



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106661581 A

(43)申请公布日 2017. 05. 10

(21)申请号 201580026620.5

(22)申请日 2015.03.16

(30)优先权数据

10-2014-0031448 2014.03.18 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.11.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2015/002527 2015.03.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/142012 KO 2015.09.24

(71)申请人 延康生物股份有限公司

地址 韩国大田市

申请人 崔源雄 安庸淳

(72)发明人 金哲熙 朴斗常 崔丁化

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

C07K 14/46(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

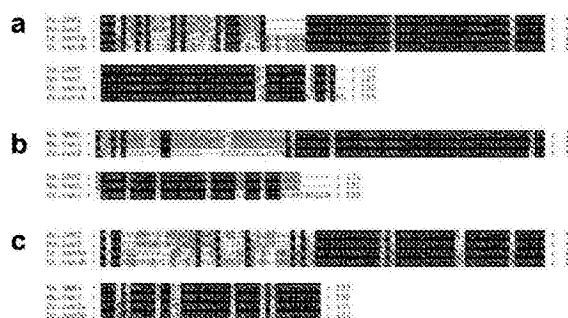
权利要求书2页 说明书18页
序列表18页 附图16页

(54)发明名称

新的SAMDORI2基因及其用途

(57)摘要

本发明涉及用于预防和治疗与脑和神经系统有关的精神疾病的药物组合物,该组合物含有趋化因子样samdori2(Sam2)作为活性成分。作为用于预防和治疗与脑和神经系统有关的精神疾病的药物组合物,包含samdori2作为活性成分的药物组合物具有使用优势,这是因为在构建在缰核中表达的Sam2被特异性敲除的斑马鱼时,确认在新鱼缸、趋暗性和社会凝聚测试中、该斑马鱼显示了比对照相对高水平的恐惧和焦虑行为;确认过量表达Sam2基因的神经细胞中抑制性神经表达降低;确认起因于sam2基因缺失的患者中显示了自闭症和过度焦虑症状。



1. 一种samdori2 (Sam2) 基因, 其具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列。
2. 一种表达载体, 其包含根据权利要求1所述的samdori2基因。
3. 一种转化体, 其通过用根据权利要求2所述的表达载体转化宿主细胞获得。
4. 一种制备表达samdori2的重组转化体的方法, 其包括:
 - 1) 制备根据权利要求2所述的表达载体; 以及
 - 2) 用步骤1) 所述的表达载体转化宿主细胞。
5. 一种samdori2蛋白, 其由根据权利要求1所述的samdori2基因所编码。
6. 一种samdori2蛋白, 其具有SEQ ID NOs:4-6和18-20的任一氨基酸序列。
7. 一种用于预防和治疗精神疾病的药物组合物, 所述组合物含有包括根据权利要求1所述的samdori2基因的表达载体、或samori2蛋白。
8. 根据权利要求7所述的用于预防和治疗精神疾病的药物组合物, 其中所述精神疾病是焦虑综合征、抑郁症、自闭症、躁狂抑郁病、精神分裂症、情绪障碍、睡眠障碍或注意缺陷多动障碍(ADHD)。
9. 一种用于预防和减轻精神疾病的健康食品, 所述食品含有包括根据权利要求1所述的samdori2基因的表达载体、或samori2蛋白。
10. 根据权利要求9所述的用于预防和减轻精神疾病的健康食品, 其中所述精神疾病是焦虑综合征、抑郁症、自闭症、躁狂抑郁病、精神分裂症、情绪障碍、睡眠障碍或注意缺陷多动障碍(ADHD)。
11. 一种用于诊断精神疾病的试剂盒, 其包含根据权利要求1所述的samdori2基因的反义核苷酸、引物集或探针、或针对根据权利要求5所述的samdori2蛋白的适体或抗体。
12. 一种诊断精神疾病的方法, 所述方法包括:
 - 1) 制备细胞, 所述细胞分离自受试者衍生的缰核;
 - 2) 测量在步骤1) 所述的细胞中的根据权利要求1所述的samdori2基因的表达水平; 以及
 - 3) 当与正常对照相比步骤2) 所述的samdori2基因被删除或降低时, 确定精神疾病发生或精神疾病的风险提高。
13. 一种根据权利要求12所述的测量samdori2基因的表达水平的方法, 其中步骤2) 中所述的表达水平是通过选自由RT-PCR、ELISA、蛋白质印迹和免疫组织化学构成的组的任一项测量的。
14. 一种筛选用于预防或治疗精神疾病的试剂的方法, 所述方法包括:
 - 1) 用受试物处理表达根据权利要求1所述的samdori2基因、或根据权利要求5所述的samdori2蛋白的细胞;
 - 2) 在步骤2) 中测量所述samdori2基因或samdori2蛋白的活性或表达; 以及
 - 3) 筛选步骤2) 中所述的samdori2基因或samdori2蛋白的活性或表达得到提高的受试样品。
15. 一种精神疾病的模型动物, 其中在非人动物的缰核中敲除根据权利要求1所述的samdori2基因。
16. 根据权利要求15所述的精神疾病的模型动物, 其中所述动物是小鼠、大鼠或斑马鱼。

17. 根据权利要求15所述的精神疾病的模型动物, 其中所述精神疾病是焦虑综合征、抑郁症、自闭症、躁狂抑郁病、精神分裂症、情绪障碍、睡眠障碍或注意缺陷多动障碍 (ADHD)。

18. 一种制备精神疾病的模型动物的方法, 其包括:

1) 将表达基因剪的载体微注射到非人动物的受精卵中, 所述基因剪特异于根据权利要求1所述的samdori2基因;

2) 饲养步骤1) 中所述的所述动物直到所述动物成年, 然后将所述动物与野生型动物繁育; 以及

3) 在步骤2) 中的繁育的动物中筛选敲除了samdori2基因的动物。

19. 根据权利要求18所述的制备精神疾病的模型动物的方法, 其中所述精神疾病是焦虑综合征、抑郁症、自闭症、躁狂抑郁病、精神分裂症、情绪障碍、睡眠障碍或注意缺陷多动障碍 (ADHD)。

20. 一种预防或治疗精神疾病的方法, 其包括向患有精神疾病的受试者施用药学有效量的包括根据权利要求1所述的samdori2基因的表达载体、或samdori2蛋白。

21. 一种包含根据权利要求1所述的samdori2基因的表达载体、或samdori2蛋白的用途, 其用作用于预防和治疗精神疾病的药物组合物。

22. 一种包含根据权利要求1所述的samdori2基因的表达载体、或samdori2蛋白的用途, 其用作用于预防和治疗精神疾病的健康食品。

23. 一种根据权利要求1所述的samdori2基因的反义核苷酸、引物集或探针、或针对根据权利要求5所述的samdori2蛋白的适体或抗体的用途, 其用于精神疾病的活体外诊断。

新的SAMDOR12基因及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及新的samdori2 (Sam2) 基因,包括所述基因用于诊断、预防或治疗精神疾病的组合物,以及利用所述基因来筛选用于诊断、预防或治疗精神疾病的试剂的方法。

背景技术

[0002] 已知的是世界人口的四分之一在一生中患有精神疾病或神经疾病。并且,已报道的是,在韩国精神疾病的发生率是31.4% (每人生) 和19.3% (每年)。还已经报道的是,在所有年龄组中发生3例精神疾病,在15到44岁之间的年龄中发生6例精神疾病(WHO, 2001)。抑郁症是所有疾病的第四主要病因,被认为到2020年成为继缺血性心脏疾病之后的第二病因。

[0003] 数十年来治疗精神疾病的技术已经大大地改进了,但是人们未能摆脱精神疾病。作为代表性的实例,对于精神分裂症和抑郁症,它们是主要的精神疾病,至少三分之一的患者持续地具有甚至不能被当前的疗法减轻的症状。对于症状减轻的其余病例,由于残余的症状和功能障碍,相当大比例的患者的生活质量降低,这成为了社会和经济的负担因素。特别是,对于精神分裂症,作为当前第一线的疗法,药物治疗在阳性症状中是有效的,但是在阴性症状中或认知功能的改善方面不太有效。因此,急切地需要开发具有改进的效力的治疗试剂。

[0004] 抑郁症,即抑郁障碍,是指一种疾病,其显示了热忱降低和情绪低落作为主要症状,引起各种认知的、心理学的和身体的症状,从而引起日常生活中生活能力的下降。每一生中抑郁障碍的发生率是15%,特别是在女性中约为25%,抑郁障碍是引起情绪、思维、身体状态和行为方面改变的严重的疾病。大多数抑郁症不是由一种原因引起的。更确切地说,由于基因、表观遗传影响、胚胎学的原因以及环境影响,复杂地破坏情绪的各种这些类型的相互作用,发生情感障碍。

[0005] 进一步地,焦虑是指广泛的很不愉快以及隐约不安的感觉,涉及身体的症状,例如心悸和出汗,以及行为症状,例如超敏感性和彷徨。由于抑郁症或焦虑在医院接受专门的精神治疗的患者数量逐年提高。此外,在2002年,抗焦虑药物的销售提高约200%。因而,不夸张地说,抑郁症或焦虑占据了现代人的精神疾病的最大部分,许多人患有抑郁症和焦虑 (Robert.F.Schmidt.Human physiology,p366;Min Seonggil.Latest Psychiatry,pp238-240;S.V.,Pharmacol.Ther.,88,pp 213-227,2000)。当处于焦虑中时,整个大脑处于觉醒状态,从而在外部行为、自主神经系统、感觉和知觉等等方面发生障碍。与这种功能相关的器官的实例包括脑,例如,大脑边缘系统 (特别是海马和扣带回)、大脑皮层 (特别是额叶和颞叶)、下丘脑、上行性网状系统和垂体腺,以及外周的器官,例如甲状腺和肾上腺皮质。根据新近的脑成像研究,已知的是焦虑与右半球、额叶、颞叶和枕叶中的障碍相关 (Robert.F.Schmidt.Human physiology,p366;Min Seonggil.Latest Psychiatry,pp238-240)。

[0006] 作为抗结核试剂发展的异丙异烟肼 (iproniazid) 被证明作为单胺氧化酶抑制剂

具有抗抑郁作用之后,新的抗抑郁药的开发收到鼓舞。作为抗精神病药物的氯丙嗪(Chlorpromazine)在1950年代早期作为抗组胺试剂开发,被证明在精神分裂症的治疗中有作用。类似地,丙米嗪(imipramine)在1955年由Geigy药物公司(Swiss)作为抗组胺试剂来合成。因而,开发受到了鼓舞。通过这些发现,开发了三环抗忧郁药(TCA),具有修饰的三环结构的许多其他的TCA,例如去甲替林(nortriptyline)、多塞平(doxepin)和氯米帕明(clomipramine),以及阿米替林(amitriptyline)和地昔帕明(desipramine)被使用。然后,开发了第二代和第三代抗抑郁药。在1980年代早期,具有类似结构和效力、被称为杂环族化合物(heterocyclics)的四环化合物,例如马普替林(Maprotiline)和阿莫沙平(amoxapine)被商品化。在1980年代,作为选择性的血清素重摄取抑制剂(SSRI)的百忧解(prozac)被开发,作为良好的治疗试剂使用。然而,已经报道的是百忧解具有如下的副作用:显示了口渴、便秘、排尿困难、视觉缺陷和无力(impotence),这些是抗胆碱能的作用;由于对心血管系统的作用,血压、脉搏和心脏传导收到显著影响;由于1-肾上腺素能受体的阻断,发生立位性低血压(orthostatic hypotension)。并且,报道了由于抗组胺作用展现了镇静效应。近年使用的抗抑郁药的实例包括选择性的血清素重摄取抑制剂、血清素去甲肾上腺素重摄取抑制剂、选择性去甲肾上腺素重摄取抑制剂、多巴胺和去甲肾上腺素重摄取抑制剂(DNRI)、去甲肾上腺素和血清素受体拮抗剂(NaSSA)、血清素受体拮抗和血清素重摄取抑制剂(SARI)、选择性血清素重摄取增强剂(SSRE),等。

[0007] 由于近年来在治疗中使用的抗抑郁药显示了低的缓解率,可能不通过新近的药物获得足够的治疗效果,因而估计进一步的抗抑郁药市场将会萎缩。为了克服这个问题,需要发展新概念的治疗试剂,其能克服当前的低缓解率。近年来在治疗中使用的抗抑郁药具有代表性的副作用,例如性功能障碍和体重增加,因而预期的是开发克服了这些副作用的新的抗抑郁药将打开新的市场。近年来在治疗中使用的抗抑郁药的其他关键问题之一是在施用后药物显示效果之前数周或数月的滞后时间。

[0008] 情绪反应例如恐惧和焦虑在作出决策和生存方面起到重要的作用。缰核(habenular nucleus)是位于前脑顶部的脑区域,在进化中维持了高度的同源性。已知的是这个脑区控制对应激、焦虑和恐惧的行为应答,特别已知的是,在人类中,缰核的功能障碍与抑郁、创伤后应激障碍和精神分裂症相关(Hikosaka, Nat. Rev. Neurosci, 11, p 503-513, 2010; Amo, R. et al, J. Neurosci, 30, 1566-1574, 2010)。并且,通过除去斑马鱼和小鼠的缰核组织的实验,已经发现缰核控制恐惧和焦虑反应。然而,对于缰核在情绪调节方面的分子机制的了解和研究是不足的。

[0009] 因此,本发明人认识到在精神疾病如焦虑和抑郁症的预防和治疗方面典型的技术难题,并尝试开发新的神经调质。因而鉴定出在缰核中表达的新的趋化因子样samdori2(Sam2)蛋白质。为了研究Sam2的功能,通过使用锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)基因剪(gene scissor)技术制备的Sam2特异性敲除的斑马鱼被用于新鱼缸、趋暗性(scototaxis)和社会凝聚(social cohesion)测试。因此,已经发现的是,显示了相比对照显著更高的焦虑行为;过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元表达被降低;因由Sam2基因缺失的患者展现了自闭症(autism)和过度焦虑(hyperanxiety)症状。因此,已经发现samdori2可以用于开发用于预防和治疗精神疾病,特别是抑郁症和自闭症的药物组合物,因而完成了本发明。

发明内容

[0010] 发明要解决的问题

[0011] 本发明的一个目的是提供新的samdori2基因,包括所述基因用于诊断、预防或治疗精神疾病的组合物,以及利用所述基因来筛选用于诊断、预防或治疗精神疾病的试剂的方法。

[0012] 用于解决问题的方案

[0013] 为了实现所述目的,本发明提供了具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列的samdori2(Sam2)基因。

[0014] 本发明还提供了表达载体,其包括具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列的samdori2基因。

[0015] 进一步的,本发明提供了通过用包括所述samdori2基因的表达载体转化宿主细胞获得的转化体。

[0016] 本发明还提供了制备表达samdori2的重组转化体的方法,所述方法包括:

[0017] 1) 制备包括samdori2基因的表达载体;以及

[0018] 2) 用所述表达载体转化宿主细胞。

[0019] 进一步的,本发明提供了由所述samdori2基因编码的samdori2蛋白。

[0020] 本发明还提供了具有SEQ ID NOs:4-6和18-20的任一氨基酸序列的samdori2蛋白。

[0021] 进一步的,本发明提供了用于预防和治疗精神疾病的药物组合物,其含有包括samdori2基因的表达载体、或samdori2蛋白。

[0022] 本发明还提供了用于预防和减轻精神疾病的健康食品,其含有包括samdori2基因的表达载体、或samdori2蛋白。

[0023] 进一步的,本发明提供了用于诊断精神疾病的试剂盒,包括samdori2基因的反义核苷酸、引物组或探针、针对samdori2基因编码的samdori2蛋白的适体或抗体。

[0024] 本发明还提供了测量samdori2基因的表达水平的方法,用于监视精神疾病或提供诊断信息,所述方法包括:

[0025] 1) 制备细胞,所述细胞分离自受试者衍生的细胞;

[0026] 2) 测量根据本发明的步骤1)的细胞中具有SEQ ID NO:1-3和15-17的任一碱基序列的samdori2基因的表达水平;以及

[0027] 3) 当与正常对照相比根据本发明的步骤2)的samdori2基因被删除或降低,确定精神疾病发生或风险提高。

[0028] 进一步的,本发明提供了筛选用于预防或治疗精神疾病的试剂的方法,所述方法包括:

[0029] 1) 用样品处理细胞,所述细胞表达具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列的samdori2基因,或具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的碱基序列的samdori2蛋白;

[0030] 2) 测量根据本发明的步骤1)中的samdori2基因或samdori2蛋白的活性或表达;以及

[0031] 3) 筛选受试样品,所述受试样品提高根据本发明的步骤2)中的samdori2基因或

samdori2蛋白的活性或表达。

[0032] 本发明还提供了精神疾病的模型动物,其中在非人动物的缰核中敲除具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列的samdori2基因。

[0033] 进一步的,本发明提供了制备精神疾病的模型动物的方法,所述方法包括:

[0034] 1) 将表达基因剪的载体微注射到非人动物的受精卵中,所述基因剪特异于具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列的samdori2基因;

[0035] 2) 饲养根据本发明的步骤1)中的所述动物直到所述动物成年,然后将所述动物与野生型动物繁育;以及

[0036] 3) 在根据本发明的步骤2)中的繁育的动物中筛选敲除了samdori2基因的动物。

[0037] 发明的效果

[0038] 本发明涉及新的趋化因子样samdori2 (Sam2) 基因以及其用途。通过构建Sam2特异性敲除的斑马鱼(其中,Sam2在缰核中表达),通过新鱼缸、趋暗性和社会凝聚测试发现,所述斑马鱼显示了比对照显著更高的恐惧和焦虑行为;过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元的表达降低;因由sam2基因缺失的患者显示了自闭症和过度焦虑症状,所述Samdori2可以有用地应用于药物组合物的开发,所述药物组合物用于预防和治疗与缰核相关的精神疾病,特别是自闭症和抑郁症。

附图说明

[0039] 附图1和2是显示脊椎动物中保守的SAM基因氨基酸序列的图像。

[0040] 附图3是显示斑马鱼的中枢神经系统中SAM基因家族的特异性表达模式的图像。

[0041] 附图3a-h': 在受精后3天斑马鱼的脑中samdori基因家族表达模式的鉴定。

[0042] 附图3i-j': 受精后24小时斑马鱼的脊髓中SAM3a和SAM3b基因表达的鉴定。

[0043] 附图4是显示使用标志物的Sam2基因表达细胞的表达模式的图像。

[0044] 附图5是显示意识紊乱(mind bomb) (mib) 中SAM基因家族表达模式的图像。

[0045] 附图6a和b是显示在SAM基因当中Sam2基因从早期发育到成年阶段持续表达的图像。

[0046] 附图6c、d、e和f是在Et (-10tpa:mmGFP) hd1转化的Sam2敲除斑马鱼中观察传出轴突(efferent axons)发育获得的图像。

[0047] 附图7是显示利用ZFN,即基因剪技术(gene scissor technique)制备Sam2基因敲除鱼类的图示。

[0048] 附图7a是显示在两个等位基因中得到突变的图示,其中5个Sam2cnu1和17个Sam2cun2碱基缺失。

[0049] 附图7b-b'是显示通过使用突变特异性限制性内切酶(Sam2cnu1)和PCR(Sam2cnu1)对两个等位基因的基因型分离的图示。

[0050] 附图7c-c'是显示受精后3天对照和Sam2突变体的正常发育的胚胎的图像。

[0051] 附图8是显示在Sam2基因敲除斑马鱼中Sam2基因缺失对特定神经元发育的影响的图像。

[0052] 附图8a-a'和b-b'是显示对照和Sam2基因敲除斑马鱼的多巴胺神经元标志物表达模式比较的图像。

[0053] 附图8c-c'、f-f'和l-l'是显示对照和Scm2基因敲除斑马鱼的血清素神经元标志物表达模式比较的图像。

[0054] 附图8d-d'是显示对照和Sam2基因敲除斑马鱼的催产素神经元标志物表达模式比较的图像。

[0055] 附图8e-e'是显示对照和Sam2基因敲除斑马鱼脚间核表达模式比较的图像。

[0056] 附图8g-g'、h-h'、i-i'和j-j'是显示对照和Sgm2基因敲除斑马鱼的各种神经元标志物表达模式比较的图像。

[0057] 附图8m-n'是通过使用转化体(Tg[hcrt:EGFP])观察对照和Sam2基因敲除斑马鱼的神经回路获得的图像,在所述转化体中LC支路轴突连接在下丘脑中。

[0058] 附图9是显示通过使用Sam2基因敲除斑马鱼和对照的新鱼缸测试结果的图像。

[0059] 附图9a是显示Sam2基因敲除斑马鱼和对照的单个个体的移动距离的图像。

[0060] 附图9b是显示Sam2基因敲除斑马鱼和对照的平均速度的图像。

[0061] 附图9c是显示Sam2基因敲除斑马鱼和对照的异常行为的图像。

[0062] 附图9d是显示Sam2基因敲除斑马鱼和对照的冻结发作(freezing bouts)的图像。

[0063] 附图10是显示通过使用Sam2基因敲除斑马鱼在开放鱼缸和趋暗性测试中焦虑增加的图像。

[0064] 附图10a是显示将对照和Sam2基因敲除斑马鱼放置在开放鱼缸中30分钟来测量趋触性,然后以一分钟时间间隔测量待在角落和中央的时间之后进行分析和比较的图像。

[0065] 附图10b和c显示了使用Sam2基因敲除斑马鱼的趋暗性测试,通过跟踪对照和Sam2基因敲除斑马鱼的运动分析和比较了待在白色部分的时间。

[0066] 附图11是通过观察Sam2基因敲除斑马鱼的行为指数测量恐惧和焦虑所获得的图像。

[0067] 附图12是通过观察Sam2基因敲除斑马鱼的社会凝聚而测量群体行为中的焦虑反应所获得的图像。

[0068] 附图13是显示了利用分子标志物的Sam2基因敲除斑马鱼的焦虑反应的图像。

[0069] 附图14是显示了通过培养大鼠海马神经元,人类Sam2基因对兴奋性和抑制性突触的影响的图像。

[0070] 附图15显示了通过Sam2基因过量表达来研究兴奋性神经元分子标志物表达的图像。

[0071] 附图16是研究人类中因由微删除引起的Sam2基因缺失导致的自闭症和过度焦虑症状的图像。

具体实施方式

[0072] 在下文中将更详细地描述本发明。

[0073] 本发明提供了具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列的samdori2(Sam2)基因。

[0074] 在本发明的具体的实施方式中,为了研究缰核中的samdori2基因表达,本发明人进行了逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)来从野生型、意识紊乱突变体和Et(-lotpa::mmGFP)hd1转化的斑马鱼中分离samdori2基因。为了研究从斑马鱼分离的基因和人类基因

组之间的进化关系,通过使用Synteny数据库 (http://teleost.cs.uoregon.edu/acos/synteny_db/)、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Ensembl (<http://asia.ensembl.org/>)和VEGA (<http://vega.sanger.ac.uk/>)数据库比较了染色体上的相似性。结果,在斑马鱼的Sam基因家族中发现了8个基因,还鉴定了物种之间氨基酸序列的高度同源性(参见附图1和2)。

[0075] 进一步的,已经发现的是,Sam基因家族具有序列CX7CCX13CX14CX11CX4CX5CX10C,其是10个规律半胱氨酸的结构,这个序列类似于CC型趋化因子的序列。为了研究分离的Sam2基因的时间和空间表达模式,进行了整体原位杂交(whole-mount in situ hybridization)。结果,发现所有Sam基因仅在中枢神经系统中表达(参见附图3和4),表达Sam基因的细胞是神经元,根据的事实是,表达Sam基因的细胞在意识紊乱突变体(*mib^{ta52b}*)¹¹中提高,其中在发育早期神经元急剧增加(参见附图5)。

[0076] 此外,发现在Sam基因当中,Sam2从发育早期到成年阶段在缰核中表达(参见附图4(c-g)和6(a-b))。

[0077] 进一步的,为了研究Sam2基因在缰核发育和功能调节中的作用,构建了Sam2基因敲除(KO)斑马鱼。结果,构建了两种突变体,其中5个Sam2^{cnu1}和17个Sam2^{cnu2}碱基分别被删除,从而不产生Sam2的氨基酸,发现Sam2敲除斑马鱼不显示存活、繁育和形态学方面的缺陷(参见附图7)。

[0078] 并且,为了研究Sam2基因缺失在特定神经元发育方面的影响,通过使用多巴胺神经元标志物,即酪氨酸羟化酶(th)、多巴胺转运蛋白(dat)、核受体相关1蛋白(nurr-1)、血清素神经元标志物(色氨酸羟化酶Raphe (tphR)、5-羟色氨酸(5-HT))、催产素神经元制造物(oxytocin neuron maker) (oxytosin (oxt))和脚间核制造物(interpenduncular nucleus maker),即生长抑素1.1 (sst1.1),比较了Sam2基因敲除斑马鱼和对照中的Sam2基因缺失。结果,发现Sam2基因敲除斑马鱼的Sam2基因缺失不同于对照的(参见附图8)。

[0079] 此外,为了通过使用各种分子标志物来研究与Sam2基因敲除斑马鱼的神经激素相关的基因的表达模式,在Sam2基因敲除斑马鱼和对照中比较了与神经激素相关的基因的表达模式。结果,发现Sam2基因敲除斑马鱼的表达模式与对照的类似(参见附图8(g-l'))。

[0080] 进一步的,通过使用Tg(hcrt:mEGFP)转化的Sam2突变体受精卵,观察到下丘脑蓝斑投射。结果,发现的是,利用Tg(hcrt:mEGFP)转化的Sam2突变受精卵,下丘脑蓝斑投射是正常的(参见附图8(m-n'))。

[0081] 此外,在Et(-1otpa:mmGFP)hd1转化的Sam2敲除斑马鱼中观察到了传出轴突发育。结果,发现在Et(-1otpa:mmGFP)hd1转化的Sam2敲除斑马鱼中正常地显示了从缰核延伸到脚间核的轴突发育(参见附图6(c-f))。因此,发现Sam2基因不直接影响神经元的发育和运动以及轴突的生长。

[0082] 此外,为了研究斑马鱼中Sam2基因缺失对恐惧和焦虑的影响,将Sam2基因敲除斑马鱼置于新鱼缸中,研究适应新空间的能力。结果,发现的是,虽然Sam2基因敲除斑马鱼的单个个体的运动性活动例如移动距离(参见附图9a)和平均速度(参见附图9b)没有显著不同于对照的,当与对照的相比较时,Sam2基因敲除斑马鱼中焦虑相关的行为(例如,将头撞向鱼缸底部的异常行为(参见附图9c)和冻结发作(参见附图9d)显著提高了。

[0083] 进一步的,根据趋触性(thigmotaxis)测试结果,发现Sam2基因敲除斑马鱼更喜欢

角落而不是中央(参见附图10)。根据该结果,发现观察到比对照更高的Sam2基因敲除斑马鱼的焦虑症状。并且,根据趋暗性测试结果发现的是, Sam2基因敲除斑马鱼的焦虑程度高于对照的(参见附图9和10)。

[0084] 另外,为了研究斑马鱼中Sam2基因缺失对恐惧和焦虑相关行为的影响,利用Sam2基因敲除斑马鱼通过社会行为分析了脊椎动物的恐惧和焦虑行为。结果,在预适应(pre adaptation)期在Sam2基因敲除斑马鱼和对照中都观察到焦虑行为。然而发现的是,在适应之后,观察到适应环境并自由游动的对照,而Sam2基因敲除斑马鱼没有适应环境,并显示了持续的焦虑反应(参见附图11)。

[0085] 此外,通过观察Sam2基因敲除斑马鱼的社会凝聚,测量了群体行为中的焦虑反应。结果发现,对于对照,在适应之后在群体中鱼之间的个体间间隙相比适应之前提高了,而Sam2基因敲除斑马鱼的鱼之间的个体间间隙没有改变(参见附图11和12)。

[0086] 进一步的,为了研究Sam2基因敲除斑马鱼中观察到的焦虑反应是否由神经递质引起,即血清素系统或应激相关的应答,利用相应的分子标志物进行了分析。结果,发现在对照和Sam2基因敲除斑马鱼的焦虑反应之间没有观察到差异(参见附图13)。因而,发现Sam2基因涉及群体中的恐惧、焦虑和行为控制。为了研究Sam2基因作为神经递质通过缰核对于行为控制的影响,进行了免疫染色通过大鼠海马神经元的培养来研究人类Sam2基因对兴奋性和抑制性突触的影响。在过量表达Sam2基因之后,作为抑制性突触标志物的囊泡GABA转运蛋白(vGAT)、桥连蛋白和GABAA受体 $\alpha 2$ 亚基(GABAAR $\alpha 2$)被用于研究。结果,发现相对于对照,抑制性突触的数量和表达水平显著降低。

[0087] 还发现,当Sam2基因过量表达时,抑制性微突触后电流(miniature inhibitory postsynaptic current, mIPSC)的振幅和频率显著降低。特别是,发现Sam2基因对抑制性突触的影响影响了邻近的神经元以及Sam2处理的神经。根据这些结果,发现Sam2基因是分泌性蛋白(参见附图14)。

[0088] 进一步的,为了研究因由Sam2基因过量表达的兴奋性神经分子标志物表达,进行了免疫染色。结果,发现Sam2基因作为神经调质起作用,增强了神经系统活性,例如,削弱突触前的抑制功能和增强兴奋性突触(参见附图15)。

[0089] 此外,征募了患者来研究因由人类中的Sam2基因缺失导致的自闭症和过度焦虑症状,在征募的患者中研究了因由微删除引起的Sam2基因缺失导致的自闭症和过度焦虑症状。结果,通过在人类中鉴定因由微删除引起的Sam2基因缺失导致的自闭症和过度焦虑症状,发现Sam2基因是人类中调节焦虑反应的关键因素(参见附图16)。

[0090] 结果,通过使用Sam2基因特异性敲除的斑马鱼,对本发明的新的Sam2基因进行了新鱼缸、趋暗性和社会凝聚测试。发现的是,与对照相比,斑马鱼显示了显著更高的恐惧和焦虑行为,在过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元表达降低了。还发现起因于Sam2基因缺失的患者显示了自闭症和过度焦虑症状。因此,新的samdori2基因可以有用地应用于开发用于预防和治疗相关的精神疾病,特别是自闭症和抑郁症的药物组合物。

[0091] 本发明还提供了包括samdori2基因的表达载体。

[0092] 所述samdori2基因优选地包括SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列,但不限于此。

[0093] 通过使用Sam2基因特异性敲除的斑马鱼,对本发明的新的Sam2基因进行了新鱼

缸、趋暗性和社会凝聚测试。发现的是,与对照相比,斑马鱼显示了显著更高的恐惧和焦虑行为,在过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元表达降低了。还发现起因于Sam2基因缺失的患者显示了自闭症和过度焦虑症状。因此,包括新的samdori2基因的表达载体可能是有用的。

[0094] 进一步的,本发明提供了通过用所述表达载体转化宿主细胞获得的转化体。

[0095] 本发明还提供了制备表达samdori2的重组转化体的方法,包括:

[0096] 1) 制备包括samdori2基因的表达载体;以及

[0097] 2) 用根据本发明的步骤1) 中的表达载体转化宿主细胞。

[0098] 步骤1) 的基因优选地具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列,但不限于此。

[0099] 通过使用Sam2基因特异性敲除的斑马鱼,对本发明的新的Sam2基因进行了新鱼缸、趋暗性和社会凝聚测试。发现的是,与对照相比,斑马鱼显示了显著更高的恐惧和焦虑行为,在过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元表达降低了。还发现起因于Sam2基因缺失的患者显示了自闭症和过度焦虑症状。因此,转化体可能是有用的,在所述转化体中转化了包括新的samdori2基因的表达载体。

[0100] 进一步的,本发明提供了由所述samdori2基因编码的samdori2蛋白。

[0101] 本发明还提供了具有SEQ ID NOs:4-6和18-20的任一氨基酸序列的samdori2蛋白。

[0102] 进一步的,本发明提供了用于预防和治疗精神疾病的药物组合物,所述组合物含有包括samori2基因的表达载体、或samori2蛋白。

[0103] 所述精神疾病优选地是焦虑综合征、抑郁症、自闭症、躁狂抑郁病、精神分裂症、情绪障碍、睡眠障碍、注意缺陷多动障碍(ADHD),但不限于此。

[0104] 通过使用Sam2基因特异性敲除的斑马鱼,对本发明的新的Sam2基因进行了新鱼缸、趋暗性和社会凝聚测试。发现的是,与对照相比,斑马鱼显示了显著更高的恐惧和焦虑行为,在过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元表达降低了。还发现起因于Sam2基因缺失的患者显示了自闭症和过度焦虑症状。因此,新的samdori2基因可以有用地用作药物组合物,用于预防和治疗相关的精神疾病,特别是自闭症和抑郁症。

[0105] 除了上文描述的成分之外,含有本发明的Sam2基因的组合物可以含有显示相同或相似功能的一种或更多种活性成分。

[0106] 本发明的组合物可以进一步包括药学上可接受添加剂。作为药学上可接受的添加剂,可以使用淀粉、糊化淀粉、微晶纤维素、乳糖(milk sugar)、聚维酮、胶体二氧化硅、磷酸氢钙、乳糖(lactose)、甘露醇、粗制麦芽糖、阿拉伯树胶、预胶化淀粉、玉米淀粉、纤维素粉、羟丙基纤维素、欧巴代(opadry)、羟甲基淀粉钠(sodium starch glycolate)、巴西棕榈蜡、合成的硅酸铝、硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸铝、硬脂酸钙、白糖、葡萄糖、山梨醇、和滑石粉,等。对于所述组合物,优选地包括0.1-90重量份数的根据本发明的药学上可接受的添加剂,但不限于此。

[0107] 在其他情况下,本发明的组合物可以在各种口服和胃肠外的制剂中施用,用于实际的临床施用。对于制剂,可以通过利用通常使用的稀释剂或赋形剂,例如填料、增量剂、粘结剂、润湿剂、崩解剂和表面活性剂来进行制备。用于口服施用的固体制剂的实例包括片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂,等等。固体制剂可以通过混合天名精(Common carpesium)

提取物和至少一种赋形剂,例如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖或明胶来制备。进一步的,除了简单的赋形剂之外,可以使用润滑剂例如硬脂酸镁和滑石粉。用于口服施用的液体制剂的实例包括悬浮液、用于内部使用的液体、乳剂和糖浆。除了一般使用的稀释剂例如水和液体石蜡之外,可以包括各种赋形剂,例如润湿剂、甜味剂、调味剂和防腐剂。用于胃肠外施用的制品的实例可以包括消毒了的溶液、非水性溶剂、悬浮液、乳剂、冻干的制品以及栓剂。对于非水性溶剂和悬浮液,可以使用丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油、可注射的酯例如油酸乙酯。对于栓剂的基底,可以使用合成脂肪酸酯(witepsol)、聚乙二醇(macrogol)、tween 61、可可油、劳瑞那(laurinum)、甘油胶(glycerogelati),等。

[0108] 本发明的组合物可以根据期望的方法口服施用或胃肠外施用。对于胃肠外施用,优选地使用局部皮肤、腹膜内注射、直肠内注射、皮下注射、静脉内注射、肌肉注射或胸内注射方法。剂量变化取决于体重、年龄、性别、健康状况以及患者的膳食、施用时间、施用方法、排出率和疾病严重程度。

[0109] 根据本发明的组合物以药学有效量施用。在本发明中,“药学有效量”是指以应用药物治疗可获得的合理的效益/风险比、足以治疗疾病的数量。有效剂量的水平可以取决于一些因素来确定,包括患者的疾病类型、严重程度、药物的活性、对药物的敏感性、施用时间、施用途径、排出率、治疗周期、同时使用的药物、以及医药领域公知的其他因素。本发明的组合物可以作为独立的治疗试剂施用,或与其他治疗试剂组合施用。并且,本发明的组合物可以连续地或同时地添加典型的治疗试剂,组合物可以单次或多次施用。重要的是考虑上述所有因素、以可以产生最大效果而没有副作用的最小剂量施用,所述剂量可以由本领域的技术人员容易地确定。

[0110] 具体地,根据本发明的化合物的有效量可以取决于患者的年龄、性别、体重而变化。一般地,0.1mg到100mg,优选的0.5mg到10mg每1公斤体重可以每天或每隔一天地施用,或每天施用1到3次。然而,取决于施用途径、肥胖症的严重程度、性别、体重、和年龄等,剂量可以提高或降低,因而上述剂量无论如何不限制本发明的范围。

[0111] 本发明还提供了用于预防和减轻精神疾病的健康食品,所述食品含有包括samori2基因的表达载体、或samori2蛋白。

[0112] 所述精神疾病优选地是焦虑综合征、抑郁症、自闭症、躁狂抑郁病、精神分裂症、情绪障碍、睡眠障碍、注意缺陷多动障碍(ADHD),但不限于此。

[0113] 通过使用Sam2基因特异性敲除的斑马鱼,对本发明的新的Sam2基因进行了新鱼缸、趋暗性和社会凝聚测试。发现的是,与对照相比,斑马鱼显示了显著更高的恐惧和焦虑行为,在过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元表达降低了。还发现起因于Sam2基因缺失的患者显示了自闭症和过度焦虑症状。因此,samdori2基因可以有用地用作健康食品,用于预防和减轻相关的精神疾病,特别是自闭症和抑郁症。

[0114] 食品的类型没有具体的限制。可以添加上文描述的材料的食物实例包括各种食品,例如小吃、面包和面条,饮料例如水、软饮料和水果饮料,口香糖、茶、复合维生素、佐料、健康功能食品,包括典型方式的所有健康功能食品。

[0115] 本发明的samdori2基因可以按照原样添加到食品中,或与其他食品或食品成分一起使用。并且,本发明的samdori2基因可以根据典型的方法适当地使用。取决于使用的目的(用于预防或缓解)可以适当地确定混合的活性成分的数量。一般地,化合物可以以食品总

重量的0.01到15wt%，优选的0.1到5wt%的数量添加到健康食品中。对于保健饮料组合物，化合物可以基于100以0.01到5.0g、优选的0.01到1.0g的比例添加。然而，对于健康管理目的的长期施用，剂量可以低于上文描述的范围。此外，可以以高于上文描述的范围的数量使用活性成分，因为就安全性而言没有问题。

[0116] 本发明的健康功能饮料组合物没有特别的限制，只要以特定的比例包括上文描述的化合物作为基本成分，以及包括各种调味剂，或者可以包括天然碳水化合物作为典型饮料的添加成分。上文描述的天 然碳水化合物的实例包括典型的糖类，例如，单糖如葡萄糖和果糖，二糖如麦芽糖和蔗糖，以及多糖如糊精和环糊精；以及糖醇，例如，木糖醇、山梨醇和赤藓醇。除了上文描述的那些之外，可以有益地使用天然的调味剂（例如，托马金（taumakin），和甜菊糖提取物）以及合成的调味剂（糖精和阿斯巴甜）。所述天然碳水化合物的比例为每100g本发明的组合物约0.1到2.0g，优选的约0.1到1.0g。

[0117] 通过在制备用作基底的食品的加工期间增加添加上文描述的提取物或本发明的化合物的工艺，或在制备用作基底的食品之后增加添加上文描述的提取物或本发明的化合物的工艺，可以容易地获得本发明的健康功能食品。可以添加口味和风味调节剂。

[0118] 除了上文描述的那些之外，本发明的samdori2基因可以含有各种营养物质、维生素、矿物质（电解质）、调味剂例如合成调味剂和天然调味剂，着色剂和填充剂（起司和巧克力）、果胶酸及其盐、海藻酸及其盐、有机酸、保护性胶体增稠剂、pH调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、醇、软饮料中使用的碳酸剂。除了上文描述的那些之外，本发明的samdori2基因可以含有果肉，用于制备天然果汁、果汁饮料和植物饮料。这些成分可以单独地或与其他成分组合使用。虽然添加剂的比例是不重要的，本发明的samdori2基因一般地选自每100重量份数约20重量份数的范围。

[0119] 进一步的，本发明提供了用于诊断精神疾病的试剂盒，所述试剂盒包括samdori2基因的反义核苷酸、引物集或探针、或针对samdori2蛋白的适体或抗体。

[0120] 通过使用Sam2基因特异性敲除斑马鱼，对本发明的新的Sam2基因进行了新鱼缸、趋暗性和社会凝聚测试。发现的是，与对照相比，斑马鱼显示了显著更高的恐惧和焦虑行为，在过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元表达降低了。还发现起因于Sam2基因缺失的患者显示自闭症和过度焦虑症状。因而，本发明的新的Sam2基因试剂盒可以有用地应用于诊断精神疾病的试剂盒。

[0121] 本发明还提供了测量samdori2基因的表达水平的方法，用于提供诊断信息或监视精神疾病，所述方法包括：

[0122] 1) 制备细胞，所述细胞分离自受试者衍生的细胞；

[0123] 2) 测量根据本发明的步骤1) 中的细胞中samdori2基因的表达水平；以及

[0124] 3) 当与正常对照相比根据本发明的步骤2) 的samdori2基因被删除或降低，确定精神疾病发生或精神疾病的风险提高。

[0125] 步骤2) 中的表达水平优选地通过选自由RT-PCR、ELISA、蛋白质印迹（western-blot）和免疫组织化学构成的组的任一项来测量，但不限于此。

[0126] 通过使用Sam2基因特异性敲除斑马鱼，对本发明的新的Sam2基因进行了新鱼缸、趋暗性和社会凝聚测试。发现与对照相比所述斑马鱼显示了显著更高的恐惧和焦虑行为，在过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元表达降低。还发现起因于Sam2基因缺失的患

者显示自闭症和过度焦虑症状。因而，本发明的新的Sam2基因可以有用地应用于测量samdori2基因的表达水平的方法，用于提供诊断信息或监视精神疾病。

[0127] 进一步的，本发明提供了筛选用于预防或治疗精神疾病的试剂的方法，所述方法包括：

[0128] 1) 用受试物处理细胞，所述细胞表达具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列的samdori2基因，或所述samdori2基因编码的samdori2蛋白；

[0129] 2) 测量根据本发明的步骤1) 中samdori2基因或samdori2蛋白的活性或表达；以及

[0130] 3) 筛选受试样品，所述受试样品提高根据本发明的步骤2) 中的samdori2基因或samdori2蛋白的活性或表达。

[0131] 通过使用Sam2基因特异性敲除斑马鱼，对本发明的新的Sam2基因进行了新鱼缸、趋暗性和社会凝聚测试。发现与对照相比所述斑马鱼显示了显著更高的恐惧和焦虑行为，在过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元表达降低。还发现起因于Sam2基因缺失的患者显示自闭症和过度焦虑症状。因而，本发明的新的Sam2基因可以有用地用于筛选预防或治疗精神疾病的试剂的方法。

[0132] 本发明还提供了精神疾病的模型动物，其中在非人动物的缰核中敲除具有SEQ ID NOs:1-3的任一碱基序列的samdori2基因。

[0133] 所述动物优选地是小鼠、大鼠、斑马鱼，但不限于此。

[0134] 所述精神疾病优选地是焦虑综合征、抑郁症、自闭症、躁狂抑郁病、精神分裂症、情绪障碍、睡眠障碍、注意缺陷多动障碍(ADHD)，但不限于此。

[0135] 通过使用Sam2基因特异性敲除斑马鱼，对本发明的新的Sam2基因进行了新鱼缸、趋暗性和社会凝聚测试。发现与对照相比所述斑马鱼显示了显著更高的恐惧和焦虑行为，在过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元表达降低。还发现起因于Sam2基因缺失的患者显示自闭症和过度焦虑症状。因而，其中具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列的samdori2基因被敲除的模型动物可以有用地应用。

[0136] 进一步的，本发明提供了制备精神疾病的模型动物的方法，包括：

[0137] 1) 将表达基因剪的载体微注射到非人动物的受精卵中，所述基因剪特异于具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列的samdori2基因；

[0138] 2) 饲养根据本发明的步骤1) 中的所述动物直到所述动物成年，然后将所述动物与野生型动物繁育；以及

[0139] 3) 在根据本发明的步骤2) 中的繁育的动物中筛选敲除了samdori2基因的动物。

[0140] 所述精神疾病优选地是焦虑综合征、抑郁症、自闭症、躁狂抑郁病、精神分裂症、情绪障碍、睡眠障碍和注意缺陷多动障碍(ADHD)，但不限于此。

[0141] 通过使用Sam2基因特异性敲除斑马鱼，对本发明的新的Sam2基因进行了新鱼缸、趋暗性和社会凝聚测试。发现与对照相比所述斑马鱼显示了显著更高的恐惧和焦虑行为，在过量表达Sam2基因的神经元中抑制性神经元表达降低了。还发现起因于Sam2基因缺失的患者显示自闭症和过度焦虑症状。因而，制备精神疾病的模型动物的方法可以有用地应用，所述模型动物中敲除具有SEQ ID NOs:1-3和15-17的任一碱基序列的samdori2基因。

[0142] 在下文中将参考实施例更详细地描述本发明。

[0143] 然而，提供以下的实施例仅是说明本发明，本发明的范围不限于以下实施例。

[0144] <实施例1>斑马鱼的饲养和制备发育的胚胎

[0145] 野生型、意识紊乱突变体 (mibta52b) 和 Et (-lotpa::mmGFP) hd1 转化的斑马鱼购自水族馆 (首尔水族馆, Dajeon)。意识紊乱 (mibta52b) 是通过 ENU 诱变获得的突变体。意识紊乱杂合体鱼是有点突变的个体, 其中 RING 结构域被替换为 M1013R, 是近交种, 被用于实验 (Itoh, et al., 2003., National Institutes of Health (NIH), USA)。Et (-lotpa::mmGFP) hd1 斑马鱼是一种新的增强子陷阱斑马鱼, 由 Matthias Carl (德国) 提供, 并被使用。准备的斑马鱼在以下条件下饲养: 温度: 28.5℃, 光暗: 9:00am 到 10:00pm 开灯, 其他时间关灯。获自斑马鱼的受精卵用蛋水 (egg water) (Sea Salts, 280g) 洗涤, 容许在陪氏培养皿上发育。然后通过解剖显微镜观察发育过程。根据时间点和形态变化选择发育的胚胎, 用 4% 多聚甲醛/PBSw 固定。

[0146] <实施例2>缰核中 SAM2 基因表达的研究

[0147] <2-1>从斑马鱼分离 SAMDORI 基因

[0148] 为了从根据<实施例1>描述的方法饲养的野生型、意识紊乱突变体和 Et (-lotpa::mmGFP) hd1 转化的斑马鱼分离 samdori 基因, 使用了逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)。

[0149] 具体地, 使用通过<实施例1>中描述的方法饲养的野生型, 分离 mRNA。使用 RT 转录产物 (Enzymomics, 韩国) 从 2μg 分离的 mRNA 中合成互补 DNA。使用 Samdori 引物进行 PCR, 所述 Samdori 引物是从互补 DNA 合成的, 在下文的表 1 中列出 (表 1)。另外, GAPDH 引物 (SEQ ID NOs: 9 和 10) 用作对照基因 (表 1)。在完成 PCR 之后, 样品使用包括溴化乙锭的 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳, 照射 UV 来鉴定条带。切下 694bp 的 Sam2 条带, 从琼脂糖分离 DNA (Elpis, 韩国)。分离的 Sam2 DNA 克隆到 T-载体 (Promega, 美国) 中, 使用 miniprep DNA 纯化系统试剂盒 (Intron, 韩国) 分离质粒并纯化, 来分析克隆的 Sam2 DNA 基因。然后, 通过自动化 DNA 测序仪分析产物。

[0150] [表 1]

[0151]

SEQ ID NO.	序列
sam2, 正向 (SEQ ID NO 7)	5' -ACGCCGCTGAATGAACCGATTACCGG-3'
sam2, 反向 (SEQ ID NO 8)	5' -GAGCGAACGCACTGCTTTACACAC-3'
beta-肌动蛋白, 正向 (SEQ ID NO 9)	5-GAGGAGCACCCCGTCCTGCTCAC-3'
Beta-肌动蛋白, 反向 (SEQ ID NO 10)	5-GATGGCTGGAACAGGGCCTCTGG-3'

[0152] <2-2>染色体上的相似性比较

[0153] 为了研究人类和斑马鱼的基因组之间的进化关系, 进行了以下方法。

[0154] 具体地, 为了研究人类的基因组与通过实施例<2-1>描述的方法分离自斑马鱼的基因的进化关系, 人类的 Sam2 基因和斑马鱼的 Sam2 基因的氨基酸序列通过使用 Synteny 数据库 (http://teleost.cs.uoregon.edu/acos/synteny_db/)、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Ensembl (<http://asia.ensembl.org/>) 和 VEGA (<http://vega.sanger.ac.uk/>) 数据库检索, 然后比较染色体上的位置来研究染色体上的进化关系。

[0155] 结果, 如附图 1 和 2 所示, 在斑马鱼的 Sam 基因家族中发现 8 个基因, 发现了物种之间氨基酸序列的高度同源性 (附图 1 和 2)。还发现 Sam 基因家族具有 10 个规律半胱氨酸的结构, CX7CCX13CXCX14CX11CX4CX5CX10C 序列, 这些序列具有与 CC-型趋化因子相似的形式。

[0156] <2-3>SAM2基因的时间和空间表达模式的研究

[0157] 为了研究Sam2基因的时间和空间表达模式,进行了整体原位杂交。

[0158] 具体地,为了研究Sam2基因的时间和空间表达模式,用限制性内切酶切割agrp、cxcr4b、dat、hcrt、lov、mch、npv、otx5、oxl(itnp)、pet-1、sst1、th、tphR和Sam基因,使用SP6、T7或T3聚合酶(Fermenters,美国)和地高辛(Digoxigenin)标记的UTP(Roche,德国)合成反义RNA探针。通过光学显微镜,在受精之后,处于每个步骤的受精卵的合适阶段添加4%多聚甲醛/PBT,在4℃固定12小时或更久。受精至少20小时之后,用镊子除去受精卵的绒毛膜,固定,使得尾部不弯曲。对于受精20小时之前的受精卵,在固定之后除去绒毛膜。此外,从尾芽期开始(受精后10小时),添加0.2mM苯硫脲/胚胎水(embryonic water)(PTU)来抑制皮肤色素形成。在除去绒毛膜之后固定的受精卵用1×PBTw(磷酸盐缓冲盐水,0.1% tween-20)洗涤三次5分钟,然后使用100%甲醇(MeOH)进行置换约3到4次。然后,产物在-20℃保存在甲醇状态下。甲醇中保存的发育的胚胎使用75%、50%和25%MeOH/PBSw以分步的方式洗涤5分钟。然后,使用PBTw以5分钟间隔时间进行五次洗涤。根据发育阶段,用包括10μg/ml蛋白酶K的PBTw处理发育的胚胎。此后,使用PBTw以5分钟的间隔时间进行3到4次洗涤。然后,产物用4%多聚甲醛/PBT在室温下固定30分钟或更久。以5分钟的间隔时间用PBTw轻轻地洗涤五次,使发育的胚胎不被损坏。然后,添加300μl HYB(50%甲酰胺、5×SSC,0.1% Tween-20),产物在68℃保持15分钟。此后,添加300μl的50%HYB(50%甲酰胺、5×SSC,5mg/ml torula RNA、50μg/ml肝素、柠檬酸、pH6,以及0.1% Tween-20),产物在68℃进行预杂交1到2小时或更久。此后,添加约30到100ng的探针,在68℃杂交12小时。维持68℃,除去探针,使用100%、75%、50%和25%的HYB*/0.2X SSCTw依序地进行洗涤,每次15分钟。在相同的温度下,用2XSSCTw进行置换,进行洗涤20分钟。然后,在0.2XSSCT中进行洗涤五次,每次30分钟,来除去未杂交的探针。此后,使用75%、50%和25%的0.2X SSCT/PBTw以5分钟间隔时间依序地进行置换,用PBTw进行五次洗涤,每次5分钟。为了研究发生的颜色和表达区域,添加300μl的5%绵羊血清/PBTw,产物在室温下保持1小时,使得探针未结合的区域与血清结合,以阻断抗体反应期间的颜色发生和表达。然后,添加在5%绵羊血清/PBTw中稀释到1/4000的300μl抗-DIG-AP Fab(150u/200μl;Roche,德国),在室温下进行反应4小时,或在4℃进行12到16小时。用PBTw进行洗涤六次10分钟,六次20分钟,8次30分钟。此后,使用染色缓冲液(0.1M Tris-Cl pH 9.5,0.1M NaCl,50mM MgCl₂,0.1% Tween-20)进行洗涤三次5分钟。作为产色底物的硝基蓝四唑/5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸(NBT/BCIP)的储备液以4.5μl/ml(储备液:包括50mg/ml NBT的二甲基甲酰胺)或3.5μl/ml(储备液:包括50mg/ml BCIP的二甲基甲酰胺)的数量添加到染色缓冲液中。然后,在室温下进行反应,遮光,通过显微镜观察来研究染色的区域。使用停止溶液(1XPBS pH 5.5,1mM EDTA,0.1% Tween-20)洗涤染色的受精卵四次5分钟。然后,用100%甲醇进行洗涤10分钟约4到5次来脱水,产物然后保存在-20℃。在75%甘油或苯甲酸苄酯:苯甲醇(2:1)溶液中使用MZ-16显微镜(Leica,美国)进行成像处理。

[0159] 结果,如附图3和4所示,发现所有sam基因仅在中枢神经系统中表达(附图3和4)。

[0160] 并且,如附图5所示,根据表达sam基因的细胞在意识紊乱突变体(mibta52b)中显著增加的事实,发现表达sam基因的细胞是神经元,在所述突变体中在发育的早期阶段期间神经元显著增加(附图5)。

[0161] 进一步的,如附图4(c-g)和6(a-b)所示,发现在sam基因当中,Sam2从早期发育到成年阶段在缰核中持续表达(附图4(c-g)和6(a-b))。

[0162] <实施例3>研究SAM2基因缺失对斑马鱼的特定神经元发育的影响

[0163] <3-1>SAM2基因敲除斑马鱼的构建

[0164] 为了研究Sam2在缰核的发育和功能调节中的作用,使用基因剪技术ZFN构建了Sam2基因敲除斑马鱼。

[0165] 具体地,为了构建作为Sam2-特异性基因剪的锌指核酸酶(ZFN)载体,靶向Sam2的第三外显子,分别相应于左侧ZFN(TGCTCCTGCTTC,SEQ ID NO:13)和右侧ZFN(CAGGTGGCAGGA,SEQ ID NO:14)的锌指用于在模块组装方法中组合来构建所述载体。构建的载体用PvuII限制性内切酶切割,使用T7RNA聚合酶合成ZFN mRNA。2到3ng通过所述方法构建的ZFN mRNA微注射到单细胞阶段的斑马鱼的受精卵中。饲养微注射的斑马鱼(F0)直到斑马鱼成年,然后与野生型斑马鱼繁育。在繁育的斑马鱼中,通过使用T7核酸内切酶1方法筛选Sam2基因敲除。通过使用以下的表2中列出的引物,筛选Sam2基因敲除斑马鱼的基因型。

[0166] 因此,如附图7所示,获得了两种突变体,其中5个Sam2^{cnu1}和17个Sam2^{cnu2}碱基分别被破坏从而不制造Sam2的氨基酸,发现Sam2敲除斑马鱼在存活、繁育和形态学方面没有缺陷(附图7)。

[0167] [表2]

[0168]

SEQ ID NO.	序列
Sam2 ^{cnu1} 正向(SEQ ID NO:11)	5'-TCTACTGAGGAGTGGTGTGA-3'
Sam2 ^{cnu1} 反向(SEQ ID NO:12)	5'-GGTCAGTTTCAGAGAGCTGG-3'
左侧ZFN(SEQ ID NO:13)	TGCTCCTGCTTC
右侧ZFN(SEQ ID NO:14)	CAGGTGGCAGGA

[0169] <3-2>研究SAM2基因缺失对特定神经元发育的影响

[0170] 使用根据例<3-1>中描述的方法制备的Sam2基因敲除斑马鱼,为研究Sam2基因缺失对特定神经元发育的影响,进行了以下的方法。

[0171] 具体地,使用多巴胺神经元标志物,即,酪氨酸羟化酶(th)、多巴胺转运蛋白(dat)、以及核受体相关的1蛋白(nurr-1)、血清素神经元标志物(色氨酸羟化酶Raphe(tphR),5-羟色氨酸(5-HT))、催产素神经元标志物(oxytosin(oxt))和脚间核标志物,即,生长抑素1.1(stt1.1),研究sam2基因缺失对特定神经元发育的影响。在多巴胺神经元中表达的th和dat的DNA用限制性内切酶切割。然后,使用RNA聚合酶进行体外转录来制备mRNA探针。制备的mRNA探针用于进行整体原位杂交。

[0172] 结果,如附图8所示,发现的是,当在Sam2基因敲除斑马鱼和对照中比较Sam2基因缺失时,Sam2基因敲除斑马鱼的Sam2基因缺失不同于对照的(附图8)。

[0173] <3-2>研究与SAM2基因敲除斑马鱼的神经激素相关的基因的表达模式

[0174] 利用根据例<3-1>中描述的方法制备的Sam2基因敲除斑马鱼,为研究与Sam2基因敲除斑马鱼的神经激素相关的基因的表达模式,进行了以下的方法。

[0175] 具体地,下视丘分泌素/增食欲素(hypocretin/orexin,hcrt)、黑色素聚集激素,

(mch)、agouti相关蛋白同系物(agrp)、神经肽Y(npY)和fev(ETS癌基因家族;pet-1)的DNA用限制性内切酶切割。然后,使用RNA聚合酶进行体外转录来制备mRNA探针。构建的mRNA探针用于进行整体原位杂交。

[0176] 结果,如附图8(g-1')所示,发现的是,当基因的表达模式与Sam2基因敲除斑马鱼和对照的神经激素相关时,与Sam2基因敲除斑马鱼的神经激素相关的基因的表达模式与对照的类似(附图8(g-1'))。

[0177] <3-3>使用TG(HCRT:MEGFP)转化的SAM2突变体受精卵观察下丘脑蓝斑投射

[0178] 使用Tg(hcrt:mEGFP)转化的Sam2突变体受精卵,为了观察下丘脑蓝斑投射,进行了以下的方法。

[0179] 具体地,在下丘脑蓝斑投射中表达荧光蛋白的转化体Tg(hcrt:mEGFP)F1成年斑马鱼,与sam2基因缺失的纯合子成年斑马鱼繁育。然后,从繁育获得的48小时的发育胚胎中,使用荧光显微镜选择表达荧光的个体,饲养直到胚胎成年。通过Sam2基因缺失和表达荧光的杂合体斑马鱼的近交,获得了Sam2基因缺失和表达荧光的纯合体发育的胚胎。然后,纯合体发育的胚胎受精后83小时,通过荧光显微镜观察下丘脑蓝斑投射。

[0180] 结果,发现的是,利用Tg(hcrt:mEGFP)转化的Sam2突变受精卵,下丘脑蓝斑投射是正常的(附图8(m-n'))。

[0181] <3-4>观察Et(-1otpa:mmGFP)hd1转化的SAM2敲除斑马鱼的传出轴突的发育

[0182] 为了观察Et(-1otpa:mmGFP)hd1转化的Sam2敲除斑马鱼的传出轴突的发育,进行了以下的方法。

[0183] 具体地,在连接到缰核的神经中表达荧光蛋白质的转化体,Et(-1otpa:mmGFP)hd1的成年斑马鱼,与Sam2基因缺失的纯合体成年斑马鱼繁育。然后,从繁育获得的48小时的发育胚胎中,使用荧光显微镜选择表达荧光的个体,饲养直到胚胎成年。通过Sam2基因缺失和表达荧光的杂合体斑马鱼的近交,获得了Sam2基因缺失和表达荧光的纯合体发育的胚胎。通过所述方法获得的Sam2基因缺失的纯合体发育的胚胎进行受精,在受精后4.5天,通过荧光显微镜观察缰核神经。

[0184] 结果,如附图6(c-f)所示,发现在正常中在Et(-1otpa:mmGFP)hd1转化的Sam2敲除斑马鱼中显示了从缰核向脚间核延伸的传出轴突的发育(6(c-f))。

[0185] 因此,发现的是,Sam2基因不直接影响神经元的发育和运动以及轴突的生长。

[0186] <实施例4>研究SAM2基因缺失对斑马鱼的恐惧和焦虑的影响

[0187] 为了研究Sam2基因缺失对斑马鱼的恐惧和焦虑的影响,对通过如实施例<3-1>中描述的方法制备的Sam2基因敲除斑马鱼进行开放鱼缸、新鱼缸和暗/光偏爱(趋暗性)测试。

[0188] 具体地,为了研究恐惧反应,将由如实施例<3-1>中描述的方法制备的雄性Sam2基因敲除斑马鱼置于新鱼缸(15cm>15cm>25cm;高度>长度>宽度)中10分钟,通过视频记录观察行为。为了通过趋暗性测试进行恐惧反应分析,将斑马鱼置于具有白色和黑色区域的箱中,容许适应5分钟。然后,通过视频记录15分钟分析行为。为了比较斑马鱼的恐惧反应,将通过Sam2基因缺失的杂合体成年斑马鱼的近交获得的后代之中没有Sam2基因缺失的杂合体成年斑马鱼用作对照。对于行为分析,使用EthoVision XT7,通过Student's t-测验进行统计分析。

[0189] 结果,如附图9所示,发现的是,作为研究适应新位置能力的新鱼缸测试的结果,

Sam2基因敲除斑马鱼的单一个体的移动距离(附图9a)、平均速度(附图9b)和运动活性没有显著不同于对照的,然而Sam2基因敲除斑马鱼的焦虑反应,例如将头撞向鱼缸底部的异常行为(附图9c)和冻结发作(附图9d)显著提高。

[0190] 进一步的,如附图9和10中所示,通过趋触性测试结果发现的是, Sam2基因敲除斑马鱼更喜欢角落而不是中央(参见附图10)。通过该结果,发现观察到更高的Sam2基因敲除斑马鱼的焦虑症状。此外,根据趋暗性测试,发现Sam2基因敲除斑马鱼的焦虑程度高于对照的(附图9和10)。

[0191] <实施例5>研究SAM2基因缺失对斑马鱼的恐惧和焦虑的影响

[0192] <5-1>通过观察SAM2基因敲除斑马鱼的行为指数测量恐惧和焦虑

[0193] 利用如实施例<3-1>中描述的方法制备的Sam2基因敲除斑马鱼,为了通过社会行为分析脊椎动物的恐惧和焦虑反应,进行了以下的方法。

[0194] 具体地,已经报道的是,作为鱼类因对食肉动物的先天反应,称为群聚(shoaling)的群体的形成被用作测量恐惧和焦虑的行为指数(Gerlai.R,Behav Brain Res,2010,207,223-231)。因而,通过群体中Sam2基因敲除斑马鱼的社会行为,分析了脊椎动物的恐惧和焦虑反应。通过<实施例4>中描述的方法,将5条Sam2基因敲除斑马鱼和5条对照置于新鱼缸中,通过视频30分钟来记录群体中斑马鱼的游动和位置,并进行分析(附图11和12)。以20秒的间隔时间分析了斑马鱼聚居(habitation)之前5到8分钟的行为和聚居之后13到16分钟的行为,使用以下的[式1]计算鱼之间的个体间隙。此外,使用SigmaPlot软件进行统计分析。

[0195] 结果,如附图11所示,发现的是,在适应之前, Sam2基因敲除斑马鱼和对照都显示了焦虑反应,但是在适应之后,观察到对照适应环境并自由游动,而Sam2基因敲除斑马鱼没有适应环境并显示了持续的焦虑反应(附图11)。

[0196] [式1]

[0197]
$$\text{距离} = \sqrt{(x_a - x_0)^2 + (y_a - y_0)^2 + (z_a - z_0)^2}$$

[0198] 其中, x_0 、 y_0 和 z_0 代表位于鱼群中心的鱼;以及

[0199] x_a 、 y_a 和 z_a 代表群聚的鱼。

[0200] <5-2>通过观察SAM2基因敲除斑马鱼的社会凝聚而测量群体行为中的焦虑反应

[0201] 通过观察由如实施例<3-1>中描述的方法制备的Sam2基因敲除斑马鱼的社会凝聚,为了测量群体行为中的焦虑反应,进行以下的方法。

[0202] 具体地,测量群体中鱼之间的个体间间隙的社会凝聚是群体行为中焦虑反应的指数。通过实施例<5-1>中描述的方法分析Sam2基因敲除斑马鱼的焦虑反应,使用上述[式1]计算鱼之间的个体间隙。此外,使用SigmaPlot软件进行统计分析。

[0203] 结果,如附图11和12所示,发现的是,对于对照,在适应之后在群体中鱼之间的个体间间隙相比适应之前提高了,而Sam2基因敲除斑马鱼之间的个体间间隙没有改变(附图11和12)。

[0204] <5-3>使用分子标志物研究SAM2基因敲除斑马鱼的焦虑反应

[0205] 为了研究通过实施例<3-1>中描述的方法制备的Sam2基因敲除斑马鱼中观察到的焦虑反应是否由神经递质、血清素系统、还是应激相关的应答引起,使用了相应的分子标志

物。

[0206] 具体地,为了分离Sam2基因缺失的一个月和三个月的杂合体和纯合体的脑,每条鱼置于15ml试管中,用4%多聚甲醛/PBTw固定。12小时之后,分离鱼的脑,用甲醇脱水。然后,进行整体原位杂交。切割tphR、slc6a4a和pomca的DNA,通过使用RNA聚合酶体外转录来构建mRNA探针。使用构建的mRNA探针进行整体原位杂交。

[0207] 结果,如附图13所示,在对照和Sam2基因敲除斑马鱼的焦虑反应方面没有观察到差异(附图13)。

[0208] 因而,通过实施例<5-3>的结果发现的是, Sam2基因与群体中的恐惧、焦虑和行为控制相关。

[0209] <实施例6>研究SAM2基因作为神经递质通过缰核对行为控制的影响

[0210] <6-1>通过大鼠海马神经元培养研究人类SAM2基因对兴奋性和抑制性突触的影响

[0211] 为了研究Sam2基因是否作为神经递质与缰核的行为控制相关,进行了免疫染色。

[0212] 具体地, BALB/c小鼠胚胎发育的第18天的海马神经元在B27细胞培养介质(威斯康星医学院动物试验委员会(Animal Experiment committee of Medical College of Wisconsin), IACUC)中培养。体外培养14天之后,使用lipofectamine2000试剂将Sam2基因导入神经元中。在体外培养17到18天之后对神经元进行免疫染色和电生理学测试。将神经元置于包括2%甲醛、4%蔗糖和1×PBS的固定溶液中2分钟,然后用冷甲醇预处理10分钟。预处理之后,容许样品与初级抗体(Primary antibodies)(大鼠抗-HA(Roche;1:250)、小鼠抗-vGAT(Synaptic systems;1:250)、小鼠抗-vGLUT(Millipore;1:250)、兔抗-GABAAR 2(Synaptic systems;1:500)、小鼠抗-PSD-95(NeuroMab;1:400)、小鼠抗-桥连蛋白(Synaptic systems;1:1,000)、小鼠抗-Gal(Promega;1:1,000)、alc兔抗-Gal(Abcam;1:5,000))和二次抗体(secondary antibodies)(Alexa Fluor488(LifeTechnologies)、轭合的Cy-3和Cy5(Jackson ImmunoResearch Laboratories))反应一天。然后,通过在Sam2基因过量表达之后的全细胞膜片记录(whole-cell patch recordings),通过测量抑制性微突触后电流(mIPSC)进行电生理学的测试。此外,使用Mini分析软件分析mIPSC。

[0213] 结果,如附图14所示,发现的是,作为使用抑制性突触标志物(囊泡GABA转运蛋白(vGAT)、桥连蛋白和GABAA受体 $\alpha 2$ 亚基(GABAAR $\alpha 2$))进行研究的结果,在Sam2基因过量表达之后,与对照相比,抑制性突触的数量和表达水平显著降低。特别是,发现的是,除了用Sam2处理的神经元之外, Sam2基因对抑制性突触的影响同样地施加到邻近的神经元,因而Sam2基因是分泌性蛋白(附图14)。

[0214] <6-2>通过SAM2基因过量表达研究兴奋性神经元标志物

[0215] 为了研究通过Sam2基因过量表达的兴奋性神经元标志物表达,进行了免疫染色。

[0216] 具体地,为了研究通过Sam2基因过量表达的兴奋性神经元标志物表达,分析了兴奋性神经元标志物,即,泡囊谷氨酸转运蛋白(vGLUT)和PSD-95。神经元在包括2%甲醛、4%蔗糖和1×PBS的固定溶液中固定2分钟,使用甲醇脱水10分钟,保存在-20℃。然后,使用75%、50%和25%甲醇/PBS溶液进行依序洗涤。初级抗体(用于抑制性突触标志物:小鼠抗-vGAT(Synapse system,1:250)、兔抗-GABAAR $\alpha 2$ (Synapse system,1:500)、小鼠抗- β -Gal(Promega,1:1,000);用于兴奋性突触标志物:小鼠抗-PSD-95(NeuroMab,1:400)、小鼠抗-vGLUT(Millipore,1:250)添加到洗涤的神经元中,并反应。产物使用1×PBS洗涤,然后添加

二次抗体 (Alexa Fluor488 (LifeTechnologies)、轭合的Cy3-和Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)) 并反应。此后,在荧光显微镜下观察抑制性和兴奋性突触标志物的神经元染色。

[0217] 结果,如附图15所示,发现Sam2基因作为神经递质起作用,从而提高神经系统的活性,例如降低突触前抑制性功能,以及增强兴奋性突触(附图15)。

[0218] <实施例7>在因由SAM2基因缺失的人类中研究自闭症和过度焦虑症状

[0219] <7-1>患者的征募

[0220] 通过对35,000名患者进行阵列比较性基因组杂交(aCHG)来研究拷贝数变异。

[0221] <7-2>在因由微删除引起的SAM2基因缺失的人类中研究自闭症和过度焦虑症状

[0222] 为了研究通过实施例<7-1>中描述的方法征募的患者中因由微删除的Sam2基因缺失导致的自闭症和过度焦虑症状,进行以下的方法:

[0223] 具体地,通过实施例<7-1>中描述的方法征募的患者与医生的讨论,诊断出由于Sam2基因缺失导致的自闭症和过度焦虑症状。

[0224] 结果,如附图16中所示,发现在人类中鉴定出由于微删除引起的Sam2基因缺失导致的具有自闭症和过度焦虑症状(过度恐惧)的患者,因而Sam2基因是人类控制焦虑反应的一个重要因子(附图16)。

SEQUENCE LISTING

<110> 延康生物股份有限公司 (GH BIO INC.)

金哲熙 (KIM, Cheol-Hee)

朴斗常 (PARK, Doo-Sang)

崔丁化 (CHOI, Jung-Hwa)

<120> 新的SAMDORI2基因及其用途

<130> 2016FP0-10_002_CN

<150> KR 10-2014-0031448

<151> 2014-03-18

<150> PCT/KR2015/002527

<151> 2015-03-16

<160> 29

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1937

<212> DNA

<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 1

```

cccgaatgca ctggagtggg gatggtccat cggcaactat aaactgattc tcatcaggaa 60
actgcacatt atctcccat cacttcaaag gtctcgtcag gcagaggtga cgccaggaga 120
tgattttaag gtgaaaatga caaggtttcc acccctcaaa cettggetcc ttttctgaca 180
atacagtctg aatgaacccg atgtcttttt ttttactgtg gaaataggat cggaagagag 240
taacattttt ttttttttaa tctgataaaa gaagattgtt gggaagctct ttgaaaaaaa 300
atttttaaatt gtggcacaga tggattttta aaagtgttag atctttccaa tgaacactaa 360
tagagtactc tgctcttggc tggatttttc agagaatggc aatggtctct gcgatgtcct 420
gggtcctgta tttgtggata agtgcttgtg caatgctact ctgcatgga tcccttcagc 480
acactttcca gcagcatcac ctgcacagac cagaaggagg gacgtgtgaa gtgatagcag 540
cacaccgatg ttgtaacaag aatcgcattg aggagcggtc acaaacagta aagtgttctc 600
gtctacctgg aaaagtggct ggaacaacaa gaaaccggcc ttcttgcgtc gatgcctcca 660
tagtgattgg gaaatgggtg tgtgagatgg agccttgcct agaaggagaa gaatgtaaga 720
cactccctga caattctgga tggatgtgcg caacaggcaa caaaattaag accacgagaa 780
ttcacccaag aacctaacag aagcatttgt ggtagtaaag gaaaaccaac cctctggaaa 840
atacattttg agaattctaa acatctcaca tatatacaag ccaaattgat ttcttacttg 900
cactttgact ggctaccaga taatcacagt gcgtttactg tgtgtaacga aatatcctac 960
agtgagaaga cacagcgttt tggcaacacc atggaaagtg ggcttaaaaa agggttttct 1020
cagtgaatatt tttgggcata atgaagaacg atcaactatc ttctaatttg aatctatagt 1080
tactttgtac catttgaaat atatgtatat atatatatat aatattttga aatattatct 1140
attctcttca agaaatgaac agtaccacag tttgagacgg ctggtgtacc cttttgagtt 1200

```

```

ttggatgttt tgtctgtttt gctttgtttt gttagtcatt tctttttcta acggcaagga 1260
agatatgtgc ccttttgaga attcaagatg gcactgacac gggaaggcca gctacaggtg 1320
gactcctgga atttgaggca tcataatgat actgaatcaa gaacttcctt ctgcttctac 1380
cagatggccc aaggaagcac atcgtcctgt tttattgctt tctaccctgt gcaatattag 1440
catgcaagct tggcttacat agtcatactt tatattcaat tgatatataa taaccgttct 1500
aacctcttcc aggaaaatat ttttagaact actagctttt ccacttagaa gaaaatgagg 1560
attcttaagg gagccactcc accatgctat taagactctg gcagagttat gggtaggata 1620
tggatcccta catgaataag tcctgtaaat acaatgtctt aaggctttgt atagctgtcc 1680
tagactgcag aaatgtcctc tgattaaatc caaagtctgg catcgtaaac tacatagtgc 1740
tgtagcaaca agtcttatca tggcatctct ttctatgttt ggtttgcttt ttccaagagt 1800
attcaggtct cctcttgtga gataggaagg ccatgaaaac aattagattt caagatgac 1860
tatgtgacca aatgttggac agccctatta aagtggtaaa caacttcttt ctaaaaaaaaa 1920
aaaaaaaaaa aaaaaaaa 1937

```

<210> 2

<211> 4069

<212> DNA

<213> 斑马鱼

<400> 2

```

gcagttgctg gggctaacag aactggctgt tgggagagag aggcgaggca acgccgccc 60
gccctgccat tccattttac tgcttaactc aacctggagt gtcaggacct attctcctgc 120
attctcgctg cactatacgg gggagccaag tcactctgta ctactggac agccaggctg 180
gggtggaatag ggttctagag tggagcaggg gctctgcctt ttatggcgac tttctaaaag 240
attagcatca gtgtcttttg acagtatagc atctgggggt ggacgcggag aggaggcttt 300
gcttgctaaa cggtctcttt ctccgccgtt gatctggatt tgtttcctcg gccccctccc 360
cccgtcctt tctttctccc ctccgcctt tagcaaagtg acacaggcga cacctgctcg 420
cttgtgttcg atgttgaac tcgcacctcc tcggtggtga cggtgccagg gcaactgtac 480
cagggggaca tcggcgggtt tcccttctt ccagcccacg atgcctagaa gggcagcggg 540
tgggctgcgt ggggctctgc ccgcagcact tcgaggcggg attgaggggc tgaagctggc 600
caggagttgc tgctaagtgg attcgagtgg aaggcgccaa gtctccgcga gggcaccagc 660
ggggacctat ctgcgagcag tgggaacagg ggcacctgga cggaggaacg cgggcgtctg 720
gaggggggac atcggctgag ctcaagacct ctctctctt ctgtcccgag cttcccagca 780
actccgccac gttggagacc cggtagctgc gagagccagg gaactcgaga agtgctggc 840
cgaggctgct ttcctgaagg tgaatcattc tgtccaattg cttttccca gagaacaaga 900
gggagggcgg gagagaggga acggaggatg tgtgagtgtg tgtgtgtgtg agagggagag 960
acgacgtgag gcgagaggaa aagtctttag tcggccttaa aagcaaaca atcagagatg 1020
gaataagagc ggtaattgca gcaagaccgc cttgattctt gcagtccagg gagctgagcg 1080
caccgcgcgc atccggcgag gacaggaggc gaccgcgggc gctgccaagg gctgcgggac 1140
tttggtttt cctcagtaaa caaatctttt gattactttg aactgtgga ataaagaagc 1200
ggggagaagg atcaggctca cttcacccg cttcaggggg attccagctt ggatgtcaga 1260

```

```

ttcctgaacc gtctttgccg tcggaggagg aaacacatcc acacacgcgc gcgcacactc 1320
gcacgctcag ggccacactc acacgccgcc ctccacgac acacagcacc agacttcggt 1380
tccttatgcc cctggatggt gacggcggat tggcatcttg gaagcgatgc gagagcgata 1440
aggctggcgc cggcccgcaa aagctgcagg agcatcgcta ggtgttgccg ccaccgggaa 1500
gcggggctgc aggatgagta agagatactt acagaaagca aaaaaggaa aactgctaata 1560
aataatatatt attgtaacct tgtgggggaa agttgtatcc agtgcaaacc atcataaagc 1620
tcaccatggt aaaacgggaa cttgtgaggt ggtggcactc cacagatgct gtaataagaa 1680
caagatagaa gaacggtcac aaacagtcaa gtgctcctgc ttccctgggc aggtggcagg 1740
caccacgcga gctgctccat catgtgtgga tgcttcaata gtggaacaga aatggtggtg 1800
ccatatgcag ccatgtctag agggagaaga atgtaaagtt cttccggatc ggaaaggatg 1860
gagctgttcc tctgggaata aagtcaaaac aactagggta accattaac ccaggagaaa 1920
tcaagtgatc ctcaaggctg atgacattga acatgcgcac agaaacttaa ctcaactcct 1980
gaggtgatct tgaagatttt tataccaactt gaaagaggcg ctcaatagtc tatttccaag 2040
ggatttcatt gcctcttctt gaaatcaaga ctttttaaaa gtcagacatg aacttgcatt 2100
tcatgaagat ttcagcagat ttgaactgtg ttcaacttgt aaattgttaa agaatttga 2160
agtcactgtc tgaggagctg gtgaagagtt gtttttttca gggatgatgt agagacagtc 2220
accttttgag ttattggctc cagatgtgac tacttttctt gtttctgcaa gctgtatccc 2280
aagtgcactg tccttctgtc ctggatgtgt tcctgggtcc tatgttcatt tgctagtggg 2340
actacacatg gctttaatga catttccttt gagaactttt cctctggcat ggtgtagact 2400
gagacaattt tatttatatc ctaatcttgg agctcagaaa gcctacatgt ttaacatct 2460
taaagttgct ttgttaaag gaatggaaat atatatccat tggtaataat gttggcaagt 2520
aatagttatc tgaataaatc aatcatataa gaatgtatag acaagctgac atatttcct 2580
aaggctaaca acacctgct gaagctcttt gtcaaataag tagtagttag aactggattg 2640
ccattttcat tatataatac ttgtacctc tagagcactc tccctttctg tttttttta 2700
agttagcttt tctttaattt ttatgttta ctatttcct tcacagaaat cagcagttag 2760
cagtcaagtt aatgggtagc cttcagttt aaaaaaattg acagggatgc atgtgagttt 2820
ctgatttctt agcttgaaca ttattcactt agatttctt cagtattttt taaaaaactg 2880
tcctatctca ttttaaaaga ctttctttt ctgtatccca atgactgttt gaatgcttat 2940
atatttgctt aatctgttga tagaaaaaat tgttcatttt cctcagtttc aaatttataa 3000
atatttgctt acagttttcc tattcaaaac atttgttagg ccaatatttt gtgacatttt 3060
tgtagcgatt ttaacgttta tggttttggt tctacaggaa agtcataaat atttaaaggc 3120
cttaaacatg tatgtacttt ttttttctaa gttatagaat gtataatttt gtactacatt 3180
tattttgttt catttgtgat atgaaggagg agaagaaaga aaagtgcata gccattctgt 3240
aacaatattg tgtaaaccta tagtttgaag gaatgcaagg agaaggattt ctgtgtttta 3300
ctcattttag gctgttcaga agatgttca aaaattgtcc tgttagaatt tccatcatgg 3360
aaggtggtat ggaagaaggt atggaaatac tttgtattct aaaaactcac tgacgtggtc 3420
agttagacat acgttggttt ccaggataga ggcccatata tcctggggag ctttggctta 3480
ttagtttgtg acaatatcca aaggccaaaa cactactcag acatttcct gggaagagca 3540
actaaaaatg taaaattggt taaaaataaa atctgaaaag tatgtatctc acattgaact 3600

```

```

aaaatccact gtctcataag ttcatggaat gaaatggctt tctgcctcca ttttaatcat 3660
gcataaaatg aattagatgg ctttgagtgg attttcaciaa tggctcaaga ctatatgaaa 3720
ttataaaaaa aaagttgccc tggggtttct gcatcaatta gaatatcatt aatttctttg 3780
taaccaagtg aaaaactata ctttttggaa attatgaatt tgtcctaggt ttgtttgaga 3840
tttgaaatta tacatcatgc ttctcatitt tttaaactatg ttctttaaat caacactgga 3900
aactctgtat tatatacaag tgtaatacat gcatataata gaaaaaaaaac atggaatttc 3960
aaatatacta actagattat ccccagtaga ttaatgttgt gactattcag aaaaggtgaa 4020
taaaattggg atataaaatg gactctcttt cataaaaaaa aaaaaaaaaa 4069

```

<210> 3

<211> 1077

<212> DNA

<213> 斑马鱼

<400> 3

```

acttgtccag gtggagttag tctgaggaca gcagatgaac agacagaaac tgaagatcc 60
ccaaaaagga tgagttagag ggtcgagcgg aactggagca cgggcggctg gctgctggca 120
ctgtgcctgg cctggctgtg gacccacctg accttggttg ccttgcagcc tcccactgcc 180
acagtgttgg tgcagcaggg cacctgcgag gtgattgcgg ctcaccgctg ctgcaaccgg 240
aaccgcatcg aggagcgctc ccagacggtg aaatgtctct gtttttctgg ccaggtggcc 300
ggcaccacgc gggcaaagcc ctctgtcgtg gacgcctcca tcgtcctgca gagatggtgg 360
tgtcagatgg agccctgcct gccgggggag gagtgttaagg tgctcccga cctgtcggga 420
tgagctgca gcagtggaca caaagtcaaa accaccaagg tcacacgata gctcttgggg 480
gtcacggcct ggacaagaaa ggcttgactg agccgtgaac tgaagaatgg tatccagtca 540
tcagccagga aagatgggga ttacttaca tgctcatgt caaatgcagc atcagtcttt 600
ccggggcatt tcagttaagc tgctcagcag atatggatgg atctgcaatc acatacctaa 660
tgtggagctg ggcttttctg gagacacgaa ggtcaacaca caattcctgc ccttaaggaa 720
tgtccagttg aattggagag ttgatgacag acaatttaga taatttaggt taaagtactt 780
gataccagac tgcggcttct gggccacatg ctatggcatg atgggggttt gggaatgaga 840
ttcccacagt tcttcagata ccctgtggcc acagggcata gaaacaagag gtcacattca 900
gcacccacca cctccctctt tcgcatcagt tctgaatccc cagcaagctg ttaacatgtt 960
gcaggaaaac actctccctt tatgccagac cagcagtatc tcatttggat gggattggat 1020
tgacttgcgg aaggaaaagta aaaataaagc caaataactt cccaaaaaaa aaaaaaa 1077

```

<210> 4

<211> 133

<212> PRT

<213> 斑马鱼

<400> 4

```

Met Ala Met Val Ser Ala Met Ser Trp Val Leu Tyr Leu Trp Ile Ser
1           5           10           15
Ala Cys Ala Met Leu Leu Cys His Gly Ser Leu Gln His Thr Phe Gln

```


<211> 133

<212> PRT

<213> 斑马鱼

<400> 6

Met Ser Glu Arg Val Glu Arg Asn Trp Ser Thr Gly Gly Trp Leu Leu
1 5 10 15
Ala Leu Cys Leu Ala Trp Leu Trp Thr His Leu Thr Leu Ala Ala Leu
 20 25 30
Gln Pro Pro Thr Ala Thr Val Leu Val Gln Gln Gly Thr Cys Glu Val
 35 40 45
Ile Ala Ala His Arg Cys Cys Asn Arg Asn Arg Ile Glu Glu Arg Ser
 50 55 60
Gln Thr Val Lys Cys Ser Cys Phe Ser Gly Gln Val Ala Gly Thr Thr
65 70 75 80
Arg Ala Lys Pro Ser Cys Val Asp Ala Ser Ile Val Leu Gln Arg Trp
 85 90 95
Trp Cys Gln Met Glu Pro Cys Leu Pro Gly Glu Glu Cys Lys Val Leu
 100 105 110
Pro Asp Leu Ser Gly Trp Ser Cys Ser Ser Gly His Lys Val Lys Thr
 115 120 125
Thr Lys Val Thr Arg
 130

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> Sam2_正向

<400> 7

acgccgctga atgaaccgat taccgg 26

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> Sam2_反向

<400> 8

gagcgaacgc actgctttac acac 24

<210> 9

<211> 23
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> Beta-肌动蛋白_正向
<400> 9
gaggagcacc ccgtcctgct cac 23
<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> Beta-肌动蛋白_反向
<400> 10
gatggctgga acagggcctc tgg 23
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> Sam2cnu1_正向
<400> 11
tctactgagg agtgggtgtga 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> Sam2cnu1_反向
<400> 12
ggtcagtttc agagagctgg 20
<210> 13
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 左侧 ZFN
<400> 13
tgctcctgct tc 12

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 右侧 ZFN

<400> 14

caggtggcag ga 12

<210> 15

<211> 2248

<212> DNA

<213> 斑马鱼

<400> 15

tgggctcggc tccgcactgc tagctgcgcg ccgccctgga cggggcgcac cgactgcgcg 60
 cgcggctgcg ggcaaacatc gggagtcctg cctcagctgc cgcttctcca gcagcagctt 120
 caggtttctc ccgcaggagc ttcgggcttc tcctggtaga gacgtgggaa cttttcttct 180
 cctggcgagg ctgcagaggt gatgggccgc tcccggggct cccgcgggga ggcggcacgg 240
 tgagcgtcct cgggctccgg tgcggcgatc agtacctagt tccggacgcg ccggtccgac 300
 ttggatgccg gctctagtcg agtcttctga gctacgataa ttttttgga cggcagaaat 360
 gattggttct agcaacagat gggaatttgg agtcactctg aaatatatcc tggaataagt 420
 gtgtttgact agaaccacat cttatgaggt cccaaggat gagagtctgt gctaagtcag 480
 tgttgctgtc gcactggctc tttctagcct acgtgttaat ggtgtgctgt aagctgatgt 540
 ccgcctcaag ccagcacctc cggggacatg caggtcacca ccaaatcaag caagggacct 600
 gtgaggtggg cgccgtgcac aggtgctgca ataagaaccg catagaagag cggtcacaaa 660
 cggtcaagtg ctcttgcttc ccgggacagg tggcgggcac aactcgggct caaccttctt 720
 gtgttgaagc ttccattgtg attcagaaat ggtggtgtca catgaatccg tgtttgaag 780
 gagaggattg taaagtgtg ccagattact caggttggtc ctgtagcagt ggcaataaag 840
 tcaaaactac gaaggtaacg cggtagcgaa gagagaggtg tgcttcaatc ctggaggggc 900
 agcaggaggc ggagctcttt tgcttggatt cccatcatgg cccctctgca gaaaattgtc 960
 taggatttca gcaacttcat atttgtatat gtgagctgtg agaggtggca ttcacttaac 1020
 tggcccagcc ctctctgctt cgtgatttta tttcattgaa ttataaccac aagccaccac 1080
 ccatttgaca tcctctctgg attccaagg agcatacctc caaatccga gaagagcaaa 1140
 tcagagtctt caaatggat caccactaag ggcatgttca ttcttcaatt tctttctgct 1200
 ttacaaaag aacttggatg tatgttccaa agggctctca ttctgttctt cttttgaact 1260
 tttccttttg tccttgattt aaagtggttt taaaggggtc taaaagatt ttggcaaac 1320
 atatttgcag atgtagatta gctggtgaag aaaattactg ctagagatca actgattaac 1380
 tggtaaagaa cgtttatatt ataacccttg aagaatagaa ggacatagtt ggattattgt 1440
 gtgtgcattg tatttttact tctatTTTTT ttttgetttc cttttccag ttagcagaga 1500
 taaaatgaga gcgttttaac ttcaatgtac cattttactg agtgctaagg aagcatatca 1560

attccaatat tttataacca aagctctatc agaacatatt tataaaactt gttggaattt 1620
 ttacggcttt tgtgtagtca ttaggtaaa tcatttaaaa tataaaacaa tctcaattta 1680
 gatcaaggggt tatttcttag atcaaattta tgccaattat atgaaaagat tttactccg 1740
 agacaggagt ctttcagtgc tgaattttta gactgtaaat gagttcttct taacttagct 1800
 gtttccctac ttctgtgact tctgtgtag ccatcttatt tctttaaaat ctgagtcctg 1860
 attggcttaa tgattttgca gcagacatgt ctccacatat tctcaaatgc tgtcatgcgg 1920
 aaacgtatga aacagatgaa gaatgactga cccagatttt agatgtataa tgttggttaa 1980
 gtacatacta ctgtaaaaaat atgggatgaa ttttatatat taagaaatgc caaaaacata 2040
 gtttctgcac caagttaatt atccctgtcc tttcacattt atagggggaa aataaatact 2100
 ttatagccta acagttattt gatgttattc ttgcagaggg aatggaaagg aatggaaaga 2160
 tttgttggcg taatttttga atatttgta tgatcatatg aataagtaaa aaaattcatc 2220
 ctgctgatgg caaaaaaaaa aaaaaaaaa 2248

<210> 16

<211> 2615

<212> DNA

<213> 斑马鱼

<400> 16

gcggcgggcg cggaggatgg cgcgcgcggg gcccgcacgt ggaggccggc gcggggggcg 60
 gggcagggcc ggctgctgag acgcgctgct gcccccgcg cgggcgcccgc ggcttcaatg 120
 gcgccatcgc ccaggaccgg cagccggcaa gatgcgaccg ccctgcccag catgtcctca 180
 actttctggg cgttcatgat cctggccagc ctgctcatcg cctactgcag tcagctggcc 240
 gccggcacct gtgagattgt gaccttgac cgggacagca gccagcctcg gaggacgatc 300
 gcccggcaga ccgcccgtg tgcgtgtaga aaggggcaga tcgccggcac cacgagagcc 360
 cggcccgccct gtgtggacgc aagaatcatc aagaccaagc agtgggtgta catgcttccg 420
 tgtctggagg gggaaggctg cgacttgta atcaaccggt caggctggac gtgcacgcag 480
 cccggcgggg ggataaagac caccacggtc tcctgacaaa cacagcccct gaggggcccc 540
 gggagtggcc ttggctccct ggagagccca cgtctcagcc acagttctcc actgcctcg 600
 gacttcaccc gttctctgcc gcccgccac tccgtttccc tgtggtccgt gaaggacggc 660
 ctcaggcctt ggcatcctga gttcgggtc gtccagccga cccgaggagg ccggaactcag 720
 acacataggg gggggggcggc acctggcacc agcaatacgc agtctgtggg agcccgcccg 780
 cgcccagccc ccgcccagcg tggcggtggc cctgctgtcc tcagaggagg aggaggagga 840
 ggcagctccg gcagccacag aaggtctgag cccagcccgc ctgagacacg acgctgccc 900
 caggggactg tcaggcacag aagcggcctc ctcccgtgcc ccagactgtc cgaattgctt 960
 ttattttctt ataacttcag tatactccat agaccaaaga gcaaaatcta tctgaacctg 1020
 gacgcaccct cactgtcagg gtccctgggg tcgcttgtgc gggcgggagg gcaatggtgg 1080
 cagagacatg ctggtggccc cggcggagcg gagagggcgg ccgtggtgga ggcctccacc 1140
 ccaggagcac cccgcgcacc ctcggaggac gggcttcggc tgcgcggagg ccgtggcaca 1200
 cctgcgggag gcagcgacgg ccccccacga gacgccggga acgcaggccg ctttattcct 1260
 ctgtacttag atcaactga ccgtactaaa atccccttct gttttaacca gttaaactg 1320

```

cctctttctac agctccattt ttgatatgtt gataatccag tatctgccaa gagcatgttg 1380
ggctctcccggt gactgctgcc tcatcgatac cccatttagc tccagaaagc aaagaaaact 1440
cgagtaacac ttgtttgaaa gagatcatta aatgtathtt gcaaagccta aagttatata 1500
tttaacagtt ttatatgtt gtatatgtt agaaaatcct atttaacaat taacgtggca 1560
gtccccggccg tcctgagagt cgggccgagc cccgtgtgtt tctgaagact ctgggggttg 1620
gacacggcgg ggaggtggtg ccccgcgagc cccggggtgc caggcacgga aggcgggact 1680
ctggggagaag cgtgcggagg accgtggcgt cggcgtcccg gatgtgtcgg tctgtcccg 1740
ggaggccggg tccccctgc tgcgggccag gcttggtcc tgattccctc tctggtccct 1800
gtattggtca acacttgagc gtacaatata ttgaacatgc ttcttccaat gggttttgtt 1860
tccattttcc tgcccccttc gccactcacg gacettgagg ccagttgacg gcccttctcc 1920
ccacgcctgt gtccccgcgt tctgagaagt cctctgtctt cgtgtcacta ggtccagaaa 1980
gtcgcgccgg gcagaggcgc aggcggggcc ggcagggccg aggaataagc gacaattctg 2040
gtttttctcc cctggccgct gttcgccagc ctcttctatt ttctgagtt cccgtgaag 2100
tatatactac ctatgagtcc aattaacatg agtattatgc tagttctatc ctactaaaaa 2160
aaacgtaaaa aaataactat atagaagctg ttccagcaac catagactga agatacgaaa 2220
gaaaatccat ttatttaaga cctgttccgg tatccatgag gacataattt acctttcagt 2280
caccacaaat ttataggcat ttgtatcctg gactaaaaga aggggctgag gttgggtttg 2340
tcatcacaga gggggtgggc ctggaaaggg tccttcccaa gctgccccgg ctccggcggc 2400
ccgggccggc agcctctgcc agccagcgtc ctacggcct cccctctgcc tgtttctttt 2460
gaaagcaagt gtagacacct tcgagggcag agatcgggag atttaagatg ttacagcata 2520
tttttttttc ttgttttaca gtattcaatt ttgtgttgat tcagctaaat tatgaaaaat 2580
aaagaaaaac tcctttgata aaaaaaaaaa aaaaaa 2615

```

<210> 17

<211> 2652

<212> DNA

<213> 斑马鱼

<400> 17

```

aaagacacaa atcgccctcc ggagtggcgc ctccagtcgc ggcggagcgc ggcgttggcg 60
gcggatggag ggcgcgagcg ggcggccgcg gaggetgcac ccggcggggc gctgatgcgg 120
cgcttgacc ttcgctgcgc gacttcgggg gcgtcgcccg agttgggact ccgcgatgca 180
gctcctgaag gcgctctggg cactggcagg ggccgcgctc tgctgcttcc tctcctagt 240
gatccacgcg cagttcctca aagaaggtca gctggccgcc ggcacctgtg agattgtgac 300
cttggaaccg gacagcagcc agcctcggag gacgatcgcc cggcagaccg cccgtgtgc 360
gtgtagaaaag gggcagatcg ccggcaccac gagagcccgg cccgctgtg tggacgcaag 420
aatcatcaag accaagcagt ggtgtgacat gcttccgtgt ctggaggggg aaggctgcga 480
cttggttaatc aaccggtcag gctggacgtg cacgcagccc ggcgggagga taaagaccac 540
cacggtctcc tgacaaacac agcccctgag gggccccggg agtggccttg gctccctgga 600
gagccacgt ctcagccaca gttctccact cgctcggac ttcacccgtt ctctgccgcc 660
cgcccactcc gtttccctgt ggtccgtgaa ggacggcctc aggccttggc atcctgagct 720

```

```

tcggtctgtc cagccgaccc gaggaggccg gactcagaca cataggcggg gggcggcacc 780
tggcatcagc aatacgcagt ctgtgggagc ccggccgcgc ccagcccccg ccgaccgtgg 840
cgttggccct gctgtcctca gaggaggagg aggaggaggc agctccggca gccacagaag 900
gctgcagccc agcccgccg agacacgacg cctgccccag gggactgtca ggcacagaag 960
cggcctcctc ccgtgcccc aactgtccga attgctttta ttttcttata ctttcagtat 1020
actccataga ccaaagagca aaatctatct gaacctggac gcaccctcac tgtcagggtc 1080
cctgggggtcg cttgtgcggg cgggagggca atgggtggcag agacatgctg gtggccccgg 1140
cggagcggag agggcggccg tgggtggaggc ctccacccca ggagcacccc gcgcaccctc 1200
ggaggacggg cttcggctgc gcggaggccg tggcacacct gcgggaggca gcgacggccc 1260
ccacgcagac gccgggaacg caggccgctt tatctctctg tacttagatc aacttgaccg 1320
tactaaaatc cctttctgtt ttaaccagtt aaacatgect cttctacagc tccatttttg 1380
atagttggat aatccagtat ctgccaagag catgttgggt ctcccgtagc tgctgcctca 1440
tcgatacccc atttagctcc agaaaagcaaa gaaaactcga gtaacacttg tttgaaagag 1500
atcattaaat gtattttgca aagcetaaag ttatatatct aacagttttt atatgttgta 1560
tattttaga aaatcctatt taacaattaa cgtggcagtc ccggccgtcc tgagagtcgg 1620
gccgagcccc gtgtgtttct gaagactctg ggggtgggac acggcgggga ggtggtgccc 1680
cgcggacccc ggggtgccag gcacggaagg cgggactctg ggagaagcgt gcggaggacc 1740
gtggcgctcg cgtcccggat gtgtcggtcg tgcccgggga ggccgggttc ccctcgctgc 1800
gggccaggct tggctcctga ttccctctct ggtccctgta ttggtcaaca cttgagcgta 1860
caatatcttg aacatgcttc ttccaatggg ttttgtttcc catttctgc ccctttegcc 1920
actcacggac cttgaggcca gttgacggcc cttctcccca cgctgtgtc cccgcgttct 1980
gagaagtcct ctgtcttcgt gtcactaggt ccagaaagtc gcgccgggca gaggcgcagg 2040
cggggccggc agggccgagg aataagcgac aattctggtt tttctcccct ggccgtcggt 2100
cgccagcctc cttcattttc ctgagttccc gctgaagtat atactaccta tgagtccaat 2160
taacatgagt attatgctag ttctatccta ctaaaaaaaaa cgtaaaaaaaaa taactatata 2220
gaagctgttc cagcaacat agactgaaga tacgaaagaa aatccattta ttaagacct 2280
gttccggtat ccatgaggac ataatttacc tttcagtcac cacaattta taggcatttg 2340
tactctggac taaaagaagg ggctgaggtt gggtttgtca tcacagagg ggtgggcctg 2400
gaaagggctc ttcccaagct gccccggtc cggcggcccc ggccggcagc ctctgccagc 2460
cagcgctctc acggcctccc cctcgctgtt ttcttttgaa agcaagtgtg gacaccttcg 2520
agggcagaga tcgggagatt taagatgtta cagcatatct tttttcttg ttttacagta 2580
ttcaattttg tgttgattca gctaaattat gaaaaataaa gaaaaactcc tttgataaaa 2640
aaaaaaaaaa aa 2652

```

<210> 18

<211> 140

<212> PRT

<213> 斑马鱼

<400> 18

Met Arg Ser Pro Arg Met Arg Val Cys Ala Lys Ser Val Leu Leu Ser

1	5	10	15
His Trp Leu Phe	Leu Ala Tyr Val	Leu Met Val Cys Cys	Lys Leu Met
20	25	30	
Ser Ala Ser Ser	Gln His Leu Arg	Gly His Ala Gly	His His Gln Ile
35	40	45	
Lys Gln Gly Thr	Cys Glu Val Val	Ala Val His Arg	Cys Cys Asn Lys
50	55	60	
Asn Arg Ile Glu	Glu Arg Ser Gln	Thr Val Lys Cys	Ser Cys Phe Pro
65	70	75	80
Gly Gln Val Ala	Gly Thr Thr Arg	Ala Gln Pro Ser	Cys Val Glu Ala
85	90	95	
Ser Ile Val Ile	Gln Lys Trp Trp	Cys His Met Asn	Pro Cys Leu Glu
100	105	110	
Gly Glu Asp Cys	Lys Val Leu Pro	Asp Tyr Ser Gly	Trp Ser Cys Ser
115	120	125	
Ser Gly Asn Lys	Val Lys Thr Thr	Lys Val Thr Arg	
130	135	140	

<210> 19

<211> 132

<212> PRT

<213> 斑马鱼

<400> 19

Met Ala Pro Ser	Pro Arg Thr Gly	Ser Arg Gln Asp	Ala Thr Ala Leu
1	5	10	15
Pro Ser Met Ser	Ser Thr Phe Trp	Ala Phe Met Ile	Leu Ala Ser Leu
20	25	30	
Leu Ile Ala Tyr	Cys Ser Gln Leu	Ala Ala Gly Thr	Cys Glu Ile Val
35	40	45	
Thr Leu Asp Arg	Asp Ser Ser Gln	Pro Arg Arg Thr	Ile Ala Arg Gln
50	55	60	
Thr Ala Arg Cys	Ala Cys Arg Lys	Gly Gln Ile Ala	Gly Thr Thr Arg
65	70	75	80
Ala Arg Pro Ala	Cys Val Asp Ala	Arg Ile Ile Lys	Thr Lys Gln Trp
85	90	95	
Cys Asp Met Leu	Pro Cys Leu Glu	Gly Glu Gly Cys	Asp Leu Leu Ile
100	105	110	
Asn Arg Ser Gly	Trp Thr Cys Thr	Gln Pro Gly Gly	Arg Ile Lys Thr
115	120	125	
Thr Thr Val Ser			

130
 <210> 20
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼
 <400> 20
 Met Gln Leu Leu Lys Ala Leu Trp Ala Leu Ala Gly Ala Ala Leu Cys
 1 5 10 15
 Cys Phe Leu Val Leu Val Ile His Ala Gln Phe Leu Lys Glu Gly Gln
 20 25 30
 Leu Ala Ala Gly Thr Cys Glu Ile Val Thr Leu Asp Arg Asp Ser Ser
 35 40 45
 Gln Pro Arg Arg Thr Ile Ala Arg Gln Thr Ala Arg Cys Ala Cys Arg
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ile Ala Gly Thr Thr Arg Ala Arg Pro Ala Cys Val Asp
 65 70 75 80
 Ala Arg Ile Ile Lys Thr Lys Gln Trp Cys Asp Met Leu Pro Cys Leu
 85 90 95
 Glu Gly Glu Gly Cys Asp Leu Leu Ile Asn Arg Ser Gly Trp Thr Cys
 100 105 110
 Thr Gln Pro Gly Gly Arg Ile Lys Thr Thr Thr Val Ser
 115 120 125

<210> 21
 <211> 436
 <212> DNA
 <213> 斑马鱼
 <400> 21
 cagccggtgc tcctgccatg tcctggetcc tgtgtctgtg gataagtgtt agctgcttac 60
 tgctctgtca cgccacttta tacgaaacca tccagcagca tcatgtgacc cgtccgggcc 120
 gaaacgccat ccagatactg gaaggaggaa catgtgaggt gatcgcagca caccgatgtt 180
 gcaacaagaa ccgtattgag gaacgttccc agacggteaa gtgttcatgt ttaccaggaa 240
 aagtggctgg cacgacacga aacaaaccct cctgtgtaga cgctccatt gtgattggga 300
 agtggtggtg tgagatggag ccatgtcttg agggagaaga gtgcaagacg ctaccagaca 360
 actccggctg gatgtgttcc tctgggaata agatcaagac cacgaggatt catccccgga 420
 cctaacaag agctcc 436

<210> 22
 <211> 883
 <212> DNA
 <213> 斑马鱼

<400> 22

```

gggcgattcg atatcgcggc cgcgatccga cgaaagttag aagacagaag aactgagagt 60
ttctacaaga cagcaatacc tggacgaaag gatataccga cacctcacia tgaatggatt 120
gaggacaaag tggttagattt tacatacagc tgccctgga cgatacagag gagggttggg 180
atgtcgtggc tgctgtgggt ttgggtcagt ctgacagtcc tgctgatgtg tgagggcact 240
ttctatgaga ccatccagca gcacctggca ccgcctggaa ccaacataca gatcctcgaa 300
ggagggacat gcgaggtgat cgcggcgcac aggtgctgta aaaaaaaa gattgaagag 360
agatctcaga cagtgaagtg ctctgttta cctgggaaag tggcaggaac caccaggaac 420
aaaccctcct gtgttgacgc ctccattgtg attgggaagt ggtggtgtga gatggagccg 480
tgtctggagg gagaagagtg taagactcta ccagacaact ccggtggat gtgctactct 540
ggaacaaga tcaaaaccac caggaatacc caccataca catccttga gcagaggtag 600
aatcactgca aagctcaaaa tggaggaact ttgaatgaag ggaaacatcc aagaggacia 660
gctgaaataa gttttccaa ctctgacca acaaccatgt gtctaaagac ttgaaatgga 720
atcctcggtc cataaatcca tctgtctctg agtaacacgg acaacagact ctttaagaaa 780
gtcgttgtgg gcgtgaacac tgctggtctt tcttccctct gtttttgttt gacagctgtc 840
aatattgttt cctctcagtg gataattaaa ctctatccc ttt 883

```

<210> 23

<211> 505

<212> DNA

<213> 斑马鱼

<400> 23

```

acgccgctga atgaaccgat taccggatcg atgaaccccc gagtcccgct ggactgatcg 60
ggctgatcgg atggattgat caggagttaa tcagagctgc aggatgagtg tccgagatct 120
tcttctgctt ctctctcaga ctcttcttct gcttctgctt ctctgagat cttcagctca 180
ctccacagag cttcacattg ttgaggtgcg gacgggcacc tgtgaggtcg tgtctttaca 240
tcgctgctgc aacaagaaca agatcgagga gcgttcgcag accgtcaagt gtcctgctt 300
cccgggacag gtggcaggaa caaccagagc cgccccgtcc tgcgtcgacg ctgctatcgt 360
ccagcagaag tgggtggtgc agatgcagcc gtgtctggat ggtgaagagt gtaaagttct 420
gccggtcttg aaaggtatga gctgcgccac cggaacaag atcaagacca ccaagatctc 480
tccagaccga gatcagctgt ggtga 505

```

<210> 24

<211> 1580

<212> DNA

<213> 斑马鱼

<400> 24

```

cgcttcaagt gctgaacact tgaggggcga gtcgagctcc tcaacgccgc tctcagtctc 60
cacgcagcct gaacacaaga ctacagcagc caaaaacacc actggtccat catggataag 120
gggatattgc cgatttgaag ccttcgttat aataccgcga attaagggtc tcgtctttac 180
gtgcttattc agatccgttc cggcgcgcaa agttcagacg catctgaagg aactttggag 240

```

```

agctggagtt cagaggactc aatcgagact tttctgaact gaagcaggaa tcgctttaat 300
accattttgca ttctcgtttg tttgagtctg tagtgatgc ttttcctggg atcgtgtttg 360
cgccaagggga aattatcagg ctttgccact gccggggttt tacttctgac aatgaagagc 420
aaatgagagc agtattactt cacctttatt gacagctcaa cgacaggatg cgggagaggg 480
agctgcagcg tgtgggcagg agattgctgc tgttgggcat ctgtctgctg tctctctggg 540
gtcagttcag cctggcctcg acacatcgca gccatattgt gcacgtcaaa gcgggaacct 600
gtgaggatcat tgctgcccac cgctgctgta acaagaacaa aatcgaggag cgctcccaaa 660
ctgtcaagtg ctctgcttc cctgggcaag tggctggaac aacaagagct gctccatcct 720
gtgtggacgc atctatagta gcgcagaagt ggtggtgtca gatgcagccg tgtatggacg 780
gtgaggagtg taagggtgtg ccggatctaa aaggctggag ctgcagcaca ggcaacaaag 840
tcaagacgac caaggtcaca cgatagtctg ggaccaacat acatttggga ctagcagcat 900
tttttttctc tctccccatt ttttcgatca aagcaatgga aatgaagata catagacttc 960
aaactacttc acaactatcg ggatcaactt gttggacctc aactgaatac taatgtcact 1020
tggaatagac catttaaaca catggagtgt tttctctctc ttccccctgt cctcttctac 1080
agtattttca ctctgccaga ctctgtctt ttgttttata aaagtgtcgg acaagatcat 1140
acgccatgta aagtaaatat tacattttaa aaaaatcagt tcagagacaa ttctgccacc 1200
atggattata acggatttcg tttttcaagc gaaagtggac tcgagaggat cacttattac 1260
ttaaatcata tgttccagag gcactaatat tcattccact atccttcagt gccaatat 1320
tctttcttct actatgagca gaatttttga tcagtgtgag gtgtatgttt ttttggctat 1380
ggttttgaaa cgggacttgt gcaaaaacaa atcgcaagt ttatgataag aattacaggt 1440
attaaacctg ataaaatgtg tacgggagct gtaaaaaaga tggcaaaaaa gatttattgt 1500
ttgtttttta aagccttggg ggccaatatt gagtcaaagt gtcagtatta tctcaataa 1560
aactctatct ctatggaaaa                                     1580

```

<210> 25

<211> 1728

<212> DNA

<213> 斑马鱼

<400> 25

```

caggtttaga cgagtcttaa ggctactcag gtggccctgt gcatttagat ggcagaatta 60
atgcaagtca ggtgaacctg taaaatattc agaaacaacg tgagctcaga aagagaagaa 120
gctgcaggac agctgtcaca aacgccgctg agtggcgctg attcaccgct cattgcgttt 180
cttcagaaca tccctggaga gcacagggat cgagtcagcg cagcgcagct ccagaccttt 240
gccttcagca ccggcagatc ctgcacagag cgccaacgcg tctccagctc ggacaaacac 300
taggaaaaca agcccaaggg gatactacgc gagatgaggg ctccgttaca aacatctgtg 360
tgatttttaa accaggagcg aaatcgttga tgtgaagttt cacgcagctc tccgttgagt 420
tgagatgaag atctgagccg ctgtgagaga aggaactttg cgtcttcgcg caccggagcg 480
ccctgcgggg acatcgggcg cttcagtgat aagaggactg aacttctttt ctgtatttgg 540
ggctttctag ctactctga cagagtagac acagaaggga tcctttggtg cggattgttg 600
aagcatctcc agttcgtgga tggaataaat cataatggaa gggcaatgag acctctttct 660

```

gctgctgggc aataatccgg actaccgcgc caacaggatg caggagcggg cgctgcagag 720
 ggcgtttgcg tggatcgta tggatatttt ggcccttggt ttgttttggg gtcatttgte 780
 tgaagcgtct tctcaccgca gtcacatcgt gcacgtgaaa gctggcacat gtgaggatgat 840
 tgcagcccat cgctgctgta acagaaataa gattgaggag cgatcgaga cggtaagtg 900
 ttctgcttc cccggacaag tggctggaac gacgagagct gcaccctcct gtgtggacgc 960
 atctatagta gtcagaagt ggtggtgtca aatgcagcca tgtgtggatg gtgaggagt 1020
 taaagtcctg cccgacctca caggctggag ctgcagcacg ggcaacaagg tgaagacaac 1080
 caaggtgact cgatagttcc aagcaacaat gtccctgggac aaaagagctg aaaatggaga 1140
 ctaactagag gcagcattga gcttcagcta acaggattta tcagtattag tcatatgaag 1200
 attatctgca atcaggaaca gactgatctc ctccataaac attaggacca tcctagagtt 1260
 aatgtgccct tctcaatgga cccctggcc ttccggacgc tcgacttttc gaatgtggat 1320
 caatagacgc tggaaatgtgt tggctagggg gtcttgatgt tcatatgcag tttatttggt 1380
 ttttacagaa ggtttgatc acctacaaca gtgcagccca gtggagtta agctcttcag 1440
 taacatgctc tccgtcattg tatttcagtt ctccccaca ttccatgatt atccctgctc 1500
 tacctgacca taaggtccaa ttattccttg tggaaatcagc atttaaactg ctggacctct 1560
 aatggactca tgtgtatagt ctttatttct aaatgaaaag cttttcagcc ccacagtctg 1620
 aaacaacaga ttagatgtac aagtatattc tagataatgt aaaagtgtaa aagatcaaag 1680
 tgttattctc aaaaacaagc gaaataaagt ttaacggtta tcactttt 1728

<210> 26

<211> 863

<212> DNA

<213> 斑马鱼

<400> 26

aaaagaaagt aagctcggtt aaaacaaaca tctgtcttca ggactcctgc tacatcccga 60
 agcgaaggag aatgctttcg ctttcataaa cggaggatct gagcgggtgt tgaggacaca 120
 ggaggagaga catgtccagc tcacagagaa gagactgac agacaacaca gaaagatgca 180
 gctgtggggg cgatctctgt ggccgctgcg gattgtgctc ttgttcacct tggtaatgtg 240
 ttctgttggg ttggtttctg cgggcacgcg gactctgagg ggacacacag cttcatacca 300
 ggtaaagcag ggtacctgtg aggtggttgc catccaccgc tgctgcaata agaacaagat 360
 tgaggagcgt tcacagaccg tcaagtgtc atgtttccct ggtcagggtg ccggtaccac 420
 acgtgcacag ccatcttggt tggaggcttc catcgtgcta cagaagtggg ggtgccaaat 480
 gcacctatgt ttggatggcg aggagtgtcaa agctcttcca gatctgactg gctggtcctg 540
 cagcaccggt aacaaaagtca aaaccaactaa ggtcacacga tagcaacaac atggcagttc 600
 taccatgagg cccaagactc cttaacgacc cactggaaaa gaaaactttc ttgtttaaga 660
 cactgacgtt gctggcggtt ttccatagge tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc 720
 gacgtcaag tcagagggtg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc 780
 ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg 840
 cctttctccc ttcggaagc gtg 863

<210> 27

<211> 1673

<212> DNA

<213> 斑马鱼

<400> 27

```

acagacggag gcggagatac agacacggcg tttctccaag aacacacgcg tctcgtttgg 60
gaccttttac acgaccgttc gaaataatgc gggaattacg gctatttcga agctgacttt 120
atctgaatgt aggctttaca gcaagcgcgt tcgacaggct actgtacaga aaacagttca 180
cagatcgcg c agttctccca gtgcgtaaaa cagacggaca ggatggtcgc gcatcacttc 240
acttagatcc acgcaacagc tacagacaaa ctggaaattt cagctccttt ttttctccga 300
tggaagctct aaaaataaaa atatgttatt ttctaaagt ttctattttt tgaaagaaaa 360
cggattgctt tctttctgaa tcttcaaacg aaaacgtagc agagggtgtg gttgttgtat 420
ggcattagaa tggagatgtg gcgtggatgc tgaaggcagt caggatgctg atgctgagag 480
ttgcgtgggc tctagcggga gcggcggtct gctgttttct catcgttctc atccactctc 540
gcttcctaag agacggtcaa cttgcagcag gcacctgtga gattgtcact ttagacaaag 600
acagcagtca gccacgcagg acgattgcca gacagacagc tcgctgtgca tgtaagaaag 660
gacagattgc tgggacaacg aatgccaggc cggcctgtgt ggacgctcgt atcgtgaaga 720
ccaagcagtg gtgtgacatg gtgccctgtc tagaggatga agagtgtgac ttgttagtaa 780
ataaatctgg ctggacttgt acacagccaa gtggcagagt gaaaactaca acggtgtcct 840
aacagtggga ggggttcctg gagcgctacc agacaaggcc tcttgcatat ttgccacct 900
gctgtagata cttgctatgt ctcatcggtc tgacacctgc ctctgcctac cagtctgcgt 960
ctcagctttg taaatgggca gtacccctt gtgccacgga gagcatacta gatgttcaca 1020
aagcgctca tggacagcag cagccttgag gaatttatga gcgactctga ggcacctacc 1080
ctgtttgaga ctgaaccaa cataggcttt tttgggactc caccagcggg tctgacctag 1140
actgtgaacc aagccgcttt ttgaactgct ttctgctgaa gtacattttt gccactcatt 1200
tttacagacc aaagaggaaa aaataatgat ataatacaga aatttaaaaa aatccattga 1260
ctatgttagc acggactgag agacagactt gaaacgatta agacggtgaa aaaaatatat 1320
atatacctaa atgtagagag gtagatatag atctatgaag actttgctat acagcggcgg 1380
tctacaagca aaaatgctga catggaacac tgaacgact gggttgacca ttcccattta 1440
tcacaatctg atgagaacct ttaatatatt acagatttcc ttgaaaggaa ctaccactg 1500
catttcaagg acagctagga tatagatact gtacacaate acatcaacaa atttgtttag 1560
catttttcag tagcaacatt ttggacagtt tgcattcage atggaagggtt aaatggaacc 1620
gtaccccat t gtttatcgtc agaagatatt aaacaagaac atgaaaactg tca 1673

```

<210> 28

<211> 408

<212> DNA

<213> 斑马鱼

<400> 28

```

acgcgtcaga tcctcggaag gatgcagcat ctccgtgtgg cgtgggcgct cgcgggagcg 60
gcgggtgggct tttttctgct cttcttgatc caagcgcatt tcttcggcga aggtcagctg 120

```

gcggcaggta catgtgaaat cgtgactctg gaccgggaca gcagccagcc aagaaggacc 180
 atcgcccggc agacggccag gtgcgcctgc aggaagggcc agattgcggg cactaccaga 240
 gccagtccag catgtgtgga tgcgcaaatt gtcaggacca gacagtgggtg tgagatgatg 300
 ccttgtttgg atgacgaagg ctgtgacctt ttggtaaaca gaacaggctg gacgtgtgca 360
 cagccaggag gccgagtga aacaaccacg gtatcctgac gccagtgg 408

<210> 29

<211> 86

<212> PRT

<213> 斑马鱼

<400> 29

Gly Thr Cys Glu Val Ile Ala Ala His Arg Cys Cys Asn Lys Asn Lys
 1 5 10 15
 Ile Glu Glu Arg Ser Gln Thr Val Lys Cys Ser Cys Phe Pro Gly Gln
 20 25 30
 Val Ala Gly Thr Thr Arg Ala Ala Pro Ser Cys Val Asp Ala Ser Ile
 35 40 45
 Val Ala Gln Lys Trp Trp Cys Gln Met Gln Pro Cys Met Asp Gly Glu
 50 55 60
 Glu Cys Lys Val Leu Pro Asp Leu Lys Gly Trp Ser Cys Ser Thr Gly
 65 70 75 80
 Asn Lys Val Lys Thr Thr
 85

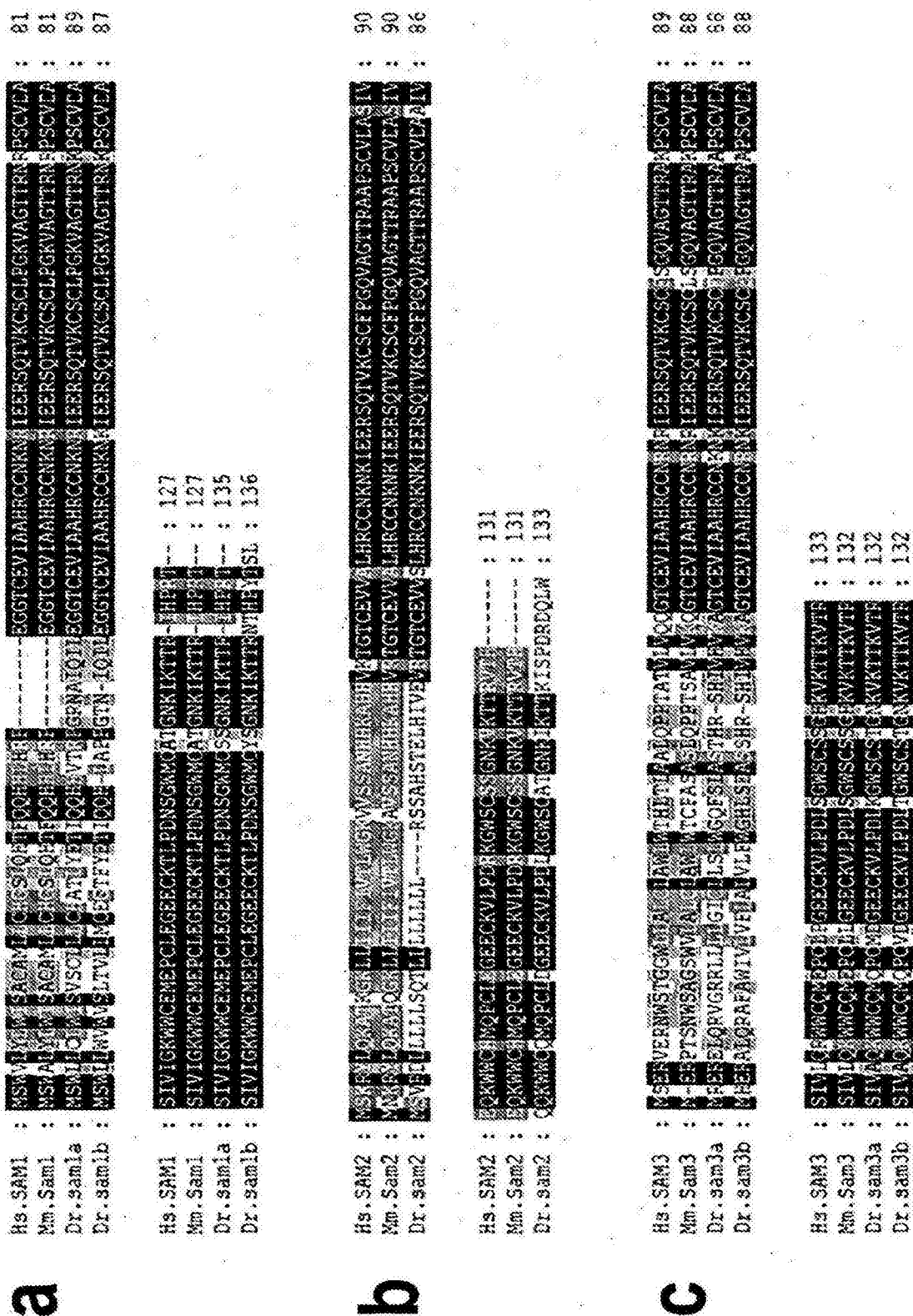


图1

d

Hs. SAM4 :	NRUGASGSHSHHFIHNVIMGCTIISASOHARGHGHDDKGGTCVVAHRCCKNH	IEERSQTVKSCFFGQVAGTTRAQPSCV	90
Mm. Sam4 :	NRVCAGSHSHSRVNTVIMGCTISASOHARGHGHDDKGGTCVVAHRCCKNH	IEERSQTVKSCFFGQVAGTTRAQPSCV	90
Dr. sam4 :	NQNGFSLMPLIVILFTLWCSGLVSHGTRSARGHIASVQGGTCVVAHRCCKNH	IEERSQTVKSCFFGQVAGTTRAQPSCV	90

Hs. SAM4 :	ASTVLRKRCINPCIGETGCPPLISGSCSGNKVKTKVTF	: 135
Mm. Sam4 :	ASTVLRKRCINPCIGETGCPPLISGSCSGNKVKTKVTF	: 135
Dr. sam4 :	ASTVLRKRCINPCIGETGCPPLISGSCSGNKVKTKVTF	: 135

e

Hs. SAM5.1 :	MAPSPRTGSRQDAIAPSMSTTNAFNIIASLLIAYCSQIAGTCEIVTLDR	DSSQPRRTIARQTARCACKGGIAGTTTAEACVEA	88
Mm. Sam5.1 :	MAPSPRTGSRQDAIAPSMSTTNAFNIIASLLIAYCSQIAGTCEIVTLDR	DSSQPRRTIARQTARCACKGGIAGTTTAEACVEA	88
Dr. sam5a :	MLKAVRMIRVANAIAGAAVCCFIVLTHSPRLRDG	QIAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARCACKGGIAGTTTAEACVEA	87
Hs. SAM5.2 :	-----MQLKALAIAGHALCCFIVLVTHAQELKEG	QIAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARCACKGGIAGTTTAEACVEA	81
Mm. Sam5.2 :	-----MQLKALAIAGHALCCFIVLVTHAQELKEG	QIAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARCACKGGIAGTTTAEACVEA	81
Dr. sam5b :	-----MQLRVANAIAGAAVGFLELLAQHEFGEG	QIAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARCACKGGIAGTTTAEACVEA	81

Hs. SAM5.1 :	SHKRTVACINIFCIGSCCDLIINAGGNTCQFGRKTTTV	: 132
Mm. Sam5.1 :	SHKRTVACINIFCIGSCCDLIINAGGNTCQFGRKTTTV	: 132
Dr. sam5a :	SHKRTVACINIFCIGSCCDLIINAGGNTCQFGRKTTTV	: 131
Hs. SAM5.2 :	SHKRTVACINIFCIGSCCDLIINAGGNTCQFGRKTTTV	: 125
Mm. Sam5.2 :	SHKRTVACINIFCIGSCCDLIINAGGNTCQFGRKTTTV	: 124
Dr. sam5b :	SHKRTVACINIFCIGSCCDLIINAGGNTCQFGRKTTTV	: 125

图2

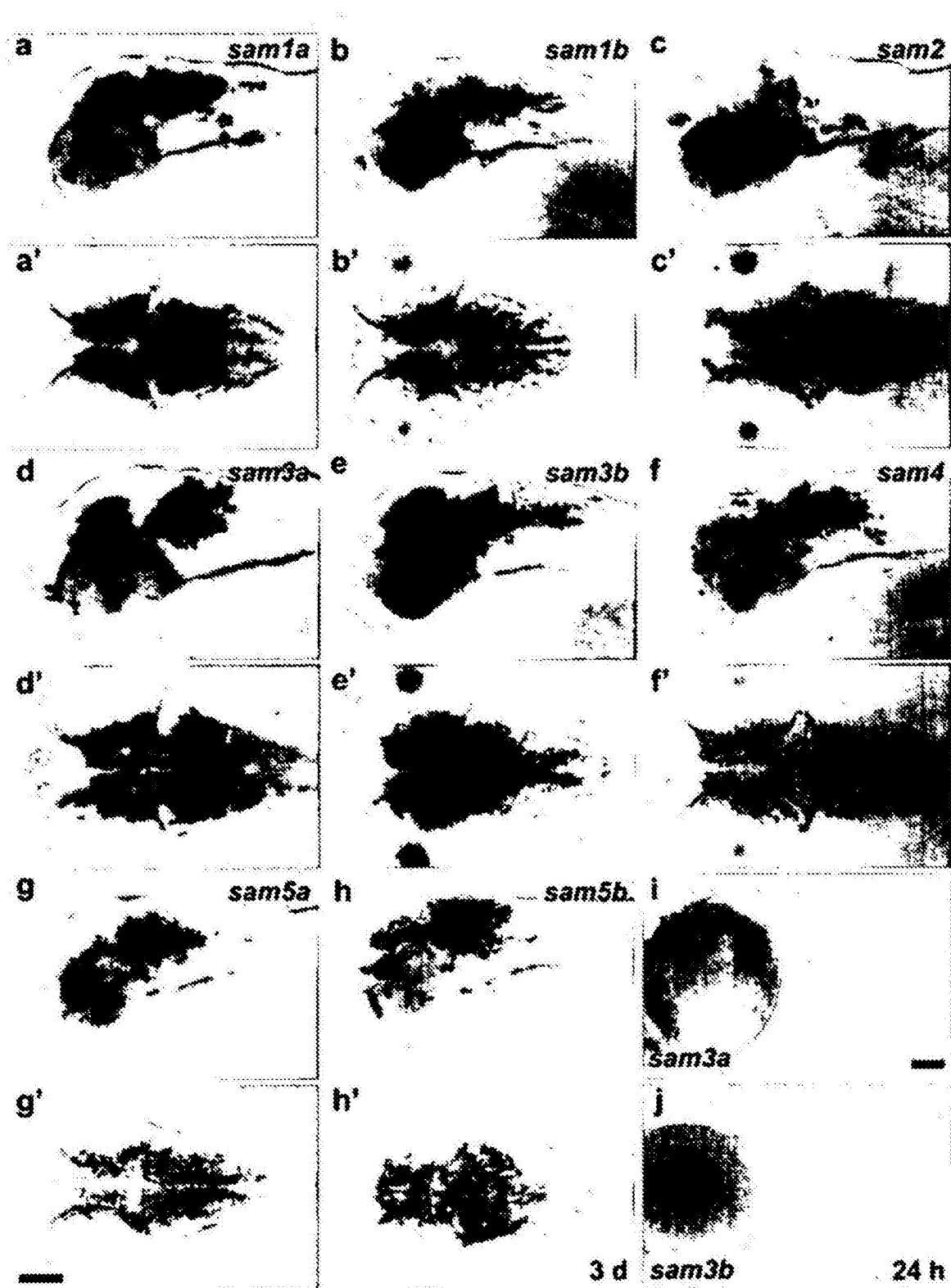


图3

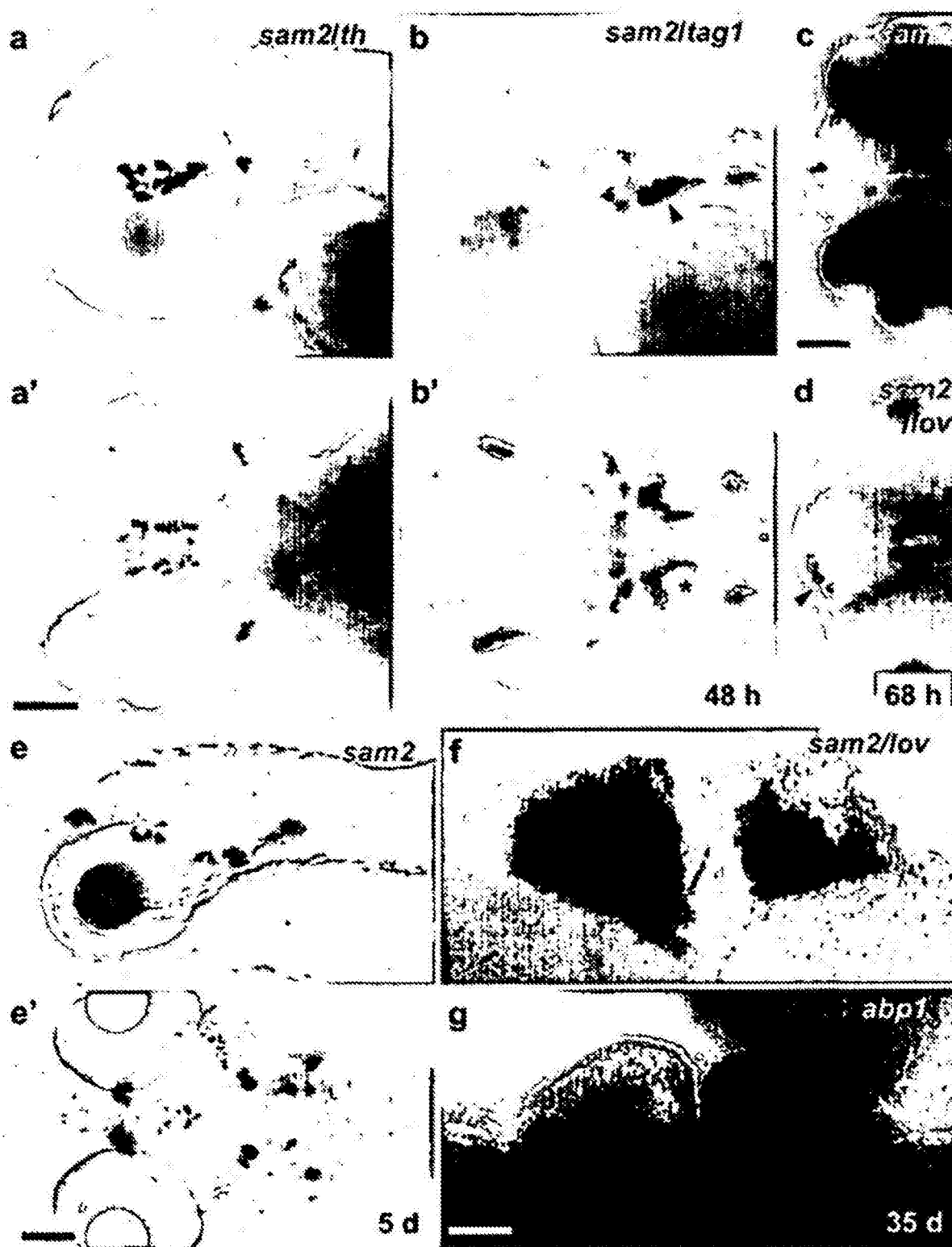


图4

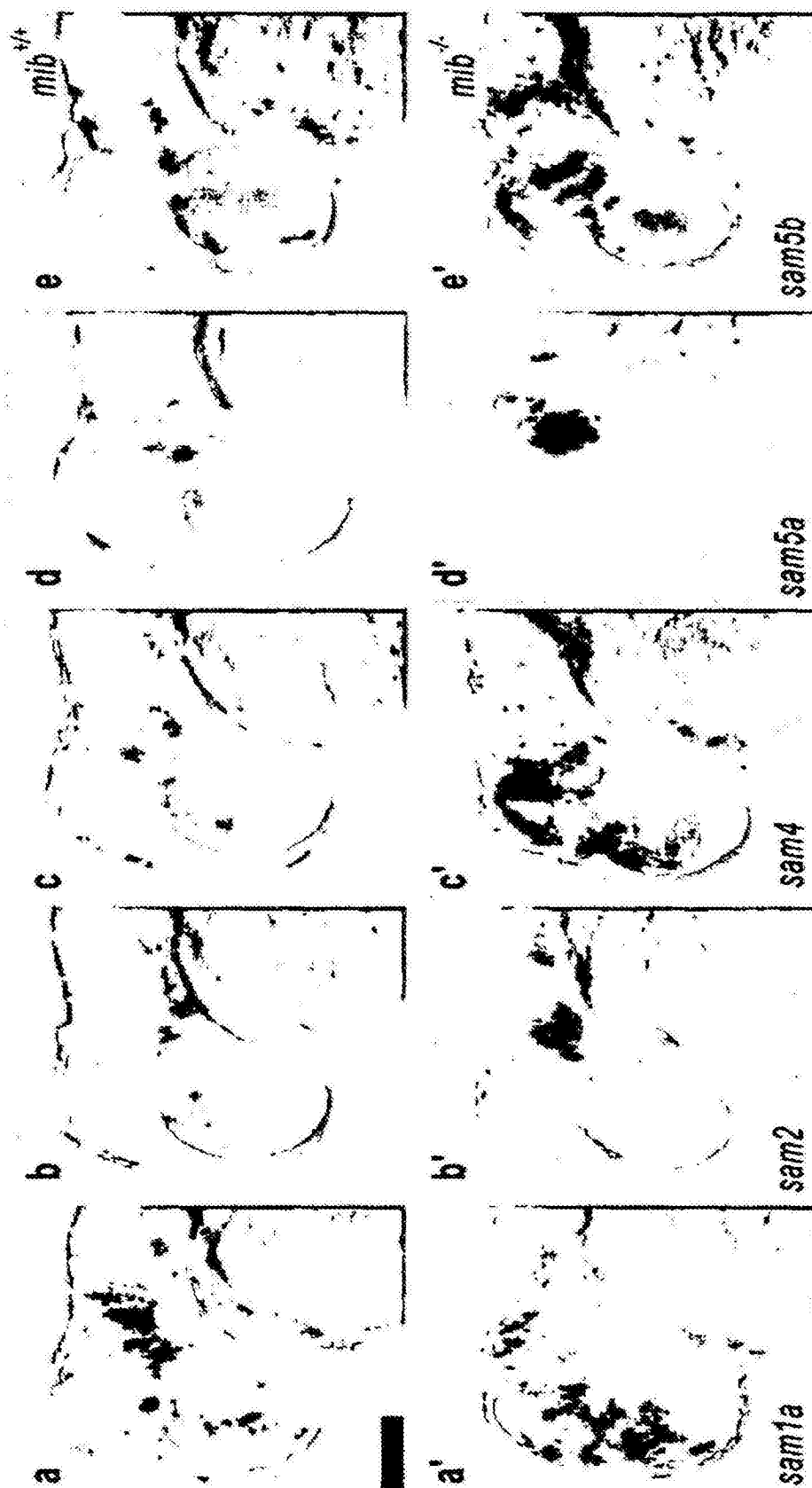


图5

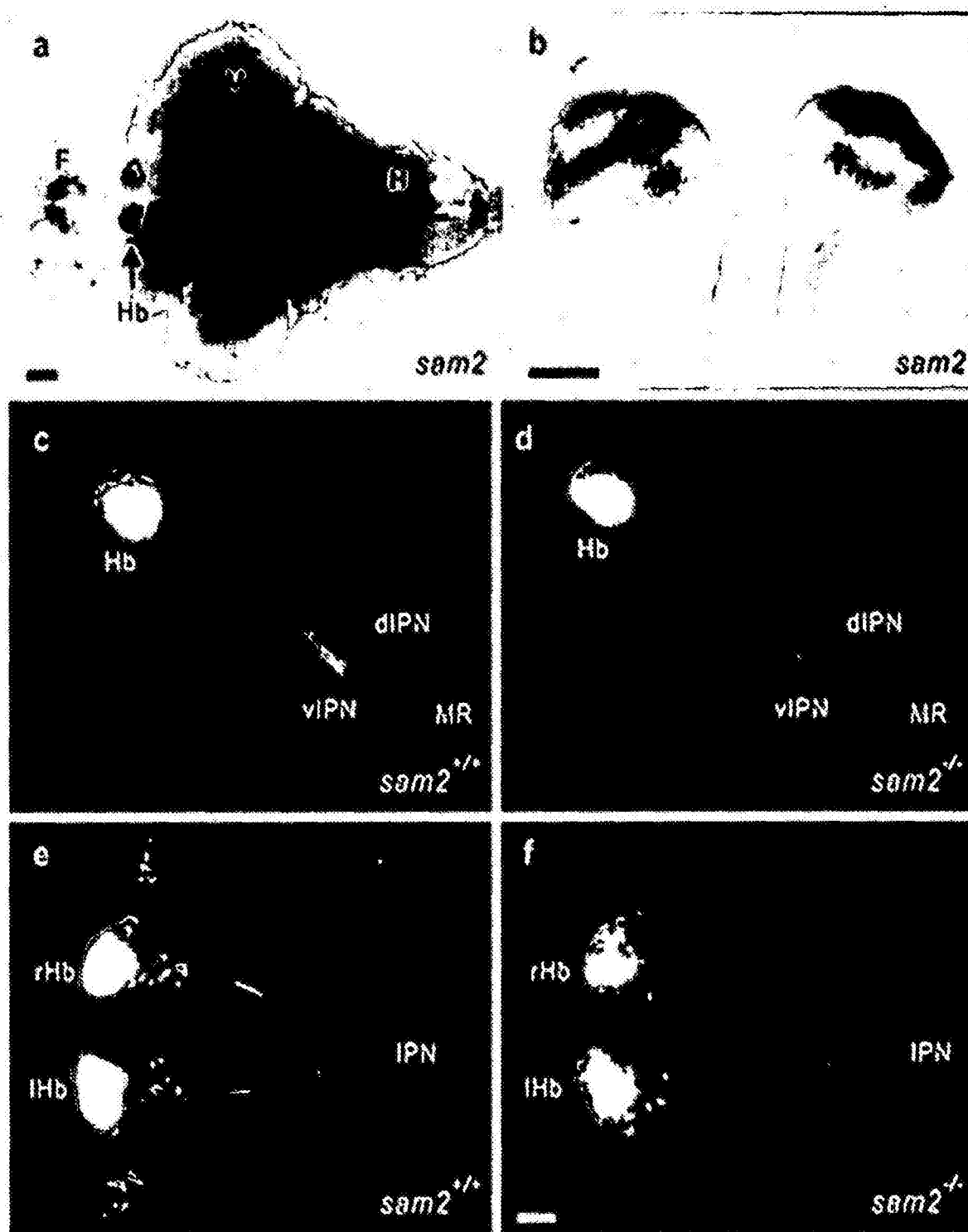


图6

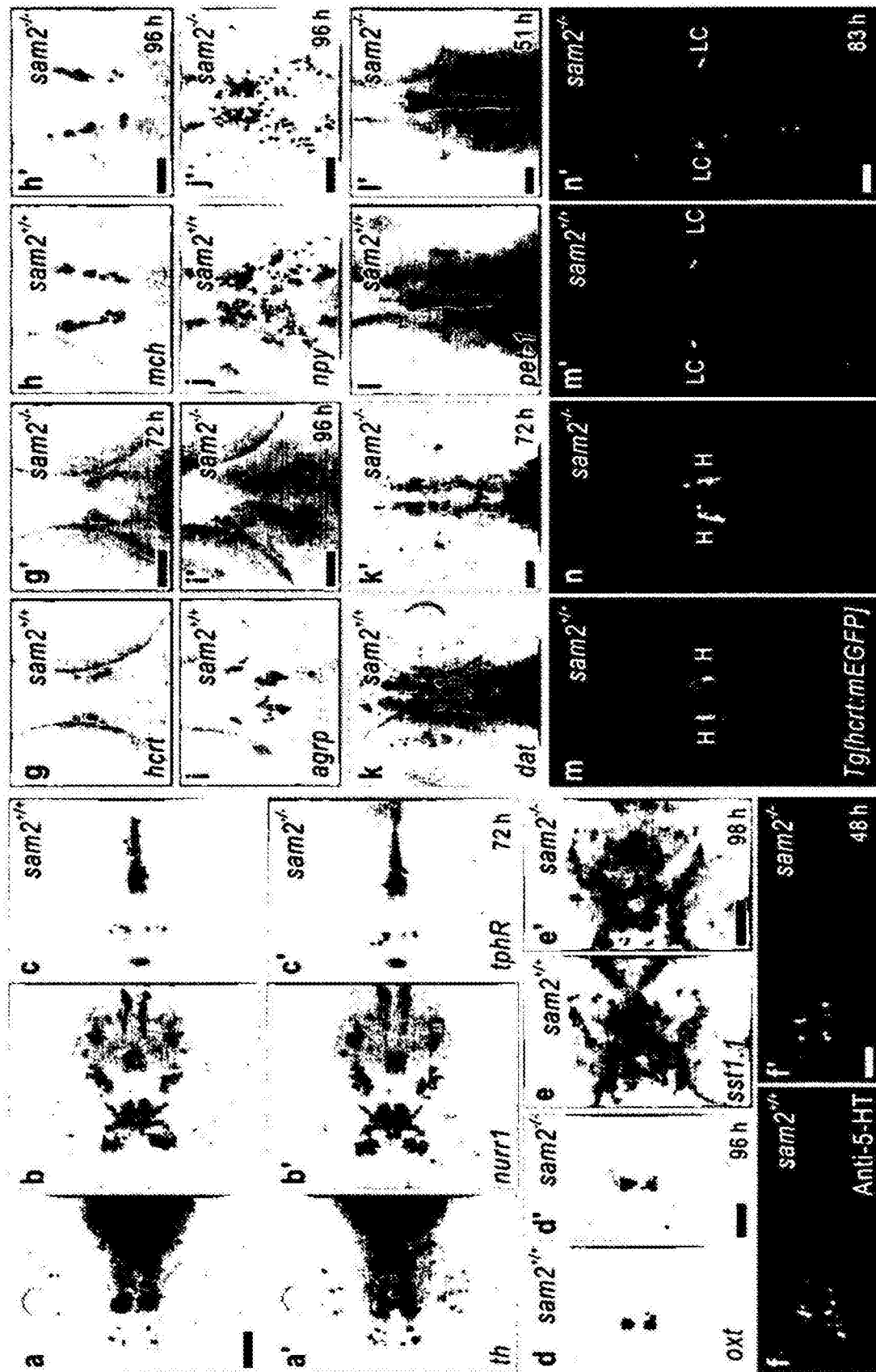


图8

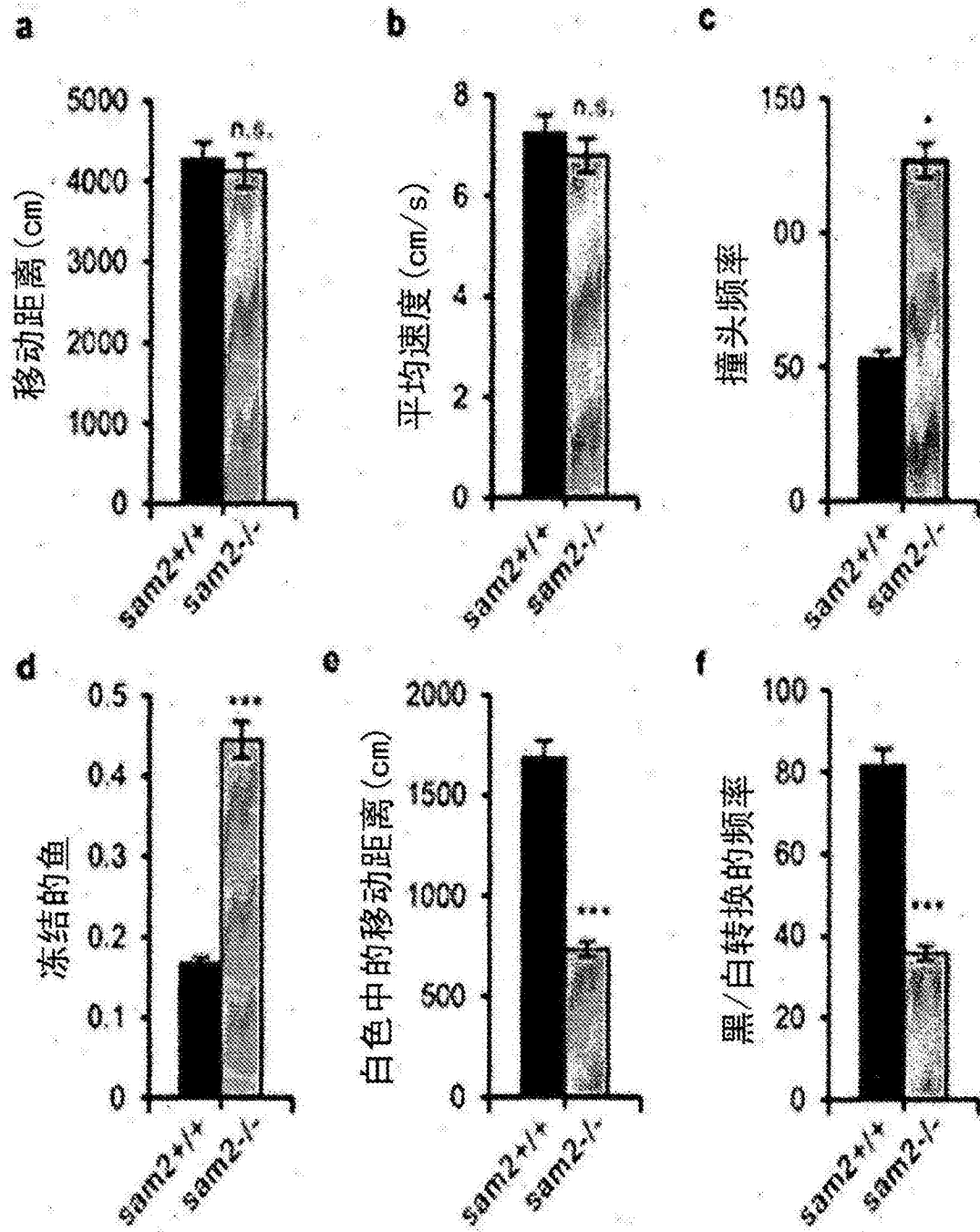


图9

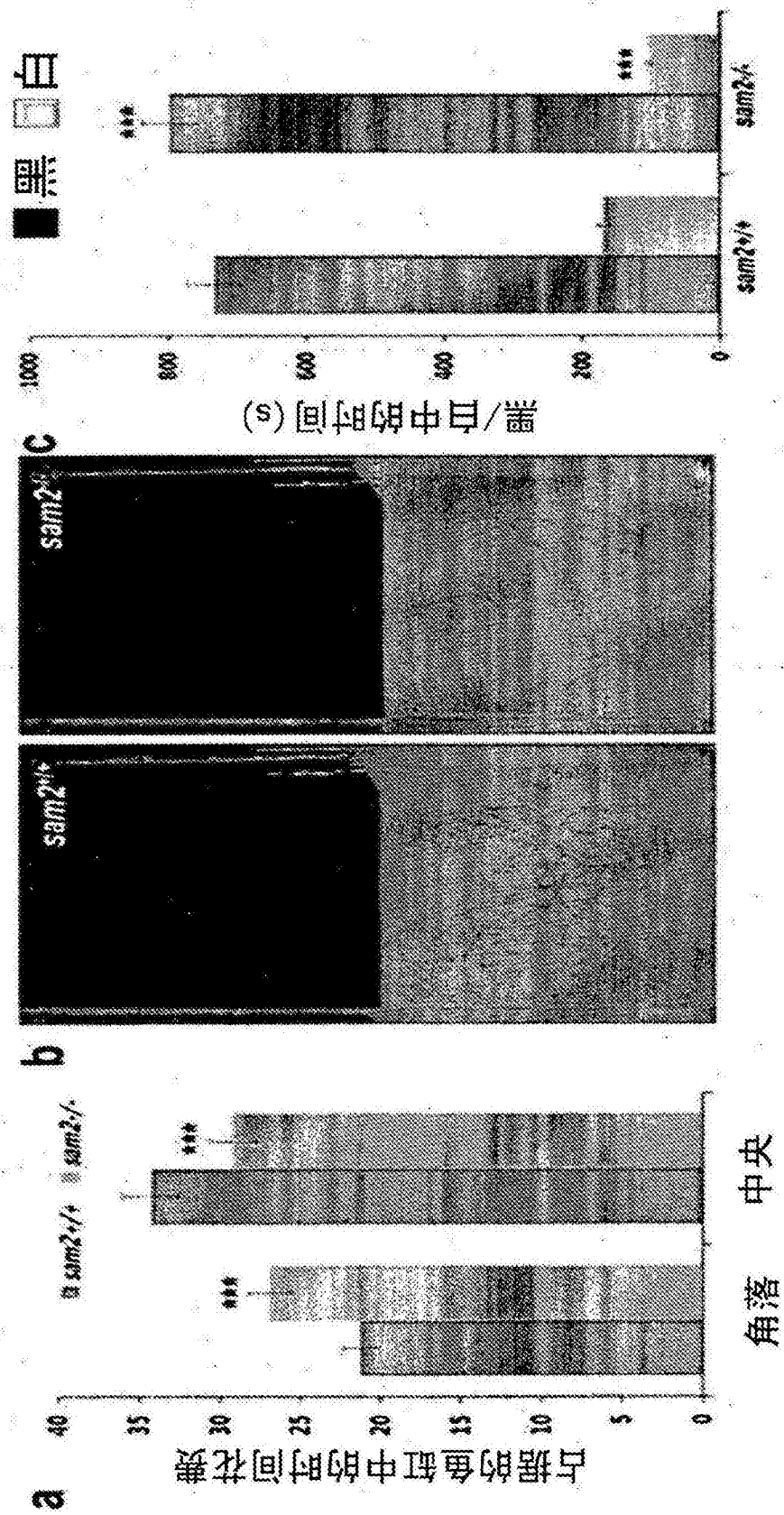


图10

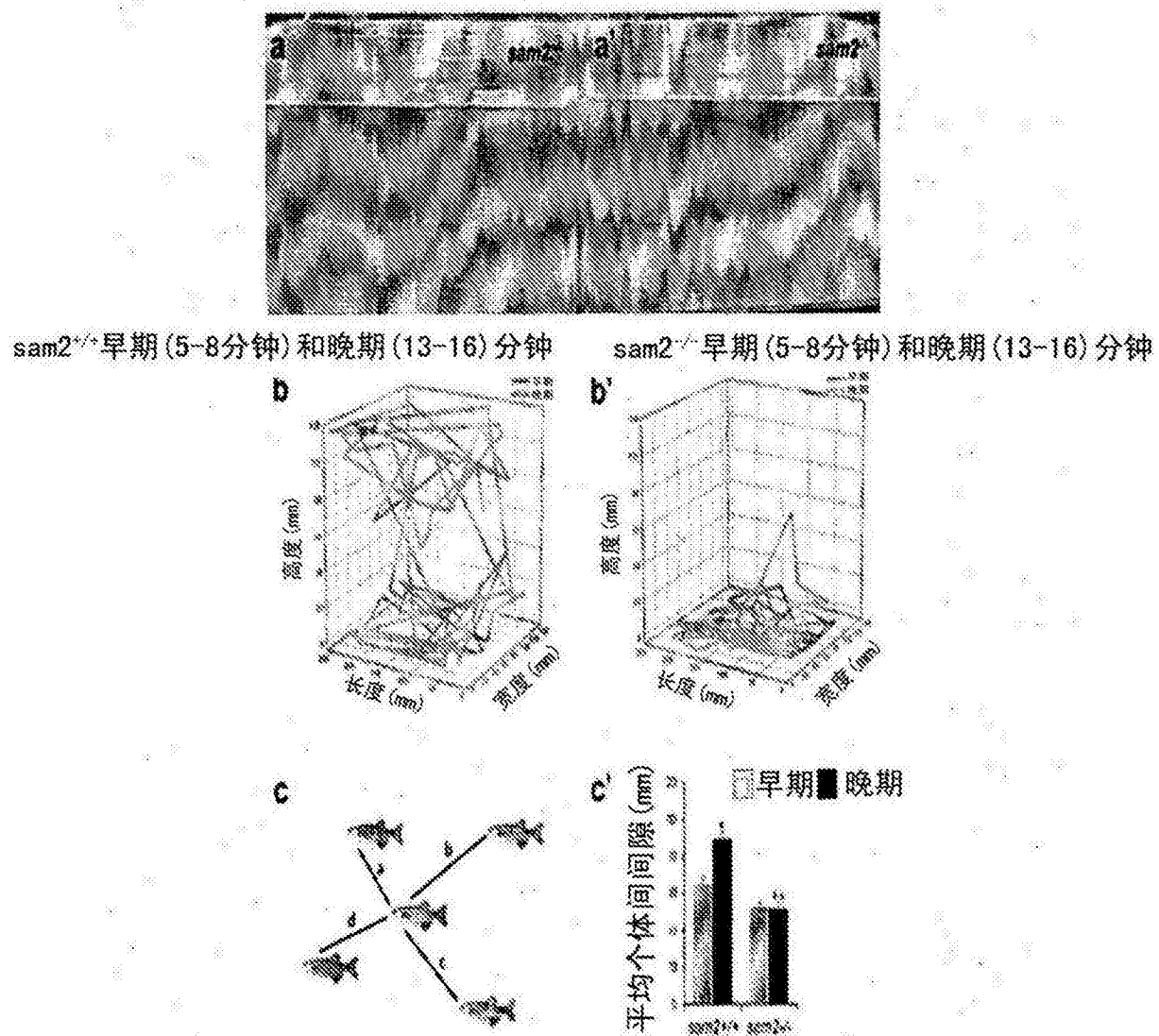


图11

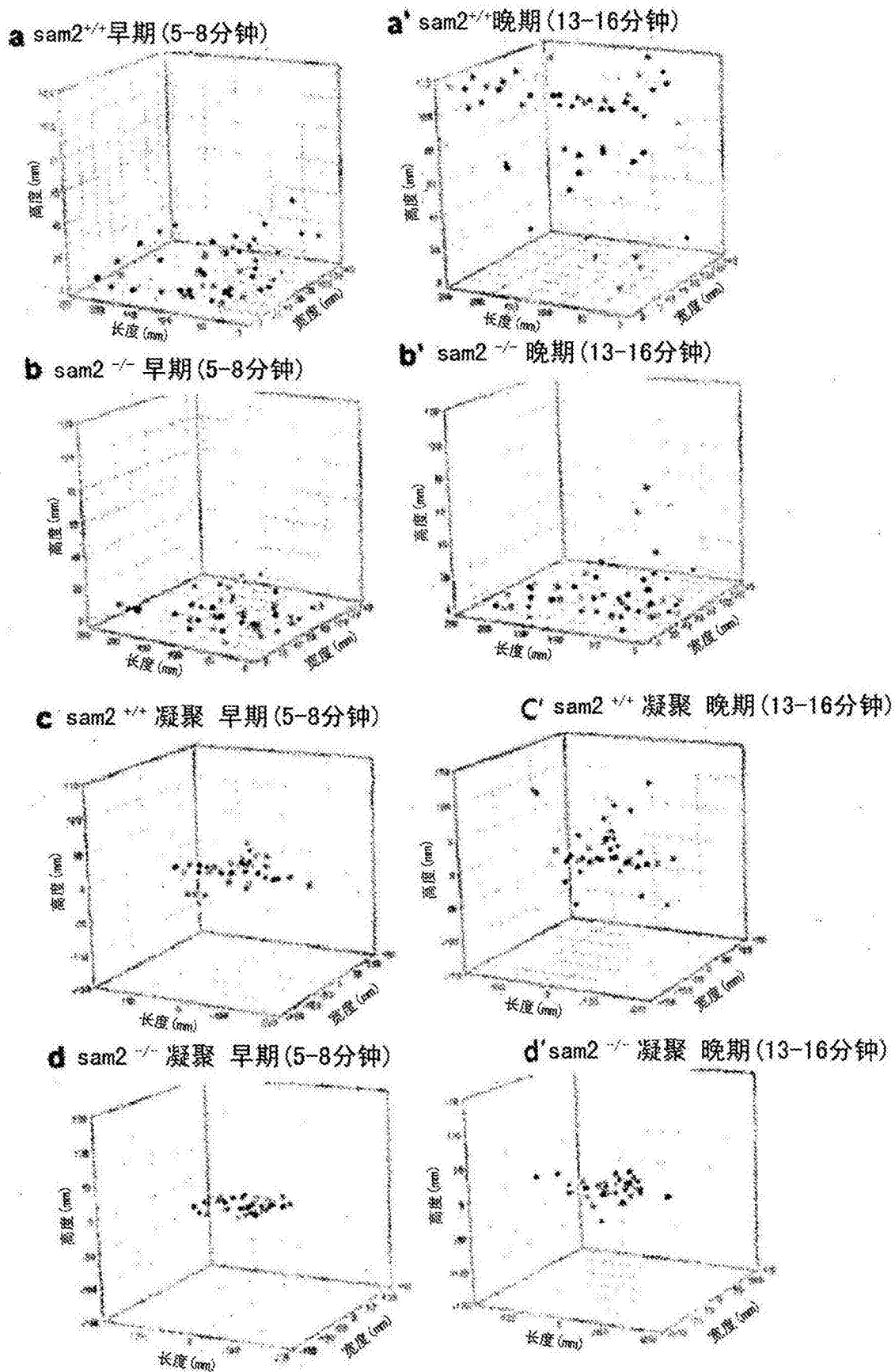


图12

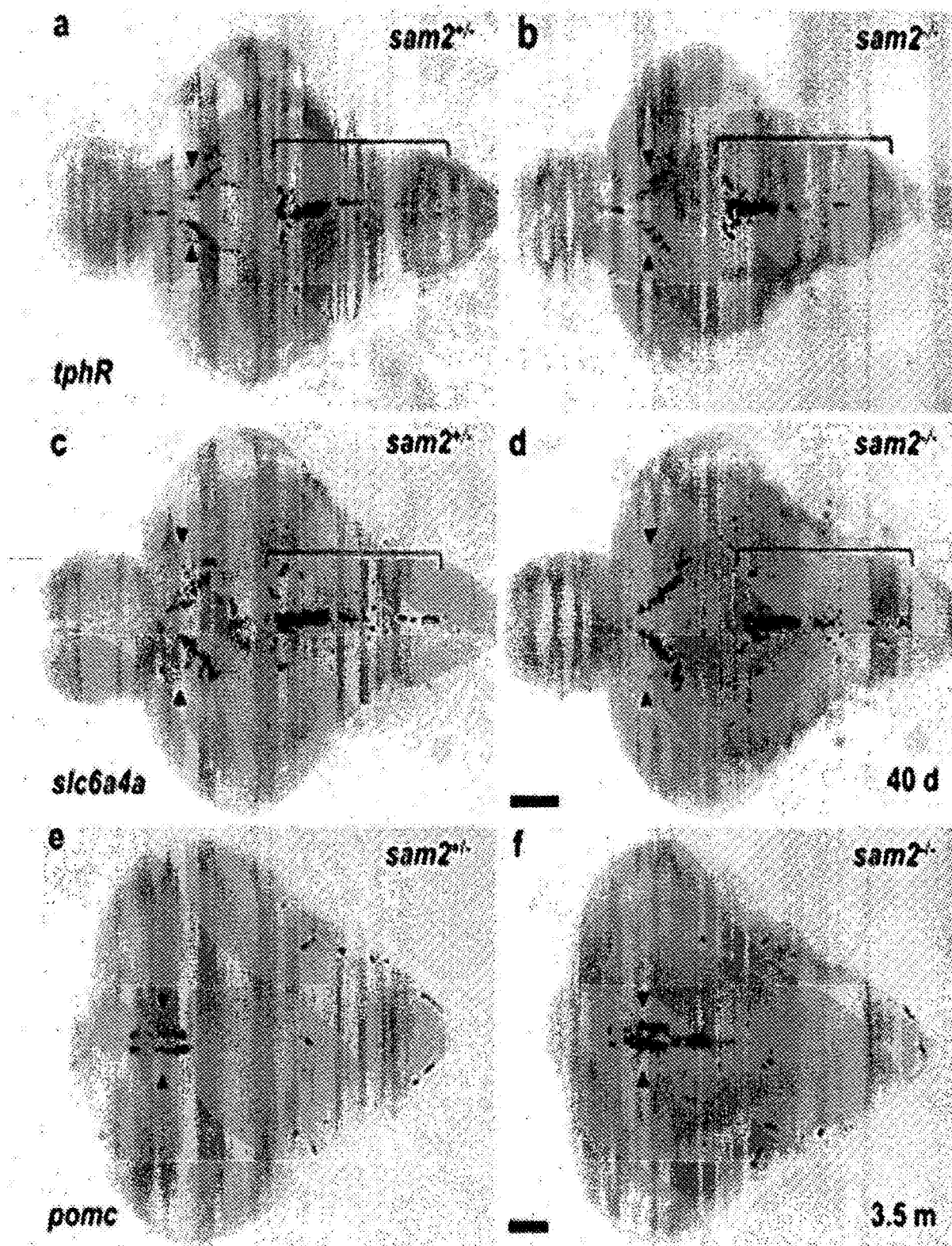


图13

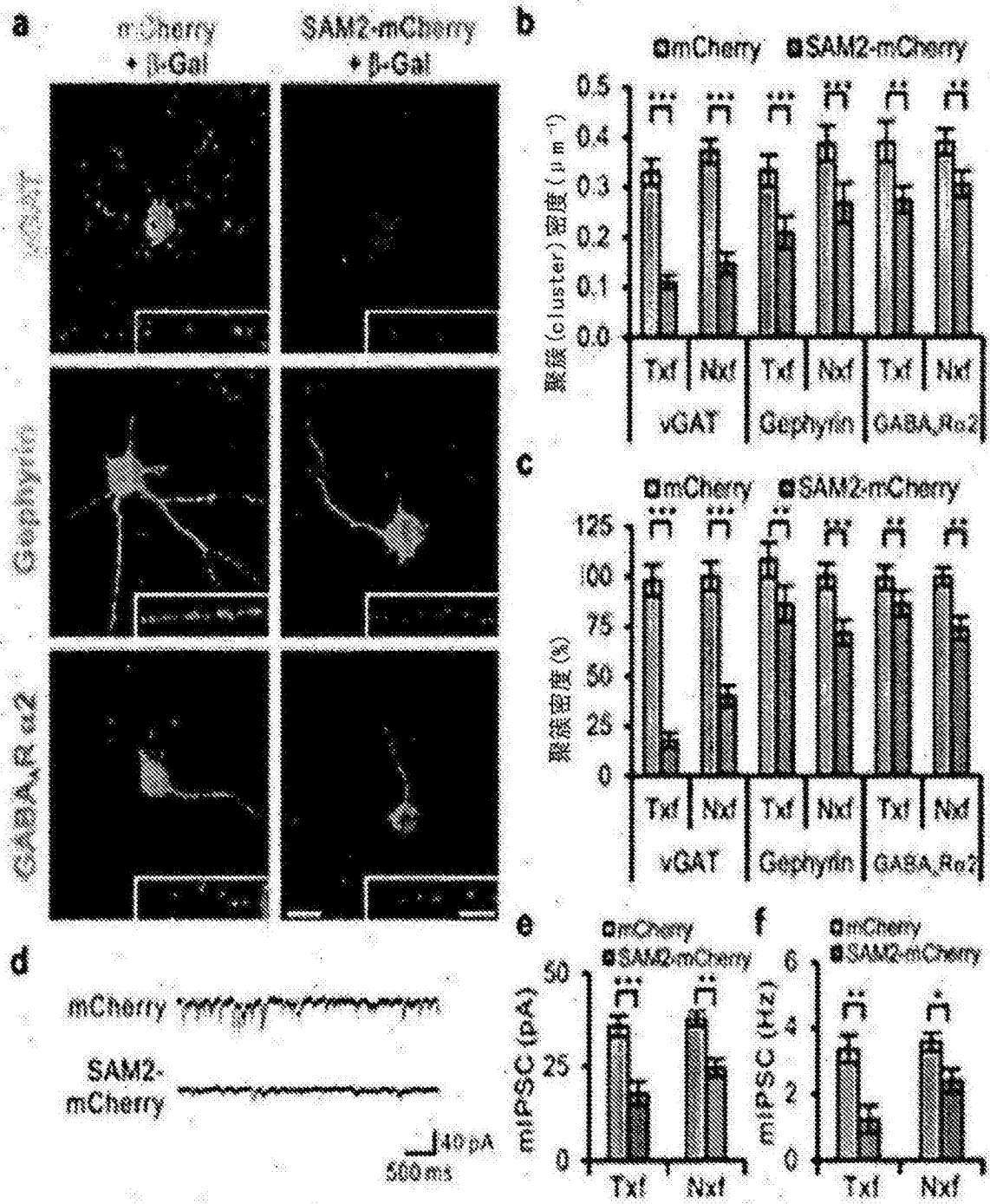


图14

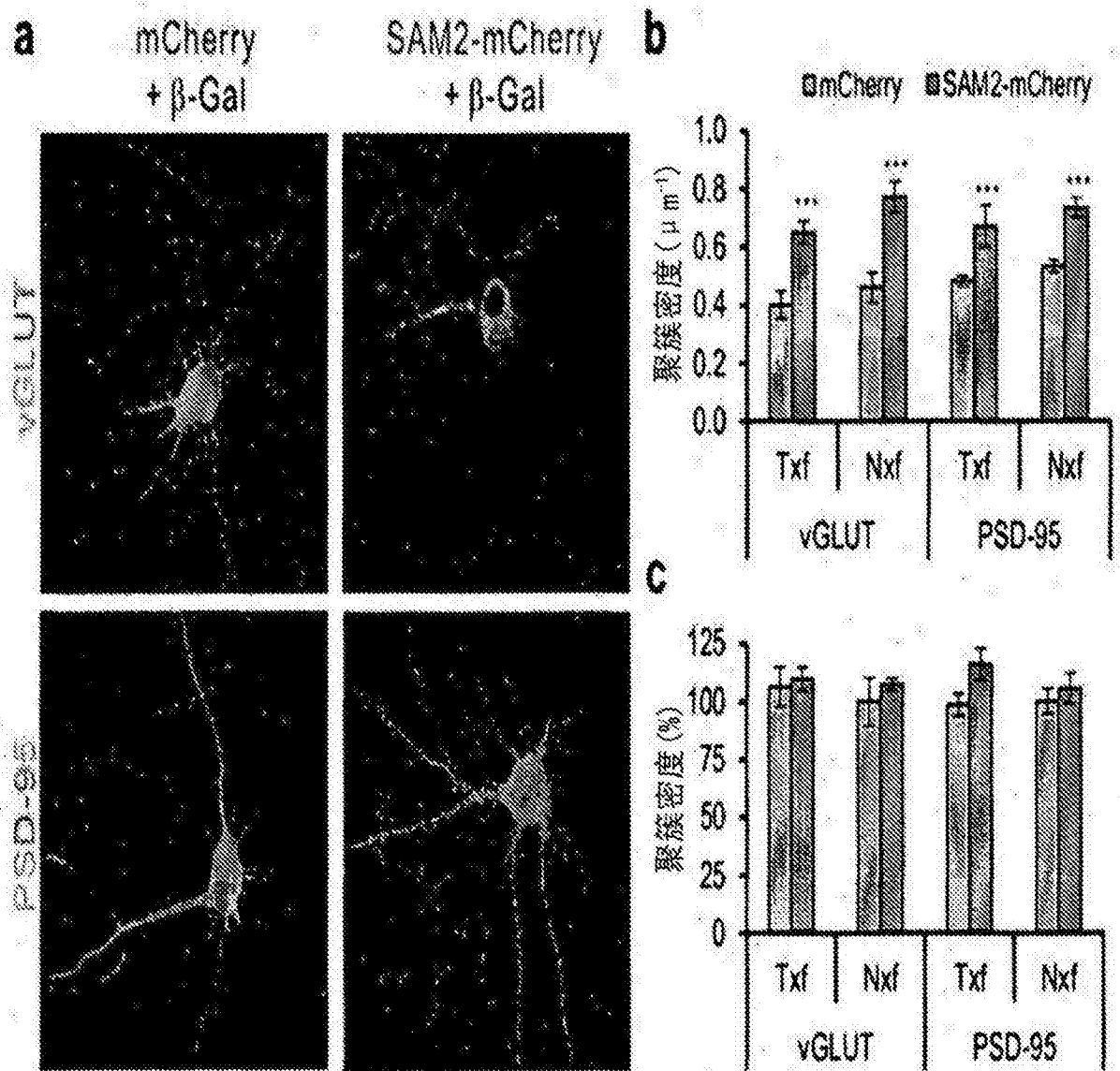


图15

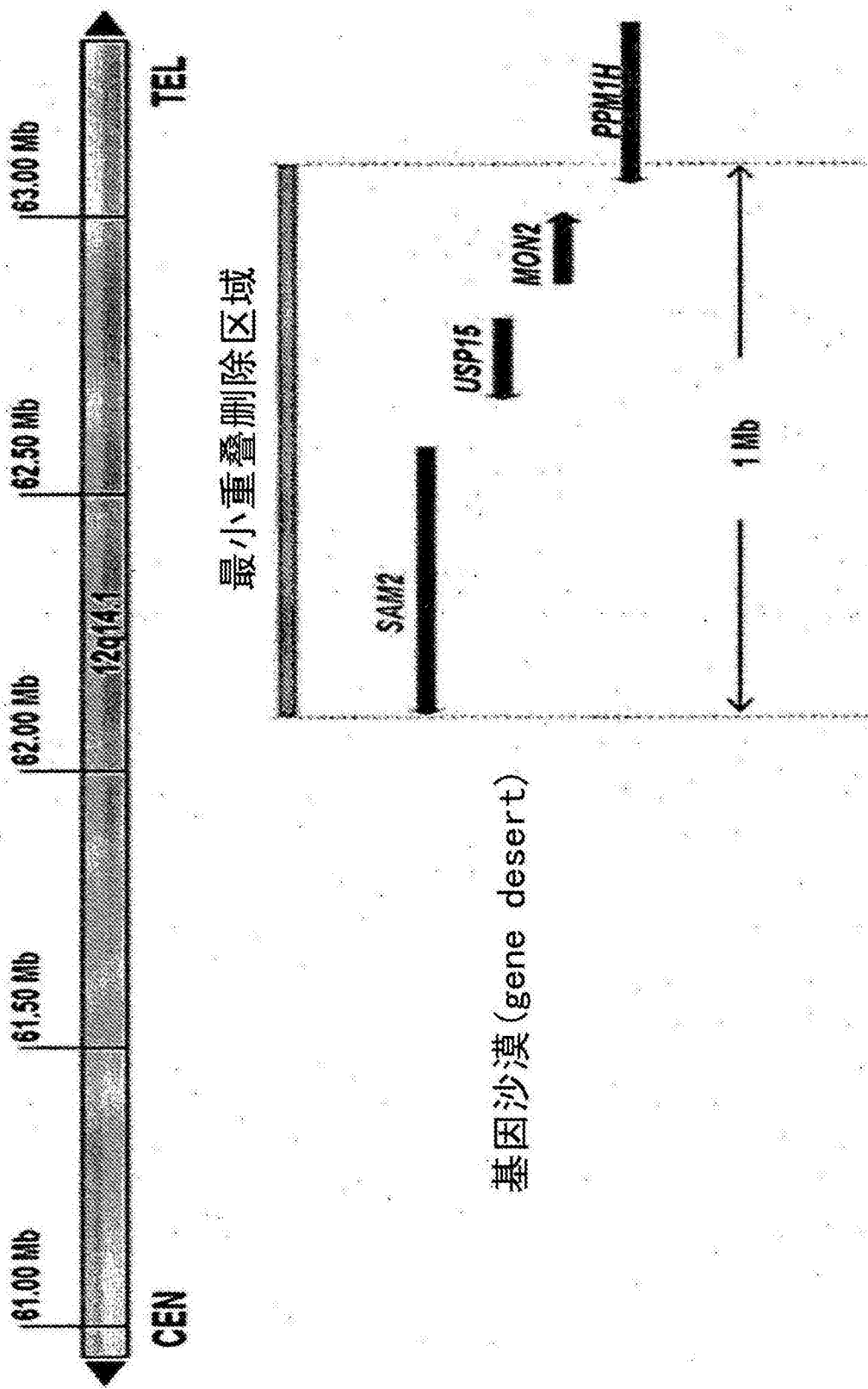


图16