



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115887655 B

(45) 授权公告日 2025.06.17

(21) 申请号 202111158620.4

A61P 27/16 (2006.01)

(22) 申请日 2021.09.30

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115887655 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2023.04.04

US 2015299698 A1,2015.10.22

CN 112566640 A,2021.03.26

(73) 专利权人 上海鲸奇生物科技有限公司

地址 201315 上海市浦东新区苗桥路455弄  
10号楼2幢4层

M Shimojo et al..Role of zinc finger domains of the transcription factor neuron-restrictive silencer factor/repressor element-1 silencing transcription factor in DNA binding and nuclear localization.《J Biol Chem》.2001, 第276卷(第16期),13121-6.

(72) 发明人 周海波 胡新德 苏锦霖

Jee-Yeon Hwang et al..REST, a master transcriptional regulator in neurodegenerative disease.《Curr Opin Neurobiol》.2018,第48卷193-200.

(74) 专利代理机构 北京唐颂永信知识产权代理有限公司 11755

专利代理师 刘伟

M Shimojo et al..Role of zinc finger domains of the transcription factor neuron-restrictive silencer factor/repressor element-1 silencing transcription factor in DNA binding and nuclear localization.《J Biol Chem》.2001, 第276卷(第16期),13121-6.

(51) Int.Cl.

- A61K 45/00 (2006.01)
- C12N 15/113 (2010.01)
- A61P 25/00 (2006.01)
- A61P 25/16 (2006.01)
- A61P 25/28 (2006.01)
- A61P 9/10 (2006.01)
- A61P 25/18 (2006.01)
- A61P 25/14 (2006.01)
- A61P 21/00 (2006.01)
- A61P 25/20 (2006.01)
- A61P 25/08 (2006.01)
- A61P 27/06 (2006.01)
- A61P 27/02 (2006.01)

审查员 汤明秀

权利要求书2页 说明书15页  
序列表10页 附图3页

(54) 发明名称

直接转分化治疗神经系统疾病

(57) 摘要

RE1/NRSE阻断剂用于治疗神经系统疾病。本公开内容涉及生物医药领域。更具体地,本公开内容涉及RE1/NRSE元件作为靶点用于将非神经元细胞转分化为神经元细胞;以及RE1/NRSE阻断剂在预防和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关的疾病中的用途。本公开内容提供了阻断RE1/NRSE元件以调节非神经元细胞中神经元相关基

因表达的方法,其包括降低REST与RE1/NRSE元件的结合,或降低REST的量或活性。本公开内容还提供了RE1/NRSE元件阻断剂,尤其是内源性RE1/NRSE结合蛋白的结合结构域及其变体,其可用于预防和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关的疾病。

1. RE1/NRSE元件阻断剂,其特征在于,所述RE1/NRSE元件阻断剂为REST变体或其编码核苷酸,所述REST变体的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1, 3, 5或9所示,所述REST变体的核苷酸序列如SEQ ID NO: 2, 4, 6或10所示。

2. 药物组合物,其包含权利要求1所述的阻断剂。

3. 药盒,其包含权利要求1所述的阻断剂。

4. 试剂盒,其包含权利要求1所述的阻断剂。

5. 根据权利要求2所述的药物组合物,其配制成用于注射或经口施用。

6. 根据权利要求2所述的药物组合物,其配制成用于颅内给药、眼内给药、耳内给药、静脉内施用、肌内施用或皮内施用。

7. 根据权利要求2所述的药物组合物,其配制成用于吸入。

8. 根据权利要求2所述的药物组合物或权利要求3所述的药盒或权利要求4所述的试剂盒,其还包含用于递送所述RE1/NRSE元件阻断剂的载体,其中所述载体为病毒载体、脂质体、纳米颗粒、外泌体,其中病毒载体包括重组腺相关病毒载体rAAV、腺相关病毒AAV载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒、SV40病毒载体、及其组合。

9. 根据权利要求8所述的药物组合物或药盒或试剂盒,其中所述载体为AAV和rAAV。

10. 根据权利要求2所述的药物组合物或权利要求3所述的药盒或权利要求4所述的试剂盒,其包含用于表达所述REST变体的表达载体,其中所述表达载体包含编码REST变体的核苷酸序列,其与引起其表达的启动子可操作地连接。

11. 根据权利要求2所述的药物组合物,其用于局部施用至以下至少一种:i) 纹状体中的胶质细胞;ii) 大脑黑质中的胶质细胞;iii) 视网膜中的胶质细胞;iv) 内耳中的胶质细胞;v) 脊髓中的胶质细胞;vi) 前额皮质中的胶质细胞;vii) 运动皮质中的胶质细胞;viii) 下丘脑中的胶质细胞;以及ix) 腹侧被盖区中的胶质细胞。

12. 根据权利要求2所述的药物组合物或权利要求3所述的药盒或权利要求4所述的试剂盒,其还包含i) 一种或更多种多巴胺神经元相关因子,或ii) 用于穆勒胶质细胞中表达一种或更多种视网膜神经节细胞相关因子,

1) 其中所述一种或更多种多巴胺神经元相关因子选自:FoxA2、Lmx1a、Lmx1b、Nurr1、Pbx1a、Pitx3、Gata2、Gata3、FGF8、BMP、En1、En2、PET1、Pax家族蛋白、SHH、Wnt家族蛋白和TGF- $\beta$ 家族蛋白,或其组合;

2) 其中所述一种或更多种视网膜神经节细胞相关因子选自: $\beta$ -catenin、Oct4、Sox2、Klf4、Crx、 $\alpha$ CamKII、Brn3a、Brn3b、Brn3C、Math5、Otx2、Ngn2、Ngn1、AscL1、miRNA9、miRNA-124、Nr2e3和Nr1因子。

13. 根据权利要求12所述的药物组合物或药盒或试剂盒,所述Pax家族蛋白为Pax3或Pax6。

14. 根据权利要求10所述的药物组合物或药盒或试剂盒,其中所述启动子是胶质细胞特异性启动子,所述胶质细胞特异性启动子选自GFAP启动子、ALDH1L1启动子、EAAT1/GLAST启动子、谷氨酰胺合成酶启动子、S100 $\beta$ 启动子、EAAT2/GLT-1启动子和R1bp1启动子。

15. 根据权利要求10所述的药物组合物或药盒或试剂盒,其中所述启动子为穆勒胶质细胞特异性启动子。

16. 根据权利要求14所述的药物组合物或药盒或试剂盒,其中所述启动子为GFAP启动子。

## 直接转分化治疗神经系统疾病

### 技术领域

[0001] 本公开内容涉及生物医药领域。更具体地,本公开内容涉及RE1/NRSE元件作为靶点用于将非神经元细胞转分化为神经元细胞;以及RE1/NRSE阻断剂在预防和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关的疾病中的用途。

### 背景技术

[0002] 抑制元件1/神经元限制性沉默元件 (repressor element 1/neuron-restrictive silencer element,RE1/NRSE) 是一段特定的DNA序列,长度约为21bp(20-23bp不等),主要与REST(RE1沉默转录因子(RE1-silencing transcription factor),其也称为神经元限制性沉默因子(neuron-restrictive silencer factor,NRSF))结合,调控神经元发育和成熟相关的基因表达。RE1是神经元成熟相关的负向调节元件,最开始被发现于NaV1.2和SCG10的启动子5'端,调控这些基因的表达。在非神经元细胞中,RE1位点被组蛋白去乙酰化酶和甲基化酶等组成的沉默复合体结合,抑制神经元相关基因的表达。然而,在小鼠和人类中大约有1800多个RE1元件,导致其很难用现有的一些技术进行调控。比如,CRISPR介导的基因调控和表观遗传修饰技术,具有非常高的精确性,能精确调控特定的基因表达,但很难通过这种方式对RE1其调控的基因进行表达调控。

[0003] 帕金森病(PD)是一种与神经元功能缺失或死亡相关的疾病,其特征是中脑黑质多巴胺神经元的丧失。目前,针对帕金森病的治疗手段主要是以左旋多巴等多巴胺类似物为代表的小分子药物。近年发展起来的手术治疗也能在一定程度上改善疾病的症状,如脑深部电极刺激。但这些方法都只能部分的缓解病情,并不能阻止病情的发展,也无法减缓多巴胺神经元的死亡。而转分化治疗概念的提出,给多巴胺神经元的再生带来了希望。通过在胶质细胞中过表达一些基因,或对胶质细胞进行基因编辑,让胶质细胞转分化为多巴胺神经元,以补充缺失或死亡的多巴胺神经元。穆勒胶质细胞(Müller glia, MG)是视网膜组织中的主要神经胶质细胞。视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)是位于视网膜最内层的神经细胞,它的树突主要与双极细胞建立突触连接,它的轴突延伸至视神经乳头处,形成视神经,延伸到大脑。视网膜神经节细胞(RGC)损伤或退行性病变是造成永久性失明的主要缘因。RGC是视网膜中唯一的输出神经元,因此RGC损伤或退行性病变将导致永久性失明。重建功能性RGC是目前唯一可以帮助失明患者恢复视力的方法,而RGC细胞非常难以再生,因此,探究如何再生出RGC细胞将为广大RGC细胞死亡导致的失明患者带来重见光明的希望。因此,本领域迫切需要开发出能够再生多巴胺神经元、视网膜神经节细胞或其他功能性神经的方法。

### 发明内容

[0004] 在一个实施方案中,本公开内容提供了阻断RE1/NRSE元件以调节非神经元细胞中神经元相关基因表达的方法,其包括降低REST与RE1/NRSE元件的结合、或者降低REST的量或活性。

[0005] 在一个优选的实施方案中,通过例如基因编辑、小RNA干扰或蛋白质加速降解的方法来降低REST的量。

[0006] 在一个优选的实施方案中,通过例如基因编辑、反义寡核苷酸(ASO)、小RNA干扰、miRNA技术、小分子化合物、或蛋白质加速降解的方法来降低REST的量。

[0007] 在一个优选的实施方案中,通过REST结合剂与REST结合来阻断REST与RE1/NRSE元件的结合,所述REST结合剂例如REST抗体。

[0008] 在一个优选的实施方案中,通过RE1/NRSE元件阻断剂与RE1/NRSE元件结合来阻断REST与RE1/NRSE元件的结合。

[0009] 在一个优选的实施方案中,所述RE1/NRSE元件阻断剂是REST的竞争性结合蛋白、短肽或基因编辑蛋白或其编码核酸,或核酸及核酸类似物,或者小分子RE1/NRSE元件阻断剂。

[0010] 在一个优选的实施方案中,所述RE1/NRSE元件阻断剂是REST变体或其编码核酸。

[0011] 在一个优选的实施方案中,所述REST变体是REST的DNA结合结构域,其缺失REST的N端和C端抑制结构域,优选地为REST的第155-420位氨基酸。

[0012] 在一个优选的实施方案中,所述REST的DNA结合结构域与激活结构域融合。

[0013] 在一个优选的实施方案中,所述激活结构域选自:表观遗传修饰蛋白或者基因激活调控元件,例如VP64、P65-HSF1、VP16、RTA、Suntag、P300、CBP或其组合,优选VP64或P65-HSF1。

[0014] 在一个优选的实施方案中,所述REST变体具有SEQ ID NO:1,3,5和9的氨基酸序列或SEQ ID NO:2,4,6和10的核苷酸序列,或者与其具有至少70%、60%、50%同一性百分比的序列。

[0015] 在一个优选的实施方案中,所述非神经元细胞包括例如胶质细胞、成纤维细胞、干细胞、神经前体细胞、神经干细胞,其中胶质细胞选自星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞、施万细胞、NG2细胞、卫星细胞、穆勒胶质细胞、内耳神经胶质细胞或其组合,优选星形胶质细胞、穆勒胶质细胞和耳蜗神经胶质细胞。

[0016] 在一个优选的实施方案中,所述胶质细胞来源于脑、脊髓、眼或耳,其中脑部胶质细胞来源于纹状体、黑质、中脑腹侧被盖区、脊髓、下丘脑、背侧中脑或大脑皮层,优选纹状体和黑质。

[0017] 在一个优选的实施方案中,调节所述非神经元细胞中的神经元相关基因表达,以使所述非神经元细胞转分化为神经元细胞,其中所述神经元细胞为哺乳动物神经元,其中优选多巴胺神经元、GABA神经元、5-HT神经元、谷氨酸能神经元、ChAT神经元、NE神经元、运动神经元、脊髓神经元、脊髓运动神经元、脊髓感觉神经元、感光细胞(视杆细胞和视锥细胞)、双极细胞、水平细胞、无长突细胞、视网膜神经节细胞(RGC)、耳蜗神经细胞(耳蜗螺旋神经节细胞和前庭神经元)、锥体神经元、中间神经元、中型多棘神经元(MSN)、浦肯野细胞、颗粒细胞、嗅感觉神经元、球周细胞或其组合,更优选多巴胺神经元、视网膜神经节细胞、感光细胞和耳蜗螺旋神经节细胞。

[0018] 在一个优选的实施方案中,所述非神经元细胞和/或神经元细胞来自例如人、非人灵长类动物、大鼠和小鼠,优选人。

[0019] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了RE1/NRSE元件阻断剂用于制备用于预防

和/或治疗与神经元功能缺失或死亡相关疾病的药物的用途,其中所述RE1/NRSE元件阻断剂降低RE1/NRSE内源结合因子与RE1/NRSE元件的结合,其中所述RE1/NRSE内源结合因子包括REST等锌指蛋白。

[0020] 在一个优选的实施方案中,所述RE1/NRSE元件阻断剂与RE1/NRSE元件结合从而阻断RE1/NRSE内源结合因子与RE1/NRSE元件的结合。

[0021] 在一个优选的实施方案中,所述RE1/NRSE元件阻断剂是REST的竞争性结合蛋白、短肽或基因编辑蛋白或其编码核酸,或核酸及核酸类似物,或者小分子RE1/NRSE元件阻断剂。

[0022] 在一个优选的实施方案中,所述RE1/NRSE元件阻断剂是REST变体或其编码核酸。

[0023] 在一个优选的实施方案中,所述REST变体是REST的DNA结合结构域,其缺失REST的N端和C端抑制结构域,优选地为REST的第155-420位氨基酸。

[0024] 在一个优选的实施方案中,所述REST的DNA结合结构域与激活结构域融合。

[0025] 在一个优选的实施方案中,所述激活结构域选自:表观遗传修饰蛋白或者基因激活调控元件,例如VP64、P65-HSF1、VP16、RTA、Suntag、P300、CBP或其组合,优选VP64或P65-HSF1。

[0026] 在一个优选的实施方案中,所述REST变体具有SEQ ID NO:1,3,5和9的氨基酸序列或SEQ ID NO:2,4,6和10的核苷酸序列,或者与其具有至少70%、60%、50%同一性百分比的序列。

[0027] 在一个优选的实施方案中,所述与神经元功能缺失或死亡相关的疾病选自:帕金森病、阿尔茨海默病、脑卒中(中风)、精神分裂症、亨廷顿舞蹈症、抑郁症、运动神经元病、肌萎缩性侧索硬化、脊髓性肌萎缩症、Pick病、睡眠失调、癫痫、共济失调、RGC细胞死亡导致的视力损伤、青光眼、年龄相关的RGC病变、视神经损伤、视网膜缺血或出血、Leber遗传性视神经病变、损伤或退行性病变导致的感光细胞变性或死亡、黄斑变性、视网膜色素变性、糖尿病有关的失明、夜盲症、色盲、遗传性失明、先天性黑蒙症、螺旋神经节细胞死亡导致的耳聋或听觉减退,或其组合。

[0028] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了RE1/NRSE元件阻断剂,其为REST变体或其编码核酸,或人工设计的REST的DNA结合结构域类似物。

[0029] 在一个优选的实施方案中,所述REST变体是REST的DNA结合结构域,其缺失REST的N端和C端抑制结构域,优选地为REST的第155-420位氨基酸。

[0030] 在一个优选的实施方案中,所述REST的DNA结合结构域与激活结构域融合。

[0031] 在一个优选的实施方案中,所述激活结构域选自:表观遗传修饰蛋白或者基因激活调控元件,例如VP64、P65-HSF1、VP16、RTA、Suntag、P300、CBP或其组合,优选VP64或P65-HSF1。

[0032] 在一个优选的实施方案中,所述REST变体具有SEQ ID NO:1,3,5和9的氨基酸序列或SEQ ID NO:2,4,6和10的核苷酸序列,或者与其具有至少70%、60%、50%同一性百分比的序列。

[0033] 在一个优选的实施方案中,所述REST变体或REST的DNA结合结构域来自例如人、非人灵长类动物、大鼠和小鼠,优选人。

[0034] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了药物组合物或药盒或试剂盒,其包含上

述阻断剂。

[0035] 在一个优选的实施方案中,所述药物组合物或药盒或试剂盒配制成用于注射、颅内给药、眼内给药、耳内给药、吸入、肠胃外施用、静脉内施用、肌肉施用、皮内施用、表面施用或经口施用。

[0036] 在一个优选的实施方案中,所述药物组合物或药盒或试剂盒还包含用于递送所述RE1/NRSE元件阻断剂的载体或运载体,其中所述载体或运载体为病毒载体、脂质体、纳米颗粒、外泌体、类病毒颗粒,其中病毒载体包括重组腺相关病毒载体(rAAV)、腺相关病毒(AAV)载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒、SV40病毒载体、及其组合,其中优选AAV和rAAV。

[0037] 在一个优选的实施方案中,所述药物组合物或药盒或试剂盒包含用于表达REST变体的表达载体,其中所述表达载体包含编码REST变体的核苷酸序列,其与引起其表达的启动子可操作地连接。

[0038] 在一个优选的实施方案中,所述药物组合物或药盒或试剂盒用于局部施用至以下至少一种:i) 纹状体中的胶质细胞;ii) 大脑黑质中的胶质细胞;iii) 视网膜中的胶质细胞;iv) 内耳中的胶质细胞;v) 脊髓中的胶质细胞;vi) 前额皮质中的胶质细胞;vii) 运动皮质中的胶质细胞;viii) 下丘脑中的胶质细胞;以及ix) 腹侧被盖区(VTA)中的胶质细胞。

[0039] 在一个优选的实施方案中,所述药物组合物或药盒或试剂盒还包含i) 一种或更多种多巴胺神经元相关因子,或ii) 用于穆勒胶质细胞中表达一种或更多种视网膜神经节细胞相关因子,

[0040] 1) 其中所述一种或更多种多巴胺神经元相关因子选自:FoxA2、Lmx1a、Lmx1b、Nurr1、Pbx1a、Pitx3、Gata2、Gata3、FGF8、BMP、En1、En2、PET1、Pax家族蛋白(Pax3、Pax6等)、SHH、Wnt家族蛋白和TGF- $\beta$ 家族蛋白,或其组合;

[0041] 2) 其中所述一种或更多种视网膜神经节细胞相关因子包括: $\beta$ -catenin、Oct4、Sox2、Klf4、Crx、aCamKII、Brn3a、Brn3b、Brn3C、Math5、Otx2、Ngn2、Ngn1、AscL1、miRNA9、miRNA-124、Nr2e3和Nr1等因子。

[0042] 在一个优选的实施方案中,所述启动子是胶质细胞特异性启动子或穆勒胶质细胞(MG)细胞特异性启动子,所述胶质细胞特异性启动子选自GFAP启动子、ALDH1L1启动子、EAAT1/GLAST启动子、谷氨酰胺合成酶启动子、S100 $\beta$ 启动子EAAT2/GLT-1启动子和R1bp1启动子,优选GFAP启动子。

[0043] 在一个优选的实施方案中,胶质细胞的转分化效率为至少1%,或至少10%、20%、30%、40%或50%。

## 附图说明

[0044] 图1.内源性锌指蛋白设计示意图。(A) REST蛋白结构示意图,REST蛋白包含N-端抑制结构域和中间负责与RE1结合的DNA结合结构,以及C-端的转录抑制结构域。RZFD-V1代表RZFD的第一种设计,包含人源REST蛋白中间负责与RE1结合的8个锌指结构域(RZFD, REST Zinc Figure domain)。(B) RZFD-V2和RZFD-V3两种设计。为了激活被REST通过结合RE1/NRSE而抑制的神经元相关基因,我们将RZFD分别融合了两种不同激活因子,分别命名为RZFD-V2和RZFD-V3。RZFD-V2由RZFD与VP64融合表达,RZFD-V3由RZFD的C-末端融合了一个

P65和一个HSF1的转录激活结构域所组成。(C)在胶质细胞中,REST与RE1相结合,REST的C-端和N-端分别招募一些转录抑制因子,使得RE1所调控的神经元相关基因不能表达。(D)我们设想在胶质细胞中表达RZFD-V1后,RZFD与RE1结合,阻止了REST与RE1的结合,从而REST沉默复合体不能抑制RE1所调控的基因,RE1所调控的神经元相关基因表达。(E)RZFD-V2通过RZFD结构域与RE1结合,阻止了REST/NRSF与RE1的结合,同时其VP64结构域能招募转录激活因子,增强RE1所调控的神经元相关基因的表达。(F)在胶质细胞向神经元转分化过程中,RZFD-V3的RZFD结构域结合与RE1结合,阻止REST与RE1的结合,解除REST对RE1调控的基因的表达,同时P65-HSF1激活结构域招募一些转录激活因子,促进RE1所调控的神经元相关基因的表达。

[0045] 图2.RZFD介导的胶质细胞向神经元转分化。(A)AAV载体设计示意图,Vector 1为GFAP驱动mCherry表达的载体示意图,GFAP是一种胶质细胞中特异性表达的启动子,mCherry是一种红色荧光蛋白,应用于标记胶质细胞。Vector 2是人源RZFD表达载体示意图,由星形胶质细胞特异性启动子GFAP来驱动RZFD的表达。(B)注射和取材分析示意图,将注射AAV当天记为第0天,在注射后2周取材分析胶质细胞转分化为神经元的结果,在注射后1.5个月时,分析胶质细胞转分化为神经元和多巴胺神经元的结果。(C)AAV病毒注射和转分化示意图,在小鼠的纹状体或黑质单独注射GFAP-mCherry,或注射GFAP-mCherry和GFAP-RZFD的混合AAV,GFAP-mCherry会将胶质细胞标记为红色,而GFAP-RZFD会将胶质细胞转分化为神经元神经元。(D)在野生型的C57小鼠纹状体中单独注射GFAP-mCherry后,将星形胶质细胞标记为红色,mCherry通道表示GFAP-mCherry标记上的星形胶质细胞,DAPI为细胞核染色,NeuN为神经元特异性标志物,Merge图显示GFAP-mCherry特异性标记星形胶质细胞而不标记神经元。(E)在小鼠纹状体中注射GFAP-mCherry和GFAP-RZFD的混合AAV后2周取材分析,大部分胶质细胞已经开始变形,而且有少量细胞已经开始表达NeuN,但没有细胞表达TH,NeuN为神经元特异性标志物,TH为多巴胺神经元特异性标志物。(F)在小鼠纹状体中注射GFAP-mCherry和GFAP-RZFD的混合AAV后1.5个月取材分析,大部分mCherry阳性细胞都表达神经元特异性标志物,而且有一部分细胞有多巴胺特异性标志物TH的表达。箭头指示的为同时表达mCherry和TH的神经元。

[0046] 图3.RZFD-VP64或RZFD-P65-HSF1介导的胶质细胞向神经元转分化。(A)GFAP-RZFD-V2和GFAP-RZFD-V3表达载体设计示意图。RZFD-V2是RZFD与VP64的融合蛋白,由胶质细胞特异性启动子GFAP驱动表达,RZFD-V3由RZFD和P65-HSF1激活结构域所组成。(B)GFAP-RZFD-V2与GFAP-mCherry混合AAV注射小鼠纹状体或黑质示意图,注射后1.5个月取材分析。(C)GFAP-RZFD-V2在纹状体中将胶质细胞转分化为神经元和多巴胺神经元代表图,mCherry为GFAP-mCherry所标记上的细胞,TH是多巴胺神经元特异性标志物,NeuN是神经元特异性标志物。箭头指示的为同时表达mCherry和TH的神经元。(D)在DAT-Cre: Ai9小鼠中注射GFAP-RZFD-V3示意图,GFAP-RZFD-V3注射到DAT-Cre: Ai9小鼠的纹状体或黑质,1.5个月取材分析,Dat-Cre是在Dat内源性启动子后面插入了Cre,Ai9是Rosa26-CAG-LSL-tdTomato-WPRE小鼠,DAT-Cre: Ai9小鼠大脑中只有成熟多巴胺神经元才能被tdTomato红色荧光信号标记上。(E)在在纹状体中注射GFAP-RZFD-V3后1.5个月取材分析结果代表图,红色荧光信号(tdTomato)代表转化而来的成熟多巴胺神经元,绿色信号为多巴胺神经元特异性标志物TH染色,白色信号为神经元特异性标志物NeuN染色,Merge图显示tdTomato红色信

号与TH染色绿色信号重合。箭头指示的为同时表达tdTomato和TH的神经元

### 具体实施方式

[0047] 虽然之前的研究表明RE1存在于许多神经相关基因的启动子区域,但是否可以通过调节RE1来实现胶质细胞向神经元转分化仍然未知。在本研究中,通过对内源性RE1结合蛋白进行基因工程改造,利用能与RE1结合的内源性蛋白REST的锌指结构域(Zinc Finger Domain, ZFD)来调控RE1,实现对其相关基因的表达调控。首先,我们对REST蛋白进行分析,发现其第159-412位为8个锌指结构域,可能与其结合于RE1相关,在其N-端1-83位为其N-端抑制区域,主要与Sin3a和Sin3b等蛋白结合,第1008-1097位为其C-端的抑制结构域和一个锌指结构域,主要RCOR1等蛋白结合。中间的84-158位和413-1007位没有明显的蛋白结构域,其功能尚不明确,可能参与调节REST与RE1的结合。之前的研究表明,删除REST蛋白的1-83和1008-1097位不影响REST与RE1的结合,但不能发挥正常工呢。

[0048] 本研究利用蛋白结构预测,结合基因工程改造技术,对REST的内源锌指结构域进行了一系列分析和改造。首先,通过截短实验,我们发现过表达REST的第155-420位氨基酸(仅包含8个锌指结构域,成为RZFD:REST Zinc Finger Domain),可以阻断REST与RE1的结合。通过AAV介导的基因递送技术,在小鼠纹状体星形胶质细胞中过表达RZFD可以将胶质细胞转分化为神经元。我们通过对RZFD进行进一步改造,在RZFD的N-端或C-端融合VP64,形成RZFD-VP64,并成功实现AAV介导的在体胶质细胞向神经元转分化。我们在RZFD上进一步融合P65和HSF1的转录激活结构域,形成RZFD-P65-HSF1。应用AAV介导的在体转分化技术,我们发现RZFD-P65-HSF1也能在纹状体中将胶质细胞转分化为神经元。

[0049] 之前的研究表明抑制REST可以将胶质细胞转分化为神经元,而REST结合与基因组中一种被称为RE1的DNA序列。而RE1是一类序列,无法通过CRISPR技术进行靶向,而本研究中采用一种人类内源性锌指结构(REST锌指结构域(RZFD))巧妙的靶向RE1序列,从而阻断REST沉默复合体与RE1的结合。在胶质细胞等非神经元细胞中,表达RZFD(RZFD-V1)解除了REST沉默复合体对神经元相关基因表达的抑制。我们进一步通过在RZFD上融合VP64(RZFD-V2)或P65-HSF1(RZFD-V3)等激活结构域,进一步促进了神经元相关基因的表达,促进胶质细胞向神经元转分化。通过免疫荧光染色和DAT-Cre: Ai9标记系统,我们还发现RZFD-V1, RZFD-V2和RZFD-V3都可以将胶质细胞转分化为多巴胺神经元。

[0050] 通过在Ai9视网膜中下腔注射AAV,我们发现RZFD, RZFD-VP64和RZFD-P65-HSF1可以将穆勒细胞转分化为视网膜神经节细胞,并且观察到部分感光细胞。视网膜神经节细胞是视觉通路中唯一将视觉信号传递到大脑的细胞,其缺失或死亡会导致永久性的失明。在非人灵长类动物中的研究与小鼠中的结果类似,我们发现在大脑中RZFD, RZFD-VP64和RZFD-P65-HSF1可以将胶质细胞转分化为多巴胺神经元,在视网膜中RZFD, RZFD-VP64和RZFD-P65-HSF1可以将穆勒细胞转分化为视网膜神经节细胞和感光细胞。

[0051] 与神经元功能缺失或死亡相关的疾病

[0052] 在本公开内容中,与神经元功能缺失或死亡相关的疾病主要包括与多巴胺神经元功能缺失或死亡相关的疾病,以及与视神经节或感光细胞缺失或死亡相关的视力障碍。与神经元功能缺失或死亡相关的疾病包括,但并不限于:帕金森病、精神分裂症、抑郁症、RGC细胞死亡导致的视力损伤、青光眼、年龄相关的RGC病变、视神经损伤、视网膜缺血或出血、

Leber遗传性视神经病变、损伤或退行性病变导致的感光细胞变性或死亡、黄斑变性、视网膜色素变性、糖尿病有关的失明、夜盲症、色盲、遗传性失明、先天性黑蒙症、螺旋神经节细胞死亡导致的耳聋或听觉减退。

[0053] 多巴胺神经元

[0054] 多巴胺能神经元 (dopaminergic neuron) 含有并释放多巴胺 (dopamine, DA) 作为神经递质的神经元。多巴胺属于儿茶酚胺类神经递质,在中枢神经系统中发挥重要的生物学作用,大脑内的多巴胺能神经元主要集中在中脑的黑质致密区 (substantia nigra pars compacta, SNc)、腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA)、下丘脑和脑室周围。很多实验证实多巴胺能神经元与人体多种疾病密切相关,最典型的就是帕金森病。

[0055] 通用方法

[0056] 动物伦理:

[0057] 本研究中动物的饲养和使用是在中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心生物医学研究伦理委员会的指导原则指导下完成。

[0058] 质粒构建:

[0059] 本研究中的质粒均为本实验室自己构建,AAV骨架载体用限制性内切酶进行酶切,并进行琼脂糖凝胶电泳,回收骨架载体。插入DNA片段为以细胞cDNA为模板进行PCR,琼脂糖凝胶电泳后回收PCR片段。利用诺唯赞生物科技有限公司的ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit (Vazyme, C113-02) 进行骨架载体与片段连接。连接后转化到DH5a大肠杆菌中进行,并涂板。第二天挑取单克隆进行鉴定,阳性克隆进行测序,测序完全正确的克隆进行扩大培养和质粒抽提。

[0060] 小鼠脑部AAV注射:

[0061] 本研究中所使用的AAV血清型为AAV8。利用瑞沃德立体定位注射系统进行立体定位注射 (C57BL/6或Dat-Cre: Ai9小鼠,年龄大于两个月)。AAV-GFAP-RZFD-V1, AAV-GFAP-RZFD-V2和AAV-GFAP-RZFD-V3的滴度为大于 $5 \times 10^{12}$ vg/ml (每次注射1-3 $\mu$ l)。将AAV注入纹状体 (AP+0.8mm, ML $\pm$ 1.6mm和DV-2.8mm) 或黑质 (AP-3.0mm, ML $\pm$ 1.25mm和DV-4.5mm)。

[0062] 小鼠组织免疫荧光染色:

[0063] 注射后2周和注射后1.5-2个月取材、切片并进行免疫荧光染色。生理盐水和4% PFA灌注小鼠后取脑,并用4%多聚甲醛 (PFA) 固定过夜,然后在30%蔗糖中脱水至少12小时以上,待组织沉入溶液底部。用OCT进行包埋后进行冷冻切片,切片厚度为30 $\mu$ m或40 $\mu$ m。免疫荧光染色之前,用0.1M磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗脑片三次,每次5-10分钟。一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜后,用PBS清洗3-4次,每次10-15分钟。然后再加入抗体稀释液稀释后的二抗进行孵育,室温孵育2-3个小时,孵育结束后再用PBS洗3-4次,每次10-15分钟。最后用抗荧光淬灭封片剂 (Life Technology) 进行封片保存。

[0064] 抗体:

[0065] 本研究中所用一抗包括:荷兰猪抗NeuN (1:500, ABN90, Millipore), 兔抗TH (1:500, AB152, Millipore), 大鼠抗DAT (1:100, MAB369, Millipore), 兔抗RBPMS (Proteintech, Cat#15187-1-AP) 和鼠抗Flag (1:2000, F3165, Sigma),。该研究中使用的二抗为: Cy5-AffiniPure Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L) (1:500, 706-175-148, Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluora-488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (1:

500,711-545-152, Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluora-488 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG(H+L) (1:500,715-545-150, Jackson ImmunoResearch) 和 Cy5 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG(H+L) (1:500,711-175-152, Jackson ImmunoResearch)。

[0066] 电生理记录:

[0067] AAV注射后1-3个月进行电生理学记录。首先将小鼠麻醉并用预冷的NMDA灌流,然后把脑子放入充有二氧化碳的NMDG人工脑脊液(ACSF) [NMDG ACSF (mM): NMDG 92, 氯化钾 2.5, 磷酸二氢钠1.25, 碳酸氢钠30, HEPES20, 葡萄糖25, 硫脲2, 抗坏血酸钠5] 在室温下, 丙酮酸钠3, 氯化钙0.5, 硫酸镁10]。灌注后提取脑并将其置于冰冷的NMDG ACSF溶液中30秒。用震动切片以0.04-0.05mm/s的速度切成厚度为250-350 $\mu$ m的厚脑片。将脑切片移入充满二氧化碳NMDG ACSF的培养皿中,并在32-34 $^{\circ}$ C保持 $\leq$ 12分钟。在室温下将切片转移到充有二氧化碳的HEPES ACSF的新的培养皿中 [HEPES, 其中含有ACSF (mM): 氯化钠92, 氯化钾2.5, 磷酸二氢钠1.25, 碳酸氢钠30, HEPES 20, 葡萄糖25, 硫脲2, 抗坏血酸钠5, 丙酮酸钠3, 氯化钙 2, 硫酸镁2]。1小时后将切片转移到含有记录缓冲液 [记录ACSF (mM): 氯化钠119, 氯化钾 2.5, 磷酸二氢钠1.25, 碳酸氢钠24, 葡萄糖12.5, 氯化钙2, 硫酸镁2] 的记录皿中。在显微镜 (Olympus BX51WI) 下记录具有红色荧光信号的神经元样细胞, 并使用Clampex 10捕获转分化细胞的电活动。

[0068] 6-OHDA PD小鼠模型

[0069] 本实验所使用的小鼠为成年C57BL/6小鼠(7-10周)小鼠。在麻醉前半小时腹腔注射25mg/kg盐酸地昔帕明(D3900, Sigma-Aldrich)。麻醉后, 向小鼠右侧内侧前脑束注射3 $\mu$ g 6-OHDA (H116, Sigma-Aldrich) 或生理盐水: 前后位(A/P) = -1.2mm, 内外侧(M/L) = -1.1mm, 背腹(D/V) = -5mm。手术后1小时, 给小鼠皮下注射1ml 4%的葡萄糖-盐水溶液。

[0070] 阿扑吗啡诱导的旋转试验

[0071] 在测试前10分钟给小鼠腹腔注射0.5mg/kg阿扑吗啡(A4393, Sigma-Aldrich)。测试时, 将小鼠各自放置在不透明的圆柱体(直径30cm)中, 由摄像机在其上方记录20分钟的行为。旋转的定义为全身转向, 其中一个后爪作为中心并且没有头部朝向的改变。统计注射一侧和注射的对侧旋转数, 并将数据量化为20分钟内的对侧逆转数。

[0072] 圆筒试验

[0073] 将小鼠轻轻放到玻璃烧杯(1000ml)中, 在其前面用录相机记录10分钟的行为。分别计算注射侧和注射对侧前肢触壁次数, 并将数据量化为同侧触壁数与总触壁数的比率。

[0074] 转杆试验

[0075] 将小鼠先进行2天训练, 在第3天进行行为测试。第1天, 转杆以4圈/分钟的固定速度训练小鼠4次, 每次300秒。第2天, 以4至40圈/分钟的加速方式训练小鼠4次。第三天以4-40圈/分钟的方式进行行为测试, 测试4次。将小鼠在脱落前在杆上停留的时间记录为停留期, 并且使用3个最长停留期的平均值进行分析。

[0076] NMDA造模:

[0077] 为研究在受损视网膜中是否可以再生RGC, 用PBS中配制200mM的NMDA溶液, 然后通过玻璃体内注射, 将1.5 $\mu$ l NMDA溶液注到4-8周龄的Ai9小鼠或5-6周龄的C57BL/6小鼠的眼睛中(用于VEP和黑白场景偏好测试)。NMDA注射2-3周后, GFAP-GFP-Cre与GFAP-CasRx-REST或GFAP-CasRx一起通过视网膜下注射共同递送至视网膜。为了评估受损视网膜的功能营救

(VEP和明暗箱穿梭实验),对5周到12个月年的小鼠(C57BL/6)注射NMDA诱导视网膜损伤,并在注射2-3周后在视网膜下注射GFAP-mCherry(0.1 $\mu$ l)与PBS(0.9 $\mu$ l)或GFAP-RZFD-V1(0.9 $\mu$ l)/GFAP-RZFD-V2(0.9 $\mu$ l)/GFAP-RZFD-V3(0.9 $\mu$ l)混合物。

[0078] 视网膜下AAV注射

[0079] 在Olympus显微镜(Olympus,日本东京)下用Hamilton注射器(32G针)向眼睛注射高滴度( $>1 \times 10^{13}$ vg/ml)AAV。为确定完整视网膜中的重编程,通过视网膜下注射(Ai9和C57BL/6小鼠,4周到12个月年龄)将共计1 $\mu$ l的GFAP-GFP-Cre(0.1 $\mu$ l)+pbs(0.9 $\mu$ l),或GFAP-GFP-Cre(0.1 $\mu$ l)和GFAP-RZFD-V1(0.9 $\mu$ l)/GFAP-RZFD-V2(0.9 $\mu$ l)/GFAP-RZFD-V3(0.9 $\mu$ l)注射至视网膜下。

[0080] 视网膜取材和切片:

[0081] AAV注射1-3个月后,取眼睛,视神经和脑组织,用4%多聚甲醛(PFA)固定2小时(眼睛和视神经)或24小时(脑部),然后在30%蔗糖溶液中脱水2h(眼睛)或24(脑)小时,视神经直接用PBS清洗后封片观察。然后用OCT进行包埋,将眼睛和大脑进行切片,厚度为30 $\mu$ m。

[0082] 视网膜免疫荧光染色:

[0083] 用于免疫荧光染色的一抗:兔抗RBPMS(1:500,15187-1-AP,Proteintech),小鼠抗Brn3a(1:100,MAB1585,Millipore),兔抗Sox9(1:500,AB5535,Millipore),兔抗Prox1(1:500,AB5475,Millipore),兔抗Pax6(1:500,901301,Biolegend)。二抗为:Cy<sup>TM</sup>5 AffiniPure Donkey小鼠抗IgG(H+L)(1:500,715-175-150,Jackson ImmunoResearch)和Cy<sup>TM</sup>5 AffiniPure Donkey兔抗IgG(H+L)(1:500,711-175-152,Jackson ImmunoResearch)。一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,然后用PBS清洗3遍,每次10分钟。二抗室温孵育2-3h,再用PBS清洗3遍,每次10分钟。最后用抗荧光淬灭剂封片(Life technology),并使用Olympus FV3000显微镜进行成像。

[0084] 视网膜电生理记录

[0085] 提前一天将小鼠放入暗室中暗适应过夜。在红外显微镜下,在含126mM NaCl、2.5mM KCl、1.25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2mM CaCl<sub>2</sub>、2mM NaHCO<sub>3</sub>和10mM葡萄糖的含氧(95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>)人工脑脊液(ACSF)中进行视网膜解剖。在正置显微镜的台面上,将视网膜的RGC面向细胞记录槽放置。使用双光子( $\lambda=1030$ nm)显微镜识别神经节细胞层中的tdTomato阳性细胞,并在红外光下对它们进行细胞贴附记录。用于记录的电极(4-7M $\Omega$ )中添加了ACSF和0.25mM Alexa488荧光染料。使用Multiclamp 700A放大器和pClamp10软件套组(Molecular Devices)进行记录。在1kHz将信号低通滤波,在10kHz数字化。用白色LED光传进行全视野光刺激。记录完毕后,用电流脉冲将荧光染料注入细胞,以标记记录的细胞。

[0086] 小鼠视觉诱发电位

[0087] 用芬太尼(0.05mg/kg)、咪达唑仑(5mg/kg)和美托咪定(0.5mg/kg)的混合物进行小鼠腹腔注射以麻醉小鼠。小鼠头部用脑立体定位仪固定,并通过加热垫使其体温维持在37 $^{\circ}$ C。在视皮层(V1)(AP-3.6至-3.9mm,ML 2.2mm)的两侧上方进行开颅(直径约1mm),并小心去除硬脑膜。视觉刺激由17英寸液晶显示器(De11 P170S,最大亮度69cd/m<sup>2</sup>)发出,该显示器距离记录端的眼睛8厘米,同时遮挡记录端同侧的眼部侧边免受视觉刺激影响。我们进行了100次2秒的重复闪光刺激(全视野,100%对比度),间隔为2秒。使用多位点硅探头(A1 $\times$ 16-5mm-50-177,NeuroNexus Technologies)在V1(AP-3.6至-3.9mm,ML 2.2mm)进行记

录,每次记录的电极尖端达到的皮质深度约为900 $\mu\text{m}$ 。参考线和接地线都放置在离记录点至少3毫米的位置。使用Cerebus 32通道系统(Blackrock microsystems)对信号进行放大并过滤神经反应。使用宽带前端滤波器(0.3~500Hz)在2kHz或10kHz对局部场电位(LFP)信号进行采样。LFP对全屏闪光刺激的反应被用于电流源密度(CSD)分析,以确定皮质层43的位置。为了生成CSD分布剖面图,我们用以下方程计算了LFP的二阶空间导数:

$$[\text{0088}] \quad (\partial^2 \phi) / (\partial z^2) \approx (\phi(z-n\Delta z) + \phi(z+n\Delta z) - 2\phi(z)) / [(n\Delta z)]^2,$$

[0089] 其中 $\phi$ 是LFP, $z$ 是记录端的坐标, $\Delta z$ 是相邻记录端之间的距离, $n\Delta z$ 是分化网格( $n=2$ )。层4(粒状层)被定为那些在初始电流接受器处的记录位置。我们使用了显示最大平均振幅的层4通道来分析每只小鼠的视觉诱发反应。

[0090] 黑白盒偏好测试

[0091] 用于黑白偏好测试的箱体包含两个部分,三分之一的暗箱部分和三分之二明箱部分(550-600流明)。小鼠可以在两个隔室之间自由移动,放入小鼠后用摄像头记录10分钟。统计小鼠在明室和暗室中的时间,并使用Ethovision XT软件进行分析。每次试验后,用70%乙醇擦拭箱体以避免嗅觉干扰。

[0092] PD模型猴制作

[0093] 本研究中所使用的食蟹猴为成年(7-10岁)的雄性食蟹猴。为了获得稳定的帕金森病疾病动物模型,通过静脉注射MPTP(1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶)对齐造模。在连续注射1周后,动物开始出现表型,并根据动物表型进行注射量的调节。在其脑内黑质区的多巴胺神经元因而大量凋亡,并持续出现诸如震颤、运动迟缓和平衡能力受损等的疾病表型后停止给药。并连续监测其病理表型,稳定持续了五周表现出病理表型后进行AAV注射。

[0094] 正电子发射计算机断层显像实验

[0095] 为了在猴脑中监测新转化产生的多巴胺神经元的特征和功能,我们在AAV给药前一个月和AAV给药后1-6个月,分别进行了PET显影(核素包括 $^{18}\text{F}$ -FP-CIT, $^{18}\text{F}$ -DTBZ和 $^{18}\text{F}$ -DOPA)。在扫描之前,先对食蟹猴进行诱导麻醉和正常麻醉,然后将动物放入到PET扫描仪中进行扫描,并监测所有生理参数。扫描的原始数据使用了标准分析方法进行分析。

[0096] 食蟹猴中NMDA诱导的视网膜损伤猴

[0097] 将食蟹猴进行麻醉,随后用1ml注射器将浓度为200mM的NMDA溶液注到玻璃体中,以清除大部分RGC。在注射后的1周内,每天给猴子涂抹适量的迪可罗眼膏,防止其产生感染或眼部红肿。

[0098] 食蟹猴视网膜下注射:

[0099] 首先将NMDA造模后2-3周的造模猴子进行麻醉和扩瞳,然后进行AAV注射。用1ml注射器先在巩膜和角膜交界的边缘进行造孔,然后用100 $\mu\text{l}$ 的Hamilton的平头针注射器进行AAV注射。将实验组或对照组的病毒混合液(100 $\mu\text{l}$ )缓慢注射到其视网膜下,注射后拔出针头并施用眼药膏。注射后连续7天给动物涂抹迪可罗眼膏,防止产生眼部感染或红肿。

[0100] 食蟹猴行为学实验和视频分析

[0101] 为了进行视频分析,猴子在给药前、给药后1到12月进行了行为学录像,并在录像收集完后进行了分析。猴子的PD症状通过以下几个分项进行分析:头部运动、面部表情、自主运动、刺激后运动、震颤、身体姿势和步态。

[0102] 食蟹猴组织取材和切片

[0103] 对于食蟹猴脑组织切片和染色, AAV注射后1-6个月对猴子进行安乐死, 然后进行生理盐水和4% PFA灌流, 并取脑组织放入到4%的PFA中继续固定1周。固定完成后, 将组织取出, 放入到30%的蔗糖溶液中进行脱水处理1-2周。然后进行切片, 将脑组织切成合适的大小, 用OCT包埋剂进行包埋, 并在冰冻切片机上进行切片, 切片厚度30-40 $\mu$ m。对于视网膜取材, 与取脑组织类似, AAV注射后大约1-6个月后进行安乐死, 然后用生理盐水和4%的PFA进行灌流, 将眼睛、视神经和大脑取出并用4%多聚甲醛 (PFA) 固定1-2周, 然后放入到30%蔗糖溶液中脱水。包埋后, 将眼睛和大脑切成30-40 $\mu$ m的薄片。

[0104] 食蟹猴组织免疫荧光染色:

[0105] 食蟹猴脑组织染色步骤与小鼠类似, 加一抗后在4 $^{\circ}$ C孵育24小时, 用PBS洗3-4次, 每次15-20分钟, 清洗后再加入二抗进行孵育, 常温孵育6-8小时, 用PBS洗3-4次, 每次15-20分钟, 然后再用抗荧光淬灭封片剂封片并保存。食蟹猴视网膜组织染色步骤与小鼠视网膜组织染色步骤类似, 首先用PBS清洗3遍, 每次10-15分钟, 然后在湿盒中进行染。首先, 用抗体稀释液稀释一抗, 并加入到切片中, 完全覆盖切片, 4 $^{\circ}$ C染色12-24小时, 然后用PBS进行清洗3-4次, 每次10-15分钟。然后进行二抗染色, 抗体全覆盖组织样本, 室温孵育6-8小时。再用PBS清洗3-4次, 每次10-15分钟, 最后用抗荧光淬灭剂进行封片。

[0106] 统计分析:

[0107] 由s.e.m.设置误差线, 以非成对双尾t检验或单因素方差分析计算统计学显著性 ( $p < 0.05$ )。所有实验均随机制定, 未使用统计学方法预确定样本量。假设数据分布正常但未经正式检验。数据收集和分析并未在盲实验条件下进行。

[0108] 实施例

[0109] 实施例1.REST变体的构建

[0110] 为了实现对RE1的调控, 我们利用REST能结合于RE1的特点, 挖掘其内源锌指蛋白 (ZF) 的RE1结合结构域来调控RE1, 称为RZFD (REST Zinc Finger Domain)。通过结构域预测和蛋白结构建模, 我们发现人源REST蛋白的第159-412位包含8个锌指蛋白结构域 (图1A)。为了进一步调控RE1控制的神经相关蛋白的表达, 我们在RZFD的C-末端融合了一个基因表达调控因子VP64和P65-HSF1, 构建成RZFD-VP64和RZFD-P65-HSF1 (图1B)。VP64和P65-HSF1可以招募转录因子和组蛋白乙酰化等蛋白到RE1附近, 调控RE1附近的染色体结构, 让其控制的基因能够表达。在非神经元 (如: 胶质细胞) 中, REST复合体结合于RE1, 在复合体中的组蛋白去乙酰化酶和甲基化酶作用下, RE1附近的染色质转变为致密状态, 神经元相关基因表达关闭 (图1C)。我们在非神经元细胞 (如: 胶质细胞) 中表达RZFD、RZFD-VP64或RZFD-P65-HSF1, RZFD、RZFD-VP64或RZFD-P65-HSF1与RE1竞争性结合, 阻止了REST沉默体与RE1的结合 (图1D, E和F)。RZFD的机制是通过与RE1竞争性结合, 而RZFD-VP64和RZFD-P65-HSF1不仅能竞争性结合于RE1, 还能进一步改变RE1附件的染色体状态, 促进其调控的神经相关基因的表达。

[0111] 实施例2.RZFD将星形胶质细胞转分化为神经元

[0112] 为了在小鼠体内实现胶质细胞向神经元细胞的转分化, 我们构建了AAV表达载体。为了特异性标记星形胶质细胞, 我们利用星形胶质细胞特异性启动子GFAP驱动mCherry表达, 人源RZFD也由GFAP启动子驱动, 特异性表达于星形胶质细胞中 (图2A)。为了检测注射后2周或2周以上的时间是否能诱导胶质细胞转分化为神经元或者多巴胺神经元, 我们分别在

注射AAV后2周或1.5个月进行取材,并进行NeuN和TH染色(图2B)。在8周龄的C57小鼠的纹状体或者黑质中注射GFAP-mCherry或GFAP-mCherry+GFAP-RZFD,其中单独注射GFAP-mCherry为对照组(图2C)。我们以前的研究表明,注射后1周到注射后3个月,在对照组中都不会有神经元的产生。与之前的研究结果一致,在注射对照组AAV2周后,我们没有观察到神经元的产生(图2D)。而在实验组中,我们发现注射后2周,可以观察到部分细胞已经开始变形,并有少部分细胞已经开始表达神经元特异性标志物NeuN(图2E)。这表明在星形胶质细胞中表达RZFD可以将星形胶质细胞转分化为神经元。在注射GFAP-mCherry+GFAP-RZFD的混合AAV病毒1.5个月后进行分析,我们发现大量的mCherry<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>双阳性细胞,这表明RZFD可以高效将星形胶质细胞转分化为神经元。与此同时,我们发现部分mCherry阳性细胞表达TH,这表明RZFD可以将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元(图2F)。

[0113] 实施例3.RZFD-VP64和RZFD-P65-HSF1将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元

[0114] 为了进一步研究调控RE1神经元相关基因的表达,我们构建了RZFD-VP64和RZFD-P65-HSF1的AAV表达载体(图3A)。在胶质细胞特异性启动子GFAP的驱动下,表达RZFD-VP64和RZFD-P65-HSF1。我们在C57小鼠的纹状体或黑质中注射GFAP-mCherry+GFAP-RZFD-VP64的混合AAV,并在注射后1.5个月取材分析(图3B)。我们发现注射GFAP-RZFD-VP64组大部分红色荧光标记的细胞都表达神经元特异性标志物NeuN,同时还有部分细胞表达多巴胺神经元特异性标志物TH(图3C)。我们在DAT-Cre: Ai9小鼠的纹状体或黑质中进行了类似的AAV注射,将GFAP-RZFD-P65-HSF1注射到小鼠的纹状体或黑质中,1.5个月取材分析(图3D)。在DAT-Cre: Ai9小鼠中,只有成都的多巴胺神经元能被标记上,而我们的研究发现在对照组小鼠的纹状体中是没有红色荧光标记的细胞。而注射了GFAP-RZFD-P65-HSF1的DAT-Cre: Ai9小鼠纹状体中有红色细胞产生,经过NeuN和TH染色,我们发现,这些有红色荧光信号的细胞表达神经元特异性标志物NeuN,同时还表达多巴胺神经元特异性标志物TH(图3E)。这表明在胶质细胞中表达RZFD-P65-HSF1能将星形胶质细胞转分化为多巴胺神经元。

[0115] 序列信息

[0116] 人RZFD氨基酸序列(SEQ ID NO.:1)

[0117] KTKPFRCKPCQYEAEESEQFVHHIRVHSAKKFFVEESAQAKARESGSSTAEEGDFSKGPIRCDCRG  
YNTNRYDHYTAHLKHHTRAGDNERYVKCIICTYTTVSEYHWRKHLRNHFPRKVYTCGKCNFYFSR  
KNNYVQHVRTHTGERPYKCELCPSYSSQKTHLTRHMRTHSGEKPFKCDQCSYVASNQHEVTRHARQ  
[0118] VHNGPKPLNCPHCDYKTADRSNFKKHVELHVNPRQFNCPVCDYAASKKCNLQYHFKSKHPTCPNK  
TM

[0119] 人与小鼠RZFD氨基酸序列相似度为95.49%。人RZFD编码序列(SEQ ID NO.:2)

aagacaaaaccccttcgctgtaagccatgccaatatgaagcagaatcgaagaacagttgtgcatcacatcagagttcacagtgctaagaattttgtggaag  
agagtgagagagaagcaggcaaaagccagggaatctggctctccactgcagaagaggagattctccaaggccccattcgctgtgaccgctgcggctac  
aataactaatgatgatcactatacagcacacctgaaacaccacaccagagctggggataatgagcagtgctacaagtgtatcattgacatacacaacagt  
gagcagatcactggaggaaacatttaagaaacattttccaagaaagtatacacatgtggaaatgcaactattttcagacagaaaaacaattatgttcag  
[0120] catgttagaactcatacaggagaacgccatataatgtgaactttgtcctactcaagttctcagaagactcatctaactagacatgctgactcattcaggtga  
gaagccatttaaatgtgatcagtgagttatgtggcctctaatcaacatgaagtaaccgccatgcaagacagttcacaatggcctaacccttaattgcccc  
cactgtgattacaaaacagcagatagaagcaacttcaaaaacatgtagactacatgtgaaccacggcagttcaattgccctgtatgtgactatgcagctcc  
aagaagtgaatctacagatcactcaaatctaaagcatcctactgtcctaataaaacaatg

[0121] NLS-RZFD-V1氨基酸序列(SEQ ID NO.:3)

[0122] MPKKRKRKVGSGKTKPFRCKPCQYEAESSEQFVHHIRVHSAKFFVEESA EKQAKARESGSSTAEEG  
 DFSKGPICRDCRGYNTNRYDHYTAHLKHHTRAGDNERVYKCICTYTTVSEYHWRKHLRNHFPRKV  
 YTCGKCNYSFDRKNNYVQHVRTHTGERPYKCELCPYSSSQKTHLTRHMRTS GEKPFKCDQCSYVA  
 SNQHEVTRHARQVHNGPKPLNCPHCDYKTADRSNFKKHVELHVNPRQFNCPVCDYAASKKCNLQY  
 HFKSKHPTCPNKTM

[0123] NLS-RZFD-V1核苷酸序列 (SEQ ID NO.:4)

atgCCTAAAAAGAAAAGAAAGGTGGGTTCTGGTaa gaccaaaccttctgctgtaagccatgccaatatgaagcagaatctgaag  
 aacagtttgtgcatcacatcacaggtcacagtgctaagaatttttgggaagagagtgagagaaagcaggcaaaagccagggaatctggctctccactgca  
 gaagaggagatttccaaggccccattcgtgtgaccgctgaggctacaataactaatgatgatcactatacagcacacctgaaacaccacaccagag  
 ctggggataatgagcagctacaagtgtatcattgcacatacacaacagtgagcagatcactggaggaacatttaagaaccattttcaaggaaagtat  
 acacatgtggaatgcaactattttcagacagaaaaaacaattatgttcagcatgttagaactatacaggagaacgccatataaatgtgaactttgtcctact  
 caagtctcagaagactcatctaactagacatatgctactcattcaggtgagaagccatttaaatgtgatcagtgagttatgtgcctctaatcaacatgaagta  
 acccgccatgcaagacaggtcacaatggcctaacctcttaattgccacactgtgattacaaaacagcagatagaagcaactcaaaaaacatgtagagct  
 acatgtgaaccacggcagttcaattgccctgtatgtgactatgcagctccaagaagtgtaatctacagatcactcaaatctaagcatcctactgtcctaataa  
 aacaatg

[0125] NLS-RZFD-V2的氨基酸序列 (SEQ ID NO.:5)

MPKKRKRKVGSGKTKPFRCKPCQYEAESSEQFVHHIRVHSAKFFVEESA EKQAKARESGSSTAEEG  
 DFSKGPICRDCRGYNTNRYDHYTAHLKHHTRAGDNERVYKCICTYTTVSEYHWRKHLRNHFPRKV  
 YTCGKCNYSFDRKNNYVQHVRTHTGERPYKCELCPYSSSQKTHLTRHMRTS GEKPFKCDQCSYVA  
 SNQHEVTRHARQVHNGPKPLNCPHCDYKTADRSNFKKHVELHVNPRQFNCPVCDYAASKKCNLQY  
 HFKSKHPTCPNKTMGSGGGGSGGGGSRADALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLDM  
 LGSDALDDFDLDMLYID

[0127] NLS-RZFD-V2的核苷酸序列 (SEQ ID NO.:6)

atgCCTAAAAAGAAAAGAAAGGTGGGTTCTGGTaa gaccaaaccttctgctgtaagccatgccaatatgaagcagaatctgaag  
 aacagtttgtgcatcacatcacaggtcacagtgctaagaatttttgggaagagagtgagagaaagcaggcaaaagccagggaatctggctctccactgca  
 gaagaggagatttccaaggccccattcgtgtgaccgctgaggctacaataactaatgatgatcactatacagcacacctgaaacaccacaccagag  
 ctggggataatgagcagctacaagtgtatcattgcacatacacaacagtgagcagatcactggaggaacatttaagaaccattttcaaggaaagtat  
 acacatgtggaatgcaactattttcagacagaaaaaacaattatgttcagcatgttagaactatacaggagaacgccatataaatgtgaactttgtcctact  
 caagtctcagaagactcatctaactagacatatgctactcattcaggtgagaagccatttaaatgtgatcagtgagttatgtgcctctaatcaacatgaagta  
 acccgccatgcaagacaggtcacaatggcctaacctcttaattgccacactgtgattacaaaacagcagatagaagcaactcaaaaaacatgtagagct  
 acatgtgaaccacggcagttcaattgccctgtatgtgactatgcagctccaagaagtgtaatctacagatcactcaaatctaagcatcctactgtcctaataa  
 aacaatgGGTAGTGGCGGTGGTGGTTCAGGAGGCGGCGGAAGCCGCGCCGACGCGCTGGACGATTT  
 CGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACG  
 CATTGGATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTTCGATCTCGATATGTT  
 ATATATCGAT

[0130] VP64氨基酸序列 (SEQ ID NO.:7)

[0131] RADALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLDMLYID

[0132] VP64核苷酸序列 (SEQ ID NO.:8)

CGCGCCGACGCGCTGGACGATTTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCCTCGATGACTTTGA  
 CCTGGATATGTTGGGAAGCGACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGATGCTCT  
 GGACGATTTTCGATCTCGATATGTTATATATCGAT

[0134] NLS-RZFD-V3氨基酸序列 (SEQ ID NO.:9)

[0135] MPKKRKRKVGSGKTKPFRCKPCQYEAESSEQFVHHIRVHSAKKFFVEESAQAKARESGSSTAEEG  
 DFSKGPIRCRCGYNTNRYDHYTAHLKHHTRAGDNERVYKCIICTYTTVSEYHWRKHLRNHFPRKV  
 YTCGKCNYSRDRKNNYVQHVRTHHTGERPYKCELCYSSSQKTHLTRHMRTHSGEKPFKCDQCSYVA  
 SNQHEVTRHARQVHNGPKPLNCPHCDYKTADRSNFKKHVELHVNPRQFNCPVCDYAASKKCNLQY  
 HFKSKHPTCPNKTMGSGGGGSGGGGSRADALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLDM  
 LGSDALDDFDLDMLYIDDYKLGSGGGGSGGGGSPSGQISNQALALAPSSAPVLAQTMVPSSAMVPL  
 AQPPAPAPVLTGPPQSLAPVPKSTQAGEGTLSEALLHLQFDAQDEDLGALLGNSTDPGVFTDLASVD  
 NSEFQQLLNQGVSMHSTAEPMLMEYPEAITRLVTVGSQRPPDPAPTPGTSGLPNGLSGDEDFSSIAD  
 MDFSALLSQISSGQGGGSGFVDTALLDLFSPSVTPDMSLPDLSSLASIQELLSPEPPRPEAE  
 NSSPDSGKQLVHYTAQPLFLDPGSVDTGSNDLPVLFELGEGSYFSEGDFGAEDPTISLLTGSEPPKAK  
 DPTVSPKKRKY

[0136] NLS-RZFD-V3核昔酸序列 (SEQ ID NO.:10)

atgCCTAAAAAGAAAAGAAAGGTGGGTTCTGGTaaagacaaacccttcgctgaagccatgccaatatgaagcagaatctgaag  
 aacagttgtgcatcacatcagagttcacagtgctagaatTTTTgtggaagagagtcagagaagcaggcaaaagccagggaatctgctctccactgca  
 gaagaggagatttccaaggcccccttcgctgtgaccgctgcccgtacaataactatgatgatcactatacagcacactgaaacaccacaccagag  
 ctgggataatgagcagctacaagtgtatcattgacatacacaacagtgagcagatcactggaggaacatttaagaacatttccaaggaagat  
 acacatgtggaatgcaactttttcagacagaaaaaacaattatgttcagcatgttagaactatacaggaagcccatataaatgtaactttgctctact  
 caagtctcagaagactcatctaactagacatatgctactcattcaggtgagaagcatttaaatgtatcagtcagttatgtgacctaatcaaatgaagta

[0137]

accgccatgcaagacagttcacaatggcctaacccttaattgccacactgtgattacaaaacagcagatagaagcaactcaaaaaacatgtagagct  
 acatgtgaaccacggcagttcaattgccctgtatgtgactatgagcttccaagaagtgaatctacagatcactcaaatcaagcactcactgtcctaataa  
 aacaatGGTAGTGGCGGTGGTGGTTCAGGAGGCGGCGGAAGCCGCGCCGACGCGCTGGACGATTT  
 CGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACG  
 CATTGGATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTCGATCTCGATATGTT  
 ATATATCGATGATTACAAGCTTGGTAGTGGCGGTGGTGGTTCAGGAGGCGGCGGAAGCCCTCAG  
 GGCAGATCAGCAACCAGGCCCTGGCTCTGGCCCCTAGCTCCGCTCCAGTGCTGGCCCAGACTATG  
 GTGCCCTCTAGTGCTATGGTGCCTCTGGCCCAGCCACCTGCTCCAGCCCCTGTGCTGACCCAGG  
 ACCACCCAGTCACTGAGCGCTCCAGTGCCCAAGTCTACACAGGCCGCGGAGGGGACTCTGAGT  
 GAAGCTCTGCTGCACCTGCAGTTCGACGCTGATGAGGACCTGGGAGCTCTGCTGGGGAACAGCA  
 CCGATCCCGGAGTGTTACAGATCTGGCCTCCGTGGACAACCTCTGAGTTTCAGCAGCTGCTGAAT  
 CAGGGCGTGTCCATGTCTCATAGTACAGCCGAACCAATGCTGATGGAGTACCCCGAAGCCATTAC  
 CCGCTGGTGACCGGCAGCCAGCGGCCCCCGACCCGCTCCAACCTCCCTGGGAACCAGCGGC  
 CTGCCAATGGGCTGTCCGGAGATGAAGACTTCTCAAGCATCGCTGATATGGACTTTAGTGCCCTG  
 CTGTCACAGATTTCTCTAGTGGGCAGGGAGGAGGTGGAAGCGGCTTCAGCGTGACACCAGTG  
 CCCTGCTGGACCTGTTACGCCCTCGGTGACCGTGCCCGACATGAGCCTGCCTGACCTTGACAGC  
 AGCCTGGCCAGTATCCAAGAGCTCCTGTCTCCCCAGGAGCCCCCAGGCCTCCCGAGGCAGAGA  
 ACAGCAGCCCGGATTCAGGGAAGCAGCTGGTGCATACACAGCGCAGCCGCTGTTCTGCTGGA  
 CCCCAGCTCCGTGGACACCGGGAGCAACGACCTGCCGGTGCTGTTGAGCTGGGAGAGGGCTCC  
 TACTTCTCCGAAGGGGACGGCTTCGCCGAGGACCCACCATCTCCCTGCTGACAGGCTCGGAGC  
 CTCCCAAAGCCAAGGACCCCACTGTCTCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTG

[0139] P65-HSF1氨基酸序列 (SEQ ID NO.:11)

PSGQISNQALALAPSSAPVLAQTMVPSSAMVPLAQPPAPAPVLTGPPQSLAPVPKSTQAGEGTLSE  
 ALLHLQFDAQDEDLGALLGNSTDPGVFTDLASVDNSEFQQLLNQGVSMHSTAEPMLMEYPEAITRL  
 VTGSQRPPDPAPTPGTSGLPNGLSGDEDFSSIADMDFSALLSQISSGQGGGSGFVDTALLDLFS  
 PSVTPDMSLPDLSSLASIQELLSPEPPRPEAENSPPDSGKQLVHYTAQPLFLDPGSVDTGSNDL  
 PVLFELEGESYFSEGDFGAEDPTISLLTGSEPPKAKDPTVS

[0141] P65-HSF1核昔酸序列 (SEQ ID NO.:12)

[0142]

CCTTCAGGGCAGATCAGCAACCAGGCCCTGGCTCTGGCCCCTAGCTCCGCTCCAGTGCTGGCCC  
AGACTATGGTGCCCTCTAGTGCTATGGTGCCCTCTGGCCCAGCCACCTGCTCCAGCCCCTGTGCTG  
ACCCAGGACCACCCAGTCACTGAGCGCTCCAGTGCCCAAGTCTACACAGGCCGGCGAGGGG  
ACTCTGAGTGAAGCTCTGCTGCACCTGCAGTTCGACGCTGATGAGGACCTGGGAGCTCTGCTGG  
GGAACAGCACCGATCCCGGAGTGTTACAGATCTGGCCTCCGTGGACAACTCTGAGTTTCAGCA  
GCTGCTGAATCAGGGCGTGTCCATGTCTCATAGTACAGCCGAACCAATGCTGATGGAGTACCCCG  
AAGCCATTACCCGGCTGGTGACCGGCAGCCAGCGCCCCCGACCCCGCTCCAACCTCCCTGGG  
AACCAGCGCCTGCCTAATGGGCTGTCCGGAGATGAAGACTTCTCAAGCATCGCTGATATGGACT  
TTAGTGCCCTGCTGTACAGATTTCTCTAGTGGGCAGGGAGGAGGTGGAAGCGGCTTCAGCGT  
GGACACCAGTGCCCTGCTGGACCTGTTACAGCCCCTCGGTGACCGTGCCCCGACATGAGCCTGCCT  
GACCTTGACAGCAGCCTGGCCAGTATCCAAGAGCTCCTGTCTCCCAGGAGCCCCCAGGCCTC  
CCGAGGCAGAGAACAGCAGCCCGATTACAGGAAGCAGCTGGTGCCTACACAGCGCAGCCGC  
TGTTCTGCTGGACCCCGCTCCGTGGACACCGGGAGCAACGACCTGCCGGTGCTGTTTGAAGCT  
GGGAGAGGGCTCCTACTTCTCCGAAGGGGACGGCTTCGCCGAGGACCCACCATCTCCCTGCTG  
ACAGGCTCGGAGCCTCCCAAAGCCAAGGACCCCACTGTCTCC

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心  
 [0003] <120> 直接转分化治疗神经系统疾病  
 [0004] <160> 12  
 [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0  
 [0006] <210> 1  
 [0007] <211> 266  
 [0008] <212> PRT  
 [0009] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [0010] <400> 1  
 [0011] Lys Thr Lys Pro Phe Arg Cys Lys Pro Cys Gln Tyr Glu Ala Glu Ser  
 [0012] 1 5 10 15  
 [0013] Glu Glu Gln Phe Val His His Ile Arg Val His Ser Ala Lys Lys Phe  
 [0014] 20 25 30  
 [0015] Phe Val Glu Glu Ser Ala Glu Lys Gln Ala Lys Ala Arg Glu Ser Gly  
 [0016] 35 40 45  
 [0017] Ser Ser Thr Ala Glu Glu Gly Asp Phe Ser Lys Gly Pro Ile Arg Cys  
 [0018] 50 55 60  
 [0019] Asp Arg Cys Gly Tyr Asn Thr Asn Arg Tyr Asp His Tyr Thr Ala His  
 [0020] 65 70 75 80  
 [0021] Leu Lys His His Thr Arg Ala Gly Asp Asn Glu Arg Val Tyr Lys Cys  
 [0022] 85 90 95  
 [0023] Ile Ile Cys Thr Tyr Thr Thr Val Ser Glu Tyr His Trp Arg Lys His  
 [0024] 100 105 110  
 [0025] Leu Arg Asn His Phe Pro Arg Lys Val Tyr Thr Cys Gly Lys Cys Asn  
 [0026] 115 120 125  
 [0027] Tyr Phe Ser Asp Arg Lys Asn Asn Tyr Val Gln His Val Arg Thr His  
 [0028] 130 135 140  
 [0029] Thr Gly Glu Arg Pro Tyr Lys Cys Glu Leu Cys Pro Tyr Ser Ser Ser  
 [0030] 145 150 155 160  
 [0031] Gln Lys Thr His Leu Thr Arg His Met Arg Thr His Ser Gly Glu Lys  
 [0032] 165 170 175  
 [0033] Pro Phe Lys Cys Asp Gln Cys Ser Tyr Val Ala Ser Asn Gln His Glu  
 [0034] 180 185 190  
 [0035] Val Thr Arg His Ala Arg Gln Val His Asn Gly Pro Lys Pro Leu Asn  
 [0036] 195 200 205  
 [0037] Cys Pro His Cys Asp Tyr Lys Thr Ala Asp Arg Ser Asn Phe Lys Lys  
 [0038] 210 215 220  
 [0039] His Val Glu Leu His Val Asn Pro Arg Gln Phe Asn Cys Pro Val Cys  
 [0040] 225 230 235 240  
 [0041] Asp Tyr Ala Ala Ser Lys Lys Cys Asn Leu Gln Tyr His Phe Lys Ser

[0042]	245	250	255
[0043]	Lys His Pro Thr Cys Pro Asn Lys Thr Met		
[0044]	260	265	
[0045]	<210> 2		
[0046]	<211> 798		
[0047]	<212> DNA		
[0048]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0049]	<400> 2		
[0050]	aagaccaaac cctttcgctg taagccatgc caatatgaag cagaatctga agaacagttt	60	
[0051]	gtgcatcaca tcagagttca cagtgtctaa aaatTTTTTg tggaagagag tgcagagaag	120	
[0052]	caggcaaaag ccagggaatc tggctcttcc actgcagaag aggagattt ctccaagggc	180	
[0053]	cccattcgct gtgaccgctg cggctacaat actaatcgat atgatcacta tacagcacac	240	
[0054]	ctgaaacacc acaccagagc tggggataat gagcagagtct acaagtgtat catttgaca	300	
[0055]	tacacaacag tgagcgagta tcaactggagg aaacatttaa gaaaccattt tccaaggaaa	360	
[0056]	gtatacacat gtggaaaatg caactatTTT tcagacagaa aaaacaatta tgttcagcat	420	
[0057]	gttagaactc atacaggaga acgcccataat aaatgtgaac tttgtcctta ctcaagtTct	480	
[0058]	cagaagactc atctaactag acatatgcgt actcattcag gtgagaagcc attttaaTgt	540	
[0059]	gatcagtgca gttatgtggc ctctaataca catgaagtaa cccgcatgc aagacagTt	600	
[0060]	cacaatgggc ctaaactct taattgcca cactgtgatt acaaaacagc agatagaagc	660	
[0061]	aactcaaaa aacatgtaga gctacatgtg aaccacggc agttcaattg ccctgtatgt	720	
[0062]	gactatgcag cttccaagaa gtgtaatcta cagtatcact tcaaatctaa gcattcTact	780	
[0063]	tgtcctaata aaacaatg	798	
[0064]	<210> 3		
[0065]	<211> 277		
[0066]	<212> PRT		
[0067]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[0068]	<400> 3		
[0069]	Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ser Gly Lys Thr Lys Pro Phe		
[0070]	1 5 10 15		
[0071]	Arg Cys Lys Pro Cys Gln Tyr Glu Ala Glu Ser Glu Glu Gln Phe Val		
[0072]	20 25 30		
[0073]	His His Ile Arg Val His Ser Ala Lys Lys Phe Phe Val Glu Glu Ser		
[0074]	35 40 45		
[0075]	Ala Glu Lys Gln Ala Lys Ala Arg Glu Ser Gly Ser Ser Thr Ala Glu		
[0076]	50 55 60		
[0077]	Glu Gly Asp Phe Ser Lys Gly Pro Ile Arg Cys Asp Arg Cys Gly Tyr		
[0078]	65 70 75 80		
[0079]	Asn Thr Asn Arg Tyr Asp His Tyr Thr Ala His Leu Lys His His Thr		
[0080]	85 90 95		
[0081]	Arg Ala Gly Asp Asn Glu Arg Val Tyr Lys Cys Ile Ile Cys Thr Tyr		
[0082]	100 105 110		
[0083]	Thr Thr Val Ser Glu Tyr His Trp Arg Lys His Leu Arg Asn His Phe		

[0084]	115	120	125
[0085]	Pro Arg Lys Val Tyr Thr Cys Gly Lys Cys Asn Tyr Phe Ser Asp Arg		
[0086]	130	135	140
[0087]	Lys Asn Asn Tyr Val Gln His Val Arg Thr His Thr Gly Glu Arg Pro		
[0088]	145	150	155
[0089]	Tyr Lys Cys Glu Leu Cys Pro Tyr Ser Ser Ser Gln Lys Thr His Leu		
[0090]	165	170	175
[0091]	Thr Arg His Met Arg Thr His Ser Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Asp		
[0092]	180	185	190
[0093]	Gln Cys Ser Tyr Val Ala Ser Asn Gln His Glu Val Thr Arg His Ala		
[0094]	195	200	205
[0095]	Arg Gln Val His Asn Gly Pro Lys Pro Leu Asn Cys Pro His Cys Asp		
[0096]	210	215	220
[0097]	Tyr Lys Thr Ala Asp Arg Ser Asn Phe Lys Lys His Val Glu Leu His		
[0098]	225	230	235
[0099]	Val Asn Pro Arg Gln Phe Asn Cys Pro Val Cys Asp Tyr Ala Ala Ser		
[0100]	245	250	255
[0101]	Lys Lys Cys Asn Leu Gln Tyr His Phe Lys Ser Lys His Pro Thr Cys		
[0102]	260	265	270
[0103]	Pro Asn Lys Thr Met		
[0104]	275		
[0105]	<210> 4		
[0106]	<211> 831		
[0107]	<212> DNA		
[0108]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0109]	<400> 4		
[0110]	atgcctaaaa agaaaagaaa ggtgggttct ggtaagacca aaccctttcg ctgtaagcca 60		
[0111]	tgccaatatg aagcagaatc tgaagaacag tttgtgcatc acatcagagt tcacagtgtc 120		
[0112]	aagaaatttt ttgtggaaga gagtgcagag aagcaggcaa aagccaggga atctggctct 180		
[0113]	tccactgcag aagagggaga tttctccaag ggccccattc gctgtgaccg ctgctggctac 240		
[0114]	aataactaatc gatatgatca ctatacagca cacctgaaac accacaccag agctggggat 300		
[0115]	aatgagcgag tctacaagtg tatcatttgc acatacacia cagtgagcga gtatcactgg 360		
[0116]	aggaaacatt taagaaacca ttttccaagg aaagtataca catgtggaaa atgcaactat 420		
[0117]	ttttcagaca gaaaaaacia ttatgttcag catgttagaa ctatacagg agaacgcca 480		
[0118]	tataaatgtg aactttgtcc ttactcaagt tctcagaaga ctcatctaac tagacatatg 540		
[0119]	cgtactcatt caggtgagaa gccatttaa tgtgatcagt gcagttatgt ggcctctaat 600		
[0120]	caacatgaag taaccgcca tgcaagacag gttcacaatg ggcctaaacc tcttaattgc 660		
[0121]	ccacactgtg attacaaaac agcagataga agcaactca aaaaacatgt agagctacat 720		
[0122]	gtgaaccac ggcagttcaa ttgccctgta tgtgactatg cagcttccaa gaagtgtaat 780		
[0123]	ctacagtatc acttcaaac taagcatcct acttgccta ataaacaat g 831		
[0124]	<210> 5		
[0125]	<211> 344		



[0168]	305	310	315	320
[0169]	Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe			
[0170]		325	330	335
[0171]	Asp Leu Asp Met Leu Tyr Ile Asp			
[0172]		340		
[0173]	<210> 6			
[0174]	<211> 1032			
[0175]	<212> DNA			
[0176]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0177]	<400> 6			
[0178]	atgcctaaaa agaaaagaaa ggtgggttct ggtaagacca aaccctttcg ctgtaagcca	60		
[0179]	tgccaatatg aagcagaatc tgaagaacag tttgtgcatc acatcagagt tcacagtget	120		
[0180]	aagaaatfff ttgtggaaga gagtgcagag aagcaggcaa aagccaggga atctggctct	180		
[0181]	tccactgcag aagagggaga tttctccaag ggccccattc gctgtgaccg ctgctggctac	240		
[0182]	aataactaatc gatatgatca ctatacagca cacctgaaac accacaccag agctggggat	300		
[0183]	aatgagcgag tctacaagtg tatcatttgc acatacacia cagtgagcga gtatcactgg	360		
[0184]	aggaacatt taagaaacca ttttccaagg aaagtataca catgtggaaa atgcaactat	420		
[0185]	ttttcagaca gaaaaaacia ttatgttcag catgttagaa ctatacagg agaacgcca	480		
[0186]	tataaatgtg aactttgtcc ttactcaagt tctcagaaga ctatctaac tagacatatg	540		
[0187]	cgtaactcatt caggtgagaa gccattaaa tgtgatcagt gcagttatgt ggcctctaat	600		
[0188]	caacatgaag taaccgcca tgcaagacag gttcaaatg ggcctaaacc tcttaattgc	660		
[0189]	ccacactgtg attacaaaac agcagataga agcaactca aaaaacatgt agagctacat	720		
[0190]	gtgaaccac ggcagttcaa ttgccctgta tgtgactatg cagcttcaa gaagtgtaat	780		
[0191]	ctacagtatc acttcaaate taagatcct acttgtccta ataaaacaat gggtagtggc	840		
[0192]	ggtgggtggt caggagcgg cggaagccgc gccgacgcgc tggacgattt cgatctcgac	900		
[0193]	atgctgggtt ctgatgccct cgatgacttt gacctggata tgttggaag cgacgcattg	960		
[0194]	gatgactttg atctggacat gctcggctcc gatgctctgg acgatttca tctcgatatg	1020		
[0195]	ttatatatcg at	1032		
[0196]	<210> 7			
[0197]	<211> 55			
[0198]	<212> PRT			
[0199]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0200]	<400> 7			
[0201]	Arg Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp			
[0202]	1	5	10	15
[0203]	Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp			
[0204]		20	25	30
[0205]	Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp			
[0206]		35	40	45
[0207]	Leu Asp Met Leu Tyr Ile Asp			
[0208]		50	55	
[0209]	<210> 8			

[0210] <211> 165  
 [0211] <212> DNA  
 [0212] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0213] <400> 8  
 [0214] cgcgccgacg cgctggacga tttcgatctc gacatgctgg gttctgatgc cctcgatgac 60  
 [0215] tttgacctgg atatgttggg aagcgacgca ttggatgact ttgatctgga catgctcggc 120  
 [0216] tccgatgctc tggacgattt cgatctcgat atgttatata tcgat 165  
 [0217] <210> 9  
 [0218] <211> 680  
 [0219] <212> PRT  
 [0220] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0221] <400> 9  
 [0222] Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ser Gly Lys Thr Lys Pro Phe  
 [0223] 1 5 10 15  
 [0224] Arg Cys Lys Pro Cys Gln Tyr Glu Ala Glu Ser Glu Glu Gln Phe Val  
 [0225] 20 25 30  
 [0226] His His Ile Arg Val His Ser Ala Lys Lys Phe Phe Val Glu Glu Ser  
 [0227] 35 40 45  
 [0228] Ala Glu Lys Gln Ala Lys Ala Arg Glu Ser Gly Ser Ser Thr Ala Glu  
 [0229] 50 55 60  
 [0230] Glu Gly Asp Phe Ser Lys Gly Pro Ile Arg Cys Asp Arg Cys Gly Tyr  
 [0231] 65 70 75 80  
 [0232] Asn Thr Asn Arg Tyr Asp His Tyr Thr Ala His Leu Lys His His Thr  
 [0233] 85 90 95  
 [0234] Arg Ala Gly Asp Asn Glu Arg Val Tyr Lys Cys Ile Ile Cys Thr Tyr  
 [0235] 100 105 110  
 [0236] Thr Thr Val Ser Glu Tyr His Trp Arg Lys His Leu Arg Asn His Phe  
 [0237] 115 120 125  
 [0238] Pro Arg Lys Val Tyr Thr Cys Gly Lys Cys Asn Tyr Phe Ser Asp Arg  
 [0239] 130 135 140  
 [0240] Lys Asn Asn Tyr Val Gln His Val Arg Thr His Thr Gly Glu Arg Pro  
 [0241] 145 150 155 160  
 [0242] Tyr Lys Cys Glu Leu Cys Pro Tyr Ser Ser Ser Gln Lys Thr His Leu  
 [0243] 165 170 175  
 [0244] Thr Arg His Met Arg Thr His Ser Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Asp  
 [0245] 180 185 190  
 [0246] Gln Cys Ser Tyr Val Ala Ser Asn Gln His Glu Val Thr Arg His Ala  
 [0247] 195 200 205  
 [0248] Arg Gln Val His Asn Gly Pro Lys Pro Leu Asn Cys Pro His Cys Asp  
 [0249] 210 215 220  
 [0250] Tyr Lys Thr Ala Asp Arg Ser Asn Phe Lys Lys His Val Glu Leu His  
 [0251] 225 230 235 240

[0252]	Val Asn Pro Arg Gln Phe Asn Cys Pro Val Cys Asp Tyr Ala Ala Ser
[0253]	245 250 255
[0254]	Lys Lys Cys Asn Leu Gln Tyr His Phe Lys Ser Lys His Pro Thr Cys
[0255]	260 265 270
[0256]	Pro Asn Lys Thr Met Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[0257]	275 280 285
[0258]	Ser Arg Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
[0259]	290 295 300
[0260]	Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu
[0261]	305 310 315 320
[0262]	Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe
[0263]	325 330 335
[0264]	Asp Leu Asp Met Leu Tyr Ile Asp Asp Tyr Lys Leu Gly Ser Gly Gly
[0265]	340 345 350
[0266]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ser Gly Gln Ile Ser Asn Gln
[0267]	355 360 365
[0268]	Ala Leu Ala Leu Ala Pro Ser Ser Ala Pro Val Leu Ala Gln Thr Met
[0269]	370 375 380
[0270]	Val Pro Ser Ser Ala Met Val Pro Leu Ala Gln Pro Pro Ala Pro Ala
[0271]	385 390 395 400
[0272]	Pro Val Leu Thr Pro Gly Pro Pro Gln Ser Leu Ser Ala Pro Val Pro
[0273]	405 410 415
[0274]	Lys Ser Thr Gln Ala Gly Glu Gly Thr Leu Ser Glu Ala Leu Leu His
[0275]	420 425 430
[0276]	Leu Gln Phe Asp Ala Asp Glu Asp Leu Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser
[0277]	435 440 445
[0278]	Thr Asp Pro Gly Val Phe Thr Asp Leu Ala Ser Val Asp Asn Ser Glu
[0279]	450 455 460
[0280]	Phe Gln Gln Leu Leu Asn Gln Gly Val Ser Met Ser His Ser Thr Ala
[0281]	465 470 475 480
[0282]	Glu Pro Met Leu Met Glu Tyr Pro Glu Ala Ile Thr Arg Leu Val Thr
[0283]	485 490 495
[0284]	Gly Ser Gln Arg Pro Pro Asp Pro Ala Pro Thr Pro Leu Gly Thr Ser
[0285]	500 505 510
[0286]	Gly Leu Pro Asn Gly Leu Ser Gly Asp Glu Asp Phe Ser Ser Ile Ala
[0287]	515 520 525
[0288]	Asp Met Asp Phe Ser Ala Leu Leu Ser Gln Ile Ser Ser Ser Gly Gln
[0289]	530 535 540
[0290]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Phe Ser Val Asp Thr Ser Ala Leu Leu Asp
[0291]	545 550 555 560
[0292]	Leu Phe Ser Pro Ser Val Thr Val Pro Asp Met Ser Leu Pro Asp Leu
[0293]	565 570 575

[0294] Asp Ser Ser Leu Ala Ser Ile Gln Glu Leu Leu Ser Pro Gln Glu Pro  
 [0295] 580 585 590  
 [0296] Pro Arg Pro Pro Glu Ala Glu Asn Ser Ser Pro Asp Ser Gly Lys Gln  
 [0297] 595 600 605  
 [0298] Leu Val His Tyr Thr Ala Gln Pro Leu Phe Leu Leu Asp Pro Gly Ser  
 [0299] 610 615 620  
 [0300] Val Asp Thr Gly Ser Asn Asp Leu Pro Val Leu Phe Glu Leu Gly Glu  
 [0301] 625 630 635 640  
 [0302] Gly Ser Tyr Phe Ser Glu Gly Asp Gly Phe Ala Glu Asp Pro Thr Ile  
 [0303] 645 650 655  
 [0304] Ser Leu Leu Thr Gly Ser Glu Pro Pro Lys Ala Lys Asp Pro Thr Val  
 [0305] 660 665 670  
 [0306] Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
 [0307] 675 680  
 [0308] <210> 10  
 [0309] <211> 2040  
 [0310] <212> DNA  
 [0311] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0312] <400> 10  
 [0313] atgcctaaaa agaaaagaaa ggtgggttct ggtaagacca aaccctttcg ctgtaagcca 60  
 [0314] tgccaatatg aagcagaatc tgaagaacag tttgtgcatc acatcagagt tcacagtget 120  
 [0315] aagaaatfff ttgtggaaga gagtgcagag aagcaggcaa aagccagga atctggctct 180  
 [0316] tccactgcag aagaggaga tttctcaag ggccccattc gctgtgaccg ctgchgctac 240  
 [0317] aataactaatc gatatgatca ctatacagca cacctgaaac accacaccag agctggggat 300  
 [0318] aatgagcgag tctacaagtg tatcatttgc acatacaca cagtgagega gtatcactgg 360  
 [0319] aggaaacatt taagaaacca ttttcaagg aaagtataca catgtggaag atgcaactat 420  
 [0320] ttttcagaca gaaaaaaca ttatgttcag catgtagaa ctatacagc agaacgcca 480  
 [0321] tataaatgtg aactttgtcc ttactcaagt tctcagaaga ctcatctaac tagacatag 540  
 [0322] cgtaactcatt caggtgagaa gccatttaa tgtgatcagt gcagttatgt ggctctaat 600  
 [0323] caacatgaag taaccgcca tgcaagacag gttcacaatg ggccaaacc tcttaattgc 660  
 [0324] ccactactgtg attacaaaac agcagataga agcaactca aaaaacatgt agagctacat 720  
 [0325] gtgaaccac gccagttcaa ttgccctgta tgtgactatg cagcttcaa gaagtgtaat 780  
 [0326] ctacagtatc acttcaaatc taagatcct acttgtccta ataaaacaat gggtagtggc 840  
 [0327] ggtggtggtt caggaggcgg cggaagccgc gccgacgcgc tggacgattt cgatctcgac 900  
 [0328] atgctgggtt ctgatgcct cgatgacttt gacctggata tgttgggaag cgacgcattg 960  
 [0329] gatgactttg atctggacat gctcggtcct gatgctctgg acgatttca tctcgatag 1020  
 [0330] ttatatatcg atgattaca gcttggtagt ggcggtggtg gttcaggagg cggcggaagc 1080  
 [0331] ccttcagggc agatcagcaa ccaggccctg gctctggccc ctagctccgc tccagtgetg 1140  
 [0332] gccagacta tgggtgccctc tagtgetatg gtgcctctgg cccagccacc tgctccagcc 1200  
 [0333] cctgtgctga cccagacc accccagtca ctgagcgctc cagtgccccaa gtctacacag 1260  
 [0334] gccggcgagg ggactctgag tgaagctctg ctgcacctgc agttcgacgc tgatgaggac 1320  
 [0335] ctgggagctc tgctggggaa cagcaccgat cccggagtgt tcacagatct ggctccctg 1380

[0336] gacaactctg agtttcagca gctgctgaat cagggcgtgt ccatgtctca tagtacagcc 1440  
 [0337] gaaccaatgc tgatggagta ccccgaagcc attaccggc tggtgaccgg cagccagcgg 1500  
 [0338] cccccgacc ccgctccaac tccctggga accagcggcc tgcctaattg gctgtccgga 1560  
 [0339] gatgaagact tctcaagcat cgctgatatg gacttttagtg ccctgctgtc acagatttcc 1620  
 [0340] tctagtgggc agggaggagg tggaagcggc ttcagcgtgg acaccagtgc cctgctggac 1680  
 [0341] ctgttcagcc cctcgggtgac cgtgcccgac atgagcctgc ctgacctga cagcagcctg 1740  
 [0342] gccagtatcc aagagetcct gtctccccag gagccccca ggctccccga ggcagagaac 1800  
 [0343] agcagcccg attcagggaa gcagctggtg cactacacag cgcagccgct gttcctgctg 1860  
 [0344] gaccccgct ccgtggacac cgggagcaac gacctgccgg tgctgtttga gctgggagag 1920  
 [0345] ggctctact tctccgaagg ggacggcttc gccgaggacc ccaccatctc cctgctgaca 1980  
 [0346] ggctcggagc ctccaaaagc caaggacccc actgtctccc ccaagaagaa gcgcaaggtg 2040  
 [0347] <210> 11  
 [0348] <211> 313  
 [0349] <212> PRT  
 [0350] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0351] <400> 11  
 [0352] Pro Ser Gly Gln Ile Ser Asn Gln Ala Leu Ala Leu Ala Pro Ser Ser  
 [0353] 1 5 10 15  
 [0354] Ala Pro Val Leu Ala Gln Thr Met Val Pro Ser Ser Ala Met Val Pro  
 [0355] 20 25 30  
 [0356] Leu Ala Gln Pro Pro Ala Pro Ala Pro Val Leu Thr Pro Gly Pro Pro  
 [0357] 35 40 45  
 [0358] Gln Ser Leu Ser Ala Pro Val Pro Lys Ser Thr Gln Ala Gly Glu Gly  
 [0359] 50 55 60  
 [0360] Thr Leu Ser Glu Ala Leu Leu His Leu Gln Phe Asp Ala Asp Glu Asp  
 [0361] 65 70 75 80  
 [0362] Leu Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser Thr Asp Pro Gly Val Phe Thr Asp  
 [0363] 85 90 95  
 [0364] Leu Ala Ser Val Asp Asn Ser Glu Phe Gln Gln Leu Leu Asn Gln Gly  
 [0365] 100 105 110  
 [0366] Val Ser Met Ser His Ser Thr Ala Glu Pro Met Leu Met Glu Tyr Pro  
 [0367] 115 120 125  
 [0368] Glu Ala Ile Thr Arg Leu Val Thr Gly Ser Gln Arg Pro Pro Asp Pro  
 [0369] 130 135 140  
 [0370] Ala Pro Thr Pro Leu Gly Thr Ser Gly Leu Pro Asn Gly Leu Ser Gly  
 [0371] 145 150 155 160  
 [0372] Asp Glu Asp Phe Ser Ser Ile Ala Asp Met Asp Phe Ser Ala Leu Leu  
 [0373] 165 170 175  
 [0374] Ser Gln Ile Ser Ser Ser Gly Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Phe Ser  
 [0375] 180 185 190  
 [0376] Val Asp Thr Ser Ala Leu Leu Asp Leu Phe Ser Pro Ser Val Thr Val  
 [0377] 195 200 205

[0378]	Pro Asp Met Ser Leu Pro Asp Leu Asp Ser Ser Leu Ala Ser Ile Gln
[0379]	210 215 220
[0380]	Glu Leu Leu Ser Pro Gln Glu Pro Pro Arg Pro Pro Glu Ala Glu Asn
[0381]	225 230 235 240
[0382]	Ser Ser Pro Asp Ser Gly Lys Gln Leu Val His Tyr Thr Ala Gln Pro
[0383]	245 250 255
[0384]	Leu Phe Leu Leu Asp Pro Gly Ser Val Asp Thr Gly Ser Asn Asp Leu
[0385]	260 265 270
[0386]	Pro Val Leu Phe Glu Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Phe Ser Glu Gly Asp
[0387]	275 280 285
[0388]	Gly Phe Ala Glu Asp Pro Thr Ile Ser Leu Leu Thr Gly Ser Glu Pro
[0389]	290 295 300
[0390]	Pro Lys Ala Lys Asp Pro Thr Val Ser
[0391]	305 310
[0392]	<210> 12
[0393]	<211> 939
[0394]	<212> DNA
[0395]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0396]	<400> 12
[0397]	ccttcagggc agatcagcaa ccaggccctg gctctggcc ctagctccgc tccagtgetg 60
[0398]	gcccagacta tgggtgccctc tagtgetatg gtgcctctgg cccagccacc tgctccagcc 120
[0399]	cctgtgetga ccccaggacc accccagtca ctgagcgtc cagtgcccaa gtctacacag 180
[0400]	gccggcgagg ggactctgag tgaagctctg ctgcacctgc agttcgacgc tgatgaggac 240
[0401]	ctgggagctc tgctggggaa cagcaccgat cccggagtgt tcacagatct ggcctccgtg 300
[0402]	gacaactctg agtttcagca gctgetgaat caggcgtgt ccatgtctca tagtacagcc 360
[0403]	gaaccaatgc tgatggagta ccccgaagcc attaccggc tggtgaccgg cagccagcgg 420
[0404]	cccccgacc ccgetccaac tcccctggga accagcggcc tgcctaattg gctgtccgga 480
[0405]	gatgaagact tctcaagcat cgctgatatg gactttagt cctgetgtc acagatttcc 540
[0406]	tctagtgggc agggaggagg tggaagcggc ttcagcgtgg acaccagtgc cctgetggac 600
[0407]	ctgttcagcc cctcgggtgac cgtgcccgac atgagcctgc ctgacctga cagcagcctg 660
[0408]	gccagtatcc aagagctct gtctcccag gagccccca ggcctcccga ggcagagaac 720
[0409]	agcagcccgg attcaggga gacagctgtg cactacacag cgcagccgt gttcctgetg 780
[0410]	gaccccgct ccgtggacac cgggagcaac gacctgccg tgctgtttga gctgggagag 840
[0411]	ggctctact tctccgaagg ggacggcttc gccaggacc ccaccatct cctgetgaca 900
[0412]	ggctcggagc ctccaaagc caaggacccc actgtctcc 939

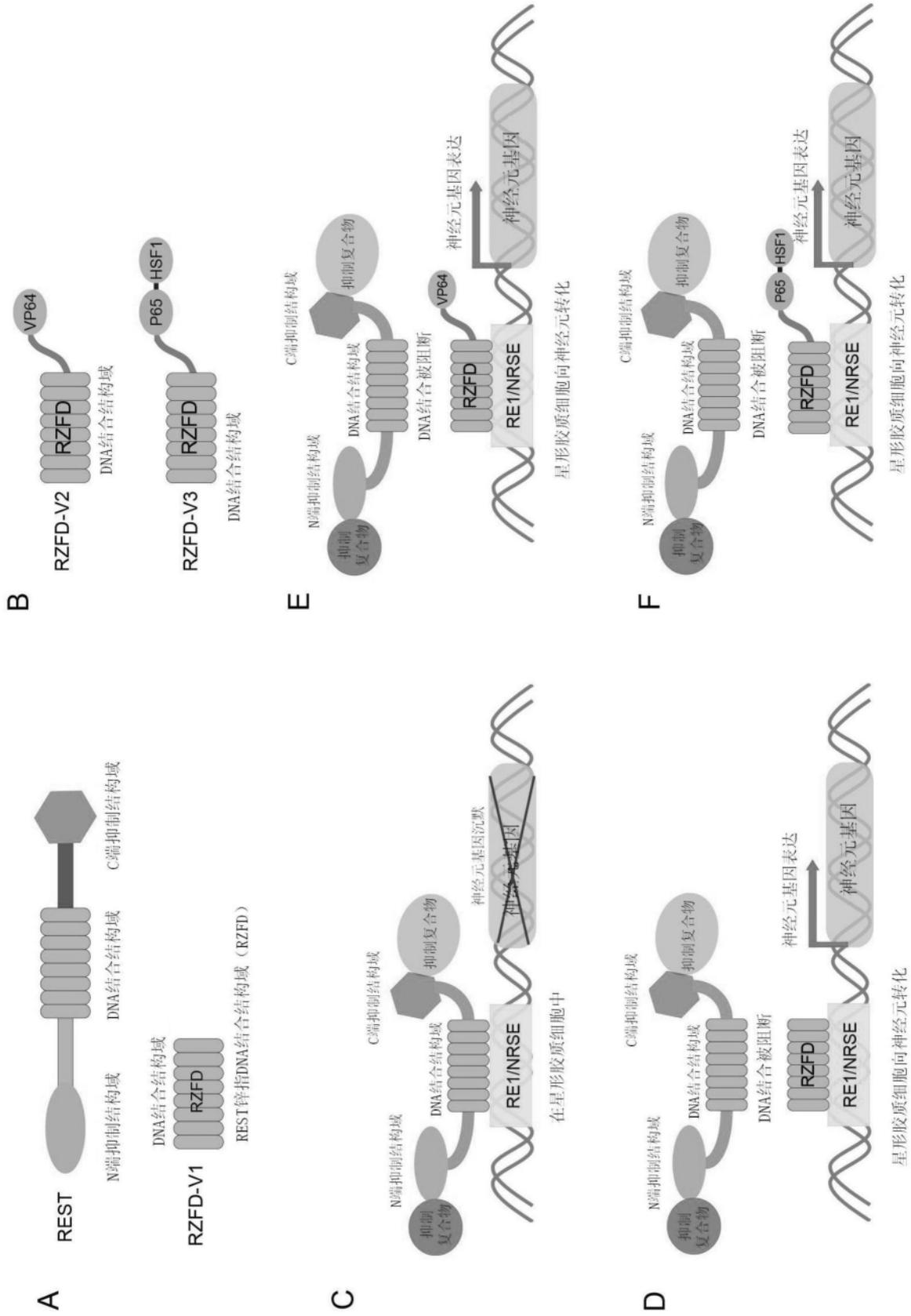


图1

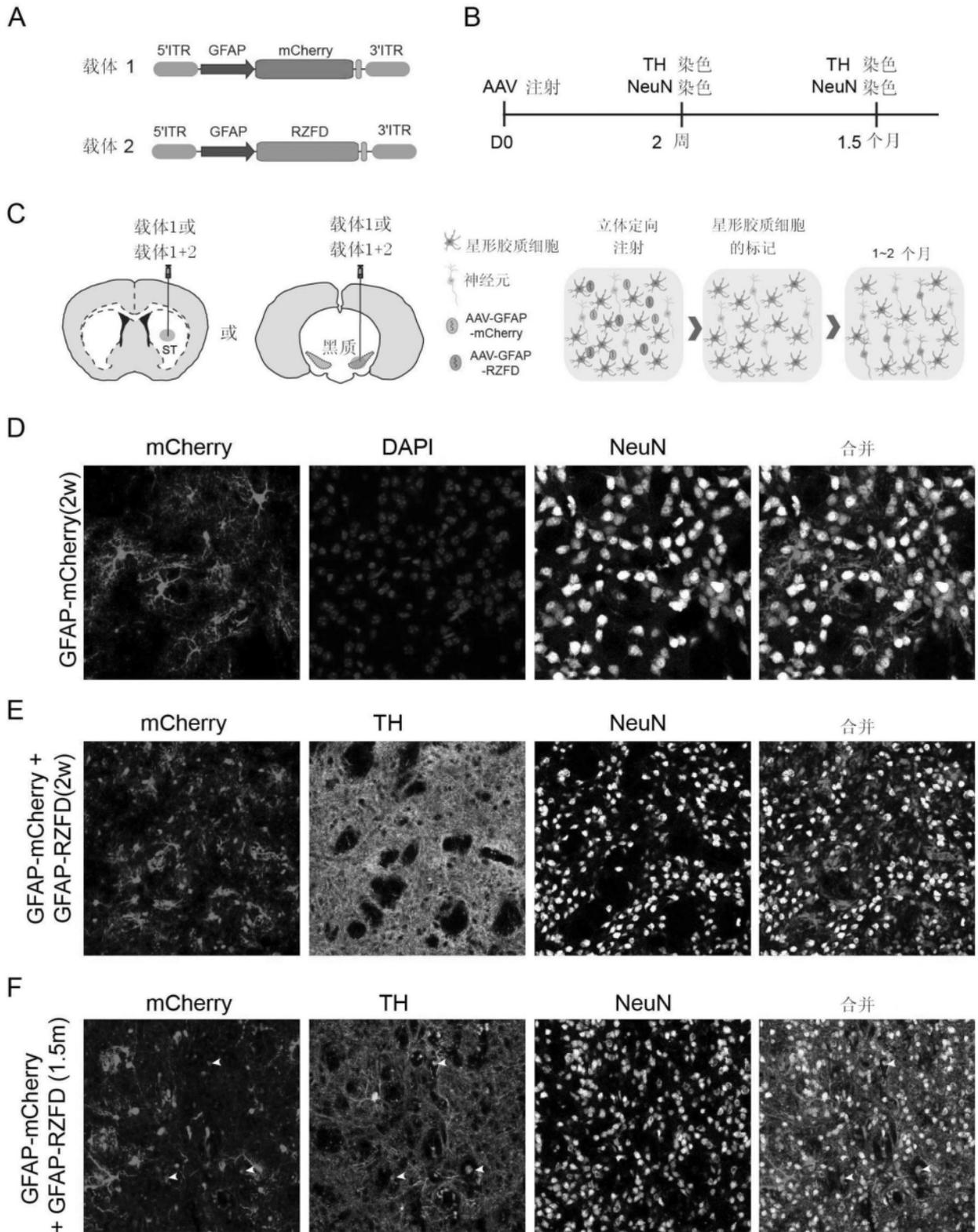


图2

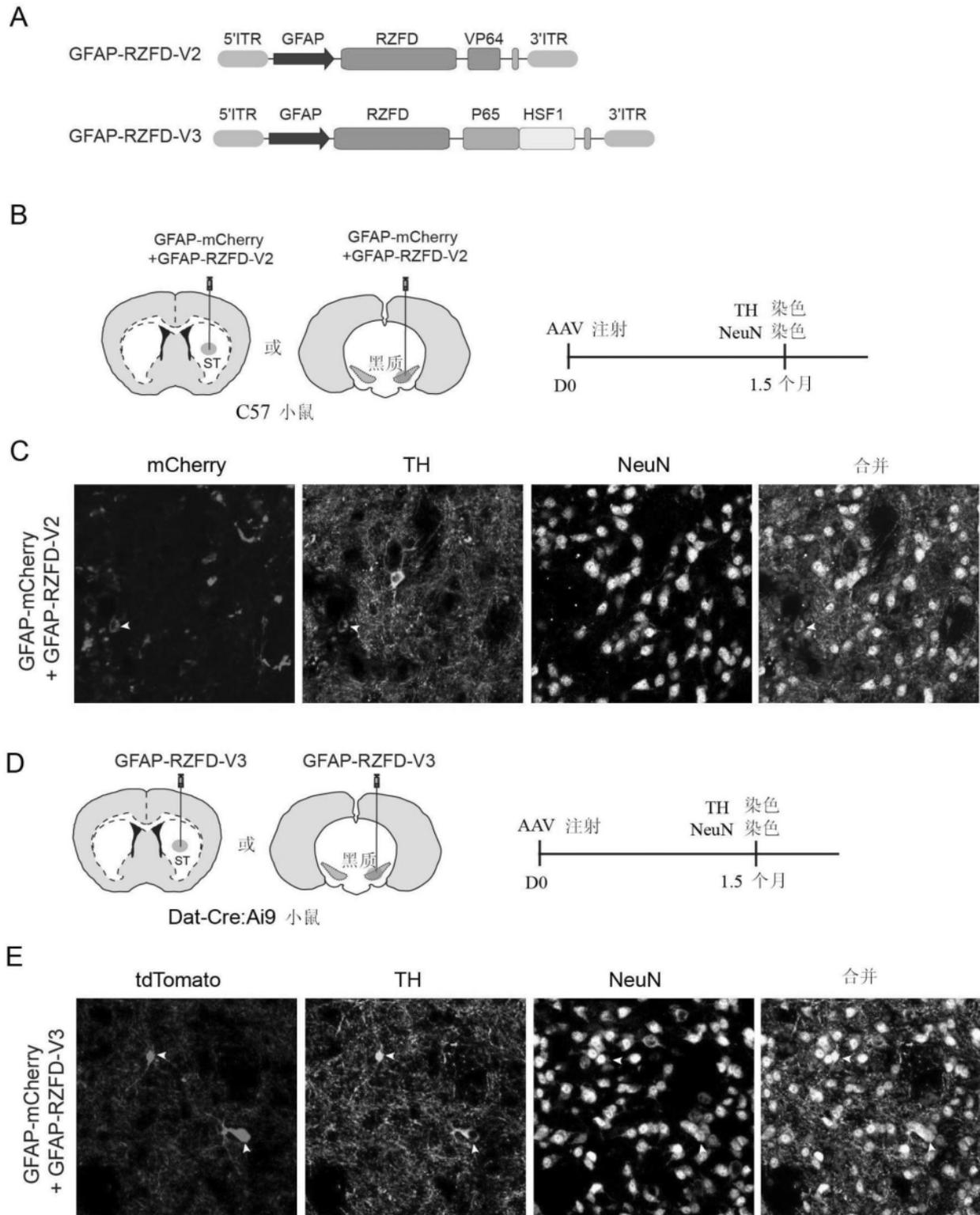


图3