



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101960021 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 26

(21) 申请号 200980106710. X *C12N 15/09* (2006. 01)
(22) 申请日 2009. 02. 27 *C12Q 1/04* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *G01N 33/48* (2006. 01)
2008-048197 2008. 02. 28 JP *G01N 33/53* (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日
2010. 08. 27
(86) PCT申请的申请数据
PCT/JP2009/053700 2009. 02. 27
(87) PCT申请的公布数据
W02009/107785 JA 2009. 09. 03
(71) 申请人 希森美康株式会社
地址 日本兵库县
(72) 发明人 池田昌郁 宇贺均 田中聪
宫本佳昭 柳田匡俊 仓田宽一
门脇正和
(74) 专利代理机构 北京市安伦律师事务所
11339
代理人 吴华 张小英
(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006. 01) 权利要求书 3 页 说明书 31 页 序列表 2 页
附图 0 页

(54) 发明名称
产生 IL-17 的辅助 T 细胞检测用标记及产生
IL-17 的辅助 T 细胞的检测方法

(57) 摘要
本发明涉及一种用于特异性检测产生 IL-17 的辅助 T 细胞 (Th17 细胞) 的多聚核苷酸标记或蛋白质标记以及 Th17 细胞检测方法, 该方法的特征是包括检测这些物质的存在。

1. 一种 IL-17 产生辅助 T 细胞 (Th17 细胞) 检测用多聚核苷酸标记, 且该多聚核苷酸选自以下基因群和基因片段:

编码白细胞介素 17A、白细胞介素 22 和白细胞介素 *tifb* 等细胞因子的基因;

编码趋化因子 CC 基元配体 20 这一趋化因子的基因;

编码属于以下群的膜蛋白质的基因: 白细胞介素 17 受体 E、白细胞介素 1 受体 1、白细胞介素 27 受体 A、G 蛋白偶联受体 15、稳定素 1、平足蛋白、含横跨膜和免疫球蛋白域 1、黑素肾上腺皮质激素 2 受体、横跨膜蛋白质 176A、孕酮和 *adipoQ* 受体家族成员 VIII、含靠停蛋白域 1、ELVOL 家族成员 7、淋巴细胞抗原 6 复合体基因座 K、G 蛋白偶联受体 183 (eb 病毒诱导基因 2)、杀伤细胞凝集素样受体亚家族 B 成员 1F、铁传递蛋白受体 2、神经元特异性基因家族成员 2、横跨膜蛋白质 176B、淀粉状蛋白 β (A4) 前体样蛋白 2、免疫球蛋白 J 链、附着分子含 Ig 样域 2、低亲和性 Fc 受体 IgG IIb、大麻类受体 2、肿瘤坏死因子受体超家族成员 14、水通道蛋白 3、Clq 及肿瘤坏死因子相关蛋白质 3、突触结合蛋白 XI、含钾通道四聚化域 12、载脂蛋白 L7b (表达序列 BC085284)、载脂蛋白 L7e (载脂蛋白 L3 类似物)、溶质载体家族 34 成员 3、细胞性视网膜结合蛋白 1、细胞性视网膜结合蛋白 I 类似物、钾大电导钙活化通道 (亚家族 M, β 成员 4)、钙离子激活钾离子通道 β 4 亚组类似物、SYS1 高尔基体局限化的集成膜蛋白同系物 (RIKEN cDNA 2610042014 基因)、及溶质载体家族 38 成员 6 (表达序列 AW322671);

编码属于 POU 域类 2 相关因子 1、T 细胞特异性转录因子 7、含 WW 域转录调节因子 1、毛发鼻指综合征 1、中心体蛋白 290、及共济失调蛋白 2 结合蛋白 1 之中的转录及翻译因子的基因;

编码属于以下群的信号分子的基因: Ras 相关关联糖尿病、乳腺癌抗雌激素抗性 3、Rab38 (RAS 癌基因家族成员)、矢车菊苷蛋白 γ 2、SH3 及 PX 域 2B、FERM、RhoGEF 和血小板白细胞 C 激酶底物域蛋白 2、失效同系物 2、B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1a、B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1b 及 B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1d;

编码转化生长因子 β 引导这一粘附分子的基因;

编码属于以下物质群的酶的基因: 细胞色素 P450, 家族 1, 亚家族 b, 多肽 1、含 EH 结构域 3、基质金属肽酶 13、羧肽酶 D、碳酸酐酶 13、葡糖胺 (N-乙酰) 转移酶 2、I 分支酶、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A2、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A6A、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A6B、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A10、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A7C、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A5、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A9、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A1、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A8 类似物、UDP-GlcNAc: β Gal β 1, 3-N 乙酰葡糖氨基转移酶 8、骨形态发生蛋白 1、尿嘧啶核苷磷酸化酶 1、肌浆球蛋白 III B、 β 位点 APP 裂解酶 2、肥大细胞蛋白酶 1、COX10 同系物, 细胞色素 c 氧化酶组装蛋白, 血红素 A: 法呢酰转移酶、发动蛋白 3、前列腺酸性磷酸酶、磷酸二酯酶 5A, cGMP 特异、含 Patatin 样磷酸酯酶域 7、RIKEN cDNA 1300007F04 基因、RIKEN cDNA1810062018 基因、磷酸酶孤儿素 1 (表达序列 AI447357、ABI 基因家族成员 3) 及多发性外生骨疣 1;

编码属于以下群体的酶抑制剂的基因: 丝氨酸 (或半胱氨酸) 肽酶抑制剂 B 簇成员 1a、蛋白磷酸酶 1 调节 (抑制剂) 亚基 14c、精巢特异性 cAMP 依赖性蛋白激酶抑制因子 β 、组织抑制剂金属蛋白酶 1、丝氨酸 (或半胱氨酸) 肽酶抑制剂 I 簇成员 1、淀粉状蛋白 β (A4)

前体蛋白及 WAP 四二硫化物核心域 2；

编码含半胱氨酸丰富分泌蛋白 LCCL 域 2 这一分泌蛋白的基因；

编码属于以下群体的结构蛋白的基因：肌动蛋白丝束蛋白 1（表达序列 AI427122）、免疫球蛋白重链复合物、免疫球蛋白重链 1a（血清 IgG2a）、免疫球蛋白重链 2（血清 IgA）、免疫球蛋白重链 1a、免疫球蛋白重链（J558 家族）、免疫球蛋白重链（ γ -多肽）、免疫球蛋白 μ 链类似物、免疫球蛋白重链 V 区 3 前体类似物、免疫球蛋白重链可变区、免疫球蛋白重链 V 区 102 前体类似物、免疫球蛋白重链 3、星云状小体、内腔蛋白、杀菌性 / 通透性增加蛋白样 2、KELCH 样 8、三重基序蛋白 2、PDZ 及 LIM 域 5、角蛋白 86、驱动蛋白家族成员 3C、驱动蛋白家族成员 1B 及驱动蛋白家族成员 5C；

属于中足性梳样 4、高移动族 AT 钩 2 假基因 1、RIKEN cDNA 2310007L24 基因、RIKEN cDNA 2310002J15 基因、序列相似家族 101，成员 B（RIKEN cDNA1500005K14 基因）、表达序列 AI646023 及含 GRAM 域 3 其中之一基因，及

属于 TOX 高移动族框蛋白家族成员 2（表达序列 AI851523）、RIKEN cDNA6030439D06 基因、RIKEN cDNA 9030418K01 基因、表达序列 AU015680、有序列号 1 的碱基序列的多核甙酸、及有序列号 2 的碱基序列的多核甙酸之一的表达序列片段（EST）。

2. 权利要求 1 所述 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记，其特征在于，其选自以下基因群和片段群：

编码白细胞介素 17A、白细胞介素 22 和白细胞介素 *tifb* 等细胞因子的基因；

编码选自以下群的膜蛋白质的基因：白细胞介素 1 受体 1、白细胞介素 27 受体 A、G-蛋白偶联受体 15、稳定素 1、载脂蛋白 L7b（表达序列 BC085284）、载脂蛋白 L7e（载脂蛋白 L3 类似物）、Clq 及肿瘤坏死因子相关蛋白质 3、大麻类受体 2、低亲和性 Fc 受体 IgG IIb、G 蛋白偶联受体 183（eb 病毒诱导基因 2）、细胞性视网膜结合蛋白 1、细胞性视网膜结合蛋白 I 类似物、淋巴细胞抗原 6 复合物基因座 K、溶质载体家族 38 成员 6（表达序列 AW322671）、突触结合蛋白 XI、横跨膜蛋白 176A、横跨膜蛋白 176B、及肿瘤坏死因子受体超家族成员 14；

编码选自 T 细胞特异性转录因子 7 和含 WW 域转录调节因子 1 之中的转录及翻译因子的基因；

编码选自 B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1a、B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1b 及 B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1d、失效同系物 2、Ras 相关关联糖尿病及 SH3 及 PX 域 2B 之中的信号分子的基因；

编码粘附分子 - 转化生长因子 β 引导的基因；

编码属于以下群的酶的基因：前列腺酸性磷酸酶、UDP-GlcNAc： β Gal β 1,3-N 乙酰葡萄糖氨基转移酶 8、骨形态发生蛋白 1、碳酸酐酶 13、细胞色素 P450，家族 1，亚家族 b，多肽 1、葡萄糖胺（N-乙酰）转移酶 2，I 分支酶、UDP 葡萄糖醛酸基转移酶 1 家族，多肽 A2、UDP 葡萄糖醛酸基转移酶 1 家族，多肽 A6A、UDP 葡萄糖醛酸基转移酶 1 家族，多肽 A6B、UDP 葡萄糖醛酸基转移酶 1 家族，多肽 A10、UDP 葡萄糖醛酸基转移酶 1 家族，多肽 A7C、UDP 葡萄糖醛酸基转移酶 1 家族，多肽 A5、UDP 葡萄糖醛酸基转移酶 1 家族，多肽 A9、UDP 葡萄糖醛酸基转移酶 1 家族，多肽 A1、UDP 葡萄糖醛酸基转移酶 1 家族，多肽 A8 类似物、基质金属蛋白酶 13、磷酸二酯酶 5A，cGMP 特异、磷酸酶孤儿素 1（表达序列 AI447357、ABI 基因家族成员 3）和尿嘧啶核苷磷酸化酶 1；

编码选自酶抑制剂丝氨酸（或半胱氨酸）肽酶抑制剂 B 簇成员 1a 和组织抑制剂金属

蛋白酶 1 之中的基因；

编码分泌蛋白 - 含半胱氨酸丰富分泌蛋白 LCCL 域 2 的基因；

编码结构蛋白 - 选自驱动蛋白家族成员 5C 和内腔蛋白之中的基因, 以及

属于 RIKEN cDNA 6030439D06 基因和 RIKEN cDNA 9030418K01 基因的表达序列片段 (EST)。

3. 权利要求 1 所述 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记, 其特征在于, 其多聚核苷酸属于以下基因群和片段群：

编码细胞因子白细胞介素 17A 的基因；

编码选自白细胞介素 1 受体 1、载脂蛋白 L7b (表达序列 BC085284)、载脂蛋白 L7e (载脂蛋白 L3 类似物)、大麻类受体 2、低亲和性 Fc 受体 IgG IIb、溶质载体家族 38 成员 6 (表达序列 AW322671)、及横跨膜蛋白 176A 之中的膜蛋白质的基因；

编码选自 B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1a、B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1b 及 B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1d 之中的信号分子的基因；

编码基质金属肽酶 13 这一酶的基因；

编码酶抑制剂——组织抑制剂金属蛋白酶 1 的基因, 以及

编码含半胱氨酸丰富分泌蛋白 LCCL 域 2 这一分泌蛋白的基因。

4. 由经权利要求 1 所述基因编码的蛋白质构成的 Th17 细胞检测用蛋白质标记。

5. 一种检测 Th17 细胞的方法, 其特征在于: 在含有细胞的试样中检测是否有权利要求 1 所述 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记或权利要求 4 所述 Th17 细胞检测用蛋白质标记。

6. 一种 DNA 芯片或微阵列, 其特征在于: 其含有与权利要求 1 所述 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记特异性杂交的探针。

7. 一种用于扩增权利要求 1 所述 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记的核酸引物。

8. 一种抗体, 其特征在于: 能与权利要求 4 所述 Th17 细胞检测用蛋白质标记特异性结合。

9. 一种 Th17 细胞检测用试剂盒, 其特征在于: 其包括权利要求 6 所述 DNA 芯片或微阵列、权利要求 7 所述核酸引物或权利要求 8 所述抗体。

产生 IL-17 的辅助 T 细胞检测用标记及产生 IL-17 的辅助 T 细胞的检测方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种产生白细胞介素 (IL)-17 的辅助 T 细胞 (以下称“Th17 细胞”) 检测用标记及检测 Th17 细胞的方法。

背景技术：

[0002] 类风湿关节炎 (以下称“RA”) 是以关节炎为主要临床症状的全身性炎症性自身免疫疾病。RA 虽然可以通过关节疼痛等自觉症状和肿胀程度以及观察骨 X 线等视觉手段判断其病情,但尚未建立一种定量性的指标。因此,目前也没有确立一种能连续监视治疗效果的定量方法。

[0003] RA 虽然是自身免疫性疾病,但其原因至今尚未搞清楚。一般认为细菌感染等是诱因,通过免疫细胞群和细胞因子群的复杂网络引起关节组织炎症。

[0004] 免疫反应中最重要的是辅助 T 细胞群。当未成熟的辅助 T 细胞 (幼稚 T 细胞) 被抗原提呈细胞提呈出抗原时,分化为辅助 T 细胞,但此时存在特定细胞因子,于是幼稚 T 细胞被诱导分化为四种细胞。所谓四种细胞是产生干扰素 (IFN)- γ 的辅助 T 细胞 (Th1 细胞)、产生白细胞介素 (IL)-4 的辅助 T 细胞 (Th2 细胞)、产生白细胞介素 (IL)-17 的辅助 T 细胞 (Th17 细胞) 和有免疫抑制效果的调节性 T 细胞 (Treg 细胞)。

[0005] 已经知道这些辅助 T 细胞中 Th17 细胞可以参与 RA 发病。

[0006] 据统计,在 RA 患者的关节滑液中的 IL-17 的水平比在变形关节炎患者的关节滑液中的 IL-17 的水平高,此外,来源于 RA 患者的滑液组织中的 T 细胞中存在 IL-17 阳性细胞,由此说明 IL-17 与 RA 病情形成、特别是关节和骨质破坏有密切关系 (专利公开 2000-186046 号公报 (专利文献 1))。在专利文献 1 记载了可以将 IL-17 作为 RA 诊断标记使用。

[0007] 据专利公开 2007-506100 号公报 (专利文献 2) 记述,分析从 RA 患者采集的末梢血血清中细胞因子发现,统计中 RA 患者的 IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α 、G-CSF、GM-CSF、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-5 和 IL-7 为高值,IL-2、CXCL8/IL-8、IL-12 和 CCL2/MCP-1 则不是高值。

[0008] 另外,根据 Ivanov 等 (细胞 (Cell),2006,126, p. 1121-1133 :非专利文献 1)、Stumhofer 等 (自然免疫学 (Nature Immunology),2006, vol. 7, p. 937-945 :非专利文献 2)、Wilson 等 (自然免疫学 (Nature Immunology),2007, vol. 8, p. 950-957 :非专利文献 3) 等的研究,关于 Th17 细胞已发现如下情况。

[0009] - 一种被称为 ROR γ t 的核内受体对 Th17 细胞分化起着重要作用。

[0010] - 由未成熟辅助 T 细胞 (幼稚 T 细胞) 向 Th17 细胞的分化受 IL-6、IL-23 和 TGF- β 诱导。

[0011] - 表达了 IL-17A、IL-17F、IL-6、IL-22、IL-26、TNF、IFN- γ 、CCL20。

[0012] -Th17 细胞表面有 IL-23 受体和 IL-12 受体 β 。

[0013] 非专利文献 1-3 是用对 IL-17 具有特异性的抗体的 ELISA(酶结合免疫吸附法)测定 IL-17 的量。

[0014] 然而,一般认为,检测 Th17 细胞本身的方法的确立,不仅能够测定 IL-17 的量,还能够更深入地理解自我免疫疾病、特别是 RA、溃疡性大肠炎、克隆病及多发性硬化症(脑炎和 / 或脊髓炎),其中尤其是 RA 及多发性硬化症(脑炎)与 Th17 细胞的关系。

[0015] 专利文献 1:专利公开 2000-186046 号公报

[0016] 专利文献 2:专利公开 2007-506100 号公报

[0017] 非专利文献 1:Ivanov 等“孤儿核受体 ROR γ t 引导促炎 IL-17+T 辅助细胞的分化(The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+T Helper Cells)”,细胞,2006,126, p. 1121-1133

[0018] 非专利文献 2:Stumhofer 等“白细胞介素 27 在中枢神经系统慢性炎症中消极地调节白细胞介素 17-产生 T 辅助细胞的发育(Interleukin 27negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system)”自然免疫学,2006, vol. 7, p. 937-945

[0019] 非专利文献 3:Wilson 等“发育,细胞因子概述及人白细胞介素 17-产生 T 辅助细胞的功能(Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells)”自然免疫学,2007, vol. 8, p. 950-957

发明内容:

[0020] 发明要解决的课题

[0021] 本项发明人的目的是要找到能特异性地检测出 Th17 细胞的分子标记、特别是在被认为与 Th17 细胞有关的疾病中常发现的分子标记。

[0022] 解决课题的手段

[0023] 本发明人首先认定能在使从小鼠脾分离的幼稚 T 细胞分化获得的 Th17 细胞特异性表达的基因和表达序列片段(EST)。然后,本发明人从用 Th17 细胞认定的基因和表达序列片段(EST)使用被认为与 Th17 细胞相关的疾病模型鼠(关节炎模型及 / 或脑脊髓炎模型)提取能在该疾病模型中高表达的基因和 EST。

[0024] 因此,本项发明是一种 Th17 细胞检测用的多聚核苷酸标记,且该多聚核苷酸选自以下基因群和基因片段:

[0025] 编码白细胞介素 17A(interleukin 17A)、白细胞介素 22(interleukin22)和白细胞介素 tiff(interleukin tiff)等细胞因子的基因;

[0026] 编码趋化因子 CC 基元配体 20(chemokine CC motif ligand 20)这一趋化因子的基因;

[0027] 编码属于以下群的膜蛋白质的基因:白细胞介素 17 受体 E(interleukin17 receptor E)、白细胞介素 1 受体 1(interleukin 1 receptor 1)、白细胞介素 27 受体 A(interleukin 27 receptorA)、G 蛋白偶联受体 15(G protein-coupled receptor 15)、稳定素 1(stabilin 1)、平足蛋白(Podoplanin)、含横跨膜和免疫球蛋白域 1(Transmembrane and immunoglobulin domain containing 1)、黑素肾上腺皮质激素 2 受体(Melanocortin 2 receptor)、横跨膜蛋白质 176A(Transmembrane protein 176A)、孕酮和 adipoQ 受体

家族成员 VIII (Progesterin and adipoQ receptor family member VIII)、含靠停蛋白域 1 (Claudin domain containing1)、ELVOL 家族成员 7 (ELVOL family member 7)、淋巴细胞抗原 6 复合物基因座 K (Lymphocyte antigen6 complex, locus K)、G 蛋白偶联受体 183 (ep 病毒诱导基因 2) (G protein-coupled receptor 183 (Epstein-Barr virus induced gene 2))、杀伤细胞凝集素样受体亚家族 B 成员 1F (Killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1F, KLRB1F)、铁传递蛋白受体 2 (Transferrin receptor 2)、神经元特异性基因家族成员 2 (neuron specific gene family member 2)、横跨膜蛋白质 176B (Transmembrane protein 176B)、淀粉状蛋白 β (A4) 前体样蛋白 2 (Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2)、免疫球蛋白 J 链 (Immunoglobulin joining chain)、附着分子含 Ig 样域 2 (Adhesion molecule with Ig like domain 2)、低亲和性 Fc 受体 IgG IIb (Fc receptor, IgG, low affinity IIb)、大麻类受体 2 (Cannabinoid receptor 2)、肿瘤坏死因子受体超家族成员 14 (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14)、水通道蛋白 3 (Aquaporin 3)、Clq 及肿瘤坏死因子相关蛋白质 3 (Clq and tumor necrosis factor related protein 3)、突触结合蛋白 XI (Synaptotagmin XI)、含钾通道四聚化域 12 (Potassium channel tetramerisation domain containing 12)、载脂蛋白 L7b (表达序列 BC085284) (Apolipoprotein L7b (expressed sequence BC085284))、载脂蛋白 L7e (载脂蛋白 L, 3 类似物) (Apolipoprotein L7e (similar to apolipoprotein L, 3))、溶质载体家族 34 成员 3 (Solute carrier family34 (member3))、细胞性视网膜结合蛋白 1 (Retinol binding protein 1, cellular)、细胞性视网膜结合蛋白 I 类似物 (similar to cellular retinol binding protein I)、钾大电导钙活化通道 (亚家族 M, β 成员 4) (Potassium large conductance calcium-activated channel (subfamily M, beta member 4), KCNMB4)、钙离子激活钾离子通道 β 4 亚组类似物 (similar to calcium activated potassium channel beta 4 subunit)、SYS1 高尔基体 - 局限化的集成膜蛋白同系物 (RIKEN cDNA 2610042014 基因) (SYS1 Golgi-localized integral membrane protein homolog (RIKEN cDNA 2610042014 gene))、及溶质载体家族 38 成员 6 (表达序列 AW322671) (Solute carrier family38, member6 (expressed sequence AW322671)) ;

[0028] 编码选自 POU 域, 类 2, 相关因子 1 (POU domain, class 2, associating factor 1)、T 细胞特异性转录因子 7 (Transcription factor 7 (T-cell specific))、含 WW 域转录调节因子 1 (WW domain containing transcriptionregulator 1)、毛发鼻指综合征 1 (Trichorhinophalangeal syndrome 1)、中心体蛋白 290 (Centrosomal protein 290)、及共济失调蛋白 2 结合蛋白 1 (Ataxin 2 binding protein 1) 之中的转录及翻译因子的基因 ;

[0029] 编码选自以下群的信号分子的基因 : Ras 相关关联糖尿病 (Ras-related associated with diabetes)、乳腺癌抗雌激素抗性 3 (Breast cancer anti-estrogen resistance 3)、Rab38 (RAS 癌基因家族成员) (Rab38 (member of RAS oncogene family))、矢车菊苷蛋白 γ 2 (Centaurin, gamma 2)、SH3 及 PX 域 2B (SH3 and PX domains 2B)、FERM, RhoGEF 和血小板白细胞 C 激酶底物域蛋白 2 (FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2)、失效同系物 2 (Disabled homolog 2)、B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1a (B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a)、B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1b (B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1b) 及 B 细胞白血病 / 淋巴瘤

2 相关蛋白 A1d(B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1d) ;

[0030] 编码转化生长因子 β 引导 (Transforming growth factor beta induced) 这一粘附分子的基因 ;

[0031] 编码属于以下群的酶的基因 : 细胞色素 P450, 家族 1, 亚家族 b, 多肽 1 (Cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1)、含 EH 结构域 3 (EH-domain containing 3)、基质金属肽酶 13 (Matrix metalloproteinase 13)、羧肽酶 D (Carboxypeptidase D)、碳酸酐酶 13 (Carbonic anhydrase 13)、葡糖胺 (N-乙酰) 转移酶 2, I 分支酶 (Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme)、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A2 (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A2)、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A6A (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6A)、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A6B (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6B)、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A10 (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A10)、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A7C (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A7C)、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A5 (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A5)、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A9 (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A9)、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A1 (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1)、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A8 类似物 (Similar to UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A8)、UDP-GlcNAc : β Gal β 1,3-N 乙酰葡糖氨基转移酶 8 (UDP-GlcNAc : betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 8)、骨形态发生蛋白 1 (Bone morphogenetic protein 1)、尿嘧啶核苷磷酸化酶 1 (Uridine phosphorylase 1)、肌浆球蛋白 III B (Myosin III B)、 β 位点 APP 裂解酶 2 (beta-site APP-cleaving enzyme 2)、肥大细胞蛋白酶 1 (Mast cell protease 1)、COX10 同系物, 细胞色素 c 氧化酶组装蛋白, 血红素 A : 法呢酰转移酶 (COX10 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein, heme A : farnesyltransferase)、发动蛋白 3 (Dynamin 3)、前列腺酸性磷酸酶 (Acid phosphatase, prostate)、磷酸二酯酶 5A, cGMP 特异 (Phosphodiesterase 5A (cGMP-specific))、含 Patatin 样磷酸酯酶域 7 (Patatin-like phospholipase domain containing 7)、RIKEN cDNA1300007F04 基因 (RIKEN cDNA 1300007F04 gene)、RIKEN cDNA 1810062018 基因 (RIKEN cDNA 1810062018 gene)、磷酸酶孤儿素 1 (表达序列 AI447357、ABI 基因家族成员 3) (Phosphatase, orphan 1 (expressed sequence AI447357, ABI gene family, member 3))、和多发性外生骨疣 1 (Exostoses (multiple) 1) ;

[0032] 编码属于以下群的酶抑制剂的基因 : 丝氨酸 (或半胱氨酸) 肽酶抑制剂 B 簇成员 1a (Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a)、蛋白磷酸酶 1 调节 (抑制剂) 亚基 14c (Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14c)、蛋白激酶抑制因子 β (cAMP 依赖, 精巢特异性) (Protein kinase inhibitor beta (cAMP dependent, testis specific))、组织抑制剂金属蛋白酶 1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 1)、丝氨酸 (或半胱氨酸) 肽酶抑制剂 I 簇成员 1 (Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade I, member 1)、淀粉状蛋白 β (A4) 前体蛋白

(Amyloid beta(A4)precursor protein) 及 WAP 四二硫化物核心域 2(WAP four-disulfide core domain 2) ;

[0033] 编码含半胱氨酸丰富分泌蛋白 LCCL 域 2(Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2) 这一分泌蛋白的基因 ;

[0034] 编码属于以下群的结构蛋白的基因 :肌动蛋白丝束蛋白 1(表达序列 AI427122)(Plastin 1(expressed sequence AI427122))、免疫球蛋白重链复合物 (immunoglobulin heavy chain complex)、免疫球蛋白重链 1a(血清 IgG2a)(immunoglobulin heavy chain 1a(serum IgG2a))、免疫球蛋白重链 2(血清 IgA)(immunoglobulin heavy chain 2(serum IgA))、免疫球蛋白重链 1a(immunoglobulin heavy chain 1a)、免疫球蛋白重链 (J558 家族)(immunoglobulin heavy chain(J558 family))、免疫球蛋白重链 (γ 多肽)(immunoglobulin heavy chain(gamma polypeptide))、免疫球蛋白 μ 链类似物 (similar to immunoglobulin mu-chain)、免疫球蛋白重链 V 区 3 前体类似物 (similar to immunoglobulin heavy chain V region 3 precursor)、免疫球蛋白重链可变区 (immunoglobulin heavy chain variable region)、免疫球蛋白重链 V 区 102 前体类似物 (similar to immunoglobulin heavy chain V region 102 precursor)、免疫球蛋白重链 3(immunoglobulin heavy chain3)、星云状小体 (Nebulette)、内腔蛋白 (Lumican)、杀菌性 / 通透性增加蛋白样 2(Bactericidal/permeability-increasing protein-like 2)、Kelch 样 8(Kelch-like 8)、三重基序蛋白 2(Tripartite motif protein 2)、PDZ 及 LIM 域 5(PDZ and LIMdomain5)、角蛋白 86(Keratin 86)、驱动蛋白家族成员 3C(Kinesin family member 3C)、驱动蛋白家族成员 1B(Kinesin family member 1B) 及驱动蛋白家族成员 5C(Kinesin family member 5C) ;

[0035] 属于中足性梳样 4(Sex comb on midleg-like 4)、高移动族 AT 钩 2 假基因 1(High mobility group AT-hook 2, pseudogene 1)、RIKEN cDNA2310007L24 基因 (RIKEN cDNA 2310007L24gene)、RIKEN cDNA 2310002J15 基因 (RIKEN cDNA 2310002J15 gene)、序列相似家族 101, 成员 B(RIKEN cDNA1500005K14 基因) (Family with sequence similarity 101, member B(RIKENcDNA 1500005K14 gene))、表达序列 AI646023(expressed sequence AI646023) 及含 GRAM 域 3(GRAM domain containing 3) 其中之一的基因, 以及

[0036] 属于 TOX 高移动族框蛋白家族成员 2(表达序列 AI851523)(TOX high mobility group box family member 2(expressed sequence AI851523))、RIKEN cDNA 6030439D06 基因 (RIKEN cDNA 6030439D06 gene)、RIKEN cDNA 9030418K01 基因 (RIKEN cDNA 9030418K01 gene)、表达序列 AU015680(expressed sequence AU015680)、有序列号 1 的碱基序列的多核苷酸及有序列号 2 的碱基序列的多核苷酸之中的表达序列片段 (EST)。

[0037] 本发明的 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记以选自以下基因群和片段群的多聚核苷酸为宜 :

[0038] 编码白细胞介素 17A、白细胞介素 22 和白细胞介素 *tifb* 等细胞因子的基因 ;

[0039] 编码选自以下膜蛋白质的基因 :白细胞介素 1 受体 1、白细胞介素 27 受体 A、G- 蛋白偶联受体 15、稳定素 1、载脂蛋白 L7b(表达序列 BC085284)、载脂蛋白 L7e(载脂蛋白 L3 类似物)、Clq 及肿瘤坏死因子相关蛋白质 3、大麻类受体 2、低亲和性 Fc 受体 IgG IIb、G 蛋白偶联受体 183(eb 病毒诱导基因 2)、细胞性视网膜结合蛋白 1、细胞性视网膜结合蛋白 I

类似物、淋巴细胞抗原 6 复合物基因座 K、溶质载体家族 38 成员 6(表达序列 AW322671)、突触结合蛋白 XI、横跨膜蛋白 176A、横跨膜蛋白 176B 以及肿瘤坏死因子受体超家族成员 14；

[0040] 编码选自 T 细胞特异性转录因子 7、含 WW 域转录调节因子 1 的转录及翻译因子的基因；

[0041] 编码选自 B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1a、B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1b 及 B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1d、失效同系物 2、Ras 相关关联糖尿病及 SH3 及 PX 域 2B 之中的信号分子的基因；

[0042] 编码粘附分子 - 转化生长因子 β 引导的基因；

[0043] 编码选自以下的酶的基因：前列腺酸性磷酸酶、UDP-GlcNAc : β Gal β 1,3-N 乙酰葡糖氨基转移酶 8、骨形态发生蛋白 1、碳酸酐酶 13、细胞色素 P450, 家族 1, 亚家族 b, 多肽 1、葡糖胺 (N- 乙酰) 转移酶 2, I 分支酶、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A2、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A6A、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A6B、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A10、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A7C、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A5、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A9、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A1、UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A8 类似物、基质金属肽酶 13、cGMP 特异性磷酸二酯酶 5A、磷酸酶孤儿素 1(表达序列 AI447357、ABI 基因家族成员 3) 和尿嘧啶核苷磷酸化酶 1；

[0044] 编码选自酶抑制剂丝氨酸 (或半胱氨酸) 肽酶抑制剂 B 簇成员 1a 和组织抑制剂金属蛋白酶 1 之中的基因；

[0045] 编码分泌蛋白 - 含半胱氨酸丰富分泌蛋白 LCCL 域 2 的基因；

[0046] 编码结构蛋白 - 选自驱动蛋白家族成员 5C 和内腔蛋白之中的基因, 以及

[0047] 选自 RIKEN cDNA 6030439D06 基因和 RIKEN cDNA 9030418K01 基因的表达序列片段 (EST)。

[0048] 本发明的 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记最好是选自以下基因群和片段群的多聚核苷酸：

[0049] 编码细胞因子白细胞介素 17A 的基因；

[0050] 编码选自白细胞介素 1 受体 1、载脂蛋白 L7b(表达序列 BC085284)、载脂蛋白 L7e(载脂蛋白 L3 类似物)、大麻类受体 2、低亲和性 Fc 受体 IgG IIb、溶质载体家族 38 成员 6(表达序列 AW322671) 和横跨膜蛋白 176A 的膜蛋白质的基因；

[0051] 编码选自 B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1a、B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1b 及 B 细胞白血病 / 淋巴瘤 2 相关蛋白 A1d 之中的信号分子的基因；

[0052] 编码酶 - 基质金属肽酶 13 的基因；

[0053] 编码酶抑制剂 - 组织抑制剂金属蛋白酶 1 的基因, 以及

[0054] 编码分泌蛋白 - 含半胱氨酸丰富分泌蛋白 LCCL 域 2 的基因。

[0055] 本发明还提供由经上述基因编码的蛋白质构成的 Th17 细胞检测用蛋白质标记。

[0056] 另外, 本发明提供一种在含有细胞的试样中检测 Th17 细胞的方法, 其中包括检测是否有上述 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记或 Th17 细胞检测用蛋白质标记。

[0057] 此外, 本发明还提供 Th17 细胞检测用试剂盒, 其中包含检测 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记用的 DNA 芯片或微阵列、含引物在内的探针及检测 Th17 细胞检测用蛋白质标记

的抗体至少其中之一。

[0058] 发明效果

[0059] 通过检测本发明的多聚核苷酸标记或蛋白质标记,可以特异性地检测出 Th17 细胞。因此,使用本发明的标记可以从含有各种细胞的试样中分离出 Th17 细胞。比如使用本发明的标记可以在含采自患者的组织等细胞的试样中特异性地检测出 Th17 细胞。因此,可以检查出该患者患有与 Th17 细胞相关的疾病、如自我免疫疾病、特别是 RA、溃疡性肠炎、克隆病及多发性硬化症(脑炎和 / 或脊髓炎)、其中尤其是 RA 及多发性硬化症(脑炎)的可能性。

具体实施方式:

[0060] 本发明的 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记选自上述基因和 EST 的多聚核苷酸、其变异型及其片段。

[0061] 上述多聚核苷酸标记物是与从幼稚 T 细胞分化的其他辅助 T 细胞 (Th1、Th2 和 Treg 细胞) 相比在 Th17 细胞有特异性存在的多聚核苷酸、其变异型或片段。上述多聚核苷酸标记物以在上述自我免疫疾病模型鼠中呈高表达的多聚核苷酸、其变异型或片段为宜。上述多聚核苷酸标记物最好是在上述自我免疫疾病模型鼠中表现出与 IL-17 表达量或病情相关的多聚核苷酸、其变异型或片段。

[0062] 因此,通过检测该多聚核苷酸标记物,可以特异性地检测出与 Th1、Th2 和 Treg 细胞有别的 Th17 细胞,并可以探讨被认为与 Th17 细胞相关的疾病在生物体内的动态指标。

[0063] 在本说明书中,所谓基因具有与在该技术领域通用的同等意思,指 mRNA 完成转录翻译成蛋白质的基因组上的一部分。

[0064] 在本说明书中,所谓表达序列片段 (EST) 具有在该技术领域通用的同等意思,指某基因的部分序列、是证明该基因被 mRNA 翻译的序列。

[0065] 另外,所谓信号分子指在细胞膜、细胞质和核等存在、并应答来自细胞内外的刺激从而被激活的一系列信号传递物质。粘附分子指存在于细胞膜表面、与细胞外基质和其他细胞膜表面分子结合引起物理粘附、信号传递、细胞结构变化等的分子群。所谓结构蛋白指主要存在于细胞内、构建和保持细胞形态、进行运动、运送信号分子的分子群。

[0066] 在本说明书中,所谓某个多聚核苷酸在 Th17 细胞中“特异性地表达”指据统计该多聚核苷酸在 Th17 细胞的表达比该多聚核苷酸在 Th17 细胞以外的其他细胞中的表达高。具体而言,该多聚核苷酸在 Th17 细胞的表达是在 Th17 细胞以外的其他细胞中表达的约 3 倍以上。该多聚核苷酸在 Th17 细胞的表达最好是该多聚核苷酸在 Th17 细胞以外的辅助 T 细胞 (Th1 细胞、Th2 细胞和 Treg 细胞) 中的表达的三倍以上。

[0067] 本发明的多聚核苷酸标记物的碱基序列已众所周知。这些可以从比如 Unigene (美国国立医学图书馆的国立生物技术信息中心 (NCBI) 提供的数据库) 获得。本发明的多聚核苷酸标记物的碱基序列的 Unigene 编号如以下表 2 所示。

[0068] 在本说明书中,所谓多聚核苷酸的“变异型”指导入变异的多聚核苷酸,该变异不改变基因编码的蛋白质通过上述基因或 EST 能够检出的性质。这种变异包括从上述基因或 EST 周知的碱基序列中缺失或置换 1 个或数个核苷酸,或者增加 1 个或数个核苷酸。

[0069] 上述变异型同上述各基因或 EST 的周知碱基序列一般至少有 80% 相同,以至少

85%相同为宜,至少约 90%相同更好,最好至少有 95%相同。

[0070] 在本说明书中,碱基序列及氨基酸序列的相同性指用 BLASTN、BLASTP、BLASTX 或 TBLASTN(比如可以使用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 以标准设定算出的结果。

[0071] 上述多聚核苷酸标记物可以是 DNA 或 RNA 之一,也可以是上述基因本身 (DNA)、mRNA、cDNA 或 cRNA 其中之一。

[0072] 通过检测本发明的多聚核苷酸标记物的基因编码的蛋白质也可以检出 Th17 细胞。因此,由上述基因编码的蛋白质构成的 Th17 细胞检测用蛋白质标记物也是本发明之一。

[0073] 这种蛋白质标记物的序列可以根据从上述 Unigene 等获得的多聚核苷酸标记物的碱基序列获得。也可以从上述 NCBI 提供的数据库获得。关于本发明的蛋白质标记物的氨基酸序列的 NCBI 编码见以下表 2。

[0074] 上述 Th17 细胞检测用蛋白质标记物可以选自上述基因编码的蛋白质、与其功能同等的变异型及其片段。

[0075] 所谓上述蛋白质的功能同等的变异型指导入了不改变上述蛋白质功能的变异的蛋白质。这种变异包括从上述众所周知的蛋白质的氨基酸序列中缺失或置换 1 个或数个核苷酸,或者增加 1 个或数个核苷酸。

[0076] 上述蛋白质的功能同等的变异型与上述各蛋白质的众所周知的氨基酸序列一般至少有 80%相同,以至少 85%相同为宜,至少约 90%相同更好,最好至少有 95%相同。

[0077] 能与上述多聚核苷酸标记物特异性杂交的分子可以用于检测上述标记物,因此作为 Th17 细胞检测用探针是有用的。该探针可以是能与上述多聚核苷酸标记物特异性杂交的 DNA、RNA 等核酸探针、肽探针任意一种。Th17 细胞检测用探针尤以检测多聚核苷酸标记物用的核酸探针、特别是 DNA 探针为佳。

[0078] 在本说明书中,所谓“能特异性杂交”指在严格 (stringent) 条件下能与目标核酸分子 (上述多聚核苷酸标记物) 杂交。

[0079] 在本说明书中,所谓严格条件指在该条件下 Th17 细胞检测用探针与目标多聚核苷酸标记物的杂交比与该目标多聚核苷酸标记物以外的多聚核苷酸杂交的检出可能性更大 (比如是背景的至少 2 倍以上)。严格条件通常是序列依赖型,而且在各种环境中各不相同。一般而言,严格条件选择得比在规定离子强度和 pH 值下的特定序列的热熔点 (thermal melting point) 约低 5°C。此 T_m 是 (在规定离子强度、pH 和核酸组成的条件下) 与上述目标序列互补的探针 50%平衡杂交的温度。

[0080] 这种条件可以是在历来为人所知的多聚核苷酸之间的杂交法如 PCR 法、微阵列法和 Southern 印迹法 (Southern blot) 等中用于多聚核苷酸之间杂交的条件。具体而言,该条件可以是在 pH7.0-9.0 下,碱浓度约低于 1.5M 钠离子,更具体地说约为 0.01-1.0M 钠离子浓度 (或其他碱),至少约 30°C。进一步具体地说,比如在微阵列法中的严格条件包括以 37°C 在 50%甲酰胺、1M NaCl 和 1% SDS 中杂交以及在 60-65°C 的 0.1×SSC 中清洗。在 PCR 法中的严格条件可以列举出 pH7-9、0.01-0.1M 的 Tris HCl、0.05-0.15M K 离子浓度 (或其他碱)、至少约 55°C。

[0081] 上述 Th17 细胞检测用核酸探针的序列可以由该专业人员根据该技术常识和上述多聚核苷酸标记物的序列适当决定,以使其能与上述多聚核苷酸标记物特异性杂交。

[0082] 上述 Th17 细胞检测用核酸探针可以用一般可利用的引物设计软件（比如引物 3(可使用 <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) 和 DHASIS Pro(日立软件工程技术株式会社)) 来决定。

[0083] 上述 Th17 细胞检测用核酸探针可用该技术领域众所周知的多聚核苷酸合成法制作。

[0084] 上述 Th17 细胞检测用核酸探针也可以用在该技术领域常用的标记物标记。用标记的 Th17 细胞检测用核酸探针可以简便地检测出 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记物、即检出 Th17 细胞。

[0085] 上述标记物可以是 ^{32}P 等放射性同位素、荧光素等荧光物质、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶等酶和生物素等在该技术领域通用的标记物。

[0086] 上述 Th17 细胞检测用核酸探针通过一种或数种组合使用可以特异性地检测出 Th17 细胞。比如用在该技术领域众所周知的方法将一种以上的该探针固定在基板上, 可以制作出 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记物的 DNA 芯片或微阵列。

[0087] 上述 Th17 细胞检测用核酸探针可以是用于以 PCR 法扩增上述多聚核苷酸标记物的二种以上引物的组合。

[0088] 能够特异性地结合到上述蛋白质标记物的分子可以用于检测上述标记物, 故可以用于检测 Th17 细胞。这种分子可以是能特异性结合蛋白质标记的 DNA、RNA 等核酸适配子和抗体等的任何一种, 但最好是抗体。当 Th17 细胞特异性标记为酶时, 使用基质作用于该酶, 产生显色、发光、荧光等, 以此即可检测。

[0089] 上述 Th17 细胞检测用抗体可以用以下历来为人所知的顺序制作。根据上述多聚核苷酸标记的基因碱基序列或蛋白质标记的氨基酸序列, 将编码具有蛋白质标记氨基酸序列的蛋白质的 DNA 分子导入适当的表达载体。再将所得表达载体导入适当的宿主细胞, 培养所得性状转换细胞, 获得目标蛋白质。提纯所得蛋白质作为免疫原, 用免疫原和所需佐剂, 免疫适当的哺乳动物如大鼠和小鼠等。从经过免疫的动物脾脏细胞等筛选产生目标免疫原的抗体的抗体产生细胞。将所得抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤, 经筛选即可获得产生抗体的杂交瘤, 该杂交瘤能产生对经上述基因编码的蛋白质有特异结合性的抗体。培养所得产生抗体的杂交瘤即可获得目标抗体。

[0090] 可以用于检测上述 Th17 细胞的核酸适配子可以通过如下众所周知的步骤制作。可以用众所周知的方法构建有任意核酸碱基序列的核酸文库, 再通过配体系统进化 (SELEX) 技术等选择可以与目标蛋白 (上述蛋白质标记) 特异性结合的适配子。

[0091] 能与上述 Th17 细胞检测用蛋白质标记特异性结合分子也可以用在该技术领域通用的标记物标记。使用所标记的 Th17 细胞检测用抗体可以简便地检测出 Th17 细胞检测用蛋白质标记, 即检测出 Th17 细胞。

[0092] 上述标记物可以是 ^{32}P 等放射性同位素、荧光素等荧光物质、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶等酶和生物素等在该技术领域通用的标记物。

[0093] 通过在含有细胞的试样中检测上述 Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记或 Th17 细胞检测用蛋白质标记的存在来检测 Th17 细胞的方法也是本发明之一。

[0094] 在本发明的方法, 作为含有细胞的试样可以列举出从哺乳动物采集的生物试样或含有人工培养的细胞的试样。生物试样包括血液、组织、关节液、脑脊液、胸水、腹水等。

[0095] 下面就上述检测多聚核苷酸标记存在的方法说明其中一实施方式。首先按照提取苯酚和沉淀乙醇以及用市面上出售的 DNA 提取试剂盒等在该技术领域众所周知的方法从含有细胞的试样中提取核酸 (DNA 或 RNA)。

[0096] 然后,检测获得的核酸试样中是否存在上述多聚核苷酸标记。在此检测中最好使用上述 Th17 细胞检测用核酸探针。

[0097] 上述多聚核苷酸标记可以通过 PCR 法、RT-PCR 法、实时定量 PCR 和 LAMP 法等核酸扩增方法和 Southern 杂交、Northern 杂交、FISH(荧光原位杂交)等杂交方法以及 DNA 芯片技术或微阵列技术等该技术领域通用的方法进行检测。在上述严格的条件下采取这些方法,通过检测上述标记物检测上述 Th17 细胞检测用核酸探针形成的杂交瘤,即可检测出多聚核苷酸标记的存在。

[0098] 下面就检测上述 Th17 细胞检测用蛋白质标记存在的方法说明一实施方式。比如,当待检蛋白质标记为位于细胞内部的蛋白质时,用该技术领域周知的方法从细胞中提取蛋白质。从细胞中提取蛋白质可以采用超声波粉碎细胞、细胞溶剂溶解细胞等众所周知的方法进行。用能与蛋白质标记特异性结合的分子可以检测出所得蛋白质试样中的上述蛋白质标记。具体而言,蛋白质标记可以通过酶联免疫吸附法 (ELISA)、免疫印迹法等该技术领域通用的方法检测。在检测中,对蛋白质标记有特异性结合的分子最好用上述 Th17 细胞检测用抗体。

[0099] 比如,当待检蛋白质标记为分泌蛋白时,用与蛋白质标记特异性结合的分子可以检出分泌在上述含细胞的试样中的蛋白质标记。从上述含细胞的试样中采集细胞(淋巴细胞),用抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、伴刀豆球蛋白 A、PHA(植物血凝素 (Phytohaemagglutinin))、PMA(佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯 (Phorbol-12-myristate-13-acetate))、钙离子载体 (Ionomycin) 等刺激采集的细胞。再用能与蛋白质标记特异性结合的分子就能检测出分泌的蛋白质标记。具体而言,蛋白质标记可以通过 ELISA、免疫印迹法等该技术领域通用的方法检测。在检测中,能与蛋白质标记特异性结合的分子最好用上述 Th17 细胞检测用抗体。

[0100] 例如,当待检蛋白质标记为存在于细胞表面的蛋白质时,用与蛋白质标记特异性结合的分子可以检出位于上述含细胞的试样中的细胞表面的蛋白质标记。从上述含细胞的试样中采集细胞的膜组分,用能与蛋白质标记特异性结合的分子就能检测出所得膜组分中的上述蛋白质标记。具体而言,可以通过酶联免疫吸附法 (ELISA)、免疫印迹法等在该技术领域通用的方法检测。当待检蛋白质标记为存在细胞表面的蛋白质时,也可以用基于流式细胞 (FCM) 技术的方法检测。在检测中,能与蛋白质标记特异性结合的分子最好用上述 Th17 细胞检测用抗体。

[0101] 例如,当用 FCM 检测蛋白质标记时,可以按以下步骤检测。

[0102] 首先,让含有细胞的试样与用适当标记物标记的上述 Th17 细胞检测用抗体接触。如果存在,则 Th17 细胞在细胞表面与此标记抗体结合。让与标记物结合的含细胞的试样从流式细胞仪通过,即可检测出 Th17 细胞。也可以根据需要用流式细胞仪辨别和分离与标记物结合的 Th17 细胞。

[0103] 这种 FCM 的方法在该行业是众所周知的,反应条件由从业人员适当决定。

实施例

[0104] 下面将以实施例详细说明本发明,但本发明不受这些实施例的限定。

[0105] 实施例 1:分析来源于小鼠的培养 Th17 细胞中的高表达基因

[0106] 1. 从小鼠脾分离幼稚 T 细胞

[0107] 摘取 BALB/c 小鼠的脾,获得含脾细胞的试样。用氯化铵对试样中的红细胞进行溶血后,用磁珠(波利塞斯(POLYSCIENCE)公司制)从试样中除去 CD8、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞和幼红细胞的细胞成分,粗制出 CD4 阳性(CD4⁺)T 细胞。从所得 CD4⁺T 细胞中通过使用流式细胞仪分类,纯化幼稚 T 细胞的组分(CD4⁺/CD25neg/CD44low/CD62high)。同样,从 C57/BL6 小鼠的脾细胞中纯化出幼稚 T 细胞。

[0108] 2. 从幼稚 T 细胞分化培养出 Th1、Th2、Treg、Th17 细胞

[0109] 将上述 1. 获得的来源于 BALB/c 小鼠的幼稚 T 细胞以 $0.5-2.0 \times 10^6$ 细胞/2ml/孔的细胞密度播种到含有抗 CD 3 抗体的 24 孔板上。在添加了表 1 所示各细胞因子和抗体以及抗 CD28 抗体的 T 细胞培养基(PRMI1640,10%胎牛血清(FBS)、10mM HEPES、1mM 丙酮酸钠、2mM L-谷酰氨酸、50 μ M 2-巯基乙醇、100U/ml 青霉素、100mg/ml 链霉素)中,在 37°C、5% CO₂ 的恒温箱内培养细胞。培养开始第三天在培养基添加表 1 所列细胞因子和抗体,再培养 2-11 天。如此,从来源于 BALB/c 小鼠的幼稚 T 细胞诱导分化出 Th1、Th2、Treg、Th17 细胞。同样方法,从上述 1. 获得的来源于 C57/BL6 小鼠的幼稚 T 细胞诱导分化出 Th1、Th2、Treg、Th17 细胞。

[0110] [表 1]

[0111]

	细胞因子	制造商名	抗体	克隆	制造商名
Th1细胞	IL-2	BECTON DICKINSON (以下称BD)	抗IL-4抗体	11B11	eBiodcience
	IL-12	BD			
Th2细胞	IL-2	BD	抗IFN γ 抗体	R4-6A2	eBiodcience
	IL-4	R&D SYSTEM			
Treg细胞	IL-2	BD	抗IL-6抗体	MP5-20F3	BD
	TGF β	R&D SYSTEM	抗IFN γ 抗体	R4-6A2	eBiodcience
			抗IL-4抗体	11B11	eBiodcience
Th17细胞	IL-6	BD	抗IL-2抗体	S4B6	BD
	TGF β	R&D SYSTEM	抗IFN γ 抗体	R4-6A2	eBiodcience
	IL-23	R&D SYSTEM	抗IL-4抗体	11B11	eBiodcience
	IL-1 β	eBiodcience			
	TNF α	eBiodcience			

[0112] 3. 用流式细胞仪确认细胞分化

[0113] 在含有如 2. 所述分化培养的细胞(2.5×10^5 细胞)的溶液中加入佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(PMA;50ng/ml)和钙离子载体($1 \mu M$)刺激细胞。四小时后添加蛋白转运抑制剂 A($10 \mu g/ml$)再培养二个小时。培养结束后,用磷酸缓冲生理食盐水(PBS)清洗细胞,然后用 4%三聚甲醛固定。固定后用皂草苷缓冲液(0.5 皂草苷、0.5% BSA、1mM 叠氮化钠(PBS 中))处理细胞使细胞膜通透性亢进。然后,使抗 IFN γ、抗 IL-4 和抗 IL-17 各抗体与细胞反应。反应后用皂草苷缓冲液和含 0.5%牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 清洗,用 FACS Canto II(BD 生物科学公司)分析,确认向 Th1、Th2、Treg、Th17 各细胞分化。

[0114] 4. 制备总 RNA

[0115] 用 PBS 清洗在上述 2 中培养了五天的来源于 BALB/c 小鼠的 Th1、Th2、Treg、Th17 各细胞后,离心分离制成颗粒 (pellet),在 -80°C 冷冻保存。用去除基因组 DNA 组织 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN 公司)) 从颗粒制备总 RNA,分析前一直在 -80°C 冷冻保存。同样,从在上述 2 中培养了五天的来源于 C57/BL6 小鼠的 Th1、Th2、Treg、Th17 各细胞,制备总 RNA。

[0116] 5. 分析微阵列表达

[0117] 利用单周期靶标记及对照物 (One-Cycle Target Labeling and Control Reagents) (Affymetrix 公司) 将在上述 4. 制备的总 RNA ($1-5\mu\text{g}$) 逆转录为 cDNA,再进行转录反应形成生物素化的 cRNA。将 $15\mu\text{g}$ 生物素化 cRNA 加入小鼠基因组 4302.0 芯片 (GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array) (Affymetrix 公司),在基因芯片杂交箱 (GeneChip Hybridization Oven) 640 (Affymetrix 公司) 中,在 45°C 、60rpm 条件下杂交 16 小时。杂交后,将经基因芯片洗涤工作站 (GeneChip Fluidics Station) 450 洗涤和荧光标记的微阵列 (DNA 芯片) 用基因芯片扫描仪 (GeneChip Scanner) 30007G (Affymetrix 公司) 分析,取得荧光强度数据。

[0118] 6. 选择在小鼠 Th17 细胞特异性表达的基因

[0119] 根据上述 5. 获得的荧光强度数据,用表达分析软件 Array Assist (MEDIBIC 公司) 将数据标准化。用管家基因的甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 荧光强度除以各基因的荧光强度,算出各基因的相对荧光强度。将 Th17 细胞各基因的相对荧光强度与 Th1、Th2 和 Treg 细胞的相比较。在 BALB/c 小鼠及 C57/BL6 小鼠的至少其中之一中,认定在 Th17 细胞中的相对荧光强度比 Th1、Th2 和 Treg 细胞都高出 3 倍以上的基因为 Th17 细胞特异性表达的基因 (Th17 细胞检测用多聚核苷酸标记)。

[0120] 所得基因如以下表 2 所示。

[0121] 另外,表 2 中列有各基因的 Affymetrix 的探针集 ID、与探针集 ID 对应的 Unigene 号、与探针集 ID 对应的基因名称以及经基因编码的蛋白质的功能。表 2 还列有在 BALB/c 小鼠或 C57/BL6 小鼠 Th1、Th2 和 Treg 细胞中的相对荧光强度与 Th17 细胞中的相对荧光强度之比 (分别为 Th17/Th1、Th17/Th2 和 Th17/Treg)。

[0122] 表 2 还同时记有表示经各基因编码的蛋白质氨基酸序列的 NCBI 编号。

[0123] [表 2-1]

[0124]

Affymetrix 的探针集ID	Unigene 号	NCBI编号	基因名称	编码的蛋 白质的功 能	相对荧光强度比		
					Th17/ Th1	Th17/ Th2	Th17/ Treg
1421672_at	Mm. 5419	NP_034682	白细胞介素17A	细胞因子	18763.8	104.1	119.5
1427624_s_at	Mm. 103585	NP_058667	白细胞介素 22, 白细胞介素tifb	细胞因子	85.4	53.8	96.6
		NP_473420					
1422029_at	Mm. 116739	NP_058656	趋化因子, CC基元, 配体20	趋化性因子	75.9	65.5	43.9
1426566_s_at	Mm. 131781	NP_001029201	白细胞介素 17 受体 E	膜蛋白	606.9	88.2	23.8
		NP_001029203					
		NP_665825					
1448950_at	Mm. 896	NP_001116854	白细胞介素 1 受体 1	膜蛋白	52.4	26.2	47.8
		NP_032388					
1449508_at	Mm. 38386	NP_057880	白细胞介素 27 受体 A	膜蛋白	3.7	5.0	3.0
1431296_at	Mm. 390873	NP_156321	G蛋白偶联受体15	膜蛋白	361.5	865.2	5.8
	Mm. 426544	NP_921879					
1450199_at	Mm. 220821	NP_619613	稳定素 1	膜蛋白	18.1	11.3	4.7
1419309_at	Mm. 2976	NP_034459	平足蛋白	膜蛋白	21.4	18.3	11.3
1419498_at	Mm. 25138	NP_079931	含横跨膜和免疫球蛋白域 1	膜蛋白	36.4	21.2	9.9
1422926_at	Mm. 426053	NP_032586	黑素肾上腺皮质激素2受体	膜蛋白	67.5	5.0	77.0
1423909_at	Mm. 27061	NP_001091741	横跨膜蛋白质176A	膜蛋白	46.1	30.9	4.3

[0125]

		NP_079602					
1428958_at	Mm. 40780	NP_083105	孕酮和adipoQ受体家族成员VIII	膜蛋白	12.1	7.6	3.3
1437399_at	Mm. 29482	NP_741968	含靠停蛋白域1	膜蛋白	39.9	15.6	3.0
1441891_x_at	Mm. 286127	NP_083277	ELVOL家族成员7, 长链脂肪酸的延伸	膜蛋白	5.7	319.1	7.2
1452855_at	Mm. 273319	NP_083903	淋巴细胞抗原6复合物, 基因座K	膜蛋白	5.9	8.8	3.6
1457691_at	Mm. 265618	NP_898852	G蛋白偶联受体183 (eb病毒诱导基因2)	膜蛋白	4.1	35.6	8.7
1457722_at	Mm. 259262	NP_694734 NP_851409	杀伤细胞凝集素样受体亚家族B成员1F	膜蛋白	10.1	38.4	6.4
1459994_x_at	Mm. 21757	NP_056614	铁传递蛋白受体2	膜蛋白	8.7	6.2	8.2
1416107_at	Mm. 3304	NP_032767	神经元特异性基因家族成员2	膜蛋白	7.5	6.6	9.1
1418004_a_at	Mm. 28385	NP_075543	横跨膜蛋白质176B	膜蛋白	19.8	19.0	3.5
1421889_a_at	Mm. 19133	NP_001095925 NP_001095926 NP_033821	淀粉状蛋白β (A4) 前体样蛋白2	膜蛋白	4.3	7.9	3.1
1424305_at	Mm. 1192	NP_690052	免疫球蛋白J链	膜蛋白	10.5	298.6	7.4
1434061_at	Mm. 24005	NP_835215	附着分子含Ig样域2	膜蛋白	5.8	17.8	4.4
1435477_s_at	Mm. 425062	NP_001070657 NP_034317	低亲和性Fc受体 IgG IIb	膜蛋白	4.2	125.1	11.1
1450476_at	Mm. 297251	NP_034054	大麻类受体2	膜蛋白	9.3	4.8	7.4
1452425_at	Mm. 215147	NP_849262	肿瘤坏死因子受体超家族成员14	膜蛋白	4.0	6.5	4.0
1422007_at	Mm. 34043	NP_057898	水通道蛋白3	膜蛋白	32.9	101.5	3.6
1422606_at	Mm. 280158	NP_112150	Clq及肿瘤坏死因子相关蛋白质3	膜蛋白	78.8	26.7	42.3
1429314_at	Mm. 379376	NP_061274	突触结合蛋白XI	膜蛋白	3.5	18.9	6.3
1434881_s_at	Mm. 246466	NP_808383	含钾通道四聚化域12	膜蛋白	56.4	47.1	8.2
1436271_at	Mm. 440965 Mm. 303207	NP_001020019 XP_997554	载脂蛋白L7b(表达序列BC085284) 载脂蛋白L7e(类似载脂蛋白L, 3)	膜蛋白	271.8	21.8	3.3

[0126] [表 2-2]

[0127]

Affymotrix 的探针集 ID	Unigene 号	NCBI 编号	基因名称	经编码的蛋白质的功能	相对荧光强度比		
					Th17 /Th1	Th17 /Th2	Th17/ Treg
1439519_at	Mm. 346652	NP_543130	溶质载体家族 34 (钠磷酸), 成员 3	膜蛋白	13.0	15.4	4.2
1448754_at	Mm. 279741	NP_035384	细胞性视网膜结合蛋白 1	膜蛋白	24.8	28.1	11.8
		XP_001473672	细胞性视网膜结合蛋白 I 类类似物				
1449471_at	Mm. 440652	NP_067427.1	钾大电导钙活化通道 (亚家族 M, β 成员 4)、钙离子激活钾离子通道 β 4 亚组类似物	膜蛋白	3.4	6.0	3.1
1450057_at	Mm. 44218	NP_079851	SYS1 高尔基体-局限化的集成膜蛋白同系物 (RIKEN cDNA 2610042014 基因)	膜蛋白	3.4	5.1	4.2
1456464_x_at	Mm. 379376	NP_061274	突触结合蛋白 XI	膜蛋白	3.9	13.8	5.0
1457266_at	Mm. 290605	XP_921985	溶质载体家族 38 成员 6 (表达基因序列 AW322671)	膜蛋白	4.0	5.3	3.3
		XP_988301					
1416957_at	Mm. 897	NP_035266	POU 域, 类 2, 相关因子 1	转录及翻译因子	8.9	26.2	8.5
1433471_at	Mm. 31630	NP_033357	T 细胞特异性转录因子 7	转录及翻译因子	18.1	31.4	5.8
1437155_a_at	Mm. 405029	NP_598545	含 WW 域转录调节因子 1	转录及翻译因子	3.4	73.4	18.4
1443161_at	Mm. 30466	NP_114389	毛发鼻指综合征 1	转录及翻译因子	18.6	7.8	3.5
1425642_at	Mm. 229114	NP_666121	中心体蛋白 290	转录及翻译因子	83.3	527.5	3.5
1418314_a_at	Mm. 370334	NP_067452	共济失调蛋白 2 结合蛋白 1	转录及翻译因子	228.6	43.1	4.7
		NP_899011					
1422562_at	Mm. 29467	NP_062636	Ras 相关关联糖尿病	信号分子	3.4	6.5	4.7
1415936_at	Mm. 45815	NP_038895	乳腺癌抗雌激素抗性 3	信号分子	288.7	17.7	3.7
1417700_at	Mm. 276669	NP_082514	Rab38, RAS 癌基因家族成员	信号分子	7.6	18.2	5.6
1435432_at	Mm. 291135	NP_001032213	矢车菊苷蛋白 γ 2	信号分子	97.6	16.7	3.1
		NP_835220					
1435644_at	Mm. 227616	NP_796338	SH3 及 PX 域 2B	信号分子	27.5	19.2	10.0
1440799_s_at	Mm. 243091	NP_663494	FERM, RhoGEF 和血小板白细胞 C 激酶底物域蛋白 2	信号分子	8.4	29.2	5.8

[0128]

1420498 _a_at	Mm. 240 830	NP_001008702	失效同系物 2	信号分子	74.0	195.0	52.3
		NP_001032994					
		NP_001095870					
		NP_075607					
1419004 _s_at	Mm. 378 888	NP_031560	B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 A1b	信号分子	3.6	17.7	8.7
		NP_031562	B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 A1d				
		NP_033872	B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 A1a				
1415871 _at	Mm. 144 55	NP_033395	转化生长因子, β 引导	粘附分子	91.1	55.2	84.0
1416612 _at	Mm. 214 016	NP_034124	细胞色素 P450, 家族 1, 亚家族 b, 多肽 1	酶	12.9	4.0	23.5
1417235 _at	Mm. 185 26	NP_065603	含 EH 结构域 3	酶	4.0	20.8	3.4
1417256 _at	Mm. 502 2	NP_032633	基质金属蛋白酶 13	酶	13.9	12.6	5.3
1418018 _at	Mm. 276 736	NP_031780	羧肽酶 D	酶	87.1	27.3	6.1
1421307 _at	Mm. 158 776	NP_078771	碳酸酐酶 13	酶	9.2	7.4	9.5
1421415 _s_at	Mm. 314 757	NP_032131	葡糖胺(N-乙酰)转移酶 2, I 分支酶	酶	15.4	5.2	13.2
		NP_076376					
		NP_573482					

[0129] [表 2-3]

[0130]

Affymotrix 探针集 ID	Unigene 号	NCBI 编号	基因名称	经编码的 蛋白质的 功能	相对荧光强度比		
					Th17/ Th1	Th17/ Th2	Th17/ Treg
1424783_ a_at	Mm. 300 095	NP_038729	UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A2	酶	12.7	183.1	4.2
		NP_659545	UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A6A				
		NP_958812	UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A6B				
		NP_964003	UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A10				
		NP_964004	UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A7C				
		NP_964005	UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A5				
		NP_964006	UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A9				
		NP_964007	UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A1				
		XP_911442	UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家				

[0131]

			族, 多肽 A8 类似物				
1425128_at	Mm. 192369	NP_001031817 NP_666296	UDP-GlcNAc: β Gal β 1, 3-N 乙酰葡萄糖氨基转移酶 8	酶	7.4	10.0	7.8
1426238_at	Mm. 27757	NP_033885	骨形态发生蛋白 1	酶	3.5	12.5	7.9
1448562_at	Mm. 4610	NP_033503	尿嘧啶核苷磷酸化酶 1	酶	38.8	9.2	8.1
1459299_at	Mm. 99648	NP_796350	肌浆球蛋白 IIIB	酶	8.7	11.7	4.4
1416673_at	Mm. 97885	NP_062390	β 位点 APP 裂解酶 2	酶	6.0	4.1	15.2
1422352_at	Mm. 201549	NP_032596	肥大细胞蛋白酶 1	酶	39.8	30.3	15.8
1429329_at	Mm. 340211	NP_848466	COX10 同系物, 细胞色素 c 氧化酶组装蛋白, 血红素 A: 法呢酰转移酶	酶	3.2	3.1	3.2
1438801_at	Mm. 441620	NP_001033708 NP_766234	发动蛋白 3	酶	17.3	9.3	3.1
1441975_at	Mm. 19941	NP_062781 NP_997551	酸性磷酸酶, 前列腺	酶	10.6	6.9	14.6
1445963_at	Mm. 134911	NP_700471	磷酸二酯酶 5A, cGMP 特异	酶	74.8	65.7	141.5
1451361_a_at	Mm. 389243	NP_666363	含 Patatin 样磷脂酶域 7	酶	3.7	4.9	4.5
1453474_at	Mm. 432526	NP_080461	RIKEN cDNA 1300007F04 基因	酶	17.5	16.2	4.3
1454013_at	Mm. 437061	NP_084456	RIKEN cDNA 1810062018 基因	酶	12.4	121.6	3.9
1457063_at	Mm. 133075	NP_694744	磷酸酶孤儿素 1 (表达基因序列 AI447357、ABI 基因家族成员 3)	酶	5.8	10.3	4.3
1458296_at	Mm. 309395	NP_034292	多发性外生骨疣 1	酶	3.6	13.1	3.9
1416318_at	Mm. 20144	NP_079705	丝氨酸 (或半胱氨酸) 肽酶抑制剂 B 簇成员 1a	酶抑制物	9.4	284.5	40.9
1417701_at	Mm. 308126	NP_597844	蛋白磷酸酶 1 调节 (抑制剂) 亚基 14c	酶抑制物	6.6	3.9	6.0
1421137_a_at	Mm. 262135	NP_001034139 NP_001034140 NP_001034141 NP_001034142 NP_032889	蛋白激酶抑制因子 β , cAMP 依赖, 精巢特异性	酶抑制物	5.9	17.9	5.8
1460227_at	Mm. 8245	NP_001037849 NP_035723	组织抑制剂金属蛋白酶 1	酶抑制物	17.1	39.4	182.4
1416702_at	Mm. 41560	NP_033276	丝氨酸 (或半胱氨酸) 肽酶抑制剂, I 簇, 成员 1	酶抑制物	5.8	20.5	3.4
1420621_a_at	Mm. 277585	NP_031497	淀粉状蛋白 β (A4) 前体蛋白	酶抑制物	3.4	4.0	7.0
1424351_at	Mm. 272	NP_080599	WAP 四二硫化物核心域 2	酶抑制	30.7	35.5	130.2

[0132]

at	89			物			
1434758_at	Mm. 264 680	NP_084485	含半胱氨酸丰富分泌蛋白 LCCL 域 2	分泌蛋白	294.1	432.9	42.7

[0133] [表 2-4]

[0134]

Affymotrix 的 探针集 ID	Unigene 号	NCBI 编号	基因名称	经编码的 蛋白质的 功能	相对荧光强度比		
					Th17 /Th1	Th17 /Th2	Th17/ reg
1460406_at	Mm. 118 69	NP_001028382	肌动蛋白丝束蛋白 1 (表达基 因序列 AI427122)	结构蛋 白	8.2	8.9	7.1
1421653_a_at	Mm. 246 497	XP_990954	免疫球蛋白重链复合物 免疫球蛋白重链 1a (血清 IgG2a) 免疫球蛋白重链 2 (血清 IgA) 免疫球蛋白重链 1a 免疫球蛋白重链 (J558 家族) 免疫球蛋白重链 (γ -多肽) 免疫球蛋白 μ 链类似物 免疫球蛋白重链 V 区 3 前体类 似物 免疫球蛋白重链可变区 免疫球蛋白重链 V 区 102 前体 类似物	结构蛋 白	496.7	96.2	4.1
1424631_a_at	Mm. 436 014	XP_001472591	免疫球蛋白重链 (γ -多肽)	结构蛋 白	32.0	6.0	20.8
1426174_s_at	Mm. 342 177	XP_001472591	免疫球蛋白重链 3	结构蛋 白	17.2	18.9	3.7
	Mm. 436 014		免疫球蛋白重链 (γ -多肽)				
1438452_at	Mm. 256 298	NP_083033	星云状小体	结构蛋 白	36.9	14.8	6.9
1423607_at	Mm. 188 88	NP_032550	内腔蛋白	结构蛋 白	5.0	70.2	39.9
1437232_at	Mm. 107 214	NP_808440	杀菌性/通透性增加蛋白样 2	结构蛋 白	4.5	9.5	4.6
1433526_at	Mm. 179 871	NP_848856	Kelch 样 8	结构蛋 白	5.3	43.2	3.7
1459860_x_at	Mm. 448 76	NP_109631	含三重基序 2	结构蛋 白	12.4	21.0	7.8
1422862_at	Mm. 117 709	NP_062782 NP_062783 NP_072048	PDZ 及 LIM 域 5	结构蛋 白	10.0	66.8	3.8
1427118_at	Mm. 347 934	NP_058575	RIKEN cDNA 5430421N21 基因	结构蛋 白	48.8	7.1	3.5
1434947_at	Mm. 768 8	NP_032471	驱动蛋白家族成员 3C	结构蛋 白	3.6	5.1	3.4
1423994	Mm. 402	NP_032467	驱动蛋白家族成员 1B	结构蛋	4.0	6.8	3.4

[0135]

_at	393	NP_997565		白			
1455266_at	Mm. 256 342	NP_032475	驱动蛋白家族成员 5C	结构蛋白	4.1	7.2	3.6

[0136] [表 2-5]

[0137]

Affymotrix 的探针集 ID	Unigene 号	NCBI 编号	基因名称	经编码的蛋白质的功能	相对荧光强度比		
					Th17/Th1	Th17/Th2	Th17/Treg
1427417_at	Mm. 98731	NP_766526	中足性梳样 4	中足性梳样 4	5.2	19.0	3.2
1440559_at	Mm. 441435	NP_835158	高移动族 AT 钩 2, 假基因 1	高移动族 AT 钩 2	20.2	4.9	7.4
1432280_at	Mm. 159539	XP_126508 XP_918060	RIKEN cDNA 2310007L24 基因	预测蛋白 LOC75573 同工型 1	180.6	54.1	10.3
1437145_s_at	Mm. 46431	NP_080691	RIKEN cDNA 2310002J15 基因	预测蛋白 LOC67859	74.5	34.4	11.1
1429764_at	Mm. 34131	XP_898485 XP_988635	序列相似家族 101, 成员 B (RIKEN cDNA 1500005K14 基因)	预测蛋白 LOC76566	6.5	6.4	3.6
1456603_at	Mm. 34131	XP_898485 XP_988635	序列相似家族 101, 成员 B (RIKEN cDNA 1500005K14 基因)	预测蛋白 LOC76566	9.6	16.6	5.2
1456878_at	Mm. 259320	NP_942560	表达序列 AI646023	预测蛋白 LOC192734	5.2	20.2	5.3
1428736_at	Mm. 24356	NP_080516	含 GRAM 域 3	预测蛋白 LOC107022	3.9	8.9	3.4
1440156_s_at	Mm. 207709	NP_001092269	TOX 高移动族框蛋白家族成员 2 (表达序列 AI851523)	EST	76.8	5.9	3.3
1443078_at	Mm. 399703	-	RIKEN cDNA 6030439D06 基因	EST	8.3	42.7	13.0
1452952_at	Mm. 220761	NP_001074758	RIKEN cDNA 9030418K01 基因	EST	25.3	8.8	9.3
1444674_at	Mm. 227443	-	表达序列 AU015680	EST	42.4	3.4	11.8
1457174_at	Mm. 227443	-	表达序列 AU015680	EST	8.2	4.3	3.9
1458341_x_at	-	-	序列号 1 的多核苷酸	EST	13.9	29.7	15.4
1460118_at	Mm. 401203	-	序列号 2 的多核苷酸	EST	11.7	14.3	8.6

[0138] 此外, 已知在 Th17 细胞中有特异性表达的基因 RAR 相关孤儿受体 γ (RAR-related orphan receptor gamma) 的相对荧光强度比见表 3。

[0139] [表 3]

[0140]

Affymotrix 的探针集 ID	Unigene 号	NCBI 编号	基因名称	经编码的蛋白质的功能	相对荧光强度比		
					Th17/Th1	Th17/Th2	Th17/Treg
1425792_a_at	Mm. 4372	NP_035411	RAR 相关孤儿受体 γ	转录因子	428.6	405.0	8.2

[0141] 这些结果显示,表 2 所列各基因与过去已知在 Th17 细胞特异性表达的表 3 的基因一样,在 Th17 细胞有特异性表达。反复进行上述实验 1. -5. 四次的结果是上述各基因在 Th17 细胞的相对荧光强度比 Th1、Th2 或 Treg 细胞的任何一个都高三倍以上。

[0142] 实施例 2 :分析在疾病模型鼠中高表达基因

[0143] 1. 制作疾病模型鼠

[0144] 1) 制作 SKG 关节炎模型鼠(以下称“关节炎模型鼠”)

[0145] 用以下方法制作了关节炎模型鼠

[0146] a) 制备菌体成分及向小鼠投放

[0147] 将由碱粪便菌 (*Alcaligenes faecalis*) 产生的热凝胶多糖 (curdlan) (SIGMA 公司) 在 PBS(磷酸盐缓冲液) 中悬浊,获得热凝胶多糖制备物 (50mg/ml) (以下称菌体成分)。该菌体成分给药到 7-8 周龄的自发性 SKG 关节炎鼠(雌) (*Nature*, vol 426, pp. 454-460 (2003) 的腹腔中,购自 clea-japan 公司) 每只 200 μ l。四周后,再向每只小鼠的腹腔内给药 200 μ l。

[0148] b) 判断关节炎重症度

[0149] 0 分 :正常

[0150] 1 分 :关节轻度炎症

[0151] 2 分 :关节轻度炎症及肿胀

[0152] 3 分 :关节中度炎症及肿胀

[0153] 4 分 :关节重度炎症及肿胀

[0154] 5 分 :关节重度炎症、肿胀及关节变形

[0155] 6 分 :关节重度炎症、肿胀、关节变形、行走困难及虚弱

[0156] 根据上述标准,对用于分析的小鼠进行筛选。上述菌体成分给药第 30 天后出现关节炎症状。分析使用了菌体成分给药 3 周判断为 0 分的 2 个小鼠、给药 8 周判断为 3 分的 2 个小鼠、给药 12 周判断为 5 分的 2 个小鼠(以下称“发病期关节炎模型鼠”)、给药 20 周判断为 6 分的 2 个小鼠及未注射菌体成分经过 20 周判为 0 分的 2 个小鼠(共计 10 个)。使用了 2 个 BALB/c 鼠(东方 (Oriental) 酵母株式会社) 作为对照鼠。

[0157] 2) 制作实验性变应性脑脊髓炎 (EAE) (急性) 模型鼠(以下称:“脑炎模型鼠”)

[0158] 用以下方法制作脑炎模型鼠。

[0159] a) 制作抗原乳胶及注射到小鼠

[0160] 混合弗氏不完全佐剂 (Difco Laboratories 公司) 与结核菌体成分结核杆菌 H37Ra (Difco Laboratories 公司), 制作出 40mg/ml 的弗氏完全佐剂 (CFA)。将 PLP (139 位 -151 位) 肽 (PLP :髓鞘蛋白脂质蛋白) (委托北海道系统科学合成肽, 氨基酸序列 : HSLGKWLGHDPDKF) (2mg/ml、溶于 PBS) 与 CFA 等量混合, 用双筒针 (化学技术株式会社) 反复注射使之混合, 制作抗原乳胶。用剃须刀剃掉 8-10 周龄的 SJL 鼠(雌) (日本 Charles river 株式会社) 背部的毛, 在该小鼠腰部正中左右各二处用 1ml 注射器分别皮下注射各 50 μ l 的上述抗原乳胶。再在该注射日向该鼠尾静脉注射 200 μ l 溶解于 PBS 的百日咳毒素 (Pertussis Toxin) (List Biological Laboratories 提供) (2 μ g/ml)。

[0161] b) 脑脊髓炎重症度评判

[0162] 用以下评分判断重症度。

[0163] 0分:正常

[0164] 1分:尾部完全麻痹

[0165] 2分:后肢部分麻痹

[0166] 3分:后肢完全麻痹

[0167] 4分:前肢麻痹

[0168] 5分:全身麻痹导致濒临死亡或死亡

[0169] 按照上述标准筛选用于分析的小鼠。接种上述抗原乳胶后第10-14天出现脑脊髓炎症状。其后,接种后第15-20天症状缓解后消失。症状发病期的分析使用了接种后第14天判断为2分以上的5个试验体(以下称“发病期脑炎模型鼠”)。症状缓解期的分析使用了接种后第18天判断为0分的5个试验体(以下称“缓解期脑炎模型鼠”)(共计10个)。使用5个仅腹腔注射百日咳毒素的SJL鼠作为对脑炎模型鼠的对照鼠。

[0170] 2. 制备总RNA

[0171] 1) 从关节炎模型鼠组织制备总RNA

[0172] 用剪子除去关节炎模型鼠关节部位的皮肤,切割脚趾,摘出足关节部位组织。在液体氮内冷冻保存摘取的足关节部位组织。用去处基因组DNA组织RNA提取试剂盒(QIAGEN公司)和匀质器QIAshredder(QIAGEN公司)从冷冻的足关节部位组织制备总RNA。同样,制备了对照鼠的总RNA。

[0173] 2) 从脑炎模型鼠的组织制备总RNA

[0174] 解剖脑炎模型鼠,切掉头和尾巴,取出脊柱。用注射器从该脊柱的尾椎椎孔注入PBS,靠其压力摘取脊髓。在液体氮内冷冻保存摘取的脊髓。用均化器(as-1株式会社)粉碎,用去处基因组DNA组织RNA提取试剂盒(QIAGEN公司)和匀质器QIAshredder(QIAGEN公司)制备总RNA。同样也制备了对照鼠的总RNA。

[0175] 3. 用微阵列分析各疾病模型鼠的基因表达

[0176] 用微阵列对作为Th17细胞检测用标记候补选择的115基因分析了在疾病模型鼠中的表达。分析使用了从与关节炎模型鼠、脑炎模型鼠和各种模型鼠相对应的对照鼠所制备的总RNA。

[0177] 用单周期靶标记及对照物(Affymetrix公司)或双周期靶标记及对照物(Two-Cycle Target Labeling and Control Reagent)(Affymetrix公司),按照操作指南将上述各总RNA(单周期时,1-5 μ g、双周期时,10-100 μ g)反转录为cDNA,再转录成生物素化cRNA。将15 μ g生物素化cRNA放入小鼠基因组430 2.0芯片(Affymetrix公司),在基因芯片杂交箱640(Affymetrix公司)中,在45 $^{\circ}$ C、60rpm条件下杂交16小时。杂交后,将基因芯片洗涤工作站450洗涤和荧光标记的微阵列用基因芯片扫描仪30007G(Affymetrix公司)扫描,取得荧光强度数据。

[0178] 用表达分析软件Gene Spring GX(安捷伦(Agilent)公司)将上述数据标准化。用GAPDH的荧光强度除以各基因的荧光强度,算出各基因的相对荧光强度。用分析的用个体数算出各疾病模型鼠和对照鼠的各基因的相对荧光强度平均值。在本实施例中,将该平均值作为各疾病模型鼠和对照鼠的各基因表达量。

[0179] 再用对照鼠的基因表达量除以各疾病模型鼠的基因表达量,以算出疾病模型鼠与对照鼠的基因表达比。本实施例中将所得各值作为关节炎模型鼠和脑炎模型鼠的各基因表

达比。比如,当某基因表达比为 2 时,表示该基因在疾病模型鼠中表达量比对照鼠多 2 倍。

[0180] 4. 区分认证 (identification) 在疾病模型鼠中高表达的基因

[0181] 1) 通过基因表达比区分

[0182] 本发明人着眼于各疾病模型鼠在症状发病期的基因表达。即,将发病期中与健康时(对照鼠)各基因表达比在 2 以上作为在疾病模型鼠高表达的基因抽取条件(以下称“抽取条件 1”)区分出发病期表达增加的基因。

[0183] 根据抽取条件 1 从已确认在培养的 Th17 细胞中有高表达的基因中分出发病期关节炎模型鼠有高表达的基因。其结果见表 4。

[0184] 同样,根据抽取条件 1 也区分出在发病期脑炎模型鼠中有高表达的基因。其结果见表 5。

[0185] 2) 通过各基因表达量和 IL-17A 基因表达量之间的相关性区分

[0186] 本发明人着眼于疾病模型鼠的 IL-17A 基因表达量的动态。即将疾病模型鼠的各基因表达量和 IL-17A 基因表达量之间的“皮尔逊积差相关系数”为 0.6 以上作为与 IL-17A 基因表达相关的基因的抽取条件(以下称“抽取条件 2”)区分出其表达量随 IL-17A 基因表达量变化的基因。在该领域,一般认为在统计中该相关系数在 0.6 以上。

[0187] 在本实施例中,皮尔逊积差相关系数如下算出。

[0188] 在同一疾病模型鼠中,设想算出该相关系数的基因表达量为 x , 设 IL-17A 基因表达量为 y 。如下设定各疾病模式中各小鼠的 i 值;

[0189] 在关节炎模式中

[0190] ——对照鼠为 $i = 1$

[0191] ——上述未接种菌体成分的鼠为 $i = 2$

[0192] ——上述接种菌体后三周的鼠为 $i = 3$ 。

[0193] 在脑炎模式中

[0194] ——对照鼠为 $i = 1$

[0195] ——接种上述抗原乳胶后 9 天的鼠为 $i = 2$

[0196] ——接种上述抗原乳胶后 14 天的鼠为 $i = 3$

[0197] ——接种上述抗原乳胶后 18 天的鼠为 $i = 4$

[0198] ——接种上述抗原乳胶后 24 天的鼠为 $i = 5$ 。

[0199] 根据上述定义的值和算式 $(x, y) = [(x_i, y_i)] (i = 1, 2, \dots, n)$ 制出由 2 组数值组成的数据列。在关节炎模式中, $n = 3$, 在脑炎模式中, $n = 5$ 。

[0200] 在计算皮尔逊积差相关系数中使用了以下算式。式中的带上划线的 x 和 y 分别为 $\bar{x} = \{x_i\}$ 及 $\bar{y} = \{y_i\}$ 的平均值。

[0201] [数字 1]

$$[0202] \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

[0203] a) 关于关节炎模型鼠

[0204] 关节炎模型鼠的 IL-17A 基因表达量,在未发病的判断为 0 分的鼠菌体成分接种后

三周已经呈现上升。因此,算出了在对照鼠、上述未接种菌体成分鼠和上述接种菌体成分三周的关节炎模型鼠中 IL-17A 基因的表达量与在上述 4. 1) 区分的各基因的表达量之间的皮尔逊积差相关系数。

[0205] 根据算出的相关系数和上述抽取条件 2 区分出在关节炎模型鼠中与 IL-17A 基因表达相关的基因。其结果在表 4 中加 * 号表示。

[0206] [表 4-1]

[0207]

基因名称	Affymetrix 的探针集 ID	表达量 (相对于 GAPDH)				表达比 (相 对于对照)	相关系数 (相对于 1117a)
		对照鼠	关节炎模型鼠				
			未接种 菌体 20 周	3 周	12 周 (发 病期)	发病期关 节炎模型 鼠 (12 周)	Balbc. 未 接种菌体 20 周接 种后 3 周
* 白细胞介素 17A	1421672_a t	207. 8	226. 3	1070. 3	3819. 4	18. 4	1. 0000
* 半胱氨酸丰富分 泌蛋白 LCCL 域 2	1437056_x _at	9461. 9	11692. 6	68955. 5	42249. 5	4. 5	0. 9999
	1434758_a t	6190. 9	4396. 2	24640. 2	17122. 4	2. 8	0. 9951
	1460458_a t	2411. 9	1507. 1	11033. 9	9248. 4	3. 8	0. 9945
* 组织抑制剂金属 蛋白酶 1	1460227_a t	5859. 1	6598. 9	19489. 8	122655. 6	20. 9	0. 9996
* 丝氨酸(或半胱氨 酸) 肽酶抑制剂 B 簇成员 1a	1416318_a t	19872. 6	20917. 2	31810. 5	59731. 1	3. 0	0. 9982
	1448301_s _at	2171. 7	3751. 0	3690. 4	11305. 4	5. 2	0. 4868
* 基质金属肽酶 13	1417256_a t	6699. 9	6086. 5	17800. 6	151299. 2	22. 6	0. 9979
* 磷酸二酯酶 5A (cGMP 特异)	1445963_a t	72. 2	60. 3	188. 1	468. 3	6. 5	0. 9947
* Clq 及肿瘤坏死 因子相关蛋白质 3	1422606_a t	631. 3	341. 8	1957. 3	34652. 4	54. 9	0. 9825
* 溶质载体家族 38 成员 6 (表达序列 AW322671)	1457266_a t	5699. 1	5825. 5	6188. 3	19804. 9	3. 5	0. 9730
* RIKEN cDNA 9030418K01 基因	1452952_a t	4179. 0	4858. 6	6652. 8	13171. 1	3. 2	0. 9688
* 横跨膜蛋白 176A	1441811_x _at	5738. 6	6814. 2	9340. 0	17201. 0	3. 0	0. 9620

[0208]

	1423909_at	5048.1	7214.1	8456.5	22824.8	4.5	0.7900	
	1425603_at	4520.0	8194.4	9177.6	15556.4	3.4	0.6693	
*	载脂蛋白 L7b (表达序列 BC085284)、载脂蛋白 L7e (载脂蛋白 L, 3 类似物)	1436271_at	67.0	97.9	163.0	355.0	5.3	0.9548
*	突触结合蛋白 XI	1455176_at	1336.4	1704.4	2095.5	4220.5	3.2	0.8836
		1449264_at	219.7	65.6	369.9	478.9	2.2	0.8526
		1429314_at	371.6	750.7	1035.0	1492.9	4.0	0.8325
*	细胞性视网膜结合蛋白 1 细胞性视网膜结合蛋白 I 类似物	1448754_at	2393.6	1377.7	3518.6	9143.3	3.8	0.8713
*	内腔蛋白	1423607_at	45156.4	25541.4	61678.3	172983.7	3.8	0.8300
*	白细胞素 1 受体 1	1448950_at	5275.9	3516.4	6544.6	33022.5	6.3	0.8047
*	驱动蛋白家族成员 5C	1455266_at	1471.4	1839.0	2064.2	4452.2	3.0	0.8005
*	大麻类受体 2	1450476_at	596.9	1315.6	1580.7	3200.9	5.4	0.7214
*	G 蛋白偶联受体 183 (eb 病毒诱导基因 2)	1457691_at	1755.0	1427.0	1853.2	4033.0	2.3	0.6645
*	B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 Ala、B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 A1b、B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 Ald	1419004_s_at	3378.0	4243.5	4389.7	45297.1	13.4	0.6260
*	Fc 受体, IgG, 低亲和性 IIb	1435477_s_at	6927.7	14380.3	15590.6	81184.0	11.7	0.6223

[0209] [表 4-2]

[0210]

基因名称	Affymetrix 的探针集 ID	表达量 (相对于 GAPDH)				表达比 (相对于对照)	相关系数 (相对于 1117a)
		对照鼠	关节炎模型鼠				
			未接种菌体 20 周	3 周	12 周 (发病期)	发病期关节炎模型鼠 (12 周)	Balbc. 未接种菌体 20 周接种后 3 周
平足蛋白	1419309_at	14163.2	11263.2	14215.8	63518.0	4.5	0.4973
SH3 及 PX 域 2B	1435644_a	9179.2	4845.8	9025.3	19073.4	2.1	0.4561

[0211]

蛋白激酶抑制因子 β , cAMP 依赖, 精巢特异性	1421137_a _at	1208.6	1380.7	1349 .7	5608.1	4.6	0.3641
	1421138_a _at	131.5	256.0	198. 2	472.7	3.6	0.0601
稳定素 1	1450199_a _at	2635.7	3637.2	3381 .6	6636.8	2.5	0.2899
高移动族 AT 钩 2, 假 基因 1	1440559_a _t	1984.9	3068.6	2639 .5	5170.4	2.6	0.1378
转化生长因子 β 引导	1437463_x _at	28975. 2	26002. 5	2786 3.1	75696.1	2.6	0.1253
	1448123_s _at	51505. 3	45384. 4	4521 7.8	108869.5	2.1	-0.5359
失效同系物 2	1423805_at	3857.4	3084.9	3452.8	8102.0	2.1	-0.0462
白细胞介素 27 受体 A	1449508_at	73.2	313.7	155.7	1432.4	19.6	-0.1598
羧肽酶 D	1447392_s _at	80.2	170.3	110. 3	207.3	2.6	-0.1704
趋化因子 CC 基元配体 20	1422029_at	1071.9	47.7	406.6	2163.0	2.0	-0.1887
免疫球蛋白重链 (gamma polypeptide)	1424631_a _at	620.0	1960.4	719.3	1567.7	2.5	-0.4245
Myosin III B	1459299_at	154.1	214.7	156.6	326.2	2.1	-0.4504
免疫球蛋白重链复合物、免疫球蛋白重链 1a (血清 IgG2a)、免疫球蛋白重链 2 (血清 IgA)、免疫球蛋白重链 1a、免疫球蛋白重 链 (J558 家族)、免疫球蛋白重链 (γ 多肽)、 免疫球蛋白 μ 链类似物、免疫球蛋白重链 V 区 3 前体类似物、免疫球蛋白重链可变区、 免疫球蛋白重链 V 区 102 前体类似物	1421653_a _at	11977. 9	63907. 6	1211 1.0	29433.2	2.5	-0.4817
杀伤细胞凝集素样受 体亚家族 B 成员 1F	1457722_at	296.8	540.1	292.3	1113.9	3.8	-0.4976
尿嘧啶核苷磷酸化酶 1	1448562_at	1105.4	858.5	859.8	10087.0	9.1	-0.5120
免疫球蛋白 J 链	1424305_at	10933.5	48147.6	8672.8	75764.9	6.9	-0.5277
含 EH-域 3	1417235_at	2007.9	2060.6	1997.2	4712.8	2.3	-0.6156
Ras 相关关联糖尿病	1422562_at	552.7	496.7	476.3	4908.7	8.9	-0.7193
多发性外生骨疣 1	1458296_at	1261.5	1234.4	646.9	5655.4	4.5	-0.9998

[0212] b) 关于脑炎模型鼠

[0213] 计算出在对照鼠和上述接种抗原乳胶后 9、14、18 和 24 天的脑炎模型鼠中 IL-17A 基因表达量与上述 4.1) 区分的各基因的表达量之间的皮尔逊积差相关系数。

[0214] 根据计算出的相关系数和上述抽取条件 2 区分出在脑炎模型鼠中与 IL-17A 基因表达相关的基因。其结果在表 5 中加 * 号表示。

[0215] 3) 根据脑炎模型鼠的病情和各基因表达量之间的相关性区分

[0216] 在脑炎模型鼠中, 接种上述抗原乳胶后第 10-14 天出现脑脊髓炎症状, 接种后第 15-20 天症状缓解后消失。因此, 本发明人着眼于脑炎模型鼠的病情和各基因表达量之间的

相关性。即,将缓解期与发病期中各基因表达量之比在 0.7 以下的作为脑炎模型鼠中与病情相关的基因的抽取条件(以下称为“抽取条件 3”),区分出其表达在发病期增加且在缓解期减少的基因。

[0217] 从上述 4.2)b) 区分的基因中,根据抽取条件 3 区分出在脑炎模型鼠中有高表达的基因。此结果在表 5 中附加 # 号表示。

[0218] [表 5-1]

[0219]

基因名称	Affymetrix 的探针集 ID	表达量 (相对于 GAPGH)					表达比 (相对于对照)	相关系数 (相对于 II17a)	表达比 (缓解期相对于发病期)
		对照鼠	脑炎模型鼠						
			9 日	14 日	18 日	24 日			
# * 转化生长因子 β 引导	1448123_s_at	931.4	1295.7	25411.1	2483.9	1726.7	27.3	0.997	9.8
	1415871_at	565.4	688.6	13625.9	1407.2	893.6	24.1	0.997	10.3
	1456250_x_at	987.4	1481.4	21477.8	2864.4	2021.7	21.8	0.998	13.3
	1437463_x_at	1289.2	1725.3	11667.4	2831.1	2230.1	9.1	0.999	24.3
# * 肿瘤坏死因子受体超家族成员 14	1452425_at	38.7	47.8	522.3	69.3	55.0	13.5	0.997	13.3
# * Fc 受体, IgG, 低亲和性 IIb	1435477_s_at	568.2	967.9	28718.8	4457.2	2623.5	50.5	1.000	15.5
# * 载脂蛋白 L7b (表达序列)	1436271_at	14.9	28.4	190.6	34.8	25.7	12.8	0.995	18.3

[0220]

	BC085284)、载脂蛋白 L7e(载脂蛋白 L, 3 类似物)									
# *	组织抑制剂金属蛋白酶 1	1460227_at	261.2	348.4	2209.3	448.1	2118.4	84.6	0.998	20.3
# *	B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 A1a、B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 A1b、B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 A1d	1419004_s_at	820.8	921.9	1697.5	384.2	2216.4	20.7	0.998	22.6
# *	UDP 葡萄糖醛基转移酶 1 家族, 多肽 A2、UDP 葡萄糖醛基转移酶 1 家族, 多肽 A6A、UDP 葡萄糖醛基转移酶 1 家族, 多肽 A6B、UDP 葡萄糖醛基转移酶 1 家族, 多肽 A10、UDP 葡萄糖醛基转移酶 1 家族, 多肽 A7C、UDP 葡萄糖醛基转移酶 1 家族, 多肽 A5、UDP 葡萄糖醛基转移酶 1 家族, 多肽 A9、UDP 葡萄糖醛基转移酶 1 家族, 多肽 A1、UDP 葡萄糖醛基转移酶 1 家族, 多肽 A8 类似物	1426260_a_at	359.2	451.7	6567.0	150.5	1014.4	18.3	0.999	22.9
		1426261_s_at	149.4	217.6	1963.8	502.1	289.9	13.1	0.997	25.6
		1424783_a_at	497.4	572.1	3717.2	125.3	926.5	7.5	0.995	33.7
# *	白细胞介素 17A	1421672_at	83.9	80.0	655.9	155.4	129.5	7.8	1.000	23.7
	前列腺酸性磷酸酶	1441975_a_at	157.3	111.4	510.4	149.1	114.7	3.2	0.987	29.2
		1453943_a_at	53.5	49.8	185.2	59.0	56.4	3.5	0.997	31.8
# *	尿嘧啶核苷磷酸化酶 1	1448562_at	535.6	580.5	2198.0	668.5	544.2	4.1	0.995	30.4
# *	横跨膜蛋白 176A	1425603_at	1254.4	185.2	9356.9	335.0	2559.2	7.5	0.992	35.8
		1423909_at	5751.3	742.8	2111.5	1256.8	1042.0	3.7	0.946	59.5
		1441811_x_at	2605.8	307.6	9358.1	580.3	4888.6	3.6	0.929	62.0
# *	UDP-GlcNAc: β Ga	1425128_	141.	72.	409.	149.	171.	2.9	0.974	36.6

[0221]

	Iβ1, 3-N 乙酰葡萄糖氨基转移酶 8	at	1	6	1	.6	7			
# *	白细胞介素 1 受体 1	1448950_at	192.8	390.6	923.4	339.4	276.5	4.8	0964	36.8
# *	大麻类受体 2	1450476_at	42.8	99.8	545.1	219.9	166.5	12.7	0.974	40.3
# *	失效同系物 2	1420498_a_at	1210.3	1597.6	5167.7	2100.7	1856.7	4.3	0.994	40.7
		1430604_a_at	348.4	336.5	954.6	391.6	322.5	2.7	0.994	41.0
		1423805_at	461.2	500.5	960.0	569.7	428.9	2.1	0.976	59.3

[0222] [表 5-2]

[0223]

基因名称	Affymetrix 的探针集 ID	表达量 (相对于 GAPGH)					表达比 (相对于对照)	相关系数 (相对于 I117a)	表达比 (缓解期相对于发病期)
		对照鼠	脑炎模型鼠						
			9 日	14 日	18 日	24 日			
# * G 蛋白偶联受体 15	1431296_at	45.7	53.9	194.7	81.8	47.6	4.3	0.987	42.0
# * 白细胞介素 22, 白细胞介素 2 受体 1 家族成员 3	1427624_s_at	19.3	25.4	71.1	30.7	14.4	3.7	0.963	43.2
# * 白细胞介素 27, 受体 A	1449508_at	103.3	57.2	432.6	198.9	142.1	4.2	0.971	46.0
# * RIKEN cDNA 6030439D06 基因	1443078_at	26.3	28.9	59.2	28.2	36.1	2.3	0.967	47.7
# * 细胞色素 P450, 家族 1, 亚家族 b, 多肽 1	1416612_at	435.9	506.8	1415.6	683.5	529.4	3.2	0.992	48.3
# * 磷酸酶 1 (表达序列 AI447357, ABI 基因家族成员 3)	1457063_at	164.6	194.8	487.0	239.2	174.8	3.0	0.987	49.1
# * 溶质载体家族 38 成员 6 (表达序列 AW322671)	1457266_at	784.7	914.8	2305.4	1143.5	1020.0	2.9	0.994	49.6
# * 半胱氨酸丰富分泌蛋白 LCC1 域 2	1460458_at	442.3	513.3	1157.8	574.6	456.4	2.6	0.989	49.6
	1434758_at	703.4	785.4	1970.7	983.1	735.6	2.8	0.990	49.9
	1437056_x_at	1505.7	2007.0	5533.9	3267.5	2847.9	3.7	0.944	59.0
# * 葡糖胺 (N-乙酰) 转移酶 2, I 分支	1425503_at	1036.0	1308.3	2675.7	1353.5	1254.7	2.6	0.988	50.6

[0224]

	酶	1451733_at	135.9	132.8	399.5	211.7	158.1	2.9	0.986	53.0
		1421415_s_at	463.2	469.5	921.0	534.0	462.9	2.0	0.995	58.0
# *	Ras 相关关联糖尿 病	1422562_at	95.3	113.9	415.9	212.1	158.7	4.4	0.973	51.0
# *	稳定素 1	1450199_a_at	275.5	335.4	902.7	498.7	342.5	3.3	0.974	55.3
	基质金属肽酶 13	1417256_at	33.6	39.3	69.4	38.7	39.3	2.1	0.987	55.7
# *	骨形态发生蛋白 1	1427457_a_at	214.6	297.6	721.7	430.3	363.1	3.4	0.952	59.6
		1426238_at	819.5	1006.6	1936.5	1478.6	1083.1	2.4	0.897	76.4
# *	T 细胞特异性转 录因子 7	1450461_at	106.2	59.2	220.1	132.9	221.6	2.1	0.625	60.4
		1433471_at	360.3	485.4	910.9	562.6	492.6	2.5	0.963	61.8
# *	横跨膜蛋白 176B	1418804_a_at	125.57.8	1481.3.1	3578.2.1	218.65.2	179.37.1	2.8	0.964	61.1
# *	碳酸酐酶 13	1421307_at	711.8	868.8	1637.3	1034.2	911.2	2.3	0.974	63.2
# *	淋巴细胞抗原 6 复合物基因座 K	1452855_at	194.4	212.9	597.3	389.6	304.2	3.1	0.933	65.2
# *	SH3 及 PX 域 2B	1435644_at	101.1.1	1070.4	2010.2	132.0.1	112.9.0	2.0	0.985	65.7
# *	含 WW 域转录调节 因子 1	1437155_a_at	110.5.7	1405.3	2476.6	168.4.1	161.2.0	2.2	0.939	68.0

[0225] [表 5-3]

[0226]

基因名称	Affymetrix 的探针 集 ID	表达量 (相对于 GAPGH)				表达比 (相对于对照)	相关系数 (相对于 II17a)	表达比 (缓解期相对于发病期)	
		对照鼠	脑炎模型鼠						
			9 日	14 日	18 日				24 日
* RIKEN cDNA 1300007F04 基因	1453474_at	202.0	232.2	476.7	345.7	204.4	2.4	0.907	72.5
* 平足蛋白	1419309_at	182.5	1887.5	5479.8	4045.8	325.9.8	3.0	0.864	73.8
* 含 Patatin 样磷酸 酯酶域 7	1451361_a_at	135.5.5	1425.8	2895.4	2151.7	187.8.3	2.1	0.912	74.3
* 细胞性视网膜结合 蛋白 1、细胞性 视网膜结合蛋白	1448754_at	122.5.1	1088.4	4167.0	4012.7	275.0.5	3.4	0.678	96.3

[0227]

I 类似物									
杀菌性/通透性增加蛋白样 2	1437232_at	23.9	60.3	62.8	66.4	37.2	2.6	0.426	105.8
免疫球蛋白重链复合物、I 免疫球蛋白重链 1a (血清 IgG2a)、免疫球蛋白重链 2 (血清 IgA)、免疫球蛋白重链 1a、免疫球蛋白重链 (J558 家族)、免疫球蛋白重链 (γ 多肽)、免疫球蛋白 μ 链类似物、免疫球蛋白重链 V 区 3 前体类似物、免疫球蛋白重链可变区、免疫球蛋白重链 V 区 102 前体类似物	1421653_a_at	357.7	351.8	877.2	1093.9	901.1	2.5	0.386	124.7
RIKEN cDNA 2310002J15 基因	1450532_at	19.5	55.9	39.8	83.6	37.2	2.0	-0.090	210.1
免疫球蛋白重链 3、免疫球蛋白重链 (γ 多肽)	1426174_s_at	44.1	77.4	154.2	369.7	173.0	3.5	0.081	239.7
免疫球蛋白重链 (γ 多肽)	1424631_a_at	49.7	46.7	107.5	531.8	240.5	2.2	-0.117	494.5

[0228] 4) 总结

[0229] 表 6 所示为在用关节炎模型鼠和脑炎模型鼠按抽取条件 2 和 3 区分出的模型鼠中有高表达的基因的名称。在该表中, ○表示在该模型鼠中满足抽取条件的基因, - 表示未满足抽取条件的基因。在关节炎模型鼠和脑炎模型鼠中都满足抽取条件的基因用 * 号表示。

[0230] [表 6]

[0231]

基因名称	关节炎	脑炎
RIKEN cDNA 6030439D06 基因	-	○
RIKEN cDNA 9030418K01 基因	○	-
前列腺酸性磷酸酶	-	○
* 载脂蛋白 L7b (表达序列 BC085284)、载脂蛋白 L7e (载脂蛋白 L, 3 类似物)	○	○
UDP-GlcNAc: β Gal β 1, 3-N 乙酰葡萄糖氨基转移酶 8	-	○

[0232]

*	B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 A1a、 B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 A1b、 B 细胞白血病/淋巴瘤 2 相关蛋白 A1d	○	○
	骨形态发生蛋白 1	—	○
	Clq 及肿瘤坏死因子相关蛋白质 3	○	—
	碳酸酐酶 13	—	○
*	大麻类受体 2	○	○
*	含半胱氨酸丰富分泌蛋白 LCCL 域 2	○	○
	细胞色素 P450, 家族 1, 亚家族 b, 多肽 1	—	○
	失效同系物 2	—	○
*	低亲和性 Fc 受体 IgG IIb	○	○
	葡糖胺(N-乙酰)转移酶 2, I 分支酶	—	○
	G 蛋白偶联受体 15	—	○
	G 蛋白偶联受体 183 (eb 病毒诱导基因 2)	○	—
*	白细胞介素 17A	○	○
*	白细胞介素 1 受体 1	○	○
	白细胞介素 22、白细胞介素 tiffb	—	○
	白细胞介素 27 受体 A	—	○
	驱动蛋白家族成员 5C	○	—
	细胞性视网膜结合蛋白 1、细胞性视网膜结合蛋白 I 类似物	○	—
	UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A2、 UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A6A、 UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A6B、 UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A10、 UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A7C、 UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A5、 UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A9、 UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A1、 UDP 葡糖醛酸基转移酶 1 家族, 多肽 A8 类似物	—	○
	内腔蛋白	○	—
	淋巴细胞抗原 6 复合物基因座 K	—	○
*	基质金属蛋白酶 13	○	○
	磷酸二酯酶 5A (cGMP 特异)	○	—
	磷酸酶, 孤儿素 1 (表达序列 AI447357、ABI 基因家族成员 3)	—	○
	Ras 相关关联糖尿病	—	○
	丝氨酸 (或半胱氨酸) 肽酶抑制剂 B 簇成员 1a	○	—
	SH3 及 PX 域 2B	—	○
*	溶质载体家族 38 成员 6 (表达序列 AW322671)	○	○
	稳定素 1	—	○
	突触结合蛋白 XI	○	—
	T 细胞特异性转录因子 7	—	○
	转化生长因子 β 引导	—	○
*	组织抑制剂金属蛋白酶 1	○	○
*	横跨膜蛋白 176A	○	○
	横跨膜蛋白 176B	—	○
	肿瘤坏死因子受体超家族成员 14	—	○
	尿嘧啶核苷磷酸化酶 1	—	○
	含 WW 域转录调节因子 1	—	○

[0233] 本申请与 2008 年 2 月 28 日申请的日本国特许申请特申 2008-048197 号相关, 其专利保护请求范围、说明书和摘要的全部均在本说明书中作为参考。

[0001]

序列表

- <110> 希森美康株式会社 (SYSMEX CORPORATION)
- <120> 产生IL-17的辅助T细胞检测用标记及产生IL-17的辅助T细胞的检测方法
- <130> TM5299PC
- <150> JP 2008-48197
- <151> 2008-02-28
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 136
- <212> DNA
- <213> Mus musculus
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (48)..(48)
- <223> n=a, c, g or t
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (50)..(50)
- <223> n=a, c, g or t
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (74)..(74)

[0002]

<223> n=a, c, g or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (100)..(100)

<223> n=a, c, g or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (102)..(102)

<223> n=a, c, g or t

<400> 1

acccacatt ataaaccatt tccagtgatc cttctgtaag aatgtgantn tgcagaggca	60
cacaccacc tgentcgggt tttgtggat tcagacctgn tnagggtact tgtgaagtea	120
ccacgttttc agtttt	136

<210> 2

<211> 239

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

ctcactttct acttctaata ctgaatgctg tttgttttg gcaggaagac gttcacagac	60
tgttcctttg aattcattgt ctgacctgcc tattggagac aaacctctgc tactcataga	120
attattaata ttttttccct gtcaatttca gttgacagaa gggataaaga ctcaacttgc	180
actcgcgtat ctgtagtcat atctgccttc aggcattgtgc cctgtgacc gtttctctg	239

专利名称(译)	产生IL-17的辅助T细胞检测用标记及产生IL-17的辅助T细胞的检测方法		
公开(公告)号	CN101960021A	公开(公告)日	2011-01-26
申请号	CN200980106710.X	申请日	2009-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
[标]发明人	池田昌郁 宇贺均 田中聪 宫本佳昭 柳田匡俊 仓田宽一 门脇正和		
发明人	池田昌郁 宇贺均 田中聪 宫本佳昭 柳田匡俊 仓田宽一 门脇正和		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12Q1/04 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6883 G01N33/56972 G01N2800/102 G01N2333/54 C12Q1/6881 G01N33/6869 C12Q2600/158		
代理人(译)	吴华 张小英		
优先权	2008048197 2008-02-28 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于特异性检测产生IL-17的辅助T细胞(Th17细胞)的多聚核苷酸标记或蛋白质标记以及Th17细胞检测方法，该方法的特征是包括检测这些物质的存在。