

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00809434.9

C12N 15/12
C07K 14/435 C12N 1/15
C12N 1/19 C12N 1/21
C12N 5/10 C12P 21/02
C07K 16/18 G01N 33/53
G01N 33/50 A01K 67/027

[43]公开日 2002年8月21日

[11]公开号 CN 1365389A

[22]申请日 2000.4.28 [21]申请号 00809434.9

[30]优先权

[32]1999.4.30 [33]JP [31]123561/99

[86]国际申请 PCT/JP00/02831 2000.4.28

[87]国际公布 WO00/66729 日 2000.11.9

[85]进入国家阶段日期 2001.12.24

[71]申请人 官田敏男

地址 日本神奈川县

共同申请人 黑川清

[72]发明人 官田敏男

[74]专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 35 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 MEG-3 蛋白

[57]摘要

本发明提供一种在肾小球膜细胞中高频表达的 DNA 以及该 DNA 所编码的蛋白(Meg-3)。这些物质可用于鉴定肾小球膜细胞和检测肾小球膜细胞中的异常状况等。此外,预计肾小球膜细胞的功能可根据上述蛋白的功能来公开,并因此使与肾小球膜细胞相关的疾病的致病机理得以澄清。另预计上述物质可用于与肾小球膜细胞相关的疾病的治疗和诊断等。

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

权 利 要 求 书

1. 一种含有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蛋白,或一种含有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列但其中一或多个氨基酸已被取代、缺失、添加、和/或插入, 且与含有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蛋白功能等价的蛋白。
2. 权利要求 1 的蛋白, 其中该蛋白含有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。
3. 编码权利要求 1 的蛋白的 DNA。
4. 权利要求 3 的 DNA, 其中该 DNA 包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列。
5. 编码权利要求 1 的蛋白或这些蛋白的功能等价物的 DNA, 该 DNA 在严谨条件下与含有 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的 DNA 杂交。
6. 一种 DNA, 其与权利要求 4 的 DNA 特异性杂交并具有至少 15 个核苷酸的链长。
7. 针对权利要求 4 的 DNA 或其一部分的反义 DNA。
8. 一种载体, 其包含权利要求 3、4 和 5 中任一项的 DNA。
9. 一种转化体, 其携有并可表达权利要求 3、4 和 5 中任一项的 DNA。
10. 产生权利要求 1 的蛋白的方法, 该方法包括培养权利要求 9 的转化体并收集权利要求 3、4 和 5 中任一项的 DNA 的表达产物。
11. 一种试剂, 其用于检测含有权利要求 6 之 DNA 的肾小球膜细胞。
12. 与权利要求 1 的蛋白结合的抗体。
13. 权利要求 12 的抗体, 其中该抗体识别含有选自 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的蛋白的一部分。
14. 权利要求 13 的抗体, 其中该抗体为单克隆抗体。
15. 一种测量权利要求 2 的蛋白或其片段的免疫试验方法, 其基于权利要求 13 或 14 的抗体对权利要求 2 的蛋白或其片段的免疫学结合。
16. 一种用于检测肾小球膜细胞的试剂, 该试剂包含权利要求 12-14 中任一项的抗体。
17. 一种检测肾小球膜增生性肾病的方法, 该方法包括测量包含在生物学样品中的权利要求 2 的蛋白或其片段并将该测量值与从正常样品获得的值进行比较。
18. 一种非人类转基因脊椎动物, 其中编码 Meg-3 的基因的表达水平已得到修饰。

19. 权利要求 18 的非人类转基因脊椎动物，其中该非人类脊椎动物是小鼠。

20. 权利要求 19 的非人类转基因脊椎动物，其中该非人类脊椎动物是一种基因敲除小鼠，该小鼠中编码 Meg-3 的基因的表达已被抑制。

说明书

MEG-3 蛋白

5

技术领域

本发明属于基因工程领域，特别涉及对肾细胞的基因分离。

背景技术

10 体内 60 万亿个各种细胞基本上包含相同的基因组 DNA。就正常生理功能而言，这些基因的表达由细胞系和细胞所接受的信号来严格控制。因此，阐明每类细胞中所表达的基因是非常重要的。

15 肾小球膜细胞在维持肾小球的结构和功能时起关键作用，它们还是每种类型的肾炎的病理生理学关键因素。例如，肾小球膜细胞的增生以及肾小球膜细胞外基质的积累被认为是各类肾小球疾病(如慢性肾炎和糖尿病性肾炎)患者体内肾小球坏死的重要病理学表现。因此，对肾小球膜细胞中特异性表达的基因的鉴定以及对其功能的阐述有助于理解肾小球膜细胞的生物学功能和与肾小球膜细胞相关的疾病的病因，并因此可对与肾小球膜细胞相关的疾病进行治疗或诊断。

20 已知 Thy1 抗原是大鼠肾小球膜细胞的标志。但该基因并非肾小球膜细胞所特有，而且不在人类的肾小球膜细胞中表达(Miyata T.等，免疫学，1989, 67: 531-533; 和 Miyata T.等，免疫学，1990, 69: 391-395)。已知肾小球膜细胞被激活时表达平滑肌肌动蛋白，但该基因也不是肾小球膜细胞特有的。迄今未见任何肾小球膜细胞特征性基因的报道。

25 本发明人曾报道 MEGSIN 是肾小球膜细胞中特异性表达的蛋白(临床研究杂志(J. Clin. Invest), 1998 年 8 月 15 日, 120: 4, 828-36)。本发明涉及具有不同于 MEGSIN 的结构的新蛋白。

发明内容

本发明的目的是对肾小球膜细胞中高表达的基因进行分离。

30 本发明人从人类肾小球膜细胞的体外培养物中分离出 mRNA 用于构建 3' 侧 cDNA 文库。然后，随机选择 cDNA 文库中的多个克隆，测定它们的

序列。接着，将所测序列与得自各种器官和细胞的 3' 侧 cDNA 克隆的已知核苷酸序列进行比较，以确定肾小球膜细胞中表达的克隆。再利用该克隆的插入片段作为探针筛选从肾小球膜细胞制备的 λ ZIPLox cDNA 文库，以确定阳性克隆的核苷酸序列(3768 bp)，从而完成本发明。根据所测定的核苷酸序列，确定带有 Kozak 翻译起始密码子的最长开放读码框的氨基酸序列。5
本发明人将带有该推导的氨基酸序列的本发明蛋白命名为 Meg-3。人类 Meg-3 cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列分别示于 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2。除了 EST 序列与 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列中距 3' 端 300-500 个碱基的核苷酸序列有 90% 或更高同一性以外，未发现其它序列与 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列有同源性。10

利用 SwissProt 数据库对该氨基酸序列进行的氨基酸序列同源性搜索证实 Meg-3 是一种新蛋白。此外，还对推导的 Meg-3 氨基酸序列进行了基元 (motif) 搜索，该搜索在从 N 末端数第 500 个氨基酸之后的区域中发现一个氨基酸序列十分类似于被称为富含组氨酸之蛋白的多种蛋白。包含从第 621 15 个氨基酸至第 701 个氨基酸的 81 个氨基酸残基的区域尤其富含脯氨酸(27.2%)，并在两个位点携有氨基酸序列(xPESPPAxP)，该序列类似于能与 SH3 (Src 同源物 3) 结构域结合的富含脯氨酸的肽 (PR 肽) 的氨基酸序列 (xPxxPPPFxP)。这些发现提示，Meg-3 蛋白的 C 末端结构可能作为 PR 结构域与胞内信号传递物质的 SH3 结构域(如属于 Src 家族的那些，等等)结合，20 而且它可能涉及信号传递途径。具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蛋白定位于胞浆的高度可能性(52.2%) 还提示 Meg-3 可能涉及信号传递。未发现任何其它氨基酸序列具有高于上述的与其它区(从 N 末端开始的 1-550 位氨基酸)的同一性。

人类原代细胞培养的一个特征是，Meg-3 基因以特别高的水平在肾小球膜细胞中表达。在另一种原代细胞培养物中，还观察到肾皮质上皮细胞以及成纤维细胞中的表达，人类脐静脉内皮细胞和平滑肌细胞中也略有表达。此外，当通过 Northern 印迹检测 Meg-3 的组织分布时，在胎盘中观察到 Meg-3 的高表达，其次是在胰腺中的表达。另外，可在肾脏、肺和心脏中观察到弱表达，在肝脏和骨骼肌中几乎观察不到 Meg-3 的表达。在脑部 25 未见 Meg-3 的表达。本发明是在这些发现的基础上完成的。30

本发明具体包括以下蛋白质、DNA 以及它们的应用。

- (1)一种含有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蛋白,或一种含有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列但其中一或多个氨基酸已被取代、缺失、添加、和/或插入,且与含有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蛋白功能等价的蛋白。
- (2)如(1)所述的蛋白,其中该蛋白含有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。
- 5 (3)编码如(1)所述的蛋白的 DNA。
- (4)如(3)所述的 DNA,其中该 DNA 包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列。
- (5)编码如(1)所述的蛋白或这些蛋白的功能等价物的 DNA,该 DNA 在严谨条件下与含有 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的 DNA 杂交。
- (6)一种 DNA,其与如(4)所述的 DNA 特异性杂交并具有至少 15 个核苷酸的链长。
- 10 (7)针对如(4)所述的 DNA 或其一部分的反义 DNA。
- (8)一种载体,其包含如(3)、(4)和(5)中任一项所述的 DNA。
- (9)一种转化体,其携有并可表达如(3)、(4)和(5)中任一项所述的 DNA。
- (10)产生如(1)所述的蛋白的方法,该方法包括培养如(9)所述的转化体并收集如(3)、(4)和(5)中任一项所述的 DNA 的表达产物。
- 15 (11)一种试剂,其用于检测含有如(6)所述之 DNA 的肾小球膜细胞。
- (12)与如(1)所述的蛋白结合的抗体。
- (13)如(12)所述的抗体,其中该抗体识别含有选自 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的蛋白的一部分。
- 20 (14)如(13)所述的抗体,其中该抗体为单克隆抗体。
- (15)一种测量如(2)所述的蛋白或其片段的免疫试验方法,其基于如(13)或(14)所述的抗体对如(2)所述的蛋白或其片段的免疫学结合。
- (16)一种用于检测肾小球膜细胞的试剂,该试剂包含如(12)-(14)中任一项所述的抗体。
- 25 (17)一种检测肾小球膜增生性肾病的方法,该方法包括测量包含在生物学样品中的如(2)所述的蛋白或其片段并将该测量值与从正常样品获得的值进行比较。
- (18)一种非人类转基因脊椎动物,其中编码 Meg-3 的基因的表达水平已得到修饰。
- 30 (19)如(18)所述的非人类转基因脊椎动物,其中该非人类脊椎动物是小鼠。

(20)如(19)所述的非人类转基因脊椎动物，其中该非人类脊椎动物是一种基因敲除小鼠，该小鼠中编码 Meg-3 的基因的表达已被抑制。

为了实现以上所述，本发明人使用了一种 3' -导向的(directed) cDNA 文库。该方法避免了由于 DNA 大小的差异所致的克隆效力的差异。3' 区的序列是每种基因特征性的，近 200-300 bp 的序列就足以证实该基因的特征(Yasuda Y., Miyata T.等, *Kidney Int*, 1998 Jan, 53:1, 154-8)。

编码本发明的人类 Meg-3 的 DNA 可以通过制备肾小球膜细胞的 mRNA 并用已知方法将它们转化为双链 cDNA 来获得。mRNA 可通过例如异硫氰酸胍-氯化铯法(Chirwin 等, *生物化学* 18, 5294, 1979), 和在有脱氧核糖核酸酶存在的情况下用一种表面活性剂以及酚处理(Berger & Birkenmeier, *生物化学* 18, 5143, 1979)等来获得。从总 RNA 制备 poly (A)⁺ RNA 可通过, 例如用结合于 oligo(dT)的 Sepharose、纤维素、乳胶颗粒等载体进行亲和层析来实现。cDNA (第一链)可通过将上述所获的 mRNA 作为模板, 将互补于 poly (A)链 3' 端的寡聚(dT)和对应于 Meg-3 之氨基酸序列部分的随机引物或合成寡核苷酸作为引物, 经逆转录酶的处理来获得。杂合子中的由 mRNA 及其互补 cDNA 组成的 mRNA 用大肠杆菌 RNA 酶 H 进行部分消化。以消化后的 mRNA 为引物, 利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 可合成 cDNA (第二链)。最后, 双链 DNA 可通过用大肠杆菌 DNA 连接酶进行处理来获得。

可将肾小球膜细胞的 poly (A)⁺ RNA 作为模板, 用根据人类 Meg-3 基因的核苷酸序列合成的引物经 RT-PCR 来克隆 DNA。或者, 不利用 PCR, 而是利用根据人类 Meg-3 基因的核苷酸序列合成的探针筛选 cDNA 文库而获得靶 cDNA。通过在由这些方法获得的多种基因中证实本发明基因的核苷酸序列而选出本发明的基因。除人类以外的其它物种, 如小鼠或大鼠中的 Meg-3 cDNA 同系物可利用类似方法获得。

另外, Meg-3 cDNA 同系物可如下分离。用上述人类 Meg-3 cDNA 的核苷酸序列作探针, 通过菌落杂交和空斑杂交来筛选 cDNA 文库, 从而分离出编码 Meg-3 同系物的 cDNA。可将分离自小鼠或大鼠组织、培养的肾小球膜细胞、等的 mRNA 作为模板合成所述 cDNA 文库。也可使用市售 cDNA 文库(Funakoshi, 等)。参照本发明的人类 Meg-3 的 cDNA, 设计位于 ORF 之前和之后的简并引物来进行 PCR, 这是另一种扩增同系物的 cDNA 的可能方法。

人类 Meg-3 基因组可通过筛选基因组文库来获得。可通过，例如制备人类 B 淋巴母细胞的基因组，将用 Sau3 部分消化的 DNA 插入噬菌体载体 EMBL3，从而获得基因组文库(血液(Blood)，第 83 卷，第 11 期，1994: 第 3126-3131 页)。可通过对所述基因组文库进行空斑杂交来获得含有所需基因组的克隆(新细胞工程实验方案，秀润社，第 79-92 页)。Meg-3 cDNA 的完整开放阅读框区(2202 bp)，或利用所述 cDNA 的一部分作为引物经 PCR 扩增人类基因组 DNA 所得的每一外显子-内含子部分都可作为探针使用。可将培养的人类肾小球膜细胞的 mRNA 或人类的肾 mRNA (购自 Clontech)作为模板，通过 5' RACE 法(5' -Full RACE Core Set, 参照宝酒造公司的方案)测定控制区的 5' UTR 序列。

本发明的基因还可利用标准的核酸化学合成法来产生，如亚磷酰胺(phosphoramidite)法(Mattenci, M. D. & Caruthers, M. H. 美国化学协会杂志(J. Am. Chem. Soc.) 103, 3185, 1981)、亚磷酸三酯法(Hunkapiller, M.等, 自然 310, 105, 1984)。

真核基因常表现出多形性，如人类干扰素基因，可利用这种多形性取代一或多个氨基酸但总体上维持蛋白的活性。一般情况下，即使有一或多个氨基酸已被修饰，也可维持蛋白的活性。因此，通过利用编码 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的人工修饰性基因获得的蛋白，只要该蛋白具有本发明基因的典型功能，就可将该蛋白的基因包括在本发明中。当蛋白中 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列已被人为修饰时，只要该蛋白仍具有本发明蛋白的特征，就可包括在本发明中。

本发明的蛋白包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列，或其中已有一或多个氨基酸被取代、缺失、添加、和/或插入且功能等价于本发明的 Meg-3 蛋白的氨基酸序列。本发明中“功能等价”指具有与 Meg-3 相同的生物学特性。例如，本发明人已发现 Meg-3 的以下生物学特性。

Meg-3 由于具有 PR 结构域(假定其可与 SH3 结构域结合)而可能与信号传递途径有关。SH3 结构域是多种细胞内信号传递物质如 Src 家族等所具有的一种结构域。此外，由于该蛋白的胞浆部分很可能含有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列(可能性为 52.2%)，因此认为 Meg-3 很可能参与信号传递。

此外，Meg-3 具有以下表达特征。首先，在人类原代细胞培养中的一个特征是，Meg-3 在肾小球膜细胞中以特别高的水平表达。在其它原代细胞

培养中，可观察到在肾皮质上皮细胞和成纤维细胞中的表达，以及在人类脐静脉内皮细胞和平滑肌细胞中的较弱表达。此外，当通过 Northern 印迹检测 Meg-3 的组织分布时，在胎盘中观察到 Meg-3 的高表达，其次是在胰腺中的表达。另外，可在肾脏、肺和心脏中观察到弱表达，在肝脏和骨骼肌中几乎观察不到 Meg-3 的表达。在脑部未见 Meg-3 的表达。可利用所述
5 每种组织的样品所制备的 mRNA，并利用，例如选自 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列为探针，通过 Northern 印迹试验了解每种组织中的 Meg-3 表达。

在上述生物学特性方面功能等价的所有蛋白组成本发明的 Meg-3。因此，本发明不仅包括结构已了解清楚的人类 Meg-3，还包括在结构或功能方面等价的其它同系物。
10

本发明的 DNA 包括编码这些功能等价蛋白的 DNA。编码这些蛋白的 DNA 可以是 cDNA、基因组 DNA、或合成的 DNA。

目标氨基酸的密码子本身是已知的，可任选，也可根据标准方法，例如根据所用宿主中密码子的使用频率来确定(Grantham, R.等, 核酸研究 9, r43, 1981)。因此，本发明包括已经利用密码子的简并性进行了适当修饰的
15 DNA。利用定点诱变法等(Mark, D. F.等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1984, 81: 5662)对这些核苷酸序列的密码子进行部分改变是可能的，这些方法以化学合成的编码所需修饰的寡核苷酸作为引物。

与包含 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的 DNA 杂交并能编码具有本发明 Meg-3 的典型功能的蛋白的 DNA，也包括在本发明的 DNA 中。能与特定序列在严谨条件下杂交的序列被认为与该特定序列所编码的蛋白具有相似的活性。严谨条件通常指以下条件。即，在 4X SSC 中于 65°C 进行杂交，然后在 0.1X SSC 中于 65°C 洗涤 1 小时。杂交和洗涤的温度可大大影响严谨度，它们可根据解链温度(T_m)来调整。T_m 根据将要杂交的碱基对中碱基组成的比例，以及杂交溶液的组成(盐浓度、甲酰胺浓度和十二烷基硫酸钠
25 浓度)来改变。因此，本领域技术人员可根据经验来考虑上述条件，以便设定能产生类似严谨度的相应条件。

本发明的 DNA，包括突变体的核苷酸序列可用于各种基于已知技术的目的。

可将如上述克隆的 Meg-3 编码基因插入适当的表达载体 DNA，然后转化其它原核或真核宿主。此外，可通过在所述表达载体中导入适当启动子
30

以及与表型表达相关的序列，使该基因在每个宿主细胞中表达。可使用的表达载体有用于大肠杆菌的 pET-3 (Studier & Moffatt, 分子生物学杂志 189, 113, 1986)等，用于 COS 细胞的 pEF-BOS (核酸研究 18, 5322, 1990), pSV2-gpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 2072, 1981)等，以及用于 CHO 细胞的 pVY1 (WO89/03874)等。目标蛋白可表达为靶基因与编码另一种多肽的基因的融合基因所衍生的融合蛋白。可较方便地对这类融合蛋白进行纯化并分离出所需蛋白。组氨酸标签、c-myc 标签、MBP 标签、GST 标签等是已知可用于融合蛋白。能表达融合了这些标签的插入子的载体已有商品。

10 例如，大肠杆菌(*Escherichia coli*)可在本发明的表达系统中作为原核宿主细胞使用。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等是可作为微生物宿主细胞使用的真核生物。哺乳动物宿主细胞有 COS 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞等。本发明的转化体可在适当选择的适于培养宿主细胞的条件下进行培养。

15 如上述，可通过对编码靶 Meg-3 的基因所转化的转化体进行培养，从细胞或培养上清中回收得到 Meg-3。可将其纯化成基本纯的蛋白。Meg-3 作为本发明的目标蛋白，可通过常用的蛋白分离和纯化方法进行分离和纯化，对所用方法无特别限制。例如，可通过适当选择并组合各种层析法来分离并纯化 Meg-3。

20 除了上述方法，本发明的基因，包含该基因的重组载体，携有该载体的转化体，以及利用基因操作产生 Meg-3，都可通过“分子克隆-实验室手册”(冷泉港实验室，纽约)所述的标准方法进行。

此外，可根据 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列设计用于检测 Meg-3 基因的探针。还可设计用于扩增含这些核苷酸序列的 DNA 和 RNA 的引物。根据
25 给定序列设计探针和引物是本领域技术人员常规可完成的。包含设计的核苷酸序列的寡核苷酸可化学合成。这些寡核苷酸可用于各种形式的杂交试验，或用于核酸的合成反应，如 PCR(如果已经有适当标记)。用作探针或引物的寡核苷酸有至少 15 个碱基，优选 25-50 个碱基。

30 根据原位杂交的结果，本发明的 Meg-3 基因在肾组织中的表达被特别限制在肾小球膜细胞中。因此，本发明中能与 Meg-3 基因特异性杂交的寡核苷酸都可作为能特异性检测肾小球膜细胞的探针和引物使用。由于肾小

球膜细胞与肾小球的功能密切相关，因此本发明的寡核苷酸可作为肾脏病理学分析中使用的有效工具。

此外，能调节 Meg-3 表达的反义核酸可根据本发明所公开的 Meg-3 编码基因的核苷酸序列来提供。本发明的反义核酸是用于证实 Meg-3 在肾小球膜细胞中的功能的重要工具。它还可用于调节因 Meg-3 基因的加速表达所致的疾病状况。反义核酸对靶基因表达的抑制效应如下。通过形成三链而抑制转录起始，通过与 RNA 聚合酶所致局部开环结构的位点形成杂合体而抑制转录，通过与合成的 RNA 形成杂合体而抑制转录，通过在内含子与外显子的连接处形成杂合体而抑制剪接，通过与剪接体形成区形成杂合体而抑制剪接，通过与 mRNA 形成杂合体而抑制 mRNA 从细胞核向细胞质的转移，通过与加帽区及 poly(A)附着区形成杂合体而抑制剪接，通过与翻译起始因子结合区形成杂合体而抑制翻译的起始，通过与起始密码子附近的核糖体结合位点形成杂合体而抑制翻译，通过与 mRNA 的翻译区以及多体结合区形成杂合体而中断蛋白质链的延伸，通过与核酸-蛋白相互作用区形成杂合体而抑制基因表达，等等。这些通过抑制转录、剪接、或翻译过程而抑制靶基因的表达(平岛(Hirashima)和井上(Inoue), 新生物化学实验讲座 2 核酸 IV 基因的复制和表达, 日本生物化学会编, 东京化学同人, 第 319-347 页, 1993)。

本发明所用的反义序列可通过上述任何一种效应抑制靶基因的表达。在一个实施方案中，如果设计了与该基因 mRNA 5' 端附近的非翻译区互补的反义序列，它可有效抑制该基因的转录。但也可使用与编码区或与非翻译区 3' 端互补的序列。在这种方式下，本发明所利用的反义 DNA 包括含有该基因翻译区以及非翻译区的反义序列的 DNA。可将所用反义 DNA 插入适当启动子下游，并优选在 3' 端插入含有转录终止信号的序列。可将如此制备的 DNA 用已知方法转化至所需宿主。优选地，该反义 DNA 序列应包含与待转化之宿主的内源基因(或其同源基因)或其一部分互补的序列。但只要基因表达被有效抑制，不必完全互补。

可将以反义 DNA 为模板转录的 RNA 设计为与靶基因的转录产物具有优选 90%，更优选 95% 的互补性。用于有效抑制靶基因表达的反义 DNA 的长度为至少 15 个核苷酸或更多，优选 100 个核苷酸或更多，更优选 500 个核苷酸或更多。通常，所用反义 RNA 的长度小于 2.5 kb。

基因组中 Meg-3 基因的启动子区和增强子区可根据本发明 Meg-3 cDNA 的核苷酸序列来获得。具体是, 可如特开平 6-181767; 免疫学杂志, 1995, 155, 2477-2486; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 3561-3565 等所述获得这些控制区。本文中, 启动子区指位于转录起始位点上游、能控制基因表达的 DNA 区, 增强子区指位于内含子或 3' UTR 中、能控制基因表达的 DNA 区。

具体地, 可用如下方法获得启动子区。

1) 可用 Meg-3 cDNA 的 5' 端位点作为探针从人类基因组文库中克隆 Meg-3 的启动子区。

10 2) 用限制酶消化 Meg-3 基因以获得含有启动子区的 DNA 并测定核苷酸序列, 其中所述启动子位于含 Meg-3 基因翻译起始密码子的上游区(2-5 kbp)。用人类肾小球膜细胞的 poly(A)⁺RNA 为模板, 通过利用选自 Meg-3 基因 5' 端位点的 cDNA 序列的引物 DNA 经引物延伸法测定转录起始位点(+1)。可能含有启动子活性的位点通过搜寻核苷酸序列中的转录因子结合序列而预测。

15 3) 将已从 2) 所得 DNA 中排除了 Meg-3 基因编码区的 DNA 片段再克隆至一种质粒, 并在该 DNA 片段下游 2-5 kbp 处连接一个报道基因, 如氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因或萤光素酶基因, 从而构建报道质粒。类似地, 对应于 Meg-3 基因上游各种位点, 且 5' 和 3' 端位点已经逐个除去的 DNA 片段可通过用限制酶消化, 或通过 PCR 来制备, 以便包括可能的启动子区。将 CAT 基因或萤光素酶基因作为报道基因连接在这些 DNA 片段的下游, 以构建报道质粒。

20 4) 可通过测量用 3) 所制备的报道质粒转化的动物细胞中 CAT 或萤光素酶的活性, 从而获得位于 Meg-3 基因上游的启动子区。

25 可用 Meg-3 cDNA 作探针, 以相同于上述对启动子的方式, 从人类基因组文库中克隆出人类 Meg-3 的基因组基因, 从而获得 3' UTR 以及内含子中的增强子区。

30 控制 Meg-3 基因表达的转录因子可用已知方法获得, 如“新细胞工程实验方案, 秀润社”, “生物手册系列(Biomanual series)5 关于转录因子的研究, 羊土社”, “DNA 及细胞生物学 13, 731-742, 1994”所述的亲和层析法, South-western 法, 指纹分析法, 凝胶滞后法, 或一步杂交法。本文中, 转

录因子指控制 Meg-3 基因转录的因子，其包括诱导转录起始反应的转录起始因子和上调或下调转录的转录控制因子。

亲和层析是，将核提取物上样至亲和层析柱(其中将如上述获得的启动子和增强子区固定在 Sepharose 或乳胶颗粒上)，然后洗柱，用含有与层析柱固相相同序列的 DNA 洗脱所结合的转录因子，回收能控制 Meg-3 基因表达的转录因子。

如果利用 South-Western 法，可用每种标记探针筛选已插入大肠杆菌表达载体(如 λ gt11)的 cDNA 的表达产物。例如，待筛选的 cDNA 被表达为与 β -半乳糖苷酶的融合蛋白，并吸附至硝酸纤维素膜上。然后，通过以启动子区或增强子区的放射性同位素标记之 DNA 片段作为探针，筛选能合成具有结合活性的融合蛋白的噬菌体，可获得能调节 Meg-3 基因表达的转录因子。

凝胶滞后法是基于 DNA 在聚丙烯酰胺凝胶上的电泳迁移性因与蛋白质的结合而发生改变。启动子区和增强子区的 DNA 片段可作为探针使用，通过与含有转录因子的样品(如核蛋白提取物)混合，可在低离子强度下利用电泳对它们进行分析。对转录因子的结合可检测为迁移性不同于游离 DNA 的带。凝胶滞后法允许以较高敏感性从蛋白质混合物中分离出转录因子。

经凝胶滞后法获得的 DNA-转录因子复合物通过进一步的指纹分析能测定出转录因子结合位点。指纹分析法利用了以下现象：蛋白质当与 DNA 结合时不被 DNA 酶 I 消化。即，末端带有 ^{32}P 标记的启动子区和增强子区 DNA，在有转录因子存在时，仅被 DNA 酶 I 部分消化，然后可利用测定核苷酸序列所用的变性聚丙烯酰胺凝胶进行分离。与没有转录因子时相同处理的结果进行比较，发现由于转录因子的结合使一条带消失了，因此可估计结合区。

本发明还提供识别 Meg-3 的抗体。本发明的抗体包括，例如针对含有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蛋白的抗体。抗本发明的 Meg-3 或其部分肽的抗体(例如，多克隆抗体，单克隆抗体)或抗血清可利用已知用于产生抗体和抗血清的方法制备，所用抗原为本发明的 Meg-3，本发明 Meg-3 的部分肽，或融合蛋白如本发明的 c-myc-(His)₆-Tag-Meg-3 或 MBP-Meg-3。

本发明的 Meg-3 或其部分肽可与已知载体或稀释剂一起给药于温血动物体内能产生抗体的部位。为了增加抗体产量，可将完全弗氏佐剂或不完全弗氏佐剂与抗原一起给药。免疫接种每 1-6 周进行一次，共进行约 2-10 次。温血动物可使用如猴子、家兔、狗、豚鼠、小鼠、大鼠、绵羊、山羊、5 和小鸡，优选小鼠和大鼠。

选择已免疫的温血动物如小鼠，测定其体内的抗体滴度，末次免疫的 2-5 天后获得所述动物的脾脏或淋巴结，将这些组织中所含抗体生成细胞与骨髓瘤细胞融合，获得能产生单克隆抗体的杂交瘤，从而可制备单克隆抗体生成细胞。通过，例如，使下述标记性 Meg-3 与抗血清反应，并测量与 10 该抗体结合的标记的活性，便可测定抗血清中的抗体滴度。细胞融合可用已知方法实施，如 Kohler 和 Milstein (自然, 256, 495, 1975) 所述。聚乙二醇 (PEG)，仙台病毒等可作为融合增强剂使用，优选 PEG。

骨髓瘤细胞实例有 X-63Ag8, NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1 等，优选 X-63Ag8。抗体生成细胞(脾细胞)与骨髓瘤细胞的比例为 1:20 - 20:1。可加入 15 约 10% - 80% 的 PEG(优选 PEG1000 - PEG6000)，并在 20 - 40°C，优选 30 - 37°C 保温 1 - 10 分钟，使细胞有效融合。能产生抗 Meg-3 抗体的杂交瘤可用各种方法筛选，例如一种方法是，将杂交瘤培养上清加样至已直接或通过载体间接吸附了 Meg-3 抗原的固相(例如微滴板)，然后加入已用放射性物质、酶等标记的抗免疫球蛋白抗体(当用于细胞融合的细胞来自小鼠时，20 用抗小鼠免疫球蛋白抗体)或蛋白 A，检测与固相结合的抗 Meg-3 单克隆抗体；另一种方法是，将杂交瘤培养上清加样至已吸附了抗免疫球蛋白抗体或蛋白 A 的固相，然后加入已标记了放射性物质、酶等的 Meg-3，检测与固相结合的抗 Meg-3 单克隆抗体。

抗-Meg-3 单克隆抗体可用已知方法或其改良法，并通常在添加了 25 HAT(次黄嘌呤、氨基喋呤、和胸腺嘧啶核苷)的动物细胞培养基中进行选择和克隆。可使用任何用于选择、克隆、和培养的培养基，只要杂交瘤可在其中生长。例如，可使用含 1-20%，优选 10-20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(大日本制药株式会社)，含 1-10% 胎牛血清的 GIT 培养基(和光纯药工业株式会社)，或用于杂交瘤培养的无血清培养基(SFM-101，日水制药株 30 式会社)。保温温度通常为 20-40°C，优选约 37°C。保温时间通常为 5 天至 3 周，优选 1-2 周。保温通常在 5% CO₂ 环境中进行。可按上文对抗血

清中抗 Meg-3 抗体滴度的测量所述相同的方法测定杂交瘤培养上清中的抗体滴度。克隆通常用已知方法进行，如半固体琼脂法，或有限稀释法。已克隆的杂交瘤优选在无血清培养基中培养，以便在上清中产生最佳量的抗体。目标单克隆抗体可在腹水中获得。

5 通过选择能识别 Meg-3 特异性表位的单克隆抗体而使本发明的单克隆抗体不与除 Meg-3 以外的其它蛋白发生交叉反应。蛋白质特异性表位通常由该蛋白的氨基酸序列中至少 7 个或更多个，优选 10-20 个连续氨基酸残基组成。因此，能识别由具有选自 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列且包含至少 7 个连续氨基酸残基的肽组成的表位的单克隆抗体可以是本发明的 Meg-3 特
10 异性单克隆抗体。

可用通常用于分离和纯化多克隆抗体的免疫球蛋白分离和纯化方法来分离和纯化抗-Meg-3 单克隆抗体。已知的纯化方法包括，例如，盐析、醇沉淀、等电点沉淀、电泳、应用离子交换剂(如 DEAE)进行的吸附和脱附、
15 超速离心、凝胶过滤、或特异性纯化方法(其中通过一种抗原结合固相或诸如蛋白 A 或蛋白 G 等活性吸附剂排他性收集抗体，然后解除结合作用，获得该抗体)。

如此所得的识别本发明 Meg-3 的单克隆抗体和多克隆抗体可用于诊断和治疗与肾小球膜细胞相关的疾病。用这些抗体测量 Meg-3 的方法有夹心
20 试验(使 Meg-3 与结合至不溶性载体的抗体和标记抗体反应，检测该反应产生的夹心复合物中的 Meg-3)或竞争试验(使标记的人类 Meg-3 与样品中的人类 Meg-3 与抗体竞争性反应，根据与该抗体反应的标记抗原的量测定样品中的人 Meg-3)。

利用夹心法测量人类 Meg-3，可以分两步进行：使固相抗体与 Meg-3 反应，通过洗涤彻底除去未反应的物质，加入标记的抗体，形成固相抗体
25 Meg-3 标记抗体的复合物；也可一步完成：将固相抗体、标记的抗体、及 Meg-3 同时混合。

测量中所用的不溶性载体的实例有，聚苯乙烯，聚乙烯，聚丙烯，聚氯
30 乙烯，聚酯，聚丙烯酸酯，尼龙，聚缩醛，合成树脂如氟化物树脂等，多糖如纤维素，琼脂糖，等，玻璃，金属等。不溶性载体的形式多样，包括盘，球，颗粒，纤维，杆，板，容器，小室，试管等。吸附了抗体的载体应在加有适当防腐剂如叠氮钠的情况下低温保存。

抗体可用已知的化学结合或物理吸附法固定。化学结合法包括，如利用了戊二醛的方法，利用了 N-琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯、N-琥珀酰亚氨基-2-马来酰亚氨基乙酸酯等的马来酰亚胺法，利用了 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺氯化物的碳二亚胺法。此外，
5 马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯法，N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯法，双重氮化(bisdiazolated)联苯胺法，及二棕榈基赖氨酸(dipalmityllysine)法。备选地，可使针对待检物质和表位的两种不同抗体反应以形成复合物，然后由经上述方法固定的第三抗体来捕获。

对免疫分析所用标记无限制。具体可使用酶、荧光物质、发光物质、
10 放射性物质、金属螯合物等。优选的标记性酶有，过氧化物酶，碱性磷酸酶， β -D-半乳糖苷酶，苹果酸脱氢酶，葡萄球菌核酸酶， δ -5-类固醇异构酶， α -甘油磷酸脱氢酶，三糖磷酸异构酶，辣根过氧化物酶，天冬酰胺酶，葡萄糖氧化酶，核糖核酸酶，尿素酶，过氧化氢酶，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，葡糖淀粉酶，以及乙酰胆碱酯酶等。优选的荧光物质有，异硫氰酸荧光素，
15 藻胆蛋白，罗丹明，藻红蛋白，藻蓝蛋白，别藻蓝蛋白，以及邻苯二醛。优选的发光物质有异鲁米诺，光泽精(lucigenin)，鲁米诺，芳香族吡啶鎓酯，咪唑，吡啶鎓盐及其修饰型酯，萤光素，萤光素酶，和水母发光蛋白。优选的放射性物质有 ^{125}I ， ^{127}I ， ^{131}I ， ^{14}C ， ^3H ， ^{32}P ， ^{35}S 等。

与上述标记物结合的方法是已知的。具体可使用直接和间接标记法。
20 常用的直接标记法是，将抗体或抗体片段与标记物通过一种交联剂以化学共价键结合。交联剂有 N,N'-邻亚苯基二马来酰亚胺，4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己酸 N-琥珀酰亚胺酯，6-马来酰亚氨基己酸 N-琥珀酰亚胺酯，4,4'-二硫代吡啶，及其它已知的交联剂。交联剂可通过已知方法与酶和抗体反应，这取决于交联剂的不同特性。间接标记法的实例有，将抗体与低分子量半
25 抗原如生物素、二硝基苯、吡哆醛、或荧光胺结合，以及将抗体用半抗原的结合配对物间接标记。抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白可作为生物素的识别配体使用，此种情况下，可将识别这些半抗原的抗体用二硝基苯、吡哆醛、或荧光胺标记。辣根过氧化物酶可用于标记抗体。此酶十分有效，因为它能与多种底物反应，且能通过过碘酸盐法很容易地与抗体结合。有
30 时也使用抗体的片段，如 Fab'，Fab，F(ab')₂ 作为抗体。多克隆和单克隆抗体都可通过相同的方法用酶标记。用上述交联剂获得的酶标抗体可用已

知方法，如亲和层析等来纯化，以便在更敏感的免疫分析系统中使用。可将纯化的酶标抗体与防腐剂如硫柳汞和稳定剂如甘油一起保存。标记的抗体可冻干并在低温避光保存很长时间。

当标记物为酶时，其底物和(必要时)显色剂可用于测定其活性。当使用过氧化物酶时，以 H_2O_2 作为底物溶液，并以 2,2'-连氮-双-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸]铵盐(ABTS)、5-氨基水杨酸、邻苯二胺、4-氨基氨基替比林(aminoantipyrine)、或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺等作为显色剂。当使用碱性磷酸酶时，可用邻硝基苯磷酸、对硝基苯磷酸等作为底物。当使用 β -D-半乳糖苷酶时，可使用荧光素-二-(β -D-半乳吡喃糖苷)、4-甲基伞形基(umbelliferyl)- β -D-半乳吡喃糖苷等作为底物。本发明还包括针对 Meg-3 的免疫分析试剂，其包含标记的或固相化的单克隆或多克隆抗体，本发明还包括含有该试剂、用于检测标记物的指示剂以及对照样品等的试剂盒。

任何生物学样品，如血浆、血清、血液、尿液、组织液、或脑脊液等体液，只要它们含有 Meg-3 或其前体或片段，就可作为测量本发明 Meg-3 的样品。

此外，本发明涉及已改变了 Meg-3 的表达水平的非人类转基因动物。本文中，Meg-3 基因包括编码 Meg-3 的 cDNA、基因组 DNA、或合成 DNA。基因表达包括转录和翻译的步骤。本发明的转基因动物可有效用于研究 Meg-3 的功能和表达控制，阐明与人类肾小球膜细胞相关的疾病的致病机制，和开发能用于筛选并检验药物安全性的疾病动物模型。

在本发明中，可通过修饰 Meg-3 而人为增加或减少其表达水平(相对于原始基因)，方法是在控制 Meg-3 基因正常表达的某些重要位点(增强子、启动子、内含子等)导入诸如缺失、取代、插入等突变。这些修饰改变了 Meg-3 基因的转录。另一方面，可通过缺失某个外显子的一部分，或用终止密码子取代特定密码子而修饰蛋白质的翻译，方法是在编码区导入点突变。这些突变可利用已知获得转基因动物的方法导入。

转基因动物，在狭义上指通过基因重组在生殖细胞中人为导入了外源基因的动物，在广义上指在发育早期将外源基因稳定地导入了染色体的动物，其中所述基因可作为基因型传给后代，所述动物包括特定基因的功能已被反义 RNA 抑制了的反义转基因动物，特定基因已经利用胚胎干细胞(ES

细胞)完成基因敲除的动物,和已在 DNA 中导入了点突变的动物。本文所用转基因动物包括除人类以外的所有脊椎动物。

5 转基因动物的制备方法有,将基因与卵(egg)混合并用磷酸钙处理该混合物的方法,显微注射法(在相差显微镜下用显微移液管将基因直接注射至前核期卵的核中(显微注射法,美国专利 4,873,191)),以及利用胚胎干细胞(ES 细胞)的方法。其它方法包括,将基因插入逆转录病毒以感染卵的方法,将基因通过精子导入卵的精子载体法等。精子载体法是通过使外源基因附着于精子或经电穿孔等掺入精细胞中并与卵受精,从而导入外源基因的遗传重组方法(M. Lavitrano 等,细胞,57,717,1989)。

10 可使用体外定点基因重组如噬菌体 P1 的 cre/loxP 重组系统,酿酒酵母的 FLP 重组系统等。还报道了利用逆转录病毒将靶蛋白的转基因导入非人类动物的方法。

经显微注射制备转基因动物的方法可如下实施。提供基本由调节表达的启动子、编码特定蛋白的基因、以及 poly(A)信号组成的转基因。应证实
15 所有谱系的表达模式和水平,因为特定分子的表达模式和水平取决于启动子活性,所制备的转基因动物在各种谱系之间不同,这取决于拷贝数和转基因在染色体上的导入位点。当表达水平因非编码区和剪接而不同时,可在 poly(A)信号的上游导入待剪接的内含子序列。导入受精卵时所用的基因尽可能纯,这是非常重要的。可使用的动物有,用于收获受精卵的小鼠(5-
20 6 周龄),用于交配的雄性小鼠,假孕的雌性小鼠,已结扎的雄性小鼠等。

为了有效获得受精卵,可利用促性腺激素等诱导排卵。收获受精卵,用注射管经显微注射方式将基因注射至卵的雄性前核中。准备好能将已处理过的卵重新放回输卵管中的动物(假孕的雌性小鼠等),每只小鼠植入约
25 10-15 个卵。转基因导入新生小鼠的结果可如下证实:从尾尖部提取基因组 DNA 并通过 Southern 杂交或 PCR 法检测转基因,或利用阳性克隆法,其中插入只能通过同源重组而活化的标记基因。转基因的表达可通过经 Northern 杂交或 RT-PCR 法检测转基因的转录子而证实。也可用蛋白特异性抗体经 Western 印迹法进行检测。

本发明的基因敲除小鼠可制备成丧失了小鼠 Meg-3 基因的功能。基因
30 敲除小鼠指一种转基因小鼠,其中通过同源重组技术使某个基因的功能丧失。基因敲除小鼠可通过用 ES 细胞进行同源重组,然后筛选其中一种等位

基因已被修饰并被破坏的那些 ES 细胞而制备。例如, 可将已遗传改造的 ES 细胞注射至胚泡细胞或 8-细胞胚胎期的受精卵中, 以便获得具有来自 ES 细胞和来自胚的两种细胞的嵌合小鼠。其中一种等位基因的所有形式已经得到修饰并被破坏的那些杂合子小鼠可通过使嵌合小鼠(嵌合指由来自两个或更多个受精卵的体细胞组成的个体)与正常小鼠杂交而产生。杂合子小鼠相互交配可产生纯合子小鼠。本发明的转基因动物包括杂合子和纯合子。

同源重组指核苷酸序列相同或十分相似的两种基因之间利用基因重组机制发生的重组。发生了同源重组的细胞可通过 PCR 来筛选。利用待导入基因的一部分序列和该基因预期将插入的染色体区的一部分序列作为引物, 进行 PCR, 然后检测产生了扩增产物的细胞, 便可证实同源重组。ES 细胞中所表达的基因的同源重组可通过已知方法或它们的改良法轻易地筛选, 所述方法如将新霉素抗性基因与待导入的基因结合, 使细胞在导入完成后具有新霉素抗性。

15 附图简述

图 1 的照片显示用抗 Meg-3 抗体进行 Western 印迹分析的结果。每条泳道对应于以下抗原:

泳道 1: MBP

泳道 2: MBP-Meg-3

20 泳道 3: 利用家兔网织红细胞(Promega)经体外转录和翻译所表达的荧光素酶蛋白

泳道 4: 3' 末端带有 c-myc 标记的 Meg-3

25 图 2 的显微照片显示用共焦激光显微镜检查 CHO 细胞的结果, 该细胞中 3' 端 c-myc 标记的 Meg-3 过表达。中心的核染成蓝色, Meg-3 位于其周围, 被荧光染成绿色。

实施本发明的最佳模式

本发明参照以下实施详细例举例说明, 但并非限制。

实施例 1: 人类肾小球膜细胞的原代培养

30 从 58 岁男性切除的正常人类肾脏分离人的肾小球膜细胞。将肾皮质无菌分离, 切碎, 通过多个筛网。所用筛网的孔径逐步减小, 将 75-200 μm

孔径的筛网所捕获的肾小球洗涤后, 与 100 μ g/ml 胶原蛋白酶(Washington Biochemical) 37°C 保温 20 分钟。洗涤后, 将肾小球重悬于含 25 mM HEPES, 10% Nu-血清(Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA), 和抗生素(10 μ g/ml 青霉素, 链霉素和两性霉素)的 199 培养基(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)中, 在 5% CO₂ 培养箱中培养。培养至第三代后, 根据一系列标准鉴定肾小球膜细胞, 这些标准有典型的形态学特征, 对胰蛋白酶、嘌呤霉素、和 D-缬氨酸的抗性, 对肌动蛋白(Zymed Laboratories, San Francisco, CA)、抗极迟抗原(VLA)-1, 3, 5 (Immunotech)的免疫染色阳性, 以及对 VIII 因子(Dako, CA)的免疫染色阴性。

10 实施例 2: 从培养的人类肾小球膜细胞中分离 mRNA

用异硫氰酸胍(GTC)法从培养至第 6 代的人肾小球膜细胞中分离总 RNA。在实施例 1 所述细胞的含血清培养基中已经长满的肾小球膜细胞培养物用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 然后溶于 5.5 mM GTC 溶液中。使溶液通过 18 号针头以除去 DNA。核以及其它细胞碎片通过在 5,000 \times g 离心 90 秒而沉淀。小心将上清上样至三氟乙酸铯(CsTFA)的上层, 在 15°C 以 125,000 \times g 离心 24 小时。将 RNA 沉淀溶于 TE 缓冲液中。用 oligo dT 纤维素层析柱(Pharmacia)分离 Poly(A)⁺ RNA。

实施例 3: 构建 3' 导向的-cDNA 文库

以 poly(A)⁺ RNA 为模板, 用基于 pUC19 (Norrand J.等, Gene, 26, 101-106, 1983)的载体引物合成 cDNA。该载体引物 DNA 包含 HincII 末端及带一个 T tale 的 PstI 末端, 并在 MboI 位点(GATC)发生 dam-甲基化。合成了第二链后, 该 cDNA 序列以及载体上 LacZ 基因中的单个 BamHI 位点分别用 MboI 和 BamHI 消化, 在较低 DNA 浓度下进行环化和连接。用连接混合物的一部分转化大肠杆菌。随机选择所得转化体, 仅通过加热使它们分别解体。cDNA 插入序列用侧翼于 pUC19 克隆位点的引物(5' - TGTAACGACGGCCAGT-3' / SEQ ID NO: 3 和 5' - ACCATGATTACGCCAAGCTTG-3' / SEQ ID NO: 4)经成对 PCR 进行扩增。用所得较短的双链 DNA 进行循环测序反应并通过自动测序仪进行分析。

30 实施例 4: 分离在肾小球膜细胞中特异性表达的基因

为了鉴定在肾小球膜细胞中特异性表达的基因，本发明人用计算机进行了大批量 DNA 测序及数据处理。各种不同细胞和器官中的转录子可同时比较(Y. Yasuda 等, *Kidney International* 53:154-158, 1998; K. Matsubara 等, *Gene*. 135, 265 (1993); K. Okubo 等, *Nat. Gen.* 2, 173 (1992))。对培养的人类肾小球膜细胞 3' -结构域 cDNA 文库进行大批量 DNA 测序，测出随机选取的 1836 个克隆的部分序列。用 FASTA 程序比较这些克隆之间的序列同源性，并进一步与 DNA 数据库 GeneBank 中的序列比较。来自各种器官和细胞的 mRNA 用斑点印迹进行分析，以选出在肾小球膜细胞中特异性表达的克隆。结果获得在肾小球膜细胞 cDNA 文库中以极高频率检测到的一些克隆。

实施例 5: 筛选人的肾小球膜细胞 λ ZIPLox cDNA 文库

用 oligo(dT)引物和随机引物，从实施例 2 所制备的完整 mRNA 合成 λ ZIPLox cDNA 文库。用市售 λ ZIPLox (Gibco BRL, λ ZIPLox *EcoRI* Arms) 合成该文库。在该 λ ZIPLox cDNA 文库中，用实施例 4 所得、可在肾小球膜细胞 cDNA 文库中较频繁测到的特定克隆的插入子作为探针，对该克隆进行筛选。用双脱氧终止法测定阳性克隆中插入的基因片段的核苷酸序列。

测序结果显示，起始密码子 ATG 的推导位置与共有序列中的一致，并给出了最长的开放读码框(符合“第一 ATG 原则”)。Meg-3 cDNA 的核苷酸序列示于 SEQ ID NO: 1, Meg-3 的推导的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 2。

实施例 6: 肾小球膜特异性基因的功能分析(1)

用 FASTA 程序在 SwissProt 数据库中进行的氨基酸同源性搜索证实，与 Meg-3 蛋白有高度同源性的已知氨基酸序列不存在，Meg-3 是一种新的蛋白质。

然后，对 Meg-3 的氨基酸序列进行基序搜索。用 PSORT WWW 服务器 (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>) 进行搜索。在从 N-末端起第 500 个氨基酸之后的区域中，发现了一个与多种蛋白质十分类似的氨基酸，它被称为富含脯氨酸的蛋白。其中含有从第 621 个氨基酸至第 701 个氨基酸的 81 个氨基酸残基的区域尤其富含脯氨酸(27.2%)，并在两个位点具有氨基酸序列 (xPESPPPAXP)，此序列与结合 SH3 (Src 同源物 3) 结构域的富含脯氨酸的肽 (PR 肽) 中氨基酸序列 (xPxxPPPFxP) 相似。此外还证实了如下磷酸化酶的磷

酸化基序的存在。还发现了两个 N-肉豆蔻酰化位点。预计定位于细胞质中的百分率为 52.2%。这些发现强烈显示, Meg-3 是一种信号传递因子。

酪蛋白激酶 II 磷酸化位点: 14

蛋白激酶 C 磷酸化位点: 9

5 酪氨酸激酶磷酸化位点: 1

此外, 根据以上事实, 可证实上文预测的具有 733 个氨基酸残基的序列对应于 Meg-3 的氨基酸序列。具有该氨基酸序列的蛋白所计算出的分子量和理论 pI 分别为约 83 kDa 和 5.72。

实施例 7: Meg-3 的功能分析(2) - 组织分布

10 对 Meg-3 如下进行 Northern 印迹分析。3' 导向的 cDNA 文库(实施例 3)中阳性克隆插入子用 RI 经随机 DNA 标记法标记, 并作为探针。从用作样品的下述细胞中获得 Poly (A)⁺RNA (2 μg), 在含 2.2 M 甲酰胺的 1% 琼脂糖凝胶上分离, 并转移至硝酸纤维素膜上。将此膜在 Rapid Hyb 溶液 (Amersham, Arlington Heights, IL)中杂交。然后, 用 0.1X SSPE/0.1% SDS,

15 60°C 的最终严谨度洗涤。

用于多种(multiple)人类原代细胞培养和组织培养的 Northern 印迹分析, 以及用于人类癌细胞系的 Northern 印迹分析的样品购自 Clontech (Palo Alto, CA)。原代细胞培养的样品可以是来自人类肾小球膜细胞、人类真皮成纤维细胞、人类肾皮质上皮细胞、人类脐静脉内皮细胞、及人类平滑肌

20 细胞的原代培养细胞的 poly (A)⁺RNA 2 μg。在人类癌细胞系的 Northern 印迹分析中, 可使用来自骨髓细胞白血病 HL-60、HeLa 细胞 S3、慢性髓细胞性白血病 K-562、淋巴母细胞白血病 MOLT-4、Burkitt 淋巴瘤 Raji、大肠腺癌 SW480, 肺癌 A549、及黑素瘤 G361 的 poly (A)⁺RNA 2 μg 作为样品。在组织的 Northern 印迹分析中, 可使用来自心脏、脑、胎盘、肺、肝脏、

25 骨骼肌、肾脏和胰腺的 poly (A)⁺RNA 2 μg 作为样品。杂交和洗涤如上述进行。结果示于表 1-3。

表 1

原代培养细胞	
人类肾小球膜细胞	+++
人类真皮成纤维细胞	++
人类肾皮质上皮细胞	++

人类脐静脉内皮细胞	±
人类平滑肌细胞	±

表 2

人类癌细胞系	
前髓细胞白血病 HL-60	-
HeLa 细胞 S3	+++
慢性髓细胞性白血病 K-562	+
淋巴瘤细胞白血病 MOLT-4	-
Burkitt 淋巴瘤 Raji	-
大肠腺癌 SW480	+++
肺癌 A549	++
黑素瘤 G361	+

表 3

人类组织	
心脏	+
脑	-
胎盘	+++
肺	+
肝脏	±
骨骼肌	±
肾脏	+
胰腺	++

5 在利用 Meg-3 cDNA 作为探针进行的 Northern 印迹分析中，在培养的肾小球膜细胞中发现了单一转录产物(约 4.0 kb)。人类原代细胞培养物的特征之一是，Meg-3 在肾小球膜细胞中以非常高的水平表达。在其它原代细胞培养物中，在肾皮质上皮细胞和真皮成纤维细胞中均有表达，在人类脐静脉内皮细胞和平滑肌细胞中可见弱表达。此外，当比较组织中的表达时，

10 人类胎盘中的 Meg-3 高表达，其次是在胰腺中。此外，还在诸如心脏、肺、和肾脏中观察到表达。肝脏和骨骼肌中的表达较弱，脑中未发现表达。除了在 HeLa 细胞 S3 和大肠腺癌 SW480 中有强表达，在肺癌 A549 中有表达外，在其它培养的癌细胞系中未发现明显的表达。

实施例 8: Meg-3 的功能分析(3) - 原位杂交

通过原位杂交(本文中缩写为 ISH)评估正常人肾组织中的 Meg-3 mRNA 表达。ISH 按已知方法(Kidney Int. 52:111 (1997))实施。用对应于人类 Meg-3 cDNA (SEQ ID NO: 5)中 404 - 433 位的核苷酸序列作为探针。Meg-3 转录产物被定位在肾小球的肾小球膜细胞中。在杂交前用 RNA 酶预处理该组织, 以便评估将 Meg-3 探针检测到的大多数信号消除后所得检测信号的特异性。此外, 根据用 100 倍过量的、具有相同核苷酸序列或无关序列的未标记寡核苷酸进行的竞争性检查发现, 使用具有相同核苷酸序列的寡核苷酸可消除 Meg-3 探针所检测的信号, 而用具有无关序列的寡核苷酸时来自 Meg-3 探针的信号仍然保留。这些结果证实, 具有 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的 Meg-3 基因在肾小球膜细胞中特异性表达。

实施例 9: Meg-3 蛋白的表达

用 1.0 μ l 培养的人肾小球膜细胞 poly (A)⁺ RNA (0.5 μ g/ μ l)为模板, 以设计用于编码翻译区的以下引物进行 PCR, 获得含 Meg-3 翻译区的基因。所用引物为:(1)包含起始密码子以及附加在 5' 末端的 EcoRI 限制酶位点的引物(5' -CGGAATTCATGGGGTGGATGGG-3' / SEQ ID NO: 6), 和(2)包括终止密码子以及 EcoRI 识别位点的引物 (5' -GCGAATTCTAGAACTCAGTCTGCACCCCTGC-3' / SEQ ID NO: 7)。反应混合物包含 5 μ l 10X Ex Taq 缓冲液, 8 μ l dNTP 混合物(2.5 mM), 0.5 μ l PCR 引物(SEQ ID NO: 6, 20 pmol/ μ l), 0.5 μ l 第一(primary)PCR A1 引物(SEQ ID NO: 7, 20 pmol/ μ l), 和 0.5 μ l TaKaRa Ex TaqTM (10 U/ μ l), 用无菌水补足总体积 50 μ l。将该混合物置于“Takara PCR 热循环仪”中, 以 94 $^{\circ}$ C 1 分钟、60 $^{\circ}$ C 2 分钟和 72 $^{\circ}$ C 2 分钟反应 30 个循环。在 0.75% 琼脂糖凝胶上电泳以观察泳带。利用 1 μ l 反应混合物经“Original TA 克隆试剂盒”(Invitrogen)亚克隆所述 DNA, 将所得质粒命名为 meg3/pCR2。用 EcoRI 消化该质粒, 然后用 T4 连接酶与已用 EcoRI 消化的麦芽糖结合蛋白融合蛋白表达载体 pMAL-c2 (New England Biolab)连接, 将所得质粒转化至大肠杆菌 JM109。18 小时后, 将氨苄青霉素抗性菌株接种至 3 ml LB 培养基中并培养 18 小时。按照小量制备法提取表达载体 pMALc2/meg3, 并用限制酶证实。

将已被 pMALc2/meg3 转化的大肠杆菌 XL1-Blue 在添加了 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 10 ml LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 18 小时。将该培养液加入 1

L 营养培养基(Rich medium)(含 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 5 g NaCl, 2 g/L 葡萄糖, 100 μ g/ml 氨基青霉素)中, 进一步 37 $^{\circ}$ C 振荡培养。当浊度计测得 OD 约为 0.8 (A600)时, 添加 3 ml 0.1 M IPTG (1.41 g 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷, 溶于 50 ml 水中), 进一步将该混合物于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养。2 小时后离心(4,000 g, 20 分钟)收获菌体, 添加 50 ml 裂解缓冲液(10 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaCl, 0.25 % 吐温 20, pH 7.0)。将菌体在该缓冲液中充分悬浮, 于-80 $^{\circ}$ C 冷冻 18 小时后, 用 SONIFIER250 (BRANSON)进行超声处理以破碎细胞。将 NaCl 加至 0.5 M, 离心(10,000 g, 30 分钟)收集上清。将 200 ml 0.25 % 吐温 20/柱层析缓冲液加入该上清中, 然后将溶液上样至填充了 30 ml 直链淀粉树脂、并已用 0.25 % 吐温 20/柱层析缓冲液(0.25 % 吐温 20, 10 mM 磷酸, 0.5 M NaCl, pH 7.2)预平衡的层析柱。将流速定为 1 ml/分钟, 在用 100 ml 0.25 % 吐温 20/柱层析缓冲液并随后用 150 ml 柱层析缓冲液洗柱后, 与直链淀粉树脂结合的融合蛋白用含 10 mM 麦芽糖的 50 ml 柱层析缓冲液洗脱。用超滤膜(Amicon stirred-cell concentrator)将洗脱级分浓缩至约 1 mg/ml, 成为浓缩的融合蛋白 MBP-Meg-3。

该融合蛋白的麦芽糖结合蛋白部分可根据以下方法用酶切割下来。将蛋白溶液置于透析管(级分分子量: 3,500)中, 对 Xa 因子缓冲液(20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM 叠氮钠)透析。将 10 μ l Xa 因子(200 μ g/ml)添加至 200 μ l (1 mg/ml)已透析的溶液中, 通过在室温反应 24 小时可特异性切割麦芽糖结合蛋白与目标蛋白之间的结合位点。切割后, 目标蛋白可利用凝胶过滤层析、离子交换柱层析等纯化方法来获得。

实施例 10: 抗 MBP-Meg-3 多克隆抗体的产生

将实施例 9 所获浓缩的融合蛋白 MBP-Meg-3(10 mM 磷酸钠, 0.5 M NaCl, 10 mM 麦芽糖)与等体积弗氏完全佐剂混合, 彻底乳化。取 0.5 ml 该乳液皮下给药至新英格兰白兔(雌性, 约 4,000 g)(20 μ g/动物)。用与弗氏不完全佐剂混合的 MBP-Meg-3 于 3 周后(50 μ g/动物)、5 周后(50 μ g/动物)、7 周后(50 μ g/动物)、9 周后(100 μ g/动物)、及 11 周后(200 μ g/动物)进行加强免疫。第三次免疫的 1 周后, 取血测定抗体滴度。经证实该滴度升高了 204,800 倍。抗体滴度用包被了 50 ng/孔抗原的 96 孔板经 EIA 测定。将 100 μ l 成功稀释的抗血清添加至每孔以进行第一步反应, 弃去上清, 洗板后, 加入抗兔 IgG Fab' -HRP (IBL, 日本)进行反应。洗板后, 用 OPD (Sigma,

USA)显色以便测量。此外,所得抗血清经 Western 印迹证实可与 MBP-Meg-3 特异性反应。

实施例 11: 兔多克隆抗-MBP-Meg-3 IgG 的反应性检查

用 MBP-Meg-3, 3' -末端 c-myc 标记的 Meg-3, 及仅表达 MBP 的大肠杆菌细胞破碎液作为抗原, 证实免疫原为 MBP-Meg-3 的兔 IgG 的反应性。

将 pMALc2/meg3 所转化的大肠杆菌 JM109 的细胞破碎液用作 MBP-Meg-3。用已除去终止密码子并添加了 EcoRI 识别位点的引物(5' - GCGAATTCGAACTCAGTCTGCACCCCTGC-3' / SEQ ID NO: 8) 取代 PCR A1 引物作为反义引物, 并用如实施例 9 所述合成的片段表达 3' -末端 c-myc 标记的 Meg-3。将该片段插入用 EcoRI 消化的哺乳动物表达载体 pcDNA3.1 (Invitrogen)中, 利用该质粒及兔网织红细胞进行 c-myc 标记的 Meg-3 的体外转录和翻译(Promega)以便表达。

用等量样品缓冲液(0.25 % Tris-HCl, 2 % SDS, 30 % 甘油, 10 % β -巯基乙醇, 0.025 % 溴酚蓝) (第一化学药品)处理每种蛋白溶液, 并将它们于 95°C 加热 5 分钟, 获得样品。使所得样品在 4-20 % 的梯度胶(第一化学药品)上进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) (Laemmli, U. K., 自然, 1970, 227: 680-685)。

将 SDS-PAGE 所分离的蛋白, 通过在印迹液(25 mM Tris-HCl, 192 mM 甘氨酸, 20 % 甲醇, pH 8.3)中以 100 V 的恒定电压处理 1 小时, 而印迹至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(BioRad)上。已印迹的 PVDF 膜用蒸馏水洗后, 在 5 % Block Ace 的 TTBS 溶液中封闭 3 小时。然后, 用 TTBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 % 吐温 20, pH 7.5)洗涤 PVDF 膜, 使其与兔多克隆抗-MBP-Meg-3 IgG 溶液(作为第一抗体, 用 TTBS 稀释)在 4°C 反应过夜。然后, 用扩增的碱性磷酸酶免疫印迹试剂盒(Amplified Alkaline Phosphatase Immune Blot Kit) (Biorad)检测。换而言之, 在室温下与生物素标记的山羊抗 IgG 的 TTBS 稀释液反应 1 小时, 接着与预先制备好的链霉抗生物素蛋白-生物素-标记的碱性磷酸酶复合物在室温下反应 1 小时。用 TTBS 洗涤 PVDF 膜, 然后将膜与底物(氮蓝四唑和 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸, *p*-甲苯胺盐溶液)室温保温约 30 分钟, 使与第一抗体结合的抗体显色。向反应混合物中添加蒸馏水以终止反应。

结果示于表 1。对应于 MBP-Meg-3 的带，用实施例 10 所得本发明多克隆抗-MBP-Meg-3 抗体证实。可见，这种多克隆抗体是特异性识别 Meg-3 的抗体。

实施例 12: Meg-3 的细胞内定位

- 5 将已插入了 Meg-3 中 EcoRI 消化片段的 ORF 片段的上述 pcDNA3.1 转化至 CHO 细胞，3' -末端 c-myc 标记型 Meg-3 被过表达。2 天后，细胞用 4 % 多聚甲醛和 0.5 % Triton X-100 固定，与抗小鼠 c-myc 抗体反应，并与 FITC 标记的抗小鼠抗体反应。或者，将细胞核用 Hoechst 33341 染色，并用共焦激光显微镜观察。
- 10 结果示于图 2。如在氨基酸序列分析中所预测，Meg-3 经证实定位于胞质中。

工业应用性

- 15 本发明提供了以高频率表达于肾小球膜细胞中的 DNA，该 DNA 编码的蛋白质等。它们被认为与肾小球膜细胞的特异性生物学活性密切相关，并可用于，例如鉴定肾小球膜细胞，和检测肾小球膜细胞中的异常。此外，该蛋白还可用于阐明肾小球膜细胞的功能，并因此研究与肾小球膜细胞相关的疾病的病因。预计本发明可用于对与肾小球膜细胞相关的疾病进行治疗和诊断等。

- 20 具体地，肾小球肾炎的发生或进展可能通过，例如人为调节 Meg-3 而得到调节。或者，对体液及肾小球膜细胞中 Meg-3 的 mRNA 或蛋白的定量可能诊断诸如肾小球肾炎之类的肾脏疾病。在肾小球肾炎中，功能性异常可见于肾小球膜区，导致肾小球膜细胞增生或加速从这些细胞产生基质。Meg-3 参与这些疾病的可能性很大。

- 25 本发明的 Meg-3，以及由本发明人以前报道的 MEGSIN 在肾小球膜细胞中高表达方面具有共同特征。但本发明的 Meg-3 可能是含有丰富脯氨酸结构域的细胞内信号传递物质，而 MEGSIN 是与 SERPIN 超家族(一种蛋白酶抑制剂)同源的蛋白质。此外，本发明的 Meg-3 可在各种组织中表达，这与 MEGSIN 的特征不同，其特异性表达于肾小球膜细胞中。因此，本发明的
30 的 Meg-3 可能是支持肾小球膜细胞的功能的一种重要蛋白质。阐述了这种重要蛋白质的本发明因此具有重要意义。

序列表

<110> 官田敏男(MIYATA, Toshio)
黑川 清(KUROKAWA, Kiyoshi)

<120> Meg-3 蛋白

<130> KRK-103PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-123561

<151> 1999-04-30

<160> 8

<170> PatentIn 2.1 版

<210> 1

<211> 3768

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (53)..(2251)

<400> 1

caggaactgg gccagctccg gtccttctt tttggggctc tcactctgga gg atg ggg 58
Met Gly
1

tgg atg gga gaa aaa acc ggg aag atc ctg acg gag ttc ctc cag ttc 106
Trp Met Gly Glu Lys Thr Gly Lys Ile Leu Thr Glu Phe Leu Gln Phe
5 10 15

tat gaa gac cag tat ggc gtg gct ctc ttc aac agc atg cgc cat gag 154
Tyr Glu Asp Gln Tyr Gly Val Ala Leu Phe Asn Ser Met Arg His Glu
20 25 30

att gag ggc acg ggg ctg ccg cag gcc cag ctg ctc tgg cgc aag gtg 202
Ile Glu Gly Thr Gly Leu Pro Gln Ala Gln Leu Leu Trp Arg Lys Val
35 40 45 50

cca ctg gac gag cgc atc gtc ttc tcg ggg aac ctc ttc cag cac cag 250
Pro Leu Asp Glu Arg Ile Val Phe Ser Gly Asn Leu Phe Gln His Gln
55 60 65

gag gac agc aag aag tgg aga aac cgc ttc agc ctc gtg ccc cac aac 298
Glu Asp Ser Lys Lys Trp Arg Asn Arg Phe Ser Leu Val Pro His Asn
70 75 80

tac ggg ctg gtg ctc tac gaa aac aaa gcg gcc tat gag cgg cag gtc 346
Tyr Gly Leu Val Leu Tyr Glu Asn Lys Ala Ala Tyr Glu Arg Gln Val
85 90 95

cca cca cga gcc gtc atc aac agt gca ggc tac aaa atc ctc acg tcc 394
Pro Pro Arg Ala Val Ile Asn Ser Ala Gly Tyr Lys Ile Leu Thr Ser
100 105 110

gtg gac caa tac ctg gag ctc att ggc aac tcc tta cca ggg acc acg 442
Val Asp Gln Tyr Leu Glu Leu Ile Gly Asn Ser Leu Pro Gly Thr Thr
115 120 125 130

gca aag tcg ggc agt gcc ccc atc ctc aag tgc ccc aca cag ttc ccg 490
Ala Lys Ser Gly Ser Ala Pro Ile Leu Lys Cys Pro Thr Gln Phe Pro
135 140 145

ctc atc ctc tgg cat cct tat gcg cgt cac tac tac ttc tgc atg atg 538
Leu Ile Leu Trp His Pro Tyr Ala Arg His Tyr Tyr Phe Cys Met Met
150 155 160

aca gaa gcc gag cag gac aag tgg cag gct gtg ctg cag gac tgc atc 586
Thr Glu Ala Glu Gln Asp Lys Trp Gln Ala Val Leu Gln Asp Cys Ile
165 170 175

cgg cac tgc aac aat gga atc cct gag gac tcc aag gta gag ggc cct 634
Arg His Cys Asn Asn Gly Ile Pro Glu Asp Ser Lys Val Glu Gly Pro
180 185 190

gcg ttc aca gat gcc atc cgc atg tac cga cag tcc aag gag ctg tac 682
Ala Phe Thr Asp Ala Ile Arg Met Tyr Arg Gln Ser Lys Glu Leu Tyr
195 200 205 210

ggc acc tgg gag atg ctg tgt ggg aac gag gtg cag atc ctg agc aac 730
Gly Thr Trp Glu Met Leu Cys Gly Asn Glu Val Gln Ile Leu Ser Asn
215 220 225

ctg gtg atg gag gag ctg ggc cct gag ctg aag gca gag ctc ggc ccg 778
Leu Val Met Glu Glu Leu Gly Pro Glu Leu Lys Ala Glu Leu Gly Pro
230 235 240

cgg ctg aag ggg aaa ccg cag gag cgg cag cgg cag tgg atc cag atc 826
Arg Leu Lys Gly Lys Pro Gln Glu Arg Gln Arg Gln Trp Ile Gln Ile
245 250 255

tcg gac gcc gtg tac cac atg gtg tac gag cag gcc aag gcg cgc ttc 874
Ser Asp Ala Val Tyr His Met Val Tyr Glu Gln Ala Lys Ala Arg Phe
260 265 270

gag gag gtg ctg tcc aag gtg cag cag gtg cag ccg gcc atg cag gcc 922
Glu Glu Val Leu Ser Lys Val Gln Gln Val Gln Pro Ala Met Gln Ala
275 280 285 290

gtc atc cga act gac atg gac caa att atc acc tcc aag gag ctc ctt 970
Val Ile Arg Thr Asp Met Asp Gln Ile Ile Thr Ser Lys Glu Leu Leu
295 300 305

gcc agc aag atc cga gcc ttc atc ctc ccc aag gca gag gtg tgc gtg 1018
Ala Ser Lys Ile Arg Ala Phe Ile Leu Pro Lys Ala Glu Val Cys Val
310 315 320

cgg aac cat gtc cag ccc tac atc cca tcc atc ctg gag gcc ctg atg 1066
Arg Asn His Val Gln Pro Tyr Ile Pro Ser Ile Leu Glu Ala Leu Met
325 330 335

gtc ccc acc agc cag ggc ttc act gag gtg cga gat gtc ttc ttc aag 1114
Val Pro Thr Ser Gln Gly Phe Thr Glu Val Arg Asp Val Phe Phe Lys
340 345 350

gag gtc acg gac atg aac ctg aac gtc atc aac gag ggc ggc att gac 1162
Glu Val Thr Asp Met Asn Leu Asn Val Ile Asn Glu Gly Gly Ile Asp
355 360 365 370

aag ctg ggc gag tac atg gag aag ctg tcc cgg ctg gcg tac cac ccc 1210
Lys Leu Gly Glu Tyr Met Glu Lys Leu Ser Arg Leu Ala Tyr His Pro
375 380 385

ctg aag atg cag agc tgc tat gag aag atg gag tcg ctg cga ctg gac 1258
Leu Lys Met Gln Ser Cys Tyr Glu Lys Met Glu Ser Leu Arg Leu Asp
390 395 400

ggg ctg cag cag cga ttt gat gtg tcc agc acg tcc gtg ttc aag cag 1306
 Gly Leu Gln Gln Arg Phe Asp Val Ser Ser Thr Ser Val Phe Lys Gln
 405 410 415

cga gcc cag atc cac atg cgg gag caa atg gac aat gcc gtg tat acg 1354
 Arg Ala Gln Ile His Met Arg Glu Gln Met Asp Asn Ala Val Tyr Thr
 420 425 430

ttc gag acc ctc ctg cac cag gag ctg ggg aag ggg ccc acc aag gag 1402
 Phe Glu Thr Leu Leu His Gln Glu Leu Gly Lys Gly Pro Thr Lys Glu
 435 440 445 450

gag ctg tgc aag tcc atc cag cgg gtc ctg gag cgg gtg ctg aaa aaa 1450
 Glu Leu Cys Lys Ser Ile Gln Arg Val Leu Glu Arg Val Leu Lys Lys
 455 460 465

tac gac tac gac agc agc tct gtg cgg aag agg ttc ttc cgg gag gcg 1498
 Tyr Asp Tyr Asp Ser Ser Ser Val Arg Lys Arg Phe Phe Arg Glu Ala
 470 475 480

ctg ctg cag atc agc atc ccg ttc ctg ctc aag aag ctg gcc cct acc 1546
 Leu Leu Gln Ile Ser Ile Pro Phe Leu Leu Lys Lys Leu Ala Pro Thr
 485 490 495

tgc aag tcg gag ctg ccc cgg ttc cag gag ctg atc ttc gag gac ttt 1594
 Cys Lys Ser Glu Leu Pro Arg Phe Gln Glu Leu Ile Phe Glu Asp Phe
 500 505 510

gcc agg ttc atc ctg gtg gaa aac acg tac gag gag gtg gtg ctg cag 1642
 Ala Arg Phe Ile Leu Val Glu Asn Thr Tyr Glu Glu Val Val Leu Gln
 515 520 525 530

acc gtc atg aag gac atc ctg cag gct gtg aag gag gcc gcg gtg cag 1690
 Thr Val Met Lys Asp Ile Leu Gln Ala Val Lys Glu Ala Ala Val Gln
 535 540 545

agg aag cac aac ctc tac cgg gac agc atg gtc atg cac aac agc gac 1738
 Arg Lys His Asn Leu Tyr Arg Asp Ser Met Val Met His Asn Ser Asp
 550 555 560

ccc aac ctg cac ctg ctg gcc gag ggc gcc ccc atc gac tgg ggc gag 1786
 Pro Asn Leu His Leu Leu Ala Glu Gly Ala Pro Ile Asp Trp Gly Glu
 565 570 575

gag tac agc aac agc ggc ggg ggc ggc agc ccc agc ccc agc acc ccg 1834
Glu Tyr Ser Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Ser Thr Pro
580 585 590

gag tca gcc acc ctc tcg gaa aag cga cgg cgc gcc aag cag gtg gtc 1882
Glu Ser Ala Thr Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Ala Lys Gln Val Val
595 600 605 610

tct gtg gtc cag gat gag gag gtg ggg ctg ccc ttt gag gct agc cct 1930
Ser Val Val Gln Asp Glu Glu Val Gly Leu Pro Phe Glu Ala Ser Pro
615 620 625

gag tca cca cca cct gcg tcc ccg gac ggt gtc act gag atc cga ggc 1978
Glu Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Asp Gly Val Thr Glu Ile Arg Gly
630 635 640

ctg ctg gcc caa ggt ctg cgg cct gag agc ccc cca cca gcc ggc ccc 2026
Leu Leu Ala Gln Gly Leu Arg Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala Gly Pro
645 650 655

ctg ctc aac ggg gcc ccc gct ggg gag agt ccc cag cct aag gcc gcc 2074
Leu Leu Asn Gly Ala Pro Ala Gly Glu Ser Pro Gln Pro Lys Ala Ala
660 665 670

ccc gag gcc tcc tcg ccg cct gcc tca ccc ctc cag cat ctc ctg cct 2122
Pro Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ala Ser Pro Leu Gln His Leu Leu Pro
675 680 685 690

gga aag gct gtg gac ctt ggg ccc ccc aag ccc agc gac cag gag act 2170
Gly Lys Ala Val Asp Leu Gly Pro Pro Lys Pro Ser Asp Gln Glu Thr
695 700 705

gga gag cag gtg tcc agc ccc agc agc cac ccc gcc ctc cac acc acc 2218
Gly Glu Gln Val Ser Ser Pro Ser Ser His Pro Ala Leu His Thr Thr
710 715 720

acc gag gac agt gca ggg gtg cag act gag ttc taggccagtg ggtccctgac 2271
Thr Glu Asp Ser Ala Gly Val Gln Thr Glu Phe
725 730

tgctgcacat ggcacaggcc gttcccttcc ggaccaggc aggctcagct ctggggaggg 2331

cacctggtc tgtgcettgt ggggtggagcc ggggcagggc tgtgtggcac cgccagggag 2391

cgggcccacc tgagtcactt tattgggttc agtcaacact ttcttgctcc ctgttttctc 2451
ttctgtggga tgatctcaga tgcaggggct ggttttgggg ttttcctgct tgtgccaagg 2511
gctggacact gctggggggc tggaaagccc ctcccttctt gtccttctgt ggcctccatc 2571
ccctcatggg tgctgccatc cttcctggag agagggaggt gaaagctggt gtgagcccag 2631
tgggttcccc cccactcacc caggagctgg ctgggccagg accgggagag ggagcactgc 2691
tgccctcctg gccctgctcc ttccgcagtt aggggtggac cgagcctcgc tttccccact 2751
gttctggagg gaaggggaag gagggggtct tcaggctgga gccaggctgg gggtgctggg 2811
tggagagatg agatttaggg ggtgcctcat ggggtgggca ggcctggggg gaaatgagaa 2871
aggcccagaa cgtgcaggtc tgcggagggg aagtgtcctg agtgaaggag gggaccccat 2931
cctgggggatg ctgggagtga gtgagtgaga tggctgagtg agggttatgg ggagcctgag 2991
gttttatggg cctgtgtatc cccttctccc ggccccagcc tgcctccctc ctgcccgcct 3051
ggcccacagg tctccctctg gtccctgtcc ctctggtggt tggggatgga gcggcagcaa 3111
gggggtgtaat ggggctgggt tctgtcttct acaggccacc ccgaggtcct cagtggttgc 3171
ctggggagcc ggacggggct cctgaggggt acaggttggg tgggcccctcc ctgagggtct 3231
ggggtcagge tttggcctct gctgcctctc agtcaccaag tcacctcct ctgaaaatcc 3291
agtecccttct ttgatgtcc ttgtgagtca ctctgggcct ggctgtcgtc cctcctcagc 3351
ttcttgttcc tgggacaagg gtcaagccag gatgggccc ggentgggat ccccccccc 3411
aggaccccaac aggccccctc ccctgntgnt ttgcgggggg cagggcagaa atggactcct 3471
tttgggtccc cgaggtgggg tcccccca gccctgcatc ctccgtgcc tagacctgct 3531
ccccagagga ggggccttga cccacaggaa gtgtggtggc gcctggcaat cagggacccc 3591
cagctgccgc agccctggtt tttggcgcac ctttccctc ttgtcccga gatttgcgcc 3651
tttagtgctt tttgaggggt tccatcatc cctccctgat attgtattga aatattatg 3711

cacactgttc atgcttttac taatcaataa acgctttatt taaaaaaaaa aaaaaaa 3768

<210> 2

<211> 733

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Gly Trp Met Gly Glu Lys Thr Gly Lys Ile Leu Thr Glu Phe Leu
1 5 10 15

Gln Phe Tyr Glu Asp Gln Tyr Gly Val Ala Leu Phe Asn Ser Met Arg
20 25 30

His Glu Ile Glu Gly Thr Gly Leu Pro Gln Ala Gln Leu Leu Trp Arg
35 40 45

Lys Val Pro Leu Asp Glu Arg Ile Val Phe Ser Gly Asn Leu Phe Gln
50 55 60

His Gln Glu Asp Ser Lys Lys Trp Arg Asn Arg Phe Ser Leu Val Pro
65 70 75 80

His Asn Tyr Gly Leu Val Leu Tyr Glu Asn Lys Ala Ala Tyr Glu Arg
85 90 95

Gln Val Pro Pro Arg Ala Val Ile Asn Ser Ala Gly Tyr Lys Ile Leu
100 105 110

Thr Ser Val Asp Gln Tyr Leu Glu Leu Ile Gly Asn Ser Leu Pro Gly
115 120 125

Thr Thr Ala Lys Ser Gly Ser Ala Pro Ile Leu Lys Cys Pro Thr Gln
130 135 140

Phe Pro Leu Ile Leu Trp His Pro Tyr Ala Arg His Tyr Tyr Phe Cys
145 150 155 160

Met Met Thr Glu Ala Glu Gln Asp Lys Trp Gln Ala Val Leu Gln Asp
165 170 175

Cys Ile Arg His Cys Asn Asn Gly Ile Pro Glu Asp Ser Lys Val Glu

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

Lys Gln Arg Ala Gln Ile His Met Arg Glu Gln Met Asp Asn Ala Val
 420 425 430

Tyr Thr Phe Glu Thr Leu Leu His Gln Glu Leu Gly Lys Gly Pro Thr
 435 440 445

Lys Glu Glu Leu Cys Lys Ser Ile Gln Arg Val Leu Glu Arg Val Leu
 450 455 460

Lys Lys Tyr Asp Tyr Asp Ser Ser Ser Val Arg Lys Arg Phe Phe Arg
 465 470 475 480

Glu Ala Leu Leu Gln Ile Ser Ile Pro Phe Leu Leu Lys Lys Leu Ala
 485 490 495

Pro Thr Cys Lys Ser Glu Leu Pro Arg Phe Gln Glu Leu Ile Phe Glu
 500 505 510

Asp Phe Ala Arg Phe Ile Leu Val Glu Asn Thr Tyr Glu Glu Val Val
 515 520 525

Leu Gln Thr Val Met Lys Asp Ile Leu Gln Ala Val Lys Glu Ala Ala
 530 535 540

Val Gln Arg Lys His Asn Leu Tyr Arg Asp Ser Met Val Met His Asn
 545 550 555 560

Ser Asp Pro Asn Leu His Leu Leu Ala Glu Gly Ala Pro Ile Asp Trp
 565 570 575

Gly Glu Glu Tyr Ser Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Ser
 580 585 590

Thr Pro Glu Ser Ala Thr Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Ala Lys Gln
 595 600 605

Val Val Ser Val Val Gln Asp Glu Glu Val Gly Leu Pro Phe Glu Ala
 610 615 620

Ser Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Asp Gly Val Thr Glu Ile
 625 630 635 640

Arg Gly Leu Leu Ala Gln Gly Leu Arg Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala
 645 650 655

Gly Pro Leu Leu Asn Gly Ala Pro Ala Gly Glu Ser Pro Gln Pro Lys
660 665 670

Ala Ala Pro Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ala Ser Pro Leu Gln His Leu
675 680 685

Leu Pro Gly Lys Ala Val Asp Leu Gly Pro Pro Lys Pro Ser Asp Gln
690 695 700

Glu Thr Gly Glu Gln Val Ser Ser Pro Ser Ser His Pro Ala Leu His
705 710 715 720

Thr Thr Thr Glu Asp Ser Ala Gly Val Gln Thr Glu Phe
725 730

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 3

tgtaaacga cggccagt

18

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 4

accatgatta cgccaagctt g

21

<210> 5

<211> 30

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 5
tacctggagc tcattggcaa ctccttacca 30

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 6
cggaattcat ggggtggatg gg 22

<210> 7
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 7
gcgaattcta gaactcagtc tgcaccctg c 31

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 8
gcgaattcga actcagtctg caccctgc 29

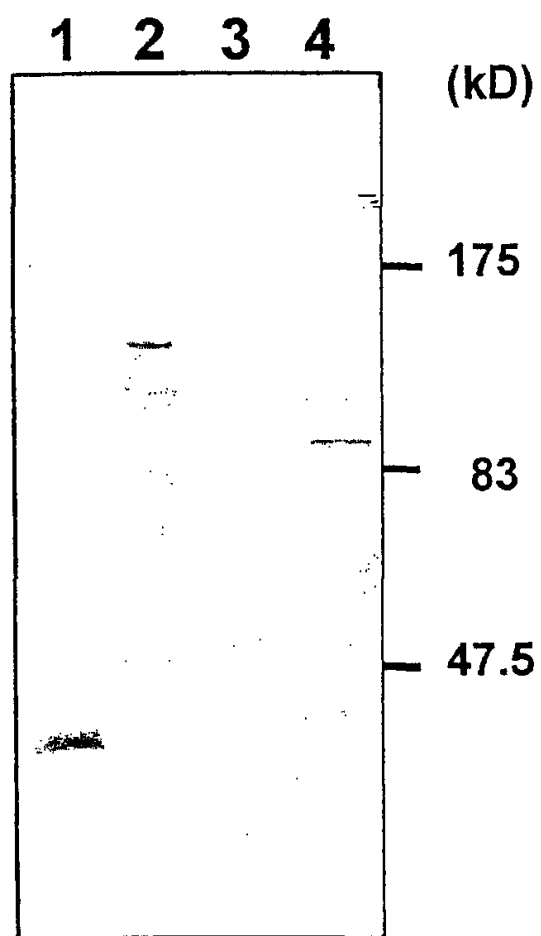


图 1



图 2

专利名称(译)	MEG - 3蛋白		
公开(公告)号	CN1365389A	公开(公告)日	2002-08-21
申请号	CN00809434.9	申请日	2000-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	宫田敏男 黑川清		
申请(专利权)人(译)	宫田敏男 黑川清		
当前申请(专利权)人(译)	宫田敏男 黑川清		
[标]发明人	宫田敏男		
发明人	宫田敏男		
IPC分类号	A61K38/00 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/12 C07K14/435 C12N5/10 C12P21/02 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/50 A01K67/027		
CPC分类号	A01K2217/075 A01K2217/05 A61K38/00 C07K14/47		
优先权	1999123561 1999-04-30 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种在肾小球膜细胞中高频表达的DNA以及该DNA所编码的蛋白(Meg - 3)。这些物质可用于鉴定肾小球膜细胞和检测肾小球膜细胞中的异常状况等。此外,预计肾小球膜细胞的功能可根据上述蛋白的功能来公开,并因此使与肾小球膜细胞相关的疾病的致病机理得以澄清。另预计上述物质可用于与肾小球膜细胞相关的疾病的治疗和诊断等。

