



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02828782.7

[43] 公开日 2005 年 6 月 8 日

[11] 公开号 CN 1625687A

[22] 申请日 2002. 10. 22 [21] 申请号 02828782. 7
 [30] 优先权
 [32] 2002. 4. 19 [33] KR [31] 2002/21488
 [86] 国际申请 PCT/KR2002/001975 2002. 10. 22
 [87] 国际公布 WO2003/089935 英 2003. 10. 30
 [85] 进入国家阶段日期 2004. 10. 19
 [71] 申请人 再生生命工学会社
 地址 韩国汉城
 [72] 发明人 金仁山 裴宗燮

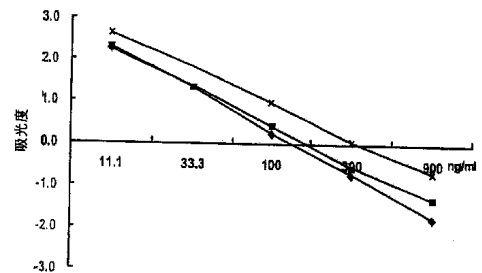
[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
 代理人 程金山

权利要求书 2 页 说明书 23 页 序列表 20 页
 附图 19 页

[54] 发明名称 用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法
 以及使用其的诊断试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法以及使用该方法的诊断试剂盒。具体而言，本发明涉及通过 β ig-h3 蛋白质或 β ig-h3 蛋白质中 fas-1 结构域的重组蛋白(包括其片段或其衍生物)与其配体之间的特异结合反应来测量体液中 β ig-h3 蛋白质的量的方法，还涉及用于肾病、肝病、类风湿性关节炎或心血管疾病的诊断试剂盒，其包含 β ig-h3 蛋白质或 β ig-h3 蛋白质中 fas-1 结构域的重组蛋白(包括其片段或其衍生物)及其配体。本发明的方法和试剂盒能够有效的作为用于诊断肾病、肝病、类风湿性关节炎或心血管疾病的损伤和发展程度的灵敏诊断方法。



1. 一种用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法，其包括以下步骤：
 - 5 1) 制备 β ig-h3 或 β ig-h3 fas-1 结构域的重组蛋白、其片段或衍生物；
 - 2) 制备针对上述步骤1的上述重组蛋白、其片段或衍生物的特异配体；和
 - 3) 通过使用上述步骤2的配体与上述步骤1的重组蛋白、其片段或衍生物的结合反应的方法来测量样品的 β ig-h3 蛋白质的量。
- 10 2. 权利要求1中所述的用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法，其中步骤1)的配体选自由抗体，RNA，DNA，脂类，蛋白质，有机化合物和无机化合物组成的组。
3. 权利要求1中所述的用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法，其中步骤3)的特异结合反应是抗原-抗体反应。
- 15 4. 权利要求3中所述的用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法，其中抗原-抗体反应是通过一种方法进行的，所述方法选自免疫印迹，免疫沉淀，ELISA，RIA，蛋白质芯片，快速测定法和微阵列组成的组。
5. 权利要求3中所述的用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法，其中步骤3)的抗原-抗体反应包括以下步骤：
 - 20 1) 用由 β ig-h3 蛋白质或 β ig-h3 fas-1 结构域制备的重组蛋白、其片段或衍生物包被基质；
 - 2) 使针对上述步骤1的蛋白质、其片段或衍生物的抗体与样品反应；
 - 3) 将上述步骤2的反应物加到步骤1的包被蛋白质上，并等待反应，然后对其进行清洗；和
 - 25 4) 将二抗加到上述步骤3的反应物上，以进一步的反应，然后测量 OD。
6. 权利要求1-5之任一项中所述的用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法，其中 β ig-h3 蛋白质是具有 SEQ. ID. NO 3 所示氨基酸序列的人 β ig-h3 蛋白质或具有 SEQ. ID. NO 5 所示氨基酸序列的小鼠 β ig-h3 蛋白质。
- 30 7. 权利要求1-5之任一项中所述的用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方

- 法,其中重复连接了1或2—10个 β ig-h3蛋白质的第四个 fas-1 结构域。
8. 权利要求 7 中所述的用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法,其中 β ig-h3 的 fas-1 结构域选自由 SEQ. ID. No 7, No 8, No 9 和 No 10 所示序列组成的组。
- 5 9. 权利要求 1 中所述的用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法,其中所述样品可以是任何体液,其包括尿液,血液或滑液。
10. 一种用于肾病,肝病,类风湿性关节炎或心血管疾病的诊断试剂盒,其包含 β ig-h3 蛋白质或 β ig-h3 蛋白质中 fas-1 结构域的重组蛋白(包括其片段或其衍生物)及其配体。
- 10 11. 权利要求 10 中所述的诊断试剂盒,其中所述配体选自由特异结合 β ig-h3 蛋白质, β ig-h3 的 fas-1 结构域,其片段或衍生物的抗体, RNA, DNA, 脂类, 蛋白质, 有机化合物和无机化合物组成的组。
12. 权利要求 11 中所述的诊断试剂盒,其中所述配体是抗体。
13. 权利要求 12 中所述的诊断试剂盒,其中所述试剂盒还额外包含缓
15 冲液,二抗,清洗液,终止液或呈色底物。
14. 权利要求 10 中所述的诊断试剂盒,其中 β ig-h3 蛋白质是具有 SEQ. ID. NO 3 所示氨基酸序列的人 β ig-h3 蛋白质或具有 SEQ. ID. NO 5 所示氨基酸序列的小鼠 β ig-h3 蛋白质。
15. 权利要求 10 中所述的诊断试剂盒,其中重复连接了1或2—10个
20 β ig-h3 蛋白质的第四个 fas-1 结构域。
16. 权利要求 15 中所述的诊断试剂盒,其中 β ig-h3 的 fas-1 结构域选自由 SEQ. ID. No 7, No 8, No 9 和 No 10 所示序列组成的组。

用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法以及使用其的诊断试剂盒

5

发明领域

本发明涉及用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法以及使用其的诊断试剂盒。具体而言，本发明涉及通过 β ig-h3 蛋白质或 β ig-h3 蛋白质中 fas-1 结构域的重组蛋白（包括其片段或其衍生物）与其配体之间的特异结合反应来测量体液中 β ig-h3 蛋白质的量的方法，还涉及用于肾病、肝病、类风湿性关节炎或心血管疾病的诊断试剂盒，其包含 β ig-h3 蛋白质或 β ig-h3 蛋白质中 fas-1 结构域的重组蛋白（包括其片段或其衍生物）及其配体。

15

发明背景

β ig-h3 是包括人黑素瘤细胞、乳房上皮细胞、角质细胞和肺成纤维细胞在内的多种细胞中由 TGF- β 诱导的胞外基质蛋白。TGF- β （转化生长因子- β ）涉及多种细胞的生长和分化，而且哺乳动物具有三种 TGF- β （TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3）。已知 TGF- β 具有许多复杂的功能，诸如生长控制、免疫应答调节、刺激骨形成、诱导软骨特异大分子、刺激伤口愈合等（Bennett, N. T. 等人, *Am. J. Surg.*, 1993, 165, 728）。TGF- β 在伤口愈合过程中表达于上皮细胞中，可能是为了在上皮细胞再生过程中刺激角质细胞中整合素的表达。最近关于 TGF- β 表达的研究揭示了，TGF- β 3 mRNA 表达于正常皮肤的上皮细胞和急性或慢性伤口恢复中的上皮细胞，TGF- β 1 mRNA 只表达于由急性伤口再生的上皮细胞中，而 TGF- β 2 mRNA 根本不表达（Schmid, P. 等人, *J. Pathol.*, 1993, 171, 191）。尽管关于上述机制的具体理论尚未建立，但是认为 TGF- β 在上皮细胞再生中发挥重要作用。

β ig-h3，即由 TGF- β 诱导的基因 h3，是由 Stonier 等人首先发现的。确切的说， β ig-h3 是在搜索来自 A549 细胞系的 cDNA 文库差异筛选数据

30

的过程中发现的, A549 细胞系是经过 TGF- β 1 处理的人肺腺癌细胞系, 据报道在 TGF- β 1 处理后两天 β ig-h3 升高了 20 倍 (Stonier, J. 等人, *DNA Cell Biol.*, 1992, 11, 511)。还通过 DNA 测序确认了 β ig-h3 是由 SEQ. ID. No 1 所示的 683 个氨基酸组成的, 具有氨基末端分泌序列和能够进行
5 针对某些整合素的配体识别的羧基末端 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列。

β ig-h3 包含四个同型内部重复结构域以及 RGD 基元, 在哺乳动物、昆虫、海胆、植物、酵母和细菌等物种的膜蛋白或分泌蛋白中都能观察到这种高度保守的序列。诸如骨膜蛋白(periostin)、成束蛋白 I、海胆 HLC-2、海藻 CAM 和分支杆菌 MPB70 等蛋白质也包含上述保守序列 (Kawamoto, T.
10 等人, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1998, 1395, 288)。在那些蛋白质中非常保守的同型结构域(在下文中称为“fas-1 结构域”)由 110—140 个氨基酸组成, 包含两个各由 10 个氨基酸组成的非常保守的分支(H1 和 H2)。 β ig-h3、骨膜蛋白和成束蛋白 I 含有 4 个 fas-1 结构域, HCL-2 含有 2 个 fas-1 结构域, 而 MPB70 则只含有 1 个 fas-1 结构域。已知那些蛋白质
15 中的一些可以作为细胞粘附分子而介导细胞的粘附和脱离, 尽管尚未能够完全解释那些蛋白质的生物学功能。例如, β ig-h3、骨膜蛋白和成束蛋白 I 分别干预成纤维细胞、成骨细胞和神经细胞的粘附, 而则证实海藻-CAM 是在团藻胚中驻留的细胞粘附分子 (LeBaron, R. G. 等人, *J. Invest. Dermatol.*, 104, 844, 1995; Horiuchi, K. 等人, *J. Bone Miner. Res.*,
20 1999, 14, 1239; Huber, O. 等人, *EMBO J.*, 1994, 13, 4212)。

纯化的 β ig-h3 蛋白质在无血清培养基中刺激皮肤成纤维细胞的粘附和铺展, 但是阻碍 A549、HeLa 和 WI-38 细胞的粘附。 β ig-h3 尤其阻碍肿瘤细胞的生长、集落的形成和出现。事实上, 通过用 β ig-h3 表达载体转染中国仓鼠卵巢细胞, 肿瘤细胞在裸鼠中的生长显著降低, 这在美国专利
25 # 5, 714, 588 和 # 5, 599, 788 中有明确叙述。此外, 在那些专利中还叙述了通过用需要量的 β ig-h3 接触伤口来刺激受伤部位周围的成纤维细胞扩展和粘附的方法。因此, 作为在许多细胞中由 TGF- β 高度诱导的细胞粘附分子, β ig-h3 在细胞生长、细胞分化、伤口愈合、形态发生和细胞粘附中发挥重要作用。

30 尽管 β ig-h3 是有效的有用物质, 然而因为人体内只生成极少量的 β

ig-h3, 所以它的供应是不足的。为了解决这个问题, 通过遗传工程在真核细胞系统中表达 β ig-h3, 从而开发了制备它的方法。可是, 在那种情况中, 生成 β ig-h3 的细胞的生长比其它细胞慢得多, 从而导致难以获得足够量的 β ig-h3 生成细胞。因此, 本发明人建立了一种纯化方法, 其中
5 使用大肠杆菌作为宿主大量表达包含整个 β ig-h3 蛋白质或其一些结构域的重组蛋白, 证实了那些重组蛋白支持细胞粘附和铺展, 并申请了专利(韩国专利申请#2000-25664)。

细胞粘附分子 β ig-h3 的细胞粘附活性首先报导于人的真皮成纤维细胞, 然后在软骨细胞、腹膜成纤维细胞和人 MRC5 成纤维细胞中也有这样的报导。早期认为 β ig-h3 的细胞粘附活性是由 β ig-h3 羧基末端的 RGD 基元介导的。但是后来报导 RGD 基元并非是刺激软骨细胞铺展所必需的, 而且通过羧基末端加工使其中 RGD 基元缺失的成熟 β ig-h3 能够阻碍细胞粘附。因此, 确认了 RGD 基元并非 β ig-h3 细胞粘附活性的必需介导体。最近的研究进一步确认了 β ig-h3 通过与整合素 $\alpha 1 \beta 1$ 独立作用来刺激细胞粘附和铺展, 尤其是成纤维细胞的铺展, 而 β ig-h3 的 RGD 基元并非由 β ig-h3 介导的细胞铺展所必需的 (Ohno, S. 等人, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1451, 196)。此外, 确认了 β ig-h3 中所包含的 H1 和 H2 肽不影响由 β ig-h3 介导的细胞粘附, 说明细胞粘附所需要的某些氨基酸并非位于 H1 和 H2 中而是在 β ig-h3 的其它部位。为了支持上文, 通过计算机分析了 β ig-h3 的重复 fas-1 结构域与其它蛋白质的 fas-1 结构域之间的同源性, 从而确认了 β ig-h3 中除了 H1 和 H2 以外的许多其它保守氨基酸参与细胞粘附的事实。
15

因此, 本发明人试图寻找参与细胞粘附和脱离活性的保守基元, 并制备包含它们的肽。结果是, 本发明人使用称为细胞粘附分子的 β ig-h3 的第二个和第四个结构域制备了通过与 $\alpha 3 \beta 1$ 整合素一起作用来介导细胞粘附和脱离的肽 NKDIL、EPDIM 和它们的衍生物, 并揭示了位于 β ig-h3 第二个和第四个结构域中 H2 区域附近的两个非常保守的氨基酸, 天冬氨酸 (Asp) 和异亮氨酸 (Ile) 是细胞粘附和脱离所必需的氨基酸, 并申请了专利(韩国专利申请#2000-25665)。
25

今天, 尚无 β ig-h3 直接涉及疾病的报导, 但是 β ig-h3 似乎涉及一
30

些人类癌症。尚未能够解释 β ig-h3 表达与肾病、肝病、类风湿性关节炎和心血管疾病发展的关联，同样尚未报导通过测量体液中 β ig-h3 蛋白质的量即利用 β ig-h3 蛋白质诊断疾病的可能性。

由此，本发明人开发了使用通过将许多 β ig-h3 或 β ig-h3 的第四个
5 fas-1 结构域连接起来而制备的重组蛋白作为标准蛋白而测量 β ig-h3 的量的方法，以及使用其的试剂盒。本发明人证实本发明的方法和试剂盒能够有效的作为灵敏诊断方法，用于诊断肾病、肝病、类风湿性关节炎或心血管疾病的损伤或发展程度，从而完成了本发明。

10 发明概述

本发明的一个目标是提供使用 β ig-h3 蛋白质或包含 β ig-h3 的 fas-1 结构域的重组蛋白来测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法，以及使用其的诊断试剂盒。

15 附图简述

图 1 是显示 β ig-h3 重组蛋白的结构图，

I、II、III 和 IV：各个结构域；

▨和▩：碱基序列保守区域；

A: β ig-h3; B: 人 β ig-h3; C: 小鼠 β ig-h3。

20 图 2 是显示通过重复 β ig-h3 IV 结构域制备的 β ig-h3 D-IV 重组蛋白的几何结构的图，

A: β ig-h3; B: β ig-h3 D-IV (1x); C: β ig-h3 D-IV (2x);

D: β ig-h3 D-IV (3x); E: β ig-h3 D-IV (4x)。

图 3 是分离的 β ig-h3 重组蛋白的电泳照片，

25 1: 人 β ig-h3; 2: 小鼠 β ig-h3。

图 4 是 β ig-h3 D-IV (1x、2x、3x、4x) 蛋白质的电泳照片，

1: β ig-h3 D-IV (1x); 2: β ig-h3 D-IV (2x);

3: β ig-h3 D-IV (3x); 4: β ig-h3 D-IV (4x)。

图 5 是显示使用一抗的 Western 印迹的结果的照片，由此确认了人 β
30 ig-h3 和小鼠 β ig-h3，

1: 人 β ig-h3; 2: 小鼠 β ig-h3。

图 6 是显示酶联免疫吸收测定法 (ELISA) 的原理的图。

图 7 是显示一抗的数量比率的图表,

◆: 1:200; ■: 1:400; ▲: 1:800;

5 ×: 1:1600; ※: 1:2000; ●: 1:3200。

图 8 是显示二抗的数量比率的图表,

A: 将一抗固定在 1:1600,

B: 将一抗固定在 1:2000,

◆: 将二抗稀释至 1:1000,

10 ■: 将二抗稀释至 1:2000,

●: 将二抗稀释至 1:3000。

图 9 是显示人 β ig-h3 蛋白质的包被浓度的图表,

◆: 0.5 μ g/ml; ■: 1.0 μ g/ml。

15 图 10 是显示人 β ig-h3 蛋白质和小鼠 β ig-h3 蛋白质都可用作标准蛋白的图表, 这通过交叉测试得到了证实,

◆: 人 β ig-h3 蛋白质包被浓度 0.5 μ g/ml, 抗人 β ig-h3 一抗 1:2000, 二抗 1:2000,

■: 人 β ig-h3 蛋白质包被浓度 0.5 μ g/ml, 抗小鼠 β ig-h3 一抗 1:2000, 二抗 1:2000,

20 ▲: 小鼠 β ig-h3 蛋白质包被浓度 0.5 μ g/ml, 抗人 β ig-h3 一抗 1:2000, 二抗 1:2000,

×: 小鼠 β ig-h3 蛋白质包被浓度 0.5 μ g/ml, 抗小鼠 β ig-h3 一抗 1:2000, 二抗 1:2000。

25 图 11 是显示重组 β ig-h3 D-IV (1x) 蛋白质和重组 β ig-h3 D-IV (4x) 蛋白质可以用作标准蛋白的图表, 这通过交叉测试得到了证实,

A 的◆: β ig-h3 D-IV (1x) 包被浓度 0.5 μ g/ml, 抗人 β ig-h3 一抗 1:2000, 二抗 1:2000,

A 的■: β ig-h3 D-IV (4x) 包被浓度 0.5 μ g/ml, 抗人 β ig-h3 一抗 1:2000, 二抗 1:2000,

30 B 的◆: β ig-h3 D-IV (1x) 包被浓度 0.5 μ g/ml, 抗小鼠 β ig-h3 一

抗 1:2000, 二抗 1:2000,

B 的■: β ig-h3 D-IV (4x) 包被浓度 $0.5 \mu\text{g/ml}$, 抗小鼠 β ig-h3 一抗 1:2000, 二抗 1:2000。

图 12 是显示肾组织中的 β ig-h3 表达模式的免疫组织化学染色照片,

5 A 的▶: S3 近侧肾小管细胞基底膜的表达模式,

B 的▶: 肾小球 Bowman 氏囊基底膜的表达模式,

B 的→: 皮质厚升支细胞(cortical thick ascending limb cell)基底膜的表达模式。

图 13 是显示诱发糖尿病大鼠尿液中的 β ig-h3 水平的图表,

10 ■: 对照组,

□: 通过链佐星(streptozotocin)处理诱发糖尿病的大鼠。

图 14 是显示图 13 中诱发糖尿病大鼠的尿液中的 β ig-h3 个体水平。

图 15 是显示由每个正常大鼠、肾单位剂量不足大鼠、慢性排斥大鼠、复发性 GN 大鼠和显示 CyA 毒性的大鼠获得的尿液中的 β ig-h3 水平的图表。
15

图 16 的图表显示了由于在肾移植后再次形成病灶性部分肾小球硬化症(focal segmental glomerulosclerosis) (FSGS) 而接受了血浆取出法处理的患者的每日尿样测量得到的不同 β ig-h3 蛋白质浓度。

图 17 的图表显示了活着的供体、死去的供体、剂量不足和排斥患者在肾移植之前和之后的尿液中测量得到的 β ig-h3 蛋白质浓度。
20

图 18 是显示诱发糖尿病小鼠损伤血管中的 β ig-h3 蛋白质表达模式的免疫组织化学染色照片,

A: 正常血管, B: 损伤血管, L: 内腔。

图 19 的图表显示了血管平滑肌细胞培养物中的 β ig-h3 蛋白质表达模式,
25

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ 。

发明详述

为了实现上述目标, 本发明提供了用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法。
30

本发明还提供了使用其且用于肾病、肝病、类风湿性关节炎或心血管疾病的诊断试剂盒。

本发明的其它特征将在下文中出现。

本发明用于测量 β ig-h3 的量的方法包括以下步骤：

- 5 1) 制备 β ig-h3 蛋白质或包含 β ig-h3 fas-1 结构域的重组蛋白、其片段或衍生物；
- 2) 制备针对上文步骤 1 的上述重组蛋白、其片段或衍生物的特异配体；和
- 3) 通过使用上文步骤 2 的配体与上文步骤 1 的重组蛋白、其片段
10 或衍生物的结合反应的方法来测量样品中 β ig-h3 蛋白质的量。

在步骤 1 中， β ig-h3 蛋白质或是具有 SEQ. ID. No 3 所示氨基酸序列的人 β ig-h3 蛋白质或是具有 SEQ. ID. No 5 所示氨基酸序列的小鼠 β ig-h3 蛋白质。图 1 显示了人和小鼠 β ig-h3 蛋白质的结构元件。图 1 中的斜线阴影区和交叉线阴影区显示重复的 fas-1 结构域 I、II、III 和 IV
15 的非常保守的序列，而空白区表示 RGD 基元。

β ig-h3 蛋白质含有 4 个 fas-1 结构域。对于上文步骤 1 的 β ig-h3 fas-1 结构域，优选选择 β ig-h3 蛋白质第一个至第四个 fas-1 结构域中的一个或超过两个，更优选使用第四个 fas-1 结构域。第四个 fas-1 结构域可以独立使用，或者作为许多 fas-1 结构域重复连接的重组蛋白。对于
20 重组蛋白，需要联合 1-10 个 fas-1 结构域，更优选使用 1-4 个 fas-1 结构域。在本发明的优选实施方案中，本发明人提供了只使用第四个 fas-1 结构域和分别通过连接 2 个、3 个和 4 个 β ig-h3 第四个结构域制备的重组蛋白的实例。

本发明人制备了由 SEQ. ID. No 7、No 8、No 9 和 No 10 每个所示的
25 蛋白质，它们分别具有 1 个、2 个、3 个和 4 个包含 β ig-h3 第 502-632 位氨基酸的第四个 fas-1 结构域，并将它们命名为“ β ig-h3 D-IV (1x)”、“ β ig-h3 D-IV (2x)”、“ β ig-h3 D-IV (3x)”和“ β ig-h3 D-IV (4x)”（见图 4）。

β ig-h3 蛋白质中与配体发生特异结合反应的部位即表位和蛋白质中
30 包含蛋白酶水解的肽的任何其它部分都可作为重组蛋白的片段。可以通过

包括磷酸化或糖基化在内的共价键以及包括离子键、配位键、氢键、疏水键或范德华键在内的非共价键来制备本发明重组蛋白的衍生物。如果上述重组蛋白衍生物片段能够与配体特异结合，那么它们也将包括在本发明蛋白质的范围之内。

5 为了制备本发明的标准蛋白，可以通过常规方法来进行表达载体的构建和转化。

在步骤 2 中，可以通过观察配体与步骤 1 的蛋白质或重组蛋白的结合反应来确认特异结合 β ig-h3、 β ig-h3 fas-1 结构域、其片段或衍生物的配体。配体有许多种类，诸如抗体、RNA、DNA、包括脂类、蛋白质或有机盐的有机化合物、或包括金属离子或无机盐的无机化合物，优选的配体是
10 使用步骤 1 的蛋白质或重组蛋白（包括片段或衍生物）作为抗原制备的步骤 2 中针对 β ig-h3 或 β ig-h3 fas-1 结构域的一抗。可以通过常规方法来制备一抗，而且可以使用单克隆抗体或多克隆抗体。

在步骤 3 中，通过配体与 β ig-h3 蛋白质、它的片段或衍生物的特异
15 结合反应来测量样品中所包含的 β ig-h3 蛋白质的量。在发生配体结合反应的部位，甚至可以使用那些片段或衍生物的片段。优选使用采用抗原-抗体结合反应的定量测定法，所述结合反应中以 β ig-h3 蛋白质作为抗原。更优选的是由下组选择一种方法：免疫印迹（*Current Protocols in Molecular Biology*, 第 2 卷, 第 10.8 章; David 等, *Cells, (a Laboratory*
20 *Manual)*, 第 1 卷, 第 73 章)、免疫沉淀（*Current Protocols in Molecular Biology*, 第 2 卷, 第 10.16 章; *Cells (a Laboratory Manual)*, 第 1 卷, 第 72 章)、ELISA（*Current Protocols in Molecular Biology*, 第 2 卷, 第 11.2 章; *ELISA Theory and Practice*, John R. Crowther; *The ELISA Guidebook*, John R. Crowther)、RIA（放射免疫测定法）（*Nuklearmedizin*,
25 1986 年 8 月, 25 (4): 125-127, Tumor markers as target substances in the radioimmunologic detection of malignancies. von Kleist S; Mariani G. *Ann Oncol*, 1999, 10 增刊 4: 37-40)、蛋白质芯片（Daniel Figeys 等人, *Electrophoresis*, 2001, 22, 208-216; Albala JS., *Expert Rev Mol Diagn*, 2001 年 7 月, 1 (2): 145-152)、快速测定法（Kasahara
30 Y 和 Ashihara Y, *Clinical Chimica Acta*, 267, 1997, 87-102; 韩国

专利申请#2000-46639)或微阵列(Vivian G. Cheung 等人, *Nature Genetics*, 1999, 21, 15-19; Robert J. Lipshutz 等人, *Nature Genetics*, 1999, 21, 20-24; Christine Debouck 和 Peter N. Goodfellow, *Nature Genetics*, 1999, 21, 48-50; *DNA Microarrays*, M. Schena), 而且 ELISA 是最优选的方法。还有可能使用生物学微芯片和自动化微阵系统以及 ELISA 进行大规模样品分析, 而且可以由此开发出使用尿液的简单的自我诊断方法。

依照本发明的优选实施方案,使用 ELISA 通过竞争测定法测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法包括以下步骤:

- 1) 用 β ig-h3 蛋白质或包含 β ig-h3 fas-1 结构域的重组蛋白、它的片段或衍生物包被基质;
- 2) 使针对上文步骤 1 的蛋白质、它的片段或衍生物的抗体与样品反应;
- 3) 将上文步骤 2 的反应物加到步骤 1 的包被蛋白质上, 并等待反应进行, 然后对其进行清洗; 和
- 4) 将二抗加到上文步骤 3 的反应物上, 进行进一步的反应, 然后测量 OD。

所有种类的常用基质都可用作上文步骤 1 的基质, 尤其是硝酸纤维素膜、聚乙烯板(例如 96 孔板)、聚苯乙烯板和载玻片可以用作基质。

用显色酶、荧光物质、发光物质、放射性同位素或金属螯合物标记上文步骤 4 的二抗。每一种常用标记物都可用于本发明, 而且过氧化物酶、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、辣根过氧化物酶、触酶(catalase)和乙酰胆碱酯酶是优选的显色酶。对于荧光物质, 优选使用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiochanate)、藻胆蛋白、若丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、正邻苯二醛等。

作为显色酶或荧光物质以外的另一种二抗标记物, 优选使用发光物质诸如异鲁米诺、光泽精、鲁米诺、吖啶鎓酯(acridinium ester)、imidazol、吖啶盐、荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白, 或者放射性同位素诸如 ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 和 ^{35}S 。另外, 还可以将小分子半抗原像生物素、二硝基苯基、pyridoxil 或荧光胺与抗体缀合。

在步骤4中使用显色酶的情况下,应当使用呈色底物来测量酶的活性,而且能够由二抗所结合的酶显色的每一种物质都可以用作呈色底物。优选使用4-氯-1-萘酚(4CN)、二氨基联苯胺(DAB)、氨基乙基咪唑(AEC)、2,2'-连氮基-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、邻苯二胺(OPD)和四甲基联苯胺(TMB)作为呈色底物。

作为上文步骤2的范例,可以使用患有β ig-h3相关疾病患者所有种类的体液。尤其优选患有肾病、肝病、类风湿性关节炎或心血管疾病患者的尿液、血液或滑液。

为了确认本发明用于测量β ig-h3蛋白质的量的方法是否正确,本发明人使用包含小鼠β ig-h3或β ig-h3第四个fas-1结构域的重组蛋白作为标准蛋白,并将结果与使用人β ig-h3作为标准蛋白获得的结果进行比较。

为了本发明用于测量β ig-h3的方法确定人β ig-h3蛋白质的最佳包被浓度和抗体的数量比率。抗人β ig-h3一抗的最佳数量比率是1:1600和1:2000(见图7),而二抗的最佳数量比率是1:2000(见图8)。人β ig-h3蛋白质的合适浓度是1.0 μ g/ml和0.5 μ g/ml,但是更优选0.5 μ g/ml作为包被浓度(见图9)。

因此,本发明人决定了人β ig-h3标准蛋白的最佳包被浓度是0.5 μ g/ml,而抗人β ig-h3一抗和二抗的最佳稀释比率皆为1:2000。

本发明人还确定了使用小鼠β ig-h3、重组β ig-h3 D-IV(1x)、β ig-h3 D-IV(2x)、β ig-h3 D-IV(3x)和β ig-h3 D-IV(4x)时蛋白质的浓度以及一抗和二抗的数量比率。确切的说,将每种蛋白质的包被浓度都调整至0.5 μ g/ml,将抗人β ig-h3一抗和二抗均稀释至1:2000,并进行定量测定法。同样,将抗小鼠β ig-h3一抗和二抗均稀释至1:2000,并进行定量测定法。

结果是,所有情况都得到了直线图,说明上述比率是最佳的,而且它们的测量范围在11ng/ml和900ng/ml之间,意味着在此测量范围内没有太大差异(见图11和图12)。

根据上述结果,证实了标准蛋白质可以是人β ig-h3、小鼠β ig-h3、重组β ig-h3 D-IV(1x)、β ig-h3 D-IV(2x)、β ig-h3 D-IV(3x)和β

ig-h3 D-IV (4x) 中的任一种, 而且抗人 β ig-h3 抗体或抗小鼠 β ig-h3 抗体可以用作一抗。

在本发明中, 标准蛋白的优选包被浓度是 0.1—2.0 μ g/ml, 更优选 0.5—1.0 μ g/ml。一抗和二抗的优选稀释比率是 1:400—1:3200, 更优选
5 1:2000。

本发明提供了用于肾病、肝病、类风湿性关节炎或心血管疾病的诊断试剂盒, 由此可以通过测量患者体液中 β ig-h3 蛋白质的量来诊断疾病。

本发明的诊断试剂盒包含 β ig-h3 蛋白质或 β ig-h3 蛋白质 fas-1 结构域的重组蛋白 (包括其片段或其衍生物) 及其配体。此时, 作为优选的
10 特异配体, 使用针对 β ig-h3 蛋白质或 β ig-h3 fas-1 结构域的抗体。试剂盒可以额外包含缓冲液、二抗、清洗液或呈色底物。

通过测量体液中 β ig-h3 蛋白质的量, 本发明的诊断试剂盒可用于诊断多种疾病, 诸如肾病、肝病、类风湿性关节炎或心血管疾病。

根据 β ig-h3 表达是由在肾病发展中发挥重要作用的 TGF- β 所诱导的
15 这一事实, 有可能通过测量 β ig-h3 蛋白质的量来诊断肾病。为了证明这一点, 测量糖尿病患者尿液中 β ig-h3 的量。结果是, 包括微蛋白尿症在内的糖尿病样肾病患者尿液中 β ig-h3 的量比正常人高大约 5 倍。一些未患肾病的糖尿病患者也显示 β ig-h3 的量比正常的高。根据上述结果, 尿液中的 β ig-h3 水平似乎反映了肾脏损伤的程度, 而一些未患肾病的糖尿
20 病患者所具有的高水平 β ig-h3 则说明他们的肾早已受到一定程度的损伤, 尽管尚未显示任何临床症状。因此, 测量患者尿液中 β ig-h3 的量是一种高度灵敏且重要的诊断方法, 它能够反映早期的肾脏损伤。

为了确认糖尿病患者尿液中的 β ig-h3 浓度是否能够反映早期的肾脏损伤, 测量了糖尿病动物中的 β ig-h3 浓度。结果是, 在诱发糖尿病 5 天
25 后 β ig-h3 浓度升高了 4 倍 (见图 13)。观察诱发糖尿病后各个个体中 β ig-h3 浓度的变化, 发现诱发糖尿病后导致尿液中的 β ig-h3 浓度大大升高 (见图 14)。在诱发糖尿病后第 5 天, 血尿和肌酸是正常的, 而且肾组织看上去是正常的。由此, 在诱发糖尿病第 5 天尿液中 β ig-h3 量的大大增加说明肾脏早已受到微小损伤, 而这是常规测试方法所检测不到的。

30 本发明人还通过测量肾移植患者在手术之前和之后尿液中 β ig-h3 的

量而证实了肾脏损伤与 β ig-h3 浓度之间的关联。结果是，手术前患者的高浓度 β ig-h3 在手术成功后逐渐下降。但是在 5 号患者的情况中，他的肾功能甚至在手术后也未恢复， β ig-h3 浓度仍然很高（见图 2）。根据所有上述结果，可以肯定 β ig-h3 浓度灵敏的反映了肾脏损伤的程度。

5 本发明人还测量了肾衰竭患者尿液中的 β ig-h3 浓度。结果是，所有那些肾衰竭患者都显示他们的尿样中有高浓度的 β ig-h3。由此，再次证实了尿液中 β ig-h3 的量灵敏的反映了甚至早期的肾脏损伤，因而测量 β ig-h3 的量对于多种肾病而言是非常重要的诊断方法（见表 3）。

确定慢性肝炎患者是否会发展成肝硬化患者是非常重要的，但是至今
10 尚无办法。形成肝硬化最重要的因素是 TGF- β 。因此，由 TGF- β 诱导表达的 β ig-h3 在血液中的浓度可能随着肝硬化的发展而升高。如果是这样，那么 β ig-h3 的量也能够反映肝硬化的程度。事实上，通过对肝炎患者肝组织的免疫组织学测试证实了 β ig-h3 表达随着肝硬化的恶化而增强。本发明人根据慢性肝炎患者的活组织检查结果将患者的状况细分成几
15 个等级和阶段，并调查了各个阶段和等级的血液 β ig-h3 浓度。慢性肝炎患者显示血液 β ig-h3 浓度比正常人高。较低阶段和等级的 β ig-h3 浓度证实比较高阶段和等级高（见表 5）。第 3 等级和第 3 阶段患者的状况是已经形成了严重的肝硬化，而且它的活性早已经过峰值。同时，第 1 和 2 等级以及第 1 和 2 阶段的患者显示炎症反应发展非常活跃的状况。由此， β
20 ig-h3 浓度意味着肝硬化活性，因而可以通过定期测量血液 β ig-h3 浓度来观察肝硬化的发展。

还测量了类风湿性关节炎患者和骨关节炎患者滑液中的 β ig-h3 浓度。结果是，在类风湿性关节炎患者的滑液中观察到高 2 倍的 β ig-h3 浓度，说明测量滑液中的 β ig-h3 浓度可能是诊断骨关节炎和类风湿性关节炎的有效方法（见表 6）。
25

另外，通过免疫组织化学方法调查了糖尿病小鼠正常和损伤血管中的 β ig-h3 表达模式，从而证实了 β ig-h3 表达与心血管疾病之间的关联。结果是， β ig-h3 蛋白质在糖尿病小鼠损伤血管中的表达大大高于正常血管（见图 18）。根据 β ig-h3 表达是由在血管病发展中发挥重要作用的 TGF- β 所诱导的
30 这一事实，调查了形成血管的血管平滑肌细胞中由 TGF- β 诱导

的 β ig-h3 表达。结果是，证实了 β ig-h3 表达随着 TGF- β 1 的量的增加而增加（见图 19）。

血液和组织中的 β ig-h3 表达反映了它们的损伤。由此，证实了本发明用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法能够有效用于多种血管病的诊断。

5 因此，本发明测量 β ig-h3 蛋白质的量的诊断试剂盒在使用中非常有效，因为它反映了肾病、肝病、类风湿性关节炎或心血管疾病的损伤和发展程度。

实施例

10 下面的实施例举例说明了本发明的实践和当前优选实施方案。

然而，应当理解的是，本领域熟练技术人员在考虑了本公开内容后，可以在本发明的精神和范围内进行修改和改进。

实施例 1：标准蛋白和一抗的制备

15 <1-1>人 β ig-h3 和小鼠 β ig-h3 的分离

本发明人已制备了人和小鼠 β ig-h3 蛋白质。图 1 显示了人和小鼠 β ig-h3 蛋白质的结构元件。图 1 中的斜线阴影区和交叉线阴影区显示重复的 fas-1 结构域 I、II、III 和 IV 中非常保守的序列，而空白区表示 RGD 基元。

20 用 *Nde* I 和 *Bgl* II 消化具有克隆到 pBluescript SK(-) 载体中由 SEQ. ID. No 2 所示碱基序列的 β ig-h3 cDNA (pBS β ig-h3; 通过克隆人皮肤乳头瘤细胞的 cDNA 得到的)，从而制备了具有平末端的 DNA 片段。将上述 DNA 片段亚克隆到 pET-29 β 载体 (购自 Novagen) 的 *EcoRV* 和 *EcoRI* 位点中。分离具有 SEQ. ID. No 3 所示 β ig-h3 第 69-653 位氨基酸的氨基酸序列的蛋白质，并命名为人 β ig-h3。

25 接着，用 *Bam*HI 和 *Xho* I 消化 β ig-h3 cDNA，从而制备了具有 SEQ. ID. No 4 所示碱基序列的 DNA 片段。将上述 DNA 片段亚克隆到 pET-29 β 载体的 *Bam*H I 和 *Xho* I 位点中。分离具有 SEQ. ID. No 5 所示 β ig-h3 第 23-641 位氨基酸的氨基酸序列的蛋白质，并命名为小鼠 β ig-h3。

30 为了表达上述人和小鼠 β ig-h3 蛋白质，转化大肠杆菌 BL21 (DE3)

细胞。将转化子在含卡那霉素 (50 μ g/ml) 的 LB 培养基中于 37°C 培养至它们的 OD₅₉₅ 达到 0.5—0.6。在培养过程中, 通过使用 1mM 异丙基- β -D-(-)-硫代半乳糖吡喃糖苷 (IPTG) 于 37°C 处理 3 小时来诱导 β ig-h3 蛋白质的表达。

- 5 将大肠杆菌细胞沉淀重悬于细胞裂解缓冲液 (50mM Tris-HCl pH8.0、100mM NaCl、1mM EDTA、1% Triton X-100、1mM 甲苯磺酰氟化物 (下文称为 “PMSF”) 和 0.5mM DTT), 然后通过超声处理进行破碎。将该流程重复 5 次。

10 将上述溶液离心, 并将含有 β ig-h3 的不溶性内含体溶于含 0.5M NaCl、5mM 咪唑和 8M 尿素的 20mM Tris-HCl 缓冲液中。使用 Ni-NTA 树脂 (Qiagen) 纯化蛋白质。为了纯化, 将蛋白质接连在尿素浓度由高至低的含 50mM NaCl 的 20mM Tris-HCl 缓冲液中透析, 并通过 SDS-PAGE 确认结果。

15 结果是, 证实了本发明的人 β ig-h3 和小鼠 β ig-h3 蛋白质得到了纯化 (图 2)。

<1-2> β ig-h3 D-IV (1x) 和 β ig-h3 D-IV (4x) 的构建和分离

20 通过 PCR 扩增 SEQ. ID. No 6 所示 DNA 片段, 该片段编码第四个结构域, 该结构域对应于 SEQ. ID. No 1 所示人 β ig-h3 的第 498—637 位氨基酸。将 PCR 产物克隆到 pET-29 β 载体中以构建第四个结构域的表达载体。本发明人将第四个结构域的表达载体命名为 “ β ig-h3 D-IV”。

25 通过 PCR 合成对应于第四个结构域的碱基序列, 并使用 Klenow 片段将 PCR 产物的 3' 末端补平。将该 PCR 产物插入上述表达载体 p β ig-h3 D-IV 的 *EcoRV* 位点, 并命名为 p β ig-h3 D-IV (2x)。用 *EcoRV* 和 *Xho I* 消化 p β ig-h3 D-IV (2x) 的插入片段, 并使用 Klenow 片段将片段的 3' 末端补平。将该片段插入 p β ig-h3 D-IV 的 *EcoRV* 位点, 并命名为 p β ig-h3 D-IV (3x)。同样, 将具有补平的 3' 末端的片段插入 p β ig-h3 D-IV (2x) 的 *EcoRV* 位点, 并命名为 p β ig-h3 D-IV (4x) (图 3)。通过将 6 个组氨酸残基连接到 DNA 片段的羧基末端而制备了 His 标签, 从而能够用 Ni-NTA
30 树脂 (Qiagen) 纯化蛋白质。

用表达载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞。将转化子在含卡那霉素 (50 μ g/ml) 的 LB 培养基中进行培养。将大肠杆菌细胞沉淀重悬于细胞裂解缓冲液 (50mM Tris-HCl pH8.0、100mM NaCl、1mM EDTA、1% Triton X-100、1mM 甲苯磺酰氟化物 (下文称为 “PMSF”) 和 0.5mM DTT), 然后通过超声处理进行破碎。将该流程重复 5 次。将上述溶液离心以获得上清液。使用 Ni-NTA 树脂 (Qiagen) 由上清液纯化蛋白质, 并通过 SDS-PAGE 确认。

结果是, 证实了具有 SEQ. ID. No 7 所示氨基酸序列的 β ig-h3 D-IV (1x)、具有 SEQ. ID. No 8 所示氨基酸序列的 β ig-h3 D-IV (2x)、具有 SEQ. ID. No 9 所示氨基酸序列的 β ig-h3 D-IV (3x)、和具有 SEQ. ID. No 10 所示氨基酸序列的 β ig-h3 D-IV (4x), 这些蛋白质都得到了表达。所有上述蛋白质都包含人 β ig-h3 的第四个结构域 (图 4)。

<1-3>一抗的制备和分离

使用实施例<1-1>中分离的人 β ig-h3 和小鼠 β ig-h3 蛋白质作为抗原来制备一抗。将蛋白质皮下注射到兔的背部。对于第一次注射, 将 200 μ g 蛋白质与弗氏完全佐剂混合, 然后注射。对于第 2 次至第 5 次注射, 将 100 μ g 蛋白质与弗氏不完全佐剂混合, 然后间隔 3 周注射。收集静脉血, 并于室温放置 2 小时。离心 (10,000xg, 10 分钟) 后, 获得含有一抗的上清液。将上清液保存于 -20 $^{\circ}$ C 以待进一步使用 (图 5)。

20

实施例 2: 人 β ig-h3 蛋白质的包被浓度和抗体的数量比率的确定

<2-1>一抗的数量比率的确定

为了确定抗人 β ig-h3 蛋白质一抗的数量比率, 用 20mM 碳酸盐-碳酸氢盐溶液 (pH9.6, 含 0.02% 叠氮化钠) 稀释人 β ig-h3 (0.5 μ g/ml)。将 β ig-h3 溶液加到 96 孔板的各个孔中 (200 μ l/孔), 并于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。用稀释液 (盐水-磷酸盐缓冲液/吐温 80) 将抗人 β ig-h3 一抗梯度稀释至 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:2000 和 1:3200, 并加到经过包被的 96 孔板中。将二抗 (1:5000) 也加到其中, 并于室温反应 1.5 小时。将底物溶液 (如下制备: 将邻苯二胺溶于甲醇 (10mg/ml), 用蒸馏水稀释至 1:100, 并与 10 μ l 30% 过氧化氢溶液混合) 也加到其中, 并于室温反应

30

1 小时。加入 50 μ l 8N 硫酸溶液终止反应，并进行 ELISA (O.D 492nm)。

结果是，证实了抗人 β ig-h3 一抗的最佳数量比率是 1:1600 和 1:2000 (图 7)。

5 <2-2>二抗的数量比率的确定

为了确定二抗的数量比率，用人 β ig-h3 蛋白质 (0.5 μ g/ml) 包被平板。将抗人 β ig-h3 一抗加到其中 (1:1600 和 1:2000)。加入二抗 (分别为 1:1000、1:2000 和 1:3000) 并进行反应。使用与上文实施例<2-1>相同的方法进行 ELISA。

10 结果是，证实了二抗的最佳数量比率是 1:2000 (图 8)。

<2-3>人 β ig-h3 蛋白质的包被浓度的确定

为了确定人 β ig-h3 蛋白质的包被浓度，将抗人 β ig-h3 一抗稀释至 1:2000，将二抗稀释至 1:2000，用人 β ig-h3 蛋白质 (分别为 0.5 μ g/ml
15 和 1.0 μ g/ml) 包被平板，然后进行 ELISA。

结果是，证实了 1.0 μ g/ml 和 0.5 μ g/ml 都是人 β ig-h3 蛋白质的合适浓度，但是 0.5 μ g/ml 作为包被浓度来说是最优选的，因为该浓度下 R^2 值最接近 1 (图 9)。

根据上述结果，本发明人决定了人 β ig-h3 标准蛋白的最佳包被浓度
20 是 0.5 μ g/ml，而抗人 β ig-h3 一抗和二抗的最佳稀释比率皆为 1:2000。

通过由下文<数学公式 1>表述的 Robard 公式 (Robard, 1971)，将由上述结果获得的数值进行 log 转化。结果是，由 11ng/ml 至 900ng/ml 形成一条线，这是测量的可能范围。还证实了甚至 10ng/ml 的范围在上述反应条件下仍有可能进行测量 (图 10)。

25 <数学公式 1>

$$\log b = \log e^{b/(100-b)}$$

在上文公式中，b 表示相对于各个浓度的不含任何抗原的孔的 OD 的百分比。

30 实施例 3：通过交叉测试测量小鼠 β ig-h3、重组 β ig-h3 D-IV (1x) 和 β

ig-h3 D-IV (4x) 的数量范围

本发明人还使用小鼠 β ig-h3、重组 β ig-h3 D-IV(1x)和 β ig-h3 D-IV (4x) 确定了蛋白质的浓度以及一抗和二抗的数量比率。具体而言, 就是确定了实验中各种蛋白质的包被浓度均为 $0.5 \mu\text{g/ml}$, 而且抗人 β ig-h3 一抗和二抗的数量比率均为 1:2000。将抗小鼠 β ig-h3 一抗和二抗的数量比率也均调整为 1:2000。

结果是, 所有情况都得到了直线图, 说明上述比率是最佳的, 而且它们的范围在 11ng/ml 和 900ng/ml 之间, 意味着在此测量范围内没有太大差异 (图 11 和图 12)。

根据上述结果, 证实了标准蛋白质可以是人 β ig-h3、小鼠 β ig-h3、重组 β ig-h3 D-IV (1x) 和 β ig-h3 D-IV (4x) 中的任一种, 而抗人 β ig-h3 抗体或抗小鼠 β ig-h3 抗体可以用作一抗。

实施例 4: 肾病与 β ig-h3 表达之间的关联

<4-1>测量糖尿病患者中的 β ig-h3

根据 β ig-h3 表达是由在肾病发展中发挥重要作用的 TGF- β 所诱导的这一事实, 本发明人已证实了肾病与 β ig-h3 表达之间的关联。为了证明这一点, 测量糖尿病患者尿液中 β ig-h3 的量。具体而言, 就是将 $110 \mu\text{l}$ 糖尿病患者的尿液与 $110 \mu\text{l}$ 一抗 (1:1000) 在圆底平板中混合, 并于 37°C 保温 1 小时。将 $200 \mu\text{l}$ 上述混合物添加到经 β ig-h3 包被的平板上, 并于室温反应 30 分钟。加入二抗-底物终止液终止反应, 并进行 ELISA (0.492nm)。

<表 1>

糖尿病患者尿液中的 β ig-h3 浓度

样品	β ig-h3 (ng/ml)
正常	31.0 (n=93, ± 8.6)
II 型 DM	101.9 (n=51, ± 17.1)
II 型 DM+微量蛋白尿	127.4 (n=30, ± 27.7)
II 型 DM+明显蛋白尿	105.4 (n=19, ± 14.9)
II 型 DM+CRF	153.6 (n=93, ± 28.1)

结果是，包括微蛋白尿的糖尿病样肾病患者尿液中 β ig-h3 的量比正常人高大约 5 倍。一些未患肾病的糖尿病患者也显示 β ig-h3 的量比正常的高。根据上述结果，尿液中的 β ig-h3 水平似乎反映了肾脏损伤的程度，而一些未患肾病的糖尿病患者所具有的高水平 β ig-h3 则说明他们的肾早已受到一定程度的损伤，尽管尚未显示任何临床症状。因此，测量患者尿液中 β ig-h3 的量是一种高度灵敏且重要的诊断方法，它能够反映早期的肾脏损伤。

<4-2>测量糖尿病动物模型中的 β ig-h3

为了确认糖尿病患者尿液中的 β ig-h3 浓度是否能够反映早期的肾脏损伤，本发明人测量了糖尿病动物中 β ig-h3 的量。

通过将一种诱发糖尿病的药物链佐星 (60mg/kg) 注射到大鼠的腹腔内，在 Sprague-Dawley (SD) 大鼠中诱发了糖尿病。通过测量大鼠的血糖而确认诱发了糖尿病。在诱发糖尿病后第 5 天由大鼠采集尿样，并使用与实施例<4-1>相同的方法测量 β ig-h3 的量。

结果是，在诱发糖尿病 5 天后 β ig-h3 的量增加了 4 倍 (56.9 ± 6.4 ng/mg 肌酸: 230.4 ± 131.8 ng/mg 肌酸，图 13)。观察诱发糖尿病后各个个体中 β ig-h3 量的变化，发现诱发糖尿病后导致尿液中 β ig-h3 的量大大增加 (图 14)。在诱发糖尿病后第 5 天，血尿和肌酸是正常的，而且肾组织看上去是正常的。因此，在诱发糖尿病第 5 天尿液中 β ig-h3 量的大大增加说明肾脏早已受到微小损伤，而这是常规方法所检测不到的。

<4-3>测量肾移植患者中的 β ig-h3

本发明人通过测量患者在肾移植之前和之后尿液中 β ig-h3 的量而证实了肾脏损伤与 β ig-h3 的量之间的关联。结果见表 2。

<表 2>

患者在肾移植之前和之后 β ig-h3 浓度的变化

天 / 患者	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	成功与否
1				376.9	199.2	105.6	59.1	67.6	84.5	63.1	61.2	39.7	9.9	0

2		149.2	147.3	133.5	159.5	148.3	147.3	96.0	74.0	40.7	20.3	27.9	26.4	0
3	107.8	95.8	101.4	102.3	102.2	106.1	106.6	125.5	83.5	49.4	36.5	33.3	23.2	0
4							298.8	208.1	140.5	169.9	188.4	76.3	24.4	0
5							188.6	160.7	469.3	290.9	494.7	324.4	-	X

结果是，手术前患者的高 β ig-h3 量在手术成功后逐渐下降。但是在 5 号患者的情况中，他的肾功能甚至在肾移植之后也未恢复， β ig-h3 的量仍然很高。根据所有上述结果，可以肯定 β ig-h3 的量灵敏的反映了肾脏损伤的程度。

5

<4-4>测量肾衰竭患者中的 β ig-h3

本发明人测量了肾衰竭患者尿液中 β ig-h3 的量。结果是，所有那些患者都显示他们的尿样中有大量的 β ig-h3 (表 3)。

<表 3>

10 肾衰竭患者尿液中的 β ig-h3 浓度

样品	β ig-h3 (ng/mg)
正常人	31.0 (n=93, \pm 8.6)
慢性肾衰竭	335.4 (n=9, \pm 56.0)

<4-5>测量肾相关疾病患者中的 β ig-h3

为了调查肾病患者中 β ig-h3 的表达是否不同，本发明人使用与实施例<4-1>相同的方法测量了由肾移植后显示正常症状的患者、所移植的肾脏较小的患者、显示慢性排斥的患者、肾盂炎复发的患者和具有 cyclosporine 毒性的患者采集的尿液中的 β ig-h3 浓度。

结果是，肾移植后症状正常的患者显示 β ig-h3 浓度平均为 34.9ng/mg 肌酸，而有慢性排斥、复发性肾盂炎和 cyclosporine 毒性的患者都显示 β ig-h3 浓度大大增加(分别为 140.8、175.4 和 90.9ng/mg 肌酸)(图 15, 20 表 4)。

〈表 4〉

β ig-h3	肾移植后正常 (n=47)	用小肾移植 (n=16)	慢性排斥 (n=15)	肾盂炎复发 (n=6)	cyclosporine 毒性 (n=6)
平均值	39.4±18.2	54.7±23.0	140.8±81.1	175.4±65.8	90.9±22.4
最小值	9.4	17.9	48.8	83.2	64.6
最大值	84.7	100.0	374.4	249.8	119.4

本发明人还调查了复发肾病患者中升高的 β ig-h3 浓度在治疗生效时是否再次下降。结果，通过血浆交换来治疗肾移植后复发性肾盂炎的患者尿液 β ig-h3 浓度逐渐降低，说明尿液 β ig-h3 浓度在治疗生效时下降。

5 因此， β ig-h3 浓度可以用作治疗反应的标志（图 16）。

〈4-6〉分析肾移植对 β ig-h3 浓度的影响

为了调查肾移植后尿液 β ig-h3 浓度的变化，本发明人测量了接受肾移植患者每天的尿液 β ig-h3 浓度。

10 结果是，不管肾是来自活着的人还是脑死亡的人，成功接受肾移植的患者的尿液 β ig-h3 浓度都逐渐下降。确切的说，对于接受来自活着的人的肾，尿液 β ig-h3 浓度在移植后 4—5 天内恢复到正常水平，而对于接受来自脑死亡的人的肾， β ig-h3 浓度在 6—7 天内恢复到正常水平（图 17）。

15 此外，对于接受小肾的患者，尿液 β ig-h3 浓度在移植后恢复到正常水平，尽管他们的血液肌酸值仍然偏高，说明移植的肾工作正常，尽管它因尺寸较小而不能将废弃产物彻底过滤掉。无论如何，反映肾脏损伤程度的 β ig-h3 浓度恢复到了正常水平（图 17）。同时，肾移植不成功的患者的尿液 β ig-h3 浓度则波动很大。

20 根据这些结果，尿液 β ig-h3 浓度可以作为早期肾病诊断的有效标志，用于检测肾病的发展和用于确定治疗效果，因为 β ig-h3 浓度很好的反映了肾脏损伤。

因此，本发明人证实了尿液 β ig-h3 浓度灵敏的反映了早期的肾脏损伤，而且对于诊断多种肾病而言是重要且有用的。

25 实施例 5：肝病与 β ig-h3 表达之间的关联

确定慢性肝炎患者是否会发展成肝硬化患者是非常重要的，但是至今尚无办法。形成肝硬化最重要的因素是 TGF- β 。因此，由 TGF- β 诱导表达的 β ig-h3 在血液中的浓度可能随着肝硬化发展而升高。如果是这样，那么 β ig-h3 的量也能够反映肝硬化的程度。事实上，通过对肝炎患者肝组织的免疫组织学测试证实了 β ig-h3 表达随着肝硬化的恶化而增强。本发明人根据慢性肝炎患者的活组织检查结果将患者的状况细分成几个等级和阶段，并调查了各个阶段和等级的血液 β ig-h3 浓度。具体而言，本发明人由慢性肝炎患者采集了血液，并使用与实施例<4-1>相同的方法测量了 β ig-h3 的量。结果见表 5。

10 <表 5>慢性肝炎患者血液中 β ig-h3 的浓度

等级	β ig-h3 (ng/mg)	阶段	β ig-h3 (ng/mg)
0 (正常)	146.2 (n=172, \pm 28.5)	0 (正常)	146.2 (n=172, \pm 28.5)
1	196.6 (n=16, \pm 30.6)	1	193.4 (n=20, \pm 30.2)
2	190.0 (n=43, \pm 72.8)	2	192.2 (n=36, \pm 79.1)
3	167.5 (n=7, \pm 21.9)	3	172.5 (n=10, \pm 21.9)

结果是，慢性肝炎患者显示血液 β ig-h3 浓度比正常人高，而且较低阶段和等级（1 和 2）的 β ig-h3 浓度证实比较高阶段和等级（3）高。第 3 等级和第 3 阶段患者的状况是已经形成了严重的肝硬化，而且它的活性早已经过峰值。同时，第 1 和 2 等级以及第 1 和 2 阶段的患者显示炎症反应发展非常活跃的状况。因此， β ig-h3 浓度意味着肝硬化活性，因而可以通过定期测量血液 β ig-h3 浓度来观察肝硬化发展。

实施例 6：类风湿性关节炎与 β ig-h3 表达之间的关联

使用与实施例<4-1>相同的方法，本发明人通过测量骨关节炎和类风湿性关节炎患者滑液中 β ig-h3 的量证实了类风湿性关节炎与 β ig-h3 表达之间的关联（表 6）。

<表 6>

滑液中的 β ig-h3 浓度

	β ig-h3 (ng/mg)
骨关节炎	11.0 (n=29, \pm 0.3)
类风湿性关节炎	21.0 (n=20, \pm 2.5)

5 结果是，在类风湿性关节炎患者的滑液中观察到高 2 倍的 β ig-h3 浓度，说明测量滑液中的 β ig-h3 浓度可能是诊断骨关节炎和类风湿性关节炎的有效方法。

实施例 7：心血管疾病与 β ig-h3 表达之间的关联

<7-1>测量诱发糖尿病小鼠的损伤血管中的 β ig-h3

10 本发明人通过免疫组织化学方法调查了糖尿病小鼠正常和损伤血管中的 β ig-h3 表达模式，从而证实了 β ig-h3 表达与心血管疾病之间的关联。

结果是， β ig-h3 蛋白质在糖尿病小鼠损伤血管中的表达大大高于正常血管（图 18）。

15 <7-2>测量血管平滑肌细胞中由 TGF- β 诱导的 β ig-h3 表达

根据 β ig-h3 表达是由在血管病发展中发挥重要作用的 TGF- β 所诱导的这一事实，本发明人试图确认 β ig-h3 表达与心血管疾病之间的关联。具体而言，本发明人使用与实施例<4-1>相同的方法测量了形成血管的血管平滑肌细胞中由 TGF- β 1 诱导的 β ig-h3 表达模式。

20 结果是，证实了 β ig-h3 表达随着 TGF- β 1 的量的增加而增加(图 19)。

根据上述结果，证实了血液和组织中的 β ig-h3 表达反映了它们的损伤。因此，本发明用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法能够有效用于多种心血管疾病的诊断。

25

工业应用

如上所述，本发明用于测量 β ig-h3 蛋白质的量的方法在用于测量各种体液中的 β ig-h3 浓度时花费不多且非常精确，在本发明方法中使用人

β ig-h3、小鼠 β ig-h3、 β ig-h3 D-IV (1x) 或 β ig-h3 D-IV (4x) 作为标准蛋白。 β ig-h3 的量灵敏的反映了早期的 TGF- β 相关疾病, 诸如肾病、肝病、类风湿性关节炎和心血管疾病, 使得本发明的方法能够有效的用于检查那些疾病的损伤和发展及其诊断。

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

Gly Asn His Leu Ser Gly Ser Glu Arg Leu Thr Leu Leu Ala Pro Leu
 405 410 415

Asn Ser Val Phe Lys Asp Gly Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg
 420 425 430

Asn Leu Leu Arg Asn His Ile Ile Lys Asp Gln Leu Ala Ser Lys Tyr
 435 440 445

Leu Tyr His Gly Gln Thr Leu Glu Thr Leu Gly Gly Lys Lys Leu Arg
 450 455 460

Val Phe Val Tyr Arg Asn Ser Leu Cys Ile Glu Asn Ser Cys Ile Ala
 465 470 475 480

Ala His Asp Lys Arg Gly Arg Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Met Asp Arg
 485 490 495

Val Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp
 500 505 510

Asn Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr
 515 520 525

Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn
 530 535 540

Glu Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly
 545 550 555 560

Asp Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu
 565 570 575

Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu
 580 585 590

Gln Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val
 595 600 605

Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val
 610 615 620

Val His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Arg Pro Gln
 625 630 635 640

Glu Arg Gly Asp Glu Leu Ala Asp Ser Ala Leu Glu Ile Phe Lys Gln
 645 650 655

Ala Ser Ala Phe Ser Arg Ala Ser Gln Arg Ser Val Arg Leu Ala Pro
 660 665 670

Val Tyr Gln Lys Leu Leu Glu Arg Met Lys His
 675 680

<210> 2

<211> 2691

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

```

gcttgcccgt cggtcgctag ctgctcggt ggcgctgct ccgctccatg gcgctcttcg      60
tgccgctgct ggctctcgcc ctggctctgg ccctggggcc cgccgcgacc ctggcgggct      120
ccgccaagtc gccctaccag ctggtgctgc agcacagcag gctccggggc cgccagcagc      180
gccccaacgt gtgtgctgtg cagaaggtta ttggcactaa taggaagtac ttcaccaact      240
gcaagcagtg gtaccaaagg aaaatctgtg gcaaatcaac agtcatcagc tacgagtgct      300
gtcctggata tgaaaaggtc cctggggaga agggctgtcc agcagcccta ccactctcaa      360
acctttacga gaccctggga gtcgttgat ccaccaccac tcagctgtac acggaccgca      420
cggagaagct gaggcctgag atggaggggc ccggcagctt caccatcttc gccctagca      480
acgaggcctg ggccctcctg ccagctgaag tgctggactc cctggtcagc aatgtcaaca      540
ttgagctgct caatgcctc cgctaccata tgggtggcag gogagtctg actgatgagc      600
tgaaacacgg catgaccctc acctctatgt accagaatc caacatccag atccaccact      660
atcctaattg gattgtaact gtgaactgtg cccggctcct gaaagccgac caccatgcaa      720
ccaacggggg ggtgcacctc atcgataagg tcctctccac catcaccaac aacatccagc      780
agatcattga gatcgaggac acctttgaga cccttggggc tgctgtggct gcatcagggc      840
tcaacacgat gcttgaaggc aacggccagt acacgctttt ggccccgacc aatgaggcct      900
tcgagaagat ccctagttag actttgaacc gtatcctggg cgaccagaa gccctgagag      960
acctgctgaa caaccacatc ttgaagtcag ctatgtgtgc tgaagccatc gttgcggggc     1020

```

tgtctgtaga gaccctggag ggcacgacac tggaggtggg ctgcagcggg gacatgctca	1080
ctatcaacgg gaaggcgatc atctccaata aagacatcct agccaccaac ggggtgatcc	1140
actacattga tgagctactc atcccagact cagccaagac actatttgaa ttggctgcag	1200
agtctgatgt gtccacagcc attgacctt tccagacaagc cggcctcggc aatcatctct	1260
ctggaagtga gcggttgacc ctctggctc ccctgaattc tgtattcaaa gatggaacct	1320
ctccaattga tgcccataca aggaatttgc ttcggaacca cataattaa gaccagctgg	1380
cctctaagta tctgtaccat ggacagacct tggaaactct gggcggcaaa aaactgagag	1440
ttttgttta tcgtaatagc ctctgcattg agaacagctg catcgcggcc caccacaaga	1500
gggggaggta cgggacctg ttcacgatgg accgggtgct gacccccca atggggactg	1560
tcattgatgt cctgaaggga gacaatcgtc ttagcatgct ggtagctgcc atccagtctg	1620
caggactgac ggagacctc aaccgggaag gactctacac agtctttgct cccacaaatg	1680
aagccttccg agccttgcca ccaagagaac ggagcagact cttgggagat gccaaagAAC	1740
ttgccaacat cctgaaatac cacattggtg atgaaatcct ggttagcggg ggcattcggg	1800
ccctggtgcg gctaaagtct ctccaagggtg acaagctgga agtcagcttg aaaaacaatg	1860
tggtgagtgt caacaaggag cctggtgccc agcctgacat catggccaca aatggcgtgg	1920
tccatgtcat caccaatggt ctgcagcctc cagccaacag acctcaggaa agaggggatg	1980
aacttgcaga ctctgcgctt gagatcttca aacaagcatt agcgttttcc agggcttccc	2040
agaggtctgt gcgactagcc cctgtctatc aaaagttatt agagaggatg aagcattagc	2100
ttgaagcact acaggaggaa tgcaccacgg cagctctccg ccaatttctc tcagatttcc	2160
acagagactg tttgaatggt ttcaaaacca agtatcacac tttaatgtac atgggcccga	2220
ccataatgag atgtgagcct tgtgcatgtg ggggaggagg gagagagatg tactttttaa	2280
atcatgttcc ccctaaacat ggctgttaac ccaactgcatg cagaaacttg gatgtcactg	2340
cctgacattc acttccagag aggaacctatc ccaaagtgtg aattgactgc ctatgccaaag	2400

tccctggaaa aggagcttca gtattgtggg gctcataaaa catgaatcaa gcaatccagc 2460
 ctcatgggaa gtcctggcac agtttttgta aagcccttgc acagctggag aaatggcatc 2520
 attataagct atgagttgaa atgttctgtc aaatgtgtct cacatctaca cgtggcttgg 2580
 aggcttttat ggggccctgt ccaggtagaa aagaaatggt atgtagagct tagatttccc 2640
 tattgtgaca gagccatggt gtgtttgtaa taataaaacc aaagaaacat a 2691

<210> 3

<211> 585

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 肽

<222> (1)..(585)

<223> 人 ID No. 1 的 69-653 氨基酸序列

<400> 3

Tyr Gln Arg Lys Ile Cys Gly Lys Ser Thr Val Ile Ser Tyr Glu Cys
 1 5 10 15

Cys Pro Gly Tyr Glu Lys Val Pro Gly Glu Lys Gly Cys Pro Ala Ala
 20 25 30

Leu Pro Leu Ser Asn Leu Tyr Glu Thr Leu Gly Val Val Gly Ser Thr
 35 40 45

Thr Thr Gln Leu Tyr Thr Asp Arg Thr Glu Lys Leu Arg Pro Glu Met
 50 55 60

Glu Gly Pro Gly Ser Phe Thr Ile Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp
 65 70 75 80

Ala Ser Leu Pro Ala Glu Val Leu Asp Ser Leu Val Ser Asn Val Asn
 85 90 95

Ile Glu Leu Leu Asn Ala Leu Arg Tyr His Met Val Gly Arg Arg Val
 100 105 110

Leu Thr Asp Glu Leu Lys His Gly Met Thr Leu Thr Ser Met Tyr Gln
 115 120 125

Asn Ser Asn Ile Gln Ile His His Tyr Pro Asn Gly Ile Val Thr Val
 130 135 140

Asn Cys Ala Arg Leu Leu Lys Ala Asp His His Ala Thr Asn Gly Val
 145 150 155 160

Val His Leu Ile Asp Lys Val Ile Ser Thr Ile Thr Asn Asn Ile Gln
 165 170 175

Gln Ile Ile Glu Ile Glu Asp Thr Phe Glu Thr Leu Arg Ala Ala Val
 180 185 190

Ala Ala Ser Gly Leu Asn Thr Met Leu Glu Gly Asn Gly Gln Tyr Thr
 195 200 205

Leu Leu Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Ile Pro Ser Glu Thr
 210 215 220

Leu Asn Arg Ile Leu Gly Asp Pro Glu Ala Leu Arg Asp Leu Leu Asn
 225 230 235 240

Asn His Ile Leu Lys Ser Ala Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Ala Gly
 245 250 255

Leu Ser Val Glu Thr Leu Glu Gly Thr Thr Leu Glu Val Gly Cys Ser
 260 265 270

Gly Asp Met Leu Thr Ile Asn Gly Lys Ala Ile Ile Ser Asn Lys Asp
 275 280 285

Ile Leu Ala Thr Asn Gly Val Ile His Tyr Ile Asp Glu Leu Leu Ile
 290 295 300

Pro Asp Ser Ala Lys Thr Leu Phe Glu Leu Ala Ala Glu Ser Asp Val
 305 310 315 320

Ser Thr Ala Ile Asp Leu Phe Arg Gln Ala Gly Leu Gly Asn His Leu
 325 330 335

Ser Gly Ser Glu Arg Leu Thr Leu Leu Ala Pro Leu Asn Ser Val Phe
 340 345 350

Lys Asp Gly Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg Asn Leu Leu Arg
 355 360 365

Asn His Ile Ile Lys Asp Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Leu Tyr His Gly
 370 375 380

Gln Thr Leu Glu Thr Leu Gly Gly Lys Lys Leu Arg Val Phe Val Tyr
385 390 395 400

Arg Asn Ser Leu Cys Ile Glu Asn Ser Cys Ile Ala Ala His Asp Lys
405 410 415

Arg Gly Arg Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Met Asp Arg Val Leu Thr Pro
420 425 430

Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser
435 440 445

Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn
450 455 460

Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg
465 470 475 480

Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu
485 490 495

Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser
500 505 510

Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys
515 520 525

Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro
530 535 540

Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile
545 550 555 560

Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Arg Pro Gln Glu Arg Gly Asp
565 570 575

Glu Leu Ala Asp Ser Ala Leu Glu Ile
580 585

<210> 4

<211> 1857

<212> DNA

<213> 小鼠脑池内 A-颗粒

<400> 4

gcaggtcccg ccaagtcacc ctaccagctg gtgctgcagc atagccggct ccggggctgc	60
cagcacggcc ccaatgtatg tgctgtgcag aaggctattg gcaccaacaa gaaatacttc	120
accaactgca agcagtggtg ccagaggaag atctgcggca agtcgacagt catcagttat	180
gagtgtctgtc ctggatatga aaaggtocca ggagagaaag gttgcccgagc agctcttccg	240
ctctcaaatc tgtatgagac catgggagtt gtgggatcga ccaccacaca gctgtataca	300
gaccgcacag aaaagctgag gcctgagatg gagggaccgc gaagcttcac catctttgct	360
cctagcaatg aggcctggtc ttccttgctt gcggaagtgc tggactccct ggtgagcaac	420
gtcaacatcg aactgctcaa tgctctccgc taccacatgg tggacaggcg ggtcctgacc	480
gatgagctca agcacggcat gaccctcacc tccatgtacc agaattcaa catccagatc	540
catcactatc ccaatgggat tgtaactggt aactgtgcc ggctgctgaa ggctgaccac	600
catgcgacca acggcgtggt gcatctcatt gacaaggcca tttccaccat caccaacaac	660
atccagcaga tcattgaaat cgaggacacc tttgagacac ttcgggccgc cgtggctgca	720
tcaggactca ataccgtgct ggagggcgac ggccagttca cactcttggc cccaaccaac	780
gaggcctttg agaagatccc tgccgagacc ttgaaccgca tcctgggtga ccagaggca	840
ctgagagacc tgctaaacaa ccacatcctg aagtcagcca tgtgtgctga ggccattgta	900
gctggaatgt ccatggagac cctggggggc accacactgg aggtgggctg cagtggggac	960
aagctcacca tcaacgggaa ggctgtcatc tccaacaaag acatcctggc caccaacggt	1020
gtcattcatt tcattgatga gctgcttacc ccagattcag ccaagacact gcttgagctg	1080
gctggggaat ctgacgtctc cactgccatt gacatcctca aacaagctgg cctcgatact	1140
catctctctg ggaaagaaca gttgacctc ctggccccc tgaattctgt gttcaaagat	1200
gggtgccctc gcatcgacgc ccagatgaag actttgcttc tgaaccacat ggtcaaagaa	1260
cagttggcct ccaagtatct gtactctgga cagacactgg acacgctggg tggcaaaaag	1320
ctgcgagtct ttgtttatcg aaatagcctc tgcatgaaa acagctgcat tgctgcccat	1380
gataagaggg gacggtttgg gaccctgttc accatggacc ggatgttgac acccccaatg	1440

gggacagtta tggatgtcct gaagggagac aatcgtttta gcatgctggt ggccgcatc 1500
 cagtctgcag gactcatgga gatcctcaac cggaagggg tctacactgt ttttgctccc 1560
 accaatgaag cgttccaagc catgcctcca gaagaactga acaaactctt ggcaaatgcc 1620
 aaggaactta ccaacatcct gaagtaccac attggtgatg aaatcctggt tagcggaggc 1680
 atcggggccc tgggtcggct gaagtctctc caaggggaca aactggaagt cagctcgaaa 1740
 aacaatgtag tgagtgtcaa taaggagcct gttgccgaaa ccgacatcat ggccacaaac 1800
 ggtgtggtct atgcatcaa cactgttctg cagccgccag ccaaccgacc acaagaa 1857

<210> 5

<211> 609

<212> PRT

<213> 小鼠脑池内 A-颗粒

<220>

<221> 肽

<222> (1)..(609)

<223> 小鼠的 23-641 氨基酸序列

<400> 5

Ala Gly Pro Ala Lys Ser Pro Tyr Gln Leu Val Leu Gln His Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Arg Gln His Gly Pro Asn Val Cys Ala Val Gln Lys Val
 20 25 30
 Ile Gly Thr Asn Arg Lys Tyr Phe Thr Asn Cys Lys Gln Trp Tyr Gln
 35 40 45
 Arg Lys Ile Cys Gly Lys Ser Thr Val Ile Ser Tyr Glu Cys Cys Pro
 50 55 60
 Gly Tyr Glu Lys Val Pro Gly Glu Lys Gly Cys Pro Ala Ala Leu Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Asn Leu Tyr Glu Thr Leu Gly Val Val Gly Ser Thr Thr Thr
 85 90 95
 Gln Leu Tyr Thr Asp Arg Thr Glu Lys Leu Arg Pro Glu Met Glu Gly

100	105	110
Pro Gly Ser Phe Thr Ile	Phe Ala Pro Ser Asn	Glu Ala Trp Ala Ser
115	120	125
Leu Pro Ala Glu Val Leu	Asp Ser Leu Val Ser	Asn Val Asn Ile Glu
130	135	140
Leu Leu Asn Ala Leu Arg	Tyr His Met Val Gly	Arg Arg Val Leu Thr
145	150	155
Asp Glu Leu Lys His Gly	Met Thr Leu Thr Ser	Met Tyr Gln Asn Ser
165	170	175
Asn Ile Gln Ile His His	Tyr Pro Asn Gly Ile	Val Thr Val Asn Cys
180	185	190
Ala Arg Leu Leu Lys Ala	Asp His His Ala Thr	Asn Gly Val Val His
195	200	205
Leu Ile Asp Lys Val Ile	Ser Thr Ile Thr Asn	Asn Ile Gln Gln Ile
210	215	220
Ile Glu Ile Glu Asp Thr	Phe Glu Thr Leu Arg	Ala Ala Val Ala Ala
225	230	235
Ser Gly Leu Asn Thr Met	Leu Glu Gly Asn Gly	Gln Tyr Thr Leu Leu
245	250	255
Ala Pro Thr Asn Glu Ala	Phe Glu Lys Ile Pro	Ser Glu Thr Leu Asn
260	265	270
Arg Ile Leu Gly Asp Pro	Glu Ala Leu Arg Asp	Leu Leu Asn Asn His
275	280	285
Ile Leu Lys Ser Ala Met	Cys Ala Glu Ala Ile	Val Ala Gly Leu Ser
290	295	300
Val Glu Thr Leu Glu Gly	Thr Thr Leu Glu Val	Gly Cys Ser Gly Asp
305	310	315
Met Leu Thr Ile Asn Gly	Lys Ala Ile Ile Ser	Asn Lys Asp Ile Leu
325	330	335
Ala Thr Asn Gly Val Ile	His Tyr Ile Asp Glu	Leu Leu Ile Pro Asp
340	345	350

Ser Ala Lys Thr Leu Phe Glu Leu Ala Ala Glu Ser Asp Val Ser Thr
 355 360 365

Ala Ile Asp Leu Phe Arg Gln Ala Gly Leu Gly Asn His Leu Ser Gly
 370 375 380

Ser Glu Arg Leu Thr Leu Leu Ala Pro Leu Asn Ser Val Phe Lys Asp
 385 390 395 400

Gly Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg Asn Leu Leu Arg Asn His
 405 410 415

Ile Ile Lys Asp Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Leu Tyr His Gly Gln Thr
 420 425 430

Leu Glu Thr Leu Gly Gly Lys Lys Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Asn
 435 440 445

Ser Leu Cys Ile Glu Asn Ser Cys Ile Ala Ala His Asp Lys Arg Gly
 450 455 460

Arg Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Met Asp Arg Val Leu Thr Pro Pro Met
 465 470 475 480

Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met Leu
 485 490 495

Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg Glu
 500 505 510

Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala Leu
 515 520 525

Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Leu Ala
 530 535 540

Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly Gly
 545 550 555 560

Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys Leu Glu
 565 570 575

Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val Ala
 580 585 590

Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr Asn
 595 600 605

Val

<210> 6
 <211> 391
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> β ig-h3 D-IV

<400> 6
 gtttgggacc ctgttcacca tggaccggat gttgacaccc ccaatgggga cagttatgga 60
 tgtcctgaag ggagacaatc gttttagcat gctggtggcc gccatccagt ctgcaggact 120
 catggagatc ctcaaccggg aaggggtcta cactgttttt gctcccacca atgaagcgtt 180
 ccaagccatg cctccagaag aactgaacaa actcttggca aatgccaaagg aacttaccaa 240
 catcctgaag taccacattg gtgatgaaat cctgggttagc ggagggcatcg gggccttggt 300
 gcggctgaag tctctccaag gggacaaact ggaagtcagc tcgaaaaaca atgtagtgag 360
 tgtcaataag gagcctggtg ccgaaaccga c 391

<210> 7
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> β ig-h3 D-IV(1X) 氨基酸序列

<400> 7
 Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn
 1 5 10 15
 Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu
 20 25 30
 Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu

	85	90	95
Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn	100	105	110
Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val	115	120	125
His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Leu Thr Pro Pro	130	135	140
Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met	145	150	155
Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg	165	170	175
Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala	180	185	190
Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Leu	195	200	205
Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly	210	215	220
Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys Leu	225	230	235
Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val	245	250	255
Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr	260	265	270
Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn	275	280	

<210> 9

<211> 420

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> β ig-h3 D-IV(3X) 氨基酸序列

```

<400> 9
Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn
 1           5           10           15

Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu
      20           25           30

Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu
      35           40           45

Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp
      50           55           60

Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile
      65           70           75           80

Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln
      85           90           95

Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn
      100          105          110

Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val
      115          120          125

His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Leu Thr Pro Pro
      130          135          140

Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met
      145          150          155          160

Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg
      165          170          175

Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala
      180          185          190

Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Leu
      195          200          205

Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly
      210          215          220

Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys Leu
      225          230          235          240

```

Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val
 245 250 255

Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr
 260 265 270

Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val
 275 280 285

Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala
 290 295 300

Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr
 305 310 315 320

Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg
 325 330 335

Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu
 340 345 350

Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala
 355 360 365

Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu
 370 375 380

Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp
 385 390 395 400

Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln
 405 410 415

Pro Pro Ala Asn
 420

<210> 10
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> β ig-h3 D-IV(4X) 氨基酸序列

<400> 10

Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn
 1 5 10 15
 Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu
 20 25 30
 Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu
 35 40 45
 Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp
 50 55 60
 Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile
 65 70 75 80
 Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln
 85 90 95
 Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn
 100 105 110
 Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val
 115 120 125
 His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Leu Thr Pro Pro
 130 135 140
 Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg
 165 170 175
 Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala
 180 185 190
 Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Leu
 195 200 205
 Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly
 210 215 220
 Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys Leu
 225 230 235 240
 Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val
 245 250 255

Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr
260 265 270

Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val
275 280 285

Met Asp Val Leu Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala
290 295 300

Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr
305 310 315 320

Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg
325 330 335

Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu
340 345 350

Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala
355 360 365

Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu Gln Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu
370 375 380

Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp
385 390 395 400

Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln
405 410 415

Pro Pro Ala Asn Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu
420 425 430

Lys Gly Asp Asn Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala
435 440 445

Gly Leu Thr Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala
450 455 460

Pro Thr Asn Glu Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg
465 470 475 480

Leu Leu Gly Asp Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile
485 490 495

Gly Asp Glu Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu

500					505					510									
Lys	Ser	Leu	Gln	Gly	Asp	Lys	Leu	Glu	Val	Ser	Leu	Lys	Asn	Asn	Val				
515					520					525									
Val	Ser	Val	Asn	Lys	Glu	Pro	Val	Ala	Glu	Pro	Asp	Ile	Met	Ala	Thr				
530					535					540									
Asn	Gly	Val	Val	His	Val	Ile	Thr	Asn	Val	Leu	Gln	Pro	Pro	Ala	Asn				
545					550					555					560				

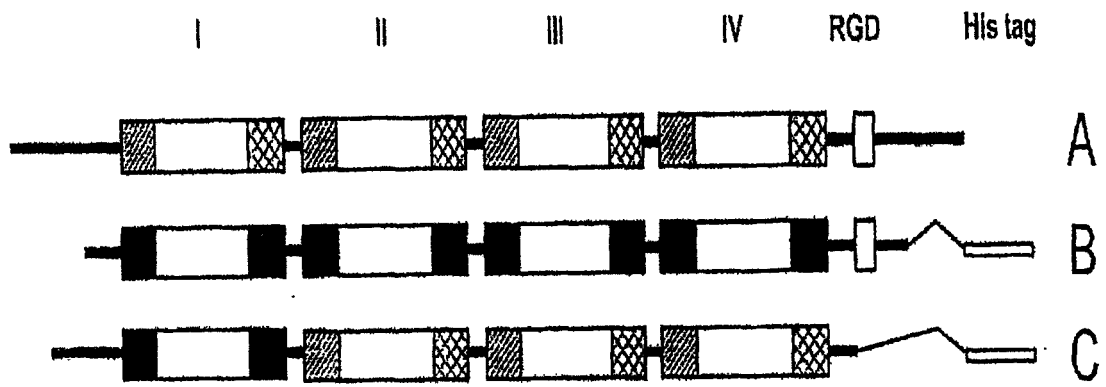


图 1

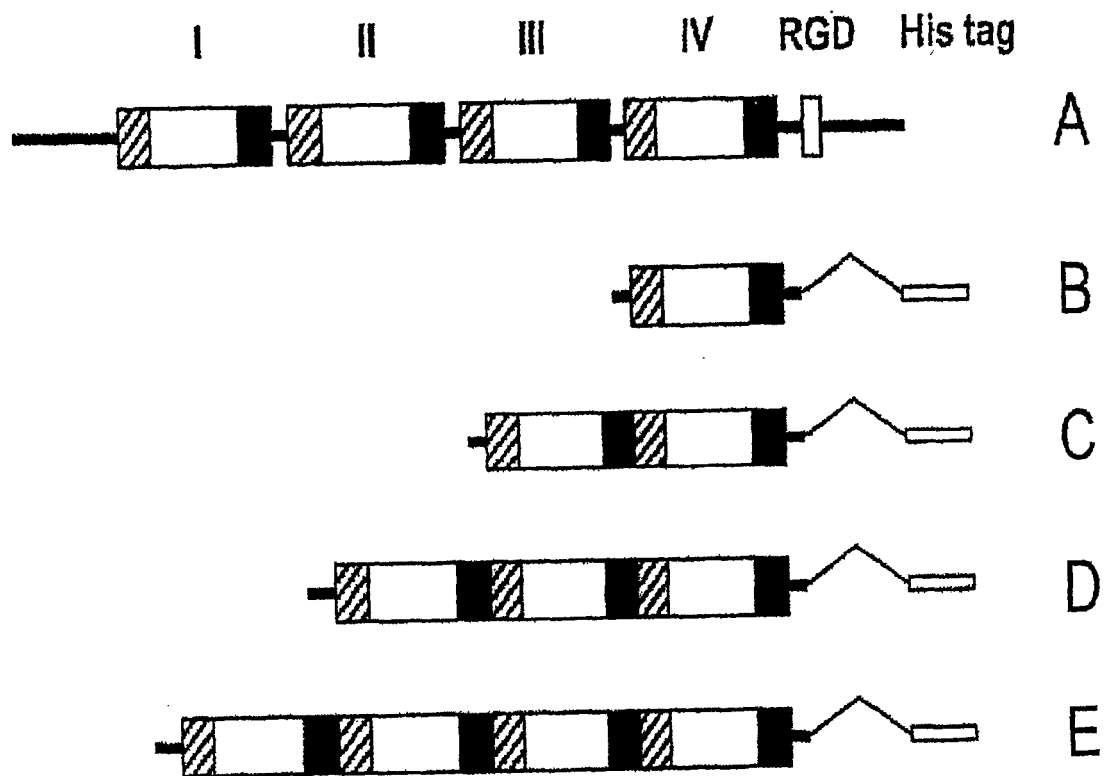


图 2

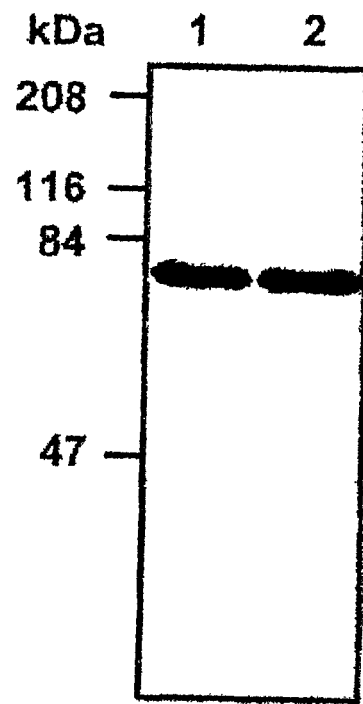


图 3

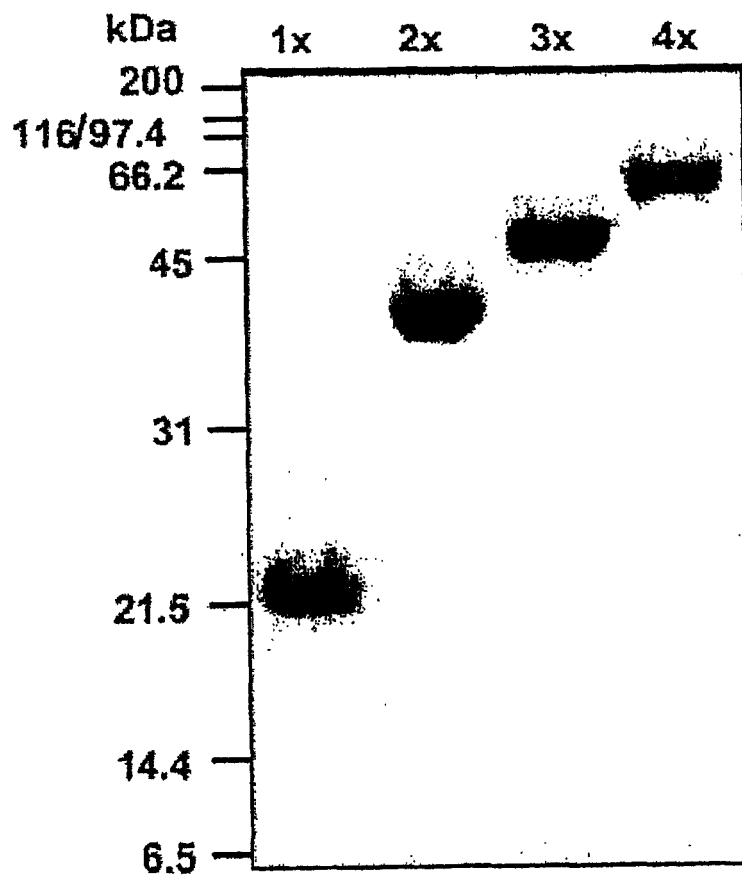


图 4

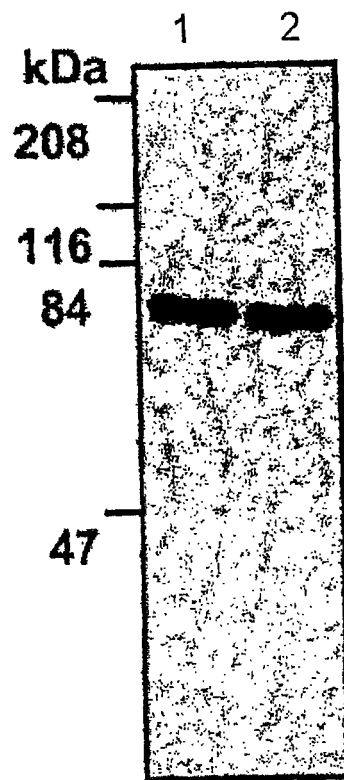


图 5

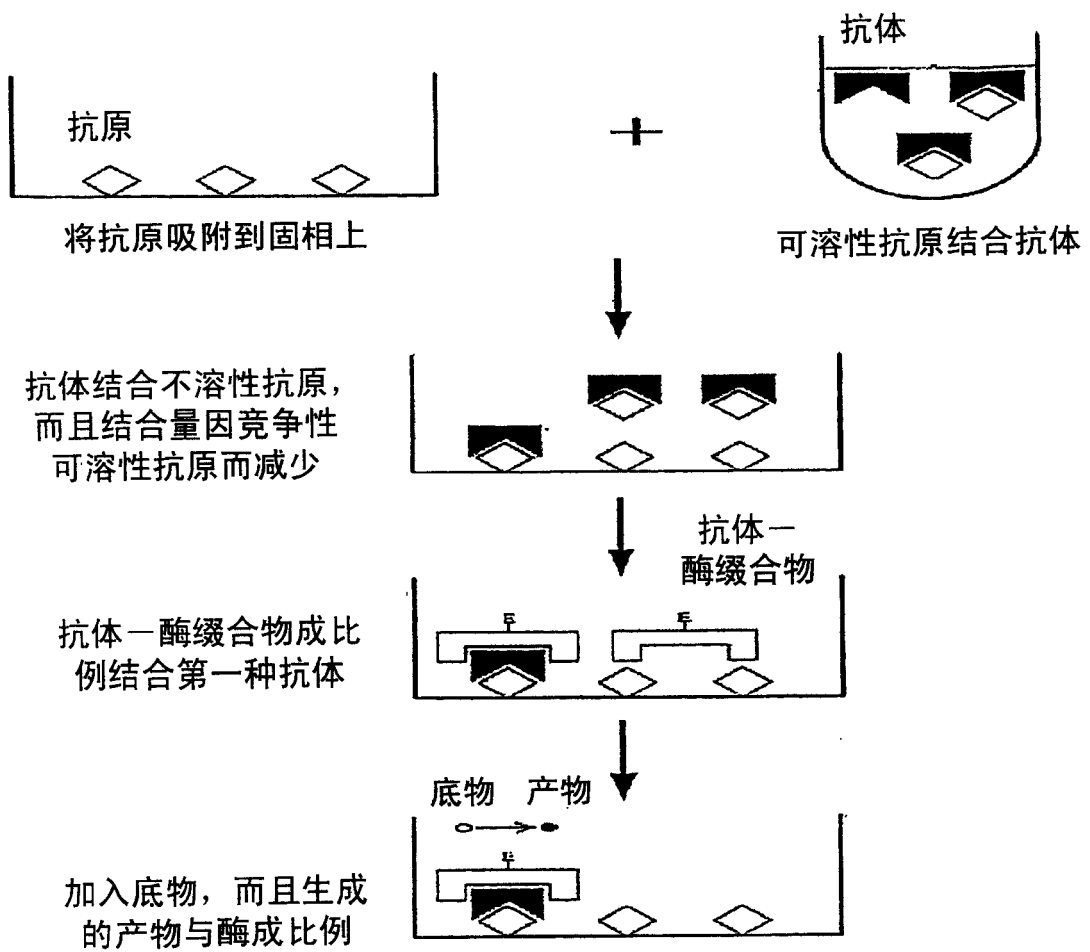


图 6

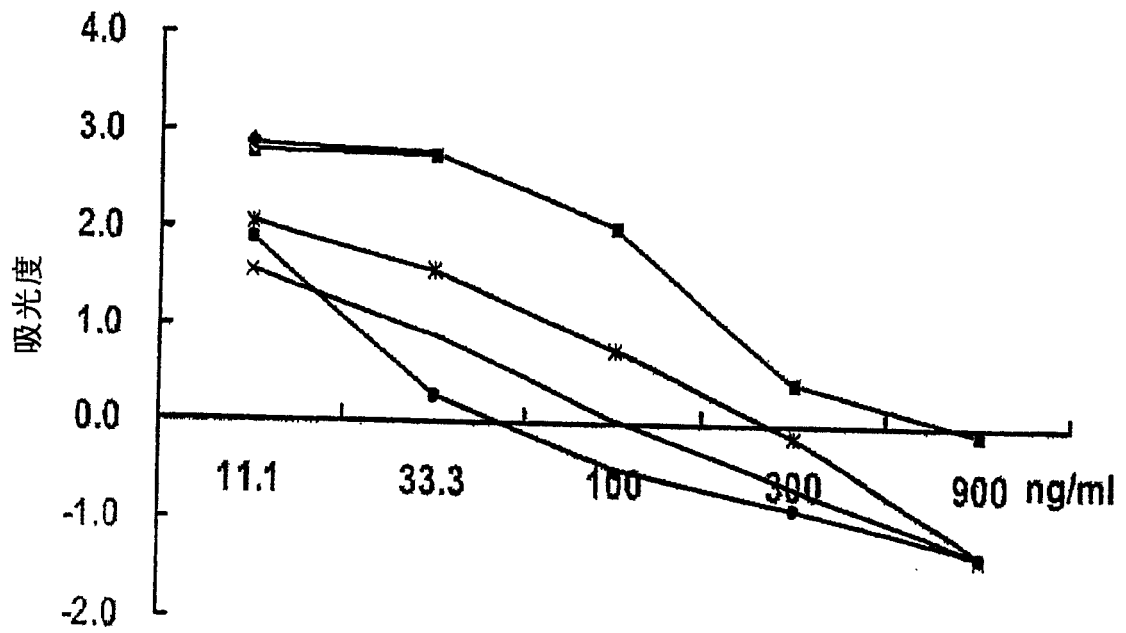


图 7

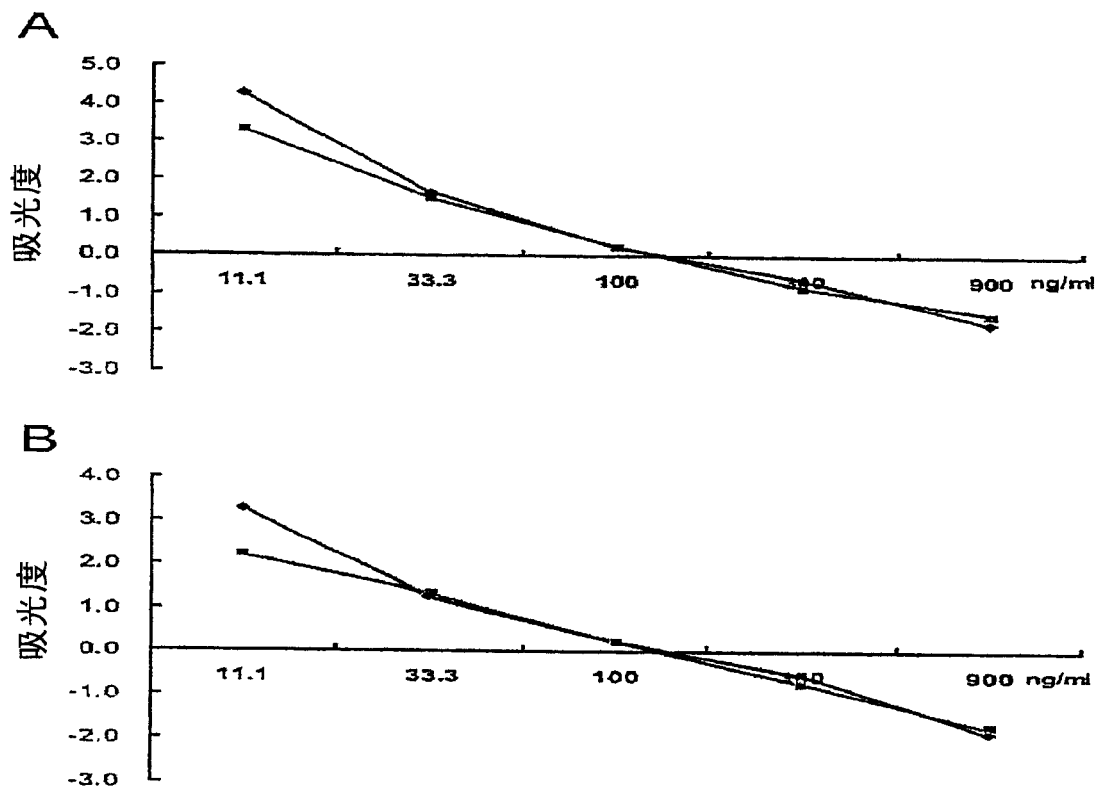


图 8

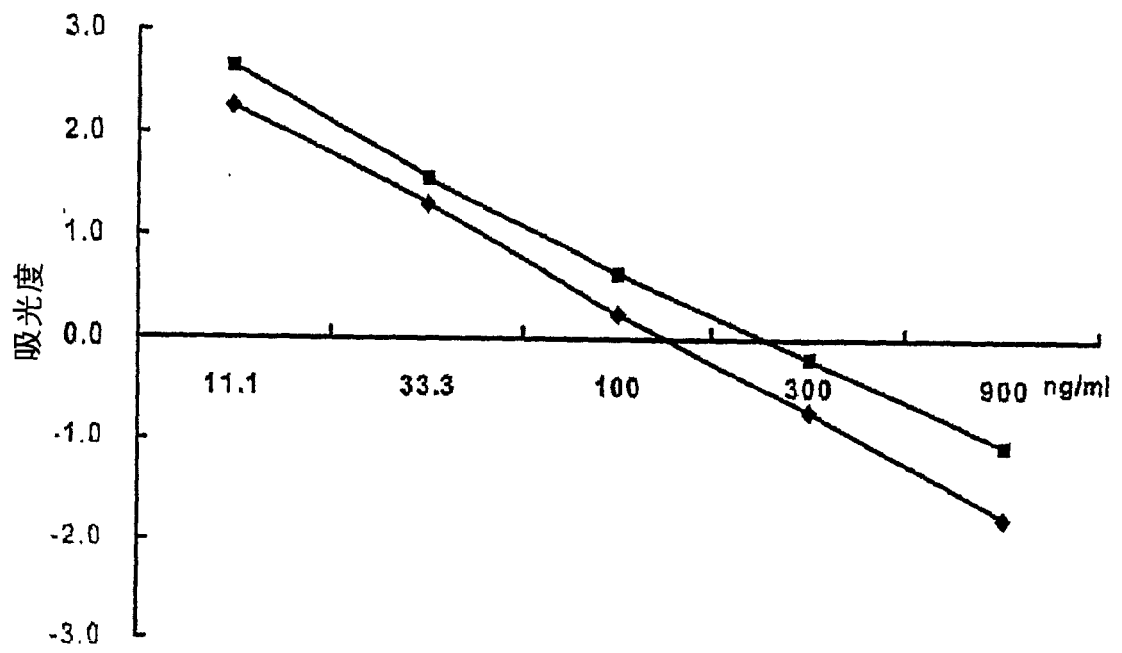


图 9

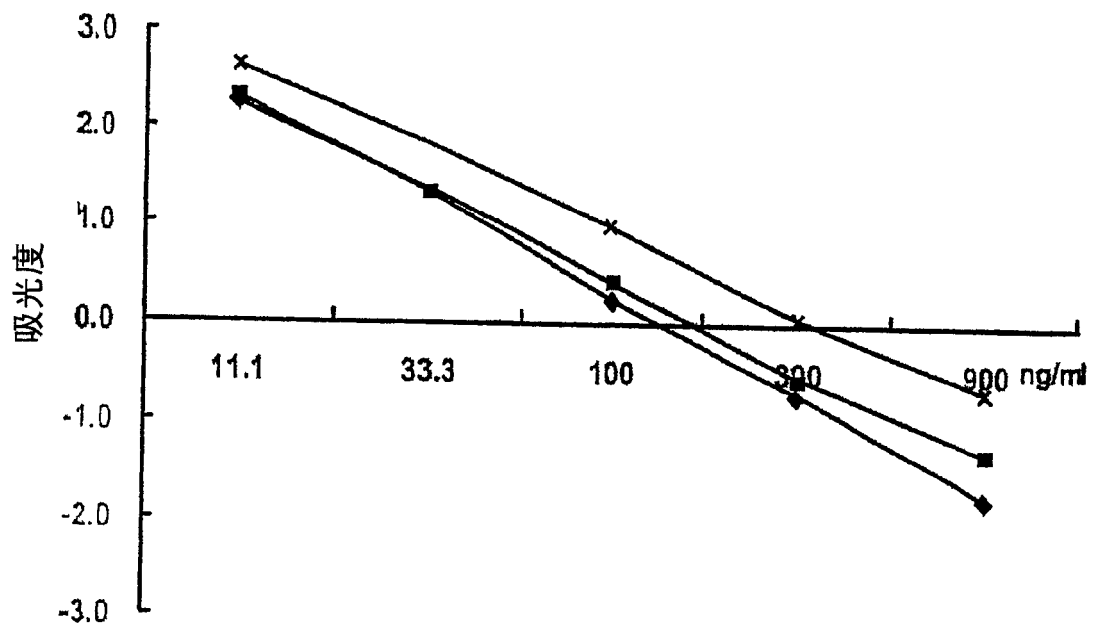


图 10

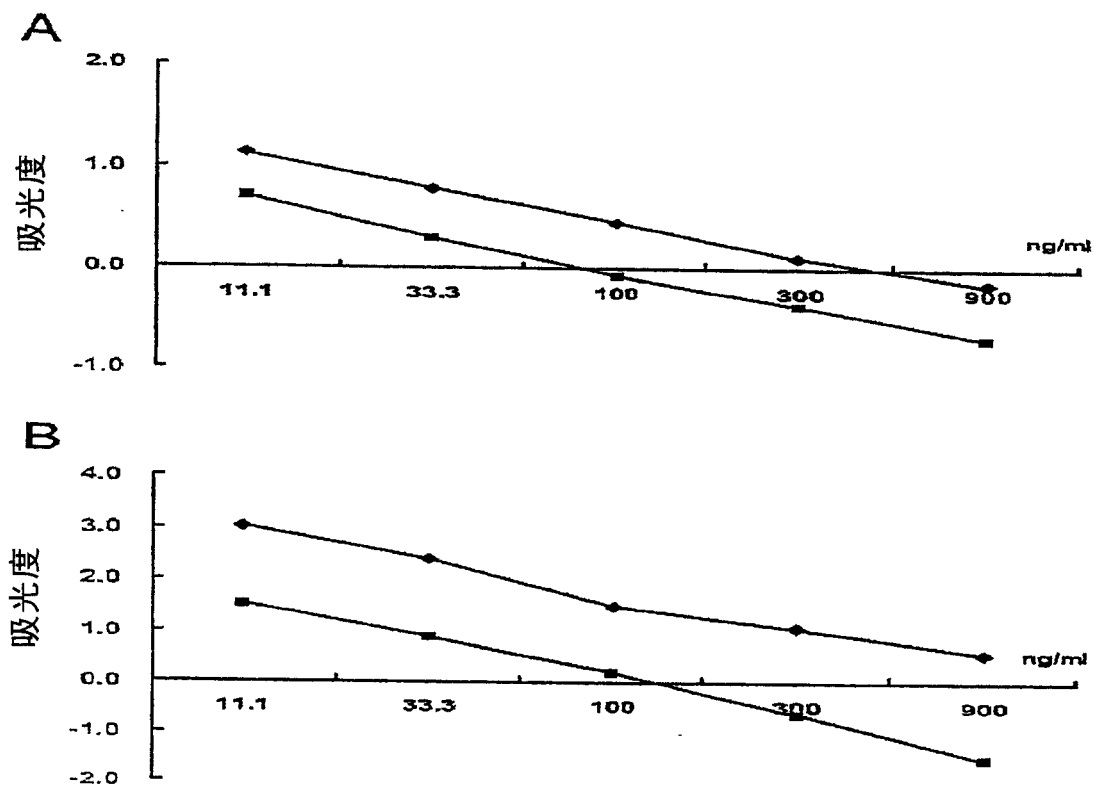


图 11

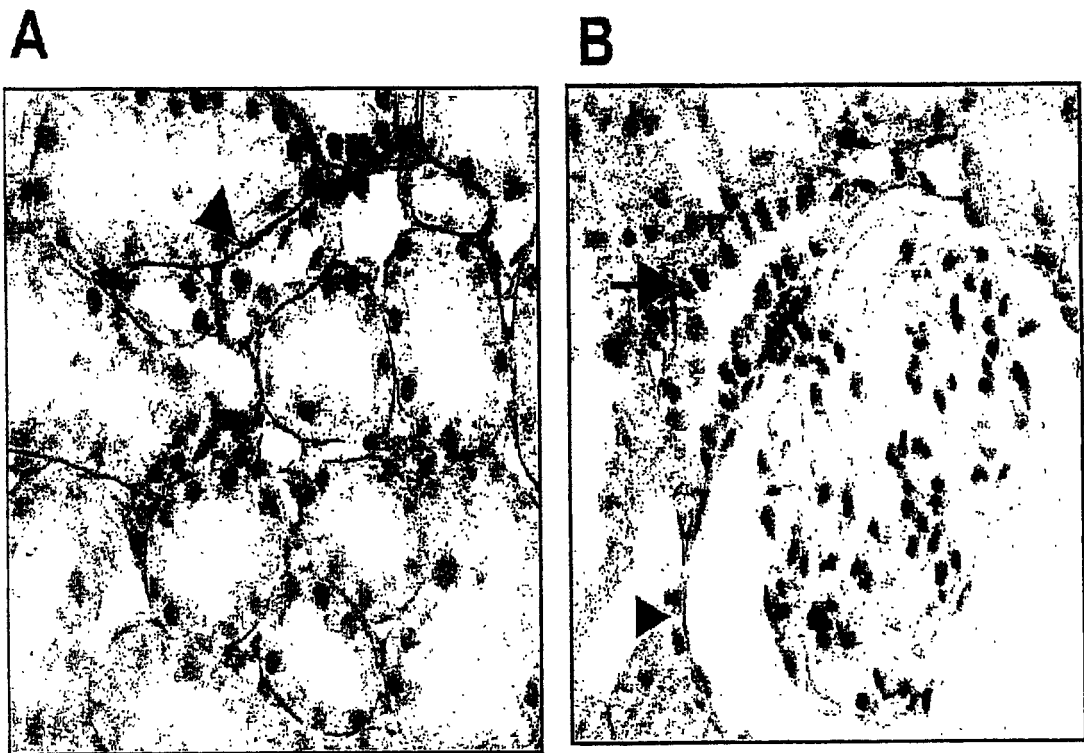


图 12

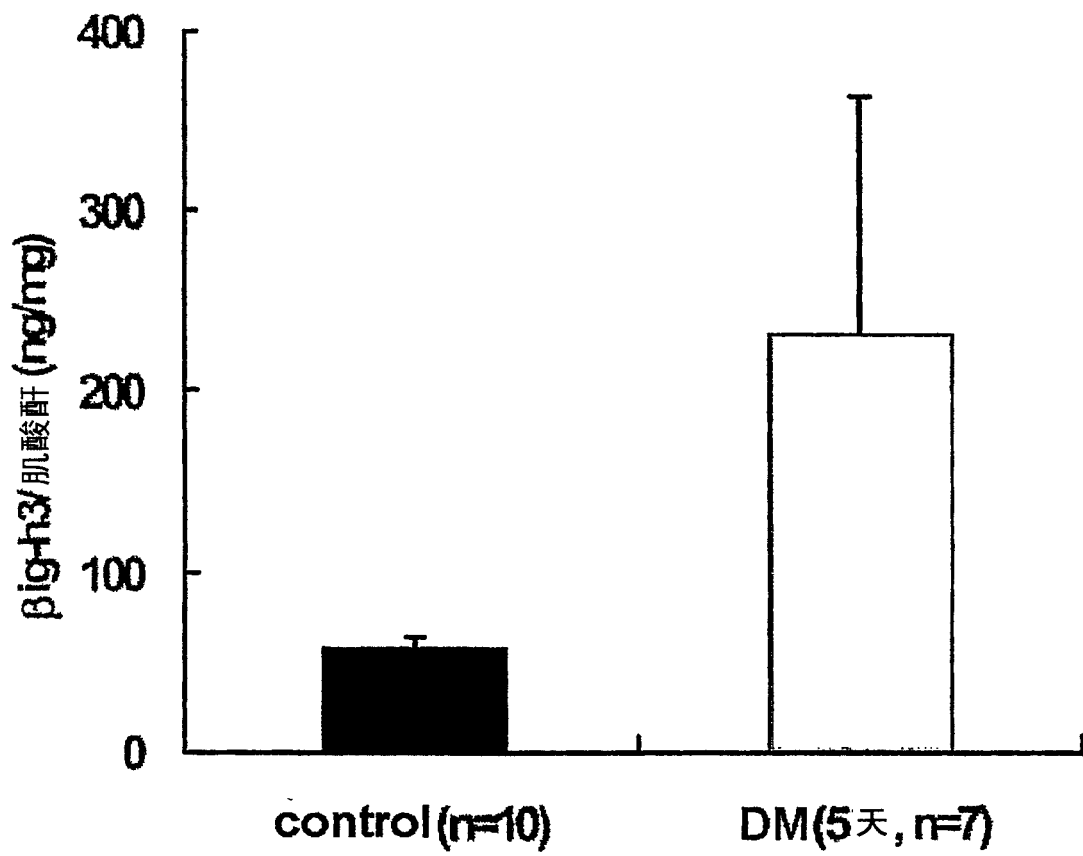


图 13

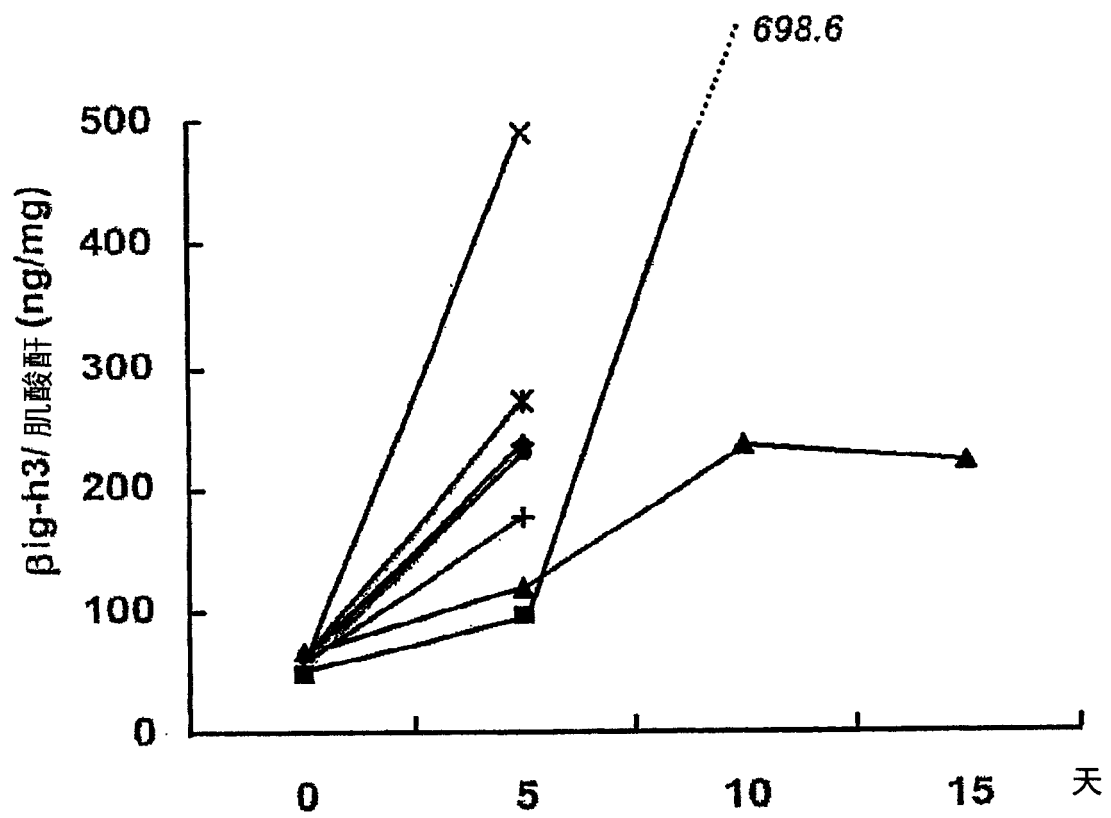


图 14

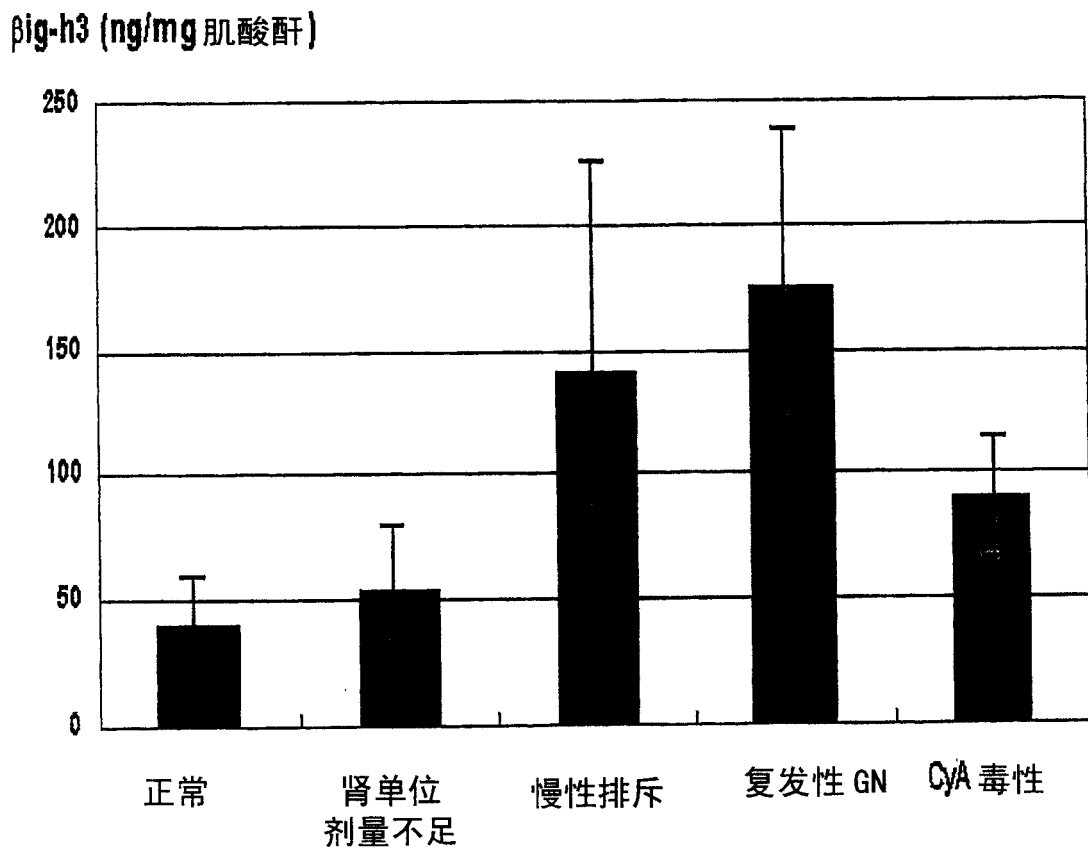


图 15

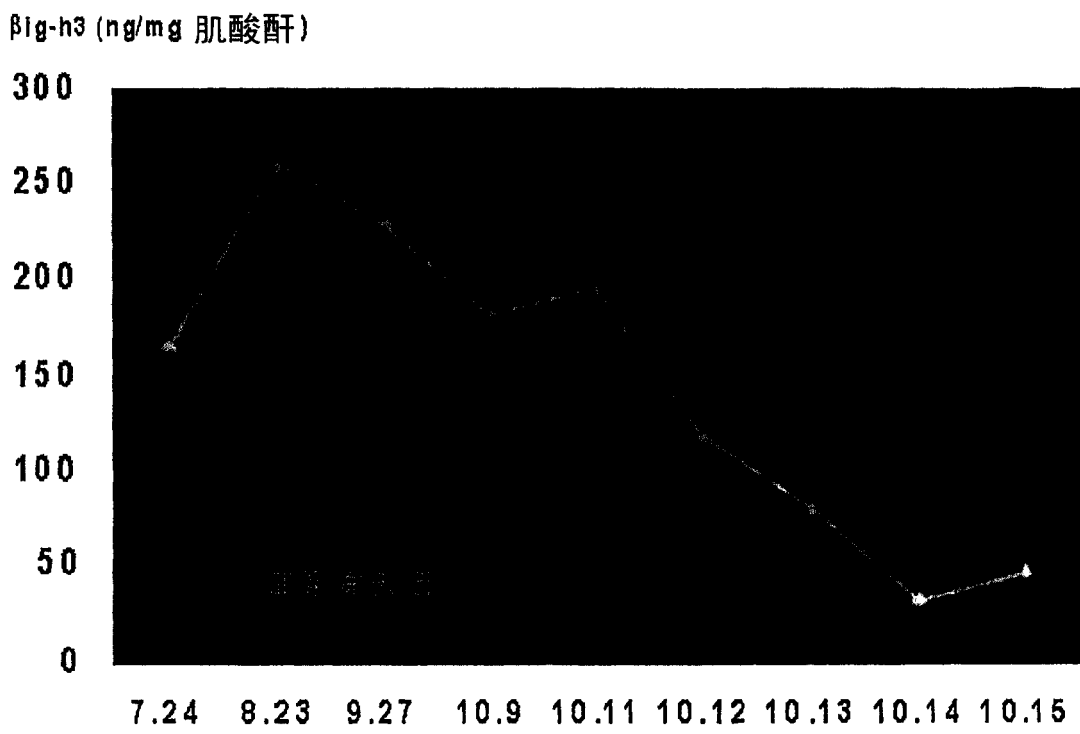


图 16

肾移植

- IgG3
- 正常 IgG3
- S.肌酸酐
- 正常 S.肌酸酐

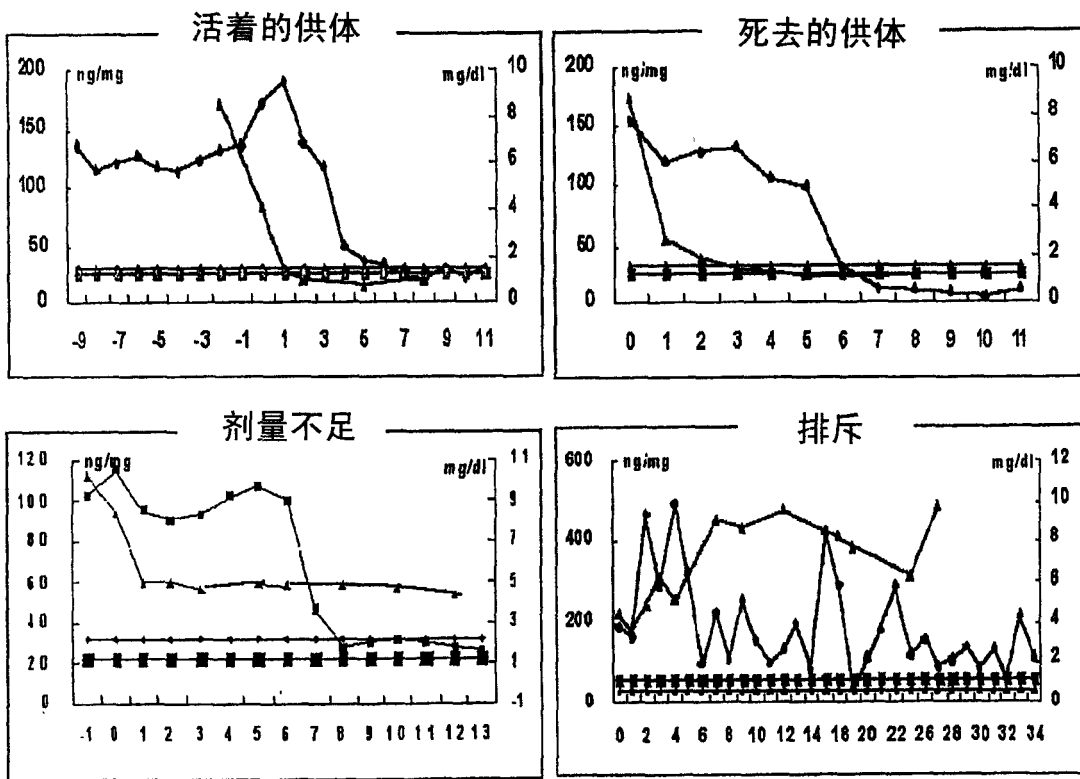


图 17

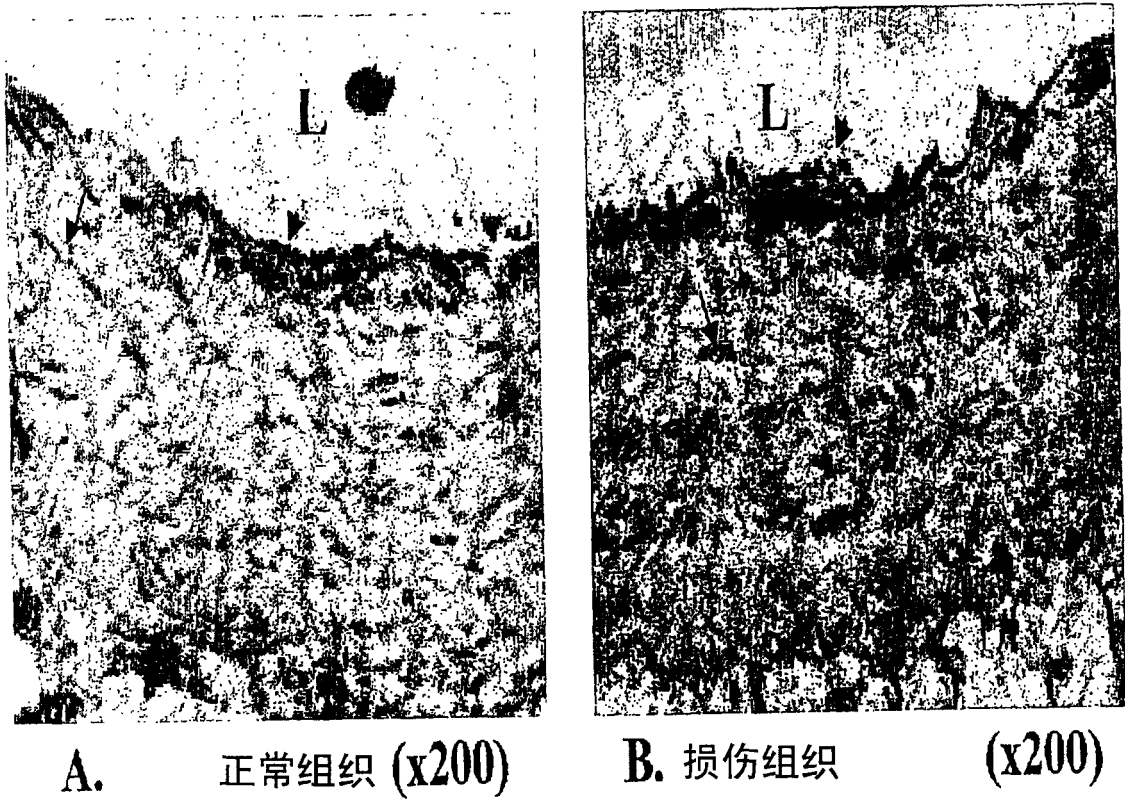


图 18

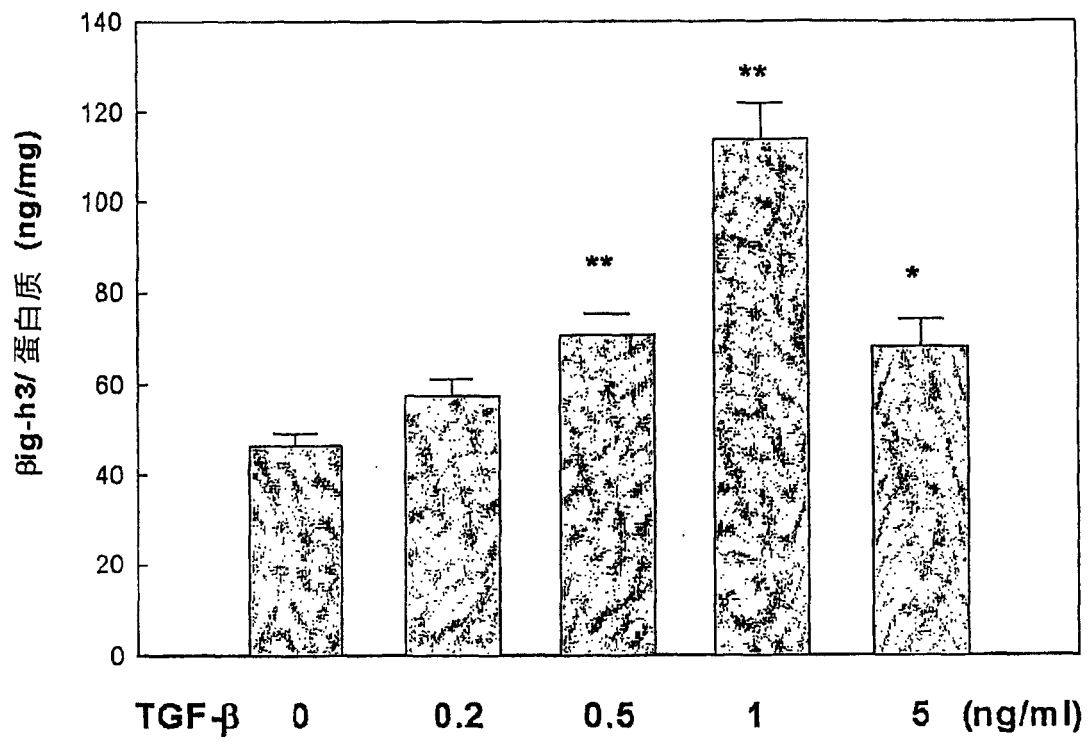


图 19

专利名称(译)	用于测量βig - h3蛋白质的量的方法以及使用其的诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN1625687A	公开(公告)日	2005-06-08
申请号	CN02828782.7	申请日	2002-10-22
[标]发明人	金仁山 裴宗燮		
发明人	金仁山 裴宗燮		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/705 C12N15/09 G01N33/566 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N2333/78		
代理人(译)	程金山		
优先权	1020020021488 2002-04-19 KR		
其他公开文献	CN100374864C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于测量 βig - h3蛋白质的量的方法以及使用该方法的诊断试剂盒。具体而言，本发明涉及通过βig - h3蛋白质或βig - h3蛋白质中 fas - 1结构域的重组蛋白(包括其片段或其衍生物)与其配体之间的特异结合反应来测量体液中βig - h3蛋白质的量的方法，还涉及用于肾病、肝病、类风湿性关节炎或心血管疾病的诊断试剂盒，其包含βig - h3蛋白质或βig - h3蛋白质中fas - 1结构域的重组蛋白(包括其片段或其衍生物)及其配体。本发明的方法和试剂盒能够有效的作为用于诊断肾病、肝病、类风湿性关节炎或心血管疾病的损伤和发展程度的灵敏诊断方法。

