

[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 01814854.9

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 9 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100535004C

[22] 申请日 2001.8.6 [21] 申请号 01814854.9

[30] 优先权

[32] 2000.8.4 [33] US [31] 60/222,863

[86] 国际申请 PCT/US2001/024747 2001.8.6

[87] 国际公布 WO2002/012284 英 2002.2.14

[85] 进入国家阶段日期 2003.2.28

[73] 专利权人 洛马林达大学医学中心

地址 美国加利福尼亚

共同专利权人 由卫生与公众服务部代表的美利坚
合众国政府

[72] 发明人 W·M·克施 L·安顿

W·J·克林 D-K·康

R·L·勒温 T·A·洛瓦特

审查员 周霞

[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 程泳

权利要求书 1 页 说明书 73 页

[54] 发明名称

用作神经变性疾病诊断的铁调节蛋白-2

[57] 摘要

本发明涉及神经变性疾病标志物的发现。更具体而言，发现在关键半胱氨酸残基处不能氧化的 IRP-2 蛋白形式是神经变性疾病(包括但不限于阿尔茨海默病(AD))的诊断物。实施方案包括编码突变 IRP-2 蛋白及其片段的核酸、突变 IRP-2 蛋白及其片段、抗突变 IRP-2 蛋白及其片段上存在的表位的抗体、制备这些核酸和多肽的方法，以及诊断动物神经变性疾病(如具有患 AD 或轻度认知缺陷综合征(MCI)危险的人)的方法。根据核磁共振成像(MRI)测定，人脑中铁的水平或分布能用来诊断 AD 和/或 MCI。

1. 抗体在制备鉴定需要神经变性疾病治疗或预防的患者的诊断剂中的用途，该抗体可与含有一个或多个选自 SEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14 和 16 的氨基酸序列的突变 IRP-2 蛋白结合，其中需要神经变性疾病的治疗或预防的患者的鉴定包括测定抗体是否与外周血白细胞中的蛋白质结合。

2. 探针在制备鉴定需要神经变性疾病治疗或预防的患者的诊断剂中的用途，该探针可与编码含有一个或多个选自 SEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14 和 16 的氨基酸序列的突变 IRP-2 蛋白的多核苷酸杂交，其中需要神经变性疾病的治疗或预防的患者的鉴定包括测定探针是否与外周血白细胞中的多核苷酸杂交。

3. 权利要求 1 的用途，其中诊断采用选自荧光激活细胞分选、免疫沉淀、Western 印迹、免疫层析、抗体染色和杂交测定的技术。

4. 权利要求 1 或 2 的用途，其中神经变性疾病是阿尔茨海默病。

用作神经变性疾病诊断的铁调节蛋白-2

发明领域

本发明涉及神经变性疾病标志物的发现。更具体而言，发现铁调节蛋白-2 (IRP-2) 形式在关键半胱氨酸残基处不能氧化，是神经变性疾病包括但不限于阿尔茨海默病的诊断物。

发明背景

神经变性疾病殃及全世界几百万人。例如，在美国阿尔茨海默病 (AD) 是继心脏病、癌症、中风之后第 4 位最常见的死因。目前仅在美国就影响超过 4 百万人，在今后 40 年由于人口老化预计其数量将加倍。除高龄和唐氏综合征之外，发展为神经变性疾病的唯一相同危险因素是存在阳性家族史。目前，研究人员正在进行遗传连锁分析，以确定引起神经变性疾病的致病基因，然而，对这类疾病的生物化学机制的了解尚处于初期。

然而，最近越来越怀疑是脑铁调节的干扰引起几种形式的神经变性疾病，如 AD (Gerlach 等人, J. Neurochem. 63:793-807 (1994))。在脑中，铁代谢受严格控制。过量的铁导致毒性，而太少则影响代谢。所有组织都通过铁调节蛋白 1 (IRP-1) 和铁调节蛋白 2 (IRP-2) 的作用调节铁离子的摄取。最近的发现揭示，这些铁调节蛋白，特别是 IRP-2，与在阿尔茨海默病患者中观察到的铁稳态的破坏有关。(Smith 等人, Brain Research, 788: 232-236 (1998))。

例如在缺铁细胞中观察到 IRP-2 水平升高。由于这种升高，IRP-2 与转铁蛋白受体 mRNA 的 3' 引发非翻译区结合，转铁蛋白受体是一种促进铁摄取的蛋白质。另外，IRP-2 还阻止与编码铁蛋白的 HnRNA 的 5' 帽子结构结合，阻断结合，随后阻止翻译。实际上，存在高水平的 IRP-2 利于铁的摄取。另一方面，如果细胞含有过量的铁，IRP-2 快速降解，铁摄取立即降低。于是，身体通过调节 IRP-2

的降解达到铁稳态。（Van Buskirk 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 722-725 (1984)）。需要更多地了解 IRP-2 降解的诱导。

尽管文献中有大量通过 MRI 定量脑铁的报道（Scheffler 等人, *Magn Reson Med.*, 42(5): 829-36 (1999); Vymazal 等人, *J Neurol Sci.*, 134 Suppl: 19-26 (1995); Quast 等人, *Magn Reson Imaging*, 11(4): 465-71 (1993)），但是没有广泛接受的方法或标准，也没有关于人的标准化的或验证的数据。例如，探索颞叶和海马体积改变速度的差异的系列纵向研究，证明是比分别测定更有效的诊断辅助方法。利用 MR 成像技术连续发现 AD 患者中颞叶萎缩。定量和连续测定局部脑铁的能力在神经变性疾病个体的诊断和预期治疗的监测方面具有潜在的用途。

顺磁形式的铁对 MR 图像有许多影响。这些影响包括 T2*加权梯度回波图像中幅度和相位图象的信号改变、T2 加权和扩散加权自旋回波图中的信号改变，以及 T1 加权图像中的信号增强。在铁含量较高的灰质中（如中央沟），铁起 T1 减少造影剂的作用。

脑铁的一个主要来源是铁蛋白的铁形式，它在脑铁的贮存和利用中起重要作用。每个铁蛋白分子由在不同染色体上编码的不同比例的 H（重）和 L（轻）链亚基组成，在铁蛋白分子的功能中起不同的作用。富含 H 的铁蛋白在铁的螯合方面有效，在铁利用率高、铁贮存少的器官中占多数，而富含 L 的铁蛋白在铁的成核方面有效，与铁的贮存有关。在脑中，不同细胞型含有与其功能作用相符合的铁蛋白的同种型。铁蛋白具有独特的磁性特性，被认为是铁诱导的 MR 组织弛豫时间改变的主要原因。脑中铁蛋白的量 10 倍于转铁蛋白的量，每个铁蛋白分子都有螯合可达 4500 个铁原子的能力。铁蛋白贮存于少突胶质细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞的髓磷脂中。巨噬细胞能将铁蛋白转化为血铁黄素——使 T2*加权 MRI 图像中信号改变的另一种强顺磁性物质。尽管众所周知，但铁蛋白的 MRI 特征尚未搞清。预期的 R2 的场依赖性静态场的平方。相反，所有证据都提示，R2 随场强线性改变。此外，一般发现弛豫时间太高，无法用简单的顺磁

性来解释。最近一篇论文提到铁蛋白的弛豫, R_1 为 2.19 ± 0.05 /s/mg Fe/g, 该值与其它测定相符 (Gossuin 等人, *Magn Reson Med*, 43(2):237-43 (2000))。

脑铁的第二个主要来源是游离铁。捕获的铁也存在其它的来源, 但其浓度较小。与相位测定、脑铁的 R_2 或 R_2' 数据和其它量值相符, 基底神经节含有比大脑半球和白质更多的可染色铁。根据尸检脑铁测定, 老人红核中的铁水平为 $2 \mu\text{g/gm}$, 而苍白球中的正常水平约为 $0.25 \mu\text{g/gm}$ 组织。其它发现包括阿尔茨海默病和帕金森病的海马中铁贮存升高, 年龄增长后灰质中铁蛋白增多, 星形胶质细胞的铁水平不变。

尝试用动物 (Fenzi 等人, *J Magn Reson Imaging*, 13(3):392-6 (2001)) 和人 (Bonkovsky 等人, *Radiology*, 212(1):227-34 (1999); Bartzokis 等人, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 46(4):821-33 (2000)) 的强磁场结果定量脑铁。尽管趋势清楚地证明当铁含量升高时 R_2 也升高, 但结果难以预测。例如, Fenzi 表示, 模型上 R_2 的斜率为 $10\text{-}30\text{/s(mg/gm Fe)}$, 不含铁时 R_2 为 40/s 。然而, 在体内 150/s 的单 T_2 对应于 $1.5\text{-}3.5 \text{ mg Fe/gm}$ 湿重的范围, 范围太宽而无法成为临床值。类似地, Bonkovsky 的数据表明, 单信号强度测量对应于低浓度时的 2/mg/gm 干肝, 和高于 1/mg/g 干肝浓度时的 5/mg/gm 干肝。

Ordidge 和他的研究小组 (Mizkeil 等人, *Magn Reson Imaging*, 15(10):1113-9 (1997)) 证明, 关键信息在于 R_2' 而不是 R_2 。 R_2 的一个问题是由于能改变 T_2 并使关于局部铁的信息混杂的其它影响。尽管黑质中的铁局部增多, 但长回波信号反常地恢复, 随着铁含量升高, R_2' 持续升高。Ordidge 等人发展了一种测定 R_2' 的方法, 尽管存在使信号移相并产生假高 R_2' 值的背景场变化。切片选择方向的局部区域用不同的切片选择梯度通过多次重复扫描来补偿。

Gelman 等人测定了 R_2 和 R_2' 效应, 发现 (*Radiology*, 213(1):135-40 (1999)) R_2 的斜率为 60/s/mg 湿重, 截距为 12.7 或 T_2 约 80ms , R_2' 的斜率为 50/s/mg 湿重, 截距为 2.7 (一个可能的推测

是, 这种非零截距可能代表血红素铁的作用), 例如, 苍白球的 $R2'$ 为 12/sec。实际上, 大量论文证明了基底神经节和肝脏中铁的 $T2$ 和 $T2^*$ 效应。此外也用扩散机制描述铁的信号损失。最近, 有关于在静态或慢扩散方案和快扩散方案中旋转移相的理论。在评价平行纤维 (Hajnal 等人, *J Comput Assist Tomogr.*, 16(4):506-13 (1992)和测定脑氧含量 (An 和 Lin, *J Cereb Blood Flow Metab.*, 20(8):1225-36 (2000)) 时, 具有这种独特特征。

$T2^*$ 测定和 $R2'$ 定量现在被认为是脑铁测定的最佳方法。Gillet 等人 (*J Neurol Sci.*, 168(1):21-7 (1999)) 采用 3D 梯度回波结构, 在 11.7T 的场强时 $TE=9ms$, 几乎恰好相当于是我们在 1.5T 时用于最佳相差图像的值。在建立的具有 AD 神经病理标志 (包括老年斑和神经原纤维缠结) 的小鼠模型中, 在基底前脑胆碱能结构, 如 Meynert 的基底中, 可见铁, 而在 AD 的苍白球中发现高铁含量。

最可能发展为 AD 的健忘个体在发展为痴呆之前, 具有被称作轻度认知障碍或轻度认知缺陷综合征 (MCI) 的病症。MCI 的鉴别根据在于对于个体的年龄和教育水平而言异常的记忆损害。尽管不是所有的 MCI 个体都发展为 AD, 但 MCI 能作为 AD 早期发作的一种潜在标志。一些研究人员提出, MCI 可视为初期 AD, 诊断为 MCI 的个体可通过药物治疗好转 (Sramek 等人, *Ann Pharmacother*, 34(10):1179-88 (2000))。因此, MCI 筛查对于早期 AD 干预和/或 AD 预防是有益的。

发明概述

一方面, 本发明提供一种纯化或分离的核酸, 其含有编码对应于人野生型 IRP-2 氨基酸残基 136-216 的肽环的序列, 在该肽环中该序列具有一个突变, 该突变干扰了该肽环中存在的半胱氨酸残基氧化的能力。在一个实施方案中, 核酸序列可至少含有 SEQ. ID. Nos. 3、5、7、9、11、13、15 之一。优选地, 该核酸序列编码含有选自 SEQ. ID. Nos. 4、6、8、10、12、14、16 的序列的肽。

在另一个优选实施方案中, 纯化或分离的多肽含有编码对应于人

野生型 IRP-2 氨基酸残基 136-216 的肽环的序列，在该肽环中该序列具有一个突变，该突变干扰了该肽环中存在的半胱氨酸残基氧化的能力。IRP-2 蛋白可含有选自 SEQ. ID. Nos. 4、6、8、10、12、14、16 的序列。优选地，IRP-2 蛋白选自 SEQ. ID. Nos. 4、6、8、10、12、14、16 的序列。更优选地，本发明涉及这种突变多肽在制备用于诊断神经变性疾病的探针中的用途，并涉及制备可与该突变多肽上存在的表位结合的抗体，其中该抗体不能与野生型 IRP-2 蛋白或其片段交叉反应。该突变体可有一个半胱氨酸残基的置换或缺失。此外，制备步骤也可包括培养产生该抗体的细胞。

在另一个实施方案中，本发明涉及一种确定需要神经变性疾病治疗或预防的患者的方法，包括：从该患者获得含多核苷酸或蛋白质的生物样品；制备一种探针，该探针选自可与野生型或突变 IRP-2 蛋白相互作用的探针，和可与编码野生型或突变 IRP-2 蛋白的多核苷酸相互作用的探针；在允许探针与生物样品中的多核苷酸或蛋白质相互作用的条件下，使生物样品与该探针接触；检测与生物样品中的多核苷酸或蛋白质相互作用的探针的量；通过用生物样品中的多核苷酸或蛋白质确定探针的存在与否，确定患者为需要神经变性疾病治疗或预防的患者。优选地，该方法包括测定探针是否与生物样品中的多核苷酸或蛋白质相互作用。更优选地，该探针选自核酸、蛋白质和拟肽。此外，与多核苷酸或蛋白质相互作用的探针量的检测包括采用选自荧光激活细胞分选（FACs）、免疫沉淀、Western 印迹、免疫层析、抗体染色和杂交测定的技术。此外，神经变性疾病是阿尔茨海默病。

在另一个优选实施方案中，本发明涉及一种抗体，它能与含有选自 SEQ. ID. Nos. 4、6、8、10、12、14、16 的氨基酸序列的蛋白质特异结合。优选地，该抗体能与含有该蛋白质的至少 10 个连续氨基酸的多肽特异结合，该蛋白质有一个半胱氨酸残基的突变。更优选地，该抗体是一种单克隆抗体。

在另一个优选实施方案中，本发明涉及一种纯化或分离的抗体，它能与突变 IRP-2 蛋白特异结合，但不能与野生型 IRP-2 蛋白特异结

合，其中该突变 IRP-2 蛋白在对应于 SEQ. ID. No.2 的氨基酸序列的肽环中含有一个突变。

另一方面，本发明涉及一种区别病人的轻度认知缺陷综合征（MCI）与其它形式痴呆的方法，包括对患者进行核磁共振成像（MRI），用以定量和/或监测脑铁，脑铁的异常水平或分布表明存在 MCI。

发明详述

本发明一方面涉及 IRP-2 基因突变产生耐受体内降解从而干扰铁稳态的 IRP-2 蛋白形式这一发现。某些突变在 IRP-2 的肽环内发生，其中关键的半胱氨酸残基经历依赖铁的氧化事件，这启动了降解过程。

实施方案包括编码突变 IRP-2 蛋白的核酸、突变 IRP-2 蛋白和这些分子的片段。另外，实施方案还包括与编码突变 IRP-2 蛋白或其片段的核酸互补的核酸，和可与突变 IRP 蛋白或其片段结合的抗体。优选地，此处所述的互补核酸用来特异性检测编码突变 IRP-2 蛋白的核酸，及区别编码突变 IRP-2 蛋白的核酸与编码野生型 IRP-2 蛋白的核酸。类似地，此处所述的优选抗体用来特异性检测突变 IRP-2，及区别突变 IRP-2 蛋白与野生型 IRP-2 蛋白。

此处所述的几种试验可用于检测编码 IRP-2 蛋白的核酸或 IRP-2 蛋白本身或这些分子的片段中是否存在突变。因此，与编码野生型和/或突变 IRP-2 蛋白或其片段的核酸互补的核酸序列和可与野生型和/或突变 IRP-2 蛋白上的表位结合的抗体用作神经变性疾病（包括但不限于阿尔茨海默病）的离体标志。因此，此处所述的诊断实施方案涉及基于核酸和基于蛋白质的测定和包括这些测定的试剂盒，用来检测生物样品（例如含外周血细胞的样品）中编码野生型和/或突变 IRP-2 蛋白的核酸或 IRP-2 蛋白。自动诊断测定技术，如标准流式细胞分析技术和阵列技术，能被此处所述的一些实施方案采用。例如，流式细胞分析能使用检测野生型或突变 IRP-2 蛋白的单克隆抗体和多克隆抗体，以快速确定患者是否易患神经变性疾病，如阿尔茨海默病。

基于载体的测定，如 ELISA、免疫层析和免疫条纹（immunostrip）测定，也能用来检测野生型和/或突变 IRP-2 蛋白的存在与否。在一个实施方案中，例如，可与编码野生型和/或突变 IRP-2 蛋白的核酸结合的探针或可与突变或野生型 IRP-2 蛋白结合的抗体与载体结合，用来筛查生物样品，从而进行神经变性疾病的诊断。

另外，神经变性疾病如阿尔茨海默病的诊断也能用与载体结合的野生型和/或突变 IRP-2 蛋白或其片段实现。因此，使固定的 IRP-2 蛋白或其片段接触含有循环抗体的生物样品，利用第二种检测分子（例如标记的抗-IgG 抗体）能确定是否存在抗突变或野生型 IRP-2 蛋白的抗体。存在抗突变 IRP-2 抗体表明易患神经变性疾病。

可以预期，在健康个体中，由 IRP-2 的氨基酸残基 136-216 构成的肽环处发生的依赖铁的氧化修饰启动了 IRP-2 降解，因而启动了铁稳态的调节。这种依赖铁的氧化修饰该肽环内的三个关键半胱氨酸残基，产生氨基丙二酸。向氨基丙二酸的转化处于遍在蛋白化阶段，发出 IRP-2 蛋白降解的信号。相反，可以预期，患神经变性疾病（如阿尔茨海默病）的个体在 IRP-2 基因中含有使 IRP-2 蛋白不能进行氧化修饰或氧化修饰水平下降的突变。一些个体也可含有多个梯度的 IRP-2 蛋白，其中一些 IRP-2 蛋白不能进行依赖铁的氧化，一些 IRP-2 蛋白经历适度的依赖铁的氧化，其它 IRP-2 蛋白经历正常水平的依赖铁的氧化。通过监测突变和野生型 IRP-2 蛋白和/或编码这些分子的核酸的水平，能进行神经变性疾病的预后。

实施方案包括编码耐受体内降解的突变 IRP-2 蛋白、其互补片段和至少含有一个突变的这些蛋白质的片段的核酸。所希望的是，这些核酸编码在对应于人野生型 IRP-2 序列的氨基酸残基 136-216 的肽环内含有突变的蛋白质。编码野生型 IRP-2 肽环一个区域的 189 个核苷酸长度的片段在序列表中列出（SEQ. ID. No.1）。编码人野生型 IRP-2 的全长 cDNA 序列在 SEQ. ID. No.17 中列出，可见 Guo 等人，J. Biol. Chem. 270 16529 (1995)，在此引用作为参考。另外，编码大

鼠野生型 IRP-2 的全长 cDNA 序列在 SEQ. ID. No.19 中列出, 可见 Guo 等人, J. Biol. Chem. 270 16529 (1995), 在此引用作为参考。当提及野生型 IRP-2 核酸时, 根据本文内容, 是指包括 SEQ. ID. No.17 和/或 18 中列出的, 或者在 Guo 等人, J. Biol. Chem. 270 16529 (1995)中所见的野生型 IRP-2 分子, 在此引用作为参考。

优选地, 核酸实施方案至少含有一个突变, 该突变使得对应于人野生型 IRP-2 氨基酸残基 136-216 的肽环内的半胱氨酸残基不能进行依赖铁的氧化。该突变可能包括该肽环内半胱氨酸残基的置换或缺失, 或干扰肽环的三维结构从而阻止依赖铁的氧化的突变。SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15 中公开了编码突变 IRP-2 蛋白肽环的一个区的几种核酸的序列。

某些核酸实施方案是编码突变 IRP-2 的基因组 DNA、RNA 和 cDNA、其互补序列或至少含有一个突变的这些分子的片段。一些实施方案在该肽环内包含大量导致多个置换和/或缺失的突变(例如, 使一个以上半胱氨酸置换和/或缺失的突变)。优选地, 核酸实施方案含有如序列表所示的核苷酸序列 (SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15 及其互补序列和/或其片段)。编码人、哺乳动物和其它生物的突变 IRP-2 的核酸序列也是实施方案, 以及获得这些序列的方法。核酸实施方案可以改变、突变或变化, 使得这种改变、突变或变化导致保守氨基酸置换。

此处所述的多肽实施方案涉及耐受体内降解的突变 IRP-2 形式, 和至少有一个突变的这些蛋白质的片段。所希望的是, 这些多肽在对应于人野生型 IRP-2 的氨基酸残基 136-216 的肽环内含有一个突变, 这使该分子对体内降解具有稳定性(例如, 对蛋白酶降解的稳定性)。对应于野生型 IRP-2 肽环一个区的 63 个核酸长的肽在序列表中列出 (SEQ. ID. No.2)。人野生型 IRP-2 的全长氨基酸序列在 SEQ. ID. No.18 中列出, 可见 Guo 等人, J. Biol. Chem. 270 16529 (1995), 在此引用作为参考。另外, 大鼠野生型 IRP-2 的全长氨基酸序列在 SEQ. ID. No.20 中列出, 可见 Guo 等人, J. Biol. Chem. 270

16529 (1995), 在此引用作为参考。当提及野生型 IRP-2 蛋白时, 根据本文内容, 是指包括 SEQ. ID. No.17 和/或 18 中列出的, 或者在 Guo 等人, J. Biol. Chem. 270 16529 (1995)中所见的野生型 IRP-2 蛋白, 在此引用作为参考。

优选地, 多肽实施方案至少含有一个突变, 它干扰对应于人野生型 IRP-2 氨基酸残基 136-216 的肽环内半胱氨酸残基的依赖铁的氧化。这种突变可能包括该区域内半胱氨酸残基的置换或缺失, 或干扰肽环三维结构从而影响 IRP-2 的依赖铁的氧化的突变。一些实施方案在该肽环内包含多个突变(例如, 一个以上的半胱氨酸突变)。SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16 中列出了几种突变 IRP-2 肽。

多肽实施方案也包括序列表中所示的部分或完整氨基酸序列 (SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16) 和这些分子的功能相当物, 包括但不限于: 含有非保守氨基酸置换的 SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16 的多肽和类似于这些分子的拟肽。其它实施方案包括制备此处所述多肽的方法, 和可与这些多肽结合的分子。实施方案也包括, 例如: 可识别野生型和/或突变 IRP-2 的多克隆和单克隆抗体。优选的抗体可与突变 IRP-2 上的表位结合, 但不与野生型 IRP-2 上的表位结合, 反之亦然, 从而区别这两种分子。提供了生产此处所述的单克隆和多克隆抗体的新方法。

诊断实施方案(包括诊断试剂盒)用来确定生物(例如昆虫、动物、哺乳动物和人)患神经变性疾病的倾向。优选地, 诊断实施方案用来确定有阿尔茨海默病危险的患者。基于核酸和基于蛋白质的诊断都包括于本发明的方面。也就是说, 某些诊断实施方案利用可与诊断核酸或蛋白质相互作用的探针, 通过检测该诊断核酸或蛋白质的存在与否, 确定患神经变性疾病的倾向。诊断核酸可以是, 例如: 编码野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段的核酸。诊断蛋白质可以是, 例如: 野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段。根据本文内容, 术语“探针”指可与诊断核酸或诊断蛋白质或其片段相互作用的分子。“探针”的例子包括至少与野生型或突变 IRP-2 核酸序列(例如人或大鼠 IRP-2)

的片段互补的核酸，和可与野生型或突变 IRP-2 蛋白序列（例如人或大鼠 IRP-2）上存在的表位相互作用的抗体。优选的探针与野生型诊断核酸或诊断蛋白质特异相互作用，但不与突变的诊断核酸或诊断蛋白质相互作用，反之亦然。

例如，一些诊断实施方案涉及与载体结合的试验，测定野生型或突变 IRP-2 或其片段与生物样品中存在的抗体相互作用的能力。所希望的是，野生型或突变 IRP-2 或其片段以多聚体的方式排列于载体上。优选实施方案包括在对应于人野生型 IRP-2 的氨基酸残基 136-216 的肽环内含有一个突变的 IRP-2 或其片段，该突变使 IRP-2 具有稳定性。最优选地，与用来产生多聚剂的载体结合的 IRP-2 或其片段至少含有一个突变，该突变干扰肽环内的半胱氨酸残基进行依赖铁的氧化的能力。

实施方案也包括能用来确定神经变性疾病患者或有患神经变性疾病危险的患者的诊断试剂盒。这些诊断试剂盒可包含与编码野生型或突变 IRP-2 蛋白的核酸互补的核酸，或能结合野生型或突变 IRP-2 蛋白的抗体（通称为“探针”）。另外，诊断试剂盒也能包含多种用于固定样品的载体、试剂、酶、检测化学试剂和说明。

此处所述的一些诊断方法用于鉴定导致神经变性疾病如 AD 的铁代谢缺陷。例如，通过检测编码 IRP-2 蛋白的核酸或 IRP-2 蛋白本身的多态性，能确定有患神经变性疾病危险的患者。其它诊断方法包括检测异常含量或水平的编码突变 IRP-2 蛋白的核酸或突变 IRP-2。通过监测 IRP-2 蛋白不同多态形式的水平，能进行神经变性疾病的预后。通过一种方法，获得野生型 IRP-2 与 IRP-2 的每种突变形式（或编码这些分子的核酸）之比，并且根据与来自健康和患病个体的相同比例的对比分析，进行神经变性疾病的预后。另外，也能获得野生型 IRP-2 与总突变形式之比，用来确定患者是否具有患神经变性疾病的危险。下一部分更详细地描述了几种核酸实施方案。

编码突变 IRP-2 多肽的核酸。

已经发现突变 IRP-2 蛋白家族，能根据存在至少一个干扰分子氧

化和同时降解的突变来鉴定它们。本发明的核酸实施方案包括编码突变 IRP-2 蛋白及其片段的核苷酸。例如，一些实施方案包括编码这些分子的基因组 DNA、RNA 和 cDNA。编码突变 IRP-2 蛋白的核酸能存在于多种不同的生物中，包括但不限于昆虫、动物和哺乳动物。

本发明的核苷酸序列包括，例如：（a）序列表中所示的 DNA 序列（SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15）；（b）编码序列表所示氨基酸序列（SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16）的核苷酸序列；（c）在严格条件下可与序列表中所示 DNA 序列（SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15）的互补序列杂交的任一核苷酸序列，例如，在 50℃ 下，在 0.5M NaHPO₄、7.0% 十二烷基硫酸钠（SDS）、1mM EDTA 中与滤纸结合的 DNA 杂交，在 50℃ 下用 0.2 × SSC/0.2% SDS 洗涤；（d）在低严格条件下（例如，在 37℃ 下在 0.5M NaHPO₄、7.0% 十二烷基硫酸钠（SDS）、1mM EDTA 中杂交，在 37℃ 下用 0.2 × SSC/0.2% SDS 洗涤）可与编码序列表中所示氨基酸序列（SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16）的 DNA 序列的互补序列杂交的任一核苷酸序列。

本发明的实施方案也包括从其它生物（例如植物、霉菌、酵母、昆虫、动物和哺乳动物）中分离的突变 IRP-2 核酸，无论该生物是天然存在的还是工程化的。分离其它种的突变 IRP-2 核酸的方法在下文描述。实施方案也包括上述序列的片段、修饰、衍生物和变体。例如，希望的实施方案包括含有突变 IRP-2 核酸特有的至少 9 个连续碱基的核酸，或与之互补的序列，本发明的优选片段包含突变 IRP-2 核酸所特有的至少 9 个连续碱基，或与之互补的序列。就此而言，核酸实施方案可含有 9 个至约 100 个连续核苷酸。例如，本发明的一些 DNA 片段包括含有突变 IRP-2 核酸特有的少于或等于 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、

73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、125、150、175、200、225 和 240 个连续核苷酸的核酸，优选地含有 SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15 的序列或其互补片段提供的区域。然而优选地，核酸实施方案含有 SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15 特有序列或其互补片段的至少 12、13、14、15、16、17、18 或 19 个连续核苷酸。更优选地，核酸实施方案含有 SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15 特有序列或其互补片段的至少 20-30 个连续核苷酸。

核酸实施方案也能通过突变改变，如对编码功能相当分子的序列进行置换、添加或缺失。由于核苷酸编码序列的简并性，在一些实施方案中能使用编码与 SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16 所示基本相同的突变 IRP-2 氨基酸序列的其它 DNA 序列。包括但不限于：含有突变 IRP-2 核酸的全部或特有部分的核酸序列，或与突变 IRP-2 核酸的全部或特有部分的核酸，它们由于编码序列内功能相当氨基酸残基（从而产生沉默改变）或功能不相当的氨基酸残基（从而产生可检测改变）的不同密码子置换而改变。

上述核酸序列具有生物技术和诊断用途，例如，用于核酸杂交测定、Southern 和 Northern 印迹分析等和神经变性疾病（例如阿尔茨海默病）的预后。利用序列表 SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15 中公开的核酸序列，能设计并通过寡核苷酸合成生产与野生型和/或突变 IRP-2 核酸互补的探针。希望的探针含有与 SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15 的核酸序列互补的核酸序列，与 SEQ. ID. No.1 相比是这些分子特有的。这些探针能用来筛查来自同生物（例如植物、霉菌、真菌、酵母、昆虫、动物和哺乳动物）的 cDNA 或基因组文库，以分离核酸实施方案的天然来源。筛查能通过滤纸杂交进行，例如，使用双份滤纸。标记探针优选地至少含有一种核酸序列的 15-30 个碱基对，该序列与 SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15 的核酸序列互补，与 SEQ. ID. No.1 相比是这些分子特有的。当 cDNA 文库与

标记序列来源于不同的生物类型时，使用的杂交洗涤条件优选地是较低严格性。

对于突变 IRP-2 核酸的克隆，例如，能在 37℃ 下在 0.5M NaHPO₄、7.0% 十二烷基硫酸钠（SDS）、1mM EDTA 中杂交过夜，在 37℃ 下用 0.2 × SSC/0.2% SDS 洗涤。低严格条件是本领域技术人员周知的，根据文库和标记序列来源的具体生物可预测地改变。这些条件的指南，参见例如 Sambrook 等人，1989，《分子克隆：实验室手册》，冷泉港出版社，N.Y.；Ausubel 等人，1989，《现代分子生物学方法》，Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y..

此外，与突变或野生型 IRP-2 核酸或其部分互补的核酸序列能用来通过常规寡核苷酸合成制备寡核苷酸引物，用于采用聚合酶链反应（PCR）或其它酶介导的核酸扩增技术的分离和诊断程序。利用根据此处公开的突变 IRP-2 基因产物的氨基酸序列设计的两条简并寡核苷酸引物组，通过 PCR，能从目的生物分离突变 IRP-2 核酸。反应的模板可以是经 mRNA 反转录获得的 cDNA，例如，mRNA 从已知或认为表达突变 IRP-2 RNA 的生物的细胞或组织制备。本领域技术人员熟悉多种 PCR 技术。关于 PCR 技术的综述，见“遗传工程分子克隆”，White B.A. 编写，《分子生物学方法》67：Humana Press, Totowa (1997)，其公开内容在此引用作为参考，和书名为《PCR 方法与应用》的出版物（1991，冷泉港出版社），其公开内容在此引用作为参考。

对于 mRNA 的扩增，将 mRNA 反转录为 cDNA，随后进行 PCR（RT-PCR），或如美国专利号 5,322,770（其公开内容在此引用作为参考）所述两步使用一种酶，都在本发明的范围之内。另一种技术包括使用反转录酶不对称缺口连接酶链反应（RT-AGLCR），如 Marshall R.L. 等人（PCR Methods and Applications 4:80-84, 1994）所述，其公开内容在此引用作为参考。简言之，用标准方法从合适的细胞或组织来源中分离 RNA。用扩增片段 5' 端特异的寡核苷酸引物

作为第一链合成的引物，对 RNA 进行反转录反应。然后通过标准末端转移酶反应，用鸟嘌呤对得到的 RNA/DNA 杂合体“加尾”。然后用 RNase H 消化该杂合体，用 poly-C 引物引发第二链合成。于是，扩增片段上游的 cDNA 序列容易地分离下来。可以采用的克隆策略的综述见，例如：Sambrook 等人，1989，同上。

在这些扩增方法的任一种中，将欲扩增的序列任一端上的引物添加到适当制备的核酸样品中，同时添加 dNTP 和热稳定聚合酶，如 Taq 聚合酶、Pfu 聚合酶或 Vent 聚合酶。样品中的核酸变性，引物与样品中的互补核酸序列特异杂交。杂交的引物然后延伸。之后启动另一循环的变性、杂交和延伸。循环重复多次，产生在引物位点之间含有该核酸序列的扩增片段。PCR 在几篇专利中有进一步的描述，包括美国专利 4,683,195、4,683,202 和 4,965,188，其公开内容在此引用作为参考。

选择引物，使之与突变 IRP-2 核酸特有的 SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15 核酸序列的一部分基本互补，从而使引物之间的序列扩增。优选地，引物长度为 16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 个核苷酸。稳定杂合体的形成取决于 DNA 的解链温度 (T_m)。 T_m 取决于引物长度、溶液的离子强度和 G+C 含量。引物的 G+C 含量越高，解链温度越高，因为 G:C 对由三个 H 键保持，而 A:T 对只有两个。本发明的扩增引物的 G+C 含量优选地为 10-75%，更优选地为 35-60%，最优选地为 40-55%。在特定测定条件下，本领域技术人员能根据经验确定引物的合适长度。

引物的间距与将要扩增的片段长度有关。在本发明内容中，含有编码突变 IRP-2 核酸片段的核酸序列的扩增片段大小可为至少约 25bp-35kb。25-100 bp 的扩增片段是一般的，50-200 bp 的片段是优选的，200-300 bp 的片段是十分优选地。应当理解，扩增引物可以是允许突变 IRP-2 核酸区域特异扩增的任一序列的引物，例如，能包含修饰如限制位点以利于克隆。

能亚克隆并测序 PCR 产物，以确保扩增的序列是突变 IRP-2 基

因的序列。然后可通过多种方法用 PCR 片段分离全长 cDNA 克隆。例如，能够标记扩增的片段，并用来筛查 cDNA 文库，如噬菌体 cDNA 文库。此外，也能用标记片段通过基因组文库筛查分离基因组克隆。来自多种不同生物（特别是人类）的基因组克隆的鉴定和表征有助于设计诊断试验和用于治疗 and 预防神经变性疾病的临床方案。

此外，也能用从怀疑或已知含有突变 IRP-2 等位基因的生物中获得的 DNA 构建基因组文库，或能用来自已知或怀疑表达突变 IRP-2 等位基因的组织的 RNA 构建 cDNA 文库。然后可标记正常 IRP-2 基因或其任何合适的片段，作为探针用于鉴定这些文库中的相应突变 IRP-2 等位基因。然而优选地，探针与这些突变分子特有的 SEQ. ID. No.3、5、7、9、11、13、15 序列互补。然后可按照本领域技术人员周知的方法，纯化含有突变 IRP-2 基因序列的克隆，并进行序列分析。

另外，也能从怀疑或已知携带这种突变等位基因的生物中已知或怀疑表达突变 IRP-2 等位基因的组织分离 RNA，例如，用该 RNA 合成的 cDNA 构建表达文库。这样，由推断的突变细胞产生的基因产物能够表达，并用标准抗体筛选技术结合抗野生型或突变 IRP-2 基因产物抗体进行筛选（筛选技术参见，例如：Harlow, E. 和 Lane 编写，1988，《抗体：实验室手册》，冷泉港出版社，冷泉港）。利用常规抗体筛选技术，能从不同生物的表达文库分离野生型和/或突变 IRP-2 蛋白。如果 IRP-2 突变产生功能改变的表达基因产物（例如半胱氨酸的氧化减少），一组抗突变 IRP-2 蛋白的多克隆抗体可与突变基因产物高效反应。能够按照本领域技术人员周知的方法，纯化通过与这些标记抗体反应检测的文库克隆，并进行序列分析。

实施方案也包括（a）含有上述任一种突变 IRP-2 编码序列和/或其互补序列（即反义）的 DNA 载体；（b）含有上述任一种突变 IRP-2 编码序列的 DNA 表达载体，该序列与引导克隆序列表达的调节元件有效连接；（c）含有上述任一种突变 IRP-2 编码序列的遗传工程宿主细胞，该序列与引导克隆序列在宿主细胞中表达的调节元件

有效连接。这些重组构建体在宿主细胞中能够自主复制。此外，重组构建体也能整合到宿主细胞的染色体 DNA 中。这些重组多核苷酸一般含有通过人工操作半合成或合成产生的突变 IRP-2 基因组或 cDNA 多核苷酸。因此，此处提供了含有突变 IRP-2 序列及其互补序列的重组核酸，它们不是天然存在的。

尽管能使用如天然存在时的编码突变 IRP-2 蛋白的核酸或含有与突变 IRP-2 基因互补的序列的核酸，但是它们经常由于缺失、置换或插入而改变，并可伴有人类不存在的序列。在此使用时，调节元件包括但不限于：诱导型和非诱导型启动子、增强子、操纵子和本领域技术人员周知的驱动和调节表达的其它元件。这些调节元件包括但不限于：巨细胞病毒 hCMV 立即早期基因、SV40 腺病毒的早期或晚期启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 系统、TRC 系统、噬菌体 A 的主要操纵子和启动子区、fd 外壳蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸激酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子和酵母 α -交配因子的启动子。

另外，也能改造重组突变 IRP-2 核酸序列及其互补序列，以改变蛋白质的加工或表达。例如，但绝非限制，突变 IRP-2 基因能与启动子序列和/或核糖体结合部位组合，或信号序列能插入编码序列上游，以使蛋白质分泌，从而利于收获或生物利用。另外，特定核酸也能在体外或体内突变，以产生和/或破坏翻译、起始和/或终止序列，或在编码区中产生变异，和/或形成新的限制位点或破坏现有的限制位点，或更有利于体外修饰。能够采用本领域周知的任何诱变技术，包括但不限于体外定点诱变（Hutchinson 等人，J. Biol. Chem., 253:6551 (1978)，在此引用作为参考）。

此外，编码其它蛋白质或其它蛋白质的结构域的核酸也能与编码突变 IRP-2 核酸的核酸连接，产生融合蛋白。编码融合蛋白实施方案的核苷酸能编码，例如，与无关蛋白质或肽（例如谷胱甘肽；Ig Fc 域，可提高产生的融合蛋白的稳定性和半衰期；或能用作标记物的酶、荧光蛋白、发光蛋白，例如绿色荧光蛋白（“GFP”））融合的全长突变 IRP-2 蛋白、截短的突变 IRP-2 蛋白或突变 IRP-2 蛋白的肽

片段。融合蛋白也可用作生物技术工具，如下文所述。下一部分描述了几种多肽实施方案和制备这些分子的方法。

突变 IRP-2 多肽

突变 IRP-2 多肽、这些分子的片段和类似于这些分子的化学试剂，包括但不限于拟肽、修饰的 IRP-2 蛋白及其衍生物或变体，也是实施方案。突变 IRP-2 多肽可天然存在，或通过遗传工程存在于大量生物中（例如植物、昆虫、两栖动物、爬行动物、鸟类、其它动物、猫、狗、啮齿动物、灵长类动物、人类和其它哺乳动物）。

上一部分描述的编码突变 IRP-2 蛋白或其片段的核酸能用常规分子生物学技术操作，产生表达突变 IRP-2 蛋白或突变 IRP-2 蛋白片段的重组构建体。这些多肽或其衍生物包括但不限于：其一级氨基酸序列为基本如序列表所示的所有氨基酸序列（SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16），和长度至少为 3 个氨基酸的 SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16 的片段，包括功能相当的氨基酸残基替换序列内的残基，而产生沉默改变的序列。SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16 的序列的优选片段至少为 3 个氨基酸，包含突变 IRP-2 蛋白特有的氨基酸序列，包括功能相当的氨基酸残基替换序列内的残基，从而产生沉默改变的序列。突变 IRP-2 肽片段的长度例如可以短于或等于 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 和 100 个氨基酸，只要该肽含有与 SEQ. ID. No.2 相比，突变 IRP-2 核酸特有的氨基酸。

本发明的实施方案包括，根据任一种标准（包括但不限于不能氧化、不能遍在蛋白化、对蛋白体降解保持稳定的能力）判断，与 SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16 所述的核苷酸序列编码的突

变 IRP-2 蛋白功能相当的蛋白质。这些功能相当的突变 IRP-2 蛋白包括但不限于：上述突变 IRP-2 核苷酸序列编码的氨基酸序列内氨基酸残基的添加或置换，但导致沉默改变，从而产生功能相当的基因产物。例如，实施方案包括 SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16 的突变 IRP-2 多肽和 SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16 的片段内的一个或多个氨基酸残基被置换为具有类似极性的另一种氨基酸的突变 IRP-2 蛋白，作为功能相当物，产生沉默改变。序列内氨基酸的置换物可选自该氨基酸所属类别的其它成员。例如，非极性（疏水性）氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电（碱性）氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。芳族氨基酸包括苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。

突变 IRP-2 多肽能利用本领域周知的技术通过化学合成法（如固相肽合成）制备，如下所述：Merrifield 等人, J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1964), Houghten 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:51:32 (1985), Stewart 和 Young, 《固相肽合成》，Pierce Chem Co., Rockford, IL (1984), Creighton, 1983, 《蛋白质：结构与分子原理》，W.H. Freeman & Co., N.Y., 在此引用作为参考。这些多肽能够合成为在氨基端含或不含甲硫氨酸。突变 IRP-2 蛋白及其片段能用作天然、纯化的突变 IRP-2 蛋白和突变 IRP-2 蛋白片段的生物活性或免疫替代物。

突变 IRP-2 蛋白能够化学合成，但利用本领域众所周知的技术通过重组 DNA 技术能更有效地生产这些多肽。这些方法能用来构建含有突变 IRP-2 核苷酸序列（例如适当的转录和翻译控制信号）的表达载体。这些方法包括，例如：体外重组 DNA 技术、合成技术和体内基因重组。此外，能够编码突变 IRP-2 核苷酸序列的 RNA 也能利用合成仪化学合成。参见，例如，《寡核苷酸合成》中所述的技术，1984, Gait, M.J.编写，IRL Press, Oxford, 在此引用作为参考。

在几个实施方案中，突变 IRP-2 蛋白和突变 IRP-2 蛋白片段在细胞系中表达。例如，使一些细胞表达 SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16 的 IRP-2 多肽或 SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16 的片段。含有这些实施方案的序列、构建体、载体、克隆和其它物质方便地可以是富含或分离的形式。在此使用时，“富含的”是指物质的浓度至少是天然浓度（例如）的约 2、5、10、100 或 1000 倍，有利的是 0.01%（重量），优选地至少约 0.1%（重量）。也涉及约 0.5%、1%、5%、10%和 20%（重量）的富含制剂。术语“分离的”需要从原始环境（例如，在天然存在时，指天然环境）中取出该物质。例如，活动物中存在的天然存在的多核苷酸不是分离的，但与天然系统中的一些或全部物质分开的相同多核苷酸是分离的。这些序列是纯化形式也是有利的。术语“纯化的”不需要绝对纯净；而是一个相对定义。例如，分离的蛋白质通常纯化为根据考马斯染色为电泳同质的。特别涉及将原材料或天然物质纯化至少一个数量级，优选地 2 或 3 个数量级，更优选地 4 或 5 个数量级。

能用多种宿主表达载体系统表达突变 IRP-2 蛋白和突变 IRP-2 蛋白片段。当突变 IRP-2 蛋白或突变 IRP-2 蛋白片段是可溶性衍生物时，如果肽或多肽不是分泌的，则可从培养物中回收，即从宿主细胞中回收，如果肽或多肽由细胞分泌，则可从培养基中回收。然而，表达系统也包括原位（即锚定于细胞膜上）表达突变 IRP-2 蛋白和突变 IRP-2 蛋白片段或其功能相当物的工程宿主细胞。从这些表达系统中纯化或富集突变 IRP-2 蛋白或其片段能用适当的去污剂和脂微团和本领域技术人员周知的方法来实现。然而，当不仅保持突变 IRP-2 蛋白的结构和功能特征重要，而且评价生物活性也重要时，能使用这些工程宿主细胞本身。

能够使用的表达系统包括但不限于：微生物，如用含 IRP-2 核苷酸序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌（如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌）；用含突变 IRP-2 核苷酸序列的重组酵母表达载体转化的酵母（如酵母属、毕赤酵母属）；用含突变

IRP-2 序列的重组病毒表达载体（例如杆状病毒）感染的昆虫细胞系统；用重组病毒表达载体（例如花椰菜花叶病毒，CaMV；烟草花叶病毒，TMV）感染或用含突变 IRP-2 核苷酸序列的重组质粒表达载体（例如 Ti 质粒）转化的植物细胞系统；或携带重组表达构建体的哺乳动物细胞系统（例如 COS、CHO、BHK、293、3T3），其含有来自哺乳动物细胞的启动子（如金属硫蛋白启动子）或来自哺乳动物病毒的启动子（如腺病毒晚期启动子，痘苗病毒 7.5K 启动子）。

在细菌系统中，根据所表达的突变 IRP-2 基因产物的预期用途能方便地选择多种表达载体。例如，当要生产大量这种蛋白质，用于生产抗野生型或突变 IRP-2 蛋白或抗野生型或突变 IRP-2 蛋白片段的抗体时，例如，引导易于纯化的融合蛋白产物高水平表达的载体是希望的。这类载体包括但不限于：大肠杆菌表达载体 pUR278（Ruther 等人, EMBO J., 2:1791 (1983), 其中突变 IRP-2 蛋白或突变 IRP-2 蛋白片段编码序列片段能分别连接到载体中，与 lacZ 编码区符合阅读框，从而产生融合蛋白）；pIN 载体（Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem., 264:5503-5509 (1989)）；等等。也能用 pGEX 载体将外源多肽表达为与谷胱甘肽 S 转移酶（GST）的融合蛋白。这些融合蛋白通常是可溶的，通过吸附于谷胱甘肽-琼脂糖珠，随后在谷胱甘肽存在下洗脱，能够从裂解的细胞中纯化。pGEX 载体设计为含有凝血酶或因子 Xa 蛋白酶切割位点，使得克隆的目标基因产物能从 GST 部分上释放。

在昆虫系统中，苜蓿银纹夜蛾（*Autographa californica*）核多角体病毒（AcNPV）用作表达外源基因的表达。病毒在草地夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）细胞中生长。突变 IRP-2 蛋白或突变 IRP-2 蛋白片段核酸序列能分别克隆到病毒的非必需区（例如多角体基因）内，置于 AcNPV 启动子（例如多角体启动子）控制下。编码序列的成功插入将使多角体基因失活，产生未包封的重组病毒（即缺乏由多角体基因编码的蛋白质外壳的病毒）。然后用这些重组病毒感染

染草地夜蛾细胞，插入的基因在其中表达（例如，见 Smith 等人, J. Virol. 46: 584 (1983); Smith, 美国专利号 4,215,051）。

在哺乳动物宿主细胞中，能采用多种基于病毒的表达系统。如果用腺病毒作为表达载体，目的核苷酸序列能与腺病毒转录/翻译控制复合物（例如晚期启动子和三联前导序列）连接。然后通过体外或体内重组将这种嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入病毒基因组非必需区（例如 E1 或 E3 区）中将产生能在感染宿主中表达 IRP-2 基因产物的活重组病毒。（例如，见 Logan 和 Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3655-3659 (1984)）。特异起始信号也是插入的突变 IRP-2 核苷酸序列有效翻译所需的。这些信号包括 ATG 起始密码子和相邻序列。如果完整的 IRP-2 基因或 cDNA（含有其自身的起始密码子和相邻序列）插入适当表达载体中，则不需要其它的翻译控制信号。

然而，如果只插入突变 IRP-2 蛋白编码序列的一部分，应当提供外源翻译控制信号，也许包括 ATG 起始密码子。此外，起始密码子应当与希望的编码序列的阅读框同相，以确保整个插入片段的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是多种来源的，可以是天然和合成的。含有适当转录增强元件、转录终止子等能提高表达效率（见 Bittner 等人, Methods in Enzymol., 153: 516-544 (1987)）。

另外，也能选择宿主细胞株，其调节插入序列的表达，或以希望的特定方式修饰和加工基因产物。蛋白质产物的这种修饰（例如糖基化）和加工（例如切割）对于蛋白质功能至关重要。不同的宿主细胞具有特有的和特异的翻译后加工机制和蛋白质和基因产物的修饰。能选择适当的细胞系或宿主系统，以确保表达的外源蛋白质正确修饰和加工。为此可使用真核宿主细胞，它们具有用于一级转录物的适当加工、基因产物糖基化和磷酸化的细胞机器。这类哺乳动物宿主细胞包括但不限于 CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3 和 WI38。

对于重组蛋白的长期、高产量地生产，稳定的表达是优选的。例

如，能构建稳定表达野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段的细胞系。优于使用含病毒复制起点的表达载体，能用受适当表达控制元件（例如启动子、增强子序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等）和选择性标记控制的 DNA 转化宿主细胞。外源 DNA 导入后，工程细胞在富集培养基中培养 1-2 天，然后换为选择培养基。重组质粒中的选择性标记提供选择抗性，并使细胞将质粒稳定整合到染色体中，生长形成转化灶，然后克隆并增殖为细胞系。该方法可方便地用于构建表达野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段的细胞系。

能使用大量选择系统，包括但不限于：单纯疱疹病毒胸苷激酶（Wigler 等人, *Cell* 11:223 (1977)）、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（Szybalska 和 Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962)）和腺嘌呤磷酸核糖转移酶（Lowy 等人, *Cell* 22:817 (1980)）基因能分别用于 tk⁻、hgp^rt⁻或 ap^rt⁻细胞中。抗代谢物抗性也能用作筛选下列基因的基础：提供氨甲喋呤抗性的 dhfr（Wigler 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567 (1980); O'Hare 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)）；提供霉酚酸抗性的 gpt（Mulligan 和 Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)）；提供氨基糖甙 G418 抗性的 neo（Colberre-Garapin 等人, *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981)）；和提供潮霉素抗性的 hyg^r（Santerre 等人, *Gene* 30:147 (1984)）。

此外，利用对于所表达的融合蛋白特异的抗体也能容易地纯化任何融合蛋白。例如，Janknecht 等人所述的系统能方便地纯化人细胞系中表达的非变性融合蛋白（Janknecht 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8972-8976 (1991)）。在该系统中，目的基因亚克隆到痘苗重组质粒中，使得该基因的开放阅读框与 6 个组氨酸残基组成的氨基端尾翻译融合。重组痘苗病毒感染的细胞的提取物加至 Ni²⁺ 次氨基乙酸-琼脂糖柱上，用含咪唑的缓冲液选择性洗脱含组氨酸尾的蛋白质。

突变 IRP-2 基因产物或其片段也能在植物、昆虫和动物中表达，

以产生转基因生物。几乎所有植物和昆虫种都能表达这些分子。希望的含野生型或突变 IRP-2 或其片段的转基因植物系统包括,例如:芥属 (*Arabidopsis*)、玉米和衣藻属 (*Chlamydomonas*)。希望的含野生型或突变 IRP-2 或其片段的昆虫系统包括,例如:黑尾果蝇 (*D. Melanogaster*) 和秀丽线虫 (*C. elegans*)。任何种的动物,包括但不限于:两栖动物、爬行动物、鸟类、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猪、小型猪、山羊、狗、猫和非人类灵长类动物,例如狒狒、猴和黑猩猩,都能用来生产突变 IRP-2 转基因动物。转基因生物希望地显示突变 IRP-2 蛋白或其片段的种系转移。某些转基因生物显示存在的一个或多个 IRP-2 基因完全敲除或点突变。例如,在一个实施方案中,转基因动物在对应于氨基酸残基 136-216 的 IRP-2 肽环内,优选地在 SEQ. ID. No.2 所示的区域内,在半胱氨酸残基处至少含有一个点突变。最优选的转基因动物实施方案含有类似于 SEQ. ID. No.4、6、8、10、12、14、16 所示突变 IRP-2 片段的突变。

优选地利用本领域周知的任何技术向动物中导入突变 IRP-2 转基因,产生原始转基因动物系,或敲除或替换原有的 IRP-2 基因。这些技术包括但不限于:原核显微注射 (Hoppe, P.C.和 Wagner, T.E., 1989, 美国专利号 4,873,191); 逆转录病毒介导的基因向种系内的转移 (Van der Putten 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152 (1985)); 胚胎干细胞中的基因打靶 (Thompson 等人, Cell 56: 313-321 (1989)); 胚胎的电穿孔 (Lo, Mol Cell. Biol. 3: 1803-1814 (1983)); 和精子介导的基因转移 (Lavitrano 等人, Cell 57:717-723 (1989)); 等等。这些技术的综述见 Gordon, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229 (1989), 在此引用作为参考。

本发明涉及在所有细胞中均携带突变 IRP-2 转基因的转基因动物,以及在某些而不是全部细胞中携带转基因的动物,即嵌合动物。转基因能整合为单一转基因或串联体,例如头-头串联或头-尾串联。例如,也能按照 Lasko 等人 (Lasko, M.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236 (1992)) 所述,将转基因选择性导入特定细胞型

中，并在其中激活。这种细胞型特异激活所需的调节序列取决于特定目的细胞型，是本领域技术人员周知的。

当希望将突变 **IRP-2** 基因转基因整合到内源突变 **IRP-2** 基因的染色体部位时，优选基因打靶。简言之，当采用这种技术时，设计含有与内源突变 **IRP-2** 基因同源的某些核苷酸序列的载体，用于通过与染色体序列同源重组整合到内源突变 **IRP-2** 基因的核苷酸序列中，并破坏其功能。例如，也能按照 **Gu** 等人 (**Gu** 等人, *Science* 265: 103-106 (1994)) 所述，将转基因选择性导入特定细胞型中，从而只灭活此细胞型中的内源突变 **IRP-2** 基因。这种细胞型特异灭活所需的调节序列取决于特定目的细胞型，是本领域技术人员周知的。

待产生转基因动物后，例如，即能利用标准技术测定重组突变 **IRP-2** 基因的表达。最初的筛选能用 **Southern** 印迹分析或 **PCR** 技术实现，用来分析动物组织，测定是否发生转基因整合。转基因动物组织中转基因的 **mRNA** 表达水平也能用以下技术测定，包括但不限于：从动物获得的细胞的 **Northern** 印迹分析、原位杂交分析和 **RT-PCR**。表达突变 **IRP-2** 基因的细胞样品也能用突变 **IRP-2** 转基因产物特异性抗体免疫细胞化学测定。

除了天然存在的多肽实施方案外，产生更希望的细胞反应的衍生或修饰的分子也属于本发明的范围。例如，衍生的突变 **IRP-2** 分子可包括这样一种工程多肽：一个或多个半胱氨酸残基掺入蛋白质中，促进形成经受更强氧化的衍生物。向多肽中导入半胱氨酸残基能用常规分子生物学技术实现。

其它实施方案包括类似于突变 **IRP-2** 多肽的拟肽。肽生物生产所使用的天然存在的氨基酸都有 **L**-构型。使用 **L**-氨基酸、**D**-氨基酸或两种不同构型的氨基酸的不同组合，能用常规合成法制备合成肽。模拟特定肽（如寡肽）的构象和希望的特征的合成化合物，在发现并消除不希望的特征，如柔性（构象丧失）和键断裂后，称为“拟肽”（参见，例如，**Spatola, A.F.**, 《氨基酸、肽和蛋白质的化学与生物化学》（**Weistein, B** 编写）第 7 卷，267-357, **Marcel Dekker**, 纽约

(1983), 它描述了亚甲基硫代生物电子等排体[CH₂S]在内啡肽类似物中作为酰胺替代的用途; Szelke 等人, 《肽: 结构与功能, 第 18 届美国肽研讨会汇编》(Hruby 和 Rich 编); 579-582, Pierce Chemical Co., Rockford Ill. (1983), 它描述了在来自血管紧张肽原的 6-13 八肽中的 Leu-Val 酰胺键处含有亚甲基氨基[CH₂ NH]和羟基乙烯基[CHOHCH₂] 生物电子等排体的肾素抑制剂。

拟肽的设计和合成一般包括从希望的肽(例如最可能模拟的肽)的氨基酸序列和构象数据(例如, 几何数据, 如键长和键角)开始。然后用这些数据确定应当设计成拟肽的几何学。本领域周知进行该步骤的大量方法与技术, 可使用其中任何一种(参见, 例如, Farmer, P.S., 《药物设计》(Ariens, E.J.编)第 10 卷, 119-143 (Academic Press, 纽约, 伦敦, 多伦多, 悉尼, 旧金山)(1980); Farmer 等人, TIPS, 9/82, 362-365; Verber 等人, TINS, 9/85, 392-396; Kaltenbronn 等人, J. Med. Chem. 33: 838-845 (1990); Spatola, A.F., 《氨基酸、肽和蛋白质的化学与生物化学》, 第 7 卷, 267-357, 第 5 章, “肽骨架修饰: 含酰胺键替代的肽的结构-活性分析。构象约束与关系”(B. Weisten 编; Marcell Dekker 纽约出版)(1983); Kemp, D.S., “拟肽与肽中 β -折叠和 α -螺旋成核的模板方法”Tibech, 第 8 卷, 249-255 (1990))。其它描述见美国专利号 5,288,707; 5,552,534; 5,811,515; 5,817,626; 5,817,879; 5,821,231; 5,874,529。下一部分描述了抗野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段的抗体的制备和用途。

抗-IRP-2 抗体

待 IRP-2 蛋白或其部分合成或表达及分离或纯化后, 能用分离或纯化的蛋白质产生单克隆或多克隆抗体或此两者。根据本文内容, 术语“抗体”可包括多克隆、单克隆、嵌合、单链、Fab 片段和由 Fab 表达文库产生的片段。可识别突变或野生型 IRP-2 蛋白或其片段的抗体具有许多用途, 包括但不限于: 生物技术用途、治疗/预防用途和诊断用途。

为生产抗体，能通过注射突变或野生型 IRP-2 蛋白或保留免疫原性的任一部分、片段或寡肽，免疫不同宿主，包括山羊、兔、大鼠、小鼠等。根据宿主种，能用不同佐剂提高免疫应答。这类佐剂包括但不限于：弗氏、矿物胶，如氢氧化铝，和表面活性物质，如溶血卵磷脂、多聚醇、聚阴离子、肽、油状乳剂、匙孔咸血蓝蛋白（KLH）和二硝基苯酚。BCG（卡介苗）和小棒状杆菌（*Corynebacterium parvum*）也是有用的佐剂。

用来诱生特异性抗体的肽可含有至少包含 3 个氨基酸，优选地至少 10-15 个氨基酸的氨基酸序列。优选地，编码突变或野生型 IRP-2 蛋白片段的短氨基酸片段与另一种蛋白质（如匙孔咸血蓝蛋白（KLH））的片段融合，产生该嵌合分子的抗体。尽管能通过对小鼠注射对应于突变或野生型 IRP-2 蛋白序列的合成 3-mer、10-mer 和 15-mer 肽生产特异识别突变或野生型 IRP-2 蛋白的抗体，但利用重组突变或野生型 IRP-2 蛋白或其片段能生产更加多样的一组抗体。

为了生产突变或野生型 IRP-2 蛋白或其片段的抗体，从转染或转化的细胞中分离基本较纯的蛋白质。例如，通过用 Amicon 过滤装置浓缩，将终制品中的多肽浓度调节到 $\mu\text{g/ml}$ 较低的水平。然后能如下制备目的多肽的单克隆或多克隆抗体：

单克隆抗体能用连续细胞系培养生产抗体分子的任何一种技术制备。包括但不限于：最早由 Koehler 和 Milstein（*Nature* 256:495-497 (1975)）描述的杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术（Kosbor 等人，*Immunol Today* 4:72 (1983)；Cote 等人，*Proc Natl Acad Sci* 80:2026-2030 (1983)）和 EBV-杂交瘤技术（Cole 等人，《单克隆抗体与癌症治疗》，Alan R. Liss Inc, 纽约 N.Y., 77-96 (1985)）。另外，也能使用为生产“嵌合抗体”而发展的技术，即，小鼠抗体基因与人类抗体基因剪接，获得具有适当抗原特异性和生物活性的分子（Morrison 等人，*Proc Natl Acad Sci* 81:6851-6855 (1984)；Neuberger 等人，*Nature* 312:604-608 (1984)；Takeda 等人，*Nature* 314:452-454 (1985)）。此外，为生产单链抗体而描述的技术（美国专利号

4,946,778) 也适用于生产对于突变或野生型 IRP-2 蛋白特异的单链抗体。抗体也能生产: 在淋巴细胞群体中诱导体内产生, 或者筛查重组免疫球蛋白文库或一组高特异性结合试剂, 如 Orlandi 等人, *Proc Natl Acad Sci* 86:3833-3837 (1989), Winter G.和 Milstein C, *Nature* 349:293-299 (1991)所公开的。

也能生产含有突变或野生型 IRP-2 蛋白或其片段的特异结合部位的抗体片段。例如, 这些片段包括但不限于: 能通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的 $F(ab')_2$ 片段, 能通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫键产生的 Fab 片段。此外, 也能构建 Fab 表达文库, 以便快速、简单地鉴定具有希望的特异性的单克隆 Fab 片段 (Huse W.D.等人, *Science* 256:1275-1281 (1989))。

利用一种方法, 单克隆抗体如下制备。简言之, 用产生所选蛋白质或肽的少量微生物重复接种小鼠数周。杀死小鼠, 分离脾脏的抗体产生细胞。在聚乙二醇存在下脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合, 该系统在含氨基喋呤的选择培养基 (HAT 培养基) 上培养破坏过量的未融合细胞。稀释成功融合的细胞, 稀释等份置于微孔板孔中, 培养物继续生长。利用免疫测定法 (例如, 最早由 Engvall, E., *Meth. Enzymol.* 70:419 (1980)所述的 ELISA, 及其衍生方法) 检测孔上清液中的抗体, 鉴定抗体产生克隆。能扩增选择的阳性克隆, 收获其单克隆抗体产物备用。单克隆抗体生产的详细程序如 Davis, L.等人, 《分子生物学基本方法》Elsevier, 纽约, 21-2 节所述。

含有一种蛋白质的异源表位的抗体的多克隆抗血清能通过用上述表达蛋白质或其衍生的肽免疫合适的动物制备, 这些蛋白质或肽可以不修饰或修饰, 以提高免疫原性。有效的多克隆抗体生产受与抗原和宿主种有关的多种因素影响。例如, 小分子比其它的更倾向于低免疫原性, 可能需要使用载体和佐剂。由于接种部位和剂量不同, 宿主动物也可能不同, 不足或过量的抗原都可导致抗血清效价降低。在多个皮内部位施用小剂量 (ng 水平) 抗原似乎是最可靠的。一种有效的兔免疫方案可见 Vaitukaitis, J.等人, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*

33:988-991 (1971)。

能以固定间隔进行加强注射，根据半定量测定，例如，用针对已知浓度抗原的琼脂双免疫扩散测定，当抗体效价开始下降时，收集抗血清。参见，例如：Ouchterlony, O.等人，《实验免疫学手册》第19章，D. Wier 编写，Blackwell (1973)。抗体的稳定浓度通常为 0.1-0.2 mg/ml 血清（约 12 μ M）。抗血清与抗原的亲合力根据制作的竞争结合曲线确定，如 Fisher, D., 《临床免疫学手册》第二版第 42 章（Rose 和 Friedman 编写）Amer. Soc. For Microbiol., Washington, D.C. (1980)所述。按照任何一种方法制备的抗体制剂都可在测定生物样品中携带抗原物质的浓度的定量免疫测定中使用；它们也可半定量或定量使用（例如，确定生物样品中是否存在突变或野生型 IRP-2 蛋白的诊断实施方案）。下文列出了制备抗氧化和还原形式的野生型和突变 IRP-2 的抗体的一个实例。下一节描述了几种评价野生型和突变 IRP-2 核酸和蛋白的性质的 IRP-2 表征试验。实施例 1 描述一种用来制备和筛选野生型和突变 IRP-2 特异性抗体的方法，实施例 2 描述一种用来制备和筛选野生型 IRP-2 特异性抗体的类似方法。

IRP-2 表征试验

术语“IRP-2 表征试验”或“IRP-2 功能试验”或“功能试验”包括直接或间接评价细胞中野生型或突变 IRP-2 核酸或蛋白的存在和野生型或突变 IRP-2 蛋白与膜结合、与另一种分子（例如遍在蛋白）相互作用和/或经受依赖铁的氧化和蛋白体降解的能力的试验。

一些功能试验包括采用多聚剂的结合试验。多聚剂的一种形式涉及含有置于载体上的野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段的产品。这些多聚剂以达到足够亲和力的形式或方法产生野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段。含有野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段的多聚剂通过将希望的多肽与大分子载体连接获得。“载体”可以是载体、蛋白质、树脂、细胞膜或用来连接或固定这些分子的任一种大分子结构。固体载体包括但不限于反应皿孔壁、试管、聚苯乙烯珠、磁珠、硝酸纤维素带、膜、微粒如乳胶颗粒、动物细胞、Duracyte®、人工细胞等。野

生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段也能与无机载体，如二氧化硅材料（例如硅胶、沸石、硅藻土或氯化玻璃）连接，例如，通过载体上的羟基、羧基或氨基和活性基团以共价键连接。

在几种多聚剂中，大分子载体具有疏水表面，通过疏水非共价作用可与野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段的一部分相互作用。有时，载体的疏水表面是一种聚合物，如塑料或疏水基团连接的其它任何聚合物，如聚苯乙烯、聚乙烯或聚乙烯基类。另外，野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段能与包括蛋白质和寡糖/多糖（例如纤维素、淀粉、糖原、壳聚糖或氯化 sepharose）在内的载体共价结合。在后面这些多聚剂中，分子上的活性基团，如羟基或氨基，用来连接载体上的活性基团，以产生共价键。其它多聚剂包括含有化学激活的其它活性基团、以便结合野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段的载体。例如，使用溴化氰激活的基质、环氧树脂激活的基质、硫凝胶或硫丙基凝胶、硝基苯氯甲酸酯和 N-羧基琥珀酰亚胺氯甲酸酯键，或过环氧乙烷丙烯酸载体（Sigma）。

此外，在某些实施方案中，考虑脂质体或脂双层（天然或合成的）作为载体，野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段通过脂质体工程技术与膜表面连接，或掺入膜中。通过一种方法，脂质体多聚体载体含有暴露于表面的野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段。疏水域能与野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段连接，以便与膜相互作用。

也涉及在野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段与载体之间插入接头，如适当长度的接头（例如，构建的类似于 λ 噬菌体柔性区的“ λ 接头”），以使目的多肽有更大的柔性，从而克服载体存在的任何空间障碍。引起或不引起最佳细胞反应的接头的合适长度可通过在本文详述的试验中用不同接头筛查野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段来确定。

在其它实施方案中，上述多聚体载体能连接多聚化野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段，产生“多聚化的多聚体载体”。例如，利用常规分子生物学技术通过串联偶联两个或多个多肽，能获得多聚化配

体。野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段的多聚形式对于许多用途可能是有利的，因为它们具有获得较高亲和力的试剂的能力。在构成多聚化试剂的各个域之间掺入接头或间隔区，如柔性 λ 接头，对于某些实施方案也是有利的。插入适当长度的 λ 接头能使分子具有更大的柔性，并且能克服空间障碍。类似地，在多聚化野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段与载体之间插入接头能产生更大的柔性，并限制载体表现的空间障碍。利用随野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段上的表位的抗体不同而不同的接头筛选野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段，能确定适当长度的接头。实施例 3 描述一种将按照实施例 1 或 2 制备的抗-IRP 抗体与珠连接的方法。

因此，鉴定可与野生型或突变 IRP-2 蛋白或其片段相互作用的试剂的几种方法使用与载体结合的上述试剂。在获得与载体结合的试剂后，例如，使分子（例如抗体或遍在蛋白）接触与载体结合的试剂，直接（例如，利用标记抗体或遍在蛋白）或间接（例如，利用针对抗-IRP-2 抗体或遍在蛋白的标记抗体）测定其结合。在某些试验中，希望氧化或还原与载体结合的野生型或突变 IRP-2，之后使其接触结合配偶体如遍在蛋白。这种氧化能在足够浓度的铁（例如 FeCl_3 ）存在下完成，但技术人员应当了解氧化与载体结合的 IRP-2 蛋白或其片段的其它多种方法。Iwai 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95:4924 (1998)描述了一种氧化 IRP-2 的方法，在此引用作为参考。

在一种表征试验中，例如，将载体结合的突变 IRP-2 肽进行氧化和遍在蛋白化的能力与载体结合的野生型 IRP-2 肽进行氧化和遍在蛋白化的能力相比较。通过一种方法，在 50:1 FeCl_3 和 10mM DTT 存在下，在 20:1 反应混合液（25mM Hepes-NaOH, pH7.2 和 40mM KCl）中，以 0.1:g/l 蛋白质的浓度进行载体结合的 IRP-2 的氧化，37℃ 15-30 分钟。在某些实施方案中，希望使用 1mM 的 Tris-羧乙基-膦（TCEP）代替 DTT 还原二硫化物。特别是，当希望是还原的 IRP-2 时，优选地，在不含铁的反应混合液中使用 1mM TCEP，37℃ 15-30 分钟。

得到氧化和/或还原的 IRP-2 后, 体外遍在蛋白化测定能如下进行。氧化和/或还原的载体结合的野生型或突变 IRP-2 添加到 400: g RD4 S100 裂解液、5mM MgCl_2 、2mM ATP、2mM DTT、6: g 遍在蛋白、25mM Tris-Cl (pH 7.6) 和 60mM KCl 中, 5 分钟。加入冰冷的含 1% NP-40、0.5% 去氧胆酸盐、50mM Tris-Cl (pH 8.0)、150mM NaCl 和 0.1% SDS 的缓冲液终止反应。用该缓冲液洗涤载体结合的偶联物 3 次; 在洗涤之间以 $1500\times g$ 离心珠。珠在 2 $\times$ Laemmli 缓冲液中煮沸 10 分钟, 在适当 SDS PAGE (例如 6%-15%) 上分离。分离的蛋白质通过电印迹转移到膜上, 利用亲和纯化的多克隆或单克隆抗遍在蛋白抗体, 通过 Western 印迹法能证实遍在蛋白的存在。该试验可证实氧化的和还原的突变和野生型 IRP-2 与遍在蛋白相互作用的能力。

利用另一种方法氧化载体结合的野生型和突变 IRP-2 肽 (例如暴露于 H_2O_2 或铁), 测定载体结合的试剂与放射标记的遍在蛋白相互作用的能力。对照包括用 TCEP 还原的载体结合的试剂。例如, 载体结合的野生型和突变 IRP-2 蛋白的等份在含有蛋白酶和异肽酶抑制剂混合物 (5mM EDTA, 10 μ M 氯高铁血红素, 1mM 4-(2-氯乙基)苯磺酰氯, 1mM E-64, 2 μ g/ml 抑酶肽和 10mM 碘乙酰胺) 的 50mM Tris-HCl (pH7.6) 中暴露于 0.02M、0.05M、0.07M 和 0.1M H_2O_2 5、10、15、30 分钟。然后, 使试验终体积为 50 μ l, 含有 50mM Tris-HCl (pH7.6), 5mM MgCl_2 , 1mM DTT, 2mM AMP-PNP, 2 μ g ^{125}I -遍在蛋白, 约 10^6 cpm, 1 μ M 遍在蛋白醛和 30 μ l 载体结合的 IRP-2 (约 10mg 蛋白质/ml)。

在 37 $^\circ\text{C}$ 下温育 20 分钟后, 载体结合的 IRP-2-遍在蛋白偶联物以 $1500\times g$ 离心 30 秒, 用 50mM Tris-HCl (pH7.6), 5mM MgCl_2 , 1mM DTT, 2mM AMP-PNP 洗涤。洗涤重复 3 次。与载体结合的 IRP-2 相关的放射性能通过闪烁法测定。该方法直接检测能与突变或野生型 IRP-2 多肽结合的遍在蛋白的量。

此外, 也能通过添加 50 μ l 2 $\times$ Laemmli 缓冲液并在 100 $^\circ\text{C}$ 下煮沸

10 分钟终止上述反应。随后，在 15% SDS-PAGE 上分离蛋白质。通过电印迹将蛋白质转移到尼龙上，干燥该膜。膜暴露于胶片 2-4 天，随后用抗-IRP-2 抗体进行 Northern 印迹分析。例如，可用与金或辣根过氧化物酶偶联的二级抗体完成结合抗体的检测。这样，遍在蛋白和 IRP-2 蛋白都可检测。遍在蛋白偶联物的水平也能通过放射自显影照片密度测定法定量。

另外也能进行基于细胞的表征试验。例如，能转染 COS 细胞，使之表达突变和/或野生型 IRP-2 蛋白（参见，例如 Samaniego 等人，*J. Biol. Chem.* 269:30904 (1994)，在此引用作为参考，关于转染 COS 细胞表达野生型 IRP-2 的方法）。筛选转化子后，阳性表达细胞等份置于氧化应激下。一种方法是，通过将培养基中柠檬酸铁铵的浓度提高到 400:μg/ml 引发氧化应激。另一种方法是，在含 0.1mM H_2O_2 、不含血清和酚红的培养基中 30 分钟，实现对氧化应激的暴露。立即收集细胞，或在 H_2O_2 或不含铁的培养基中培养，使它们从氧化应激中恢复。除了培养基中不含 H_2O_2 或铁之外，与暴露细胞几乎完全一样地处理对照细胞。细胞暴露于 H_2O_2 或铁之后的生存力可通过台盼蓝排除和 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑盐染色监测。也能测定还原谷胱甘肽的水平。此外，也能按照厂商说明，用生物发光体细胞测定试剂盒（Sigma）监测细胞中的 ATP 水平。

在暴露于 0.1mM H_2O_2 或铁 30 分钟后收集细胞，在含有蛋白酶和异肽酶抑制剂混合物（5mM EDTA, 10μM 氯高铁血红素, 1mM 4-(2-氯乙基)苯磺酰氯, 1mM E-64, 2μg/ml 抑酶肽和 10mM 碘乙酰胺）的 50mM Tris-HCl (pH7.6) 中匀浆。在 SDS-PAGE (8%) 分离并转移到硝酸纤维素后，用亲和纯化的遍在蛋白的多克隆抗体或单克隆抗体探针杂交该印迹，随后与 ^{125}I -蛋白 A 温育。遍在蛋白和遍在蛋白偶联物通过放射自显影检测，并通过图像分析定量。

此外也可收集细胞并在 50mM Tris, 1mM DTT (pH7.6) 中匀浆。细胞上清液中的遍在蛋白偶联物活性定量为催化内源蛋白质底物与外源 ^{125}I -标记的遍在蛋白形成偶联物的能力。该试验在 50μl 终体

积中进行, 含有 50mM Tris-HCl (pH7.6), 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 2mM AMP-PNP, 2μg ¹²⁵I-遍在蛋白, 约 10⁶ cpm, 1μM 遍在蛋白醛, 和 30μl 细胞上清液 (10mg 蛋白质/ml)。添加 30μl 细胞上清液开始反应。在 37℃ 下温育 20 分钟后, 加入 50μl 2×Laemmi 缓冲液终止反应。在 100℃ 下煮沸 10 分钟后, 经 15% SDS-PAGE 分离 20μl 混合液中的蛋白质。进行平行实验作为阴性对照, 其中 AMP-PNP 替换为 4.5 单位的己糖激酶和 12mM 2-去氧葡萄糖。干燥凝胶后, 暴露于胶片 2-4 天。遍在蛋白偶联物的水平能通过放射自显影照片密度测定法定量。利用上述表征试验, 能轻易地测定突变和野生型 IRP-2 蛋白进行氧化和遍在蛋白化的能力 (参见, Shang 等人, J. Biol. Chem. 272:23086 (1997), 在此引用作为参考, 关于适于 IRP-2-遍在蛋白偶联物分析的多种遍在蛋白测定法)。

根据此处公开内容, 技术人员应当理解, 这些试验能用来评价所选择的不同 IRP-2 蛋白形式对于蛋白体降解的能力, 并提出与神经变性疾病有关的 IRP-2 形式。在下面的内容中, 描述了几个诊断实施方案。

诊断实施方案

诊断实施方案一般能根据是基于核酸还是基于蛋白质的试验来归类。一些诊断试验检测 IRP-2 核酸或蛋白质中导致氧化、遍在蛋白化和蛋白体降解异常的突变或多态性。其它诊断试验通过检测与患病生物中的突变和/或野生型 IRP-2 RNA 或蛋白水平相似的待测生物中的突变和/或野生型 IRP-2 RNA 或蛋白水平, 或通过检测与患病生物中的突变和/或野生型 IRP-2 RNA 或蛋白水平不同的待测生物中的突变和/或野生型 IRP-2 RNA 或蛋白水平, 鉴定并区别氧化、遍在蛋白化和蛋白体降解的缺陷。

另外也涉及含有下列实施方案所述的试剂和方法的试剂盒的生产, 以便快速检测和确定神经变性疾病。该诊断试剂盒可包含核酸探针或抗体或其组合, 它特异检测突变或野生型 IRP-2 核酸或蛋白或核酸探针或抗体或其组合, 它们能用来测定野生型或突变 IRP-2 的

RNA 或蛋白质表达水平。这些试剂盒的检测成分一般与一种或多种下列试剂一起提供。一般也提供能吸附或以其它方式结合 DNA、RNA 或蛋白质的载体。可采用的载体包括硝酸纤维素膜、尼龙或衍生尼龙, 其特征在于携带正电取代基的阵列。也能提供一种或多种限制酶、对照试剂、缓冲液、扩增酶、非人类多核苷酸, 如小牛胸腺或鲑精 DNA, 以及描述如何用试剂盒工具诊断神经变性疾病(例如阿尔茨海默病)的一套说明。

基于核酸的有效诊断技术包括但不限于: 直接 DNA 测序、Southern 印迹分析、单链构象分析(SSCA)、RNase 保护试验、点印迹分析、核酸扩增和这些方法的组合。这些分析的起点是从生物样品中分离或纯化的核酸。应当理解, 患者血液是合适的生物样品。此外, 如果用诊断试验确定突变或多态性 IRP-2 的存在与否, 则任何 DNA 来源都能用作生物样品, 包括但不限于毛发、颊细胞和皮肤细胞。使用对应于编码氨基酸残基的 DNA 侧翼区域的引物, 从样品中提取核酸, 并利用对应于编码氨基酸残基的 DNA 侧翼区的引物, 通过 DNA 扩增技术如聚合酶链反应(PCR)扩增, 这些氨基酸残基被认为是引起氧化、遍在蛋白化和蛋白体降解缺陷的多态性, 因而提供神经变性疾病的预后。

从待测个体中获得足量的 DNA 后, 即能用几种方法检测 IRP-2 多态性。直接 DNA 测序, 无论是手工测序还是自动荧光测序, 都能检测这些序列变化。另一种方法是单链构象多态性测定(SSCA) (Orita 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2776-2770 (1989), 在此引用作为参考)。然而该方法不能检测所有序列变化, 特别是在 DNA 片段大小超过 200 个碱基对时, 但能优化检测大多数 DNA 序列变化。

检测灵敏度降低是一个缺点, 但 SSCA 可能引起的通量提高使其成为进行突变检测的直接测序的有吸引力的可行备选方法。然后对在 SSCA 凝胶上迁移率改变的片段测序, 以确定 DNA 序列变化的确切性质。基于检测两条互补 DNA 链间错配的其它方法包括夹板变性凝

胶电泳 (CDGE) (Sheffield 等人, *Am. J. Hum. Genet.* 49:699-706 (1991))、异源双链分析 (HA) (White 等人, *Genomics* 12: 301-306 (1992)) 和化学错配切割 (CMC) (Grompe 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5855-5892 (1989))。关于当前使用的检测 DNA 序列变化的方法的综述可见 Grompe, *Nature Genetics* 5:111-117 (1993)。

下面描述了 7 种众所周知的基于核酸的方法, 用于证实多态性的存在。只是出于举例目的, 而非限制本发明的任何方面, 这些方法包括:

(1) 单链构象分析 (SSCA) (Orita 等人);

(2) 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) (Wartell 等人, *Nucl. Acids Res.* 18:2699-2705 (1990) 和 Sheffield 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 232-236 (1989)), 均在此引用作为参考;

(3) RNase 保护试验 (Finkelstein 等人, *Genomics* 7:167-172 (1990), Kinszler 等人, *Science* 251: 1366-1370 (1991)), 均在此引用作为参考;

(4) 可识别核苷酸错配的蛋白质的用途, 如大肠杆菌 *mutS* 蛋白 (Modrich, *Ann. Rev. Genet.* 25:229-253 (1991)), 在此引用作为参考;

(5) 等位基因特异的 PCR (Rano 和 Kidd, *Nucl. Acids Res.* 17:8392 (1989), 在此引用作为参考), 包括使用 3'端可与多态性杂交的引物, 如果不存在多态性, 无扩增产物;

(6) 耐扩增突变系统 (ARMS), 如欧洲专利申请号 0332435 和 Newton 等人, *Nucl. Acids Res.* 17:2503-2516 (1989) 所公开的, 在此引用作为参考;

(7) 时间温度梯度凝胶电泳 (TTGE), 如 U.S./E.G. 报告 2103 中 Bio-Rad 所述, 在此引用作为参考。

在 SSCA、DGGE、TTGE 和 RNase 保护试验中, 当存在多态性时, 出现一条新的电泳带。SSCA 和 TTGE 可检测由于序列改变导致单链分子内碱基配对不同因而迁移率不同的带, 这可通过电泳检测。

RNase 保护包括将突变多核苷酸切割为两个或多个较小的片段。**DGGE** 用变性梯度凝胶检测序列迁移率的差异。在等位基因特异的寡核苷酸测定 (**ASOs**) (**Conner** 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:278-282 (1983)) 中, 设计一种寡核苷酸检测特异序列, 通过检测杂交信号存在与否进行测定。在 **mutS** 试验中, 蛋白质只与在多态性与非多态性序列的异源双链体中含有核苷酸错配的序列结合。错配是指杂交的核酸双链体, 其中两条链不是 100% 互补。缺乏总同源性是由于从生物样品获得的扩增子中存在一种或多种多态性, 例如, 与非多态性链杂交的。错配检测能用来检测 **DNA** 或 **mRNA** 中的点突变。尽管这些技术比测序灵敏度低, 但它们易于对大量生物样品进行, 并适于阵列技术。

在某些实施方案中, 可鉴别编码野生型 **IRP-2** 与编码突变 **IRP-2** 的多核苷酸的核酸探针以规则的阵列与载体结合, 其中该核酸探针与载体上彼此不重叠的不同区域结合。优选地, 这种规则阵列设计为“可编址的”, 在此记录探针的不同位置, 并能作为测定程序的一部分接近。这些探针与载体在不同的已知位置连接。了解每个核酸探针的精确位置使这些“可编址的”阵列特别可用于结合测定。然后用常规方法 (例如放射或荧光) 标记来自几种生物样品的核酸, 标记样品在允许杂交的条件下添加到阵列上。

如果样品中的核酸与阵列上的探针杂交, 将在载体上对应于杂合体位置的位置处检测到信号。由于每种标记样品的种类已知, 添加标记样品的载体区域已知, 因此能快速确定多形变体的存在。利用高通量诊断或检测分析领域技术人员周知的技术, 这些方法可自动化。

另外也能使用与上述相反的一种方法。生物样品中存在的核酸可置于载体上, 以产生可编址的阵列。优选地, 样品置于载体上不重叠的已知位置。应用与编码多态性的核酸互补的标记核酸探针, 并检测阵列上对应于放置生物样品的位置处是否有信号, 检测每种样品中是否存在具有希望的多态性的核酸。因为生物样品的种类及其在阵列上的位置已知, 能快速鉴定多态性变体。利用高通量诊断分析领域技术

人员周知的技术，这些方法也可自动化。

本发明此方面能使用本领域周知的任何可编址阵列技术。多核苷酸阵列的一个具体实施方案称为 Genechip™，在美国专利 5,143,854、PCT 公开文本 WO 90/15070 和 92/10092 中概述。这些阵列一般用机制合成法或光导合成法生产，它们包括光能法（photolithographic）和固相寡核苷酸合成法的组合（Foodor 等人，*Science*, 251:767-777 (1991)）。一般称为“极大规模固相聚合物合成”（VLSPIS™）的技术的发展，使得在固体载体上固定寡核苷酸阵列成为可能，其中探针一般固定于芯片固体表面的高密度阵列中。美国专利 5,143,854 和 5,412,087 和 PCT 公开文本 WO 90/15070、WO 92/10092 和 WO 95/11995 中提到了 VLSPIS™ 技术的实例，它们描述了通过如光导合成技术等的方法形成寡核苷酸阵列的方法。在旨在产生固定于固体载体上的核苷酸阵列的设计策略中，发展了其它呈现策略，以在芯片上排列和显示寡核苷酸阵列，试图使杂交模式和诊断信息最大化。PCT 公开文本 WO 94/12305、WO 94/11530、WO 97/29212 和 WO 97/31256 公开了这些呈现策略的实例。

本领域技术人员周知多种标记物和偶联技术，能在多种核酸测定中使用。产生用于杂交或 PCR 的标记核酸有几种方法，包括但不限于：寡标记、切口平移、末端标记或使用标记核苷酸的 PCR 扩增。此外，为了生产 mRNA 探针，也能将编码 IRP-2 的核酸能克隆到载体中。这些载体在本领域中周知，可以购得，能用来通过添加适当 RNA 聚合酶（如 T7、T3 或 SP6）和标记核苷酸，在体外合成 RNA 探针。许多公司，如 Pharmacia Biotech（Piscataway N.J.）、Promega（Madison Wis.）和 U.S. Biochemical Corp（Cleveland Ohio），供应商品试剂盒和这些方法的方案。合适的报道分子或标记物包括放射性核素、酶、荧光、化学发光或发色剂，以及底物、辅因子、抑制剂、磁性颗粒等。

如上简述，RNase 保护法是适用于阵列技术的错配切割技术的一个实例。优选地，该方法包括使用与多态性 IRP-2 序列互补的标记核

酸探针 (riboprobe)。然而, 该方法可包括使用与含有野生型基因的 IRP-2 序列互补的标记核酸探针。从生物样品中分离、扩增的核酸探针和 mRNA 或 DNA 退火 (杂交), 随后用 RNase A 酶消化, 这能检测双链 RNase 结构中的错配。如果用 RNase A 检测到错配, 则样品中不含多态性变体, 酶在错配位点切割并破坏核酸探针。因此, 当在电泳凝胶基质上分离退火的 RNA 时, 如果检测到错配并被 RNase A 切割, 将得到比全长双链 RNA (核酸探针) 和 mRNA 或 DNA 小得多的 RNA 产物。

核酸探针的互补体也能分散于阵列上, 并在变性剩余的任何杂合体后用 Rnase A 消化产物严格探针杂交。在这种情况下, 如果检测到错配并且探针被 Rnase A 破坏, 阵列上的互补体将与降解的 RNA 在严格条件下退火。DNA 探针能以一种类似的方式通过酶或化学切割检测错配。参见, 例如: Cotton 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397 (1988); Shenk 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:989 (1975); Novack 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:586 (1986)。也能根据错配双链体相对于配对双链体的电泳能力的改变检测错配 (参见, 例如: Cariello, *Human Genetics* 42:726 (1988), 在此引用作为参考)。在杂交前, 能利用上述任一种技术, PCR 扩增来自待测生物的对应于多态性 IRP-2 区域的 mRNA 或 DNA。

利用常规试验也能检测蛋白质样品中是否存在 IRP-2 多态性或野生型序列。例如, 能用对 IRP-2 多态性有免疫反应性的抗体筛查生物样品, 确定神经变性疾病 (例如阿尔茨海默病) 的倾向。另外, 也能用区别野生型 IRP-2 与突变 IRP-2 的抗体确定一种生物没有神经变性疾病 (例如阿尔茨海默病) 的倾向。在优选实施方案中, 用抗体从溶液中免疫沉淀 IRP-2 的野生型或突变形式, 或者用抗体与 Western 或免疫印迹上的野生型或突变 IRP-2 反应。优选的诊断实施方案也包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA)、免疫放射测定 (IRMA) 和免疫酶测定 (IEMA), 包括采用单克隆和/或多克隆抗体的夹心测定。David 等人在美国专利号 4,376,110 和 4,486,530 中

描述了典型夹心测定，在此引用作为参考。其它实施方案采用美国专利号 5,290,678、5,604,105、5,710,008、5,744,358 和 5,747,274 中公开的免疫条纹技术，在此引用作为参考。

在另一种优选的基于蛋白质的诊断中，本发明的抗体以规则阵列与载体结合，其中大量抗体与载体上彼此不重叠的不同区域结合。如基于核酸的测定一样，基于蛋白质的阵列是规则的阵列，它被设计为“可编址的”，以便记录不同的位置，并能作为测定程序的一部分接近。这些探针在不同的已知位置与载体连接。了解每个核酸探针的精确位置使这些“可编址的”阵列特别可用于结合测定。例如，一种可编址的阵列可包含一种载体，该载体含有的几个区域与特异识别特定 IRP-2 蛋白并能区别突变和野生型 IRP-2 蛋白的大量抗体探针连接。

因此，从生物样品获得蛋白质，并用常规方法（例如放射、比色或荧光）标记。在允许结合的条件下将标记样品添加到阵列上。如果样品中的蛋白质与阵列上的抗体探针杂交，则在载体上对应于抗体-蛋白质复合物的位置处能检测到信号。由于每种标记样品的种类已知，添加标记样品的载体区域已知，因此能快速确定其存在、浓度和/或表达水平。即，利用已知浓度的标记的突变或野生型 IRP-2 蛋白标准，研究人员能精确测定特定待测样品中 IRP-2 蛋白的蛋白质浓度，也能估计特定 IRP-2 蛋白形式的表达水平。也能利用常规密度测定法更精确地测定特定 IRP-2 蛋白的浓度或表达水平。利用高通量诊断分析领域技术人员周知的技术，这些方法可自动化。

在另一个实施方案中，也能使用与上述相反的一种方法。生物样品中存在的蛋白质可置于载体上，产生可编址的阵列。优选地，蛋白质样品置于载体上不重叠的已知位置。利用可识别突变或野生型 IRP-2 蛋白特异性表位的标记抗体探针，检测每种样品中是否存在编码突变或野生型 IRP-2 蛋白的蛋白质。因为生物样品的种类及其在阵列上的位置已知，能快速确定特定多态性的存在、浓度和/或表达水平。

即，利用已知浓度的标记的突变和/或野生型 IRP-2 蛋白标准，

研究人员能精确测定样品中 IRP-2 蛋白的浓度, 根据此信息也能估计特定 IRP-2 蛋白形式的表达水平。也能利用常规密度测定法更精确地测定特定 IRP-2 蛋白的浓度或表达水平。利用高通量诊断分析领域技术人员周知的技术, 这些方法也可自动化。如上详述, 本发明此方面能采用本领域周知的任何可编址阵列技术, 并在芯片上显示蛋白质阵列, 以使抗体结合模式和诊断信息最大化。

在另一种诊断实施方案中, 美国专利号 5,290,678、5,604,105、5,710,008、5,744,358 和 5,747,274 (在此引用作为参考) 中公开的免疫条纹技术适于递呈可用野生型或突变 IRP-2 蛋白抗体识别的抗原。然后用这些抗原递呈免疫条纹分析生物样品中是否存在不同 IRP-2 蛋白形式的抗体。尽管野生型或突变 IRP-2 肽或蛋白是这些实施方案优选的抗原, 但也能使用类似于这些分子的拟肽。这些基于拟肽的实施方案可能具有更强的蛋白酶抗性, 可以加上条纹, 并用于许多用途。优选地, 生产基于拟肽的 IRP-2 阵列 (例如, 含有类似于野生型和突变 IRP-2 蛋白的拟肽的基因芯片), 用于筛查大量生物样品。

在另一个优选方法中, 从怀疑具有神经变性疾病危险的患者获取血样, 利用针对野生型 IRP-2 蛋白和/或突变 IRP-2 蛋白上的表位的抗体通过流式细胞术进行分析。可以使用利用荧光标记第二抗体 (例如荧光蛋白偶联的山羊抗人 IgG) 的标准流式细胞分析技术和可购得的细胞固定和透化试剂盒 (PermaCyte-FP)。因此, 重悬浮的细胞与抗-IRP-2 抗体和二级抗体反应, 免疫复合物通过, 之后进行 FACS。监测细胞的荧光分布和量。利用野生型和/或突变 IRP-2 蛋白特异性抗体, 能快速确定不同形式 IRP-2 蛋白的存在和含量。

如上所述, IRP-2 分子中多态性的存在或检测能提供对神经变性疾病 (例如阿尔茨海默病) 的诊断。其它实施方案包括制备含有对于 IRP-2 特定多态性变体特异的检测成分 (如抗体) 的诊断试剂盒。该检测成分一般与一种或多种下列试剂一起提供。通常也提供能吸收或以其它方式结合 RNA 或蛋白质的载体。用于此目的的适当载体包括但不限于: 硝酸纤维素膜、尼龙或衍生尼龙, 其特征在于携带正电取

代基的阵列，和 GeneChips™ 或其相当物。试剂盒中也可配备一种或多种酶，如逆转录酶和/或 Taq 聚合酶，以及 dNTP、缓冲液或非人类多核苷酸，如小牛胸腺或鲑精 DNA。试剂盒测定结果可由卫生人员或诊断实验室解释。此外，也能生产诊断试剂盒，出售给私人进行自我诊断。

除了根据 IRP-2 DNA、mRNA 或蛋白质中是否存在多态性诊断疾病外，一些与 IRP-2 氧化、遍在蛋白化和蛋白体降解缺陷有关神经变性疾病是由突变和野生型 IRP-2 水平下降引起的。通过监测 IRP-2 特定形式的表达水平，例如，能进行诊断或确定疾病状态。即，许多神经变性疾病起因于剂量效应，其中仍含过多的不能进行氧化的突变 IRP-2。因此，通过测定不同 IRP-2 表达水平的比例（例如 IRP-2 表达模式），能进行健康或疾病的预后。

因此，确定来自健康个体及患神经变性疾病个体的不同样品的 IRP-2 表达水平。这些数值能记录在数据库中，并且可与从待测个体获得的值比较。另外，健康和患病个体的不同样品中的 IRP-2 表达比例或模式也记录在数据库中。这些分析被称为“疾病状态谱”，通过比较一种疾病状态谱（例如健康或患病个体的）与待测个体的疾病状态谱，医生能快速诊断是否患有疾病。含有数名神经变性疾病患者的 IRP-2 表达值的数据库是有价值的标准，能用它来监测疾病的进展。这样，标准与生物值之间的偏差就确定了疾病状态的严重程度。

上述基于核酸和基于蛋白质的诊断技术能用来检测组织中 IRP-2 RNA 或蛋白的水平或含量或表达比。通过定量 Northern 杂交，原位分析、免疫组化、ELISA、基因芯片阵列技术、PCR 和 Western 印迹，例如，能快速确定特定 IRP-2（野生型或突变的）RNA 或蛋白的含量或表达水平，并从此信息确定表达比。例如，一种诊断方法包括将大量 IRP-2 同种型的表达水平比例与疾病状态相关联的方法。为了实施此方法，获得神经变性疾病患者的生物样品和正常个体的生物样品。然后，测定样品中两种或多种 IRP-2 蛋白（例如野生型和突变 IRP-2）或编码 IRP-2 蛋白的核酸的表达水平，并分析野生型和突变

IRP-2 表达比与神经变性疾病之间是否有统计学显著的相关性。统计学显著的相关性能用本领域技术人员熟知的统计学方法确定, 包括 t 检验和卡方检验。

在测定不同 IRP-2 分子的水平后, 即可将信息记录于计算机可读介质上, 如硬盘、软盘、DVD 驱动器、zip 驱动器等。在记录并形成包含所研究的不同 IRP-2 分子表达水平的数据库后, 利用一种用来比较不同 IRP-2 分子的表达水平的比较程序获得表达比。在第一次比较中, 例如, 得到野生型 IRP-2 与突变 IRP-2 之比。另外, 希望的比较可包括但不限于多种形式的突变 IRP-2 之间和/或与野生型 IRP-2 之比。实施例描述了氧化和还原野生型和突变 IRP-2 特异的抗体的制备。本发明另一方面涉及一种利用核磁共振成像 (MRI) 测定和/或监测不同体内状态的脑铁 (非转铁蛋白结合的铁 (NTB)、转铁蛋白结合的铁 (TBI) 和高分子量复合物, 包括铁蛋白和血铁黄素) 的方法。高分辨率 3D 梯度回波成像、去除背景场效应的相位成像 (SWI) (了解 T2* 信号损失) 和利用特殊自旋回波/梯度回波成像方法提取磁化率结合, 可对脑铁进行绝对定量。

A. 高分辨率 3D 梯度回波成像

获得对小局部场磁化率效应的敏感性需要用长回波时间成像。空气/组织界面引起的背景场效应使得与这些区域相邻的组织信号在长回波时间内显著损失。如前所述, 用极小的三维像素 (voxel) 能减少沿三维像素的移相, 使得背景 (或其它) 场的相位变化减至小于 2π 。这种操作使信号明显恢复, 当过滤图像时, 信噪比恢复到较高分辨率。这些结果不同于用较低分辨率获得的结果。该方法称为转换器效应, 即 MR 采集法固有的特殊非线性。在 1.5T 时长达 120ms 的回波时间的相位图像代表一种显示组织间磁化率差异的方法。静脉结构、灰质/白质磁化率差异和基底神经节中的铁用这种改良方法可见。

B. 相位成像和去除背景场效应

使用相位成像是开始估计脑组织间存在顺磁性 (或反磁性) 差异

的一种自然方法。MR 图像中的相位根据 $\phi = \gamma \Delta B T$ 得出，其中 γ 是回磁比， ΔB 是一种组织与另一种组织的磁场改变， t 是测定数据的时间（通常是回波时间 TE）。

显示这些差异的问题是由于空气/组织界面的背景场效应的额外相位效应引起的。研制了一种高通量相位滤波器来除去和要是低空间频率的背景场效应。这种处理技术显著改善了相位图像。该方法已经成功用于在功能脑激活过程中对脑氧饱和度和氧饱和度的更小改变作图（即，对于用于这些实验的特定 3D 序列，我们能容易地测量小至 0.03ppm 的改变，误差为 0.002）。这意味着，对于 0.025 的 p 值，用该程序能测量小至 0.004 的磁化率差异（使用的程序为 5 分钟，3D 梯度回波法，TE=40ms，分辨率为 $0.5 \times 1.0 \times 2.0 \text{mm}^3$ ）。二次收集这些数据并平均，或者平均多次采集的值，以及将数据过滤为较低分辨率，能提高灵敏度。

另一种除去所有线性相位效应的方法是使用双回波法。根据由背景相位效应预期的相位的简单线性依赖性，用第一回波的相位预测第二回波的相位。当第一回波的相位 $\gamma \Delta B T E_1$ 乘以 $T E_2 / T E_1$ 预测 $\gamma \Delta B T E_2$ ，并从第二回波相位减去预测的相位时（通过复杂除法实现），修正图像的预期相位为零，超过与两隔（two-compartment）模型有关的任何非线性效应，其中相位效应不只是简单的相加。该方法允许分离小局部像素效应。

C. 了解 T2*信号损失

最近，对偶极场（其来源是三维像素内含的小体积）引起的球面三维像素的信号损失进行了分析评价。在信号特征中，长回波时间能诱发明显的振荡（即，性质上非指数的信号改变）。在试图定量 T2*加权成像中的信号损失中，发展了一种理论，可在存在磁化率改变的随机分布小局部来源时预测信号特征。具体而言，信号改变在接近时间起点处实际上不是指数的，在中间（和长）时域是指数。该理论能用来提取随机来源的体积磁化率，以及三维像素内的体积分数。该方法的确切定量性质未对一组随机结构进行体内验证。

研究了脑中 T1 弛豫的依赖性, 表明脑正面区域的灰质 T1 最长, 而靠近运动皮质的区域 T1 值最小。该区域的灰质与白质对比降低。相同区域的相位测定显示相位与铁含量之间有强相关性, 在运动皮质中最大。本发明涉及相位与脑铁含量 (是年龄的函数) 之间的相关性。

D. 利用特殊自旋回波/梯度回波成像方法提取磁化率

为了说明背景场在切片或三维像素上的不均一性不是由显微镜作用引起的, 并消除对 rf 脉冲设计的任何依赖性, 定义了特殊组织梯度回波和自旋回波采集方法。在自旋回波周围采集一系列梯度回波, 如下除去背景场效应。最后的梯度回波除以第一个梯度回波图像, 生成在三维像素上没有移相的 T2 加权图像的相当图像。T2 已知后, 消除 T2 对多梯度回波的影响, 只留下由 T2' 引起的原始改变 (磁化率的局部来源引起的信号改变)。信号依赖性可显示在时间上具有平方特性, 当拟合时, 能定量提取磁矩和来源的体积含量。

在本发明的一个优选实施方案中, 为了研究人和动物, 在 1.5T 和 4.7T 下进行 MR 成像。小至 0.004 ppm 的磁化率差异能用 3D 梯度回波法测量, TE=40ms, 分辨率为 $0.5 \times 1.0 \times 2.0 \text{ mm}^3$ (需要 5 分钟扫描时间)。达到 4.7T, 利用小鼠脑表面沟回, 获得约 8 倍的 SNR, 三维像素大小减至 $0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$ 。如果数据采集 40 分钟, 三维像素大小能减至 $0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ mm}$, 这不是该方案成功的临界点, 但在区别小鼠脑结构中有益。

另一个优选实施方案涉及称作模型 (phantom) 的物质的核磁共振像分析 (MRI), 它具有已知的磁化率, 用于验证 MRI 以特定几何学正确定量铁含量的能力。考虑三个不同的图形: 第一, 简单试管与主磁场平行和垂直地成像; 第二, 薄平面成像; 第三, 代表脑实质中许多褶皱的弯曲薄平面成像。这些平面用聚酯薄膜胶片产生, 以分离 2-3mm 厚的层, 模拟人脑。这些模型的大小为每边 10cm, 模拟人脑, 也能适当调节和填补模型。琼脂糖凝胶用作填充物, 涂以一系列不同浓度的几种不同的载铁化合物 (首先 100nmol/gm, 然后从

500nmol/gm 开始, 以 500nmol/gm 的增量, 增至 2000nmol/gm, 共 4 倍), 用来模拟脑铁。用试管形测定每一成分的磁化率, 因为在这些条件下, 几何图形对相位的影响已经确定。具体而言, 准备 4 个不同的模型类型, 包括 a) FeCl_3 , b) FeSO_4 , c) 铁蛋白, d) 血铁黄素。模型实验可研究铁浓度对随机系统的影响(预期低浓度对信号损失有指数影响, 而预期高浓度有更高的几何依赖性)。然而, 脑结构和铁浓度似乎没有如同沟回相位的一般几何影响, 发现相当均一, 不依赖于发生的折叠。这表明为低浓度, 因此, 是不依赖于目标形态校正相位的一种简单方法。这些实验能在 1.5T 和 4.7T 下进行, 以确保有线性行为, 并且从一个场强到下一个不需特别校正。因此, 模型的成像允许将从 MR 图像获得的磁化性值与每个模型内的已知铁浓度相关。能够测试具有不同形态、含有不同浓度的不同铁分子的模型。在施行前, 利用此模型, 对人在 1.5T 下、对动物在 4.7T 下进行程序优化。本发明涉及一种用于动物和人的铁定量方法, 用于监测阿尔茨海默病脑中铁随时间的改变。

另一个优选实施方案涉及对积累脑铁并证实患神经变性疾病的转基因小鼠的核磁共振图像分析, 用于验证 MRI 技术。编码铁调节蛋白-2 (IRP-2) 缺失的工程转基因小鼠已知积累显著水平的神经元铁 (La Vaute 2001)。转基因小鼠在 6 个月以内发作神经变性症状, 一般表现为共济失调、前庭功能障碍、震颤和体位异常 (La Vaute 2001)。优选地, 小鼠保持于 24 小时光-暗日程, 可自由获得固形食物和水。此外, 观察小鼠的皮肤、口粘膜、行为和神经指征, 每周称重一次。对显示异常行为的动物实施安乐死。以选择的间隔, 通过异氟醚吸入 (4% 诱发, 1% 保持) 麻醉动物进行神经成像, 然后置于 MRI 相容的立体定向装置中。连续监测直肠温度, 用置于动物下的温水盘管保持 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

为了用优化 MRI 程序精确关联新的成像发现, 对 4 组小鼠成像。本发明涉及根据含量和位置监测小鼠脑组织中的铁调节蛋白, 包括 IRP-2。分组为 a) 对照 (C57bl/c), b) $\text{Ireb}2^{+/+}$, c) $\text{Ireb}2^{+/-}$,

d) *Ireb2*^{-/-}小鼠。分组可提供脑内铁积累（及其不同形式）的作用的综述。以前的工作证明，这些小鼠的脑铁含量逐渐升高，直到 18 个月大。利用优化的程序，小鼠在 1、3、6、9、12、18 个月时连续成像，以了解脑铁的空间和时间沉积。开始时的成像组较大，足够每个时间点取出 6 只动物进行定量组织化学，这可绝对验证脑（和其它组织）中铁的不同形式，并将成像数据与实际铁水平相关联，局部铁水平和成像数据相关联，以最终了解神经变性疾病的基础。

在成像之前，用足量异氟醚麻醉小鼠，防止 MR 图像上的移动伪影。用配有柱管的 Bruker Avance 4.7T 成像仪进行成像。磁场均匀后，用 700ms 的弛豫时间和 20ms 的回波时间（TE）获得自旋回波 T1 加权探查（scout），在冠向、径向和横向采集两次和 3 个切片。10 个切片，每个 2mm 厚，间隔 2mm，在海马（前囟后约 4mm）和梨状皮质（前囟水平）水平放置于探查图像上。采集自旋回波扩散加权和多回波 T2 加权数据组。对于冠状切片，用于扩散加权程序的参数是 2200/100 ms（TR/TE），采集两次，45mm 视野（FOV），128×128 矩阵。以 Z 方向施加扩散梯度。利用 $b=1000 \text{ s/mm}^2$ 的值计算表观扩散系数（ADC）图。多回波 T2 加权程序参数包括 3000/40ms（TR/TE）和每 40ms 间隔 6 束回波，3-5 个切片采集一次。

ADC 图根据方程 $ADC = \ln(S_0/S_n)/b$ 确定，其中 S_n 是 DW 图像的平均强度， S_0 是相应扩散未加权图像的平均强度{6032}。计算图中每个像素的 ADC。高 ADC 值在 DW 图中显示为亮点。目标区（ROI）的 ADC 计算为特定区域内所有像素的 ADC 的平均值。T2 图由 6 回波 T2 程序生成。然后利用方程 $M(t) = M_0(1 - e^{-t/T_2})$ ，根据与数据的非线性最小平方曲线拟合，计算 T2 弛豫常数，其中 M_0 是衰减前的初始磁化值， t 是回波时间（ms）， T_2 是自旋-自旋弛豫时间。

另一个优选实施方案涉及对每只小鼠切片之前的一个切片进行的图像分析，其中海马下方能看到卷曲。该位置近似地对应于前囟-

3.60mm, 使每一目标区域 (ROI) 的截面最大。利用 Cheshire™ 图像处理软件 (Hayden Image Processing Group, Waltham, MA) 概述并分析 ROI, 由第二名研究人员证实。双侧 ROI 包括小脑扁桃 (和相关的核)、梨状皮质 (包括鼻外和鼻周皮质)、海马、夹肌后皮质 (包括动力和躯体感觉皮质) 和丘脑。两个像素宽度分开海马和夹肌后 ROI。横穿海马底部画线, 延伸穿过皮质, 为夹肌后 ROI 的下边缘划界。梨状和小脑扁桃 ROI 彼此毗连, 向上、向下延伸相同的距离。中间 2-4 个像素分开丘脑与扁桃样 ROI, 使横向脑室的信号作用最小。一个 5×5 像素正方形居于丘脑中心。对于 3D 梯度回波图像, 估计切片周围的切片信息。

尽管从模型数据中提取铁的能力是有希望的, 但固有的分歧混淆了动物 (和人) 脑中铁的定量。为了化学鉴别铁的类型, 尝试了经 MRI 测得的组织与铁蛋白铁之间、 β -淀粉样噬斑周围巨噬细胞与游离铁的相对磁化率。脑铁用相位和 T2' 成像定量, 与在小鼠脑中组织化学发现的相比较。众所周知, 在靠近噬斑的血管之中和周围含铁。MR 图像与小鼠模型的脑铁改变有关, 具有检测早期噬斑形成的能力。

在本发明的另一个实施方案中, 在完成 MRI 分析后, 对 4 只小鼠实施安乐死, 收集脑和血液组织, 贮存、加工, 用于免疫组织化学和铁化学, 补充 MRI 研究, 并与之结合了解 IRP-2 在脑铁代谢中的作用。CO₂ 窒息后从小鼠中取出血液和脑组织。合并每组的血液, 处理分离白细胞, 获得血清样品, 于 -70℃ 冻存。将脑分开成右半球和左半球, 按湿重记录重量, 将每只动物的一个半脑随机置于 plp (4% 缓冲福尔马林溶液) 中, 另一半置于冷冻保护剂中冻存。冷冻的脑组织切片, 前 (水平 1)、中 (水平 2)、后 (水平 3) 每第 3 个切片置于聚赖氨酸包被的载玻片上。大脑皮质、侧脑室、胼胝体和尾状壳存在于水平 1 切片中, 大脑皮质、丘脑、第三脑室和海马存在于水平 2 切片中, 小脑、髓质、第四脑室和锥体束存在于水平 3 切片中。由每个半脑制备 33 个 5-10 μ m 切片 (一式三份: 1 个 H&E, 1 个凋

亡, 1 个对铁蛋白铁分布的普鲁士蓝染色, 7 个利用抗-IRP-1、抗-IRP-2、抗铁蛋白、抗转铁蛋白受体、 β -淀粉样蛋白在蛋白和血铁黄素进行免疫细胞化学)。其它 3 个 $30\mu\text{m}$ 切片 (每个脑水平 1 个) 称重 (湿重), 置于排空的冷冻袋中, 处理基本铁含量。

对于小鼠组织的 H&E 和凋亡测定, 来自三个脑水平中每一个的 $5\text{-}10\mu\text{m}$ 组织切片用 H&E 染色, 进行组织的形态学评价。一组脑组织切片用 Green 等人, 2001 所述改良的 Apodirect 试验标记。利用末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 介导的荧光素 (FITC) -偶联的 BrdU 向核酸游离 3'端添加, 根据 DNA 损伤估计脑组织中的晚期凋亡事件。简言之, 组织在 -20°C 的 70%乙醇中固定 15 分钟。固定的组织用 PBS 重新水合 5 分钟, 与试剂盒提供的 TdT 混合物、反应缓冲液和 FITC-BrdU 温育。组织与 DNA 标记混合物在室温 ($22\text{-}24^{\circ}\text{C}$) 下温育过夜, 洗涤, 并用碘化丙锭 (PI) /RNase 复染 30 分钟, 洗涤, 并用 permafluor 保护, 用盖玻片覆盖。用如下所述的激光扫描细胞计数器 (LSC) (CompuCyte, Cambridge, MA) 定量 FITC-BrdU 掺入。

对于冷冻小鼠组织切片的免疫细胞化学标记, 如上凋亡测定所述固定组织 (Green 等人, 1995; Green 等人, 2001)。固定的组织用一级抗体 (抗 Irp-1、抗 Irp-2、抗铁蛋白、抗转铁蛋白/转铁蛋白受体、 α -淀粉样蛋白在蛋白和血铁黄素) 标记。与一级抗体/抗血清在 40°C 下温育 16 小时, 随后用含 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST) 洗涤。不直接与荧光分子偶联的抗体然后用 alexa-488、alexa-594、Cy-2 或 Cy-5 抗小鼠或兔 IgG 抗体在 25°C 下标记最少 4 小时的温育时间。在二级抗体温育结束前, 根据双标记物和/或共聚焦显微镜作为分析终点的能力, 加入 DAPI ($1\mu\text{g/ml}$) 或碘化丙锭 (PI, $5\mu\text{g/ml}$) 10 分钟。用 PBST 洗涤除去过量的二级抗体和核复染剂, 组织用 permafluor 和盖玻片保护, 避光干燥, 之后进行定量分析 (如前所述的 LSC 和共聚焦显微镜检) 和照相。通过对照切片与非免疫血清和二级抗体或单独的二级抗体温育测定非特异性荧光。

对于小鼠组织中特异蛋白质（包括 IRP-2）的定量，对荧光标记的小鼠组织进行激光扫描细胞计数（LSC）。LSC 以 Olympus BX50 为基础，配有氩离子、氦-氖和 UV 激光，进行六色分析。有 4 个传感器，在扫描过程中同时以标称对应于 0.5 微米空间间隔的 625 000 Hz 进行数字化。荧光能量由接目镜收集，由部分镀银的镜片反射，使 CCD 相机对细胞摄像，并通过扫描透镜引导至扫描镜。二色性镜和光学干涉滤镜由 4 个光放大电子管支持，每一个都能检测特定范围的荧光波长。数字记录荧光值和 x, y 坐标，在计算机中存储为 FCS 文件。所分析的组织根据标记的核勾画轮廓。可选择多种门控参数，包括收集关于信号强度对比细胞大小、细胞数量（面积、周长、计数等）的信息的参数。用对照阳性和阴性样品优化方案设置和显示参数，存储优化的方案和显示文件，用于扫描复制切片。

对于 LSC 定量的特异蛋白质的定位，对小鼠组织进行共聚焦显微镜分析。多种蛋白质具有与其功能性质相符合的不连续位置，因此，通过共聚焦显微镜分析（Altura 等人，2001）进行特异蛋白质的细胞/亚细胞定位能获得较好的理解。荧光标记的组织切片用基于 Olympus IX-70 的 BioRad-1024 共聚焦显微镜进行三维成像。切片用低倍（4-20 $\times$ ）放大、0.5 μm z 级获得上述蛋白质的总体分布，用高倍（40-100 $\times$ ）放大获得细胞/亚细胞定位。

对于小鼠组织的铁定量，通过普鲁士蓝染色（铁）估计铁的分布，通过自动光谱分析估计总铁。对石蜡包埋的切片进行普鲁士蓝染色，使用标准方法的灵敏改良法（Moos 和 Mollgard, 1993），包括亚铁氰化钾（2.5%）与盐酸（2.5%）在室温下混合 20 分钟，用过氧化氢漂洗，细胞核用 PI 复染。

对于 MR 成像数据的统计学分析，利用一维 ANOVA 对每一动物进行双侧目的区（ROI）的左右对比。然后进行双尾 student t 检验（ $p < 0.05$ 时显著， $p < 0.01$ 时非常显著），比较每一时间点的对照值与实验值。

为了从 MR 成像数据中提取相对铁含量，本发明涉及一种使用高

分辨率 3D 梯度回波程序的成像方法。当分辨率是目标大小的 1-2 倍时，所研究的大多数磁化率特征最佳成像。由于此原因，对人脑使用下列参数：TR=67ms，TE=40ms，分辨率为 $0.5 \times 1.0 \times 2.0 \text{ mm}^3$ ，扫描时间为 5 分钟。小结构如 300-500 微米级的小静脉和基底神经节中小于 1 mm^3 的铁沉淀由于信号消除性质和在图像上的相位效应而在图像上可见。对微像素效应的这种强灵敏度使 SWI 如此强烈。如上所述，扫描 40 分钟，小鼠脑中能集中 $0.25 \times 0.25 \times 0.25 \text{ mm}^3$ 的分辨率。

在本发明的另一个实施方案中，对于随机系统，像素大小不重要，为了更快的成像和较佳的 SNR，能使用较大的像素。对上述模型测试梯度回波程序，测定是铁浓度函数和分辨率函数的相位，以确保测量标度不变。

由于灰质与白质间的铁浓度差在 40s 时表现为约 20 度，对应于约 0.1 ppm，进行模型、动物、人体的相位误差分析。如果幅度图像中的 SNR 仅为 15:1，则相位的标准差为 0.06 弧度（4°或 0.002 ppm）或约 10%误差。然后可设想估计大于 3 个标准差的磁化率差异，其对应于 0.006 ppm， $p=0.005$ 。通过平均改善数据能用两种方法实现。第一，根据需要的分辨率，获得更多的数据，或过滤数据。例如，如果较低分辨率足够，则用较低的分辨率进行实验提高 SNR，能显著改善每个单位时间的 SNR。例如，用 $0.5 \times 1.0 \times 2.0 \text{ mm}^3$ 的分辨率和 TE=40ms 进行 MR 扫描需要 5 分钟获得并产生上述数值。然而，如果 $1 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ 的分辨率足够，则扫描需要一半的时间，而产生高 2 倍的 SNR。因此，如果使用相同的 5 分钟，SNR 的提高是 $2\sqrt{2}$ ，相当于在高 8 倍的场强下成像。在模型和动物中，分辨率可为 0.25 微米至 1mm。

对于人类研究，对前 5 名正常人和 5 名年龄相当的阿尔茨海默患者使用几组成像参数。为了测定体内灵敏度，包括 40、80 和 120ms 的回波时间。为了研究是像素大小的函数的灵敏度，分辨率可为 $0.5 \times 0.5 \times 1.0 \text{ mm}^3$ - $1 \times 1 \times 2 \text{ mm}^3$ 。在较高分辨率的图像上，将数据过滤为较低分辨率的图像，使每个方向降低 2 倍，与较低分辨率的数据相

比较。该方法的原理包括相对于较低分辨率扫描，Gibbs 环减少，场不均匀性的影响降低，可检查标度不变性的影响。

绝对铁含量能从 MR 成像数据中提取。随着铁浓度升高，预测 T_2' 值线性提高。使用如下所述的多回波、梯度/自旋回波组合。生成 $TE=80ms$ 的自旋回波结构。关于此回波时间，采集一系列相同极性的 31 束回波（每 2.5ms 一束回波）。下面的理论（更多细节见 xx、xy 和 xz）已经在理论上预测并通过实验验证。一组随机球体的信号特征（已知凝集为球形的铁的近似值，特别是假如使用高像素）如下得出：

$$S(t) = p(1-\lambda)\exp(-0.4l(t\delta\omega)^2) \quad t\delta\omega < 1.5 \quad \text{和}$$

$$S(t) = p(1-\lambda)\exp(-it\Delta\omega)\exp(-R_2'\text{abs}(t-t_s)) \quad t\delta\omega > 1.5$$

其中

$$\delta\omega = \gamma 4\pi(M-M_0)/3, R_2' = 1.21 \lambda \delta\omega, t_s = 1/(1.21 \delta\omega) \quad \text{和} \quad \Delta\omega = -0.16 \lambda \delta\omega.$$

通过测定短时间和长时间成分，获得对每个指数的幅度、 $(M-M_0)$ （从 dw 提取）和 λ （从 R_2' 提取，因为 $\delta\omega$ 未知）的数字估计。例如，对于在 MRI 中用作对比剂的磁性颗粒，如 AMI 225， $\delta\omega$ 的值为 $3.4 \times 10^{-7}/s$ 。利用 $\lambda = 2 \times 10^{-6}$ 的体积分数产生 82.23/s 的 R_2' ，与其它估计十分一致（数字模拟 80-100s）。当磁化率已知时， R_2' 能直接用作体积分数 λ 的量度。对于 ppm 级的更小的磁化率，如反磁或顺磁物质， $\delta\omega$ 为 ms 级。例如，对于血细胞比容为 0.4、氧饱和度为 55% 的静脉， $\delta\omega$ 值约为 3ms。反之，磁化率越小， $\delta\omega$ 越长，在自旋回波之后或之前当 t_s 为 3-30ms 时，能利用信号发现产生信号损失的来源的磁化率及其体积含量。因为测定引起信号损失的每种成分（铁蛋白等）的磁化率，所以不使用该特征。然而，对于直接与 R_2' 有关的 $-0.16 \lambda \delta\omega$ 相位，能进行另一种数字估计。当磁场变化只有一个原因时，这种估计不提供新的信息。然而，如果非血红素铁不是唯一原因，而血红素铁通过上述静脉机制作用，则这两者可能不再相关，测量的回波的暂时响应将是一条抛物线。据此，能用两个参数模型从非血红素铁中提取血红素。最后，作为一种实现方法，用对比剂以一种已知方法修饰局部磁化率，并重复该实验。

上述结果与 T1、T2 和扩散加权图像相比较，用以前的磁场值接触基值。动物模型切片中描述的多回波、自旋回波程序是测量 T1。利用 3D 可变角方法和常规 2D 多 IR 程序估计 T1 值。

对 4 个量度都进行完全误差分析：相位、R2'、R2 和 R1。注意方法间的差异。在许多情况下能发生信号恢复，对于 R1 和 R2 方法，这破坏与铁的相关性，但不影响相位或 R2'。

消除所有线性相位效应的另一种简单方法是使用一种双回波法。根据由背景相位效应预期的简单的相位线性依赖性，利用第一回波的相位预测第二回波的相位。如果第一回波的相位 $\gamma\Delta BTE1$ 乘以 $TE2/TE1$ 预测 $\gamma\Delta BTE2$ ，并从第二回波相位中减去预测的相位（通常通过复杂除法完成），则修正图像的预期相位将为零。这用来估计与两隔模型相关的任何非线性效应，其相位效应不只是简单的相加，并且能分离像素效应内的小局部。

利用已知的铁蛋白磁化率估计方法由血红素和非血红素来源预期的相位，和由红核获得的浓度 1450nmol/gm ，用多回波空间技术估计，以定量血红素组分。血红素铁本身对血液有振荡效应，但对游离铁或铁蛋白中的铁没有。该技术对来自静脉血的部分体积效应敏感，与铁在脑实质中均匀分布引起的效应截然不同。用血液清零（nulling）技术进行相同的程序。定量来自于血红素铁（如果有的话）及游离铁或铁蛋白结合铁的相位特征的量。可以用已知量的对比剂（相位效应为 $1^\circ/\text{mM/ms}$ 的常规试剂）模拟血液磁化率来测定血液的作用。通过加倍血液的作用，估计血液本身对相位的影响。为了解决分辨率和标度依赖性问题，对人类能以 $0.5\text{-}2\text{mm}$ ，对动物能以 $0.25\text{-}1\text{mm}$ 进行实验，确定像素大小对测定是否有任何影响。实质图像相位或临界时间 t_c 的任何改变都是血液作用的标志。

可以对相位特征和相位滤波器去除背景物质的能力进行研究。使用的滤波器是高通量滤波器，故可导致 DC 信息丢失。由于磁化率（未深度累及的组织间的差异）的定量是重要的，检查了提取 DC 水平相位的能力，并与原始的未滤波数据进行了比较。为了确保相位的

绝对值，不使用相位差、已知磁化率的参照标记。进行了动物和人的成像。

在本发明中，利用 MR 成像监测患者。MR 成像对 β -淀粉样斑早期信息灵敏，与 AD 中的铁含量和斑块及血管改变晚期的变性作用有关，是一种定量脑铁的方法。

本发明的另一方面涉及 AD 的早期干预和/或可能的预防方法。由于具有 AD 危险的患者在出现疾病攻击性和破坏性前数月或数年间显示轻度认知缺陷，包括行为功能和记忆缺陷，故用可提高 AD 诊断精确度的特异鉴别神经心理学研究和详细认知检测研究 AD 病例的后续结果是有用的。

由于轻度认知疾病 (MCI) ——一种亚痴呆——提示与 AD 有关，本发明的一个优选实施方案涉及 MCI 患者的目标群体。对于标准神经心理检查，诊断的患者通常表现低于参照标准 1.0-1.5 的标准差，不能用标准检查确定为痴呆。最近公布了对老年人 MCI 早期检查的原则和实际建议 (Jolles 等人, *Drugs Aging*, 7(6):459-79 (1995))。优选地，本发明涉及一种区别不同轻度认知疾病 (MCI) 病例的方法。更优选地，本发明包括静态 MCI 病例与快速发展为痴呆的 MCI 病例的鉴别。此外，本发明还包括一种鉴别痴呆综合征与能够手术治疗的疾病的方法。例如，发展了区别 MCI 与通过分流术能够缓解的常压性脑积水的方法。此外，也发展了区别额-颞萎缩和多梗塞痴呆病与 AD 的方法。本发明的另一个优选实施方案涉及用检查仪器 (包括：小型心理状态检查、神经生理学检查) 临床监测 MCI 患者的痴呆过程，支持数据来自聚焦认知仪和信息。

另一个优选实施方案涉及脑病和铁代谢的相关性。优选地，通过 MRI 技术定量的脑铁水平与患者痴呆的临床病程相关。此外，通过 IRP-2 测定监测的外周血 IRP-2 水平与患者痴呆的临床病程相关。含有水平不规则的脑铁或外周 IRP-2 的患者作为进一步研究 AD 干预和可能的 AD 预防的最佳候选者。

研究包括 100 名不同来源的 MCI 个体。50 名个体第一年加

入, 50 名个体第二年加入。每个月遇到 6-8 名新 MCI 患者的医疗服务是主要的患者来源。第二位的患者来源包括当地的神经病学家和精神科医生和电台和电视台上的公共服务信息。

电话接触和直接医疗服务后, 对患者进行全面的物理和神经学评价, 包括心理测试研究, 以估计缺陷水平。这些筛选研究如美国神经学研究所质量分组标准委员会所述。

进入过程包括与研究合作者电话谈话或直接的医疗服务。第一次访问是在根据痴呆综合征邮件调查表筛选后约见。

按照质量标准分组委员会准则进行受检者选择。进入研究的标准包括下列:

- 1) 年龄>50 岁
- 2) 教育超过 7 级
- 3) 无主要神经病史: 中风、肿瘤、外伤、内分泌病或精神病
- 4) 无神经破坏药物使用史
- 5) 小型心理状态测试评分 ≥ 10
- 6) 能给予知情同意
- 7) 富有经验的监护人, 家族成员

每名患者的评价在 2 周内完成, 包括 3 个部分。记录编号, 并将标准信息——心理测试得分、血液分析结果、MRI 数据——提取为特殊的编码形式。每两周回顾一次数据。所有受检者都根据 Loma Linda 大学医学中心人类研究委员会和 NIH 批准的规则给予知情同意。

实施例 1

IRP-2 肽特异性抗体的制备

氧化和还原形式的野生型和突变 IRP-2 肽的特异性抗体如下制备。用常规分子生物学方法生产 7 个克隆, 它们在 IRP-2 的氨基酸残基 138-216 的肽环中有一个或多个半胱氨酸被替换为丙氨酸。

“C1A”克隆靠近 N 端的第一个半胱氨酸被替换为丙氨酸 (SEQ. ID.

No.4)。“C2A”克隆靠近 N 端的第二个半胱氨酸被替换为丙氨酸 (SEQ. ID. No.6)。“C3A”克隆靠近 N 端的第三个半胱氨酸被替换为丙氨酸 (SEQ. ID. No.8)。“C12A”克隆靠近 N 端的第一个和第二个半胱氨酸被替换为丙氨酸 (SEQ. ID. No.10)。“C23A”克隆靠近 N 端的第二个和第三个半胱氨酸被替换为丙氨酸 (SEQ. ID. No.12)。“C13A”克隆靠近 N 端的第一个和第三个半胱氨酸被替换为丙氨酸 (SEQ. ID. No.14)。“C123A”克隆靠近 N 端的第一个、第二个和第三个半胱氨酸被替换为丙氨酸 (SEQ. ID. No.16)。野生型肽序列也在大肠杆菌中重组产生 (SEQ. ID. No.2)。

在重组肽分离后,即进行氧化或还原。在 37℃ 和 50:1 M FeCl₃ 和 10mM DTT 存在下,在 20:1 反应混合液 (25mM Hepes-NaOH, pH 7.2 和 40mM KCl) 中,以 0.1:g/:l 蛋白质的浓度进行 IRP-2 的氧化 15-30 分钟。在 37℃ 下,肽在 1mM Tris-羧乙基-膦 (TCEP) 中温育 15-30 分钟,获得还原形式的肽。获得氧化和还原的肽后,它们与 KLH 偶联,用来在小鼠中生产抗体。杂交瘤用常规方法制备,为生产用来接种小鼠的肽的特异性抗体筛选克隆。发现产生的野生型肽的抗体在 ELISA 和 Western 印迹试验中可识别 SEQ. ID. Nos.2 的肽和全长 IRP-2。发现 1:5000 稀释足够。也用另一种筛选方法筛选某些抗体。因为 IRP-2 的氧化可能依赖于半胱氨酸残基向氨基丙二酸的转化,所以合成含有氨基丙二酸的 IRP-2 肽。根据对氨基丙二酸和天然 IRP-2 肽的反应性筛选克隆。选择对氨基丙二酸有反应性但对天然肽无反应性的克隆。根据本实施例所述,能制备突变和野生型 IRP-2 蛋白的抗体。这些抗体能在此处所述的诊断试验中使用,用来鉴定受检者患神经变性疾病的倾向。下一实施例描述了用来制备野生型 IRP-2 特异性抗体的一种类似方法。

实施例 2

IRP-2 特异性抗体

在本实施例中,提供了一种制备和筛选 IRP-2 特异性抗体的方

法。为了制备该抗体，按照使用说明，用 RIBI 佐剂（Corixa）中的 63 个残基（野生型）的“环肽”免疫 Balb/c 小鼠。然后用标准杂交瘤技术使小鼠脾细胞与 Sp2/0 骨髓瘤细胞融合。根据与环肽及整个分子的反应性筛选得到的杂交瘤。根据 ELISA（天然分子）和 Western 印迹分析（变性分子），6 个克隆为阳性。根据生长特征和强测定结果，选择其中之一（4G11）进行大规模抗体生产。

然后进行 4G11 与其它 5 个克隆的竞争结合试验，以确定它们是识别相同的还是不同的表位。只有一个（14F7）不能明显抑制 4G11 的结合，可能是在不同部位结合。因此，14F7 和 4G11-HRP 成为捕获 ELISA 测定（下述）的基础，它也能用来检测生物样品中的 IRP-2。该试验对低至 1mg/ml 的浓度敏感，显示极佳的线性。

捕获试验如下进行。未标记抗体用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液（Sigma #C-3041）稀释，一般至 1-10 μ g/ml。不同的抗体浓度可能需要根据经验确定，从 10 μ g/ml 向下至工作浓度。不会由于拥挤而阻碍抗原结合是重要的，选择发出强信号的最低浓度。然后将抗体以每孔约 100 μ l 置于以带（Falcon #3073）覆盖的 Immulon-1 平板（Dynex #3355）中，4 $^{\circ}$ C 温育过夜。

随后，将平板加热至室温，用 PBS（w/o tween）（Cellgro, #20-031-CV，稀释为 1 $\times$ 的 10 $\times$ 浓缩物）洗孔 3 次。然后向每孔中添加 200 μ l SuperBlock（Pierce #37515），倒空，共重复该步骤 3 次，阻断平板。板孔用 PBS-Tween（PBS + 0.05% Tween-20, Sigma #P-6585）洗涤 3 次。向孔中加入稀释液（对照）、抗原和标准（约 100 μ l）。使用的稀释液是载体（10% SuperBlock 于 PBS-Tween 中）。轻拍板孔，在室温下反应 1 小时（摇动平板可大大提高测定灵敏度）。随后用 PBS-Tween 洗孔 3 次。

之后加入约 100:1 用载体稀释的 HRP-标记的检测抗体（使用商品时按照厂商建议，自产抗体根据经验适当稀释）。轻拍板孔，在室温下反应 1 小时（摇动平板可大大提高测定灵敏度）。随后用 PBS-Tween 洗孔 3 次。向孔中加入约 100 μ l 底物（Bio-Rad #172-1067）。

开盖反应约 30 分钟，读取 630nm（参照为 490nm）下的吸光度。实验参数是，在测定中，对于大多数浓缩抗原，在约 30 分钟的温育时间内获得约 2.0 的 OD 值。当摸索捕获抗体、抗原和检测抗体的适当稀释度时，进行“跳棋盘”试验是有用的。下一个实施例描述了将抗-IRP-2 抗体与珠连接的一种方法。

实施例 3

载体结合的 IRP-2 抗体

该实施例描述了一种方法，用来制备载体结合的 IRP-2 抗体，用于流式细胞分析。用磺基-SMCC 修饰约 5mg 纯化的、不含载体（无其它蛋白质）的小鼠抗 IRP-2 单克隆抗体，然后与 15mg 2-亚胺硫烷（iminothiolane）修饰的 r-藻红蛋白偶联。用 Sepharose S-300-HR 柱通过大小排阻层析，使产生的偶联物与游离的未偶联 r-藻红蛋白和游离的未偶联单克隆抗体分离。该方法需要 2 天完成。可用的偶联物的终产量约为初始抗体质量的 50-95%，一般预期产量>85%。通过在山羊抗小鼠包被的 7 微米珠上捕获偶联物和流式细胞分析证实偶联成功。

实施例 4

白细胞的制备

用 68% Percoll 通过密度梯度分离由肝素抗凝的外周血样品制备单核细胞。简言之，20ml 未稀释的全血样品在 50ml 离心管中的 25ml 68% Percoll 上分层。然后以 800×g 离心血液 20 分钟。收集界面细胞，离心沉淀。振荡破坏细胞沉淀，用 25ml VitaLyse 红细胞裂解缓冲液（BioErgonomics）裂解，除去残余的红细胞。细胞用 25ml PBS 洗涤一次，然后重悬浮为 1×10^7 单核细胞/ml。每次标记步骤使用 100 微升细胞（ 1×10^6 ）。

为刺激炎症细胞因子表达，细胞以 1×10^6 细胞/ml 的浓度重悬浮于基础培养基或 ActiCyte-LPS 培养基（BioErgonomics, St. Paul, MN）中，在 5% CO₂ 空气中 37℃ 温育 20 小时。在后 4 小时温育期

间，向培养物中加入高尔基体抑制剂布雷菲德菌素 A (10ng/ml)，以抑制细胞因子的分泌，增强胞内染色。在温育期之后，收集细胞，保留培养上清液进行细胞因子分泌分析。保留细胞进行胞内细胞因子检测。

为了检测胞内 IRP-2 蛋白水平的改变或凋亡的诱导，以下列方式进行淋巴细胞的激活。将 100 万个单核细胞重悬浮于基础培养基或 ActiCyte-LPS 培养基 (BioErgonomics, St. Paul, MN) 中，在 5% CO₂ 空气中 37℃ 温育 48-72 小时。ActiCyte-TC 培养基含有抗-CD3 抗体和人细胞因子白介素-1 α (IL-1 α) 和白介素-2 (IL-2)。这种培养基通过 T 细胞抗原受体和两种细胞因子受体的 ϵ 链特异激活 T 淋巴细胞。

实施例 5

荧光染料标记的抗-IRP-2 抗体

1. 抗体的荧光染料标记

为了用 FITC 标记抗体，抗体以 5mg/ml 的浓度交换到 100mM KH₂CO₃ 缓冲液 (pH 9.0) 中。以 25:1 的摩尔比向抗体中加入 FITC (Molecular Probes) (10 mg/ml DMF 溶液)，在室温下避光温育 1 小时。用 G-25 Sephadex 柱从抗体中分离游离的 FITC。用 2-亚氨基硫烷生产藻红蛋白和 Cy5PE 偶联物，修饰荧光染料和磺基-SMCC，修饰抗体。修饰的蛋白质然后在室温下避光温育 1 小时。通过 Sephacryl S-300-HR 柱 (Sigma) 分离将游离的荧光染料和抗体与荧光染料偶联的抗体分离。改变荧光染料与蛋白质之比可能是为特定抗体或肽抗原优化荧光信号所必需的。

2. 抗-IRP-2 抗体和荧光染料标记的抗-IRP-2 抗体的质量控制

利用 BioErgonomics, Inc.发展的抗原 ELISA 和基于微粒的免疫荧光测定，检测抗 IRP-2 天然、突变肽和完整蛋白质的抗体的特异性。生物素标记的天然和突变肽或完整 IRP-2 蛋白与抗生物素蛋白包被的 7 μ m 直径的聚苯乙烯顺磁性颗粒结合，这些颗粒与生物素标记

的分子高特异性、高亲和力地结合。利用夹心法检测新生产的抗体对各种不同 IRP-2 肽包被的微粒的特异性。随后与藻红蛋白标记的山羊抗小鼠 Ig 抗体反应,检测与抗原包被的颗粒结合的 IRP-2 特异性抗体。通过流式细胞术分析样品。产生阳性荧光信号的抗体被认为可能是天然或突变肽特异的。在与细胞或抗原包被的微粒温育之前,细胞或抗原包被的颗粒与未标记的相同抗体预温育,或标记抗体与抗原预温育,阻断了抗-IRP-2 抗体的特异结合和荧光性,这证实了其特异性。

抗原包被的微粒用于前面选择的 IRP-2 特异性抗体荧光偶联的质量控制。根据抗原包被的微粒的结合和抗原阳性和抗原阴性细胞群体的胞内标记,选择用产生最佳信噪比的藻红蛋白或 Cy5-藻红蛋白荧光染料最佳地标记抗-IRP-2 抗体。通过用未标记抗体特异阻断荧光染料标记的抗体,确定 IRP-2 肽或整个分子特定表位的抗体的特异性分组。

实施例 6

来自 MCI 患者的外周血样品的分析

外周血样品从 MCI 患者中获得。血液测定每年最少进行两次。

1. β APP 表面膜形式表达的测定

通过流式细胞分析测定研究对象的 β APP 的细胞表面膜形式的相对表达。简言之,分离的单核细胞用 β APP (Boehringer Mannheim) N 端特异的单克隆抗体 22C11 染色 30 分钟,并用藻红蛋白偶联的 CD14 染色。与抗体温育后,细胞用 PBS 洗涤一次,除去未结合的抗体,然后通过流式细胞术分析细胞。

2. 功能细胞表面转铁蛋白受体表达的测定

通过流式细胞分析测定待测对象的细胞上功能转铁蛋白受体的相对表达。简言之,分离的单核细胞用 100ng 藻红蛋白偶联的人转铁蛋白 (BioE Inc.) 染色 15 分钟,用 PBS 洗涤一次,除去未结合的偶联物,然后进行流式细胞分析。功能受体(即,实际上能结合转铁蛋白

的受体)的表达与细胞荧光强度成正比。

3. 循环白细胞表达致炎细胞因子的测定

在细菌脂多糖 (LPS) 存在或不存在下温育单核细胞 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) 20 小时, 以测定致炎细胞因子白介素-1 α (IL-1 α)、白介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的基础和刺激产生。产细胞因子细胞的鉴定根据胞内细胞因子的分析通过流式细胞术进行。简言之, 如 IRP-2 蛋白的鉴定所述固定并透化细胞。用 PE 或 Cy5PE 标记的 IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α 特异性抗体标记细胞。在 20 小时温育过程中分泌到培养基中的细胞因子的量通过基于流式细胞分析的定量免疫荧光试验 (ImmunoFlow and MultiFlow, BioErgonomics, Inc., St Paul, MN) 测定。

4. 活化单核细胞中凋亡或坏死的检测试验

简言之, ActiCyte-TC 激活的 100 万个单核细胞用 PBS 洗涤, 并用磷脂酰丝氨酸结合蛋白膜联蛋白-V-FITC (200 ng, Caltag, South San Francisco, CA) 和 DNA 嵌入染料碘化丙锭 (4 μg) 染色。单独膜联蛋白-V 阳性或膜联蛋白-V 和碘化丙锭阳性的细胞分别被认为是早期或晚期凋亡的, 而单独碘化丙锭阳性的细胞被认为是坏死的。

5. 胞内 IRP-2 环肽的表达和 IRP-2 表达细胞的鉴定试验

胞内 IRP-2 环肽的表达用 FITC、PE 和 Cy5PE 偶联的抗-IRP-2 单克隆抗体通过流式细胞分析测定, 以鉴定表达天然 IRP-2 蛋白的细胞。这些实验旨在寻找 IRP-2 铁降解域多态性。洗涤的细胞 (1×10^6 于 100 μl PBS 中) 通过在 1ml 1% 甲醛中温育 30 分钟固定, 表示为荧光标记的抗胞内 IRP-2 蛋白抗体的特异结合。特定抗-IRP-2 抗体的阳性荧光和特异性的确定根据与抗原或标记抗体预温育能特异竞争的荧光强度改变来测定。特定抗-CD 抗体阳性的细胞通过与类似标记的同种型对照抗体或荧光染色被未标记抗体特异阻断的细胞相比较来测定。

6. 流式细胞分析数据与患者临床状态的相关性

在具有每名患者数据表的不同归档系统中, 流式细胞分析数据与

患者的临床状态有关。利用方差分析 (ANOVA) 分析 MCI 患者组中 IRP-2 “环肽”降解筛查的结果。可进一步检查比较两个群体组 (AD 和老年对照) 中突变 IRP-2 肽的数据。

尽管已经参照实施方案和实施例描述了本发明, 但应当理解, 在不背离本发明精神的情况下能进行多种修改。因此, 本发明只受下列权利要求书的限制。此处引用的所有参考文献均引用作为参考。

序列表

<110> Loma Linda University

<120> 用作神经变性疾病诊断的铁调节蛋白-2 (IRP-2)

<130> LOMAU.140PR

<160> 20

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 189

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆寡核苷酸

<400> 1

```
gcaatacaga atgcaccaaa tcctggaggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60
ccacttaaag tgcagcetaa gaagcttccc tgcagaggcc agactacctg ccgaggatct 120
tgtgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt ctctgcagat tgagaataca 180
cccatcctg                                     189
```

<210> 2

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于抗体制备的肽

<400> 2

```
Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala
 1             5             10             15
Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg
      20             25             30
Gly Gln Thr Thr Cys Arg Gly Ser Cys Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg
      35             40             45
Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu
 50             55             60
```

<210> 3

<211> 189

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆寡核苷酸

<400> 3


```

gcaatacaga atgcaccaaa tcctggaggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60
ccacttaaag tgcagcctaa gaagcttccc gccagaggcc agactacctg ccgaggatct 120
tgtgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt cttcgcagat tgagaatata 180
cccatcctg                                     189

```

<210> 4

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于抗体制备的肽

<400> 4

```

Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala
1           5           10           15
Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg
20           25           30
Gly Gln Thr Thr Cys Arg Gly Ser Cys Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg
35           40           45
Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu
50           55           60

```

<210> 5

<211> 189

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆寡核苷酸

<400> 5

```

gcaatacaga atgcaccaaa tcctggaggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60
ccacttaaag tgcagcctaa gaagcttccc tgcagaggcc agactaccgc ccgaggatct 120
tgtgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt cttcgcagat tgagaatata 180
cccatcctg                                     189

```

<210> 6

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于抗体制备的肽

<400> 6

```

Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala
1           5           10           15
Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg
20           25           30
Gly Gln Thr Thr Ala Arg Gly Ser Cys Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg
35           40           45
Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu
50           55           60

```

<210> 7
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克隆寡核苷酸

<400> 7
 gcaatacaga atgcaccaa tcttgagggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60
 ccaacttaaag tgcagcctaa gaagcttccc tgcagaggcc agactacctg ccgaggatct 120
 gctgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt cttcgcagat tgagaatata 180
 cccatcctg 189

<210> 8
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于抗体制备的肽

<400> 8
 Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala
 1 5 10 15
 Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg
 20 25 30
 Gly Gln Thr Thr Cys Arg Gly Ser Ala Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg
 35 40 45
 Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu
 50 55 60

<210> 9
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克隆寡核苷酸

<400> 9
 gcaatacaga atgcaccaa tcttgagggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60
 ccaacttaaag tgcagcctaa gaagcttccc gccagaggcc agactaccgc ccgaggatct 120
 tgtgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt cttcgcagat tgagaatata 180
 cccatcctg 189

<210> 10
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于抗体制备的肽

<400> 10
 Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala

1	5	10	15
Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Ala Arg			
20	25	30	
Gly Gln Thr Thr Ala Arg Gly Ser Cys Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg			
35	40	45	
Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu			
50	55	60	

<210> 11

<211> 189

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆寡核苷酸

<400> 11

```

gcaatacaga atgcacaaa tcctggaggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60
ccacttaaag tgcagcctaa gaagcttccc tgcagaggcc agactaccgc ccgaggatct 120
gctgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt cttcgcagat tgagaataca 180
cccatcctg                                     189

```

<210> 12

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于抗体制备的肽

<400> 12

Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala			
1	5	10	15
Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg			
20	25	30	
Gly Gln Thr Thr Ala Arg Gly Ser Ala Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg			
35	40	45	
Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu			
50	55	60	

<210> 13

<211> 189

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆寡核苷酸

<400> 13

```

gcaatacaga atgcacaaa tcctggaggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60
ccacttaaag tgcagcctaa gaagcttccc gccagaggcc agactacctg ccgaggatct 120
gctgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt cttcgcagat tgagaataca 180
cccatcctg                                     189

```

<210> 14

<211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于抗体制备的肽

<400> 14
 Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala
 1 5 10 15
 Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Ala Arg
 20 25 30
 Gly Gln Thr Thr Cys Arg Gly Ser Ala Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg
 35 40 45
 Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu
 50 55 60

<210> 15
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克隆寡核苷酸

<400> 15
 gcaatacaga atgcaccaaa tcctggaggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60
 ccacttaaag tgcagcctaa gaagcttccc gccagaggcc agactaccgc ccgaggatct 120
 gctgattctg gagaactagg ccgaaactoa ggaacatttt ctctgcagat tgagaataca 180
 cccatcctg 189

<210> 16
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于抗体制备的肽

<400> 16
 Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala
 1 5 10 15
 Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Ala Arg
 20 25 30
 Gly Gln Thr Thr Ala Arg Gly Ser Ala Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg
 35 40 45
 Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu
 50 55 60

<210> 17
 <211> 2867
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<400> 17

```

tacottattg aaacattaaa tgacagttca cataagaagt tcttcgatgt atctaaactt 60
ggcaccaagt atgatgttct gccttactca atacgggtct tgttggaagc tgctgtacga 120
aatttgtgat gctttttaat gaagaaggaa gatgttatga acatttttaga ctggaaaacc 180
aaacaaagca atgttgaagt gccctttttc cctgccgtg tcttcttca agattttact 240
ggaataccag caatggtgga ttttgctgct atgagggagg cagtgaaaac tcttgagggt 300
gatcctgaga aagtccatcc tgcttgtccg acagatotta cagttgacca ttctttacaa 360
attgaactca gtaaagtgtc aatacagaat gcaccaaato ctggagggtg tgacctgcag 420
aaagoaggaa agctctctcc acttaaagtg cagcctaaga agcttccctg cagaggccag 480
actaactgcc gaggatcttg tgattctgga gaactaggcc gaaactcagg aacattttct 540
tcgcagattg agaatacacc catcctgtgt ccttttcatt tgcaaccagt gcctgaacct 600
gaaacagtgt taaaaaatca agaagtagaa ttggcagaa atcgagagag gcttcagttt 660
tttaagtgga gttcaagagt tttaaagaat gtggcagtga tccctcctgg aactggaatg 720
gotcatcaaa taaacttaga atatttgtca agagtggttt ttgaagaaaa agacctctc 780
ttcccagaca gtgtagtcgg cacagattca cacataacga tgggtgaatg tttagggatt 840
ctgggggtgg ggggttgagg cattgaaaca gaagcagtta tgcttggctc gccagtttct 900
cttactttac cagaggtggg tggatgtgag ttaactgggt catcaaacc ttttgttaca 960
tccatagatg ttgttcttg tattacaaag cacctcaggc aagtaggagt ggctggaaag 1020
tttgttgagt tttttggaag tggagtttca caattatcta tagttgatcg aactacaata 1080
gcaaacatgt gtccggaata tgggtgctatc ctcagotttt tccctgttga caatgtgaca 1140
ttaaacatt tagaacatac aggttttagc aaagccaaac tcgaatcaat ggaaacatac 1200
cctaaagctg tgaaattggt tcgaaatgac cagaattctt caggagaacc tgaatactcc 1260
caggtgatcc agattaatct gaattcaata gtccatctg ttagtggtcc aaaaagacct 1320
cgggatagag ttgctgtgac agatatgaaa agcagatttc aggcttgctt aaatgaaaag 1380
gttggaattt aaggcttcca aattgcagct gaaaaacaaa aggatattgt ctccattcat 1440
tatgaaggaa gtgaatataa gctgtctcat ggatcagtgg tcattgctgc agttatcagt 1500
tgtaccaata attgcaatcc atctgtcatg cttgctgcag gtcttttggc taaaaaggct 1560
gttgaagctg gtctgctgtt taaaccttat ataagaacaa gtttatctcc aggcagtggg 1620
atggttacac attacctcag ttcaagtgga gtattaccat atctaagtaa gcttgattt 1680
gaaatcggtg gctatggatg ttcaacttgt gtgggaaata cagcaccctt atcagacgca 1740
gtttttaaag cagtaaaaca ggggtgattt gttaacctgt gtaattttat ctggaaaaaa 1800
aattttgaag gtcgtctttg tgattgtgtt cgtgccaat atcttgctc tccacctta 1860
gtggtagctt atgccatagc aggcacagt aatatagatt tccagacaga acctttagg 1920
actgacccca ccggcaagaa catttaactg catgatattt ggcttagtgc agaagaagt 1980
catcgagtag aggaagaaca tgttatacta tccatgttta aagcattaaa agataaaaata 2040
gaaatgggga ataaacggtg gaattcctta gaagcacgg attcagtttt gtttccatgg 2100
gaactaaagt ctacttatat cagatgccct tcaatttttg ataaacttac caaagagcca 2160
attgcaactc aggctattga aaatgcccat gtottattat atttgggaga ctctgtcaca 2220
acagatcata tatcacctgc aggaagtatc gctaggaata gtgctgccgc taagtattt 2280
acaaacagag gccttacctc tcgtgaattc aactottacg gagctcgaag aggtaatgat 2340
gctgtaatga caagaggcac ttttgcaaat atcaagcttt ttaataagtt tattggaaaa 2400
ccagctccta aaacaattca ttttccatca ggacagacgc tagatgtatt tgaggctgca 2460
gagctgtacc agaaagaagg tatcccactg attattttag caggaaagaa atatggttca 2520
ggaaactcca gagactgggc tgccaaagga cgtattttac tgggtgtgaa agctgttttg 2580
gccgaaagtt atgaaaaaat acacaaagat catttgattg gaattggcat agctccact 2640
cagttccttc caggagaaaa tgcagattcc ttgggcctct ccggtagaga aacattttct 2700
ttaacatttc ctgaagaact gtctcctgga attacattga atatacagac aagcactgga 2760
aaagtattca gcgtgattgc ttctgttgaa gatgatgtgg aaataacatt atacaaacat 2820
ggaggattat taaactttgt ggcacgaaaa ttctcatagt atctact 2867

```

<210> 18

<211> 952

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 18

Tyr Leu Ile Glu Thr Leu Asn Asp Ser Ser His Lys Lys Phe Phe Asp

1

5

10

15

Val Ser Lys Leu Gly Thr Lys Tyr Asp Val Leu Pro Tyr Ser Ile Arg
 20 25 30
 Val Leu Leu Glu Ala Ala Val Arg Asn Cys Asp Gly Phe Leu Met Lys
 35 40 45
 Lys Glu Asp Val Met Asn Ile Leu Asp Trp Lys Thr Lys Gln Ser Asn
 50 55 60
 Val Glu Val Pro Phe Phe Pro Ala Arg Val Leu Leu Gln Asp Phe Thr
 65 70 75 80
 Gly Ile Pro Ala Met Val Asp Phe Ala Ala Met Arg Glu Ala Val Lys
 85 90 95
 Thr Leu Gly Gly Asp Pro Glu Lys Val His Pro Ala Cys Pro Thr Asp
 100 105 110
 Leu Thr Val Asp His Ser Leu Gln Ile Asp Phe Ser Lys Cys Ala Ile
 115 120 125
 Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala Gly Lys
 130 135 140
 Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg Gly Gln
 145 150 155 160
 Thr Thr Cys Arg Gly Ser Cys Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg Asn Ser
 165 170 175
 Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu Cys Pro Phe
 180 185 190
 His Leu Gln Pro Val Pro Glu Pro Glu Thr Val Leu Lys Asn Gln Glu
 195 200 205
 Val Glu Phe Gly Arg Asn Arg Glu Arg Leu Gln Phe Phe Lys Trp Ser
 210 215 220
 Ser Arg Val Leu Lys Asn Val Ala Val Ile Pro Pro Gly Thr Gly Met
 225 230 235 240
 Ala His Gln Ile Asn Leu Glu Tyr Leu Ser Arg Val Val Phe Glu Glu
 245 250 255
 Lys Asp Leu Leu Phe Pro Asp Ser Val Val Gly Thr Asp Ser His Ile
 260 265 270
 Thr Met Val Asn Gly Leu Gly Ile Leu Gly Trp Gly Val Gly Gly Ile
 275 280 285
 Glu Thr Glu Ala Val Met Leu Gly Leu Pro Val Ser Leu Thr Leu Pro
 290 295 300
 Glu Val Val Gly Cys Glu Leu Thr Gly Ser Ser Asn Pro Phe Val Thr
 305 310 315 320
 Ser Ile Asp Val Val Leu Gly Ile Thr Lys His Leu Arg Gln Val Gly
 325 330 335
 Val Ala Gly Lys Phe Val Glu Phe Phe Gly Ser Gly Val Ser Gln Leu
 340 345 350
 Ser Ile Val Asp Arg Thr Thr Ile Ala Asn Met Cys Pro Glu Tyr Gly
 355 360 365
 Ala Ile Leu Ser Phe Phe Pro Val Asp Asn Val Thr Leu Lys His Leu
 370 375 380
 Glu His Thr Gly Phe Ser Lys Ala Lys Leu Glu Ser Met Glu Thr Tyr
 385 390 395 400
 Leu Lys Ala Val Lys Leu Phe Arg Asn Asp Gln Asn Ser Ser Gly Glu
 405 410 415
 Pro Glu Tyr Ser Gln Val Ile Gln Ile Asn Leu Asn Ser Ile Val Pro
 420 425 430
 Ser Val Ser Gly Pro Lys Arg Pro Arg Asp Arg Val Ala Val Thr Asp
 435 440 445
 Met Lys Ser Asp Phe Gln Ala Cys Leu Asn Glu Lys Val Gly Phe Lys
 450 455 460
 Gly Phe Gln Ile Ala Ala Glu Lys Gln Lys Asp Ile Val Ser Ile His

465					470					475					480
Tyr	Glu	Gly	Ser	Glu	Tyr	Lys	Leu	Ser	His	Gly	Ser	Val	Val	Ile	Ala
				485					490					495	
Ala	Val	Ile	Ser	Cys	Thr	Asn	Asn	Cys	Asn	Pro	Ser	Val	Met	Leu	Ala
			500					505					510		
Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys	Lys	Ala	Val	Glu	Ala	Gly	Leu	Arg	Val	Lys
		515					520					525			
Pro	Tyr	Ile	Arg	Thr	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Met	Val	Thr	His
	530				535						540				
Tyr	Leu	Ser	Ser	Ser	Gly	Val	Leu	Pro	Tyr	Leu	Ser	Lys	Leu	Gly	Phe
545					550					555					560
Glu	Ile	Val	Gly	Tyr	Gly	Cys	Ser	Thr	Cys	Val	Gly	Asn	Thr	Ala	Pro
			565					570						575	
Leu	Ser	Asp	Ala	Val	Leu	Asn	Ala	Val	Lys	Gln	Gly	Asp	Leu	Val	Thr
		580					585					590			
Cys	Gly	Asn	Phe	Ile	Trp	Lys	Lys	Asn	Phe	Glu	Gly	Arg	Leu	Cys	Asp
		595				600						605			
Cys	Val	Arg	Ala	Asn	Tyr	Leu	Ala	Ser	Pro	Pro	Leu	Val	Val	Ala	Tyr
	610				615						620				
Ala	Ile	Ala	Gly	Thr	Val	Asn	Ile	Asp	Phe	Gln	Thr	Glu	Pro	Leu	Gly
625					630					635					640
Thr	Asp	Pro	Thr	Gly	Lys	Asn	Ile	Tyr	Leu	His	Asp	Ile	Trp	Pro	Ser
			645					650					655		
Arg	Glu	Glu	Val	His	Arg	Val	Glu	Glu	Glu	His	Val	Ile	Leu	Ser	Met
		660					665						670		
Phe	Lys	Ala	Leu	Lys	Asp	Lys	Ile	Glu	Met	Gly	Asn	Lys	Arg	Trp	Asn
		675				680						685			
Ser	Leu	Glu	Ala	Pro	Asp	Ser	Val	Leu	Phe	Pro	Trp	Asp	Leu	Lys	Ser
	690				695						700				
Thr	Tyr	Ile	Arg	Cys	Pro	Ser	Phe	Phe	Asp	Lys	Leu	Thr	Lys	Glu	Pro
705					710					715					720
Ile	Ala	Leu	Gln	Ala	Ile	Glu	Asn	Ala	His	Val	Leu	Leu	Tyr	Leu	Gly
			725					730						735	
Asp	Ser	Val	Thr	Thr	Asp	His	Ile	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Arg
		740						745					750		
Asn	Ser	Ala	Ala	Ala	Lys	Tyr	Leu	Thr	Asn	Arg	Gly	Leu	Thr	Pro	Arg
		755				760						765			
Glu	Phe	Asn	Ser	Tyr	Gly	Ala	Arg	Arg	Gly	Asn	Asp	Ala	Val	Met	Thr
	770				775					780					
Arg	Gly	Thr	Phe	Ala	Asn	Ile	Lys	Leu	Phe	Asn	Lys	Phe	Ile	Gly	Lys
785					790					795					800
Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	Ile	His	Phe	Pro	Ser	Gly	Gln	Thr	Leu	Asp	Val
			805					810						815	
Phe	Glu	Ala	Ala	Glu	Leu	Tyr	Gln	Lys	Glu	Gly	Ile	Pro	Leu	Ile	Ile
		820						825					830		
Leu	Ala	Gly	Lys	Lys	Tyr	Gly	Ser	Gly	Asn	Ser	Arg	Asp	Trp	Ala	Ala
		835				840						845			
Lys	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	Gly	Val	Lys	Ala	Val	Leu	Ala	Glu	Ser	Tyr
	850				855						860				
Glu	Lys	Ile	His	Lys	Asp	His	Leu	Ile	Gly	Ile	Gly	Ile	Ala	Pro	Leu
865					870					875					880
Gln	Phe	Leu	Pro	Gly	Glu	Asn	Ala	Asp	Ser	Leu	Gly	Leu	Ser	Gly	Arg
			885					890						895	
Glu	Thr	Phe	Ser	Leu	Thr	Phe	Pro	Glu	Glu	Leu	Ser	Pro	Gly	Ile	Thr
		900						905					910		
Leu	Asn	Ile	Gln	Thr	Ser	Thr	Gly	Lys	Val	Phe	Ser	Val	Ile	Ala	Ser
		915					920						925		

Phe Glu Asp Asp Val Glu Ile Thr Leu Tyr Lys His Gly Gly Leu Leu
 930 935 940
 Asn Phe Val Ala Arg Lys Phe Ser
 945 950

<210> 19
 <211> 3770
 <212> DNA
 <213> Rattus Norvegicus

<400> 19
 tgaggccggc gatggactcc ccaagtgcag gatacacctt tgagtacctt attgaaacat 60
 taaatggcag ttacagaag aagttcttca atgtacctaa acttggaggc accaagtatg 120
 atattctgcc ttactcaata cgggtcctat tggaaagctgc tgtaacgaaat tgtgatggat 180
 ttttaaatgaa aaaggaagat gttataaata ttttggactg gaaaacccaaa caaagcaatg 240
 ttgaagtgcc ctttttcccc gcccggtgtt ttcttcaaga ttctactgga ataccggcaa 300
 tgggtggatt tgctgctatg agggaggcaa tgaaaactct tggaggatgat cctaagaaag 360
 tccacccttg ctgtccaaca gatctcacag ttgaccactc ttacagatt gacttcagta 420
 aatgtgcaat acagaatgca ccaaactctg gaggtgggtga cctacagaaa gcaggaaagc 480
 tctctccact taaagtacag cctaagaagc ttccatgtcg aggccagact acctgccggg 540
 gatcgtgtga ttctggagaa ctaagccgaa actcaggaaac attttcttcg cagattgaga 600
 atacgcctgt cctgtgtccc tttcatttgc aaccagtgcc tgaacctgag acggtgttaa 660
 aaaatcaaga agtagaattt ggcagaaatc gagagaggct tcaatttttc aagtggagct 720
 caggagcttt taagaatgtg gcagtcaccc ctctggaac tggaaatggct catcaagtga 780
 acttagaaca tttgtcgaga gtagtgtttg aagaagccga cctgctcttc ccagacagcg 840
 taattggcac agattctcat ataaccatgg tgaatggatt gggaattctt ggggtggggag 900
 ttggaggcat tgagacagag gcagttatgc ttggcctgcc agttactctt accttaccag 960
 aggtggtttg atgtgagcta actgggtcat ccaatgcttt tgttacatcc atagatattg 1020
 tcttaggcat taaaaagcac ctccaggcaag taggcgtggc tggaaagtgt gttgagttct 1080
 ttggaagtgg agtttcacaa ttatctattg tcgatagaac tactatagca aacatgtgtc 1140
 ccgagtatgg tgctatcttc agctttttcc ctgttgacaa tgtgacacta cgacatttag 1200
 aacatacagg ttttgacaaa accaaacttg agtcaatgga agaatacctt aaagctgtga 1260
 aattgtttcg aaatgatgag aattcttcag aacctgaata ttctcagggtg atacagatta 1320
 atctgaattc aatagttgca tctgtcagtg gtccaaaaag gcctcaggat agagtgtctg 1380
 taacagatat gaaaagtgat tttcaggctt gcttaaataa aaaggttggg tttaaaggct 1440
 tocaagttgc agcagaaaaa caaagtgata ctgtctcagt tcgttatgat ggaagtgatg 1500
 ataagctgtc ccatgggtcc gtggtcattg ctgcggttat cagctgtacc aataactgca 1560
 atccatcagt gatgctogct gcaggctctt tggctaaaaa ggctgttgaa actggtctac 1620
 gagttaaaac ttatataaga acaagtttgt ctccaggcag tgggatgggt acacattacc 1680
 tcagttcaag tggagtgtta ccctacctta gcaagctagg gtttgaaata gttggctatg 1740
 gatgttcaac gtgtgttagga aatacagcac ctttatcaga agcaattttg aatgcagtaa 1800
 aacagggtga tttggctaoc tgtggagttt tatctggaaa caaaaatttc gaaggtcgtc 1860
 tttgtgattg tgtccgtgct aattatctcg cctctccacc cttagtgggtg gcttacgcca 1920
 tagcaggcac agtgaatata gatttccaga cagagccatt aggtactgac tctacaggca 1980
 agaacattta cctgcatgac atttggccta gtcgagaaga agttcatcag atagaagaag 2040
 aactgttata tttgtccatg tttaaagcac tgaaagagaa agtagagatg ggaaataaac 2100
 ggtggaattc cttagacgct ccagattcag tgttgtttcc atgggatgtt aagtctactt 2160
 acatcagatg ccttccattt tttgataaac ttaccaaaga accagctgca tcccagccta 2220
 ttgaaaatgc ccatgtcctg ttgtacttgg gagactctgt cactacagac cacatatcac 2280
 ctgctggaag cattgtctagg agcagagctg ctgctaagta cttgacaaac agaggcctta 2340
 ctccccgaga gttcaactct tatggagctc gaagaggtaa tgatgctgtg atgacaagag 2400
 gcacgtttgc aaacatcaag ctttttaata agtttattgg gaagccagct cccaaaacaa 2460
 ttcattttcc atcaggacag acgctcgatg tatttgaagc tgcagaatta taccaaaaag 2520
 aaggatatcc actgataatt ttagcaggaa aaaaatatgg ttcaggaaat tcaagagact 2580
 gggctgcgaa aggacctat ttgctgggtg taaaggctgt tttggctgaa agctatgaaa 2640
 agatacacaa agatcatttg attggaattg gtatagcacc acttgagttc ctcccaggag 2700


```

aaaatgcaga ttccttgggc ctctccggca gagaagtatt ttctttatca tttcctgaag 2760
aactctttcc tgggaattacg ttaaataataa agacgagcac tggcaaagag ttcagcgtga 2820
ttgcagcatt tgaaaatgat gtggagataa ctttgtacaa acatggagga ttgttaaact 2880
ttgtggctcg aaaattctta tagtatctac tccccatggt atctttcatg gctggtaact 2940
gcaaagcctt cttctgtgct ggaccagga atcattgoca tggaaactgca gatgatttca 3000
gtatacttct ctcctccatg gatgtaaagc ataacgaatc aacgtagtga ctaaaatgaa 3060
atcttgattt taaataatat acgaatggtg ctattaacat tgctaaaatc aacgtgtgaa 3120
ggtgtgttgt ggaagagacc tgtaagtatg ggggggtatat tttatgagaa cattttgtaa 3180
ataaagacag aatttgaact tgtgttgaag attcatatga atagccgttc taaagctgtt 3240
tgttttgttt tgcaccttaa aactggacta ctgtttgttg gtttaagaat agcaagttga 3300
tttagaagaa gccagactag atcctaaaat tatggaaatg ggtacctgat ttagaaatga 3360
atttttaaat gtttttcttt ccagaattga attggacaca attggcattt ccagtttgta 3420
atgtaagtca ggtttggcct tagtctcaat acatctgcaa ggcatagaac ctgccccaga 3480
tcacagtccc tctgaccagc caaaatgtcc tccatgtctg cagataaatg actgtaaaat 3540
acagctgatt gtgtggtacc gtgtattagt aagaatatat ttcctgtggt atagccctgt 3600
aattttttca gtaacttgcc actatgaccc actcacaagc ccaaatacgg tgtattaatt 3660
tggactagat tttgtctcatt ttacatgact gtaactcctg taacctcaat taggaatcac 3720
tagctgacat tccacactcc ttttatgact gctggaaaca attgagtcaa 3770

```

<210> 20

<211> 963

<212> PRT

<213> Rattus Norvegicus

<400> 20

```

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

```

Asn Leu Glu His Leu Ser Arg Val Val Phe Glu Glu Ala Asp Leu Leu
 260 265 270
 Phe Pro Asp Ser Val Ile Gly Thr Asp Ser His Ile Thr Met Val Asn
 275 280 285
 Gly Leu Gly Ile Leu Gly Trp Gly Val Gly Gly Ile Glu Thr Glu Ala
 290 295 300
 Val Met Leu Gly Leu Pro Val Thr Leu Thr Leu Pro Glu Val Val Gly
 305 310 315 320
 Cys Glu Leu Thr Gly Ser Ser Asn Ala Phe Val Thr Ser Ile Asp Ile
 325 330 335
 Val Leu Gly Ile Thr Lys His Leu Arg Gln Val Gly Val Ala Gly Lys
 340 345 350
 Phe Val Glu Phe Phe Gly Ser Gly Val Ser Gln Leu Ser Ile Val Asp
 355 360 365
 Arg Thr Thr Ile Ala Asn Met Cys Pro Glu Tyr Gly Ala Ile Leu Ser
 370 375 380
 Phe Phe Pro Val Asp Asn Val Thr Leu Arg His Leu Glu His Thr Gly
 385 390 395 400
 Phe Asp Lys Thr Lys Leu Glu Ser Met Glu Glu Tyr Leu Lys Ala Val
 405 410 415
 Lys Leu Phe Arg Asn Asp Glu Asn Ser Ser Glu Pro Glu Tyr Ser Gln
 420 425 430
 Val Ile Gln Ile Asn Leu Asn Ser Ile Val Ala Ser Val Ser Gly Pro
 435 440 445
 Lys Arg Pro Gln Asp Arg Val Ala Val Thr Asp Met Lys Ser Asp Phe
 450 455 460
 Gln Ala Cys Leu Asn Glu Lys Val Gly Phe Lys Gly Phe Gln Val Ala
 465 470 475 480
 Ala Glu Lys Gln Ser Asp Thr Val Ser Val Arg Tyr Asp Gly Ser Glu
 485 490 495
 Tyr Lys Leu Ser His Gly Ser Val Val Ile Ala Ala Val Ile Ser Cys
 500 505 510
 Thr Asn Asn Cys Asn Pro Ser Val Met Leu Ala Ala Gly Leu Leu Ala
 515 520 525
 Lys Lys Ala Val Glu Thr Gly Leu Arg Val Lys Pro Tyr Ile Arg Thr
 530 535 540
 Ser Leu Ser Pro Gly Ser Gly Met Val Thr His Tyr Leu Ser Ser Ser
 545 550 555 560
 Gly Val Leu Pro Tyr Leu Ser Lys Leu Gly Phe Glu Ile Val Gly Tyr
 565 570 575
 Gly Cys Ser Thr Cys Val Gly Asn Thr Ala Pro Leu Ser Glu Ala Ile
 580 585 590
 Leu Asn Ala Val Lys Gln Gly Asp Leu Ala Thr Cys Gly Val Leu Ser
 595 600 605
 Gly Asn Lys Asn Phe Glu Gly Arg Leu Cys Asp Cys Val Arg Ala Asn
 610 615 620
 Tyr Leu Ala Ser Pro Pro Leu Val Val Ala Tyr Ala Ile Ala Gly Thr
 625 630 635 640
 Val Asn Ile Asp Phe Gln Thr Glu Pro Leu Gly Thr Asp Ser Thr Gly
 645 650 655
 Lys Asn Ile Tyr Leu His Asp Ile Trp Pro Ser Arg Glu Glu Val His
 660 665 670
 Gln Ile Glu Glu Glu His Val Ile Leu Ser Met Phe Lys Ala Leu Lys
 675 680 685
 Glu Lys Val Glu Met Gly Asn Lys Arg Trp Asn Ser Leu Asp Ala Pro
 690 695 700
 Asp Ser Val Leu Phe Pro Trp Asp Val Lys Ser Thr Tyr Ile Arg Cys

705					710					715					720
Pro	Ser	Phe	Phe	Asp	Lys	Leu	Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	Ala	Ser	Gln	Pro
				725					730					735	
Ile	Glu	Asn	Ala	His	Val	Leu	Leu	Tyr	Leu	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Thr
			740					745					750		
Asp	His	Ile	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala
		755					760					765			
Lys	Tyr	Leu	Thr	Asn	Arg	Gly	Leu	Thr	Pro	Arg	Glu	Phe	Asn	Ser	Tyr
	770					775				780					
Gly	Ala	Arg	Arg	Gly	Asn	Asp	Ala	Val	Met	Thr	Arg	Gly	Thr	Phe	Ala
785					790					795					800
Asn	Ile	Lys	Leu	Phe	Asn	Lys	Phe	Ile	Gly	Lys	Pro	Ala	Pro	Lys	Thr
				805					810					815	
Ile	His	Phe	Pro	Ser	Gly	Gln	Thr	Leu	Asp	Val	Phe	Glu	Ala	Ala	Glu
			820					825					830		
Leu	Tyr	Gln	Lys	Glu	Gly	Ile	Pro	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Gly	Lys	Lys
		835					840					845			
Tyr	Gly	Ser	Gly	Asn	Ser	Arg	Asp	Trp	Ala	Ala	Lys	Gly	Pro	Tyr	Leu
	850					855					860				
Leu	Gly	Val	Lys	Ala	Val	Leu	Ala	Glu	Ser	Tyr	Glu	Lys	Ile	His	Lys
865					870					875					880
Asp	His	Leu	Ile	Gly	Ile	Gly	Ile	Ala	Pro	Leu	Glu	Phe	Leu	Pro	Gly
				885				890						895	
Glu	Asn	Ala	Asp	Ser	Leu	Gly	Leu	Ser	Gly	Arg	Glu	Val	Phe	Ser	Leu
			900					905					910		
Ser	Phe	Pro	Glu	Glu	Leu	Phe	Pro	Gly	Ile	Thr	Leu	Asn	Ile	Lys	Thr
		915					920					925			
Ser	Thr	Gly	Lys	Glu	Phe	Ser	Val	Ile	Ala	Ala	Phe	Glu	Asn	Asp	Val
	930					935					940				
Glu	Ile	Thr	Leu	Tyr	Lys	His	Gly	Gly	Leu	Leu	Asn	Phe	Val	Ala	Arg
945					950				955						960
Lys	Phe	Leu													