

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/12



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01808748.5

C12N 15/63 C12N 1/21

C12N 5/10 C07K 14/705

C07K 16/28 C12Q 1/68

G01N 33/53 G01N 33/68

A61K 31/7088 A61K 39/395

A61P 35/00

[43] 公开日 2003 年 6 月 25 日

[11] 公开号 CN 1426468A

[22] 申请日 2001.3.2 [21] 申请号 01808748.5

[30] 优先权

[32] 2000. 3. 3 [33] US [31] 60/186,915

[86] 国际申请 PCT/US01/06801 2001.3.2

[87] 国际公布 WO01/66741 英 2001.9.13

[85] 进入国家阶段日期 2002.10.28

[71] 申请人 图拉莱克公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 戴维·穆 斯科特·鲍尔斯

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 7 页 说明书 65 页 序列表 4 页
附图 4 页

[54] 发明名称 KCNB:新型钾通道蛋白

[57] 摘要

本发明提供了新型钾通道蛋白 KCNB 的核酸和蛋白序列。本发明公开的序列用于许多任意目的,包括用于 KCNB 的特异性检测、与 KCNB 相关和/或调节 KCNB 活性的分子的鉴定,以便诊断许多与 KCNB 或 KCNB 活性相关的任意症状,或调节哺乳动物中 KCNB 分子的数目或活性。

```
KCNK3 1 mkrqmvrtlalivctftyllvgaavfdalesepelieqrqlrqqelra 50
      |||
KCNB 1 MKRONVRLSLIVCTFTYLLVGAAVFDALSDHEMRREEKLBEBIRIKG 50
      |||
      PI
51 rylsggggyeelervvrlkphkagvqwfagsgfyfaytvtittigghaa 100
      |||
51 KYNIGSEEDYRQLELVILQSEPHRAGVQWKFAGSFFFAITVITTIYGHAA 100
      |||
101 pstdgskvfcmfyaligipiltlvmfqlgerintlvryllhrakglmx 150
      |||
101 PGTADGKAFCMFYAVLIGIPILTVMFQSLGERMVFVRVYLLKRIKCCGMK 150
      |||
      PI
151 radvsamnmvligffecistlcigaaafeyehwtffgavvyvccitltti 200
      |||
151 NTLVSMENNVIVGPFSCMGLCIGAAAFQCCBEWSFPHAYTTCFILTITI 200
      |||
      PI
201 gfgdyvalqkdqalgtqpyvafsfvyiltglvtvigaflnlvrfetm 250
      |||
201 GFGDYVALQKDGALQKKTIVAFSFWYLLVGLVIGAFNLVVRPLTMN 250
      |||
      PI
251 aedekrdsehralltrngqagggggggahttdtasaaaggggfruvy 300
      |||
251 SEDERRDAEBSASL.....AGNRNSMVIHIPEEPSPRP.....RYK 287
      |||
301 aevlhfgmceclwykareklysipmldiprdlstdtcveqahspggg 350
      |||
288 ADVPDLOSVCSTCYRSQD...YGRSVAFONSFAKLAPHYFSSISYKI 334
      |||
351 grysdtprrrlcsgepraaisvstglhslatfrglmkrrasv. 394
      |||
335 EBISSPSTLANSLS...FP.SPISSISFGLSPSTDRQRLMKRRKSV* 375
```

ISSN 1008-4274

1. 编码钾通道多肽的分离的核酸，所述钾通道多肽与氨基酸序列 SEQ ID NO:1 有大于 70% 的氨基酸序列同一性。

5

2. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述多肽与氨基酸序列 SEQ ID NO:1 有大于 90% 的氨基酸序列同一性。

3. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述多肽与氨基酸序列 SEQ ID NO:1 有大于 95% 的氨基酸序列同一性。

10

4. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述核酸编码与针对氨基酸序列 SEQ ID NO:1 所产生的多克隆抗体特异性结合的多肽。

15

5. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述核酸编码包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的蛋白。

6. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述核酸包含核苷酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5。

20

7. 权利要求 1 所述的分离的核酸，其中所述核酸由引物扩增，所述引物与包含核苷酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5 的核酸在严格条件下特异性杂交。

25

8. 编码多肽的分离的核酸，所述多肽与包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的多肽有大于 70% 氨基酸同一性，其中所述核酸与核苷酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5 在适度严格杂交条件下选择性杂交。

30

9. 编码钾通道多肽的分离的核酸，所述钾通道多肽与包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的多肽有大于 70% 的氨基酸同一性，其中所述核

酸与核苷酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5 在严格杂交条件下选择性杂交。

5 10. 编码钾通道多肽的分离的核酸，其中所述多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的至少 30 个连续氨基酸。

 11. 编码氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的亚片段的分离的核酸，其中所述亚片段选自 C 末端结构域、M3 结构域和从第 30 位氨基酸至第 70 位氨基酸的亚片段。

10

 12. 分离的钾通道多肽，其与氨基酸序列 SEQ ID NO:1 有大于 70 %氨基酸序列同一性。

 13. 权利要求 12 所述的多肽，其中所述多肽与氨基酸序列 SEQ ID
15 NO:1 的氨基酸序列有大于 90%的氨基酸序列同一性。

 14. 权利要求 12 所述的多肽，其中所述多肽与氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列有大于 95%的氨基酸序列同一性。

20 15. 权利要求 12 所述的多肽，其中所述多肽与针对 SEQ ID NO:1 所产生的多克隆抗体特异性结合。

 16. 权利要求 12 所述的多肽，其中所述多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1。

25

 17. 分离的钾通道多肽，其中所述多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的至少 30 个连续氨基酸。

30 18. 分离的多肽，其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的亚片段，其中所述亚片段选自 C 末端结构域、M3 结构域和从第 30 位氨基酸至第

70 位氨基酸的亚片段。

19. 与权利要求 12 或 17 所述的多肽选择性结合的抗体。

5 20. 包含权利要求 1 所述的核酸的表达载体。

21. 用权利要求 20 所述的载体转染的宿主细胞。

22. 鉴定调节钾通道多肽活性的化合物的方法，所述方法包括：

- 10 (i) 将所述化合物同与 SEQ ID NO:1 有大于 70% 的氨基酸同一性的多肽接触；和
 (ii) 确定所述化合物对所述多肽的功能效应。

15 23. 权利要求 22 所述的方法，其中所述多肽与 SEQ ID NO:1 有大于 90% 的氨基酸序列同一性。

24. 权利要求 22 所述的方法，其中所述多肽与 SEQ ID NO:1 有大于 95% 的氨基酸序列同一性。

20 25. 权利要求 22 所述的方法，其中所述化合物是小的有机化合物。

26. 权利要求 22 所述的方法，其中所述多肽与固相连接。

25 27. 权利要求 26 所述的方法，其中所述多肽与固相共价连接。

28. 权利要求 22 所述的方法，其中所述功能效应通过测定离子通量的变化而确定。

30 29. 权利要求 22 所述的方法，其中所述功能效应通过测定所述

化合物与所述多肽的结合而确定。

30. 权利要求 22 所述的方法，其中所述多肽是重组的。

5 31. 权利要求 22 所述的方法，其中所述多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1。

32. 权利要求 22 所述的方法，其中所述多肽在细胞或细胞膜中表达。

10

33. 权利要求 32 所述的方法，其中所述细胞是真核细胞。

34. 权利要求 33 所述的方法，其中真核细胞是神经元。

15 35. 从来自哺乳动物的生物样品中检测癌细胞的方法，所述方法包括下列步骤：

 (i) 提供来自哺乳动物的生物样品；和

 (ii) 在来自哺乳动物的样品中检测编码与 SEQ ID NO:1 有大于 70% 的氨基酸同一性的钾通道多肽的核酸分子，其中与正常水平比较样品中所述核酸分子水平的增加显示存在癌细胞。

20

36. 权利要求 35 所述的方法，其中所述多肽与 SEQ ID NO:1 有大于 90% 的氨基酸序列同一性。

25 37. 权利要求 35 所述的方法，其中所述多肽与 SEQ IN NO:1 有大于 95% 的氨基酸序列同一性。

38. 权利要求 35 所述的方法，其中所述核酸分子包含序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5。

30

39. 权利要求 35 所述的方法，其中检测步骤进一步包含：

(a) 将所述核酸分子同与所述核酸分子选择性杂交的探针接触，所述接触条件使所述探针与所述核酸分子选择性杂交以形成稳定的杂交复合体；和

5 (b) 检测所述杂交复合体。

40. 权利要求 39 所述的方法，其中接触步骤进一步包含在扩增反应中扩增所述核酸分子的步骤。

10 41. 权利要求 40 所述的方法，其中所述扩增反应是聚合酶链式反应。

42. 权利要求 35 所述的方法，其中所述癌细胞选自乳腺癌细胞、肺癌细胞、结肠癌细胞以及前列腺癌细胞。

15

43. 权利要求 42 所述的方法，其中所述癌细胞是乳腺癌细胞。

44. 权利要求 42 所述的方法，其中所述癌细胞是肺癌细胞。

20 45. 权利要求 35 所述的方法，其中哺乳动物是人。

46. 检测来自哺乳动物生物样品中的癌细胞的方法，所述方法包括下列步骤：

(i) 提供来自哺乳动物生物样品；和

25 (ii) 在来自哺乳动物的样品中检测与 SEQ ID NO:1 有大于 70 % 的氨基酸同一性的钾通道多肽，其中与正常水平比较样品中所述多肽水平的增加显示存在癌细胞。

30 47. 权利要求 46 的方法，其中所述多肽与 SEQ ID NO:1 有大于 90 % 的氨基酸序列同一性。

48. 权利要求 46 的方法, 其中所述多肽与 SEQ ID NO:1 有大于 95 % 的氨基酸序列同一性。

5 49. 权利要求 46 的方法, 其中所述多肽包含序列 SEQ ID NO:1。

50. 权利要求 46 的方法, 其中所述多肽的检测采用与所述多肽选择性结合的抗体。

10 51. 权利要求 50 的方法, 其中所述多肽由免疫测定方法定量。

52. 权利要求 46 的方法, 其中所述癌细胞选自乳腺癌细胞、肺癌细胞、结肠癌细胞以及前列腺癌细胞。

15 53. 权利要求 52 的方法, 其中所述癌细胞是乳腺癌细胞。

54. 权利要求 52 的方法, 其中所述癌细胞是肺癌细胞。

55. 权利要求 46 的方法, 其中所述哺乳动物是人。

20

56. 抑制癌细胞增殖的方法, 所述癌细胞过量表达与 SEQ ID NO:1 有大于 70% 氨基酸同一性的钾通道多肽, 所述方法包括将所述癌细胞与治疗有效量的钾通道多肽的抑制剂接触的步骤。

25 57. 权利要求 56 所述的方法, 其中所述将癌细胞与治疗有效量的抑制剂接触的步骤导致癌细胞的编程性细胞死亡。

58. 权利要求 56 所述的方法, 其中所述癌细胞选自乳腺癌、肺癌、结肠癌或前列腺癌。

30

59. 权利要求 58 所述的方法，其中所述癌细胞是乳腺癌细胞。

60. 权利要求 58 所述的方法，其中所述癌细胞是肺癌细胞。

5 61. 权利要求 56 所述的方法，其中所述钾通道多肽包含氨基酸
序列 SEQ ID NO:1。

62. 权利要求 56 所述的方法，其中所述抑制剂是抗体。

10 63. 权利要求 56 所述的方法，其中所述抑制剂是反义多核苷酸。

64. 治疗钾通道相关失调的方法，所述方法包括施用治疗有效量的
的钾通道多肽的调节剂，所述多肽与 SEQ ID NO:1 有大于 70% 的氨基
酸同一性。

15

65. 治疗与钾通道蛋白相关的疾病或状况的方法，所述方法包括
给患者施用权利要求 19 所述的抗体。

20

66. 制备钾通道多肽的方法，所述方法包括由重组表达载体来表
达所述多肽的步骤，所述表达载体包含编码所述多肽的核酸，其中所
述多肽的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 有 70% 的氨基酸同一性。

25

67. 制备包含钾通道多肽的重组细胞的方法，所述方法包括用包
含编码所述多肽的核酸的表达载体转导所述细胞的步骤，其中所述多
肽的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 有大于 70% 的氨基酸同一性。

KCNB: 新型钾通道蛋白

5 相关申请参考

本申请要求 2000 年 3 月 3 日提交的美国临时申请 60/186,951 的优先权，以其全文在此引作参考。

发明背景

10 钾离子通道 (K^+ 通道) 为普遍存在的跨膜蛋白，是膜电位的主要决定因素，即压差存在于几乎所有动物细胞的质膜之间。在可兴奋细胞中， K^+ 通道限定了动作电位的频率和持续时间，并在神经元整合、肌肉收缩和激素分泌中发挥了根本作用。在非可兴奋细胞中， K^+ 通道对维持膜电位和调节细胞体积至关重要。因此，这些通道是开发可用于
15 调节基础细胞电生理学的调节剂重要的目标，尤其是用于治疗应用。

发明概述

本发明提供编码新型 K^+ 通道蛋白 KCNB (乳房中表达的钾通道) 20 的分离核酸。本发明公开的序列可用于任何目的，包括用于表达 KCNB 细胞的特异性检测、与 KCNB 活性相关和/或调节 KCNB 活性的分子的鉴定或与 K^+ 通道活性或表达相关的任何状况如癌症的诊断。核酸和其编码的新型受体在本发明中尤其称为 KCNB。

25 一方面，本发明提供编码多肽的分离核酸，所述多肽与 SEQ ID NO:1 有至少 70% 的氨基酸序列同一性，通常大于 90% 或 95% 的序列同一性。在一实施方案中，该核酸编码与多克隆抗体特异结合的多肽，所述多克隆抗体抗 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。在另一实施方案中，该核酸编码具有钾通道活性的多肽。在另一实施方案中，该核酸编码
30 含有氨基酸序列的蛋白。

在进一步实施方案中，该核酸包含 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5 的核苷酸序列，或可通过引物扩增，所述引物在严格条件下与具有核苷酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5 的核酸特异性杂交。

5

在另一方面，本发明提供分离核酸，所述分离的核酸在严格条件下与具有 SEQ ID NO:1 核苷酸序列的核酸特异性杂交。

在另一方面，本发明提供编码多肽的分离核酸，所述多肽与氨基酸序列 SEQ ID NO:1 有至少 70% 的氨基酸同一性，通常大于 90% 或 95% 序列同一性，其中所述核酸在适度严格的杂交条件下选择性地与 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列杂交。

在另一实施方案中，本发明提供分离多肽，所述分离多肽与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列有至少 70% 的氨基酸序列同一性，通常大于 90% 或 95% 的序列同一性。在一实施方案中，该多肽特异性地与抗 SEQ ID NO:1 的多克隆抗体结合。在另一实施方案中，该多肽具有钾通道活性。在其他实施方案中，该多肽具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。

在另一方面，本发明提供可选择性地与多肽结合的抗体，所述多肽与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列有至少 70% 的氨基酸同一性，通常大于 90% 或 95% 的序列同一性。

在另一方面，本发明提供包含编码多肽核酸的表达载体，所述多肽与 SEQ ID NO:1 有至少 70% 氨基酸序列同一性，通常大于 90% 或 95% 序列同一性。在另一方面，本发明提供了用该载体转染的宿主细胞。

本发明还提供鉴定调节钾通道活性的化合物的方法，该方法包括：(i) 将所述化合物与多肽接触，该多肽与 SEQ ID NO:1 有至少 70

%氨基酸序列同一性，通常大于 90%或 95%序列同一性；和 (ii) 确定所述化合物对该多肽的功能效应。在一实施方案中，该多肽与固相连接，例如与固相共价连接。

5 在一实施方案中，通过测定离子通量的变化来确定功能效应。在另一实施方案中，通过测定化合物与多肽的结合来确定功能效应。在进一步实施方案中，该多肽是重组的。在一些实施方案中，该多肽包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列，或在细胞或细胞膜中表达。所述细胞可以是真核细胞，如神经元。

10

 在另一方面，本发明提供鉴定 KCNB 活性的调节剂的方法，所述方法包括：(i) 将 KCNB 与候选调节剂接触；和 (ii) 确定候选调节剂对 KCNB 是否具有功能效应。在一实施方案中，KCNB 包含多肽，所述多肽与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列有至少 70%氨基酸序列同一性，通常大于 90%或 95%序列同一性。在另一实施方案中，KCNB 包含具有 SEQ ID NO:1 氨基酸序列的至少 30 个连续氨基酸的多肽。在进一步实施方案中，KCNB 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。在进一步实施方案中，KCNB 具有钾通道活性或与固相连接，例如共价连接。

15

20

 在一些实施方案中，通过测定离子通量的变化或通过测定化合物与 KCNB 的结合来确定功能效应。

25

 在另一实施方案中，多肽在细胞或细胞膜中表达。所述细胞为真核细胞，如神经元或肿瘤细胞。在一实施方案中，真核细胞是肿瘤细胞，其中与正常细胞比较，KCNB 在细胞或细胞膜中扩增。

30

 在另一方面，本发明提供来自哺乳动物通常是人的生物样品中的癌细胞的检测方法，所述方法包括下列步骤：(i) 提供来自哺乳动物的生物样品；和 (ii) 检测来自哺乳动物样品中的 KCNB 核酸分子，

其中与正常细胞比较样品中的 KCNB 核酸增加表明存在癌症细胞。在一实施方案中，KCNB 核酸分子与 SEQ ID NO:2 的核酸序列有大于 70 %核酸序列同一性。在另一实施方案中，KCNB 核酸分子包含 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:5 的核酸序列的至少 50 个连续核苷酸。在一选择性实施方案中，该核酸序列包含 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:5 的序列。

在进一步实施方案中，检测步骤进一步包括：（a）将基因与探针接触，所述探针在一定条件下选择性地与 KCNB 核酸分子杂交，其中探针与基因选择性地杂交从而形成稳定的杂交复合体；和（b）检测杂交复合体。在一实施方案中，接触步骤进一步包含在扩增反应中扩增 KCNB 核酸分子的步骤。在一些实施方案中，扩增反应是聚合酶链反应。

在另一实施方案中，癌细胞选自乳腺癌细胞、肺癌细胞、结肠癌细胞和前列腺癌细胞。通常，癌细胞是乳腺癌细胞或肺癌细胞。

在另一方面，本发明提供检测来自哺乳动物通常是人的生物样品中癌细胞的方法，所述方法包含下列步骤：（i）提供来自哺乳动物的生物样品；和（ii）检测 KCNB 多肽的过量表达，由此检测生物样品中癌细胞的存在。在一实施方案中，KCNB 多肽与 SEQ ID NO:1 的核酸序列有大于 70%的氨基酸序列同一性，通常大于 90%或 95%的序列同一性。在另一实施方案中，KCNB 多肽包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的至少 50 个连续核苷酸。在进一步实施方案中，该多肽包含 SEQ ID NO:1 的序列。

25

在一实施方案中，多肽检测采用与该多肽选择性结合的抗体。通常，所述多肽的定量采用免疫分析。

在一些实施方案中，癌细胞选自乳腺癌细胞、肺癌细胞、结肠癌细胞和前列腺癌细胞。通常，癌细胞是乳腺癌细胞或肺癌细胞。

30

在另一方面，本发明提供抑制癌细胞增殖的方法，所述癌细胞过量表达 KCNB 多肽，该多肽与 SEQ ID NO:1 有至少 70% 的氨基酸同一性，通常大于 90% 或 95% 的序列同一性，所述方法包括将癌细胞与治疗有效量的 KCNB 多肽的抑制剂接触的步骤。在一些实施方案中，癌细胞选自乳腺癌细胞、肺癌细胞、结肠癌细胞或前列腺癌细胞。通常，癌细胞是乳腺癌细胞或肺癌细胞。在一实施方案中，KCNB 多肽具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。在其他实施方案中，抑制剂为抗体或反义多核苷酸。

在另一方面，本发明提供治疗 KCNB 相关的失调的方法，所述方法包含施用治疗有效量的 KCNB 调节剂。

在另一方面，本发明提供治疗与钾通道相关的疾病或症状的方法，所述方法包括给患者施用抗体，该抗体与分离的钾通道多肽选择性结合，所述多肽与 SEQ ID NO:1 有大于 70% 的氨基酸同一性，通常大于 90% 或 95% 的序列同一性。在一实施方案方面，本发明提供编码多肽的分离核酸，其中所述核酸在严格杂交条件下与包含 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5 的核苷酸序列的核酸特异性地杂交。

附图简述

附图 1 表示对应于 KCNB 结构域的氨基酸序列。

附图 2 是基因组 DNA 扩增中心和 KCNB 基因座物理图的示意图。x-轴表示人染色体 8q24.3 区域中的 10 个标记。y-轴表示 x-轴中所定义的每个标记的拷贝数。KCNB 基因以箭头表示。人基因组克隆不是克隆真正大小的刻度。10 个标记以等间隔放置，不是实际距离刻度，而是为视图目的。

附图 3 表示功能 KCNB 在 COS-7 细胞中的表达。方块表示 KCNB 转染细胞的 I-V 曲线。密封圈表示用缺乏 KCNB 插入的对照质粒转染的细胞所产生的信号。

附图 4 表示 KCNB、BCL2 和 KCNB/BCL2 转染子对 TNF- α -诱导的细胞死亡的灵敏度。

发明详述和优选实施方案

5 I. 引言

本发明提供编码 KCNB 的分离核酸和氨基酸序列以及 KCNB 的生产方法。表达 KCNB 的组织或细胞类型包括但不限于大脑、胰腺、肾脏、乳房、肺、结肠、脾脏、肝脏、胎盘、胃、卵巢、前列腺、膀胱以及外周血单核细胞。结构上，KCNB (SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:5) 的全长核苷酸序列编码长度为 374 个氨基酸的多肽 (SEQ ID NO:1)。该氨基酸序列与钾通道蛋白 KCNK3 或 TASK 的氨基酸序列有 62% 的序列同一性，所述钾通道蛋白 KCNK3 或 TASK 是钾通道 TWIK-1 家族成员 (参见，例如 Duprat 等，EMBO J. 16:5464-5471, 1997; 美国专利 6,013,470 和 WO99/37762)，由 2 个孔 (P) 结构域和 4 个跨膜区域限定。K⁺通道 TWIK 家族的 2 个孔结构域和 4 个跨膜结构域的保守性与功能特性的保守性的相关不是必须的：已鉴定 TWIK 家族成员产生弱的 K⁺内向整流；另一成员产生 K⁺外向整流。两种通道在静息电位时都是开放的，并且能够驱动膜静息电位向 K⁺平衡电位靠近。KCNK3 (或 TASK) 产生具有本底电导特征的 K⁺电流，并对胞外 pH 在窄的生理范围内的变化很敏感 (参见，例如 Duprat 等，同上)。与 KCNB 不同，TASK 在癌症中未观察到过量表达。

本发明还提供筛选 KCNB 核酸和蛋白的调节剂的方法，如激活剂、抑制剂、刺激物、增强子等。这些调节剂可影响 KCNB 活性，即通过调节 KCNB 转录、翻译、mRNA 或蛋白稳定性，通过改变 KCNB 与质膜或其他分子的相互作用，或通过影响 KCNB 蛋白活性。在一实施方案中，如采用高通量筛选 (HTS) 方法筛选化合物，以便对那些能与分离的 KCNB 多肽或其片段结合和/或调节其活性的化合物进行鉴定。在另一实施方案中，KCNB 蛋白在细胞中重组表达，KCNB 调节通过采用任何测定钾离子通道功能的方法进行分析，如膜电位的测

定。测定膜电位的方法包括例如膜片钳技术、全细胞电流测定、放射性铷标记的流量分析以及采用电压灵敏的染料的荧光分析。

5 在许多实施方案中，将 KCNB 多核苷酸或多肽体内或离体导入细胞，由此细胞中的 KCNB 活性得到调节。例如可将编码全长 KCNB 多肽的多核苷酸导入到细胞群中，从而调节细胞的电生理特性。

10 在某些实施方案中，可将针对 KCNB 的单克隆或多克隆抗体，优选 KCNB 的 N 端结构域、C 端结构域、跨膜结构域或胞外环施用给哺乳动物，以便抑制细胞中 KCNB 的活性。这些实施方案可用于治疗与 KCNB 活性相关的疾病或失调如癌症。

15 本发明还提供检测 KCNB 核酸和蛋白表达的方法。KCNB 多肽也可用于生成单克隆抗体和多克隆抗体，所述抗体用于检测 KCNB 表达的细胞或用于改善 KCNB 活性。采用 mRNA 反转录和扩增、总 RNA 或 polyA⁺RNA 分离、RNA 印迹法、斑点印迹法、原位杂交、核糖核酸酶保护、S1 消化、探针 DNA 微芯片阵列以及蛋白质印迹等技术也可鉴定表达 KCNB 的细胞。

20 功能上，KCNB 核酸编码钾离子通道蛋白。KCNB 核苷酸和氨基酸序列的特定区可用于鉴定 KCNB 基因的多态变体、种内同系物以及等位基因。鉴定采用体外技术如在严格或温和杂交条件下采用 PCR 或利用计算机系统将该种序列信息与其他核苷酸序列进行比较。使用本发明下文所讨论的任何序列比较算法进行序列比较。与 KCNB 多肽或其保守区如 KCNB 的 C 末端区域特异性结合的抗体也可用于鉴定等位
25 基因、种内同系物以及多态变体。

30 KCNB 的多态变体、种内同系物以及等位基因的确认通常是将具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的 KCNB 多肽与公认的 KCNB 蛋白进行比较，以便显示对 KCNB 基因或蛋白的多态变体或等位基因的鉴

定。这些变体或同系物通过表达变体和分析活性，例如通过确定如本发明下文所述的电生理特性，可确认为具有相同功能特征。

5 KCNB 的核苷酸和氨基酸序列信息也可用于构建 KCNB 蛋白模型。随后这些模型用于鉴定可激活或抑制 KCNB 蛋白的化合物。这些调节 KCNB 基因或蛋白活性的化合物可用于研究 KCNB 基因的生理作用。

10 本发明还提供分析，优选高通量筛选(HTS)分析，来鉴定与 KCNB 相互作用和/或调节 KCNB 的化合物或其他分子。在某些分析中，采用 KCNB 的特定区域，如 N 末端、跨膜、孔或 C 末端区域。

15 本发明还提供治疗与 KCNB 活性相关的疾病或症状的方法。例如，本发明方法可用于诊断、预测或治疗任何类型的癌症。在优选实施方案中，癌症为上皮癌，如乳腺癌、肺癌、前列腺癌、肾癌、胃癌、胆囊癌或卵巢癌，或任何胃肠道癌。

20 本发明的诊断方法可用于包括灵长类、犬科、猫科、鼠科、牛、马、羊、猪、兔类等动物以及人。

还提供试剂盒用于进行本发明公开的诊断和治疗方法。

II. 定义

如本发明所用，除非另有规定，下列术语含有它们应有的意思。

25 因此，术语“KCNB”是指 KCNB 核酸和多肽的多态变体、等位基因、突变体和种内同系物，其(1)具有氨基酸序列，所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 的 KCNB 序列有大于约 65%的氨基酸序列同一性，70%、75%、80%、85%、90%优选 91%、92%、93%、94%、
30 95%、96%、97%、98%或 99%或更高的氨基酸序列同一性，优选在

至少约 50、100、200、500、1000 或更多的氨基酸的区域之上；（2）与抗体如多克隆抗体结合，所述抗体抗包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的免疫原和其保守性修饰变体；（3）在严格杂交条件下，与 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5 的 KCNB 核酸序列和其保守性修饰变体特异性杂交；（4）具有核酸序列，所述核酸序列与 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5 有大于约 95% 优选大于约 96%、97%、98%、99% 或更高的核苷酸序列同一性，优选在至少约 50、100、200、500、1000 或更多的核苷酸的区域之上；或（5）通过引物扩增，所述引物在严格杂交条件下与和选自 SEQ ID NO:3 和 4、SEQ ID NO:6 和 7 以及 SEQ ID NO:9 和 10 组成的组的引物对相同的序列特异性杂交。KCNB 多核苷酸或多肽序列通常来自哺乳动物，包括但不限于人、大鼠、小鼠、仓鼠、牛、猪、马、羊或任何哺乳动物。“KCNB 多核苷酸”和“KCNB 多肽”两者或是天然存在或是重组的。人 KCNB 基因位于染色体 8q24.3。

“全长” KCNB 蛋白或核酸是指含有全部元件的 KCNB 多肽或多核苷酸序列或其变体，所述元件通常包含在一种或多种天然存在的野生型 KCNB 多核苷酸或多肽序列。然而，人们将认识到 KCNB 的衍生物、同系物和片段可容易地用于本发明中。这些 KCNB 变体可包含任何一种或多种如 SEQ ID NO:1 所显示的多肽的结构域，或多拷贝的任何一种或多种结构域，或在相互之间或与其他蛋白或蛋白结构域的新型组合中任何数目的结构域。

拓扑上，如本发明所定义的全长 KCNB 多肽据认为具有氨基末端结构域、2 个孔结构域、4 个跨膜结构域和 C 末端结构域（附图 1）。鉴定这些结构域的结构可采用本领域技术人员所熟知的方法进行，如鉴定疏水和亲水结构域的序列分析程序（参见，如 Stryer, Biochemistry (第 3 版, 1998)；也可参见任何以网络为基础的序列分析程序，如那些在网址 dot.imgen.bcm.tmc.edu 中所找到的程序）。

“C 末端结构域”其对应于 SEQ ID NO:1 从约 250 到约 374 的氨

基酸，是指从蛋白的约第 4 个跨膜结构域延伸至 C 末端的蛋白区域。该结构域是 KCNB 及其同系物的标志，其与 KCNK3 有少于约 30% 或者少于约 50%、40% 或 35% 的序列同一性。

5 “P 结构域”是指编码孔结构域的蛋白的结构区域，其是钾离子通道的特征（参见，如 Heginbotham 等，*Biophys. J.* 66:1061-1067, 1994）。KCNB 具有两个孔结构域，即两个 P 结构域。

10 “跨膜结构域”是指位于质膜内并跨越质膜的疏水蛋白结构域，也可包括对应的胞质（胞内）和胞外环。KCNB 的跨膜结构域的鉴定可采用标准方法，如在 Kyte & Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982) 或 Stryer，同上中所描述。KCNB 有 4 个跨膜结构域。

15 “保守性修饰变体”适用于氨基酸和核酸序列。关于特定核酸序列，保守性修饰变体是指那些编码相同或基本上相同的氨基酸序列的核酸，或者指基本相同的核酸序列，如果该核酸不编码氨基酸序列。由于遗传密码简并，很多功能性相同的核酸编码任何给定的多肽。例如，密码子 CGU、CGC、CGA、CGG、AGA 和 AGG 都编码精氨酸。因此，在每个由密码子所规定的精氨酸的位置上，可将密码子改变成任何所述的对应密码子，而不改变所编码的多肽。这些核酸变化称为
20 “沉默替换”或“沉默变异”，其是一类“保守性修饰变异”。本发明所述的每个编码多肽的多核苷酸序列也描述每种可能的沉默变异，除了另有标注以外。因此，沉默替换是每个编码氨基酸的核酸序列暗含的特征。专业技术人员将认识到通过标准技术将核酸中各个密码子
25 （除了 AUG 以外，其是甲硫氨酸唯一的密码子）可经修饰产生功能性相同的分子。在一些实施方案中，编码酶的核苷酸序列优选在特定宿主细胞（如酵母、哺乳动物、植物、真菌等）中最佳表达以用于生产酶。

30 至于氨基酸序列，专业技术人员将认识到核酸、肽、多肽或蛋白

序列中个别替换、缺少或添加，可变更、添加或缺失编码序列中单一氨基酸或小百分比的氨基酸，是保守性修饰变体，其中变更导致用化学相似的氨基酸替换某种氨基酸。保守替换表提供了功能相似的氨基酸，为本领域所熟知。这些保守修饰变体除上述之外，不排除发明的多态变体、种内同系物以及等位基因。

下列 8 组中每组都含有对另一氨基酸是保守替换的氨基酸：

- 1) 丙氨酸 (A)、甘氨酸 (G)；
- 2) 天门冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E)；
- 10 3) 天门冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)；
- 4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K)；
- 5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、缬氨酸 (V)；
- 6) 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W)；
- 7) 丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)；以及
- 15 8) 半胱氨酸 (C)、甲硫氨酸 (M)

(参见，如 Creighton, *Proteins* (1984))。

根据各层次的结构可描述如多肽结构的大分子结构。对此结构的综述，参见，如 Alberts 等，*Molecular Biology of the Cell* (第 3 版，1994) 以及 Cantor 和 Schimmel, *Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules* (1980)。“一级结构”指特定肽的氨基酸序列。“二级结构”指多肽内局部有序的三维结构。这些结构通常被认作结构域。结构域是形成多肽的紧密单元多肽部分，长度通常有 50-350 个氨基酸。典型的结构域由次级结构如 β -折叠和 α -螺旋部分组成。“三级结构”指多肽单体完整的三维结构。“四级结构”指由独立的三级单元非共价缔合组成的三维结构。各向异性术语也称为能量术语。

动物中的“癌症”指存在具有诱发癌症细胞典型特征的细胞，如不控制增殖、胚质不灭、转移潜力、快速生长和增殖速率、某些特定

的形态学特征和细胞标记。在一些情况下，癌细胞将是肿瘤形式，但这些细胞可单独存在于动物内或作为独立细胞如白细胞在血流中循环。

5 本发明所用“生物样品”是指含有一种或多种 KCNB 核酸的生物组织或流体的样品，所述 KCNB 核酸编码一种或多种 KCNB 蛋白。这些样品包括但不限于从人、小鼠和大鼠中分离的组织，具体是乳腺和肺组织以及血液、淋巴组织、肝脏、大脑、心脏、脾脏、睾丸、卵巢、胸腺、肾脏和胚胎组织。生物样品也可包括组织切片如为组织学
10 目的而取出的冷冻切片。生物样品通常获自真核生物，如昆虫、原生动物、鸟类、鱼类、爬行动物，和优选哺乳动物如大鼠、小鼠、牛、狗、豚鼠或兔，以及最优选灵长类动物如黑猩猩或人。

 “确定功能效应”是指分析化合物的效应，所述化合物增加或减少直接或间接受到 KCNB 多肽影响的参数，如功能效应、物理效应和
15 化学效应。这些功能效应包括但不限于离子通量、膜电位、电流振幅、电压门控和 pH 灵敏度的变化，以及其他生物效应如 KCNB 或任何标记基因的基因表达的变化等。离子通量可包括任何通过通道的离子，如钾或铷及其类似物如放射性同位素。这些功能效应的测定可采用本
20 领域专业技术人员所知的任何方法，如膜片钳，通过使用电压灵敏的染料或通过测定参数变化如光谱特性（如荧光性、吸光率、折光率）、流体动力学（如状态）、色谱或溶解度特性。

 KCNB 基因或蛋白的“抑制剂”、“激活剂”和“调节剂”交互
25 使用，意指经过对 KCNB 活性或数量采用体外和体内分析鉴定是抑制、激活或调节的分子。这些调节分子，本发明也称作化合物，包括多肽、抗体、氨基酸、核苷酸、脂、碳水化合物或任何有机或无机分子。抑制剂是例如延迟或部分或全部阻断 KCNB 活性、使 KCNB 脱敏或负调节 KCNB 表达或稳定性的化合物。激活剂是例如打开 KCNB
30 通道、致敏 KCNB 或刺激 KCNB 活性或增加 KCNB 表达或稳定性的

化合物。对抑制剂和激活剂的分析下文描述，包括例如在细胞和细胞膜中表达 KCNB 蛋白，应用公认的调节剂，然后确定对细胞电生理特性的功能效应。功能效应的测定包括例如确定膜电位中的变化。测定膜电位的方法包括但不限于膜片钳技术、全细胞电流的确定、放射性标记的铷通量分析以及采用电压灵敏的染料所进行的荧光分析。

含有 KCNB 多肽的样品或分析，经潜在激活剂、抑制剂或调节剂处理后，与没有抑制剂、激活剂或调节剂的对照样品比较，从而检测候选化合物的效应。将对照样品（未用化合物处理）的相对 KCNB 活性值赋值 100%。当相对于对照活性值约为 80%，可选择约 50%或 25-0%时，实现 KCNB 多肽的抑制。当相对于对照活性值约为 110%，可选择约 150%，可选择约 200-500%或约 1000-3000%更高时，实现 KCNB 多肽的激活。

术语“分离的”、“纯化的”或“生物纯”是指实质上或基本上没有如天然状态所发现通常相伴的成分的物质。纯度和同质性的确定通常采用分析化学技术，如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高压液相色谱。存在于制剂中的优势种类蛋白是基本纯的。具体而言，分离 KCNB 核酸从位于 KCNB 基因侧翼并编码除 KCNB 以外的蛋白的可读框中分离。术语“纯化的”表示核酸或蛋白在电泳凝胶中基本产生一条带。具体地，其表示核酸或蛋白的纯度至少 85%，可选择至少 95%以及可选择至少 99%。

“核酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸或核糖核酸及其多聚体。该术语包括含有已知核苷酸类似物或修饰的主链残基或键的核酸，其可以是合成、天然存在和非天然存在，与标准核酸具有相似的结合特性，并且以与标准核苷酸相似的方式代谢。这些类似物的例子包括但不限于硫代磷酸酯、磷酸酰胺、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸盐、2-O-甲基核糖核苷酸、肽核酸（PNA）。

除非另有所指，特定核酸序列也暗含其保守修饰的变体（如简并密码子替换）和互补序列，以及明示的序列。具体而言，通过生成序列可实现简并密码子替换，在所述序列中，一个或多个选定的（或全部）密码子的第3个位置用混合的碱基和/或脱氧肌苷残基替换（Batzer等，*Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991)；Ohtsuka等，*J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985)；Rossolini等，*Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)）。术语核酸可与基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸和多核苷酸交互使用。

术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本发明中可交互使用，用来指氨基酸残基的多聚体。这些术语适用于这样的氨基酸多聚体，即其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物，以及适用于天然存在的氨基酸多聚体和非天然存在的氨基酸多聚体。

术语“氨基酸”指天然存在和合成的氨基酸，以及以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸，以及后来经修饰的那些氨基酸，例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指与天然存在的氨基酸具有相同的基本化学结构的一些化合物，即与氢结合的 α 碳、羧基基团、氨基基团和R基团，如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这些类似物具有修饰的R基团（如正亮氨酸）或修饰的肽主链，但保留了与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指其结构与氨基酸一般化学结构不同，但其作用方式类似于天然存在的氨基酸的一些化合物。

氨基酸在本发明中可参照共知的三字母符号或参照用IUPAC-IUB生化命名委员会建议的单字母符号。同样，核苷酸也可以参照普遍接受的单字母密码表示。

“标记”或“可检测部分”是可通过分光镜、光化学、生物化学、

免疫化学或化学方法检测的组合物。例如，有用的标记包括 ^{32}P 、荧光染料、电子密试剂、酶（如在 ELISA 中通常所用的酶）、生物素、地高辛配基或肝素和可检测的蛋白，如将放射性标记掺入所述肽或用于检测与所述肽特异性反应的抗体。

5

“标记核酸探针或寡核苷酸”是一种通过接头共价与标记结合或通过离子、范德华、静电或氢键以化学键或非共价与标记结合的核酸或寡核苷酸，这样通过检测与探针结合的标记的存在就可检测探针的存在。

10

如本发明所用的“核酸探针或寡核苷酸”定义为通过一种或多种类型的化学键，通常互补碱基配对或形成氢键，能够与互补序列的靶核酸结合的核酸。如本发明所用的探针可包括天然碱基（即 A、G、C 或 T）或修饰碱基（7-脱氮鸟苷、肌苷等）。此外，探针中的碱基可通过除磷酸二酯键以外的键连接，只要其不干扰杂交。因此，例如，探针可以是肽核酸，其中组成型碱基通过肽键连接而非以磷酸二酯键连接。本领域专业技术人员将会理解，探针可与探针序列缺乏完全互补性的靶序列结合，取决于杂交条件的严格性。探针任选直接标记，如用同位素、生色团、发光团、色原标记，或间接标记，如采用后来可与链亲和素复合体结合的生物素标记。通过对探针存在与否的分析，人们可检测选择序列或亚序列的存在与否。

15

20

25

术语“重组”当用于涉及例如细胞或核酸、蛋白或载体时表示细胞、核酸、蛋白或载体已被异源核酸或蛋白的导入或天然核酸或蛋白的变更所修饰，或表示细胞是经过如此修饰的细胞衍生来的。因此，例如重组细胞表达细胞的天然（非重组）形式中未发现的基因，或者表达那些异常表达、低水平表达或根本不表达的天然基因。

30

术语“异源”当用于有关核酸部分时表示核酸包含两种或更多种自然界中相互之间未发现关系相同的亚序列。例如，通常核酸经重组

产生，具有两种或更多种来自不相关基因的序列，这些不相关基因排列成新的功能核酸，例如来自一种源的启动子和来自另一种源的编码区。同样，异源蛋白表示蛋白包含自然界中相互之间未发现关系相同的两种或多种亚序列（如融合蛋白）。

5

“启动子”定义为指导核酸转录的核酸控制序列的排列。如本发明所用的启动子包括在靠近转录起始位点的必需核酸序列，例如在聚合酶 II 启动子情况下的 TATA 元件。启动子也任选包括远端的增强子或阻遏元件，其可位于距离转录起始位点多达数千个碱基对。“组成型”启动子在大多数环境和发育条件下是活泼的。“可诱导”启动子在环境或发育调节下是活泼的。术语“可操作连接”是指介于核酸表达控制序列（如启动子或转录因子结合位点的排列）和第二核酸序列之间的功能键合，其中表达控制序列指导与第二序列相对应的核酸转录。

15

“表达载体”是核酸构建体，由重组或合成产生，具有一系列指定核酸元件，这些元件允许特定核酸在宿主细胞中的转录。表达载体可以是质粒、病毒或核酸片段的部分。表达载体通常包括与启动子可操作连接、又待转录的核酸。

20

术语“相同的”或百分数的“同一性”在两种或更多种核酸或多肽序列的情况下，指两种或更多种序列或亚序列是相同的，或具有规定百分数的相同氨基酸残基或核苷酸（即当在比较窗和指定区域上对最大对应性进行比较和序列对比时，在指定区域（如 SEQ ID NO:1、2 或 5）约 70%同一性，优选 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性），正如利用 BLAST 或 BLAST2.0 序列比较算法和下述的缺省参数或通过手工对比和肉眼观察所测定。这些序列可以说是“基本相同的”。该定义也指测试序列的补码（compliment）。此定义还包括具有缺失和/或添加的序列，以及那些具有替换的序列。如下所述，优选算法可说

30

明间隙等。同一性优选存在于长度至少约 25 个氨基酸或核苷酸的区域，更优选在长度为 50、60、70、80、90 或 100 个氨基酸或核苷酸的区域上。

5 对于序列比较，通常把一种序列充当标准序列来比较测试序列。当利用序列比较算法时，将测试和标准序列都输入计算机，如果需要，设定亚序列座标，然后设定序列算法程序参数。可采用缺省的程序参数，或者设定选择参数。然后，序列比较算法根据程序参数计算测试序列相对于标准序列的序列同一性百分数。

10

 如本发明所用，“比较窗口”包括涉及任何一个数目的邻接位置的区段，数目选自 20-600，通常约 50-约 200，更通常是约 100-约 150，其中在两个序列最佳对比后，可将一个序列与相同数目邻接位置的标准序列比较。序列对比比较方法是本领域熟知的。通过 Smith 和
15 Waterman 在 Adv. Appl. Math. 2:482(1981)中的局部同源性算法、Needleman 和 Wunsch 在 J. Mol. Biol. 48:443(1970)中的同源性序列对比算法、Pearson 和 Lipman 在 Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444(1988)中的相似性方法的研究、这些算法的计算机化实施(威斯康星遗传基因软件包 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group,
20 575 Science Dr., Madison, WI)或通过手工对比和肉眼观察(参见，例如 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 等编, 1995 年增刊), 可以进行最佳序列对比比较。

 适于确定序列同一性和序列相似性百分数的算法的另一个例子是
25 BLAST 和 BLAST2.0 算法，其在 Altschul 等，Nuc. Acids Res. 25:2389-3402 (1977)和 Altschul 等，J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)中分别有描述。BLAST 分析的软件可以公开地从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)
(www.ncbi.nlm.nih.gov/) 得到。该算法包括通过鉴定欲查询序列中的短长度 W 字码首先鉴定高得分序列对(HSP)，与数据库序列中相同
30

长度的字码进行对比时，它们可匹配或满足一些正的阈值分 T 。 T 称为邻近字码得分阈值（Altschul 等，同上）。这些初始邻近字码命中作为起始检索的种子以发现含有它们的更长的 HSP。字码命中可沿着各个序列在两个方向上延伸，直到累积对比得分增加。对于核苷酸序列，累积得分可以利用参数 M （匹配残基对的奖分；总是大于 0）和 N （错配残基的罚分；总是小于 0）来计算。对于氨基酸序列，采用得分矩阵计算累积得分。当累积对比得分以数量 X 从其最大获得值下降时；当由于积累了一个或多个负的得分残基对比，累积得分趋向零或以下时；或当每个序列达到终点时，各方向的字码命中就暂时终止。

BLAST 算法参数 W 、 T 和 X 决定了序列对比的敏感性和速度。BLASTN 程序（对于核苷酸序列）采用字码长度（ W ）11、期望值（ E ）10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 作为缺省参数，并比较两条链。对于氨基酸序列，BLASTP 程序采用字码长度 3 和期望值（ E ）10 作为缺省参数，以及 BLOSUM62 得分矩阵（参见 Henikoff 和 Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)）采用对比（ B ）50、期望值（ E ）、10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 作为参数，并比较两条链。

BLAST 算法也进行两个序列之间相似性的统计分析（参见，例如 Karlin 和 Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)）。由 BLAST 算法提供的相似性的一个测量值是最小概率和（ $P(N)$ ），其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间匹配偶然出现的概率的指征。例如，如果在测试核酸和标准核酸的比较中，最小概率和小于约 0.2，更优选小于约 0.01，最优选小于约 0.001，那么该核酸就可视为与标准序列相似。

25

两个核酸序列或多肽基本相同的指征如下文所述是由第一核酸编码的多肽可以与针对由第二核酸编码的多肽所产生的抗体发生免疫交叉反应。所以，这个多肽通常与第二多肽基本相同，例如两个肽只有靠保守取代来区别。两个核酸序列基本相同的另一个指征是两个分子或它们的互补分子在严格条件下相互杂交，如下文所述。两个核酸序

30

列基本同源的另一个指征是可以利用相同的引物扩增序列。

5 短语“选择性（或特异性）杂交”指分子在严格杂交条件下只与特定核苷酸序列结合、转接或杂交，当该序列以复合体混合物（如总细胞或文库 DNA 或 RNA）存在时。

10 短语“严格杂交条件”通常是指在核酸复合体混合物中，探针与其靶亚序列杂交而不与其他序列杂交的条件。严格条件取决于序列，并且在不同环境下有所区别。序列越长，特异性杂交的温度越高。在 Tjissen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” 中可以找到核酸杂交的详尽的指南。一般而言，在规定的离子强度和 pH 下，所选择的严格条件比特异序列的热熔点 (T_m) 低约 5-10°C。 T_m 是指在探针与靶序列杂交平衡时有 50 % 的探针与靶互补（在规定离子强度、pH 和核酸浓度下）的温度（靶序列过量存在，在 T_m 杂交平衡时，有 50% 的探针被占用）。严格条件是在 pH7.0-8.3 时，盐浓度小于约 1.0M 钠离子，通常约 0.01 到 1.0M 钠离子浓度（或其他盐），以及对于短探针（例如 10-50 个核苷酸）温度至少约 30°C，对于长探针（例如大于 50 个核苷酸）至少约 60°C。 20 严格条件也可加入去稳定试剂如甲醛来达到。对于选择性或特异性杂交，阳性信号至少两倍于背景，任选 10 倍于背景杂交。严格杂交条件的例子如下：50% 甲醛、5×SSC 和 1% SDS，42°C 温育，或 5×SSC、1% SDS，65°C 温育，并用 0.2×SSC 和 0.1% SDS，65°C 洗涤。这些洗涤可操作 5、15、30、60、120 或更长时间。对于 PCR，低严格性扩增通常温度约为 36°C，尽管退火温度根据引物长度可在约 32-48°C 之间变化。对于高严格性 PCR 扩增，温度通常约为 62°C，尽管高严格性退火温度范围为约 50°C—约 65°C，这取决于引物长度和特异性。 25 通常高严格性扩增和低严格性扩增两者的循环条件包括 90°C-95°C 变性 30 秒-2 分钟、退火持续 30 秒-2 分钟以及约 72°C 延伸 1-2 分钟。

30

如果核酸所编码的多肽基本相同，那么在严格条件下该核酸仍然是基本同源的，它们相互不发生杂交。例如，当采用遗传密码允许的最大密码子简并性创建核酸拷贝时，就会出现这种情形。在这些情况中，核酸通常在适度严格杂交条件下杂交。“适度严格杂交条件”的例子包括在 40% 甲醛、1M NaCl、1%SDS 的缓冲液中 37℃ 杂交，以及用 1×SSC 45℃ 洗涤。这些洗涤可操作 5、15、30、60、120 或更长时间。阳性杂交至少两倍于背景。普通技术人员将容易地认识到选择性杂交和洗涤条件可用于提供相似严格性的条件。

“抗体”是指含有来自免疫球蛋白基因或其片段的框架区的多肽，该多肽可特异性结合和识别抗原。识别的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区的基因以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链可分类为 κ 或 λ 。重链可分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，它们依次分别定义免疫球蛋白类别为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

免疫球蛋白（抗体）结构单元的例子包括四聚体。各个四聚体由两对相同的多肽链组成，每对都具有一个“轻”链（约 25kDa）和一个“重”链（约 50-70kDa）。各链的 N 末端限定了一个主要负责抗原识别的约 100-110 或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链（ V_L ）和可变重链（ V_H ）分别指这些轻链和重链。

抗体例如可作为完整的免疫球蛋白存在，或作为用各种肽酶消化产生的特征清晰的许多片段存在。所以，例如胃蛋白酶在绞链区中二硫键以下消化抗体以产生 $F(ab)'_2$ ， $F(ab)'_2$ 是 Fab 的二聚体，其本身是通过二硫键与 V_H-C_H1 连接的轻链。在温和条件下可断裂绞链区中的二硫键，还原 $F(ab)'_2$ ，从而将 $F(ab)'_2$ 二聚体转变成 Fab' 单体。Fab' 单体基本上是带有部分绞链区的 Fab（参见 Fundamental Immunology（Paul 编，第三版，1993 年）。当各种抗体片段依据完整抗体的消化来限时，技术人员将懂得这些片段可用化学方法或采用重组 DNA 方法重新合成。因此，如本文所用的术语抗体也包括由修饰整个抗体所产生

的抗体片段，或采用重组 DNA 方法重新合成的那些抗体片段（例如单链 Fv），或采用噬菌体展示文库鉴定的那些抗体片段（参见，例如 McCafferty 等，Nature 348:552-554 (1990)）。

5 对于单克隆或多克隆抗体的制备，可以利用本领域已知的任何技术（参见，例如 Kohler 和 Milstein，Nature 256:495-497 (1975)；Kozbor 等，Immunology Today 4:72 (1983)；Cole 等，第 77-96 页，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (1985)）。生产单链抗体的技术（美国专利 4,946,778）可适用于生产本发明多肽的抗体。同样，转基因小鼠
10 或其他生物体如其他哺乳动物可用于表达人源化抗体。或者，噬菌体展示技术可用于鉴定与选定抗原特异性结合的抗体和异数的 Fab 片段（参见，例如 McCafferty 等，Nature 348:552-554 (1990)；Marks 等，Biotechnology 10:779-783 (1992)）。

15 “嵌合抗体”是抗体分子，其中(a)恒定区或其部分被改变、替代或交换，从而使抗原结合位点（可变区）连接到不同类别或改变类别的恒定区、效应物官能团和/或物种上，或连接到给嵌合抗体赋予新特性的完全不同的分子上，如酶、毒素、激素、生长因子、药物等；或(b)可变区或其部分被具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替代
20 或交换。

 “抗-KCNB”抗体是与由 KCNB 基因、cDNA 或其亚序列编码的多肽特异性结合的抗体或抗体片段，如 C 末端结构域。

25 术语“免疫测定”是利用抗体特异性结合抗原的分析。免疫测定是利用特定抗体的特异性结合特性为特征来分离、靶击和/或定量抗原。

 短语“特异性（或选择性）结合”抗体或“特异性（或选择性）
30 免疫反应”当涉及蛋白或肽时，指在异源蛋白群体和其他生物制品中

确定蛋白存在的结合反应。因此，在设定的免疫测定条件下，指定抗体与特定蛋白结合至少两倍于背景，并基本上不与样品中存在的其他蛋白有显著量的结合。在这些条件下，与抗体的特异性结合可要求选择对特定蛋白有特异性的抗体。例如，可选择由特异物种如大鼠、小鼠或人对 KCNB 多肽产生的多克隆抗体，得到的多克隆抗体只与 KCNB 蛋白而不与其他蛋白发生特异性免疫反应。除了 KCNB 蛋白的多态变体和等位基因之外。从其他物种中减去与 KCNB 分子交叉反应的抗体可完成这种选择。各种免疫测定形式可用于选择与特定蛋白特异性免疫反应的抗体。例如，固相 ELISA 免疫测定通常用于选择与蛋白特异性免疫反应的抗体(参见，例如 Harlow 和 Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)，描述了可用于确定特异免疫反应性的免疫测定形式和条件)。特异性或选择性反应通常至少两倍于背景信号或噪声，更通常是背景的 10 倍到 100 倍以上。

术语“选择性相关”指核酸与如上定义的另一核酸“选择性杂交”的能力，或指抗体“选择性（或特异性）结合”蛋白的能力，如上定义。

“宿主细胞”意指含有表达载体并支持表达载体复制或表达的细胞。宿主细胞可以是原核细胞，如 *E.coli*，或真核细胞，如酵母、昆虫、两栖动物，或哺乳动物细胞，如 CHO 细胞和 Hela 细胞等，例如培养细胞、外植体和体内细胞。短语“检测癌症”或“诊断癌症”是指确定动物中癌症或癌前期状况的存在与否。“检测癌症”也指获得有关动物中存在癌细胞的可能性的间接证据。检测癌症单独采用本发明方法、与其他方法组合或根据有关动物健康状态的其他信息来实现。

III. KCNB 核酸的操作和检测

在本发明众多实施方案中，将采用编码 KCNB 多肽的核酸，包括全长 KCNB 蛋白或其任何衍生物、变体、同系物或它们的片段。这

些核酸用于任一应用，包括生产 KCNB 蛋白、诊断分析、治疗应用、KCNB 特异探针、对 KCNB 结合和/或调节化合物的分析，以便从其他物种或小鼠中鉴定和/或分离出 KCNB 同系物，以及用于其他应用。

5 A. 一般重组 DNA 方法

本发明的众多应用涉及克隆、合成、维持、突变和其他可在重组遗传领域中采用常规技术进行的核酸序列的操作。基础版本公开了本发明采用的一般方法，包括 Sambrook 等，Molecular Cloning, A Laboratory Mannual（第二版，1989）；Kriegler, Gene Transfer and
10 Expression: A Laboratory Manual（1990）；和 Current Protocols in Molecular Biology（Ausubel 等，1994 年）。

对于核酸，其大小以千碱基（kb）或碱基对（bp）表示。这些大小的估计来自于琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳、测序核酸或公布的
15 DNA 序列。对于蛋白，大小是以千道尔顿（kDa）或氨基酸残基数表示。蛋白大小的估计来自凝胶电泳、测序蛋白、衍生的氨基酸序列或公布的蛋白序列。

根据 Beaucage 和 Caruthers 在 Tetrahedron Letts. 22:1859-1862
20 (1981)中首先描述的固相亚磷酸胺三酯方法，采用自动合成仪可化学合成市场上不能得到的寡核苷酸，正如 Van Devanter 等在 Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984 年)中所述。通过纯聚丙烯酰胺凝胶电泳或通过如 Pearson 和 Reanier 在 J. Chrom. 255:137-149 (1983)中所述的离子交换 HPLC 可进行寡核苷酸的纯化。

25

采用例如 Wallace 等在 Gene 16:21-26 (1981)中所述的对双链模板测序的链终止方法，在克隆后可证实克隆基因和合成寡核苷酸的序列。

30 B. 分离和检测 KCNB 核苷酸序列

在本发明众多实施方案中，采用重组方法将分离和克隆 KCNB 核酸。这些实施方案用于例如分离表达蛋白的 KCNB 多核苷酸，或变体、衍生物、表达盒或来自于 KCNB 的其他序列的生成过程；监控 KCNB 基因表达，用于各种物种中 KCNB 序列的确定、患者的诊断目的，即
5 检测 KCNB 中的突变，或用于基因型确定和/或法医应用。

通常编码 KCNB 蛋白的核酸序列和相关核酸序列同系物可通过与探针杂交从 cDNA 和基因组 DNA 文库中克隆，或采用带有寡核苷酸引物的扩增技术分离。例如，KCNB 序列通常通过与核酸探针杂交
10 从哺乳动物核酸（基因组或 cDNA）文库中分离，所述核酸探针的序列可来自 SEQ ID NO:2，或者采用包含例如 SEQ ID NO:3 和 4，或 6 和 7，或 9 和 10 的引物扩增。KCNB 的 RNA 和 cDNA 可从中分离的合适的生物材料包括如乳房和肺部组织以及血、淋巴、脑、肝、心、脾、睾丸、卵巢、胸腺、肾、胚胎或其他组织。

15 采用引物的扩增技术也可用于从 DNA 或 RNA 中扩增和分离 KCNB 序列（参见，例如 Dieffenbach 和 Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual (1995)）。引物可用于例如扩增全长序列或一个至数百个核苷酸的探针（采用例如 SEQ ID NO:3 和 4 所示的引物），然后用于筛选全长 KCNB 克隆的哺乳动物文库。

也可以抗体作为探针从表达文库中分离编码 KCNB 多肽的核酸。使用序列 SEQ ID NO:1 或其衍生物或片段可产生这些多克隆或单克隆抗体。

25 使用 KCNB 核酸探针和寡核苷酸，在严格杂交条件下，通过筛选文库可分离与 KCNB 基因基本相同的多态变体、等位基因和种间同系物。或者，通过采用抗 KCNB 多肽的抗血清或纯化抗体免疫检测表达的同系物，所述抗血清或纯化抗体也识别和选择性结合 KCNB 同系物，利用表达文库来克隆 KCNB 多态变体、等位基因和种间同系物。
30

使用任一熟知的技术，包括把 KCNB 探针与基因组或 cDNA 文库在适度严格条件下杂交，或在低严格性条件下使用来自 KCNB 选择性的区域的探针，例如针对 C 末端结构域生成的特异探针，可鉴定相关性更远缘的 KCNB 同系物。同样，远缘同系物可采用简并引物对从核酸文库中扩增，即掺入所有可能的编码给定氨基酸序列的密码子的引物，尤其基于高保守的氨基酸延伸。这些引物对那些技术人员是熟知的，并且例如从网上可获得许多程序用于简并引物的设计。

10 为了制备 cDNA 文库，应选择富含 KCNB mRNA 的源，例如从大脑，或乳腺癌或肺癌细胞中分离的细胞。然后使用逆转录酶将 mRNA 制成 cDNA，连接到重组载体上，并转染入重组宿主中用于繁殖、筛选和克隆。制备和筛选 cDNA 文库的方法是众所周知的（参见，例如 Gubler 和 Hoffman, *Gene* 25:263-269 (1983); Sambrook 等, 同上; Ausubel 15 等, 同上)。

对于基因组文库，将 DNA 从组织或细胞中抽提出来，通过机械剪切或酶消化产生约 12-20kb 的片段。然后梯度离心，从不需要的大小片段中分离出所需的片段，并且构建在 λ 噬菌体载体中。这些载体和噬菌体在体外包装。通过如 Benton 和 Davis 在 *Science* 196:180-182 (1977)中所述的噬菌斑杂交可分析重组噬菌体。如 Grunstein 等在 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:3961-3965 (1975)中通常描述的进行菌落杂交。

25 分离 KCNB 核酸及其同系物的另一种方法是将合成的寡核苷酸引物的利用和 RNA 或 DNA 模板的扩增相结合（参见，美国专利 4,683,195 和 4,683,202；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis 等编, 1990)）。聚合酶链式反应 (PCR) 和连接酶链式反应 (LCR) 的方法可用于直接从 mRNA、cDNA、基因组文库或 cDNA 文库中扩增 KCNB 基因的核酸序列。使用本文提供的序列 30

可设计简并寡核苷酸来扩增 KCNB 同系物。引物中能掺入限制性内切酶位点。聚合酶链式反应或其他体外扩增方法也可用于例如克隆编码待表达蛋白的核酸序列，制备核酸探针，用于检测生理样品中编码 KCNB mRNA 的存在、核酸测序或其他目的。通过 PCR 反应扩增的基因可从琼脂糖凝胶中纯化并克隆到适当的载体中。

可采用合成的寡核苷酸构建重组 KCNB 基因，用作探针或用于蛋白表达。该方法的操作采用一系列长度通常为 40-120bp 的表示基因有义和无义链的重叠寡核苷酸进行。然后将这些 DNA 片段退火、连接和克隆。或者，利用扩增技术和精确引物扩增 KCNB 核酸的特异亚序列。然后将特异亚序列连接到表达载体中。

通常将编码 KCNB 多肽的核酸在转化到原核或真核细胞用于复制和/或表达之前先克隆到中间载体上。这些中间载体通常是原核载体，例如质粒或穿梭载体。载体、细胞和转染方法是专业技术人员所熟知的，并描述在例如 Ausubel 或 Sambrook 中，皆同上。

由 KCNB 核酸编码的多肽的钾通道活性的评价可采用专业技术人员已知的各种分析方法，例如膜片钳，使用电压敏感的染料，或测定参数变化，这些参数如光谱特性（例如荧光、吸光度、折射率）、流体动力学（例如状态）、色谱或溶解度特性。通常 KCNB 活性的评价采用表达分析系统，其中将编码 KCNB 的表达载体转染到细胞中。然后与对照细胞比较，可评价细胞的电生理特性。例如，KCNB 表达载体可用质粒共转染，如绿色荧光蛋白表达质粒，这允许鉴定转染细胞。然后对那些表达 KCNB 的转染子测定细胞电生理，同时与用缺少 KCNB 插入的表达载体和鉴别质粒共转染产生的转染子进行比较。表达的 KCNB 蛋白的活性的分析可使用各种试验方法以测定离子通量的变化，包括膜片钳技术、全细胞电流的测定、放射性标记铷通量试验以及使用电压敏感的染料的荧光分析（参见，例如 Vestergaard-Bogind 等，J. Membrane Biol. 88:67-75 (1988); Daniel 等，J. Pharmacol. Meth.

25:185-193 (1993); Hoevinsky 等, J. Membrane Biol. 137:59-70 (1994))。

5 可任选核酸用于编码包含 KCNB 多肽或其结构域的嵌合蛋白，所述结构域与异源多肽或多肽组合。例如，如 KCNB 的 N 末端或 C 末端结构域、胞外环或跨膜结构域可共价连接异源蛋白，如异源跨膜结构域或异源胞外结构域。其他选择的异源蛋白包括例如，荧光酶、GFP 和 β -gal。

10 在某些实施方案中，采用基于杂交的方法可检测 KCNB 多核苷酸以确定例如 KCNB RNA 的水平，或检测特定 DNA 序列，例如用于诊断或预后应用。KCNB 多核苷酸水平的检测可通过检测任何 KCNB DNA 或 RNA，包括基因组 DNA、mRNA 和 cDNA。检测可包括多核苷酸（例如基因组 DNA、cDNA 或 mRNA）水平的定量，或者也可进行 KCNB 水平或存在与否的定性评价，尤其与对照水平比较。可采用
15 检测以上任意多核苷酸的任一方法，如下文所述。这些方法包括例如杂交、扩增和其他分析方法。

20 在某些实施方案中，检测细胞中增加的水平或诊断存在的能力用作癌细胞的标记，即用于监控患者癌细胞的数目或定位，如同体内或体外检测一样。

KCNB 的基因表达可通过本领域已知的技术分析，例如 RNA 印迹、mRNA 的逆转录和 PCR 扩增，包括 mRNA 水平随实时 PCR 程序进行定量 PCR 分析（例如逆转录酶-TAQMAN™ 扩增）、斑点印迹、
25 原位杂交、核糖核酸酶保护、探针 DNA 微芯片阵列等。在一个实施方案中，高密度的寡核苷酸分析技术（例如 GeneChip™）用于鉴定 KCNB 的同系物和多态变体，或用于监控 KCNB mRNA 的水平。在 KCNB 与已知疾病例如癌症相连的情况下，它们可采用 GeneChip™ 作为诊断工具以检测生物样品中的疾病，参见，例如 Gunthand 等, AIDS
30 Res. Hum. Retroviruses 14:869-876 (1998); Kozal 等, Nat. Med. 2:753-

759 (1996); Matson 等, Anal. Biochem. 224:110-106 (1995); Lockhart 等, Nat. Biotechnol. 14:1675-1680 (1996); Gingeras 等, Genome Res. 8:435-448 (1998); Hacia 等, Nucleic Acids Res. 26:3865-3866 (1998)。

5 在一个实施方案中, 例如为了诊断癌症, 估算拷贝数即细胞中 KCNB 基因数。一般而言, 对于给定的常染色体基因, 动物各个基因有两套拷贝。然而, 拷贝数通过基因扩增或复制例如在癌细胞中可增加, 或通过缺失可减少。计算特定基因拷贝数的方法对本领域专业技术人员是熟知的, 此外, 还包括以杂交和扩增为基础的分析方法。

10

 基于杂交分析的任一方法可用于检测生物样品的细胞中 KCNB 基因或拷贝数。一种这样的方法是 DNA 印迹。在 DNA 印迹中, 基因组 DNA 通常是片段化的, 电泳分离后转移到膜上, 随后与 KCNB 特异探针杂交。对于拷贝数的确定, 将来自探针对靶区的杂交信号强度与来自对照探针对正常基因组 DNA 区 (例如相同或相关细胞、组织和器官等的非扩增部分) 的信号进行比较, 提供相对 KCNB 拷贝数的测算。DNA 印迹方法学是本领域熟知的, 并描述在例如 Ausubel 等或 Sambrook 等, 同上中。

15

20 确定样品中 KCNB 基因拷贝数的另一方法是原位杂交, 例如荧光原位杂交或 FISH。原位杂交分析是熟知的 (例如, Angerer (1987) Meth. Enzymol. 152:649)。一般而言, 原位杂交包含下列主要步骤: (1) 待分析组织或生物结构的固定; (2) 生物结构的预杂交处理以增加靶 DNA 的可接近性并降低非特异结合; (3) 核酸混合物与生物结构或组织中的核酸杂交; (4) 杂交后洗涤以去除杂交中未结合的核酸片段; 以及 (5) 杂交核酸片段的检测。

25

 在这些应用中所用的探针通常例如用放射性同位素或荧光报道分子标记。优选探针要足够长, 例如从约 50、100 或 200 个核苷酸到约 1000 或更多个核苷酸, 这是为了在严格杂交条件下与靶核酸特异性杂

30

交。

5 在众多实施方案中，如比较基因组杂交（CGH）的“比较探针”方法用于检测基因扩增。在比较基因组杂交方法中，核酸的“测试”集合用第一标记标记，而第二集合（如来自健康细胞或组织）用第二标记标记。核酸杂交的比率通过与阵列中各个纤维结合的第一和第二标记的比率来确定。例如由于测试集合中基因扩增，检测来自两个标记的信号比率的差异，并且该比率提供了 KCNB 基因拷贝数的测定。

10 适合于采用本发明方法的杂交方案描述在例如 Albertson (1984) EMBO J. 3:1227-1234 ; Pinkel(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9138-9142; EPO Pub. No.430,402; Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In Situ Hybridization Protocols, Choo 编, Humana Press, Totowa, NJ (1994)等。

15 在另一实施方案中，基于扩增的测定用于检测 KCNB 表达或用于测定 KCNB 基因的拷贝数。在这些测定中，存在于样品中的 KCNB 核苷酸序列充当扩增反应（例如 PCR）中的模板。在定量扩增中，扩增产物的量将同原始样品中模板的量成比例。与合适的对照比较提供了样品中 KCNB 多核苷酸水平的测定。定量扩增方法对本领域专业技术人员是熟知的。定量 PCR 的详细方案提供在例如 Innis 等(1990) PCR
20 Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.中。KCNB 的核酸序列（参见，例如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5）足够使得专业技术人员常规地选择引物来扩增基因的任何部分。

25 在一些实施方案中，基于 TaqMan 的测定用于定量 KCNB 多核苷酸。基于 TaqMan 的测定采用含有 5' 荧光染料和 3' 淬灭剂的荧光寡核苷酸探针。所述探针与 PCR 产物杂交，但由于 3' 端的封闭剂其自身不能延伸。当 PCR 产物经随后循环扩增后，聚合酶例如 AmpliTaq
30 的 5' 核酸酶活性导致 TaqMan 探针的切割。此切割将 5' 荧光染料和

3' 淬灭剂分开，由此导致作为扩增函数的荧光增加（参见，例如由 Perkin-Elmer 提供的文献，如 www2.perkin-elmer.com）。

其他合适的扩增方法包括但不限于连接酶链式反应（LCR）（参见，Wu 和 Wallace (1989) *Genomics* 4:560, Landegren 等 (1988) *Science* 241:1077, 和 Barringer 等 (1990) *Gene* 89:117）、转录扩增（Kwoh 等 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173）、自动维持序列扩增（Guatelli 等 (1990) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87:1874）、点 PCR 以及接头连接物 PCR 等。

C. 原核和真核生物中表达

为了获得高水平表达的克隆基因或核酸，如编码 KCNB 多肽的 cDNA，通常将 KCNB 序列亚克隆到表达载体中，所述表达载体含有指导转录的强启动子、转录/翻译终止子，以及如果核酸编码蛋白还含有用于翻译起始的核糖体结合位点。合适的细菌启动子是本领域熟知的，并在例如 Sambrook 等和 Ausubel 等中有描述。表达 KCNB 蛋白的细菌表达系统可利用例如大肠杆菌、芽孢杆菌和沙门氏菌（Palva 等, *Gene* 22:229-235 (1983); Mosbach 等, *Nature* 302:543-545 (1983)）。这些表达系统的试剂盒可以从市场上得到。哺乳动物细胞、酵母和昆虫细胞的真核表达系统是本领域熟知的，并且也可以从市场上得到。在一个实施方案中，真核表达载体是腺病毒载体、腺病毒相关载体或逆转录病毒载体。

对于治疗应用，使用任一方法将 KCNB 核酸导入到体外、体内或离体细胞，这些方法包括但不限于病毒载体感染、基于脂质体方法、生物弹颗粒传递法（基因枪）和裸 DNA 注射。这些治疗有用的核酸包括但不限于全长 KCNB 的编码序列，KCNB 片段、结构域、衍生物或变体的编码序列，KCNB 反义序列以及 KCNB 核酶。通常，这些序列和启动子可操作连接，但在众多应用中，将核酸施用给自身直接治疗有效的细胞，例如某些反义或核酶分子。

用于指导异源核酸表达的启动子取决于特定应用。启动子任选定位在距离异源转录起始位点与其天然座位中距离转录起始位点大约相同的位置上。然而，正如本领域已知，这种距离可允许有一些变化而无丧失启动子的功能。

除启动子以外，表达载体通常含有转录单位或表达盒，所述表达盒在宿主细胞中含有编码 KCNB 核酸的表达所需要的所有其他元件。因此，表达盒通常含有与编码 KCNB 多肽的核酸序列可操作连接的启动子以及含有转录物有效聚腺苷酸化、核糖体结合位点和翻译终止所需的信号。编码 KCNB 多肽的核酸序列能与可切割的信号肽序列连接，以促进转染细胞中编码蛋白的分泌。这些信号肽还包括来自组织溶酶原激活剂的信号肽、胰岛素和神经元生长因子以及绿夜蛾（*Heliothis virescens*）的保幼激素酯酶。表达盒的其他元件可包括增强子，以及如果基因组 DNA 被用作结构基因，还包括带有功能拼接供体和受体位点的内含子。

除启动子序列以外，表达盒也应含有结构基因下游的转录终止区，以提供有效的终止。终止区可从与启动子序列相同的基因中获得，或可从不同的基因中获得。

用于将遗传信息输送入细胞中的特定表达载体不是特别关键。可使用在真核和原核细胞中表达的任何常规载体。标准的细菌表达载体包括如以 pBR322 为基础的质粒、pSKF、pET23D，还包括如 GST 和 LacZ 的融合表达系统。在重组蛋白中也可以加入表位标记，以提供方便分离的方法，如 c-myc、HA 标记、6-组氨酸标记、麦芽糖结合蛋白、VSV-G 标记、抗 DYKDDDDK 标记或任何对本领域专业技术人员所熟知的大量标记。

通常将含有来自真核生物病毒的调节元件的表达载体用于真核表

达载体中，如 SV40 载体、乳头状瘤病毒载体和衍生自 EB 病毒的载体。真核载体的其他例子包括 pMSG、pAV009/A⁺、pMTO10/A⁺、pMAMneo-5、杆状病毒 pDSVE 和任何其他载体，所述其他载体允许在 CMV 启动子、SV40 早期启动子、SV40 晚期启动子、金属硫蛋白启动子、鼠类乳腺肿瘤病毒启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、多角体蛋白启动子或其他在真核细胞中显示有效表达的启动子的指导下表达蛋白。

一些表达系统具有提供基因扩增的标记，如新霉素、胸腺嘧啶核苷激酶、潮霉素 B 磷酸转移酶和二氢叶酸还原酶。或者，不参与基因扩增的高产表达系统也是合适的，如在昆虫细胞中使用杆状病毒载体，其带有在多角体蛋白启动子或其他强杆状病毒启动子指导下的编码 KCNB 多肽的序列。

通常包括在表达载体中的元件也包括大肠杆菌中发挥功能的复制子、编码抗生素抗性的基因以允许选择含有重组质粒的细菌，和质粒非必需区域中独特的限制位点允许插入真核序列。特定抗生素抗性基因的选择并非关键，本领域已知的许多抗性基因任何一个都合适。如果需要，可以任选原核序列，这样它们就不干扰真核细胞中 DNA 的复制。

可使用标准转染方法生产细菌、哺乳动物、酵母或昆虫细胞系，所述细胞系可表达大量的 KCNB 蛋白，然后采用标准技术纯化蛋白（参见，例如 Colley 等，J. Biol. Chem. 264:17619-17622(1989)；Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, Vol.182 (Deutscher 编，1990 年)）。根据标准技术操作真核和原核细胞的转化（参见，例如 Morrison, J. Bact. 132:349-351 (1977)；Clark-Curtiss 和 Curtiss, Methods in Enzymology 101:347-362 (Wu 等编，1983 年)）。

任何用于在宿主细胞中导入外源核苷酸序列的熟知方法都可被采

用。这些方法包括使用的试剂如 Superfect (Qiagen)、脂质体、磷酸钙转染、1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物、原生质体融合、电穿孔、微注射、质粒载体、病毒载体、生物弹颗粒传递法 (biolistic particle acceleration) (基因枪) 或任何其他熟知的在宿主细胞中导入克隆的基因组 DNA、cDNA、合成 DNA 或其他外源遗传物质的方法 (参见, 例如 Sambrook 等, 同上)。所用的特定遗传工程方法只需要能在表达 KCNB 基因的宿主细胞中成功导入至少一种基因。

在表达载体导入细胞后, 在有利于 KCNB 多肽表达的条件下培养转染细胞, 再使用下文所鉴定的标准技术从培养物中回收 KCNB 多肽。原核或真核细胞的培养方法是熟知的, 并教导在例如 Ausubel 等、Sambrook 等和 Freshney, *Culture of Animal Cells*, 第三版, (1993), A Wiley-Liss Publication。

IV. KCNB 多肽的纯化

天然存在和重组的 KCNB 多肽可被纯化后用于功能分析、结合分析、诊断分析和其他应用中。天然存在的 KCNB 多肽例如从哺乳动物组织, 如血液和淋巴组织, 或从任何其他来源的 KCNB 同系物中纯化出来。重组 KCNB 多肽从任何适当的细菌或真核表达系统例如 CHO 细胞或昆虫细胞中纯化出来。

通过标准技术可将 KCNB 纯化至基本纯, 这些标准技术包括但不限于用如硫酸铵这样的物质进行选择性的沉淀、柱层析、免疫纯化方法和其他方法 (参见, 例如 Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); 美国专利 4,673,641; Ausubel 等, 同上; 和 Sambrook 等, 同上)。

当重组 KCNB 多肽正被纯化时, 可使用许多方法。例如, 可将具有分子粘着特性的蛋白与 KCNB 多肽可逆性融合。利用适当的配体, 可将 KCNB 多肽选择性地吸附到纯化柱上, 从柱中再以相对纯的

形式分离出来。然后用酶除去融合蛋白。使用免疫亲和柱也可纯化 KCNB 蛋白。

A. 重组 KCNB 蛋白的纯化

5 通常在启动子诱导后,重组蛋白被转化的细菌或真核细胞,如 CHO 细胞或昆虫细胞,大量表达,但表达可能是组成型的。用 IPTG 诱导启动子是可诱导启动子系统的一个例子。根据本领域标准方法可使细胞生长。新鲜或冷冻细胞用于蛋白分离。

10 细菌中表达的蛋白可形成不溶的团聚体(“包含体”)。有若干方案适用于纯化 KCNB 包含体。例如,包含体的纯化通常包括细菌细胞破裂,例如在 50mM Tris/HCl pH7.5、50mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM DTT、0.1mM ATP 和 1mM PMSF 的缓冲液中温育,然后抽提、分离和/或纯化包含体。细胞悬浮液可通过 French Press 采用 2-3 个通道裂解,用 Polytron (Brinkman Instruments) 匀浆或在冰上超声处理。对本领域技术人员来说,采用任一个方法裂解细菌都是显而易见的(参见,例如 Sambrook 等,同上; Ausubel 等,同上)。

20 如果需要,包含体可被溶解,通常将裂解细胞悬浮液离心,以除去不需要的不溶物质。用配伍的缓冲液稀释或透析后可将形成包含体的蛋白复性。适当的溶剂包括但不限于脲(从约 4M 到约 8M)、甲醛(至少约 80% v/v)和盐酸胍(从约 4M 到约 8M)。由于蛋白可能不可逆变性,并伴随出现免疫原性和/或活性缺乏,因此,能溶解团聚体形成的蛋白的一些溶剂,例如 SDS(十二烷基硫酸钠)和 70% 甲酸
25 在本方法中是不适用的。虽然盐酸胍和类似试剂是变性剂,但是这种变性也不是不可逆的,在去除(例如通过透析)或稀释变性剂后可发生复性,允许重新形成免疫原性和/或生物活性的蛋白。其他合适的缓冲液是本领域技术人员已知的。使用标准分离技术,例如采用 Ni-NTA 琼脂糖树脂,能将 KCNB 多肽从其他细菌蛋白中分离出来。

30

或者，从细菌周质中纯化 KCNB 多肽是可能的。细菌裂解后，当把 KCNB 蛋白排出到细菌的周质中时，除了本领域技术人员已知的其他方法以外，通过冷渗透休克可分离细菌周质部分。为了从周质中分离重组蛋白，细菌细胞离心形成沉淀。在含有 20% 蔗糖的缓冲液中重悬浮沉淀。为了裂解细胞，细菌离心后将沉淀再悬浮于冰冷的 5mM MgSO₄ 并在冰浴中保持约 10 分钟。离心细胞悬浮液，倾析上清液并保存。通过本领域技术人员熟知的标准分离技术可从宿主蛋白中分离上清液中存在的重组蛋白。

10 B. 纯化 KCNB 多肽的标准蛋白分离技术

通常作为起始步骤，特别是如果蛋白混合物是复合体时，初始盐分级分离可从目的重组蛋白中分离出许多不需要的宿主细胞蛋白（或来源于细胞培养基的蛋白）。优选盐是硫酸铵。硫酸铵通过有效减少蛋白混合物中的水量沉淀蛋白。然后根据它们的溶解度，蛋白沉淀。蛋白越疏水，越有可能在较低的硫酸铵浓度下沉淀。方案通常包括在蛋白溶液中加入饱和硫酸铵，以使硫酸铵浓度介于 20-30% 之间。该浓度将沉淀大多数疏水蛋白。丢弃沉淀（除非目的蛋白是疏水的），再在上清液中加入硫酸铵至目的蛋白沉淀已知的浓度。然后以缓冲液溶解沉淀，如果需要，通过透析或渗滤除去过量的盐。依赖蛋白溶解度的其他方法如冷乙醇沉淀，是本领域技术人员熟知的，也可用于分级分离复合蛋白混合物。

使用超滤方法，通过孔径大小不同的膜（例如 Amicon 或 Millipore 膜），依据 KCNB 蛋白的分子量，可将其从更大和更小的蛋白中分离出来。作为第一步，将蛋白混合物通过一定孔径大小的膜超滤，此膜的截留分子量小于目的蛋白的分子量。将超滤存留液再次对膜超滤，此膜的截留分子量大于目的蛋白的分子量。重组蛋白将通过膜进入滤出液中。然后如下所述层析分离滤出液。

30 KCNB 蛋白也可根据大小、表面静电荷、疏水性和对异源分子的

亲和性从其他蛋白中分离。另外，针对蛋白所产生的抗体可以与柱基质结合，然后免疫纯化蛋白。所有这些方法都是本领域熟知的。对专业技术人员来说，层析技术可在任何规模并使用来自许多不同制造商的设备来进行是显而易见的（例如 Pharmacia Biotech）。

5

V. 针对 KCNB 家族成员的抗体

在本发明众多实施方案中，将采用与 KCNB 多肽特异性结合的抗体。这些抗体有许多应用，包括用于调节 KCNB 活性和用于免疫测定以检测 KCNB 和 KCNB 的变体、衍生物和片段等。免疫测定可用于定性或定量分析 KCNB 多肽。此实用技术的综述可在 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988)中找到。在一些实施方案中，为了诊断和/或预后应用，抗体用于检测 KCNB。

10

15

20

针对 KCNB 的抗体也可包含嵌合抗体，其中抗体或其亚片段与分子连接，其中(a)恒定区或其部分被改变、替代或交换，从而使抗原结合位点（可变区）连接到不同类别或改变类别的恒定区、效应物官能团和/或物种上，或连接到给嵌合抗体赋予新特性的完全不同的分子上，如酶、毒素、激素、生长因子、药物等；或(b)可变区或其部分被具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替代或交换。这些抗体可用作例如靶试剂来靶击如对 KCNB 表达细胞的毒素的部分。

25

30

与 KCNB 多肽特异性反应的多克隆和单克隆抗体的生产方法对本领域技术人员来说是已知的（参见，例如 Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow 和 Lane, 同上; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (第二版, 1986); 以及 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975))。这些技术包括通过从噬菌体或类似载体中的重组抗体文库中筛选抗体来制备抗体，以及通过免疫兔或小鼠来制备多克隆和单克隆抗体（参见，例如 Huse 等, *Science* 246:1275-1281 (1989); Ward 等, *Nature* 341:544-546 (1989))。

许多包含 KCNB 的免疫原可用于生产与 KCNB 多肽特异性反应的抗体。例如，如本发明所述分离重组 KCNB 蛋白或其抗原片段。如上文所述，重组蛋白可在真核或原核细胞中表达和纯化。重组蛋白是生产单克隆或多克隆抗体的优选免疫原。或者，从本发明公开的序列衍生并与载体蛋白结合的合成肽可用作免疫原。天然存在的蛋白也可以纯的或不纯的形式采用。然后将产物注射到能产生抗体的动物体内。可生成单克隆或多克隆抗体，随后用于免疫测定以检测蛋白。

多克隆抗体的生产方法是本领域技术人员已知的。使用标准佐剂如弗氏佐剂和标准免疫方案将蛋白免疫纯种品系的小鼠（例如 BALB/C 小鼠）或兔子。动物对免疫原制剂的免疫应答通过采集测试血并测定 KCNB 多肽的反应性效价来监控。当所获得的针对免疫原的抗体效价适当高时，从动物中收集血液，并制备抗血清。如果需要，可进一步进行抗血清的分级分离以富集与蛋白反应的抗体（参见 Harlow 和 Lane，同上）。

通过各种本领域技术人员熟悉的技术可获得单克隆抗体。简而言之，从以所需抗原免疫的动物中产生的脾细胞通常与骨髓瘤细胞的融合而永生化（参见 Kohler 和 Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519 (1976)）。永生化的其他方法包括用 EB 病毒、致癌基因或逆转录病毒转化或其他本领域熟知的方法。为了生产对抗原所需的特异性和亲和性的抗体，筛选来自单个永生化细胞的菌落，并且由这些细胞产生的单克隆抗体的产量可通过各种技术包括给脊椎动物宿主的腹膜腔注射来提高。或者，根据 Huse 等在 Science 246:1275-1281 (1989)中概括的一般方案，通过从人 B 细胞中筛选 DNA 文库可分离编码单克隆抗体或其结合片段的 DNA 序列。

收集单克隆抗体和多克隆血清，并在免疫测定中滴定免疫原蛋白，例如采用固定在固相支持物上的免疫原进行的固相免疫测定。通常，选择效价为 10^4 或更高的多克隆抗血清，采用竞争性结合免疫测

定方法，测试它们针对非 KCNB 蛋白或甚至针对来自其他生物体的相关蛋白的交叉反应性。特异性多克隆抗血清和单克隆抗体通常以一定的 K_d 结合， K_d 至少约 0.1mM，更常见至少约 1 μ M，或者至少约 0.1 μ M 或更少，和任选 0.01 μ M 或更少。

5

A. 免疫结合测定

一旦可得到 KCNB 特异抗体，单个 KCNB 蛋白可通过各种免疫测定方法进行检测。对于一般免疫测定的综述，也参见 *Methods in Biology: Antibodies in Cell Biology*, volume 37 (Asai 编 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites 和 Terr 编，第 7 版，1991 年)。另外，本发明的免疫测定可用于若干结构的任一结构的检测。这些在 *Enzyme Immunoassay* (Maggio 编，1980)；以及 Harlow 和 Lane，同上有广泛综述。免疫结合测定（或免疫测定）通常使用与选择的蛋白或抗原特异性结合的抗体（在本发明中指 KCNB 蛋白或其抗原亚序列）。
10 抗体（例如抗-KCNB）的生产可借助于本领域技术人员熟知的任何方法以及如上所述的方法。
15

免疫测定也经常利用标记介质来特异性结合和标记由抗体和抗原形成的复合体。标记介质本身可以是含有抗体/抗原复合体的一个部分。因此，标记介质可以是标记的 KCNB 多肽或标记的抗-KCNB 抗体。或者，标记介质可以是第三部分，如与抗体/KCNB 复合体特异性结合的第二抗体（第二抗体通常是特异于衍生第一抗体的物种的抗体）。能特异性结合免疫球蛋白恒定区的其他蛋白如蛋白 A 或蛋白 G 也可用作标记介质。这些蛋白与来自各种物种的免疫球蛋白恒定区表现出强的非免疫原反应性（参见，例如 Kronval 等，*J. Immunol.* 111:1401-1406 (1973)；Akerstrom 等，*J. Immunol.* 135:2589-2542 (1985)）。标记介质可用可检测部分如生物素进行修饰，生物素可特异性结合另一分子如链亲和素。各种可检测部分是本领域技术人员熟知的。
20
25
30

测定全程中，在试剂各个结合后，都需要温育和/或洗涤步骤。温育步骤的时间可从约 5 秒到几小时内变化，任选从约 5 分钟到约 24 小时。然而，温育时间将根据测定形式、抗原、溶液体积、浓度等发生变化。测定一般在室温下进行，尽管它们可在如 10℃ 到 40℃ 的温度范围进行。

1. 非竞争测定形式

检测样品中 KCNB 蛋白的免疫测定可以是竞争性的也可以是非竞争性的。非竞争免疫测定是直接测定抗原量的测定。在一个优选“三明治”的测定中，例如抗-KCNB 抗体可直接与固体底物结合，并固定在其上。这些固定的抗体捕获测试样品中存在的 KCNB 蛋白。因此，固定的 KCNB 蛋白被如携有标记的第二 KCNB 抗体的标记介质结合。或者，第二抗体可缺少标记，但它可依次被标记的第三抗体结合，所述第三抗体特异于衍生第二抗体物种的抗体。第二或第三抗体通常用可检测部分如生物素修饰，而生物素又与另一分子如链亲和素特异性结合从而提供可检测部分。

2. 竞争测定形式

在竞争测定中，通过测定已知的加入（外源）KCNB 蛋白与抗-KCNB 抗体的结合被样品中存在的未知 KCNB 蛋白所取代（竞争占用）的量，可间接检测样品中存在的 KCNB 蛋白量。在一个竞争测定中，样品中加入已知量的 KCNB 蛋白，然后将样品与和 KCNB 蛋白特异性结合的抗体接触。与抗体结合的外源 KCNB 蛋白量与样品中存在的 KCNB 蛋白浓度成反比。在特定的优选实施方案中，抗体固定于固相底物上。通过测定 KCNB/抗体复合体中存在的 KCNB 蛋白量，或者通过测定剩余未复合的蛋白量可以确定与抗体结合的 KCNB 蛋白量。通过提供标记 KCNB 分子可检测 KCNB 蛋白量。

半抗原抑制测定是另一优选的竞争测定。在此测定中，将已知 KCNB 蛋白固定在固相基质上。样品中加入已知量的抗-KCNB 抗体，

然后将样品与固定的 KCNB 接触。与已知固定的 KCNB 蛋白结合的抗-KCNB 抗体量与样品中存在的 KCNB 蛋白量成反比。通过检测抗体的固定部分或溶液中剩余的抗体部分可再次检测固定抗体的量。如果抗体是标记的，可直接检测，或者通过如上文所述的随后加入与抗体特异性结合的标记部分进行间接检测。

3. 交叉反应性的确定

以竞争结合形式的免疫测定也可用于交叉反应性的确定。例如，可将至少部分由 SEQ ID NO:2 编码的蛋白固定于固相支持物上。将与固定抗原竞争结合抗血清的蛋白（例如 KCNB 蛋白和同系物）加入到测定中。把外加蛋白与固定化蛋白竞争结合抗血清的能力和由 SEQ ID NO:2 编码的 KCNB 多肽与自身竞争的能力比较。利用标准算法计算上面蛋白的交叉反应性的百分数。选择与上面列出的各个外加蛋白交叉反应性小于 10% 的抗血清并合并。通过用外加假定的蛋白例如远缘相关的同系物进行免疫吸附可从合并的抗血清中任选除去交叉反应的抗体。

然后将免疫吸附和合并的抗血清用于如上所述竞争结合的免疫测定中，从而把认为也许是 KCNB 蛋白的等位基因或多态变体的第二蛋白与免疫原蛋白（即由 SEQ ID NO:2 编码的 KCNB 蛋白）进行比较。为了进行此比较，在宽范围的浓度下分别测定两个蛋白，并确定抑制 50% 的抗血清与固定蛋白结合所需的各个蛋白量。如果抑制 50% 的结合所需的第二蛋白量比抑制 50% 的结合所需的由 SEQ ID NO:2 编码的蛋白量小 10 倍，那么就说第二蛋白与针对 KCNB 免疫原所产生的多克隆抗体特异性结合。

使用 KCNB 同系物，通过去除交叉反应抗体后，可制备与来自特定物种的 KCNB 蛋白特异性结合的多克隆抗体。例如，通过去除与小鼠 KCNB 交叉反应的抗体，可制备特异于人 KCNB 的抗体。以类似方式，采用多种 KCNB 基因可在生物体中制备特异于特定 KCNB

蛋白的抗体。

4. 其他测定形式

5 蛋白质印迹（免疫印迹）分析可用于检测和定量样品中 KCNB 蛋白的存在。此技术一般包括通过凝胶电泳根据分子量分离样品蛋白，将分离的蛋白转移到适当的固相支持物上（如硝酸纤维素滤膜、尼龙滤膜或衍生的尼龙滤膜），和把样品和特异性结合 KCNB 蛋白的抗体一起温育。抗-KCNB 多肽抗体在固相支持物上与 KCNB 多肽特异性结合。这些抗体可直接标记，或者可随后采用与抗-KCNB 抗体特异性结合的标记抗体（例如，标记的羊抗小鼠抗体）进行检测。

15 其他测定形式包括脂质体免疫测定（LIA），其采用设计成结合特异分子（例如抗体）并释放胶囊化的试剂或标记的脂质体。然后根据标准技术检测释放的化学成分（参见 Monroe 等，*Amer. Clin. Prod. Rev.* 5:34-41(1986)）。

20 本领域技术人员懂得通常理想的是使免疫测定中的非特异结合最小化。具体而言，当测定包括固定于固相基质上的抗原或抗体时，需要使与基质非特异结合的量最小化。减少这种非特异结合的方法是本领域技术人员熟知的。该技术通常包括用蛋白组合物包被基质。具体而言，广泛使用蛋白组合物，如牛血清白蛋白（BSA）、无脂奶粉和明胶，以奶粉最优选。

5. 标记

25 只要不显著干扰测定中所用的抗体的特异性结合，测定中所用的特定标记或可检测基团不是本发明的关键方面。可检测基团可以是具有可检测物理或化学特性的任何物质。这些可检测标记已在免疫测定领域发展成熟，一般而言，这些方法中有用的大多数标记都可适用于本发明。因此，标记是通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电、光或化学方法可检测的任何组合物。本发明中有用的标记包括磁珠（例

30

如 DYNABEADS™)、荧光染料(例如异硫氰酸荧光素、Texas 红、罗丹明等)、放射性标记(例如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和其他 ELISA 中常用的酶),以及比色标记,如胶体金或有色玻璃或塑料珠(例如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等)。

根据本领域熟知的方法,标记可直接或间接与测定所需的成分偶联。如上所示,可使用多种标记,标记选择依据所要求的灵敏度、与化合物结合的容易程度、稳定性要求、可用仪器和防护条件。

非放射性标记通常用间接方法附着。配体分子(例如生物素)一般与分子共价结合。然后配体与另一分子(例如链亲和素)结合,此分子或是固有可检测的,或与信号系统如可检测酶、荧光化合物或化学发光化合物共价结合。配体及其靶可与识别 KCNB 蛋白的抗体或识别抗-KCNB 的第二抗体以任意适当组合方式使用。

这些分子也可以例如通过与酶或荧光团结合直接与产生信号的化合物结合。作为标记的目的酶主要是水解酶,具体是磷酸酶、酯酶和糖苷酶,或氧化酶,尤其是过氧化物酶。荧光化合物包括荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹酰、伞形酮等。化学发光化合物包括荧光素和 2,3-二氢二氮杂萘酮(dihydrophthalazinediones),例如发光氨。可利用的各种标记或信号产生系统的综述参见美国专利 4,391,904。

检测标记的方法是本领域技术人员熟知的。因此,例如当标记是放射性标记时,检测的方法包括闪烁计数器或放射自显影中的光学胶片。当标记是荧光标记时,可通过用适当波长的光激发荧光染料并检测产生的荧光。荧光检测可通过肉眼、照相胶片方法、电子检测器如电荷偶联装置(CCD)或光电倍增管等进行。通过给酶提供合适的底物并检测形成的反应产物可相似地检测酶标记。最后,通过观察与标记相

关的颜色可容易地检测简单的比色标记。因此，在各种量尺的测定中，结合金经常显示粉红色，而不同的结合珠显示不同的珠的颜色。

有些测定形式不需要使用标记成分。例如凝集测定可用于检测靶抗体的存在。在此情况下，抗原包被的颗粒为包含靶抗体的样品所凝集。以此形式，没有成分需要标记，靶抗体的存在通过简单的肉眼观察进行检测。

VI. 与改变 KCNB 活性或表达相关的疾病的诊断

KCNB 核酸、蛋白和/或抗体在诊断或预后上可用于检测与正常比较有变化的 KCNB 活性或表达相关的疾病或症状。这些疾病可与降低或增加的 KCNB 活性或表达相关。KCNB 活性或表达的检测可采用任意试剂，包括例如 KCNB 蛋白、mRNA、基因组 DNA 或针对 KCNB 的抗体。活性变化可显示在例如 KCNB 基因拷贝数和 KCNB 基因序列突变的改变，以及显示转录、翻译、RNA、蛋白水平、蛋白稳定性或蛋白活性的改变。因而，本发明提供例子的大量测定的任意方法可用于检测 KCNB 核酸或多肽。

本发明序列相应地可用于治疗本发明描述的患者任意失调或症状，其中 KCNB 表达或活性水平的改变或 KCNB 多核苷酸或多肽中有害突变的检测显示疾病或症状存在或可能性。因此，本发明为与增加或降低的 KCNB 活性相关的疾病提供检测或诊断疾病或其可能性的方法。这些疾病包括癌症（下文进一步讨论）；与大脑相关的失调，如癫痫、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、中风、多发性硬化、偏头痛；以及精神病失调，如抑郁症、精神分裂症、既有狂躁又有抑郁发作的情感性精神病；以及其他疾病（参见，例如 *Harrison's Principles of Internal Medicine*，第 12 版，Wilson 等编，McGraw-Hill, Inc.）。其他疾病包括与心脏相关的疾病，如心律不齐、心力衰竭；和各种心血管疾病（参见，例如 *Harrison's Principles of Internal Medicine*，第 12 版，Wilson 等编，McGraw-Hill, Inc.）以及与胰腺相关的疾病，如胰腺炎、

糖尿病和胰腺中其他激素分泌异常，如胰高血糖素、生长激素抑制素分泌（参见，例如 Harrison's Principles of Internal Medicine，第 12 版，Wilson 等编，McGraw-Hill, Inc.）。

5 在某些实施方案中，例如癌症诊断、KCNB 多核苷酸水平、多肽或蛋白活性将被定量。在这些实施方案中，来自患有或怀疑患有 KCNB 相关失调的患者的生物样品中的 KCNB 水平与正常对照之间的差异在统计学上将优选是显著的。诊断存在通常表示生物样品中 KCNB 多肽或多核苷酸的水平与对照样品中所预计的水平相比至少约 1.5、2、5、10 或更多倍的改变，所述对照样品例如是代表健康受试者或正常组织的生物材料样品。KCNB 的检测可体外进行，即在采自哺乳动物的生物样品内的细胞或体内细胞来进行。“诊断存在”显示比正常对照样品中所预计的 KCNB 水平发生变化的任何水平。

15 在一个实施方案中，KCNB 核酸和蛋白可单独或与其他诊断方法组合用作诊断或预后工具，以检测与癌症相关的 KCNB 拷贝数或表达的增加，所述癌症例如是乳腺癌或肺癌以及其他癌症，如上皮癌，例如直肠癌、前列腺癌、肾癌、胃癌、膀胱癌、卵巢癌或胃肠道癌。KCNB 核酸或蛋白的检测也可用于检测癌症治疗的功效。例如，KCNB 蛋白或核酸的水平在抗癌治疗后可与治疗前的水平比较，其中治疗后 KCNB 蛋白或核酸水平的降低显示治疗有效。KCNB 蛋白或核酸水平也可用于影响哺乳动物中抗癌治疗的选择，其中例如 KCNB 的大量增加显示使用了较积极的抗癌治疗，而少量增加或不增加显示使用了较消极的抗癌治疗。此外，为了评价一段时期疾病的发展，检测癌细胞的能力可用于体内或体外监控患者中癌细胞的数目和/或定位，所述癌细胞显示改变的 KCNB 活性或表达。

VI. 调节 KCNB 活性

A. KCNB 蛋白的调节剂测定

30 在本发明众多实施方案中，通过给细胞体内或体外施用任一种大

量的 KCNB 调节分子例如多肽、抗体、氨基酸、核苷酸、脂、碳水化合物或任何有机或无机分子，可调节细胞中 KCNB 活性的水平。

5 为鉴定能调节 KCNB 的分子，将进行测定以便检测各种候选调节剂对细胞中 KCNB 活性的影响。可采用各种体外和体内测定方法对 KCNB 多肽的活性进行评价，以便确定功能、化学和物理效应，所述方法例如测定 KCNB 与其他分子的结合（放射性结合）、测定 KCNB 蛋白和/或 RNA 水平或测定 KCNB 多肽的其他方面，例如磷酸化水平、转录水平、保护细胞免遭编程性细胞死亡、受体或通道活性等。这些
10 测定可用于测试 KCNB 蛋白的激活剂和抑制剂。因此，经鉴定的调节剂对例如许多诊断和治疗应用是有用的。

使用各种测定方法可测定 KCNB 蛋白的钾通道活性以便测定离子通量的变化，所述方法包括膜片钳技术、全细胞电流测定、放射性
15 标记的铷通量测定以及采用电压敏感的染料进行的荧光测定（参见，例如 Vestergaard-Bogind 等，J. Membrane Biol. 88:67-75 (1988); Daniel 等，J. Pharmacol. Meth. 25:185-193 (1991); Hoesvinsky 等，J. Membrane Biol. 137:59-70 (1994)）。例如，可将编码 KCNB 蛋白或其同系物的核酸注射到非洲爪蟾卵母细胞中。通过测定细胞膜极化的变化即细胞
20 膜电位的变化可确定 KCNB 活性。获得电生理测定的优选方法是采用膜片钳技术测定电流，例如“细胞附着”方式、“内翻外”方式和“全细胞”方式（参见，例如 Ackerman 等，New Engl. J. Med. 336:1575-1595 (1997)）。利用如 Hamil 等在 Pflugers. Archiv. 391:85 (1981)中所描述的标准方法可确定全细胞电流。

25

如保护免遭编程性细胞死亡的 KCNB 活性也可确定。例如，采用实施例 4 中所描述的方法可测定 KCNB 保护细胞免遭 TNF- α 诱导的编程性细胞死亡的能力。

30

测定中的 KCNB 蛋白通常是重组体或带有序列 SEQ ID NO:1 的

天然存在的多肽或其保守性修饰变体。或者，测定中的 KCNB 蛋白衍生自真核细胞并包括与 SEQ ID NO:1 有氨基酸序列同一性的氨基酸亚序列。氨基酸序列同一性大体上至少是 70%、任选至少 75%、85% 或 90%，或任选至少 95% 至 98%。测定中的多肽任选包含 KCNB 蛋白的结构域，如 N 末端结构域、C 末端结构域、胞外环、一个或多个跨膜结构域等。在某些实施方案中，将 KCNB 蛋白的结构域，例如 N 末端结构域、C 末端结构域、胞外环或一个或多个跨膜结构域，与固相基质结合，并用于例如分离可结合和/或调节活性的任何分子。在某些实施方案中，将 KCNB 多肽的结构域，例如 N 末端结构域、C 末端结构域、胞外环或一个或多个跨膜结构域，与异源多肽融合，由此形成嵌合多肽。这些嵌合多肽例如在测定方法中鉴定 KCNB 调节剂也是有用的。

把用潜在 KCNB 蛋白抑制剂或激活剂处理的样品或测定与没有测试化合物的对照样品比较，以便检验调节程度。对照样品（未用激活剂或抑制剂处理）的相对 KCNB 活性值设定为 100。当 KCNB 的活性值相对于对照是约 90%，任选约 50%，任选约 25-0% 时，就达到了 KCNB 蛋白的抑制。当 KCNB 的活性值相对于对照是约 110%，任选 150%、200-500% 或约 1000-2000% 时，就达到了 KCNB 蛋白的激活。

通过检验如上所述的任何参数可测定测试化合物对多肽功能的影响。任何影响 KCNB 活性的适当生理变化都可用于评估测试化合物对本发明的多肽的影响。当利用完整细胞或动物确定其功能效果时，人们也可测定各种效应，如细胞生长或 pH 变化、胞内第二信使如 Ca^{2+} 、IP3、cGMP 或 cAMP 的变化或细胞膜电位的变化。

将含有目的 KCNB 蛋白的宿主细胞与测试化合物接触足够长的时间以便发生相互作用，然后检测基因表达的水平。根据经验确定发生这些相互作用所需的时间，如经过一个时间过程然后测定作为时间

函数的转录水平。利用本领域技术人员已知的任何适当的方法可检测转录量。例如，利用蛋白印迹可检测目的蛋白的 mRNA 表达，或利用免疫测定检测它们的多肽产物。

5 B. KCNB-相互作用化合物的测定

10 在一些实施方案中，测定操作可用来鉴定与 KCNB 蛋白物理上相互作用的分子。这些分子可以是任何类型的分子，包括多肽、多核苷酸、氨基酸、核苷酸、碳水化合物、脂或任何有机或无机分子。这些分子可表示与 KCNB 正常相互作用的分子，或可以是合成的或其他能与 KCNB 相互作用的分子以及表示可潜在性地用作引导化合物以鉴定能与 KCNB 反应和/或调节 KCNB 的分子类别的分子。这些测定可表示物理结合测定，如亲和层析、免疫沉淀、二杂种筛选或其他结合测定，或可表示遗传测定。

15 在本发明描述的体内或体外任意结合测定或功能测定中，可采用任何 KCNB 蛋白或 KCNB 蛋白的任何衍生物、变体、同系物或片段。KCNB 蛋白优选与 SEQ ID NO:1 至少有约 70% 的同一性。在众多实施方案中，采用 KCNB 蛋白片段。例如，可使用仅含有 N 末端或 C 末端或胞外环或跨膜结构域的片段。这些片段可被单独使用、与其他 KCNB 片段组合使用或与来自异源蛋白的序列组合使用，例如片段可与异源多肽融合，由此形成嵌合多肽。

25 基于与 KCNB 蛋白或其片段特异性结合的能力，可分离与 KCNB 蛋白相互作用的化合物。在众多实施方案中，KCNB 蛋白或蛋白片段可附着到固相支持物上。在一个实施方案中，使用 KCNB 多肽制备亲和柱，并鉴定物理上相互作用的分子。对专业技术人员来说，层析技术可在任何规模并使用来自许多不同制造商（例如 Pharmacia Biotechnology）的设备来进行是显而易见的。此外，与 KCNB 蛋白体内相互作用的分子可通过共免疫沉淀或其他方法鉴定，即使用抗-KCNB 抗体从细胞或细胞抽提物中免疫沉淀 KCNB 蛋白，和鉴定化合

30

物，例如与 KCNB 蛋白一起沉淀的蛋白。这些方法本领域技术人员是熟知的，并教导在例如 Ausubel 等， Sambrook 等， 和 Harlow 和 Lane，全部同上。

5 C. 调节剂和结合化合物

作为 KCNB 蛋白调节剂，测试化合物可以是任何小的有机或无机化学化合物或生物学实体，例如蛋白、糖、核酸或脂。测试化合物通常是小的化学分子和肽。尽管可用的大多数化合物常常溶解在水或有机（特别是基于 DMSO）溶液中，但基本上任何化合物都可用作本发明测定中潜在的调节剂或结合化合物。通过使测定步骤自动化并给测定方法提供任何方便来源的化合物，设计测定方法对大的化学品文库进行筛选，通常测定平行进行（例如以自动化测定中微量滴定板上的微滴形式）。人们可意识到有许多化学化合物的供应商，包括 Sigma (St. Louis, MO)、Aldrich (St. Louis, MO)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、
10 Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs Switzerland) 等。

在一个优选的实施方案中，高通量的筛选方法包括提供含有大量潜在治疗化合物（潜在调节剂或结合化合物）的组合化学品或肽文库。然后在一个或多个测定中，如本发明所述，筛选这些“组合化学品文库”，以便对展示所需特征活性的那些文库成员（特别是化学物种或
20 亚类）进行鉴定。经鉴定的化合物可充当常规的“引导化合物”或自身可用作潜在或真正的治疗剂。

组合化学品文库是各种各样的化学化合物的集合，所述化合物由化学合成或生物合成通过组合许多化学“构件”如试剂产生。例如，
25 多肽文库的线性组合化学品文库是通过对给定化合物长度（即多肽化合物中氨基酸的数目）以各种可能的方式组合一系列化学构件（氨基酸）而形成的。通过化学构件的如此组合混合可合成数百万的化合物。

30 组合化学品文库的制备和筛选是本领域技术人员熟知的。这些组

合化学品文库包括但不限于肽文库（参见，例如美国专利 5,010,175, Furka, Int. J. Pept. Prot. Res. 37:487-493 (1991)和 Houghton 等, Nature 354:84-88 (1991)）。也可使用产生化学多样性文库的其他化学物质。这些化学物质包括但不限于类肽（例如 PCT 公开号 WO 91/19735）、
5 编码肽（例如 PCT 公开号 WO 93/20242）、无规则的生物寡聚体（例如 PCT 公开号 WO 92/00091）、苯二氮平（benzodiazepines）（例如美国专利号 5,288,514）、如海因、苯二氮平（benzodiazepines）和二肽的多变聚体（diversomers）（Hobbs 等, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A 90:6909-6913 (1993)）、联乙烯多肽（Hagihara 等, J. Amer. Chem. Soc. 114:6568 (1992)）、带有葡萄糖支架的非肽的肽模拟物（Hirschmann 等, J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218 (1992)）、小化合物文库的类似有机合成物（Chen 等, J. Amer. Chem. Soc. 116:2661 (1994)）、寡聚氨基甲酸酯（Cho 等, Science 261:1303 (1993)），和/或肽基磷酸酯（Campbell 等, J. Org. Chem. 59:658 (1994)）、核酸文库（参见 Ausubel、
15 Berger 和 Sambrook, 全部同上）、肽核酸文库（参见，例如美国专利号 5,539,083）、抗体文库（参见，例如 Vaughn 等, Nature Biotechnology 14(3):309-314 (1996)和 PCT/US96/10287）、碳水化合物文库（参见，例如 Liang 等, Science 274:1520-1522 (1996)和美国专利号 5,593,853）、有机小分子文库（参见，例如苯二氮平（benzodiazepines），Baum C 和 EN, 1 月 18 日, 第 33 页(1993); 类异戊二烯, 美国专利号 5,569,588; 噻唑烷酮（thiazolidinones）和间噻唑烷酮（metathiazanones），美国
20 专利号 5,549,974; 吡咯烷, 美国专利号 5,525,735 和 5,519,134; 吗啉化合物, 美国专利号 5,506,337; 苯二氮平（benzodiazepines），美国专利号 5,288,514 等）。

25

制备组合文库的设备可从市场上得到（参见，例如 357MPS、390MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA)。另外，许多组合文库本身也可从市场得到（参见，例如 ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D
30

Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD 等)。

1. 固态和溶性高通量测定

5 在一个实施方案中，本发明提供了溶性测定，利用如 N 末端或 C 末端结构域的分子，所述分子是单独的或与异源蛋白共价连接产生的嵌合分子。在另一实施方案中，本发明提供以高通量形式基于固相的体外测定，其中结构域、嵌合分子、KCNB 蛋白，或表达 KCNB 蛋白的细胞或组织附着到固相基质上。

10 在本发明的高通量测定中，一天筛选多达数千个不同的调节剂是可能的。具体而言，各个微量滴定板的孔都可用于针对选定的潜在调节剂进行单独测定，或者如果需要观察浓度或温育时间的作用，那么每 5-10 个孔可测试一个调节剂。因此，一个标准微量滴定板可分析约 100 个（即 96 个）调节剂。如果使用 1536 个孔的平板，那么一个平
15 板可容易地测定约 100 至约 1500 个不同的化合物。每天测定若干个不同的平板是可能的，利用本发明的综合系统，可对多达 6000-20000 个不同的化合物进行测定筛选。最近，已开发出试剂操作的显微流体方法。

20 通过共价或非共价键例如通过标记，可将目的分子与固态成分直接或间接结合。标记可以是各种成分的任一种。一般而言，结合标记的分子（标记结合物）固定于固相支持物上，目的标记分子通过标记和标记结合物的相互作用而附着于固相支持物上。

25 根据文献中清楚描述的已知分子的相互作用，可使用许多标记和标记结合物。例如，当标记具有天然结合物时，例如生物素、蛋白 A 或蛋白 G，其可与适当标记结合物（卵白素、链亲和素、中性卵白素、免疫球蛋白的 Fc 区域等）结合使用。针对带有如生物素的天然结合物的分子的抗体和适合的标记结合物也是广泛得到的（参见 SIGMA
30 Immunochemicals 1998 目录，SIGMA, St. Louis MO）。

任意半抗原性或抗原性化合物相似地可与适当抗体结合使用，以形成标记/标记结合物对。成千上万的特异抗体都可从市场上得到，并且其他许多抗体在文献中都有描述。例如，在一个共同的构型中，标记是第一抗体，标记结合物是识别第一抗体的第二抗体。

如聚氨基甲酸酯、聚酯、聚碳酸酯、聚脲、聚酰胺、聚乙酰亚胺、聚亚芳基硫、聚硅氧烷、聚酰亚胺和聚乙酸的合成多聚体也可形成适当的标记或标记结合物。许多其他的标记/标记结合物对在本发明所述的测定系统中也是有用的，正如专业技术人员在参阅本发明内容后将是清楚的。

如肽、聚醚等的常见接头也可用作标记，包括如介于约 5-200 个氨基酸的聚甘氨酸序列的多肽序列。这些活接头是本领域技术人员已知的。例如，聚乙二醇接头可从 Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabama 得到。这些接头任选具有酰胺键、硫氢键或杂官能团键。

利用目前任意可得的各种方法，将标记结合物固定于固相基质上。固相基质通常通过将全部或部分基质暴露给化学试剂而被衍生或功能化，所述化学试剂是将化学基团固定于与部分标记结合物反应的表面上。例如，适于附着较长链部分的基团包括胺、羟基、硫醇和羧基基团。氨烷基硅烷和羟烷基硅烷可用于使各种表面功能化，如玻璃表面。构建这些固相生物多聚体阵列在文献中已有清楚描述，参见，例如 Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963) (描述了例如肽的固相合成)；Geysen 等, J. Immun. Meth. 102:259-274 (1987) (描述了在针状物上固相成分的合成)；Frank 和 Doring, Tetrahedron 44:60316040 (1988) (描述了在纤维素圆形物上各种肽序列的合成)；Fodor 等, Science, 251:767-777 (1991)；Sheldon 等, Clinical Chemistry 39(4):718-719 (1993)；和 Kozal 等, Nature Medicine 2(7):753759 (1996) (全部描述了固定于固相基质的生物多聚体阵列)。将标记结合物固定

于底物的非化学途径包括其他常用方法，如热、紫外辐射交联等。

2. 基于计算机分析

对调节 KCNB 蛋白活性的化合物的另一测定包括计算机辅助药物设计，其中根据由氨基酸序列编码的结构信息，计算机系统用于生成 KCNB 蛋白的三维结构。输入的氨基酸序列与计算机程序中预先设立的算法直接和主动地相互作用，产生蛋白的二级、三级和四级结构模型。然后检验蛋白结构的模型以便鉴定具有结合能力的结构区。将这些区域再用于鉴定与蛋白结合的化合物。

10

将至少 10 个氨基酸残基的蛋白氨基酸序列或编码 KCNB 多肽的对应核酸序列输入计算机系统，产生蛋白的三维结构模型。编码多肽的核苷酸序列或其氨基酸序列优选是 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 及其保守修饰版本。氨基酸序列表示蛋白的一级序列或亚序列，其编码蛋白的结构信息。至少 10 个残基的氨基酸序列（或编码 10 个氨基酸的核苷酸序列）通过计算机键盘和计算机可读介质输入到计算机系统中，所述计算机可读介质包括但不限于电子存储介质（例如磁盘、磁带、胶卷和芯片）、光介质（例如 CDROM）、通过互联网和 RAM 传播的信息。然后通过氨基酸序列和计算机系统的相互作用，使用本领域技术人员已知的软件，生成蛋白的三维结构模型。

15

20

氨基酸序列表示编码信息的一级结构，所述信息对形成目的蛋白的二级、三级和四级结构是必须的。软件能阅读由一级序列编码的某些参数以生成结构模型。这些参数称为“能量术语”，其主要包括静电电位、疏水性电位、溶剂可达的表面和氢键。二级能量术语包括范德华电位。生物分子以累积方式形成使能量术语最小化的结构。所以计算机程序利用由一级结构或氨基酸序列编码的这些术语来产生二级结构模型。

25

然后，在二级结构能量术语基础上形成由二级结构编码的蛋白的

30

三级结构。此时用户可以输入其他变量，如蛋白是否是膜结合的或可溶性的、其在体内和细胞内的定位，如细胞质、表面或核中。这些变量和二级结构的能量术语一起用于形成三级结构模型。在制作三级结构模型中，计算机程序匹配同样的二级结构疏水表面和同样的二级结构亲水表面。

一旦结构已生成，由计算机系统来鉴定潜在的调节剂结合区。如上所述，通过输入氨基酸或核苷酸序列或化合物的化学式，可生成潜在调节剂的三维结构。再将潜在调节剂的三维结构与 KCNB 蛋白的三维结构比较，以便鉴定与蛋白结合的化合物。采用能量术语确定蛋白和化合物之间的结合亲和性，从而确定哪些化合物具有提高的与蛋白结合的可能性。

计算机系统也用于筛选 KCNB 基因的突变、多肽变体、等位基因和种间同系物。这些突变可与疾状况态或遗传特征相关。如上所述，GeneChip™ 和相关技术也可用于筛选突变、多态变体、等位基因和种间同系物。一旦变体得到鉴定，诊断测定就可用于鉴定具有这些突变基因的患者。鉴定突变的 KCNB 基因包括分别接受 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 的第一核酸或氨基酸序列及其保守修饰版本的输入。如上所述，将序列输入到计算机系统。再将第一核酸或氨基酸序列同与第一序列基本相同的第二核酸或氨基酸序列比较。以上述方式将第二序列输入到计算机系统中。一旦将第一和第二序列比较后，就可鉴定序列间核苷酸或氨基酸的差异。这些序列可表示 KCNB 基因中等位基因差异以及与疾状况态和遗传特性相关的突变。

VIII. 调节 nKCN 活性/表达来治疗疾病或状况

在本发明的许多实施方案中，给患者体内或离体施用核酸、多肽或其他分子以便影响患者中 KCNB 活性或表达的变化。所需变化可以是 KCNB 活性或表达的提高或降低。例如，在带有肿瘤的乳腺癌患者中，所述肿瘤相对于正常乳腺组织表现出 KCNB 水平的提高，降低

KCNB 活性或表达可能是合乎要求的。在带有与 KCNB 活性或表达降低相关的疾病的其他患者中，提高 KCNB 活性或表达可能是理想的。

5 因此，本发明提供治疗与 KCNB 活性提高或降低相关的疾病的方法。在某些实施方案中，KCNB 可用于疾病或状况诊断和治疗中。例如，在特定细胞中表达的 KCNB 活性可用于调节细胞功能（例如对胞外信号的应答），由此特异性调节患者中那种类型细胞的功能。进一步，细胞中特异 KCNB 的突变可能产生与缺乏特定细胞类型的功能相关的疾病、状况或症状。这些疾病包括癌症，包括乳腺癌、肺癌、10 结肠癌和前列腺癌；大脑相关的失调，如癫痫、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、中风、多发性硬化、偏头痛；和精神失调，包括抑郁症、精神分裂症、既有狂躁又有抑郁发作的情感性精神病，以及其他疾病（参见，例如 *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 第 12 版，Wilson 等编，McGraw-Hill, Inc.）。其他疾病包括与心脏相关的疾病，如心律不齐和心力衰竭；和各种心血管疾病（参见，例如 *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 第 12 版，Wilson 等编，McGraw-Hill, Inc.）以及15 与胰腺相关的疾病，如胰腺炎、糖尿病和胰腺中其他激素分泌异常，如胰高血糖素、生长激素抑制素分泌（参见，例如 *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 第 12 版，Wilson 等编，McGraw-Hill, Inc.）。KCNB 20 调节（例如通过施用 KCNB 调节剂）可相应用于治疗或预防任何状况或疾病。

25 可给患者施用的化合物包括编码全长 KCNB 多肽的核酸，例如如 SEQ ID NO:1 显示，或包括其任何与启动子可操作连接的衍生物、片段或变体。合适的核酸还包括抑制序列，如反义或核酶序列，这些序列能以例如与启动子可操作连接的表达载体的方式递送，或可直接递送。同样，可使用编码调节 KCNB 表达的多肽的核酸。

30 一般而言，可使用大量载体或方法的任一种将核酸递给细胞，如逆转录病毒、腺病毒或腺病毒相关载体、脂质体制剂、裸 DNA 注射、

易化的（丁哌卡因（bupivacaine）、聚合体、肽介导的）送递、阳离子脂复合体以及颗粒介导（“基因枪”）或压力介导的送递。

5 蛋白也可送递给患者以调节 KCNB 活性。在优选实施方案中，将送递与 KCNB 特异性结合的多克隆或单克隆抗体。还可使用与 KCNB 相互作用和/或调节 KCNB 活性的多肽，例如采用本发明所述的测定方法鉴定的多肽。另外，可使用影响 KCNB 表达的多肽。

10 进一步，可使用经发现或设计具有与 KCNB 相互作用和/或调节 KCNB 活性的任何化合物。例如，可使用经本发明所述方法发现的具有结合 KCNB 或调节 KCNB 活性的化合物。

15 上述任何分子可用于提高或降低 KCNB 表达或活性，或者还影响 KCNB 多肽或多核苷酸的特性和/或行为，例如稳定性、胞外定位和与其他胞内或胞外部分的相互作用等。

A. 给药和药物组合物

20 任何本发明分子的给药可通过任一途径实现，所述途径正常用于将调节剂化合物导入或带到与待治疗组织的最终接触。以任何适当方式施用调节剂，任选将调节剂与可药用载体一起施用。适合施用这些调节剂的方法是可用的并且是本领域技术人员熟知的，虽然有一个以上途径可用于施用特定组合物，但特定途径经常能比其他途径提供更直接和更有效的反应。

25 由即将施用的特定组合物以及施用组合物所用的特定方法可部分确定可药用载体。因此有许许多多各种各样的本发明药物组合物的适合的配方（参见，例如 Remington's Pharmaceutical Sciences，第 17 版，1985））。

30 KCNB 调节剂单独或与其他适当成分组合可制成通过吸入给药的

汽雾剂（即它们可被“汽雾化”）。汽雾剂能放置于可加压的推进剂中，如二氯二氟甲烷、丙烷和氮等。

5 适于给药的制剂包括水溶液和非水溶液、等渗无菌溶液，其可含有抗氧化剂、缓冲液、细菌抑制剂和让制剂等渗的溶质，和可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的非水无菌悬浮液。在本发明的实践中，例如通过口服、鼻内、局部、静脉内、，腹膜内、膀胱内、鞘内可施用组合物。化合物制剂可以单剂量或多剂量的密封容器呈现，如安瓿和小瓶。溶液和悬浮液可从前述种类的无菌粉末、颗粒和片剂中制备。调节剂也可作为部分制备的食物或药物被施用。

15 本发明情况下，给患者施用的剂量应足以在一段时间上给受试者产生有益的反应。剂量将由所使用的特定调节剂的功效和受试者的状况以及体重或待治疗区的表面积来确定。剂量大小也将由伴随着特定受试者中特定化合物或载体的施用而出现的任何副作用的存在、性质和程度来确定。

20 在确定待施用调节剂的有效量时，医生可评估调节剂的血浆循环水平、调节剂的毒性和抗调节剂抗体的产生。一般而言，调节剂剂量对通常的受试者是约 1ng/kg-10mg/kg。

25 对于给药，如同适合受试者的体重和整体健康程度一样，本发明调节剂的施用可由调节剂的 LD-50 和各种浓度下抑制剂的副作用所确定的速度进行。给药剂量可以一次或分次完成。

IX. 试剂盒

30 与 KCNB 核酸如 KCNB 探针和引物特异性杂交的试剂和 KCNB 特异试剂可用于治疗 KCNB 相关的疾病或症状。所述 KCNB 特异试剂特异地与 KCNB 抗体结合调节 KCNB 蛋白的活性，或其他化合物特异地结合，调节 KCNB 蛋白的活性。

5 为了检测样品中 KCNB 多核苷酸，用于检测 DNA 和 RNA 存在的核酸测定方法包括许多本领域专业技术人员已知的技术，如 Southern 分析、Northern 分析、斑点印迹、核糖核酸酶保护、S1 分析、如 PCR 和 LCR 的扩增技术和原位杂交。在原位杂交中，例如将靶核酸从其细胞环境中释放出来，以用于细胞内杂交，而保存细胞形态用于随后的说明和分析。下列文献提供了原位杂交的技术综述：Singer 等，Biotechniques 4:230-250 (1986)；Haase 等，Methods in Virology，第 VII 卷，第 189-226 页(1984)；和 Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (Hames 等编，1987)。另外，使用上述的各种免疫测定技术可检测 KCNB 蛋白。通常将测试样品与阳性对照（例如表达重组 KCNB 蛋白的样品）和阴性对照比较。

15 本发明还提供了筛选 KCNB 蛋白或核酸的调节剂的试剂盒。这些试剂盒可从容易得到的材料和试剂中制备。例如，这些试剂盒可包含下列任何一个或多个材料：KCNB 核酸或蛋白、反应管和测试 KCNB 活性的说明书。试剂盒任选含有生物活性的 KCNB 蛋白。根据本发明，根据试剂盒的目的用途和用户的特定要求，可制备各种试剂盒和成分。

20

实施例

实施例 1 KCNB 在癌症中的扩增

下列实施例表示 KCNB 在癌症中的扩增。

25

KCNB 被鉴定为人染色体区域 8q24.3 处的扩增中心，其在癌症中扩增。本实施例表明在 8q24.3 扩增子中 DNA 拷贝数的确定（附图 2）。

30 对从原发性肿瘤和肿瘤细胞系中制备的基因组 DNA 样品标 10 个

标记，对各个标记进行 DNA 拷贝数确定以便限定扩增子的边界。使用下列标记：Wi-11623，人 STS；FAK，粘着斑激酶（保藏编号 L13616）；34D10-5'，CITB 人 BAC B&C 文库释放 IV 的克隆 34D10 的 T7 侧 BAC 序列；381K12-T7，CITB 人 BAC B&C 文库释放 IV 的克隆 381K12 的 T7 侧 BAC 序列；431C18T7，基因组克隆 AC007869 的 T7 侧 BAC 末端序列；d8s1741，人 STS；564L17-5'，基因组克隆 AC007871 的 T7 末端 BAC 序列；4P6-3'，CITB 人 BAC B&C 文库释放 IV 的基因组克隆 4p6 的 SP6 末端 BAC 序列；WI-18632，人 STS；T1-5'，人 cDNA 克隆 AK026394.1 的 5'末端。CHTN159 和 87-634 是原发性乳腺癌，以及 ZR7530 和 MDAMB436 是乳腺癌细胞系。

各个标记探针采用 PrimerExpress 1.0（Applied Biosystems）进行设计并由 Operon Technologies 合成。遵照厂商方案，将靶探针、表示基因组中正常单个拷贝区的标准探针以及肿瘤基因组 DNA（10ng）放置到 Applied Biosystems 7700 Taqman 序列检测仪。结果显示在附图 2 中。这些数据限定 8q24.3 区的扩增的边界。

大约 200 个乳腺癌的进一步分析显示约 10-14%在该区域扩增。原发性乳腺癌由冷泉港实验室的 Linda Rodgers 和 Mike Wigler 以及 Duke 大学的 Jeff Marks 提供。

KCNB 的鉴定

基于 PCR 的物理作图（参考同上）显示人 BAC 文库 CITB 释放 IV（Research Genetics）的 BAC 克隆 431c18（保藏编号 AC007869）在中心位置。随后将 BAC 克隆中所含的长度约 200kb 的人基因组序列通过 BLASTX 用于检索 Genbank 和 SWISSPROT 数据库。

该序列区经发现与前述的秀丽线虫（*Caenorhabditis elegans*）钾通道蛋白 TWK-8（保藏编号 P34410）表现出序列同源性。TWK-8 同源于人钾通道 KCNK3（保藏编号 AAC51777/PID g2465542），

其定位于人染色体 2p23 上。根据 KCNK3 的同源性，如 SEQ ID NO:2 所阐述的可读框从基因组序列中进行确定。KCNB 推导的可读框与 KCNK3 共享 62% 的氨基酸同一性。由基因组 DNA 编码的 KCNB 蛋白的预测氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所描述。

5

来自乳腺癌细胞系的 KCNB cDNA 的 PCR 扩增

然后使用引物和 SEQ ID NO:3 和 4 中所阐述的核苷酸序列进行高保真 PCR，从而从来自乳腺癌细胞系 ZR7530 的 cDNA 制备中获得编码 KCNB 的 cDNA。cDNA 的分离如下。

10

(1) 第一链 cDNA 制备：

将 1 μ g 从人乳腺癌细胞系 ZR7530 中制备的总 RNA 与 1 μ M 的 oligo(dT)₁₈ 和 200 单位的 MMLV 逆转录酶 (CLONTECH, Palo Alto, CA) 在总体积 20 μ l 含有下列成分的溶液中温育：50mM Tris-HCl pH 8.3、75mM KCl、3mM MgCl₂ 和 50 μ M dNTP。42℃温育 60 分钟后，将反应维持在 95℃ 5 分钟以灭活反转录酶。随后加入 80 μ l 不含核酸酶的水，最终生成第一链 cDNA 制剂。

15

(2) KCN cDNA 的 PCR 扩增：

将 4 μ l 的 ZR7530 的第一链 cDNA 制剂在 50 μ l 总体积下与下列成分混合：20 μ M dNTP、0.5 μ M 的各个寡核苷酸 R5 和 R10（分别是 SEQ ID NO:3 和 4）、10mM Tris-HCl pH 8.85、5mM (NH₄)₂SO₄、25mM KCl、2mM MgSO₄ 和 3 个单位的 PWO DNA 聚合酶 (Roche, Indianapolis)。反应用矿物油 (30 μ l) 覆盖，并采用 PCR 热循环仪 (MJ Research, Watertown, MA) 扩增 40 个循环，各循环由 3 步组成：95℃，20 秒、64℃，40 秒和 72℃，1 分钟。随后使用 High-Pure PCR 纯化柱 (Roche, Indianapolis, IN) 遵照厂商建议纯化混合物。在采用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析后，检测长度约 1.2kb 的产物，其代表 KCNB 全长可读框。

20

25

30

cDNA 的序列与基因组序列 (SEQ ID NO:2) 的可读框的序列是

相同的，除了在第 653 位置上的胞嘧啶以外，其取代了基因组序列中存在的 T。在该位以 C 取代 T 不改变由核苷酸序列编码的氨基酸。使用 RACE（cDNA 末端快速扩增）方法，确定乳腺癌细胞系 ZR7530 中 KCNB 信使 RNA 的 5'和 3' 非翻译区（UTR）的核苷酸序列。包括 5'和 3'UTR 的 cDNA 序列阐述在 SEQ ID NO:5 中。

包括 5'和 3'UTR 在内的序列长度约 2.3kb。起始甲硫氨酸密码子和终止密码子以粗体标示。距离序列 5'末端的第 323 位置的 G 核苷酸标记外显子 1 的末端，以及第 324 位置的 G 核苷酸表示外显子 2 的第一个碱基。从 KCNB cDNA 与对应基因组序列（保藏编号 AC007869）的比较中，大约 83.6kb 的内含子推测是位于外显子 1 和 2 的侧翼。公认的聚腺苷酸化信号序列以下划线表示。

实施例 2. KCNB 表达

下列实施例表明 KCNB 通常在大脑中以高水平表达，并在癌症中过量表达。

相对于正常乳腺细胞 KCNB 在乳腺癌细胞系中过量表达

相对应正常乳腺组织也确定了乳腺癌组织中 KCNB mRNA 的表达水平（表 1）。如下显示进行定量 PCR。

使用 Trizol 试剂（Gibco/Life technology,Gaithersburg,MD）从肿瘤细胞系和冰冻的原发性肿瘤组织中分离总 RNA 并以约 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 浓度保存在 RNasecure（Ambion,TX）中。总 RNA 用 DNAaseI（Gibco）处理以消除基因组 DNA，然后根据厂商（Perkin Elmer/ABI）说明以一个管的形式与 PCR 扩增偶合进行逆转录酶反应。PCR 循环数需要跨过样品肿瘤 RNA 制剂中预先设定的阈值，也称为 Ct 值，使用 PE/ABI 7700 Taqman 仪，以靶探针和 β 肌动蛋白探针测定各种浓度下一系列正常乳腺 RNA 制剂。然后由未知样品 Ct 值的统计分析和从各种浓度的乳腺 RNA 制剂生成的标准曲线可计算出各个样品中靶序列与 β 肌

动蛋白的相对多度。

各个定量的 PCR 采用三种寡核苷酸：正向引物、反向引物和探针。使用两组不同的寡核苷酸进行分析，得到表 1 所示的结果，所述寡核苷酸阐述在 SEQ ID NO:6-8 和 9-11 中。各组得到可比较的结果。表 1 中所示的结果表明 KCNB 相对于正常细胞在乳腺癌细胞中过量表达。

从 38 个经检验的原发性乳腺癌中，有 19 个以 5 倍于正常乳腺组织的水平或更高表达 KCNB mRNA（19/38=50%过量表达频率）（表 1b）。显示 KCNB 基因拷贝数增加的 11 个肿瘤全部也都显示 mRNA 的过量表达。（显示 KCNB 基因拷贝数小于 2.5 的肿瘤以“-”标记，而拷贝数大于 2.5 的肿瘤以“+”标记。ND 代表“不确定”。）

在没有 KCNB 扩增的 12 个肿瘤中，有 7 个过量表达 KCNB，这通常是致癌基因的特点。

表 1a

乳腺癌细胞系中相对 KCNB mRNA 的水平

乳腺癌细胞系	相对 mRNA 水平
¹ ZR7530	3
BT20	0.27
BT549	0.81
MCF7	0.32
2 6NC	0.56
² HBL-100	1
² 正常乳腺上皮细胞	1

¹ 在表中 7 个细胞系中，ZR7530 是唯一一个在 8q24.3 扩增的细胞系。

²KCNB mRNA 的相对水平被归一化成 HBL-100 细胞系或正常乳腺上皮细胞。β 肌动蛋白 mRNA 在所有测试样品中用作内在标准。

ND=不确定

表 1b
原发性乳腺癌中 mRNA 表达

乳腺癌	基因拷贝数	相对 mRNA 表达水平
88-523	-	7.1
96-201	-	13
96-342	-	5.8
96-102	-	8.9
96-32	-	0.4
96-16	-	0.7
95-523	-	1.0
95-377	-	3.5
95-326	-	10
94-847	-	2.9
94-797	-	16
88-468	-	27
CHTN159	+	13.8
95-480	+	9.2
95-347	+	11
91-82	+	550
90-445	+	32.3
90-794	+	343.3
90-197	+	66
88-499	+	108
87-634	+	69
96-308	+	25
88-682	+	3.5
96-442	ND	2.2
96-349	ND	4.7
96-317	ND	11
96-273	ND	0.4
96-190	ND	5.2
96-160	ND	1.2
96-140	ND	3.4
96-109	ND	0.35
96-84	ND	1.0
95-504	ND	1.9
95-487	ND	1.5
95-427	ND	1.4
95-283	ND	1.7
95-237	ND	1.6
95-65	ND	0.14

5 KCNB 在其他上皮肿瘤中的表达

KCNB 表达也在除乳腺癌以外的肿瘤类型中检验（表 2）。结果显示 KCNB 也在肺和前列腺瘤中过量表达。各个受检肿瘤类型的数目

被标示。从 26 个受检样品中发现有 4 个转移性前列腺瘤以 5 倍或更高水平过量表达。在 20 个受检肺癌中，有 35%表现出大于 5 倍的表达。

5

表 2

肿瘤类型	扩增	MRNA 过量表达频率
乳腺癌 n=38	<2 倍:19 5-10 倍:7 10-20 倍:6 >20 倍:6	50%>5 倍
肺癌 n=20	<2 倍:8 2-3 倍:5 5-10 倍:3 10-20 倍:1 >40 倍:3	35%>5 倍
结肠瘤 n=10	<2 倍:9 >40 倍:1	10%>5 倍
前列腺瘤 n=26	<2 倍:20 2-5 倍:2 5-10 倍:2 10 倍:2 >20 倍:6	15%>5 倍

KCNB 的近缘序列同系物的人 TASK1 在癌症中不过量表达

10

TASK1 (也称为 KCNK3, Duprat 等, EMBO J.(1997)16,5464-5471) 与 KCNB 共享 62%的蛋白序列同一性。检验原发性乳腺癌的亚组以

15

确定 TASK 是否在癌症中过量表达。使用与确定 KCNB mRNA 水平相似的方法确定 TASK1 mRNA 的水平。用于 Taqman 分析 TASK1 mRNA 表达和拷贝数的 TASK 引物和探针如下：正向 PCR 引物，5'GCAGTGTCTGGAAGGCTGAAG 3' (SEQ ID NO:12)；反向 PCR 引物，5'CGCACTGGAGGTTCAAGCTAA 3' (SEQ ID NO:13)；以及检测探针 [6-FAM]-CCTCCAGCCACATTCT CATAGCAGGTAGG-[TAMRA] (SEQ ID NO:14)。

TASK1 在癌症中不过量表达，也没有任何乳腺癌经鉴定显示出

TASK1 基因拷贝数的增加（表 3）。因此，与癌症相关的基因拷贝数增加和过量表达在 TASK 类型的钾通道中对 KCNB 是独特的。

表 3

乳腺癌	KCNB 基因拷贝数	相对 mRNA 水平 KCNB	相对 mRNA 水平 TASK1
95-523	-	1	0.07
95-377	-	3.5	0.9
95-326	-	10.0	0.03
94-847	-	2.9	0.3
94-797	-	16	0.7
95-347	+	11	0.03
91-82	+	550	1.8
87-634	+	69	0.7
88-682	+	3.5	0.07

5

KCNB 在正常人脑组织中的高表达

15 种正常人组织总 RNA 购自 Biochain Institute，并采用 RT-Taqman 分析 KCNB 表达（表 4）。大多数组织表达 KCNB 的水平相当，除了脑组织以外，其表达相对高水平的 KCNB。水平确定相对于组织中的 β 肌动蛋白水平。结果以任意单位表示。

10

表 4

正常组织	相对 KCNB mRNA 水平
大脑	1381
胰腺	7.6
心脏	8.6
结肠	1.5
脾脏	1.1
肝脏	1.2
胎盘	0.91
乳房	2.1
肾脏	3.9
胃	2.6
卵巢	1.4
肺	2.7
前列腺	0.85
膀胱	2.2
PBL	0.96

实施例 3. 功能性 KCNB 在 COS-7 细胞中的表达

下列实施例显示 KCNB 表达对全细胞电流的影响。

- 5 采用编码 KCNB 的表达质粒和转染分析检验 COS-7 细胞中 KCNB 的活性。对照培养接受相同的缺乏 KCNB 插入的表达载体。全细胞电流在含有 140mM KCl 的移液和浴液中进行记录。支持电位为 0mV，电压从-150 至+116mV，梯级增加为 14mV。结果显示在附图 3 中。这些数据表明在那些表达 KCNB 的细胞中产生了电流，并进一步表明
- 10 KCNB 表现出钾通道蛋白的活性特征。

实施例 4. KCNB 保护细胞免遭 TNF- α 诱导的细胞死亡

- 使用基于逆转录病毒的基因转移方法，建立表达 KCNB、BCL2 或 KCNB 和 BCL2 两者的 MEF（小鼠胚胎纤维原细胞）细胞系 A9 的转染子。然后测定这些细胞系对 TNF- α 的灵敏度。将转染子培养在含有 0、2.5 或 5ng/ml 小鼠 TNF- α （Calbiochem）的 DMEM/F-12（Gibco）+10%FBS（Gibco）中。加入 TNF- α 48 小时后，收集全部细胞，包括死的和活的，并用台盼蓝染色。结果（附图 4）显示与那些使用对照载体或单独 BCL2 载体所生成的转化子比较，大量表达 KCNB 或 KCNB
- 15 和 BCL2 的细胞在用 2.5 或 5ng/ml TNF- α 处理后都是存活的。因此，观察到 KCNB 表达可防止细胞免于 TNF- α 诱导的死亡。
- 20

本说明书中引用的全部出版物和专利申请在此引作参考，有如各个单独出版物或专利被特异和分别地被指出引作参考一样。

25

尽管上述发明为了清楚理解目的，以说明和实施例的方式已经详细描述，但是显而易见，对于本领域专业技术人员来说，依据本发明的教导，在无需背离实质或权利要求书保护的范围下可对本发明作出某些变化和修饰。

SEQ ID NO:1

基于人基因组 DNA 序列的 KCNB 蛋白序列

MKRQNVRTLIVCTFTYLLVGA AVFDALESDHEMREEEKLK AEEIRIKGKYNIS
5 SEDYRQLELVILQSEPHRAGVQWK FAGSFYFAITVITTIGYGH AAPGTDAGKAFC
MFYAVLGIPLTLVMFQSLGERMNTFVRYLLKRIKKCCGMRNTDVSMENMVTVG
FFSCMGTLICIGAAAFSQCEEWSFFHAYYYCFITLTTIGFGDYVALQTKGALQKKP
LYVAFSFMYLVLTVIGAFNLVVLRLT MNSEDERDAEERASLAGNRNSMVI
HIPEEPRPSRPRYKADV PDLQSVCSCTCYRSQDYGGRSVAPQNSFSAKLAPHYFH
10 SISYKIEEISPSTLKN SLFPSPISISPGLHSFTDHQRLMKRRKSV

SEQ ID NO:2

来自基因组 DNA 预测的 KCNB 可读框

5' ATGAAGAGGCAGAACGTGCGGACTCTGTCCCTCATCGTCTGCACCTTCACC
TACCTGCTGGTGGGCGCCGCGCTGTTCGACGCCCTCGAGTCGGACCACGAGA
15 TGC GCGAGGAGGAGAACTCAAAGCCGAGGAGATCCGGATCAAGGGGAAGT
ACAACATCAGCAGCGAGGACTACCGGCAGCTGGAGCTGGTGATCCTGCAGTC
GGAACCGCACCGCGCCGGCGTCCAGTGGAATTCGCCGGCTCCTTCTACTTTG
CGATCACGGTCATCACCACCATAGGTTATGGGCACGCTGCACCTGGCACCGA
TGCGGGCAAGGCCTTCTGCATGTTCTACGCCGTGCTGGGCATCCCGCTGACAC
20 TGGTCATGTTCCAGAGCCTGGGCGAGCGCATGAACACCTTCGTGCGCTACCTG
CTGAAGCGCATTAAGAAGTGCTGTGGCATGCGCAACACTGACGTGTCTATGG
AGAACATGGTGACTGTGGGCTTCTTCTCCTGCATGGGGACGCTGTGCATCGGG
GCGGCCGCCTTCTCCAGTGTGAGGAGTGGAGCTTCTTCCACGCCTACTACTA
CTGCTTCATCACGTTGACTACCATTGGGTTTCGGGGACTACGTGGCCCTGCAGA
25 CCAAGGGTGCCCTGCAGAAGAAGCCGCTCTACGTGGCCTTTAGCTTTATGTAT
ATCCTGGTGGGGCTGACGGTCATCGGGGCCTTCTCAACCTGGTCGTCCTCAG
GTTCTTGACCATGAACAGTGAGGATGAGCGGCGGGATGCTGAAGAGAGGGCA
TCCCTCGCCGGAACCGCAACAGCATGGTCATTACATCCCTGAGGAGCCGC
GGCCCAGCCGGCCCAGGTACAAGGCGGACGTCCCGGACCTGCAGTCTGTGTG
30 CTCCTGCACCTGCTACCGCTCGCAGGACTATGGCGGCCGCTCGGTGGCACCGC
AGAACTCCTTCAGCGCCAAGCTTGCCCCCACTACTTCCACTCCATCTCTTAC
AAGATCGAGGAGATCTCACCAAGCACATTA AAAAACAGCCTCTTCCCATCGC

CTATTAGCTCCATCTCTCCTGGGTACACAGCTTTACCGACCACCAGAGGCTG
ATGAAACGCCGGAAGTCCGTTTAG 3'

SEQ ID NO: 3

用于 PCR 扩增 KCNB cDNA 的有义引物

5 KCNB-R5: 5'-GCCATGAAGAGGCAGAACGTGCG

SEQ ID NO: 4

用于 PCR 扩增 KCNB cDNA 的反义引物

KCNB-R10: 5'-CGGACTTCCGGCGTTTCATCA

SEQ ID NO: 5

10 包括乳腺癌细胞系 ZR7530 的 5' 和 3' UTR 的全长 cDNA 核苷酸序列

5' TGCGGGACATGCCCCCGCGCCGGCTCCTTGCTGGCGGCCATGAAGAGGC
AGAACGTGCGGACTCTGTCCCTCATCGTCTGCACCTTCACCTACCTGCTGGTG
GGCGCCGCCGTGTTTCGACGCCCTCGAGTCGGACCACGAGATGCGCGAGGAGG
15 AGAAACTCAAAGCCGAGGAGATCCGGATCAAGGGGAAGTACAACATCAGCA
GCGAGGACTACCGGCAGCTGGAGCTGGTGATCCTGCAGTCGGAACCGCACCG
CGCCGGCGTCCAGTGGAATTCGCCGGCTCCTTCTACTTTGCGATCACGGTCA
TCACCACCATAGGTTATGGGCACGCTGCACCTGGCACCGATGCGGGCAAGGC
CTTCTGCATGTTCTACGCCGTGCTGGGCATCCCGCTGACACTGGTCATGTTCC
20 AGAGCCTGGGCGAGCGCATGAACACCTTCGTGCGCTACCTGCTGAAGCGCAT
TAAGAAGTGCTGTGGCATGCGCAACACTGACGTGTCTATGGAGAACATGGTG
ACTGTGGGCTTCTTCTCCTGCATGGGGACGCTGTGCATCGGGGCGGCCGCTT
CTCCAGTGTGAGGAGTGGAGCTTCTTCCACGCCTACTACTGCTTCATCA
CGTTGACTACCATTTGGGTTTCGGGGACTACGTGGCCCTGCAGACCAAGGGCGC
25 CCTGCAGAAGAAGCCGCTCTACGTGGCCTTTAGCTTTATGTATATCCTGGTGG
GGCTGACGGTCATCGGGGCCTTCTCAACCTGGTCGTCCTCAGGTTCTTGACC
ATGAACAGTGAGGATGAGCGGCGGGATGCTGAAGAGAGGGCATCCCTCGCC
GGAAACCGCAACAGCATGGTCATTACATCCCTGAGGAGCCGCGGCCAGCC
GGCCCAGGTACAAGGCGGACGTCCCGGACCTGCAGTCTGTGTGCTCCTGCAC
30 CTGCTACCGCTCGCAGGACTATGGCGGCCGCTCGGTGGCACCGCAGAACTCC
TTCAGCGCCAAGCTTGCCCCCACTACTTCCACTCCATCTCTTACAAGATCGA
GGAGATCTACCAAGCACATTAACAAAACAGCCTCTTCCCATCGCCTATTAGCT

CCATCTCTCCTGGGTTACACAGCTTTACCGACCACCAGAGGCTGATGAAACGC
 CGGAAGTCCGTTTAGGTGTGGGGAGGGAAATGGGACAGAAAAGTCATTTGTC
 ATAGTTGGTGTTAATTTCCATTGGTCCAACCTCGTCTTTTCTTATTTATTAT
 TATTATTGTCATCATTATTACTTTCTCTCCTTCCTCCTTTCTTGGTCTCTTGGTC
 5 TCATTTTCCCCCACCTTTCCAGCCAGACAGAGCAGGCCAAAGGGAAATACAG
 GCCCATCCTCCTCTGAAACTCACATCTGAGCATGAAGCATGGATCTCCTCCTT
 CCTTCCCAGCAGACTATGCCTTACATTTCTCACCCACCCACCCATCATCTCT
 GCAGTGGTTTTCCCGGGACAGATGTGAGACCAAGACCACGGAGACAGAGCTG
 AGAGGATACCCACCCCAAAGCTGCACATCACGCTCAGCCTTCAATCGCCTAC
 10 CCTTAGTGGTGTCTCTGACCTAACTCCTTTCTCTTTTCTTAAGGACTGAGTGAC
 TGTGTGTGTGTTGTGTGTGTGCTTCTGTGTGCACGTGTGTCGTGACAAAACGG
 GAAGTATTAGGTATTCCGTTTTCTTTCCCATCACACATCATAGCCTGCTTTTGG
 CTGCTTCCAAACAAAACGGGAAGACAAAACCCACAAGGTTTTTGATTTATCG
 TATTTTGCCAAATCAAGCATGTTTCATTAAGCAGTTCTTATCCCTGATGTGTCA
 15 TGGCCATATTTTCTAAATGCTAGGTTCTAAATTATATTAATGTTTTTTAGGGGC
 GGGTGGGCAAGACGACCCAAACCATCTTAGCTTGCCAGTTCAGACATTTTTTA
 AAAAGCATGCACTTTGTAAACTGGTATGCGCTATCAACAAAAAACTAGAA
 ATGGAATAATCCAAAGCCAATAACATTAACCTATAAAAGACATTTTAAATTT
 GTCACCTCCAGTTCCAACAATTTACCATGCAACTGGAATTGTCAGGGGAAAC
 20 GGGAAAATTGTTGGAACCCAGAGTATCTATTTCCCTCTTATTGATGATTTTG
 TGCAGCACCTACCCTGCATAAATAAGAATTATAGTGTTGGAATGCTTGGGTGA
 GAATGGGTATTAGTATGTGGCTGTGGTTCCTTTTCTCATGAAAATTGACAGG
 GCATTCCTCATTAAAAATACATATCTATTTCAAGAAAAAAAAAAAAA 3'

SEQ ID NO: 6

25 用于对 KCNB 进行定量 PCR 的有义引物

KCNB QF1: 5'-CGGCGTCCAGTGGAATT

SEQ ID NO: 7

用于对 KCNB 进行定量 PCR 的反义引物

KCNB QR1: 5'-GCCCATAACCTATGGTGGTGAT

30 **SEQ ID NO: 8**

用于定量 PCR 的 KCNB 探针寡核苷酸

KCNB QP1: 5'-(6-FAM)-CCGGCTCCTTCTACTTTGCGATCACG-(TAMRA)

SEQ ID NO: 9

用于对 KCNB 进行定量 PCR 的有义引物

KCNB QF3: 5'-ACCTGCTGAAGCGCATTAAGA

SEQ ID NO: 10

5 用于对 KCNB 进行定量 PCR 的反义引物

KCNB QR3: 5'-GTCACCATGTTCTCCATAGACACG

SEQ ID NO: 11

用于定量 PCR 的 KCNB 探针寡核苷酸

KCNB QP3: 5'-(6-FAM)-CAGTGTTGCGCATGCCACAGCA-(TAMRA)

10 **SEQ ID NO: 12**

用于定量 PCR 的正向 TASK1 引物

5' GCAGTGTCTGGAAGGCTGAAG 3'

SEQ ID NO:13

用于定量 PCR 的反向 TASK1 引物

15 5' CGCACTG GAGGTTCAAGCTAA 3'

SEQ ID NO:14

用于定量 PCR 的 TASK1 探针寡核苷酸

5' [6-FAM]-CCTCCAGCCACATTCT CATAGCAGGTAGG-[TAMRA] 3'

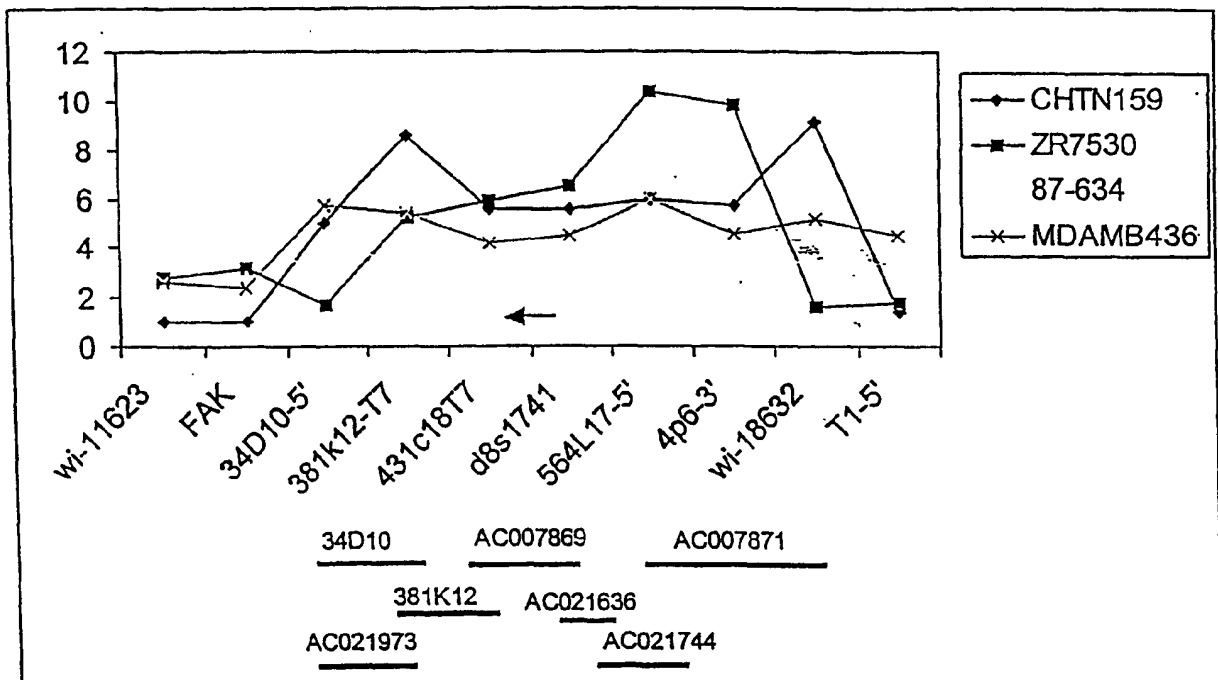


图 2

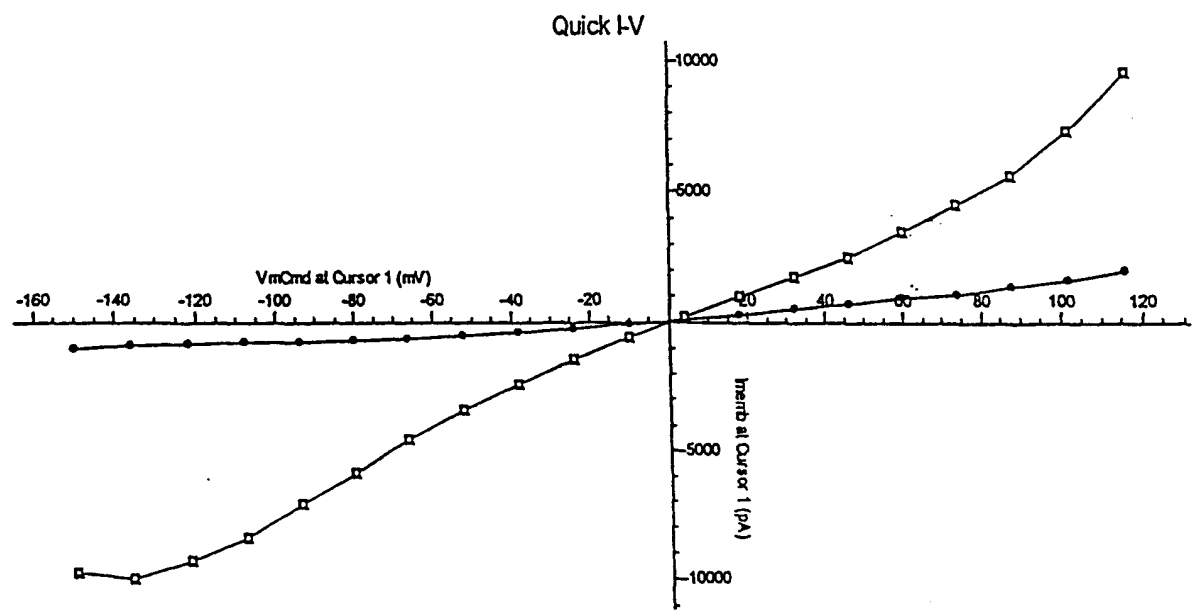


图 3

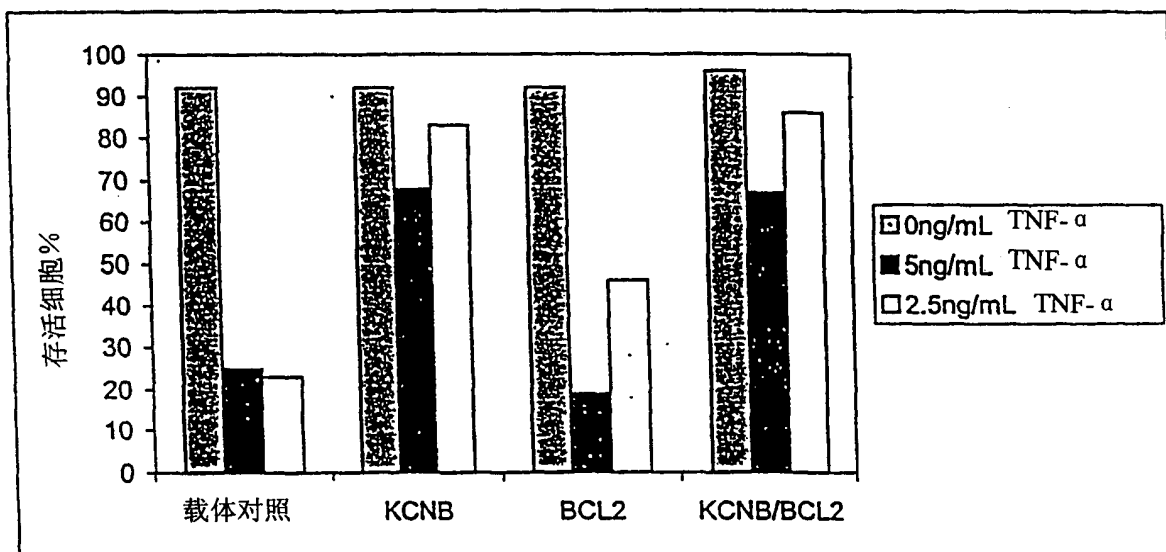


图 4