

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810176485.4

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

[43] 公开日 2009年5月6日

[11] 公开号 CN 101423551A

[22] 申请日 2001.6.27

[21] 申请号 200810176485.4

分案原申请号 01813125.5

[30] 优先权

[32] 2000.7.27 [33] US [31] 09/626,617

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 劳尔·杜穆蒂尔

琼-克里斯托弗·雷诺尔德

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 刘晓东 彭鲲鹏

权利要求书2页 说明书40页

[54] 发明名称

分离的编码 T 细胞诱导因子或白介素 - 21 的核酸分子, 其编码的蛋白和其应用

[57] 摘要

本发明涉及核酸分子的分离, 其表达经 IL - 9 上调。对应于该核酸分子的蛋白的氨基酸显示出细胞因子的某些结构特征。除核酸分子和蛋白之外, 还公开了所述这些分子的多种用途。这些分子可称作 T 细胞诱导因子。这些分子涉及 STAT 分子的激活, 急性期蛋白和炎症。

1. 刺激 STAT 转录因子表达的方法, 包括使能够进行所述表达的细胞与一定数量的 IL-TIF/IL-21 相接触, 使所述细胞足够刺激所述表达。
- 5 2. 权利要求 1 的方法, 其中所述 STAT 转录因子是 STAT3 或 STAT1。
3. 权利要求 2 的方法, 其中所述 STAT 转录因子是 STAT3。
4. 权利要求 1 的方法, 其中所述 IL-TIF/IL-21 是哺乳动物 IL-TIF/IL-21。
5. 权利要求 4 的方法, 其中所述哺乳动物 IL-TIF/IL-21 是人
10 IL-TIF/IL-21。
6. 权利要求 5 的方法, 其中所述人 IL-TIF/IL-21 是由 SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 26 所编码。
7. 诱导细胞产生急性期蛋白的方法, 包括使所述细胞与一定数量 IL-TIF/IL-21 相接触, 该数量足够诱导所述急性期蛋白的产生。
- 15 8. 权利要求 7 的方法, 其中所述细胞是肝脏细胞。
9. 权利要求 7 的方法, 其中所述急性期蛋白是人血清淀粉状蛋白 A, α 1 胰凝乳蛋白酶或结合珠蛋白。
10. 权利要求 7 的方法, 其中所述 IL-TIF/IL-21 是哺乳动物 IL-TIF/IL-21。
- 20 11. 权利要求 10 的方法, 其中所述哺乳动物 IL-TIF/IL-21 是人 IL-TIF/IL-21。
12. 权利要求 11 的方法, 其中所述人 IL-TIF/IL-21 由 SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 26 所编码。
13. 调节 IL-TIF/IL-21 分子活性的方法, 包括使 IL-TIF/IL-21 活性
25 易感性的细胞与一定数量的 IL-TIF-IL-21 调节物相接触, 所述数量足够调节 IL-TIF/IL-21 活性。
14. 权利要求 13 的方法, 其中所述调节物是能够与 IL-10R β 分子结合的物质。
15. 权利要求 14 的方法, 其中所述调节物是能够特异性结合 IL-10R β
30 分子的抗体。
16. 权利要求 16 的方法, 其中所述调节物是 IL-10R 分子的拮抗剂。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述 IL-10R 分子是 IL-10R 分子的激动剂。
18. 权利要求 14 的方法，其中所述分子是 IL-10R 分子的激动剂。
19. 权利要求 18 的方法，其中所述 IL-10R 分子是 IL-10R β 。
- 5 20. 检测暴露于炎症物质的方法，包括检测来自相信暴露于炎症的受试者的样品中 IL-TIF/IL-21 的表达，其中 TIF 的表达指示着暴露于炎症物质。
21. 鉴定 IL-TIF/IL-21 调节物的方法，包括将确信为 IL-TIF/IL-21 调节物的物质与 IL-TIF/IL-21 源和表达急性期蛋白的细胞相接触，并测定
- 10 所述细胞产生的急性期蛋白，其中与在缺乏所述物质情况下所述细胞产量相比，所述急性期蛋白产量的改变，指示所述物质是 IL-TIF/IL-21 调节物。

分离的编码 T 细胞诱导因子或白介素-21 的 核酸分子，其编码的蛋白和其应用

本申请是申请号为之中国专利申请的分案申请，原申请 01813125.5 是根据专利合作条约的国际申请 (PCT/US01/20485) 进入中国国家阶段的国家申请。

相关申请

本申请是 1999 年 10 月 18 日提交的 09/419,568 申请的部分继续申请，而后者是 1999 年 7 月 16 日提交的 09/354,243 申请的部分继续申请，而后者又是 1998 年 10 月 26 日提交的 09/178,973 申请的部分继续申请。所有
10 这些申请均全文引入作为参考。

发明领域

本发明涉及新分离的核酸分子及其应用。该核酸分子显示可被白介素-9 (“IL-9”) 上调。本文还公开了这些核酸分子所编码的蛋白。这些分子
15 曾被称为 “T 细胞衍生的诱导因子” 或 “TIFs”; 但是现在它们被称为 “白介素-21” 或 “IL-21”, 也叫做 “IL-TIF”。为此, 这些术语在本文中是可以相互替换的。这些核酸分子编码的蛋白可诱导细胞中 STAT 活化。它们可用于如刺激靶组织再生。而且, 它们的抑制剂或拮抗剂 (antagonist) 可用于延迟、阻滞或抑制其它组织的分化。
20

发明背景和现有技术

在过去十年中, 对免疫系统及其调节作用的了解不断深入。其中一个倍受瞩目的领域是对调节免疫系统的蛋白和糖蛋白的研究。这些分子中最了解的家族之一是细胞因子。这些分子参与细胞间 “通信”。细胞因子家族的个别成员参与了更广泛的病理过程, 如癌症和过敏症。一方面细胞因子
25 参与病理过程, 另一方面它们也具有治疗价值。

白介素是其中一类细胞因子。有关白介素的文献很多。不可能穷举本领域的全部专利, 仅示范性地举例包括 Mertelsmann 等的 U. S. Patent No. 4,778,879; Stern 的 U. S. Patent No. 4,490,289; Mark 等的 U. S. Patent
30 No. 4,518,584; 以及 Miyaji 等的 U. S. Patent No. 4,851,512, 它们都涉及白介素-2 或 “IL-2”。涉及白介素-1 (“IL-1”) 的其它专利, 如 Cosman

的 U.S. Patent No. 4,808,611。所有这些专利均全文引入作为参考。涉及不同白介素的更近期专利包括 U.S. Patent No. 5,694,234 (IL-13); 5,650,492 (IL-12); 5,700,664; 5,371,193 和 5,215,895 (IL-11); 5,728,377; 5,710,251; 5,328,989 (IL-10); 5,580,753, 5,587,302, 5,157,112, 5,208,218 (IL-9); 5,194,375, 4,965,195 (IL-7); 5,723,120, 5,178,856 (IL-6) 和 5,017,691 (IL-4)。对专利文献的粗略回顾显示,白介素家族成员的特定多样。可以设想更大的细胞因子家族将显示更多的多样性。参见,如 Aggarwal 等的 Human Cytokines: Handbook For Basic And Clinical Research (Blackwell Scientific Publications, 1992), Paul 编, Fundamental Immunology (Raven Press, 1993), 763-836 页,“T-Cell Derived Cytokines And Their Receptors”, 以及 “Proinflammatory Cytokines and Immunity”。所有引用的文献均全文引入作为参考。

各种细胞因子之间的关系很复杂。从引用的文献可见,特定细胞因子水平的增高或降低可以直接或间接影响受试者所产生的其它分子的水平。受影响的分子有些是其它细胞因子。

白介素-9, 曾被称为 “P40”, 是 T 细胞衍生的分子, 最初被鉴定为支持 T4 细胞系的持久抗原非依赖性生长的因子。见如 Uyttenhove 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 6934 (1988), 和 Van Snick 等, J. Exp. Med. 169: 363 (1989), 以及 Simpson 等, Eur. J. Biochem. 183: 715 (1989), 均引入作为参考。

首先观察到 IL-9 对限制性 T4 细胞系的活性, 但未观察到对 CTL 或新分离的 T 细胞的活性。见如 Uyttenhove 等, 同上, 和 Schmitt 等, Eur. J. Immunol. 19: 21679 (1989)。当实验确定 IL-9 和称作 T 细胞生长因子 III (“TCGF III”) 的分子与 MEA (肥大细胞生长增强活性) 作用相同时, 其活性范围扩大了, 其中 MEA 是可增强骨髓来源的肥大细胞对 IL-3 的增殖应答的因子, 可见于 Hültner 等, Eur. J. Immunol. 和 U.S. Patent No. 5,164,317, 这两篇文献均引入作为参考。还发现人型 IL-9 刺激成巨核细胞白血病的增殖。可参见 Yang 等, Blood 74: 1880 (1989)。对 IL-9 的研究显示其还可以支持红细胞集落形成 (Donahue 等, Blood 75 (12): 2271-2275 (6-15-90)); 促进髓系红细胞爆发形成的增殖 (Williams 等, Blood 78 (8): 306-311 (9-1-90)); 支持成人和胎儿来源的 BFU-E's 的克隆成熟 (Holbrook

等, Blood 77(10): 2129-2134(5-15-91))。IL-9 的表达还与霍奇金病和大细胞退行性淋巴瘤有关(Merz 等, Blood 78(8): 1311-1317(9-1-90))。对易患或不易患支气管过度反应的小鼠的遗传分析揭示, 这一模型与 IL-9 基因的联系, 及 IL-9 产量与易感性的关系(Nicolaidis 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 13175-13180, 1997)。人类遗传学研究也指出 IL-9 和 IL-9R 基因是哮喘的候选基因(Doull 等, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 153, 1280-1284, 1996; Horoyd 等, Genomics 52, 233-235, 1998)。同样, 对 IL-9 转基因小鼠的研究证实 IL-9 表达增加导致肺肥大细胞增生, 嗜酸细胞增多症, 支气管过度反应和高水平的 IGE(Temann 等, J. Exp. Med. 188, 1307-1320, 1998; Godfraind 等, J. Immunol. 160, 3989-3996, 1998; McLane 等, Am. J. Resp. Cell. Mol. 19: 713-720(1999))。综上所述, 这些观察有力地说明 IL-9 在该疾病中发挥重要作用。另有研究表明 IL-9 及其突变蛋白与哮喘和过敏有关。见 PCT 申请 US96/12757(Levitt 等)和 PCT US97/21992(Levitt 等), 均引入作为参考。

15 已知 IL-9 能够影响受试者体内其它分子的水平。参见 Louahed 等, J. Immunol. 154: 5061-5070(1995); Demoulin 等, Mol. Cell. Biol. 16: 4710-4716(1996), 均引入作为参考。还认识到受影响的分子在生物系统中具有自己的功能。例如, Demoulin 等显示 IL-9 的众多已知活性由 STAT 转录因子的活化介导。因此, 一直在尝试对其存在和/或水平受其它分子如
20 细胞因子影响的分子进行鉴定。

以下内容将描述这类分子。发现编码本发明蛋白的核酸分子在 IL-9 存在时表达, 缺乏 IL-9 时不表达。因此, 这些分子尤其是受试者中 IL-9 的表达或效应的“标志”。这些曾被称为 T 细胞衍生的诱导因子或“TIF”的分子现在被称为白介素-21, 或“IL-21”。下面的描述将显示本发明的这些及
25 其它特点。

优选实施例详述

实施例 1

30 已知小鼠淋巴细胞系 BW5147 可在体外生长, 且其培养基中不需加入任何细胞因子。为确定经 IL-9 诱导的基因, BW5147 样品用或不用 IL-9(200U/ml)培养 24 小时。然后, 用异硫氰酸胍裂解, CsCl 梯度离心,

分离总 RNA。这些是本领域公知技术。之后,用 oligo(dT) 纤维素柱从总 RNA 中纯化多聚腺苷化 RNA。然后用分离的 polyA RNA 生成双链 cDNA。使用商业可获得的 oligo(dT) 引物。3-5 μ g polyA RNA 的任意部位与 1 μ g 寡聚 dT 加热至 70 $^{\circ}$ C, 10 分钟, 然后与 5x 第一链缓冲液 (250mM HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 10mM 二硫苏糖醇, 500 μ M 脱氧核苷三磷酸, 和 800U 逆转录酶一起孵育。反应总体积是 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。由此合成第一条 cDNA 链。加入 30 μ l 的 5x 第二链缓冲液 (100mM Tris-HCl (pH6.9)), 450mM KCl, 23mM MgCl₂, 0.75mM β -NAD⁺, 50mM (NH₄)₂SO₄, 60U 大肠杆菌 (E. coli) DNA 聚合酶, 2U 的大肠杆菌 RNase H, 10U 的大肠杆菌 DNA 连接酶, 和 250 μ M 脱氧核苷三磷酸, 终体积 150 μ l, 来实现第二链的合成。混合物在 16 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。

产物用酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀。cDNA 终产物重悬于 200 μ l TE。

对接受刺激的 BW5147 细胞(下文中称为“试验物”(tester)), 和平行的未受刺激的 BW5147(下文中称为“对照物”(driver))进行这些步骤。

15 实施例 2

根据已知的方法将实施例 1 中制备的 cDNA 进行扣除克隆(subtraction cloning)。为此, 制备了 6 个寡核苷酸:

5'-AGCACTCTCC AGCCTCTCAC CGCA-3' (SEQ ID NO: 1);

5'-GATCTGCGGT GA-3' (SEQ ID NO: 2);

20 5'-ACCGACGTCG ACTATCCATG AACA-3' (SEQ ID NO: 3);

5'-GATCTGTTCA TG-3' (SEQ ID NO: 4);

5'-AGGCAACTGT GCTATCCGAG GGAA-3' (SEQ ID NO: 5); 和

5'-GATCTTCCCT CG-3' (SEQ ID NO: 6)。

这些序列作如下使用。双链 cDNA (2 μ g) 用限制性内切酶 DpnII 消化, 用 25 酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀, 重悬于 20 μ l TE (100mM Tris-HCl (pH7.5); 1mM EDTA) 中。12 μ l 酶切的 cDNA (1.2 μ g) 与 4 μ l 脱盐的 SEQ ID NO: 1 (2mg/ml), 4 μ l 脱盐的 SEQ ID NO: 2 (1mg/ml), 10 μ l 5x 衔接子缓冲液 (330mM Tris-HCl, pH7.6, 50mM MgCl₂, 5mM ATP, 7 μ l DDT (100mM), 和 28 μ l 水混合, 使所述 cDNA 连接到双链 SEQ ID NO: 1 和 2。加热该混合物到 50 $^{\circ}$ C, 使寡核苷酸之间及与样品 DNA 间退火, 然后冷却到 10 $^{\circ}$ C 1 小时以上, 再加入 5 μ l T4 DNA 30 连接酶, 在 12-16 $^{\circ}$ C 孵育 12-14 小时。加入 140 μ l TE 稀释。然后用 200 μ l

样品以如下方式进行 PCR。

实施例 3

为进行 PCR，取 200 μ l 样品与 2 μ g SEQ ID NO: 1 在 72 $^{\circ}$ C 加热 3 分钟，去除与实施例 2 中产物杂交的 SEQ ID NO: 2，其中所述样品是含有 2 μ l 连接产物的 66mM Tris-HCl, pH8.8, 4 mM MgCl₂, 16mM (NH₄)₂SO₄, 33 μ g/ml BSA, 0.3mM 各种 dNTP (浓度: 500 μ M) 的缓冲液。用 5U 的 Taq 聚合酶 (72 $^{\circ}$ C, 5 分钟) 填平 3' 端。扩增 20 个循环 (每个循环: 95 $^{\circ}$ C 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 3 分钟)，将产物汇总后，酚抽提，乙醇沉淀，重悬于 TE 缓冲液，使其浓度为 0.5 μ g/ μ l。下文中将其称为代表产物 (representation)。

10 实施例 4

然后代表产物经 DpnII 消化，去除其中的 SEQ ID NO: 1，准备扣除杂交。消化产物经酚抽提，乙醇沉淀。所用为未刺激的样品时即产生对照物，所用为刺激的样品时则产生试验物。部分试验物 (20 μ g) 经 1.2% 琼脂糖凝胶纯化和分离。用上述连接 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 同样的方法，将 15 样品 (2 μ g) 与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 连接起来。

在扣除杂交的首次循环中，将 0.4 μ g 已连接了 SEQ ID NO: 3 和 4 的试验物样品与 40 μ g 对照物 cDNA 混合。混合物经酚抽提，乙醇沉淀，溶于 2 μ l 3xEE 缓冲液 (30mM EEPs pH 8.0), 3mM EDTA; pH 8.0, 3mM EDTA。加盖 30 μ l 矿物油，在 98 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟。加入 5M NaCl (0.5 μ l)，然后，DNA 在 67 $^{\circ}$ C 杂交 20 小时。用 TE 和 tRNA 载体稀释反应混合物到 200 μ l。样品 72 $^{\circ}$ C 孵育 3 分钟，使 SEQ ID NO: 4 解链，然后进行 4 个 PCR 反应 (200 μ l)。这包括 20 μ l 经稀释的无引物的杂交混合物，用于填平重新退火的试验物末端，加入 SEQ ID NO: 3 样品后，进行 10 个扩增循环 (每个循环: 95 $^{\circ}$ C 1 分钟, 70 $^{\circ}$ C 3 分钟)，将产品汇总后，酚抽提，乙醇沉淀，重悬于 40 μ l 0.2x TE 缓冲液。25 将 20 μ l 该材料用 20U 绿豆核酸酶处理 30 分钟以降解单链 DNA，此步骤的总体积为 40 μ l。用 50mM Tris-HCl, pH8.9 稀释样品 (1: 5)，然后 98 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟使酶失活。用 20 μ l 上述产物，2 μ l SEQ ID NO: 3 (1mg/ml)，和 1 μ l (5U) Taq DNA 聚合酶进行第二轮 PCR。共进行 18 轮循环 (每个循环: 95 $^{\circ}$ C 1 分钟, 70 $^{\circ}$ C 3 分钟)。将产物汇总，酚抽提，乙醇沉淀，重悬至 0.5-1 μ g/ μ l。该 30 产物称为 “DP1”，或第一个示差产物 (difference product)。

实施例 5

DP1 如上述用内切酶 DpnII 消化, 与 SEQ ID NO: 5 和 6 连接, 过程同 SEQ ID NO: 1, 2, 3 和 4 的描述。重复实施例 4 描述的扣除杂交和选择性扩增, 则产生了第二个示差产物, 或 “DP2”。这些实验中 50ng 的 DP1 是试验物。对照物 (40 μ g) 如上所述。重复上述过程, 用 SEQ ID NO: 3 和 4 作接合物, 产生第三个示差产物。为产生第三个示差产物, 将 100pg 的试验物与 40 μ g 对照物混合。重复上述所有实验步骤, 但最后扩增 22 轮循环, 其中每个循环为 95 $^{\circ}$ C 1 分钟, 70 $^{\circ}$ C 3 分钟。如此产生最终示差产物。

实施例 6

用 DpnII 消化最终示差产物。克隆到商业可获得载体 pTZ19R 的 BamHI 10 位点。制备双链 DNA 质粒, 然后用常规方法测序。其序列用 BLAST 检索程序与 GenBank 和 EMBL 数据库的已知序列进行比较。

在扣除过程的最后, 确定了一段短 cDNA 片段, 即, 约 200 个碱基对长度的片段。这个片段用于筛选 BW5147 细胞的 cDNA 文库。对最大的克隆进行测序。下面将对其进行讨论。其不与任何已知序列相符。

15 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 7) 长 1119 个碱基对, 包括 537 个碱基对的开放阅读框, 其编码长 179 个氨基酸的蛋白质。该蛋白的预计分子量是 20, 093。另有两个 ATG 密码子, 假如作为起始密码子, 将分别产生长 172 和 167 个氨基酸的蛋白, 分子量分别为 19, 335 和 18, 770 道尔顿。该蛋白的每中形式的特征在于有一段疏水氨基酸序列, 该序列在穿过内质网时被切除, 从而产生成熟蛋白。

20 对该序列的分析显示具有三个富含 AT 的基序 (TTATTTAT)。常在细胞因子和癌基因的 5' 非翻译区发现这些基序。Kruys 等, Science 245: 852 (1989) 显示这些重复区可以调整 mRNA 的稳定性。

实施例 7

25 以上述实施例 6 中分离和分析的 cDNA 作探针, 鉴定 TIF α 的基因组 DNA。采用标准方法用 SEQ ID NO: 7 筛选小鼠品系 129 的基因组文库。将一个阳性克隆的 EcoRI 片段亚克隆到 pZERO 质粒中, 并部分测序。这部分序列称为 SEQ ID NO: 8。

实施例 8

30 上面实施例 7 中所述阳性克隆的第二个 EcoRI 片段也被亚克隆。同源性很高, 但序列不相同。具体而言, 这个序列的内含子 1 与 SEQ ID NO: 8

有 98%相同, 内含子 2 有 100%相同, 内含子 3 有 92%相同。

令人惊讶的时, 该序列中的启动子均无同源性, 说明其调节是独立的。5'非翻译区有 92%相同。TIF α 的第一外显子分为外显子 1 α 和外显子 1 β 。第一编码外显子(TIF α 外显子 1b 和 TIF β 外显子 1)有 99.5%相同, 第二外显子 5 100%相同, 第三外显子 97%相同, 第四外显子 98.5%相同, 第五外显子是 96%相同。非翻译区中的同源性为 96%。

实施例 9

用上述实施例 8 中的信息, 推测出所述第二个克隆的 cDNA 序列, 称为 TIF β , 如 SEQ ID NO: 9 所示。还用上述同样的方法确定了基因组 DNA 序列, 如 SEQ ID NO: 42 所示。其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示。

与 TIF α 相比, TIF β 的编码区有 6 个沉默改变。有两个改变导致不连续的氨基酸改变(在 36 位和 113 位, TIF α 的 Val 变为 TIF β 的 Ile)。在 112 位有一个更显著的改变, 由 Gln 变为 Arg。

15 实施例 10

用实验研究 TIF 的表达。用重组小鼠 IL-9 (200U/ml) 刺激 BW5147 细胞达不同时长(0.2, 0.5, 1, 2 和 24 小时)。用标准方法和试剂分离总 RNA。使用 5 μ g 总 RNA 和 oligo(dT) 引物进行逆转录。对应于 20ng 总 RNA 的 cDNA 样品用不同引物扩增 25 个循环。(每个循环: 94 $^{\circ}$ C 4 分钟, 57 $^{\circ}$ C 1 分钟, 20 72 $^{\circ}$ C 2 分钟)。TIF 引物为:

5'-CTGCCTGCTT CTCATTGCC T-3' (SEQ ID NO: 10) 和

5'-CAAGTCTACC TCTGGTCTCA T-3' (SEQ ID NO: 11) (分别是有义链和反义链)

它们分别对应于 SEQ ID NO: 7 的 107-127 和 766-786 核苷酸。B-肌动蛋白作为对照也进行扩增, 扩增 18 个循环(第一个循环: 94 $^{\circ}$ C 4 分钟, 60 $^{\circ}$ C 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟。后续循环是 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 60 $^{\circ}$ C 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟)。

扩增后, PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶分析, 用放射标记的内部探针印记证实特异性扩增。TIF 探针为:

5'-GACGCAAGCA TTTCTCAGAG-3' (SEQ ID NO: 12)

30 所示条件和探针并非特异于 TIF 的某一种形式; 然而, TIF α 的扩增产物包含一个 KpnI 限制位点, 而 TIF β 无此限制位点。用 KpnI 消化扩增产物

显示, IL-9 诱导的主要(如果不是全部) TIF mRNA 是 TIF α , 说明经 IL-9 迅速诱导 TIF α 的表达。刺激 30 分钟后可以检出 TIF α 的 mRNA, 在 1-24 小时内达到平台期。

实施例 11

- 5 进行实验, 该实验显示上述 IL-9 对 TIF mRNA 的诱导不需要合成蛋白。在这些实验中, 如实施例 10 所述, 从刺激 24 小时的细胞中抽提总 RNA, 用或不用 10 μ g/ml 的蛋白合成抑制剂放线菌酮作用 4.5 小时。在一组平行实验中, 细胞未受刺激。如实施例 10 所述抽提总 RNA 并进行 RT-PCR 扩增。用 EB 染色的 1%琼脂糖凝胶分析 PCR 后的产物。结果发现当蛋白合成被阻断
- 10 时, IL-9 的诱导仍会发生。因此 IL-9 的作用是直接作用, 不需要蛋白介导物的合成。

实施例 12

- 在这些实验中, 用 BW5147 细胞系的衍生物来研究 STAT 蛋白对 TIF mRNA 的诱导作用。第一个细胞系, BW-h9R, 表达野生型人 IL-9 受体。BW-Phe116
- 15 细胞系是具有单个突变(在 116 位)的转染子, 它使受体不能活化 STAT 转录因子。另一个细胞系 BW-mut6, 具有一个突变, 它使受体不能活化 STAT5, 但仍有活化 STAT1 和 STAT3 的能力。最后, 细胞系 BW-mut7 具有一个突变, 它使 IL-9 受体不能活化 STAT1 和 STAT3, 但仍有活化 STAT5 的能力。

- 如实施例 10 所述, 刺激细胞, 分离总 RNA, 逆转录并扩增 cDNA(细胞
- 20 被刺激 24 小时, 使用人和鼠重组 IL-9)。如上所述, PCR 产物在 EB 染色的 1%琼脂糖凝胶上分析。

分析显示, 人 IL-9 不能诱导 BW-Phe116 的表达, 说明其涉及 STAT 转录因子。已发现 IL-9 在 BW-mut6 突变体中可诱导 TIF 表达, 但在 mut7 变异体中不能诱导, 说明其与 STAT1 或 STAT3 有关, 而不涉及 STAT5。

25 实施例 13

研究正常小鼠脾细胞中 TIF mRNA 的表达。

- 培养来自 10-12 周龄的 Balb/c 小鼠的脾细胞 24 小时, 所用培养基为对照培养基或补充有 20 μ g/ml LPS(其可活化 B 淋巴细胞和巨噬细胞), 或 ConA(其可活化 T 细胞), 或 ConA 加 1%抗小鼠 IL-9 的阻断抗血清的对照培
- 30 养基, 以 β -肌动蛋白作为对照。如上纯化 RNA, 进行 RT-PCR 分析。

数据显示, TIF 在休眠的脾细胞中表达很弱, 不受 LPS 诱导, 但受 ConA

的强烈诱导。抗 IL-9 的抗血清不能影响 ConA 的诱导作用，说明该效应不经 IL-9 介导，或经其它细胞因子介导。

用 RT-PCR 产物的序列分析 ConA 活化的脾细胞，发现这些细胞主要表达 TIF α ，或排它性地表达 TIF α 。

5 实施例 14

进一步的研究显示，即使在缺乏 IL-9 诱导时，TIF mRNA 仍能表达。用尼龙毛(wool)柱从来自 5 周龄 FVB 小鼠的脾细胞中富集 T 细胞。然后在补充有 ConA(一种 T 细胞活化物)或 PMA(其能够在大多数细胞中激活 PKC)的培养基中，加入或不加入 IL-9 的情况下，刺激所述细胞 24 小时。

- 10 用标准技术分离总 RNA, 10 μ g 样品在含有 2.2M 甲醛的 1.3%琼脂糖凝胶上电泳分离，转至硝酸纤维素膜上，标记，按 Van Snick 等, J. Exp. Med., 169: 363 (1989)的杂交实验进行分析，该文献引入作为参考。

结果显示，ConA 对 TIF 的诱导不能被修饰，而 IL-9 在 PMA 活化的脾细胞中不能诱导 TIF RNA。

15 实施例 15

- 检测各种细胞系中 TIF mRNA 的表达。在这些实验中，用特定的细胞因子刺激小鼠细胞系至少一天。具体为，9T7 是一种 T 细胞淋巴瘤，其可对 IL-2, IL-4 或 IL-9 产生应答。TS3 和 TS6 细胞系是来自 T 辅助细胞克隆，并在 IL-2 或 IL-9 存在下增殖。MC9 和 LI38 是肥大细胞系，其在 IL-3 或
20 IL-9 存在下增殖。

刺激后，用常规的异硫氰酸胍裂解和 CsCl 梯度离心制备总 RNA。

然后用 Northern 印记分析 9T7 细胞系，用上述 RT-PCR 方法分析其它细胞系。

- 发现 IL-9 可上调 T 辅助细胞和肥大细胞中 TIF 的表达。IL-2 和 IL-3
25 则不能。然而，无论是否存在细胞因子，9T7 细胞系中显示大致相同的表达水平，说明 IL-9 对于 TIF 的表达不是必须的。

实施例 16

- 然后研究 B 细胞系中 TIF mRNA 的表达。A20, 70Z/3 和 BCL-1 是 B 细胞白血病细胞系，它们体外生长不需要细胞因子。这些细胞用 IL-4 和 IL-9
30 刺激 24 小时，用标准方法分离总 RNA。如上述经 RT-PCR 扩增 35 个循环，然后经印记和杂交来分析其表达。

结果显示,在B细胞中检出TIF的表达,IL-9和IL-4存在时最多仅有很弱的上调。

实施例 17

研究本发明分子在T辅助细胞系中的表达。TS2和TS1是已知的T辅助
5 细胞系,它们来自T辅助细胞克隆,在IL-9或IL-2(TS2)和IL-9或IL-4(TS1)
存在下增殖。具体为,存在列出的细胞因子时,TS2或TS1细胞可生长至少
10天,然后用已知方法抽提RNA。用上述的实验方法,经RT-PCR(35个循
环)研究这些分子的表达。IL-4和IL-9均可诱导TS1细胞TIF的表达,IL-2
不能诱导TS2表达TIF。

10 实施例 18

研究不同小鼠器官TIF mRNA的表达。用标准的异硫氰酸胍方法和CsCl
梯度离心,从肝,肾,心,脑,肠,脾,胸腺,肺,肌肉和骨髓中制备总
RNA。用上述方案进行40个循环的RT-PCR。在胸腺组织者发现最强表达,
脑组织中发现次强的信号,在其它组织者表达比这两者弱。

15 实施例 19

以下实验描述了293-EBNA细胞中产生TIF α 。

TIF α 的互补DNA如上所述。将其亚克隆到商业可获得的pCEP-4表达载
体并与CMV启动子操纵性连接。用标准脂转染胺(lipofectamine)方法将所
20 获的质粒转染到293-EBNA细胞。转染后,细胞在不含蛋氨酸但补充了³⁵S
标记蛋氨酸的培养基中孵育24小时。收集上清,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。
凝胶干燥后放射自显影1天。将cDNA以反义方向克隆到相同质粒后,转染细
胞作为对照。

发现用TIF正向转染的细胞有一条大约25-30kd的异质性带。在本系
统中,预测分子量与实际分子量之间的偏差以及异质性均归因于糖基化。
25 在一组平行实验中,编码人TIF的cDNA的表达方式与小鼠cDNA的表达方
式相同。除了cDNA的改变,所以实验参数均相同。

实施例 20

进一步进行实验来研究COS细胞中TIF α 的产生。具体为,将TIF α 的
cDNA亚克隆到上述Demoulin等描述的质粒pEF-BOS.puro中,与EF-1 α 启
30 动子操纵性连接。采用上述同样的脂转染胺方法将质粒cDNA转染到COS细
胞。细胞在不含蛋氨酸但补充了³⁵S标记蛋氨酸的培养基中孵育24小时,

之后用上面实施例 19 所述方法处理上清。再次观察到一条 25-30kd 的异质性带，还有一条 18kd 的带，其很可能代表该分子的非糖基化形式。

实施例 21

从以下实验发现 TIF 能够诱导肾小球膜细胞、神经元黑色素瘤细胞和
5 肝癌细胞中 STAT 的活化。已知当细胞因子活化 STAT 因子时，这些因子形成二聚体，从胞浆移至核内，与启动子的靶序列结合。实验细节如下。

如上述转染的 293-EBNA 细胞在正常培养基中孵育 48 小时备用，对照
上清也如上述处理。使用小鼠肾小球膜细胞系(下文中称为“MES13”)样品，
大鼠嗜铬细胞瘤细胞系(下文中称“PC12”)，4 种不同的人黑色素瘤细胞
10 (SK23, AUMA, NA-8me1 和 MULL)，人肝癌细胞(HepG3)和大鼠肝癌细胞
(H-4-II-K)。在 1%的上清存在下，刺激细胞样品(0.5×10^6) 5-10 分钟。根据
已引入作为参考的 Demoulin 等, Mol. Cell. Biol. 16: 4710(1996)制备
核提取物。简言之，用 PBS 洗涤细胞，然后重悬于冰冷却的 1ml 低渗缓冲
液 15 分钟。(缓冲液是 10mM HEPES 缓冲液, pH7.5, 10mM KCl, 1mM MgCl₂,
15 5%甘油, 0.5mM EDTA, 0.1mM EGTA, 0.5mM 二硫苏糖醇和 1mM Pefabloc, 1mM
Na₃V₄, 和 5mM NaF)。加入 65μl 的 NP-40 裂解细胞，然后离心。14000rpm
离心 30 秒沉淀核，用补充有 HEPES (20mM)，甘油 (20%) 和 NaCl (420mM) 的缓
冲液抽提。离心 2 分钟除去核碎片。根据上述 Demoulin 等的方法确定 DNA
结合活性，使用称为“GRR”的 ³²P 标记双链寡核苷酸，它包含 FcγRI 基因
20 启动子的 STAT 结合位点，即：

5'-ATGTATTTCCAGAAA-3' (SEQ ID NO: 13) 和

5'-CCTTTTCTGGGAAATAC-3' (SEQ ID NO: 14)

其对应于 GRR 探针中结合位点的上链和下链。简言之，5μl 的核提取物
在结合缓冲液 (12mM HEPES, pH7.6, 10mM KCl, 0.5mM EDTA, 2.5%甘油,
25 0.1mg poly (dI-dC) /ml) 中孵育 5 分钟。加入放射标记的 GRR 探针 (10^5 cpm;
约 0.5ng)，继续孵育 25 分钟，然后上样至非变性聚丙烯酰胺凝胶。

还注意到上述 MES13 细胞中发现的复合物在凝胶中的迁移被抗 STAT5
和抗 STAT3 抗体导致部分改变 (overshift)，这表明 (i) 所检测的细胞是 TIF
的靶目标，(ii) STAT5 和 STAT3 是 TIF 活化的复合物中重要成分。与上述实
30 施例 12 比较，STAT 图谱的差异归因于细胞来源的不同 (人和小鼠相比)。还
观察到人 TIF 可在小鼠细胞中起作用，反之亦然。

实施例 22

本实施例详述编码人 TIF 的核酸分子的分离和克隆。首先,用标准的密度梯度离心制备人外周血单核细胞。随后,以 3×10^6 个细胞/ml 的密度培养 24 小时,其间加入或不加抗 CD3 单抗(该抗体是商业可获得的 OKT3 单抗,为 1/500 稀释的腹水)。使用该抗体是因为 T 细胞来源的细胞因子通常只在 CD3 特异性抗体的活化下表达。

采用标准异硫氰酸胍/CsCl 超速离心技术从这些细胞中分离总 RNA。用 oligo(dT) 引物逆转录 10 μ g 的 RNA 样品。

如上述方法制备 cDNA,用 PCR 扩增与 100ng 总 RNA 相当的 cDNA,所用引物如下:

5'-AGGTGCTGAACTTCACCCTGGA-3' (SEQ ID NO: 15)

5'-CCACTCTCTCCAAGCTTTTTCA-3' (SEQ ID NO: 16)

它们均基于小鼠 cDNA 序列(即 SEQ ID NO: 7)。进行 30 个循环的 PCR,每个循环是 94 $^{\circ}$ C 1 分钟,42 $^{\circ}$ C 1 分钟,72 $^{\circ}$ C 2 分钟。用标准方法经琼脂糖凝胶分离扩增产物,然后测序。结果显示扩增的是 cDNA 片段。从而进行第二个反应,除用 SEQ ID NO: 17 替换 SEQ ID NO: 16 外,其余物质相同,SEQ ID NO: 17 为;

5'-CAAGTCTACCTCTGGTCTCAT-3'

第二个 PCR 反应进行 25 个循环,每个循环为 94 $^{\circ}$ C 1 分钟,45 $^{\circ}$ C 1 分钟,72 $^{\circ}$ C 2 分钟。扩增产物的处理同第一个反应。418 个核苷酸的片段被扩增,该片段被发现于抗 CD-3 刺激的细胞中,但未见于休眠的(resting)PBMCs 中。该片段的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示。

实施例 23

制备扩增产物后,用标准的 5'-RACE 技术分离 5'端 cDNA。简言之,以 SEQ ID NO: 19(如下)作为引物制备 cDNA 第一链:

5'-TGGCCAGGAAGGGCACCACCT-3'

这个引物基于实施例 22 的序列信息。简言之,5'-RACE 法实施如下:将上述制备的 1 μ g 总 RNA,2.5pM 的 SEQ ID NO: 19,逆转录酶,逆转录缓冲液,2.5 μ l 的 dNTP 混合物(10mM),2.5 μ l MgCl₂(25mM),和 2.5 μ l DDT(0.1M)混合。反应完成后,加入 RnaseH 和 RnaseT1 除去原始 RNA。还除去未掺入的 dNTP,引物和蛋白。用末端转移酶,或“TdT”给 cDNA 加尾。如下所述,

该酶为缩短的锚定引物产生 3'结合位点。通过加入纯化的 cDNA 第一链, TdT, 缓冲液(10mM Tris-HCl, 25mM KCl, 1.5mM MgCl₂)和 200μM dCTP 进行加尾。

下面是加尾反应, 用下述引物进行 PCR 反应:

5'-CCTATCAGAT TGAGGGAACA G-3' (SEQ ID NO: 20)和

5'-RACE 缩短的锚定引物:

5'-GGCCACGCGT CGACTAGTAC GGGIIGGGIIGGGIIG-3' (SEQ ID NO: 21)。

扩增 35 个循环(每个循环为 94°C 1 分钟, 56°C 1 分钟, 72°C 2 分钟)。随后对 1/100 稀释的扩增产物 5μl, 以 SEQ ID NO: 20 和缩短的通用扩增引物进行巢式扩增(nested amplification):

10 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (SEQ ID NO: 22)

扩增 30 个循环(每个循环为 94°C 1 分钟, 56°C 1 分钟, 72°C 2 分钟)。用标准方法克隆 PCR 产物, 并测序。

这三个实验, 即上述两个产生片段的实验, 和上述 5'-RACE PCR 可使扩增产物已测定的序列进行对比排列, 以产生完全的序列。

15 排列后得到推测的开放阅读框侧翼的寡核苷酸序列:

5'-CCTTCCCCAGTCACCAGTTG-3' (SEQ ID NO: 23)和

5'-TAATTGTTATTCTTAGCAGG-3' (SEQ ID NO: 24)。

20 这些引物用于扩增完整开放阅读框, 所用 mRNA 来自上述 CD3 特异性单抗刺激的细胞。扩增 25 个循环, (每个循环为 94°C 1 分钟, 56°C 1 分钟, 72°C 2 分钟)。

人 cDNA 的完整序列见 SEQ ID NO: 25。其含有 537 个碱基对的 ORF, 该 ORF 编码 179 个氨基酸的蛋白。与鼠蛋白的长度相同。人蛋白与鼠蛋白具有 79%的氨基酸同一性, 而 IL-10 具有 25%同一性。人和鼠蛋白分别如 SEQ ID NO: 43 和 40 所列。

25 实施例 24

这些实验详细描述与上述 cDNA 对应的人基因组 DNA。

30 根据该 cDNA 序列, 将引物设计为与 SEQ ID NO: 25 的 51-70 位核苷酸和 631-650 位核苷酸相对应。用标准方法进行 PCR。具体为, 以来自 CESS 细胞(EBV 转染, 类淋巴母细胞细胞系)的 100ng 的基因组 DNA 作模板, 扩增 33 个循环(每个循环为 94°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 5 分钟)。分离序列并测序, 将其示于 SEQ ID NO: 26。该序列长约 4.8Kb, 被认为包含编码 TIF

分子的完整基因组序列, 仅缺少 5'侧翼区, 启动子区和 3'末端。分析显示其含有 6 个外显子和 5 个内含子, 与小鼠的基因组序列相同。

使用标准方法进行 Southern 印记杂交。显示基因组只含有 TIF 基因的单拷贝。

5 实施例 25

有必要确定上述基因组 DNA 是否位于人基因组中。为此采用两种不同的方法。在第一个方法中, 用荧光标记上述 SEQ ID NO: 26 序列作为探针, 采用标准的原位杂交 (“FISH”) 探查人的基因组。

第二个方法中, 用 SEQ ID NO: 25 的 51-70 位核苷酸以及
10 5'-ATCAGATGGATTACTGAATG-3' (SEQ ID NO: 27) 作探针筛选一组放射性杂合克隆。用 25ng 的基因组 DNA 作模板进行 PCR, 扩增 35 个循环, 每个循环为 94℃1 分钟, 55℃1 分钟, 72℃2 分钟。

两种方法均显示该基因位于染色体 12q15。一些研究发现, 哮喘相关疾病与该位点有关。参见 Nat. Genet. 15: 398-392 (1997); Ober 等, Hum. Mol
15 Genet. 7 (9): 1393-1398 (1998); Nickel 等, Genomic 46 (1): 159-162 (1997); Takahashi 等, Genomics 44 (1): 1502 (1997); Barnes 等, Genomics 37 (1): 41-50 (1996), 均引入作为参考。

访问公共数据库, 确定该序列是否已存在于其中。在 BAC 克隆中发现了 TIF 的末尾的一个外显子, 其衍生自染色体 12q15。(序列号: AC007458;
20 191, 111 碱基对, BAC RDCI11-444B24)。在该克隆中鉴定到这个末尾的外显子说明 TIF 基因位于距 IFN 基因约 90Kb 碱基处, 距 AK155 基因不超过 30Kb 碱基, 该 AK155 是 IL-10 相关的细胞因子 (Knappe 等, J. Virol 74: 3881-3887 (2000))。

实施例 26

25 这些实验描述与 TIF 蛋白结合的抗体的制备。为此, 用标准方法将 SEQ ID NO: 7 编码的氨基酸 40-61 组成的肽与 KLH 载体蛋白偶联, 比例为 1mg 肽比 1mg 载体蛋白。用 150μg 该复合物以两周的间隔免疫受试动物 (兔) 3 次。第一次注射时, 免疫原经完全弗氏佐剂乳化, 后二次用不完全弗氏佐剂。

末次注射后 1 个月第一次放血, 用已知方法制备血清。

30 用标准 Western 印迹检测血清。简言之, 从转染 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 25 的细胞取上清 10μl, 经 SDS-PAGE 电泳分离, 然后印迹至 PVDF 膜。

抗血清 1: 500 稀释, 在标准 Western 印记方案中使用, 还用到抗兔抗体作为二抗, 用市售的检测试剂盒。

发现该血清确实可以识别 TIF 蛋白。

实施例 27

5 本实施例描述为鉴定可与人 TIF 反应的细胞系所进行的实验。在转染前, 以 3×10^5 个细胞/孔每天的量将如上所述 HEK293-EBNA 人胚胎肾细胞接种到 6 孔板。用 $2\mu\text{g}$ 含有人 TIF cDNA 的 pCEP-4 质粒转染这些细胞, 该质粒是在 CMV 启动子的调控下。转染后细胞在 1.5ml 正常培养基中培养 3 天, 为使重组人 TIF 的产量达到最大。

10 可以假定, 人 TIF 能够以与小鼠因子相同的方式诱导 STAT 转录因子的激活。接下来进行上述实施例 21 的方案。向核提取物的混合物中加入抗-STAT 抗体 ($0.75\mu\text{g}$ 抗-STAT1, $1\mu\text{g}$ 抗-STAT3, 或 $1\mu\text{g}$ 抗-STAT5b) 以及标记探针, 并孵育, 进行迁移率的实验。

15 当使用肝细胞系 HepG2 时, 可以观察到 TIF 诱导的带迁移。上述的抗体用于进一步突出该反应的特点。抗-STAT-3 抗体最大程度地改变了复合物的滞后, 而抗-STAT-1 抗体则改变了较弱的其余复合物的迁移率。抗-STAT-5 抗体没有任何作用。这说明 STAT-3 以及, 更小范围而言, 抗-STAT-1 是 TIF 激活的主要转录因子。使用人肝细胞系 HepG3 以及肝细胞系 H4IIE 也得到这些结果。

20 实施例 28

本实施例描述通过报道基因测定 STAT 激活而设计的实验。报道基因是“pGRR5”, 其含有实施例 21 中所列序列的 5 个拷贝, TK 启动子调控下的荧光素酶基因的上游。对照是 pRL-TK 载体, 其含有在 TK 启动子调控下的 *remilla* 荧光素酶基因。

25 将 10^6 HepG2 细胞与 $15\mu\text{g}$ pGRR5, $1\mu\text{g}$ Pr1-TK (250V , 74Ω , $1,200\mu\text{F}$) 混合, 进行该试验。将转染株汇集物分到 24 孔板中 ($42,000$ 细胞/孔)。

1 小时后, 用人 TIF (1% HEK293 细胞上清), 与 300U/ml 人 IL-6, 来自假转染 HEK293 细胞的 1% 上清一起, 或者仅仅用培养基, 刺激细胞。

2 小时后, 将细胞制成球状, 并溶解。使用标准方法监测荧光素酶活性。
30 结果说明用本发明的分子进行刺激可以提高含有 STAT 结合位点的启动子转染活性。

实施例 29

已知 IL-6 这样的细胞因子激活 STAT-3 可导致肝细胞中急性期蛋白的诱导。为测定 TIF 是否也具有相同活性,用来自瞬间转染的 HEK293-EBNA 细胞的 1%上清,刺激 5×10^6 HepG2 细胞 2, 13 或 24 小时。在一些试验中
5 使用 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白合成抑制剂放线菌酮,与细胞和上清共同孵育。刺激后,使用标准方法分离总 RNA,使用 oligo(dT)引物,用 $10 \mu\text{g}$ 总 RNA 样品进行逆转录。然后,相应于 20ng RNA 的 cDNA,与人血清淀粉状蛋白 A (“SAA”) 特异性的引物一起,被扩增 18 个循环,引物为:

agctcagcta cagcacagat
10 (有义链, SEQ ID NO: 28)

cctgccccat ttattggcag
(反义链, SEQ ID NO: 29)

人 $\alpha 1$ 抗胰凝乳蛋白酶:

tgtcctctgc caccctaaca
15 (有义链, SEQ ID NO: 30)

taattcacca ggaccaiccat
(反义链, SEQ ID NO: 31)

人结合珠蛋白的:

gtggactcag gcaatgatgt
20 (有义链, SEQ ID NO: 32)

acatagagtgt taaagtggg
(反义链, SEQ ID NO: 33)

人 β -肌动蛋白的:

gctggaaggt ggacagcgag
25 (有义链, SEQ ID NO: 34)

tggcatcgtg atggactccg
(反义链, SEQ ID NO: 35)

对于 SAA, T_m 为 54°C , 而对于人 $\alpha 1$ 抗胰凝乳蛋白酶和结合珠蛋白是 52°C , β -肌动蛋白是 56°C 。使用标准方法用溴乙锭染色的琼脂糖凝胶分析
30 PCR 产物。

结果显示 TIF 强有力地诱导 SAA 和 $\alpha 1$ 抗胰凝乳蛋白酶以及, 更小范围

的说, 结合珠蛋白。为检测 TIF 是否直接上调 SAA 或是否需要蛋白合成, 在放线菌酮存在下, 如上所述刺激 HEPG2 细胞。SAA 的表达未受影响, 说明蛋白合成对于 TIF 的活性而言并不是必须的。

实施例 30

- 5 上述的结果显示 TIF 和 IL-6 对于急性期蛋白反应物显示出类似的活性。由于 IL-6 的活性是通过 gp130 介导, 所以进行试验来检测是否 TIF 的活性也是通过 gp130 介导。

为检测是否如此, 如上所述, 用荧光素酶报道基因转染 HepG2 细胞, 然后在多克隆, 抗 gp130 抗体的存在下, 用 TIF 或 IL-6 刺激, 这些抗体已
10 预先被鉴定为可以阻断 gp130 相互作用的细胞因子的活性。

结果显示多克隆仅能够阻断 IL-6 的活性。

进行平行试验来检测 IL-10R β 链是否相关。在-IL-10R β 抗体的存在下, TIF 的活性被彻底阻断, 而 IL-6 的活性不受影响。对于 SAA 表达进行的试验中也观察到相同的效果。

15 实施例 31

这些实验是为检测 TIF 体内调节急性期蛋白的能力而设计。

- 将各种剂量的重组鼠 TIF (50, 12.5, 3.2, 0.8, 或 0.2 μ g) 腹膜注射到
20 内毒素抗性的雌性小鼠 C3H/HeJ (10-12 周龄) 内。注射 6 小时后, 处死小鼠, 接受了 50 μ g TIF 的小鼠除外, 该小鼠在 1, 3, 6, 12 或 24 小时后被处死。
取出肝脏并直接冷冻在液氮中。然后使用标准方法分离总 RNA, 之后在含有 2.2ml/升甲醛的 1.3% 琼脂糖凝胶中分离 10 μ g 总 RNA 样品。然后样品被转移到硝酸纤维素膜上。

- 使用商业可获得的标记试剂盒制备鼠 SAA 探针。根据 Van Snick 等,
25 J. Exp. Med 169: 363-368 (1989) 进行杂交实验, 将其并入作参考。探针本身是如上所述, 使用如上述的来自小鼠肝脏的 cDNA, 通过 PCR 制备。制备探针所用的引物为:

tctgctccct gctcctggga

(有义链 SEQ ID NO: 36) 以及

tccaggaggt ctgtagtaat

- 30 (反义链 SEQ ID NO: 37)

结果显示最高剂量的小鼠 TIF (50 μ g) 在短至腹膜注射后 1 小时后, 即诱

导了 SAA 的表达。最长的作用时期可达到 6 小时。在注射后 24 小时, SAA 的表达水平降低。

使用各种剂量 TIF 的实验数据说明使用 3.2 μ g 剂量时, 仍可获得最大程度的 SAA 诱导。当使用低至 0.8 μ g 剂量时, 仍可检测到 SAA 信使 (message)。

5 实施例 32

起初, TIF 被鉴定为一种 T 细胞衍生的细胞因子。多数调节肝脏急性期蛋白的细胞因子主要在炎症期间产生。为鉴定 TIF 能否在炎症刺激中体内产生, 将 2 μ g E. coli 脂多糖抗原腹膜注射到 12 周龄的雌性 BALB/c 小鼠中。2 小时后处死小鼠, 器官被冷冻在液氮中。使用标准方法分离总 RNA, 使用
10 oligo(dT) 引物对 10 μ g 总 RNA 进行逆转录。逆转录后, 相应于 20ng 总 RNA 的 cDNA, 与 TIF 特异性的引物一起, 被扩增 25 个循环, 引物为:

ctgccctgctt ctcattgccc t

(有义链 SEQ ID NO: 38) 以及

caagtctacc tctggtctca t

15 (反义链 SEQ ID NO: 39)

其 T_m 为 55 $^{\circ}$ C。通过琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

结果说明 LPS 在所有受检测的器官中都诱导 TIF 表达, 说明 TIF 与炎症过程相关。

以上实施例描述了本发明, 其中一方面是分离的核酸分子, 其编码 TIF
20 蛋白如具有核苷酸序列 SEQ ID NO: 7, 25 或 26 所编码氨基酸序列的蛋白。本领域技术人员将认同, 遗传密码的简并性有利于制备可能与 SEQ ID NO: 7, 25 或 26 的核苷酸序列不同, 但编码相同蛋白的核酸分子。当然, SEQ ID NO: 7, 25 或 26 是本发明的优选实施方案, 但其它实施方案也是本发明的一部分。基因组 DNA, 互补 DNA 和 RNA, 如 mRNA 均包括在内。从其它动物物种,
25 包括其它哺乳动物分离的核酸分子也是本发明的一部分。本发明的一个优选方面为分离的核酸分子, 其互补物可在严谨条件下与 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 26 杂交。使用的“严谨条件”: 如在缓冲液 (3.5xSSC), 0.02% Ficoll, 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.02% 牛血清白蛋白, 25mM NaH_2PO_4 (pH7), 0.1% SDS, 2mM EDTA 中 65 $^{\circ}$ C 杂
30 交, 然后室温 2xSSC 洗涤, 然后在如 65 $^{\circ}$ C 的高温下 0.1 xSSC/0.2 xSSC 中洗涤。也可使用更严谨的条件, 如 0.1 xSSC。这些核酸分子编码约 17-22kD

的蛋白，如 SDS-PAGE 所测，它们可活化 STAT 蛋白，如 STAT1，STAT3 和/或 STAT5。经 SDS-PAGE 测定，这些蛋白的糖基化形式约为 17 到 30kD。本发明另一部分是分离的核酸分子，其编码蛋白与 SEQ ID NO: 7, 25 或 26，所编码的蛋白具有至少 30%，优选至少 45%，更优选至少 60%，最优选 90%
5 的氨基酸同一性例如 SEQ ID NO: 42。

本发明另一方面为包含本发明核酸分子的表达载体，所述核酸分子与启动子操纵性连接，从而可促进所述 DNA 的表达。制备这类载体是本领域技术人员公知的。

所述载体及核酸分子本身均可用于制备原核或真核的重组细胞，这些
10 重组细胞中掺入了所述表达载体，或是核酸分子本身。根据本发明这一方面可使用的细胞类型有 E. coli 细胞，COS 细胞，CHO 细胞等。

本发明另一方面为上述核酸分子所编码的蛋白，优选其分离的形式。“蛋白”指核酸分子表达的直接产物，其糖基化形式，和多聚体形式，如二聚体，三聚体等。本发明还有一个部分是多聚体，如二聚体，其至少包
15 含本发明的一个蛋白分子，和至少一个不同的蛋白分子。优选该不同的蛋白分子是细胞因子，如 IL-10。本发明还有一个方面的构建体，如融合蛋白，其中上述蛋白的全部或部分以某种形式，如融合蛋白的形式，与至少一种其它蛋白或多肽，或氨基酸序列相连。例如，“融合配对物”可以是直接或间接提供识别信号的分子，如 FLAG 肽， β -半乳糖苷酶，荧光素酶等。这
20 些融合配对物优选与上述位于蛋白 N 端和/或 C 端的分子连接；但应理解已知有许多的技术可将分子与氨基酸连接，这些方法中任一个或全部均可尝试属于本发明的一部分的构建体。

如上所述，本发明的每个蛋白分子优选经 SDS-PAGE 测定分子量约 17-30kD。当然在多聚体形式中，复合物的分子量会有变化，但其中所含 TIF
25 分子的分子量经 SDS-PAGE 测定均应为 17-30kD。

这些蛋白优选包含至少约 120 个氨基酸，不超过约 200 个氨基酸。优选这些氨基酸序列由 SEQ ID NO: 7, 8, 9, 25 或 26 编码的氨基酸序列组成，或包括其全部或部分。更优选该氨基酸序列包含上述各序列所编码的除约前 40 个氨基酸以外的所有氨基酸。甚至更优选它包含这些序列所编码的除
30 约前 20 个氨基酸以外的所有氨基酸。最优选地，该蛋白包含 SEQ ID NO: 40 或 41 所示的氨基酸，以及上述这些氨基酸所定义的蛋白。

本领域技术人员将认同，上述核苷酸分子所编码蛋白的是本发明的特征，并可用于根据标准方法产生抗体。这些单克隆或多克隆形式的抗体，以及所述抗体的片段、嵌合形式、人源化形式、重组形式等均构成了本发明的另一方面。本发明的特征还有免疫原，其包含本发明蛋白分子的全部或部分氨基酸序列，优选与佐剂，如完全或不完全弗氏佐剂组合。这些蛋白序列的部分可与其它分子如匙孔血蓝蛋白连接，以增加其免疫原性。这些抗体可用于如确定是否有本发明蛋白存在。这是本发明的另一特征。现进行描述。实施例中已显示，存在 IL-9 时本发明核酸分子表达。因此本发明的另一特征是确定 IL-9 是否存在或已经存在的一种方法，其中可用抗体检测本发明蛋白，或用本发明核酸分子作探针检测 mRNA。可直接测定 mRNA，或其 cDNA 形式。这些探针可标记或不标记，取决于使用者。因此，可通过测定本发明核酸分子的存在来确定给予 IL-9 后细胞因子是否仍有效。这类试验可用于如定量研究，其中可确定细胞是否对 IL-9 敏感，如果是，敏感程度如何。还可利用本发明的蛋白使 STAT 蛋白，如 STAT1, STAT3 和/或 STAT5 磷酸化。这样可使 STAT 蛋白形成二聚体，然后移至细胞核，从而激活这些 STAT 蛋白对细胞的作用。

可将这些分子施用于受试者，如患淋巴瘤，免疫系统疾病如过敏，获得性免疫缺陷综合症，自身免疫性糖尿病，甲状腺炎或任何其他疾病的受试者，从而检验 IL-9 激动剂 (agonist) 或拮抗剂的效力，所述疾病可参见 U. S. Patent No. 5,830,454; 5,824,551, 以及 1997 年 9 月 8 日提交，现在被批准的申请 08/925348, 均引入作为参考。这些分子也可用于介导 IL-9 在这些或其它疾病中的作用。由于 IL-9 诱导 TIF, 所以 TIF 是 IL-9 活性的有效介导体。因此，本发明另一方面是在如哮喘，过敏和淋巴瘤等与 IL-9 活性过度有关的情况下，测定内源性 IL-9 活性的方法。还可使用例如反义分子，与 TIF 结合的抗体或这些分子的其它拮抗剂，通过阻断或抑制 TIF 或 TIF 活性来阻断或抑制 IL-9 活性，例如 TIF 突变蛋白可与 TIF 受体结合但不能活化该受体，因此可抑制 IL-9 诱导的活性，它是本发明的又一特征。可用这类 TIF 突变蛋白治疗的疾病有过敏，哮喘等。本发明的突变蛋白可根据 Weigel 等, *Eur. J. Biochem* 180(2): 295-300(1989) 和 Epps 等, *Cytokine* 9(3): 149-156(1997) 所述制备，均引入作为参考。这类突变蛋白可用于治疗哮喘，过敏或二者。此外，本领域技术人员很清楚，上述分

子还可用于筛选合适的突变蛋白。调节 IL-9 活性的能力对于上述疾病，以及凋亡，包括可地松诱导的凋亡，涉及 BCL-3 的核表达等疾病(condition)很重要，因为已知 IL-9 诱导这种表达。本文中“抗体”是指于 TIF 结合的抗体的任何部分，包括嵌合抗体和人源化抗体。

- 5 本发明的另一特征涉及本发明 TIF 型分子在其效应组织上刺激再生或抑制分化的能力。如上已示，TIF 可靶向多种肿瘤和正常细胞系(即肾小球膜细胞，神经元细胞，以及黑色素瘤细胞和肝癌细胞)。因此可在需要通过 TIF 分子的作用使组织再生的样品中，加入一定量的 TIF 型分子，从而刺激组织再生。该方法在体内，体外均可使用。同样，需要抑制特定组织，如
- 10 黑色素瘤细胞或肝癌细胞分化时，可加入 TIF 拮抗剂。

- 如实施例 25 所述，编码 TIF 的基因定位于 12 号染色体。已知这一染色体与哮喘有关。还公知 12q15 区域与其它炎症疾病相关。因此，本发明另一实施方案是测定疾病，如哮喘或与哮喘有关的疾病易感性的方法，其是通过确定 TIF 基因位点是否存在畸变，如多态性，缺失，添加等。这类
- 15 畸变可以指示哮喘，过敏性疾病，或一或多种相关疾病的易感性或存在。检测 DNA 序列中的异常是本领域已知的，在此不再赘述。优选标准技术，如 PCR，并用上述方法和引物检测所述异常。

- 以上所列数据，特别是 LPS 对本发明分子表达的诱导，以及该分子对急性期蛋白的调节，都指示着本发明的分子与炎症反应十分相关。因此本
- 20 发明的另一特征涉及使用 IL-TIF/IL-21 来鉴定促炎症以及抗炎症试剂。本领域技术人员公知 IL-TIF/IL-21 能够调节炎症反应。该调节的一个优选方面是，通过施用 IL-TIF/IL-21 或其拮抗剂来调节器官，例如肝脏所产生的急性期蛋白。参见如 Janeway 等，Immunobiology(4th版)，并入作为参考。Janeway 解释了各种细胞因子如 IL-1，IL-6 和 TNF- α 激活肝细胞合成急性
- 25 相蛋白，如 c-反应蛋白，甘露聚糖结合凝集素，以及上面实施例描述的那些。

IL-TIF/IL-21 激活急性期蛋白的功能还可通过测定在推定的激动剂或拮抗剂以及 IL-TIF/IL-21 存在下，急性期蛋白产量的改变，用于鉴定 IL-TIF/IL-21 激动剂或拮抗剂的方法。

- 30 本发明的另一部分是鉴于 IL-TIF/IL-21 与白介素-10 受体的关系来调节其活性的方法。如上所示，IL-10R β 拮抗剂，如抗体，能够抑制

IL-TIF/IL-21 活性。因此，本发明的另一特征是应用 IL-10 受体的激动剂和拮抗剂，如 IL-10R β 激动剂和拮抗剂，来调节 IL-TIF/IL-21 的产量。

本发明的其它特征对于本领域技术人员是显而易见的，无需赘述。

所用术语和表达方式旨在说明，并非限制，无意用这些术语和表达排除本发明所示和所述特征或其部分的任何等价体，应理解各种修改均包括在本发明的范围内。

<110> 劳尔.杜穆蒂尔 (Dumoutier, Laure)
 琼-克里斯托弗.雷诺尔德 (Renauld, Jean-Christophe)

<120> 分离的编码 T 细胞诱导因子或白介素-21 的核酸分子, 其编码的蛋白和其应用
 <130> LUD 5664 PCT

<140>
 <141>

<150> US09/419,568
 <151> 1999-10-18

<150> US09/354,243
 <151> 1999-07-16

<150> US09/178,973
 <151> 1998-10-26

<160> 43

<210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <400> 1
 agcaactctcc agcctctcac cgca 24

<210> 2
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <400> 2
 gatctgcggt ga 12

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <400> 3
 accgacgtcg actatccatg aaca 24

<210> 4
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <400> 4
 gatctgttca tg 12

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <400> 5
 aggcaactgt gctatccgag ggaa 24

<210> 6
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <400> 6

```

gatcttccct cg 12
<210> 7
<211> 1119
<212> DNA
<213> 小鼠 (Mus musculus)
<220>
<400> 7
taaacaggct ctctctcac ttatcaactg ttgacacttg tgcgatctct gatggctgic 60
ctgcagaaat ctatgagttt ticccttatg gggactttgg ccgccagctg cctgcttctc 120
attgccctgt gggcccagga ggcaaatgcg ctgcccgta acacccggtg caagcttgag 180
gtgtccaact tccagcagcc gtacatcgtc aaccgcacct ttatgctggc caaggaggcc 240
agccttgtag ataacaacac agacgtccgg ctcatcgggg agaaactggt ccgaggagtc 300
agtgctaaag atcagtgcta cctgatgaag cagggtgctca acttcaccci ggaagacgtt 360
ctgctccccc agtcagacag gttccagccc tacatgcagg aggtggtacc ttccctgacc 420
aaactcagca atcagctcag ctctgtcac atcagcggtg acgaccagaa catccagaag 480
aatgtcagaa ggctgaagga gacagtgaaa aagcttggag agagtggaga gatcaaggcg 540
attggggaac tggacctgct gtttatgtct ctgagaaaig ctgctgctg agcgagaaga 600
agctagaaaa cgaagaactg ctcttcctg ccttctaaaa agaacaataa gatccctgaa 660
tggacttttt tactaaagga aagtgagaag ctaactcca tcatcattag aagatttcac 720
atgaaacctg gctcagttga aaaagaaaat agtgtcaagt tgcctatgag accagaggta 780
gacttgataa ccacaaagat tcattgacaa tatittattg tcactgatga tacaacagaa 840
aaataatgta ctttaaaaaa ttglltgaag ggaggttacc tctcattcct tttagaaaaa 900
agcttaatgta acttcatttc catatccaat attttatata tgtaagtta tttattataa 960
gtatacattt tatttatgic agtttatiaa tatggattta tttatagaaa cattatctgc 1020
tattgatatt tagtataagg caaataatat ttatgacaat aactatggaa acaagatac 1080
ttaggcttta ataacacat ggatatcata aaaaaaaaa 1119

```

```

<210> 8
<211> 7445
<212> DNA
<213> 小鼠 (Mus musculus)
<220>
<400> 8
gtctatcact tgcittaagat tcttctaatt tataaaaaaa actatttctt aaaatgaaaa 60
gcaaacagag cacgfatiaa tagcatggig ttctgacct gcaggtacag agtggaatgg 120
taagaggcgc tattatcagc ataaccaac atgtaaatgt tttcttctgg caagcaaact 180
tgaaatctat gtcttaaaaa atcttcaagc ctctaataa gtgctaacga ctggagtccg 240
ctgctgcca acagagctct tgagcacgct ctctctggt tgcaatttta tgttcttga 300
tcgactcccc aacctctcac ctteggctcc tgatggccac ctttcaactt tctgattta 360
tgaactccat gtttaactt tttattaaa atattcacac aatcagtggt tgtgcaagtc 420
tgtttacccc acatgtaigt ctgtcacca agtgcctgct ggigtgtg ggggcaagga 480

```

gcaggagagg gtgccctggc accggagtca cggatgggtg tgagccacca tgaggatgct 540
 gggagttaga cccaggtcct ccagaagtgc agcaaatgct cllaaccaca cgcaggcatt 600
 tctctcicca gccccaatat gagtgccttt agattccacc tagaatagag atctgatggc 660
 ttcactcact gccacctccc ctttgcactt tctgccaag gaacacccaaa aagcaagaat 720
 ccccacactg ctttgcctcc tcaagtctgc acctctcaac aggtcaagat tctccagtgt 780
 ccctctaaca ctttccccag tgcctcteta acactttctc cagtgtccct ctaacacttt 840
 ctccagtgtc cctctaacac ttftgacttc aattagciga ggggagaaa atctcacaca 900
 gtgattitca tgacttcgcg ttctagtcta gatgtaggca ttgctgtgc agtctagggt 960
 aggcgtctgc tcccgtctgt taggaaagac ttcttagtc tagttgtcag gtgctatctg 1020
 ggattcagtg tacatacaat gcaaaaaatc ccagtatttt gtaaattctc ttcttcaact 1080
 atccatctat atagtatggt atgttaggtt catttaaaaa taatattttg agacttatgc 1140
 ttgcacaagt aaaatgtcag agaattagca aatgtatagt attattttat tttaaaaaaa 1200
 tctatgcita aaatgtctat tagattgttc actaccgata ttccaaact taacttgacc 1260
 ttggctatga ttccaacctt tgiatttgca tctaccataa cagtctctga accagaacat 1320
 tctgtggcaa tgggagctgt gaagaaagcc aacattctta ttaaaaaaaaa aaaacagcta 1380
 gttatagttt aggatccat atactaaaaa aatagagat ataattattt taaaaattga 1440
 aataatctcc aagtttcat tatggcttat tcaaagcac agaatatagg acacgggtct 1500
 tttattctg gtcacttcta aagagataag aatctatgaa gttgggtgga aatgagctc 1560
 gtgacccaaa cgctgactca atagctacgg gagatcaaag gcctctctac tcaatcagaa 1620
 tctactacgg caagccatg gctttctttg aaaaccgigt ttagaagatt tctgggattt 1680
 gtgtgcaaaa gcacctgtt ggccctcacc gtgacgtttt agggaagact tccatctct 1740
 caaggiggga aggcttggag gtgggtctt gtggccctct atggtggtta ggtacttctc 1800
 agaagacagg actggaaatt agataatgtc tgatgtcata tcaatcaca taccaaaaaa 1860
 acctgggtg cccgatggct ataaaagcag caacttctgc ctctccatc acaagcagag 1920
 acacciaaac aggttaagcac tcagacctct acagacaatc atctgcttgg taccatgcta 1980
 cccgacgaac atgctcccci gatgtttttg ccttttgctc tctcactaac aggcctctct 2040
 ctcacttata aactgttgac acttgtgca tctctgatgg ctgtcctgca gaaatctatg 2100
 agtttttccc ttatggggac ttggccgcc agctgcctgc ttctcattgc cctgtgggcc 2160
 caggaggcaa atgcgctgcc cgtcaacacc cgggtcaagc ttgaggtgtc caacttcag 2220
 cagccgtaca tctcaaccg cacctttatg ctggccaagg aggtacagct gcatctcttt 2280
 ctctccatac cgccttgcca tttctctga agcacttga aactctttag gggcgcttta 2340
 tctccgagg tctcactacc tatgtttctt gtctctttag agactcttta aggactgggt 2400
 cttttctat ttctatttca aggtctcagg acctttctt aicttggctt tcaggacaca 2460
 taiactgaat ttatctaca gaggcgcat tagaaagcca cccacgactg caatactttc 2520
 catttctctg tgctctctc tgaactcata ctctcttggc tactcttgag acccactgcg 2580

gacatacacc tctacttaca ggcttttctt ccatctcctt gtcacccagg cacttagggg 2640
tttctctctt tcaggccagc cttgcagata acaacacaga cgtccggctc atcggggaga 2700
aactgttccg aggagtcagt gtaagtcctc actgtgatga gcagggctag ctgcgggagc 2760
tggtaggccc tctgggatag tctgacgtat gacccctgct gcttcttctc tacctgcagg 2820
ctaaagatca gtgctaccig atgaagcagg tgctcaactt caccctggaa gacgttctgc 2880
tccccagtc agacaggttc cagccctaca tgcaggaggt ggtaccittc ctgaccaaac 2940
tcagcaatca gctcagctcc tgtgtaagtc tgactctggc tacctatgct cctctctctt 3000
cctcttctat tccagtaaga acccgaggtc ctgccctctc tctcttcaca agagtgagga 3060
gggcctcagc accaccacca tcataggcca ctgaaatag gtcacaaagg cttggcctc 3120
aatlgagtaa tactttgagt ttgtatgagt gaagctttat ttgttttctc catggaaaga 3180

aatcaactca aattctgtag gatgagaaag atgttgggaa cgaaaaaagg cctagataga 3240
gaaacagatc tgctgagtat agtacttatg gggggagcag ggggcgatat ccactgaglia 3300
caagtacttg tggggagaga aatccactga gtacaagtac ttgttggcat ggagatccac 3360
tgagtacaag tactigtggg gggaggggaaat ggcacagagc aaaagttaa gggaaaggaag 3420
atggagaggc ctcatggttg ggggtgtgaa aggtcactcc ttctccatgt gatggagagt 3480
taagaaaaac cagtgtgtga gtigtatgct ttcagacacc cccaactatg aaacatatcc 3540
acgaggagcg ggcagactgt gggagacctg gcatttaggg aaggcgcggc ttctcacagc 3600
agaaacttta tgctcatctc ttgtcttaca ctccacctt tgatgaggtt cagctcaggt 3660
ttcgtttcta ccgttcttgc tacttggtgga aacttcagta ggattcccca aagacgagga 3720
cagctcttct gtaagggagg gacctggatt tcagtctctt agagaacgaa atagctcaga 3780
gaatctaggt caactgaaa tctaggtcac agcgggcaaa aatgactgaa cgcctctatt 3840
ccaggatgaa ggtcagctgc ctcagatata ctgaggtatt gggctccca cggataagat 3900
tctgttagtg agtctgctt tattttgcag cacatcagcg gtgacgacca gaacatccag 3960
aagaatgtca gaaggctgaa ggagacagtg aaaaaggtag tattggcaag ccacaatact 4020
aagccattca gtaggagacg tggggatttc ttctctgct tcccagctcc ttctactttg 4080
taacatttta ttgacttgt ctactatctg gtccattact cgttagctg cacctgtatc 4140
tagctgggtc tatagatctt tcaatctgtg tctaaattg taagtcacaa ttctggagct 4200
agcagaaagc ttagctcagc cagtctcatg agcacttctt cggaggatgg ctgtgacag 4260
agtcaatgct agaagacagc atccctgatt cccagctctg cacttgccta gtggccatgt 4320
gtaattactt tggcttgatt aagtatttgg gaaagccagt tcccacggac ctacataatc 4380
tgaagaacca tgcatgaaa actagaaagc tgggcacaaa ctactagag atgatttttg 4440
agctcattaa acggatgctc tgaatgtgg caaaatcaac ccagaataac aacaaaagag 4500
ctggatttgc aaataggaca agtatttaga atcactggta ttaatagcta tcatcttaat 4560
taaaatatag ggcctatata tatatttaag attaaacaca agagtggata gcctcccaat 4620

ttacttggcc tggtttcaaa agagtaaaaa taccagtcac ggattaatta tagtgcacg 4680
aaagtatgag atggaaaccc ttctcttact ttttaccctc atttcttagt ttttttttc 4740
ttcacaccct gatcaagcca ctagtaagca cctatctgct gtgagctatt atatgacttt 4800
acagcaaaaca acattgctgt gtggcctctt tggggaaggg aacaggatag caggaggctc 4860
aggctagcaa gtctgacttg ccctaaagcc agaggcatgg ttgatagcag agaaagtgag 4920
gctcttcgca agtgggtgtg ctttaagtaat cagaaacagg aaggctccgg ttgatggaat 4980
taccagtaag atatctacc ttatctcctt ctatcgaacc taaatcgtct ctttttcttg 5040
tggttaggct gataaacaca ctgttttct tttgagtggt catggctttg tagattttta 5100
gtgctctgcc agtctgtgt agagggttg ttacctgac acctgggctt ggatgttagc 5160
atgccaaagg cacacacttc tgaatgcctg tgtaaaaggt tattattcat ttactttgtc 5220
tttggaaagg tgaagcgtgt gtgagaaaga actcacagga gatgtgttct ctgtaggaaa 5280
acttttttt tcccttaaa tgcctataat ccactttcag tcaactttga cttttatacc 5340
atgctgtcac atgaaagagt gtttaggccc gctctcagc ctctgggaaa agcaccaata 5400
ggggaaggaa tgttatgctg agaaatctga ccggcaggga aactggcag agctccccg 5460
aagaccacca cagggtttaa gtaggaacag tccagggtgg gctcagtaa tagaatggaa 5520
cagagcgagg gaagataagc tacaaggtt catagggctc ggagtctta agatacaaaa 5580
tagctgcttg ggctcataa caaaggaagt ctgggaaggc agcaagtgag agggaaatgg 5640
aaaggaaaaaacagaatgt agaggacttg aacagctaca aatcctctac cagacgattt 5700
ttcttggaa aatctagaag gtagtggatt aggtgattgc agggggactt gctttgcat 5760
ttgaaatctg gttttgtct ctccattgag gttgaaagcg tcacctttt taccctcga 5820
tggaggagga aagaaggggt gttatgactc ctacctggag ttttactagt ttacgcaatg 5880

gaacagacac tggggacctc ctcttgaca aaaaaatgga aacctgtgt ttgtctgtt 5940
tgttctttt ttaagaaagc acaggcaaag cccgaccaca tgggttgaat gtgggtcttt 6000
gagtcaagc ttttagattg agcactcact aatagttagt catggctcagg tggagggcta 6060
cctgtcagc cgagccctgc tggcttcgca cttaacatct ccaggctcga gtatcacttc 6120
ctgctactta gcacagttg gaggtagca aaccttttt tccaaccccc actaaaattt 6180
aattgacaaa agactgtgta atttgtggga tacagtgta taatgatct atgtgtgcat 6240
tgtcaaggi tcaataagat agattaatag gccatcaac agctttatgg gtgtgaaatg 6300
caagtaatat aggtagatgc ctgtgtgtc cttaggtcag aaaggcatga ttttaagtc 6360
ttgggcaaat catattatac tcatgctaaa aatacattat gttgattatt aatcttttag 6420
agaaggctga tacttggttt tgggtctcag caagcaaatg tcaccagctc tttctaactg 6480
gtaccacttt agaaaatgct acctgtgctc aaattggttt gtattcttat tttcatagct 6540
tggagagagt ggagagatca agcgattgg ggaactggac ctgctgttta tgtctctgag 6600
aaatgcttgc gtctgagcga gaagaagcta gaaaacgaag aactgctcct tctgccttc 6660

taaaaagaac aataagatcc ctgaatggac tttttacta aaggaaagtg agaagctaac 6720
 gtccatcadc attagaagat ticacatgaa acctggctca gttgaaaaag aaaatagtgt 6780
 caagttgtcc atgagaccag aggttagactt gataaccaca aagattcatt gacaatattt 6840
 tattgtcact gatgatacaa cagaaaaata atgtacttta aaaaattggt tgaaaggagg 6900
 ttacctctca ticcctttaga aaaaaagctt atgtaacttc atttccatat ccaatatttt 6960
 atatatgtaa gtttatttat tataagfata cattttattt atgtcagttt attaatatgg 7020
 atttatttat agaaacatta tcigctattg atatttagla taaggcaaat aatatttatg 7080
 acaataacta tggaaacaag atatcttagg cttaataaa cacatggata tcataaatct 7140
 tctgtctigt aattttctc cctttaatat caacaatacc atcatcatca tcattacca 7200
 atcattctca tgatttcatt cttagccat attatactgt taaagtgtt tccctggaggc 7260
 ctgtggtttt gtgtgtgttg tgtgtgtgtg tggggttatg caigtgaaag ccagagatgg 7320
 atattagggtg ticttctcta tcagctcttg ccttattatt tgagacaggg tctgtcactg 7380
 aacctgtagc taggctggcc aacaagctct attaatitit ttaagattt attaatatg 7440
 tgtat 7445

<210> 9

<211> 1111

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>

<400> 9

aacaggctct cctctcagtt atcaactttt gacacttgtg cgatcgggtga tggctgtcct 60
 gcagaaatct atgagttttt cccttatggg gactttggcc gccagctgcc tgcttctcat 120
 tgccctgttg gccagaggag caaatgctgt gccatcaac acccgggtgca agcttgaggt 180
 gtccaacttc cagcagccgt acatcgtcaa ccgcaccttt atgttggtcca aggaggccag 240
 ccttgcatg atacaacacag acgtccggct catcggggag aaactgttcc gaggagtcat 300
 tgctaaggat cagtgtctacc tgatgaagca ggtgtctaac ttcaccttgg aagacattct 360
 gctccccag tcagacaggt tccggcccta catgcaggag gtgggtgcctt tccctgaccaa 420
 actcagcaat cagctcagct cctgtccat cagtgtgtgac gaccagaaca tccagaagaa 480
 tgtcagaagg ctgaaggaga cagtgaanaa gcttggagag agcggagaga tcaaagcgat 540
 cggggaactg gacctgtctt ttatgtctct gagaaatgct tgcgtctgag cgagaagaag 600
 ctagaaaacg aagaactgct ccttcctgcc ttctaaaaag aacaataaga tccctgaatg 660
 gactttttta ctaaaggaaa gtgagaagct aacgtccacc atcattagaa gatttcacat 720
 gaaacctggc tcagttgaaa gagaaaatag tgtcaagttg tccatgagac cagaggtaga 780
 ctgtataacc acaaagatc attgacaata ttttatgtc attgataatg caacagaaaa 840
 agtatgtact ttaaaaaatt gtttgaagg aggttaccctc tcattcctct agaagaaaag 900
 cctatgtaac ttcatttcca taaccaatc tttatataatg taagtttatt tattataagt 960
 atacatttta tttatgtcag tttattaata tggatttatt tatagaaaa itatctgatg 1020

ttgatatttg agtataaagc aaataatatt tatgataata actatagaaa caagataatct 1080

taggcttttaa taaacacatg aatatcataa a 1111

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <400> 10
 ctgcctgctt ctcattgccc t 21

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <400> 11
 caagtcctacc tctggtctca t 21

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <400> 12
 gacgcaagca tttctcagag 20

<210> 13
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <220>
 <400> 13
 atgtatticc cagaaa 16

<210> 14
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <220>
 <400> 14
 ccttttctgg gaaatac 17

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <400> 15
 aggtgctcaa cttcaccctg ga 22

<210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <400> 16
 ccactctctc caagcttttt ca 22

<210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>

<400> 17
 caagtctacc tctggctca t 21

<210> 18
 <211> 418
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)
 <220>
 <400> 18
 agaagtgctg ttocctcaat ctgatagggt ccagccttat atgcaggagg tgggtccctt 60
 cctggccagg ctcagcaaca ggctaagcac atgcatat gaaggigatg accigcatal 120
 ccagaggaat gtgcaaaagc tgaaggacac agtgaaaaag cttggagaga gtggagagat 180
 caaagcaatt ggagaactgg atttgctggt tatgctctg agaaatgcct gcatttgacc 240
 agagcaaagc tgaaaaatga ataactaac ccccttccct gctagaaata acaattagat 300
 gccccaaagc gattttttt aaccaaaagg aagatgggaa gccaaactcc atcatgatgg 360
 gggattcca aatgaacccc tgcgttagtt acaaaggaaa ccaatgccac ttttgitt 418

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)
 <220>
 <400> 19
 tggccaggaa gggcaccacc t 21

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)
 <220>
 <400> 20
 cctatcagat tgagggaaca g 21

<210> 21
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列 PCR 引物的描述
 <220>
 <221> 改变的碱基
 <222> 24, 25, 29, 30, 34, 35
 <223> a 是肌苷
 <400> 21
 ggccacgct cgactagtac gggaaggaa gggag 36

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <400> 22
 ggccacgct cgactagtac 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)
 <220>
 <400> 23
 ccttcccag tcaccagttg 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)
 <220>
 <400> 24
 taattgttat tcttagcagg 20

<210> 25
 <211> 690
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)
 <220>
 <400> 25
 tgcacaagca gaatcttcag aacaggttct ccttccccag tcaccagttg ctcgagttag 60
 aattgtctgc aatggccgcc ctgcagaaat ctgtgagctc tttccttatg gggaccctgg 120
 ccaccagctg cctccttctc ttggccctct tggtagagg aggagcagct gcgccatca 180
 gctcccactg caggcttgac aagtcctaac tccagcagcc ctatatacacc aaccgcacct 240
 tcatgtctggc taaggaggct agcttggctg ataacaacac agacgttcgt ctcatggggg 300
 agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgtgcta tctgatgaag cagggtctga 360
 acttcacctt tgaagaagtg ctgttccctc aatctgatag gttccagcct tataatgcagg 420
 aggtgggtgcc ctccctggcc aggcctcagca acaggctaag cacatgtcat attgaagggtg 480
 atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa aagcttggag 540
 agagtgagaga gatcaaagca attggagaac tggatttgcg gtttatgtct ctgagaaatg 600
 cctgcatttg accagagcaa agctgaaaaa tgaataacta accccctttc cctgctagaa 660
 ataacaatta gatgcccaca agcgattttt 690

<210> 26
 <211> 4797
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)
 <220>
 <400> 26
 tgcacaagca gaatcttcag aacaggttct ccttccccag tcaccagttg ctcgagttag 60
 aattgtctgc aatggccgcc ctgcagaaat ctgtgagctc tttccttatg gggaccctgg 120
 ccaccagctg cctccttctc ttggccctct tggtagagg aggagcagct gcgccatca 180
 gctcccactg caggcttgac aagtcctaac tccagcagcc ctatatacacc aaccgcacct 240
 tcatgtctggc taaggaggia tacaiccaa tccgtctctt tctcgttggg tctacttggg 300
 atccaaatag tcttaaaact tttcttcaga gcatctctaa gagctttagg aaccactgt 360
 ttatccctga ggglagataa atttctgtt tttcagaga ctctttggga atctggcttt 420
 tttttttct tgaacttctt ccttccattt tggcctttat gatacatatg atgaatttt 480
 cccaagagc ggccattcag taatccatct gatgattttt tttccttta tgcctctgtg 540
 cattgttcta aactcatgca cacatctgaa tctgtctttt agtctttatg atgttgcct 600
 ggggagacgg gatggggcac atgtctatgt ataaattttt tttctatttg ctcaatgicc 660
 agacccttag tctttcttc tcttccaggc tagcttggct gataacaaca cagacgttcg 720
 tctcattggg gagaactgtt tccacggagt cagtgttaagc tacagttgtg acgaacaggg 780

ccgtgtgccg tccatgggta cttgggggtgg tggigtatgat gglttaggtc ttatccctta 840
 tgacccttcc tgtttccctt ccaccctgcag atgagtgagc gctgctatct gatgaagcag 900
 gtgctgaact tcacccttga agaagtgcig ttccctcaat ctgatagggt ccagccttat 960
 atgcaggagg tgggtccctt cctggccagg ctcagcaaca ggctaagcac atgtgtaagt 1020
 tcagctctca gcctatgccc acctaccctt ccttccctcc tccacagag acccccttac 1080
 cccaactctc tctccctccc cctaccctta agctagcagg aagaagtgtc ttggcagcag 1140
 tgttatcagg agtcatitgg gatcatagag tatttgcitt tgctttgact ggtcacatc 1200
 ttgagtttat agtggtgaat ggggtctgga acttaagtgt acagaagccg cattggtttg 1260
 tcttcggaaa aaaggcaact caggttgcgt aagatgagaa aggtgttggg aaaacatcta 1320
 gctgtggaaa tggatccatt gagtctaagt tgttgagggg aggggatggc atggagagaa 1380
 attagaagag aaagtgggaa atgggaaggc ttaaagtcgg tgggtgggtcg gcagactgtt 1440
 gccctgttga tgtcatggga agccacaaaa tgggaggcgt gtaacttga tgccctgaa 1500
 catttgaac tatgaaaaaa agtttgagtg gaggggccc agtaaaaggc cctaggactt 1560
 actgaagagg gcttaatttt cacatgagat gttttatgta catttctgt tctaagcatg 1620
 caattttctg gagatagat tgaggtttta ttccttacag aatttgcata aactactccg 1680

 ctctttccac aaatgcaaac ctgagtagga ttcccaaag atgaagagag gtctcttcta 1740
 agggaagtga ctggattctg gcgtccaagg gaattcaaga gctcaggaaa tctaggtcac 1800
 tgttgaatc taggtcattg tgggcaaaa tactaagagc ttaattcca ggtgaattgt 1860
 actgtacctc catgggtgtg gaggttcata aagtttcagc acaacaitaa gatagtatg 1920
 ctgttatatg ttttatagca tattgaagggt gatgacctgc atatccagag gaatgtgcaa 1980
 aagctgaagg acacagtgaa aaaggtagga ctgataactg tcaatgctaa gicatgcaat 2040
 aggagagaca aatgttgttt tcttttctt tctttcttc catcactttg tgattttica 2100
 ctgtattctc ctaccaccag ggcgattact ttgggtctctg tgtatgtaga tatactata 2160
 tatctagatg tcaagttcca aatcttgcaa attgtagaat tctagaactg gttgggatct 2220
 tagcttgtct agtcacataa cctcagattc tggggatggt cagtggcaga gatagggcta 2280
 gaatgcaggc ctctgaate ccaagccagc acttttccc gttgtgatac agattagttt 2340
 tggtagcatt aattcttagg gaaattcag attcciatg actcatgtaa tctgaagaag 2400
 tacttgttta aaaacagaaa aatgcctatg ggcaaattta ttggaagtca tttttgaagt 2460
 cattaatgca ttgctttgaa acttgggaaga ataaactcag aacaatgaga aaagagctgg 2520
 acttgcatac agggctaatt tctggagtaa taacactta ttigaatta tcataatata 2580
 tatcagatat tgattatagt ttaaagcaa gagcagacaa ccccgatctc tttatacag 2640
 gttcaatag agtaaaaaa ttagtaagag atttattata gttaaatgga agtctgaatt 2700
 ggtaagcttt ttttcttcc tctctccat caagacctc cattctagtt tcttcttca 2760
 ctccctcaac aaatccctag ggagcaitta tccatgggtg gctgggtgac attctatag 2820

tgaatgatac catcatgtgg cctatttggg gaaaagaaca acaatggaag gcttagacta 2880
acaatagtga ctaccccaa aaccggagga atgattagga gcagtgaag tgacgctctt 2940
gcaagcaggt acaactaaat atcagaaac atgaaggctc cagttgatgg aattttcagt 3000
aacaagctta accttaattc ccccttttcc cctcttgact ttttaaaaaa gcgfttcttc 3060
ctgagcatca tttaatgagt gtgactgttt ctctcttga taattgaagg cttttagatt 3120
tfaaatgtg aagcccagtt ctctgttat agaactatta tctagacatg gagggctgaa 3180
tgttagcatg ccacagacaa ggcatgcttt acacatcttg cttaaaaaat tactgtattc 3240
atcttgcttg tigtctllag aaaagigaag tgtgagagag gagaatctca tggatgctg 3300
tgtgtatttc aagacctta atccattttg aaagaatcaa tttcatattt gcaatgggtt 3360
gccatgtgga agagtatta tgcctttttg ctggtagctt cagaaagcac aggagggaga 3420
gcaatgttgt tcagagaaag atcaacagga ggagaaactg tcagagctgt ctgaaatagg 3480
gtggttttgg gaggcattaa ttccctctcg ttgggggtaa aagcagaacg caggttggta 3540
gtaaaatgca tgacagacag taggggacga taaactttaa aattctttat agtcttggag 3600
tctttgagat agaaaagaat atctttttgg ccttatgtca aaagaagtat ggaagggtga 3660
aagggcggaa gaaagcagga aaaggaagaa ccatgtatta tatagaggac aatggtgaca 3720
aggttttct tgaataatg caaatatgat agattagagg aatttcagta gggatgctt 3780
ttcactgaa ttgggttcc ctcttcgatt aagtttggga tccctatctg catttgactt 3840
ggagagagaa agaatgaatg ttaggaccta tatctggtt tctattaact aaagcaagtg 3900
gaaaagactt atttggtatt ttcccacaa aagtgaaac ttttcttta ctgtttgca 3960
aaaagggtga aatagaaaaa gccttaatgt attggtgaat acatggttca aagtcatttg 4020
agtagagatg ttttaaatca ggagtgtcca atcatttggc ttccctggac caccttgaaa 4080
gaattgtctt gglacacaca taaaatacaa gaacaatagc tgatgagcta aaaaagtcca 4140
tgcataaatc tcatactgtt ttaagaaagt ttatgaattt ctgttaggtt gcattcaaag 4200
ctgtctggg ccattgtcgg cctgtgggct gcaggttga caagctcctt ataagtaac 4260
tgtcatagat agtttggag ctgcaaaaca ggccaaggca taatgggtgg cactcgggat 4320
ccccagatc ccagcctcac ttcagtcicc ttgctctggt taagaagggg tggtaacac 4380

tctgccagc ttttaaacag cttcattagt gtgagggtca cctgaaattg atgcctgctg 4440
gtggcctctc agtccagaga gccgtcattt taagctcttt ggcaaatcat acaatactaa 4500
agggatatta ctatgaatgt ttacaaatg cttaaaactc ggtttctgtc tccatcaacc 4560
taatcttga atttctaatt tgttcacttt agaaaacatg gcataaatgc tcaataactt 4620
ttgactctt atttcacag ctggagaga gtggagagat caaagcaatt ggagaactgg 4680
atitgtgtt tatgtctctg agaaatgctt gcaattgacc agagcaaagc tgaaaaatga 4740
ataactaacc cctttccct gctagaata acaattagat gcccaaagc gattttt 4797

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)
<220>
<400> 27
atcagatgga ttactgaatg 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)
<220>
<400> 28
agctcagcta cagcacagat 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)
<220>
<400> 29
cctgccccat ttattggcag 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)
<220>
<400> 30
tgtcctctgc caccctaaca 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)
<220>
<400> 31
taattcacca ggaccatcat 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)
<220>
<400> 32
gtggactcag gcaatgatgt 20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)
<220>
<400> 33
acatagagtg ttaaagtggg 20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)
<220>
<400> 34
gctggaaggt ggacagcgag 20

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)
<220>

```

<400> 35
tggcatcgtg atggactccg 20

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠 (Mus musculus)
<220>
<400> 36
tctgctccct gctcctggga 20

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠 (Mus musculus)
<220>
<400> 37
tccaggaggt ctgtagtaat 20

<210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠 (Mus musculus)
<220>
<400> 38
ctgcctgctt ctcattgccc t 21

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠 (Mus musculus)
<220>
<400> 39
caagtcctacc tctggtctca t 21

<210> 40
<211> 179
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)
<220>
<400> 40
Met Ala Val Leu Gln Lys Ser Met Ser Phe Ser Leu Met Gly Thr Leu
1          5          10          15
Ala Ala Ser Cys Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Ala Gln Glu Ala Asn
20          25          30
Ala Leu Pro Val Asn Thr Arg Cys Lys Leu Glu Val Ser Asn Phe Gln
35          40          45
Gln Pro Tyr Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser
50          55          60
Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe
65          70          75          80
Arg Gly Val Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu
85          90          95
Asn Phe Thr Leu Glu Asp Val Leu Leu Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln
100         105         110
Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln
115        120        125
Leu Ser Ser Cys His Ile Ser Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn
130        135        140

```

Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu
145 150 155 160

Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn
165 170 175

Ala Cys Val

<210> 41

<211> 179

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>

<400> 41

Met Ala Val Leu Gln Lys Ser Met Ser Phe Ser Leu Met Gly Thr Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ser Cys Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Ala Gln Glu Ala Asn
20 25 30

Ala Leu Pro Ile Asn Thr Arg Cys Lys Leu Glu Val Ser Asn Phe Gln
35 40 45

Gln Pro Tyr Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser
50 55 60

Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe
65 70 75 80

Arg Gly Val Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu
85 90 95

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

Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln
115 120 125

Leu Ser Ser Cys His Ile Ser Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn
130 135 140

Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu
145 150 155 160

Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn
165 170 175

Ala Cys Val

<210> 42

<211> 5935

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>

<400> 42

gaattcaagt ccacatgcaa tcaatccgaa tactttgtaa attctcttct tcaaataacc 60
atctatatag tataagttat tgtaggatca ttiaaaaata atgitttgag acctatgttt 120
gcacaagtaa aatgfcagag agaattagca aatgtatagt attattttat ttiaaaaat 180
ctatgcttaa aatgcttatt agattgttca ctactgacat ttccaaactt aactigacct 240
tggetatgat ttcaaccttt gtatttgcac ctaccataac tgtgtgctca ctaccatgc 300
tatecgacga gcattgtccc ctgatgtttt tgccttttgc tctctcgtca acaggctctc 360
ctctcagtta tcaacttttg acacttgtgc gatcggatgat ggctgtcctg cagaaatcta 420

tgagtttttc ctttatgggg accttgccg ccagctgcct gcttctcatt gccctgtggg 480
 cccaggaggc aaatgcgctg cccatcaaca cccggtgcaa gcttgaggig tccaacttcc 540
 agcagccgta catcgtcaac cgcaccttta tgctggccaa ggaggiacag ctgcatctct 600
 ttctctccat accgccttgc catitctctg aagcacttgc aaactcttta ggggcgcttt 660
 atctccgag gtctcactac ctatgttttc tgtctcttta gagactcttt aaggactgga 720
 tctttttcta ttctatttc aaggctctcag gaccatttcc tatcttggcc tcaggacac 780
 atatactgaa tttatctiac agaggcgctg ttagaaagcc acccagcact gcaatacttt 840
 ccatcctggt gtgctctctt cigaactcat actctcttgg ctactcctga gaccactgc 900
 ggacatacat ctctacttac aggcttttct tccatctcct tgcacccag gcacttaggg 960
 ttttctctct tcaggccag ccttgcagat aacaacacag acgtccggct catcggggag 1020
 aaactgttcc gaggagttag tgaagtccct cactgtgatg agcagggcta gctgcgggag 1080
 ctggiggacc ctctgggata gtctgacgta tgacccctgc tgcctcttgt ctacctgag 1140
 gctaaggatc agtgcctact gatgaagcag gtgctcaact tcacctgga agacattctg 1200
 ctccccagt cagacagggt cggccctac atgcaggagg tgggtccttt cctgacaaa 1260
 ctgagcaatc agctcagctc ctgtgtaagt ctggctctgg ctacctatgc tctctctct 1320
 tctctttcta ttccagtaag aaccggaggc cctgccctct ctctcttcc aagagttagg 1380
 agggcctcag caccaccacc atcatagcc acctgaaata ggtcacaag gctttggctt 1440
 caattgagta atactttgag ttgtatttag ttaagcttta ttgttttat ccatggaaag 1500
 aaatcaactc aaattctgta ggatgagaaa gatgttggga acgaaaaag gcctagatag 1560
 agaaacagat ctgctgagta cagtacttat gggggggggg ggcagggggc gatatccact 1620
 gagtccaagt acttgttggg agagaaatcc actgagtaca agtacttgtg ggggaaggaa 1680
 tggcacagag caaaagtiga agggaaagag gaagatggag aggcctcaat gttgggggig 1740
 tgaagggtca ctctttttc catgtgatgg agagttaaga aaaatcagtg tgtgagttg 1800
 atgtcttcag acaccccaac tatggcagac tgtgggagac ctggcattta gggaaaggcg 1860
 ggcttttcac acgagaaact ttatgctcat ctcttgtgct acactccac ctttgatgag 1920
 gttaaagtca ggtttcgitt ctaccgttct tgcctactgtt ggaaacttca gtaggattcc 1980
 ccaaagacga ggacagctct tctgtaaggg agggacctgg atttcagtgt cctagagaac 2040
 gaaatagctc agagaatcta ggtaacgtg aaatctaggt cacagcgggc aaaaatgact 2100
 gaacgcctct attccaggig aacggtcacg tgcctcagat atactgaggt attgggctcc 2160
 caccggataa gattctgita gtgagctcgc ttttatttg cagcacatca gtggtagca 2220
 ccagaacatc cagaagaatg tcagaaggct gaaggagaca gtagaaaagg tactattggc 2280
 aagccacaat actaagccat tcagtaggag acgtggggat ttctttctct gcttcccagt 2340
 ctctctact ttgtaacatt ttctttgact tgtctactgt ctggctcatt actcacttag 2400
 ctgcacctgc atctagctgg gtctatagat cttcaatct gtgtctaat ttgtaagtea 2460
 caattctgga gctagcagaa agccttagctc agccagtctc atgagcactt gctcggagga 2520

tggcttgtga cagagtcaat gctagaagac agcatccctg attcccagct ctgcacttgc 2580
 ctagtggcca cgtgtaatta ctttagcctg attaagiatt tgggaaagcc aattcccacc 2640
 gacciacata atccgaagaa gcatgcattg aaaactagaa agctgggcac aaacttacta 2700
 gagatgattt ttgagcicat taaactgatg ctctgaaatg tgatcaaatc aaccagaat 2760
 aacaacaaaa gagctggatt tgcaaatagg acaagiattt agaatcactg gtattaacag 2820
 ctgtcatctt aattaaaata tagtgtctat ttagctgcct atttaagatt aaacacaaga 2880
 gtggataact tcccaattia ctgggcctgg tticaataga gtaaaaaat cagtcataga 2940
 ttaattatag tgtcatgaaa gtatgagttg gaaaccctt ccttactttt taccttcatt 3000
 tcttagtiat taitttttt tcttcacacc ctgatcaagc cactagtaag cacctatctg 3060
 ctgcgagcta ttatagact ttacagcaaa caacattgct gtgtggcctc ttgggggaag 3120
 ggaacaggat agcaggaggc tcaggctagc aagctggac tcaacctaaa gccagaggca 3180
 tggttgatag cagagaaagt gaggctctc acaagtgggt gtgcttaagt aatcagaaac 3240
 aggaaggctc tggttgatgg aattatcagt aagatatcta cccttatctc cttcttctat 3300
 agaagctaaa ccgtctctcc tcttgtgtg taggctgata aacacgcttg tttcttttg 3360
 aggttcatg gotttgcaga tttcagtgc tctgccagtt cttgttagag ggtttgttac 3420

 cttgacacct gggcttggat gitagcatgc caaaggcaca cacttctgaa tgcctgtgta 3480
 aaaggttatt attcatttac ttgtctttg gaaaggtaga gtgtgtgtga gaaagaactc 3540
 acaggagatg taitctctgt aggaaaactt tttttcccc ttaaagcct ataatccact 3600
 ttcagtcaac ttgactttt ataccatgct gtcacatgaa agagtgttta ggcccgtctc 3660
 cgtggctctg ggaaaagcac caatagggga agaaatgta tggcgagaaa tctgactggc 3720
 agggaaactg ggtcagagct ccccaaagac cactacaggt gttaagtagg aacagtcgag 3780
 ggigggttca tataatagaa tggaacagag ggagggaga taagctacia agtttcatag 3840
 ggtcctaagt cttaaagata caaaatagct ggttgggctt cataacaaag gaagtctggg 3900
 aaggcagcaa gcattgagag ggagatggaa agggaaaaaa caatgtagag gatttgaaa 3960
 gctacaaatc ctccacgaga ggattttct tggaggaatc tagaacaagg gtgggtggatt 4020
 aggtggatcg cagaaggact tgctttgcca ttgaaatctg ggttttgtc tctccattga 4080
 ggttgagagc gtcaccctt tttaccctgg ataggaggag gaaagaaggg gtgttttgac 4140
 tcttacctgg agttttacta gtttacgcaa tggaacagac acicgggacc tctcttgac 4200
 aagaaaaaaa aaaaaaaaaag gaaacctgtt gtttctctg ttgttctt ttgtaagaaa 4260
 gcacaggcag ctgggcattg tggccatgc ctttaatccc agcatttggg aggcagaggc 4320
 aggtgacttt ctaaattcaa ggccagcctg gtctacaaag tgagttccag gacagccagg 4380
 gctatacaga gaaacctgt ctcgggaaaa aaaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaagaag 4440
 agaagaggag aggagaggag aggagaggag aggagaggag aggagaggag aggagaggag 4500
 aggagaggag aagagaagag aagagaagag aagagaagag aagagaagag aagagaagag 4560

aagagaagag aagagaagag aagagaagag aagagaagag aagagaaaag aaaagagaaa 4620
agaaaagaaa aaagcaagca agcaagcact ggcaaagcat gccacatgg gacgtaigtg 4680
ggcttttgag acaaggcttt tgaattgagc gctcatcaat agttgatcat ggtcaggtgg 4740
agggtacct gtcaggccga gccctgctgg cttagcactt aacatctcca ggtctcagta 4800
tcacttcccg ctgcttagca cagttaggag ttgagcaaac ctttttticc aacccccact 4860
aaaatttaat ttacaaaagg cagtgttaatt tgtgggatac agtgtgataa ttgatctatg 4920
tgtgcattgt gcaaggttca ataaggtaga tcaataggcc catcaacagc tttatgggtg 4980
tgaaatgcaa gtaatatagg tagatgcctg tgtgtcctta ggtcagaaaag gcatgatttt 5040
aaggctcttg gcaaatcata ttatactcat gttaaaaatg cattatgttg attatcaatc 5100
ttttagagaa ggctgatact tggtttgggt gctcagcaag caaatgtcac cagctctttc 5160
taactagtag cactttagaa aatgctaccc gtgctcaaat tggtttgtat tcttattttc 5220
atagcttggg gagagcggag agatcaaagc gatcggggaa ctggacctgc tgtttatgtc 5280
tctgagaaaat gcttgcgtct gagcgagaag aagctagaaa acgagaagct gctccttcct 5340
gcccttctaaa aagaacaata agatccctga atggactttt ttactaaagg aaagtgagaa 5400
gctaacgtcc accatcatta gaagatttca catgaaacct ggctcagttg aaagagaaaa 5460
tagtgtcaag ttgtccatga gaccagaggt agacttgata accacaaaga tcattgaca 5520
atattttatt gcatlgata atgcaacaga aaaagtatgt actttaaaaa attgtttgaa 5580
aggaggttac ctctcattcc tctagaagaa aagcctatgt aacttcattt ccataaccaa 5640
tactttatat atgtaagttt atttattata agtatacatt ttatttatgt cagtttatta 5700
atatggattt atttatagaa aaattaicig atgttgatat ttgagtataa agcaaataat 5760
atztatgata ataactatag aaacaagata tcttaggcct taataaacac atgaatatca 5820
taaactttct gctctgtaat ttttctccct ttaatatcaa caataccatc atcgtcatca 5880
ttaccaatc attctcatga cttcatgctt gactcatatt atctggtaaa gtttg 5935

<210> 43

<211> 179

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<400> 43

Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu
1 5 10 15

Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala
20 25 30

Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln
35 40 45

Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser
50 55 60

Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe
65 70 75 80

His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu
85 90 95

Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln
100 105 110

Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg
115 120 125

Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn
130 135 140

Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu
145 150 155 160

Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn
165 170 175

Ala Cys Ile