

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12Q 1/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00818875.0

C12Q 1/02 C12N 15/12
G01N 33/50 G01N 33/563
C07K 16/18 G01N 33/92
A61K 48/00 A61P 3/06
//C12N5/10 C07K14/47

[43] 公开日 2003 年 7 月 30 日

[11] 公开号 CN 1433482A

[22] 申请日 2000.12.8 [21] 申请号 00818875.0
[30] 优先权
[32] 1999.12.9 [33] JP [31] 349976/1999
[86] 国际申请 PCT/JP00/08722 2000.12.8
[87] 国际公布 WO01/42499 日 2001.6.14
[85] 进入国家阶段日期 2002.8.8
[71] 申请人 三共株式会社
地址 日本东京都
[72] 发明人 小石龙太 小野满 古川秀比古
掘越大能 藤原俊彦 安藤洋介

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 曹雯 孟凡宏

权利要求书 5 页 说明书 46 页 序列表 10 页
附图 5 页

[54] 发明名称 高脂血症的治疗或预防剂的检验方法

[57] 摘要

本发明提供用于检验高脂血症的治疗或预防剂的新型方法,以及该方法中所用的核酸探针、引物及抗体。具体来说,本发明提供以序列表序列号 1 或序列号 2 所示的、参与调节哺乳动物血液中中性脂肪浓度的基因的表达式为指标,检验待测物质作为高脂血症的治疗或预防剂的效果的方法,该方法中所用的核酸探针、引物及抗体。使用本发明的方法,可以探寻高脂血症的治疗或预防剂的候选物质。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 检验物质作为高脂血症的治疗或预防剂的效果的方法，该方法包括以下步骤；

1) 将培养细胞在待测物质存在下或非存在下进行培养；

5 2) 检测由上述 1) 得到的培养细胞中，具有下述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列（其中，序列中的 t 改为读作 u）的 mRNA 的表达量；

a) 序列表序列号 1 的核苷酸序号 47 至 1411 所示的核苷酸序列；

b) 序列表序列号 3 的核苷酸序号 78 至 1457 所示的核苷酸序列；

10 c) 插入到转化大肠杆菌 E.coli pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6490) 携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

d) 插入到转化大肠杆菌 E.coli pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6491) 携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

15 e) 在严格条件下与由上述 a) 乃至 d) 任一项所述核苷酸序列的反义序列构成的多核苷酸杂交，并编码具有可使血中的中性脂肪浓度上升的活性的多肽的核苷酸序列；以及

3) 比较上述步骤 2) 的结果，即，比较在待测物质非存在下培养的细胞和待测物质存在下培养的细胞之间检测出的 mRNA 表达量。

2. 权利要求 1 所述的方法，其特征在于，培养细胞来自肝脏。

20 3. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，培养细胞来自灵长类或啮齿类动物。

4. 权利要求 3 所述的方法，其特征在于，培养细胞来自人或小鼠。

5. 权利要求 1 至 4 任一项所述的方法，其特征在于，mRNA 表达量的检测方法为 Northern blot、斑点印迹或狭线印迹。

25 6. 权利要求 1 至 4 任一项所述的方法，其特征在于，mRNA 表达量的检测方法为 RT-PCR。

7. 权利要求 1 至 4 任一项所述的方法，其特征在于，mRNA 表达量的检测方法为核糖核酸酶保护分析法。

30 8. 权利要求 1 至 4 任一项所述的方法，其特征在于，mRNA 表达量的检测方法为连缀转录分析法。

9. 具有与含有下述 a) 乃至 d) 任一项所述核苷酸序列（其中，序列中的 t 改为读作 u）的 mRNA 在严格条件下杂交的核苷酸序列的多

核苷酸（其中，含有下述 a）乃至 d）所述核苷酸序列的除外）；

a）序列表序列号 1 的核苷酸序号 47 至 1411 所示的核苷酸序列；

b）序列表序列号 3 的核苷酸序号 78 至 1457 所示的核苷酸序列；

5 c）插入到转化大肠杆菌 *E.coli* pBK/m55-1 SANK 72199（FERM BP-6490）携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

d）插入到转化大肠杆菌 *E.coli* pTrip/h55-1 SANK 72299（FERM BP-6491）携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列。

10 10. 序列表序列号 1 的核苷酸序号 47 至 1411 所示核苷酸序列的一侧或两侧末端缺失了 1 个核苷酸或 2 个核苷酸以上，且至少由 15 个核苷酸组成的 DNA。

11. 序列表序列号 3 的核苷酸序号 78 至 1457 所示核苷酸序列的一侧或两侧末端缺失了 1 个核苷酸或 2 个核苷酸以上，且至少由 15 个核苷酸组成的 DNA。

15 12. 检验物质作为高脂血症的治疗或预防剂的效果的方法，该方法包括以下步骤；

1）将培养细胞在待测物质存在下或非存在下进行培养；

2）利用可特异识别该多肽的抗体检测上述 1）得到的培养细胞上清中，由下述 a）乃至 e）任一项所述核苷酸序列编码的氨基酸序列或其一部分构成的多肽的产量；

20 a）序列表序列号 1 的核苷酸序号 47 至 1411 所示的核苷酸序列；

b）序列表序列号 3 的核苷酸序号 78 至 1457 所示的核苷酸序列；

c）插入到转化大肠杆菌 *E.coli* pBK/m55-1 SANK 72199（FERM BP-6490）携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

25 d）插入到转化大肠杆菌 *E.coli* pTrip/h55-1 SANK 72299（FERM BP-6491）携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

e）在严格条件下与由上述 a）乃至 d）任一项所述核苷酸序列的反义序列构成的多核苷酸杂交，并编码具有可使血中的中性脂肪浓度上升的活性的多肽的核苷酸序列；

30 3）比较上述步骤 2）的结果，即，比较在待测物质非存在下培养的细胞和待测物质存在下培养的细胞之间检测出的多肽量。

13. 权利要求 12 所述的方法，其特征在于，可特异识别由 a）乃至 e）任一项所述核苷酸序列编码的氨基酸序列或其一部分构成的多肽

的抗体为，可特异识别由序列表序列号 2 的氨基酸序号 17-455 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分、由序列表序列号 2 的氨基酸序号 19-455 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分、或由序列表序列号 4 的氨基酸序号 17-460 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分的抗体。

- 5 14. 权利要求 12 或 13 所述的方法，其特征在于，可特异识别由 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列编码的氨基酸序列或其一部分构成的多肽的抗体为，可特异识别序列表序列号 9 的氨基酸序号 1-13 所示的氨基酸序列或序列号 10 的氨基酸序号 1-14 所示的氨基酸序列的抗体。

- 10 15. 权利要求 12 至 14 任一项所述的方法，其特征在于，将由 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列编码的氨基酸序列或其一部分构成的多肽产量用可特异识别该多肽的抗体进行检测的操作为 Western blot、斑点印迹或狭线印迹。

- 15 16. 权利要求 12 至 14 任一项所述的方法，其特征在于，将由 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列编码的氨基酸序列或其一部分构成的多肽产量用可特异识别该多肽的抗体进行检测的操作为固相酶免疫定量法（ELISA 法）或放射性同位素免疫定量法（RIA 法）。

17. 特异识别由下述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列编码的氨基酸序列或其一部分构成的多肽的抗体；

- 20 a) 序列表序列号 1 的核苷酸序号 47 至 1411 所示的核苷酸序列；
 b) 序列表序列号 3 的核苷酸序号 78 至 1457 所示的核苷酸序列；
 c) 插入到转化大肠杆菌 E.coli pBK/m55-1 SANK 72199（FERM BP-6490）携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

- d) 插入到转化大肠杆菌 E.coli pTrip/h55-1 SANK 72299（FERM BP-6491）携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

- 25 e) 在严格条件下与由上述 a) 乃至 d) 任一项所述核苷酸序列的反义序列构成的多核苷酸杂交，并编码具有可使血中的中性脂肪浓度上升的活性的多肽的核苷酸序列。

- 30 18. 权利要求 17 所述的抗体，其特征在于，该抗体可特异识别序列表序列号 9 的氨基酸序号 1 至 13 所示的氨基酸序列或序列号 10 的氨基酸序号 1 至 14 所示的氨基酸序列。

19. 用于检验高脂血症的治疗或预防剂的试剂盒，该试剂盒中含有权利要求 17 或 18 所述的抗体。

20. 检验物质作为高脂血症的治疗或预防剂的效果的方法，该方法包括下述步骤；

1) 将待测物质投给通过基因操作得到的、将含有下述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的外源基因以可高效表达该基因的方式导入的非人动物；

a) 序列表序列号 1 的核苷酸序号 47 至 1411 所示的核苷酸序列；

b) 序列表序列号 3 的核苷酸序号 78 至 1457 所示的核苷酸序列；

c) 插入到转化大肠杆菌 *E.coli* pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6490) 携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

d) 插入到转化大肠杆菌 *E.coli* pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6491) 携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

e) 在严格条件下与由上述 a) 乃至 d) 任一项所述核苷酸序列的反义序列构成的多核苷酸杂交，并编码具有可使血中的中性脂肪浓度上升的活性的多肽的核苷酸序列；

2) 测定 1) 的动物血中的中性脂肪浓度。

21. 权利要求 20 所述的方法，其特征在于，1) 的非人动物为小鼠。

22. 权利要求 20 所述的方法，其特征在于，外源基因导入 1) 所述的非人动物的步骤通过用含有整合该基因的腺病毒载体的腺病毒感染该动物来实现。

23. 具有与含有下述 a) 乃至 d) 任一项所述核苷酸序列（其中，序列中的 t 改为读作 u）的 mRNA 在严格条件下杂交的核苷酸序列的多核苷酸在制备用于检验高脂血症的治疗或预防剂的探针中的应用；

a) 序列表序列号 1 的核苷酸序号 47 至 1411 所示的核苷酸序列；

b) 序列表序列号 3 的核苷酸序号 78 至 1457 所示的核苷酸序列；

c) 插入到转化大肠杆菌 *E.coli* pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6490) 携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

d) 插入到转化大肠杆菌 *E.coli* pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6491) 携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列。

24. 由序列表序列号 2 的氨基酸序号 17-455 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分、由序列表序列号 2 的氨基酸序号 19-455 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分、或由序列表序列号 4 的氨基酸序号

17-460 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分在制备用于检验高脂血症的治疗或预防剂的抗体中的应用。

25. 由序列表序列号 2 的氨基酸序号 17-455 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分、由序列表序列号 2 的氨基酸序号 19-455 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分、或由序列表序列号 4 的氨基酸序号 17-460 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分在制作高脂血症的治疗或预防剂的检验试剂盒中的应用。

26. 由序列表序列号 3 的核苷酸序号 78 至 1457 所示核苷酸序列中连续的 15 至 30 个核苷酸构成的核苷酸序列的反义序列构成 DNA 或 RNA。

27. 含有权利要求 26 所述的 DNA 或 RNA 作为有效成分的高脂血症治疗剂。

高脂血症的治疗或预防剂的检验方法

技术领域

- 5 本发明涉及高脂血症的治疗或预防剂的新型检验方法，该方法中使用的核酸探针、引物和抗体。

背景技术

- 最近，随着饮食结构的改变，脂肪和胆固醇的过量摄取导致的高脂血症患者明显增多。高脂血症是血清脂质，即胆固醇、中性脂肪（甘油三酯，TG）、磷脂、游离脂肪酸等的血清浓度增高的疾病，并且是导致动脉硬化症的重要危险因子。进而招致高血压、心绞痛和心肌梗塞之类的冠状动脉硬化症，脑梗塞等并发症的可能性增高。

- 迄今为止，已报道了多个具有抗高脂血症作用的化合物，但其中的大部分是通过化学方法合成的物质，因此在其性质上不可能避免连续使用时产生的种种副作用。

- 另一方面，目前市售的普伐他汀钠（pravastatin Sodium）是一种来自微生物代谢产物的强有力的高脂血症治疗剂，其作用是胆固醇生物合成体系中的限速酶 HMG-CoA 还原酶的抑制剂。类似于此，如果可以鉴定出存在于生物体内的高脂血症相关蛋白质或其编码基因，则可开发出通过直接抑制其功能或通过对其表达进行调控等消除了副作用（或减少了副作用），且更有效的高脂血症治疗剂，但对于这种与高脂血症发作密切相关的基因还无从了解。

- 另一方面，本发明方法中使用的核酸探针的相同序列已作为编码“血管生成因子相关蛋白质 3”的核苷酸序列公开在 Genbank 数据库中，并且在国际专利申请公开 WO99/55869 号公报中同一核苷酸序列又作为编码“ $\alpha 5$ ”的基因公开，但对于具有这些核苷酸序列的基因与高脂血症的关系还完全不知晓。因此，对于编码“血管生成因子相关蛋白质 3”乃至“ $\alpha 5$ ”的核苷酸序列的一部分可用于高脂血症的治疗或预防剂检验也不知晓。

- 30 即，本发明的目的在于，提供可用于高脂血症的治疗或预防剂检验的新型方法，以及该方法中使用的核酸探针、引物或抗体。

发明的公开

本发明人等以寻找高脂血症的治疗或预防剂的靶基因为目的，通过将先天性低脂血症小鼠的基因与高脂血症小鼠的基因进行比较，对高脂血症的病原基因在染色体上的位置进行了悉心研究，结果在鉴定高脂血症小鼠中高效表达的基因方面取得了成功。同源性检索的结果表明，该基因的 cDNA 已作为编码“血管生成因子相关蛋白质 3”的核苷酸序列公开在 Genbank 数据库中，但本发明人等发现将具有该核苷酸序列的基因在低脂血症小鼠中强制表达时，血液中的中性脂肪浓度上升，进而明确了该基因具有以往未见报道的新型功能。由此，成功地创立了利用将该核苷酸序列或其一部分作为探针或引物的基因表达检测体系的、高脂血症的治疗或预防剂的新型检验方法。并且，通过制备该核苷酸序列编码多肽的特异性抗体，创立了利用将该抗体用于检测该多肽产量的实验体系的、高脂血症的治疗或预防剂的新型检验方法。进而，通过制作将该核苷酸序列导入到实验动物中的模型动物，成功地创立了利用该模型动物的高脂血症治疗或预防剂的新型检验方法，从而完成了本发明。

第一，本发明涉及包括下述步骤的、检验物质作为高脂血症的治疗或预防剂的效果的方法。

- 1) 将培养细胞在待测物质存在下或非存在下进行培养;
- 2) 检测由上述 1) 得到的培养细胞中，具有下述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列（其中，序列中的 t 改为读作 u）的 mRNA 的表达量；
 - a) 序列表序列号 1 的核苷酸序号 47 至 1411 所示的核苷酸序列；
 - b) 序列表序列号 3 的核苷酸序号 78 至 1457 所示的核苷酸序列；
 - c) 插入到转化大肠杆菌 E.coli pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6490) 携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；
 - d) 插入到转化大肠杆菌 E.coli pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6491) 携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；
 - e) 在严格条件下与由上述 a) 乃至 d) 任一项所述核苷酸序列的反义序列构成的多核苷酸杂交，并编码具有可使血中的中性脂肪浓度上升的活性的多肽的核苷酸序列；以及
- 3) 比较上述步骤 2) 的结果，即，比较在待测物质非存在下培养的细胞和待测物质存在下培养的细胞之间检测出的 mRNA 表达量。

优选上述培养细胞来自于肝脏（初代培养肝细胞等），并优选来

自于灵长类或啮齿类动物。更优选来自于人、小鼠、大鼠或仓鼠的细胞，但本发明不限于此。

上述方法中，作为检测 mRNA 表达量的方法，优选 Northern blot、斑点印迹 (dot blot) 或狭线印迹 (slot blot)、RT-PCR、核糖核酸酶保护分析、连缀转录分析 (run on assay)、DNA 芯片分析、DNA 微阵列分析、或定量 PCR 方法等，但本发明不限于此。

第二，本发明涉及具有与可用于上述方法中的核酸探针，即，与含有上述 a) 乃至 d) 任一项所述核苷酸序列 (其中，序列中的 t 改为读作 u) 的 mRNA 在严格条件下杂交的核苷酸序列的多核苷酸 (其中，含有下述 a) 乃至 d) 所述核苷酸序列的除外)。并且，序列表序列号 1 的核苷酸序号 47 至 1411 所示核苷酸序列的一侧或两侧末端缺失了 1 个核苷酸或 2 个核苷酸以上且至少由 15 个核苷酸组成的 DNA，或序列表序列号 3 的核苷酸序号 78 至 1457 所示核苷酸序列的一侧或两侧末端缺失了 1 个核苷酸或 2 个核苷酸以上且至少由 15 个核苷酸组成的 DNA 也都可以优选用作上述方法中的核酸探针。

第三，本发明涉及包括下述步骤的、检验物质作为高脂血症的治疗或预防剂的效果的方法，以及可用于下述步骤 2) 中的抗体。

- 1) 将培养细胞在待测物质存在下或非存在下进行培养；
- 2) 利用可特异识别下述多肽的抗体检测上述 1) 得到的培养细胞上清中，由上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列编码的氨基酸序列或其一部分构成的多肽的产量；以及
- 3) 比较上述步骤 2) 的结果，即，比较在待测物质非存在下培养的细胞和待测物质存在下培养的细胞之间检测出的多肽量。

此方法中，可特异识别由上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列编码的氨基酸序列或其一部分构成的多肽的抗体，优选可特异识别由序列表序列号 2 的氨基酸序号 17-455 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分、由序列表序列号 2 的氨基酸序号 19-455 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分、或由序列表序列号 4 的氨基酸序号 17-460 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分的抗体，更优选可特异识别序列表序列号 9 的氨基酸序号 1-13 所示的氨基酸序列或序列表序列号 10 的氨基酸序号 1-14 所示的氨基酸序列的抗体。

此外，上述步骤 2) 中作为用抗体进行检测的方法，优选 Western

blot、斑点印迹或狭线印迹、固相酶免疫定量法（ELISA 法）或放射性同位素免疫定量法（RIA 法），但本发明并不局限于此。

第四，本发明涉及包括上述抗体的、检验高脂血症的治疗或预防剂的试剂盒。

5 第五，本发明涉及包括下述步骤的、检验物质作为高脂血症的治疗或预防剂的效果的方法。

1) 将待测物质投给通过基因操作得到的、将含有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的外源基因以可高效表达该基因的方式导入的非人动物；以及

10 2) 测定 1) 的动物血中的中性脂肪浓度。

此方法中，上述步骤 1) 的非人动物优选为小鼠，但本发明并不局限于此。并且，作为将外源基因导入步骤 1) 所述的非人动物中的方法，优选将含有整合了该基因的腺病毒载体的腺病毒感染该动物的方法，但本发明并不局限于此。

15 第六，本发明涉及由序列列表序列号 3 的核苷酸序号 78-1457 所示核苷酸序列中连续的 15 个乃至 30 个核苷酸构成的核苷酸序列的反义 DNA 或 RNA 序列，以及含有该 DNA 或 RNA 作为有效成分的高脂血症治疗剂。

20 即，本发明提供将具有序列列表序列号 1 或序列号 3 中所示核苷酸序列、并参与哺乳动物血液中中性脂肪浓度调节的基因的表达作为指标检验待测物质作为高脂血症的治疗或预防剂的效果的方法，该方法中使用的核酸探针、引物及抗体，以及具有序列列表序列号 3 中所示核苷酸序列的 DNA 的反义核酸分子。

25 本发明中，“在严格条件下杂交”是指在市售的杂交溶液 ExpressHyb Hybridization Solution（Clontech 公司制）中 68℃ 进行杂交，或在与上述条件同等的条件下进行杂交。

30 具体来说，本发明的方法例如是将具有序列列表序列号 1 中核苷酸序号 47 至 1411 所示核苷酸序列或序列列表序列号 3 中核苷酸序号 78 至 1457 所示核苷酸序列的基因、或编码与上述基因编码的多肽具有相同活性的多肽的基因的表达，通过该核酸（mRNA）或该多肽的特异性检测进行测定，进而筛选可降低该基因表达量的待测物质作为高脂血症的治疗或预防剂的候选物质的方法。以下，通过核酸的检测方式以及

多肽的检测方式两部分内容对本发明进行说明。

(A) 核酸的检测

1) 探针

5 进行核酸的检测时，核酸杂交方法中使用的探针是 DNA 或 RNA，其核苷酸序列可以是与具有下述 a) 乃至 e) 中任一序列（其中，序列中的 t 改为读作 u）的多核苷酸在严格条件下杂交的核苷酸序列。

a) 序列表序列号 1 中核苷酸序号 47 至 1411 所示的核苷酸序列；

b) 序列表序列号 3 中核苷酸序号 78 至 1457 所示的核苷酸序列；

10 c) 插入到转化大肠杆菌 *E.coli* pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6490) 携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

d) 插入到转化大肠杆菌 *E.coli* pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6491) 携有的噬菌体粒子中的 DNA 所具有的核苷酸序列；

15 e) 在严格条件下与具有上述 a) 乃至 d) 任一项所述核苷酸序列的反义序列的多核苷酸杂交，并编码具有可使血中的中性脂肪浓度上升的活性的多肽的核苷酸序列。

例如，具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的反义序列的多核苷酸，具有该反义序列中连续的且至少由 15 个核苷酸构成的部分序列的多核苷酸，或该反义序列的改变体等，以及通过与具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的多核苷酸在严格条件下杂交，进而可
20 特异检测该多核苷酸的核苷酸序列均可在本发明的方法中使用。这些核苷酸序列中，具有上述 a) 所述核苷酸序列的反义序列的多核苷酸，例如可以将序列表序列号 1 所示的核苷酸序列信息为基础，从小鼠肝脏 cDNA 文库中通过已知的方法，例如噬菌斑杂交法、菌落杂交法或 PCR 法等克隆出 cDNA 克隆，并用已知的方法直接标记，或将该 cDNA
25 作为模板并在应用聚合酶反应的复制或转录反应中进行标记，进而以标记探针的形式得到。并且，具有上述 b) 所述核苷酸序列的反义序列的多核苷酸，例如可以将序列表序列号 3 所示的核苷酸序列信息为基础，从人肝脏 cDNA 文库中通过同样的操作克隆出 cDNA 克隆，进而得到标记探针。另一方面，具有上述 c) 或 d) 所述核苷酸序列的反义
30 序列的多核苷酸，例如可以从保藏在日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1-3 号工业技术院生命工学工业技术研究所，国际保藏日期为 1999 年 11 月 19 日，保藏编号为 FERM BP-6940 或 FERM BP-6941 的转化大肠杆

菌 E.coli pBK/m55-1 SANK 72199 株或 E.coli pTrip/h55-1 SANK 72299 株携有的噬菌体粒子中获得。

此外，具有上述 e) 所述核苷酸序列的反义序列的多核苷酸，例如可以将通过上述步骤得到的具有上述 a) 乃至 d) 所述核苷酸序列的反义序列的多核苷酸作为探针，通过噬菌斑杂交法或菌落杂交法从任一哺乳动物的 cDNA 文库（优选肝脏 cDNA 文库）中进行克隆，进而从分离的 cDNA 克隆获得。

再者，具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的反义序列中连续的且至少由 15 个核苷酸构成的部分序列的多核苷酸，如果是数十个核苷酸程度的序列，就可以通过化学合成来得到。或者，也可以将通过上述步骤得到的具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的 cDNA 克隆中的任一部分序列通过 PCR 等亚克隆后，利用与上述同样的方法调制成具有反义序列的探针。

例如，即使是在序列表序列号 1 所述核苷酸序列的反义序列中连续的且由数十个核苷酸构成的部分序列中附加、缺失和/或附加数个核苷酸的核苷酸序列构成的多核苷酸，只要与上述 a) 乃至 e) 任一项所述多核糖核苷酸在严格条件下杂交，就可在本发明的方法中使用。上述多核苷酸可以通过利用化学合成法或聚合酶链反应（以下，称作“PCR”）等的本发明所属技术领域已知的诱变法进行制备。

本发明方法中使用的探针可以由单一的核苷酸序列构成，对此没有特殊的限制。即，本发明的方法中，可以用满足上述要素的多种核苷酸序列的混合物作为探针，也可以分别单独利用上述多种核苷酸序列进行多重检测。

2) RT-PCR 用引物

本发明中进行核酸的检测的另外一种方式为，首先进行以 mRNA 为模板的逆转录酶反应后，进行 PCR 并特异扩增 DNA 片段，即，进行 RT-PCR 的方法。此方法中，为了特异扩增目的核苷酸序列，使用与 mRNA 中特定的部分序列互补的反义引物，以及与由该反义引物并通过逆转录酶反应生成的 cDNA 序列中特定的部分序列互补的有义引物。

可用于逆转录酶及 PCR 两者的反义引物，实质上由上述 a) 乃至 e) 所述核苷酸序列的反义序列中连续的且至少为 18 个核苷酸，优选

至少为 23 个核苷酸的核苷酸序列构成。

另一方面，PCR 中使用的有义引物的序列，由上述 a) 乃至 e) 所述核苷酸序列中、相当于上述反义引物的互补链的序列中存在于比最靠近 5' 末端侧还要靠近 5' 末端侧区域的序列中的连续且至少为 18 个核苷酸，优选至少为 21 个核苷酸的任一部分序列构成。但是，有义引物与反义引物间存在相互互补的序列时，由于引物彼此间的配对，将扩增出非特异性的序列并有可能干扰特异基因的检测，所以优选设计出避免产生类似于上述组合的引物。

这些反义引物及有义引物均可以在上述规定的那些核苷酸序列的 5' 末端附加与上述 a) 乃至 e) 所述核苷酸序列无关的核苷酸序列作为接头。但是，为了不干扰特异基因的检测，上述接头优选为在反应中不与反应液内核酸产生非特异配对的核苷酸序列。

3) 检测基因表达的细胞或动物

可用于本发明方法中的培养细胞，只要是表达具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因的哺乳动物细胞即可。优选来自哺乳动物肝脏的培养细胞（优选初代培养肝细胞），但也可以使用例如将具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因与其启动子区域一起导入的细胞等人工进行转化的细胞（例如，CHO 细胞）。作为哺乳动物种，优选人、小鼠、大鼠或仓鼠，更优选人或小鼠，进而作为优选的细胞，例如高脂血症小鼠 KK 小鼠（可由日本 Kurea 公司购得）的初代培养肝细胞，但不仅限于此。另外，可判断为比使用培养细胞更适合的情况下，也可采用将待测物质投给哺乳动物个体，然后检测从该动物个体摘出的其脏器或组织细胞中具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因的表达式的方法。此时，作为基因表达检测对象的脏器或组织可以是表达具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因的脏器或组织，但优选肝脏。此实施方式中优选的哺乳动物种为人、小鼠、大鼠或仓鼠，更优选人或小鼠。例如作为小鼠可以优选使用上述 KK 小鼠，但本发明并不局限于此。

可用于本发明方法中的培养细胞，只要是可表达具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因的条件（未添加待测物质），即可在任一条件下进行培养。例如，针对该培养细胞确立的培养条件为已知，且在该条件下该细胞表达具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列

的基因时，即可在该条件下进行培养。

4) 待测物质的添加

上述细胞的培养过程中，将待测物质添加到培养基中并培养一定期间。作为待测物质，例如化合物、微生物的代谢产物、植物或动物组织的提取物、它们的衍生物或它们的混合物等。待测物质的给药量或浓度可以适宜进行设定，或例如也可以作成稀释系列等后设定多种给药量。存在待测物质时的培养期间也可以适宜进行设定，但优选 30 分钟乃至 24 小时。将待测物质投给哺乳动物个体时，根据待测物质的物性，分为口服给药、静脉注射、腹腔内注射、透皮给药、皮下注射等给药形式进行使用。

5) 样品的制备

从通过上述步骤培养的细胞提取 RNA 时，在培养结束后优选立即用 RNA 提取用溶剂（例如，含有苯酚等具有灭活核糖核酸酶作用的成分的溶剂）将细胞直接溶解。或者，在不破坏细胞的前提下，通过用细胞刮刀小心刮或用胰蛋白酶等蛋白酶平稳地从培养基材中分离等方法回收细胞后，迅速转至 RNA 提取步骤。

作为 RNA 的提取方法，例如可采用硫氰酸胍-氯化铯超离心法、硫氰酸胍-热酚法、盐酸胍法、酸性硫氰酸胍-苯酚-氯仿法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., (1987) Anal. Biochem., 162, 156-159) 等，优选酸性硫氰酸胍-苯酚-氯仿法。

由得到的 RNA 进一步纯化 mRNA 的方法如下所述。即，已知存在于真核细胞细胞质中的 mRNA 大多数在其 3'末端具有 poly(A) 序列，所以利用这一特征，例如将 mRNA 吸附在生物素化的寡聚(dT) 探针上，然后再利用生物素/链霉抗生物素蛋白之间的结合将 mRNA 捕获在固定化了链霉抗生物素蛋白的顺磁性粒子上，并经过洗涤操作后，通过洗脱 mRNA 来纯化 mRNA。另外，也可以采用将 mRNA 吸附于寡聚(dT) 纤维素柱，然后将之洗脱进行纯化的方法。还可通过蔗糖密度梯度离心等进一步将 mRNA 分级分离。但本发明的方法中，这些 mRNA 的纯化步骤不是必须的，只要可检测出具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因，也可以将总 RNA 用于随后的步骤。

6) 样品的固定

通过核酸杂交进行检测时，为了特异性检测通过上述步骤得到的

RNA 样品中的基因，或者将该 RNA 样品经琼脂糖凝胶电泳后转印至（Northern blot 法）杂交实验用薄膜（以下，略作“薄膜”），或者直接将样品印迹到薄膜上，即，通过斑点印迹法或狭线印迹法等固载于薄膜上。作为这种薄膜，例如可以采用硝酸纤维素薄膜（例如 Amersham Pharmacia 制的 High bond-C pure 等）、正电性尼龙膜（例如 Amersham Pharmacia 制的 High bond-N+等）或亲水性尼龙膜（例如 Amersham Pharmacia 制的 High bond-N/NX 等）等。

作为 Northern blot 用琼脂糖凝胶电泳方法，例如琼脂糖甲酰胺凝胶电泳法，以及用乙二醛和二甲基亚砷处理样品并使样品变性后，用磷酸缓冲液制备的琼脂糖凝胶进行电泳的方法，以及琼脂糖凝胶甲基汞电泳法（以上可参照 Maniatis, T.等（1982）《分子克隆 实验指南》，冷泉港实验室，NY）等，但并不仅限于此。

从电泳后的凝胶中将 RNA 转移至薄膜上，即，作为印迹方法，例如毛细管转移法（Maniatis, T.等（1982）《分子克隆 实验指南》，冷泉港实验室，NY）、真空法、电泳法（Maniatis, T.等（1982）《分子克隆 实验指南》，冷泉港实验室，NY）等，用于斑点印迹法或狭线印迹法的器材也已有市售品（例如 Bio-Rad 制的 Biodot 等）。

印迹结束后，进行将转移至薄膜上的 RNA 固定在薄膜上的操作（该操作根据薄膜的材质而有所不同，并且根据制品不同有时并不需要固定操作）。

7) 探针的标记

对于通过核酸杂交进行检测时，检测通过上述步骤固定的 RNA 样品中的特定的 mRNA 所用的探针的标记方法和检测方法如下所述。

i) 放射性同位素标记

将 DNA 片段或将携有该片段的载体作为材料乃至模板，例如用缺口平移法（例如用 Amersham Pharmacia 制的缺口平移试剂盒等）、随机引物法（例如用 Amersham Pharmacia 制的 multi prime DNA 标记系统等）、末端标记法（例如用宝酒造（株）社制的 Mega label, Amersham Pharmacia 公司制的 3'-末端标记试剂盒等）制备标记 DNA 探针，或通过利用亚克隆模板 DNA 的载体中的 SP6 启动子或 T7 启动子的体外转录法制备标记 RNA。这些探针的检测可通过利用 X 光片或显影板的放射自显影来进行，并且，采用 X 光片时可以用光密度分析法（例如使

用 Bio-Rad 公司制的 GS-700 影像光密度分析仪) 进行定量, 采用显影板时可以用 BAS2000II (富士胶卷制) 系统进行定量。

ii) 酶标记

DNA 或 RNA 片段直接用酶进行标记。标记时所用的酶, 例如碱性磷酸酶 (使用 Amersham Pharmacia 制的 Alkphos Direct system for chemiluminescence 等)、辣根过氧化物酶 (使用 Amersham Pharmacia 制的 ECL direct nucleic acid labeling and detection system 等)。探针的检测, 可通过将薄膜浸渍在含有可由标记的酶的催化反应检测出的底物, 例如含有通过上述催化反应可生成生色底物或发光底物的缓冲液中进行。采用生色底物时可通过目视进行检测, 采用发光底物时与放射性同位素标记时相同, 可通过利用 X 光片或影像显影板的放射自显影或利用快拍相机的拍照进行检测。并且, 采用发光底物时, 也可以进行利用光密度测定仪或 BAS2000II 系统的定量。

iii) 用其它分子进行标记

15 荧光素标记: 将 DNA 片段用缺口平移法、随机引物法、或 3' 末端标记法 (使用由 Amersham Pharmacia 公司购入的 ECL 3'-oligo labeling system 等) 进行标记。或通过利用 SP6、T7 启动子的体外转录标记 RNA。

20 生物素标记: 标记 DNA 的 5' 末端 (使用由 Amersham Pharmacia 公司购入的寡核苷酸-生物素标记试剂盒等), 或将 DNA 片段用缺口平移法、随机引物法等进行标记。

地高辛修饰 dUTP 标记: 将 DNA 片段用缺口平移法、随机引物法等进行标记。

25 这些标记分子的检测过程均包括将可特异结合已标记分子的分子用放射性同位素或酶标记后, 再结合在探针上的步骤。作为可特异结合分子, 例如采用荧光素或地高辛时为抗荧光素抗体或抗地高辛抗体, 采用生物素时为抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白。结合在这些探针上后, 可通过用该标记的放射性同位素或酶并按照上述 i) 或 ii) 所述的同样方法进行检测。

30 8) 杂交

杂交可采用本发明所属技术领域中公知的方法进行。关于本发明中杂交溶液或洗涤液的组成, 杂交温度或洗涤温度, 例如可按照文献

(《生物实验图解说明 4》, p148, 秀润社刊) 所述进行, 但优选条件如下所述。

杂交溶液: ExpressHyb Hybridization Solution (ClonTech 公司制);

- 5 探针的终浓度(采用放射性标记探针时): 1 乃至 2×10^6 cpm/ml (优选 2×10^6 cpm/ml);

杂交温度及时间: 68°C , 1 乃至 24 小时;

膜的洗涤条件:

- 10 i) 将在 0.1 乃至 $5 \times \text{SSC}$ (最优选 $2 \times \text{SSC}$)、0.05 乃至 0.1% SDS (最优选 0.05%) 十二烷基硫酸钠 (以下, 略作 “SDS”) 中, 于室温乃至 42°C (最优选室温) 振荡 20 乃至 60 分钟 (最优选 20 分钟) 的操作, 交换洗涤液反复 2 乃至 6 次 (最优选 3 次);

- 15 ii) 上述 i) 后, 在 $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 中, 于 50 乃至 65°C 振荡 20 乃至 60 分钟的操作, 交换洗涤液反复 2 乃至 6 次。或在 0.2 乃至 $0.5 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 中, 于 62 乃至 65°C 振荡 20 乃至 60 分钟的操作, 交换洗涤液反复 2 乃至 6 次。最优选在 $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 中, 于 50°C 振荡 20 分钟的操作, 交换洗涤液反复 3 次。

- 20 洗涤结束后, 如上述 7) 所述, 结合探针的标记法进行检测及定量。另外, 将已知在每单位细胞中表达量稳定的基因 (例如, 用于检测 23kDa 高碱性蛋白质、 α -微管蛋白、甘油醛-3-脱氢酶、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶、磷脂酶 2、核糖体蛋白质 S9、泛醌等基因表达的探针已有市售) 在各样品中的表达量, 出于对由各样品间 RNA 量的差别导致的不均衡进行补正的目的而同时进行测定, 然后以该稳定性表达基因的表达量为标准, 将待测对象基因表达量的相对值, 通过在施用待测物质的细胞组和未施用的细胞组之间进行比较, 可进行更为精确的评价。

其结果, 可使具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因的表达量降低的待测物质可作为高脂血症的治疗或预防剂。

9) RT-PCR 反应

- 30 通过 RT-PCR 检测核酸的方式中, 各反应的条件如下所述。另外, 用于 RT-PCR 检测的样品, 通常没有必要纯化至 poly (A)⁺RNA。

i) 逆转录酶反应

反应液组成的例子（总量 20 μ l）：

总 RNA 适量；

氯化镁 2.5 乃至 5mM（优选 5mM）；

5 1 $\times$ RNA PCR 缓冲液（10mM Tris-盐酸（25 $^{\circ}$ C 时的 pH 为 8.3 乃至 9.0，优选 8.3）、50mM 氯化钾）；

dNTPs 0.5 乃至 1mM（优选 1mM）；

反义引物 1 μ M（作为反义引物的代用品，可以添加市售的随机引物或寡聚（dT）引物（12-20 个核苷酸）2.5 μ M）；

逆转录酶 0.25 乃至 1 单位/ μ l（优选 0.25 单位/ μ l）；

10 用灭菌水调至 20 μ l。

反应温度条件：

30 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟（只限于使用随机引物时）后，于 42 乃至 60 $^{\circ}$ C（优选 42 $^{\circ}$ C）保温 15 乃至 30 分钟（优选 30 分钟），再于 99 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟使酶失活，然后于 4 乃至 5 $^{\circ}$ C（优选 5 $^{\circ}$ C）冷却 5 分钟。

15 ii) PCR

反应液组成的例子：

氯化镁 2 乃至 2.5mM（优选 2.5mM）；

1 $\times$ PCR 缓冲液（10mM Tris-盐酸（25 $^{\circ}$ C 时的 pH 为 8.3 乃至 9.0，优选 8.3）、50mM 氯化钾）；

20 dNTPs 0.2 乃至 0.25mM（优选 0.25mM）；

反义引物及有义引物 0.2 乃至 0.5 μ M（优选 0.2 μ M）；

Taq 聚合酶 1 乃至 2.5 单位（优选 2.5 单位）

用灭菌水将总量调节至 80 μ l，将该总量加到结束逆转录反应的反应液总量中，然后开始 PCR。

25 反应温度条件：首先于 90 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟后，90 乃至 95 $^{\circ}$ C（优选 94 $^{\circ}$ C）加热 30 秒，然后将 40 乃至 60 $^{\circ}$ C（优选在根据引物特性算出的解链温度（ T_m ）至比其低 20 $^{\circ}$ C 的温度范围内）30 秒、70 乃至 75 $^{\circ}$ C（优选 72 $^{\circ}$ C）1.5 分钟的温度循环反复 28 乃至 50 个循环（优选 28 个循环），最后于 4 $^{\circ}$ C 进行冷却。

30 PCR 反应结束后，反应液进行电泳，检测是否扩增出目的大小的条带。进行定量检测时，将预先进行系列稀释的 cDNA 克隆作为标准的模板 DNA，在相同条件下进行 PCR，并确定可进行定量检测的温度

循环次数，或者，例如每 5 个循环取一部分反应液样品分别进行电泳。另外，例如也可通过在进行 PCR 反应时使用放射性标记 dCTP，以条带持有的放射能的量作为指标进行定量。

- 比较来自在待测物质存在下培养的细胞的样品和来自在待测物质非存在下培养的细胞的样品之间的检测结果，可知降低了具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因的表达量的待测物质可作为高脂血症的治疗或预防剂。

10) 其他方法

- 作为测定具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因的表达量的方法，例如可以举出以下所述的方法。

- i) 核糖核酸酶保护分析 (RNase protection assay)：只将 RNA 样品中具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的 mRNA (其中，序列中的 t 改为读作 u) 与标记探针进行杂交，形成双链多核苷酸后，在样品中添加核糖核酸酶并孵育，此时，与探针杂交的 mRNA 由于形成双链而免于核糖核酸酶的降解，其余 RNA 由于被降解掉，所以只残留该双链多核苷酸 (如果探针比检测出的 mRNA 短，将残留与探针链长相当的双链多核苷酸)。通过定量该双链多核苷酸，测定目的基因的表达量。具体的例如可参照以下所述方法。

- 为了将未形成双链残留的标记探针与双链多核苷酸完全进行分离并为了使定量易于进行，残留的标记探针优选核糖核酸酶进行降解，此时，核糖核酸酶如果使用也可以降解单链 DNA 的酶，则标记探针可以是 DNA 或 RNA。标记探针的制备方法可以参照上述 1) 乃至 7) 所述的方法，但此方法中所用的探针的长度优选为 50 乃至 500 个核苷酸左右。另外，将双链 DNA 直接标记后只进行热变性的探针等混有互补链的探针在本方法中并不适用。

- RNA 探针例如可以采用下述方法进行制备。首先，将模板 DNA 插入到具有噬菌体启动子 (T7、SP6、T3 启动子等) 的质粒载体 (例如，Promega 公司制的 pGEM-T 等) 中。然后，将此重组质粒用限制酶在插入片段的紧下游一个位点切断降解。以得到的直链 DNA 作为模板，在放射能标记的核糖核苷酸存在下进行体外转录反应。适应于载体中的启动子，该反应中可以使用 T7、SP6 或 T3 聚合酶等酶。以上操作，例如可以采用核糖探针系统-T7、同一系统的 SP6 或同一系统的 T3

(均为 Promega 公司制) 进行。

到制备 RNA 样品的步骤如上述 3) 乃至 5) 所述。取相当于制备的总 RNA 样品 10 乃至 20 μ g 的 RNA 样品以及相当于 5×10^5 cpm 的过量的标记探针进行核糖核酸酶保护分析。这一操作可以采用市售的试剂盒 (HybSpeed RPA Kit, Ambion 公司制) 进行。核糖核酸酶降解后得到的样品在含有 8M 脲的 4 乃至 12% 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳后, 使胶干燥, 用 X 光片进行放射自显影。通过以上操作, 可检测出免于核糖核酸酶降解的双链多核苷酸条带, 而该条带的定量可以按照上述 7) 中 i) 所述的方法进行。进而, 与进行 Northern blot 分析时同样, 出于对由各样品间 RNA 量的差别导致的不均衡进行补正的目的, 同时对 β -肌动蛋白基因的表达量进行测定的话, 可以进行更为精确的评价。

如上所述, 比较来自在待测物质存在下培养的细胞的样品和来自在待测物质非存在下培养的细胞的样品之间的检测结果, 可知降低了具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因的表达量的待测物质可作为高脂血症的治疗或预防剂。

ii) 连缀转录分析 (Run-on assay, 参照 Greenberg, M. E. and Ziff, E. B. (1984) Nature 311, 433-438, 以及 Groudine, M. et al. (1981) Mol. Cell Biol. 1, 281-288): 本方法是从细胞中分离核后测定目的基因的转录活性的方法, 而非如上所述的检测细胞内 mRNA 的方法, 但在本发明中包括在“检测基因表达量的方法”中。用分离的细胞核在试管内进行转录反应时, 分离核之前已经开始转录并只进行生成的 mRNA 链继续延伸的反应。在该反应进行时添加放射性标记的核糖核苷酸标记正在延伸的 mRNA, 进而通过检测其中含有的与非标记探针杂交的 mRNA, 可以测定分离核时的目的基因的转录活性。为了确定待测物质的影响最为显著的时间数据, 可采取对于将待测物质添加在培养细胞中起至分离核为止的时间, 例如从添加 30 分钟后、1 小时后、2 小时后、4 小时后、8 小时后及 24 小时后的细胞中分离核, 然后分别进行试验的方法等。具体的操作过程除了按照上述 1) 所述的方法制备非标记探针之外, 其余均按上述参照文献所述的方法进行。通过以上步骤, 比较来自在待测物质存在下培养的细胞的样品和来自在待测物质非存在下培养的细胞的样品之间的检测结果, 可知降低了具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因的表达量的待测物质可作为高脂血症的治

疗或预防剂。

iii) DNA 芯片分析、DNA 微阵列分析

[1]获取探针用样品的制备

首先，提取纯化来自在待测物质存在下培养的细胞的样品、以及来自在待测物质非存在下培养的细胞的样品的 mRNA。到制备 RNA 样品的步骤如上述 3) 乃至 5) 所述。

[2]探针的标记

作为用于制备 DNA 芯片分析或 DNA 微阵列分析用探针的起始材料，例如可以使用未纯化的总 RNA，但优选通过上述 5) 所述的方法纯化的 poly (A)⁺RNA。

利用核酸杂交进行检测时，探针的标记方法和检测方法如下所述。

用 Affymetrix 公司制 DNA 芯片进行分析时所用的探针：按照 Affymetrix 公司制 DNA 芯片中附带的方案，利用生物素标记的 cRNA 探针。

用 DNA 微阵列进行分析时所用的探针：通过逆转录酶反应由 poly (A)⁺RNA 制备 cDNA 时，通过加入荧光色素（例如 Cy3、Cy5 等）标记的 d-UTP 等荧光标记 cDNA。此时，分别用不同的色素标记来自在待测物质存在下培养的细胞的样品、以及来自在待测物质非存在下培养的细胞的样品的话，则以后进行杂交时可混合使用两者。

用滤膜进行分析时所用的探针：通过逆转录酶反应由 poly (A)⁺RNA 制备 cDNA 时，通过加入放射性同位素（例如 ³²P、³³P）标记的 d-CTP 等标记探针。

[3]固定样品

作为用于与上述步骤[2]得到的标记探针杂交的固定样品，例如以下列出的样品。

固定以数据库的 EST (expressed sequence tag) 序列或 mRNA 序列为基础合成的反义寡核苷酸的基因芯片 (Affymetrix 公司制) (Lipshutz, R. J. et al. (1999) Nature genet. 21, suppliment, 20-24) :

上述 EST 序列或 mRNA 序列优选与用于探针制备的细胞为同种动物来源，但不仅限于此，例如也可以使用近缘种动物来源的序列。但是，使用的是将具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因、

在 Genbank 数据库上作为编码“血管生成因子相关蛋白质 3”的核苷酸序列已知的基因、或含有它们中任一个的部分序列的序列进行固定的样品。

- 5 固定由与用于探针制备的细胞为同种乃至近缘动物的脏器组织（优选肝脏）、或由从该脏器组织分离或株化的细胞得到的 mRNA 制备的 cDNA 乃至 RT-PCR 产物的 DNA 微阵列或滤膜：

- 10 这些 cDNA 或 RT-PCR 产物，例如能够以作为 mRNA 材料的动物的 EST 数据库等的序列信息为基础合成引物后，通过实施逆转录酶反应或 PCR 来进行克隆化。作为制备样品的材料，使用的是表达具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因、在 Genbank 数据库上作为编码“血管生成因子相关蛋白质 3”的核苷酸序列已知的基因的细胞（优选来源于肝脏细胞）。作为该 cDNA 或 RT-PCR 产物，也包括预先将表达量有差异的 mRNA 通过削减法（subtraction method, Diatchenko, L. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93, 6025-15 6030）、差异显示法（Kato, K. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 3685-3690）等进行筛选而制备的产物。另外，DNA 微阵列或滤膜也可以使用含有作为检测对象的基因，即在 Genbank 数据库上作为编码“血管生成因子相关蛋白质 3”的核苷酸序列已知的基因的市售品，也可以制备用定位器（spotter）将具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因20 进行固定的 DNA 微阵列或滤膜（例如，宝酒造（株）社制的 GMS417 阵列等）。

在该固定材料上，用上述[2]中制备的探针，在相同条件下分别、或混合后同时进行杂交（Brown, P. O. et al. (1999) Natrue genet. 21, suppliment, 33-37）。

25 [4]分析

采用 Affymetrix 公司制 DNA 芯片进行分析时：按照 Affymetrix 公司制 DNA 芯片中附带的方案，进行杂交及分析。

- 30 采用 DNA 微阵列进行分析时：例如采用宝酒造（株）社的市售 DNA 微阵列时，按照宝酒造（株）社的方案进行杂交及洗涤，用荧光信号检测仪（例如宝酒造（株）社制的 GMS418 阵列扫描仪等）检测荧光信号后，进行分析。

采用滤膜时：杂交可以按照本发明所属技术领域众所周知的方

法进行。例如，进行杂交及洗涤后，用分析装置（例如 ClonTech 公司制 Altasimage 等）进行分析。

上述所有情况均是将同一批固定样品分别与来自从在待测物质存在下培养的细胞得到的样品的探针、以及来自从在待测物质非存在下培养的细胞得到的样品的探针杂交。此时，除使用的探针以外，其余杂交条件相同。如上述[2]中所述，用不同的荧光色素标记各个探针时，也可以将两种探针的混合物与一个固定样品进行杂交（Brown, P. O. et al. (1999) Natrue genet. 21, supplement, 33-37）。

分析的结果，测定来自从在待测物质存在下培养的细胞得到的样品的探针、以及来自从在待测物质非存在下培养的细胞得到的样品的探针两者之间与固定样品的靶基因，即具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因、或具有编码“血管生成因子相关蛋白质 3”的核苷酸序列的基因杂交的探针量。其结果，比较与靶基因杂交的探针量后，在来自从在待测物质存在下培养的细胞得到的样品的探针一方少于来自从在待测物质非存在下培养的细胞得到的样品的探针时，待测物质为抑制具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因表达的物质，所以可作为高脂血症的治疗或预防剂。

iv) 其它

除上述以外，作为用来自在待测物质存在下培养的细胞的样品特异性检测与来自在待测物质非存在下培养的细胞的样品相比可降低具有上述 a) 乃至 e) 任一项所述核苷酸序列的基因表达量的待测物质的方法，例如以下的方法。

即，可利用在单一的反应中将 PCR 与杂交探测（Hybridization Probing, 以下略作“探测”）组合的已知称作“Taqman”的技术（Holland, P. M. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7276-7280），以及在单一反应中将 PCR 与探测组合的方法（Higuchi et al. Biotechnology, 10, 413-417 (1992)）。在后一个方法中，将受到紫外线激发后会发出荧光的核酸检测试剂溴化乙锭添加到 PCR 反应液中。存在双链 DNA 时由于可增加溴化乙锭的荧光，照射激发光时可检测出的荧光的增加可与双链 PCR 产物的蓄积相关。

作为将 PCR 扩增与探测相组合的其它方法，也可以利用欧洲专利申请公开第 0601899 号公报记载的方法。再者，也可以用 Light cycler

系统（Roche diagnostics 公司制，参照日本专利公开 2000-312600 号公报）定量 mRNA 量。

（B）多肽的检测

以下，作为本发明方法的另一种实施方式，例如检测在上述检测基因表达的实施方式中作为检测对象的基因所编码的多肽的方法。在此实施方式中，将样品中的多肽固定于 96 孔板的孔内底面或膜等后，用特异性识别靶多肽的抗体进行检测。其中，采用 96 板的方法是通常称为固相酶免疫定量法（ELISA 法）或放射性同位素免疫定量法（RIA 法）的方法。另一方面，作为固定在膜上的方法，例如样品经聚丙烯酰胺电泳后将多肽印迹在膜上的方法（Western blot 法），或直接将样品或其稀释液浸染在膜上的方法，即，所谓的斑点印迹法或狭线印迹法。

1) 样品的制备

与在上述检测多肽的实施方式中使用的培养细胞种类相关的条件，与上述检测基因表达的实施方式时相同。并且，也可采用将待测物质投给哺乳动物个体，然后将从该动物个体提取的血清作为样品的方法。此时，优选的哺乳动物种为人、小鼠、大鼠或仓鼠，更优选人或小鼠。例如，作为小鼠可优选使用高脂血症小鼠 KK 小鼠，但本发明不受此限制。对于培养细胞的培养条件、待测物质的给药方法，也与检测基因表达的实施方式时相同。另外，作为需要研究作为高脂血症的治疗或预防剂的活性的待测物质，例如化合物、微生物的代谢产物、植物或动物组织的提取物、它们的衍生物或其它它们的混合物等。

作为用于制备本实施方式中样品的材料，可以使用在待测物质存在下或非存在下培养的细胞培养的培养上清或细胞质组分，但优选培养上清。培养上清是在培养结束后回收，根据需要经膜过滤灭菌后提供给 ELISA/RIA 用样品或 Western blot 用样品的制备步骤。

作为 ELISA/RIA 用样品，例如直接使用回收的培养上清，或使用用缓冲液进行适度稀释的稀释物。

Western blot 用（电泳用）样品的制备方法如下所述。首先，例如将培养上清用三氯乙酸处理以使蛋白质沉淀，然后通过离心分离得到沉淀。将该沉淀用冰冷的丙酮洗涤并风干后，溶解在 SDS-聚丙烯酰胺电泳用且含 2-巯基乙醇的样品缓冲液中（Bio-Rad 公司制等）。

进行斑点/狭线印迹时，例如将回收的培养上清直接或用缓冲液适度稀释后，通过使用印迹装置等直接吸附在膜上。

2) 样品的固定

5 为了特异性检测由上述步骤得到的样品中的多肽，将该样品进行固定。作为 Western blot 法、斑点印迹法或狭线印迹法中使用的膜，例如硝酸纤维素膜(例如，Bio-Rad 公司制等)、尼龙膜(例如，Amersham Pharmacia 公司制 High bond-ECL 等)、棉膜(例如，Bio-Rad 公司制 Blot absorbent filter 等)或聚偏二氟乙烯(PDVF)膜(例如，Bio-Rad 公司制等)等。

10 作为将多肽从电泳后凝胶转移至膜上的所谓印迹方法，例如湿式印迹法(CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY volume2 ed by J. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober)、半干式印迹法(参照上述 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY volume2)等。用于斑点印迹法或狭线印迹法的器材
15 也已有市售品(例如，Bio-Rad 的 Biodot 等)。

另一方面，为了用 ELISA 法/RIA 法进行检测及定量，在专用的 96 孔板(例如，Nunc 公司制 Immunoplate maxi soap 等)中装入样品或其稀释液(例如用含有 0.05%叠氮钠的磷酸缓冲生理盐水(以下略作“PBS”)稀释的稀释物)后，通过在 4℃乃至室温放置过夜或在 37℃
20 放置 1 乃至 3 小时，使多肽吸附在孔内底面进行固定。

3) 抗体

本实施方式中使用的抗体，例如特异识别上述 A) 中含有 a) 至 e) 所述核苷酸序列的基因在动物细胞中表达产生的多肽，优选由序列表
25 序列号 2 的氨基酸序号 17-455(更优选氨基酸序号 19-455)所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分，或由序列号 4 的氨基酸序号 17-460 所示氨基酸序列构成的多肽或其一部分的抗体。作为这种抗体的优选例子，例如与由序列表序列号 2 中氨基酸序号 17-455(更优选氨基酸序号 19-455)所示氨基酸序列构成的多肽及由序列号 4 中氨基酸序号 17-460 所示氨基酸序列构成的多肽中任意一方结合，但不与其它任何
30 小鼠或人蛋白质结合的抗体。

本实施方式中的抗体，可通过常规方法将用作抗原的蛋白质或选自其氨基酸序列的任意多肽免疫动物，并通过提取纯化体内产生的抗

体来得到。另外,按照公知的方法(例如 Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody p.365-367, 1980, Prentice Hall Press, N.Y.), 通过融合产生针对本发明蛋白质的抗体的抗体生成细胞与骨髓瘤细胞构建杂交瘤, 也可以得到单克隆抗体。

- 5 作为用于制备本实施方式中使用的抗体的抗原, 例如由序列表序列号 2 中氨基酸序号 17-455 (优选氨基酸序号 19-455) 所示氨基酸序列构成的多肽或由其至少 6 个连续的部分氨基酸序列构成的多肽, 或由序列号 4 中氨基酸序号 17-460 所示氨基酸序列构成的多肽或由其至少 6 个连续的部分氨基酸序列构成的多肽, 或在这些多肽上附加任意氨基酸序列或载体形式的衍生物, 但优选在由序列表序列号 9 中氨基酸序号 1-14 构成的多肽的 C 末端或在由序列号 10 中氨基酸序号 1-14 所示氨基酸序列构成的多肽的 N 末上, 将钥孔藤血蓝蛋白作为载体进行结合的抗原。

- 15 由序列表序列号 2 中氨基酸序号 17-455 (优选氨基酸序号 19-455) 所示氨基酸序列构成的多肽或由序列号 4 中氨基酸序号 17-460 所示氨基酸序列构成的多肽, 例如可以将序列表序列号 1 中核苷酸序号 47-1411 所示核苷酸序列或序列表序列号 3 中核苷酸序号 78-1457 所示核苷酸序列编码的多肽通过基因操作在宿主细胞中进行生产来得到。具体来说, 通过将具有上述核苷酸序列的 DNA 整合到适当的载体 DNA 中, 转化其它原核生物或真核生物的宿主细胞。进而, 通过在这些载体中导入适当的启动子以及与性状表达有关的序列, 使基因在各种宿主中的表达成为可能。

- 25 作为原核细胞的宿主, 例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等。用目的基因转化这些宿主细胞时, 用含有来自与宿主相适应的物种的复制子, 即, 用含有复制起点和调控序列的载体转化宿主细胞。作为载体, 优选具有可赋予转化细胞以表现性状 (表现型) 的选择性的序列的载体。

- 30 例如, 作为大肠杆菌通常使用 K12 株等, 作为载体通常使用 pBR322 或 pUC 系列的质粒, 但不局限于此, 可以使用所有公知的各种菌株及载体。

作为启动子, 在大肠杆菌中, 例如色氨酸 (*trp*) 启动子、乳糖 (*lac*) 启动子、色氨酸-乳糖 (*tac*) 启动子, 脂蛋白 (*lpp*) 启动子、多肽链延

伸因子 Tu (TufB) 启动子等, 这些启动子中的任一种均可用于目的多肽的生产。

作为枯草杆菌例如优选 207-25 株, 作为载体可使用 pTUB228 (Ohmura, K. et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93) 等, 但并不局限于此。
5 也可以连接上编码枯草杆菌 α -淀粉酶的信号肽序列的 DNA 序列, 进行菌体外的分泌表达。

真核细胞的宿主细胞包括脊椎动物、昆虫、酵母等的细胞, 作为脊椎细胞, 例如通常使用猿猴细胞 COS 细胞 (Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182; ATCC CRL-1650) 或中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞, ATCC
10 CCL-61) 的二氢叶酸还原酶缺失株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4126-4220) 等, 但并不局限于此。

作为脊椎动物细胞的表达载体, 通常可以使用具有位于待表达基因上游的启动子、RNA 剪接位点、多腺苷化位点、以及转录终止序列等的载体, 进而其中根据需要还可以具有复制起点。作为该表达载体
15 的例子, 例如具有 SV40 早期启动子的 pSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1854-1864) 等, 但并不局限于此。

作为宿主细胞使用 COS 细胞时, 作为表达载体可以使用具有 SV40 复制起点, 可在 COS 细胞中自主复制, 且还具有转录启动子、转录终止信号、以及 RNA 剪接位点的载体。该表达载体可通过二乙基氨基乙
20 基 (DEAE)-葡聚糖法 (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res, 11, 1295-1308)、磷酸钙-DNA 共沉淀法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) Virology 52, 456-457)、以及电脉冲穿孔法 (Neuman, E. et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845) 等导入 COS 细胞中, 进而可以得到目的转化细胞。另外, 作为宿主细胞使用 COS 细胞时,
25 除表达载体之外, 还可同时共转染可表达发挥抗生素 G418 抗性筛选标记作用的 neo 基因的载体, 例如共转染 pRSVneo (Sambrook, J.等 (1989) 《分子克隆 实验指南》, 冷泉港实验室, NY) 或 pSV20-neo (Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341) 等, 并通过筛选 G418 抗性的克隆, 可以得到稳定产生目的多肽的转化
30 细胞。

将昆虫细胞作为宿主细胞使用时, 鳞翅类夜蛾科的草地夜蛾

(*Spodoptera frugiperda*) 卵巢细胞的株化细胞 (Sf-9 或 Sf-21) 或粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 卵巢细胞的 High Five 细胞 (Wickham, T. J. et al, (1992) *Biotechnol. Pro. I*: 391-396) 等通常可作为宿主细胞使用, 作为杆状病毒转移载体, 通常可使用利用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 的多角体蛋白质启动子的 pVL1392/1393 (Kidd, I. M. and V. C. Emery (1993) *The use of baculoviruses as expression vectors. Applied Biochemistry and Biotechnology* 42, 137-159)。其余的也可以使用利用杆状病毒 P10 或杆状病毒碱性蛋白质的启动子的载体。再者, 也可以将 AcNPV 被膜表面蛋白质 GP67 的分泌信号序列连接在目的蛋白质的 N 末端侧, 形成重组蛋白质并以分泌蛋白质的形式进行表达 (Zhe-mei wang, et al. (1998) *Biol. Chem.*, 379, 167-174)。

作为以真核微生物为宿主细胞的表达体系, 通常熟知的是酵母, 其中优选酵母菌属酵母, 例如面包酵母酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或石油酵母毕赤巴斯德酵母 (*Pichia pastoris*)。作为该酵母等真菌微生物的表达载体, 例如可优选利用乙醇脱氢酶基因的启动子 (Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3018-3025) 或酸性磷酸酶基因的启动子等。另外, 以分泌型蛋白质的形式进行表达时, 也能够以具有分泌信号序列和在 N 末端侧具有宿主细胞内源性蛋白酶或已知蛋白酶的切割位点的重组体形式进行表达。例如, 已知在石油酵母中表达胰蛋白酶型丝氨酸蛋白酶的人肥大细胞胰蛋白酶的体系中, 通过在 N 末端侧连接酵母 α 因子的分泌信号序列和石油酵母的 KEX2 蛋白酶的切割位点后进行表达, 可将活性型胰蛋白酶分泌在培养基中 (Andrew, L. Niles, et al. (1998) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28, 125-131)。

由上述方法得到的转化体可按照常规方法进行培养, 通过该培养, 可在细胞内或细胞外生成目的多肽。作该培养中使用的培养基, 可以根据采用的宿主细胞适宜选择惯用的各种培养基, 例如, 培养上述 COS 细胞时, 可在 RPMI1640 培养基或 Dulbecco 改进 Eagle 培养基 (以下略作 “DEME”) 等培养基中, 根据需要添加胎牛血清等血清成分后进行使用。

通过上述培养, 在转化体的细胞内或细胞外生成的重组蛋白质, 可通过利用该蛋白质的物理性质或化学性质等的各种公知的分离操作

方法进行分离纯化。作为该方法，具体的例子可举出用通常的蛋白沉淀剂进行处理、超滤、分子筛色谱（凝胶过滤）、吸附色谱、离子交换色谱、亲和色谱、高速液相色谱（HPLC）等各种液相色谱、透析法、以及这些方法的组合等。另外，通过在进行表达的重组蛋白质上连接6个组氨酸残基，可用镍亲和柱有效地进行纯化。通过组合上述方法，可以更为轻松地制备高收率、高纯度的本发明多肽。

由上述方法得到的抗体可以应用在 RIA 法、ELISA 法、荧光抗体法、受体血细胞凝集反应法等和各种免疫学测定方法或免疫组织染色法等中。

10 4) 检测

由上述 3) 所述方法得到的抗体可直接标记后用于检测，或以该抗体为一抗，与特异性识别该抗体（识别来自制备抗体的动物的抗体）的标记二抗协同用于检测。

作为标记的种类，优选酶（碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶）或生物素（增加在二抗的生物素上再结合酶标记链霉抗生物素蛋白的操作），但并不局限于此。对于使用标记二抗（或标记链霉抗生物素蛋白）的方法，预先标记过的抗体（或链霉抗生物素蛋白）已有种种市售品。采用 RIA 法时，使用标记 I^{125} 等放射性同位素的抗体，测定采用液闪计数器等进行。

20 通过检测这些标记的酶的活性，可以测定抗原多肽的量。使用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶时，通过这些酶的催化而生色的底物或发光的底物已有市售。

采用生色底物时，在 Western blot 法或斑点/狭线印迹法中能够以目测的方式进行测定。在 ELISA 法中，优选利用市售的微量板读数器测定各孔的吸光度（测定波长因底物不同而有所差异），进而进行定量。并且，优选将上述 3) 中制备抗体时使用的抗体调制为稀释系列，将该稀释系列作为标准抗原样品并与其它样品同时进行检测操作，通过制作将标准抗原浓度与测定值线性化的标准曲线，可以定量其它样品中的抗原浓度。

30 另一方面，使用发光底物时，在 Western blot 法或斑点/狭线印迹法中可通过利用 X 光片或显影板的放射自显影或利用快拍相机的拍摄来进行检测，也可以利用光密度分析仪或 BAS2000II 系统进行定量。

另外，在 ELISA 法中使用发光底物时，利用发光微量板读数器（例如，Bio-Rad 公司制等）测定酶活性。

5) 测定操作

i) 采用 Western blot 法、斑点印迹法或狭线印迹法时

- 5 首先，为了防止抗体的非特异性吸附，预先进行在含有可防止发生上述非特异性吸附的物质的缓冲液中将膜浸渍一定时间的操作（封闭）。可以使用封闭液的组成中例如含有 5%脱脂乳、0.05 乃至 0.1%Tween20 的磷酸缓冲生理盐水（PBS）或 Tris 盐酸生理盐水（TBS）。替代脱脂乳，也可以使用 1 乃至 10%牛血清白蛋白、0.5 乃至 10 3%明胶或 1%聚乙烯吡咯烷酮等。封闭时间为 4℃下 16 乃至 24 小时，或室温下 1 乃至 3 小时。

- 随后，将膜用含 0.05 乃至 0.1%Tween20 的 PBS 或 TBS（以下称作“洗涤液”）洗涤，除去残余的封闭液后，用上述 3）所述方法制备的抗体在用洗涤液适度稀释的溶液中浸渍一定时间，使抗体结合在膜上的抗原上。此时的抗体稀释倍数，例如可以将上述 3）所述重组抗原的阶段稀释物作为样品进行预 Western blot 实验来确定。该抗体反应操作，优选在室温进行 1 小时。抗体反应操作结束后，用洗涤液洗涤膜。这里，使用的抗体为已标记抗体时，可以直接进行检测操作。使用未标记抗体时，随即进行二抗反应。标记二抗例如使用市售品时，20 用洗涤液稀释 2000 倍乃至 20000 倍后使用（附带的指导书中描述了适宜的稀释倍数时，按该描述进行稀释）。将洗涤除去一抗后的膜在二抗溶液中室温浸渍 1 乃至 3 小时，用洗涤液洗涤后，根据标记方法进行检测操作。洗涤操作例如首先在洗涤液中将膜振荡 15 分钟后，将洗涤液更换为新的并振荡 5 分钟，然后再度更换洗涤液并振荡 5 分钟。25 根据需要还可更换洗涤液进行洗涤。

ii) ELISA/RIA

- 首先，为了防止抗体非特异性吸附在用上述 2）所述方法固定样品的板的孔内底面，与 Western blot 时相同，预先进行封闭。封闭条件与 Western blot 项所述的相同。

- 30 其次，将孔内部用含 0.05 乃至 0.1%Tween20 的 PBS 或 TBS（以下称作“洗涤液”）洗涤，除去残余的封闭液后，分注入用洗涤液适度稀释由上述 3）所述方法制备的抗体的溶液，并温育一定时间，使抗体

结合在抗原上。此时的抗体稀释倍数，例如可以将上述3)所述重组抗原的阶段稀释物作为样品进行预ELISA实验来确定。该抗体反应操作，优选在室温进行1小时。抗体反应操作结束后，用洗涤液洗涤孔内部。这里，使用的抗体为已标记抗体时，可以直接进行检测操作。

- 5 使用未标记抗体时，随即进行二抗反应。标记二抗例如使用市售品时，用洗涤液稀释2000倍乃至20000倍后使用（附带的指导书中描述了适宜的稀释倍数时，按该描述进行稀释）。将二抗溶液分注入洗涤除去一抗后的孔中，于室温温育1乃至3小时，用洗涤液洗涤后，根据标记方法进行检测操作。洗涤操作例如首先将洗涤液分注到孔中振荡5
- 10 分钟后，将洗涤液更换为新的并振荡5分钟，然后再度更换洗涤液并振荡5分钟。根据需要还可更换洗涤液进行洗涤。

- 在本发明中，所谓夹心ELISA法例如可以通过以下所述方法实施。首先，从序列表序列号2中氨基酸序号17-455（优选氨基酸序号19-455）所示氨基酸序列及序列号4中氨基酸序号17-460所示氨基酸
- 15 序列的任一个中选出2个亲水性区域，合成由各区域中6个氨基酸残基构成的部分肽，取得以该部分肽作为抗原的2种抗体。将其中一个抗体按上述4)所述的方法进行标记。未标记的抗体按上述2)所述的方法固定在96孔ELISA用板的孔内底面。封闭后，将样品液加到孔内部并于常温温育1小时。将孔内部洗涤后，分注入标记一方的抗体稀
- 20 释液进行温育。再次洗涤孔内部后，根据标记方法进行检测操作。

6) 评价

- 用以上所述的方法，比较来自在待测物质存在下培养的细胞的样品和在待测物质非存在下培养的细胞的样品之间的检测结果，由结果可知，降低了用上述3)所述方法制备的抗体特异结合的多肽的产量的
- 25 待测物质可用作高脂血症的治疗或预防剂。另外，通过组合用上述3)所述方法制备的抗体和其它上述一系列反应中使用的试剂，可提供用于检验高脂血症的治疗或预防剂的试剂盒。

- 本发明方法中作为检测对象的多肽，可按照获取上述抗体制备用抗原的方法所述得到之外，也可利用整合具有序列表序列号1中核苷
- 30 酸序号47-1411所示核苷酸序列或序列表序列号3中核苷酸序号78-1457所示核苷酸序列的DNA的腺病毒载体在动物细胞中产生。作为构建上述重组腺病毒载体的方法，例如利用市售的试剂盒（例如，宝酒

造(株)社制的腺病毒表达载体试剂盒)的方法。在本发明方法中作为检测对象的基因与哺乳动物血中中性脂肪浓度密切相关,例如将具有由上述方法得到的重组腺病毒载体的重组腺病毒感染哺乳动物、例如感染小鼠后,表达该重组腺病毒载体携有的基因,并通过观察血中中性脂肪浓度的上升来加以证明,以及通过先天性低脂血症小鼠中具有序列表序列号1中核苷酸序号47-1411所示核苷酸序列的基因的表达量少于高脂血症小鼠来加以证明。

另外,利用通过基因操作的得到的、以高效表达的方式导入含有上述a)乃至e)任一项所述核苷酸序列的外源基因的非人动物检验高脂血症的治疗或预防剂的方法也包括在本发明中。该方法中使用的动物,例如感染上述重组腺病毒的KK/San小鼠、或将具有序列表序列号1中核苷酸序号47-1411所示核苷酸序列或序列表序列号3中核苷酸序号78-1457所示核苷酸序列的DNA导入小鼠的转基因小鼠等,但并不局限于此。

转基因动物可以从动物体取得受精卵,并向其中导入基因后,移植到拟妊娠动物体内并通过使其发生来得到,关于这一过程的顺序,可以参照已确立的方法[参照《发生工程学实验手册》,野村达次监修,胜木原也编著,1987年刊;《小鼠胚胎操作手册》,B. Hogan, F. Costantini and E. Lacy编著,山内一也、丰田裕、岩仓洋一郎翻译,1989年刊;特公平5-48093号公报等]。具体过程为,例如以小鼠为实验对象时,首先将排卵诱导剂投给雌性小鼠(优选血中中性脂肪浓度低于正常水平的小鼠,例如优选KK/San小鼠,但不局限于此)后,与同系雄鼠交配,第二天从雌性小鼠输卵管中提取前核受精卵。然后,用微小玻璃管将欲导入的DNA片段溶液注入到受精卵的前核中。此外,作为促使导入基因在动物细胞内表达的启动子或增强子等调控基因,只要可在导入的动物细胞内发挥作用,就对此没有限制。注入DNA的受精卵移植到拟妊娠养母雌性小鼠(Slc:ICR等)的输卵管中,约20天后通过自然分娩或切开子宫生出。作为确认由此得到的动物是否保持有导入的基因的方法,例如从该动物的尾巴等部位提取DNA,以该DNA为模板并利用导入基因特异性的有义和反义引物进行PCR的方法,以及用数种限制酶消化该DNA后进行电泳,将凝胶中的DNA印迹到硝酸纤维素膜或尼龙膜上后,以将导入基因的全部或一部分进行

标记的 DNA 作为探针进行 Southern blot 的方法等。另外，对于导入基因在体内是否确实进行表达，可通过测定外周血中的中性脂肪浓度加以确认。导入基因在动物体内确实进行表达时，与未导入基因的动物相比血中的中性脂肪浓度变高。

- 5 将待测物质投给由上述步骤得到的基因导入动物，筛选可降低血中中性脂肪浓度的物质（优选也将待测物质投给未导入基因的动物后，对结果进行比较，并筛选可显著降低基因导入动物中的血中中性脂肪浓度的物质）。根据该方法，除抑制或阻碍导入基因的表达的物质之外，可发现有助于该基因编码的多肽本身的功能表达、或与该多肽相互作用进而有助于该多肽功能表达的因子（例如受体）等，阻碍与通过该多肽的作用使血中中性脂肪浓度的上升有关的任意生物体反应的物质。这种物质也可作为高脂血症的治疗或预防剂。
- 10

本发明还涉及特异结合在本发明方法中作为检测对象的多肽（以下，略作“检测对象多肽”）的、抗体以外的多肽，即检测对象多肽的受体。该受体为存在于细胞膜上的蛋白质时，例如可通过以下所述的方法克隆该受体。首先，构建可在哺乳动物细胞中表达由序列表序列号 1 中核苷酸序号 47-1411 所示核苷酸序列或序列表序列号 3 中核苷酸序号 78-1457 所示核苷酸序列构成的 DNA 的重组载体，导入 COS-1 细胞后回收培养上清，纯化检测对象多肽的重组多肽。将得到的重组多肽用荧光素异硫氰酸酯（下，略作“FITC”）进行标记。然后，将标记重组多肽添加到来自种种哺乳动物组织的培养细胞中，鉴定标记重组多肽特异结合在细胞膜上的细胞，即表达受体的细胞。将来自自己鉴定细胞的 cDNA 文库整合到可在哺乳动物细胞中进行表达的载体中，在不表达受体的细胞（优选 COS-1 或 CHO，更优选 CHO 细胞）中进行表达。在表达该 cDNA 文库的细胞中添加上述 FITC 标记的重组多肽，培养一定时间后回收细胞，用细胞分类器筛选结合 FITC 标记重组多肽的细胞。从得到的细胞中用 PCR 等克隆导入的 cDNA。根据需要重复以上操作，最终克隆出编码特异结合 FITC 标记重组多肽的受体的 cDNA。另外，受体本身可从由上述步骤克隆化的细胞中回收。

15

20

25

- 30 由此，如果可得到编码检测对象多肽的受体的 cDNA，则可利用作为该 cDNA 文库材料的细胞筛选阻碍检测对象多肽与该受体之间相互作用的物质、通过结合在该受体上发挥与检测对象多肽同样的功能的

物质、或阻碍由检测对象多肽和该受体之间相互作用起始的信号传递的物质。具体来说，例如通过限制酶消化等将小鼠基因组 DNA 适宜片段化，将在它们的一端连接编码绿色荧光蛋白质（green fluorescent protein，作为报告试验用载体，ClonTech 公司制的 pEGFP-1 已有市售）的 DNA 的载体，导入作为上述 cDNA 文库材料的细胞中。在该细胞的培养过程中，添加检测对象多肽的重组多肽（未进行标记），并用细胞分类器筛选生成绿色荧光蛋白质的细胞。筛选出的细胞在该重组多肽存在下生成绿色荧光蛋白质。在 96 孔培养板中培养该细胞并使每孔细胞数大致相等，然后或只添加待测物质，或同时添加该重组多肽和待测物质后培养一定时间，用荧光微量板读数计测定绿色荧光蛋白质的生成量。只添加待测物质进行培养时，若可生成绿色荧光蛋白质的话，则可认为该待测物质是检测对象多肽的促效剂。另一方面，同时添加该重组多肽和待测物质的孔中的绿色荧光蛋白质的生成量少于单独添加该重组多肽的孔时，该物质为检测对象多肽的拮抗剂或为该多肽的信号传递抑制剂，并可认为可用作于高脂血症的治疗或预防剂。

由上述步骤得到的拮抗剂为蛋白质或多肽时，具有编码该蛋白质或多肽的核苷酸序列的多核苷酸可用于高脂血症的基因治疗。这种多肽例如可通过分析已鉴定的拮抗剂蛋白质或多肽的氨基酸序列，并合成由编码该氨基酸序列的核苷酸序列组成的寡核苷酸后，通过筛选种种 cDNA 文库或基因组文库来得到。另外，具有拮抗活性的多肽来自随机合成的人工多肽库时，化学合成由编码该多肽的氨基酸序列的核苷酸序列组成的 DNA。基因治疗过程中，例如将编码由上述方法得到的拮抗剂的多核苷酸整合到病毒载体中，用具有该重组病毒载体的病毒（经灭毒化处理）感染患者。由此，患者体内生成拮抗剂，并抑制由序列表序列号 4 所示氨基酸序列构成的多肽的功能，进而可降低血中的中性脂肪浓度。

作为将基因治疗剂导入细胞内的方法，利用病毒载体的基因导入方法、或非病毒性的基因导入方法（《日经科学》，1994 年 4 月号，20-45 页；《实验医学增刊》，12（15）（1994）；《实验医学别册 基因治疗的基础技术》，羊土社（1996））两种方法均可适用。

作为利用病毒载体的基因导入方法，例如在反转录病毒、腺病毒、

腺病毒相关病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、痘病毒、脊髓灰质炎病毒、Sindbis 病毒等 DNA 病毒或 RNA 病毒中整合编码 TR4 或变异 TR4 的 DNA 的方法。其中，特别优选利用反转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒、牛痘病毒的方法。作为非病毒性的基因导入方法，例如将表达质粒直接注入到肌肉内的方法（DNA 疫苗法）、脂质体法、脂转染法、微注射法、磷酸钙法、电穿孔法等，特别优选 DNA 疫苗法、脂质体法。

另外，将基因治疗剂作为医药实际使用时，例如将 DNA 直接导入到体内的体内（in vivo）法，以及从人体中取出某种细胞后，在体外将 DNA 导入该细胞，并将该细胞重新移植到体内的体外（ex vivo）法（《日经科学》，1994 年 4 月号，20-45 页；《月刊药事》，36（1），23-48（1994）；《实验医学增刊》，12（15）（1994））。

例如，该基因治疗剂以体内法形式施用，根据疾病和症状等，可通过静脉、动脉、皮下、皮内、肌肉内等适当的给药途径施用。另外，以体内法形式施用，通常可以将该基因治疗剂制成注射剂的形式，但根据需要也可加入常规载体。再者，以脂质体或膜融合脂质体（仙台病毒脂质体等）形式施用，可以制成悬浮剂、冻干剂、离心分离浓缩冻干剂等脂质体制剂形式。

与序列表序列号 3 中核苷酸序号 78-1457 所示核苷酸序列的部分序列互补的核苷酸序列可用于所谓的反义治疗中。反义分子能够以与序列表序列号 3 中核苷酸序号 78-1457 所示核苷酸序列的部分序列互补并通常由 15 乃至 30mer 构成的 DNA 形式，或其硫代磷酸酯、甲基磷酸酯或吗啉衍生物等稳定的 DNA 形式，2'-O-烷基 RNA 等稳定的 RNA 形式使用。这种反义分子可以通过微量注入、脂质体胶囊化、或利用具有反义序列的载体进行表达等本发明技术领域众所周知的方法导入到细胞中。这种反义疗法对于可通过降低序列表序列号 3 中核苷酸序号 78-1457 所示核苷酸序列编码的蛋白质活性来治疗的疾病，特别是对于高脂血症的治疗有效。

可用作含有上述反义寡核苷酸的医药的组合物，可通过混合可药用载体等公知的方法制造。作为这种载体及制造方法，例如记载于 Remington 的《药物科学》中。此外，在含有序列表序列号 3 中核苷酸序号 78-1457 所示核苷酸序列的基因的表达或其基因产物的活性异常的高脂血症的治疗过程中，对于患者个体使用足够量的药物。该有效

量可以根据个体的状态、体重、性别、以及年龄等各种因素，或根据皮下、局部、口服及肌肉内等给药方法进行变化。例如，进行静脉注射时，以 0.02 乃至 0.2mg/kg/小时使用 2 小时，进行皮下给药时，给药量则变为 1 乃至 200mg/m²/天。

5

附图的简单说明

图 1 是来自 KK 小鼠脏器的样品的 Northern blot 分析结果。图右侧的数字（28S 及 18S）表示标准 RNA 的沉降系数。

图 2 是将基因导入 COS-1 细胞培养上清作为样品时的 Western blot 分析结果。图左侧的数字表示分子量标准的分子量（单位为 KDa）。

10

图 3 是将基因导入 HeLa 细胞培养上清作为样品时的 Western blot 分析结果。图左侧的数字表示分子量标准的分子量（单位为 KDa）。

图 4 是感染重组腺病毒的 KK/San 小鼠外周血中中性脂肪浓度的测定结果。

图 5 是来自 KK 小鼠及感染重组腺病毒的 KK/San 小鼠肝脏的样品的 Northern blot 分析结果。图左侧的数字表示标准 RNA 的沉降系数。

实施发明的最佳方式

以下，结合实施例对本发明进行更为详细的说明，但本发明并不局限于此。另外，在下述实施例中，如果不对有关基因操作的各操作过程加以特别说明时，则根据《分子克隆》（Sambrook, J., Fritsch, E. F.及 Maniatis, T.编著，冷泉港实验室出版，1989 年发刊）中所述的方法进行，或采用市售的试剂盒时，则按照市售品的指导书进行使用。

20

参考例 1. cDNA 的克隆

以小鼠肝脏作为材料，按照下述方法得到具有序列号 1 中所示核苷酸序列的 cDNA。

25 a) 从小鼠肝脏提取 mRNA

解剖 2 只 9 周龄的 KK 小鼠（雄性，获自滨松医科大学附属动物实验设施），摘出肝脏后，迅速置于液氮中急速冷冻。测定其重量，取 3.1g 在液氮存在下于研钵中进行粉碎。加入 5.5M 硫氰酸胍（以下，略作 GT）缓冲液（5.5M 硫氰酸胍，25mM 柠檬酸钠（pH7.0），0.5% 十二烷基肌氨酸钠，0.2M β-巯基乙醇）30ml，用研磨棒破碎组织，加入新的 GT 缓冲液 10ml，用研磨棒破碎后，回收溶解液。用 GT 缓冲液 20 ml 洗涤研钵后，该溶液也进行回收。将 36 ml 回收液 3000rpm、

30

10℃离心 10 分钟后，将上清转移至新试管中，各用 18 号注射针反复抽打 20 次。然后用三氟乙酸铯 (CsTFA) 进行密度梯度离心，分离总 RNA。将 19 ml CsTFA 原液用 18.924 ml 无核糖核酸酶重蒸水稀释，取 6.18 ml 该稀释液分别装到 6 支 13PA (Beckmann 制) 管中，并将先前回收的样品 (每管 5.2 ml) 置于稀释液的上层。将该管用备有旋转转子 (日立工机 (株) 社制 P40ST) 的超离心机 (日立 SCP70H 型) 于 30000rpm (约 125000g)、20℃离心 20.5 小时后，将除去上清得到的沉淀悬浮于 mRNA 纯化试剂盒 (Amersham Pharmacia 公司制的 Quick prep mRNA 纯化试剂盒) 附带的提取缓冲液 3.3 ml 中。mRNA 的纯化按照该纯化试剂盒附带的方案进行。将由此得到的 5μg mRNA 作为模板，按照 cDNA 文库制备试剂盒 (Stratagene 公司制的 ZAP express cDNA Giga pack III gold cloning Kit) 附带的方案使用试剂盒，制备λ噬菌体 cDNA 文库。

b) cDNA 文库的第一次筛选

将感染由上述 a) 所述方法得到的λ噬菌体 cDNA 文库的大肠杆菌涂布在直径 9cm 的琼脂培养皿 (NZY 培养基: 0.5%氯化钠, 0.2%硫酸镁 7 水合物, 0.5%酵母提取物, 1%酪蛋白水解物, 1.5%琼脂) 上, 并使每个平皿形成 1.8×10^5 个噬菌斑, 37℃培养 8 小时。在该形成噬菌斑的琼脂培养基的 14 个位置上, 用 250μl 大口径移液枪枪头 (RAININ 公司制) 的尖头部分, 连带噬菌斑挑取琼脂培养基, 将这些琼脂培养基片置于分别装有 100μl SM 缓冲液 (0.1M 氯化钠, 8mM 硫酸镁, 50mM Tris-盐酸 (pH7.5), 0.01%明胶) 的塑料离心管中, 用振荡混合器激烈混悬并在 4℃放置 1-2 小时后, 12000×g 离心 5 分钟, 回收上清作为噬菌体悬浮液。

另一方面, 作为 PCR 中使用的引物, 将具有下述核苷酸序列的寡核苷酸, 用 DNA 自动合成仪 (型号 394, (株) Perkin-Elmer 日本应用生物技术系统事业部制), 按照亚磷酰胺法 (Matteucci, M. D., and Caruthers, M. H. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191) 合成。

引物 1: 5'-gactgatcaa atatgttgag ctt-3' (序列表序列号 5)

以及引物 2: 5'-tgcattccaga gtggatccag a-3' (序列表序列号 6)

将由上述方法得到的噬菌体悬浮液 5μl 与 2.5μl 的 10×PCR 用缓冲液 (宝酒造 (株) 社制的 Taq 聚合酶附带)、4μl 的 dNTP 混合液 (各

2.5mM, 宝酒造(株)社制的 Taq 聚合酶附带)、各 1 μ l 分别调节至 7.5 μ M 的上述引物 1 及 2、0.25 μ l 的 Taq 聚合酶(宝酒造(株)社制)、11.25 的灭菌水混合, 首先在 94 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟后, 接着将 94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒作为一个温度循环, 进行 30 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 保温 7 分钟后, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。反应物在 4%琼脂糖凝胶(用 FMC BioProducts 公司制的 NuSieve3:1 琼脂糖调制)进行电泳, 分析特异扩增的片段。由此对 14 个噬菌体悬浮液进行筛选的结果, 得到了 2 个特异扩增目的 cDNA 片段的阳性样品。

2) 第二次筛选

10 以小鼠基因组 DNA (ClonTech 公司制) 100ng 为模板, 按上述 b) 所述条件进行 PCR, 进行琼脂糖凝胶电泳回收扩增的 DNA 片段。以该 DNA 片段为模板, 进行生成用 multi-prime DNA 标记系统 (Amersham Pharmacia 公司制) 标记 32 P 的 DNA 片段的反应后, 将反应液注入到镍柱 (Amersham Pharmacia 公司制) 中。将该柱用 400 μ l 的 TE (10mM Tris-盐酸 (pH7.5), 1mM EDTA) 洗涤一次, 再用 400 μ l 的 TE 洗涤并回收洗脱液。将该洗脱组分的全部作为以下第二次筛选的标记探针。

20 另一方面, 将在上述 b) 中判断为阳性的噬菌体悬浮液用 SM 缓冲液稀释 100 倍, 用其中 2 μ l 噬菌体悬浮液感染大肠杆菌后, 涂布于直径 9cm 琼脂培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 8 小时。在该形成噬菌斑的琼脂培养基上, 覆盖上合乎平皿内经的圆形尼龙膜 (Amersham Pharmacia 公司制的 High bond N+), 4 $^{\circ}$ C 放置 5 分钟转移噬菌斑。用 18G 注射针在膜的三个位置上穿透至琼脂培养基做上三个位置契合用标记后, 剥离膜后依次浸渍在碱溶液 (1.5M 氯化钠, 0.5M 氢氧化钠) 2 分钟, 中和溶液 (1.5M 氯化钠, 0.5M Tris-盐酸 (pH8.0)) 5 分钟, 含 2 $\times$ SSC、0.2M Tris-盐酸 (pH7.5) 的溶液中 30 秒钟后, 在室温完全风干。

30 将该膜在 20ml 杂交溶液 (ClonTech 公司制的 ExpressHyb 杂交液) 中 68 $^{\circ}$ C 保温 1 小时后, 换成含标记探针的 8ml 杂交溶液于 68 $^{\circ}$ C 保温 6 小时。然后, 将该膜于含 2 $\times$ SSC、0.05%SDS 的溶液中反复进行 3 次室温缓缓振荡 15 分钟的洗涤操作, 再用含 0.1 $\times$ SSC、0.1%SDS 的溶液反复进行 3 次 50 $^{\circ}$ C、30 分钟的洗涤操作。

洗涤后的膜进行放射自显影, 将确认为阳性的位置上的原噬菌斑

从琼脂培养基中回收，将该噬菌体悬浮液用上述 b) 所述条件进行 PCR，结果表明 10 个阳性噬菌斑样品中有 6 个可以特异扩增 DNA 片段。

将其中扩增结果最理想的样品的噬菌体悬浮液，用 ZAP express
5 cDNA Giga pack III gold 克隆试剂盒 (Stratagene 公司制) 中附带的辅助噬菌体及宿主菌，并按照该试剂盒中附带的方案进行体内剪切 (in vivo excision)，在琼脂培养基上形成含噬菌体粒子的大肠杆菌菌落。分离这些菌落并分别提取噬菌体粒子，用上述 b) 所述方法进行 PCR 的结果，筛选特异扩增 DNA 片段的菌落并进行培养，分离携有具有
10 1.6kbp cDNA 插入片段的噬菌体粒子 #55-1 的转化大肠杆菌 E.coli pBK/m55-1 SANK 72199。

得到的噬菌体粒子 #55-1 中插入的 cDNA 全长核苷酸序列用 (株) Perkin Elmer 日本应用生物技术系统事业部制的 ABI prism 337DNA 测序仪或 3700DNA 测序仪进行分析的结果，可知为序列表序列号 1 中所
15 示序列 (其中，序列表序列号 1 中核苷酸序号 1-8 为来自载体的衔接序列)。该序列与在 GenBank 数据库中注册为小鼠血管生成因子相关蛋白质 3 的序列 (注册号: AF162224) 相同。另外，携有该噬菌体粒子 #55-1 的转化大肠杆菌 E.coli pBK/m55-1 SANK 72199 于 1999 年 (平成 11 年) 11 月 19 日委托日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1-3 号的工业技术
20 院生命工学工业技术研究所进行国际保藏，保藏编号为 FERM BP-6940。

实施例 1. Northern blot 分析

a) 从小鼠脏器提取总 RNA

为了研究表达参考例 1 中得到的 cDNA 的组织，进行 Northern blot
25 分析。首先，从 KK 小鼠 (高脂血症小鼠) 及 KK/San 小鼠 (低脂血症变异小鼠，白木等，第 7 届糖尿病动物研究会 (1993 年)) 的睾丸 (testis)、脾脏 (spleen)、肾脏 (kidney)、小肠 (small intestine)、肝脏 (liver) 及脑 (brain) 中提取总 RNA。解剖 18 周龄的 KK 小鼠及 KK/San 小鼠，分别摘出各脏器后，迅速置于液氮中急速冷冻后，于
30 -80℃ 保存。对于脏器 0.5g 加入约 15ml 的 TRIzol 试剂 (Gibco BRL 公司制)，用超速匀浆器 Polytoron (Ckinematica 公司制) 在冰中进行匀浆 (6 级 2 分种)。将此在室温静置 5 分钟后，加入 3ml 氯仿并用手

激烈颠倒混合 15 秒。再于室温静置 3 分钟后，于 $12000\times g$ 、 4°C 离心 15 分钟。离心后回收上清，加入 0.8 体积不含核糖核酸酶的异丙醇进行混合。将此在室温静置 10 分钟，于 $12000\times g$ 、 4°C 离心 10 分钟后，去除上清并加入不含核糖核酸酶的 70% 乙醇。将此于 $12000\times g$ 、 4°C 离心 10 分钟后，去除上清并干燥沉淀后，于 -80°C 保存。

b) 总 RNA 的电泳及印迹

用不含核糖核酸酶的重蒸水将回收的各脏器总 RNA 调节至 $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 后，将该 RNA 液 $5\mu\text{l}$ 与 RNA 样品缓冲液 ($1.15\times\text{MOPS}$ 缓冲液 ($1\times\text{MOPS}$ 缓冲液含有 20mM MOPS, 5mM 乙酸钠, 1mM 乙二胺四乙酸 (以下, 略作 “EDTA”)) , 2.4M 甲醛, 57% 甲酰胺, 7% 甘油, $18\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴酚蓝, $18\mu\text{g}/\text{ml}$ 二甲苯胺, 0.18mM EDTA) $16\mu\text{l}$ 混合, 65°C 保温 10 分钟后, 在冰上放置 5 分钟。将该溶液全部注入到含 1.17% 福尔马林的电泳用琼脂糖凝胶 ($1\times\text{MOPS}$ 缓冲液, 1.17% 琼脂 (Bio-Rad 公司制的高强度分析用琼脂), 0.66M 甲醛) 的 1 个上样孔中进行电泳。电泳过程为, 在放入含 $500\text{ng}/\text{ml}$ 溴化乙锭的 $1\times\text{MOPS}$ 缓冲液的 submarine 电泳槽中, 于 50V 通电约 1 小时后, 再于 100V 通电约 1.5 小时。电泳结束后, 将琼脂糖凝胶中的 RNA 按毛细管转移法 (Maniatis, T. 等 (1982) 《分子克隆 实验指南》, 冷泉港实验室, NY) 转移过夜 (转移用溶液使用 $20\times\text{SSC}$) 至尼龙膜 (Amersham Pharmacia 公司制的 High bond N+) 上。将该膜用 $2\times\text{SSC}$ 洗涤 5 分钟后, 风干, 用交联用紫外线照射装置 (Tomi-精工 (株) 社制的 Spectrolinker XL-1000) 进行紫外线照射 ($1200\text{J}/\text{cm}^2$) 以固定 RNA。

c) 探针的制备

用参考例 1 的 b) 中合成的引物, 使用 Thermal cycler ((株) Perkin Elmer 日本应用生物技术系统事业部制的 Gene amplifier PCR 系统 9600) 并在以下的条件进行 PCR。首先, 在引物 (终浓度分别为 $0.5\mu\text{M}$) 和 Tween20 (Sigma 公司制, 终浓度 0.1%) 中加入灭菌水调节总量至 $7.5\mu\text{l}$ 后, 添加 $2\times\text{PCR}$ solution premix Taq (宝酒造 (株) 社制, 含 0.05 单位/ μl Taq 聚合酶, 0.4mM dNTPs, 20mM Tris-盐酸 (pH8.3), 100mM 氯化钾, 3mM 氯化镁) $7.5\mu\text{l}$ 。再加入小鼠基因组 DNA (ClonTech 公司制) $1\mu\text{l}$ (相当于 100ng), 调制反应液。将该反应液先在 94°C 加热 3 分钟后, 进行 35 个 94°C 30 秒、 55°C 1 分钟、 72°C 45 秒的温度循环,

然后于 4℃ 保存。

取该 PCR 后的反应液 1μl, 按 TA 克隆试剂盒 (Invitrogen 公司制的 Dual promoter version A) 附带的方案使用该试剂盒, 将扩增的 DNA 片段克隆到质粒载体中。用该重组质粒载体转化感受态大肠杆菌, 在含 50μg/ml 的氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上进行培养。其结果, 筛选出显示氨苄青霉素抗性并生长的大肠杆菌菌落, 用 4ml 含 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基 37℃ 培养过夜。从其中 3.5ml 的培养液中用质粒自动提取装置 (Kurabo 公司制的 PI-50) 回收质粒 DNA。对得到的质粒 DNA 进行核苷酸序列分析, 将插入目的 PCR 产物的质粒用于以下的操作。

将筛选的质粒 DNA 8μg 用限制酶 EcoRI 消化后, 进行酚/氯仿萃取、乙醇沉淀, 得到的沉淀溶解于灭菌水 10μl 中。该溶液中加入着色液 (0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯胺, 15% Ficoll (型号 400)) 2μl, 将全部进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (胶浓度 8%, 100V, 室温 3 小时)。电泳后的凝胶用溴化乙锭染色后, 在紫外线照射下用刀片将相当于目的 DNA 的条带 (约 200bp, 序列表序列号 11) 部分的凝胶片切出, 转移到微量离心管中进行粉碎。向其中加入 300μl 抽提缓冲液 (0.5M 醋酸铵, 10mM EDTA (pH8.0), 0.1% SDS), 37℃ 保温过夜后, 进行酚/氯仿萃取 2 次, 乙醇沉淀 1 次, 将沉淀用灭菌水 20μl 溶解。

对于得到的 DNA 溶液 5μl, 按照参考例 1 的 c) 中所述方法制备 ³²P 标记的探针 (400μl)。

d) 杂交

将上述 b) 中制成的膜放入 20ml 杂交溶液 (ClonTech 公司制的 ExpressHyb 杂交液) 中, 68℃ 孵育 1 小时 (预杂交) 后, 在含 ³²P 标记探针的 20ml 杂交溶液中 68℃ 孵育过夜。然后, 将膜在含 2×SSC、0.05% SDS 的溶液中室温 20 分钟洗涤 3 次。再于含 0.1×SSC、0.1% SDS 的溶液中 50℃ 20 分钟洗涤 3 次后, 进行放射自显影。

其结果, 只在肝脏中发现有检测基因的表达, 并且其表达量在 KK/San 小鼠 (低脂血症小鼠) 中明显要比在 KK 小鼠 (高脂血症小鼠) 中低 (图 1)。

上述实验体系中, 例如由在待测物质存在下或非存在下培养的 KK 小鼠初代培养肝细胞制备 RNA 样品, 通过进行以后步骤同样的操作,

可研究待测物质作为高脂血症的治疗或预防剂的效果。该实验中降低检测基因的表观量的待测物质可作为高脂血症的治疗或预防剂。同时处理多个检测样品时，也可以省去电泳步骤而进行斑点印迹或狭线印迹。

5 参考例 2. 人 cDNA 的克隆

1) 探针的制备

为了获得对应于序列表序列号 1 所示小鼠 cDNA 的人 cDNA，合成了具有下述核苷酸序列的寡核苷酸。

5'-tctctagtt atttctcca g-3' (序列表序列号 7)，以及

10 5'-tggtttgccca gcatagatc-3' (序列表序列号 8)

然后，混合人基因组 DNA (Boehringer 公司制，200mg/ml) 1 μ l、Taq 聚合酶 (宝酒造 (株) 社制的 rTaq，5 单位/ μ l) 1 μ l、10 $\times$ PCR 用缓冲液 (宝酒造 (株) 社制) 10 μ l、dNTP 混合液 (各 2.5mM) 16 μ l、20 μ M 引物各 2 μ l、以及灭菌水 68 μ l。将此反应液于 94 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟后，
15 接着反复 30 次 94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒的温度循环，最后于 72 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟后，于 4 $^{\circ}$ C 保存。将该反应液用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳后，切出扩增 DNA 条带部分的凝胶片并进行纯化。将由此得到的 DNA 用 DNA 标记试剂盒 (宝酒造 (株) 社制的 BcaBest 标记试剂盒) 标记上 32 P 后，作为下述 2) 中的探针。

20 2) cDNA 文库的第一次筛选

将市售的人肝脏 cDNA 文库 (ClonTech 公司制的 Human Liver 5'-STRETCH cDNA 文库) 中 1×10^6 个噬菌斑的 DNA 固定在尼龙膜上。即，将感染 cDNA 文库的大肠杆菌涂布在 20 个直径 9cm 的琼脂培养皿上，每个平皿形成 5×10^4 个噬菌斑，37 $^{\circ}$ C 培养 8 小时。在该形成噬菌斑
25 的琼脂培养基上，覆盖上合乎平皿内径的圆形尼龙膜 (Amersham Pharmacia 公司制的 High bond N+)，4 $^{\circ}$ C 放置 5 分钟转移噬菌斑。用 18G 注射针在膜的三个位置上穿透至琼脂培养基做上三个位置契合用标记后，剥离膜后依次浸渍在碱溶液 (1.5M 氯化钠，0.5M 氢氧化钠) 2 分钟，中和溶液 (1.5M 氯化钠，0.5M Tris-盐酸 (pH8.0)) 5 分钟，
30 含 2 $\times$ SSC、0.2M Tris-盐酸 (pH7.5) 的溶液中 30 秒钟后，在室温完全风干。然后，用交联用紫外线照射装置 (Tomi-精工 (株) 社制的 Spectrolinker XL-1000) 照射紫外线 (1200J/cm 2) 以固定 DNA。

将由此制成的膜在含上述 1) 中得到的标记探针的杂交溶液 (ClonTech 公司制的 ExpressHyb 杂交液) 中 65℃ 孵育过夜。然后, 将膜用含 2×SSC、0.05%SDS 的溶液于室温洗涤 3 次, 每次 15 分钟, 然后再于含 0.1×SSC、0.1%SDS 的溶液 50℃ 洗涤 3 次, 每次 30 分钟, 5 然后进行放射自显影。

其结果, 将与确定为阳性信号的位置契合的噬菌斑, 连带培养基从上述琼脂培养基中抠出, 分别放入 100μl 的 SM 缓冲液 (0.1M 氯化钠, 8mM 硫酸镁, 50mM Tris-盐酸 (pH7.5), 0.01%明胶) 中充分悬浮后, 于 4℃ 放置 2 小时, 然后 12000×g 离心 5 分钟并回收上清。

10 用由此得到的 1 次阳性噬菌体液再次感染大肠杆菌后, 在直径 9cm 的琼脂培养皿上进行培养, 使每个平皿形成 500 个噬菌斑。通过重复上述操作进行第二次筛选。用得到的 2 次阳性克隆噬菌体感染大肠杆菌 BM 25.8 (ClonTech 公司制) 后, 于 37℃ 在琼脂培养基上进行培养, 形成含噬菌体粒子的大肠杆菌菌落。分离菌落, 用液体培养基进行小量培养后提取噬菌体粒子, 用限制酶酶切进行插入片段的分析, 结果 15 分离出携有含 1.6kbp 插入片段的克隆 #h5-1 的大肠杆菌 E.coli pTrip/h55-1 SANK 72299。分析该克隆中插入片段的核苷酸序列的结果, 与在 GenBank 数据库中注册为人血管生成因子相关蛋白质 3 的 cDNA 序列 (注册号: AF152562) 一致 (序列表序列号 3, 其中, 序列表序列号 3 中核苷酸序号 1-14 为来自载体的衔接序列)。另外, 携有 20 该噬菌体粒子 #h55-1 的转化大肠杆菌 E.coli pTrip/h55-1 SANK 72299 于 1999 年 (平成 11 年) 11 月 19 日委托日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1-3 号的工业技术院生命工学工业技术研究所进行国际保藏, 保藏编号为 FERM BP-6941。

25 实施例 2. 多克隆抗体的制备

为了制备识别序列表序列号 1 及序列号 3 所示核苷酸序列编码的氨基酸序列、即具有序列表序列号 2 及序列表序列号 4 所示氨基酸序列的多肽的抗体, 作为抗原, 用化学合成法合成了具有选自这些小鼠及人多肽之间保守性区域的 2 种氨基酸序列的多肽 (使用仪器: Perkin 30 Elmer 公司制的型号 433)。

Glu-Pro-Lys-Ser-Arg-Phe-Ala-Met-Leu-Asp-Asp-Val-Lys-Cys (55-1-N1, 序列表序列号 9), 以及

Cys-Gly-Glu-Asn-Asn-Leu-Asn-Gly-Lys-Tyr-Asn-Lys-Pro-Arg (55-1-C1, 序列表序列号 10)

其中, 55-1-N1 的氨基酸序列由于在随后要结合钥孔藤血蓝蛋白 (以下, 略作“KLH”) 作为载体, 所以在原有氨基酸序列的 C 末端附加上半胱氨酸残基。另一方面, 55-1-C1 中结合 KLH 的 N 末端的半胱氨酸为原有氨基酸序列自身携带的。

其次, 将合成肽 55-1-N1 11.1mg 及 KLH 21.5mg, 或 55-1-C1 10.2mg 及 KLH 21.2mg 分别用 N-(6-马来酰亚胺己酰氧基) 琥珀酰亚胺 (EMCS, 同仁化学研究所 (株) 社制) 试剂进行缩合 (作为缩合反应溶剂使用含 8M 脲、0.9% 氯化钠的 0.02M 磷酸缓冲液 (pH7.5), 于室温保温 15 小时)。将该反应液加到 8M 脲溶液中后, 对流动水进行透析, 再对纯水进行透析后进行冻干, 得到结合 KLH 的肽抗原。向这些肽抗原约 10mg 中加入 1ml 生理盐水, 用超声波振荡器 (sonicator)、振荡混合器、玻璃棒等制成细致均匀的悬浮液。然后, 用生理盐水将总量调节至 7.5ml, 再取 1ml 分装到小瓶中冷冻保存。

进行免疫时, 将 1 份上述小瓶的抗原溶液进行融解并与等量的佐剂混合后, 分别在两只兔子的背上进行皮下或皮内注射。佐剂使用弗氏完全佐剂, 第 2 次以后的免疫过程中则改为使用弗氏不完全佐剂。免疫是每隔 2 周进行 4 次, 第 2 次免疫后进行试验采血, 血清中的抗体效价用固相法的酶联免疫测定法 (ELISA) 进行测定。将各抗原肽涂在 96 孔 ELISA 用微量板中, 使用辣根过氧化物酶标记抗兔 IgG 抗体作为二抗。第 4 次免疫起 13 天后进行完全采血。

采血后, 用亲和柱纯化抗体。即, 在使 N-(6-马来酰亚胺己酰氧基) 琥珀酰亚胺 (EMCS, 同仁化学研究所 (株) 社制) 和氨基烷基琼脂糖 (Bio-Rad 公司制的 Affigel 102) 反应后活化的载体 EMC-琼脂糖 (约 5ml) 上结合多肽 (55-1-N1 为 7.82mg, 55-1-C1 为 8.07mg)。未反应的 EMC 基用 0.1M 盐酸巯基乙胺 (含 5mM EDTA) 进行处理使之惰化。用 PBS (含 0.02M 磷酸缓冲液 (pH7.0), 0.9% 氯化钠) 将抗血清 8ml 稀释 2 倍, 用硫酸铵沉淀 (终浓度 40%) 法得到沉淀物, 将该沉淀物溶解于 PBS 中, 脱盐后用 PBS 进行透析, 将该透析液作为粗 IgG 组分。分 3 批用亲和柱进行色谱操作。即, 将 1/3 的粗 IgG 组分上样到亲和柱中, 反复 3 次将直接通过的组分再次上样到柱中的操作。合并

直接通过部分和洗脱液得到的 40ml 作为非吸附组分进行收集。为了除去非特异结合在柱上的物质，用含 1M 氯化钠的 PBS 充分洗涤后，用 4M 氯化镁溶液、3.5M 硫氰酸钾溶液及 0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液（pH2.3）依次洗涤柱子，将与结合在柱载体上的多肽特异结合的抗体作为亲和纯化抗体进行洗脱。目的抗体由于含在 4M 氯化镁溶液及 3.5M 硫氰酸钾溶液的洗脱液中，因此将各洗脱液用 PBS 进行透析后，用作以下操作中的抗体。

实施例 3. COS-1 细胞中的表达及 Western blot 分析

将参考例 2 中得到的 #h5-1 噬菌体粒子 DNA 用限制酶 EcoRI 和 XbaI 消化，进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后，用实施例 1 的 c) 中所述的方法分离纯化含 cDNA 的约 1.6kb 片段。另一方面，将高效表达载体 pME18S (Hara, T. et al. (1992) EMBO. J. 11, 1875-; 《生物技术手册第 3 辑 基因克隆实验方法》，横田崇、新井贤一编著，羊土社，p18-20) 同样用 EcoRI 和 XbaI 消化，末端脱磷酸化后，用 DNA 连接试剂盒 (宝酒造 (株) 社制的 version2) 与上述 cDNA 片段连接。用该 DNA 转化大肠杆菌，对得到转化株携有的质粒 DNA 进行限制酶分析，筛选携有 1.6kb DNA 片段的菌株命名为 pMEh55-1。

然后，将携有 pMEh55-1 的转化大肠杆菌在含 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 100ml 液体 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。从该培养液中，用质粒纯化试剂盒 (Promega 公司制的 Wizard purefection 质粒 DNA 纯化系统) 回收 pMEh55-1 DNA，用氯化铯法进行纯化。

用由此得到的质粒 pMEh55-1 转染 COS-1 细胞。转染 COS-1 细胞时，通过使用 (株) 岛津制作所的基因导入装置 GTE-1 的电穿孔法进行。即，首先从将 COS-1 细胞增殖至半汇合状态的烧瓶中，通过胰蛋白酶-EDTA 处理回收细胞，用 PBS (-) 缓冲液 (宝酒造 (株) 社制) 洗涤。然后将该细胞用 PBS (-) 缓冲液悬浮至 6×10^7 个细胞/ml。将通过上述方法回收的质粒 DNA (pMEh55-1) 用 PBS (-) 缓冲液调节至 200 μ g/ml。将细胞悬浮液和 DNA 溶液各 20 μ l 混合，将此装入电极间距 2mm 的小室中，将 600-30 μ sec 的脉冲以 1 秒钟的间隔施加 2 次。将该小室于 4 $^{\circ}$ C 冷却 5 分钟后，将其中的细胞-DNA 混合液加到含 10% 胎牛血清的 DMEM 10ml 中，转移到平皿中后于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养过夜。然后去除培养上清，用无血清培养基 (DMEM) 洗涤细胞，加入 DMEM

10ml 培养 3 天。

从由此得到的细胞培养物中回收培养上清。将不含 cDNA 的阴性对照质粒 pME18S 或用 pMEh55-1 转染得到的 COS-1 细胞的无血清培养上清 0.3ml 分别用三氯乙酸（以下，略作“TCA”）处理以沉淀蛋白质，通过离心得到沉淀。将该沉淀用冰冷丙酮洗涤并风干后，溶解于含 SDS-聚丙烯酰胺电泳（SDS-PAGE）用 2-巯基乙醇的样品缓冲液（Bio-Rad 公司制）中，用 4-20% 聚丙烯酰胺密度梯度凝胶（第一化学药品（株）制的 multi-gel 4/20）在还原条件下进行 SDS-PAGE。

电泳后，将聚丙烯酰胺凝胶中的条带在转移缓冲液（192mM 甘氨酸，20% 甲醇，25mM Tris）中，用凝胶-膜转移装置（Marisol 公司制的 NP7513）于 4℃、90 分钟、200mA 的条件转移至硝酸纤维素膜（Bio-Rad 公司制）上。

对于转移后的硝酸纤维素膜，用实施例得到的抗体（以下，略作“55-1-N1 抗体”或“55-1-C1 抗体”）进行 Western blot 分析。即，首先将硝酸纤维素膜用含 0.05% Tween 20 的 PBS（以下，略作“0.05% Tween 20-PBS”）洗涤（室温 15 分钟 1 次，然后 5 分钟 2 次）后，装入塑料袋（商品名为 Hybribag，Cosmobio 公司制）中，加入含 5% 脱脂乳（雪印乳业（株）社制）的 0.05% Tween 20-PBS 20ml，室温振荡 1 小时。1 小时后取出膜，在 0.05% Tween 20-PBS 中进行 15 分钟 1 次、然后 5 分钟 2 次的洗涤操作。洗涤后，将膜转移至新的塑料袋中，添加含 55-1-N1 抗体或 55-1-C1 抗体（100 倍稀释）、1% 牛血清白蛋白（以下略作“BSA”，Sigma 公司制）的 0.05% Tween 20-PBS 20ml，室温振荡 1 小时。1 小时后取出膜，用 0.05% Tween 20-PBS 溶液进行 15 分钟 1 次、5 分钟 2 次的洗涤操作。然后，将膜转移至新的塑料袋中，加入用含 1% BSA 的 0.05% Tween 20-PBS 稀释 2000 倍的辣根过氧化物酶标记抗兔 IgG 抗体（Amersham Pharmacia 公司制）稀释液 20ml，室温振荡 1 小时。1 小时后取出膜，用 0.05% Tween 20-PBS 进行 15 分钟 1 次、然后 5 分钟 4 次的洗涤操作。洗涤后，将膜置于包裹膜上，用 ECL Western blotting 检测溶液（Amersham Pharmacia 公司制）检测 55-1-N1 抗体或 55-1-C1 抗体结合的条带（将膜置于包裹膜上，在 ECL Western blotting 检测溶液中浸渍 1 分钟后，室温放置 1 小时以减低背景，用 X 光片进行感光（3 秒钟））。其结果，通过两种抗体，在导

入 pMEh55-1 质粒 DNA 得到的 COS-1 培养上清中检测出特异的条带（图 2）。

对于表达参考例 1 中得到的小鼠 cDNA 的 COS-1 细胞培养上清也进行同样的实验。即，将参考例 1 中得到的噬菌体粒子#55-1 DNA 用限制酶 EcoRI 和 XbaI 消化，将得到的约 1.6kb 插入 DNA 片段整合到 pME18S 中构建克隆（pME55-1），并用上述同样的方法导入 COS-1 细胞中，回收培养上清。对于从此培养上清制备的样品，用 55-1-N1 抗体或 55-1-C1 抗体进行 Western blot 分析，用任一抗体进行检测时，均可在导入 pME55-1 质粒 DNA 得到的 COS-1 培养上清中检测出特异的条带。

在上述实验体系中，例如由待测物质存在下或非存在下培养的 KK 小鼠初代培养肝细胞的培养上清制备样品，通过进行以下步骤相同的操作，可以研究待测物质作为高脂血症的治疗或预防剂的效果。在该实验中，降低了检测抗原量的待测物质可以作为高脂血症的治疗或预防剂。同时处理多个检测样品时，也可以省去电泳步骤而进行斑点印迹或狭线印迹。

实施例 4. 重组腺病毒的制备及在培养细胞中的表达

用市售的试剂盒（宝酒造（株）制的腺病毒表达载体试剂盒）制备强制表达参考例 1 中得到的小鼠 cDNA 的重组腺病毒。即，用限制酶 EcoRI 及 XbaI 消化参考例 1 中得到的噬菌体粒子克隆#55-1，将得到的约 1.7kb DNA 片段平末端化后，作为插入 DNA 片段用于以下的操作。

另外，构建在由细胞肥大病毒增强子和家禽 β -肌动蛋白启动子驱动表达的粘粒载体 pAxCAwt（腺病毒表达载体试剂盒中附带）的限制酶 SmaI 识别位点插入 DNA 插入片段的粘粒 pAxCA/mAP5。用磷酸钙转染系统（LifeTech 公司制）将 pAxCA/mAP5 DNA 及末端蛋白质结合病毒 DNA（DNA-TPC，腺病毒表达载体试剂盒中附带）共转染至 293 细胞（ATCC CRL1573），分离重组腺病毒 Ad/mAP-5，并在 293 细胞中扩增。另外，同样构建具有整合从对照粘粒 pAxCAiLacZ 中切出的 LacZ 基因的重组腺病毒载体的腺病毒 Ad/LacZ，并在 293 细胞中进行扩增。从 293 细胞中回收扩增的病毒时，首先对病毒感染 293 细胞进行 30 秒 $\times$ 4 次的超声波处理（使用 Branson 公司制的 B-1200），然后反复 2 次

通过氯化铯密度梯度离心进行纯化的步骤。将得到的病毒液用添加10%甘油的PBS于4℃进行透析后，-70℃冷冻保存直至使用。

将由此得到的重组腺病毒以约5m.o.i.(多重感染度, multiplicity of infection)感染HeLa细胞(ATCC CCL2), 在无血清培养基(Dulbecco改进Eagle培养基(DMEM))中培养3-4天后, 回收培养上清。将该上清1ml装入1.5ml体积Eppendorf管中, 添加100μl三氯乙酸并在室温放置3分钟后, 用台式离心机15000rpm离心5分钟。除去上清, 加入冰冷的丙酮0.5ml充分搅拌后, 再次用台式离心机15000rpm离心2分钟。除去上清, 再加入冰冷的丙酮0.5ml充分搅拌后, 用台式离心机15000rpm离心2分钟, 除去上清, 真空干燥沉淀物。将该沉淀溶解在10μl的蒸馏水中, 与含2-巯基乙醇的SDS-PAGE样品缓冲液(Bio-Rad公司制)混合后, 99℃加热5分钟, 制备电泳用样品。将样品在4-20%聚丙烯酰胺密度梯度凝胶中进行电泳(电泳用缓冲液为25mM Tris, 192mM甘氨酸, 0.1%SDS)后, 在转移缓冲液中于4℃、1小时、200mA的条件转移至硝酸纤维素膜上。转移的膜在添加0.5%脱脂乳的PBS液中于4℃封闭过夜, 用洗涤液(0.05% Tween 20-PBS)洗涤3次。然后, 将膜装入用含5%胎牛血清的0.05% Tween 20-PBS将55-1-N1抗体纯化前的抗血清和55-1-C1抗体纯化前的抗血清的混合物稀释10000倍的反应液中, 室温孵育1小时后, 用洗涤液洗涤3次。接着, 将膜在用含5%胎牛血清的0.05% Tween 20-PBS将辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(Bio-Rad公司制的H+L)稀释10000倍的反应液中室温孵育1小时后, 用洗涤液洗涤5次。将该膜置于包裹膜上, 在ECL Western blotting检测溶液中浸渍1分钟后, 室温放置1小时以减低背景, 然后用X光片感光(3秒钟)。其结果, 在感染重组腺病毒Ad/mAP-5的HeLa细胞培养上清样品带中检测出特异的条带(图3)。

另一方面, 将噬菌体粒子克隆#h5-1携有的cDNA整合到腺病毒载体中, 进而构建重组腺病毒(Ad/hAP5), 并进行同样的实验。对在HeLa细胞中进行表达的培养上清进行Western blot分析的结果, 同样可检测出特异的条带(图3)。

30 实施例5. 利用重组腺病毒进行体内表达

将通过上述方法纯化的重组腺病毒Ad/mAP-5或Ad/LacZ, 用含10%甘油的PBS稀释至 2×10^{10} pfu(噬菌斑形成单位, plaque forming

unit) /ml, 然后分别在 3 只 (Ad/mAP-5) 或 2 只 (Ad/LacZ) 13-14 周龄雄性 KK/San 小鼠身上, 各 100 μ l (2×10^9 pfu) 通过尾静脉注射进行接种。接种 1 天后, 从各只小鼠的眼底用采血管采血, 用台式离心机 5200rpm 离心 15 分钟分离血浆, 用中性脂肪测定试剂盒 (和光制药 (株) 社制的 triglyceride E-test Wako) 测定中性脂肪浓度。相对于 Ad/LacZ 接种小鼠组的血中中性脂肪浓度没有明显的差异, 在 Ad/mAP-5 接种小鼠组和其它 2 组之间血中中性脂肪浓度具有明显的差异 (图 4)。

另一方面, 将噬菌体粒子克隆#h5-1 携有的 cDNA 整合到腺病毒载体中, 进而构建重组腺病毒 (Ad/hAP5), 并进行同样的实验。在雄性 KK/San 小鼠中进行表达的结果, 血中中性脂肪浓度明显增高, 可确认人源分子也可在小鼠体内发挥作用 (图 4)。

另外, 从这些血中中性脂肪浓度明显具有差异并感染腺病毒的小鼠组肝脏中回收总 RNA, 按照实施例 1 所述的方法进行 Northern blot 分析时, 可确认导入基因确实进行了高效表达 (图 5)。从腺病毒感染 KK/San 小鼠组中检测出的条带比在未进行基因操作的 KK 小鼠中检测出的条带要大, 这是由于重组腺病毒载体中有效的转录起始位点或 poly(A) 附加信号与原来基因上的具有差异的缘故。不管怎样, 在整合到重组腺病毒载体中的 cDNA 中, 由于在最初的翻译起始密码的紧 5' 末端侧存在与该翻译起始密码在同一阅读框架内的终止密码, 因此该 mRNA 大小上的差异不会影响翻译的氨基酸序列。

实施例 6. 重组蛋白质的纯化及 N 末端氨基酸序列的测定

按照以下所述的方法, 用实施例 3 中制备的、插入具有序列表序列号 3 中所示核苷酸序列的人 cDNA 的表达载体 pMEh55-1 转化动物细胞, 纯化分泌在该转化细胞培养上清中的重组蛋白质, 并测定其 N 末端氨基酸序列。

(1) 转化体的获得及培养上清的制备

在含 10%FCS (Gibco BRL 公司制)、10 单位/ml 青霉素及 10 μ g/ml 链霉素 (Gibco BRL 公司制) 的 α MEM (Gibco BRL 公司制) 培养基中增殖二氢叶酸还原酶缺失 CHO 细胞 (ATCC CRL-9096) 后, 使用转染试剂 (Roche Diagnostics 公司制的 FuGENE6), 将 pMEh55-1 质粒以 1 μ g/10⁶ 细胞的比例进行转染。具体来说, 细胞用 200 个细胞培养

皿（150mm $\varnothing$ ，Coring 公司制）培养至 1.5×10^7 细胞/平皿，转染时每个平皿使用 15 μ g 的 pMEh55-1 质粒。转染操作后的细胞在上述含 FCS 的培养基中培养 24 小时后，将培养基更换为无血清 α MEM 培养基（30ml/平皿），再培养 3 天，回收无血清培养上清 6L。

5 （2）重组蛋白质的纯化

1）在柱（Amersham Pharmacia Biotech 公司制的 stream line C-100）中填充 1.6L 胶体积的 Sephadex G25（Amersham Pharmacia Biotech 公司制），注入 600ml 上述（1）中得到的培养上清（流速为 20ml/分钟）。然后，将洗脱缓冲液（20mM Tris-盐酸（pH7.5），0.01%叠氮钠（Sigma 公司制），0.05%蛋白酶抑制剂混合液（Sigma 公司制），0.05% Tween 20（Sigma 公司制）；以下略作“A 液”）以流速 50ml/分钟流过柱子，回收开始时的 1500ml 体积的洗脱液。该操作实施 10 次，进行上述（1）中得到的 6L 培养上清的脱盐及低分子物质去除操作。

2）然后，上述 1）中的得到的洗脱液用 FPLC 装置（Amersham Pharmacia Biotech 公司制的 Biopilot system），按照以下所述的条件，通过离子交换色谱进行分级。

柱子：将 Q Sepharose fastflow（Amersham Pharmacia Biotech 公司制）100ml 填充在 XK50/100 柱（Amersham Pharmacia Biotech 公司制）中。

20 A 液：参照上述

B 液：20mM Tris-盐酸，1M 氯化钠（pH7.5），0.01%叠氮钠，0.05%蛋白酶抑制剂混合液，0.05% Tween 20

流速：10ml/分钟

收集组分：各 10ml/管

25 温度：4 $^{\circ}$ C

洗脱条件：100%A 液至 100%B 液的直线浓度梯度（60 分钟），回收氯化钠浓度 0.3~0.4M 的洗脱组分。

3）然后，对于上述 2）中通过离子交换色谱回收的组分，用 FPLC 并按照以下所述的条件组，进行特异性的亲和色谱。

30 柱子：将 Affigel blue（Bio-Rad 公司制）10ml 填充在 XK16/40 柱（Amersham Pharmacia Biotech 公司制）中。

缓冲液组成：

C 液: 20mM Tris-盐酸, 0.5M 氯化钠 (pH7.5), 0.01%叠氮钠, 0.05%蛋白酶抑制剂混合液, 0.05% Tween 20

D 液: 20mM Tris-盐酸, 1M 氯化钠 (pH7.5), 0.01%叠氮钠, 0.05%蛋白酶抑制剂混合液, 0.05% Tween 20

5 流速: 1.5ml/分钟

温度: 4℃

上述 2) 中回收的组分流经柱子后, 流入 60ml C 液进行洗涤, 然后流入 100ml D 液, 回收由 D 液洗脱出的组分。

4) 上述 3) 中得到的洗脱液中加入等量 (100ml) 的 A 液, 对于该混合液, 用 FPLC 并按照以下所述的条件组, 进行特异性的亲和色谱。

10 柱子: 将 lentil lectin Sepharoses 4B (Amersham Pharmacia Biotech 公司制) 10ml 填充在 XK16/40 柱中。

缓冲液组成:

C 液: 参照上述

15 F 液: 20mM Tris-盐酸, 0.5M 氯化钠, 0.3M 甲基吡喃甘露糖苷 (pH7.5), 0.01%叠氮钠, 0.05%蛋白酶抑制剂混合液, 0.05% Tween 20

流速: 1ml/分钟

温度: 4℃

20 样品通过柱子后, 流入 50ml C 液进行洗涤, 然后流入 50ml F 液, 回收由 F 液洗脱出的组分。

将该洗脱液转移到透析管 (排除分子量界限 10KDa, Gibco BRL 公司制) 中, 用含 0.01%叠氮钠及 0.1%蛋白酶抑制剂混合液的 Dulbecco PBS (-) (日本制药 (株) 社制) 2L, 于 4℃透析过夜。然后, 回收透析管中的溶液, 向其中 4ml 中加入 1/10 体积的含 4mg/ml 脱氧胆酸钠的 TCA (0.4ml), 回收得到的沉淀, 接着加入丙酮并回收得到的沉淀, 溶解于 50μl 的灭菌超纯水中。

(3) N 末端氨基酸序列的测定

30 上述 (2) 中纯化的样品中加入 PNGaseF (New England Biolab 公司制), 切断 N 结合型糖链。具体来说, 首先在 50μl 的样品中添加 6μl 的 10×变性缓冲液 (PNGaseF 试剂中附带) 进行搅拌, 在沸水浴中加热 10 分钟。将此冷却至室温后, 依次加入 6μl 的 10% Nonidet P-40 及

6 μ l 的 10 $\times$ G7 缓冲液（以上均为 PNGaseF 试剂中附带）进行搅拌。向其中加入 3 μ l 的 PNGaseF，边搅拌边在 37 $^{\circ}$ C 的水浴中保温 2 小时。

对于该 N 结合型糖链切断反应后的反应液，在使用 4~20% 浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶（第一化学药品（株）社制的 Multi gel 4/20）及微型板电泳装置（日本 eido（株）社制）的还原条件下进行 SDS-PAGE。电泳后，用凝胶-膜转移装置（Marisol 公司制），将胶中分离的蛋白质转移至 0.2 μ m 孔径的聚偏二氟乙烯（PVDF）膜（Bio-Rad 公司制）上（2mA/cm²，4 $^{\circ}$ C 2 小时）。转移后的膜用 100% 甲醇（和光纯药（株）社制）浸润 10 秒钟后，用超纯水洗涤 2 分钟，然后用考马斯染色液（Bio-Rad 公司制）染色 5 分钟，再将膜浸在甲醇中脱色 2 分钟的结果，看到了相当于约 50KDa 的条带。切出该条带部分的膜，用蛋白测序仪（岛津制作所（株）社制的 PPSQ-10）进行 N 末端序列的分析。

其结果，上述约 50KDa 的条带的 N 末端氨基酸序列为 Ser-Arg-Ile-Asp-Gln-Asp-Asn-Ser-Ser-Phe-Asp（序列表序列号 4 中氨基酸序号 17 至 27）。由此，可知序列表序列号 3 中核苷酸序号 78 至 1457 所示核苷酸序列编码的蛋白质在哺乳动物细胞中 N 末端 16 个肽（序列表序列号 4 中氨基酸序号 1 至 16）被切断，并以将紧随其后的丝氨酸残基（序列表序列号 4 中氨基酸序号 17）作为 N 末端的成熟体形式进行分泌。

20 产业上的实用性

如上所述，根据本发明，由序列表序列号 1 中核苷酸序号 47 至 1411 所示核苷酸序列或序列表序列号 3 中核苷酸序号 78 至 1457 所示核苷酸序列构成的基因是使血中的中性脂肪浓度上升的基因因子之一，进而，可确定抑制该基因表达量的物质可作为高脂血症的治疗或预防剂。即，在本发明的方法、以及在该方法的进行核酸检测的方式中作为探针或引物使用的多核苷酸，以及在该方法的进行多肽检测的方式中使用的抗体，均可用于高脂血症的治疗或预防剂的探索研究中。

<110> 三共株式会社 (Sankyo Company, Limited)

<120> 高脂血症的治疗或预防剂的检验方法

<130> FP-200054

<140>

<141>

<150> JP H11-349976

<151> 1999-12-09

<160> 11

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 1604

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (47)..(1411)

<223>

<400> 1

ggcacgaggt tccaaattgc ttaaaattga ataattgaga caaaaa atg cac aca 55
Met His Thr
1

att aaa tta ttc ctt ttt gtt gtt cct tta gta att gca tcc aga gtg 103
Ile Lys Leu Phe Leu Phe Val Val Pro Leu Val Ile Ala Ser Arg Val
5 10 15

gat cca gac ctt tca tca ttt gat tct gca cct tca gag cca aaa tca 151
Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Pro Ser Glu Pro Lys Ser
20 25 30 35

aga ttt gct atg ttg gat gat gtc aaa att tta gcg aat ggc ctc ctg 199
Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn Gly Leu Leu
40 45 50

cag ctg ggt cat gga ctt aaa gat ttt gtc cat aag act aag gga caa Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr Lys Gly Gln 55 60 65	247
att aac gac ata ttt cag aag ctc aac ata ttt gat cag tct ttt tat Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln Ser Phe Tyr 70 75 80	295
gac cta tca ctt cga acc aat gaa atc aaa gaa gag gaa aag gag cta Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Lys Glu Leu 85 90 95	343
aga aga act aca tct aca cta caa gtt aaa aac gag gag gtg aag aac Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu Val Lys Asn 100 105 110 115	391
atg tca gta gaa ctg aac tca aag ctt gag agt ctg ctg gaa gag aag Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu Glu Glu Lys 120 125 130	439
aca gcc ctt caa cac aag gtc agg gct ttg gag gag cag cta acc aac Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln Leu Thr Asn 135 140 145	487
tta att cta agc cca gct ggg gct cag gag cac cca gaa gta aca tca Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu His Pro Glu Val Thr Ser 150 155 160	535
ctc aaa agt ttt gta gaa cag caa gac aac agc ata aga gaa ctc ctc Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Arg Glu Leu Leu 165 170 175	583
cag agt gtg gaa gaa cag tat aaa caa tta agt caa cag cac atg cag Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu Ser Gln Gln His Met Gln 180 185 190 195	631
ata aaa gaa ata gaa aag cag ctc aga aag act ggt att caa gaa ccc Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys Thr Gly Ile Gln Glu Pro 200 205 210	679
tca gaa aat tct ctt tct tct aaa tca aga gca cca aga act act ccc Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Arg Ala Pro Arg Thr Thr Pro 215 220 225	727
cct ctt caa ctg aac gaa aca gaa aat aca gaa caa gat gac ctt cct Pro Leu Gln Leu Asn Glu Thr Glu Asn Thr Glu Gln Asp Asp Leu Pro 230 235 240	775
gcc gac tgc tct gcc gtt tat aac aga ggc gaa cat aca agt ggc gtg Ala Asp Cys Ser Ala Val Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Val 245 250 255	823
tac act att aaa cca aga aac tcc caa ggg ttt aat gtc tac tgt gat Tyr Thr Ile Lys Pro Arg Asn Ser Gln Gly Phe Asn Val Tyr Cys Asp 260 265 270 275	871
acc caa tca ggc agt cca tgg aca tta att caa cac cgg aaa gat ggc Thr Gln Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Lys Asp Gly 280 285 290	919
tca cag gac ttc aac gaa aca tgg gaa aac tac gaa aag ggc ttt ggg Ser Gln Asp Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Glu Lys Gly Phe Gly 295 300 305	967
agg ctc gat gga gaa ttt tgg ttg ggc cta gag aag atc tat gct ata Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ala Ile 310 315 320	1015
gtc caa cag tct aac tac att tta cga ctc gag cta caa gac tgg aaa Val Gln Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Leu Glu Leu Gln Asp Trp Lys 325 330 335	1063

```

gac agc aag cac tac gtt gaa tac tcc ttt cac ctg ggc agt cac gaa      1111
Asp Ser Lys His Tyr Val Glu Tyr Ser Phe His Leu Gly Ser His Glu
340                               345                               350                               355

acc aac tac acg cta cat gtg gct gag att gct ggc aat atc cct ggg      1159
Thr Asn Tyr Thr Leu His Val Ala Glu Met Phe Ala Gly Asn Ile Pro Gly
                               360                               365                               370

gcc ctc cca gag cac aca gac ctg atg ttt tct aca tgg aat cac aga      1207
Ala Leu Pro Glu His Thr Asp Leu Met Phe Ser Thr Trp Asn His Arg
                               375                               380                               385

gca aag gga cag ctc tac tgt cca gaa agt tac tca ggt ggc tgg tgg      1255
Ala Lys Gly Gln Leu Tyr Cys Pro Glu Ser Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
                               390                               395                               400

tgg aat gac ata tgt gga gaa aac aac cta aat gga aaa tac aac aaa      1303
Trp Asn Asp Ile Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
                               405                               410                               415

ccc aga acc aaa tcc aga cca gag aga aga aga ggg atc tac tgg aga      1351
Pro Arg Thr Lys Ser Arg Pro Glu Arg Arg Arg Gly Ile Tyr Trp Arg
420                               425                               430                               435

cct cag agc aga aag ctc tat gct atc aaa tca tcc aaa atg atg ctc      1399
Pro Gln Ser Arg Lys Leu Tyr Ala Ile Lys Ser Ser Lys Met Met Leu
                               440                               445                               450

cag ccc acc acc taagaagctt caactgaact gagacaaaat aaaagatcaa      1451
Gln Pro Thr Thr
                               455

taaattaaat attaaagtcc tcccgatcac tgtagtaatc tggattataa attttaatgg      1511

aaagcttgag aattgaattt caattagggt taaactcatt gttaagatca gatatcacccg      1571

aatcaacgta aacaaaattt atcttttttca atc                                1604

```

<210> 2

<211> 455

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 2

```

Met His Thr Ile Lys Leu Phe Leu Phe Val Val Pro Leu Val Ile Ala
1                               5                               10                               15

Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Pro Ser Glu
                               20                               25                               30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
                               35                               40                               45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
50                               55                               60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
65                               70                               75                               80

```

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 115 120 125

Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln
 130 135 140

Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu His Pro Glu
 145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Arg
 165 170 175

Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu Ser Gln Gln
 180 185 190

His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys Thr Gly Ile
 195 200 205

Gln Glu Pro Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Arg Ala Pro Arg
 210 215 220

Thr Thr Pro Pro Leu Gln Leu Asn Glu Thr Glu Asn Thr Glu Gln Asp
 225 230 235 240

Asp Leu Pro Ala Asp Cys Ser Ala Val Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255

Ser Gly Val Tyr Thr Ile Lys Pro Arg Asn Ser Gln Gly Phe Asn Val
 260 265 270

Tyr Cys Asp Thr Gln Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285

Lys Asp Gly Ser Gln Asp Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Glu Lys
 290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320

Tyr Ala Ile Val Gln Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Leu Glu Leu Gln
 325 330 335

Asp Trp Lys Asp Ser Lys His Tyr Val Glu Tyr Ser Phe His Leu Gly
 340 345 350

Ser His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Val Ala Glu Ile Ala Gly Asn
 355 360 365

Ile Pro Gly Ala Leu Pro Glu His Thr Asp Leu Met Phe Ser Thr Trp
370 375 380

Asn His Arg Ala Lys Gly Gln Leu Tyr Cys Pro Glu Ser Tyr Ser Gly
385 390 395 400

Gly Trp Trp Trp Asn Asp Ile Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
405 410 415

Tyr Asn Lys Pro Arg Thr Lys Ser Arg Pro Glu Arg Arg Arg Gly Ile
420 425 430

Tyr Trp Arg Pro Gln Ser Arg Lys Leu Tyr Ala Ile Lys Ser Ser Lys
435 440 445

Met Met Leu Gln Pro Thr Thr
450 455

<210> 3

<211> 1716

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (78)..(1457)

<223>

<400> 3
gcggccgcgt cgacgtctag gtctgtctcc agaagaaaac agttccacgt tgcttgaaat 60

tgaaaatcaa gataaaa atg ttc aca att aag ctc ctt ctt ttt att gtt 110
Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val
1 5 10

cct cta gtt att tcc tcc aga att gat caa gac aat tca tca ttt gat 158
Pro Leu Val Ile Ser Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp
15 20 25

tct cta tct cca gag cca aaa tca aga ttt gct atg tta gac gat gta 206
Ser Leu Ser Pro Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val
30 35 40

aaa att tta gcc aat ggc ctc ctt cag ttg gga cat ggt ctt aaa gac 254
Lys Ile Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp
45 50 55

ttt gtc cat aag acg aag ggc caa att aat gac ata ttt caa aaa ctc 302
Phe Val His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu
60 65 70 75

aac ata ttt gat cag tct ttt tat gat cta tcg ctg caa acc agt gaa 350
Asn Ile Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu
80 85 90

atc aaa gaa gaa gaa aag gaa ctg aga aga act aca tat aaa cta caa 398

Ile	Lys	Glu	Glu	Glu	Lys	Glu	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Gln	
		95						100					105			
gtc	aaa	aat	gaa	gag	gta	aag	aat	atg	tca	ctt	gaa	ctc	aac	tca	aaa	446
Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Met	Ser	Leu	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	
		110					115					120				
ctt	gaa	agc	ctc	cta	gaa	gaa	aaa	att	cta	ctt	caa	caa	aaa	gtg	aaa	494
Leu	Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Leu	Leu	Gln	Gln	Lys	Val	Lys	
		125				130					135					
tat	tta	gaa	gag	caa	cta	act	aac	tta	att	caa	aat	caa	cct	gaa	act	542
Tyr	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Thr	Asn	Leu	Ile	Gln	Asn	Gln	Pro	Glu	Thr	
					145					150					155	
cca	gaa	cac	cca	gaa	gta	act	tca	ctt	aaa	act	ttt	gta	gaa	aaa	caa	590
Pro	Glu	His	Pro	Glu	Val	Thr	Ser	Leu	Lys	Thr	Phe	Val	Glu	Lys	Gln	
				160					165						170	
gat	aat	agc	atc	aaa	gac	ctt	ctc	cag	acc	gtg	gaa	gac	caa	tat	aaa	638
Asp	Asn	Ser	Ile	Lys	Asp	Leu	Leu	Gln	Thr	Val	Glu	Asp	Gln	Tyr	Lys	
			175					180					185			
caa	tta	aac	caa	cag	cat	agt	caa	ata	aaa	gaa	ata	gaa	aat	cag	ctc	686
Gln	Leu	Asn	Gln	Gln	His	Ser	Gln	Ile	Lys	Glu	Ile	Glu	Asn	Gln	Leu	
		190					195					200				
aga	agg	act	agt	att	caa	gaa	ccc	aca	gaa	att	tct	cta	tct	tcc	aag	734
Arg	Arg	Thr	Ser	Ile	Gln	Glu	Pro	Thr	Glu	Ile	Ser	Leu	Ser	Ser	Lys	
		205				210					215					
cca	aga	gca	cca	aga	act	act	ccc	ttt	ctt	cag	ttg	aat	gaa	ata	aga	782
Pro	Arg	Ala	Pro	Arg	Thr	Thr	Pro	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Glu	Ile	Arg	
					225					230					235	
aat	gta	aaa	cat	gat	ggc	att	cct	gct	gaa	tgt	acc	acc	att	tat	aac	830
Asn	Val	Lys	His	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	Glu	Cys	Thr	Thr	Ile	Tyr	Asn	
				240					245					250		
aga	ggt	gaa	cat	aca	agt	ggc	atg	tat	gcc	atc	aga	ccc	agc	aac	tct	878
Arg	Gly	Glu	His	Thr	Ser	Gly	Met	Tyr	Ala	Ile	Arg	Pro	Ser	Asn	Ser	
			255					260					265			
caa	gtt	ttt	cat	gtc	tac	tgt	gat	gtt	ata	tca	ggt	agt	cca	tgg	aca	926
Gln	Val	Phe	His	Val	Tyr	Cys	Asp	Val	Ile	Ser	Gly	Ser	Pro	Trp	Thr	
		270					275					280				
tta	att	caa	cat	cga	ata	gat	gga	tca	caa	aac	ttc	aat	gaa	acg	tgg	974
Leu	Ile	Gln	His	Arg	Ile	Asp	Gly	Ser	Gln	Asn	Phe	Asn	Glu	Thr	Trp	
		285				290					295					
gag	aac	tac	aaa	tat	ggt	ttt	ggg	agg	ctt	gat	gga	gaa	ttt	tgg	ttg	1022
Glu	Asn	Tyr	Lys	Tyr	Gly	Phe	Gly	Arg	Leu	Asp	Gly	Glu	Phe	Trp	Leu	
					305				310						315	
ggc	cta	gag	aag	ata	tac	tcc	ata	gtg	aag	caa	tct	aat	tat	gtt	tta	1070
Gly	Leu	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ser	Ile	Val	Lys	Gln	Ser	Asn	Tyr	Val	Leu	
				320					325					330		
cga	att	gag	ttg	gaa	gac	tgg	aaa	gac	aac	aaa	cat	tat	att	gaa	tat	1118
Arg	Ile	Glu	Leu	Glu	Asp	Trp	Lys	Asp	Asn	Lys	His	Tyr	Ile	Glu	Tyr	
				335				340					345			
tct	ttt	tac	ttg	gga	aat	cac	gaa	acc	aac	tat	acg	cta	cat	cta	gtt	1166
Ser	Phe	Tyr	Leu	Gly	Asn	His	Glu	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	His	Leu	Val	
		350					355					360				
gcg	att	act	ggc	aat	gtc	ccc	aat	gca	atc	ccg	gaa	aac	aaa	gat	ttg	1214
Ala	Ile	Thr	Gly	Asn	Val	Pro	Asn	Ala	Ile	Pro	Glu	Asn	Lys	Asp	Leu	
			365			370					375					
gtg	ttt	tct	act	tgg	gat	cac	aaa	gca	aaa	gga	cac	ttc	aac	tgt	cca	1262

Val	Phe	Ser	Thr	Trp	Asp	His	Lys	Ala	Lys	Gly	His	Phe	Asn	Cys	Pro	
380					385					390					395	
gag ggt tat tca gga ggc tgg tgg tgg cat gat gag tgt gga gaa aac																1310
Glu	Gly	Tyr	Ser	Gly	Gly	Trp	Trp	Trp	His	Asp	Glu	Cys	Gly	Glu	Asn	
				400					405					410		
aac cta aat ggt aaa tat aac aaa cca aga gca aaa tct aag cca gag																1358
Asn	Leu	Asn	Gly	Lys	Tyr	Asn	Lys	Pro	Arg	Ala	Lys	Ser	Lys	Pro	Glu	
			415					420					425			
agg aga aga gga tta tct tgg aag tct caa aat gga agg tta tac tct																1406
Arg	Arg	Arg	Gly	Leu	Ser	Trp	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Arg	Leu	Tyr	Ser	
			430				435					440				
ata aaa tca acc aaa atg ttg atc cat cca aca gat tca gaa agc ttt																1454
Ile	Lys	Ser	Thr	Lys	Met	Leu	Ile	His	Pro	Thr	Asp	Ser	Glu	Ser	Phe	
	445					450					455					
gaa tgaactgagg caaatttaaa aggcaataat ttaaacatta acctcattcc																1507
Glu																
460																
aagttaatgt ggtctaataa tctggtatta aatccttaag agaaagcttg agaaatagat																1567
tttttttatc ttaaagtcac tgtctattta agattaaaca tacaatcaca taaccttaaa																1627
gaataccggt tacattttctc aatcaaaatt cttataatac tatttggttt aaattttgtg																1687
atgtgggaat caattttaga tggtcacaa																1716

<210> 4

<211> 460

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Met	Phe	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Val	Pro	Leu	Val	Ile	Ser
1				5					10					15	

Ser	Arg	Ile	Asp	Gln	Asp	Asn	Ser	Ser	Phe	Asp	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu
			20				25					30			

Pro	Lys	Ser	Arg	Phe	Ala	Met	Leu	Asp	Asp	Val	Lys	Ile	Leu	Ala	Asn
		35					40					45			

Gly	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	His	Gly	Leu	Lys	Asp	Phe	Val	His	Lys	Thr
	50					55					60				

Lys	Gly	Gln	Ile	Asn	Asp	Ile	Phe	Gln	Lys	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Gln
65				70						75				80	

Ser	Phe	Tyr	Asp	Leu	Ser	Leu	Gln	Thr	Ser	Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Glu
				85				90					95		

Lys	Glu	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Gln	Val	Lys	Asn	Glu	Glu
			100					105					110		

Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 115 120 125

Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
 130 135 140

Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
 145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
 165 170 175

Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
 180 185 190

His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile
 195 200 205

Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
 210 215 220

Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
 225 230 235 240

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
 260 265 270

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
 290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
 325 330 335

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
 340 345 350

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
 355 360 365

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
 370 375 380

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
 385 390 395 400

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
 405 410 415

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
 420 425 430

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
 435 440 445

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
 450 455 460

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 5
 gactgatcaa atatgttgag ctt

23

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 6
 tgcattccaga gtggatccag a

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人 (*Homo sapiens*)

<400> 7
 tcctctagtt atttcctcca g

21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人 (*Homo sapiens*)

<400> 8
 tggtttgcca gcgatagatc

20

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的说明：为获得多克隆抗体作为抗原使用的合成寡肽

<400> 9

Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Cys
1 5 10

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 10

Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg
1 5 10

<210> 11

<211> 199

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 11

ttgcatccag agtggatcca gacctttcat catttgattc tgcaccttca gagccaaaat	60
caagatttgc tatgttggat gatgtcaaaa ttttagcgaa tggcctcctg cagctggggtc	120
atggacttaa agattttgtc cataagacta agggacaaat taacgacata tttcagaagc	180
tcaacatatt tgatcagtc	199

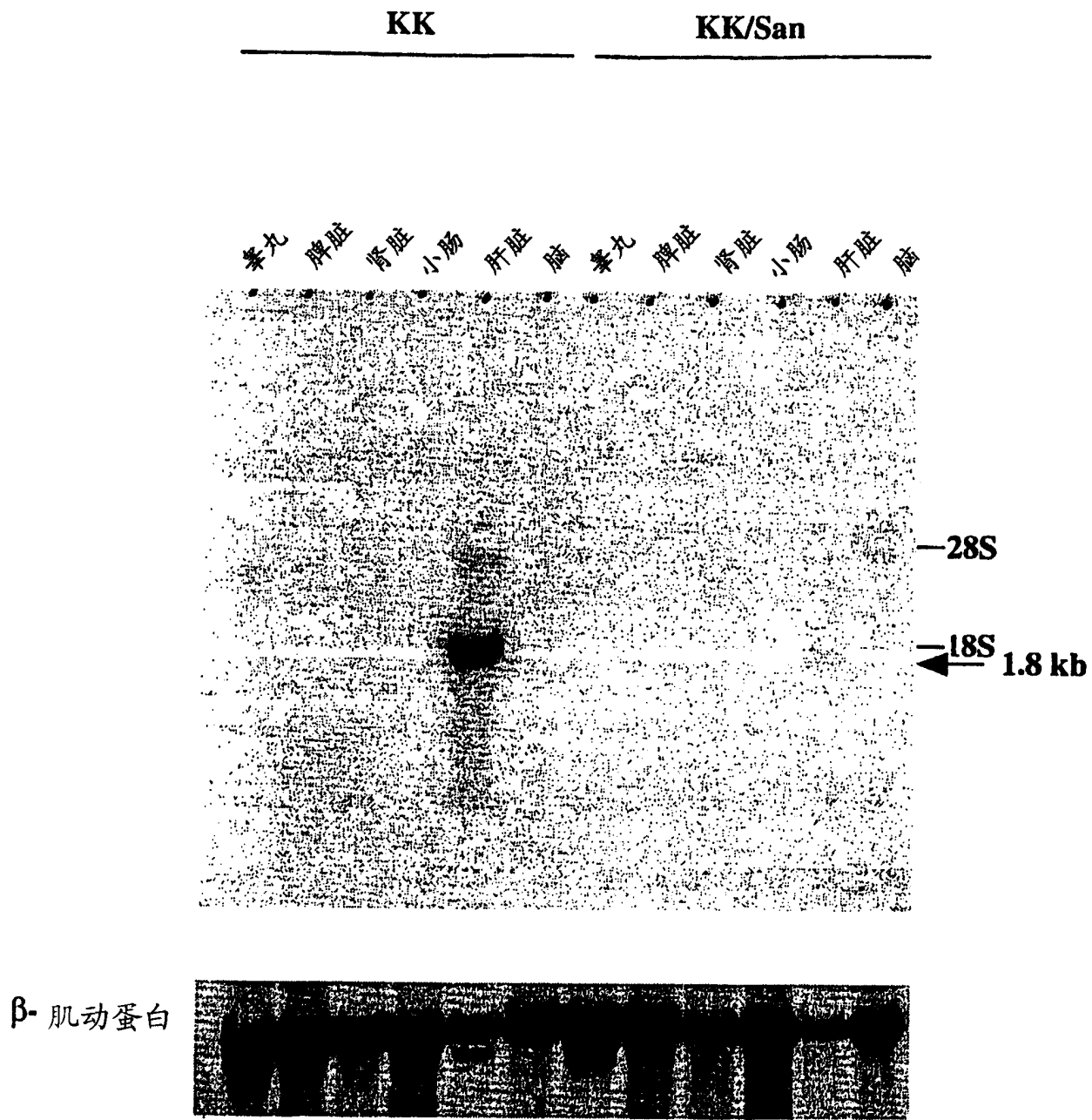


图 1

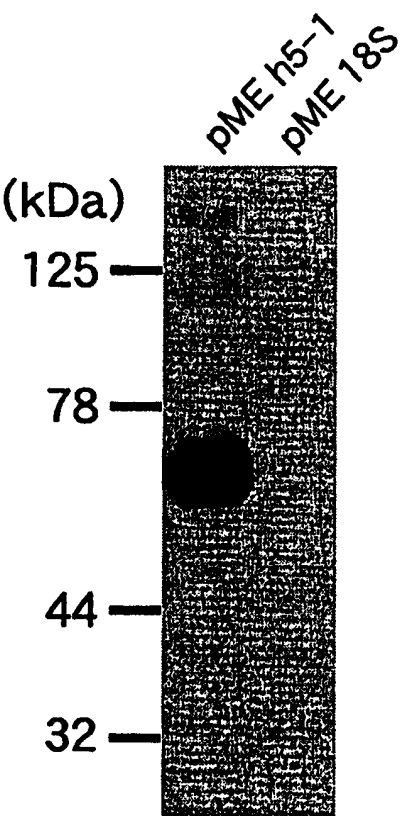


图 2

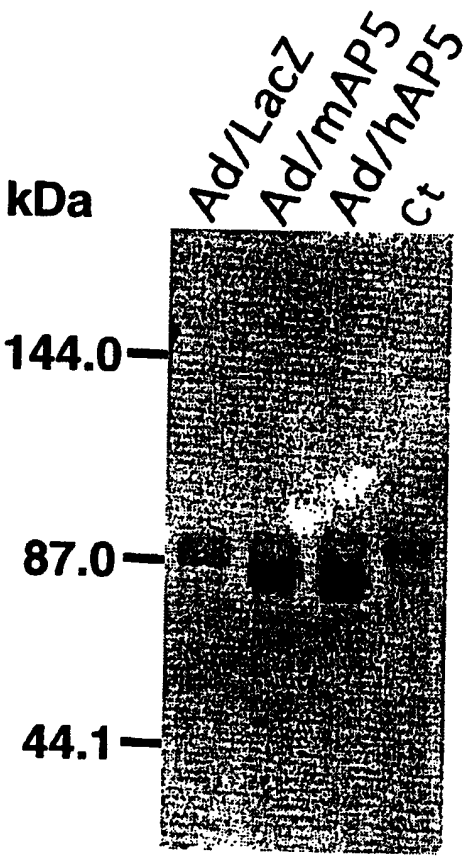


图 3

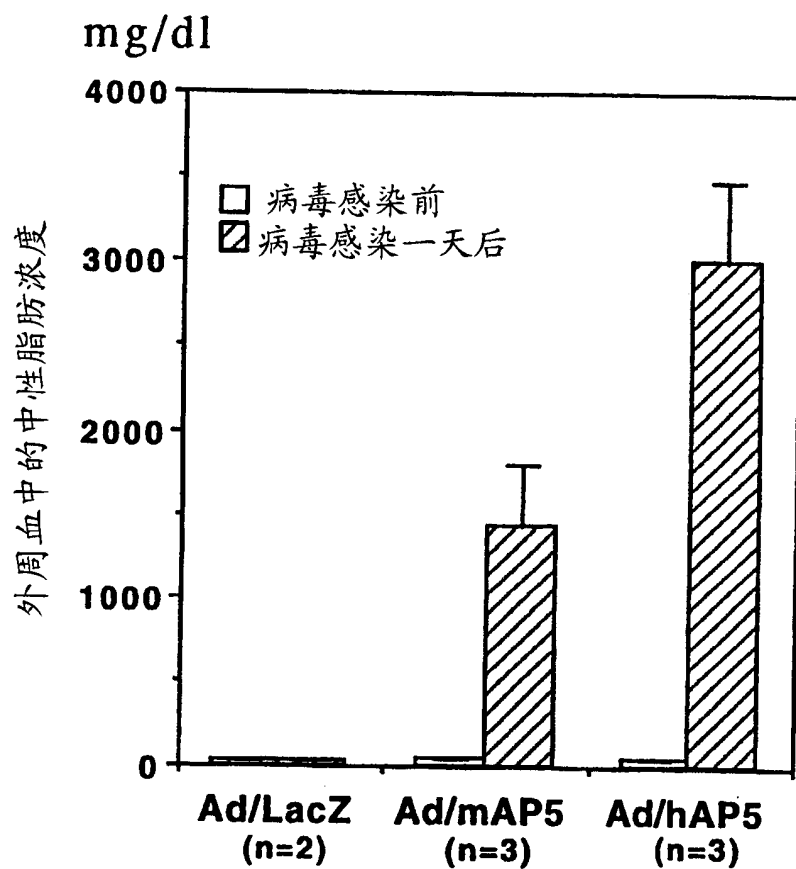


图 4

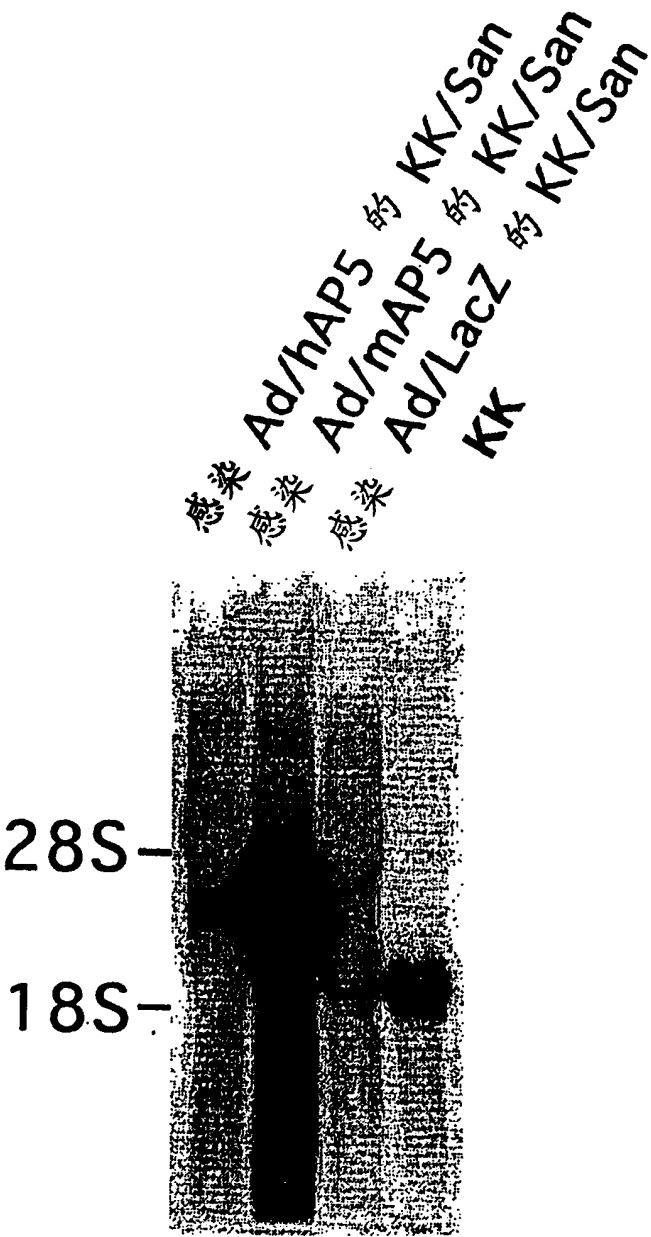


图 5