

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/54

C12N 9/12 C12N 5/10

C12N 15/62 C07K 16/40

G01N 33/50

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97197004.1

[43] 公开日 2001 年 8 月 1 日

[11] 公开号 CN 1306576A

[22] 申请日 1997.6.26 [21] 申请号 97197004.1

[30] 优先权

[32] 1996.6.27 [33] US [31] 08/672,211

[86] 国际申请 PCT/US97/11219 1997.6.26

[87] 国际公布 WO97/49818 英 1997.12.31

[85] 进入国家阶段日期 1999.2.2

[71] 申请人 昂尼克斯药物公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 L·斯泰芬斯 P·T·豪肯斯

S·布拉塞尔曼

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 樊卫民

权利要求书 7 页 说明书 78 页 附图页数 20 页

[54] 发明名称 G-β-γ 调控的磷脂酰肌醇-3 激酶

[57] 摘要

本发明涉及编码受 G 蛋白调控的磷脂酰肌醇-3' 激酶的核苷酸的发现、鉴定和表征。该激酶是一种异源二聚体酶,在与三聚体的 G 蛋白结合的受体的激活下产生胞内信使,磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸。这一新型蛋白质包括一个催化亚基 p120, 和一个调控亚基 p101, 它存在于造血源细胞中并参与导致炎症的免疫系统反应。p101 亚基的存在是活化的三聚体 G 蛋白存在下,激酶活性被强烈地激活的主要原因。本发明包括编码 p101 和 p120 的核苷酸。宿主细胞表达体系、p101 和 p120 蛋白、融合蛋白、多肽和肽、这些蛋白的抗体、表达 p101 或 p120 转基因的转基因动物、或不表达 p101 或 p120 基因的重组敲除细胞和动物、该酶的拮抗剂和激动剂、其它调节 p101 或 p120 基因表达或酶活性的可被用于诊断、药物筛选、临床试验剂量测定、和/或用于炎性紊乱的治疗的化合物。

1. 一种编码 G-β-γ 调控的磷脂酰肌醇-3 激酶 (G-β-γ 激酶) 的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。
2. 一种编码 G-β-γ 激酶的催化亚基 p120 的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。
3. 一种编码 G-β-γ 激酶的调控亚基 p101 的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。
4. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。
5. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。
6. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。
7. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示。
8. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示。
9. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。
10. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。
11. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示。
12. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。
13. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。
14. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。
15. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示。
16. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示。
17. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示。
18. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示。
19. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示。
20. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示。
21. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示。
22. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示。
23. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示。
24. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示。
25. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示。
26. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示。
27. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示。
28. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示。
29. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示。
30. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示。
31. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示。
32. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 32 所示。
33. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示。
34. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示。
35. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示。
36. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示。
37. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示。
38. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 38 所示。
39. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示。
40. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 40 所示。
41. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示。
42. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示。
43. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示。
44. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示。
45. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示。
46. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示。
47. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示。
48. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示。
49. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 49 所示。
50. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示。
51. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示。
52. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示。
53. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示。
54. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示。
55. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 55 所示。
56. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示。
57. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 57 所示。
58. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示。
59. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 59 所示。
60. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 60 所示。
61. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 61 所示。
62. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 62 所示。
63. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 63 所示。
64. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 64 所示。
65. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 65 所示。
66. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 66 所示。
67. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 67 所示。
68. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 68 所示。
69. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 69 所示。
70. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 70 所示。
71. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 71 所示。
72. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 72 所示。
73. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 73 所示。
74. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 74 所示。
75. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 75 所示。
76. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 76 所示。
77. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 77 所示。
78. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 78 所示。
79. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 79 所示。
80. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 80 所示。
81. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 81 所示。
82. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 82 所示。
83. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 83 所示。
84. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 84 所示。
85. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 85 所示。
86. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 86 所示。
87. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 87 所示。
88. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 88 所示。
89. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 89 所示。
90. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 90 所示。
91. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 91 所示。
92. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 92 所示。
93. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 93 所示。
94. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 94 所示。
95. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 95 所示。
96. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 96 所示。
97. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 97 所示。
98. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 98 所示。
99. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 99 所示。
100. 一种编码 G-β-γ 激酶的核苷酸, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 100 所示。

ISSN 1008-4274

中的与一种异源多肽融合的多肽的一种嵌合蛋白质。

10. 权利要求 9 的经分离的核苷酸序列，其中异源多肽为一种 Glu 标记或 myc 表位标记。

11. 一种包含权利要求 1 到 10 中任一项中的核苷酸序列的核苷酸载体。

12. 一种表达载体，其包含与在宿主细胞中控制该核苷酸序列表达的一种核苷酸调控序列有效地结合的权利要求 1 至 10 中任一项中的核苷酸序列。

13. 权利要求 12 的表达载体，其中所述调控序列选自巨细胞病毒 hCMV 极早期基因启动子、SV40 腺病毒早期或晚期启动子、杆状病毒启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 系统、TRC 系统、 λ 噬菌体的主要操纵子和启动子区域、fd 外壳蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸激酶启动子、酸性磷酸酶启动子和酵母 α 交配因子启动子。

14. 一种经基因工程改造以含有权利要求 1 到 13 中任一项中的核苷酸序列的宿主细胞。

15. 一种根据权利要求 14 的宿主细胞，其中该宿主细胞经基因工程改造以含有与在宿主细胞中控制该核苷酸序列表达的一种核苷酸调控序列有效地结合的权利要求 1 到 13 中任一项中的核苷酸序列。

16. 权利要求 15 的宿主细胞，其中该宿主细胞是 Sf9 细胞、中国仓鼠卵巢细胞、COS 细胞或 U937 细胞。

17. 一种经基因工程改造的宿主细胞，其中天然 p101 基因序列或编码权利要求 1 到 13 中任一项中的核苷酸序列的序列被破坏，以便抑制或阻碍天然 p101 基因产物的表达。

18. 一种经分离的 G 蛋白激活的 PI3K，其包含一个 p101 调控亚基和一个 p120 催化亚基。

19. 一种经分离的 p101 调控亚基蛋白。

20. 一种经分离的 p101 调控亚基蛋白，其具有 SEQ ID No: 2 的氨基酸序列，或由保藏号为 97636 的保藏于美国典型培养物保藏中心的 pCMV3mycp101 的 cDNA 克隆中所含的 cDNA 编码的氨基酸序列。

分子在高度严格条件下至少可与编码 p120 蛋白最后 28 个氨基酸的(a)的核苷酸序列或其互补物杂交的序列。

57. 一种根据权利要求 54 的经分离的核酸分子, 其中该核酸分子编码 SEQ ID No: 4 或编码保藏号为 97637 的保藏于美国典型培养物保藏中心的 pCMV3mycp120 的 cDNA 克隆中所含的 cDNA 编码的氨基酸序列。

58. 一种根据权利要求 55 的经分离的核酸分子, 其中该核酸分子编码 SEQ ID No: 14。

59. 一种表达载体, 其包含与在宿主细胞中控制该核苷酸序列表达的一种核苷酸调控序列有效地结合的权利要求 53 到 58 中的任一项中的核苷酸序列。

60. 一种经基因工程改造以含有权利要求 53 到 58 中的任一项中的核苷酸序列的宿主细胞。

61. 一种经基因工程改造以含有权利要求 1 到 13 以及权利要求 53 到 58 中的任一项中的核苷酸序列的宿主细胞。

62. 权利要求 14 的宿主细胞, 其中该宿主细胞是一种动物的一部分。

63. 权利要求 60 的宿主细胞, 其中该宿主细胞是一种动物的一部分。

64. 权利要求 61 的宿主细胞, 其中该宿主细胞是一种动物的一部分。

65. 一种编码 p101 调控亚基或其片段的经分离的核酸分子, 其含有选自编码下列氨基酸序列的核苷酸序列, 包括编码 1-160 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 2, 编码 161-263 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 2, 编码 1-732 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 2, 编码 733-877 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 2; 编码 1-160 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 12, 编码 161-263 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 12, 编码 1-735 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 12 和编码 736-880 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 12。

66. 一种编码 p120 亚基或其片段的经分离的核酸分子, 其含有选自编码下列氨基酸序列的核苷酸序列, 包括编码从约 41 延伸至 1102 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 4 和编码从约 41 延伸至 1102 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 14。

67. 一种编码 p120 亚基或其片段的经分离的核酸分子，其含有选自编码下列氨基酸序列的核苷酸序列，包括编码 173-302 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 4，或编码 173-302 位氨基酸残基的 SEQ ID No: 14。

说明书

G- β - γ 调控的磷脂酰肌醇-3'激酶

1. 导言

本发明涉及新型的 G-蛋白调控的磷酸肌醇 3OH-激酶, 该酶从造血谱系细胞中分离, 其参与细胞信号传导途径, 本发明还涉及这些新型的酶在疾病的治疗和诊断中的应用。

2. 发明背景

磷酸肌醇 3OH-激酶 (PI3K) 是一个酶类大家族, 可以 3-磷酸化至少一种胞内磷酸肌醇。 (Whitman 等, 1988, 自然(Nature) 332:644-646; Ayger 等, 1989, 细胞(Cell) 57:167-175) 3-磷酸化的磷酸肌醇存在于所有高等真核细胞中。越来越多的证据表示出 PI3K 和此酶的一个脂类产物, 磷脂酰肌醇 (3,4,5) -三磷酸 (以下简称 “ PtdIns(3,4,5)P₃ ”), 是新型的重要的细胞信号传导中第二信使系统的一部分。这一新型的基于 PtdIns(3,4,5)P₃ 的信号系统的成分看来独立于已表征的基于肌醇磷脂的信号途径, 在后者中磷酸肌醇酶 C (phosphoinositidase C) (PIC) 水解 PtdIns(4,5)P₂ 释放结构独特的第二信使肌醇 (1,4,5) -三磷酸 (Ins(1,4,5)P₃) 和二酰甘油。

所选的胞外激动剂和生长因子将刺激胞内 PI3K 的活性并导致快速且短暂的胞内 PtdIns(3,4,5)P₃ 的累积。令人吃惊的是, 多种不同类型的细胞表面受体的刺激, 包括受体酪氨酸激酶、与 src 家族非受体性酪氨酸激酶结合的受体、细胞因子类生长因子及 G 蛋白偶联受体, 都将激活 PI3K 家族的成员 (综述见 Stephens 等, 1993, Biochemica et Biophysica Acta, 1179:27-75)。例如, 酪氨酸激酶受体, 其激活后导致 PtdIns(3,4,5)P₃ 的累积增加的有 PDGF 受体、EGF 受体、FGF 受体家族的成员、CSF-1 受体、胰岛素受体、IGF-1 受体和 NGF 受体。刺激 PtdIns(3,4,5)P₃ 的累积增加的与 src 家族非受体性酪氨酸激酶结合的受体有 II-2 受体、II-3 受

体、mIgM受体、CD4受体、CD2受体和CD3/T细胞受体。另外，细胞因子IL-4受体和与G蛋白结合的凝血酶受体、ATP受体和fMLP受体，它们均刺激PI3K的活性，随后导致PtdIns(3,4,5)P₃的累积。这样看来，PtdIns(3,4,5)P₃在非常不同的信号途径中作为第二信使。

PI3K的活性和PtdIns(3,4,5)P₃的产生是产生这些多种多样的受体的信号传导的一个生理相关途径这一命题，特别是从以下两组不同的实验证据中得到了支持：一个实验是真菌代谢物抑制PI3K活性，一个是观察直接的蛋白连接。渥曼青霉素（一种真菌代谢物）通过以共价方式连接在PI3K的催化结构域而不可逆地抑制其活性。渥曼青霉素对PI3K活性的抑制消除了随后的因胞外因子产生的细胞反应。例如，通过刺激PI3K并合成PtdIns(3,4,5)P₃，嗜中性粒细胞应答趋化因子fMet-Leu-Phe(fMLP)。PtdIns(3,4,5)P₃的合成与在嗜中性粒细胞破坏入侵微生物过程中的呼吸爆发（respiratory burst）的激活相关。用渥曼青霉素处理嗜中性粒细胞避免了fMLP诱导的呼吸爆发反应（Thelen等，1994, PNAS, USA 91:4960-4964）。确实，这些渥曼青霉素实验以及其它实验证据表明，在造血谱系细胞中，特别是嗜中性粒细胞、单核细胞及其它类型白细胞中PI3K的活性参与很多与急性和慢性炎症相关的非记忆性免疫反应。

这些PI3K酶与一些活化的受体酪氨酸激酶直接相互作用，并可被共同提纯。纯化后发现，与受体酪氨酸激酶相结合的PI3K包含一些170-200kD的异源二聚体（Otsu等，1991，细胞65:91-104, Pons等，1994，分子细胞生物学(Mol. Cell. Biol.) 15:4453-4465, Inukai等，1996，生物化学杂志(J.Biol. Chem.) 271:5317-5320），二聚体中包含一个催化亚基和一个衔接（或调控）亚基。

催化亚基的两个不同的同源物，p110 α和p110 β，已描述并克隆。可与渥曼青霉素不可逆结合的该催化亚基，与一个高度相关的调控亚基小家族，p55 α、p55PIK、p85 α和p85 β中的一个或其它成员紧密地结合，形成上述的170-200kD的异源二聚体。已知的这些调控亚基中包含很多蛋白质与蛋白相互作用结构域，包括两个SH2结构域（Cantley

等, 1991, 细胞 64:281-302) 。

SH2 结构域的存在认为负责 PI3K 异源二聚体与受体酪氨酸激酶结合并刺激受体酪氨酸激酶的活化。这些活化的受体在局部共有序列中的关键的酪氨酸残基上被在 55-87kD 的 PI3K 衔接亚基中发现的 SH2 结构域磷酸化 (Songyang 等, 1993, 细胞 72:767-778)。一旦 PI3K 异源二聚体结合, 就直接激活 PI3K 催化亚基, (尽管这一效应在体外相对较小, Carpenter 等, 1993, 生物化学杂志 268:9478-9483, Backer 等, 1992, EMBO J. 11:3469-3479), 并将胞质 PI3K 转移为它的磷脂底物的来源。这些因子的共同作用导致 PtdIns(3,4,5)P₃ 的大量涌现。很明显, 这些 PI3K 的同工型 (p100 α / p110 β / p55 α、 p55PIK) 看来结构上适合在受体调控的酪氨酸激酶下游作为所用的信号传导者, 很象 τ 家族的 PI-PLC 受体敏感的酪氨酸激酶调控的方式 (Lee 和 Rhee, 1995, Current Biol. 7:193-189)。

利用异源三亚基聚合体 GTP 酶传导其信号(例如, fMLP、PAF、ATP 和凝血酶)的细胞表面受体的激活可导致 PtdIns(3,4,5)P₃ 的产生, 但是 PI3K 的 p110/p85 亚家族看来并不参与这样的 PtdIns(3,4,5)P₃ 的产生。这些类型的细胞表面受体已在造血源细胞 (hematopoietic origin) 中被描述, 其活性参与了免疫系统的炎症反应。近来的证据表示, 色谱形不同的另一型渥曼青霉素敏感型 PI3K 存在于 U937 细胞和嗜中性粒细胞中, 具有相近的相对分子量约 220kD (Stephens 等, 1994, 细胞 77:83-93)。这种 PI3K 活性可以被 G β γ 亚基, 而不是 G α -GTP 亚基特异性激活。一种相似的 PI3K 活性也已在一种骨肉瘤细胞系中描述 (Morris 等, 1995, 分子药物 (Mol. Pharm.) 48:532-539)。血小板也包含 G β γ 敏感型 PI3K, 但是还不清楚它是否是一个 p85/p110PI3K 家族成员 (Thomason 等, 1994, 生物化学杂志 269:16525-16528)。似乎这一性质知之甚少的 G β γ 敏感型 PI3K 在对激动剂如 ATP、fMLP 等的应答中很可能负责 PtdIns(3,4,5)P₃ 的产生。

Stoyanov 等 (1995) 最近发表从人骨髓 cDNA 文库中克隆并表达渥曼青霉素敏感的 PtdIns(4,5)P₂ 选择性 PI3K, 称为 p110 γ。 p110 γ 以

PCR 的方法扩增, 其引物的设计是以潜在的 PI3K 的以及 PtdIns4 激酶的催化中心为靶位。它明显区别于 p110 α 和 p110 β , 因为, 比如说, 缺少一个与 p85 衔接家族成员结合的氨基端结合结构域。基于 p110 γ 在体外对 G α -GTP 和 G $\beta \gamma$ 亚基的敏感性和在骨髓来源的细胞中的表达, 推测它在结合异源三聚体的 GTP 酶的受体的下游具有 PI3K 活性。然而, 这一假说留下了几个未解决的涉及更早的生物化学证据的问题, 该证据指出, 应答 G $\beta \gamma$ 的 PI3K 不受 G α -GTP 亚基刺激, 并具有大得多的约 220kD 的分子量。

认为 G $\beta \gamma$ 亚基对 p110 γ 的作用是通过一种推定的 NH₂ 端血小板-白细胞 C 激酶底物同源 (PH) 结构域介导的。然而, 随着对越来越多的 G $\beta \gamma$ 调控的效应物的描述, 很多证据表示 PH 结构域并不代表被广泛应用的 G $\beta \gamma$ 结合结构域。近来的工作, 即, 利用仅存在于被 G $\beta \gamma$ 活化的腺苷酸环化酶 (AC2 和 AC4) 中的结构域的序列的一组相对小的肽, 应用这些肽特异性阻断几个效应物受 G $\beta \gamma$ 的激活或抑制, 提示可能会有证据确证 G $\beta \gamma$ 亚基包含一个广泛应用的效应物活化结构域。另外, 与这一效应物活化结构域相互作用的不同效应物上的区域显示出很大的序列相似性。接下来, 作为这些关于肽的研究重点的 AC2 上的结构域中的一个基序 (Gln-X-X-Glu-Arg), 在钾离子通道和 β -ARK 上的一些区域出现, 而这些区域已经涉及 G $\beta \gamma$ 亚基的调控 (Chen 等, 1995, 科学 (Science) 268:1166-1169)。然而, 这一基序并不在所有的已知由 G $\beta \gamma$ 亚基调控的蛋白中重现, 所以迄今为止依靠序列分析还不能预测是否一种蛋白质将受 G $\beta \gamma$ 亚基的调控。

PI3K 活性由通过与 G 蛋白结合的受体传导其信号的细胞激动剂激活, 这一机理仍缺乏鉴定。需要指出的是绝大多数激活参与炎症反应的嗜中性粒细胞呼吸爆发的激动剂将更倾向于结合 G 蛋白偶联受体, 而不是受体酪氨酸激酶。这样, PI3K 应答这些类型的趋化因子而受调控的机理看来非常不同于依靠生长因子的通过酪氨酸激酶传导信号的调控。本发明依靠鉴定、纯化以及新型的特异类型的由三聚体 G 蛋白的 $\beta \gamma$ 亚基激活的 PI3K 的克隆来解决这一问题。

3. 发明概述

本发明涉及编码受三聚体 G 蛋白调控的 PI3K 的核苷酸的发现、鉴定、纯化和克隆，PI3K 是一种新型的蛋白，在与 G 蛋白结合的受体的激活下可产生第二信使 $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ 的累积。这一新型的 G 蛋白调控的 PI3K 包含一个催化亚基 p120，和一个调控亚基 p101。p120 催化亚基与 PI3K 的催化亚基 p110 α 、p110 β 和 p110 γ 具有部分氨基酸序列同源性。另一方面，p101 是一个全新的蛋白质，与其它以前的可获得的序列没有可鉴定的同源性。在不存在 p101 调控亚基的情况下，活化的 G 蛋白亚基诱导一个依靠 p120 催化亚基的温和的催化活性的激活。然而，在 p101 亚基存在时，PI3K 催化亚基的活性借助活化的 G 蛋白激活提高 100 倍以上。

编码猪的 p101 和 p120 以及人的 p101 和 p120 的 cDNA 已经被克隆并测序，并在此描述。猪的 p101 和 p120 cDNA 分别编码约 877 个氨基酸和约 1102 个氨基酸的蛋白质(图 2 和图 4)，而人的 p101 和 p120 的 cDNA 分别编码约 880 个氨基酸和约 1102 个氨基酸的蛋白质(图 11 和图 13)。尽管 p120 蛋白的氨基酸序列与其它那些已知的 PI3K 催化亚基同源，但在此描述的 p120cDNA 与编码已知的 PI3K 催化亚基的 cDNA 有区别，特别是在，例如，羧基端(氨基酸残基 1075 至 1102)。

p101 转录物主要存在于造血谱系的细胞中。p120 以及其它 PI3K 催化亚基蛋白，看来有一个非常广泛的组织和细胞类型分布。值得注意的是，三聚体 G 蛋白敏感的 PI3K 的活性仅存在于有限数量的造血谱系细胞中(例如，嗜中性粒细胞、血小板等)。这样看来，应答与三聚体 G 蛋白结合的受体刺激激活 PI3K 酶的能力主要取决于 p101 亚基的存在。

本发明包含下列核苷酸、表达该核苷酸的宿主细胞和该核苷酸的表达产物：(a) 编码哺乳动物 p101 和 p120 蛋白的核苷酸，包括猪 p101 和 p120 以及人 p101 和 p120，以及 p101 和 p120 基因产物，包括猪和人的基因产物；(b) 编码与其功能结构域相对应的 p101 和 p120 的部分的核苷酸，以及如下核苷酸序列定义的多肽产物，包括但不限于编码，例如，p101

析的引物。本发明还提供用于在实际中应用这些方法的诊断试剂盒。

此外，本发明还涉及一些方法，这些方法是关于 p101 基因和/或 p120 基因的产物在用于鉴定某些调节 G 蛋白调控的 PI3K 基因的表达和/或 p101 基因和/或 p120 基因产物的活性（即作为激动剂和拮抗剂）的用途。这样的化合物可以用作控制免疫系统紊乱的试剂和，特别是，用作治疗炎性紊乱例如关节炎、脓毒性休克、成人呼吸窘迫综合征（ARDS）、肺炎、哮喘、过敏、再灌注损伤、动脉粥样硬化、阿尔茨海默病和癌症的治疗性试剂。

更进一步，本发明包含一些用于治疗炎性紊乱例如关节炎、脓毒性休克、成人呼吸窘迫综合征（ARDS）、肺炎、哮喘、过敏症、再灌注损伤、动脉粥样硬化、阿尔茨海默病和癌症的方法和组合物。这些方法和组合物可以调节 p101 基因表达的水平 and/或 p101 或 p120 基因产物活性的水平。

本发明部分地基于一个令人惊讶的发现，即在分离出来的嗜中性粒细胞中 G 蛋白刺激的 PI3K 活性的发现；基于包含一个 p101 亚基和一个 p120 亚基的该活性物质即异源二聚体 PI3K 蛋白的纯化和表征；基于从猪嗜中性粒细胞 mRNA、人单核细胞 mRNA 和人白细胞 mRNA 制备的文库中 p101cDNA 的鉴定和克隆；基于从猪嗜中性粒细胞 mRNA 和人白细胞 mRNA 制备的文库中 p120cDNA 的鉴定和克隆；基于新型序列的表征；以及基于在昆虫细胞、U937 细胞和 Cos-7 细胞中的分离的重组表达的 p101 和 p120 蛋白的研究。

3.1 定义

在此应用的下列条目，无论用单数还是复数，均含有下面所示的含义：

G 蛋白调控的 PI3K：指一种 PI3K 酶，其活性由活化的三聚体 G 蛋白（如 G β γ 亚基和/或 G α -GTP 亚基）刺激。

p101：指 G 蛋白调控的 PI3K 的调控亚基，也称为衔接亚基。p101 包括与 p101 同源或结合于 p120 并在三聚体 G 蛋白的激活下刺激 PI3K

的二抗检出（图 5 的上半部分），或者与 100nM 的 $[^3\text{H}]$ -17-羟基-渥曼青霉素温育，以 SDS-PAGE（6%丙烯酰胺并作荧光自显影）解析（图 5 的下半部分）。G β γ 敏感的 PI3K 活性洗脱在第 20-24 流分中。

图 6. 经过最后一步 Mini Q 柱纯化之后的 B 峰包含 G β γ 敏感的 PI3K 活性。对 B 峰活性的最后一步纯化产物经 Mini Q 柱分离后，在活化的 G β γ 亚基（ β γ ）、酪氨酸磷酸化的肽（YP-肽）、渥曼青霉素和/或 G α_i -GDP 亚基（ α_i -GDP）存在与不存在下对其进行了分析。

图 7. 在 Sf9 细胞中重组表达的游离 p120 和 p101/p120 PI3K 的药理学特性和调控特性。实验包括以下内容：与不同试剂温育的 7nM p101/p120 或 36nM p120（终浓度）；10mM NaF 和 30 μ M AlCl_3 (A/F)；1 μ M G β γ 亚基（ β γ ）；2 μ M G α_i -GDP；100nM 渥曼青霉素(W) 或 50 μ M 酪氨酸磷酸化的肽(PY)，实验前 15 分钟（0 $^\circ\text{C}$ 下）加入 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ；定量掺入 ^{32}P 的 $^{32}\text{P}\text{-PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ 。所示数据为平均值（ $n=2$ ）。

图 8. U937 细胞中的 p101 与 G β γ 激活的 PI3K 的活性相关。U937 细胞瞬时地由编码(EE)120 或(EE)101 的哺乳动物表达载体转染，其由编码 myc101、myc120 或无关的对照 myc 融合蛋白的哺乳动物表达载体共转染，如文中所述。共用 40 μ g 载体 DNA。共转染后，细胞裂解、预洗并与共价交联有 α -(EE)单克隆抗体的 G 蛋白 sepharose 免疫沉淀，在实施例中所详述。所得免疫沉淀物经洗涤并鉴定 G β γ 激活的（1 μ M，终浓度）PI3K 活性。来自用无关(EE)-标记的蛋白的转染细胞中的免疫沉淀中检测出的 PI3K 活性，从所示数据中减去或不减去 G β γ （这些是分别为存在与不存在 G β γ 时 1896dpm 和 2862dpm 的平均值）。以 ^{35}S -蛋氨酸标记的平行的转染显示了 $^{35}\text{S}\text{-p101}$ 和 $^{35}\text{S}\text{-p120}$ 在免疫沉淀中的量，其当共转染时下降 40%（数据未显示）。

图 9. 体内 p101/p120 受 G β γ 的调控。Cos-7 细胞由编码 G β γ 亚基（“ $\beta_1\gamma_2$ ”）、p101（“101”）和/或 p120（“120”）的哺乳动物表达载体转染，如文中所述。经 48 小时的瞬时表达，每个转染的细胞或者进行 Western 杂交以检测“相关蛋白”，或者对 $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$

的累积（带阴影的条框）进行鉴定。对于 Western 杂交，样品以 α -(myc) 单克隆抗体作探针对不同的(myc)标记的蛋白的表达进行定量。给出的结论与所有 4 个关键载体存在时所得到的表达相关；(myc)-p120 和(myc)-p101 的绝对水平非常相似，均为 10 倍于(myc)- γ_2 的水平。平行批次的细胞以 $[^{32}\text{P}]\text{-Pi}$ 标记；90 分钟后将脂类抽提、去酰基化并且对溶解的水溶头部基团进行阴离子交换 HPLC，由液体闪烁记数法定量。所示数据为平均值（ $n=2$ ） $\pm$ 变化范围。 $[^{32}\text{P}]\text{-PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ 的数据在无关 DNA 对照（ $972 \pm 41\text{dpm}$ ）之上。

图 10A 和 10B. 人 p101 衔接亚基核苷酸序列。（SEQ ID No: 11）

图 11. 推导的人 p101 氨基酸序列。（SEQ ID No: 12）

图 12A 和 12B. 人 p120 催化亚基核苷酸序列。（SEQ ID No: 13）

图 13. 推导的人 p120 催化亚基序列。（SEQ ID No: 14）

5. 发明详述

本发明涉及一种特定类型的由三聚体 G-蛋白的 $\beta\gamma$ 亚基激活的 PI3K 的鉴定、纯化和克隆。在此首次进行描述的 p101 是一种 G-蛋白调控的 PI3K 的新型亚基。在此同作描述的是 G-蛋白调控的 PI3K 的催化亚基 p120 的鉴定、克隆和序列的修正。

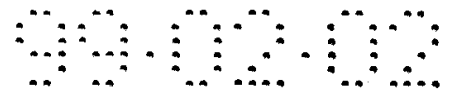
PI3K 是一种酶，它在 3d 位磷酸化磷脂酰肌醇以产生胞内信号分子 $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ 。尽管已显示 PI3K 的活性在多种细胞类别中一经酪氨酸激酶受体的刺激即被诱导，但是由与三聚体的 G-蛋白结合的受体激活的 PI3K 活性仅在有限数量的造血谱系来源的细胞（例如血小板、单核细胞和淋巴细胞）中检测出来。有趣的是，在这些细胞中 $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ 的累积与很多参与急、慢性炎症的免疫应答有关。例如，嗜中性粒细胞特别是由应答微生物感染所释放的趋化因子 fMLP 所激活。这一激动剂结合到百日咳毒素敏感的 G 蛋白偶联受体上并激活嗜中性粒细胞呼吸爆发，导致超氧化物的产生和细胞毒性。呼吸爆发反应与一快速并瞬时的胞内 PI3K 活性的增加相关。

对嗜中性粒细胞的研究表明，选择性抑制 PI3K 的催化成分的渥曼青

霉素导致超氧化物产生的停止。由于绝大多数激活这一呼吸爆发的激动剂结合于与 G 蛋白结合的受体，G 蛋白调控的 PI3K 的活性代表一种主导性效应物途径的候选物，其抑制将减轻炎症的破坏细胞的作用。然而，渥曼青霉素不是一个临床上合适的这一途径的抑制剂，因为渥曼青霉素抑制 PI3K 的所有催化活性，包括参与其它细胞途径，如生长因子的活性。

在此报道的发现，即 G-蛋白调控的 PI3K 由两个亚基组成：催化亚基（p110 γ ，p117 或 p120）和 p101 调控亚基。PI3K 对可刺激 G β γ 亚基从活化的三聚体 G-蛋白释放的细胞表面受体的反应能力主要取决于 p101 调控亚基的存在。尽管催化亚基在体外有 G β γ 亚基存在下也会表现出对 PI3K 活性一个小的刺激（约 1.7 倍），但 p101 蛋白的加入将提高 G β γ 对 PI3K 活性的刺激 100 倍。对 p101 的中和、去除或干扰 p101 结合于其结合伴侣，将使细胞失去应答激活的 G β γ 亚基产生大量增加的胞内信号 PtdIns(3,4,5)P₃ 的能力。这样看来，在骨髓来源的细胞中有限的 p101 亚基的分布是对这一应答的细胞类型特异性的关键因素。此外，p101 上没有明显的与其它任何已鉴定的序列的同源物。这一发现使 p101 和 p101/p120 复合物成为非特异性效应最小的抑制、激活或调节 G 蛋白激活的 PI3K 的可选择的靶位。

本发明还包括 p101 和 p120 的核苷酸、p101 和 p120 的蛋白和肽以及抗 p101 和 p120 的抗体（比如，其能够作为 p101 和 p120 的激动剂或拮抗剂）、抑制 G 蛋白激活的 PI3K 的活性或表达的拮抗剂或者一些激活 G 蛋白激活的 PI3K 的活性或增加其表达的激动剂，这些激动剂在动物比如人类中，治疗造血谱系细胞激活紊乱，包括但不限于，与急、慢性炎症相关的免疫应答。例如，G β γ 激活的 PI3K 的拮抗剂可用于治疗包括类风湿性关节炎在内的关节炎、脓毒性休克、成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)、肺炎、哮喘和其它肺部疾病、过敏、再灌注损伤、动脉粥样硬化和其它心血管疾病、阿尔茨海默病和癌症，在此仅列出一些炎症紊乱。另外，p101 核苷酸和 p101 调控亚基，以及 p120 核苷酸和 p120 催化亚基，在鉴定有效的治疗参与 G 蛋白激活的 PI3K 的造血谱系细胞激活紊乱的化合物时是很有用的。



进一步,本发明包含 p101 和 p120 核苷酸、p101 和 p120 蛋白和肽、以及在造血谱系细胞激活紊乱诊断中抗 p101 和 p120 抗体的用途。在一个病人中 p101 调控亚基或 p120 催化亚基的异常,或在 G 蛋白激活的 PI3K 信号传导途径中的异常的诊断,将同样有助于制订一个合适的疗法或治疗方案。

特别地，下面一段内容描述的发明包含 p101 调控亚基、相应于 p101 调控亚基功能结构域的多肽或肽（例如，催化亚基结合结构域，或与激活的 G 蛋白相互作用的 结构域）、突变的截短的或缺失的 p101 调控亚基（例如，缺失了一个或多个功能结构域或部分的 p101 调控亚基）、p101 调控亚基融合蛋白（例如，p101 调控亚基或 p101 调控亚基的一个功能结构域，其融合于一个不相关的蛋白或肽，例如一种表位标记，即 myc 表位）、编码这些产物的核苷酸序列和可产生这些 p101 调控亚基产物的宿主细胞表达体系。

另外，本发明还包括 p120 催化亚基蛋白、多肽、p120 亚基的功能结构域（例如，催化结构域）、突变的截短的或缺失的 p120 调控亚基蛋白、p120 融合蛋白、编码这些产物的核苷酸序列和可产生这些 p120 催化亚基产物的宿主细胞表达体系。

本发明还包括抗体和抗独特型抗体（包括 Fab 片段）、G 蛋白激活的 PI3K 的拮抗剂和激动剂以及抑制 p101 或 p120 基因表达（转录因子抑制剂、反义和核酶分子、或基因或调控序列替代构建体）、或启动 p101 调控亚基的表达（例如，一些表达构建体，其中 p101 编码序列与表达控制元件例如启动子、启动子/增强子等有效地结合）的化合物或核苷酸构建体。本发明还涉及基因工程改造了的宿主细胞和动物，以表达人 p101 调控亚基（或其突变体），或抑制或“敲除”动物内源性 p101 调控亚基的表达。

进一步，本发明特别地包含防止 p101 调控亚基与其结合伴侣的结合的拮抗剂，包括 p120 和其它 PI3K 催化亚基蛋白例如 p117 和 p110 γ ，以及活化的三聚体 G 蛋白蛋白，包括 G $\beta \gamma$ 亚基。

p101 调控亚基蛋白或肽、 p101 调控亚基融合蛋白、 p101 核苷酸序

(虽然它们在远端羧基端有很大差异), 但 p101 蛋白与数据库中的任何序列都不相关。

猪与人 p101 和 p120 同源物氨基酸序列比较揭示了在这两个种间的高度保守性。这一在两个哺乳动物种间高度的保守性暗示, 哺乳动物种间可能普遍存在一个相似的程度的保守性。相同于猪的序列用于克隆人同源物的方法, 本领域技术人员应用已公开的人和/或猪的序列以及在本说明书中描述的方法可从其它哺乳动物种类中克隆 p101 和 p120 同源物。

这里叙述的实验, 即在昆虫细胞中表达 p101 和/或 p120 融合蛋白, 说明 p101 以 1:1 的化学计算摩尔比紧密地与 p120 结合。能够表现 PI3K 活性的游离的经过纯化的 p120 对 G α 亚基和酪氨酸磷酸化的肽的存在不敏感, 并且仅微弱地受 G $\beta \gamma$ 亚基刺激。然而, 当与 p101 结合后, p120 的 PI3K 活性在 G $\beta \gamma$ 亚基存在下刺激增加 100 倍。当 p101 单独在昆虫细胞中表达时, p101 并不表现 PI3K 活性。

当 p101 在人 U937 细胞中以标记的融合蛋白的形式表达时, 一个有趣的结果出现了。当这个重组表达的猪 p101 通过融合蛋白标记进行免疫沉淀时, 这些免疫沉淀物确实包含 G 蛋白调控的 PI3K 活性。p120 与 p101 的共表达轻微地降低可沉降的 PI3K 的活性量。这些结果说明人 U937 细胞包含一种 PI3K 催化亚基, 这一亚基能够与 p101 调控亚基结合, 并由其激活。这些结果表明除了高度保守的氨基酸序列, 来自不同哺乳动物种类的同源物相互间在功能和结构上很相似。

此外, 用编码 p101、p120 和/或 G $\beta \gamma$ 亚基构建体在 Cos-7 细胞中进行瞬时转染, 其在应答活化的 G 蛋白时一般并不刺激 PI3K 活性。当存在 p101 下共表达时, 表达 p120 的构建体的转染仅以一种依赖 G $\beta \gamma$ 的方式产生胞内 PtdIns(3,4,5)P₃ 水平的明显提高。

本发明的各方面在下面这一部分进行更详细的描述。

5.1 p101 和 p120 基因

在图 1 和 2 中分别列出猪 p101 调控亚基的 cDNA 序列(SEQ ID No: 1)和推导的氨基酸序列(SEQ ID No: 2)。一个相对普通的等位突变

发生于开放阅读框架中 483 位氨基酸残基；一个丝氨酸可在此位被甘氨酸取代。

在图 10 和 11 中分别列出人 p101 调控亚基的 cDNA 序列(SEQ ID No: 11)和推导的氨基酸序列 (SEQ ID No: 12)。

认为编码猪 p101 调控亚基开始的 733 个氨基酸 (相应于人亚基的前 736 氨基酸) 的核苷酸序列足够与催化亚基结合。然而, 没有另外 145 个羧基端氨基酸, 此结合于 p120 的截短的 p101 不能应答 G β γ 亚基刺激 PI3K 活性。因此, 认为催化亚基相连的结构域包含在前 732 氨基酸内(对于人为 735), 且 733 到 877 位羧基端氨基酸 (对于人为 736 到 880 位) 可能参与应答 G β γ 亚基。

猪 p101 的其它结构域由以下氨基酸残基描述, 从约 1 到 160、80 到 120、161 到 263、264 到 414、415 到 565、566 到 706、707 到 832 和/或 833 到 877。相应的人 p101 结构域由以下氨基酸残基描述, 从约 1 到 160、80 到 120、161 到 263、264 到 416、417 到 567、568 到 709、710 到 835 和/或 836 到 880。编码从约 161 到 263 氨基酸残基的核苷酸序列定义一种血小板-白细胞 C 激酶底物同源 (“ PH ”) 结构域 (PROSITE: PS50003)。PH 结构域可参与蛋白质与 G β γ 亚基的结合 (Touhara 等, 1994, 生物化学杂志 269: 10217), 以及与膜磷脂的结合 (见 Shaw,1996, 生物鉴定 (Bioessays), 18: 35-46)。如此, p101 的 PH 结构域可能参与这两类事件。

编码 p101 的 1 到 160 氨基酸的核苷酸序列可能负责结合 p120 催化亚基。分析 p101 蛋白此区域二级结构时, 可预见其有自身包含的交替的 α -螺旋/ β -折叠结构。在此结构内发现与 “ WW 结构域” 的同源区 (Staub 等, 1996, 结构 4: 495-499 和 TIBS 21: 161-163)。此 WW 结构域可能结合于在 p120 蛋白 N 端发现的富含脯氨酸的结构域(残基 310 到 315)。如此, p101 的 WW 结构域可能参与介导调节亚基和催化亚基之间的相互作用。

分别在图 3 和 4 中显示猪 p120 cDNA 序列 (SEQ ID No:3) 和推导的氨基酸序列 (SEQ ID No:4)。分别在图 12 和 13 显示人 p120 cDNA

序列 (SEQ ID No:13) 和推导的氨基酸序列 (SEQ ID No:14)。隐义的凝血酶切割位点出现在开始的约 40 个氨基酸残基后。缺乏这些约 40 个氨基端残基的截短的 p120 蛋白仍能结合 p101, 但 PI3K 活性降低约 20% 到 30%。换言之, 具有 SEQ ID No:4 (猪 p120 推导的氨基酸序列) 部分从约氨基酸残基 41 延伸到残基 1102 的氨基酸序列的蛋白质保留了全长 p120 的功能。基于猪和人 p120 高度序列同源性, 具有 SEQ ID No:14 (人 p120 推导的氨基酸序列) 部分从约氨基酸残基 41 延伸到残基 1102 的氨基酸序列的蛋白质, 也将保留全长 p120 的功能。尽管 Stoyanov 等 (1995) 报道 p120 蛋白质与早先克隆的 p110 γ 蛋白高度同源, 但 p120 C 末端在氨基酸残基 1075 与报导的 p110 γ 蛋白质不同; 因此, p120 最后的 28 个氨基酸残基在任一同源蛋白质的报告中并未公布。如上所述, 编码包括 p120 残基 310 到 315 的富脯氨酸区域的核苷酸可能参与 p120 与 p101 之间的相互作用。另外, 编码 p120 从约 173 到 302 氨基酸残基的核苷酸定义了弱 PH 结构域, 它可能是关于膜结合和/或 G β γ 与 p101/p120 复合物的相互作用的候选者。

实施例 1 中呈现的数据, 如下, 证明 p120 cDNA 编码 G β γ 激活的 PI3K 的催化亚基。p101 cDNA 编码结合于 p120 亚基的新的调控亚基蛋白质。此异源二聚体应答于三聚体 G 蛋白连接受体的激活从而 3-磷酸化 PtdIns、PtdIns4P 和 PtdIns(4,5)P₂。

本发明的 p101 核苷酸序列包括: (a) 如图 1 或 10 所示的 DNA 序列或包含于保藏号为 97636 的保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 的 cDNA 克隆 pCMV3mycp101 的 DNA 序列; (b) 编码如图 2 或图 10 所示氨基酸序列的核苷酸序列, 或由保藏于美国典型培养物保藏中心的 cDNA 克隆 pCMV3mycp101 编码的 p101 调控亚基氨基酸序列的核苷酸序列; (c) 在高度严格条件下杂交于如图 1 或图 10 所示 DNA 序列互补物的任何核苷酸序列或包含于保藏于美国典型培养物保藏中心的 cDNA 克隆 pCMV3mycp101 中的任何核苷酸顺序, 例如, 在 0.5M NaHPO₄, 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 1mM EDTA 在 65 °C 条件下与结合在膜上的 DNA 杂交, 并在 0.1xSSC/0.1%SDS 在 68 °C 下清洗, (Ausubel F.M. 等, 编 1989,

并且发现推导的人和猪氨基酸序列高度保守。通过实验证明了两个同源物结构和功能的相似性，该实验显示当猪 p101 在 U937 细胞中表达时，猪 p101 与催化亚基的人同源物结合。另外，酪氨酸激酶调控的 PI3K 蛋白质家族的成员，例如 p110/p85 PI3K 在不同哺乳动物中也保守。因此 p101 和 p120 同源物可从已知或怀疑含有三聚体 G 蛋白调控的 PI3K 的哺乳动物细胞，特别是造血源细胞以及更特别是血小板、单核细胞、白细胞、破骨细胞和嗜中性粒细胞中分离。

在相关物种中 p101 同源物的鉴定可用于以发现药物为目的的与人更紧密相关的动物模型系统的开发。例如，得自目的生物体的嗜中性粒细胞 mRNA 合成的 cDNAs 表达文库，可用得自该物种标记的催化亚基例如 p120、p117 或 p110 γ 催化亚基融合蛋白来筛选。另外，这些得自目的生物体的 cDNA 文库或基因组 DNA 文库可用在此描述为杂交或扩增探针的核苷酸通过杂交进行筛选。而且，在基因组内其它基因座上编码与 p101 基因产物一个或多个结构域有广泛同源性的蛋白质的基因也可经由相同技术鉴定。至于 cDNA 文库，这些筛选技术可鉴定得自在相同或不同物种中可选择的剪接转录物的克隆。

可使用多重滤膜通过滤膜杂交进行筛选。标记的探针包含如图 1 和 10 分别所示的人或猪 p101 核苷酸序列中至少 15 - 30 个碱基对。当 cDNA 文库来源于不同于得到标记序列的生物体类型的生物体时，所使用的杂交冲洗条件应该是较低严格性的。关于用猪和 / 或人 p101 探针克隆哺乳动物 p101 同源物，可通过杂交，例如，可在 Church 缓冲液(7 %SDS, 250mM NaHPO₄, 2 μ M EDTA, 1%BSA) 中于 65 $^{\circ}$ C 过夜进行。可用 2xSSC, 0.1%SDS, 在 65 $^{\circ}$ C 下清洗以及然后在 0.1xSSC, 0.1%SDS, 在 65 $^{\circ}$ C 的条件下进行清洗。

低度严格条件对本领域技术人员来说是众所周知的，并且依赖于文库以及衍生标记的序列的特定生物体而相应地变化。关于这些条件的指南见，例如 Sambrook 等，1989，分子克隆实验室手册，冷泉港出版社，N.Y.；以及 Ausubel 等，1989，当代分子生物学方法，Green Publishing Associates 和 Wiley Interscience, N.Y..

另外，仍旧使用合适的严格条件，标记的 p101 核苷酸探针可用于筛选来自目标生物体的基因组文库。人基因组克隆的鉴定和表征对设计诊断实验和用于治疗人类造血谱系细胞激活紊乱的治疗临床方案有帮助。例如，得自人基因内含子 / 外显子边界邻近区域的序列可用于设计能用于诊断的在检测外显子、内含子、剪接位点（例如剪切接受体和 / 或供体位点）等中突变的扩增分析中的引物。

此外，p101 基因同源物可通过使用基于在此公开的 p101 基因产物内氨基酸序列设计的两简并性寡核苷酸引物库进行 PCR 从目的生物体的核酸中分离出来。反应的模板可为得自 mRNA 反转录物的 cDNA，此 mRNA 从例如，已知或怀疑表达 p101 等位基因的人类或非人类细胞系或细胞型如嗜中性粒细胞中制备。

PCR 产物可被亚克隆和测序以确保所扩增的序列代表 p101 基因序列。然后 PCR 片段可用于各种方法以分离全长 cDNA 克隆。例如，扩增片段可被标记并用于筛选 cDNA 文库，诸如噬菌体 cDNA 文库。此外，标记的片段可用于经由基因组文库的筛选分离基因组克隆。

PCR 技术还可用于分离全长 cDNA 序列。例如，依据标准步骤可从合适细胞源（即已知或怀疑表达 p101 基因如，嗜中性粒细胞或白细胞的其它类型的细胞）中分离 RNA。使用对引发第一条链合成的扩增片段的最 5' 末端特异的寡核苷酸引物，可在 RNA 上进行逆转录反应。然后得到的 RNA/DNA 杂合体使用标准末端转移酶反应用鸟苷酸“加尾”，杂合体可用 RNAase H 消化并且使用 ploy C 引物引发第二条链合成。如此，扩增片段的 cDNA 序列上游很容易被分离。可能用到的克隆策略见例如，Sambrook 等，1989，出处同前。

p101 基因序列可额外地用于分离突变 p101 等位基因。这些突变等位基因可从已知或者推定有与造血谱系细胞激活紊乱症状，如炎症有关的基因表型的个体中分离。然后突变等位基因及突变等位基因产物用于如下所述的治疗和诊断系统中。额外地，这些 p101 基因序列可用于检测影响造血谱系细胞激活的 p101 基因调控（例如：启动子或启动子 / 增强子）缺陷。

例如可使用本领域技术人员周知的 PCR 技术分离突变 p101 基因的 cDNA。在这种情况下，第一条 cDNA 链可通过将寡聚 dT 寡核苷酸杂交于分离自己知或怀疑推断的带有突变 p101 等位基因个体中的细胞的 mRNA，并且用反转录酶延伸新链来合成。然后用特异性杂交于正常基因 5'末端的寡核苷酸来合成 cDNA 第二条链。使用这两个引物，然后通过 PCR 扩增产物，克隆进合适载体并通过本领域技术人员周知的技术进行 DNA 序列分析。通过比较突变 p101 等位基因和正常 p101 等位基因的 DNA 序列，可确定负责突变 p101 基因产物功能缺失或改变的突变。

另外，可用得自怀疑或已知带有突变 p101 等位基因个体的 DNA 构建基因组文库或使用得自己知或怀疑表达突变 p101 等位基因细胞型的 RNA 构建 cDNA 文库。由此，正常 p101 基因或其任何合适片段可被标记并用作为在这些文库中鉴定相应突变 p101 等位基因的探针。然后纯化含有突变 p101 基因序列的克隆并根据本领域技术人员周知的方法进行序列分析。

另外，使用从例如分离自怀疑或已知带有此突变等位基因的个体中的已知或怀疑表达突变 p101 等位基因的细胞型的 RNA 合成的 cDNA 构建表达文库。用此法，推测的突变细胞型制造的基因产物可用标准抗体筛选技术连同抗正常 p101 基因产物的抗体（如以下 5.3 部分所述）表达和筛选（筛选技术见例如，Harlow,E.和 Lane.编,1988，“抗体：实验室手册”，冷泉港出版社，冷泉港）。另外，可通过应用标记的融合蛋白比如，(EE)120 或 myc120 融合蛋白的筛选方法完成筛选。在 p101 突变导致功能改变的表达基因产物（例如，错义或移码突变的结果）产生的情况下，抗 p101 调控亚基抗体的多克隆系易于和突变 p101 调控亚基基因产物交叉反应。经由其和这些标记的抗体反应检测的文库克隆可被纯化并根据本领域技术人员周知的方法进行序列分析。

本发明还包括编码突变 p101 调控亚基、p101 调控亚基的肽段、截短的 p101 调控亚基和 p101 调控亚基融合蛋白的核苷酸序列。这些包括但不限于编码如下 5.2 部分所述突变 p101 调控亚基；与催化结合相关的多肽或肽，或 p101 调控亚基 G β γ 亚基的结合结构域或这些结构域的部

分；其中一或两个结构域缺失的截短的 p101 调控亚基或截短的无功能 p101 调控亚基的核苷酸序列。编码融合蛋白的核苷酸可包括但不限于全长 p101 调控亚基、截短的 p101 调控亚基或与不相关蛋白质或肽融合的 p101 调控亚基肽片段，比如，协助纯化或检测所得融合蛋白的表位标记；或可用作标记物的酶、荧光蛋白、发光蛋白。

本发明还包括(a)含任何前述 p101 调控亚基编码序列和 / 或它们的互补物（即反义）的 DNA 载体；(b)含任何与指导编码序列表达的调控元件序列有效地结合的前述 p101 调控亚基编码序列的 DNA 表达载体；以及(c)含任何与指导编码序列在宿主细胞中表达的调控元件有效地结合的前述 p101 调控亚基编码序列的基因工程宿主细胞。在此使用的调控元件包括但不限于可诱导的和非可诱导的启动子、增强子、操纵子和其它本领域技术人员已知的驱动和调控表达的元件。这些调控元件包括但不限于杆状病毒启动子、巨细胞病毒 hCMV 极早期基因启动子、SV40 腺病毒早期或晚期启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 系统、TRC 系统、噬菌体 A 主要操纵子和启动子区域、fd 外壳蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸激酶启动子、酸性磷酸酶启动子以及酵母 α -交配因子启动子。

最后，本发明还包括编码 p120 亚基蛋白质的核苷酸，这些蛋白质包括新近描述的此催化亚基羧基端，p120 亚基蛋白质的缺失变异体，在高度严格条件下杂交于这些核苷酸并编码功能等同物的 120 等位基因变异体的核苷酸，包括保藏号为 9 7 6 3 7 的保藏于美国典型培养物保藏中心的 cDNA 克隆 pCMV3mycp120（例如，突变等位基因或天然发生的等位基因，诸如在 483 位氨基酸残基等位基因变异），以及用如上所述本发明 p101 核苷酸的分离方法从不同生物体分离的 p120 核苷酸等同物。此外，本发明包括用于重组生产 p120 的表达载体和宿主细胞。

5.2 p101 和 p120 蛋白质和多肽

可制备 p101 调控亚基和 p120 催化亚基，p101 调控亚基和/或 p101 调控亚基融合蛋白以及 p120 催化亚基和/或 p120 催化亚基融合蛋白的多肽和肽片段、突变的、截短的或缺失的形式以用于多种用途，包括但不限于

酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和蛋氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺；正电荷（碱性）氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸；负电荷（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。相似的，本发明还包括上述 p120 蛋白的功能等同物。

尽管可对 p101 DNA 进行随机突变（用本领域技术人员周知的随机突变技术）并且检测所得的 p101 调控亚基突变体活性，可设计 p101 编码序列的定点突变（使用本领域技术人员周知的定点突变技术）以产生使功能增加，例如对催化亚基的更高的结合亲和力，和/或更大的信号传导能力；或功能降低，例如对催化亚基的较低的结合亲和力，和/或减小的信号传导能力的突变 p101 调控亚基。

例如，猪 p101 的氨基酸序列可以与人 p101 调控亚基的序列进行比较。可设计 p101 调控亚基突变体以使物种间相同的区域得以保持而可变的残基通过例如，氨基酸残基的缺失、或插入、或一个或多个不同氨基酸残基的取代被改变。可设计在可变位置的保守性改变以产生保留功能的 p101 调控亚基突变体；例如，催化亚基结合亲和力或激活的 G 蛋白的传导能力或二者均有。可以在这些可变位置设计非保守性变化以改变功能，例如催化亚基结合亲和力或信号传导能力，或两者都有。另外，想要改变功能的地方，也可设计保守区域的缺失或非保守性改变。使用此处提到的教导，本领域技术人员可以很容易检测这些突变或缺失的 p101 调控亚基的这些改变。

可对 p101 编码序列进行其它突变以产生更适合于在所选宿主细胞中表达和放大等等的 p101 调控亚基。例如，每个氨基酸的三联密码子可以被修饰以形成更为接近宿主细胞翻译机制使用的偏好密码子。

相应于 p101 调控亚基（例如 p120 结合结构域，G 蛋白相互作用结构域，或从约 1 到 150、151 到 300、301 到 450、451 到 600、601 到 732（猪）或 601 到 735（人）和 733 到 877（猪）或 736 到 881（人）的一个或多个结构域（或一个结构域的一部分），截短的或缺失的 p101 调控亚基（例如，其中一个或多个以上结构域的部分缺失的 p101 调控亚

如杆状病毒)感染的昆虫细胞体系;经重组病毒表达载体(例如菜花花叶病毒, CaMV;烟草花叶病毒, TMV)或经含 p101 核苷酸序列的重组质粒表达载体(例如 Ti 质粒)转化的植物细胞体系;或包含得自哺乳动物细胞(例如金属硫蛋白启动子)或得自哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子;牛痘病毒 7.5K 启动子)的启动子的重组表达构建体的哺乳动物细胞体系(例如, COS、CHO、BHK、293、3T3、U937)。

在细菌体系中, 依赖以 p101 基因产物表达为目的的用途有利地选择许多表达载体。例如, 大量生产此蛋白质以产生 p101 调控亚基蛋白的药物组合物或产生抗 p101 调控亚基蛋白抗体时, 需要例如, 指导易被纯化的融合蛋白高水平表达的质粒。这些载体包括但不限于大肠杆菌表达载体 pUR278(Ruther 等, 1983, EMBO J. 2:1791), 其中的 p101 编码序列被单个地连接于载体 lacZ 编码区域框架中以产生融合蛋白; pIN 载体 (Inouye&Inouye, 1985, 核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 13:3101-3109; Van Heeke&Schuster, 1989, 生物化学杂志 264:5503-5509); 等等。pGEX 载体也可用来以谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 融合蛋白表达外源性多肽。如果插入的序列编码相对较小的多肽 (小于 25KD), 这些融合蛋白一般可溶并且吸附入谷胱甘肽-琼脂糖小珠后在游离谷胱甘肽存在下洗脱很易从裂解细胞中纯化。设计 pGEX 载体以包括凝血酶或因子 Xa 蛋白酶裂解位点以使克隆的目的基因产物可从 GST 部分释放出来。另外, 如果所得融合蛋白不溶并在宿主细胞中形成包涵体, 可用本领域技术人员所周知的技术纯化包涵体并且溶解重组蛋白。

在昆虫体系中, 苜蓿丫纹夜蛾 (Autographa californica) 核多汗 (polyhidrosis) 病毒(AcNPV)可用作载体来表达外源基因(例如, 见 Smith 等, 1983, 病毒学杂志 (J.Virol.) 46: 584; Smith, U.S.专利 4,215,051)。在以下所述特定的实施方案中, Sf9 昆虫细胞被表达 6 x HIS 标记的 p120 构建体或表达(EE)标记的 p101 构建体的杆状病毒载体感染。

在哺乳动物宿主细胞中, 可使用许多基于病毒的表达体系。以下更详细描述的特实施方中用 CMV 启动子在 U937 细胞或 Cos-7 细胞中瞬

时表达重组蛋白来表达标记的 p101 或 p120cDNA 序列。另外，本领域中众所周知的逆转录病毒载体系统可用于在宿主细胞中插入重组表达构建体。例如，在公开的 PCT 申请 WO96/09400 和 WO94/29438 中描述的转导造血细胞的逆转录病毒载体系统。

在腺病毒用作表达载体的情况下，目的 p101 核苷酸序列可被连于一种腺病毒转录/翻译控制复合物，例如，晚期启动子和三联前导序列。然后通过体外或体内重组将此嵌合基因插入腺病毒基因组。插入病毒基因组非必需区域（例如区域 E1 或 E3）将导致有生存能力并能在所感染的宿主中表达 p101 基因产物的重组病毒（例如见 Logan & Shenk, 1984, 美国国家科学院院报（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）81: 3655-3659）。插入的 p101 核苷酸序列的有效翻译还需要特异起始信号。这些信号包括 ATG 起始密码子及邻近序列。在完整的包括自身起始密码子和邻近序列的 p101 基因或 cDNA 插入合适的表达载体的情况下，不需要额外翻译控制信号。然而，在仅仅插入 p101 编码序列一部分的情况下，必须提供包括可以是 ATG 起始密码子的外源性翻译控制信号。而且，起始密码子必须和所需要的编码序列的阅读框架方向相同以确保全部插入物的翻译。这些外源性翻译控制信号和起始密码子可为各种来源，天然的和合成的。表达效率可被包括合适的转录增强子元件、转录终止子等等提高（见 Bittner 等，1987，酶学方法（Methods in Enzymol.）153: 516-544）。

另外，要选择调节插入序列的表达或以所需特殊方式修饰并加工基因产物的宿主细胞株。这些蛋白产物的修饰（例如糖基化）和加工（例如切割）对蛋白质的功能很重要。不同宿主细胞有对蛋白质和基因产物的翻译后加工及修饰的特征性和特异性的机制。可选择合适的细胞系或宿主系统以确保表达的外源蛋白正确的修饰和加工。为此目的，可使用有合适的加工初级转录产物的细胞机制的真核宿主细胞。这种哺乳动物宿主细胞包括但不限于 CHO、VERO、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、WI38 和 U937 细胞。

对于重组蛋白长期、高产量的生产优选可以稳定地表达。例如，可构建稳定地表达上述 p101 序列的细胞系。不使用含病毒来源的复制起点的

表达载体，宿主细胞可用合适表达控制元件（例如启动子、增强子序列、转录终止子、多腺苷化位点等）控制的 DNA 及选择性标记转化。引入外源 DNA 后，允许构建的细胞在加富培养基中生长 1-2 天，然后转入选择性培养基。重组质粒中的选择性标记赋予选择抗性并且允许细胞稳定地将质粒整合进它们的染色体并且可生长和形成依次可被克隆和扩展成细胞系的细胞转化灶。使用这种方法可有利地构建表达 p101 基因产物的细胞系。这些构建的细胞系在筛选和评价影响 p101 基因产物内源性活性的化合物上尤其有用。

可使用许多选择系统，包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶（Wigler 等，1977，细胞 11：223），次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（Szybalska & Azybalski, 1962，美国国家科学院院报 48:2026）以及腺嘌呤磷酸核糖转移酶（Lowy 等，1980，细胞 22：817）基因可分别用在 tk⁻、hgp^rt⁻或 ap^rt⁻细胞中。而且，抗代谢产物抗性可用作下列基因筛选的基础：dhfr，赋予氨甲喋呤抗性（Wigler 等，1980，美国国家科学院院报 77:3567；O'Hare 等，1981，美国国家科学院院报 78:1527）；gpt，赋予霉酚酸抗性（Mulligan & Berg, 1981, 美国国家科学院院报 78:2072）；neo，赋予氨基糖苷 G-418 抗性（Colberre-Garapin 等，1981，分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) 150：1）；以及 hyg^ro，赋予潮霉素抗性（Santerre 等，1984，基因 30：147）。

p101 基因产物也可以在转基因动物中表达。任何种类动物包括但不限于小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猪、小型猪、山羊以及非人的灵长类例如狒狒、猴子、黑猩猩均可以用于产生 p101 转基因动物。

本领域中任何已知技术均可用于向动物中引入 p101 转基因以产生转基因动物的创立系。这些技术包括但不限于原核显微注射（Hoppe.P.C. 和 Wagner,T.E., 1989，美国专利 4, 873,191）；逆转录病毒介导的基因转入胚系（Van der Putten 等，1985，美国国家科学院院报 82:6148-6152）；在胚胎干细胞中基因打靶（Thompson 等，1989，细胞 56：313-321）；胚胎的电穿孔（Lo. 1983，分子细胞生物学(Mol Cell. Biol.) 3：1803-1814）；以及精子介导的基因转移（Lavitrano 等，1989，细

IgA、IgD 以及它们的亚类。产本发明的单克隆抗体的杂交瘤可在体外或体内培养。体内高效价单克隆抗体的产生使其成为目前优选的生产方法。

另外,可以使用通过剪接得自合适的抗原特异性的鼠抗体分子的基因以及得自合适的生物学活性的人抗体分子的基因以生产“嵌合抗体”所发展的技术(Morrison 等, 1984,美国国家科学院院报, 81:6851-6855; Neuberger 等, 1984,自然, 312:604-608; Takeda 等,1985,自然, 314:452-454)。嵌合抗体为一种分子, 其中的不同部分来源于不同动物种属诸如有得自猪单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的部分。

另外,可以修改描述的用于生产单链抗体的技术(美国专利 4, 946, 778; Bird,1988, 科学 242: 423-426; Huston 等, 1988, 美国国家科学院院报 85: 5879-5883; 以及 Ward 等, 1989, 自然 334: 544-546)以生产抗 p101 基因产物的单链抗体。通过一种氨基酸桥连接 Fv 区的重链和轻链, 产生单链多肽可形成单链抗体。

用已知的技术可产生识别特异性表位的抗体片段。例如, 这些片段包括但不限于: 由胃蛋白酶酶解抗体分子产生的 $F(ab')_2$ 片段以及由还原 $F(ab')_2$ 片段二硫桥产生的 Fab 片段。另外, 构建 Fab 表达文库(Huse 等, 1989, 科学, 246: 1275-1281)以允许快速及方便地鉴定带有所需特异性的单克隆 Fab 片段。

使用本领域中周知的技术, 抗 p101 调控亚基或 p120 催化亚基抗体可依次用于产生分别“模拟” p101 调控亚基或 p120 亚基的抗独特型抗体(见, 例如, Greenspan & Bona, 1993, FASEB J. 7(5):437-444; 和 Nissinoff, 1991, 免疫学杂志(J. Immunol.) 147(8):2429-2438)。例如, 结合于 p101 调控亚基并且竞争性抑制催化亚基与 p101 调控亚基结合的抗体可用于产生“模拟” p101 调控亚基并且因此结合和中和催化亚基的抗独特型抗体。这些中和抗独特型或这些抗独特型的 Fab 片段的抗体可在治疗方案中使用以中和催化亚基并且减轻炎症。

5.4 造血细胞激活紊乱的诊断

运用多种方法诊断性和预后性评价造血谱系细胞激活紊乱, 包括炎性

紊乱以及对这些疾病倾向的病人的鉴定。

这些方法可以例如使用诸如上述的 p101 和 p120 核苷酸序列以及 5.3 部分中所述的 p101 调控亚基和 p120 抗体的试剂。特别的是，这些试剂可用于例如：（1）检测 p101 或 p120 基因突变的出现，或检测与非造血谱系细胞激活紊乱状态相关的 p101 或 p120mRNA 的过度或者低下表达；（2）检测与非造血谱系细胞激活紊乱状态相关的 p101 或 p120 基因产物的过度或者低下冗余（under-abundance）；以及（3）检测由 p101 调控亚基和 p120 催化亚基介导的信号传导途径中的干扰或异常。

此处描述的方法可通过例如使用含至少一种特异性 p101 或 p120 核苷酸序列或此处描述的 p101 或 p120 调控亚基抗体试剂的预先包装的诊断试剂盒来进行，此试剂盒可很方便地用在例如临床设备中以诊断呈现造血谱系细胞激活紊乱异常的病人。

为检测 p101 或 p120 突变，可用任何有核细胞作为基因组核酸的起始来源。为检测 p101 或 p120 基因表达或 p101 或 p120 基因产物，可运用其中表达 p101 或 p120 基因的任一细胞类型或组织 例如，嗜中性粒细胞。

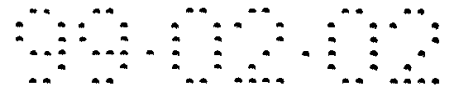
基于核酸的检测技术在以下 5.4.1 部分描述。肽检测技术在以下 5.4.2 部分描述。

5.4.1 p101 基因和转录物的检测

可使用很多技术检测 p101 或 p120 基因内的突变。可用任何有核细胞的核酸作为这些分析技术的起点，并且那些本领域技术人员周知的标准核酸制备步骤进行分离。

可在生物样品的杂交或扩增分析中使用 DNA 以检测有关基因结构的异常，包括点突变、插入、缺失和染色体重排。这些分析包括但不限于 Southern 分析，单链构象多形态分析（SSCP）以及 PCR 分析。

检测 p101 或 p120 基因特异性突变的这些诊断方法可包括例如在适宜于这些试剂和在 p101 或 p120 基因内它们的互补序列特异性退火的条件下，用一种或多种核酸反应物包括重组 DNA 分子、克隆的基因或其简



并性变异体接触并培养得自样品例如得自病人的样品或其它合适的细胞来源的核酸包括上述的重组 DNA 分子、克隆的基因或它们的简并性变异体。优选的，这些核苷酸反应物长度至少为 15 到 30 个核苷酸。温育后，从核酸分子杂合体中除去所有未退火的核酸。然后检测这种已杂交的核苷酸分子，如果有任何这样的分子存在的话。使用这样的检测方案，得自目标细胞类型或组织的核酸被固定于例如固态支持物（诸如膜或如微孔板或聚苯乙烯珠）上的塑料表面。在这种情况下，温育后，很易除去上述类型的未退火的标记的核苷酸反应物。用本领域技术人员所周知的标准技术完成剩余的退火的标记的 p101 或 p120 核酸反应物的检测。核酸反应物所退火结合的 p101 或 p120 基因序列可与正常基因序列预期的退火模式作比较以确定是否存在基因突变。

用于在病人样品或其它合适细胞来源中检测 p101 或 p120 基因特异性核酸分子的替代诊断方法可包括它们的扩增，例如通过 PCR（实验实施方案列于 Mullis, K.B., 1987, U.S. 专利 4, 683, 202），其后使用为本领域技术人员所周知的技术检测扩增的分子。如果被扩增的核酸仅含 p101 或 p120 基因的正常拷贝，所得的扩增序列可与预期的那些作比较以确定是否存在基因突变。

另外，使用众所周知的基因分型技术以鉴定带有 p101 或 p120 基因突变的个体。这些技术包括例如限制性片段长度多形体(RFLP)的使用，此多形体包括与使用的特异性限制酶识别位点之一中的序列变异。

通过检测和测定 p101 或 p120 转录也可分析 p101 或 p120 基因表达的水平。例如，得自己知或怀疑表达 p101 或 p120 基因的细胞类型或组织诸如造血谱系细胞，尤其是骨髓细胞和血小板的 RNA 可运用上述的杂交或 PCR 技术来分离和检测。分离的细胞来源于细胞培养物或病人。取自培养物的细胞的分析是评价用作基于细胞的基因治疗技术的一部分或检测化合物对 p101 或 p120 基因表达的影响中的必需步骤。这些分析可揭示 p101 或 p120 基因表达模式的质量和数量，包括 p101 或 p120 基因表达的激活或失活。

5.4.2 p101 基因产物的检测

以上 5.3 部分描述的针对野生型或突变 p101 或 p120 基因产物或保守的变异体或其肽片段的抗体也可用作此处所述的造血谱系细胞激活紊乱的诊断和预后。这些诊断方法可用于检测 p101 或 p120 基因表达水平的异常或用于检测 p101 调控亚基的结构和/或暂时的组织、细胞或亚细胞位置的异常，并且可在体内或体外进行例如在活检组织上。

待分析的组织或细胞类型一般包括那些已知或怀疑含表达 p101 或 p120 基因的细胞，如渗入炎性组织的嗜中性粒细胞。此处运用的蛋白分离方法可以是例如 Harlow 和 Lane 所述的那些方法（Harlow, E. 和 Lane, D., 1988. “抗体：实验室手册”。冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约）。此处全文引入作为参考。分离的细胞可来源于细胞培养物或病人。取自培养物的细胞分析在评价用作基于细胞的基因治疗技术或者检测化合物对 p101 或 p120 基因表达的影响的细胞中为必需步骤。

例如，用于本发明中的诸如以上 5.3 部分所述的抗体或抗体片段可用于在定性或定量检测是否存在 p101 或 p120 基因产物或其保守的变异体或它们的肽片段。例如可通过应用荧光标记的抗体（见此部分以下）结合光学显微镜、细胞流式测量术或荧光测量检测的免疫荧光技术来完成。

为原位检测 p101 或 p120 基因产物或保守的变异体或其肽片段或为检测催化亚基的结合（在标记的催化亚基融合蛋白情况下），本发明中有用的抗体（或它们的片段）或融合的或连接的蛋白可额外地在组织学上用于免疫荧光、免疫电子显微镜或非免疫分析。

从病人取得组织学样品并且还应用本发明标记的抗体或融合蛋白完成原位检测。优选的通过在生物学样品上覆盖标记的抗体（或片段）的方式应用抗体（或片段）或融合蛋白。在这个方法使用过程中，不仅可以确定 p101 或 p120 基因产物或保守变异体或肽片段的存在也可确定它在所检测的组织中的分布。使用本发明，本领域普通技术人员可以看出可改造多种组织学方法（诸如染色步骤）的任一种以实现样品的原位检测。

p101 或 p120 基因产物或保守变异体或它们的肽片段的免疫分析和非免疫分析典型地包括温育样品，诸如生物学液体、组织提取物、新收集的

细胞和在可检出的能鉴定 p101 或 p120 基因产物或保守变异体或它们的肽片段的标记的抗体存在下培养在细胞培养基的细胞裂解产物以及通过任何一种本领域周知的方法检测结合的抗体。

生物学样品可拿来接触并固定于固态支持物或载体诸如硝酸纤维素膜或能固定细胞、细胞颗粒或可溶性蛋白的其它固相支持物上。然后用合适缓冲液清洗支持物，之后用可检测到的标记的 p101 调控亚基或 p120 亚基抗体或融合蛋白处理。用缓冲液第二次冲洗固相支持物以除去未结合的抗体或融合蛋白。然后用传统方法检测固相支持物上结合的标记量。

“固相支持物或载体”意在包含任何能结合抗原或抗体的支持物。众所周知的支持物或载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩以及磁铁矿。用于本发明目的的载体特性可以是某些程度可溶或不溶。支持材料实际上可有任何可能的结构形状，只要偶联的分子能和抗原或抗体结合。这样，支持物的形状可为圆球形如珠中、圆柱形，如试管内表面或杆的外表面上。另外，表面可为平的例如片状，试验条状等等。优选的支持物包括聚苯乙烯珠。本领域技术人员知道或能通过使用常规实验确定许多其它适合结合抗体或抗原的载体。

根据众所周知的方法确定给定的许多 p101 调控亚基或 p120 亚基抗体或融合蛋白的结合活性。本领域技术人员能确定通过常规实验方法各自确定有效的和最佳分析条件。

就抗体而言，抗体被可检测标记的方法之一为将抗体和一种酶连接并用于酶免疫分析(EIA)(Voller, “酶联免疫吸附分析(ELISA)” 1978, 诊断水平 2: 1-7, 微生物学联合季刊出版物, Walkersville, MD); Voller 等, 1978, 临床病理学杂志, 31: 507-520; Butler, 1981, 酶学方法, 73: 482-523; Maggio(编)1980, 酶免疫分析, CRC 出版社, Boca Raton, FL; Ishikawa 等(编)1981, 酶免疫分析, Kigaku Shoin, 东京)。与抗体结合的酶将与合适的底物反应，优选的是产色底物，其反应方式如产生通过例如色谱法、荧光法或通过可见方法可检测的化学部分。用于可检测性标记抗体的酶包括但不限于苹果酸脱氢酶、葡萄糖球菌核酶、 Δ -5-

类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶以及乙酰胆碱酯酶。通过应用酶的产色底物的比色法完成检测。也可通过与相似地制备的标准相比较的底物酶反应程度的可见比较完成检测。

使用各种其它任一免疫分析也可完成检测。例如，通过放射性标记抗体或抗体片段，可通过放射免疫分析检测(RIA)(见，例如，Weintraub, B. 放射免疫分析原理，放射性配体分析技术第七期训练班，内分泌学会，1986，此处引入作为参考) p101 调控亚基。放射性同位素可通过诸如使用 γ -计数器或闪烁计或放射自显影的方法检测。

也可用荧光化合物标记抗体。当荧光标记的抗体暴露于合适波长的光时，因荧光可检测抗体的存在。最经常使用的荧光标记化合物有异硫氰酸荧光素、若丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白以及荧光胺。

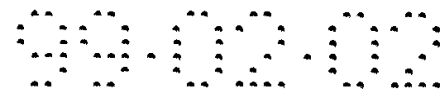
使用产荧光性金属诸如 ^{152}Eu 或镧系的其它金属也可将抗体可检测地标记。使用诸如二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA) 或乙二胺四乙酸(EDTA) 的金属螯合基团可将这些金属连于抗体上。

还可通过将其偶联于化学发光化合物上可检测地标记抗体。然后检测化学反应过程中存在产生的发光确定化学发光标记的抗体的存在。尤其有用的化学发光标记化合物的实例有鲁米诺、异鲁米诺，theromatic 吡啶鎓酯，咪唑，吡啶鎓盐以及草酸酯。

相似地，生物发光化合物可用于标记本发明的抗体。生物发光化合物是在生物体系中发现的一类化学发光物，其中催化性蛋白增加了化学发光反应的效率。通过检测发光检测生物发光蛋白质的存在。重要的用于标记的生物发光化合物有荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白。

5.5 调节 G-蛋白激活的 PI3K 的表达或活性的化合物的筛选实验

设计以下实验用于鉴定下列化合物，与 p101 调控亚基或 p120 催化亚基相互作用（例如，结合）的化合物，与一些与 p101 调控亚基和/或



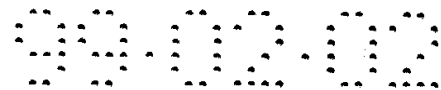
中这些化合物能调节 p101 调控亚基或 p120 催化亚基表达或活性。鉴定这样的化合物或组合物后，鉴定活性位点或区域。这样的活性位点典型的是结合伴侣位点，诸如， p120 催化亚基与 p101 调控亚基自身的相互作用结构域。使用本领域中公知的方法包括，例如从肽的氨基酸序列，从核酸的核苷酸序列，或从带有自然配体的相关化合物或组合物复合物的研究鉴定活性位点。在后一种情况下，可用化学或 X-射线结晶法通过寻找因子上发现复合配体的地方发现活性位点。

其次，确定活性位点的三维几何结构。这可以通过已知的方法包括能确定完整分子结构的 X-射线结晶法。另一方面，可用固相或液相 NMR 确定一定的内分子距离。可用确定结构的任何其它实验方法得到部分或完整的几何结构。可用天然的或人工的复合配体测定几何结构，这可提高确定的活性位点结构的准确性。

如果确定了不完全的或不够准确的结构，可使用基于数字模拟的计算机方法完成其结构或提高其准确性。可使用任何识别模型，包括特异于特定的生物多聚体诸如蛋白质或核酸的参数化模型，基于计算分子运动的分子动力学模型，基于热集合的统计力学模型或组合模型。对于大多数模型种类需要代表组成原子和基团之间力的标准分子力场，并且可从物理化学中已知的力场选择。不完全的或不太准确的实验结构可作为用这些模型方法得到完全和较准确的结构约束。

最后，或通过实验性地或通过模拟或通过组合确定活性位点的结构后，搜寻含有化合物以及有关它们分子结构信息的数据库鉴定候选的调节化合物。这样的搜寻寻找有与所确定的活性位点结构相匹配的并且与所定义的活性位点的基团相互作用的化合物。这样的搜寻可以是人工的，但优选计算机辅助的。从此研究发现的这些化合物为潜在的 G 蛋白激活的 PI3K 调节化合物。

另外，这些方法可用于鉴定从已知调控化合物或配体改进的调控化合物。已知化合物的组分可被修饰并且使用应用于新组合物的上述实验和计算机模拟方法确定修改的结构效应。然后改变的结构与化合物的活性位点结构相比较以确定是否发生改进的相互配合或相互作用。在这种方法中诸



如通过改变侧基能很快评价组分中的系统性改变以得到提高特异性或活性的修饰过的调控配体。

对于鉴定基于 p120 催化亚基、p101 调控亚基和相关转导和转录因子的活性位点的确定的调节化合物有用的进一步实验和计算机模拟方法对本领域技术人员而言是显而易见的。

分子模拟系统的例子为 CHARMM 和 QUANTA 程序 (Polygen 公司, Waltham, MA)。CHARMM 行使能量最小化和分子动力学功能。QUANTA 进行分子结构构建、图示模型及分析。QUANTA 允许分子之间相互行为作用的相互作用构建、修饰、可见化和分析。

许多文章综述了与特定蛋白相互作用的药物的计算机模拟, 诸如 Rotivinen 等, 1988, *Acta Pharmaceutical Fennica* 97:159-166; Ripka, 新科学家 (New Scientist) 54-57 (6 月 16, 1988); McKinaly 和 Rossmann, 1989, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:111-122; Perry 和 Davies, 药物设计中的定量结构活性关系 (QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design) pp. 189-193 (Alzn R. Liss, Inc. 1989); Lewis 和 Dean, 1989, *Proc. R. Soc. Lond.* 236:125-140 和 141-162; 以及关于核酸组分的模型受体, Askew 等, 1989, 美国化学学会杂志 (J. Am. Chem. Soc.) 111: 1082-1090。筛选和图示描述化学物质的其它计算机程序可得自诸如 BioDesign, Inc. (Pasadena, CA.), Allelix, Inc. (Mississauga, Ontario, 加拿大), 以及 Hypercube, Inc. (Cambridge, Ontario) 等公司。尽管这些最初是为应用于针对特定蛋白的药物, 一旦 DNA 或 RNA 区域被鉴定, 它们就可被改造以适合于设计针对此 DNA 或 RNA 区域的药物。

尽管上述涉及到能改变结合的化合物的设计和产生, 一种作为抑制剂或激动剂的化合物也能从已知化合物包括天然产物或合成化学物质以及生物学活性物质 (包括蛋白质) 的文库中筛选。

通过诸如此处描述的那些分析鉴定的化合物可能用于例如详尽阐述 p101 或 p120 基因产物的生物学功能以及用于改善造血谱系细胞激活紊乱。下面 5.54 部分中讨论了为检测例如通过诸如 5.5.1 到 5.5.1 部分描述的那些技术鉴定的化合物的有效性的分析方法。

5.5.1 结合于 p101 调控亚基的化合物的体外筛选实验

设计体外系统以鉴定能与 p101 调控亚基或 p120 催化亚基相互作用（例如，结合）的化合物。被鉴定的化合物可用于例如调节野生型和/或突变型 p101 或 p120 基因产物活性；也可用于为鉴定破坏正常 p101 调控亚基/催化亚基相互作用的化合物的筛选；或用于鉴定它们自身破坏这样的相互作用。

用于鉴定与 p101 调控亚基结合的化合物的实验原理包含：在足够允许 p101 调控亚基与受试化合物相互作用和结合的条件和时间下制备两种成分的反应混合物，这样在反应混合物中形成可被去除和/或被检测的复合物。所使用的 p101 调控亚基种类取决于筛选实验的目的。例如，全长 p101 调控亚基，或含融合进在实验系统中（例如，所得的复合物的标记、分离等等）提供便利的蛋白质或多肽的 p101 调控亚基的融合蛋白均可用于寻找天然配体的激动剂。

可用各种方法进行筛选实验。例如，进行这种鉴定的一种方法包含：在固相上锚定 p101 调控亚基蛋白、多肽、肽或融合蛋白或受试底物并且检测反应末期锚定在固相上的 p101 调控亚基/受试化合物复合物。在这样的方法的一种实施方案中，p101 调控亚基反应物可被锚定在固体表面上，并且未被锚定的受试化合物可被直接或间接标记。在此方法的另一实施方案中，锚定在固相上的 p101 调控亚基蛋白与标记的催化亚基诸如 p120 形成复合物。然后，即可进行受试化合物破坏 p101/p120 复合物结合的能力的分析实验。

在实践中，微孔板可很方便地用作固相。可由非共价或共价吸附固定锚定的组分。用蛋白质溶液简单包被在固体表面并且干燥可完成非共价吸附。另外，对被固定的蛋白质有特异性的固定化抗体，优选单克隆抗体可用于将蛋白质锚定在固体表面。固体表面可提前制备并贮存。

为了进行鉴定，未固定的组分加到含有锚定组分的包被的表面。反应结束后，在形成的任何复合物均可在固体表面保持固定的条件下去除未反应组分（例如，通过清洗）。可用很多方法完成对锚定在固体表面的复合

物的检测。若未固定组分是预先标记过的，固定在表面的标记的检出即提示形成了复合物。如未预标记未固定组分，可用一种间接标记的方法检测锚定在表面上的复合物，例如，使用对未固定组分特异性的标记过的抗体（抗体可依次用标记的抗 Ig 抗体直接标记或间接标记）。

另外，可在液相中进行反应，从未反应组分分离反应产物并且检测复合物；例如，使用针对 p101 调控亚基蛋白、多肽、肽或融合蛋白或催化亚基蛋白或融合蛋白、或受试化合物的一种固定化抗体锚定溶液中形成的任何复合物以及使用针对可能的复合物的其它组分的标记抗体以检测锚定的复合物。

5.5.2 与 p101 或 p120 蛋白质相互作用的细胞内蛋白的鉴定

合适检测蛋白质-蛋白质相互作用的任何方法均被用于鉴定和 p101 调控亚基和/或 p120 催化亚基相互作用的细胞内蛋白质。传统方法中可使用的有共免疫沉淀、交联以及通过梯度或色谱柱对细胞裂解物或得自细胞裂解物的蛋白质和裂解物中与 p101 调控亚基相互作用的待鉴定的蛋白质及 p101 调控亚基蛋白质的共纯化。对于这些实验，使用的 p101 调控亚基组分可为全长 p101 调控亚基或截短的肽。相似地，组分可为 p120 催化亚基或 p101 调控亚基和 p120 催化亚基的复合物。一旦被分离，这样的细胞内蛋白质可被鉴定并且结合标准技术反过来用于鉴定与其相互作用的蛋白质。例如，使用本领域技术人员周知的技术诸如通过 Edman 降解技术（见，例如， Creighton, 1983, 《蛋白质：结构和分子机理》（“Proteins: Structures and Molecular Principles”） W.H. Freeman & Co. N.Y., pp. 34-39）确定与 p101 调控亚基、PI3K（p101/p120 复合物）或 p120 催化亚基相互作用的细胞内蛋白质的氨基酸序列的至少一部分。得到的氨基酸序列可用作用于筛选编码这样的细胞内蛋白质的基因序列的寡核苷酸混合物生产的指导。例如通过标准杂交或 PCR 技术完成筛选。产生寡核苷酸混合物和筛选的技术是众所周知的（见，例如， Ausubel, 出处同前, 《PCR 方法：方法与应用指南》（PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications），1990, Innis, M. Et 等编. Academic 出版社,

Inc., 纽约)。

另外，可应用同时鉴定编码与 p101 调控亚基和/或 p120 催化亚基和/或 PI3K 相互作用的细胞内蛋白质的基因的方法。这些方法包括，例如，探查表达 (probing expression)、文库、以与众所周知的 λ gt11 文库抗体探查技术相似的方式，使用标记的 p101 调控亚基蛋白质或 p101 调控亚基多肽、肽或融合蛋白，例如，p101 调控亚基多肽或融合进一种标记 (例如酶、荧光、发光蛋白质或染料) 的 p101 调控亚基结构域，或 Ig-Fc 结构域。

一种体内检测蛋白质相互作用的方法，双杂交系统在此详尽描述，其仅仅为了说明而不意在限制。此系统的一个版本已被描述并且可从 Clontech (Palo Alto, CA) 购得。

简而言之，使用这样的系统，构建编码两种杂合蛋白质的质粒：一种质粒包括编码融合进编码 p101 调控亚基、p101 调控亚基多肽、肽或融合蛋白的 p101 核苷酸序列的转录激活子蛋白的 DNA 结合结构域的核苷酸，另一种质粒包括编码融合进一种 cDNA 的转录激活子蛋白的激活结构域的核苷酸，此 cDNA 编码已被重组进此质粒作为 cDNA 文库一部分的未知蛋白质。DNA 结合结构域融合质粒和 cDNA 文库被转化进含有一种报告基因 (例如，HBS 或 LacZ) 的酵母啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中。该报告基因其调节区域含转录激活子的结合位点。任何一种杂合蛋白单独不能激活报告基因的转录；DNA 结合结构域杂合体不能激活是因为它不提供激活功能；并且激活结构域杂合体不能激活是因为它不能定位于激活子的结合位点。两个杂合体蛋白质的相互作用重新组成有功能的激活子蛋白质并且导致报告基因的表达，这可以通过分析报告基因产物的实验检测。

双杂交系统或相关方法学均可用于筛选激活结构域文库以得到与“诱饵”基因产物相互作用的蛋白质。通过举例而不意在限制的方式，P101 调控亚基可用作诱饵基因产物。总的基因组或 cDNA 序列被融合进编码一种激活结构域的 DNA 中。此文库和编码融合进 DNA 结合结构域的诱饵 p101 基因产物杂合体的质粒被共转化进一种酵母报告株，并且从中筛选

表达报告基因的那些转化体。例如，不意在限制的，如图 1 中描述的诱饵 p101 基因序列诸如 p101（或 p101 的结构域）的开放阅读框可被克隆进一种载体中，以使载体通过翻译被融合进编码 GAL4 蛋白的 DNA 结合结构域的 DNA 中。纯化这些克隆并且分离负责报告基因表达的文库质粒。然后用 DNA 测序鉴定文库质粒编码的蛋白质。

使用本领域中常规运用的方法建立细胞系的 cDNA 文库，由此检测与诱饵 p101 基因产物相互作用的蛋白质。根据此处描述的特定系统，例如将 cDNA 片段插入载体以使它们通过翻译被融合进 GAL4 的转录激活结构域。此文库可与诱饵 p101 基因-GAL4 融合质粒共转染进含有由带 GAL4 激活序列的启动子驱动的 LacZ 基因的酵母株。cDNA 编码的蛋白质（其融合进与诱饵 p101 基因产物相互作用的 GAL4 转录激活结构域。）重组成活性 GAL4 蛋白质并且因此驱使 HIS3 基因的表达。可通过它们在含缺乏组氨酸的半固体琼脂基质培养基的培养皿上生长检测表达 HIS 的克隆。然后从这些菌株纯化 cDNA 并使用本领域常规运用的技术使 cDNA 用于产生和分离诱饵 p101 基因-相互作用蛋白。

5.5.3 干扰 p101 调控亚基/细胞内大分子相互作用的化合物的鉴定

为此讨论的目的，与 p101 调控亚基相互作用的大分子被称为“结合伴侣”。这些结合伴侣可能参与 p101 调控亚基信号传导途径，并且因此参与造血谱系细胞激活调控 p101 调控亚基的作用。已知的结合伴侣为 PI3K 激酶的催化亚基诸如 p120、p117 以及某些 p110 蛋白。其它结合伴侣可能为激活的三聚体 G 蛋白诸如 G β γ 亚基和/或脂质。因此，想要鉴定干扰或破坏这样的结合伴侣与 p101 之间相互作用的化合物，其可用于调节 p101 调控亚基活性并因此控制与 p101 调控亚基活性相关的造血谱系细胞激活紊乱。

用于鉴定干扰 p101 调控亚基与其结合伴侣或伴侣之间相互作用的化合物的实验系统的基本原理包含：在足够允许 5.5.1 和 5.5.2 部分中所述的 p101 调控亚基蛋白、多肽、肽或融合蛋白与结合伴侣相互作用并结合，形成复合物的条件和时间下，制备含这些蛋白和结合伴侣的反应混合物。

为了检验化合物的抑制活性，于存在或不存在受试化合物的情况下制备反应混合物。受试化合物可最初包括在反应混合物中或在加入 p101 调控亚基一部分及其结合伴侣之后的某个时刻被加入。温育无受试化合物或有安慰剂的对照反应混合物。然后检测 p101 调控亚基部分和结合伴侣之间形成的任何复合物。对照反应中而不是含受试化合物的反应混合物中复合物的形成提示化合物干扰 p101 调控亚基蛋白与相互作用的结合伴侣之间的相互作用。另外，含受试化合物和正常 p101 调控亚基蛋白的反应混合物内复合物的形成也与含受试化合物和突变的 p101 调控亚基的反应混合物内复合物的形成相比较。在想要鉴定破坏突变的而不是正常的 p101 调控亚基相互作用的化合物时，此比较很重要。

干扰 p101 调控亚基与结合伴侣之间相互作用的化合物的鉴定可以异源性或同源性方式进行。异源性鉴定包含将 p101 调控亚基一部分产物或结合伴侣锚定到固相上以及检测反应末期锚定在固相上的复合物。在同源性鉴定中，全部反应在液相中进行。任一种方法中，可改变反应物加入的顺序以得到关于受试化合物的不同信息。例如，通过竞争干扰相互作用的受试化合物可通过在受试物质存在下进行反应来鉴定；即，通过在加 p101 调控亚基一部分和相互作用的结合伴侣之前或同时将受试物质加入反应混合物中。另一可选的方法是，破坏预先形成复合物的受试化合物，例如有较高结合常数可取代复合物成分之一的化合物，可通过形成复合物后将受试化合物加入反应混合物中进行检测。以下简短描述不同的格式。

异源性鉴定体系中，将 p101 调控亚基一部分或相互作用的结合伴侣锚定在固体表面上，同时直接或间接标记未锚定的物种。实践中，可很方便地使用微孔板。通过非共价或共价吸附固定锚定物种。简单地在固体表面铺 p101 或 p120 基因产物或结合伴侣的溶液并干燥可完成非共价吸附。另一可选的方法是，可用针对被固定物种的固定化抗体将物种固定在固体表面。提前制备表面并贮存。

为进行鉴定，将固定化物种的伴侣暴露于有或无受试化合物的包被表面。反应结束后，除去未反应组分（例如，通过清洗）并且形成的任何复合物将保持固定在固体表面。可用许多方法完成锚定在固体表面上化合物

的检测。对于预先标记的未固定物种，检测到固定在表面上标记提示形成了复合物。对于没有预先标记的固定物种，可用间接标记以检测锚定在表面上的复合物；例如，使用对起初未固定物种特异的标记抗体（用标记的抗-Ig 抗体依次直接标记或间接标记抗体）。依赖加入反应组分的顺序，可检测抑制复合物形成或破坏预先形成复合物的受试化合物。

另一可选的方法是。在有或无受试化合物存在下在液相中进行反应，从未反应组分中分离反应产物，并且检测复合物；例如，使用对锚定溶液中形成的任何复合物的结合组分之一有特异性的抗体，以及对检测锚定的复合物的其它伴侣特异性的标记抗体。再次，依赖将反应物加入液相的顺序，鉴定抑制复合物或破坏预先形成的复合物的受试化合物。

在本发明另一实施方案中，可使用同源性鉴定。此方法中，制备预先形成的 p101 调控亚基一部分与相互作用的结合伴侣的复合物，其中或 p101 调控亚基或其结合伴侣被标记，但标记产生的信号因复合物的形成被淬灭（见，例如，为免疫分析使用此方法的 Rubenstein 的美国专利号 4,109,496）。与其竞争且置换得自预先形成的复合物的物种之一的受试物质的加入将导致背景上信号的产生。以此方法，可鉴定破坏 p101 调控亚基/细胞内结合伴侣相互作用的受试物质。

在一特定的实施方案中，可制备 p101 调控亚基的融合蛋白用于固定。例如，使用融合质粒如 pGEX-5X-1 将 p101 调控亚基或肽片段，（例如，相应于 CD），融合进谷胱甘肽-S-转移酶（GST）基因，以此在得到的融合蛋白中维持其结合活性。使用本领域中以及以上 5.3 部分描述的常规使用方法纯化相互作用的结合伴侣并用于产生单克隆抗体。例如通过本领域中常规使用的方法用放射性同位素 ^{125}I 标记此抗体。在异源性鉴定中，例如 GST-p101 调控亚基融合蛋白可被锚定在谷胱甘肽-琼脂糖珠上。然后以允许相互作用和结合发生的方式在有或无受试化合物时加入相互作用的结合伴侣。反应阶段的后期，清洗除去未结合的物质，并且将标记的单克隆抗体加入系统中并允许与复合物的组分结合。p101 或 p120 基因产物与相互作用的结合伴侣之间的相互作用可通过测定保持与谷胱甘肽-琼脂糖珠结合的放射性量而检测。受试化合物对相互作用的成功抑制

将导致测定的放射性降低。

另一可选的方法是, 在无固态谷胱甘肽-琼脂糖珠存在下, GST-p101 调控亚基融合蛋白和相互作用的结合伴侣可在液体中一起混合。在允许的物种相互作用期间或在相互作用之后向其中加入受试化合物。然后将此混合物加入谷胱甘肽-琼脂糖珠并且清洗除去未结合的物质。再次通过加入标记的抗体并测定结合于珠上的放射性检测 p101 调控亚基/结合伴侣相互作用的抑制程度。

在本发明的另一实施方案中, 使用相应于 p101 调控亚基和/或相互作用或结合伴侣 (在结合伴侣是蛋白质的情况下) 的结合结构域的肽片段, 而不是一种或两种全长蛋白质, 可运用这些相同技术。本领域中常规使用的任何一种方法均可用于鉴定和分离结合位点。这些方法包括但不限于编码其中一种蛋白质的基因的突变并且对共免疫沉淀分析中结合的破坏进行筛选。然后选择编码复合物中第二物种的基因中的补偿突变。编码各自蛋白质基因的序列分析揭示了相应于参与相互作用的结合的蛋白质区域的突变。另一可选的方法是, 使用上述的方法将一种蛋白质锚定到固体表面并且允许其与经蛋白水解酶诸如胰蛋白酶处理过的标记的结合伴侣相互作用和结合。清洗后, 含结合结构域的标记的肽保持与固态物质结合, 其可被分离以及通过氨基酸测序鉴定。而且, 一旦得到编码细胞内结合伴侣的基因, 可构建短基因片段以表达随后测定结合活性并且被纯化或合成的蛋白质的肽片段。

例如, 而不意在限制, 通过制造 GST-p101 调控亚基融合蛋白质并允许其与谷胱甘肽琼脂糖珠结合可将 p101 基因产物锚定于如上所述的固态物质。用放射性同位素诸如 ^{35}S 标记相互作用结合伴侣, 并且用蛋白水解酶诸如胰蛋白酶切割。然后将切割产物加到锚定的 GST-p101 融合蛋白中并允许结合。清洗除去未结合的肽后, 洗脱代表细胞内结合伴侣结合结构域的标记的结合物质, 用公知的方法纯化并分析其氨基酸序列。合成生产如此鉴定的肽或使用重组 DNA 技术融合进合适的蛋白中。

5.5.4 改善炎性紊乱的化合物的鉴定

化合物,包括但不限于通过诸如以上 5.5.1 到 5.5.3 部分中描述的那些鉴定技术鉴定的化合物,可检测其改善免疫系统紊乱症状包括炎症的能力。上述的分析可鉴定影响 p101 调控亚基活性的化合物(例如,与 p101 调控亚基结合、抑制天然配体的结合,以及激活信号传导(激动剂)或阻断激活(拮抗剂),以及与 p101 调控亚基的天然配体结合并中和配体活性的化合物);或影响 p101 或 p120 基因活性的化合物(通过影响 p101 或 p120 基因表达,包括影响或干扰剪接事件以调节 p101 调控亚基全长或截短形式的分子表达的,例如,蛋白质或小有机分子)。然而,应该注意此处描述的鉴定也鉴定调节 p101 调控亚基信号传导(例如,影响下游信号传递事件的化合物,诸如参加传导通过与 p101 调控亚基结合的催化亚基产生的 $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_3$ 信号传导的活性的抑制子或增强子)的化合物。影响 p101 或 p120 基因和/或 p101 或 p120 基因产物参与的 p101 调控亚基信号传导途径中另一步骤的化合物的鉴定和使用,因通过影响相同途径可调节 p101 调控亚基对造血谱系细胞激活紊乱发展的影响均包括在本发明的范围内。这样的化合物可用作处理造血谱系细胞激活紊乱的治疗方法的一部分。

本发明包含基于细胞的和基于动物模型的鉴定以鉴定显示改善造血谱系细胞激活紊乱症状的能力的化合物。这样的基于细胞的鉴定系统也可用作鉴定天然配体、催化亚基包括重组或合成产生的催化亚基和催化亚基突变体的标准。

基于细胞的系统可用于鉴定起改善造血谱系细胞激活紊乱症状作用的化合物。这样的细胞系统包括,例如表达 p101 和/或 p120 基因的重组或非重组细胞诸如细胞系。例如可使用白细胞或衍生自白细胞的细胞系。另外,基因工程改造的以表达功能性的 p101/p120 PI3K 并且应答由天然配体 $\text{G} \beta \gamma$ 亚基激活的表达宿主细胞(例如, COS 细胞、CHO 细胞、成纤维细胞、SF9 细胞),例如通过测量化学或表型改变、另一宿主细胞基因的引入、细胞内信使水平的改变(例如, $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, 等)可被用作鉴定的终点。

在使用这样的细胞系统中,在足够浓度和足够在暴露的细胞中引起这

样的造血谱系细胞激活紊乱症状的改善的时间下, 可将细胞与怀疑有改善造血谱系细胞激活紊乱症状能力的化合物接触。接触后, 分析细胞以测定 p101 或 p120 基因表达的改变, 例如通过分析细胞裂解物的 p101 或 p120 mRNA 转录物(例如, 通过 Northern 分析)或细胞中表达的 p101 或 p120 蛋白; 调控或调节 p101 或 p120 基因表达的化合物是治疗的有价值的候选者。另一可选的方法是, 检查细胞以确定一或多种造血谱系细胞激活紊乱样细胞表型是否已被改变以与更正常的或更野生型的表型或更可能产生较低发生率或严重性的紊乱症状的表型相似。更进一步, 鉴定 p101 调控亚基是其一部分的信号传导途径组分的表达和/或活性, 或 p101 调控亚基信号传导途径本身的活性。

例如, 细胞接触化合物后, 分析细胞裂解物中存在的第二信使 PtdIns(3,4,5)P₃ 水平的增高, 与得自未接触的对照细胞相比较。在这些鉴定系统中受试化合物抑制第二信使产生的能力表明受试化合物抑制通过 p101 调控亚基激活开始发起的信号传导。用阴离子交换型 HPLC 可很容易的分析细胞裂解物。另一可选的方法是, 以如此处全文引入作为参考的如 Wymann 等, 1987, 分析生物化学, 165: 371-378 中所述通过监测源自辣根过氧化酶催化的鲁米诺氧化化学发光分析超氧化产生或 O₂ 的水平。最后, 使用本领域技术人员周知的技术鉴定完整细胞的细胞粘附性的改变。

另外, 基于包括例如小鼠的动物的造血谱系细胞激活紊乱系统可用于鉴定能改善造血谱系细胞激活紊乱样症状的化合物。这样的动物模型可用作鉴定在治疗这样的紊乱中有效的药物、药剂、疗法以及干预的检验系统。例如, 将怀疑有改善造血谱系细胞激活紊乱症状的化合物以在所接触的动物中足以显示改善造血谱系细胞激活紊乱症状的浓度和时间接触动物模型。通过评价与造血谱系细胞激活紊乱相关的紊乱诸如炎症的逆转来监测动物对接触的反应。至于干预, 任何逆转造血谱系细胞激活紊乱样症状的任一方面的治疗可被看作人造血谱系细胞激活紊乱治疗干预的候选者。通过得自如下讨论的剂量-反应曲线确定受试试剂的剂量。

5.6 与 G 蛋白激活的 PI3K 的刺激相关的疾病，包括炎性紊乱的治疗

本发明还包含修饰造血谱系细胞激活和处理造血谱系细胞激活紊乱，包括炎性紊乱的方法和组合物。例如通过降低 p101 基因表达水平和/或 p101 调控亚基基因活性，和/或下调 p101 调控亚基途径的活性（例如，通过干扰 p101 调控亚基与 p120 催化亚基之间的相互作用，或通过以下游信号传递为靶的事件），白细胞对激活三聚体 G 蛋白偶联受体的因子（诸如细胞因子）的反应可被降低并且慢性炎性紊乱的症状可得到改善。相反的，通过增加 p101 调控亚基活性可增强白细胞对 G 蛋白偶联受体的激活的反应。例如，这样的增强可用作促进免疫系统对感染的反应。

5.6.1 抑制 p101 衔接子的表达或 p101 衔接子的活性以降低 G 蛋白激活的 PI3K 活性并减轻炎症

中和催化亚基或抑制 p101 或 p120 基因的表达（或者转录或者翻译）的任何方法可用以减轻炎性反应。这样的方法可用以治疗炎性反应紊乱诸如关节炎（包括类风湿性关节炎）、脓毒性休克、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺炎、哮喘以及其它肺部疾病、过敏、再灌注损伤、动脉粥样硬化以及其它心血管疾病、阿尔茨海默病和癌症，此处仅例举了一些炎性紊乱。

在一个实施方案中，设计免疫疗法以降低内源性 p101 或 p120 基因表达水平，例如，使用反义或核酶方法以抑制或阻止 p101 或 p120 mRNA 转录物的翻译；三螺旋方法以抑制 p101 或 p120 基因的转录；或靶向同源重组以使 p101 或 p120 基因或其内源性启动子失活或“敲除”。

反义方法包含与 p101 或 p120 调控亚基 mRNA 互补的寡核苷酸（或者 DNA 或者 RNA）的设计。反义寡核苷酸与互补的 p101 或 p120 mRNA 转录物结合并阻止翻译。尽管优选，但不必绝对互补。如此处提及的与一种 RNA 的一部分“互补”的序列意味着有足够互补能与 RNA 杂交形成一种稳定双螺旋的序列。在双链反义核酸情况下，这样可检测双螺旋 DNA 的一条单链，或鉴定三螺旋形成。杂交的能力取决于互补的程度和反义核酸长度。通常，杂交的核酸越长，它所含的与 RNA 碱基的错配就越多并

例如, Zon, 1988, 药学研究 5: 539-549)。最后, 寡核苷酸可与另一分子连接, 例如, 肽、杂交引发的交联试剂、转运试剂、杂交引发的裂解试剂, 等等。

反义寡核苷酸包含至少一个修饰过的碱基部分, 其选自包括但不限于 5-氟尿嘧啶, 5-溴尿嘧啶, 5-氯尿嘧啶, 5-碘尿嘧啶, 次黄嘌呤, 黄嘌呤, 4-酰基胞嘧啶, 5-羧羧甲基尿嘧啶, 5-羧甲氧甲基-2-硫尿嘧啶, 5-羧甲氧甲基尿嘧啶, 双氢尿嘧啶, β -D-galactosyl queosine, 肌苷, N6-异戊烯基腺嘌呤, 1-甲基鸟嘌呤, 1-甲基肌苷, 2,2-双甲基鸟嘌呤, 2-甲基腺嘌呤, 2-甲基鸟嘌呤, 3-甲基胞嘧啶, 5-甲基胞嘧啶, N6-腺嘌呤, 7-甲基鸟嘌呤, 5-甲氧甲基尿嘧啶, 5-甲氧基甲基-2-硫尿嘧啶, β -D-mannosyl queosine, 5'-甲氧羧甲基尿嘧啶, 5-甲氧基尿嘧啶, 2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤, 尿嘧啶-5-氧乙酸(v), wybutoxosine, 假尿嘧啶, queosine, 2-硫胞嘧啶, 5-甲基-2-硫尿嘧啶, 2-硫尿嘧啶, 4-硫尿嘧啶, 5-甲基尿嘧啶, 尿嘧啶-5-羧乙酸甲酯, 尿嘧啶-5-羧乙酸(v), 5-甲基-2-硫尿嘧啶, 3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶, (acp3)w, 以及 2,6-双氨基嘌呤的基团。

反义寡核苷酸也包含至少一种修饰过的糖部分其选自包括但不限于阿拉伯糖, 2-氟阿拉伯糖, 木酮糖以及己糖的基团。

在另一实施方案中, 反应寡核苷酸包含至少一处修饰过的磷酸骨架选自硫代磷酸酯, 二硫代磷酸酯, 氨基硫代磷酸酯, 氨基磷酸盐, 二氨基磷酸盐, 甲基膦酸盐, 烷基磷酸三酯, 以及 formacetal 或其类似物的基团。

在又一实施方案中, 反义寡核苷酸是 α -异头寡核苷酸。 α -异头寡核苷酸与和通常 β -单位相反的链之间平行走向的互补 RNA 形成特殊的双链杂合体 (Gautier 等, 1987, 核酸研究, 15: 6625-6641)。此寡核苷酸为 2'-O-甲基核糖核苷酸 (Inoue 等, 1987, 核酸研究 15: 6131-6148), 或嵌合的 RNA-DNA 类似物 (Inoue 等, 1987, FEBS Lett. 215:327-330)。

本发明的寡核苷酸可通过本领域中已知的标准方法合成, 例如, 通过使用自动 DNA 合成仪 (诸如购于 Biosearch, Applied Biosystems, 等)。

作为例子, 硫代磷酸酯寡核苷酸可通过 Stein 等, 1988, 核酸研究, 16: 3209 的方法来合成。使用控制的微孔玻璃多聚支持物制备甲基膦酸寡核苷酸 (Sarin 等, 1988, 美国国家科学院院报 85:7448-7451)。

虽然可使用与 p101 或 p120 编码区域序列互补的反义核苷酸。但优选那些与被转录的非翻译区互补的。

将反义分子输运至在体内表达 p101 调控亚基的细胞, 例如, 造血来源的细胞诸如血小板、嗜中性粒细胞以及其它白细胞。已发展了许多方法用于将反义 DNA 或 RNA 输运至细胞; 例如, 直接将反义分子注射进组织或细胞衍生位点, 或全身性施用被设计定向于所期望的细胞 (例如, 连接于肽或针对特异性结合的受体或表达在靶细胞表面抗原的抗体的反义分子) 的修饰过的反义分子。

然而, 通常很难达到有效抑制内源性 mRNA 翻译的反义分子的细胞内浓度。因此, 优选的方法使用含置于强 pol III 或 pol II 启动子控制下的反义寡核苷酸的重组 DNA 构建体。使用这样的构建体转染病人的细胞将导致足够量的单链 RNA 转录此 RNA 与内源性 p101 或 p120 转录物形成互补碱基对并且因此阻止 p101 或 p120 mRNA 的翻译。例如, 将载体在体内导入以使被细胞吸收并且指导反义 RNA 的转录。这样的载体保持游离着或与染色体整合, 只要它能被转录以产生所要的反义 RNA。可用本领域中重组 DNA 技术标准方法构建这样的载体。载体可为在哺乳动物细胞中用于复制和表达的质粒、病毒、或本领域中已知的其它种类。编码反义 RNA 序列的表达可通过本领域中已知的在哺乳动物优选为人类细胞中起作用的任何启动子。这样的启动子可为诱导型或组成型。这样的启动子包括但不限于: SV40 早期启动子区域 (Bernoist 和 Chambon, 1981, 自然, 290:304-310), 包含在劳氏肉瘤病毒 3' 长末端重复序列中的启动子 (Yamamoto 等, 1980, 细胞 22:787-797), 疱疹胸苷激酶启动子 (Wagner 等, 1981, 美国国家科学院院报 78:1441-1445), 金属硫蛋白基因的调控序列 (Brinster 等, 1982, 自然 296:39-42) 等等。任何类型的质粒、粘粒、YAC 或病毒载体均可用于制备可直接引入组织或细胞衍生位点内例如, 骨髓的重组 DNA 构建体。另一可选的方法是, 在以另一

途径完成给药的情况下（例如，全身性地）可使用选择性感染所要的组织或细胞类型的病毒载体（例如，感染造血谱系细胞的病毒）。

被设计催化性裂解 p101 或 p120 mRNA 转录产物的核酶分子也可用于阻止 p101 或 p120mRNA 的翻译以及 p101 调控亚基的表达（见，例如，PCT 国际公开文本 WO90/11364, 1990 年 10 月 4 日公开；Sarver 等, 1990, 科学 247:1222-1225）。虽然可使用在识别序列特异的位点裂解 mRNA 的核酶破坏 p101 或 p120 mRNA, 优选使用锤头核酶。锤头核酶在与靶 mRNA 形成互补碱基对的侧翼区域支配的位置切割 mRNA。唯一的要求是靶 mRNA 有如下两个碱基的序列：5'-UG-3'。锤头核酶的构建和生产为本领域众所周知并在 Haseloff 和 Gerlach, 1988, 自然, 334; 585-591 中有详细描述。人类 p101 或 p120cDNA 核苷酸序列中有好几百可能的锤头核酶切割位点（图 3）。优选的改造核酶以使切割识别位点位于 p101 或 p120 mRNA 的 5'端附近；即，提高效率并且使非功能性 mRNA 转录物的细胞内积累最小。

本发明的核酶也包括 RNA 核糖核酸内切酶（此处往下“Cech-型核酶”）诸如嗜热四膜虫（已知如 IVS, 或 L-19IVS RNA）中天然存在并且已被 Thomas Cech 及合作者（Zaug 等, 1984, 科学, 224:574-578; Zaug 和 Cech, 1986, 科学, 231:470-475; Zaug 等, 1986, 自然, 324:429-433; 大学专利公司公开的国际专利申请 No. WO88/04300; Been 和 Cech, 1986, 细胞 47:207-216）详尽描述的那种。Cech-型核酶有与靶 RNA 序列杂交的八个碱基对活性位点，之后发生靶 RNA 的切割。本发明包含那些指向 p101 或 p120 中存在的八个碱基对活性位点序列的 Cech-型核酶。

在反义方法中，核酶可由修饰过的寡核苷酸组成（例如，为改善的稳定性，靶向性，等等）并且被输送至体内表达 p101 调控亚基的细胞，例如，嗜中性粒细胞。优选的输送方法包括在强组成型 pol III 或 pol II 启动子控制下使用“编码”核酶的 DNA 构建体，以使被转染的细胞产生足以破坏内源性 p101 或 p120 信息并抑制翻译的核酶。因为不象反义分子，核酶是催化性的，为保证效率需较低的细胞内浓度。

利用靶向同源性重组使 p101 或 p120 基因或其启动子失活或“敲除”

也可降低内源性 p101 或 p120 基因表达（例如，见 Smithies 等, 1985, 自然 317:230-234; Thomas & Capecchi, 1987, 细胞 51:503-512; Thompson 等, 1989, 细胞, 5:313-321; 此处全文引入作为参考）。例如，有或无选择性标记和/或负性选择性标记时使用侧翼与内源性 p101 或 p120 基因（p101 或 p120 基因的编码区域或调控区域）同源的 DNA 的突变的非功能性的 p101 调控亚基（或完全不相关的 DNA 序列）转染体内表达 p101 调控亚基的细胞。通过靶向同源重组 DNA 构建体的插入导致 p101 或 p120 基因的失活。这样的方法尤其适合于使用对 ES（胚胎干）细胞作修饰产生带失活 p101 调控亚基的动物后代的农业领域（例如，见 Thomas 和 Capecchi, 1987 以及 Thompson 1989, 出处同前）。然而，可修改此方法用于人体，只要运用合适的病毒载体在体内直接施用重组 DNA 构建体或靶向体内所期望的位点。

另一可选的方法是，通过定向于与 p101 或 p120 基因的调控区域（即，p101 或 p120 启动子和/或增强子）互补的脱氧核苷酸序列以形成阻止体内靶细胞中 p101 或 p120 基因转录的三螺旋结构，可降低内源性 p101 或 p120 基因表达（一般见，Helene, C., 1991, Anticancer Drug Des., 6(6):569-84; Helene, C. 等, 1992, Ann. N.Y. Acad. Sci., 660:27-36; 以及 Maher, L.J., 1992, 生物鉴定(Bioassays) 14(12):807-15）。

在本发明另一实施方案中，使用“显性失活(dorminant negative)”方法干扰 PI3K 的三聚 G 蛋白 PI3K 的活化可降低 p101 调控亚基的活性。至此，编码缺陷型 p101 调控亚基的构建体可用于基因治疗方法中使合适的靶细胞中 p101 调控亚基的活性消失。例如，其中 G β γ 相互作用结构域缺失或突变的指导 p101 调控亚基的宿主细胞表达核苷酸序列可被引入造血细胞（通过上述的或体内体外基因治疗方法）。另外，仅编码 p101 功能性结构域的核苷酸序列可用作天然 p101/p120 相互作用的抑制剂。另一可选的方法是，靶向同源重组可用于将这样的缺失或突变引入受治疗者骨髓中的内源性 p101 或 p120 基因。构建的细胞将表达非功能性受体（即，能结合催化亚基但不能刺激应答 G 蛋白激活的催化活性的调节亚基）。这样的构建细胞，即嗜中性粒细胞或其它白细胞谱系，证明对于细

胞外趋化因子的 G 蛋白偶联受体的激活反应消失，导致炎性表型减少。

5.6.2 恢复或提高 p101 调控亚基的表达或活性以促进免疫系统激活

关于正常 p101 或 p120 基因表达水平及/或 p101 调控亚基基因产物活性的提高，可用 p101 或 p120 核酸序列治疗造血谱系细胞激活紊乱，包括免疫系统对趋化因子的反应性降低。如果导致免疫系统功能失调的原因是缺陷的 p101 调控亚基，可采用例如基因置换治疗的疗法。具体而言，正常 p101 基因的单或多拷贝或指导表达具有正常功能的 p101 基因产物的 p101 基因的一部分，可利用载体注射入患者或动物体内的适当细胞中。载体包括但不限于腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒和疱疹病毒载体，还包括其它将 DNA 导入细胞的粒子如脂质体。

由于 p101 或 p120 基因在造血谱系细胞内，包括嗜中性粒细胞和其它白细胞内表达，这种基因置换治疗的技术应当可以将 p101 或 p120 基因序列输运入患者的这些细胞类型中。或者，可利用靶向同源重组来校正合适细胞类型中的例如，骨髓细胞或嗜中性粒细胞和/或其它白细胞缺陷型内源 p101 或 p120 基因。对于动物，靶向同源重组可用于校正 ES 细胞中的缺陷，以得到具有校正了的基因的后代。

最后，上述已鉴定的化合物可用于刺激免疫系统，这些复合物通过激活 p101 调控亚基刺激、增强或改变激活的 p101 调控亚基传导的信号，例如，可通过激活 p101 调控亚基级联中下游信号传递蛋白并因此避开缺陷的 p101 调控亚基。给药的制剂和方式则依赖于该化合物的理化性质。

5.7 药物制备和给药方法

已鉴定可影响 p101 或 p120 基因表达或 p101 调控亚基活性的这些化合物，或影响 p101 与它的任何结合伴侣的相互作用（结合伴侣包括但不限于催化亚基）的上述化合物可以按治疗有效剂量给予患者，以治疗或改善造血谱系细胞激活紊乱，包括炎性反应紊乱例如关节炎象风湿性关节炎、脓毒性休克、成人呼吸窘迫综合征（ARDS）、肺炎、哮喘和其它肺病、过敏、再灌注损伤、动脉粥样硬化和其它心血管疾病、阿尔茨海

默病以及癌症。治疗有效剂量是指化合物的量足以导致造血谱系细胞激活紊乱症状的改善。

5.7.1 有效剂量

上述化合物的毒性和疗效可以用细胞培养和实验动物的标准药学方法检测，例如，检测 LD_{50} （使群体的 50 % 死亡的剂量）和 ED_{50} （对群体的 50 % 有效的剂量）。毒性和疗效的剂量比例是治疗指数，它可表示为比例 LD_{50}/ED_{50} 。优选显示高治疗指数的化合物。虽然可以使用有毒副作用的化合物，但应当注意的是应设计一个精细的输运体系，使该化合物定位到所要影响的组织的位点，以最大程度地减少对未感染细胞潜在的伤害，由此减少副作用。

从细胞培养鉴定和动物研究获得的数据可以为人用剂量制定出范围。该化合物的剂量优选在包含极少或无毒性的 ED_{50} 的血药浓度范围之内。剂量可依据所采用的剂型和给药途径在此范围内浮动。对于本发明中的方法所用的任何化合物，治疗有效剂量可以从细胞培养鉴定中进行初步估计。调配用于动物模型的剂量以得到包括了细胞培养所确定的 IC_{50} （即，达到将症状半数抑制的所测化合物的浓度）的血浆浓度范围。上述结果可用于更精确地确定用于人的剂量。可用例如高效液相色谱的方法测定血浆中的浓度。

5.7.2 配方与使用

用于符合本发明的药物组合物可用一种或多种药学可接受的载体或赋形剂以传统方式进行调配。

因而，化合物和其药学可接受的盐以及溶剂化物可以通过吸入或吹入（通过口或鼻）给药，或口服、面颊给药，或肠胃外或直肠给药。

对于口服给药，药物组合物可以采用例如片剂或胶囊的形式，用药学可接受的赋形剂诸如结合剂（例如，预凝胶化的玉米淀粉，聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素）；填充物（例如乳糖，微晶体纤维素或磷酸氢钙）；润滑剂（例如，硬脂酸镁，滑石粉或二氧化硅）；崩解剂（例如，土豆淀粉或淀粉羟乙酸钠）；或湿化剂（例如，十二烷基硫酸钠）通过常规方法

酸钾的TLC板并在氯仿: 丙酮: 甲醇: 乙酸: 水 (40:15:13:12:8,v/v/v/v/v; Traynor-Kaplan等,1988)混合物中解析。

脂质/G蛋白亚基混合物制备如下: 真空干燥PtdIns(4,5)P₂(由Folch 磷酸肌醇流分2次通过固化新霉素的色谱循环制备)和PtdEtn(Sigma)(鉴定中分别足以形成50 μM和0.5mM的最终浓度)。在有些实验中包括PtdIns 4P(制备方法与PtdIns(4,5)P₂相似)和/或PtdIns(Sigma)。干燥的脂质在补加0.1% 胆酸钠的最终冲洗缓冲液(如上文)中超声破碎(室温下)。冰浴冷却后,以部分已分散的脂质原料与每次鉴定总共1 μl的一种混合物混匀,该混合物包括Gβγ存储缓冲液(1%胆酸盐;50 mM HEPES,pH 7.5,4℃, 0.1M NaCl;1mM DTT;0.5 mM EDTA),活性Gβγ,或得自3-7mg/ml原液的在存储缓冲液中煮沸过的等量Gβγ。在有些实验中,这1 μl混合物成分包括Gα亚基或在Gβγ与Gα亚基(或GDP结合的或激活的,见下文)在冰上预先混合10分钟情况下的存储缓冲液。

通过与10 mM NaF, 30 μM AlCl₃(A/F)冰浴10分钟激活Gα亚基(Gα:o,i₂和i₃的等摩尔比混合物,如文中所述进行制备,并存储在与Gβγ亚基相同的但不包括10 μM GDP的缓冲液);这些亚基被稀释的分析液也含有A/F。

a) 蛋白质纯化

直接将猪血(42批次)收集到21个容器中的抗凝剂中。在40分钟的收集 中血样/抗凝剂与3%(w/v)聚乙烯吡咯烷酮(PVP,360KD)与等渗盐液(4.2 份血混合物:0.8份PVP)混合。静置35分钟(25个容器中)后,红细胞已充分沉 降,可将上清虹吸出来并在1L的容器中离心(8分钟,1000 × g)。回收约28L 这种初级上清液。沉淀的细胞重悬于Hank's液使最终积累体积可放入两个 1L的离心瓶中。细胞经离心沉淀(8分钟,1000 × g)。吸出上清,细胞团块加 入70 ml冰冷水进行低渗透冲击(以裂解任何残余的污染红细胞)。混合20- 30秒后,加入77 ml 10 × Hank's液(无钙离子)。用Hank's液冲洗后,将细 胞收集到离心瓶中,沉淀并重悬于冰冷的500 ml 40 mM TRIS, pH 7.5, 4℃; 0.12 M NaCl; 2.5 mM MgCl₂的溶液中。加入2-异丙基氟磷酸(终 浓度0.5mM)置冰上5分钟后,沉淀细胞(约80-90ml总体积)并重悬于300ml

冰冷的40 mM TRIS, pH 7.5;0.1 M NaCl;2.5 mM MgCl₂;1 mM EGTA; 0.2 mM EDTA和抗蛋白酶I中。超声处理细胞悬液 (Heat Systems Probe公司超声器,设定为9.25, 4 × 15秒,每次爆破间混合一分钟,所有操作在冰上进行)后离心(2000 × g,10分钟)以沉淀未破碎细胞及细胞核(小于5%的细胞仍保持完整)。离心上清(100 000 × g,60分钟,4℃),轻轻倒出上清,合并后与EDTA、甜菜碱和DTT(终浓度分别为5mM、1%和1mM)混合,最后在液氮中冰冻及保存于-80℃。经这一方式制备的胞浆组分很典型地蛋白浓度为8-9 mg/ml (每次制备约2.5g蛋白)。一旦收集相当于750L血液 (18到42份制备, 9 × 10¹²个细胞, 40g蛋白质) 的胞浆并冻存于-80℃, 应间隔5小时分三批融化。这一步之后所有步骤均应在2-4℃进行。

新鲜融化的胞浆中补加Tween-20(终浓度 0.05%,w/v), 离心(20 000 × g, 30分钟, 2℃), 过滤(5 μ m 硝酸纤维素膜, 直径4.5cm, Whatman) 后以缓冲液K(见下文)稀释约2.5倍至最终导电率为200 μ S(4℃), 然后上样于一根经缓冲液K平衡的800ml(直径5cm)Fast Flow Q Sepharose 柱(用蠕动泵12.5ml/分钟)。稀释后胞浆总体积约15.5升。一旦加样, 以1升缓冲液K洗柱, 再用4.5升含0.1-0.6M NaCl线性梯度的缓冲液K以8ml/分钟流速洗脱。收集五十份1ml的流分。连续监测(后续步骤也如此)柱洗脱物的导电率和吸光率(280nm)。缓冲液K包括如下成份: 40mM TRIS/HCl, 1mM EGTA, 0.2 mM EDTA, 1%甜菜碱, 0.05% w/v Tween 20, 5 mM β -甘油磷酸, 4℃时pH 7.5, 含抗蛋白酶、亮肽素(leupeptin)、苯丁抑制素、抑胃酶肽A和抑肽酶各4 μ g/ml及0.1mM PMSF(‘抗蛋白酶 I’)的15 mM β -巯基乙醇。这一溶液及其后者均经0.2 μ m微孔过滤。

一旦相关流分经P13K方法鉴定, 将它们汇集后立即加样(10ml/分钟)于1.8 L Sephadex-G25-fine柱(直径5 cm),此柱已由18 升缓冲液L预平衡(仅最后2升含抗蛋白酶II), (缓冲液L包括:5 mM β -甘油磷酸, 20 mM KCl, 0.05% w/v Tween 20, 1% 甜菜碱, 0.1 mM EDTA, 10 mM磷酸钾, 4℃时pH 7.0, 15 mM β -巯基乙醇加抗蛋白酶 II)。Q Sepharose柱脱盐的汇集物立即上样(5ml/分钟)于80ml 羟基磷灰石(直径2.6cm, Macroprep-ceramic, BioRad 公司), 此柱已经由1升缓冲液M(5mM

M HEPES, 4℃时pH 6.9, 15mM β -巯基乙醇。

得自A和B的相关流分各自合并(两者总体积均有6ml)用缓冲液R稀释到24ml(终导电率250 μ S, 4℃), 并上样(0.8ml/分钟)于一个丙烯酸基质阳离子交换型HPLC柱(体积2.5ml, BioRad), 以25ml其中含KCl(0.1-0.6M线性梯度)的缓冲液R洗脱。洗脱物收集于1ml单位流分中。缓冲液R包含: 1.0%甜菜碱, 0.05% w/v Tween 20, 1mM EGTA, 0.2 EDTA, 20 mM HEPES, 4℃时pH6.8, 15mM β -巯基乙醇加上抗蛋白酶I。

合并相关流分((A) 3ml, (B) 2ml), 用缓冲液S(终导电率180 μ S, 4℃)稀释7倍, 然后上样(0.15ml/分钟)于Mini Q柱(0.24ml, 工作于Parmacia Smart系统)。此柱以1ml缓冲液S冲洗, 并用含0.1-0.5M NaCl线性梯度的缓冲液S以0.1ml/分钟流速洗脱。洗脱物收集于75 μ l单位流分中。缓冲液S包含: 1.0% 甜菜碱, 0.05% w/v Tween 20, 1mM EGTA, 0.2mM EDTA, 2 mM β -甘油磷酸, 10mM Tris, 4℃时pH7.7, 1mM DTT(无抗蛋白酶)。

整个纯化过程中蛋白质浓度按以下四种方式估计:(a)利用蛋白结合染色(BioRad, 这一方法仅用于裂解物、胞浆和Q Sepharose流分); (b)通过积分280nm吸收峰区(这一方法可由染色结合鉴定校正); (c)过滤器上的蛋白经丽春红S染色, 并与相近固定化标准定义的组分的染色强度比较; 以及(d)经SDS-PAGE凝胶解析后的蛋白质, 用考马斯R250染色, 并与同一胶上已知浓度的蛋白组分比较。

PI3K的最终制备物(首步纯化品)与100nM [3 H]-17-羟基-渥曼青霉素(17.7 Ci mmol⁻¹, Amersham, 定制)温育, 经SDS-PAGE解析, 考马斯兰染色, 并拍照。然后用荧光自显影检测 [3 H]。

6.2 结果

经离子交换色谱分析猪嗜中性粒细胞胞浆表明它包含有G β γ 激活的PI3K活性, 与已在U937细胞及骨癌细胞中描述的有相似性质。用 [3 H]-17-羟基-渥曼青霉素作为探针鉴定由表观大小为117KD、120KD的蛋白双

联体, 此双联体洗脱于含有G β γ 激活的PI3K活性的流分中,而且其含量为由p110 α 和/或p110 β 结合的 $[^3\text{H}]$ -17-羟基-渥曼青霉素水平的2-4%(见图5)。进一步纯化此G β γ 激活的PI3K活性峰(所有图、表详述了经最终测序的PI3K制品的纯化过程)。在此过程中,它被分成的两个峰(A和B)均表现出明显的、内在的、相关的220KD分子量。一旦基本纯化,如考马斯染色SDS-PAGE胶鉴定所示,就明确表现出两种活性与两种蛋白质共同迁移:(A)117KD蛋白(其特异性结合 $[^3\text{H}]$ -17-羟基-渥曼青霉素并因此被推定为催化亚基)和101KD蛋白;以及(B)120KD蛋白(也结合 $[^3\text{H}]$ -17-羟基-渥曼青霉素)和101KD蛋白。这一结果表明PI3K活性物在其天然状态下是p117/p101和p120/p101异源二聚体。在其最终形式中,PI3K的A和B从嗜中性粒细胞裂解物中被纯化约180,000倍和380,000倍(从血液中纯化了1,000,000,000倍)且活性总回收率为5.5%。表1表明了每个步骤中蛋白质和PI3K活性的回收率。

表1猪白细胞G蛋白 β γ 亚基激活的PI3K的纯化

活性汇集物	汇集物总蛋白	汇集物体积	汇集物总活性	纯化倍数
胞浆	40g	15l	100%	1
Q-Sepharose 脱盐	1.5g (1.5g)	40ml (450ml)	90% (124%)	24
羟基磷灰石	162mg	100ml	125%	309
肝素Sepharose 峰A	19mg	15ml	46%	970
峰B	12mg	15ml	53%	1769
Mono Q汇集物A	5.4mg	3ml	16%	1187
B	1.4mg	3ml	15%	4291
体积排阻(采用850 μ l)A	0.722mg	6ml	16%	8902
B	0.2mg	6ml	15.5%	51038
阳离子交换A	0.13mg	3ml	6%	18489
B	0.014mg	2ml	9.5%	271761
Mini Q汇集物获自A	15 μ g	0.225ml	2.2%	58754
获自B	10 μ g	0.225ml	3.1%	174151

与p85/p110家族成员对比,这种浓缩的程度与这些蛋白质结合的 $[^3\text{H}]$ -17-羟基-渥曼青霉素的量一致。因此所有这些蛋白认为是低丰度的。

PI3K A和B的纯化制品就其脂肪激酶活性而言没有差异。两种制品均 (a)以 $\text{G}\alpha$ -GDP敏感方式被 $\text{G}\beta\gamma$ 亚基激活超过100倍;(b)可被100nM 渥曼青霉素(鉴定中含 $5\mu\text{M}$ ATP)完全抑制;(c)在有或无 $\text{G}\beta\gamma$ s时对可激活p85/p110家族PI3K达5倍(见图6)的酪氨酸磷酸化肽不敏感;(d)能3磷酸化PtdIns, PtdIns4P 和PtdIns(4,5) P_2 (这些产物可由依次去酰化和脱甘油后用 $[^3\text{H}]$ -内标记标准物进行 $[^{32}\text{P}]$ -标记的水溶性产物的阴离子交换型HPLC分析来鉴定)。更进一步,通过利用 γ -磷酸化的ATP作为磷酸供体,PI3K的A和B纯化制品表现出了后一底物最低的表观 K_m 值(A和B分别为8和 $10\mu\text{M}$) (结果未发表)。

7. 实施例: 猪 $\text{G}\beta\gamma$ -活化的PI3K A 和B的肽的序列测定

在此实施例中,以氨基酸测序分析两种猪PI3K 蛋白。自相当于40g 胞浆蛋白纯化的PI3K A和B被Western杂交印记在硝酸纤维素膜上,经丽春红S染色,切下相应于所有四种亚基的条带,用胰酶处理后再进行内部氨基酸序列分析。

7.1 材料与方

肽生成与肽测序。用于测序的蛋白等分试样用Western杂交点于(用湿点样器)硝酸纤维素膜($0.45\mu\text{m}$ 孔径BA 85, Schleicher和Schuell)上。转移缓冲液包含:192mM甘氨酸,25mM TRIS 和10% v/v 甲醇。在最终转移单位安装前,凝胶/滤膜三明治(-)边上支撑的Whatman No.1滤纸以及凝胶(1mm 厚)浸于(2-3分钟)含0.0005%(w/v) SDS的转移缓冲液。采用恒定35V(0.25-0.35安培,5℃)共转移16小时。滤膜用含于1%乙酸中的0.1% 丽春红S染色1分钟,然后在1%乙酸中脱色1分钟。上样于凝胶的约85-90%的蛋白可由滤膜回收。从硝酸纤维素膜中切出感兴趣的条带,按文献(Tempest等,1990,电泳, 11:537-552)经修正(Liu等,1990)后进行内部氨基酸序列分析。简述如下:用 $0.5\mu\text{g}$ 胰酶(Promega, Madison, WI)在 $25\mu\text{l}$ 100mM

NH_4HCO_3 中(补加1% 两性试剂 3-16)于37℃进行原位蛋白水解2小时。所获得的肽混合物分别用0.1% β -巯基乙醇(BioRad, Richmond,CA)和0.3%4-乙烯基嘧啶(Aldrich,Milwaukee,WI)还原及S-烷基化,并利用反相HPLC 分步收集。也在一个相同大小的硝酸纤维素膜条上处理酶空白对照。

HPLC溶剂和系统结构可见文献(Elicone等,1994),除了使用2.1mm 214 TP54 Vydac C4柱(Separations Group, Hesperia,CA)且带有梯度洗脱,流速为100 μl /分钟。含Try 肽的鉴定可通过297nm和277nm处光吸收比的分析手工进行,采用Applied Biosystems (Foster City,CA) 100 0S 型二极管阵列检测仪(Erdjument-Bromage等, 1994)进行实时检测。手工收集流分,在走柱期间将其置于冰上,然后于分析前置于-70℃保存。

分析纯化的肽段采用自动Edman降解及矩阵辅助激光吸收离子飞行时间(MALDI-TOF)质谱仪联合进行;这种联合方法的细节,包括质量辅助的化学后测序路径,能在其它地方查到(Geromanos等,1994,蛋白质化学技术 (Techniques in Protein Chemistry) V 143-150; Elicone等,1994,色谱杂志 (J. Chromatogr.) 676:121-137; Erdjument-Bromage 等,1994,蛋白质科学 (Protein Sci.) 3:2435-2446)。保存后,在上样于测序仪圆盘和质谱仪屏极上之前,柱流分补加洁净TPA(以达到终浓度10%)。质量分析(2%等分样品上)利用Voyager RP MALDI-TOF仪器(Vestec/PerSeptive,Framingham,MA)连同 337nm输出氮激光, 1.3m飞行管和作为基质的 α -氰基-4-羟基桂皮酸(购自Linear Sci.,Reno ,NV的预制溶液)以线形模式进行。采用30KV离子加速电压(栅极电压70%,指导线电压为0.1%)和-2.0KV多重电压。利用TDS 520 Tektronix(Beaverton,OR)数码示波器,根据特异最大值的最佳偏转来调节激光通量和获取数量。利用GRAMS(Galactic, Salem,NH)数据分析软件自飞行时间文件中可产生Mz (质荷比)光谱。每个样品按文献(Geromanos等,1994)在有和无两种校正物(APID和P8930, 每个25飞摩尔)分析两次。化学测序(95%的样本)采用477A型Applied Biosystems(AB)仪器进行。逐步释放的PTH-氨基酸用装有PTH C18(2/1 $\times$ 220mm;颗粒大小5 μm)柱(AB)的'在线'120A HPLC系统(AB)来鉴

定。根据文献(Erdjument-Bromage等,1994,蛋白质科学,3:2435-2446;Tempst等,1994,Methods Companion Meth.Enzymol.6:284-261) 仪器和步骤按飞摩尔级水平的带硫海因(thihydantoin)氨基酸分析进行了优化。

肽平均异构体质量用ProComp 1.2版软件(从P.C.Andrews博士, Michigan大学,Ann Arbor,MI处获得)根据已知氨基酸残基(包括推定的那些)加和而成。

根据PDGF β R中酪氨酸740和751附近序列在Babraham研究所利用显微化学设备制备两重酪氨酸磷酸化的肽(18个残基)。

7.2 结果

肽测序数据立即解决了关于这些蛋白之间关系的一些问题。来源于PI3K A和B的p101是相同的并且在开放阅读框架的483位点鉴定出相对共同的等位基因变异体(注明在图4), 即一个丝氨酸被甘氨酸代替。p117和p120表现出完全相同的胰蛋白酶HPLC峰形, 并且除一个源于p117的氨基端封闭的肽外,从两个物种已测序的所有明显共有的肽段是相同的(见下文)。然后肽序列信息用于设计钓出编码这些蛋白的核苷酸序列的探针。

8. 实施例: 编码猪的p120和p101的cDNA的克隆

以猪p120肽序列和猪p101肽序列为基础的简并性寡核苷酸探针用于筛选以寡聚dT为引物的扩增的cDNA文库(从猪嗜中性粒细胞poly-A选择性RNA制成)。以下叙述编码p101和p120蛋白的cDNA的克隆和表征。

8.1 材料与方法

我们从 4.2×10^9 个猪嗜中性粒细胞中制备0.7mg总RNA(Chomczynsk & Sacchi, 1987,分析生物化学 (Anal. Biochemistry) 162:156-159)。Stratagene(San Diego,CA)使用此RNA产生Poly A选择性mRNA, 由此他们在 λ ZAPII中制备寡聚dT引物和随机引物的cDNA文库(分别约为 5.4×10^6 和 3.2×10^6 初级p.f.u.)。扩增文库由约 2×10^6 个原始重组子构建而成, 并通过标准方法用于筛选p120和p101 cDNA。

利用基于得自p120肽序列的 $[^{32}\text{P}]$ -标记的寡聚物[CA(T/C) GA(T/C)

TT(T/C) ACI CA(A/G) CA(A/G) GTI CA(A/G) GTI AT(T/C/A) GA (T/C) ATG](SEQ ID NO: 5)来筛选得自以寡聚dT为引物的 2.5×10^6 个空斑。基于质粒和两条测序过的DBA链如BluescriptTM分离鉴定了12个阳性克隆（在Babraham研究所采用ABI自动测序设备）。这些质粒的插入序列代表带有两个定义编码所有源于p117/p120胰酶消化物的全部肽序列的全长开放阅读框架的一系列重叠的克隆（图4）。

用 $[^{32}\text{P}]$ -标记的基于得自p101的肽序列的寡聚物[GCI TA(T/C) AT G GA(A/G) GA(T/C) ATI GA(A/G) GA](SEQ ID No:6)从寡聚dT引物文库中筛选衍生 0.9×10^6 个空斑。对一个阳性克隆进行了检定、分离、测序。此克隆的5'端(D11)代表了胰酶水解肽段之一的一部分序列，因此鉴定它为一个部分克隆。利用源自D11的 $[^{32}\text{P}]$ 标记的Cla I限制性酶切片段进一步从以寡聚dT引物文库中筛选了 0.6×10^5 个空斑。鉴定了66个阳性克隆，分离了其中49个，对其中一些进行部分测序。这些克隆代表一系列部分重叠克隆，它们均含有D11序列但都小于D11自身。再用得自D11的 $[^{32}\text{P}]$ 标记的Apa I限制性酶切片段从随机引物文库中筛选了 3.5×10^6 个空斑。检定出98个阳性克隆。这些克隆再用基于PCR的方法，以针对BluescriptTM载体设计的引物(正向或反向引物)和内部D11序列，对这些克隆进行再筛选（在初级空斑分离物的阶段）。这使我们能够鉴定(不依赖于方向)最长的编码p101序列的可能的N端延伸。分离及测序带有最大PCR片段的三个克隆进行。这些代表部分重叠的克隆与D11一起，确定了一个编码源自p101胰酶消化物所有肽序列的全长开放阅读框架（图1和图2）。

8.2结果

两个克隆确定了一个编码所有p117/p120胰酶消化肽的全长开放阅读框架（见图1-4）。在三个可能的起始蛋氨酸中，基于对氨基端封闭的p120衍生的多肽的测量分子量与由三个蛋氨酸中每个作为起始翻译点所推出的氨基端肽的理论分子量之间的精确比较，确定中间的一个有活性（与Stoyanov等1995，科学269:690-693的假定相反）。这样，p120的理论大小为126KD。比较由p117得到的氨基端封闭的肽与p120氨基端相关区

域,表明两者没有精确重合(允许正常氨基端封闭)。这样p117既不象是从p120蛋白水解性修饰或翻译后修饰而成的,也不像由p120内的第二翻译起始点而得到的。但是编码p117开放阅读框架的cDNA还未分离出来。

用定义p120的蛋白和DNA序列在数据库中寻找相似的结构。鉴定与所有已被克隆的PI3K的相似性。然而,序列除种属差异外,与p110 γ 几乎一样(Stoyanov等,1995),我们得到的序列与Stoyanov等人的唯一显著不同发现在远端COOH端中。仅根据一级结构,还不能肯定p120中COOH端血小板-白细胞C激酶底物同源性区域的鉴定。

通过利用来自猪嗜中性粒细胞的源于寡聚dT和随机引物的cDNA文库的几个重叠片段,定义了一个编码源于p101所有肽序列的全长开放阅读框架。鉴定了一个源于p101的氨基端封闭的肽;它的大小精确等同于从所述开放阅读框架预测起点所定义的前12个残基的预计的氨基端乙酰化的形式的分子量。预测的相应p101分子量是97kD。虽然在蛋白和DNA序列库中寻找过相似结构或亚结构,但没有发现有明显相同的序列。

9. 实施例: 编码人p120和p101的cDNA的克隆

源于猪p101和p120 cDNA序列放射性标记的PCR产物被成功地用于筛选人类cDNA文库中的同源物。编码人p101和p120 cDNA的克隆及表征叙述如下:

9.1 人p101

用相应于猪p101 cDNA序列887-1287的放射性标记PCR产物筛选人类单核细胞cDNA文库(Clontech, Palo Alto, CA; mRNA来源: U937细胞系, 50ng/ml PMA处理3.5天)。含有人类cDNA文库的 λ gt11噬菌体按Clontech λ 文库操作手册所述铺板, 并转移到尼龙滤膜。结合于滤膜的DNA经高压消毒膜1分钟而变性, 之后滤膜在42 $^{\circ}$ C预杂交液中进行2小时预杂交, 预杂交液包括50%甲醛、5 $\times$ Denhardts、5 $\times$ SSC、0.05mg/ml鲑鱼精DNA、0.05M pH6.8的NaPO₄、1mM焦磷酸钠和1%SDS。放射性标记的PCR探针经煮沸5分钟变性, 在冰上冷却15分钟, 然后以终浓度1百万cpm/ml

加入处于杂交缓冲液的滤膜上。杂交在持续搅动下于42℃过夜进行。之后滤膜在室温用2×SSC, 1% SDS洗20分钟, 42℃下用2×SSC 1% SDS再洗20分钟, 最后在42℃下用0.2×SSC, 1% SDS洗20分钟。放射自显影后, 根据Clontech文库手册,采集阳性克隆本身及周围区域, 并将噬菌体洗脱到噬菌体稀释缓冲液中, 从而分离阳性克隆。噬菌体再以可以分离到单噬菌斑的密度重铺板, 生长过夜, 转移到尼龙滤膜。滤膜用与上述同样的放射性PCR探针杂交, 洗涤并进行放射自显影。挑选单个、纯的阳性噬菌斑, 噬菌体洗脱入噬菌体稀释缓冲液, 然后重铺板产生一个平铺生长的菌苔。空斑纯化的菌苔被洗脱入噬菌体缓冲液根据Clontech文库操作手册分离λ噬菌体DNA。

用限制性酶EcoRI酶切纯化的λDNA, 在琼脂糖凝胶上分离后, 分离这些EcoR I处理的DNA插入片段且重组进EcoR I线性化的Bluescript K S+。对这些含DNA插入片段的Bluescript质粒进行测序。各自分离的cDNA克隆中有五个包含与猪p101 cDNA 1137到位于3021处的终止密码子间同源的序列。与猪p101序列相比, 已分离的人克隆含有一个3'端544bp的非翻译序列。

由于猪的序列在5'端富含GC, 所以在寡聚dT引物文库中发现一个全长克隆的可能性非常低。因此, 为了增大发现富GC含5'端区之克隆的可能性, 我们决定采用同为寡聚dT引物和随机引物的引物文库。运用同样的猪p101序列放射性标记的PCR产物和上述同样方法, 我们筛选了一个人白细胞5'端Stretch加cDNA文库 (Clontech, mRNA来源: 正常外周血白细胞) 和几个已分离的克隆, 其中一个包含人p101序列的5'端。这一克隆包括大约编码序列上游的300bp和编码序列的前1612bp。将白细胞克隆5'端克隆 (从起始密码子上游77bp处的Hind III点到1262点处的Sac I点) 与单核细胞克隆 (从Sac I点到3014点的Xba I点, 即终止密码子下游305bp处) 融合构建成一个含人类p101序列全部编码区域的全长cDNA的克隆。这一全长cDNA的序列已全部确定, 其编码的氨基酸序列也已推定。

由于这个全长克隆源于两个不同文库的不同克隆, 所以确证了在白血

胞文库中p101克隆3'端的存在。利用不同的五套PCR引物,我们证明了克隆自单核细胞文库的p101的3'端存在于单核细胞文库和白细胞文库中。

9.2 人p120

猪p120的人类同源物经过筛选一个白细胞cDNA文库(Clontech, mRNA来源:正常外周血白细胞)而克隆,实验根据上述人p101的克隆方法,采用了猪序列中875至1315bp的一个放射性标记的PCR片段。我们独立分离出了两个含人p120 5'端的克隆,它们相应于Stephen等人报道的猪序列6至2414。人类序列在2408处有一个EcoR I位点,由于cDNA文库是以EcoR I接头构建的,所以全长人类序列必包括于两个分离的克隆,一个包括5'端EcoR I片段,另一个包括3'端EcoR I片段。因此用来自猪p120序列3'端(2801-3395bp)的放射性标记的PCR片段在上述相同条件下对文库进行再筛选。我们独立分离出两个包含从位点2408(人类序列)到5128的poly A尾起始点序列的3'端的克隆。分离含有5'和3'端EcoR I片段的两个噬菌体的DNA插入片段,于EcoR I位点处融合产成一个全长cDNA克隆(1至5128),它包括全部人类p120同源物编码区(84至3390)。已确定全长cDNA克隆的全部序列并推断出编码的氨基酸序列。

10. 实施例: 猪p120和p101在昆虫细胞中的表达

制备重组的克隆的杆状病毒(rbv),该病毒带有氨基端6xHIS标记的p120(pAcHLT p120)cDNA或氨基端(EE)-标记的p101 cDNA((pAc O-G1)p101),并用于在昆虫(Sf9)细胞中驱动上述蛋白的产生。

10.1 材料与方法

10.1.1 表达载体的构建

利用N端PCR和适合的限制性内切酶位点,将猪p120和p101开放阅读框架改造成一种可插入多种表达载体的形式。在每种情形中,在N端标记后的第一个编码的氨基酸是起始蛋氨酸。p120cDNA3'非翻译区全长利用,而p101cDNA的则在BamHI位点(第192位核苷酸,图1)截断。用于

在Sf9细胞中杆状病毒驱动表达的载体是pAcHLT(它编码其后为一凝血酶切点的N端‘6xHis-标记’, Phanminogen; p120开放阅读框架被插入XhoI-EcoRI位点)和pAcO-G1(它编码一个N端‘EE-标记’, ONYX Pharmaceuticals; p101开放阅读框架被插入EcoRI-NotI位点)。所有载体在使用前经过N端测序。

10.1.2 Sf9细胞转染和重组蛋白产生

Sf9细胞在含11%HI-FBS的TNM FH的旋转摇瓶中生长, 并使细胞数量维持在 0.5 至 2×10^6 个细胞/ml。建议采用带有线性化baculo-gold DNA(Pharminogen)的InsectinTM(Invitrogen)脂质体和相关的杆状病毒转移载体转染Sf9细胞(Invitrogen)。所得重组杆状病毒经空斑纯化和放大以产生高滴度的病毒贮液。pAcO-G1 p101病毒在27℃条件下感染吸附Sf9细胞2.2天; pAcHLT p120病毒可在27℃条件下在旋转培养基中感染(通常地)1.9天。细胞收集于冰冷的0.41%KCl; 2.66%蔗糖; 20mM MgCl₂; 8mMNaH₂PO₄ pH6.2, 25℃溶液中; 经1mM二异丙基氟磷酸(冰上5分钟)处理, 并在收集溶液中冲洗一次。离心浓缩的分装细胞在液氮中冷冻并保存于-80℃。

10.1.3 Sf9来源的蛋白的纯化

猪p120用一种金属离子螯合柱(Talon, Clontech)纯化。细胞沉集物以每1升感染的Sf9细胞培养物50ml超声缓冲液的比率融化, 超声缓冲液成分包括0.10 M NaCl; 50mM磷酸钾, pH8.0, 4℃; 10mM Tris.HCl, pH8.0, 4℃; 1mM MgCl₂和抗蛋白酶I(见上文), 并用探针超声破碎(冰上4 x 15秒破碎次), 并离心(120,000 x g 40分钟, 4℃)。移去上清且合并收集(管中上端云雾状上清单独分离; 先用0.45 μ M滤器低蛋白结合力的滤膜过滤之后合并其余上清)。细胞浆流分中加入Tween-20和甜菜碱(分别为0.05%, w/v, 和1%)后泵入已用平衡液(1.2ml树脂每升原始Sf9感染物, 线性流速20 cm/小时)平衡的Talon柱, 这一步以及以下步骤均在4℃进行。柱随后以如下诸液各20倍柱体积冲洗: 缓冲液A,

50mM磷酸钠, pH8.0, 4℃; 10mM Tris/HCl, pH8.0, 4℃; 0.15M NaCl; 1%甜菜碱; 0.05%, w/v Tween-20; 缓冲液B, 1%, w/v, Triton X-100; 0.15M NaCl; 50mM 磷酸钠, pH8.0, 4℃; 10mM Tris, pH 8.0, 4℃; 1%甜菜碱; 0.05%, w/v, Tween-20; 缓冲液C, 0.15M NaCl; 50 mM 磷酸钠, pH7.1, 4℃; 1%甜菜碱; 0.05%, w/v, Tween-20; 缓冲液D, 0.15M NaCl; 30mM Tris, pH7.5, 4℃; 1%甜菜碱; 0.02%, w/v, Tween-20 10%v/v, 乙二醇; 1mM $MgCl_2$; 然后加入8倍柱体积缓冲液E, 其成份包括加入10mM咪唑的缓冲液D (pH7.5)。缓冲液E冲洗过程中, 以2ml为单位进行分部收集。最后, 以前述所用流量的一半, 用缓冲液F冲洗柱, 其成份包括, 加入70mM咪唑的缓冲液D (pH7.5; 终浓度)。以1 ml 为单位进行分部收集。基于Abs280nm踪迹 (连续记录) 依经验收集流分并立即加入1mM DTT和1mM EGTA(终浓度)。一般地, 这个过程可在每升Sf9培养物中产生4mg p120。以这种方式制备的p120其纯度一般大于90%。p120最终汇集物经过一个装有以缓冲液G平衡的15ml G-25超细柱去除盐份。缓冲液G成份包括加入1mM DTT和1mM EGTA(终浓度)的缓冲液D。某些实验中所用的p120空白也与制备正常p120完全平行地制备, 其过程中只是细胞用野生型杆状病毒感染或不感染起始细胞。源于这种空白制剂的最终流分也以一个“平行体积”收集, 因为它实际上不含有蛋白。

p120的6 x HIS标记包含一个凝血酶切割识别基序。通过利用凝血酶的仔细滴定及用6%聚丙烯酰胺SDS-凝胶分析发现了两个凝血酶位点, 它们对凝血酶的敏感性相近, 均在氨基端附近 (因为有一种 α COOH-端抗体仍可将这种双切p120免疫沉淀)。其中一个位点位于预期中所设计的标记位置之内, 另一个位点约距氨基端40个残基(此区域内没有凝血酶适合的识别序列)。在优化的条件下(2 U/ml, 凝血酶; 0.2 mg/ml p120; 4小时, 4℃, 含1mM EGTA, 1mM $MgCl_2$)可制备凝血酶切割的p120制剂, 其中含15%未切割的p120, 50%切于真正的氨基端凝血酶位点, 35%有约额外40个残基被切割。在这些实验中, 凝血酶的作用经加入潜在的凝血酶抑制剂(sigma)来终止, 该抑制剂为100nM N-乙酰基 D-Phe Pro-2-氨基-5胍

基丁硼酸。贯穿这一工作的自始至终,部分切割的p120与完全未切割的p120的制剂是平行使用的。已经明确的是(A)所有三种p120蛋白与p101的结合均有非常近似的亲和力, (B)G β γ 对与p120混合物结合的p101的激活程度与它对与未切割的p120结合的p101的激活程度相近, (C)部分切割与未切割的p120在无p101时事实上对G β γ 亚基不敏感(虽然完全的凝血酶切割可使整个p120催化活性下降20-30%, 并且由G β γ 增加1.7倍的表现活性, 在无p101的情况下增加2.5倍)。

猪(EE)-p101按以下方法从Sf9细胞冷冻沉淀物中纯化。从2升感染的Sf9培养物中收集的细胞, 按上述在50ml的0.12M NaCl; 1mM MgCl₂; 25mM HEPES, pH7.4, 4℃; 1mM EGTA加抗蛋白酶I中进行超声处理。离心后(120,000 x g, , 4℃, 40分钟), 移去上清(如上述), 加入1%w/v Triton X100, 0.4%胆酸钠, 0.4M NaCl(终浓度), 与2ml与 α -(myc)不相关单克隆抗体共价交联的包装蛋白G琼脂糖(用平衡液冲洗)混合。在4℃混合30分钟后, 沉淀珠子取出上清并与1ml与 α -(EE)单克隆抗体共价交联的包装蛋白G琼脂糖(用平衡液冲洗)混合。4℃下混合2小时后, 珠子用以下方式冲洗用于U937细胞 α -(EE)免疫沉淀, 除了(a)冲洗在20ml离心管中进行, 且(b)珠子最终以缓冲液H冲洗3次, 其组成包括带有1%, w/v, Triton X-100的缓冲液G。一些实验中所用的‘p101空白’(p101C)的制剂如上文所述, 可从野生型杆状病毒感染或未感染的细胞制备。

用两种类型的重组杆状病毒共转染sfq细胞在体内形成的p101/p120异源二聚体用所述用于(EE)-p101的纯化方法纯化, 除了免疫沉淀用缓冲液I冲洗4次, 缓冲液I 1%,w/v, Triton X-100; 0.15M NaCl; 20mM HEPES, pH7.4, 4℃; 1mM EGTA; 用缓冲液J冲洗2次, 其组成包括加入0.4 M NaCl(终浓度)的缓冲液I, 然后以1个柱体积的缓冲液G中之150 μ g/ml(EE)肽洗脱前, 用缓冲液G冲洗3次。这种(EE)肽, 氨基端乙酰化EYMPTD, 对 α -(EE)单克隆抗体有很高的亲合性。当珠子与(EE)多肽在冰上共温育40分钟后, 移取上清。洗脱蛋白的各等份进行稀释, 并用于分析PI3K活性(见上文)或直接与SDS样品缓冲液混合。

在体外重构实验中，在含有1%,w/v, Triton X-100(这时等同于缓冲液H)之缓冲液G中的p120制品与仍结合于蛋白G基质的(EE)-p101(10:1蛋白摩尔比)混合，混合2小时(均在4℃)，然后如下文实施例所述之体内重构的p101/120-PI3K纯化的方法用(EE)-多肽进行冲洗和洗脱。

10.2 结果

应用标记的单步纯化方式产生的纯化蛋白制品可由考马斯染色法鉴定，它们的表观大小与预期相符。此外，两者在Western杂交中通过特异性的COOH端定向以及由序列内定向均能正确地识别抗多肽兔多克隆血清(未展示)，这提示了其真实性。

以上情况中，p120以1:1摩尔化学计量紧密地结合于p101，无论(a)在体外，当两个蛋白均各自独立纯化后混合(p101仍与用于分离的蛋白G基质结合)然后在用(EE)-肽洗脱前严格冲洗，或(b)在体内，当Sf9细胞用两种构型的rbv共感染且蛋白通过p101标记纯化(数据未展示)时。

游离的纯化的p120是一个PtdIns(4,5)P₂选择的渥曼青霉素敏感的PI3K。Gβγ对游离p120PI3K活性有小的双模式(bi-modal)影响。结合于GDP的Gα's α₀、α₁、α₂和α₃的等摩尔混合物(终总浓度2μM)在氟化铝的存在下，对游离p120PI3K活性没有明显影响(这是一种当以1.5倍摩尔过量加入时能够完全抑制Gβγ对PI3K作用的Gα制剂)。能够活化p85/p110-PI3K家族成员的酪氨酸磷酸化的肽也对p120PI3K活性没有可探测到的影响。当结合于p101(体内或体外)时，p120的PI3K活性可由Gβγ亚基激活增加100倍以上。酪氨酸磷酸化的肽和Gα-GDP/氟化铝对Gβγ活化的，或基础的，p101/p120PI3K活性没有影响。在无Gβγ的条件下，p101/p120复合物中p120的特异性活性低于游离p120的特异性活性但在有Gβγ存在时可提高50倍以上(见图7)。

在相同的、Gβγ刺激的实验条件下比较猪嗜中性粒细胞来源的PI3K(B)和Sf9来源的p101/120异源二聚体的特异催化活性，表明来源于Sf9的物质每毫克蛋白活性要高出2倍。这一结果与相近的从循环血嗜中性粒细

胞制备的PI3K的年龄鉴定（‘age at assays’）实验并不矛盾，该实验通过4天纯化步骤实现，并提示重组PI3K的主体是正确折叠的，并且任何重要的翻译后修饰必是合适的。

11. 实施例：猪p120和p101在哺乳动物细胞中的表达

构建了一个可瞬时表达猪p101和p120的氨基端表位标记的形式（myc）或（EE）的哺乳动物表达载体家族。本实施例描述了从哺乳动物细胞中纯化的重组p101和p120融合蛋白的生产，接着分析了其性质。

11.1 材料与方法

11.1.1 细胞培养

U937细胞生长于含10%V/V热灭活的（H1）-FBS的RPMI 1640中并且每2天稀释4倍。Cos-7细胞生长于含10%HI-FBS的DMEM中。

11.1.2 表达载体的构建

利用N端PCR和恰当的限制内切酶位点，将猪p120和p101开放阅读框架处理成可插入多种表达载体的形式（在每种情形中在N-端标记后之第一个氨基酸编码为起始蛋氨酸）。3’非翻译的p120cDNA区域（resin）全长利用而p101cDNA的则在BamH I位点（核苷酸位点192，图1）截短。采用在哺乳细胞中巨细胞病毒驱动表达的载体（A）pCMV（EE）（编码一个氨基端MEEEEFMPMPMEF（SEQ ID NO: 7）或MEEEEFMPMEFSS（SEQ ID NO: 8）‘EE-标记’分别用于p101或p120表达）和（B）pCMV(myc)（编码一个N端MEQKLISEEDLEF（SEQ ID NO: 9）或MEQKLISEEDLEFSS（SEQ ID NO: 10）‘myc-标记’分别用于p101或P102表达）。在使用前所有载体均被氨基端测序。

11.1.3 U937转染步骤

指数生长的U937细胞（12小时以前稀释）于室温，经2次PBS冲洗，重悬于无菌电穿孔培养基（EM）中，该培养基包括：30mM NaCl, 0.12M KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄和5mM MgCl₂。环状质粒

DNA加入含细胞的 $1 \times \text{EM}$ 中，形成终体积0.5ml，包括 1.4×10^7 个细胞和40 μg 总DNA（一般采用40 μg 有相同启动子和表达相近标记但不含相关蛋白的表达质粒），然后转移到一个小杯中（0.4cm间隙，BioRad）。室温静置十五分钟之后，进行电穿孔（280v，960 μF 条件下，进行一个脉冲，采用BioRad Gene脉冲仪，时间常数定为18毫秒），然后放于冰上8分钟，再以5ml含10%HI-FBS的RPMI稀释。放置5分钟以使死亡细胞聚集，细胞用补加青霉素和链霉素的含10% HI-FBS的35ml的RPMI稀释，然后加入TPA和 ZnCl_2 （均在U937细胞中对CMV启动子的表达有放大作用）分别至终浓度 $5 \times 10^{-8}\text{M}$ 和200 μM 。如果细胞要用 $[^{35}\text{S}]$ -蛋氨酸（Translabel, ICN）标记，则电穿孔后所用的RPMI中应无蛋氨酸及亮氨酸，并含有2mM NaHCO_3 和25mM HEPES以及10%透析的HI-FBS并有细胞应重悬于含20 $\mu\text{Ci/ml}$ $[^{35}\text{S}]$ -蛋氨酸/亮氨酸（ phsTPA 和 ZnCl_2 ，如上）终体积10毫升的培养液中。12小时后，（无论有无 $[^{35}\text{S}]$ ）细胞悬液与二异丙基氟磷酸混合（终浓度1mM），放置五分钟，然后离心收集，用PBS冲洗一次，裂解用于免疫沉淀。按如下方式对于来自U937细胞裂解产物的（EE）-表位标记的蛋白进行免疫沉淀。来自一次电穿孔的细胞裂解于1.25ml裂解缓冲液，其包括1% w/v Triton X-100, 25mM HEPES, pH7.4, 4 $^\circ\text{C}$; 1mM EGTA, 1mM MgCl_2 , 0.15mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ 亮肽素, 10 $\mu\text{g/ml}$ 抑酶肽, 10 $\mu\text{g/ml}$ 抗蛋白酶, 10 $\mu\text{g/ml}$ 抑胃酶肽A和10 $\mu\text{g/ml}$ 甜菜碱（此后称为抗蛋白酶I）。离心裂解产物（12,000rpm, 0 $^\circ\text{C}$, 15分钟）。所得上清取出并与4M NaCl(0.1ml), 20%胆酸钠(25 μl)和共价偶联于不相关的、异型配对的鼠单克隆抗体的蛋白G sepharose（40 μl 装体积）混合（约5-10mg/ml sepharose）。上清颠倒混合20分钟，沉淀珠子，上清转移至另一个装有共价偶联于 α -（EE）-鼠单克隆抗体的蛋白G sepharose珠子（10 μl 装）的试管（约5-10mg/ml sepharose）。4 $^\circ\text{C}$ 下混合2小时之后，免疫沉淀物用1.0%, w/v, Triton X-100; 0.4%胆酸盐; 0.004% SDS; 0.4M NaCl; 1mM EGTA; 25mM HEPES, pH7.4, 于0 $^\circ\text{C}$ 下洗5次; 用0.5M LiCl, 0.1M Tris, pH8.0, 4 $^\circ\text{C}$ 下洗1次; 用0.12M NaCl; 1mM EGTA; 25mM HEPES, pH7.4, 0 $^\circ\text{C}$ 下冲洗2次。最后一次缓冲液

补加1mM DTT（终冲洗缓冲液）。如果免疫沉淀物从 $[^{35}\text{S}]$ -蛋氨酸标记的细胞制备，最后一次冲洗可省略，珠子在SDS上样缓冲液中煮沸。另外，样品以下面所述进行PI3K活性的鉴定。

11.1.4 COS-7细胞转染

指数生长的COS-7细胞在转染3小时前，用胰酶消化重铺板成50-70%铺满。在转染时再次胰酶消化，用10%FBS的DMEM稀释，计数，以PBS洗两次，并重悬于EM(每小瓶 1×10^7 个细胞)与环状质粒DNA混合（每小瓶40 μg ，组成为10 μg EXV-(EE)- β_1 ，10 μg EXV-(myc)- τ_2 ，10 μg pCMV-(myc)-p120或10-40 μg 无关哺乳动物表达载体），形成最终体积500 μl ，然后转移到电穿孔小杯（0.4cm间隙，BioRad公司）。室温10分钟后对细胞行电穿孔（250V, 960 μF ），置冰上8分钟，然后稀释于含10%FBS的DMEM中，让已凝结的细胞聚集，而当细胞等分入60cm圆盘（每小瓶4个圆盘）时应避免聚集。

48小时后，各自处理后的4个圆盘在HEPES缓冲的DMEM中冲洗，其中包括1mM NaHCO_3 和0.2%无脂肪酸的BSA。10小时后收集两份重复圆盘用于Western杂交（以 α -(myc)单克隆抗体为第一检测试剂， α 鼠-HRP为第二检测系统，并用ECL和密度扫描定量测定）。这两个圆盘用无磷酸盐含1mM NaHCO_3 0.2%无脂肪酸的BSA的DMEM冲洗，然后再与300 μCi $[^{32}\text{P}]$ -Pi每圆盘（4ml）37℃下再温育90分钟。吸出培养基加入1ml冰冷的1M HCl。刮下并移取细胞，圆盘用1.33ml甲醇冲洗。HCl和甲醇冲洗物与2.66ml氯仿合并（形成一个'Folch'两相溶媒分配）混合、离心。移取下层相并再与1.95ml含0.5m EDTA和1mM硫酸四丁基铵的新鲜上层相（见上文）混合。混合、离心后，移取下层相，干燥，去乙酰化并制备用于阴离子交换型HPLC(Stephen等，1991自然 351:33-39，此处全文引入作为参考)。

11.2 结果

当在U937细胞内瞬时表达时，(EE)-p101和(EE)-p120能够约以

等量从 $[^{35}\text{S}]$ 蛋氨酸标记的细胞中特异性地免疫沉淀出来(对于蛋氨酸相对的complement; 分别为8:25,数据未显示)。严格冲洗的 $\alpha - (\text{EE}) - \text{p101}$ 免疫沉淀物包含有渥曼青霉素敏感的 $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ 选择性及 $\text{G}\beta\gamma$ 敏感的PI3K活性,而这一点在对照中,无论是用无关单克隆抗体进行免疫沉淀或用一个编码(EE)标记的无关蛋白cDNA的表达产物,在用 $[^{35}\text{S}]$ -蛋氨酸标记评价时均没有这一特性,其与(EE)-p101水平相近。

由 $\text{G}\beta\gamma$ 产生的激活可由与2倍过量(摩尔数)的 $\text{G}\alpha - \text{GDP}$ 预温育来阻断。此外,在这些p101免疫沉淀物中的PI3K活性对 $\text{G}\alpha - \text{GDP}$ / 氟化铝不敏感。(myc)-p120与(EE)-p101共转染不能提高在 $\alpha - (\text{EE})$ 免疫沉淀物中特异性地恢复的活性。事实上它下降了,可能是由于(EE)-p101的表达在(myc)-p120表达载体存在时相对较低。相反,用(EE)-p120 $\alpha - (\text{EE})$ 免疫沉淀物转染的细胞无论在有无 $\text{G}\beta\gamma$ 时均几乎不能检测到PI3K活性。这些细胞中包含的 $[^{35}\text{S}]$ 蛋氨酸标记的p120的摩尔量与来自(EE)-p101转染细胞的 $\alpha - (\text{EE})$ 免疫沉淀物中(EE)-p101的摩尔量相近。与(myc)-p101共转染,除了(EE)-p120表达下降外(用 $[^{35}\text{S}]$ 蛋氨酸标记评价)产生了一个实质性增加,尤其是 $\text{G}\beta\gamma$ 激活的可恢复的PI3K的活性(见图8)。这一数据提示U937细胞(人类)包含一个内源性PI3K催化亚基,它可与瞬时表达的p101(猪)结合。当结合p101(猪)后,内源性催化亚基就表现出主要由 $\text{G}\beta\gamma$ 进行调控,因为所有免疫沉淀物中的p120均与p101结合。

相反,从(EE)-p120转染的细胞中来的 $\alpha - (\text{EE})$ 免疫沉淀物,大部分的p120与p101不结合,因此相对无活性(与有 $\text{G}\beta\gamma$ 存在时的结合于p101对比)。然而,在 $\text{G}\beta\gamma$ 存在条件下检测PI3K活性时,通过与(myc)-p101共转染明显放大。对这些数据的另一种解释---p120是“变性”的(虽可溶也可被免疫沉淀)除非在有p101条件下---不同于独立的源于Sf9纯化的蛋白所获得的数据所显示的。

为测试p101/p120在体内是否能由 $\text{G}\beta\gamma$ 活化并产生 $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$,我们在Cos-7细胞内瞬时表达了(myc)- γ_2 、(EE)- β_1 、(myc)-p101和(myc)-p120的多种组合,并在转染后48小时测定它们对细胞中 $[^{35}\text{P}]$ -磷酸肌醇水平的影响(见图9)。p120在有p101存在时以依赖 $\beta_2\gamma_2$ 方式明显增加Pt

dIns(3,4,5)P₃和PtdIns(3,4)P₂的产生。这一结果不能够由引入的上述组合中不同的cDNA的相关表达中的变化来解释（见图9）。

12. 克隆的保藏

以下微生物或克隆已于所示日期保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC），Rockville, Maryland并分配了保藏号码：

克隆	ATCC保藏号	保藏日期
pCMV3mycp101	97636	6/27/96
pCMV3mycp120	97637	6/27/96

本发明不仅限于这里所述的仅仅意在对本发明各个方面加以单独说明的特定的实施方案，功能上等同的方法和组分也包括在本发明的范围中。确实，对本发明的各种修饰以及在此展示和描述的那些修饰，对于本领域技术人员依上述的描述和附图将是显而易见的。这样的修饰均会落入所附权利要求的范围。

说 明 书 附 图

P101 核苷酸序列

最长的开放阅读框架 从 390 至 3023

A: 916 C: 1,559 G:1,394 T:823 其它: 0

P101.Seq 长度: 4692 1996 年 5 月 24 日, 10: 71

1	CCGTGCGCCC	CTCAAGACTA	ATGGACCCCC	GGCTCAGGAA	TCGCACGAGG
51	CAGGCTCACA	CCCGAGGCCC	ATGGAAGTTC	CCAGGCCAGG	GGTCAAGTTG
101	GAACCGAAGC	TGCTGCCAGC	TTACACCACA	GCCACAGCAA	CTTGGGATCT
151	GAGCTGCATC	TGTGACCTAC	ACCACAGCTC	ACGGCAATGC	TGGATTCCCA
201	ACACACCAAG	TGGGGCCAGG	GATCGAACCC	GCATCCTCTT	GGACAGTAGT
251	CAGATTCATT	ACCACTGAGC	CATTGACAGG	AACTCCAGGG	GCAGGGGGGA
301	GTCTCTTGTT	TTTGGCTCCT	CCCGACACCT	GGTGAAATGG	ACCAGCGCAG
351	GCACCCCTTT	CCAGTGGCTG	TCCCAGGCGA	TGACTCAGGA	TGCAGCCAGG
401	GGCCACGACG	TGCACGGAGG	ACCGCATCCA	GCACGCCCTG	GAGCGCTGCT
451	TGCACGGGCT	CAGCCTCAGC	CGCCGCTCCA	CCTCCTGGTC	AGCTGGGCTG
501	TGTCTAAACT	GTTGGAGCCT	GCAGGAGCTG	GTCAGCAGGG	ATCCGGGCCA
551	CTTCCTTATC	CTCCTGGAGC	AGATCCTGCA	GAAAACCCGA	GAGGTCCAAG
601	AGAAGGGCAC	CTATGACCTC	CTCGCGCCCC	TGGCCCTGCT	CTTCTATTCT
651	ACTGTCCTCT	GTACGCCACA	CTTCCCGCCA	GA CTCAGATC	TCCTTCTGAA
701	AGCAGCCAGA	ACCTACCACC	GATTCTTGAC	CTGGCCGGTT	CCGTACTGCA
751	GCATCTGCCA	GGAAGTGCTC	ACCTTCATCG	ATGCTGAGCT	GAAGGCCCCA
801	GGAATCTCCT	ACCAGCGACT	GGTGAGGGCG	GAGCAGGGCC	TGTCCACAAG
851	GAGTCACCGC	AGCTCCACCG	TCACGGTGCT	CTTGGTGAAC	CCCGTGGAGG
901	TGCAGGCTGA	GTTCTTGAC	GTGGCCGACA	AGCTGAGCAC	ACCAGGGCCC
951	TCGCCGCACA	GCGCCTACAT	CACCCTGCTC	CTGCATGCCT	TCCAGGCCAC
1001	CTTTGGGGCC	CACTGTGACC	TCTCTGGTCT	GCACCGCAGG	TTGCAGTCCA
1051	AGACCCTGGC	AGAGCTCGAG	GCCATCTTCA	CGGAGACAGC	CGAGGCACAG
1101	GAGCTGGCCT	CAGGCATCGG	GGATGCAGCT	GAGGCCCGGC	AGTGGCTCAG
1151	GACCAAGCTG	CAGGCGGTGG	GAGAGAAGGC	CGGCTTCCCT	GGTGTCTTAG

图 1A

P101 核苷酸序列

1201	ACACCGCCAA	ACCTGGCAAG	CTCCGCACCA	TCCCCATCCC	GGTCGCCAGG
1251	TGCTACACCT	ACAGCTGGAA	CCAGGACAGC	TTCGACATCC	TGCAGGAAAT
1301	CCTGCTCAAG	GAGCAGGAGC	TGCTCCAGCC	AGAGATCCTG	GACGACGAGG
1351	AGGACGAGGA	CGAGGAGGAC	GAGGAAGAGG	ACTTGACGC	CGACGGCCAC
1401	TGCGCGGAGA	GGGACTCCGT	GCTCTCCACC	GGCTCGGCGG	CCTCCCACGC
1451	CTCCACGCTG	TCCCTGGCCT	CGTCCCAGGC	CTCGGGGCCC	ACGCTCTCCC
1501	GCCAGTTGCT	GACCTCCTTC	GTCTCGGGCC	TCTCGGATGG	CGTGGACAGC
1551	GGCTACATGG	AGGACATCGA	GGAGAGCGCC	TACGAGCGGC	CCCGGAGGCC
1601	TGGCGGCCAC	GAGCGCCGGG	GCCACCGCCG	GCCC GG CAG	AAGTTCAACA
1651	GGATCTATAA	ACTCTTCAAG	AGCACCAGCC	AGATGGTGCT	GCGGAGGGAC
1701	TCGCGCAGCC	TGGAGGGCAG	CCCGGACAGC	GGCCCGCCCC	TGCGTCGGGC
1751	CGGCAGCCTC	TGCAGCCCCC	TGGACAGCCC	GACCCTGCCC	CCGTCCCGGG
1801	CCCAGGGCTC	CCGCTCGCTG	CCCCAGCCCA	AGCTCAGCCC	CCAGCTGCCC
1851	GGCTGGCTCC	TGGCCCCCGC	CTCCCGCCAC	CAGCGCCGCC	GCCCCCTTCT
1901	GAGCGGGGAC	GAGGACCCCA	AGGCTTCCAC	GCTGCGTGTC	GTGGTCTTCG
1951	GCTCGGATCG	GATCTCGGGG	AAGGTGGTCC	GGGCTTACAG	CAACCTGCGG
2001	CGGCTGGAGA	ACAACCGTCC	TCTCCTCACA	CGGTTCTTCA	AGCTACAGTT
2051	CTTCTACGTG	CCTGTCAAGC	GGAGCCGTGG	GACAGGCACC	CCCACCAGCC
2101	CAGCCCCTCG	GAGCCAGACG	CCCCCCTCC	CCACAGACGC	CCCGAGGCAC
2151	CCGGGCCCTG	CAGAGCTGGG	CGCCGCCCCC	TGGGAGGAGA	GCACCAATGA
2201	CATCTCCCAC	TACCTCGGCA	TGCTCGACCC	CTGGTACGAG	CGAAACGTCC
2251	TGGGCCTCAT	GCACCTGCCT	CCTGAAGTCC	TGTGCCAGTC	CCTGAAGGCT
2301	GAGCCCCGGC	CCCTGGAGGG	CTCCCCTGCC	CAGCTGCCCA	TCCTGGCGGA
2351	CATGCTGCTC	TACTACTGCC	GCTTCGCTGC	CCGGCCGGTG	CTGCTGCAGG
2401	TCTATCAGAC	CGAGCTGACC	TTCATCACCG	GGGAGAAGAC	GACGGAGATC
2451	TTCATCCACT	CCCTGGAGCT	GGGCCACTCT	GCTGCCACAC	GTGCCATCAA
2501	GGCTTCGGGT	CCTGGCAGCA	AGCGGCTGGG	CATCGATGGT	GACCGGGAGG

图 1B

P101 核苷酸序列

2551	CCGTCCCTCT	AACACTACAG	ATAATTTACA	GCAAGGGGGC	CATCAGCGGC
2601	CGGAGTCGCT	GGAGCAACAT	GGAAAAGCTC	TGCACCTCTG	TCAACCTCAG
2651	CAAGGCCTGC	CGGCAGCAGG	AGGAGCTAGA	CTCCAGCACA	GAGGCCCTGA
2701	CGCTAAACCT	GACAGAAGTG	GTGAAAAGAC	AGACCCCTAA	ATCCAAGAAG
2751	GGCTTTAACC	AGATCAGCAC	CTCGCAGATC	AAAGTGGACA	AGGTGCAGAT
2801	CATCGGCTCT	AACAGCTGCC	CCTTTGCCGT	GTGTCTGGAC	CAGGACGAGA
2851	GGAAGATCCT	GCAGAGTGTC	ATCAGGTGCG	AGGTCTCGCC	CTGCTACAAG
2901	CCTGAGAAGA	GCAGCCTCTG	CCCCCACC	CAGAGGCCCT	CCTACCCGCC
2951	AGCGCCGGCC	ACGCCCAGCC	TCTGCTCCCT	GCTCTGCCTG	CCCATCATGA
3001	CTTTCAGCGG	AGCTCTGCCC	TAGCCGCCAC	CCTGCACCAG	CCTGGACAGG
3051	GAGCCGGGGG	GCAGCCTCCT	CGGAGCCCC	TCCCCAGAAG	ACTGGCGGCT
3101	GAGAGGGTCG	TGCTCCCTGT	GGAGAACAGA	GGGGCCGTGT	ACTGGGTCAG
3151	GGTCCCGCTG	TGGGCCCTGC	AGCAGCAAGA	GCGGGGGCTG	CTGGGGCCTC
3201	AGGGCTCTGT	TTGGGCGAGA	AGCAGGCATT	AGGGAGAGGG	GCCTGGCCCC
3251	ACGGCTCTCA	GCTTCCTCAC	GGTAGCGGAG	AGAGGGATGG	GTGAGCTTGA
3301	CCTCAAGGCC	CTGGCCTCCA	GTGGGGGTCC	AGGATCCTTT	CTGGAAGGAA
3351	GATCCCAAGG	CGCTGGTGCT	CTGGGGGTGTG	GTGTTAGGGG	CTCCCCCCCC
3401	AGCCCTGGGC	CAGGGCCCCC	CCGTTACTTT	GTCAGAGACT	TGGGGATCCT
3451	GTGTCTGGAG	GGTCAAGTCC	CCCTCCCTGG	GGGTTCAAGC	AGTGGAAGTA
3501	TGGTTGCGAC	TTTTCTGACG	TTGGTGCAAT	CCCCGCCCCC	ACCTCAACCC
3551	CCCCACAAAA	AAACCCCTTC	TCTCTTTCAA	GTTCCCTGGG	TCTTCTGTGA
3601	AACAGCACTA	ACACTTGACC	TGGCTGTGCC	AGCACTTGGA	ACAGATGCTC
3651	CCTGGATCGA	GAGCCTTGCG	AGACAGGACA	AGCTTAGGTT	CGGTGGTGGC
3701	TCAGTTACCT	TCTAGCGAAA	TGAGCAGAAG	GAGGTGAATT	GGCTCCTTCG
3751	AGGCTCCCCT	ACCTGGGCAC	TAAGATGGGG	GGAATAAGGC	CGCCTTAAAG
3801	GGTTGGGGTG	ATGTCGTCTG	CAAAGCGCCT	GGCCCAAGTG	CCGGCTGGTA
3851	GCAAGGTGCG	GCCTCACCC	CTGGGCGTCG	ACTCCCTCGT	GTGGCGGGAG

图 1C

P101 核苷酸序列

3901	GCTAAAAGGA	TGCCCTGCCC	CCGTGATGCT	GTCATTCCCT	CCTTCCAATT
3951	CACTGATGAG	GCAGGACCCA	GACTGAGGGG	GTGAGGGGCG	CACAGTTCTA
4001	CCTTTGAAGG	AGGAAGTGCC	TTGATCAGAG	TAAGAGGAGG	GTGGCCCAGG
4051	CGCCCCCAAC	CGCCCCCTCC	TCCTCTCCCA	GGTTGGCCCC	TGTGCCTCCC
4101	ACTCCCATCT	CACTCCTTGG	GCTGGCGCAC	ATCACGGGCA	CAGTCCTCCA
4151	GCCCCACAGT	TCACTGGTAC	CATGGCCCCT	GGGTCGGTTC	GCAGAGGATG
4201	GAGGATAAGA	CTTGCCTCGA	GAAC TTGGGT	CTGATGGGGA	AACCGGGTGA
4251	TGGAAATGAT	TCCGGAAGAT	TAAACCTCC	CAGGTTCAAG	TGTCGGAGAA
4301	CCGCCCCCAC	AACCGGACTA	GGTTGGTAGG	GAGAGGGCAG	GGCTTGGGCC
4351	CGGGATTTGG	ACTAGGAGAG	GCGGGGGGAG	GTAACCAGAG	AAgCAAGACA
4401	GTTGTATCCC	CGCAAAAGAC	CCTTCCCCGC	CCCTCCCCTC	CTGCTCTGGC
4451	TCCATCTGCT	TCAAAGGGTC	TGGGCTTTAG	GAGCCCGTGG	TGCCCAGCGC
4501	AGCGTACTCA	GGACTCGAGA	GACGCGGACC	GTGCCAGTTC	CCACCCTGTG
4551	CCACTCCAGG	CCCCAGGGAG	GGGTTTGCAA	TATACCCTCA	ACGTTTTTGT
4601	GTGTGTGGTA	AGGTCGTCCT	AGGACCCcAA	ATGGAATTTA	ACGTTATTGT
4651	CAAATAAAAC	TTGATTTGTC	TTGGAAAAAA	AAAAAAAAAA	.AA

图 1D

P101 蛋白序列

最长的开放阅读框架 从 390 至 3023

P101.Seq 翻译 核查: 4919 从 390 至 3023

产生符号 1 至 878

P101.Pep 长度 878, 1996 年 5 月 24 日, 10:19

1 MQPGATTCTE DRIQHALERC LHGLSLSRRS TSWAGLCLN CWSLQELVSR
 51 DPGHFLILLE QILQKTREVO EKGTYDLLAP LALLFYSTVL CTPHFPPDSO
 101 LLLKAARTYH RFLTWVPYIC SICQELLTFI DAELKAPGIS YQRLVRAEQG
 151 LSTRSHRSST VTVLLVNPVE VQAFLDVAD KLSTPGPSPH SAYITLLLHA
 201 FQATFGAHCN LSGLHRRLOS KTAELEAIF TETAEAQELA SGIGDAAEAR
 251 QWLRTKLQAV GEKAGFPGVL DTAKPGKLRIT IPIPVARCYT YSWNQDSFDI
 301 LQEILLKEQE LLQPEILDDE EDEDEDEEEE DLDAAGHCAE RDSVLSTGSA
 351 ASHASTLSLA SSQASGPTLS ROLLTSFVSG LSDGVDSGYM EDIEESAYER
 401 PRRPGGHERR GHRRPGQKFN RIYKLFKSTS QWLRDRSRS LEGSPDSGPP
 451 LRRAGSLCSP LDSPTLPPSR AQGSRSLPQP KLSPQLPGWL LAPASRHQRR
 501 RPFLSGDEDP KASTLRVVVF GSDRISGKVV RAYSNLRRLE NNRPLLTRFF
 551 KLQFFYVPVK RSRGTGTPTS PAPRSQTPPL PTDAPRHPCP AELGAAPWEE
 601 STNDISHYLG MLDPWYERNV LGLMHLPEV LCQSLKAEPR PLEGSPAQLP
 651 ILADMLLYYC RFAARPVLLQ VYQTELTFTT GEKTTEIFIH SLELGHSAAT
 701 RAIKASGPGS KRLGIDGDRE AVPLTLQIIY SKGAISGRSR WSNMEKLCTS
 751 VNLSKACRQQ EELDSSTEAL TLNLTEVVKR QTPKSKKGFN QISTSQIKVD
 801 KVQIIGSNSC PFAVCLDQDE RKILQSVIRC EVSPCYKPEK SSLCPPPQRP
 851 SYPPAPATPD LCSLLCLPIM TFSGALP*

图 2

P120 核苷酸序列

最长的开放阅读框架 从 89 至 3397

A: 1,010 C: 965 G:953 T:880 其它: 0

P120.Seq 长度: 3806, 1995 年 3 月 27 日, 13:10

```

1  GGCACGAGGA  ATTTGTTTTG  TTTTCAGAAA  TTAAACAAAT  GATCCTTCAG
51 CATCATCACC  TCCGCTGCTT  TATCAGGTCG  CATAGGGCAT  GGAGCTGGAG
101 AACTATGAAC  AGCCCGTGGT  GCTGAGAGAG  GACAACCGCC  GCAGGCGTCG
151 GAGGATGAAG  CCGCGCAGCA  CGGCAGCCAG  CCTGTCCTCC  ATGGAGCTCA
201 TCCCCATCGA  GTTTGTTTTG  GCCACCAGCC  AGCGCAACAC  CAAGACCCCC
251 GAAACGGCAC  TGCTGCACGT  GGCCGGCCAC  GGCAATGTGG  AGAAGATGAA
301 GGCCAGGTG  TTGTTGCGCG  CGCTGGAGAC  GAGCGTTTCT  TGGGACTTCT
351 ACCACCGGTT  CGGCCCCGAC  CACTTCCTCC  TGGTCTTCCA  GAAGAAGGGG
401 GAGTGGTACG  AGATCTATGA  CAAGTACCAG  GTGGTGCAGA  CCCTGGACTG
451 CCTGCGCTAC  TGGGAGGTGT  TGCACCGCAG  CCCCGGGCAG  ATCCACGTGG
501 TCCAGCGGCA  CGCGCCCTCG  GAGGAGACAT  TGGCCTTCCA  GCGCCAGCTC
551 AACGCCCTCA  TCGGCTACGA  CGTCACCGAC  GTCAGCAACG  TGCATGACGA
601 TGAGCTGGAG  TTCACGCGGC  GCCGCTGGT  CACCCCGCGC  ATGGCCGAGG
651 TGGCCGGCCG  CGACCCCAAG  CTTTACGCCA  TGCACCCCTG  GGTGACATCC
701 AAGCCCCTCC  CTGAGTACCT  TCTGAAGAAG  ATCACTAACA  ACTGCGTCTT
751 CATCGTCATT  CACCGCAGCA  CCACCAGCCA  GACCATCAAG  GTCTCGGCCG
801 ATGACACCCC  AGGCACCATC  CTCCAGAGCT  TCTTTACCAA  GATGGCCAAG
851 AAGAAATCTC  TGATGGATAT  CCCTGAAAGC  CAGAACGAAC  GGGACTTTGT
901 GCTGCGCGTC  TCGGGCCGGG  ATGAGTACCT  GGTGGGTGAG  ACGCCCATCA
951 AAAATTTCCA  GTGGGTGAGG  CAGTGCCTCA  AGAATGGGGA  GGAGATTAC
1001 CTTGTGCTGG  ACACTCCTCC  AGACCCAGCC  CTGGACGAGG  TGAGGAAGGA
1051 AGAGTGGCCG  CTGGTGGATG  ACTGCACGGG  AGTCACTGGC  TACCACGAGC
1101 AGCTGACCAT  CCACGGCAAG  GACCATGAAA  GTGTGTTTAC  CGTGTCCCTG
1151 TGGGACTGTG  ACCGCAAGTT  CAGGGTCAAA  ATCAGAGGCA  TTGATATCCC

```

图 3A

P120 核苷酸序列

1201	TGTCCTGCCC	CGGACCGCTG	ACCTCACGGT	GTTTGTGGAG	GCAAACATCC
1251	AGTATGGGCA	GCAAGTCCTT	TGCCAAAGGA	GAACCAGCCC	CAAACCCCTTC
1301	ACGGAGGAGG	TGCTCTGGAA	CGTGTGGCTT	GAGTTCAGTA	TTAAAATCAA
1351	AGACTTACCC	AAAGGGGCTC	TGCTGAACCT	CCAGATCTAC	TGCGGCAAAG
1401	CTCCAGCACT	GTCTGGCAAG	ACCTCTGCAG	AGATGCCCAG	TCCCGAGTCC
1451	AAAGGCAAAG	CTCAGCTTCT	GTACTATGTC	AACCTATTGC	TGATAGACCA
1501	CCGCTTCCTC	CTGCGCCATG	GCGAGTATGT	GCTCCACATG	TGGCAGTTAT
1551	CCGGGAAGGG	GGAAGACCAA	GGGAGCTTCA	ATGCCGACAA	GCTCACGTCG
1601	GGAACCAACC	CGGACAAGGA	GGACTCAATG	TCCATCTCCA	TTCTTCTGGA
1651	CAATTACTGC	CAGCCCATAG	CCTTGCCTAA	GCATCGGCCT	ACCCCTGACC
1701	CAGAAGGGGA	CCGGGTTCGG	GCAGAAATGC	CCAATCAGCT	TCGGAAGCAA
1751	CTGGAGGCAA	TCATAGCCAC	GGATCCGCTT	AACCCACTCA	CAGCTGAAGA
1801	CAAAGAACTG	CTCTGGCATT	TCAGATATGA	AAGCCTGAAG	GATCCCAAAG
1851	CGTATCCTAA	GCTCTTTAGC	TCGGTGAAAT	GGGGACAGCA	AGAAATTGTG
1901	GCCAAAACAT	ACCAATTATT	AGCCAAAAGG	GAGGTCTGGG	ATCAGAGTGC
1951	TTTGATGTG	GGGTAAACCA	TGCAGCTCCT	GGACTGCAAC	TTCTCGGATG
2001	AAAACGTGAG	AGCCATTGCA	GTCCAGAAAC	TGGAGAGCTT	GGAGGATGAT
2051	GACGTGCTCC	ATTACCTGCT	CCAGCTGGTC	CAGGCTGTGA	AATTTGAACC
2101	ATACCATGAC	AGTGCCCTAG	CCAGATTTCT	GCTGAAGCGT	GGTTTAAGAA
2151	ACAAGAGAAT	TGGTCACTTC	TTGTTTTGGT	TCTTGAGAAG	TGAGATTGCC
2201	CAGTCTAGGC	ACTATCAGCA	GAGGTTTGCA	GTGATCCTGG	AAGCCTACCT
2251	GAGGGGCTGT	GGCACAGCCA	TGCTGCACGA	CTTCACCCAG	CAAGTCCAAG
2301	TAATTGACAT	GTTACAAAAA	GTCACCATTG	ACATTAAATC	GCTCTCTGCT
2351	GAAAAGTATG	ACGTCAGTTC	CCAAGTTATT	TCCCAACTTA	AGCAAAAGCT
2401	TGAAAACCTA	CAGAATTTGA	ATCTCCCCCA	AAGCTTTAGA	GTTCCCTATG
2451	ATCCTGGACT	GAAAGCCGGG	GCACTGGTGA	TCGAAAAATG	TAAAGTGATG
2501	GCCTCCAAGA	AGAAGCCCCT	GTGGCTTGAG	TTTAAATGTG	CCGATCCTAC

图 3B

P120 核苷酸序列

2551	GGCTCTATCA	AATGAAACAA	TTGGAATTAT	CTTTAAACAC	GGTGACGATC
2601	TGCGCCAAGA	CATGCTTATT	TTACAGATTC	TACGAATCAT	GGAGTCCATT
2651	TGGGAGACCG	AATCTTTGGA	TCTGTGCCTC	CTGCCATATG	GCTGCATTTT
2701	AACTGGTGAC	AAAATAGGAA	TGATCGAGAT	CGTGAAGGAC	GCCACGACAA
2751	TCGCCAAAAT	TCAGCAAAGC	ACAGTGGGCA	ACACGGGTGC	CTTTAAAGAT
2801	GAAGTCCTGA	GTCACCTGGCT	CAAAGAAAAA	TGCCCTATTG	AAGAAAAGTT
2851	TCAGGCAGCT	GTGGAGAGAT	TTGTTTATTC	CTGTGCCGGC	TACTGTGTGG
2901	CAACCTTTGT	TCTCGGAATA	GGCGACAGAC	ACAATGACAA	TATTATGATC
2951	TCAGAAACAG	GAAATCTATT	TCATATTGAT	TTCGGACACA	TTCTTGGGAA
3001	TTACAAAAGT	TTCCTGGGCA	TTAATAAAGA	GAGGGTGCCA	TTTGTGCTAA
3051	CCCCAGACTT	CCTGTTTGTG	ATGGGGACTT	CTGGAAAGAA	GACAAGTCTA
3101	CACTTCCAGA	AATTCAGGA	TGTCTGCGTC	AAGGCTTACC	TAGCCCTTCG
3151	TCATCACACA	AACCTACTGA	TCATCCTCTT	CTCCATGATG	CTGATGACAG
3201	GAATGCCCCA	GTTAACCAGC	AAAGAAGACA	TTGAATACAT	TCGGGATGCC
3251	CTCACAGTGG	GCAAAAGTGA	GGAGGATGCT	AAAAAGTATT	TTCTGGATCA
3301	GATTGAAGTT	TGCAGAGACA	AAGGATGGAC	CGTGCAGTTT	AACTGGTTCT
3351	TACATCTTGT	TCTTGGCATC	AAACAAGGGG	AGAAGCATCC	CGCATAAAAC
3401	TTTGGGCCAA	GAGTTAAAAC	CCAAGTTATT	GTCCTAATGC	TTTACGTCAG
3451	CAGGACAATC	ACCGAACTTG	ATGTCATGTA	GTGGGACATT	ATGAAAGCTG
3501	GCACTTGAGA	AATATAGCTC	TTCCCCTAAC	TGAACTCTTC	ACTGGAGAAA
3551	AACCTTGGCA	TGTTTAAAGTA	ATGTTCAGTG	TTAGGCTTAT	TTGCATGTTT
3601	GTTTTTCTC	ATGTGCCCCC	TCAGTCATGT	TGGAGACTGT	TCTAAATTTA
3651	AGTGGCCTAA	TGACCTCTGA	AGTTTCAACT	TTCTTGGTAC	TGAGTGCTTC
3701	TGAAATTCTT	TACAATAATT	GGTAACATCT	ATTGTCAGCT	GGGTATCCTC
3751	TCAATTTTGG	TTATCCTTGG	GTTTCTCAAA	CTCCTTACAG	GAAAAAAAAA
3801	AAAAAAA				

图 3C

P120 蛋白序列

最长的开放阅读框架 从 89 至 3397

P120.Seq 翻译 核查: 6041 从 89 至 3397

产生符号 1 至 1103

P120.Pep 长度 1103, 1996 年 5 月 24 日, 9:52

```

1  MELENYEQPV VLREDNRRRR RRMKPRSTAA SLSSMELIPI EFVLATSQRN
51  TKTPETALLH VAGHGNVEKM KAQVLLRALE TSVSWDFYHR FGPDHFLLVF
101 QKKGEWYEIY DKYQVVQTL DCLRYWEVLHR SPGQIHVVQR HAPSEETLAF
151 QRQLNALIGY DVTDVSNVHD DELEFTRRRRL VTPRMAEVAG RDPKLYAMHP
201 WVTSKPLPEY LLKKITNNCV FIVIHRSSTS QTIKVSADDT PGTILOQSFFT
251 KMAKKKSLMD IPESQNERDF VLRVCGRDEY LVGETPIKNF QWVRQCLKNG
301 EEIHLVLDTP PDPALDEVK EEWPLVDDCT GVTGYHEQLT IHGKDHESVF
351 TVSLWDCDRK FRVKIRGIDI PVLPRADLT VFVEANIQYG QQVLCORRTS
401 PKPFTEEVW NWLEFSIKI KDLPGALLN LOIYCGKAPA LSGKTSAMP
451 SPESKGKAQL LYYNLLLID HRFLRHGEY VLHMVQLSGK GEDQGSFNAD
501 KLTSGTNPDK EDSMSISILL DNYCHPIALP KHRPTDPEG DRVRAEMPNO
551 LRKQLEAIIA TDPLNPLTAE DKELLWHFRY ESLKDPKAYP KLFSSVKWQ
601 QEIVAKTYQL LAKREVDQS ALDVGLTMQL LDCNFSDENV RAIIVQKLES
651 LEDDDLVHYL LQLVQAVKFE PYHDSALARF LLKRGLRNKR IGHFLFWFLR
701 SEIAQSRHYQ ORFAVILEAY LRGCGTAMLH DFTQQVQVID MLQKVTIDIK
751 SLSAEKYDVS SQVISQLKQK LENLQNLNLP QSFRVPYDPG LKAGALVIEK
801 CKVMASKKKP LWLEFKCADP TALSNETIGI IFKHGDDLRO DMLILQILRI
851 MESIWETESL DLCLLPYCCI STGDKIGMIE IVKDATTIAK IQQSTVNGTG
901 AFKDEVLSHW LKEKPIEEK FOAAVERFVY SCAGYCVATF VLGIGDRHND
951 NIMISETGNL FHIDFGHILG NYKSFLGINK ERVPFVLTDP FLFVMTSGK
1001 KTSLHFQKFQ DVCVKAYLAL RHHTNLLIIL FSMMLTGMP QLTSKEDIEY
1051 IRDALTVGKS EEDAKKYFLD QIEVCRDKGW TVQFNWFLHL VLGIKQGEKH
1101 PA*
```

图 4

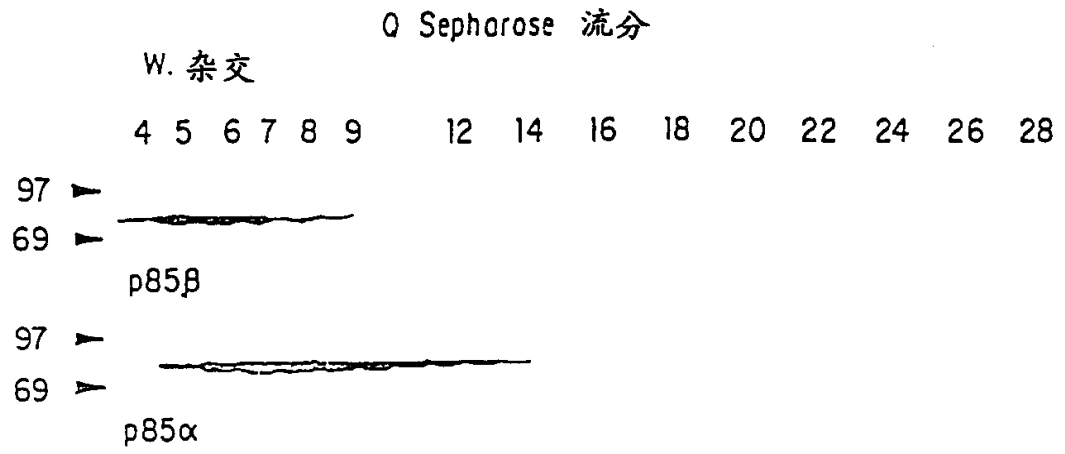


图 5A

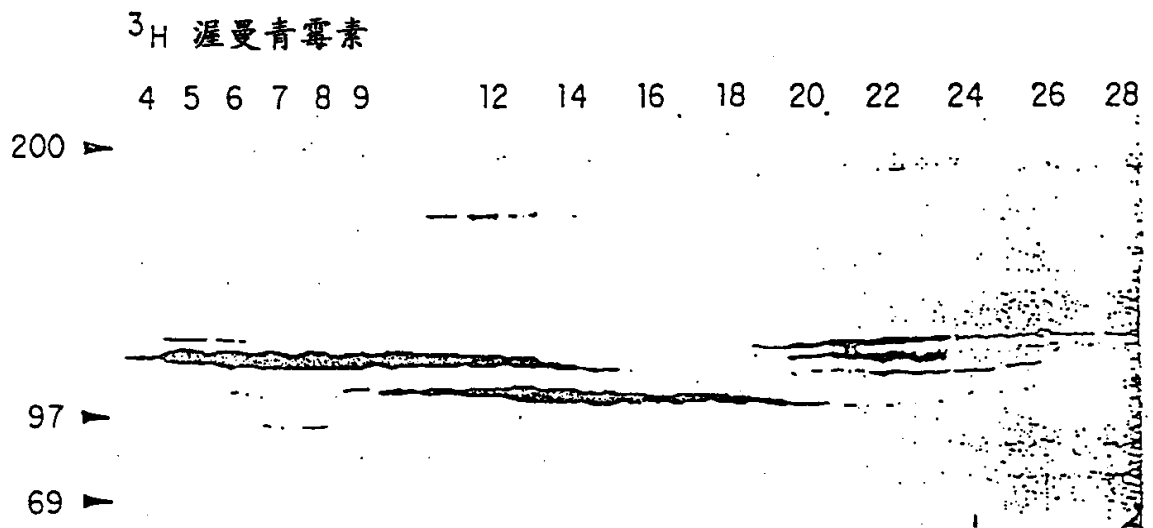


图 5B

MINI Q B
 $\beta\gamma$ - 敏感 P13K 活性

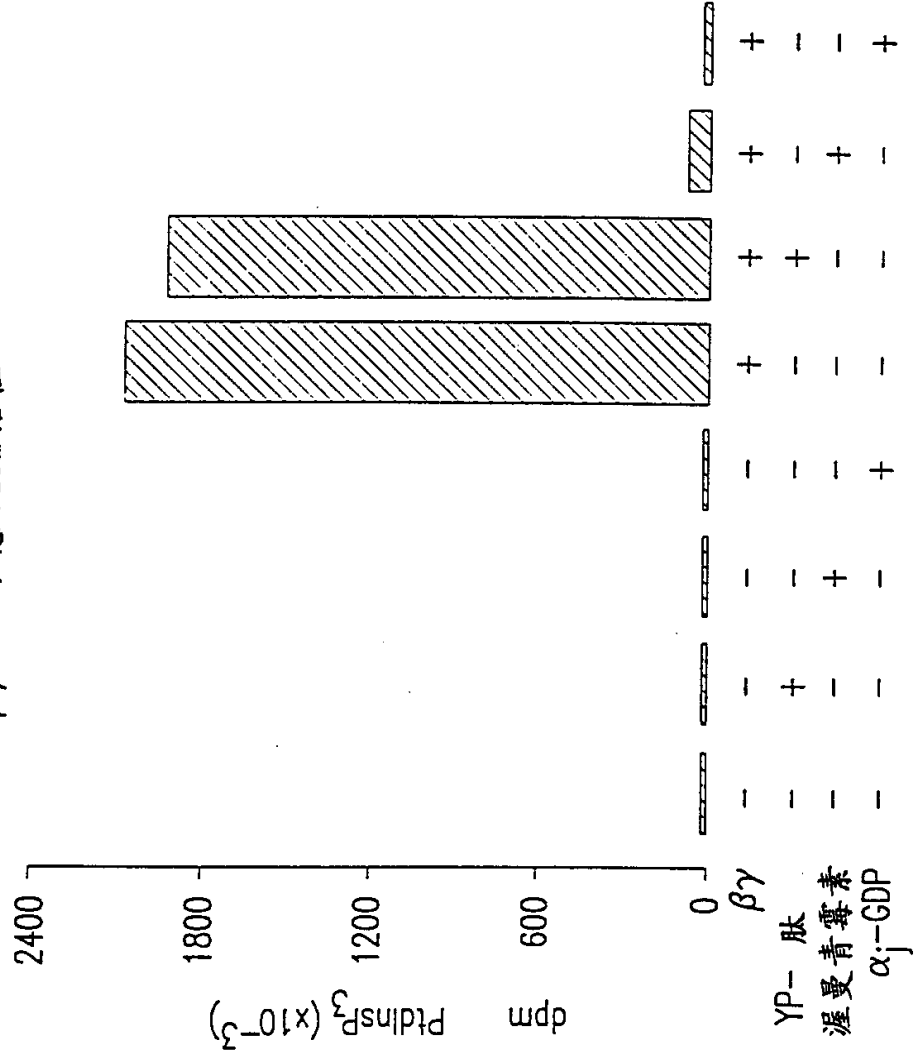


图 6

P120 与异源二聚体 P120/P101 性质的比较

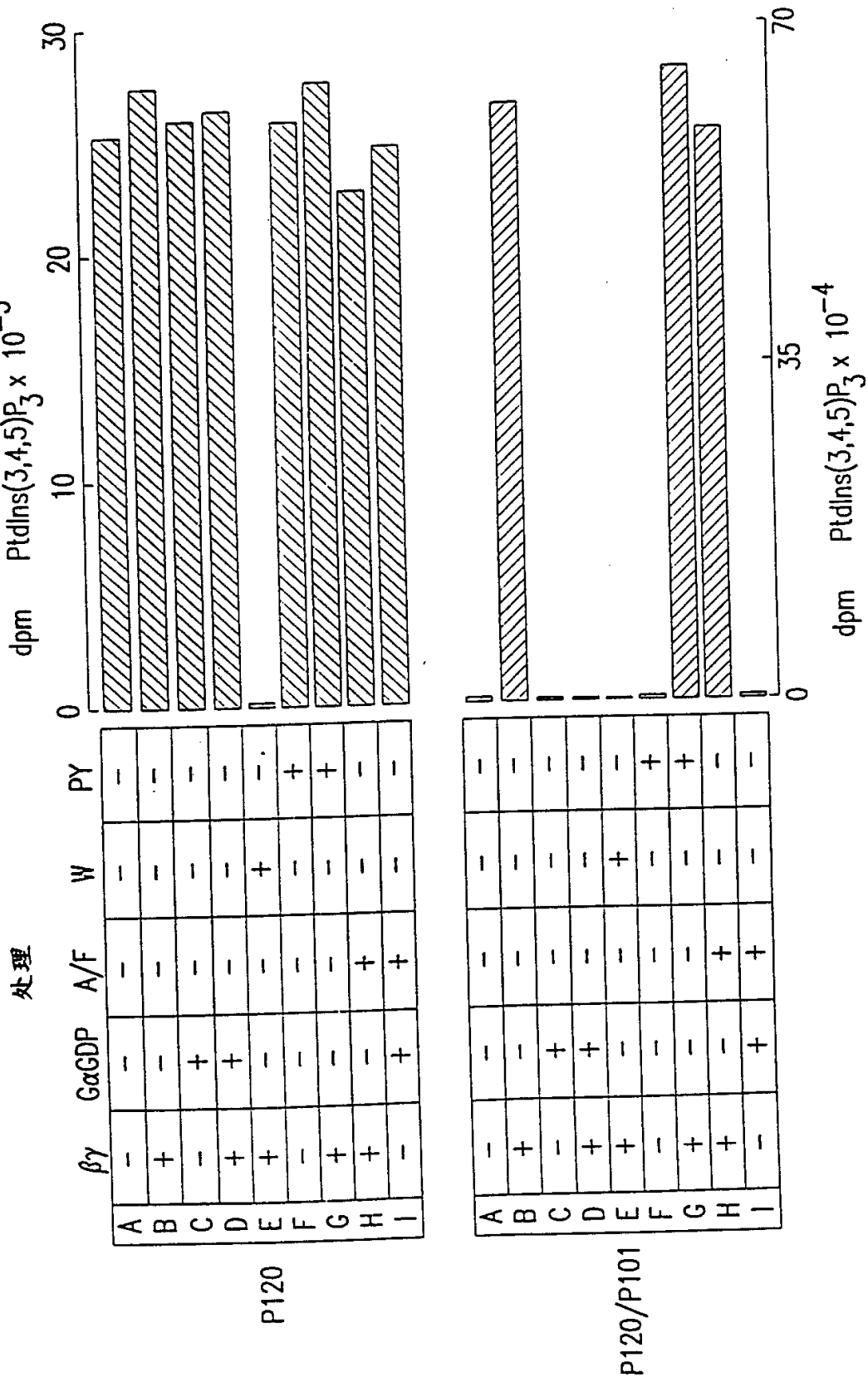


图 7

P101 的表达对从 P120 转染的 U937 细胞中恢复 $\beta\gamma$ 敏感的 PI3K 活性的影响

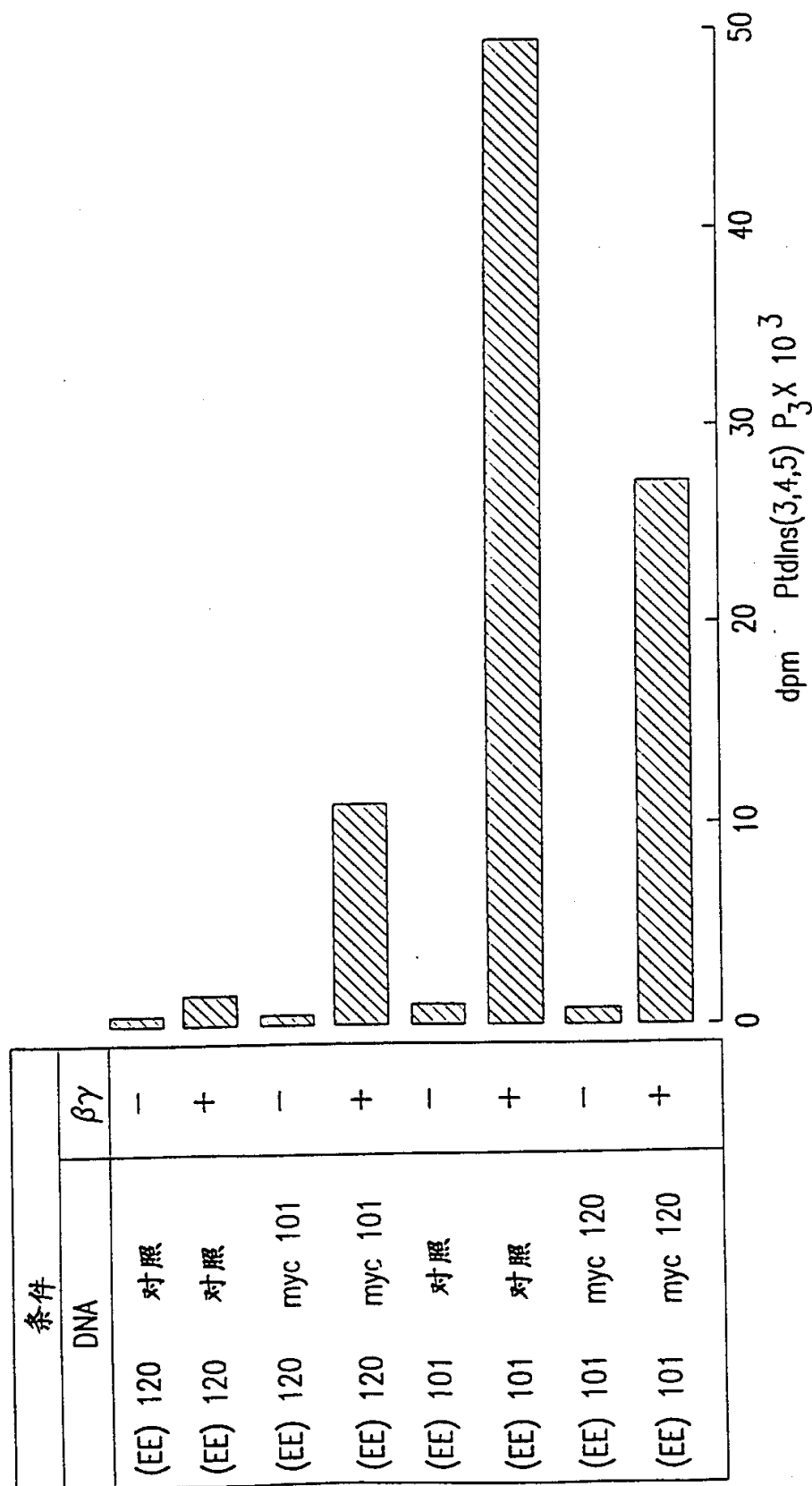


图 8

P101、P120 和 β γ cDNA 的瞬间表达对 Cos-7 细胞中 PtdInsP₃ 浓度的影响

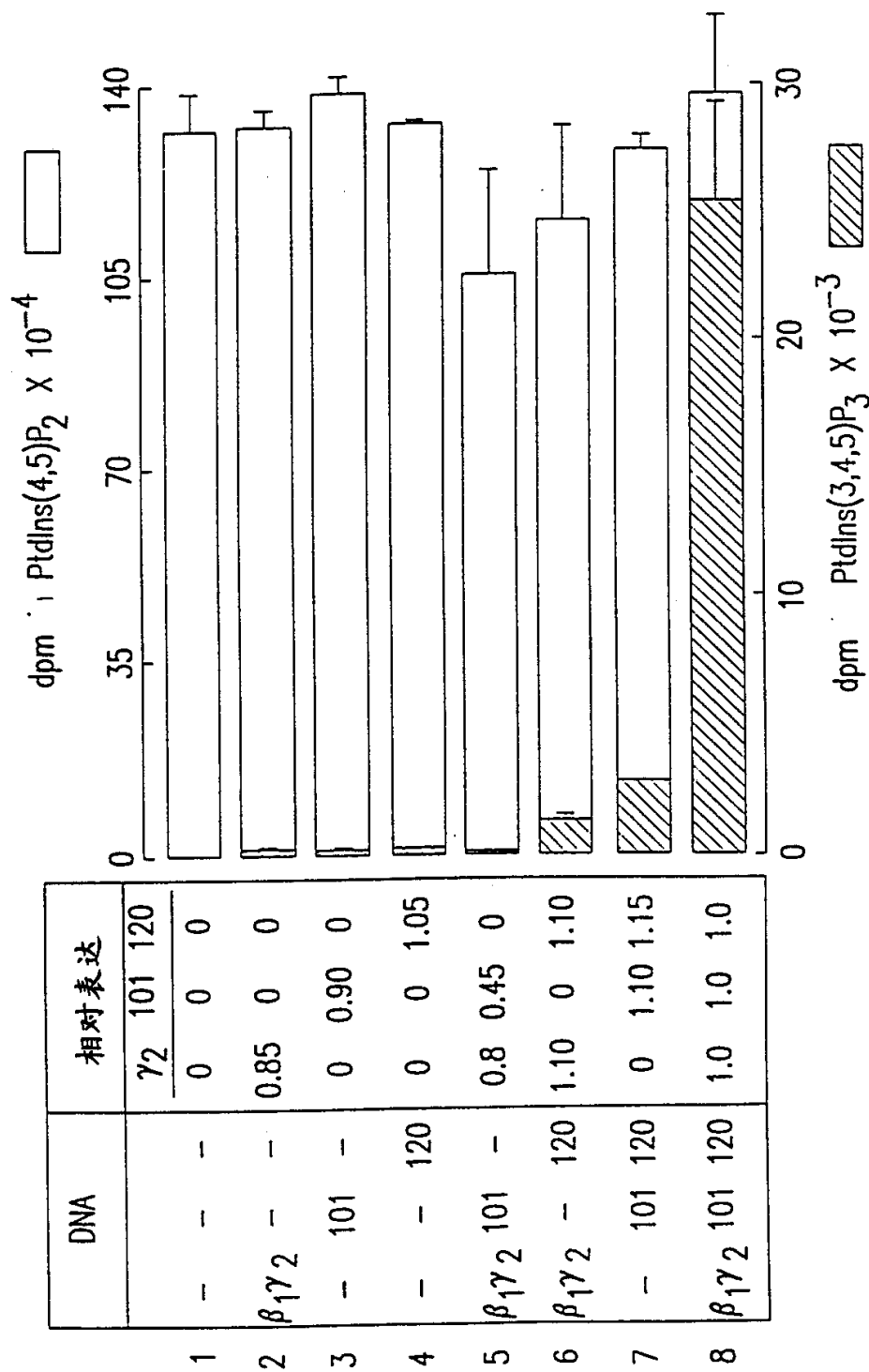


图 9

AAGCTTACTCAGGGCATCTGCTACAGCATTTTAICTTCCCAAGAGCCCAATGAGGGGATGACCCAGGATGCAGCCAGGGG
 CCACGACATGCACGGAGGACCGCATCCAGCATGCCC TGGAACGCTGCTTGCATGGACTCAGCCTCAGCCGCGCTCCACC
 TCCTGGTCAGCTGGGC TGTGCTGAACTGCTGGAGCCTGCAGGAGCTGGTACAGAGGACCCGGGCACATTCTTATCCT
 CCTTGAGCAGATCCTGCAGAAGACCCGAGAGGTCCAGGAGAGGGCACCTACGACCTGCTCACCCGCTGGCCCTGCTCT
 TCTATTCCACTGTTCTTTGTACACCACACTTCCCACCAGACTCGGATCTCTTCTGAAAGCAGCCAGCACCTACCACCGG
 TTCTGACCTGGCCTGTTCTTACTGCAGCATCTGCCAGGAGCTGCTCACCTTCATTGATGCTGAACCTCAAGGCCCAGG
 GATCTCCTACCAGAGACTGGTGAGGGCTGAGCAGGGCTGCCCATCAGGAGTCACCGCAGCTCCACCGTCACCGTGTGTC
 TGTGAAACCCAGTGGAAAGTGCAGGCCGAGTTCTTGTGTAGCCAA TAAGCTGAGTACGCCCGGACACTCGCCTCACAGT
 GCCTACACCACCTGCTCTGCACGGCTTCCAGGCCACCTTTGGGGCCCACTGTGACGTCGCCGGCTTGCACCTGCAGGCT
 ACAGGCCAAGACCTGGCAGAGCTTGAGGACATCTTACGGAGACCGCAGAGGCACAGGAGCTGGCATCTGGCATCGGGG
 ATGCTGCAGAGGCCCGGGTGGCTCAGGACCAAGCTGCAGCGGGTGGGAGAAAGCTGGCTTCCCTGGGGTGTAGAC
 ACTGCAAAACCCAGGGAAGCTCCACACCATCCCATCCCTGTGCCAGGTGCTACACCTACAGCTGGAGCCAGGACAGCTT
 TGACATCCTGCAGGAAATCCTGCTCAAGGAACAGGAGCTACTCCAGCAGGATCCTGGGAGATGATGAAGAGGAGGAAG
 AGGAGGAGGAGGAGGTGGAGGAGGACTTGGAACCTGACGGGCACTGTGCCAGAGAGATTCCCTGCTCTCCACAGCTCT
 TTGGCGTCCCATGACTCCACCTTGCTCCCTTGCACTCTCCAGGCTCGGGGCGGCCCTCTCGGCCCATCTGCTGACTTC
 CTTTGTCTCAGGCC TCTGTATGGCATGGACAGCGGCTACGTGGAGGACAGCGAGGAGAGCTCCTCGAGTGGCCTTGGA
 GGCGTGGCAGCCAGGAACGCCGAGGCCACCGCAGGCC TGGGCAGAGTTTCATCAGGATCTATAACTCTTCAAGAGCACC
 AGCCAGCTGGTACTGCGGAGGACTCTCGGAGCCTGGAGGGCAGCTCGGACACGGCCCTGCCCTGAGCGGGCAGGGAG
 CCTCTGCAGCCCCCTGGACGAAACAGTATCACCCCTTCCCGGCCCCAGCGCTCCCGCTCCCTGCCCCAGCCAACTCG
 GTACCCAGCTGCCAGCTGGCTTCTGGCCCCCTGCTTACGGCCCCCAGCGCCCGGCCCTTCCCTGAGTGGAGATGAGGAT
 CCCAAGCTTCCACGCTACGTGTTGTGGTCTTTGGCTCCGATCGGATTCAGGGAAGGTGGCTCGGGCGTACAGCAACCT
 TCGGGCGCTGGAGAACAAATCGCCCACTCTCACACGGTCTTCAAACTTCAGTTCTTCTACGTGCTGTGAAGCGAAGTC
 ATGGGACCAAGCCCTGGTGGCTGTCCACCCCTCGGAGCCAGACGCCCTCACCCCCGACAGACTCCCCCTAGGCACGCCCAGC
 CCTGGAGAGCTGGGCAACCCCATGGGAGGAGAGCAATGACATCTCCCACTACCTCGGCATGCTGGACCCCTTGGTA
 TGAGCGCAATGTACTGGGCTCATGACCTGCCCTTGAAGTCTGTGCGCAGCAGTCCCTGAAGGCTGAAGCCCCAGGCC
 TGGAGGGCTCCCCAACCCAGCTGCCCCATCCTGGCTGACATGCTACTTACTGCTGCTTGGCGCCAGACCCGGTGTCTG

图 10A

CTGCAACTCTATCAGACCGAGCTGACCTTCATCTGGGAGAAAGACGACAGAGATCTTCATCCACTCCTTGGAGCTGGG
 TCACGCCGTGCCACACGTGCCATCAGGGCTCAGGTCTGGCAGCAAGCGGCTGGGCATCGATGGCGACCGGGAGGCTG
 TTCCTCTAACACTACAGATTATTTACAGCAGGGGGCCATCAGTGGACGAAGTCGCTGGAGCAACCTGGAGAAGGTCTGT
 ACCTCGGTGMCCCTCAACAGGCTGCCGGAAGCAGGAGGTGGATTCCAGCATGGAGGCCCTGACGCTAACCTGAC
 AGAGIGGTGAAAGGCAGAACCTCCAAATCCAAAGMAGGGCTTTAACCAATTAGCAATCGCAGATCAAMGTGGACAACTG
 TGCAGATCATCGGCTCCAAACAGCTGCCCTTTGCTGTGTGCTGGACCAAGGATGAGAGAAAGATCCTGCAGAGTGTAGTC
 AGATGTGAGGTCTCACCGTGTCTACAAGCCAGAGAAGAGCGACCTCTCTCACCACCCAGACGCTCCTGACCTGCCGGC
 CCAGGCCGCACCTGATCTCTGCTCCCTTCTCTGCCCTGCCCATCATGACTTTCAGTGGAGCTCTGCCCTAGTGTGGGCCCA
 GCGCCAGACTGGACAGAAGCCCTGGGGCAACCTCCTCGGCCACCCCTCCAGGACAGTCCCTCTCTGTGGAGAACTGAATG
 GCCCTGTGCAGAGCCA TAGTCCCACTGTGGGTCTTGCAATGAGCAGGGGCTGGGAGTAGAGGGTTCTGGGGCCTCAGGG
 TTCTGGGAAGCAACAGCTATCAGAGAGAGAAGGGCCAGACCCCATAGCCTCTTAGATTCTTGGCAGTAGAAGGAAGG
 ATGGGTAAATTGACCTCTGAAGTCCCTGACCATTAGCATGGTCTAGGATCCTTTCTAGAGGAAGATCTGAGGGCTCTGGT
 GCTCAGGGGGATGGCTGGGCCCTTTCTCTCMCCCTTGGCTGAGCCTACCCCTTACTTTGCCAAAGACTTGAGGACCCCTG
 TATGCTGGAGTTCAGTCCCCCTCCTCTGTGGGGCTCAGGTGATTGAATGTGGATGAACATTTCTCTACTTCAAGACCA
 CCTCTCCCTGCAAAACACACACACATGGCATGATGTACGCACATGGGCACCG

图 10B

MOPGATTG:EDRIQHALERCLHGLSLRRSTSWASAGLCLNCWSLQELVSRDPGHFLILLEQILQKTREVQEKGYDILLTP
LALLFYSTVLCPTHFPPDSOLLKAASTYHRFLTWPVPYCSICQELLTFIDAEKAPGISYQRLVRAEQGLPIRSHRSST
VTVLLNPVEVQAEFLAVANKLSTPGHSPHAYTTLLHAFQATFGAHCVPGLHCRLOAKTLAELEDIFTETAEAQELA
SGIGDAAEARWLR TKLQAVGEKAGFPGVLD TAKPGKLHTIPVARCYYTYSWSDSFDILQEILLKEQELLQPGILGDD
EEEEEEEEVEEDLETDGHCAERDSLLSTSLASHDSTLSASSQASGPALSRHLLTSFVSGLSDGMDSGYVEDSEESS
EVPWRRGSQERRGHRPGQKFI RYKLFKSTQVLRRDSRLEGSSDTALPLRAGSLCSPLDEPVSPPSRAQSRSLP
QPKLGTQLPSWLLAPASRPQRRPFLSGDEDPKASTLRWVWFGSDRISGKVARAYSNLRRLENNRPLL TRFFKLOFFYVP
VKRSHGTSPGACPPPRSQTSPPTDSPRHASPGELGTTPWEESTNDISHYLGMLDPWYERNVLGLMHLPEVL CQQLKA
EAQALEGSPTQLPILADMLLYYCRFAARPVLLQLYQTELTFITGEKTEIFIHSLLELGHSAATRAIKASGPGSKRLGIDG
DREAVPLTLQIYYSKGAISGRSRWSNLEKVCTSVNLNKACRKQEELDSSMEALTLNLT EVVKRQNSKSKGFNQISTSQI
KVDKVQIIIGSNSCPFVCLDQDERKILQSVVRCEVSPCYKPEKSDLSSPPQTPPDLPQAAPDLC SLLCLPIMTFSGALP

图 11

000000
000000
000000
000000
000000

TTTGAATTTGTTTTCTTTTCAAAAATTAACAAATGATCCTTCAGCATCATCGCCTCCGCTGCTTTATCAGGTCGCATAG
 GGCATGGAGCTGGAGAACTATAACAGCCCGTGGTGTGAGAGAGGACAACTGCCGAAGGCGCCGGAGGATGAAGCCCGC
 CAGTGCTGCGGCCAGCCTGTCTCCATGGAGCTCATCCCCATCGAGTTCGTGCTGCCCACCAGCCAGCGCAAATGCAAGA
 GCCCCGAAACGGCGCTGCTGCACGTGGCCGGCCACGGCAACGTGGAGCAGATGAAGGCCAGGTGTGGCTGCGAGCGCTG
 GAGACCAGCGTGGCGCGGACTTCTACCACCGCTGGGACCGCATCACTTCCTCCTGCTCTATCAGAAGAAGGGGCAGTG
 GTACGAGATCTACGACAAGTACCAGGTGGTGCAGACTCTGGACTGCCTGCGCTACTGGAAGGCCACGCACCGGAGCCCCG
 GCCAGATCCACCTGGTGCAGCGGCACCCGCCCTCCGAGGAGTCCCAAGCCTTCAGCGGCAGCTCACGGCGCTGATTGGC
 TATGACGTCACTGACGTGACGAACGTGCACGACGATGAGCTGGAGTTACGCGCCGTGGCTTGGTGACCCCGCGCATGGC
 GGAGGTGGCCAGCCGCGACCCCAAGCTCTACGCCATGCACCCGTGGGTGACGTCCAAGCCCCCTCCCGAGTACCTGTGGA
 AGAAGATTGCCAACAACTGCATCTTCATCGTCAATCACCGCAGCACCACCAGCCAGACCATTAAGGTCTCACCCGACGAC
 ACCCCCGGCGCCATCCTGCAGAGCTTCTTACCAAGATGGCCAAGAAGAAATCTCTGATGGATATCCCGAAAGCCAAG
 CGAACAGGATTTTGTGCTGCGCGTCTGTGGCCGGGATGAGTACCTGGTGGGCGAAACGCCCATCAAAAATTCCAGTGGG
 TGAGGCACTGCCTCAAGAACGGAGAAGAGATTCACGTGGTACTGGACACGCCTCCAGACCCGGCCCTAGACGAGGTGAGG
 AAGGAAGAGTGGCCGCTGGTGGACGACTGCACGGGAGTCACCGCTACCATGAGCAGCTTACCATCCACGGCAAGGACCA
 CGAGAGTGTGTTACCGTGTCCCTGTGGGACTGCGACCGCAAGTTCAGGGTCAAGATCAGAGGCATTGATATCCCGTCC
 TGCCTCGGAACACCGACCTCACAGTTTTTGTAGAGGCAAACATCCAGCATGGGCAACAAGTCCTTTGCCAAAGGAGAACC
 AGCCCCAAACCTTCACAGAGGAGGTGCTGTGGAATGTGTGGCTTGAGTTCAGTATCAAAATCAAAGACTTGCCCAAAGG
 GGCTCTACTGAACCTCCAGATCTACTGCGGTAAAGCTCCAGCACTGTCCAGCAAGGCCTCTGCAGAGTCCCCAGTTCTG
 AGTCCAAGGGCAAAGTTCGGCTTCTCTATTATGTGAACCTGCTGCTGATAGACCACCGTTTCTCTCGCGCGTGGAGAA
 TACGTCTCTCCACATGTGGCAGATATCTGGGAAGGGAGAAGACCAAGGAAGCTTCAATGCTGACAAACTCACGTCTGCAAC
 TAACCCAGACAAGGAGAAGTCAATGTCCATCTCCATTCTTCTGGACAATTACTGCCACCCGATAGCCCTGCCTAAGCATC
 AGCCCCACCCCTGACCCGGAAGGGACCGGGTTCGAGCAGAAATGCCCAACCAGCTTCGCAAGCAATTGGAGGCGATCATA
 GCCACTGATCCACTTAACCTCTCACAGCAGAGGACAAAGAATTGCTCTGGCATTTTAGATACGAAAGCCTTAAGCACCC
 AAAAGCATATCCTAAGCTATTTAGTTCAGTGAAATGGGGACAGCAAGAAATTGTGGCCAAAACATACCAATTGTTGGCCA
 GAAGGGAAGTCTGGGATCAAAGTGCTTTGGATGTTGGGTAAACAATGCAGCTCCTGGACTGCAACTTCTCAGATGAAAAAT
 GTAAGAGCCATTGCAGTTCAGAACTGGAGAGCTTGGAGGACGATGATGTTCTGCATTACCTTCTACAATTGGTCCAGGC
 TGTGAAATTTGAACCATAACCATGATAGCGCCCTTGCCAGATTTCTGCTGAAGCGTGGTTAAGAAACAAAAGAATTGGTC
 ACTTTTTGTTTTGGTTCTTGAGAAGTGAGATAGCCAGTCCAGACACTATCAGCAGAGGTTGCTGTGATTCTGGAAGCC
 TATCTGAGGGGCTGTGGCACAGCCATGCTGCACGACTTTACCCAACAAGTCCAAGTAATCGAGATGTTACAAAAAGTCAC
 CCTTGATATTAATCGCTCTCTGCTGAAAAGTATGACGTGAGTTCCCAAGTTATTTCAAACTTAACAAAAGCTTGAAA
 ACCTGCAGAATTCTCAACTCCCCGAAAGCTTTAGAGTTCCATATGATCCTGGACTGAAAGCAGGAGCGCTGGCAATTGAA
 AAATGTAAAGTAATGGCCTCCAAAGAAAAACCACATATGGCTTGAGTTTAAATGTGCCGATCCTACAGCCCTATCAATGA
 AACAAATTGGAATTATCTTTAAACATGGTGTGATCTGCGCCAAGACATGCTTATTTTACAGATTCTACGAATCATGGAGT
 CTATTTGGGAGACTGAATCTTTGGATCTATGCCTCCTGCCATATGGTTGCATTTCAACTGGTGACAAAATAGGAATGATC
 GAGATTGTGAAAGACGCCACGACAAATGCCAAANTTCAGCAAAGCACAGTGGGCAACACGGGAGCAATTAAGATGAAGT
 CCTGAATCACTGGCTCAAAGAAAAATCCCTACTGAAGAAAAGTTTCAGGCAGCAGTGGAGAGATTTGTTTTATTCTGTG

图 12A

CAGGCTACTGTGTGGCAACCTTTGTTCTTGGGAATAGGCGACAGACACAATGACAATATTATGATCACCGAGACAGGAAAC
 CTATTTTCATATTGACTTCGGGCACATTCTTGGGAATTACAAAAGTTTCTTGGGCATTAATAAAGAGAGAGTGCCATTTGT
 GCTAACCCCTGACTTCCTCTTTGTGATGGGAACCTCTGGAAAGAAGACAAGCCACACTTCCAGAAATTTCCAGGACATCT
 GTGTTAaGGCTTATCTAGCCCTTCGTTCATCACACAAACCTACTGATCATCCTGTTCTCCATGATGCTGATGACAGGAATG
 CCCCAGTTAACAAGCAAAGAAGACATTGAATATATCCGGGATGCCCTCACAGTGGGGAAAAATGAGGAGGATGCTAAAAA
 GTATTTTCTTGATCAGATCGAAGTTTGCAGAGACAAAGGATGGACTGTGCAGTTTAATTGGTTTCTACATCTTGTCTTGT
 GCATCAAACAAGGAGAGAAACATTGAGCCTAATACTTTAGGCTAGAATCAAAAAACAAGTTAGTGTTCTATGGTTTAAAT
 AGCATAGCAATCATCGAAGTTGGATTTCAAATGCAATAGACATTGTGAAAGCTGGCATTTCAGAAGTATAGCTCTTTTCC
 TACCTGAACTCTTCCCTGGAGAAAAGATGTTGGCATTGCTGATTGTTTGGTTAAGCAATGTCCAGTGCTAGGATTATTTG
 CAGGTTTGGTTTTTTTCTCATTTGTCTGTGGCATTGGAGAATATTCTTGGTTTAAACAGACTAATGACTTCCTTATTGTCC
 CTGATATTTTACTATCTTACTATTGAGTGCTTCTGGAAATCTTtGGAATAATTGATGACATCTATTTTCATCTGGGTT
 TAGTCTCAATTTTGGTTATCTTTGTGTCTCTCAAGCTCTTTAAAGAAAAAGATGTAATCGTTGTAACCTTTGTCTCATTC
 CTTAAATGATGCTTCCAAACATCTCCTTAGTGTCTGCAGGTGTTAGTGGTGTGCTAAAAGCAAGGAAAGCGAGTTAGTCT
 TTTCAAGTGCTTTTGGCAATTCAATTCTTTGTTCATGTATAACTGAGACACACAAACACAGCAGGAGAAATCTAAACCGTT
 GTGCCCTTGACCTTCTCTGCTGGTCTTGTTCAGGGTTATGAATATGAAAAAATAGAGATGAGACTTTTTGTGTCAACTC
 TGTCCACAAGAGTGAGTTATCTAGTATGATTAGTATAGCTTTCTCCAGCATGGCAGCAGGAAGTAACACAGGGCCTCTT
 TTATGCCTGACATTTCTTCCCTTCTTTTCCCTGCCTCCCTTTTTTCATCAATTGCAATGCTCCCACTCTTTACAGA
 CTTGTGAAATCTTCAAGAACACCTTTACTCTATAACTCAAAAATAGTTGAAAAATAATTACTTCTCAAGGATTATTAGA
 ATCTTAGGTACTTATTTGTAAAGATGTTTAGTGACTTTTTTTTCAAGTATCTATAAAGGAGGCAGATTCTAGAAAAATAG
 AATTAGTTTCCAAATGCCTTAATTTTAACTTTGGCCTGAACAGTTTTTTCTTTTTCTTAATGGAAGAAGATATTTAATA
 TCTTAAAAATATTCCAAGTTAGGAAGAACACTACTTGCCCTATCCATTTCCCATTTAAAGGACTTTTAACTTTGACACA
 GTCCTTCAGATTTCTTGAAATCCTTGAAATATCTTACTTTAAAAATATTTTCATCTCTGAAATATCTCGTTATTTATTG
 GAGGTATTGTTTAACTTAGATAGACCATTAAATTATTTATAAAATATTTTGTAAATTACcTGTAAGTAATACATTACATA
 GAAAAAATATGTTAACAGTGCTCTCTGTTTAAAGTATAATCAGATATAAATATATaACTTAATTTTTTAATTTTAAAAATA
 GATACCTGTTTGACTTTGAGGTAGTCCAGACCTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATGTGTGCAAAAGCCCAAAGGTTT
 CTAAGCCTGCTGCAAGAAGAATCAACAGGGACACTTTTAAAAACACTCTTATCAGCCTGGGCAACACAGTGAGACTC
 CATCTCTTAAAAAAAATTAGCTGGGTATAGTGGTATGTGCCTGTAGTCCCAGGTACTCAGGAGGCTGASGCAGGAGGA
 TTGCCTGAGCCCAGGAGGTGGAAACTGCAGAGACTCATGATCATGTCTTACACTCCAGCCTGGATAACAGAGCGAGACC
 CTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCGACCGAG

图 12B

MELENYQPVVLRDNCRRRRRMKPRSAASLSSMELPIEFVLPTSQRCKSPETALLHVAGHGNVEQMKQWLRALLET
SVAADFYHRLGPHIFLLLQKKGQWYEIYDKYQVVQTLDCLRWKATHRSPQIHLVQRIPPEESQAFQRQLTALIGYD
VTDVSNVIDELEFTRRGLVTPRMAEASRDPKLYAMIPWVTSKPLPEYLWKKIANNCIFIVIHRSITTSQTIKVSDDTP
GAILQSFTKMAKKSLMDIPESQEQDFLVRUGRDEYLVGETPIKNFQWVRHCLKNGEEIHVVLDTPPDPALDEVKFE
EWPLVDDCTGVTGYIEQLTIHGKDIESVFTVSLMDCDRKFRVKIRGIDIPVLPRNTDLTVFVEANIQIQQVLCQRRITSIP
KPFTEEVLNWNWLEFSIKIKDLPKGALLNLQIYCGKAPALSSKASAESSESCKGVRLLYVYNLLTIDHRFLLRGEYV
LHWQITSGKGEDQGSFNADKLTSATNPKENSMSISILLDNYCHPIALPKHQTPDPEGRVRAEHPNQLRKQLEAIIAT
DPLNPLTAEDKELLWIFRYESLKHPIKAYPKLFSSVKNGQOEIVAKTYQLLARREWQDSALDVGLTMQLLDCNFSDENVR
AJAVQKLESLEDDVLLHYLLQLVQAVKFEPYHDSALARFLLKRGLRNKRIGHFLFWFLRSEIAQSRHYQQRFAVILEAYL
RGGGTAMLHDFTOQQQVIEMLQKVTLDIKLSAEKYDVSSQVISQLKQKLENLQNSQLPESFRVPYDPGLKAGALAEKC
KVMASKKKPLWLEFKCADPIALSNETIGIIFKHGDDLQDQWMLILQILRIMESIWETESLDCLLPYGCTSGDKIGHIEI
VKDATTIAKIQQSTVGTGAFKDEVLNHMLKEKSPTEEFQAAVERFVYSCAGYCVATFVLGIGDRHNDNIMJITETGNLF
HIDFGHTLGNYSFLGINKERVPFVLTPDFLFVMGTSGKKTSPHFQKFQDICVKAYLALRHHITNLLIILFSMMLMTGMIQ
LTSKEDIEYIRDALTVGKNEEDAKKYFLDQIEVCROKGNVTQFNWFLHLVLGIKQGEKHS.