

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2002年8月1日(01.08.02)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 02/58722 A1

- (51) 国际分类号: A61K 38/17 (ZHAO, Guoping) [CN/CN]; 于川(YU, Chuan) [CN/CN]; 胡兰旋(HU, Landian) [CN/CN]; 中国上海市漕宝路 500 号, Shanghai 200233 (CN).
- (21) 国际申请号: PCT/CN01/01292
- (22) 国际申请日: 2001年8月30日(30.08.01) (74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN).
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文 (81) 指定国(国家): JP, US
- (30) 优先权: CN00125042.6 2000年9月5日(05.09.00) CN (84) 指定国(地区): 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国科学院上海生物工程研究中心(SHANGHAI RESEARCH CENTER OF BIOTECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市漕宝路 500 号, Shanghai 200233 (CN).
- (72) 发明人;及
- (75) 发明人/申请人(仅对美国): 孔祥银(KONG, Xiangyin) [CN/CN]; 肖尚喜(XIAO, Shangxi) [CN/CN]; 赵国屏
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING AND TREATING DENTINOGENESIS IMPERFECTA TYPE II BY USING DENTIN SIALOPHOSPHOPROTEIN (DSPP) GENE AND ITS ENCODING PRODUCT

(54) 发明名称: 利用牙本质唾磷蛋白基因及其编码产物诊断和治疗牙本质生成不全 II 型的方法

(57) Abstract: The present invention discloses a method for diagnosing dentinogenesis imperfecta type II and/or dentinogenesis imperfecta type II that accompany deafness, which includes determining a DSPP gene, its transcript and/or protein of an individual, comparing the sequence of them with a normal sequence to confirm whether a mutation (or mutations) is (are) exist, wherein the presence of the mutation(s) indicates the individual has higher risk of suffering from said diseases than the normal population. The present invention also discloses a method and a pharmaceutical composition for treating said diseases.

(57) 摘要

本发明公开了一种诊断牙本质生成不全 II 型和/或牙本质生成不全 II 型伴耳聋的方法, 它包括检测个体的 DSPP 基因、转录本和/或蛋白与正常相比是否存在变异, 存在变异就表明该个体患牙本质生成不全 II 型和/或牙本质生成不全 II 型伴耳聋的可能性大于正常人群。本发明还公开了治疗牙本质生成不全 II 型和/或牙本质生成不全 II 型伴耳聋的方法和药物组合物。

利用牙本质唾磷蛋白基因及其编码产物
诊断和治疗牙本质生成不全 II 型的方法

发明领域

- 5 本发明涉及生物工程和医学领域。更具体地，本发明涉及利用人 DSPP 基因及其编码产物诊断和治疗牙本质生成不全 II 型的方法，以及含有 DSPP 基因和/或蛋白的药物组合物。

背景

- 10 牙齿发育期间和成熟牙齿内的牙本质由于成牙本质细胞生成，牙本质发生时，成牙本质细胞形成牙本质小管，位于小管内的牙本质细胞突使得牙本质成为一个活的组织。牙本质形成的最初阶段成牙本质细胞进行牙本质基质成分的合成、分泌和重吸收。蛋白质合成发生于细胞体内，胞吐作用和胞吞作用主要发生于细胞突内。最先形成的是未矿化的罩牙本质基质，主要为细胞分泌胶原和非胶原成分，成束的胶原纤维集合形成球状结构。由于新的纤维不断增加，胶原变的越来越紧密，
15 最后这些前期胶原纤维转化为胶原纤维。这就形成了以胶原性基质为特征的前期牙本质，随后矿化晶体在离细胞一定距离处逐渐沉积最终形成牙本质。

- 完全成熟的牙本质无机矿化物质含量比骨略高，占重量的 65%，基本上是羟基磷灰石晶体形式。有机质占 20%，主要是胶原蛋白和非胶原蛋白(non-collagenous
20 proteins, NCPs),其中胶原为羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)板状晶体(plate like crystalline)的沉积提供支架。

- 牙本质中的胶原主要是 I 型胶原，其中 10%~15%是 I 型胶原三聚体。I 型胶原占胶原成分的 97%。与其他结缔组织不同，牙本质之中缺乏 III 型胶原。牙本质中还含有 V 型和 VI 胶原，但含量较少。牙本质非胶原蛋白含量较少，但种类繁多。
25 根据蛋白质的来源不同，将牙本质非胶原蛋白分为牙本质特异性蛋白、矿化组织特异性蛋白、非特异性蛋白、血清来源蛋白(也称牙本质亲和性蛋白)四大类。牙本质特异性蛋白是指唯一由成牙本质细胞合成和分泌，只在牙本质中存在和发现的蛋白。矿化组织特异性蛋白是指既在牙本质中又在牙骨质和骨中存在和发现，由这三种矿化组织中的细胞合成、分泌的蛋白。非特异性蛋白是指既在牙本质中存在，又
30 在其他组织包括软组织中存在，既由成牙本质细胞又由其他类型细胞合成、分泌的蛋白。血清来源蛋白是指由身体其他细胞(主要是肝细胞)合成并分泌进入血清的蛋白，这些蛋白虽不由成牙本质细胞合成，但对牙本质有高度亲和力，可由血液循环

进入牙本质中，又称为牙本质亲和性蛋白。蛋白多糖(proteoglycans, PGS)是牙本质中另一类主要的非胶原蛋白。它是由许多的多糖侧链与一个核心蛋白共价结合形成的大分子。其侧链由重复的二糖链单位组成，每一个单位由一个糖醛酸和一个N-乙酰氨基乙糖组成。蛋白多糖在牙本质发生中的功能之一就是可能影响甚至控制前期牙本质中胶原骨架的组织化。固定在固态支架上的牙本质蛋白多糖在体外生理PH和离子条件下以及在体内均能诱导羟基磷灰石的形成。相反，液态的蛋白多糖却在体外抑制矿物质形成。蛋白多糖与钙离子的结合是诱导羟基磷灰石形成的先决条件。

牙本质生成不全(dentinogenesis imperfecta DGI)是一种常染色体显性遗传病，发病率为1/8000，临床上将其分为3型⁽¹⁾(注：括号内的数字表示文献的编号)，I型，牙本质生成不全，又名DGI-I，患者除牙本质生成不全外，常伴有成骨发育不全的症状，其病因为广泛的I型胶原基因突变⁽²⁾；II型，DGI-II，又名遗传性乳光牙本质(hereditary opalescent dentin)，外显率近100%，其病因与牙本质的矿化不良有关⁽³⁾；III型，DGI-III，又名白兰地型牙本质生成不全(dentinogenesis imperfecta, Brandywine type)或称为隔离群遗传性乳光牙本质(isolate hereditary opalescent dentin)，为孤立发生于美国马里兰州华盛顿DC的3个隔离民族群中特殊的遗传性乳光牙本质，该病由Witkop 1956年最初报道⁽⁴⁾，国内未见报道。DGI-III有明显的遗传异质性，其病因与矿化不良相关。由于DGI-I的致病基因已发现，DGI-III只见于美国马里兰州的隔离居民群，因此DGI-II是牙体牙髓病学研究的重点。

DGI-II的临床表现及病理改变。该病由于矿化失调、紊乱，导致牙本质中胚层发育不良，患者乳、恒牙列皆可受累，但乳牙列病损更为严重。牙齿的颜色呈浅蓝色至黄褐色改变，矿化不良的牙本质较软，牙冠易于磨损。此外，矿化不良的牙本质基质代偿性生成增加，造成牙髓腔狭窄或闭塞。X线摄片可见牙冠呈球茎状，颈部收缩，牙根细小，髓腔狭窄或闭塞，根管消失或呈线样狭窄带。病理显示，釉质外表正常，但约1/3患者可见到发育不良和钙化不全。釉牙本质界变异较大，有些牙齿的釉牙本质界扇形结构不明显，而另一些却特别显著。牙本质呈层板状，外层牙本质接近正常，有细分枝的牙本质小管。其余部分的牙本质明显异常，一些短的、形态异常的小管紊乱地分布于牙本质基质之中。前期牙本质带非常宽，沿着层板见到被包埋的细胞残余，类似于被包埋的造牙本质细胞和血管。电镜观察表明，发育不良牙本质微晶的形态和大小没有变化，但数目少，间断可见未钙化或部分钙化的胶原纤维横束和大量结晶空隙。

牙本质生成不全-II型的基因定位。早在1969年, Bixler等⁽⁵⁾企图用一些蛋白多态标记(如ABO、Rh、MNSs、Kell、Fy、JK、HP、ACP1、PGM1和PTC)对DGI-II家系进行连锁分析,但未能得到连锁的证据。至1977年, Mikkelsen等⁽⁶⁾将维生素D结合蛋白一组特异性组分(GC)定位于4q11-q13。次年, K ü hnl
5 鉴定出GC有GC2/2、2/1+、2/1-、1+/1-、1+/1+和1-/1-6种表型。随后Ball.S.P
等⁽⁷⁾运用GC的多态性标记对其命名的Family MRC4000的DGI-II大家系进行了连锁分析,结果发现DGI-II与GC紧密连锁(Lod值为+7.9, $\theta=0.13$)。1992年, Crall
等⁽⁸⁾将DGI-II定位于GC和干扰素诱导的细胞因子(Interferon-inducible cytokine
INP-10)两蛋白多肽标记之间,染色体定位于4q12-21。上述初步结果只是将DGI-
10 II的致病基因粗略定位,在当时情况下,要想在此范围内克隆致病基因几乎不可
能。

1995年, Crosby A.H等⁽⁹⁾利用9个短串联重复多态标记(STRP)在收集的2个DGI-II大家系中进行连锁分析,结果致病基因被定位于4q21-23区域的D4S2691
和D4S2692两个STRP之间。多点连锁分析提示致病基因可能在以SPP1为中心上
15 下3.2cM的区域。最近, Aplin H.M等⁽¹⁰⁾应用高密的5个STRP对Crosby A.H的2
个大家系进行了基因分型(genotyping),连锁分析的结果表明,DGI-II致病基因位
于GATA62A11和D4S1563两STRP之间,其遗传距离为2cM。此外,该研究小组
构建了该区域的YACs Contigs,且应用PCR技术确定了DMP1、IBSP、SPP1
和DSPP基因都位于该候选区域内。

20 然而,迄今为止,尚没有充分揭示牙本质生成不全II型的确切原因,也没有
人揭示出牙本质生成不全II型与某种蛋白存在直接的相关性。

此外,本领域还缺乏早期和/或产前诊断牙本质生成不全II型疾病的有效方法
以及非手术治疗牙本质生成不全II型的有效手段。

25 因此,本领域迫切需要开发新的诊断和治疗牙本质生成不全II型的有效方法,
以及相关的治疗药物,诊断技术和试剂。

发明概述

本发明的一个目的就是提供一种新的诊断(尤其是产前和/或早期诊断)牙本质
生成不全II型(及伴耳聋)的方法及检测试剂盒。

30 本发明的另一目的是提供一种新的治疗牙本质生成不全II型(及伴耳聋)的方
法。

本发明的再一目的是提供一种治疗牙本质生成不全II型(及伴耳聋)的药物组

合物。

在本发明的第一方面，提供了一种对个体的牙本质生成不全 II 型和/或牙本质生成不全 II 型伴耳聋易感性进行诊断的方法，它包括步骤：

5 检测该个体的 DSPP 基因、转录本和/或蛋白，并与正常的 DSPP 基因、转录本和/或蛋白相比较，

存在差异就表明该个体患牙本质生成不全 II 型和/或牙本质生成不全 II 型伴耳聋的可能性高于正常人群。

10 更佳地，被检测的是 DSPP 的基因或转录本，并与正常 DSPP 核苷酸序列比较差异。更佳地，所述的差异选自下组：外显子 3,第 1 位 G1 → T1；内含子 3,第 1 位的 G1 → A1。

在本发明的第二方面，提供了一种治疗牙本质生成不全 II 型和/或牙本质生成不全 II 型伴耳聋的方法，它包括步骤：给需要所述治疗的病人施用安全有效量的正常 DSPP 和/或 DSP 蛋白。更佳地，DSPP 和/或 DSP 蛋白被局部施用于牙周组织。

15 在本发明的第三方面，提供了一种药物组合物，它含有安全有效量的 DSPP 和/或 DSP 蛋白以及药学上可接受的载体。更佳地，它是针剂。

在本发明的第四方面，提供了一种检测牙本质生成不全 II 型和/或牙本质生成不全 II 型伴耳聋的试剂盒，它包括特异性扩增 DSPP 基因或转录本的引物。更佳地，它还含有与突变部位结合的探针。

20 本发明的其它方面由于本文的技术的公开，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

25 图 1A 是 DSPP 基因组成的模式图。该基因有 5 个外显子、4 个内含子，总长为 8201bp。其中 E1(7-98)、E2(2359-2437)、E3(3577-3660)、E4(3794-4780) 和 E5(5257-8201) 编码 DSPP。而 E1、E2、E3、E4 以及 E5 的 (5257-5520) 部分共同编码 DSP，E5 的 (5521-7893) 部分编码 DPP。

图 2 显示了牙本质生成不全 II 型家系 4q21 区域 STRP 标记的单体型。

图 3 显示了牙本质生成不全 II 型并伴耳聋家系 4q21 区域 STRP 标记的单体型。

30 图 4A 和 4B 显示了 DSPP 基因中的序列变化。图 4A 显示了在外显子 3 中,第 1 位 G1 → T1，该位点的变化导致密码子由 GTT 变为 TTT(相应氨基酸由 Val → Phe)；图 4B 显示了在内含子 3 中,第 1 位的 G1 → A1，该位点的变化导致了剪切

位点改变。

具体实施方式

5 本发明的发明人经过多年研究，首次发现和证明了牙本质唾磷蛋白(DSPP)和/或牙本质唾蛋白(DSP)与牙本质生成不全 II 型密切相关，而且发现了它的新功能，牙本质唾磷蛋白或牙本质唾蛋白(DSP)的改变将直接导致牙本质生成不全 II 型。在此基础上完成了本发明。

10 首先，本发明人利用收集的国内牙本质生成不全及牙本质生成不全伴耳聋的遗传性家系，通过微卫星标记进行基因分型，运用连锁分析的方法将牙本质生成不全的致病基因定位于第 4 号染色体的 4q21-22 区域。

然后，本发明人通过如下步骤确定了牙本质生成不全的候选基因：

- (1)找出定位于染色体 4q21-22 区域所有基因即绘制 4q21-22 区域的转录图谱。
- (2)了解染色体 4q21-22 区域所有基因在牙髓中的表达情况。
- 15 (3)位于染色体 4q21-22 区域所有基因且在牙髓中表达基因为牙本质生成不全的候选基因。

结果表明，候选基因包括：牙本质基因蛋白(DMP1),胃唾蛋白(IBSP)，唾磷蛋白(SPP1),牙本质唾蛋白(DSP)和牙本质磷蛋白(DPP)和牙本质唾磷蛋白(DSPP)。

20 接着，本发明人对所有的候选基因进行突变筛选，即确定的候选基因利用 SSCP 技术进行突变筛选，最终发现 DSPP 的突变与牙本质生成不全有直接因果关系，而其他基因不相关。

最后，通过序列分析确定了两个遗传家系中 DSPP 基因突变的方式和位置。其中，在一个牙本质生成不全 II 型家系中，相关的突变情况为外显子 3 的第 1 位 G1 → T1(SEQ ID NO: 1 中第 3577 位)，这一改变不仅导致氨基酸发生改变，还可能 25 导致剪切位点的变化，从而可能造成内含子被表达、翻译提前中止、或译码等变化(图 4A)，从而无法表达正常的 DSPP(或 DSP)蛋白。

30 在另一牙本质生成不全 II 型并伴耳聋家系中，相关突变情况为内含子 3 中的第 1 位的 G1 → A1(SEQ ID NO:1 中的第 3661 位)。这一改变预计导致剪切位点的变化，从而可能造成内含子被表达、翻译提前中止、或译码等变化(图 4B)，从而无法表达正常的 DSPP(或 DSP)蛋白，还可能影响信号肽的翻译而导致 DSPP 无法正确定位。令人意外的是，这一位点的变化，不仅造成了牙本质生成不全 II 型，还导致了携带者患耳聋。这暗示 DSPP 的变化还与耳聋相关。通过检测 DSPP 的正

常与否，可以诊断耳聋(尤其是牙本质生成不全 II 型伴耳聋)。

在本发明的基础上，人们可以针对 DSPP 基因及其产物(转录本、蛋白等)以及相互作用的分子而进行药物设计开发。此外，还可利用 DSPP 基因进行体外牙齿再造，部分牙齿结构重塑(如牙本质)。

5

人类的牙本质唾磷蛋白(DSPP)的突变导致人类的牙本质生成不全 II 型，可根据 DSPP 基因及其表达产物设计的药物和诊断治疗技术，可用于诊断和治疗人类的牙本质生成不全 II 型。

人 DSPP 基因和蛋白：

10 关于人 DSPP 基因和蛋白的详细序列，可参见基因库中的登录号 AF163151，以及 Gu,K., Chang,S., Ritchie,H.H., Clarkson,B.H. and Rutherford,R.B., Eur. J. Oral Sci. 2000 Feb:108(1):35-42 等文献。在序列表的 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 中分别列出了人 DSPP 的核苷酸序列和氨基酸序列。在图 1 中显示了人 DSPP 中各内含子和外显子。

15	外显子 1	7..98
	mRNA	合并的(7..98,2359..2437,3577..3660,3794..4780,5257..8201)
	外显子 2	2359..2437
	CDS	合并的(2387..2437,3577..3660,3794..4780,5257..7896)
	信号肽	2387..2431
20	成熟肽	合并的(2432..2437,3577..3660,3794..4780,5257..7893) /产物="牙本质唾磷蛋白"
	成熟肽	合并的(2432..2437,3577..3660,3794..4780,5257..5520) /产物="牙本质唾蛋白"
	外显子 3	3577..3660
25	外显子 4	3794..4780
	外显子 5	5257..8201
	成熟肽	5521..7893
	其他调整	5596..5604 /注="区域: 细胞结合域"
	polyA 信号	7988..7993
30	polyA 信号	8171..8176

DSPP 和/或 DSP 蛋白或多肽有多方面的用途。这些用途包括(但不限于)：直

接做为药物治疗 DSPP 和/或 DSP 蛋白功能低下或丧失所致的疾病，和用于筛选促进 DSPP 和/或 DSP 蛋白功能的抗体、多肽或其它配体。用表达的重组人 DSPP 和/或 DSP 蛋白筛选多肽库可用于寻找有治疗价值的能刺激人 DSPP 和/或 DSP 蛋白功能的多肽分子。

5 另一方面，本发明还包括对人 DSPP DNA 或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于人 DSPP 基因产物或片段。较佳地，指那些能与入 DSPP 基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制人 DSPP 蛋白的分子，也包括那些并不影响人 DSPP 蛋白功能的抗体。

10 本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如 Fab'或(Fab)₂ 片段；抗体重链；抗体轻链；遗传工程改造的单链 Fv 分子(Ladner 等人，美国专利 No. 4, 946, 778)；或嵌合抗体，如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，
15 纯化的人 DSPP 基因产物或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的，表达人 DSPP 蛋白或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人，Nature 256;495, 1975; Kohler 等人，Eur. J. Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人，Eur. J. Immunol. 6:292, 1976;
20 Hammerling 等人，In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y., 1981)。本发明的抗体包括能阻断人 DSPP 蛋白功能的抗体以及不影响人 DSPP 蛋白功能的抗体。本发明的各类抗体可以利用人 DSPP 基因产物的片段或功能区，通过常规免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与人 DSPP 基因产物的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞
25 (例如 E. Coli)中生产的基因产物来免疫动物而产生；与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽)，可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

抗人 DSPP 和/或 DSP 蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中，检测活检标本中的人 DSPP 和/或 DSP 蛋白。

30 多克隆抗体的生产可用入 DSPP 和/或 DSP 蛋白或多肽免疫动物，如家兔，小鼠，大鼠等。多种佐剂可用于增强免疫反应，包括但不限于弗氏佐剂等。

利用本发明蛋白，通过各种常规筛选方法，可筛选出与 DSPP 和/或 DSP 蛋白

发生相互作用的物质，如抑制剂、激动剂或拮抗剂等。

本发明蛋白及其抗体、抑制剂、激动剂、拮抗剂等，当在治疗上进行施用(给药)时，可提供不同的效果。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中 pH 通常约为 5-8，较佳地 pH 约为 6-8，尽管
5 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但并不限于)：肌内、静脉内、皮下、或局部给药。较佳地是在牙周组织局部给药。

正常的 DSPP 和/或 DSP 多肽可直接用于疾病治疗，例如，用于牙本质生成不全 II 型方面的治疗。在使用本发明 DSPP 和/或 DSP 蛋白时，还可同时使用其他
10 治疗牙本质生成不全 II 型的药剂。

本发明还提供了一种药物组合物，它含有安全有效量的本发明 DSPP 和/或 DSP 蛋白以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他
15 辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如针剂、片剂和胶囊之类的药物组合物，可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约 0.1 微克/千克体重-约 5 毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的 DSPP 和/或 DSP 蛋白或其拮抗剂、激动剂施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约 0.1 微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约 10 毫克/千克体重，较佳地该剂量是约 0.1 微克/千克体重-约 100 微克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

人 DSPP 和/或 DSP 蛋白的多聚核苷酸也可用于多种治疗目的。基因治疗技术
25 可用于治疗由于 DSPP 和/或 DSP 蛋白的无表达或异常/无活性的 DSPP 和/或 DSP 蛋白的表达所致的细胞增殖、发育或代谢异常。构建携带 DSPP 和/或 DSP 基因的重组病毒载体的方法可见于已有文献(Sambrook, et al.)。另外重组人 DSPP 和/或 DSP 基因可包装到脂质体中，然后再转移至细胞内。

多聚核苷酸导入组织或细胞内的方法包括：将多聚核苷酸直接注入到体内组织中；或在体外通过载体(如病毒、噬菌体或质粒等)先将多聚核苷酸导入细胞
30 中，再将细胞移植到体内等。

本发明还涉及定量和定位检测人 DSPP 和/或 DSP 蛋白水平的诊断试验方法。

这些试验是本领域所熟知的，且包括 FISH 测定和放射免疫测定。试验中所检测的人 DSPP 和/或 DSP 蛋白水平，可以用作解释人 DSPP 和/或 DSP 蛋白在各种疾病中的重要性和用于诊断 DSPP 和/或 DSP 蛋白起作用的疾病。

5 一种检测样品中是否存在 DSPP 和/或 DSP 蛋白的方法是利用 DSPP 和/或 DSP 蛋白的特异性抗体进行检测，它包括：将样品与 DSPP 和/或 DSP 蛋白特异性抗体接触；观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在 DSPP 和/或 DSP 蛋白。

DSPP 和/或 DSP 蛋白的多聚核苷酸可用于 DSPP 和/或 DSP 蛋白相关疾病的诊断和治疗。在诊断方面，DSPP 和/或 DSP 蛋白的多聚核苷酸可用于检测 DSPP 和/或 DSP 蛋白的表达与否或在疾病状态下 DSPP 和/或 DSP 蛋白的异常表达。如 DSPP DNA 序列可用于对活检标本的杂交以判断 DSPP 和/或 DSP 蛋白的表达异常。杂交技术包括 Southern 印迹法，Northern 印迹法、原位杂交等。这些技术方法都是公开的成熟技术，相关的试剂盒都可从商业途径得到。本发明的多核苷酸的一部分或全部可作为探针固定在微阵列(microarray)或 DNA 芯片(又称为“基因芯片”)
15 上，用于分析组织中基因的差异表达分析和基因诊断。用 DSPP 和/或 DSP 蛋白特异的引物进行 RNA-聚合酶链反应(RT-PCR)体外扩增也可检测 DSPP 和/或 DSP 蛋白的转录产物。

检测 DSPP 和/或 DSPP 蛋白基因的突变也可用于诊断 DSPP 和/或 DSP 蛋白相关的疾病。DSPP 和/或 DSP 蛋白突变的形式包括与正常野生型 DSPP DNA 序列相比的点突变、易位、缺失、重组和其它任何异常等。可用已有的技术如 Southern 印迹法、DNA 序列分析、PCR 和原位杂交检测突变。另外，突变有可能影响蛋白的表达，因此用 Northern 印迹法、Western 印迹法可间接判断基因有无突变。
20

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。
25

实施例 1

30 DGI-II 家系 42 人，DGI-II 伴耳聋家系共 14 人。所有家系成员都由经验丰富的口腔科医师认真检查确诊，并作详细记录。耳聋患者由五官科医师认真检查，并得到电测听和脑干诱发电位的资料进一步证实。抽取家系成员 5ml 外周血，ACD

血球保存液抗凝处理，DNA 提取按如下方法进行：

血样 DNA 的制备

血样 DNA 抽提使用 Qiagen 试剂盒，方法按厂家的方案进行，具体步骤如下：

- a. 于 1.5ml 的离心管中加入蛋白酶 K(20 μ l)、抗凝血标本(200 μ l)及缓冲液 AL(200 μ l)。振荡 15 秒混匀。
- b. 于 56 $^{\circ}$ C 消化 10 分钟后，加 100%乙醇 210 μ l，低速离心 10 秒。
- c. 将以上混合物移到 QIAamp 离心柱中，8000rpm 离心 1 分钟。
- d. 弃去滤过液并将 QIAamp 离心柱转到新的 2ml 收集管中。
- e. 加 500 μ l 缓冲液 AW1 到 QIAamp 离心柱内，8000rpm 离心 1 分钟。
- 10 f. 弃去滤过液并在 QIAamp 离心柱中加入 500 μ l 的 AW2，14000rpm 离心 3 分钟。
- g. 弃去滤过液并将 QIAamp 离心柱转移到新的 1.5ml 的离心管。
- h. 加 200 μ l 缓冲液 AE 到 QIAamp 离心柱内，室温静置 5 分钟，8000rpm 离心 1 分钟，离心管内收集的液体即为血液中抽取的 DNA 溶液。
- 15 i. 1%琼脂糖电泳检查抽取的 DNA 质量，然后用紫外分光光度计将 DNA 定量，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

实施例 2

1、基因分型：

- 20 4q21 区的高度多态的 STR 标记(标记 A-G 分别为：D4s2691,D4s1534,GATA62A11,DSP,DMP1,SPP1,D4s451)的引物序列从 Genome Database 中获得。PCR 扩增在 MJ-Research Inc. PTC-225 型 PCR 仪中进行。扩增程序采用 LI-COR 公司的操作说明书中 touchdown Program 各项参数。PCR 反应体系为 10 μ l，含 20ng 基因组 DNA 模板，2.0mM dNTP，1.0pM 带有 M13 尾巴正链引物和 1.0pM 反链引物，1.0pM 荧光标记的 M13 引物，1.5mM MgCl₂，10mM Tris-HCl，1U 的 Gold Taq 酶(Perkin-Elmer Corp.)。反应体系开始于 95 $^{\circ}$ C 变性 8 分钟，随后 95 $^{\circ}$ C 变性 45 秒，68 $^{\circ}$ C 退火 2 分钟，每循环下降 2 $^{\circ}$ C，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟，4 循环后，95 $^{\circ}$ C 变性 45 秒，58 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟，2 ~ 4 个循环后，退火温度降至 50 ~ 54 $^{\circ}$ C，95 $^{\circ}$ C 变性 30 秒，50 ~ 54 $^{\circ}$ C 退火 30 秒，30 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒，共 20 ~ 30 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 分钟。PCR 产物和荧光标记的标准 DNA marker 在 LICOR 测序仪上进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，收集的资料由 Base Image 4.1 和 Gene Image 3.12 软件分析，同时制作连锁分析家系文件。该

连锁分析家系文件直接用于下一步的连锁分析和单体型分析。

2、连锁分析和单体型分析：

DGI-II 遗传方式定位常染色体显性遗传。等位基因外显率为 100%，疾病基因频率设为 0.0001，各个 STR 的等位基因频率取平均值。运用 LINKAGE5.10 版的 5 MLINK 和 ILINK 程序进行 2 点连锁分析，单体型构建由 SIMWALK2 Version 2.31 和 CYRILLIC2.02 软件分析。

数据如表 1 和 2，以及图 2 和 3 所示。

表 1 DGI-II 家系致病基因位点和 4q21 区 STRP 位点的两点连锁分析

位置	在 θ 处的 LOD							最大值	
	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	Lod	θ
A	$-\infty$	<u>-0.11</u>	<u>2.19</u>	<u>2.76</u>	<u>2.59</u>	<u>1.81</u>	<u>0.83</u>	<u>2.76</u>	<u>0.1</u>
B	<u>1.65</u>	<u>1.62</u>	<u>1.51</u>	<u>1.37</u>	<u>1.09</u>	<u>0.78</u>	<u>0.42</u>	<u>1.65</u>	<u>0.0</u>
C	<u>7.63</u>	<u>7.50</u>	<u>6.96</u>	<u>6.25</u>	<u>4.74</u>	<u>3.09</u>	<u>1.36</u>	<u>7.63</u>	<u>0.0</u>
D	<u>6.06</u>	<u>5.96</u>	<u>5.53</u>	<u>4.98</u>	<u>3.82</u>	<u>2.57</u>	<u>1.24</u>	<u>6.06</u>	<u>0.0</u>
E	<u>8.24</u>	<u>8.11</u>	<u>7.54</u>	<u>6.80</u>	<u>5.22</u>	<u>3.49</u>	<u>1.67</u>	<u>8.24</u>	<u>0.0</u>
F	<u>8.38</u>	<u>8.24</u>	<u>7.67</u>	<u>6.93</u>	<u>5.32</u>	<u>3.55</u>	<u>1.64</u>	<u>8.38</u>	<u>0.0</u>
G	7.34	7.23	6.77	6.16	4.87	3.44	1.84	7.34	0.0

10

表 2 DGI-II 伴耳聋家系致病基因位点和 4q21 区 STRP 位点的两点连锁分析

位置	在 θ 处的 LOD							最大值	
	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	Lod	θ
A	$-\infty$	-2.86	-1.48	-0.92	-0.42	-0.18	-0.05	-0.05	0.4
B	$-\infty$	0.67	1.19	1.25	1.04	0.65	0.21	1.25	0.1
C	1.20	1.8	1.07	0.93	0.63	0.33	0.08	1.20	0.0
D	-0.14	-0.09	-0.05	-0.02	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00	0.2
E	0.91	0.92	0.91	0.86	0.67	0.41	0.14	0.92	0.01
F	2.71	2.66	2.46	2.21	1.65	1.02	0.37	2.71	0.0
G	2.11	2.07	1.91	1.70	1.24	0.73	0.23	2.07	0.0

结果表明,收集的 DGI-II 家系以及 DGI-II 伴耳聋家系的致病基因与 4q21 的 STRP 标记连锁。

实施例 3

5 候选基因的突变筛选

运用 Primer 5.0(<http://www.PrimerBiosoft.com>)软件设计覆盖 DSP 基因外显子及外显子和内含子交界区的引物(具体序列如表 3 所示),利用 PCR-SSCP 技术对 DSP 基因进行突变筛选,PCR 产物在 10%非变性的聚丙烯酰胺凝胶和含 4%甘油的 9.3%非变性聚丙烯酰胺凝胶两种条件下电泳,然后按常规的标准方法银染。

10 引物如下:

表 3 DSPP 编码区的引物序列

引物名称	序列	编号	碱基数
DSPP-E1 正向	5'-TGCAAAAGTCCATGACAGTG-3'	SEQ ID NO:3	128
DSPP-E1 反向	5'-TCAGTTGGTTCTGAGTAAAAGGA-3'	SEQ ID NO:4	
DSPP-E2 正向	5'-AAGTAATTTTGTGCTGTTCTTT-3'	SEQ ID NO:5	149
DSPP-E2 反向	5'-AACAAAGTGAAGAGTTTTCT-3'	SEQ ID NO:6	
DSPP-E3 正向	5'-AAGAACCTTTCAATTGCTAGT-3'	SEQ ID NO:7	189
DSPP-E3 反向	5'-TGGAGAAGTTAATGGAATGTAGCA-3'	SEQ ID NO:8	
DSPP-E4 正向	5'-TGCAATTTGCTTTCTTCAA-3'	SEQ ID NO:9	205
DSPP-E4 反向	5'-CCTCTTCGTTGCTAATGTGG-3'	SEQ ID NO:10	
DSPP-E5 正向	5'-TCACAAGGTAGAAGGAATG-3'	SEQ ID NO:11	226
DSPP-E5 反向	5'-GTTTGTGGCTCCAGCATTGT-3'	SEQ ID NO:12	
DSPP-E6 正向	5'-GGGACACAGGAAAAGCAGAA-3'	SEQ ID NO:13	243
DSPP-E6 反向	5'-TGTTATTGCTTCCAGCTACTTGAG-3'	SEQ ID NO:14	
DSPP-E7 正向	5'-CAATGAGGATGTCGCTGTTG-3'	SEQ ID NO:15	206
DSPP-E7 反向	5'-TATCCAGGCCAGCATCTTCT-3'	SEQ ID NO:16	
DSPP-E8 正向	5'-CACCTCAGATCAACAGCAAGAG-3'	SEQ ID NO:17	226
DSPP-E8 反向	5'-TCTTCTTTCCCATGGTCCTG-3'	SEQ ID NO:18	
DSPP-E9 正向	5'-ATGAAGAAGCAGGAATGGA-3'	SEQ ID NO:19	232
DSPP-E9 反向	5'-ATTCTTTGGCTGCCATTGTC-3'	SEQ ID NO:20	
DSPP-E10 正向	5'-TGATGGAGACAAGACCTCCAA-3'	SEQ ID NO:21	205

DSPP-E10 反向	5'-TGCCATTGAAAGAAATCAGC-3'	SEQ ID NO:22	
DSPP-E11 正向	5'-TTCTTTCCTCCATCCTTCCA-3'	SEQ ID NO:23	194
DSPP-E11 反向	5'-TTCTGATTTTTGGCCAGGTC-3'	SEQ ID NO:24	
DSPP-E12 正向	5'-GGCAATGTCAAGACACAAGG-3'	SEQ ID NO:25	236
DSPP-E12 反向	5'-TCTCCTCGGCTACTGCTGTT-3'	SEQ ID NO:26	
DSPP-E13 正向	5'-TGCAAGGAGATGATCCCAAT-3'	SEQ ID NO:27	231
DSPP-E13 反向	5'-TGTCATCATTCCCATTGTTACC-3'	SEQ ID NO:28	
DSPP-E14 正向	5'-CAAAAGGAGCAGAAGATGATGA-3'	SEQ ID NO:29	243
DSPP-E14 反向	5'-TGCTGTCACTGTCACTGCTG-3'	SEQ ID NO:30	
DSPP-E15 正向	5'-GCAGTGATAGTAGTGACAGCAGTG-3'	SEQ ID NO:31	205
DSPP-E15 反向	5'-TTGCTGCTGTCTGACTTGCT-3'	SEQ ID NO:32	
DSPP-E16 正向	5'-CAAATCAGACAGTGGCAAAGG-3'	SEQ ID NO:33	508
DSPP-E16 反向	5'- GCTCTCACTGCTATTGCTGCT -3'	SEQ ID NO:34	
DSPP-E17 正向	5'- GCAAGTCAGACAGCAGCAAA -3'	SEQ ID NO:35	598
DSPP-E17 反向	5'- CTGCTGTCGCTATCACTGCT -3'	SEQ ID NO:36	
DSPP-E18 正向	5'- ATAGCAACGACAGCAGCAAT-3'	SEQ ID NO:37	583
DSPP-E18 反向	5'-TCGCTGCTATTGCTATCACTG -3'	SEQ ID NO:38	
DSPP-E19 正向	5'-GCAACAGCAGTGATAGTGACA-3'	SEQ ID NO:39	598
DSPP-E19 反向	5'-CTGCTGTCGCTGCTTTCA-3'	SEQ ID NO:40	
DSPP-E20 正向	5'-AGCAGCGACAGCAGTGATAT-3'	SEQ ID NO:41	500
DSPP-E20 反向	5'-TTGTTACCGTTACCAGACTTGC-3'	SEQ ID NO:42	
DSPP-E21 正向	5'-TGACAGCACATCTGACAGCA-3'	SEQ ID NO:43	261
DSPP-E21 反向	5'-TCCCCCAGTTGTTTTTGT-3'	SEQ ID NO:44	

PCR 产物测序了解突变的类型及位置

1、常规 PCR 扩增经 SSCP 筛选出电泳带谱有特征性改变的基因序列。

2、Millipore 柱纯化 PCR 产物。

5

3、测序反应

(1)反应体系

反应化合物 2ul

引物(0.8uM) 2ul

纯化 PCR 产物 3ul

(2)反应条件

96 °C 30 秒

96 °C 30 秒

5 50 °C 5 秒

60 °C 4 分钟

60 °C 4 分钟

35 个循环

(3)测序反应产物的沉淀

10 A.在测序反应产物中加入 9 倍体积的 70%乙醇, 4 °C 3min

B.4 °C,4000rpm 离心 30min

C.4 °C 倒置离心, 当速度达到 1300rpm 时立即停止。

(5)上样测序

A.在沉淀的测序反应产物中加入 2ul 上样染料。

15 B.90 °C 变性 2min , 立即冰浴。

C. ABI PRISM 377 测序仪上加样, 测序。

20 结果如图 4A 和 4B 所示。其中, 在牙本质生成不全 II 型家系中, 相关的突变情况为外显子 3 的第 1 位 G1 → T1(SEQ ID NO: 1 中第 3577 位), 这一改变不仅导致氨基酸发生改变, 还可能导致剪切位点的变化, 从而可能造成内含子被表达、翻译提前中止、或译码等变化(图 4A), 从而无法表达正常的 DSPP(或 DSP)蛋白。

25 在另一牙本质生成不全 II 型并伴耳聋家系中, 相关突变情况为内含子 3 中的第 1 位的 G1 → A1(SEQ ID NO:1 中的第 3661 位)。这一改变预计导致剪切位点的变化, 从而可能造成内含子被表达、翻译提前中止、或译码等变化(图 4B), 从而无法表达正常的 DSPP(或 DSP)蛋白, 还可能影响信号肽的翻译而导致 DSPP 无法正确定位。令人意外的是, 这一位点的变化, 不仅造成了牙本质生成不全 II 型, 还导致了携带者患耳聋。这暗示 DSPP 的变化还与耳聋相关。通过检测 DSPP 的正常与否, 可以诊断耳聋(尤其是牙本质生成不全 II 型伴耳聋)。

30 讨论

1、连锁分析与单体型

我们选用了 4q21 区域 7 个 STR 标记对收集的 DGI- II 家系和 DGI- II 伴耳聋家

系进行了基因分型，连锁分析和构建的单体型表明： DGI-II 家系的致病基因与 4q21 连锁，并在 SPP1 位点产生最大的 Lod 值为 8.38($\theta = 0.00$)(表 1，图 2)； DGI-II 伴耳聋家系亦于 4q21 区域的 STR 位点连锁，且产生最大的 Lod 值为 2.71($\theta = 0.00$)(表 2，图 3)

5 2、候选基因的突变筛选及测序验证

设计了 22 个覆盖 DSPP 基因的引物，对 DSPP 基因进行突变筛选并测序验证，发现 DGI-II 家系的致病基因与 4q21 区域的 STR 连锁，而 DGI-II 伴耳聋家系的致病基因亦与 4q21 区域的 STR 连锁，而 100 个正常人无此变化。说明此变化与 DGI-II 有因果关系。

10 DPP 和 DSP 是由 DSPP 编码的单一转录物的表达产物，分裂为两个较小的具有特异性物理化学性质的多肽。 DSP、DPP 都在牙髓组织中特异性表达，另外，亦有可能在耳蜗组织中表达。 DSP 富含谷氨酸、丝氨酸和甘氨酸有众多的磷酸化位点，推测与牙齿的矿化有关。 DPP 在矿化的作用是双响的。低浓度的 DPP 可结合于 I 型胶原纤维的间隙，启动板状磷石晶体的沉积；高浓度的 DPP 可结合于生长之中的晶体，影响其大小和形状，减缓晶体生长。 DSPP 基因的突变筛选牙本质生成不全和耳聋的机理有待于进一步的研究。

20 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

文献

1. Witkop CJ et al. Hereditary defects in enamel and dentin. *Acta Genet* 1957;7:236~239
2. Cetta G et al. Third international conference on osteogenesis imperfecta. *Ann NY*
5 *Avad Sci*, 1998
3. Takagi Y et al. Matrix protein difference between human normal and
dentinogenesis imperfecta dentin. In the chemistry and biology of mineralized
connective tissues. Veis A, editor. New York: Elsevier/North-Holland. 1981
4. Witkop CJ, et al. Medical and dental findings in the Brandywine isolate. *AL J*
10 *Med Sci* 1966;3:382~403
5. Bixler D, et al. Dentinogenesis imperfecta: genetic variation in a six-generation
family. *J. Dent. Res.* 1968;48:1196~1199
6. Mikkelsen, M et al. Possible localization of Gc-system on chromosome 4. Loss
of long arm 4 material associated with father-child incompatibility within the Gc-system.
15 *Hum. Hered.* 1988;27:105~107
7. Ball, SP, et al. Linkage between dentinogenesis imperfecta and Gc.
Ann. Hum. Genet. 1982;46:35~40
8. Crall MG. Genetic marker study of dentinogenesis imperfecta. *Proc Finn Dent*
Soc. 1992;88:285~293
- 20 9. Crodby AH, et al. Genetic mapping of dentinogenesis imperfecta type II Locus.
Am. J. Hum. Genet. 1995;57:832~839
10. Aplin H.M, et al. Refinement of the dentinogenesis imperfecta type II locus to
an interval of less than 2 centimorgans at chromosome 4q21 and the creation of a yeast
artificial chromosome contig of the critical region. *J. Dent. Res.* 1999;78(6):1270~1276

25

权 利 要 求 书

1.一种对个体的牙本质生成不全 II 型和/或牙本质生成不全 II 型伴耳聋易感性进行诊断的方法,其特征在于,它包括步骤:

5 检测该个体的 DSPP 基因、转录本和/或蛋白,并与正常的 DSPP 基因、转录本和/或蛋白相比较,

存在差异就表明该个体患牙本质生成不全 II 型和/或牙本质生成不全 II 型伴耳聋的可能性高于正常人群。

2.如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,检测的是 DSPP 的基因或转录本,
10 并与正常 DSPP 核苷酸序列比较差异。

3.如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述的差异选自下组:

外显子 3,第 1 位 G1 → T1

内含子 3,第 1 位的 G1 → A1。

4.一种治疗牙本质生成不全 II 型和/或牙本质生成不全 II 型伴耳聋的方法,其
15 特征在于,包括步骤:给需要所述治疗的病人施用安全有效量的正常 DSPP 和/或 DSP 蛋白。

5.如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的 DSPP 和/或 DSP 蛋白被局部施用于牙周组织。

6.一种药物组合物,其特征在于,它含有安全有效量的 DSPP 和/或 DSP 蛋白
20 以及药学上可接受的载体。

7.如权利要求 6 所述的组合物,其特征在于,它是针剂。

8.一种检测牙本质生成不全 II 型和/或牙本质生成不全 II 型伴耳聋的试剂盒,其特征
在于,它包括特异性扩增 DSPP 基因或转录本的引物。

9.如权利要求 8 所述的试剂盒,其特征在于,它还含有与突变部位结合的探
25 针。

10.如权利要求 9 所述的试剂盒,其特征在于,所述的突变选自下组:

外显子 3,第 1 位 G1 → T1

内含子 3,第 1 位的 G1 → A1。

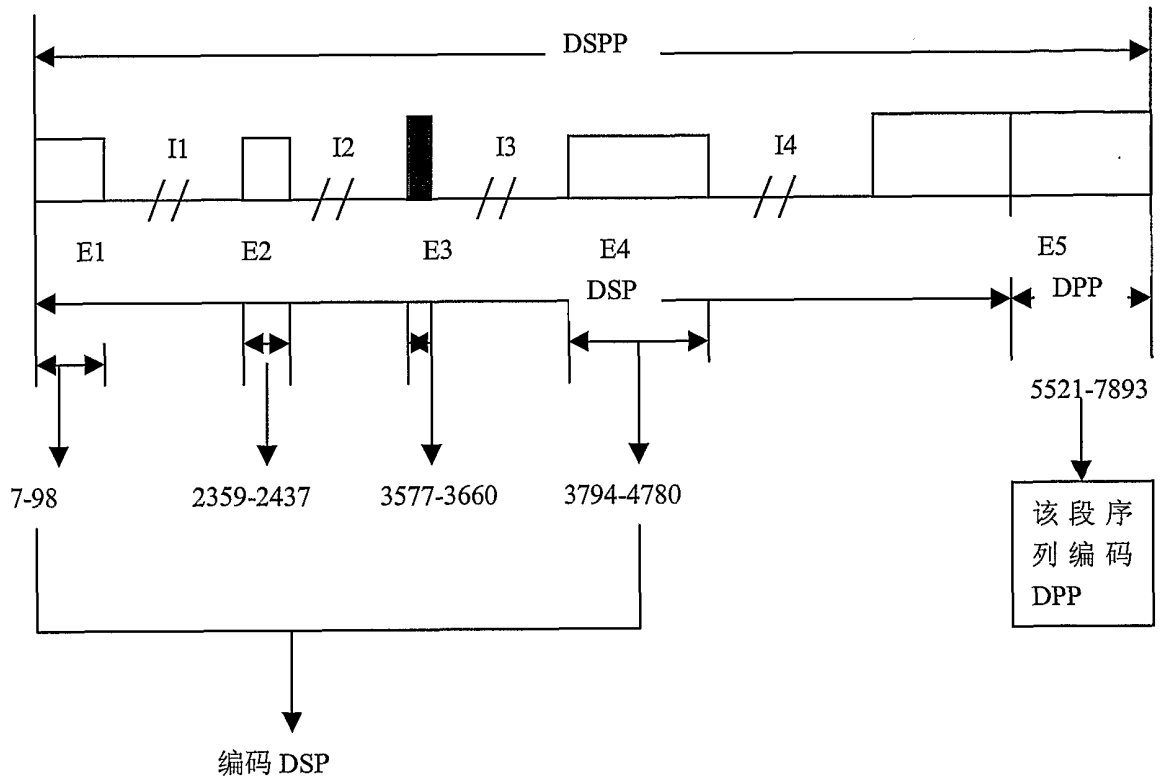


图 1

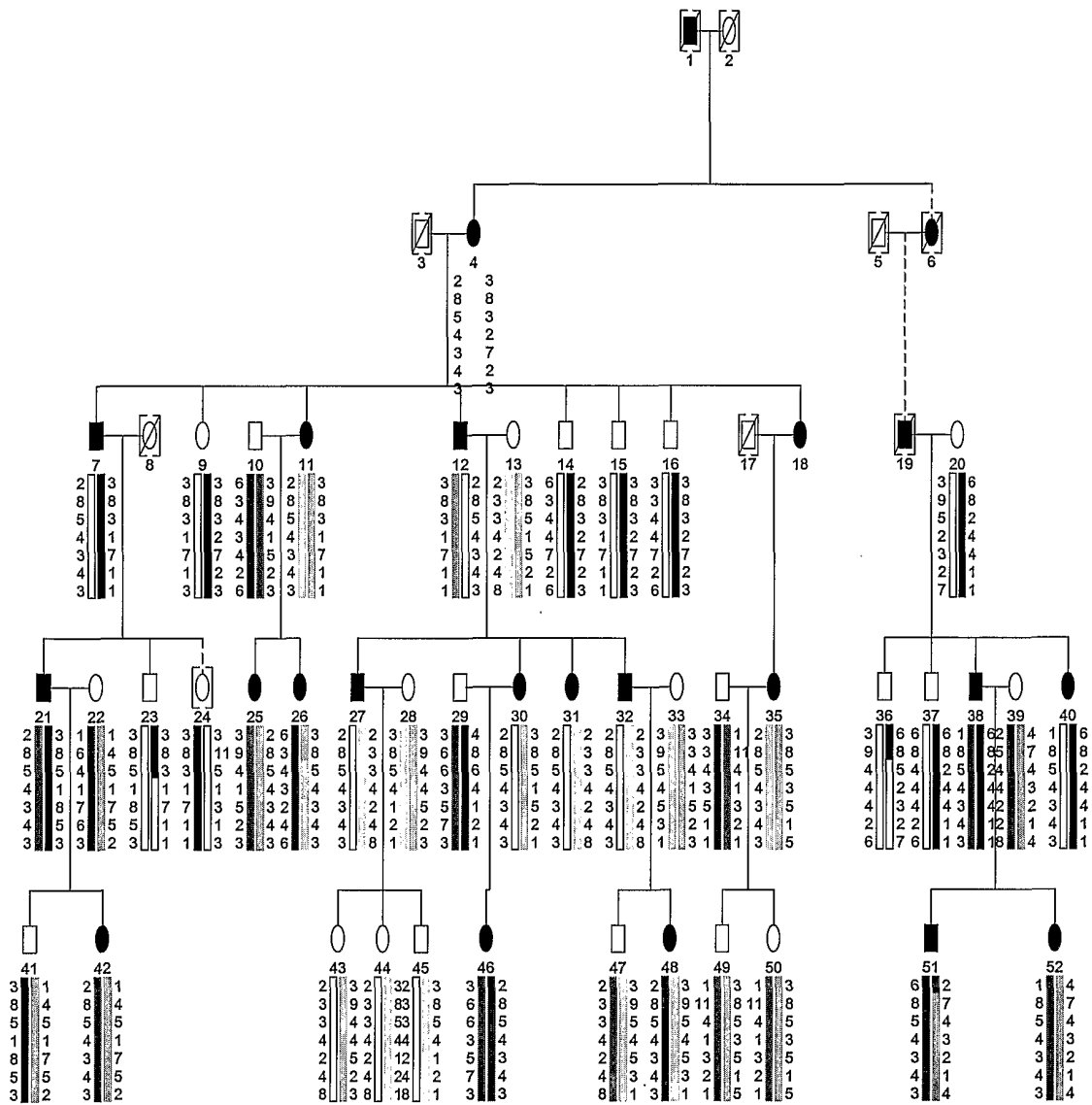


图 2

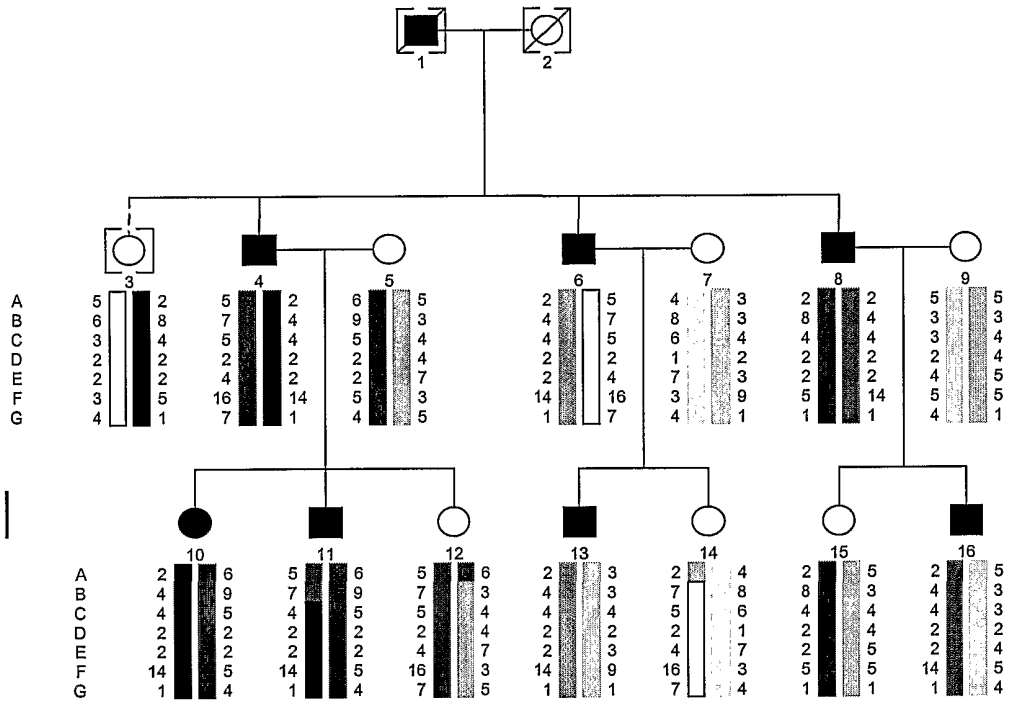
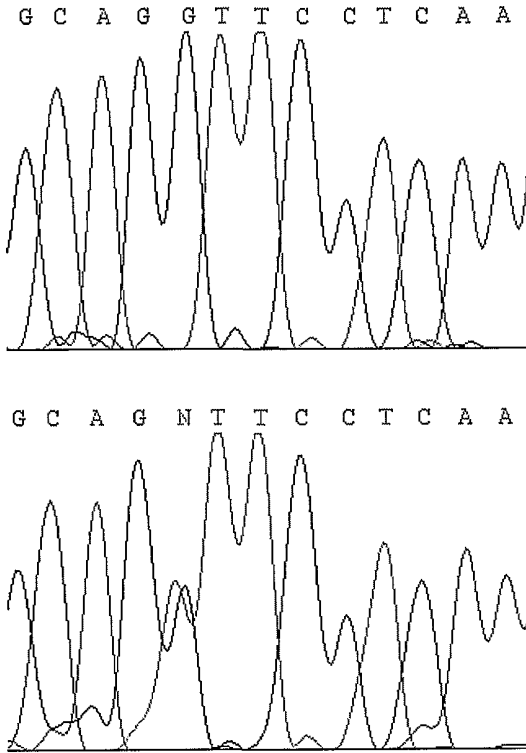


图 3



外显子 3 中:

密码子: GTT → TTT

氨基酸: Val → Phe

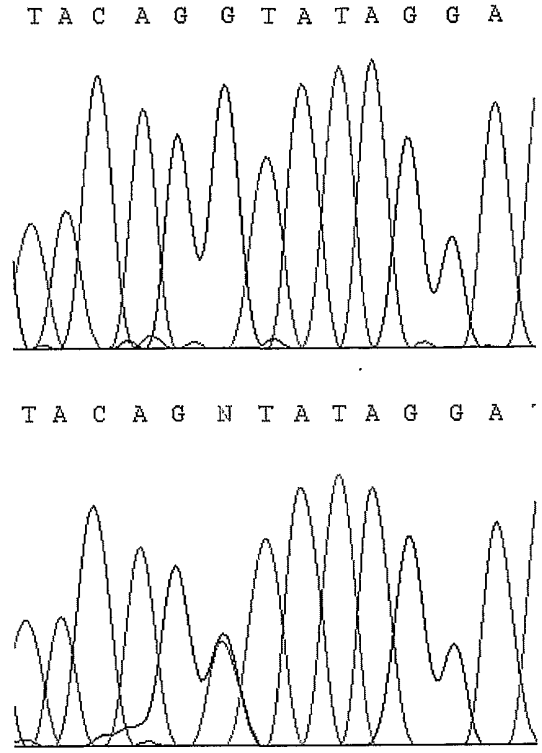
剪切位点改变

... cagtattttctacttggcag **Ntt cct caa agc aaa** ...

~~~~~ V P Q S K

内含子 2                  外显子 3

图 4A



内含子 3 中

G → A

剪切位点改变

...aat **gtg tca gta cag** Ntataggatgtaat ...

N V S V Q ~~~~~

外显子 3                  内含子 3

图 4B

## 序列表

<110> 中国科学院上海生物工程研究中心  
孔, 祥银 等人

<120> 利用牙本质唾磷蛋白基因及其编码产物诊断和治疗牙本质生成不全 II 型的方法

<130> 004121 PC

<150> CN 00125042.6

<151> 2000-09-05

<160> 44

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 8201

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```

attgtcatgc aaaagtccag gacagtgggc cactttcagt cttcaaagag aaagataaga      60
aattctggat ttcaaaatc cttttgaagc cttttaaggt aagatgaaat atccttttta      120
ctcagaacca actgattcat ttagaaagaa ctttgaattt caaagatgaa gccagtttga      180
ttttaagaag cgagtacccc ttaatgatta gattgtatgc ttcctttttg acttgtcata      240
ttgatagtat gtataaaaga taacggacga ttacgaccta aggaagagat agattgggaa      300
gaagaaagac ctcgactga aaaattggcc aactgagggtg gaaatttgac aattaactat      360
ctgggcactt tgattagttt tgataaaaa tgagataact cagatttcaa aaatccacct      420
tgggctttca aacaaggctt caattaggct ttgcttttta gtatatttatt acttactatt      480
acttattatt tattgtccca catgaaatga aatttagcaa tcactaatga tgccaaatct      540
aattgctaaa tgaaatgaag ctaaattcct tttcattagt aacaataaat gaaataatct      600
gatggagctt cacaaattct gaagtctttg tttcatgctg aggtcacctg ggccattttt      660
attgtagtct tcgaagtcac tcacctgctt tggaaacggt gataaccatc atggaattgt      720
tcaggagtgg agctgaaaga gagatgtagt ggtcagattt ctgaactgta gctcagaaac      780
tggacacgta tcaactctggc cttggctgca ggtaccttcc cagtatgctg aggctcttcc      840
aaatcacagt gcagacgggc cttctgcaga gctatgtaat gattaggctt gggactgcaa      900
agtacaggat aactgtggct tagtaaacag ctggccttca acatctgtgc ccagagctc      960
tgcatgatac ttgtcctggt gtcacctcag cctcacttga atctatggca tttcagaagg     1020
agctctagct gttcttggct tictgttgaa cagctataag aatgagcact tttttccctc     1080
tcagtagctc tggaactgtg tcatctctcc tgtgagaaaa cgccagtaat tctcatgaca     1140
gttgatattc agtgaagttt tattatattt tcactaccac cattaaatc aatcaaagcc     1200
attttatgac atgcagcatt ataacttata catctggtgg gagttcatga aataggagta     1260

```

aaactctcct ttctatcatt acttcaagaa atccaacttg caatataaat taatTTTTTT 1320  
actcacacag attataaaat gtctattcca acttatcaga aacatgtttt agaccatttc 1380  
tgaatttgaa ttctaacagg gatgaagaat catgatttta gaagtcccat aaaataattg 1440  
ctatcattta ttcaaaaatt gcaaagtgcc tgaagcaatg ctagatattg ctgatagtca 1500  
taaataatta tcaacaacat tcagaaaacg ttttttctg tgctttgcat tggatacaa 1560  
taatcaccaa gacactctcc tgggcctcag gagcttacag gaaatcaggg caacacataa 1620  
gtaactaggc aatTTTaaac agtgcaatgc gttaccagtg agacgtgcaa acttccttgg 1680  
tataaaaagg aaagagatac caaataccct ttgaagtggc gtcagagagg gcgtctcaga 1740  
gataattcta ccaaacttca ggataatcct gaggtgcagg tgttgttatt attccagtg 1800  
gagggataat aaacctactt aaatttctca agcttacaca gcaagtagca ggggtaacat 1860  
ttgaaccag gtctctgaat acaaaccocg tattcttcc actagcgtag gctccctcat 1920  
gttagtaatt tctttctctt aaagtctggt atagctcaat tctatagatt tggagtaagg 1980  
atgacaagtg ttttacctt gaagcacaat ttcagcagaa ttagttagta cttgattaaa 2040  
gctattcaga agagaaatag atgtttttac acccaagaat tgcagaagaa caaagttaca 2100  
gctatgccct ttgtacctat tatgggtgtt tccttcattg gcacaggcag aaaaaaatct 2160  
aggaagctac attagtgtg agcctgggtga tgtcccata accacaccag gtatgttctg 2220  
gaccatcgta tgccttctcg tgtagatac atgcttctg tccaggaaaa gggcaaatgc 2280  
ttacacatca aaataatata gtactatgat tttccctta cttataagt aattttgtgc 2340  
tgttctttt ttatacagcc attgattatt attattccta aagaaaatga agataattac 2400  
atatttttgc atttgggcag tagcatgggc cattccagta agtatgccct tcttagaaaa 2460  
cctcttcact ttgttatctt ttttaaccta acattaatac aaaatgtagt gtgtgtgtgt 2520  
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgcatgtac atgtgtgtat atatgtgtgt gtgtatatat 2580  
gtttccttaa ttttttttaa caggctgagt ctaaacttt agatttgca taagggcttt 2640  
atgtgatata tgtgaggttt caacaaaacc actccaattc atcgtctcat tcctctatag 2700  
aaactcatat ctcgtctgaa ggattattat tatttaaac atttattcag attaatttac 2760  
acttaatgcc cagaagtcag ggagactttg tccatctttg cttcactc tgtgaatttc 2820  
attctaatac gaacaaagtc tgtgctgttt aggaagttc caagaaagaa taataagaaa 2880  
aagtagattt ttttcaaca tataggagac taattttca ctcagagtta ttatttatgt 2940  
gctcactgtg gaaaatttgg aatatatgac gaaaaccaat aaaaattga gaaaattcaa 3000  
ccatttataa ttttactagc cagccatcat gtttaacatt ttcatatgct ttcataatac 3060  
caaacattg gtatttatgt agttgaaaat gttctcaagt atttcaatg tgctcttgca 3120



gagcacagaa gtatactagc gtaactcttg attttgcttc tgtgcaggct ctggtcacgc 3180  
ctcctgttct ctttaagagtt ttcatcagga ttacacttag agcgggtttg tgctagtgca 3240  
agaggctttt tgtagagaaa caccagaggt ctatcccctc gtctttctac aagactcttt 3300  
ccttctacag ttgagataag tgggctgatac taacacgtcc ataaaattgg taataccaca 3360  
gtgaaaaata tccatgtacc cagtttaaat tctacacaag ccctgtaaga agccacttct 3420  
cttttctatc tgattagatc atactttggc ctttgtgta aacctttctt cttcatggag 3480  
ggaagaatat ttgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgcacgctc acacacatat tcacaaataa 3540  
gaaccttttc aatagccagt attttctact tggcaggttc ctcaaagcaa accactggag 3600  
agacatgtcg aaaaatccat gaatttgcac ctccctagcaa gatcaaatgt gtcagtacag 3660  
gtataggatg taatataattt cattttattt cctatttctg agttgctaca ttccattaac 3720  
ttctccaaga ttgcaatttg ctttccttca agatcattga cactcataat tgattgaatt 3780  
gtttcttttt caggatgagt taaatgccag tggaaacctc aaagaaagtg gtgtcctggt 3840  
gcatgaagggt gatagaggaa ggcaagagaa tacccaagat ggtcacaagg gagaaggaa 3900  
tggctctaag tgggcagaag taggaggaa gagtttttct acatattcca cattagcaaa 3960  
cgaagagggg aatattgagg gctggaatgg ggacacagga aaagcagaaa catatggtca 4020  
tgatggaata catgggaaag aagaaaacat cacagcaaat ggcatccagg gacaagtaag 4080  
catcattgac aatgctggag ccacaaacag aagcaacact aatggaaata ctgataagaa 4140  
tacccaaaat ggggatgttg gcgatgcagg tcacaatgag gatgtcgtctg ttgtccaaga 4200  
agatggacct caagtagctg gaagcaataa cagtacagac aatgaggatg aaataattga 4260  
gaattcctgt agaaacgagg gtaatacaag tgaataaca cctcagatca acagcaagag 4320  
aaatgggact aaggaagctg aggtaacacc aggcactgga gaagatgctg gcctggataa 4380  
ttccgatggg agtccttagtg ggaatggagc agatgaggat gaagacgagg gttctggtga 4440  
tgatgaagat gaagaagcag ggaatggaaa agacagtagt aataacagca agggccagga 4500  
gggccaggac catgggaaag aagatgatca tgatagtagc ataggtaaaa attcggatag 4560  
taaagaatat tatgaccctg aaggcaaaga agatcccat aatgaagttg atggagacaa 4620  
gacctccaag agtgaggaga attctgctgg tattccagaa gacaatggca gccaaagaat 4680  
agaggacacc cagaagctca accatagaga aagcaaacgc gtagaaaata gaatcaccaa 4740  
agaatcagag acacatgctg ttgggaagag ccaagataag gttagtittgt aaagctgatt 4800  
tctttcaatg gcagtttaaa ttcttccctt ccatctattg atgctagcac aaaaataaac 4860  
catgacaagc atccatgtat ttttgtatcc atattacttg actatttaag gaaatctaga 4920  
gtccttacta gacttcgaga tagaacaact ttaaacaact tacatttctg ataacttagt 4980  
tataattcta gaaaagtctt atgtgaaatc atggatcccc atgtaattgt ttacaaaagt 5040

tcctactggg taggaatgtg gatgaatfff taaggaatct aagcaccagg atgctttcaa 5100  
 ttacagaata aagcacatff tcacaaataa ctgtgaagta ctagaaatgt aactcctatc 5160  
 cctatggcaa cttttcccag ttattcttcc tcagatcaat gcaatfffgc agcaaatatt 5220  
 cactagttaa tcattctttc ctccatcctt ccatagggaa tagaaatcaa ggttcccagc 5280  
 agtggcaaca gaaatattac caaagaagtt gggaaaggca acgaaggtaa agaggataaa 5340  
 ggacaacatg gaatgatcftt gggcaaaggc aatgtcaaga cacaaggaga ggttgtcaac 5400  
 atagaaggac ctggccaaaa atcagaacca ggaataaag ttggacacag caatacaggt 5460  
 agtgacagca atagtgatgg atatgacagt tatgattffg atgataagtc catgcaagga 5520  
 gatgatccca atagcagtga tgaatctaaf ggcaatgatg atgctaattc agaaagtgac 5580  
 aataacagca gtagccgagg agatgcttct tataactctg atgaatcaaa agataatggc 5640  
 aatggcagtg actcaaaagg agcagaagat gatgacagtg atagcacatc agacactaat 5700  
 aatagtgaca gtaatggcaa tggtaacaaf gggaatgatg acaatgacaa atcagacagf 5760  
 ggcaaaggta aatcagatag cagtgacagf gatagtagtg atagcagcaa tagcagtgat 5820  
 agtagtgaca gcagtgacag tgacagcagf gatagcaaca gtagcagfga tagtgacagc 5880  
 agtgacagtg acagcagfga tagcagtgac agtgatagta gtgatagcag caatagcagf 5940  
 gacagtagtg acagcagfga tagcagtgac agtagtgata gtagtgacag cagtgacagc 6000  
 aagtcagaca gcagcaaatc agagagcgac agcagtgata gtgacagtaa gtcagacagc 6060  
 agtgacagca acagcagfga cagtagtgac aacagtgata gcagcgacag cagcaatagc 6120  
 agtaacagca gtgatagtag tgacagcagf gatagcagtg acagcagcag tagcagtgac 6180  
 agcagcagta gcagtgacag cagcaacagc agtgatagta gtgacagtag tgacagcagc 6240  
 aatagcagtg agagcagfga tagtagtgac agcagtgata gtgacagcag tgatagtagf 6300  
 gacagcagta atagtaacag cagcgatagf gacagcagca acagcagcga tagcagtgac 6360  
 agcagtgata gcagtgacag cagcaacagc agtgacagta gcgatagcag tgacagcagc 6420  
 aacagcagtg acagcagfga tagcagtgac agcagtgata gtagtgacag cagcaacagc 6480  
 agtgatagca acgacagcag caatagcagf gacagcagtg atagcagcaa cagcagtgat 6540  
 agcagcaaca gcagtgatag cagtgatagc agtgacagca gtgatagcga cagcagcaaf 6600  
 agcagtgaca gcagtaatag tagtgacagc agcgatagca gcaacagcag tgatagcagc 6660  
 gacagcagcg atagcagfga cagcagtgat agcgacagca gcaatagaag tgacagtagf 6720  
 aatagtagtg acagcagcga tagcagtgac agcagcaaca gcagtgacag cagtgatagf 6780  
 agtgacagca gtgacagcaa cgaaagcagc aatagcagtg acagcagfga tagcagcaac 6840  
 agcagtgata gtgacagcag tgatagcagc aacagcagtg acagcagfga tagcagcaac 6900

agcagtgata gcagtgaaag cagtaatagt agtgacaaca gcaatagcag tgacagcagc 6960  
aacagcagtg acagcagtga tagcagtgac agcagtaata gtagtgacag cagcaatagc 7020  
ggtgacagca gcaacagcag tgacagcagt gatagcaata gcagcgacag cagtgcagc 7080  
agcaacagca gcgatagcag tgacagcagt gatagcagtg acagcagtga cagcagtgat 7140  
agcagcaaca gcagtgatag cagtgcagc agtgacagca gtgatagcag taatagtagt 7200  
gacagcagca acagcagtga cagcagcgat agcagtgaca gcagcgatag cagtgcagc 7260  
agtgacagca gcaatagcag tgacagcagt gacagcagcg acagcagtga tagcagtgac 7320  
agcagtggca gcagcgacag cagtgatagc agtgacagca gtgatagcag cgatagcagt 7380  
gacagcagcg acagcagtga cagcagtgac agcagtgaaa gcagcgacag cagcgatagc 7440  
agcgacagca gtgacagcag cgacagcagt gacagcagcg atagcagcga cagcagcgac 7500  
agcagcgata gcagtgcag cagcaatagc agtgatagca gcgacagcag tgatagcagt 7560  
gacagcagcg acagcagcga tagcagcgac agcagtgata gtagtgatag cagtgcagc 7620  
agtgacagca gcgacagcag tgacagcagc gacagcagtg acagcagcga cagcagtgac 7680  
agcaatgaaa gcagcgacag cagtgcagc agcgatagca gtgacagcag caacagcagt 7740  
gacagcagcg acagcagtga tagcagtgac agcacatctg acagcaatga tgagagtgc 7800  
agccagagca agtctggtaa cgtaacaac aatggaagtg acagtgacag tgacagtgaa 7860  
ggcagtgaca gtaaccactc aaccagtgat gattagaaca aaagaaaaac ccataagatt 7920  
ccttttgtga aaagtttggg aatgggatag gaaaaaaga tttccaagaa agtaaagaaa 7980  
ggggagaaat aaacataaga cgtatgtaaa caaaaacaac tgggggaatc aatcaaaca 8040  
gttgattca gaaccaagac ctaactcctg cagagacaga ctctgaatgc atgaccttg 8100  
gtacatgcct gttaatattc atgttctgaa aatattttgt taaaagtgta aatctaaaca 8160  
taaaagaaca attaaaatat tctttaatac ttcacacaga a 8201

<210> 2  
<211> 1253  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 2

Met Lys Ile Ile Thr Tyr Phe Cys Ile Trp Ala Val Ala Trp Ala Ile  
1 5 10 15  
Pro Val Pro Gln Ser Lys Pro Leu Glu Arg His Val Glu Lys Ser Met  
20 25 30  
Asn Leu His Leu Leu Ala Arg Ser Asn Val Ser Val Gln Asp Glu Leu  
35 40 45  
Asn Ala Ser Gly Thr Ile Lys Glu Ser Gly Val Leu Val His Glu Gly  
50 55 60  
Asp Arg Gly Arg Gln Glu Asn Thr Gln Asp Gly His Lys Gly Glu Gly  
65 70 75 80  
Asn Gly Ser Lys Trp Ala Glu Val Gly Gly Lys Ser Phe Ser Thr Tyr

85 90 95  
 Ser Thr Leu Ala Asn Glu Glu Gly Asn Ile Glu Gly Trp Asn Gly Asp  
 100 105 110  
 Thr Gly Lys Ala Glu Thr Tyr Gly His Asp Gly Ile His Gly Lys Glu  
 115 120 125  
 Glu Asn Ile Thr Ala Asn Gly Ile Gln Gly Gln Val Ser Ile Ile Asp  
 130 135 140  
 Asn Ala Gly Ala Thr Asn Arg Ser Asn Thr Asn Gly Asn Thr Asp Lys  
 145 150 155 160  
 Asn Thr Gln Asn Gly Asp Val Gly Asp Ala Gly His Asn Glu Asp Val  
 165 170 175  
 Ala Val Val Gln Glu Asp Gly Pro Gln Val Ala Gly Ser Asn Asn Ser  
 180 185 190  
 Thr Asp Asn Glu Asp Glu Ile Ile Glu Asn Ser Cys Arg Asn Glu Gly  
 195 200 205  
 Asn Thr Ser Glu Ile Thr Pro Gln Ile Asn Ser Lys Arg Asn Gly Thr  
 210 215 220  
 Lys Glu Ala Glu Val Thr Pro Gly Thr Gly Glu Asp Ala Gly Leu Asp  
 225 230 235 240  
 Asn Ser Asp Gly Ser Pro Ser Gly Asn Gly Ala Asp Glu Asp Glu Asp  
 245 250 255  
 Glu Gly Ser Gly Asp Asp Glu Asp Glu Glu Ala Gly Asn Gly Lys Asp  
 260 265 270  
 Ser Ser Asn Asn Ser Lys Gly Gln Glu Gly Gln Asp His Gly Lys Glu  
 275 280 285  
 Asp Asp His Asp Ser Ser Ile Gly Gln Asn Ser Asp Ser Lys Glu Tyr  
 290 295 300  
 Tyr Asp Pro Glu Gly Lys Glu Asp Pro His Asn Glu Val Asp Gly Asp  
 305 310 315 320  
 Lys Thr Ser Lys Ser Glu Glu Asn Ser Ala Gly Ile Pro Glu Asp Asn  
 325 330 335  
 Gly Ser Gln Arg Ile Glu Asp Thr Gln Lys Leu Asn His Arg Glu Ser  
 340 345 350  
 Lys Arg Val Glu Asn Arg Ile Thr Lys Glu Ser Glu Thr His Ala Val  
 355 360 365  
 Gly Lys Ser Gln Asp Lys Gly Ile Glu Ile Lys Gly Pro Ser Ser Gly  
 370 375 380  
 Asn Arg Asn Ile Thr Lys Glu Val Gly Lys Gly Asn Glu Gly Lys Glu  
 385 390 395 400  
 Asp Lys Gly Gln His Gly Met Ile Leu Gly Lys Gly Asn Val Lys Thr  
 405 410 415  
 Gln Gly Glu Val Val Asn Ile Glu Gly Pro Gly Gln Lys Ser Glu Pro  
 420 425 430  
 Gly Asn Lys Val Gly His Ser Asn Thr Gly Ser Asp Ser Asn Ser Asp  
 435 440 445  
 Gly Tyr Asp Ser Tyr Asp Phe Asp Asp Lys Ser Met Gln Gly Asp Asp  
 450 455 460  
 Pro Asn Ser Ser Asp Glu Ser Asn Gly Asn Asp Asp Ala Asn Ser Glu  
 465 470 475 480  
 Ser Asp Asn Asn Ser Ser Ser Arg Gly Asp Ala Ser Tyr Asn Ser Asp  
 485 490 495  
 Glu Ser Lys Asp Asn Gly Asn Gly Ser Asp Ser Lys Gly Ala Glu Asp  
 500 505 510  
 Asp Asp Ser Asp Ser Thr Ser Asp Thr Asn Asn Ser Asp Ser Asn Gly  
 515 520 525  
 Asn Gly Asn Asn Gly Asn Asp Asp Asn Asp Lys Ser Asp Ser Gly Lys  
 530 535 540  
 Gly Lys Ser Asp Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser  
 545 550 555 560  
 Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser Asp Ser Asn Ser  
 565 570 575  
 Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser Asp Ser Asp  
 580 585 590

Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser  
 595 600 605  
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Lys Ser  
 610 615 620  
 Asp Ser Ser Lys Ser Glu Ser Asp Ser Ser Asp Ser Asp Ser Lys Ser  
 625 630 635 640  
 Asp Ser Ser Asp Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Asn Ser Asp Ser  
 645 650 655  
 Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser  
 660 665 670  
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Asp  
 675 680 685  
 Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser  
 690 695 700  
 Ser Glu Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser Asp  
 705 710 715 720  
 Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Asn Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser Asn  
 725 730 735  
 Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser  
 740 745 750  
 Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser  
 755 760 765  
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp  
 770 775 780  
 Ser Asn Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser  
 785 790 795 800  
 Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser  
 805 810 815  
 Asp Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser  
 820 825 830  
 Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser  
 835 840 845  
 Asp Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser Asn Arg Ser Asp Ser Ser Asn Ser  
 850 855 860  
 Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser  
 865 870 875 880  
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Glu Ser Ser Asn Ser Ser Asp  
 885 890 895  
 Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser  
 900 905 910  
 Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Glu  
 915 920 925  
 Ser Ser Asn Ser Ser Asp Asn Ser Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser  
 930 935 940  
 Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser  
 945 950 955 960  
 Asn Ser Gly Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Asn Ser  
 965 970 975  
 Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser  
 980 985 990  
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Asp  
 995 1000 1005  
 Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ser Asp  
 1010 1015 1020  
 Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp  
 1025 1030 1035  
 Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp  
 1040 1045 1050  
 Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Gly Ser Ser Asp  
 1055 1060 1065  
 Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp  
 1070 1075 1080  
 Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Glu Ser Ser Asp



|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| <213> 引物                                      |    |
| <400> 7<br>aagaaccttt tcaattgcta gt           | 22 |
| <210> 8<br><211> 24<br><212> DNA<br><213> 引物  |    |
| <400> 8<br>tggagaagtt aatggaatgt agca         | 24 |
| <210> 9<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物  |    |
| <400> 9<br>tgcaatttgc tttccttcaa              | 20 |
| <210> 10<br><211> 21<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 10<br>cctcttcggt tgctaattgt g           | 21 |
| <210> 11<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 11<br>tcacaaggta gaagggatg              | 20 |
| <210> 12<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 12<br>gtttgtggct ccagcattgt             | 20 |
| <210> 13<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 13<br>gggacacagg aaaagcagaa             | 20 |
| <210> 14<br><211> 24<br><212> DNA             |    |

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| <213> 引物                                      |    |
| <400> 14<br>tgttattgct tccagctact tgag        | 24 |
| <210> 15<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 15<br>caatgaggat gtcgctgttg             | 20 |
| <210> 16<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 16<br>tatccaggcc agcatcttct             | 20 |
| <210> 17<br><211> 22<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 17<br>cacctcagat caacagcaag ag          | 22 |
| <210> 18<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 18<br>tcttctttcc catggtcctg             | 20 |
| <210> 19<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 19<br>atgaagaagc agggaatgga             | 20 |
| <210> 20<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 20<br>attctttggc tgccattgtc             | 20 |
| <210> 21<br><211> 21<br><212> DNA             |    |



|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| <213> 引物                                      |    |
| <400> 21<br>tgatggagac aagacctcca a           | 21 |
| <210> 22<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 22<br>tgccattgaa agaaatcagc             | 20 |
| <210> 23<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 23<br>ttctttcctc catccttcca             | 20 |
| <210> 24<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 24<br>ttctgatttt tggccaggtc             | 20 |
| <210> 25<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 25<br>ggcaatgtca agacacaagg             | 20 |
| <210> 26<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 26<br>tctcctcggc tactgctgtt             | 20 |
| <210> 27<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 27<br>tgcaaggaga tgatcccaat             | 20 |
| <210> 28<br><211> 22<br><212> DNA             |    |

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| <213> 引物                                      |    |
| <400> 28<br>tgtcatcatt cccattgtta cc          | 22 |
| <210> 29<br><211> 22<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 29<br>caaaaggagc agaagatgat ga          | 22 |
| <210> 30<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 30<br>tgctgtcact gtcactgctg             | 20 |
| <210> 31<br><211> 24<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 31<br>gcagtgatag tagtgacagc agtg        | 24 |
| <210> 32<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 32<br>ttgctgctgt ctgacttgct             | 20 |
| <210> 33<br><211> 21<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 33<br>caaatcagac agtggcaaag g           | 21 |
| <210> 34<br><211> 21<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 34<br>gctctcactg ctattgctgc t           | 21 |
| <210> 35<br><211> 20<br><212> DNA             |    |

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| <213> 引物                                      |    |
| <400> 35<br>gcaagtcaga cagcagcaaa             | 20 |
| <210> 36<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 36<br>ctgctgtcgc tatcactgct             | 20 |
| <210> 37<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 37<br>atagcaacga cagcagcaat             | 20 |
| <210> 38<br><211> 21<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 38<br>tcgctgctat tgctatcact g           | 21 |
| <210> 39<br><211> 21<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 39<br>gcaacagcag tgatagtgac a           | 21 |
| <210> 40<br><211> 18<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 40<br>ctgctgtcgc tgctttca               | 18 |
| <210> 41<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> 引物 |    |
| <400> 41<br>agcagcgaca gcagtgatat             | 20 |
| <210> 42<br><211> 22<br><212> DNA             |    |

<213> 引物

<400> 42

ttgttaccgt taccagactt gc

22

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> 引物

<400> 43

tgacagcaca tctgacagca

20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> 引物

<400> 44

tccccagtt gtttttgttt

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN01/01292

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>7</sup> A61K38/17

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>7</sup> A61K38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Chinese Patnets, Chinese Scientific and Technical Journals

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank, EPOQUE, BA, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| X         | Eur J Oral Sci 1998; 106 Suppl 1:227-33<br>see the abstract                        | 1,2,4-9            |
| X         | J Biol Chem 1997; 272(2):835-42<br>see the abstract                                | 1,2,4-9            |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 April 2002 (02. 04. 02)

Date of mailing of the international search report

30 MAY 2002

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office  
6, Xitucheng Road, Haidian District,  
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-010-62019451

Authorized officer

SUN, guangxiu

Telephone No. 86-010-62093884



国际检索报告

国际申请号

PCT/CN01/01292

A. 主题的分类

IPC<sup>7</sup> A61K38/17

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC<sup>7</sup> A61K38/17

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献数据库, 中文科技期刊数据库

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

GenBank, EPOQUE, BA, MEDLINE

C. 相关文件

| 类型* | 引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明                           | 相关的权利要求编号 |
|-----|------------------------------------------------|-----------|
| X   | Eur J Oral Sci 1998; 106 Suppl 1:227-33<br>见摘要 | 1,2,4-9   |
| X   | J Biol Chem 1997; 272(2):835-42<br>见摘要         | 1,2,4-9   |

其余文件在 C 栏的续页中列出。

见同族专利附件。

\* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

02. 4 月 2002(02.04.02)

国际检索报告邮寄日期

30. 5 月 2002 (02.05.30)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-010-62019451

授权官员

孙广秀

电话号码: 86-010-62093884

