

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680005904.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/94 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

[43] 公开日 2008年5月14日

[11] 公开号 CN 101180543A

[22] 申请日 2006.2.23

[21] 申请号 200680005904.7

[30] 优先权

[32] 2005.2.23 [33] US [31] 60/655,974

[86] 国际申请 PCT/US2006/006284 2006.2.23

[87] 国际公布 WO2006/091672 英 2006.8.31

[85] 进入国家阶段日期 2007.8.23

[71] 申请人 美国陶氏益农公司

地址 美国印第安纳州

[72] 发明人 K·R·库克 耿超贤

V·L·萨尔加多 N·奥尔

G·B·沃森 G·D·古斯塔夫松

S·舒安德 J·M·哈斯勒

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司  
代理人 程伟

权利要求书 8 页 说明书 58 页 序列表 5 页

[54] 发明名称

使用烟碱乙酰胆碱受体亚单位的新检测方法

[57] 摘要

本申请属于鉴定和表征新的杀虫靶位的领域，特别是涉及宿主细胞，检测和其抗体。

1. 宿主细胞包括 (i) 核酸, 其与编码受体亚单位的具有 NCBI 接收号 No.NM205953 的基因的编码区的第 79-1485 位之间的核酸序列有至少 50% 同一性; (ii) 核酸, 其编码离子通道亚单位, 其中该宿主细胞能够对 spinosyn 响应。

2. 根据权利要求 1 所述的宿主细胞, 其中该受体亚单位是烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位。

3. 根据权利要求 1 所述的宿主细胞, 其是无脊椎动物细胞。

4. 根据权利要求 1 所述的宿主细胞, 其中编码该受体亚单位的该核酸是包括选自下面序列的核酸:

(a) 具有 NCBI 接收号 No.NM205953 的序列;

(b) 具有接收号 No.NM205953 的编码来自于黑腹果蝇受体亚单位的剪切变异体的序列;

(c) 序列, 由于遗传密码的简并性, 其编码与 (a) - (b) 中定义的所述序列相同的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1 所述的宿主细胞, 其中编码该离子通道亚单位的该核酸是由该宿主细胞内源性产生的。

6. 根据权利要求 1 所述的宿主细胞, 其中编码该离子通道亚单位的该核酸是编码配体门控性离子通道亚单位的核酸。

7. 根据权利要求 6 所述的宿主细胞, 其中编码该配体门控性离子通道亚单位的该核酸选自编码烟碱乙酰胆碱受体亚单位的核酸、编码 GABA 受体亚单位的核酸、编码 5-羟色胺受体亚单位的核酸或编码谷氨酸受体亚单位的核酸。

8. 根据权利要求 1 所述的宿主细胞, 其中编码该离子通道亚单位的该核酸是编码电压门控性离子通道亚单位的核酸。

9. 根据权利要求 8 所述的宿主细胞, 其中编码该电压门控性离子通道亚单位的该核酸选自编码钙、钠、钾或氯化物的电压门控性离子通道亚单位的核酸。

10. 根据权利要求 7 所述的宿主细胞, 其中编码该烟碱乙酰胆碱受体亚单位的该核酸是包括选自下面序列的核酸:

- (a) 具有 SEQ ID NO:1 的核酸序列;
- (b) 核酸, 其具有与具有 SEQ ID NO:1 的基因的编码区的第 925-2424 位之间的核酸序列至少 50%同一性;
- (c) 编码烟碱乙酰胆碱受体亚单位的剪切变异体的核苷酸序列;
- (d) 序列, 由于遗传密码的简并性, 其编码与 (a) - (c) 中定义的所述序列相同的氨基酸序列。

11. 根据权利要求 1 所述的宿主细胞, 进一步包括 (iii) 编码辅助蛋白的核酸。

12. 根据权利要求 11 所述的宿主细胞, 其中编码该辅助蛋白的该核酸是编码无脊椎动物的辅助蛋白的核酸。

13. 根据权利要求 12 所述的宿主细胞, 其中编码该无脊椎动物的辅助蛋白的该核酸是包括选自下面序列的核酸:

- (a) 具有 NCBI 接收号 No.NM 068898 的核酸;
- (b) 序列, 其具有与具有 NCBI 接收号 No.NM 068898 的基因的编码区的第 1-1137 位之间的核酸序列有至少 36%的同一性;
- (c) 编码新杆状线虫 (*Caenorhabditis elegans*) ric-3 辅助蛋白剪切变异体的序列;
- (d) 序列, 由于遗传密码的简并性, 其编码与 (a) - (c) 中定义的所述序列相同的氨基酸序列。

14. 根据权利要求 1 所述的宿主细胞, 进一步包括编码离子通道亚单位的第二个核酸。

15. 根据权利要求 14 所述的宿主细胞, 其中该第二个核酸是编码烟碱  $\alpha$ -7 受体亚单位的核酸。

16. 根据权利要求 15 所述的宿主细胞, 其中编码该烟碱  $\alpha$ -7 受体亚单位的该第二个核酸是包括选自下面序列的核酸:

- (a) 核酸, 其与具有 SEQ ID NO: 2 的基因的编码区的第 106-1617 位之间的核酸序列有至少 50%的同一性;
- (b) 核酸, 其编码烟碱  $\alpha$ -7 受体亚单位, 具有 SEQ ID NO: 2;
- (c) 编码黑腹果蝇的烟碱  $\alpha$ -7 受体亚单位的该序列的剪切变异体;
- (d) 序列, 由于遗传密码的简并性, 其编码与 (a) - (c) 中定义的所述序列相同的氨基酸序列。

17. 根据权利要求 1 所述的宿主细胞, 其中编码该受体亚单位的核酸包括载体。

18. 根据权利要求 17 所述的宿主细胞, 其中该核酸可操作地连接于调节序列, 该调节序列确保该核酸在宿主细胞中表达。

19. 根据权利要求 1 所述的宿主细胞, 其中编码该离子通道亚单位的该核酸包括载体。

20. 根据权利要求 19 所述的宿主细胞, 其中该核酸可操作地连接于调节序列, 其中所述调节序列确保该核酸在该宿主细胞中表达。

21. 宿主细胞包括 (i) 核酸, 其与编码受体亚单位的具有 NCBI 接收号 No.NM205953 的基因的编码区的第 79-1485 位之间的核酸序列有至少 50% 的同一性; (ii) 核酸, 其编码辅助蛋白, 其中该宿主细胞能够对 spinosyn 响应。

22. 根据权利要求 21 所述的宿主细胞, 其中该受体亚单位是烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位。

23. 根据权利要求 21 所述的宿主细胞, 其是无脊椎动物细胞。

24. 根据权利要求 21 所述的宿主细胞, 其中编码受体亚单位的该核酸是包括选自下面序列的核酸:

(a) 具有 NCBI 接收号 No.NM 205953 的序列;

(b) 序列, 其编码黑腹果蝇的受体亚单位的剪切变异体, 具有 NCBI 接收号 No.NM 205953;

(c) 序列, 由于遗传密码的简并性, 其编码与 (a) - (b) 中定义的所述序列相同的氨基酸序列。

25. 根据权利要求 21 所述的宿主细胞, 其中编码辅助蛋白的该核酸是编码无脊椎动物辅助蛋白的核酸。

26. 根据权利要求 25 所述的宿主细胞, 其中编码无脊椎动物辅助蛋白的核酸是包括选自下面序列的核酸:

(a) 具有 NCBI 接收号 No.NM068898 的核酸;

(b) 序列, 其具有与具有 NCBI 接收号 No.NM 068898 的基因的编码区的第 1-1137 位之间的核酸序列有至少 36% 的同一性;

(c) 编码新杆状线虫 ric-3 辅助蛋白剪切变异体的序列;

(d) 序列, 由于遗传密码的简并性, 其编码与 (a) - (c) 中定义

的所述序列相同的氨基酸序列。

27. 检测化学化合物影响受体亚单位的能力的方法，包括下述步骤：

(a) 将 (i) 核酸，其与编码受体亚单位的具有 NCBI 接收号 No.NM205953 的基因的编码区的第 79-1485 位之间的核酸序列有至少 50% 同一性；(ii) 核酸，其编码离子通道亚单位，体外导入宿主细胞，以表达该受体亚单位和该离子通道亚单位，其中该宿主细胞能对 spinosyn 响应；

(b) 将该受体亚单位暴露于化学化合物；

(c) 评估被暴露的受体亚单位以检测该化学化合物是否影响该受体亚单位。

28. 根据权利要求 27 所述的方法，其中该评估步骤包括监测离子转运。

29. 根据权利要求 27 所述的方法，其中该评估步骤包括检测该化合物与该受体亚单位结合的亲和力。

30. 根据权利要求 27 所述的方法，其中该化学化合物是化学化合物的混合物。

31. 根据权利要求 27 所述的方法，其中该宿主细胞是非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的卵母细胞。

32. 根据权利要求 27 所述的方法，其中该宿主细胞是昆虫细胞系。

33. 根据权利要求 32 所述的方法，其中所述的昆虫细胞系选自果蝇 Schneider 细胞系、果蝇 Kc 细胞系、Sf9 细胞系或 High Five 细胞系。

34. 检测化学化合物影响受体亚单位能力的方法，包括以下步骤：

(a) 将 (i) 核酸，其与编码受体亚单位的具有 NCBI 接收号 No.NM205953 的编码区的第 79-1485 位之间的核酸序列有至少 50% 同一性体外导入宿主细胞，以表达该受体亚单位，其中离子通道亚单位由该宿主细胞内源性产生和表达，其中该宿主细胞能对 spinosyn 响应；

(b) 将该受体亚单位暴露于化学化合物；

(c) 评估被暴露的受体亚单位以检测该化学化合物是否影响该受体亚单位。

35. 根据权利要求 34 所述的方法，其中该评估步骤包括监测离子转运。

36. 根据权利要求 34 所述的方法，其中该评估步骤包括监测该化合物与该受体的结合亲和力。

37. 根据权利要求 34 所述的方法，其中该化学化合物是化学化合物的混合物。

38. 根据权利要求 34 所述的方法，其中该宿主细胞是非洲爪蟾卵母细胞。

39. 根据权利要求 34 所述的方法，其中该宿主细胞是昆虫细胞系。

40. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述的昆虫细胞系选自果蝇 Schneider 细胞系、果蝇 Kc 细胞系、Sf9 细胞系或 High Five 细胞系。

41. 检测化学化合物影响受体亚单位能力的方法，包括以下步骤：

(a) 将 (i) 核酸，其与编码受体亚单位的具有 NCBI 接收号 No.NM205953 的基因的编码区的第 79-1485 位之间的核酸序列有至少 50% 同一性；(ii) 分离的核酸分子，其编码辅助蛋白，体外导入宿主细胞，以表达该受体亚单位和该辅助蛋白，其中该宿主细胞能对 spinosyn 响应；

(b) 将该表达受体亚单位暴露于化学化合物；

(c) 评估该被暴露的受体亚单位以检测该化学化合物是否影响该受体亚单位。

42. 根据权利要求 41 所述的方法，其中该评估步骤包括监测离子转运。

43. 根据权利要求 41 所述的方法，其中该评估步骤包括检测该化合物与该受体的结合亲和力。

44. 检测化学化合物影响受体亚单位能力的方法，包括以下步骤：

(a) 核酸，其与编码受体亚单位的具有 NCBI 接收号 No.NM205953 的基因的编码区的第 79-1485 位之间的核酸序列有至少 50% 同一性；(ii) 分离的核酸分子，其编码辅助蛋白，体外导入宿主细胞，以表达该受体亚单位，其中该宿主细胞内源性产生和表达辅助蛋白，其中该宿主细胞能对 spinosyn 响应；

(b) 将该被表达受体亚单位暴露于化学化合物；

(c) 评估该被暴露的受体亚单位以检测该化学化合物是否影响该受体亚单位。

45. 根据权利要求 44 所述的方法，其中该化学化合物是化学化合物的混合物。

46. 根据权利要求 44 所述的方法，其中该宿主细胞是非洲爪蟾卵母细胞。

47. 根据权利要求 44 所述的方法，其中该宿主细胞是昆虫细胞系。

48. 特异结合多肽抗原表位的抗体，其中该多肽由与具有 NCBI 接收号 No.NM205953 的基因的编码区的第 79-1485 位之间的核酸序列有至少 50%同一性的核酸编码，其中表达由该核酸编码的该多肽的该宿主细胞能对 spinosyn 响应。

49. 根据权利要求 48 所述的抗体，其中该抗原决定簇来源于 367-380 位氨基酸，并且该核酸序列是具有 NCBI 接收号 No.NM205953 的核酸序列。

50. 根据权利要求 48 所述的抗体，其中该抗体是单克隆抗体。

51. 包括基因突变的生物体，其中该基因的编码区具有与具有 NCBI 接收号 No.NM205953 的基因的编码区的第 79-1485 位之间的核酸序列至少 50%的同一性，并且其中该生物体包括显示出比其来源的亲本生物体对 spinosyn 降低的反应性的突变。

52. 根据权利要求 51 所述的生物体，其中该生物体是无脊椎动物。

53. 根据权利要求 52 所述的生物体，其中该无脊椎动物是果蝇。

54. 根据权利要求 51 所述的生物体，其中该生物体的基因组的该基因是纯合子。

55. 根据权利要求 51 所述的生物体是无脊椎动物。

56. 根据权利要求 51 所述的生物体是昆虫。

57. 载体，包括：(a) 反义核苷酸序列，其实质上互补于 (1) 具有 NCBI 接收号 No.NM205953 的基因的编码区的第 79-1485 位之间的核酸序列有至少 50%同一性的 DNA 分子的相应部分；(b) 调节序列，其与该反义核苷酸序列操作性连接，以便该反义核苷酸序列在其转化的细胞中表达，并且其中该转化细胞展现了比未转化细胞对 spinosyn 降低的响应。

58. 转化有根据权利要求 57 所述的载体的细胞。
59. 根据权利要求 58 所述的细胞, 其中该细胞是无脊椎动物细胞。
60. 根据权利要求 59 所述的细胞, 其中该无脊椎动物细胞是黑腹果蝇细胞或新杆状线虫细胞。
61. 筛选化合物的方法, 包括下述步骤:
- (a) 把化合物给药于转基因生物体, 该转基因生物体包括由根据权利要求 57 所述的载体转化的细胞,
- (b) 观察该化合物对该生物体的效应。
62. 用于筛选化合物活性的试剂盒, 该试剂盒包括: 包括由根据权利要求 57 所述的载体转化的细胞的转基因生物体。
63. 筛选抗 spinosyn 的生物体的方法, 包括步骤: (a) 从该生物体获得核酸; (b) 检测核酸的序列, 该核酸与具有 NCBI 接收号 No.NM 205953 的基因的编码区的第 79-1485 核酸序列有至少 50% 的同一性; (c) 比较该检测的序列和来自于对 spinosyn 易感的生物体的相同基因的序列, 其中该被筛选的生物体和该对 spinosyn 易感的生物体是来源于同一个物种。
64. 筛选化合物的方法, 包括下述步骤:
- (a) 把该化合物给药于转基因生物体, 该转基因生物体包括由根据权利要求 57 所述的载体转化的细胞; 和 (c) 观测该化合物对该生物体的效果。
65. 根据权利要求 64 所述的方法, 其中该生物体是脊椎动物。
66. 根据权利要求 65 所述的方法, 其中该脊椎动物是鱼。
67. 根据权利要求 66 所述的方法, 其中该鱼是斑马鱼。
68. 根据权利要求 64 所述的方法, 其中该脊椎动物是小鼠。
69. 检测化学化合物影响受体亚单位能力的方法, 包括以下步骤:
- (a) 将载体, 其包括 (i) 核苷酸序列, 其与具有 NCBI 接收号 No.NM 205953 的基因的编码区第 79-1485 位的核酸序列有至少 50% 同一性的核苷酸序列; (ii) 与该核苷酸序列操作性连接的调节序列, 导入生物体的一个或多个细胞中, 以至于该核苷酸序列在其转化的至少一个或多个细胞中表达, 并且其中该转化细胞展现了比未转化细胞对 spinosyn 增强的响应。



- (b) 将该被转化细胞表达的该受体亚单位暴露于化学化合物；
- (c) 评估该被暴露的受体亚单位以检测该化学化合物是否影响该受体亚单位。

70. 根据权利要求 69 所述的方法，其中该转化细胞包括组织培养物。

71. 根据权利要求 69 所述的方法，其中该转化细胞包括完整的生物体。

## 使用烟碱乙酰胆碱受体亚单位的新检测方法

### 技术领域

本发明得到了国立卫生研究院 5-U01-AI053873 号的资助。因此，政府可享有本发明的某些权利。

目前本发明应用于识别和鉴定新的杀虫的靶位，特别是与宿主细胞相关的新的杀虫的靶位、检测和其抗体。

### 背景技术

由昆虫对农作物造成的全球经济损失是令人震惊的。在美国每年由于鳞翅类害虫造成的经济损失估计高达 600,000,000 美元。因此，在现代农业中杀虫剂是杀灭害虫的重要物质。一种被称为多杀菌素的杀虫剂是两种天然代谢物 spinosyn A 和 spinosyn D 的混合物，其是由放线菌 *saccharopolyspora spinosa* 中产生的。多杀菌素可以有效地依次杀灭昆虫中鳞翅目、双翅目和缨翅目害虫，还可以有效地抗鞘翅目和直翅目的害虫。

杀虫剂多杀菌素通常是针对生物体特定的靶点，例如关键蛋白质。迄今为止，仅仅鉴定了为数不多的杀虫剂作用的靶位。也可能由于田间的昆虫种群增加了对杀虫剂的抗药性，这些靶位点作用失效。由于多杀菌素是天然的杀虫剂，因此有望发现其他作用于多杀菌素靶位的具有杀虫效果的化学化合物。

### 发明内容

尽管不断的改进技术，目前知道的具有杀虫效果的靶位还是有限的，因此需要发现和研制新的、有效的、安全的杀虫剂。本发明根据这个需要，寻找到了以类似于多杀菌素的作用方式和化学组成的新的可以有效的识别和鉴定靶位点，即多杀菌素靶位点。此外，来自于脊椎动物的烟碱乙酰胆碱受体是干涉多种疾病状态的药学和动物健康化合物重要靶位。因此，本发明也提供了一个研究烟碱乙酰胆碱受体亚

单位相互作用和药物学的模式系统。

SEQUENCE ID NO: 1 是位于果蝇 2L 染色体 34E 位点上的编码烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -5 亚单位的核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 2 是果蝇 X 染色体上 18C 位点的编码烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -7 亚单位的核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 3 是位于 30D 位点编码果蝇烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -6 受体亚单位的正向 PCR 引物的寡核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 4 是位于 30D 位点编码果蝇烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -6 受体亚单位的反向 PCR 引物的核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 5 是位于 34E 编码果蝇烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -5 受体亚单位的正向 PCR 引物的核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 6 是位于 34E 编码果蝇烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -5 受体亚单位的反向 PCR 引物的核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 7 是位于 18C 编码果蝇烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -7 受体亚单位的正向 PCR 引物的核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 8 是位于 18C 编码果蝇烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -7 受体亚单位的反向 PCR 引物的核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 9 是编码线虫 ric-3 正向 PCR 引物的核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 10 是编码线虫 ric-3 反向 PCR 引物的核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 11 是对应于果蝇烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -6 受体亚单位第 367-380 位氨基酸的氨基酸序列。

SEQUENCE ID NO: 12 是加入 Kozak 翻译起始信号编码 30D nAChR  $\alpha$ 6 正向 PCR 引物的核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 13 是编码 30D nAChR  $\alpha$ 6 反向 PCR 引物的核苷酸序列。

SEQUENCE ID NO: 14 是加入 Kozak 翻译起始信号编码线虫 ric3 正向 PCR 引物的核苷酸序列。

上面列出来的序列是与参考文献 Nucleic Acids Res.13:3021-3030 (1985) 和 Biochemical J.219(No.2):345-373(1984)列出来的标准一致的

核酸序列字母的单字母密码和氨基酸单字母密码，所述文献通过参考并入本申请。核酸和氨基酸序列数据所用的符号和格式遵守 37 C.F.R. §1.822 的要求。

本发明一方面涉及宿主细胞，其包括：(i) 与编码受体亚单位的 NCBI 接收号 No.NM205953 基因编码区第 79-1485 位核酸有至少 50% 同一性的核酸；(ii) 编码离子通道亚单位的核酸，其中宿主细胞能对 spinosyn 响应。

本发明的另一方面涉及宿主细胞，其包括 (i) 与编码的受体亚单位 NCBI 接收号 No.NM205953 基因编码区第 79-1485 位核酸有至少 50% 同一性的核酸；(ii) 编码前体蛋白质的核酸，其中宿主细胞中能对 spinosyn 响应。

本发明的另外一个方面涉及检测影响受体亚单位能力的化学化合物的方法，包括以下步骤：(a) 将 (i) NCBI 接收号为 No.NM205953 的编码受体亚单位的编码区第 79-1485 位核酸序列有至少 50% 同一性的核酸；和 (ii) 编码离子通道亚单位的核酸分子体外导入宿主细胞，以表达受体亚单位和离子通道亚单位，其中该宿主细胞能对 spinosyn 响应；(b) 将受体亚单位暴露于化学化合物；(c) 评估暴露的受体亚单位来判断化学化合物是否会影响受体亚单位。

本发明的另一方面涉及用于评估化学化合物影响受体亚单位能力的方法，包括以下步骤：(a) 将 (i) 与编码受体亚单位 NCBI 接收号为 No.NM205953 的基因第 79-1485 位核酸序列有至少 50% 同一性的核酸体外导入宿主细胞，以表达受体亚单位；其中离子通道亚单位由宿主细胞内源性产生和表达，其中宿主细胞能对 syinosyn 响应；(b) 将表达的受体亚单位暴露于化学化合物；(c) 评估被暴露的受体亚单位来判断化学化合物是否会影响受体亚单位。

本发明的另一方面涉及检测化学化合物对受体亚单位影响能力的方法，包括以下步骤：(a) 将 (i) 与编码受体亚单位 NCBI 接收号为 No.NM205953 的第 79-1485 位核酸序列有至少 50% 同一性的核酸在宿主细胞体外表达受体亚单位，(ii) 编码辅助蛋白的分离的核酸分子体外导入宿主细胞以表达受体亚单位好辅助蛋白，其中宿主细胞能对 spinosyn 响应；(b) 将表达的受体亚单位暴露于化学化合物；(c) 评估

暴露的受体亚单位来判断化学化合物是否会影响受体亚单位。

本发明的另外一个方面涉及评估化学化合物影响受体亚单位的能力的方法，包括以下步骤：(a) 与编码受体亚单位 NCBI 接收号 No.NM205953 基因编码区第 79-1485 位核酸有 50%同一性的核酸体外导入宿主细胞，以表达受体亚单位，其中宿主细胞内源性产生和表达辅助蛋白，其中宿主细胞能对 spinosyn 响应；(b) 将表达的受体亚单位暴露于化学化合物；(c) 评估被暴露的受体亚单位来判断化学化合物是否会影响受体亚单位。

本发明的另一方面涉及可以特异性的与 NCBI 接受号为 No.NM205953 编码区第 79-1485 位核酸序列有至少 50%同一性的核酸序列编码的多肽抗原表位结合的抗体，其中功能性表达由核酸编码的多肽的宿主细胞能对 spinosyn 响应。

本发明的另外一方面涉及包括了基因突变的生物体，其中基因编码区具有与 NCBI 接收号 No.NM205953 编码区第 79-1485 位核酸序列有至少 50%同一性，其中包括突变的生物体显示比其来源的母系的生物体对 spinosyn 降低的响应性。

本发明另一方面涉及载体，包括 (a) 与 (1) 与 NCBI 接收号 No.NM205953 编码区的第 79-1485 位核酸序列有至少 50%同一性的 DNA 分子的一条链的对应部分基本上互补的反义核酸序列；(b) 与反义核酸序列可操作性连接的调节序列，以在转化细胞中表达反义核酸序列，其中转化细胞比未转化细胞对 spinosyn 的响应性减少。

本发明的再一个方面涉及用于筛选对 spinosyn 抗性的生物体，包括下面步骤：(a) 从生物体中获得核酸；(b) 检测与 NCBI 接受号为 No.NM205953 基因编码区第 79-1485 位核酸有至少 50%同一性的核酸序列；(c) 比较被检测的序列与来自于对 spinosyn 易感的生物体的相同基因的序列，其中被筛选的生物体与 spinosyn 易感的生物体来源于同一个物种的。

在进一步的实施范例中，本发明涉及检测影响受体亚单位的化学化合物的能力的方法，包括下面步骤：(a) 将包括 (i) 与 NCBI 接收号 No.NM205953 基因编码区的第 79-1485 位有至少 50%同一性的核酸序列；(ii) 与核酸序列可操作性连接的调节序列的载体导入生物体的

一个或多个细胞中，以使得核酸序列的在至少一个或者多个转化细胞中表达，其中转化细胞显示了比未转化细胞对 spinosyn 响应的增强；

(b) 将表达受体亚单位的转化细胞暴露于化学化合物；(c) 评估暴露的受体亚单位来检测化学化合物是否影响受体亚单位。

本发明的其他特性和优点将在下面的说明书中进行解释，其中一部分在说明书中是清楚的，或者在本项发明的应用中学到。在本文中可以从本发明的说明书和其权利要求中了解和知道其优点。将被理解，对本发明的总的描述和后面更为的详细描述是示例性和说明性的，并用于对进一步解释要求保护的本发明。

为更方便的了解本发明下面是部分定义。单位、前缀和符号以其 SI 的接收格式表示。除非有其他的说明，核酸都是按照从左侧 5'端起始到右侧 3'端的顺序；氨基酸是从左到右从氨基端到羧基端。说明书中列出的数值范围是包括在限定的一定范围内的，且包括该范围内的每一个整数。本申请提到的氨基酸是按照 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐使用的众所周知的三个字母的密码子或者是一个字母的密码子。同样，核酸也是用该委员会命名的单字母代码。除非另作说明，本文所涉及的软件术语和电工、电子术语是按照新的 IEEE 标准的电工和电子术语词典进行使用（第五版本，1993 年）。下述定义的术语被参考文献更详细的定义，并作为整体并入本申请。

**“辅助蛋白”**指包括但不限于是昆虫和无脊椎动物的辅助蛋白，例如伴侣蛋白质，其参与膜运输、离子通道亚单位的成熟、折叠和多肽如受体亚单位的转运和/或装配。**“编码辅助蛋白的核酸”**或者**“多核酸的辅助蛋白”**指的是编码辅助蛋白的多聚核酸。这个术语也包括任何辅助蛋白的片段、变异体、同系物、等位基因或者前体（如前导蛋白（preproteins）或前蛋白）。

**“抗体”**指的是能够特异结合抗原决定簇的完整分子和其片段。可以用完整的多肽或片段作为免疫抗原来制备特异性结合该多肽的抗体（如，本发明中提到的核酸编码的多肽）。如有需要，可以使这些蛋白质与载体蛋白连接。

**“反义 RNA”**指的是可以阻断靶基因（美国专利号 No.5,107,065 通过参考并入本申请）表达的，且与该基因的初级转录本或 mRNA 的全

部或部分互补的 RNA 转录本。它可以与靶基因的转录本的任何一段互补，如：5'非编码序列、3'非编码序列、内含子或者编码序列，等等。

“具有转录活性的 RNA（功能 RNA）”指的是正义 RNA、反义 RNA、核酶 RNA、或者是那些参与细胞过程但并不能被翻译的 RNA。

“结合亲和力”指的是配体与受体或者其他蛋白质相互作用的倾向（propensity）。

“离子转运”指的是在生物系统中盐离子和其他电解质以离子的形式从一个地方运动到另一个地方。

“抗原表位（抗原决定簇）”指的是大分子的任何一个区域能够或者具有识别并结合一个或者更多特异性抗体的潜能，也包括结合特异性抗体的区域。

“表达”指的是来源于本发明中的核酸片段的正义（mRNA）或反义 RNA 的转录本和稳定累积。表达也指的是 mRNA 翻译形成的多肽。

“反义抑制”指的是能够抑制靶标蛋白质表达的反义 RNA 转录本的产物。“过表达”指的是的转基因生物体中的某一个基因的表达产物明显高于正常或者非转基因生物体。“共抑制”指的是能够抑制相同或基本相似的外源性或内源性基因（美国专利号 No.5,231,020 通过参考并入本申请）表达的正义 RNA 转录本的产物。

“功能表达”指的是宿主细胞离子通道分子的合成和任何必需的翻译后的过程，使得在对细胞膜电位的实验性增加改变的响应中或一旦暴露于适当的药理化合物的情况下离子通道能够正确的插入到细胞膜上并能够进行离子转运。

“基因”指的是表达特异蛋白质的核酸片段，包括前面的调节序列（5'非编码区）和编码区后面的序列（3'非编码区）。“天然基因”指的是在自然界中发现的本身具有调节序列的基因。“嵌合基因”指的是除天然基因之外的任何基因，包括未在自然界中一起存在的调节和编码序列。因此，嵌合基因包括不同来源的调节序列和编码序列或者是相同来源的但与自然界中的天然基因不同的方式排列的调节序列和编码序列。

“内源基因”指的是在生物体的基因组中位于原来位置的天然基因。“外源基因”指的是未在宿主生物体中发现的基因，可通过基因转

移将其转入到宿主生物体中。外源基因包括能够嵌入到非其天然生物体中的天然基因或嵌合基因。“转基因”指的是能够通过转化的方法进入基因组中的基因。

“基因组 DNA”指的是染色体 DNA 并且可能包括内含子。“内含子”是间插序列，是一个基因中的 DNA 非编码序列，该基因可以被转录成不均一核 RNA (hnRNA)，但在核内通过 RNA 剪切的形式去除内含子，留下一个成熟的 mRNA，然后在细胞质内翻译。内含子末端的区域是自身互补的，在 hnRNA 中形成天然的发夹结构。

“宿主细胞”指的是将分离得到的核酸片段稳定的或瞬间转入的任何细胞或生物体。宿主细胞可以是一个大生物体的一部分、组织培养的个体或自由生活的生物体。这些包括但不限于：脊椎动物和无脊椎动物宿主、真核宿主如哺乳动物细胞（例如 SH-SY5Y 细胞、COS 细胞、HEK-293 细胞和 PC12 细胞）、大鼠和小鼠、众所周知的模式生物如：斑马鱼、爪蟾卵、昆虫细胞（昆虫细胞系如：果蝇 schneider、果蝇 Kc、Sf9 和 High Five 系），原核宿主如细菌（包括但不限于大肠杆菌、芽胞杆菌属、链霉菌属和假单胞细菌属）以及真菌（包括但不限于来源于克鲁维酵母属和酵母菌物种的细胞）和植物。

“昆虫”包括昆虫纲中的任何空气呼吸的节肢动物，包括但不限于家蝇、果蝇或醋蝇（黑腹果蝇），也包括其他农业昆虫、医学昆虫、重要的兽医昆虫等如桃蚜（绿色桃蚜）、绿棉铃虫（烟草蚜虫）、马铃薯甲虫（科罗拉多马铃薯甲虫）、德国小蠊（德国蟑螂）、苹果蠹蛾、小菜蛾、埃及伊蚊和冈比亚按蚊。

“离子通道亚单位”指的是能够形成部分离子通道的任何蛋白质分子，包括那些在形成离子通道的过程中能够与其他分子结合的亚单位。“编码离子通道亚单位的核酸”或“离子通道亚单位多聚核酸”指的是编码离子通道亚单位的多聚核酸。这个术语也包括任何离子通道亚单位的片段、变异体、同系物、等位基因或前体（如前导蛋白或前体蛋白）。“编码离子通道亚单位的核酸”这个术语也包括由宿主细胞如 PC12 细胞内源性产生的核酸的实施方案。

“分离”指的是如核酸或蛋白质的物质，其为（1）基本上或完全没有在天然存在的环境中发现的通常与该物质相伴或相互作用的组分；



(2) 如果这个物质在其自然环境中，但被人类的故意介入而改变形成组合物和/或被放到不是该物质的原来位置上的细胞中。

“损伤”指的是核酸与来源于母系或野生型种群的核酸相比发生的任何分子变化。例如，损伤可以是核酸序列的缺失、倒置、插入、复制、转换、颠换或重排。

“配体门控离子通道亚单位”指的是形成受配体调节的任何离子通道的部分的亚单位，包括但不限于烟碱乙酰胆碱受体亚单位、GABA受体亚单位、5-羟色胺受体亚单位和谷氨酸受体亚单位。已知并可以从公用数据库和互联网可以获得核酸序列、蛋白质序列，以及多序列对比和系统进化的研究。“编码配体门控离子通道亚单位的核酸”或“配体门控离子通道亚单位多聚核酸”指的是编码配体门控离子通道亚单位的多聚核酸。这个术语也包括任何配体门控离子通道亚单位的片段、变体、同系物、等位基因或前体（如前导蛋白或前体蛋白）。

“核酸”指的是任何核酸，包括单链或多链脱氧核糖核酸或核糖核酸碱基的聚合物。核酸也包括片段、修饰的核酸和变体。因此，本申请使用的术语“多聚核酸”和“核酸”是可以替换使用的。

典型的“启动子”指的是指导结构基因转录产生RNA的DNA序列。典型的启动子位于基因上游500bp(碱基对)接近转录起始位点的区域。如果是一个可诱导型启动子，在外源性或内源性诱导因素作用下，转录会增加或减少。相反，对于组成型启动子诱导因素不能调控其转录。

“受体亚单位”指的是构成完整受体的任何蛋白质。“烟碱乙酰胆碱受体亚单位”指的是构成完整的烟碱乙酰胆碱受体组成的任何蛋白质，如烟碱乙酰胆碱 $\alpha$ -5、 $\alpha$ -6和 $\alpha$ -7受体亚单位。前面提到的所有引用的编码受体亚单位的核酸指的是编码受体亚单位的多聚核酸。这个术语也包括任何受体亚单位的片段、变体、同系物、等位基因或前体（如：前导蛋白或前体蛋白）。

“抗性”指的是遗传确定的昆虫种群对spinosyn作用的相对响应。一般，昆虫品系或种群在杀虫剂试验中（以可以杀死一个属或种群中50%的用药剂量作为评判标准）显示了比适当的参考耐受剂量或者比易感种群至少高于2倍，优选4-8倍，更优选至少10倍以上的抗性则被认为其具有“抗性”。

“对 spinosyn 的响应”指的是暴露 spinosyn 产生的可以检测到包括但不限于行为、存活力、配体结合或离子转运的改变的效应。

“**Spinosyn**”指的是包括由放线菌多刺糖多孢菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 产生的由 U.S. 专利号 No. 5,362,634 鉴定命名的 A83543 等发酵产物。这些化合物指的是因子或 A、B、C、D、E、F、G、H、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W 和 Y 组分等等 (可参见公布的国际专利申请书 WO 93/09126 和 WO 94/20518) 以及下文中会被提到的 Spinosyn A、B、C 等等。天然产生的 spinosyn 化合物由融合到 12-元大环内酯的 5,6,5-三环系统、中性糖 (鼠李糖) 和氨基糖 (forosamine) 组成 (见 Kirst et al, 1991)。包括由 *Saccharopolyspora pagona* 产生的 21-正丁巴比妥 spinosyn 这些及其他的天然 spinosyn 化合物是由位于 1815 北方大学街道, 皮奥里亚 (Peoria,) III. 61604 的中西部北方区域研究中心、农业研究服务处和美国农业部存贮培养的命名为 NRRL18719、18537、18538、18539、18743、18395 和 18823 保藏培养物发酵产生的。在 U.S. Pat. Nos. 5,496,931、5,670,364、5,591,606、5,571,901、5,202,242、5,767,253、5,840,861、5,670,486 和 5,631,155 专利中也公开了 Spinosyn 化合物。Spinosyn A 和 D 是 spinosyn 的两个组分, 其是具有特别活性杀虫剂。由称为多杀菌素的 Dow AgroSciences (Indianapolis, Ind.) 生产的主要包含这两种 spinosyn 组分 (大约 85% 的 spinosyn A 和 15% 的 spinosyn D)。此处使用的此术语也包括由 spinosyn 合成或半合成的“**spinosyn 衍生物**”。

“**实质类似**”指的是核酸片段, 其中一个或多个核酸碱基变化导致一个或多个氨基酸的替换, 但并不影响由 DNA 序列编码蛋白质的功能特性。“**实质类似**”也指的是核酸片段, 其中一个或多个核酸碱基发生改变不能影响由反义或共抑制方法导致的核酸片段介导的基因表达发生改变。“**实质类似**”也指的是发生缺失或插入一个或多个核酸核酸片段的修饰, 没有从实质上影响合成的转录本与由反义或共抑制介导基因表达发生改变的功能特性或者获得的蛋白质分子的功能特性相比发生改变。因此可以理解为本发明包括更多的特定的例举的序列。

例如, 本领域所熟知的用小于靶基因整个编码区的核酸片段和与靶基因不是 100% 同一性的核酸片段可以反义抑制和共抑制基因的表

达。此外，本领域所熟知的靶基因的改变可以导致在特定位点上化学等值的氨基酸的产生，但并不影响编码蛋白质的功能特性。因此，疏水性氨基酸丙氨酸的密码子可以被其他具有较少疏水残基如：甘氨酸和具有较多疏水残基如缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸编码的密码子所替换。类似的，发生阴离子电荷残基替换，如谷氨酸替换天冬氨酸，或阳离子电荷残基发生替换，如精氨酸替换赖氨酸，可以产生一样的功能产物。造成蛋白质分子的 N 端和 C 端部分的发生改变的核酸变化并不能改变蛋白质的活性。可以用本领域常规方法预测编码产物的保留生物学活性的每一个修饰。

此外，实质类似的核酸片段具有在严谨条件下（0.1X SSC、0.1% SDS, 65° C）与本申请公开的核酸片段杂交的能力。

本发明中的实质类似的核酸片段也可以由其编码的氨基酸序列与在本申请公开的用本领域技术人员通常使用的计算方法得到的氨基酸序列的百分比类似性进行比对。优先选择那些编码的氨基酸与本申请报道的核酸序列编码的氨基酸序列有 80%以上相似性的核酸片段。更优选那些核酸序列编码的氨基酸与本申请报道的核酸序列编码的氨基酸序列有 90%以上相似性的核酸片段。最优选那些核酸序列编码的氨基酸与本申请报道的核酸序列编码的氨基酸序列有 95%以上相似性的核酸片段。用 Vector NTi Suite (InforMax, North Bethesda, MD) 程序对序列对比和百分比近似计算。用 Clustal method of alignment (Higgins and Sharp, 1989) 的缺省参数 (GAPPENALTY-10, GAP extension PENALTY=0.1) (此后称为 Clustal algorithm) 对序列多重对比。用 Clustal method 进行配对对比的缺省参数是 KTUPLE 1、GAP PENALTY=3、WINDOW=5 和 DIAGONALS SAVED=5。

氨基酸或核酸序列的“实质部分”指的是用本领域技术人员评估的方法或应用自动化的计算机算法如 BLAST（基本的局部比对搜索工具，参见 Altschul et al, 1993, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)）进行序列比较的时需要的足以推定多肽或基因的氨基酸或核酸序列。大体上，与氨基酸相邻十个或更多或者三十个或更多的核酸的序列可以用来推定与已知蛋白质或基因的同源的多肽或核酸序列。此外，就核酸序列而论，可以应用依赖序列的方法，利用包括 20-30 个相邻的核酸的基因

特异寡核苷酸探针鉴定（如 Souther 杂交）和分离（如细菌克隆或噬菌体的原位杂交）基因。另外，12-15 个碱基的短寡核苷酸可用来作为进行 PCR 扩增的引物来获得包括引物的特异的核酸片段。相应地，核酸序列的“实质部分”指的是需要特异性鉴定和/或分离包括该序列的核酸片段的足够序列。本说明书说明了一个或多个编码特异的植物蛋白质的部分或全部氨基酸和核酸序列。本领域的技术人员利用本申请报道的序列，可以将本申请公开的全部或实质部分序列用于本领域技术人员已知的目的。

“**转录调节区**”和“**调节区**”指的是调节基因转录的 DNA 区域。调节区包括许多顺式作用元件，这些顺式作用元件包括但不限于启动子、增强子和激素反应元件。由于内含子和 5'非翻译区可以影响转录，因此转录调节区还包括这些序列。调节区可操作地连接于核酸，以保证宿主细胞中核酸的表达。

“**转基因动物**”指的是通过将 DNA 人为插入和稳定整合到基因组上的修饰动物。DNA 可以随机或定向插入到染色体、附加体或染色体外元件的特定位点。

“**转基因细胞**”指的是将 DNA 人为插入到染色体或附加体或染色体外元件的细胞。

“**变异体**”指的是实质类似的序列。一般，本发明的核酸序列变异体与天然核酸序列有至少 46%、48%、50%、52%、53%、55%、60%、65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99% 的同一性，其中百分比序列同一性是基于全部序列的，用缺省参数进行 GAP 10 分析得到的。一般来说，本发明中的多肽序列变异体与天然蛋白质有至少 60 %、65 %、70 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %或 99% 的同一性，其中百分比序列同一性是基于全部序列的，用缺省参数进行 GAP 10 分析得到的。GAP 用的是 Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443-453, 1970) 算法来寻找两个完整序列的最大匹配数和最小缺口数的比对。

“**变异体**”也指的是与本发明包含的和生物学功能必需的基序高度相似的氨基酸序列的实质类似序列。通常，本发明的多肽序列的变异体与定义的基序的保守氨基酸残基有至少 85%、90%或 95%的序列同一性。

本发明使用的本领域所熟知的标准重组 DNA 和分子克隆技术，在 Sambrook and Russell (2000)中有详细描述。

本发明包括的变异体包括核酸的个别替换、缺失或加入，或改变、添加或缺失单个氨基酸，或在编码的序列中的小部分氨基酸的多肽序列。“保守修饰变异体”通过化学类似的氨基酸替换原来的氨基酸导致改变。可以利用假定宿主的偏好的密码子参数制备或合成改变的核酸。

本发明的核酸片段可被用来分离来源于同一个或不同物种的编码同源性蛋白质的 cDNAs 和基因。用本领域所熟知的依赖于序列的方法分离同源基因。依赖于序列的方法的实施例包括但不限于核酸杂交方法和 DNA、RNA 扩增方法，例如各种使用核酸扩增技术的方法（如多聚酶链延伸反应、连接酶链反应）。

例如可以本领域所熟知的以全部或部分核酸片段作为杂交探针筛选目标生物体，从而直接分离编码其他烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位的 cDNAs 或基因组 DNAs。用本领域所熟知的方法根据核酸序列设计并合成特异的寡核苷酸探针（Sambrook and Russell, 2000）。此外，本领域技术人员也可以用全部序列来指导合成 DNA 探针，如随机引物 DNA 标记、缺口平移或末端标记，或用体外转录系统合成 RNA 探针。

另外，设计可以用来扩增全部或部分序列的特异性引物。在扩增反应中或在扩增反应后，直接标记得到的扩增产物，将标记得到的扩增产物作为探针在适当的严谨条件下来分离全长 cDNA 或基因组片段。

另外，核酸片段的两个小片段可被用到多聚酶链反应中来扩增更长的编码 DNA 或 RNA 的同源基因的核酸片段。多聚酶链反应可用来扩增核酸片段克隆形成的文库，其中一个引物的序列来源于核酸片段，另外一个引物的序列是利用编码基因的 mRNA 前体 3'末端的多聚腺苷酸尾巴的序列。第二条引物的序列也可以来源于克隆载体序列。例如，本领域熟练的技术人员可遵循 RACE 技术（Frohman et al, 1988）使用 PCR 方法扩增转录本中某一个点到 3'或 5'末端产生 cDNAs。根据序列

设计 3'和 5'方向的引物。使用商业上通用的 3'RACE 或 5'RACE 系统 (Invitrogen, Madison, WI)分离特异性的 3'或 5' cDNA 片段(Ohara et al.,1989; Loh et al, 1989)。将 3'和 5'RACE 得到的产物相连可以得到全长的 cDNAs 产物(Frohman and Martin, 1989)。得到的核酸和推测得到的氨基酸序列可用于 cDNA 表达文库的免疫筛选。可以合成氨基酸序列代表性部分的多肽。可用这些肽免疫动物制备特异性的针对组成氨基酸序列的多肽或蛋白质的单克隆或多克隆抗体。用得到的抗体筛选 cDNA 文库分离感兴趣的全长 cDNA 克隆 (Lerner, 1984; Sambrook and Russell, 2000)。

本发明包括的编码相同氨基酸序列的许多多聚核酸。遗传密码子的简并性使得“沉寂变异体”的出现，其例如可用于选择性杂交、检测本发明的多聚核酸的等位变异体。另外，本发明包括了由等位变异体组成的分离的核酸。本申请用的术语“等位基因”指的是相同基因相关的核酸。也可将变异体描述成，如，剪切、物种或多态变异体。剪切变异体是与参考分子有高度同一性，但由于它在 mRNA 过程中改变剪切外显子产生了比参考分子多或少一定数量的多聚核酸。因此，相应的多肽会比参考分子增加或减少功能结构域。物种变异体指的是在不同物种中不同的多聚核酸。获得的多肽通常互相具有很高的氨基酸同一性。多态变异体是特定物种的个体的某一个特定基因的多聚核酸序列，也包括一个核酸碱基的多聚核酸序列变异产生的“单核苷酸多态性 (SNP)”。

本项发明中提到的核酸变异体可以通过如下方法如：寡核苷酸定点诱变、接头分区诱变、PCR 产生的诱变等等获得，也可参见 McPherson (1991)。因此，本发明也包括那些核酸序列与发明中的序列具有实质相似性的序列组成的 DNA 分子。

就某一个特定核酸序列而言，“保守修饰变异体”指的是那些编码一致或保守修饰氨基酸序列变异体的核酸序列。由于遗传密码子的简并性，大量功能上相同的核酸编码特定的蛋白质。例如，密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 都编码丙氨酸。因此，丙氨酸的指定密码子中的一个发生上面描述的相应的变化都不会改变其编码的多肽。这样的核酸变异体叫做“沉寂变异体”，它属于一种保守修饰的变异体。本申请

的每一个核酸序列都依据遗传密码子编码一个多肽，都可能描述核酸的每一个可能的沉默变异体。本领域技术人员可以识别被修饰核酸产生的功能一致分子的密码子（除了 AUG 是蛋氨酸的唯一密码子，UGG 是色氨酸的唯一密码子外）。相应地，在本发明描述的多肽序列以及本发明要求保护的权利要求范围中，本发明描述的多肽序列，包含了编码这个多肽的核酸的每一个沉默变异体。

“保守修饰变异体”是由于个体替换、缺失或加入核酸、肽、多肽或蛋白质序列的改变、增加或缺失编码序列的一个氨基酸或一小部分氨基酸序列的氨基酸序列，这个改变导致用化学类似氨基酸替代原来的氨基酸。因此，从整体中可以选择从 1 到 50 任何数目的氨基酸残基。例如，1、2、3、14、25、37、45 或 50 个氨基酸残基都可以。典型的保守修饰变异体与同一个来源的未修饰的多肽序列具有相似的生物学活性。如一般天然蛋白质对其天然的底物有至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或 90%的底物特异性、酶活性或配体/受体结合。保守置换表格提供了本领域所熟知的功能上相似的氨基酸。

例如，下面六组包括的氨基酸是每一个组内的是可以相互保守置换的：1)丙氨酸 (A)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)；2)天冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E)；3) 天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)；4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K)；5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、蛋氨酸 (M)、缬氨酸 (V)；6)苯丙氨酸 (F)、酪氨酸(Y)、色氨酸 (W)。也可以用其他本领域所熟知的保守置换模式（参见 Creighton,1984），如用比较软件 GCG 包、BLAST 或 CLUSTAL 对序列进行评分。

“载体”指的是能够运送另外一个与其相连的核酸的核酸分子。一种类型的载体就是“质粒”，指的是连接了一个 DNA 片段的环状双链 DNA 环。另外一种类型的载体是病毒载体，其中加入的 DNA 片段可以插入到病毒基因组中。某些载体在进入宿主细胞后可以自身复制（如具有细菌来源复制子的细菌载体和附加哺乳动物载体）。其他载体（如非附加体哺乳动物载体）当转入宿主细胞后，可以整合到宿主细胞的基因组中，因此和宿主的基因组一起复制。此外，某些载体具有能够指导与它相连接基因表达的能力。这样的载体指的是本申请说的“表达载体”。总的来说，重组 DNA 技术使用的表达载体通常都是质粒的

形式。在本说明书中，由于质粒是最常使用的载体形式，因此“质粒”和“载体”这两个术语可以交互使用。然而，本项发明也包括具有相同的功能的其它形式的表达载体，如病毒载体（复制缺陷的逆病毒、腺病毒和腺伴随病毒）。

“电压门控性离子通道亚单位”指的是形成任何受电压的变化调节离子通道的部分的亚单位，包括但不限于钙、钠、钾和氯化物电压门控性离子通道亚单位。可以从 NCBI 数据库上找到已经公布的编码这些电压门控性离子通道的核酸序列。“**编码电压门控性离子通道亚单位的核酸**”或“**电压门控性离子通道亚单位多聚核酸**”指的是编码电压门控性离子通道亚单位的多聚核酸，该术语也包括任何电压门控性离子通道亚单位的片段、变异体、同源物、等位基因或前体（如前导蛋白或前体蛋白）。

## 2.详细描述

本发明的实施方案涉及包括特定的核酸，并在合适条件下，能够表达某个氨基酸的宿主细胞。本发明的宿主细胞包括与 NCBI 接收号 No. NM 205953 编码的受体亚单位的基因编码区在 79-1485 位有至少 50%、优选至少 60%、尤其至少 70%、更优选至少 80%或特别是 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %和 100%的同一性的核酸，优选其长度超过至少 100、特别是超过至少 500 个紧邻的核酸，和特别是完全覆盖全序列。NCBI 接收号 No. NM 205953 基因在黑腹果蝇基因组中位于染色体 2L 的 30D。示例性的核酸序列包括但不限于果蝇或其它无脊椎动物的核酸序列，如秀丽隐杆线虫(NCBI 接收号 No. NM 072806)、冈比亚按蚊 (NCBI 接收号 No. AY705401)、产蜜蚜虫 (NCBI 接收号 No. AY 500239)和烟芽夜蛾（绿棉铃虫）(NCBI 接收号 No. AF143847)。可以获得这些已经公布了示例性的核酸序列相对应的氨基酸序列。

在一些实施方案中，这个核酸序列编码烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位。在其它实施方案中，编码受体亚单位的核酸序列是包括选自下面序列的核酸：(a) NCBI 接收号 No. NM 205953 的核酸序列；(b) 编码黑腹果蝇接收号 No. NM 205953 受体亚单位的剪切变异体的序列，如：



公共数据库公布的 (NCBI 接收号 Nos. NM 164874, NM 205951, NM 135472, NM 205952, NM 205953 AF321445, AF321446, AF321447, AF321448 和 AF321449); (c)由于遗传密码子简并性, 编码与在 (a) 和 (b) 中定义的相同的氨基酸的序列。

在本发明的另外一个实施方案中, 宿主细胞还包括编码离子通道亚单位的核酸。本领域技术人员可以明白编码离子通道亚单位的核酸是宿主细胞内源性产生或非内源性产生的。在可以内源性产生的离子通道亚单位的情况下, 因此没有必要将核酸转入宿主细胞中。示例性的离子通道亚单位包括配体门控性离子通道亚单位, 如烟碱乙酰胆碱受体亚单位、 $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 受体亚单位、5-羟色胺受体亚单位、谷氨酸受体亚单位和它们的功能片段, 以及电压门控性离子通道亚单位如钙、钠、钾、氯化物门控性离子通道亚单位和它们的功能片段。在一些实施方案中, 宿主细胞包括编码烟碱乙酰胆碱受体亚单位的离子通道亚单位的核酸。在其它实施方案, 编码烟碱乙酰胆碱受体亚单位的核酸包括选自下面的序列: (a) 具有 SEQ ID No: 1 的核酸序列; (b) 与 SEQ ID No: 1 编码烟碱乙酰胆碱受体亚单位基因编码区 925-2424 位序列有至少 50%、优选至少 60%、尤其优选至少 70%、更优选至少 80%和特别优选 90%、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99%和 100%的同一性的核酸序列, 序列的长度优选超过至少 100、特别优选至少超过 500 个紧邻的核酸、并特别优选覆盖序列的全长; (c)包括已知和公共数据库得到的(NCBI 接收号 Nos. NM 176035, NM 205986, NM 205985, AF 272778) 编码烟碱乙酰胆碱受体亚单位剪切变异体的核酸序列; (d) 由于遗传密码子简并性编码在 (a) - (c) 中定义的序列, 编码相同氨基酸的序列。上面提到的 SEQ ID No: 1 位于黑腹果蝇基因组的染色体 2L 的 34E。

在本发明的实施方案中, 宿主细胞能够对 spinosyn 响应。本领域的技术人员可以用本申请描述的容易有效的方法进行检测, 如电压钳制术、离子流测定胶迁移、Western Blots、放射标记竞争试验、噬菌体表达克隆和色谱联合分段分离技术。

此外除了含有上面提及序列的宿主细胞, 本发明的实施方案涉及还包括编码辅助蛋白核酸的宿主细胞。在特定的实施方案是, 编码辅

助蛋白的核酸是编码无脊椎动物辅助蛋白的核酸。在进一步的实施方案中，编码辅助蛋白的核酸选自 (a) 具有 NCBI 接收号 No.NM068898 的核酸；(b) 与 NCBI 接收号 No. NM 068898 基因编码区的第 1-1137 位序列有至少 36% 的同一性、优选至少 40%，特别优选至少 50%、优选至少 60%、特别优选至少 70%、更优选 80 % 和特别优选 90 %、91 %、92%、93%、94%、95 %、96%、97%、98%、99% 和 100% 的同一性，序列的长度优选超过至少 100、特别超过至少 500 个紧密相连的核酸，和特别覆盖整个序列的编码辅助蛋白的序列；(c) NCBI 接收号 No. NM 068898 编码秀丽隐杆线虫 ric-3 辅助蛋白的剪切变异体的序列；(d) 由于密码子的简并性，编码与(a) - (c) 定义的氨基酸相同的氨基酸的序列。此外，本发明的实施方案涉及还包括编码离子通道亚单位的第二个核酸的宿主细胞。特定的编码离子通道亚单位的第二个核酸是编码配体门控性离子通道的第二个亚单位。在一些实施方案中，宿主细胞包括编码配体门控性离子通道亚单位的第二个核酸，这个核酸也是烟碱乙酰胆碱受体亚单位。甚至在其它一些实施方案中，编码烟碱乙酰胆碱受体亚单位的核酸是编码烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -7 受体亚单位的核酸。在进一步的实施方案是，编码烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -7 受体亚单位的核酸选自下述的序列：(a) 与编码烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -7 受体亚单位的 SEQ ID No: 2 基因编码区第 106-1617 序列有至少 50%、优选至少 60%、特别优选至少 70%、更优选至少 80% 和特别优选 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 和 100% 同一性的序列，这个序列的长度优选超过至少 100、特别超过至少 500 个紧密连接的核苷酸，和基本覆盖全长核酸的序列。(b) 与编码烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -7 受体亚单位的 SEQ ID No: 2 序列有至少 50% 同一性；(c) 来源于黑腹果蝇的编码烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -7 受体亚单位的剪切变异体的序列，包括可以从公共数据库中查到的序列 (NCBI 接收号 Nos. NM 206791、NM 167645、NM 206790、NM 080340、AJ 554210 和 AY 036614)；(d) 由于密码子的简并性，编码与 (a) - (c) 中定义的氨基酸相同的氨基酸的序列。需要提到的是，包含 SEQ ID No: 2 的基因位于黑腹果蝇基因组的 X 染色体的 18C 位置。

本发明的实施方案还涉及包括与 NCBI 接收号 No. NM 205953

编码受体亚单位的基因的 79-1485 核酸序列有至少 50%同一性的核酸；(ii)编码辅助蛋白的核酸，其中宿主细胞能对 spinosyn 响应的宿主细胞。在这些特别的实施方案中，编码离子通道亚单位的核酸不需要被转入到宿主细胞中。

本发明的另外一个方面涉及，包括前面提到的核酸序列的载体，优选表达载体的宿主细胞。在本发明的实施方案中，提供了前面提到的载体形式，其中的核苷酸序列与在载体中存在的并且被安排在该核苷酸序列中的调控序列操作性连接，且受其调控。这些调控核酸序列与本发明中的核酸序列可以是异源的，即它们来源于不同的基因或生物体，或同源的，即与本发明的核苷酸在调控单位中是天然共同存在的。

本发明的重组表达载体包括适于在宿主细胞中表达的核酸，也就是说重组表达载体包括一个或更多个基于被用来表达的宿主细胞中筛选得到的与表达核酸序列操作性连接的调节序列。在重组表达载体中，“可操作连接”指的是感兴趣的核酸以表达核酸序列的方式与调控序列相连（如体外转录/翻译系统或转入载体的宿主细胞）。调节序列包括那些在许多类型的宿主细胞中直接组成型表达的核酸序列和那些仅仅在部分宿主细胞中直接表达的核酸序列（如组织特异性调节序列）。本领域技术人员可以理解根据要转入的宿主细胞和想要表达的蛋白质的表达水平等等来设计要用的表达载体。

在真核或原核细胞中根据蛋白质的表达来设计重组表达载体。例如，可以在细菌大肠杆菌细胞、昆虫细胞（杆状病毒表达载体）、酵母细胞或哺乳细胞中表达蛋白质。Goeddel, 1990 中详细说明了如何选择合适的宿主细胞。

本发明中证实的宿主细胞，提供了检测化学化合物中化学试剂与受体亚单位相互作用或影响受体亚单位的能力，如作用于 spinosyn 类似物。

因此，本发明的另外一个方面涉及检测化学化合物影响受体亚单位的能力的方法包括下述步骤：(a) 将 (i) 与包含 NCBI 接收号 No. NM 205953 编码受体亚单位的基因的编码区的第 79-1485 位核酸序列有至少 50%同一性的核酸；(ii) 编码离子通道亚基的核酸分子转入宿

主细胞中，体外表达受体亚单位和离子通道亚基，其中宿主细胞能对 spinosyn 响应；(b) 将表达的受体亚单位与化学化合物暴露；(c) 评估被表达和被暴露的受体亚基来检测是否化学化合物可以影响受体亚基。

本领域所熟知的诱导核酸进入宿主细胞的方法很多。其中之一就是微注射，也就是直接用细的玻璃注射针将 DNA 注射到细胞核中（或者直接将 RNA 注射到细胞的细胞质中）。也可以将 DNA 和惰性碳水化合物聚合物（葡聚糖）共同孵育，其中该聚合物与带正电荷的化学基团（DEAE、溴化甲基）耦合。DNA 通过其带负电荷的磷酸基团依附到 DEAE-葡聚糖）上。这些大的包含 DNA 的颗粒依次依附到细胞表面，通过已知的内吞作用进入细胞。逃避被破坏的细胞质中的一些 DNA 进入到细胞核，象其他基因一样转录形成 RNA。另外一个方法是，用磷酸钙沉淀的方法使细胞摄入 DNA。电穿孔的方法是将细胞放到含有 DNA 的溶液中，用电脉冲使细胞膜瞬间打开，DNA 通过这些打开的孔直接进入细胞质中，或用 DEAE-葡聚糖和磷酸钙方法形成内吞小囊泡旁路进入细胞（这个途径有时可以破坏囊泡或 DNA）。也可以通过人工脂囊泡、脂质体与细胞膜融合，直接将其与 DNA 的内容物运送到细胞质，从而将 DNA 转入细胞。更直接的方法是，用原代培养的植物细胞和组织，将 DNA 吸入到钨微粒的表面，鸟枪注射入细胞。

这些方法中的微注射，电穿孔和脂质体融合很适合诱导蛋白质进入细胞。还可以参考 Mannino and Gould-Fogerite, 1988; Shigekawa and Dower, 1988; Capecchi ; 1980 和 Klein et al, 1987。

诱导核酸进入细胞的方法也包括使用病毒载体。由于病毒的生长依赖于进入细胞的病毒基因组能力，因此运用病毒载体诱导核酸进入细胞是一个很精明和有效的方法。被广泛使用的产生蛋白质的一种这样的病毒是昆虫病毒：杆状病毒。由于杆状病毒在复制的过程中能够产生令人瞩目的水平的结构蛋白质（病毒外壳蛋白质）而被许多学者关注。如果外源基因置换病毒的基因，该外源基因的表达明显增加。像牛痘苗一样，杆状病毒很大，因此必需将外源基因重组到病毒基因组上。为了在杆状病毒中表达外源基因，要将感兴趣的基因克隆到带有小部分病毒基因组的载体的病毒外壳蛋白基因上。将重组质粒和野

生型的杆状病毒 DNA 共同转染昆虫细胞。以较低的效率质粒和病毒 DNA 通过同源序列重组，因此可以将外源基因插入病毒基因组中。由于缺乏外壳蛋白包含重组病毒的斑看上去与病毒的斑不同。挑选重组病毒的斑扩大培养。病毒原种然后用于感染新鲜培养的昆虫细胞，使外源蛋白质高效表达。可以参考 Miller (1989) 的杆状病毒载体。多种病毒载体如噬菌体、痘苗病毒、腺病毒和逆转录病毒可被用来转化哺乳动物细胞。

需要指出的是，转化细胞的一些方法需要使用中间质粒载体。Cohen 和 Boyer 的专利 U.S.Pat.No.4,237,224 描述了用限制性内切酶和 DNA 连接酶的方法构建重组质粒表达系统。利用转化的方法将重组质粒导入细胞，在单细胞的原核细胞生物体中复制，在组织培养的真核细胞中生长。用本领域熟知的 Sambrook and Russell (2000) 所述标准的克隆方法将 DNA 序列克隆到质粒载体上。

在本发明的一些实施方案中，所用的宿主细胞能够内源性产生编码离子通道亚单位的核酸，所以，没有必要将编码离子通道亚单位的核酸诱导进入宿主细胞。因此，检测化学化合物影响受体亚单位的方法包括下述步骤：(a) 将 (i) 诱导编码受体亚单位的核苷酸序列导入宿主细胞，体外表达受体亚单位，其中宿主细胞可以内源性产生和表达离子通道亚单位，其中宿主细胞能对 spinosyn 响应；以及因此 (b) 使受体亚单位暴露于化学化合物；(c) 评估受处理的受体亚单位来检测化学化合物是否可以影响受体亚单位。

本发明的另外一个实施方案涉及检测化学化合物影响受体亚单位的相关方法包括下述步骤：(a) 将 (i) 与编码受体亚单位的 NCBI 接收号 No. NM 205953 基因编码区第 79-1485 位核苷酸序列至少 50% 同一性的核酸；(ii) 编码辅助蛋白的核酸分子导入宿主细胞，体外表达受体亚单位和辅助蛋白，其中宿主细胞能对 spinosyn 响应；(b) 使受体亚单位暴露于化学化合物；(c) 评价被表达的和被暴露的的受体亚单位来检测化学化合物是否能够影响受体亚单位。

在本发明的一些实施方案是，所用的宿主细胞能够内源性表达辅助蛋白，所以，没有必要将编码辅助蛋白的核酸诱导进入宿主细胞。因此，检测化学化合物影响受体亚基的方法包括下述步骤：(a) 将 (i)

编码受体亚单位的核酸序列进入宿主细胞，并使其体外表达受体亚单位，其中宿主细胞能够产生和表达内源性的辅助蛋白，其中宿主细胞能对 spinosyn 响应；以及因此 (b) 使受体亚单位暴露于化学化合物；(c) 评估被暴露的受体亚单位来检测化学化合物是否可以影响受体亚基。

无论如何，本发明所用的宿主细胞是可以暴露于各种化学化合物如可能的杀虫剂和杀虫剂 (pesticides)，并通过评估细胞和化合物的相互作用，发现和鉴定新的控制昆虫的化合物。本发明的实施方案中，所用的化学化合物是化学化合物的混合物。筛选化学化合物的示例方法在 Eldefrawi et al. (1987)和 Rauh et al. (1990)中公开。

本领域熟知的有许多种通过评估被暴露的宿主细胞来检测化学化合物是否可以影响受体亚单位的方法。在一个实施方案中，评估包括监测离子转运，例如通过离子通道，如对非洲爪蟾的卵母细胞功能性表达的通道用电压钳制术进行分析 (参见 Taglialatela et al, 1992 和 Stuhmer, 1992 总体讨论的用电压钳制术分析在爪蟾表达的受体和离子通道)。

用包含一种或多种化合物的培养基预培养细胞，向培养基中加入含放射性指示剂如放射性钙( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) 或放射性钠( $^{22}\text{Na}^{+}$ )的培养基，继续培养细胞，过滤分离细胞来监测离子转运。用液体闪烁计数或其它放射性技术(Bloomquist and Soderlund, 1988)测量细胞中的放射性指示剂来监测离子转运。在另外一个实施方案中，用钙或钠选择性荧光螯合剂平衡预处理细胞，洗涤细胞，用化学试剂处理细胞，通过测量荧光来监测细胞内钙或钠的增加，来评估化学化合物对受体的影响(Deri and Adam- Vizi, 1993; Lin, et al, 1999; PCT Int Appl. WO 2004033647; PCT Application: WO 20031009; Wilcox, 1999)。

在进一步的实施方案中，通过测量化合物对受体亚单位的结合亲和力和力来评估化学化合物对受体亚单位的影响。检测结合的结合试验是本领域技术人员已知的，包括但不限于凝胶迁移检测、western blots、放射标记的竞争检测、基于噬菌体的表达克隆、色谱分段分离、共沉淀、交联、相互作用捕获或双杂交试验、Southwestern 分析、ELISA 等等，其在例如 Current Protocols in Molecular Biology (1999, John Wiley

& Sons, NY)中描述, 通过参考全文并入本申请。筛选的化合物包括任何化合物, 但不限于细胞外、细胞内、生物或化学起源的化合物。本发明的方法也包含配体, 特别是带有指示剂如放射标记、荧光标记、化学荧光标记、酶标记和免疫原标记的可能的杀虫剂。试验中用的核酸包括在溶液中游离的、附着到固体支持物上的、细胞表面的或位于细胞内或与细胞部分结合的核酸。例如, 本领域技术人员可以测量受体亚单位和被试验的化合物形成的复合物。也可以检测被试验的化合物减少受体亚单位和其底物形成的复合物。

另外, 这项试验特别适用于使用 CCD 照相机、发光计或其它合适的光亮检测系统进行高通量筛选的检测。通过这种方式, 向培养在多孔盘中的细胞加入试验必需的试验底物和试剂, 来检测进入细胞内的钙。此外, 可以使用商业仪器如"FLIPR- fluorimetric imaging based plate reader" (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, Calif., USA; Wood et al, 2000) 和 "VIPR" voltage ion probe reader (Aurora, Bioscience Corp. CA, USA)。“FLIPR”可以高通量精确测量整个细胞内的荧光。电压敏感的荧光染料 FLIPR 技术被大量的用来测量哺乳动物细胞的膜电位和细胞的荧光现象。这个设备使用的是低角度激光扫描光照, 从而在接近标准的 96 孔板的孔底部大约 200 微米的处的掩膜(mask)以选择性激发荧光。低角度激光通过选择性将光只想单层细胞而减少产生的背景, 也消除了周围培养基产生的荧光背景。然后使用 CCD 照相机对平板底部的所有视野照相, 来测量每一个孔的底部产生的荧光。根据孔的面积均化测量得到的信号, 然后测量所有细胞的平均响应。这个系统具有同时测量每一个孔荧光的优点, 也避免了通过一个孔接一个孔的测量方法中连续测量的不精确性。这个系统可以以每秒两次的速度读出 96 孔或 384 孔板每一个孔的荧光信号。这个特性使得 FLIPR 系统可以平行的快速测量荧光, 该特性可以检测细胞的许多生理性能变化。细胞的这些生理性能变化可以作为药物发现功能试验的代理标志物。FLIPR 也被设计为具有本领域的已有的灵敏度。此灵敏度使得它可以精确测量非常小的变化。被称为“chameleons”的不编码辅助因子的新的钙荧光指示剂在细胞内有明确的定位。这些所谓的“chameleons”包括绿色荧光蛋白(GFP)的蓝或青紫发射突变、钙调节蛋白、钙调节蛋白结

合多肽 M13 和增强绿色或黄色发射的 GFP 的衔接融合。结合钙的钙调节蛋白包裹 M13 功能区，增加(Miyawaki et al, 1997)或减少(Romoser et al, 1997)GFP 蛋白两侧的荧光共振能的转移。

本发明鉴定了不同宿主细胞以及方法，也提供了产生的抗体，即与 NCBI 接收号 No. NM 205953 基因编码区第 79-1485 位核酸序列有至少 50%、优选至少 60%、特别优选至少 70%的同一性、更优选至少 80%的同一性、特别是 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和 100%的同一性的核酸序列编码的多肽的抗原表位特异性结合的抗体，其中这个多肽在宿主细胞表达、优选功能表达由能对 spinosyn 响应的核酸编码的多肽。优选与 NCBI 接收号 No. NM 205953 核酸序列以及才第 367-380 位氨基酸的多肽特异性结合的抗体。本发明的抗体包括能够与已经鉴定的抗原表位结合的多克隆和单克隆抗体、抗体的片段和人源化的抗体。本发明的人源化的抗体可以用本领域技术人员已知的嵌合体的方法产生。本发明的抗体片段包括但不限于 Fab、Fab2 和 Fd 片段。

本发明也提供了能够产生上面描述抗体的杂交瘤。杂交瘤是能够分泌特异性单克隆抗体的永生化细胞系。

一般而言，本领域所熟知的制备多克隆、单克隆抗体以及能够产生理想抗体的杂交瘤技术参见 Campbell, 1984 和 St. Groth et al, 1980。用烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位蛋白质（或其抗原片段）作为抗原免疫任何已知能够产生抗体的动物（小鼠、兔子等等）可以产生抗体。免疫方法是本领域技术人员已知的。这些方法包括皮下或腹腔注射蛋白质。本领域技术人员可以根据免疫不同的动物、蛋白质抗原性和免疫注射的位置知道用于免疫接种的烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位蛋白质的量是不同的。

对作为免疫原的蛋白质修饰或给予佐剂给药来增加蛋白质抗原性。增加蛋白质抗原性的方法是本领域已知的，包括但不限于将抗原与异种蛋白质偶联（如球蛋白或  $\beta$ -半乳糖苷酶）或在免疫过程中加入佐剂。对于单克隆抗体，将从被免疫动物中分离的脾细胞与骨髓瘤细胞融合（如 SP2/O-Ag 15 骨髓瘤细胞）形成产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。



可以使用本领域所熟知的鉴定产生具有理想特征的抗体杂交瘤细胞的任何方法之一。这些方法包括 ELISA 试验筛选杂交瘤、Western blot 分析或放射性免疫法(Lutz et al, 1988)。克隆培养分泌理想抗体的杂交瘤, 而后用本领域所熟知的方法 (Campbell, 1984) 测定抗体的类和亚类。从被免疫的动物分离含抗体的抗血清的多克隆抗体, 而后用上面描述的一个方法筛选得到具有理想特异性的抗体。

本申请进一步提供了上面描述的以可检测标记形式存在的抗体。抗体可以通过使用放射性同位素、亲和标记(如生物素、卵白素等)、酶标记(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、荧光标记(如 FITC 或若丹明等)、顺磁原子、纳米颗粒而被可检测地标记。用本来领域所熟知的方法对抗体进行标记, 例如参见 Sternberger et al, 1970、Bayer et al, 1979、Engval et al, 1972、Goding 1976 和 Ye et al, 2005。

本发明标记的抗体或其片段可用于进行体外、体内和原位检测鉴定表达具有该被鉴定的抗原表位的受体亚单位的细胞或组织、鉴定包含具有该被鉴定的抗原表位的受体亚单位的样品或鉴定样品中的存在的具有该被鉴定的抗原表位的受体亚单位。更特别地, 抗体或其片段通过与样品孵育可用于检测样品中的具有该被鉴定的抗原表位的受体亚单位。与样品中具有理想抗原表位的任何受体亚单位结合的抗体或其片段形成复合物。然后检测复合物, 籍此检测样品中的受体亚单位。

本发明的另外一个方面涉及包含基因的生物体, 其中基因的编码区与包含 NCBI 接收号 No. NM 205953 基因编码区的第 79-1485 位核酸序列有至少 50% 同一性, 其中包含了突变的生物体显示相对母系来源的生物体对 spinosyn 的响应的降低。

感兴趣基因的突变可导致生物体中的受体亚单位蛋白质不表达, 或可以表达受体亚单位蛋白质但包含改变的配体结合位点。本领域所熟知的任何遗传诱变的方法都可以产生基因的突变 (Ashburner, 1989 和 Wood, 1988)。在基因或基因组中产生突变的技术包括辐射 (如 X 射线、紫外或  $\gamma$  射线)、化学试剂(如 EMS、MMS、ENU、甲醛等)和由转位子插入诱导的包括发育不全的可动因子导致的插入诱变或转位子介导的缺失, 如前面所述的男性重组。改变基因表达的其它方法包括使用转位子 (如 P 元件、EP-类型“过表达阱”元件、水手元件、piggyBac

转位子、hermes、minos、sleeping beauty 等) 反义双链 RNA 干扰、肽和 RNA 适体、直接缺失、同源重组、显性负性等位基因和细胞内抗体使基因不表达。

许多诱变剂可以造成遗传突变。诱变剂的示例是本领域技术人员已知的, 包括但不限于化学诱变剂(如影响(增加或减少)活性的 DNA 嵌入或 DNA 结合化学试剂、化学试剂与 DNA 分子结合编码可能或表达基因的蛋白质)、物理诱变剂(如紫外光、电离辐射( $\gamma$ 、 $\beta$ 、 $\alpha$  辐射、X 射线))、生物化学诱变剂(如限制性内切酶、DNA 修复诱变剂、DNA 修复抑制剂、易错 DNA 多聚酶和复制蛋白质)等等。诱变剂和 DNA 相互作用造成 DNA 序列的诱变改变。在损伤作用下加入诱变剂造成突变可启动替代的 DNA 修复机制可以参与完成突变。

在某一个实施方案中, 化学诱变可诱导靶细胞或生物体一个或多个基因的突变。化学诱变剂通常的实施例是 N-乙基-N-亚硝基脒(ENU) 突变细胞和生物体。在本发明中使用的化学诱变剂的其它实施例包括但不限于 ethylmethanesulphonate (EMS) 和 ICR 191。许多其他的化学诱变剂是本领域技术人员所熟悉的, 也可以用于本发明, 参见 Friedberg et al, 1995, 通过参考, 其指导化学诱变剂和在不同细胞和生物体中诱导基因突变的突变, 而并入本发明。本领域技术人员可以明白突变包括缺失突变、插入突变、移码突变、无义突变、错义突变或剪切突变。

本申请示范了本领域所熟知的破裂和失活基因的转位子插入突变技术。许多技术应用 P 元件转位子诱导果蝇的插入诱变, 产生诱导隐性致死突变的 P 元件转位子的技术(P-致死) 特别适用于快速鉴定新的果蝇的必需基因(Cooley et al, 1988; Spralding et al, 1995; Oh et al, 2003)。由于 P 元件和果蝇基因组的序列是已知的, 所以快速鉴定转录单位是可能的, 即由插入到插入序列的两侧的 P 元件一端或两端序列造成的断裂 P 元件。本发明中, 断裂感兴趣的果蝇基因如果是同源的则不能导致致死效应, 但可以对抗 spinosyn 或其衍生物的致死效应。这个基因的突变显示影响编码蛋白质的化合物是有效的杀虫剂化合物, 这类蛋白质是筛选和发现的有效杀虫剂的极好的靶标。此外, 影响这类蛋白质的化合物具有治疗的效果。

用共抑制的方法(Bingham, 1997; Smyth, 1997; Que and Jorgensen,

1998) 可产生 spinosyn 抗性表型 (包括 apinosyn 衍生物抗性表型)。共抑制是由于表达或注射与感兴趣基因的部分片段一致的反义 RNA 链造成的基因表达降低的表型。共抑制效应被有效延伸到植物和线虫以产生功能缺失表型。在果蝇中只有一篇关于共抑制的报道, 即用共抑制方法从白色 Adh 转基因诱导 Adh 基因降低的表达 (Pal-Bhadra et al, 1997)。

用双链 RNA 干扰技术 (dsRNAi) 可以产生 spinosyn 抗性表型。这个方法是根据来源于基因编码区的双链 RNA 的干扰特性, 在线虫的遗传研究中广泛使用 (Fire et al, 1998), 在果蝇中可产生功能缺失的表型 (Kennerdell and Carthew, 1998; Misquitta and Patterson, 1999)。这个方法的一个实施例是, 在体外合成来源于感兴趣基因 (例如主题基因) 的重要部分的互补的正义和反义 RNAs。在注射缓冲液中退火正义和反义 RNAs, 将双链 RNA 注射或其他方法诱导进入动物 (如在它们的食物中或浸渍在包含 RNA 的缓冲液中)。然后检查注射动物的后代的感兴趣表型 (PCT 公布 no. WO99/32619)。

产生功能丢失如 spinosyn 抗性表型的其它方法包括使用肽适配体作为蛋白质功能的显性抑制子 (Kolonin and Finley, 1998; Xu et al, 1997; Hoogenboom et al, 1998)、RNA 适配体 (Good et al., 1997; Ellington et al, 1995; Bell et al, 1998; Shi et al, 1999) 和细胞内抗体 (Chen et al, 1994; Hassanzadeh et al, 1998a and 1998b)。

细胞内表达的抗体或细胞内抗体都是单链抗体分子, 与细胞内的靶分子特异性结合并使其失活。细胞内抗体可用于细胞试验和整个生物体如果蝇 (Chen et al, 1994; Hassanzadeh et al, 1998a and 1998b)。用与主题 (subject) 蛋白质特异性反应的细胞内抗体构建诱导表达载体, 这些载体被诱导进入模式生物体, 用上面描述的研究适配体的相同方式进行研究。

突变的生物体可用于筛选理想表型如 spinosyn 抗性, 选择、鉴定和分类产生理想表型的基因如克隆、测序、序列图等, 鉴定生物体如根据本发明的这一方面的突变生物体。

本研究的另一个方面是载体: 包括 (a) 反义核苷酸序列基本上与 (1) 与包含 NCBI 接收号 No. NM 205953 编码受体亚单位的编码区

的第 79-1458 位置的核酸序列有至少 50% 的同一性、优选至少 60% 的同一性、特别优选至少 70% 的同一性、更优选至少 80% 的同一性、特别是 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 和 100% 的同一性的 DNA 分子一条链的相应部分区域互补；(b) 与反义核酸连接的调节序列，以至于反义核酸序列在转入的细胞中表达，其中转化细胞公开了比未转化细胞对 spinosyn 的响应降低。

反义分子与编码受体亚单位的整个 DNA 互补，如与整个分子的核酸长度相同。然而，较理想的是更短分子。在一些范例中，可以用整个反义分子的片段。合适的片段优选含有至少 20 个核酸，可以与编码整个分子的 mRNA 杂交。导入与受体亚单位基因产物 mRNA（如导入反义分子）互补的 RNA 或单链 DNA 分子进入细胞可减少黑腹果蝇的受体亚单位基因产物的表达水平。反义分子与受体亚单位基因产物 mRNA 配对，阻滞 mRNA 翻译成蛋白质。因此，黑腹果蝇的受体亚单位反义分子能够阻断编码受体亚单位的 mRNA 翻译成功能受体。

与编码受体亚单位或其片段的 mRNA 互补的反义分子可用来显著降低黑腹果蝇功能受体亚单位的表达。先选择表达功能受体亚单位第一水平的细胞，然后导入反义分子（或其片段）进入细胞。反义分子（或其片段）阻断黑腹果蝇受体亚单位的表达导致细胞中黑腹果蝇功能受体亚单位的第二水平表达。第二表达水平少于起始的第一次表达水平。

传统地，目标基因编码区（来自于基因组 DNA 或 cDNA）或编码反义 RNAs 的基因、共抑制 RNAs、干扰 dsRNA、RNA 适配体、肽适配体或细胞内抗体与特异启动子和具有已经很好了解其调节功能的转录增强子、优选异源启动子/增强子（启动子/增强子对基因表达的主要途径是非天然的）结合产生转基因动物。

用本领域所熟知的方法将外源性核酸序列转入动物或培养细胞的基因组中可产生转基因动物或重组细胞系。对于无脊椎动物模型，最常见的方法是使用转位因子。有几个合适的转位因子可用来导入核酸序列进入模式生物体的基因组中。转位因子特别适合向感兴趣的基因中插入序列，以至于不能正确表达编码蛋白质，产生功能缺失表型的基因敲除动物。在果蝇中用 P 元件(Rubin and Spradling, 1982; U.S. Pat.

No. 4,670,388)、在线虫用 Tc1 (Zwaal et al, 1993; Epstein and Shakes, 1995) 可以很好的建立这项技术。也可以使用其它 Tc1 样转位因子如 minos、mariner 和 sleeping beauty。此外,已经鉴定了在不同物种中发挥作用的转位因子,如 PiggyBac (Thibault et al., 1999)、hobo 和 hermes。

除了产生功能缺失表型外,转位因子也可用来将感兴趣的基因或其突变或变异体作为附加基因插入到动物基因组的任何功能区,导致基因的错误表达(包括过表达)。优化的从 pGMR 衍生的载体可以特异性的使转基因果蝇的基因错误表达的 (Hay et al., 1994), 载体长度为 9Kb, 包含: 大肠杆菌的复制起始区、氨苄青霉素耐药基因、活动插入序列的 P 元件转位子的 3' 和 5' 末端、White 标志基因、包括 hsp70 增强子的 TATA 区表达单位和  $\alpha$ -tubulin 基因 3' 非翻译区的。表达亚单位包括插入增强子的第一个多克隆位点和位于 500 个碱基下游的插入感兴趣基因的第二个多克隆位点。作为转位因子的替代,利用同源重组或基因打靶技术置换动物同源基因中感兴趣基因的一个或两个拷贝。外源或内源启动子元件可以调节转基因,转基因可以是一个小的基因或是一个大的基因组片段。在一个应用中,例如使用果蝇 (Brand et al, 1994) 或线虫 (Mello and Fire, 1995) 中异位表达基因分析基因的功能。

已经很好表征的可以用于产生转基因动物的异源启动子的实施例是包括热休克启动子/增强子,即在温度诱导下错误表达。在果蝇中,包括 hsp 70 和 hsp83 基因,在线虫中包括 hsp 16-2 和 hsp 16-41 基因。也使用果蝇中组织特异性启动子/增强子包括在眼睛中表达的 eyeless (Mozer and Benzer, 1994)、sevenless (Bowtell et al, 1991) 和 glass-responsive 启动子/增强子 (Quiring et al., 1994) 和在翅膀中表达的 dpp 或 vestigial 基因起源的启动子/增强子 (Stachling-Hampton et al, 1994; Kim et al, 1996)。最后,用内源性启动子如主要蛋白质通路基因限制显性激活或显性负性转基因的正常激活通路是必需的。

在线虫中,有用的组织特异性启动子/增强子的示例包括咽肌肉特异性表达的 myo-2 基因启动子、用于身体-肌肉特异性表达的 hlh-1 基因启动子、神经元接触特异性基因表达的 mec-7 基因启动子。优选的实施方案中,将基因插入转化载体,然后和包含显性可选标记如, rol-6 的质粒注射入线虫,由于基因融合直接造成主要通路基因的错误表达。

通过表型和主要通路基因错误表达造成的表型来鉴定转基因动物。

在果蝇中,用外源 DNA 的二元控制系统检测发育特异性阶段和组织特异性模式的错误表达 (mis-expression) 基因。二元外源调节系统的两个实施例包括源自酵母的 UAS/GAL4 系统 (Hay et al, 1997; Ellis et al, 1993; Brand and Perrimon, 1993)和源自大肠杆菌的 Tet 系统(Bello et al, 1998)。

用已知的方法可以产生显性负性突变,该突变引起蛋白质干扰野生型蛋白质拷贝的正常功能,并且其导致在正常基因拷贝存在下的功能丢失或降低功能的表型(Hershkowitz, 1987)。

本发明的一个方面,提供了稳定转化的转基因鱼。在一个实施方案中,转基因鱼的基因组中含有被导入与启动子操作性连接的受体亚单位基因,其被稳定整合或插入到基因组中。优选的启动子包括器官或组织特异性启动子(包括细胞特异性的启动子)或可以被特异性组织调节的启动子。典型的,来自于除鱼之外的动物的受体亚单位基因有利于构建到在本申请详细描述的重组载体上。优选的受体亚单位基因是无脊椎动物受体亚单位。这样的鱼可以形成稳定鱼系,其能够复制,并把与受体亚单位相关的遗传信息传递给它们后代的。

本发明中用了许多种的鱼。鱼的实施例包括硬骨鱼如斑马鱼。与其它动物模型相比,与其他动物相比较,选用斑马鱼有特别的好处。如,斑马鱼适于遗传筛选、修饰筛选和化学筛选,可快速的发育成 ex-utero,有明显的生活周期,每周可产生非常多的后代。用相对很小的设施(在 9 升的池子中可以生存 54 个成年斑马鱼)可以喂养斑马鱼,且很容易产生为数众多的后代,每一个成熟的雌性一般每周可以产 100-300 个卵。这些卵是体外受精产生的,胚胎是透明的,因此可以用解剖显微镜观察早期的造血组织和其它器官和组织系统的发育。胚胎的大部分器官的发育是非常快的,在受精后 5 天血细胞可以完全发育成熟,3 个月时达到生殖成熟。

载体包括编码受体亚单位的基因操作性与启动子相连接。优选器官或组织特异性的启动子。

由于大部分哺乳动物的启动子在鱼中不能很好的发挥作用,因此本领域的技术人员用所熟知的方法将斑马鱼、fogu 或其它物种的鱼的

基因组调节序列特异性的克隆到感兴趣的编码序列的上游、中间和下游。类似的程序也可以用来构建其其如：斑马鱼的器官或组织特异性启动子，这也是本领域技术人员已知的。

转运载体中包括转基因。本申请用的本领域所熟知的载体指的是包括设计用来直接转化（如通过将外源性的 DNA 插入到其基因组可以改变细胞遗传物质的过程）目标细胞遗传物质的核酸序列构建。载体可能包括多个位置和序列定向的（oriented）遗传性元件，即与其它必需或理想元件操作性连接，以便在盒（cassette）中核酸的可以被转录，并且如果需要在微注射的单细胞受精胚胎中翻译核酸。

通过本领域技术人员所熟知的和许多文献中描述的方法将上面引用的核酸序列插入载体从而构建重组表达载体。

本发明用了许多已知的载体。合适的载体包括质粒载体、病毒载体包括逆病毒载体（参见 Miller et al, 1993）、腺病毒载体（参见 Erzurum, et al, 1993; Zabner, et al, 1994; and Davidson, et al, 1993）、腺相关病毒载体（参见 Flotte, et al, 1993）、疱疹病毒载体（参见 Anderson, et al, 1993）和慢病毒载体（参见 Lever, 2000）。这些载体包括其它已知的在特异宿主细胞中有效表达的必需或理想的遗传元件，包括调节元件，如本申请描述的转基因鱼宿主细胞。例如，载体包括启动子，例如本申请描述的具有器官或组织特异性的启动子，和与启动子共同作用以达到转录基因的任何必需的增强子序列。“增强子”指能够在细胞中刺激启动子活性的核酸序列元件，如本申请描述的转基因鱼宿主细胞。载体也可以例如是线性的。

核酸序列与编码报告基因产物的核酸序列融合，以便形成融合蛋白质，能够可视化观察或其他方式鉴定存在的融合蛋白质或其位置。术语“编码”指的是通过转录和翻译的机制，转录和翻译核酸序列的过程，这使细胞具有将一系列的氨基酸聚集到氨基酸序列上产生多肽的信息的特性。这样的核苷酸序列的一个示例是，本发明用的编码 GFP 的核苷酸序列，以便在发育的胚胎的区域和/或 hatched 或者成熟鱼融合蛋白一旦表达时产生荧光。作为替代，可以使用其它报告基因产物包括荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素酰基转移酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和碱性磷酸酶。检测本申请描述的报告基因产物存在，包括检测其活性或

量的试验是本领域技术人员熟知的，以及也在定期更新的 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al, eds., John Wiley & Sons) 中有描述。本申请可以发现对报告基因试验的更详细的描述，例如下面的文章：荧光素酶参见 Nguyen, V. T. et al. (1988)、 $\beta$ -半乳糖苷酶参见 Martin, C. S., et al, 1997; Jain and Magrath, 1991);  $\beta$ -葡萄糖苷酶,  $\beta$ -葡萄糖苷酶和碱性磷酸酶参见 Bronstein, et al (1994); 氯霉素酰基转移酶参见 Cullen (1987); Gorman, C. et al, (1982); Miner et al. (1988); Sleigh (1986); 小时 uby and Wilson (1992)。

本发明的另外一个方面，基因位于报告基因之前，所述报告基因如荧光蛋白质基因（例如 GFP、RFP、BFP、YFP 或 dsRED2）或荧光素酶蛋白质基因，包含位于特异性重组酶识别位点（如 Flox、Lox 或 FRT 位点）两侧的一个强的转录终止位点。一个普遍存在的启动子（如 EFl- $\alpha$  或  $\beta$ -actin）可以启动 "Loxed"、"Floxed" 或 "FRPed" 报告基因的表达。由于位于报告基因内的强转录终止位点，在重组蛋白质不存在的情况下，报告基因的邻近的第二个基因产物（如受体亚单位基因）不表达。然而，当在细胞中激活重组蛋白质表达时，就会切断 Loxed, Floxed, or FRPed 的报告基因产物，第二个基因与普遍表达的基因启动子并排排列。此外，组织特异性重组通过使用激光激活热休克可导入位点特异性重组酶转基因。在胚胎发育过程中激光可激活单个细胞。

这些发明的另外一个方面是本申请提供了制备转基因鱼的方法。在一个实施方案中，方法包括导入受精鱼卵（包含鱼的胚胎）或没有受精的鱼卵的核酸，该核酸包括无脊椎动物受体亚单位与启动子操作性连接。本申请描述的核酸可以是载体的一部分。当用受精的鱼卵时方法包括从鱼的胚胎发育成转基因鱼。当编码烟碱受体亚单位的基因导入没有受精的卵时的方法包括受精鱼卵和从鱼的胚胎发育成转基因鱼。有许多本领域技术人员熟知的方法可将核酸导入到卵中，包括机械的方法、化学方法、亲脂的方法、逆病毒感染的方法和电穿孔。例如，示例性的机械方法包括例如微注射。示例性的化学方法包括例如磷酸钙法或 DEAE-葡聚糖法。示例性的亲脂的方法包括使用脂质体和其它脂质介导转染的阳离子试剂。这些方法都是本领域技术人员已知的，例如也在 *Gene Transfer Methods: Introducing DNA into Living Cells*



and Organisms, (Norton and Steel, 2000)和定期更新的 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al.,)中有描述。例如, 涉及鱼的微注射的方法在例如 Chen and Powers (1990)和 Fletcher and Davis (1991)有更进一步的详细描述。涉及鱼的电穿孔的方法在例如 Powers et al. (1992)和 Lu et al. (1992)中有更进一步的详细描述。用逆病毒载体, 如泛嗜性逆病毒载体感染的方法导入 DNA 进入鱼卵或胚胎的技术在 Burns, J. C, et al (1993)中有描述。

包括转基因的载体或其它核酸可以在发育的理想阶段导入没有受精的卵或受精的卵中。本申请描述了可以使用的多个编码不同转基因的载体。当使用受体卵或胚胎时, 优选将核酸导入胚胎(即在发育的一个细胞阶段)。然而, 在发育的后期包括两细胞期、四细胞期等等的阶段可以通过给药的方式把核酸导入。因此核酸可以被导入桑椹胚、囊胚等等中。用上面描述的转基因的方法可以将分离的至少一个核酸分子导入进入受精卵。此外, 在发育的后期当核酸进入受精卵, 用上面描述的转基因的方法, 分离的至少一个核酸分子整合到上述转基因构建中, 并进入至少一个细胞中如桑椹胚、囊胚中。

用标准的方法可以从合适的鱼得到其卵。许多鱼可以通过商业购买的方式得到, 如宠物商店。用本领域已知的方法可得到受精卵。例如, 将相应年龄的鱼, 如 3-12 个月的鱼, 按照雌性和雄性的理想比率如 (2:1) 放到一个相应大小的容器如池子中。在交配后的一定时间如 10-60 分钟, 将鱼放在池子中的交配室中, 收集受精卵。例如在 Gulp et al. (1991)中描述了这个方法。或者, 本领域技术人员所熟知的方法是用人工授精的方法得到鱼的受精卵。还可以用本领域技术人员所熟知的其它方法得到受精的鱼卵。

在把构建的核酸导入进入鱼卵或胚胎后, 形成的鱼卵或胚胎在具有一个适宜的环境中发育成成年的鱼。例如, 这个适宜的环境包括在 28.5°C 的 E3 卵水中生活 15 天, 而后在 16 天注入循环系统的水 (Westerfield, 2000)。

可以通过包括基因组 DNA 的点杂交和 Southern blot 杂交的本领域技术人员熟知的方法鉴定本申请描述的产生的转基因鱼。简言之, 这个方法包括从鱼的组织中分离基因组 DNA、用限制性内切酶消化 DNA

和 Southern blot 杂交消化的 DNA 产物，如在 Chen, T. T. et al (1996) 中有描述。通过从鳍组织中分离基因组 DNA、聚合酶链反应扩增转基因序列和 Southern blot 分析扩增的产物进行初步筛选，这个方法在 Lu et al. (1992) 和 Chen et al (1993) 有描述。此外，如果被导入的核酸编码包括受体亚单位 GFP 融合蛋白质的烟碱受体亚单位荧光融合蛋白质，可以用可见的荧光进行初步筛选。

优选的产生转基因鱼的转基因可以稳定整合到其基因组中。这意味着转基因被整合到鱼的基因组中而不是染色体外。在转基因鱼孵化后的一个合适的时间，加入试验的药物或试剂。在本发明的其它形式中，在鱼的胚胎和鱼卵中加入试验试剂。

用标准的本领域技术人员已知的方法可以将编码受体亚单位的 DNA 片段整合到转基因小鼠的基因组中。本领域已知的多种方法可以用于将转基因导入动物以生成建立起来的转基因动物系，例如可参见 Hogan et al. 1986 and 1994; U.S. Pat. Nos. 5,602,299; 5,175,384; 6,066,778 和 6,037,521。这些技术包括但不限于原核微注射(U.S. Pat. No. 4,873,191)、逆病毒介导基因转入生殖种系 (Van der Putten et al. 1985)、胚胎干细胞基因打靶 (Thompson et al, 1989)、胚胎电穿孔 (Lo, 1983); 和精子介导的基因转移(Lavitrano et al. 1989))。

例如，用在不同发育阶段的胚胎细胞导入转基因生成转基因动物。根据胚胎细胞的发育不同的阶段用不同的方法。受精卵是微注射一个很好的靶标，微注射受精卵的方法是本领域已知的，参见 U.S. Pat. No. 4,873,191 中的描述。在小鼠中，如果雄性前核的直径大小达到大约 20 微米时，可以重复注射 1-2 皮升 (pl) 的 DNA 溶液。用受精卵作为靶标进行基因转移具有主要的优点，即在大多数情况下，注射的 DNA 可以在第一次分裂前整合到宿主基因组中(Brinster, et al. 1985)，作为结果，非人类的转基因动物的所有细胞都带有了转基因。由于 50% 的生殖细胞都带有转基因，这通常也可以反映转基因从建立者 (founder) 传给后代的传递效率。将受体亚单位核酸片段微注射到前核可以生成转基因小鼠。

导入目标载体进入胚胎干细胞 (ES) 可以生成本发明的转基因动物。在适合条件下体外培养植入前胚胎可以获得胚胎干细胞(Evans et

al. 1981; Bradley et al. 1984; Gossler et al 1986; and Robertson et al. 1986)。使用本领域技术人员熟知的包括电穿孔、磷酸钙共沉淀、原生质体或原生质球融合、脂质体和 DEAE-葡聚糖介导的 DNA 转染的方法可以将 DNA 有效转入到胚胎干细胞生成转基因。通过逆病毒介导的导入或微注射技术可以将转基因导入进入胚胎干细胞。转染的胚胎干细胞在进入胚泡期胚胎的囊胚腔后，可以扩增胚胎，生成嵌合体动物 (reviewed in Jaenisch, 1988)。转染的胚胎干细胞进入囊胚腔前，如果转基因带有筛选标记，可用各种筛选的方法富集整合了转基因的胚胎干细胞。也可以用 PCR 的方法筛选整合到转基因中的胚胎干细胞。在胚胎干细胞进入囊胚腔前，这个方法不需要在合适的筛选条件培养转染的胚胎干细胞。

此外，可以用逆病毒感染的方法将转基因导入非人的动物中。发育的非人的胚胎可以在体外培养到胚泡期。期间，卵裂球可作为逆病毒感染的靶标(Janenich, 1976)。酶切消化透明带可以有效感染卵裂球(Hogan et al, 1986)。典型的导入转基因的病毒载体系统是带有转基因的复制缺陷逆病毒(Jahner et al., 1985); Van der Putten, et al, 1985)。在单层病毒包装细胞中培养卵裂球可以非常容易和有效的转染 (Van der Putten et al, 1985; Stewart et al, 1987)，或者，可以在后面的阶段进行病毒感染，将病毒和病毒包装细胞注射入囊胚腔(Jahner et al, 1982)。大部分的第一代是转基因的嵌入体，因为整合仅仅发生在一部分的细胞，其之后形成转基因动物。另外，逆病毒载体介导的第一代转基因动物的转基因插入到基因组的的不同位置，一般其后代就会分离。此外，小型的胚胎可通过子宫内的逆病毒感染导入转基因进入种系(Jahner et al., 1982)。其它本领域技术人员已知的利用逆病毒或逆病毒载体生成转基因动物的方法包括逆病毒颗粒或产生逆病毒的丝裂霉素 C 处理的细胞微注射到受精卵或早期胚胎的卵黄周隙(WO 90/08832; Haskell and Bowen, 1995)。

将编码受体亚单位多肽的 cDNA 的 DNA 片段微注射到非人哺乳动物如小鼠的单细胞胚胎前核，将注射的胚胎移植到假孕雌性动物的输卵管或子宫，生成转基因动物。

培养生成的第一代动物可以交配、近亲交配、远亲交配或交叉交

配生成特定动物的后代。这些交配策略的示例包括但不限于多于一个整合位点的远亲交配可产生不同的种系，不同种系的近亲交配产生高表达转基因的化合物转基因（由于每一个转基因的加成表达效应），异源转基因小鼠的交配产生 DNA 分析中增加表达而不需要筛选的在某一个整合位点的纯合子小鼠，不同的纯合子种系的交配可产生化合物杂合子或纯合子的种系，培养不同近亲交配遗传背景的动物来检查表达修饰转基因动物和表达的生理效应。

本发明得到了在所有细胞均携带转基因的非人的转基因哺乳动物，和部分细胞中带有转基因的非人的转基因哺乳动物，即嵌合体动物。转基因可以以单转基因或串联体如头头串联或头尾串联整合。

筛选转基因动物，检测以筛选表达受体亚单位表型的动物。可以先用如 Southern blot 分析或 PCR 技术进行第一步筛选分析动物细胞来证实转基因的整合。可以用但不限于来自动物组织样品的 Northern blot 分析、原位杂交和逆转录酶 PCR(rt-PCR)的方法评估转基因动物细胞中的转基因 mRNA 的表达。可以进一步表征非人转基因哺乳动物的特性，以鉴定具有本发明的方法中有用的表型的那些动物。

本发明的筛选方法中，对有机体如果蝇给予大量的候选试剂。给药后，通过与对照（如没有给予候选试剂的转基因或野生型的果蝇）比对检测生物体，确定对有机体例如果蝇有效的候选试剂。一般，通过将候选试剂混合到果蝇的营养培养基中，并放在有果蝇（幼虫或成虫，一般是成虫）的培养基中，以便该果蝇以此培养基为食而口服给药，所述的培养基例如水和含有添加的营养试剂。用本领域所熟知的方法对其它生物体给药。一般分析多数混合物的试验是平行进行的，不同浓度的试剂试验来得到对候选试剂不同浓度的不同反应。一般，浓度试验中要有一个不加复合物的阴性对照。优选的实施方案是，用高通量筛选的方法对大量的生物体平行的筛选大量候选化合物。“大量”也是多数的意思，也就是指至少 10-50，通常至少 100 和更通常至少 1000，其中数目可以是 10,000 或 50,000 或更多，但是在许多试验中将不超过 5000。

本发明的方法用于筛选大量不同的可能杀虫剂的候选化合物。候选的复合物包括许多化学类型，尽管通常是有机分子，优选分子量大的

于 50 并小于 2,500Da 的小分子有机化合物。候选的化合物包括与蛋白质结构相互作用所必须的功能集团，特别是氢键结合，以及特别包括至少氨基、羧基、羟基或羧基集团，优选至少两个功能集团。候选的化合物通常包括含有上面提到的一个或更多个功能集团取代的环状的碳或杂环结构和/或芳香或多芳香结构。候选化合物也发现于活性分子中，包括但不限于肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶和其衍生物、结构类似物或其组合。

候选化合物的来源很丰富包括合成的文库或天然的化合物。例如，有许多方法可以随机和直接合成大量的有机化合物和活性分子包括随机表达寡聚核苷酸和寡肽的方法。在细菌、真菌、植物和动物抽提物中可产生天然化合物文库。此外，天然或合成的文库和化合物可以通过传统化学、物理和生物化学方法修饰，可用于生成组合文库。直接或随机化学修饰，如酰化、烷化、酯化、酰化 (amidification) 等等可以被产生结构类似物。用药物设计或计算机模式的方法可以创造新的可能杀虫剂或治疗化合物。

上述筛选的方法是评估用作杀虫剂的候选化合物效果和安全性多步筛选过程的部分。本发明的多步筛选过程候选化合物或化合物文库可用于在本发明的转基因生物体中筛选。此外，在筛选候选化合物作为杀虫剂的体外筛选试验前要先做一个体内筛选。可以使用任何常规的体外筛选的试验，其中许多合适的体外筛选试验是本领域技术人员所熟知的。

本发明也提供了用于本发明的筛选方法的试剂盒。本发明的试剂盒包括本发明生物体或生成这样生物体的方式，例如本发明的雄性和雌性有机体，携带需要的基因，例如转基因、转座酶基因、GAL4 等等的载体。把果蝇放在相应的容器中如管形瓶中培养。本发明的试剂盒也包括动物的营养培养基，如果蝇的培养基。用本领域技术人员所熟知的基于 PCR 检测的直接对比的方法，筛选果蝇种群中具有抗性杀虫剂的生物活性。如 Aronstein, K. et al. (1993)。

## 附图说明

## 具体实施方式

### 实施例

#### 克隆果蝇烟碱乙酰胆碱 $\alpha$ -6 亚单位

使用 FasrTack2.0mRNA 分离试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 从冰冻的果蝇头部分离 Poly A+mRNA。将果蝇头 (0.326g) 和 15ml 裂解液加入到 Dounce 匀浆器中, 从 10 倍的储存液中得到裂解液。然后, 按照说明书操作, 用 25 $\mu$ l 的洗脱缓冲液悬浮最后得到的 mRNA 沉淀。用溶解在 200 $\mu$ l 的洗脱缓冲液中的 5 $\mu$ l mRNA 测定 A260/A280 的读数。mRNA 的浓度是 0.139 $\mu$ g/ $\mu$ l, 总量是 3.475 $\mu$ g。使用 Invitrogen cDNA cycle 试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 合成第一条链 cDNA, 20 $\mu$ l 反应体系中, 加入 3.5 $\mu$ l mRNA (0.4865 $\mu$ g mRNA), 按照说明书进行操作。然后用 FailSafe PCR 试剂盒 (Epicentre, Madison, WI) 进行 PCR, 25 $\mu$ l 反应体系依次加入: 1 $\mu$ l cDNA、2.5 $\mu$ l 的 10pM/ $\mu$ l 的 SEQUENCE ID NOS.3 和 4 引物、0.5 $\mu$ l FailSafe 酶、12.5 $\mu$ l 2 $\times$ FailSafe PCR 混合物 (A-L) 和 5 $\mu$ l H<sub>2</sub>O。在 PerkinElmer Cetus DNA thermal cycler 仪器上进行 PCR 反应, 条件如下: 95 $^{\circ}$ C 30 秒, 55 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟, 共 30 个循环。取 5 $\mu$ l 反应产物 1% 的琼脂糖/TBE 凝胶电泳。用预混合物 A、D 和 G 可以分别产生预期的 1497bp 长度的反应产物。将剩下的 20 $\mu$ l PCR 反应产物上样到 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 切下目的条带, 用 Qiaex II (Qiagen, Valencia, CA) 纯化回收条带。将纯化回收得到的 PCR 产物连接到 pCR2.1-TOPO 载体上, 然后按照 Invitrogen, Carlsbad, CA 的说明书操作将其转化到 TOP10 细胞。用 Wizard Plus SV 小量抽提试剂盒 (Promega, Madison, WI) 提取从每一个 PCR 产物中得到的 18 个克隆的质粒 DNA。用 EcoR I 酶切分析质粒 DNA, 可以产生三种形式的片段: 包括 932bp 和 565bp 的两个片段、只有一个的 1497bp 片段或者是稍微大一些的单一条带。对这些克隆测序结果公开来源于外显子 3 和 8 (Grauso et al, 2002) 的不同剪切可以产生剪切变异体。由于 RNAi 编辑 (Grauso et al. 2002) 导致内部 Eco RI 酶切位点消失, 因此 Eco RI 酶切消化只能产生单一的酶切片段。用标准的分子技术从 pCR2.1-TOPO 载体上切下果蝇 30D 基因作为 Bam HI 片段, 并亚克隆到 pAcP(+)/IEI-3 (Novagen, Madison, WI) 和 pGH19 (Liman et. al, 1992) 载

体上。

#### 克隆果蝇烟碱乙酰胆碱 $\alpha$ -5 亚单位

以果蝇的胚胎 mRNA 作为模板(Clontech, Palo Alto, CA), 用 Superscript II first strand synthesis 试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA)合成第一条链 cDNA。以序列 ID 号 5 和 6 为引物, 用 FailSafe PCR kit (Epicentre, Madison, WI)试剂盒的 2X 反应混合物 A-F 进行 PCR 反应, 条件如下: 95°C 3 分钟变性, 而后进行 30 个循环的 95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 2.5 分钟, 最后 72°C 延伸 10 min。反应 A 和 D 可以扩增得到预期片段为 2440bp 的 PCR 产物, 将其连接到 pCRBluntII-TOPO 载体上, 对得到的一些克隆测序。其中得到的一个克隆与 NCBI 接收号 No. AF272778 仅仅有 3 个碱基的改变。这些核苷酸的变化导致 2 个氨基酸的置换, 在 603 位置处 I-V 的变化 (相对于 M 起始) 和 795 处 I-M 的变化, 这两个置换都是保守氨基酸。用标准的分子技术从 pCRBluntII-TOPO 载体中酶切该基因, 命名为 Xba I 片段, 将其亚克隆到 pAcP(+)/IE1-3 和 pGH 19 载体上。

#### 克隆果蝇烟碱乙酰胆碱 $\alpha$ -7 亚单位

以果蝇的幼虫 mRNA 作为模板(Clontech, Palo Alto, CA), 用 Superscript II first strand synthesis 试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA)合成第一条链 cDNA。以序列 ID 号 7 和 8 为引物, 用 ThermalAce PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)试剂盒进行 PCR, 使用梯度段 (gradient block) 的循环条件, 如下: 95°C 预变性 3 分钟, 而后 95°C 30 秒, 45°C、53.3°C 或者 60°C 30 秒, 74°C 2 分钟, 共 30 个循环, 最后 74°C 延伸 10 分钟。每个反应产生预期大小的产物: 1633bp。将 60°C 退火得到的产物连接到 pCRBluntII-TOPO 载体上, 然后测序和鉴定得到的大小正确的克隆。结果得到了从 ATG 起始密码子开始 1378 处单个碱基 C 到 T 的变化, 这个改变导致形成了翻译提前终止密码子。用 QuickChange II site directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA)试剂盒将 T 还原成 C。最后得到的序列与 NCBI 接收号 No. AJ554210 匹配发现, 除了在 311 位的赖氨酸为苏氨酸和 C 端的 FP 氨基酸序列替代了 VSGVRG。用标准的分子技术从 pCRBluntII-TOPO 酶切片段, 命名为 Xba I 靶基因, 亚

克隆到 pAcP(+)*IEI-3* 和 pGH19 载体上。

### 克隆线虫 *ric-3*

将得到的线虫 *ric3* 基因 PCR 产物连接到 pCR2.1-TOPO 载体上，证实包含 1137bp 大小插入片段的正确的克隆。以加入了 Bam HI 酶切位点的序列 ID 号 9 和 10 为引物，用 FailSafe PCR kit 试剂盒进行 PCR 扩增。将得到的 PCR 产物克隆到 pCR2.1-TOPO 载体上，对大小正确的克隆进行测序。得到的克隆与 NCBI 接收号 NM 068898 序列完全一致。用标准的分子技术，从 p2.1-TOPO 重组载体中将基因切下，作为 Bam HI 片段，并亚克隆到 pAcP(+)*IEI-3* 和 pGH19 载体上。

### 功能分析

#### 制备宿主细胞

通过水浴 (bathing) 用 2g/l 的三卡因甲基磺酸盐麻醉非洲爪蟾 (*Xenopus 1*, Ann Arbor, MI; Nasco, Fort Atkinson, WI)，外科手术取出卵母细胞，将其放到包含 96 mM NaCl、2 mM KCl、1.8 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM HEPES<sub>5</sub>、2.5 mM 丙酮酸钠、100 units/ml 青霉素和 0.1 mg/ml 链霉素 pH 7.6 的培养溶液中。卵母细胞在通常不含 Ca<sup>2+</sup>的蛋白酶溶液中分散，以 defolliculate 卵母细胞，该蛋白酶溶液包含 88 mM NaCl、2.5 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM HEPES、2.5 mM 丙酮酸钠、100 units/ml 青霉素和 0.1 mg/ml 链霉素 pH 7.6 和 1.5 mg/ml 胶原酶 IA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。分离之后，彻底冲洗卵母细胞，然后将其放回到含有 Ca<sup>2+</sup>的培养溶液中，18° C 保存。

#### 合成用于爪蟾卵母细胞注射的 cRNA

按照下面的方法合成 cRNA:用 Not I、Xho I 或 Nhe I 其中的一个限制性内切酶酶切线性化质粒 DNA。用 T7 mMessage mMachine kit (Ambion, Austin, TX) 试剂盒按照说明书操作，以线性化的 DNA 为模板合成 cRNA。

#### 导入核酸分子

用于将 cRNA 注射入爪蟾卵母细胞的，微量移液器在 DMZ-Universal Puller (Zeitz-Instruments, München, Germany) 上做成。用



负压将注射用的 cRNA 吸入到微量移液器中。用 Nanoject II 卵母细胞注射器 (Drummond Scientific Co., Broomall, PA), 以正压将接近 10-50 ng 的 cRNA 注射到卵母细胞中。下面这些核酸被注射到卵母细胞: (1) 烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位亚单位 (30D); (2) 烟碱  $\alpha$ -7 受体亚单位 (34E); (3) 烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位和 线虫 ric-3 (30D 和 ric-3); (4) 烟碱  $\alpha$ -7 受体亚单位和线虫 (34E 和 ric-3); (5) 烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位和烟碱  $\alpha$ -7 受体亚单位(30D 和 34E); (6) 烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位、烟碱  $\alpha$ -7 受体亚单位和线虫 ric-3 (30D、34E 和 ric-3)。

### 电压钳制术分析

电压钳制术记录的对照外部溶液包括 88mM NaCl、1 mM KCl、0.41 mM CaCl<sub>2</sub>、2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.3 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、0.82 mM MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 和 15 mM HEPES pH 7.6。用重力灌注系统连续灌注记录室。向外部溶液中加入 1mM 的烟碱, 然后将其加入到灌注液, 持续 30 秒。而后, 以不少于 10 分钟从外部溶液中洗脱烟碱。此后, 用 DMSO (二甲基亚砷) 溶解 spinosyn A, 以终浓度 10  $\mu$ M 将其溶解到外部溶液中, 然后将其加入到灌注液中, 持续 60 秒。而后从外部溶液中洗脱 spinosyn A, 使得 DMSO 的终浓度不超过 0.1% (v/v)。

注射后用电压钳制术记录 1-5 天, 用 OC-725C 卵母细胞夹子 (Warner Instruments, Hamden, CT) 进行手工记录, 大部分的结果要用 Roboocyte 自动卵母细胞记录系统 (Roboocyte Automated Oocyte Recording System) (Multichannel Systems, Reutlingen, Germany) 记录。对于手工记录, 装配到 DMZ-Universal Puller (Zeitz- Instruments, München, Germany) 上的记录的微电极填充了 3 mM KCl, 具有 1-5 M $\Omega$  的电阻。标准的电压钳制术的两个电极是用来记录加入烟碱或 spinosyn A 后电流的变化。加入烟碱或 spinosyn A 后卵母细胞的电压钳位到 -60 mV, 电流在峰值检测。用上面描述的放大器放大得到的数据, 用 AcqKnowledge 硬件/软件 (BIOPAC Systems, Inc., Santa Barbara, CA) 或 Roboocyte 自动卵母细胞记录系统软件 (Multichannel Systems, Reutlingen, Germany) 在计算机上记录数据。

## 结果和讨论

下面的表格 1 公开了结果。

表 1.

组合	烟碱响应	<i>Spinosyn A</i> 响应
30D	-	-
34E	+	-
34E/ <i>ric-3</i>	+	-
30D/ <i>ric-3</i>	+	+
34E/30D	++	++
34E/30D/ <i>ric-3</i>	++++	++++

"-" 表示的是诱导的可以忽略不计的电流。

"+"表示电流幅度小。

"++" 表示中等幅度电流。

"++++" 表示高幅度电流。

本申请所出现的对数据的“可忽略不计”、“小”、“中等”和“高”描述性的术语都是相对的。

从上面的表 1 可以看到,用 30D (位于染色体 2L 的 30D 位置的烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位)的 cRNA 单独注射卵母细胞,卵母细胞显示对烟碱和 *spinosyn A* 都没有反应。用 34E (位于染色体 2L 的 34E 位置的烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -5 亚单位)的 cRNA 单独或是 34E 和 *ric-3* cRNAs 联合注射卵母细胞显示对烟碱小幅度的反应,但对 *spinosyn A* 没有可检测到的反应。将 30D 和 *ric-3* cRNAs 联合注射卵母细胞,显示细胞对烟碱和 *spinosyn A* 的小幅度的反应。这个结果显示烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位亚单位与伴随蛋白质共同表达,即辅助蛋白能检测具有影响  $\alpha$ -6 受体能力的化学试剂。将 34E 和 30D cRNAs 联合注射卵母细胞显示了对烟碱和 *spinosyn A* 中等幅度的响应。这更进一步证明烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位与伴随蛋白质共同表达,即离子通道亚单位能够检测具有影响  $\alpha$ -6 受体能力的化学试剂。将 34E、30D 和 *ric-3* cRNAs 共同注射入卵母细胞显示了对烟碱或 *spinosyn A* 的高幅度响应。这更证明烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位与多个伴随蛋白质共同表达,能检测具有影响  $\alpha$ -6 受体能力的化学试剂。

### 结合试验

在昆虫细胞中表达烟碱乙酰胆碱受体亚单位

用标准的分子克隆技术将位于染色体 2L 30D 的烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位的基因克隆到杆状病毒载体 pAcP(+)IE1-3 (Novagen, Madison, WI), 用杆状病毒介导其表达, 产生重组病毒, 将 Sf9 细胞稀释到 2ml Sf900II SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 培养基中, 按照  $8 \times 10^5$  细胞/孔的密度, 接种到 6 孔板上, 27°C 贴壁培养 1 小时。在 12 x 75mm 的聚苯乙烯的管中混合 DNA/lipid 的混合物, 包括 86 $\mu$ l 无菌水、5 $\mu$ l 浓度为 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l 载体、5 $\mu$ l BacPAK6 Bsu36 1 线性 DNA (Clontech, Palo Alto, CA) 和 4 $\mu$ l Bacfectin (Clontech, Palo Alto, CA), 室温培养混合物 15 分钟。在培养 DNA/lipid 混合物的过程中, 弃掉贴壁培养细胞的培养基, 加入新鲜的 1.5ml 培养基。然后将 DNA/lipid 混合物逐滴滴入到细胞上, 同时要不断的摇晃, 27°C 培养 5 小时。然后, 再加入 1.5ml 的 Sf900II SFM, 27°C 培养 4-5 days。用台式离心机 1000 rpm 5 分钟离心细胞混合物, 弃去细胞碎片。将包含重组病毒 (转染培养基) 的上清收集到一个干净的 tube 管中, 4°C 储存。

为了扩增重组病毒, 以  $1 \times 10^6$  细胞/ml 的密度将 50ml 的 SfP 细胞加入到 125ml 的一次性锥形瓶中。向细胞中加入 1ml 的转染培养基, 27°C 140 rpm 培养 48 hours。48 小时后, 收集转染混合物 1000 rpm 离心 5 分钟。将上清转移到干净的指定存放 P<sub>1</sub> 病毒储存的烧瓶中。为表达烟碱乙酰胆碱受体亚单位, 50ml 的 SfP 细胞按照  $2 \times 10^6$  细胞/ml 的密度接种到 125ml 的锥形瓶中。向细胞中加入 1ml 的 P<sub>1</sub>Vh-US 储存液, 27°C 140 rpm 培养 24hours。取 100 $\mu$ l 的样品做 Western blot 证明烟碱乙酰胆碱受体亚单位的表达, 剩下的样品用来作结合试验。

### 在 D.Mel-2 细胞中表达克隆的 30D nAC 小时 $\alpha$ -6

前面克隆得到的果蝇 nAC 小时  $\alpha$ -6 基因是用 PCR 方法, 以在 seq ID. 12 和 13 引物的 5'和 3'末端加入 Spe I 位点的扩增得到的。在 seq ID. 12 的 5'端加入了 Kozak 翻译起始序列增加 30D nAC 小时  $\alpha$ -6 在 D.Mel-2 细胞中的表达。将得到的 PCR 产物连接到 pCR2.1-TOPO

(Invitrogen, Carlsbad, CA)载体上并测序。除了引物处的引入的变化,与前面确定得到的 nAC 小时 30D 一致。用 Spe I 酶从 pCR2.1-TOPO 载体上切下目标基因,然后分别连接到 Spe I 酶切和碱性磷酸酶处理的线性化 pMT/V5-HisA 和 pIB/V5-HisA 载体上。用限制性酶切和测序鉴定正确的克隆。用 Qiagen EndoFree Maxi kit (Qiagen, Valencia, CA)试剂盒大量提取质粒。

#### 在 D.Mel-2 细胞中表达克隆的线虫 ric3

用加入了 Kozak 翻译起始信号的 Seq ID 14 和 Seq ID 10 引物 PCR 扩增前面得到了克隆的线虫 ric3 基因。将得到的 PCR 产物连接到 pCR2.1-TOPO 载体上,并测序。此序列除了加入的 Kozak 序列与前述的序列一致。作为 Bam HI 片段分离这个基因,将其分别连接到已经用 Bam HI 酶切和碱性磷酸酶处理的 pIB/V5-HisA 和 pMT/V5-HisA 载体上。用限制性酶切和测序鉴定正确的克隆。用 Qiagen EndoFree Maxi kit 试剂盒大量提取质粒。

#### 在 D.Mel-2 细胞中瞬间表达果蝇 nAC 小时 $\alpha$ -6 基因

将在含抗生素/抗微生物剂的果蝇 SFM 中培养的 D.Mel-2 细胞按照  $1.9 \times 10^7$  细胞/烧瓶密度接种到  $75\text{cm}^2$  烧瓶上,  $27^\circ\text{C}$  过夜培养。用  $12 \times 75\text{mm}$  的聚苯乙烯管混合转染混合物,包括  $1630 \mu\text{l}$  无菌水、 $40 \mu\text{g}$  pIB/V5-HisA/ric3、 $40 \mu\text{g}$  pIB/V5-HisA/30D 和  $250 \mu\text{l}$  CellFectin。轻微混合试剂,然后室温培养 15 分钟。在培养混合物的过程中,用 10ml 的新鲜的不含抗生素的果蝇 SFM 培养基洗涤细胞,然后弃掉这个培养基,加入不含抗生素的 6ml 新鲜的果蝇 SFM 培养基。向转染混合物中加入 4ml 不含抗生素的果蝇 SFM 培养基,然后将这个混合物转移到烧瓶中。上下吹打轻微混匀,  $27^\circ\text{C}$  过夜培养。

#### 在 D.Mel-2 细胞中稳定表达果蝇 nAC 小时 $\alpha$ -6 基因

D.Mel-2 细胞购于 Invitrogen (Carlsbad, CA), 在 125ml 摇瓶中培养,需要 50ml 的体积。在包含 5ml/L 抗生素-抗维生物剂(100X) (Gibco, Carlsbad,CA)的果蝇 SFM 培养基,按照  $3 \times 10^5$  细胞/ml 的密度每周两次传代。将 D.Mel-2 细胞按照  $5 \times 10^5$  细胞/孔的密度接种到 12 孔板中,

27°C 过夜培养。在 12 x 75mm 的聚苯乙烯管中加入 6 $\mu$ g pIB/V5-HisA/ric3、82 $\mu$ l 无菌 H<sub>2</sub>O 和 12 $\mu$ l CellFectin (Invitrogen, Carlsbad, CA)。轻微混合混合物，室温培养 15 分钟。在培养转染混合物的过程中，弃掉细胞中的培养基，加入不含抗生素的 1ml 新鲜的培养基。15 分钟后，弃去细胞培养基。向转染混合物中加入 0.5ml 不含抗生素的培养基，然后将这个溶液加入到细胞中。混合物 27°C 培养 48 小时。48 小时后，用细胞刮从盘上刮下细胞，分到包含抗生素的 2ml 果蝇 SFM 培养基的 6 孔板的四个孔中。27°C 贴壁培养 1 小时，弃去培养基，加入包含 25 $\mu$ g/ml 杀稻瘟菌素 S (Blasticidin S) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的新鲜培养基。27°C 培养 5 天。5 天后，刮掉细胞集中转移到一个管中，台式离心机中 600 rpm 离心，弃去上清，用含 25 $\mu$ g/ml 杀稻瘟菌素 S 的 50ml 新鲜的果蝇 SFM 悬浮细胞，27°C/140 rpm 震荡培养。细胞以 3 x 10<sup>5</sup> cells/ml 的密度每周传代两次。筛选 4 周后，降低杀稻瘟菌素 S 的浓度到 10  $\mu$ g/ml。在筛选剂量下培养 3 个月，接种 5 x 10<sup>5</sup> 细胞/孔 到 12 孔板中，27°C 过夜培养。三个 12 x 75mm 的聚苯乙烯管中都加入下面的试剂：2 $\mu$ g pMT/V5-HisA/30D、0.15 $\mu$ g pCoHygro(Invitrogen, Carlsbad,CA) (表达质粒和筛选质粒的比例是 40:1)、89 $\mu$ l 无菌 H<sub>2</sub>O 和 12 $\mu$ l CellFectin。轻微混合样品，室温培养 15 分钟，然后按照上面所描述的方法转染细胞。24 小时后，弃去包含转染混合物的培养基，加入包含抗生素的 1ml 新鲜培养基，27°C 培养另外 24 小时。从 12 孔板的三个孔中刮散细胞，平均分到两个 6 孔板中。贴壁培养 6 小时后，向培养基中分别加入含有 200、150、100 或 50 $\mu$ g/ml hygromycin B (潮霉素 B) 的 2ml/孔的新鲜培养基。27°C 继续培养，每 4-5 天换含潮霉素 B 的新鲜培养基。筛选培养两周后，刮散 200 $\mu$ g/ml 潮霉素 B 筛选的细胞，轻微沉淀，用包含 200 $\mu$ g/ml 潮霉素 B 的 25ml 新鲜培养基悬浮，然后转到 125ml 的摇瓶中。27°C 140rpm 继续培养，在筛选剂量下扩增细胞。为了诱导 30D nAChR 的表达，台式离心机 630 rpm 5 分钟离心收集细胞。用不含潮霉素 B，终浓度为 600 $\mu$ M 硫酸铜的新鲜培养基按照 2 x 10<sup>6</sup> 细胞/ml 密度悬浮细胞，27°C/140rpm 培养 24 小时。

### 制备转化细胞

为进行结合试验，如下方法制备昆虫细胞和 cRNA 注射的爪蟾卵母细胞：在室温下轻微离心昆虫细胞。弃去上清，用冰冷的包含 200 mM 蔗糖、10 mM 磷酸盐缓冲液、1 mM EDTA 和 1 mM PMSF 在 pH 7.2-7.4 条件下洗涤两次。用冰冷的储存缓冲液稀释最后得到的细胞沉淀，然后分装，这些分装的样品在 -80°C 储存，准备做结合试验。

按照前面描述的用电生理学的方法注射爪蟾卵母细胞，完整细胞用于结合试验。

### 放射性配体置换结合试验

在结合试验中用两个主要的放射性配体：传统的  $\alpha 7$  放射性配体、 $[^3\text{H}]$ methyllycaconitine (MLA, 甲基牛扁亭碱) 和  $[^3\text{H}]$ dihydrospinosyn A (DHSA)。针对这两个放射性配体要用包含 10 mM 磷酸钠 (7.2-7.4) 的结合缓冲液。用 D.Me1-2 细胞，所有试验需要 50  $\mu\text{l}$  细胞悬浮液。用爪蟾卵母细胞进行结合试验，集合卵母细胞 (2-5 卵母细胞)，转入 1ml 的结合缓冲液中，轻微吹打结合缓冲液，换两次新的结合缓冲液，洗去残存的卵母细胞培养基。向每一个卵母细胞聚集中加入终体积为 50-100  $\mu\text{l}$  缓冲液。没有标记的烟碱和 spinosyn A 分别用 100% 的 DMSO 和 100% 的乙醇配制成终浓度为 40mM，如果有需要可以室温下超声，而后可以用结合缓冲液再稀释。溶剂的终浓度要维持在每孔小于 0.1%。25  $\mu\text{l}$  没有标记的竞争性化合物加入到细胞悬浮液或卵母细胞中。用化合物对细胞或细胞抽提物在平的摇床轻微摇晃预处理 15-30 分钟，如果是  $[^3\text{H}]$ DHSA 则 10°C 处理，如果是  $[^3\text{H}]$ MLA 则室温处理。在总体积为 100  $\mu\text{l}$  的结合缓冲液中，向混合物中加入 25  $\mu\text{l}$  的 1-10 nM  $[^3\text{H}]$ MLA 或  $[^3\text{H}]$ DHSA。分别在三个反应 96 孔微孔滴定板中重复进行试验，用平的摇床轻微摇晃 30-90 分钟，如果是  $[^3\text{H}]$ DHSA 则 10°C 进行，如果是  $[^3\text{H}]$ MLA 则室温下进行。用 TomTec (CT) 96- 孔细胞收集器，通过 GF/C 玻璃纤维滤器色片 (fiber filter mats) 轻微真空分离结合放射性和游离放射性的细胞抽提物。对于用  $[^3\text{H}]$ DHSA 进行的试验，用 0.5% 的 PEI (w/v, 用去离子水稀释) 预浸滤器色片 1-2 小时，以减少非特异性结合。然而，对于用  $[^3\text{H}]$ MLA 进行的试验，只要简单的用包含 2mg/ml

BSA (pH 7.2-7.4)的 10mM 的磷酸钠缓冲液预浸滤器色片就可以了。用冰冷的结合缓冲液快速洗涤样品三次，用 60°C 烤箱烘干滤器色片，用 Meltilex solid-scintillant (PerkinElmer, Finland)的 Wallac MicroBeta 计数器 (Counter) (Wallac, CT)计算三分钟的样品放射活性。

在检测整个卵母细胞的结合试验的情况下，加入冰冷的结合缓冲液终止反应，然后两次抽吸步骤，中间用结合缓冲液洗涤。将卵母细胞转到包含 7ml 闪烁液鸡尾酒溶液 (scintillation cocktail) (UltimaGold MV, Packard Biosciences, CT)的闪烁瓶中漩涡，用液体闪烁计数器 (liquid scintillation counter) (Tri-carb 2900TR, Packard Biosciences, CT)计数 3 分钟。

### 结果和讨论

表 2 用 D $\alpha$ 6 注射完整爪蟾卵母细胞后三天进行的 [<sup>3</sup>H]MLA 结合试验

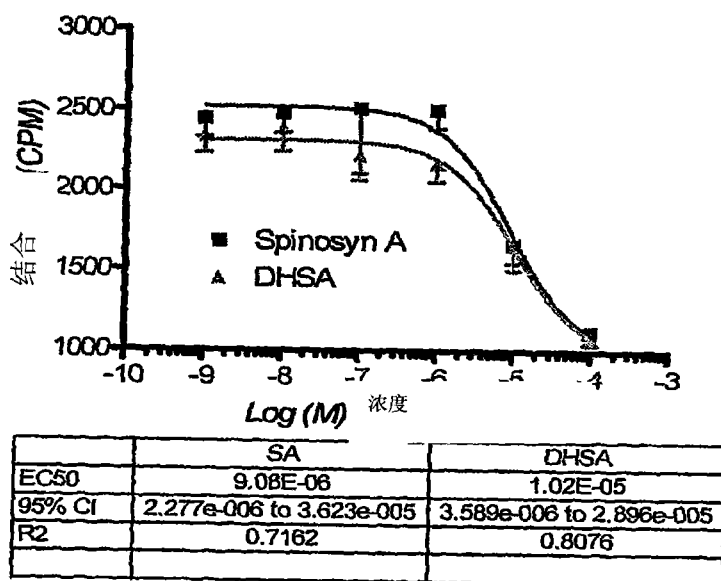
测试化合物	结合总量的替换百分数
10 $\mu$ M Spinosyn A	72
1 mM 烟碱	72

表 2 的结果显示在烟碱存在下， [<sup>3</sup>H]MLA 能够置换 (72%) D $\alpha$ 6-烟碱受体的烟碱。与卵母细胞的功能相关的数据 (如诱导) 提供了 spinosyn 对爪蟾卵母细胞表达 D $\alpha$ 6 烟碱受体的效果。此外，这些数据第一次公开了， spinosyn A 可以与在爪蟾卵母细胞表达的 D $\alpha$ 6 烟碱受体中的 [<sup>3</sup>H]MLA 结合。在瞬间表达 D $\alpha$ 6 烟碱受体的 Sf9 和 S2 细胞中观察到 [<sup>3</sup>H]MLA 剂量依赖的置换试验，表明这个试验可以被用来进行高通量筛选和证实与 D $\alpha$ 6 烟碱受体相互作用的化学试剂。

如下面的 Figure 3 所看到的，与 D.Mel-2 细胞中表达的 D $\alpha$ 6 和线虫的 ric3 的 [<sup>3</sup>H]DHSA 结合可以促进 [<sup>3</sup>H]MLA 的整个结合 (improved

over the overall binding seen with [ $^3\text{H}$ ]MLA)。

Figure 3. [ $^3\text{H}$ ]DHSA 置换



此外，使用 [ $^3\text{H}$ ]DHSA 对 D.Me1-2 细胞进行药理学观察发现，天然的烟碱 (nicotinic in nature) 可被烟碱置换 (nicotinic in nature as demonstrated by displacement by nicotine)，而不能被毒蕈碱的试剂如：毒蕈碱和阿托品置换。尽管置换 [ $^3\text{H}$ ]DHSA 结合，通过使用传统的如 MLA 和  $\alpha$ -金环蛇毒的烟碱对抗物，可以在较高浓度表明，且这些配体和受体化合物的亲和力相对很低。其它烟碱配体如吡虫啉、地棘蛙素、噻虫嗪、甲酰胆碱和山梗菜硷不能明显置换 [ $^3\text{H}$ ]DHSA 的结合。这个结合的进一步表征通过评估在 [ $^3\text{H}$ ]DHSA 结合试验中许多已知 spinosyn 类似物的效果而进行。鼠李糖或呋塞米中没有观察到显著的置换。spinosynA 的 pseudoagylcone 也不能显著置换。Spinosyn A、dihydrospinosyn A 和 spinosyn A 的许多生物学活性衍生物在 [ $^3\text{H}$ ]DHSA 结合试验中可以显著置换 [ $^3\text{H}$ ]DHSA。这些数据进一步支持 [ $^3\text{H}$ ]DHSA 结合试验可以用来预测配体和 spinosyn A 的结合位点之间的相互作用，因此可以用于检测结构活性关系。此外，这些数据表明这个试验/受体结合可以被用来发现新的与 spinosyn 靶点相互作用的试剂。

制备果蝇 30D-特异性 (烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位) 多克隆抗体



对所有已经公布的昆虫烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$  亚单位序列利用 Vector NTi 程序的比对特性进行比对。证实了一个与 30D 编码区 367-380 位氨基酸相符的 15 个氨基酸肽，其对于 30D 是唯一的。将 SEQUENCE ID NO: 11 的肽序列提交到 Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA) 可以获得肽特定的多克隆抗体。用 30D 特异的抗体作为一抗，western blot 检测确认宿主细胞中表达的烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -6 受体亚单位。这个 30D 特异抗体不能与表达的烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -5 受体亚单位或鸡的  $\alpha$ -7 受体亚单位的宿主细胞中分离的蛋白发生反应。

### 发明的有机体

用两种方法对抗 spinosyn A 的黑腹果蝇进行筛选。其中一个方法是，收集纯合子遗传型 *en bw dp* 的雄性果蝇，并在没有雌性的情况下培养到 2-5 天 (aged 2-5)。雄性果蝇饥饿 2-3 小时，然后给予在 1% 蔗糖(w/v) 中的 40-50 mM 诱变剂的甲基磺酸乙酯 (mutagen ethylmethane sulfonate) (EMS) 溶液接近 16 小时。EMS 处理后存活下来的雄性分别与能够对抗 spinosyn A 的有无效等位基因烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -6 受体亚单位 (其赋予 spinosyn A 抗性) 的纯合子雌性交配或者与基因型为 *CyO/InGla* (*CyO* 赋予 spinosyn A 抗性) 的雌性交配。交配后产的卵发育成成虫。2-5 天后，通过给果蝇喂食 spinosyn A，和同时在管形瓶中，其事先用溶解在 5% 蔗糖溶液中的 100ppm spinosyn A 溶液浸渍的滤纸覆盖标准黑腹果蝇的培养液培养。在化合物处理 36-96 小时后，如果 spinosyn A 对成虫没有显示或者有很小的毒性，则对 spinosyn A 有抗性的成虫个体打分。被认定对 spinosyn A 有抗药性的成虫与 *CyO/InGla* 遗传型的果蝇杂交 (cross)，以用于同源第二个染色体。这些杂交的第二个染色体的后代如果还是纯合子则继续用 spinosyn A 抗性进行筛选。

第二种方法是，携带赋予 spinosyn A 抗性的无效等位基因 (for a null allele that confers spinosyn A resistance)、和在 Y 染色体上带有 *hs-hid* (热休克头 (heat-shock-head) 进化缺陷) 转基因的纯合子的雄性黑腹果蝇 (*D. melanogaster*) 与携带赋予 spinosyn A 抗性的无效等位基因纯合子雌性交配。收集交配后产生的卵，使其发育，在 5-6 天后，将发育的幼虫放到 37°C 培养 2 小时。这个热休克处理使得产生的 *hid*

基因异位和致死性表达。由于 *hs-hid* 结构位于 Y 染色体上，所以只在雄性幼虫发生热休克后的死亡。因此，只有雌性幼虫可以发育为成虫。用这个方式收集的接近 13,000 未经改变 (*virgin*) 雌性果蝇成虫，其与大约 4,000 *cn bw dp* 纯合子雄性交配，如前面所描述的这些雄性成虫用 EMS 发生突变。收集交配后产生的筛选后的具有抗性的幼虫，并把它们放到含有 0.1ppm spinosyn A 的培养基中。3 天后对具有抗 spinosyn A 的发育幼虫打分，将这些打分的具有抗性的幼虫移到新鲜培养基的管形瓶中，在无 spinosyn A 处理下继续培养。新出现的成虫与 *CyO/InGla* 遗传型的果蝇杂交以同源产生 (*isogenizing*) 第二个染色体。这些杂交的第二个染色体的纯合子后代继续用 spinosyn A 抗性进行筛选。

用上面描述的两种方法分离的编码黑腹果蝇烟碱乙酰胆碱  $\alpha$ -6 受体亚单位的大约 10 个突变的等位基因具有 spinosyn A 抗性。分析这些等位基因揭示了几种不同类型的突变。这些突变包括：引入了一个提前终止密码子、在基因序列编码的多肽发生单个氨基酸的置换导致的突变，和影响 mRNA 剪切的突变。导入提前终止密码子的例子是 NCBI 接收号 No. NM 205953 的烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位，其编码 26 位的谷氨酰胺 CAA 密码子突变为终止密码子 TAA，引入了一个提前终止密码子，从而对抗 spinosyn A。氨基酸置换的示例是 NCBI 接收号 No. NM 205953 的烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位的 168 位半胱氨酸 TGC 密码子变为丝氨酸 TCC 密码子，从而对抗 spinosyn A。mRNA 剪切位点突变的示例是 NCBI 接收号 No. NM 205953 的烟碱乙酰胆碱受体  $\alpha$ -6 亚单位在第四个内含子的末端剪切受体位点发生突变，从 TAGCGC 变为 TAACGC，从而对抗 spinosyn A。

#### 用突变的果蝇进行 21-正巴比妥-spinosyn 筛选

分别预处理 10 个俄勒冈野生种的成年黑腹果蝇（5 个雄性和 5 个雌性）和 10 个 spinosyn 抗性株的两组成年果蝇。建立两组（每组 10 个果蝇）进行预处理。用 2:1 的丙酮和水配制 spinosyn A 和 21-正巴比妥-spinosyn 类似物的储存液，浓度 1000ppm，而后用 10%蔗糖稀释到所需要的浓度。从棉花心（接近 1/4 英寸）加入 500 ul 的处理物处理管形瓶（或对照用溶剂），然后把果蝇放到每一个管形瓶中，用棉花心盖

上。处理后 72 小时监测果蝇，期间在室温下培养，要求 12:12 的白天和黑夜循环。

## 结果

处理后 72 小时所有的果蝇都死亡了。100ppm 的 spinosyn A 或 21 - 正巴比妥 spinosyn 都足够致死所有野生型的果蝇。在相同浓度下，却没有显著致死具有 spinosyn 抗性的果蝇。剂量响应数据 (即 LD<sub>50</sub>)表明具有 spinosyn A 抗性的果蝇对 spinosyn A 的抗性比野生型果蝇至少高 100 倍。此外，spinosyn A 抗性果蝇比新分类的 spinosyns 如 21 - 正巴比妥 spinosyns 的抗性大于 100 倍 (基于 LD<sub>50</sub>)。这些数据显示可以将 spinosyn A 抗性的果蝇 (即靶位点突变) 用于筛选发现新的与 spinosyn A  $\alpha$ -6 烟碱性受体亚单位相互作用的新的化合物。

尽管优选的实施方案已经解释和描述的非常具体，对于相关领域的技术人员可以清楚的发现各种修饰、加入、减少等等的变化将不超出本发明的精神，并且这些也被认为是在本发明的权利要求范围内。

## LIST OF REFERENCES CITED

- Altschul et al, *J Mol Biol* 215:403-410 (1993).
- Anderson et al, *CeI Mol Neurobiol* 13:503-515 (1993).
- Aronstein et al, *Pestic Biochem. Physiol* 48(3):229-233 (1993).
- Ashburner, In *Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila melanogaster genetics* (1997) Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.
- Ashburner, In *Drosophila melanogaster. A Laboratory Manual* (1989), Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press: pp. 299-418
- Ausuble et. al, In *Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition.* (1995),
- Bayer et al, *Meth Enzym* 62:308 (1979).
- Bell et al, *J Biol Chem* 273:14309-14314 (1998).
- Bello et al, *Development* 125:2193-2202 (1998).
- Bingham, *Cell* 90(3):385-387 (1997).
- Bloomquist and Soderlund, *Mol Pharmacol* 33 :543-550 (1988).

- Bowtell et al, PNAS USA 88(15):6853-6857 (1991).
- Bradley et al, Nature 309:255-258 (1984).
- Brand and Perrimon, Development 118:401-415 (1993).
- Brand et al, Methods Cell Biol 44:635-654 (1994). Brinster et al, PNAS 82:4438-4442 (1985).
- Bronstein et al, in Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects, pp. 20-23, (A. K. Campbell, et al, eds., John Wiley & Sons, 1994)
- Bums et al, PNAS 90:8033-8037 (1993).
- Campbell, Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, (1984).
- Capecchi, Cell 22:479-488 (1980).
- Chen and Powers, Trends Biotechnol 8:209-215 (1990).
- Chen et al, Molec Biol Biotechnol 2:88-95 (1993).
- Chen et al, Hum Gen Ther 5:595-601 (1994).
- Chen et al, Biotech Ann Rev 2:205-236 (1996).
- Cooley et al., Science 239(4844): 1121-1128 (1988). Creighton, Proteins. Structure and Molecular Principles. (1984).
- Cullen, Methods Enzymol 152:684-704 (1987).
- Gulp et al, PNAS USA 88:7953-7957 (1991).
- Davidson et al, Nature Genetics 3:219-223 (1993).
- Deri and Adam-Vizi, J Neurochem 61:818-825 (1993).
- Eldefrawi et al, FASEB J 1:262-271 (1987).
- Ellington et al, Biotechnol Ann Rev 1:185-214 (1995).
- Ellis et al, Development 119(3):855-865 (1993).
- Engval et al, Immunol 109:129 (1972).
- Epstein and Shakes, Caenorhabditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism (1995).
- Erzuram et al, Nucleic Acids Res 21: 1607-1612 (1993).
- Evan et al, Nature 292:154-156 (1981). Fire et al, Nature 391:806-811 (1998).
- Fletcher and Davis, In Genetic Engineering (1991).
- Flotte et al, PNAS USA 90:10613-10617 (1993).
- Friedburg et al, DNA Repair and Mutagenesis (1995).
- Frohman et al, PNAS USA 85:8998 (1988).

- Frohman and Martin, *Technique* 1:165-170 (1989).
- Goding, *J Immunol Meth* 13:215 (1976).
- Goeddel, *Gene Expression Technology In Methods in Enzymology* (1990).
- Good et al, *Gene Therapy* 4:45-54 (1997).
- Gorman et al, *Mol Cell Biol* 2:1044-1051 (1982).
- Gossler et al, *PNAS* 83:9065-9069 (1986).
- Grauso et al, *Genetics* 160:1519-1533 (2002).
- Haskell and Bowen, *Mol Reproduc Dev* 40:386 (1995).
- Hassanzadeh et al, *FEBS Letters* 16:75-80 (1998a).
- Hassanzadeh et al, *FEBS Letters* 16:81-86 (1998b).
- Hay et al, *Development* 120 2121-2129 (1994).
- Hay et al, *PNAS USA* 94(10):5195-5200 (1997).
- Hershkowitz, *Nature* 329:219-222 (1987).
- Higgins and Sharp, *Computer Applications BioSci* 5(2):151-153 (1989).
- Hogan et al, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (1994).
- Hogan et al, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (1986).
- Hoogeboom et al, *Immunotechnology* 4: 1 -20 (1998).
- Hruby and Wilson, *Methods Enzymol* 216:369-372 (1992).
- Jaenisch, *Science* 240:1468-1474 (1988).
- Jahner et al., *PNAS* 82:6927-6931.
- Jahner et al, *Nature* 298:623-628 (1982).
- Jain and Magrath, *Anal Biochem* 199:119-124 (1991).
- Janenich, *PNAS* 73:1260-1264 (1976).
- Kenderdell and Carthew, *Cell* 95:1017-1026 (1998).
- Kim et al, *Nature* 382:133-138 (1996).
- Kirst et al, *Tetrahedron Lett* 32(37):4839-4842 (1991).
- Klein et al, *Nature* 327:70-73 (1987).
- Kolonin and Finley, *PNAS USA* 95:14266-14291 (1998).
- Lavitrano et al, *Cell* 57:717-723 (1989).
- Lerner, *Adv. Immunol* 36: 1-44 (1984)
- Lever, *Curr Opinion Mol Ther* 2:488-496 (2000).

- Liman et. al, *Neuro* 9(5):861-871 (1992).
- Lin et al, *Biotechniques* 26(2):318-326 (1999).
- Lo, *Mol. Cell Biol.* 3:1803-1814 (1983).
- Loh et al, *Science* 243:217-220 (1989).
- Loughney et al, *Cell* 58:1143-1154 (1989).
- Lu et al, *Molec Biol Biotechnol* 1:366-375 (1992).
- Lutz et al, *Exp Cell Res* 175:109-124 (1988).
- Mannino, and Gould-Fogerite, *BioTechniques* 6:682-690 (1988).
- Martin et al, in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons* (1997).
- McPherson, *Directed Mutagenesis: A Practical Approach* (1991).
- MeHo and Fire, *Methods Cell Biol* 48:451-482 (1995).
- Miller, *Bioessays* 11:91-95 (1989).
- Miller et al, *Methods of Enzymology* 217:581-599 (1993).
- Miner et al, *J Virol* 62:297-304 (1988).
- Misquitta and Patterson, *PNAS USA* 96:1451-1456 (1999).
- Miyawaki et al, *Nature* 388(6645):882-887 (1997).
- Mozer and Benzer, *Development* 120:1049-1058 (1994).
- Needleman and Wunsch, *J Mol Biol* 48:443-453 (1970). Nguyen et al, *Anal Biochem* 171:404-408 (1988). Norton and Steel, In *Gene Transfer Methods: Introducing DNA into Living Cells and Organisms* (2000).
- Oh et al, *Genetics* 163:195-201 (2003).
- Ohara et al, *PNAS USA* 86:5673-5677 (1989).
- Pal-Bhadra et al, *Cell* 90(3):479-490 (1997).
- Powers et al., *Molec Mar Biol Biotechnol* 1:301-308 (1992).
- Que and Jorgensen, *Dev Genetics* 22(1):100-119 (1998).
- Quiring et al, *Science* 265:785-789 (1994).
- Rauh et al, *Trends Pharmacol Sci* 11 :325-329 (1990).
- Robertson et al, *Nature* 322:445-448 (1986).
- Romoser et al, *J Biol Chem* 272(20): 13270- 13274 (1997). Rubin and Spradling, *Science* 218:348-353 (1982).
- Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2000).
- Shi et al, *PNAS USA* 96: 10033-10038 (1999).
- Shigekawa, and Dower, *BioTechniques* 6:742-751 (1988).

- Sleigh, *Anal Biochem* 156:251-256 (1986).
- Smyth, *Curr Biol* 7(12):793-795 (1997).
- Spralding et al, *PNAS USA* 92:10824-10830 (1995).
- St. Groth et al, *J Immunol Methods* 35:1-21 (1980).
- Stachling-Hampton et al, *Cell Growth Differ* 5(6):585-593 (1994).
- Sternberger et al, *J Histochem Cytochem* 18:315 (1970).
- Stewart et al, *EMBO J.* 6:383-388 (1987).
- Stuhmer, *Methods in Enzymology* 207:319-339 (1992).
- Taglialatela et al, *Biophys J* 61:78-82 (1992).
- Thibault et al, *Insect Mol Biol* 8(1): 119-122 (1999).
- Thompson et al, *Cell* 56:313-321 (1989).
- Van der Putten et al, *PNAS* 82:6148-6152 (1985).
- Westerfield, In *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 4th Edition (2000).
- Wilcox, In *Methods in Molecular Biology: Calcium Signalling Protocols* (1999).
- Wood, In *The Nematode C. elegans* (1988).
- Wood et al, *Recent Res Develop Neurochem* 3(1):135-142 (2000).
- Xu et al, *PNAS USA* 94:12473-12478 (1997).
- Ye et al, *Talanta* 65(1):206-210 (2005).
- Zabner et al, *Nature Genetics* 6:75-83 (1994).
- Zwaal et al, *PNAS USA* 90:7431-7435 (1993).

所有在本申请引用的发表文章和申请的专利都通过参考而并入本申请中，正如每个发表文章或专利申请被详细说明和指出通过参考并入本申请一样。尽管前述的发明通过解释和示例的方式更详细的描述，以便达到被清楚理解的目的。对于本领域技术人员而言，对本发明的某些修改和修饰将不超出本发明的精神和所附的权利要求的范围。

## SEQUENCE ID NO: 1

1 atgaaaaatg cacaactgaa actgactgaa gttgacgatg  
41 atgagctgtg gctggcagta agattagcgc actgcagcag  
81 caactttagc agcagtagca gcacaagaac caccagcagc  
121 aaccagaggc acaaccagca actcacaaca ctgcaaccaa  
161 ggagcttaag tacaaaacac cacagcaaca ttgcaagcga  
201 gcagcacaat agccagcaac aggagccagc atcgaaggac  
241 gaggatgtag ccaaccacgg tagaagcaat gaccagcaga  
281 cgcacttgca acagctagac agcagcaaca tgtgtcgcc  
321 aaagacagcc gcagcagcaa ctgctgccgg cgatgaagca  
361 acaaccaaac aaccaacaaa cataagactg tgtgcacgca  
401 agcgacaacg attgcgtcgc cgacgaaaaa gaaaaccagc  
441 aaccccaaac gaaacagata tcaagaaaca acagcaactt  
481 agcatgcctc ccttcaaac gcgcaaatcc acggacacct  
521 acagcacacc agcagcaaca accagctgtc cgacagccac  
561 ctacatgcaa tgtcgagcca gcgacaatga gttcagtatt  
601 ccgatatcga gacatgatag agtatccacg gccacattcg  
641 cctgggtgtt gcatgtgctg caggtgctgc tcgtgtcgt  
681 gcaacagtgg caacttcacg tgcaacagcg atcggtgcta  
721 ctgttcagaa ggatcgcagc gagcaccatc gccttcattt  
761 cctatttagg cagctttgca gcgcaactga aaaatagcag  
801 cagcagcagt agcagcagca acagcagcaa caacagcagc  
841 acgcaaatat taaacggact taataaacac tcatggatat  
881 tttattgat atattgaat ttatctgcta aagtttgcct  
921 agcaggatat catgaaaaga gactgttaca cgatcttttg  
961 gatccttata atacactaga acgtcccgtt ctcaatgaat  
1001 cggacccgtt acaattaagc tttggtttaa cttaatgca  
1041 aattatcgat gtggacgaga aaaatcaatt gctagtact  
1081 aatgtgtggt taaaactgga gtggaacgac atgaatctcc  
1121 gctggaacac ctccgactat ggccggagtta aggatctgcg  
1161 aataccgccg catcgcactt ggaagccgga cgtgctgatg  
1201 tacaacagtg cggatgaggg atttgacggc acctaccaga  
1241 cgaacgtggt ggtgcggaac aacggctcgt gtctatacgt  
1281 tccgccgggg atcttcaagt cgacgtgcaa gatcgacatc  
1321 acgtggttcc ccttcgatga ccagcgggtgc gagatgaagt



1361 tcggcagttg gacctacgac ggattccagc tggatttaca  
1401 attacaagat gaaactggcg gtgatatcag cagttacgtg  
1441 ctcaacggcg agtgggaact actgggtgtg cccggcaaac  
1481 gtaacgagat ctattacaac tgctgcccgg aaccctatat  
1521 agacatcacc ttcgcatca tcatccgccc acgaacactg  
1561 tactatttct tcaacctgat catacctgt gtactgattg  
1601 cctccatggc cttgctcgga ttcacctgc cgccagattc  
1641 gggtgaaaaa ttatcgctgg gtgttaccat cttgctctcg  
1681 ctgaccgtgt ttctgaatat ggttgccgag acaatgccgg  
1721 ctacttccga tgcggtgcca ttgctgggta catatttcaa  
1761 ttgcataatg tttatggtag cttcatccgt tgtgtcaacg  
1801 attttagtat taaattatca tcatcgaat gctgatacgc  
1841 acgaaatgct cgaatggata cgcacgtgt tttgtgctg  
1881 gctgccatgg atattgcaa tgagtcgccc aggacgaccg  
1921 ctgacctag agtttccgac cacgccctgt tcggacacat  
1961 cctccgagcg gaagcaccag atactctccg acgttgagct  
2001 gaaagagcgc tcgtcgaaat cgctgctggc caacgtacta  
2041 gacatcgatg atgacttccg gcacaattgt cgccccatga  
2081 cgccccggcg aacactgcca cacaaccggt ctttctatcg  
2121 cacggtttat ggacaaggcg acgatggcag cattgggcca  
2161 attggcagca cccgaatgcc ggatgcggtc acccatcata  
2201 cgtgcatcaa atcatcaact gaatatgaat taggtttaat  
2241 cttaaaggaa attcgctta taactgatca gctacgtaaa  
2281 gatgacgagt gcaatgacat tgccaatgat tggaaattg  
2321 cagctatggt cgttgacaga ctgtgcctta tcatattcac  
2361 aatgttcgca atattagcca caatggctgt actactatca  
2401 gcaccacata ttattgtctc gtag

#### SEQUENCE ID NO: 2

1 atgagcttcccacaaccgca ctcatgccc gaggccactg caaacgggtg cagaatgctg  
61 gtctatggcc tgggactttt aattatgata ccggcttgtg cggctggacc ccatgagaag  
121cggctactccacgcccttctggacaactac aacagcctggagcgtccggt ggtcaatgaa  
181tccgatccat tgcaactgag ctccggacta acactcatgc agattatcga tgtggacgaa  
241 aagaatcaac tgettataac gaatattgg ctcaaattgg aatggaacga tatgaatctt  
301cgatggaattcgagtgagtt cgggtgtgtgcgggatctgc gaattccgcc acatcgctca

361tggaaaccggatgtactgatgtacaacagtgccgacgagggcttcgatgg aacgtacgcc  
 421acaaatgtgggtggttcgcaa taatgggagc tgtctgtacg taccgccagg tatattcaag  
 481tcaacgtgta aatcgacat tacgtggttt ccattcgacg atcagagatg tgaatgaaa  
 541tttggttcgt ggacctacga tgggtttcag ttggacctgc agttgcagga cgaagctggt  
 601ggcgacattt ctagtttat aaccaatggc gaatgggact tgtaggtgt gcccggtaaa  
 661 cgaatgaaa tctactataa ttgctgcca gaacctata ttgacataac attcgccatt  
 721 ttgataaggc gcaaacggt gtactatttt tcaatctga ttgtgccgtg cgtactgatc  
 781 gcctccatgg cactgctagg gtttactctg ccaccagatt ctggtgaaaa gctttcgctt  
 841 ggagttacaa ttctattatc gcttacagtc ttctcaaca tggggccga aacaatgccg  
 901 gcgacctccg atgcggtacc gctgctcgga acttattca attgcattat gtttatgggtg  
 961 gcctcatcag ttgtgtcaac catactgtc ctcaattatc atcatagaaa tccagatacg  
 1021 catgaaatga gtgaatggat aagagtaata ttctttatt ggttaccttg catattgcgc  
 1081atgcaaagaccggacaggttggtctacgaatgtccgccgccgcccctcttc ttcgagtcc  
 1141tccgcatccg gcgagaagaa gcaacagatc caaacggtg agctaaagga  
 gagatcctcc  
 1201aagtctctgc tggccaatgt gctcgatata gacgatgatt tccgatgcaa tcatgatgt  
 1261 gccagcgcga ctttgcceca ccagccaca tattacagga cgatgtacag  
 gcaaggggat  
 1321 gacggcagcg tgggaccgt gggaccagct ggtccagtg tggacgggcg  
 tttgcacgag  
 1381 gccattccc acacctgtct gacatcctct gcggagtacg aactggcgct  
 gatactcaag  
 1441 gagctgcgtt ggataacaga acagctcaa aaagaggacg aaacaagcga  
 cattacgcga  
 1501 gattgaaat ttgctgcat ggtcgtgat cgtttgtgcc ttattattt cacctgttt  
 1561 actattatag caaccctgc tgtactcttc tcagegcgcg atttcattt cccgta

SEQUENCE ID NO: 3 g gatccatgg actccccgct gccagcgtcg ct  
 SEQUENCEIDNO: 4 g gatccttat tgcacgatta tgtgcggagc gga  
 SEQUENCEIDNO: 5 tctagacacc atgaaaaatg cacaactgaa actgact  
 SEQUENCEIDNO: 6 tctagactac gagacaataa tatgtggtgc tga  
 SEQUENCEIDNO: 7 tctagacacc atgagcttcc cacaaccgca ctca  
 SEQUENCEIDNO: 8 tctagattac gggaaaatga aatgcggcgc tga  
 SEQUENCEIDNO: 9 g gatccatgc caaaaactga acggcgt  
 SEQUENCEIDNO: 10 g gatcctcaa gtcttttag gtctccgct

SEQUENCE ID NO. : 11 SNRMKELELKERSS

SEQUENCEIDNO.: 12 actagtcacc atggactccc cgctgccagc gtcg

SEQUENCEIDNO.: 13 actagtttat tgcacgatta tgtgcggagc

SEQUENCEIDNO.: 14 ggatccaccatgccaaaaactgaacggcgt

<110> 美国陶氏益农公司  
 <120> 使用烟碱乙酰胆碱受体亚单位的新检测方法  
 <130> 63,095A  
 <160> 14  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 2424  
 <212> DNA  
 <213> 位于果蝇2L染色体34E位点上的编码烟碱乙酰胆碱受体 $\alpha$ -5亚单位的核苷酸序列  
 <400> 1  
 atgaaaaatg cacaactgaa actgactgaa gttgacgatg atgagctgtg gctggcagta 60  
 agattagcgc actgcagcag caacttttagc agcagtagca gcacaagaac caccagcagc 120  
 aaccagaggg acaaccagca actcacaaca ctgcaaccaa ggagcttaag taaaaaacac 180  
 cacagcaaca ttgcaagcga gcagcacaat agccagcaac aggagccagc atcgaaggac 240  
 gaggatgtag ccaaccacgg tagaagcaat gaccagcaga cgcattctgca acagctagac 300  
 agcagcaaca tgttgtcggc aaagacagcc gcagcagcaa ctgctgccgg cgatgaagca 360  
 acaacccaac aaccaacaaa cataagactg tgtgcacgca agcgacaacg attgcgctgc 420  
 cgacgaaaaa gaaaaccagc aacccccaaac gaaacagata tcaagaaaca acagcaactt 480  
 agcatgcctc ctttcaaac gcgcaaatcc acggacacct acagcacacc agcagcaaca 540  
 accagctgtc cgacagccac ctacatgcaa tgtcagagcca gcgacaatga gttcagattt 600  
 ccgatatcga gacatgatag agtatccacg gccacattcg cctgggtgtt gcatgtgctg 660  
 caggtgctgc tcgtgtcgtc gcaacagtgg caacttcacg tgcaacagcg atcgggtgcta 720  
 ctgttcagaa ggatcgcagc gagcaccatc gccttcattt cctatttagg cagctttgca 780  
 gcgcaactga aaaatagcag cagcagcagt agcagcagca acagcagcaa caacagcagc 840  
 acgcaaatat taaacggact taataaacac tcatggatat ttttattgat atatttgaat 900  
 ttatctgcta aagtttgcct agcaggatat catgaaaaga gactgttaca cgatcttttg 960  
 gatccttata atacactaga acgtcccgtt ctcaatgaat cggacccggtt acaattaagc 1020  
 tttggtttaa cttraatgca aattatcgat gtggacgaga aaaatcaatt gctagtcact 1080  
 aatgtgtggt taaaactgga gtggaacgac atgaatctcc gctggaacac ctccgactat 1140  
 ggcggagtta aggatctgcg aataccgccg catcgcatct ggaagccgga cgtgctgatg 1200  
 tacaacagtg cggatgaggg atttgacggc acctaccaga cgaacgtggt ggtgcggaac 1260  
 aacggctcgt gtctatacgt tccgccgggg atcttcaagt cgacgtgcaa gatcgacatc 1320  
 acgtggttcc ctttcgatga ccagcggcgc gagatgaagt tcggcagttg gacctacgac 1380  
 ggattccagc tggatttaca attacaagat gaaactggcg gtgatcagc cagttacgtg 1440  
 ctcaacggcg agtgggaact actgggtgtg cccggcaaac gtaacgagat ctattacaac 1500

```

tgctgcccgg aaccctatat agacatcacc ttcgccatca tcatccgccc acgaacactg 1560
tactatttct tcaacctgat cataccttgt gtactgattg cctccatgga cttgctcggg 1620
ttcacccctgc cgccagattc gggtgaaaaa ttatcgctgg gtgttaccat cttgctctcg 1680
ctgaccgtgt ttctgaatat ggttgccgag acaatgccgg ctacttccga tgcggtgcc 1740
ttgctgggta catatttcaa ttgcataatg tttatggtag cttcatccgt tgtgtcaacg 1800
atthtagtat taaattatca tcatcgaaat gctgatacgc acgaaatgtc cgaatggata 1860
cgcacatcgtg ttttgtgctg gctgccatgg atattgcaa tgagtcgccc aggacgaccg 1920
ctgacccatg agtttccgac cacgcccctgt tcggacacat cctccgagcg gaagcaccag 1980
atactctccg acgttgagct gaaagagcgc tcgtcgaaat cgctgctggc caacgtacta 2040
gacatcgtg atgacttccg gcacaattgt cgccccatga cgcccggcgg aacactgcc 2100
cacaacccgg ctttctatcg cacggtttat ggacaaggcg acgatggcag cattggggcca 2160
attggcagca cccgaatgcc ggatgcggtc acccatcata cgtgcatcaa atcatcaact 2220
gaatatgaat taggtttaat cttaaaggaa attcgcttta taactgatca gctacgtaaa 2280
gatgacgagt gcaatgacat tgccaatgat tggaaattg cagctatggt cgttgacaga 2340
ctgtgcctta tcatattcac aatgttcgca atattagcca caatggctgt actactatca 2400
gcaccacata ttattgtctc gtag 2424

```

<210> 2

<211> 1616

<212> DNA

<213> 位于果蝇X染色体上18C位点的编码烟碱乙酰胆碱受体 $\alpha$ -7亚单位的核苷酸序列

<400> 2

```

atgagcttcc cacaaccgca ctcatgccc gaggccactg caaacggtgg cagaatgctg 60
gtctatggcc tgggactttt aattatgata ccggcttgtg cggctggacc ccatgagaag 120
cggctactcc acgccccttct ggacaactac aacagcctgg agcgtccggt ggtcaatgaa 180
tccgatccat tgcaactgag cttcggacta aactcatgc agattatcga tgtggacgaa 240
aagaatcaac tgcttataac gaatatttgg ctcaaattgg aatggaacga tatgaatctt 300
cgatggaatt cgagtgagtt' cggtggtgtg cgggatctgc gaattccgcc acatcgccca 360
tggaaaccgg atgtactgat gtacaacagt gccgacgagg gcttcgatgg aacgtacgcc 420
acaaatgtgg tggttcgcaa taatgggagc tgtctgtacg taccgccagg tatattcaag 480
tcaacgtgta aaatcgacat tacgtggttt ccattcgacg atcagagatg tgaaatgaaa 540
tttggttcgt ggacctacga tgggtttcag ttggacctgc agttgcagga cgaagctggt 600
ggcgacattt cttagctttat aaccaatggc gaatgggact tgttaggtgt gcccggtaaa 660
cgaaatgaaa tctactataa ttgctgccc gaaccttata ttgacataac attcgccatt 720
ttgataaggc gcaaaacgtt gtactattht ttcaatctga ttgtgccgtg cgtactgatc 780
gcctccatgg cactgctagg gtttacctg ccaccagatt ctggtgaaaa gctttcgctt 840

```

```

ggagttacaa ttctattatc gcttacagtc ttcctcaaca tggtagccga aacaatgccg 900
gcgacctccg atgcgggtacc gctgctcgga acttatttca attgcattat gtttatgggtg 960
gcctcatcag ttgtgtcaac catacttgtc ctcaattatc atcatagaaa tccagatacg 1020
catgaaatga gtgaatggat aagagtaata ttcctttatt ggttaccttg catattgcgc 1080
atgcaaagac ccggacaggt tggctacgaa tgtccgccgc cgccctcttc ttcgagttcc 1140
tccgcatccg gcgagaagaa gcaacagatc caaacgctg agctaaagga gagatcctcc 1200
aagtctctgc tggccaatgt gctcgatata gacgatgatt tccgatgcaa tcatcgatgt 1260
gccagcgcga ctttgcccca ccagcccaca tattacagga cgatgtacag gcaaggggat 1320
gacggcagcg tgggaccctg gggaccagct ggtccagttg tggacgggagc tttgcacgag 1380
gccatttccc acacctgtct gacatcctct gcggagtacg aactggcgct gatactcaag 1440
gagctgcggt ggataacaga acagctcaaa aaagaggacg aaacaagcga cattacgcga 1500
gattggaaat ttgctgccat ggtcgtcgat cgtttggtcc ttattatatt caccttgttt 1560
actattatag caaccctcgc tgtactcttc tcagcgccgc atttcatttt cccgta 1616

```

```

<210> 3
<211> 32
<212> DNA
<213> 位于30D位点编码果蝇烟碱乙酰胆碱 $\alpha$ -6受体亚单位的正向PCR引物的寡核苷酸序列

```

```

<400> 3
ggatccatgg actccccgct gccagcgtcg ct 32

```

```

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> 位于30D位点编码果蝇烟碱乙酰胆碱 $\alpha$ -6受体亚单位的反向PCR引物的核苷酸序列

```

```

<400> 4
ggatccttat tgcacgatta tgtgaggagc gga 33

```

```

<210> 5
<211> 37
<212> DNA
<213> 位于34E编码果蝇烟碱乙酰胆碱 $\alpha$ -5受体亚单位的正向PCR引物的核苷酸序列

```

```

<400> 5
tctagacacc atgaaaaatg cacaactgaa actgact 37

```

```

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> 位于34E编码果蝇烟碱乙酰胆碱 $\alpha$ -5受体亚单位的反向PCR引物的核苷酸序列

```

```

<400> 6
tctagactac gagacaataa tatgtggtgc tga 33

```

<210> 7		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> 位于 <b>18C</b> 编码果蝇烟碱乙酰胆碱 $\alpha$ -7受体亚单位的正向PCR引物的核苷酸序列		
<400> 7	tctagacacc atgagcttcc cacaaccgca ctca	34
<210> 8		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> 位于 <b>18C</b> 编码果蝇烟碱乙酰胆碱 $\alpha$ -7受体亚单位的反向PCR引物的核苷酸序列		
<400> 8	tctagattac gggaaaatga aatgcggcgc tga	33
<210> 9		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> 编码线虫 <b>ric-3</b> 正向PCR引物的核苷酸序列		
<400> 9	ggatccatgc caaaaactga acggcgt	27
<210> 10		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> 编码线虫 <b>ric-3</b> 反向PCR引物的核苷酸序列		
<400> 10	ggatcctcaa gtcttttttag gtctccgcct	30
<210> 11		
<211> 14		
<212> PRT		
<213> 对应于果蝇烟碱乙酰胆碱 $\alpha$ -6受体亚单位第 <b>367-380</b> 位氨基酸的氨基酸序列		
<400> 11	Ser Asn Arg Met Lys Glu Leu Glu Leu Lys Glu Arg Ser Ser	
1	5	10
<210> 12		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> 加入 <b>Kozak</b> 翻译起始信号编码 <b>30D nAChR <math>\alpha</math>6</b> 正向PCR引物的核苷酸序列		
<400> 12	actagtacc atggactccc cgctgccagc gtcg	34
<210> 13		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> 编码 <b>30D nAChR <math>\alpha</math>6</b> 反向PCR引物的核苷酸序列		
<400> 13	actagtttat tgcacgatta tgtgaggagc	30

<210> 14  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 加入Kozak翻译起始信号编码线虫ric3正向PCR引物的核  
苷酸序列  
<400> 14  
ggatccacca tgccaaaaac tgaacggcgt

30