



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102030822 A

(43) 申请公布日 2011.04.27

- 
- (21) 申请号 200910235602.4 *C12N 15/11* (2006.01)
- (22) 申请日 2009.09.29 *A61K 38/19* (2006.01)
- (71) 申请人 北京大学 *A61K 39/395* (2006.01)  
地址 100191 北京市海淀区学院路 38 号 *A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 31/00* (2006.01)
- (72) 发明人 马大龙 韩文玲 郭晓欢 王平章 *A61P 37/00* (2006.01)  
李婷 黄晶 郭金海 付伟伟 *A61P 35/00* (2006.01)  
张岩飞 石太平 *G01N 33/53* (2006.01)
- (74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 *C12Q 1/68* (2006.01)  
公司 11127
- 代理人 韩蕾
- (51) Int. Cl.  
*C07K 14/52* (2006.01)  
*C12N 15/19* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01)  
*C12N 1/15* (2006.01)  
*C12N 1/19* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C07K 16/24* (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 30 页 附图 4 页

---

### (54) 发明名称

人类新细胞因子 VSTM1-v2 及其应用

### (57) 摘要

本发明涉及人类新细胞因子 VSTM1-v2 及其应用。具体地说本发明是涉及 VSTM1 的剪切体 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段；所述 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在促进 Th17 分化和 CD8+T 淋巴细胞的杀伤功能中的应用，以及在制备用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的药物组合物中的应用；本发明还涉及 VSTM1-v2 的拮抗剂例如单克隆抗体或多克隆抗体，包含 VSTM1-v2 的载体、宿主细胞或组合物，及检测 VSTM1-v2 或其免疫性片段的试剂，以及它们的应用。

1. 如下 (a) 或 (b) 所示的蛋白或其免疫性片段：
  - (a) 由 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列组成的蛋白或其免疫性片段；或
  - (b) 在 (a) 限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且与 (a) 具有相同功能的由 (a) 衍生的蛋白或其免疫性片段；所述的免疫性片段优选为 SEQ ID NO :4 第 17 ~ 32 位或第 62 ~ 81 位所示的氨基酸序列组成的多肽,或 SEQ ID NO :4 第 17 ~ 205 位所示的氨基酸序列组成的蛋白。
2. 编码权利要求 1 所述的蛋白或其免疫性片段的多核苷酸序列；所述的多核苷酸序列优选为 SEQ ID NO :3 所示的多核苷酸序列。
3. 一种基因工程载体,其包含如权利要求 2 所述的多核苷酸序列；所述的载体优选为质粒。
4. 一种宿主细胞,该宿主细胞经权利要求 3 所述的基因工程载体转化、转染或转导得到。
5. 针对权利要求 1 所述的蛋白或其免疫性片段或权利要求 2 所述的多核苷酸序列的拮抗剂；优选所述的拮抗剂为抗体、反义 RNA 或小干扰 RNA。
6. 权利要求 1 所述的蛋白或其免疫性片段或权利要求 2 所述的多核苷酸序列在促进 Th17 分化和 / 或 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的杀伤功能中的应用。
7. 权利要求 1 所述的蛋白或其免疫性片段,或权利要求 2 所述的多核苷酸序列,或权利要求 5 所述的拮抗剂,在制备用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的药物组合物中的应用；其中,所述的蛋白优选为 SEQ ID NO :4 第 17 ~ 205 位所示的氨基酸序列组成的蛋白,所述的多核苷酸序列优选为 SEQ ID NO :3 所示的多核苷酸序列；所述的拮抗剂优选为单克隆抗体或多克隆抗体；所述的免疫相关疾病优选为感染性疾病、自身免疫性疾病或肿瘤。
8. 如权利要求 7 所述的应用,其中所述的多核苷酸序列包含于载体中；所述的载体优选为质粒。
9. 一种用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的组合物,该组合物含有权利要求 1 所述的蛋白或其免疫性片段,或权利要求 2 所述的多核苷酸序列,或权利要求 3 所述的载体,或权利要求 4 所述的宿主细胞,或权利要求 5 所述的拮抗剂；以及一种或多种药用赋形剂或药用载体。
10. 检测权利要求 1 所述的蛋白或其免疫性片段或权利要求 2 所述的多核苷酸序列的试剂在制备用于免疫相关疾病辅助诊断、预后判断的组合物中的应用；优选所述的试剂为抗体、反义 RNA 或小干扰 RNA。

## 人类新细胞因子 VSTM1-v2 及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的人类细胞因子及其应用,特别是涉及 VSTM1 的一种剪切体 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段,所述 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在促进 Th17 分化和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的杀伤功能中的应用以及在制备用于治疗免疫相关疾病的药物组合物中的应用,还涉及 VSTM1-v2 的拮抗剂,包含 VSTM1-v2 的载体、宿主细胞或组合物,及检测 VSTM1-v2 或其免疫性片段的试剂,以及它们的应用。

### 背景技术

[0002] 免疫系统在机体具有至关重要的作用,它对外能够防御病原微生物的入侵,对内则能及时清除衰老、病变和死亡的细胞,维持内环境的稳定。免疫系统通过免疫应答完成上述功能。机体各种细胞分泌的细胞因子 (Cytokine) 可以调控细胞生长分化、调节免疫功能和生理反应并参与病理反应。细胞因子一般多是小分子分泌蛋白,通过与细胞因子受体结合,在免疫细胞之间传递信息,对天然免疫应答和适应性免疫应答均发挥重要调控作用。至今已发现的细胞因子达 200 多种,根据功能不同可以将其分为六类:1、白细胞介素 (Interleukin, IL);2、集落刺激因子 (Colony-Stimulating Factor, CSF);3、干扰素 (Interferon, IFN);4、肿瘤坏死因子 (Tumor-Necrosis Factor, TNF);5、趋化因子 (Chemokine, CK);6、生长因子 (Growth Factor, GF)。细胞因子种类繁多,功能广泛。

[0003] Th 细胞是适应性免疫应答的枢纽,而细胞因子是其发挥作用的主要方式。Th 细胞可分为 Th1、Th2 和 Th17 三类,它们产生的特征性细胞因子分别是 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-17。Th1 的主要作用是抵御胞内病原微生物的感染,参与类风湿性关节炎、糖尿病等自身免疫性疾病的发生、发展;Th2 参与抗寄生虫感染和过敏反应;Th17 在抗胞外细菌和真菌感染中具有重要作用,并参与炎性肠病等自身免疫性疾病的发生、发展 (Jin Fang Zhu, William E. Paul, CD4 T cells: fates, functions, and faults, *Blood*, 2008, 112(5):1557-1568)。作为 CD4<sup>+</sup> 效应 T 细胞的新亚群, Th17 细胞主要分泌 IL-17A、IL-17F、IL-22、IL-26 和肿瘤坏死因子等细胞因子。这些炎性因子介导了炎性反应 (防御胞外病原菌的感染)、自身免疫性疾病、肿瘤和移植排斥等。相关研究发现类风湿性关节炎 (RA)、多发性硬化症 (MS)、哮喘、狼疮以及在移植排斥反应中 IL-17 的表达均增加。研究发现,在自身免疫性炎性肠病如溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 患者急性期的肠黏膜内有大量 IL-17<sup>+</sup> 细胞的存在。IL-17 既对炎性肠病黏膜炎症反应的诱导和维持发挥了重要作用,也促进多种炎性细胞因子的分泌,如 IL-26、TNF- $\beta$ 、CC 家族的趋化因子等。近期部分研究还发现在血管炎、多发性硬化症、肾病综合征、银屑病等患者的血清和组织中, IL-17 的表达量与病程、病情关系密切 (Lauren A. Zenewicz, Andrey Antov, Richard A. Flavell, CD4T-cell differentiation and inflammatory bowel disease, *Trends in Molecular Medicine*, 2009, 15(5):199-207; Jennifer Louten, Katia Boniface, Rene de Waal Malefyt, Development and function of TH17 cells in health and disease, *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123(5):1004-1011)。最近研究发现很多细胞因子参与了

Th17 细胞的分化调节。一般认为, IL-6 和 TGF- $\beta$  提供了初始 T 细胞向 Th17 细胞分化的始动因素, IL-23 在维持向 Th17 细胞分化中起非常重要的作用; TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎性细胞因子则能促进 Th17 细胞的分化; Th17 细胞可以分泌 IL-21, 有自反馈作用; 而 IL-25、IL-27、IL-35 更多表现出对 Th17 细胞分化的抑制作用, 但其作用可能更为复杂。深入研究 Th17 细胞的分化、生理和病理功能以及调控机制, 对研究自身免疫性疾病具有重要的理论意义和潜在的应用价值。

[0004] CD8<sup>+</sup>T 细胞可以识别 MHC-I/ 抗原肽复合物后能够杀伤靶细胞, 又被称为杀伤性 T 细胞 CTL, 其主要功能是清除被病毒及其它胞内寄生微生物感染的宿主细胞, 另外动物实验证明肿瘤特异性 CTL 能够杀伤相应肿瘤细胞。CD8<sup>+</sup>T 细胞活化之后可以释放穿孔素和分泌细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ , 继而杀伤靶细胞。

[0005] 目前利用基因工程技术生产的重组细胞因子或重组可溶性受体以及治疗性抗体等治疗肿瘤、造血障碍、感染等已收到良好疗效, 成为新一代的药物。重组细胞因子做为药物具有很多优越之处, 如: 细胞因子为人体自身成分, 可调节机体的生理过程和提高免疫功能, 很低剂量即可发挥作用, 因而疗效显著, 副作用小, 是一种全新的生物制剂, 已成为某些疑难病症不可缺少的治疗手段 (Antonella Viola, Andrew D. Luster, Chemokines and Their Receptors: Drug Targets in Immunity and Inflammation, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2008, 48: 171-197)。目前已批准生产的细胞因子药物包括干扰素  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ , Epo, GM-CSF, G-CSF, IL-2 等。另外, 据不完全统计, 目前国际上至少已有 26 个通过基因组药物进入临床研究, 包括新的重组细胞因子、重组可溶性受体等。同时, 细胞因子或者细胞表面受体检测也是判断机体免疫功能和免疫细胞分化等的重要指标, 具有重要的实验室研究价值, 在临床上有诸多实用价值、包括许多疾病的诊断、病程观察、疗效判断及细胞因子治疗监测等。

## 发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供 VSTM1 的剪切体特别是 VSTM1-v2 的蛋白或其衍生蛋白或它们的免疫性片段。

[0007] 本发明的另一目的是提供编码 VSTM1-v2 的蛋白或其衍生蛋白或它们的免疫性片段的多核苷酸序列。

[0008] 本发明的另一目的是提供一种包含 VSTM1-v2 的载体。

[0009] 本发明的另一目的是提供一种包含 VSTM1-v2 的宿主细胞。

[0010] 本发明的另一目的是提供一种 VSTM1-v2 的拮抗剂。

[0011] 本发明的另一目的是提供 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在促进 Th17 分化和 / 或 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的杀伤功能中的应用。

[0012] 本发明的另一目的是提供 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段, 或者它们的拮抗剂, 在制备预防和 / 或治疗免疫系统疾病的组合物中的应用。

[0013] 本发明的另一目的是提供一种用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的组合物。

[0014] 本发明的另一目的是提供一种用于检测 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段的试剂。

[0015] 本发明的另一目的是提供检测 VSTM1-v2 的基因和蛋白或它们的免疫性片段的试

剂的应用。

[0016] 本发明提供了如下 (a) 或 (b) 所示的蛋白或其免疫性片段：

[0017] (a) 由 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列组成的蛋白或其免疫性片段；或

[0018] (b) 在 (a) 限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且与 (a) 具有相同功能的由 (a) 衍生的蛋白或其免疫性片段；

[0019] 所述的免疫性片段优选为 SEQ ID NO :4 第 17 ~ 32 位或第 62 ~ 81 位所示的氨基酸序列组成的多肽,或 SEQ ID NO :4 第 17 ~ 205 位所示的氨基酸序列组成的蛋白。

[0020] 本发明还提供了编码上述 (a) 或 (b) 所述蛋白或其免疫性片段的多核苷酸序列；所述的多核苷酸序列优选为 SEQ ID NO :3 所示的多核苷酸序列。

[0021] 本发明还提供了一种基因工程载体,其包含所述的多核苷酸序列；该载体优选为质粒。

[0022] 本发明还提供了一种宿主细胞,其经所述的基因工程载体转化、转染或转导得到。

[0023] 本发明还提供了一种针对所述的蛋白或其免疫性片段或所述的多核苷酸序列的拮抗剂；优选所述的拮抗剂为抗体、反义 RNA 或小干扰 RNA。

[0024] 本发明还提供了所述的蛋白或其免疫性片段或所述的多核苷酸序列在促进 Th17 分化和 / 或 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的杀伤功能中的应用。例如,所述的蛋白或其免疫性片段或所述的多核苷酸序列在制备促进 Th17 分化和 / 或 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的杀伤功能的制剂中的应用。

[0025] 本发明还提供了所述的蛋白或其免疫性片段、所述的多核苷酸序列、或所述的拮抗剂在预防和 / 或治疗免疫相关疾病中的应用,例如,在制备用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的药物组合物中的应用；其中,所述的蛋白优选为 SEQ ID NO :4 第 17 ~ 205 位所示的氨基酸序列组成的蛋白,所述的多核苷酸序列优选为 SEQ ID NO :3 所示的多核苷酸序列；所述的拮抗剂优选为单克隆抗体或多克隆抗体；所述的免疫相关疾病优选为感染性疾病、自身免疫性疾病或肿瘤。所述的多核苷酸序列可以包含于载体中；所述的载体优选为质粒。

[0026] 本发明还提供了一种用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的药用组合物,该组合物含有所述的蛋白或其免疫性片段,或所述的多核苷酸序列,或所述的载体,或所述的宿主细胞,或所述的拮抗剂；以及一种或多种药用赋形剂或药用载体。

[0027] 本发明还提供了一种用于检测所述蛋白或其免疫性片段或所述多核苷酸序列的试剂。

[0028] 本发明还提供了检测所述的蛋白或其免疫性片段或所述的多核苷酸序列的试剂的应用,例如在制备用于免疫相关疾病辅助诊断、预后判断的组合物中的应用。优选所述的试剂为抗体、反义 RNA 或小干扰 RNA。所述的免疫相关疾病具体可以为感染性疾病、自身免疫性疾病或肿瘤等。

[0029] 本发明研究发现人类基因 VSTM1 至少存在 5 种剪切体,分别为 VSTM1-v1、VSTM1-v2、VSTM1-v3、VSTM1-v4、VSTM1-v5。其中,VSTM1-v2 编码一种经典分泌蛋白,含有 N 糖基化修饰位点,对 Th17 分化和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的杀伤功能具有促进作用；说明 VSTM1-v2 是一个新的潜在细胞因子。因此,VSTM1-v2 的基因或蛋白或其免疫性片段、抗体、siRNA 在感染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤的辅助诊断、预防和 / 或治疗方面具有潜在临床应用价值。

## 附图说明

[0030] 图 1 显示利用 DNASTAR 软件包对 VSTM1-v2 的亲疏水性 (1)、抗原性 (2)、表面暴露性 (3) 等特性分析的结果。图中矩形框表示的是本发明实施例 5 中多肽设计的位点。

[0031] 图 2A 和图 2B 显示本发明的 VSTM1-v2 在正常组织中的表达谱 RT-PCR 分析。其中, 图 2A 为人 16 种正常组织文库, 各泳道分别为: 1- 脑; 2- 心脏; 3- 肾脏; 4- 肝脏; 5- 肺脏; 6- 胰腺; 7- 胎盘; 8- 骨骼肌; 9- 结肠; 10- 白细胞; 11- 卵巢; 12- 前列腺; 13- 小肠; 14- 脾脏; 15- 睾丸; 16- 胸腺。图 2B 为人 7 种正常免疫系统组织文库, 各泳道分别为: 1- 白细胞; 2- 骨髓; 3- 淋巴结; 4- 脾脏; 5- 胸腺; 6- 扁桃体; 7- 胎肝; 8- 阴性对照。

[0032] 图 3A 显示实施例 4 中 SDS-PAGE 和质谱分析鉴定 GST-VSTM1-v2 重组蛋白质的纯化以及凝血酶酶切结果。其中, 泳道 1 和 2 分别为酶切前后的 GST-VSTM1-v2 重组蛋白质样品。图片右侧为相应条带的质谱分析结果。图 3B 显示实施例 4 中 SDS-PAGE 鉴定 Trx-His-S-VSTM1-v2 重组蛋白质的纯化结果。其中, 泳道 1 为细菌裂解的上清, 泳道 2、3 均为蛋白纯化时从镍柱洗脱的成分。

[0033] 图 4 显示 Western blot 鉴定实施例 5 中以原核蛋白制备的 VSTM1 抗体的特异性的结果。其中, 泳道 1 为转染空载体的阴性对照组, 泳道 2 为转染了 pcDB-VSTM1-v2 的实验组。

[0034] 图 5 显示 Western blot 检测 VSTM1-v2 蛋白的超表达情况以及 BFA 对 VSTM1-v2 分泌的影响。

[0035] 图 6 显示 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定真核细胞 VSTM1-v2 分泌蛋白质的纯化结果。其中, 泳道 1、2、3、4、5 为 SDS-PAGE 结果, 泳道 6 为 Western blot, 泳道 1、2、6 为纯化的 VSTM1-v2 蛋白, 泳道 3、4、5 为 BSA 蛋白标准品。

[0036] 图 7 显示 Western blot 检测真核细胞纯化 VSTM1-v2 分泌蛋白质的糖基化修饰情况。其中, 泳道 1 为未加入酶的阴性对照, 泳道 2 为加入 N 糖苷酶 F 组, 泳道 3 为加入 O 糖苷酶组。

[0037] 图 8 显示流式细胞仪检测 VSTM1-v2 分泌蛋白对 CD4<sup>+</sup>T 细胞的 IL-4 (图片 A)、IFN- $\gamma$  (图片 B)、IL-17A (图片 C) 细胞因子表达的影响。图中标号 1 ~ 8 分别代表同型对照组、PBS、VSTM1-v2-1、VSTM1-v2-10、VSTM1-v2-100、 $\Delta$ VSTM1-v2-100、rVSTM1-v2、 $\Delta$ rVSTM1-v2 组。

[0038] 图 9 显示实施例 9 中检测 VSTM1-v2 分泌蛋白对 Th17 细胞分化的影响结果。其中, 图片 A 显示通过 FACS 检测 VSTM1-v2 分泌蛋白对 Th17 细胞分化的影响结果, 图中标号 1 ~ 5 分别代表同型对照组、PBS、VSTM1-v2-1、VSTM1-v2-10、VSTM1-v2-100 组。图片 B 显示通过 ELISA 检测细胞因子 IL-17A 的分泌情况结果。图片 C 显示利用 realtime PCR 方法检测 IL-17A 转录水平的结果。图片 D 显示通过 [<sup>3</sup>H]-TdR 掺入实验检测细胞增殖结果。图片 B、C、D 中标号 1 ~ 4 分别代表 PBS、VSTM1-v2-1、VSTM1-v2-10、VSTM1-v2-100 组。

[0039] 图 10 显示检测 VSTM1-v2 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞的杀伤功能的影响。其中, 图片 A 显示 FACS 检测细胞内细胞因子 IFN- $\gamma$  的变化结果; 图片 B 为 CD8<sup>+</sup>T 细胞与 K562 细胞孵育的光学显微镜照片; 图片 C 显示利用流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染检测 K562 细胞的凋亡结果。图中标号 1、2 分别代表 PBS 和 VSTM1-v2-10 组。

## 具体实施方式

[0040] 本发明发现人类新基因 VSTM1 至少存在 5 种剪切体,分别为 VSTM1-v1、VSTM1-v2、VSTM1-v3、VSTM1-v4、VSTM1-v5(参见实施例 1)。其中,VSTM1-v2 编码一种经典分泌蛋白,即本发明所述的 VSTM1-v2 蛋白。

[0041] 根据本发明的一个方面,本发明提供如下 (a) 或 (b) 所示的蛋白或其免疫性片段:

[0042] (a) 由 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列组成的蛋白或其免疫性片段;或

[0043] (b) 在 (a) 限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且与 (a) 具有相同功能的由 (a) 衍生的蛋白或其免疫性片段。

[0044] 如 SEQ ID NO:4 所述的氨基酸序列为本发明的 VSTM1-v2 的蛋白序列,共 205 个氨基酸,分子量 22.5kD,等电点 4.84。该蛋白具有两个 N 糖基化位点,且具有信号肽序列 (SEQID No:4 第 1~16 位),由于 TMHMM 分析无跨膜区,VSTM1-v2 可能为一新的分泌蛋白。

[0045] 由 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列组成的蛋白的免疫性片段可以为 VSTM1-v2 蛋白的任何具有免疫原性的片段,例如 SEQ ID NO:4 第 17~32 位或第 62~81 位所示的氨基酸序列组成的多肽,或 SEQ ID NO:4 第 17~205 位所示的氨基酸序列组成的蛋白。根据本发明,可以对 VSTM1-v2 蛋白或其免疫性片段进行取代、缺失或添加一个或几个氨基酸,而获得与 VSTM1-v2 蛋白或其免疫性片段具有相同功能的由所述蛋白或其免疫性片段衍生的序列。所述取代、缺失或添加一个或几个氨基酸而获得具有相同功能的衍生物的技术是本领域技术人员所已知的,例如可以是进行非极性氨基酸间或是极性氨基酸间(特别是不带电荷的极性氨基酸间或带相同电荷(带正电荷或负电荷)的极性氨基酸间)的取代。例如,本领域技术人员可利用常见氨基酸序列的分类进行非极性氨基酸间或是极性氨基酸间的取代,例如 Asp 与 Glu 之间的互换。

[0046] 本发明还提供了编码上述 (a) 或 (b) 所述的蛋白或其免疫性片段的多核苷酸序列。

[0047] VSTM1-v2 基因为编码本发明的 SEQ ID NO:4 的多核苷酸序列,其可以为 SEQ ID NO:4 所示氨基酸的编码序列,除了上述氨基酸序列的编码序列之外,还可以包括非编码序列,例如内含子、编码序列 5' 或 3' 端的非编码序列等。所述多核苷酸序列可以是 DNA 或 RNA,其中 DNA 包括 cDNA、基因组 DNA 以及人工合成的 DNA,可以是单链的或双链的,可以是编码链或非编码链。其中优选的基因为 SEQ ID NO:3 所示的多核苷酸序列,该序列全长 640 个核苷酸,其包含编码 VSTM1-v2 蛋白的序列(例如编码序列(CDS:核苷酸第 12~629 位)和 5' 的非编码区(核苷酸第 1~11 位)和 3' 的非编码区(核苷酸第 630~640 位))。或者,更优选一种分离的核苷酸序列,其只包含 VSTM1 蛋白的编码序列。

[0048] 本领域普通技术人员已知,本发明 VSTM1-v2 的核苷酸序列可以完全相同于如 SEQ IDNO:3 所示的编码序列,也可以由于遗传密码的简并性,不完全等同于上述核苷酸的编码序列。例如,根据每个具体的原核宿主或者真核宿主所使用的密码子的频率不同,可以选择相应的密码子,从而提高所述的多核苷酸在相应的宿主中表达效率。也可以为了获得比天然的核苷酸序列具有更好性能的多核苷酸(如更长的半衰期)而转换密码子。

[0049] 本发明的 VSTM1-v2 基因或蛋白的免疫性片段包括本发明的 VSTM1-v2 蛋白的免疫性片段或 VSTM1-v2 基因的免疫性片段。本发明的 VSTM1-v2 基因的免疫性片段可以为编码

所述 VSTM1-v2 蛋白的免疫性片段的核苷酸序列,例如:编码 SEQ ID NO:4 第 17 ~ 205 位所示氨基酸序列的多核苷酸序列,优选 SEQ ID NO:3 第 60 ~ 629 位所示多核苷酸序列。

[0050] 本发明所提供的蛋白或其免疫性片段,以及多核苷酸序列,是分离的蛋白或其免疫性片段,以及多核苷酸序列。所述“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核苷酸或蛋白或多肽氨基酸序列是没有分离纯化的,但同样的多核苷酸或蛋白或多肽如果从天然状态中与共同存在的其它物质分开,则为分离纯化的。这样的多核苷酸可能是某一载体的一部分,也可能这样的多核苷酸或蛋白或多肽是某一组合物的一部分,既然载体或组合物不是它们的天然环境的成分,这些多核苷酸或蛋白多肽仍然是分离的。

[0051] 本发明的多核苷酸序列能用本领域已有的方法获得。这些技术包括但不限于:(1) 通过杂交技术分离 DNA 序列;(2) 人工化学合成 DNA 序列;(3) 通过构建 cDNA 文库大规模获得所需的多核苷酸;(4) PCR 扩增技术。例如,本发明的 VSTM1-v2 的多核苷酸序列或其免疫性片段可以依据标准的 PCR 扩增技术将 cDNA、mRNA 或者基因组 DNA 作为模板,并选取合适的寡核苷酸引物扩增得到。这样得到核苷酸可以克隆进合适的载体中,然后利用在所述载体中的复制得到。也可以通过标准 DNA 合成技术得到,例如,使用可以按本领域熟知的固相亚磷酸酰胺三酯法在 DNA 合成仪上合成。本发明的基因,或者各种 DNA 片段等核苷酸序列的测定可用常规方法,如双脱氧链终止法(Sanger et al. PNAS, 1977, 74:5463-5467);也可用商业测序试剂盒等。为了获得全长的 cDNA 序列,测序需要反复进行。有时需要测定多个克隆的 cDNA 序列,才能拼接成全长的 cDNA 序列。

[0052] 本发明的 VSTM1-v2 的蛋白或其免疫性片段可以是重组蛋白或多肽、天然蛋白或多肽、合成蛋白或多肽、半合成蛋白或多肽,优选重组蛋白或多肽。本发明的蛋白或其免疫性片段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(如细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。本发明的蛋白或其免疫性片段可以是糖基化的,也可以是非糖基化的;可以包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

[0053] 本发明的 VSTM1-v2 的蛋白或其免疫性片段可以通过常规方法获得,例如可按照 Steward 和 Young (Steward, J. M. 和 Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984)) 描述的方法用 Applied Biosystem 合成仪或 Pioneer™ 合成仪按固相化学技术合成,或者可使用衍生于本发明的 DNA 构建体的 mRNA,在无细胞翻译系统中产生所需的蛋白或多肽。也可按常规的生物工程方法由宿主细胞中的重组 DNA 序列编码产生蛋白或多肽产物 (Science, 1984; 224:1431),例如包括以下步骤:

[0054] (1) 用本发明的多核苷酸(或其变体),或用含有此多核苷酸的表达载体转化、转染或转导合适的宿主细胞;(2) 在合适的培养基中培养步骤(1)得到的宿主细胞;(3) 从培养基或细胞中分离、纯化所需的蛋白或多肽。

[0055] 本发明的多核苷酸和蛋白或其免疫性片段优选以分离形式提供,更佳地被纯化至均质。

[0056] 根据本发明的另一方面,本发明提供一种含有本发明的多核苷酸序列的载体。本发明中的多核苷酸序列可以插入到重组表达载体中。所述基因工程载体可以是普通载体、表达载体等。其中普通载体主要用于各种基因组文库和 cDNA 文库的建立,它们通常含有两

个或两个以上的标记基因,其中一个基因用于选择转化体(transfomnant),另一基因则是用于检查载体中是否有外源 DNA 插入。表达载体主要用于研究基因的表达或是用于大量生产一些有用的转录产物或蛋白质,有的也可用于 cDNA 文库的建立。这类载体除具有普通型载体的特征外,表达载体中应含有适当的启动子、核糖体结合位点、终止子等。为了便于表达产物在细胞中定位,在多肽编码序列上游可加入适当的前导序列。必要时,为了提高编码本发明 VSTM1-v2 的 DNA 在高等真核细胞中的转录效率,可在载体中插入增强子序列。合适载体和启动子的选择为本领域技术人员周知。本领域技术人员周知用于构建含有本发明的多核苷酸以及合适的转录及翻译调控组件之载体的方法。具体地说,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,或者其它载体。在本发明中适用的载体可以是原核表达载体,也可以是真核表达载体。适用于原核细胞的市售表达载体一般均带有可选择标志和细胞复制原点,带有 lac、T7 (Rosenberg, et al. Gene, 1987, 56 :125)、 $\lambda$  PL 和 trP 等细菌启动子,以及已知克隆载体 pBR322 (ATCC 37017) 的其它遗传组件。这样的市售载体包括 pGEM (Promega) 和 pKK223-3 (Phannacia) 可根据所选用的适当启动子和待表达的结构基因序列来选择衍生于 pBR322 的适当载体。GST 原核表达系统也可用于本发明。适用于真核细胞的载体带有真核细胞启动子如 CMV、SV40 等,这样的载体包括 pMT-hILr3 (马大龙,狄春辉,庞健等 (1991) 高技术通讯 11 :26-29), pQE-9 (Qiagen)、pD10、pNHI 8A (Stratagene)、pKK233-3、pDR540、pRrr5 (Pharmacia), 以及 pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-hisB(-) (Invitrogen)、pCI、pWLNE0、pSG (Stratagene)、pSVL (Pharnlacia)、pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, 以下缩写为 pcDT)。本发明优选 pcDT,它可以直接与 PCR 产物连接来构建真核表达载体,大大提高规模化生产的效率。在本发明的具体实施例中,是将 VSTM1-v2 多核苷酸序列的 PCR 产物克隆至 pGEM-T Easy (Promega)、pcDNA3.1/mycHis(-)B、pGEX4T-1 和 pET-32a-c (+) 载体中。只要能在宿主体内复制和稳定,任何质粒和载体都可以应用。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组件。用本领域的技术人员熟知的方法来构建含有本发明所述多核苷酸序列和转录 / 翻译控制信号的表达载体即可。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组 DNA 技术等 (Sambrook, et al. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。

[0057] 本发明还涉及用上述载体或者本发明的多核苷酸经基因工程产生的适于表达本发明蛋白或其免疫性片段的宿主细胞。本发明的载体和多核苷酸可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达人类分泌性细胞因子的蛋白质。该宿主包括但不限于:原核宿主,诸如大肠杆菌、芽孢杆菌属、链霉菌属等;真核宿主,诸如:酵母属、曲霉属、昆虫细胞,诸如果蝇 S2 和草地夜蛾 Sf9;植物细胞;动物细胞,如 CHO、COS (猴肾成纤维细胞系, Gluzman (Cell 23 :175, 1981)) 或 Bowes 黑素瘤细胞、293T、HeLa 细胞及其它的能表达相容载体的细胞系。

[0058] 本领域的技术人员都知道如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞及将含有本发明的多核苷酸的构建体导入上述宿主细胞的方法,包括但不限于:氯化钙介导的转化、磷酸钙转染、DEAE-15 葡聚糖介导的转染、电穿孔、显微注射、粒子轰击法或基因枪方法 (Sambrook, J. (1989), Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press), 在适当的培养条件与培养基中培养经转化的宿主菌株或细胞,使其生长到恰当的

细胞密度之后,用适当的方法(例如温度转变或化学药品诱导)诱导所选择的启动子,并将细胞再培养一段时间。针对不同的宿主菌株或细胞以及所表达的目的蛋白或多肽的性质选择相应的培养条件和培养基在本领域技术人员知识范围之内。当宿主细胞为原核细胞如大肠杆菌时,能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收集,用  $\text{CaCl}_2$  法处理,所用步骤是本领域众所周知的。可供选择的是  $\text{MgCl}_2$  处理,也可用电穿孔的方法处理。当宿主是真核细胞时,可选择以下转染方法: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,来表达本发明的多核苷酸所编码的蛋白或多肽。根据所选的宿主细胞选择合适的常规培养基,在适于宿主细胞生长的条件下培养。在本发明的实施例中使用的宿主细胞例如:大肠杆菌 BL21 和 293T 细胞(ATCC CRL-11268)等。

[0059] 本发明还提供一种生产所述蛋白或其免疫性片段的方法:在适于表达的条件下,培养含有编码本发明的多核苷酸或其片段的宿主细胞;从所述细胞培养物中获得多核苷酸编码的蛋白或多肽。上述方法中的重组蛋白或多肽可包被于细胞内、细胞外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蛋白或多肽。具体地说,在转化宿主细胞并在被转化的宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用适当的方法(如温度变动或化学特质诱导)诱导启动子,然后继续培养。培养完成后,可用离心法收集细胞,并用任何已知的方法,这些方法是本领域技术人员所熟知的,如冻融法、超声处理法、渗透破菌、溶菌酶溶解法或机械破碎法破碎细胞。可以用各种已知的方法从宿主细胞培养物中回收和纯化本发明的蛋白或多肽或其片段或融合蛋白或多肽,这些方法包括硫酸铁或乙醇沉淀法、酸萃取法、超离心、超滤法、离子交换层析法、磷酸纤维层析法、疏水相互作用层析法、凝胶过滤法、亲和层析法、高效液相层析和其它各种液相层析技术或这些方法的结合。

[0060] 本发明还涉及与本发明多核苷酸的任何一部分同源的核酸片段。如本文所用,“核酸片段”的长度至少含有 15 个核苷酸,优选至少 30 个核苷酸,更优选至少 50 个核苷酸,最优选至少 100 个核苷酸。此核酸片段通常是在本发明的核苷酸序列信息的基础上化学合成的 DNA 序列。上述核酸片段可以用于 PCR 扩增技术(如作为引物)以确定和/或分离编码人类分泌性细胞因子的多核苷酸;也可以作为杂交所用的探针。也可以用于 RNA 干扰技术。本发明的多核苷酸的一部分或全部也可作为探针固定在微阵列(Microarray)或 DNA 芯片上,用于分析组织中基因的差异表达和基因诊断。探针的标记可用放射性同位素,荧光素或酶(如碱性磷酸酶)等。至于这些片段是否编码蛋白或多肽或编码的蛋白或多肽是否具有本发明蛋白或多肽的功能,对于检测、杂交和/或抑制表达这些用途来说并不是特别重要。

[0061] 本发明还提供针对所述的 VSTM1-v2 的基因或蛋白的拮抗剂。拮抗剂(例如蛋白、核酸、碳水化合物)可以与本发明的 VSTM1-v2 结合并抑制或封闭 VSTM1-v2 的生物活性。优选所述的拮抗剂为抗体、反义 RNA 或小干扰 RNA。所述抗体包括单克隆抗体或多克隆抗体,优选中和性抗体。所述的抗体优选为与 SEQ ID NO:4 的氨基酸残基 17~205 所示的序列、SEQ ID NO:4 的氨基酸残基 17~32 所示的序列、SEQ ID NO:4 的氨基酸残基 62~81 所示的序列特异性结合的多克隆抗体或单克隆抗体。所述“特异性结合”是指多克隆抗体或单克隆抗体特异性识别靶抗原并与靶抗原的不同抗原表位或抗原决定簇结合的特性。本发明中所述的抗体包括那些能够结合并抑制本发明 VSTM1 基因产物的抗体,也包括那些并不影响本发明 VSTM1 多肽功能的抗体。上述抗体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 片段和 Fab 表达文库产生的抗体;抗体重链;抗体轻链;遗传工程改造的单链 Fv 分子(Ladner 等人,美国专利 No. 4, 946, 778);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。本发明的多肽蛋白或其免疫性片段的抗体可用本领域公知的抗体制备方法来生产。例子有:单克隆抗体可用杂交瘤技术生产(Kohler and Milstein. Nature, 1975, 256 :495-497)。多克隆抗体的生产可用本发明的多肽蛋白或其免疫性片段免疫动物,如家兔、小鼠、大鼠等。在本发明的一个实施例中(参见实施例 5),以抗原性较强的 VSTM1 N 端(SEQ ID NO :4 的氨基酸序列 17 ~ 32 和 62 ~ 81)和 VSTM1 原核蛋白(SEQ ID NO :4 的氨基酸序列 17 ~ 205)为例,制备多克隆抗体,经 ELISA 法检测抗体效价,Western blot 鉴定抗体特异性,证实得到效价高、特异性好的抗体,可将该抗体进一步用于 VSTM1 的表达谱分析和功能研究。多种佐剂可用于增强免疫反应,包括但不限于弗氏佐剂。将人恒定区和非人源的可变区结合的嵌合抗体可用已有的技术产生(Morrison et al. PNAS, 1985, 81 :6851)。单链抗体也可用已有的技术生产(U. S. Pat No. 4946778)。本发明的各类抗体可以利用本发明的蛋白或其免疫性片段、衍生物、类似物或表达它们的细胞作为抗原,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。

[0062] 根据本发明的一个方面,本发明提供了 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在促进 Th17 分化中的应用,还提供了 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在促进 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的杀伤功能中的应用。例如,所述的 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在制备促进 Th17 分化和 / 或 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的杀伤功能的制剂中的应用。Th17 在抗胞外细菌和真菌感染中具有重要作用,并参与炎性肠病等自身免疫性疾病的发生、发展;深入研究 Th17 细胞的分化、生理和病理功能以及调控机制,对研究自身免疫性疾病具有重要的理论意义和潜在的应用价值。而 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞活化后作为 CTL,杀伤靶细胞,在抗肿瘤和抗病毒免疫中发挥重要作用。由于本发明的 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段能够促进 Th17 分化,并能够促进 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的杀伤功能,而拮抗剂可以抑制或封闭 VSTM1-v2 的生物活性,所以本发明的 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段或它们的拮抗剂可以用于免疫相关疾病(如感染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤等)的预防和 / 或治疗,具体而言, VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段可以广泛用于细菌真菌和病毒感染性疾病的预防和 / 或治疗,以及用于肿瘤的预防和 / 或治疗,而其拮抗剂如中和性抗体、反义 RNA 或小干扰 RNA 等则可用于自身免疫性疾病的预防和 / 或治疗。

[0063] 根据本发明的另一方面,本发明提供 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段,或它们的拮抗剂,在制备用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的药物组合物中的应用。其中,所述的蛋白优选为 SEQ ID NO :4 第 17 ~ 205 位所示的氨基酸序列组成的蛋白,所述的多核苷酸序列优选为 SEQ ID NO :3 所示的多核苷酸序列;所述的拮抗剂优选为单克隆抗体或多克隆抗体;所述的免疫相关疾病例如为感染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤等。本发明的 VSTM1-v2 的基因和蛋白可以以基因和蛋白的形式直接包含在用于治疗免疫相关疾病的药物组合物中利用其瞬时表达产物进行治疗,也可以以包含在表达载体中的形式包含在用于治疗免疫相关疾病的药物组合物中利用瞬时和稳定的表达产物进行治疗。

[0064] 本发明还提供一种用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的药物组合物,该组合物含有所述的蛋白或其免疫性片段,或所述的多核苷酸序列,或所述的载体,或所述的宿主细

胞,或所述的拮抗剂;以及一种或多种药用赋形剂或药用载体。药用赋形剂或药用载体指无毒固态、半固态或液态填充剂、稀释剂、包囊材料或其他制剂辅料。所述药物组合物适于局部、静脉内、腹膜内、肌内、皮下、鼻内或皮内给药等途径。当以上述或其他方式进行治疗时,治疗有效量的本发明的 VSTM1-v2 可以是本发明 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段的纯净形式、药用盐形式,或选择性与药用赋形剂组合。对任何特定患者的具体治疗有效剂量取决于许多因素,包括所治疗的疾病和其严重程度;所用具体化合物的活性;所用的特定组合物;患者的年龄、体重、性别、饮食和一般健康状况;给药时间;给药途径;具体化合物的排泄速度;治疗的持续时间联合或同时服用的其他药物等。本发明的 VSTM1-v2 蛋白或其免疫性片段也可通过在活体表达该蛋白或其免疫性片段来使用。例如患者的细胞可以通过在体外用编码本发明蛋白或其免疫性片段的基因进行基因工程操作,然后将工程细胞提供给患者,使工程细胞在体内高表达这种蛋白或其免疫性片段,从而达到治疗目的。

[0065] 本发明还提供一种体外检测来自待测者的样品中本发明所述 VSTM1-v2 的基因或蛋白的表达水平是否变化的方法,其包括:检测待测样品中所述多核苷酸或蛋白或多肽的表达水平;将待测样品中所述多核苷酸或蛋白或多肽的表达水平与正常样品的多核苷酸或蛋白或多肽的表达水平进行比较;确定待测样品中多核苷酸或蛋白或多肽的表达水平是否变化。所述正常样品可以从已知未患病的正常人的细胞获得,该细胞应与待测样品细胞的组织来源一致;正常样品的多核苷酸的表达水平可以从所述正常人的细胞获得的具有统计学意义的多核苷酸的表达水平。其中所述检测待测样品中多核苷酸水平的方法可以为上述任何检测方法,优选利用 RT-PCR 检测所述多核苷酸在核酸水平的表达水平;或利用特异性单克隆或多克隆抗体检测所述多核苷酸在蛋白质水平的表达水平,例如免疫组织化学检测。所述待测样品可以从来自受试者的细胞获得,如来自血液、尿、唾液、胃液,活组织检查和尸体解剖材料的细胞。

[0066] 本发明同时提供用于检测本发明所述的 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段的试剂。例如,用于检测所述多核苷酸在核酸水平的表达的试剂;或用于检测所述多核苷酸在蛋白质水平的表达的试剂。本发明还提供检测 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段的表达的试剂在制备用于免疫相关疾病辅助诊断、预后判断的组合物中的应用。所述试剂可以为蛋白、核酸、碳水化合物等,优选为抗体、反义 RNA 或小干扰 RNA (siRNA)。本发明的 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段可以作为诊断指标。因此,可以通过检测本发明的 VSTM1-v2 的基因或蛋白或它们的免疫性片段的表达水平而检测体内因本发明的 VSTM1-v2 表达不足或过量所致的病理状态,具体的检测方法可以是利用限制性片段长度多态性分析 (RFLP)、反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)、荧光原位杂交法 (FISH) 等方法或它们的组合。同样,也可以使用本发明 VSTM1-v2 蛋白的抗体,通过放射性免疫分析、竞争性结合法、Western 印迹分析法或酶联免疫吸附法 (ELISA) 达到相同的目的。

[0067] 在本发明的具体实施例中,本发明中利用 pcDB-VSTM1-v2-myc-his 真核细胞转染上清、纯化重组人 VSTM1-v2 蛋白进行功能研究,RT-PCR 实验显示 VSTM1-v2 仅在免疫系统和免疫细胞中表达,提示 VSTM1-v2 主要在免疫系统中发挥作用。本发明进一步通过 FACS、ELISA、realtime PCR 等实验方法发现 VSTM1-v2 能明显促进 CD4<sup>+</sup>T 细胞 IL-17A 表达增加,VSTM1-v2 可在体外促进 Th17 细胞的分化。<sup>3</sup>H]-TdR 掺入方法检测发现 VSTM1-v2 可促进 Th17 细胞的增殖。而且,本发明的具体实施例中还发现 VSTM1-v2 能明显促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞

IFN- $\gamma$  的表达,并促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞杀伤作用。VSTM1-v2 可能作为一个细胞因子介导 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的分化和调节 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的功能,在免疫系统中发挥其重要功能。

[0068] 本发明的 VSTM1-v2 是一分泌蛋白,可由免疫系统细胞、白细胞等多种细胞产生,并在免疫系统中发挥重要调控作用。因此,VSTM1-v2 具备了细胞因子的结构和功能特点,可能作为一个细胞因子发挥其重要功能。VSTM1-v2 蛋白、抗体、siRNA 在感染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤辅助诊断、预防和 / 或治疗方面具有潜在临床应用价值。

## 实施例

[0069] 下面结合具体实施例进一步阐明本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不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,《分子克隆实验指南》(第三版)(Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL) Press, 2001) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0070] 实施例 1、VSTM1 基因的 cDNA 的克隆及生物信息学分析

[0071] 首先采用以下方法制备粒细胞 cDNA 文库:使用 TRIzol (Invitrogen) 提取粒细胞总 RNA (按说明书操作),用 Reverse transcript<sup>TM</sup> kit (Invitrogen) 逆转录合成单链 cDNA 文库 (按说明书操作)。上述外周血单个核细胞和粒细胞的收集方法如文献所述 (Boyum, A., 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplement (Oslo) 97, 77-89)。

[0072] 通过与 NCBI 的 Human\_est 数据库比对分析 cDNA 序列以及可变剪接体。通过 NCBI 的 tBLASTn 程序寻找同源蛋白,同时从基因组数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) 得到染色体定位。蛋白功能结构域分析使用 NCBI CDD 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)。其它蛋白相关分析使用 ExPASy 数据库 (<http://us.expasy.org/>), 包括:TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 用于跨膜区分析;Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 用于信号肽分析;Psort II (<http://psort.nibb.ac.jp>) 用于亚细胞定位预测;GNF SymAtlas (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>) 用于表达谱分析;Prosite (<http://www.expasy.org/prosite/>) 用于结构域分析。并使用 DNASTAR 软件分析蛋白质抗原性、亲疏水性、表面暴露性等。通过生物信息学分析,发现 UniGene :Hs. 444431, 其对应基因为 VSTM1, GeneID : 284415, 定位于 19q13.42, 为一未知功能人类新基因,利用 Human\_est 数据库通过 BLASTn 方法进行序列校正无误,然后根据该序列设计 VSTM1 基因全长阅读框架的巢式特异引物:外侧正向引物 5' -GCAAGAGTGGGGCAGAG-3' (SEQ ID No :11);外侧反向引物 5' -ACGAAGAGCAAGGAAACAC-3' (SEQ ID No :12);内侧正向引物 5' -GAAGGGACGCTATG ACCGC-3' (SEQ ID No :13);内侧反向引物 5' -CTGTCTTCTTGCTACACTTTC-3' (SEQ ID No :14)。用上述引物,分别以人正常脾组织 cDNA 文库 (Clontech :Cat. No. 636743)、人正常胎肝组织 cDNA 文库 (Clontech :Cat. No. 636748) 以及人正常粒细胞 cDNA 文库 (前述制备) 为模板进行第一次 PCR 扩增反应,反应条件如下:

[0073] 反应体积 50  $\mu$  l, 其中含有:人正常脾 / 胎肝组织 / 粒细胞 cDNA 模板 :5  $\mu$  l (5ng);

引物:外侧正向引物、反向引物终浓度各 0.2 μM;dNTP:终浓度各 200 μM;Taq DNA 聚合酶:2.5U;10×Taq DNA 聚合酶缓冲液:5 μl;用双蒸水补足至 50 μl 体积。

[0074] 反应温度、时间:94℃,变性 5 分钟;然后 94℃变性 30 秒,52℃退火 30 秒,72℃延伸 1 分钟,扩增 30 个循环;最后在 72℃下延伸 10 分钟。

[0075] 一扩产物用双蒸水稀释 50 倍作为模板进行第二次 PCR 扩增反应,反应条件如下:

[0076] 反应体积 50 μl,其中含有:一扩产物稀释 50 倍:5 μl(5ng);引物:内侧正向引物、反向引物终浓度各 0.2 μM;dNTP:终浓度各 200 μM;TaqDNA 聚合酶:2.5U;10×Taq DNA 聚合酶缓冲液:5 μl;用双蒸水补足至 50 μl 体积。

[0077] 反应温度、时间:94℃,变性 5 分钟;然后 94℃变性 30 秒,61℃退火 30 秒,72℃延伸 1 分钟,扩增 30 个循环;最后在 72℃下延伸 10 分钟。

[0078] 扩增产物为 3'有碱基 A 的 3'突出粘端片段,用 QIAquick 胶回收试剂盒(Qiagen, 28706)按产品说明书进行纯化,然后与 3'有碱基 T 的线性 pGEM-T EASY 载体(Promega, A1360)在 16℃下连接 8 小时,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α(可由 TakaRa 等公司市售购得),转化物在含氨苄青霉素的 LB 平板培养基上生长,挑选克隆,提取质粒,使用 ABI PRISM 3700DNA 分析仪(Perkin-Elmer/Applied Biosystem)测序。

[0079] 本实施例中以人正常脾组织、胎肝组织及粒细胞 cDNA 文库为模板扩增 VSTM1,获得 VSTM1 基因的五种剪切体形式,本发明将这五种剪切体分别命名为 VSTM1-v1、VSTM1-v2、VSTM1-v3、VSTM1-v4、VSTM1-v5,其蛋白质序列与核酸序列见 SEQ ID No:1~10。将含有 VSTM1 五种剪切体的 cDNA 的 pGEM-T EASY 载体分别命名为 pGEM-T-VSTM1-v1、pGEM-T-VSTM1-v2、pGEM-T-VSTM1-v3、pGEM-T-VSTM1-v4、pGEM-T-VSTM1-v5。

[0080]

	VSTM1-v1	VSTM1-v2	VSTM1-v3	VSTM1-v4	VSTM1-v5
ORF 全长	711bp SEQ ID No: 1 第 12~722 位	618bp SEQ ID No: 3 第 12~629 位	351bp SEQ ID No: 5 第 12~362 位	447bp SEQ ID No: 7 第 67~513 位	432bp SEQ ID No: 9 第 12~443 位
编码氨基酸数目	236aa SEQ ID No: 2	205aa SEQ ID No: 4	116aa SEQ ID No: 6	148aa SEQ ID No: 8	143aa SEQ ID No: 10

[0081] VSTM1-v2 组织来源为脾、粒细胞。VSTM1-v2 编码一个 205 个氨基酸的蛋白质,分子量 22.5kD,等电点 4.84。该蛋白最大特点是具有分泌信号肽序列(SEQ ID No:4 第 1~16 位),Signal P 分析有明显的信号肽,为 N 端的 16 个氨基酸,且具有两个 N 糖基化位点,TMHMM 分析无跨膜区,VSTM1-v2 可能为一新的分泌蛋白。利用 DNASTAR 软件包(DNASTAR Inc.,Madison,WI,USA)对 VSTM1-v2 的抗原性、亲疏水性、表面暴露性等特性进行预测结果请参见图 1。

[0082] 实施例 2、VSTM1-v2 在组织和细胞中的表达谱分析

[0083] 为了分析 VSTM1-v2 在正常组织中的 mRNA 表达水平,本实施例中使用购买的 clontech 人正常组织 cDNA 文库,用实施例 1 中巢式 PCR 扩增条件对 VSTM1 进行扩增。使用 5'引物(5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3' SEQ ID No:15)与 3'引物(5'-CATG TGGCCATGAGGTCCACCAC-3' SEQ ID No:16)扩增 GAPDH 作为内参,扩增条件为 94℃(5 分钟)→94℃(40 秒),58℃(40 秒),72℃(40 秒),扩增 20 个循环→72℃(7 分钟)。PCR

扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后, GENE Snap 凝胶成像系统检测。

[0084] 实验结果请参见图 2A 和图 2B 所示, 其中, 图 2A 为表示人 16 种正常组织文库, 各泳道分别为: 1, 脑; 2, 心脏; 3, 肾脏; 4, 肝脏; 5, 肺脏; 6, 胰腺; 7, 胎盘; 8, 骨骼肌; 9, 结肠; 10, 白细胞; 11, 卵巢; 12, 前列腺; 13, 小肠; 14, 脾脏; 15, 睾丸; 16, 胸腺。图 2B 为表示人 7 种正常免疫系统组织文库, 各泳道分别为: 1, 白细胞; 2, 骨髓; 3, 淋巴结; 4, 脾脏; 5, 胸腺; 6, 扁桃体; 7, 胎肝; 8 为阴性对照。本实施例的实验结果表明, VSTM1-v2 仅在免疫系统像脾脏、胸腺、淋巴结、骨髓以及白细胞中表达, 提示 VSTM1-v2 可能作为人体自身重要的一个细胞因子, 在免疫系统中发挥重要的作用。

[0085] 实施例 3、真核细胞表达质粒 pcDB-VSTM1-v2-myc-his 的构建

[0086] 为了检测 VSTM1-v2 的功能, 本实施例中构建了含有 VSTM1-v2 cDNA 的真核表达质粒: pcDNA3.1B-VSTM1-v2-myc-his (pcDB-VSTM1-v2-myc-his)。用带有 Not I (TaKaRa) 酶切位点的上游引物 (5' -CGAGCGGCCGCATGACCGCAGAATTCCTCTC-3' SEQ ID No:17) 和 Kpn I (TaKaRa) 酶切位点的下游引物 (5' -CTTGGTACCGACTTTTCAGTGCCGCATATT-3' SEQ ID No:18) 对 pGEM-T-VSTM1-v2 载体 (参见实施例 1 中制备) 进行 PCR 扩增 (反应温度、时间: 94℃, 变性 5 分钟; 然后 94℃ 变性 30 秒, 56℃ 退火 30 秒, 72℃ 延伸 1 分钟, 扩增 35 个循环; 最后在 72℃ 下延伸 10 分钟), 得到 VSTM1-v2 的 cDNA 的全长 ORF 片段, 然后用 Not I 和 Kpn I 酶切该 PCR 产物, 同时用 Not I 和 Kpn I 酶切真核表达载体 pcDNA3.1/mycHis(-) B (Invitrogen, V85520, 以下缩写为 pcDB, pcDB 是设计用于重组蛋白在哺乳类动物细胞系中高表达的载体, 它含有人巨细胞病毒 CMV 启动子, 可在哺乳类动物细胞系中实现高表达。将酶切后的 VSTM1-v2 的 cDNA 基因片段与载体在 16℃ 下连接 8 小时, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 转化物在含氨苄青霉素的 LB 平板培养基上生长, 挑选生长的菌落, 提取质粒, PCR 鉴定, 挑选阳性克隆, 通过测序 (同上), 选出正确的插入序列的 VSTM1-v2 的 cDNA 基因质粒, 命名为 pcDB-VSTM1-v2-myc-his (带有 c-myc 和 his 标签)。

[0087] 实施例 4、VSTM1-v2 原核表达质粒的构建以及原核蛋白的纯化

[0088] 1、VSTM1-v2 原核表达质粒的构建

[0089] 为了制备 VSTM1 抗体和进行分泌蛋白 VSTM1-v2 的功能研究, 本实施例中构建了含有 VSTM1-v2 cDNA 的原核表达载体: pGEX4T-1-VSTM1-v2 和 pET-32a-c(+)-VSTM1-v2。其中插入的 VSTM1-v2 片段为去除信号肽后的 ORF 区。首先用带有 BamH I (TaKaRa) 酶切位点的上游引物 (5' -CGCGGATCCTACGAAGATGAGAAAAAGAATG-3' SEQ ID No:19) 和 Sma I (TaKaRa) 酶切位点的下游引物 (3' -CGCCGTGACTTTTCACATCGGGCCCCCT-5' SEQ ID No:20) 对 pGEM-T-VSTM1-v2 载体 (参见实施例 1 中制备) 进行 PCR 扩增 (反应温度、时间: 94℃, 变性 5 分钟; 然后 94℃ 变性 30 秒, 56℃ 退火 30 秒, 72℃ 延伸 1 分钟, 扩增 35 个循环; 最后在 72℃ 下延伸 10 分钟), 得到 VSTM1-v2 的 cDNA 的全长 ORF 片段, 然后用 BamH I 和 Sma I 酶切该 PCR 产物, 同时用 BamH I 和 Sma I 酶切原核表达载体 pGEX4T-1, 将酶切后的 VSTM1-v2 的 cDNA 基因片段与载体在 16℃ 下连接 8 小时, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 转化物在含氨苄青霉素的 LB 平板培养基上生长, 挑选生长的菌落, 提取质粒, PCR 鉴定, 挑选阳性克隆, 通过测序 (同上), 选出正确的插入序列的 VSTM1-v2 的 cDNA 基因质粒, 命名为 pGEX4T-1-VSTM1-v2。其表达的重组蛋白为 GST-VSTM1-v2, 即蛋白的 N 端带有 GST 标签, 而 GST 标签与 VSTM1-v2 目的蛋白之间有一个凝血酶的酶切位点, 便于酶切与纯化。pET-32a-c(+)-VSTM1-v2 克

隆构建过程与 pGEX4T-1-VSTM1-v2 一致。pET-32a-c(+)-VSTM1-v2 表达的重组蛋白为 Trx-His-S-VSTM1-v2, 即蛋白的 N 端带有 Trx、His 和 S 三个标签, 而 His 标签与 S 标签之间有一个凝血酶的酶切位点, S 标签与 VSTM1-v2 目的蛋白之间有一个肠激酶的酶切位点, 便于更多选择地酶切与纯化。

#### [0090] 2、重组 VSTM1-v2 蛋白的表达与纯化

##### [0091] (1)pGEX4T-1-VSTM1-v2

[0092] 原核表达质粒 pGEX4T-1-VSTM1-v2 转化大肠杆菌 BL21 (可由 TakaRa 等公司市售购得), 转化物 LB 平板培养基 (Amp 抗性) 上生长, 牙签挑单菌落接于 5ml LB (Amp 抗性) 中, 37°C, 300rpm, 过夜培养, 然后按 1% 量转接入 100ml 2×YP 中 (含 Amp 110 μl), 37°C, 300rpm, 待 OD 值 0.7 ~ 0.8 时, 加入 IPTG (终浓度为 0.6mM), 22°C, 300rpm, 诱导表达 6 小时。

[0093] 首先取 1ml 诱导后菌液进行小量鉴定, 8000rpm 离心 10 分钟, 200 μl 水溶离心后的菌体, 超声裂菌 5 次 (400w, 10s 超声, 10s 间隔), 12000rpm, 4°C, 5min 离心, 取 100 μl 上清, SDS-PAGE 电泳。

[0094] 然后进行大量纯化, 收集诱导后的 GST-VSTM1-v2 工程菌, 用 PBS 洗涤一次, 8000rpm 离心 10 分钟, 弃上清取沉淀, 用 PBS 重悬菌体 (PBS 10ml/100ml 培养基)。超声裂菌 90 次 (400w, 10s 超声, 10s 间隔, 冰浴), 12000rpm, 4°C, 20min 离心, 弃沉淀, 留上清, 上清过 0.45um 滤膜。取 1ml Glutathione-Sepharose4B 装柱, 先用去离子水洗去柱料中的保存液, 再用 PBS 平衡柱子, 将滤过的超声上清加到平衡好的柱子上, 控制流速 3ml/min 左右。上样结束后, 用 PBS 冲洗柱子至基线。封闭柱子下面的出液阀, 将凝血酶配制成 40units/ml PBS 溶液, 加到层析柱上, 使柱料完全浸泡在酶溶液中, 室温放置 1 小时。打开出液阀, 收集酶切液, 再用 2ml PBS 洗柱子, 洗柱液与前面收集到的酶切液合并到一起, 置于透析袋中, 用预冷的 1×PBS (PH7.4) 4°C 透析两次, 每次 3 小时, 然后于 4°C 使用 PEG-2000 浓缩蛋白至 500 μl, 吸出蛋白, 于 4°C, 18000g 离心 20 分钟除菌, 取上清分装保存于 -80°C 待用。

##### [0095] (2)pET-32a-c(+)-VSTM1-v2

[0096] 原核表达质粒 pET-32a-c(+)-VSTM1-v2 转化大肠杆菌 BL21, 转化物 LB 平板培养基 (Amp 抗性) 上生长, 牙签挑单菌落接于 5ml LB (Amp 抗性) 中, 37°C, 300rpm, 过夜培养, 然后按 1% 量转接入 100ml LB 中 (含 Amp 110 μl), 37°C, 300rpm, 待 OD 值 0.7 ~ 0.8 时, 加入 IPTG (终浓度为 0.6mM), 22°C, 300rpm, 诱导表达 6 小时。

[0097] 首先取 1ml 诱导后菌液进行小量鉴定, 8000rpm 离心 10 分钟, 200 μl 水溶离心后的菌体, 超声裂菌 5 次 (400w, 10s 超声, 10s 间隔), 12000rpm, 4°C, 5min 离心, 取 100 μl 上清, SDS-PAGE 电泳。

[0098] 然后进行大量纯化, 收集诱导后的 Trx-His-S-VSTM1-v2 工程菌, 用 PBS 洗涤一次, 8000rpm 离心 10 分钟, 弃上清取沉淀, 用 PBS 重悬菌体 (PBS 20ml/100ml 培养基)。超声裂菌 90 次 (400w, 10s 超声, 10s 间隔, 冰浴), 12000rpm, 4°C, 20min 离心, 弃沉淀, 留上清, 上清过 0.45um 滤膜。

[0099] 用 Ni<sup>2+</sup> 柱料纯化上述处理后上清: 先将上清经过 0.45 μm 滤器过滤后, 在上清中加入咪唑 (10mM)/NaCl (200mM), 再与柱料结合, 流速控制在 10 滴每分钟, 再用平衡缓冲液【咪唑 (20mM)/NaCl (200mM) 溶于 1×PBS (PH7.4)】冲洗柱料, 以洗去未结合的杂蛋白, 至分光回

至基线后,用洗脱液【咪唑 (500mM)/NaCl (200mM) 溶于 1×PBS (PH7.4)】洗脱结合蛋白直至分光光度计测量值不再下降,收集洗脱液于透析袋中,用预冷的 1×PBS (PH7.4) 4℃透析两次,每次 3 小时,然后于 4℃使用 PEG-2000 浓缩蛋白至 500 μ l,吸出蛋白,于 4℃,18000g 离心 20 分钟除菌,取上清分装保存于 -80℃待用。

[0100] 用 BCA 方法 (按 BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, 23227) 说明书进行) 对两种重组蛋白进行蛋白定量,并取部分样品进行 SDS-PAGE,鉴定重组 VSTM1-v2 蛋白纯化的纯度。

[0101] 图 3A 显示了 SDS-PAGE 和质谱分析鉴定纯化的 GST-VSTM1-v2 重组蛋白质 (GST-rVSTM1-v2, 图中泳道 1) 以及经凝血酶酶切后 (rVSTM1-v2, 图中泳道 2) 的 SDS-PAGE 结果。GST-VSTM1-v2 蛋白纯化后 SDS-PAGE 出现两条带,经质谱分析皆为目的蛋白;通过凝血酶酶切后,重组 VSTM1-v2 条带单一,符合预期大小,且纯度较高。

[0102] 图 3B 显示了 SDS-PAGE 鉴定 Trx-His-S-VSTM1-v2 重组蛋白质的纯化结果。可以看出,重组蛋白 Trx-His-S-VSTM1-v2 纯化后纯度稍低,但已达制备抗体要求。

[0103] 实施例 5、VSTM1 抗体的制备、纯化及鉴定

[0104] 1、以原核蛋白制备 VSTM1 多克隆抗体

[0105] 用实施例 4 制备的纯化的 Trx-His-S-VSTM1-v2 原核蛋白免疫动物。选用成年雄性新西兰兔,初次免疫将 300 μ g 的抗原用 PBS 稀释至 1ml 后与等体积的弗氏完全佐剂充分混合,于两足部各 0.25ml 皮下注射,其余后背部皮下多点 (6 点) 注射。之后每 3 周加强免疫一次,用量同前,全部后背部皮下多点 (8 点) 注射。第三次加强免疫后 10 天取兔耳缘静脉血样检测效价,至效价达 1 : 10<sup>5</sup> 以上后,将家兔处死心脏取血,获取血清。

[0106] 用 CNBR 活化的 Sepharose 4B 耦联 GST-VSTM1-v2 原核蛋白制备的亲和层析柱。然后加入上述获取的抗 VSTM1 的兔免疫血清 4℃旋转混合过夜,留取穿过液备用,再用 PBS 冲洗柱料。再加入 0.1M 甘氨酸缓冲液洗脱 (pH2.4),洗脱液接入预加入 3M Tris (pH9.0) 的收集管中。然后用微量滴度板检测管内抗体浓度。纯化获得的特异性抗体,置于 4℃用 pH7.4PBS 大体积透析,更换三次,每次间隔 8 小时。然后用聚乙二醇在 4℃将蛋白浓缩至 1ml。

[0107] 在 HEK 293T 细胞中超表达 VSTM1-v2 (具体参见实施例 6),通过 Western blot 鉴定抗体特异性,结果请参见图 4,表明此抗体能特异性识别外源性表达的 VSTM1-v2 蛋白。

[0108] 2、以合成多肽制备 VSTM1 多克隆抗体

[0109] 本实施例中,还根据对 VSTM1-v2 的生物学分析,选取了 VSTM1-v2 蛋白 N 端两段氨基酸序列:SEQ ID NO:4 第 17 ~ 32 位、第 62 ~ 81 位所示的氨基酸序列 (请参见图 1 中矩形框所示,这两段序列亲水性、抗原性与表面暴露性都较好,且无糖基化修饰),并将它们返回到蛋白质数据库中进行匹配,验证其特异性后进行多肽合成 (多肽委托杭州中肽生化有限公司合成)。多肽纯度要求大于 75%,部分多肽偶联 KLH。

[0110] 然后制备抗体,免疫动物选用成年雄性新西兰兔,两条与 KLH 偶联的多肽等质量混合免疫家兔,一共免疫四次,制备多克隆抗体。初次免疫将 300 μ g 的混合多肽用 PBS 稀释至 1ml 后与等体积的弗氏完全佐剂充分混合,于两足部各 0.25ml 皮下注射,其余后背部皮下多点 (6 点) 注射。之后每 3 周加强免疫一次,用量同前,全部后背部皮下多点 (8 点) 注射。第三次加强免疫后 10 天取兔耳缘静脉血样检测效价,至效价达 1 : 10<sup>5</sup> 以上后,将家兔处死心脏取血,获取血清。血清用 CNBR 耦联 VSTM1-v2N 端多肽纯化获得抗体,Western blot

鉴定抗体特异性结果（参见图 5）表明该抗体能特异性识别外源性表达蛋白，因此得到 VSTM1 特异的多克隆抗体。

[0111] 实施例 6、VSTM1-v2 是通过经典途径分泌的分泌蛋白

[0112] 生物信息学提示 VSTM1-v2 为分泌蛋白，本实施例中通过具体实验验证这一点。

[0113] 1、细胞培养、转染：用质粒 pcDB-VSTM1-v2-myc-his 转染 HEK 293T 细胞。

[0114] HEK293T 细胞为日本 T. Matsuda 教授馈赠（也可商购如从 ATCC 购得 HEK293T 细胞），用含 10% 胎牛血清（FBS）的 DMEM（Dulbecco's modified Eagle's medium, 4.5g/L 葡萄糖, 4mM L-谷氨酰胺, 100U/ml 青霉素, 100 μg/ml 链霉素）培养。

[0115] 使用 Vigofect 阳离子转染法转染目的基因 pcDB-VSTM1-v2-myc-his 真核表达质粒。具体操作步骤如下：(1) 细胞培养：将 HEK 293T 细胞 ( $3.0 \times 10^5$  个) 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基铺在 10cm 培养皿中，在 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 的培养箱中培养 24 小时；(2) 制备 DNA-Vigofect 复合物：用 100 μl PBS 稀释 5 μg 目的质粒，缓慢混合均匀；同样用 100 μl PBS 稀释 2 μl VigoFect，缓慢混合均匀，在室温下放置 5 分钟后，与稀释的 DNA 缓慢混合，室温放置 15 分钟，以形成 DNA-VigoFect 复合物；(3) 转染：将 DNA-VigoFect 复合物缓慢滴入细胞培养板（200 μl/孔），轻微摇匀；5% CO<sub>2</sub>, 37°C 的培养箱中培养。

[0116] 转染 24 小时后，分别在细胞培养上清中加入 10mg/ml BFA (Brefeldin-A, 布雷菲德菌素 A) 和 DMSO（用作阴性对照），处理细胞 24 小时后，细胞融合率约达到 90% 时，收集各实验组细胞及细胞培养上清用于 Western blot 分析。

[0117] 2、获取细胞培养上清及提取细胞蛋白和 Western blot 检测 VSTM1 蛋白的超表达情况 293T 细胞培养上清的收集：细胞转染 48 小时后，分别收集各实验组细胞培养上清，于 4°C, 2000g 离心 10 分钟，弃沉淀，再于 4°C, 15000g 离心 15 分钟，然后于 37°C 真空干燥浓缩 1 小时，留取处理后的细胞培养上清。

[0118] 293T 细胞总蛋白的提取：将留取上清后的细胞置于冰上，用冰预冷的 1×PBS 洗两遍，用冰预冷的 1×PBS 吹下细胞，将细胞收集到 1.5mL 离心管中，于 4°C, 2000g 离心 5 分钟。去除上清，在沉淀中加入 RIPA 细胞裂解液（20mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 1mMEDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 蛋白酶抑制剂 Cocktail），冰上放置 30 分钟，4°C, 15000g 离心 15 分钟，上清转入新管，存于 -80°C 备用。

[0119] 蛋白定量：细胞提取的蛋白按照 BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, 23227) 说明书提供的方法进行蛋白定量。

[0120] Western blot：每组细胞蛋白取 30 μg，每组细胞培养上清取 40 μl，加入蛋白上样缓冲液（北京宝赛生物技术有限公司），于 100°C 水浴煮 5 分钟。12.5% PAGE 电泳，100mV 电转 1 小时，TBST 液平衡，用 5% 牛奶室温封闭 2 小时，分别加入实施例 5 中以合成多肽制备的 VSTM1 多克隆抗体（1：1000）、单克隆抗 β-actin 抗体（Sigma, 1：3000）作为一抗，4°C 过夜，用 TBST 充分洗膜 3 次，每次 10 分钟；然后加入相应的 IRDye™ 800 标记的二抗（1：10000），室温避光反应 1 小时；再用 TBST 充分洗膜 3 次，每次 10 分钟；最后使用 Odyssey Infrared Imager 在 800nm 波长下检测信号。

[0121] Western blot 分析结果请参见图 5 所示，在超表达 VSTM1-v2 的 293T 细胞的培养上清中，可检测到 VSTM1-v2，但其蛋白分子量偏大，可能为糖基化等修饰所致。加入经典分泌途径（内质网高尔基体途径）的抑制剂 BFA 后，VSTM1-v2 分泌明显减少，证明 VSTM1-v2

为通过经典途径分泌的分泌蛋白。

[0122] 实施例 7、真核细胞 VSTM1-v2 分泌蛋白质的表达与纯化

[0123] 将 HEK 293T 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基铺在 10cm 培养皿中, 在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的培养箱中培养 24 小时。使用 Vigofect 阳离子转染法 (参见实施例 6) 转染目的基因 pcDB-VSTM1-v2-myc-his 真核表达质粒。转染 6 小时后用常温的 1×PBS 洗涤细胞一次, 更换新鲜的无血清培养基 (但含有低蛋白的培养细胞因子), 在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的培养箱中培养。48 小时后收集细胞培养上清, 于 4°C, 2000g 离心 10 分钟, 目的是去除细胞培养上清的细胞, 弃沉淀, 再于 4°C, 18000g 离心 20 分钟, 去除上清中的小颗粒物质, 留取处理后的细胞培养上清。用 Ni<sup>2+</sup> 柱料纯化上述处理后的细胞培养上清; 具体方法与实施例 4 同, 取处理后的上清分装保存于 -80°C 待用。取 5 μl 蛋白用 BCA 方法对其进行 BCA 蛋白定量, 取部分样品 (每组细胞蛋白取 30 μg) 加入蛋白上样缓冲液, 于 100°C 水浴煮 5 分钟, 进行 SDS-PAGE 以及 western blot, 鉴定 VSTM1-v2 分泌蛋白纯化的纯度。

[0124] 结果请参见图 6 所示, VSTM1-v2 纯化蛋白纯度较高。

[0125] 实施例 8、真核细胞纯化 VSTM1-v2 分泌蛋白质的糖基化实验

[0126] 取 3×30 μl 实施例 7 中制备的真核细胞纯化 VSTM1-v2 蛋白, 加入 0.1% SDS 与 50mM β-巯基乙醇, 95°C 变性 5 分钟, 然后加入 1% NP-40、蛋白酶抑制剂 cocktail, 分别加入 N-糖苷酶 F、O-糖苷酶以及双蒸水, 37°C 酶切 2 小时, 然后加入蛋白上样缓冲液终止酶切反应, 通过 western blot 检测 VSTM 1-v2 的糖基化修饰情况。

[0127] 结果如图 7 所示, 与加入双蒸水的对照 (泳道 1) 相比, 加入 N-糖苷酶 F 酶切后 VSTM1-v2 条带 (泳道 2) 明显变小致密, 而加入 O-糖苷酶后 (泳道 3) 没有明显变化, 提示 VSTM1-v2 分泌蛋白具有 N 糖基化修饰, 而无 O 糖基化修饰。

[0128] 实施例 9、检测 VSTM1-v2 对 CD4<sup>+</sup>T 细胞活化和分化的影响

[0129] 1、检测 VSTM1-v2 分泌蛋白对 CD4<sup>+</sup>T 细胞细胞因子表达的影响

[0130] 首先应用淋巴细胞分层液从正常人外周血中分离得到 PBMC (正常人外周血单个核细胞), 然后从中用阳性分选磁珠纯化得到 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞, 将磁珠纯化得到 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞培养于用抗 CD3 (1 μg/ml; clone OKT3) 和抗 CD28 (2 μg/ml; clone 15E8) 抗体包被的细胞培养板, 密度为 1.5×10<sup>6</sup> 个细胞 /ml, 分为七组, 分别加入 PBS、真核细胞 VSTM1-v2 分泌蛋白 (1ng、10ng、100ng/ml)、加热灭活真核细胞 VSTM1-v2 分泌蛋白 (100ng/ml)、原核细胞 VSTM1-v2 蛋白 (100ng/ml, GST-VSTM1-v2 重组蛋白去掉 GST 标签) 及其加热灭活蛋白, 以上七组分别定义为 PBS、VSTM1-v2-1、VSTM1-v2-10、VSTM1-v2-100、Δ VSTM1-v2-100、rVSTM1-v2 以及 Δ rVSTM1-v2。

[0131] 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 69 小时加入 BFA 抑制细胞因子的分泌, 72 小时收获细胞通过流式细胞仪 (FACS) 检测细胞内 IFN-γ、IL-4、IL-17A 等各种细胞因子的变化。细胞内分子检测: 收获不同类型的免疫细胞, 用冷的 PBS/0.1% BSA 洗涤两次, 首先用 3% 多聚甲醛冰上固定 30min; 然后用 0.1% Triton X-100 室温孵育 30min, 1500rpm 离心 5min。再加入 100 μl 封闭液 (PBS/10% 正常羊血清) 重悬细胞, 室温封闭 30 分钟。随后加入 PE 标记的 IFN-γ 抗体 (BD)、FITC 标记的 IL-4 抗体 (BD)、APC 标记的 IL-17A 抗体 (R&D), 4°C 避光孵育 40min; 使用相应 IgG 作为阴性对照。最后用 PBS/0.1% BSA 洗涤两次后, 通过流式细胞仪收集细胞, 使用 Cellquest 软件对结果进行分析。

[0132] 检测结果请参见图 8 所示, IFN- $\gamma$  和 IL-4 没有明显变化(图片 A、B), 而真核和原核蛋白 VSTM1-v2 都能明显促进 IL-17A 分泌的细胞增多(图片 C)。由于在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中, IL-17A 主要由 Th17 细胞分泌, 因此, 本实施例结果提示 VSTM1-v2 可能会影响 Th17 细胞的分化。

[0133] 2、检测 VSTM1-v2 分泌蛋白对 Th17 细胞分化的影响

[0134] 同样首先应用淋巴细胞分层液从正常人外周血中分离得到 PBMC(正常人外周血单个核细胞), 然后从中用阳性分选磁珠纯化得到 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞, 在纯化的细胞中加入小鼠抗人 CD45RO 抗体(BD) 和大鼠抗小鼠 IgG2a 阳性分选磁珠(Dynal Biotech) 去除 CD45RO<sup>+</sup> 细胞, 余下的细胞即为 CD45RA<sup>+</sup> 的 Naive T 淋巴细胞。利用流式细胞技术, 用荧光标记的抗 CD45RA、CD45RO 和 CD4 抗体鉴定所分选的 CD4<sup>+</sup>Naive T 淋巴细胞的纯度。

[0135] 将 Naive T 淋巴细胞培养于包被抗 CD3(1  $\mu$ g/ml; clone OKT3) 和抗 CD28(2  $\mu$ g/ml; clone 15E8) 抗体的细胞培养板中, 在培养体系中加入重组人 IL-1 $\beta$  (50ng/ml)、重组人 IL-6(50ng/ml)、重组人 IL-23(50ng/ml)、重组人 TNF- $\alpha$  (10ng/ml)、重组人 TGF- $\beta$  1(5ng/ml)、抗人 IL-4 的抗体(5  $\mu$ g/ml) 和抗人 IFN- $\gamma$  (5  $\mu$ g/ml) 的抗体。四天后, 细胞换液去除抗 CD3 和抗 CD28 抗体, 加入重组人 IL-2(5ng/ml), 其余细胞因子和抗体不变, 继续培养三天。在 Th17 细胞分化的过程中分别加入 PBS、真核细胞 VSTM1-v2 分泌蛋白(1ng/ml、10ng/ml、100ng/ml), 检测 VSTM1-v2 分泌蛋白对 Th17 细胞分化的影响。

[0136] Th17 细胞诱导分化 7 天后, 用 PMA(100ng/ml) 和 ionomycin(1  $\mu$ M) 刺激细胞 6 小时, 其中后 3 小时加入 BFA 抑制细胞因子的分泌, 通过 FACS 检测其细胞内的 IL-17A 水平。结果请参见图 9 中图片 A 所示, VSTM1-v2 能促进 IL-17A<sup>+</sup>Th17 细胞增多。

[0137] 另外 Th17 细胞诱导分化 7 天后, 收获细胞培养上清, 通过 ELISA 检测细胞因子 IL-17A 的分泌情况。结果请参见图 9 中图片 B 所示, 可以发现 VSTM1-v2 能促进 IL-17A 的分泌。

[0138] 另外提取上述各组细胞的 RNA, 利用 realtime PCR 方法(Real-time PCR 采用 SYBRGreen 方法和 LightCycler 仪器进行) 检测 IL-17A 转录水平的变化。结果请参见图 9 中图片 C 所示, 与 FACS 结果一致, VSTM1-v2 能促进 Th17 细胞 IL-17A 的表达。

[0139] 另外通过 [<sup>3</sup>H]-TdR 掺入实验检测细胞增殖, 具体实验操作: 将分离获得 CD4<sup>+</sup>Naive T 淋巴细胞, 将细胞悬浮在 10% FBS RPMI 1640 中, 调整细胞浓度为 2 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml。加入用抗 CD3 和 CD28 抗体包被的 96 孔平底培养板, 100  $\mu$ l/孔, 培养条件与诱导 Th17 细胞分化体系相同, 同时加入 PBS 或真核细胞 VSTM1-v2 分泌蛋白, 每组设立 3 个复孔, 培养 7 天后加入 [<sup>3</sup>H]-TdR, 浓度为 1  $\mu$ Ci/ml, 继续培养 18 小时后, 收集细胞至 96 孔 Filtermat 上, MicroBeta Windows Workstation(Wallac) 测定 [<sup>3</sup>H]-TdR 的掺入情况。 [<sup>3</sup>H]-TdR 掺入方法检测发现 VSTM1-v2 分泌蛋白(100ng/ml) 可促进 Th17 细胞的增殖, 结果请参见图 9 中图片 D 所示。

[0140] 以上结果表明 VSTM1-v2 可在体外促进 Th17 细胞的分化。

[0141] 实施例 10、检测 VSTM1-v2 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞活化和杀伤功能的影响实验

[0142] 首先应用淋巴细胞分层液从正常人外周血中分离得到 PBMC(正常人外周血单个核细胞), 然后从中用阳性分选磁珠纯化得到 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞, 培养于用抗 CD3(1  $\mu$ g/ml; clone OKT3) 和抗 CD28(2  $\mu$ g/ml; clone 15E8) 抗体包被的细胞培养板, 密度为 1.5 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞/ml, 分为两组, 分别加入 PBS 和真核细胞 VSTM1-v2 分泌蛋白(10ng/ml)。

[0143] 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 69 小时后加入 BFA 抑制细胞因子的分泌, 72 小时收获细胞通过 FACS 检测细胞内细胞因子 IFN- $\gamma$  的变化, 结果请参见图 10 中图片 A 所示, 发现 VSTM1-v2 能明显促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞 IFN- $\gamma$  的表达。

[0144] 检测 CD8<sup>+</sup>T 细胞杀伤 K562 细胞的功能实验时, 磁珠纯化得到的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞, 培养于用抗 CD3 (1  $\mu$ g/ml) 和抗 CD28 (2  $\mu$ g/ml) 抗体包被的细胞培养板, 密度为  $1.5 \times 10^6$  个细胞/ml, 细胞共培养六天, 中间换一次新鲜培养基, 六天后将 CD8<sup>+</sup>T 细胞与 K562 细胞以 9 : 1 的比例共孵育, 同时加入抗 CD3 (1  $\mu$ g/ml) 和抗 CD28 (2  $\mu$ g/ml) 抗体, 另外加入 PBS 或真核细胞 VSTM1-v2 分泌蛋白 (10ng/ml), 24 小时后光镜下观察 CD8<sup>+</sup>T 细胞对 K562 细胞的杀伤作用, 并利用流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染检测 K562 细胞的凋亡, 从而反映 VSTM1-v2 分泌蛋白对 CD8<sup>+</sup>T 细胞杀伤 K562 细胞功能的影响。

[0145] 流式细胞仪检测细胞凋亡的具体操作为: 收获细胞并制备成单细胞悬液, 预冷的 PBS 洗 2 次后, 换 binding buffer (10mM HEPES, pH 7.4, 140mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mMKCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>) 洗细胞一次, 加入 FITC-Annexin V 至终浓度 0.5  $\mu$ g/ml, 4°C 孵育 30 分钟, 加入 propidium iodide 至终浓度 1  $\mu$ g/ml, 上流式细胞仪, 以 488nm 氩激发光检测细胞程序性死亡。

[0146] 检测结果请参见图 10 中图片 B 与图片 C 所示, 发现 VSTM1-v2 能明显促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞与 K562 细胞聚集成团以及 K562 细胞的凋亡, 提示 VSTM1-v2 能促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞对 K562 细胞的杀伤作用。

[0147] 以上实施例说明, VSTM1-v2 作为一个分泌蛋白, 在体外介导 Th 细胞的分化和调节 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的功能, 在体内可能作为一个细胞因子, 在免疫系统中发挥其重要功能。VSTM1-v2 蛋白及 VSTM1 抗体在抗感染、提高免疫力、抗自身免疫性疾病以及抗肿瘤免疫等方面具有潜在的临床应用价值。

[0148] 序列表

[0149] <110> 北京大学

[0150] <120> 人类新细胞因子 VSTM1-v2 及其应用

[0151] <130> GAI09CN1795C

[0152] <160> 20

[0153] <170> PatentIn version 3.5

[0154] <210> 1

[0155] <211> 733

[0156] <212> DNA

[0157] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0158] <220>

[0159] <221> CDS

[0160] <222> (12).. (722)

[0161] <400> 1

[0162] gaagggacgc t atg acc gca gaa ttc ctc tcc ctg ctt tgc ctc ggg ctg 50

[0163] Met Thr Ala Glu Phe Leu Ser Leu Leu Cys Leu Gly Leu

[0164] 1 5 10

[0165]	tgt ctg ggc tac gaa gat gag aaa aag aat gag aaa ccg ccc aag ccc	98
[0166]	Cys Leu Gly Tyr Glu Asp Glu Lys Lys Asn Glu Lys Pro Pro Lys Pro	
[0167]	15 20 25	
[0168]	tcc ctc cac gcc tgg ccc agc tcg gtg gtt gaa gcc gag agc aat gtg	146
[0169]	Ser Leu His Ala Trp Pro Ser Ser Val Val Glu Ala Glu Ser Asn Val	
[0170]	30 35 40 45	
[0171]	acc ctg aag tgt cag gct cat tcc cag aat gtg aca ttt gtg ctg cgc	194
[0172]	Thr Leu Lys Cys Gln Ala His Ser Gln Asn Val Thr Phe Val Leu Arg	
[0173]	50 55 60	
[0174]	aag gtg aac gac tct ggg tac aag cag gaa cag agc tcg gca gaa aac	242
[0175]	Lys Val Asn Asp Ser Gly Tyr Lys Gln Glu Gln Ser Ser Ala Glu Asn	
[0176]	65 70 75	
[0177]	gaa gct gaa ttc ccc ttc acg gac ctg aag cct aag gat gct ggg agg	290
[0178]	Glu Ala Glu Phe Pro Phe Thr Asp Leu Lys Pro Lys Asp Ala Gly Arg	
[0179]	80 85 90	
[0180]	tac ttt tgt gcc tac aag aca aca gcc tcc cat gag tgg tca gaa agc	338
[0181]	Tyr Phe Cys Ala Tyr Lys Thr Thr Ala Ser His Glu Trp Ser Glu Ser	
[0182]	95 100 105	
[0183]	agt gaa cac ttg cag ctg gtg gtc aca gat aaa cac gat gaa ctt gaa	386
[0184]	Ser Glu His Leu Gln Leu Val Val Thr Asp Lys His Asp Glu Leu Glu	
[0185]	110 115 120 125	
[0186]	gct ccc tca atg aaa aca gac acc aga acc atc ttt gtc gcc atc ttc	434
[0187]	Ala Pro Ser Met Lys Thr Asp Thr Arg Thr Ile Phe Val Ala Ile Phe	
[0188]	130 135 140	
[0189]	agc tgc atc tcc atc ctt ctc ctc ttc ctc tca gtc ttc atc atc tac	482
[0190]	Ser Cys Ile Ser Ile Leu Leu Leu Phe Leu Ser Val Phe Ile Ile Tyr	
[0191]	145 150 155	
[0192]	aga tgc agc cag cac ggt tca tca tct gag gaa tcc acc aag aga acc	530
[0193]	Arg Cys Ser Gln His Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser Thr Lys Arg Thr	
[0194]	160 165 170	
[0195]	agc cat tcc aaa ctt ccg gag cag gag gct gcc gag gca gat tta tcc	578
[0196]	Ser His Ser Lys Leu Pro Glu Gln Glu Ala Ala Glu Ala Asp Leu Ser	
[0197]	175 180 185	
[0198]	aat atg gaa agg gta tct ctc tcg acg gca gac ccc caa gga gtg acc	626
[0199]	Asn Met Glu Arg Val Ser Leu Ser Thr Ala Asp Pro Gln Gly Val Thr	
[0200]	190 195 200 205	
[0201]	tat gct gag cta agc acc agc gcc ctg tct gag gca gct tca gac acc	674
[0202]	Tyr Ala Glu Leu Ser Thr Ser Ala Leu Ser Glu Ala Ala Ser Asp Thr	
[0203]	210 215 220	

[0204] acc cag gag ccc cca gga tct cat gaa tat gcg gca ctg aaa gtg tag 722  
 [0205] Thr Gln Glu Pro Pro Gly Ser His Glu Tyr Ala Ala Leu Lys Val  
 [0206] 225 230 235  
 [0207] caagaagaca g 733  
 [0208] <210>2  
 [0209] <211>236  
 [0210] <212>PRT  
 [0211] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [0212] <400>2  
 [0213] Met Thr Ala Glu Phe Leu Ser Leu Leu Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly  
 [0214] 1 5 10 15  
 [0215] Tyr Glu Asp Glu Lys Lys Asn Glu Lys Pro Pro Lys Pro Ser Leu His  
 [0216] 20 25 30  
 [0217] Ala Trp Pro Ser Ser Val Val Glu Ala Glu Ser Asn Val Thr Leu Lys  
 [0218] 35 40 45  
 [0219] Cys Gln Ala His Ser Gln Asn Val Thr Phe Val Leu Arg Lys Val Asn  
 [0220] 50 55 60  
 [0221] Asp Ser Gly Tyr Lys Gln Glu Gln Ser Ser Ala Glu Asn Glu Ala Glu  
 [0222] 65 70 75 80  
 [0223] Phe Pro Phe Thr Asp Leu Lys Pro Lys Asp Ala Gly Arg Tyr Phe Cys  
 [0224] 85 90 95  
 [0225] Ala Tyr Lys Thr Thr Ala Ser His Glu Trp Ser Glu Ser Ser Glu His  
 [0226] 100 105 110  
 [0227] Leu Gln Leu Val Val Thr Asp Lys His Asp Glu Leu Glu Ala Pro Ser  
 [0228] 115 120 125  
 [0229] Met Lys Thr Asp Thr Arg Thr Ile Phe Val Ala Ile Phe Ser Cys Ile  
 [0230] 130 135 140  
 [0231] Ser Ile Leu Leu Leu Phe Leu Ser Val Phe Ile Ile Tyr Arg Cys Ser  
 [0232] 145 150 155 160  
 [0233] Gln His Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser Thr Lys Arg Thr Ser His Ser  
 [0234] 165 170 175  
 [0235] Lys Leu Pro Glu Gln Glu Ala Ala Glu Ala Asp Leu Ser Asn Met Glu  
 [0236] 180 185 190  
 [0237] Arg Val Ser Leu Ser Thr Ala Asp Pro Gln Gly Val Thr Tyr Ala Glu  
 [0238] 195 200 205  
 [0239] Leu Ser Thr Ser Ala Leu Ser Glu Ala Ala Ser Asp Thr Thr Gln Glu  
 [0240] 210 215 220  
 [0241] Pro Pro Gly Ser His Glu Tyr Ala Ala Leu Lys Val  
 [0242] 225 230 235

[0243] <210>3  
 [0244] <211>640  
 [0245] <212>DNA  
 [0246] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [0247] <220>  
 [0248] <221>CDS  
 [0249] <222>(12).. (629)  
 [0250] <400>3  
 [0251] gaagggacgc t atg acc gca gaa ttc ctc tcc ctg ctt tgc ctc ggg ctg 50  
 [0252] Met Thr Ala Glu Phe Leu Ser Leu Leu Cys Leu Gly Leu  
 [0253] 1 5 10  
 [0254] tgt ctg ggc tac gaa gat gag aaa aag aat gag aaa ccg ccc aag ccc 98  
 [0255] Cys Leu Gly Tyr Glu Asp Glu Lys Lys Asn Glu Lys Pro Pro Lys Pro  
 [0256] 15 20 25  
 [0257] tcc ctc cac gcc tgg ccc agc tcg gtg gtt gaa gcc gag agc aat gtg 146  
 [0258] Ser Leu His Ala Trp Pro Ser Ser Val Val Glu Ala Glu Ser Asn Val  
 [0259] 30 35 40 45  
 [0260] acc ctg aag tgt cag gct cat tcc cag aat gtg aca ttt gtg ctg cgc 194  
 [0261] Thr Leu Lys Cys Gln Ala His Ser Gln Asn Val Thr Phe Val Leu Arg  
 [0262] 50 55 60  
 [0263] aag gtg aac gac tct ggg tac aag cag gaa cag agc tcg gca gaa aac 242  
 [0264] Lys Val Asn Asp Ser Gly Tyr Lys Gln Glu Gln Ser Ser Ala Glu Asn  
 [0265] 65 70 75  
 [0266] gaa gct gaa ttc ccc ttc acg gac ctg aag cct aag gat gct ggg agg 290  
 [0267] Glu Ala Glu Phe Pro Phe Thr Asp Leu Lys Pro Lys Asp Ala Gly Arg  
 [0268] 80 85 90  
 [0269] tac ttt tgt gcc tac aag aca aca gcc tcc cat gag tgg tca gaa agc 338  
 [0270] Tyr Phe Cys Ala Tyr Lys Thr Thr Ala Ser His Glu Trp Ser Glu Ser  
 [0271] 95 100 105  
 [0272] agt gaa cac ttg cag ctg gtg gtc aca gat aaa cac gat gaa ctt gaa 386  
 [0273] Ser Glu His Leu Gln Leu Val Val Thr Asp Lys His Asp Glu Leu Glu  
 [0274] 110 115 120 125  
 [0275] gct ccc tca atg aaa aca ggt tca tca tct gag gaa tcc acc aag aga 434  
 [0276] Ala Pro Ser Met Lys Thr Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser Thr Lys Arg  
 [0277] 130 135 140  
 [0278] acc agc cat tcc aaa ctt ccg gag cag gag gct gcc gag gca gat tta 482  
 [0279] Thr Ser His Ser Lys Leu Pro Glu Gln Glu Ala Ala Glu Ala Asp Leu  
 [0280] 145 150 155  
 [0281] tcc aat atg gaa agg gta tct ctc tcg acg gca gac ccc caa gga gtg 530

[0282] Ser Asn Met Glu Arg Val Ser Leu Ser Thr Ala Asp Pro Gln Gly Val  
 [0283] 160 165 170  
 [0284] acc tat gct gag cta agc acc agc gcc ctg tct gag gca gct tca gac 578  
 [0285] Thr Tyr Ala Glu Leu Ser Thr Ser Ala Leu Ser Glu Ala Ala Ser Asp  
 [0286] 175 180 185  
 [0287] acc acc cag gag ccc cca gga tct cat gaa tat gcg gca ctg aaa gtg 626  
 [0288] Thr Thr Gln Glu Pro Pro Gly Ser His Glu Tyr Ala Ala Leu Lys Val  
 [0289] 190 195 200 205  
 [0290] tag caagaagaca g 640  
 [0291] <210>4  
 [0292] <211>205  
 [0293] <212>PRT  
 [0294] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [0295] <400>4  
 [0296] Met Thr Ala Glu Phe Leu Ser Leu Leu Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly  
 [0297] 1 5 10 15  
 [0298] Tyr Glu Asp Glu Lys Lys Asn Glu Lys Pro Pro Lys Pro Ser Leu His  
 [0299] 20 25 30  
 [0300] Ala Trp Pro Ser Ser Val Val Glu Ala Glu Ser Asn Val Thr Leu Lys  
 [0301] 35 40 45  
 [0302] Cys Gln Ala His Ser Gln Asn Val Thr Phe Val Leu Arg Lys Val Asn  
 [0303] 50 55 60  
 [0304] Asp Ser Gly Tyr Lys Gln Glu Gln Ser Ser Ala Glu Asn Glu Ala Glu  
 [0305] 65 70 75 80  
 [0306] Phe Pro Phe Thr Asp Leu Lys Pro Lys Asp Ala Gly Arg Tyr Phe Cys  
 [0307] 85 90 95  
 [0308] Ala Tyr Lys Thr Thr Ala Ser His Glu Trp Ser Glu Ser Ser Glu His  
 [0309] 100 105 110  
 [0310] Leu Gln Leu Val Val Thr Asp Lys His Asp Glu Leu Glu Ala Pro Ser  
 [0311] 115 120 125  
 [0312] Met Lys Thr Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser Thr Lys Arg Thr Ser His  
 [0313] 130 135 140  
 [0314] Ser Lys Leu Pro Glu Gln Glu Ala Ala Glu Ala Asp Leu Ser Asn Met  
 [0315] 145 150 155 160  
 [0316] Glu Arg Val Ser Leu Ser Thr Ala Asp Pro Gln Gly Val Thr Tyr Ala  
 [0317] 165 170 175  
 [0318] Glu Leu Ser Thr Ser Ala Leu Ser Glu Ala Ala Ser Asp Thr Thr Gln  
 [0319] 180 185 190  
 [0320] Glu Pro Pro Gly Ser His Glu Tyr Ala Ala Leu Lys Val

[0321]	195	200	205	
[0322]	<210>5			
[0323]	<211>373			
[0324]	<212>DNA			
[0325]	<213> 智人 (Homo sapiens)			
[0326]	<220>			
[0327]	<221>CDS			
[0328]	<222>(12).. (362)			
[0329]	<400>5			
[0330]	gaagggacgc t atg acc gca gaa ttc ctc tcc ctg ctt tgc ctc gac acc			50
[0331]	Met Thr Ala Glu Phe Leu Ser Leu Leu Cys Leu Asp Thr			
[0332]	1 5 10			
[0333]	aga acc atc ttt gtc gcc atc ttc agc tgc atc tcc atc ctt ctc ctc			98
[0334]	Arg Thr Ile Phe Val Ala Ile Phe Ser Cys Ile Ser Ile Leu Leu Leu			
[0335]	15 20 25			
[0336]	ttc ctc tca gtc ttc atc atc tac aga tgc agc cag cac agt tca tca			146
[0337]	Phe Leu Ser Val Phe Ile Ile Tyr Arg Cys Ser Gln His Ser Ser Ser			
[0338]	30 35 40 45			
[0339]	tct gag gaa tcc acc aag aga acc agc cat tcc aaa ctt ccg gag cag			194
[0340]	Ser Glu Glu Ser Thr Lys Arg Thr Ser His Ser Lys Leu Pro Glu Gln			
[0341]	50 55 60			
[0342]	gag gct gcc gag gca gat tta tcc aat atg gaa agg gta tct ctc tcg			242
[0343]	Glu Ala Ala Glu Ala Asp Leu Ser Asn Met Glu Arg Val Ser Leu Ser			
[0344]	65 70 75			
[0345]	acg gca gac ccc caa gga gtg acc tat gct gag cta agc acc agc gcc			290
[0346]	Thr Ala Asp Pro Gln Gly Val Thr Tyr Ala Glu Leu Ser Thr Ser Ala			
[0347]	80 85 90			
[0348]	ctg tct gag gca gct tca gac acc acc cag gag ccc cca gga tct cat			338
[0349]	Leu Ser Glu Ala Ala Ser Asp Thr Thr Gln Glu Pro Pro Gly Ser His			
[0350]	95 100 105			
[0351]	gaa tat gcg gca ctg aaa gtg tag caagaagaca g			373
[0352]	Glu Tyr Ala Ala Leu Lys Val			
[0353]	110 115			
[0354]	<210>6			
[0355]	<211>116			
[0356]	<212>PRT			
[0357]	<213> 智人 (Homo sapiens)			
[0358]	<400>6			
[0359]	Met Thr Ala Glu Phe Leu Ser Leu Leu Cys Leu Asp Thr Arg Thr Ile			

[0360]	1	5	10	15	
[0361]	Phe Val Ala Ile Phe Ser Cys Ile Ser Ile Leu Leu Leu Phe Leu Ser				
[0362]		20	25	30	
[0363]	Val Phe Ile Ile Tyr Arg Cys Ser Gln His Ser Ser Ser Ser Glu Glu				
[0364]		35	40	45	
[0365]	Ser Thr Lys Arg Thr Ser His Ser Lys Leu Pro Glu Gln Glu Ala Ala				
[0366]		50	55	60	
[0367]	Glu Ala Asp Leu Ser Asn Met Glu Arg Val Ser Leu Ser Thr Ala Asp				
[0368]	65	70	75	80	
[0369]	Pro Gln Gly Val Thr Tyr Ala Glu Leu Ser Thr Ser Ala Leu Ser Glu				
[0370]		85	90	95	
[0371]	Ala Ala Ser Asp Thr Thr Gln Glu Pro Pro Gly Ser His Glu Tyr Ala				
[0372]		100	105	110	
[0373]	Ala Leu Lys Val				
[0374]		115			
[0375]	<210>7				
[0376]	<211>524				
[0377]	<212>DNA				
[0378]	<213> 智人 (Homo sapiens)				
[0379]	<220>				
[0380]	<221>CDS				
[0381]	<222>(67).. (513)				
[0382]	<400>7				
[0383]	gaagggacgc tatgaccgca gaattcctct cctgctttg cctcgggctg tgtctgggct				60
[0384]	acgaag atg aga aaa aga atg ggt ccc act cgg ttg ccc agg ctg gag				108
[0385]	Met Arg Lys Arg Met Gly Pro Thr Arg Leu Pro Arg Leu Glu				
[0386]	1	5	10		
[0387]	tgc agt ggt gca atc aca gct cac agc agc ctt gac ctc cca ggc cca				156
[0388]	Cys Ser Gly Ala Ile Thr Ala His Ser Ser Leu Asp Leu Pro Gly Pro				
[0389]	15	20	25	30	
[0390]	gat aaa cac gat gaa ctt gaa gct cct tca atg aaa aca gac acc aga				204
[0391]	Asp Lys His Asp Glu Leu Glu Ala Pro Ser Met Lys Thr Asp Thr Arg				
[0392]		35	40	45	
[0393]	acc atc ttt gtc gcc atc ttc agc tgc atc tcc atc ctt ctc ctc ttc				252
[0394]	Thr Ile Phe Val Ala Ile Phe Ser Cys Ile Ser Ile Leu Leu Leu Phe				
[0395]		50	55	60	
[0396]	ctc tca gtc ttc atc atc tac aga tgc agc cag cac ggt tca tca tct				300
[0397]	Leu Ser Val Phe Ile Ile Tyr Arg Cys Ser Gln His Gly Ser Ser Ser				
[0398]	65	70	75		

[0399] gag gaa tcc acc aag aga acc agc cat tcc gaa ctt cca gag cag gag 348  
 [0400] Glu Glu Ser Thr Lys Arg Thr Ser His Ser Glu Leu Pro Glu Gln Glu  
 [0401] 80 85 90  
 [0402] gct gcc gag gca gat tta tcc aat atg gaa agg gta tct ctc tcg acg 396  
 [0403] Ala Ala Glu Ala Asp Leu Ser Asn Met Glu Arg Val Ser Leu Ser Thr  
 [0404] 95 100 105 110  
 [0405] gca gac ccc caa gga gtg acc tat gct gag cta agc acc agc gcc ctg 444  
 [0406] Ala Asp Pro Gln Gly Val Thr Tyr Ala Glu Leu Ser Thr Ser Ala Leu  
 [0407] 115 120 125  
 [0408] tct gag gca gct tca gac acc acc cag gag ccc cca gga tct cat gaa 492  
 [0409] Ser Glu Ala Ala Ser Asp Thr Thr Gln Glu Pro Pro Gly Ser His Glu  
 [0410] 130 135 140  
 [0411] tat gcg gca ctg aaa gtg tag caagaagaca g 524  
 [0412] Tyr Ala Ala Leu Lys Val  
 [0413] 145  
 [0414] <210>8  
 [0415] <211>148  
 [0416] <212>PRT  
 [0417] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [0418] <400>8  
 [0419] Met Arg Lys Arg Met Gly Pro Thr Arg Leu Pro Arg Leu Glu Cys Ser  
 [0420] 1 5 10 15  
 [0421] Gly Ala Ile Thr Ala His Ser Ser Leu Asp Leu Pro Gly Pro Asp Lys  
 [0422] 20 25 30  
 [0423] His Asp Glu Leu Glu Ala Pro Ser Met Lys Thr Asp Thr Arg Thr Ile  
 [0424] 35 40 45  
 [0425] Phe Val Ala Ile Phe Ser Cys Ile Ser Ile Leu Leu Leu Phe Leu Ser  
 [0426] 50 55 60  
 [0427] Val Phe Ile Ile Tyr Arg Cys Ser Gln His Gly Ser Ser Ser Glu Glu  
 [0428] 65 70 75 80  
 [0429] Ser Thr Lys Arg Thr Ser His Ser Glu Leu Pro Glu Gln Glu Ala Ala  
 [0430] 85 90 95  
 [0431] Glu Ala Asp Leu Ser Asn Met Glu Arg Val Ser Leu Ser Thr Ala Asp  
 [0432] 100 105 110  
 [0433] Pro Gln Gly Val Thr Tyr Ala Glu Leu Ser Thr Ser Ala Leu Ser Glu  
 [0434] 115 120 125  
 [0435] Ala Ala Ser Asp Thr Thr Gln Glu Pro Pro Gly Ser His Glu Tyr Ala  
 [0436] 130 135 140  
 [0437] Ala Leu Lys Val

[0438] 145  
 [0439] <210>9  
 [0440] <211>822  
 [0441] <212>DNA  
 [0442] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [0443] <220>  
 [0444] <221>CDS  
 [0445] <222>(12).. (443)  
 [0446] <400>9  
 [0447] gaagggacgc t atg acc gca gaa ttc ctc tcc ctg ctt tgc ctc ggg ctg 50  
 [0448] Met Thr Ala Glu Phe Leu Ser Leu Leu Cys Leu Gly Leu  
 [0449] 1 5 10  
 [0450] tgt ctg ggc tac gaa gat gag aaa aag aat gag aaa ccg ccc aag ccc 98  
 [0451] Cys Leu Gly Tyr Glu Asp Glu Lys Lys Asn Glu Lys Pro Pro Lys Pro  
 [0452] 15 20 25  
 [0453] tcc ctc cac gcc tgg ccc agc tcg gtg gtt gaa gcc gag agc aat gtg 146  
 [0454] Ser Leu His Ala Trp Pro Ser Ser Val Val Glu Ala Glu Ser Asn Val  
 [0455] 30 35 40 45  
 [0456] acc ctg aag tgt cag gct cat ttc cag aat gtg aca ttt gtg ctg cgc 194  
 [0457] Thr Leu Lys Cys Gln Ala His Phe Gln Asn Val Thr Phe Val Leu Arg  
 [0458] 50 55 60  
 [0459] aag gtg aac gac tct ggg tac aag cag gaa cag agc tcg gca gaa aac 242  
 [0460] Lys Val Asn Asp Ser Gly Tyr Lys Gln Glu Gln Ser Ser Ala Glu Asn  
 [0461] 65 70 75  
 [0462] gaa gct gaa ttc ccc ttc acg gac ctg aag cct aag gat gct ggg agg 290  
 [0463] Glu Ala Glu Phe Pro Phe Thr Asp Leu Lys Pro Lys Asp Ala Gly Arg  
 [0464] 80 85 90  
 [0465] tac ttt tgt gcc tac aag aca aca gcc tcc cat gag tgg tca gaa agc 338  
 [0466] Tyr Phe Cys Ala Tyr Lys Thr Thr Ala Ser His Glu Trp Ser Glu Ser  
 [0467] 95 100 105  
 [0468] agt gaa cac ttg cag ctg gtg gtc aca gat aaa cac gat gaa ctt gaa 386  
 [0469] Ser Glu His Leu Gln Leu Val Val Thr Asp Lys His Asp Glu Leu Glu  
 [0470] 110 115 120 125  
 [0471] gct ccc tca atg aaa aca gtg gct cac gtc tgt aat acc agg acc ttg 434  
 [0472] Ala Pro Ser Met Lys Thr Val Ala His Val Cys Asn Thr Arg Thr Leu  
 [0473] 130 135 140  
 [0474] gga aga tga ggcaggagga tcaacttgagc ccaggggttc aagaccagcc 483  
 [0475] Gly Arg  
 [0476] tggacaactt gacaccagaa ccatctttgt cgccatcttc agctgcatct ccatccttct 543



- [0516] <213> 人工序列  
[0517] <220>  
[0518] <223> 引物  
[0519] <400>12  
[0520] acgaagagca aggaaacac 19  
[0521] <210>13  
[0522] <211>19  
[0523] <212>DNA  
[0524] <213> 人工序列  
[0525] <220>  
[0526] <223> 引物  
[0527] <400>13  
[0528] gaagggacgc tatgaccgc 19  
[0529] <210>14  
[0530] <211>21  
[0531] <212>DNA  
[0532] <213> 人工序列  
[0533] <220>  
[0534] <223> 引物  
[0535] <400>14  
[0536] ctgtcttctt gctacacttt c 21  
[0537] <210>15  
[0538] <211>26  
[0539] <212>DNA  
[0540] <213> 人工序列  
[0541] <220>  
[0542] <223> 引物  
[0543] <400>15  
[0544] tgaaggtcgg agtcaacgga tttggt 26  
[0545] <210>16  
[0546] <211>24  
[0547] <212>DNA  
[0548] <213> 人工序列  
[0549] <220>  
[0550] <223> 引物  
[0551] <400>16  
[0552] catgtgggcc atgaggcca ccac 24  
[0553] <210>17  
[0554] <211>31

[0555]	<212>DNA	
[0556]	<213> 人工序列	
[0557]	<220>	
[0558]	<223> 引物	
[0559]	<400>17	
[0560]	cgagcggccg catgaccgca gaattcctct c	31
[0561]	<210>18	
[0562]	<211>31	
[0563]	<212>DNA	
[0564]	<213> 人工序列	
[0565]	<220>	
[0566]	<223> 引物	
[0567]	<400>18	
[0568]	cttggtagcg acactttcag tgccgcatat t	31
[0569]	<210>19	
[0570]	<211>31	
[0571]	<212>DNA	
[0572]	<213> 人工序列	
[0573]	<220>	
[0574]	<223> 引物	
[0575]	<400>19	
[0576]	cgcggtacct acgaagatga gaaaaagaat g	31
[0577]	<210>20	
[0578]	<211>27	
[0579]	<212>DNA	
[0580]	<213> 人工序列	
[0581]	<220>	
[0582]	<223> 引物	
[0583]	<400>20	
[0584]	cgccgtgact ttcacatcgg gccccct	27

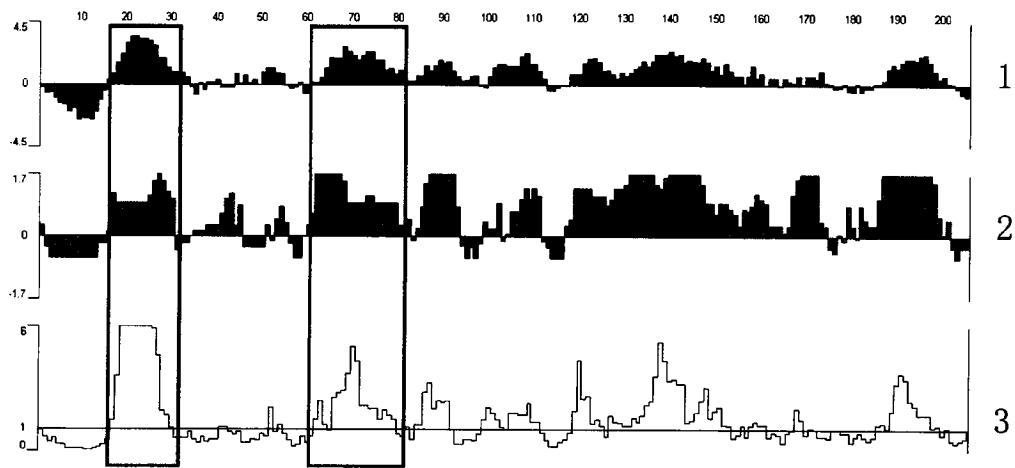


图 1

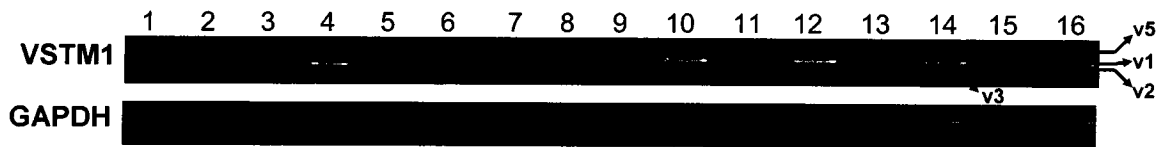


图 2A

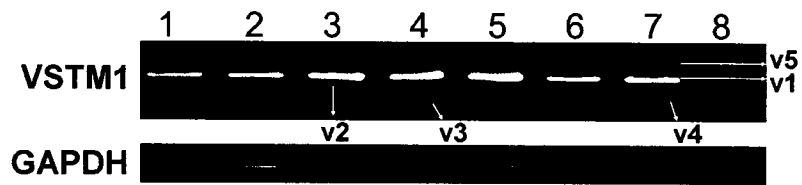


图 2B

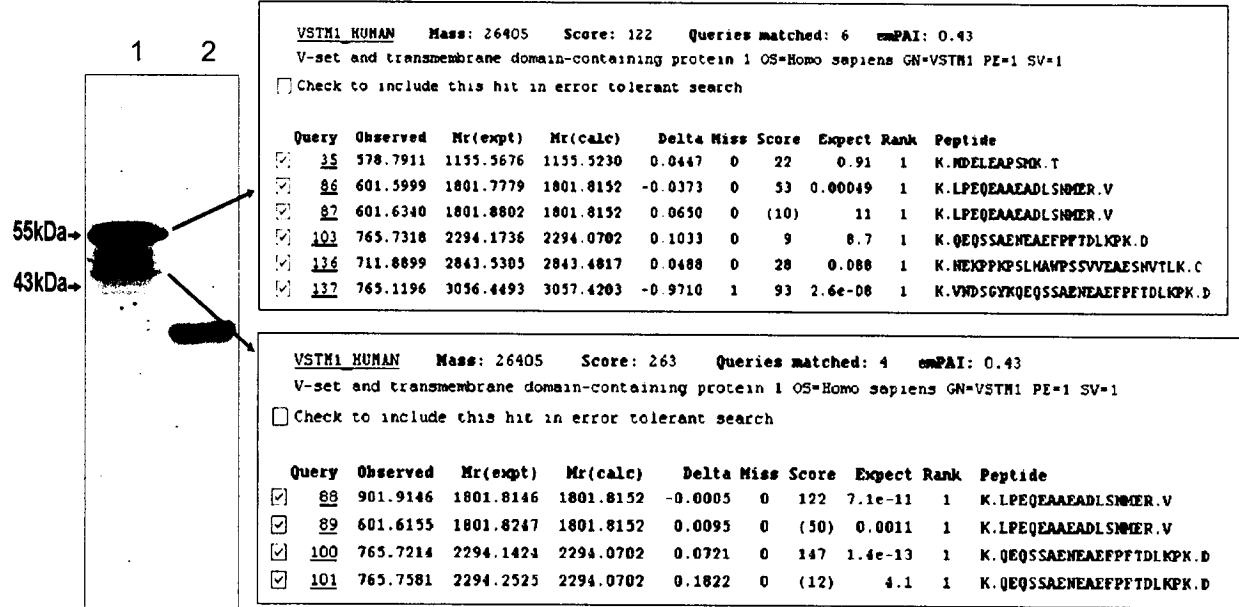


图 3A

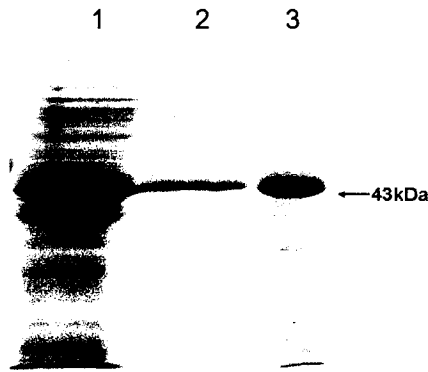


图 3B



图 4

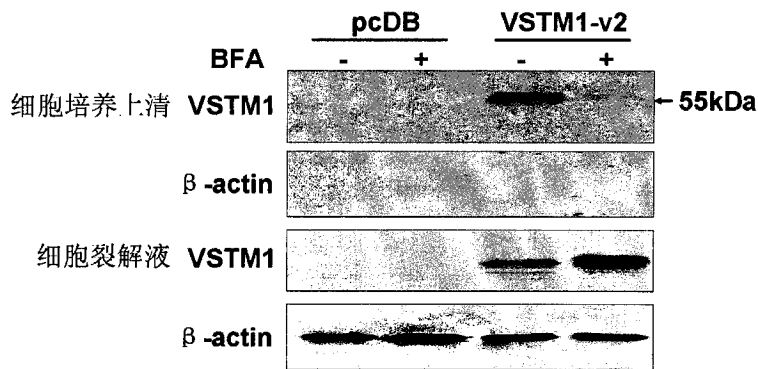


图 5

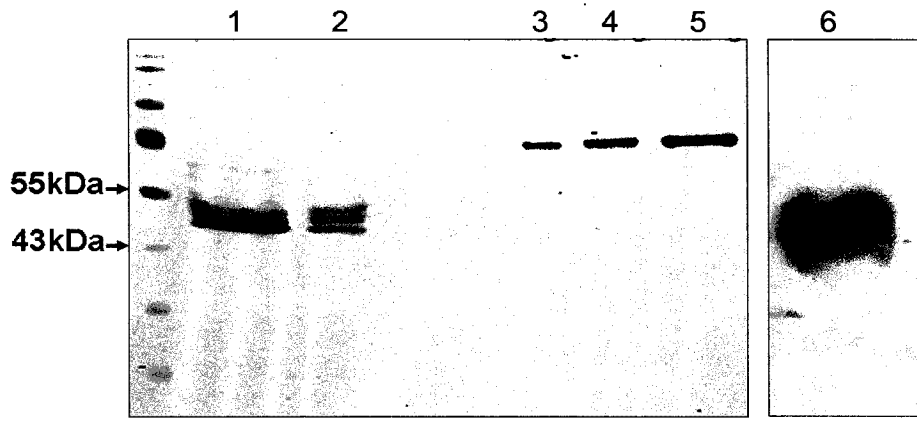


图 6

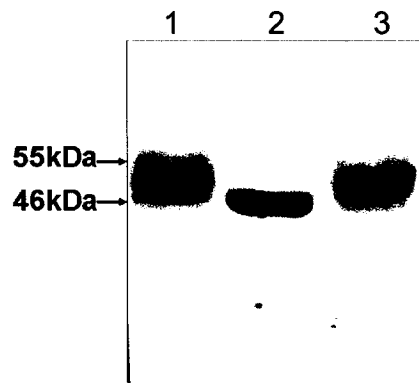


图 7

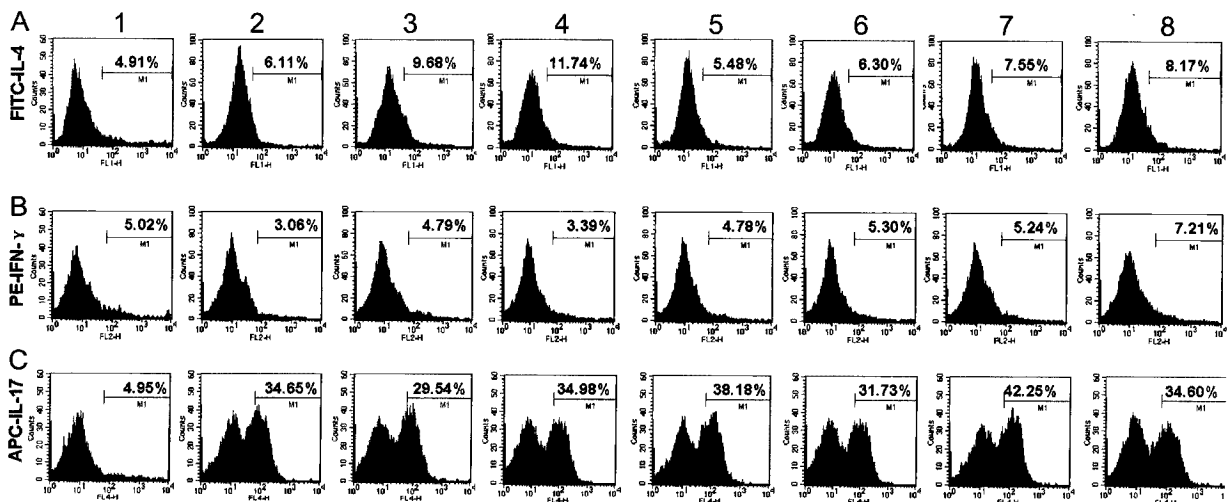


图 8

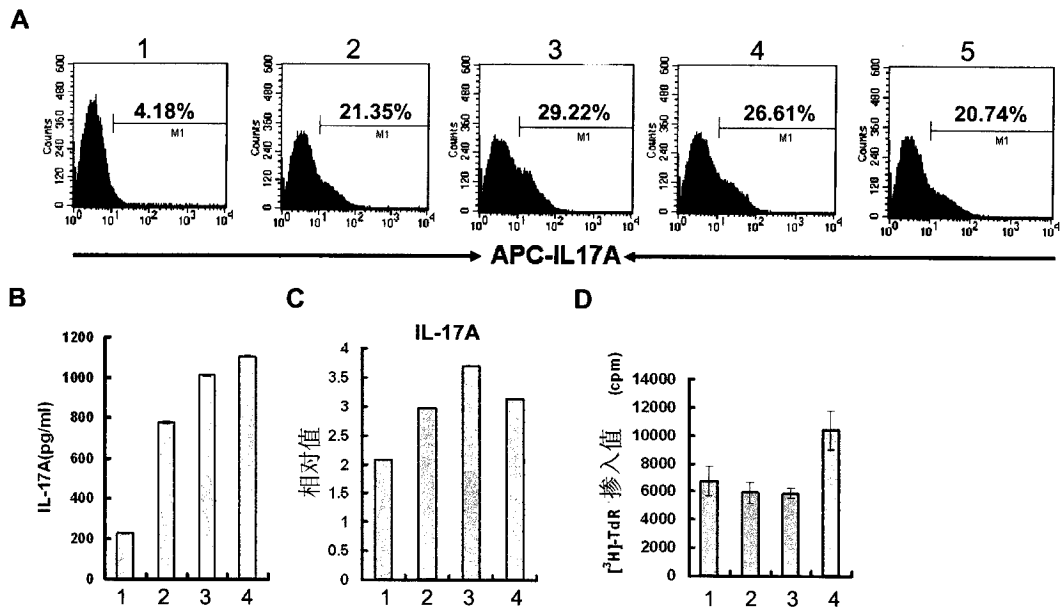


图 9

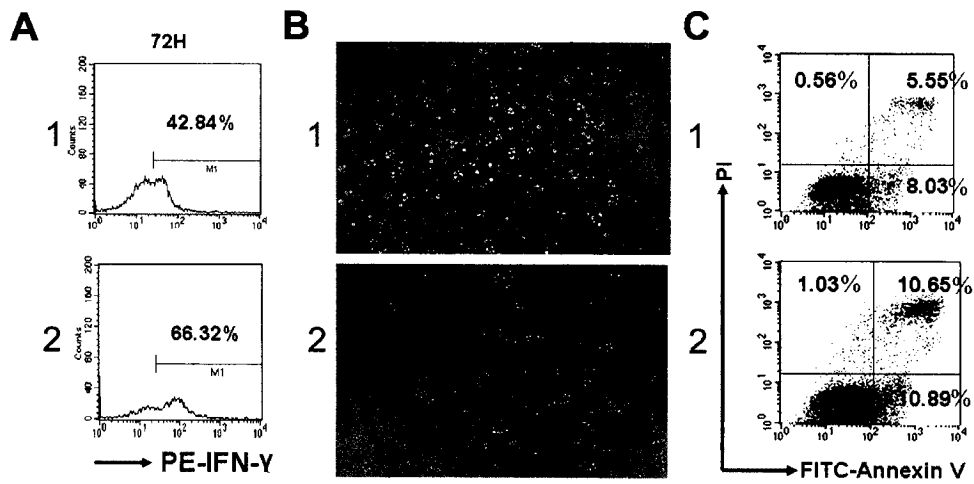


图 10

专利名称(译)	人类新细胞因子VSTM1-v2及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN102030822A</a>	公开(公告)日	2011-04-27
申请号	CN200910235602.4	申请日	2009-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学		
[标]发明人	马大龙 韩文玲 郭晓欢 王平章 李婷 黄晶 郭金海 付伟伟 张岩飞 石太平		
发明人	马大龙 韩文玲 郭晓欢 王平章 李婷 黄晶 郭金海 付伟伟 张岩飞 石太平		
IPC分类号	C07K14/52 C12N15/19 C12N15/63 C12N1/21 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C07K16/24 C12N15/11 A61K38/19 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/00 A61P37/00 A61P35/00 G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	C07K16/24 A61K38/00 C07K14/52 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02		
代理人(译)	韩蕾		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及人类新细胞因子VSTM1-v2及其应用。具体地说本发明是涉及VSTM1的剪切体VSTM1-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段；所述VSTM1-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段在促进Th17分化和CD8+T淋巴细胞的杀伤功能中的应用，以及在制备用于预防和/或治疗免疫相关疾病的药物组合物中的应用；本发明还涉及VSTM1-v2的拮抗剂例如单克隆抗体或多克隆抗体，包含VSTM1-v2的载体、宿主细胞或组合物，及检测VSTM1-v2或其免疫性片段的试剂，以及它们的应用。

	VSTM1-v1	VSTM1-v2	VSTM1-v3	VSTM1-v4	VSTM1-v5
ORF 全长	711bp SEQ ID No: 1 第12~722位	618bp SEQ ID No: 3 第12~629位	351bp SEQ ID No: 5 第12~362位	447bp SEQ ID No: 7 第67~513位	432bp SEQ ID No: 9 第12~443位
编码氨基酸数目	236aa SEQ ID No: 2	205aa SEQ ID No: 4	116aa SEQ ID No: 6	148aa SEQ ID No: 8	143aa SEQ ID No: 10