



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103382220 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 06

(21) 申请号 201210135542. 0	<i>C12Q 1/68</i> (2006. 01)
(22) 申请日 2012. 05. 03	<i>G01N 33/53</i> (2006. 01)
(71) 申请人 北京大学	<i>A61K 38/19</i> (2006. 01)
地址 100191 北京市海淀区学院路 38 号	<i>A61K 39/395</i> (2006. 01)
(72) 发明人 韩文玲 马大龙 王文彦 张荷钰	<i>A61K 48/00</i> (2006. 01)
王平章 张颖妹 宋泉声 李婷	<i>A61P 35/00</i> (2006. 01)
付伟伟 潘文	<i>A61P 31/04</i> (2006. 01)
(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127	<i>A61P 31/10</i> (2006. 01)
代理人 丁香兰 韩蕾	<i>A61P 31/12</i> (2006. 01)
	<i>A61P 37/02</i> (2006. 01)

(51) Int. Cl.
C07K 14/52 (2006. 01)
C07K 16/24 (2006. 01)
C12N 15/19 (2006. 01)
C12N 15/63 (2006. 01)
C12N 1/15 (2006. 01)
C12N 1/19 (2006. 01)
C12N 1/21 (2006. 01)
C12N 5/10 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书15页
 序列表5页 附图18页

(54) 发明名称
 具有抗感染、抗肿瘤活性的细胞因子FAM19A4
 及其应用

(57) 摘要
 本发明涉及一种具有抗感染、抗肿瘤活性的细胞因子 FAM19A4 及其应用, 具体地, 本发明提供了 FAM19A4 的基因或蛋白或它们的免疫性片段, 包含所述 FAM19A4 的基因或蛋白或它们的免疫性片段的基因工程载体、宿主细胞, 以及针对所述 FAM19A4 蛋白或其免疫性片段的抗体。本发明还提供了所述的 FAM19A4 的基因或蛋白或它们的免疫性片段在制备具有抗病毒、抗胞内细菌、抗真菌、抗胞外细菌和抗肿瘤作用的药物制剂中的应用; 还提供了检测所述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。

1. 如下 (a) 或 (b) 所示的蛋白或其免疫性片段：
 - (a) 由 SEQ ID No. 2 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 46 ~ 140 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. 1 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。
4. 根据权利要求 3 所述的基因工程载体，其中所述的载体为质粒。
5. 一种宿主细胞，该宿主细胞经权利要求 3 或 4 所述的基因工程载体转化、转染或转导得到。
6. 针对权利要求 1 所述的蛋白或其免疫性片段的抗体，优选为多克隆抗体。
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，在制备具有抗病毒、抗胞内细菌、抗真菌、抗胞外细菌和抗肿瘤作用的药物制剂中的应用；在制备对 TNF- α 刺激的 RAW264.7 细胞具有趋化作用的制剂中的应用；在制备具有增强巨噬细胞的吞噬能力、促进 ROS 的发生的制剂中的应用；在制备具有增强巨噬细胞的吞噬能力、促进 ROS 的发生的制剂中的应用；在制备具备下调巨噬细胞炎症因子的表达、抑制 NF- κ B 转录活性的功能的制剂中的应用；在制备促进 Th1 和 Th17 细胞的分化及活化的制剂中的应用；或者在制备具备下调 CD55 或 CD59 的 mRNA 水平、抑制 CD46、CD55 或 CD59 的蛋白水平表达的功能的制剂中的应用。
8. 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 6 所述的抗体，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。
9. 根据权利要求 8 所述的应用，其中，所述的蛋白为 SEQ ID No. 2 所示或 SEQ ID No. 2 第 46 ~ 140 位所示的氨基酸序列组成的蛋白；所述的多核苷酸序列为 SEQ ID No. 1 所示的多核苷酸序列；所述的抗体为多克隆抗体；所述的免疫相关疾病为感染性疾病、自身免疫性疾病或肿瘤。
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；所述的检测试剂优选为权利要求 6 所述的抗体。

具有抗感染、抗肿瘤活性的细胞因子 FAM19A4 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 FAM19A4 的基因或蛋白或它们的免疫性片段,所述 FAM19A4 的基因或蛋白或它们的免疫性片段具有抗感染、抗肿瘤活性。

背景技术

[0002] 细胞因子是由机体多种细胞分泌的具有调控细胞生长分化、调节免疫功能和生理反应并参与病理反应的小分子蛋白质,通过与受体结合发挥作用。细胞因子主要包括白细胞介素 (Interleukin, IL)、集落刺激因子 (Colony-Stimulating Factor, CSF)、干扰素 (Interferon, IFN)、肿瘤坏死因子 (Tumor-Necrosis Factor, TNF)、趋化因子 (Chemokine) 等。细胞因子是免疫细胞之间的交流语言,对天然免疫应答和适应性免疫应答均发挥重要的作用。

[0003] 天然免疫应答是机体抵御病原体入侵的第一道防线,由屏障结构、天然免疫分子和天然免疫细胞等组成。天然免疫细胞包括吞噬细胞 (中性粒细胞、单核-巨噬细胞) 和树突状细胞等。其中吞噬细胞通过黏附、渗出、趋化作用募集和迁移到炎症灶;通过甘露糖受体、补体受体、Toll 样受体和 IgG FcR 等受体识别和吞噬病原体;通过无氧杀伤和有氧杀伤 (H₂O₂、氧自由基、NO) 机制杀伤病原体;分泌多种炎性细胞因子促进炎症反应。树突状细胞被称作介导天然免疫应答和适应性免疫应答的桥梁细胞。

[0004] 适应性免疫应答包括细胞免疫应答和体液免疫应答, CD4⁺T 细胞是适应性免疫应答的枢纽。细胞因子不仅能够决定 CD4⁺T 细胞的分化方向,也对已分化的 CD4⁺T 细胞具有调控作用;此外,细胞因子还是 CD4⁺T 细胞发挥作用的主要方式, Th1、Th2、Th17 和 iTreg 细胞产生的特征性细胞因子 IFN- γ 、IL-4、IL-17 和 TGF- β , 分别在抗胞内感染、寄生虫、胞外细菌和真菌、调节炎症及自身免疫病等过程中发挥重要作用。

[0005] 细胞因子在免疫应答中发挥重要调节作用,如 Th1 细胞可产生特征性细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 等, IFN- γ 是巨噬细胞激活因子,能够增强其对胞内微生物的吞噬和杀伤能力;IFN- γ 还能够诱导 B 细胞产生具有强免疫调理作用的 IgG2a 和 IgG3, 进一步促进巨噬细胞的吞噬功能。IL-2 能促进抗原特异性 CTL 细胞活化,为部分 CTL 的活化提供第二信号。CTL 是体内最重要的抗原特异性杀伤细胞,对病毒感染细胞和肿瘤细胞具有很强的杀伤作用。TNF- α 可以活化中性粒细胞,促进其杀伤病原体。总之, Th1 细胞活化后,产生上述效应细胞因子,介导细胞免疫,在抗胞内微生物感染、抗肿瘤免疫中发挥重要作用,并参与迟发型超敏反应 (delayed type hypersensitivity, DTH) 的发生和发展。Th17 细胞活化后产生细胞因子 IL-17、IL-22 等, IL-17 进一步募集、活化中性粒细胞;IL-22 可以诱导上皮细胞产生防御素杀伤菌体,在抗真菌和抗胞外菌感染中发挥重要作用,并参与自身免疫病的发生、发展。

[0006] 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和中和性抗体在治疗肿瘤、造血障碍、感染等方面收到良好疗效,成为新一代药物。重组细胞因子作为药物

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,已成为某些疑难病症不可缺少的治疗手段。目前已批准生产的细胞因子药物包括 IFN- α 、 β 、 γ ,Epo,GM-CSF,G-CSF,IL-2 等。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、重组可溶性受体和中和性抗体等。如 IL-2 是第一个被证明具有肿瘤治疗作用的细胞因子,1992 年成功上市,其主要用于治疗肾细胞癌和黑色素瘤。IL-12 能够促进 Th1 细胞分化,促进 NK 细胞和 CTL 细胞活化,增强其杀伤功能,其在抗卵巢癌方面的研究已进入 II 期临床。

[0007] 另一方面,随着抗生素、皮质类固醇激素、免疫抑制剂的广泛应用,临床上耐药菌株渐成增长趋势,各种胞内胞外微生物感染呈明显上升趋势,使免疫受损人群的感染几率大幅增长。为了增强机体抗感染的能力,开发新细胞因子为药物,提高免疫细胞抑制病原体的增殖与侵袭的能力就至关重要。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供一种新的细胞因子。

[0009] 本案发明人采用免疫基因组学策略,利用生物信息学遴选、功能筛选和系统性功能研究发现了一种新的细胞因子:人类细胞因子 FAM19A4,相关研究结果提示,FAM19A4 在抗感染、抗肿瘤等方面可能发挥重要作用,具有潜在的临床应用价值。

[0010] 从而,具体地,本发明的一个目的是提供一种 FAM19A4 的蛋白或其衍生蛋白或它们的免疫性片段。

[0011] 本发明的另一目的是提供编码 FAM19A4 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。

[0012] 本发明的另一目的是提供一种包含 FAM19A4 的载体。

[0013] 本发明的另一目的是提供一种包含 FAM19A4 的宿主细胞。

[0014] 本发明的另一目的是提供一种 FAM19A4 的多克隆抗体。

[0015] 本发明的另一目的是提供 FAM19A4 的基因或蛋白或它们的免疫性片段,或者 FAM19A4 的多克隆抗体在制备一些药物制剂中的应用。

[0016] 本发明的另一目的是提供用于检测 FAM19A4 的基因或蛋白或它们的免疫性片段的试剂。

[0017] 本发明的另一目的是提供检测 FAM19A4 的基因和蛋白或它们的免疫性片段的试剂的应用。

[0018] 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:

[0019] (a) 由 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白或其免疫性片段;或

[0020] (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。

[0021] 如 SEQ ID No. 2 所述的氨基酸序列为本发明的 FAM19A4 的蛋白序列,共 140 个氨基酸,分子量 15.7kD,等电点 9.02。该蛋白具有信号肽序列 (SEQ ID No. 2 第 1~45 位)。

[0022] 由 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白的免疫性片段可以为 FAM19A4 蛋白的任何具有免疫原性的片段,例如 SEQ ID No. 2 第 46~140 位所示的氨基酸序列组成的蛋

白。根据本发明,可以对 FAM19A4 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 FAM19A4 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,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。

[0023] 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。

[0024] FAM19A4 基因为编码本发明的 SEQ ID No. 2 的多核苷酸序列,其可以为 SEQ ID No. 2 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。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. 1 所示的多核苷酸序列,该序列全长 2248 个核苷酸 (SEQ ID No. 1),其包含编码 FAM19A4 蛋白的序列 (例如编码序列 (CDS:核苷酸第 444 ~ 866 位) 和 5' 的非编码区 (核苷酸第 1 ~ 443 位) 和 3' 的非编码区 (核苷酸第 867 ~ 2248 位))。或者,更优选一种分离的核苷酸序列,其只包含 FAM19A4 蛋白的编码序列。

[0025] 本领域普通技术人员已知,本发明 FAM19A4 的核苷酸序列可以完全相同于如 SEQ ID No. 1 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。

[0026] 本发明的 FAM19A4 基因或蛋白的免疫性片段包括本发明的 FAM19A4 蛋白的免疫性片段或 FAM19A4 基因的免疫性片段。本发明的 FAM19A4 基因的免疫性片段可以为编码所述 FAM19A4 蛋白的免疫性片段的核苷酸序列,例如:编码 SEQ ID No. 4 第 46 ~ 140 位所示氨基酸序列的多核苷酸序列。

[0027] 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。

[0028] 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 FAM19A4 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;也可用商业测序试剂盒等。

[0029] 本发明的 FAM19A4 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中产生。

[0030] 本发明的 FAM19A4 的蛋白或其免疫性片段可以通过常规方法获得, 例如可用 Applied Biosystem 合成仪或 Pioneer™ 合成仪按固相化学技术合成。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, 例如包括以下步骤: (1) 用本发明的多核苷酸 (或其变异体), 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。

[0031] 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。

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 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, 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。

[0035] 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。

[0036] 本发明还提供针对所述的 FAM19A4 的抗体。所述抗体包括单克隆抗体或多克隆抗体, 优选多克隆抗体。所述的抗体优选为与 SEQ ID No. 2 的氨基酸残基 46 ~ 140 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 FAM19A4 基因产物的抗体,也包括那些并不影响本发明 FAM19A4 多肽功能的抗体。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生产。例子有:单克隆抗体可用杂交瘤技术生产。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,制备多克隆抗体。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。

[0037] 根据本发明的一个方面,本发明提供了 FAM19A4 的基因或蛋白或它们的免疫性片段,或 FAM19A4 的抗体在制备一些制剂包括药物制剂、检测制剂中的应用。具体地,是其(FAM19A4 的基因或蛋白或它们的免疫性片段,或 FAM19A4 的抗体)在制备对 TNF- α 刺激的 RAW264.7 细胞具有趋化作用的制剂中的应用;其在制备具有增强巨噬细胞的吞噬能力、促进 ROS 的发生的制剂中的应用;其在制备具备下调巨噬细胞炎症因子的表达、抑制 NF- κ B 转录活性的功能的制剂中的应用;其在制备促进 Th1 和 Th17 细胞的分化及活化的制剂中的应用;其在制备具备下调 CD55 或 CD59 的 mRNA 水平、抑制 CD46、CD55 或 CD59 的蛋白水平表达的功能的制剂中的应用。

[0038] 根据本发明的另一方面,本发明提供 FAM19A4 的基因或蛋白或它们的免疫性片段,或 FAM19A4 的抗体,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. 2 第 46 ~ 140 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. 1 所示的多核苷酸序列;所述的抗体优选为多克隆抗体;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 FAM19A4 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。

[0039] 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 FAM19A4 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。

[0040] 本发明同时提供用于检测本发明所述的 FAM19A4 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 FAM19A4 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) 等。本发明的 FAM19A4 的基因或蛋白或它们的免疫性片段可以作为自身免疫病的标志和治疗靶点。因此,可以通过检测本发明的 FAM19A4 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 FAM19A4 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 FAM19A4 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。

[0041] 在本发明的具体实施例中,本发明发现 FAM19A4 在 LPS 刺激的小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 和经 PMA 诱导分化的人前体单核细胞系 THP-1 中表达上调,提示其可能对巨噬细胞具有调节功能。FAM19A4 蛋白对 TNF- α 活化后的 RAW264.7 细胞具有趋化活性;体内外实验证明 FAM19A4 能够促进 RAW264.7 细胞和小鼠腹腔巨噬细胞对 zymosan 的吞噬功能,下调炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达。重组 FAM19A4 蛋白能够下调结肠癌细胞系 HT-29 表面补体调节蛋白 CD46、CD55 和 CD59 在 mRNA 水平的表达,下调 CD46 蛋白水平的表达;对前列腺癌细胞系 DU145 表面的 CD55 和 CD59 的表达在 mRNA 水平起抑制作用,下调 CD46、CD55 和 CD59 的蛋白水平表达。GEO 数据库提示 FAM19A4 在衣原体肺炎感染患者单核细胞来源的 DC 中表达上调,实验结果证明其在脂多糖 LPS 及 zymosan 刺激的 DC 中表达明显上调,提示 FAM19A4 可能对 Th1 和 Th17 细胞的分化具有调节作用。在 mBSA 诱导的小鼠 DTH 模型中, FAM19A4 可加重发病小鼠的足垫肿胀程度,并提高小鼠血清中 IL-17 的表达水平,小鼠淋巴结细胞培养上清中 IFN- γ 和 IL-17 分泌明显增加,证明其能够促进 Th1 和 Th17 细胞的分化、活化。

[0042] 综上所述,本发明提供了一种新的细胞因子:FAM19A4,其在抗感染、抗病毒、抗胞内细菌、抗真菌、抗胞外细菌和抗肿瘤等方面可能发挥重要作用,具有潜在的临床应用价值。

附图说明

[0043] 图 1 显示 FAM19A4 基因的生物信息学分析的部分结果。其中,图片 A, FAM19A4 的核酸序列及预测的氨基酸序列;图片 B, SignalP 预测 FAM19A4 的 N 端存在一个典型的信号肽区域;图片 C、D, FAM19A4 各种属间同源性较高,其中人 FAM19A4 与小鼠 Fam19a4 在蛋白质水平的同源性高达 93.3%。

[0044] 图 2A 显示 FAM19A4 在人正常组织中未检出表达。

[0045] 图 2B 显示 FAM19A4 在多种人肿瘤细胞系中广泛低表达或表达缺失。

[0046] 图 2C 显示 FAM19A4 的表达与炎症反应相关。其中,图片 A, GEO 数据库显示 FAM19A4 在衣原体肺炎感染患者单核细胞来源的 DC 中表达上调;图片 B, FAM19A4 在 LPS 和 zymosan 刺激的成熟 DC 中表达上调;图片 C, FAM19A4 在 LPS 刺激的经 PMA 诱导分化的 THP-1 中表达上调;Fam19a4 在 LPS 刺激后的 RAW264.7 中表达上调。

[0047] 图 3A 显示 FAM19A4 是通过经典途径分泌的分泌蛋白,其分泌可被 BFA 抑制。

[0048] 图 3B 显示已获得 FAM19A4 真核重组蛋白。其中,图片 A,经鉴定,得到高纯度

FAM19A4 真核重组蛋白 ; 图片 B, N 端测序结果显示 FAM19A4 成熟蛋白全长为 95 个氨基酸。

[0049] 图 3C 显示兔抗人 FAM19A4 多克隆抗体可特异性识别外源性表达的 FAM19A4 蛋白。

[0050] 图 4 显示 FAM19A4 对 TNF- α 刺激的 RAW264.7 细胞具有趋化作用, 其趋化活性具有剂量依赖性。

[0051] 图 5 显示 FAM19A4 可增强巨噬细胞的吞噬能力, 促进 ROS 的发生。其中, 图片 A/C, FAM19A4 可显著提高 RAW264.7 细胞的平均吞噬颗粒数, 增加吞噬细胞的比例, 整体上增强巨噬细胞的吞噬能力。图片 B, FAM19A4 可增强小鼠腹腔巨噬细胞的体外吞噬能力。图片 D, FAM19A4 可增强小鼠腹腔巨噬细胞的体内吞噬能力。图片 E, FAM19A4 在 zymosan 刺激的基础上促进 RAW264.7 细胞 ROS 的发生。

[0052] 图 6 显示 FAM19A4 可下调巨噬细胞炎症因子的表达, 抑制 NF- κ B 转录活性。其中, 图片 A, 在 RAW264.7 细胞中 FAM19A4 可减弱由 zymosan 引起的 Tnf- α 表达上调, 而对 IL-6 的影响不显著。图片 C, 在小鼠腹腔巨噬细胞中 FAM19A4 对 zymosan 刺激后的 Tnf- α 和 IL-6 表达均有下调作用。图片 B, 在 RAW264.7 细胞中 FAM19A4 可减弱 NF- κ B 的转录活性。

[0053] 图 7 显示 FAM19A4 在 DTH 模型中与 Th1 和 Th17 细胞的分化及活化有关。其中, 图片 A, FAM19A4 加重小鼠足垫肿胀程度 ; 图片 B, FAM19A4 提高小鼠血清中 IL-17 的表达水平 ; 图片 C, FAM19A4 在无 mBSA 刺激下提高小鼠淋巴细胞培养上清中 IFN- γ 的分泌, 有无 mBSA 的刺激均可提高小鼠淋巴细胞培养上清中 IL-17 的分泌。

[0054] 图 8A 显示 HT-29 细胞中, FAM19A4 可下调 CD55 和 CD59 的 mRNA 水平, 加热可使部分失活 ; 显著抑制 CD55 的蛋白水平表达。

[0055] 图 8B 显示 DU145 细胞中, FAM19A4 下调 CD55 和 CD59 的 mRNA 水平, 抑制 CD46、CD55 及 CD59 的蛋白水平表达。

具体实施方式

[0056] 为了更清楚地理解本发明, 现参照下列实施例及附图进一步描述本发明。实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。实施例中, 一些主要的实验材料及操作如下所述, 其他未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件, 例如 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, 或按照制造商所建议的条件。

[0057] 1、RNA 提取、RT-PCR、cDNA 文库的和 Real-time PCR

[0058] 收集 9 种细胞系, 使用 TRIzol (Invitrogen) 提取总 RNA (按说明书操作)。收集未刺激及炎症因子 IL-1 β (10ng/ml) 刺激 3h、6h、15h、24h 的 A549 细胞 ; 经 PMA (10ng/ml) 诱导分化 24h 后未刺激及炎症因子 LPS (100ng/ml) 刺激 3h、6h、12h 的 THP-1 细胞 ; 未刺激及炎症因子 LPS (100ng/ml) 刺激 2h、4h、6h 的 RAW264.7 细胞 ; 未刺激及炎症因子 LPS (100ng/ml) 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞 ; 未刺激及 PI 刺激的小鼠 Th17 细胞 ; 分别收集 10 例正常供者的外周血单个核细胞, 经分选得到的单核细胞、经诱导得到的未成熟 DC 及 polyI :C、zymosan、LPS 等刺激的成熟 DC 细胞 ; 收集未刺激及 FAM19A4 真核重组蛋白 (10ng/ml) 刺激 24h 的 DU145 细胞和 HT-29 细胞 ; 正常 Balb/c 小鼠及肺部注射肺炎克雷伯菌 3h、6h、24h 的小鼠肺组织, 使用 TRIzol 提取总 RNA。每个样品取 2 μ g, 用 Reverse transcript™

kit(Invitrogen) 逆转录合成单链 cDNA 文库。Real-time PCR 采用 SYBR Green 方法和 LightCycler 仪器进行。

[0059] 2、细胞培养和转染

[0060] HEK293T 细胞为传代培养,用含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM(4.5g/L glucose, 4mM-glutamine,100U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素)培养。A549 细胞购于 ATCC,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养,THP-1 细胞购于 ATCC,用含有 10% FBS 和 0.9% 2M 葡萄糖的 RPMI1640 培养基培养,RAW264.7、DU145 和 HT-29 细胞购于 ATCC,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养。

[0061] HEK 293T 细胞转染方法为阳离子转染法,具体操作步骤如下:(1) 细胞培养:将 HEK 293T 细胞 (3.0×10^5 个)用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基铺在六孔细胞培养板上,在 5% CO₂、37℃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% CO₂,37℃的培养箱中培养。(4) 转染 6 小时后,弃去培养基,加入新鲜的含 10% FBS 的 DMEM 培养基或 293T 无血清培养基(但含有低蛋白的培养细胞因子)继续培养 48 小时。

[0062] 3、细胞培养上清及细胞总蛋白提取和 Western blot 分析

[0063] 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℃,2000g 离心 10 分钟,弃沉淀,再于 4℃,15000g 离心 15 分钟,然后于 37℃真空干燥浓缩 1 小时,留取处理后的细胞培养上清。

[0064] 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℃,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,1mM EDTA,1mM EGTA,1% Triton X-100,蛋白酶抑制剂 phosSTOP(Roche)),冰上放置 30 分钟,4℃,15000g 离心 15 分钟,上清转入新管,存于 -80℃备用。

[0065] 蛋白定量:细胞提取的蛋白按照 BCATM Protein Assay Kit(Pierce,23227)说明书提供的方法进行蛋白定量。

[0066] 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℃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,加入相应的一抗,4℃过夜,用 TBST 充分洗膜 3 次,每次 10 分钟;然后加入相应的 IRDyeTM 700/800 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 检测信号。

[0067] 4、小鼠腹腔巨噬细胞的分离

[0068] 选取 6-8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠,每只小鼠腹腔注射 3%的硫代乙醇酸钠溶液(PBS 作溶剂)2ml,48 小时断颈处死小鼠,腹腔注射 5ml 预冷的 PBS 轻揉腹壁 1 分钟,打开腹膜回收腹腔内的 PBS 入无菌离心管,4℃下 2000rpm 离心 5 分钟,得到小鼠腹腔巨噬细胞,使用含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基,5% CO₂、37℃的培养箱中培养,初始细胞密度为 1×10^6 /ml。培养 4 小时后换新培养基,培养过夜后在培养上清中加入炎症因子 LPS 或

FAM19A4 真核重组蛋白等刺激。整个过程均在无菌密闭条件下完成。

[0069] 5、ELISA

[0070] 细胞培养相应时间后收获上清,于 4℃,2000g 离心 10 分钟,弃沉淀,再于 4℃,15000g 离心 15 分钟,去除上清中细胞和碎片。使用小鼠 TNF- α 、IL-6 细胞因子 ELISA 试剂盒 (eBIOSCIENCE) 夹心法检测细胞因子的分泌量。

[0071] 6、双荧光素酶报告基因系统

[0072] 6.1 细胞转染、收获和裂解

[0073] 用 pRL-TK (海肾荧光素酶载体,作为荧光内对照)、NF- κ B-luc (萤火虫荧光素酶载体) 共转染 RAW264.7 细胞。转染 12 小时后换新鲜培养基,加入 FAM19A4 蛋白或 LPS 作为阳性对照预处理细胞 2 小时后加入 zymosan (100ug/ml) 孵育 24 小时,PBS 充分洗涤细胞,加入 Reporter Lysis Buffer (Promega, E4030),在 -70℃ 下放置 30 分钟,取出后在室温自然融化,使细胞裂解。

[0074] 6.2 荧光素酶活性检测

[0075] 将 20 μ l 细胞裂解液移入荧光板 (Gronier,655075),用 Dual-Luciferase Reporter Assay System 10-Pack (Promega,E1960),通过 Veritas 微板荧光分析仪检测荧光素酶活性。先加入萤火虫 (Firefly) 荧光素酶底物 25 μ l/孔,检测萤火虫荧光素酶活性,再加入终止液和海肾 (Renilla) 荧光素酶底物 25 μ l/孔,检测内对照海肾荧光素酶活性。

[0076] 6.3 数据统计分析

[0077] 使用 Excel 软件进行数据处理。首先,将每个孔的测得数值经“萤火虫荧光素酶荧光强度 / 海肾荧光素酶荧光强度”计算,所得数值代表该孔的 NF- κ B 活性。第二步,将阴性对照组的 NF- κ B 活性定为 1 (100%),计算其它各组的相对 NF- κ B 活性。第三步,每组的三个复孔取平均值与标准差,代表该组的 NF- κ B 活性。

[0078] 7、小鼠迟发型超敏反应 (delayed type hypersensitivity, DTH) 模型建立

[0079] 选取 8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠,第 0 天给每只小鼠腹部皮内两点注射 125 μ g (50 μ l) CFA 充分乳化的 mBSA,每日腹腔注射 100ng FAM19A4 蛋白。第七天每只小鼠左足垫皮下注射 150 μ g mBSA/PBS 溶液 (30 μ l) 进行激发,右足垫皮下注射等体积的 PBS 做为阴性对照。激发前和激发 24 小时后均使用游标卡尺测量小鼠足垫厚度。衡量 DTH 反应强度的足垫厚度变化计算公式是:足垫肿胀程度 (mm) = (mBSA 激发的足垫厚度 - 激发前足垫厚度) - (PBS 注射的足垫厚度 - 激发前足垫厚度)。然后摘眼球取血,4℃ 过夜,然后 3000rpm 离心,取血清至新 Ep 管,12000rpm 离心 10min 去除碎片,所得血清即可用于 IFN- γ 和 IL-17 的 ELISA 检测。取脾研磨获得脾细胞,重悬成 5×10^6 /ml 培养于 24 孔板,在 10 μ g/ml mBSA 及重组蛋白,分析抗原特异性 T 淋巴细胞的增殖,检测培养上清中 IFN- γ 、IL-17 等细胞因子的分泌。

[0080] 8、流式细胞仪检测细胞表面分子

[0081] 收获细胞并制备成单细胞悬液,预冷的 PBS 洗 2 次后,4% FBS 封闭 15 分钟,加入抗 CD46-FITC、抗 CD55-PE 或抗 CD59-FITC 抗体 (BD) 4℃ 避光孵育 30 分钟,PBS 复洗细胞 1 次后加入 100 μ l PBS 重悬细胞,上流式细胞仪检测 FL-1 及 FL-2 通道。

[0082] 9、统计学分析

[0083] 以上数据的标准差代表一次实验中不同复孔间的差异,以上实验均至少重复两次

以上,以其中一次的数据作为代表;Student's T 检验分析各组之间是否存在显著性差异, $p < 0.05$ 认为具有统计学差异。

[0084] 实施例一、FAM19A4 基因的 cDNA 克隆及生物信息学分析

[0085] 1、生物信息学分析

[0086] 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。

[0087] 通过生物信息学分析,发现 UniGene:Hs.187873,其对应基因为 FAM19A4,属于 FAM19/TAF9 家族。该家族基因已被报道与中枢神经系统相关,FAM19A4 在丘脑中高表达,但生物学功能尚无报道,为一未知功能人类新基因。

[0088] FAM19A4 隶属于 TAF9 家族,该家族成员 FAM19A1-5 相互同源性较高,氨基酸序列中均包含丰富的半胱氨酸;家族成员在正常细胞及组织中广泛低表达,只表达于大脑的特定区域。生物信息学发现,FAM19A4 基因定位于 3p14.1,Ref:NC 000003.11, GeneID:151647,序列全长 2248bp(参见 SEQ ID No.1),ORF 全长 423bp,编码 140 个氨基酸(参见 SEQ ID No.2),分子量约 15.7kD,等电点 9.02。图 1 中图片 A 显示了 FAM19A4 的核酸序列和预测的蛋白质序列。SignalP 预测其 N 端存在一个典型的信号肽,为 N 端的 36 个氨基酸(图 1 中 B)。FAM19A4 氨基酸序列中有 10 个半胱氨酸,同时具有 CC 和 CXC 基序,预测为趋化因子样蛋白,但与经典趋化因子结构不同。

[0089] FAM19A4 进化保守,各种属间同源性较高,其中人 FAM19A4 与小鼠 Fam19a4 在蛋白质水平的同源性高达 93.3%(图 1 中 C、D),提示其具有重要功能。电子表达谱提示人 FAM19A4 在各正常及癌症组织器官中呈广泛低表达,小鼠 Fam19a4 仅在背脊神经节中高表达。综上提示,FAM19A4 及小鼠同源基因在正常生理状态下功能并不活跃。

[0090] 2、FAM19A4 基因的 cDNA 的克隆

[0091] 利用 Human_est 数据库通过 BLASTn 方法对 FAM19A4 基因进行序列校正无误。根据该序列设计 FAM19A4 基因全长阅读框架的特异引物:

[0092] 正向引物 5' -gcggccgcccaccatgaggtccccaaggatgagagtct-3' (SEQ ID No.3)

[0093] 反向引物 5' -ggtaccgccccgcgttaccttcgtagttttgact-3' (SEQ ID No.4)

[0094] 上述引物中,下划线分别为限制性内切酶 Not I 和 KpnI 识别序列

[0095] 用上述引物,以 MGC(Mammalian Gene Collection) 克隆编号 BC031566 对应的重组质粒为模板扩增 FAM19A4 的编码区,扩增反应条件如下:

[0096] 反应体积 50 μ l,其中含有:

[0097]	重组质粒模板	1 μ l (10ng)
	引物	正向引物、反向引物终浓度各 0.2 μ M
	dNTP	终浓度各 200 μ M
	Taq DNA 聚合酶	2.5U
	10 \times Taq DNA 聚合酶缓冲液	5 μ l
	用双蒸水补足至 50 μ l 体积	

[0098] 反应温度、时间:94 $^{\circ}$ C,变性 5 分钟;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,60 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟,扩增 30 个循环;最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 分钟。

[0099] 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 $^{\circ}$ C 下连接过夜,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,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 3700 DNA 分析仪 (Perkin-Elmer/Applied Biosystem) 测序,测序正确,获得连接有 FAM19A4 的 cDNA 的 pGEM-T EASY 载体,即 pGEM-T-FAM19A4 重组质粒。

[0100] 实施例二、FAM19A4 表达谱分析

[0101] 使用购买的 clontech 人正常组织 cDNA 文库以及按照前述制备的人 cDNA 文库,分析 FAM19A4 在正常组织和白血病细胞系中的 mRNA 表达水平。具体操作如下:

[0102] 用实施例一之 2 中记载的 PCR 扩增条件对 FAM19A4 进行扩增。对于上述 1 中制备的小鼠 cDNA 文库,使用 5' 引物 (5' -TTCACGGTCACTCTCCAGGAC-3', SEQ ID No. 5) 与 3' 引物 (5' -AGCCACGTAAATGCCACCTTC-3', SEQ ID No. 6) 扩增小鼠同源基因 Fam19a4,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C (5 分钟) \rightarrow 94 $^{\circ}$ C (40 秒),54 $^{\circ}$ C (40 秒),72 $^{\circ}$ C (40 秒),扩增 30 个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C (7 分钟)。

[0103] 使用 5' 引物 (5' -TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3', SEQ ID No. 7) 与 3' 引物 (5' -CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC-3', SEQ ID No. 8) 扩增 GAPDH 作为内参,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C (5 分钟) \rightarrow 94 $^{\circ}$ C (40 秒),58 $^{\circ}$ C (40 秒),72 $^{\circ}$ C (40 秒),扩增 22 个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C (7 分钟)。

[0104] 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。

[0105] 实验结果请参见图 2A、图 2B 和图 2C。结果显示:

[0106] 使用购买的 clontech 人正常组织 cDNA 文库扩增 FAM19A4,在多种人正常组织中未检测到其表达 (图 2A)。

[0107] FAM19A4 在 9 种肿瘤细胞系中均表达缺失,仅在慢性粒细胞白血病癌细胞 K562 细胞中呈较高水平的表达 (图 2B)。

[0108] GEO 数据库显示 FAM19A4 在衣原体肺炎感染患者单核细胞来源的 DC 中表达上调 (图 2C 中图片 A)。本发明的研究发现,在检测的三个不同健康个体中,FAM19A4 在 PBMC 及单核细胞中均未检测到其表达,在两个个体的未成熟 DC 中微弱表达,在 LPS 和 zymosan 刺激得到的成熟 DC 中表达上调 (图 2C 中图片 B)。同时,在 PMA 诱导分化的 THP-1 细胞系中,FAM19A4 在 LPS 刺激下表达上调;小鼠同源基因 Fam19a4 在 LPS 刺激后的小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 中表达呈微弱上调 (图 2C 中图片 C)。综上提示,FAM19A4 的表达与炎症反应有密切联系。

[0109] 实施例三、FAM19A4 真核表达质粒的构建以及真核蛋白的纯化

[0110] 1、FAM19A4 真核表达质粒的构建

[0111] 为了进行 FAM19A4 的功能研究,本实施例使用 Not I 和 Kpn I 对 pGEM-T-FAM19A4 重组质粒酶切处理,回收并将目的基因片断 (FAM19A4 的编码区) 进一步连接到经过 Not I 和 Kpn I 处理的真核表达载体 pcDNA3.1-myc/his(-)B(Invitrogen, V85520),从而获得 pcDB-FAM19A4-myc-his(与 c-myc 和 his 标签融合)重组真核表达质粒。

[0112] 2、重组 FAM19A4 蛋白的表达与纯化

[0113] 将 293T 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基铺在 10cm 培养皿中,在 5% CO₂、37°C 的培养箱中培养 24 小时。使用 Vigofect 阳离子转染法转染目的基因 pcDB-FAM19A4-myc-his 真核表达质粒。转染 24 小时后用常温的 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% CO₂, 37°C 的培养箱中培养。48 小时后收集细胞培养上清于无菌的新离心管中,于 4°C, 2000g 离心 10 分钟,留取处理后的细胞培养上清。

[0114] 用 Ni²⁺ 柱料纯化上述处理后的细胞培养上清: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,再用 20 倍体积平衡缓冲液冲洗柱料,以洗去未结合的杂蛋白,用 1 倍体积洗脱液与柱料孵育 15 分钟后洗脱结合蛋白,收集洗脱液于透析袋中,用预冷的 PBS (PH7.4) 4°C 透析两次,每次 3 小时,然后吸出蛋白,并取部分第二次透析结束的 PBS 作为功能实验的阴性对照,分别于 4°C、18000g 离心 20 分钟除菌,取上清分装保存于 -80°C 待用,整个过程均在无菌密闭条件下完成。

[0115] 取 5 μl 蛋白用 BCA 方法对其进行蛋白定量,用 SDS-PAGE 和鲎实验检测蛋白质纯度和 LPS 的残留情况,通常保证蛋白质的纯度在 95% 以上, LPS 的残留量低于 1EU/mg。

[0116] 生物信息学提示 FAM19A4 为分泌蛋白,本实施例还通过 BFA 阻断实验验证了这一点。BFA 阻断实验具体操作:首先用质粒 pcDB-FAM19A4-myc-his 或空载体对照转染 293T 细胞,转染 24 小时后,分别在细胞培养上清中加入 10 μg/ml Brefeldin A (BFA) 或 DMSO (用作阴性对照),处理细胞 24 小时后,收集各实验组细胞及细胞培养上清用于 Western blot 分析。

[0117] 结果如图 3A 所示,在超表达 FAM19A4 的 293T 细胞的培养上清中,可检测到 FAM19A4,其蛋白分子量约为 18kDa。加入经典分泌途径(内质网高尔基体途径)的抑制剂 BFA 后, FAM19A4 分泌明显减少,证明 FAM19A4 为通过经典途径分泌的分泌蛋白。

[0118] 为了进行 FAM19A4 的功能研究,本实施例中将 FAM19A4 的编码区片段克隆到 pcDNA3.1-myc/his(-)B 真核表达载体中,并在终止子前插入 myc 和 his 标签序列,成功构建了 pcDB-FAM19A4-myc-his 真核表达质粒,即 FAM19A4 蛋白 C 端带有 myc 和 his 标签,并将此真核表达质粒转染 293T 细胞,用 Ni²⁺ 柱料纯化细胞培养上清获得 FAM19A4 重组蛋白。经鉴定, FAM19A4 的蛋白表达量高达 2.62mg/L,对 FAM19A4 蛋白进行纯化后,其纯度在 95% 以上, LPS << 0.11EU/mg,达到进行功能实验的要求(图 3B 中图片 A)。

[0119] 此外,本实施例将 FAM19A4 真核蛋白转 PVDF 膜,进行 N 端测序(上海基康生物技术有限公司),结果如图 3B 中图片 B 所示,所测氨基酸数目及序列(从 N 端到 C 端)共 5 个 (HQIKQ),该位点起始于预测 FAM19A4 氨基酸序列的第 46 位,提示 FAM19A4 成熟蛋白全长为 95 个氨基酸,信号肽区域为 N 端的 45 个氨基酸,而不是 SignalP 预测的 N 端 36 个氨基酸。

[0120] 实施例四、FAM19A4 抗体的制备、纯化及鉴定

[0121] 1、FAM19A4 多克隆抗体的制备

[0122] 用纯化的 FAM19A4-myc-his 真核重组蛋白免疫动物。选用成年雄性新西兰兔,初次免疫将 300ug 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 $1 : 10^5$ 以上后,将家兔处死心脏取血,获取血清。

[0123] 2、FAM19A4 多克隆抗体的纯化与鉴定

[0124] 血清采用 Protein G 柱进行多克隆抗体纯化:先将血清经过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤器过滤后,与柱料在 4°C 孵育过夜。血清与柱料结合后,用20倍体积 PBS 冲洗柱料,以洗去未结合的杂蛋白。再用1倍体积 0.1M 甘氨酸缓冲液洗脱 ($\text{pH}2.4$) 与柱料孵育15分钟后洗脱。收集洗脱液于透析袋中,用预冷的 PBS ($\text{pH}7.4$) 4°C 透析两次,每次3小时,然后吸出蛋白,于 4°C 、 12000rpm 离心20分钟除菌,取上清,获得纯化抗体,分装保存于 -80°C 待用。在 293T 细胞中超表达 FAM19A4,通过 Western blot、FACS、ELISA 等方法鉴定抗体的亲和力及特异性。

[0125] 结果参见图 3C,表明此兔抗人 FAM19A4 多克隆抗体可特异性识别外源性表达的 FAM19A4 蛋白。

[0126] 实施例五、FAM19A4 趋化活性实验

[0127] 生物信息学提示 FAM19A4 氨基酸序列中富含半胱氨酸,含有 CC、CXC 等基序,为趋化因子样蛋白,因此,本实施例对 FAM19A4 的趋化活性进行检测。

[0128] 趋化实验具体操作:将 RAW264.7 细胞数调整为 $5 \times 10^5/\text{ml}$,加入 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激,浓度为 $20\text{ng}/\text{ml}$ 。在趋化小室的下孔加入 FAM19A4 真核蛋白,浓度为 $10\text{ng}/\text{ml}$,3个复孔,每孔 $27 \mu\text{l}$;阳性对照孔分别加同样浓度的 CCL5, $27 \mu\text{l}$ /孔,3个复孔;阴性对照孔加 PBS, $27 \mu\text{l}$ /孔,3个复孔。覆盖鼠尾胶原包被过夜的 PVP free 聚炭膜 ($8 \mu\text{m}$) 及硅胶垫,加上层孔,孔内加细胞悬液 $55 \mu\text{l}$ /孔。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 孵育 6h 后取出膜,刮去非特异粘附的细胞,甲醇固定,姬姆萨染色,显微镜下观察,计数趋化过孔的细胞,计算趋化指数(趋化指数 = 实验组趋化的细胞数的均数 \div 对照组趋化的细胞数的均数)。

[0129] 实验结果发现, FAM19A4 对静息的单核细胞/巨噬细胞无明显趋化活性(图4中A)。

[0130] 根据 FAM19A4 在表达谱方面的结果提示,推测 FAM19A4 发挥作用可能与炎症状态下的细胞表面相关受体的表达、活化有关,于是本实施例进一步利用 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激的 RAW264.7 细胞检测 FAM19A4 的趋化活性,同时使用 CCL5/RANTES 作为阳性对照,结果显示 FAM19A4 对 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激的 RAW264.7 细胞具有趋化作用,其趋化活性具有剂量依赖性(图4)。

[0131] 实施例六、FAM19A4 可增强巨噬细胞的吞噬能力,促进 ROS 的发生

[0132] 1、吞噬功能检测

[0133] 将巨噬细胞(RAW264.7 细胞或小鼠腹腔巨噬细胞)用含有 $10\% \text{FBS}$ 的 RPMI1640 培养基铺在 24 孔培养板上,培养孔中事先放置盖玻片, $1.5 \times 10^4/\text{ml}$, $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C 的培养箱中培养 30 分钟待细胞贴壁,加入 LPS 或重组真核蛋白 FAM19A4 刺激 2 小时后加入酵母多糖颗粒 zymosan 或 FITC-zymosan,30 分钟后收获细胞。如加入未标记的 zymosan,则进行瑞氏染色镜下观察并计数,分别计算吞噬细胞百分数 (percentage of phagocytic cells, PP), 平均吞噬颗粒数 (mean number of particles per cell, MNP) 以及吞噬指数 (phagocytic

index, $PI = PP \times MNP$)。如加入 FITC 标记的 zymosan, 则利用流式细胞仪进行检测, 计算 RRI ($RRI = \text{吞噬细胞百分数} \times \text{实验组吞噬平均荧光强度 MFI} / \text{对照组吞噬平均荧光强度 MFI}$) 数据做以评测。该系统以 IFN- γ 作为阳性对照。

[0134] 结果请参见图 5。结果显示, 暴露于 FAM19A4 的 RAW264.7 细胞及小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能增强 (图 5 中 A、C)。FAM19A4 可显著提高吞噬细胞的平均吞噬颗粒数, 增加吞噬细胞的比例, 整体上增强巨噬细胞的吞噬能力。

[0135] 基于以上 RAW264.7 细胞系结果的提示, 本实施例还利用硫代乙醇酸钠诱导获得小鼠腹腔巨噬细胞体外贴壁 4 小时后作如上处理, 结果表明 FAM19A4 同样可以增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 与细胞系中的结果一致 (图 5 中 B)。

[0136] 根据细胞系及原代巨噬细胞在体外实验的结果, 本实施例对 6-8 周 C57BL/6J 小鼠腹腔注射不同剂量的 FAM19A4 蛋白 (100ng/ 只, 1 μ g/ 只), 系统使用 IFN- γ (200ng/ 只) 作为阳性对照。2 小时后注射 5×10^6 FITC-zymosan, 吞噬 30 分钟后断颈处死小鼠, 分离腹腔细胞, 标记小鼠巨噬细胞特异标记物 F4/80 后进行流式细胞分析, 计算巨噬细胞的吞噬比例 FITC⁺/F4/80⁺, 结果参见图 5 中 D, FAM19A4 可增强小鼠腹腔细胞中的巨噬细胞对 zymosan 的吞噬作用。

[0137] 2、ROS 反应检测

[0138] ROS 反应检测使用购于碧云天的活性氧检测试剂盒, 按照其产品说明在贴壁的 RAW264.7 细胞中预装载还原型 DCFH-DA 探针 10 μ M (处理 RAW264.7 细胞如吞噬功能检测部分相同, 在加入 FAM19A4 蛋白刺激之前预先装载 DCFH-DA 探针), 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。无血清培养基洗涤细胞三次以充分去除未进入胞内的探针, 换全培养基加入或不加入 FAM19A4 蛋白刺激 2 小时后加入 zymosan, 30 分钟收获细胞进行流式细胞仪检测其发光强度。

[0139] 结果表明 FAM19A4 可以加强由 zymosan 引起的 RAW264.7 细胞中 ROS 反应的发生, 而该蛋白本身并未表现出如上效果 (如图 5 中 E)。

[0140] 本实施例的结果, 可以推测巨噬细胞为 FAM19A4 的功能靶细胞之一, FAM19A4 在感染初期尤其是真菌感染中发挥重要作用。

[0141] 实施例七、FAM19A4 可下调巨噬细胞炎症因子的表达, 抑制 NF- κ B 转录活性

[0142] 本实施例收获经 FAM19A4 及 zymosan 共处理 24 小时的细胞培养上清, 检测上清中 Tnf- α 和 IL-6 的分泌情况, 结果发现 FAM19A4 单独刺激巨噬细胞对其炎症因子的分泌没有影响, 但在与 zymosan 共同存在时可减弱由 zymosan 引起的炎症因子的表达上调, 表现为可使 RAW264.7 细胞中 Tnf- α 分泌减少, 而 IL-6 变化不明显 (图 6 中 A); 对小鼠腹腔巨噬细胞分泌的 Tnf- α 和 IL-6 均有下调作用 (图 6 中 C)。

[0143] 根据如上结果, FAM19A4 既然可以减弱由 zymosan 引起的炎症因子的表达, 推测该蛋白是否通过影响了其上游转录因子的活性而达到的这一效应。本实施例使用 NF- κ B 双荧光素酶报告基因系统作为其检测的指标, 在实验体系中加入 FAM19A4 蛋白与 zymosan 协同刺激, 同时设置单独加入目的蛋白或 zymosan 作为对照。结果如图 6 中 B 所示, FAM19A4 单独作用于 RAW264.7 细胞并不能对 NF- κ B 的转录活性产生影响, 蛋白与 zymosan 协同刺激较之 zymosan 的独立作用有明显的减弱效应。

[0144] 实施例八、FAM19A4 与 Th 细胞分化及活化

[0145] Th1 和 Th17 细胞活化后, 参与 DTH 的发生和发展; 在 mBSA 诱导的小鼠 DTH 模型中,

Th1 细胞抑制 DTH 的进程,而 Th17 细胞发挥促进作用。本实施例利用 mBSA 诱导小鼠 DTH 模型,在致敏后第 0-6 天每日腹腔注射 FAM19A4 真核蛋白,第 6 天处死小鼠,测量小鼠足垫肿胀厚度,检测血清中细胞因子分泌情况,并取其淋巴结检测各指标。结果发现 FAM19A4 能够加重小鼠足垫肿胀程度(图 7 中 A)。此外,检测小鼠血清中细胞因子发现注射 FAM19A4 蛋白组小鼠血清中 IL-17 水平与对照组相比明显增加(图 7 中 B);同时,分离小鼠淋巴结细胞体外与 mBSA 共孵育,检测抗原特异性 T 淋巴细胞反应情况,结果发现注射 FAM19A4 蛋白组小鼠淋巴细胞培养上清中 IL-17 分泌明显增加,同时发现分离出的淋巴结细胞在没有 mBSA 刺激下,其分泌的 IFN- γ 和 IL-17 也有所增加(图 7 中 C)。

[0146] 实施例九、FAM19A4 对肿瘤细胞表面补体调节蛋白表达的影响

[0147] 补体系统的一个重要的生理功能是溶解外来的细胞,当然也包括肿瘤细胞,这个溶解的激活过程,主要经过以下两种途径:一是由抗原抗体复合物激发的经典途径;二是由外来的细胞,包括肿瘤细胞激发的旁路途径。每一种途径都要形成双分子复合物和 C3 转化酶,最终 C5b, C6, C7, C8, C9 结合成补体攻击复合物附着于要攻击的外来细胞和肿瘤细胞表面,导致细胞的溶解。传统上认为体内存在着多种可溶性及膜结合性的补体调节蛋白(complement regulatory protein, CRP),它们以特定的方式与不同的补体成分相互作用,使补体的激活和抑制处于精细的平衡状态,从而防止对自身组织造成损害,又能有效的杀灭外来的微生物。目前在肿瘤免疫中研究得较多的是膜结合 CRP 中的 CD46, CD55, CD59。为了进一步分析 FAM19A4 与肿瘤的发生发展的关系,本实施例选取了不同的细胞系,利用 RT-PCR 和 FACS 的方法检测 FAM19A4 蛋白对补体调节蛋白表达的影响。

[0148] 在人结肠癌细胞系 HT-29 中, FAM19A4 可下调 CD55 和 CD59 的 mRNA 水平,加热可使部分失活;显著抑制 CD55 的蛋白表达,对 CD59 蛋白水平的表达影响不显著(图 8A)。

[0149] 在人前列腺癌细胞系 DU145 中, FAM19A4 可下调 CD55 和 CD59 的 mRNA 水平,抑制 CD46、CD55 及 CD59 的蛋白表达,对 CD46 的 mRNA 水平并无显著作用(图 8B)。由于 IFN- γ 可显著抑制 DU145 细胞表面 CD59 的表达,所以本实施例使用 IFN- γ 刺激作为系统的阳性对照。

[0001]

序列表

<110> 北京大学

<120> 具有抗感染、抗肿瘤活性的细胞因子FAM19A4 及其应用

<130> GAI12CN1171C

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2248

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (444)..(866)

<400> 1

tgggctcgge tccgactgc tagctgcgeg cegccctgga eggggcgcaec gaactgcgeg	60
cgcggtcgcg ggcaaacatc gggagtctctg cctcagctgc cgtttctcca gcagcagett	120
cagcttcttc ccgcaggagc ttccggcttc tccctgtaga gacgtgggaa cttttctctc	180
cctggcgcagg ctgcagaggt gatgggcgcg tcccggggct cccgcgggga ggcggcacgg	240
tgagcgtcct cgggctccgg tgcggcgatc agtacctagt tccggacgcg ccggtccgac	300
ttggatgccg gctctagctg agtctcttga gctacgataa ttttttggaa cggcagaaat	360
gattggtttc agcaacagat gggaatttgg agtcactctg aaatatatcc tggaaataagt	420
gtgtttgact agaaccacat ctt atg agg tcc cca agg atg aga gtc tgt get	473
Met Arg Ser Pro Arg Met Arg Val Cys Ala	
1 5 10	
aag tca gtg ttg ctg tgc cac tgg ctc ttt cta gcc tac gtg tta atg	521
Lys Ser Val Leu Leu Ser His Trp Leu Phe Leu Ala Tyr Val Leu Met	
15 20 25	
gtg tgc tgt aag ctg atg tcc gcc tca agc cag cac ctc cgg gga cat	569
Val Cys Cys Lys Leu Met Ser Ala Ser Ser Gln His Leu Arg Gly His	
30 35 40	

[0002]

```

gea ggt cac cac caa atc aag eaa ggg acc tgt gag gtg gtc gcc gtg      617
Ala Gly His His Gln Ile Lys Gln Gly Thr Cys Glu Val Val Ala Val
      45              50              55

cac agg tgc tgc aat aag aac cgc ata gaa gag egg tca caa acg gtc      665
His Arg Cys Cys Asn Lys Asn Arg Ile Glu Glu Arg Ser Gln Thr Val
      60              65              70

aag tgc tet tgc ttc ccg gga cag gtg gcg ggc aca act egg gct caa      713
Lys Cys Ser Cys Phe Pro Gly Gln Val Ala Gly Thr Thr Arg Ala Gln
      75              80              85              90

cct tet tgt gtt gaa gct tcc att gtg att cag aaa tgg tgg tgt cac      761
Pro Ser Cys Val Glu Ala Ser Ile Val Ile Gln Lys Trp Trp Cys His
      95              100             105

atg aat ccg tgt ttg gaa gga gag gat tgt aaa gtg ctg cca gat tac      809
Met Asn Pro Cys Leu Glu Gly Glu Asp Cys Lys Val Leu Pro Asp Tyr
      110             115             120

tca ggt tgg tcc tgt agc agt ggc aat aaa gtc aaa act acg aag gta      857
Ser Gly Trp Ser Cys Ser Ser Gly Asn Lys Val Lys Thr Thr Lys Val
      125             130             135

acg egg tag cgaagagaga ggtgtgcttc aatcctggag ggcagcagg      906
Thr Arg
      140

aggcggagct cttttgcttg gattcccatc atggcccctc tgcagaaaat tgtctaggat      966

ttcagcaact tcatatttgt atatgtgagc tgtgagaggt ggcattcact taactggccc      1026

agccctctct gettctgtgat tttatttcat tgaattataa ccacaagcca ccaccattt      1086

gacatctctct ctggattccc aaggagcata cctccaaaat ccgagaagag caaateagag      1146

cttccaaaat ggaacaccac taagggeatg tcaattcttc accttcttct tctttttaca      1206

aaagaacttg gatgtatggt ccaaagggtc ctcaattctgt tectcttttg aacttttct      1266

tttgtccttg tattaaagtg gttttaaagg ggtctaaaaa gattttggca aaacatattt      1326

gcagatgtag attagctggt gaagaaaatt actgctagag atcaactgat taactggtaa      1386

agaacgttta tttlataacc ctgaagaatt agaaggacat agttggatta ttgtgtgtgc      1446

attgtatttt tacttctatt ttttttttgc ttccattttt ccagttagca gagataaaat      1506

gagagcgttt taacttcaat gtaccatttt actgagtget aaggaagcat atcaatteca      1566

```

[0003]

```

atattttata accaaagctc tatcagaaca tatttataaa acttgttga atttttacgg      1626
cttttgtgta gtcattgtagg taaatcattt aaaatataaa acaatctcaa tttagatcaa      1686
gggttatttc ttatgacaaa tttatgceaa ttatatgaaa agattttaac tccgagacag      1746
gagtctttca gtgctgaatt tttagactgt aaatgagttc ttettaactt agctgtttcc      1806
ctactctctg gaettctgtg ttagecatct tattcttita aaatctgagt cctgattggc      1866
ttaatgattt tgcagcagac atgtctccac atattctcaa atgctgtcat ggggaaacgt      1926
atgaaacaga tgaagaatga ctgaccaga ttttagatgt ataatgttgt taaagtacat      1986
actactgtaa aaatatggga tgaattttat atattaagaa atgccaaaaa catagtttct      2046
gcaccaagtt aattatccct gtctttcac atttataggg ggaaaaataaa tactttatag      2106
cctaacagtt atttgatgtt attcttgcag agggaatgga aaggaaatgga aagatttgit      2166
ggcgtaatit ttgaatattt gttatgatca tatgaataag taaaaaaatt catcctgctg      2226
atggcaaaaa aaaaaaaaaa aa                                             2248
    
```

```

<210> 2
<211> 140
<212> PRT
<213> Homo sapiens
    
```

<400> 2

```

Met Arg Ser Pro Arg Met Arg Val Cys Ala Lys Ser Val Leu Leu Ser
1           5           10           15
    
```

```

His Trp Leu Phe Leu Ala Tyr Val Leu Met Val Cys Cys Lys Leu Met
           20           25           30
    
```

```

Ser Ala Ser Ser Gln His Leu Arg Gly His Ala Gly His His Gln Ile
           35           40           45
    
```

```

Lys Gln Gly Thr Cys Glu Val Val Ala Val His Arg Cys Cys Asn Lys
           50           55           60
    
```

[0004]

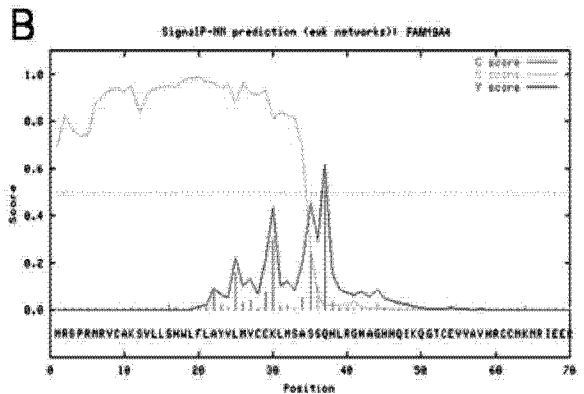
<220>		
<223>	引物	
<400>	5	
	tccaaggtea ctctccagga c	21
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	6	
	agccaagtaa atgccacctt c	21
<210>	7	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	7	
	tgaaggtcgg agtcaacgga tttggt	26
<210>	8	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	8	
	catgtgggcc atgaggtcca ccac	24

A

```

1      TGGGCTCGGCTCCGCACTGCTAGCTGCGGCGCCGCTGGACGGGGGCGCACCGACTGGCGG
61     CGCGGCTGCGGGCAACATCGGGAGTCCCTGCTCAGCTGCGGCTCTCCAGCAGCAGCTT
121    CAGGCTTCTCCCGCAGGAGCTTCGGGCTTCTCCTGGTAGAGAGCTGGGAACCTTTCTCT
181    CCGGGCGAGGCTCGCAGGTTGATGGGCGCTCCCGGGCTCCCGGGGAGGCGGCAAGG
241    TGAGCGTCTCCGGCTCCCGGTGGCGGATCAGTACCTAGTTCGCGAGCGCGGCTCCGAC
301    TTGGATGCGCGCTAGTCCGAGTCTCTGAGCTACGATAATTTTTTGGAAACGGCAGAAAT
361    GATTGGTCTAGCAACAGATGGGAATTTGGAGTCACTCTGAATATATCTTGGATTAAGT
421    GTGTTGACTAGAACCACATCTTATGAGGTCGCCAAGGARGAGAGTCTGTGCTAGTCCAG
          I M R S P R M R V C A K S 12
481    TGTGTGCTGTCGCACCTGGCTCTTCTAGCTACGTTGTAATGGTGTGCTGTAAGCTGATGT
V L L S H N L F L A Y V L N V C C K L M 32
541    CCGCTCAAGCCAGCACCCTCCGGGACATGCAAGTCAACCACCAATCAAGCAAGGGAAGCT
S A S S Q H L R G H A G H N Q I K Q G T 52
601    GTGAGTGGTCCCGCTGCAAGTGTCTGCAATAGAGACCCGATAGAGAGCGGTCCACAA
C E V V A V H R C C N K N R I E E R S Q 72
661    CGGTCAGTGTCTTGTCTCCCGGACAGGTGGCGGGCACACTCGGCTCAACCTCTT
T V K C S C F P G Q V A G T T R A Q P S 92
721    GTGTTGAGCTCCCATTTGATTCAGAAATGGTGGTCAATGAAATCCGRTTGGAG
C V E A S I V I Q K W W C H M N P C L E 112
781    GAGAGATTGTAAAGTGTCCAGATTACTCAGGTTGGTCTGCTAGAGAGTGGCAATAAG
G E D C K Y L P D Y S G W S C S S G N K 132
841    TCAAACTACCAAGTAAACCGGTAGCGAGAGAGAGGTGTGCTTCAACCTCGGAGGGG
V K T T K V T R * 140
901    AGCAGGAGCGGAGCTCTTTTGTGGATCCCATCARGSCCCCTCTGCGAATAATGTC
TAGGATTCAGCACTTCAATTTGTATATGTGAGCTGTAGAGGTGGCTTCACTTAN
961    TGGCCCGACCCCTCTCTGCTTCTGTTTATTTCATTGAATATAACACAAAGCCACAC
1021   CCATTTGACATCTCTCTGATCCCAAGGAGCATACTCCAAATCCGAGAGAGCAAAA
1081   TCAGAGTCTTCAAAATGGATCACCCTAAGGGCATGTTCACTTCTCTCTGCT
1141   TTACAAAAGAACCTTGGATGTATGTTCCALAGGGTCTCTATTCTGTTCTCTTTGACT
1201   TTTCCCTTTTGTCTGATTAAGTGGTTTTAAAGGGTCTTAAAGATTTTGGCAAAAC
1261   ATATTTGCAGATGTAGATTAGCTGGTGAAGAAATTAAGTCTAGAGTCACTGATTAAC
1321   TGGTAAAGAACCTTTATTTTAAACCTTGAAGAATAGAGGACATAGTTGGATTATGT
1381   GTGTGCAATGTATTTTACTTCTATTTTTTTTTTGTCTTCCATTTCCAGTTAGCAGAGA
1441   TAAATGAGAGCCTTTTAACTTCAATGTACATTTTACTGAGTCTAAGGAAGCATATCA
1501   ATTCCAAATTTTTATAACAAAGCTCTATCAGAACATTTTAAAACTGTGGAAATTT
1561   TTACGGCTTTTGTAGTCAATGAGTAAATCAATTAATAATAAAACATCTCAATTA
1621   GATCAAGGGTATTTCTAGATCAATTTATGCCAATATATGAAAAGTTTTAACTCCG
1681   AGACAGGAGTCTTTCAGTGTGAATTTTATAGCTGTAATGAGTCTCTTAACTTAGCT
1741   GTTCCCTACTTCTGTGACTTCTGTTAGCCATCTTATTTCTTAAATCTGAGTCTG
1801   ATTGGCTTAAATGATTTTTCAGCAGACTGTCTCCACATATCTCAATGTCTCAGCGG
1861   AARGTATGAAACAGATGAAGATGACTGACCCAGATTTTAGATGATATATGTTGTTAA
1921   GTACATACTACTGTAAATAATGGGTGAATTTATATATTAAGAAATGCCAAAACATA
1981   GTTCTGCACCAAGTTAATTAATCCCTGCTTTTCAATTTATAGGGGAAATAAATACT
2041   TTATAGCTAACAGTATTTTGTGTTATTTCTGCAAGGGAATGGAAGGAATGGAAGA
2101   TTTGTGCGGTAAATTTTGAATATTTGTATGATCATATGAAATAGTAAATAAATTCATC
2161   CTGCTGATGGCAAAAAAAAAAAAAA
2221

```



C

Gene		Identity (%)	
Species	Symbol	Protein	DNA
H.sapiens	FAM19A4		
vs. <i>P.troglodytes</i>	LOC736206	99.3	99.3
vs. <i>C.lupus</i>	LOC610997	96.3	91.7
vs. <i>B.taurus</i>	FAM19A4	94.8	88.0
vs. <i>M.musculus</i>	Fam19a4	93.3	88.4
vs. <i>R.norvegicus</i>	Fam19a4	92.5	87.8
vs. <i>D.renio</i>	zgc:154141	76.2	71.3

D

```

FAM19A4      MRSPRMRCVCKSVLLSHMLFLAYVLNVCCKLMSASSQLRGNHGHQIKQGTCEVVAWHRCCKNRIEE
Fan19a4     -----MRUCAKVLLSRMLFLTYVLNVCCKLMSASSQLRGNHGHQIKQGTCEVVAWHRCCKNRIEE
          ***** ***,**,*:*****

FAM19A4      CCNKHRIEERSQTUNCSFCFQAGTTRAQPSVEASIVIQKWHMNPCLGEDCKVLP
Fan19a4     CCNKHRIEERSQTUNCSFCFQAGTTRAQPSVEASIVIQKWHMNPCLGEDCKVLP
          ***** ***,*****

FAM19A4      DSSGMSCSSENKVKTTNTR
Fan19a4     DSSGMSCSSENKVKTTNTR
          *****

```

图 1

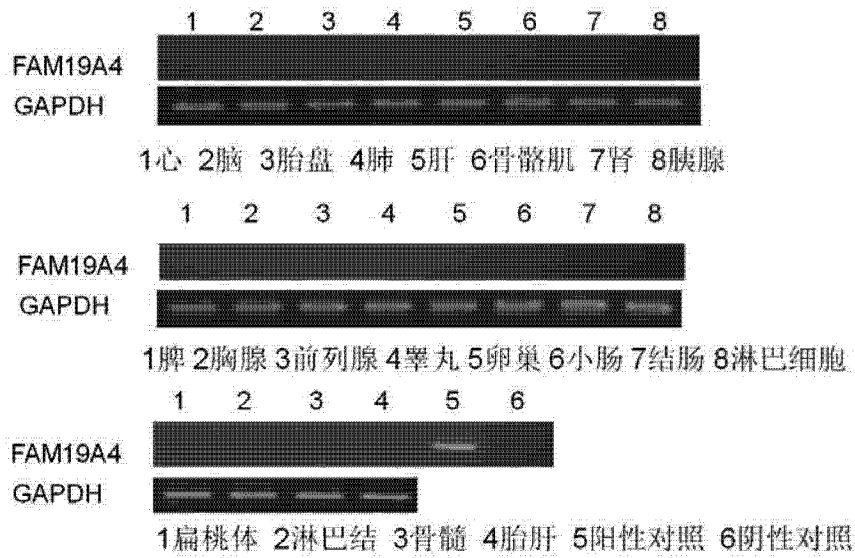


图 2A

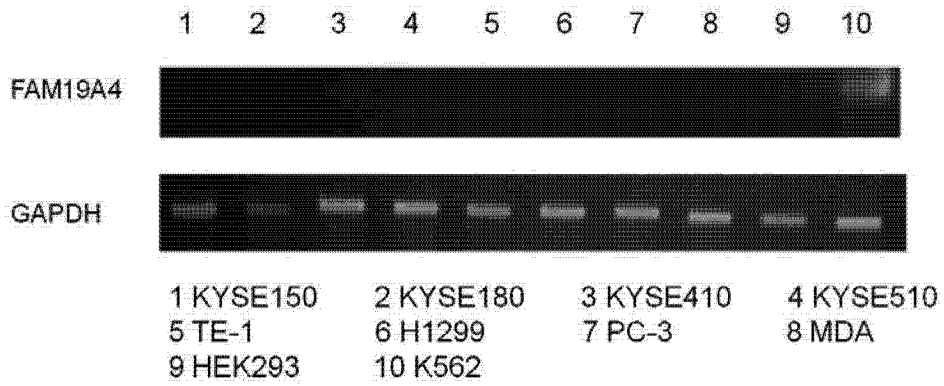


图 2B

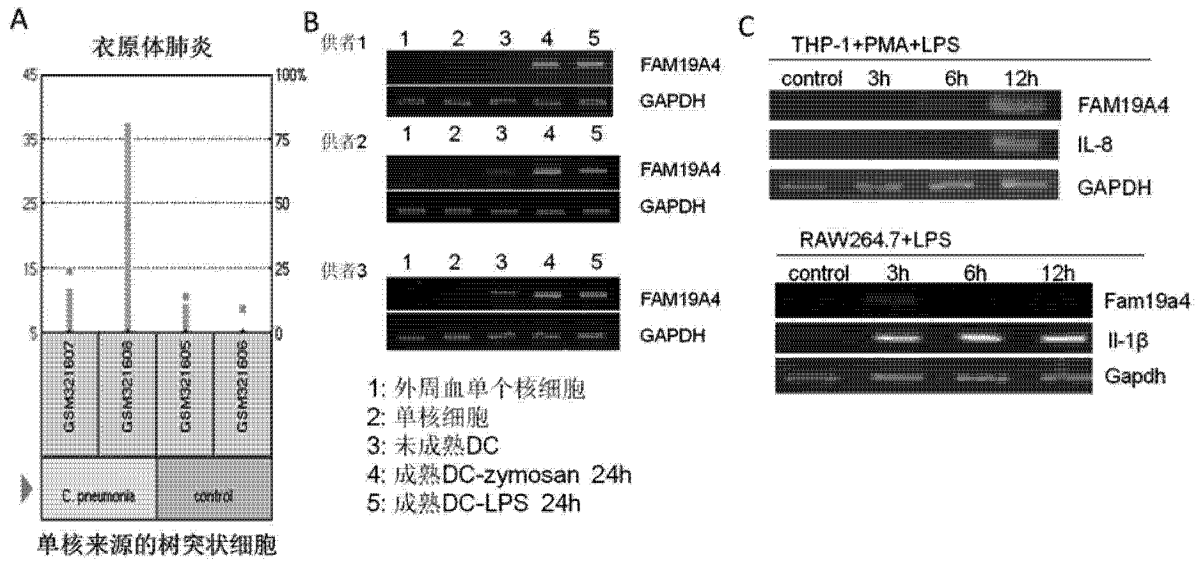


图 2C

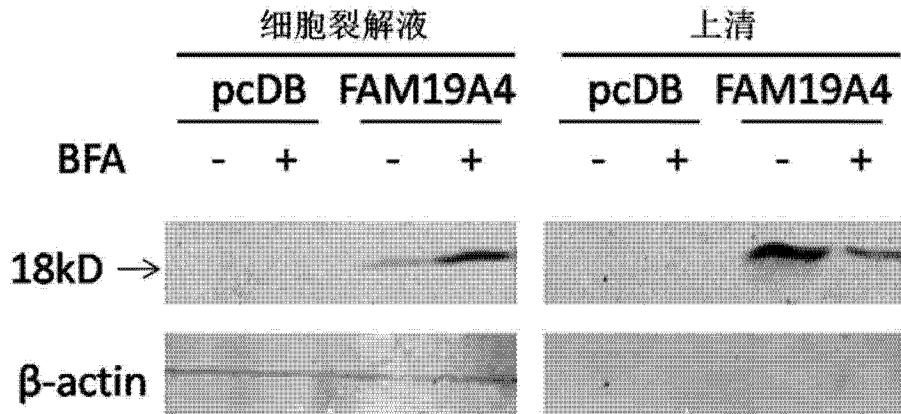


图 3A

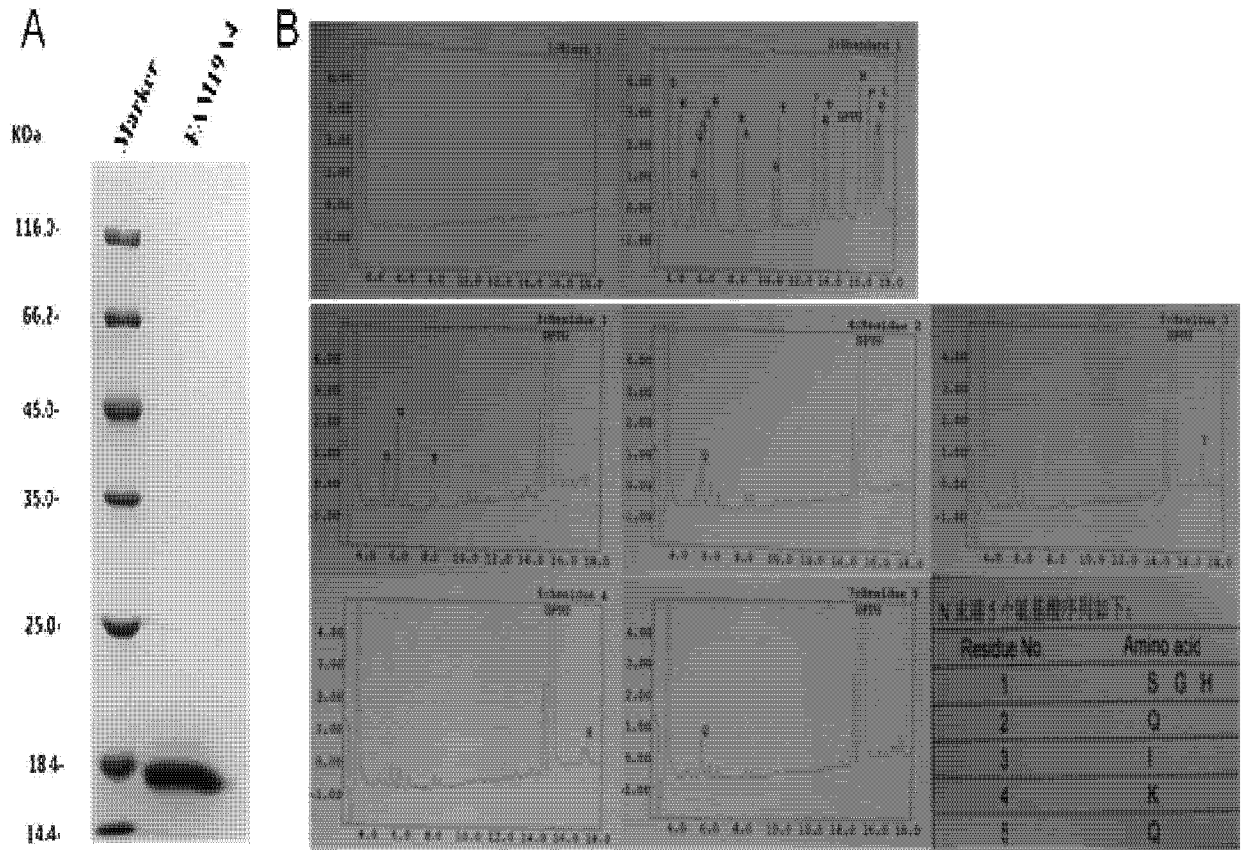


图 3B

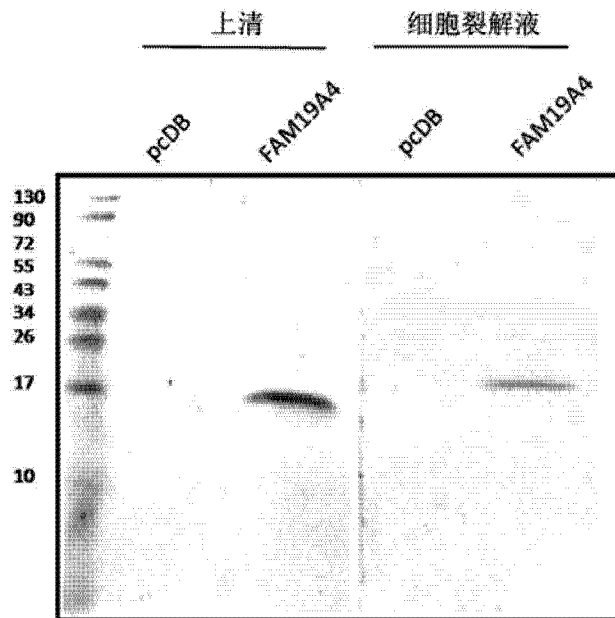


图 3C

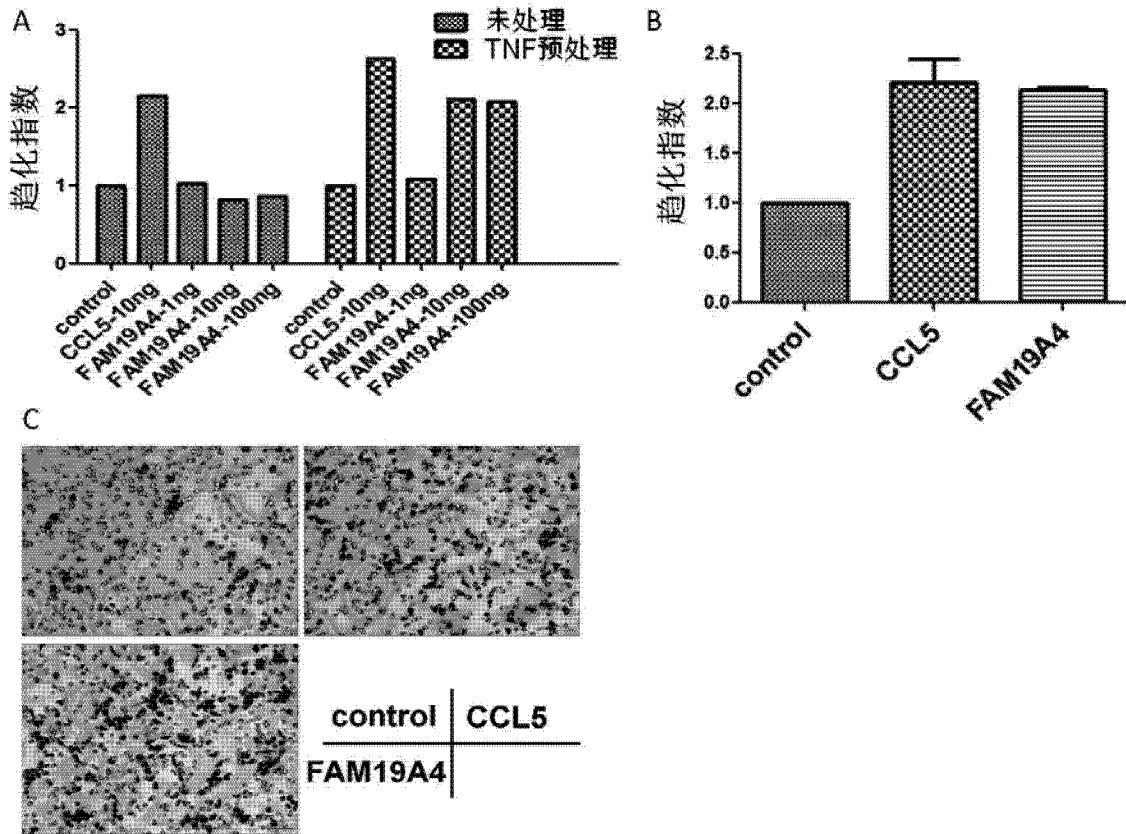


图 4

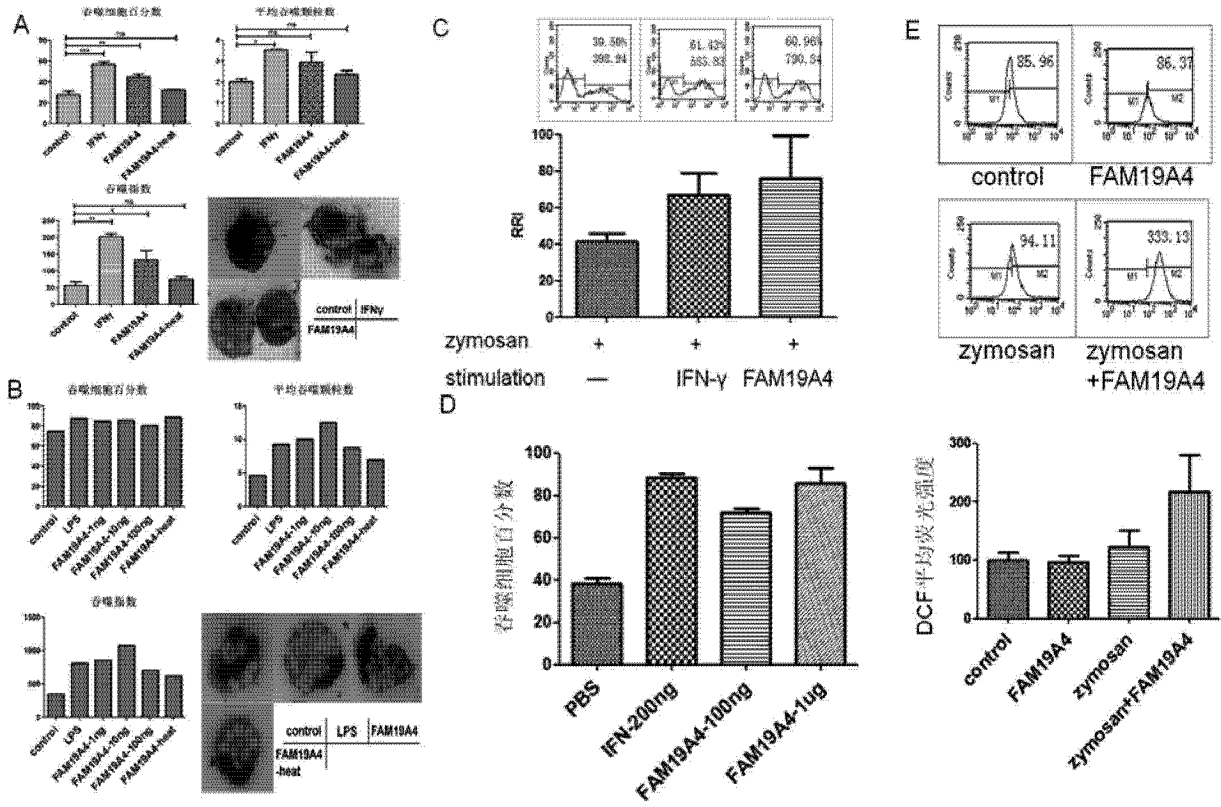


图 5

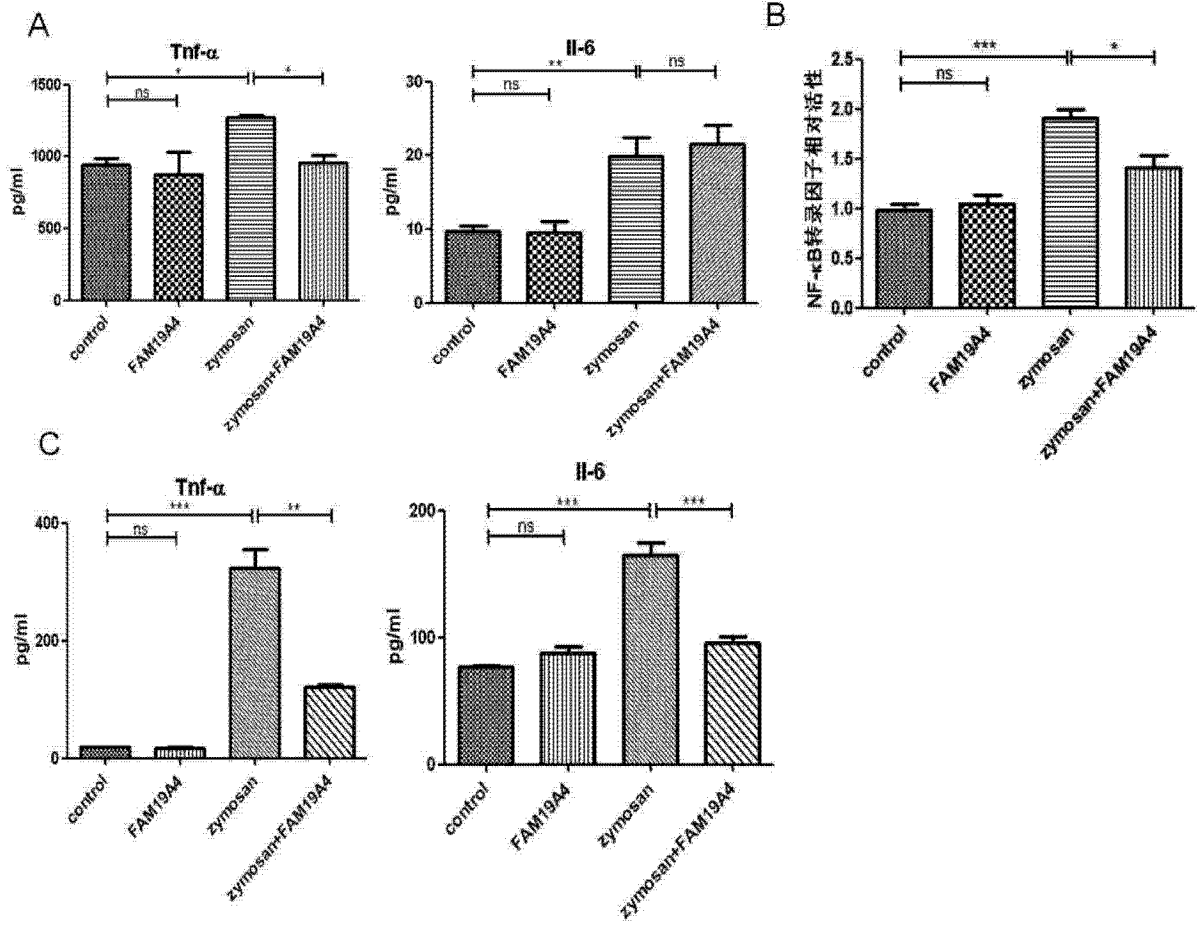


图 6

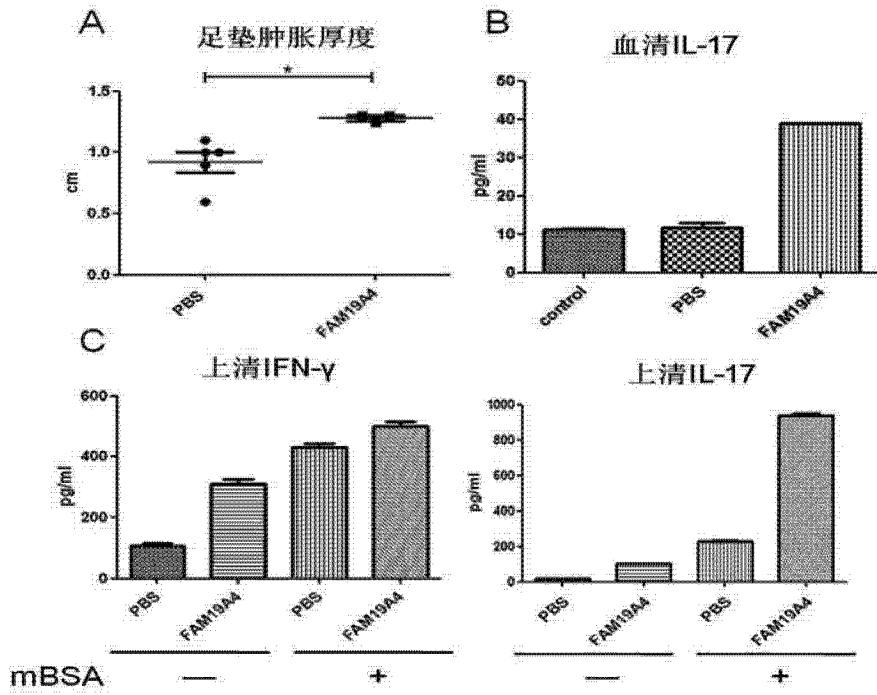


图 7

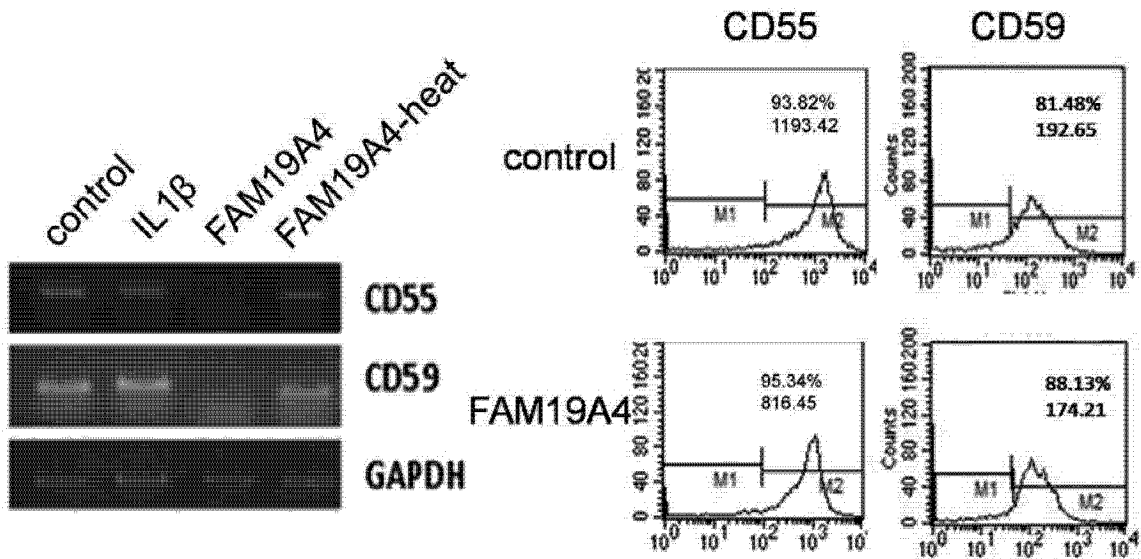


图 8A

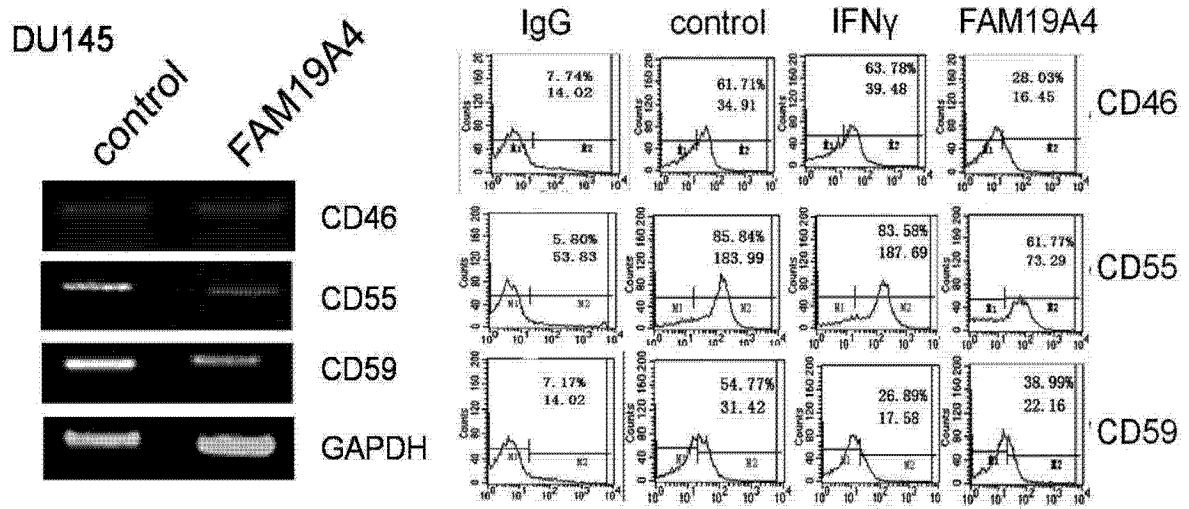


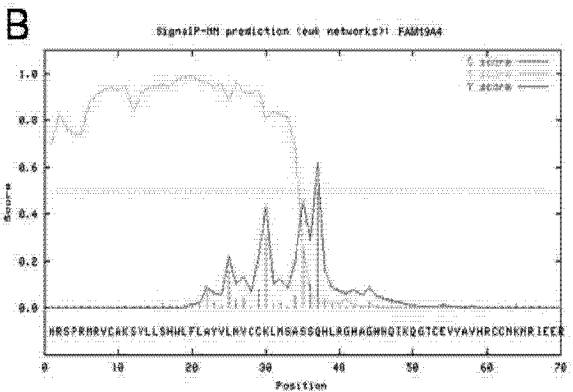
图 8B

A

```

1 TGGGCTGGGCTCCGCACTGCTAGCTGCGCGCGCCCTGGACGGGGCCACCCGACTGCGCG
61 CCGGGCTGCGGGCAACATCGGGGATCTCTGCTCAGCTGCGGCTTCCACAGCAGCTT
121 CAGGCTCTCCCGCAGGAGCTTCGGGCTTCTCTGTTAGAGACGTGGGAACCTTTTCTCT
181 CCTGGGAGGCTGCAGAGGTGATGGGCGGCTCCCGGGGCTCCCGGGGAGGGGACCG
241 TGAGCTCCCGGGCTCCGGTCCGGCGATCAGTACCTAGTTCGGGAGCGCCGGTCCGAC
301 TFGGATGCCGGCTCTAGTCCAGTCTTCTGAGCTACGATAATTTTTTGAACCGCAGAAAT
361 GATTTGTTCTPAGCAACAGATGGGAATTTGGAGTCACTCTGAAATATATCCTGGAAATAGT
421 GFTTTTGACTAGAACCCACATCTTATGGTCCCAAGSATGAGAGTCTGTGCTAASTCAG
      1 M R S P R M R V C A K S 124
481 TGTTCGTGTCGCACTGCTCTTCTTAGCTACGGTAAAGGTGTCTGTAAGCTGATGT
541 V L L S R W L P L A Y V L M V C C K L M
601 CCGCCTCAAGCCAGCTCCCGGGACATGCAGGTCCACCCCAATCAAGCAAGGGACCT
661 S A S S Q H L R G H A G H H Q I K Q G T 524
601 FTGAGGTGGTCCCGTGCACAGGTCTGCAATAAGAACCGCATAGAGAGCGGTCCACAA
661 C E V V A V H R C C N K N R I E E R S Q 724
661 CGGTCAAGTCTCTCTGCTCCCGGGACAGGTGGCGGGCACAACTCGGGCTCAACCTTCT
721 T V K C S C P P S Q V A G T P R A Q P S 924
721 GTGTGAAGCTTCCATTTGTSATTCAGAAATGGTGGTGCACATGAATCCGTGTTTGGAG
781 C V E A S I V I Q K W W C H M N P C L E 1124
781 GAGAGGATTTAAAGTCTCCCGGGACAGTACTCAGGTTGGTCTGATGCAATAAAG
841 G E D C K V L P D Y S G W S C S S G N K 1324
841 TCAAACTACGAGGTAAAGCGGTAGCGAAGAGAGGTTGTGCTTCAATCCTGGAGGGCG
      V K T T K V T R * 140
901 AGCAGAGGGGGAGCTCTTTTGTCTGGATCCCAATCATGGCCCTCTGCAAGAAATTTGTC
961 TAGGATTTGAGCAGCTTCATATTTGATATTTGAGCTGTGAGAGGGGGCATTCACTTAAC
1021 TGGCCCGCCCTCTCTGCTTCTGATTTTATTTTCATTTGAATATAACCAAGCCACCAC
1081 CCATTTGACATCTCTCTGATTTCCCAAGGAGCATACCTCCAAATCCGAGAGAGCAAA
1141 TCAAGCTCTCAAAATGGATCACCACATAGGSCATGTTTCATTTCTCACTTTCTTTCTGCT
1201 TTTACAAAAGAACTGGAGTATGTTCCAAAGGGTCTCATTTCTGTTCCCTTTTGAAGCT
1261 TTTCTTTTGTCTTGTATTAAGTGGTTTTAAAGGGTCTAAAAAGATTTTGGCAAAAC
1321 ATATTTGCAAGTATGATTTAGCTGGTGAAGAAAATTAAGTCTAGAGATCAACTGATTAAC
1381 TGGTAAAGAACCTTTATTTATAACCTTGAAGAATAGAAGGACATAGTTGGATATTGTT
1441 GTGTGCAATGTATTTTACTTCTATTTTFTTTTGGCTTCCATTTTCCAGTTAGCAGAG
1501 TAAATTSAGACCTTTTAACTTCATGTCACATTTTACTGATGCTAAGGAACATATCA
1561 ATTCCAAATTTTATAACCAAGCTCTATCAGAACATAATTTATAAACTTGTGGAAATTT
1621 TTAGCGCTTTTGTGATCATGTAGGTAAATCAATTTAAATATAAAACATCTCAATTT
1681 GATCAAGGTTATTTCTPAGATCAATTTATGCCAAATATATGAAAGATTTTAACTCCG
1741 AGACAGSAGTCTTCAATGCTGAATTTTGAAGTGTAAATGAGTCTCTTAAGTCTAGCT
1801 GTTCCCTACTTCTGACTTCTGTGTGAGCATCTATTTCTTTAAATCTGAGTCTGCT
1861 ATTGGCTTAATGATTTTGCAGCAGACATGCTCCACATATCTCAAATGCTCTCATGCG
1921 AAGCTATGAACAGATGAGAGATGCTGACCCAGATTTTAAATGATATGTTGTTAA
1981 GTACATACTACTGTAATAATGGGATGAATTTATATATTAAGAAATGCCAAAACATA
2041 GTTCTGCACCAGTTAATTAATCCCTGCTTTCACATTTATAGGGGAAATTAATTAAT
2101 TTTATGCTAACAGTTATTTGATGTTATTTCTGACAGAGGAATGGAAGGAATGGAAGCA
2161 TTTGTTGGCGTAAATTTTGAATATTTGTTGATCATGATAGTAAATAAATTCATC
2221 CTGCTGATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```



C

Gene		Identity (%)	
Species	Symbol	Protein	DNA
H.sapiens	FAM19A4		
vs. <i>P.troglodytes</i>	LOC736206	99.3	99.3
vs. <i>C.lupus</i>	LOC610997	96.3	91.7
vs. <i>B.taurus</i>	FAM19A4	94.8	88.0
vs. <i>M.musculus</i>	Fam19a4	93.3	88.4
vs. <i>R.norvegicus</i>	Fam19a4	92.5	87.8
vs. <i>D.rerio</i>	zgc:154141	76.2	71.3

D

```

FAM19a4  MRSPRHRVCAKSYLLSHLFLAYVLMVCCCKLM
Fan19a4  -----MRVCAKULLSRULVLYVLMVCCCKLMSASSQLRCHAGHHLKPGTCEVVAHHR
          ***** **:*:*:***** ** *****
FAM19a4  CCNKRRIEERSQTUNKSCFFPQUGTTRAQPSCEAESIVIQRWNHHPCLGEGDCKVLP
Fan19a4  CCNKRRIEERSQTUNKSCFFPQUGTTRAQPSCEAAIVIERWNHHPCLGEGDCKVLP
          ***** **:*:*:***** ** *****
FAM19a4  DYSGNSDSSGNKTKTR
Fan19a4  DSSGNSDSSGNKTKTR
          * *****

```

图 1

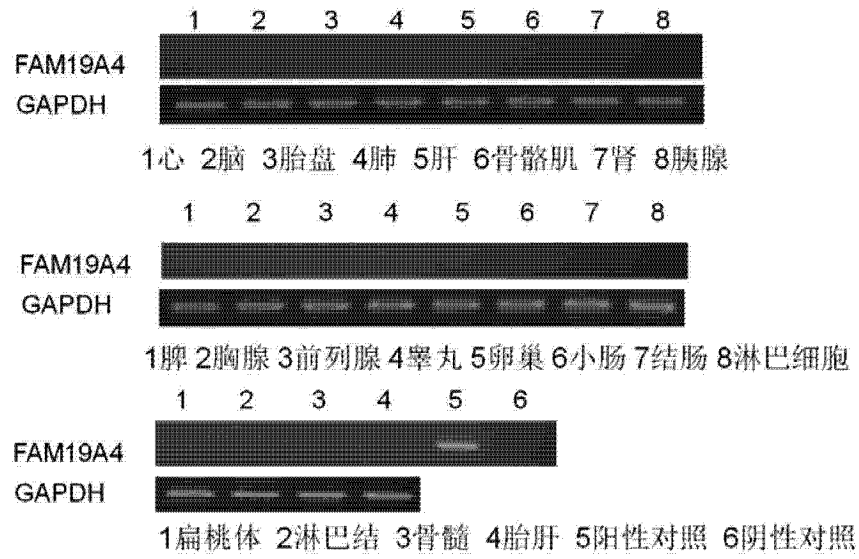


图 2A

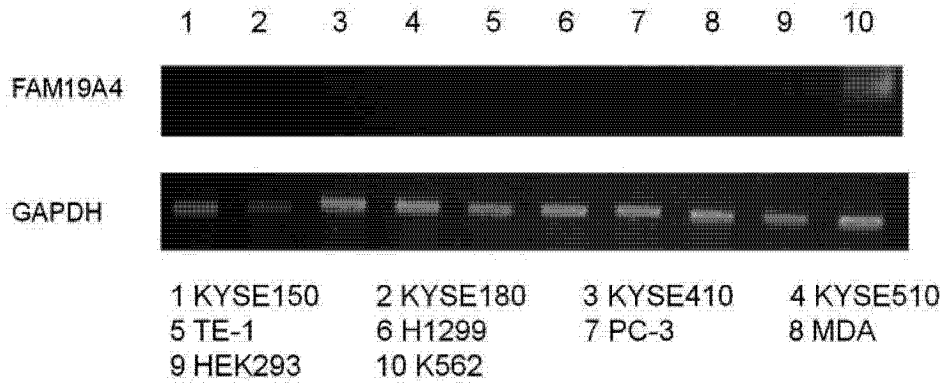


图 2B

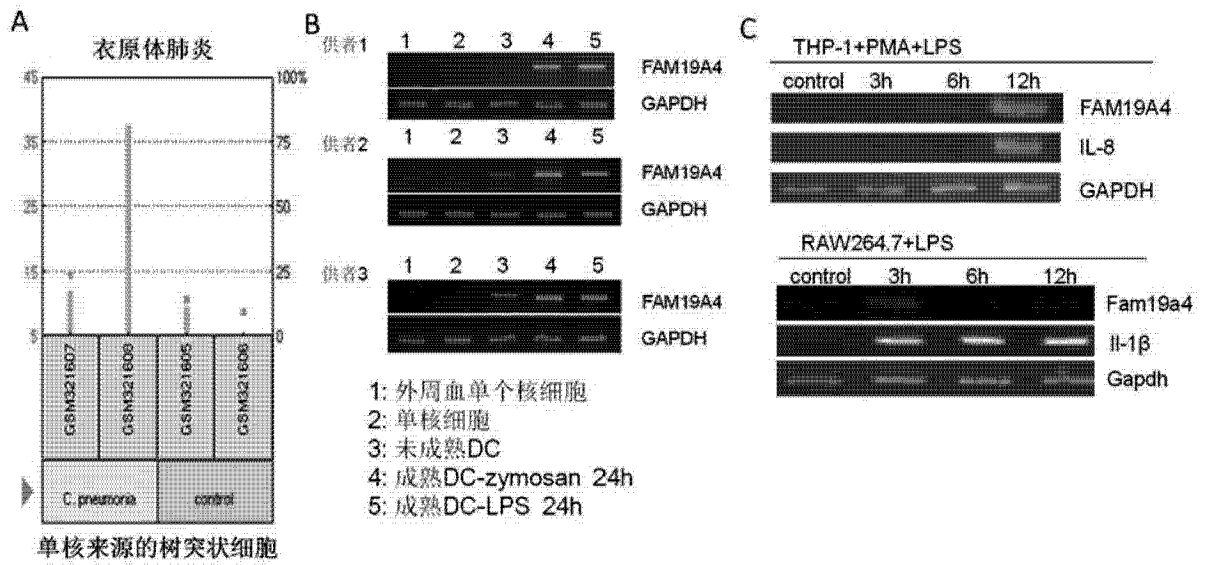


图 2C

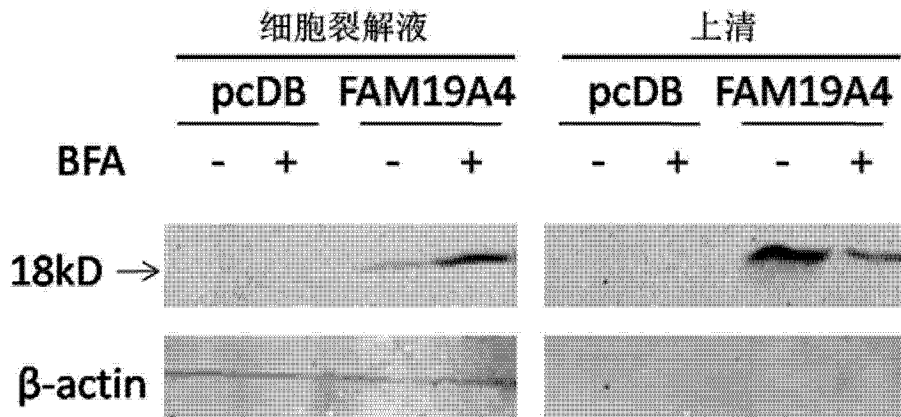


图 3A

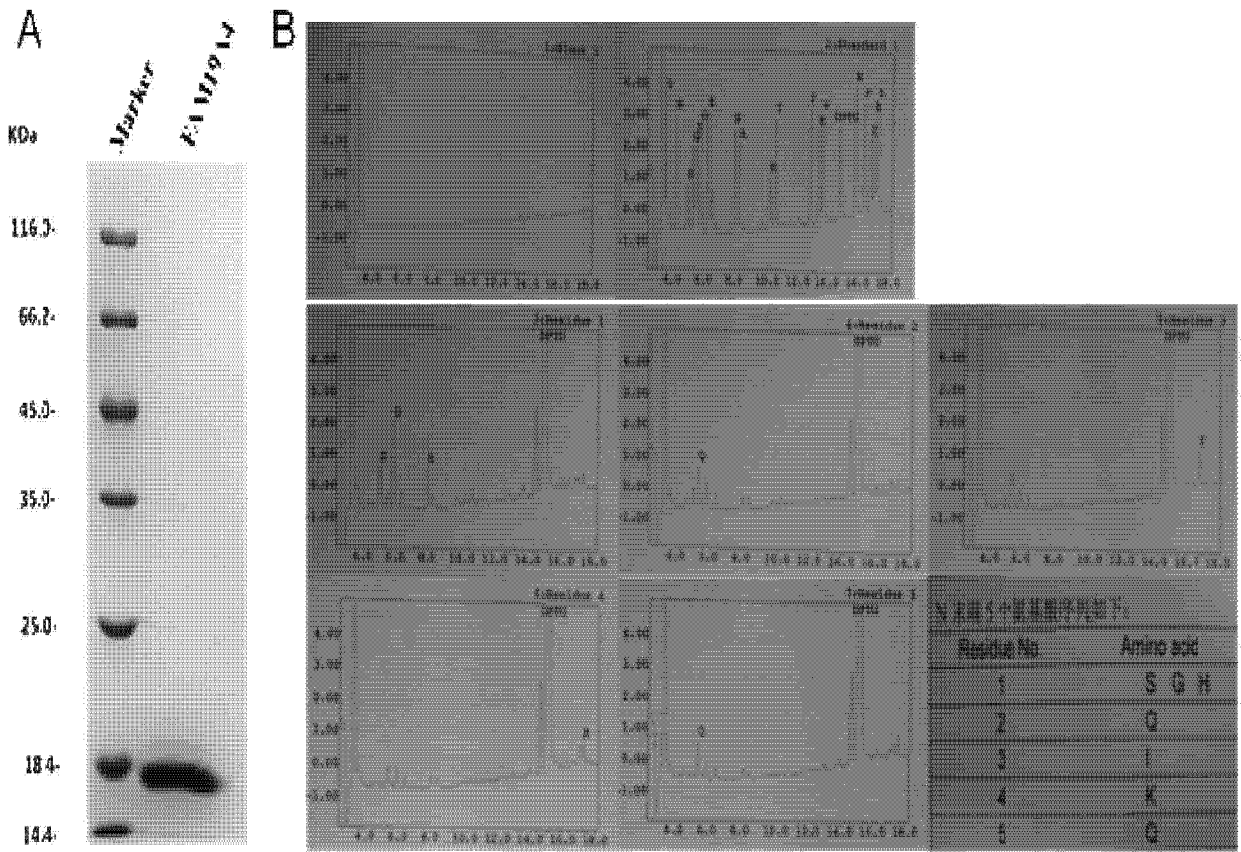


图 3B

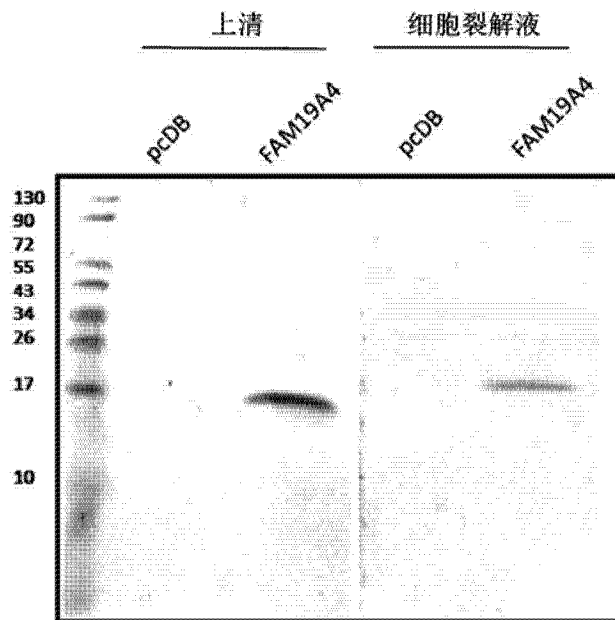


图 3C

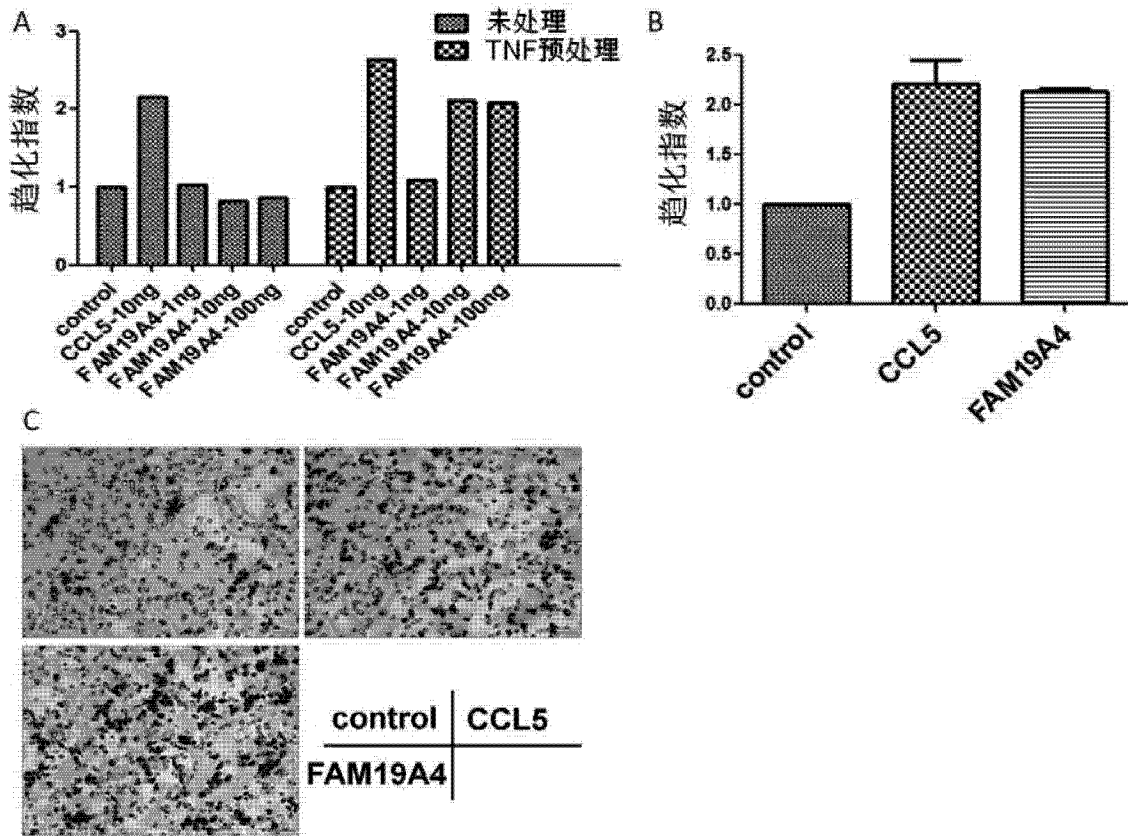


图 4

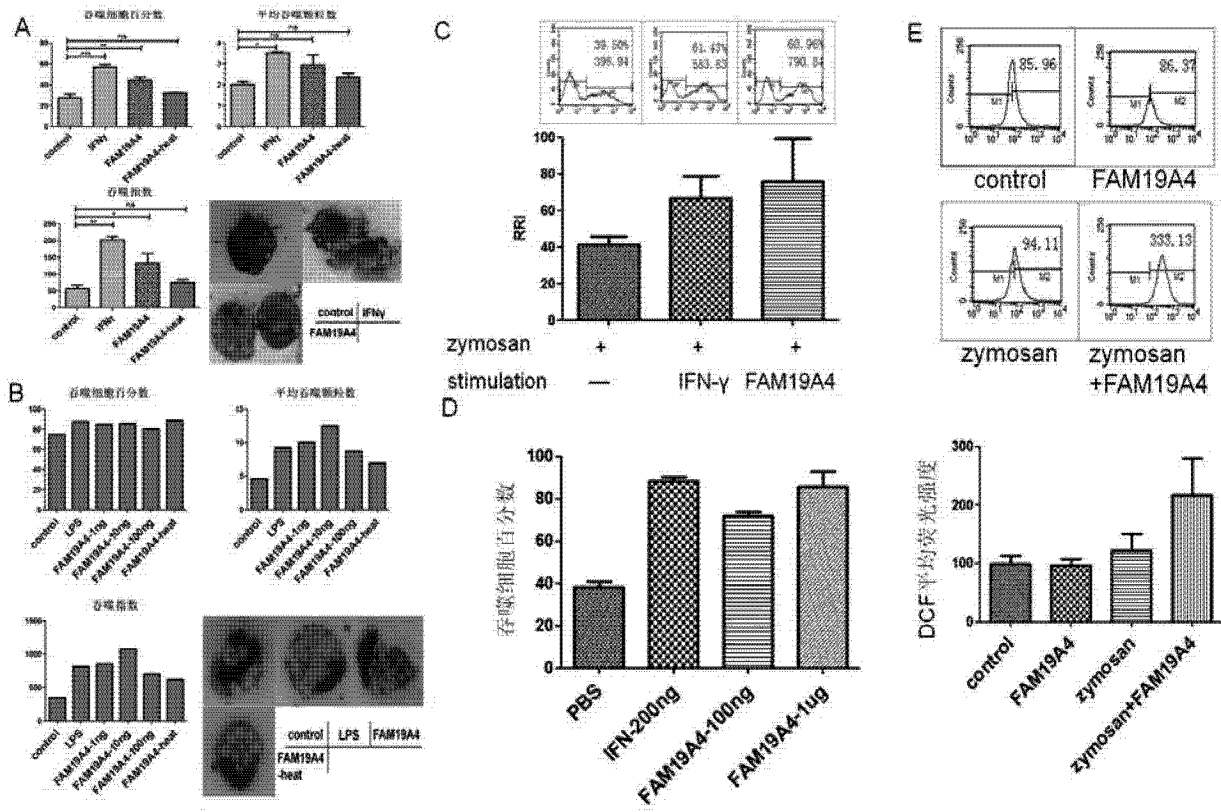


图 5

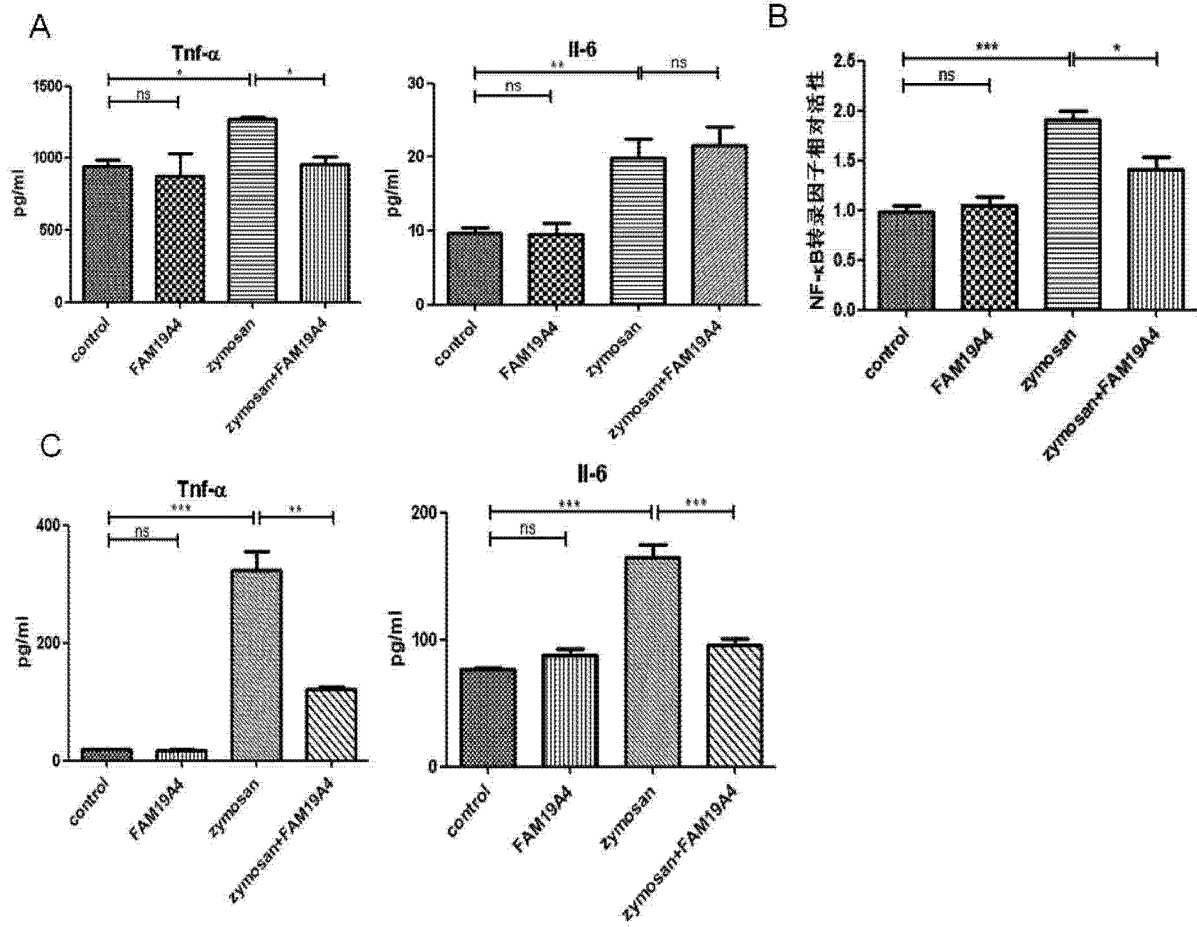


图 6

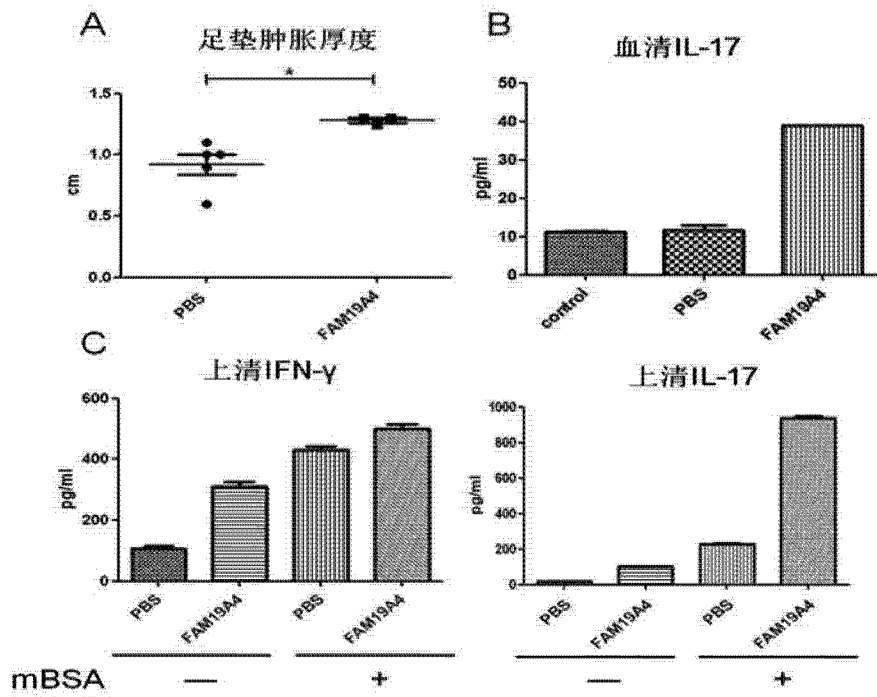


图 7

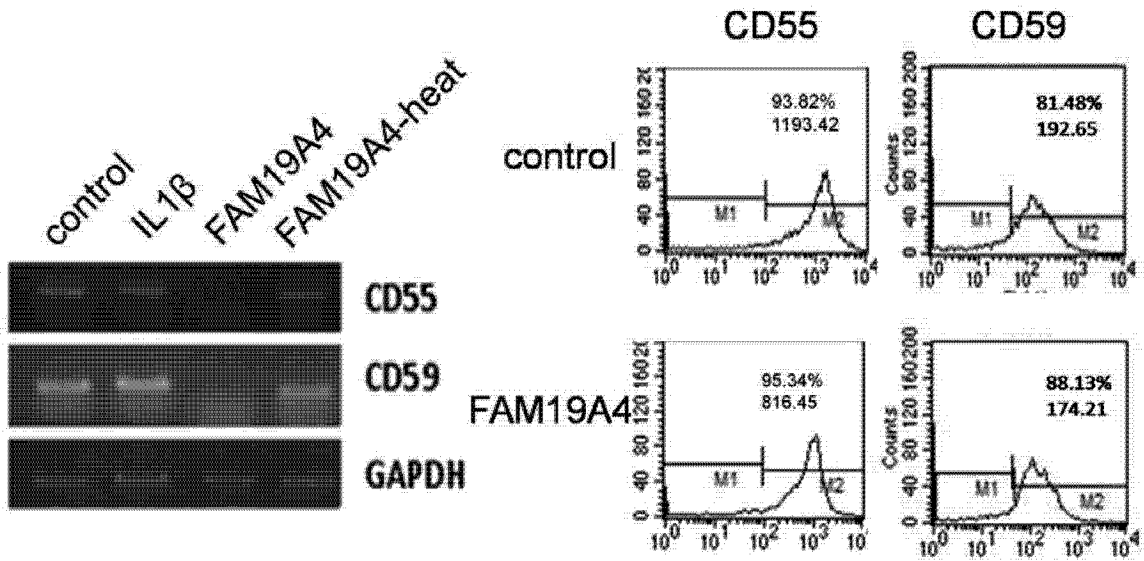


图 8A

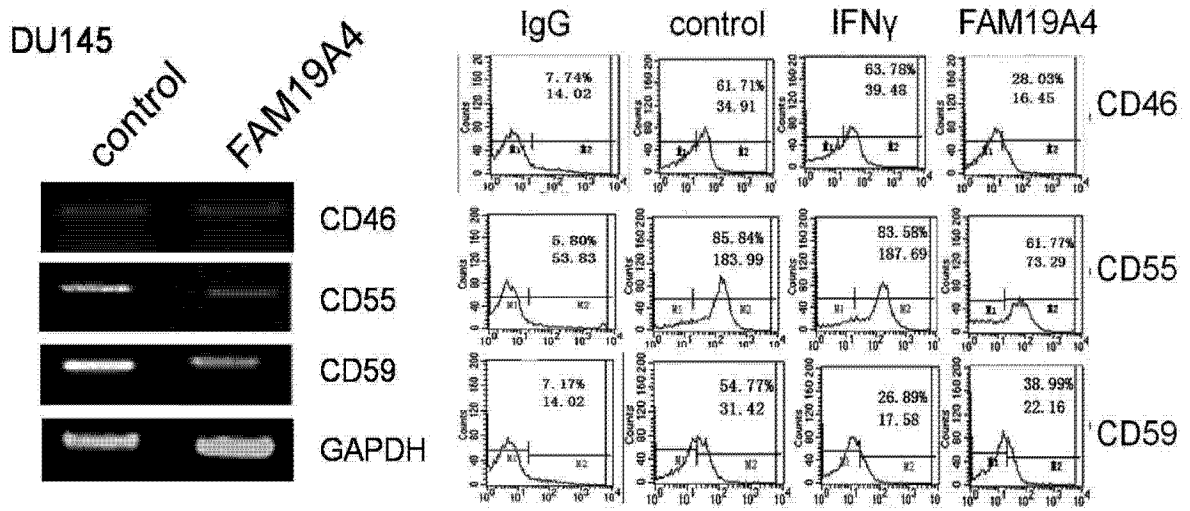


图 8B

专利名称(译)	具有抗感染、抗肿瘤活性的细胞因子FAM19A4及其应用		
公开(公告)号	CN103382220A	公开(公告)日	2013-11-06
申请号	CN201210135542.0	申请日	2012-05-03
[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	韩文玲 马大龙 王文彦 张荷钰 王平章 张颖妹 宋泉声 李婷 付伟伟 潘文		
发明人	韩文玲 马大龙 王文彦 张荷钰 王平章 张颖妹 宋泉声 李婷 付伟伟 潘文		
IPC分类号	C07K14/52 C07K16/24 C12N15/19 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/68 G01N33/53 A61K38/19 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P37/02		
代理人(译)	韩蕾		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种具有抗感染、抗肿瘤活性的细胞因子FAM19A4及其应用，具体地，本发明提供了FAM19A4的基因或蛋白或它们的免疫性片段，包含所述FAM19A4的基因或蛋白或它们的免疫性片段的基因工程载体、宿主细胞，以及针对所述FAM19A4蛋白或其免疫性片段的抗体。本发明还提供了所述的FAM19A4的基因或蛋白或它们的免疫性片段在制备具有抗病毒、抗胞内细菌、抗真菌、抗胞外细菌和抗肿瘤作用的药物制剂中的应用；还提供了检测所述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。

重组质粒模板	1 μ l (10ng)
引物	正向引物、反向引物终浓度各 0.2 μ M
dNTP	终浓度各 200 μ M
Taq DNA 聚合酶	2.5U
10 \times Taq DNA 聚合酶缓冲液	5 μ l
用双蒸水补足至 50 μ l 体积	

