容器、杯(cell)、试管等。吸附有抗体的载体应该保存于含有适当防腐剂如叠氮钠的凉爽地方。

抗体可以通过已知的化学结合或物理吸附法进行固定化。化学结合方法包括，例如，利用戊二醛的方法，利用 N-琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯、N-琥珀酰亚胺-2-马来酰亚胺乙酸酯等的马来酰亚胺法，利用 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺氯化物的碳化二亚胺法，等。另外，还有马来酰亚胺苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯法、N-琥珀酰亚胺-3-(2-二硫代吡啶)丙酸酯法，双偶氮联苯胺(bisdiazolated benzidine)法，以及二棕榈精赖氨酸(dipalmityllysine)法。另一个办法是，使两个不同抗体针对待检测物质反应而产生复合物，将表位用上述方法以固定化的第三抗体来捕获。

任何用于免疫分析的标记都可以不受限制的使用。具体地，酶、荧光物质、发光物质、放射性物质、金属螯合剂等都可以使用。优选的标记酶有，例如，过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、苹果酸脱氢酶、葡萄糖球菌核酸酶、 δ -5-类固醇异构酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、丙糖磷酸异构酶、辣根过氧化物酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶、以及乙酰胆碱酯酶等。优选的荧光物质包括，例如，异硫氰酸荧光素、藻胆(色素)蛋白、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、以及邻苯二醛。优选的发光物质包括，例如，异鲁米诺(isoluminol)、硝酸双-N-甲基吡啶、鲁米诺、芳香吡啶鎓酯(aromatic acridinium ester)、咪唑、吡啶鎓盐(acridinium salt)及其修饰的酯、萤光素、萤光素酶、以及水母蛋白。优选的放射性物质包括，例如， ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 等。

结合上述标记物的方法是已知的。具体的，直接和间接的标记都可以使用。普通的直接标记是利用交联剂使抗体或抗体片段与标记物发生化学共价连接的方法。交联试剂包括 N,N'-邻苯二马来酰亚胺(N,N'-orthophenylenedimaleimide)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己酸 N-琥珀酰亚胺酯、6-马来酰亚氨基己酸 N-琥珀酰亚胺酯、4,4'-二硫代吡啶、和其他已知的交联剂。根据交联剂的特性，可以用已知的方法使交联剂与酶和抗体发生反

5 应。间接标记方法的实例包括将抗体结合到低分子量的半抗原，如生物素、二硝基苯基、吡哆醛、或荧光胺上，以及通过半抗原的结合配对物间接标记抗体。亲和素和链亲和素可以作为生物素的识别配体，而二硝基苯基、吡哆醛、或荧光胺用识别这些半抗原的抗体进行标记。辣根过氧化物酶可用作标记抗体的酶。这个酶很有用，因为它可以和许多物质反应，而且容易通过高碘酸盐的方法连接到抗体上。偶尔，抗体的片段也可以作为抗体使用，如 Fab'、Fab、F(ab')₂。多克隆和单克隆抗体都可以通过同样的方法进行酶标记。通过以上交联剂得到的酶标抗体可以用已知方法纯化，如亲和层析等，以用于更敏感的免疫分析系统中。纯化的酶标抗体与防腐剂如乙基汞硫代水杨酸钠和稳定剂如甘油一起保存。标记抗体可以冷冻干燥、并在凉爽黑暗的地方储存很长时间。

15 当标记物是酶时可用其底物如有必要外加显色剂检测其活性。当酶为过氧化氢酶时，可用 H₂O₂ 作底物，用 2,2'-连氮-双-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸]铵盐(ABTS)、5-氨基水杨酸、邻苯二胺、4-氨基安替比林(4-aminoantipyrine)、或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺等作显色剂。当酶为碱性磷酸酶时，可用邻硝基苯磷酸、对硝基苯磷酸等做底物。当酶用 β-D-半乳糖苷酶时，可用荧光素二-(β-D-半乳糖吡喃糖苷)、4-甲基伞形基(umbelliferyl)-β-D-半乳糖吡喃糖苷等作底物。本发明还包括用于 Meg-4 的免疫试分析剂，其中包含标记的或固定化的单克隆或多克隆抗体，本发明进一步包括含有该试剂和用于检测标记物的指示剂以及对照样品的试剂盒等。

20 任何生物样品，如体液，例如血浆、血清、血液、尿、组织液或脑脊液等，只要其中含有 Meg-4 或其前体或片段，就都可以作为样品来检测本发明的 Meg-4。

25 另外，本发明涉及转基因非人脊椎动物，其中 Meg-4 基因的表达水平已改变。在此，Meg-4 基因包括编码 Meg-4 的 cDNA、基因组 DNA、或合成 DNA。基因表达既包括转录阶段也包括翻译阶段。本发明的转基因动物可用于研究 Meg-4 的功能和表达调控，阐明人类肾小球膜细胞相关疾病的发展机制，并且开发疾病模型动物以用于药物的筛选和安全性测试。

30 在本发明中，通过在一些控制 Meg-4 基因正常表达的重要位点(增强子，启动子，内含子，等)引入突变如缺失、取代、插入等，可以修饰 Meg-4 基因以便和原始基因相比人为地增加或降低其表达水平。这样的修饰改变了

Meg-4 基因的转录。另一方面，通过删除外显子的一部分、或通过编码区引入点突变而用终止密码子代替某一密码子，可以修饰蛋白的翻译。这样的突变可以采用已知的方法引入，以得到转基因动物。

5 转基因动物的含义，狭义上讲，是指通过基因重组将外源基因人工导入了生殖细胞中的动物，广义上讲，是指在动物发育的早期将外源基因稳定地导入了其染色体中的动物，该基因可作为基因型遗传给其后代，包括其中特定基因的功能被反义 RNA 抑制了的反义转基因动物、通过使用胚胎干细胞(ES 细胞)将其中特定基因剔除了的动物、以及引入了点突变 DNA 的动物。此处使用的转基因动物包括除人之外的所有脊椎动物。

10 转基因动物可通过下列方法制备：包括将基因与卵细胞混合并用磷酸钙处理该混合物的方法，在相差显微镜下用微量移液器将基因直接注射入前核卵细胞的细胞核中的显微注射法(显微注射法，美国专利 4,873,191)，以及使用胚胎干细胞(ES 细胞)的方法。其他方法包括，例如，将基因插入到逆转录病毒载体中以感染卵细胞的方法和将基因通过精子导入卵细胞中的精子载体法。精子载体法是基因重组的方法，其中通过吸附外源基因将外源基因导入精子中或通过电穿孔等将外源基因掺入精细胞中，然后再与卵细胞受精(M. Lavitranoet 等，细胞，57，77，1989)。

20 可以使用体内位点特异的基因重组，如噬菌体 P1 的 cre/loxP 重组酶系统、酿酒酵母的 FLP 重组酶系统。利用逆转录病毒将目标蛋白的转基因导入非人动物的方法已有报道。

25 转基因动物可以通过显微注射制备，例如，以下列方式。提供一个转基因，其基本上包括了调节表达的启动子、编码特定蛋白的基因和 poly(A)信号。应该确认所有谱系的表达模式和水平，因为特定分子的表达模式和水平取决于启动子的活性。根据待导入的转基因的拷贝数量和其在染色体中的导入位点，制备各谱系不同的转基因动物。当已知表达水平随非编码区和剪接而变化时，可以在 poly(A)信号上游导入待剪接的内含子序列。在导入受精卵时，使用尽可能纯的基因是很重要的。使用的动物包括用于收集受精卵的小鼠(5 至 6 周龄)、用于交配的雄性小鼠、假孕雌性小鼠、结扎了输精管的雄性小鼠，等。

30 为有效地得到受精卵，可用促性腺素等诱导排卵。收集受精卵，用注射移液器通过显微注射将基因注入卵细胞的雄性前核中。制备用于将处理过的

卵细胞返回到输卵管中的动物(假孕雌性小鼠, 等), 每一个个体移植大约 10 至 15 个卵细胞。可通过如下方法确认新生小鼠中导入了转基因: 从新生小鼠的尾尖提取基因组 DNA, 通过 Southern 印迹或 PCR 法检测转基因, 或通过阳性克隆的方法, 其中, 插入了只能经同源重组才被激活的标记基因。通过 Northern 印迹或反转录 PCR 方法检测来源于转基因的转录产物, 可以确认转基因的表达。用蛋白特异的抗体通过 Western 印迹法也可以检测。

制备本发明的基因剔除小鼠, 以便失去 Meg-4 基因的功能。剔除小鼠的意思是用同源重组技术使特定基因的功能消失, 造成该基因的破坏, 以此来阐明其功能的转基因小鼠。通过用 ES 细胞进行同源重组、并选择其中一个等位基因被修饰和破坏的 ES 细胞, 可以制备基因剔除小鼠。例如, 将基因操作的 ES 细胞注射入胚泡中或受精卵的 8 细胞胚胎中, 得到同时含有来源于 ES 细胞和胚胎的细胞的嵌合小鼠。通过嵌合小鼠(嵌合意味着包含有来源于两个或多个受精卵的体细胞的个体)和正常小鼠的交配, 可以制备其中一个等位基因的全部都被修饰或损坏的杂合小鼠。杂合小鼠互相交配可产生纯合小鼠。本发明的转基因动物既包括杂合子也包括纯合子。

同源重组意味着两个核苷酸序列相同或极其相似的基因之间通过遗传重组的机制发生的重组。带有同源重组的细胞可以用 PCR 选出。同源重组可以通过进行 PCR 确认: 用被插入的基因的一部分序列以及该基因预期插入的染色体区域的部分序列作为引物, 检测产生扩增产物的细胞。ES 细胞表达的基因中的同源重组可以容易地用已知方法或其改进方法进行筛选, 例如, 将新霉素抗性基因连接到被导入的基因上, 使导入后的细胞具有新霉素抗性。

附图简述

图 1 显示了通过 PSORT II(PSORT 的 WWW 服务器: <http://psort.nibb.ac.jp:8800/>)进行关于 Meg-4 的基序搜索的结果概要。图中标明了 DNA 的碱基而使翻译起始点位置为 1。

图 2 是显示用 Meg-4 肽的抗体进行 Western 印迹分析的结果的照片。每一泳道对应下列抗原。M 表示分子量标记物。

泳道 1, 表达 MBP(抗 Meg-4 肽的 IgG)的大肠杆菌的细胞裂解物;

泳道 2, 表达 MBP- Meg-4(抗 Meg-4 肽的 IgG)的大肠杆菌的细胞裂解物;

泳道 3, 表达大肠杆菌的细胞裂解物(正常兔 IgG);

泳道 4, 表达 MBP-Meg-4(正常兔 IgG)的大肠杆菌的细胞裂解物;

图 3 是显示用 Meg-4 cDNA 作探针通过 FISH 法进行染色体分析的结果的荧光显微摄影照片。图中用白色箭头指示的是用 Meg-4 cDNA 检测到的信号。

图 4 是显示 10p11.23-12.1.位置的核型模式图, Meg-4 基因位于所述位置中。所有核型模式图都基于国际命名法。

实施发明的最佳模式

10 本发明参考以下实施例详细说明, 但不应理解为其仅限于此。

实施例 1: 人肾小球膜细胞的原代培养

人肾脏肾小球膜细胞由从 58 岁男性切除的正常人肾中分离。在无菌条件下分离肾皮质, 切碎, 用几个筛网过滤。所用筛网的孔径逐步递减, 洗涤被孔径为 75 到 200 μm 的筛网捕获的肾小球并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 用 100 $\mu\text{g/ml}$ 的胶原酶 (Washington Biochemical) 孵育 20 分钟。洗涤后, 将肾小球重悬于含有 25mM HEPES、10% Nu-血清(Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)和抗生素(10 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素、链霉素和二性霉素 B)的培养基 199(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)中, 再于 5% CO_2 的培养箱中培养。在第三代, 根据一系列标准鉴定肾小球膜细胞, 例如典型的形态学特征, 对胰蛋白酶、嘌呤霉素和 D-缬氨酸的抗性, 肌动蛋白(Zymed Laboratories, San Francisco, CA)、抗极晚期抗原(VLA)-1,3,5(Immunotech)免疫染色阳性, VIII 因子免疫染色阴性(Dako, CA)。

实施例 2: 从培养的人肾小球膜细胞分离 mRNA

在第六代, 用异硫氰酸胍(GTC)法从人肾小球膜细胞中分离总 RNA。将实施例 1 中含血清的细胞培养液中肾小球膜细胞的融合培养物用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 再溶解于 5.5mM 的 GTC 溶液中。使其通过 18 号规格的针以去除 DNA。以 5,000 $\times g$ 离心 90 秒, 沉淀细胞核和其他细胞碎片。将上清液小心加到三氟乙酸铯(CsTFA)层上, 以 125,000 $\times g$ 在 15 $^{\circ}\text{C}$ 离心 24 小时。将 RNA 沉淀物溶于 TE 缓冲液中。用 oligo dT 纤维素柱(Pharmacia)分离 poly(A)⁺ RNA。

实施例 3: 3' 导向的 cDNA 文库的构建

用基于 pUC19 的载体引物(Norrande J.等, 基因, 26, 101-106, 1983), 以 poly(A)⁺ RNA 作模板,合成 cDNA。这一载体 DNA 引物包括带有 T 尾(tale)的 *HincII* 端和 *PstI* 端,以及在 *MboI* 位点(GATC)的甲基化坝(dam-methylated)。合成第二条链以后,分别用 *MboI* 和 *BamHI* 消化该 cDNA 序列以及
5 所述载体中 LacZ 基因的单一 *BamHI* 位点,并且用低 DNA 浓度进行环化和连接。用一部分连接混合物转化大肠杆菌。随机选择得到的转化体并通过简单地加热使每一转化体独立溶解。用 pUC19 克隆位点两翼的引物(5' - TGTAACACGACGGCCAGT-3' /SEQ ID NO: 3 和 5' - ACCATGATTACGCCAAGCTTG-3' /SEQ ID NO: 4), 通过成对 PCR 扩增
10 cDNA 的插入序列。得到的短的双链 DNA 用于循环测序反应,并用自动测序仪分析。

实施例 4: 肾小球膜细胞中特异表达的基因的分离

为了确定在肾小球膜细胞中特异表达的基因,本发明进行了大规模 DNA 测序,并用计算机进行了数据处理。同时比较了各种不同细胞和器官中的转录物(Y. Yasuda 等, Kidney International 53: 154-158, 1998; K. Matsubara 等, 基因 135, 265(1993); K. Okubo 等, Nat. Gen. 2, 173(1992))。进行培养
15 的人肾小球膜细胞的 3' -结构域 cDNA 的大规模 DNA 测序,测定随机挑选的 1836 个克隆的部分序列。比较不同克隆之间的序列同源性,并进一步用 FASTA 程序与 DNA 数据库 GenBank 中的序列比较。用斑点印迹分析不同器官和细胞中的 mRNA,以选择在肾小球膜细胞中特异表达的克隆。结果,获得了一些在肾小球膜细胞 cDNA 文库中以极高频率检测到的克隆。
20

实施例 5: 人肾小球膜细胞 λ ZIPLox cDNA 文库的筛选

从根据实施例 2 制备的完整 mRNA 中,用 oligo (dT)引物和随机引物合成 λ ZIPLox cDNA 文库。用商业化的 λ ZIPLox(Gibco BRL, λ ZIPLox EcoR I Arms)合成该文库。在该 λ ZIPLox cDNA 文库中筛选实施例 4 所得、在肾小球膜细胞 cDNA 文库中能以较高频率检测到的特定克隆,所用探针为其插入序列。通过双脱氧终止法测定阳性克隆(2 个克隆)中插入的基因片段的核苷酸序列。
25

序列测定结果显示,所分离的两个克隆中,一个包含 ORF 的一部分和
30 3' UTR-poly(A),另一个包含 ORF 的一部分和 5' UTR。两个核苷酸序列有互相重叠的区域,而且通过排列对照,可以确定 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序

列是该 cDNA 的核苷酸序列。在该 cDNA 核苷酸序列中，估计基于最长 ORF 的 773 个氨基酸残基为该基因产物的推导氨基酸序列。本发明人将含有此氨基酸序列的蛋白命名为 Meg-4。

实施例 6：肾小球膜特异性基因的功能分析(1)

5 用 SwissProt 数据库，以 FASTA 程序进行的氨基酸同源性搜索证实，该 Meg-4 蛋白是新蛋白。小鼠 ATP-MP 被确定为其同源蛋白。Meg-4 和 ATP-MP 有 89.8% 的氨基酸序列同源，有 81.7% 的 cDNA 核苷酸序列同源。另外，在 Meg-4 中，58 个氨基酸残基(56-155)被插入到相当于 ATP-MP 的氨基酸 55-58 位的位置上。可推测 ATP-MP 是小鼠中的 Meg-4 同源体。

10 其次，对 Meg-4 的氨基酸序列进行了基序搜索。用 PSORT WWW 服务器(<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>)进行该搜索。搜索结果概述于图 1 中。如图 1 所示，已证明 Meg-4 包含 AAA 蛋白家族的一个基序(Patel, S., Latterich, M., 细胞生物学动态(Trends in Cell Biol.), 1998, 8: 65-71)。具体地，已证实在下列位置存在 AAA 蛋白家族的共同基序。

- 15 379-386：ATP 结合基序
 476-494：最小 AAA 蛋白基序
 434-438：步行者 B 基序
 600-603：Zn 结合基序

20 另外，根据这些事实，可证实上述推导的氨基酸序列是 Meg-4 的氨基酸序列。

AAA 蛋白的特异性 AAA 基序是存在于许多物种间的保守氨基酸序列，例如植物、细菌、以及哺乳动物。由此，可以推测，AAA 蛋白家族是具有维持基本细胞功能的重要功能的蛋白。因此，具有如上所述特征的 Meg-4 在肾小球膜细胞中高度表达这一事实表明，该蛋白在保持肾细胞的形态和功能方面具有重要作用。

25 同时，在肾脏的肾小球膜细胞中产生几种蛋白酶，并且这些蛋白酶被认为部分地负责细胞的功能。从其基因结构的特点判断，Meg-4 有可能具有蛋白酶活性。这也表明，Meg-4 可能与肾脏肾小球膜细胞的生理和疾病状况的生理有很大关联。

30 虽然有报道线粒体金属蛋白酶(Casari G.等，细胞，1998，93：973-983)是人中 AAA 蛋白的一个实例，但是除了 AAA 蛋白基序以外，它和 Meg-4

几乎没有同源性。也有报道来源于原核细胞(大肠杆菌)的 FtsH(Santos 和 Almeida, 细胞生物学杂志 1975, 124:1502-1507)和分离于酵母(酿酒酵母)的 YME1(Thorsness, P. E., 分子细胞生物学 1993, 5418-5426)是 AAA 蛋白。可以认为 Meg-4 可能是人中这些蛋白的其中一个同源体。然而, 除了 AAA 基
5 序外, 没有发现和这些蛋白中任何一个同源的氨基酸序列。

实施例 7: Meg-4 的功能分析(2) - 组织分步

按如下所述进行 Meg-4 的 Northern 印迹分析。通过随机 DNA 标记, 用 RI 标记 3' 导向的 cDNA 文库(实施例 3)的阳性克隆插入片段, 并将其作为
10 探针。从下述用作样品的细胞中分离 poly(A)⁺ RNA(2 μg), 并通过含有 2.2M 甲酰胺的琼脂糖凝胶分离, 再转移到硝酸纤维素滤膜上。滤膜在快速 Hyb 溶液 (Amersham, Arlington Heights, IL) 中杂交。杂交后, 用 0.1 × SSPE/0.1%SDS、60℃ 的最终严谨度洗涤滤膜。

用于多种人原代培养细胞和组织的 Northern 印迹分析的样品, 以及用于人癌细胞系 Northern 印迹分析的样品, 购自 Clontech(Palo Alto, CA)。作为原
15 代培养细胞的样品, 使用了 2 μg 来自肾小球膜细胞、人皮肤上皮细胞、人肾皮质上皮细胞、人脐静脉内皮细胞以及人平滑肌细胞的原代培养细胞的 poly(A)⁺ RNA。对于人癌细胞系的 Northern 印迹分析, 使用了来源于前髓细胞性白血病 HL-60、HeLa 细胞 S3、慢性髓样白血病 K-562、淋巴瘤细胞性白血病 MOLT-4、伯基特淋巴瘤 Raji、大肠腺癌 SW480、肺癌 A549、黑素瘤 G361 的 2 μg poly(A)⁺ RNA 作为样品。对于组织的 Northern 印迹分析,
20 使用了 2 μg 来自心、脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾和胰腺的 poly(A)⁺ RNA 作为样品。杂交和洗涤按如上所述进行。结果显示于表 1-3 中。

表 1

原代培养细胞	
肾小球膜细胞	+++
人皮肤上皮细胞	++
人肾皮质上皮细胞	+
人脐静脉内皮细胞	±
人平滑肌细胞	±

表 2

人癌细胞系	
前髓细胞性白血病 HL-60	±
HeLa 细胞 S3	+
慢性髓样白血病 K-562	+
淋巴母细胞性白血病 MOLT-4	±
伯基特淋巴瘤 Raji	-
大肠腺癌 SW480	+
肺癌 A549	+
黑素瘤 G361	-

表 3

人组织	
心	+
脑	+
胎盘	+
肺	±
肝	±
骨骼肌	++
肾	+
胰腺	+

5 在用 Meg-4 cDNA 作探针的 Northern 印迹分析中,在培养的肾小球膜细胞中发现了单一的转录产物(大约 4kb)。比较不同组织,在如人肾、心、脑、胎盘、骨骼肌和胰腺等组织中观察到表达,肺和肝中的表达较弱,但是已证实肾小球膜细胞中的表达水平特别高。在培养的癌细胞系中没有观察到显著的表达。

10 实施例 8: Meg-4 表型分析

实施例 6 指出了本发明的 Meg-4 是大肠杆菌 FtsH 和酵母 YME1L(已报

道它们是 AAA 蛋白)的人类同源体的可能性。然而,发现在该申请递交后作为 FtsH 的人类对应物而报告的氨基酸序列(AF070656)始于 Meg-4 中 225 位的甲硫氨酸。而且,在 3' 端中翻译框架已发生移动。此外,与该申请提交后报告的、对应于小鼠 FtsH 氨基酸序列中 55-58 位的 sse-PV-Inlr 区相比,本
5 发明的 Meg-4 显示 59 个氨基酸的插入和置换, sse-(59 个氨基酸的插入和置换)-Inlr。基于这样的信息,尝试人类中分离 Meg-4 的表型。

即,用在实施例 5 中得到的人肾小球膜细胞 λ ZIPLox cDNA 文库作模板,用下列引物组,通过 PCR 法扩增 cDNA。引物组设计成可以扩增编码 Meg-4 氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)中 56-116 位的核苷酸序列。

10 有义引物(5' 端)

5' -atgttttct tgtcgagcac ggtgcaaccc c-3' /SEQ ID NO: 5

反义引物(AS754)

5' -tctcggaggt agactggaga cgtcgtgtcc t-3' /SEQ ID NO: 6

结果证实在所得扩增产物中存在由 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列构成的
15 cDNA。推导出的由该核苷酸序列编码的氨基酸序列显示于 SEQ ID NO: 8 中。在 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列中,与 Meg-4 的 56-116 位的区域对应的氨基酸序列是 sse-PS-Inlr。另外,在本申请提交后报告的人 YME1L(编码 ATP-依赖性金属蛋白酶 YME1L 的人 mRNA)的氨基酸序列(AJ132637)和 SEQ ID NO: 2 显示的 Meg-4 有 98.3% 的序列同源性,并显示对应于 SEQ ID NO: 8 中
20 55-58 位的氨基酸序列是 sse-PS-Inlr。概括这些发现,这一系列氨基酸序列间的关系可显示如下。

SEQ ID NO: 2(Meg-4)	sse-... 59aa... -Inlr
鼠 FtsH	sse- PV -Inlr
SEQ ID NO: 8(Meg-4 表型)	sse- PS -Inlr
25 人 YME1L(AJ132637)	sse- PS -Inlr

根据上面内容,可以假定本发明的 Meg-4 有类似于 YME1L 的功能。

实施例 9: 针对 Meg-4 的合成肽的多克隆抗体的产生

用与 AAA 家族其它蛋白具有低同源性并具有亲水性的区域作为抗原,制备针对 Meg-4 的多克隆抗体。通过固相肽合成法,制备在 N 末端或 C 末端有半胱氨酸而且有如下所示的氨基酸序列的肽。
30

距离 N 端的位置 氨基酸序列

每一个合成的肽和佐剂(Difco)都充分混合, 乳化, 对兔子皮下给药。一旦开始(20 μ g/个体), 在开始 3 周后进行另外 4 次免疫(50 μ g/个体), 其后每两周免疫一次(50, 100, 200 μ g/个体)。关于佐剂, 第一次免疫用完全弗氏佐剂, 第二次及其后的免疫用不完全弗氏佐剂。为了证实从 41 和 55 天后收集的血液得到的血清与所述合成肽发生反应, 用酶联免疫吸附试验(ELISA)评估血清的抗体滴度。准向包被有 50ng/孔抗原的 96 孔板的每孔中加入 100 μ L 连续稀释的抗血清以进行第一反应, 洗涤, 用 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG(Cappel Product)进行第二反应。洗涤后, 加入邻苯二胺(Wako Pure Chemical Industries)作为底物进行显色, 测量 492nm 处的吸光值, 其证实了抗体滴度的增加。

实施例 10: 抗 Meg-4 合成肽的多克隆抗体的纯化方法

按照下列已知方法(Saibou Kougaku Bessatsu (细胞生物技术增刊卷)试验方案系列 (Experimental Protocol Series), 抗肽试验方案 (Anti-Peptide Experiment Protocol), Shujun-sha)通过亲和层析纯化抗 Meg-4 合成肽的多克隆抗体。试验方案如下。

PBS(-)稀释的、因 Meg-4 免疫已提高了抗体滴度的兔血清的纯化, 可以在用于 IgG 纯化的蛋白 G 柱上通过亲和层析完成。所得纯化抗体以 Western 印迹分析检测其与 Meg-4 蛋白偶联型蛋白的反应, 从而证明其对 Meg-4 的特异性(实施例 11)。

实施例 11: 兔抗 Meg-4 肽的多克隆 IgG 活性的检测

用 MBP-Meg-4 和只表达 MBP 的大肠杆菌裂解液作为抗原, 证实了免疫原为 Meg-4 肽的兔 IgG 的活性。MBP-Meg-4 按如下制备。根据 SEQ ID NO: 1 所示 MEGSIN 基因的核苷酸序列, 通过 PCR 扩增编码区。将该扩增产物插入麦芽糖结合蛋白偶联的蛋白表达载体 pMAL-c(New England Biolab)中, 产生了表达由 MBP 和 MEGSIN 蛋白形成的偶联蛋白的载体。用该载体转化大肠杆菌, 其细胞裂解液用作 MBP-Meg-4。

用同样量的样品缓冲液(0.25% Tris-HCl, 2% SDS, 30%甘油, 10% β -巯基乙醇, 0.025%溴酚蓝)处理每一种蛋白溶液并且在 100 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟, 得到样品。用胶浓度为 4-20%的梯度胶(Daiichi Chemicals)通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(Laemmli, U.K., 自然, 1970, 227: 680-685)分离所

得样品。

通过用印迹缓冲液(25mM Tris-HCl, 192 mM 甘氨酸, 20% 甲醇, pH 8.3) 在恒定电压 100V 下处理 1 小时, 将通过 SDS-PAGE 分离的蛋白印迹到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(BioRad)上。用蒸馏水洗涤印迹后的 PVDF 膜, 使其在含 5%Block Ace 溶液的 TTBS 中封闭 3 小时。然后, 用 TTBS(20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05%吐温 20, pH 7.5)洗涤 PVDF 膜, 在 4℃ 与兔多克隆抗 Meg-4 肽 IgG 溶液反应过夜, 后者是用 TTBS 稀释的第一抗体。随后, 用放大的碱性磷酸酶免疫印迹试剂盒(Amplified Alkaline Phosphatase Immune Blot Kit)(Biorad)进行检测。换句话说, 在室温与用 TTBS 稀释的标记有生物素的山羊抗兔 IgG 孵育 1 小时后, 使其通过在室温与链亲和素-生物素标记的碱性磷酸酶孵育, 而与预先制备好的链亲和素-生物素标记的碱性磷酸酶复合物反应 1 小时。通过用 TTBS 洗涤 PVDF, 并使其和底物(氮蓝四唑和 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐, 对甲苯胺盐溶液)在室温孵育大约 30 分钟, 使得可观察到结合于第一抗体上的该抗体。通过与蒸馏水完全反应而终止该反应。

结果示于图 2 中。用实施例 10 所得本发明的多克隆抗 Meg-4 抗体证实了对应于 MBP-Meg-4 的带。因此表明, 该多克隆抗体是特异性识别 Meg-4 的抗体。

实施例 12: 用 FISH 法分析 Meg-4 基因在染色体上的定位

通过缺口翻译法, 将克隆 F960 的 DNA 用地高辛配基偶联的 dUTP 标记。克隆 F960 是通过用 Meg-4 特异性探针筛选人基因组 Bac(细菌人工染色体)文库得到的阳性克隆。用于 Bac 文库筛选的 Meg-4 特异性探针是对应于 ZIPLox cDNA 克隆中 Kpn-I/Sca I 消化区段的片段, 该克隆包含 cDNA 的 5' 区(0-644 个核苷酸)作为插入子。

标记的探针用消化的人 DNA 处理, 随后, 与正常的中期相人染色体杂交。人染色体通过使 PHA 刺激的外周血淋巴细胞在含有 50%甲酰胺、10%硫酸葡聚糖和 2×SSC 的溶液中处理而得到。通过用 DAPI 复染、并随后与结合有荧光素的抗地高辛配基的抗体反应可检测杂交信号。

通过该试验, 在 C 组染色体短臂观察到特征性信号, 根据该染色体的大小、特征形态以及带型, 可认为该染色体为 10 号染色体(图 3)。

随后, 对定位于 10q22(长臂)的匿名探针、10 号染色体的中心粒特异性探针和克隆 F960 共染色。该试验可以比较特异于长臂和短臂的信号。根据

使用 10 号染色体特异的探针 10 的分析, F960 定位于染色体 10p 上从中心粒到端粒的 23% 位置处。该区对应于 10p11.23-12.1。在所分析的 80 个中期相细胞中, 75 个显示了特异于 F960 的信号。

5

产业实用性

本发明提供了在肾小球膜细胞中以高频率表达的 DNA、该 DNA 编码的蛋白以及结合该蛋白的抗体等。据推测它们与肾小球膜细胞特异的生物活性紧密相关, 而且可用于, 例如, 鉴定肾小球膜细胞以及检测肾小球膜细胞中的异常。而且, 该蛋白有助于阐明肾小球膜细胞的功能, 并依次研究涉及肾小球膜细胞的疾病的原因。预计本发明可用于涉及肾小球膜细胞的疾病的治疗和诊断。

具体地, 例如通过人工调节 Meg-4, 可以调整肾小球肾炎的发作或进展。另外, 体液和肾小球膜细胞中 Meg-4 的 mRNA 和蛋白的定量, 能够诊断肾脏疾病如肾小球肾炎。在肾小球肾炎中, 可以在肾小球膜区看见功能异常, 导致肾小球膜细胞的增殖或从这些细胞加速生成基质。Meg-4 涉及这些疾病的可能性很大。

本发明人先前已报告过, 本发明的 Meg-4 和 MEGSIN 在肾小球膜细胞中高水平表达方面具有共同特征。但是, 本发明的 Meg-4 据认为属于 AAA 蛋白家族的 ATP-MP 组, 而 MEGSIN 是与 SERPIN 超家族同源的蛋白, 该家族为蛋白酶抑制剂。另外, 观察到本发明的 Meg-4 在多种组织中表达, 这与 MEGSIN 的特点不同, 后者在肾小球膜细胞中特异性表达。因此, 本发明的 Meg-4 可能是支持肾小球膜细胞功能的重要蛋白。本发明因阐明了这类重要蛋白的存在而具有重大意义。

序列表

<110> MIYATA, TOSHIO
KUROKAWA, KIYOSHI

<120> Meg-4 蛋白

<130> KRK-001PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-021543

<151> 1999-01-29

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3941

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```
ctatagggaa agctgggtacg cctgcaggta cgggtccgga aattcgggc cgcgtcgacg 60
ggtagggtcg ctgagggccc gccgggggtg aggtcgctga gggcccgccg gagatgtttt 120
ccttgctgag cacgggtgcaa cccagttta cagttcctct gagtcctctc atcaatgcct 180
tccatacacc aaaaaacact tctgtttctc tcagtgagtg gtcagtttct caaaaccagc 240
atcgagatgt agttcctgag catgaggctc ccagcagtg gtagtatgtc agtgacttcc 300
tgacgaagct taacattgtt tcaatcggea aaggaaaaat attcgaaggg tacagatcca 360
tgttcatgga gccagcaaaa aggatgaaga agagcttggg cacaaccgat aactggcaca 420
tccgtccaga acccttctcc ctctcaatcc ctcttctact taacttaagg gaccttggat 480
tatctgaatt aaaaattgga cagattgatc agctggtaga aaatctactt cctggatttt 540
gtaaaggcaa aaacatttct tcccattggc atacatcca tgtctctgca caatccttct 600
ttgaaaataa atatggtaac ttagatata ttagtacatt acgttctctc tgcttgtatc 660
gacatcattc aagagctctt caaagcattt gttcagatct tcagtagtgg ccagttttca 720
tacagtctcg gggttttaaa actttgaaat caaggacacg acgtctccag tctacctccg 780
agagattagc tgaacacag aatatagcgc catcattcgt gaaggggttt cttttgcggg 840
acagaggatc agatgttgag agtttgaca aactcatgaa aaccaaaaat atacctgaag 900
ctcaccaaga tgcatttaaa actggttttg cggaagggtt tctgaaagct caagcactca 960
cacaaaaaac caatgatcc ctaaggcgaa cccgtctgat tctcttcggt ctgctgctat 1020
tcggcattta tggacttcta aaaaacccat ttttatctgt ccgcttccgg acaacaacag 1080
ggcttgattc tgcagtagat cctgtccaga tgaaaaatgt cacctttgaa catgttaaag 1140
gggtggagga agctaaacaa gaattacagg aagttgttga attcttgaaa aatccacaaa 1200
```

aatttactat tcttggaggt aaacttccaa aaggaattct tttagttgga cccccaggga 1260
ctgaaaagac acttcttgcc cgagctgtgg cgggagaagc tgatgttctt ttttattatg 1320
cttctggatc cgaatttgat gagatgtttg tgggtgtggg agccagccgt atcagaaatc 1380
tttttaggga agcaaaggcg aatgctcctt gtgttatatt tattgatgaa ttagattctg 1440
ttggtgggaa gagaattgaa tctccaatgc atccatattc aaggcagacc ataaatcaac 1500
ttcttctgta aatggatggt tttaaaccca atgaaggagt tatcataata ggagccacaa 1560
acttcccaga ggcattagat aatgccttaa tacgtcctgg tctttttgac atgcaagtta 1620
cagttccaag gccagatgta aaaggtcgaa cagaaatctt gaaatggtat ctcrataaaw 1680
taaagtttga tcaatccgtt gatccagaaa ttatagctcg aggtactgtt ggcttttccg 1740
gagcagagtt ggagaatctt gtgaaccarg ctgcattaaa agcagctgtt gatggaaaag 1800
aatggttac catgaaggag ctggagttt ccaaagacaa aattctaatt gggcctgaaa 1860
gaagaagtgt ggaattgat aacaaaaaca aaaccatcac agcatatcat gaatctggtc 1920
atgccattat tgcatattac acaaaagatg caatgcctat caacaaagct acaatcatgc 1980
cacgggggccc aacgcttgga catgtgtccc tgttacctga gaatgacaga tggaatgaaa 2040
ctagagccca gctgcttgca caaatggatg ttagtatggg aggaagagtg gcagaggagc 2100
ttatatttgg aaccgacctt attacaacag gtgcttccag tgattttgat aatgccacta 2160
aaatagcaaa gcggatggtt accaaatttg gaatgagtga aaagcttgga gttatgacct 2220
acagtgatac agggaaacta agtccagaaa cccaatctgc catcgaacaa gaaataagaa 2280
tccttctaag ggactcatat gaacgagcaa aacatatctt gaaaactcat gcaaaggagc 2340
ataagaatct cgcagaagct ttattgacct atgagacttt ggatgcaaaa gagattcaaa 2400
ttgttcttga ggggaaaaag ttggaagtga gatgataact ctcttgatat ggatgcttgc 2460
tggttttatt gcaagaatat aagtagcatt gcagtagtct acttttaca cgctttcccc 2520
tcattcttga tgtagtgtaa ttgaagggtg tgaatgctt tgtcaatcat ttgtcacatt 2580
tatccagttt gggttattct cattatgaca cctattgcaa attagcatcc catggcaaat 2640
atattttgaa aaaataaaga actatcagga ttgaaaacag ctcttttgag gaatgtcaat 2700
tagttattaa gttgaaagta attaattgatt ttatgtttgg ttactctact agatttgata 2760
aaaattgtgc ctttagcctt ctatatacat cagtggaaac ttaagatgca gtaattatgt 2820
tccagattga ccatgaataa aatatttttt aatctaaatg tagagaagtt gggattaaaa 2880
gcagcctcgg aaacacagag ccaggaatat agccttttgg catggtgcca tggctcacat 2940
ctgtaatccc agcacttttg gagctgagg cgggtggatt gcttgaggcc aggagttcga 3000
gaccagcctg gccaacgtgg tgaacgctg tctctactaa aatacaaaaa aatagggctg 3060
ggcgcggttg ctcacgcctg taatcccagc acttttcaga ggccaaggcg ggcaaatcac 3120
ctgagggtcaa gagtttgaga ccagcctggc caacatgggtg aaaccccatc tctactaaac 3180
atgcaaaaat tacctgggca tgggtggcagg tgcttataat cccagctact ctgggggcca 3240
aggcaggaga attgcttgag cctgggagat ggaggttgca gtgagctgag atcatgccac 3300
tgcactccag cctgggcaac agagcaagac tctgcctcaa aaaaaaatta aaataaattt 3360
aaatacaaaa aaaaatagcc aggtgtgggg tgcatgcctg gaatcccagc tacttgagag 3420
gctgaggcac gagaattgct tgaaccagg aggtggaggt tgcagtgagc caagatcaca 3480
ggagccactg cactccagcc tgggtgacag agtgagactc tgtctcaaaa aaaaaattaa 3540
ataaattatt ataaccttcc agaaatgctg tgtgcatttt catgttcttt tttttagcat 3600
tactgtcact ctccctaatg aatgtactt cagagaagca gtattttgtt aaataaatac 3660
ataacctcat tctgaataat gtccctcatt ttgactataa ctgtgcttgg tttcaaaagc 3720
aaaattaaac aaaaatctca gtcccctccg aagtgaactt tgtgttacc tgcgtcagaa 3780
atgccaaagt gtgtttactt ttcattcaga ttttgtgaat atgaacatgc tgttatagga 3840
tctacagatg aatatttaac tcaatagaaa aattatttta gaacacattg tattggtatt 3900

tacaaccaga ttatattctt gacgttgact tcattaaat t

3941

<210> 2

<211> 773

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Met Phe Ser Leu Ser Ser Thr Val Gln Pro Gln Phe Thr Val Pro Leu
1 5 10 15

Ser His Leu Ile Asn Ala Phe His Thr Pro Lys Asn Thr Ser Val Ser
20 25 30

Leu Ser Gly Val Ser Val Ser Gln Asn Gln His Arg Asp Val Val Pro
35 40 45

Glu His Glu Ala Pro Ser Ser Glu Cys Met Phe Ser Asp Phe Leu Thr
50 55 60

Lys Leu Asn Ile Val Ser Ile Gly Lys Gly Lys Ile Phe Glu Gly Tyr
65 70 75 80

Arg Ser Met Phe Met Glu Pro Ala Lys Arg Met Lys Lys Ser Leu Asp
85 90 95

Thr Thr Asp Asn Trp His Ile Arg Pro Glu Pro Phe Ser Leu Ser Ile
100 105 110

Pro Pro Ser Leu Asn Leu Arg Asp Leu Gly Leu Ser Glu Leu Lys Ile
115 120 125

Gly Gln Ile Asp Gln Leu Val Glu Asn Leu Leu Pro Gly Phe Cys Lys
130 135 140

Gly Lys Asn Ile Ser Ser His Trp His Thr Ser His Val Ser Ala Gln
145 150 155 160

Ser Phe Phe Glu Asn Lys Tyr Gly Asn Leu Asp Ile Phe Ser Thr Leu
165 170 175

Arg Ser Ser Cys Leu Tyr Arg His His Ser Arg Ala Leu Gln Ser Ile
180 185 190

Cys Ser Asp Leu Gln Tyr Trp Pro Val Phe Ile Gln Ser Arg Gly Phe

195	200	205
Lys Thr Leu Lys Ser Arg Thr Arg Arg Leu Gln Ser Thr Ser Glu Arg		
210	215	220
Leu Ala Glu Thr Gln Asn Ile Ala Pro Ser Phe Val Lys Gly Phe Leu		
225	230	235
Leu Arg Asp Arg Gly Ser Asp Val Glu Ser Leu Asp Lys Leu Met Lys		
	245	250
255		
Thr Lys Asn Ile Pro Glu Ala His Gln Asp Ala Phe Lys Thr Gly Phe		
260	265	270
Ala Glu Gly Phe Leu Lys Ala Gln Ala Leu Thr Gln Lys Thr Asn Asp		
275	280	285
Ser Leu Arg Arg Thr Arg Leu Ile Leu Phe Val Leu Leu Leu Phe Gly		
290	295	300
Ile Tyr Gly Leu Leu Lys Asn Pro Phe Leu Ser Val Arg Phe Arg Thr		
305	310	315
320		
Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ala Val Asp Pro Val Gln Met Lys Asn Val		
	325	330
335		
Thr Phe Glu His Val Lys Gly Val Glu Glu Ala Lys Gln Glu Leu Gln		
340	345	350
Glu Val Val Glu Phe Leu Lys Asn Pro Gln Lys Phe Thr Ile Leu Gly		
355	360	365
Gly Lys Leu Pro Lys Gly Ile Leu Leu Val Gly Pro Pro Gly Thr Gly		
370	375	380
Lys Thr Leu Leu Ala Arg Ala Val Ala Gly Glu Ala Asp Val Pro Phe		
385	390	395
400		
Tyr Tyr Ala Ser Gly Ser Glu Phe Asp Glu Met Phe Val Gly Val Gly		
	405	410
415		
Ala Ser Arg Ile Arg Asn Leu Phe Arg Glu Ala Lys Ala Asn Ala Pro		
420	425	430
Cys Val Ile Phe Ile Asp Glu Leu Asp Ser Val Gly Gly Lys Arg Ile		

435	440	445
Glu Ser Pro Met His Pro Tyr Ser Arg Gln Thr Ile Asn Gln Leu Leu		
450	455	460
Ala Glu Met Asp Gly Phe Lys Pro Asn Glu Gly Val Ile Ile Ile Gly		
465	470	475
Ala Thr Asn Phe Pro Glu Ala Leu Asp Asn Ala Leu Ile Arg Pro Gly		
485	490	495
Arg Phe Asp Met Gln Val Thr Val Pro Arg Pro Asp Val Lys Gly Arg		
500	505	510
Thr Glu Ile Leu Lys Trp Tyr Leu Asx Lys Xaa Lys Phe Asp Gln Ser		
515	520	525
Val Asp Pro Glu Ile Ile Ala Arg Gly Thr Val Gly Phe Ser Gly Ala		
530	535	540
Glu Leu Glu Asn Leu Val Asn Gln Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp		
545	550	555
Gly Lys Glu Met Val Thr Met Lys Glu Leu Glu Phe Ser Lys Asp Lys		
565	570	575
Ile Leu Met Gly Pro Glu Arg Arg Ser Val Glu Ile Asp Asn Lys Asn		
580	585	590
Lys Thr Ile Thr Ala Tyr His Glu Ser Gly His Ala Ile Ile Ala Tyr		
595	600	605
Tyr Thr Lys Asp Ala Met Pro Ile Asn Lys Ala Thr Ile Met Pro Arg		
610	615	620
Gly Pro Thr Leu Gly His Val Ser Leu Leu Pro Glu Asn Asp Arg Trp		
625	630	635
Asn Glu Thr Arg Ala Gln Leu Leu Ala Gln Met Asp Val Ser Met Gly		
645	650	655
Gly Arg Val Ala Glu Glu Leu Ile Phe Gly Thr Asp His Ile Thr Thr		
660	665	670
Gly Ala Ser Ser Asp Phe Asp Asn Ala Thr Lys Ile Ala Lys Arg Met		

675	680	685
Val Thr Lys Phe Gly Met Ser Glu Lys Leu Gly Val Met Thr Tyr Ser		
690	695	700
Asp Thr Gly Lys Leu Ser Pro Glu Thr Gln Ser Ala Ile Glu Gln Glu		
705	710	715
Ile Arg Ile Leu Leu Arg Asp Ser Tyr Glu Arg Ala Lys His Ile Leu		
725	730	735
Lys Thr His Ala Lys Glu His Lys Asn Leu Ala Glu Ala Leu Leu Thr		
740	745	750
Tyr Glu Thr Leu Asp Ala Lys Glu Ile Gln Ile Val Leu Glu Gly Lys		
755	760	765
Lys Leu Glu Val Arg		
770		

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的引物序列

<400> 3

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的引物序列

<400> 4

accatgatta cgccaagctt g

21

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的引物序列

<400> 5

atgttttcct tgtcgagcac ggtgcaaccc c

31

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的引物序列

<400> 6

tctcggaggt agactggaga cgtcgtgtcc t

31

<210> 7

<211> 499

<212> DNA

<213> 人

<400> 7

atgttttcct tgtcgagcac ggtgcaaccc cagtttacag ttctctgag tcattctcacc 60
aatgccttcc ataccacaaa aaacacttct gtttctctca gtggagtgtc agtttctcaa 120
aaccagcacc gagatgtagt tcttgagcat gaggctccca gcagtgagcc ttcacttaac 180
ttaagggacc ttggattatc tgaattaaaa attggacaga ttgatcagct ggtagaaaat 240
ctacttctcg gatcttctga aggcaaaaac atttcttccc attggcatac atcccatgtc 300
tctgcacaat ccttctttga aaataaatat ggtaacttag atatatattag tacattacgt 360
tcctcttget tgtatcgaca tcattcaaga gctcttcaaa gcatttgttc agatcttcag 420
tactggccag ttttcataca gtctcggggg tttaaaactt tgaaatcaag gacacgacgt 480
ctccagtcta cctccgaga 499

<210> 8

<211> 166

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Met Phe Ser Leu Ser Ser Thr Val Gln Pro Gln Phe Thr Val Pro Leu

1

5

10

15

Ser His Leu Ile Asn Ala Phe His Thr Pro Lys Asn Thr Ser Val Ser
20 25 30

Leu Ser Gly Val Ser Val Ser Gln Asn Gln His Arg Asp Val Val Pro
35 40 45

Glu His Glu Ala Pro Ser Ser Glu Pro Ser Leu Asn Leu Arg Asp Leu
50 55 60

Gly Leu Ser Glu Leu Lys Ile Gly Gln Ile Asp Gln Leu Val Glu Asn
65 70 75 80

Leu Leu Pro Gly Phe Cys Lys Gly Lys Asn Ile Ser Ser His Trp His
85 90 95

Thr Ser His Val Ser Ala Gln Ser Phe Phe Glu Asn Lys Tyr Gly Asn
100 105 110

Leu Asp Ile Phe Ser Thr Leu Arg Ser Ser Cys Leu Tyr Arg His His
115 120 125

Ser Arg Ala Leu Gln Ser Ile Cys Ser Asp Leu Gln Tyr Trp Pro Val
130 135 140

Phe Ile Gln Ser Arg Gly Phe Lys Thr Leu Lys Ser Arg Thr Arg Arg
145 150 155 160

Leu Gln Ser Thr Ser Glu
165

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的引物序列

<400> 9

Lys Asp Lys Ile Leu Met Gly Pro Glu Arg Arg Ser Val Glu Ile Asp
1 5 10 15

Asn Lys Asn Lys



图 2

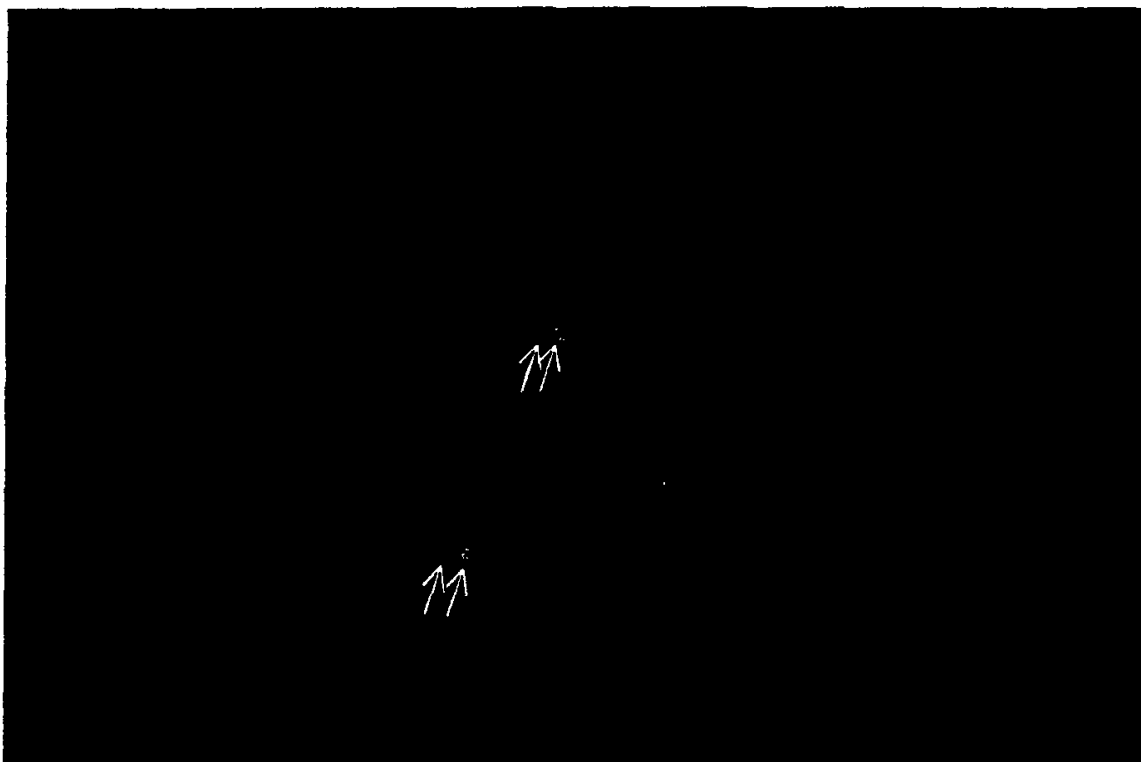
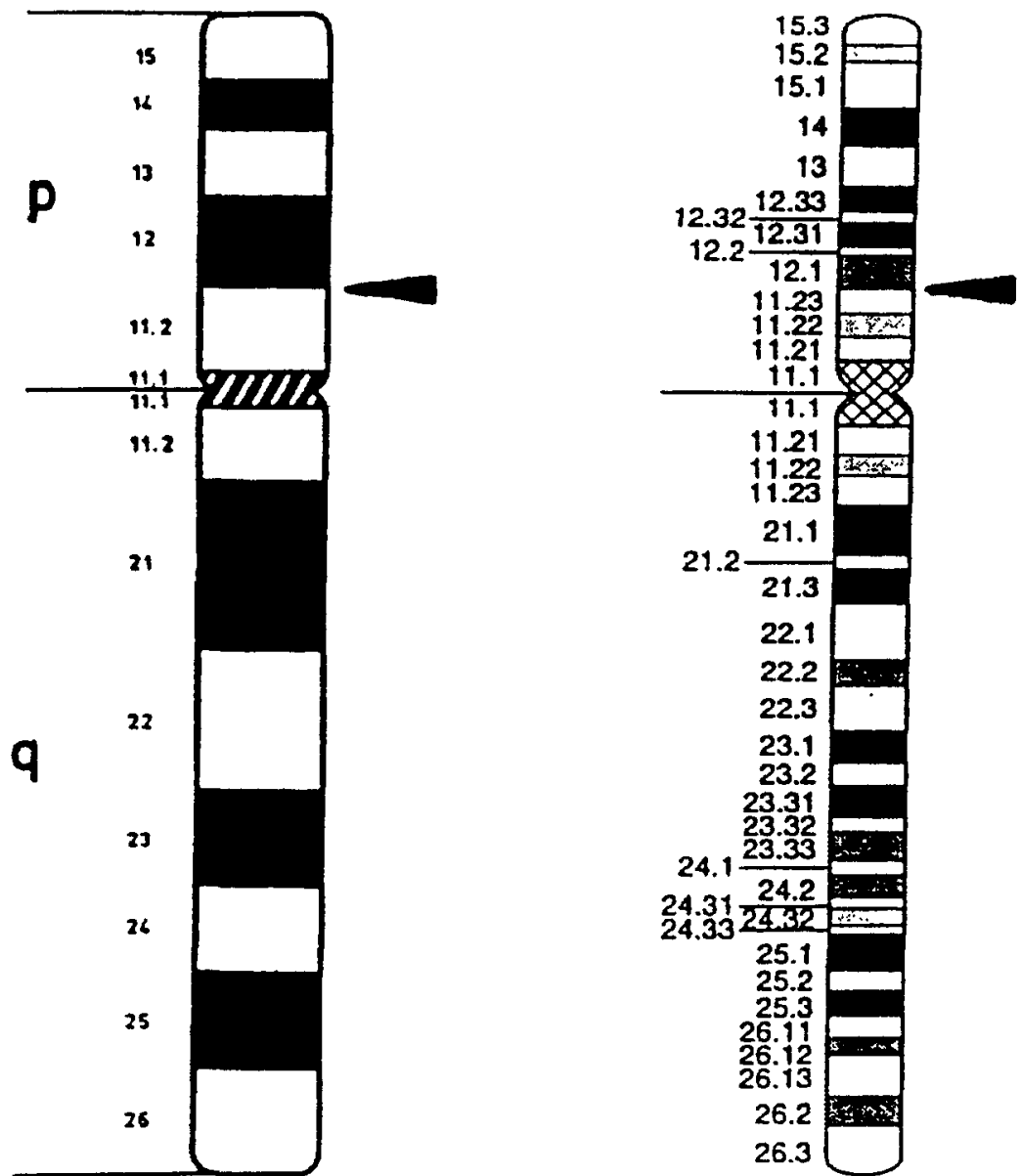


图 3



10

图 4

