



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1738900 B

(45) 授权公告日 2011.07.06

(21) 申请号 200380108886.1 *G01N 33/50* (2006.01)
(22) 申请日 2003.11.18 *G01N 33/53* (2006.01)
(30) 优先权数据 *A01K 67/027* (2006.01)
02/14374 2002.11.18 FR *C12N 15/11* (2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日 (56) 对比文件
2005.07.15 WO 0224733 A, 2002.03.28, 19-26.
(86) PCT申请的申请数据 CN 1209843 A, 1999.03.03, 全文.
PCT/FR2003/003413 2003.11.18 Tomta T..New markers for pancreatic
(87) PCT申请的公布数据 islets and islet cell tumors..PATHOLOGY
INTERNATIONAL52 7.2002, 52(7), 435-432.
W02004/046355 FR 2004.06.03 审查员 廖雅静
(73) 专利权人 原子能委员会
地址 法国巴黎
专利权人 约瑟夫·傅里叶大学
(72) 发明人 米歇尔·塞夫 阿兰·法维耶
(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
代理人 林晓红
(51) Int. Cl.
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 3 页

(54) 发明名称

特异于胰腺胰岛 β 细胞的蛋白质及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种特异性表达于胰腺胰岛 β 细胞的 ZnT-8 蛋白,涉及编码上述的与胰岛素成熟及外排相关的蛋白质的多核苷酸,并涉及它们的应用,例如在分选及研究 β 细胞和筛选治疗糖尿病和高胰岛素血症的药物上的应用。

1. 至少一种分离的多核苷酸或相应的蛋白质作为胰腺胰岛 β 细胞的特异性标记的用途,所述多核苷酸或相应的蛋白质选自:

- 由以下序列之一组成的多核苷酸:(a) 序列 SEQ ID NO. 1, (b) 选自 SEQ ID NO. 3 和 4 的序列,以及 (c) 与 (a) 和 (b) 中所定义的序列之一互补的有义或反义序列;和

- (d) 由上述 (a) 中所定义的多核苷酸所编码的具有序列 SEQ IDNO. 2 的蛋白质。

2. 权利要求 1 的用途,其特征在于 (b) 中所定义的所述分离的多核苷酸为由 SEQ ID NO. 3 和与 SEQ ID NO. 4 互补的序列组成的引物对。

3. 一种分离的多核苷酸,其特征在于其可用于权利要求 1 中所定义的用途中且其具有选自以下序列的序列:

(a) 序列 SEQ ID NO. 1,

(b) 选自 SEQ ID NO. 3 和 4 的序列,

(c) 一种与 (a) 或 (b) 中所定义的序列之一互补的有义或反义序列。

4. 用于扩增可用于权利要求 1 中所定义的用途的核酸的一对引物,其特征在于其为权利要求 2 中所定义的引物对。

5. 一种用于确定生物学样品中的 ZnT8 的转录谱或所述的转录谱的变化的方法,包括:第一步,用任何合适的方式从生物学样品中得到 RNA,第二步,在适合于 RNA 和探针之间杂交的条件下,将所述 RNA 与一种由权利要求 3 的多核苷酸所组成的标记探针相接触,以及第三步,用任何合适的方式显示所形成的杂合体。

6. 权利要求 5 的方法,其中第二步是一个逆转录和 / 或用权利要求 4 的一对引物扩增所述转录产物的步骤,以及第三步是一个用任何合适的方式显示所扩增的核酸的步骤。

7. 权利要求 5 或 6 的方法,其特征在于还包括一个通过与预先选定的对照进行比较而评价基因的转录水平的步骤。

8. 一种用于分析生物学样品中的 SEQ ID NO. 1、或者权利要求 3 的多核苷酸的方法,包括:第一步,用任何合适的方式从生物学样品中得到 DNA,第二步,用权利要求 4 的一对引物所进行的扩增,第三步,用任何合适的方式显示所形成的扩增的核酸,以及第四步,分离及测序所检测到的核酸。

9. 一种用于进行权利要求 5 到 8 中任一项的方法的试剂盒,包括:

(a) 至少一种权利要求 3 的探针和 / 或一对权利要求 4 的引物;

(b) 进行所述的探针和 / 或所述的引物与生物学样品的核酸之间的杂交反应所需的试剂;

(c) 进行扩增反应所需的试剂;和

(d) 测定或检测所述探针与生物学样品的核酸之间所形成的杂合体、或所形成的扩增的核酸所需的试剂。

10. DNA 芯片,包括至少一种权利要求 3 的多核苷酸。

11. 权利要求 3 的多核苷酸用于制备 DNA 芯片的用途。

12. 一种克隆载体和 / 或表达载体,其特征在于其包括一种由权利要求 3(a) 的多核苷酸或与之互补的有义或反义序列所组成的插入物。

13. 一种经权利要求 3(a) 的多核苷酸或与之互补的有义或反义序列或权利要求 12 的载体修饰的细胞。

14. 权利要求 13 的修饰的细胞用于生产一种蛋白质的用途,所述蛋白质由权利要求 3(a) 的多核苷酸或与之互补的有义或反义序列编码。

15. 一种制备由权利要求 3(a) 的多核苷酸或与之互补的有义或反义序列所编码的蛋白质的方法,其特征在于其包括在容许所述蛋白质表达的条件下,培养权利要求 13 的修饰的细胞,并纯化所述的重组蛋白质。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

17. 特异于 SEQ ID NO. 2 的蛋白质的单克隆或多克隆抗体用于测定和 / 或分选胰岛或 β 细胞的用途。

18. 特异于 SEQ ID NO. 2 的蛋白质的单克隆或多克隆抗体用于分析干细胞分化为胰岛细胞的用途。

19. 权利要求 18 的用途,其中所述胰岛细胞为 β 细胞。

20. 一种选择胰岛的 β 细胞的方法,包括:第一步,将可能含有这些胰岛和 / 或细胞的生物学样品与特异于 SEQ ID NO. 2 的蛋白质的单克隆或多克隆抗体相接触,第二步,用任何合适的方式验证标记了抗体的细胞,以及第三步,用任何合适的方式分离所标记的细胞。

21. 一种用于分析干细胞分化成胰岛细胞或分化成 β 细胞的方法,包括:第一步,将可能含有正在分化的所述干细胞的生物学样品的细胞与特异于 SEQ ID NO. 2 的蛋白质的单克隆或多克隆抗体相接触,第二步,用任何合适的方式验证标记了抗体的细胞,以及第三步,用任何合适的方式观察所标记的细胞。

22. 权利要求 21 的方法,还包括一个用任何合适的方式分离所标记的细胞的附加步骤。

23. 一种筛选能在体外或体内直接或间接地与权利要求 3 的多核苷酸相互作用的化学或生物化学化合物的方法,其特征在于其包括:第一步,将候选的化学或生物化学化合物与权利要求 3 的多核苷酸或权利要求 13 的细胞或权利要求 10 的 DNA 芯片相接触,以及第二步,测定候选的化学或生物化学化合物与所述的多核苷酸或细胞或 DNA 芯片之间所形成的复合物。

24. 一种筛选能在体外或体内直接或间接地调控权利要求 3 的多核苷酸的表达的方法,其特征在于其包括:第一步,将候选的化学或生物化学化合物与权利要求 3 的多核苷酸或权利要求 13 的细胞或权利要求 10 的 DNA 芯片相接触,以及第二步,用任何合适的方式测定权利要求 3 的多核苷酸的表达。

25. 一种筛选可潜在用于治疗糖尿病或高胰岛素血症的化学或生物化学化合物的方法,其特征在于其包括:第一步,将候选的化学或生物化学化合物与由权利要求 3 的多核苷酸所编码的蛋白质或权利要求 13 的细胞相接触,以及第二步,测定候选的化学或生物化学化合物与所述的蛋白质或细胞之间所形成的复合物。

26. 选自权利要求 3 的多核苷酸、由权利要求 3 的多核苷酸所编码的蛋白质和特异于 SEQ ID NO. 2 的蛋白质的抗体中的一种产品用于确定编码 ZnT8 的基因的等位基因变异性、突变、缺失、或杂合性的丧失的用途。

27. SEQ ID NO. 2 的蛋白质用于制备检测存在针对胰腺胰岛 β 细胞的自身抗体的蛋白质芯片的用途。

28. 权利要求 27 的用途,其中所述蛋白质存在于包含所述蛋白质的芯片上。

-
29. 权利要求 27 的用途,其中所述检测包括免疫酶学检测和 / 或免疫化学检测。
 30. 一种蛋白质芯片,其包含 SEQ ID NO. 2 的多肽。

特异于胰腺胰岛 β 细胞的蛋白质及其应用

[0001] 本发明涉及一种特异表达于胰腺胰岛 β 细胞的被称为 ZnT-8 的蛋白质, 涉及编码上述的与胰岛素成熟及外排相关的蛋白质的多核苷酸, 并涉及它的应用, 特别是在分选及研究 β 细胞和筛选治疗糖尿病和高胰岛素血症的药物上的应用。

[0002] 糖尿病是最常见的疾病之一, 它影响了工业化国家的 5% 人口并且其发生率在全球所有国家都在持续增加 (预计, 到 2025 年将有 3 亿糖尿病患者, 包括法国的 240 万患者)。在各种形式的糖尿病中, I 型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病影响着将近 500,000 到一百万美国人和 150,000 法国人, 及 0.2 到 0.4% 人口。特征性的症状包括高水平的血糖和尿糖、严重的利尿、强烈的饥饿感和乏渴感、以及体重减轻。

[0003] 非胰岛素依赖性 II 型糖尿病 (NIDD) 也被称作为“肥胖性”糖尿病或晚期起病糖尿病, 常发生于约 50 岁左右人群。通过饮食、服用口服药物的方式治疗, 在疾病进展多年后用胰岛素治疗。目前, 有两百万法国人正在接受抗糖尿病药物和 / 或胰岛素的治疗。

[0004] 尽管通用胰岛素注射及控制糖的摄入可以控制糖尿病, 但是目前与该疾病相关的并发症需要新的预防、治疗和诊断糖尿病的方法。

[0005] 胰腺包括两种在形态和生理上都有所不同的结构:

[0006] - 外分泌胰腺, 它产生参与消化的酶 (淀粉酶、脂肪酶等) 以及碳酸氢钠。

[0007] - 内分泌胰腺, 它产生参与控制血糖的激素 (胰岛素、胰高血糖素、生长抑素和胰多肽)。

[0008] 内分泌胰腺的细胞被组合成为以小岛形式 (朗格汉氏岛或胰岛) 分散于胰腺中的微器官。每个胰岛由 4 种细胞类型所组成: α 细胞、 β 细胞、 δ 细胞和 PP 细胞。 α 细胞位于岛的周边并分泌胰高血糖素。 β 细胞位于岛的中央且是唯一能应答于葡萄糖并分泌胰岛素的细胞。 δ 细胞位于岛的周边并分泌生长抑素。PP 细胞的功能还有争议 (合成胰多肽)。

[0009] 研究 β 细胞的细胞模型的缺乏以及适用于该细胞类型的可靠和有效的细胞分选方法的缺乏都妨碍了对其功能的研究, 并因此妨碍了治疗 I 型和 II 型糖尿病的新方法的发展。

[0010] 在对糖尿病的治疗中, 除规律给予胰岛素外, 用于生理地控制高血糖并将糖尿病患者的高血糖正常化的方法之一是恢复细胞的体内胰岛素分泌。在这个方面, 已经提出了一些方法:

[0011] - 获得动物的产胰岛素细胞进行异种移植;

[0012] - 体外将分离到的干细胞分化为分泌胰岛素的细胞, 再移植, 以克服免疫的问题及避免患者免疫抑制治疗的需要。但是, 通过分化干细胞廉价地生产大量产胰岛素细胞要求特别适用于分型并纯化所分化的细胞的新的生物分子工具;

[0013] - 胰岛移植; 近期许多研究的主题都是制备用于治疗目的的胰岛或 β 细胞。移植的第一步是从已经被宣布为脑死亡的供体中取出胰腺。胰岛的分离从用胶原酶溶液酶消化胰腺开始。不是所有的移植都要求纯化所消化的胰岛。但是, 现在绝大多数研究者都认为纯化胰岛对于同种异体移植是必需的 [2]。然后, 通过门静脉内注射移植入有效量 (最小

3000IEQ/kg) 的胰岛 (IEQ:胰岛等效量)。

[0014] 但是,分离胰岛或 β 细胞需要用于选择及鉴定 β 细胞的特殊及可靠的方法。

[0015] 以往的研究已经尝试发展用于标记 β 细胞的方法。所提出的方法包括:

[0016] -用 GFP(绿色荧光蛋白质)标记,它可荧光标记细胞。这种技术的主要缺点是需要将外源基因或转基因引入到细胞内,更甚者是需使用病毒载体(腺病毒)[1];

[0017] -基于 β 细胞的大量的自体荧光的技术[2]。但是,这个技术缺乏对细胞类型的特异性。

[0018] -将细胞与锌特异性荧光素(Newport Green[3]或双硫脲[3])孵育。这个技术基于 β 细胞内大量的锌含量。锌是胰岛素分泌颗粒的一种主要成分,另外它在控制胰岛素的分泌上发挥着作用[5]。但是,这些技术有着许多缺点:使用化学品、对 β 细胞的毒性危险、缺乏对细胞类型的特异性。另外,双硫脲有着快速光降解的问题[6];

[0019] -通过用 T 细胞克隆(WO 91/17186)对 β 细胞所表达的抗原的识别来间接验证。对该抗原的最初研究没有提供肽序列特征的结果,也没有提供对 β 细胞以及胰岛和胰腺或生物体的其他细胞类型的选择性的结果。相同作者的更新研究显示该抗原有着更广泛的分布,因此该抗原是非特异于 β 细胞的抗原[7]。

[0020] 因此,缺乏针对胰腺胰岛 β 细胞的特异及可靠的标记物。

[0021] 本发明的一个目的是提供一种这样的标记物。

[0022] 胰岛蓄积了大量的锌,因此为了在分泌囊泡中蓄积锌就需要非常有效及非常特异的转运蛋白[8]。应答于外界刺激例如葡萄糖浓度的增高,通过细胞外排作用将胰 β 细胞所生成并储存的胰岛素释放到细胞外基质中。葡萄糖的增高引起 ATP/ADP 比的改变、钾通道的关闭和钙通道的开放,这就引起细胞外排胰岛素[9]。

[0023] 已知在有锌时,胰岛素与锌分别地按 4:1 和 6:2 的胰岛素:锌比例结合形成四聚体和六聚体。胰岛素以由与按每个六聚体与 2 个锌原子结合的六聚体所构成的固态形式被储存于分泌囊泡中。囊泡含有比形成胰岛素-锌六聚体所必需量的 1 到 1.5 倍过量的锌。在外排胰岛素期间,富含胰岛素的囊泡与 β 细胞的细胞膜融合并将胰岛素及锌释放到循环中。所释放的锌作用于钾通道的负反馈环,造成钾通道的活化及细胞外排的终止。

[0024] 在哺乳动物细胞中,已经克隆并描述了 7 种具有锌转运蛋白功能的同源蛋白质,称作为 ZnT-1、-2、-3、-4、-5、-6 和 -7。对这些蛋白质一级结构的分析使得确定出一个由 6 个跨膜结构域和一个富含组氨酸的细胞内环所构成的共同结构单位成为可能。ZnT-1 是一种定位于细胞膜上的遍在的转运蛋白,它保证锌流到细胞外[11]。ZnT-2 容许细胞耐受培养基中的过量的锌,从而通过将锌定位于酸性的细胞浆内囊泡中获得对锌的耐受性,因此保证锌在细胞内远高出正常水平的蓄积[12]。已经克隆出人的 ZnT-3 和 ZnT-4,它们具有与 ZnT-2 相似的功能。ZnT-3 特异于某些组织,被强烈地表达于脑部、富含锌的突触囊泡膜、海马的苔状纤维以及睾丸中。ZnT-4 被遍在地表达,但是高水平的表达见于脑部和上皮细胞中。这个转运蛋白在哺乳动物的上皮中是重要的,它参与控制母乳中的锌含量。ZnT-5 和 ZnT-6 也是定位于高尔基体的遍在的转运蛋白。ZnT-7 是一种特异地定位于内质网中的遍在的转运蛋白。

[0025] 先前研究提出了一种搜索参与胰腺 β 细胞的锌代谢的基因的方法。这些研究没有证实一种特异的蛋白质或转运蛋白[10]。

[0026] 本发明者已经分离出一个 1110 个碱基对的多核苷酸 (SEQ ID NO. 1), 它代表相应于在胰岛中特异表达的, 以及更特异地是在分泌胰岛素的细胞或 β 细胞中特异表达 mRNA 的 cDNA。

[0027] 本发明的多核苷酸编码被称为 ZnT-8 (SEQ ID NO. 2) 的蛋白质, 这是一种 369 个氨基酸的蛋白质, 所估计的分子量为 40.8 kDa, 具有与 ZnT 家族蛋白质一级结构同源的一级结构。编码所述蛋白质的基因被称为 ZnT-8。

[0028] 对完整的 ZnT-8 蛋白质的跨膜电位的研究显示它具有 6 个跨膜结构域 (第 74-95、107-126、141-163、177-196、216-240 和 246-267 位氨基酸) 及定位于胞浆内的 N 和 C 末端。这个研究也显示该蛋白质二级结构具有 3 个细胞外氨基酸环 (第 96-106、164-176 和 241-245 位氨基酸)。

[0029] 另外, ZnT-8 蛋白质在胰岛素分泌囊泡及在细胞膜上的定位说明它参与了锌在含胰岛素囊泡内的蓄积, 因此它在胰腺胰岛 β 细胞内的胰岛素的成熟及外排上发挥着作用。

[0030] ZnT-8 蛋白质及相应的多核苷酸第一次被用作为胰腺胰岛 β 细胞的特异的和可靠的标记物; 这种标记物的用途具体的如下所述:

[0031] - 细胞分选: 该标记物使得肉眼可见地选择性分选及检测 β 细胞成为可能, 它不需要化学地或生物地修饰所述的细胞, 特异地是用针对所述蛋白质的抗体。

[0032] - 体外研究模型: 该标记物可被用于体外研究 (i) 转运蛋白 (ZnT-8) 在模型细胞系 (例如 INS-1 小鼠胰岛素瘤细胞系) 中的过表达及对应答于葡萄糖刺激的胰岛素分泌的影响; (ii) 细胞对氧化应激条件或者低或高锌浓度所诱导的细胞死亡 (凋亡) 的敏感性; 以及 (iii) 应答于各种外源性刺激 (生长因子、胰腺提取物), 干细胞分化为胰岛素分泌细胞的过程。

[0033] - 筛选药物: 该标记物也代表一种用于筛选能介导 ZnT-8 基因表达和 / 或 ZnT-8 蛋白质活性的物质的有用的药理学靶点, 该物质有可能被用于糖尿病和高胰岛素血症的治疗。

[0034] - 糖尿病的诊断: 多核苷酸也可被便利地用于在高危家族中早期诊断糖尿病, 具体地是它使得检测 ZnT-8 基因中的可见突变以及减少或甚至减免通常所进行的检查成为可能。

[0035] 因此, 本发明的一个主题是作为胰腺胰岛 β 细胞的特异性标记物的至少一种分离的多核苷酸或相应蛋白质的用途, 这些多核苷酸选自:

[0036] 一包括或具有以下序列之一的多核苷酸: (a) 序列 SEQ ID NO. 1; (b) 序列 SEQ ID NO. 1 的至少 15 个连续核苷酸的片段, 优选的是 20 个核苷酸, 甚至更优选的是 25 到 30 个核苷酸的片段; (c) 一种在最佳比对后, 与 (a) 或 (b) 中所定义的序列之一具有至少 80% 相同性百分比的序列; 以及 (d) 一种与 (a)、(b) 或 (c) 中所定义的序列之一互补的有义或反义序列; 以及

[0037] - 由上述 (a)、(b)、(c) 或 (d) 中所定义的多核苷酸所编码的蛋白质, 包括或具有以下序列之一: (e) 序列 SEQ ID NO. 2; (f) 序列 SEQ ID NO. 2 的至少 15 个连续氨基酸的片段; (g) 一种在最佳比对后, 与 (e) 或 (f) 中所定义的序列之一具有至少 60% 相同性百分比或至少 65% 相似性的序列, 优选具有 80% 相同性或至少 90% 相似性, 或甚至更优选具有 90% 相同性或至少 95% 相似性。

[0038] 本发明包含 ZnT-8 蛋白质以及如上述所定义的相应的多核苷酸的用途。

[0039] 可以从胰岛细胞或细胞的 DNA 文库中,特异地从胰腺细胞的 DNA 文库中,极特异地从人胰腺细胞的 DNA 文库中分离到如上定义的多核苷酸。优选地,所用的细胞是胰岛细胞。

[0040] 通过在总 DNA 上所进行的聚合酶链反应 (PCR),通过在胰腺胰岛 β 细胞的总 RNA 上所进行的 RT-PCR,或通过化学合成也可以得到如上定义的多核苷酸。

[0041] 为了本发明的目的,采用了以下的定义。

[0042] 名词“多核苷酸”的意思是修饰或未修饰核苷酸的一个精确系列,可能包括非天然核苷酸。因此,这个名词覆盖了任何编码 ZnT-8 蛋白质或所述蛋白质的一个片段的序列(基因组 DNA、mRNA、cDNA),也覆盖了对应的有义或反义寡核苷酸以及对应的小干扰 RNA (siRNA)。

[0043] “在最佳比对后与参照序列具有某一相同性百分比的核酸或蛋白质”用于表示与参照序列比较具有某些改变的核酸或蛋白质,例如具体为缺失、截断、延伸、嵌合融合和/或取代,具体的是点取代,以及在最佳比对后表现为与参照核苷酸或氨基酸序列具有至少 80% 相同性的核苷酸序列或至少 65% 相同性的氨基酸序列的核酸或蛋白质。

[0044] 两个序列(核酸或蛋白质序列)之间的“相同性百分比”用于表示在最佳比对后所得到的两个所对比的序列之间的同一的核苷酸或氨基酸残基的百分比,这个百分比是纯粹统计上的百分比,以及两个序列之间的差异是随机分布的且分布于序列的全长内。

[0045] 名词“最优比对”或“最佳比对”用于表示通过下文所述的比对所确定的相同性百分比是最高的。按惯例进行两个核苷酸或氨基酸序列之间的比较:在将这些序列最佳比对之后比较这些序列,通过片段或通过“比较窗”进行比较以辨别并比较序列的局部区域的相似性。具体地用以下算法的其中一种可以进行比较序列的最佳比对:Smith 和 Waterman (1981) 的局部同源性算法、Neddleman 和 Wunsch (1970) 的局部同源性算法、Pearson 和 Lipman (1988) 的相同性搜索方法、使用这些算法的计算机程序(威斯康辛遗传软件包(遗传计算机组,575 Science Dr., Madison, WI)或因特网服务器中的 GAP、BESTFIT、BLAST P、BLASTN、BLASTX、TBLASTX、FASTA 和 TFASTA,特别是那些国立生物技术信息中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、EMBL (<http://www.embl.org>) 和 Ensembl 项目 (<http://www.ensembl.org>) 的服务器)。

[0046] 为了得到最佳比对,优选地用 BLOSUM 62 矩阵使用 BLAST 程序。也可以将 PAM 或 PAM250 矩阵作为一种用于核苷酸序列的相同性矩阵。

[0047] 为了得到“特异性杂交”,优选地使用高严格性的杂交条件,即所选定的温度条件和离子强度条件使得它们容许进行所要求的互补的多核苷酸之间的特异的及选择性的杂交。

[0048] 经举例说明的方法,为了定义上述的多核苷酸的目的,在杂交步骤中的高严格性的条件优选地是如下的条件:分两步进行 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交:(1) 在 42°C 含有 5x SSC (1x SSC 相应于 0.15M NaCl+0.015M 柠檬酸钠溶液)、50% 甲酰胺、7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、10x Denhardt、5% 硫酸右旋糖酐和 1% 鲑精 DNA 的磷酸缓冲液中预杂交 3 个小时;(2) 在一个依赖于探针长度的温度下杂交 20 个小时(即,对于比 100 个核苷酸更长的探针的温度为 42°C),紧接着是在 20°C 2x SSC+2% SDS 中洗涤 20 分钟两次,在 20°C 0.1x SSC+0.1% SDS 中洗涤 1 次。对于比 100 个核苷酸更长的探针,则在 60°C 0.1x SSC+0.1%

SDS 中进行末次洗涤 60 分钟。对于更长或更短的探针,本领域人员可以调整上述的针对所定义长度的探针的高严格性的杂交条件。

[0049] “合适的技术或方法”在此用于指的是本领域人员所常用的及许多著作所阐述的熟知技术或方法,例如在名为分子克隆的著作 (Laboratory Manual (Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press) [13]) 中所阐述的。

[0050] 在最佳比对后, c) 中所定义的多核苷酸与 a) 或 b) 中所定义的序列之一具有至少 80% 的相同性百分比, 优选具有 90%, 更优选具有 95%, 甚至更优选具有 98%。c) 中所定义的多核苷酸包括序列 SEQ ID NO. 1 的变体的多核苷酸, 即相应于等位基因变体的所有多核苷酸, 即相应于序列 SEQ ID NO. 1 的单一变异的多核苷酸。这些天然的变异序列相应于哺乳动物特别是人所具有的多态性, 以及特别地相应于能导致病变出现的多态性, 例如胰岛内的细胞死亡和糖尿病。

[0051] “变异多核苷酸”也用于表示任何其 mRNA 将序列 SEQ ID NO. 1 的多核苷酸作为其互补 DNA 的基因组序列的剪切位点的突变或变异所形成的 RNA 或 cDNA。

[0052] 当排列两个序列使得能得到两者之间的最大对应性时, 根据同一氨基酸残基或保守取代而不同的氨基酸残基的百分比评价蛋白质与参照蛋白质的相似性。为了本发明的目的, 名词“保守取代”用于表示用一种具有相似化学特性 (大小、电荷或极性) 的氨基酸对另一种氨基酸的取代, 这种取代通常不改变蛋白质的功能特性。

[0053] 当一种蛋白质序列可以包括最多到每 100 个参照序列的氨基酸的 100-X 个非保守改变时, 在本发明中该蛋白质被定义为有着与参照序列具有至少 X% 相似性的氨基酸序列。为了本发明的目的, 名词“非保守改变”包括对参照序列中的氨基酸的删除、非保守取代、或连续的或分散的插入。

[0054] (g) 中所定义的蛋白质包括为序列 SEQ ID NO. 2 的变体的蛋白质, 即由上述所定义的变异多核苷酸所编码的变异蛋白质, 具体的是其氨基酸序列相对于序列 SEQ ID NO. 2 具有至少一个突变的蛋白质, 这些突变具体的是至少一个氨基酸残基的截断、缺失、取代和/或添加。

[0055] 优选地, 变异蛋白质具有与糖尿病或高胰岛素血症相关的突变。

[0056] 根据本发明的用途的一个有利的实施方案, 如 (c) 中所定义的所述分离的多核苷酸是序列 SEQ ID NO. 1 的一种变体, 它包括一个造成序列 SEQ ID NO. 1 所编码的蛋白质的氨基酸序列改变的突变。

[0057] 根据本发明的用途的另一个有利的实施方案, 如 (b) 或 (d) 中所定义的所述分离的多核苷酸选自 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 的引物对以及 SEQ ID NO. 5 和 SEQ ID NO. 6 的引物对。

[0058] 根据本发明的用途的仍另一个有利的实施方案, 通过利用上面所定义的引物对的扩增可获得所述分离的多核苷酸。

[0059] 根据本发明的用途的仍另一个有利的实施方案, (d) 中所定义的所述多核苷酸是小干扰 RNA (siRNA), 通过其与所述多核苷酸的相应的 mRNA 相互作用可引起 mRNA 降解。

[0060] 根据本发明的用途的仍另一个有利的实施方案, 如 (g) 中所定义的所述蛋白质是 SEQ ID NO. 2 的变体, 它具有与糖尿病或高胰岛素血症相关的突变。

[0061] 根据本发明的用途的仍另一个有利的实施方案, (f) 中所定义的所述片段具有一

个选自 SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9 和 SEQ ID NO. 10 的序列。

[0062] 本发明的一个主题也是一个如上面所定义的多核苷酸,除了:

[0063] -NCBI 数据库中的编号为 No. AX526723、No. AX526725 和 No. AX526727 的序列中所包括的至少 15 个连续核苷酸的片段;

[0064] - 在基因库数据库中的编号为 BM565129、BM310003、BM875526、BG655918、BQ417284、BQ267316、BU072134、BQ267526、BQ270198、BU581447、BU070173、BQ631692 和 BU949895 的 EST,以及 NCBI 数据库中的编号为 AX526723、AX526725 和 AX526727 的序列。

[0065] 本发明的片段可以被特异地作为用于检测 / 扩增相应于其他生物体的本发明的多核苷酸的多核苷酸 (RNA 或基因组 DNA) 的探针或引物。

[0066] 优选地,可以使用的本发明的引物对是那些相应于序列 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 以及序列 SEQ ID NO. 5 和 SEQ ID NO. 6 所定义的引物对。

[0067] 本发明的一个主题也是可以通过利用如上面所定义的引物进行扩增而得到的多核苷酸。

[0068] 根据本发明的多核苷酸的一个有利的实施方案,它是一种相应于如上面所定义的多核苷酸的小干扰 RNA,在长度上少于 30 个核苷酸,优选的长度为 20 和 23 个核苷酸之间,通过其与所述多核苷酸的相应的 mRNA 相互作用可引起它们降解。通过本领域人员所熟知的任何方法可以得到这些 siRNA,例如通过化学合成或通过载体的表达。

[0069] 发明包括相应于本发明的多核苷酸的有义寡核苷酸,通过其与在调控本发明的所述多核苷酸的表达中所涉及的蛋白质的相互作用将诱导该表达的抑制或活化。

[0070] 为了得到可检测的和 / 或可定量的信号,利用本领域人员所熟知的方法可以用放射性或非放射性化合物直接或间接地标记本发明的探针和引物。

[0071] 用放射性元素或用非放射性分子实现对本发明的引物或探针的标记。在所用的放射性同位素中,所提及的包括 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^3H 或 ^{125}I 。非放射性构件选自例如生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或异羟基洋地黄毒贰元的配体、半抗原、染料和例如放射性发光物、化学发光物、生物发光物、荧光剂或磷光剂的发光物。

[0072] 因此,在使用引物或探针的方法特别是 PCR(聚合酶链反应)技术 (U. S. NO. 4, 683, 202) 中可以将本发明的多核苷酸用作为引物和 / 或探针。其他用于扩增靶核酸的技术可以被用作为对 PCR 的一种替换方法。目前存在用于这种扩增的大量方法,例如 SDA(链取代扩增)技术、TAS(基于转录的扩增体系)技术、3SR(自动维持序列扩增)技术、NASBA(基于核酸序列的扩增)技术、TMA(转录介导的扩增)技术、LCR(连接酶链反应)技术、PCR(修补链反应)技术、CPR(循环探针反应)技术、和 Q- β -复制酶扩增技术。也提到了 PCR-SSCP,这使得检测点突变成为可能。

[0073] 当然本领域人员非常知道这些技术。

[0074] 作为探针或作为引物,本发明的各种多核苷酸使得或确定生物学样品中的所对应的转录谱或这种转录谱的任何可能的改变,或检测所对应的基因、该基因的等位基因变体或所述基因内的至少一个外显子的一个或多个核苷酸的突变(插入、缺失或取代)所造成的该基因的任何可能的功能性改变(造成所述基因所编码的蛋白质的活性的根本改变)成为可能。这些突变具体地包括在相应于定位于对蛋白质的生物学活性至关重要的区域内的氨基酸残基的密码子的缺失、插入或非保守取代。

[0075] 因此,本发明的一个主题是一种用于确定生物学样品中的相应于本发明的多核苷酸的基因的转录谱或所述的转录谱的改变的方法,包括: 第一步,从生物学样品中得到总 RNA,第二步,在适合于 RNA 和探针之间杂交的条件下,将所述 RNA 与包括本发明的多核苷酸的标记探针相接触,以及第三步,用任何合适的方式显示所形成的杂合体。

[0076] 根据所述方法的一个实施方案中,第二步可以是一个利用上面所述的一对引物所实施的逆转录和 / 或转录产物的扩增的步骤,以及第三步可以是用任何合适的方式显示所形成的扩增的核酸的步骤。

[0077] 用于确定基因的转录谱的所述的方法也包括一个由通过与预先选定的对照样品比较评价基因的转录水平,以及任选地研究其与可检测的表型例如前胰岛素转化为成熟胰岛素的量、细胞的胰岛素含量、应答于葡萄糖的刺激所分泌的胰岛素的量、细胞内或囊泡内的锌浓度、或细胞表面上所表达的蛋白质(基因产物)的量的相关性所构成的步骤。例如所述的对照样品可以包括一个在相同的条件下可应用所述的用于确定基因的转录谱的方法的具有相应于本发明的多核苷酸的基因的正常或改变表达的生物学样品。

[0078] 本发明的一个主题也是一种用于检测生物学样品中的相应于本发明的多核苷酸的基因或所述基因的等位基因变体或该基因的功能性改变的方法,包括:第一步,用任何合适的方式从生物学样品中得到 DNA,第二步,在适合于 DNA 和探针之间的特异性杂交的条件下将所述 DNA 与包括本发明的多核苷酸的标记探针相接触,以及第三步,用任何合适的方式检测所形成的杂合体。

[0079] 根据所述方法的一个有利的实施方案,第二步可以是用如上所述的一对引物实施的一个扩增步骤,以及第三步可以是一个用任何合适的方式显示所形成的扩增的核酸的步骤。本发明可以任选地包括第四步,分离并测序所证实的核酸。

[0080] 后一方法也可以使得分离相应于本发明的多核苷酸的基因的等位基因成为可能,它们与可检测的表型例如餐后血糖的变化、是否存在胰岛素的分泌、应答于葡萄糖刺激的循环葡萄糖的水平或所分泌的胰岛素的量相关,以及通常与 I 型或 II 型糖尿病类型的病理或与锌代谢异常相关。在胰岛素释放期间所分泌的锌作用于钾通道,该通道通过钙通道引起这种外排作用。因此,这是一种反馈环 [14]。本发明的多肽涉及于锌在含有胰岛素的囊泡中的蓄积,以及在外排期间它也被发现于细胞膜上。因此蛋白质的突变体可以改变囊泡中所含有的锌的量或锌在细胞周边的浓聚,并因此改变了钾通道的开放状态,依赖于突变体的作用造成了胰岛素分泌的减少或增加(I 型糖尿病或高胰岛素血症)。在这个特殊的方法中,生物学样品将是来源于表达所述的可检测表型的个体的样品。

[0081] 这些方法,特别是那些基于寻找基因内的突变的方法可以容许预先证实对糖尿病的易感性,或诊断糖尿病或任何与糖尿病相关的病变,或对抗糖尿病治疗的分子或剂量的个体适应性。

[0082] 本发明的一个主题也是一种进行上述方法的试剂盒,包括:

[0083] a) 至少一种本发明的探针或引物对;

[0084] b) 进行所述的探针和 / 或所述的引物与所测试的生物学样品的核酸之间的杂交反应所需的试剂;

[0085] c) 进行扩增反应所需的试剂;

[0086] d) 检测和 / 或测定所述的探针和生物学样品的核酸所形成的杂合体、或所形成的

扩增的核酸所需的试剂。

[0087] 这样的试剂盒也可以包括用于确保所得到的结果的质量的阳性或阴性对照。它们也可以包括制备生物学样品的核酸所需的试剂。

[0088] 本发明的另一个主题是一个 DNA 芯片,包括至少一个本发明的多核苷酸。

[0089] 本发明的仍另一个主题是如上面所定义的多核苷酸用于制备 DNA 芯片的用途。本领域人员根据所选白的支持物能选自用于生产这样一种 芯片的合适的制备技术,例如通过将寡核苷酸沉淀到玻璃或尼龙支持物上,或经化学或电化学地植入寡核苷酸。

[0090] 本发明的多核苷酸在体外可被用作作为研究以下方面的工具:

[0091] a) 转运蛋白 (ZnT-8) 在模型细胞系 (例如 INS-1 胰岛素瘤细胞系) 中的过表达以及对应答于葡萄糖刺激的胰岛素分泌的影响;

[0092] b) 细胞对氧化应激条件或者低或高锌浓度条件所诱导的细胞死亡 (凋亡) 的敏感性;

[0093] c) 干细胞应答于各种外来刺激 (生长因子、胰腺提取物) 分化为胰岛素分泌细胞的过程。

[0094] 本发明也涉及本发明的多核苷酸所编码的蛋白质。

[0095] 为了本发明的目的,名词“蛋白质”用于表示一个精确的修饰或非修饰氨基酸序列,可能包括非天然氨基酸。

[0096] 或从 β 细胞,或通过化学合成,或通过重组 DNA 技术,具体地是利用包括含有如上所定义的多核苷酸的插入物的表达载体的重组 DNA 技术都能得到本发明的蛋白质。

[0097] 本发明也涉及如上所定义的多核苷酸用于生产如上所定义的 ZnT-8 蛋白质的用途。

[0098] 当通过化学合成得到本发明的蛋白质时,可以通过多种已知的肽合成途径的任何一种途径得到本发明的蛋白质,例如使用固相的技术或使用部分固相的技术、通过片段浓缩或通过溶液中的传统合成方法。对于这种情况,可以改变蛋白质的序列以改进它的可溶性,特别是在水溶剂中的可溶性。本领域人员已知这些改变,例如疏水性区域的缺失或用亲水性氨基酸取代疏水性氨基酸。

[0099] 优选地,本发明的蛋白质是一种包括或具有序列 SEQ ID NO. 2 的蛋白质 (相应于 ZnT-8 基因所编码的蛋白质)。

[0100] 本发明的一个主题也是如上所定义的蛋白质的一个片段,其特征在于其选自由序列 SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9 和 SEQ IDNO. 10 所组成的组。

[0101] 本发明的另一个主题是一种蛋白质芯片,它包括如上所定义的蛋白质或蛋白质片段。

[0102] 本发明的仍另一个主题是如上所定义的蛋白质或蛋白质片段用于制备蛋白质芯片的用途。与 DNA 芯片一样,本领域人员根据所选定的支持物能选择用于制备这样的芯片的合适的制备技术。

[0103] 如上所定义的蛋白质、蛋白质片段或蛋白质芯片可被用于检测在个体血清中所存在的针对所述蛋白质的抗体。

[0104] 本发明也涉及如上所定义的蛋白质或蛋白质片段用于免疫化学和免疫酶学方法测试的用途,以及用于搜索针对本发明的蛋白质的自身抗体的用途。

[0105] 本发明的一个主题也是克隆和 / 或表达被插入本发明的多核苷酸的载体。

[0106] 这样的载体可以包括表达及任选地分泌宿主细胞内的蛋白质所需的元件。

[0107] 所述的载体优选地包括：一个启动子、翻译起始和终止信号、以及用于转录的合适的调控区。它们被稳定地保留于细胞内应当是可能的，并且它们可以任选地包括编码特异于分泌所翻译蛋白质的特殊信号，例如强的遍在的启动子，或一种选择性地存在于特殊细胞和 / 或组织类型例如胰腺的启动子。根据所用的细胞宿主，选择这些不同的控制序列。

[0108] 本发明的多核苷酸可以被插入到在所选宿主内自主复制的载体或整合到所选宿主中的载体。

[0109] 在自主复制的体系中，根据宿主细胞，优选地使用质粒或病毒类型的体系。病毒载体具体地可以是腺病毒、逆转录病毒、慢病毒、痘病毒或疱疹病毒。那些本领域人员知道可被用于每一种如此体系的技术。

[0110] 当需要序列被整合于宿主细胞的染色体时，例如使用质粒或病毒类型的体系是可能的，这些病毒是例如逆转录病毒或腺伴随病毒 (AAV)。

[0111] 在非病毒载体中，优先使用的载体是裸多核苷酸例如裸 DNA 或 RNA，细菌人工染色体 (BAC)、用于酵母内表达的酵母人工染色体 (YAC)、用于小鼠细胞内表达的小鼠人工染色体 (MAC) 以及优选地用于人细胞内表达的人人工染色体 (HAC)。

[0112] 根据本领域人员常用的方法制备这些载体，以及用标准方法可以将所形成的重组载体引入到合适的宿主中，例如脂转染法、电穿孔法、热休克法、化学膜透化后的转化、细胞融合。

[0113] 本发明的一个主题也是经修饰的宿主细胞，具体的是原核和真核细胞，其中至少一种本发明的多核苷酸或至少一种本发明的载体已经被引入到细胞中。

[0114] 在可以被用于本发明的目的的细胞中，所提及的细胞包括细菌细胞、酵母细胞、动物细胞、特别是哺乳动物细胞或植物细胞。所提及的细胞也可以包括方法可以实施于其上的昆虫细胞，例如方法可以使用杆状病毒。

[0115] 本发明的一个主题也是非人的转基因生物体，例如转基因动物或植物，其中所有的或一部分细胞含有游离或整合形式的本发明的多核苷酸或本发明的载体。

[0116] 优选地根据本发明，非人的转基因生物体是那些携带由含有无功能的或具有一个突变的本发明的多核苷酸的细胞的生物体。

[0117] 根据本发明，转基因动物优选地是哺乳动物，更优选地是啮齿类动物，具体的是小鼠、鼠或兔，以及猪科 (Suidae)，具体的是猪。

[0118] 用本领域人员已知的任何常用方法可以获得转基因动物，例如通过胚胎干细胞同源重组、将这些干细胞转移到胚胎内、选择生殖系中被影响的嵌合体以及上述的嵌合体的生长。

[0119] 因此本发明的细胞或转基因动物或植物可以表达或过表达编码本发明的蛋白质的基因或它们的同源基因，或表达所述的已经引入一个突变的基因。

[0120] 例如可以将转基因动物用作为用于研究糖尿病病因的模型。

[0121] 本发明的转基因生物体可以被用于生产本发明的蛋白质。

[0122] 根据本领域人员已知的技术可以纯化本发明的蛋白质。因此，可以单独或联合地用方法从细胞裂解液和提取物中、或从培养基上清液中纯化出蛋白质，这些方法例如

分馏法、层析法、利用特异的单克隆或多克隆抗体的免疫亲和技术等。优选地,根据一个方法纯化本发明的蛋白质,这个方法包括:第一步,用离心分离出膜蛋白质,随后是第二步,用 T. C. Thomas, M. G. McNamee, (Purification of membrane proteins. Section IX, pp 499-520, in Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification, edited by M. P. Deutscher, vol. 182, Academic Press, New York, 1990) 所描述的免疫亲和法纯化。

[0123] 本发明的一个主题也是用于制备重组 ZnT-8 蛋白质的方法,其特征在于其包括在容许表达所述蛋白质以及纯化所述的重组蛋白质的条件下,培养本发明的经修饰的细胞特别是哺乳动物细胞,或来源于本发明的非人类转基因生物体的细胞。

[0124] 本发明的一个主题也是一种蛋白质,其特征在于可以用任何一种上述的制备方法得到的蛋白质。

[0125] 如上所示所得到的蛋白质可以是糖基化和非糖基化形式,以及可以或不具有天然蛋白质的四级结构。

[0126] 本发明者通过研究跨膜电位的方法也已经能够显示出本发明的蛋白质的二级结构具有 3 个细胞外氨基酸环(第 96-106 位、164-176 位和 241-245 位氨基酸),可以制成针对于此的单克隆或多克隆抗体。

[0127] 因此本发明的一个主题也是单克隆或多克隆抗体,其特征在于它们能特异地识别本发明的蛋白质。

[0128] 优选地,抗体特异地识别序列 SEQ ID NO. 2 蛋白质、它的片段、或如上所定义的所述蛋白质的变体。

[0129] 优选地,本发明的抗体特异地识别相应于 SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8 和 SEQ ID NO. 10 (PEP1、PEP2 和 PEP4) 的本发明的蛋白质的细胞外环,和 / 或相应于 SEQ ID NO. 9 (PEP3) 的本发明的蛋白质的细胞内环。

[0130] 例如本发明的抗体是嵌合抗体、人源化抗体或 Fab 或 F(ab')₂ 片段。为了得到可检测的和 / 或可定量的信号,它们也可以是免疫交联物或标记抗体的形式。

[0131] 可以直接从人血清或用本发明的蛋白质接种的动物血清中得到所述的抗体,本发明的蛋白质特异地是那些由基因重组或肽合成所生成的蛋白质。

[0132] 根据常用的方法可以得到特异的多克隆抗体。根据传统的杂交瘤培养方法可以得到特异的单克隆抗体。

[0133] 本发明的另一个主题是一种包括至少一种本发明的抗体的蛋白质芯片。

[0134] 本发明也涉及本发明的抗体用于制备包括所述抗体的蛋白质芯片的用途。本领域人员能根据所选自的支持物选择用于生产这样的芯片的合适的制备技术。

[0135] 本发明的一个主题也是本发明的抗体或抗体芯片用于检测和 / 或纯化本发明的蛋白质的用途,优选地是所述蛋白质的细胞外或细胞内环,优选地是相应于 SEQ ID NO. 7 到 SEQ ID NO. 10 的序列。

[0136] 总而言之,可以在任何必须能观察到本发明的正常或突变蛋白质表达的状态下有利地应用本发明的抗体。

[0137] 具体地,单克隆抗体可以被用于检测生物学样品中的这些蛋白质。因此,它们构成了一组对特异组织切片中的本发明的蛋白质的表达的免疫细胞化学或免疫组织化学分析的方法,具体的是对 SEQ ID NO. 2 蛋白质或它的一种变体。一般地,对于这些分析,所用的

抗体可被例如金标记方法用免疫荧光化合物所标记以成为可检测的抗体,或酶免疫交联物的形式。

[0138] 具体地它们使得验证这些蛋白质在生物学组织或样品中的异常表达成为可能。

[0139] 本发明的一个主题也是一种用于检测生物学样品中的 ZnT-8 蛋白质的方法,包括:第一步,将生物学样品与本发明的抗体接触,以及第二步,用任何合适的方式验证所形成的抗原-抗体复合物。

[0140] 本发明的一个主题也是一种用于进行上述方法的试剂盒,包括:

[0141] a) 至少一种本发明的单克隆或多克隆抗体;

[0142] b) 检测在免疫反应期间所形成的抗原-抗体复合物的试剂;

[0143] 根据本发明的一个特殊的实施方案,试剂盒可以任选地包括用于构成容许免疫反应的媒介的试剂。

[0144] 利用人或动物的胰腺,具体的是小鼠、鼠、兔和猪的胰腺,本发明的抗体也被用于检测和/或分选胰岛,优选地是 β 细胞。对于分离的细胞,可以用流式细胞仪(FACS)进行这样的分选。对于岛,将它们标记将改善目前的分离方法:用Ficoll、euro-Ficoll或Ficoll-乏影葡胺钠通过密度梯度的分离,或一种优选的方法,它是一种细胞分离器上的白蛋白质梯度。

[0145] 因此,本发明的一个主题是一种用于分选胰岛 β 细胞的方法,包括:第一步,将可能含有这些岛和/或细胞的生物学样品的细胞与本发明的抗体接触,第二步,用任何合适的方式验证抗体所标记的细胞,以及第三步,用任何合适的方式分离所标记的细胞。

[0146] 本发明的抗体也可以用于监测干细胞分化为胰岛 β 细胞的过程,这些细胞特异地是人或动物细胞,并且也可被用于分选这些在分化后表达 ZnT-8 蛋白质,具体的是序列 SEQ ID NO. 2 蛋白质的细胞。

[0147] 因此,本发明的一个主题是一种用于监测干细胞分化为胰岛细胞或分化为 β 细胞的过程的方法,包括:第一步,将可能含有所述的正在进行分化的干细胞的生物学样品的细胞与本发明的抗体接触,第二步,用任何合适的方式验证抗体所标记的细胞,以及第三步,用任何合适的方式识别所标记的抗体。

[0148] 所述的方法也可以包括附加步骤包括用任何合适的方式分离所标记的细胞。

[0149] 本发明的多核苷酸、细胞、转基因生物体或 DNA 芯片可被用于筛选能在体外或体内直接或间接地与本发明的多核苷酸相互作用和/或调控所述多核苷酸的表达的化学或生物化学化合物。

[0150] 因此,本发明的一个主题是一种筛选能在体外或体内直接或间接地与本发明的多核苷酸相互作用的化学或生物化学化合物的方法,其特征在于其包括:第一步,将候选的化学或生物化学化合物与本发明的多核苷酸、细胞、非人类转基因生物体或 DNA 芯片接触,以及第二步,检测在候选的化学或生物化学化合物与本发明的多核苷酸、细胞、非人类转基因生物体或 DNA 芯片之间所形成的复合物。

[0151] 本发明的一个主题也是一种筛选能在体外或体内直接或间接地调控本发明的多核苷酸的表达的方法,其特征在于其包括:第一步,将候选的化学或生物化学化合物与本发明的多核苷酸、细胞、非人类转基因生物体或 DNA 芯片接触,以及第二步,用任何合适的方式测定所述多核苷酸的表达。

[0152] 本发明的蛋白质、细胞、转基因生物体或蛋白质芯片可被用于筛选在体外或体内能直接或间接地与本发明的蛋白质相互作用,和/或能调控所述蛋白质的表达或活性的化学或生物化学化合物。

[0153] 因此,本发明的一个主题是一种筛选能在体外或体内直接或间接地与本发明的蛋白质相互作用的化学或生物化学化合物的方法,其特征在于其包括:第一步,将候选的化学或生物化学化合物与本发明的蛋白质、细胞、非人类转基因生物体或蛋白质芯片接触,以及第二步,检测在候选的化学或生物化学化合物与本发明的蛋白质、细胞、非人类转基因生物体或蛋白质芯片之间所形成的复合物。

[0154] 本发明的一个主题也是一种筛选能在体外或体内直接或间接地调控本发明的蛋白质的表达和/或活性的方法,其特征在于其包括:第一步,将候选的化学或生物化学化合物与本发明的蛋白质、细胞、非人类转基因生物体或蛋白质芯片接触,以及第二步,用任何合适的方式测定所述蛋白质的表达和/或活性。

[0155] 本发明的一个主题也是用作药物的本发明的多核苷酸、蛋白质、抗体、载体或转化细胞。

[0156] 本发明的多核苷酸、蛋白质、抗体、载体或转化细胞可被用于制备用于预防和/或治疗糖尿病(特别是与存在至少一种相应于 SEQ ID NO. 1 的基因的突变、和/或相应于 SEQ ID NO. 2 的蛋白质的异常表达),或用于预防和/或治疗高胰岛素血症(当观察到胰岛素基因的异常的表达、成熟或分泌),或用于调节 β 细胞内的和/或待被修饰以用于分泌胰岛素的细胞内的胰岛素的成熟和分泌,或用于调节 β 细胞的凋亡现象的药物。

[0157] 异常表达的意思是过表达、表达低下或表达突变蛋白质。异常成熟的意思是前胰岛素不能被蛋白质裂解或不能被蛋白质充分地裂解为胰岛素,或胰岛素和锌在细胞内分泌囊泡内不能共结晶、不充分共结晶或过多共结晶。

[0158] 本发明的一个主题也是本发明的蛋白质或抗体的多核苷酸用于确定编码本发明的蛋白质的基因的等位基因变异性、突变、缺失、杂合性的丧失或任何遗传学异常。通过分析本发明的核酸和序列(基因组 DNA、RNA 或 cDNA)以及本发明的抗体使得直接检测序列 ZnT-8 基因中的突变成为可能。特别地,识别具有突变的抗原决定簇的本发明的抗体的用途使得区别“正常”蛋白质与“与病变相关的”蛋白质成为可能。

[0159] 本领域人员也知道如何进行研究基因表达的变化变化的技术,例如通过具体地用 Northern 印迹或用本发明的探针或引物的 RT-PCR 对 mRNA 的分析,或通过具体地用利用本发明的抗体的 Western 印迹对所表达的蛋白质的分析。

[0160] 除了上述的内容外,本发明也包括其他在下面的描述中所出现的内容,描述指的是进行本发明的实施例以及附图,其中:

[0161] - 图 1 显示了通过对编码 ZnT-8 蛋白质(A)的 mRNA 的组织表达的 RT-PCR 分析,通过比较遍在的肌动蛋白 mRNA(B)的表达。1:脑;2:心脏;3:肾脏;4:脾脏;5:肝脏;6:结肠;7:肺;8:小肠;9:肌肉;10:胃;11:睾丸;12:胎盘;13:唾液腺;14:甲状腺;15:肾上腺;16:胰腺;17:卵巢;18:子宫;19:前列腺;20:皮肤;21:白细胞;22:骨髓;23:胎脑;24:胎肝。只在胰腺(第 16 列)中检测了所述 mRNA 的表达。

[0162] - 图 2 显示了对在鼠胰岛素瘤细胞 INS-1(第 1 列)、胎儿(第 2 列)和成人(第 3 列)胰岛中的编码 ZnT-8 蛋白质的 mRNA 的表达的分析,通过与上皮细胞系(HeLa 细胞系)

的比较。在鼠胰岛素瘤细胞系和成人及胎儿胰岛中检测到了 mRNA,而在上皮细胞 (HeLa 细胞系) 中没有检测到任何转录。将肌动蛋白质 mRNA 用作为对照。

[0163] - 图 3 显示了对 ZnT-8-GFP 融合蛋白质在转化的上皮细胞 (HeLa 细胞系) 中的定位的荧光显微镜分析。荧光被定位于细胞浆的囊泡内,以及也被定位于细胞膜上。

[0164] - 图 4 显示了对 ZnT-8-GFP 融合蛋白质在被转化的鼠胰岛素瘤细胞 (INS-1 细胞系) 中的定位的荧光显微镜分析。荧光被定位于分泌囊泡中,说明 ZnT-8 在胰岛素的成熟与外排中的作用。

[0165] 下面的实施例只是用于举例说明本发明,并不是以任何方式来限制本发明。

[0166] 实施例 1:克隆编码 ZnT-8 蛋白质的 cDNA

[0167] 利用可获得的人基因组序列通过搜索与 ZnT 家族的基因同源的基因,用生物信息学确定出被称为 ZnT-8 基因的编码 ZnT-8 蛋白质的基因。对基因组序列的分析使得定位和确定 ZnT-8 基因的内含子 / 外显子结构成为可能。

[0168] 利用从 ZnT-8 基因的序列中所确定出的引物对 (SEQ ID NO. 5 :5'-ACTCTAGAATGGAGTTTCTTGAAAGAACGT A 和 SEQ ID NO. 6 :5'-AATCTAGAGTCACAGGGGTCTTCACAGA) 用 RT-PCR 从根据在 T. Kenmochi 等 (Pancreas, 2000, 20, 2, 184-90) 中所给出的技术所制备的人胰岛的 mRNA 中扩增出编码 ZnT-8 的 cDNA。

[0169] 更详细地,根据产品说明书,用 RNA 提取试剂盒 (Roche) 从胰岛中提取出总 RNA。然后通过测定在 250nm 下的吸光度检测所得到的 RNA,并将其保存在 -80°C。

[0170] 根据产品说明书,用 Titan 单管 RT-PCR 试剂盒 (Roche) 和引物对 SEQ ID NO. 5 及 SEQ ID NO. 6 进行扩增。在 52°C 进行逆转录 30 分钟,然后通过 30 个循环 (94°C 30s, 53°C 30s, 72°C 1 分钟) 及在 72°C 最后延伸 5 分钟的方式扩增所合成的 cDNA。在存在溴化乙锭时用琼脂糖凝胶电泳 (1.5%) 分离扩增产物,并根据产品说明书用核酸纯化试剂盒 (QIAGEN) 纯化包括具有序列 SEQ ID NO. 1 的 cDNA 序列的 1123 碱基对的扩增产物。

[0171] 实施例 2:对编码 ZnT-8 蛋白质的 mRNA 的组织表达的分析

[0172] 利用下面的引物:SEQ ID NO. 3 :5'-GAT GCT GCC CAC CTC TTAATT GAC 和 SEQ ID NO. 4 :5'-TCA TCT TTT CCA TCC TGG TCTTGG,用 PCR 分析编码 ZnT-8 蛋白质的 mRNA 在从各种人组织中制备得到的商业化 cDNA 中的表达。引物 (SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4) 选自两个不同的外显子,以避免扩增基因组序列。所测试的组织为:1:脑;2:心脏;3:肾脏;4:脾脏;5:肝脏;6:结肠;7:肺;8:小肠;9:肌肉;10:胃;11:睾丸;12:胎盘;13:唾液腺;14:甲状腺;15:肾上腺;16:胰腺;17:卵巢;18:子宫;19:前列腺;20:皮肤;21:白细胞;22:骨髓;23:胎脑;24:胎肝。

[0173] 更详细地,将 2 μ l cDNA 与 2 种特异引物 (1 μ M 终浓度) 和常用的 PCR 混和物 (1 单位 Taq DNA 聚合酶、含有 1.5mM 镁、10mM dNTP 的缓冲液) 混和。通过 30 个循环 (94°C 30s, 53°C 30s, 72°C 1 分钟) 及在 72°C 最后延伸 5 分钟的方式进行扩增。然后在存在溴化乙锭时用琼脂糖凝胶电泳 (1.5%) 分析产物。

[0174] 在图 1 中所给出的结果显示,通过与用作为对照的肌动蛋白质信使 (图 1B) 的比较,相应于本发明的多核苷酸的 mRNA 只在胰腺细胞内表达 (图 1A 的第 16 列),而在其他所分析的 23 种组织的细胞内都没有表达 (图 1A 的第 1 到 15 列及 17 到 24 列)。

[0175] 实施例 3:相应于本发明的多核苷酸的 mRNA 在胎儿和成人胰腺细胞内及在鼠胰岛

素瘤细胞系 (INS-1) 内的表达

[0176] 利用来自各种人组织的 RNA :胎儿和成人胰岛、鼠胰岛素瘤细胞系 (INS-1, Asfari M. et al., Endocrinology, 1992, 130, 1, 167-78), 用 RT-PCR 进行对编码 ZnT-8 蛋白质的 mRNA 表达的分析, 通过与用作为对照的人上皮细胞系 (HeLa) 的比较。用磷酸缓冲液 (PBS) 将 10^6 个细胞洗涤两次, 然后在 2000g 下离心 3 分钟。如在实施例 1 中所描述的提取总 RNA, 并将 RNA 浓度调整为 $1\text{ng}/\mu\text{l}$ (ZnT-8) 或 $1\text{pg}/\mu\text{l}$ (β -激动蛋白质对照)。如在实施例 2 中所描述的, 扩增转录产物, 然后分析扩增产物。

[0177] 在图 2 中所给出的结果显示编码 ZnT-8 蛋白质的 mRNA 被表达于胎儿和成人胰岛的细胞内以及鼠胰岛素瘤细胞系 (INS-1) 内, 但在上皮细胞系 (HeLa 细胞系) 内没有表达。

实施例 4 :ZnT-8/GFP 融合蛋白质的表达

[0179] 蛋白质是相应于 SEQ ID NO. 1 (ZnT-8) 的 cDNA 所编码的人蛋白质。用 XbaI 限制性内切酶消化实施例 1 中所得到的 1123 碱基对的 PCR 产物, 然后将其克隆到载体 pcDNA3. 1-CT-GFP (Invitrogen) 中以得到经测序证实的被称为 pZnT-8-GFP 的载体。

[0180] 将载体 pZnT-8-GFP 短暂地转染到上皮细胞系 (HeLa) 内并将其稳定地转染到鼠胰岛素瘤细胞系 (INS-1) 内。

[0181] 将 HeLa 上皮细胞 (ATCC 编号 CCL-2) 培养于加有 5% 去补体的小牛血清和 2mM 谷氨酰胺的 Opti-MEM 培养基中 (Modified Eagle's Medium, Life Technologies)。然后将细胞在 37°C 孵育于富含 5% CO_2 的湿化大气中。

[0182] 将 INS-1 细胞培养于加有胎牛血清 (10%)、2- 巯基乙 -1- 醇 ($50\mu\text{M}$)、丙酮酸钠 (1mM)、HEPES (10mM)、L- 谷氨酰胺 (2mM)、100U/ml 青霉素和链霉素 ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 RPMI (Life Technologies)。

[0183] 根据产品说明书利用 Exgen500 (Euromedex) 用载体 pZnT-8-GFP (每 10^6 个细胞 $1\mu\text{g}$ DNA) 转染培养于 35mm Petri 培养皿中的细胞。在用载体 ZnT-8-GFP 转染后, 在加有 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的前述的同一培养基中选择并克隆 INS-1, 然后用以下参数 :激发波长 450-490nm ;发射波长 530nm, 在倒置荧光显微镜 (Axipvert, Zeiss) 下观察克隆的荧光。

[0184] 在转染 48 个小时后, 通过如上面所说明的对稳定转染的 INS-1 细胞克隆的荧光观察分析 ZnT-8-GFP 融合蛋白质在 HeLa 细胞内的表达。

[0185] 在图 3 中所给出的结果 (HeLa 细胞系) 显示 ZnT-8 蛋白质被定位于细胞浆内囊泡中及定位于细胞膜上, 该定位证实 ZnT-8 蛋白质具有细胞外分泌途径并且位于细胞的表面。

[0186] 在图 4 中所给出的结果 (INS-1 细胞系) 显示 ZnT-8 蛋白质被定位于胰岛素分泌囊泡中 ;该定位说明 ZnT-8 参与了胰岛素的成熟 ;另外, 因为该试验是在基础水平 (无葡萄糖的刺激) 下进行的, 因此在用葡萄糖刺激后, 在胰岛素外排期间, 蛋白质也将存在于细胞膜上。

实施例 5 :对 ZnT-8 蛋白质序列的分析

[0188] 用 TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 和 SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuimenu0.html>) 进行对 ZnT-8 一级序列的分析以及跨膜结构域的预测。

[0189] 完整的 ZnT-8 蛋白质具有 6 个预测的跨膜结构域 (第 74-95、107-126、141-163、

177-196、216-240 和 246-267 位氨基酸), N 和 C 末端位于胞浆内。

[0190] 实施例 6: 针对 ZnT-8 的细胞外环 (PEP1、PEP2 和 PEP4) 及针对细胞内环 (PEP3) 的多克隆抗体的制备

[0191] 根据 Merrifield 等 (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85 :2149-) (1946) 最先描述的方法固相合成相应于具有序列 SEQ ID NO. 7 : PEP1 : HIAGSLAVVTDA AHL L ; SEQ ID NO. 8 : PEP2 : CERLLYPDYQIQATV ; SEQ ID NO. 9 : PEP3 : CLGHNHKEVQANASVR ; 和 SEQ ID NO. 10 : PEP4 : YFKPEYKIADPIC 的抗原决定簇的肽, 将其纯化并缀合于一种载体蛋白质 (例如白蛋白质) 上。根据以下的接种方案将缀合的肽注射到兔内 :

[0192] D0 : 首次接种 ; D14 : 第二次接种 ; D28 : 第三次接种 ; D38 : 鉴定特异性 ; D56 : 第四次接种 ; D66 和 D80 : 回收血清。直接使用或用酸性介质洗脱在蛋白质 A 柱上纯化后使用血清。利用 Eurogentec SA, Belgium 公司的用户说明以及要求进行这些操作。

[0193] 实施例 7: 对在实施例 6 中得到的抗体的荧光标记

[0194] 通过亲和层析法在蛋白质 G 柱 (Pharmacia) 上纯化抗体。将 5ml 血清转入到用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 平衡的柱 (1ml) 中, 然后用同 20ml 同一缓冲液洗涤以洗脱未结合的蛋白质。然后用 0.1M 甘氨酸-HCl 溶液 (pH 2.5) 分离抗体, 然后用 40 μ l 12M Tris-HCl 缓冲液 (pH 10.0) 中和。

[0195] 将 2mg 抗体稀释于 1ml 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 中。即时制备 NHS-FITC (SIGMA ; 1mg/ml DMSO) 溶液。将 75 μ l NHS-FITC 溶液与抗体溶液混和, 然后将混和物在室温下孵育 45 分钟。按以下的方式在 PD10 柱 (PHARMACIA) 中纯化所标记的抗体 : 用 30ml PBS 洗涤柱, 装入 1ml 需纯化的标记抗体的溶液以及 5ml PBS, 最后收集 2ml 纯化物, 保存含有标记抗体的第二部分纯化物。

[0196] 参考文献

[0197] 1. Soria B. : In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. Differentiation 2001 ; 68 : 205-19.

[0198] 2. Gores PF, Sutherland DE. Pancreatic islet transplantation : is purification necessary ? Am. J. Surg. 1993 ; 166 : 538-42.

[0199] 3. Bloc A, Cens T, Cruz H, Dunant Y. Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic-cells : activation of ATP-sensitive K⁺ channels. J. Physiol. 2000 ; 529 Pt 3 : 723-34.

[0200] 4. Meyer K, Irminger JC, Moss LG, de Vargas LM, Oberholzer J, Bosco D, et al. : Sorting human beta-cells consequent to targeted expression of green fluorescent protein. Diabetes 1998 ; 47 : 1974-7.

[0201] 5. Giordano C, Stassi G, Todaro M, Richiusa P, Giordano M, Mattina A, et al. : Autofluorescence-activated sorting of human single beta cells and endocrine non-beta cells after enzymatic islet dissociation. Transplant Proc ; 1994 ; 26 : 651-2.

[0202] 6. Lukowiak B, Vandewalle B, Riachy R, Kerr-Conte J, Gmyr V, Belaich S, et al. : Identification and purification of functional human beta-cells by a new specific zinc fluorescent probe. J. Histochem. Cytochem. 2001 ; 49 : 519-28.

- [0203] 7. Shiroy A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, et al. : Identification of Insulin-Producing Cells Derived from Embryonic Stem Cells by Zinc-Chelating Dithizone. *Stem Cells* 2002 ;20 :284-292.
- [0204] 8. Jiao L, Gray DW, Gohde W, Flynn GJ, Morris PJ. In vitro staining of islets of Langerhans for fluorescence-activated cell sorting. *Transplantation* 1991 ;52 :450-2.
- [0205] 9. Kallan AA, Roep BO, Arden SD, Hutton JC, de Vries RR : Beta- cell reactive T-cell clones from type I diabetes patients are not beta cell specific and recognize multiple antigens. *J. Autoimmun.* 1995 ;8 :887-99.
- [0206] 10. Zalewski PD, Millard SH, Forbes IJ, Kapaniris O, Slavotinek A, Betts WH et al. : Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J. Histochem. Cytochem.* 1994 ;42 :877-84.
- [0207] 11. Easom RA. Beta-granule transport and exocytosis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2000 ;11 :253-66.
- [0208] 12. Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo J.* 1995 ;14 :639-49.
- [0209] 13. Sambrook J, Russell DW. (2000) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [0210] 14. Bloc A et al. , *J Physiol.* 2000, Dec. 15 ;529 Pt 3 :723-34).

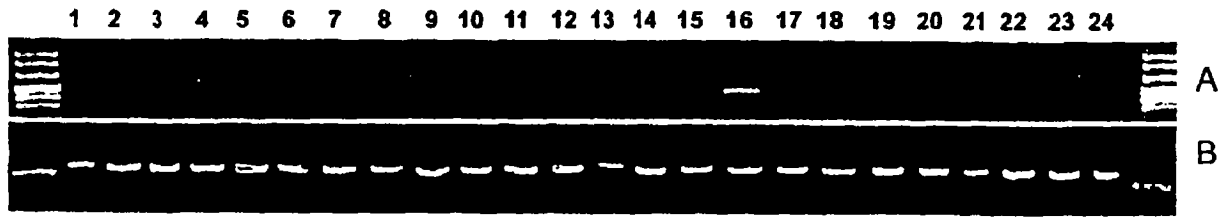


图 1

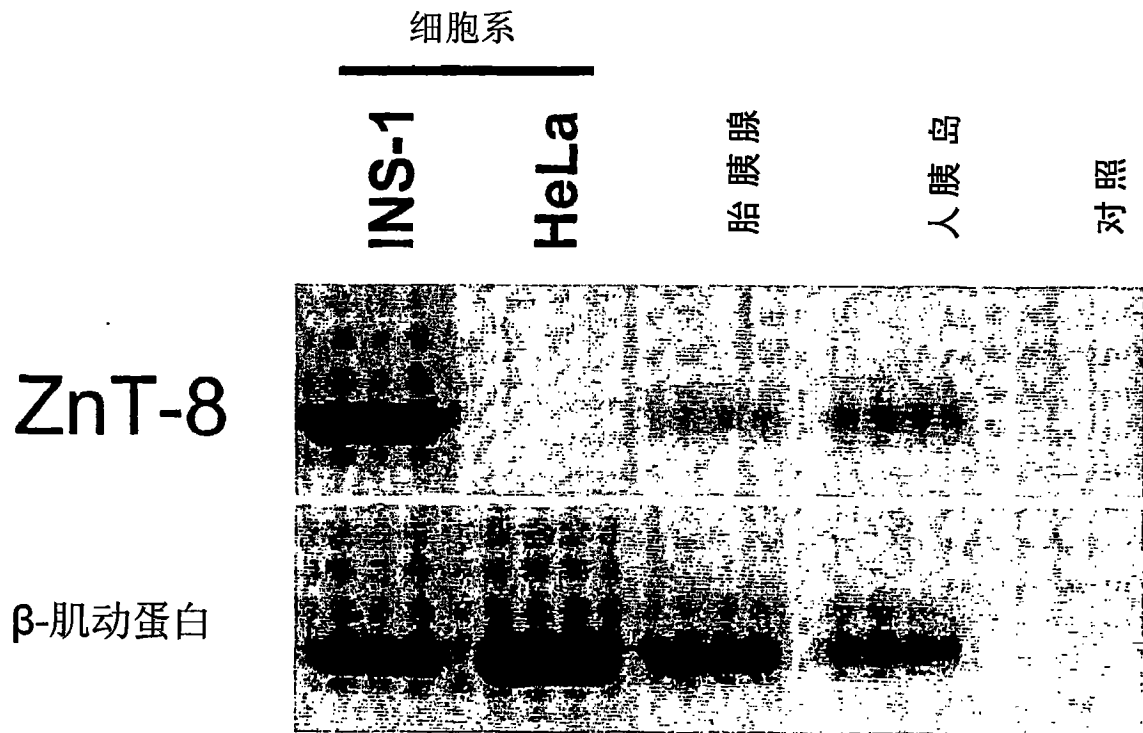


图 2

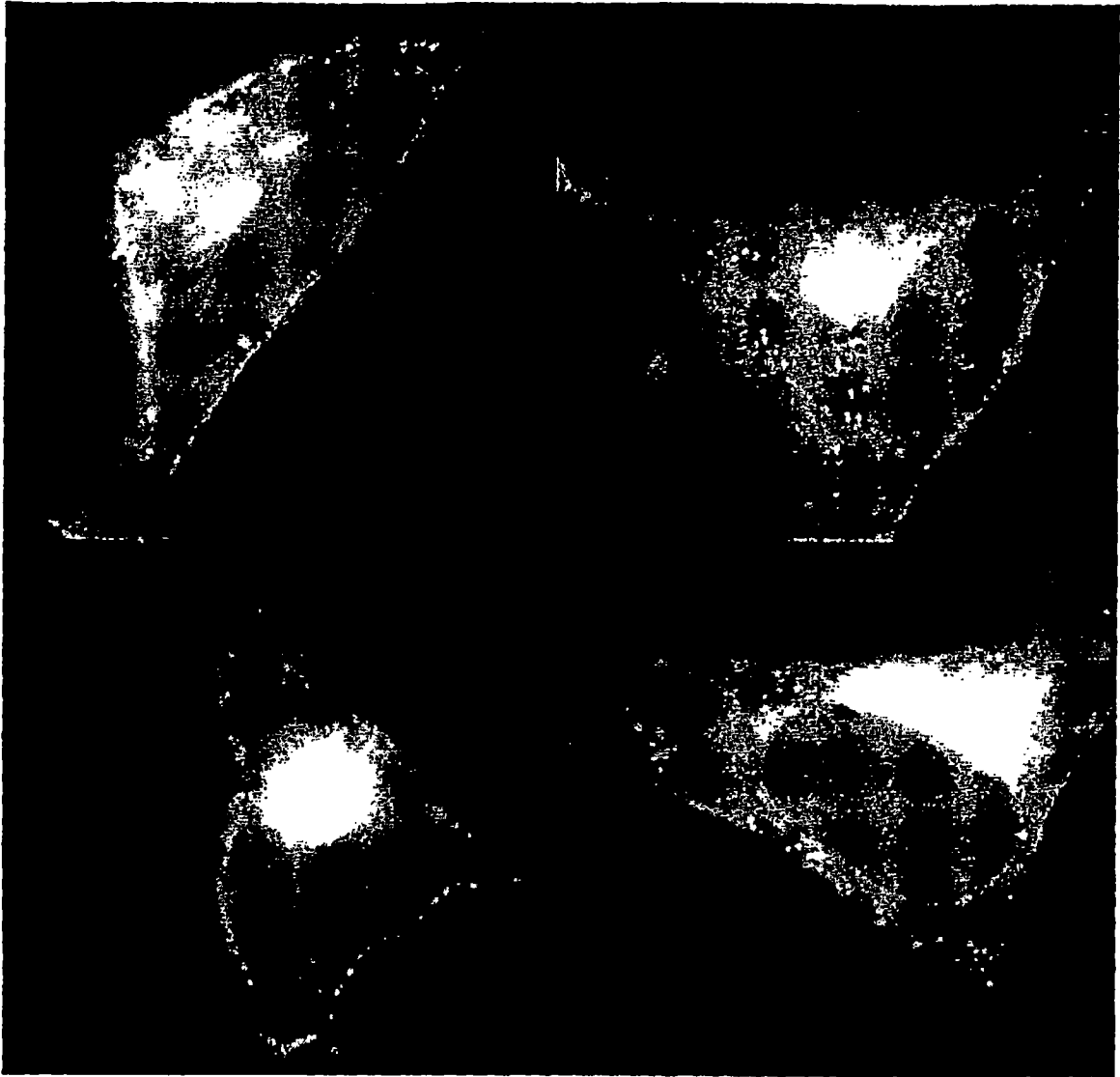


图 3



图 4

专利名称(译)	特异于胰腺胰岛β细胞的蛋白质及其应用		
公开(公告)号	CN1738900B	公开(公告)日	2011-07-06
申请号	CN200380108886.1	申请日	2003-11-18
[标]申请(专利权)人(译)	原子能委员会 约瑟夫·傅里叶大学		
申请(专利权)人(译)	原子能委员会 约瑟夫·傅里叶大学		
当前申请(专利权)人(译)	原子能委员会 约瑟夫·傅里叶大学		
[标]发明人	米歇尔塞夫 阿兰法维耶		
发明人	米歇尔·塞夫 阿兰·法维耶		
IPC分类号	C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 A01K67/027 C12N15/11 A61K38/00 A61P3/10 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/6883 A61K38/00 C07K14/705 C07K16/28 C07K2317/34 G01N33/6872 C12Q2600/158 G01N2500/04 A01K2217/05 G01N2500/10		
代理人(译)	林晓红		
优先权	2002014374 2002-11-18 FR		
其他公开文献	CN1738900A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种特异性表达于胰腺胰岛β细胞的ZnT-8蛋白，涉及编码上述的与胰岛素成熟及外排相关的蛋白质的多核苷酸，并涉及它们的应用，例如在分选及研究β细胞和筛选治疗糖尿病和高胰岛素血症的药物上的应用。

