

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310122654.3

C07K 14/435

C07K 14/47

C07H 21/00

C12N 15/12

C12N 15/63

C12P 21/00

A61K 38/17

[43] 公开日 2005 年 6 月 29 日

[11] 公开号 CN 1631898A

[22] 申请日 2003.12.24

[21] 申请号 200310122654.3

[71] 申请人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

[72] 发明人 王宝梅 李楠 吴艳峰 曹雪涛

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐迅

A61P 35/00 A61P 29/00 A61P 31/00

权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 3 页

[54] 发明名称 人骨髓基质细胞来源的线粒体转运蛋白分子及其编码序列和用途

[57] 摘要

本发明涉及了一种人骨髓基质细胞来源的新型线粒体转运蛋白分子 (Bonemarrow stromal cell - derived mitochondria carrier protein, HuBMSC - MCP)。本发明提供编码此蛋白分子的多核苷酸和经重组技术产生这种蛋白分子的方法。本发明还公开了编码这种新型线粒体转运蛋白分子的多核苷酸的用途。本发明还证实了 HuBMSC - MCP 可增强树突状细胞内吞作用。

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

-
1. 一种分离的人 HuBMSC-MCP 多肽，其特征在于，它包含：具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。
- 5 2. 如权利要求 1 所述的多肽，其特征在于，该多肽选自下组：
- (a) 具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽；
- (b) 将 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的，且具有增强树突状细胞内吞作用的功能的由(a)衍生的多肽。
3. 一种分离的多核苷酸，其特征在于，它包含一核苷酸序列，该核苷酸序列选自下组：
- 10 (a) 编码如权利要求 1 所述多肽的多核苷酸；
- (b) 与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。
4. 如权利要求 3 所述的多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸编码具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的多肽。
- 15 5. 如权利要求 3 所述的多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸的序列选自下组的一种：
- (a) 具有 SEQ ID NO: 1 中 192-1154 位的序列；
- (b) 具有 SEQ ID NO: 1 中 1-1433 位的序列。
6. 一种载体，其特征在于，它含有权利要求 3 所述的多核苷酸。
- 20 7. 一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，它含有权利要求 6 所述的载体。
8. 一种人 HuBMSC-MCP 蛋白的制备方法，其特征在于，该方法包含：
- (a) 在表达条件下，培养权利要求 7 所述的宿主细胞；
- (b) 从培养物中分离出人 HuBMSC-MCP 蛋白。
- 25 9. 一种能与权利要求 1 所述的人 HuBMSC-MCP 多肽特异性结合的抗体。
10. 一种组合物，其特征在于，它含有安全有效量的权利要求 1 所述的多肽以及药学上可接受的载体。

人骨髓基质细胞来源的线粒体转运蛋白分子及其编码序列和用途

5 技术领域

本发明属于分子生物学领域，具体地说，本发明涉及新的编码人线粒体转运蛋白分子 HuBMSC-MCP (human bone marrow stromal cell-derived mitochondria carrier protein) 多肽的多核苷酸，以及此多核苷酸编码的多肽。本发明还涉及此多核苷酸和多肽的用途和制备。具体地说，本发明的多肽是一种新的线粒体

10 转运蛋白分子。

背景技术

骨髓基质细胞作为造血微环境的主要成分，对造血系统的分化和维持至关重要。除了与造血干细胞的直接作用，它们还可以通过分泌大量的细胞因子调控造

15 血干细胞的分化。在一定程度上，某些白血病的发生与骨髓微环境的异常有关。骨髓基质细胞除了参与对造血的调控，目前还发现具有多种生物学功能，诸如，通过分泌趋化因子，生长因子，细胞因子调控免疫系统的发育和自稳；骨髓基质细胞作为间叶细胞，保留了多分化潜能，能够被诱导分化为成骨细胞，脂肪细胞，肌肉细胞，神经元细胞以及髓鞘细胞等；并且在一定的外界因素诱导下分化为抗

20 原提呈细胞，刺激 T 细胞活化。因此研究骨髓基质细胞来源相关分子的生物学功能有助于探讨白血病的发病机制、细胞分化、组织形成、免疫调控以及损伤修复，是当前免疫学研究的热点。

线粒体内膜上镶嵌着许多与其代谢物质转运有关的功能相关，结构相似的蛋白质，被统称为线粒体转运蛋白超家族 (mitochondrial carrier protein)。

25 此超家族分子的结构特点为 (1) 均含有三个重复区域，每个区域包含 100 个左右的氨基酸；(2) 每个区域包含一个序列基序 $(PX(D/E)Xh(K/R)X(R/K)X_{20-30}(D/E)GX_4)a(K/R)GRG$ ，其中 h 代表疏水性氨基酸，a 代表芳香族氨基酸；(3) 疏水性分析显示每一区域含有两个跨膜螺旋，其间有一亲水区相连；(4) 分子量在 28-32kDa 之间。该超家族已知的成员包括：ADP/ATP 转运蛋白、解偶联蛋

30 白、磷酸盐转运蛋白、酮戊二酸/苹果酸转运蛋白、柠檬酸转运蛋白、二羧酸转运蛋白、肉毒碱转运蛋白、鸟苷酸转运蛋白及一些未知功能的蛋白，如从酿酒

酵母中提取的 MRS3 及 MRS4 蛋白, Grave 病蛋白等。

特异性免疫反应是由抗原提呈细胞捕获抗原, 经加工、处理后将抗原信息传递给 T、B 淋巴细胞后诱发产生的, 因此, 抗原的加工处理和提呈是机体免疫反应的首要环节, 直接关系到免疫激活或免疫耐受的诱导。

5 树突状细胞 (dendritic cell, DC) 是目前已知的机体内功能最强的专职性抗原提呈细胞, 其主要通过两种途径捕获抗原: 构成型巨吞饮和甘露糖受体介导的内吞。有效的内吞是 DC 发挥功能的关键环节。

因此, 发现新的线粒体转运蛋白分子对于认识机体免疫细胞的作用机制等具有重要价值。线粒体转运蛋白分子在肿瘤的发生、生长过程中发挥重要调控作用, 并可能在抗肿瘤、抗炎症反应、抗感染以及免疫功能调节等多个领域的免疫诊断和免疫治疗方面具有重要的开发和应用价值。因此, 本领域迫切需要开发新的人骨髓基质细胞来源的线粒体转运蛋白分子。

发明内容

15 本发明的目的是提供一种新的人骨髓基质细胞来源的线粒体转运蛋白以及其片段、类似物和衍生物。

本发明的另一目的是提供编码这些多肽的多核苷酸。

本发明的另一目的是提供生产这些多肽的方法以及该多肽和编码序列的用途。

20

在本发明的第一方面, 提供新颖的分离出的 HuBMSC-MCP 多肽, 该多肽是人骨髓基质细胞来源的, 它包含: 具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。

25 较佳地, 该多肽选自下组: (a) 具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽; (b) 将 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的, 且具有增强树突状细胞内吞作用的功能的由 (a) 衍生的多肽。更佳地, 所述多肽具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

30 在本发明的第二方面, 提供编码分离的这些多肽的多核苷酸, 该多核苷酸包含一核苷酸序列, 该核苷酸序列与选自下组的一种核苷酸序列有至少 80% 相同性: (a) 编码上述人 HuBMSC-MCP 的多核苷酸; 和 (b) 与多核苷酸 (a) 互补的多核苷酸。较佳地, 该多核苷酸编码具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的多肽。更佳地, 该多核苷酸的序列是选自下组的一种: (a) 具有 SEQ ID NO: 1 中 192-1154 位的

序列; (b) 具有 SEQ ID NO: 1 中 1-1433 位的序列。

在本发明的第三方面, 提供了含有上述多核苷酸的载体, 以及被该载体转化或转导的宿主细胞或者被上述多核苷酸直接转化或转导的宿主细胞。

在本发明的第四方面, 提供了制备人 HuBMSC-MCP 蛋白的方法, 该方法包含:
5 (a) 在表达条件下, 培养上述被转化或转导的宿主细胞; (b) 从培养物中分离出人 HuBMSC-MCP 蛋白。

在本发明的第五方面, 提供了与上述的人 HuBMSC-MCP 多肽特异性结合的抗体。还提供了可用于检测的核酸分子, 它含有上述的多核苷酸中连续的 15-1433 个核苷酸。

10 在本发明的第六方面, 提供了模拟、促进、拮抗人 HuBMSC-MCP 多肽活性的化合物, 以及抑制人 HuBMSC-MCP 多肽的表达的化合物。还提供了筛选和/或制备这些化合物的方法。较佳地, 该化合物是人 HuBMSC-MCP 多肽的编码序列或其片段的反义序列。

在本发明的第七方面, 提供了检测样品中是否存在 HuBMSC-MCP 蛋白的方法,
15 它包括: 将样品与 HuBMSC-MCP 蛋白的特异性抗体接触, 观察是否形成抗体复合物, 形成了抗体复合物就表示样品中存在 HuBMSC-MCP 蛋白。

在本发明的第八方面, 提供了一种检测与人 HuBMSC-MCP 多肽异常表达相关的疾病或疾病易感性的方法, 该方法包括: 检测细胞样品中编码所述 HuBMSC-MCP 多肽表达量。

20 在本发明的第九方面, 提供了本发明多肽和编码序列的用途。例如本发明多肽可被用于筛选促进人 HuBMSC-MCP 多肽活性的激动剂, 或者筛选抑制人 HuBMSC-MCP 多肽活性的拮抗剂、或者被用于肽指纹图谱鉴定。本发明的人 HuBMSC-MCP 蛋白的编码序列或其片段, 可被作为引物用于 PCR 扩增反应, 或者作为探针用于杂交反应, 或者用于制造基因芯片或微阵列。

25 在本发明的第十方面, 提供了一种组合物, 它含有安全有效量的本发明的入 HuBMSC-MCP 多肽或其激动剂、拮抗剂以及药学上可接受的载体。这些组合物可用于促进树突状细胞的内吞作用, 在治疗肿瘤、炎症、神经系统和心血管病等病症方面有应用前景。

30 本发明的其它方面由于本文的技术的公开, 对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

下列附图用于说明本发明的具体实施方案，而不用于限定由权利要求书所界定的本发明范围。

图 1 是本发明的人 HuBMSC-MCP 的 cDNA 序列。

5 图 2 是本发明的人 HuBMSC-MCP 的全长氨基酸序列。

图 3 是本发明的人 HuBMSC-MCP 与其他线粒体转运蛋白的氨基酸序列同源性比较图。上方序列是人 HuBMSC-MCP，下方序列是其他线粒体转运蛋白。相同的氨基酸在多个个序列之间用黑体标出，相似的氨基酸用灰体标出。

图 4 是本发明的人 HuBMSC-MCP RT-PCR 表达分析，提示 HuBMSC-MCP 表达于
10 某些肿瘤细胞。

图 5 是本发明的人 HuBMSC-MCP 的细胞内定位，提示 HuBMSC-MCP 分布在人线粒体内。

图 6 显示本发明的人 HuBMSC-MCP 过表达后，显著增强 DC 的内吞活性。

15 具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，首次分离了骨髓基质细胞来源的新型线粒体转运蛋白分子 (Bone marrow stromal cell-derived mitochondria carrier protein, HuBMSC-MCP)。RT-PCR 分析表明 HuBMSC-MCP 在某些肿瘤细胞中有表达，这表明 HuBMSC-MCP 维持着某些肿瘤细胞的分化。

20 此外，本发明的人线粒体转运蛋白分子 HuBMSC-MCP 与已知家族成员有极高的同源性，具有线粒体转运蛋白超家族成员的全部结构特征。这暗示 HuBMSC-MCP 与其他家族成员一样转运一种与线粒体氧化磷酸化相关的底物，为细胞的生命活动提供能量。共聚焦显微镜观察显示 HuBMSC-MCP 与线粒体共定位于人乳腺癌细胞系—MCF-7 的伪足中。而伪足的形成是肿瘤细胞穿越血管内皮细胞下基底膜形成转移的
25 显著特征，因此，本发明的人线粒体转运蛋白分子 HuBMSC-MCP 可能与肿瘤细胞的侵袭转移有关，为肿瘤细胞伪足的形成及移动提供能量。同时，本发明的人线粒体转运蛋白分子 HuBMSC-MCP 可显著增强 DC 的内吞作用。

因此，HuBMSC-MCP 蛋白或其相关的拮抗剂、激动剂等可为治疗肿瘤等疾病提供新的免疫诊断和靶向治疗途径，因而具有巨大的应用前景。

30

在本发明中，术语“HuBMSC-MCP 蛋白”、“HuBMSC-MCP 多肽”或“线粒

体转运蛋白分子 HuBMSC-MCP”可互换使用，都指具有人线粒体转运蛋白分子 HuBMSC-MCP 氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的蛋白或多肽。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质，原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开，则为分离纯化的。

如本文所用，“分离的 HuBMSC-MCP 蛋白或多肽”是指 HuBMSC-MCP 多肽基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化 HuBMSC-MCP 蛋白。基本上纯的多肽在非还原聚丙烯酰胺凝胶上能产生单一的主带。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽，优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物，或是化学合成的产物，或使用重组技术从原核或真核宿主(例如，细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主，本发明的多肽可以是糖基化的，或可以是非糖基化的。本发明的多肽还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

本发明还包括人 HuBMSC-MCP 蛋白的片段、衍生物和类似物。如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然人 HuBMSC-MCP 蛋白相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与抗原 IgG 片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

在本发明中，术语“人 HuBMSC-MCP 多肽”指具有人 HuBMSC-MCP 蛋白活性的 SEQ ID NO. 2 序列的多肽。该术语还包括具有与人 HuBMSC-MCP 蛋白相同功能的、SEQ ID NO. 2 序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于)：一个或多个(通常为 1-50 个，较佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或多个(通常为 20 个以内，较佳地为 10 个以内，更佳地为 5 个以内)氨基酸。例如，在本领域中，

用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质的功能。又比如，在 C 末端和/或 N 末端添加一个或多个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括人 HuBMSC-MCP 蛋白的活性片段和活性衍生物。

5 该多肽的变异形式包括：同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与人 HuBMSC-MCP DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白、以及利用抗人 HuBMSC-MCP 多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其他多肽，如包含人 HuBMSC-MCP 多肽或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外，本发明还包括了人 HuBMSC-MCP 多肽的可溶性片段。通常，该片段具有人 HuBMSC-MCP 多肽序列的至少约 10 个连续氨基酸，通常至少约 30
10 个连续氨基酸，较佳地至少约 50 个连续氨基酸，更佳地至少约 80 个连续氨基酸，最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

发明还提供人 HuBMSC-MCP 蛋白或多肽的类似物。这些类似物与天然人 HuBMSC-MCP 多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导
15 变异体可以通过各种技术得到，如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变，还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然 L-氨基酸的残基(如 D-氨基酸)的类似物，以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解，本发明的多肽并不限于上述列举的代表性的多肽。

20 修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修
25 饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

在本发明中，“人 HuBMSC-MCP 蛋白保守性变异多肽”指与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列相比，有至多 10 个，较佳地至多 8 个，更佳地至多 5 个，最佳地至多 3 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 1 进行氨基酸替换而产生。

表 1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编
5 码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用，“简并的变异体”在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO:2 的蛋白质，但与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列有差别的核酸序列。

编码 SEQ ID NO:2 的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；
成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列(和任选的附加
10 编码序列)以及非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是

还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体,其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的,等位变异体是一个多核苷酸的替换形式,它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入,但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%, 较佳地至少 70%, 更佳地至少 80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中,“严格条件”是指:(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱,如 $0.2\times\text{SSC}$, 0.1%SDS, 60°C ; 或(2)杂交时加有变性剂,如 50%(v/v)甲酰胺, 0.1%小牛血清/0.1% Ficoll, 42°C 等; 或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90%以上,更好是 95%以上时才发生杂交。并且,可杂交的多核苷酸编码的多肽与 SEQ ID NO:2 所示的成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。如本文所用,“核酸片段”的长度至少含 15 个核苷酸,较好是至少 30 个核苷酸,更好是至少 50 个核苷酸,最好是至少 100 个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如 PCR)以确定和/或分离编码 HuBMSC-MCP 蛋白的多聚核苷酸。

本发明中的多肽和多核苷酸优选以分离的形式提供,更佳地被纯化至均质。

本发明的人 HuBMSC-MCP 核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次 PCR 扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前, 已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段, 或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外, 还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

5 应用 PCR 技术扩增 DNA/RNA 的方法(Saiki, et al. Science 1985;230:1350-1354)被优选用于获得本发明的基因。特别是很难从文库中得到全长的 cDNA 时, 可优选使用 RACE 法(RACE-cDNA 末端快速扩增法), 用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择, 并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的 DNA/RNA 片段。

10 本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体, 以及用本发明的载体或 HuBMSC-MCP 蛋白编码序列经基因工程产生的宿主细胞, 以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

通过常规的重组 DNA 技术(Science, 1984; 224: 1431), 可利用本发明的多聚核苷酸序列可用来表达或生产重组的 HuBMSC-MCP 多肽。一般来说有以下步骤:

- 15 (1). 用本发明的编码人 HuBMSC-MCP 多肽的多核苷酸(或变异体), 或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;
- (2). 在合适的培养基中培养的宿主细胞;
- (3). 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

本发明中, 人 HuBMSC-MCP 多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。在本发明中适用的载体包括但不限于: 在细菌中表达的基于 T7 的表达载体(Rosenberg, et al. Gene, 1987, 56:125); 在哺乳动物细胞中表达的 pMSXND 表达载体(Lee and Nathans, J Bio Chem. 263:3521, 1988)和在昆虫细胞中表达的来源于杆状病毒的载体。总之, 只要能在宿主体内复制和稳定, 任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

20

25

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含人 HuBMSC-MCP 编码 DNA 序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等(Sambrook, et al. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1989)。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上, 以指导 mRNA 合成。这

30

些启动子的代表性例子有：大肠杆菌的 lac 或 trp 启动子； λ 噬菌体 P_L 启动子；真核启动子包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、反转录病毒的 LTRs 和其他一些已知的可控制基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白 (GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；植物细胞；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO、COS、293 细胞、或 Bowes 黑素瘤细胞的动物细胞等。

本发明的多核苷酸在高等真核细胞中表达时，如果在载体中插入增强子序列时将会使转录得到增强。增强子是 DNA 的顺式作用因子，通常大约有 10 到 300 个碱基对，作用于启动子以增强基因的转录。可举的例子包括在复制起始点晚期一侧的 100 到 270 个碱基对的 SV40 增强子、在复制起始点晚期一侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子等。

本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl₂ 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl₂。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法（如温度转换或化学诱导）诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞

外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

重组的人 HuBMSC-MCP 蛋白或多肽有多方面的用途。这些用途包括(但不限于)：直接做为药物治疗 HuBMSC-MCP 蛋白功能低下或丧失所致的疾病，和用于筛选促进或对抗 HuBMSC-MCP 蛋白功能的抗体、多肽或其它配体。用表达的重组人 HuBMSC-MCP 蛋白筛选多肽库可用于寻找有治疗价值的能抑制或刺激人 HuBMSC-MCP 蛋白功能的多肽分子。

另一方面，本发明还包括对人 HuBMSC-MCP DNA 或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于人 HuBMSC-MCP 基因产物或片段。较佳地，指那些能与人 HuBMSC-MCP 基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制人 HuBMSC-MCP 蛋白的分子，也包括那些并不影响人 HuBMSC-MCP 蛋白功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的人 HuBMSC-MCP 基因产物结合的抗体。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如 Fab' 或 (Fab)₂ 片段；抗体重链；抗体轻链；遗传工程改造的单链 Fv 分子；或嵌合抗体，如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的人 HuBMSC-MCP 基因产物或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的，表达人 HuBMSC-MCP 蛋白或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人, Nature 256:495, 1975; Kohler 等人, Eur. J. Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人, Eur. J. Immunol. 6:292, 1976; Hammerling 等人, In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 1981)。本发明的抗体包括能阻断人 HuBMSC-MCP 蛋白功能的抗体以及不影响人 HuBMSC-MCP 蛋白功能的抗体。本发明的各类抗体可以利用人 HuBMSC-MCP 基因产物的片段或功能区，通过常规免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与人 HuBMSC-

MCP 基因产物的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如 *E. Coli*)中生产的基因产物来免疫动物而产生;与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽),可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

- 5 抗人 HuBMSC-MCP 蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中,检测活检标本中的人 HuBMSC-MCP 蛋白。此外,与人 HuBMSC-MCP 蛋白结合的单克隆抗体也可用放射性同位素标记,注入体内可跟踪其位置和分布。

本发明中的抗体可用于治疗或预防与人 HuBMSC-MCP 蛋白相关的疾病。给予适当剂量的抗体可以刺激或阻断人 HuBMSC-MCP 蛋白的产生或活性。

- 10 抗体也可用于设计成针对体内某一特殊部位的免疫毒素。如人 HuBMSC-MCP 蛋白高亲和性的单克隆抗体可与细菌或植物毒素(如白喉毒素,蓖麻蛋白,红豆碱等)共价结合。一种通常的方法是用巯基交联剂如 SPDP,攻击抗体的氨基,通过二硫键的交换,将毒素结合于抗体上。

- 多克隆抗体的生产可用人 HuBMSC-MCP 蛋白或多肽免疫动物,如家兔,小鼠,大鼠等。多种佐剂可用于增强免疫反应,包括但不限于弗氏佐剂等。

利用本发明蛋白,通过各种常规筛选方法,可筛选出与 HuBMSC-MCP 蛋白发生相互作用的物质,如配体、抑制剂、激动剂或拮抗剂等。

- 本发明蛋白及其抗体、抑制剂、激动剂、拮抗剂或受体等,当在治疗上进行施用(给药)时,可提供不同的效果。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中 pH 通常约为 5-8,较佳地 pH 约为 6-8,尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。

- 25 本发明的多肽或其激动剂和拮抗剂可直接用于疾病治疗,例如用于肿瘤方面的治疗。在使用时,还可同时使用其他治疗剂。

- 30 本发明还提供了一种药物组合物,它含有安全有效量的本发明 HuBMSC-MCP 多肽或其激动剂、拮抗剂以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物,可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶

囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约 1 微克/千克体重-约 5 毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的 HuBMSC-MCP 蛋白或其拮抗剂、激动剂施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约 10 微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约 8 毫克/千克体重，较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 1 毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

人 HuBMSC-MCP 蛋白的多聚核苷酸也可用于多种治疗目的。基因治疗技术可用于治疗由于 HuBMSC-MCP 蛋白的无表达或异常/无活性的 HuBMSC-MCP 蛋白的表达所致的细胞增殖、发育或代谢异常。重组的基因治疗载体(如病毒载体)可设计成表达变异的 HuBMSC-MCP 蛋白，以抑制内源性的 HuBMSC-MCP 蛋白活性。来源于病毒的表达载体如逆转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒、单纯疱疹病毒、细小病毒等可用于将 HuBMSC-MCP 基因转移至细胞内。构建携带 HuBMSC-MCP 基因的重组病毒载体的方法可见于已有文献(Sambrook, et al.)。另外重组人 HuBMSC-MCP 基因可包装到脂质体中，然后再转移至细胞内。

抑制人 HuBMSC-MCPmRNA 的寡聚核苷酸(包括反义 RNA 和 DNA)以及核酶也在本发明的范围之内。核酶是一种能特异性分解特定 RNA 的酶样 RNA 分子，其作用机制是核酶分子与互补的靶 RNA 特异性杂交后进行核酸内切作用。反义的 RNA 和 DNA 及核酶可用已有的任何 RNA 或 DNA 合成技术获得，如固相磷酸酰胺化学合成法合成寡核苷酸的技术已广泛应用。反义 RNA 分子可通过编码该 RNA 的 DNA 序列在体外或体内转录获得。这种 DNA 序列已整合到载体的 RNA 聚合酶启动子的下游。为了增加核酸分子的稳定性，可用多种方法对其进行修饰，如增加两侧的序列长度，核糖核苷之间的连接应用磷酸硫酸酯键或肽键而非磷酸二酯键。

多聚核苷酸导入组织或细胞内的方法包括：将多聚核苷酸直接注入到体内组织中；或在体外通过载体(如病毒、噬菌体或质粒等)先将多聚核苷酸导入细胞中，再将细胞移植到体内等。

能与人 HuBMSC-MCP 蛋白结合的多肽分子可通过筛选由各种可能组合的氨基酸结合于固相物组成的随机多肽库而获得。筛选时，必须对人 HuBMSC-MCP 蛋白分子进行标记。

本发明还涉及定量和定位检测人 HuBMSC-MCP 蛋白水平的诊断试验方法。这些试验是本领域所熟知的，且包括 FISH 测定和放射免疫测定。试验中所检测的

人 HuBMSC-MCP 蛋白水平, 可以用作解释人 HuBMSC-MCP 蛋白在各种疾病中的重要性和用于诊断 HuBMSC-MCP 蛋白起作用的疾病。

一种检测检测样品中是否存在 HuBMSC-MCP 蛋白的方法是利用 HuBMSC-MCP 蛋白的特异性抗体进行检测, 它包括: 将样品与 HuBMSC-MCP 蛋白特异性抗体接触; 5 观察是否形成抗体复合物, 形成了抗体复合物就表示样品中存在 HuBMSC-MCP 蛋白。

HuBMSC-MCP 蛋白的多聚核苷酸可用于 HuBMSC-MCP 蛋白相关疾病的诊断和治疗。在诊断方面, HuBMSC-MCP 蛋白的多聚核苷酸可用于检测 HuBMSC-MCP 蛋白的表达与否或在疾病状态下 HuBMSC-MCP 蛋白的异常表达。如 HuBMSC-MCP DNA 序列 10 可用于对活检标本的杂交以判断 HuBMSC-MCP 蛋白的表达异常。杂交技术包括 Southern 印迹法, Northern 印迹法、原位杂交等。这些技术方法都是公开的成熟技术, 相关的试剂盒都可从商业途径得到。本发明的多核苷酸的一部分或全部可作为探针固定在微阵列(microarray)或 DNA 芯片(又称为“基因芯片”)上, 用于分析组织中基因的差异表达分析和基因诊断。用 HuBMSC-MCP 蛋白特异的引物 15 进行 RNA-聚合酶链反应(RT-PCR)体外扩增也可检测 HuBMSC-MCP 蛋白的转录产物。

检测 HuBMSC-MCP 基因的突变也可用于诊断 HuBMSC-MCP 蛋白相关的疾病。HuBMSC-MCP 蛋白突变的形式包括与正常野生型 HuBMSC-MCP DNA 序列相比的点突变、易位、缺失、重组和其它任何异常等。可用已有的技术如 Southern 印迹法、 20 DNA 序列分析、PCR 和原位杂交检测突变。另外, 突变有可能影响蛋白的表达, 因此用 Northern 印迹法、Western 印迹法可间接判断基因有无突变。

本发明的序列对染色体鉴定也是有价值的。简而言之, 根据本发明 HuBMSC-MCP 蛋白的 cDNA 制备 PCR 引物(优选 15-35bp), 可以将序列定位于染色体上。然后, 将这些引物用于 PCR 筛选含各条人染色体的体细胞杂合细胞。只有 25 那些含有相应于引物的人基因的杂合细胞会产生扩增的片段。

一旦序列被定位到准确的染色体位置, 此序列在染色体上的物理位置就可以与基因图数据相关联。这些数据可见于例如, V.Mckusick, Mendelian Inheritance in Man(可通过与 Johns Hopkins University Welch Medical Library 联机获得)。然后可通过连锁分析, 确定基因与业已定位到染色体区域上的疾病之间的关系。

30

在本发明的一个实例中, 提供了一种分离的多核苷酸, 它编码具有 SEQ ID NO:

2 所示氨基酸序列的多肽。本发明的多核苷酸是从人骨髓基质细胞 cDNA 文库中分离出的。其序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 它包含的多核苷酸序列全长为 1433 个碱基, 其开放读框位于 192-1154 位, 编码全长为 321 个氨基酸的人 HuBMSC-MCP 蛋白 (SEQ ID NO: 2)。该 HuBMSC-MCP 蛋白属于线粒体转运蛋白家族分子, 与
5 ADP/ATP 转运蛋白、解偶联蛋白、磷酸盐转运蛋白、酮戊二酸/苹果酸转运蛋白等氨基酸序列具有一定同源性, 在线粒体转运蛋白结构域内一致性可高达 25% 以上, 相似性则可达 50%。RT-PCR 分析表明 HuBMSC-MCP 在多种肿瘤细胞系中表达。因此, HuBMSC-MCP 蛋白或其相关的拮抗剂、激动剂等可为治疗肿瘤、炎症、神经系统和心血管病等疾病提供新的免疫诊断和靶向治疗途径, 因而具有巨大的应用
10 前景。

下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件如 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册 (New York: Cold
15 Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1: 人 HuBMSC-MCP cDNA 的克隆

用 Trizol 试剂 (Life Technologies 公司) 提取人骨髓基质细胞总 RNA。然后, 从总 RNA 中分离 poly(A) mRNA。将 poly(A) mRNA 经逆转录形成 cDNA 后, 用
20 SuperScriptII 克隆试剂盒 (购自 Gibco) 将 cDNA 片段定向插入到载体的多克隆位点上, 转化 DH5 α 细菌形成 cDNA 质粒文库。用双脱氧法测定随机挑选克隆的 5' 末端的序列。将测定的 cDNA 序列与已有的公共 DNA 序列数据库进行比较, 结果发现有一个 cDNA 克隆的 DNA 序列为新的全长 cDNA。通过合成一系列引物对新克隆所含的 DNA 序列进行双向测定。计算机分析表明, 克隆所含的全长 cDNA 是一个新的 cDNA 序列 (如 SEQ ID NO: 1 和图 1 所示), 编码一个新的蛋白质 (如 SEQ ID
25 NO: 2 和图 2 所示)。此蛋白质被命名为人骨髓基质细胞来源线粒体转运蛋白分子 HuBMSC-MCP, 其编码基因命名为人骨髓基质细胞来源线粒体转运蛋白分子 HuBMSC-MCP 基因。

30 序列 SEQ ID NO: 1 全长为 1433bp, 包括 191 bp 的 5' 端非编码区和 276bp 的 3' 端非编码区, 编码含 321 个氨基酸的多肽。理论上计算未糖基化的成熟分子的

分子量约为 35.4kD。

BLAST 分析表明其与已知基因不同，与人线粒体转运蛋白的氨基酸序列具有一定同源性，一致性达 28%，相似性达 50%(图 3)，属于线粒体转运蛋白 (mitochondrial carrier protein) 家族分子。

5

实施例 2：用 RT-PCR 方法进行人 HuBMSC-MCP 的细胞表达分析

用 Trizol 试剂提取处于对数生长期人结肠癌细胞系 LoVo、前列腺癌细胞系 PC-3、宫颈癌细胞系 HeLa、卵巢癌细胞系 CaoV3、乳腺癌细胞系 MCF-7 等细胞的细胞总 RNA。取 5 μ g 细胞总 RNA 与 1 μ g Oligo-dT₁₂₋₁₈ 混合，进行反转录。反转录体系为 20 μ l，反应结束后加 80 μ l ddH₂O 进行稀释。PCR 扩增 HuBMSC-MCP 所用的引物如下：有义引物 5'-GAG ACC AAC ATC CGT GAC - 3' (SEQ ID NO: 3)，反义引物 5' CCTCGTCCTT ATGACTTC - 3' (SEQ ID NO: 4)，同时以 β -肌动蛋白作为阳性对照。PCR 反应体积为 50 μ l，其中含反转录模板 10 μ l、0.5mM 引物、0.2mM dNTP 和 1U rTaq DNA 聚合酶(Takara)，扩增参数为 95 $^{\circ}$ C 15 秒、57 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒，28 个循环后 PCR 产物行 1.5%琼脂糖凝胶电泳初步确认。DNA 序列分析结果表明该 PCR 产物的 DNA 序列与 SEQ ID NO:1 所示的 386-971 完全相同。

结果显示，HuBMSC-MCP mRNA 在 MCF-7 乳腺癌细胞系、HeLa 宫颈癌细胞系等多数肿瘤细胞中有表达，在 LoVo 细胞系中未见表达(图 4)。

20 实施例 3：人 HuBMSC-MCP 重组表达

在该实施例中，Trizol 试剂 (Life Technologies 公司)提取人骨髓基质细胞总 RNA 作为模板，经过反转录后，用序列如下的 5' 和 3' 端的 PCR 寡核苷酸引物进行扩增，获得人 HuBMSC-MCP DNA 作为插入片段。

PCR 反应中使用的 5' 端寡核苷酸引物序列为：

25 5'-GCG GTA CCG ACT GAG TAC GGT CTT CTA A-3' (SEQ ID NO: 5)

该引物含有 KpnI 限制性内切酶的酶切位点，在该酶切位点之后是人 HuBMSC-MCP 的部分编码序列；

3' 端引物序列为：

5'-CGG GAT CCC ATG GCG ACG GGC GGC CAG C-3' (SEQ ID NO: 6)

30 该引物含有 BamHI 限制性内切酶的酶切位点、翻译终止子和人 HuBMSC-MCP 的部分编码序列。

将获得的 PCR 产物纯化后经 KpnI 和 BamHI 酶切再与质粒 pRsetB(Invitrogen 公司)按常规方法重组并转化至感受态大肠杆菌 DH5 α ，挑取阳性克隆鉴定后纯化并测序 (ABI 公司的 377 型测序仪, BigDye Terminator 试剂盒, PE 公司)。将正确序列的人 HuBMSC-MCPcDNA 的质粒转化大肠杆菌 BL21。

5 阳性克隆用 KpnI 和 BamHI 酶切鉴定, 产物行 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析。经测序证实, 已插入了所设计的 HuBMSC-MCP 编码序列。

挑表达 HuBMSC-MCP 的阳性 BL21 克隆接种于 100mlLB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 300rpm 振荡培养 12-15hr, 1:10 稀释于预热的 LB 培养基继续振荡培养 1.5hr, 加 1M IPTG 至 1mM 后 37 $^{\circ}$ C 诱导 2-6hr, 5,000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min 去上清, 置

10 冰上用 50ml 1 \times PBS (0.14M NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH7.3) 重悬, 超声(B. Braun Labsonic U)破碎后再加入 20% Triton X-100 至 1%轻摇 30min, 然后 12,000g 4 $^{\circ}$ C离心 10min, 上清用 0.8 μ m 滤膜过滤后, 过 2mlHis-Sepharose 层析柱, 1 \times PBS 充分洗涤后, 加入 500ul 洗脱缓冲液室温静置 30 分钟后收集洗脱液, 重复洗脱 2-3 次, 得到人 HuBMSC-MCP 蛋白。分子量与预

15 测值相符。

实施例 4 : 抗人 HuBMSC-MCP 抗体的产生

将实施例 3 中获得的重组蛋白人 HuBMSC-MCP 用来免疫动物以产生抗体, 具体方法如下。重组分子用层析法进行分离后备用。也可用 SDS-PAGE 凝胶电泳法

20 进行分离, 将电泳条带从凝胶中切下, 并用等体积的完全 Freund's 佐剂乳化。用 50-100 μ g/0.2ml 乳化过的蛋白, 对小鼠进行腹膜内注射。14 天后, 用非完全 Freund's 佐剂乳化的同样抗原, 对小鼠以 50-100 μ g/0.2ml 的剂量进行腹膜内注射以加强免疫。每隔 14 天进行一次加强免疫, 至少进行三次。获得的抗血清的特异反应活性用它在体外沉淀人 HuBMSC-MCP 基因翻译产物的能力加以评估。结

25 果发现, 抗体可特异性地与本发明蛋白发生结合。

实施例 5: HuBMSC-MCP 真核融合表达载体的构建

在该实施例中, Trizol 试剂 (Life Technologies 公司)提取人骨髓基质细胞总 RNA 作为模板, 经过反转录后, 用序列如下的 5' 和 3' 端的 PCR 寡核苷酸引物进行扩增, 获得人 HuBMSC-MCP DNA 作为插入片段。PCR 反应参数为 95 $^{\circ}$ C 15 秒, 58 $^{\circ}$ C

30 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 45 秒, 20 循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟,

全长 HuBMSC-MCP 上游引物为 5'-GCG GTA CCG ACT GAG TAC GGT CTT CTA A-3' (SEQ ID NO: 5), 下游引物为 5'-CGG GAT CCC ATG GCG ACG GGC GGC CAG C-3' (SEQ ID NO: 6), 产物编码全长 HuBMSC-MCP 蛋白。

PCR 产物纯化后经 KpnI 和 BamHI 酶切, 并与 pEGFP-N1 载体(Clontech 公司)按常规方法重组并转化至感受态细菌 DH5 α 。挑取白色克隆进行鉴定、纯化并测序。经测序证实, 已插入了所设计的 HuBMSC-MCP 编码序列。

实施例 6: HuBMSC-MCP 蛋白细胞内定位的免疫荧光分析

以实施例 5 中所构建的 HuBMSC-MCP 全长融合表达载体质粒 DNA 利用 LipofectAMINE 试剂 (Invitrogen) 进行真核细胞 293T 的基因转染。瞬时转染细胞于转染后 48 小时以胰酶消化, 铺于无菌盖玻片上, 在共聚焦显微镜下进行观察。细胞器共定位检测, 待细胞贴壁后, 先分别用线粒体、内质网和高尔基器、溶酶体特异性染料进行染色, 浓度为 1 μ M, 37 $^{\circ}$ C, 15 分钟。用 PBS 洗后, 共聚焦显微镜下进行观察。

结果显示: HuBMSC-MCP 转染细胞的荧光信号均散在分布在胞浆内; 细胞器共定位实验结果提示, HuBMSC-MCP 分布于线粒体内(图 5)。

实施例 7: 人 HuBMSC-MCP 显著增强 DC 的内吞活性

收集体外培养 5 天的树突状细胞, 用无血清的 RPMI1640 洗两遍, 并调细胞浓度至 1×10^7 cells/ml。取 300 μ l 细胞悬液与 20 μ g 体外转录的 HuBMSC-MCP mRNA 混合, 加入 0.2-cm 的电击杯中, 用 BTX ECM-830 电穿孔仪, 505 V, 99 μ s, 2 个电脉冲, 中间间隔 10sec。电穿孔后 24h, 取 5×10^5 DC 与 0.1mg/ml FITC-dextran 分别在 4 $^{\circ}$ C 或 37 $^{\circ}$ C 共孵育 60min。冰 PBS 洗后, 流式细胞仪分析。

结果显示, 人 HuBMSC-MCP 转染 DC 后, 显著增强 DC 的内吞活性(图 6 的 A 和 B 分别为对照和转染后的 DC)。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 第二军医大学免疫学研究所

<120> 人骨髓基质细胞来源的线粒体转运蛋白分子及其编码序列和用途

<130> 037861

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1433

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (192)..(1154)

<223>

<400> 1

```

ggcgccgcg gccacgccgc ggaaggcgcg ggccgagcag agccggcgct tggagcccgc      60
gcgcgcatgg aggcgttgcc ggcagccctc tgagggcagc ggggagacaa gaccggcgca      120
cctcgcgcat cctcgagcc gccacgcgct ctgccaccg ggcggcgacg ggccgcgag      180
ccggcgcggc c atg gcg acg ggc ggc cag cag aag gag aac acg ctg ctt      230
           Met Ala Thr Gly Gly Gln Gln Lys Glu Asn Thr Leu Leu
           1             5             10
cac ctc ttc gcc ggc ggg tgt gga ggc aca gtt ggt gct att ttc act      278
His Leu Phe Ala Gly Gly Cys Gly Gly Thr Val Gly Ala Ile Phe Thr
           15             20             25
tgt cca cta gaa gtc att aag aca cgg ttg cag tct tca aga tta gct      326
Cys Pro Leu Glu Val Ile Lys Thr Arg Leu Gln Ser Ser Arg Leu Ala
           30             35             40             45
ctc cgg aca gtc tac tat cct cag gtt cat ctg ggg acc att agt gga      374
Leu Arg Thr Val Tyr Tyr Pro Gln Val His Leu Gly Thr Ile Ser Gly
           50             55             60
gct gga atg gtg aga cca aca tcc gtg aca cct gga ctc ttt cag gtt      422
Ala Gly Met Val Arg Pro Thr Ser Val Thr Pro Gly Leu Phe Gln Val
           65             70             75
ctg aag tcg atc ttg gag aaa gag gga cca aag tca ctt ttt aga ggc      470

```

Leu Lys Ser Ile Leu Glu Lys Glu Gly Pro Lys Ser Leu Phe Arg Gly	
80	85 90
ttg ggt cca aat ttg gtt gga gtt gca cca tca agg gct gta tac ttt	518
Leu Gly Pro Asn Leu Val Gly Val Ala Pro Ser Arg Ala Val Tyr Phe	
95	100 105
gca tgt tac tcc aaa gcc aaa gag caa ttt aat ggc att ttc gtg cct	566
Ala Cys Tyr Ser Lys Ala Lys Glu Gln Phe Asn Gly Ile Phe Val Pro	
110	115 120 125
aac agc aat att gtg cat att ttc tca gct ggc tct gca gct ttt atc	614
Asn Ser Asn Ile Val His Ile Phe Ser Ala Gly Ser Ala Ala Phe Ile	
	130 135 140
aca aat tcc tta atg aat cct ata tgg atg gtt aaa acc cga atg cag	662
Thr Asn Ser Leu Met Asn Pro Ile Trp Met Val Lys Thr Arg Met Gln	
	145 150 155
cta gaa cag aaa gtg agg ggc tct aag cag atg aat aca ctc cag tgt	710
Leu Glu Gln Lys Val Arg Gly Ser Lys Gln Met Asn Thr Leu Gln Cys	
	160 165 170
gct cgt tac gtt tac cag acc gaa ggc att cgt ggc ttc tat aga gga	758
Ala Arg Tyr Val Tyr Gln Thr Glu Gly Ile Arg Gly Phe Tyr Arg Gly	
	175 180 185
tta act gcc tcg tat gct gga att tcc gaa act ata atc tgc ttt gct	806
Leu Thr Ala Ser Tyr Ala Gly Ile Ser Glu Thr Ile Ile Cys Phe Ala	
	190 195 200 205
att tat gaa agt tta aag aag tat ctg aaa gaa gct cca tta gcc tct	854
Ile Tyr Glu Ser Leu Lys Lys Tyr Leu Lys Glu Ala Pro Leu Ala Ser	
	210 215 220
tct gca aat ggg act gag aaa aat tcc aca agt ttt ttt gga ctt atg	902
Ser Ala Asn Gly Thr Glu Lys Asn Ser Thr Ser Phe Phe Gly Leu Met	
	225 230 235
gca gct gct gct ctt tct aag ggc tgt gcc tcc tgc att gct tat cca	950
Ala Ala Ala Ala Leu Ser Lys Gly Cys Ala Ser Cys Ile Ala Tyr Pro	
	240 245 250
cac gaa gtc ata agg acg agg ctc cgg gaa gag ggc acc aag tac aag	998
His Glu Val Ile Arg Thr Arg Leu Arg Glu Glu Gly Thr Lys Tyr Lys	
	255 260 265
tct ttt gtc cag acg gcg cgc ctg gtg ttc cgg gaa gaa ggc tac ctt	1046
Ser Phe Val Gln Thr Ala Arg Leu Val Phe Arg Glu Glu Gly Tyr Leu	
	270 275 280 285

gcc ttt tat aga gga ctg ttt gcc cag ctt atc cgg cag atc cca aat 1094
 Ala Phe Tyr Arg Gly Leu Phe Ala Gln Leu Ile Arg Gln Ile Pro Asn
 290 295 300

act gcc att gtg ttg tct act tat gag tta att gtg tac ctg tta gaa 1142
 Thr Ala Ile Val Leu Ser Thr Tyr Glu Leu Ile Val Tyr Leu Leu Glu
 305 310 315

gac cgt act cag taacaggccg gaaaattgtg ctctagaaga ataaaactga 1194
 Asp Arg Thr Gln
 320

aaaactctag agaatttttt ttccccattg atgtttagaa agtttgagac tgaacagga 1254

aaggccataa aatatctggt tcatatcacc tgttggacat ttccttttgg attcatgctt 1314

tctggaaggt ttaaattcat taacgttaat agttaattat aacttttttt ttaacttaag 1374

aggattcagg gttaagcccc aactaaatta aatcatgcta ttaatttaa gtataaaaa 1433

<210> 2

<211> 321

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Ala Thr Gly Gly Gln Gln Lys Glu Asn Thr Leu Leu His Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Gly Gly Cys Gly Gly Thr Val Gly Ala Ile Phe Thr Cys Pro Leu
 20 25 30

Glu Val Ile Lys Thr Arg Leu Gln Ser Ser Arg Leu Ala Leu Arg Thr
 35 40 45

Val Tyr Tyr Pro Gln Val His Leu Gly Thr Ile Ser Gly Ala Gly Met
 50 55 60

Val Arg Pro Thr Ser Val Thr Pro Gly Leu Phe Gln Val Leu Lys Ser
 65 70 75 80

Ile Leu Glu Lys Glu Gly Pro Lys Ser Leu Phe Arg Gly Leu Gly Pro
 85 90 95

Asn Leu Val Gly Val Ala Pro Ser Arg Ala Val Tyr Phe Ala Cys Tyr
 100 105 110

Ser Lys Ala Lys Glu Gln Phe Asn Gly Ile Phe Val Pro Asn Ser Asn

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

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> 引物

<400> 3	
gagaccaaca tccgtgac	18
<210> 4	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(18)	
<223> 引物	
<400> 4	
cctcgtcctt atgacttc	18
<210> 5	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(28)	
<223> 引物	
<400> 5	
gcggtaccga ctgagtacgg tcttctaa	28
<210> 6	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(28)	
<223> 引物	
<400> 6	
cgggatccca tggcgacggg cggccagc	28

```

ggcgccggcg gccacgccgc ggaaggcgcg ggccgagcag agccgggctg tggagcccgc      60
gcgcgcatgg aggcgttgcc ggcagccctc tgagggcagc ggggagacaa gacccggcga      120
cctcgcgcat ccctcgagcc gccacgcgct ctcgccaccg ggcggcgacg ggccgcggag      180
ccggcgcggc catggcgacg ggcggccagc agaaggagaa cacgctgctt cacctcttcg      240
ccggcggggtg tggaggcaca gttggtgcta ttttcaactg tccactagaa gtcattaaga      300
cacggttgca gtctcaaga ttagctctcc ggacagtcta ctatcctcag gttcatctgg      360
ggaccattag tggagctgga atggtgagac caacatccgt gacacctgga ctctttcagg      420
ttctgaagtc gatcttgag aaagagggac caaagtcact ttttagaggc ttgggtccaa      480
at ttggttg agttgcacca tcaagggtg tatactttgc atgttactcc aaagccaaag      540
agcaatttaa tggcattttc gtgcctaaca gcaatattgt gcatattttc tcagctggct      600
ctgcagcttt tatcacaat tccttaatga atcctatatg gatggttaaa acccgaatgc      660
agctagaaca gaaagtgagg ggctctaagc agatgaatac actccagtgt gctcgttacg      720
tttaccagac cgaaggcatt cgtggcttct atagaggatt aactgcctcg tatgctggaa      780
tttccgaaac tataatctgc tttgctatct atgaaagttt aaagaagtat ctgaaagaag      840
ctccattagc ctcttctgca aatgggactg agaaaaattc cacaagtttt tttggactta      900
tggcagctgc tgccttttct aagggtctgt cctcctgcat tgcttatcca cacgaagtca      960
taaggacgag gctccgggaa gagggcacca agtacaagtc ttttgtccag acggcgcgcc     1020
tggtgttccg ggaagaaggc taccttgcc tttatagagg actgtttgcc cagcttatcc     1080
ggcagatccc aaatactgcc attgtgttgt ctacttatga gtttaattgtg tacctgttag     1140
aagaccgtac tcagtaacag gccggaaaat tgtgctctag aagaataaaa ctgaaaaact     1200
ctagagaatt ttttttcccc attgatgttt agaaagtttg agactgaaac aggaaaggcc     1260
ataaaatata tggttcatat cacctgttgg acatttcctt ttggattcat gctttctgga     1320
aggtttaaat tcattaacgt taatagttaa ttataacttt tttttaact taagaggatt     1380
cagggttaag cccaactaa attaaatcat gctatttaat ttaagtataa aaa              1433
(SEQ ID NO:1)

```

图 1

```

MATGGQQKEN TLLHLFAGGC GGTVGAIFTC PLEVIKTRLQ SSRLALRTVY YPQVHLGTIS      60
GAGMVRPTSV TPGLFQVLKS ILEKEGPKSL FRGLGPNLVG VAPSRVYFA CYSKAKEQFN      120
GIFVPNSNIV HIFSAGSAF ITNSLMNPIW MVKTRMQLEQ KVRGSKQMN T LQCARYVYQT      180
EGIRGFYRGL TASYAGISET IICFAIYESL KKYLKEAPLA SSANGTEKNS TSFFGLMAAA      240
ALSKGCASCI AYPHEVIRTR LREEGTYKYS FVQ TARLVFR EEGYLAFYRG LFAQLIRQIP      300
NTAIVLSTYE LIVYLLEDRT Q              321
(SEQ ID NO:2)

```

图 2

HuBMSC-MCP	~M A T G G Q Q K E	N T L L H.....	L F A G C C G T V	R A I F T S L E V	34
hMFT	q s a s a s s a w s	t v f r h v r y e n	l i a q v s a q v l	s n l a l h p i d l	45
Rim2p	g s e i e n h p t v	k p w v h.....	f v a a d i r a m a	q a v v e t e f d l	75
HuBMSC-MCP	I K T R L L . S R	L A L R T V Y Y P Q	V H L G T I S G A S	M V R P T S V T ..	71
hMFT	v k l r f a v s d g	l e l.....r p	61
Rim2p	v k t r l d . s d.	.i f l k a y k s q a	V n i.....s k d	s t r p e s i n y v	109
HuBMSC-MCP	..P R L. F Q..	..V L K S I L E K	E G P K S D H R S I	R F N D S V A F S	104
hMFT	...y n g i	l h c l t t i w k l	d g l l g l y q g v	t p n i w a g l s	95
Rim2p	i q a q t h f k e t	i g i i g n v y k q	p q f r e l k r t	q t n i w a i s a	149
HuBMSC-MCP	R A V Y F A C Y S K	A R E Q F N G I F.	.V P N S N I V H I	F S A G S A A F I T	142
hMFT	w g l v f f f y n a	i k s.y k t e q r	a e h l e a t e y l	v s a a e a q a m t	134
Rim2p	r s i n f f t w g t	t k d m w a k a f n	n g q e t p m i h l	m a a a t a q w a t	189
HuBMSC-MCP	N S L M N F I W M V	K T F M Q L E Q ..	K V R G ..S K Q M	N T L Q C A R Y V Y	178
hMFT	l c i u n p l w v t	k t i l m l q y d a	v v n s p h r g y k	q m f e t i v k i v	174
Rim2p	a t a t n p i w l i	k t r v g l d k a g	k t s v ..y q y k	h s w e e k s e i	227
HuBMSC-MCP	Q T E G I R G F Y R	G L T A S M A S I S	E T H I C F A I Y E	S D F K Y L E R A P	218
hMFT	k y e g v v g l y k	g f v p q l f g t s	h g h l g f m a y e	l l k.....	207
Rim2p	r n e q a f t a l y k	a l s a s w l q s v	e q l l w l l y e	q m r l i e r s	267
HuBMSC-MCP	L A S...S A N G	T E K N E...T S	F F G L M A A A A S	S E G C A C I A V	252
hMFT	.l k y n q h i r	l p e a q l s t v e	y...i s v a a l	s k i f a v a a c y	243
Rim2p	i e k f g y q a e q	t k s t s e k v k e	w c q r s g s a g l	a k f v a s i a v	307
HuBMSC-MCP	P H E V I E T R L F	...E E S..T F	V K S F V V T A R L	V F R E E G Y L A F	287
hMFT	p y q v v a r lq d q h m f	y s g v i d v i t k	t w k e v g g f	278
Rim2p	p h e v v r r l i	q t p k e n a k r e	v t e l v a s f k v	i i k e e l f s m	347
HuBMSC-MCP	Y R G L F A Q L I E	Q I F E T A I V L S	T V E L I V Y L S E	U R T Q ...321	
hMFT	y k g i a p n l i r	v t p a c c i t i v	v v e n v s h f l l	a l r e k r k 3 15	
Rim2p	v s g l t h i m r	t v r s i a m f g	t w e i v i r l l s	...377	

图 3

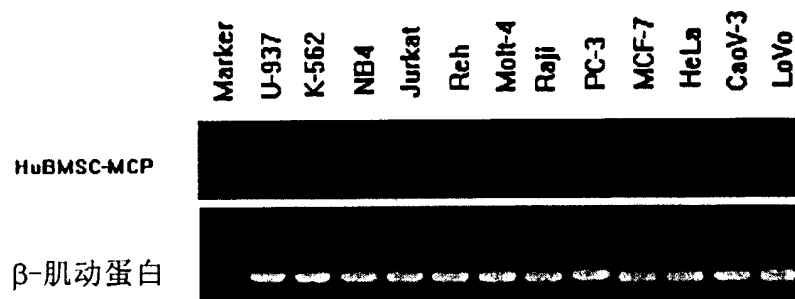


图 4

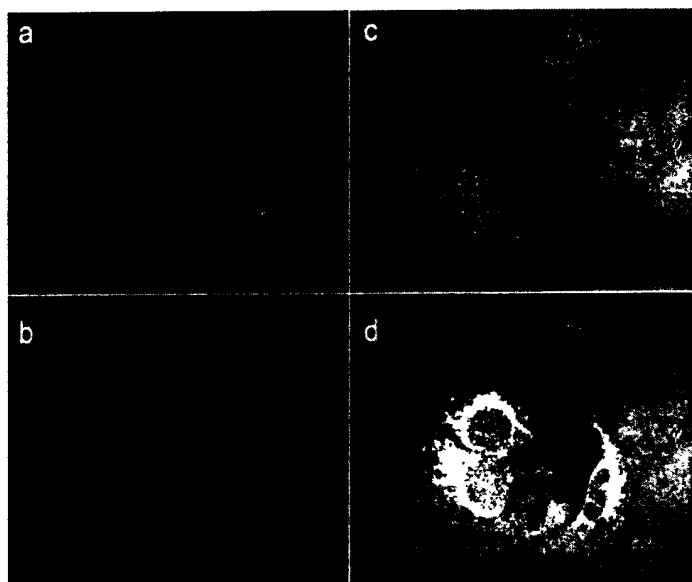


图 5

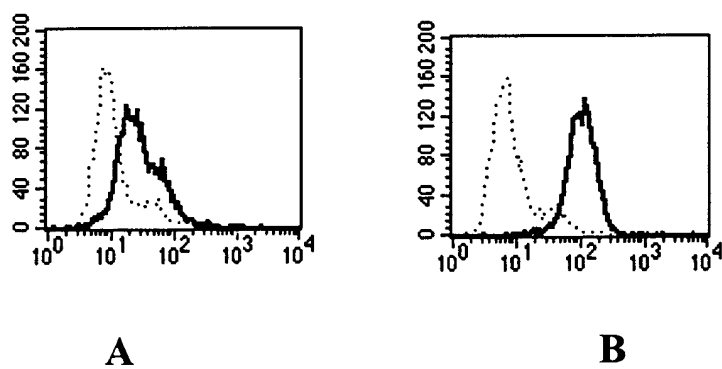


图 6