

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/68

G01N 33/53

G01N 33/577

G01N 33/553



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00807212.4

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1198146C

[22] 申请日 2000.3.17 [21] 申请号 00807212.4

[30] 优先权

[32] 1999. 3. 19 [33] JP [31] 75305/1999

[32] 1999. 10. 28 [33] JP [31] 306623/1999

[86] 国际申请 PCT/JP2000/001646 2000. 3. 17

[87] 国际公布 WO2000/057189 日 2000. 9. 28

[85] 进入国家阶段日期 2001. 11. 5

[71] 专利权人 黑川清

地址 日本东京都

共同专利权人 扶桑药品工业株式会社

宫田敏男 学校法人东海大学

[72] 发明人 宫田敏男

审查员 汪妍瑜

[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 1 页 说明书 47 页 附图 13 页

[54] 发明名称 检测 megsin 蛋白的方法及其应用

[57] 摘要

本发明提供一种通过测定活体样品中 megsin 蛋白来评价肾功能的方法。另外，本发明还提供了用于测定活体样品中 megsin 蛋白的免疫分析试剂和试剂盒。

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

1. 一种用于评价肾功能的方法，其包括测定尿液样品中的 megsin 蛋白，包括：
- 5 (a) 将所述样品与包括抗 megsin 蛋白抗体的试剂接触；和
- (b) 通过体外测定所述尿液样品中的 megsin 蛋白的量，并将其与对照样品中 megsin 蛋白的量进行比较来评价肾功能。
2. 权利要求 1 所述评价肾功能的方法，其中的抗 megsin 蛋白抗体是单克隆抗体。
- 10 3. 用于检测尿液样品中 megsin 蛋白的方法，其包含下列步骤：
- i)使检测 megsin 蛋白的颗粒与尿液样品接触，该颗粒包含固体磁性颗粒，所述固体颗粒表面结合有抗 megsin 蛋白的第一抗体，其中抗 megsin 蛋白抗体识别由 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列组成的多肽。
- 15 ii)使结合有标记分子的抗 megsin 蛋白第二抗体与已接触尿液样品的 megsin 蛋白检测颗粒接触，其中第二抗 megsin 蛋白抗体识别由 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列组成的多肽，并且，
- 20 iii)检测通过所述抗 megsin 蛋白第二抗体与 megsin 蛋白结合的所述标记分子。
4. 权利要求 3 所述的检测方法，其中抗 megsin 蛋白第一抗体和抗 megsin 蛋白第二抗体都是单克隆抗体。

检测 megsin 蛋白的方法及其应用

5 技术领域

本发明涉及评价肾功能的方法，其包括测定活体样品，如尿液，血液等，中的 megsin 蛋白。此外，本发明涉及含抗 megsin 蛋白抗体的肾功能诊断试剂。

10 技术背景

肾移植是治疗晚期肾衰的唯一方法，此时肾的血过滤和解毒功能已完全衰竭。但是在日本，支持肾移植的肾源供应体系的建设很不完善。此外，移植方法本身的社会认同还处于一种初级阶段，因此在现今的状况下，只能以透析疗法来进行肾移植治疗。

15 如今，接受透析的病人数量估计约为 170,000。每位患者平均每年的治疗费用需要 6 百万日圆，这被认为是给医疗保险制度增加压力的最大原因之一。此外，每周 2-3 天，每天 4-6 小时的透析，大大地制约了患者参加社会活动。

肾衰是肾病的最终结局。导致肾衰的原因和发病过程不尽相同。有许多是由非肾源疾病导致的，如药物中毒，传染病，恶性肿瘤，糖尿病，系统性红斑狼疮(SLE)，都会导致肾障碍并最终导致肾衰。

肾障碍的显著症状只出现在晚期，即病情已恶化至接近肾衰时。因此，它们易被忽视，很多病例在症状出现时肾脏已经发生不可逆性的损害。因此，在症状出现前尽可能的早期发现肾障碍是非常重要的，这样可以防止肾衰的发生，以减少对患者参加社会活动的制约，并进一步减少透析治疗给社会医疗保险造成的财政负担。

25 至今，被称为尿分析的尿蛋白和尿沉积检测广泛应用于肾障碍的诊断。但是，即使在正常人中因剧烈运动，心理压力，丰富的肉类膳食，月经前等也会出现暂时性的尿蛋白升高。在另一方面，有与肾疾病无关的尿蛋白，如主要见于青少年(正常健康人群中约有 0.5%)中的体位性蛋白尿。在尿道疾病，膀胱疾病，女性生殖器疾病等情况下，也可检测到尿蛋白。因此，

只检测尿蛋白很难确诊肾障碍。

尿液离心后可用显微镜观察到尿沉积。但是，在正常健康人的尿沉积中同样可检测到红细胞沉积，这可能是来自于非肾障碍的其它的失调，比如那些与尿道相连的器官的失调。因此，尿沉积也不足以对肾障碍确诊。

- 5 一种早期诊断糖尿病性肾病的方法包括，定量分析可作为糖尿病性肾病指标的渗入尿中的白蛋白含量，并将此含量与正常人的值进行比较，但即使正常人尿中白蛋白的含量也有波动，所以这种方法不能完全解释糖尿病性肾病的准确状态。

- 10 此外，可化验血清肌酐(Cr)和血液尿素氮(BUN)以测定血液中尿成分的滞留，但此方法易受饮食影响。因此，从尿蛋白以及血清 Cr 和 BUN 中得到的异常值未必起因于肾障碍，因这些均常见于正常健康人或其它疾病的患者。

- 15 肾障碍还可通过测定各种物质，包括尿 β_2 -微球蛋白、N-乙酰葡萄糖胺酶(NAG)、IgG、运铁蛋白、白细胞介素-6、等来诊断。但是，在许多病例中这些检测不能反映肾障碍的严重程度，并因此远非有效。

- 20 而且，即使通过检测尿液中的这些血液成分怀疑有全肾障碍或涉及免疫反应的疾病，仍很难鉴定肾组织内受到所述疾病影响的部位。除上述方法外，目前尚无方法能以足够的敏感性和特异性来诊断肾病和确定其严重性。肾活检的组织学诊断被认为是最终诊断并确定肾障碍及其严重程度所必需的。

但是，肾活检是有创性检查，常伴有并发症，比如出血，感染等。而且，要进行此类检查，必须住进具有良好设备和专家的医院，给患者带来身体和社会的重负。

- 25 如上所述，通过尿分析的检测是简便易行的，同时也是处理大量尿样的极好方法。但它远不能满足对肾障碍的确诊。另一方面，肾活检是诊断和确定肾障碍严重程度的可靠方法。但是它的使用受到高度限制，而且无法改进。因此，需要有一种既具有尿液分析的简便性，又具有肾活检的准确性的方法。

- 30 在特定组织，不限于肾，中特异性表达的蛋白常用作器官功能性紊乱的指标。例如，酶蛋白如 LDH 和 γ GTP 广泛用于肝功能的指标。但尚无一种肾特异性蛋白可作为肾功能的指标。

5 本发明人通过大量 DNA 序列分析和数据库分析分离到一种在肾小球膜细胞中强效表达的被称为 megsin 的基因。而且成功得到 megsin 蛋白，其含有由 megsin 全长 cDNA 克隆编码的 380 个氨基酸。本发明人使用 Swiss Prot 数据库按 FASTA 程序进行氨基酸同源性检索(T. Miyata 等，临床研究杂志(J. Clin. Invest.), 120:828-836 (1998))发现人 megsin 蛋白属于 SERPIN(丝氨酸蛋白酶抑制剂)超家族(R. Carrell 等，Trends Biochem. Sci., 10:20 (1985); R. Carrell 等，冷泉港 Symp. Quant. Biol., 52: 527(1987); E.K.O.Kruithof 等，血液，86:4007(1995); J.Potempa 等，生物化学杂志，269: 15957(1994); E.Remold-O' Donnell, FEBS Let., 315: 105(1993))。这些发现均见专利申请(PCT/JP98/04269)。

15 人 megsin 蛋白在人成纤维细胞，平滑肌细胞，内皮细胞，和角质化细胞中弱表达，而在肾小球膜细胞中表达很强。IgA 肾病患者和正常健康个体间对肾组织中 megsin 蛋白表达水平的比较揭示，在 IgA 肾病患者中 megsin 蛋白表达水平显著较高。因此，尿液或血液中的 megsin 蛋白可作为肾小球膜细胞增生性肾病(例如，IgA 肾病等肾病)的一种标记物。megin 蛋白的基因表达有可能与肾病的发生和进程密切相关。但是至今还不清楚 megsin 蛋白基因表达与肾病进展的关系。

发明内容

20 本发明的一个目的是解决上述问题，并且提供一种诊断肾病和确定其严重程度的方法，以及提供用于此方法的试剂和试剂盒。

25 首先，本发明人认为为了对肾病确诊并确定其严重程度，测定与疾病程度相关的特异蛋白是必需的。因此至于研究存在于肾小球中的肾小球膜细胞。肾小球膜位于肾小球毛细血管丛(glomerular tuft)中的小叶中央，是一种能作为核心将各小叶连接在一起的组织。肾小球膜为肾小球基底膜覆盖。它由肾小球膜细胞(与毛细血管腔之间隔着内皮细胞)和肾小球膜基质(与 3 层肾小球基底膜中的内透明层连接的无定形物质)构成。

30 肾小球膜细胞在维持肾小球的结构和功能中起着关键作用。它们的增殖被认为是肾小球疾病，如肾小球肾炎和肾小球硬化症发病的主要因素。此外，肾小球膜细胞是所有类型的肾炎破坏的靶。例如，肾小球膜细胞的增殖和细胞外肾小球膜基质的积累被认为是各种肾小球疾病(如慢性肾小球

肾炎和糖尿病性肾炎这两种导致末期肾衰的主要病因)患者的肾小球硬化症发展的第一步(D.Schlondorff, *Kidney Int.*,49:1583-1585,(1996);R.B.Sterzel等, 肾小球膜细胞, 免疫性肾病, 595-626(1997))。因此, 鉴定在肾小球膜细胞中特异性表达的基因并阐明其表达调节与肾病之间的相关性, 有助于
5 阐明肾小球膜细胞的生物学特性及肾小球膜细胞相关疾病的病因, 并由此治疗或诊断肾小球膜细胞相关疾病。

有报道类固醇试剂对于伴有肾小球膜细胞极度增殖的 IgA 肾病是有效的(J.V.Donadio 等, *J.Am.Soc.Nephrol.*8:1324-1332(1997))。但是, 类固醇试剂的使用经常引起严重的副作用, 所以, 应避免对类固醇试剂无效型 IgA
10 肾病无目的地给与类固醇试剂。因此, 类固醇治疗必需与组织损伤的严重程度如肾小球膜细胞的增殖相关, 相应地, 长期存在能简便评价肾小球膜细胞增殖程度的肾功能检查方法。

本发明人认为 megsin 蛋白的基因表达增加与肾病的发生和发展有关, 这种增加使 megsin 蛋白产量的增加, 由此导致 megsin 蛋白渗漏至尿液和血
15 液中, 其渗漏量与病情的进展相关。为证实此机理, 发明人试图测定和比较在各种活体样品中 megsin 蛋白的浓度或含量, 并因此通过测定 megsin 蛋白的浓度或含量来评价与 megsin 蛋白相关的肾病, 以此完成本发明。因此, 本发明涉及一种评价肾功能的方法, 以及用于此方法的试剂或试剂盒, 如下所列:

- 20 (1)一种评价肾功能的方法, 其包含测定活体样品中的 megsin 蛋白;
(2)(1)所述肾功能评价法, 其包含测定活体样品中的 megsin 蛋白, 以及将其与正常样本中 megsin 蛋白的测定值进行对比;
(3)(1)所述肾功能评价法, 其中的活体样品是尿液;
(4)(1)所述肾功能评价法, 其中通过采用抗 megsin 蛋白抗体经抗原抗
25 体反应测定活体样品中的 megsin 蛋白;
(5)(4)所述肾功能评价法, 其中抗 megsin 蛋白抗体是单克隆抗体;
(6)肾功能诊断试剂, 其包含抗 megsin 蛋白抗体;
(7)(6)所述肾功能诊断试剂, 其中抗 megsin 蛋白抗体是单克隆抗体;
(8)检测活体样品中 megsin 蛋白的颗粒, 其中此种颗粒包含固体颗粒,
30 抗 megsin 蛋白抗体附着在其表面;
(9)(8)所述 megsin 蛋白检测颗粒, 其中固体颗粒具有磁性;

(10)(8)所述 megsin 蛋白检测颗粒，其中固体颗粒的相对密度不小于 1；

(11)(8)所述 megsin 蛋白检测颗粒，其中抗 megsin 蛋白抗体是单克隆抗体；

(12)检测活体样品中 megsin 蛋白的方法，包含下列步骤：

5 i)将 megsin 蛋白检测颗粒与活体样品，所述颗粒包含固体颗粒，其表面结合有抗 megsin 蛋白第一抗体；

ii)将偶联标记分子的抗 megsin 蛋白第二抗体与已接触了活体样品的 megsin 蛋白检测颗粒接触；

iii)检测通过抗 megsin 蛋白第二抗体结合至 megsin 蛋白的标记分子；

10 (13)(12)所述检测方法，其中抗 megsin 蛋白第一抗体和抗 megsin 蛋白第二抗体都是单克隆抗体；

(14)(13)所述检测的方法，其中抗 megsin 蛋白第一抗体和抗 megsin 蛋白第二抗体具有不同识别位点；

(15)(12)中所述的检测方法，其中的活体样品是尿液；

15 (16)(12)中所述的检测方法，其中的活体样品是血液；

(17)用于检测 megsin 蛋白的试剂盒，其中包含下列部件：

(a)可结合抗 megsin 蛋白抗体的磁性固体颗粒，

(b)抗 megsin 蛋白抗体，可以预先结合至所述磁性固体颗粒上，或可以间接附着其上，及

20 (c)磁体

(18)(17)中所述用于 megsin 蛋白检测的试剂盒，进一步含有结合了标记分子的抗 megsin 蛋白抗体。

如上所述，megin 蛋白被分离为由高度表达于人肾小球膜细胞中的基因编码的蛋白。本发明的 megsin 蛋白不只包含具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蛋白质(人 megsin 蛋白)，还包括与其功能等价的蛋白质。例如，来自非人的其它物种的 megsin 蛋白同系物可以称为是与其功能等价的蛋白质。其它实例有这些同系物的前体和片段。megin 蛋白-蛋白酶复合物也可作为肾功能的指标，只要其可以在活体样品中检测。来自非人物种的 megsin 蛋白同系物可作为评价相关物种中肾功能的指标。故，它们可用于理解肾

30 功能紊乱模型中的疾病状态。

可如下得到非人物种 megsin 蛋白同系物：首先，根据编码人 megsin

蛋白(SEQ ID NO: 1)的 cDNA 序列, 设计对应于 ORF 起点和终点的简并引物, 利用该引物经 PCR 扩增同源 cDNA。如果扩增的 cDNA 不是全长 cDNA, 再根据 5' RACE 等方法确定其上游碱基序列。例如, 用提取自培养的肾小球膜细胞的 mRNA 作为大鼠模板进行 RT-PCR。所用简并引物可以是, 例如, 具有下列碱基序列的寡核苷酸。大鼠的 megsin 蛋白同系物的部分结构可通过对这类 PCR 方法所得克隆的序列测定而揭示。

简并引物 FY: GTGAATGCTGTGTACTTAAAGGC AANTGN/SEQ ID NO: 3(对应于 172VNAVYFKGK180)

10 简并引物 R21: AANAGRAANGGRTCNGC/SEQ ID NO: 4(其中 R 是 A 或 G, 该引物对应于 357ADHPFLF363)

但是, 用这组引物对只能扩增所述 cDNA 的一部分, 为得到 5' 区域, 必需从大鼠 megsin 蛋白的克隆片段制备基因特异引物, 用它们进行再次简并 PCR。所用引物的碱基序列(对应于 megsin 蛋白的 N 末端氨基酸序列)如下所示:

15 简并引物 RM-CtermC1: ATGGCNTCNGCNGCNGCNGCNAAYGC/SEQ ID NO: 5 (其中 Y 是 T 或 C; 该引物对应于编码 megsin 蛋白 N-末端的序列)

RM-MR-A2: CGACCTCCAGAGGCAATTCCAGAGAGATCAGCCCTGG/SEQ ID NO: 6

20 RM-MR-A1:
GTCTTCCAAGCCTACAGATTTCAAGTGGCTCCTC/SEQ ID NO: 7
(两者均为大鼠 megsin 蛋白特异性反向引物)

通过将得到的 PCR 产物插入 pGEM-T-easy 载体(Promega)以测定碱基序列, 可以得到编码所述大鼠同系物的 cDNA 的 3' 区域。最后, 根据如上所得碱基序列设计引物, 通过 5' RACE 和 3' RACE 可以测定编码所述同系物的全长 cDNA 的碱基序列。两个基因特异性反义引物, 即 RM-PR01: GCTCAGGGCAGTGAA GATGCTCAGGGAAGA/SEQ ID NO: 8 和 RM-PR02: CTGACGTGCACAGT CACCTCGAGCACCC/SEQ ID NO: 9 可用于大鼠中的 5' RACE。另一方面, 基因特异性有义引物 RM-MR-S3: 30 GAGGTCTCAGAAGAAGGCACTGAGGCAACTGCTGCC/SEQ ID NO: 10 可用于 3' -RACE 中。用同样方法可分离小鼠的同系物。依照上面的方法,

可以测定大鼠和小鼠的 megsin cDNA 序列，它们分别如 SEQ ID NO: 18(大鼠)和 SEQ ID NO: 20(小鼠)所示。

本发明用于测定 megsin 蛋白的方法没有限定。例如，利用 megsin 蛋白抗体和 megsin 蛋白间的免疫反应的免疫分析，其特异性和灵敏性甚佳。

5 这类实例有：免疫沉淀，放射免疫分析，免疫荧光分析，酶免疫分析，化学发光试验，和免疫组化。此外，megin 蛋白可利用抗 megsin 蛋白抗体通过 Western 印迹法测定。这些免疫分析可以组合，比如在免疫沉淀后进行 Western 印迹。这些试验方法为本技术领域所熟知。

10 免疫组化染色法是使本发明抗体与分离的人体细胞或其破碎细胞液、组织或其破碎组织液、血清、胸膜积液、腹水、泪液等反应，进一步与经过异硫氰酸荧光素(FITC)等荧光物质或过氧化物酶等酶标记的抗小鼠 IgG 抗体或其结合片段反应，再用显微镜观察。也可利用生物素化的抗体与链霉抗生物素蛋白结合型标记物质的结合对每一标记物质进行间接标记。此外，由于 megsin 蛋白是一种蛋白酶抑制剂，可借助其对蛋白酶的抑制活性
15 作为指标来对其进行检测。或者，可利用 megsin 蛋白对蛋白酶的亲和性对其进行检测。

对 megsin 蛋白免疫分析而言所必需的抗体的来源或其制备方法不限，只要其能识别检测对象，即 megsin 蛋白即可。因此，可以使用多克隆抗体，单克隆抗体，及其混合物等。此外，也可仅用含抗体分子可变区的片段。
20 抗 megsin 蛋白抗体可如下得到。例如，本发明所用抗体包含抗具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蛋白的抗体。抗 megsin 蛋白或其部分氨基酸序列的抗体(例如，多克隆抗体或单克隆抗体)或抗血清可按照传统的抗体或抗血清制备方法制备，用作抗原的有，megin 蛋白、包含其部分氨基酸序列的寡肽、以及融合蛋白，比如 c-myc-(His)₆-Tag-megin 蛋白和 MBP-megin 蛋白。
25 例如，单克隆抗体可按下列方法制备。如果使用带部分氨基酸序列的合成肽作为免疫原，优选尽量使用对 megsin 蛋白特异性的高度亲水性氨基酸序列。这样的氨基酸序列包括 SEQ ID NO: 11 到 17，它们都用于实施例
30 中。在这些序列中，表示为 SEQ ID NO: 12(人)，SEQ ID NO: 14(人)，或 SEQ ID NO: 17(大鼠)的氨基酸序列尤其产生对肾小球组织有较好反应性的抗体。

本发明的 megsin 蛋白或具有该 megsin 蛋白部分氨基酸序列的合成肽，

可单独或与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。用作免疫原的合成肽为与载体蛋白，如牛甲状腺球蛋白和匙孔蛾血蓝蛋白相结合的肽形式。为提高抗体的生产，可将弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂与抗原一起给药。每1到6周免疫一次，共免疫约2到10次。可用的温血动物如，猴，兔，狗，豚鼠，小鼠，大鼠，绵羊，山羊，和家禽，优选小鼠或大鼠。单克隆抗体生成细胞可如下制备：选择已免疫的具有可检测的抗体滴度的温血动物(如小鼠)，在末次免疫的2到5天后，取动物的脾或淋巴结，使这些组织中的抗体生成细胞与骨髓瘤细胞融合，得到能产生单克隆抗体的杂交瘤。使下述标记的 megsin 蛋白与抗血清反应，并测定与抗体结合的标记的活性，由此可测定抗血清中的抗体滴度。

本发明中不与除 megsin 蛋白以外的蛋白质发生交叉反应的单克隆抗体可通过选择能识别 megsin 蛋白特异性表位的抗体而得到。一般地，特异于所述蛋白的表位在该蛋白的氨基酸序列中包含至少7个或更多连续的氨基酸残基，优选10到20个氨基酸。因此，例如，识别含以下肽的表位，并包含至少7个连续氨基酸残基的单克隆抗体可以是 megsin 蛋白特异性单克隆抗体，所述肽具有选自 SEQ ID NO: 2(人)、SEQ ID NO: 19(大鼠)，或 SEQ ID NO: 21(小鼠)所示的氨基酸序列。可筛选在 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 19(大鼠)，或 SEQ ID NO: 21(小鼠)的氨基酸序列中保守的序列以选出 megsin 蛋白家族的通用表位。如果一个区域包含特异于所有序列的氨基酸序列，可挑选出能识别不同物种的单克隆抗体。

抗 MEGSIN 蛋白单克隆抗体可按照免疫球蛋白的分离和纯化方法分离和纯化，与多克隆抗体的分离和纯化相似。公知的纯化方法包括，例如，盐析，醇沉淀，等电点沉淀，电泳，离子交换剂(如 DEAE)的吸附和解吸，超速离心，凝胶过滤，或排它性收集抗体的特异性纯化方法，例如用抗原结合固相或活性吸附剂，如蛋白 A 或蛋白 G，收集抗体，然后使所述结合分离而得到抗体的方法。

以这种方式得到的可识别本发明 megsin 蛋白的单克隆抗体和多克隆抗体，可用于诊断和治疗肾小球膜细胞相关疾病。使用这些抗体测定 megsin 蛋白的方法有夹心法，其包括使 megsin 蛋白与结合在固相载体上的抗体或标记的抗体反应，然后检测此反应产生的夹心复合物中的 MEGSIN 蛋白；或竞争法，其包括使标记的人尿源 megsin 蛋白和受检标本中人尿源 megsin

蛋白与抗体进行竞争性反应，根据与抗体反应的标记抗原的量可以测定受检标本中的人尿源 megsin 蛋白。

通过夹心法测定人尿源 megsin 蛋白可分两步或一步进行，其中两步法是使固相抗体与人尿源 megsin 蛋白反应，未反应的物质经过洗涤完全除去，
5 再加入标记的抗体形成固相抗体-标记的人尿源 megsin 蛋白抗体复合物；一步法是使固相抗体，标记的抗体，和人尿源 MEGSIN 蛋白同时混合在一起。

适用于该试验的固相载体有聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚氯乙烯、聚酯、聚丙烯酸酯、尼龙、聚缩醛、氟树脂等合成树脂，纤维素，琼脂糖等多糖，玻璃，金属等。固相载体的形状可以是多样的，有颗粒状，盘状，
10 球形，纤维状，棒状，板状，容器形式，小格，试管等。吸附有抗体的载体可(适当)加入防腐剂，如叠氮钠，应冷藏保存。

另一方面，已知固体颗粒可作为试剂用于评价人类精子的授精能力。这些颗粒表面结合了一种单克隆抗体，该抗体能与已发生顶体反应的人类精子特异性反应(日本专利第 2651249 号)。这种用于检测精子授精能力的颗粒是一种固体颗粒，其结合有能与已发生顶体反应之人类精子特异性反应的单克隆抗体。通过使精子与所述颗粒反应，并计数与所述颗粒结合的精子，来评价人类精子的授精能力。授精能力无需使用复杂技术如放射活性、
15 荧光等便可准确、简单且不费时地检测。由于磁性固体颗粒可利用磁体轻易聚集，故可用于测定小量样品的量。本发明人发现，可利用此技术更简便准确地检测 megsin 蛋白。
20

抗体可用已知的化学结合或物理吸附方法固相化。化学结合方法有，应用戊二醛的方法，应用 N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯，N-琥珀酰亚胺基-2-马来酰亚胺乙酸酯等的马来酰亚胺法，以及应用 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺盐酸化物的碳二亚胺法等。其它的例子有，马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯法，N-琥珀酰亚胺基-3-(2-二硫代吡啶基)丙酸酯法，双重氮化(bisdiazolated)联苯胺法，二棕榈基赖氨酸法。或者先使两种有着不同表位的抗体与待检物质反应形成复合物，然后用经上述方法固定的第三抗体捕获所述复合物。
25

对所述标记无限制，只要其可用于免疫分析。具体地说，可以使用酶，
30 荧光物质，发光物质，放射性物质，金属螯合物等。优选的标记酶有，例如，过氧化物酶，碱性磷酸酶， β -D-半乳糖苷酶，苹果酸脱氢酶，葡萄糖

菌核酸酶, Δ -5-类固醇异构酶, α -甘油磷酸脱氢酶, 丙糖磷酸异构酶, 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, 和乙酰胆碱酯酶等。优选的荧光物质包括, 例如, 异硫氰酸荧光素, 藻胆蛋白, 罗丹明, 藻红蛋白, 藻青蛋白, 别藻青蛋白, 和邻苯二甲醛等。优选发光物质包括, 例如, 异鲁米诺, 硝酸双-N-甲基吡啶(lucigenin), 鲁米诺, 芳香族吡啶鎓酯, 咪唑, 吡啶鎓盐, 及其修饰的酯, 虫萤光素, 萤光素酶, 和水母发光蛋白。优选放射性物质包括, 例如, ^{125}I , ^{127}I , ^{131}I , ^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{35}S 等。

将上述标记物与抗体结合的方法众所周知。具体地说, 有直接标记和间接标记。通常使用的直接标记法是使用交联剂将抗体或抗体片段化学共价结合到标记上。交联剂包括 N, N'-邻亚苯基双马来酰亚胺, 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷酸 N-琥珀酰亚胺酯, 6-马来酰亚胺己酯·N-琥珀酰亚胺酯, 4,4'-二硫代嘧啶, 以及其它已知的交联剂。可按照交联剂的特性, 采用已知的方法使之与酶和抗体反应。间接标记法的例子包括首先使低分子量半抗原如生物素, 二硝基苯, 吡哆醛或荧光胺与抗体结合, 再用该半抗原的结合配对物间接标记该抗体。抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白可用作生物素的识别配体, 而二硝基苯, 吡哆醛, 或荧光胺可用识别这些半抗原的抗体标记。

辣根过氧化物酶可用作标记抗体的酶。使用此酶是因为它可与多种底物反应并且通过过碘酸盐氧化方法轻易附着在抗体上。偶尔可将抗体片段, 例如, Fab', Fab, F(ab')₂ 用作抗体。多克隆和单克隆抗体都可用同样的方法进行酶标记。采用上述交联剂得到的酶标抗体可由已知方法如亲和层析等纯化。以使用作更为灵敏的免疫分析系统。纯化的酶标抗体加入防腐剂如硫柳汞, 稳定剂如甘油, 然后保存。标记的抗体可以冻干并在凉爽阴暗的地方长期保存。

当标记试剂为酶时, 可使用其底物, 必要时还使用一种显色剂来测定其活性。当过氧化物酶用作酶时, H₂O₂ 用作底物溶液, 2,2'-连氮-二[3-乙基苯并噻唑啉磺酸]铵盐(ABTS), 5-氨基水杨酸, 邻苯二胺, 4-氨基安替比林(4-aminoantipyrine), 或 3,3', 5,5'-四甲基联苯胺等用作显色剂。当碱性磷酸酶用作此酶时, 邻硝基苯磷酸酯盐, 对硝基苯磷酸酯盐等可用作底物。当 β -D-半乳糖苷酶用作酶时, 荧光素-二(β -D-半乳糖吡喃糖苷), 4-甲基伞形

酮基(methylumbelliferyl)- β -D-半乳糖吡喃糖苷等可用作底物。本发明也包括用于 megsin 蛋白的免疫分析试剂，其包括标记的或固定化的单克隆或多克隆抗体。本发明进一步包括含有所述试剂、用于标记检测的指示剂、以及对照样品的试剂盒。

5 任何活体样品如体液包括血浆，血清，血液，尿液，组织液，或脑脊髓液等，只要含有 megsin 蛋白或其前体或片段，都可用作检测本发明的 megsin 蛋白的样本。在这些活体样品中，随着肾小球膜细胞的增殖和活化，可在尿液中以高频率检测出 megsin 蛋白。因此，尿液中 megsin 蛋白的检测可用作肾小球膜增生性肾病，如 IgA 肾病的标记(marker)。

10 这里的肾功能评价指充分了解作为构成肾组织之重要细胞的肾小球膜细胞的状况，也指是否存在引起肾小球膜细胞异常的肾病以及其严重程度。本发明所说的肾疾病包括导致肾小球膜细胞异常的任何疾病。具体地说，包括 IgA 肾病，急性肾小球肾炎，肾小球局灶硬化(focal sclerosing glomerulopathy)，膜增生性肾小球肾炎，糖尿病肾炎，狼疮性肾炎等。受到
15 这些肾病影响的肾功能变化状况可以由本发明方法进行评价。在上述这些疾病中，用于评价肾功能的本方法尤其有效于指示肾小球膜细胞增生性肾病，如 IgA 肾病。而且，本发明用于评价肾功能的方法不仅可用于诊断肾病的存在或其严重程度，还可以评价治疗效果或预后判断。另外，本发明用于评价肾功能的方法对尿蛋白检查显示阳性的尿样测定 megsin 蛋白的含
20 量可以排除非于肾小球膜细胞增殖的疾病，象急性肾盂肾炎，慢性肾盂肾炎，隐匿性肾病综合征(minimal-change nephritic syndrome)，慢性肾小球肾炎，肾淀粉样变性病等。

按照本发明评价肾功能的方法，获得要进行肾功能检测的个体的活体样品，依照上述方法测定其中的 megsin 蛋白浓度。优选地，根据测定的浓
25 度和体积确定 megsin 蛋白含量，并与正常人进行对比。为计算尿液试样的 megsin 蛋白含量，收集一天中所有尿液并测定其尿量。这样，可以确定一整天的尿液中的 megsin 蛋白含量。可选地，即使在偶尔采取尿样的情况下，也可用肌酸酐校正来推测其含量。术语“肌酸酐校正”是指根据肌酸酐浓度校正由于尿中含量的变化对目标成分的稀释(或浓缩)的影响。每日排泄到
30 尿液中的肌酸酐量是固定的。基于此事实，偶尔收集的尿液占每日总尿量的百分比可以从肌酸酐浓度求出，还可将同一尿液中目标成分的浓度换算

为每天的总排泄量。或者，可用通常用于肾功能诊断的体重校正方法预测血液中的含量。体重校正方法是根据从采血个体的体重预计的体积来计算血液成分的量。

5 或者，可在一定时间内通过观察某个体活体样品中的 megsin 蛋白浓度变化追踪肾功能的变化，不必再转换成量。或者先设定特定物种或人种等群体的体液中 megsin 蛋白浓度的正常值，然后将某个体的 megsin 蛋白浓度(或含量)与该正常值进行比较，从而确定肾功能是否异常。

10 本发明所用活体样品可以是尿液或血液。更优选尿液，因为收集尿液不会对身体造成损伤，且可直接反映取样时的肾功能状况，。尽管收集血液会造成一些创伤，但由于 megsin 蛋白是肾特异性蛋白，其测定值的变化与肾功能异常密切相关。故，用血液和尿液中的 megsin 蛋白含量作为肾功能的指标可获得较高特异性。与现今广泛采用的用尿蛋白为标志来筛查肾功能疾病的方法相比，利用 megsin 蛋白作指标可获得具有更高敏感性和特异性的筛选方法。一种通过测定尿液中 megsin 蛋白而评价肾功能的方法详述
15 于下，该方法的基础是用单克隆抗体经免疫学方法测定 megsin 蛋白。

(A) 抗体的制备

(1)动物的免疫以及抗体生成细胞的制备

20 可如下免疫动物。哺乳动物，如大鼠，小鼠等，用按照传统方法(例如，T. Miyata 等，临床研究杂志，120: 828-836(1998))纯化的人 megsin 蛋白免疫。优选对细胞融合所用无限增殖细胞的来源动物品系进行免疫。例如，优选 8-10 周龄的小鼠，雌雄均可。免疫如下进行：(1)纯化的人 megsin 蛋白与合适的佐剂(例如，弗氏完全佐剂，氢氧化铝胶百日咳疫苗等)混合为乳剂，(2)以皮下，腹膜内，静脉等方式给药至动物。重复此免疫过程 2-5 次，
25 每次间隔 1-2 周。末次免疫为对动物腹膜内给药 0.5-2 μ g 的人 megsin 蛋白。从如此免疫的动物体液得到多克隆抗体。在每次免疫的 3-7 天后，从眼底静脉丛采血，血清抗体滴度由下述的蛋白 A 玫瑰花结试验(欧洲免疫学杂志，4:500-507(1974))测定。在抗体滴度足够高时收获抗体或抗体生成细胞。

30 蛋白 A 玫瑰花结试验如下进行：72 孔 Terasaki 板(Falcon)用人成红细胞系 K562(日本癌症研究来源库(JCRS))包被；加入用 PBS(磷酸氢二钠 2.90g, 磷酸氢钾 0.20g, 氯化钠 8g, 氯化钾 0.2g, 蒸馏水 1L)稀释的标本；将平板于 CO₂

保温箱中 37℃ 静置 30 分钟；用 PBS 洗孔；加入用蛋白 A 包被的绵羊红细胞(Amersha Pharmacia Biotech)；显微镜观察花结的形成。

从上述人 megsin 蛋白免疫的动物可获得抗体生成细胞。抗体生成细胞可从脾，淋巴结，外周血等获得。但是，特别优选脾。例如，在末次免疫的 3-4 天后，无菌摘除脾，在极限必需培养基(MEM)(用水制药)中切碎，用镊子剥离组织和细胞，经 1,200rpm 离心 5 分钟后，弃去上清。沉淀用 Tris-HCl 缓冲液(pH7.65)处理 1-2 分钟，去除红细胞。用 MEM 洗涤三遍，得到用于细胞融合的脾细胞。

(2)无限增殖细胞的制备

10 具有无限增殖能力的任何细胞都可用作融合中的无限增殖细胞。一般使用骨髓瘤细胞。优选采用抗体生成细胞的同类型细胞。例如，以小鼠为例，已知下列细胞系为 8-氮鸟嘌呤抗性小鼠(BALB/c)的骨髓瘤细胞系。

P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) (Current.Topics in Microbiol. Immunol., 81:1-7, (1978)),

15 P3/NS1/1-Ag4-1(NS-1)(欧洲免疫学杂志, 6:511-519,(1976)),

SP2/0-Ag14(SP-2)(自然, 276: 269-270, (1978)),

P3-X63-Ag8653(653)(免疫学杂志, 123: 1548-1550, (1979)),

P3-X63-Ag8(X63)(自然, 256:495-497,(1975))

20 将这些无限增殖细胞系在 8-氮鸟嘌呤培养基中传代(普通培养基, 在 RPMI-1640 培养基中添加谷氨酰胺(1.5mM), 2-巯基乙醇(5×10^{-5} M), 庆大霉素($10 \mu\text{g/ml}$),胎牛血清(FCS, CLS)(10%), 进一步在这个普通培养基中加入 8-氮鸟嘌呤($15 \mu\text{g/mM}$)), 在细胞融合前于普通培养基中传代培养 3-4 天以确保在细胞融合当天细胞数量达到 2×10^7 个以上。

(3)细胞融合

25 细胞融合可如下进行。培养孔用 MEM 培养基或 PBS 充分洗涤后,使(1)中所得抗体生成细胞与在(2)中制备的无限增殖细胞以 5-10: 1 的比例混合。1,200 rpm 离心 5 分钟后,弃去上清,使沉淀的细胞充分分离。细胞以 0.1-1.0mL/ 10^8 加入到含 1-4g 聚乙二醇-1000(PEG-1000), 1-4mL MEM 培养基, 0.5-1.0mL 二甲亚砜的混合物中,在搅拌融合细胞时保持混合物在 37℃。然后,每隔 10 分钟向混合物中添加 3mL MEM 培养基进行稀释,通过多次添加 MEM 至总量为 50mL 来终止细胞融合反应。接着,离心($1,500 \times 5$ 分钟)

30

后弃去上清，轻敲细胞，加入 100mL 普通培养基(RPMI-1640 培养基，10% FCS)，用刻度移液管轻轻吹打使细胞悬浮。96 孔板每孔分配 100 μ L 悬浮液，在 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 孵育 3-5 天。培养板每孔加入 100 μ L HAT 培养基(补充了次黄嘌呤(10^{-4} M)，胸腺嘧啶脱氧核苷(1.5×10^{-5} M)，氨基喋呤(4×10^{-7} M)的普通培养基)，再孵育 3 天。其后，每三天弃去培养液上清的一半，加入等量的 HAT 培养基。在 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 继续孵育约 2 周。

(4) 杂交瘤的筛选和克隆

在已观察到融合细胞生长菌落的孔中弃去一半的上清，加入等量的 HT 培养基(无氨基喋呤的 HAT 培养基)，将细胞孵育 4 天。取部分培养上清液，采用上述的蛋白 A 玫瑰花结试验测定抗 megsin 蛋白的抗体滴度。抗体滴度也可采用如下的其它方法测定。例如，将杂交瘤培养上清液加入到固相(如微量滴定板)上，megin 蛋白直接与载体一起吸附于该固相上；加入用放射性物质或酶标记的抗免疫球蛋白抗体(如果用于细胞融合的细胞来自小鼠时，则使用抗小鼠免疫球蛋白抗体)或蛋白 A；检测附着于该固相上的抗-megin 蛋白单克隆抗体。抗体滴度测定方法还有：将杂交瘤培养上清液加至吸附了抗免疫球蛋白抗体或蛋白 A 的固相上；加入以放射性物质或酶等标记的 megsin 蛋白；检测附着于该固相上的抗-megin 蛋白单克隆抗体。

对观察到有与 megsin 蛋白反应的抗体产生的孔通过有限稀释的方法重复进行 4 次克隆，挑选 megsin 蛋白抗体滴度稳定的细胞系作为能产生抗 megsin 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

(5) 单克隆抗体的制备

通过体外或体内培养所得杂交瘤可产生单克隆抗体。当进行体内培养时，可将杂交瘤移植至任意动物上。优选使用与用于细胞融合的脾细胞来源相同的动物。例如，可将(4)中得到的 $2-4 \times 10^6$ 个能产生抗 megsin 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞腹腔内给药至已用降植烷处理过(在腹腔内给药 0.5mL 2, 6, 10, 14-四甲基十五烷-降植烷后培养 2 周)的 8-10 周龄 BALB/c 雌性小鼠。2-3 周后，由于内脏腔内腹水的积累小鼠腹部膨大，该腹水中含高浓度的单克隆抗体。收集腹水，离心(3,000rpm \times 5 分钟)除去固体物质，纯化 IgG。另一方面，杂交瘤可以无血清体外培养，合适量的抗体分泌到上清液中。腹水或培养上清液用 50% 硫酸铵盐析，然后对 PBS 透析 1-2 周。使透析过的级分通过蛋白 A Sepharose 凝胶柱，收集 IgG 级分得到纯化的单

克隆抗体。

抗体同种型的测定依照 Ouchterlony 方法(双向免疫扩散试验)(免疫学实验入门, 生物化学实验 15, 学会出版中心, 74 页(1981))。采用 Folin 法以及 280nm 处光吸收值($1.4(OD_{280}) = \text{免疫球蛋白 } 1\text{mg/mL}$)求出蛋白含量。

5 (6)单克隆抗体的鉴定

上述得到的单克隆抗体可如下鉴定: (1)利用人类淋巴细胞衍生的细胞系如 HSB-2, K562 等进行免疫沉淀反应, 这些细胞表面已用碘标记(免疫学杂志, 138: 2850-3855(1987)); (2)用酶联免疫吸附试验(ELISA)(免疫学杂志, 142: 2743-2750(1989))。

10 (7)标记的单克隆抗体的制备

所得纯化的单克隆抗体可利用戊二醛法(免疫化学, 6:43(1969)), 过碘酸法(组织化学和细胞化学杂志, 22, 1084(1974)), 马来酰亚胺法(生物化学杂志, 79: 233(1976)), 吡啶基二硫化物法(生物化学杂志, 173: 723(1978))等进行酶标记。

15 例如, 如下进行过碘酸法: (1)过碘酸(38.5mg/mL)搅拌加入到过氧化物酶溶液(4mg/mL)中; (2)室温下反应 20 分钟; (3)用 1mM 乙酸缓冲液(pH4.5)更换 PD-10(Amersham Pharmacia Biotech)缓冲液; (4)加入 40 μ L 0.2M 氢氧化钠; (5)加入已对 10mM 碳酸缓冲液(pH9.5)透析的 10mg 单克隆抗体; (6)室温下反应 2 小时; (7)反应完成后, 混合物冰上冷却; (8)加入 100 μ L 硼氢化钠(4mg/mL)溶液, 反应 2 小时; (9)将 PD-10 换为 PBS; (10)3,000rpm 离心 30 分钟; (11)上清液采用 Sephacryl S200 HR26 \times 30(Amersham Pharmacia Biotech)凝胶过滤; (12)通过测定 403 和 280nm 处的吸光值得到标记的单克隆抗体级分; (13)将牛血清白蛋白(10mg/mL)加入到该级分中; (14)-20 $^{\circ}$ C 保存, 使用前用 PBS-吐温(商标)20 稀释。

25 (B)制备检测用颗粒

本文用于检测的颗粒可通过将抗 megsin 蛋白单克隆抗体经物理或化学方法结合到合适的颗粒如层析所用凝胶上而制备。本发明中将抗体结合至化学活化颗粒的方法因具有预期的结合稳定性而为优选。具体如, 将本发明所用抗体结合至已被对甲苯磺酰氯活化而甲苯磺酰化的颗粒的方法。

30 所用颗粒材料可用玻璃, 琼脂糖, Sepharose, 琼脂糖填充型多孔硅藻土, 亲水性共聚丙烯酸凝胶, 聚苯乙烯等制备。使用磁性颗粒可利用磁体

吸引颗粒，从而测定微量样品。例如，将可以磁化的物质(如 Fe_2O_3)放入颗粒核心中，可以使颗粒超顺磁化。这类颗粒作为免疫学分析的固相有售。这类颗粒要采取适合的形状，如球形，不定形断面等，但优选球形颗粒。颗粒大小不限，如平均粒径可以是 $5\text{-}1000\mu\text{m}$ 。此外，使用比重大于反应液(约 5 1)的颗粒易于收集，其效果与使用磁性颗粒的近似。此外，使用较大比重的颗粒对与易于脱离的抗体结合更有利，因为收集颗粒时可以采用较温和的离心条件。

抗 megsin 蛋白抗体可通过直接或间接方式结合到颗粒上。例如，如果使用小鼠单克隆抗体作为抗体，可将能识别小鼠 IgG 的抗体结合到颗粒上，10 从而使小鼠抗体间接结合于颗粒上。这样的抗体称为第二抗体。除了第二抗体外，利用蛋白 A 或蛋白 G(它们结合免疫球蛋白恒定区)，或利用生物素化抗体捕获与抗生物素蛋白结合的颗粒等也可完成间接结合。为使第二抗体、蛋白 A 或蛋白 G 化学结合到颗粒上，优选在进行结合前活化颗粒。能将蛋白偶联至颗粒的任何活化方法都可以选择作为颗粒的活化方法。15 这样的活化方法包括，甲苯磺酰氯法，溴化氰法，溴乙酰法，戊二醛法等。也有市售的活化颗粒。这些活化颗粒的活化和与蛋白，如第二抗体，蛋白 A，蛋白 G 等的结合，可按照传统方法进行。

另外，已偶联至第二抗体，蛋白 A，蛋白 G 等的颗粒也有售。已知市售的颗粒如下所示。

20 Dynabeads™ M-450, M-280, Veritas 提供, Dynal Japan 进口

绵羊抗小鼠 IgG 包被型

山羊抗小鼠 IgG 包被型

绵羊抗大鼠 IgG 包被型

绵羊抗家兔 IgG 包被型

25 Polyscience 公司

山羊抗小鼠 IgG (H 和 L 链)羧化珠

山羊抗家兔 IgG(H 和 L 链)羧化珠

蛋白 A 羧化珠

山羊抗家兔 IgG(H 和 L 链)微磁颗粒

30 山羊抗家兔 IgG(H 和 L 链)微磁颗粒

蛋白 A 微磁颗粒

绵羊抗小鼠 IgG(H 和 L 链) 微磁颗粒

本发明抗体与上述颗粒的结合可如下进行：(1)用蛋白溶液处理悬浮于合适培养基中的颗粒以阻止非特异性结合，(2)混合含抗体的腹水或纯化的抗体溶液。

5 (C)检测方法

本发明的检测方法是：收集受检者血液或尿液，离心后取上清作为样品。离心尿液可分离沉渣，静置尿液上清，或使用经过滤除去沉渣的尿液。使利用上面制备的检测颗粒所稀释的标样与在(7)中得到的标记抗体混合，室温下孵育 2 小时。反应结束后，洗涤混合物，加入底物溶液进行显色反应。然后，混合物离心除去颗粒，上清转移到微量滴定板上，测定吸光度。采自正常人的标样也按照同样的方法检测，对比吸光度。可以仅比较 megsin 蛋白的浓度，以及比较体液中 megsin 蛋白的绝对含量(通过乘以个体的体液体积即可得到)，或依据其它类似校正值来比较。

10 (D)试剂盒

15 用于进行上述实验的材料可以作为试剂盒提供。该试剂盒可以包括检测颗粒(已如上述偶联了抗体)和磁体。它也可包括结合有标记分子的抗体。此外，本发明的试剂盒还包括试管，离心管，其它类似容器，移液管或其它吸取装置，或显微镜。此外，可组合检测标记所必需的酶底物，依据阳性或阴性标准品。可用能作为上述检测颗粒之原料固体颗粒和抗体替代检测颗粒。本发明参考以下实施例详述，但不限于此。

附图说明

图 1 表示采用作为抗原的合成肽-2 的特异性多克隆抗体进行 Western 印迹的结果，该肽具有 megsin 蛋白的部分氨基酸序列(SEQ ID NO: 12)。

25 每一条带表示如下：

1; MBP

2: MBP-megsin 蛋白

3: His-megsin 蛋白

4: MBP-PAI II

30 5: 在 CHO 细胞中表达的 megsin 蛋白

6: 用 megsin 蛋白基因转染的重组病毒感染的蚕的体液

7: megsin 蛋白基因转染前的病毒载体感染的蚕的体液

8: 未感染病毒的蚕的体液

9: 正常人血清

5 图 2 表示采用作为抗原的合成肽-3 的特异性多克隆抗体进行 Western 印迹的结果, 该肽具有 megsin 蛋白的部分氨基酸序列(SEQ ID NO: 13)。每一条带表示的蛋白同图 1。

图 3 表示采用作为抗原的合成肽-342 的特异性多克隆抗体进行 Western 印迹的结果, 该肽具有 megsin 蛋白的部分氨基酸序列(SEQ ID NO: 15)。每一条带表示的蛋白同图 1。

10 图 4 表示采用作为抗原的 MBP-megsin 蛋白的特异性多克隆抗体进行 Western 印迹的结果。每一条带表示的蛋白同图 1。

图 5 显示了尿 megsin 蛋白的 ELISA 检测结果。纵轴表示 megsin 蛋白检测值(肌酐比例: AU)。样品来自健康人(16 份样品), IgA 肾病患者(24 份样品), 隐匿性肾病综合征患者(24 份样品)。

15 图 6 表示了尿 megsin 蛋白的 Western 印迹检测结果。每一条带表示如下:

1: MBP-megsin 蛋白

2-5: 健康人的浓缩尿液

6-7: IgA 肾病患者的浓缩尿液

20 图 7 表示 IgA 肾病患者肾组织的免疫染色的显微照片。

图 8 表示健康人肾组织免疫染色的显微照片。I 为放大 33 倍, II-IV 放大 80 倍。

图 9 表示健康人的肾, 肝, 脾组织免疫染色的显微照片。V 放大倍数为 33 倍的照片, VI 是 80 倍, VII 和 VIII 是 40 倍。

25 图 10 表示用大鼠 megsin 肽-2 抗体对正常大鼠的肾, 肝, 脾组织进行免疫染色的显微照片。I 和 II 为放大倍数 100 倍的照片, III 和 IV 是 40 倍。

图 11 表示通过免疫沉淀法检测 megsin 蛋白的结果。

泳道 1: 抗-megsin 肽-2 抗体(-)

泳道 2: 抗-megsin 肽-2 抗体(+)

30 泳道 3: 分子量标记物

图 12 表示使用 CHO-megsin 或 MBP-megsin 作为抗原并使用抗-megsin

肽-2 抗体的 ELISA 结果。纵轴表示 492nm 的吸光度，横轴表示抗原浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。

图 13 表示使用 CHO-megsin 或 MBP-megsin 作为抗原并使用抗-megsin 肽-4(257-272)抗体的 ELISA 结果。纵轴表示 492nm 的吸光度，横轴表示抗原浓度($\mu\text{g/mL}$)。

实施本发明的最佳模式

[实施例 1] 肾小球膜细胞

从宝公司(日本东京)购入的人肾小球膜细胞和 CHO(中国仓鼠卵巢细胞)在含有 10% 胎牛血清的 Dulbecco' s 改良型 Eagle' s 培养基中，5% CO_2 培养箱 37 $^\circ\text{C}$ 下培养。将人肾小球膜细胞传 7-10 代后用于下面的实验。

[实施例 2] 抗 megsin 蛋白合成肽多克隆抗体的制备

采用与丝氨酸蛋白酶抑制剂家族其它成员的同源性低且具有亲水性的区域作为免疫原，制备抗 megsin 蛋白多克隆抗体。具体地说，挑选带有人 megsin(SEQ ID NO: 2)和大鼠 megsin(SEQ ID NO: 19)的下列氨基酸序列的多肽作为免疫原：

距 N-末端的位置	氨基酸序列	SEQ ID NO/No.
16- 30	FREDDNQGNGNVFF	11/1
72- 86	SQSGLQSQLKRVFSD	12/2
339-354	ATGSNIVEKQLPQSTL	13/3
257-272	NLMEWTNPRRMTSKYV	14/4
342-356	SNIVEKQLPQSTLFR	15/342
74- 87	LGLQYQLKRVLAD	16/rat1
341-354	ESNIVEKLLPESTV	17/rat2

具有上述氨基酸序列并在 N-末端附着了一个 C(对肽 3 而言是在其 C-末端)的肽段在自动合成仪 432A 型(Perkin Elmer, Foster City, CA)上合成。合成肽经反相 HPLC 纯化后，冻干，用于竞争实验以确认免疫力和免疫学特异性。

这些合成肽各通过 N-(6-马来酰亚胺基己酰氧基)琥珀酰亚胺(同仁化学研究所监制)与牛甲状腺球蛋白(Sigmar)结合，对 0.85% NaCl 溶液透析，与佐剂(Difco)充分混合为乳剂，皮下注射家兔。第一次注射(20 μg /兔)三周后，

进行第二次免疫(50 μ g/兔),此后,每二周一次共进行4次免疫(50,100,200 μ g/兔)。弗氏完全佐剂只用于第一次免疫,此后,使用弗氏不完全佐剂。在41和55天后,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)评价血清抗体滴度,以确认采血得到的血清能与合成肽反应。为进行首次反应,在96孔板的每一已预先固定了50ng抗原的孔中加入100 μ L连续稀释的抗血清。洗板后,在第二次反应中使HRP偶联型山羊抗兔IgG(Cappel)与之反应。洗涤后,采用邻苯二胺(和光纯药)为底物进行显色反应,在492nm测定吸光度。抗体滴度的增长得以确认。

10 [实施例3]抗 megsin 蛋白合成肽的多克隆抗体的纯化

按照传统方法(细胞工程学增编(实验讲义系列)抗肽实验讲义,秀润社,日本)通过免疫亲和层析纯化 megsin 蛋白合成肽的多克隆抗体。更具体地,此方法如下进行:1)将每一合成肽固定到 FMP(2-氟-1-甲基吡啶鎓甲苯-4-磺酸)活化的 Cellulofine(生化学工业)上以制备亲和柱;2)用 PBS(-)稀释表现出抗体滴度增长的兔血清,使用肽柱亲和纯化该抗体。通过 Western 印迹(图1-4)确认纯化抗体与 megsin 蛋白融合蛋白的反应,从而证明得到的纯化抗体是 megsin 蛋白特异性抗体。

[实施例4]抗大鼠 megsin 合成肽的抗体的制备

20 使每种大鼠 megsin 合成肽附着于匙孔螯血蓝蛋白(KLH) (Calbiochem-Novabiochem, La-Jolla, CA)。即,悬浮在 0.05M 磷酸钠缓冲液(pH7.2)中的 KLH 与溶解于二甲基甲酰胺中的间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯(MBS)室温下搅拌30分钟。反应液用 0.05M 磷酸钠缓冲液(pH6.0)透析,然后作为 KLH-MB 使用。然后,将上述的肽悬浮于蒸馏水中,并与所得 KLH-MB 一起保温。加入一半的 0.2M 磷酸氢二钠到 KLH-MB 并在室温下搅拌3小时。反应之后,用磷酸钠缓冲液透析,最后冻干。

25 用所得 KLH 偶联型合成肽和佐剂免疫家兔。弗氏完全佐剂(FCA)(DIFCO Laboratories,USA)只用于第一次免疫,弗氏不完全佐剂(DIFCO Laboratories,USA)用于随后的免疫。以2-3周的间隔免疫5次。使用蛋白A亲和柱(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)从抗血清中纯化 IgG。在兔免疫前也获取血清,以同样方式纯化 IgG。

[实施例 5]兔多克隆抗 megsin 肽 IgG 反应性的研究

兔 IgG(以 megsin 肽作为免疫原产生的)的反应性采用下列多种蛋白作为抗原进行研究。如下制备 MBP-megsin 蛋白和 His-megsin 蛋白:1)根据 SEQ ID NO: 1 所示 megsin 基因的碱基序列经 PCR 扩增编码区域; 2)将扩增产物插入到麦芽糖结合蛋白融合蛋白表达载体 pMAL-c(New England Biolab)以得到表达 MBP 与 megsin 蛋白的融合蛋白的载体; 3)用此载体转化大肠杆菌; 接着 4)利用直链淀粉等经亲和层析从破碎细胞液中纯化表达产物, 得到 MBP-megsin 蛋白。为得到 His-megsin 蛋白, 构建融合蛋白表达载体, 其在载体 ptrcHisA(Invitrogen)(其以与组氨酸标签的融合蛋白形式表达所插入的基因)中包含上述 megsin 基因。用此载体转化大肠杆菌 JM109, 经 IPTG 诱导表达后, 从破碎细胞液经镍柱等纯化融合蛋白形式的 His-megsin 蛋白。

然后, 使重组 megsin 如下在 CHO 细胞中表达。通过利用 PCR 引入突变, 将 c-myc 标签和组氨酸标签连接到 megsin cDNA 全长编码区的 N-末端。将标签偶联型 megsin cDNA 克隆至哺乳动物表达载体 pREP9(Invitrogen)。采用 LipofectAMINE(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)将含有人 megsin cDNA 的 pREP9 转化至 CHO 细胞(10^5 细胞), 该细胞已在 6 孔板上于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中进行了培养。用 0.5mg/ml 焦硫酸遗传霉素(和光纯药)筛选稳定的转化体。然后, 用(His)6 亲和柱从培养上清液中纯化 c-myc-组氨酸标签偶联型 megsin 重组体(CHO megsin)。

被 megsin 蛋白(+)病毒感染的蚕的体液指依照已知方法(普通病毒学杂志 78: 3073- 3080 (1979))用已引入 megsin 基因的病毒感染的蚕的体液。另一方面, 被 megsin 蛋白(-)病毒感染的蚕的体液是指用不含 megsin 基因的病毒感染的蚕的体液。设计这些 megsin 重组体所必需的 megsin 编码基因可利用肾小球膜细胞的 mRNA 为模板经 PCR 合成, 或从本发明人构建的 megsin 基因克隆载体(保藏号 FERM BP-6518)得到。

观察对纤溶酶原激活剂抑制因子-1, MBP-纤溶酶原激活剂抑制因子-2 融合蛋白(MBP-PAI II), 等等的反应性。挑选这些蛋白以确认抗体的交叉反应性, 它们与 megsin 蛋白有一定程度的同源性。

30 MBP-megsin 蛋白,
His-megsin 蛋白,

MBP-PAI II,

PAI I,

在 CHO 细胞中表达的 megsin 蛋白,

megsin 蛋白(+)病毒感染的蚕的体液

5 megsin 蛋白(-)病毒感染的蚕的体液

未经病毒感染的蚕的体液, 以及

人血清白蛋白。

每一蛋白溶液用同样量的样品缓冲液(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, 100℃加热 5

10 分钟, 蛋白用 4-20% 的梯度胶经 SDS-聚丙烯凝胶电泳(SDS-PAGE)

(Laemmli, U.K., 自然, 227:680-685(1970))分离。经 SDS-PAGE 分离的蛋白通过 100V 恒定电压 1 小时印迹在聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(BioRad)上, 使用的

印迹液为 25mM Tris-HCl, 192mM 甘氨酸, 20% 甲醇, pH8.3。已印迹的 PVDF 膜用蒸馏水洗后, 在含 5% Block Ace 的 TTBS 液中封闭 3 小时。PVDF 膜

15 用 TTBS (20mM Tris, 500mM NaCl, 0.05% 吐温 20, pH7.5)洗后, 4℃下与

第一抗体, 即稀释在 TTBS 中的兔多克隆抗 megsin 肽 IgG, 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

Immuneblot Kit) (BioRad)检测。就是说, 首先与 TTBS 稀释的生物素化山羊抗家兔 IgG 一起室温下孵育 1 小时, 接着与链霉抗生物素蛋白-生物素化碱性

20 磷酸酶复合物反应, 该复合物事先由链霉抗生物素蛋白和生物素化碱性

磷酸酶室温下孵育 1 小时而制备。PVDF 膜在 TTBS 中洗涤, 然后和底物(氮蓝四唑和 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸酯, 甲苯胺溶液)室温下孵育约 30 分钟, 使

与第一抗体结合的抗体显色。通过与足量蒸馏水充分反应而终止该反应。

结果见图 1-4。各图中参与反应的抗体是以下列物质为免疫原得到的。

25 图 1. 免疫原: megsin 肽-2

图 2. 免疫原: megsin 肽-3

图 3. 免疫原: megsin 肽-342, 和

图 4. 免疫原: MBP-megsin 蛋白

30 [实施例 6]亲和纯化的抗 megsin 肽 IgG 的酶标记

借助市售标记试剂盒(AP 标记试剂盒: Boehringer-Mannheim)遵循试剂

盒上的指示，用碱性磷酸酶标记实施例 3 得到的亲和纯化的抗 megsin 肽 IgG。借助另一标记试剂盒(ECL 蛋白生物素标记组件：Amersham Pharmacia Biotech)遵循试剂盒上的指示进行生物素标记。

5 [实施例 7]尿中 megsin 蛋白的 ELISA 检测

来自 16 例健康人，24 例 IgA 肾病患者，和 24 例隐匿型肾病综合征患者的尿液经离心排除不溶性物质。再用截留分子量为 5,000 的超滤膜(Ultrafree, Millipore)将其浓缩。用兔多克隆抗-megsin 肽-2-IgG 包被 96 孔 ELISA 板各孔。每孔加 120 μ L PBS(-)，接着加入 120 μ L 浓缩尿液，4 $^{\circ}$ C 静置过夜。用 PBS(-)洗孔，加入 Block Ace(大日本制药)室温下封闭 2 小时。各孔再用含 0.05 % (w/v)吐温 20(和光纯药)的 PBS(-)洗，加入碱性磷酸酶标记的兔多克隆抗-megsin 肽-1 抗体，室温下静置 1 小时。用吐温-PBS 洗后，每孔中加入 100 μ L 显色底物溶液(1mg/mL 邻苯二胺(和光纯药)-1M 二乙醇胺(和光纯药)缓冲液(pH9.8))。室温下反应后，用 50 μ L /孔 1N 氢氧化钠终止反应，用微滴板读取仪(Spectra MAX250, Molecular Devices)读取 405nm 的吸光度。从标准曲线确定尿液中 megsin 蛋白浓度。用市售肌酸酐检测试剂(用于自动分析仪“Dia”-Crea, Dia Pharmaceutical)测定同一尿样中的肌酸酐浓度，将 megsin 蛋白量校正为肌酸酐比例。结果如图 5 所示。健康人和 IgA 肾病患者间($p < 0.001$)，或 IgA 肾病患者和隐匿型肾病综合征患者间($p < 0.001$)，观察到 megsin 蛋白浓度的显著差异。

由于观察到健康人和 IgA 肾病患者间 megsin 蛋白浓度的显著差异，通过测定尿中 megsin 蛋白可以确定肾病的发生。此外，由于 IgA 肾病患者和隐匿型肾病综合征患者间的显著差异，表明依照本发明测定尿 megsin 蛋白可以区分这些疾病。这两种疾病用尿蛋白作为指标进行传统筛选时无法区分，因为它们都显示阳性结果。

此外，与没有进行肌酸酐校正的尿 megsin 蛋白浓度相比，尽管 megsin 蛋白浓度易于在肾病患者出现且其值很高，仅少量病例难以证明统计学上的显著差异。故按本发明测定尿中 megsin 蛋白时，优选通过诸如肌酸酐校正等方法比较含量。

30

[实施例 8]采用 Western 印迹检测并定量尿中 megsin 蛋白

将来自 8 个健康人和 9 个 IgA 肾病患者的尿样离心，弃去不溶物后，用截留分子量 5,000(Ultrafree, Millipore)的超滤膜浓缩。用等量的样品缓冲液(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)处理浓缩尿液，100℃加热 5 分钟，然后在 4-20 % 的梯度胶(第一化学药品)上经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) (Laemmli, U.K.(1970) 自然 227, 680-685)分离。SDS-PAGE 分离所得蛋白用 100V 恒定电压经 1 小时印迹在聚偏二氟乙烯膜(BioRad)上，所用印迹液为 25mM Tris-HCl, 192mM 甘氨酸, 20 % 甲醇, pH8.3。已印迹的 PVDF 膜用蒸馏水洗后，在含 5 % Block Ace 的 TTBS 液中封闭 3 小时。PVDF 膜用 TTBS (20mM Tris, 500mM NaCl, 0.05 % 吐温 20, pH7.5)洗，4℃稀释在 TTBS 中的家兔多克隆抗 megsin 肽 IgG(第一抗体)反应过夜。

然后，用扩增的碱性磷酸酶免疫印迹试剂盒(BioRad)检测。即，首先与 TTBS 稀释的生物素化山羊抗家兔 IgG 一起室温下孵育 1 小时，接着与链霉抗生物素蛋白-生物素化碱性磷酸酶复合物反应，该复合物由链霉抗生物素蛋白和生物素化碱性磷酸酶室温下孵育 1 小时而制备。PVDF 膜在 TTBS 中洗涤，然后和底物(氮蓝四唑和 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸，甲苯胺溶液)室温下孵育约 30 分钟，使与第一抗体结合的抗体显色。通过与足量蒸馏水充分反应来终止反应。使用电泳图像处理仪(AE-6920M-05, Atto)和电泳位置图像分析软件(AE-6920WSE/MSE, Atto)定量分析显色的凝胶区带。结果(电泳图谱)如图 6 所示。图象分析仪的测定如下。与健康人浓缩尿液的区带相比，可观察到 IgA 肾病患者的区带较致密。可见，通过定量分析这些区带的密度可定量测定 megsin 蛋白。

图象分析仪的测定结果

泳道	测定结果
25	1 分子量标记物
	2 8.5
	3 5.2
	4 13.8
	5 4.8
30	6 32.8
	7 15.1

[实施例 9] 制备检测颗粒

本发明的检测颗粒可通过将抗 megsin 肽 IgG 经由抗小鼠 IgG 抗体偶联至市售磁性颗粒而获得。甲苯磺酰活化型 Dynabeads™ M-450(匀质甲苯磺酰活化型顺磁聚苯乙烯颗粒: Dynal Biotech)用作本发明颗粒, 其 1mM 盐酸液经无菌蒸馏水洗一次, 然后用 0.2M 硼酸缓冲液(pH9.5)洗一次。接着将抗 megsin 肽 IgG 抗体溶于 0.2M 硼酸缓冲液(pH9.5)中至浓度 150 μ g/mL, 然后将此溶液加至等量活化型颗粒悬浮液(抗体/颗粒=75 μ g/15mg)中。接着使混合物在 22 $^{\circ}$ C 温和搅拌 24 小时。用磁体收集抗体偶联型颗粒, 弃去上清, 留下吸附在磁体上的颗粒。颗粒按照如下顺序清洗:

- (1)用 5mL 0.1M PBS (pH7.0)洗涤 10 分钟,
- (2)用 5mL 1M 乙醇胺-HCl(pH 9.5)洗涤 2 小时,
- (3)用含 0.1M 氯化钠, 0.1% 牛血清白蛋白(BSA), 0.1% 吐温 20 的 5mL 0.05M Tris (pH7.5)洗涤 12 小时,
- (4)用不含吐温 20 的如(3)所述缓冲液 5mL 洗涤 2 小时。

此后, 用磁体收集颗粒, 弃去上清, 将颗粒悬浮在含 10% Block Ace 的 PBS(-)/BSA 中至 4×10^8 颗粒/mL(30mg/mL)的浓度。所得 IgG 偶联型颗粒可在 4 $^{\circ}$ C 下保持稳定至少 6 个月。

[实施例 10]通过磁性颗粒方法测定尿中 megsin 蛋白

利用实施例 9 中制备的抗体偶联型颗粒经磁性颗粒法测定偶尔采集的尿样中的 megsin 蛋白浓度, 这些尿样来自 12 例健康人和 24 例患有不同肾病的患者, 其中 12 例为 IgG 肾病患者, 另 12 例为隐匿型肾病综合征患者。尿样保存于 -80 $^{\circ}$ C, 测定前解冻。将它们于 3,000rpm 下离心 5 分钟, 取上清作样品。如下测定:

500,000 偶联了第一抗体(家兔多克隆抗 megsin 肽-2 抗体)的磁性颗粒放入已用 Block Ace(大日本制药)封闭的试管(1.5ml)中。每种尿样取 500 μ L 与等量的碱性磷酸酶标记型家兔多克隆抗 megsin 肽-1 抗体的 PBS(-)液混合, 室温下旋转 2 小时。然后, 3,000rpm 离心 5 分钟后, 用磁体吸住颗粒, 弃去上清, 加入 1 mL 洗液(含 0.05% (w/v)吐温 20(和光纯药)的 PBS(-) (pH7.4) (吐温-PBS)), 搅拌洗涤颗粒共 4 次, 然后加入 100 μ L 底物溶液, 搅拌下反

应 20 到 30 分钟。含有 1mg/mL 邻苯二胺(和光纯药)的 1M 二乙醇胺(和光纯药)缓冲液(pH9.8)用作底物溶液。反应完成后,用 50 μ L 1N 氢氧化钠终止反应,在 450nm 下测定吸光度。从标准曲线计算尿 megsin 蛋白浓度。如实施例 7 所述测定同一尿样中的肌酸酐浓度,将 megsin 蛋白浓度校正为肌酸酐比例。

依照测定结果,与健康人的相比,IgA 肾病患者的尿 megsin 蛋白测定值(肌酸酐校正值:AU)分布在上部区域。此外,IgA 肾病患者的尿 megsin 蛋白测定值也比隐匿型肾病综合征患者的高。故根据本发明,不仅可判断某人是否患由肾病,而且可以准确确定肾病的状态。

10

[实施例 11]使用 megsin 肽抗体对肾组织进行免疫组化染色

3 例 IgA 肾病患者(2 位男性,1 位女性;年龄 21-48 岁)经同意取其肾组织。从肾肿瘤患者手术切除的肾组织中取无肿瘤组织用作正常肾组织样品。提供正常肾组织的患者尿液未见异常,从组织学角度排除肾小球表现异常者。经患者同意,从其体内取除肾以外的其它组织作为对照。又从正常 Wister 系大鼠(雄性,8 周龄)取肾和其它器官。

15

肾组织按照传统方法包埋在冰冻组织包埋剂(O.C.T.化合物)中。使用冷冻切片机从冷冻包埋组织上切下 4 μ m 的冷冻切片。将这些冷冻切片用 3-氨基丙基乙氧基硅烷(Sigma)包埋在载玻片上(用 4%多聚甲醛固定 15 分钟)。

20

冷冻切片用含 0.5%吐温 20 的 PBS 洗涤,以 4%脱脂牛奶封闭,与抗 megsin 肽-2 抗体和抗 megsin 肽-4 抗体一起在湿容器中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。以 1:100 稀释的过氧化物酶标记型山羊抗家兔 IgG 抗体(DAKO)洗涤组织切片并室温下孵育 2 小时。使用含有 0.003%充氧水的 3,3'-二氨基联苯胺检测过氧化物酶。以苏木精染色细胞核。遵循传统方法进行苏木精/伊红染色。

25

IgA 肾病患者肾组织免疫组化染色的显微照片(ECLIPSE E400:80 倍放大,Nikon)如图 7 所示。图中显示,在人肾小球组织中有一个可用本发明的肽抗体染色的位点。尤其是,在肾小球膜细胞内和肾小球膜基质内观察到显著的阳性染色,但是肾小管没有被染色。

30

人肾组织肾小球可被人 megsin 肽-2 抗体染色(图 8-I 和 8-II),或可被人 megsin 肽-4 抗体染色(图 9-V 和 9-VI)。尤其是,可在肾小球膜区观察到显著的阳性染色。在另一方面,肾组织间隙未被人 megsin 肽-4 抗体染色(图

8-I)。肝组织(图 9-VII), 脾组织(图 9-VIII), 胰腺组织, 心脏, 和主动脉组织也未被人 megsin 肽-2 抗体染色(未列出数据)。由于过量 megsin 肽-2 完全抑制了组织染色, 故免疫染色的特异性可以得到确认(图 8-IV)。用免疫前的家兔 IgG 检测不到免疫反应(图 8-III)。此外, 与 megsin 肽-2 抗体和 megsin 肽抗体-4 相比, 用抗 megsin 肽-1 或 megsin 肽-3 的抗体不能在人肾组织的肾小球上进行特异性免疫染色(未列出数据)。

用 megsin 蛋白(大鼠 megsin 肽-2; 图 10-I)通过免疫染色同样可以在大鼠肾组织的肾小球观察到阳性结果。在肾间质, 肝组织(图 10-III), 或脾组织(图 10-IV)观察不到反应。通过先与大鼠 megsin 肽-2 一起孵育, 对大鼠肾组织的免疫反应得到抑制(图 10-II)。用免疫前的家兔 IgG, 或用抗大鼠 megsin 肽-1 的抗体检测不到免疫反应(未列出数据)。

[实施例 12] 免疫沉淀反应

尝试检测 megsin 蛋白以确认在人肾小球膜细胞中 megsin 蛋白的存在。即用^[35S] 甲硫氨酸实施免疫沉淀反应(T.Minori 等, 生物化学杂志 259: 560 (1984)), 所得免疫复合物经 SDS-PAGE 和放射自显影进行分析。

首先, 将肾小球膜细胞在标记培养基(含 10% 热灭活的胎牛血清和^[35S] 甲硫氨酸(3.7Mbcq/mL)的 DMEM)中 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 16 小时, 使所有蛋白成分被标记。

接着, 细胞用冷 PBS 洗涤, 悬浮于 200μL TSA(Tris-HCl 缓冲液(pH8.0), 0.14M 氯化钠, 0.025% 叠氮钠)中, 该缓冲液含 1% Triton X-100, 1% 牛血红蛋白, 1mM 碘乙酰胺, 0.2U/mL 抑酶肽, 1mM PMSF(苯甲基磺酰氟)。4℃ 下 1 小时静置后, 4℃ 下 100,000×g 离心 1 小时得到裂解物。

使放射性标记的抗原(10⁵-10⁶cpm)与 1μL 实施例 2 及实施例 3 所得抗 megsin 肽-2 多克隆抗体(0.7mg/mL)4℃ 下孵育 90 分钟。

添加蛋白 G-sepharose(Pharmacia Biotech)后进一步 4℃ 下孵育 90 分钟以沉淀免疫复合物。沉淀物用含 0.1% Triton X-100 和 0.1% 牛血红蛋白的 TSA 洗涤 3 次, 再用 0.05M Tris-HCl 缓冲液(pH6.8)洗涤一次。

将已洗涤的免疫沉淀物悬浮于 30μL 样品缓冲液(0.5M Tris-HCl 缓冲液(pH6.8), 10% SDS, β-巯基乙醇, 甘油, 1% BPB)中, 煮沸 5 分钟。以旋涡混合器混合使之悬浮, 混合物 200×g 离心 1 分钟。上清液按照传统方法进

行 SDS 电泳和放射自显影分析。¹⁴C-甲基化蛋白混合物(分子量依次为 220, 97.4, 66, 46, 30kDa; Amersham International)用作分子量标记。结果于图 11 所示。在 50kDa 的分子量标记附近观察到被抗 megsin 肽-2 抗体特异性识别的多肽(第二道中指示为“meg”的条带)。

5

[实施例 13]megin 的 ELISA 检测

对表达于 CHO 细胞的 megsin 蛋白(CHO-megin 蛋白: T.Miyata 等, 临床研究杂志 120:828-836 (1998); PCT/JP98/04269)和实施例 5 所述的 MBP-megin 蛋白实施 ELISA 检测。

10 纯化的 CHO-megin 蛋白溶液(50 μ L/孔)用 50mM 碳酸缓冲液(pH9.6)逐步稀释,然后加至 96 孔 ELISA 板上,4 $^{\circ}$ C 过夜。每孔经 PBS 洗涤后,加 350 μ L Block Ace(大日本制药)室温封闭 2 小时。然后,每孔用含 0.05%吐温 20 的 PBS(吐温-PBS)洗涤。实施例 2 和 3 中得到的抗 megsin 肽-2 多克隆抗体和抗 megsin 肽-4 多克隆抗体用吐温-PBS 稀释后每孔加入 50 μ L, 室温静置 15 小时。每孔用吐温-PBS 洗涤,加入生物素化抗家兔 IgG(Cappel), 4 $^{\circ}$ C 静置过夜,用吐温-PBS 洗涤。

每孔加入过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白溶液(Amersham), 室温静置 1 小时。每孔再用吐温-PBS 洗涤,然后加入 100 μ L/孔邻苯二胺底物显色液(在含 0.009%充氧水的柠檬酸-磷酸缓冲液(pH9.0)中溶解邻苯二胺至浓度为 0.04%)。室温避光反应 10-30 分钟,每孔加入 50 μ L 2M 硫酸终止反应,使用微滴板读取仪(SPECTRAMax250, Molecular Device, 日本)读取 492nm 的吸光度。

25 对 MBP-megin 蛋白进行同样处理。结果见图 12(megin 肽-2 抗体)和图 13(megin 肽-4 抗体)。结果表明, megsin 肽-2 抗体和 megsin 肽-4 抗体均以浓度依赖方式与 megsin 蛋白发生特异性反应。作为对照的 CHO 或 MBP 上清液没有观察到任何反应。

工业应用

30 本发明有利于肾功能的评价,其并非如肾活检一样对身体造成明显损伤,而是使用如尿液和血液这样的无创性样品来进行评价。对体外简易肾功能评价的认识使得可以对更多患者实施快速而经济的检验服务。有许多

肾病希望通过早期诊断可以推迟透析治疗。因此，本发明不仅减轻了受检者的负担，并通过提供操作简单的肾功能评价方法得以检查并发现更多将来可能要接受透析的患者。此外，由于有极佳的指示物(即存在于活体样品如尿液、血液中，能反映肾功能的 megsin 蛋白)，可获得较高的评价可靠性。

- 5 尤其是，本发明提供的 megsin 蛋白的免疫检测方法，和用于此方法的试剂盒，在利用磁性颗粒载体的可操作性上具有优势。通过本检测方法可实现 megsin 蛋白的快速准确检测。此外，由于本方法可以充分了解肾小球膜细胞增殖情况，本发明可以方便地确定何时开始或是否继续使用治疗 IgA 肾病的类固醇疗法。

序列列表

- <110> 黑川清 (KUROCAWA, Kiyoshi)
 宫田敏男 (MIYATA, Toshio)
 扶桑药品工业株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)
- <120> 检测 megsin 蛋白的方法及其应用
- <130> F2-101DP1PCT
- <140>
 <141>
- <150> JP 1999-75305
 <151> 1999-03-19
- <150> JP 1999-306623
 <151> 1999-10-28
- <160> 21
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
 <211> 1143
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)
- <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1140)
- <300>
 <302> 肾小球膜超显性基因, megsin, 是一种在 IgA 肾病中
 上调的新型丝氨酸蛋白酶抑制剂。
 <303> 临床研究杂志
 <304> 120
 <305> 4
 <306> 828-836
 <307> 1998-8-15
- <400> 1
 atg gcc tcc ctt gct gca gca aat gca gag ttt tgc ttc aac ctg ttc 48
 Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe

1	5	10	15	
aga gag atg gat gac aat caa gga aat gga aat gtg ttc ttt tcc tct				96
Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser				
	20	25	30	
ctg agc ctc ttc gct gcc ctg gcc ctg gtc cgc ttg ggc gct caa gat				144
Leu Ser Leu Phe Ala Ala Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp				
	35	40	45	
gac tcc ctc tct cag att gat aag ttg ctt cat gtt aac act gcc tca				192
Asp Ser Leu Ser Gln Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser				
	50	55	60	
gga tat gga aac tct tct aat agt cag tca ggg ctc cag tct caa ctg				240
Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu				
	65	70	75	80
aaa aga gtt ttt tct gat ata aat gca tcc cac aag gat tat gat ctc				288
Lys Arg Val Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Lys Asp Tyr Asp Leu				
	85	90	95	
agc att gtg aat ggg ctt ttt gct gaa aaa gtg tat ggc ttt cat aag				336
Ser Ile Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys				
	100	105	110	
gac tac att gag tgt gcc gaa aaa tta tac gat gcc aaa gtg gag cga				384
Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg				
	115	120	125	
gtt gac ttt acg aat cat tta gaa gac act aga cgt aat att aat aag				432
Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn Lys				
	130	135	140	
tgg gtt gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aac gtg att ggt gaa				480
Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile Gly Glu				
	145	150	155	160
ggt ggc ata agc tca tct gct gta atg gtg ctg gtg aat gct gtg tac				528
Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr				
	165	170	175	
ttc aaa ggc aag tgg caa tca gcc ttc acc aag agc gaa acc ata aat				576
Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser Glu Thr Ile Asn				

	180	185	190	
tgc cat ttc aaa tct ccc aag tgc tct ggg aag gca gtc gcc atg atg				624
Cys His Phe Lys Ser Pro Lys Cys Ser Gly Lys Ala Val Ala Met Met				
	195	200	205	
cat cag gaa cgg aag ttc aat ttg tct gtt att gag gac cca tca atg				672
His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val Ile Glu Asp Pro Ser Met				
	210	215	220	
aag att ctt gag ctc aga tac aat ggt ggc ata aac atg tac gtt ctg				720
Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu				
	225	230	235	240
ctg cct gag aat gac ctc tct gaa att gaa aac aaa ctg acc ttt cag				768
Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln				
	245	250	255	
aat cta atg gaa tgg acc aat cca agg cga atg acc tct aag tat gtt				816
Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn Pro Arg Arg Met Thr Ser Lys Tyr Val				
	260	265	270	
gag gta ttt ttt cct cag ttc aag ata gag aag aat tat gaa atg aaa				864
Glu Val Phe Phe Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys				
	275	280	285	
caa tat ttg aga gcc cta ggg ctg aaa gat atc ttt gat gaa tcc aaa				912
Gln Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys				
	290	295	300	
gca gat ctc tct ggg att gct tcg ggg ggt cgt ctg tat ata tca agg				960
Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg				
	305	310	315	320
atg atg cac aaa tct tac ata gag gtc act gag gag ggc acc gag gct				1008
Met Met His Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala				
	325	330	335	
act gct gcc aca gga agt aat att gta gaa aag caa ctc cct cag tcc				1056
Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser				
	340	345	350	
acg ctg ttt aga gct gac cac cca ttc cta ttt gtt atc agg aag gat				1104
Thr Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp				

355	360	365	
gac atc atc tta ttc agt ggc aaa gtt tct tgc cct tga			1143
Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro			
370	375	380	
<210> 2			
<211> 380			
<212> PRT			
<213> 人 (Homo sapiens)			
<400> 2			
Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe			
1	5	10	15
Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser			
	20	25	30
Leu Ser Leu Phe Ala Ala Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp			
	35	40	45
Asp Ser Leu Ser Gln Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser			
50	55	60	
Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu			
65	70	75	80
Lys Arg Val Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Lys Asp Tyr Asp Leu			
	85	90	95
Ser Ile Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys			
	100	105	110
Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg			
115	120	125	
Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn Lys			
130	135	140	
Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile Gly Glu			
145	150	155	160
Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr			

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

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:人工合成的简并引物序列

<400> 3

gtgaatgctg tgtacttaaa ggcaantgn

29

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:人工合成的简并引物序列

<400> 4

aanagraang grtcngc

17

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:人工合成的简并引物序列

<400> 5

atggcntcn gcnngcngc cnaaygc

27

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:人工合成的简并引物序列

<400> 6

cgacctccag aggcaattcc agagagatca gccctgg

37

- <210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 人工序列的描述：人工合成的简并引物序列
- <400> 7
gtcttccaag cctacagatt tcaagtggct cctc 34
- <210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 人工序列的描述：人工合成的反义引物序列
- <400> 8
gctcagggca gtgaagatgc tcaggggaaga 30
- <210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 人工序列的描述：人工合成的反义引物序列
- <400> 9
ctgacgtgca cagtcacctc gagcacc 27
- <210> 10
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的有义引物序列

<400> 10

gaggtctcag aagaaggcac tgaggcaact gctgcc

36

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的人 megsin 结构域肽

<400> 11

Phe	Arg	Glu	Met	Asp	Asp	Asn	Gln	Gly	Asn	Gly	Asn	Val	Phe	Phe
1				5				10						15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的人 megsin 结构域肽

<400> 12

Ser	Gln	Ser	Gly	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	Lys	Arg	Val	Phe	Ser	Asp
1				5				10						15

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的人 megsin 结构域肽

<400> 13

Ala	Thr	Gly	Ser	Asn	Ile	Val	Glu	Lys	Gln	Leu	Pro	Gln	Ser	Thr	Leu
1				5					10						15

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的人 megsin 结构域肽

<400> 14

Asn	Leu	Met	Glu	Trp	Thr	Asn	Pro	Arg	Arg	Met	Thr	Ser	Lys	Tyr	Val
1				5					10						15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的人 megsin 结构域肽

<400> 15

Ser	Asn	Ile	Val	Glu	Lys	Gln	Leu	Pro	Gln	Ser	Thr	Leu	Phe	Arg
1					5					10				15

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的人 megsin 结构域肽

<400> 16

Leu	Gly	Leu	Gln	Tyr	Gln	Leu	Lys	Arg	Val	Leu	Ala	Asp
1						5						10

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工合成的人 megsin 结构域肽

<400> 17

Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro Glu Ser Thr Val
1 5 10

<210> 18

<211> 1229

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(1147)

<300>

<310> PCT/JP98/04269

<311> 1998-09-22

<400> 18

tttcaaa atg gcc tcc ctt gct gca gca aat gca gaa ttt ggc ttc gac 49
Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp
1 5 10

tta ttc aga gag atg gat agt agt caa gga aac gga aat gta ttc ttc 97
Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe
15 20 25 30

tct tcc ctg agc atc ttc act gcc ctg agc cta atc cgt ttg ggt gct 145
Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Ser Leu Ile Arg Leu Gly Ala
35 40 45

cga ggt gac tgt nnn cgt cag att gac aag gcc ctg cac ttt atc tcc 193
Arg Gly Asp Cys Xaa Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe Ile Ser
50 55 60

cca tca aga caa ggg aat tca tcg aac agt cag cta gga ctg caa tat 241
Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Leu Gly Leu Gln Tyr
65 70 75

caa ttg aaa aga gtt ctt gct gac ata aac tca tct cat aag gat nnn 289
Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys Asp Xaa
80 85 90

aaa ctc agc att gcc aat gga gtt ttt gca gag aaa gta ttt gat ttt 337
 Lys Leu Ser Ile Ala Asn Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Phe Asp Phe
 95 100 105 110

cat aag agc tat atg gag tgt gct gaa aac tta tac aat gct aaa gtg 385
 His Lys Ser Tyr Met Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val
 115 120 125

gaa aga gtt gat ttt aca aat gat ata caa gaa acc aga ttt aaa att 433
 Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Ile Gln Glu Thr Arg Phe Lys Ile
 130 135 140

aat aaa tgg att gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aag gtg ttg 481
 Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu
 145 150 155

ggg gac agc agc ctc agc tca tca gct gtc atg gtg cta gtg aat gct 529
 Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala
 160 165 170

gtt tac ttc aaa ggc aag tgg aaa tcg gcc ttc acc aag agt gat acc 577
 Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Ser Asp Thr
 175 180 185 190

ctc agt tgc cat ttc agg tct ccc agc ggt cct gga aaa gca gtt aat 625
 Leu Ser Cys His Phe Arg Ser Pro Ser Gly Pro Gly Lys Ala Val Asn
 195 200 205

atg atg cat caa gaa cgg agg ttc aat ttg tct acc att cag gag cca 673
 Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln Glu Pro
 210 215 220

cca atg cag att ctt gag cta caa tat cat ggt ggc ata agc atg tac 721
 Pro Met Gln Ile Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr
 225 230 235

atc atg ttg ccc gag gat gac cta tcc gaa att gaa agc aag ctg agt 769
 Ile Met Leu Pro Glu Asp Asp Leu Ser Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser
 240 245 250

ttc cag aat cta atg gac tgg aca aat agc agg aag atg aaa tct cag 817
 Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Ser Arg Lys Met Lys Ser Gln
 255 260 265 270

tat gtg aat gtg ttt ctc ccc cag ttc aag ata gag aaa gat tat gaa 865
 Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asp Tyr Glu
 275 280 285

atg agg agc cac ttg aaa tct gta ggc ttg gaa gac atc ttt gtt gag 913
 Met Arg Ser His Leu Lys Ser Val Gly Leu Glu Asp Ile Phe Val Glu
 290 295 300

tcc agg gct gat ctg tct gga att gcc tct gga ggt cgt ctc tat gta 961
 Ser Arg Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val
 305 310 315

tca aag cta atg cac aag tcc ctc ata gag gtc tca gaa gaa ggc acc 1009
 Ser Lys Leu Met His Lys Ser Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr
 320 325 330

gag gca act gct gcc aca gaa agt aac atc gtt gaa aag cta ctt cct 1057
 Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro
 335 340 345 350

gaa tcc acg gtg ttc aga gct gac cgc ccc ttt ctg ttt gtc att agg 1105
 Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg
 355 360 365

aag aat ggc atc atc tta ttt act ggc aaa gtc tcg tgt cct 1147
 Lys Asn Gly Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro
 370 375 380

tgaaattcta tttggttttc catacactaa caggcatgaa gaaacatcat aagtgaatag 1207

aattgtaatt ggaagtacat gg 1229

<210> 19

<211> 380

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 19

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp Leu Phe
 1 5 10 15

Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser

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

Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Ser Arg Lys Met Lys Ser Gln Tyr Val
 260 265 270

Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asp Tyr Glu Met Arg
 275 280 285

Ser His Leu Lys Ser Val Gly Leu Glu Asp Ile Phe Val Glu Ser Arg
 290 295 300

Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val Ser Lys
 305 310 315 320

Leu Met His Lys Ser Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Ala
 325 330 335

Thr Ala Ala Thr Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro Glu Ser
 340 345 350

Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asn
 355 360 365

Gly Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro
 370 375 380

<210> 20

<211> 1147

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1104)

<300>

<310> PCT/JP98/04269

<311> 1998-09-22

<400> 20

ttc gac tta ttc aga gag atg gat agt agc caa gga aat gga aat gta 48

Phe Asp Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val

1

5

10

15

ttc ttc tct tcc ctg agc atc ttc act gcc ctg acc cta atc cgt ctg 96

Phe Phe Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Thr Leu Ile Arg Leu	
20 25 30	
ggt gct cga ggt gac tgt gca cgt cag att gac aag gca ctg cac ttt	144
Gly Ala Arg Gly Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe	
35 40 45	
aac ata cca tca aga caa gga aac tca tct aat aat cag cca gga ctt	192
Asn Ile Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Asn Gln Pro Gly Leu	
50 55 60	
cag tat caa ttg aaa aga gtt ctt gct gac ata aac tca tct cat aag	240
Gln Tyr Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys	
65 70 75 80	
gat tat gaa ctc agc att gcc act gga gtt ttt gca gaa aaa gtc tat	288
Asp Tyr Glu Leu Ser Ile Ala Thr Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Tyr	
85 90 95	
gac ttt cat aag aac tac att gag tgt gct gaa aac tta tac aat gct	336
Asp Phe His Lys Asn Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala	
100 105 110	
aaa gtg gaa aga gtt gac ttc aca aat gat gta caa gat acc aga ttt	384
Lys Val Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Val Gln Asp Thr Arg Phe	
115 120 125	
aaa att aat aaa tgg att gaa aat gag aca cat gga aag atc aag aag	432
Lys Ile Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys	
130 135 140	
gtg ttg ggc gac agc agc ctc agc tcg tcg gct gtc atg gtg ctg gtg	480
Val Leu Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val	
145 150 155 160	
aac gct gtt tac ttc aaa ggc aaa tgg aaa tcg gcc ttc acc aag act	528
Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Thr	
165 170 175	
gat acc ctc agt tgc cgt ttt agg tct ccc acg tgt cct gga aaa gta	576
Asp Thr Leu Ser Cys Arg Phe Arg Ser Pro Thr Cys Pro Gly Lys Val	
180 185 190	
gtt aat atg atg cat caa gaa cgg cgg ttc aat ttg tct acc att cag	624

Val Asn Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln	
195	200 205
cag cca cca atg cag gtt ctt gag ctc caa tat cat ggt ggc ata agc	672
Gln Pro Pro Met Gln Val Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser	
210	215 220
atg tac att atg ctg cct gag gat ggc cta tgt gaa att gaa agc aag	720
Met Tyr Ile Met Leu Pro Glu Asp Gly Leu Cys Glu Ile Glu Ser Lys	
225	230 235 240
ctg agt ttc cag aat ctg atg gac tgg acc aat agg agg aaa atg aaa	768
Leu Ser Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Arg Arg Lys Met Lys	
245	250 255
tct cag tat gtg aac gtg ttt ctc ccc cag ttc aag ata gag aag aat	816
Ser Gln Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn	
260	265 270
tat gaa atg acg cac cac ttg aaa tcc tta ggc ttg aaa gat atc ttt	864
Tyr Glu Met Thr His His Leu Lys Ser Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe	
275	280 285
gat gag tcc agt gca gat ctc tct gga att gcc tct gga ggt cgt ctc	912
Asp Glu Ser Ser Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu	
290	295 300
tac gta tca aag cta atg cac aag tca ttc ata gag gtc tca gag gag	960
Tyr Val Ser Lys Leu Met His Lys Ser Phe Ile Glu Val Ser Glu Glu	
305	310 315 320
ggc act gaa gcc act gct gcc aca gaa aat aac att gtt gaa aag cag	1008
Gly Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Asn Asn Ile Val Glu Lys Gln	
325	330 335
ctt cct gag tcc aca gtg ttc aga gcc gac cgc ccc ttt ctg ttt gtc	1056
Leu Pro Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val	
340	345 350
atc aag aag aat gac atc atc tta ttt act ggc aaa gtc tct tgt cct	1104
Ile Lys Lys Asn Asp Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro	
355	360 365
tgaaattcga tttggtttcc tatacagtaa caggcatcaa gaa	1147

<210> 21

<211> 368

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 21

Phe Asp Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val
1 5 10 15

Phe Phe Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Thr Leu Ile Arg Leu
 20 25 30

Gly Ala Arg Gly Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe
 35 40 45

Asn Ile Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Asn Gln Pro Gly Leu
50 55 60

Gln Tyr Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys
65 70 75 80

Asp Tyr Glu Leu Ser Ile Ala Thr Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Tyr
 85 90 95

Asp Phe His Lys Asn Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala
 100 105 110

Lys Val Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Val Gln Asp Thr Arg Phe
 115 120 125

Lys Ile Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys
 130 135 140

Val Leu Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val
 145 150 155 160

Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Thr
 165 170 175

Asp Thr Leu Ser Cys Arg Phe Arg Ser Pro Thr Cys Pro Gly Lys Val
 180 185 190

Val Asn Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln
 195 200 205

Gln Pro Pro Met Gln Val Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser
 210 215 220

Met Tyr Ile Met Leu Pro Glu Asp Gly Leu Cys Glu Ile Glu Ser Lys
 225 230 235 240

Leu Ser Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Arg Arg Lys Met Lys
 245 250 255

Ser Gln Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn
 260 265 270

Tyr Glu Met Thr His His Leu Lys Ser Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe
 275 280 285

Asp Glu Ser Ser Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu
 290 295 300

Tyr Val Ser Lys Leu Met His Lys Ser Phe Ile Glu Val Ser Glu Glu
 305 310 315 320

Gly Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Asn Asn Ile Val Glu Lys Gln
 325 330 335

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

Ile Lys Lys Asn Asp Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro
 355 360 365

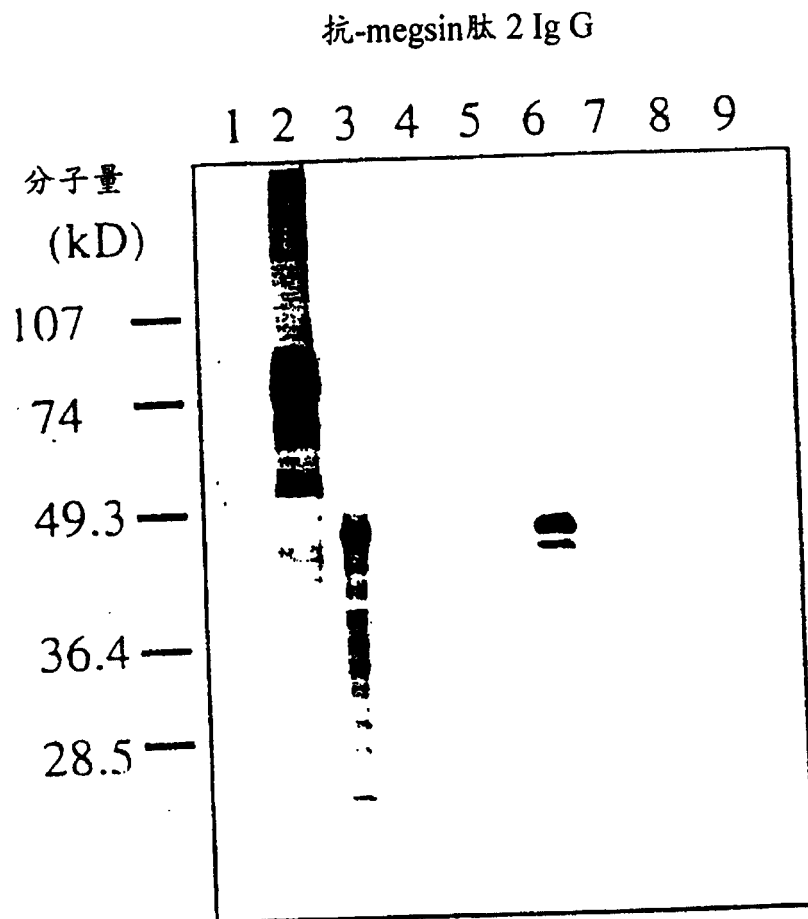


图 1

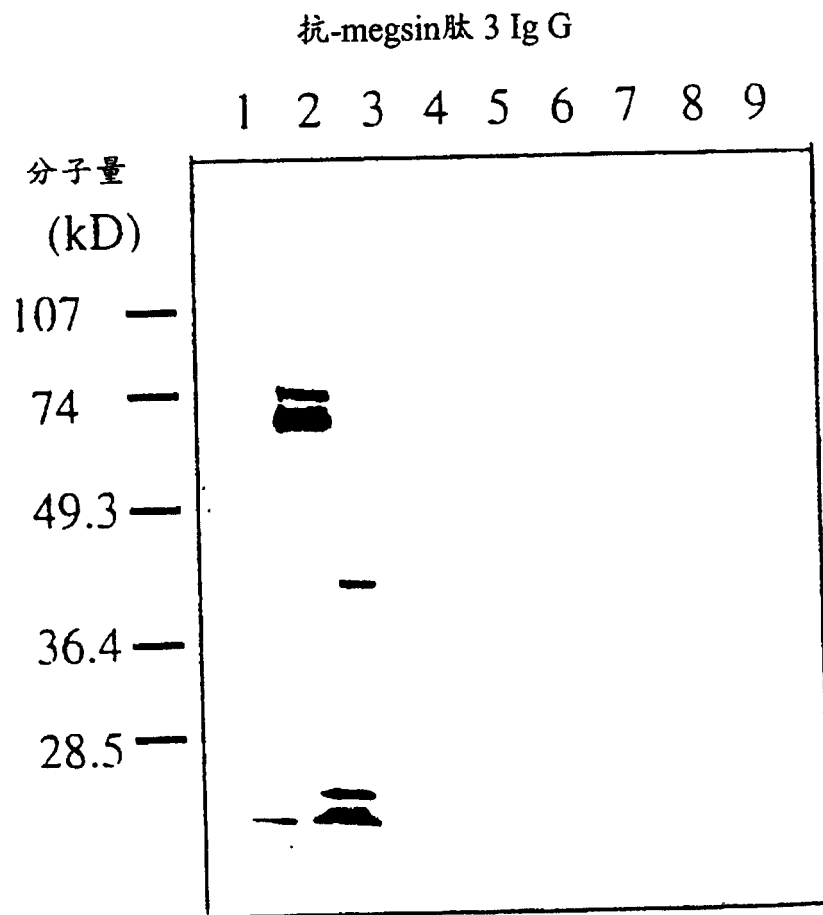


图 2

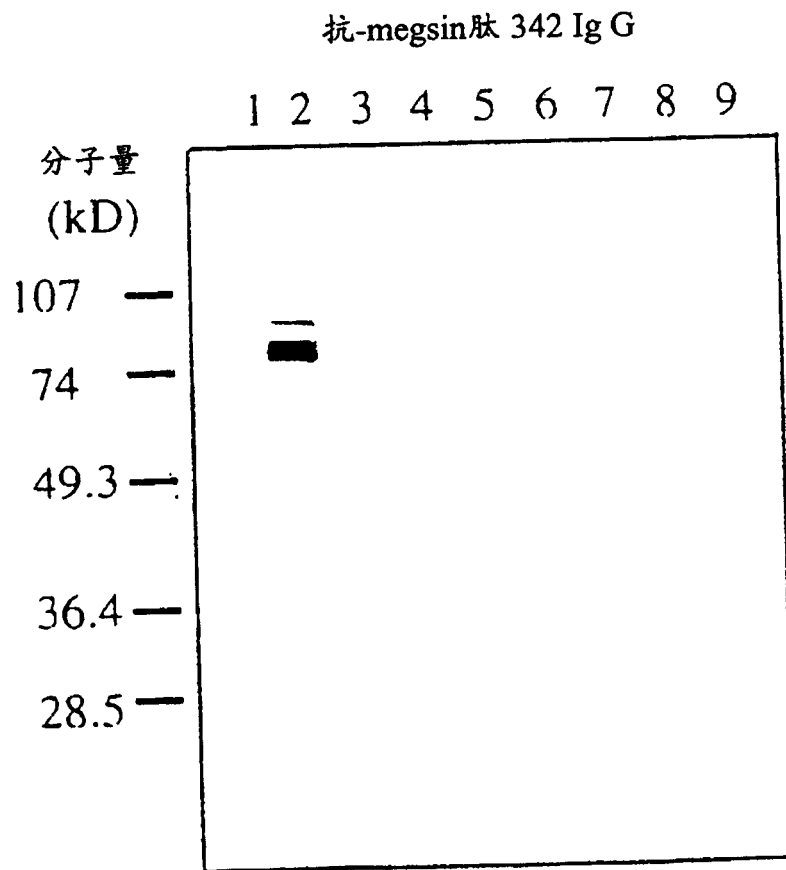


图 3

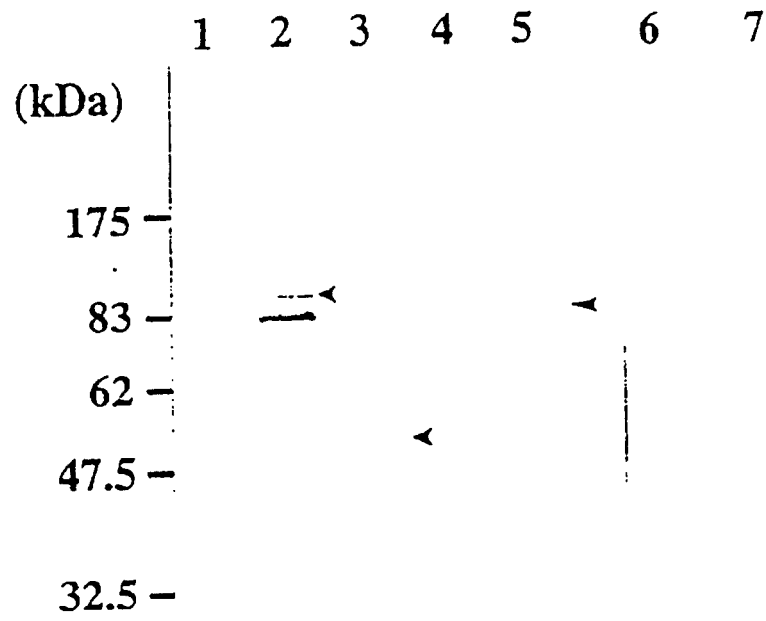


图 4

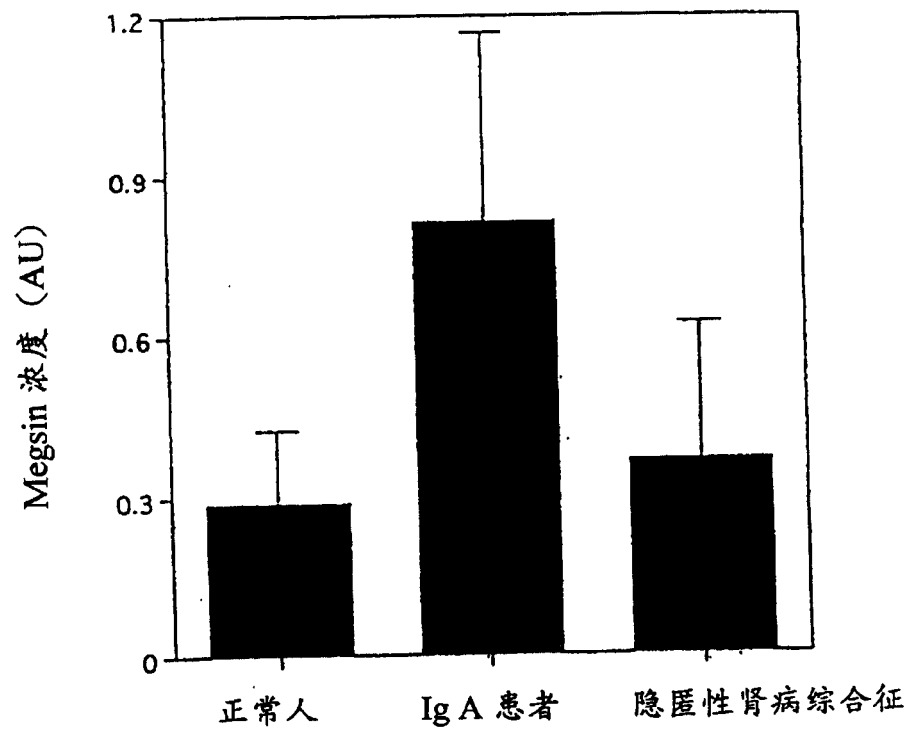


图 5

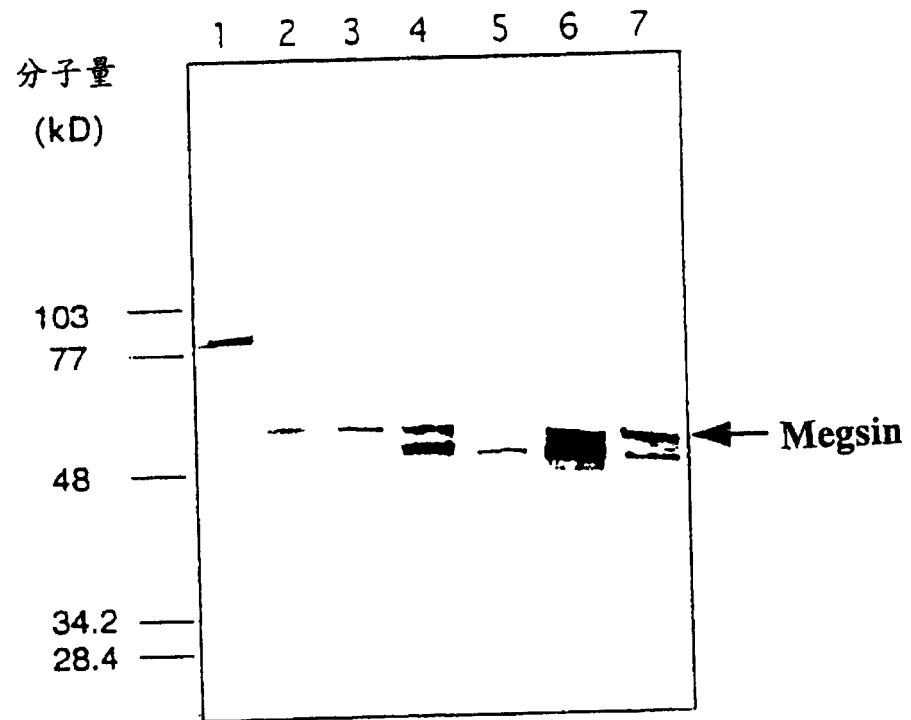


图 6

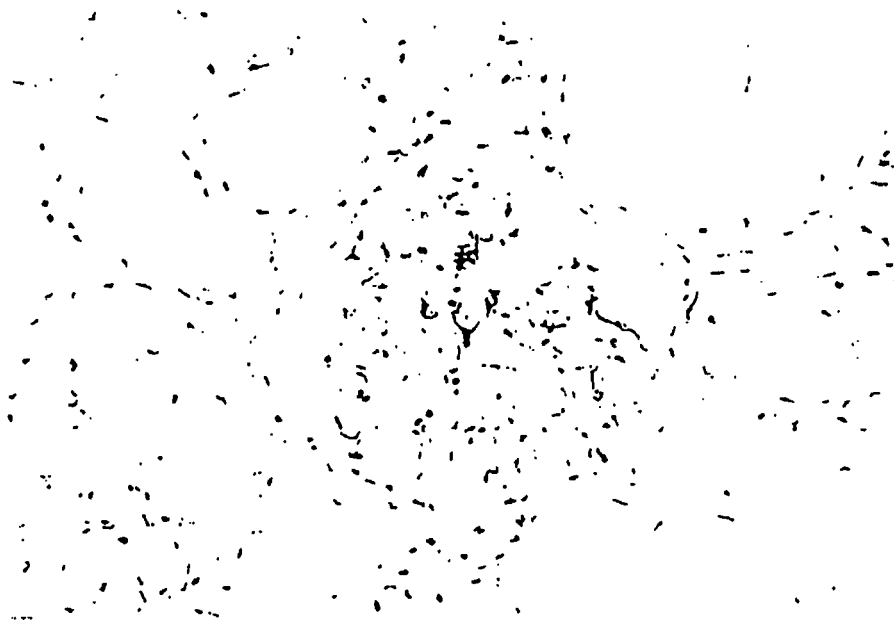


图 7



图 8

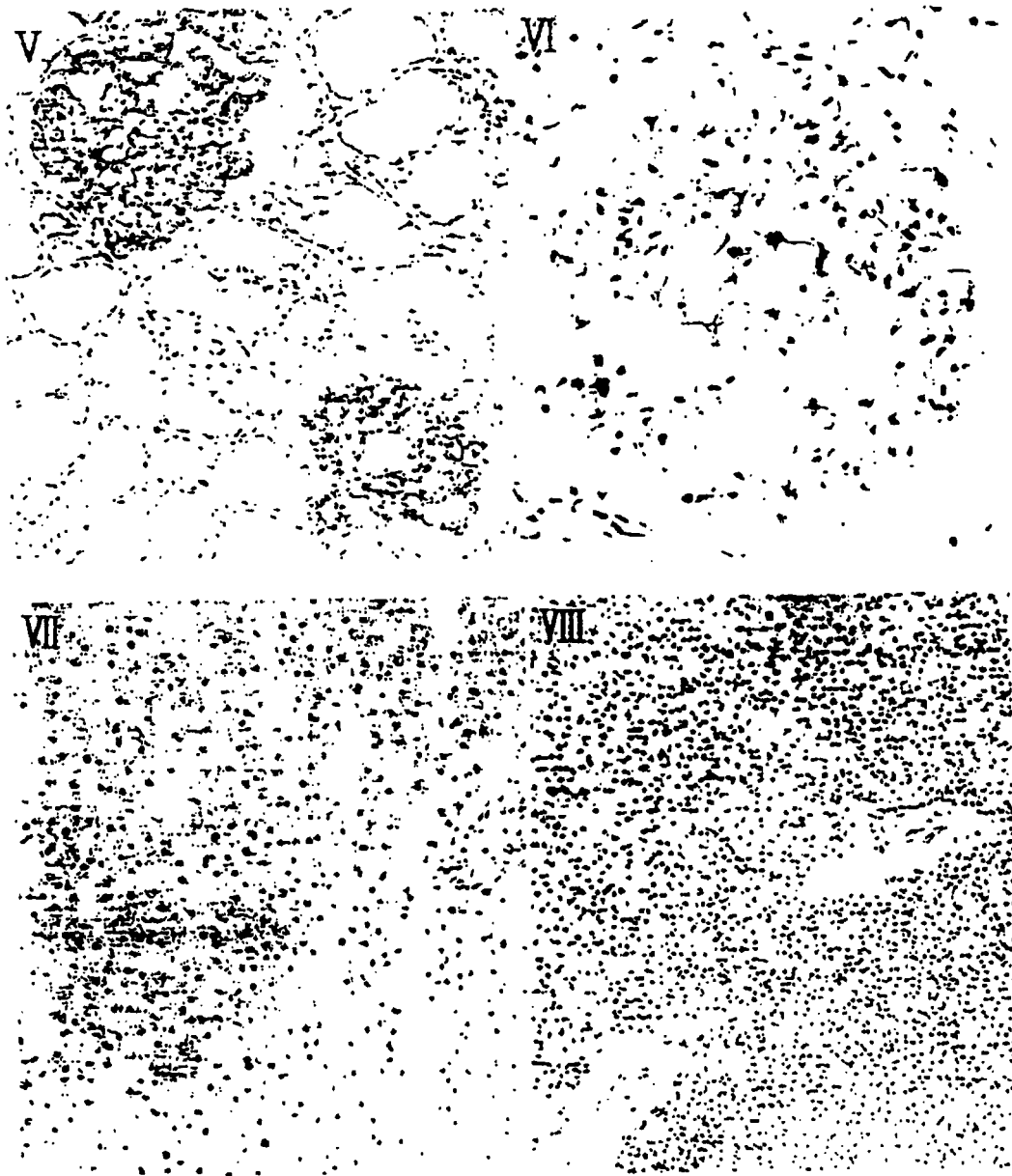


图 9

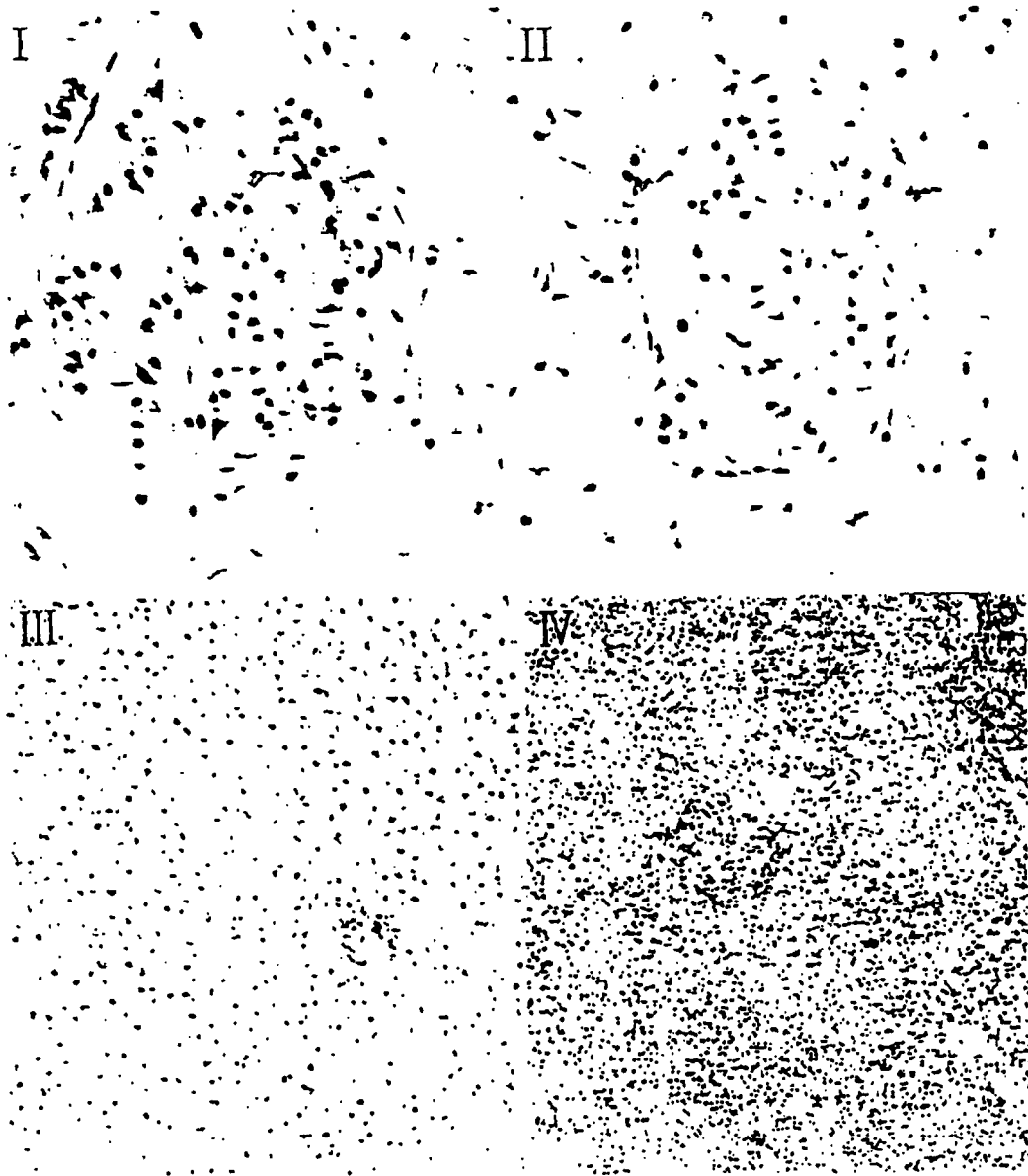


图 10

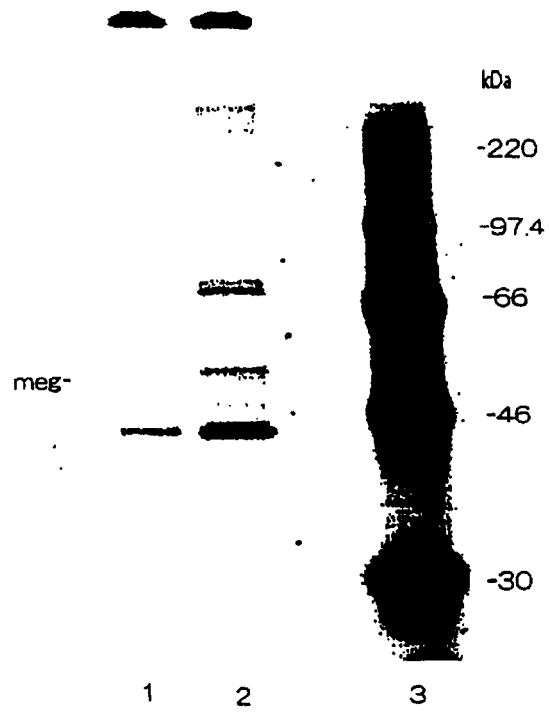


图 11

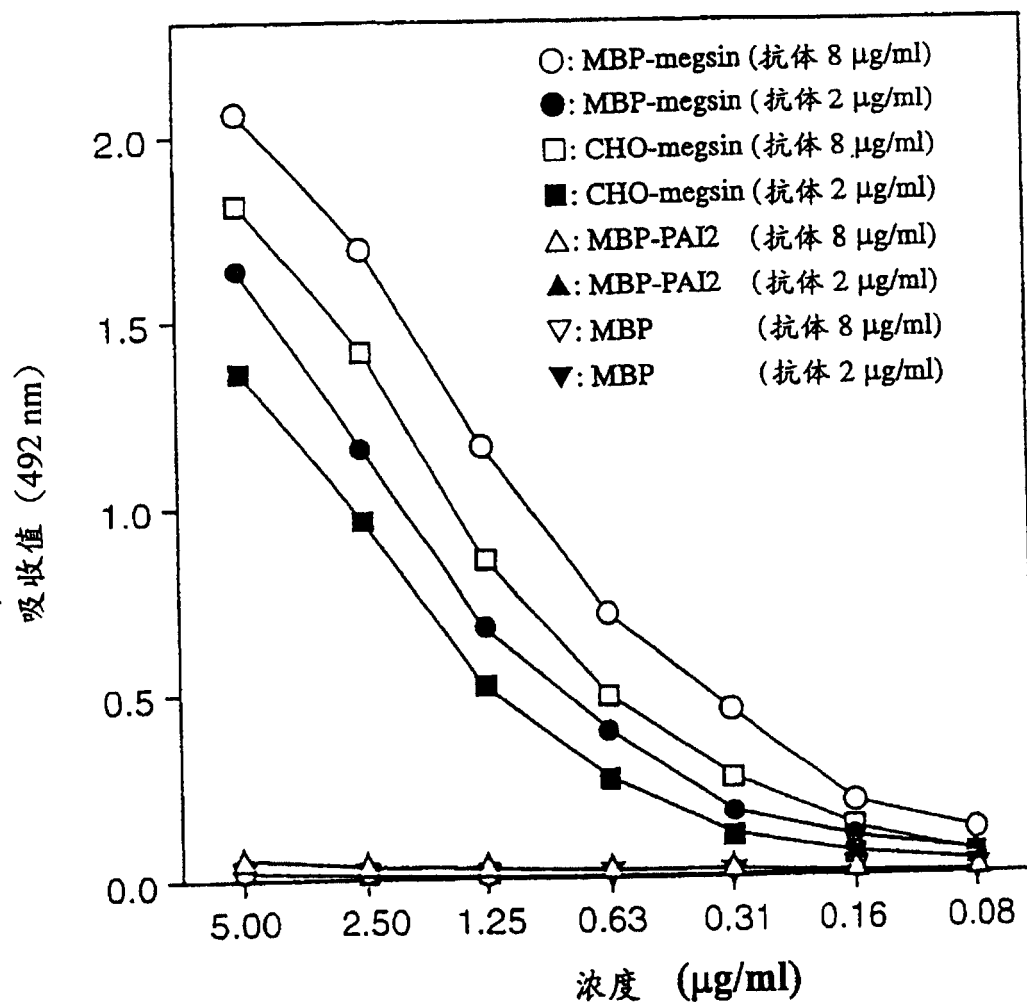


图 12

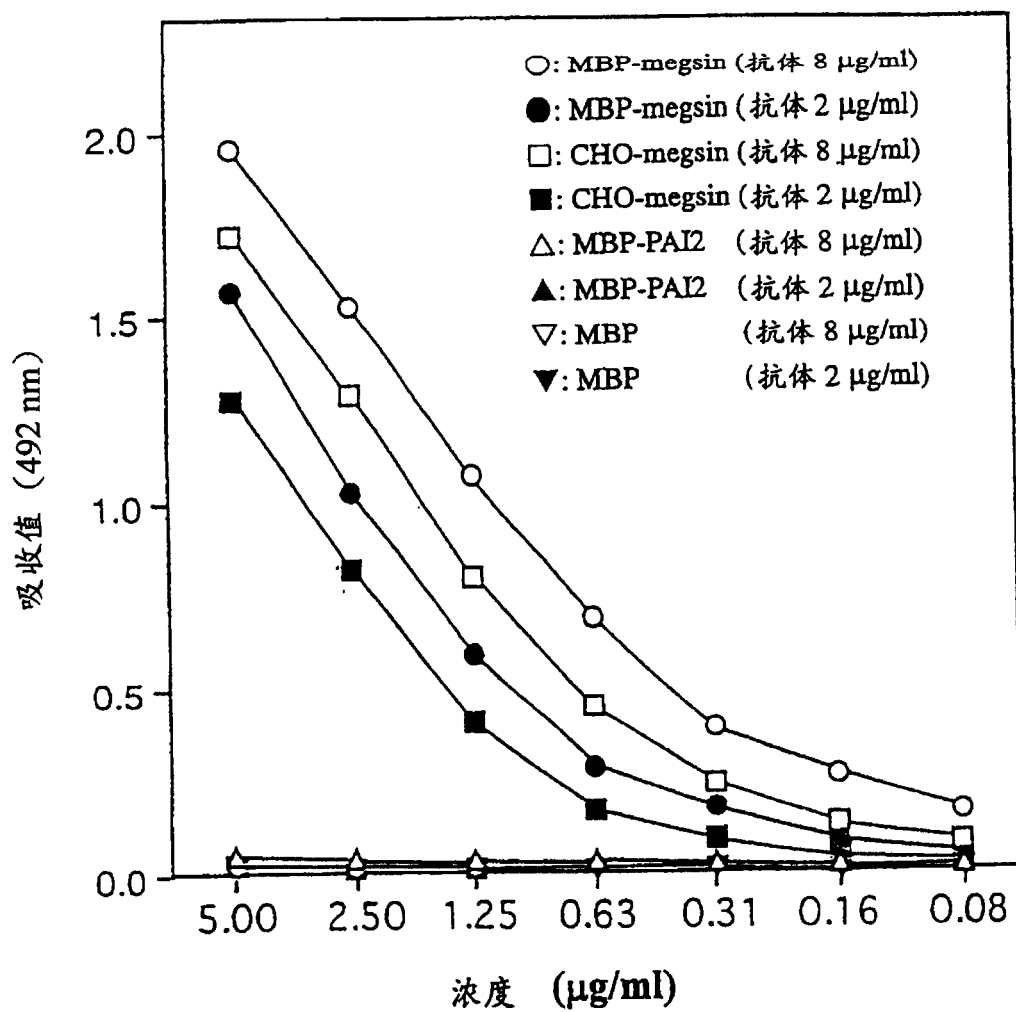


图 13

专利名称(译)	检测megsin蛋白的方法及其应用		
公开(公告)号	CN1198146C	公开(公告)日	2005-04-20
申请号	CN00807212.4	申请日	2000-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	黑川清 宫田敏男		
申请(专利权)人(译)	黑川清 扶桑药品工业株式会社 宫田敏男		
当前申请(专利权)人(译)	黑川清 扶桑药品工业株式会社 宫田敏男 学校法人东海大学		
[标]发明人	宫田敏男		
发明人	宫田敏男		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/553		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/47 G01N2800/347 Y10S435/975 Y10S436/808 Y10S436/811		
优先权	1999075305 1999-03-19 JP 1999306623 1999-10-28 JP		
其他公开文献	CN1352744A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种通过测定活体样品中megsin蛋白来评价肾功能的方法。另外，本发明还提供了用于测定活体样品中megsin蛋白的免疫分析试剂和试剂盒。

