[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03811434.8

[43] 公开日 2006 年 11 月 1 日

[11] 公开号 CN 1856708A

[22] 申请日 2003.3.20 [21] 申请号 03811434.8

[30] 优先权

[32] 2002. 3.20 [33] DK [31] PA200200431

[86] 国际申请 PCT/DK2003/000190 2003.3.20

[87] 国际公布 WO2003/078456 英 2003.9.25

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.19

[71] 申请人 普赖德普罗特奥米克斯公司

地址 丹麦欧登塞

[72] 发明人 P·M·拉森 S·J·菲

J·纳鲁普 A·E·卡尔森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 6 页 说明书 53 页 附图 3 页

[54] 发明名称

人糖尿病介导蛋白

[57] 摘要

本发明提供人分沁型和非分沁型糖尿病介导蛋白质，包括保护性的和有害的糖尿病介导蛋白质，以及编码上述蛋白质的多核苷酸，用于鉴定能改变糖尿病介导蛋白质表达的试验化合物的药物筛选法，通过施用能改变糖尿病介导蛋白质表达的化合物来预防或改善糖尿病的方法。

1.一种诊断包括人类的哺乳动物的糖尿病的方法，该方法包括测定取自所述哺乳动物的生物样品内的至少一种标记蛋白的存在与否或表达水平，其中该标记蛋白选自：

a） 表1、2和/或3中定义的蛋白质；和

b） 表1、2或3中蛋白质的修饰体或衍生物，它与表1、2或3中的蛋白质有至少80%的序列同源性。

2.权利要求1的方法，其中所述的方法包括确定选自下列中的至少一种标记蛋白增加的表达（增量调节的标记蛋白）：

a） 表1和/或2 和/或3中定义的并用上箭头标记的蛋白质；和

b） a)中蛋白质的修饰体或衍生物，它与a)中的蛋白质有至少80%的序列同源性。

3.权利要求1或2任一项的方法，其中所述生物样品选自尿液、血液、唾液、淋巴液和组织。

4.权利要求3的方法，其中所述组织为胰腺组织。

5.一种测定包括人的哺乳动物患糖尿病倾向的方法，该方法包括测定取自所述哺乳动物的生物样品内的至少一种标记蛋白的存在与否或相对表达水平，其中该标记蛋白选自：

a） 表1、2 和3中定义的蛋白质；和

b） 表1、2或3中蛋白质的修饰体或衍生物，它与表1、2或3中的蛋白质有至少80%的序列同源性。

6.一种测定人患糖尿病倾向的方法，该方法包括：

a） 测定取自人体的生物样品内至少一种标记蛋白增加的表达，所述的标记蛋白选自：i）表1、2和／或3中定义的增量调节的蛋白，和ii）i)中蛋白的修饰体或衍生物，它与i)中蛋白有至少80％的序列同源性；

b） 测定取自人体生物样品内至少一种标记蛋白减少的表达，所述的标记蛋白选自：i）表1、2和／或3定义的减量调节的蛋白，和ii）i)

中蛋白的修饰体或衍生物，它与 i)蛋白有至少 80％的序列同源性；或

c) a)与 b)中测定的组合。

7.权利要求 1、5 或 6 中任一项权利要求所述的方法，其中至少一种标记蛋白选自：

a) 所述的生物样品的蛋白中在聚丙烯酰胺凝胶上显现出的量明显低于或明显高于对照品的一种或多种蛋白；

b) 在所述生物样品蛋白的聚丙烯酰胺凝胶上存在而在对照品的聚丙烯酰胺凝胶上不存在的一种或多种蛋白；和

c) 在所述生物样品蛋白的聚丙烯酰胺凝胶上不存在而在对照品的聚丙烯酰胺凝胶上存在的一种或多种蛋白。

8. 一种治疗包括人类的哺乳动物的糖尿病的方法，包括改变选自下列中的至少一种标记蛋白的表达：

a) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白；和

b) 表 1、2 或 3 的蛋白的修饰体或衍生物，它与表 1、2 或 3 的蛋白有至少 80％的序列同源性。

9.一种治疗包括人类的哺乳动物的糖尿病的方法，包括对所述的人施用选自下列中的至少一种化合物：

a) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白；

b) 表 1、2 或 3 的蛋白的修饰体或衍生物，它与表 1、2 或 3 中的蛋白有至少 80％的序列同源性；

c) 与 a)和／或 b)中的蛋白有同样功能的蛋白；

d) 编码 a)、 b) 或 c)中蛋白的核苷酸序列；

e) a)、 b) 或 c)的蛋白的抗体；

f) 能结合 a)、 b) 或 c)的蛋白的核酸片段；和

g) 能结合 a)、 b) 或 c)的蛋白的化合物。

10.一种预防或延迟包括人的哺乳动物糖尿病发病的方法，包括给所述的人施用：

a) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白；

b) 表 1、2 或 3 的蛋白的修饰体或衍生物，它与表 1、2 或 3 的蛋

白有至少 80％的序列同源性;

c) a)和 b)中定义的蛋白的模拟物;

d) 编码 a)和／或 b)中定义的蛋白的核苷酸序列;

e) a)和／或 b)中定义的蛋白的抗体;

f) 能结合 a)和／或 b)的蛋白的核酸片段; 和／或

g) 能结合 a)和／或 b)中定义的蛋白的化合物。

11.一种测定物质对治疗糖尿病具有治疗性效果的可能性的方法，包括在将测试模型暴露于所述物质之前和之后测定选自下列中的一种或多种蛋白的表达水平:

a) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白; 和

b) 表 1、2 或 3 的蛋白的修饰体或衍生物，它与表 1、2 或 3 的蛋白有至少 80％的序列同源性。

12.一种测定化合物治疗糖尿病的效果的方法，包括测定选自下列中的一种或多种蛋白的表达水平:

a) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白; 和

b) 表 1、2 或 3 的蛋白的修饰体或衍生物，它与表 1、2 或 3 中的蛋白有至少 80％的序列同源性。

13.一种测定用于治疗糖尿病的化合物效果水平的方法，包括在将试验模型暴露于所述物质之前和之后测定选自下列中的一种或多种蛋白的表达水平:

a) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白; 和

b) 表 1、2 或 3 的蛋白的修饰体或衍生物，它与表 1、2 或 3 的蛋白有至少 80％的序列同源性。

14.一种测定患糖尿病或易患糖尿病的包括人类的哺乳动物的糖尿病的特征或诱因的方法，包括相对一种模型确定选自下列的蛋白的表达水平:

a) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白; 和

b) 表 1、2 或 3 的蛋白的修饰体或衍生物，它与表 1、2 或 3 的蛋白有至少 80％的序列同源性。

15.一种基本纯的蛋白，选自:

a) 表1、2和3中的蛋白；和

c) 与a)中蛋白有至少80%序列同源性的蛋白。

16.一种核酸片段，包括编码表1、2或3中定义的蛋白或与其有至少80%序列同源性的蛋白的核苷酸序列。

17.一种与根据权利要求16的核酸片段或其部分或其互补链杂交的核酸片段。

18.根据权利要求16－17中任一项的核酸片段用于检测选自下列的肽的存在的用途:

a) 表1、2和/或3中定义的蛋白；和

b) 表1、2或3的蛋白的修饰体或衍生物，它与表1、2或3的蛋白有至少80%的序列同源性。

19.能结合选自下列的蛋白的抗体:

a) 表1、2和/或3中定义的蛋白；和

b) 表1、2或3的蛋白的修饰体或衍生物，它与表1、2或3的蛋白有至少80%的序列同源性。

20.权利要求19的抗体，所述抗体为多克隆抗体。

21.权利要求19的抗体，所述抗体为单克隆抗体。

22.权利要求19－21中任一项的抗体用于检测选自下列的蛋白的存在的用途:

a) 表1、2和/或3中定义的蛋白；和

b) 表1、2或3的蛋白的修饰体或衍生物，它与表1、2或3的蛋白有至少80%的序列同源性。

23.一种诊断包括人类的哺乳动物的糖尿病或糖尿病遗传倾向的测试试剂盒，包括:

a) 一种特异性结合选自下列的至少一种标记蛋白的结合工具: i)表1、2和/或3中定义的蛋白；和 ii) i)中蛋白的修饰体或衍生物，它与i)中的蛋白有至少80%的序列同源性;或该结合工具为至少一种所述标记蛋白的抗体、能结合至少一种所述标记蛋白的核酸片段或能结合

至少一种所述标记蛋白的化合物；

b) 一种检测所述结合工具与至少一种所述标记蛋白或与至少一种所述核酸片段结合，若有的话，或结合的水平的工具，和

c) 一种将与结合工具的结合，若有的话，或结合的水平是否表示个体哺乳动物有患糖尿病的较高可能性或有患糖尿病的遗传倾向相关联的工具。

24.一种测定物质的效果的方法，该方法包括使用哺乳动物，例如人，其中哺乳动物是通过运用权利要求 1－7 中的任一项的方法确定为有患糖尿病的较大可能性或有患糖尿病的遗传倾向的个体，该方法包括将所述的物质施用给所述个体并测定该物质的效果。

25.一种药物组合物，包括：

a) 能调节核酸片段表达的物质，该核酸片段编码选自下列的蛋白的至少片段：i) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白；和 ii) i)中蛋白的修饰体或衍生物，它与 i)中的蛋白有至少 80％的序列同源性；

b) 选自下列的标记蛋白：i) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白；和 ii) i)中蛋白的修饰体或衍生物，它与 i)中的蛋白有至少 80％的序列同源性；

c) 选自下列的蛋白的衍生物、同源物或模拟物：i) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白；和 ii) i)中蛋白的修饰体或衍生物，它与 i)中的蛋白有至少 80％的序列同源性；

d) 选自下列的蛋白的抗体：i) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白；和 ii) i)中蛋白的修饰体或衍生物，它与 i)中的蛋白有至少 80％的序列同源性；

e) 能结合选自下列的标记蛋白的核酸片段、衍生物或模拟物（如 PNA）：i) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白；和 ii) i)中蛋白的修饰体或衍生物，它与 i)中的蛋白有至少 80％的序列同源性；

f) 能结合选自下列的标记蛋白的化合物：i) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白；和 ii) i)中蛋白的修饰体或衍生物，它与 i)中的蛋白有至少 80％的序列同源性；

26.用作药物，如用于治疗或预防糖尿病的权利要求 25 的药物组合物。

27.选自下列的化合物在制备用于治疗或预防糖尿病的药物中的用途:

a) 表 1、2 和／或 3 中定义的蛋白;

b) 表 1、2 或 3 的蛋白的修饰体或衍生物，它与表 1、2 或 3 的蛋白有至少 80％的序列同源性;

c) 与 a)和／或 b)中的蛋白有同样功能的蛋白;

d) 编码 a)、b)或 c)中蛋白的核苷酸序列;

e) a)、b)或 c)中蛋白的抗体;

f) 能结合 a)、b)或 c)的蛋白的核酸片段、衍生物或模拟物（例如 PNA）; 和

g) 能结合a)、b)或c)的蛋白的化合物。

人糖尿病介导蛋白

发明领域

概括地讲，本发明涉及人糖尿病介导蛋白、鉴定糖尿病介导蛋白的方法、筛选影响糖尿病介导蛋白的表达的药物的方法、以及治疗和预防糖尿病的治疗性化合物。

发明背景

人体内和人疾病的动物模型内的胰岛素依赖型的糖尿病(IDDM)的发展表征为朗格罕氏岛内单核细胞渗透和β细胞的破坏(胰岛炎)。β细胞破坏的机制还不清楚。积累的证据表明细胞因子，如白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)或干扰素-γ(IFN-γ)或其结合物，主要由巨噬细胞和单核细胞产生的，可能是胰岛β细胞破坏的媒介物[Mandrup-Poulsen T,Nerup J. New concepts in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus Contrib Nephrol.1989; 73: 1-14;discussion 14-5]。

人糖尿病的动物模型包括有糖尿病倾向的 BB（BB-DP）大鼠和非肥胖型糖尿病（NOD）小鼠。构建大鼠胰岛蛋白的二维（2D）凝胶图，并用它测定在体外将大鼠胰岛细胞与 IL-1β接触后蛋白质合成中的定性和定量的变化（Andersen 等（1995）Diabetes 44:400-407;John NE 等，Dieabetes.(2000)49:1879-29.Christensen 等人 Autoimmunity.(2000); 32:1-15 和 Mose Larsen 等人，Diabetes.(2001) 50:1056-63）。PCT/IB97/01627 记载了通过二维凝胶分析鉴定的大鼠糖尿病介导蛋白。

发明概述

本发明部分建立于人糖尿病介导（DM）蛋白的发现和鉴定。DM 蛋白是一种涉及糖尿病发展或预防有发展糖尿病危险的受试者的糖尿病发展

的蛋白，并可通过在有疾病发展和无疾病发展期间的差异表达而鉴别的这类蛋白。糖尿病的发展包括临床前可检测的所有阶段。

因此，一方面本发明基本上以纯化的人蛋白为特点，其中该蛋白存在于人胰岛细胞内，并在糖尿病的发展期间呈现出与没有糖尿病发展时的不同的表达。纯化的糖尿病介导蛋白选自表中列举的蛋白（包括其所有的修饰体（如生化或化学修饰的蛋白）、变异体或降解产物），尤其是表6、7和8中列举的蛋白。在相关的一方面，本发明的特点是选自下列的分离的蛋白：IEF斑点8,370,473，524,535,551,651,656,909,1013,1186,1353,1400,1477,1549,1629,1685,1689,1707,1715,1766,1800,1902,1935,2041，2079,2354，2382,2408,2411,13652，和14098（表6中所列的），NEPHGE斑点26,35，60,76,85,128，130,171，187,188，195,243，270,421，449,508，509,532,558,560，609,719，729,829，836,837，3879，和6600（表7中所列的）和IEF斑点122SPI，123SPI，126SPI，130SPI，135SPI，140SPI,160SPI,218SPI，248SPI，277SPI，304SPI，314SPI，和338SPI(表8中所列的)。这些蛋白中一种或多种蛋白（包括其所有的修饰体、变异体或降解产物）的表达可被用来评估受试者发展糖尿病的危险性，评估方法包括获取受试者的生物样品，并测定上面列举的一种或多种蛋白的表达水平，其中上面列举的一种或多种蛋白表达的改变可能表示有疾病发展的危险。

另一方面本发明的特点为人胰岛细胞蛋白的数据库，这些蛋白被鉴定为当与一种或多种细胞因子的组合接触时显示出相对于未与这些细胞因子接触的人胰岛细胞的改变的蛋白表达的人胰岛细胞蛋白。在一个的实施方案中，这些细胞与IL-1β接触；在另一实施方案中，细胞与包括（i）IFNγ和TNFα(ii) IFNγ和TNFα，以及（iii）IL-1β、IFNγ和TNFα之一的细胞因子混合物接触。在具体的实施方案中，人糖尿病介导蛋白的数据库通过将细胞与IL-1β、IFNγ和TNFα的混合物接触而产生。在更具体的实施方案中，本发明的特点为这样一些蛋白的数据库：被鉴定为当人胰岛细胞与150 pg/ml的IL-1β，1000 U/ml的IFNγ，和

5000 U/ml 的 TNFα接触时显示出改变的表达的人胰岛细胞蛋白。在整个说明书和表中称这为‘细胞因子混合物’。

显示出相对于对照细胞表达改变的蛋白包括表 1、2 和 3 中所列的和图 1、2 和 3 中所示的蛋白的数据库。在更具体的实施方案中，本发明提供包括表 1、2 和 3 中所列蛋白的数据库的蛋白数据库子集。该数据库子集包括在预测和／或评估受试者发展糖尿病的危险性中有诊断作用的标记。因此，一方面本发明提供选自表 1 和／或表 2 和／或表 3 中所列蛋白的标记蛋白子集，包括它们的所有变异体、翻译后的修饰体、降解产物和由其衍生的肽以及同源蛋白。在更具体的实施方案中，数据库包括表 1、表 2 和表 3 所列的 5 种或更多种、10 种或更多种、15 种或更多种或 25 种或更多种的蛋白。

在与此相关的一方面，本发明的特点是分泌型人胰岛细胞蛋白，包括当与 IL-1β、IFNγ和 TNFα接触时显示出相对于未与这些细胞因子接触时改变的蛋白表达的分泌型人胰岛细胞蛋白。在具体的实施方案中，蛋白数据库由表 3 所列和图 3 所示的蛋白构成。这些蛋白包括鉴定为 12SPI, 63SPI, 79SPI, 81SPI, 82SPI, 83SPI, 122SPI, 123SPI, 126SPI, 130SPI, 135SPI, 140SPI, 160SPI, 168SPI, 213SPI, 215SPI, 215SPI, 218SPI, 248SPI, 258SPI, 258SPI, 259SPI, 277SPI, 304SPI, 314SPI, 320SPI, 338SPI, 和 1157SPI 的蛋白。在更具体的实施方案中，该数据库包括表 3 所列分泌蛋白的子集。在更具体的实施方案中，该数据库包括 15 种或更多、10 种或更多和 5 种或更多的所述蛋白。

另一相关的方面，蛋白质组合可以是细胞蛋白（表 1 和 2 所列）和分泌型蛋白（表 3 所列）的组合。

如表 1、2 和 3 及图 1、2 和 3 所示，许多糖尿病介导蛋白用质谱通过与先前已鉴定的蛋白相对应而进行鉴定。与先前鉴定过的蛋白没有对应的蛋白在本文中通过其质谱表征。新的非分泌的人糖尿病介导蛋白以分子量、PI、和质谱特征表征，在 IEF 凝胶上鉴定的蛋白收集在表 6 中和在 NEPHGE 凝胶上鉴定的蛋白收集在表 7 中。对于一些蛋白，不可能

得到质谱，所以只能用其等电点和分子量和在凝胶电泳图上的位置表征（图 1、2 和 3）。

如表 3 中所示的分泌型糖尿病介导蛋白，许多分泌型糖尿病介导蛋白通过与先前鉴定过的蛋白相对应（PI 和分子量一致）而鉴定。不与已鉴定蛋白相对应的新的分泌型蛋白以质谱特征表征（表 8）。

本发明的糖尿病介导蛋白用于药物筛选试验以鉴定能调节糖尿病发展的化合物，所述化合物通过调节糖尿病介导蛋白的表达用作治疗或预防糖尿病的治疗剂和用作能预防或改善糖尿病的治疗剂的目标。

特定的 DM 蛋白的表达变化在诊断上用作糖尿病发展的指示并用于预测其发展过程（预后）。因此，一方面本发明的特点是一种诊断糖尿病发展的方法，该方法是通过测量一种或多种选自表 1－3 中所列的非分泌和／或分泌型糖尿病介导蛋白在蛋白质表达方面的增加或减少。测量怀疑有糖尿病或有发展成糖尿病危险的受试者体内蛋白质表达的变化，蛋白质表达的变化是相对于正常的非糖尿病的对照组体内蛋白质的表达而言的。在优选的实施方案中，表 1－3 中的一种或多种蛋白质的组合的变化表示糖尿病的发展。在更优选的实施方案中，表 1－3 中的至少 5 种蛋白的组合的变化表示糖尿病的发展。在进一步优选的实施方案中，表 1－3 中的至少 10 种蛋白的组合的变化表示糖尿病的发展。

本发明提供已鉴定的糖尿病介导蛋白，所述蛋白可被进一步表征为保护性的或有害的蛋白，在 PCT/IB97/01627 有记载，该申请在此全文引入作为参考。保护性的蛋白是一种阻止、抑制或减缓有发展糖尿病危险的受试者体内糖尿病发展的蛋白，有害的蛋白是一种引起糖尿病发展、增加糖尿病发展的危险或减少有发展糖尿病危险的受试者发展糖尿病所需时间的蛋白。有害的蛋白也包括阻止或干扰保护性蛋白表达的蛋白。

本发明包括基本纯的保护性或有害的糖尿病介导蛋白和编码本发明的糖尿病介导蛋白的多核苷酸序列。

一方面，本发明的特点是一种筛选影响一种或多种糖尿病介导蛋白的表达的化合物的试验方法。在具体的实施方案中，本发明提供一种鉴定能够诱导或增强内源的保护性蛋白表达的试验方法。在另一具体的实

施方案中，本发明的试验方法用于鉴定能抑制有害的糖尿病介导蛋白的表达因而抑制糖尿病的发展。

在与此相关的一方面，本发明提供一种鉴定能调节糖尿病介导蛋白活性的化合物，例如激动剂、拮抗剂或通过阻断糖尿病介导蛋白的活化所需的翻译后的步骤调节其活性的。特定 DM 蛋白在表达上的变化用于鉴定能调节 DM 蛋白表达的化合物的筛选方法中。能调节一种或多种糖尿病介导蛋白的表达的化合物可用作潜在的治疗或预防糖尿病的治疗剂。因此，一方面本发明的特点是鉴定能调节糖尿病介导蛋白表达的化合物的试验方法，该方法包括将试验化合物与表达一种或多种糖尿病介导蛋白的细胞或组织接触，并测定试验化合物对一种或多种糖尿病介导蛋白表达的作用。测定化合物的作用可通过本领域已知的各种方法进行，包括杂交进行探查或其它的寡核苷酸、抗体识别，例如，免疫扩散法、荧光免疫检验法、ELISA, RIA,印迹、免疫沉淀反应法、免疫电泳法或色谱法以及电泳法。能增加选自表 1、2 和 3 的糖尿病介导蛋白中一种或多种蛋白的表达和减少选自表 1、2 和 3 的糖尿病介导蛋白中一种或多种蛋白的表达的化合物为预防或治疗糖尿病的候补治疗性物质。蛋白表达的变化是相对于没有试验化合物时的表达来测定的。

另一方面，本发明提供一种通过施用治疗有效量的保护性的糖尿病介导蛋白来预防有糖尿病危险的受试者的糖尿病或改善糖尿病受试者的糖尿病症状的治疗方法。优选受试者为人。提供编码保护性的糖尿病介导蛋白的多核苷酸的基因治疗也包括在本发明的范围内。本发明进一步包括一种通过施用有效量的多核苷酸来预防和／或治疗糖尿病的治疗方法，其中所述的多核苷酸在体内抑制有害的糖尿病介导蛋白的表达。候选治疗性化合物选自表 1、2 和 3 中的蛋白、其同源物和衍生物及其模拟物。

在与此相关的方面，本发明提供一种预防和／或治疗有糖尿病危险的受试者的糖尿病的治疗方法，该方法是通过施用治疗有效量的能抑制或减少内源的有害糖尿病介导蛋白表达的化合物进行的。在另一实施方案中，本发明提供一种预防和／或治疗有糖尿病危险的受试者的糖尿病

的治疗方法，该方法是通过施用治疗有效量的能诱导或增强内源的保护性糖尿病介导蛋白表达的化合物进行的。在与此相关的方面，本发明提供一种预防和／或治疗有糖尿病危险的受试者糖尿病的治疗方法，该方法是通过施用治疗有效量的能调节糖尿病介导蛋白活性的化合物，例如激动剂、拮抗剂，或是通过阻止糖尿病介导蛋白的激活而进行的。本发明的治疗方法包括本领域已知的用于给有需要的受试者提供治疗剂的离体方法。

本发明的目的之一是鉴定介导糖尿病发病的人蛋白。

本发明的另一目的是提供人糖尿病介导蛋白，该蛋白用于鉴定能预防、延迟或改善受试者糖尿病的试验化合物的试验中。

本发明的另一目的是提供人糖尿病介导蛋白，该蛋白用于鉴定能引起、加速或恶化受试者糖尿病的试验化合物的分析中，表明该试验化合物将不适于作为药物化合物。

本发明的上述和其它目的、优点和特点对于阅读了介导糖尿病的基因和蛋白、分析方法的详述和权利要求后的本领域的技术人员来说是显而易见的。

发明详述

本发明一方面涉及一种诊断人糖尿病的方法，该方法包括测定人的生物样品中至少一种标记蛋白表达的存在或其水平，其中所述标记蛋白选自表 1、2 和 3 及图 1、2 和 3 中公开的任何一种蛋白和表 1、2 和 3 中标记蛋白的修饰体和衍生物，所述修饰体和衍生物与表 1、2 和 3 中的标记蛋白有至少 80％的同源性，其中 pI 为以等电聚焦法测定的标记蛋白的等电点，向上的箭头表示在接触的细胞内该蛋白增量调节，向下的箭头表示在接触的细胞内该蛋白减量调节，并在聚丙烯酰胺凝胶上测定分子量(分子量以 kDa 为单位)。

进一步地，所述方法的应用优选包括至少 2 种、至少 5 种或甚至更优选至少 10 种所述的蛋白，因为对于这些标记物的应用 2 种或更多种、5 种或更多种或 10 种或更多种蛋白的表达变化从统计学上是更加可靠的

指示。

本发明进一步的方面涉及一种诊断人糖尿病的方法，该方法包括测定人的生物样品中的至少一种标记蛋白表达的存在或水平，还包括确定至少一种标记蛋白增加的表达（增量调节的标记蛋白）或确定至少一种标记蛋白减少的表达（减量调节的标记蛋白），这些蛋白选自增量调节和减量调节的标记蛋白或增量和减量调节的标记蛋白的组合。

本发明进一步涉及一种治疗糖尿病的方法，该方法包括上调一种减量调节的蛋白、下调一种增量调节的蛋白或两种手段相结合。也就是说本发明涉及一种治疗人糖尿病的方法，该方法包括改变表 1、2 或 3 以及图 1、2 和 3 中标记蛋白的表达。此外，本发明涉及治疗人糖尿病的方法，该方法包括对所述的人施用表 1、2 或 3 中的标记蛋白、编码表 1、2 或 3 的标记蛋白的核苷酸序列、表 1、2 或 3 蛋白的抗体、能结合表 1、2 或 3 的标记蛋白的核酸片段或能结合表 1、2 或 3 中标记蛋白的化合物。

在鉴定作为糖尿病标记蛋白的标记蛋白的过程中，所述的标记蛋白要么是先前不清楚与糖尿病有关的蛋白，要么在糖尿病中它们的表达水平不清楚（增量或减量调节），本发明的研究者目前已分离出先前未被鉴定且的确未与糖尿病相关的蛋白。与这些新蛋白相关的是，本发明还涉及选自表 1、2 和 3 中蛋白以及与其有至少 80％同源性的蛋白。

本发明进一步的方面涉及新蛋白和表 1、2 和 3 中的蛋白作为糖尿病标记物或指示物的用途以及虽已知但其存在与否或普遍性先前被认为与糖尿病无关的蛋白的用途。蛋白质表达和蛋白质表达模式的变化对于诊断、预后和治疗应用以及靶标是重要的。

本发明的方法可被进一步用来测定人患糖尿病的倾向，该方法包括在人的生物样品内测定至少一种标记蛋白的存在或相对水平，其中所述指示有患糖尿病倾向的标记蛋白选自表 1、2 和 3 中公开的蛋白和表 1、2 或 3 中标记蛋白的修饰体和衍生物，所述的修饰体和衍生物与表 1、2 或 3 中的标记蛋白有至少 80％的同源性。

一种诊断人有患糖尿病倾向的方法，可包括在人的生物样品内测定至少一种标记蛋白增加的表达，所述的标记蛋白选自表 1、2 和 3 的蛋白，

确定人生物样品内至少一种标记蛋白的减少的表达（减量调节的标记蛋白），确定至少一种标记蛋白的增加的表达，或确定标记蛋白的增加的表达与减少的表达的组合。因此，确定测定一种蛋白是受增量调节还是减量调节可作为易患糖尿病的指示。增量和减量调节的模式也可作为指示。也就是说确定一种以上的蛋白的表达水平并一组蛋白的表达模式作为指示。

在合适的实施方案中，至少一种标记蛋白选自所述生物样品的蛋白在聚丙烯酰胺凝胶上显示出比对照品明显低或明显高的一种或多种的蛋白、在所述生物样品的蛋白聚丙烯酰胺凝胶上显示而在对照品聚丙烯酰胺凝胶上不显示的一种或多种蛋白、在所述生物样品的蛋白聚丙烯酰胺凝胶上没有显示而在对照品聚丙烯酰胺凝胶上显示的一种或多种蛋白。

类似地，关于治疗糖尿病的方法，可将一种单一的蛋白作为治疗的目标或可将一组的蛋白作为目标。这类目标蛋白的表达水平可被改变或可干扰这类蛋白本身以改变其活性。因此，治疗人糖尿病方法的一个有价值的实施方案包括改变表 1、2 或 3 中的至少一种标记蛋白的表达。

因此，本发明进一步涉及一种治疗人糖尿病的方法，包括对所述的人施用表 1、2 或 3 中至少一种标记蛋白、其衍生物、同源物或其模仿物、编码表 1、2 或 3 中的标记蛋白的核苷酸序列、表 1、2 或 3 中的抗体、能结合表 1、2 或 3 中的标记蛋白（或其对应的基因）的核酸片段、或能结合表 1、2 或 3 中的标记蛋白（或其对应的基因）的化合物。

本发明的阻止或延迟人糖尿病发作的方法可包括对所述的人施用表 1、2 或 3 中的一种标记蛋白、其衍生物、同源物或其模仿物、编码表 1、2 或 3 中的标记蛋白的核苷酸序列（如 DNA、cDNA、RNA、其 PNA 同源物或模仿物）、表 1、2 或 3 中的抗体、能结合表 1、2 或 3 中的标记蛋白的核酸片段（如 DNA、cDNA、RNA、PNA、其同源物或模仿物）、或能结合表 1、2 或 3 中的标记蛋白（或其对应的基因）的化合物。

因此，本发明的一个特别有价值的方面涉及一种药物组合物，该组合物包括能调节编码表 1、2 或 3 中蛋白的至少部分的核酸片段表达的物质、或表 1、2 或 3 中至少一种标记蛋白、表 1、2 或 3 中的抗体、能结

合表 1、2 或 3 中的标记蛋白的核酸片段、或能结合表 1、2 或 3 中的标记蛋白的化合物。

本发明进一步涉及一种测定一种物质具有治疗糖尿病的治疗作用的可能性的方法，该方法包括在将实验模型与所述试剂接触之前和之后测定表 1、2 或 3 中的一种或多种蛋白的表达水平并比较该表达水平。

在化合物的测试中，有关试剂的活性或靶的知识对于理解所述试剂的治疗活性是有用的并有助于改进所需的治疗效果。本发明研究者的进展允许实现一种测定化合物在治疗糖尿病中的效果的方法，该方法包括测定表 1、2 或 3 中的一种或多种蛋白的蛋白质表达水平，本发明涉及到一种测定治疗糖尿病的化合物的效果水平或活性水平的方法，该方法包括测定在将实验模型与所述试剂接触之前和之后测定表 1、2 或 3 中一种或多种蛋白的表达水平。

因此，本发明进一步涉及一种测定物质生理作用的方法，该方法包括使用已确定为有较大可能患糖尿病和具有患糖尿病遗传倾向的哺乳动物以本发明的方法进行测定，该方法包括对所述的个体施用所述的物质并测定该物质的效果。本发明的研究者预见到测定患糖尿病或易患所述疾病的人的糖尿病特征和病因，包括确定表 1、2 或 3 中的蛋白相对模型的表达水平，用来了解所述的疾病和可能的治疗方法。

本发明的每种方法涉及表 1、2 或 3 中的蛋白或与其有至少 80％的同源性的蛋白和／或是其翻译后的修饰体的用途。类似地，表 1、2 或 3 中的新鉴定的蛋白进一步包括与之有至少 80%同源性的蛋白，其是或不是这类蛋白的修饰产品。

本发明进一步涉及一种包括编码表 1、2 或 3 中定义的肽的核苷酸序列的核酸片段，以及涉及与上述核酸片段或其部分杂交的核酸片段。可使用所述核酸片段检测表 1、2 或 3 中肽的存在。

本发明进一步涉及能结合表 1、2 或 3 中定义的蛋白（或其翻译后修饰体的任何部分）的抗体。该抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。可使用抗体检测表 1、2 或 3 中显示的肽的存在。

本发明有价值的一方面涉及一种用于诊断哺乳动物糖尿病或有糖尿

病遗传倾向的试剂盒，它包括:

a)一种结合工具，该结合工具特异性地结合至少一种表1、2或3中所示的标记蛋白（或其翻译后的修饰体的任何部分）或表1、2或3中的蛋白的抗体、能结合表1、2或3中的标记蛋白的核酸片段（或其翻译后的修饰体的任何部分）、或能结合表1、2或3中的标记蛋白的化合物（或其翻译后的修饰体的任何部分）。

b)检测结合工具与至少一种标记蛋白或至少一种肽或至少一种核酸片段的结合（假如有结合的话）、或结合的水平的工具，和

c)将与结合工具的结合（如果有的话）、或结合的水平、是否表明个体哺乳动物有较大可能患糖尿病或有患糖尿病的遗传倾向相关联起来的工具。

须知可以预料一种以上的标记物相结合的检测将使得该分析成为糖尿病相关疾病的更可靠的指示。因此，诊断或测定至少一种糖尿病相关疾病的倾向的方法优选包括测定两种标记物的存在、活性、浓度和／或表达水平，三种或更多种的标记物（例如至少4、5、6或7种标记物）将是更优选的。类似地暗示用一种以上的本发明化合物（一种以上选自多肽、核酸片段或本发明的抗体），例如至少2、3、4、5、6或7种化合物进行治疗将使疾病的治疗更加有效，其中所述化合物能有效地影响一种以上的标记蛋白的水平。

在描述本发明的人糖尿病介导蛋白和基因和所用的试验方法之前，应理解本发明不限于具体的试验方法、糖尿病介导蛋白和基因、所述的试验化合物，因为所述的方法、基因及其制备当然可以变化。也应理解本文中的术语只是为了描述具体的实施方案而不是用来限制本发明，因为本发明只受所附的权利要求的限制。

如说明书和权利要求述中所使用的，单数形式的"一种"和 "所述"包括其复数名词，除非上下文另外清楚地加以说明。因此，例如“糖尿病介导蛋白”或“一种糖尿病介导蛋白”包括这类蛋白的混合物，“该制剂”或“该方法”包括本文描述的和／或对本领域的技术人员来说在阅读了本发明公开文本等后是显而易见的一种或多种的这类制剂、方法和

/或步骤。

除非另有定义，本文中使用的所有技术和科学术语为本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。虽然任何与本文中描述的方法和材料相似的或等同的方法和材料可用于本发明的实践或试验中，但优选的方法和材料为本文描述的方法和材料。本文中所提到的出版物在此引入作为参考以公开和描述与此相关的被出版物引用的方法和/或材料。

术语“糖尿病”包括胰岛素依赖型的糖尿病(IDDM, 青少年糖尿病或T1D)和 II 型糖尿病（成年发作的糖尿病 T2D)。术语“与糖尿病相关的疾病”包括肥胖、循环不足、胰岛素抗性（insulin-resistance)、X综合症、糖尿病性的视网膜病、糖尿病性的神经病变以及神经病变和动脉硬化症中的深度糖化终产物的作用（the involvement of advanced glycation end products (AGE)）。

术语“蛋白”包括氨基酸链的蛋白质、多肽和肽，包括所有的翻译后的修饰（例如处理和切断、糖基化或磷酸化），这种修饰通常在调节蛋白质的功能中起决定作用。该术语还包括天然的蛋白质以及合成的或重组的蛋白质、多肽和肽。术语“糖尿病介导蛋白”是指与糖尿病发病相关的蛋白质。糖尿病介导蛋白是在糖尿病的发病期间显示出变化的表达的蛋白，即与无糖尿病发病相比在糖尿病发病期间受增量调节或减量调节的蛋白或其表达受增量调节或减量调节的蛋白。在本发明中，糖尿病介导蛋白被鉴定为当人胰岛细胞与一种或多种细胞因子接触时显示出改变的表达的人胰岛细胞蛋白，其中所述的改变的表达是相对于没有与一或多种细胞因子接触的对照细胞的表达而言的。

可将蛋白以化学方法或生物方法进行修饰，包括磷酸化、甲基化、硫酸化（sulphylated)、糖基化或加入任何形式的脂质或脂肪酸、泛素或任何其它的大基团或含额外的氨基酸或任何其它形式的修饰（其中有200多种修饰形式是已知的)。这些修饰发生在蛋白质的特定位置并且在一个位置上的特定的修饰可能与在同一蛋白质上的不同位置上相同的修饰具有不同的效果。它们在细胞内可以是可逆的，例如它们可被用来开启和关闭酶，所以这些蛋白质可以各种形式存在－每种形式具有与这些

蛋白质功能相关的活性。而且多肽可被裂解，例如通过处理其 N-端或 C-端以移除信号肽或将其拼接以除去内部的序列。在蛋白质数据库如 EXPASY 可找到许多这类例子，有越来越多的手段预测这些修饰及其功能(参见 http://www. expasy. ch/)。因为据估计人体内的每种蛋白平均被修饰了 10 次，所以可预料本文中已鉴定过的大多数蛋白都是以某种方式或另外的方式修饰过的。因此在表 1、2 和 3 中给出了它们的表观等电点和分子量以便与理论值相比较以显示该修饰对蛋白质具有什么效果。

对多肽而言，术语“基本纯”是指重量比至少 60%，无与其自然相关的其他蛋白质和天然存在的有机分子。基本纯的糖尿病介导蛋白为重量比至少 75%的糖尿病介导蛋白，更优选至少 90%，最优选至少 99%。基本纯的糖尿病介导蛋白可从下列方法获得：由天然来源提取；编码糖尿病介导蛋白的重组核酸的表达；在对天然或重组细胞或表达系统电泳后回收或以化学方法合成该蛋白质。纯度可用任何合适的方法如柱色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳或 HPLC 分析进行测定。

术语“蛋白质”还包括上述多肽的衍生物、相似物和模拟物。这类衍生物、相似物和模拟物优选地与衍生前的多肽具有相同的活性，例如同一种酶活性。该衍生物、相似物和模拟物可具有比母体多肽低的活性、相同的活性或优选地具有比母多肽高的活性。

术语“至少一种”（例如至少一种化合物或至少一种标记蛋白）包括整数 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 等。应理解可用单一的蛋白，但在本发明的方法中使用一种以上的标记蛋白更有利。也就是说确定一种以上的蛋白的表达水平并用一组蛋白的表达模式作为指示。显然糖尿病鉴定的可靠性随组中蛋白的数量增加而增加。

“肽模拟物”是模拟肽的生物活性但在化学特性方面不再具有肽的性质的分子。按严格的定义，肽模拟物是不再含任何肽键（即氨基酸之间的酰胺键）的分子。然而术语肽模拟物有时用来描述在特性上不再完全是肽的分子，如伪肽、半肽和类肽。无论是完全的非肽或部分的非肽，本发明的肽模拟物具有非常类似于肽的活性基团的三维空间排列的反应

性化学基团的空间排列，模拟肽以肽的这种空间结构为基础。因为这种相似的活性部位的几何结构，模拟肽对生物系统具有作用，该作用类似于肽的生物活性。本发明包括肽模拟物的组合物，其为模拟本发明的生物活性肽的活性的相似物，即本发明的模拟肽可被用来治疗与糖尿病相关的疾病。优选地，本发明的肽模拟物在三维形状和生物活性方面都与肽基本上相似或与如上述的活性部位基本上相似。

另外，模拟物可以是‘抗模拟物’。换而言之，是能适合和阻断蛋白质的活性部位、或与结合部位或跟其它生物活性分子相互作用的部位相结合以干扰蛋白质的功能的分子。目前大多数药物属于这种类型。本发明包括这类能与本发明的多肽相互作应的抗模拟物。

使用特定的肽的模拟物或抗模拟物比使用肽本身具有明显的优点，因为肽通常显示出两种不利的性质:（1）低的生物利用度; 和（2）短的作用持续时间。肽模拟物或抗模拟物提供了解决这两个主要障碍的明显的途径，因为其分子足够小以致口服时具有活性且作用的持续时间长。还能节约相当可观的成本并有改进的与肽模拟物有关的受试者的依从性，因为与胃肠外给药和经粘膜给药的肽比较，它们能口服给药。而且生产肽模拟物比生产肽廉价。最后，对于肽而言有与稳定性、贮藏和免疫反应有关的问题，而肽模拟物没有这些问题。

因此上述肽可应用于具有相似的生物活性因而具有相似的治疗用途的这类小化合物。开发肽模拟物的技术为常规技术。所以肽键可被非肽键替换，允许肽模拟物采用相似的结构，因而具有与原始的肽相似的活性。此外还可通过以其它相似结构的化学基团替换氨基酸基团来作进一步的修饰。通过 NMR 光谱、结晶学和／或计算机辅助的分子模拟来测定原始肽的三级结构有助于模拟肽的发展。这些技术有助于开发具有比原始肽更高效力和／或更高生物利用度和／或更高稳定性的新组合物[Dean (1994), BioEssays, 16: 683-687; Cohen 和 Shatzmiller (1993), J. Mol. Graph. 11: 166-173; Wiley 和 Rich (1993), Med. Res. Rev. , 13: 327-384; Moore (1994), Trends Pharmacol. Sci. , 15: 124-129; Hruby (1993), Biopolymers, 33: 1073-1082; Bugg 等 (1993), Sci.

Am. , 269: 92-98, 上述所有文献在此引入作为参考]。一旦一种可能的肽模拟物被鉴定，就可合成它并用本文中描述的诊断分析方法或合适的疾病抑制剂分析方法对其进行分析以估计其活性（见 Finlay 等人（1983）, Ce11, 57:1083-1093 及 Fujiwara 等人 1993, Cancer Res. 53:4129-4133, 全部引用作为参考）。

因此，通过利用上述的方法，本发明提供具有比上述多肽增强的治疗活性的化合物。本发明包括能通过上述方法获得的具有上述肽的生物活性和相似的三维结构的肽模拟物。肽模拟物可从任何前面描述的修饰肽产生或从带有一种以上的前述修饰的肽产生，这对本领域的技术人员来说是显而易见的。更显而易见的是，本发明的肽模拟物除用作治疗化合物外可被进一步地用于开发更有效的肽模拟物。

术语“表达”的意思不仅包括蛋白质的物理表达，也包括表达的蛋白质的活性测量。例如蛋白质可以一种非活性的形式表达，通过磷酸化活化。尽管蛋白质的实际表达不变，但其有效的表达（活性）可被修饰。在凝胶上活性的变化可随蛋白质修饰形式的表达变化测量。“改变的蛋白质”或“改变的蛋白质表达”是指在糖尿病发病期间其表达增加（“增量调节”）、减少（“减量调节”）、被抑制（即关闭）或被诱导（即开启）的蛋白质。

术语“介导糖尿病的基因或多核苷酸”是指编码蛋白质、肽或蛋白质片段的遗传物质，它编码完整的糖尿病介导蛋白或其片段。该术语源自任何物种的编码糖尿病介导蛋白的任何基因。介导糖尿病的基因或多核苷酸可以是天然存在的或部分或完全合成的。

术语“核酸片段”“多核苷酸”、“核酸序列”等应理解为包括 DNA, RNA, LNA（闭合的核酸）, PNA, RNA, dsRNA 和 RNA-DNA 杂交体的核酸分子。也包括含非天然核苷的核酸分子。该术语包括任何长度的，例如 10－10000 的核苷酸的核酸分子，这由其用途决定。当核酸分子用作例如在 DNA 治疗中的药物，或用于生产本发明多肽的方法中时，优选使用编码至少部分多肽的分子，该分子具有约 18 至约 1000 核苷酸的长度，任选地将该分子嵌入载体中。当核酸用作探测物、引物或用于反义治疗中时，

优选使用长度为 10－100 的分子。按照本发明，可使用其它的分子长度，例如至少有 12、15、21、24，27,30，33,36，39,42，50，60,70，80,90，100,200，300,400，500 或 1000 个核苷酸的分子（或核苷酸衍生物），或最多有 10000,5000，4000,3000，2000,1000，700,500，400,300，200,100，50,40，30 或 20 个核苷酸的分子（或核苷酸衍生物）。应理解可将这些数值自由组合以产生一定的范围。

本文中所用的“分离的”多核苷酸是指不直接与在获取该多核苷酸的生物体天然基因组中直接与之相邻的（即 5’末端和 3’末端处的序列）任何一个编码序列相邻近（即共价键连接）。因此该术语包括重组的多核苷酸，例如并入载体中的、并入到自发复制的质粒或病毒中的或并入到原核生物或真核生物的基因组的 DNA 中的、或以独立于其它序列的单独的分子形式存在的重组的多核苷酸。它还包括编码额外的多肽序列的杂交基因的部分。本发明分离纯化的多肽序列还包括在严格的条件下与本文详细说明的多核苷酸序列杂交的多核苷酸序列。

术语“严格的条件”是指保证杂交的多核苷酸序列之间的特异性的杂交条件。本领域的技术人员可选择杂交后洗涤条件，包括温度和盐的浓度，该条件能减少非特异性的杂交以致于只有高互补性的序列才能被识别(Sambrook etal. (1989) Molecular Cloning, 2d ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,在此特别引入作为参考)。例如这样的条件是在具体的条件下杂交的，例如，包括在 5xSSC 中预浸和在 20％的甲酰胺、5xDenhardt′s 溶液、50 mM 磷酸钠、 pH 6.8、50μg 变性的超声处理过的小牛胸腺 DNA 的溶液中于约 40℃下预杂交 1 小时，接着在补充了 100μM ATP 的相同溶液中在约 40℃下杂交 18 小时(Sambrook 等 (1989) *op cit.*)。本发明分离和纯化的多核苷酸序列还包括与编码糖尿病介导蛋白的多核苷酸序列互补的序列(反义序列)和核糖酶。在本申请中多核苷酸序列之间的杂交优选在严格的条件下进行。

术语“序列同一性”（或“序列同源性”）是指对同等长度的两组氨基酸序列或同等长度的两组核苷酸序列同源性程度的测量。如果被比较的两组序列的长度不等，那么必须通过插入缺口或在蛋白质序列末端截

断来将它们比对至尽可能最佳的配合。序列的同一性可用 $\frac{(N_{ref}-N_{dif})\ 100}{N_{ref}}$ 计算，其中 N_{dif} 为两组序列比对时不相同的残基的总数，N_{ref} 为其中序列之一的残基数。因此，DNA 序列 AGTCAGTC 与序列 AATCAATC 有 75％的序列同一性(N_{dif}=2 且 N_{ref}=8)。缺口当作非同一性的具体残基进行计算，即 DNA 序列 AGTGTC 与 DNA 序列 AGTCAGTC 有 75％的序列同源性(N_{dif}=2 且 N_{ref}=8)。另外序列同源性可用 BLAST 程序例如 BLASTP 程序进行计算(Pearson W. R 和 D. J. Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448) (www. ncbi.nim. nih. gov/cgi-bin/BLAST)。在本发明的一方面，用序列比对的方法 Clustal W 以默认的参数进行比对，该方法记载在 Thompson J.，等 Nucleic Acids Res 1994 22: 4673-4680，从 http://www2. ebi. ac. uk/clustalw/可获取该方法。另外，两组核酸序列的同源性程度可用 GCG 程序组件的第 8 版的 GAP 进行测定，使用对于 DNA: GAP 标准罚分权重 5.00，长度权重 0.300，Gribskov 和 Burgess 在 Nucl. Acids Res. 14 (16); 6745- 6763 (1986)中描述的矩阵，并且两组氨基酸序列的同源性程度可用 GCG 程序组件的第 8 版的 GAP(Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711, USA) 进行测定，使用对于蛋白质: GAP 标准罚分权重 3.00,长度权重 0.100, Gribskov 和 Burgess 在 Nucl. Acids Res. 14 (16); 6745-6763 (1986)中描述的矩阵。

优选的序列同源性的最小百分数为至少 70%,如至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%和至少 99.5%。

术语蛋白质“数据库”是指由具有至少一种共有的特征而选择的蛋白质集合。术语“数据库”可被其它表示蛋白质集合的术语替代，这些术语包括“库”或“族”。本发明提供人胰岛细胞蛋白的数据库，在一实施方案中当与特定的细胞因子组合接触时这些蛋白显示出改变的表达为其共有的特征。

整个说明书中，除非上下文另有所指，词语“包括”应理解为包括所述的元素或整数或元素或整数形成的集合，但不排除任何其它的元素

或或整数或元素或整数形成的集合。

本发明涉及本发明的多肽或核酸用作治疗的疫苗的用途，这在文献如 Lowry, D. B. 等 1999, Nature 400: 269-71 中有记载。

在免疫检测中与本发明的多肽发生特异性反应的单克隆或多克隆抗体、或所述抗体的特异性结合片段也属于本发明的一部分。所述抗体可用本领域技术人员已知的方法制备。多克隆抗体可在哺乳动物内产生，例如通过注射一种或多种本发明的多肽制备，需要时可加入佐剂。例如，本发明的单克隆抗体可通过杂交瘤方法生产，该方法最早在 Kohler 和 Milstein, Nature, 256: 495 (1975)中公开，或者通过重组 DNA 方法，例如美国专利 4,816,567 中描述的方法生产。单克隆抗体也可从例如用 McCafferty 等, Nature, 348: 552-554 (1990)中描述的方法产生的噬菌体库中分离得到。其它生产抗体的方法在文献例如 US 6,136, 958 中有记载。

在诊断、治疗或测试中，本发明的抗体、核酸片段和／或多肽可单独使用，或作为组合物中的成分使用。这类组合物为本领域所已知，包括这样的组合物：其中本发明的抗体、核酸片段或多肽与至少一种其它的分子例如标记物（例如放射性或荧光物质）偶联，优选以共价键的方式偶联。

本发明进一步涉及利用上述化合物治疗和／或预防受试者的糖尿病相关疾病的方法。

本发明的方法包括这些步骤：a) 将本发明的一种或多种化合物与合适的药物载体结合；和 b)给受试者施用与载体结合的治疗有效量的或预防有效量的化合物。

术语“合适的药物载体”是指任何药学领域已知的用于化合物给药的载体。按照本发明可使用任何合适的药物载体，只要不存在相容性的问题。

将有效的剂量施用于受试者可通过胃肠外注射来实现，如静脉注射、鞘内注射、肌内注射或动脉内注射。化合物也可口服或经皮给药，或通过任何其它的本领域技术人员已知的方式例如通过气雾剂或鼻内喷雾的

方式给药。本发明优选口服给药。

本文中所用的术语“治疗有效量”是指治疗性治疗受试者所需的一种或多种本发明的化合物的量。这种治疗对于患有确诊为糖尿病相关疾病的受试者是适当的。类似地，术语“预防有效量”是指预防受试者所需的一种或多种本发明的化合物的量。这种预防对于受试者，例如，还没有确诊为有任何糖尿病相关疾病症状的受试者是适当的。当确定受试者有患糖尿病相关疾病的危险（例如，通过以具有标记物的改变的水平来确定糖尿病的倾向）时就开始预防性治疗是有益的。已知某些 IDDM 的标记物（例如 GAD_{65}和其它自身抗体）能在糖尿病发作前至少 8 年检测到。

正如本领域技术人员所了解的，所给定的化合物的剂量、给药途径和治疗持续的时间不仅取决于化合物的类型和其治疗疾病的效力，也取决于受治疗的个体，要考虑这样一些因素，如受试者的体重、对受试者进行的其它治疗和受试者的病情、临床反应和耐受性。剂量、给药途径和治疗持续的时间可由本领域技术人员对这些因素和其它相关因素进行评估后决定。

本发明的各个方面

人的糖尿病介导蛋白和多核苷酸

本发明提供人的糖尿病介导蛋白，即被鉴定为在糖尿病发病期间相关的或受影响的蛋白。糖尿病介导蛋白表征为在糖尿病发病期间相对于没有糖尿病发病时其表达被改变的蛋白。本发明的公开从人胰岛细胞蛋白的二维凝胶数据库中鉴定出糖尿病介导的蛋白。糖尿病介导蛋白包括保护性的糖尿病介导蛋白和有害的糖尿病介导蛋白。通过将人胰岛细胞与细胞因子接触来鉴定糖尿病介导蛋白，其中细胞因子为已知或公认为在糖尿病最终发病之前选择性地破坏胰岛细胞的细胞因子。本发明提供通过下述方法鉴定的糖尿病介导蛋白：使用二维凝胶比较对照品和用细胞因子刺激的胰岛从而鉴定哪些蛋白有反应，鉴定在细胞反应中起作用的蛋白。可用连环分析确定蛋白质的官能团及其调节（例如通过激酶磷酸化或其它的翻译后的修饰）。

保护性的糖尿病介导蛋白

本发明提供基本纯的保护性糖尿病介导蛋白（“保护性蛋白”），其特征为能防止有糖尿病发病危险的受试者的糖尿病发病，或能改善或减轻糖尿病受试者的糖尿病症状。本发明的保护性蛋白可直接用于防止糖尿病发病，或通过诱导或增强第二保护性蛋白的合成或者通过减少或抑制有害蛋白的合成而间接作用。本发明进一步包括与人的糖尿病介导蛋白的整个氨基酸序列有至少 80％同一性的氨基酸序列，优选至少 90％、更优选至少 95％和最优选至少 98％的同一性。同源性或同一性的百分数可以测定，例如通过使用 GAP 计算机程序（第 6 版，购自 University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG)）对序列信息比较而测定。GAP 程序运用 Needleman 和 Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 中的比对方法，该方法在 Smith 和 Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482 中进行了修正。简而言之，GAP 程序将相似性定义为比对的符号（即核苷酸或氨基酸）中相似的数目除两个序列中较短序列的符号的总数。GAP 程序默认的参数包括: (1)一元比较矩阵（unitary comparison matrix）（包含同一性的值 1 和非同一性的值 0）和 Gribskov 和 Burgess (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745 中权重的比较矩阵(the weighted comparison matrix)，这在 Schwartz 和 Dayhoff, eds. (1979) Atlas Of 蛋白 Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 中有记载。(2)每个缺口罚分 3.0 而对每个缺口的每个符号另外罚分 0.10; 和(3) 对于末端缺口无罚分。

本发明进一步包括编码本发明的糖尿病介导蛋白的多核苷酸序列，包括 DNA, cDNA, PNA 和 RNA 序列。还应当理解编码全部的或部分的糖尿病介导蛋白的多核苷酸也包括在本发明的范围内，只要它们编码具有介导糖尿病活性的多肽。这类多核苷酸包括天然存在的、合成和有意操纵的多核苷酸。例如，这类多核苷酸可经历定点突变形成。本发明的多核苷酸序列还包括反义序列。反义序列包括用修饰的寡核苷酸合成的序列。本发明的多核苷酸包括由遗传密码简并生成的序列。有 20 种天然的氨基

酸，其中大多数由一种以上的密码子指定。因此，所有简并的核苷酸序列都包括在本发明的范围内，只要由核苷酸序列编码的介导糖尿病的多肽氨基酸序列功能上没有变化。

有害的糖尿病介导蛋白

有害的糖尿病介导蛋白（“有害蛋白”）的特征为增强糖尿病的发病或增加受试者糖尿病发病危险。

鉴定糖尿病介导蛋白的方法

二维凝胶电泳(2-DGE)是分离蛋白质混合物特别有效的手段(例如 Andersen 等 (1995) Diabetes 44: 400-407; John NE 等, Diabetes. (2000); 49: 1819-29. Christensen 等, Autoimmunity. (2000); 32: 1-15 和 Mose Larsen 等, Diabetes. (2001); 50: 1056-63)。将细胞蛋白提取物加到凝胶上，各蛋白首先依电荷分离，然后依大小分离。结果是有 1000－5000 个斑点的特征图谱，每个斑点通常为单一的蛋白质。通过增加凝胶的尺寸和通过使用放射性同位素示踪法、银染和将凝胶的厚度减至 1.5mm 和更低以增加灵敏度可提高分辨率。通过使二维凝胶处于狭窄的 pH 范围内(例如 1.5、1 pH 单位 或更小)而获得分辨率的显著进一步改善。如下面的实施例所述，从 2D 凝胶上回收的单一的蛋白可通过质谱鉴定以得到胰蛋白酶的裂解模式和各个肽的精确分子量。然后用这些观测到的值在 DNA 和蛋白质数据库中进行检索以确定是否存在与先前鉴定过的蛋白相匹配的蛋白。根据已知的蛋白可以测定同一性或从与已知蛋白的高同源性可推算出同一性。当用 2D 凝胶电泳分离和鉴定出在糖尿病的发病期间显示出合成改变的蛋白斑点时，将鉴定的蛋白从凝胶上切离并用胰蛋白酶消化产生肽。从凝胶上回收肽并进行质谱分离（matrix assisted laser desorption／离子化的质谱）(MALDI)，并将所得到的 MS 图谱与公共的序列数据库中所有序列的计算机化的 MS 图谱和合适的序列信息对照进行分析。如果得到任何与先前克隆的序列的匹配，就将有关相应的基因和编码的蛋白质的信息收集起来。当所鉴定的

糖尿病介导蛋白不能与先前克隆的蛋白质匹配时，可通过本领域技术人员已知的方法将蛋白质微序列化以获得部分氨基酸序列信息。也可将蛋白质(当能以足够的量获得时)部分序列化，例如通过nanoelectrospray tandem质谱部分序列化，在该过程中使特定的肽在气相中成碎片并用所得碎片的分子量推导出部分氨基酸序列。一旦获得部分序列的信息就可能在 cDNA 或 EST （表达的序列标签）数据库中以及前面提到的数据库中进行检索。

在从数据库检索或氨基酸序列化获得的结果的基础上，构建具体的或简并的引物并用于筛选大鼠和人胰岛库，或用 PCR 的第一链 cDNA 克隆相应的 cDNA 的部分序列。然后用所得到的序列通过 5′-race PCR 或通过常规的杂交筛选技术，然后通过重组蛋白质的表达获得全长编码的区域(Karlsen 等 (1991) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88: 8337-8341; Karlsen 等 (1994) in: Insulin secretion and pancreatic beta-cell research, Flatt, P. R.,ed. , Smith-Gordon, USA; Chapter 64, pp. 1-9; Karlsen 等 (1995) Diabetes 44: 757- 758)。

糖尿病介导蛋白可以本领域已知的各种方法进行分离，包括从生物材料纯化、由重组 DNA 表达(见上面)。常规的方法步骤包括提取、沉淀、色谱、亲和色谱和电泳。例如，细胞表达糖尿病介导蛋白可通过离心法或用合适的缓冲液收集、裂解，并将蛋白质通过柱色谱分离，例如在 DEAE-纤维素、磷酸纤维素、多聚核糖胞苷酸－琼脂、羟磷灰石上进行，或通过电泳或免疫沉淀分离。另外，使用特异性抗体通过电泳可分离糖尿病介导蛋白。

糖尿病介导蛋白用于筛选能影响糖尿病介导蛋白表达的化合物的用途

本发明提供的方法用于筛选能影响糖尿病介导蛋白表达并因而影响哺乳动物糖尿病发病的化合物。用于筛选能影响一种或多种糖尿病介导蛋白表达的药物的一种模型是将可能有有益作用的化合物（包括抗过敏的寡核苷酸）施用给培养的细胞。有用的细胞是 RIN、转染的细胞或胰

岛细胞。然后可通过 2D 凝胶电泳分析试验化合物对蛋白表达的作用。

另一种筛选模式是用有糖尿病发病危险的哺乳动物进行体内筛选的方法。简而言之，将具有增加的患糖尿病危险的哺乳动物（例如有糖尿病倾向的 BB 大鼠或 NOD 小鼠）与试验化合物接触，并测定与试验化合物的接触对糖尿病发病的作用。

可通过测定一种或多种糖尿病介导蛋白的表达并通过将糖尿病发作的时间与没有糖尿病发展时的表达和时间比较可监测整个发展期间糖尿病的发展。对一种或多种糖尿病介导蛋白的表达的测定包括介导糖尿病蛋白本身、翻译后的修饰产品和／或糖尿病介导蛋白降解产物。在一实施方案中，糖尿病介导蛋白的活化是通过测量糖尿病介导蛋白在试验样品中的表达水平进行测定的。合适的试验样品包括体液，如血液、尿液或脑脊髓液、或由其得到的液体，如血浆或血清。在一具体的实施方案中，蛋白质在试验样品中的表达水平通过蛋白印迹分析测量。存在样品中的蛋白质通过凝胶电泳分离，转移到膜上，并用标记的蛋白质特异性抗体进行探测。在另一具体的实施方案中，糖尿病介导蛋白的表达水平是通过 RNA 印迹分析测量的。从试验样品中分离多聚腺苷酸化的[poly(A)+] mRNA 。将 mRNA 通过电泳分离并转移到膜上。用标记的 cDNA 探测该膜。在另一实施方案中，蛋白质的表达通过应用于表达的 mRNA 的定量 PCR 进行测量的。

在又一方面，本发明提供鉴定能抑制或减少内源的有害的蛋白表达的化合物的方法，以及通过施用治疗有效量的能抑制或减少内源的有害的蛋白表达的化合物来预防和／或治疗糖尿病的方法。

本发明的糖尿病介导蛋白也用于筛选调节糖尿病介导蛋白活性的试剂。因此，一方面，本发明的特点是鉴定调节糖尿病介导蛋白活性的试剂，该方法包括以待测试剂孵育表达糖尿病介导蛋白的细胞，并测量待测试剂对糖尿病介导蛋白的合成、磷酸化、功能或活性的作用。当糖尿病介导蛋白经磷酸化激活时，待测试剂同糖尿病介导蛋白孵育和用伽马-[^{32}P] 或[^{33}P]-标记的-ATP （或其它的单核苷酸）或 [^{32}P] 或 [^{33}P] -焦磷酸盐（磷酸）或 [^{32}S] -蛋氨酸孵育，并测定磷酸化的速率。在另一

实施方案中，待测试剂同以糖尿病介导蛋白的多核苷酸表达载体转染的细胞孵育，并以 RNA 印迹分析方法测量待测试剂对糖尿病介导蛋白转录的作用。在进一步的实施方案中，用糖尿病介导蛋白的抗体以蛋白质印迹分析方法测量待测试剂对糖尿病介导蛋白合成的作用。在另一实施方案中，试剂对糖尿病介导蛋白活性的作用是通过用待测 [^{32}P] -ATP（或上述的其它放射化学试剂）和糖尿病介导蛋白的途径中的底物孵育糖尿病介导蛋白进行测量的。所有的试验结果都将与以[^{35}S]-蛋氨酸正常标记的细胞进行比较以测定蛋白质表达的调节。底物磷酸化的速率用本领域已知的方法测定。

术语糖尿病介导蛋白活性的调节包括激动和拮抗。本发明尤其用于筛选抑制有害蛋白活性的试剂。这类试剂用于治疗或预防糖尿病。

治疗应用

本发明提供通过应用治疗有效量的保护性糖尿病介导蛋白来预防和／或治疗人糖尿病的方法。优选地哺乳动物为有患糖尿病危险的人。

使用已鉴定的糖尿病介导蛋白和相关的糖尿病治疗剂的药物筛选

在本发明的药物筛选法中，已鉴定的保护性的或有害的糖尿病介导蛋白用于鉴定能影响其表达的试验化合物。如此鉴定的试验化合物为预防、改善或延迟有患糖尿病危险受试者的糖尿病发作的候选治疗剂。影响糖尿病介导蛋白的试验化合物可以是，但不限于，至少一种选自核酸、化合物、蛋白质、元素、脂质、抗体、糖、同位素、碳水化合物、显象剂、脂蛋白、糖蛋白、酶、可检测的探测剂、和抗体或其片段、或它们的组合，如本文所述，它们可进行可探测的标记，如标记抗体。这些标记包括但不限于酶标记、放射性同位素或放射性化合物或元素、荧光化合物或金属、化学发光性化合物和生物荧光化合物。

治疗性化合物在本发明的药物筛选法中是通过其诱导或增强保护性蛋白以致有患糖尿病危险的受试者的疾病发作被阻止或延迟的能力而鉴定。候选治疗性化合物也可通过其阻止或减少有害蛋白表达以致有患糖

尿病危险的受试者的疾病发作被阻止或延迟的能力而鉴定。作为治疗性化合物的治疗性核酸可具有，但不限于，至少一种下述的对靶细胞的治疗作用：抑制有害蛋白 DNA 序列的转录；抑制有害蛋白 RNA 序列的翻译；抑制有害蛋白对应的 RNA 或 DNA 序列的逆转录；抑制蛋白翻译后的修饰；诱导保护性蛋白对应的 DNA 序列的转录；诱导保护性蛋白对应的 RNA 序列的翻译；诱导保护性蛋白对应的 RNA 或 DNA 序列的逆转录；核酸翻译为蛋白质或酶；将核酸并入靶细胞的染色体用于治疗性核酸的组成型或短暂表达。治疗性核酸的治疗作用可包括，但不限于：关闭有缺陷基因或对其表达进行加工，如反义 RNA 或 DNA；抑制病毒的复制或合成；表达编码治疗性蛋白或修正缺陷蛋白的异源核酸的基因治疗；修正 RNA 如 hnRNA、mRNA、tRNA、或 rRNA 有缺陷的表达或表达不足；编码药物或前药、或能在表达糖尿病介导蛋白或肽的病变或正常细胞内产生作为药物或前药的化合物的酶；和任何已知的其它治疗作用。本发明也包括通过提供编码保护性的糖尿病介导蛋白的多核苷酸的基因治疗法。本发明进一步包括通过施用有效量的抑制有害的糖尿病介导蛋白体内表达的多核苷酸来预防糖尿病的方法。

在本发明的治疗方法中，对病人长期或短期应用治疗化合物。任选地，长期应用保护性的蛋白并联合应用有效量的与该治疗性化合物不同作用途径的化合物。本发明的治疗方法可与其它治疗糖尿病的方法相结合。治疗制剂在 PCT/IB97/01627 有记载，特在此全文引入作为治疗制剂的说明和本领域已知的治疗化合物的给药方法，包括常规的和基因治疗技术的参考。

人的糖尿病介导蛋白的鉴定和表征

如下面的实施例所述，将从器官捐献者胰腺分离的人朗格罕氏岛在标准的培养条件下于 RPMI 1640 培养基中在下列重组细胞因子存在的情况下培养：

A = 仅有培养基；

B = 培养基 + 150 pg/ml 白细胞介素-1β (IL-1β)（相当于 60

U/ml);

C=培养基+ 1500 pg/ml IL-1β;

D=培养基+1000 U/ml-IFN-γ +5000 U/ml 肿瘤坏死因子-α (TNFα);

E=150 pg/ml IL-1β + 1000U/mlIFN$_\gamma$ + 5000U/mlTNF$_\alpha$。

在标准的细胞培养条件下 20 小时，将细胞在[^{35}S]-蛋氨酸存在下标记 4 小时。从细胞和培养基中分离出蛋白质。从培养基得到的蛋白质代表不与细胞因子接触或与一种或多种细胞因子接触后的分泌型蛋白质。通过 2-D 凝胶电泳和质谱分析蛋白质样品。

对于分析凝胶，用于鉴定表达水平改变的蛋白质，进行 6 个单独的试验，每个试验用 150 个胰岛。这可以构造每种培养条件下的合成图像。这样通过这种方式将对照条件（A）和其它与细胞因子接触的任何条件下（B-E）的结果进行比较和统计学评估可以鉴定胰岛中的和分泌到培养基中的与对照条件相比被显著增量调节或减量调节的一组蛋白。为了对在上述的凝胶分析中鉴定为增量调节或减量调节的斑点进行MS鉴定，制备定量的／制备型凝胶，每种试验条件用 100,000 个胰岛（以便在每个斑点上得到足量的蛋白进行MS鉴定）。这样，将两组各 100,000 个胰岛在没有细胞因子（A）或在 3 种细胞因子（E）存在的条件下进行培养，增加了让所有的耳的蛋白点都能进行MS鉴定的可能性。

实验

给出下面的实施例是为了将如何制备和使用本发明的蛋白质、基因和试验方法的完整的公开和说明提供给本领域的普通技术人员，而不是用来限制发明人所指的发明范围。已作了很大的努力确保所用的数字（例如量、温度等）的准确性，但仍包括一些实验误差和偏差。除非另有说明，份为重量份量，分子量为重量平均分子量，温度为摄氏度，压力为大气压或接近大气压。

实施例 1。材料和方法

试剂

克他命(Ketamin)购自 Park-Davis (Barcelona, Spain), xylazin 购自 Bayer (Lever- kusen, Germany), Temgesic@ 购自 Reckitt 和 Colemann (Hull, UK)。RPMI 1640、Hanks′平衡盐溶液(HBSS), 和 DMEM 购自 Gibco, Paisley,苏格兰。RPMI 1640 含 11 mmol D-葡萄糖, 并补充了 20 mM HEPES 缓冲液、100,000 IU/l 青霉素和 100mg/l 链霉素。可靠的重组人 IL-1β由 Novo Nordisk Ltd. (Bagsvaerd, Denmark) 提供, 特异活性为 400 U/ng。使用的其它试剂: 2-巯基乙醇、牛血清白蛋白(BSA)、Tris-HCL、Tris 碱、甘氨酸, (Sigma, St. Louis, USA); 三氯乙酸(TCA)、磷酸、NaOH、甘油、正丁醇、溴酚蓝、硝普钠(SNP), H_3PO_4 和 $NaNO_2$ (Merck, Darmstadt, Germany); 过滤器 (HAWP 0.25 mm 孔径) (Millipore, Boston, USA); RNAse A, DNAse I (Worthington, Freehold, NJ, USA); [^{35}S]-蛋氨酸 (SJ 204, 特异活性: > 1. 000 Ci/mmol, 含 0.1%的 2-巯基乙醇、Amplify@ (Amersham International, Amersham, UK); 尿素 (超高纯) (Schwarz/Mann, Cambridge, MA, USA); 丙烯酰胺、二丙烯酰胺、TEMED、过硫酸铵(BioRad, Richmond, CA, USA); 两性电解质: pH 5-7, pH 3.5-10, pH 7-9, pH 8-9.5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden); Nonidet P-40 (BDH, Poole, UK); 两性电解质: pH 5-7 和十二烷基硫酸钠(Serva, Heidelberg, Germany); 琼脂(Litex, Copenhagen, Denmark); 乙醇 (绝对浓度 96%) (Danish Distillers, Aalborg, Denmark); 甲醇 (Prolabo, Brione Le Blanc, France); 乙酸 (技术质量,99%冰乙酸) (Bie & Berntsen, Arhus, Denmark) 和 X-光胶片(Curix RP-2) (AGFA)。

人的样品

分离人胰岛(Andersen 等 (1995) Diabetes 44: 400-407; John NE 等, Diabetes. (2000); 49: 1819-29. Christensen 等, Autoimmunity. (2000); 32: 1-15 以及 Mose Larsen 等, Diabetes. (2001); 50: 1056-63), 人胰岛由糖尿病研究所, 细胞移植组, (Diabetes Research

Inst. , Division of Cellular Transplantation, Miami, Florida, 美国）提供。在培养几天后，将胰岛按上述的具体条件处理。在试验的最后步骤中在 2D－凝胶分析前将洗涤过的胰岛和培养基／标记培养基直接（对于制备型凝胶），或在样品缓冲液中水解后（对于分析型凝胶）于－80℃下贮藏。

细胞因子激发

将制备好的人胰岛细胞在 5 种不同的试验条件下培养：A 组在单独的培养基中培养；B 组在培养基＋150pg/ml IL-1β （相当于 60 U/ml）中培养；C 组在培养基＋1500pg/ml IL-1β 中培养；D 组在培养基＋1000 U/mlIFNγ ＋5000 U/mlTNFα 中培养； D 组在 150pg/ml IL-1β ＋1000 U/mlIFNγ ＋5000 U/mlTNFα 中培养。将细胞在标准的条件下于 37℃孵育 20 小时，接着用[^{35}S]-蛋氨酸孵育 4 小时。收集细胞以进行 2-D 凝胶电泳和质谱分析。收集每试验组中标记的培养基以进行分泌蛋白质的分析。

样品的制备

将用于分析的部分 150 胰岛／条件在水解缓冲液中直接裂解，大部分在条件 A 和 E 下培养的用于上述制备凝胶和 MS 鉴定的胰岛(100,000/条件)在研钵内碾碎、再混悬于 100 ml DNAse I/RNAse A 溶液中并经冻／融两次裂解。在第二次融化后，将样品置于冰上 30 分钟以便核酸消化，然后冷冻干燥过夜。在 2D-凝胶分离前通过振摇将样品溶解在 120ml 的裂解缓冲液(8.5 M 尿素，2% Nonidet P-40，5% 2-巯基乙醇和 2% 两性电解质， pH 范围为 7-9)中最少 4 小时。

[^{35}S]-蛋氨酸掺入量的测定

通过向每组两份同等样品 5ml 的 1：10 稀释液中加入作为蛋白质载体的 10 mg BSA (0.2mg/mlH_2O)、接着加入 0.5ml 的 10% TCA 来定量测定[^{35}S]-蛋氨酸掺入量。在经 0.25 mm HAWP 过滤器过滤之前让其在 4℃下

沉淀 30 分钟。将过滤器干燥并置入闪烁液体中计数。

2-D 凝胶电泳

该方法早有记载(O'Farrell 等 (1977) Cell 12: 1133-1142)。简而言之，第一种二维凝胶含 4％丙烯酰胺、0.25％二丙烯酰胺和两性电解质。每种样品的等数计量(10^6cpm) 应用到凝胶上。在放射性较低的情况下，必须调整与凝胶的曝光时间以便可比较的总的光密度。将样品在等电聚焦(IEF; pH 3.5-7)和非平衡 pH-梯度电泳(NEPHGE; pH 6.5-10. 5)凝胶上分析。第二种二维凝胶含 12.5％的丙烯酰胺和 0.063％二丙烯酰胺，进行一整夜。电泳后，在干燥前用 Amplify@固定和处理凝胶以便荧光显像。使凝胶与 X-光胶片接触并在-70 ℃下暴光 3－40 天。每份凝胶暴光至少 3 次以补偿 X-射线的动态范围的不足。将一些凝胶立即干燥并将凝胶暴露于磷光板（phosphorimaging plate）上以便捕获影像。暴光 3 至 15 天（每份凝胶暴光 1 次，因为磷光显像仪的动态范围超过 10^6）后，用 AGFA ADC 70 在板上读数并将图像以 16 bit 文档输出以便分析。

MW 和 pI 的测定

蛋白质的分子量用已知的蛋白质的值以内插法测定。界标（Landmark）蛋白质通过下列中的一种或几种技术鉴定：免疫印迹、免疫沉淀反应、质谱、微序化或肽图谱。

荧光图象的计算机分析

用 BioImage@ 程序(6.1 版)在 Sun-sparc 工作站进行计算机分析。首先，将荧光图像或自显影图像扫描，通过 BioImage@ 程序鉴定斑点并进行定量测定。接着将锚点（anchor points）置于凝胶上（每份凝胶相同的斑点被指定相同的锚点)，并要求计算机将凝胶相匹配。计算机匹配完后，进行人工编辑以确保正确的斑点分界线的鉴定、正确的计算机匹配能发现计算机程序初期不能发现的斑点和斑点的定量测定。最后，提取数据以便用 Excel@电子制表软件(Microsoft)计算。为避免 IEF 和

NEPHGE 亚组中重复的斑点的存在，在分析时忽略 IEF 凝胶碱性部分或 NEPHGE 凝胶酸性部分中重复的斑点。

统计学分析

运用 Student 的 t 检验， $P < 0.01$ 被认为是有显著性差异。

实施例 2. 糖尿病介导蛋白的表征

质谱

在本发明的至少一份凝胶中在包括至少一种蛋白质斑点的至少一个凝胶块上原位消化。按照对 Rosenfeld 等 (1992) Anal. Biochem. 203: 173-179 中方法改进后的方法制备凝胶，在 Fey 等 (1997) Electrophoresis 18: 1-12 中有记载，两篇文献均在此具体引入作为参考。简而言之，将凝胶迅速染色和脱色。用解剖刀将目的蛋白质的凝胶带切割下来，在－20℃下贮存在含 UHQ 水的微量离心管中，由此可获得目的蛋白质。通过在 40% 乙腈/60%的消化缓冲液中洗涤凝胶块至少 1 小时直到除去考马斯亮兰染料从而将蛋白质消化。

这样洗涤除去了考马斯亮兰染料、凝胶缓冲液、SDS 和盐份。如有必要，可反复洗涤。然后将凝胶块在真空离心机中干燥 20－30 分钟直到收缩并在表面上变白。干燥的时间取决于凝胶块的大小和厚度。将胰蛋白酶(或所用的酶)溶解在消化缓冲液中并取 5ml 加入到凝胶填料中(取决于待分析的凝胶中蛋白质的量(0.1 mg))。另外加入消化缓冲液直到凝胶块在试管底部几乎被缓冲液覆盖，约 10 ml。然后将凝胶块在 37℃下孵育 6 小时或过夜，然后用 70-100 ml 60% 乙腈/40%水孵育以 2-6 小时提取肽。可重复提取以增加回收率。然后将提取物冻干并在 MALDI-MS 分析前溶解在 30% 乙腈/2% TFA 中。

实施例 3.定量凝胶分析

上述两组二维凝胶分析产生表 1－8 中所列的人糖尿病介导蛋白数据库的鉴定。这些蛋白质通过用 1500pg/ml IL-1β 或细胞因子(150pg/ml

IL-1β（β白细胞介素）、1000U/ml IFNγ（γ干扰素)和 5000U/mlTNFα（α肿瘤坏死因子））的混合物处理人胰导而鉴定。

表 1 所列的所有细胞蛋白鉴定为当用细胞因子处理[^{35}S]-蛋氨酸标记的人胰岛并在 IEF 凝胶分析蛋白时显示出统计学上显著的表达改变的细胞蛋白。在表 1、2 和 3 各表中 IL-1β1500 是指用 1500pg/ml IL-1β刺激。'细胞因子混合物'是指用 150pg/ml IL-1β、1000U/ml IFNγ和 5000U/mlTNFα诱导的刺激。向上的箭头表示在处理的细胞中蛋白质以较高的量表达；向下的箭头则相反。

表 2 所列的所有细胞蛋白鉴定为当用细胞因子处理[^{35}S]-蛋氨酸标记的人胰岛并在 NEPHGE 凝胶上分析蛋白时显示出统计学上显著的表达改变的细胞蛋白。

表 3 所列的所有分泌蛋白鉴定为当用细胞因子处理[^{35}S]-蛋氨酸标记的人胰岛并在 IEF 凝胶上对蛋白进行分析时显示出统计学上显著的表达改变的分泌蛋白。

表 4 所列的为被鉴定为在细胞因子激发时在 IEF 凝胶分析中显示出表达改变的蛋白(cf. 表 1)并提供蛋白质片段的质谱分子量值。这些蛋白质通过参考记录在公众可获得的数据库中的其它种类的蛋白质（包括氨基酸序列和核苷酸序列）进行鉴定。

表 5 所列的为被鉴定为在细胞因子激发时在 NEPHGE 凝胶分析中显示出表达改变的蛋白(cf. 表 2)并提供蛋白质片段的质谱分子量值。这些蛋白质通过参考记录在公众可获得的数据库中的其它种类的蛋白质（包括氨基酸序列和核苷酸序列）进行鉴定。

表 6 所列的为以 IEF 凝胶(cf. 表 1)鉴定的没有任何已知蛋白相对应的新的人胰岛细胞蛋白并提供这些蛋白质片段的质谱分子量值。

表 7 所列的为以 NEPHGE 凝胶(cf. 表 2)鉴定的没有任何已知蛋白相对应的新的人胰岛细胞蛋白并提供这些蛋白质片段的质谱分子量值。

表 8 所列的为以 IEF 凝胶(cf. 表 1)鉴定的没有任何已知的蛋白相对应的由人胰岛细胞分泌的蛋白并提供这些蛋白质片段的质谱分子量值。

图 1 显示了两份用 [^{35}S] 蛋氨酸-标记的人胰岛的二维凝胶图像和按本文中描述的方法分离的蛋白质。本文中或表中提到的蛋白质都被标记以便参考。右边给出了近似分子量的刻度。图像的右边是酸性面并覆盖了标定的 4 到 7 的 pH 范围。

图 2 显示了两份用 [^{35}S] 蛋氨酸-标记的人胰岛的二维凝胶图像和按本文中描述的方法分离的蛋白质。本文中或表中提到的蛋白质都被标记以便参考分子量刻度。图像的右边的酸性面并覆盖了标定的 6.5 到 10.5 的 pH 范围。

图 3 显示了两份用 [^{35}S] 蛋氨酸-标记的胰岛分泌的人蛋白的二维凝胶图像和按本文中描述的方法分离的蛋白质。本文中或表中提到的蛋白质都被标记以便以分子量的数值范围为指示供参考。图像呈现的是右边的酸性面并覆盖了标定的 4 到 7 的 pH 范围。

表 1

以 MS 鉴定表征的、通过与其它种类的相关性鉴定的人胰岛细胞蛋白和未曾鉴定的蛋白

斑点 #	基因名称	标识符	IL1 β 1500	细胞因子混合物	蛋白质名称	观察的 pI	分子量
8				↓	新谱，见表 6	4.79	249,415
191	HS74	P34932		↓	热激 70kD 蛋白 4 (HSP70RY) HSPA4.	4.95	127,654
267	EZRI	P15311		↓	Ezrin (P81) (细胞绒毛蛋白) (绒毛蛋白-2) V1L2	6.34	69,286
297			↓		新的未鉴定过的蛋白	5.90	76,695
370				↓	新谱，见表 6	5.15	88,075
473			↓		新谱，见表 6	6.31	69,863
504	HS7C	P11142		↑	热激同源 71kD 蛋白 HSPA8 或 HSC70 或 HSP73	5.96	62,425
524				↑	新谱，见表 6	5.78	63,041
535				↑	新谱，见表 6	5.60	70,495
551				↑	新谱，见表 6	5.53	70,096
554				↓	新的未鉴定过的蛋白	5.40	66,003
651			↓		新谱，见表 6	4.67	78,015
656				↓	新谱，见表 6	4.65	69,924
677			↑	↑	新的未鉴定过的蛋白	6.84	68,176
699	DHAX	P49419	↓	↓	肌苷-5'-单磷酸脱氢酶 2 (EC 1.1.1.205) (IMP 脱氢酶 2) (IMPDH-II) (IMPD 2) IMPDH2 或 IMPD2.	6.46	61,913
699	IMD2	P12268	↓	↓	肌苷-5'-单磷酸脱氢酶 2 (EC 1.1.1.205) (IMP 脱氢酶 2) (IMPDH-II) (IMPD 2) IMPDH2 或 IMPD2.	6.46	61,913
699	DHAC	P00352	↓	↑	醛脱氢酶，细胞质的 (EC 1.2.1.3) (1 类) (ALHDII) ALDH-E1 AIDH1 或 ALDC	6.46	61,913
724	AMPL	P00727		↑	牛胞质氨基肽酶 (EC3.4.11.1) (亮氨酸氨基肽酶) (LAP)	6.32	57,846
				↑	见表 4(亮氨酰氨基肽酶) (脯氨酸氨基肽酶) (EC 3.4.11.5) (脯氨酰氨基肽酶)		
724	DHAC	P00352		↑	醛脱氢酶，细胞质的 (EC 1.2.1.3) (1 类) (ALHDII) (ALDH-E1)	6.32	57,846
725	DHAC	P00352	↓	↓	醛脱氢酶，细胞质的 (EC 1.2.1.3) (1 类) (ALHDII) (ALDH-E1)	6.30	56,853
760	SYW	P23381	↑	↑	色氨酰基-tRNA 合成酶 (EC	5.78	52,099

					6.1.1.2) (色氨酰基-tRNA 连接酶)		
763			↑	↑	新的未鉴定过的蛋白	5.71	52,172
812	P60	P10809	↓	↓	线粒体基质蛋白 P1 (P60 淋巴细胞蛋白) 60 kD 陪伴蛋白 (热激蛋白 60) HSP-60 (蛋白 CPN60) (GROEL) - (HUCHA60)	5.15	55,253
826	YPH	P19971		↑	胸苷磷酸化酶 (EC 2.4.2.4) (TDRPase) (血小板衍生的内皮细胞生长因子) (PD-ECGF) (gliostatin) ECGF1	5.14	50,432
855	TBA1	P04687		↑	微管蛋白α-1 链 TUBA1	4.93	57,204
855	TBB1	P07437		↑	微管蛋白 β-1 链	4.93	57,204
855	HSU52513	Q99634		↑	RIG-G	4.93	57,204
864	TBB1	P07437	↓	↓	微管蛋白 β-1 链. TUBB1	4.76	54,251
864	TBB2	P05217	↓	↓	微管蛋白 β-2 链. TUBB2	4.76	54,251
864	PDI	P07237	↓	↓	蛋白质二硫化物异构酶 (PDI) (EC 5.3.4.1) 脯氨酰-4-羟化酶 β 亚基 (EC 1.14.11.2) 细胞甲状腺激素结合蛋白 (P55)	4.76	54,251
864	CBPH	P16870	↓	↓	羧肽酶 H (EC 3.4.17.10) (CPH) (羧肽酶 E) (CPE) (脑啡肽转换酶) (激素原加工羧肽酶)	4.76	54,251
909			↓	↓	新谱, 见表 6	4.41	64,739
963	IDHC	P41562		↑	RAT 异柠檬酸脱氢酶 (NADP) 细胞质 (EC 1.1.1.42) (草酰琥珀酸脱羧酶) (IDH) (NADP+-特异的 ICDH) (IDP) IDH1 见表 4	6.40	47,310
971	GATM	P50440		↓	甘氨酸脒基转移酶 (EC2.1.4.1) (L-精氨酸: 甘氨酸脒基转移酶) (转脒酶) AGAT	6.30	49,264
977	NUCM	P17694		↓	牛 NADH-泛醌 氧化还原 49 kD 亚基 (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3) (复合物 I49kD) (CI-49kD) NDUFS2 见表 4	6.36	45,388
989	GATM	P50440		↓	甘氨酸脒基转移酶 (EC2.1.4.1) (L-精氨酸: 甘氨酸脒基转移酶) (转脒酶) AGAT	6.27	47,318
1001	SYW	P23381		↑	色氨酰-tRNA 合成酶 (EC 6.1.1.2) (色氨酰-tRNA 连接酶)	5.93	45,147
1012	SYW	P23381	↓	↑	色氨酰-tRNA 合成酶 (EC 6.1.1.2) (色氨酰-tRNA 连接酶)	5.82	45,316
1012	PRS7	P35998	↓	↑	26S 蛋白酶调节亚基 7 (MSS1 蛋	5.82	45,316

					白).		
1013				↑	新谱见表 6	5.79	44,636
1022	DHAG	P49189	↑	↑	醛脱氢酶, E3 同工酶 (EC 1.2.1.3) (Gamma 氨基丁醛脱氢酶) (EC 1.2.1.19) (R-氨基丁醛脱氢酶).	5.71	44,824
1159	RINI	P13489		↑	胎盘核糖核酸酶抑制剂 (核糖核酸酶/血管生成素抑制剂) (RAI) (RI)	4.50	48,395
1170	GR75	P38646	↑	↑	Mortalin, 线粒体压力-70 蛋白 (75 KD 葡萄糖调节蛋白) GRP 75	6.74	34,598
1176			↑		新的未鉴定蛋白	6.50	42,222
1186			↑		新谱见表 6	6.46	36,234
1210	NED5	Q15019		↓	NEDD5 蛋白同源物 (KIAA0158) NEDD5 或 DIFF6)	6.14	40,411
1221	1A32	P10314		↑	HLA I 型组织相容性抗原, A-32(AW-19) alpha 链 HLA-A 或 HLAA	5.91	39,707
1241	ANX4	P09525		↑	膜联蛋白 IV (脂皮质蛋白 IV) (内联蛋白 I) (嗜铬粒结合蛋白 4) (蛋白质 II) (P32.5) (胎盘抗血凝蛋白 II) (PAP-II) (PP4-X) (35-beta 钙介蛋白) (糖结合蛋白 P3 3/P4 1)	5.64	38,609
1241	DCUP	P06132		↑	尿卟啉原脱羧酶(EC 4.1.1.37) (URO-D) UROD	5.64	38,609
1349	ANX2	P07355		↓	膜联蛋白 II (脂皮质蛋白 II) (依钙蛋白 I 重链) (嗜铬粒结合蛋白 8) (P36) (蛋白质 I) (胎盘抗血凝蛋白 IV) (PAP-IV)	6.70	32,626
1353			↑		新谱见表 6	6.68	32,210
1368	ANX4	P09525	↓	↓	膜联蛋白 IV (脂皮质蛋白 IV) (内联蛋白 I) (嗜铬粒结合蛋白 4) (蛋白质 II) (P32.5) (胎盘抗血凝蛋白 II) (PAP -II) (PP4-X) (35-beta 钙介蛋白) (糖结合蛋白 P33/P41)	6.36	30,916
1376	G3P2	P04406		↑	甘油醛 3-磷酸脱氢酶, 肝 EC 1.2.1.12	6.19	34,534
1376	ANX2	P07355		↑	膜联蛋白 II (脂皮质蛋白 I) (依钙蛋白 I 重链) (嗜铬粒结合蛋白 8) (P36) (蛋白 I) (胎盘抗血凝蛋白 IV) (PAP-IV) ANX2	6.19	34,534
1400				↓	新谱, 见表 6	5.77	33,725
1411	ANX4	P09525		↑	膜联蛋白 IV (脂皮质蛋白 IV) (内联蛋白 I) (嗜铬粒结合蛋白 4) (蛋白 II) (P32.5) (胎盘抗血凝	5.49	31,904

					蛋白 11) (PAP-II) - (PP4-X) (35-beta 钙介蛋白) (糖结合蛋白 P33/P41)		
1421	ANX2	P07355		↑	膜联蛋白 II (脂皮质蛋白 II) (依钙蛋白 I 重链) (嗜铬粒结合蛋白 8) (P36) (蛋白 I) (胎盘抗血凝蛋白 IV) (PAP-IV)	5.43	33.800
1421	IPYR	P37980		↑	牛无机焦磷酸酶 (EC 3.6.1.1) (焦磷酸磷酸-水解酶) (PPASE) PP 见表 4	5.43	33,800
1426	ANX2	P07355		↑	膜联蛋白 II (脂皮质蛋白 II) (依钙蛋白 I 重链) (嗜铬粒结合蛋白 8) (P36) (蛋白 I) (胎盘抗血凝蛋白 IV) (PAP-IV)	5.28	33,836
1477				↑	新谱，见表 6	4.48	35,393
1531	IGUP	Q06323	↑	↑	干扰素 gamma 上调的 I-5111 蛋白 (IGUP I-5111)	5.68	28,980
1545	CAPB	P47756	↑		F-肌动蛋白加帽蛋白 beta 亚基 (CAPZ) CAPZB.	5.36	28,940
1545	CATD	P07339	↑		组织蛋白酶 D (EC 3.4.23.5) CTSD	5.36	28,940
1545	PRC2	P25786	↑		蛋白酶体成分 C2 (EC 3.4.99.46) (Macropain 亚基 C2) (蛋白酶体 NU 链) (多催化性内肽酶复合物亚基 C2) (30 kD 前体的蛋白) (PROS-30) PSMA1 或 PSC2 或 PROS30	5.36	28,940
1549				↑	新谱，见表 6	5.40	28,949
1609	SODM	P04179	↑	↑	过氧化物歧化酶 (MN) (EC 1.15.1.1) SOD2	6.83	21,212
1629			↑		新谱，见表 6	6.15	25,165
1632	TPIS	P00938		↑	磷酸丙糖异构酶 (EC5.3.1.1) (TIM) TPI1 或 TPI	6.11	27,492
1632	ULA6	P30041		↑	24 kD 蛋白	6.11	27,492
1632	PRCF	P40306		↑	蛋白酶体成分 MECL-1 (EC 3.4.99.46) (Macropain 亚基 MECL-1) (多催化性内肽酶复合物亚基 MECL-1) PSMB10 或 MECL1	6.11	27,492
1664	S856 55	P35232		↓	Prohibitin PHB	5.44	27,014
1664	HS27	P04792		↓	热激 27 kD 蛋白 (HSP 27) (压力反应蛋白 27) (SRP27) (雌激素调节的 24 kD 蛋白) (28 kD 热激蛋白) HSPB1 或 HSP27	5.44	27,014

1685				↑	新谱，见表 6	4.81	23,690
1689				↓	新谱，见表 6	4.69	22,974
1697	HMG1	P09429	↑	↑	高迁泳动族蛋白 HMGI(HMG-1)	4.60	24,122
1707			↑	↑	新谱，见表 6	6.50	24,673
1715			↓	↓	新谱，见表 6	5.82	26,369
1737	PRC7	P28065		↑	蛋白酶体链 7 (EC 3.4.99.46) (Macropain 链 7) (多催化性内肽酶复合物链 7) (环 12 蛋白) PSMB9 或 LMP2 或 RING12	4.56	19,832
1766			↓	↓	新谱，见表 6	5.61	17,650
1800				↓	新谱，见表 6	4.47	17,697
1853	B2MG	P01884	↑	↑	Beta-2-微球蛋白	5.73	7,077
1861		G267406		↓		6.28	60,877
1902				↑	新谱，见表 6	5.52	71,993
1923	AMPL	P00727		↑	牛细胞质氨肽酶 (EC3.4.11.1) (亮氨酸氨肽酶) (LAP) (亮氨酰氨肽酶) (脯氨酸氨肽酶) (EC3.4.11.5) (脯氨酰氨肽酶)见表 4	6.45	59,804
1923	DHAC	P00352		↑	醛脱氢酶，细胞质(EC 1.2.1.3) (1 类) (ALHDII) (ALDH-E1)	6.45	59,804
1923	DHE3	P00367		↑	谷氨酸脱氢酶 1 (EC 1.4.1.3) (GDH)	6.45	59,804
1930			↓	↓	新的未鉴定的蛋白	4.73	47,472
1935			↑	↑	新谱，见表 6	6.51	49,146
1996	ENPL	P14625		↓	Endoplasmin (94 kD 葡萄糖调节的蛋白) (grp94) (gp96 同源物) (肿瘤排斥抗原 1)TRA1	4.92	90,497
2036	AMYS	P04745		↑	alpha-唾液淀粉酶 (EC 3.2.1.1) (1 ,4-alpha-D-葡聚糖 glucano 水解酶) AMY1A 或 AMY1	6.44	70,123
672	DCE2	Q05329	↑	↑	谷氨酸脱羧酶 65kD 同工形	4.46	78,008
2041			↑	↑	新谱，见表 6	6.35	68,704
2079			↓	↓	新谱，见表 6	5.86	47,814
2104	ILEU	P30740		↓	白细胞弹性蛋白酶抑制剂 (LEI) (单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂) (EI) ELANH2 或 PI2	5.37	41,459
2104	1B08	P30463		↑	HLA I 类 组织相容性抗原，BW-65(B-14) B*1402 alpha 链 HLA-B 或 HLAB	5.37	41,459
2145	LITA	P05451		↑	(岛细胞再生因子)(ICRF) 胰石蛋白 1α(胰石蛋白) (PSP)胰腺线蛋白) (PTP)	5.38	13,733
2159	ATPA	P25705	↑	↑	ATP 合酶 alpha 链，线粒体(EC 3.6.1.34) ATP5A1.	6.83	64,414
2276	ER60	P30101		↑	蛋白二硫化物异构酶 ER-60 (EC	5.68	52,329

					5.3.4.1) (ERP60) (58 KD微粒体蛋白) (P58) (GRP58) (ERP57)		
2276	SYW	P23381		↑	色氨酰-tRNA 合成酶 (EC 6.1.1.2) (色氨酸-tRNA 连接酶)	5.68	52,329
2286	SYW	P23381		↑	色氨酰-tRNA 合成酶 (EC6.1.1.2) (色氨酸--tRNA 连接酶)	5.64	52,988
2286	ER60	P30101		↑	蛋白) (P58) (GRP58) (ERP57)	5.64	52,988
2354				↓	新谱，见表 6	5.75	44,151
2368	ILEU	P30740		↑	白细胞弹性蛋白酶抑制剂 (LEI) (单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂) (EI) ELANH2 或 PI2	5.27	41,658
2368	1B39	P30480		↑	HLA I 类 组织相容性抗原，BW-42 B*4201 alpha 链 HLA-B 或 HLAB	5.27	41,658
2382			↓	↓	新谱，见表 6	5.74	36,688
2408			↑		新谱，见表 6	5.74	29,142
2411			↑	↑	新谱，见表 6	7.17	21,901
2422			↑	↑	新的未鉴定的蛋白	4.71	288,000
2423			↑	↑	新的未鉴定的蛋白	4.65	286,000
13298	SYW	P23381		↑	色氨酰-tRNA 合成酶 (EC 6.1.1.2) (色氨酸--tRNA 连接酶)	5.86	52,288
13652				↑	新谱，见表 6	4.98	35,726
14098				↑	新谱，见表 6	6.83	21,691
14103	SOD M	P04179	↑	↑	过氧化物歧化酶 (MN) (EC 1.15.1.1) SOD2	7.41	20,628

表 2

以 MS 鉴定表征的、通过与其它物种的相关性鉴定的人胰岛细胞蛋白和未曾鉴定的蛋白

斑点 #	基因名称	标识符	IL1β1 500	细胞因子混合物	蛋白质名称	观察的 pI	分子量
007	HBP	Q00341	↓		高密度脂蛋白结合蛋白(HDL-结合蛋白)	7.22	96,450
026				↑	新谱，见表7	8.20	79,860
035			↑	↑	新谱，见表7	7.68	79,138
060			↓	↓	新谱，见表7	8.34	72,134
076				↑	新谱，见表7	7.82	68,538
085				↑	新谱，见表7	7.52	68,772
128			↑		新谱，见表7	8.64	63,052
130			↑		新谱，见表7	8.43	64,647
140	KPY1	P14618	↑		丙酮酸激酶，M1 (肌肉同工酶)	8.31	58,557

					(EC 2.7.1.40)		
142	ROM	P52272	↓		异源核核糖核蛋白 M (HNRNP M)	8.21	62,958
147	ROM	P52272	↓	↓	异源核核糖核蛋白M (HNRNP M)	8.03	62,953
147	CPT2	P23786	↓	↓	线粒体肉碱棕榈酰转移酶 II (EC 2.3.1.21)	8.03	62,953
157	PUT2	P30038	↓	↓	Delta-1-吡咯啉-5-羧酸脱氢酶 (EC 1.5.1.12)	7.55	60,341
157	CATA	P04040	↓	↓	过氧化氢酶 (EC 1.11.1.6)	7.55	60,341
167		Q05329	↑	↑	谷氨酸脱羧酶 65kD 同工型	7.30	61,344
171			↓		新谱，见表7	7.10	61,058
187				↑	新谱，见表7	9.21	51,881
188				↑	新谱，见表7	9.17	51,844
195			↓		新谱，见表7	9.07	56,351
241	ATPA	P25705	↓	↓	ATP 合酶 alpha 链，线粒体(EC 3.6.1.34)	7.54	53,358
243				↑	新谱，见表7	7.55	55,588
247	DHE3	P00367		↑	谷氨酸脱氢酶 1 (EC 1.4.1.3)	7.46	55,349
247	PBEF	P43490		↑	前-B 细胞增强因子	7.46	55,349
256	DHE3	P00367		↑	谷氨酸脱氢酶 1(EC 1.4.1.3)	6.90	57,118
256	G6PD	P11413		↑	葡萄糖-6-磷酸 1-脱氢酶 (EC 1.1.1.49)	6.90	57,118
263			↓	↓	新的未鉴定的蛋白	9,619	49,828
270			↓		新谱，见表7	9.14	47,719
308	GABT	P80404	↓		4-氨基丁酸 氨基转移酶，线粒体 (EC 2.6.1.19) 见表5	7.96	51,251
339	ODPA	P08559		↑	丙酮酸脱氢酶 E1 成分，alpha 亚基，体细胞 (EC 1.2.4.1)	6.95	49,851
339	TAP-A	Y13582		↑	与抗原加工相关的转运蛋白亚基 TAP-A	6.95	49,851
339	IDHP	P48735		↑	异柠檬酸脱氢酶 (NADP)，线粒体 (EC1.1.1.42) 见表5	6.95	49,851
369	RAB7	P51149	↑		RAS-相关蛋白 RAB-7	8.48	42,835
369	ALFA	P04075	↑		果糖-二磷酸 醛缩酶 A (肌肉) (EC 4.1.2.13)	8.48	42,835
376	DBDD	Q04828	↑		反式-1,2- 二氢苯-1,2-二醇 脱氢酶 (EC1.3.1.20)	8.14	41,509
376	ALFA	P04075	↑		果糖-二磷酸 醛缩酶A (肌肉) (EC 4.1.2.13)	8.14	41,509
377	GAPDHG	J04038	↑		新的未鉴定的蛋白	8.23	39,510
386	THIL	P24752		↓	乙酰-CoA 乙酰转移酶，线粒体 (EC 2.3.1.9)	7.82	44,584
386	PGK1	P00558		↓	磷酸甘油酸 激酶 1 (EC 2.7.2.3)	7.82	44,584
418	MDHP	G290614	↓		苹果酸脱氢酶 见表 5	8.89	35,367
418	ROA1	P09651	↓		异源核核糖核蛋白A1 (螺旋去稳定蛋白)(单链结合蛋白) (HNRNP 核心蛋白 A1)	8.89	35,367
421			↓		新谱，见表7	8.95	32,958
449				↑	新谱，见表7	7.85	37,503
453	POR2	P45880	↓		电压依赖的阴离子选择性通道蛋	7.73	35,149

					白 2 (VDAC2) (线粒体外膜蛋白孔蛋白)		
460	NC5R	P00387	↓	↑	NADH-细胞色素 B5 还原酶 (EC 1.6.2.2)	7.41	36,378
464	MDHC	P40925	↓		苹果酸脱氢酶, 细胞质 (EC 1.1.1.37)	7.01	36,742
474	E123123	E123123	↓	↓	NIPSNAP1 蛋白 [2769648] 见表5	9.44	25,090
500				↑	新的未鉴定的蛋白	7.85	30,805
508				↑	新谱, 见表7	7.71	26,937
509			↑		新谱, 见表7	7.32	29,812
515	PMGB	P18669	↓		磷酸甘油酸异构酶, 脑 (EC 5.4.2.1)	6.86	25,560
517			↑		新谱, 见表7	9.79	20,443
519	NGAL	P80188	↑		MMP-9的Alpha-2-微球蛋白调节的亚基 (Lipocalin-2)	9.55	20,534
532			↑	↑	新谱, 见表7	8.20	26,749
536	ETFB	P38117	↑		电子转移黄素蛋白 beta-亚基 (beta-ETF) 见表5	8.11	26,840
536	014818	014818	↑		蛋白酶体 亚基 XAPC7	8.11	26,840
538	TDX2	Q06830	↑		天然杀伤细胞增强因子 A	8.02	21,570
538	COF1	P23528	↑		Cofilin, 非肌肉同工型.	8.02	21,570
538	LEG3	P17931	↑		Galectin-3 (半乳糖特异的植物凝血素 3) (MAC-2 抗原) (IGE 结合蛋白) (35kd 植物凝血素)	8.02	21,570
538	SODM	P04179	↑		过氧化物歧化酶 (MN) (EC 1.15.1.1)	8.02	21,570
544	ES1	P30042	↓		ES1 蛋白同源物 (蛋白KNP-I) (GT335)	7.74	23,665
546	SODM	P04179	↑	↑	过氧化物歧化酶 (MN) (EC 1.15.1.1)	7.74	21,122
549	HSSOD	X07834	↑	↑	过氧化物歧化酶 (MN) (EC 1.15.1.1)	7.63	20,690
551	SODM	P04179	↑	↑	过氧化物歧化酶 (MN) (EC 1.15.1.1)	7.45	20,108
558				↓	新谱, 见表7	10.01	16,701
559			↓	↓	新谱, 见表7	10.06	16,640
560			↓	↓	新谱, 见表7	9.43	18,700
565	SM22	Q01995	↓	↓	平滑肌蛋白 22-alpha (SM22-alpha) (Transgelin)	8.86	21,594
565	PRCE	P28074	↓	↓	蛋白酶体 epsilon 链 (EC3.4.99.46)	8.86	21,594
568	TDX2	Q06830	↑		天然杀伤细胞增强因子 A	8.58	22,493
572	SM2H	P37802		↑	SM22-alpha 同源物 (HA1756)	8.21	19,370
577	SODM	P04179	↑	↑	过氧化物歧化酶 (MN) (EC 1.15.1.1).	7.75	19,871
580				↑	新的未鉴定的蛋白	10.30	14,098
596	COF1	P23528	↓	↓	Cofilin, 非肌肉同工型	8.36	16,170
605	CYPH	P05092	↓	↓	肽基-脯氨酰顺反异构酶 A (EC	7.94	27,866

					5.2.1.8)		
609			↓	↓	新谱，见表7	8.79	9,751
635	Q13122	Q13122	↓		100 kDa 共活化物 见表5	7.54	83,777
642	GATM	P50440	↓		甘氨酸脒基转移酶 (EC2.1.4.1) (L-精氨酸: 甘氨酸脒基转移酶)	7.15	51,281
642	ENOA	P06733	↓		Alpha 烯醇酶 (EC 4.2.1.11)	7.15	51,281
656	TDX2	Q06830		↑	硫氧还蛋白过氧化物酶 2 (硫氧还蛋白依赖的过氧化物还原酶 2) (增殖相关蛋白 PAG) (天然杀伤细胞增强因子 A)	8.80	37,605
693	ALFA	P04075	↓	↓	果糖-二磷酸 醛缩酶 A (肌肉) (EC 4.1.2.13)	9.65	49,829
702	C10H	Q16181	↑		CDC10 蛋白 同源物	9.15	46,065
719			↑	↑	新谱，见表7	8.43	25,936
720	PRCY	P28062	↑	↑	蛋白酶体 成分 C13(EC 3.4.99.46)	8.26	22,960
720	TDX2	Q06830	↑	↑	硫氧还蛋白过氧化物酶 2 (硫氧还蛋白依赖的过氧化物还原酶 2) (增殖相关蛋白PAG) (天然杀伤细胞增强因子A)	8.26	22,960
729			↑		新谱，见表7	7.58	128,532
780	G3P2	P04406		↑	甘油醛3-磷酸脱氢酶，肝 (EC1.2.1.12)	8.02	39,330
780	ROA2	P22626		↓	异源核核糖核蛋白A2/B1 (HNRNP A2 和 HNRNP B1).	8.02	39,330
786	ANX2	P07355		↓	膜链蛋白 II (脂皮质蛋白 II)	7.09	38,665
811			↑		新的未鉴定的蛋白	8.38	23,437
816	PRCE	P28074			蛋白酶体 epsilon 链 (EC3.4.99.46)	8.97	21,177
825	H5U889	O00586	↑		hm45	9.58	15,624
828	NDKB	P22392		↓	核苷二磷酸激酶B (EC 2.7.4.6)	8.70	15,409
829			↓		新谱，见表7	8.59	15,630
834	CYPB	P23284	↓	↓	肽基脯氨酰顺反异构酶 B (EC 5.2.1.8)	9.64	13,601
836			↓	↑	新谱，见表7	8.19	20,638
837				↑	新谱，见表7	8.17	21,390
3755			↓	↓	新的未鉴定的蛋白	10.56	12,875
3879			↓		新谱，见表7	8.35	16,365
3889	FLRE	P30043	↑	↑	黄素还原酶 (EC 1.6.99.1)	7.93	22,328
4325	PRS8	P47210	↓		26S蛋白酶调节亚基8(蛋白酶体亚基P45) (甲状腺激素相互作用蛋白1) (TRIP1)	7.47	48.652
6600			↓		新谱，见表7	9.04	21.431

表 3

在人胰岛细胞培养基中检测到的、以 MS 鉴定表征的蛋白和未曾鉴定的蛋白

斑点#	基因名称	标识符	IL1 β 1500	细胞因子混合物	蛋白质名称	观察的 pI	分子量
63SPI	ALBU	P02768	↑	↑	血清白蛋白 ALB	4.74	64,376
83SPI	ALBU	P02768	↑	↑	血清白蛋白 ALB	4.94	58,998
122SPI			↑		见表8	7.36	34,564
123SPI			↓	↓	见表8	6.65	36,736
126SPI			↓	↓	见表8	5.42	35,578
130SPI				↑	见表8	4.65	32,480
135SPI				↓	见表8	6.36	30,916
140SPI			↓	↓	见表B	4.73	29,274
160SPI			↓		见表B	5.25	21,101
168SPI	ALBU	P02768	↓	↓	血清白蛋白 ALB	5.27	18,521
213SPI	ALBU	P02768		↑	血清白蛋白 ALB	5.88	31,124
215SPI	ALBU	P02768		↓	血清白蛋白 ALB	4.98	12,7138
215SPI	TRFE	P02787		↓	血清转铁蛋白 (铁传递蛋白) (beta-1-金属结合球蛋白) TF	4.98	12,7138
218SPI					见表8	6.27	632,16
248SPI			↓	↓	见表8	4.67	292,24
258SPI	ALBU	P02768		↑	血清白蛋白 ALB	6.15	246,493
258SPI	HSIG G1LH	Y14737		↑	免疫球蛋白 lambda 重链	6.15	246,493
277SPI			↓	↓	见表8	5.05	15,752
304S PI			↓	↓	见表8	6.71	36,953
314SPI			↑		见表8	6.46	56,100
320SPI	ALBU	P02768	↓		血清白蛋白 ALB	5.89	9,210
338SPI			↓	↓	见表8	4.67	16,603
1157SPI	ALBU	P02768	↓	↓	血清白蛋白 ALB	5.47	18,501
1157SPI	HSIG G1LH	Y14737	↓	↓	免疫球蛋白 lambda 重链	5.47	18,501

表 4

以 MS 表征的人胰岛细胞蛋白

肽的分子量值从质谱仪上直接读出，因此与由这样的仪器一般得到的准确性有关。这些质量值来自从 IEF 凝胶上回收的人胰岛细胞蛋白，并通过参考记录在公众可获得的数据库（无论是核苷酸序列还是蛋白质序列）中的其它物种的蛋白质进行鉴定。

IEF 点 724:

984.4406	1004.6172	1045.5750	1084.6248	1137.5220	1172.5513	1181.5787
1188.5267	1189.5705	1193.5450	1209.5364	1232.6502	1237.5782	1244.6390
1273.6111	1365.6163	1381.6246	1418.7151	1434.7000	1437.7885	1476.6972
1525.7884	1544.7837	1583.7063	1589.8061	1601.7708	1618.7619	1630.8195
1645.8241	1684.8527	1700.7857	1728.8839	1730.8908	1745.9084	1781.8147
1794.8168	1826.8641	1860.9918	1918.9139	1940.9287	1989.9645	2005.9335
2055.9358	2077.1362	2095.9846	2211.0999	2328.1808	2674.4376	3198.8492

IEF 点 963:

903.5003	976.5949	1045.5749	1064.5752	1168.5158	1198.6904	1319.6604
1341.6072	1350.6473	1379.6844	1437.8828	1445.7037	1501.7661	1509.6583
1515.7456	1596.7730	1707.7736	1790.9116	1794.8513	1797.8409	1808.9138
1838.9222	1852.9407	1878.9424	1946.9897	2122.0285	2150.0260	2211.0999
2406.2399	2559.1687	2585.3182				

IEF 点 977:

842.5100	973.4918	1021.4022	1031.4738	1037.3794	1045.4938	1060.7676
1075.5956	1151.6148	1159.5482	1179.5398	1196.5457	1263.5613	1267.6112
1277.6170	1279.5629	1307.5846	1320.5246	1329.5717	1386.6334	1437.7641
1458.6907	1472.6424	1475.6892	1536.8279	1597.8518	1674.8387	1700.9337
1717.7814	1794.8163	1802.9448	1826.7513	1873.0013	1881.0435	1888.9044
1942.0398	1994.0735	2211.0999	2225.1090	2231.1803	2455.2958	

IEF 点 1421:

957.5447	1053.4829	1075.5106	1114.5114	1146.5867	1151.6223	1163.5530
1177.5601	1197.6195	1222.5030	1227.5776	1277.6330	1291.6297	1302.6520
1307.6147	1317.6238	1327.6099	1343.6147	1383.6003	1391.6233	1393.6514
1396.7482	1403.6989	1421.6244	1427.8312	1434.6764	1439.7253	1460.6249
1469.7214	1475.6805	1477.6583	1487.7037	1489.6919	1515.7063	1540.7410
1542.7700	1544.7626	1565.7587	1570.7737	1588.7486	1613.8336	1619.8079
1630.8408	1639.7890	1645.7757	1650.8568	1674.8047	1678.8083	1685.7486
1694.8735	1701.7636	1726.8556	1741.8646	1749.8863	1763.7788	1789.9034
1805.8828	1837.9159	1850.9476	1863.9118	1869.9458	1923.9277	1938.8968
1988.0785	1993.9638	2052.0445	2101.0154	2139.0677	2155.0785	2175.8964
2196.1696	2211.1000	2225.1153	2230.0816	2444.2075	2461.1385	

IEF 点 1861:

986.6183	1099.5910	1277.6498	1305.6530	1383.6670	1390.5687	1462.7108
1475.7014	1489.7417	1516.7727	1544.7517	1555.7811	1590.7901	1594.8311
1638.7729	1644.8520	1654.8019	1661.7714	1701.8654	1707.7328	1716.8788
1746.9048	1756.9955	1794.8406	1799.9569	1802.8989	1837.9500	1851.9245
1900.9804	1920.1066	1990.9681	1993.9618	2062.0419	2211.1082	2225.1014
2272.1417	2298.1959	2472.2712	2502.2031			

IEF 点 1923:

1004.6256	1045.5750	1084.6033	1137.4897	1172.5717	1181.5737	1188.5163
1189.5777	1193.5510	1209.5453	1232.6509	1237.5933	1263.6638	1273.6130
1277.6849	1307.6799	1365.6431	1381.6188	1394.7306	1418.7243	1425.6424
1437.8278	1444.6997	1455.7280	1475.7475	1525.7932	1544.7815	1583.7130
1589.7876	1601.7387	1618.7568	1630.8242	1645.8190	1669.8494	1684.8860
1686.8789	1700.8011	1707.8472	1728.8715	1737.8908	1746.8984	1748.9094
1779.9697	1782.8774	1794.8152	1835.9384	1838.9265	1860.9665	1908.0260
1915.9525	1920.9264	1940.9263	1989.9395	2055.9253	2077.1037	2095.9638
2211.0999	2278.2563	2328.1495	3197.5962	3494.9900		

表 5

以 MS 表征的人胰岛细胞蛋白

肽的分子量值从质谱仪上直接读出，因此与由这样的仪器一般得到的准确性有关。这些质量值来自从 NEPHGE 凝胶上回收的人胰岛细胞蛋白，并通过参考记录在公众可获得的数据库（无论是核苷酸序列还是蛋白质序列）中的其它物种的蛋白质进行鉴定。

NEPHGE 点 308:

1016.5065	1032.4876	1035.6038	1055.5031	1148.5696	1179.6000	1197.6175
1211.5699	1221.5578	1229.7271	1264.6730	1265.6893	1277.6546	1283.7385
1307.6327	1317.7154	1338.7857	1352.8162	1379.7060	1383.6587	1405.6557
1434.7509	1475.7249	1487.7638	1505.7494	1527.6946	1539.7651	1549.7666
1561.7328	1594.8652	1612.7713	1628.7452	1631.7017	1636.6749	1638.8614
1645.8028	1707.7680	1710.8218	1719.7991	1757.9016	1770.9237	1786.9209
1794.8343	1812.9308	1822.9402	1837.9966	1852.9594	1940.9424	1988.0063
1993.9935	2064.1358	2149.0169	2155.2298	2196.1764	2211.0999	2250.1119
2596.2598	2674.3040	3150.8016				

NEPHGE 点 339:

1009.3940	1171.5822	1179.5496	1226.4567	1277.6437	1320.6468	1383.6308
1405.4537	1411.7060	1426.7141	1437.8630	1471.7116	1475.7304	1483.6959
1493.6772	1501.7870	1542.8788	1592.6512	1596.7767	1638.8489	1695.8217
1707.7969	1715.8272	1778.8540	1794.8041	1797.8152	1819.8835	1823.9229
1838.9469	1851.9609	1878.9472	1940.9953	1962.8823	1978.9525	1993.9931
2018.0026	2211.1201	2225.1558	2274.1434	2283.1658	2299.2521	2344.3761
2383.9712	2402.2620	2406.3035	2431.0818	2705.2697	2719.1012	2731.3472
2807.4831						

NEPHGE 点 418:

822.4000	832.4732	842.5100	908.6270	928.4098	992.4582	1033.4602
1045.4933	1065.4224	1073.4967	1107.4692	1116.4852	1147.5546	1157.4959
1165.4439	1167.4800	1179.5001	1201.5553	1218.5409	1232.5022	1277.6204
1299.5559	1307.5788	1352.6447	1357.6185	1384.6983	1393.6325	1406.5687
1422.5837	1427.6627	1437.6719	1454.6286	1470.6347	1475.6829	1493.6574
1500.6009	1503.6764	1560.7424	1628.7381	1657.7530	1694.6866	1699.7547
1707.7213	1716.8199	1741.7043	1751.7916	1784.8936	1791.7001	1838.8855
1851.8301	1867.8840	1987.9418	2211.0999	2365.2112	2383.9402	

NEPHGE 点 474:

679.5296	706.4771	714.4944	730.4229	991.5260	1012.5126	1092.5579
1108.5016	1212.5737	1225.5337	1277.6968	1307.6588	1446.8720	1475.7748
1604.7245	1710.9075	1772.9576	1788.9636	1794.8920	1867.0268	2018.1137
2174.2120	2211.2344	2401.4191	2789.6777			

NEPHGE 点 536:

853.5924 945.5755 978.5561 998.5303 1011.6255 1045.5785 1054.6595
1066.5559 1102.5904 1179.6000 1183.7368 1184.6987 1277.6972 1291.7293
1295.7841 1304.7071 1307.7127 1339.7158 1403.7144 1617.8575 1634.8604
1664.8766 1666.7879 1683.9517 1737.8633 1794.8280 1801.8590 1812.0373
1902.8723 1907.8546 1918.9088 1940.9273 1945.9582 1993.9928 2026.0434
2065.0661 2196.0354 2211.0999 2449.2132 2577.3710

NEPHGE 点 635,
842.5456 1011.6439 1036.5530 1045.5684 1048.6357 1064.5920 1071.5091
1082.6031 1092.5681 1106.6437 1157.5750 1179.6000 1232.6820 1277.7070
1307.6714 1314.7441 1320.5891 1323.6417 1338.7554 1350.6851 1357.6931
1383.6509 1389.6969 1396.6928 1401.6416 1407.7207 1429.6767 1434.7677
1461.6809 1475.7583 1493.7287 1535.8219 1620.8873 1638.8669 1657.7833
1665.9997 1702.8599 1707.7849 1709.8196 1716.8613 1724.9400 1757.9150
1794.8189 1829.8908 1838.9142 1851.9404 1867.9269 1940.9311 1959.9202
1993.9642 2047.0784 2150.0418 2211.0999

表 6

以 MS 表征的人胰岛细胞蛋白

肽的分子量值从质谱仪上直接读出，因此与由这样的仪器一般得到的准确性有关。这些质量值来自从 IEF 凝胶上回收的人胰岛细胞蛋白，并不能与记录在公众可获得的数据库（无论是核苷酸序列还是蛋白质序列）中的任何蛋白质匹配。

IEF 点 8:
1045.6833 1179.6990 1277.8454 1475.8751 1794.9853 1816.9418 1833.9383
2211.3200 2225.3308 2231.4079 2239.3200 2249.2374 2298.4052 2721.5682
2807.6137 3340.0959

IEF 点 370:
842.5100 995.5638 1009.5700 1023.5915 1045.4798 1155.5365 1254.5757
1264.5343 1275.5888 1348.5604 1419.6498 1475.6669 1794.7643 1940.9135
1950.0052 1993.9562 2211.0999 2403.2608

IEF 点 473:
1008.2678 1094.4059 1151.4450 1208.4057 1254.4806 1267.4619 1277.4823
1285.4220 1315.4963 1355.4978 1375.5110 1383.4741 1475.5626 1488.6075
1497.5317 1506.5091 1555.6522 1589.7591 1607.6268 1615.6441 1624.6694
1668.7791 1697.7066 1700.8164 1706.8476 1716.7516 1761.7701 1794.7184
1826.7320 1838.8344 1853.8072 1880.9486 1919.9092 1922.8662 1940.8495
1993.9770 2034.9080 2107.0836 2211.0999 2225.1068 2231.2066

IEF 点 524:
842.5100 1045.5152 1201.6168 1404.6128 1481.7153 1561.8987 1794.7933
1826.8585 1940.9415 2211.0999 2225.1233 2230.1675 2240.1371 2284.2128
2298.2138 2315.1913

IEF 点 535:
1061.3738 1077.1038 1277.6330 1352.6221 1398.7634 1470.7513 1561.2142
1561.6867 1637.8923 1670.3631 1674.8225 1794.8100 1826.8587 1838.9166
1852.9038 1940.9301 1942.9249 1993.9472 2027.0373 2083.0422 2085.0098
2914.5719

IEF 点 551:

973.6111 1036.5433 1109.4879 1179.6000 1211.6334 1263.7032 1277.7166
1308.6403 1352.5835 1365.6650 1369.6804 1383.6823 1434.7299 1475.7586
1487.7383 1493.7134 1637.9332 1687.8217 1699.8350 1707.7806 1716.8403
1784.7226 1794.8425 1796.9945 1838.0168 1993.9891 2211.1000 2297.1887
2663.2473 2705.1573 2720.2757 2807.3089 3121.4704

IEF 点 651:
842.5100 1263.6624 1277.6589 1332.6843 1404.7025 1419.6938 1491.7324
1508.9459 1512.7036 1517.8358 1587.8030 1638.8522 1729.9886 1749.0137
1794.8426 1838.9400 1844.0229 1851.9611 1922.9308 1934.0288 1940.9595
1987.0910 1993.9490 2000.0800 2040.1006 2043.1000 2083.9484 2093.0841
2124.0855 2137.1187 2165.0434 2211.1000 2225.1111 2231.1652 2284.1895
2298.2321

IEF 点 656:
842.5100 1045.5397 1176.4935 1179.5345 1277.6399 1307.6511 1320.5211
1323.6361 1354.6520 1357.6312 1383.5951 1433.7019 1450.6642 1461.6939
1473.6322 1475.7114 1498.5909 1561.6855 1613.7589 1707.7832 1716.8349
1718.8505 1794.7881 1838.9436 1854.6243 1882.0321 1908.9185 1992.0052
1993.9823 2130.2472 2211.0999 2225.0997 2284.1469 2298.1604

IEF 点 909:
842.5100 1045.5307 1066.0095 1077.1195 1140.5949 1151.6268 1173.5611
1179.5166 1234.5855 1263.6313 1277.6287 1301.6433 1307.6049 1314.6572
1320.5066 1357.6246 1383.5860 1434.6890 1475.6862 1493.6750 1532.7323
1535.8087 1547.6337 1623.8526 1638.7999 1669.8425 1707.7065 1716.8138
1739.9255 1766.8347 1791.7279 1794.7902 1806.8742 1838.9270 1852.9250
1868.9303 1881.0355 1890.9128 1940.9064 1944.9914 1993.9906 2111.9138
2171.1384 2211.1000 2225.1044 2230.1917 2240.1803 2298.1557 2384.9693

IEF 点 1013:
842.5100 918.2719 995.6119 1045.5322 1050.5029 1144.5461 1191.6716
1201.6286 1214.5566 1308.4854 1319.6821 1341.5464 1474.7240 1536.8891
1604.7969 1701.9124 1707.8899 1781.8221 1794.8021 1801.0348 1826.8456
1916.8642 1923.9753 1940.9620 1982.9495 1999.9878 2083.9889 2112.0200
2211.0999 2225.1149 2314.1955

IEF 点 1186:
842.5100 1277.6348 1795.8217 1918.9837 2211.1000

IEF 点 1353:
842.5100 870.5290 944.4994 981.5298 989.5240 995.5611
998.5569 1009.5790 1023.5824 1035.4838 1045.5007 1111.4667 1172.5993
1179.5128 1198.5672 1240.5947 1263.5655 1277.6049 1307.5663 1314.6804
1411.6442 1421.5773 1427.7229 1460.6109 1475.6725 1533.7745 1542.7685
1544.7350 1614.8168 1699.7857 1707.7142 1716.8069 1763.7734 1794.7732
1940.9113 1993.9414 2082.9974 2211.0999 2284.1656 2298.1924 2315.1733
2346.2393 2402.2586

IEF 点 1400:
1077.4235 1545.1665 1557.1800 1615.2899 1629.3171 1639.2424 1644.2703
1650.2177 1679.2655 1764.2349 1781.2559 1795.2691 1827.3200 1923.3377
1941.4215 2012.4217 2084.4777 2196.6995 2211.6313 2298.7533 2314.7422

IEF 点 1477:
842.5100 1045.5856 1061.4107 1201.6810 1243.6338 1298.7593 1314.7386
1353.7389 1442.6934 1794.8225 1816.8090 1826.8278 1940.9308 1962.9235

2083.9815 2211.0999 2225.0952 2233.0880 2239.1110 2247.1584 2259.1687
2283.1243 2298.1830 2300.1578 2300.1578 2314.2315 842.5100

IEF 点 1549:
944.5832 952.5302 963.4854 968.5148 989.6031 1011.4641 1038.5338
1045.5750 1085.6121 1109.5172 1123.4616 1141.4897 1151.5241 1169.4984
1180.5681 1239.5897 1254.5633 1263.6304 1293.6086 1332.6938 1404.7182
1449.7184 1453.7806 1462.6382 1481.7035 1487.7197 1504.7506 1534.7408
1550.6930 1601.8160 1620.7593 1696.8256 1776.8086 1794.8104 1834.9544
2082.9407 2104.9489 2120.9161 2191.1179 2211.0999 2307.1286 3494.7356

IEF 点 1629:
842.5100 1081.5213 1163.5498 1277.6486 1510.6347 1602.8306 1614.7873
1622.7896 1766.8741 1783.9029 1794.8229 1821.9804 1889.0158 1905.9656
1940.9499 1994.9698 2001.0446 2015.9908 2100.9779 2194.1209 2206.0567
2211.1000 2222.1179 2227.0998 2232.1773 2239.1005 2284.1852 2298.1724
2315.1713 2402.2609

IEF 点 1685:
842.5100 1022.5918 1041.4846 1045.5657 1081.5660 1094.6393 1123.5216
1140.6257 1151.6597 1179.5806 1198.6117 1237.5847 1251.7101 1258.6385
1264.6728 1267.6759 1277.6951 1294.6699 1311.6514 1337.5819 1360.6477
1367.6365 1375.7053 1424.7336 1475.7213 1496.7138 1510.6506 1535.8694
1555.7990 1589.9143 1613.8034 1624.8305 1664.9408 1668.8845 1700.9492
1717.9895 1761.8855 1765.8807 1781.9631 1794.8734 1881.0306 1940.9391
1994.0829 2015.9654 2076.0592 2107.1025 2211.0999 2225.0950 2240.1006
2292.0774 2298.1665

IEF 点 1689:
1151.6236 1252.6359 1264.6176 1277.6329 1307.6662 1341.7101 1344.6395
1368.5754 1375.6627 1383.6225 1394.6589 1419.6925 1497.7909 1509.7184
1535.8266 1555.7803 1566.7852 1570.8423 1578.7812 1585.8527 1613.8076
1621.7580 1650.8802 1707.7462 1712.7774 1715.8487 1728.8015 1794.7926
1804.8966 1818.9066 1825.8959 1838.8990 1881.0462 1895.9270 1936.9580
1952.9601 1962.9766 1980.9366 2082.9915 2099.0082 2139.9269 2155.9884
2196.2051 2211.0999 2225.1098 2239.1133 2283.1903 2314.2017 2362.0761
2528.2225

IEF 点 1707:
842.5100 1187.5823 1277.6596 1306.7072 1383.6581 1424.7845 1475.7350
1481.8440 1560.7928 1589.8204 1612.7670 1647.8648 1708.8533 1743.8693
1794.8108 1826.7289 1940.9432 1993.9578 2020.0073 2034.9747 2083.9911
2211.1000

IEF 点 1715:
842.5100 995.5831 1009.5829 1023.5820 1045.5202 1070.4854 1087.5118
1154.6259 1314.6766 1316.5599 1370.6312 1427.7708 1593.7765 1675.7657
1713.7559 1794.7779 1900.9901 1940.9405 1981.9982 2211.0999 2225.0993
2230.1190 2239.1017 2353.1943 2447.2427 2455.3168 2465.3108 2664.2730
2721.2672

IEF 点 1766:
842.5100 944.4946 989.5409 1017.6835 1032.5402 1045.5083 1060.5038
1071.5384 1077.0911 1084.5774 1107.4665 1129.5720 1179.5248 1193.5853
1201.5667 1205.5819 1234.6034 1263.6062 1277.6315 1281.5339 1314.7075
1320.5393 1325.6773 1349.6438 1363.6477 1381.7550 1398.6787 1407.6259
1434.7108 1436.6620 1475.7174 1491.8240 1493.6869 1505.8475 1519.8568
1556.8407 1602.7688 1636.8141 1678.8399 1707.7623 1743.8024 1780.7768

1794.7887 1838.9008 1872.9419 1931.1324 1993.9690 2083.0147 2097.9525
2211.1000 3451.8065

IEF 点 1800:
842.5100 965.4350 976.4934 992.4239 1045.5079 1065.4919 1074.4756
1120.5483 1164.5137 1179.5419 1254.6347 1260.5475 1277.6344 1292.6279
1302.6309 1308.6085 1383.6186 1415.5896 1419.6711 1434.7317 1467.8188
1475.7193 1487.7064 1493.6788 1506.7180 1522.7029 1524.6992 1553.6528
1639.8495 1657.7832 1665.7380 1676.7759 1681.7378 1707.7739 1709.7370
1716.8454 1759.9521 1783.7564 1791.8506 1794.8215 1838.9510 1940.9262
1993.9821 2211.1000 2671.4041 2687.4419 2721.3115

IEF 点 1902:
1045.5319 1352.5423 1794.7875 1942.9269 2211.0737 2225.0935 2230.1477
2240.0732 2285.1071 2298.1320 2315.1105

IEF 点 1935:
842.5100 976.5614 995.5965 1045.5409 1137.6845 1277.6514 1320.6409
1411.7267 1437.8481 1445.6587 1463.6928 1475.7462 1515.7311 1540.7581
1592.7102 1794.8039 1878.9334 1940.9419 1993.9565 2211.0999 2225.1032
2230.2255 2239.1103 2284.2093 2293.1057 2298.2019 2406.2187

IEF 点 2041:
842.5100 870.5188 995.5983 1009.5573 1011.5865 1045.5044 1073.4231
1253.5788 1277.6266 1287.5708 1357.6107 1391.6701 1427.6972 1475.7224
1487.7416 1567.7156 1567.7156 1615.7750 1624.7871 1715.8582 1745.9047
1794.7998 1826.7704 1940.9130 1993.9553 2011.9662 2082.9776 2211.0999
2298.1935

IEF 点 2079:
842.5100 1045.5126 1074.5097 1128.4836 1144.4893 1179.5318 1201.6130
1215.4643 1226.5814 1232.5216 1267.6287 1272.5458 1277.6236 1291.6468
1314.6885 1320.5261 1330.5987 1350.6193 1475.6943 1535.8375 1553.7165
1624.8774 1649.7828 1657.7624 1664.9078 1687.9333 1707.7469 1791.7278
1794.8045 1813.8890 1826.7495 1838.9154 1851.9083 1940.8912 1970.0934
1991.1016 2096.9820 2150.0510 2198.9812 2211.0999 2225.1041 2230.2625
2239.1553 2246.2206 2314.1744 2338.1612 2367.2374 2383.9340 2501.2666
2617.5910 3121.5635 3126.5388

IEF 点 2354:
842.5100 870.4939 1012.5286 1022.5067 1029.3960 1045.4719 1056.5117
1073.4775 1081.4615 1090.4351 1094.5511 1102.4539 1128.4784 1140.5488
1151.5872 1157.5311 1179.4996 1191.5849 1194.5774 1198.5323 1234.5742
1251.6062 1259.5414 1263.5214 1267.6025 1273.4958 1277.5635 1300.4431
1307.5481 1313.6037 1320.4906 1340.5876 1364.6104 1364.6104 1375.6429
1383.5667 1388.6014 1402.6673 1434.6889 1474.6751 1493.6490 1496.6232
1535.8077 1555.7629 1577.6201 1604.7703 1613.7706 1664.8756 1667.8486
1692.8624 1707.7665 1716.7989 1735.7390 1777.9508 1781.8353 1794.7863
1804.9251 1825.6777 1838.8740 1851.8978 1881.0424 1889.9527 1910.9100
1916.8051 1940.8769 1966.0780 1982.9535 1991.0975 1994.0892 2076.0763
2112.0231 2211.0999 2225.1186 2230.1505 2239.1165 2283.1613 2292.1405
2297.1707

IEF 点 2382:
792.5768 810.5959 814.6006 824.2747 830.5626 842.5100
877.0198 889.9431 905.6620 923.6817 927.6588 943.6340 1002.9798
1018.7167 1036.7046 1040.7238 1056.6945 1063.3297 1079.0752 1116.0163
1131.7560 1149.7860 1153.7654 1169.7402 1229.0710 1244.8292 1262.8523

1266.8593 1282.7904 1342.0994 1357.9284 1375.9517 1379.9293 1413.9492
1471.0408 1475.6861 1489.0704 1493.0714 1584.1187 1602.1516 1697.2401
1715.2577 1737.1939 1828.3534 1993.9914 2211.1000 2225.1434

IEF 点 2408:
842.5100 1045.4988 1239.5138 1287.6241 1462.7030 1590.8423 1601.7867
1794.7912 1838.8872 1903.0143 1940.9054 1987.1174 1993.9468 2083.0461
2211.1000

IEF 点 2411:
842.5100 870.5059 895.4053 995.5448 1009.5518 1023.5688 1045.4862
1179.4954 1201.5783 1234.5657 1263.5824 1277.6078 1307.5765 1314.6757
1325.6195 1383.6090 1404.5953 1427.7396 1434.6573 1458.6092 1460.6883
1462.6815 1475.6602 1478.6293 1512.7909 1524.8316 1564.6905 1576.6922
1580.6980 1611.7268 1638.7754 1649.7423 1660.7930 1700.7628 1707.7236
1716.7952 1725.7846 1743.8049 1754.9104 1762.7919 1766.7505 1794.7743
1826.7847 1837.8701 1855.8577 1900.9779 1940.9038 1993.9091 2011.9112
2016.0210 2027.1124 2082.9987 2152.9815 2196.1547 2201.1245 2211.1000
2284.1674 2298.1775 2315.1778 2402.2727 2521.3566

IEF 点 13652:
973.5179 1036.4774 1060.5342 1065.4002 1090.4578 1157.5122 1179.5299
1193.5473 1263.6227 1277.6329 1307.6100 1320.5257 1383.6186 1421.6125
1434.6909 1458.6522 1475.6960 1493.6697 1513.7133 1532.7183 1638.8153
1657.7778 1707.7530 1716.8296 1784.6837 1796.9843 1837.9545 1851.9192
1941.9522 1993.9786 2054.1177 2150.1636 2184.0966 2211.0999 2225.1274
2383.9529 2400.0149 2510.1564

IEF 点 14098:
1151.6250 1187.5380 1211.6015 1252.6166 1263.6201 1267.6316 1277.6330
1302.6286 1307.6252 1329.6415 1340.5773 1383.6123 1424.6965 1460.7071
1475.6824 1487.7308 1535.8328 1555.7827 1589.7920 1613.8149 1638.8404
1647.7635 1663.3717 1700.9248 1707.7385 1716.8250 1743.8547 1778.9302
1794.7865 1837.9159 1851.9112 1872.9419 1881.0100 1922.9211 1933.9521
1940.9217 1964.9583 1987.0662 1993.9735 2035.0110 2082.9785 2184.1098
2196.1297 2211.0999 2225.1263 2230.1914 2239.1200 2250.0874 2314.1757

表 7

以 MS 表征的人胰岛细胞蛋白

肽的分子量值从质谱仪上直接读出，因此与由这样的仪器一般得到的准确性有关。这些质量值来自从 NEPHGE 凝胶上回收的人胰岛细胞蛋白，并不能与记录在公众可获得的数据库（无论是核苷酸序列还是蛋白质序列）中的任何蛋白质匹配。

NEPHGE 点 26:
842.5131 870.5369 1045.5217 1179.5371 1265.5405 1277.6271 1308.5457
1314.6746 1320.5417 1324.5497 1357.6471 1427.7444 1475.6748 1493.6661
1664.8418 1703.9330 1716.7841 1719.8587 1743.8199 1760.7887 1775.8273
1791.7874 1794.7814 1826.7590 1940.8930 1945.9745 1993.9401 2211.0453
2225.0987 2230.1019 2239.1267 2284.1508 2299.1526 2314.0976 2383.8783

NEPHGE 点 35:
1169.6652 1277.6525 1320.5251 1366.6936 1403.7316 1427.7965 1467.6493
1475.7490 1486.6881 1550.7053 1638.8392 1651.8001 1707.8210 1794.8089
1838.8934 1940.9146 1950.9534 1994.0184 2011.9465 2082.9935 2152.1050

2157.1118 2211.0999 2292.1087 2313.1264 2368.9793 2418.3266 2439.1478
2467.3066 2468.3029 2563.0697 2581.4875 2597.4212 2921.4292 3034.4707
3220.5008 3494.9136 3510.9276 3636.8963

NEPHGE 点 60:
842.5164 1277.6644 1302.6646 1360.5887 1383.6568 1385.7016 1393.6752
1401.7137 1438.8428 1475.7287 1553.7800 1624.9132 1638.9032 1662.9161
1667.8327 1707.8457 1716.8488 1747.9246 1751.9333 1774.9206 1794.8637
1816.8897 1837.9933 1841.0036 1851.9912 1941.0238 1994.0339 2150.1644
2211.1608

NEPHGE 点 76:
1383.6718 1446.7509 1475.7966 1670.8364 1675.8901 1708.8213 1794.8184
1940.8887 1962.9070 1993.9970 2082.9848 2153.0730 2211.0999 2225.1123
2230.1870 2239.1271 2280.1950 2283.2022 2292.0475 2297.1802 2344.2374
2401.2168 2663.2692 2720.2978 2748.2944 2807.3426 2914.5394 2921.4777
3034.4733 3121.4973 3494.8696

NEPHGE 点 85:
1045.5675 1106.4748 1179.5952 1195.5825 1277.6749 1308.6332 1320.5991
1350.6556 1475.7490 1574.8568 1638.8508 1649.8395 1657.8089 1687.9355
1707.7763 1716.8866 1794.8259 1813.8380 1838.9120 1901.0576 1940.9125
1993.9837 2016.0573 2024.0827 2083.9875 2121.0337 2153.0677 2211.1000
2298.1652

NEPHGE 点 128:
842.5173 950.6940 985.5799 1011.6137 1033.7815 1045.5060 1068.6652
1077.7487 1179.5300 1211.6160 1277.6031 1299.8620 1307.6073 1334.7733
1335.7890 1338.7442 1341.9049 1370.7179 1376.8093 1425.0543 1434.6812
1541.0283 1665.9233 1691.1798 1726.0926 1727.1155 1761.0134 2211.0275

NEPHGE 点 130:
1045.5140 1179.5478 1193.5777 1277.6468 1307.6332 1338.7790 1365.5711
1383.6908 1389.6799 1434.7248 1475.7414 1493.7520 1535.8696 1666.0050
1707.8047 1716.9037 1743.9190 1794.8584 1838.0415 1994.0216 2035.0458
2211.1738

NEPHGE 点 171:
908.7717 942.7243 944.7402 950.8137 1033.8325 1045.6096 1060.5907
1157.5914 1165.5494 1179.6000 1201.6932 1232.5837 1235.5335 1277.7091
1291.6390 1299.9770 1308.6576 1327.7262 1333.9192 1335.9331 1342.0107
1370.6904 1393.7220 1444.8475 1461.7450 1475.7837 1493.7477 1533.7963
1567.8593 1581.7525 1586.7939 1599.8235 1605.8154 1616.8242 1629.8415
1657.8337 1682.8824 1691.2433 1707.8322 1714.8844 1716.8714 1741.7966
1744.9603 1752.8348 1791.7680 2099.0363 2211.0999

NEPHGE 点 187 and 188:
1123.5817 1251.7002 1292.6499 1403.7788 1448.7823 1508.7700 1576.8817
1638.9820 1687.9971 1780.0016 1908.0271 2002.1204 2182.3150 2199.3031
2211.2807 2225.2657 2230.3124 2283.2795 2295.3212 2587.5794 2662.7369
2705.3950 2720.5340 2748.5163

NEPHGE 点 195:
973.5609 976.5443 1045.5840 1157.5838 1179.5999 1201.6708 1234.6620
1263.6625 1277.7208 1284.6043 1300.5175 1307.6708 1320.5245 1323.6305
1337.6572 1357.6867 1365.6012 1383.7097 1386.6658 1434.7588 1475.7479
1493.7223 1638.8590 1707.7833 1716.8781 1755.8142 1794.7931 1837.9626

1851.9484 1882.0046 1890.9783 1905.0450 1940.9194 1993.9950 2083.0237
2211.0999

NEPHGE 点 243:
1045.5466 1060.0443 1066.0453 1794.7869 2211.1470 2225.1316 2236.2563
2239.2134

NEPHGE 点 270:
950.7789 973.5897 989.5751 1003.5955 1025.6590 1029.6033 1036.5737
1045.5866 1060.5666 1064.6402 1074.5264 1082.5967 1090.5566 1107.5747
1157.5786 1165.5700 1179.6000 1201.6640 1213.6248 1232.6071 1234.6742
1257.6697 1259.6823 1263.6743 1277.7118 1299.9629 1300.5490 1307.6720
1323.6470 1335.9371 1357.7143 1379.7259 1383.6952 1393.7250 1404.7544
1407.6986 1434.7663 1438.7044 1475.7611 1493.7269 1504.8006 1523.8004
1560.8202 1638.9009 1657.7832 1691.2608 1707.7958 1716.8609 1791.7356
1793.9708 1795.8320 1837.9885 1851.9594 1890.9722 1940.9413 1993.9967
2054.1412 2064.1473 2086.0239 2120.0246 2211.0999 2509.1782

NEPHGE 点 421:
1045.5551 1140.6401 1179.5911 1201.6178 1218.6234 1233.6811 1277.6552
1302.6608 1307.6456 1314.7202 1454.6592 1475.7489 1535.8938 1560.7882
1567.8222 1628.7809 1660.8150 1664.9552 1716.8609 1784.9210 1793.1088
1913.0411 1940.9146 1963.9912 1993.9933 2211.0999

NEPHGE 点 449:
1775.7252 2210.8860 2224.9665 2238.8424 2663.1016 2720.1628 2749.1314
2807.1013 2821.1104 3121.5130

NEPHGE 点 508:
842.5100 1045.5536 1066.5542 1179.5953 1183.6831 1236.5941 1291.6831
1295.6332 1307.6875 1403.6576 1428.8009 1475.7001 1665.6731 1763.8092
1784.9099 1794.8168 1801.9166 1816.9433 1993.9722 2052.1099 2072.1142
2140.0546 2180.2004 2211.0999 2225.1141 2230.1947 2239.1373 2246.1973
2283.1010 2292.0967 2299.1391 2313.1951 2344.1912 2361.2462 2663.3861
2678.1476 2720.3396 2748.1750 2807.3801 2821.3286 3121.6227 3339.9020
3349.7006

NEPHGE 点 509:
842.5661 950.7645 1045.5750 1138.4976 1141.5052 1157.5242 1162.5323
1179.5556 1188.6617 1192.5322 1201.6627 1206.5864 1207.5732 1231.5848
1248.5986 1254.5988 1264.6176 1277.6566 1299.9226 1308.6124 1309.6189
1314.7051 1335.8741 1341.9762 1351.6377 1369.6827 1408.7250 1431.6785
1440.6923 1475.7310 1548.7768 1562.7803 1582.8090 1621.9304 1691.2267
1716.8358 1725.1946 1727.1917 1749.9958 1794.8245 1990.0044 2006.0106
2034.9689 2211.1000 2398.2911 2672.2803 3530.7912

NEPHGE 点 532:
842.5100 856.5163 987.4343 998.4821 1012.4873 1045.5354 1066.5093
1078.4847 1080.5039 1092.4997 1100.5099 1665.7157 1679.7342 1691.7426
1697.7075 1707.7815 1794.8100 1826.7846 1846.8073 1940.9527 2011.9847
2078.1252 2082.9893 2211.0999 2225.0967 2239.1366 2283.1418 2297.1983
2313.2183 2344.2588 2663.3824 2691.3461 2705.3164 2720.3205 2734.3788
2744.3915 2748.3478 2807.3461 2821.4211 2914.6472 2921.3275 3338.9020
3348.7397

NEPHGE 点 558:
831.5173 908.6378 944.5866 950.6773 973.4943 1003.4784 1027.4818
1031.5106 1033.4303 1037.4838 1045.4983 1090.4512 1118.4363 1157.5146

1165.4922 1179.5187 1193.5475 1201.5905 1232.5216 1234.6120 1254.6082
1277.6373 1300.4872 1302.6032 1308.5774 1320.5401 1340.5812 1357.6289
1365.5703 1383.6340 1393.6433 1418.6599 1434.6912 1443.7196 1454.6651
1475.7090 1493.6847 1560.7731 1608.7220 1657.7727 1707.7505 1716.8222
1791.7034 1794.7971 1838.9112 2138.1215 2211.1154 2533.4148

NEPHGE 点 560:
1678.8305 1700.8144 1732.7947 1760.8185 2211.1243

NEPHGE spot 609:
842.5823 1045.6003 1074.5479 1111.6290 1179.6000 1232.5793 1307.6391
1320.5689 1350.6723 1385.7186 1475.7164 1479.7159 1493.7217 1503.7389
1548.8342 1573.7621 1638.8672 1650.9216 1657.8110 1707.7865 1743.8224
1791.7538 1794.7899 1813.9147 1826.8037 1838.9318 1851.9457 1867.9339
1994.0167 2091.9105 2150.1387 2198.9669 2211.1000 2383.9361 2501.2078
2717.0710

NEPHGE 点 719:
1245.4899 1256.5258 1273.5880 1600.6902 1738.8842 1743.7380 1794.7060
2034.7818 2210.8631 2282.9633 2541.9943 2637.0529 2662.1501 2719.9902
2780.1056

NEPHGE 点 729:
842.6014 973.5732 995.6290 997.6764 1009.6652 1011.6854 1037.5903
1045.5939 1060.6033 1140.5753 1157.5940 1165.6028 1179.6000 1234.6787
1263.6654 1277.7022 1300.5221 1307.6667 1314.7520 1320.5957 1323.6536
1357.6990 1379.7386 1383.6807 1427.8123 1434.7499 1475.7565 1487.7571
1493.7502 1638.8667 1699.8308 1707.7936 1716.8692 1784.7536 1794.8321
1837.9871 1851.9540 1993.9841 2211.0999

NEPHGE 点 829:
728.6920 754.5651 806.5817 840.6673 901.6037 908.7999
922.8081 929.5580 942.7504 944.7633 950.8350 984.6868 1045.6162
1060.5888 1065.5604 1069.5700 1101.6517 1107.5696 1115.5327 1168.6149
1175.6590 1179.6000 1191.6387 1201.6858 1204.6558 1234.6775 1264.5820
1277.7048 1289.6860 1297.7003 1307.6572 1314.7802 1335.9463 1344.7647
1357.7094 1383.6713 1475.7766 1599.8000 1641.7130 1716.8676 1743.8138
1759.8716 1761.8461 1763.9059 1778.9217 1785.9446 1794.8405 2211.0999
3553.7439

NEPHGE 点 836:
550.6338 559.4159 594.3097 620.3219 628.2701 634.3534
677.3904 705.4059 719.4081 763.4069 777.3504 816.4305
842.5100 856.5303 870.5226 901.4988 944.5088 953.5746
967.5807 979.4747 985.5182 1020.4115 1032.5642 1045.5452 1060.5229
1088.5526 1107.5244 1126.4778 1137.4690 1151.4924 1168.5205 1179.5371
1217.5778 1265.5486 1277.6444 1308.6107 1314.6961 1320.5574 1323.6041
1334.6886 1349.7357 1369.6180 1377.7381 1404.5148 1411.6379 1475.7199
1493.7304 1504.8048 1664.9080 1703.9596 1719.9754 1733.9201 1736.0145
1743.7900 1759.7683 1775.8072 1791.8303 1794.8143 1806.8917 1826.8090
1831.7637 1837.9212 1853.9619 1858.9394 1906.9335 1945.9915 1993.9626
2113.0476 2117.9938 2123.1281 2128.0641 2211.1000 2221.1253 2225.1040
2240.1259 2283.1314 2292.0664 2299.1709 2314.1811 2383.9977

NEPHGE 点 837:
842.5100 944.5317 1020.4700 1055.5366 1242.5797 1281.5708 1362.6911
1625.7170 1763.7852 1794.7933 2152.9836 2211.1000 3173.9268

NEPHGE 点 3879:
806.4919 1029.6369 1036.5549 1045.5927 1065.5397 1087.5387 1090.5970
1115.5180 1157.6195 1165.5772 1175.6512 1179.6000 1198.6571 1201.6794
1205.6320 1232.6643 1243.6040 1277.7034 1297.6864 1300.5622 1307.6610
1314.7621 1320.5558 1323.6573 1330.7207 1337.6185 1340.7602 1344.7320
1383.6828 1426.7184 1434.7529 1438.8223 1441.7131 1469.7683 1475.7527
1493.7449 1535.8745 1634.8796 1638.8827 1656.7456 1675.8037 1707.7860
1716.8731 1728.8562 1743.8410 1759.8798 1785.9333 1794.8294 1804.8441
1838.9205 1990.1067 1994.0040 2211.1000

NEPHGE 点 6600:
1112.7125 1119.8876 1154.7604 1179.5853 1258.5560 1299.9739 1334.8759
1342.0311 1369.7625 1376.9353 1404.6771 1411.8281 1691.3292 1726.2245
1761.1320 1794.8996 2101.1599 2117.5243 2211.2240

表 8

在人胰岛细胞培养基中可检测到的并以 MS 表征的蛋白

肽的分子量值从质谱仪上直接读出，因此与由这样的仪器一般得到的准确性有关。这些质量值来自在培养基（如方法中所述）中培养人胰岛后培养基中可检测到的蛋白质。这些蛋白质从 IEF 凝胶上回收。其肽的质量值并不能与以相似的方法处理产生的肽匹配，如果有任何蛋白质记录在公众可获得的数据库（无论是核苷酸序列还是蛋白质序列）。

IEF 点 122SPI:
842.5100 927.4963 973.5343 1066.4649 1109.4248 1165.5350 1179.5583
1213.6268 1234.6228 1263.6294 1277.6595 1300.4708 1307.6346 1315.6246
1320.5471 1357.6533 1365.5835 1379.6918 1383.6430 1390.6393 1400.6369
1405.6680 1421.6233 1427.7104 1434.7311 1475.7333 1493.6983 1497.7529
1513.7643 1639.9035 1657.7697 1699.8245 1707.7840 1716.8404 1745.8399
1797.0431 1819.0044 1834.9854 1837.9651 1993.9989 2096.1253 2114.1074
2129.9106 2211.0999 2224.2375 2239.1053 2249.0984 2367.2937 2383.9584
2509.2311 2705.2275 2872.5248 3314.3928

IEF 点 123SPI:
842.5100 995.6139 1045.5020 1179.5325 1257.6289 1277.6396 1307.6108 1382.6104
1418.6783 1434.7291 1475.7101 1487.7178 1523.7513 1540.7742 1604.7757 1608.7595
1638.8370 1707.7398 1716.8473 1794.8201 1812.0723 1837.9388 1851.9256 1867.9182
1901.0100 1940.9715 1993.9586 2113.0096 2150.0818 2184.0996 2211.0999 2225.1103
2231.1825 2345.2339 2384.9304

IEF 点 126SPI:
842.5100 1023.6778 1095.6006 1137.7430 1164.6686 1198.6274 1204.6551 1217.6581
1277.6826 1291.6875 1308.6616 1313.6816 1366.7194 1371.7416 1383.6704 1428.7966
1439.7924 1444.7147 1475.7456 1487.7390 1570.8290 1619.8479 1629.8740 1638.8514
1662.8514 1674.8398 1679.8136 1684.8887 1692.8810 1707.7897 1794.8050 1824.9642
1837.9740 1852.9313 1867.9291 1869.9953 1896.0050 1902.0257 1940.9322 1953.0459
1962.9743 1993.9616 2151.0562 2158.1156 2169.0372 2184.0868 2211.1000 2283.2157
2297.1638 2345.2835 2748.3837

IEF 点 130SPI:
842.5100 1036.5147 1075.5384 1082.5560 1107.5100 1165.5090 1179.5516 1198.6566
1277.6451 1303.6580 1307.6217 1329.6573 1393.6412 1455.6351 1475.7144 1487.7050
1515.7538 1638.8218 1657.7565 1704.8650 1707.7353 1758.8640 1790.8768 1794.7723

1799.8790 1811.8747 1837.9550 1839.9159 1872.9456 1914.0100 1941.9548 1993.9509
2047.0529 2054.0744 2150.0295 2184.0963 2211.0999 2250.0364 2383.9437

IEF 点 135SPI:
842.5100 1271.6481 1343.6065 1413.7382 1440.6092 1452.6148 1515.7276 1571.7985
1692.8303 1709.7921 1794.8135 2211.1000

IEF 点 140SPI:
842.5100 995.6118 1192.5588 1198.6323 1277.6308 1311.5802 1333.6658 1344.5990
1350.6185 1419.6963 1475.7224 1487.6666 1515.7236 1575.7435 1638.8524 1687.8674
1707.7437 1773.8513 1780.8198 1790.8845 1794.8104 1838.9057 1853.9362 1858.9484
1901.1178 1954.0130 1993.9445 2016.0588 2075.9670 2155.1313 2211.0999 2279.2190
2284.2035 2384.9802 2401.1453

IEF 点 160SPI:
842.5100 944.4201 1045.4319 1093.3863 1121.4125 1179.4628 1195.4396 1277.5655
1297.5044 1302.5312 1307.5412 1320.4609 1350.5468 1383.5719 1475.6543 1556.6594
1638.8052 1650.7700 1657.7602 1684.7837 1707.7410 1794.7624 1812.8635 1838.9208
1851.8857 1872.9481 1931.9711 1993.9814 2211.0999 2225.1307 2383.9509 2389.2171

IEF 点 218SPI:
842.5100 950.6771 995.4745 1021.4311 1043.4929 1045.4833 1060.5128
1109.4391 1126.4305 1142.4871 1157.5613 1179.5079 1199.4923 1210.5203
1220.5043 1234.6055 1263.6086 1277.6299 1286.5597 1300.4350 1302.6175
1307.5960 1314.7119 1320.5066 1329.5849 1353.6598 1357.6076 1365.5460
1383.5880 1393.6262 1427.7609 1434.7341 1475.6921 1493.6654 1545.7737
1553.7960 1700.7823 1707.7831 1714.8079 1716.8088 1726.8174 1794.7979
1825.9672 1838.9224 1922.9490 1933.9836 1940.9304 1987.0506 1993.9688
2005.0097 2083.0669 2211.0999 2225.1217 2230.1991 2239.1338 2283.2517
2297.1804 2344.3708 2367.2739 2384.1822 2401.2136 2662.6332 3077.6726
3095.4811 3339.9445 3349.7509

IEF 点 248SPI:
842.5100 995.5661 1192.5533 1198.6455 1344.5956 1419.6789 1424.7739 1515.7473
1704.8844 1794.8113 1869.9654 1902.0689 1940.9132 1952.9542 1959.9920 2016.1083
2153.1172 2155.0712 2211.1000 2279.1779 2284.1800 2344.2439 2402.2584

IEF 点 277SPI:
842.5100 944.5108 989.5777 1032.5590 1137.6793 1180.5632 1277.6210 1325.6529
1335.6512 1349.6238 1363.6523 1366.7033 1398.7028 1467.7336 1475.7235 1538.8441
1602.7634 1636.8005 1638.8129 1652.7675 1670.9066 1703.8669 1719.9301 1743.8032
1758.8949 1794.7991 1839.8938 1931.1572 1940.9432 1993.9414 2030.0920 2153.0395
2176.9849 2211.0999 2284.1637 2298.1739 2345.2744

IEF 点 304SPI:
842.7320 2211.6199 2225.6395 2284.7376 2346.7681

IEF 点 314SPI:
1747.1466 1929.2249 2040.3318 2079.2340 2292.4766 2309.5383 2338.5453 2367.6507

IEF 点 338SPI:
842.5100 1277.6344 1298.6552 1302.6274 1307.5972 1329.6478 1381.7755 1398.6603
1426.7642 1475.7128 1487.6784 1523.7645 1602.7505 1638.8279 1707.7565 1742.8419
1758.8799 1784.7091 1794.7915 1812.0358 1838.9245 1851.9135 1867.8992 1941.9594
1966.0151 1969.0193 1993.9537 2150.0574 2176.0349 2184.0894 2211.0999 2225.1184
2286.1485 2299.1497 2331.1452 2361.1860 2383.9924 2501.1805 2509.2701 2580.3195
2643.3333 2702.2667 2707.2342 2718.2130 2723.3186 2808.3617 2832.3462

图1

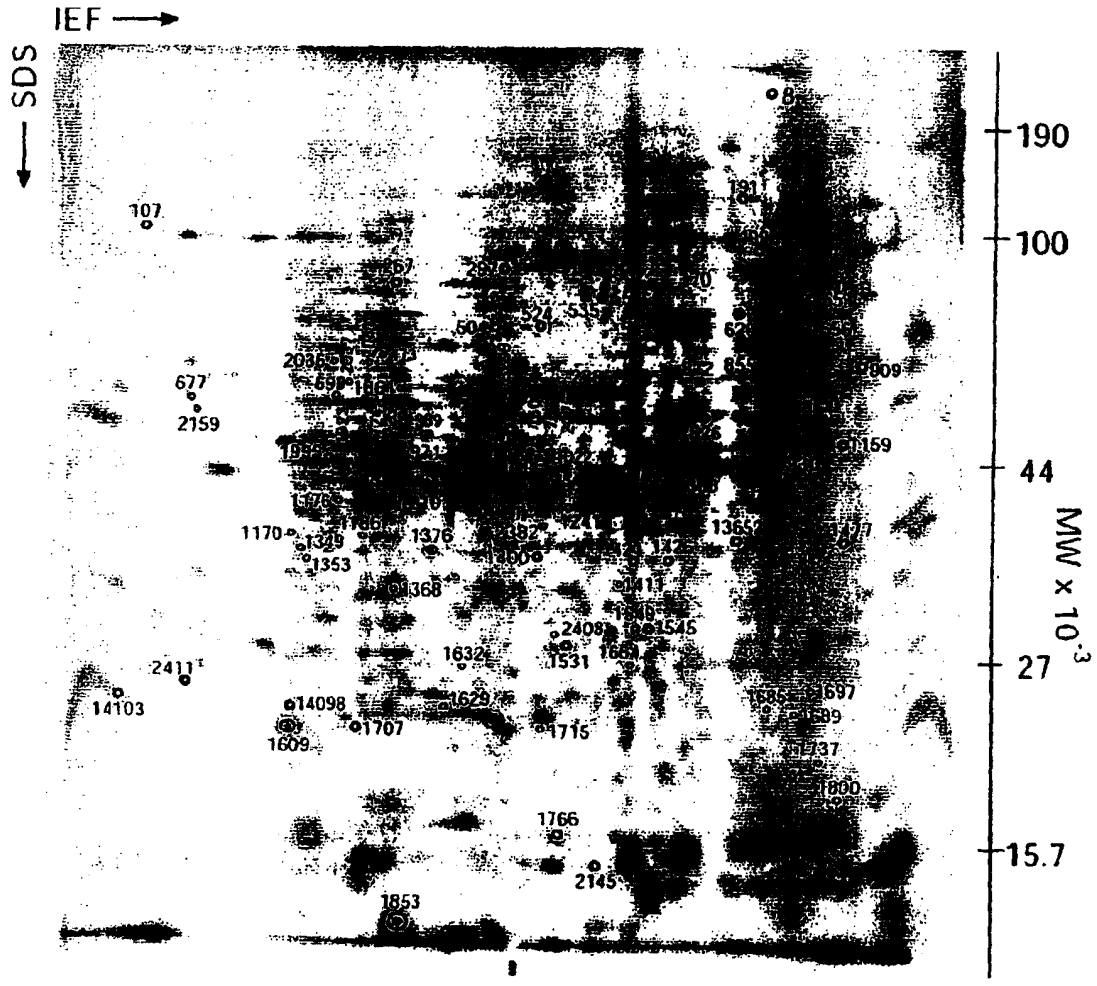

IEF
SDS
190
100
44
27
15.7
MW x 10-3
107
677
2159
1170
1329
1376
1353
1368
1411
2408
1545
1632
1531
2411
14103
14098
1609
1707
1629
1715
1766
2145
1853
1697
1800

图2

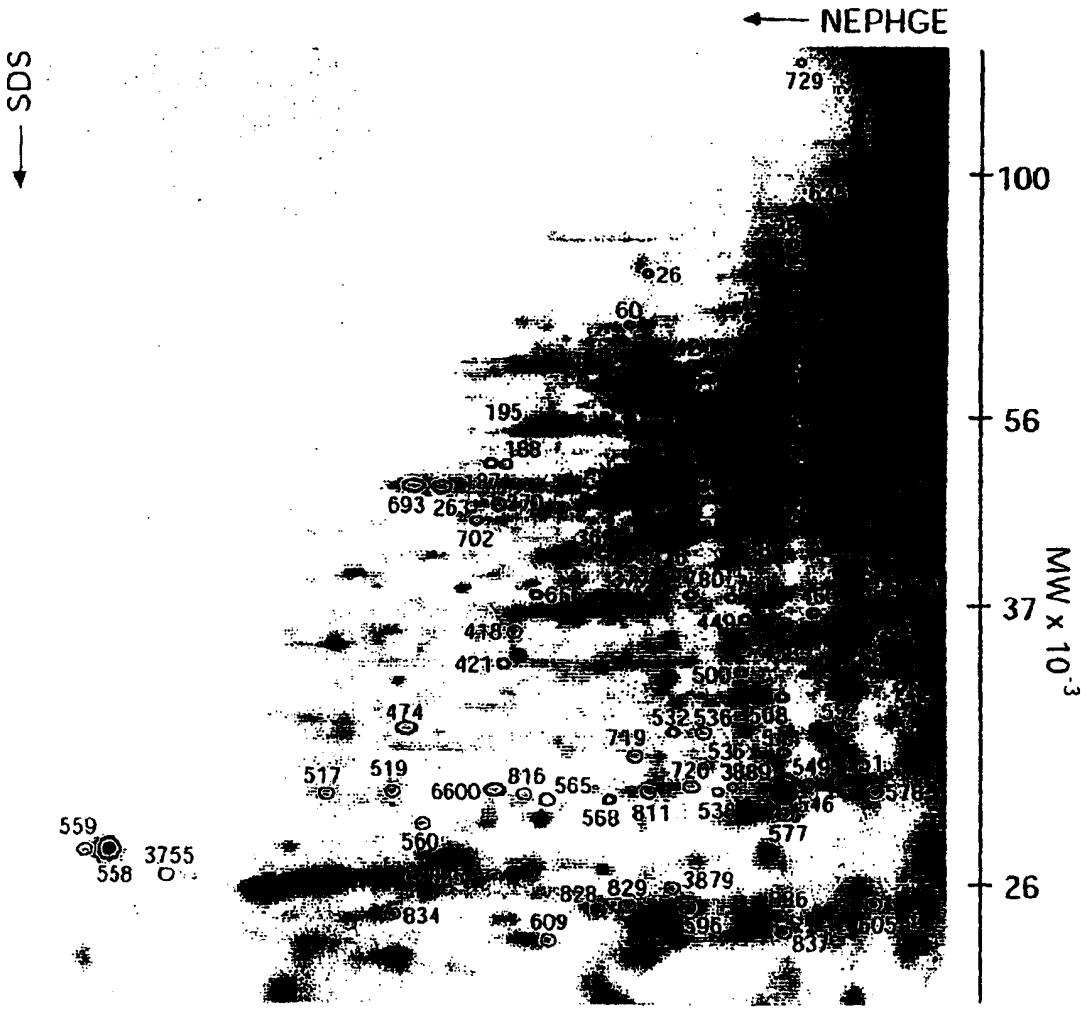
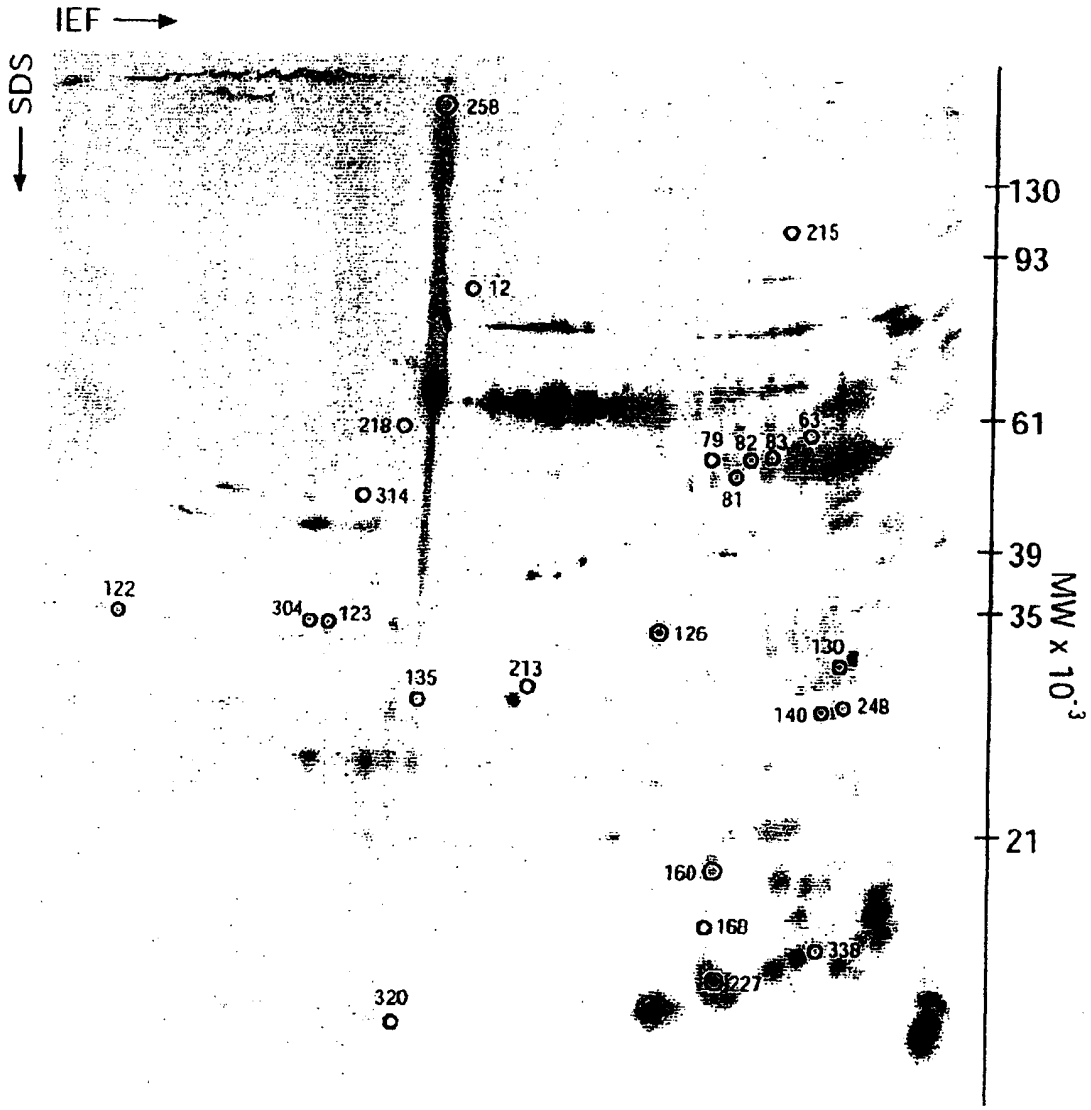

NEPHGE
SDS
100
56
37
26
MW x 10-3
729
26
60
195
188
693
702
474
421
517
519
6600
816
565
568
811
559
558
3755
560
828
829
3879
834
609
749
720
577

图 3


IEF
SDS
258
215
12
218
314
79
82
83
63
81
122
304
123
126
130
135
213
140
248
160
168
338
227
320
130
93
61
39
35
21
MW x 10-3