



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101849003 A

(43) 申请公布日 2010.09.29

(21) 申请号 200880025067.3 *C07K 16/18* (2006.01)
(22) 申请日 2008.05.26 *C12Q 1/68* (2006.01)
(30) 优先权数据 *G01N 33/53* (2006.01)
139642/2007 2007.05.25 JP *C12P 21/08* (2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日
2010.01.18
(86) PCT申请的申请数据
PCT/JP2008/059673 2008.05.26
(87) PCT申请的公布数据
W02008/146797 JA 2008.12.04
(71) 申请人 日本赤十字社
地址 日本东京都
申请人 湧永制药株式会社
(72) 发明人 谷上纯子 石井博之 前川尻真司
永田希美 冈孝纪
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 张萍 李连涛
(51) Int. Cl. *C12N 15/09* (2006.01)
权利要求书 2 页 说明书 19 页 序列表 20 页
附图 0 页

(54) 发明名称

新型 GPIIIa 基因

(57) 摘要

本发明的目的是提供用于测定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险的探针、引物、引物组和抗体。根据本发明,提供探针、引物、引物组和抗体,以用于 GPIIIa 基因的第 1297 位的胸腺嘧啶残基的检测。

1. 包含 GPIIIa 基因的核苷酸序列的多核苷酸,其中所述 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基是胸腺嘧啶残基,或包含所述胸腺嘧啶残基的其片段。

2. 权利要求 1 所述的多核苷酸或其片段,选自以下 (i)、(ii)、(iii) 和 (iv) :

(i) 包含 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列的多核苷酸 ;

(ii) 下述多核苷酸,该多核苷酸由 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列中插入、置换和 / 或缺失了一个或多个核苷酸和 / 或向其一端或两端添加了一个或多个核苷酸的核苷酸序列组成,并且该多核苷酸编码与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能的蛋白质 ;

(iii) 下述多核苷酸,该多核苷酸在严格条件下与由 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列的互补序列组成的多核苷酸杂交,且该多核苷酸编码与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能的蛋白质 ;和

(iv) 下述多核苷酸,该多核苷酸与由 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列组成的多核苷酸具有 70% 以上的同一性,且该多核苷酸编码与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能的蛋白质。

3. 权利要求 1 所述的多核苷酸或其片段,编码由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列或其一部分组成的蛋白质。

4. 权利要求 1 所述的多核苷酸或其片段,由 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列或其一部分组成。

5. 包含 GPIIIa 蛋白质的氨基酸序列的蛋白质,其中所述 GPIIIa 蛋白质的第 407 位的氨基酸残基是丝氨酸残基,或者包含所述丝氨酸残基的其片段。

6. 权利要求 5 所述的蛋白质或其片段,选自以下 (v)、(vi)、(vii) 和 (viii) :

(v) 包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的蛋白质 ;

(vi) 下述蛋白质,该蛋白质由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列中插入、置换和 / 或缺失了一个或多个氨基酸和 / 或向其一端或两端添加了一个或多个氨基酸的氨基酸序列组成,并且该蛋白质与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能 ;

(vii) 由下述多核苷酸编码的蛋白质,该多核苷酸在严格条件下,与由编码 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的多核苷酸的核苷酸序列的互补序列组成的多核苷酸杂交,且所述蛋白质与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能 ;和

(viii) 下述蛋白质,该蛋白质由与 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列具有 70% 以上的同一性的氨基酸序列组成,且该蛋白质与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能。

7. 权利要求 5 所述的蛋白质或其片段,由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列或其一部分组成。

8. 引物,其可以与权利要求 1-4 中任一项所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列杂交,且其用于通过核酸扩增法来扩增包含 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基或与其配对的残基的区域。

9. 权利要求 8 所述的引物,由下述多核苷酸组成,所述多核苷酸包含权利要求 1-4 中任一项所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列的至少 10 个连续核苷酸。

10. 权利要求 8 或 9 所述的引物,具有至少 12 至 30 个碱基的长度。

11. 引物组,其由权利要求 8-10 中任一项所述的两种或更多种引物组成,且其用于通

过核酸扩增法来扩增包含 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基或与其配对的残基的区域。

12. 权利要求 8-10 中任一项所述的引物或权利要求 11 所述的引物组,用于测定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险,或血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性。

13. 探针,其可以与权利要求 1-4 中任一项所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列杂交,且其用于 GPIIIa 基因的第 1297 位的胸腺嘧啶残基的检测。

14. 权利要求 13 所述的探针,包含与下述区域杂交的多核苷酸,所述区域包含:权利要求 1-4 中任一项所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中的、GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基或与其配对的残基。

15. 权利要求 13 或 14 所述的探针,由下述多核苷酸组成,该多核苷酸包含权利要求 1-4 中任一项所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列的至少 10 个连续核苷酸。

16. 权利要求 13-15 中任一项所述的探针,具有至少 12 至 30 个碱基的长度。

17. 权利要求 13-16 中任一项所述的探针,用于测定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险,或血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性。

18. 抗体,该抗体抗权利要求 5-7 中任一项所述的蛋白质或其片段。

19. 用于通过检测 GPIIIa 基因中的突变来判定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险、或血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性的方法,其包括使用权利要求 8-10 中任一项所述的引物、权利要求 11 所述的引物组或权利要求 13-16 中任一项所述的探针,来检测 GPIIIa 基因的第 1297 位的胸腺嘧啶残基的步骤。

20. 用于通过检测 GPIIIa 基因中的突变来判定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险、或血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性的方法,其包括使用权利要求 18 所述的抗体来检测 GPIIIa 蛋白质的第 407 位的丝氨酸残基的步骤。

21. 用于判定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险、或血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性的试剂盒,至少包含权利要求 8-10 中任一项所述的引物、权利要求 11 所述的引物组、权利要求 13-16 中任一项所述的探针或权利要求 18 所述的抗体。

新型 GPIIIa 基因

技术领域

[0001] 本发明涉及新型 GPIIIa 基因,该基因是用于测定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险的标记,更具体地,本发明涉及用于检测所述 GPIIIa 基因中的突变的装置 (means),和用于该突变的检测方法和检测试剂盒。

背景技术

[0002] 血小板粘附于血管疾病部位,然后彼此结合(凝集)形成血栓,并且这些功能由存在于血小板膜上的各种蛋白质控制。已知的此类膜蛋白质的实例包括 GPI(糖蛋白 I)、GPIIb(糖蛋白 IIb)和 GPIIIa(糖蛋白 IIIa)。关于 GPIIIa,从正常人的血小板分离出了编码 GPIIIa 蛋白质的全长 cDNA,并确定了其基因结构(J. Biol. Chem. 262(9) p. 3936-3939)。进一步地,已对存在于这些膜蛋白质上的血小板抗原(HPA-1 ~ 7)进行了研究(J. Clin. Invest 40 p1597(1961)、Prog. Hematol. 4 p222(1964)、Vox Sang 4p161(1959)、Vox Sang 39 p113(1980))。

[0003] 血小板抗原作为新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜(NAITP, neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura)、输血后紫癜(post-transfusion purpura)、血小板输注治疗无效(refractoriness to platelet transfusion therapy)等的原因已为人所知。在日本人中,据说抗 HPA-2b 抗体与血小板输注治疗无效有关,且抗 HPA-4b 抗体与 NAITP 有关。因此,血小板抗原的类型在临床上日益变得重要。

[0004] 血小板抗原类型由于数种糖蛋白的多态性(polymorphism)而发生(表 1),该多态性在蛋白质水平上通过单一氨基酸置换而产生,而在基因水平上通过单一碱基置换而产生。因此,在基于基因的血小板抗原的分型中,该类单一碱基中的差异被评定(Japanese Journal of Transfusion Medicine. Vol. No. 139(1):204-211,1993)。

[表 1]

抗原系统	抗原	血小板膜蛋白	氨基酸置换	密码子
HPA-1	HPA-1a	GPIIIa	Leu (33)	CTG
	HPA-1b		Pro	CCG
HPA-2	HPA-2a	GPIb	Thu (145)	ACG
	HPA-2b		Met	ATG
HPA-3	HPA-3a	GPIIb	Ile (843)	ATC
	HPA-3b		Ser	AGC
HPA-4	HPA-4a	GPIIIa	Arg (143)	CGA
	HPA-4b		Gln	CAA
HPA-5	HPA-5a	GPIa	Glu (505)	GAG
	HPA-5b		Lys	AAG
HPA-6	HPA-6a	GPIIIa	Arg (489)	CGA, CGG
	HPA-6b		Gln	CAG
HPA-7	HPA-7a	GPIIIa	Pro (407)	CCC
	HPA-7b		Ala	GCC
HPA-8	HPA-8a	GPIIIa	Arg (636)	CGT
	HPA-8b		Cys	TGT
Nak ^a	Nak ^{a+}	CD36	Pro (90)	CCT
	Nak ^{a-}		Ser	TCT

[0005] 然而,还存在未知的血小板抗原类型,目前尚未对其实现充分的阐明。关于 HPA-7,迄今仅报道的基因多态型是 HPA-7a,其中 GPIIIa 基因的第 1297 位碱基是胞嘧啶(第 407 位的氨基酸为脯氨酸);和 HPA-7b,其中基因的第 1297 位的碱基是鸟嘌呤(第 407 位的氨基酸是丙氨酸)(Blood :83 :70-76,1993)。

发明内容

[0006] 本发明人已在新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜 (NAITP) 的分析中发现了新型的血小板特异性抗原。具体地,本发明人发现:存在于 GPIIIa 基因的外显子 9 中的第 1297 位的核苷酸残基通常是胞嘧啶,但在患有新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜的患者中,该胞嘧啶被置换成了胸腺嘧啶。进一步地,本发明人发现:该置换与新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜相关联(实施例 1)。本发明以该发现为基础。

[0007] 本发明的目的在于提供新型的 GPIIIa 突变基因和蛋白质,用于检测所述基因和所述蛋白质中的突变的装置,用于所述突变的检测方法和检测试剂盒。

[0008] 根据本发明,提供包含 GPIIIa 基因的核苷酸序列的多核苷酸,其中该 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基是胸腺嘧啶残基;或包含该胸腺嘧啶残基的其片段(以下称作“本发明所述的多核苷酸”)。

[0009] 根据本发明,提供包含 GPIIIa 蛋白质的氨基酸序列的蛋白质,其中 GPIIIa 蛋白质的第 407 位的氨基酸残基是丝氨酸残基,或包含该丝氨酸残基的其片段(以下称作“本发明所述的蛋白质”)。

[0010] 根据本发明,提供可以与本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列杂交的引物,且该引物用于通过核酸扩增法来扩增包含 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基或与其配对的残基的区域(以下称作“本发明所述的引物”)。

[0011] 根据本发明,提供包含两种以上的本发明所述的引物的引物组(primer set),其用于通过核酸扩增法来扩增包含 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基或与其配对的残基的区域(以下称作“本发明所述的引物组”)。

[0012] 根据本发明,提供可以与本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列杂交的探针,并且该探针用于 GPIIIa 基因的第 1297 位的胸腺嘧啶残基的检测(以下称作“本发明所述的探针”)。

[0013] 根据本发明,提供抗本发明所述的蛋白质或其片段的抗体(以下称作“本发明所述的抗体”)。

[0014] 根据本发明,提供通过检测 GPIIIa 基因的突变来判定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险的方法,该方法包括使用本发明所述的引物、引物组或探针来检测 GPIIIa 基因的第 1297 位的胸腺嘧啶残基的步骤。

[0015] 进一步地,根据本发明,提供通过检测 GPIIIa 基因的突变来判定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险的方法,该方法包括使用本发明所述的抗体来检测 GPIIIa 蛋白质的第 407 位的丝氨酸残基的步骤(以下,上述两种方法合并称作“本发明的第一实施方式的方法”)。

[0016] 根据本发明,提供通过检测 GPIIIa 基因的突变来判定血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性的方法,该方法包括使用本发明所述的引物、引物组或探针来检测 GPIIIa 基因的第 1297 位的胸腺嘧啶残基的步骤。

[0017] 进一步地,根据本发明,提供通过检测 GPIIIa 基因的突变来判定血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性的方法,该方法包括使用本发明所述的抗体来检测 GPIIIa 蛋白质的第 407 位的丝氨酸残基的步骤(以下,上述两种方法合并称作“本发明的第二实施方式的方法”)。

[0018] 根据本发明,提供用于判定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险的试剂盒,其至少包含本发明所述的引物、引物组、探针或抗体。

[0019] 根据本发明,提供用于判定血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性的试剂盒,其至少包含本发明所述的引物、引物组、探针或抗体。

[0020] 本发明所述的探针、引物、引物组或抗体可以作为标记用于判定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险。因此,本发明对新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜的基因诊断等有用。进一步地,本发明所述的探针、引物、引物组或抗体可以作为标记用于判定血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性。因此,本发明对血小板输注中的输注效果的预测等有用。

具体实施方式

[0021] [突变基因和突变蛋白质] 本发明所述的多核苷酸可以作为竞争杂交中的标记标准核酸用于检测 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基的突变,即替换为胸腺嘧啶残基(以下,称作“GPIIIa 基因的第 1297T 多态性”(实施例 1)。进一步地,它还可以用作所述检

测中所用的寡核苷酸探针的核苷酸序列。

[0022] 在本说明书中，“GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基”意指从下述起点计算的位于第 1297 位的核苷酸残基，所述起点即第一残基，其是 GPIIIa 基因中编码信号肽的区域的起始密码子的腺嘌呤残基。

[0023] GPIIIa 基因的第 1 至 78 位构成编码信号肽的区域，GPIIIa 基因的第 79 至 2364 位构成编码成熟蛋白质的区域。

[0024] 用于检测 GPIIIa 基因的 1297T 多态性的标记标准核酸可以是能够检测 GPIIIa 基因中的第 1297 位的核苷酸残基置换为胸腺嘧啶残基的标记标准核酸，并且也可以是本发明所述的多核苷酸的片段。具体地，作为本发明所述的多核苷酸的片段，是 GPIIIa 基因的核苷酸序列中第 1297 位的核苷酸残基为胸腺嘧啶残基的多核苷酸的片段，其中所述片段包含胸腺嘧啶残基。

[0025] 本发明所述的多核苷酸包括选自以下的 (i)、(ii)、(iii) 和 (iv) 的多核苷酸：(i) 包含 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列的多核苷酸；(ii) 下述多核苷酸，该多核苷酸由 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列中插入、置换和 / 或缺失了一个或多个核苷酸和 / 或向其一端或两端添加了一个或多个核苷酸的核苷酸序列组成，并且该多核苷酸编码与由 SEQ IDNO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能的蛋白质（前提是：在所述多核苷酸中，SEQ ID NO :1 的核苷酸序列的第 1297 位的核苷酸残基是胸腺嘧啶残基）；(iii) 下述多核苷酸，该多核苷酸在严格条件下与由 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列的互补序列组成的多核苷酸杂交，且该多核苷酸编码与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能的蛋白质（前提是：在所述多核苷酸中，对应于 SEQ ID NO :1 核苷酸序列的第 1297 位的核苷酸残基是胸腺嘧啶残基）；和 (iv) 下述多核苷酸，该多核苷酸与由 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列组成的多核苷酸具有 70% 以上的同一性，且该多核苷酸编码与由 SEQ IDNO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能的蛋白质（前提是：在所述多核苷酸中，对应于 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列的第 1297 位的核苷酸残基是胸腺嘧啶残基）。

[0026] SEQ ID NO :1 的核苷酸序列的第 1 至 78 位的序列是编码信号肽的序列（GenBank 登录号 NM_000212）。在本发明中，编码信号肽的序列并不局限于该序列，只要它可以编码能够起信号肽功能的肽即可。

[0027] 本发明所述的多核苷酸优选为编码下述蛋白质的多核苷酸，所述蛋白质由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成或者由其一部分组成，该部分包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的第 407 位的氨基酸残基。

[0028] 在本发明中，当 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列给定时，编码其的核苷酸序列可容易地被确定，且可选择各种编码 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0029] 因此，编码由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质的多核苷酸，除了 SEQ ID NO :1 的 DNA 序列的部分或全部之外，还意指编码同一氨基酸的 DNA 序列，其具有存在简并关系的密码子作为 DNA 序列。本发明进一步包括与这些序列对应的 RNA 序列。

[0030] 编码由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质的多核苷酸的优选实例包括：由 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列组成的多核苷酸。

[0031] 在本说明书中，蛋白质是否与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能，可以通过评价与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质的表达相关的生物学

现象或功能来确定。

[0032] 本发明所述的多核苷酸优选为,由 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列组成的多核苷酸或包含 SEQ ID NO :1 的第 1297 位的核苷酸残基的其片段。本发明所述的多核苷酸更优选为,至少包含由 SEQ ID NO :7 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :1 中的第 1201 至 1391 位的核苷酸序列) 组成的多核苷酸的多核苷酸。本发明所述的多核苷酸进一步优选为,至少包含由 SEQ IDNO :3 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :1 中的第 1281 至 1320 位的核苷酸序列) 组成的多核苷酸的多核苷酸。

[0033] 本发明所述的蛋白质可作为抗原用于制备下述抗体,该抗体能够检测 GPIIIa 蛋白质的第 407 位的氨基酸残基的突变,即,置换为丝氨酸残基 (以下称为“GPIIIa 蛋白质的 407S 多态性”)。

[0034] 在本说明书中,“GPIIIa 蛋白质的第 407 位的氨基酸残基”意指从起点计算位于第 407 位的氨基酸残基,所述起点即是第一残基,其是构成 GPIIIa 成熟型蛋白质的氨基酸序列中的 N 末端的甘氨酸残基。

[0035] “GPIIIa 成熟型蛋白质”是指,由 GPIIIa 基因的第 79 至 2364 位的核苷酸序列编码的蛋白质,其不包含信号肽。例如,它是由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0036] 本发明所述的蛋白质包括选自以下 (v)、(vi)、(vii) 和 (viii) 的蛋白质:(v) 包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的蛋白质;(vi) 下述蛋白质,该蛋白质由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列中插入、置换和 / 或缺失了一个或多个氨基酸和 / 或向其一端或两端添加了一个或多个氨基酸的氨基酸序列组成,并且该蛋白质与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能 (前提是:SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的第 407 位的氨基酸残基是丝氨酸残基);(vii) 由下述多核苷酸编码的蛋白质,该多核苷酸在严格条件下,与由编码 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的多核苷酸的核苷酸序列的互补序列组成的多核苷酸杂交,且所述蛋白质与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能 (前提是:对应于 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的第 407 位的氨基酸残基的氨基酸残基是丝氨酸残基);和 (viii) 下述蛋白质,该蛋白质由与 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列具有 70% 以上的同一性的氨基酸序列组成,且该蛋白质与由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能 (前提是:对应于 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的第 407 位的氨基酸残基的氨基酸残基是丝氨酸残基)。

[0037] 本发明所述的蛋白质优选为,由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质或包含 SEQ ID NO :2 的第 407 位的氨基酸残基的其片段。本发明所述的蛋白质更优选为,至少包含由 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列 (SEQ IDNO :2 中的第 381 至 450 位的氨基酸序列) 组成的多肽的蛋白质 (多肽)。本发明所述的蛋白质进一步优选为,至少包含由 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2 中的第 395 至 420 位的氨基酸序列) 组成的多肽的蛋白质 (多肽)。

[0038] 用于制备能够检测 GPIIIa 蛋白质的 407S 多态性的抗体的抗原,可以是能够检测 GPIIIa 蛋白质中的第 407 位的氨基酸残基向丝氨酸残基的置换的抗原,并且也可以是本发明所述蛋白质的片段 (肽)。具体地,本发明所述的蛋白质的片段,是 GPIIIa 蛋白质的氨基酸序列中第 407 位的氨基酸残基是丝氨酸残基的蛋白质的片段,其中所述片段包含丝氨酸残基。

[0039] 本发明所述的蛋白质的片段是具有至少 6 个氨基酸残基的多肽 (例如,8、10、12 或

15 个氨基酸残基以上)。

[0040] 在本发明中,“GPIIIa 基因”已知为编码血小板膜蛋白的基因,且已经以 GenBank 登录号 M35999 (SEQ ID NO :5 (碱基序列), SEQ IDNO :6 (氨基酸序列)) 或登录号 NM_000212 登记。

[0041] GPIIIa 基因不仅包括以下 (i') 的多核苷酸,还包括选自以下 (ii')、(iii') 和 (iv') 的同源多核苷酸:(i') 包含 SEQ ID NO :5 的核苷酸序列的多核苷酸;(ii') 下述多核苷酸,该多核苷酸由 SEQ ID NO :5 的核苷酸序列中插入、置换和 / 或缺失了一个或多个核苷酸和 / 或向其一端或两端添加了一个或多个核苷酸的核苷酸序列组成,并且该多核苷酸编码与由 SEQ IDNO :6 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能的蛋白质;(iii') 下述多核苷酸,该多核苷酸在严格条件下与由 SEQ ID NO :5 的核苷酸序列的互补序列组成的多核苷酸杂交,且该多核苷酸编码与由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能的蛋白质;和 (iv') 下述多核苷酸,该多核苷酸与由 SEQ ID NO :5 的核苷酸序列组成的多核苷酸具有 70% 以上的同一性,且该多核苷酸编码与由 SEQ IDNO :6 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能的蛋白质。

[0042] SEQ ID NO :5 的核苷酸序列的第 1 至 78 位的序列是编码信号肽的序列 (GenBank 登录号 NM_000212)。在本发明中,编码信号肽的序列并不局限于该序列,只要它可以编码能够起信号肽功能的肽即可。

[0043] GPIIIa 基因优选为包含 SEQ ID NO :5 的核苷酸序列的多核苷酸。

[0044] 进一步地,GPIIIa 基因优选为编码包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的蛋白质的多核苷酸。

[0045] 作为 GPIIIa 蛋白质,除了以下 (v') 的蛋白质之外,还提供选自 (vi')、(vii') 和 (viii') 的同源蛋白质(多肽):(v') 包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的蛋白质;(vi') 下述蛋白质,该蛋白质由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列中插入、置换和 / 或缺失了一个或多个氨基酸和 / 或向其一端或两端添加了一个或多个氨基酸的氨基酸序列组成,并且该蛋白质与由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能;(vii') 由下述多核苷酸编码的蛋白质,该多核苷酸在严格条件下与由编码 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的多核苷酸的核苷酸序列的互补序列组成的多核苷酸杂交,且所述蛋白质与由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能;和 (viii') 下述蛋白质,该蛋白质由与 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列具有 70% 以上的同一性的氨基酸序列组成,且该蛋白质与由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能。

[0046] GPIIIa 蛋白质优选为由 SEQ ID NO :5 的核苷酸序列编码的蛋白质。

[0047] 进一步地,作为 GPIIIa 蛋白质,更优选地提供包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的蛋白质。

[0048] 在本说明书中,“插入、置换和 / 或缺失了一个或多个核苷酸和 / 或向其一端或两端添加了一个或多个核苷酸”以及“插入、置换和 / 或缺失了一个或多个氨基酸和 / 或向其一端或两端添加了一个或多个氨基酸”意指,已经通过位点定向诱变等公知的技术方法,或者通过可以自然发生程度的多个核苷酸或氨基酸的置换等,进行了改变。待改变的核苷酸或氨基酸的数目可以是例如 1 至 30 个,优选 1 至 20 个,更优选 1 至 10 个,还更优选 1 至 4 个,尤其优选 1 至 2 个的插入、置换或缺失,和 / 或向一端或两端的添加。

[0049] 本发明所述的多核苷酸的经改变的核苷酸序列是,对 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基不产生影响的经改变的核苷酸序列,且可以优选为具有一个或多个(例如,一个或几个,或 1、2、3 或 4 个)突变的本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列,其中所述突变不影响由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的蛋白质的功能。

[0050] GPIIIa 基因的经改变的核苷酸序列可优选为,具有一个或多个(例如,一个或几个,或 1、2、3 或 4 个)突变的 GPIIIa 基因的核苷酸序列,其中所述突变不影响由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的蛋白质的功能。

[0051] 本发明所述的蛋白质的经改变的氨基酸序列是,对 GPIIIa 蛋白质的第 407 位的氨基酸残基不产生影响的经改变的氨基酸序列,且可以优选为具有一个或多个(例如,一个或几个,或 1、2、3 或 4 个)保守置换的 SEQ ID NO :2 中所示的本发明所述的蛋白质的氨基酸序列。

[0052] GPIIIa 蛋白质的经改变的氨基酸序列可以优选为,具有一个或多个(例如,一个或几个,或 1、2、3 或 4 个)保守置换的 SEQ ID NO :6 中所示的 GPIIIa 蛋白质的氨基酸序列。

[0053] 在本说明书中,“保守置换(一个或多个)”意指,一个或多个氨基酸残基被其化学相似的氨基酸残基(一个或多个)置换以使蛋白质的功能实质上不被改变。其实例包括下述情形:某疏水性残基被另一个疏水性残基置换的情形;某极性残基被另一个具有相同电荷的极性残基置换的情形。此类可被置换的功能相似的氨基酸(一个或多个),对每一氨基酸而言是为本领域公知的。作为非极性(疏水性)氨基酸,其具体实例包括丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸、色氨酸、苯丙氨酸和蛋氨酸。极性(中性)氨基酸的实例包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天门冬酰胺和半胱氨酸。具有正电荷的(碱性)氨基酸的实例包括精氨酸、组氨酸和赖氨酸。具有负电荷的(酸性)氨基酸的实例包括天门冬氨酸和谷氨酸。

[0054] 在本说明书中,“杂交”意指在严格条件下与目标多核苷酸杂交,而不与该目标核苷酸之外的核苷酸杂交。所述“严格条件”可基于探针序列或引物序列及其互补链所形成的双链的熔解温度(°C)、以及溶液的盐浓度等来决定。在选择探针序列或引物序列之后设置合适的严格条件是本领域技术人员所熟知的技术(例如, *Molecular Cloning 2nd edition*, ColdSpring Harbor Laboratory (1989))。

[0055] 杂交可根据已知方法进行。在使用市售文库的情形中,其可根据附于其中的使用说明书记载的方法来进行。

[0056] 在本说明书中,关于碱基序列或氨基酸序列的术语“同一性”意指,待比较的序列之间、构成各序列的碱基或氨基酸残基的一致程度。在本说明书中所示的每一“同一性”的数值,可以通过本领域技术人员已知的同源性检索程序算出的数值,并且可通过 FASTA、BLAST 等、使用默认(初始设定)参数而容易地算出。

[0057] 与 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列具有 70% 以上同一性的氨基酸序列可以是优选与其具有 80% 以上,更优选 85% 以上,还更优选 90% 以上,还更优选 95% 以上,特别优选 98% 以上,且最优选 99% 以上的同一性的氨基酸序列。

[0058] 与 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列具有 70% 以上同一性的氨基酸序列可以是优选与其具有 80% 以上,更优选 85% 以上,还更优选 90% 以上,还更优选 95% 以上,特别优选 98%

以上,且最优选 99% 以上的同一性的氨基酸序列。

[0059] 在本发明中,当 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列给定时,编码其的核苷酸序列可容易地被确定,且可选择各种编码 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0060] 因此,编码包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的蛋白质的多核苷酸,除了 SEQ ID NO :5 的 DNA 序列的部分或全部之外,还意指编码同一氨基酸的 DNA 序列,其具有存在简并关系的密码子作为 DNA 序列。本发明进一步包括与这些序列对应的 RNA 序列。

[0061] 编码包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的蛋白质的多核苷酸的优选实例包括:包含 SEQ ID NO :5 的核苷酸序列的多核苷酸。

[0062] 在本说明书中,蛋白质是否与由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的蛋白质具有同等功能,可以通过评价与由 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的蛋白质的表达相关的生物学现象或功能来确定。

[0063] 根据本发明,提供由包含 GPIIIa 基因的核苷酸序列的多核苷酸的核苷酸序列的互补序列组成的多核苷酸,其中所述 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基是胸腺嘧啶残基,或者提供包含与该胸腺嘧啶残基配对的残基的其片段。

[0064] [引物和引物组] 本发明所述的引物可以与本发明所述的多核苷酸特异性地杂交,以通过核酸扩增法来扩增包含 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基或与其配对的残基的区域。因此,本发明所述的引物可被用作标记用于判定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病的风险。进一步地,本发明所述的引物可用作标记用于判定血小板输注中血小板输注治疗无效发病的可能性。

[0065] 本发明所述的引物意指,由脱氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA) 等构成的引物,且优选由 DNA 构成的引物。

[0066] 本发明所述的引物可以通过核酸扩增法,来扩增本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中包含 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基或与其配对的残基的区域。其实例包括由下述多核苷酸组成的那些,所述多核苷酸具有本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中的至少 10 个,优选至少 15 个,更优选至少 20 个,进一步优选至少 21 个连续核苷酸残基。进一步地,本发明所述的引物的实例包括由下述多核苷酸组成的那些,该多核苷酸具有本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中的 10 至 30 个,12 至 30 个,15 至 30 个,20 至 30 个,或 21 至 30 个连续核苷酸残基。

[0067] 进一步地,本发明所述的引物可以是能够与本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中包含 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基或与其配对的残基的区域进行杂交的引物。

[0068] 此处,包含本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中的连续核苷酸的多核苷酸,可以起本发明所述的引物的作用,并且其实例也包括下述经改变的多核苷酸,该经改变的多核苷酸包含本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中的连续核苷酸中导入了一个或多个(例如 1、2、3 或 4 个)对 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基不产生影响的突变(其可选自例如插入、置换、缺失和添加)的核苷酸。经改变的多核苷酸的实例包括:包含 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列或其互补序列中的至少 12 至 30 个连续核苷酸中导入了一个或多个突变的核苷酸、且作为本发明所述的引物起作用的多核苷酸。

[0069] 本发明所述的引物的长度可以是至少 10 个碱基,且优选至少 15 个碱基,更优选至

少 20 个碱基,还更优选至少 21 个碱基。进一步地,本发明所述的引物长度为 12 至 30 个碱基,20 至 30 个碱基,或 21 至 30 个碱基。

[0070] 根据本发明所述的引物的优选实施方式,提供具有 12 至 30 个碱基长度的引物,其由具有至少 10 个(更优选至少 15 个,更优选至少 20 个,还更优选至少 21 个)本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中的连续核苷酸的多核苷酸组成;该引物可通过核酸扩增法来扩增包含 GPIIIa 基因的核苷酸序列中的第 1297 位的核苷酸残基的区域,并且该引物被用于 GPIIIa 基因的 1297T 多态性的检测。

[0071] 本发明所述的引物也可以用作引物组,该引物组包含两种或更多种本发明所述的引物的组合。

[0072] 本发明所述的引物组能以以下述方式选择,以便本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中,包含 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基或与其配对的残基的区域可以通过核酸扩增法来扩增。核酸扩增法是已知的,且本领域技术人员可选择适用于核酸扩增的引物对。例如,在 PCR 方法中,可以按下述方式选择引物,以便两个引物中的一个与 GPIIIa 突变基因的正链配对,另一个引物与 GPIIIa 突变基因的负链配对,且由一个引物延伸的延伸链为另一个引物所配对。进一步地,在 LAMP 方法(WO 00/28082)中,相对于目的基因,分别定义了自 3' 端起的三个区域,即 F3c、F2c 和 F1c;以及自 5' 端起的三个区域,即 B1、B2 和 B3,这六个区域可用于设计四种引物。

[0073] 本发明所述的引物和引物组,可根据常规方法,用作已知核酸扩增法比如 PCR 方法(Saiki, R. K., Bugawan, T. L., et al. (1986) Nature, 324, 163-166)、NASBA 方法(Compton, J. (1991) Nature, 650, 91-92)、TMA 方法(Kacian, D. L., 和 Fultz, T. J. (1995) US. Patent 5, 399, 491)、SDA 方法(Walker, G. T., Little, M. C., et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 392-396)或 PCR-SSCP 方法(Orita, M., Iwahara, H., et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2776-2770)中的引物和引物组。

[0074] 本发明所述的引物可以以本说明书中所公开的核苷酸序列为基础而化学合成。引物的制备是公知的,且可根据常规方法进行。

[0075] [探针] 本发明所述的探针与本发明所述的多核苷酸特异性地杂交,且可以检测 GPIIIa 基因的 1297T 多态性。因此,本发明所述的探针可以用作标记用于判定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜和/或其发病风险。进一步地,本发明所述的探针可用作标记用于判定血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性。

[0076] 本发明所述的探针意指由脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)等构成的探针,且优选为由 DNA 构成的探针。

[0077] 本发明所述的探针的实例包括:能够与本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中包含 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基或与其配对的残基的区域进行杂交的探针。

[0078] 本发明所述的探针的实例包括:由包含本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中的至少 10 个、优选至少 14 个、更优选至少 15 个、还更优选至少 16 个连续核苷酸残基的多核苷酸构成的探针。进一步地,本发明所述的探针的实例包括:由包含本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中的 10 至 20 个、12 至 20 个、14 至 20 个、15 至 20 个、16 至 20 个、10 至 30 个、12 至 30 个、14 至 30 个、15 至 30 个、或 16 至 30 个连续核苷

酸残基的多核苷酸构成的探针。

[0079] 此处,包含本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中的连续核苷酸的多核苷酸,可以作为本发明所述的探针起作用,并且其实例也包括下述经改变的多核苷酸,该经改变的多核苷酸包含本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中的连续核苷酸中引入了一个或多个(例如1、2、3或4个)对GPIIIa基因的第1297位的核苷酸残基不产生影响的突变(其可选自例如插入、置换、缺失和添加)的核苷酸。经改变的多核苷酸的实例包括下述多核苷酸,该多核苷酸包含SEQ IDNO:1的核苷酸序列或其互补序列中的至少12至30个连续核苷酸中引入了一个或多个突变的核苷酸,且所述多核苷酸作为本发明所述的探针起作用。

[0080] 本发明所述的探针的长度为至少10个碱基。进一步地,本发明所述的探针的长度为12至30个碱基。

[0081] 根据本发明所述的探针的优选实施方式,提供具有12至30个碱基长度的探针和引物,其由包含至少10个(更优选为至少15个)本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中的连续核苷酸的多核苷酸构成,且其可以与包含GPIIIa基因的核苷酸序列中的第1297位的核苷酸残基的区域杂交,并且所述探针和引物用于GPIIIa基因的1297T多态性的检测。

[0082] 本发明所述的探针可以按照常规方法,作为探针用于Northern印迹方法、Southern印迹方法或原位杂交方法等已知的方法中。

[0083] 本发明所述的探针可以以本说明书中所公开的核苷酸序列为基础而化学合成。引物的制备是公知的,且可根据常规方法进行。

[0084] [抗体] 本发明所述的抗体可以特异性地识别本发明所述的蛋白质,且可以检测GPIIIa蛋白质的407S多态性。因此,本发明所述的抗体可以用作标记用于判定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险。进一步地,本发明所述的抗体可用作标记用于判定血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性。

[0085] 根据本发明所述的抗体的优选实施方式,提供识别下述区域的抗体,该区域包含本发明所述的蛋白质的氨基酸序列中的GPIIIa蛋白质的第407位的氨基酸残基。通过使用这种抗体,可以检测GPIIIa蛋白质的407S多态性。这种抗体的实例包括对抗下述蛋白质的抗体,所述蛋白质包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列中的第407位的氨基酸残基的至少6个氨基酸残基。

[0086] 对抗本发明所述的蛋白质的抗体的实例包括:对抗具有SEQ IDNO:2的氨基酸序列或其一部分的蛋白质的抗体。

[0087] 本发明所述的抗体的实例包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体(scFv)、人源化抗体、多特异性抗体、和抗体片段比如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc和Fv。

[0088] 本发明所述的抗体可以使用本领域技术人员所熟知的方法获得。

[0089] [检测方法] GPIIIa基因的核苷酸序列中,第1297位的核苷酸残基向胸腺嘧啶残基的置换,可以为新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险的指标。因此,根据本发明,新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险可以通过检测GPIIIa基因的1297T多态性来判定。

[0090] 存在下述可能性,即GPIIIa基因中第1297位的核苷酸残基被置换为胸腺嘧啶残

基的血小板抗原 (HPA-7 抗原) 会由于抗原的差异而在血小板输注时引起血小板输注治疗无效。因此, 该置换可以是血小板输注中是否发生血小板输注治疗无效的指标, 即血小板输注中输注效果的指标。因此, 根据本发明, 血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性可以通过检测 GPIIIa 基因的 1297T 多态性而判定。

[0091] 本发明所述的检测方法没有特别限定, 只要它能检测试验样品中的 GPIIIa 基因的 1297T 多态性或 GPIIIa 蛋白质的 407S 多态性即可, 并且其实例包括杂交方法、核酸扩增法和抗原-抗体反应法。

[0092] 此处, “试验样品” 可以包含下述区域, 该区域含有 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基或者 GPIIIa 蛋白质的第 407 位的氨基酸残基, 并且该样品可通过从待试验人 (对象) 提取基因、mRNA 或蛋白质而获得。mRNA 可以在使用前根据需要转换为 cDNA。在本说明书中, “基因” 同样包括这种 cDNA。

[0093] 此处, “对象” 除了新生儿, 还可以是该新生儿的血亲亲属。本发明的有利方面在于可在出生以前判定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜的发病风险。

[0094] 对象的基因、mRNA 或蛋白质可以从人体中的任何细胞提取, 且所述细胞优选为白细胞。

[0095] 根据本发明, 提取的基因或 mRNA 可以直接用于限制性片段长度多态性方法 (RFLP 方法) (Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503)、等位基因特异的寡核苷酸探针法 (ASO 方法) (Wallace, R. B., Schaffer, N. J., et al. (1979) *Nucleic Acid Res.*, 6, 3543) 或寡核苷酸连接分析法, 以检测所述 GPIIIa 基因的 1297T 多态性。

[0096] 根据本发明所述的检测方法, 试验样品中的 GPIIIa 基因的 1297T 多态性可以通过下述方式来检测: 使用本发明所述的引物或引物组, 利用核酸扩增法来扩增核酸样品 (mRNA 或其逆转录产物), 并分析该扩增产物。

[0097] 利用核酸扩增法检测 GPIIIa 基因的 1297T 多态性, 例如可以通过以下步骤来进行: (c) 将来源于试验样品的多核苷酸作为模板, 使用本发明所述的引物或引物组来施行核酸扩增法; 和 (d) 分析所形成的扩增产物。

[0098] 在步骤 (c) 中, 可以使用由试验样品制备的 mRNA 或由该 mRNA 逆转录的互补 DNA 作为模板。

[0099] 基因扩增可以使用核酸扩增法进行, 比如 PCR 方法 (Saiki, R. K., Bugawan, T. L., et al. (1986) *Nature*, 324, 163-166)、NASBA 方法 (Comptom, J. (1991) *Nature*, 650, 91-92)、TMA 方法 (Kacian, D. L., and Fultz, T. J. (1995) *US. Patent* 5, 399, 491) 或 SDA 方法 (Walker, G. T., Little, M. C., et al (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 392-396)。

[0100] 通过这些方法扩增的基因, 根据其扩增产物的特征可以用来检测 GPIIIa 基因的 1297T 多态性。例如, 对于用 PCR 方法扩增的片段, 通过碱基序列确定方法可以容易地确定核苷酸序列, 并且由此可以确定 GPIIIa 基因的第 1297 位的核苷酸残基是否是胸腺嘧啶。

[0101] 通过 PCR 的基因扩增也可使用识别一个碱基差异的 PCR-SSCP 方法 (Orita, M., Iwahara, H., et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2776-2770) 来进行。PCR-SSCP 方法是下述方法, 该方法中通过 PCR 扩增的核酸片段被热变性为单链后, 在恒定温度下使用非变性聚丙烯酰胺凝胶分离。所述方法可以通过将核苷酸片段的差异所致的高级结构的形成中的差异作为电泳迁移率中的差异来评价而检测一个碱基的差异。

[0102] 通过其它PCR方法扩增的片段,可以通过限制性片段长度多态性方法(RFLP方法)(Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503)、等位基因特异的寡核苷酸探针法(ASO方法)(Saiki, R. K., Bugawan, T. L., et al., (1986) *Nature*, 324, 163-166)、寡核苷酸连接分析法(Landegren, U., Kaiser, R., et al. (1990) *PCR Protocols*, Academic Press, Inc. p92-98)、PCR-PHFA方法(Oka, T., Matsunaga, H., et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1541-1547)、PCR-rSSO方法(Kawai, S., et al., (1994) *Hum Immunol*, 41(2), 121-126)等来分析。在同时处理多个样品时,优选PCR-PHFA方法或PCR-rSSO方法。

[0103] 根据本发明所述的检测方法,可以通过使用能够与本发明所述的多核苷酸的核苷酸序列或其互补序列中包含GPIIIa基因的第1297位的核苷酸残基或与其配对的残基的区域杂交的本发明的引物或引物组,通过核酸扩增法扩增核酸样品(mRNA或其逆转录产物),并检测该扩增产物,从而检测试验样品中的GPIIIa基因的1297T多态性。

[0104] 根据本发明所述的第一实施方式,第1297位的核苷酸残基被确定为胸腺嘧啶的对象,由于被评价为检测到了GPIIIa基因的1297T多态性,因此可以被诊断或判定为患有新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜的患者或具有其发病风险。

[0105] 根据本发明所述的方法的第二实施方式,第1297位的核苷酸残基被确定为胸腺嘧啶的对象,由于被评价为检测到了GPIIIa基因的1297T多态性,因此可被诊断或判定为具有血小板输注中血小板输注治疗无效发病可能性。

[0106] 根据本发明所述的检测方法,可以通过将本发明所述的探针与核酸样品(mRNA或其逆转录产物)杂交,并检测杂交复合物即双链核苷酸,来检测试验样品中的GPIIIa基因的1297T多态性。

[0107] 对于杂交方法的详细步骤,可以参照 *Nucleic Acid hybridization* BiosScientific Publishers(1999)。

[0108] 利用杂交方法检测GPIIIa基因的1297T多态性,例如可以通过以下步骤来进行:(a)使来自试验样品的多核苷酸与本发明所述的探针接触;和(b)检测杂交复合物。

[0109] 在步骤(a)中,可以将来自试验样品制备的mRNA或从该mRNA逆转录得到的互补DNA(cDNA)作为来自待试验细胞样品的多核苷酸,与上述探针接触。

[0110] 在使用探针的检测方法中,探针可以被标记。标记的实例包括使用放射性物质、酶和荧光物质的标记。

[0111] 杂交产物的检测可以利用熟知的方法比如Northern杂交、Southern杂交或菌落杂交来进行。

[0112] 根据本发明所述的第一实施方式,第1297位的核苷酸残基被确定为胸腺嘧啶的对象,由于被评价为检测到了GPIIIa基因的1297T多态性,因此可以被诊断或判定为患有新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜的患者或具有其发病风险。

[0113] 根据本发明所述的方法的第二实施方式,第1297位的核苷酸残基被确定为胸腺嘧啶的对象,由于被评价为检测到了GPIIIa基因的1297T多态性的评价,因此可被诊断或判定为具有血小板输注中血小板输注治疗无效发病可能性。

[0114] 根据本发明所述的检测方法,可以通过使本发明所述的抗体与试验样品接触,并检测抗原-抗体反应,来检测该试验样品中的GPIIIa蛋白质的407S多态性。

[0115] 使用抗原-抗体反应的GPIIIa蛋白质的407S多态性的检测,例如可以通过以下

步骤来进行:(e)使来自试验样品的蛋白质与本发明所述的抗体接触;和(f)检测抗原-抗体复合物。

[0116] 检测抗原-抗体反应的方法是本领域技术人员所熟知的,例如,被认为包含多巴胺分泌(dopamine-producing)神经细胞增殖前体细胞的待试验细胞样品中的GPIIIa蛋白质,可以通过免疫学方法检测。对于所述免疫学方法,可以对已经根据需要进行了适当处理(比如细胞的分离和提取操作)的细胞样品施用以前已知的方法比如免疫组织染色方法、酶免疫测定法、Western印迹方法、凝集法、竞争法或夹心法。免疫组织染色法例如可以通过使用标记抗体的直接法、或使用对抗该抗体的标记抗体的间接法来进行。作为标记试剂,可以使用已知的标记物质比如荧光物质、放射性物质、酶、金属和染料。

[0117] 根据本发明所述方法的第一实施方式,检测到抗原-抗体复合物的对象,由于被评价为检测到了GPIIIa蛋白质的407S多态性,因此可被诊断或判定为患有新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜的患者或具有其发病风险。

[0118] 根据本发明方法所述的第二实施方式,检测到抗原-抗体络合物的对象,由于被评价为检测到了GPIIIa蛋白质的407S多态性,因此可以被诊断或判定为具有血小板输注中血小板输注治疗无效的发病可能性。

[0119] [检测试剂盒]根据本发明,提供用于进行本发明所述的检测方法的试剂盒。

[0120] 用于进行本发明所述的检测方法的检测试剂盒的实例包括,用于检测GPIIIa基因的1297T多态性的试剂盒,其至少包含本发明所述的探针、引物或引物组。进一步地,用于进行本发明所述的检测方法的检测试剂盒的实例包括,用于检测GPIIIa蛋白质的407S多态性的试剂盒,其至少包含本发明所述的抗体。

[0121] 本发明所述的探针、引物、引物组和抗体可以是经标记的那些。

[0122] 至少包含本发明所述的探针的本发明所述的检测试剂盒,通过杂交方法来检测GPIIIa基因的1297T多态性。

[0123] 根据需要,本发明所述的试剂盒可以进一步地包含用于进行杂交方法的各种试剂,比如用于检测标记的底物;杂交缓冲液;说明书;和/或仪器。

[0124] 至少包含本发明所述的引物或本发明所述的引物组的本发明所述的检测试剂盒,通过核酸扩增法来检测GPIIIa基因的表达。

[0125] 根据需要,本发明所述的试剂盒可以进一步地包含用于进行核酸扩增法各种试剂,比如缓冲液;指示PCR可正常进行的内标;说明书;和/或仪器。

[0126] 至少包含本发明所述的抗体的本发明所述的检测试剂盒,通过检测抗原-抗体反应来检测GPIIIa蛋白质的407S多态性。

[0127] 根据检测方法的第三实施方式,本发明所述的试剂盒可以进一步地包含用于进行抗原-抗体反应的各种试剂,比如用于ELISA法等的第二抗体;染色剂;缓冲液;说明书;和/或仪器。

实施例

[0128] 现在本发明将借助于实施例具体地描述,但本发明例如引物序列、探针序列等并不受其限定。

[0129] 实施例1:GPIIIa(HPA-7)基因中的多态性和新生儿异体免疫性凝血细胞减少性

紫癜之间的关系关于被诊断为新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜 (NAITP) 的患儿, 预测包含在母亲血清中的抗体将与患儿的血小板反应。因为该患儿是第二个孩子, 故认为在第一个孩子的妊娠期间对来源于父亲的血小板特异性抗原产生敏化的母亲, 获得了对抗该抗原的抗体产生能力, 并且患儿的血小板受到在第二个孩子的妊娠期间产生的抗体的侵袭。因为患儿的血小板特异性抗原源自于父亲, 故通过 MPHA 方法证实了患儿和其母亲的血清对父亲的血小板的反应性 (Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, Vol. 52, No. 652(6) 678-683, 2006)。

[0130] 首先, 将父亲的血小板固定于微孔板的孔上, 然后使该血小板与患儿和母亲的血清, 以及其稀释液反应。将反应物与涂覆有人 IgG 抗体的羊红细胞反应, 并观测生成的凝集图像。

[0131] 结果, 分别为至多 1024 倍和 16 倍稀释的母亲血清和患儿血清显示了对父亲血小板的阳性反应。

[0132] 然后, 使用 PCR-PHFA 方法分析了血小板抗原基因的类型 (W098/02574)。

[0133] 结果, 观测到了不相容性, 因为血小板抗原之中, 对于 HPA-2, 母亲具有 (a-b+), 父亲具有 (a+b-) 且患儿具有 (a+b+); 而对于 HPA-3, 母亲具有 (a+b-), 父亲和患儿具有 (a+b+)。然而, 对于 HPA-1、4、5 和 6 的血小板抗原类型, 观测到了相容性, 因为父母和患儿均具有 (a+b-)。另一方面, 对于 HPA-7, 与之前报道的用于 HPA-7a 和 HPA-7b 的标准 DNAs 通过 PHFA 方法比较, 结果显示所用个体中均存在 HPA-7a 基因, 而不存在 HPA-7b 基因。

[0134] 来源于父亲的血小板特异性抗原被认为存在于患儿中。因此, 检查了父亲的血小板对已知抗体的反应性, 虽然该血小板对 HPA-1 至 HPA-6 抗体为阴性, 但是对 HPA-7b 抗体却显示反应性。此处, 因为父亲的血小板与 HPA-7b 抗体反应, 故预测到 GPIIIa 基因之中对应于 HPA-7 的区域中的某碱基的置换。基于该考虑, 使用以下引物扩增了父亲染色体 DNA 中的 GPIIIa 基因的外显子 9, 并且使用 Wizard Plus SV Gel 与 PCRclean 系统纯化了扩增产物, 然后将其连接到 pT7Blue-T 载体 (由 Novagen 制造) 中并导入 E. coli JM109 株 (由 TAKARA 制造) 中。WHPA7-A : 5' -TCCAGAGCTGGAGTGTTAACTG (SEQ ID NO : 9) WHPA7-B : 5' -CTGGCAGGCACAGTCACAATC (SEQ ID NO : 10)

[0135] 培养获得的白色菌落然后纯化质粒, 随后使用 M13-R18 引物 (由 TAKAEA 制造) 进行测序, 以确认克隆区域的碱基序列。测序使用 BigDyeterminator ver. 1.1 (由 Applied Biosystems 制造) 来进行。测序结果如表 2 所示。HPA-7a 表示 HPA-7a 基因, HPA-7b 表示 HPA-7b 基因, 且 HPA-7 新表示不同于 HPA-7a 基因和 HPA-7b 基因的新型基因。

表 2

HPA-7a	1201	C A G A G C T G G A G T G T T A A C T G G G C C C A A C T G T G T G T C T A A T A	1240
HPA-7b		C A G A G C T G G A G T G T T A A C T G G G C C C A A C T G T G T G T C T A A T A	
HPA-7 新		C A G A G C T G G A G T G T T A A C T G G G C C C A A C T G T G T G T C T A A T A	
HPA-7a	1241	C A A T C T T T C T T T C C A T C C A G G T G A G C T T C A G C A T T G A G G C	1280
HPA-7b		C A A T C T T T C C A T C C A G G T G A G C T T C A G C A T T G A G G C	
HPA-7 新		C A A T C T T T C C A T C C A G G T G A G C T T C A G C A T T G A G G C	
HPA-7a	1281	C A A G G T G C G A G G C T G T G T C C C A G G A G A A G G A G A A G T C C T T T	1320
HPA-7b		C A A G G T G C G A G G C T G T G T C C C A G G A G A A G G A G A A G T C C T T T	
HPA-7 新		C A A G G T G C G A G G C T G T G T C C C A G G A G A A G G A G A A G T C C T T T	
HPA-7a	1321	A C C A T A A A G C C C G T G G G C T T C A A G G A C A G C C T G A T C G T C C	1360
HPA-7b		A C C A T A A A G C C C G T G G G C T T C A A G G A C A G C C T G A T C G T C C	
HPA-7 新		A C C A T A A A G C C C G T G G G C T T C A A G G A C A G C C T G A T C G T C C	
HPA-7a	1361	A G G T C A C C T T T G A T T G G A C T G T G C C C T G C C C A G	
HPA-7b		A G G T C A C C T T T G A T T G G A C T G T G C C C T G C C C A G	
HPA-7 新		A G G T C A C C T T T G A T T G G A C T G T G C C C T G C C C A G	

表 3

HPA-7a	381	Ala	Gln	Leu	Cys	Leu	Cys	Leu	Thr	Ile	Phe	Leu	Ser	Ile	Gln	Val	Ser	Phe	Ser	Ile	Glu	Ala	Lys	Val	Arg	Gly	Cys	407	Gln	Glu	410	Lys
HPA-7b	Trp	Ala	Gln	Leu	Cys	Leu	Cys	Leu	Thr	Ile	Phe	Leu	Ser	Ile	Gln	Val	Ser	Phe	Ser	Ile	Glu	Ala	Lys	Val	Arg	Gly	Cys	Gln	Glu	Lys		
HPA-7 新	Trp	Ala	Gln	Leu	Cys	Leu	Cys	Leu	Thr	Ile	Phe	Leu	Ser	Ile	Gln	Val	Ser	Phe	Ser	Ile	Glu	Ala	Lys	Val	Arg	Gly	Cys	Gln	Glu	Lys		
HPA-7a	411	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ile	Val	Gln	Val	Thr	430	Pha	Asp	Cys	Ala	Cys	Gln	Ala	440	Gln	
HPA-7b	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Thr	Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ile	Val	Gln	Val	Thr	Pha	Asp	Cys	Ala	Cys	Gln	Ala	Gln			
HPA-7 新	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Thr	Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ile	Val	Gln	Val	Thr	Pha	Asp	Cys	Ala	Cys	Gln	Ala	Gln			
HPA-7a	441	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn	Asn	450	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn	Asn	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn	
HPA-7b	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn	Asn	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn	Asn	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn			
HPA-7 新	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn	Asn	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn	Asn	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn			

[0136] 如表 2 和表 3 中所示, 确认了 GPIIIa 基因的第 1297 位的碱基是胸腺嘧啶, 且由该基因产生的蛋白质的第 407 位的氨基酸是丝氨酸的基因 (HPA-7 新) (SEQ ID NO :7 (碱基

序列), SEQ ID NO :8(氨基酸序列))。关于 HPA-7 基因,作为基因多态性,迄今已经报道了 GPIIIa 基因的第 1297 位的碱基是胞嘧啶、第 407 位的氨基酸是脯氨酸的 HPA-7a 基因;和 GPIIIa 基因的第 1297 位的碱基是鸟嘌呤、第 407 位的氨基酸是丙氨酸的 HPA-7b 基因,但此次确认的基因被证实具有不同于它们的新序列。

[0137] 实施例 2:通过 PCR-PHFA 方法构建 HPA-7 的新型等位基因检测系统现在将描述通过 PCR-PHFA 方法构建 HPA-7 的新型等位基因检测系统。在 PHFA 方法中,将用非标记引物扩增样品所得的产物(样品 DNA)和用标记引物扩增相同区域所得的产物(标准 DNA)一起混合,并热变性,然后基于在温度梯度下退火时产生的链置换的程度来检测样品 DNA 和标准 DNA 的序列是否相同。

[0138] (1) 标记标准 DNA 的制备使用以下引物,扩增分别整合了 HPA-7a 基因、HPA-7b 基因和实施例 1 中所确认的新型等位基因(HPA-7 新)的质粒,以制备一端标记有 DNP(二硝基苯基)而另一端标记有生物素的 PCR 产物,将该产物分别用作 HPA-7a、HPA-7b 和 HPA-7 新的标准 DNA。DNP-WHPA7-A :5' -TCCAGAGCTGGAGTGTAACTG(SEQ ID NO :11) 生物素 -WHPA7-B :5' -CTGGCAGGCACAGTCACAATC(SEQ ID NO :12)

[0139] (2) 样品 DNA 的制备使用以下非标记引物通过 PCR 扩增分别整合了 HPA-7a、HPA-7b 和 HPA-7 新的质粒,以获得样品 DNA。进一步地,使用相同引物扩增事先已知基因型的染色体 DNA 以获得样品 DNA。WHPA7-A :5' -TCCAGAGCTGGAGTGTAACTG(SEQ ID NO :9) WHPA7-B :5' -CTGGCAGGCACAGTCACAATC(SEQ ID NO :10)

[0140] (3) 竞争杂交使用 30 μ l 的 3 \times SSC(终浓度),将两端具有标记的 1 μ l 标准 DNA 和 20 μ l 的样品 DNA 混合,并将所得混合物在 98 $^{\circ}$ C 下加热 10 分钟,以将 DNA 变性为单链。将混合物按 1 $^{\circ}$ C /10 分钟的速度渐渐冷却至 70 $^{\circ}$ C 以退火。此时,具有完全匹配序列的互补链,相较于具有误配(一个或多个)的那些优先地重新构建。即,在具有完全相同于标准 DNA 的序列的样品 DNA 的情形中,标准 DNA 两端的标记被数学地稀释,使得可预测具有两标记的分子的比例约为总数的 1/21。相反,样品 DNA 中不存在相同于标准 DNA 的序列时,在两端具有标记的原始标准 DNA 优先被重新构建。

[0141] (4) 重新构建的标准 DNA 的检测向预先涂覆有链霉亲和素的微型板的孔中添加在两端均具有标记的标准 DNA,将该 DNA 通过末端的生物素维持在孔中。通过对其添加标记有抗 -DNP 抗体的碱性磷酸酶,预计该碱性磷酸酶将通过标准 DNA 被捕获于孔中。对其添加作为该酶底物的 pNPP(对硝基酚),则引起出现黄色。该颜色通过测定 405nm 处的吸光度来定量和检测。在样品 DNA 中存在相同于标准 DNA 的序列的情形中,所述吸光度低,而在不存在相同序列时,则该吸光度高。关于指标值,将混合有水的各标准 DNA 所测得的吸光度定义为 100,并显示了与各样品混合、热变性和温度梯度后所测得的吸光度的比例。该数值为 20 以下时,判定样品对标准 DNA 为阳性,而该数值为 20 以上时,判定该样品为阴性。

[0142] 对于由 HPA-7a、HPA-7b 和 HPA-7 新基因制备的标准 DNA,测量了各样品 DNA 所显示的指标值。结果示于表 4。

表 4

样品 DNA	标准 DNA					
	A405			指标		
	HPA-7a	HPA-7b	HPA-7 新	HPA-7a	HPA-7b	HPA-7 新
阳性对照	0.897	0.984	1.060	100	100	100
HPA-7a	0.049	0.529	0.661	5	54	62
HPA-7b	0.407	0.046	0.695	45	5	66
HPA-7 新	0.577	0.659	0.050	64	67	5
HPA-7a/b	0.095	0.069	0.618	11	7	58
No. 1	0.052	0.543	0.681	6	55	64
No. 2	0.101	0.533	0.135	11	54	13
No. 3	0.062	0.572	0.705	7	58	67
No. 4	0.059	0.535	0.642	7	54	61
No. 5	0.066	0.520	0.637	7	53	60
No. 6	0.040	0.484	0.586	4	49	55
No. 7	0.039	0.467	0.603	4	47	57

[0143] 由克隆了各基因的质粒制备的样品相对于它们各自的标准 DNA 显示了低指标值。

[0144] 此处,样品 No. 1、No. 3 至 No. 7 的指标值相对于 HPA-7a 为 20 以下,而它们相对于 HPA-7b 和 HPA-7 新却均显示超过 50 的数值,故推测它们具有 HPA-7a 的同源基因型。另一方面,样品 No. 2 相对于 HPA-7a 和 HPA-7 新的标准 DNA 显示 20 以下的指标值,故推测其具有 HPA-7a/ 新的杂合基因型。

[0145] 由以上结果,显示 GPIIIa 基因的 1297T 多态性可以通过 PCR-PHFA 方法来检测。

[0146] 实施例 3:通过荧光珠法构建检测新型等位基因的方法现在将描述通过荧光珠法构建检测新型等位基因的方法。在所述荧光珠法 (Clin Chem. 43(9)p1799-801(1997)) 中,可以通过用 2 种荧光染料来染色珠子 (beads) 以便各染料实现 10 个梯度,从而来识别 100 种珠子。通过将不同的探针固定在各珠子上,并与样品 DNA 进行杂交,从而在测定中同时检测到对多个 DNA 探针的反应性。

[0147] (1) 基因扩增使用以下引物根据常规方法对人染色体 DNA 进行 PCR 扩增。生物素 -P6/7FC :5' -CCATCCAGGTGAGCTTCAGC (SEQ ID NO :13) 生物素 -P6/7RC-2 :5' -AGTGGTTGCAGGTATATGAGGG (SEQ IDNO :14)

[0148] (2) Luminex 珠子的预备作为探针序列,将具有以下核苷酸序列的低聚核苷酸根据常规方法固定在 Luminex 珠子 (由 Luminex 制造) 上。珠子 No. 1 (用于检测 HPA-7a 的珠子) :5' -GCTGTCCCAGGAG-3' (SEQ ID NO :15) 珠子 No. 2 (用于检测 HPA-7b 的珠子) :5' -GAGGCTGTGCCAGGA-3' (SEQ ID NO :16) 珠子 No. 3 [用于检测 HPA-7 新的珠子] :5' -GAGGCTGTCCCAGG-3' (SEQ ID NO :17) 珠子 No. 4 (用于检测 HPA-7 的共通珠子) :5' -TGAACCTAATAGCCATCGC-3' (SEQ ID NO :18)

[0149] (3) 杂交和检测作为样品,使用以下物质:样品 No. 1 :具有 HPA-7a 基因的质粒样品 No. 2 :具有 HPA-7b 基因的质粒样品 No. 3 :具有 HPA-7 新基因的质粒样品样品 No. 4 :染色体 DNA No. 001 样品 No. 5 :染色体 DNA No. 019 样品 No. 6 :染色体 DNA No. 193

[0150] 通过利用这些作为样品,进行了 PCR 扩增和与探针的杂交,测量通过结合至珠子的探针捕获到的 PCR 产物的荧光值。

[0151] 首先,将5 μ l 的PCR反应液与5 μ l 的碱溶液混合,以将DNA变性为单链。将所得混合物与25 μ l 的含有上述4种珠子和荧光标记链霉亲和素[由BD Biosciences制造)的杂交溶液混合,从而中和。将所得混合物在55°C下孵育30分钟,以使探针与PCR产物杂交,同时进行PCR产物的荧光标记。然后,在添加洗涤液并混合所得混合物后,通过离心除去上清,以除去未结合至探针的PCR产物和过量的荧光标记链霉亲和素。将珠子混悬于洗涤液,并使用Luminex设备,进行与珠子上的探针杂交的荧光标记PCR产物,和四种珠子的识别。检

测结果如表5所示。[表5]

样品 No.	珠子 No.			
	珠子 No. 1	珠子 No. 2	珠子 No. 3	珠子 No. 4
样品 No. 1	7466	47	78	5503
样品 No. 2	69	12067	1649	5985
样品 No. 3	128	594	12190	5929
样品 No. 4	10017	79	217	7504
样品 No. 5	9611	83	142	7836
样品 No. 6	5355	174	9324	6054

[0152] 关于荧光值,通过设定截断值为2000,染色的细胞变为阳性。因为样品No. 1、样品No. 2和样品No. 3分别是具有HPA-7a、HPA-7b和HPA-7新的序列的质粒,故它们分别与它们各自的探针特异性地反应,而给出比截断值高的荧光值。进一步地,它们均与具有共通序列(commonsequence)作为探针的珠子No. 4反应而给出高荧光值。另一方面,因为染色体DNA即样品No. 4和No. 5对结合有HPA-1a和共通序列的珠子给出高荧光值,故可看出它们具有同型接合的HPA-7a。因为样品No. 6相对于结合有HPA-7a、HPA-7新和共通序列的珠子给出高荧光值,故可看出它具有杂合的HPA-7a和HPA-7新。

[0153] 由以上结果,显示GPIIIa基因的1297T多态性可以通过使用荧光珠法来检测。

cct aat gac ggg cag tgt cat gtt ggt agt gac aat cat tac tct gcc	927
Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Val Gly Ser Asp Asn His Tyr Ser Ala	
270 275 280	
tcc act acc atg gat tat ccc tct ttg ggg ctg atg act gag aag cta	975
Ser Thr Thr Met Asp Tyr Pro Ser Leu Gly Leu Met Thr Glu Lys Leu	
285 290 295	
tcc cag aaa aac atc aat ttg atc ttt gca gtg act gaa aat gta gtc	1023
Ser Gln Lys Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala Val Thr Glu Asn Val Val	
300 305 310 315	
aat ctc tat cag aac tat agt gag ctc atc cca ggg acc aca gtt ggg	1071
Asn Leu Tyr Gln Asn Tyr Ser Glu Leu Ile Pro Gly Thr Thr Val Gly	
320 325 330	
gtt ctg tcc atg gat tcc agc aat gtc ctc cag ctc att gtt gat gct	1119
Val Leu Ser Met Asp Ser Ser Asn Val Leu Gln Leu Ile Val Asp Ala	
335 340 345	
tat ggg aaa atc cgt tct aaa gtc gag ctg gaa gtg cgt gac ctc cct	1167
Tyr Gly Lys Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu Glu Val Arg Asp Leu Pro	
350 355 360	
gaa gag ttg tct cta tcc ttc aat gcc acc tgc ctc aac aat gag gtc	1215
Glu Glu Leu Ser Leu Ser Phe Asn Ala Thr Cys Leu Asn Asn Glu Val	
365 370 375	
atc cct ggc ctc aag tct tgt atg gga ctc aag att gga gac acg gtg	1263
Ile Pro Gly Leu Lys Ser Cys Met Gly Leu Lys Ile Gly Asp Thr Val	
380 385 390 395	
agc ttc agc att gag gcc aag gtg cga ggc tgt tcc cag gag aag gag	1311
Ser Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys Ser Gln Glu Lys Glu	
400 405 410	
aag tcc ttt acc ata aag ccc gtg ggc ttc aag gac agc ctg atc gtc	1359
Lys Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly Phe Lys Asp Ser Leu Ile Val	
415 420 425	
cag gtc acc ttt gat tgt gac tgt gcc tgc cag gcc caa get gaa cct	1407
Gln Val Thr Phe Asp Cys Asp Cys Ala Cys Gln Ala Gln Ala Glu Pro	
430 435 440	
aat agc cat cgc tgc aac aat ggc aat ggg acc ttt gag tgt ggg gta	1455
Asn Ser His Arg Cys Asn Asn Gly Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Val	
445 450 455	
tgc cgt tgt ggg cct ggc tgg ctg gga tcc cag tgt gag tgc tea gag	1503
Cys Arg Cys Gly Pro Gly Trp Leu Gly Ser Gln Cys Glu Cys Ser Glu	
460 465 470 475	

gag gac tat cgc cct tcc cag cag gac gag tgc agc ccc cgg gag ggt	1551
Glu Asp Tyr Arg Pro Ser Gln Gln Asp Glu Cys Ser Pro Arg Glu Gly	
480 485 490	
cag ccc gtc tgc agc cag cgg ggc gag tgc ctc tgt ggt caa tgt gtc	1599
Gln Pro Val Cys Ser Gln Arg Gly Glu Cys Leu Cys Gly Gln Cys Val	
495 500 505	
tgc cac agc agt gac ttt ggc aag atc acg ggc aag tac tgc gag tgt	1647
Cys His Ser Ser Asp Phe Gly Lys Ile Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Cys	
510 515 520	
gac gac ttc tcc tgt gtc cgc tac aag ggg gag atg tgc tca ggc cat	1695
Asp Asp Phe Ser Cys Val Arg Tyr Lys Gly Glu Met Cys Ser Gly His	
525 530 535	
ggc cag tgc agc tgt ggg gac tgc ctg tgt gac tcc gac tgg acc ggc	1743
Gly Gln Cys Ser Cys Gly Asp Cys Leu Cys Asp Ser Asp Trp Thr Gly	
540 545 550 555	
tac tac tgc aac tgt acc acg cgt act gac acc tgc atg tcc agc aat	1791
Tyr Tyr Cys Asn Cys Thr Thr Arg Thr Asp Thr Cys Met Ser Ser Asn	
560 565 570	
ggg ctg ctg tgc agc ggc cgc ggc aag tgt gaa tgt ggc agc tgt gtc	1839
Gly Leu Leu Cys Ser Gly Arg Gly Lys Cys Glu Cys Gly Ser Cys Val	
575 580 585	
tgt atc cag ccg ggc tcc tat ggg gac acc tgt gag aag tgc ccc acc	1887
Cys Ile Gln Pro Gly Ser Tyr Gly Asp Thr Cys Glu Lys Cys Pro Thr	
590 595 600	
tgc cca gat gcc tgc acc ttt aag aaa gaa tgt gtg gag tgt aag aag	1935
Cys Pro Asp Ala Cys Thr Phe Lys Lys Glu Cys Val Glu Cys Lys Lys	
605 610 615	
ttt gac cgg gga gcc cta cat gac gaa aat acc tgc aac cgt tac tgc	1983
Phe Asp Arg Gly Ala Leu His Asp Glu Asn Thr Cys Asn Arg Tyr Cys	
620 625 630 635	
cgt gac gag att gag tca gtg aaa gag ctt aag gac act ggc aag gat	2031
Arg Asp Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Thr Gly Lys Asp	
640 645 650	
gca gtg aat tgt acc tat aag aat gag gat gac tgt gtc gtc aga ttc	2079
Ala Val Asn Cys Thr Tyr Lys Asn Glu Asp Asp Cys Val Val Arg Phe	
655 660 665	
cag tac tat gaa gat tet agt gga aag tcc atc ctg tat gtg gta gaa	2127
Gln Tyr Tyr Glu Asp Ser Ser Gly Lys Ser Ile Leu Tyr Val Val Glu	
670 675 680	

gag cca gag tgt ccc aag ggc cct gac atc ctg gtg gtc ctg ctc tca	2175
Glu Pro Glu Cys Pro Lys Gly Pro Asp Ile Leu Val Val Leu Leu Ser	
685 690 695	
gtg atg ggg gcc att ctg ctc att ggc ctt gcc gcc ctg ctc atc tgg	2223
Val Met Gly Ala Ile Leu Leu Ile Gly Leu Ala Ala Leu Leu Ile Trp	
700 705 710 715	
aaa ctc ctc atc acc atc cac gac cga aaa gaa ttc gct aaa ttt gag	2271
Lys Leu Leu Ile Thr Ile His Asp Arg Lys Glu Phe Ala Lys Phe Glu	
720 725 730	
gaa gaa cgc gcc aga gca aaa tgg gac aca gcc aac aac cca ctg tat	2319
Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr	
735 740 745	
aaa gag gcc acg tet acc ttc acc aat atc acg tac cgg ggc act	2364
Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr	
750 755 760	
taatgataag cagtcatect cagatcatta tcagcctgtg ccaggattgc aggagtccct	2424
gccatcatgt ttacagagga cagtatttgt ggggagggat ttcggggctc agagtggggt	2484
aggttgggag aatgtcagta tgtggaagtg tgggtctgtg tgtgtgtatg tgggggtctg	2544
tgtgtttatg tgtgtgtgtt gtgtgtggga gtgtgtaatt taaaattgtg atgtgtcctg	2604
ataagctgag ctccttagcc tttgteccag aatgcctcct gcagggattc ttctgctta	2664
gcttgagggt gactatggag ctgagcaggt gttcttcatt acctcagtga gaagccagct	2724
ttctcatca ggccattgtc cctgaagaga agggcagggc tgaggcctct cattccagag	2784
gaagggacac caagccttgg ctctaccctg agttcataaa tttatggttc tcaggcctga	2844
ctctcagcag ctatggtagg aactgctggc ttggcagccc gggtcactctg tacctctgcc	2904
tcctttcccc tccctcaggc cgaaggagga gtcagggaga gctgaactat tagagctgcc	2964
tgtgcctttt gccateccct caaccagct atggttctct cgcaaggga gtccttgcaa	3024
gctaattctt tgacctgttg ggagtgagga tgtctgggcc actcaggggt cattcatgga	3084
ctgggggatg taccagcatt cccagttca taatcacaac ccttcaaaga tttgcttat	3144
tggcagctct actctggagg tttgtttaga agaagtgtgt cacccttagg ccagcaccat	3204
ctctttacct cctaattcca caccctcact gctgtagaca tttgctatga cctggggatg	3264
tctctcatga ccaaattgctt ttectcaaag ggagagagtg ctattgtaga gccagagtc	3324
tggccctatg cttecgccct cctgtccctc atccatagca cctccacata cctggccctg	3384
agccttgggtg tgctgtatec atccatgggg ctgattgtat ttaccttcta cctcttggct	3444
gccttgtgaa ggaattatc ccatgagttg gctgggaata agtgccagga tggaatgatg	3504
ggtcagttgt atcagcacgt gtggcctgtt ctctatggg ttacaacctc atttaactca	3564
gtctttaate tgagaggcca cagtgcatt ttattttatt tttctcatga tgaggtttc	3624
ttaacttaaa agaacatgta tataaacatg cttgcattat atttgtaaat ttatgtgtat	3684
ggcaaagaag gagagcatag gaaaccacac agacttgggc agggtagaga cactcccact	3744
tggcatcatt cacagcaagt cactggccag tggctggatc tgtgaggggc tctctcatga	3804

tagaaggcta tgggataga tgtgtggaca cattggacct ttcctgagga agagggactg 3864
 ttcttttgtc ccagaaaagc agtggctcca ttggtgttga catacatcca acattaaaag 3924
 ccacccccaa atgccaaga aaaaaagaaa gacttatcaa catttgttcc atgagcagaa 3984
 aactggagct ctggcctcag tgttacagct aaataatctt taattaaggc aagtcacttt 4044
 cttcttctta aagctgtttc tagtttgaga aatgatggga ttttagcagc cagtcttgaa 4104
 ggtctctttc agtatcaaca ttctaagatg ctgggactta ctgtgtcatc aatgtgcgg 4164
 ttaagattct ctgggatatt gatactgttt gtgttttttag ttgggagatc tgagagacct 4224
 ggctttggca agagcagatg tcattccata tcacctttct caatgaaagt ctcatctat 4284
 cctctctcca aaccgtttt ccaacatttg ttaatagtta cgtctctcct gatgtagcac 4344
 ttaagcttca tttagttatt atttctttct tcaactttgca cacatttgca tccacatatt 4404
 agggaaggaa taagtagctg caaactatct attcctgtat tattgtgtta acattgagat 4464
 aaacc 4469

<210>2

<211>762

<212>PRT

<213> 智人

<400>2

Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys
 1 5 10 15
 Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro
 20 25 30
 Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn
 35 40 45
 Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu
 50 55 60
 Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp
 85 90 95
 Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val
 100 105 110
 Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu
 115 120 125
 Trp Ser Ile Gln Asn Leu Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys
 130 135 140
 Leu Thr Ser Asn Leu Arg Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro

145	150	155	160
Val Ser Pro Tyr Met Tyr Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro			
	165	170	175
Cys Tyr Asp Met Lys Thr Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His			
	180	185	190
Val Leu Thr Leu Thr Asp Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys			
	195	200	205
Lys Gln Ser Val Ser Arg Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp			
	210	215	220
Ala Ile Met Gln Ala Thr Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn			
225	230	235	240
Asp Ala Ser His Leu Leu Val Phe Thr Thr Asp Ala Lys Thr His Ile			
	245	250	255
Ala Leu Asp Gly Arg Leu Ala Gly Ile Val Gln Pro Asn Asp Gly Gln			
	260	265	270
Cys His Val Gly Ser Asp Asn His Tyr Ser Ala Ser Thr Thr Met Asp			
	275	280	285
Tyr Pro Ser Leu Gly Leu Met Thr Glu Lys Leu Ser Gln Lys Asn Ile			
	290	295	300
Asn Leu Ile Phe Ala Val Thr Glu Asn Val Val Asn Leu Tyr Gln Asn			
305	310	315	320
Tyr Ser Glu Leu Ile Pro Gly Thr Thr Val Gly Val Leu Ser Met Asp			
	325	330	335
Ser Ser Asn Val Leu Gln Leu Ile Val Asp Ala Tyr Gly Lys Ile Arg			
	340	345	350
Ser Lys Val Glu Leu Glu Val Arg Asp Leu Pro Glu Glu Leu Ser Leu			
	355	360	365
Ser Phe Asn Ala Thr Cys Leu Asn Asn Glu Val Ile Pro Gly Leu Lys			
	370	375	380
Ser Cys Met Gly Leu Lys Ile Gly Asp Thr Val Ser Phe Ser Ile Glu			
385	390	395	400
Ala Lys Val Arg Gly Cys Ser Gln Glu Lys Glu Lys Ser Phe Thr Ile			
	405	410	415
Lys Pro Val Gly Phe Lys Asp Ser Leu Ile Val Gln Val Thr Phe Asp			
	420	425	430
Cys Asp Cys Ala Cys Gln Ala Gln Ala Glu Pro Asn Ser His Arg Cys			
	435	440	445
Asn Asn Gly Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Val Cys Arg Cys Gly Pro			
	450	455	460

Gly Trp Leu Gly Ser Gln Cys Glu Cys Ser Glu Glu Asp Tyr Arg Pro																	
465					470					475							480
Ser Gln Gln Asp Glu Cys Ser Pro Arg Glu Gly Gln Pro Val Cys Ser																	
					485					490							495
Gln Arg Gly Glu Cys Leu Cys Gly Gln Cys Val Cys His Ser Ser Asp																	
					500					505							510
Phe Gly Lys Ile Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Cys Asp Asp Phe Ser Cys																	
					515					520							525
Val Arg Tyr Lys Gly Glu Met Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Ser Cys																	
					530					535							540
Gly Asp Cys Leu Cys Asp Ser Asp Trp Thr Gly Tyr Tyr Cys Asn Cys																	
545					550					555							560
Thr Thr Arg Thr Asp Thr Cys Met Ser Ser Asn Gly Leu Leu Cys Ser																	
					565					570							575
Gly Arg Gly Lys Cys Glu Cys Gly Ser Cys Val Cys Ile Gln Pro Gly																	
					580					585							590
Ser Tyr Gly Asp Thr Cys Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys																	
					595					600							605
Thr Phe Lys Lys Glu Cys Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Gly Ala																	
					610					615							620
Leu His Asp Glu Asn Thr Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu																	
625					630					635							640
Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr																	
					645					650							655
Tyr Lys Asn Glu Asp Asp Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp																	
					660					665							670
Ser Ser Gly Lys Ser Ile Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro																	
					675					680							685
Lys Gly Pro Asp Ile Leu Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile																	
					690					695							700
Leu Leu Ile Gly Leu Ala Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr																	
705					710					715							720
Ile His Asp Arg Lys Glu Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg																	
					725					730							735
Ala Lys Trp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser																	
					740					745							750
Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr																	
					755					760							

30	35	40	
ctg ctg aag gat aac tgt gcc cca gaa tcc atc gag ttc cca gtg agt			255
Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser			
45	50	55	60
gag gcc cga gta cta gag gac agg ccc ctc agc gac aag ggc tct gga			303
Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly			
	65	70	75
gac agc tcc cag gtc act caa gtc agt ccc cag agg att gca ctc cgg			351
Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu Arg			
	80	85	90
ctc cgg cca gat gat tcg aag aat ttc tcc atc caa gtg cgg cag gtg			399
Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg Gln Val			
	95	100	105
gag gat tac cct gtg gac atc tac tac ttg atg gac ctg tct tac tcc			447
Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser			
	110	115	120
atg aag gat gat ctg tgg agc atc cag aac ctg ggt acc aag ctg gcc			495
Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu Gly Thr Lys Leu Ala			
	125	130	135
140			
acc cag atg cga aag ctc acc agt aac ctg cgg att ggc ttc ggg gca			543
Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg Ile Gly Phe Gly Ala			
	145	150	155
ttt gtg gac aag cct gtg tca cca tac atg tat atc tcc cca cca gag			591
Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr Ile Ser Pro Pro Glu			
	160	165	170
gcc ctc gaa aac ccc tgc tat gat atg aag acc acc tgc ttg ccc atg			639
Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr Thr Cys Leu Pro Met			
	175	180	185
ttt ggc tac aaa cac gtg ctg acg cta act gac cag gtg acc cgc ttc			687
Phe Gly Tyr Lys His Val Leu Thr Leu Thr Asp Gln Val Thr Arg Phe			
	190	195	200
aat gag gaa gtg aag aag cag agt gtg tca cgg aac cga gat gcc cca			735
Asn Glu Glu Val Lys Lys Gln Ser Val Ser Arg Asn Arg Asp Ala Pro			
	205	210	215
220			
gag ggt ggc ttt gat gcc atc atg cag gct aca gtc tgt gat gaa aag			783
Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Thr Val Cys Asp Glu Lys			
	225	230	235
att ggc tgg agg aat gat gca tcc cac ttg ctg gtg ttt acc act gat			831
Ile Gly Trp Arg Asn Asp Ala Ser His Leu Leu Val Phe Thr Thr Asp			

240	245	250	
gcc aag act cat ata gca ttg gac gga agg ctg gca ggc att gtc cag			879
Ala Lys Thr His Ile Ala Leu Asp Gly Arg Leu Ala Gly Ile Val Gln			
255	260	265	
cct aat gac ggg cag tgt cat gtt ggt agt gac aat cat tac tct gcc			927
Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Val Gly Ser Asp Asn His Tyr Ser Ala			
270	275	280	
tcc act acc atg gat tat ccc tct ttg ggg ctg atg act gag aag cta			975
Ser Thr Thr Met Asp Tyr Pro Ser Leu Gly Leu Met Thr Glu Lys Leu			
285	290	295	300
tcc cag aaa aac atc aat ttg atc ttt gca gtg act gaa aat gta gtc			1023
Ser Gln Lys Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala Val Thr Glu Asn Val Val			
305	310	315	
aat ctc tat cag aac tat agt gag ctc atc cca ggg acc aca gtt ggg			1071
Asn Leu Tyr Gln Asn Tyr Ser Glu Leu Ile Pro Gly Thr Thr Val Gly			
320	325	330	
gtt ctg tcc atg gat tcc agc aat gtc ctc cag ctc att gtt gat get			1119
Val Leu Ser Met Asp Ser Ser Asn Val Leu Gln Leu Ile Val Asp Ala			
335	340	345	
tat ggg aaa atc cgt tct aaa gtc gag ctg gaa gtg cgt gac ctc cct			1167
Tyr Gly Lys Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu Glu Val Arg Asp Leu Pro			
350	355	360	
gaa gag ttg tct cta tcc ttc aat gcc acc tgc ctc aac aat gag gtc			1215
Glu Glu Leu Ser Leu Ser Phe Asn Ala Thr Cys Leu Asn Asn Glu Val			
365	370	375	380
atc cct ggc ctc aag tct tgt atg gga ctc aag att gga gac acg gtg			1263
Ile Pro Gly Leu Lys Ser Cys Met Gly Leu Lys Ile Gly Asp Thr Val			
385	390	395	
agc ttc agc att gag gcc aag gtg cga ggc tgt ccc cag gag aag gag			1311
Ser Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys Pro Gln Glu Lys Glu			
400	405	410	
aag tcc ttt acc ata aag ccc gtg ggc ttc aag gac agc ctg atc gtc			1359
Lys Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly Phe Lys Asp Ser Leu Ile Val			
415	420	425	
cag gtc acc ttt gat tgt gac tgt gcc tgc cag gcc caa get gaa cct			1407
Gln Val Thr Phe Asp Cys Asp Cys Ala Cys Gln Ala Gln Ala Glu Pro			
430	435	440	
aat agc cat cgc tgc aac aat ggc aat ggg acc ttt gag tgt ggg gta			1455
Asn Ser His Arg Cys Asn Asn Gly Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Val			

445	450	455	460	
tgc cgt tgt ggg cct ggc tgg ctg gga tcc cag tgt gag tgc tca gag				1503
Cys Arg Cys Gly Pro Gly Trp Leu Gly Ser Gln Cys Glu Cys Ser Glu				
	465	470	475	
gag gac tat cgc cct tcc cag cag gac gag tgc agc ccc cgg gag ggt				1551
Glu Asp Tyr Arg Pro Ser Gln Gln Asp Glu Cys Ser Pro Arg Glu Gly				
	480	485	490	
cag ccc gtc tgc agc cag cgg ggc gag tgc ctc tgt ggt caa tgt gtc				1599
Gln Pro Val Cys Ser Gln Arg Gly Glu Cys Leu Cys Gly Gln Cys Val				
	495	500	505	
tgc cac agc agt gac ttt ggc aag atc acg ggc aag tac tgc gag tgt				1647
Cys His Ser Ser Asp Phe Gly Lys Ile Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Cys				
	510	515	520	
gac gac ttc tcc tgt gtc cgc tac aag ggg gag atg tgc tca ggc cat				1695
Asp Asp Phe Ser Cys Val Arg Tyr Lys Gly Glu Met Cys Ser Gly His				
	525	530	535	540
ggc cag tgc agc tgt ggg gac tgc ctg tgt gac tcc gac tgg acc ggc				1743
Gly Gln Cys Ser Cys Gly Asp Cys Leu Cys Asp Ser Asp Trp Thr Gly				
	545	550	555	
tac tac tgc aac tgt acc acg cgt act gac acc tgc atg tcc agc aat				1791
Tyr Tyr Cys Asn Cys Thr Thr Arg Thr Asp Thr Cys Met Ser Ser Asn				
	560	565	570	
ggg ctg ctg tgc agc ggc cgc ggc aag tgt gaa tgt ggc agc tgt gtc				1839
Gly Leu Leu Cys Ser Gly Arg Gly Lys Cys Glu Cys Gly Ser Cys Val				
	575	580	585	
tgt atc cag ccg ggc tcc tat ggg gac acc tgt gag aag tgc ccc acc				1887
Cys Ile Gln Pro Gly Ser Tyr Gly Asp Thr Cys Glu Lys Cys Pro Thr				
	590	595	600	
tgc cca gat gcc tgc acc ttt aag aaa gaa tgt gtg gag tgt aag aag				1935
Cys Pro Asp Ala Cys Thr Phe Lys Lys Glu Cys Val Glu Cys Lys Lys				
	605	610	615	620
ttt gac cgg gga gcc cta cat gac gaa aat acc tgc aac cgt tac tgc				1983
Phe Asp Arg Gly Ala Leu His Asp Glu Asn Thr Cys Asn Arg Tyr Cys				
	625	630	635	
cgt gac gag att gag tca gtg aaa gag ctt aag gac act ggc aag gat				2031
Arg Asp Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Thr Gly Lys Asp				
	640	645	650	
gca gtg aat tgt acc tat aag aat gag gat gac tgt gtc gtc aga ttc				2079
Ala Val Asn Cys Thr Tyr Lys Asn Glu Asp Asp Cys Val Val Arg Phe				

655	660	665	
cag tac tat gaa gat tct agt gga aag tcc atc ctg tat gtg gta gaa			2127
Gln Tyr Tyr Glu Asp Ser Ser Gly Lys Ser Ile Leu Tyr Val Val Glu			
670	675	680	
gag cca gag tgt ccc aag ggc cct gac atc ctg gtg gtc ctg ctc tea			2175
Glu Pro Glu Cys Pro Lys Gly Pro Asp Ile Leu Val Val Leu Leu Ser			
685	690	695	700
gtg atg ggg gcc att ctg ctc att ggc ctt gcc gcc ctg ctc atc tgg			2223
Val Met Gly Ala Ile Leu Leu Ile Gly Leu Ala Ala Leu Leu Ile Trp			
705	710	715	
aaa ctc ctc atc acc atc cac gac cga aaa gaa ttc gct aaa ttt gag			2271
Lys Leu Leu Ile Thr Ile His Asp Arg Lys Glu Phe Ala Lys Phe Glu			
720	725	730	
gaa gaa cgc gcc aga gca aaa tgg gac aca gcc aac aac cca ctg tat			2319
Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr			
735	740	745	
aaa gag gcc acg tct acc ttc acc aat atc acg tac cgg ggc act			2364
Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr			
750	755	760	
taatgataag cagtcacct cagatcatta tcagcctgtg ccaggattgc aggagtcct			2424
gccatcatgt ttacagagga cagtatttgt ggggagggat ttcggggctc agagtgggg			2484
aggttgggag aatgfcagta tgtggaagtg tgggtctgtg tgtgtgtatg tgggggtctg			2544
tgtgtttatg tgtgtgtgtt gtgtgtggga gtgtgtaatt taaaattgtg atgtgtcctg			2604
ataagctgag ctccttagcc tttgtcccag aatgcctcct gcagggattc ttctgtetta			2664
gcttgagggt gactatggag ctgagcaggt gttcttcatt acctcagtga gaagccagct			2724
ttctcatca ggccattgtc cctgaagaga agggcagggc tgaggcctct cattccagag			2784
gaagggacac caagccttgg ctctaccctg agttcataaa tttatggttc tcaggcctga			2844
ctctcagcag ctatggtagg aactgctggc ttggcagccc gggcatctg tacctctgcc			2904
tcctttccc tcctcaggc cgaaggagga gtcagggaga gtgaactat tagagctgcc			2964
tgtgcctttt gccatcccct caaccagct atggttctct cgcaaggaa gtccttgcaa			3024
gctaattctt tgacctgttg ggagtgagga tgtctgggcc actcaggggt cattcatggc			3084
ctgggggatg taccagcatc tcccagttca taatcaaac cttcaaaga tttgccttat			3144
tggcagctct actctggagg tttgtttaga agaagtgtgt cacccttagg ccagcaccat			3204
ctctttacct cetaattcca caccctcact gctgtagaca tttgctatga cctggggatg			3264
tctctcatga ccaaatgctt ttctcaaag ggagagagtg ctattgtaga gccagagtc			3324
tggccctatg cttecggect cctgtccctc atccatagca cctccacata cctggccctg			3384
agccttggtg tgctgtatcc atccatgggg ctgattgtat ttacctteta cctcttgget			3444
gccttggtgaa ggaattatc ccatgagttg gctgggaata agtgccagga tggaatgatg			3504
ggtcagttgt atcagcacgt gtggcctgtt cttctatggg ttacaacctc atttaactca			3564

115	120	125
Trp Ser Ile Gln Asn Leu Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys		
130	135	140
Leu Thr Ser Asn Leu Arg Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro		
145	150	155
Val Ser Pro Tyr Met Tyr Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro		160
	165	170
Cys Tyr Asp Met Lys Thr Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His		175
	180	185
Val Leu Thr Leu Thr Asp Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys		190
	195	200
Lys Gln Ser Val Ser Arg Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp		205
	210	215
Ala Ile Met Gln Ala Thr Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn		220
225	230	235
Asp Ala Ser His Leu Leu Val Phe Thr Thr Asp Ala Lys Thr His Ile		240
	245	250
Ala Leu Asp Gly Arg Leu Ala Gly Ile Val Gln Pro Asn Asp Gly Gln		255
	260	265
Cys His Val Gly Ser Asp Asn His Tyr Ser Ala Ser Thr Thr Met Asp		270
	275	280
Tyr Pro Ser Leu Gly Leu Met Thr Glu Lys Leu Ser Gln Lys Asn Ile		285
	290	295
Asn Leu Ile Phe Ala Val Thr Glu Asn Val Val Asn Leu Tyr Gln Asn		300
305	310	315
Tyr Ser Glu Leu Ile Pro Gly Thr Thr Val Gly Val Leu Ser Met Asp		320
	325	330
Ser Ser Asn Val Leu Gln Leu Ile Val Asp Ala Tyr Gly Lys Ile Arg		335
	340	345
Ser Lys Val Glu Leu Glu Val Arg Asp Leu Pro Glu Glu Leu Ser Leu		350
	355	360
Ser Phe Asn Ala Thr Cys Leu Asn Asn Glu Val Ile Pro Gly Leu Lys		365
	370	375
Ser Cys Met Gly Leu Lys Ile Gly Asp Thr Val Ser Phe Ser Ile Glu		380
385	390	395
Ala Lys Val Arg Gly Cys Pro Gln Glu Lys Glu Lys Ser Phe Thr Ile		400
	405	410
Lys Pro Val Gly Phe Lys Asp Ser Leu Ile Val Gln Val Thr Phe Asp		415
	420	425
		430

Cys Asp Cys Ala Cys Gln Ala Gln Ala Glu Pro Asn Ser His Arg Cys
 435 440 445
 Asn Asn Gly Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Val Cys Arg Cys Gly Pro
 450 455 460
 Gly Trp Leu Gly Ser Gln Cys Glu Cys Ser Glu Glu Asp Tyr Arg Pro
 465 470 475 480
 Ser Gln Gln Asp Glu Cys Ser Pro Arg Glu Gly Gln Pro Val Cys Ser
 485 490 495
 Gln Arg Gly Glu Cys Leu Cys Gly Gln Cys Val Cys His Ser Ser Asp
 500 505 510
 Phe Gly Lys Ile Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Cys Asp Asp Phe Ser Cys
 515 520 525
 Val Arg Tyr Lys Gly Glu Met Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Ser Cys
 530 535 540
 Gly Asp Cys Leu Cys Asp Ser Asp Trp Thr Gly Tyr Tyr Cys Asn Cys
 545 550 555 560
 Thr Thr Arg Thr Asp Thr Cys Met Ser Ser Asn Gly Leu Leu Cys Ser
 565 570 575
 Gly Arg Gly Lys Cys Glu Cys Gly Ser Cys Val Cys Ile Gln Pro Gly
 580 585 590
 Ser Tyr Gly Asp Thr Cys Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys
 595 600 605
 Thr Phe Lys Lys Glu Cys Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Gly Ala
 610 615 620
 Leu His Asp Glu Asn Thr Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu
 625 630 635 640
 Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr
 645 650 655
 Tyr Lys Asn Glu Asp Asp Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp
 660 665 670
 Ser Ser Gly Lys Ser Ile Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro
 675 680 685
 Lys Gly Pro Asp Ile Leu Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile
 690 695 700
 Leu Leu Ile Gly Leu Ala Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr
 705 710 715 720
 Ile His Asp Arg Lys Glu Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg
 725 730 735
 Ala Lys Trp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser

740 745 750
 Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr
 755 760

<210>7

<211>191

<212>DNA

<213> 智人

<400>7

cagagctgga gtgttaactg ggcccaactg tgtctaaata caatctttct ttccatccag 60
 gtgagcttca gcattgagge caaggtgcca ggctgttccc aggagaagga gaagtccttt 120
 accataaage cegtgggctt caaggacagc ctgatcgtcc aggtcacctt tgattggact 180
 gtgcctgcca g 191

<210>8

<211>70

<212>PRT

<213> 智人

<400>8

Trp Ala Gln Leu Cys Leu Asn Thr Ile Phe Leu Ser Ile Gln Val Ser
 1 5 10 15
 Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys Ser Gln Glu Lys Glu Lys
 20 25 30
 Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly Phe Lys Asp Ser Leu Ile Val Gln
 35 40 45
 Val Thr Phe Asp Cys Asp Cys Ala Cys Gln Ala Gln Ala Glu Pro Asn
 50 55 60
 Ser His Arg Cys Asn Asn
 65 70

<210>9

<211>22

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>9

tccagagctg gagtggttaac tg 22

<210>10

<211>21

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>10

ctggcaggca cagtcacaat c 21

<210>11

<211>22

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>11

tccagagctg gagtggttaac tg 22

<210>12

<211>21

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>12

ctggcaggca cagtcacaat c 21

<210>13

<211>20

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>13

ccatccaggt gagcttcagc

20

<210>14

<211>22

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>14

agtggttgca ggtatatgag gg

22

<210>15

<211>14

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 探针

<400>15

gctgtcccca ggag

14

<210>16

<211>16

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 探针

<400>16

gaggctgtgc ccagga 16

<210>17

<211>15

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 探针

<400>17

gaggctgttc ccagg 15

<210>18

<211>19

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 探针

<400>18

tgaacctaat agccatcgc 19

专利名称(译)	新型GPIIIa基因		
公开(公告)号	CN101849003A	公开(公告)日	2010-09-29
申请号	CN200880025067.3	申请日	2008-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	日本红十字会		
申请(专利权)人(译)	日本红十字会		
当前申请(专利权)人(译)	日本红十字会		
[标]发明人	谷上纯子 石井博之 前川尻真司 永田希美 冈孝纪		
发明人	谷上纯子 石井博之 前川尻真司 永田希美 冈孝纪		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C12Q2600/156 C12Q1/6883 G01N2800/222 C07K16/2848 G01N2800/245 G01N33/86 C07K14/70557		
代理人(译)	张萍 李连涛		
优先权	2007139642 2007-05-25 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的是提供用于测定新生儿异体免疫性凝血细胞减少性紫癜或其发病风险的探针、引物、引物组和抗体。根据本发明，提供探针、引物、引物组和抗体，以用于GPIIIa基因的第1297位的胸腺嘧啶残基的检测。