[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/12
C07K 14/575 C07K 14/495
C07K 16/18 A61K 38/17
A61P 1/16

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95193816.9

[43] 授权公告日 2003 年 6 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1110558C

[22] 申请日 1995.6.30 [21] 申请号 95193816.9

[30] 优先权

[32] 1994. 7. 1 [33] DE [31] P4423190.3

[32] 1995. 3.27 [33] DE [31] 19511243.1

[86] 国际申请 PCT/EP95/02552 1995.6.30

[87] 国际公布 WO96/01316 德 1996.1.18

[85] 进入国家阶段日期 1996.12.27

[71] 专利权人 药物生物技术发展公司

地址 联邦德国海德堡

[72] 发明人 G·霍藤 H·奈德哈特
R·贝克托尔德 J·波尔

[56] 参考文献

EP－A－0222491 1987.05.20 C12N15/12

审查员 常 矛

[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 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 29 页 附图 5 页

[54] 发明名称 新的 TGF－β 家族的生长/分化因子

[57] 摘要

本发明包括 TGF—β 家族的一种蛋白、其编码 DNA 及含有该蛋白的一种医药组合物。

ISSN1008-4274

1. 编码一个 TGF－β 家族蛋白的 DNA 分子，它包含

(a) SEQ ID NO.1 中所示核苷酸序列的编码成熟蛋白的部分或编码成熟蛋白加信号肽或/和前体肽的部分，

(b) 由序列(a)根据遗传密码的简并性而得到的核酸序列之一，

(c) 与(a)或(b)的序列在如下严紧条件下杂交的核苷酸序列：

用 6×SSC 于 62－66℃杂交，再用 0.6×SSC、0.1%SDS 于 62－66℃洗膜 1 小时，

并且前提是根据(c)的 DNA 分子至少要含有完整的 TGF－β 家族的具有 MP121 生物活性的成熟蛋白的编码区。

2. 根据权利要求 1 所述的 DNA 分子

其特征为：其还含有编码另一 TGF－β 家族蛋白的成熟蛋白或信号肽和/或前体肽的核苷酸序列从而编码一种融合蛋白。

3. 载体

其特征为：它是通过将权利要求 1 或 2 的 DNA 分子插入质粒而得到的。

4. 权利要求 1 或 2 中 DNA 序列所编码的 TGF－β 家族的蛋白。

5. 权利要求 4 中的蛋白

其特征为：它至少含有 SEQ ID NO.2 或 SEQ ID NO.4 中所示氨基酸序列的成熟蛋白部分。

6. 嵌合蛋白

其特征为：

它含有权利要求 4 或 5 中的蛋白和一个受体结合域。

7. 异源双体蛋白

其特征为：它由权利要求 4、5 或 6 中的蛋白单体及其它 TGF－β 家族蛋白单体构成。

8. 药物组合物

其特征为：它至少含有权利要求 4 至 7 中一项的一种蛋白作为有

效成分。

9. 权利要求 8 的药物组合物，其还含有制药常用载体、助剂、稀释剂或填充剂。

10. 根据权利要求 4－7 中任一项的一种蛋白用于制备治疗肝脏疾病的药物的用途。

11. 源自权利要求 1 的 DNA 分子的反义 RNA。

12. 权利要求 1 或 2 中的 DNA 序列或权利要求 3 中的载体在对病体细胞进行体外转染的应用。

13. 抗体，

其特征为：其特异性结合权利要求 4 至 7 中任一项的一种蛋白。

14. 权利要求 4—7 任一项的蛋白在制备用于促进多巴胺神经元存活的药物组合物中的用途。

新的 TGF －β 家族的生长/分化因子

本发明涉及一种新的 TGF －β 家族的生长/分化因子及其 DNA 编码序列。

属于 TGF －β 家族的生长因子有 BMP-、 TGF-及激活素/抑制素-相关的蛋白(Roberts und Sporn, Handbook of Experimental Pharmacology 95, 419-472, (1990)). 此类生长因子广泛应用于临床治疗及相关应用。此类因子适于创伤治疗及组织再生。 并且， TGF －β 家族的更多因子可诱导组织如骨骼生长。

Wozney (Progress in Growth Factor Research 1 (1989), 267-280) 和 Vale 等人 (Handbook of Experimental Pharmacology 95 (1990), 211-248) 报道了各种不同的生长因子如与 BMP-和激活素/抑制素组相近的因子。 这种的成员之间具有明显的结构相似性。此类蛋白的前体由一个 N 端信号序列、前肽和一个含有 110 至 140 个氨基酸的 C 端序列构成。 C 端从前体分裂之后成为成熟蛋白。此类因子根据其氨基酸序列的同源性来划分。成熟蛋白含有高度保守的序列，尤其是此类因子具有该家族成员所共有的 7 个半胱氨酸残基。 TGF －β 类蛋白是多功能的具有激素活性的生长因子，并且也具有其他相关的生物活性如细胞的向化性、促进细胞的分化和组织诱导能力。 EP 0 222 491 A1 公开了抑制素α 和β 链的序列。

总之， TGF －β 类蛋白在结构上的区别使其具有相当不同的生物学作用，并且此类蛋白存在于广泛不同的组织类型和发育时期。因而在执行具体功能方面有所不同，如要求的细胞生理环境、寿命、定位、对辅助因子的需求、抗降解能力。尽管已描述很多蛋白具有组织诱导的潜力，但是对其在机体内，尤其是在医学上的作用还需进行详细研究。很可能还有未知的 TGF －β 家族成员蛋白，它们对于不同组织的分化/诱导特别有意义。由于对其功能不够了解，而缺乏鉴别不同 TGF －β 蛋白的生物检测方法，因而这些新的 TGF －β 蛋白的分离具有很大难度。另一方面，与已知 TGF －

β蛋白的核酸序列同源性太小，传统的核酸杂交技术也不可能用于筛选未知的TGF－β蛋白。尽管如此，急需分离鉴定新的TGF－β蛋白以满足所有医疗上所需要的具有（组织）诱导/分化作用的蛋白。该类（蛋白）因子可用于治疗各种组织损伤和组织退化疾病。

PCT/EP93/00350 专利申请提供了TGF－β蛋白MP121的一个核酸和蛋白序列，并标明了大部分与成熟肽相对应的序列。MP121前体肽的全序列还未公开发表。

本发明的根本任务是得到新的具有促细胞分裂和/或诱导分化潜力的TGF－β蛋白的DNA编码序列，尤其是TGF-蛋白MP121的DNA和氨基酸全长序列。

这一问题的解决在于得到一个编码TGF－β家族蛋白的DNA分子，它包含:

(a) 编码成熟蛋白区段及任选地SEQ ID NO.1中标明的核甘酸序列的其它功能区段

(b) 由序列(a)根据遗传密码的简并而得到的核酸序列之一

(c)一种对应于序列（a）和（b）之一的等位衍生物的核苷酸序列

(d)基于其源自其它脊椎动物而与序列（a）不同的序列之一

(e) 与(a)、(b)、(c)、或(d)的序列之一杂交的核苷酸序列

并且前提是根据(e)的DNA分子至少要含有TGF－β家族的成熟蛋白的编码区。

本发明的其它实施形式涉及权利要求2至10的主题，本发明的其它优点和特征由优选实施方案说明。序列及图谱现简述如下:

SEQ ID NO. 1 表示人的TGF－β蛋白MP121的编码DNA的完整核苷酸序列。起始密码ATG始于第128个核苷酸。完全成熟蛋白尤其优选始于第836个核苷酸。

SEQ ID NO. 2 是根据SEQ ID NO.1核酸序列推出的人TGF－β蛋白MP121的原前体蛋白的全长氨基酸序列。成熟蛋白起始点优选位于第217至240氨基酸之间的区域，尤其是第236或第237、而最优选第237氨基酸。

SEQ ID NO. 3 是小鼠的TGF－β蛋白MP121编码DNA的的完整核

苷酸序列。编码区开始于第 131 个核苷酸处的 ATG 起始码并结束于在第1187个核苷酸处的终止码。优选成熟蛋白的起始码始于第839位核苷酸，在其基因组 DNA 的第 446 与 447 个位置之间有一长度为 5.5kb 的内含子。

SEQ ID NO. 4 是小鼠 TGF－β蛋白 MP121 的原前体蛋白的完整氨基酸序列，该氨基酸序列是根据 SEQ ID NO.3 的核苷酸序列而得到的。该成熟蛋白起始点与 SEQ ID NO. 2 的人 MP121 蛋白的起始点相当，即在第 217 至 240 氨基酸之间的区域。该成熟蛋白的最优选的起始点是第 237 个氨基酸，这样成熟蛋白部分正如人的 MP121 成熟蛋白一样由 116 个氨基酸组成。TGF－β家族的前体蛋白通常在RXXR位点之后切开从而分离成熟蛋白(见Özkaynak et al., J. Biol. Chem. 267, 25220-25227, (1992)及其所引的文献)。因此就小鼠的 MP121 而言，成熟蛋白的至少部分起始点也可能是第 236 个氨基酸。

SEQ ID NO. 5 显示人的MP121基因的外显子/内含子相接的核苷酸序列。两个外显子的核苷酸由大写字母表示，而内含子序列由小写字母表示。

图 1 是人 MP121 与一些 TGF －β家族成员（抑制素α和β链）的氨基酸序列的比较，该图的比较是由 7 个保守的半胱氨酸残基的第一个开始。* 表示该氨基酸在参加比较的所有蛋白中都是相同的；+ 表示在至少有一个参加比较的蛋白与人 MP121 都含有该氨基酸。

图 2 表示在此项发明中应用的寡核苷酸引物的核酸序列以及与已知的 TGF －β家族成员的序列比较。M 代表 A 或 C，S 代表 C 或 G，R 代表 A 或 G，而 K 代表 G 或 T。2a 表示引物 OD 的序列，而 2b 表示引物 OID 的序列。

图 3 显示的是利用抗人 MP121 的鸡抗体进行的 Western 印迹的简图。

图 4 表示在小鼠不同组织中 MP121 与激活素βA 和βB 的表达相比较。

图 5 表示利用部分纯化的 MP121 对多巴胺神经元进行处理，对该神经元的生存力所产生的正面效果。

此外本发明中涉及的概念“成熟蛋白”也包括总蛋白的功能区域，它们具有几乎同样生物学活性并优选至少要含有 TGF －β家族的 7 个保守半

胱氨酸所在的区段的那些区域。 特别是成熟蛋白的 N 端有可能被轻度修饰，因此其序列会与 SEQ ID NO 2 和 4 的序列有所不同。成熟蛋白中可能有附加的氨基酸存在，其存在不影响蛋白的功能、也可能存在氨基酸缺失，只要这些氨基酸的缺失也不限制蛋白的功能。但优选人及小鼠的蛋白具有 SEQ ID NO 2 和 SEQ ID NO 4 氨基酸序列中第 237 个氨基酸以后的所有氨基酸。已经发现，在 TGF －β 家族的其它成员中，位于成熟蛋白 N 端的附加氨基酸不影响蛋白的活性，如 N 端附加的 6 个组氨酸即属此种情况。

本发明包括上述所定义的成熟蛋白的编码区段， 任选地也包括 SEQ ID NO 1 核苷酸序列的其它功能区段、及根据遗传密码的简并所产生的所有序列以及这些序列的衍生物。并且，本发明包括来自其他哺乳动物的由于来源不同而序列稍有不同的编码 TGF －β 家族蛋白的 DNA 序列，但这些 DNA 所编码的蛋白序列相近并具有大致相同的生物学作用。这些序列相互间具有很大的共同点，正如 SEQ ID NO 1 和 NO 3 比较所得出的相似性一样。

另外，本发明也包含与上述序列杂交的序列，前提是这些 DNA 序列至少含有完整的编码 TGF － β 家族成熟蛋白（根据上述定义）的区段并保留生物活性。

“功能区域”的概念从本发明的角度来讲，是指能够具备 MP121 蛋白天然区域的生物学作用之一的蛋白片段，如作为信号肽、前体肽或成熟蛋白部分。

优选的人 MP121 成熟蛋白部分的 DNA 编码区段优选从第 836 个核苷酸开始至终止码即 SEQ ID NO 1 所示序列的第 1184 个核苷酸。任选地该 DNA 分子还可能包括 SEQ ID NO 1 所示序列的其它功能区段，即编码信号肽或/和前体肽部分的核苷酸序列。特别优选该 DNA 分子包含用于信号－和前肽部分和成熟蛋白的部分的序列，即 SEQ ID NO 1 所示序列的第 128 至 1184 个核苷酸。如 SEQ ID NO.3 所示，优选的小鼠的 MP121 成熟蛋白的编码区始于第 839 个核苷酸直至第 1187 个核苷酸的终止码，某些情况下，该 DNA 分子也包括 SEQ ID NO.3 所示序列的其它功能区段，即信号肽或/和前体肽部分的编码序列。

另一方面，除成熟肽编码区之外，本发明的 DNA 分子也包括其它蛋白

的功能信号肽和/或前体肽部分的编码区，这些蛋白如具有“半胱氨酸结”（ Cystine Knot Motif ）的蛋白(Cell,Vol.73(1993).S.421-424)，尤其是TGF-B-家族的其它蛋白如上面所提到的激活素/ 抑制素或 BMP-蛋白，特别是 MP52（见 PCT/EP94/02630 ）。所涉及的核苷酸序列来源于上述所列的公开发表的文献。重要的是，这些序列仍然保持成熟蛋白的正确阅读框架。不过，由于在不同的寄主细胞中得到表达，因而不同的信号序列或/及前体肽可能对其表达具有正面影响。前体肽被其它蛋白的前体肽所替代已有诸如以下的报道(Mol. Endocrinol. 5 (1991), 149-155; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 2905-2909). 尽管该专利所覆盖的所有来自其它脊椎动物的简并序列及杂交序列，由于其核苷酸或/和氨基酸序列的细微变化而表现出结构上的区别，但是，这类序列所编码的蛋白仍具有大致相同的有用特性，使其仍然可能在医学上得到基本相同的应用。

根据本发明，“杂交”是常用杂交条件，优选利用 6x SSC 的盐浓度，杂交温度为 62^0C-66^0C，之后的洗膜条件是使用 0.6xSSC , 0.1%SDS，于 62 ℃-66 ℃洗涤 1 小时.

本发明的优选实施形式是如上所定义的源于脊椎动物尤其是哺乳动物如猪，鸡及啮齿动物如大鼠或小鼠，尤其是来源于灵长类如人的 DNA 序列及复制的相应序列。

SEQ ID NO.1 及 3 所示的及称作人及鼠 MP121 的序列是本发明特别优选实施形式。 MP121 基因的转录在肝组织中进行，其编码蛋白与抑制素/激活素类的成熟蛋白的氨基酸序列具有很大同源性（见图 1 ）。人的α-抑制素、抑制素β_A（激活素β_A）、及抑制素β_B（激活素β_B）的蛋白序列已由 Mason 等报道 (Biochem. Biophys. Res. Comm. 135, 957-964 (1986)). 已知的抑制素序列所特有的典型的序列同源性也在 MP121 前体肽部分中出现，而 MP121 前体肽的其它部分与抑制素的前体肽有明显区别。

但就目前所知， MP121 与激活素的表达模式有所不同。激活素主要在性腺中表达（激活素β_A在卵巢，激活素β_B在睾丸及卵巢），而 MP121 主要在肝脏中表达。迄今所用的实验方法还不足以检测其微量表达。 据文献报道，已证实激活素除了在不同小鼠组织的性腺表达之外也在成年动物 (Meunier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 247-251 (1988)) 以及在胚胎

发育过程中表达 (Roberts et al., Endocrinology 128, 3122-3129 (1991)). 因此 MP121 也可能在其它组织中表达，这还有待于进一步的证实。

本发明的另一内容是至少含有本发明中的 DNA 分子的一个拷贝的载体。在此类载体中，优选该 DNA 分子与控制表达的序列相接。这类载体适用于在稳定或瞬时转化的细胞中生产 TGF －β 类蛋白。不同的动物、植物、真菌及细菌系统可用于转化以及后续的培养。优选本发明中的载体含有在寄主细胞中复制所必需的序列，并且可自主复制。此外优选利用含有可选择标记基因的载体使寄主细胞的转化能够得到鉴定。

本发明的另一内容是经本发明中的 DNA 或载体转化的寄主细胞，合适的寄主细胞实例包括各种真核及原核细胞，如：大肠杆菌、昆虫细胞、植物细胞，哺乳细胞及真菌如酵母菌。

本发明的另一重要内容是权利要求 1 的 DNA 序列所编码的 TGF －β 家族的一个蛋白。优选该蛋白具有 SEQ ID NO.2 或 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列或任选地其功能部分（如上定义），并且表现出可能与医疗应用相关的生物特性如组织诱导活性。

由于该蛋白与具有“半胱氨酸结”的蛋白尤其是 TGF －β 蛋白形成同源双体或异源双体，因而该蛋白的上述特性会有所变化。这些双体结构同样可能在临床上得到应用，所以也是本专利申请的内容。优选异源双体包含由本发明中的蛋白单体及 α-, β_A-或β_B-抑制素链的单体形成的异源双体。优选异源双体的性质可能更与激活素及抑制素的性质相近。例如：若与抑制素α-蛋白或其他抑制素β-蛋白形成异源双体，那么 MP121/抑制素（α-链）或 MP121/激活素（β_A- 或β_B- 链）的异源双体就可能抑制或促进促滤泡激素（ FSH ）的合成。 MP121/激活素异源双体也可能影响中胚层的发育。可以进一步预见，与 TGF-β 蛋白的 BMP 类的成员形成异源双体，会增强类 BMP 活性，诸如诱导或促进骨骼形成，软骨形成及结缔组织的形成的能力。

因此本发明的另一内容是如下所述的异源双体：由权利要求 1 的 DNA 序列所编码的本发明的 TGF -β 家族蛋白，与具有“半胱氨酸结” 的蛋白尤其是与其它 TGF -β 家族蛋白的单体所形成的异源双体。类似的异源双体蛋白在 WO93/09229, EPO 626451A2 及 J.Biol. Chem. 265 (1990). 13198-

13205 中已有描述。

本发明的另一内容是如下的嵌合蛋白：即具有本发明的 DNA 序列编码蛋白如优选 SEQ ID NO.2 及 SEQ ID NO.4 所示的蛋白的功能衍生物或区段，尤其是具有成熟蛋白的功能区段并此外含有其它蛋白的部分片段的嵌合蛋白。其它蛋白可以是优选属于 TGF-β 家族的含有“半胱氨酸结”的蛋白，如尤其 MP52(PCT/EP94/02630). 其它的完整蛋白的区域如蛋白的受体结合部位，会使原始的 MP121 蛋白的特异性发生变化

本发明中的蛋白优选 MP121 的生物特性可根据以下文献中的活性分析方法进行确定 Wrana 等(Cell 71. 1003-1014 (1992)), Ling 等(Proc. Natl. Acad. of Science. 82. 7217-7221 (1985)), Takuwa 等(Am. J. Physiol. 257. E797-E803 (1989)), Fann 和 Patterson (Proc. Natl. Acad. of Science. 91. 43-47 (1994)), Broxmeyer 等(Proc. Natl. Acad. of Science. 85. 9052-9056 (1988)), Green 等(Cell. 71. 731-739 (1992)), Partridge 等 (Endocrinology. 108. 213-219 (1981)) 或 Krieglstein 等(EMBO J. 14. 736-742 (1995))。

已有报道，激活素 A 及 TGF-β1, -2 和 -3 在体外具有提高多巴胺神经元生存力的效果 (Krieglstein 等 EMBO J. 14 , 736-742 (1995)); Krieglstein 等 Neurosciene 63. 1189-1196 (1994))。 部分纯化的 MP121 对经 8 天培养的多巴胺神经元的存活力具有促进作用（与对照的上清液相比较）（图 5 ）。

本发明的另一内容是生产 TGF-β-家族蛋白的如下方法：其特征在于，培养本发明的 DNA 或载体所转化的寄主细胞，从细胞中或/和培养液的上清液中提取 TGF-β-蛋白。该方法包括在合适培养基中转化寄主细胞的培养及所产生的 TGF-β-蛋白的提纯。通过该方法可生产足够量的目的蛋白，使其可能应用于医疗或需要生长因子的细胞培养技术。寄主细胞可以是细菌如芽孢杆菌类或大肠杆菌，真菌如酵母菌，植物细胞如烟草、马铃薯或拟南芥，或动物细胞尤其是脊椎动物细胞系如 Mo-、 Cos-或 CHO-细胞系，或昆虫细胞系。利用杆状病毒系统，可实现在昆虫幼虫中的表达。利用细菌进行生产，则本发明蛋白可以包含体形式产生。对这些包含体可依照已知的方法进行复性，以得到具有活性的蛋白(见 Jaenicke， R. 和 Rudolph，

R. Protein Structure. ed. Creighton, T.E., IRL Press. Chapter 9). 若生产与其它 TGF-β 家族成员蛋白所形成的异源双体，两种蛋白的单体可在同一细胞系中表达或分别表达，对形成的包含体同样的复性方法是合适的。适用于在同一细胞系中的共表达的方法主要有病毒系统如杆状病毒系统或痘菌病毒系统。异源双体蛋白质的生产原则上专业人员是已知的，如 WO 93/09229 和 EP 0626 451A2 中所述。

生产含有其它蛋白部分的嵌合蛋白，需要在 DNA 水平上作相应的改变，这些通常是专业人员熟知的并由其操作(EMBO J. 10 (1991), 2105-2110; Cell 69 (1992), 329-341; J. Neurosci. 39 (1994), 195-210).

本发明的另一内容是含有药物有效量的 TGF-β 蛋白作为有效成分的药物组合物。这种组合物任选地含有制药上可接受的载体、辅助剂、稀释或填充剂。此药物组合物可单独用于创伤治疗及组织再生，也可与其它有效成分结合使用，如：其它 TGF-β 蛋白或生长因子如 EGF（表皮生长因子或 PDGF(血小板生长因子）。并且，此种药物组合物也可用于预防疾病。

本发明中的内容还有：含有本发明的异源双体蛋白或/和嵌合蛋白的药物组合物。

优选本发明的药物组合物用于治疗或预防骨/软骨/结缔组织/皮肤、黏膜、内皮组织、上皮组织、神经、大脑、肾或牙齿的损伤；及用于牙齿植入、创伤愈合及组织再生过程；作为促进细胞分裂素用于诱导肝组织生长，诱导骨髓细胞或前体细胞的增生；用于保持分化状态及治疗不育症及用于避孕。此外本发明的药物组合物还用于治疗物质交换方面的疾病如消化系统疾病或涉及血糖水平的疾病。

本发明中的 TGF-β 蛋白的另一可能的临床应用是作为免疫反应的抑制因子以避免器官移植后的排斥现象，或用于促进血管生成。并且，本发明中的蛋白还可用于促进受孕能力或避孕。本发明中的医药组合物还可用于防病或整容外科。该组合物的使用不局限于人类，也适用于动物、尤其是家养或经济动物。

另外，根据不同需要异源双体蛋白及嵌合蛋白的使用范围及特异性也可由于其它蛋白或蛋白单体的区段不同而有所改变。

总之，本发明中的蛋白可用于治疗与 MP121 的表达有关的疾病，一方

面可通过提高 MP121 的量或已有的 M121 的活性，另一方面，则可通过抑制 MP121 的活性来实现。因此本发明的另一项内容是合成反义核酸及核酶，以用于抑制 MP121 的转译。抑制是由于信使 RNA 被反义核酸结合“隐蔽”或被核酶切割。

已有关于合成反义核酸的报道(Weintraub, H.M, Scientific American 262: 40 (1990))。 反义核酸与相对应的信使 RNA 杂交而形成不能被转译的双链分子。反义核酸的利用例如见 Marcus-Sekura, C.J 的报道 (Anal. Biochem. 172 (1988), S.289-295)。

核酶是具有特异性切割类似于 DNA 限制性内切酶的其它单链 RNA 分子能力的 RNA 分子。 核酶的合成见报道: Cech, J. Amer. Med. Assn. 260 (1988), S. 3030.

根据本发明，具有本发明 DNA 序列的合适载体可用于在体外或体内转染病体细胞，或将该载体先用于体外细胞转染，再将这些转染细胞植入病人体内。同样，可将 MP121 反义多核苷酸转入不期望 MP121 表达的细胞。

对 MP121 活性的压制已可通过将与 MP121 相反不引起信号继续传导的分子结合于 MP121 受体上来进行。

由此可见，在本发明的范围内，细胞的 MP121 受体也很令人感兴趣。为发现 MP121 受体，首先通过交联实验，测定不同细胞系对放射性标记的 MP121 (^{125}J-MP121) 的结合能力。 然后，对结合 MP121 的细胞，利用表达载体(InVitrogen 提供)构建 cDNA 文库。利用对放射性标记的 MP121 的结合能力，筛选出被受体－ cDNA 转染的细胞。这是本专业人员已知的方法，如其用于分离激活素受体 (Mathews, L.S. & Vale,W.W, Cell 65 (1991), 973-982) 和 TGF-β Type II 受体(Lin, H.Y, 等， Cell 68 (1992), 775-785)。据推测 MP121 受体与已知的激活素受体类似，属于同一家族的受体复合体，因而也可利用已知的方法简并的寡核苷酸进行 PCR，以发现异源复合体的部分片段。这一方法也用于激活素及 TGF-β TYPE I 受体 (Tsuchida, 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 11242-11246; Attisano 等, Cell, 75 (1993), 671-680; Franzen 等， Cell 75 (1993), 681-692).

本发明的最后一项内容是能够特异结合本发明蛋白的抗体或其一个抗体片段（如 Fab 或 Fab'）。生产此种特异性抗体或抗体片段的方法属于一

般专业常识. 优选该抗体是一单克隆抗体. 此抗体或抗体片段也适用于诊断方法.

此外, 本发明将由以下实施例阐明.

例 1: MP121 的分离

1.1 总 RNA 是根据 Chirgwin 等的方法从(40 岁)人的肝组织中提取的(Biochemistry, 18, 5294-5299 (1979)). Poly(A+)-RNA 则通过 Oligo-(dT)层析从总 RNA 中分离出来 (见产品提供者的方法 Stratagene Poly(A) Quick-Column).

1.2 . 反转录反应如下: 将 1-2.5μg Poly(A)+-RNA 5 分钟加热至 65 ℃, 快速转到冰上冷却. 反应混合物包括 27u RNA-Guard (Pharmacia), 2.5μg Oligo(dT)12-18 (Pharmacia), 5 x 缓冲液 (250mmol/l Tris/HCl pH8.5,50mmol/l $MgCl_2$,50mmol/l DTT,5mmol/l 各 dNTP, 600mmol/ l KCl), 及每μg Poly(A +)-RNA 所需的 20U AMV 反转录酶 (Boehringer Mannheim). 反应混合物(25μl)在 42^0C 温育 2 小时之后, 将所得 cDNA 保存于-20^0C .

1.3 图 2 所示的脱氧核苷酸引物 OD 及 OID 由全自动 DNA 合成仪(Biosearch)合成. 先通过变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳、再利用等速电泳将凝胶上的主带分离, 从而将引物纯化. 通过比较已知 TGF-β 家族成员的核酸序列且选择较高的保守区, 以设计寡核苷酸, 该保守区的比较如图 2 所示. 为了便于克隆, 两个寡核苷酸都有 EcoRI 酶切位点, 并且, 引物 OD 在其 5' 端还有一个 NcoI 酶切位点.

1.4. PCR 反应的起始物是相当于 20ng Poly(A +)RNA 的 cDNA (见 1.2). 50μl 的反应体积包括 1 x PCR 缓冲液 (16.6mmol/l$(NH_4)_2SO_4$, 67 mmol/l Tris/HCl pH 8.8, 2mmol/l $MgCl_2$, 6.7 μmol/l EDTA,

10mmol/l β-巯基乙醇, 170 μ g/ml 牛血清蛋白(BSA) (Gibco), 200 μ mol/l 各 dNTP (Pharmacia), 30pmol 各寡核苷酸（ OD & OID ）及 1.5U Taq-聚合酶 (Ampli Taq, Perkin Elmer Cetus). 于反应混合物之上加一层石蜡油，然后进行 40 个循环的 PCR 反应 . PCR 反应产物经过酚/氯仿抽提纯化后，用乙醇沉淀浓缩.

1.5. PCR 反应产物的一半用于 SphI (Pharmacia) 及 AlwNI (Biolabs) 酶切反应（根据公司提供的方法）. 另一半则用于 AvaI (BRL)、 AlwNI (Biolabs) 及 TfiI (Biolabs) 酶切反应. 酶切反应体积为 100μl (含 8U 酶), 于 37^{0}C 温育 2~12 小时(TfiI 除外，为 65^{0}C 温育)进行.

1.6. 利用琼脂糖凝胶电泳将酶切产物分离. 经溴乙锭染色后将未被酶切的扩增片段从凝胶上切出，并经酚抽提后分离出来. 所得的 DNA 再经过两次酚/氯仿抽提后纯化.

1.7. 经乙醇沉淀后所得的 DNA 的 1/4 或 1/5 重新用以扩增，反应条件与第一次的扩增条件相同，不同的是循环次数降至 13 次，重新扩增产物经纯化后，用于与上述相同的酶切反应，然后从未被酶切的产物如对于扩增产物所述的一样琼脂糖凝胶上分离出来，再用于重复扩增.

1.8 将从凝胶上最后分离出的扩增产物用 4U EcoRI(Pharmacia) 酶切（反应条件: 根据酶提供者所述）. 酶切混合物的 1/4 用于与 EcoRI 切割的 pBluescript Sk+ (Stratagene) 载体连接. 连接后各酶复合物的 24 个克隆作序列分析. AlwNI 和 SphI 酶切片段只具有 BMP6 及抑制素βA 序列、而不含任何新的序列. 在 AvaI 、 AlwNI 及 TfiI 的酶切片段中，发现了 19 个相同的新序列并被命名为 MP121 . 这些质粒被命名为 pSK-MP121(OD/OID). 其中的一个序列与发现的主要序列在两个核苷酸上有所不同. 连接反应及大肠杆菌的转化是根据 Sambrook 等的方法(Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989)).

根据 Frohmann (见 Perkin-ELmer Corp 出版的 Amplifications, 5, 11-15 (1990)) 的方法，得到了 cDNA 克隆的 3’ 端序列，从而具备了全长的 cDNA 克隆。用于分离第一 MP121 片段的肝 mRNA 如上所述在使用连接有衔接头引物的 Oligo dT(16mer) (AGAATTCGCATGCCATGGTCGACGAAGC-T16)的情况下反转录.扩增反应所用的衔接头引物是(AGAATTCGCATGCCATGGTCGACG)及根据 MP121 序列所合成的一内部引物 (GGCTACGCCATGAACTTCTGCATA)。扩增产物又重新用于扩增反应，所用引物为：衔接头引物及另一根据 MP121 制备 的内部引物(ACATAGCAGGC ATGCCTGGTATTG)。重新扩增产物经 SphI 酶切后，克隆在 pT7/T3 U19 载体 (Pharmacia) 的 SphI 位点并且测定其序列。利用与已知 MP121 序列的重合部分，对所得克隆进行鉴定。将一个被命名为 P121Lt3'MP13 的克隆用于分离一个 NcoI/SphI 片段（ NcoI 端经 T4 聚合酶处理为钝端）。该片段被克隆在上面提及的 pSK-MP121 (OD/OID) 载体上， OD- 引物序列与 pSK 的多克隆点的 T7 引物的方向相对应。 所用的载体是经 SphI/SmaI 酶切的。所构建的重组基因命名为 pMP121 DFus6 。 其含有 SEQ ID NO.1 所示的第 922 至 1360 个核苷酸的 MP121 序列部分。

1.9 pMP121 DFus6 中的 DdeI 片段，即 SEQ ID NO.1 中第 931 至 1304 个核苷酸部分，被用于筛选一个人肝脏的 cDNA 文库 (Clontech, #HL3006b, Lot 36223) (方法见 Ausubel 等 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley - Interscience (1989)出版)。 从 8.1 x 10^5 噬菌体中筛选出 24 个噬菌体区（ Mischplaques ），并分别纯化得到了单噬菌体。从中选出经 PCR 反应检测为阳性的 10 个克隆，并纯化出单噬菌体。 PCR 所用引物为 LO2(ACATAGCAGGCATGCCTGGTATTG)及来自 DdeI 片段的引物 LOI1(CTGCAGCTGTGTTGGCCTTGAGA) .将噬菌体中的 cDNA 片段经 EcoRI 酶切分离出来，并克隆在用 EcoRI 裂解的 pBluescript SK 载体。

对所得质粒之一 SK121L9.1 的序列测定表明。起始密码始于 SEQ ID NO.1 中的第 128 位核苷酸，在该起始密码之前有三个处在同一阅读框架

的终止码，分别在第 62、77及 92个核苷酸处。 经过与其它TGF-β蛋白的序列同源性比较， MP121成熟蛋白始于SEQ ID NO.1中的第836个核苷酸，即 SEQ NO.2中的第 237个氨基酸，终止码始于SEQ ID NO.1的第 1184个核苷酸。

质粒SK121L9.1(保藏号: 9177)在 1994年4月26日保藏在DSM中。

1.10. 小鼠中MP121 cDNA 及其基因组DNA的分离:

将人MP121序列信息用于分离小鼠的 MP121序列，其中涉及的方法是专业人员所熟知的方法，见 Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al; Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Wiley & Sons, 1987-1995)或 Molecular Cloning (Sambrook et al, 2nd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989).

首先，从人 MP121 序列合成两个引物： ACGAATTCCGACGAGGCATCGACTGC ,及GCGTCGACTACCATGTCAGGTATGTC,在两个引物 的 5' 端设计了一个酶切点 (EcoRI 及 SalI). 两个引物用于小鼠基因组 DNA 的扩增后，将所得的 0.35Kb 长的片段再克隆在Bluescript (Stratagene) 载体上，并用于制备放射性探针，利用该探针按照标准方法筛选小鼠基因组 DNA 的λ文库和 cDNA 文库。 cDNA 是由小鼠的肝脏分离出的RNA合成，加上EcoRI/NotI 连接物序列后克隆在λgt10上。

从基因库及 cDNA 库中都分离出了 MP121 克隆。将含有全长编码序列的 cDNA 亚克隆在 Bluescript SK (Stratagene) 的 EcoRI 位点，所得质粒命名为 小鼠 SKMP121 并于 1995 年 5 月 10 日保藏在 DSM 资料库中(DSM9964).序列分析所得全序列如SEQ ID NO.3所示。在 SEQ ID NO.3序列中起始码始于第131个核苷酸而终止码始于第 1187个核苷酸.根据该序列所推出的蛋白序列见 SEQ ID NO.4 .

来自基因组文库的含MP121 克隆的亚克隆分析表明， MP121前体肽的编码区含有一个约 5.5kb长的内含子。该内含子位于SEQ ID NO.3 所

示序列的第 446 与 447 个核苷酸之间。外显子/内含子的交接点如 SEQ ID NO.5 所示。

例 2： MP121 的表达

在真核及原核系统中都有可能表达 MP121 。

只将 MP121 的成熟蛋白区段用于原核表达。 在纯化之后在大肠杆菌中表达的 MP121 成熟单体，可折叠为双体。为简化 MP121 蛋白的纯化过程，在成熟蛋白的 N-端可附加 6 个组氨酸残基，通过 6 个组氨酸残基与 Ni 螯合物 Column 层析柱的结合从而易于蛋白的纯化。

例如：用原核载体 pBP4 表达人 MP121 成熟蛋白区段（ SEQ ID No.2 中的第 237 - 352 氨基酸)，其 N-端共有包括 6 个组氨酸在内的 13 个附加氨基酸 (MHHHHHHKLEFAM)。该载体是 pBR322 质粒的衍生物，并含有抗四环素基因和来自 pBluescriptII SK 质粒(Stratagene) 的 T7 启动子。另外，该载体在其 T7 启动子之后还有一个核糖体结合部位和一个起始码，起始码之后则是 6 个组氨酸密码。终止子（ T ）位于多个用于插入内含子单酶切插入位点如 Eco RI,Xho I,Sma I 和 Apa I 及三种阅读框架的终止码之后。以质粒 SK121L9.1 (DSM 保藏号： 9177) 为模板，经 PCR 反应扩增出 MP121 成熟蛋白的 cDNA，所用引物为：
GAATTCGCCATGGGCATCGACTGCCAAGGAGG 和
CCGCTCGAGAAGCTTCAACTGCA CCCACAGGC. 两个寡核苷酸的末端都有附加的酶切位点 (分别为 Eco RI/Nco I,或 Xho I/Hin dIII)。 将所得的 377bp 长的片段克隆于 pBluescript II SK (Stratagene) 的 EcoRV 位点。将其中一个克隆(MP1215'端指向 T7 启动子)经 EcoRI 酶切后所得的 0.38kb 的片段也克隆于 pBP4 载体的 EcoRI 位点。所得质粒 pBP4MP121His 中插入片段的正确走向经酶切分析及序列分析之后而得到确定。 pBP4MP121His 质粒于 1995 年 1 月 30 日保藏在 DSM 资料库中(保藏号为 9704 ）。

MP121 蛋白也可通过利用 T7-RNA 聚合酶而得到表达。可利用不同的表达 T7-RNA 聚合酶的方法，如：利用另一个含有 T7-RNA 聚合酶基因的质粒、或编码 T7-RNA 聚合酶的噬菌体侵染，或通过一特殊的含有 T7-

RNA 聚合酶整合基因的细菌菌株 BL21(DE3)pLysS (Novagen, #69451-1), 在 IPTG 诱导表达 T7-RNA 聚合酶的情况下，可得到具有组氨酸标记(His-Tag)的 MP121 成熟蛋白(MP121 His)的包含体。在 SDS 聚丙稀酰胺（ 15%）凝胶电泳中，该蛋白的表观分子量近 16KD （理论分子量: 14.2KD），如图 3 的 Western blot 所示。用 pBP4 质粒转化的细菌作为对照，则没有发现特异的蛋白条带。由于该蛋白含有组氨酸标记(His-Tag),所以，可利用 Ni 螯合剂-层析柱纯化蛋白的方法，如 Hochuli 等所述(BIO/Technology Vol. 6, 1321-1325 (1988)). 通过反相高压液相色谱法(HPLC)可对蛋白作进一步的纯化。利用一反相色谱柱 (Nucleosil 300-7C4, Macherey-Nagel, Art: 715023), 所用色谱条件为: 流速 2 毫升/分钟，溶于 0.1%TFA 的乙腈，梯度为 0~90%, 时间: 100 分钟。在此条件下，MP121His 蛋白在乙腈浓度为 40% 时开始洗脱。

利用 MP121 特异性抗体，通过 Western blot 分析以证实上述蛋白为人的 MP121 蛋白。所用的 MP121 多克隆抗体来自鸡及兔。为得到用于免疫的抗原,将 MP121 成熟蛋白中的一个区段(SEQ ID NO.2 中第 260 至 352 个氨基酸)与 MS2 一噬菌体聚合酶的前 98 个氨基酸片段的融合蛋白，在大肠杆菌中得到表达。将分离出的融合蛋白（ MS2 - MP121 ）包含体经聚丙烯酰胺电泳分离，根据铜染色法染色之后，从凝胶上冲洗出来并用于免疫（鸡或兔）（ Tessmer,U.& Dernick,R.,IBL(1990)8-13 ）。从鸡或兔获得的抗体都能够检测出 MP121 的特异表达。图 3 所示的 Western blot 分析，所用的是来自鸡的 MP121 抗体。 该抗体经过 PEG 沉淀(Thalley B.S 及 Carroll,S.B. BIO/Technology, Vol.8, 934-938(1990))及膜结合抗原(融合蛋白(MS2-MP121))的处理而得到进一步纯化 方法见 Sambrook et al., Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989.18.17 页）。 所用的二抗为与碱性磷酸酶(Sigma A9171)相偶连的抗鸡免疫球蛋白 G (IgG)。利用 Tropix Western-Light Protein Detection Kit (Serva #WL10RC) 试剂盒，根据供货者所提供的方法进行进一步检测。

为得到具有生物活性的材料，可将在大肠杆菌中表达的 MP121 单体经纯化后折叠为双体。所用方法见 Jaenicke, R.和 Rudolph, R (Protein Structure, ed, Creighton, T.E . IRL Press, Chapter9).

在真核细胞中表达 MP121， 所用的是牛痘病毒表达系统。 该表达系统在下述文献中有详细报道 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 等， Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Wiley & Sons , Chapter 16, Unit1 6.15 ~ 16.18) (以下将该文献简称 CP)，本专业人员可效仿。该系统的主要依据是，使用特定载体外源 DNA 可通过同源重组而整合在牛痘病毒的基因组上。基于这一原理，所用的载体含有牛痘病毒基因组上的 TK(胸苷激酶)基因。另外，载体也携带有大肠杆菌的花黄素一鸟嘌呤一磷酸核糖基转移酶基因(gpt) (Falkner, F.G. & Moss, B., J. of Virol. 62 (1988), 1849-1854))，旨在筛选重组病毒在该载体中克隆了带有 MP121 的整个编码区的 cDNA 。

为缩短质粒 SK121L9.1 (DSM 保藏号： 9177) 中 5'-端及 3'-端的非翻译区，并在两端添加单酶切位点， 需要进行一系列的 PCR 反应及亚克隆步骤。所有 PCR 反应都是以 SK121 L9.1 质粒(DSM 保藏号 9177)作为模板。为缩短 5'-端的非翻译区所用的引物是 CCCGGATCCGCTAGCA CCATGACCTCCTCATTG CTTCTG (两端分别有 BamHI 和 NheI 酶切位点)，及一内部引物(CCCTGTTGTCCTCTAGAAGTG)。将所得的 PCR 片段克隆在 Bluescript SK （ Stratagene)上，通过序列分析并与 SEQ ID NO.1 所示序列的重合部分进行比较，以对所得序列进行确定。为缩短 3'端的非翻译区所用的模板是质粒 pBP4M121His 中的 SphI/EcoRI 片段 (0.22kb)。

人 MP121 的两端片段通过内部的酶切位点(XbaI 与 SphI)与质粒 SK121L9.1 (DSM 保藏号 9177) 中的 MP121 中的缺少中间 DNA 序列相连接，标准方法见 Sambrook 等 (Molecular Cloning, 2nd editeon, Cold Spring Harbour Laboratory Press , 1989)。已被缩短的 cDNA 仍具有完整的 MP121 阅读框架 (SEQ ID NO.1 中第 128-1184 个核苷酸)，并作为 BamHI 和 EcoRI 片段克隆在经 BamHI 和 EcoRI 酶切的 pBP1 载体上。由此所获得的质粒 pBP1MP121 于 1995 年 1 月 12 日保藏在 DSM 资料库中(保藏号： 9665 ）。

质粒 pBP1MP121 被用于构建重组的牛痘病毒。为此，将悬浮于 1 毫升 PBS 缓冲液的野生型牛痘病毒与 80%合生的 143B 细胞 (HuTK- , ATCC CRL 8303) 在直径为 35mm 的培养皿中混合，室温下中度振荡 30

分钟以实现病毒对细胞的侵染（ 1 病毒/10 细胞）。将上清液移去并加入 2 毫升培养液(MEM,Gibco BRL # 041-01095, 含稀释到 1/500 浓度的青霉素和链霉素， Gibco BRL # 043-05140),于 37^{0}C 温育 2 小时。最后将培养液除去后，加入 100ng pBP1MP121 和 2μg 媒介 DNA（超声波处理的小牛胸腺 DNA ， Boehringer Mannheim # 104175 ）及 10μl Lipofektin(Gibco BRL#18292-011), 在 1ml MEM 中温育约 15 小时（ 37^{0}C ），添加含有 20 % FCS （ Sigma #F-7524 ）的 1ml MEM 之后于 37 ℃继续温育 24 小时，最后将裂解细胞深冻保存。

基于花黄素－鸟嘌呤－磷酸核糖基转移酶的 gpt 筛选，及重组病毒的分离及扩增过程，大致如文献 CP 中 Unit 16.17 所述进行。只是所用的细胞为 RK13(ATCC CCL37)。

利用斑点杂交法(见 CP.Unit 16.18) 以确定 MP121 cDNA 是否整合在病毒基因组上。经 pBPMP121 转染所获得的重组病毒与野生型病毒，都被用于分析 MP121 在细胞系 143B(人 HuTK-,ATCC CRL 8303) 及 NIH-3T3 (DSM ACC59,瑞士小鼠胚胎) 中的表达。根据细胞系提供者的说明进行细胞培养，用大约 3 倍于连生细胞数量的病毒进行细胞侵染（ 37 ℃， 30 分钟）， 然后加入含有 10% FCS 及青霉素/链霉素(1:500,Gibco BRL# 043-05140)的培养液，并在 37^{0}C 温育 6 小时。除去培养液后的细胞用例如 HBSS(Gibco, BRL #14180-046) 经两次洗涤后，再加入不含 FCS 的生产培养液 (MEM 用于 HuTK- 细胞系， DMEM+4.5g/l 葡萄糖 +NEAA (Gibco, BRL # 11140-035)用于 NIH - 3T3 细胞系；分别加入 Aprotinin (Fluka # 10820,50U/ml) 和青霉素/链霉素)。经 20 至 22 小时培养之后收集培养细胞的上清液，利用 Western blots 分析表达水平 (标准方法见 CP, Unit 10.8)。在 1~3 毫升的细胞培养液的上清液中， 加入等体积的丙酮并在冰上温育至少一小时之后蛋白质沉淀并进行离心。将所得沉淀悬浮于电泳上样液之中，并用于 15%聚丙烯酰胺凝胶电泳（上样液： 7M 尿素， 1% SDS, 7mM NaH_2PO_4, 0.01% 溴酚蓝，及任选 1% β－巯基乙醇）。所用的标记蛋白为预染色的蛋白分子量标准物(Gibco BRL #6041-020)。蛋白转膜(PVDF 膜: Immobilon #IPVH 00010) 及封膜过程与标准

方法相同.

从(图 3)Western blot 简图可以看出，经重组病毒侵染的细胞显示有特异性的 MP121 条带. NIH-3T3 细胞中表达的 MP121 为分泌蛋白,该蛋白在非还原条件下电泳后显示分子量约为 18KD （预期的理论分子量为 25KD ）. 该蛋白在还原性电泳中显示的分子量为 15 KD（期望的理论分子量为 12.5 KD ）. 该结果表明, MP121 正如所期望的是作为成熟蛋白的双体得到表达. MP121 蛋白双体比单体 MP121 移动相对稍慢一些，这很可能是由于球状结构的形成，在 Hu Tk －细胞中，也发现前体蛋白被加工为成熟蛋白. 经野生型病毒(不含外源 DNA)侵染的细胞(HuTK －或 NIH － 3T3) 在 Western blot 没有显示条带.

牛痘表达系统适用于利用重组牛痘病毒进行共转化，尤其是宜于不同 TGF-β 蛋白的异源双体蛋白的形成.利用含有一种 TGF-β 蛋白单体特异性抗体的亲合柱，有可能将异源双体与同源双体分开. 其中抑制素的α－以及β A－β B 链尤其令人感兴趣.

例 3： 小鼠不同组织中 MP121 表达的研究

从 6 周龄小鼠的不同组织（脑、心脏、肾、肝、肺、脾、肌肉、卵巢、睾丸）及胚胎干细胞中依照标准方法提取总 RNA . 按产家说明用 10μg 总 RNA 进行核糖核酸酶保护实验(RPA)(Ambion RPAII Kit, # 1410). 为获得激活素β_A及β_B的特异性探针，利用特异性引物，对与成熟蛋白相对应的小鼠（ 129SV ）基因组 DNA 进行扩增. 为使扩增片段易于克隆，引物的末端各引入了 EcoRI 及/或 BamHI 或 HindIII 酶切位点 .扩增激活素 β_A 的引物序列来自鼠的 mRNA 序列 (GenBank Accession # M 37482):

GGATCCGAATTCGGCTTGGAGTGTGATGGCAAGG 和 GGATCCGAATTCCTCTG GGACCTGGCAACTCTAG .

扩增激活素β_B 所用的简并引物则来自人的序列(Mason et al, Molecular Endocrinology 3, 1352-1358 (1989)): GAGAATTCCA(GA)CA(GA)TT(TC)TT(CT)AT 和 GCAAGCTTT(GA)TA(TC)T C(GA)TC(GA)TC . 获得的 PCR 片段亚克隆于载体 pGEM-4 (Promega) 上并对其进行鉴定. RPA 测验所保护的激活

素特异性序列片段，激活素β_A为369bp而激活素β_B为254bp．MP121的保护片段为SEQ ID NO.3序列中的第887－1164个核苷酸．克隆于pGEM-4中的片段用于离体转录反应，以合成放射性标记的反义RNA探针．根据供货者(Promega, Riboprobe Gemini Systems)所提供反应条件，使用100μM CTP和α^{32}P-CTP (800Ci/mmol, Amersham)．同样，用DdeI切开的线状质粒pTri-GAPDH(Ambion # 7431)所合成的放射性标记RNA(CTP浓度为1mM)，用以作为对照．将4个反义RNA探针从聚丙烯酰胺凝胶上分离出来，并分别用于与小鼠相应组织的RNA(10μg总RNA/1 x 10^5cpm探针)混合，在42^{0}C温育过夜．根据标准方法进行变性凝胶电泳及放射性自显影（4天）．

例4：MP121的部分纯化及部分纯化的MP121的活性研究

在牛痘表达系统(见例2)所获得的MP121蛋白，可以通过两种层析柱而得到部分纯化．

MP121生产过程如下：连生的NIH－3T3细胞（DSM ACC59，瑞士小鼠胚胎）与同样数量的重组病毒混合，于37^{0}C温育30分钟以完成侵染过程，然后，添加含有10%FCS及青霉素/链霉素的培养液．

在37^{0}C培养4小时之后，除去培养液将细胞洗涤两次，加入设有FCS的生产培养液（见例2）．继续培养20－22小时之后．收集上清液并进行离心(40000 x g, 30分钟，4℃)，然后对上清液再进行过滤以除去病毒（过滤网：0.1μm孔径，MillexVV, Millipore #SLVV25LS）．利用野生型牛痘病毒侵染所得的细胞，按以上方法获得对照上清液(Wt)．根据Western blot分析，MP121的表达量估计为50~100μg/l．

在1.1升含有MP121的细胞上清液中，分别加入蛋白酶抑制剂PMSF (1μM)，$(NH_4)_2SO_4$ (终浓度为1M), Tris - pH8.0 (终浓度为20mM)，将该样品加到经缓冲液A (1M$(NH_4)_2SO_4$, 20mM Tris-pH 8.0)平衡的苯基琼脂糖柱(体积为5毫升(FastFlow (high sub) Pharmacia #17-0973-05)，利用15倍于柱体积的缓冲液A及10倍于柱体积的缓冲液B（20mM Tris.pH 8.0）冲洗并用线性梯度从100％缓冲液C(20mM Tris pH8.0,80%乙二醇）洗脱，流速为1毫升/分钟，洗脱50分钟（每个馏分5ml）．Western blot

分析表明， MP121 蛋白在乙二醇浓度为 50~80%时被洗脱出来。将蛋白组分的一部分经聚丙烯酰胺凝胶（浓度 15%）电泳，根据银染色法(Silver Stain-II, Daiichi #SE140000) 确定含有 MP121 的组分并将其集中起来。纯化对照上清液所得的相应组分，经银染色法分析之后，也被集中起来。

收集的 MP121 蛋白组分，通过反相高压液相色谱（ HPLC ）进一步纯化。先用缓冲液 A （ 0.1%三氟乙酸的水溶液）平衡 C8 色谱柱（ Aquapore RP300, Applied Biosystems, 颗粒直径 7μm, 孔径: 300A°）。将上述收集的含 MP121 蛋白的组分加到色谱柱上之后，先用缓冲液 A 充分洗涤色谱柱。再用每分钟 1.5%缓冲液 B （ 90 % 乙腈， 0.1 % 三氟乙酸）的线性梯度以 0.2ml/分钟的流速将结合蛋白洗脱下来。将所收集的不同组分（体积: 600μl ）用于 Western blot 及根据银染色法所进行的凝胶电泳分析。 MP121 蛋白在乙腈浓度为 55%时开始洗脱。将含 MP121 蛋白的组分集中起来，并且上清液的纯化过程中的相应组分也被集中。经银染色的凝胶电泳分析表明， MP121 蛋白组分中仍混有其它蛋白。为获得纯化的 MP121 ，需要进一步的纯化步骤。

可用专业人员所熟悉的纯化方法作进一步纯化，如: 使用凝胶筛柱，离子交换柱，亲和柱或金属螯合柱。根据 Western blot 分析结果估计，从 1 升细胞培养的上清液中可分离出约 8 克部分纯化的 MP121 。部分纯化的蛋白经冷冻干燥后保存于-80°C.

为证实 MP121 对多巴胺神经元的影响，从 14 天龄的大鼠胚胎(E14)的中脑区分离神经元(方法见 Shimoda 等 Brain Res. 586, 319-331(1992))。根据 Krieglstein 等(Neuroscience 63, 1189-1196(1994)) 所述方法，进行神经单细胞的分离及培养。在涂有多鸟氨酸/昆布氨酸的载玻片上，设计细胞密度为 200000 细胞/厘米^2。经 24 小时培养之后，每隔三天将 2/3 的培养液（ 500μl ）移去并添加同样量的新鲜培养液及所需的其它成分。 将苯基琼脂糖柱及反相高压液相色谱(HPLC)纯化及冷冻干燥后部分纯化的 MP121 蛋白溶于 50 % 乙腈中，加入细胞培养液。 MP121 在培养液中的终浓度为 20ng/ml(乙腈的终浓度为 0.3%)。将同样量的纯化的对照上清液(wt)样品溶于 50%乙腈中并加入对照培养液中，其中乙腈的终浓度也为 0.3%。

经 8 天培养后，用 4% 多聚甲醛在室温下对所得培养物进行固定，经丙酮渗透处理后（ 10 分钟，-20 ℃)再用 PBS（磷酸缓冲的盐溶液）冲洗，经 1% H_2O_2(溶于 PBS)处理，并用马血清冲洗、封闭处理之后，进行免疫组织化学染色。酪氨酸羟化酶（ TH ）是多巴胺及其它儿茶酚胺生物合成过程中的特定酶，所以 TH 可作为上述神经元细胞培养的标记（含去甲肾上腺素的细胞不被分离）.用抗大鼠 TH 的小鼠单克隆抗体(稀释 1:200, Boehringer Mannheim)，经 37^0C, 1 小时温育处理后，再用试剂盒(Vectastain ABC Kit: Vecto Labs)进行进一步检测。从 0.12cm^2 面积内统计 TH 一阳性细胞的数量。从图 5 可明显看出， MP121 对多巴胺神经元的生长具有正面影响。

图 5 表示从大鼠胚胎（ E14 ）中脑分离的神经元，经 8 天培养后 TH 免疫反应呈阳性的多巴胺神经元的存活数量。部分纯化的 MP121 （浓度 20ng/ml ）、等量的对照上清液产物（ wt ）的处理效果及未经处理的神经元（对照: 含有 0.3% 乙腈培养液 ）。所示值为三次重复取样的平均值±平均标准误差。

图 3 — 5 的详细说明:

图 3： 利用抗 MP121 的鸡抗体所进行的 Western blot 简图。

1： 在还原条件下(1% β-巯基乙醇) 经 pBP4MP121His 转化的大肠杆菌细胞。

2: 在还原条件下(1% β-巯基乙醇) 经重组病毒 (含有插入的 MP121 cDNA) 侵染的 NIH-3T3 细胞的培养上清液。

3： 在非还原条件下经重组病毒 (含有插入的 MP121 cDNA) 侵染的 NIH-3T3 细胞的培养上清液。

M：预染的蛋白分子量标记（标明主要蛋白条带的表观分子量）(Gibco BRL #26041-020).

图 4： 核糖核酸酶保护实验的凝胶分析的放射自显影图谱。所用的特异性探针为激活素β_A(β_A)-、 激活素β_B(β_B)-、 MP121-及作为对照的 GAPDH-

探针.

所用的总 RNA 是来自不同的小鼠组织（ 1: 大脑， 2: 心脏， 3: 肾， 4: 肝， 5: 肺， 6: 肌肉， 9: 卵巢， 10: 脾， 11: 睾丸），来自胚干细胞（ 12： CJ7 ）和作为对照的酵母（泳道 13 ）. 样品 14 不含 RNA 以作为对照. 8 和 15 表示杂交中的未被保护的反义 RNA 样品: 右侧的括号内标明了期望的未被保护的片段长度; 被保护的片段长度则在左侧标明. 样品 7 是作为分子量标记的经 MspI(Biolabs # 303)酶切及γ-32P-ATP (Amersham)末端标记的 pBR322 质粒。

图 5： 表示经 8 天培养后存活的具有 TH 一免疫反应的大鼠胚胎(E14)中脑的多巴胺神经元数目. 所测效果来自以下不同处理: 部分纯化的 MP121（浓度为 20ng/ml ）、等量的部分纯化的对照上清液(wt)及未经处理的神经元（对照: 含有 0.3%乙腈的培养液），所示值为三次重复取样的平均值±平均标准误差。

序列说明

(1) 一般信息
(i) 申请人
(A) 名称: Biopharm Gesellschaft zur biotechnologischen Entwicklung von Pharmaka mbH
(B) 街号: Czernyring 22
(C) 地点: Heidelberg
(E) 国家: Germany
(F) 邮编: 69115

(ii) 发明名称: 新的 TGF —β 家族的生长/分化因子

(iii) 序列数: 6

(iv) 计算机可读形式:
(A) 介质类型: 软盘
(B) 计算机: IBM PC 兼容机
(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) 申请信息:
申请号:WO PCT/EP95/02552

(2) SEQ ID NO: 1 说明

(i) 序列特征:
(A) 长度: 2272 BP
(B) 种类: 核苷酸
(C) 链状: 双链
(D) 拓扑: 线状
(vi) 原始来源:
(A) 有机体: Homo sapiens

(xi) 序列说明: SEQ ID NO: 1:

CAAGGAGCCA TGCCAGCTGG ACACACACTT CTTCCAGGGC CTCTGGCAGC CAGGACAGAG 60

TTGAGACCAC AGCTGTTGAG ACCCTGAGCC CTGAGTCTGT ATTGCTCAAG AAGGGCCTTC 120

CCCAGCAATG ACCTCCTCAT TGCTTCTGGC CTTTCTCCTC CTGGCTCCAA CCACAGTGGC 180

CACTCCCAGA GCTGGCGGTC AGTGTCCAGC ATGTGGGGGG CCCACCTTGG AACTGGAGAG 240

CCAGCGGGAG CTGCTTCTTG ATCTGGCCAA GAGAAGCATC TTGGACAAGC TGCACCTCAC 300

CCAGCGCCCA ACACTGAACC GCCCTGTGTC CAGAGCTGCT TTGAGGACTG CACTGCAGCA 360

CCTCCACGGG GTCCCACAGG GGGCACTTCT AGAGGACAAC AGGGAACAGG AATGTGAAAT 420

CATCAGCTTT GCTGAGACAG GCCTCTCCAC CATCAACCAG ACTCGTCTTG ATTTTCACTT 480

CTCCTCTGAT AGAACTGCTG GTGACAGGGA GGTCCAGCAG GCCAGTCTCA TGTTCTTTGT 540

CCAGCTCCCT TCCAATACCA CTTGGACCTT GAAAGTGAGA GTCCTTGTGC TGGGTCCACA 600

TAATACCAAC CTCACCTTGG CTACTCAGTA CCTGCTGGAG GTGGATGCCA GTGGCTGGCA 660

TCAACTCCCC CTAGGGCCTG AAGCTCAAGC TGCCTGCAGC CAGGGGCACC TGACCCTGGA 720

GCTGGTACTT GAAGGCCAGG TAGCCCAGAG CTCAGTCATC CTGGGTGGAG CTGCCCATAG 780

GCCTTTTGTG GCAGCCCGGG TGAGAGTTGG GGGCAAACAC CAGATTCACC GACGAGGCAT 840

CGACTGCCAA GGAGGGTCCA GGATGTGCTG TCGACAAGAG TTTTTTGTGG ACTTCCGTGA 900

GATTGGCTGG CACGACTGGA TCATCCAGCC TGAGGGCTAC GCCATGAACT TCTGCATAGG 960

GCAGTGCCCA CTACACATAG CAGGCATGCC TGGTATTGCT GCCTCCTTTC ACACTGCAGT 1020

GCTCAATCTT CTCAAGGCCA ACACAGCTGC AGGCACCACT GGAGGGGGCT CATGCTGTGT 1080

ACCCACGGCC CGGCGCCCCC TGTCTCTGCT CTATTATGAC AGGGACAGCA ACATTGTCAA 1140

GACTGACATA CCTGACATGG TAGTAGAGGC CTGTGGGTGC AGTTAGTCTA TGTGTGGTAT 1200

GGGCAGCCCA AGGTTGCATG GGAAAACACG CCCCTACAGA AGTGCACTTC CTTGAGAGGA 1260

GGGAATGACC TCATTCTCTG TCCAGAATGT GGACTCCCTC TTCCTGAGCA TCTTATGGAA 1320

ATTACCCCAC CTTTGACTTG AAGAAACCTT CATCTAAAGC AAGTCACTGT GCCATCTTCC 1380

TGACCACTAC CCTCTTTCCT AGGGCATAGT CCATCCCGCT AGTCCATCCC GCTAGCCCCA 1440

CTCCAGGGAC TCAGACCCAT CTCCAACCAT GAGCAATGCC ATCTGGTTCC CAGGCAAAGA 1500

CACCCTTAGC TCACCTTTAA TAGACCCCAT AACCCACTAT GCCTTCCTGT CCTTTCTACT 1560

CAATGGTCCC CACTCCAAGA TGAGTTGACA CAACCCCTTC CCCCAATTTT TGTGGATCTC 1620

CAGAGAGGCC CTTCTTTGGA TTCACCAAAG TTTAGATCAC TGCTGCCCAA AATAGAGGCT 1680

TACCTACCCC CCTCTTTGTT GTGAGCCCCT GTCCTTCTTA GTTGTCCAGG TGAACTACTA 1740

AAGCTCTCTT TGCATACCTT CATCCATTTT TTGTCCTTCT CTGCCTTTCT CTATGCCCTT 1800

AAGGCGTGA. TTGCCTGAGC TCTATCACCT GAGCTCCCCT GCCCTCTGGC TTCCTGCTGT 1860

GGTCAGGGCA TTTCTTATCC CTGTTCCCTC TCTGTCTAGG TGTCATGGTT CTGTGTAACT 1920

GTGGCTATTC TGTGTCCCTA CACTACCTGG CTACCCCCTT CCATGGCCCC AGCTCTGCCT 1980

ACATTCTGAT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TGAAAAGTTA AAAATTCCTT AATTTTTTAT 2040

TCCTGGTACC ACTACCACAA TTTACAGGGC AATATACCTG ATGTAATGAA AAGAAAAAGA 2100

AAAAGACAAA GCTACAACAG ATAAAAGACC TCAGGAATGT ACATCTAATT GACACTACAT 2160

TGCATTAATC AATAGCTGCA CTTTTTGCAA ACTGTGGCTA TGACAGTCCT GAACAAGAAG 2220

GGTTTCCTGT TTAAGCTGCA GTAACTTTTC TGACTATGGA TCATCGTTCC TT 2272

(2) 对 SEQ ID NO: 2 的说明:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 352 氨基酸
(B) 种类: 氨基酸
(C) 链状:
(D) 拓扑: 线状

(ii)分子种类: 肽

(vi) 原始来源:
(A) 有机体: **Homo sapiens**

(xi) 序列说明: **SEQ ID NO: 2:**

```
Met Thr Ser Ser Leu Leu Leu Ala Phe Leu Leu Leu Ala Pro Thr Thr
1               5                  10                  15

Val Ala Thr Pro Arg Ala Gly Gly Gln Cys Pro Ala Cys Gly Gly Pro
            20                  25                  30

Thr Leu Glu Leu Glu Ser Gln Arg Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Lys
        35                  40                  45

Arg Ser Ile Leu Asp Lys Leu His Leu Thr Gln Arg Pro Thr Leu Asn
    50                  55                  60

Arg Pro Val Ser Arg Ala Ala Leu Arg Thr Ala Leu Gln His Leu His
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Gln Gly Ala Leu Leu Glu Asp Asn Arg Glu Gln Glu Cys
                85                  90                  95

Glu Ile Ile Ser Phe Ala Glu Thr Gly Leu Ser Thr Ile Asn Gln Thr
            100                 105                 110

Arg Leu Asp Phe His Phe Ser Ser Asp Arg Thr Ala Gly Asp Arg Glu
        115                 120                 125

Val Gln Gln Ala Ser Leu Met Phe Phe Val Gln Leu Pro Ser Asn Thr
    130                 135                 140

Thr Trp Thr Leu Lys Val Arg Val Leu Val Leu Gly Pro His Asn Thr
145                 150                 155                 160

Asn Leu Thr Leu Ala Thr Gln Tyr Leu Leu Glu Val Asp Ala Ser Gly
                165                 170                 175

Trp His Gln Leu Pro Leu Gly Pro Glu Ala Gln Ala Ala Cys Ser Gln
            180                 185                 190

Gly His Leu Thr Leu Glu Leu Val Leu Glu Gly Gln Val Ala Gln Ser
        195                 200                 205

Ser Val Ile Leu Gly Gly Ala Ala His Arg Pro Phe Val Ala Ala Arg
    210                 215                 220

Val Arg Val Gly Gly Lys His Gln Ile His Arg Arg Gly Ile Asp Cys
225                 230                 235                 240

Gln Gly Gly Ser Arg Met Cys Cys Arg Gln Glu Phe Phe Val Asp Phe
                245                 250                 255

Arg Glu Ile Gly Trp His Asp Trp Ile Ile Gln Pro Glu Gly Tyr Ala
            260                 265                 270

Met Asn Phe Cys Ile Gly Gln Cys Pro Leu His Ile Ala Gly Met Pro
        275                 280                 285

Gly Ile Ala Ala Ser Phe His Thr Ala Val Leu Asn Leu Leu Lys Ala
```

290 295 300

Asn Thr Ala Ala Gly Thr Thr Gly Gly Gly Ser Cys Cys Val Pro Thr
305 310 315 320

Ala Arg Arg Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg Asp Ser Asn Ile
325 330 335

Val Lys Thr Asp Ile Pro Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Ser
340 345 350

(2) 对 SEQ ID NO: 3 的说明

(i) 序列特征:
(A) 长度: 1558 BP
(B) 种类: 核苷酸
(C) 链状: 双链
(D) 拓扑: 线状

(vi) 原始来源:
(A) 有机体: 小鼠

(xi) 序列说明: SEQ ID NO: 3:

AAGGAGTCAT GCCAGTCGGA GGTCAGTCAC ATTCCTCCCA GGGTCCCTGG TGCCCAGGAC 60

AGAGTTGAAG CACTCCCGTT GAGACCCTGA ATATAGGCTT TGGGTCCTTT AAGGAGGCTA 120

TCCTCCAGCA ATGGCCTCCT CCTTGCTCCT GGCTCTTCTG TTCCTGACTC CAACCACAGT 180

AGTGAACCCC AAAACTGAGG GTCCATGCCC AGCATGTTGG GGTGCCATCT TTGACCTGGA 240

GAGCCAGCGG GAGCTGCTTC TCGATTTGGC CAAGAAAAGT ATCCTGGACA AGCTGCACCT 300

CAGCCAGCGC CCCATACTCA GTCGGCCAGT GTCCAGAGGG GCTCTCAAGA CCGCGCTGCA 360

GCGCCTCCGC GGGCCTCGAC GGGAAACCCT GTTGGAGCAT GACCAGAGAC AAGAAGAATA 420

TGAGATCATC AGCTTTGCTG ACACAGACCT CTCCAGCATC AACCAGACCC GGCTCGAGTT 480

CCACTTCTCT GGTAGAATGG CCAGTGGCAT GGAGGTCCGG CAGACCCGCT TCATGTTCTT 540

CGTGCAGTTC CCCCACAATG CCACCCAGAC CATGAATATA AGAGTTCTTG TGCTAAGACC 600

ATATGACACC AACCTCACCT TGACAAGTCA GTACGTGGTG CAGGTGAATG CCAGTGGCTG 660

GTACCAGCTT CTCCTGGGAC CTGAAGCTCA AGCTGCTTGC AGCCAGGGAC ACCTTACTCT 720

GGAGCTGGTA CCAGAAAGCC AGGTGGCCCA CAGTTCCTTG ATCCTGGGCT GGTTTTCCCA 780

CAGGCCTTTT GTGGCAGCCC AGGTAAGGGT TGAGGGCAAG CATCGGGTTC GCCGGCGAGG 840

TATCGATTGC CAGGGGGGGT CCAGGATGTG CTGTCGACAA GAGTTTTTTG TAGACTTCCG 900

TGAGATTGGC TGGAATGACT GGATCATCCA GCCTGAAGGC TATGCCATGA ACTTCTGCAC 960

TGGGCAGTGC CCACTACATG TGGCAGGCAT GCCTGGCATC TCTGCCTCCT TTCACACTGC 1020

AGTGCTGAAT CTGCTCAAAG CCAACGCAGC TGCTGGCACC ACTGGCAGGG GCTCGTGCTG 1080

CGTGCCTACA TCTCGGCGCC CTCTGTCTTT GCTCTACTAT GACAGGGACA GCAACATTGT 1140

CAAGACGGAT ATACCTGACA TGGTGGTCGA GGCCTGCGGG TGTAGTTAGC TTATGGGTGA 1200

TACAGGCTGC CTGAGGTAGA ATGGCCTTCC TCAGGAAGGG AAACTCTGTT CCCACTTCTG 1260

TCCAGAATGG AAACACCTTT CTAAGCATGC AGACATCCCT CTGTGGACTT CAGGGGATCC 1320

ACCTCTAAAG AGAGTCACTA GTGACCAACA GCCTTTCTCT CTCCTGGGAC ATGGTTGACC 1380

CAGTACACCC ATCCTCAGCC TTAAGTTAGA GGCTAATCGA CTCCTACATA TATATGTCAT 1440

TTTGTCCTAG CAAACACCCC TTAGCTCCCC TTAGTCAACT ATGTAATCTA CTCTGCCTCC 1500

CTGACCCTGC CACCGGAAGG TTCCTATTCC ACGATGATAT GCCTTAGTGT CTCCCCTT 1558

(2) 对 SEQ ID NO: 4 的说明:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 352 氨基酸
(B) 种类: 氨基酸
(C) 链状:
(D) 拓扑: 线状
(ii) 分子种类: 肽
(vi) 原始来源:
(A) 有机体: 小鼠

(xi) 序列说明: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Ser Ser Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe Leu Thr Pro Thr Thr
1 5 10 15

Val Val Asn Pro Lys Thr Glu Gly Pro Cys Pro Ala Cys Trp Gly Ala
20 25 30

Ile Phe Asp Leu Glu Ser Gln Arg Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Lys
35 40 45

Lys Ser Ile Leu Asp Lys Leu His Leu Ser Gln Arg Pro Ile Leu Ser
50 55 60

Arg Pro Val Ser Arg Gly Ala Leu Lys Thr Ala Leu Gln Arg Leu Arg
65 70 75 80

Gly Pro Arg Arg Glu Thr Leu Leu Glu His Asp Gln Arg Gln Glu Glu
85 90 95

Tyr Glu Ile Ile Ser Phe Ala Asp Thr Asp Leu Ser Ser Ile Asn Gln
100 105 110

Thr Arg Leu Glu Phe His Phe Ser Gly Arg Met Ala Ser Gly Met Glu
115 120 125

Val Arg Gln Thr Arg Phe Met Phe Phe Val Gln Phe Pro His Asn Ala
130 135 140

Thr Gln Thr Met Asn Ile Arg Val Leu Val Leu Arg Pro Tyr Asp Thr
145 150 155 160

Asn Leu Thr Leu Thr Ser Gln Tyr Val Val Gln Val Asn Ala Ser Gly
165 170 175

```
Trp Tyr Gln Leu Leu Leu Gly Pro Glu Ala Gln Ala Ala Cys Ser Gln
            180                 185                 190

Gly His Leu Thr Leu Glu Leu Val Pro Glu Ser Gln Val Ala His Ser
        195                 200                 205

Ser Leu Ile Leu Gly Trp Phe Ser His Arg Pro Phe Val Ala Ala Gln
    210                 215                 220

Val Arg Val Glu Gly Lys His Arg Val Arg Arg Arg Gly Ile Asp Cys
225                 230                 235                 240

Gln Gly Gly Ser Arg Met Cys Cys Arg Gln Glu Phe Phe Val Asp Phe
                245                 250                 255

Arg Glu Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Gln Pro Glu Gly Tyr Ala
            260                 265                 270

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

Gly Ile Ser Ala Ser Phe His Thr Ala Val Leu Asn Leu Leu Lys Ala
    290                 295                 300

Asn Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Arg Gly Ser Cys Cys Val Pro Thr
305                 310                 315                 320

Ser Arg Arg Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg Asp Ser Asn Ile
                325                 330                 335

Val Lys Thr Asp Ile Pro Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Ser
            340                 345                 350
```

(2) 对 SEQ ID NO: 5 的说明

(i) 序列特征:
(A) 长度: 18bp
(B) 种类: 核苷酸
(C) 链状: 双链
(D) 拓扑: 线状

(vi) 原始来源:
(A) 有机体: Homo sapiens

(ix) 特征:
(A) 名称/键: 外显子
(B) 位置: 1..3

(ix) 特征:
(A) 名称/键: 内含子
(B) 位置: 4..18

(xi) 序列说明: SEQ ID NO: 5:

```
CAGGTAGGTC CATGGTCG                                              18
```

(2) 对 SEQ ID NO: 6 的说明

(i) 序列特征:
(A) 长度: 18bp
(B) 种类: 核苷酸
(C) 链状: 双链
(D) 拓扑: 线状

(vi) 原始来源:
(A) 有机体: Homo sapiens
(ix) 特征:
(A) 名称/键: 内含子
(B) 位置: 1..15
(ix) 特征:
(A) 名称/键: 外显子
(B) 位置: 16..18

(xi) 序列说明: SEQ ID NO: 6:

CTTGATTTTT AACAGACC 18

图 1

```
                    10          20          30          40
MP121       CCRQEFFVDF  REIGWHDWII  QPEGYAMNFC  IGQCPLHIAG
INHIB βA    CCKKQFFVSF  KDIGWNDWII  APSGYHANYC  EGECPSHIAG
INHIB βB    CCRQQFFIDF  RLIGWNDWII  APTGYYGNYC  EGSCPAYLAG
INHIB α     CHRVALNISF  QELGWERWIV  YPPSFIFHYC  HGGCGLHIP-
            *+++ ++++*  +++** +**+   * ++  + *   * *++++++

                    50          60          70          80
MP121       MPGIAASFHT  AVLNLLKANT  AAGTTGGGSC  C--VPTARRP
INHIB βA    TSGSSLSFHS  TVINHYRMRG  HSPFANLKSC  C--VPTKLRP
INHIB βB    VPGSASSFHT  AVVNQYRMRG  LNP-GTVNSC  C--IPTKLST
INHIB α     ---PNLSLPV  PGAPPTPAQP  YSLLPGAQPC  CAALPGTMRP
             ++ + *+++  ++ +   +        +  +*  *  +*+  ++

                    90         100        110
MP121       LSLLYYDRDS  NIVKTD-IPD  MVVEACGCS
INHIB βA    MSMLYYDDGQ  NIIKKD-IQN  MIVEECGCS
INHIB βB    MSMLYFDDEY  NIVKRD-VPN  MIVEECGCA
INHIB α     LHVRTTSDGG  YSFKYETVPN  LLTQHCACI
            ++ ++++     +++* + ++   + ++ *+*+
```

图 2a

EcoRI NcoI

OD	ATGAATTCCCATGGACCTGGGCTGGMAKGAMTGGAT
BMP 2	ACGTGGGGTGGAATGACTGGAT
BMP 3	ATATTGGCTGGAGTGAATGGAT
BMP 4	ATGTGGGCTGGAATGACTGGAT
BMP 7	ACCTGGGCTGGCAGGACTGGAT
TGF-β1	AGGACCTCGGCTGGAAGTGGAT
TGF-β2	GGGATCTAGGGTGGAAATGGAT
TGF-β3	AGGATCTGGGCTGGAAGTGGGT
INHIBIN α	AGCTGGGCTGGGAACGGTGGAT
INHIBIN β_A	ACATCGGCTGGAATGACTGGAT
INHIBIN β_B	TCATCGGCTGGAACGACTGGAT

图 2b

EcoRI

OID	ATGAATTCGAGCTGCGTSGGSRCACAGCA
BMP 2	GAGTTCTGTCGGGACACAGCA
BMP 3	CATCTTTTCTGGTACACAGCA
BMP 4	CAGTTCAGTGGGCACACAACA
BMP 7	GAGCTGCGTGGGCGCACAGCA
TGF-β1	CAGCGCCTGCGGCACGCAGCA
TGF-β2	TAAATCTTGGGACACGCAGCA
TGF-β3	CAGGTCCTGGGGCACGCAGCA
INHIBIN α	CCCTGGGAGAGCAGCACAGCA
INHIBIN β_A	CAGCTTGGTGGGCACACAGCA
INHIBIN β_B	CAGCTTGGTGGGAATGCAGCA

图 3

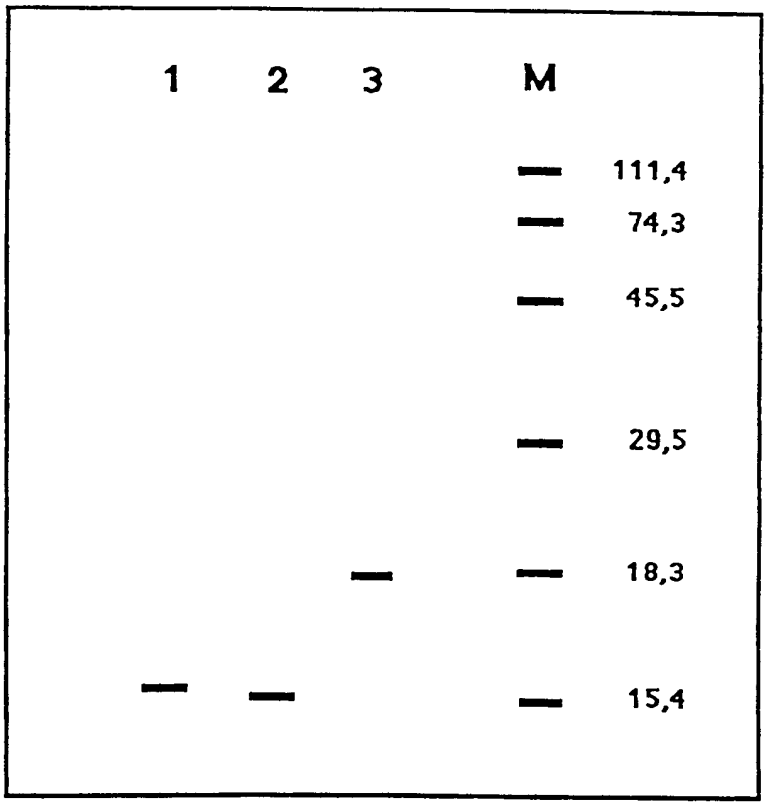

图 4

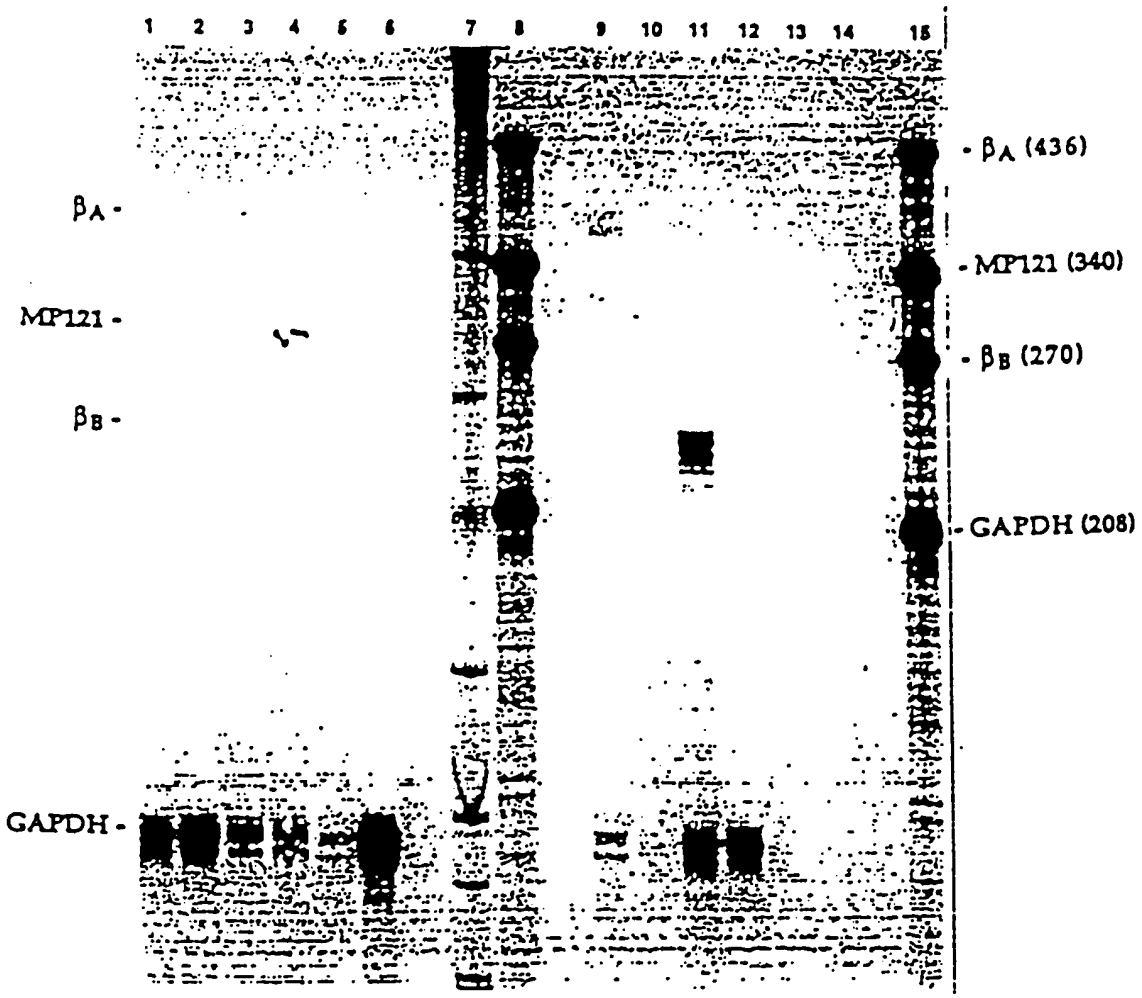
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
βA -
MP121 -
βB -
GAPDH -
- βA (436)
- MP121 (340)
- βB (270)
- GAPDH (208)

图 5

