

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/47



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/12 C12N 1/21

C12N 1/19 C12N 5/10

C07K 16/18 C12Q 1/68

G01N 33/53 G01N 33/577

//C12P21/02

[21] 申请号 01808399.4

[43] 公开日 2003 年 6 月 25 日

[11] 公开号 CN 1426420A

[22] 申请日 2001.2.21 [21] 申请号 01808399.4

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 21 [33] JP [31] 42933/2000

[86] 国际申请 PCT/JP01/01236 2001.2.21

[87] 国际公布 WO01/60859 日 2001.8.23

[85] 进入国家阶段日期 2002.10.21

[71] 申请人 吴羽化学工业株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 广濑国孝 酒井润

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 孟凡宏

权利要求书 2 页 说明书 24 页 序列表 16 页
附图 5 页

[54] 发明名称 新蛋白质以及编码该蛋白质的新基因

[57] 摘要

本发明概述了一组新蛋白质、编码该组蛋白质的新基因、分别含有上述新基因的质粒组、分别含有上述各个质粒的转化体、针对上述新的各个蛋白质的抗体或其片段、细菌感染症的检测方法以及新的多肽。上述各个新的蛋白质是对活化的人巨噬细胞特异的蛋白质。

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

1. 含有由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列的蛋白质或其功能等价的改变体或其片段。
2. 编码权利要求 1 记载的蛋白质或其功能等价的改变体的基因。
5
3. 权利要求 2 记载的基因, 其是由序列表中序列号 1 表示的碱基序列中的第 37 位~1479 位碱基组成的碱基序列构成的。
4. 含有权利要求 2 或 3 记载的基因的质粒。
5. 含有权利要求 4 记载的质粒的转化体。
- 10 6. 抗体或其片段, 其特征是可与权利要求 1 记载的蛋白质或其功能等价改变体进行特异反应。
7. 细菌感染症的检测方法, 其特征是分析被检测样品中的含有由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列的蛋白质或其功能等价的改变体或它们的 mRNA。
- 15 8. 权利要求 7 记载的检测方法, 其中细菌感染症是败血病。
9. 可以与序列表中序列号 1 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交的多核苷酸。
10. 含有由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列的蛋白质或其功能等价的改变体或其片段。
- 20 11. 编码权利要求 10 记载的蛋白质或其功能等价的改变体的基因。
12. 权利要求 11 记载的基因, 其是由序列表中序列号 3 表示的碱基序列中的第 126 位~1295 位碱基组成的碱基序列构成的。
13. 含有权利要求 11 或 12 记载的基因的质粒。
- 25 14. 含有权利要求 13 记载的质粒的转化体。
15. 抗体或其片段, 其特征是可与权利要求 10 记载的蛋白质或其功能等价改变体进行特异反应。
16. 细菌感染症的检测方法, 其特征是分析被检测样品中的含有由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列的蛋白质或其功能等价的改变体或它们的 mRNA。
- 30 17. 权利要求 16 记载的检测方法, 其中细菌感染症是败血病。
18. 可以与序列表中序列号 3 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异

杂交的多核苷酸。

19. 含有由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列的蛋白质或其功能等价的改变体或其片段。

5 20. 编码权利要求 19 记载的蛋白质或其功能等价的改变体的基因。

21. 权利要求 20 记载的基因，其是由序列表中序列号 5 表示的碱基序列中的第 56 位～第 304 位碱基组成的碱基序列构成的。

22. 含有权利要求 20 或 21 记载的基因的质粒。

23. 含有权利要求 22 记载的质粒的转化体。

10 24. 抗体或其片段，其特征是可与权利要求 19 记载的蛋白质或其功能等价改变体进行特异反应。

25. 细菌感染症的检测方法，其特征是分析被检测样品中的含有由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列的蛋白质或其功能等价的改变体或它们的 mRNA。

15 26. 权利要求 25 记载的检测方法，其中细菌感染症是败血病。

27. 可以与序列表中序列号 5 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交的多核苷酸。

新蛋白质以及编码该蛋白质的新基因

技术领域

5 本发明涉及到多个新蛋白质、编码这些蛋白质的新基因、分别含有上述各新基因的质粒、分别含有上述各个质粒的转化体、针对上述新的各个蛋白质的抗体或其片段、细菌感染症的检测方法以及新的多肽。本发明的新蛋白质是活化的人巨噬细胞特异的蛋白质。

背景技术

10 人们已经知道脂多糖 (Lipopolysaccharide; LPS) 是存在于革兰氏阴性细菌外膜的糖脂, 可以使巨噬细胞活化、诱导许多基因的表达。被 LPS 诱导表达的基因已知有表现出抗肿瘤作用和抗炎症作用(例如由细菌感染引起的炎症)的白细胞介素 (interleukin; IL) - 1、IL - 6、IL - 12、IL - 15、IL - 18、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor; TNF)、以及趋化因子 (例如, IL - 8 或 MCP); 表现出造血作用的粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF)、单核细胞 (monocyte; M) - CSF、或 GM - CSF; 或在炎症 (例如由细菌感染引起的炎症) 疾病中起着主要作用的胶原分解酶、环加氧酶 (COX)、或一氧化氮 (NO) 合成酶 (iNOS) 等各个基因, 15 这些基因编码的蛋白质几乎都是在生物体内起着重要作用的生理活性蛋白质 [Annu. rev. Immunol., 2. 283-318 (1984); Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates, 637-662, Raven Press Ltd., New York (1992)]。

25 人染色体中大约存在 10 万个基因, 但现在只分离和鉴定了其中的 1/10 ~ 1/5, 大部分依然没有被分离和解析。可以认为被 LPS 刺激特异诱导表达的基因组中的大部分是未鉴定的新基因。

而败血症 (septicemia) 是在身体的某个地方存在化脓病灶, 大量细菌从该病灶处断续地或连续地流入到血液中的全身性疾病。败血症的诊断可以通过培养血液、证明有细菌存在来确认。然而在该方法 30 中不仅存在着花费时间, 而且存在着在进行采血操作时通常存在于皮肤的细菌 (例如, 皮肤表面的葡萄球菌) 混入、污染血液的缺点。

因此, 本发明人将可在诊断炎症、变态反应、或癌症等疾病 (特

别是细菌感染症)的新型诊断和/或治疗药物的开发中应用作为目的,对通过 LPS 刺激在巨噬细胞中可特异诱导表达的基因进行了深入探索,探索结果可以对新的 3 种新基因进行分离和鉴定。另外本发明人发现任一个新基因是在健康人中都不能表达,但在细菌感染症患者中可进行表达的基因。本发明正是基于这样见解的发明。

发明概述

本发明涉及到

(1) 含有序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列的蛋白质或其功能等价的改变体或其片段(以下统称为「本发明第 1 种新蛋白质」)、

10 (2) 含有序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列的蛋白质或其功能等价的改变体或其片段(以下统称为「本发明第 2 种新蛋白质」)、

(3) 含有序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列的蛋白质或其功能等价的改变体或其片段(以下统称为「本发明第 3 种新蛋白质」)。

另外本发明还涉及到:

15 (1) 编码上述「本发明第 1 种新蛋白质」的基因(以下统称为「本发明第 1 种新基因」)、

(2) 编码上述「本发明第 2 种新蛋白质」的基因(以下统称为「本发明第 2 种新基因」)、

20 (3) 编码上述「本发明第 3 种新蛋白质」的基因(以下统称为「本发明第 3 种新基因」)。

另外本发明还涉及到分别含有上述各个基因的质粒。

本发明还涉及到分别含有上述各个质粒的转化体。

本发明还涉及到抗体或其片段,其特征是它们可以分别与上述各种蛋白质或其功能等价的改变体进行特异反应。

25 本发明还涉及到细菌感染症的检测方法,其特征是:分析被检测样品中的上述各种蛋白质或其功能等价改变体或它们的 mRNA。

另外本发明还涉及到:

(1) 能够与由序列表中序列号 1 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交的多核苷酸(以下称为「本发明第 1 种探针」)、

30 (2) 能够与由序列表中序列号 3 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交的多核苷酸(以下称为「本发明第 2 种探针」)、

(3) 能够与由序列表中序列号 5 表示的碱基序列构成的 mRNA 特

异杂交的多核苷酸（以下称为「本发明第3种探针」）。

在本说明书中所谓「功能等价的改变体」指的是含有在原来蛋白质的氨基酸序列中缺失、置换和/或附加1个或1个以上（最好是1个或数个）氨基酸的氨基酸序列，而且具有与原有的上述蛋白质同样活性的蛋白质。另外在本说明书的用语「附加」中包括在氨基酸序列的N末端和/或C末端附加1个或1个以上（最好是1个或数个）氨基酸和在氨基酸序列内部插入1个或1个以上（最好是1个或数个）氨基酸两方面意思。

在本说明书中所谓「同源蛋白质」指的是含有与原有蛋白质的氨基酸序列的同源性在90%以上（在95%以上比较理想，在98%以上更理想，在99%以上最理想）的氨基酸序列，而且具有与原有的上述蛋白质同样活性的蛋白质。另外本说明书中上述「同源性」指的是从BLAST[Basic local alignment search tool; Altschul, S.F.等人, J.Mol.Biol., 215, 403-410, (1990)]得到的值。

另外本说明书中用语「基因」和用语「多核苷酸」中任一个用语都包括DNA和RNA。

附图的简单说明

图1是表示通过RNA印迹法检测本发明的新的3种基因在LPS刺激或未刺激下在人巨噬细胞中表达的电泳结果照片。

图2是表示通过RNA印迹法检测本发明的3种新基因组织特异表达的电泳结果照片。

图3是表示使本发明基因NLG-1-1在COS-1细胞中表达的显微镜照片。

图4是表示使本发明基因NLG-2在COS-1细胞中表达的显微镜照片。

图5是表示本发明基因NLG-1-1的FISH解析结果的显微镜照片。

图6是表示通过RNA印迹法检测本发明的新的3种基因在健康人和败血病患者中表达的电泳结果照片。

30 实施发明的最好方式

以下对本发明进行详细说明。

本发明第1种新蛋白质最好是含有(1)序列表中序列号2表示

的氨基酸序列的蛋白质、(2)与上述(1)蛋白质功能等价的改变体以及(3)与上述(1)蛋白质同源的蛋白质、以及(4)它们[即上述(1)蛋白质、上述(2)的功能等价的改变体、或上述(3)同源蛋白质]的片段、由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列构成的蛋白质或与其功能等价改变体或同源的蛋白质。

由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列构成的蛋白质是由 481 个氨基酸组成的。由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列构成的蛋白质，由于与小鼠 IRG - 1 (Immune-responsive protein-1) [Immunogenetics, 41, 263-270, (1995)]在氨基酸序列上表现出大约 82% 的高同源性，所以被认为是人 IRG - 1。

在序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列中已知可被蛋白激酶 C 磷酸化的部位有 8 处，可被酪蛋白激酶 (II) 磷酸化的部位有 10 处，由此可以认为由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列构成的蛋白质在传递 LPS 刺激的信息的细胞内信息传递系统中起着重要的作用。

由于在 N 末端不存在信号肽序列，所以认为由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列构成的蛋白质在细胞中表现其生物活性。

而作为含有序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列的蛋白质诸如由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列构成的蛋白质和与融合用配偶体融合的融合蛋白质。在上述融合蛋白质中可以使融合用配偶体结合在由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列构成的上述蛋白质 N 末端和/C 末端。

作为融合用配偶体可以使用诸如纯化用蛋白质[例如谷胱甘肽 S - 转移酶 (GST) 的全部或一部分]、检测用蛋白质[例如 β - 半乳糖苷酶 α 肽 (LacZ α)]的全部或一部分、或表达用蛋白质(例如信号序列)。

在上述融合蛋白质中，在由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列组成的上述蛋白质与上述融合用配偶体之间也可以适当地导入可被限定分解的蛋白质分解酶(例如，凝血酶或因子 Xa)切断的氨基酸序列。

含有由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列的蛋白质或与其在功能上等价的改变体或同源蛋白质的片段只要是可以用作制备本发明的第 1 抗体或其片段的免疫原即可，并没有特别限定，但由 13 个以上氨基酸残基构成的比较理想，由 20 个以上氨基酸残基构成的更好，

由 50 个以上氨基酸残基构成的最理想。

这些本发明的第 1 种新蛋白质可以通过众所周知的方法获得，例如，使用本发明的第 1 种新基因按照众所周知的基因工程手法可以制备。

5 本发明的第 1 种新基因只要是编码本发明的第 1 种新蛋白质即可，并没有特别限定，例如，由序列表中序列号 1 表示的碱基序列中的第 37 位～第 1479 位碱基组成的碱基序列构成的基因。

由序列表中序列号 1 表示的碱基序列中的第 37 位～第 1479 位碱基组成的碱基序列构成的上述基因编码由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列组成的蛋白质。另外，由序列表中序列号 1 表示的碱基序列中的第 37 位～第 1479 位碱基组成的碱基序列构成的上述基因是在健康人中不表达，但在细菌感染症患者中表达的基因。

15 本发明的第 1 种探针只要是可与由序列表中序列号 1 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交的即可，并没有特别限定，例如，由与由序列表中序列号 1 表示的碱基序列互补的碱基序列或其部分碱基序列构成的单链或双链多核苷酸。本发明的第 1 种探针的碱基数的下限虽然没有特别限定，但本发明的第 1 种探针的碱基数在 18 个以上比较理想，26 个以上更好，41 个以上最理想。另外其上限也没有限定，但本发明的第 1 种探针的碱基数最好在 2180 个以下。而本说明书中所谓的「可与由序列表中序列号 1 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交」指的是在后述的实施例 1 (4) 中记载的条件下[即、含有 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的 $2 \times \text{SSC}$ (standard sodium citrate)] 于室温洗 2 次，每次 20 分钟，再于 65°C 下用含有 0.1% SDS 的 $0.2 \times \text{SSC}$ 洗 2 次，每次 20 分钟，与来自健康人的 mRNA 不杂交，但与由序列表中序列号 1 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交。

20 本发明第 2 种新蛋白质最好是含有 (1) 序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列的蛋白质、(2) 在功能上与上述 (1) 蛋白质功能等价的改变体以及 (3) 与上述 (1) 蛋白质同源的蛋白质、以及 (4) 它们[即上述 (1) 蛋白质、上述 (2) 的功能上等价的改变体、或上述 (3) 同源蛋白质]的片段、由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列构成的蛋白质或与其功能等价的改变体或同源的蛋白质。

由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列构成的蛋白质是由 390 个

氨基酸残基组成的。由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列构成的蛋白质由于与小鼠 IRG - 1 (Immune-responsive protein-1) [Immunogenetics, 41, 263-270, (1995)] 在氨基酸序列上表现出大约 82% 的高同源性, 所以被认为人 IRG - 1。

5 在序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列中已知可被蛋白激酶磷酸化的部位有 6 处, 可被酪蛋白激酶 II 磷酸化的部位有 8 处, 由此可以认为由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列构成的蛋白质在传递 LPS 刺激的信息的细胞内信息传递系统中起着重要的作用。

10 由于在 N 末端不存在信号肽序列, 所以认为由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列构成的蛋白质在细胞中表现其生物活性。

而作为含有序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列的蛋白质诸如由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列构成的蛋白质和与融合用配偶体融合的融合蛋白质。在上述融合蛋白质中可以使融合用配偶体结合在由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列构成的上述蛋白质 N 末端和/或 C 末端。

15 作为融合用配偶体可以使用诸如纯化用蛋白质 [例如谷胱甘肽 S - 转移酶 (GST) 的全部或一部分]、检测用蛋白质 [例如 β - 半乳糖苷酶 α 肽 (LacZ α)] 的全部或一部分、或表达用蛋白质 (例如信号序列)。

20 另外在上述融合蛋白质中, 在由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列组成的上述蛋白质与上述融合用配偶体之间也可以适当地导入可被限定分解的蛋白质分解酶 (例如, 凝血酶或因子 Xa) 切断的氨基酸序列。

25 含有由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列的蛋白质或与其在功能上等价的改变体或同源蛋白质的片段只要是可以用作制备本发明的第 2 抗体或其片段的免疫原即可, 并没有特别限定, 但由 13 个以上氨基酸残基构成的比较理想, 由 20 个以上氨基酸残基构成的更好, 由 50 个以上氨基酸残基构成的最理想。

30 这些本发明的第 2 种新蛋白质可以通过众所周知的方法获得, 例如, 使用本发明的第 2 种新基因按照众所周知的基因工程手法可以制备。

本发明的第 2 种新基因只要是编码本发明的第 2 种新蛋白质的即

可，并没有特别限定，例如，由序列表中序列号 3 表示的碱基序列中的第 126 位～第 1295 位碱基组成的碱基序列构成的基因。

由序列表中序列号 3 表示的碱基序列中的第 126 位～第 1295 位碱基组成的碱基序列构成的上述基因编码由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列组成的蛋白质。另外，由序列表中序列号 3 表示的碱基序列中的第 126 位～第 1295 位碱基组成的碱基序列构成的上述基因是在健康人中不表达，但在细菌感染症患者中表达的基因。

本发明的第 2 种探针只要是可与由序列表中序列号 3 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交的即可，并没有特别限定，例如，由与由序列表中序列号 3 表示的碱基序列互补的碱基序列或其部分碱基序列构成的单链或双链多核苷酸。本发明的第 2 种探针的碱基数的下限虽然没有特别限定，但本发明的第 2 种探针的碱基数在 18 个以上比较理想，26 个以上更好，41 个以上最理想。另外其上限也没有限定，但本发明的第 2 种探针的碱基数最好在 1970 个以下。而本说明书中所谓的「可与由序列表中序列号 3 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交」指的是在后述的实施例 1 (4) 中记载的条件下与来自健康人的 mRNA 不杂交，但与由序列表中序列号 3 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交。

本发明第 3 种新蛋白质最好是含有序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列的蛋白质、(2) 在与上述 (1) 蛋白质功能等价的改变体以及 (3) 与上述 (1) 蛋白质同源的蛋白质、以及 (4) 它们[即上述 (1) 蛋白质、上述 (2) 的功能上等价的改变体、或上述 (3) 同源蛋白质]的片段、由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列构成的蛋白质或与其功能等价改变体或同源的蛋白质。

由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列构成的蛋白质是由 83 个氨基酸组成的。由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列构成的蛋白质与小鼠 NADH-泛醌氧化还原酶 MLRQ 亚基 (CI-MLRQ) 在氨基酸序列上表现出大约 27% 的同源性。据文献报道小鼠 NADH-泛醌氧化还原酶 MLRQ 亚基存在于构成线粒体电子传递系统的 4 种复合物 (I、II、II、IV) 的一个复合物 I (complex I) 中，与活性氧的产生有关 [Circulation Res., 85, 357-363 (1999); Biochem. Mol. Biol. Int., 43, 669-675 (1997)]。在序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列构成

的蛋白质就象其氨基酸序列所表明的那样，由于也没有间隙，与小鼠 NADH - 泛醌氧化还原酶 MLRQ 亚基的结构也比较类似，所以可能具有传递电子能力，与炎症发生时活性氧的产生有关。

5 由于在 N 末端不存在信号肽，所以认为由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列构成的蛋白质在细胞中表现其生物活性。

而作为含有序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列的蛋白质诸如由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列构成的蛋白质和与融合用配偶体融合的融合蛋白质。在上述融合蛋白质中可以使融合用配偶体结合在由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列构成的蛋白质 N 末端和/或 C
10 末端。

作为融合用配偶体可以使用诸如纯化用蛋白质 [例如谷胱甘肽 S - 转移酶 (GST) 的全部或一部分]、检测用蛋白质 [例如 β - 半乳糖苷酶 α 肽 (LacZ α)] 的全部或一部分、或表达用蛋白质 (例如信号序列)。

15 另外在上述融合蛋白质中，在由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列组成的上述蛋白质与上述融合用配偶体之间也可以适当地导入可被限制分解的蛋白质分解酶 (例如，凝血酶或因子 Xa) 切断的氨基酸序列。

含有由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列的蛋白质或与其在功能上等价的改变体或同源蛋白质的片段只要是可以用作制备本发明的第 3 抗体或其片段的免疫原即可，并没有特别限定，但由 13 个以上氨基酸残基构成的比较理想，由 20 个以上氨基酸残基构成的更好，由 50 个以上氨基酸残基构成的最理想。

25 这些本发明的第 3 种新蛋白质可以通过众所周知的方法获得，例如，使用本发明的第 3 种新基因按照众所周知的基因工程手法可以制备。

本发明的第 3 种新基因只要是编码本发明的第 3 种新蛋白质的即可，并没有特别限定，例如，由序列表中序列号 5 表示的碱基序列中的第 56 位 ~ 第 304 位碱基组成的碱基序列构成的基因。

30 由序列表中序列号 5 表示的碱基序列中的第 56 位 ~ 第 1304 位碱基组成的碱基序列构成的上述基因编码由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列组成的蛋白质。另外，由序列表中序列号 5 表示的碱基序列

中的第 56 位~第 1304 位碱基组成的碱基序列构成的上述基因是在健康人中不表达,但在细菌感染症患者中表达的基因。

本发明的第 3 种探针只要是可与由序列表中序列号 5 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交的即可,并没有特别限定,例如,由与由序列表中序列号 5 表示的碱基序列互补的碱基序列或其部分碱基序列构成的单链或双链多核苷酸。本发明的第 3 种探针的碱基数的下限虽然没有特别限定,但本发明的第 3 种探针的碱基数在 18 个以上比较理想,26 个以上更好,41 个以上最理想。另外其上限也没有限定,但本发明的第 3 种探针的碱基数最好在 652 个以下。而本说明书中所谓的「可与由序列表中序列号 5 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交」指的是在后述的实施例 1(4)中记载的条件下与来自健康人的 mRNA 不杂交,但与由序列表中序列号 1 表示的碱基序列构成的 mRNA 特异杂交。

本发明的质粒只要是含有本发明的上述各个新基因(即本发明的第 1 种新基因、本发明的第 2 种新基因、或本发明的第 3 种新基因)即可,并没有特别限定,例如通过向按照所用的宿主细胞适当选择的众所周知的表达载体中分别插入本发明的上述各个基因得到的各个质粒(即、含有本发明的第 1 种新基因的本发明第 1 种质粒、含有本发明的第 2 种新基因的本发明第 2 种质粒、或含有本发明的第 3 种新基因的本发明第 3 种质粒)。

另外本发明的转化体只要是含有本发明的上述各个质粒(本发明第 1 种质粒、本发明第 2 种质粒、或本发明第 3 种质粒、)即可,也没有特别限定,例如使用本发明的上述各个质粒通过转化所希望的宿主细胞得到的各个转化体(即含有本发明第 1 种质粒的本发明第 1 种转化体、含有本发明第 2 种质粒的本发明第 2 种转化体、本发明第 3 种质粒的本发明第 3 种转化体)。

作为上述宿主细胞例如通常使用的众所周知的微生物,如大肠杆菌或酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、或众所周知的培养细胞,如动物细胞(如,CHO 细胞或 COS 细胞)或昆虫细胞(例如 BmN4 细胞)。

而作为众所周知的上述表达载体如对于大肠杆菌使用 pUC、pTV、pGEX、pKK 或 pTrcHis;对于酵母使用 pEMBL 或 pYES2;对于 CHO 细

胞使用 pMAMneo; 对于 COS 细胞使用 pcDNA3; 对于 BmN4 细胞使用含有蚕核型多角体病毒 (BmNPV) 的多角体蛋白启动子的载体 (例如, pBK283)。

5 本发明的第 1 种抗体或其片段分别与本发明的第 1 种蛋白质或其功能等价的改变体特异反应。而本发明的第 2 种抗体或其片段分别与本发明的第 2 种蛋白质或其功能等价的改变体特异反应。本发明的第 3 种抗体或其片段分别与本发明的第 3 种蛋白质或其功能等价的改变体特异反应。

本发明的上述各个抗体中包括单克隆抗体和多克隆抗体。

10 本发明的单克隆抗体 (即与本发明的第 1 种蛋白质或其功能等价的改变体分别进行特异反应的本发明的第 1 种单克隆抗体、与本发明的第 2 种蛋白质或其功能等价的改变体特异反应的本发明的第 2 种单克隆抗体、与本发明的第 3 种蛋白质或其功能等价的改变体特异反应的本发明的第 3 种单克隆抗体) 可以通使用本发明的新的各个蛋白质
15 或与其功能等价的改变体, 或它们的片段作为免疫用抗原和筛选用抗原, 以及按照公知的手段获得。

例如, 使用上述免疫用抗原免疫小鼠, 将从该小鼠摘取的脾脏细胞和小鼠骨髓瘤细胞按照 Nature, 256, 495 (1975) 记载的细胞融合法, 或 J. Immunol. Method, 100, 181-189 (1987) 记载的电细胞融合法进行细胞融合, 通过使用上述的筛选用抗原进行筛选, 可以得到产生
20 本发明单克隆抗体的杂交瘤。

作为培养上述杂交瘤的培养基只要是适于杂交瘤培养的培养基就可以, 最好使用在 Dulbecco 改进的 Eagle 的最小必需培养基 (Dulbecco's modified Eagle' minimum essential medium) 中含有胎牛血清、L-谷氨酰胺、L-丙酮酸以及抗生素 (青霉素 G 和链霉
25 素) 的培养基。

上述杂交瘤在培养基中进行培养时, 可以在 5% CO₂ 浓度、37℃ 条件下大约培养 3 天。如在小鼠腹腔中进行培养时大约培养 14 天。

通过使用蛋白质的分离和纯化中一般常用的方法可以从上述得到的培养液或小鼠的腹水中分离和纯化上述单克隆抗体。
30

一般常用的方法如硫酸盐析、使用离子交换纤维素的离子交换柱层析、使用分子筛的分子筛柱层析、使用蛋白 A 结合多糖类的亲和柱

层析、透析、或冷冻干燥等。

本发明的各多克隆抗体（与本发明的第 1 种蛋白质或其功能等价的改变体特异反应的本发明的第 1 种多克隆抗体、与本发明的第 2 种蛋白质或其功能等价的改变体特异反应的本发明的第 2 种多克隆抗体、与本发明的第 3 种蛋白质或其功能等价的改变体特异反应的本发明的第 3 种多克隆抗体）可以使用本发明的新的各个蛋白质或与其功能等价的改变体，或它们的片段作为免疫用抗原和筛选用抗原，以及使用众所周知的各自方法，例如按照以下给出的方法进行制备。

即将含有抗原的生理盐水与等量的弗氏完全佐剂或不完全佐剂、或其等价物，例如 Hunter's TiterMax™ (Cat. No. YT001-00, 日本国东京) 乳化混合之后，注射到哺乳动物（特别是兔子或羊）的皮下、腹腔内、或肌肉内等任一处（初次免疫）。以后每隔 2~4 周进行同样操作，进行数次免疫。在最终免疫 1~2 周后从哺乳动物的颈动脉或心脏采血，通过使用硫酸铵对血清进行盐析可以制备抗体。

本发明的各个抗体片段是本发明的上述各个抗体（包括单克隆抗体和多克隆抗体）的部分片段，而只要具有与原有抗体同样反应特异性并没有特别限定。作为本发明的抗体片段如 Fab、Fab'、F(ab')₂、或 Fv。本发明的抗体片段例如可以按照常规方法通过用蛋白分解酶对本发明的多克隆抗体或单克隆抗体进行消化，然后再通过蛋白质的分离和纯化的常规方法得到。

根据本发明人发现，本发明的蛋白质（特别是由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列的蛋白质、由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列的蛋白质、或由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列的蛋白质）以及其 mRNA 在健康人中不表达，而在细菌感染症（例如败血症、肺炎、尿路感染症、骨髓炎、或中耳炎等）患者中表达，所以本发明的蛋白质及其 mRNA 可以用作细菌感染症的诊断标志。即，通过使用本发明的体外检测方法，在被检测对象采集的被检测样品中如果存在本发明的蛋白质和/或其 mRNA，那么可以判定该被检测对象是细菌感染症患者，而不存在本发明的蛋白质和/或其 mRNA，那么可以判定不是细菌感染症。

在本发明方法中可以使用的被检测样品只要含有本发明的蛋白质和/或其 mRNA 即可，并没有特别限定，生物样品，例如从动物，如哺

乳动物、特别是人（尤其是患者）采集的细胞等组织或其提取物、或血液（例如血清或血浆）、尿、或脑脊髓液等体液。只要是通常临床检查等的被检测样品即可，并没有特别限定，都可以使用。

5 以下关于本发明方法首先对通过分析本发明的蛋白质的 mRNA 检测细菌感染症的方法进行说明，然后通过分析本发明的蛋白质来说明检测细菌感染症的方法。

本发明的方法内，通过分析本发明的蛋白质的 mRNA 检测细菌感染症的方法并没有特别限定，例如包括以下步骤的检测方法：
使被检测样品与含有与本发明蛋白质的 mRNA 的碱基序列互补的碱基
10 序列的多核苷酸接触的步骤；以及
分析上述多核苷酸与本发明蛋白质的 mRNA 的结合物的步骤的方法（以下称之为「本发明的第 1 种检测方法」）、或
包括将被检测样品中的 mRNA 转换为 cDNA 的逆转录步骤；
使用上述逆转录步骤得到的反应液和以本发明蛋白质基因作为模板，
15 可以扩增基因的引物，实施基因扩增反应 [特别是聚合酶链式反应（PCR）] 的基因扩增步骤；以及
对在上述基因扩增步骤扩增的基因进行分析的步骤的方法（以下称为「本发明的第 2 种检测方法」）。

在本发明的第 1 检测方法中使被检测样品与包含与本发明蛋白质的
20 的 mRNA 的碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸（例如本发明的探针）反应，通过检测生成的本发明蛋白质的 mRNA - 多核苷酸结合物的存在，或测定其含量分析本发明蛋白质的 mRNA。

上述多核苷酸含有与由被选择的基因（DNA）转录的 mRNA 的一部分互补或实质上互补的序列，与由靶基因转录的 mRNA 之间形成双链。
25 为了与其靶 mRNA 形成稳定的复合物，具有充分互补性的任一个多核苷酸都适用。本发明方法中可以使用的多核苷酸只要是实质上在靶 mRNA 内的哪一区域范围互补都可以。多核苷酸分子可以用作检测本发明蛋白质基因中特异的 mRNA 表达增减的 DNA 探针。即通过特异附着在作为目标的本发明蛋白质的 mRNA，形成分子杂化体可以检测细胞内
30 本发明蛋白质 mRNA 表达的程度。

在本发明第 1 种方法中可以使用的多核苷酸可以适当选择与本发明蛋白质的 mRNA 的特异碱基序列互补的碱基序列，例如使用众所周

知的 DNA 合成装置、PCR 装置或基因克隆等进行制备。虽然可以使用各种长度的多核苷酸，但长度在 10 个碱基以上比较理想，最好含有 17 个以上碱基的多核苷酸。

上述多核苷酸可以是没有修饰的多核苷酸或多核苷酸类似物。合适的类似物如乙基或甲基膦酸酯类似物、硫代磷酸酯修饰的多脱氧核苷酸 [Nucleic Acids Res., 14, 9081-9093, (1986); J. Am. Chem. Soc., 106, 6077-6079, (1984)] 等。另外由于近年来在多核苷酸类似物的制造中的进步，例如也可以使用 2'-O-甲基核糖核苷酸 [Nucleic Acids Res., 15, 6131-6148, (1987)] 或复合 RNA-DNA 类似物嵌合核糖核苷酸 [FEBS Lett., 215, 327-330, (1987)] 等。

被选择的多核苷酸可以是带有电荷的，或不带电荷的任何一种。为了在体外或体内进行这样的实验，可以使用众所周知的标记试剂，例如放射性同位素或荧光物质等按照常规方法对多核苷酸进行标记。作为放射性同位素例如有 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、或 ^{35}S 等。其中作为放射性同位素使用随机引物法 [Anal. Biochem., 132, 6-13, (1983)] 用 ^{32}P 进行标记比较适用。而作为可以更容易且危险性小的操作的标记如可以形成衍生物的荧光色素。作为荧光色素可以使用与多核苷酸结合的所有色素，例如荧光素、若丹明、德克萨斯红 (Texas Red)、4-氟-7-硝基苯并呋喃、香豆素、荧光胺、琥珀酰荧光素、或丹黄酰氯 (ダンシル) 等比较适用。

例如通过使用本发明蛋白质的 cDNA 的 RNA 印迹解析对本发明蛋白质 mRNA 量的测定可以象如下所示那样进行。即，从任意体细胞或组织提取、分离 mRNA，对分离的 mRNA 进行琼脂糖凝胶电泳，转移到硝酸纤维素或尼龙膜上，然后通过本发明蛋白质的 cDNA 探针反应，对本发明蛋白质 mRNA 量进行测定。使用的本发明蛋白质 cDNA 探针是与本发明蛋白质 mRNA 互补的 DNA，希望其长度在 17 个碱基以上。

本发明第 2 种检测方法中的逆转录步骤和基因扩增步骤 (特别是 PCR 步骤) 的各个反应本身可以通过通常的逆转录反应和基因扩增反应，例如逆转录 PCR (RT-PCR) 法实施。即使用逆转录酶和寡 (dT) 引物，进行逆转录反应后，使用耐热性 DNA 聚合酶 (例如，Taq 聚合酶)，实施初期变性反应 (例如，于 97°C 下保温 2~3 分钟) 后，反复进行如下扩增循环 (例如进行 15~45 次循环)，实施 PCR: (1) DNA

的变性过程（于 90~94℃温育 30 秒）、（2）单链 DNA 和引物的退火过程（于 50~55℃温育 30 秒）、以及（3）通过耐热性 DNA 聚合酶进行的 DNA 合成过程（于 70~75℃温育 1~2 分钟）。

5 本发明第 2 种检测方法中的分析步骤也是通过 DNA 的通常分析方法、例如进行琼脂糖凝胶电泳后用适当的 DNA 结合性色素（例如溴乙锭）对凝胶进行染色的方法或 DNA 印迹法实施。

另外本发明的方法内通过分析本发明的蛋白质检测细菌感染症的方法并没有特别限定，例如包括以下步骤的检测方法（以下称之为「本发明的第 3 种检测方法」）：

10 使被检测样品与和本发明蛋白质有免疫学反应性的免疫反应性物质接触的步骤；以及
分析上述免疫反应物质与本发明蛋白质的结合物的步骤。

在本发明的第 3 种检测方法中首先使上述被检测样品与与本发明蛋白质有免疫学反应性的免疫反应性物质接触。在使用来自人的被检测样品时，最好使与由序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列的蛋白质、
15 由序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列构成的蛋白质、或由序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列构成的蛋白质有免疫学反应性的免疫反应性物质与被检测样品接触。

在使被检测样品与和本发明蛋白质有免疫学反应性的免疫反应性物质接触时，假如在被检测物质中不存在本发明蛋白质，就不会发生
20 与上述免疫反应性物质的反应，如果在被检测物质中存在本发明蛋白质，本发明的蛋白质与上述免疫反应性物质结合，本发明蛋白质与免疫反应性物质的结合物根据本发明蛋白质的存在量生成。该结合物由于可以根据众所周知的方法简单地进行检测，所以可以从结合物的存在或量检测上述被检测样品中的本发明蛋白质的存在，可以测定其存在的量。作为被检测样品可以使用组织切片或细胞，通过荧光抗体法或酶抗体法对组织或细胞中的本发明蛋白质进行测定也是有可能的。

作为与本发明蛋白质有免疫反应的免疫反应物质，例如有针对本发明蛋白质的抗血清、针对本发明蛋白质的多克隆抗体、或针对本发明蛋白质的单克隆抗体或这些抗体的片段等。以上这些抗体或片段既
30 可以单独使用，也可以组合同时使用。上述抗体片段中包括如 Fab、Fab'、F(ab')₂、或 Fv 等片段。

在本发明的第3种检测方法中首先使被检测样品与与本发明蛋白质有免疫学反应性的免疫反应性物质接触，使本发明蛋白质-免疫反应性物质结合物生成。然后通过免疫化学测定法，检测与抗体结合的本发明蛋白质，测定其生成量，可以知道被检测样品中的本发明蛋白质水平。

作为免疫化学的测定方法原则上可以使用所有常用的免疫分析方法，例如EIA法、ELISA法、或RIA法等。这些免疫测定方法一般可大致分为以下一些方法。

(1) 竞争法：使含有未知量抗原的被检测样品和用标记试剂标记的一定量的抗原与相对应的一定量抗体竞争反应，测定与抗体结合的标记抗原或没有与抗体结合的标记抗原的活性。

(2) 夹心法：向含有未知量抗原的被检测样品中加入过量的搭载在载体上的抗体，使其反应（第1个反应），然后加入用标记试剂标记的过量的一定量抗体使其反应（第2个反应）。测定载体上保持的带有标记抗体或载体上没有保持的带有标记抗体的活性。第1个反应和第2个反应同时进行，也可以错开时间进行。

当标记试剂是放射性同位素时可以用井型计数器或液体闪烁计数器进行测定。当标记试剂是酶时，可以加入底物后放置，用比色法或荧光法测定酶活性。标记试剂无论是荧光物质还是发光物质可以分别按照众所周知的方法进行测定。

除了上述方法以外，最近已经使用将电泳后的蛋白质转移到硝酸纤维素等膜上，用抗体检测目的蛋白质的蛋白质印迹法，无论哪一种方法都可以用于本发明蛋白质的检测。

这些测定方法中使用的抗体可以通过众所周知的抗体标记法进行标记，例如预先用放射性同位素、酶、荧光物质、或发光性物质等的适当标记物进行标记。

作为放射性同位素例如可以使用 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、或 ^{35}S 等。

作为酶是稳定、比活性高的比较好，例如可以使用糖苷酶（例如， β -半乳糖苷酶、 β -糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -果糖苷酶、 α -半乳糖苷酶、 α -糖苷酶、或 α -甘露糖苷酶）、淀粉酶（ α -淀粉酶、 β -淀粉酶、异淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、或高峰淀粉酶）、纤维素酶、或溶菌酶等碳水化合物酶；脲酶、或天冬酰胺酶等酰胺酶；

胆碱酯酶（例如乙酰胆碱酯酶）、磷酸酶（例如碱性磷酸酶）、硫酸酯酶、或脂肪酶等酯酶；脱氧核糖核酸酶、或核糖核酸酶等核酸酶；过氧化氢酶、过氧化物酶、或细胞色素氧化酶等铁卟啉酶；酪氨酸酶、或天冬氨酸氧化酶等铜酶；或乙醇脱氢酶、苹果酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、或异柠檬酸脱氢酶等脱氢酶等。

作为荧光物质如荧光胺、或异硫氰酸荧光素等，作为发光性物质如氨基苯二酰肼、氨基苯二酰肼衍生物、荧光素、或光泽精等。

来自上述各种标记的信号检测可以通过众所周知的方法实施。

而作为使抗体和标记试剂结合的方法可以使用任何常规的方法，例如氯胺 T 法 [Nature, 194, 495-496, (1962)]，过碘酸法 [Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 22, 1084-1091, (1974)]，或马来酰亚胺法 [Journal of Biochemistry, 79, 233-236, (1976)] 等。

在上述测定方法中，例如 EIA 法可以按如下所示那样进行。首先将被检测样品加到已经固定于载体（例如分析板）上的第 1 抗体中，使本发明蛋白质与第 1 抗体结合，生成结合物，向该结合物中加入结合酶标记试剂（例如过氧化物酶）的第 2 抗体，使上述结合物进一步结合第 2 抗体，生成「第 1 抗体 - 本发明蛋白质 - 第 2 抗体」结合物。向得到的「第 1 抗体 - 本发明蛋白质 - 第 2 抗体」结合物中加入上述标记酶（过氧化物酶）的底物，通过测定酶反应的生成物的吸光度或荧光强度测定附着于「第 1 抗体 - 本发明蛋白质 - 第 2 抗体」结合物上的标记酶的酶活性。就含有已知量的本发明蛋白质的标准溶液预先实施上述的一系列操作，将本发明蛋白质和吸光度或荧光强度之间的关系作成标准曲线。然后将含有未知量的本发明蛋白质的被检测样品得到的吸光度或荧光强度与标准曲线对照，可以测定被检测样品中的本发明蛋白质的量。

按照以下给出的方法也可以进行 EIA 法。即首先通过使载体（例如分析板）与被检测样品接触，将被检测样品内的本发明蛋白质固定于载体上，然后加入一次抗体，使本发明蛋白质与一次抗体结合生成结合物，然后向该结合物中加入结合酶标记试剂（例如过氧化物酶）的抗一次抗体抗体（二次抗体），使二次抗体结合于上述结合物上，生成「本发明蛋白质 - 一次抗体 - 二次抗体」结合物。向得到的「本

发明蛋白质 - 一次抗体 - 二次抗体」结合物中加入上述标记酶（过氧化物酶）的底物，通过测定酶反应的生成物的吸光度或荧光强度测定附着于上述「本发明蛋白质 - 一次抗体 - 二次抗体」结合物上的标记酶的酶活性。就含有已知量的本发明蛋白质的标准溶液预先实施上述的一系列操作，将本发明蛋白质和吸光度或荧光强度之间的关系作成标准曲线。然后将含有未知量的本发明蛋白质的被检测样品得到的吸光度或荧光强度与标准曲线对照，可以测定被检测样品中的本发明蛋白质的量。

而 RIA 法可以象如下那样进行。首先将被检测样品加到已经固定于载体（例如试管）上的第 1 抗体中，使本发明蛋白质与第 1 抗体结合，生成结合物，向该结合物中加入用放射性同位素标记试剂标识的（例如， ^{125}I ）的第 2 抗体，使上述结合物进一步结合第 2 抗体，生成「第 1 抗体 - 本发明蛋白质 - 第 2 抗体」结合物。测定得到的「第 1 抗体 - 本发明蛋白质 - 第 2 抗体」结合物的放射能活性（例如， γ - 放射能活性）。就含有已知量的本发明蛋白质的标准溶液预先实施上述的一系列操作，将本发明蛋白质和放射能活性之间的关系作成标准曲线。然后将含有未知量的本发明蛋白质的被检测样品得到的放射能活性与标准曲线对照，可以测定被检测样品中的本发明蛋白质的量。

另外通过以下给出的方法也可以进行 RIA 法。即首先通过使载体（例如试管）与被检测样品接触，将被检测样品内的本发明蛋白质固定于载体上，然后加入一次抗体，使本发明蛋白质与一次抗体结合生成结合物，然后向该结合物中加入用放射性同位素标记试剂（例如， ^{125}I ）标识的抗一次抗体抗体（二次抗体），使二次抗体结合于上述结合物上，生成「本发明蛋白质 - 一次抗体 - 二次抗体」结合物。然后测定得到的「本发明蛋白质 - 一次抗体 - 二次抗体」结合物的放射能活性（例如， γ - 放射能活性）。就含有已知量的本发明蛋白质的标准溶液预先实施上述的一系列操作，将本发明蛋白质和放射能活性之间的关系作成标准曲线。然后将含有未知量的本发明蛋白质的被检测样品得到的放射能活性与标准曲线对照，可以测定被检测样品中的本发明蛋白质的量。

实施例

以下通过实施例对本发明进行具体说明，但这些实施例并没有限定本发明的范围。

5 实施例 1: 活化人巨噬细胞特异的新基因的分离和鉴定

(1) 来自脂多糖 (LPS) 刺激巨噬细胞的 mRNA 的分离

以 1L 健康人血液作为起始材料，使用市售的外周血单核细胞制备试剂 [Lymphoprep; Nycomed 公司; ノルウエー, オスロ] 制备外周血单核细胞。将得到的外周血单核细胞悬浮于含有 10 μ g/mL-LPS (Difco Laboratories 公司; 美国密歇根州底特律) 和 10% 胎牛血清 (FCS) 的 RPMI 1640 培养基中，使细胞浓度达到 10⁶ 个/mL。将细胞悬浮液加到塑料培养皿中，每个皿加 20mL，于 37℃ 和 5% CO₂ 条件下进行培养。

培养 3 个小时后，弃掉上清，用 20mL 磷酸缓冲液 (phosphate-buffered saline; PBS) 将附着细胞 (即 LPS 活化的巨噬细胞) 洗 3 次。加入细胞溶解用溶液 [4mol/L 异硫氰酸胍, 30mmol/L 醋酸钠 (pH4.8)] 3mL，用带有针头的注射器反复进行 3 次吸-排操作，铺到预先加有 5.7mol/L 氯化铯缓冲液 (pH4.8) 1.2mL 的超离心 5PA 管 (日立工机; 日本国胜田市)。经 18 小时离心 (20℃, 38000rpm) 后，除去离心管中的上清，用 200 μ L 灭菌水将离心管中的沉淀溶解，回收 RNA。从 1L 血液中可以得到约 1mg 总 RNA (即来自 LPS 刺激巨噬细胞的总 RNA)。

然后使用市售的 mRNA 制备试剂盒 [Poly (A) Quik mRNA Isolation kit; Stratagene 公司; 美国加利福尼亚州 La Jolla]，从 500 μ g 总 RNA 中制备出 15 μ g mRNA (即来自 LPS 刺激巨噬细胞的总 RNA)。

(2) 噬菌体 cDNA 文库的制作

从得到的来自 LPS 刺激巨噬细胞的 15 μ g mRNA 取出 5 μ g 制作噬菌体 cDNA 文库。在 cDNA 文库的制作中使用市售的试剂盒 (ZAP Express cDNA Synthesis Kit 和 ZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit; Stratagene 公司)。

(3) cDNA 的部分碱基序列的解析

为了解析来自 LPS 刺激的巨噬细胞的 cDNA 的碱基序列，按照

常规方法随机挑选大约 1000 个噬斑，作为噬菌粒回收 cDNA。就回收的大约 1000 个来自 LPS 刺激的巨噬细胞的 cDNA 使用市售的碱基序列确定用试剂盒 (Dye Terminator Cycle Sequencing kit; Perkin Elmer Japan 公司; 浦安市) 分别解析 cDNA 的 5' 末端一侧以及 3' 末端一侧的 400~500 个碱基。就得到的各个序列通过 NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://inhouse.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 BLAST (basic local alignment tool) 进行 DNA 同源性检索时，发现了 63 个未知的新基因。

(4) 通过 RNA 印迹法进行解析

按照上述实施例 (1) 记载的来自 LPS 刺激的巨噬细胞的总 RNA 制备过程制备来自 LPS 刺激的巨噬细胞的总 RNA。另外除了用含有 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基代替含有 10 μ g/mL-LPS 和 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基以外，按照上述实施例 (1) 记载的来自 LPS 刺激的巨噬细胞的总 RNA 制备过程制备来自未受 LPS 刺激的巨噬细胞的总 RNA。按照常规方法对上述来自 LPS (10 μ g/mL) 刺激的巨噬细胞的总 RNA 和来自未受 LPS 刺激的巨噬细胞的总 RNA 进行甲醛/琼脂糖凝胶电泳后，将 RNA 转移到尼龙膜上。

将转移了 RNA 的上述膜于 80℃ 和减压下热处理 2 小时后，浸入到市售的预杂交用溶液 (Hybrisoll; Oncor 公司; 美国马里兰州 Gaithersburg)，于 42℃ 下进行 3 小时预杂交。然后使用随机引物标记试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司; 德国)，分别加入用同位素 32 P 标记的上述实施例 1 (3) 中得到的各个新基因，于 42℃ 杂交过夜。第二天用含有 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的 2 \times SSC (标准柠檬酸钠)] 于室温下洗 2 次，每次 20 分钟，再于 65℃ 下用含有 0.1% SDS 的 0.2 \times SSC 洗 2 次，每次 20 分钟。将洗净的膜包起来于 -80℃ 下进行一个晚上的自动放射自显影。

显影结果表明在上述实施例 1 (3) 得到的 63 个新基因内由于 LPS 刺激其表达被诱导的基因有 3 个。3 个新基因 (NLG-1-1、NLG-1-2 和 NLG-2) 的 RNA 印迹法的结果如图 1 所示。在图 1 中记号「+」指的是「LPS 刺激」，而记号「-」指的是「LPS 未刺激」，「Origin」指的是「泳动起始点」。3 个新基因 (NLG-1-1、NLG-1-2 和 NLG-2) 的 mRNA 的长度大约分别是 2.3kb、2.3kb、和 0.7kb。

另外对组织特异性研究的结果就象图 2 所示那样, 基因 NLG-1-1 和基因 NLG-1-2 在研究的所有组织[即脾脏(带 1)、胸腺(带 2)、前列腺(带 3)、精巢(带 4)、卵巢(带 5)、小肠(带 6)、大肠(带 7)和外周血淋巴细胞(带 8)]中虽然弱但都表达, 与此相反基因 NLG-2 只在精巢(带 4)和大肠(带 7)中明显表达, 而在其它组织看不到表达。

(5) 全碱基序列的确定

3 个新基因 (NLG-1-1、NLG-1-2 和 NLG-2) 全碱基序列根据常规方法确定。

10 基因 NLG-1-1 和基因 NLG-1-2 分别由 2180bp 和 1970bp 组成, 其具体的碱基序列分别为序列表中序列号 1 和序列号 3 表示的碱基序列。基因 NLG-1-1 和基因 NLG-1-2 同源性的检索结果表明基因 NLG-1-1 的第 193 位~第 2139 位的碱基序列与基因 NLG-1-2 的第 9 位~第 1955 位的碱基序列完全相同。这可以想象为通过有选择地剪接 (alternative splicing), 2 种 mRNA 是从一个染色体基因转录的。15 基因 NLG-1-1 编码由含有序列表中序列号 2 表示的氨基酸序列的 481 个氨基酸残基组成的蛋白质。而基因 NLG-1-2 编码由含有序列表中序列号 4 表示的氨基酸序列的 390 个氨基酸残基组成的蛋白质。

而基因 NLG-2 由 652bp 构成, 其具体的碱基序列是序列表中序列号 5 表示的碱基序列。另外基因 NLG-2 编码由含有序列表中序列号 6 表示的氨基酸序列的 83 个氨基酸残基组成的蛋白质。20

实施例 2: 基因 NLG-1-1 和基因 NLG-2 在动物细胞中的表达

在本实施例中作为动物细胞使用 COS-1 (大日本制药; 日本国大阪府吹田市), 作为载体使用 pQB125-fN3rsGFP 载体 (Quantum biotechnologies; 加拿大魁北克州蒙特利尔市), 按照以下给出的过程使基因 NLG-1-1 和基因 NLG-2 表达。如果使用上述载体, 由于25 可以作为与绿色荧光蛋白 (GFP) 融合的融合蛋白质表达目的基因, 所以通过对绿色荧光进行跟踪可以观察目的基因的分布。

30 基因 NLG-1-1 和基因 NLG-2 的各个 cDNA 通过逆转录 PCR (RT-PCR) 按照以下给出的过程进行制备。即从 LPS 刺激 3 小时的人外周血单核细胞 (PBMC) 制备 mRNA, 将使用市售的 cDNA 合成试剂盒 (SMART

PCR cDNA syhthesis kit; Clontech 公司; 美国加利福尼亚州帕泊阿尔托) 从该 mRNA 合成的 cDNA 作为模板使用。

作为引物使用由序列:

5' -CACGGATCCATTCTTCGCTGAAGTCATCATGAG
5 C-3' (序列号 7)

构成的 NLG-2 正向引物、由序列:

5' -GTGGAATTCTTTGGTCAACCCTTTGGACATTTTG
C-3' (序列号 8)

NLG-2 反向引物、由序列:

10 5' -CACGGATCCTTCTTTACAACGAAATGATGCTCA
AG-3' (序列号 9)

构成的 NLG-1-1 正向引物以及、由序列:

5' -GTGGAATTCGGAGAGATTTGTGATAGAATTATT
ACATGC-3' (序列号 10)

15 构成的 NLG-1-1 反向引物。

PCR 使用市售的 PCR 用试剂 (Advantage cDNA polymerase Mix; Clontech 公司), 每一循环由变性步骤 (94°C, 30 秒)、退火过程和延伸过程 (68°C, 2 分钟) 构成, 反复进行 30 个循环。

20 得到的 PCR 产物经限制酶 BamHI (宝酒造; 日本国东京都中央区) 和限制酶 EcoRI (宝酒造) 消化后, 使用市售的试剂盒 (DNA ligation kit Ver. 2; 宝酒造) 与 pQBI 25-fN3rsGFP 载体连接进行克隆, 用于以下实验。

25 在基因导入的前一天, 将 COS-1 细胞加到 6 孔板中 (1×10^6 细胞/孔)。这时将预先经高压灭菌锅灭菌的盖玻片放置在上述 6 孔板的各个孔中, 于上述盖玻片的上面进行细胞培养。第二天使用市售的转移用试剂 (LipofectAMINE reagent; Gibco BRL; 美国马里兰 Rockville) 将先前得到的载体导入 COS-1 细胞。导入 3 日后用含有 4% (v/v) 甲醛的 PBS 将盖玻片上的细胞固定 30 分钟, 用含有 20% (v/v) 屈立通 X-100 的 PBS 处理 30 分钟, 再用含有 20% (v/v) 正
30 常山羊血清 (Vector Laboratories; 美国加利福尼亚州 Burlingame) 的 PBS 处理 30 分钟。

在线粒体的染色中使用抗细胞色素 c 抗体 (Santa Cruz

Biotechnology; 美国加利福尼亚州 Santa Cruz) 和德克萨斯红 (Texas Red) 标记抗兔 IgG 抗体 (Vector Laboratories), 在内质网的染色中使用抗 (肌) 钙网蛋白抗体 (Upstate Biotechnology; 美国纽约州 Lake Placid) 和德克萨斯红 (Texas Red) 标记抗兔 IgG 抗体 (Vector Laboratories), 在高尔基体的染色中使用抗高尔基体 58K 蛋白质抗体 (Sigma; 美国密苏里州圣路易斯) 和德克萨斯红 (Texas Red) 标记抗鼠 IgG 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories; 美国马里兰州 Gaithersburg), 分别进行免疫染色。

在核的染色中使用碘化丙锭 (propidium iodide; 和光纯药工业; 日本国大阪府大阪市), 在细胞质的染色中使用 hydroethidine (Polysciences; 美国宾夕法尼亚州 Warrington)。

将盖玻片安装到载玻片上后, 用共聚焦激光扫描显微镜 FV500 (Olympus; 日本国东京都千代田区) 进行观察。图 3 给出了使基因 NLG-1-1 表达的 COS-1 细胞的状态, 图 4 给出了使基因 NLG-2 表达的 COS-1 细胞的状态。在图 3 和图 4 中 A 是表示基因 NLG-1-1 或基因 NLG-2 编码的蛋白质和 GFP 的融合蛋白质的表达状态的绿色荧光图像, 而 B 是对线粒体进行染色的红色荧光图像, C 是将上述 A 荧光图像和上述 B 的荧光图像重合在一起的图像, D 是微分干涉图像。

就象图 3A 表示的那样, 在核的周围可观察到基因 NLG-1-1 的表达。而图 3A 中的绿色荧光图像和图 3B 的红色荧光图像 (对线粒体就象染色的荧光图像) 非常一致, 荧光图像一致时在图 3C 中观察到黄色。另外对内质网进行染色的荧光图像、对高尔基体进行染色的荧光图像、核的染色图像, 或细胞质的染色图像中的无论哪一个图像都与图 3A 中的绿色荧光图像不一致。因此可以判明基因 NLG-1-1 编码的蛋白质分布于线粒体。

另外就象图 4 所表明的那样, 可以判明基因 NLG-2 编码的蛋白质也和基因 NLG-1-1 编码的蛋白质一样分布于线粒体。

实施例 3: 基因 NLG-1-1 的染色体座位的确定

通过 FISH (荧光 in situ 杂交) 解析 [Chromosoma., 102, 325-332 (1993)] 确定基因 NLG-1-1 的染色体座位时发现它存在于 13 号染色体的长臂 22 (13q22)。结果如图 5 所示。在图 5 中, A 是 DAPI (4', 6

-二脒基-2-苯基吡啶)染色的结果, B 是 FISH 信号的结果。图 5A 中的箭头表示基因 NLG-1-1 的染色体部位, 图 5B 中的数字「13」表示第 13 号染色体。

- 5 实施例 4: 在败血病患者中基因 NLG-1-1、NLG-1-2 和 NLG-2 表达的确证

将从 4 名健康人和 4 名败血病患者分别采集 20mL 血作为起始材料, 按照上述实施例 1 (1) 记载的顺序制备外周血单核细胞, 再从上述外周血单核细胞分别制备约 20 μ g 的总 RNA。

- 10 使用各个 RNA 10 μ g 按照上述实施例 1 (4) 记载的顺序实施 RNA 印迹。结果如图 6 所示。在图 6 中, (A) 表示使用基因 NLG-1-1 作为探针时的结果, 以下同样, (B) 表示使用基因 NLG-1-2 作为探针, 而 (C) 表示使用 NLG-2 作为探针时的结果。而在图 6 中, 带 1~4 表示来自健康人的 RNA 的结果, 带 5~8 表示来自败血病患者的 RNA 的结果。

- 15 就象图 6 所表示的那样, 本发明的 3 种新基因 (NLG-1-1、NLG-1-2 和 NLG-2) 的表达在 4 名健康人都看不到, 但在 4 名败血病患者中却表现非常明显。通过对本发明的这些基因的表达进行分析, 从这些结果可以确认这些基因可以用于细菌感染症的诊断、或治疗
- 20 后病况的判定。

产业上利用的可能性

- 已知由 LPS 刺激引起的生命现象与发炎时的现象同样。事实上在发炎时起主要作用的巨噬细胞中 LPS 刺激特异诱导表达的基因群中包括炎性细胞因子 (TNF, IL-1、IL-6、IL-18)、趋化因子 (IL-8、MCP)、作为炎性疾病的慢性风湿性关节的发炎部位引起产生异常的胶原等分泌性蛋白质、作为细胞内蛋白质引起炎症的产生 NO (一氧化氮) 的 NO 合成酶、产生前列腺素的环加氧酶 (COXII), 而且包括与炎性蛋白质基因的表达有关的基因转录因子 NF-kB 等几乎所有的炎性疾病起因蛋白质基因。

- 30 有关针对这些蛋白质的抑制剂作为抗炎药物的临床开发正在深入进行, 很多处于临床实验中。例如抗 TNF 抗体或 NO 合成酶抑制剂已经作为炎性疾病的治疗药使用了。另外胶原酶抑制剂作为癌转移抑制

剂，COXII 抑制剂作为治疗癌症药都分别处于临床开发中。从这些结果中可以认为通过 LPS 诱导表达的本发明的新基因及其蛋白质也都极有可能与炎症性疾病、变态反应或癌的发生和/或进展有关系。

5 本发明的第 1 和第 2 种新蛋白质有可能与 LPS 的细胞内信息传递系统有关。而本发明的第 3 种新蛋白质有可能与细胞内电子传递和/或自由基产生有关。因此这些蛋白质与以往的消炎药开发的目标不同，上述蛋白质的抑制剂有可能成为新型消炎药。利用逆转录 PCR (RT-PCR) 法、RNA 印迹法、点渍法、或 DNA 微点阵 (microarray)，通过对来自人的临床样品中的上述蛋白质基因的表达的研究，也许可以
10 用于炎症、变态反应、或癌的诊断中。或者使用上述蛋白质的抗体也许可以进行炎症、变态反应、或癌的诊断。另外上述蛋白质基因的反义 DNA 也有可能用于炎症、变态反应、或癌的治疗 (包括基因治疗)。

通过本发明的探针或本发明的抗体可以进行细菌感染症 (例如败血病、肺炎、尿路感染症、骨髓炎、或中耳炎) 的诊断。本发明蛋白质
15 在制备本发明抗体时是有用的，本发明的新基因、本发明的质粒、以及本发明的转化体在制备本发明的蛋白质中是有用的。

以上按照特定模式对本发明进行了说明，但本领域技术人员都清楚的变形和改良都包括在本发明的范围内。

<110> 吴羽化学工业株式会社

5 <120> 新蛋白质以及编码该蛋白的基因

<130> KRH-647

<150> JP 2000-042933

10 <151> 2000-02-21

<160> 10

<210> 1

15 <211> 2180

<212> DNA

<213> 人类

<220>

20 <221> CDS

<222> (37)..(1482)

<400> 1

ggcacgagct gaactgaacc tcttctttac aacgaa atg atg ctc aag tct atc 54

25 Met Met Leu Lys Ser Ile

1 5

aca gaa agc ttt gcc aca gca atc cat ggc ttg aaa gtg gga cac ctg 102

Thr Glu Ser Phe Ala Thr Ala Ile His Gly Leu Lys Val Gly His Leu

30 10 15 20

aca gat cgt gtt att cag agg agc aag agg atg att cta gac act ctg 150

Thr Asp Arg Val Ile Gln Arg Ser Lys Arg Met Ile Leu Asp Thr Leu

25 30 35

35 ggt gct ggg ttc ctg gga acc act acg gaa gtg ttt cac ata gcc agc 198

Gly Ala Gly Phe Leu Gly Thr Thr Thr Glu Val Phe His Ile Ala Ser

40 45 50

	Met	Ala	Asn	Ala	Ala	Thr	Gln	Thr	Lys	Pro	Leu	His	Ile	Gly	Asn	Ala	
	200						205					210					
	gcc aag cat ggg ata gaa gct gca ttt ttg gca atg ttg ggt ctc caa																726
5	Ala	Lys	His	Gly	Ile	Glu	Ala	Ala	Phe	Leu	Ala	Met	Leu	Gly	Leu	Gln	
	215					220				225						230	
	gga aac aag cag gtc ttg gac ttg gag gca gga ttt ggg gcc ttt tat																774
10	Gly	Asn	Lys	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Gly	Ala	Phe	Tyr	
					235					240						245	
	gcc aac tat tcc cca aaa gtc ctt cca agc ata gct tcc tac agt tgg																822
	Ala	Asn	Tyr	Ser	Pro	Lys	Val	Leu	Pro	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ser	Trp	
				250					255						260		
15	ctg ctg gac cag cag gac gtg gcc ttt aag cgt ttt cct gca cat tta																870
	Leu	Leu	Asp	Gln	Gln	Asp	Val	Ala	Phe	Lys	Arg	Phe	Pro	Ala	His	Leu	
				265					270						275		
	tct acc cac tgg gtg gca gac gca gct gca tct gtg aga aag cac ctt																918
20	Ser	Thr	His	Trp	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	Arg	Lys	His	Leu	
				280					285						290		
	gta gca gag aga gcc ctg ctt cca act gac tac att aag aga att gtg																966
25	Val	Ala	Glu	Arg	Ala	Leu	Leu	Pro	Thr	Asp	Tyr	Ile	Lys	Arg	Ile	Val	
	295					300					305					310	
	ctc agg ata cca aat gtc cag tat gta aac agg ccc ttt cca gtt tog																1014
30	Leu	Arg	Ile	Pro	Asn	Val	Gln	Tyr	Val	Asn	Arg	Pro	Phe	Pro	Val	Ser	
					315					320						325	
	gag cat gaa gcc cgt cat tca ttc cag tat gtg gcc tgt gcc atg ctg																1062
	Glu	His	Glu	Ala	Arg	His	Ser	Phe	Gln	Tyr	Val	Ala	Cys	Ala	Met	Leu	
				330					335						340		
35	ctt gat ggt ggc atc act gtc ccc tca ttc cat gaa tgc cag atc aac																1110
	Leu	Asp	Gly	Gly	Ile	Thr	Val	Pro	Ser	Phe	His	Glu	Cys	Gln	Ile	Asn	
				345					350						355		

agg cca cag gtg aga gag ctg ctc agt aag gtg gag ctg gag tac cct 1158
 Arg Pro Gln Val Arg Glu Leu Leu Ser Lys Val Glu Leu Glu Tyr Pro
 360 365 370

5

ccg gac aac ttg cca agc ttc aac ata ctg tac tgt gaa ata agt gtc 1206
 Pro Asp Asn Leu Pro Ser Phe Asn Ile Leu Tyr Cys Glu Ile Ser Val
 375 380 385 390

10

acc ctc aag gat gga gcc acc ttc aca gat cgc tct gat acc ttc tat 1254
 Thr Leu Lys Asp Gly Ala Thr Phe Thr Asp Arg Ser Asp Thr Phe Tyr
 395 400 405

15

ggg cac tgg aga aaa cca ctg agc cag gag gac cta gag gaa aag ttc 1302
 Gly His Trp Arg Lys Pro Leu Ser Gln Glu Asp Leu Glu Glu Lys Phe
 410 415 420

20

aga gcc aat gcc tcc aag atg ctg tcc tgg gac aca gtg gaa agc ctt 1350
 Arg Ala Asn Ala Ser Lys Met Leu Ser Trp Asp Thr Val Glu Ser Leu
 425 430 435

25

ata aag ata gtc aaa aat cta gaa gac cta gaa gac tgt tct gtg tta 1398
 Ile Lys Ile Val Lys Asn Leu Glu Asp Leu Glu Asp Cys Ser Val Leu
 440 445 450

30

act aca ctt ctc aaa gga ccc tct cca cca gag gta gct tca aac tct 1446
 Thr Thr Leu Leu Lys Gly Pro Ser Pro Pro Glu Val Ala Ser Asn Ser
 455 460 465 470

35

cca gca tgt aat aat tct atc aca aat ctc tcc tgaggcttac caacatctaa 1499
 Pro Ala Cys Asn Asn Ser Ile Thr Asn Leu Ser
 475 480

atgactttgc atttggggag attcaatgat ttggtttgta aagcaagggt ctgctgcttg 1559

gttttccag gaaaaatgaa caaagatgga gagagtccag aaacagaact acatatatct 1619

ggaaggagoc ttctcctgaa aattttgcag gacagttcca cttacctaaa tcaagatgaa 1679

acacacacac aaaaatgagt ttgtaagcat tcacaagggt gaaattcaac tcacctgtga 1739
 tttacttata aaattaatct cttcatagga attatgtgtg gacttcatga gcctcaaggt 1799
 5 tttagaggga tgtgaacctg catgtatatt ttctgacagt ggagagggct ctggtgcatt 1859
 gtgtcaccaa cagatctcct agaccatggc ttattaccaa gccctccaca gtgcaagggg 1919
 10 tgctactggg gaatgggtgg gtttaaattc tgctctgcc attcactaga tgtagccttg 1979
 agcatgttac cattagccct ctgcctcagt ttccctatit gtcaagccga agtaaaaagc 2039
 agtctggaaa aatcgcattt tggctctaga acccatggtc ttaagcactg caatatatca 2099
 15 cctttcagta taaaaatatt tgaatcagag ttgcaataaa gaatgaaaag gaaaaaagag 2159
 aagtaaaaaa aaaaaaaaaa a 2180
 20
 <210> 2
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> 人类
 25
 <400> 2
 Met Met Leu Lys Ser Ile Thr Glu Ser Phe Ala Thr Ala Ile His Gly
 1 5 10 15
 30 Leu Lys Val Gly His Leu Thr Asp Arg Val Ile Gln Arg Ser Lys Arg
 20 25 30
 Met Ile Leu Asp Thr Leu Gly Ala Gly Phe Leu Gly Thr Thr Thr Glu
 35 40 45
 Val Phe His Ile Ala Ser Gln Tyr Ser Lys Ile Tyr Ser Ser Asn Ile
 50 55 60

Ser Ser Thr Val Trp Gly Gln Pro Asp Ile Arg Leu Pro Pro Thr Tyr
 65 70 75 80

Ala Ala Phe Val Asn Gly Val Ala Ile His Ser Met Asp Phe Asp Asp
 5 85 90 95

Thr Trp His Pro Ala Thr His Pro Ser Gly Ala Val Leu Pro Val Leu
 100 105 110

Thr Ala Leu Ala Glu Ala Leu Pro Arg Ser Pro Lys Phe Ser Gly Leu
 10 115 120 125

Asp Leu Leu Leu Ala Phe Asn Val Gly Ile Glu Val Gln Gly Arg Leu
 130 135 140

15 Leu His Phe Ala Lys Glu Ala Asn Asp Met Pro Lys Arg Phe His Pro
 145 150 155 160

Pro Ser Val Val Gly Thr Leu Gly Ser Ala Ala Ala Ala Ser Lys Phe
 20 165 170 175

Leu Gly Leu Ser Ser Thr Lys Cys Arg Glu Ala Leu Ala Ile Ala Val
 180 185 190

25 Ser His Ala Gly Ala Pro Met Ala Asn Ala Ala Thr Gln Thr Lys Pro
 195 200 205

Leu His Ile Gly Asn Ala Ala Lys His Gly Ile Glu Ala Ala Phe Leu
 210 215 220

30 Ala Met Leu Gly Leu Gln Gly Asn Lys Gln Val Leu Asp Leu Glu Ala
 225 230 235 240

Gly Phe Gly Ala Phe Tyr Ala Asn Tyr Ser Pro Lys Val Leu Pro Ser
 35 245 250 255

Ile Ala Ser Tyr Ser Trp Leu Leu Asp Gln Gln Asp Val Ala Phe Lys
 260 265 270

Arg Phe Pro Ala His Leu Ser Thr His Trp Val Ala Asp Ala Ala Ala
 275 280 285

5 Ser Val Arg Lys His Leu Val Ala Glu Arg Ala Leu Leu Pro Thr Asp
 290 295 300

Tyr Ile Lys Arg Ile Val Leu Arg Ile Pro Asn Val Gln Tyr Val Asn
 305 310 315 320

10 Arg Pro Phe Pro Val Ser Glu His Glu Ala Arg His Ser Phe Gln Tyr
 325 330 335

Val Ala Cys Ala Met Leu Leu Asp Gly Gly Ile Thr Val Pro Ser Phe
 15 340 345 350

His Glu Cys Gln Ile Asn Arg Pro Gln Val Arg Glu Leu Leu Ser Lys
 355 360 365

20 Val Glu Leu Glu Tyr Pro Pro Asp Asn Leu Pro Ser Phe Asn Ile Leu
 370 375 380

Tyr Cys Glu Ile Ser Val Thr Leu Lys Asp Gly Ala Thr Phe Thr Asp
 385 390 395 400

25 Arg Ser Asp Thr Phe Tyr Gly His Trp Arg Lys Pro Leu Ser Gln Glu
 405 410 415

Asp Leu Glu Glu Lys Phe Arg Ala Asn Ala Ser Lys Met Leu Ser Trp
 30 420 425 430

Asp Thr Val Glu Ser Leu Ile Lys Ile Val Lys Asn Leu Glu Asp Leu
 435 440 445

35 Glu Asp Cys Ser Val Leu Thr Thr Leu Leu Lys Gly Pro Ser Pro Pro
 450 455 460

Glu Val Ala Ser Asn Ser Pro Ala Cys Asn Asn Ser Ile Thr Asn Leu

	gct gct gca tcc aag ttt tta gga ctt agc tcg aca aag tgc cga gaa	410
	Ala Ala Ala Ser Lys Phe Leu Gly Leu Ser Ser Thr Lys Cys Arg Glu	
	80 85 90 95	
5		
	gct ctg gcc att gct gtt tcc cat gct ggg gca ccc atg gcc aat gct	458
	Ala Leu Ala Ile Ala Val Ser His Ala Gly Ala Pro Met Ala Asn Ala	
	100 105 110	
10		
	gcc acc cag acc aag ccc ctc cac att ggc aat gct gcc aag cat ggg	506
	Ala Thr Gln Thr Lys Pro Leu His Ile Gly Asn Ala Ala Lys His Gly	
	115 120 125	
15		
	ata gaa gct goa ttt ttg gca atg ttg ggt ctc caa gga aac aag cag	554
	Ile Glu Ala Ala Phe Leu Ala Met Leu Gly Leu Gln Gly Asn Lys Gln	
	130 135 140	
20		
	gtc ttg gac ttg gag gca gga ttt ggg gcc ttt tat gcc aac tat tcc	602
	Val Leu Asp Leu Glu Ala Gly Phe Gly Ala Phe Tyr Ala Asn Tyr Ser	
	145 150 155	
25		
	cca aaa gtc ctt cca agc ata gct tcc tac agt tgg ctg ctg gac cag	650
	Pro Lys Val Leu Pro Ser Ile Ala Ser Tyr Ser Trp Leu Leu Asp Gln	
	160 165 170 175	
30		
	cag gac gtg gcc ttt aag cgt ttt cct gca cat tta tct acc cac tgg	698
	Gln Asp Val Ala Phe Lys Arg Phe Pro Ala His Leu Ser Thr His Trp	
	180 185 190	
35		
	gtg gca gac gca gct gca tct gtg aga aag cac ctt gta gca gag aga	746
	Val Ala Asp Ala Ala Ala Ser Val Arg Lys His Leu Val Ala Glu Arg	
	195 200 205	
40		
	gcc ctg ctt cca act gac tac att aag aga att gtg ctc agg ata cca	794
	Ala Leu Leu Pro Thr Asp Tyr Ile Lys Arg Ile Val Leu Arg Ile Pro	
	210 215 220	
45		
	aat gtc cag tat gta aac agg ccc ttt cca gtt tcg gag cat gaa gcc	842

	Asn Val Gln Tyr Val Asn Arg Pro Phe Pro Val Ser Glu His Glu Ala	
	225	230 235
	cgt cat tca ttc cag tat gtg gcc tgt gcc atg ctg ctt gat ggt ggc	890
5	Arg His Ser Phe Gln Tyr Val Ala Cys Ala Met Leu Leu Asp Gly Gly	
	240	245 250 255
	atc act gtc ccc tca ttc cat gaa tgc cag atc aac agg cca cag gtg	938
10	Ile Thr Val Pro Ser Phe His Glu Cys Gln Ile Asn Arg Pro Gln Val	
	260	265 270
	aga gag ctg ctc agt aag gtg gag ctg gag tac cct ccg gac aac ttg	986
15	Arg Glu Leu Leu Ser Lys Val Glu Leu Glu Tyr Pro Pro Asp Asn Leu	
	275	280 285
	cca agc ttc aac ata ctg tac tgt gaa ata agt gtc acc ctc aag gat	1034
20	Pro Ser Phe Asn Ile Leu Tyr Cys Glu Ile Ser Val Thr Leu Lys Asp	
	290	295 300
	gga gcc acc ttc aca gat cgc tct gat acc ttc tat ggg cac tgg aga	1082
25	Gly Ala Thr Phe Thr Asp Arg Ser Asp Thr Phe Tyr Gly His Trp Arg	
	305	310 315
	aaa cca ctg agc cag gag gac cta gag gaa aag ttc aga gcc aat gcc	1130
30	Lys Pro Leu Ser Gln Glu Asp Leu Glu Glu Lys Phe Arg Ala Asn Ala	
	320	325 330 335
	tcc aag atg ctg tcc tgg gac aca gtg gaa agc ctt ata aag ata gtc	1178
35	Ser Lys Met Leu Ser Trp Asp Thr Val Glu Ser Leu Ile Lys Ile Val	
	340	345 350
	aaa aat cta gaa gac cta gaa gac tgt tct gtg tta act aca ctt ctc	1226
40	Lys Asn Leu Glu Asp Leu Glu Asp Cys Ser Val Leu Thr Thr Leu Leu	
	355	360 365
	aaa gga ccc tct cca cca gag gta gct tca aac tct cca gca tgt aat	1274
45	Lys Gly Pro Ser Pro Pro Glu Val Ala Ser Asn Ser Pro Ala Cys Asn	
	370	375 380

aat tct atc aca aat ctc tcc tgaggcttac caacatctaa atgactttgc 1325
 Asn Ser Ile Thr Asn Leu Ser
 385 390

5

atttggggag attcaatgat ttggtttgta aagcaagggt ctgctgcttg gttttcccag 1385
 gaaaaatgaa caaagatgga gagagtccag aacagaact acatatatct ggaaggagcc 1445

10

ttctcctgaa aattttgcag gacagttcca cttacctaaa tcaagatgaa acacacacac 1505
 aaaaatgagt ttgtaagcat tcacaagggt gaaattcaac tcacctgtga tttacttata 1565
 aaattaatct cttcatagga attatgtgtg gacttcatga gcctcaagggt tttagaggga 1625

15

tgtgaacctg catgtatatt ttctgacagt ggagagggt ctggtgcatt gtgtcaccaa 1685
 cagatctcct agaccatggc ttattaccaa gccctccaca gtgcaagggg tgctactggg 1745

20

gaatgggtgg gtttaaacc tgcctctgcc attcactaga tgtagccttg agcatgttac 1805
 cattagccct ctgcctcagt ttccctatct gtcaagccga agtaaaaagc agtctggaaa 1865
 aatcgcattt tggctctaga acccatggtc ttaagcactg caatatatca cttttcagta 1925

25

taaaaatatt tgaatcagag ttgcaataaa aaaaaaaaaa aaaaa 1970

<210> 4
 30 <211> 390
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 4
 35 Met Asp Phe Asp Asp Thr Trp His Pro Ala Thr His Pro Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Leu Pro Val Leu Thr Ala Leu Ala Glu Ala Leu Pro Arg Ser Pro

			20					25				30				
	Lys	Phe	Ser	Gly	Leu	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Asn	Val	Gly	Ile	Glu
			35					40					45			
5	Val	Gln	Gly	Arg	Leu	Leu	His	Phe	Ala	Lys	Glu	Ala	Asn	Asp	Met	Pro
			50					55					60			
	Lys	Arg	Phe	His	Pro	Pro	Ser	Val	Val	Gly	Thr	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala
10	65						70					75				80
	Ala	Ala	Ser	Lys	Phe	Leu	Gly	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys	Cys	Arg	Glu	Ala
							85									95
15	Leu	Ala	Ile	Ala	Val	Ser	His	Ala	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Ala	Ala
							100									110
	Thr	Gln	Thr	Lys	Pro	Leu	His	Ile	Gly	Asn	Ala	Ala	Lys	His	Gly	Ile
							115									125
20	Glu	Ala	Ala	Phe	Leu	Ala	Met	Leu	Gly	Leu	Gln	Gly	Asn	Lys	Gln	Val
							130									140
	Leu	Asp	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Gly	Ala	Phe	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ser	Pro
25	145						150							155		160
	Lys	Val	Leu	Pro	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ser	Trp	Leu	Leu	Asp	Gln	Gln
							165									175
30	Asp	Val	Ala	Phe	Lys	Arg	Phe	Pro	Ala	His	Leu	Ser	Thr	His	Trp	Val
							180									190
	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	Arg	Lys	His	Leu	Val	Ala	Glu	Arg	Ala
							195									205
35	Leu	Leu	Pro	Thr	Asp	Tyr	Ile	Lys	Arg	Ile	Val	Leu	Arg	Ile	Pro	Asn
							210									220

Val Gln Tyr Val Asn Arg Pro Phe Pro Val Ser Glu His Glu Ala Arg
 225 230 235 240

5 His Ser Phe Gln Tyr Val Ala Cys Ala Met Leu Leu Asp Gly Gly Ile
 245 250 255

Thr Val Pro Ser Phe His Glu Cys Gln Ile Asn Arg Pro Gln Val Arg
 260 265 270

10 Glu Leu Leu Ser Lys Val Glu Leu Glu Tyr Pro Pro Asp Asn Leu Pro
 275 280 285

Ser Phe Asn Ile Leu Tyr Cys Glu Ile Ser Val Thr Leu Lys Asp Gly
 290 295 300

15 Ala Thr Phe Thr Asp Arg Ser Asp Thr Phe Tyr Gly His Trp Arg Lys
 305 310 315 320

Pro Leu Ser Gln Glu Asp Leu Glu Glu Lys Phe Arg Ala Asn Ala Ser
 20 325 330 335

Lys Met Leu Ser Trp Asp Thr Val Glu Ser Leu Ile Lys Ile Val Lys
 340 345 350

25 Asn Leu Glu Asp Leu Glu Asp Cys Ser Val Leu Thr Thr Leu Leu Lys
 355 360 365

Gly Pro Ser Pro Pro Glu Val Ala Ser Asn Ser Pro Ala Cys Asn Asn
 370 375 380

30 Ser Ile Thr Asn Leu Ser
 385 390

35 <210> 5
 <211> 652
 <212> DNA
 <213> 人类

ttttgtttat gatctatgaa tgttttttctt aaaatttaca aagctttgta aattagattt 594
 tctttaataa aatgccattt gtgcaagatt tctcaaagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 652
 5
 <210> 6
 <211> 83
 <212> PRT
 10 <213> 人类

 <400> 6
 Met Ser Phe Phe Gln Leu Leu Met Lys Arg Lys Glu Leu Ile Pro Leu
 1 5 10 15
 15
 Val Val Phe Met Thr Val Ala Ala Gly Gly Ala Ser Ser Phe Ala Val
 20 25 30
 Tyr Ser Leu Trp Lys Thr Asp Val Ile Leu Asp Arg Lys Lys Asn Pro
 20 35 40 45
 Glu Pro Trp Glu Thr Val Asp Pro Thr Val Pro Gln Lys Leu Ile Thr
 50 55 60
 25 Ile Asn Gln Gln Trp Lys Pro Ile Glu Glu Leu Gln Asn Val Gln Arg
 65 70 75 80
 Val Thr Lys
 30
 <210> 7
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 35
 <220>
 <223> 人工序列: NLG-2 正向引物

	<400> 7		
	cacgatcca ttcttcgctg aagtcacat gagg		34
5	<210> 8		
	<211> 34		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
10	<220>		
	<223> 人工序列: NLG-2 反向引物		
	<400> 8		
	gtggaattct ttggcacc tttggacatt ttgc		34
15			
	<210> 9		
	<211> 35		
	<212> DNA		
20	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列: NLG-1-1 正向引物		
25	<400> 9		
	cacgatcct totttacaac gaaatgatgc tcaag		35
	<210> 10		
30	<211> 39		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
35	<223> 人工序列: NLG-1-1 反向引物		
	<400> 10		
	gtggaattcg gagagatttg tgatagaatt attacatgc		39

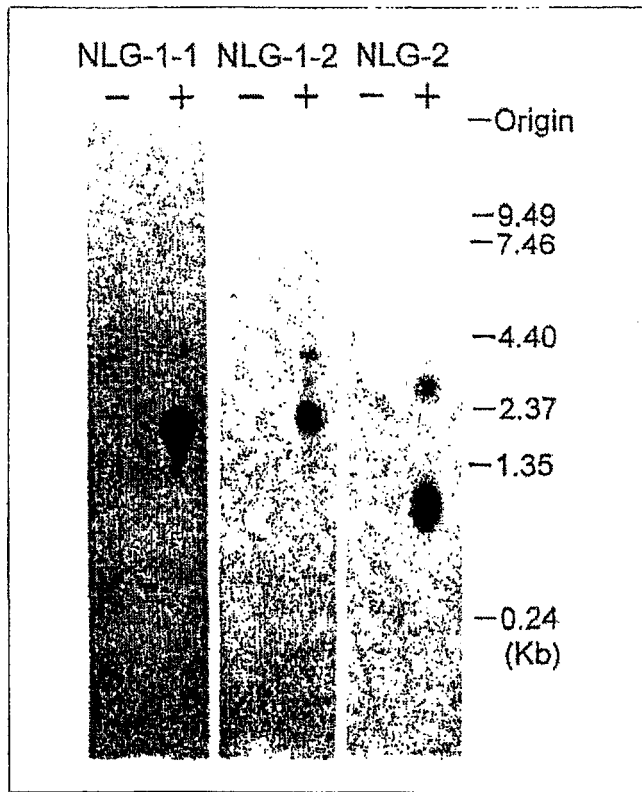


图 1

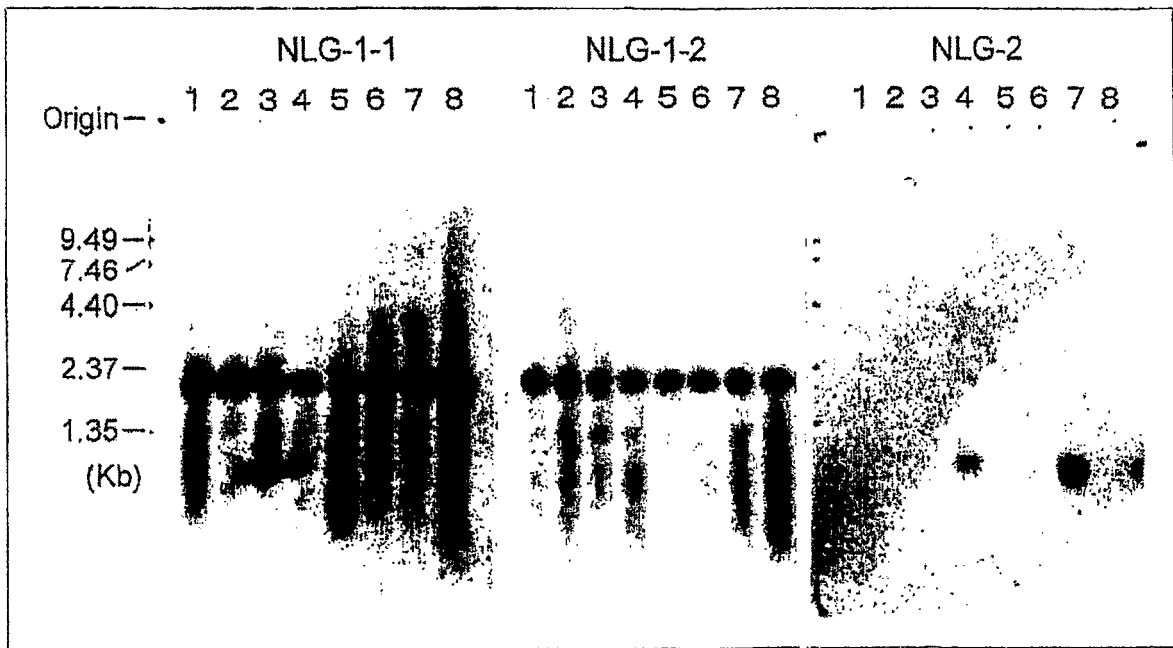
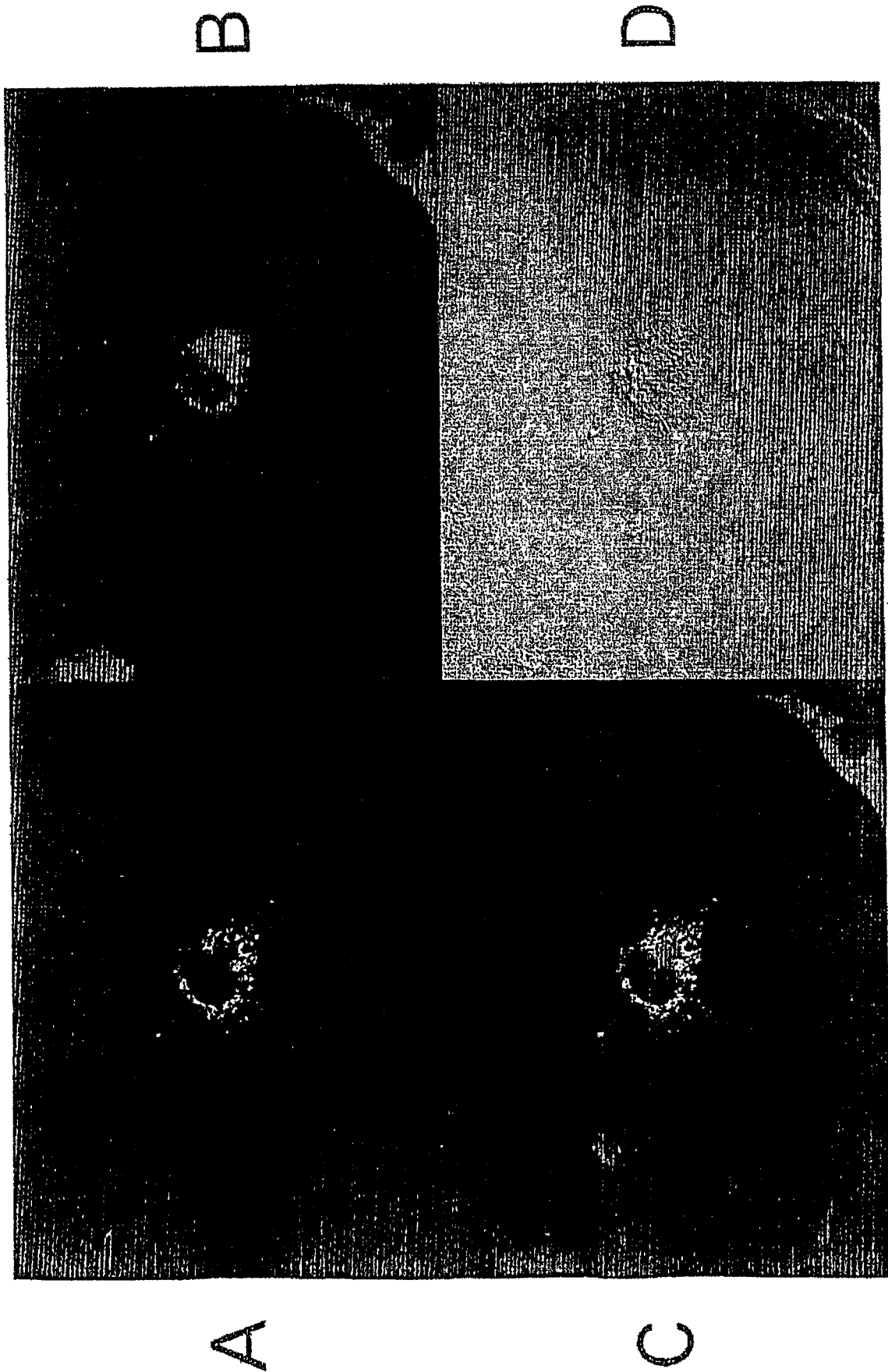


图 2



3
图

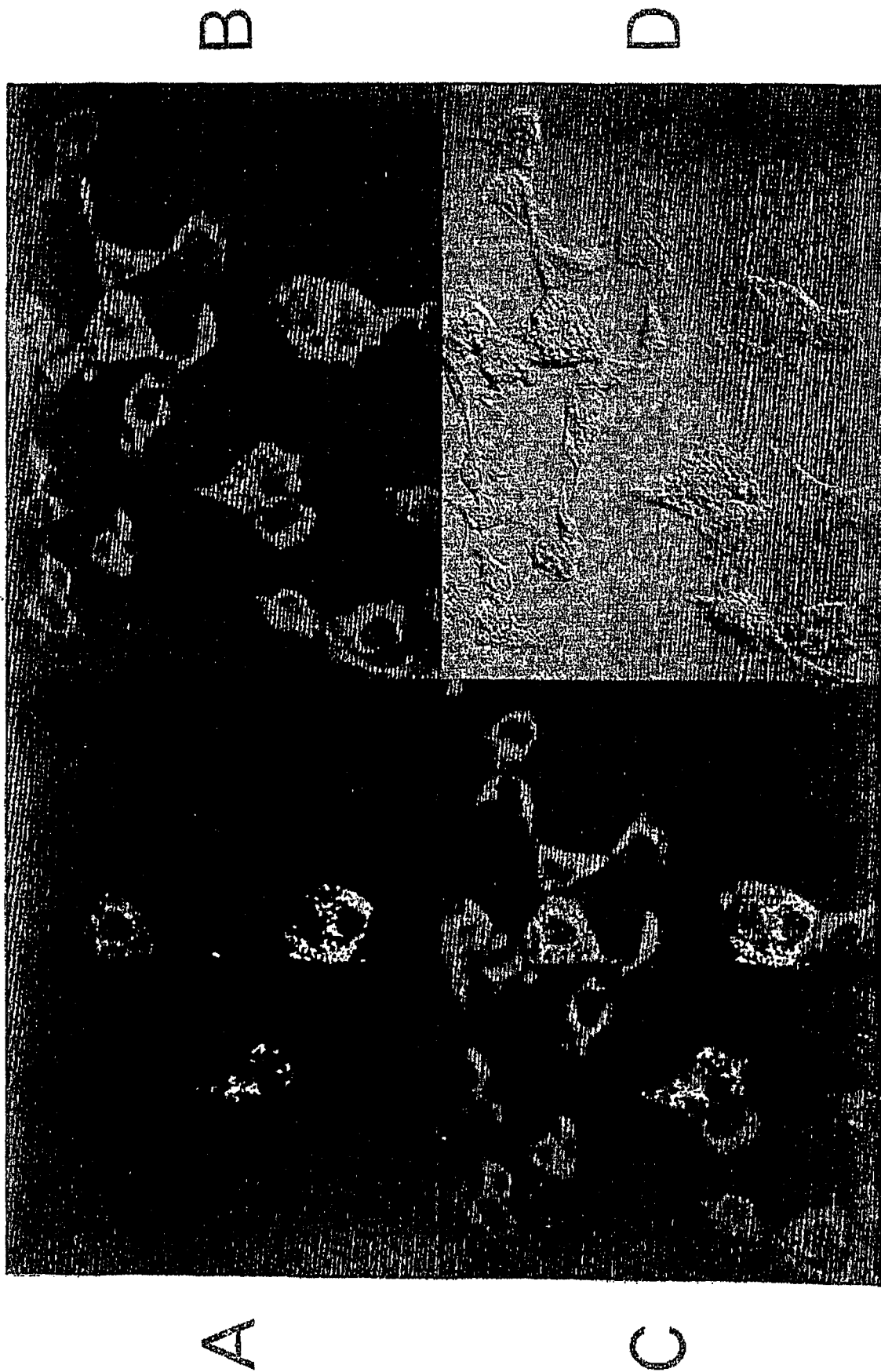
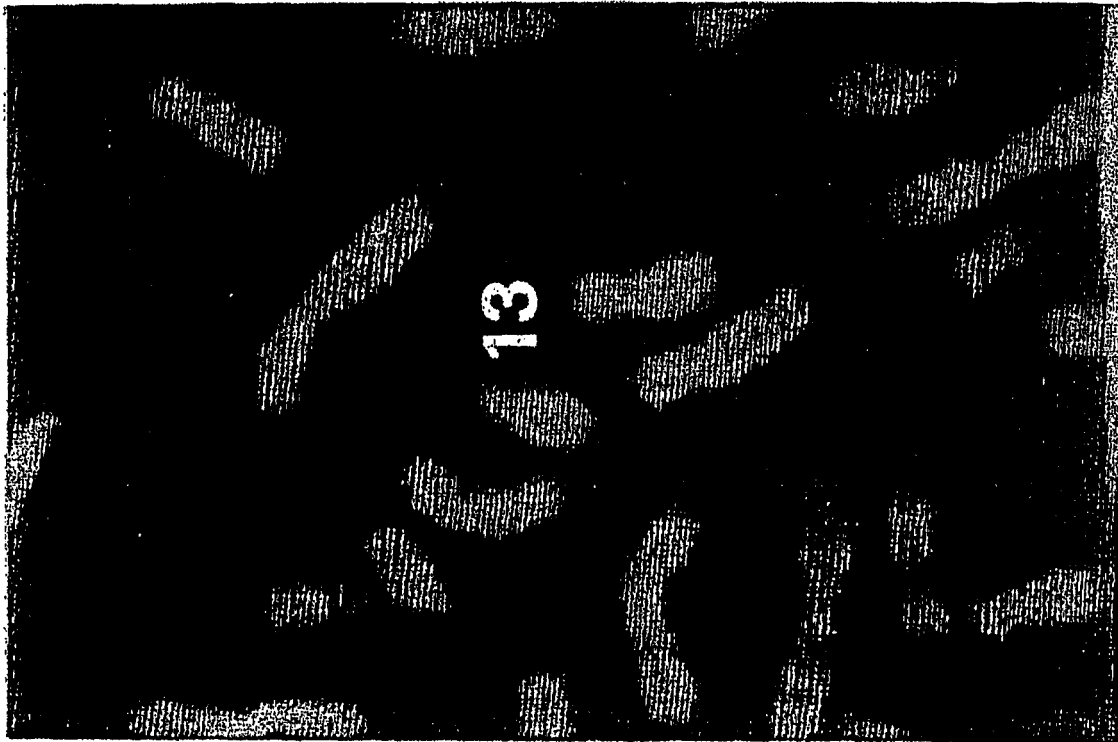
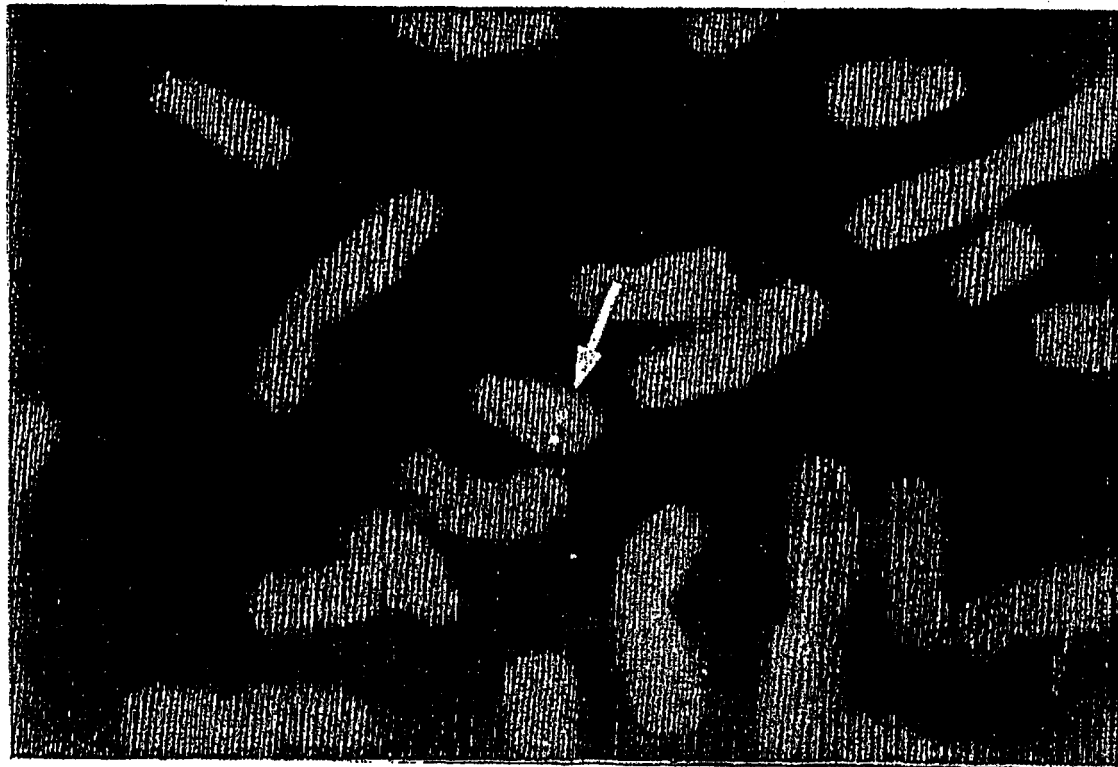


图 4

B



5



A

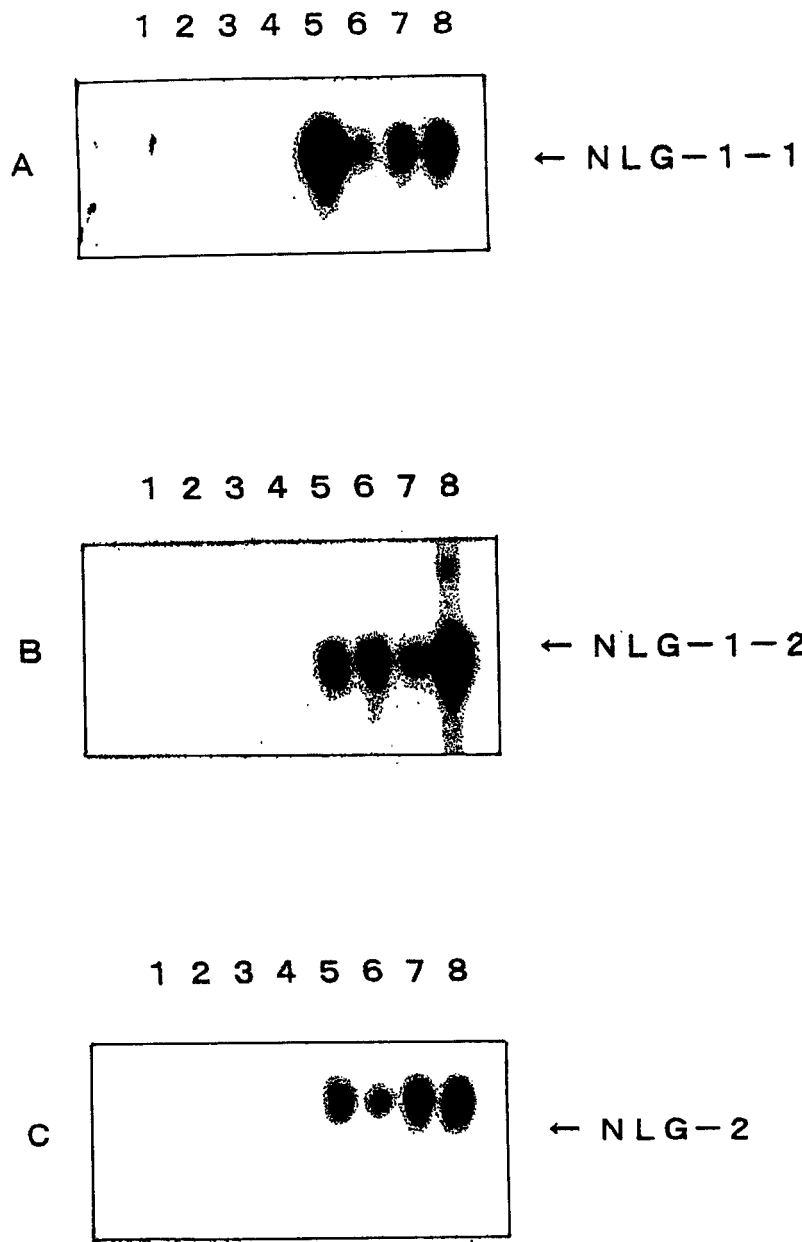


图 6

专利名称(译)	新蛋白质以及编码该蛋白质的新基因		
公开(公告)号	CN1426420A	公开(公告)日	2003-06-25
申请号	CN01808399.4	申请日	2001-02-21
申请(专利权)人(译)	吴羽化学工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	吴羽化学工业株式会社		
[标]发明人	广濑国孝 酒井润		
发明人	广濑国孝 酒井润		
IPC分类号	A61K38/00 C07K14/47 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/12 C12N5/10 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/47		
代理人(译)	曹雯		
优先权	2000042933 2000-02-21 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明概述了一组新蛋白质、编码该组蛋白质的新基因、分别含有上述新基因的质粒组、分别含有上述各个质粒的转化体、针对上述新的各个蛋白质的抗体或其片段、细菌感染症的检测方法以及新的多肽。上述各个新的蛋白质是对活化的人巨噬细胞特异的蛋白质。

