[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 96198552.6

[51] Int. Cl.
C07K 14/52 (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 4 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1253471C

[51] Int. Cl. (续)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C12R 1/91 (2006.01)

[22] 申请日 1996.9.27 [21] 申请号 96198552.6

[30] 优先权

[32] 1995. 9.27 [33] JP [31] 249457/95

[32] 1996. 3.13 [33] JP [31] 56044/96

[86] 国际申请 PCT/JP1996/002801 1996.9.27

[87] 国际公布 WO1997/011969 日 1997.4.3

[85] 进入国家阶段日期 1998.5.25

[71] 专利权人 盐野义制药株式会社

地址 日本大阪府大阪市

[72] 发明人 今井俊夫 吉田哲也 义江修

审查员 王亦然

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 齐曾度

权利要求书 2 页 说明书 48 页 附图 29 页

[54] 发明名称

CC 型趋化因子样蛋白质

[57] 摘要

分离的新型 CC 型趋化因子样蛋白质，它是在免疫学刺激物的作用下从外周血单核细胞表达的，具有细胞迁移活性；编码该蛋白质的 DNA；含有该 DNA 的表达载体和转化体；用该转化体制备重组蛋白质的方法；和含有该蛋白质的医药组合物。

1. 一种具有序列号 1 中氨基酸残基 24～94 的氨基酸序列的人 CC 型趋化因子样蛋白质.

2. 一种具有序列号 1 中氨基酸残基 1－94 氨基酸序列的人 CC 型趋化因子样蛋白质.

3. 一种具有序列号 2 中氨基酸 24－93 氨基酸序列的小鼠 CC 型趋化因子样蛋白质.

4. 一种序列号 2 中氨基酸残基 1－93 氨基酸序列的小鼠 CC 型趋化因子样蛋白质.

5. 编码权利要求 1－4 中任一项中蛋白质的 DNA.

6. 一种编码具有诱导表达 CCR4 受体的细胞迁移活性的蛋白的 DNA，它具有选自以下的碱基序列:

i) 序列号 1 碱基 53 到 334 的碱基序列;

ii) 序列号 1 碱基 122 到 334 的碱基序列;

iii) 与 i)或 ii)的碱基序列在以下条件下杂交的碱基序列，所述条件为温度 42°C，杂交溶液含有 5×SSPE、50％甲酰胺、2％SDS、10×Denhardt's 溶液、100μg/ml 鲑精 DNA，室温下用含有 2×SSC 和 0.1% SDS 的缓冲液洗涤 10 分钟，60°C 下用含有 0.2×SSC 和 0.1% SDS 的缓冲液洗涤两次;

iv) 序列号 3 的碱基 71 到 280 的碱基序列;

v) 序列号 3 的碱基 2 到 280 的碱基序列;

vi) 与 iv)或 v)的碱基序列在以下条件下杂交的碱基序列，所述条件为温度 42°C，杂交溶液含有 5×SSPE、50％甲酰胺、2％SDS、10×Denhardt's 溶液、100μg/ml 鲑精 DNA，室温下用含有 2×SSC 和 0.1% SDS 的缓冲液洗涤 10 分钟，60°C 下用含有 0.2×SSC 和 0.1% SDS 的缓冲液洗涤两次.

7. 含有权利要求 5 或 6 中 DNA 的表达载体.

8. 将权利要求 7 中的表达载体导入宿主细胞而获得的转化体.

9. 权利要求 8 的转化体，其中宿主细胞为蚕细胞.

10. 权利要求 1－4 任一项中的蛋白质的制备方法，其特征在于培养权利要求 8 的转化体，并从培养基中回收产生的蛋白质.

11. 含有权利要求 1－4 任一项中的蛋白质的医药组合物.

12. 抗权利要求 1－4 任一项中的蛋白质的单克隆抗体.

13. 产生权利要求 12 中单克隆抗体的杂交瘤细胞.

14. 筛选权利要求 1－4 任一项中之蛋白质的激动剂或拮抗剂的方法，包括将推测含有这种激动剂或拮抗剂的样品与分泌该蛋白质的细胞及诱导该蛋白质分泌的细胞因子混合，测定该蛋白质的分泌量。

15. 筛选权利要求 1－4 任一项中之蛋白质的激动剂或拮抗剂的方法，包括将推测含有这种激动剂或拮抗剂的样品与该蛋白质特异的受体进行反应，测定其结合活性和/或反应性。

CC型趋化因子样蛋白质

技术领域

本发明涉及新的CC型趋化因子样蛋白质、编码该蛋白质的DNA、含有该DNA的载体，含有该载体的转化体。此外，本发明涉及上述新型蛋白质的应用以及含有该蛋白质的医药组合物的应用，如作为抗炎剂、免疫应答调节剂、与炎症和/或与免疫相关疾病的诊断药。本发明还涉及该蛋白质的单克隆抗体和产生该抗体的杂交瘤。

背景技术

由物理、化学、或生物学因素而引起的各种外源性或内源性组织损伤、侵袭、接触抗原等诱导强有力的炎症反应和免疫反应。虽然这些反应是重要的机体防御反应，但有时又成为急性或慢性疾病的原因。当诱发炎症反应和免疫反应的原因物质接触组织的时候，中性粒细胞、粒细胞、淋巴细胞或巨噬细胞等炎症性细胞或免疫活性细胞首先吸附到血管内皮，并向血管外迁移，然后聚集在侵袭或损伤组织及存在抗原的组织，这就引起了炎症反应和免疫反应。作为诱导这样序列细胞迁移反应的物质，有一组趋化作用的细胞因子，即所谓的趋化因子。趋化因子是一组能诱导迁移反应（趋化反应）的细胞因子，目前已报道的至少有18种趋化因子。已知，由于这些趋化因子的氨基酸序列存在相似性，其结构彼此密切相关。

根据通常保存的4个半胱氨酸残基中最初两个的排列顺序，可将趋化因子大致分为两型α或CXC型（2个半胱氨酸由1个氨基酸间隔开）和β或CC型（2个半胱氨酸相邻）。已知人类的CXC型趋化因子包括IL-8、β-TG、PF-4、MGSA/GRO、ENA-78、NAP-2、GCP-1、GCP-2、IP-10等，它们主要诱导中性粒细胞的活化和迁移。已知人类的CC型趋化因子有MIP-1α、MIP-1β、RANTES、MCP-1、MCP-2、MCP-3、I-309等，它们主要诱导单核/巨噬细胞的活化和迁移。而且CC型趋化因子也能诱导T细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞的活化和迁移（J. J. Oppenheim 等，免疫学年刊 9: 617-648, 1991; M. Baggiolini & C. A. Dahinden，今日免疫 15:127-133, 1994）。此外，最近报道趋化因子SCM-1不属于上述2种趋化因子类型中的任何一种，

推测为γ型或C型（ T. Yoshida 等， FEBS Letters 360: 155-159, 1995 ）。

如上所述，由于趋化因子与生物体的防御反应密切相关，所以新型趋化因子的鉴定和其活性的阐明不仅大大有利于分析与趋化因子相关的免疫应答，而且大大利于开发相关症状和疾病的治疗、预防和诊断方法。人源的趋化因子有益于实现该目的，而进行必要的动物实验时，有必要应用人之外的动物，优选小鼠来源的趋化因子。因此人们希望获得新型的人源趋化因子，以及相应的小鼠来源的趋化因子。但是，与多数微量即具有活性的生理活性物质相同，得到新型趋化因子并不容易。

本发明人们考虑到趋化因子是结构上具有相似性的分泌蛋白质，想通过信号序列捕获法获得趋化因子，为此进行了许多研究。

即用独创的信号序列捕获载体（ Yoshida 等， FEBS Letters 360: 155-159, 1995 ）从用丝裂原刺激的正常人外周血单核细胞分离大量的编码分泌型蛋白质和I型膜蛋白质的cDNA片段，将其碱基序列与已知的数据库相比较，找到有可能编码 CC 型趋化因子特征序列的 cDNA 片段。然后用该cDNA片段分离全长cDNA，测定碱基序列并进行鉴定。就象这样，本发明人们最后成功地获得编码具有信号序列、分离信号序列后属于成熟型CC型趋化因子的分泌型蛋白质的DNA。

将该新型的DNA插入到适当的表达载体中，然后将表达载体转化到合适的宿主细胞，培养转化体，该转化体就能产生对HUT78细胞显示细胞迁移活性的CC型人趋化因子样蛋白质。然后，用这人源的编码趋化因子样蛋白质的DNA，最终在转化体的表达中成功获得相应小鼠的基因组DNA和cDNA。新型人源的编码CC型趋化因子样蛋白质的DNA的碱基序列及其推定的氨基酸序列如序列号1所示，小鼠来源的编码CC型趋化因子样蛋白质的DNA的碱基序列及其推定的氨基酸序列如序列号2所示。

发明公开

本发明具有以下特征:

1) 在免疫刺激物的存在下从外周血单核细胞诱导表达;

2) 在缺乏刺激时主要从胸腺表达而不是从脾; 和

3) 提供蛋白质,它具有CC型趋化因子特征的2个相邻半胱氨酸残基。

本发明的新型CC型趋化因子样蛋白质，是在免疫学刺激的存在下

从外周血单核细胞表达的，但在植物血凝素（ PHA ）及体液免疫的诱导下能更好地表达。尤其是在 GM-CSF 、 IL-3 和 IL-4 等与体液免疫诱导相关的细胞因子的存在下，从单核细胞表达最好。但是具有这样的特征不用 TNP-α 、 IPN-γ 等细胞免疫诱导的细胞因子或 LPS 等进行诱导。

本发明的新型蛋白质，其组成性表达器官为胸腺、并且在对免疫学刺激的应答中诱导产生，基于这些特性，本发明人将该蛋白质命名为“ TARC ”[Thymus and Activation-Regulated Chemokine（胸腺和活化调节的趋化因子）] 。因此，本说明书中，称这种新型蛋白质为 TARC 或 TARC 蛋白质，编码它的 DNA 称为 TARC DNA 。“ TARC ”：包括人源和小鼠来源的 TARC ，但在必要的时候，称人源的 TARC 为人 TARC 或 hTARC ，称小鼠来源的 TARC 为小鼠 TARC 或 mTARC 。另外，编码这些蛋白质的 DNA 分别称为人 TARC DNA 、 hTARC DNA 、小鼠 TARC DNA 、 mTARC DNA 。但是，有时将人 TARC 和编码它的 DNA 简单称作 TARC 及 TARC DNA 。另外，本说明书中与 TARC 相关的，编码它的 DNA 或基因术语有可能交换使用。而 DNA 可以是合成的或天然的 DNA 。

另外，由于编码本发明 TARC 的 DNA 的公开，该领域的技术人员可用该技术领域熟知的方法，通过， 1 个或多个氨基酸的替换、插入或缺失等容易地获得具有与有上述氨基酸序列的 TARC 基本上同等功能或活性的 TARC 变异体。因此，如上得到的变异体也包含在本发明的 TARC 之内。

因此本发明还提供 CC 型趋化因子样蛋白质，它具有序列号 1 中氨基酸残基 24 ~ 94 的氨基酸序列，或者提供其变异体，该变异体具有该序列中氨基酸或氨基酸序列发生替换、插入、缺失的序列，并具有与人 CC 型趋化因子样蛋白质基本上的同等的功能或活性。

另外本发明还提供具有序列号 1 的氨基酸残基中 1 ~ 94 氨基酸序列的人 CC 型趋化因子样蛋白质或其变异体，该变异体具有该序列中氨基酸或氨基酸序列发生替换、插入、缺失的序列，且具有与该人 CC 型趋化因子样蛋白质基本上同等的功能或活性。

本发明还提供具有序列号 2 的氨基酸残基 24 ~ 93 氨基酸序列的小鼠 CC 型趋化因子样蛋白质或其变异体，该变异体具有该序列中氨基酸残或氨基酸序列发生替换、插入、缺失的序列，且具有与该小鼠 CC 型

趋化因子样蛋白质基本上同等的功能或活性。

此外，本发明还提供具有序列号 2 的氨基酸残基 1～93 氨基酸序列的小鼠 CC 型趋化因子样蛋白质或其变异体，该变异体具有该序列中氨基酸残或氨基酸序列发生替换、插入、缺失的序列，且具有与该小鼠 CC 型趋化因子样蛋白质基本上同等的功能或活性。本说明书中，TARC 的“变异体”与具有说明书中氨基酸序列的 TARC 基本上的同等的功能或活性，具有化学或生化学的改变，或者含有天然或非天然的氨基酸。

附图简述

图 1 表示人 TARC 的 cDNA 的碱基序列和推定的氨基酸序列。

图 2 表示本发明的人 TARC 蛋白质与已知的 7 种人 CC 型趋化因子的氨基酸序列进行比较的结果。

图 3 中 A 是用 PHA 刺激正常人外周血单核细胞后的时间以及用 Northern 印迹分析 hTARC mRNA 表达的结果的照片，B 为用 Northern 印迹分析各种组织中 hTARC mRNA 表达的结果的照片。

图 4 是重组载体 pVL-TARC 的基因图谱。

图 5 中 A 表示昆虫细胞中产生的人 TARC 的最终纯品从 Cosmosil 5C4-300 柱（Nacalai Tesque）的洗脱带，B 为表明 SDS-PAGE 结果的电泳照片。

图 6 为表达载体 pGEMEX-TARC 的基因图。

图 7 是表明大肠杆菌中表达的人 TARC 纯化的各阶段进行的 SDS-PAGE 的结果的电泳照片。

图 8 是小鼠 TARC 的 cDNA 的碱基序列和推定的氨基酸序列图。

图 9 是重组载体 pVL-mTARC 的基因图。

图 10 中 A 为昆虫细胞中产生的小鼠 TARC 的最终纯品从 Cosmosil 5C4-300 柱（Nacalai Tesque）的洗脱带，B 为表明 SDS-PAGE 结果的电泳的照片。

图 11 是将昆虫细胞中产生的纯化的小鼠 TARC 皮下注射到 Balb/C 小鼠，24h 小时后观察其组织的形态学，其中用苏木精－伊红组织染色来观察细胞的浸润像。

图 12 是只将 PBS 注射到 Balb/C 小鼠皮下，24h 后通过苏木精－伊红染色观察细胞浸润像时的组织形态的照片。

图 13 是表明 ^{125}I 标记的 TARC 与各种细胞进行特异性结合结果的棒图。

图 15 中，A 表示 ^{125}I 标记的 TARC 浓度固定，非标记的 TARC 浓度变化的情况下，与 Jurkat 细胞进行特异性结合量的变化图，B 表示 ^{125}I 标记的 TARC 浓度一定的时候，不存在非标记的趋化因子或在 200nm 其它趋化因子或 TARC 存在下，与 Jurkat 细胞结合的 ^{125}I 标记的 TARC 结合量图。

图 16 表示 ^{125}I 标记的 TARC 的浓度固定，非标记的其它趋化因子或 TARC 的浓度变化的情况下，与红细胞进行特异性结合量的变化。

图 17 是图 16 中所示的结果的散点（ Scatchard ）图。

图 18 表示 TARC 的浓度对 HUT78 细胞迁移活性的影响。

图 19 表示 TARC 的浓度对粒细胞迁移活性的影响。

图 20 表明 TARC 的浓度对单核细胞迁移活性的影响。

图 21 表明在 PHA 、抗 CD_3 抗体和 LPS 的刺激下正常人外周血单核细胞 TARC 表达随时间的变化图。

图 22 表示在各种细胞因子[IL-1α（ R &D ）、 IL-2（ Sionogi 制药公司）、 IL-3 （ Genzyme ）、 IL-4 （ PeproTech ）、 IL-7（ PeproTech ）、 IL-10（ Genzyme ）、 GM-CSF（ Genzyme ）、 TNF-α（ PeproTech ）、 IFN-γ（ Sionogi 制药公司）、 M-CSF 及 PHA（ R & D ）] 的刺激下，正常人外周血单核细胞 TARC 的表达量。

图 23 表示细胞因子的浓度与正常人外周血单核细胞 TARC 表达量的关系。

图 24 表示 PHA 、 PHA/PMA 、 GM-CSF 、 IL-3 、 IL-4 对从正常人外周血单核细胞分离的 CD14 阳性单核细胞和 CD14 阴性淋巴细胞诱导 TARC 表达的效果。

图 25 是在 PHA（ GIBCO-BRL ）、 LPS（ L4391 、 Sigma ）、 IL-4（ PeproTech ）、 IL-3（ Genzyme ）或 GM-CSF（ Genzyme ）刺激人外周血单核细胞，用 Northern 印迹分析 TARC mRNA 表达的结果。

图 26 中 A 表示在细胞因子（ IL-4 、 IL-3 或 GM-CSF)的刺激下从正常人外周血单核细胞分泌的 TARC 对 T 细胞株 HUT78 的迁移活性，图 26 中 B 表示只有在抗 TARC 抗体的情况下对 HUT78 的迁移活性才能消失。

图 27 表示细胞因子 IFN-γ和 IL-10 对细胞因子刺激下正常人外周血单核细胞 TARC 表达的抑制作用。

图 28 是表达 TARC 和 SEAP 融合蛋白的重组载体 pDREF-TARC-SEAP（His）的基因图。

图 29 表示将 TARC-SEAP 的浓度固定在 1nM，非标记的 TARC 浓度变化的情况下，表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞与 TARC-SEAP 进行特异性结合的结合量的变化。

图 30 表示将 TARC-SEAP 的浓度固定在 1nM 时，各 TARC 在内的各种非标记人趋化因子为 200nM 时，对表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞与 TARC-SEAP 结合的抑制作用。

图 31 表示 TARC、RANTES 及 MIP-1α的浓度对表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞迁移活性的影响。

实施发明的最佳方案

对本发明的 TARC 进行各种研究，结果表明 TARC 具有如下所述与已知的 CC 型趋化因子不同的特性，是一种新型的蛋白质。

（1）人 TARC 在基因水平上是由 94 个氨基酸组成的蛋白质，从结构上分析推测在 23 和 24 位的丙氨酸间切开信号序列后是一由 71 个氨基酸组成的分子量约 8kDa 的碱性的成熟蛋白。

（2）成熟型 TARC 显示出与 CC 型趋化因子明显的同源性，尤其是全部保持 CC 型趋化因子保持的 4 个半胱氨酸（参照图 2）。

（3）与已知的 CC 型趋化因子的同源性达 30%，对 RANTES 最高达 29%。

（4）与已知的 CC 型趋化因子不同，几乎只在胸腺组织中组成性表达。

（5）在免疫学刺激下，在外周血单核细胞中（PBMC）表达。

（6）在 PBMC 中的表达具有以下特征，如

1) 非特异的植物血凝素比 T 细胞特异的抗 CD3 抗体具有更强的刺激作用，而对普通趋化因子的表达具有诱导活性的 LPS 不能诱导表达。

2) 生理浓度的细胞因子（GM-CSF, IL-3, IL-4）能诱导表达。

3) 能诱导已知趋化因子表达的 TNF-α、IFN-γ不能诱导表达。

4) PHA、GM-CSF、IL-3 和 IL-4 也可诱导 TARC mRNA 的表达。

5) GM-CSF 、 IL-3 、 IL-4 只刺激单核细胞的分泌，而 PHA 、 PHA/PMA 只刺激淋巴细胞的分泌， PHA 刺激诱导表达在加入 PMA 后显著受抑制。

6) 未刺激和 LPS 刺激的人外周血单核细胞几乎不表达 TARC 的 mRNA，而 GM-CSF、 IL-3 的刺激下能诱导 400 倍的表达， IL-4、 PHA 的刺激下约诱导 40 倍的表达。

7) 小鼠 TARC 有与人 TARC 同样的特征，在基因水平上是由 93 个氨基酸组成的蛋白质，从结构上分析，推测在 23 位和 24 位的丙氨酸间切开信号序列后，是一种成熟蛋白，是由 70 个氨基酸组成，分子量约为 8kDa 的碱性蛋白质。

8) 人 TARC 与小鼠 TARC 的同源性高达 64.4%。

9) 具有白细胞浸润作用（趋化因子样活性）。

10) TARC 的受体在某些 T 细胞（ Jurkat 、 Molt3 、 CEM 、 Hut78 、 MT2 、 MT4 、 Hut102 ）、外周血淋巴细胞、活性外周血 T 细胞上表达。

11) 细胞上的 TARC 受体不依赖于其它趋化因子的受体，与 TARC 的结合不被其它趋化因子所抑制。

12) 红细胞上趋化因子受体中的 1 个与 DARC 特异性结合。

13) 在 IL-3 及 GM-CSF 的刺激下，正常人外周血单核细胞的培养液能引起 HUT78 细胞强烈的迁移，而未经刺激或 IL-4 刺激下的培养液不引起迁移。另外，经 GM-CSF 处理的培养上清对 HUT78 细胞的迁移性经豚鼠抗 TARC 抗体处理后几乎消失。

14) 抑制 IL-4 诱导的体液免疫的 IFN-γ ，普遍抑制免疫应答的 IL-10 能抑制 GM-CSF 、 IL-3 、 IL-4 刺激下诱导的外周血单核细胞 TARC 的表达。

15) 据报道， MIP-1α 、 RANTES 、 MCP-I 的受体与 CCR4 （ C. A. Power 等， 生化杂志， Vol. 270, NO. 33, 19495-19500, 1995 ）特异性结合（该文献中报道用非洲爪蟾卵细胞表达的 CCR4 进行实验）。

16) 对表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞具有迁移活性。

以上表明本发明的 TARC 属于 CC 型趋化因子，是一种新型的细胞因子。另外， TARC 在免疫学刺激下诱导产生，并且只在胸腺内组成型表达，在外周中，在某些细胞因子（ GM-CSF 、 IL-3 或 IL-4 ）的刺激

下从外周血的单核细胞表达。

因此推测TARC与未成熟的T细胞向胸腺组织迁移和胸腺组织中T细胞的分化成熟相关。此外，在免疫刺激下诱导外周单核细胞产生这一事实表明TARC在炎症和免疫反应中起重要作用。TARC在生物体内的炎症反应和免疫反应中能诱导白细胞的迁移和活性，并且对胸腺T细胞的分化成熟起到重要作用，因此我们认为它是医学上的重要蛋白质。

上述TARC的表达与已知的CC型趋化因子有显著不同，这表明TARC具有特异的生理学功能。例如，非特异性植物血凝素（PHA）比T细胞特异的抗CD3抗体具有更强的刺激作用，这表明TARC应该在T细胞分泌的细胞因子的刺激下从外周血单核细胞（PBMC）表达，而不是T细胞直接分泌。LPS能诱导大多数已知趋化因子表达，而对单核细胞不能诱导TARC的表达，这一点也表明了上面的情况。

具体而言，TARC的表达在各种细胞因子的诱导下产生，尤其是在GM-CSF、IL-3和IL-4的作用下能更强的诱导表达。这些细胞因子中前二者与免疫系统维持自身恒定相关，IL-4与变态反应等体液免疫的诱导相关，由此可推测，TARC在诱导体液免疫的状态下发挥功能。再者能诱导已知趋化因子表达的TNF-α、IFN-γ不能诱导TARC表达，这提示TARC在与其它趋化因子不同的状态下表达，发挥作用。但是，这些事实不能否定除正常人末梢单核细胞外，淋巴细胞也表达TARC的可能性。

另外发现，当PMA（佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯）与PHA一起使用时，能更好地诱导大多数趋化因子的表达，而作用于TARC时，表达减少。这表明TARC的表达在与IL-4的表达相同的控制下进行。这支持TARC与Il-4同样与体液免疫相关这一推测。

另外，GM-CSF、IL-3刺激正常人外周血单核细胞所得培养液与重组TARC同样对HUT78细胞显示细胞迁移活性。GM-CSF刺激所得培养液的迁移活性被抗TARC抗体所中和。这表明与重组TARC同样，正常人外周血单核细胞分泌的TARC也对表达TARC特异受体的细胞具有细胞迁移活性。

如上所述，与其它趋化因子不同TARC的表达是在诱导体液免疫的时候诱导外周血单核细胞表达。IL-4诱导体液免疫，IFN-γ则抑制，相

反， IFN-γ诱导细胞免疫，而 IL-4 则抑制。另外 IL-10 抑制整体免疫。GM-CSF 、 IL-3 和 IL-4 诱导正常人外周血单核细胞表达 TARC 能被 IFN-γ、 IL-10 所抑制。这表明 TARC 在诱导免疫反应的情况下表达，且在诱导体液免疫反应的状态下表达，相反在细胞免疫的状态下其表达受到抑制。由此我们认为 TARC 尤其在变态反应、特异性变态反应。哮喘等体液免疫的状态下表达，发挥作用。

本发明 TARC 功能的阐释，有利于阐明胸腺功能、 T 细胞的分化和成熟、炎症反应和免疫反应的机制等，由此有利于提供诱导或抑制炎症反应或免疫反应的新手段。另外，本发明的编码 TARC 的基因（ DNA ）和抗－ TARC 抗体，有利于分析 TARC 基因的突变及其 mRNA 、蛋白质的表达状态，为揭示血液系统和免疫系统疾病的病因和诊断提供新手段，由此有利于开发诊断和治疗这些疾病的新方法。

另外，将编码本发明 TARC 的基因（ DNA 插入到适当的载体，以体外导入培养细胞，或者直接体内施用，可有利于开发基因治疗，如对 TARC 基因异常引起的遗传性疾病，各种癌症及艾滋病等致死性感染性疾病。

除此之外，预计通过测定 TARC 的血液浓度可诊断过敏反应。特异性变态反应、哮喘等。另外，估计通过抑制 TARC 的表达和活性，可治疗或预防过敏反应，特异性变态反应、哮喘等，通过诱导 TARC 的表达和活化可诱导体液免疫抑制细胞免疫。

因此，本发明还提供包含本发明 TARC 或其变异体在内的医药组合物。本发明的医药组合物包括预防药、治疗药和诊断药，其施用量和施用途径可通过常规方法，根据使用目的、施用对象的病情等适当决定。再者，由于本发明的 TARC 蛋白质本来是生物体内的活性物质，所以不难理解产生该蛋白质活性的量，即本发明医药组合物中使用范围内的剂量不会出现急性中毒问题。

为了各种不同的目的， TARC 和含有其活性部分的片段，针对该 TARC 及其片段的单克隆（单抗）或多克隆抗体、与 TARC 特异性结合的受体等均有用。

因此本发明还提供 TARC 特异的单克隆抗体及生产单抗的杂交瘤。如后面实施例所述，可用该领域确立的已知方法制备这种抗体和杂交瘤。

鉴于本发明TARC蛋白质的作用，若能检测该蛋白质的激动剂或拮抗剂将有利于TARC相关疾病或异常状态的治疗、预防或诊断。如本发明中所公开的，利用TARC蛋白质定量法、受体特异性等来筛选这些物质。

因此，本发明还提供筛选TARC蛋白质激动剂或拮抗剂的方法，它包括将推测含有该激动剂或拮抗剂的样品与分泌该蛋白质的细胞及诱导该蛋白质分泌的细胞因子混合，测定该蛋白质的分泌量。

例如参照后面实施例中所示的蛋白定量法对 TARC 蛋白质进行定量。

另外，上面方法中所用的细胞因子包括，如 GM-CSF 、 IL-3 和 IL-4，分泌TARC的细胞，如外周血单核细胞。

此外，本发明提供筛选TARC蛋白质激动剂或拮抗剂的反应，它包括将推测含有该激动剂或拮抗剂的样品与该蛋白质特异的受体进行反应，测定其结合活性和/或反应性。

上面方法中应用的受体，如可用CCR4，可用后面实施例中所述的方法测定结合活性或反应性。

下面将说明本发明TARC的制造和鉴定方法。如无特别指示以下的描述只是举例说明，可适当应用本领域的技术人员所熟知的技术进行基因重组、转化宿主细胞、用转化体生产重组蛋白质，分离纯化表达的蛋白质以及分析法和免疫学方法等。

I. 编码TARC蛋白质的DNA序列的确定

含编码本发明TARC蛋白质的DNA的DNA片段，比如，可从植物血凝素（ PHA ）刺激的正常人外周血单核细胞（ PBMC ）来源的cDNA文库获得。

（ 1 ）探针的制备

用以下方法制备从 cDNA 文库筛选编码 TARC 蛋白质的基因用的探针。

由于TARC为分泌型蛋白质，所以其mRNA 5′端是编码信号序列的区域。因此，首先用quickprep mRNA纯化试剂盒（ Pharmacia ）从PHA刺激的PBMC抽提poly(A)+ RNA。用作随机引物（ GIBCO-BRL ）可从该mRNA制备单链DNA， 3′端结合有Oligo （ dC ）锚。

接着用Oligo （ dG ）引物合成双链DNA， 用超声波裂解，用T4

聚合酶修复。将该物质与 Uni-amp 衔接子（ Clontech ）结合，进行琼脂糖电泳，之后抽提富含 5′侧序列的 300～600bp 的片段。将所得片段插入到信号序列捕获载体 pDREF-CD4ST （ Yoshida 等， FEBS Letters 360: 155-159, 1995 ）。该载体是含有 EB 病毒（ EBV ）复制起点的穿梭载体，在 EBNA-1 蛋白质的存在下能进行自我复制。另外具有的特征是在强 EF-1α 启动子的下游插入缺乏信号序列，编码人 CD4 的 DNA，当编码信号序列的未知 cDNA 片段正好插入到两者间框架时，转染的 Raji 细胞表达 CD4 。

用插入了上述片段的载体 pDREF-CD4ST 转染 Raji 细胞，通过分选集中 CD4 阳性的 Raji 细胞，从中回收质粒。然后再次将单个质粒导入 Raji 细胞，通过证实 CD4 的表达，最后分离插入的 cDNA 片段，可能编码信号序列的质粒。测定插入到这些质粒中的 cDNA 的碱基序列，与已有的数据库相比较，以选择编码 CC 型趋化因子特征序列的 cDNA 片段。所得 cDNA 有可能编码所期望的新型蛋白质，用 ^{32}P 标记它，用作筛选 PHA 刺激的人 PBMC 来源的 cDNA 文库的探针，以获得全长 cDNA 。

cDNA 文库可按照常规方法进行构建，如按照以下方法。用 quickprep micro mRNA 纯化试剂盒（ Pharmacia ）从 PHA 刺激的人 PBMC 抽提 poly(A)+ RNA，用寡核苷（ dT ）作引物，通过逆转录酶从 poly(A)+ RNA 合成 cDNA ，然后插入到，如 pSPORT1 载体（ GIBCO-BRL ）。用上述部分得到的探针，用本领域技术人员熟知的任何一种方法，如重组噬菌体斑的杂交和重组大肠杆菌的克隆杂交等筛选文库。

然后测定所得重组质粒插入 cDNA 的碱基序列。如用下面的方法进行测序。首先，用该片段内存在的限制性酶部位切割插入片段，然后将各 cDNA 片段亚克隆到适当的测序载体，如 pBluescript （ Stratagene ）。然后测定克隆片段的碱基序列，如用 Sanger 法（ F. Sanger 美国国家科学院院刊, 74: 5463-5467, 1977 ）。

II. 重组型 TARC 蛋白质的表达

将编码本发明 TARC 蛋白质的 DNA 整合到表达载体中，将所得表达载体导入适合的宿主细胞，如细菌、酵母、昆虫细胞或动物细胞中，得到转化体。

适合本发明 TARC DNA 表达的表达载体的实例为，宿主细胞为细菌时用 pRSET、 pGEMEX 和 pKK233-2，宿主细胞为酵母时用 pYES2，昆虫细胞用 pVL1393，动物细胞用 pEF-BOS， pSRα 和 pDR2 等，但并不局限于此。

在大肠杆菌等原核微生物的情况下，在强启动子（例如 T7 启动子）的控制下， TARC DNA 可作为前体蛋白质表达，前体蛋白质包括原核微生物分泌的蛋白质的天然前体物质来源的信号序列（如信号肽 OMPa ）和成熟型 TARC 蛋白质。

用酵母时，可作为这样的前体蛋白质进行表达，它包括酵母分泌的蛋白质的天然前体物质来源的序列（如外激素α 的前原序列（ prepro-Sequence ））和成熟型 TARC 蛋白质。

用动物细胞的时候，可将 TARC 蛋白质插入到适当表达载体强启动子如， EF-1α 启动子的下游，与有效的选择标记（如二氢叶酸还原酶）一起导入动物细胞（如 CHO dhfr$^-$ 细胞），选择有耐药（这时用氨甲蝶呤）性的细胞，这样可建立有高表达能力的细胞株。

用人细胞的时候，将 TARC 蛋白质基因整合到病毒或逆转录病毒，用重组病毒感染人细胞。在适合 TARC 表达的条件下培养所得转化体，转化体可产生 TARC 蛋白质。另外，成熟型 TARC 蛋白质可用众所周知的方法全部合成，如用固相法和有必要重视两个二硫键结合的存在。

因此，本发明包括上述基因工程的 TARC 或化学合成的 TARC 。

III. 抗 TARC 抗体的制备

如上所述，本发明 TARC 特异的抗体有利于阐明与 TARC 相关的生理学现象，有利于与 TARC 活性相关异常和疾病的治疗、预防或诊断。因此，本发明还提供 TARC 蛋白质特异的抗体。

针对蛋白质的抗体（多克隆和单克隆）的制备方法在该技术领域是众所周知的。

例如，根据序列号 1 或 2 中所示 TARC 氨基酸序列的一部分，可用常规的肽合成仪合成的肽，或表达 TARC 的载体转化的细菌、酵母、动物细胞、昆虫细胞等产生的 TARC 蛋白质通过常规的蛋白质化学方法进行纯化后，用这些肽作抗原，免疫小鼠、大鼠、仓鼠、兔子等动物，从它们的血清制备多克隆抗 TARC 抗体。

另外，从免疫小鼠和大鼠的脾脏或淋巴结获取细胞，与骨髓瘤细胞

融合，按照 Kohler 和 Milstein 的方法[自然，256, 495-497 (1975)]或其改良的方法 Ueda 等方法[美国国家科学院院刊， 79, 4386-4390 (1982)]制备杂交瘤，之后可从该杂交瘤生产抗 TARC 的单克隆抗体（单抗）制备单克隆抗体的步骤如下所示。

（ a ）用 TARC 蛋白质免疫小鼠;

（ b ）摘除免疫小鼠的脾脏并分离脾细胞;

（ c ）在融合促进剂的存在下（如聚乙二醇），用上述的 Kohler 等的方法将分离的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合;

（ d ）培养在未融合的骨髓瘤细胞不能生长的选择培养基中所得到的杂交瘤;

（ e ）用 ELISA 法或免疫电印迹技术选择能生产所期望抗体的杂交瘤细胞，并用有限稀释法进行克隆;

（ f ）培养生产 TARC 单克隆抗体的杂交瘤细胞，并从培养物中分离单克隆抗体。

（ IV ） TARC mRNA 及 TARC 蛋白质的检测

本发明 TARC mRNA 及 TARC 蛋白质的存在，可分别用常规的特异性 mRNA 检测法和蛋白质检测法进行检测。

例如可用反义 RNA 和 cDNA 作探针，通过 Northern 印迹分析法和原位杂交法检测 mRNA 。另外，在逆转录酶将 mRNA 转换为 cDNA 后，通过与合适的引物结合，用聚合酶链式反应（以下称作 PCR ）也可进行检测。

蛋白质的存在可用上述（ III ）得到 的 TARC 特异性抗体，通过免疫沉淀法和 Western 印迹法进行证实。

V. TARC 蛋白质的免疫测定

例如可用放射性同位素、过氧化酶或碱性磷酸酶等酶，或荧光色素等标记一定量的 TARC ，加入未标记浓度已知的 TARC 和血清中的抗 TARC 多克隆抗体或单克隆抗体进行抗原抗体竞争反应。适当变化非标记抗原的浓度后，用适宜的方法分离与抗体结合了的标记抗原和未与抗体结合的标记抗原，测定与抗体结合的标记抗原的放射活性、酶活性或荧光强度。随着非标记抗原量的增加，与抗体结合的标记抗原的量减少。这种关系可画成一标准曲线。此外，可将识别 TARC 蛋白质上不同表位的 2 种单抗中的一种固定，用上述任何一种方法标记另一种抗体，

用标记抗体检测与固定抗体结合了的 TARC ，并定量，即也可用夹心法。

然后将上述反应系统中浓度已知的非标记抗原替换为含未知量抗原的样品，反应后，获得放射活性、酶活性或荧光强度，与标准曲线进行比较就可知样品中抗原的量即 TARC 蛋白质的量，因此可提供监测炎症反应和免疫反应或 T 细胞分化成熟的新方法。

VI. TARC 蛋白质趋化因子活性的证实

本发明 TARC 蛋白质的趋化活性可这样证实，如在体外，在由介入了孔径恒定的滤器而分隔开的培养容器的一侧加入 TARC，在另一侧加入目的细胞，一定时间后比较 TARC 存在时通过滤器孔移动到对侧的细胞数与随机移动的细胞数。另外，在体内可这样证实，动物皮下施用纯化的 TARC 蛋白，用组织学方法检测细胞的浸润和募集。

通过以下实施例来说明本发明。

实施例 1 分离编码人 TARC 的 DNA

1. 人 TARC cDNA 的克隆

（ 1 ）用植物血凝素刺激的人外周血单核细胞制备 cDNA 文库

用 GIBCO-BRL 的 cDNA 合成系统和 cDNA 克隆系统，按照文献（ J. Sambrook 等，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室，纽约 (1989)）已有的常规方法，如下用植物血凝素（ PHA ）刺激的人外周血单核细胞制备 cDNA 文库。

首先，用 quickprep Micro mRNA 纯化试剂盒（ Pharmacia ）从 PHA 刺激的正常人外周血单核细胞抽提 Poly(A)+ RNA 。用试剂盒中给予的细胞溶解液溶解 PHA 刺激了 72 小时， 2×10^7 即人外周血单核细胞。然后，加入 Oligo-dT 树脂，混合 3 分钟，在 Poly(A)+ RNA 与 Oligo-dT 树脂结合之后，用 TOMY 离心机 MRX-150 （ TOMY 精工） 12000 转离心， 1 分钟。用高盐浓度的洗液洗涤所得沉淀物， 3 次，用低盐浓度的洗液洗 5 次，洗净后洗脱液洗脱。在洗脱液中加入 0.1 倍量 3M 醋酸钠和 2 倍的乙醇， － 80 ℃冷却 1 小时，用 TOMY 离心机 MRX-150 （ TOMY 精工）在 12000 转离心 5 分钟，将沉淀的 poly(A)+ RNA 溶解到无菌蒸馏水中。测定 260nm 处的吸光度，计算回收的 poly(A)+ RNA 的量。从 PHA 刺激的人外周血单核细胞获得 10μg 的 poly(A)+ RNA 。

然后以纯化的 poly(A)+ RNA 为模板，按下面的方法合成 cDNA 。

首先，以 4μg poly(A)+ RNA 为模板，在反应缓冲液中（ 50mm Tris - HCl 、 pH 8.3, 75mM KCl, 3mM $MgCl_2$, 10mM DTT, 500μM dNTP(dATP 、 dGTP 、 dCTP 、 dTTP), 50μg/ml Not I 引物 - 衔接子（ GIBCO - BRL ），和 2 万 U/ml 逆转录酶 SUPER SCRIPT II RT ），37 ℃反应 1 小时，合成单链 DNA 。 Not I 引物 - 衔接子的序列如序列表的序列号 3 所示。以该单链 DNA 为模板，在反应缓冲液（ 25mM Tris - HCl, pH7.5, 100mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 1.2mM DTT, 0.15 mM β - NAD+, 250μm dNTP(dATP 、 dGTP 、 dCTP 、 dTTP), 65U/ml DNA 连接酶， 250U/ml DNA 聚合酶和 13U/ml Rnase H ）中，16 ℃反应 2 小时，合成 cDNA 。然后，加入 DNA 聚合酶，终浓度达 65U/ml，再在 16 ℃反应 5 分钟，形成双链。将该双链 DNA 在反应缓冲液（ 50mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM $MgCl_2$, 1mM DTT， 1mM ATP， 5 % PEG 8000， 200μg/ml Sal I 衔接子（ GIBCO-BRL ）， 100U/ml T4 DNA 聚合酶）中， 16 ℃反应 16 个小时，以与 Sal I 衔接子接合。 Sal I 衔接子是序列表中序号 4 和 5 中所示 DNA 退火了的双链 DNA 。将所得 cDNA 插入到 pSPORT1 载体的 Not I 和 Sal I 位点的中间，制成 cDNA 文库。

（ 2 ）信号序列捕获用 cDNA 文库的制备

用 GIBCO-BRL 的 cDNA 合成系统、 5′RACE 系统和 cDNA 克隆系统，参照文献（ J. Sambrook 等，分子克隆: 实验手册，第 2 版，冷泉港实验室，纽约（ 1989 ））中的常规方法，从 PHA 刺激的人外周血单核细胞制备 mRNA 5′末端近区富集的 cDNA ，用以制备信号序列捕获文库。

首先，用从 PHA 刺激的人外周血单核细胞获得的 poly(A)+RNA 作模板，按以下的方法合成 mRNA 5′末端近区富集的 cDNA，以 5mg poly(A)+RNA 作模板，用逆转录酶 SUPER SCRIPT II RT （ GIBCO-BRL ），在反应缓冲液（ 50mM Tris-HCl 、 pH 8.3, 75mM KCl, 3mM $MgCl_2$, 10mM DTT, 500 μM dNTP(dATP 、 dGTP 、 dCTP 、 dTTP), 150μg 随机引物（ GIBCO-BRL ）， 2 万 U/ml 逆转录酶 SUPER SCRIPT II RT ）中， 37 ℃反应 1 小时，合成单链 DNA 。向该反应液中加入 6N NaOH，终浓度为 0.4N，再在 65 ℃反应 30 分钟，在模板 poly(A)+RNA 水解后，加入 6N 醋酸，终浓度为 0.4N 去中和混合物。然后加入等量的 Tris-HCl 、 pH 8.0 饱和的酚/氯仿混合液（ 1:1 ），搅拌后用 TOMY 离

心机 MRX-150 在 12000 转离心 5 分钟。取出其水层，加入 0.2 倍的 3M 醋酸钠、 2 倍乙醇， - 80 ℃冷却 1 小时后，再用 TOMY 离心机 MRX - 150 （ TOMY 精工）在 12000 转离心 5 分钟，用灭菌蒸馏水溶解沉淀物。将该单链 DNA 在反应缓冲液（ 20mM Tris-HCl 、 pH 8.4, 50mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200μM dCTP, 400U/ml 末端脱氧核苷酸转移酶）中， 37 ℃反应 10 分钟，在 3′端结合上 Oligo-dC 层。再在 70 ℃处理 5 分钟，使末端脱氧核苷酸转移酶失活。将结合有 Oligo-dC 层的单链 DNA 在反应缓冲液（ 25mM Tris-HCl 、 pH 7.5, 100mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 10mM$(NH_4)_2SO_4$ 、 1.2mM DTT, 0.15 mM β-NAD+， 250μM dNTP (dATP 、 dGTP 、 dCTP 、 dTTP)， 500μg 锚式引物（序列表中序号 6 ） 65U/ml DNA 连接酶， 250U/ml DNA 聚合酶 I 和 BU/ml RNASE H ）中， 16 ℃反应 2 小时，合成双链 DNA 。锚式引物用 DNA 合成仪（ Cyclone Plus DNA synthesiser, Miligen/Biosearch ）合成。合成时用 Miligen/Biosearch 的β - 连接的β - 氰乙基磷酰亚胺试剂。合成后用 2ml 氨水（ 28 %， Nacalai Tesque ）从柱中洗脱合成的核苷酸，之后在 60 ℃处理 5 小时，脱去保护基。在脱去了保护基的核苷酸中加入 10 倍的正丁醇，用 TOMY 离心机（ TOMY 精工）在 3000 转离心 10 分钟，回收沉淀。将回收的核苷酸溶解到无菌水中，测定 260nm 处的吸光度，确定含量。

用冰冷却双链 DNA，用 TOMY 超声波破碎仪 UD - 201 （ TOMY - 精工）以最大输出量部分降解 150 秒钟，加入 T4 DNA 聚合酶，终浓度达 65U/ml，在 160 ℃反应 5 分钟后，在反应缓冲液（ 50mM Tris-HCl, pH 7.6, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 1mM ATP, 5%PEG 8000, 200μg/ml UNI-Amp 衔接子， 1000U/ml T4 DNA 聚合酶）中，再在 16 ℃反应 16 小时，与 UNI-Amp 衔接子结合（ Clontech ）。 UNI-Amp 衔接子是序列表中序号 7 和 8 中所示 DNA 的退火产物。将所得到的部分降解的双链 DNA 作模板，在反应缓冲液（ 10mM Tris-HCl 、 pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.1%明胶， 200μM dNTP(dATP 、 dGTP 、 dCTP 、 dTTP)， 400 nM UAP 引物（ GIBCO-BRL ）， 400nM UNI-Amp 引物（ Clontech ）， 100 U/ml AmpliTaq DNA 聚合酶 I)中进行 PCR 反应。 UAP 引物和 UNI-Amp 引物的序列分别如序列表中序号 9 和 10 所示。用购自宝酒的 Ampli Taq 试剂盒在 DNA Thermal Cycler (Perkin -

Elmor ）下进行 PCR 。反应如下进行: 94 ℃预处理 3′后， 94 ℃ 45″、58 ℃ 45″、 72 ℃ 2′重复 30 个循环，最后在 72 ℃处理 3 分钟。

将这样制备的在 mRNA 5′末端近区 富集的 cDNA 插入到单独制备的 pDREF-CD4ST 载体（ Yoshida 等， FEBS Letters 360: 155 - 159, 1995 ） Sal I 和 XbaI 位点的中间，制备信号序列捕获文库。按照如下的方法，将信号序列捕获文库导入人 B 细胞株 Raji，通过鉴定细胞表面表达 cD4 的克隆，选择保持信号序列的片段。

（ 3 ）信号序列捕获

将上面（ 2 ）中制备的来源于 PHA 刺激的人外周血单核细胞，由 mRNA 5′末端近区浓缩的 cDNA 构成的信号序列捕获 cDNA 文库 10μg，悬浮到 500μl PBS 中，用电穿孔法导入 1×10^7 个 Raji 细胞中。用 BioRad 的 Gene Pluser 在 250V 电压、 500μF 静电容量下进行电穿孔。在潮霉素（ 200μg/ml ）存在的条件下将导入了 cDNA 文库的 Raji 细胞培养 1 周，通过选择有耐药性的细胞而获得。将具有耐药性的细胞与小鼠抗人 CD4 抗体（ OKT4 ，从 ATCC 获得）在 4 ℃反应 30 分钟，洗净后再与磁珠标记的羊抗小鼠 IgG 抗体（ Dynabeads 、 Dynal ）在 4 ℃反应 30 分钟。用磁性分选器分离磁珠标记的、细胞表面表达 CD4 的细胞。磁性分选进行 3 次，最终得到 45 % 的细胞在细胞表面表达 CD4 的细胞团。

用 Magic Minipreps DNA 纯化系统（ Promega ）从细胞团回收质粒 DNA ，再次导入大肠杆菌 DH10B 。将大肠杆菌接种到 LB - 氨苄青霉素 - 琼脂板上（ 10g 胰蛋白胨， 5g 酵母提取物， 10g NaCl ， 15g 琼脂， 50μg/ml 氨苄青霉素/1ml 蒸馏水）， 37 ℃培养一晚上。用 Magic Minipreps DNA 纯化系统（ Promega ）从培养液中纯化质粒 DNA ，再次通过电穿孔法导入到悬浮于 500μl PBS 中的 1×10^7 个 Raji 细胞中。将这些 Raji 细胞与小鼠的抗 CD4 抗体（ OKT4 ， ATCC ）在 4 ℃反应 30 分钟，洗净后再与 FITC 标记的兔抗小鼠 Ig G(Fab′)$_2$ 抗体（购自 Dako ）在 4 ℃反应 30 分钟。用 Fac Star Plus （ Becton-Dickinson ）鉴定 FITC 标记的表达 CD4 的细胞。检查 100 个大肠杆菌的克隆，最后得到 42 个克隆在细胞表示诱导 CD4 表达。

根据 Sanger 法， 用 Pharmacia 公司的 Autoread Sequence 试剂盒和 A.L.F. II 自动测序仪检测这些克隆的碱基序列。所得克隆序列与已有的

数据库相比较，结果发现克隆98在推测的信号序列断裂位点9氨基酸的下游有2个连续的半胱氨酸，是一种细胞迁移性趋化因子，具有结构上与CC型趋化因子相一致的特征。

（4）人TARC全长cDNA的克隆

为了获得克隆98的全长cDNA，用多引物DNA标记系统（Amersham Japan）以^{32}P标记207bp克隆98的cDNA片断，用它作探针，通过菌落杂交法筛选（1）中制备的PHA刺激的人外周血单核细胞的cDNA文库。菌落杂交法参照文献（J. Sambrook等，分子克隆：实验手册，第2版，冷泉港实验室，纽约，（1989））.中已有的方法进行。

将含有人PHA活化的外周血单核细胞cDNA文库的大肠杆菌DH10B接种到LB－氨苄青霉素－琼脂板中（10g胰蛋白胨，5g酵母提取物，10g NaCl，15g琼脂，50μg/ml氨苄青霉素/ml蒸馏水），37℃培养一晚上。将平皿中生长的大肠杆菌菌落转移到尼龙膜上（Hybond-N+，Amersham Japan），然后用SDS处理（10％SDS），碱变性（0.5N NaOH，1.5M NaCl），洗涤（2×SSC）。用^{32}P标记的菌落98作探针与尼龙膜进行杂交。用6×SSC（1×SSC：0.15M NaCl，0.015M柠檬酸钠）、50％甲酰胺、0.5％SDS、5倍的Denhardt's溶液，100μg/ml鲑鱼精子作杂交溶液，在42℃杂交一晚上。用2×SSC，0.1％SDS缓冲液在室温下洗膜10分钟，用0.2×SSC、0.1％SDS缓冲液在60℃洗30分钟，洗2次，之后用X光胶片（Kodak）感光，显影，鉴定与探针进行反应的菌落，最终得到一个cDNA克隆（Clone D3A）。根据Sager法，用Pharmacia的Autoread Sequence kit和A.L.F.II自动测序仪测定插入到克隆D3A中的cDNA的序列，再进行下面的各种检测，结果证实，该cDNA是编码目的新型CC型趋化因子样蛋白质（TARC）的。

II. 人TARC的结构的确定

（1）分析hTARC cDNA的碱基序列及其编码的氨基酸序列

根据Sanger法，用Pharmacia的Autoread Sequence kit和A.L.F. II自动测序仪检测上面I.(4)中得到的克隆D3A的碱基序列。cDNA克隆D3A的碱基序列和内部不包括翻译终止密码子的开放读框的氨基酸序列如图1所示。

如图1所示，它表明插入到克隆D3A中的基因含有由94个氨基酸

组成的开放阅读框， N 末端有以信号肽为特征的、强疏水性氨基酸序列。这 94 个氨基酸形成的蛋白质的分子量为 10,507。另外，根据计算，推定的信号肽切断位点在 Ala-23 和 Ala-24 间，如图 1 中的垂直棒所示。从该切断位点到 9 氨基酸下游有 CC 型趋化因子特征的两个连续的半胱氨酸。

此外，推测信号肽切断后，由 71 个氨基酸组成的推定成熟型蛋白质是分泌型蛋白质。由这 71 个氨基酸组成的推定的成熟型分泌型蛋白质的分子量计算为 8,083，通过计算，等电点为 9.7。

（ 2 ）与 CC 型趋化因子在序列上的相似性

应用 FASTA 和 Clustal V 程序，将 hTARC 的氨基酸序列与已知的 CC 型趋化因子的氨基酸序列进行比较。结果如图 2 所示。图 2 中，包括 hTARC 在内的所有 CC 型趋化因子中保存的氨基酸用粗线围着的阴影表示，而大多数的趋化因子保存的氨基酸只用阴影表示。另外，hTARC 与其它 CC 型趋化因子的同源程度用 % 在右侧表示。

图 2 表明 hTARC 的成熟型分泌蛋白质的氨基酸序列属于 CC 型趋化因子，与 RNATES、 MIP-Ia、 MIP-Ib、 I-309、 MCP-1、 MCP-2、 MCP-3 的同源性分别为 29 %、 26 %、 28 %、 24 %、 24 %、 24 %、 28 %。另外还表明在所有 CC 型趋化因子中保存的 4 个半胱氨酸，在 hTARC 中也保存着。以上结果暗示，所得氨基酸序列是新型的人 CC 型趋化因子的。

III.用 Northern 印迹分析法分析 hTARC mRNA 的表达

从各种人组织分离 poly(A)+RNA 2μg，经过琼脂糖凝胶电泳，转移到尼龙膜上（多组织印迹），从 Clonetech 公司购入该产品。另外，用 PHA 刺激人外周血单核细胞， 0、 4、 24 和 72 小时后，用 quickprep micro mRNA 纯化试剂盒（ Pharmacia ）从中抽提 poly(A)+RNA。将分离的 poly(A)+RNA 1μg 进行琼脂糖凝胶电泳，胶中含 0.66M 甲醛，转移到尼龙膜上（ Hybond-N+ ）（ Amersham Japan ）。用多引物 DNA 标记系统（ Amersham Japan ）以 ^{32}P 标记的 hTARC cDNA 克隆 D3A 的 SmaI-Pst I 片段作探针与这些膜进行杂交。杂交溶液是 5 × SSPE（ 1 × SSPE 为 0.18M NaCl, 0.01M 磷酸钠、 pH 7.5, 1mM EDTA ）、 50 % 甲酰胺、 2 % SDS、 10 × Denhardt's 溶液， 100μg/ml 鲑鱼精子 DNA，在 42 ℃ 杂交一晚。洗膜用 2 × SSC、 0.1% SDS 缓冲液，在室温洗 10

分钟，用 0.2 × SSC、0.1% 在 60 ℃洗 30 分钟，洗 2 次，之后用 X 光胶片（Kodak）感光，显影，进行分析。PHA 刺激后的时间及 TARC mRNA 的表达结果如图 3A 所示，在各种人组织中 TARC mRNA 的表达如图 38 所示。

图 3B 中可看出，hTARC 的 mRNA 在胸腺中大量表达，在肺、大肠和小肠中较少表达，而在其它组织中几乎检测不到。

这些结果提示，hTARC 与其它的 CC 型趋化因子不同，只在胸腺组织中组成型表达，在免疫学刺激下可诱导其产生。

实施例 2 重组人 TARC 在蚕细胞中的表达

（1）构建在蚕细胞中表达 hTARC DNA 用的重组载体 pVL-TARC

用 EcoRI 和 Not I 同时消化实施例 1 中的克隆 D3A，可得到 0.5kb 的 DNA 片段，该片段两端有 EcoRI 和 NotI 位点，包括从翻译起始密码子到翻译终止密码子长度的 hTARC 序列。将该 DNA 片段插入到制备重组型杆状病毒时应用的 pVL1393（Invitrogen）的 EcoRI 位点和 NotI 位点之间，可得到重组载体 PVL-TARC。该重组载体 pVL-TARC 的基因图如图 4 所示。

（2）转化体的培养

接着将重组载体 pVL-TARC 与具有致死性缺失、线性的 AcNPV DNA 同时导入 sf9 昆虫细胞，得到重组杆状病毒，用有限稀释法纯化所得的重组杆状病毒，在 M.0.I.= 0.1 时再感染 sf9 昆虫细胞，得到种病毒。在 M.0.I. = 10 - 20 时用种病毒感染 Tn5B-4 昆虫细胞（Invitrogen）（每 150cm^2 培养瓶 1.2 × 10^7 个），在无血清的 EX-CELL 400 培养基（JRH Biosciences）（每 150cm^2 培养瓶 30ml）上，27 ℃培养 2 天。

（3）产物的分离和纯化

回收培养上清，通过 0.22μm 的滤膜。向滤液中加入 1/10 体积的 500mM MES（pH 6.5），过 A 缓冲液（50mM MES（pH 6.5)/100 mM NaCl）平衡了的 1ml Resouce-S 柱（Pharmacia）。用 A 缓冲液冲洗含有 hTARC 蛋白质的柱子，然后用 A 缓冲液和 B 缓冲液（50mM MES（pH 6.5)/100mM NaCl）配制的 NaCl 盐浓度梯度液进行洗脱。用 SDS-PAGE 和银染色鉴定含 hTARC 蛋白质的级分。SDS-PAGE 的结果如图 5B 所示。图 5B 中 F 和 H 分别是 FPLC 级分（终了一步前的一纯化步）和 HPLC 级分的结果。

在含 hTARC 蛋白质的级分中加入终浓度为 0.1%的 TFA，上 A 缓冲液（0.1%TFA）平衡过的 Cosmosil 5CA 300 柱（Nacalai Tesque），用缓冲液 A 和缓冲液 B（0.1% TFA, 60%乙腈）配成的乙腈梯度液进行洗脱。hTARC 蛋白质的洗脱带如图 5A 所示。收集含 hTARC 蛋白质的级分，在真空干燥中挥发乙腈，对不含内毒素的 PBS 进行透析，得到纯化的终产品。用 BCA 试剂盒（Pierce），以 BSA 作对照来测定蛋白质的浓度。从 300ml 培养上清中获得 300μg 纯化的 hTARC 蛋白质，表达量良好。用鲎裂解物测定（QCL-1000, Bio Whitaker）对混入的内毒素进行定量，在 4pg/μg 以下。用氨基酸测序仪（岛津）检测纯化 hTARC 蛋白质 N 末端的氨基酸序列，为 ARGTNVGRE。如图 5 所示，该氨基酸序列与 71 个氨基酸组成的成熟分泌型蛋白质 N 末端的氨基酸序列一致，而 71 个氨基酸是从碱基序列上切断预测的信号肽后形成的。

通过细胞迁移试验对纯化的 TARC 蛋白的活性进行评价。由 HUT78 细胞，粒细胞，和单核细胞得到的结果分别如图 18，19，20 所示。这些结果表明纯化的 TARC 蛋白对 T-细胞系 HUT78 具有迁移活性。

实施例 3 重组人 TARC 在大肠杆菌中的表达

（1）构建在大肠杆菌中表达 hTARC DNA 用的载体－pGEMEX-TARC.

以实施例 1 中的克隆 D3A 作模板，通过 PCR 可获得 0.2kb 的 DNA 片段，该片段两端有 NdeI 和 NotI 位点，含有成熟型 hTARC 的序列，从起始密码子到终止密码子。PCR 中所用的 2 个核苷酸序列如序列表中序号 11 和 12 所示。用购自宝酒的 AmpliTaq kit，在 DNA Thermal Cycler（Perkin-Elmer）上进行 PCR。反应以克隆 D3A 的 DNA 作模板，在反应缓冲液（10 mM Tris-HCl、pH 8.3, 50mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1%明胶，200μM dNTP（dATP, dGTP, dCTP, dTTP），400μM 引物和 100U/ml AmpliTaq DNA 聚合酶 I）进行。反应这样进行：94℃预处理 3 分钟后，在 94℃45′、55℃ 45″、72℃ 1′进行 15 个循环，最后在 72℃处理 3 分钟。用 NdlI 和 NotI 同时消化反应生成物，插入到 pGEMEXI(Promega)的 NdeI 位点和 NotI 位点之间，得到表达载体 pGEMEX-TARC。该载体的基因图如图 6 所示。

（2）转化体的培养

用导入了表达载体pGEMEX-TARC的大肠杆菌BL21表达末端有甲硫氨酸的成熟型TARC蛋白质。大肠杆菌BL21的培养在添加了1mM IPTG的LB培养基上进行，在37℃培养3小时。

（3）产物的分离、纯化

将大肠杆菌悬浮到Tris缓冲液（50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM

EDTA, 1mM 2-ME, 50mM NaCl, 0.2mM PMSF ）中，冻融 5 次。接着加入终浓度为 10μg/ml 的 DNaseI 、 10mM 的 $MgCl_2$, 室温放置 10 分钟。在 4 ℃、 10000 转、 15 分钟离心，用洗液（ 0.5% Triton X-100, 10mM EDTA ）洗涤沉淀的 hTARC 蛋白质，洗 3 次，可得到部分纯化的重组型 hTARC 蛋白质。表示 hTARC 纯化的 SDS-PAGE 电泳结果如图 7 所示。图 7 中， S 是离心后上清的结果， W1 、 W2 、 W3 是用洗液洗涤离心所得沉淀物分别洗 1 、 2 、 3 次时的洗脱物的结果， P 是含 hTARC 的洗净后的沉淀物的结果。

实施例 4 分离编码小鼠 TARC 的 DNA

I. 小鼠 TARC 基因组 DNA 的克隆

为了获得小鼠 TARC 的基因组 DNA , 用实施例 1 中人 TARC cDNA 克隆 D3A 的 SmaI-PstI 片段作探针，用多引物 DNA 标记系统（ Amersham Japan ）以 ^{32}P 标记，通过斑点杂交法筛选 Balb/C 小鼠来源的基因组 DNA 文库（ Clontech ）。斑点杂交法按照文献（ Sambrook 等，分子克隆: 实验手册，第 2 版，冷泉港实验室，纽约、(1989)）的方法进行。

将 Balb/C 小鼠基因组 DNA 文库的噬菌体液和大肠杆菌 LE392 接种到 LB 平皿（ 10g 胰蛋白胨， 5g 酵母提取物， 10g NaCl, 15g 琼脂/1L 蒸馏水）， 30 ℃培养一晚上。将平皿上生长的噬菌斑转移到尼龙膜（ Hybond-N+, Amershan Japan ）上， SDS 处理（ 10 % SDS ）、碱变性（ 0.5N NaOH, 1.5M NaCl ）、随后进行洗涤（ 2 × SSC ）。以 ^{32}P 标记的 hTARC 的 cDNA 克隆 D3A 的 SmaI-PstI 片段作探针，与尼龙膜进行杂交。杂交溶液为 5 × SSPE （ 1 × SSPE 包括 0.18M NaCl, 0.01M 磷酸钠， pH 7.5, 1mM EDTA ）， 30 % 甲酰胺， 2 % SDS， 10 × Denhart's 溶液， 100μg/ml 鲑鱼精子 DNA , 在 42 ℃杂交一晚上。洗膜用 2 × SSC 、 0.1% SDS 在室温洗 10 分钟， 2 × SSC 、 0.1% SDS 在 60 ℃洗 30 分钟洗 2 次，之后 X 光胶片（ Kakak ）感光，显影，鉴定与探针进行反应的斑点。最后得到 8 个基因组克隆。

根据 Sanger 法，用 Pharmacia 公司的 Autoread Sequence kit 和 A.L.F.II 自动测序仪测定其中 1 个克隆（ Clone #3 ）的 4234 个碱基序列。可以看到有 3 个区域与人 TARC 有高度同源性。推测这 3 个区域为外显子，连结的碱基序列有一个由 93 个氨基酸组成的开读框，与人

TARC 具有高同源性，可达 64.4%，因此可以判断该 DNA 是小鼠 TARC 的基因组 DNA 。

II. 小鼠 TARC cDNA 的克隆

（ 1 ）由 PHA 刺激的 Balb/C 小鼠脾细胞制备 cDNA 文库

由 PHA 刺激的 Balb/C 小鼠脾细胞制备 cDNA 文库，可参照文献（ Sambrook 等，分子克隆：实验手册，第 2 版，冷泉港实验室，纽约(1989)），应用 GIBCO-BRL 的 cDNA 合成系统和 cDNA 克隆系统，按下面的方法进行。

首先，用 quickprep micro mRNA 纯化试剂盒（ Pharmacia ）从 PHA 刺激的 Balb/C 小鼠脾细胞抽提 poly(A)+RNA 。用给予的细胞裂解液裂解 PHA24 小时刺激的 Balb/C 小鼠脾细胞 2×10^7 个。接着加入 oligo-dT 树脂，混和 3 分钟， poly(A)+RNA 结合树脂后，用 TOMY 离心机 MRX-150 （ TOMY －精工）在 12000 转离心 1 分钟。用高盐浓度洗液洗所得沉淀物 3 次，用低盐浓度洗液洗 5 次，之后用洗脱液洗脱。在洗脱液中加入 0.1 倍量 3M 醋酸钠和 2 倍的乙醇，－ 80 ℃冷却 1 小时，用 TOMY 离心机 MRX-150 （ TOMY 精工）在 12000 转离心 5 分钟，将沉淀的 poly(A)+RNA 溶解到无菌蒸馏水中。测定 260nm 处的吸光度，计算回收的 poly(A)+RNA 的量。从 PHA 刺激的 Balb/C 小鼠脾细胞获得 10μg 的 poly(A)+RNA 。

然后以纯化的 poly(A)+RNA 为模板，按下面的方法合成 cDNA 。首先，以 4μg poly(A)+RNA 为模板，用逆转录酶 SUPER SCRIPT II RT （ GIBCO-BRL ）在反应缓冲液中（ 50 mM Tris-HCl 、 pH 8.3, 75mM KCl, 3 mM $MgCl_2$,10mM DTT, 500μM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP ）， 50μg/ml Not I 引物－衔接子（ GIBCO-BRL ），和 2 万 U/ml 逆转录酶 SUPER SCRIPT II RT ），37 ℃反应 1 小时，合成单链 DNA 。Not I 引物－启动子的序列如序列表的序列号 3 所示。以该单链 DNA 为模板，在反应缓冲液（ 25 mM Tris-HCl 、 pH 7.5, 100nM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10mM$(NH_4)_2SO_4$， 1.2mM DTT, 0.15mM β-NAD+, 250μM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP ）， 65U/ml DNA 连接酶， 250U /ml DNA, 聚合酶和 13U/ml Rnase H)中， 16 ℃反应 2 小时，合成 cDNA 。然后，加入 DNA 聚合酶，终浓度达 65U/ml，再在 16 ℃反应 5 分钟，形成双链。将该双链 DNA 在反应缓冲液（ 50mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM $MgCl_2$,

1mM DTT， 1mM ATP， 5 % PEG 8000， 200μg/ml EcoR I衔接子（ GIBCO-BRL ）， 100U/ml T4 DNA 聚合酶）中， 16 ℃反应 16 个小时，以与 Sal I 衔接子接合。 EcoR I 衔接子是序列表中序号 13 和 14 中所示 DNA 退火了的双链 DNA。将所得 cDNA 插入到λExcell 载体的 Not I 和 EcoR I 位点的中间，制成 cDNA 文库。

（ 2 ）探针的制备

以上面（ 1 ）中制备的由 PHA 刺激的 Balb/C 小鼠脾细胞而来的 cDNA 文库作模板，在反应缓冲液中（ 10 mM Tris-HCl 、 pH 8.3, 50mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1%明胶， 200μM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP ）， 400nM mG98 外显子上游引物， 400nM mG98 外显子下游引物， 100U/ml AmpliTaq DNA 聚合酶 I)中进行聚合酶链式反应。 mG98 外显子上游引物和 mG98 外显子下游引物是在上面 1 中所得小鼠基因组 DNA 的基础上设计的。这些引物的序列分别在序列表的序列号 15 和 16 中表示。 mG98 外显子上游引物和 mG98 外显子下游引物用 DNA 合成仪（ Cyclone Plus DNA Synthesizer, Miligen/Biosearch ）合成。合成时用 Miligen/Biosearch 公司的β －联接的β －氰乙基磷酰亚胺试剂进行。合成后用 2ml 氨水（ 28 %， Nacalai Tesque ）从柱中洗脱合成的核苷酸，之后在 60 ℃处理 5 小时，脱去保护基。在脱去保护基的核苷酸中加入 10 倍的正丁醇，用 TOMY 离心机（ TOMY 精工）在 3000 转离心 10 分钟，回收沉淀。将回收的核苷酸溶解到无菌水中，测定 260nm 处的吸光度，确定含量。

用购自宝酒造的 Ampli Taq 试剂盒在 DNA Thermal Cycler (Perkin － Elmor)下进行 PCR。反应如下进行： 94 ℃预处理 3′后， 94 ℃ 45″、 60 ℃ 45″、 72 ℃ 1′重复 40 个循环，最后在 72 ℃处理 3 分钟。所得 321bp 的 DNA 片段用作探针以获取小鼠 TARC 的全长 cDNA 。

（ 3 ）小鼠 TARC 全长 cDNA 的克隆

为了获得小鼠 TARC 的全长 cDNA，用多引物 DNA 标记系统（ Amersham Japan ）以 ^{32}P 标记上面（ 2 ）中得到的 321bp 的 cDNA 片断，用它作探针，通过菌落杂交法筛选（ 1 ）中制备的 PHA 刺激的 Balb/C 小鼠脾细胞的 cDNA 文库。菌落杂交法参照文献（ J. Sambrook 等，分子克隆：实验手册，第 2 版，冷泉港实验室，纽约，（ 1989 ））. 中已有的方法进行。

将 PHA 刺激 Balb/C 小鼠脾细胞而来的 cDNA 文库的噬菌体液和大肠杆菌 LE392 接种到 LB 平皿（ 10g 胰蛋白胨， 5g 酵母提取物， 10g NaCl, 15g 琼脂/1L 蒸馏水）， 30 ℃培养一晚上。将平皿上全长的噬菌斑转移到尼龙膜上（ Hybond-N+, Amersham Japan ），然后用 SDS 处理（ 10 % SDS), 碱变性（ 0.5N NaOH， 1.5M NaCl), 洗涤（ 2 × SSC)。用 ^{32}P 标记的 321bp 的 DNA 片段作探针与尼龙膜进行杂交。用 5 × SSPE（ 1 × SSPE: 0.18M NaCl, 0.01M 磷酸钠、 pH 7.5, 1mM EDTA ）、 50 % 甲酰胺、 2% SDS 、 10 倍的 Denhardt's 溶液， 100μg/ml 鲑鱼精子作杂交溶液，在 42 ℃杂交一晚上。用 2 × SSC， 0.1% SDS 缓冲液在室温下洗膜 10 分钟，用 0.2 × SSC 、 0.1% SDS 缓冲液在 60 ℃洗 30 分钟，洗 2 次，之后用 X 光胶片（ Kodak ）感光，显影，鉴定与探针进行反应的菌落，最终得到一个 cDNA 克隆（ Clone #1 ）。根据 Sanger法，用 Pharmacia 的 Autoread Sequence kit 和 A.L.F.II 自动测序仪测定插入到克隆#1 中的 cDNA 的序列，再进行下面的各种检测，结果证实，该 cDNA 是编码目的新型 CC 型趋化因子样蛋白质（ mTARC ）的。

II. 小鼠 TARC 的结构的确定

（ 1 ）分析 mTARC cDNA 的碱基序列及其编码的氨基酸序列

（根据 Sanger 法, 用 Pharmacia 的 Autoread Sequence kit 和 A.L.F. II 自动测序仪检测上面 I.(4)中得到的克隆 D3A 的碱基序列。）上面 II（ 3 ）中得到的小鼠 cDNA 克隆#1 的碱基序列和内部不包括翻译终止密码子的开读框的氨基酸序列如图 8 所示。

如图 8 所示，它表明插入到克隆#1 中的基因含有由 93 个氨基酸组成的开读框， N 末端有以信号肽为特征的、强疏水性氨基酸序列。这 93 个氨基酸形成的蛋白质的分子量为 10,466 。另外，根据计算，推定的信号肽切断位点在 Ala-23 和 Ala-24 间，如图 8 中的垂直棒所示。从该切断位点到 9 氨基酸下游有 CC 型趋化因子特征的两个连续的半胱氨酸。

此外，推测信号肽切断后，由 70 个氨基酸组成的推定成熟型蛋白质是分泌型蛋白质。由这 70 个氨基酸组成的推定的成熟型分泌型蛋白质的分子量计算为 7916, 通过计算，等电点为 10.2 。

（ 2 ）与人 TARC 的相似性

可以证明成熟型分泌小鼠 TARC 蛋白质的氨基酸序列与人 TARC

有 65 %的同源性。另外证明小鼠 TARC 开放阅读框的碱基序列与人 TARC 有 70 %的同源性。证明在所有 CC 型趋化因子中保存的 4 个半胱氨酸在小鼠 TARC 中也保存着。这些结果暗示小鼠 TARC 是人 TARC 的小鼠同源基因和蛋白质。

实施例 5 重组小鼠 TARC 在蚕细胞中的表达

（ 1 ）构建在蚕细胞中表达 hTARC DNA 用的重组载体 pVL-mTARC

用 EcoRI 和 Not I 同时消化 Clone #1， 可得到 0.5kb 的 DNA 片段，该片段两端有 EcoRI 和 NotI 位点，包括从翻译起始密码子到翻译终止密码子长度的 mTARC 序列。将该 DNA 片段插入到制备重组型杆状病毒时应用的 pVL1393 （ Invitrogen ）的 EcoRI 位点和 NotI 位点之间，可得到重组载体 pVL-mTARC 。该重组载体 pVL-TARC 的基因图如图 9 所示。

（ 2 ）转化体的培养

接着将重组载体 pVL-mTARC 与具有致死性缺失、线性的 AcNPV DNA 同时导入 sf9 昆虫细胞，得到重组杆状病毒，用有限稀释法纯化所得的重组杆状病毒，在 M.0.I.= 0.1 时再感染 sf9 昆虫细胞，得到种病毒。在 M.0.I. = 10 - 20 时用种病毒感染 Tn5B-4 昆虫细胞（ Invitrogen ）（每 150cm^2 培养瓶 1.2×10^7 个），在无血清的 EX-CELL 400 培养基（ JRH Biosciences ）（每 150cm^2 培养瓶 30ml ）上， 27 ℃培养 2 天。

（ 3 ）产物的分离和纯化

回收培养上清，通过 0.22μm 的滤膜。向滤液中加入 1/10 体积的 500mM MES (pH 6.5)，过 A 缓冲液（ 50mM MES (pH 6.5)/100 mM NaCl ）平衡了的 1ml Resouce-S 柱（ Pharmacia ）。用 A 缓冲液冲洗给含有 mTARC 蛋白质的柱子，然后用 A 缓冲液和 B 缓冲液（ 50mM MES (pH 6.5)/100mM NaCl ）配制的 NaCl 盐浓度梯度液进行洗脱。用 SDS-PAGE 和银染色鉴定含 mTARC 蛋白质的级分。 SDS-PAGE 的结果如图 10B 所示。图 10B 中 F 和 H 分别是 FPLC 级分（终了一步前的一个纯化步骤）和 HPLC 级分的结果。

在含 mTARC 蛋白质的级分中加入终浓度为 0.1%的 TFA，上 A 缓冲液（ 0.1%TFA ）平衡过的 Cosmosil 5CA 300 柱（ Nacalai Tesque ），用缓冲液 A 和缓冲液 B （ 0.1% TFA, 60%乙腈）配成的乙腈梯度液进行洗脱。 mTARC 蛋白质的洗脱带如图 10A 所示。收集含 mTARC 蛋白质

的级分，在真空干燥中挥发乙腈，对不含内毒素的 PBS 进行透析，得到纯化的终产品。用 BCA 试剂盒（ Pierce ），以 BSA 作对照来测定蛋白质的浓度。从 300ml 培养上清中获得 168μg 纯化的 mTARC 蛋白质，表达量良好。用鲎裂解物测定（ QCL-1000, Bio Whitaker ）对混入的内毒素进行定量，在 2pg/μg 以下。用氨基酸测序仪（岛津）检测纯化 hTARC 蛋白质 N 末端的氨基酸序列，为 ARATNVGRE**LDYF 。如图 10 所示，该氨基酸序列与 70 个氨基酸组成的成熟分泌型蛋白质 N 末端的氨基酸序列一致，而 70 个氨基酸是从碱基序列上切断预测的信号肽后形成的。

实施例 6 由小鼠 TARC 诱导白细胞浸润

在小鼠皮下施用实施例 5 中的小鼠 TARC 诱导白细胞浸润。

将纯化的小鼠 TARC 蛋白质在 Balb/C 小鼠背部皮内施用，通过检查有无白细胞浸润来证实 mTARC 的趋化因子样活性。具体地讲，将小鼠 TARC 的纯品 50ng 溶解到不含内毒素的 PBS 中，达 50μl，在 Balb/C 小鼠的背部皮内施用。用 50μl 不含内毒素的 PBS 作阴性对照。施用后 4 、 24 小时后，脱颈椎处死小鼠，切下施用部位的皮肤，用 10 % 甲醛固定。其后，用石蜡包埋固定的皮肤，用切片机制备 5μm 厚的切片，用苏木精－伊红染色。图 11 为 mTARC 的结果，图 12 为对照的结果。图 11 和 12 中， A 为施用 24 小时后显微镜照片的 100 倍， B 为 400 倍。如图 11A 和 B 所示，施用了小鼠 TARC 的皮下组织中，在施用 TARC 24 小时后可看到淋巴细胞和单核细胞的浸润。而如图 12A 和 12B 中所显示的只施用 PBS 则看不到这种变化。

实施例 7 检测表达 TARC 受体的细胞

用碘标记的人 TARC 检测表达 TARC 受体的细胞。用 ^{125}I 标记 Bolton － Hunter 试剂（ Amersham Japan ）以 ^{125}I 标记实施例 2 中在昆虫细胞表达的纯化的人 TARC 蛋白质。用 Bio-Gel 96 （ Bio-Rad ）过滤 ^{125}I 标记的 hTARC，求得比活性为 81.6μCi/μg 。用标记的 hTARC 进行与各种细胞的结合试验。

用结合缓冲液（ PRMI 1640 、 20mM HEPES(pH 7.4)、 1 % BSA 、 0.02% NaN_3 ）洗涤 $1 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ 个被检测细胞，之后悬浮到 100 μl 的结合缓冲液中。向该细胞悬液中加入 100μl 的结合缓冲液，使 加入的 ^{125}I 标记的 hTARC 终浓度为 0.66nM，室温结合 1 小时。结合反应完

成后将反应液重铺到300μl的邻苯二甲酸二丁基酯:橄榄油（4:1）溶液上，通过离心分离与细胞结合了的^{125}I标记的TARC和未结合的^{125}I标记的TARC，然后用γ计数仪测定与细胞结合的^{125}I标记的TARC的放射量。从不存在非标记TARC的情况下结合的^{125}I标记TARC的值减去200nM非标记hTARC存在下非特异结合的^{125}I标记TARC的值，可得到与人TARC细胞的特异性结合。图13是每10^6个不同种类的细胞^{125}I标记TARC的特异结合。

图13表明，在一部分T细胞株（Jurkat, Molt 3、CEM、Hut78、MT2、MT4、Hut102）、外周血淋巴细胞、活化的外周血T细胞中可看到相当特异的结合。在其它T细胞株（Molt4、HPB-ALL、TCL-Kan、TLOml）单核细胞株（U937、THP1）、或红细胞株（K562）、外周血单核细胞中很难看到特异性结合。在B细胞株（Raji）、胎儿肾脏来源的细胞株（293E）、外周血颗粒细胞中几乎看不到特异性结合。

以上结果显示，TARC受体可在某种T细胞上大量表达。

实施例8 TARC与受体的结合特性

用T细胞株Jurkat更详细地分析TARC受体。

（1）结合常数和受体数

为了求出结合常数和受体数，检测能达到结合平衡的条件，结果证明^{125}I标记的人TARC与Jurkat细胞的特异结合在15℃、1小时达到平衡。因此通过^{125}I标记TARC浓度的变化，检测与4×10^6个Jurkat细胞特异结合量的变化。特异性结合量可用不存在非标记TARC的条件下结合的^{125}I标记TARC的值减去存在1μM非标记TARC的条件下非特异结合的^{125}I标记TARC的值来求出。其结果如图14A所示，^{125}I标记的TARC与Jurkat细胞的特异结合用饱和曲线描绘。用Scatchard分析的结果如图14B所示。Jurkat细胞上与^{125}I标记TARC的特异性结合位点是1种，根据计算，结合常数为2.1nM，每个细胞的结合数为603。

接着，将^{125}I标记TARC的浓度固定在2nM，通过变化非标记TARC的浓度来检测与4×10^6个Jurkat细胞特异性结合量的变化。特异性结合量可通过各种浓度非标记TARC存在的条件下结合的^{125}I标记TARC的值减去1μM非标记TARC存在的条件下非特异结合的^{125}I标记TARC

的值而求出，非标记 TARC 不存在的条件下特异性结合量以 100 % 计算。结果如图 15A 所示。 Scatchard 分析的结果为： Jurkat 细胞上 ^{125}I 标记 TARC 的特异性结合位点是 1 种，根据计算，结合常数为 2.1nM，每 1 个细胞的结合数为 948 。

（ 2 ）其它 CC 型趋化因子的结合抑制

检查 TARC 与 Jurkat 细胞的结合是否与其它的趋化因子间存在竞争。 ^{125}I 标记 hTARC 的浓度为 0.66nM，不存在非标记趋化因子的条件下或存在 200nM IL-8 、 RANTES 、 MCP-1 、 MCP-1α 、（全部购自 PreproTech ）或 TARC 的情况下在室温下与 4×10^6 个 Jurkat 细胞结合 1 小时。结果如图 15B 所示。可以看到， ^{125}I 标记 TARC 的结合只在非标记 TARC 存在的情况下受到竞争抑制，而其它的趋化因子不抑制结合。因此，这些表明 Jurkat 细胞上的 TARC 受体与其它趋化因子的受体不同，是一种独立的受体。

（ 3 ）与红细胞上受体的结合活性。

已知红细胞上存在各种趋化因子可结合的受体－ Dutty 抗原/趋化因子受体（ Duffy Antigen/receptor for chemokine (DARC)）。固定 ^{125}I 标记 TARC 的浓度为 0.66nM，变化非标记的其它趋化因子 IL-8 、 RANTES 、 MCP-1 、 MCP-1α 或 TARC 的浓度，检测与 10^8 个红细胞特异结合量的变化。特异结合量可用存在各种浓度非标记趋化因子的条件下结合的 ^{125}I 标记 TARC 值减去存在 1μM 非标记 TARC 的情况下非特异结合的 ^{125}I 标记 TARC 值求出，不存在非标记 TARC 的情况下特异的结合量以 100 % 计算。结果如图 16 所示。可以看到 ^{125}I 标记 TARC 的结合受到非标记 TARC 、 IL-8 、 RANTES 、 MCP-1 等竞争抑制，而 MCP-1α 几乎不发生竞争抑制。 Scatchard 分析的结果如图 17 所示。红细胞上 ^{125}I 标记 TARC 的特异性结合位点为 1 种，根据计算，结合常数为 17nM 。 TARC 的结合常数及竞争抑制模式与其它的趋化因子如 IL-8 的 DARC 的结合常数及竞争抑制模式相同，由此表明 TARC 与红细胞上的 DARC 结合。

实施例 9 TARC 的免疫测定

（ 1 ）制备谷胱甘肽－ S －转移酶（ GST ）和 TARC 的融合蛋白

用表达该融合蛋白的载体 pGEX-TARC 制备谷胱甘肽－ S －转移（ GST ）和 TARC 的融合蛋白。

以实施例1中克隆D3A作模板，通过PCR可获得一个0.2kb的DNA片段，该片段两端有BamHI和NotI位点，含有成熟型TARC从起始密码子到终止密码子的序列。PCR中所用的两个寡核苷酸序列如序列表中序列号17和18中表示。用购自宝酒的AmpliTaq kit，在DNA Thermal Cycler（Perkin-Elmer）上进行PCR。反应中以克隆D3A的DNA作模板，在反应缓冲液（10 mM Tris-HCl、pH 8.3, 50mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1%明胶，200μM dNTP（dATP、dGTP、dCTP、dTTP），400μM引物，和100U/ml AmpliTaq DNA聚合酶I）中进行。反应这样进行：94℃预处理3分钟，在94℃ 45″、55℃ 45″、72℃ 1′为1循环重复进行15个循环，最后在72℃处理3′。用BamHI和NotI同时消化反应生成物，插入到pGEX4T-3（pharmacia）的Bam HI位点和NotI位点之间，得到表达载体pGEX-TARC。

用导入了表达载体pGEX-TARC的大肠杆菌表达氨基酸末端添加了GST的成熟型TARC蛋白质。在加入了终浓度为0.1mM IPTG、含0.2%葡萄糖的2×YT培养基中，37℃培养大肠杆菌JM109 4小时。随后将大肠杆菌悬浮到STE缓冲液（10mM Tris-HCl、pH 8.0、1mM EDTA, 100mM NaCl, 1mM PMSF, 100μg/ml溶菌酶），冰上放置15分钟。接着加入终浓度为5mM的DTT、1.4%的N－月桂酰肌氨酸钠，在冰上冷却，用TOMY超声波破碎仪UD-210（TOMY－精工）以最大功率处理300秒。以10,000转、5分钟，4℃的条件离心，在上清中加入终浓度为2.5%的Triton X-100，之后加入谷胱甘肽Sepharose 4B树脂，4℃进行一晚上结合反应。用PBS冲洗与GST-TARC融合蛋白结合的树脂，洗5次，然后加入与树脂等体积的含1％SDS的PBS，在100℃处理5分钟，释放GST-TARC融合蛋白。在所得GST-TARC融合蛋白质溶液中加入9倍体积的PBS，用作抗原。

（2）抗TARC抗体的制备

使用豚鼠，将100μg的GST-TARC融合蛋白质与等体积的完全弗氏佐剂混合，然后施用到豚鼠皮下来制备抗体。每2周进行一次增强免疫，将100μg GST-TARC融合蛋白质与等体积的完全弗氏佐剂混合，之后皮下施用。共免疫3次，收集血清。

（3）抗TARC抗体的纯化和标记

用以下方法制备生物素化的抗TARC抗体。向Affi-Gel 15树脂

（ BioRad ）中加入 3 倍体积的纯化 GST-TARC 融合蛋白质或 GST 蛋白质溶液， 4 ℃放置一晚上。除去蛋白质溶液后，向树脂中加入封闭液（ 10mM 乙醇胺、 pH 8.0 ）， 4 ℃放置 1 小时。用 20 倍体积的 PBS 冲洗树脂，然后加入结合缓冲液（ 20mM Tris-HCl 、 pH 7.2, 0.5 M NaCl ）。在所得血清中加入等体积的饱和硫铵， 4 ℃放置 1 晚后，在 12000 转， 20 分钟、 4 ℃的条件下离心。向所得沉淀物中加入 PBS 溶解，对结合缓冲液进行透析，首先置于 GST 蛋白质结合树脂中，室温放置 2 小时，除去抗 GST 的抗体。所得流过溶液置于 GST-TARC 融合蛋白质结合树脂中， 4 ℃放置 1 晚上，用 20 倍体积的结合缓冲液洗涤树脂，用 0.1M 甘氨酸洗脱抗 TARC 的抗体。向该抗体溶液中加入 1M Tris-HCl 、 pH 9.5 、对 0.1M $NaHCO_3$ 进行透析，加入 NHS-LC-Biotin （ Pierce ）， 4 ℃放置 2.5 小时。将该生物素化的抗体对 50mM Tris-HCl 、 pH 7.5 进行透析，然后用 PBS 透析。

固相抗 TARC 抗体的纯化如下进行。向抗血清中加入终浓度为 100mM 的 Tris-HCl 、 pH 8.0，上 Hitrap-protein 柱，用柱子 10 倍体积的 100mM Tris-HCl 、 pH 8.0 洗柱，接着用 10 倍体积的 100mM Tris-HCl 、 pH 8.0 洗柱。用 0.1M 甘氨酸洗脱结合的抗体，加入 1M Tris-HCl 、 pH 9.5 后对 PBS 进行透析。

II. TARC 蛋白质的免疫测定

TARC 蛋白质的定量按以下所谓夹心法（三明治法）进行，用生物素化抗体确定与固相抗体结合的 TARC 的量。首先用 50mM Tris-HCl pH 8.0 缓冲液将待固定抗体溶解为 10μg/ml， 96 孔板（ Maxisorb, Nunc ）每孔中加入 50μl, 4 ℃放置 1 晚。去除抗体溶液后，加入 100μl 含 1mg/ml BSA 的 PBS, 室温放置 1 小时，用含 0.02% Tween - 20 的 PBS 洗 1 次。将 Triton X - 100 以终浓度 0.5%加到昆虫细胞中表达的浓度已知的纯化重组人 TARC 中或加到含有未知量抗原的试样中，然后每孔加入 50μl ，室温放置 1 小时，用 Tx-PBS 溶液（ 0.5% Triton X - 100 ）洗 3 次，然后用 Tx-PBS 溶液将生物素化抗 TARC 抗体稀释 1000 倍，每孔加入 50μl ，室温放置 30 分钟。用 Tx-PBS 洗液洗 3 次后，用 Tx-PBS 溶液将过氧化酶标记的链霉抗生物素蛋白（ Vector ）稀释 400 倍，每孔加入 50μl ，室温放置 30 分钟。用 Tx-PBS 溶液洗 3 次，用 PBS 洗 1 次后，加入底物溶液（ 100mM NaOAc 、 pH 5.5, 1mM EDTA, 6.72mg/ml,

TMBZ, 0.03% H_2O_2 ） 100μl，进行显色反应。加入 50 μl 1N H_2SO_4 终止反应，在 450nm 处测定吸光度。接着用浓度已知的重组人 TARC 作标准曲线，根据标准曲线可知道样品中 TARC 蛋白质的量。检测灵敏度为 50pg/ml 。

实施例 10 具有 TARC 诱导活性的物质

（ 1 ）鉴定诱导 TARC 蛋白质的刺激

将正常人外周血单核细胞加入到 96 孔板（ Coaster ），每孔加入 2.5×10^5 个，不加刺激物质或将刺激物 PHA （ GIBCO-BRL ）作 100 倍稀释，加入终浓度为 10μg/ml 的抗 CD3 抗体（ OKT3 ）或 LPS （ L4391、Sigma ） 100 ng/ml，在 250μl RPMI - 1640/10 % FCS 中培养。培养 6、12 、 24 、 36 、 48 、 72 小时后回收培养液，用 0.45μm 的滤器过滤，用所得滤液进行 TARC 蛋白质的定量。结果如图 21 所示，如图 21 所示，TARC 蛋白质在 PHA 、抗 CD3 抗体的刺激下时间依赖性的表达，在 72 小时时表达量直线增加。 PHA 刺激 12 小时、抗 CD3 抗体刺激 24 小时可检测出表达， PHA 以 16ng/ml 、抗 CD3 抗体以 2.5ng/ml 刺激 72 小时可表达。 LPS 和不刺激时几乎检测不到表达。

（ 2 ）能诱导 TARC 蛋白质的细胞因子的鉴定

由于 PHA 比抗 CD3 抗体有更强的诱导 TARC 表达的作用，所以认为诱导与细胞因子相关。

将正常人外周血单核细胞加到 96 孔板（ Coaster ），每孔加入 2.5×10^5 个细胞，不加细胞因子或加入下列细胞因子： 10ng/ml IL-1α(R&D)、 100 U/ml IL-2, (Sionogi 制药公司)、 50ng/ml IL-3(Genzyme)、 50ng/ml （ PeproTech)、 50ng/ml IL-7 （ PeproTech)、50ng/ml IL-10 （ Genzyme)、 10ng/ml GM-CSF （ Genzyme)、 50ng/ml TNFα （ PeproTech)、 1000U/ml IFN-γ （ Sionogi 制药公司)、 10ng/ml M-CSF （ R & D ），在 250μl RPMI - 1640/10 % FCS 中培养。培养 48 小时后回收培养液，用 0.45μm 滤器进行过滤，用所得溶液进行 TARC 蛋白质的定量。其结果如图 22 所示。如图 22 所示， GM-CSF 、 IL-3 、IL-4 能诱导 TARC 蛋白质表达，表达量分别为 12 、 6 、 2ng/ml 。

同样检测 GM-CSF 、 IL-3 、 IL-4 的浓度依赖性。结果如图 23 所示。如图 23 所示， GM-CSF 的 ED50 为 0.7 ng/ml,表达最大达 3.3ng/ml，在更高的浓度下反而不诱导表达。描绘 IL-3 、 IL-4 的饱和曲线， ED50

为 0.5 、 0.8ng/ml 。

以上结果显示， TARC 的表达与 TNF-α 、 IPN-γ 诱导的大多数趋化因子的表达相比，极具有特征。

实施例 11 表达 TARC 蛋白质的细胞的鉴定

（ 1 ）为了鉴定表达 TARC 的细胞，将正常人外周血单核细胞分为 CD14 阳性单核细胞和 CD14 阴性淋巴细胞，用 PHA 、 PHA/PMA 、 GM-CSF 、 IL-3 、 IL-4 进行刺激。将浓度为 2×10^7/ml 的正常人外周血单核细胞悬浮到冰冷的分离缓冲液（ 5mM EDTA 、 1 % FCS 、 PBS ）中，加入 1/450 量的 FITC 标记的抗 CD14 抗体（ Becton-Dickinson ），在冰上放置 30 分钟。用分离缓冲液洗涤，以 10^7 细胞/80ml 的终浓度悬浮到分离缓冲液中，加入 20μl 含 10^7 细胞的磁珠标记的抗小鼠 IgG 抗体（ Miltenyi-Biotec ）， 4 ℃放置 15 分钟。用分离缓冲液洗涤，悬浮到 500μl 分离缓冲液中，用 NACS （ Miltoyi-Biotec ）分离 CD14 阳性单核细胞和 CD14 阴性淋巴细胞。在 96 孔板（ Coaster 的每孔中加入正常人外周血单核细胞和 2.5×10^5 个 CD14 阴性淋巴细胞、 1.8×10^5 个 CD14 阳性单核细胞，不进行刺激或加入刺激物： 100 倍稀释的 PHA （ GIBCO-BRL ）、 100 倍稀释的 PHA （ GIBCO-BRL)和 50ng/mlPMA、50ng/ml IL-4 （ PeproTech ）、 50ng/ml IL-3 （ Genzyme ）、 10gn/ml GM-CSF （ Genzyme ），在 250μl RPMI-1640/10 % FCS 中培养。培养 48 小时后回收培养液，用 0.45μM 的滤器过滤，用所得滤液进行 TARC 蛋白质的定量。其结果如图 24 所示。如图 24 中的图所示， GM-CSF 、 IL-3 、 IL-4 只刺激单核细胞分泌 TARC 。相反， PHA 、 PHA/PMA 只刺激淋巴细胞表达， PHA 的刺激诱导表达，在加入 PMA 后受到显著抑制。

（ 2 ）用 Northern 印迹分析法分析 TARC mRNA 的表达

不刺激或用 100 倍稀释了的 PHA （ GIBCO-BRL ）、 100ng/ml LPS （ L4391 、 Sigma 、 10ng/ml IL-4 （ PeproTech ）、 10ng/ml IL-3 （ Genzyme)、 4ng/ml GM-CSF （ Genzyme)刺激人外周血单核细胞，24 小时后，用 TRIZOL RNA 纯化试剂盒（ GIBCO-BRL ）抽提 RNA 。将所得 5μg RNA 进行含 0.66M 甲醛的 1.2%琼脂糖凝胶电泳，转移到尼龙膜（ Hybond-N+）（ Amershan Japan ）上。用多引物 DNA 标记系统（ Amersham Japan ）以 ^{32}P 标记 TARC cDNA 克隆 B3A 的 SmaI-PstI

片段，以它作探针与尼龙膜进行杂交。杂交溶液用 QuickHyb 液（ Stratagene ）、 100μg/ml 的鲑鱼精子 DNA，在 68 ℃杂交 1.5 小时。用 2 × SSC， 0.1% SDS 缓冲液室温洗膜 10 分钟， 0.2 × SSC、 0.1% SDS 缓冲液于 55 ℃洗膜 30 分钟，洗 2 次，之后将 X 光胶片（ Kodak ）感光，显像分析。从图 25 的结果可以看出，没有刺激或在 LPS 刺激下人外周血单核细胞几乎不表达 TARC 的 mRNA，但 GM-CSF、 IL-3 的刺激约能诱导 400 倍的表达， IL-4 、 PHA 的刺激约能诱导 40 倍的表达。

以上结果表明， GM-CSF、 IL-3 、 IL-4 刺激外周血单核细胞表达 TARC，不是通过促进分泌颗粒释放蓄积的蛋白质，而是主要通过增加 mRNA 实现的。

实施例 12 来源于人 PBMC 的 TARC 对 T 细胞的迁移活性

用以下方法检测细胞因子刺激下从正常人外周血单核细胞分泌的 TARC 对 T 细胞的迁移活性。

用 48 孔趋化性盒（ chemotaxis chamber, Neuro Probe ）测定细胞迁移活性。不刺激或用在 50ng/ml IL-4 （ PeproTech ）、 50ng/ml IL-3 （ Genzyme ）、 10ng/ml GM-CSF （ Genzyme ）刺激人外周血单核细胞， 36 小时后回收培养液，用 0.45μm 的滤器过滤，用所得滤液测定细胞迁移活性。培养滤液加在下孔，而将悬浮在缓冲液（ RPMI - 1640 、 20nM Hepes (pH 7.4)、 1 % BSA ）中的 4 × 10^5 个 T 细胞株 HUT78 加到上孔。用 IV 型胶原溶液（ 5μg/ml 水溶液）室温下包被 1 小时的不含聚乙烯吡咯烷酮的聚碳酸酯膜（孔径 5μm， Neuro Probe ）隔离上下孔。 37 ℃培养 2 小时后，取下膜，用 PBS 冲洗上侧，固定，染色。

用放大 800 倍的显微镜，从每孔随机选择 5 个视野来测定迁移细胞的数目。结果如图 26 所示。如图 26 的图所示， IL-3 和 GM-CSF 刺激的培养液能引起 HUT78 细胞很强的迁移，不刺激或 IL-4 刺激的培养液未引起迁移。

此外，当用 10μg/ml 豚鼠抗 TARC 抗体（ TARC Ab ）处理 GM-CSF 刺激的培养上清时，其对 HUT78 细胞的迁移活性几乎消失。

这些结果提示具有迁移活性的 TARC 是在细胞因子的刺激下从单核细胞分泌的。

实施例 13 细胞因子抑制 TARC 的表达

由于与诱导体液免疫相关的 Th2 型细胞因子 IL-4 能诱导 TARC 的表达，因此研究了抑制 Th2 诱导的 Th1 型细胞因子 IFN-γ、抑制全身免疫反应的细胞因子 IL-10 对 TARC 表达诱导的影响。将正常人外周血单核细胞加到 96 孔板（ Coaster ），每孔加 2.5×10^5 个，加入细胞因子 10ng/ml IL-4（ PeproTech ）、 10 ng/ml IL-3（ Genzyme ）、 5ng/ml GM-CSF（ Genzyme ），再在存在 50ng/ml IL - 10（ Genzyme ）或 1000U/ml IFN-γ（ Sionogi 制药公司）的 250μl RPMI - 1640/10 % FCS 中培养。 48 小时后回收培养液，用 0.45μm 滤器过滤，用所得滤液进行 TARC 蛋白质的定量。结果如图 27 所示。如图 27 中的图所示， GM-USF、 IL-3、 IL-4 的刺激能诱导外周血单核细胞表达 TARC，这种作用被 IFN-γ、 IL-10 所抑制。因此我们认为诱导体液免疫的刺激能诱导 TARC 的分泌，诱导细胞免疫的状态下抑制其分泌。

实施例 14 TARC 对表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞的结合活性

用 TARC 与分泌的碱性磷酸酶（ SEAP ）-（组氨酸）$_6$ 的融合蛋白探讨 TARC 与 293/EBNA-1 细胞表示表达的 CCR4 受体的结合活性。

（ 1 ）制备融合蛋白质（ TARC-SEAP ）

表达 TARC 与 SEAP 的融合蛋白的载体 - PDREF-SEAP（ $His)_6$ 如图 28 所示。首先说明制备该载体的方法。以 Clontech 公司的质粒 pSEAP-EnHancer 作模板，用 5′-XbaI-AP 引物（序列号 19 ）和 3′-AP（ $His)_6$-NotI 引物（序列号 20 ）通过 PCR 扩增六个组氨酸联结的序列 -$(His)_6$ 部分的编码区域，用限制性酶 XbaI 和 NotI 裂解所得 PCR 产物，导入到 pDREF-Hyg（ Yoshida 等， FEBS Letters 360: 155 - 159，1995 ）的 XbaI 和 NotI 位点之间，制备 pDREF-SEAP ($His)_6$。

接着，如图 28 所示，在 pDREF-SEAP($His)_6$ 载体的 SalI 和 XbaI 位点之间插入 TARC cDNA 的 ORF ，制备载体 - PDREF-TARC-SEAP（ $His)_6$，它能编码 TARC 与介入了 5 个氨基酸形成的接头（ Ser-Arg-Ser-Ser-Gly ）的 SEAP-$(His)_6$ 形成的融合蛋白。下面说明该载体的制作方法。

以编码 TARC 碱基序列的 TARC cDNA 作模板，用 TY98F 引物（序列号 3 ）和 TY98R 引物（序列号 4 ）进行 PCR 扩增，用限制性酶 SalI 和 XbaI 裂解所得 PCR 产物，之后导入到 pDREF-SEAP $(His)_6$ 的 SalI 和

XbaI 位点之间，制成 pDREF-TARC-SEAP$(His)_6$。通过 lipofetamin（Gibco-BRL）将该载体导入 293/EBNA-1 细胞（Inviterogen）。培养 3－4 天后，回收培养上清，通过 0.45μm 孔径的滤器，加入 20mM HEPES (pH 7.4)和 0.02%叠氮钠，4℃保存。

（2）融合蛋白质的（TARC-SEAP）的测定

用夹心型酶联免疫吸附法（enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA）分析所产生的融合蛋白（TARC-SEAP）。

即用单克隆型抗胎盘碱性磷酸酶（placental alkaline phosphatase）（anti-PLAP）（Medix Biotech）（2μg/ml，50mM Tris-HCl, pH 9.5）铺盖 96 孔微量试验板（Maxsorb）（Nunc），用牛血清白蛋白（BSA）（1mg/ml，磷酸缓冲盐溶液）封闭。用稀释液（含 0.02% Tween-20 的 PBS）稀释样品，加到微量板中，室温反应 1 小时后，用稀释液洗涤，然后加入 500 倍稀释了的生物素化的兔抗 PLAP 抗体，反应 1 小时。再洗涤后，加入过氧化物酶偶联的链霉抗生物素蛋白（Vector），反应 30 分钟。洗涤后用 3.3′－5.5′－四甲基联苯胺检测结合的过氧化酶活性。用 1N H_2SO_4 终止反应，测定 450nm 的吸光度。

用化学发光法，使用 Great EscApe Detection Kit（Clontech）测定碱性磷酸酶活性），求出相对光单位（RLU）。用纯化 PLAP（Cosmo Bio）制作 AP 标准曲线。当使用的 SEAP 和 TARC-SEAP 为 1pmol 时，分别为 8.7×10^7 RLU/s 和 1.2×10^8 RLU/S。

（3）制备表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞

以人胎盘基因组 DNA（Clontech）作模板，用 CKR4-XbaF 引物（序列号 23）和 CKR4-XbaR 引物（序列号 24）通过 PCR 扩增编码 CCR4 的区域，用限制性酶 XbaI 裂解所得引物后，导入 Pbluescript SK+（Stratagene）的 XbaI 位点。用 SalI 和 NotI 从所得质粒裂解编码 CCR4 的区域后，导入 PDREF-Hyg（Yoshida 等，FEBS Letters 360: 155－159，1995)的 SalI 和 NotI 位点之间，制备 pDREF-CCR4。用 Lipofectamine（Gibco-BRL）将该质粒导入 293/EBNA-1 细胞（Invitrogen）。在潮霉素（200μg/ml）存在的条件下培养导入了 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞，培养 1 周，选择具有耐药性的细胞。

（4）TARC-SEAP 融合蛋白与表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞的特异性结合。

将 TARC-SEAP 的浓度固定在 1nM，变化非标记 TARC 的浓度，观测与表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞的特异性结合量的变化。结合实验在含 20 mM HEPES （ pH 7.4 ）， 1 % BSA， 0.02%叠氮化钠的 RPMI - 1640 200μl 中进行。竞争性结合实验为向 4×10^5 个细胞中加入 1nM 的 TARC - SEAP 和各种浓度的非标记 TARC，室温反应 1 小时，洗涤后，用含 50μl 1 %/Triton X-100 的 10nM Tris - HCl (pH 8.0)溶解细胞，在 65 ℃处理 10 分钟灭活细胞来源的磷酸酶，离心后，测定 25μl 上清中的 AP 活性。用 1nM SEAP 测定非特异性结合。用各种浓度的非标记 TARC 存在时结合的 TARC-SEAP 的值，减去非特异结合的 SEAP 的值求出的特异性结合量，非标记 TARC 不存在时的特异性结合量以 100 % 计算。结果如图 29 所示。代表结合强度的 50 % 抑制浓度为 3nM，由此可知 TARC 与 CCR4 很强地结合。

（ 5 ）其它趋化因子对 TARC-SEAP 融合蛋白与表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞特异性结合的影响。

探讨 TARC 与表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞的特异性结合是否与其它的趋化因子发生竞争。

将 TARC-SEAP 的浓度固定在 1nM，不存在非标记趋化因子或存在 200nM MCP-1 、 PANTES 、 MIP-1α 、 MIP-1β （全部为 PeproTech 产品）、 LARC 或 TARC 的条件下，与 4×10^5 个表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞结合，室温下结合 1 小时。结果如图 30 所示。可以看出 TARC-SEAP 的结合只被非标记 TARC 竞争抑制，而其它的趋化因子不抑制结合。该结果表明 CCR4 是一受体，它只与 TARC 进行强烈结合，而不与其它趋化因子进行强结合。

实施例 15 hTARC 对表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞的迁移活性

应用 48 孔趋化性小室（ chemotaxis chamber ， Neuro Probe)测定人 TARC 对表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞的迁移活性。参照实施例 2，用缓冲液（ RPMI - 1640 、 20mM Hepes (pH 7.4)、 1 % BSA ）稀释昆虫细胞中表达的纯化重组人 TARC ，加入下孔，将 1×10^5 个表达 CCR4 的 293/EBNA - 1 细胞加入上孔。用 IV 型胶原溶液（ 20μg/ml ）37 ℃包被了 4 小时的不含聚乙烯吡咯烷酮的聚碳酸酯膜（孔径 8μm, Neuro Probe ）隔离上下孔。 37 ℃培养 4 小时后，取出膜，用 PBS 洗涤上侧，固定、染色。

在放大 400 倍的显微镜下，每孔随机选择 5 个视野（ HPF ）测定迁移细胞数。结果如图 31 所示。如图 31 中图显示的，表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞的迁移对 TARC 有浓度依赖性。纵轴上的四角箭头表示不加 TARC 的对照结果。而与 TARC 不同的其它趋化因子 RANTES 和 MIP-1α 对表达 CCR4 的 293/EBNA-1 细胞没有明显的迁移活性。

序列表

序列号: 1

序列长度: 582

序列类型: 核酸

链型: 双链

拓扑学: 线性

序列种类: cDNA 到 mRNA

来源

生物名: 人

序列特征

表示特征的记号: CDS

位点: 53..334

特征决定方法: S

序列

```
CCCTGAGCAG AGGGACCTGC ACACAGAGAC TCCCTCCTGG GCTCCTGGCA CC ATG GCC    58
                                                          Met Ala
                                                            1

CCA CTG AAG ATG CTG GCC CTG GTC ACC CTC CTC CTG GGG GCT TCT CTG    106
Pro Leu Lys Met Leu Ala Leu Val Thr Leu Leu Leu Gly Ala Ser Leu
          5                  10                  15

CAG CAC ATC CAC GCA GCT CGA GGG ACC AAT GTG GGC CGG GAG TGC TGC    154
Gln His Ile His Ala Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys
     20                  25                  30

CTG GAG TAC TTC AAG GGA GCC ATT CCC CTT AGA AAG CTG AAG ACG TGG    202
Leu Glu Tyr Phe Lys Gly Ala Ile Pro Leu Arg Lys Leu Lys Thr Trp
35                  40                  45                  50

TAC CAG ACA TCT GAG GAC TGC TCC AGG GAT GCC ATC GTT TTT GTA ACT    250
Tyr Gln Thr Ser Glu Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr
```

55 60 65

GTG CAG GGC AGG GCC ATC TGT TCG GAC CCC AAC AAC AAG AGA GTG AAG 298
Val Gln Gly Arg Ala Ile Cys Ser Asp Pro Asn Asn Lys Arg Val Lys

70 75 80

AAT GCA GTT AAA TAC CTG CAA AGC CTT GAG AGG TCT TGA AG CCTCCTCACC 349
Asn Ala Val Lys Tyr Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser

85 90

CCAGACTCCT GACTGTCTCC CGGGACTACC TGGGACCTCC ACCGTTGGTG TTCACCGCCC 409

CCACCCTGAG CGCCTGGGTC CAGGGGAGGC CTTCCAGGGA CGAAGAAGAG CCACAGTGAG 469

GGAGATCCCA TCCCCTTGTC TGAACTGGAG CCATGGGCAC AAAGGGCCCA GATTAAAGTC 529

TTTATCCTCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA 582

序列号: 2

序列长度: 558

序列类型: 核酸

链型: 双链

拓扑学: 线性

序列种类:

来源

生物名: 人

序列特征

表示特征的记号: CDS

位点: 2..280

特征决定方法: S

序列

C ATG AGG TCA CTT CAG ATG CTG CTC CTG GCT GCT CTG CTT CTG GGG ACT 49
Met Arg Ser Leu Gln Met Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Leu Gly Thr

1 5 10 15

TTT CTG CAG CAT GCC AGA GCT GCT CGA GCC ACC AAT GTA GGC CGA GAG 97

Phe Leu Gln His Ala Arg Ala Ala Arg Ala Thr Asn Val Gly Arg Glu
20 25 30

TGC TGC CTG GAT TAC TTC AAA GGG GCC ATT CCT ATC AGG AAG TTG GTG 145
Cys Cys Leu Asp Tyr Phe Lys Gly Ala Ile Pro Ile Arg Lys Leu Val
35 40 45

AGC TGG TAT AAG ACC TCA GTG GAG TGT TCC AGG GAT GCC ATC GTG TTT 193
Ser Trp Tyr Lys Thr Ser Val Glu Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe
50 55 60

CTG ACT GTC CAG GGC AAG CTC ATC TGT GCA GAC CCC AAA GAC AAA CAT 241
Leu Thr Val Gln Gly Lys Leu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Asp Lys His
65 70 75 80

GTG AAG AAG GCC ATC AGA TTG GTG AAA AAC CCA AGG CCG TGA CCTTCCCGC 292
Val Lys Lys Ala Ile Arg Leu Val Lys Asn Pro Arg Pro
85 90

TGAGGCATTT GGAGACGCCA GGGCTGCTGT CCATGGTTTC AACATAAAGC GGCCTGTGAC 352

CAGCAGAGCC CAAGAGCAGC CACAGAGCAG AAGTCCCTGT TCCCTTTTTT ATGGACTCTT 412

ATGCACTACA GGCGAACACA AAAAAAAGCA ACGGAATAAA GCCTTCCTCC CTCAAAAAAA 472

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 532

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 558

序列号: 3

序列长度: 45

序列类型: 核酸

链型: 单链

拓扑学: 线性

序列种类: 其它核酸 合成的 DNA

序列

GATTAGTTCT AGATCGCGAC GCGGCCGCCC TTTTTTTTTT TTTTT 45

序列号: 4
序列长度: 16
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

TCGACCCACG CGTCCG 16

序列号: 5
序列长度: 12
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CGGACGCGTG GG 12

序列号: 6
序列长度: 48
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CTACTACTAC TAGGCCACGC GTCGACTAGT ACGGGGGGGG GGGGGGGG 48

序列号: 7
序列长度: 31
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性

序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CCTCTGAAGG TTCCAGAATC GATAGTCTAG A 31

序列号: 8
序列长度: 35
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

5' P-CTCTAGACTA TCGATTCTGG AACCTTCAGA GGTTT-3' 35

序列号: 9
序列长度: 32
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CTACTACTAC TAGGCCACGC GTCGACTAGT AC 32

序列号: 10
序列长度: 25
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CCTCTGAAGG TTCCAGAATC GATAG 25

序列号: 11
序列长度: 27
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CGCCATATGG CTCGAGGGAC CAATGTG 27

序列号: 12
序列长度: 29
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CGCGCGGCCG CTCAAGACCT CTCAAGGCT 29

序列号: 13
序列长度: 14
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

AATTCGGCAC GAGG 14

序列号: 14
序列长度: 10
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性

序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

5' P-GGAGCACGGC-3' 10

序列号: 15
序列长度: 24
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CTCTGCTTCT GGGGACTTTT CTGC 24

序列号: 16
序列长度: 24
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

GGTCACAGGC CGCTTTATGT TGAA 24

序列号: 17
序列长度: 27
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CGCGGATCCG CTCGAGGGAC CAATGTG 27

序列号: 18
序列长度: 29
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CGCGCGGCCG CTCAAGACCT CTCAAGGCT 29

序列号: 19
序列长度: 42
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CGCTCTAGAA GCTCCGGAAT CATCCCAGTT GAGGAGGAGA AC 42

序列号: 20
序列长度: 53
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性
序列种类: 其它核酸 合成的 DNA
序列

CGCGCGGCCG CTCAGTGATG GTGATGGTGA TGACCCGGGT GCGCGGCGTC GGT 53

序列号: 21
序列长度: 27
序列类型: 核酸
链型: 单链
拓扑学: 线性

序列种类: 其它核酸 合成的 DNA

序列

CGCGTCGACG GCACCATGGC CCCACTG 27

序列号: 22

序列长度: 27

序列类型: 核酸

链型: 单链

拓扑学: 线性

序列种类: 其它核酸 合成的 DNA

序列

CGCTCTAGAA GACCTCTCAA GGCTTTG 27

序列号: 23

序列长度: 38

序列类型: 核酸

链型: 单链

拓扑学: 线性

序列种类: 其它核酸 合成的 DNA

序列

GCTCTAGAGC CACCATGAAC CCCACGGATA TAGCAGAT 38

序列号: 24

序列长度: 32

序列类型: 核酸

链型: 单链

拓扑学: 线性

序列种类: 其它核酸 合成的 DNA

序列

CGTCTAGACT ACAGAGCATC ATGGAGATCA TG 32

图 1

```
1                CCCTGAGCAGAGGGACCTGCACACAGAGACTCCCTCCTGGGCTCCTGGCACC      52

53   ATG GCC CCA CTG AAG ATG CTG GCC CTG GTC ACC CTC CTC CTG GGG       97
 1    M   A   P   L   K   M   L   A   L   V   T   L   L   L   G       15

98   GCT TCT CTG CAG CAC ATC CAC GCA|GCT CGA GGG ACC AAT GTG GGC      142
16    A   S   L   Q   H   I   H   A | A   R   G   T   N   V   G       30

143  CGG GAG TGC TGC CTG GAG TAC TTC AAG GGA GCC ATT CCC CTT AGA      187
31    R   E   C   C   L   E   Y   F   K   G   A   I   P   L   R       45

188  AAG CTG AAG ACG TGG TAC CAG ACA TCT GAG GAC TGC TCC AGG GAT      232
46    K   L   K   T   W   Y   Q   T   S   E   D   C   S   R   D       60

233  GCC ATC GTT TTT GTA ACT GTG CAG GGC AGG GCC ATC TGT TCG GAC      277
61    A   I   V   F   V   T   V   Q   G   R   A   I   C   S   D       75

278  CCC AAC AAC AAG AGA GTG ÀAG AAT GCA GTT AAA TAC CTG CAA AGC      322
76    P   N   N   K   R   V   K   N   A   V   K   Y   L   Q   S       90

323  CTT GAG AGG TCT TGA AGCCTCCTCACCCCAGACTCCTGACTGTCTCCCGGGACT      376
91    L   E   R   S   *                                              94

377  ACCTGGGACCTCCACCGTTGGTGTTCACCGCCCCCACCCTGAGCGCCTGGGTCCAGGGG      435

436  AGGCCTTCCAGGGACGAAGAAGAGCCACAGTGAGGGAGATCCCATCCCCTTGTCTGAAC      494

495  TGGAGCCATGGGCACAAAGGGCCCAGATTAAAGTCTTTATCCTC                      538
```

图 2

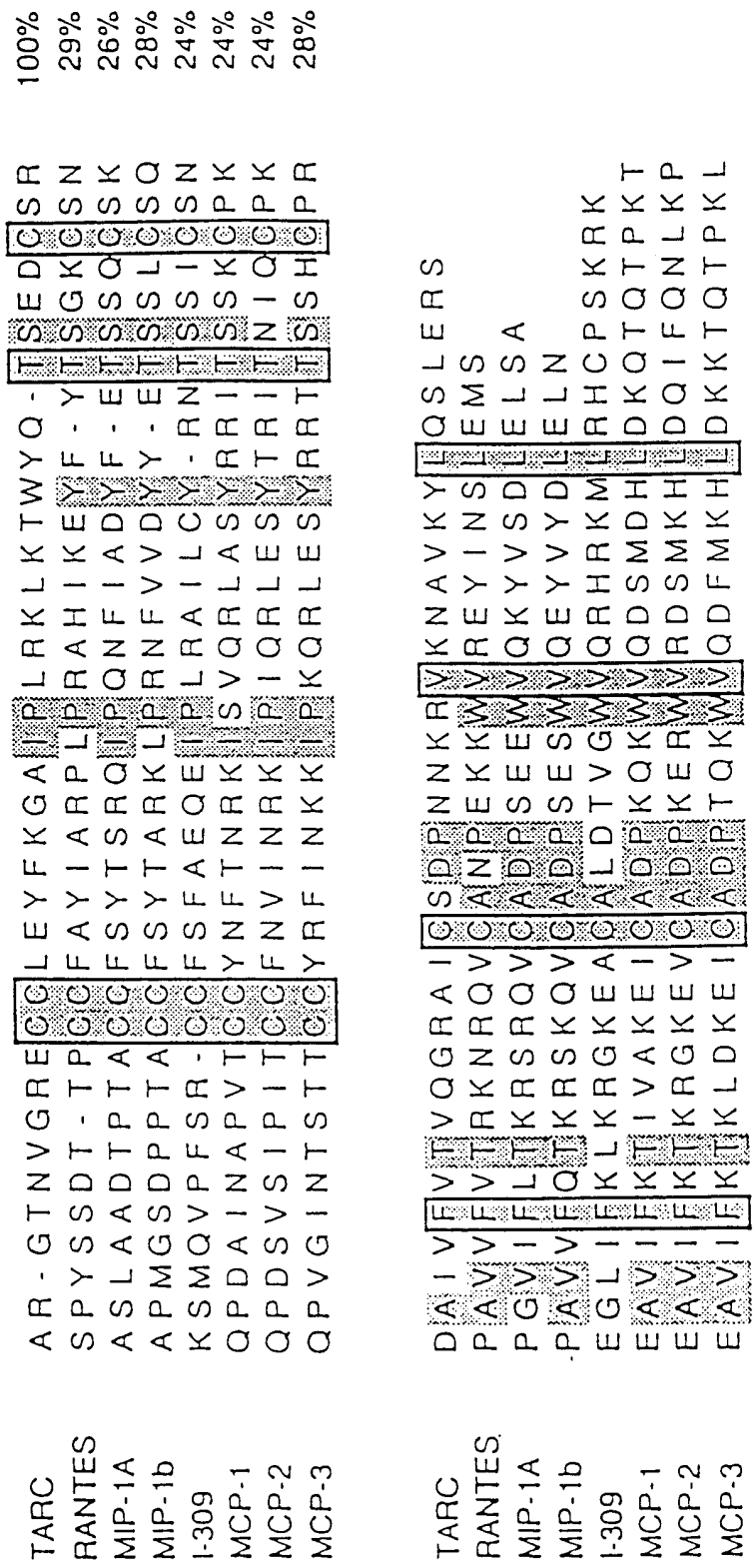

TARC
RANTES
MIP-1A
MIP-1b
I-309
MCP-1
MCP-2
MCP-3
100%
29%
26%
28%
24%
24%
24%
28%

图 3

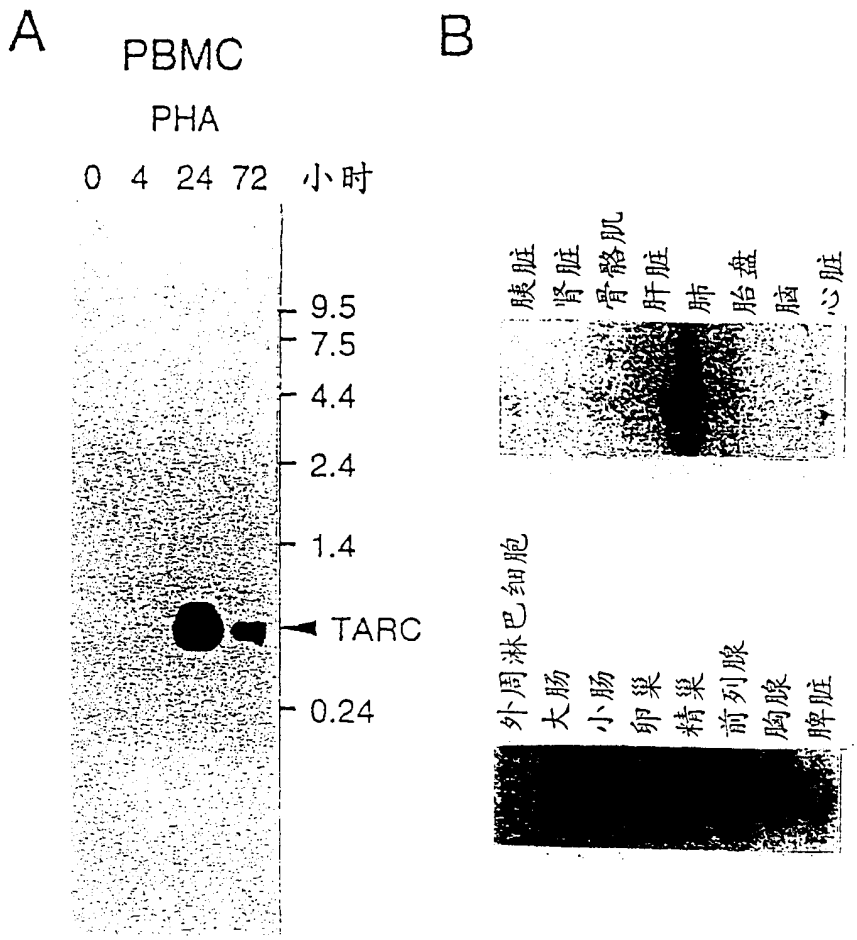

A
PBMC
PHA
0 4 24 72 小时
9.5
7.5
4.4
2.4
1.4
TARC
0.24
B
胰脏
肾脏
骨骼肌
肝脏
肺
胎盘
脑
心脏
外周淋巴细胞
大肠
小肠
卵巢
精巢
前列腺
胸腺
脾脏

图 4

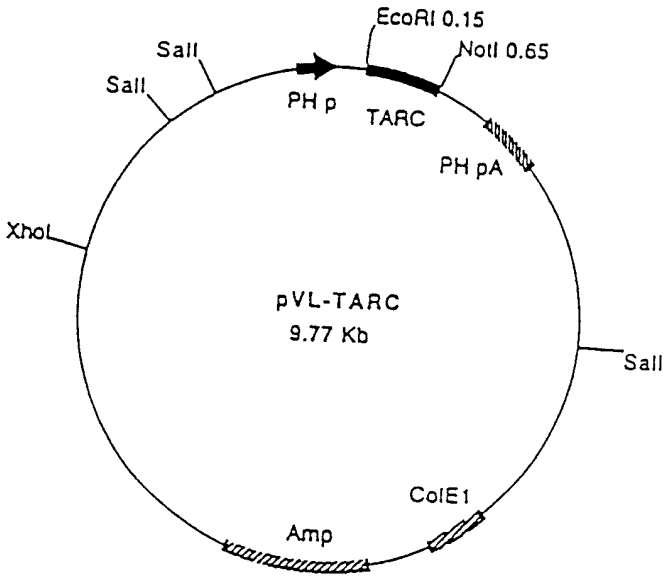

EcoRI 0.15
NotI 0.65
SalI
SalI
PH p
TARC
PH pA
XhoI
pVL-TARC
9.77 Kb
SalI
ColE1
Amp

图 5

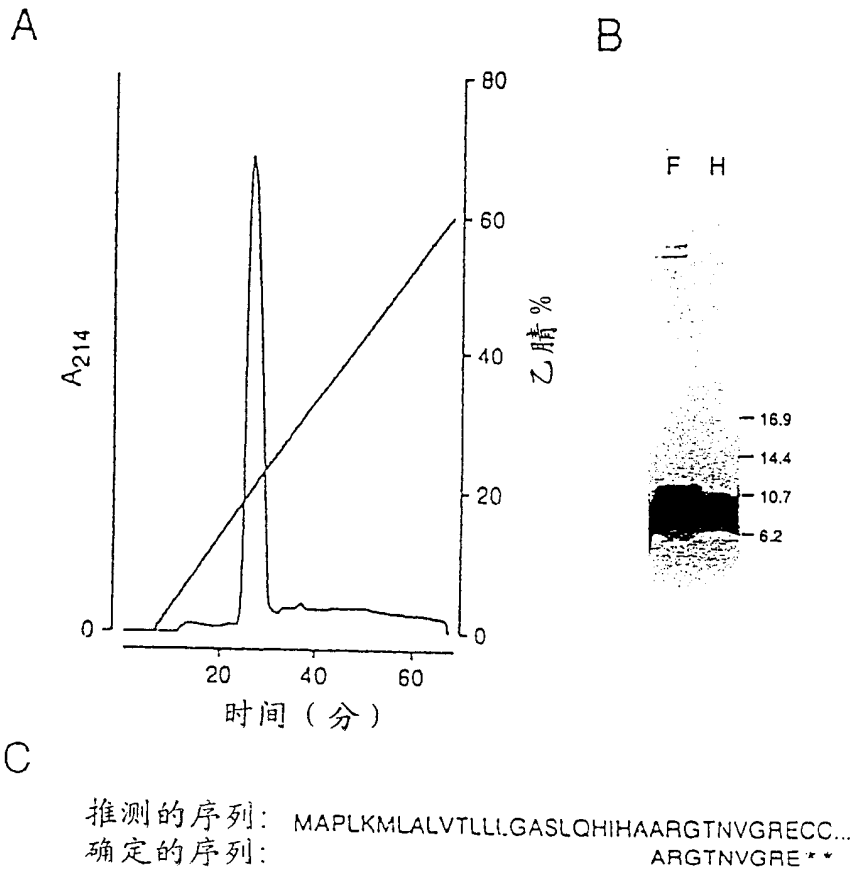

A
B
80
60
40
20
0
A_{214}
乙腈%
0
20
40
60
时间（分）
F H
16.9
14.4
10.7
6.2
C
推测的序列: MAPLKMLALVTLLLGASLQHIHAARGTNVGRECC...
确定的序列: ARGTNVGRE**

图 6

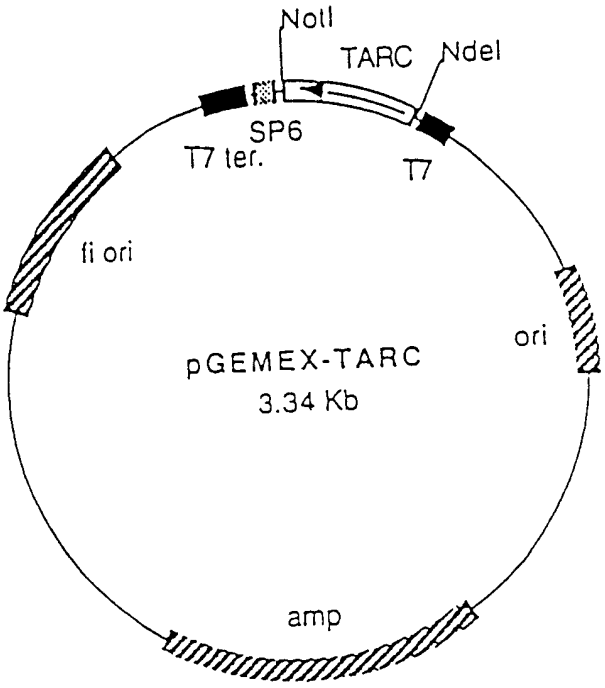


图 7

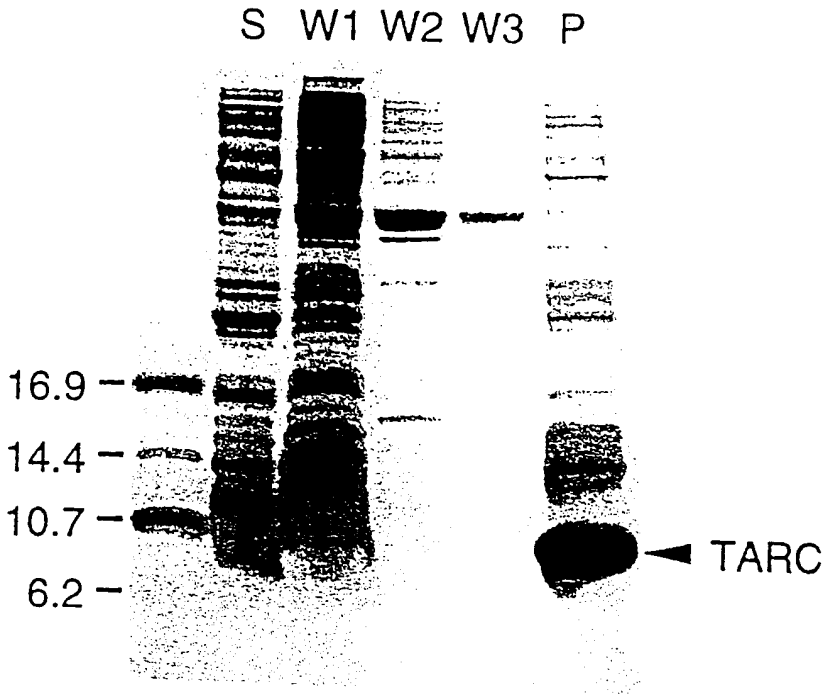


图 8

```
1                                                                   C   1

    2 ATG AGG TCA CTT CAG ATG CTG CTC CTG GCT GCT CTG CTT CTG GGG      46
    1  M   R   S   L   Q   M   L   L   L   A   A   L   L   L   G      15

   47 ACT TTT CTG CAG CAT GCC AGA GCT|GCT CGA GCC ACC AAT GTA GGC      91
   15  T   F   L   Q   H   A   R   A | A   R   A   T   N   V   G      30

   92 CGA GAG TGC TGC CTG GAT TAC TTC AAA GGG GCC ATT CCT ATC AGG     136
   30  R   E   C   C   L   D   Y   F   K   G   A   I   P   I   R      45

  137 AAG TTG GTG AGC TGG TAT AAG ACC TCA GTG GAG TGT TCC AGG GAT     181
   45  K   L   V   S   W   Y   K   T   S   V   E   C   S   R   D      60

  182 GCC ATC GTG TTT CTG ACT GTC CAG GGC AAG CTC ATC TGT GCA GAC     226
   60  A   I   V   F   L   T   V   Q   G   K   L   I   C   A   D      75

  227 CCC AAA GAC AAA CAT GTG AAG AAG GCC ATC AGA TTG GTG AAA AAC     271
   75  P   K   D   K   H   V   K   K   A   I   R   L   V   K   N      90

  272 CCA AGG CCG TGA CCTTCCCGCTGAGGCATTTGGAGACGCCAGGGCTGCTGTCCAT     326
   91  P   R   P   *                                                  93

  327 GGTTTCAACATAAAGCGGCCTGTGACCAGCAGAGCCCAAGAGCAGCCACAGAGCAGAAG     385

  386 TCCCTGTTCCCTTTTTTATGGACTCTTATGCACTACAGGCGAACACAAAAAAAAAGCAAC     444

  445 GGAATAAAGCCTTCCTCCCTC                                         465
```

图 9

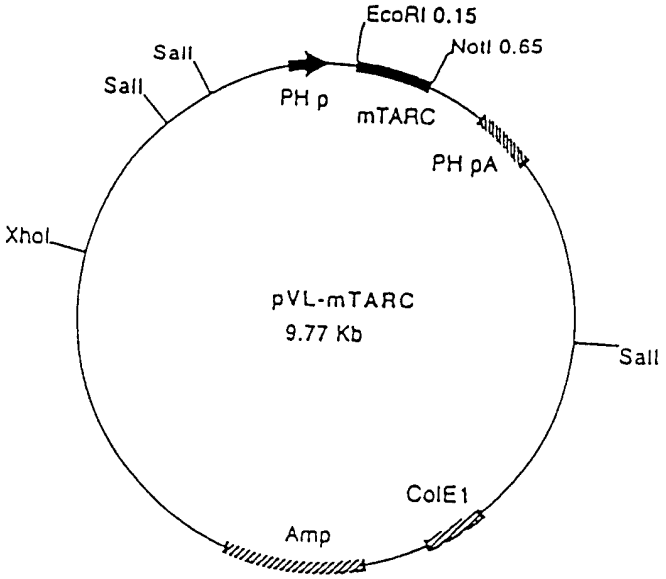

EcoRI 0.15
NotI 0.65
SalI
SalI
PH p
mTARC
PH pA
XhoI
pVL-mTARC
9.77 Kb
SalI
ColE1
Amp

图 10

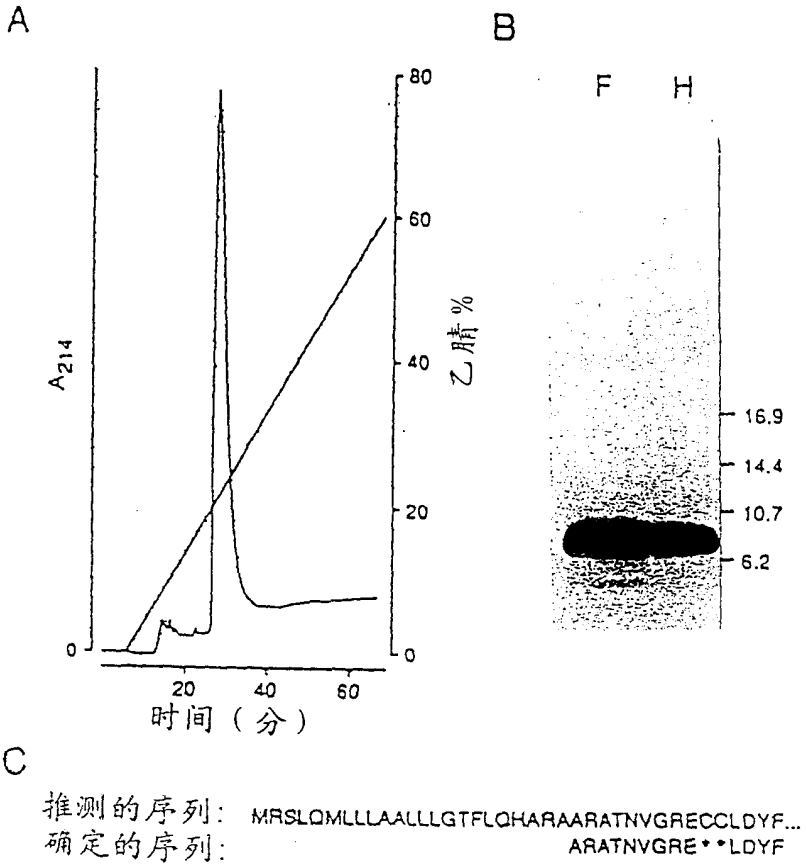
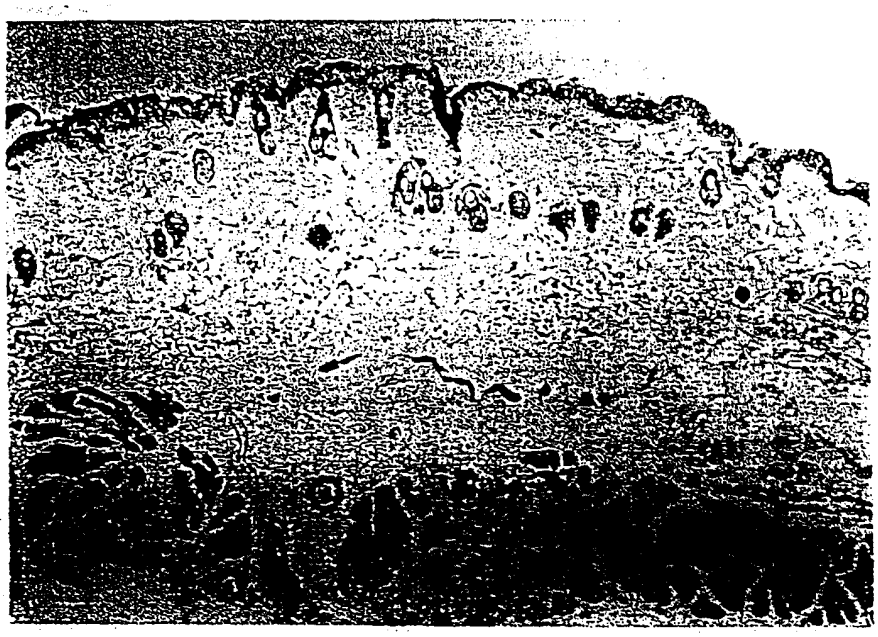

A
B
C
A_{214}
0
80
60
40
20
0
20
40
60
时间（分）
乙腈 %
F
H
16.9
14.4
10.7
6.2
推测的序列: MRSLQMLLLAALLLGTFLQHARAARATNVGRECCLDYF...
确定的序列: ARATNVGRE**LDYF

图 11

A



B

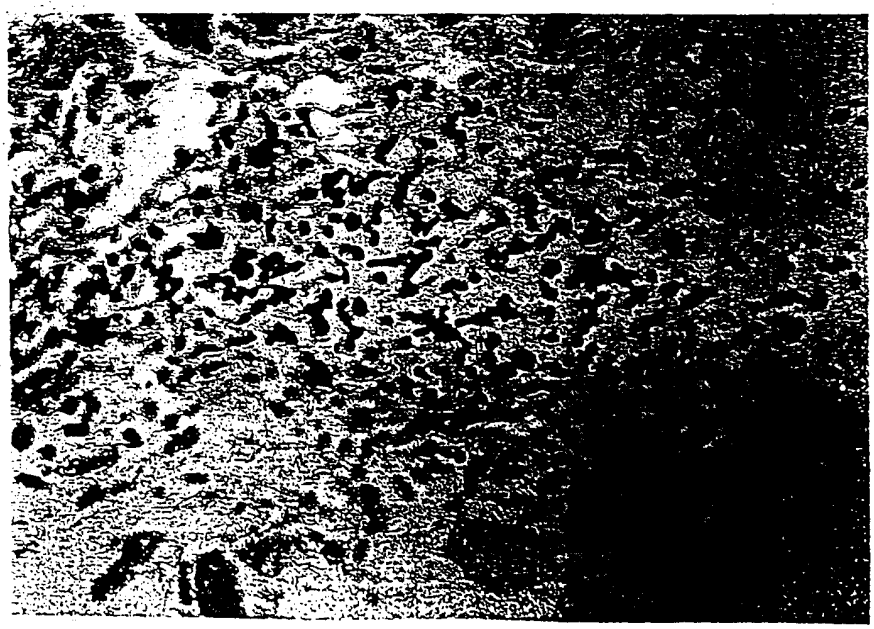


图 12

A



B

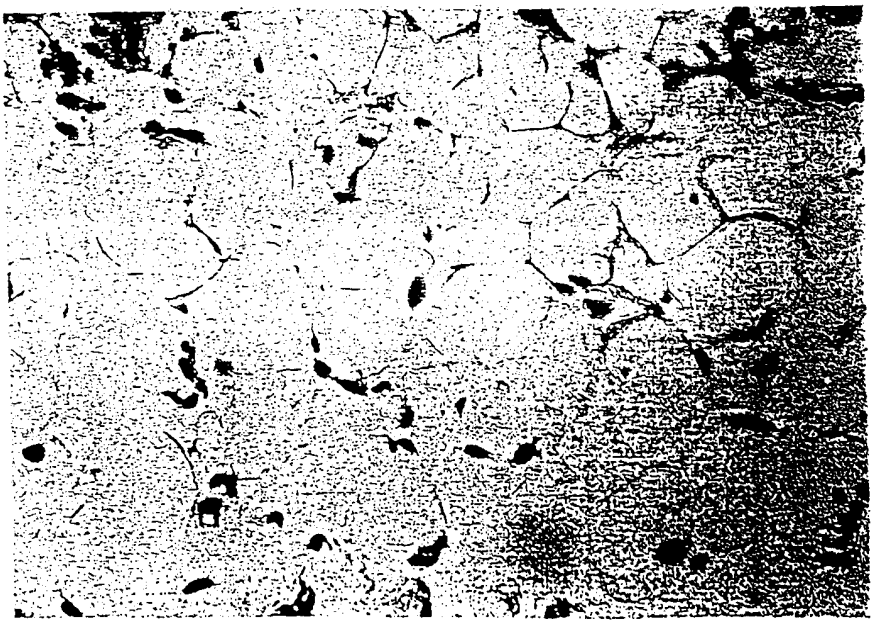


图 13

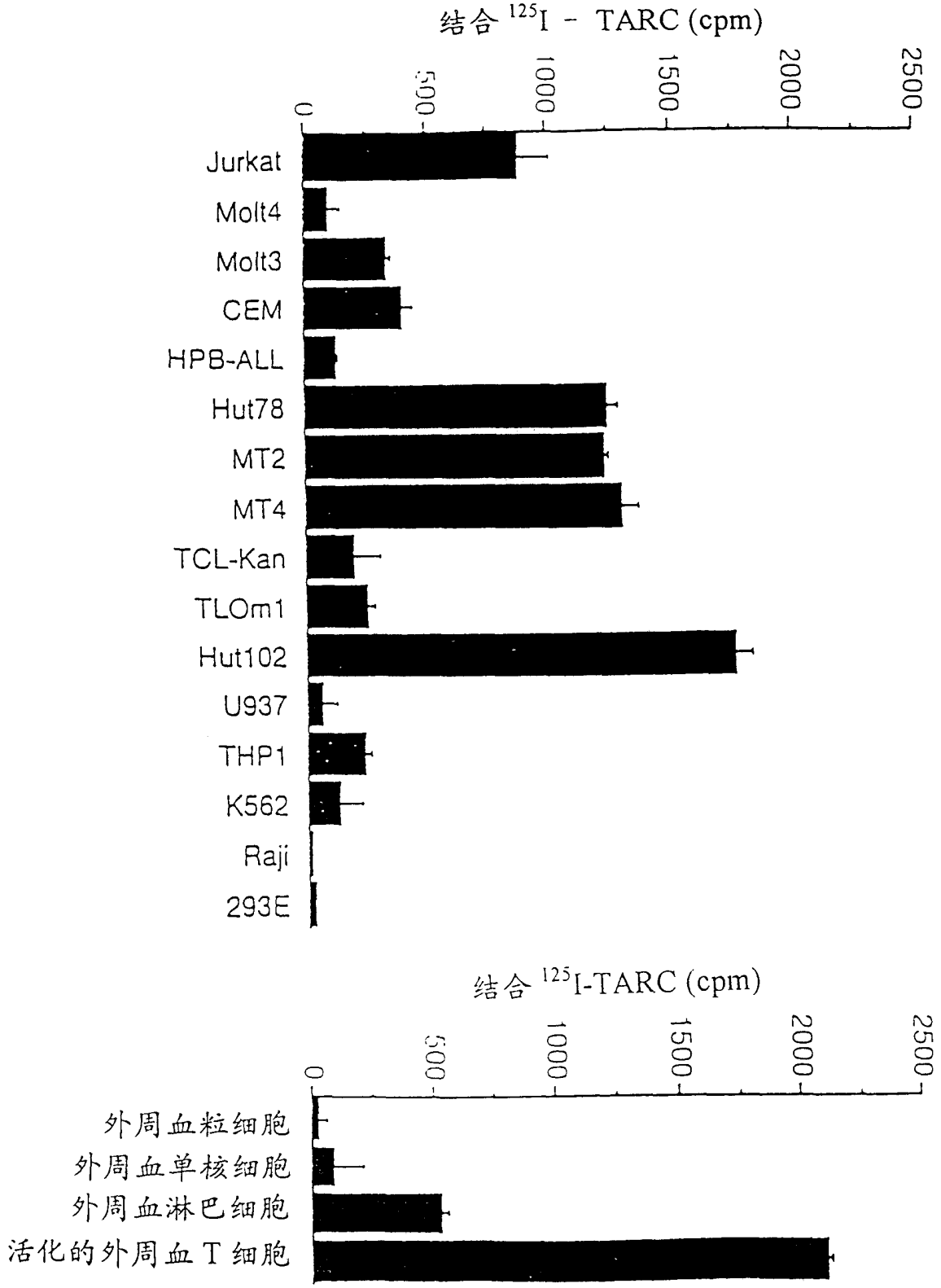

结合 125I - TARC (cpm)
0
500
1000
1500
2000
2500
Jurkat
Molt4
Molt3
CEM
HPB-ALL
Hut78
MT2
MT4
TCL-Kan
TLOm1
Hut102
U937
THP1
K562
Raji
293E
结合 125I-TARC (cpm)
0
500
1000
1500
2000
2500
外周血粒细胞
外周血单核细胞
外周血淋巴细胞
活化的外周血 T 细胞

图 14

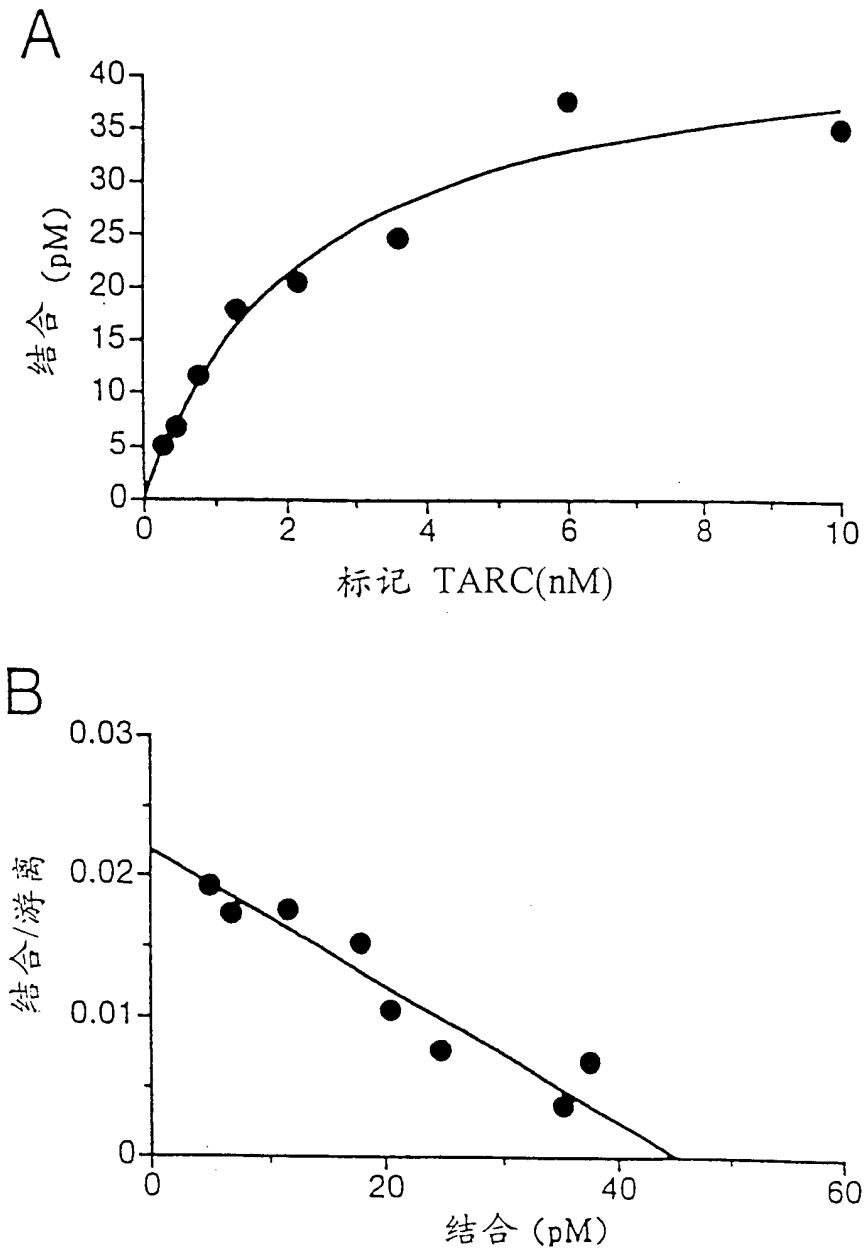

A
结合 (pM)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
2
4
6
8
10
标记 TARC(nM)
B
结合/游离
0.03
0.02
0.01
0
0
20
40
60
结合 (pM)

图 15

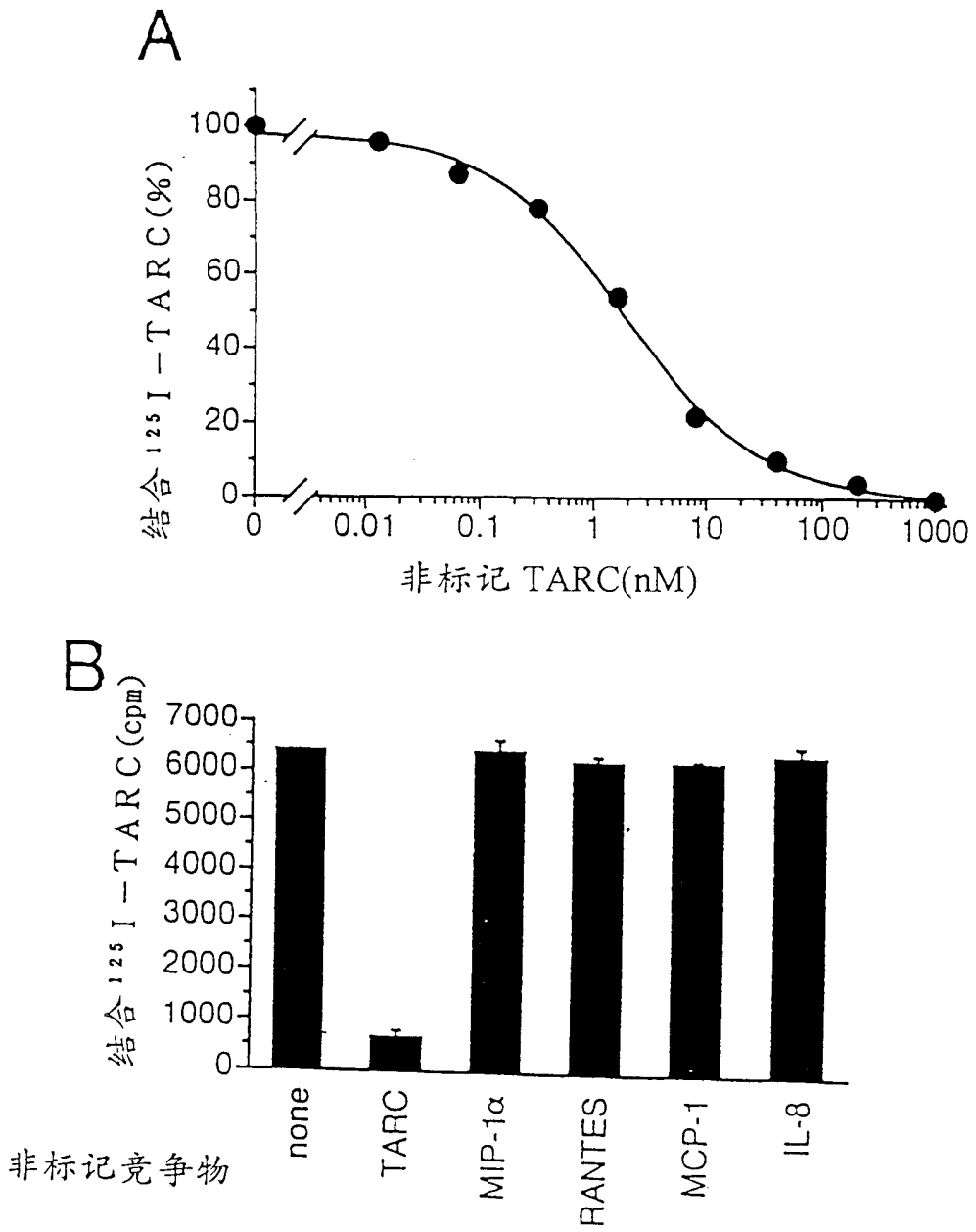

A
结合 125 I－TARC(%)
100
80
60
40
20
0
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
非标记 TARC(nM)
B
结合 125 I－TARC(cpm)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
none
TARC
MIP-1α
RANTES
MCP-1
IL-8
非标记竞争物

图 16

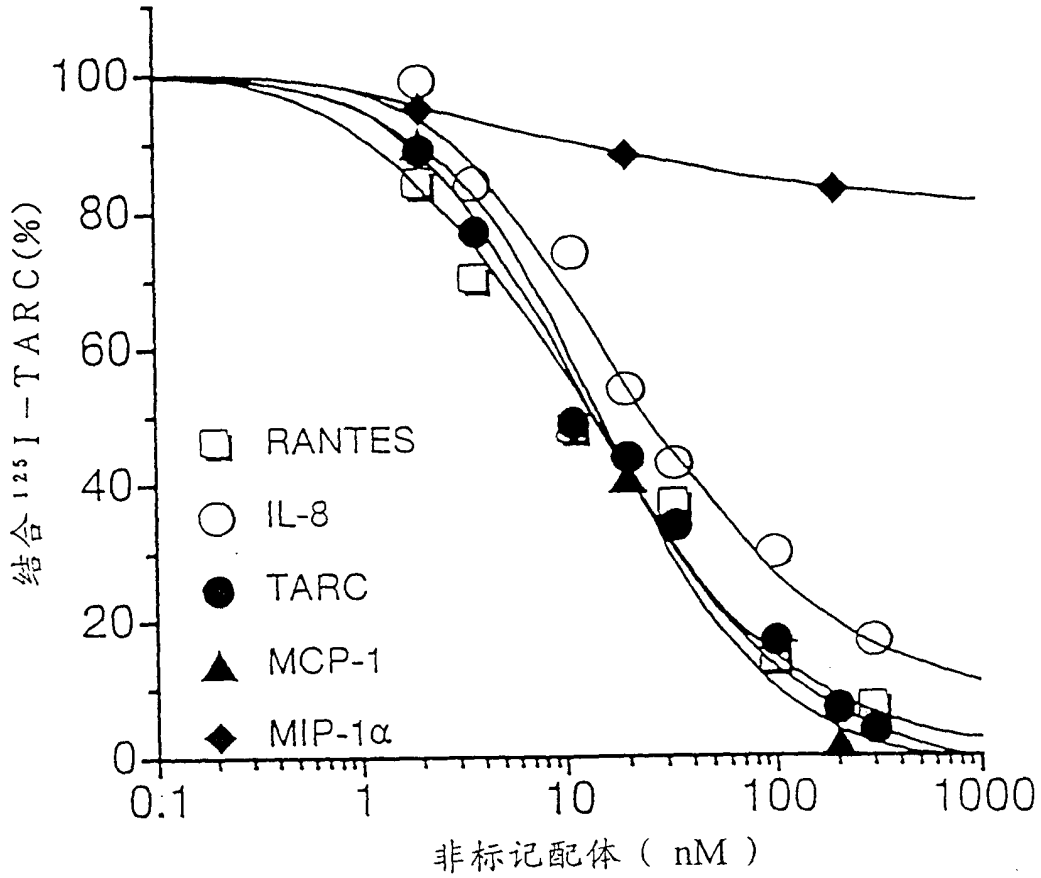

100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
1000
结合 125 I－TARC(%)
非标记配体（ nM ）
RANTES
IL-8
TARC
MCP-1
MIP-1α

图 17

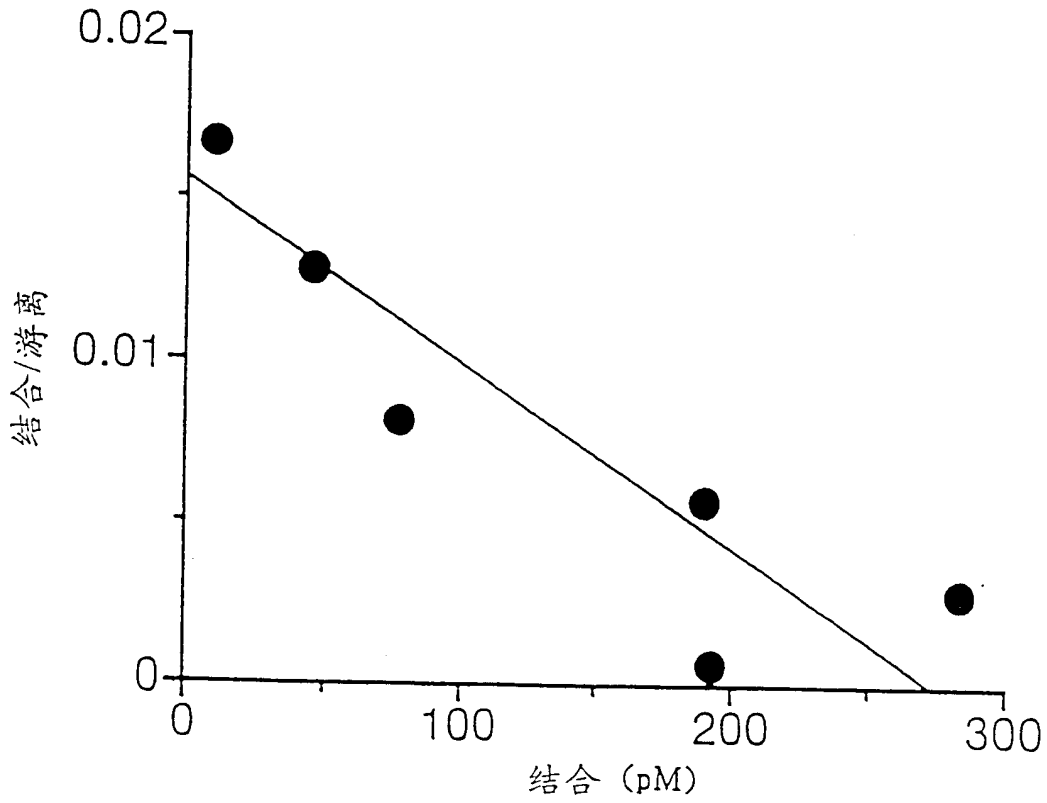


图 18

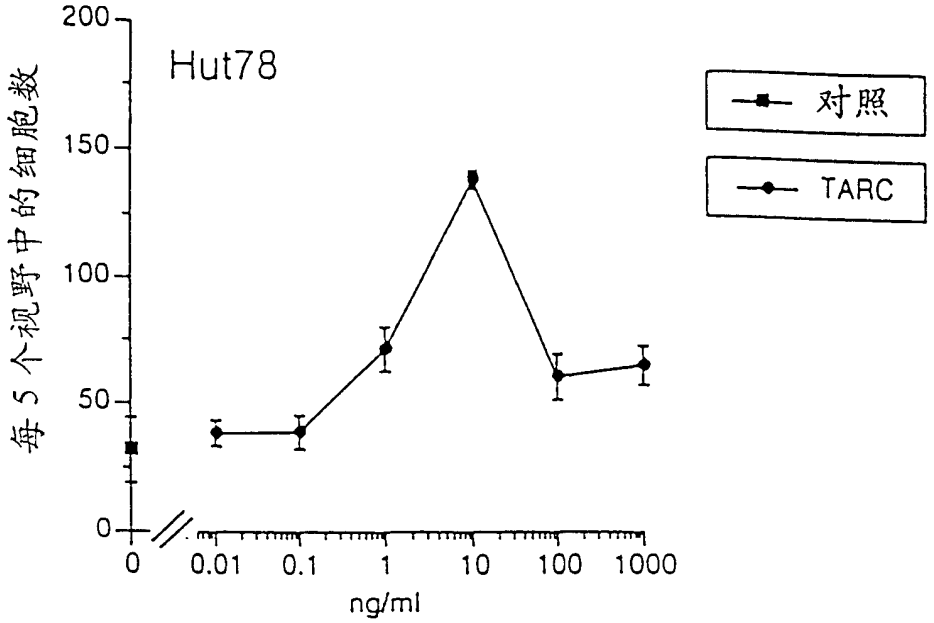

Hut78
每5个视野中的细胞数
200
150
100
50
0
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
ng/ml
对照
TARC

图 19

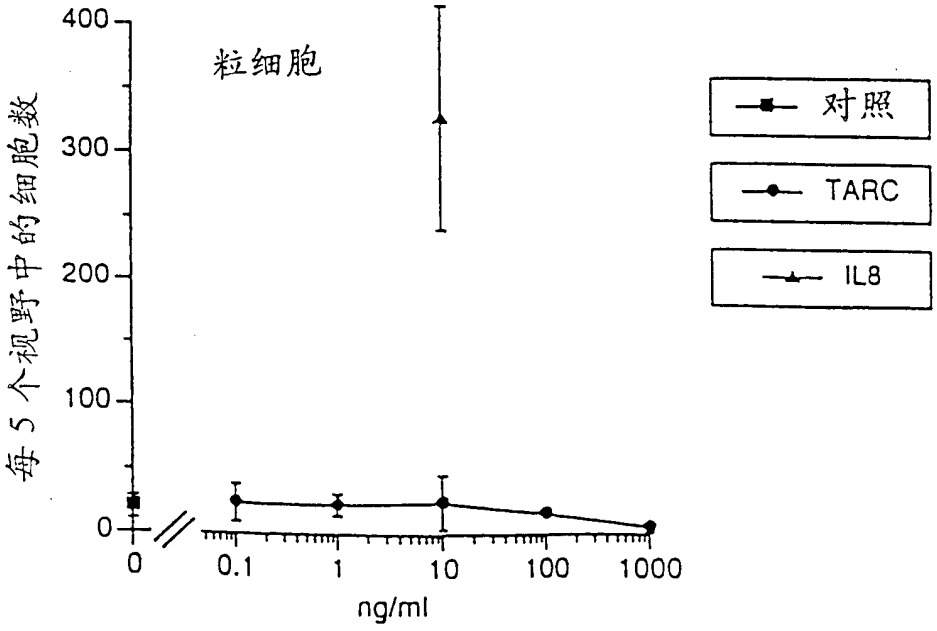

粒细胞
每5个视野中的细胞数
400
300
200
100
0
0
0.1
1
10
100
1000
ng/ml
对照
TARC
IL8

图 20

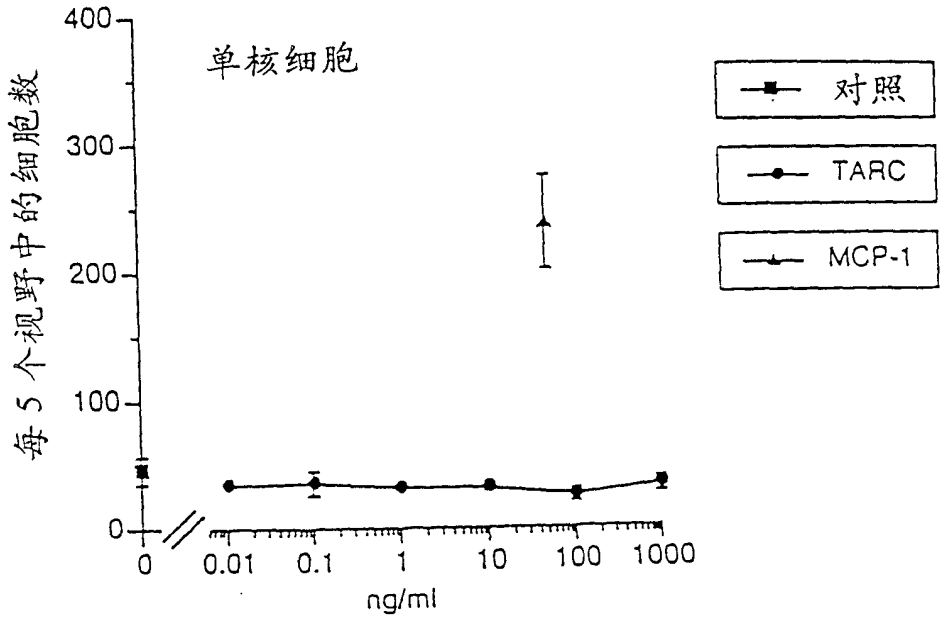

单核细胞
每5个视野中的细胞数
400
300
200
100
0
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
ng/ml
对照
TARC
MCP-1

图 21

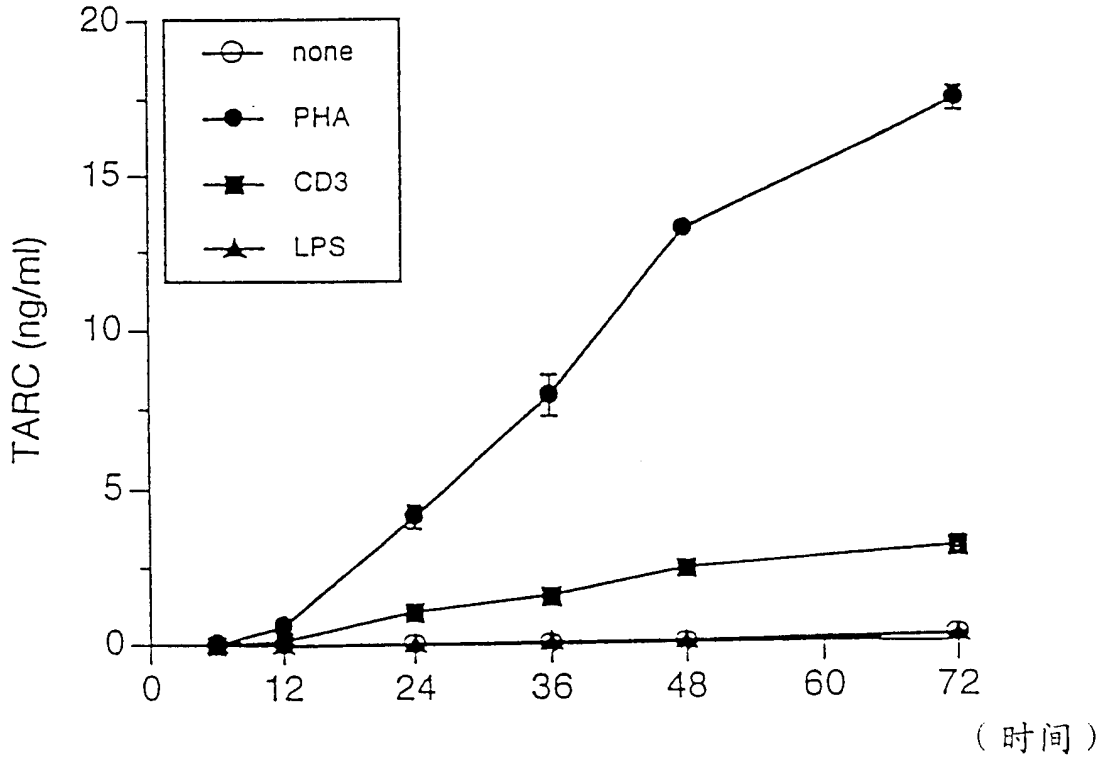


图 22

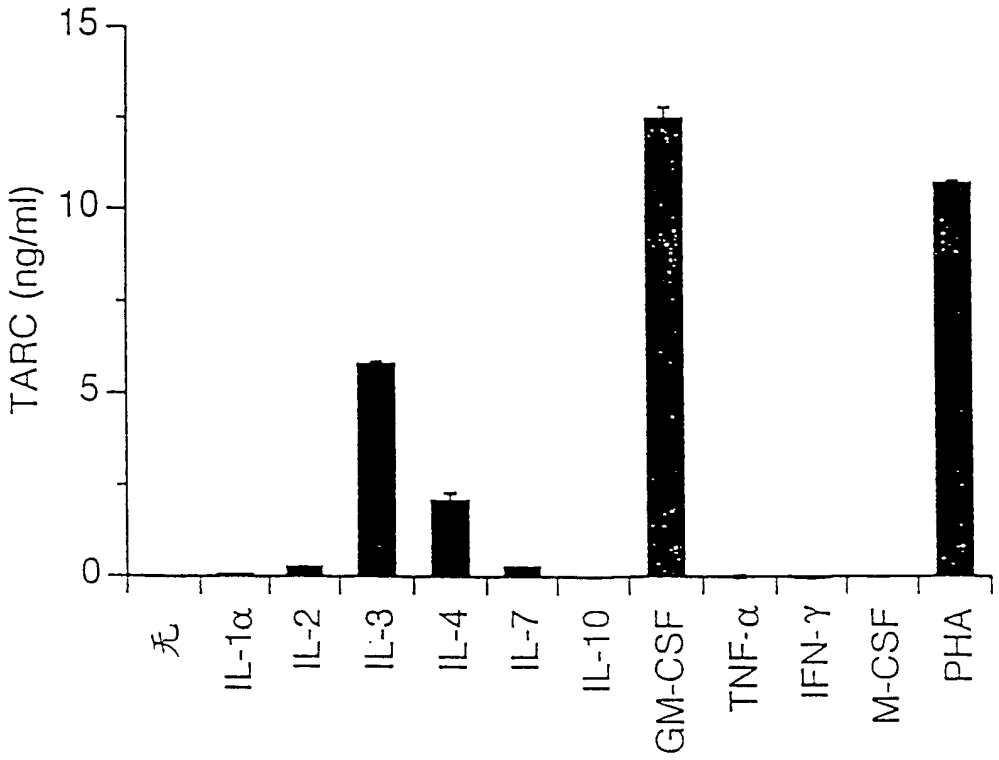

TARC (ng/ml)
15
10
5
0
无
IL-1α
IL-2
IL-3
IL-4
IL-7
IL-10
GM-CSF
TNF-α
IFN-γ
M-CSF
PHA

图 23

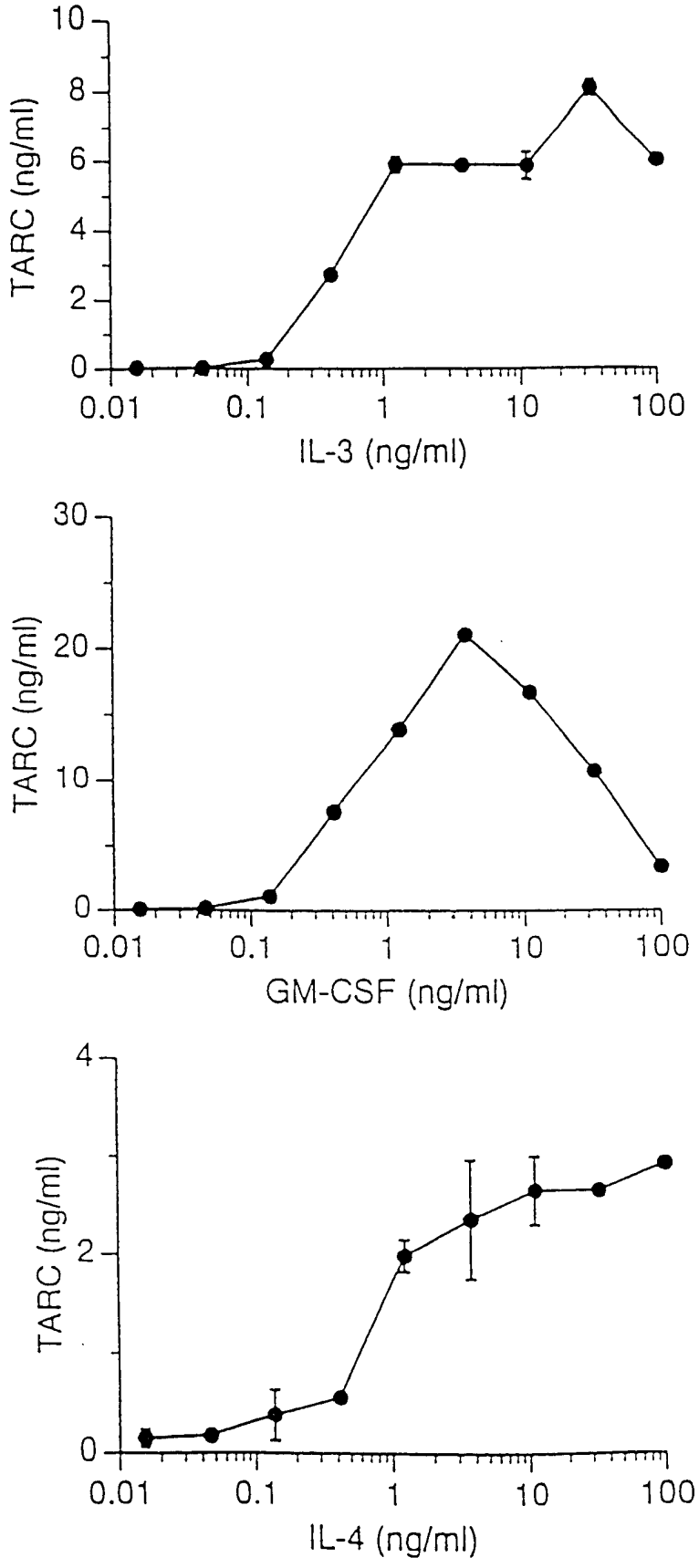

TARC (ng/ml)
10
8
6
4
2
0
0.01
0.1
1
10
100
IL-3 (ng/ml)
TARC (ng/ml)
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
100
GM-CSF (ng/ml)
TARC (ng/ml)
4
2
0
0.01
0.1
1
10
100
IL-4 (ng/ml)

图 24

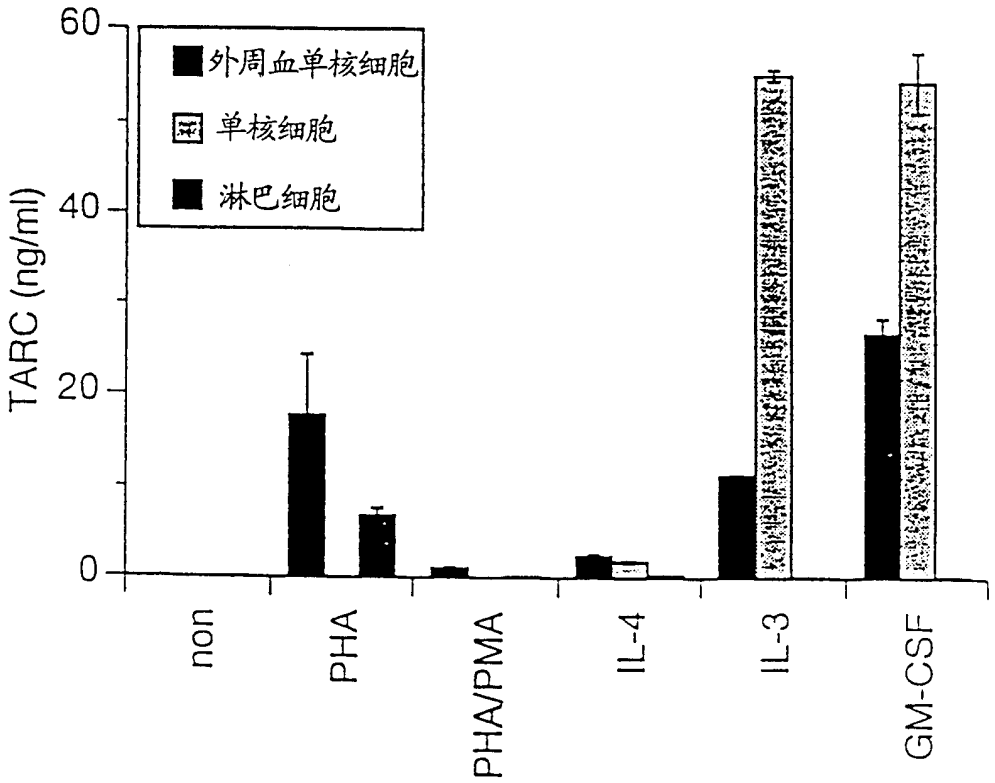

60
40
20
0
TARC (ng/ml)
外周血单核细胞
单核细胞
淋巴细胞
non
PHA
PHA/PMA
IL-4
IL-3
GM-CSF

图 25

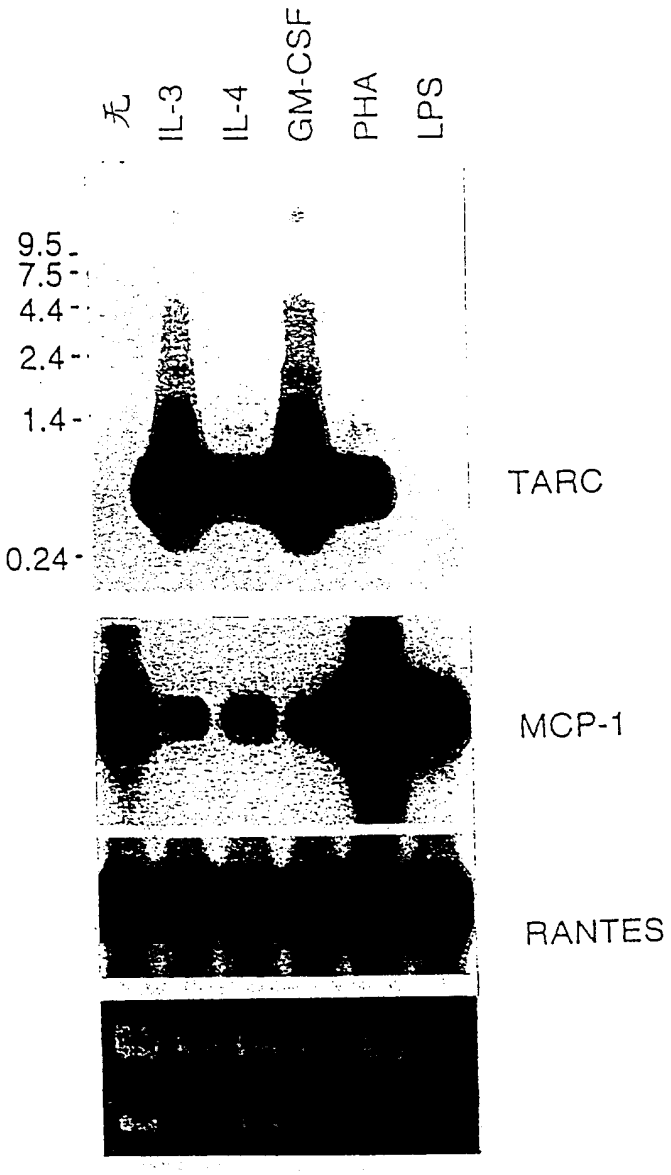


图 26

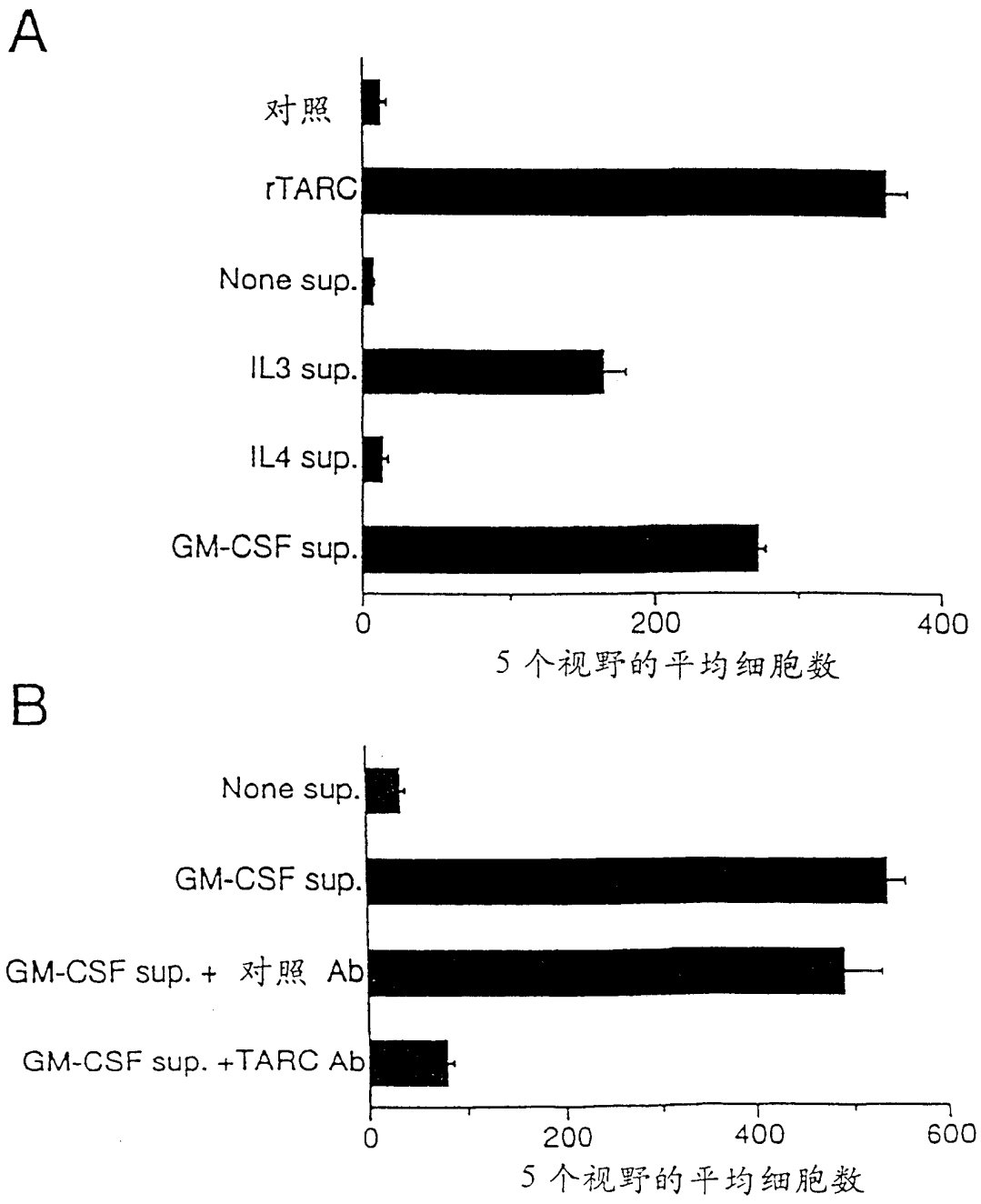

A
对照
rTARC
None sup.
IL3 sup.
IL4 sup.
GM-CSF sup.
0
200
400
5 个视野的平均细胞数
B
None sup.
GM-CSF sup.
GM-CSF sup. + 对照 Ab
GM-CSF sup. +TARC Ab
0
200
400
600
5 个视野的平均细胞数

图 27

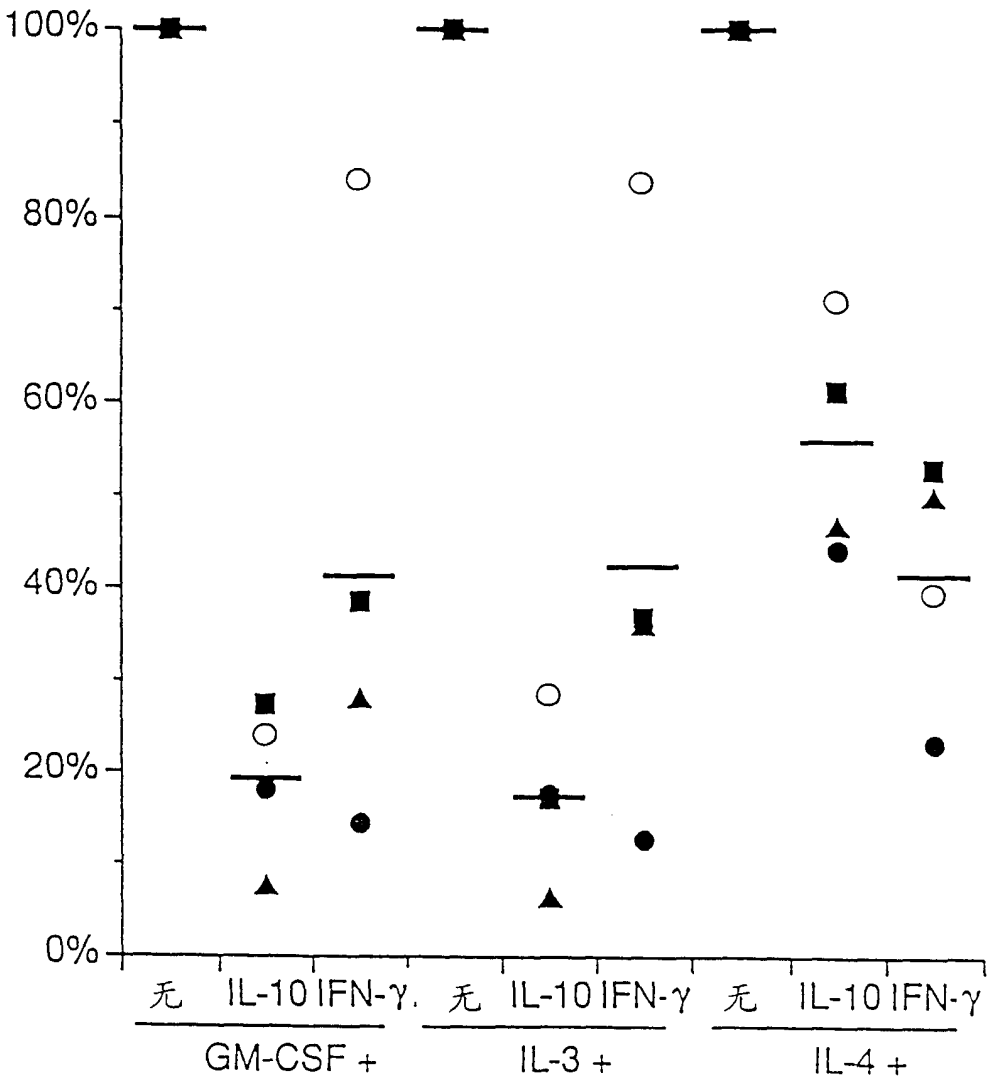

100%
80%
60%
40%
20%
0%
无
IL-10
IFN-γ
无
IL-10
IFN-γ
无
IL-10
IFN-γ
GM-CSF +
IL-3 +
IL-4 +

图 28

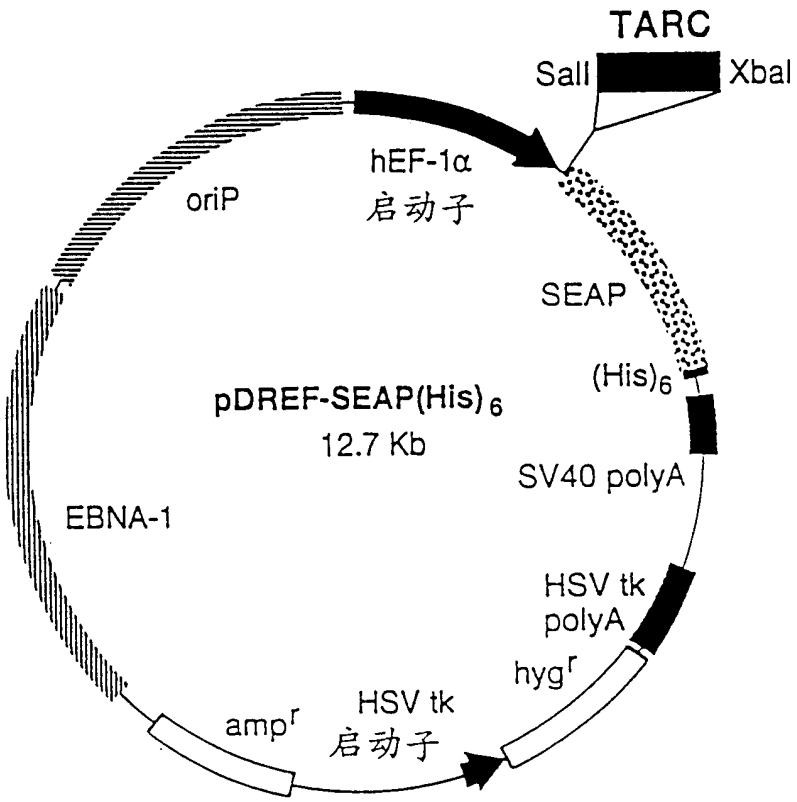

TARC
SalI
XbaI
hEF-1α
启动子
oriP
SEAP
(His)6
pDREF-SEAP(His)6
12.7 Kb
SV40 polyA
EBNA-1
HSV tk
polyA
hygr
ampr
HSV tk
启动子

图 29

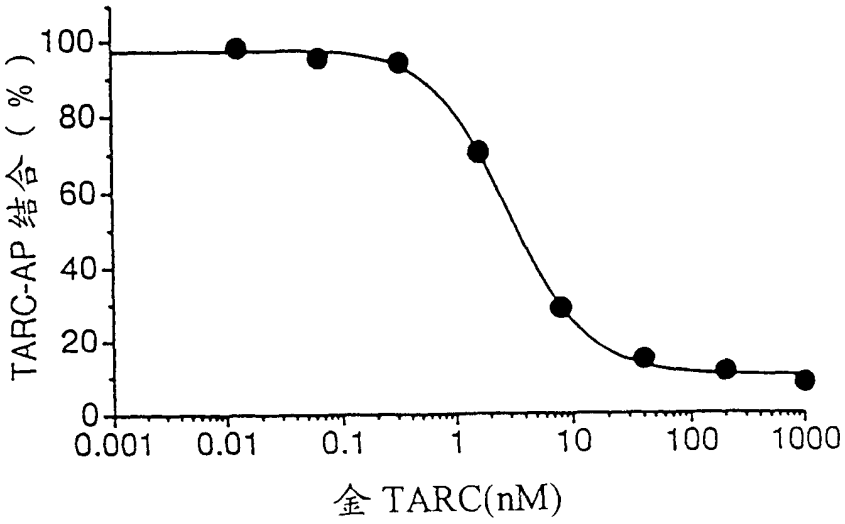

TARC-AP 结合 (%)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
金 TARC(nM)

图 30

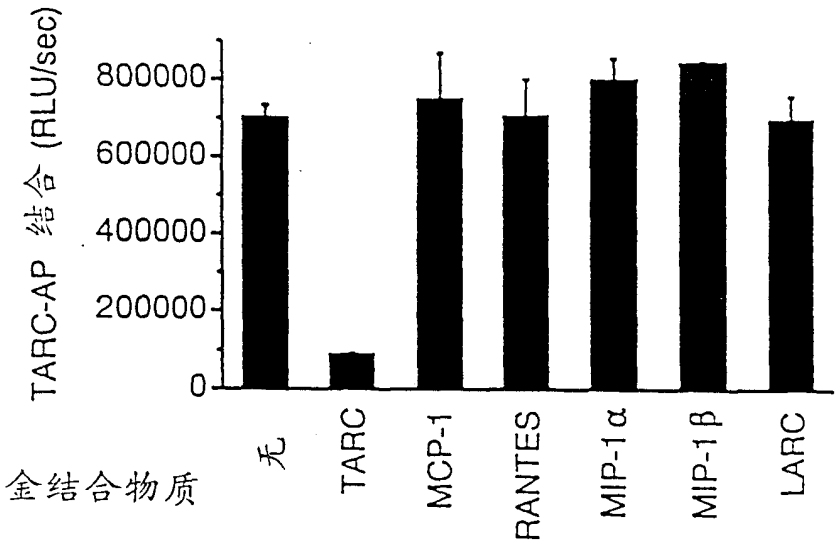
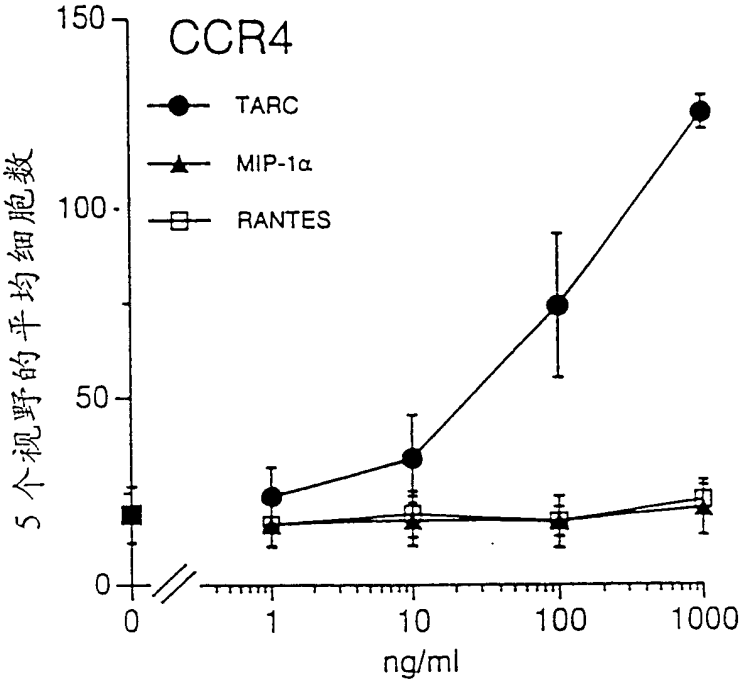

TARC-AP 结合 (RLU/sec)
800000
600000
400000
200000
0
无
TARC
MCP-1
RANTES
MIP-1α
MIP-1β
LARC
金结合物质

图 31


CCR4
TARC
MIP-1α
RANTES
5个视野的平均细胞数
150
100
50
0
0
1
10
100
1000
ng/ml