

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01105523.5

[51] Int. Cl.

C12N 9/36 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 4 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1252257C

[22] 申请日 2001.3.2 [21] 申请号 01105523.5

[71] 专利权人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

[72] 发明人 余 龙 赵 勇 胡培蓉 唐丽莎

赵寿元

审查员 罗 霄

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 30 页

[54] 发明名称

人类 G 型溶菌酶、其编码序列、制法及用途

[57] 摘要

本发明提供了一种新的人类鹅型溶菌酶 (LYG2) 及识别和编码 LYG2 的多聚核苷酸。本发明还提供了相应的表达载体, 宿主细胞, 抗体, 激动剂和拮抗剂。本发明还提供了与 LYG2 表达有关的疾病的诊断、治疗和预防的方法。

1. 一种分离纯化的多聚核苷酸, 其特征在于, 其编码的氨基酸序列是 SEQ ID No.1。
- 5 2. 一种分离纯化的多聚核苷酸, 其特征在于, 它是 SEQ ID No.2 中第 1-846 位或第 114-662 位的多聚核苷酸序列。
3. 一种分离纯化的多聚核苷酸, 其特征在于, 它与权利要求 1 中所述的多聚核苷酸完全互补。
4. 一种表达载体, 其特征在于, 它包含权利要求 1 中所述多聚核苷酸。
- 10 5. 一种宿主细胞, 其特征在于, 它包含权利要求 4 中所述的表达载体。
6. 一种制备多肽的方法, 该方法包含以下步骤:
 - (a) 在适合此多肽表达的环境下培养权利要求 5 中所述的宿主细胞, 以及
 - (b) 从宿主细胞的培养物中提取该多肽。
7. 一种从含有核酸的生物样本中检测多聚核苷酸的方法, 该方法包含以下步
- 15 骤:
 - (a) 扩增权利要求 1 中所述的多聚核苷酸,
 - (b) 将权利要求 1 中所述的多聚核苷酸与该生物样本中至少一条核酸杂交, 以形成杂交复合物, 以及
 - (c) 检测此杂交复合物, 其中此杂交复合物的存在与该生物样本中编码该多
- 20 肽的多聚核苷酸的存在相关联。
8. 一种探针, 该探针包含 SEQ ID No.2 中 10-846 个连续核苷酸构成的序列或其完全互补链序列。
9. 一种抗体, 其特征在于, 它能与 SEQ ID No.1 中的氨基酸序列的多肽特异性结合。

人类 G 型溶菌酶、其编码序列、制法及用途

- 5 本发明提供了一种新的人类鹅型溶菌酶的核酸和氨基酸序列，且提供了将该序列用于自身免疫系统/炎症、肾脏、肾上腺方面的疾病和肿瘤的诊断、治疗及预防的方法。

溶菌酶是一个酶家族，能催化细菌细胞壁某些粘多糖水解，特别是催化 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡萄糖胺之间的 β -1, 4-糖苷键，并能引起细菌裂解。溶菌酶在多种生物体例如病毒、鸟类以及哺乳动物中都存在。在人体中，溶菌酶存在于脾、肺、肾、白细胞、血浆、唾液、乳汁、眼泪和软骨中。(Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 153450 Lysozyme; Weaver, L. H. et al. (1985) J. Mol. Biol. 184: 739-741)。

10 已知的两种溶菌酶，鸡型(C型)和鹅型(G型)，最初分别是鸡蛋清和鹅蛋清中分离出的。C型与G型溶菌酶有着相似的三维结构，但氨基酸序列不同。(Nakano, T. and Graf, T. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1090: 273-276)。在鸡中，两种类型的溶菌酶都存在于中性粒细胞中，而蛋清中仅存在C型溶菌酶。对鸡中两种类型的溶菌酶 mRNA 的表达谱进行分析，发现C型溶菌酶 mRNA 既存在于附着的单核细胞和巨噬细胞中，也存在于非附着的早幼粒细胞和粒细胞以及骨髓、脾、黏液囊和输卵管细胞中。G型溶菌酶 mRNA 存在于非附着的骨髓和肺细胞中。从鸡中克隆出的G型溶菌酶基因编码一个211个氨基酸的蛋白质，该蛋白包含一个公认的26氨基酸的N端切割信号。在鸡、黑天鹅、鹅和鸵鸟中发现了同源的G型溶菌酶。其中保守的残基包括三个催化中心残基 Glu99、Asp12和Asp123(以鸡G型溶菌酶前体计数)以及4个半胱氨酸，这4个半胱氨酸在黑天鹅G型溶菌酶中形成两个双硫键。在兔子中已经发现了多种同功酶，包括白细胞型、消化道型，也许还有淋巴上皮细胞型(OMIM153450, supra; Nakano (1991) supra; 20 and GenBank g 1310929)。编码类似C型溶菌酶的蛋白的人溶菌酶基因也已被克隆(Yoshimura, K. et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 150:794-801)。

溶菌酶与多种疾病有关。Nakano(supra)认为溶菌酶可能在宿主防御系统中起作用。带有遗传性溶菌酶缺陷的年老兔子对感染的敏感性增加，特别是皮下脓肿的高敏感性(OMIM153450, supra)。人溶菌酶基因突变会引起遗传性系统性淀粉样变。该病是一种罕见的显性常染色体病，淀粉样蛋白在内脏，包括肾、肾上腺、脾和肝中沉积，该病通常在50岁前致人死命。淀粉样沉积中包含有氨基酸被替换的溶菌酶。肾脏淀粉样变是最常见的，也是器官累及中最严重的(Pepys, M. B. et al. (1993) Nature 362: 553-557; OMIM 105200 Familial Visceral Amyloidosis; Cotran, R. S. et al. (1994) Robbins Pathologic Basis of Disease, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pa., 30 pp. 231-238)。G型溶菌酶在带v-myb癌基因的L106突变子的成髓细胞白血病病毒的

鸟的早幼粒细胞中被表达(Nakano, T. and Graf, T. (1992) *Oncogene* 7:527-534; and Nakano (1991) *supra.*)。

因此,本领域迫切需要开发新的溶菌酶。

- 5 本发明的一个目的是提供一种多聚核苷酸,该多聚核苷酸被命名为人LYG2,它编码人类G型溶菌酶2(已公布的人类G型溶菌酶在本文中被称作LYG1)。

本发明的一个目的是提供一种新的人溶菌酶蛋白LYG2。

- 10 本发明所提供了一种新的人类G型溶菌酶及其编码多核苷酸,为自身免疫/炎症性、肾脏、肾上腺相关的疾病和癌症的诊断、治疗和预防提供了新的途径。

- 本发明还提供了一种充分纯化的变异蛋白,该蛋白与SEQ ID No.1中的氨基酸序列或其片断的顺序有至少90%的同一性。本发明还提供一种分离纯化的多聚核苷酸,该多聚核苷酸编码含有SEQ ID No.1中的氨基酸序列或其片断顺序的多肽。本发明还提供一种分离纯化的多聚核苷酸变异体,其与编码含有SEQ ID No.1中的氨基酸序列或其片断顺序的多聚核苷酸有至少70%同一性。

 本发明还提供了一种分离纯化的多聚核苷酸,该多聚核苷酸能在严紧条件下与编码含有SEQ ID No.1中的氨基酸序列或其片断顺序的多肽的多聚核苷酸相杂交,还提供与编码含有SEQ ID No.1中的氨基酸序列或其片断顺序的多肽的多聚核苷酸相互补的多聚核苷酸。

- 20 本发明还提供一种分离纯化的多聚核苷酸,该多聚核苷酸含有SEQ ID No.2中第1-846位或第114-662位的多聚核苷酸序列或其片断顺序。本发明还提供一种分离纯化的多聚核苷酸变异体,其与含有SEQ ID No.2中的多聚核苷酸序列或其片断顺序的多聚核苷酸有至少70%同一性。还提供一种分离纯化的与含有SEQ ID No.2中的顺序或其片断顺序的多聚核苷酸相互补的多聚核苷酸。

- 25 本发明还提供一种表达载体,它含有至少一段编码包含SEQ ID No.1中的氨基酸序列或其片断的多聚核苷酸。另一方面,此表达载体包含在宿主细胞中。

- 本发明还提供了一种制备含有SEQ ID No.1中的氨基酸序列或其片断的多肽的方法。其步骤为:(a)在适合含有SEQ ID No.1中的氨基酸序列或其片断的多肽表达的环境中培养宿主细胞,该宿主细胞含有一个表达载体,该表达载体带有至少一段编码含有SEQ ID No.1中的氨基酸序列或其片断多肽的多聚核苷酸;(b)从宿主培养物中提取此多肽。

 本发明还提供一种药学成分,该成分包含了充分纯化的多肽,该多肽含有SEQ ID No.1中的氨基酸序列或其片断,并与一适合的药学载体相连。

- 35 本发明还提供了一种和包含SEQ ID No.1中的氨基酸序列或其片断的多肽结合的纯化抗体,以及该纯化抗体的激动剂和纯化的拮抗剂。

本发明还提供了一种治疗或预防自身免疫/炎症疾病的方法，该方法包括：给需要治疗的病人以有效剂量的药学成分，该成分含带有 SEQ ID No.1 中的氨基酸序列或其片断的纯化多肽。

5 本发明还提供了一种治疗或预防肾脏疾病的方法，该方法包括：给需要治疗的病人以有效剂量的药学成分，该成分含带有 SEQ ID No.1 中的氨基酸序列或其片断的纯化多肽。

本发明还提供了一种治疗或预防肾上腺疾病的方法，该方法包括：给需要治疗的病人以有效数量的药学成分，该成分含带有 SEQ ID No.1 中的氨基酸序列或其片断的纯化多肽。

10 本发明还提供一种治疗或预防癌症的方法，该方法包括：对此有需求的病人给予有效量的拮抗剂，该拮抗剂可拮抗具有 SEQ ID No. 1 中氨基酸序列或其片断的多肽。

本发明还提供了一种在含有核酸的生物样本中检测编码 SEQ ID No.1 中氨基酸或其片断的多聚核苷酸的方法。其步骤是：

15 (a)将编码 SEQ ID No.1 中氨基酸序列或其片断的多聚核苷酸与该生物样本中至少一种核酸杂交，得到一个杂交复合物。

(b)检测该复合物，其中该杂交复合物的存在与该生物样本中编码 SEQ ID No.1 中氨基酸或其片断的多聚核苷酸的存在密切相关。另一方面，本方法还包括杂交前对多聚核苷酸的扩增。

20 定义

“LYG2”是指充分纯化的 LYG2 的氨基酸序列或其变异形式，其来源可以是任何种属，特别是哺乳类动物，包括牛、绵羊、猪、鼠、马、较佳的是来源于人的；或是任何方法，可以是天然，合成，半合成或重组来源。

25 术语“激动剂”指一个结合 LYG2 后可增强 LYG2 效果或延长 LYG2 有效时间的分子。激动剂可包括蛋白质，核酸，碳水化合物或任何其他与 LYG2 结合并调节其作用的分子。

“等位变异体”是编码 LYG2 基因的另一种形式。等位变异体可由核酸顺序的至少一个突变引起，该突变可造成 mRNA 或多肽的改变，这种改变可能会也可能不会引起蛋白质结构或功能的变化。任何一个特定的天然或重组基因可以没有，有一个或有许多
30 等位形式。

编码 LYG2 的“变异”核酸序列包括含有不同核苷酸缺失，插入或替换的核酸顺序，这些核酸可以产生一个与 LYG2 相同的多核苷酸或带有至少一个 LYG2 功能特征的多肽。此定义还包括了与等位变异体间发生的一些不恰当的或不期望的的杂交，这些等位变异体的座位与编码 LYG2 的多聚核苷酸的正常染色体座位不同。被编码的蛋白也可以发生
35 “变异”，可能含有氨基酸残基的缺失，插入和替换，还可以引起沉默突变，从而产生

与 LYG2 的功能等等的蛋白质。在保留 LYG2 的生物或免疫活性的前提下，可以基于各残基极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和双亲性的性质对 LYG2 的氨基酸进行人为的替换。例如，带负电的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸，带正电的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸，具有相似的疏水性的不带电的极性氨基酸，包括亮氨酸，异亮氨酸和缬氨酸，甘氨酸和丙氨酸，天门冬酰胺和谷氨酰胺，丝氨酸和苏氨酸，以及苯丙氨酸和酪氨酸。

5 术语“氨基酸”或“氨基酸序列”指一个寡肽、肽、多肽或蛋白质顺序，且包括天然及合成分子。本文中，“片段”，“免疫片段”或“抗原片段”指的是较佳的至少 10 个氨基酸长度的 LYG2 片断，或最佳的至少 14 个氨基酸。这些片断有 LYG2 的一些生物或免疫活性。虽然“氨基酸序列”指天然形成的蛋白质分子的氨基酸序列，“氨基酸序列”以及相似的术语不应局限于本文所述蛋白质分子的全长氨基酸序列。

10 术语“扩增”指一核酸顺序的多份拷贝的制备。扩增通常用本领域中所熟知的 PCR 技术完成。

术语“拮抗剂”指的是与 LYG2 结合后降低 LYG2 生物或免疫活性的作用效果或时间的分子。拮抗剂可包括蛋白，核酸，碳水化合物，抗体或其它任何降低 LYG2 作用的分子。

15 术语“抗体”指能结合抗原决定簇的完整分子以及片段，如 Fab, F(ab')₂ 及 Fv 片断。与 LYG2 多肽结合的抗体可用完整的多肽或含有小肽的片断作为免疫抗原得到。用来免疫动物(如小鼠，大鼠或兔子)的多肽或寡肽可由 RNA 翻译或化学合成得到，且在需要时可与载体蛋白相联。常用的与肽链化学偶联的载体包括牛血清白蛋白，甲状腺球蛋白和匙孔形血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin)。偶联的蛋白即可用于免疫动物。

20 术语“抗原决定簇”指与特定抗体接触的分子的一段(如一个表位)。当一个蛋白或蛋白片断被用来免疫一个动物时，该蛋白的许多区域(基于蛋白中的区域或三维结构)可以引起能与抗原决定簇特异结合的抗体的产生。抗原决定簇可以与抗原(即引发免疫应答的免疫原)竞争性结合抗体。

25 术语“反义”是指任何一种含有可与一特定核苷酸序列中的“有义”链相互补的核苷酸序列的成分。反义分子可由包括合成或转录的任何方法制备。转入细胞后，此互补核苷酸可与细胞产生的天然顺序形成复式结构，阻碍转录或翻译。“负”链可指反义链，“正”链可指有义链。

30 术语“有生物学活性的”指具有一个天然分子的结构，调节或生化功能的蛋白质。与此相似，“有免疫活性的”指天然、重组或合成的 LYG2 或与之有关的寡肽，它们能在适当的动物或细胞中引发特定的免疫应答并与特定抗体结合的功能。

术语“互补”或“互补性”指通过碱基配对而形成的多聚核苷酸的天然结合。例如：5'A-G-T 3'与互补序列 3'T-C-A 5'相结合。两个单链分子间的“互补性”可以是“部分的”，即仅有一部分核酸可结合，也可是“完全的”，即两个单链分子序列完全互补。

35 “一致序列”指一段核酸顺序，该序列可以是为鉴定不确定的碱基而进行重复测

序得到的序列；或者是一段由多个重叠片断拼接而成的核酸顺序。有些顺序为了产生一致序列既被延伸也被拼装过。

一个“缺失”指在一个氨基酸序列或核苷酸序列中丢失了一个或多个氨基酸残基或核苷酸的变化。

- 5 术语“衍生物”指的是经化学修饰的一个多肽顺序或多核苷酸序列。一个多聚核苷酸序列的化学修饰形式包括，烷基化，酰基或氨基基团替代等。一个衍生的多聚核苷酸可编码一个多肽，该多肽至少保持有天然分子的一项生物或免疫功能。一个衍生多肽是经糖基化或任何相似过程作用后，仍保有原多肽的至少一项生物或免疫功能的多肽。

- 10 术语“相似性”指的是互补性的程度，可有部分相似性或完全相似性。“同一性”可以代替“相似性”。一个“充分相似”顺序指的是一个部分互补的顺序，它可以至少部分抑制一个相同的顺序与靶核酸的杂交。对完全互补的顺序与靶顺序的杂交的抑制可通过在低严紧度的条件下进行杂交分析(Southern 或 Northern 杂交等等)来检验。一个充分相似的顺序或杂交探针可在严紧度降低的条件下竞争并抑制一个完全相似(相同)的顺序与靶顺序的杂交。这并不意味着在严紧度降低的条件下允许非特异的结合发生，
15 而是在此条件下两个顺序的结合要求是特异的(有选择性的)。检测有无非特异结合可用另一非互补的(即少于 30%相似性或同一性)靶顺序来实现。如果没有非特异结合，则充分相似的顺序或探针不会和第二个非互补的靶顺序结合。

- “同一性百分比”或“%同一性”指比较两个或更多氨基酸序列或核酸顺序的序列相同性的百分比。同一性百分比可由电脑测定，如用 PCGENE 程序。PCGENE 程序可以根据不同的方法如 Clustal 方法形成两个或以上顺序之间的联配。Clustal 算法通过比较
20 两两序列将序列分成簇。先簇内成对联配，再簇间联配。如，两个氨基酸序列 A 和 B 的同一百分比是这样计算的：将 A 的序列长度减去 A 中未匹配的残基数减去 B 中未匹配的残基，除以所有 A 与 B 中匹配的残基数，再乘以 100。A 和 B 之间没有或有低相似性的间隙序列在计算同一百分比时不被包括进去。核酸序列之间的同一百分比也可用本
25 领域的其它方法如 Jotun Hein 方法(见，如，Hein, J. (1990) Methods Enzymol. 183:626-645.)来计算。序列间的相似性也可以用本领域的其它方法如改变杂交条件来计算。

 “人类人工染色体”(HACs)是含有大约 6kb 到 10Mb 的 DNA 序列的线性微染色体，它含有所有染色体稳定的有丝分离及维持所必需的元件。

- 30 “人化抗体”指非抗原结合部分的氨基酸序列经改变而更类似于人类抗体，同时仍保留有原结合功能的动物抗体。

 “杂交”指任何核酸链通过碱基配对与互补链结合的过程。

- 术语“杂交复合物”指两个核酸序列通过互补碱基间的氢键的形成而产生的复合物。杂交复合物可在溶液中形成(如，C₀或 R₀t 分析)或者一个溶液中的核酸序列和一个
35 个固定在固体支持物(如纸，膜，滤膜，芯片，针尖或玻璃片，或其他任何固定了细胞

或核酸的合适的底物)上的核酸序列之间形成。

术语“插入”或“添加”指对天然产生的分子的改变，这种改变可在原氨基酸序列或核苷酸序列中添加一个或多个氨基酸或核苷酸。

- 5 术语“免疫应答”指与炎症、创伤、免疫疾病、感染或遗传性疾病等有关的情况。这些情况受各种因素的影响，如细胞因子、趋化因子及其它信号分子的表达，它们可影响细胞和系统的防御体系。

术语“微矩阵”是指将不同的多聚核苷酸排列在一个基质上如纸、尼龙或其它任何一种膜、滤膜、芯片、玻片或任何其它合适的固体支持物。术语“元件”或“微矩阵元件”，指的是排列在一个基质表面的可杂交的多聚核苷酸。

- 10 术语“调节”指的是LYG2活性的改变。例如，蛋白活性或结合特征的改变，其它任何生物功能或免疫性质的增强或减弱。

- 术语“核酸”或“核酸顺序”指核苷酸、寡核苷酸、多聚核苷酸及其片断。它可指基因组来源的或合成的DNA或RNA，可以是单链也可是双链，可以是有义链或反义链，可以是肽核酸(PNA)，也可是任何DNA样或RNA样的物质。本文中，“片断”指翻译后可产生一段多肽的核酸序列，该多肽应保留原有原全长多肽的某种功能特征如抗原性或某种结构域特征，如ATP结合位点。
- 15

术语“寡核苷酸”指至少约6-60个核苷酸，较佳的约15-30个核苷酸，最佳的约20-25个核苷酸的核酸顺序，这些序列能被用于PCR扩增，用于杂交分析或微阵列中。

- 术语“肽核苷酸”大体等价于本领域中一般性地定义的术语“扩增引物”，“引物”，“寡聚体”和“探针”，“肽核酸”(PNA)是指一反义分子或抗基因药剂，它含有一段寡核苷酸，该寡核苷酸由至少长约5个连接在以赖氨酸结尾的氨基酸残基组成的肽骨架上的核苷酸组成。末端的赖氨酸使得该组分具有可溶性，肽核酸优先与单链DNA或RNA互补结合并终止转录延伸。(如，见Nicolson, P. E. 等人, 1993, Anticancer Drug Des. 8:53-63)。
- 20

- 25 术语“样品”在这里采用其最广泛的含义，一个可能含有编码LYG2的核苷酸，或其片段，或LYG2本身的生物样本(可能包括体液，细胞染色体、细胞器的提取物，或分离自细胞的膜)；细胞，存在于溶液中或结合于固体支持物上的基因组DNA、RNA或cDNA、组织、组织印迹等等。

- 术语“特异结合”或“特异性结合”是指蛋白或肽与激动剂、抗体或拮抗剂之间的相互作用，这种相互作用依赖于该蛋白特定结构的存在，如抗原决定簇或抗原表位。例如，如果一种抗体对表位“A”有特异性，则一种含有表位A的多肽的存在，或游离的未被标记的A的存在，均会在一个包含游离标记A和该抗体的反应中降低结合该抗体的标记A的量。
- 30

- 术语“严紧条件”是指能让多核苷酸与要求权利的多核苷酸杂交的条件。严紧条件可由盐浓度、有机溶剂浓度(如，甲酰胺，温度，或其它在本领域中为人熟知的条件
- 35

来界定的，尤其是可通过降低盐浓度，增加甲酰胺浓度，或提高杂交温度来增加严紧性）浓度来界定。

术语“基本纯的”是指取自天然环境并被分离的核酸或氨基酸序列，并且至少有60%，较佳的至少75%，最佳地至少90%与天然状态下伴随其的组分分离。

- 5 术语“取代”是指一个或更多的氨基酸或核苷酸分别被不同的氨基酸或核苷酸替换。

- 10 术语“转化”指的是外源DNA进入并改变一个受体细胞的过程，依据本领域中已知的种种方法，转化可以在自然或人工条件下发生，并可依据任何已知的方法使外来核酸序列插入原核或真核宿主细胞，转化方法要视将被转化的宿主细胞的类型而定，它可能包括（但不限于）病毒感染、电穿孔、电休克、脂转染法和粒子轰击。术语“转化的”细胞包括被稳定转化的细胞，在其中，插入的DNA能够以自主复制质粒或宿主染色体的一部分的形式复制，也包括被暂时转化的，在一定时期内表达插入DNA或RNA的细胞。

- 15 LYG2多肽的“变异形式”指改变了一个或多个氨基酸残基的一个氨基酸序列。该“变异形式”可具有“保守的”改变，其特征在于替代的氨基酸具有（与被替代者）相似的结构上的或化学上的性质。（例，用异亮氨酸取代亮氨酸）。更为罕见的是，一个变异形式可能具有“非保守的”改变（如，用色氨酸取代甘氨酸）。类似的次要变异也可能包括氨基酸缺失或插入，或两者皆有。

- 20 术语“变异形式”，在用于多核苷酸序列时，包括与LYG2相关的多核苷酸序列。这个概念也包含“等同的”（如上定义）、“剪接”“种间”或“多态”变异形式。一种剪接变异形式可能与参比分子有着显著的同源性，但由于mRNA加工过程中外显子的可变剪接，它通常有更多或更少数目的多核苷酸。其相应的多肽可能会有额外的功能结构域或结构域的缺失。种间变异形式是那些随着物种的不同而不同的多核苷酸序列。因而其编码的多肽相互之间通常会有显著氨基酸同一性。一个多态变异形式是指在同一不同个体之间某一特定基因的多核苷酸序列上的变异。多态变异形式还可能包括“单核苷酸多态性”（SNP，其中多核苷酸序列仅单个碱基改变）SNPS的存在或许显示了，如，某一特定人群，某一疾病状态，或某一疾病状态的倾向。

- 30 在对本发明中的蛋白，核苷酸序列和方法进行描述前，应理解本发明不限于所描述的特定的方法，操作手册，细胞系，载体和反应物，因为这些都是可能改变的。还应理解此处所用的术语仅仅为描述特定的具体情况，而不是为了限制本发明包括的范围，本发明的范围应由附加的权利要求书所限制。

必须注意，除非文中清楚地表明为特指，在附带的权利要求书中“一个”实际表示的是复数。举例说，“一个宿主细胞”指的是许多这样的宿主细胞，“一个抗体”指一个或更多的抗体或本领域人员熟知的其他相应物。

- 35 除非另有说明，此处所用的技术和科学术语都与本发明所属领域中所理解的意义

相同。虽然任何与此处描述的方法或材料相似或相同的方法和材料都可用于检测或重复本发明，仍有必要描述一下优先采用的方法、设备和材料。此处被引用的文章目的是描述和指出这些文章中报道的细胞系，载体和方法，而这些是和本发明有关的。

5 本发明是基于一种新的人类鹅型溶菌酶(LYG2)及编码 LYG2 的多核苷酸的发现，以及这些成分在诊断、治疗或预防自体免疫 / 炎症、肾脏、肾上腺疾病和癌症方面的应用。

10 在一个具体实施例中，本发明包括一个含有 SEQ ID NO：1 氨基酸序列的多肽 LYG2。LYG2 有 182 个氨基酸，在残基 T16，S26, T45 及 T153 处有四个潜在的蛋白激酶 C 的磷酸化位点。LYG2 还有一个潜在信号序列(残基 M1 到残基 S19 左右)。分析显示，从残基 S4 到 G174，LYG2 与溶菌酶 G 的特征序列有同源性，LYG2 与 LYG1 有化学和结构上的相似性，尤其是 LYG2 与人的鹅型溶菌酶具有 31.2% 的同一性。LYG2 与鸡的鹅型溶菌酶都具有四个在鹅型溶菌酶中保守的半胱氨酸，据推测这些半胱氨酸在 LYG2 的残基 C39，C53，C62 和 C92 处形成二硫键。LYG2 在 D117 处含有在鹅型溶菌酶的催化中心保守的天冬氨酸残基，而在另外两个催化中心的残基位点上有一个带电荷的 E105 残基和一个酸性的 Q127 残基。

15 本发明还包括 LYG2 的各种变异形式。首选的 LYG2 变异形式是与 LYG2 氨基酸序列至少有约 80%，更佳地至少约 90%，最佳的至少约 95% 的同一性，并至少包含一个 LYG2 功能或结构特征的变异形式。

本发明还包括编码 LYG2 的多核苷酸。在一个具体的实施例中，本发明包括一个含有 SEQ ID NO：2 序列的多核苷酸序列，该序列编码 LYG2。

20 本发明还包括编码 LYG2 的多核苷酸序列的变异形式。特别地，这样一个变异多核苷酸与编码 LYG2 的多核苷酸序列有至少约 70%，更佳地至少约 85%，最佳地至少约 95% 的多核苷酸序列的同一性。本发明的一个具体方面包括一个 SEQ ID NO：2 的变形式，它与 SEQ ID NO.2 有着至少约 70%，更佳的约 85%，最佳地至少约 95% 的多核苷酸序列同一性。任何一个上述多核苷酸变异形式均能编码至少包含一个 LYG2 的功能或结构特性的氨基酸序列。

25 本领域中的技术人员都知道，由于遗传密码的简并性，可能会产生许多编码 LYG2 的多核苷酸序列，其中一些与已知天然存在的基因的多核苷酸序列的相似性都很低，本发明还包括个由于选择了不同密码子组合而产生的多核苷酸序列的变异形式。这些组合是依照天然存在的 LYG2 的多核苷酸序列，采用标准三联体遗传密码而产生的。

30 LYG2 也可由基本不同的核苷酸序列编码，如：编码序列中包含有非天然存在的密码子；依照宿主对特定密码子的使用频率，可以选择密码子以增加存在于特定原核或真核宿主中肽的表达速率。其它大范围更改编码序列的理由包括产生具有更多合乎需要的性质的 RNA 转录本，如具有较天然序列产生的转录物有更长的半衰期。

35 本发明还包括编码 LYG2 衍生物，或其片段，或其完全通过合成化学合成的分段。在合成之后，利用本领域中所熟知的试剂，可以将合成序列插入许多可用的表达载体和

细胞系统中的任何一个。而且，可用合成化学法将突变导入编码 LYG2 或其任何一个片段的序列。

杂交之后的洗涤步骤也可在严紧度上变化。洗涤的严紧条件可由盐浓度和温度来限定。如上，洗涤的严紧度可通过降低盐浓度或增高温度来提高。例如，洗涤步骤的严紧盐浓度较佳地不高于 30mM NaCl 和 3mM 柠檬酸三钠，最佳地不高于约 15mM NaCl 和 1.5mM 柠檬酸三钠。洗涤步骤的严紧温度条件通常至少约 25°C，更佳地至少约为 42°C，最佳地至少约为 68°C。在一个较佳的实施例中，可在 25°C，30 mM NaCl，3mM 柠檬酸三钠和 0.1%SDS 条件下进行洗涤，在一个更佳的实施例中，可在 42°C，15mM NaCl，1.5mM 柠檬酸三钠和 0.1%SDS 条件下进行洗涤步骤。在一个最佳的实施例中，可在 68°C，15mM NaCl，1.5mM 柠檬酸三钠和 0.1%SDS 条件下进行洗涤步骤。这些条件的种种有用处的改变为本领域内的技术人员所熟悉。

本领域中，DNA 测序和分析的各种方法为众人所熟知。这些方法能利用各诸如 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段，Taq DNA 聚合酶或是各种聚合酶和校正外切核酸的组合。较佳地，测序预备可由热循环控制设备和仪器自动完成，测序也可自动完成，例如使用 ABI 377 测序系统(PE Biosystems)。序列可由本领域中众所周知的计算机程序和算法来分析(如 PCGENE, Clustal 等)。

利用部分核苷酸序列和各种本领域已知的基于 PCR 的方法来检测上游序列(诸如启动子和调控元件)可将编码 LYG2 的核酸序列进一步延伸。例如，利用通用引物和嵌套引物可从克隆在载体上的基因组 DNA 中扩增未知序列(如见 Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic, 2: 318-322)。另一种方法，反向 PCR 利用向不同方向延伸的引物来从环状的模板上扩增未知序列。该模板来源于含有已知基因组座位和周围序列的限制性片段(如见, Triglia, T. 等人(1988) Nucleic Acids Res. 16: 8186)，第三种方法是捕获 PCR，它涉及扩增人的和酵母的人工染色体中邻近已知序列的 DNA 片段(如见, lagerstrom, M. 等人(1991) PCR Methods Applic. 上 111-119)。这种方法可用许多限制性酶消化和连接的手段将一双链核苷酸序列插入未知序列的区域，再在进行 PCR。其它可用于获取未知序列的方法在本领域中已为人们所知。(如见, Parker, J. D. et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 3055-3060)。此外，人们可用 PCR 和嵌套引物进行基因组 DNA 步移。这个过程无需筛选文库并有利于寻找内含子 / 外显子接头。对所有基于 PCR 的方法而言，引物的设计可利用市售软件，如 OLG04.06 Primer Analysis Software (National Biosciences Inc. Plymouth, Minn.) 或其它合适的程序来完成，其长度约为 22-30 核苷酸，GC 比约 50% 或更高，并可在约 68°C-72°C 的温度下与模板进行退火反应。

当筛选全长 cDNA 时，利用已经过大小选择并含有较大的 cDNA 的文库较佳。当用一个寡聚 d(T) 文库不能获得全长 cDNA 时，选用随机引物文库较适合，因为它经常包含基因的 5' 区域的序列，基因组文库可用于将序列扩延伸至 5' 端非转录调控区域。

市售毛细管电泳系统可用于分析或确认测序产物或 PCR 产物的大小或核苷酸序列。尤其是毛细管测序系统，该系统将可流动的多聚物用于电泳分离；四种不同的荧光染料以产生核苷酸特异的、由激光激发的荧光；电荷藕合照相机装置用于检测荧光发射的波长。利用合适的软件(如：GENOTYPER 和 SEQUENCE NAVIGATOR analysis software
5 (PE Biosystems)可将输出 / 光强度转换为电信号，而且从上样到计算机分析和显示电子数据的全过程可由计算机控制，毛细管电泳尤其适用于对特定样品中的有限量的 cDNA 小片段进行测序。

在本发明的另一实施例中，编码 LYG2 的多核苷酸序列或其片段可克隆在重组 DNA 分子，该分子能在合适的宿主细胞中指导 LYG2，或其片段，或其功能等价物的表达。
10 由于固有的遗传密码的固有简并性，可利用其他编码与 LYG2 的氨基酸序列大体相同或功能等价的 DNA 序列来表达 LYG2。

在另一个实施例中，利用本领域众所周知的化学方法(见，如 Caruthers, M. H. 等人(1980)Nucl. Acids Symp. Ser(Z) 215-223, Hom. T. 等人(1980)Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232)可全部或部分合成编码 LYG2 的序列。或者 LYG2 本身或其片段也
15 可用化学方法合成。例如，用各种固相技术(见，如 J. Y. Rdearge 等人(1995)Science 269:202-204)可进行多肽合成，利用 ABI model 43/A 肽合成仪(PE Biosystems)可进行自动合成。此外，在，LYG2 或其任何一部分的氨基酸序列都可通过定向合成和 / 或与来自其它蛋白的其任何部分相融合而产生变异多肽。

该肽可由制备型的高效液相色谱来基本纯化。(见，R.M.Chiez 和
20 F.Z.Regrier(1990)Methods Enzymol. 182:392-421)。通过氨基酸分析或测序可证实合成肽的成分(见，如 T.Creighton (1984) Proteins, structures and Molecular Properties, WH Freeman and CO., New York, N.Y.)。

为了表达具有生物活性的 LYG2，将编码 LYG2 及其衍生物的核苷酸序列插入到合适的表达载体中，如，一个含有能在合适的宿主中对插入的编码序列进行转录和翻译调
25 控的必要元件的载体。这些元件包括诸如增强子，组成型和诱导型启动子，载体和编码 LYG2 的多核苷酸序列的 5'和 3'非翻译区，这些元件在其调控能力和特异性上各不相同。特异性的起始信号可使编码 LYG2 的序列进行更有效的翻译。这类信号包括 ATG 起始密码子及其相邻的序列。如 KOZAK 序列，倘若编码 LYG2 的序列和其起始密码子及上游调控序列都插入了适宜的表达载体，则无需其它的转录或翻译调控信号。然而，如果仅仅
30 是编码序列，或其一个片段插入了载体，则包括一个在框 ATG 起始密码子在内的外源翻译，调控信号就必需由载体来提供。外源翻译元件和起始密码子可以有不同的来源——既可以是天然的也可以是合成的。含有适于特定宿主细胞系统所用的增强子可提高表达效率。(见，如，D. Scharf 等人(1994)Results Probl. Cell Differ. 20: 125-162)。

用本领域技术人员所熟知的种种方法，可以来构建包含有编码 LYG2 的序列和合适
35 的转录、翻译调控元件的表达载体。这些方法包括：体外重组 DNA 技术、合成技术及体

内遗传重组。(见,如 Sambrook 等人(1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold spring Llarbor Press, Plainview, N.Y., 第 4.8 和 16-17 章, 和 F.M. Ausbel 等人(1995, 及定期增刊)*Current Protoecols in Molecular Biology*, John wiley of sons, new york, n.y 第 9.13 和 16 章)

5 可用不同的表达载体 / 宿主系统来包装并表达 LYG2 编码序列。它们包括(但不限于)微生物,如转化重组噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体的细菌的;转化酵母表达载体的酵母;用病毒表达载体(如:杆状病毒)感染的昆虫细胞体系;用病毒表达载体或加括号细菌表达载体(如 Ti 质料或 pBR332 质粒), (如:花椰菜花叶病毒(CaMV)或烟草花叶病毒(TMV))转化的植物细胞体系;或动物细胞体。本发明并不被所用的宿主细胞所限制。

10 在细菌体系中依据编码 LYG2 的多核苷酸序列的预期用途对克隆和表达载体可有多种选择。例如,编码 LYG2 的多核苷酸序列的常规克隆、亚克隆及增殖可以用诸如 PBLUESCRIPT 噬菌粒(Stratagence)或 PSPORT2 质粒(Life Technologies)等的多功能大肠杆菌载体来进行。由于 LYG2 编码序列与载体多克隆位点的连接会破坏 LacZ 基因,这使得对含有重组分子的转化细菌进行比色筛选成为可能。此外,这些载体对体内转录、双脱氧测序,协同辅助噬菌体进行的单链拯救,以及在所克隆的序列中造成嵌套缺失很有用处(见,如 Van rleeke, G. 和 S.W.Schuster (1989)*J. B. Chem.* 264:5535-5509)。当需要大量的 LYG2, 如,用于产生抗体时,就要用 LYG2 定向高水平表达的载体。例如,可以用含有强诱导型 T5 或 T7 噬菌体启动子的载体。

20 酵母表达系统可用于生产 LYG2。许多含有组成型或诱导型启动子(如 α 因子,醇氧化酶及 PGH)的载体可用于酿酒酵母或 pichia Pastors 中。此外,这些载体可引导表达蛋白分泌或滞留于胞内,并能够将外来序列整合进宿主的基因组以稳定增殖。(见,如 Ausube, supra;和 grant 等人(1987)*metheds enzymol.* 153: 516-554; C.A. Scorer 等人(1994)*Bio/technology*12:181-184)。

25 植物系统也可用于表达 LYG2。LYG2 编码序列的转录可由病毒启动子,如单独使用或与 TWV 的 Ω 前导序列联合使用的 Camv19S 和 35s 启动子(N.Takamatsn (1984)*S224:838-834*, 及 J.Winter 等人(1191)*results probl. Cell differ.* 17:85-105);或者,如 RUBISCO 的小亚基或热休克蛋白的启动子等植物启动子(CoruLYG2i, G. et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. et al. (1984) *Science* 224:838-843; and Winter, J. et al. (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105.)。这些构建物可通过定向 DNA 转化或病原体介导的转染而导入植物细胞。(见,如, S.Hobbs 或 L.E. Murry 在 MCGRAW HILL YEARLOOK OF SCIENCE AND Technology (1192). 191-196 页, Mcgraw hill, New York, N.Y.)

30 在哺乳动物细胞中,有多个基于病毒的表达系统可用。若用腺病毒作为一个表达载体,则可将 LYG2 编码序列连接到由晚期启动子和三联体前导序列构成的腺病毒转录

/ 翻译复合体上。在病毒基因组非必需的 E1 或 E3 区的插入可用于获取在宿主细胞中表达 LYG2 的感染性病毒(见, 如 J. Logan 和 T. Shenk(1984) Proc. Natl. Acad. Scio81: 3655-3659)。另外, 转录增强子, 如劳氏内瘤病毒(RSV)增强子, 可用于提高在哺乳动物宿主细胞中的表达。基于 SV40 或 EBV 的载体也可用于高水平蛋白表达。

- 5 人工染色体(HACS)也可用以递送较质粒所能包装并表达的 DNA 片段更大的 DNA 片段。由常规的递送方式(脂质体, 聚阳离子氨基多聚物或囊泡), 可以构建并运送约 6Kb-10Mb 的 HACs 用于治疗目的。(见, 如 J.T.Harrington 等人(1997)Nat. Genet. 15:345-355)。

- 10 为了在哺乳动物系统中长期产生重组蛋白, 首先要使 LYG2 在细胞系中稳定表达。例如, 利用含有病毒复制起点和 / 或内源表达元件以及位于同一个载体或不同载体上的选择性标记基因的表达载体, 可将 LYG2 编码基因转化进入细胞系。导入载体之后, 可让细胞在转移到选择培养基之前先在富集培养基上生长约 1-2 天。选择性标记的目的在于赋予对选择剂的抗性, 且它的存在可让成功表达导入序列的细胞生长、恢复。根据细胞类型采用合适的组织培养技术可使稳定转化细胞的抗性克隆增殖。

- 15 尽管标记基因表达的存在或不存在暗示了我们感兴趣的基因也存在, 但该基因的存在与表达尚需确证。例如, 如果 LYG2 编码基因插入了标记基因序列内, 则可通过标记基因功能的丧失来鉴定含有 LYG2 编码序列的转化细胞。或者, 将标记基因与 LYG2 编码序列串联放置, 并处在单一启动子的控制下, 诱导或选择的作用下标记基因的表达通常也显示了串联基础的表达。

- 20 一般地, 利用各种本领域技术人员已知的方法步骤, 可以鉴定含有 LYG2 编码核酸序列的和表达 LYG2 的宿主细胞。这些方法步骤包括, 但不限于, DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交, PCR 扩增, 以及包括各种基于膜、溶液、芯片对核酸和蛋白质序列进行检测的方法在内的测定方法。或是利用特异性的多克隆抗体或的单克隆抗体以检测和测量 LYG2 表达, 这些免疫学方法在本领域中是已知的。这类技术的例子包括有酶联免疫吸附测定(ELISAS), 放射免疫测定(RIAS), 以及荧光激活细胞分选(FACS)。利用对 LYG2 上两个相互独立的表位有活性的单克隆抗体而进行的基于单克隆的双位点免疫测定方法当为首选, 但也可采用竞争性结合测定法。这些测定方法和其它测定方法在本领域中为人所熟知(见, 如, R. Hampton 等人(1990) serological methods, a laboratory manual, APS Press, stpaul minn. 第 IV 部分; J.Z.coligan 等人(1997, 及定期增刊)Current
25 Protocols in ImMmnology, Greene Pub. Associates and wiley-interscience, New York, N. Y.; 及 D. E. maddox 等人(1983)J. Exp. med. 158:1211-1216)

- 30 大量的标记和连接技术为本领域中的技术人员所知, 这些技术可用于各种核酸和氨基酸分析。用以产生标记杂交探针和 PCR 探针、以检测与编码 LYG2 的多核苷酸相关序列的的方法包括, 寡核苷酸标记, 缺刻平移, 末端标记或用标记的核苷酸进行的 PCR
35 扩增, 或者, 编码 LYG2 的序列或其任何一个片段都可被克隆进载体以产生 mRNA 探针,

这类载体在本领域内是已知的，且有市售。通过添加对诸如 T7、T3 或 SP6 的合适的 RNA 聚合酶及标记的核苷酸，这类载体可用于体内合成 RNA 探针。利用各种市售的试剂盒，如 Amersham pharmacia Biotech and proanega (Maddison, wis) 提供的试剂盒，可以完成这些流程。合适的报告分子和标记可使检测工作易于进行，这些分子和标记包括放射性同位素，酶、荧光剂，化学发光剂或生色剂，也包括底物，辅助因子，抑制剂，磁性颗粒，以及类似物。

转化有编码 LYG2 的核苷酸序列的宿主细胞可在适于蛋白表达和从细胞培养物中回收蛋白的条件下培养。转化细胞产生的蛋白是分泌出去还是停留于细胞内，取决于所用的序列和 / 或载体。本领域的技术人员应当理解，含有编码 LYG2 的多核苷酸的表达载体可设计成包含信号序列，该序列指导 LYG2 分泌通过原核或真核细胞膜。

此外，宿主细胞株的选择可依据该细胞株对插入序列的表达的调控或修饰能力。多肽的这类修饰包括，但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化，及酰化。蛋白质前体的翻译后加工可以限定蛋白质靶向、折叠和 / 或活性。具有特异的蛋白翻译后加工能力或机制的不同宿主细胞，可以从美国模式培养物保藏物 (American, Type Culture Collection) 处得到 (ATCC, Bathesda, Md)，可以对这些宿主细胞加以选择以确保对外来蛋白的正确加工和修饰。

在本发明的另一实施例中，可以将编码 LYG2 的天然的、经修饰的或重组的核酸序列连接到一个异源序列上，在任何一个上述的宿主系统中表达融合蛋白。例如，含有可被市售抗体识别的异源成分的嵌合 LYG2 蛋白能有助于对肽文库的筛选，从而获得有抑制 LYG2 活性的抑制剂。异源蛋白成分和多肽组分还可促进利用市售亲和性基质对融合蛋白的纯化。这类组成成分包括，但不限于，谷胱甘肽 S 转移酶 (GST)，麦芽糖结合蛋白 (MBP)，硫氧还蛋白 (Trx)，钙调蛋白结合肽 (CBP)，6-His，FLAG，C-MYC 和红细胞凝集素 (HA)。GST、MBP、TRX、CBP 和 6-His 能分别在固定化的谷胱甘肽、麦芽糖、氧化苯肼、钙调蛋白树脂和金属螯合树脂上纯化相应的融合蛋白。利用市售的特异识别这些表位标签的单克隆和多克隆抗体，用 FLAG、c-MYE 和血凝素 (HA) 来免疫亲和纯化融合蛋白。此外，可以人工构造融合蛋白，让它在 LYG2 编码序列和异源蛋白序列之间包含一个蛋白裂解位点，从而使得 LYG2 在纯化后可与异源成分裂解分开。

在本发明的一个更为深入的实施例中，可以完成放射性标记的 LYG2 的体外合成。这些系统偶联了 T7、T3 或 SP6 启动子的蛋白编码序列的转录和翻译。翻译发生在有放射性标记的氨基酸前体，较佳地为 Sup^{35}S -甲硫氨的条件下。

LYG2 的片段不仅可以由重组产物来产生，也可以直接用固相合成技术中的直接肽合成来产生 (见，如，Creighton, supra, pp55-60)。蛋白质合成可通过手工 (操作) 技术或自动化技术来进行，例如，使用 ABI msdel 43/A 肽合成仪 (PE Biosystems) 可完成蛋白质的自动合成。可分别合成 LYG2 的各种片段，然后将它们结合起来以产生 LYG2 的全长分子。

在 LYG2 和来自人的鹅型溶菌酶 LYG2 之间存在着化学上和结构上的相似性。此外 LYG2 在癌性组织、发炎的组织、肾组织、乳房组织、肾上腺组织、结肠组织和神经组织中有表达。因而，LYG2 主要在自体免疫炎症、肾脏和肾上腺的疾病及癌症方面起作用。

5 因此，在一个实施例中，LYG2 或其片段或其衍生物可施与受试对象以治疗或预防自体免疫 / 炎症疾病。这类自体免疫 / 炎症疾病包括(但不限于)：获得性免疫缺陷综合征(AIDS)，阿狄森氏病(慢性肾上腺皮质机能减退症)，成人呼吸障碍综合症、过敏、关节强硬性脊椎炎、淀粉状蛋白病、贫血、哮喘、动脉粥样硬化，自体免疫溶血性贫血，自体免疫性甲状腺炎、脚气、胆囊炎、接触性皮炎、局限性回肠炎、过敏性皮炎，支气管
10 管炎、糖尿、肺气肿，阶段性淋巴球减少症及淋巴肉芽肿，骨髓成红细胞增多症，红斑、萎缩性胃炎、血管球性肾炎，肺出血肾炎综合症、痛风、突眼性甲状腺肿、桥本甲状腺炎、嗜酸细胞综合症，急性肠炎、硬化症、重症肌无力、心肌炎或心包炎、骨关节炎、骨质疏松症、胰腺性，多神经炎，牛皮癣，赖特综合症，风湿性关节炎，硬皮病，斯耶格伦综合症，系统性过敏，系统性狼疮、系统性硬化，血小板减少性紫癜，溃疡性大肠
15 性，葡萄膜炎，成人早老症，并发性癌症，血渗析及体外循环，病毒性的、细菌性、真菌性的、寄生虫性的、原动物性的及肠道寄生虫性的感染和外伤。

在另一个实施例中，可将能表达 LYG2 或其片段或其衍生物的载体施与受试对象以治疗或预防自体免疫 / 炎症的疾病，这些病包括(但不限于)上述的那些疾病。

在再一个的实施例中，可将一含有基本纯的 LYG2 的药物成分连同合适的药物
20 载体一起施与受试对象来治疗或预防自体免疫 / 炎症的疾病，这些包括(但不限于)上述的那些疾病。

在又一个实施例中，可将调节 LYG2 活性的激动剂施与受试对象以治疗或预防自体免疫 / 炎症的疾病，它们包括(但不限于)以上列举出的疾病。

因此，在另一个实施例中，LYG2 或其片段或其衍生物可被施与受试对象以治疗或
25 预防肾脏疾病。这类肾脏疾病包括(但不限于)：肾脏淀粉样变性，肾型高血压；醛固酮过多症；阿狄森氏病；肾衰竭；血管球性肾炎；慢性血管球性肾炎；肾囊病变及发育畸形，如多囊病，肾发育异常以及皮质或髓质囊，遗传性肾发育不良症(PRD)，如：陷性的和常染色体占优势的 PRO；髓质囊性病；肾脏海绵体样髓质及管状发育异常；Alprot 氏综合症；影响肾脏生理功能的非肾脏癌症，如：支气管瘤，或脑基部瘤；多
30 种骨髓瘤；肾脏腺癌；转移性肾癌；由消化、注射、吸入或吸收任何药剂、化学试剂或生物试剂，如重金属、任何抗生素、镇痛药、溶剂、草酸中诱发剂、抗癌药、除草剂、杀虫剂、植物性和生物性的因素或抗癫痫药引起的对肾脏有害的疾病。

在另一个实施例中，可将能表达 LYG2 或其片段或衍生物的载体施与受试对象以治疗或预防肾脏疾病，这些疾病包括(但不限于)上述的那些疾病。

35 在再一个实施例中，可将含有基本纯 LYG2 的药物成分连同合适的药物载体一

起施与受试对象以用来治疗或预防肾脏疾病，它们包括(但不限于)上面所提供的疾病。

在又一个实施例中，可将调节 LYG2 活性的激动剂施与受试对象以治疗或预防肾脏疾病，它们包括(但不限于)以上列举的疾病。

因此，在另一个实施例中，LYG2 或其片段或其衍生物可被施与受试对象以治疗或
5 预防肾上腺疾病。此类肾上腺疾病包括(但不限于)：肾上腺皮质的增生、癌或腺瘤，碱中毒相关的高血压，淀粉样变性病，血钾过少，库欣病，liddle 氏综合症以及 Arnold-Healy-Gorden 综合症，嗜铬细胞瘤，以及阿狄森氏病。

在另一个实施例中，可将能表达 LYG2 或其片段或其衍生物的载体施与受试对象以治疗或预防肾上腺疾病，它们包括(但不限于)上述的疾病。

10 在再一个实施例中，可将一个含基本 LYG2 的药物成分连同合适的药物载体一起施与受试对象来治疗或预防肾上腺疾病，它们包括(但不限于)以上提供的疾病。

在又一个实施例中，可将调节 LYG2 活性的激动剂施与受试对象来治疗或预防肾上腺疾病，它们包括(但不限于)以上所列出的疾病。

在再一个实施例中，可将 LYG2 的拮抗剂施与受试对象以治疗或预防癌症。这样的
15 癌症包括(但不限于)：腺瘤，白血病，淋巴瘤，黑素瘤，骨髓瘤，肉瘤，畸胎瘤，且尤其包括：肾上腺癌，膀胱癌，骨癌，骨髓癌，脑癌，乳腺癌，子宫颈癌，胆囊癌，神经中枢癌，胃肠道癌，心脏癌，肾脏癌，肝癌，肺癌，肌癌，卵巢癌，胰腺癌，甲状旁腺癌，阴茎癌，前列腺癌，唾液腺癌，皮肤癌，脾癌，睾丸癌，胸腺癌，甲状腺癌以及子宫癌。一方面，特异性结合 LYG2 的抗体可以作为拮抗剂而被直接利用或是作为将药剂
20 带入表达 LYG2 的细胞或组织的靶向机制或递送机制而被间接利用。

在一个附加的实施例中，可将一个表达 LYG2 编码多核苷酸的互补链的载体施与受试对象，为了治疗或预防癌症，这类癌症包括(但不限于)上述的癌症。

在另一个实施例中，本发明中的任何一个蛋白、拮抗剂、抗体、激动剂、互补序列或载体都可结合其他合适的治疗药剂一起施用。依照常规的药物学原理，本领域中的
25 普通技术人员就能完成用于复合疗法的合适药剂的选择。不同治疗药剂的复合可以协同作用而影响上述各种疾病的治疗和预防。通过这种途径，人们用更少剂量的各种药物就能达到治疗功效，因而也降低了不利副作用的可能性。

运用本领域中通常已知的方法就可产生 LYG2 的拮抗剂。特别地，纯化的 LYG2 可以用来产生抗体，或是用来筛查药剂库以鉴定特异性结合 LYG2 的药剂。针对 LYG2 的抗
30 体还可利用本领域中为人熟知的方法来产生。这类抗体包括(但不限于)：多克隆抗体；单克隆抗体，嵌合抗体和单链抗体，Fab 片段，以及由 Fab 表达文库产生的片段。中和抗体(如：抑制二聚体形成的中和抗体)，尤为适用于治疗。

为产生多克隆抗体，可注射 LYG2 或其任何具有免疫原性的片段或寡肽来免疫各种宿主，它们包括山羊、兔、大鼠、小鼠，人及其它宿主。对于涉及产生单克隆抗体的下游应用而言，大鼠和小鼠是首选的宿主。为增强免疫应答，根据宿主的不同可选用各种
35

佐剂。这样的佐剂包括(但不限于): Freund's 佐剂; 矿物凝胶, 如氢氧化铝; 表面活性物质, 如溶血卵磷脂; 聚阳离子; 油乳剂; 匙孔戚血蓝蛋白(KLH); 以及二硝基苯酸。在用于人的佐剂中, BCG(卡介菌)尤为适宜。(关于对抗体产生和分析方法的评论, 可见, 如, E. Harlow 和 D. Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)。

5 5 更佳地, 用于诱导产生针对 LYG2 的抗体的寡肽、肽或片段具有一个至少约由 5 个氨基酸构成的氨基酸序列, 更佳地, 至少约由 14 个氨基酸构成。更佳地, 这些寡肽或其片段与天然蛋白的部分氨基酸序列是同一的, 并且包含了一天然存在的小分子的完整的氨基酸序列。短的 LYG2 氨基酸片段可以与另一蛋白如 KLH 的短氨基酸片段融合, 从而可以用于产生针对嵌合分子的抗体。

10 10 制备 LYG2 的单克隆抗体, 可利用培养连续传代细胞株以产生抗体分子的技术。这些技术包括(但不限于): 杂交瘤技术, 人类 B 细胞杂交瘤技术, 以及 EBV 杂交瘤技术。(见, G. Köhler 等人(1975) *Nature* 256:495-497; D. Kozbor 等人(1985) *J. Immunol. Methods* 1:31-42; R. J. Cote 等人(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030; 以及 S. P. Cole 等人(1984) *Mol. Cell Biol.* 62:109-120)。

15 15 此外, 可利用已开发的用于产生“嵌合抗体”的各种技术, 如将小鼠抗体基因剪接到人的抗体基因上以获取具有合适的抗原特异性和生物活性的分子。(见, M. S. Newberger 等人(1984) *Nature* 312:604-608 和 S. Takeda 等人(1985) *Nature* 314:452-454; 以及 S. L. Morridon 等人(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855)。或者, 利用本领域中已知的方法, 可以利用上述用以产生单链抗体的技术来产生 LYG2 特异性的单链抗体。通过免疫球蛋白文库的链随机组合改组, 可以产生具有相关特异性而又不同的独特型抗体(见, 如 D. R. Burton (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:10134-10137)。

20 20 可以在体内淋巴细胞群中诱导抗体的生成。或者, 如同文献中所揭示的那样, 通过筛选免疫球蛋白文库或系列高特异性结合的试剂来产生抗体。(见, R. Orlandi 等人(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:3833-3837; 以及 G. Winter 等(1991) *Nature* 349:293-299)

25 25 也可产生含有 LYG2 特异性结合经点的抗体片段。这类片段包括(但不限于): 用胃蛋白酶消化抗体分子而产生的 $F(ab)'_2$ 片段, 以及还原 $F(ab)'_2$ 片段的二硫桥而产生的 Fab 片段。或者, 构建 Fab 表达文库以便快速而简单地鉴定带有所预期的特异性的单克隆 Fab 片段。(见 W. D. Huse 等人(1989) *Science* 246:1275-1281)。

30 30 许多免疫测定法可以用于抗体筛选, 以便鉴定出兼有所期望的特异性和最小交叉反应性的抗体。本领域中有许多已知的免疫测定方案。这些方案利用单克隆抗体或多克隆抗体进行竞争性结合或免疫放射分析。通常包括对 LYG2 与其特异性抗体形成的复合物的测量, 利用对 2 个相互不干扰的 LYG2 抗原表位具有反应性的单克隆抗体进行的基

于单克隆、双位点的免疫分析法则更佳，但竞争性结合分析法也可以应用。

通过估计这些多抗的滴度和亲合度可以进一步确定它们的质量及对某种下游应用的适合度。例如，一种多克隆抗体制备物至少应含 1-2mg 特异性抗体/ml，且最好为 5-10mg/ml，才适用于需要进行 LYG2-抗体复合物沉淀反应的实验操作。测定抗体特异性、滴度、亲合度的方法，以及在各种应用中抗体性质和用途的说明介绍通常是易得到的(参见 e.g. catty, supra and doligan et al. supra)。

在本发明的另一实施例中，编码 LYG2 的多核苷酸，或其片段，或其互补序列可被用于治疗。一方面，编码 LYG2 的多核苷酸的互补序列可用于阻碍 mRNA 转录。一定条件下，细胞可被编码 G OLY 的多核苷酸的互补序列所转化。因此，互补分子或互补片段可用于调节 LYG2 活性，或调节基因功能。现在在本领域中这种技术是很普遍的，寡聚核苷酸或大片段或它们的反义序列可通过 LYG2 编码序列上的编码区或控制区上的各种位点来设计。

各种源于逆转录病毒、腺病毒、疱疹病毒、痘病毒或各种细菌质粒的表达载体可用于将核苷酸序列转入目的器官、目的组织或细胞群中。本领域技术人员熟知的各项技术可用于构建载体，以表达 LYG2 编码序列的互补序列(见， e.g., sambrook supra, and Ausubel, supra)。

通过用可高水平表达多核苷酸的表达载体转化细胞或组织，编码 LYG2 的基因或其片段可被关闭。这一类构建物可用于介导非翻译序列或反义序列进入细胞。即使在与 DNA 缺乏整合性的情况下，这一类载体可以继续转录 RNA 分子直至内源核酸酶使它们失活。在不能复制载体的情况下，瞬时表达可持续一个月或更长，如在载体系统具有合适的复制因子的情况下，持续时间可进一步延长。

如上所述，通过对 LYG2 编码基因的控制区、5'区或调控区的互补序列或反义分子(DNA， RNA 或 PNA)进行设计，可以对表达基因进行修饰。来源于转录起始位点处的寡核苷酸，例如来源于-10 到+10 区的寡核苷酸是优先的选择。类似地：抑制作用可通过三螺旋碱基配对法产生。由于它使双螺旋链不能充分解链，从而抑制了 DNA 与多聚酶、转录因子或调控分子的结合，故非常有用，近来利用三螺旋 DNA 的疗法已在文献中有所阐述(见 e.g., gee, j.e. 等(1994)in Huber, B. E. and B.I. carr, holecnlar and Immunologic Aproaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.T., PP163-177)。通过设计互补序列或反义分子可以阻碍 mRNA 结合于核糖体而抑制 mRNA 的翻译。

核酶，是具有酶活性的 RNA 分子，也可用于催化 RNA 特异切割位点的裂解。核酶反应的机制涉及到核酶分子与互补靶 RNA 的特异性结合，随之是靶 RNA 的裂解。例如，人工合成的锤型花式的核酶分子可特异性并有效地催化 LYG2 编码序列的裂解。靶 RNA 上任何潜在的的特异性核酶作用位点可由扫描靶分子初步检测出，这些位点包括以下一些序列：GUA、GUU 和 GUC。与靶 RNA 中核酶作用位点对应的短 RNA 序列(15 ~ 20bp)一旦被检出，就应对其二级结构进行估测，因为某些二级结构会使得寡核苷酸无法被操

作。候选目标的适合性也可通过 RNA 酶保护分析法测试其与互补寡核苷酸的杂交难易来确定。

本发明中的互补核糖核酸分子及核酶可通过本领域中任何已知的合成核酸分子的方法来制备。这些技术中包括化学合成法，如固相亚磷酰胺固相合成法。此外，RNA 分子可由 LYG2 的编码序列的体外转录或体内转录而产生。这些 DNA 序列可克隆至一大类具有 T7 或 sp6RNA 多聚酶启动子等合适启动子的载体中。或者，也可将组成型或诱导型地合成互补 RNA 的 cDNA 构建物导入细胞株、细胞或组织中。

RNA 分子可加以修饰以增进其在胞内的稳定性和半衰期。可能的修饰形式包括(但不限于)在分子的 5'和、或 3'末端加上侧翼序列，或用硫代磷酸酯键或 2'O-甲基键代替分子主链间的磷酸二酯键连接。这些修饰形式同样适用于 PNAs 的制备并可被扩展到其它核苷酸分子中，包括非普通碱基如肌苷、也包括酰基化、甲基化、硫化或其它类似修饰形式的胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤及尿嘧啶。这些修饰形式不易为内源核酸内切酶识别。

有许多方法可制备导入细胞或组织的载体，并同样适于体内和体外疗法。对于 ex vivo 疗法，载体先导入从病人身上取出的干细胞中，再克隆增殖细胞，通过自体移植又转回原病人中。

上述方法可通过转染、淋巴注射、或聚阳离子氨基聚合物等方式达到导入载体的目的(Goldamn. C. K. et al. 1997. Nature Biotechnology 15:462-466)。可用于需要此疗法的任何对象，包括：哺乳动物如狗、猫、牛、羊、兔、猴，最佳的是人类。

在本发明的另一实施例中，涉及到药物组分或无菌组分与可载药的载体相配合的使用以达到上述治疗效果的问题。这些药物组份包括 LYG2，LYG2 的抗体以及 LYG2 的模拟物、兴奋剂、拮抗剂、抑制剂，这些组份可被单独使用或至少与一种其它药剂配合使用。如一种稳定的可用于任何无菌的、可在生物体内存在的包括(但不限于)盐水、缓冲盐水、葡萄糖水，的复合物。这些组份可单独施用于病人，或与其它药剂药物及激素配合使用。

本发明中的药物组份可通过任何途径施用。包括(但不限于)：口服、静脉注射、肌注、动脉注射、骨髓注射、皮下注射或腹膜注射方式。

除了活性组份以外，这些药物成份还包括合适的含激发剂和辅剂的可承载药物的载体，它有助于将活性复合物转为可使用的药物成份。更进一步的生成和使用技术细节参见最新版的 remington's pharmaceutical silences lmaack publishing. Co., Easton, pa.。

供口服的药物成份可用本领域中为普通技术人员所知的适合口服的各种药剂载体承载。这些药物成份以药片、药丸、糖丸、胶囊、流质、悬浮剂等形式供病人吸收。

制备供口服的药物时，可将活性成份与固体固型剂混合研磨成颗粒状混合物，再制成药片或糖丸核心，并可以加上适当的辅剂。合适的固型剂包括糖和蛋白类填充剂，

包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖酶，从玉米、麦、米、土豆或其它植物中提取的淀粉，纤维素如甲基化纤维素或-纤维或甲基钠纤维素，树胶以及蛋白如明胶、胶原。需要的话，还可加上分散剂和促溶剂，如琼脂、藻酸及其盐，如固体藻酸盐。

5 糖丸核心必须与合适的包衣结合，如饱和糖溶液，(也可含阿拉伯树胶，聚乙烯吡咯烷酮，聚乙烯二醇和/或二氧化钛)及合适的有机溶剂或混合溶剂，可在药片或色素以区分产品或标明活性成份的数量，如剂型等。

可口服的药物制成品包括由明胶制成的契合型胶囊和由明胶及葡萄糖酶、山梨糖酶三类色衣制成的软的、密封的胶囊。契合型胶囊除含有活性成份外，还含有填充型和结合(如乳糖或淀粉)、润滑剂(如 talcum 粉或硬脂酸镁)，此外还有稳定剂。在软胶囊
10 中，活性成份溶解或悬浮在合适的液体中。如油脂，液体或聚乙烯二醇液体，它们中可加入稳定剂。

注射用药物剂型可以是水溶液配方的，更佳地是生理兼容性缓冲液如 Hanks 溶液或生理盐水。注射剂可含有可增加悬浮液粘度的物质如羧甲基钠纤维素，山梨糖醇或右旋糖苷，此外，活性复合物悬浮液亦可制成油脂型的悬浮注射剂。合适的亲脂性溶剂或
15 媒介物包括脂肪，(如芝麻油)，或合成脂肪酸酯，(如乙基油酸盐)，三甘油酯，或脂质体。非脂质聚阳离子氨基高聚物亦可用作媒介物。此外，悬浮液也可含适用的稳定剂或增加复合物溶解性的药剂，以制备高浓度的溶液。

用于局部或鼻部给药的配方中，含有本领域中通常所知的可透过特殊障碍的渗透剂。

20 本发明中的药剂成份可通过本领域中的已知的方式生产：如常规的混合、溶解、颗粒、制丸、研粉、乳化、封装或冻干过程。

这些药物成份能与多种酸结合形成盐，并以盐的形式保存。这些酸包括(并不限于)：盐酸、硫酸、醋酸、乳酸、酒石酸、苹果酸及琥珀酸。盐较之相应的基本成分而言更易溶解于水溶液或其它质子溶剂中。在其它例子中，更佳的制成品是冻干粉形式的，
25 可包括以下部分或全部成份，1mm-50mm 的组氨酸，0.1%到 0.2%蔗糖，2%到 7%的甘露醇，PH 范围为 4.5 到 5.5，将它们在使用前与缓冲液混合。

在另一实施例中，与 LYG2 特异性结合的抗体可用表达于以 LYG2 为特征的疾病的诊断，或用于对给予 LYG2 或 LYG2 的激活剂，拮抗剂或抑制剂治疗的病人的监控分析。用于诊断目的的抗体可用以上描述相同方式制备。对 LYG2 的诊断分析包括：利用该抗
30 体及标记检测人体液细胞或组织抽提物中的 LYG2。该抗体可以经或未经修饰，亦可将其与报告分子共价或非共价连接而标记。本领域中有许多报告分子可以利用，其中几个上文已提及。

许多本领域普通技术员所掌握的方案可用来测量 LYG2，包括 ELISA，RIA，及 FACS 等，它们为诊断 LYG2 表达水平的改变或异常变化提供了基础。正常的或标准的 LYG2
35 表达值可由下述过程确定：将正常实验动物对象(最好是人)的体液或细胞提取物，在适

合复合物形成的条件下与 LYG2 抗体结合。标准的复合物含量可通过各种方法定量测定，更佳的是光学测量方式。将 LYG2 在实验对象、对照和活体组织的病变样品中表达的测量值与标准值比较，两者间的差异可用于确定疾病诊断的参数。

在本发明的另一实施例中，编码 LYG2 的多核苷酸可用于诊断目的，此类多核苷酸
5 包括：寡聚核苷酸序列，互补 RNA、DNA 分子及 PNA 分子，这些多核苷酸可用于检测及定量测定活体组织中的基因表达，其中，LYG2 表达可能与疾病相关。诊断分析可用于测定 LYG2 表达的丧失、存在及过量情况，并用来监测治疗间期 LYG2 的调整水平。

该探针宜包含 SEQ ID No.2 中 10-846 个连续核苷酸构成的序列或其互补链序列。
10 探针可用于相关序列的检测，该探针与任何 LYG2 编码序列最好能有至少 50% 的序列同一性，本发明的杂交探针可以是 DNA 或 RNA。

制备编码 LYG2 的 DNA 的特异性探针的方法有：将编码 LYG2 或 LYG2 衍生物的多核苷酸克隆到制备 mRNA 探针的载体中，这些载体是本领域中已知的，市售的，并可用于通过添加合适的 RNA 多聚酶及合适的标记核苷酸的方式离体合成 RNA 探针。杂交探针可为各种报告基因所标记，如放射性核苷，如 ^{32}P 或 ^{35}S ，及酶标，如通过亲合素 / 生物素
15 偶联系统与探针偶联的碱性磷酸酶，以及其它类似方法。

编码 LYG2 的多核苷酸可用于与 LYG2 表达相关的疾病的诊断。这些疾病包括(但不限于)：自身免疫病 / 炎性病，如获得性免疫缺陷综合症(AIDS)，Addison's 病，成人呼吸
20 困难综合症、过敏、关节僵硬性脊椎炎、淀粉样病变、贫血、哮喘、动脉粥样硬化、自身免疫溶血性贫血、自身免疫性甲状腺炎、脚气、胆囊炎、接触性皮炎，Crohn's 病，过敏性皮炎、支气管炎、糖尿病，肺气肿阶段性淋巴球减少症及淋巴肉芽肿，骨髓成红
25 血细胞增多型、红斑、萎缩性胃炎、血管球性肾炎、Goodpasture's 综合症、痛风、Grave's 病、急性肠炎、硬化症、严重肌力症、心肌炎、心包炎、骨关节炎、骨质疏松症、胰腺炎、多神经炎、牛皮癣、Reiter's 综合症、风湿性关节炎、硬皮病、siogren's 综合症、系统性多种过敏，系统性狼疮、系统性硬化、血小板减少性此癜、溃性大肠炎；
30 葡萄膜炎；werner 综合症、并发性癌症、血渗析及体外循环、滤过性毒菌的、细菌性的、真菌性的、寄生性的、原生动物的及肠道寄生虫的感染、外伤；肾病如：肾脏淀粉样性病、高血压；醛甾酮过多症；addison's 病，肾衰竭；血管球性肾炎、慢性血管球性肾炎、肾囊的病变及发育畸形如：多囊病，肾发育异常，及皮质髓质囊；遗传性的肾发育不良症 (PRD) 如：隐性和常染色体占优势的 PRD：髓质囊性病，肾脏海绵体样髓
35 质及管状发育异常；Alprot's 综合症；影响肾生理功能的非肾脏癌症，如：支气管癌或脑基部瘤；多种骨髓瘤；胰腺癌；志移性肾癌；由消化、注射、吸入或吸收任何药剂、化学试剂或生物试剂如重金属、任何抗生素；镇痛药、溶剂、抗癌药、除草剂、杀虫剂、植物性的和生物性的及某些对胃有害的疾病，肾上腺疾病如：增生、癌、或腺瘤与碱中毒有关的高血压，淀粉样变性病、胰腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、肉瘤、畸胎瘤，以及特别地，肾上腺癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、脑癌、乳房癌、子宫颈癌、胆囊、神经

中枢癌、胃肠道癌、心癌、肾癌、肝癌、肺癌、肌癌、卵巢癌、胰腺癌、副甲状腺癌、阴茎癌、前列腺癌、唾液腺癌、皮肤癌、脾癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌及子宫癌。编码 LYG2 多核苷酸序列可用于 Southern 或 Northern 分析,或其它基于膜技术的分析,用于 PCR 技术;量杆、针尖及 ELISA 类分析;以及用于病人体液或组织的微矩阵分析以

5 检测 LYG2 表达的变化。这些定性或定量分析方法都是本领域中熟知的。

编码 LYG2 的核苷酸序列可用常规方法标记,然后在适合杂交复合物形成的条件下加入到病人的体液或组织样品中。经过温浴后,洗涤样品,定量测量信号值并与标准值比较,如果病人样品中的信号值与对照组相比有明显改变,则编码 LYG2 的核苷酸水平的改变表明相关病变的存在。这些分析在动物研究及临床实验中,可用于评价某一特定

10 疗法的功效。也可用于监测某一病例的治疗过程。

为了提供与 LYG2 表达相关的病变的诊断基础,必须确定正常的或标准的 LYG2 表达的分布图,这可以通过以下方面获得:将来自动物或人的正常对象个体中提取的体液或细胞抽提物,在适合杂交或扩增的条件下,与编码 LYG2 的序列或其片段混合。通过比较此正常对象的值与另一实验中由定量的基本纯的多核苷酸得出的值,就可得出标准的杂交的数量值,通过此方式得出的标准数值可与从具有病变症状的病人提出的样品的值比较,偏离的大小就可用来确定是否存在病变。

15

一旦确定了病变的存在并开始实施治疗方案后,可定期重复进行杂交分析以确定病人中的表达水平是否开始接近正常个体中观测到的水平,连续的分析结果可用来显示一段时间的治疗功效,从几天到数月。

根据 LYG2 编码序列设计的寡核苷酸的其它诊断用途涉及 PCR 的使用,这些寡聚物可由化学合成,酶切产生,或体外生成,寡聚物最好含有 LYG2 编码序列的片段,或含有与其互补的片段,将它们在优化的条件下应用可以鉴定特定的基因或状况,寡聚物也可在低严谨的条件下用以检测或定量测量相近的 DNA 或 RNA 序列。

20

可用来定量分析 LYG2 表达的方法包括:放射性标记或生物素化核苷酸,对照核酸共扩增,以及基于标准曲线的推导(见 e.g. melby, d.c. et al. (1993) J. Immunol. Methods 159: 235-244; 及 Duplaa, C. et al. (1993) Anal. Biochem 212: 224-236),多个样品定量分析可通过类似 ELISA 的分析来快速得到结果。该方法中,寡聚物被稀释到不同浓度,以分光光度法量热法就可快速定量。

25

在另一实施例中,从以上的描述的多聚核苷酸序列获得的寡核苷酸或其全长片段可作微矩阵的对象,微矩阵列可用于同时检测大量基因的表达水平,并可检测出基因变异、突变及多态现象。这些信息可用于推断基因功能,理解疾病产生的基因基础,诊断疾病,并可改进及监测药剂的活性。

30

微排列方法可通过本领域中已知方式去准备,应用及分析(见 e.g. Brennan, T.M. et al. (1995) U.S. Pat. no. 5,474,796; Schena, M. et al (1996) Proc. Natl. Acad Sci, 93:10614-10619) PCT application wo95/35505, Heller, R.A. et al. (1997) Prol.

35

Natl. Acad. Sci. 94:2510-2155; and Heller, M.J. et al. (1197) U.S Pat No. 5,605,622)。

在本发明另一实施例中,编码LYG2的核酸序列可用于生成对天然基因组序列定位有用的探针,该序列可被定位于某一染色体,染色体某一特殊区域,或人工染色体构建物,如人类人工染色体(HALs),酵母人工染色体(YACs),细菌人工染色体(BALs),细菌PI构建物,或单一染色体的cDNA文库(见e.g. Price, L. M.(1993) Blood Rev. 7:127-134;及Trask, B.J.(1191)Trends Genet. 7:149-154)。

荧光原位杂交技术可与其它物理制图谱技术及基因图谱数据结合(见e.g. Heinz-Ulrich等(1995)in Meyers, R.A. led)Molecular Biology and Biotechnology, VCH Publishers New York, N.T, PP965-968)。在各类科学手册或OMIM站点上可查到基因图谱数据的例子,LYG2编码基因在物理图谱上的位置与某特殊疾病或某一疾病易感性的关系可用于确定与此疾病关联的DNA的位置,本发明的核苷酸序列可用于检测正常者、携带者及发病者之间基因序列的不同。

在染色体原位杂交制备物和制物理图谱技术方面,如采用确定染色体标记的连索分析,可用于进一步扩展基因图谱。通常,即使在位于人类第几条染色体或长短臂不知的情况下,某一基因在另一哺乳动物(如鼠)染色体上的布局可以提供相关标记的信息。新的序列可通过物理图谱定位于染色体上。这为利用定位克隆或其它找基因技术的寻找疾病基因的工作者提供了有用的信息,一旦疾病或综合症通过基因连锁被初步定位于某一基因组区域,如ataxia-telangiectasia定位11922-23,任何位于这一区域的序列就可能是与疾病相关联基因,或调控基因,可作进一步研究(见e.g.,Gatti,R.A等(1988)Nature 336:577-580)本发明的核苷酸序列也可用于检测在正常的,携带者或发病者中基于易位、插入而带来的染色体位置的差异。

在本发明另一实施例,LYG2的催化片段或免疫原性片段,或寡肽可用于筛选复合物文库(通过各种药物筛选技术)。在该方法中用到的片段可以是溶于液相的,可定位于固相支持物上,位于细胞表面的,或定位于胞内的。LYG2与被测试药物间连接复合物的形成是可被测量的。

另一种药物筛选技术为鉴别与感兴趣的蛋白有结合性的复合物提供了高效筛选方式(见e.g. Geysen等(1984)PCT application W084103564)。这类技术中,少量的许多不同的测试复合物被合成于固体物质表面,如塑料针或其它表面,这些测试物可与LYG2或其片段反应,反应后经洗涤,被结合的LYG2就可通过本领域已知技术测出,纯化的LYG2也可直接包裹于盘上,以用于前述的药物筛选技术中。另外,非中和性抗体可用于结合肽并将其固定于固相支持物上。

在另一实施例中,可以采用竞争性药物筛选分析。此法利用可与LYG2特异性结合的中和抗体,与待测复合物竞争同LYG2的结合。在此方法中,抗体可用于检测任何具有一个或多个LYG2的抗原决簇的肽段。

在另一实施例中，编码 LYG2 的核苷酸序列用于已发展的任何分子生物学技术中，只要该新技术基于已知核苷酸的性质，这些特性包括(但不限于)：基因编码三联体及碱基特异性配对。

5 本发明的人LYG2核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次PCR扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

10 一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

15 目前，已经可以完全通过化学合成来编码本发明蛋白(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中的各种DNA分子(如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

此外，由于本发明的人LYG2具有源自人的天然氨基酸序列，因此，与来源于其他物种的同族蛋白相比，预计在施用于人时将具有更高的活性和/或更低的副作用(例如在人体内的免疫原性更低或没有)。

20

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

25

实施例1 人LYG2基因的cDNA序列的克隆和测定

1) 数据库的筛选

30 以LYG1基因的cDNA序列为出发序列，检索GenBank人EST数据库，得到同源的EST。以得到的EST为探针再一次检索EST数据库，获得与之部分重叠并向5'或3'延伸的EST序列。将这些新获得的EST与探针序列联配成一重叠群。以此重叠群的5'和3'末端再检索EST数据库，并重复以上步骤，直到获得一条无法再延伸的EST重叠群为止。

2) 引物扩增

35 基于上述得到的EST重叠群的序列，设计引物。以人羧基 λ gt10cDNA文库(购自Clontech公司)为模板，用一对寡核苷酸为引物——A1：5'-

GTAAGGTTGCAAACAAGGTCCTG-3' (SEQ ID NO.3) 为正向引物, 寡核苷酸 B1 : 5'-TCACACTGGTCTTCAGTGGTCTC -3'(SEQ ID NO.4) 为反向引物, 进行 PCR。PCR 条件为 93℃ 4 分钟, 随之以 93℃ 1 分钟、70℃ 1 分钟和 72℃ 1 分钟进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 分钟。电泳检测得到的 PCR 片段为 846bp 的目的片段。

5

3) PCR 产物的测序

将如上获得的 PCR 扩增产物与 pGEM-T[®]载体 (Promega) 连接, 转化大肠杆菌 JM103, 用 QIAprep Plasmid 试剂盒 (QIAGEN) 提取质粒, 用双链嵌套式缺失试剂盒 (Pharmacia) 对插入片段进行定向系列缺失, 然后用 PCR 对缺失子进行快速鉴定及排序。用 SequiTherm EXCEL[®] DNA 测序试剂盒 (Epicentre Technologies) 对依次截短的缺失子进行测序, 最后用电脑软件拼接顺序, 获得全长 cDNA 序列, 共 846bp, 详细序列见 SEQ ID NO.2, 其中开放读框位于 114-662 位核苷酸。

根据得到的全长 cDNA 序列推导出人 LYG2 的氨基酸序列共 182 个氨基酸残基, 其氨基酸序列详见 SEQ ID NO.1。

15

实施例 2 同源比较

用本发明的人 LYG2 的全长 cDNA 序列及其编码蛋白, 在 Non-redundant GenBank+EMBL +DDBJ+PDB 数据库及 Non-redundant GenBank CDS translations+PDB+Swiss Prot+Spupdate+PIR 数据库中, 用 BLAST 算法进行核酸和蛋白同源检索。采用 BLAST 的计算机技术被用于在数据库 (如 Genbank) 中搜索相同的或相关的分子。这种分析比基于多种膜杂交的方式迅速得多。此外, 计算机搜索的敏感度也可以调整。检索结果发现, 本发明的人 LYG2 与 G 型溶菌酶家族成员显示了较高的同源性。它与人中已发现的 G 型溶菌酶 LYG1 在核酸水平上的同一性达到了约 46%, 在蛋白水平上则达到了约 31%。此外, 本发明的 LYG2 与来自黑天鹅、鸵鸟和鸡的 G 型溶菌酶 (sp|P00717、sp|P00718 和 sp|P00719) 在蛋白水平上的同一性分别达到了 39%、40% 和 36%, 因此这表明本发明的人 LYG2 也属于 LYG 基因家族, 具有相同或相似类似的功能。

实施例 3 Northern 分析

Northern 分析是一项用于检测基因转录的实验室技术。它包括: 将标记的核苷酸序列与含有从特定细胞或组织中抽提的 RNA 的膜杂交。

Northern 结果显示, LYG2 在各组织中广谱表达但表达量都较低, 其中在脑及睾丸中的表达量稍高。

实施例 4 标记和运用杂交探针

35

根据 SEQ ID NO:2 设计的杂交探针可用于搜索其 cDNA 序列、基因组序列及 mRNA 序列。虽然本方法是针对标记这 23 个左右寡聚核苷酸设计的,但是从本质上来说,它也可应用于更长的核苷酸序列。寡聚核苷酸探针设计时使用了一些软件,如 PCGENE 等。标记时采用了 50 pmol 的游离核苷酸、250 mCi 的 γ - ^{32}P 标记的三磷酸腺苷及 T4 多核苷酸激酶的体系。标记好的寡聚核苷酸过 G-25 葡聚糖层析柱加以纯化 (Amersham Pharmacia Biotech)。把纯化后的探针固定在杂交膜上,洗膜,使背景降至 7-10 cpm,备用。

用 Ase I, Bgl II, Eco RI, Pst I, XbaI, or Pvu II (NEN Life Science Products) 等内切酶酶切人类基因组序列。每份酶切产物都在 0.7% 的琼脂糖凝胶中电泳,然后转移到尼龙膜上进行杂交反应。反应需要在 40 °C 中进行 16 个小时。在室温下逐渐增加柠檬酸钠达 0.1x 和十二烷基磺酸钠的浓度达 0.5x 以去掉非特异性的信号。经 X 光胶片 (Eastman Kodak, Rochester, N. Y.) 曝光若干小时后,杂交结果就清晰可见了。

实施例 5. Microarrays

Microarrays, 又称 DNA 芯片。芯片可通过使用一系列化学方法及喷墨技术把样品固定在底物上得到。常用的方法有射线、化学、热力学、机械方法等,形成的元件有点状、条形等等。一块典型的芯片通常含有一定数量的元件,可通过手工或用适当的仪器设备制备。杂交反应后,洗去未结合的探针,然后用扫描仪来检测发生杂交反应的元件及反应的程度。探针与每一个芯片元件的互补性和结合量都可通过对扫描出的图像的分析来判断。

全长 cDNA、EST、或基因片段都可以作为固定于底物上的样品。适合于杂交的片段可通过用一些著名的生物软件 (如 LASERGENE SOFTWARE (DNASTAR), 来选择。这些全长 cDNA、EST、与本发明的核酸序列相关的片断、或与这项发明有关的 cDNA 库中随机选出的片段被有序的排列于玻璃等载体上。cDNA 固着于玻片的方法是: 紫外线交联、热学、化学处理、干燥 (Schena, M. et al. (1995) Science 270:467-470; and Shalon, D. et al. (1996) Genome Res. 6:639-645.) 等。将探针用荧光标记后,再与固着地反应元件杂交。杂交的结果用前述方法分析。

实施例 6. 互补多核苷酸片段

LYG2 的互补序列或互补片段可用于检测、降低或抑制天然 LYG2 的表达。实例 4 中提到的寡聚核苷酸为 15-30 个碱基对,原则上说该方法亦可用于更小或更大的核苷酸片断。LYG2 互补寡聚核苷酸及编码序列可用软件 OLIGO 4.06 辅助设计。在 LYG2 的 5' 端设计特异性互补片段可以阻止启动子与 LYG2 相结合从而抑制转录,设计互补多核苷酸片段也可以阻碍其与核糖体亚基与 LYG2 的编码转录本结合从而阻止蛋白翻译。

实施例 7. LYG2 的表达

LYG2 的表达和纯化建立在使用细菌或病毒表达体系的基础上。

在细菌中, LYG2 的 cDNA 首先被连接到含有抗菌素抗性及可诱导的高效启动子的载体上, 这样的启动子至少包括 trp-lac(tac)融合启动子、连有 lac 操纵子调节单元的 T5 或 T7 噬菌体启动子等。把重组载体转化到适当的宿主细胞中去, 如 BL23(DE3)等, 具有抗菌素抗性的细菌会在 IPTG 的诱导下表达 LYG2。在真核细胞中, LYG2 与 AcMNPV(一种重组病毒)形成的重组子, 感染昆虫或哺乳动物细胞而表达的。杆状病毒的多角体蛋白基因通过同源重组或细菌介导的转座作用而被 LYG2 的 cDNA 序列替代, 替代后的病毒仍保持着感染性并且多角蛋白基因的强启动子使 LYG2 基因的转录能高效进行。在此过程中, 细菌或病毒的易传染性及其重组体启动子的强大功能保证了 LYG2 的高表达量。重组子的杆状病毒大多用于感染昆虫 Sf9 细胞, 如果把该杆状病毒的遗传特性进行某些修饰, 还可用于感染人类的肝(实质)细胞 (Engelhard, E. K. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.)。

纯化时, LYG2 通常是与 GST 或多肽标签(如 FLAG, 6-His 等)结合形成融合蛋白进行的, 这样可快速、简便、高特异性的把重组融合蛋白从细菌裂解液中提取纯化出来。GST 是一个从日本血吸虫中提取出来的分子量约为 26kDa 的酶, 在固化的谷胱甘肽存在的情况下可用于提取融合蛋白而保证不破坏其活性及抗原性(Amersham Pharmacia Biotech)。融合蛋白抽提出来后可按常规的操作手册把 GST 与 LYG2 在特定位点分开。FLAG 是一个由 8 个氨基酸残基组成的多肽, 可以通过利用市售的抗 FLAG 的单抗或多抗抗体与 FLAG 之间的特异性免疫亲和力来纯化融合蛋白(Eastman Kodak)。6-His 是含有 6 个连续组氨酸的多肽, 利用它能特异附着到金属螯合树脂上的特性来提取融合蛋白。关于蛋白表达和纯化方法可见目前市售的操作手册(John Wiley & Sons, New York, N.Y., ch 10, 16)。用以上方法纯化获得的 LYG2 可直接用于活性检测实验。

25

实施例 8. 活性验证

LYG2 的蛋白活性可通过检测其裂解微球菌细胞的能力来验证(Enzymatic Assay of Lysozyme I, Sigma Aldrich, St. Louis Mo.)。在 25℃下把适量微球菌冻干粉悬浮在 66mM, pH6.24 的磷酸钾缓冲液(缓冲液 A)中, 浓度保持在 0.015%左右。把 2.5ml 上述悬浮液移入比色皿, 保持 25℃恒温, 恒温分光光度计测定其在 450nm 的吸光率, 直到其恒定在 0.6-0.7 之间, 用 2.5ml 的缓冲液 A 作为空白对照。在含有微球菌的比色皿中加入 0.1ml 的 LYG2 溶液(用冷的缓冲液 A 配制), 在作对照的比色皿中加入 0.1ml 的缓冲液 A, 立即颠倒混匀, 连续测定 5 分钟内在 450nm 处的吸光率。细菌裂解时溶液变清, 因此其在 450nm 的吸光率也随之下落。样品管中溶液在 450nm 的吸光率下降的速率与 LYG2 原溶液的浓度成一定比率。

35

实施例 9. 功能测试

检测 LYG2 的功能需将其转入哺乳动物细胞中并大量表达。先把 cDNA 连到含有强启动子的哺乳动物载体上，如包含细胞巨化病毒启动子的 PCMV SPORT(Life
5 technology), PCR3.1 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.)等。利用脂质体或电转化的方法把 5-10ng 重组载体转染某种人体细胞系，最佳选择为内皮细胞或造血干细胞，同时将 1-2ng 含标记蛋白编码序列的质粒进行共转染。使用标记蛋白可区分已被转染的细胞与未被转染的细胞，这样的蛋白包括 GFP，CD64，GFP-CD64 融合蛋白等。

流式细胞仪 FEM(Flow cytometry) 是一种以激光为基础能自动检测细胞性状的技术，也可以知道重组载体上的 cDNA 是否表达。它能够检测出表达 GFP 或 CD64-GFP 的转染细胞，也能检测出细胞的性状，如凋亡状态。它也能够通过检测荧光分子的数量及荧光强度来检测发生于细胞死亡前或伴随细胞死亡的细胞变化。这些变化包括：用碘化丙
10 aV 染 DNA 的方法来测定核 DNA 含量；通过直线光和直侧光的方法测定细胞和颗粒大小的改变；通过测量 5'-脱氧溴尿苷的吸收来推测 DNA 合成是否减少，通过测定与特异抗
15 体结合来推测细胞表面或细胞内某些蛋白质表达量是否减少；通过与荧光蛋白连接的膜连蛋白来检测细胞膜成分是否改变。流式细胞仪技术在 Flow Cytometry(Ormerod, M. G. 1994. Oxford, New York, N.Y)一书中有详尽的描述。

LYG2 表达量对细胞的影响亦可以通过检测含有 GFP 或 GFP-CD64 融合蛋白编码序列的细胞获得。CD64 或 GFP-CD64 在细胞表面表达，且通常与人 IgG 的保守区域或 CD64
20 抗体结合。使用结合有人 IgG 或 CD64 的磁珠可有效地把已转染和未转染的细胞区分开 (DYNAL, Lake Success, N.Y.)。对于 mRNA，则可使用本领域常规技术进行分离。编码 LYG2 的 mRNA 及其它相关基因的表达可通过 Northern 杂交或基因芯片技术检测。

实施例 10. 制备抗体

25 通过 PAGE 凝胶电泳等方法纯化的 LYG2 可以用于免疫兔子以产生抗体。用 LASERGENE 软件分析得到的 LYG2 的氨基酸序列的高免疫原性位点，通过本领域的常规方法可合成相应的寡聚肽并得到抗体。按常规方法可选择适当的抗原决定部位，如 C 末端或亲水区域。

通常，长度为 15 个氨基酸的多肽可用 ABI 型 43/A 多肽合成仪合成，并可与 KLH
30 结合以增加免疫原性(通过与 MBS 反应而结合)。多肽与 KLH 结合的复合物用完全福氏佐剂乳化后可免疫兔子。所得到的抗血清可用免疫血清反应检测，如把上述多肽与已用 1%BSA 封闭的塑料载体连接，再与兔子的抗血清混合进行反应，洗涤，然后再与用放射性碘标记的抗兔血清的山羊抗体进行反应。

实施例 11. 用特异性的抗体纯化天然 LYG2

天然的或重组的 LYG2 都可以用免疫亲和层析法纯化。层析柱可以通过把抗 LYG2 的抗体与活性层析树脂，如被 CNBr 激活的 SEPHAROSE 树脂 (Amersham Pharmacia Biotech) 共价结合而构建。共价结合后，树脂可按使用手册封闭并洗涤。

5 纯化样品时，将含有样品的溶液缓慢加入层析柱。LYG2 会结合到层析柱上。样品过柱时要最大限度的保证 LYG2 与色谱柱的结合强度，如使用高离子强度的清洁剂为洗脱介质。液体介质洗脱完毕后需把结合于柱上的 LYG2 洗脱下来，这时要使用可解离 LYG2 与其抗体间结合力的试剂，如 pH2.0-3.0 的离液剂，高度浓缩的尿素或硫氰酸盐离子等。

10 实施例 12. 鉴定与 LYG2 反应的分子

用 ^{125}I 标记 LYG2 或其中的生物活性片段 (Bolton et al. (1973) Biochem. J. 133:529-539.)，把候选分子按顺序加入多孔板的样孔中，然后加入标记好的 LYG2 产物。经洗涤后，凡结合有 LYG2 的样孔都将被进一步分析。采用不同浓度的 LYG2 所得到的实验数据可用于推测候选分子的数量、亲和性等特性。

15

应理解，本发明列举了许多实验方法的具体条件，这仅在于说明本发明而不用于限制本发明。对本发明中所涉及实验方法、实验体系的常规修饰或变异都应在本发明的权利要求范围内。

序列表

(1) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 序列特征:

5 (A) 长度: 182 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 多肽

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 1

10 MLSSVVFGL IALIGTSRSS YPFSHSMKPH LHPRLYHGCY GDIMTMKTSG 50
 ATCDPNSVMN CGIRGSEMFA EMDLRAIKPY QTLIKEVGQR HCVDPVIAA 100
 IISRESHGGS VLQDGWDHRG LKFGLMQLDK QTYHPVGAWD SKEHLSQATG 150
 ILTERIKAIQ KKFPTWSVAQ HLKGRLYSEY FV 182

15 (2) SEQ ID NO: 2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 846bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链性: 单链

20 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2

gtaaaaggtt gaagtgcagt ttgctgctga gtacagaaga cctttgcaaa cagagagggg 60
 agattttctc tgtaaggttg caaacaaggt cctggaagat aagattcccc gccatgttat 120
 25 cctccgtggt gtttggggga ctaattgccc tcattggcac ttccaggagc tcatacccct 180
 tcagtcactc aatgaagcct cacctacatc cagcctgta ccacggctgc tatggggaca 240
 tcatgaccat gaagacctct ggggccactt gtgatccaaa cagtgtgatg aactgcggga 300
 tccgtggttc tgaaatgttt gctgagatgg atttgagggc cataaaacct taccagactc 360
 tgatcaaaga agtcgggcag agacattgcg tggaccctgc tgtcatcgca gccatcatct 420
 30 ccagggaag ccatggcgga tctgtcctgc aagacggctg ggaccacagg ggacttaaat 480
 ttggcttgat gcagcttgat aaacaaacgt accaccctgt cggtgccctg gatagcaaag 540
 agcacctttc acaggctact gggattctaa cagagagaat taaggcaatc cagaaaaaat 600
 tccccacgtg gagtgttgct cagcacctca aaggtaggct gtattctgag tactttgttt 660
 aaatgagcaa tgaatgagac cactgaagac cagtgtgacc cgagactccc tgggagcatt 720
 35 tccacggggg cagcagtggc cctgggagga gctgtctaga ggctgcattt gcattccctg 780
 aaccactgag ttactttgag aggtcctcca tctcaacct ccatttctc ttctgcagaa 840
 tgttgg 846

(3) SEQ ID NO. 3 的信息

5	(i) 序列特征	
	(A) 长度: 23 碱基	
	(B) 类型: 核酸	
	(C) 链性: 单链	
	(D) 拓扑结构: 线性	
	(ii) 分子类型: 寡核苷酸	
	(iii) 序列描述: SEQ ID NO. 3:	
	GTAAGGTTGC AAACAAGGTC CTG	23
10	(4) SEQ ID NO. 4 的信息	
	(i) 序列特征	
	(A) 长度: 23 碱基	
	(B) 类型: 核酸	
	(C) 链性: 单链	
15	(D) 拓扑结构: 线性	
	(ii) 分子类型: 寡核苷酸	
	(iii) 序列描述: SEQ ID NO : 4	
	TCACACTGGT CTTCAGTGGT CTC	23