(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109310740 B
(45)授权公告日 2022.10.14

(21)申请号 201780035614.5
(22)申请日 2017.06.08
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109310740 A
(43)申请公布日 2019.02.05
(30)优先权数据
10-2016-0071252 2016.06.08 KR
10-2017-0013799 2017.01.31 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.12.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2017/005959 2017.06.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/213435 KO 2017.12.14
(73)专利权人 株式会社大熊制药
地址 韩国京畿道
(72)发明人 高正敏
(74)专利代理机构 北京伟思知识产权代理事务所(普通合伙) 11725
专利代理师 聂宁乐 胡瑾
(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A23L 33/18(2006.01)
A23L 33/13(2006.01)
A61K 8/64(2006.01)
A61K 8/60(2006.01)
A23K 20/147(2006.01)
A23K 20/153(2006.01)
A61Q 19/00(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
(56)对比文件
CN 104582727 A,2015.04.29
WO 2012042289 A1,2012.04.05
US 2016120940 A1,2016.05.05
审查员 马艳林

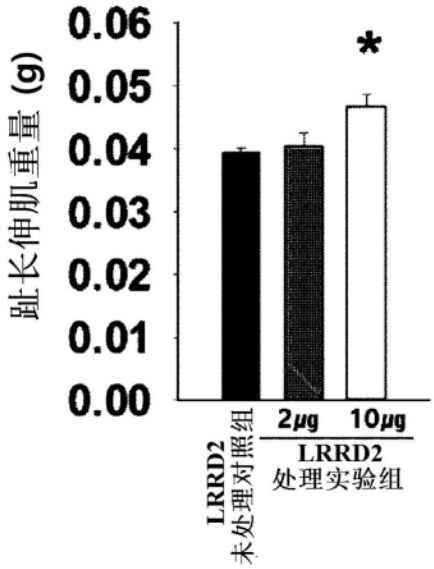
权利要求书1页 说明书23页
序列表24页 附图33页

(54)发明名称

使用SLIT－ROBO系统的预防或治疗肌肉减少症的组合物

(57)摘要

本发明涉及使用SLIT－ROBO系统的用于预防或治疗肌肉减少症的组合物，更详细地，包含选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的基因或其表达蛋白质作为有效成分的用于预防及治疗肌肉疾病或用于改善肌肉功能的组合物。



CN 109310740 B

1.一种将选自由Slit3及LRRD2组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因使用在用于预防或治疗肌肉疾病的药物的制造的用途，其中上述Slit3蛋白由序列1的氨基酸序列组成，上述LRRD2蛋白由序列4的氨基酸序列组成。

2.根据权利要求1所述的用途，其特征在于，上述Slit3蛋白通过由序列5的碱基序列组成的*slit3*基因表达。

3.根据权利要求1所述的用途，其特征在于，上述LRRD2蛋白通过由序列8的碱基序列组成的基因表达。

4.根据权利要求1所述的用途，其特征在于，上述肌肉疾病是由肌肉功能降低、肌肉萎缩或肌肉退化引起的肌肉疾病。

5.根据权利要求4所述的用途，其特征在于，上述肌肉疾病为选自由张力缺乏、肌肉萎缩症、肌肉营养不良症、肌无力症、恶病质及肌肉减少症组成的组中的一种以上。

6.一种将选自由Slit3及LRRD2组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因使用在用于改善肌肉功能的组合物的制造的用途，其中上述Slit3蛋白由序列1的氨基酸序列组成，上述LRRD2蛋白由序列4的氨基酸序列组成。

7.一种Slit3蛋白或将其编码的基因在制造用于诊断肌肉疾病的试剂盒中的用途，其中上述Slit3蛋白由序列1的氨基酸序列组成。

8.根据权利要求7所述的用途，其特征在于，上述肌肉疾病是由肌肉功能降低、肌肉萎缩或肌肉退化引起的肌肉疾病。

9.根据权利要求8所述的用途，其特征在于，上述肌肉疾病为选自由张力缺乏、肌肉萎缩症、肌肉营养不良症、肌无力症、恶病质及肌肉减少症组成的组中的一种以上。

10.一种筛选肌肉疾病治疗剂的方法，其特征在于，包括：

步骤i)，用表达由序列1的氨基酸序列组成的Slit3蛋白的细胞株处理受试化合物或组合物；

步骤ii)，在上述步骤i)处理的细胞株中测量上述Slit3蛋白的表达水平；以及

步骤iii)，筛选上述步骤ii)的Slit3蛋白的表达水平相比于未处理受试化合物或组合物的对照组的细胞株有所增加的受试化合物或组合物。

11.根据权利要求10所述的筛选肌肉疾病治疗剂的方法，其特征在于，上述肌肉疾病是由肌肉功能降低、肌肉萎缩或肌肉退化引起的肌肉疾病。

12.根据权利要求11所述的筛选肌肉疾病治疗剂的方法，其特征在于，上述肌肉疾病为选自由张力缺乏、肌肉萎缩症、肌肉营养不良症、肌无力症、恶病质及肌肉减少症组成的组中的一种以上。

使用SLIT－ROBO系统的预防或治疗肌肉减少症的组合物

技术领域

[0001] 本申请要求申请日为2016年6月8日的韩国专利申请第10－2016－0071252号及申请日为2017年1月31日的韩国专利申请第10－2017－0013799号的优先权，本申请引用上述说明书的全文。

[0002] 本发明涉及使用SLIT－ROBO系统的预防或治疗肌肉减少症的组合物，更详细地，涉及包含选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的基因或其表达蛋白质；和/或其活化剂作为有效成分的用于预防及治疗肌肉疾病或用于改善肌肉功能的组合物。

背景技术

[0003] Slit蛋白为众所周知的蛋白质，可调节神经系统的发育过程中神经元和轴突的迁移。Slit蛋白作用于Robo受体以调节生理活性，并且已知其在心脏、肺、肾、乳房组织等各种组织中作为调节各种细胞内过程的因子的作用，并且，随着最近报告其在细胞的生长、粘附性能及迁移性能的调节中起重要作用，据报道，Slit蛋白可参与细胞分化过程中的迁移及癌症发生和转移过程。具体而言，据报告，Slit蛋白及Robo蛋白在脊椎动物的胚胎发育步骤表达，Slit3、Robo1及Robo2蛋白的表达在肌肉组织中增加(Neil Vargesson et.al., Mechanisms of development 106.1(2001)据报告，Slit3蛋白在胚胎后肢肌肉组织的肌肉细胞中表达增加，但它只参与迁移(migration)而提及肌肉细胞的分化无关。

[0004] 人类Robo蛋白以Robo1、Robo2、Robo3及Robo4等四种形态存在。据报告，Slit和Robo可发挥各种作用，具体取决于与哪种亚型相互结合，但由于还可根据表达细胞发挥不同的作用，因而对其正在积极研究中。与此相关地，韩国授权专利第10－1617497号公开了Slt3蛋白通过与Robo1或Robo2相互作用显示活性，从而诱导造骨细胞的分化并增加骨形成。

[0005] 肌肉减少症是指骨骼肌的量和功能降低状态。肌肉减少症是由老化、急速异常、营养不良、缺乏身体锻炼、炎症及退行性疾病等多种原因引起，其中，老化及性急速缺乏可能是主要原因，由于医疗技术的发展及多种治疗剂的研发，随着全世界的平均寿命增加老龄化人口增加，因而预计对肌肉减少症的治疗的需求也将持续增加。

[0006] 在肌肉减少症患者中，由于作为肌肉母细胞的干细胞的卫星细胞的募集、活性或增殖的障碍导致的肌肉母细胞(myoblast)的数量减少，肌肉母细胞的增殖及分化减少，由此在组织学水平上，肌肉减少症患者的肌肉的肌纤维大小及数量减少，导致肌肉功能降低。

[0007] 在过去的十年中，随着以美国和欧洲为中心积极开展的对肌肉减少症的流行病学的研究，最近对肌肉减少症的临床重要性的关心剧增。在早期研究中，肌肉减少症因全身衰弱、活动障碍及肌肉减少而导致生活质量的降低等的结果成为主流，然而根据最近发表的研究，除了生活质量以外，还显著增加骨质疏松性骨折的危险。并且，在肌肉减少症患者中，可导致糖尿病及代谢综合症、肥胖、慢性肾功能衰竭、慢性肝功能衰竭等的慢性疾病，最终导致死亡率增加，因此肌肉减少症作为应接受适当的治疗的疾病受到关注。

[0008] 据报告，最近在美国，肌肉减少症患者可发生身体障碍的可能性增加了约1.5倍至3.5倍，从而导致每年185亿美元的社会费用。根据韩国国民健康营养调查，肌肉减少症的发病率在60岁以上的男性为42.0％、女性为42.7％，是非常普遍的疾病，尤其，由于韩国在全球中的老龄化速度最高，因而这将成为日后重要的社会问题。

[0009] 目前，已知运动、蛋白质及热量补充等有助于肌肉减少症，然而对占大部分的肌肉减少症患者的老年人并没有多大帮助，因此急需肌肉减少症治疗剂。但是，目前用于肌肉减少症的治疗剂中，对改善肌肉减少及增进肌肉量呈现直接效果的药物还处于临床实验水平的阶段，还没有最终被美国食品及药物管理局(FDA，Food and Drug Administration)批准的药物。因此，为了治疗肌肉减少症，已经尝试了一些将选择性雄激素受体调节剂(selective androgen receptor modulator)、激活素受体拮抗剂(activin receptor antagonist)、快速骨骼肌肌钙蛋白抑制剂(fast skeletal muscle troponin inhibitor)等作为肌肉减少症治疗剂的开发，但是还处于初期临床尝试水平。

[0010] 根据肌肉减少症治疗剂趋势的报告，2010年全球肌肉减少症治疗剂市场为约1000万美元(US)，预计2018年将成长为2000万美元规模(“Sarcopenia Therapeutics－Pipeline Assessment and Market Forecasts to 2018”，2011.11.17)。并且，在2013年欧明旗下私人保管监管机构Innovative Meticines Initiative宣布将投资约5千万欧元用于开发老年人肌肉减少症治疗剂，以作为四大保健研究主题之一。

[0011] 为此，本发明者们为了开发对肌肉减少症有直接的治疗效果的治疗剂而研究的结果，发现缺乏Slit蛋白的小鼠的肌肉将减少，Slit蛋白与Robo1或Robo2受体结合使通过Slit－Robo系统与肌肉母细胞的M－钙粘着蛋白(M－cadherin)结合的β－连环蛋白(β－catenin)游离，从而使β－连环蛋白活性化并增加肌细胞生成素(myogenin)的表达，通过诱导肌肉母细胞的分化来促进肌肉的形成。并且，不仅Slit蛋白全长，尤其在处理作为其活性片段的LRRD2蛋白的情况下，也可以通过促进肌肉母细胞的分化来诱导肌肉量的增加，因此通过确认Slit蛋白、Robo蛋白、它们的片段或将其编码的基因可用作预防及治疗/改善肌肉减少症的有效成分来完成了本发明。

[0012] 现有技术文献

[0013] 专利文献1:KR10－1617497B1

发明内容

[0014] 技术问题

[0015] 像这样，本发明者们发现了Slit蛋白与Robo1或Robo2受体结合使通过Slit－Robo系统与肌肉母细胞的M－钙粘着蛋白结合的β－连环蛋白游离，从而使β－连环蛋白活性化并增加肌细胞生成素的表达，通过诱导肌肉母细胞的分化来促进肌肉的形成。并且，发现了不仅Slit蛋白全长，尤其在处理其活性片段的情况下，也可以通过促进肌肉母细胞的分化来诱导肌肉量的增加，从而完成了本发明。

[0016] 因此，本发明的目的在于，提供用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物。

[0017] 本发明的再一目的在于，提供用于预防及改善肌肉疾病的保健食品或饲料添加物。

[0018] 本发明的另一目的在于，提供用于改善肌肉功能的化妆品组合物。

[0019] 本发明的还有一目的在于，提供蛋白质检测方法，上述蛋白质检测方法用于提供肌肉疾病诊断信息。

[0020] 本发明的又一目的在于，提供筛选肌肉疾病治疗剂的方法。

[0021] 解决问题的手段

[0022] 为了实现上述目的，本发明提供用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物，上述用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物包含选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的一种蛋白质；或将其编码的基因或其活化剂(activator)作为有效成分。

[0023] 在本发明的一优选实施例中，提供用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物，上述用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物包含选自由以下序列1至序列4的氨基酸序列组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因作为有效成分：由序列1的氨基酸组成的Slit3蛋白；由序列2的氨基酸组成的Robo1蛋白；由序列3的氨基酸组成的Robo2蛋白；以及由序列4的氨基酸组成的LRRD2蛋白。

[0024] 并且，本发明提供肌肉疾病的治疗方法，上述肌肉疾病的治疗方法包括向所需的对象给药选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因的步骤。

[0025] 并且，本发明提供肌肉疾病的治疗方法，上述肌肉疾病的治疗方法包括向所需的对象给药选自由序列1至序列4的氨基酸序列组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因的步骤。

[0026] 并且，本发明提供肌肉疾病的治疗方法，上述肌肉疾病的治疗方法包括向所需的对象给药选自由Slit及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因的活化剂(activator)的步骤。

[0027] 并且，本发明提供肌肉疾病的治疗方法，上述肌肉疾病的治疗方法包括向所需的对象给药选自由Robo及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因的活化剂的步骤。

[0028] 并且，本发明提供将选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因使用在用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物的用途。

[0029] 并且，本发明提供将选自由序列1至序列4的氨基酸序列组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因使用在用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物的用途。

[0030] 并且，本发明提供将选自由Slit及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因的活化剂(activator)使用在用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物的用途。

[0031] 并且，本发明提供将选自由由Robo及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因的活化剂使用在用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物的用途。

[0032] 并且，本发明提供用于预防及改善肌肉疾病的保健食品，上述用于预防及改善肌肉疾病的保健食品包含选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因或它们的活化剂作为有效成分。

[0033] 并且，本发明提供将选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因或它们的活化剂使用在用于预防及改善肌肉疾病

的保健食品的用途。

[0034] 并且,本发明提供将选自由序列1至序列4的氨基酸序列组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因使用在用于预防及改善肌肉疾病的保健食品的用途。

[0035] 在本发明的一优选实施例中,提供用于预防及改善肌肉疾病的保健食品,上述用于预防及改善肌肉疾病的保健食品包含选自由序列1至序列4的氨基酸序列组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因作为有效成分。

[0036] 并且,本发明提供用于改善肌肉功能的化妆品组合物,上述用于改善肌肉功能的化妆品组合物包含选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因或它们的活化剂作为有效成分。

[0037] 并且,本发明提供将选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因或它们的活化剂使用在用于改善肌肉功能的化妆品组合物的用途。

[0038] 并且,本发明提供将选自由序列1至序列4的氨基酸序列组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因使用在用于改善肌肉功能的化妆品组合物的用途。

[0039] 在本发明的一优选实施例中,提供用于改善肌肉功能的化妆品组合物,上述用于改善肌肉功能的化妆品组合物包含选自由序列1至序列4的氨基酸序列组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因作为有效成分。

[0040] 并且,本发明提供用于改善肌肉功能的饲料添加物,上述用于改善肌肉功能的饲料添加物包含选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因或它们的活化剂作为有效成分。

[0041] 并且,本发明提供将选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因或它们的活化剂使用在用于改善肌肉功能的饲料添加物的用途。

[0042] 并且,本发明提供将选自由序列1至序列4的氨基酸序列组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因使用在用于改善肌肉功能的饲料添加物的用途。

[0043] 在本发明的一优选实施例中,提供用于改善肌肉功能的饲料添加物,上述用于改善肌肉功能的饲料添加物包含选自由序列1至序列4的氨基酸序列组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因作为有效成分。

[0044] 根据本发明的一优选实施例,上述Slit3蛋白可通过由由序列5的碱基序列组成的slit3基因表达。

[0045] 根据本发明的一优选实施例,上述Robo1蛋白可通过由序列6的碱基序列组成的robo1基因表达。

[0046] 根据本发明的一优选实施例,上述Robo2蛋白可通过由序列7的碱基序列组成的robo2基因表达。

[0047] 根据本发明的一优选实施例,上述LRRD2蛋白可通过由序列8的碱基序列组成的基因表达。

[0048] 根据本发明的再一优选实施例,上述肌肉疾病可以是是由肌肉功能降低、肌肉萎缩或肌肉退化引起的肌肉疾病,上述肌肉疾病可以是选自由张力缺乏(atony)、肌肉萎缩症(muscular atrophy)、肌肉营养不良症(muscular dystrophy)、肌肉退化、肌无力症、恶病

质(cachexia)及肌肉减少症(sarcopenia)组成的组中的一种以上。

[0049] 并且,本发明提供用于提供肌肉疾病诊断信息的蛋白质检测方法,上述用于提供肌肉疾病诊断信息的蛋白质检测方法包括:步骤i),测量来源于作为实验组的受试者的试样中由序列1氨基酸序列组成的Slit3蛋白的表达水平;步骤ii),将上述步骤i)中测量的Slit3蛋白的表达水平与作为对照组的来源于正常对象的试样的Slit3蛋白的表达水平进行比较;以及步骤iii),在与对照组相比,在上述步骤ii)中比较的实验组的Slit3蛋白的表达水平降低的情况下,判断实验组为肌肉疾病。

[0050] 而且,本发明提供筛选肌肉疾病治疗剂的方法,上述筛选肌肉疾病治疗剂的方法包括:步骤i),用表达选自由由序列1的氨基酸序列组成的Slit3蛋白、由序列2的氨基酸序列组成的Robo1蛋白以及由序列3的氨基酸序列组成的Robo2蛋白组成的组中的一种以上的细胞株处理受试化合物或组合物;步骤ii),在上述步骤i)处理的细胞株中测量上述Slit3蛋白的表达水平或者上述Robo1蛋白或Robo2蛋白的活性;以及步骤iii),筛选上述步骤ii)的Slit3蛋白的表达水平或者Robo1蛋白或Robo2蛋白的活性相比于未处理受试化合物或组合物的对照组的细胞株有所增加的受试化合物或组合物。

[0051] 发明的效果

[0052] 本发明可提供使用SLIT－ROBO系统的预防或治疗肌肉减少症的组合物,尤其,本发明可提供包含选自由Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2及它们的片段组成的组中的基因或其表达蛋白质或其活化剂的用于预防及治疗肌肉疾病或用于改善肌肉功能的组合物。

[0053] 尤其,具体地,本发明的Slit蛋白与Robo1或Robo2受体结合使通过Slit－Robo系统与肌肉母细胞的M－钙粘着蛋白结合的β－连环蛋白游离,从而使β－连环蛋白活性化并增加肌细胞生成素的表达,通过诱导肌肉母细胞的分化来促进肌肉的形成。并且,不仅Slit蛋白全长,尤其在处理作为其活性片段的LRRD2蛋白的情况下,也可以通过促进肌肉母细胞的分化来诱导肌肉量的增加,因而通过确认Slit蛋白、Robo蛋白、它们的活性片段或将其编码的基因可用作预防及治疗/改善肌肉减少症的有效成分,因此是有效的。

附图说明

[0054] 图1a至图1e示出缺乏Slit3的雄性小鼠模型组中的体重变化及肌肉减少指标。

[0055] 图2a至图2e示出缺乏Slit3的雌性小鼠模型组中的体重变化及肌肉减少指标。

[0056] 图3a至3d示出对缺乏Slit3的雄性小鼠模型组的趾长伸肌(EDL,extensor digitorum longus)进行苏木精—伊红染色(Hematoxylin&Eosin staining)的结果。

[0057] 图4a至图4d示出对缺乏Slit3的雄性小鼠模型组的GC肌肉进行苏木精—伊红染色的结果。

[0058] 图5a至图5d示出对缺乏Slit3的雄性小鼠模型组的GC肌肉进行免疫组织化学染色的结果。

[0059] 图6示出根据Slit3处理的C2C12细胞株的细胞生存能力变化,以确认Slit3的肌肉母细胞分化促进效果。

[0060] 图7a至图7e示出在从肌肉母细胞向肌管细胞(myotube)的分化中,Slit3的分化增加效果。

[0061] 图8a至图8f示出在肌肉母细胞的分化过程中,根据Slit3处理的多种肌源性调节

因子的信使核糖核酸(mRNA)表达水平的变化。

[0062] 图9a及图9b示出在肌肉母细胞的分化过程中,根据Slit3处理的肌细胞生成素的蛋白质表达水平的变化。

[0063] 图10示出在肌肉母细胞的分化过程中,根据Slit3处理的肌细胞生成素阳性细胞数量的差异。

[0064] 图11为确认在肌肉母细胞中表达的钙粘(Caderin)蛋白的种类及表达水平的图。

[0065] 图11a示出肌肉母细胞中M－钙粘着蛋白及N－钙粘蛋白的信使核糖核酸表达水平。

[0066] 图11b示出肌肉母细胞中M－钙粘着蛋白及N－钙粘蛋白的蛋白质表达水平。

[0067] 图12为确认基于Slit3的β－连环蛋白(β－catenin)活性化的肌肉母细胞分化诱导效果的图。

[0068] 图12a示出肌肉母细胞中根据加入Slit3的β－连环蛋白活性的确认。

[0069] 图12b示出通过共同免疫沉淀法确认根据Slit3处理的M－钙粘着蛋白及β－连环蛋白的结合水平的变化的结果。

[0070] 图12c至图12e示出根据抑制β－连环蛋白表达的Slit3的肌肉母细胞分化收率的确认。

[0071] 图12f示出根据抑制β－连环蛋白表达的Slit3处理的肌肉母细胞中肌细胞生成素的表达水平变化。

[0072] 图13为确认肌肉母细胞中与Slit3结合的Robo受体亚型的图。

[0073] 图13a示出在作为肌肉母细胞的C2C12细胞中表达的Robo受体的亚型。

[0074] 图13b至图13d示出C2C12细胞中根据Robo1或Robo2敲除,基于Slit3的肌细胞生成素表达增加效果不明显。

[0075] 图14a至图14e示出缺乏Robo受体的小鼠模型中的体重变化及肌肉减少指标的确认。

[0076] 图15a至图15d示出在试管内水平中基于Slit3的LRRD2的肌肉母细胞分化效果。

[0077] 图16a至图16e示出生物体内水平中基于Slit3的LRRD2的体重变化及肌肉减少指标的增加效果的确认。

具体实施方式

[0078] 如上所述,随着全世界平均寿命增加,老龄化人口也正在增加,为此预计对肌肉减少症的治疗的需求将持续增加,然而还没有关于美国食品及药物管理局(FDA,Food and Drug Administration)批准作为肌肉减少症治疗剂的药物的报告。

[0079] 在本发明的一具体例中,Slit蛋白或其活性片段与Robo1或Robo2受体结合使通过Slit－Robo系统与肌肉母细胞的M－钙粘着蛋白(M－cadherin)结合的β－连环蛋白(β－catenin)游离,从而使β－连环蛋白活性化并增加肌细胞生成素(myogenin)的表达,通过诱导肌肉母细胞的分化来促进肌肉的形成,因此可直接显示出对肌肉减少症的治疗效果。

[0080] 因此,本发明提供用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物,上述用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物包含选自由Slit1、Slit2、Slit3蛋白、Robo1蛋白、Robo2蛋白及LRRD2蛋白组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因或它们的活化剂作为有效成分。

[0081] 优选地，本发明的“Slit3蛋白”由序列1的氨基酸组成，本发明的“Robo1蛋白”由序列2的氨基酸组成，本发明的“Robo2蛋白”由序列3的氨基酸组成，本发明的“LRRD2蛋白”由序列4的氨基酸组成，可包括上述蛋白质或肽(peptide)的功能性等同物。

[0082] 上述“功能性等同物”因蛋白质或肽的氨基酸加成、取代或缺失，而与上述序列1至序列4的氨基酸序列具有至少70％以上，优选地，80％以上，更优选地，90％以上，进一步优选地，95％以上的序列相同性，上述“功能性等同物”指具有与由序列1至序列4的氨基酸序列组成的蛋白质或肽实质上相同的生理活性的蛋白质或肽。

[0083] 本发明的“活化剂”包括可增强Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2和/或它们的片段的表达，或可使SLIT－ROBO系统活性化的各种化合物、蛋白质或肽、碱基序列等。上述化合物、蛋白质或肽、碱基序列的各种代谢物、前提和药物等同物也包括在上述活化剂中。

[0084] 本发明的“Slit3蛋白”优选由slit3基因表达，上述slit3基因表达由序列5的碱基序列组成，“Robo1蛋白”优选由robo1基因表达，上述robo1基因由序列6的碱基序列组成，“Robo2蛋白”优选由robo2基因表达，上述robo2基因由序列7的碱基序列组成，“LRRD2蛋白”优选由由序列8的碱基序列组成的基因表达，但并不局限于此。

[0085] 本发明的肌肉疾病优选是本发明所属技术领域中报告的由肌肉功能降低、肌肉萎缩或肌肉退化引起的肌肉疾病，具体地，更优选是选自由张力缺乏(atony)、肌肉萎缩症(muscular atrophy)、肌肉营养不良症(muscular dystrophy)、肌肉退化、肌无力症、恶病质(cachexia)及肌肉减少症(sarcopenia)组成的组中的一种以上，但并不局限于此。

[0086] 上述肌肉萎缩或退化由先天因素、后天因素、老化等原因发生，肌肉萎缩的特征在于，肌肉量的逐渐损失，肌肉，尤其是骨骼肌或随意肌及心肌的弱化及退化。

[0087] 更具体地，上述肌肉统称筋、肌肉、肌腱，肌功能或肌肉功能是指通过肌肉的收缩发挥其力量的能力，并且包括:肌肉力量，肌肉为了克服阻力，可发挥的最大限度的收缩力;肌肉耐力，肌肉在给定的重量下可重复多长时间及几次收缩和放松的能力;以及爆发力，但短时间内发挥强大的力量的能力。上述肌肉功能与肌肉量成正比，术语“肌肉功能改善”是指使肌肉功能向更积极的方向改善。

[0088] 在本发明的优选实施例中，在确认Slit3基因表达与肌肉量的关系的结果，本发明者发现缺乏Slit3的小鼠的骨骼肌减少(图1、图2、表1及表2)，肌纤维面积显著减少，然而肌肉母细胞及其卫星细胞的数量没有变化(图3至图5)。

[0089] 并且，在确认Slit3的肌肉母细胞分化促进效果的结果，本发明者们发现Slit3对肌肉母细胞生存能力不产生影响，促进肌肉母细胞分化为肌肉肌纤维分化(图6及图7)，参与这种分化的肌源性调节因子，借助Slit3增加了肌细胞生成素的表达(图8至图10)。

[0090] 并且，本发明者们发现在肌肉母细胞分化为肌肉肌纤维的过程中，在肌肉母细胞中表达的M－钙粘着蛋白比N－钙粘着蛋白(N－cadherin)丰富，与M－钙粘着蛋白结合的β－连环蛋白游离来使β－连环蛋白借助Slit3增加(图11a、图11b及12a)，在肌肉母细胞的分化过程中，借助Slit3使Mβ－连环蛋白得活性增加，并使肌细胞生成素的表达增加，来诱导肌肉母细胞的分化，从而参与肌肉形成促进(图12b、图12c至图12e及图12f)。

[0091] 并且，在确认肌肉母细胞中与Slit3结合的Robo受体亚型的结果中，本发明者们发现Robo1及Robo2受体在肌肉母细胞表面表达，它们形成Slit－Robo系统并显示了Slit3的效果(图13a及图13b及图13c)。尤其，在缺乏Robo1的情况下，在生物体水平显示出肌肉量减

少,因此可通过Slit3及Robo1或Robo2的结合系统显示出肌肉减少症的改善效果(表3及图14)。

[0092] 并且,在确认基于Slit3的LRRD2结构域的肌肉母细胞分化及肌肉量增进效果的结果,本发明者们发现在试管内水平中,基于Slit3的LRRD2的肌肉母细胞分化效果增加,在生物体内水平中,给药Slit3的LRRD2的肌肉减少症模型小鼠的体重及肌肉减少指标增加(图15、图16及表4)。

[0093] 因此,本发明的Slit蛋白与Robo1或Robo2受体结合使通过Slit－Robo系统与肌肉母细胞的M－钙粘着蛋白(M－cadherin)结合的β－连环蛋白(β－catenin)游离,从而使β－连环蛋白活性化并增加肌细胞生成素(myogenin)的表达,通过诱导肌肉母细胞的分化来促进肌肉的形成。并且,不仅Slit蛋白全长,在处理其活性片段的情况下,也可以通过促进肌肉母细胞的分化来诱导肌肉量的增加,因此尤其优选地,本发明的Slit3蛋白或Slit3的LRRD2蛋白或将其编码的基因可用作预防及治疗肌肉减少症的药物组合物的有效成分。

[0094] 本发明的蛋白质或肽不仅包括具有其野生型氨基酸序列的蛋白质或肽,其氨基酸序列变异体也包括在本发明的范围内。上述氨基酸序列变异体是指借助Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2或LRRD2的野生型氨基酸序列和一个以上的氨基酸残基的缺失、插入、费保守或保守取代或它们的组合具有互不相同的序列的蛋白质或肽。

[0095] 整体不变更分子的活性的蛋白质及肽中所可能的氨基酸交换是本领域已知的(H.Neurath,R.L.Hill,The Proteins,Academic Press,New York,1979)。最常见的交换是氨基酸残基Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly之间的交换。根据情况也可以变更(modification)为磷酸化(phosphorylation)、硫酸化(sulfation)、乙酰化(acetylation)、糖基化(glycosylation)、甲基化(methylation)、法尼基化(farnesylation)等。

[0096] 本发明的Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白及LRRD2蛋白或其变异体可以从天然提取或合成(Merrifleld,J.Amer.chem.Soc.85:2149－2156,1963)或借助以DNA序列为基本的基因的重组方法制备(Sambrook et al,Molecular Cloning,Cold Spring Harbour Laboratory Press,New York,USA,2版,1989)。

[0097] 本发明的Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白及LRRD2蛋白不仅以蛋白质的形态提供,还可以以表达载体形态提供,上述表达载体为为了用作基因治疗或疫苗等而在细胞内使将Slit3、Robo1、Robo2蛋白及LRRD2蛋白编码的基因表达。

[0098] 上述表达载体可使用通过插入上述Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或将LRRD2蛋白编码基因来表达的本领域已知的表达载体,例如,pBK－CMV(Staratagene)、pCR3.1(Invitrogen)等表达载体。

[0099] 并且,能够以表达载体的形态等可操作的连接形态,向本发明的用于调节将Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白及LRRD2蛋白编码的碱基序列,即,包含核苷酸(nucleotide)的重组DNA的表达的核酸序列给药上述核苷酸,使得其可在治疗对象患者内表达。上述载体包括适当的转录调节信号,上述转录调节信号包括可表达编码序列的启动子部位,优选地,上述启动子在待治疗患者内启动。因此,作为人类基因治疗用,作为包括增强子的其他操作序列或调节序列的术语的启动子不仅是用于将核糖核酸聚合酶(RNA

polymerase)引导至转录开始部位所需的序列,优选地,可以是来自人类基因的人类启动子序列或来自通常从人类表达的基因的人类启动子序列,例如来自人类巨细胞病毒(CMV,cytomegalovirus)的启动子。在这种方面,在适当已知的真核启动子中,适当的是巨细胞病毒,即,初期启动子、胸苷激酶(HSV thymidine kinase)启动子、初期及后期猿猴空泡病毒40(SV40)启动子、肉瘤病毒("RSV")等的逆转录病毒(retrovirus)长末端重复序列(LTR)启动子及鼠金属硫蛋白(metallothionein)-1启动子等的金属硫蛋白启动子。

[0100] 上述核苷酸序列及转录调节序列可通过基于市售的pBR322等的质粒(plasmid)在可复制的质粒载体内克隆来被提供,或者可通过公知的步骤的可借助日常应用入手的质粒构建。

[0101] 上述载体还可以包含位于序列3'的转录调节序列以及可被待治疗患者识别的聚腺苷酸化序列,上述聚腺苷酸化序列为,例如,来自当用作人类治疗时来猿猴空泡病毒40等的病毒的相应序列。其他转录调节序列在此技术领域是公知的,因而可利用。

[0102] 上述表达载体还可以包括抗生素抗性等的可选标记,使得上述载体可以传播。

[0103] 能够合成上述蛋白质或肽的表达载体可以通过物理方法直接引导伤口部位。它们的例包括局部地将适当的载体内的"裸露的"核酸载体适用于磷酸盐缓盐水(PBS)等的药学上可接受的赋形剂中的溶液内,或根据本领域已知的方法亦成为"基因枪"的粒子子弹等的物理方法给药载体。如美国专利第5371015号所述,上述"基因枪"技术为在来自推进装置的高压力下释放的方法,将以载体涂敷的金珠等的惰性粒子以足够的速度加速穿过皮肤细胞的表面等的伤口部位。并且,作为直接向受体给药DNA的其他物理方法有超声波、电刺激、电穿过和微量种子(microseeding)。

[0104] 上述基因序列还可以通过转化的宿主细胞的方法向伤口部位给药。细胞包括从患者收货的细胞,可以借助本领域公知的基因引入方法将上述核酸序列引入该细胞内,从而在培养液中培养转化的细胞将其移植到患者体内。

[0105] 如上所述的表达结构体能够以多种方法用于本发明的治疗。因此,表达结构体可以直接施用于患者的需治疗部位。

[0106] 并且,本发明的药物组合物可包括增加Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白的表达的活性因子作为有效成分。

[0107] 上述增加Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白的表达的活性因子是指通过直接或间接作用于slit1、slit2、slit3、robo1、robo2基因或将LRRD2编码的基因,以改善、诱导、刺激、增加Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白的生物活性的物质。上述物质包括有机或无机化合物等的单一化合物、肽、蛋白质、核酸、碳水化合物及脂质等的生物体高分子化合物及多种化合物的复合物等。上述增加slit1、slit2、slit3的表达的活性因子可用于因slit1、slit2、slit3的表达、活性或功能的减少而引起的疾病的预防、改善及治疗。

[0108] 上述物质使slit1、slit2、slit3、robo1、robo2基因或将LRRD2编码的基因活性化的机制不受特别限制。例如,上述物质可用作增加转录、翻译等的基因表达,或将非活性形转换为活性形的机制。优选地,使slit1、slit2、slit3、robo1、robo2基因或将LRRD2编码的基因活性化的物质为肽、蛋白质、核酸、碳水化合物及脂质等的生物体高分子化合物。对于核酸及蛋白质序列已公知的slit1、slit2、slit3,本领域技术人员可本领域技术制备或筛

选用作诱导剂或活性剂的有机或无机化合物等的单一化合物、肽、蛋白质、核酸、碳水化合物及脂质等的生物体高分子化合物及多种化合物的复合物等。

[0109] 本发明的组合物可以是口服或非口服等的多种剂型。在剂型化上述组合物的情况下，可使用缓冲剂(例如，盐水或磷酸盐缓盐水(PBS))、抗氧化剂、抑菌剂、螯合剂(例如，乙二胺四乙酸(EDTA)或谷胱甘肽(glutathione))、填充剂、增量剂、粘合剂、佐剂(例如，氢氧化铝)、悬浮剂、增稠剂、润湿剂、崩解剂或表面活性剂、稀释剂或赋形剂。

[0110] 用于口服给药的固体制剂包括片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂等，这种固体制剂可通过将一种以上的化合物与至少一种以上的赋形剂混合而成，上述赋形剂为，例如，淀粉(包括玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉等)、碳酸钙(calcium carbonate)、蔗糖(sucrose)、乳糖(lactose)、右旋糖(dextrose)、山梨糖醇(sorbitol)、甘露醇(Mannitol)、木糖醇(xylitol)、赤藓糖醇麦芽糖醇(erythritol maltitol)、纤维素(cellulose)、甲基纤维素(methylcellulose)、羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethylcellulose)及羟丙基甲基纤维素(h ydroxypropylmethyl－cellulose)或明胶。例如，片剂或糖衣片剂可以通过将活性成分与固体赋形剂混合，然后研磨，加入合适的助剂，并将混合物加工成颗粒来获得。

[0111] 除了简单的赋形剂之外，还可以使用硬脂酸镁、滑石等的润滑剂。用于口服给药的液体制剂包括悬浮液、内溶液剂、乳剂或糖浆等，除了常用的作为简单稀释剂的水、液体石蜡外，还包括如润湿剂、甜味剂、香料或防腐剂等的各种赋形剂。并且，根据情况，可以加入交联的聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone)、琼脂、海藻酸或海藻酸钠等作为崩解剂，并且还可以包括抗凝剂、润滑剂、润湿剂、香料、乳化剂和防腐剂等。

[0112] 用于费口服给药的制剂包括无菌水溶液、非水溶剂，悬浮溶剂，乳剂，冷冻干燥制剂或栓剂等。作为非水溶剂及悬浮溶剂可以如使用丙二醇(propylene glycol)、聚乙二醇(polyethylene glycol)、橄榄油等的植物油、油酸乙酯等可注射酯等。作为栓剂基质可使用Witepsol、聚乙二醇、吐温(tween)61、可可纸、月桂、甘油、明胶等。

[0113] 本发明的组合物可以口服或非口服给药，当非口服给药时，能够以如下形态根据本领域公知的方法剂型化：皮肤外用；腹腔内、直肠、静脉、肌肉、皮下、子宫内硬膜或脑血管内注射的注射剂；经皮给药剂；或鼻腔吸入剂。

[0114] 在上述注射剂的情况下，必须经过灭菌并防止细菌及真菌等的微生物的污染。在注射剂的情况下，合适的载体包括但不限于水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇及液体聚乙二醇等)、它们的混合物和/或含有植物油的溶剂或分散介质。更优选地，作为合适的载体可使用Hanks溶液、林格溶液、含有三乙醇胺的磷酸盐缓盐水(PBS，phosphate buffered saline)或注射用无菌水、10％乙醇，40％丙二醇及5％葡萄糖等的等渗溶液等。为了保护上述注射剂免受微生物污染，可以进一步包括对羟基苯甲酸酯(parabens)、苯酚(chlorobutanol)、氯丁醇(phenol)、山梨酸(sorbic acid)、硫柳汞(thimerosal)等的各种抗菌剂及抗真菌剂。并且，在大多数情况下，可注射剂还可包含糖或氯化钠等的等渗剂。

[0115] 在经皮给药剂的情况下，可包括软膏剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、外用溶液剂、糊剂、搽剂、气锭剂等。在上文中，经皮给药是指将药物组合物局部向皮肤给药，由此将药物组合物中含有的有效量的活性成分递送到皮肤中。

[0116] 在吸入给药剂的情况下，根据本发明使用的组合物使用二氯氟甲烷

(dichlorofluoromethane)、二氯四氟甲烷(trichlorofluoromethane)、二氯四氟乙烷(dichlorotetrafluoroethane)、二氧化碳或其它合适的气体等的合适的推进剂,以气溶胶喷雾的形态从加压包装或喷雾器方便地输送。在加压气溶胶的情况下,给药单位可以通过递送计量的量的阀来确定。例如,用于在吸入器或吹入器中使用的明胶胶囊剂及采样管可被剂型化为含有所述化合物及乳糖或淀粉等的合适的粉末基质的粉末混合物。非口服给药用剂型在作为所有只要化学中已公知的处方书的文献(Remington's Pharmaceutical Science,15th Edition,1975.Mack Publishing Company,Easton,Pennsylvania 18042,Chapter 87:Blaug,Seymour)中记载。

[0117] 本发明的组合物以药学有效量给药。在本发明中,"药学有效量"是指足以以可适用于医学治疗的合理的益处/风险比治疗疾病的量,并且有效剂量水平将取决于患者疾病的类型、严重程度、药物的活性、对药物的敏感性、给药时间、给药途径及排出速率、治疗持续时间、包括共同给药的因素、以及医学领域中众所周知的其他因素。本发明的组合物可以作为单独的治疗剂给药或与其他治疗剂组合给药,与常规治疗剂相继或同时给药,并且可以单次或多次给药。即,本发明组合物的总有效量可以以单剂量(single dose)向患者给药,并且通过分段治疗方法(fractionated treatment protocol)以多剂量(multiple dose)长期给药。重要的是考虑所有上述因素并且以最少的量获得最大效果而没有副作用的量给药,这可以由本领域技术人员容易地确定。

[0118] 本发明的药物组合物的给药量根据患者的体重、年龄、性别、健康状况、饮食、给药时间、给药方法、排泄率及疾病严重程度而变化。在非口服给药期间,基于Slit1,Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白,每日给药量优选为每天每千克体重0.01mg至50mg,更优选0.1mg至30mg。而且,在口服给药的情况下,基于本发明的Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白,优选每日给药一次或几次每千克体重0.01mg至100mg,更优选为0.01mg至10mg。然而,给药量可以根据给药途径、肥胖的严重程度、性别、体重、年龄等而变化,因此,给药量不以任何方式限定本发明的范围。

[0119] 本发明的组合物可以单独使用或与使用手术、放射疗法、激素疗法、化学疗法及生物反应调节剂的方法组合使用。

[0120] 本发明的药物组合物还可以以Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白或将其编码的碱基序列作为有效成分的外用剂的剂型提供。在将本发明的预防及治疗肌肉疾病的药物组合物用作皮肤外用剂的情况下,另外还可以包含脂肪物质、有机溶剂、增溶剂、增稠剂及胶凝剂、软化剂、抗氧化剂、悬浮剂、稳定剂、发泡剂(foaming agent)、芳香剂、表面活性剂、水、离子型乳化剂、非离子型乳化剂、填充剂、金属离子螯合剂、螯合剂、防腐剂、维生素、阻断剂、增湿剂、精油、染料、颜料、亲水性活性剂、亲脂性活性剂或脂质囊泡等皮肤外用剂中常用的任何其他组分等的皮肤科学领域中常用的助剂。并且,上述组分也可以以皮肤科学领域常用的量引入。

[0121] 在提供本发明的用于预防及治疗肌肉疾病的药物组合物作为皮肤外用剂的情况下,它可以是软膏、贴剂、凝胶、乳膏或喷雾剂等的制剂,但并不局限于此。

[0122] 并且,本发明提供用于预防及改善肌肉疾病的保健食品,上述用于预防及改善肌肉疾病的保健食品包含选自由Slit1蛋白、Slit2蛋白、Slit3蛋白、Robo1蛋白、Robo2蛋白及LRRD2蛋白组成的组中的一种蛋白质及将其编码的基因作为有效成分。

[0123] 优选地，本发明的“Slit3蛋白”由序列1的氨基酸组成，本发明的“Robo1蛋白”由序列2的氨基酸组成，本发明的“Robo2蛋白”由序列3的氨基酸组成，本发明的“LRRD2蛋白”由序列4的氨基酸组成，可包括上述蛋白质或肽的功能性等同物。

[0124] 上述“功能性等同物”因蛋白质或肽的氨基酸加成、取代或缺失，而与上述序列1至序列4的氨基酸序列具有至少70％以上，优选地，80％以上，更优选地，90％以上，进一步优选地，95％以上的序列相同性，上述“功能性等同物”指具有与由序列1至序列4的氨基酸序列组成的蛋白质或肽实质上相同的生理活性的蛋白质或肽。

[0125] 本发明的“Slit3蛋白”优选由slit3基因表达，上述slit3基因表达由序列5的碱基序列组成，“Robo1蛋白”优选由robo1基因表达，上述robo1基因由序列6的碱基序列组成，“Robo2蛋白”优选由robo2基因表达，上述robo2基因由序列7的碱基序列组成，“LRRD2蛋白”优选由由序列8的碱基序列组成的基因表达，但并不局限于此。

[0126] 本发明的肌肉疾病优选是本发明所属技术领域中报告的由肌肉功能降低、肌肉萎缩或肌肉退化引起的肌肉疾病，具体地，更优选是选自由张力缺乏(atony)、肌肉萎缩症(muscular atrophy)、肌肉营养不良症(muscular dystrophy)、肌肉退化、肌无力症、恶病质(cachexia)及肌肉减少症(sarcopenia)组成的组中的一种以上，但并不局限于此。

[0127] 上述肌肉萎缩或退化由先天因素、后天因素、老化等原因发生，肌肉萎缩的特征在于，肌肉量的逐渐损失，肌肉，尤其是骨骼肌或随意肌及心肌的弱化及退化。

[0128] 更具体地，上述肌肉统称筋、肌肉、肌腱，肌功能或肌肉功能是指通过肌肉的收缩发挥其力量的能力，并且包括：肌肉力量，肌肉为了克服阻力，可发挥的最大限度的收缩力；肌肉耐力，肌肉在给定的重量下可重复多长时间及几次收缩和放松的能力；以及爆发力，但短时间内发挥强大的力量的能力。上述肌肉功能与肌肉量成正比，术语“肌肉功能改善”是指使肌肉功能向更积极的方向改善。

[0129] 本发明的Slit蛋白与Robo1或Robo2受体结合使通过Slit－Robo系统与肌肉母细胞的M－钙粘着蛋白结合的β－连环蛋白游离，从而使β－连环蛋白活性化并增加肌细胞生成素的表达，通过诱导肌肉母细胞的分化来促进肌肉的形成。并且，不仅Slit蛋白全长，在处理作为其活性片段的LRRD2蛋白的情况下，也可以通过促进肌肉母细胞的分化来诱导肌肉量的增加，因此，本发明的Slit蛋白或Slit的活性片段或将其编码的基因可用作预防及治疗肌肉减少症的保健食品的有效成分。并且，本发明的Slit蛋白或Slit的活性片段或将其编码的基因可用作预防及治疗肌肉减少症的饲料组合物的有效成分。

[0130] 根据本发明的食品组合物可以以多种形态根据本发明所属技术领域已知的常规方法来制备。常见的食品虽不限于此，但可通过在饮料(包括含酒精饮料)、水果及其加工食品(例如，水果罐头、瓶装罐头、果酱、柑橘属果酱等)、鱼类、肉类及其加工食品(例如，火腿、香肠、腌牛肉等)、面包类、面类(例如，乌冬面、荞麦面、拉面、意大利面、通心粉等)、果汁、各种饮料、饼干、饴糖、乳制品(例如，黄油、芝士等)、食用植物油、人造黄油、植物性蛋白、蒸煮食品、冷冻食品、各种调味料(例如，大酱、酱油、沙司等)等加入本发明的Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白来制备。并且，作为营养助剂虽不限于此，但可通过对胶囊、片剂、丸剂等加入本发明的Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白来制备。并且，保健食品虽不限于此，例如，通过液化、颗粒化、胶囊化及粉末化来将本发明的Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白以茶、果汁及饮料的形态制备，使得其

以饮用(保健饮料)的方式被摄入。并且,为以食品添加剂的形态使用本发明的Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白,可以以粉末或浓缩液的形态制备。并且,本发明的Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白可以通过与具有预防肌肉疾病及改善肌肉功能效果的已知的活性成分混合来以组合物的形态制备。

[0131] 在本发明的Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白用作保健饮料的情况下,与常规饮料相同地,上述保健饮料组合物可包含各种风味鸡或天然碳水化合物等作为附加成分。上述天然碳水化合物可以使用:葡萄糖、果糖等的单糖(monosaccharide);麦芽糖、蔗糖等的二糖类;糊精、环糊精等的多聚糖(polysaccharide);木糖醇、山梨糖醇、赤藓糖醇等的糖醇。甜味剂可以使用:奇异果甜蛋白(thaumatin)、甜叶菊提取物等的天然甜味剂;糖精、阿司帕坦(aspartame)等的合成甜味剂等。上述天然碳水化合物的比率为,每100mL本发明的组合物通常为约0.01～0.04g,优选地,为约0.02～0.03g。

[0132] 并且,本发明的Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白可作为用于预防肌肉疾病及改善肌肉功能的食品组合物的有效成分来包含,为用于实现预防肌肉疾病及改善肌肉功能的效果的量不受特别限制。对于整体组合总重量,优选地,为0.01重量百分比至100重量百分比。本发明的食品组合物可以通过将Slit1、Slit2、Slit3、Robo1、Robo2蛋白或LRRD2蛋白和已知的具有预防肌肉疾病及改善肌肉功能效果的其他活性成分混合来制备。

[0133] 除上述之外,本发明的保健食品可包括各种营养剂、维生素、电解质、风味剂、着色剂、果胶酸、果胶酸盐、海藻酸、海藻酸盐、有机酸、保护胶体增稠剂、pH调节剂、稳定剂、甘油、醇或碳酸化剂等。此外,本发明的保健食品还可以包括天然果汁、果汁饮料或者用于蔬菜饮料的制造的果肉。这种成分可以单独使用或混合使用。这种添加剂的比率虽不重要,但通常本发明的组合物在每100重量份中选择0.01～0.1重量份的范围。

[0134] 并且,本发明提供用于改善肌肉功能的化妆品组合物,上述用于改善肌肉功能的化妆品组合物包含选自由Slit1蛋白、Slit2蛋白、Slit3蛋白、Robo1蛋白、Robo2蛋白及LRRD2蛋白组成的组中的一种蛋白质或将其编码的基因作为有效成分。上述化妆品组合物没有特别限制,但可以在皮肤上外用或者可以口服摄入。

[0135] 优选地,本发明的“Slit3蛋白”由序列1的氨基酸组成,本发明的“Robo1蛋白”由序列2的氨基酸组成,本发明的“Robo2蛋白”由序列3的氨基酸组成,本发明的“LRRD2蛋白”由序列4的氨基酸组成,可包括上述蛋白质或肽的功能性等同物。

[0136] 上述“功能性等同物”因蛋白质或肽的氨基酸加成、取代或缺失,而与上述序列1至序列4的氨基酸序列具有至少70%以上,优选地,80%以上,更优选地,90%以上,进一步优选地,95%以上的序列相同性,上述“功能性等同物”指具有与由序列1至序列4的氨基酸序列组成的蛋白质或肽实质上相同的生理活性的蛋白质或肽。

[0137] 本发明的“Slit3蛋白”优选由slit3基因表达,上述slit3基因表达由序列5的碱基序列组成,“Robo1蛋白”优选由robo1基因表达,上述robo1基因由序列6的碱基序列组成,“Robo2蛋白”优选由robo2基因表达,上述robo2基因由序列7的碱基序列组成,“LRRD2蛋白”优选由由序列8的碱基序列组成的基因表达,但并不局限于此。

[0138] 本发明的肌肉疾病优选是本发明所属技术领域中报告的由肌肉功能降低、肌肉萎缩或肌肉退化引起的肌肉疾病,具体地,更优选是选自由张力缺乏、肌肉萎缩症、肌肉营养

不良症、肌肉退化、肌无力症、恶病质及肌肉减少症组成的组中的一种以上，但并不局限于此。

[0139] 上述肌肉萎缩或退化由先天因素、后天因素、老化等原因发生，肌肉萎缩的特征在于，肌肉量的逐渐损失，肌肉，尤其是骨骼肌或随意肌及心肌的弱化及退化。

[0140] 更具体地，上述肌肉统称筋、肌肉、肌腱，肌功能或肌肉功能是指通过肌肉的收缩发挥其力量的能力，并且包括：肌肉力量，肌肉为了克服阻力，可发挥的最大限度的收缩力；肌肉耐力，肌肉在给定的重量下可重复多长时间及几次收缩和放松的能力；以及爆发力，但短时间内发挥强大的力量的能力。上述肌肉功能与肌肉量成正比，术语“肌肉功能改善”是指使肌肉功能向更积极的方向改善。

[0141] 本发明的Slit蛋白与Robo1或Robo2受体结合使通过Slit－Robo系统与肌肉母细胞的M－钙粘着蛋白结合的β－连环蛋白游离，从而使β－连环蛋白活性化并增加肌细胞生成素的表达，通过诱导肌肉母细胞的分化来促进肌肉的形成。并且，不仅Slit蛋白全长，在处理作为其活性片段的LRRD2蛋白的情况下，也可以通过促进肌肉母细胞的分化来诱导肌肉量的增加，因此，本发明的Slit蛋白或Slit的活性片段或将其编码的基因可用作预防及治疗肌肉减少症的药物组合物的有效成分。并且，本发明的Slit蛋白或Slit的活性片段或将其编码的基因可用作改善肌肉功能的化妆品组合物的有效成分。

[0142] 本发明的用于改善肌肉功能的组合物还可以是化妆品组合物。本发明的化妆品组合物包含Slit1蛋白、Slit2蛋白、Slit3蛋白、Robo1蛋白、Robo2蛋白或LRRD2蛋白作为有效成分，并能够与皮肤学可接受的赋形剂一同以基础化妆品组合物(化妆水、乳膏、精华、洁面泡沫及洁面水等的洁面剂、面膜、身体护理油)、彩妆化妆品组合物(粉底、口红、睫毛膏、化妆品基底)、头发产品组合物(洗发水、润发液、护发素、发胶)及香皂等的形态来制备。

[0143] 上述赋形剂包括但不限于润肤剂、皮肤渗透促进剂、着色剂、芳香剂、乳化剂、增稠剂及溶剂。并且，还可以包括芳香剂、色素、杀菌剂、抗氧化剂、防腐剂及保湿剂等，为了改善物理性能的目的可以包括增粘剂、无机盐类、合成高分子物质等。例如，在使用本发明化妆品组合物制造洁面剂及香皂的情况下，可通过将上述Slit1蛋白、Slit2蛋白、Slit3蛋白、Robo1蛋白、Robo2蛋白或LRRD2蛋白添加到普通的洁面剂及香皂基底来容易地制造。在制造乳膏的情况下，可通过将Slit1蛋白、Slit2蛋白、Slit3蛋白、Robo1蛋白、Robo2蛋白或LRRD2蛋白或将其编码的碱基序列添加到普通的乳化型(O/W)乳膏基底来制造。还可以添加芳香剂、螯合剂、色素、抗氧化剂、防腐剂等和用于改善物性的蛋白质、矿物质或维生素等合成或天然材料。

[0144] 本发明的化妆品组合物中所包含的Slit1蛋白、Slit2蛋白、Slit3蛋白、Robo1蛋白、Robo2蛋白或LRRD2蛋白的含量没有特别限定，但相对于组合物总重量，优选地，为0.001重量百分比至10重量百分比，更优选地，为0.01重量百分比至5重量百分比。若上述含量在小于0.001重量百分比，则不能期待所需的抗老化或改善皱纹的效果，若大于10重量百分比，则在难以获得安全性或难以制剂。

[0145] 并且，本发明提供用于提供肌肉疾病诊断信息的蛋白质检测方法，上述用于提供肌肉疾病诊断信息的蛋白质检测方法包括：步骤i)，测量来源于作为实验组的受试者的试样中由序列1氨基酸序列组成的Slit3蛋白的表达水平；步骤ii)，将上述步骤i)中测量的Slit3蛋白的表达水平与作为对照组的来源于正常对象的试样的Slit3蛋白的表达水平进

行比较;以及步骤iii),在与对照组相比,在上述步骤ii)中比较的实验组的Slit3蛋白的表达水平降低的情况下,判断实验组为肌肉疾病。

[0146] 在本发明中,“测量蛋白质的表达水平”可通过测量信使核糖核酸或蛋白质的表达水平来确认。

[0147] 并且,本发明提供筛选肌肉疾病治疗剂的方法,上述筛选肌肉疾病治疗剂的方法包括:步骤i),用表达选自由由序列1的氨基酸序列组成的Slit3蛋白、由序列2的氨基酸序列组成的Robo1蛋白以及由序列3的氨基酸序列组成的Robo2蛋白组成的组中的一种以上的细胞株处理受试化合物或组合物;步骤ii),在上述步骤i)处理的细胞株中测量上述Slit3蛋白的表达水平或者上述Robo1蛋白或Robo2蛋白的活性;以及步骤iii),筛选上述步骤ii)的Slit3蛋白的表达水平或者Robo1蛋白或Robo2蛋白的活性相比于未处理受试化合物或组合物的对照组的细胞株有所增加的受试化合物或组合物。

[0148] 本发明的肌肉疾病优选是本发明所属技术领域中报告的由肌肉功能降低、肌肉萎缩或肌肉退化引起的肌肉疾病,具体地,更优选是选自由张力缺乏、肌肉萎缩症、肌肉营养不良症、肌肉退化、肌无力症、恶病质及肌肉减少症组成的组中的一种以上,但并不局限于此。

[0149] 上述肌肉萎缩或退化由先天因素、后天因素、老化等原因发生,肌肉萎缩的特征在于,肌肉量的逐渐损失,肌肉,尤其是骨骼肌或随意肌及心肌的弱化及退化。

[0150] 更具体地,上述肌肉统称筋、肌肉、肌腱,肌功能或肌肉功能是指通过肌肉的收缩发挥其力量的能力,并且包括:肌肉力量,肌肉为了克服阻力,可发挥的最大限度的收缩力;肌肉耐力,肌肉在给定的重量下可重复多长时间及几次收缩和放松的能力;以及爆发力,但短时间内发挥强大的力量的能力。上述肌肉功能与肌肉量成正比,术语“肌肉功能改善”是指使肌肉功能向更积极的方向改善。

[0151] 本发明的Slit蛋白或其LRRD2蛋白与Robo1或Robo2受体结合使通过Slit－Robo系统与肌肉母细胞的M－钙粘着蛋白结合的β－连环蛋白游离,从而使β－连环蛋白活性化并增加肌细胞生成素的表达,通过诱导肌肉母细胞的分化来促进肌肉的形成。因此,可通过Slit蛋白或其LRRD2蛋白的表达水平在出现直接症状之前,判断肌肉减少症是否发作。并且,可以筛选能够增加Slit蛋白的表达水平或Robo受体的活性的化合物或组合物作为肌肉减少症治疗剂候选物质。

[0152] 在本发明的方法中,测量信使核糖核酸的表达水平是指通过确认生物试样中将SLIT3蛋白或LRRD2蛋白编码的信使核糖核酸是否存在和表达水平来测量信使核糖核酸的量。其分析方法可使用本领域公知的方法,例如,聚合酶链式反应(PCR)、反转录酶－聚合酶链锁反应(RT－PCR)、竞争性反转录酶－聚合酶链锁反应(Competitive RT－PCR)、实时反转录聚合酶链反应(Realtime RT－PCR)、核糖核酸酶保护测分析法(RPA,RNase protection assay)、印迹法(Northern blotting)、基因芯片等,但并不局限于此。

[0153] 在本发明的方法中,测量蛋白质的表达水平是指通过确认生物试样中确认SLIT3蛋白或LRRD2蛋白是否存在以及表达表达水平的过程来测量蛋白质的量。优选地,蛋白质的量可以通过使用相对于上述基因的蛋白质以特异性结合的抗体来确认。其分析方法可使用本领域公知的方法,例如,蛋白质印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA,enzyme linked immunosorbent assay)、放射免疫测定(RIA,Radioimmunoassay)、放射免疫扩散法

(radioimmunodiffusion)、奥氏扩散法(Ouchterlony)免疫扩散法、火箭免疫电泳、免疫沉淀法(Immunoprecipitation Assay)、补体结合分析法(Complement Fixation Assay)、荧光激活细胞分类器(FACS,Fluorescence Activated Cell Sorter)、蛋白质芯片(protein chip)等,但并不局限于此。

[0154] 在用于提供上述肌肉疾病诊断信息的蛋白质检测方法及筛选肌肉疾病治疗剂的方法中,虽然记载了使用优选一实施例的Slit3,但可以使用Slit1、Slit2;或Slit1、slit2、slit3的活性片段。

[0155] 以下,将参考实施例更详细地说明本发明。对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施例仅用于说明目的,本发明的范围不应被解释为受这些实施例的限制。

[0156] <实施例1>确认Slit3表达与肌肉量的关系

[0157] <1-1>在Slit3缺乏小鼠模型中确认体重变化及肌肉减少指标

[0158] 为了确认Slit3是否参与生物体中骨骼肌的形成,在小鼠模型中确认了根据有或没有Slit3表达的肌肉量变化。

[0159] 具体地,通过从突变小鼠区域资源中心(Mutant Mouse Regional Resource Centers(Stock number 030759-MU;columbia,MO,USA))购买slit3敲除小鼠的胚胎,使雄性及雌性slit3+/-C57BL/6J小鼠交配,来制造缺乏Slit3的小鼠模型。Slit3缺乏小鼠模型分为雄性组合雌性组,测量缺乏Slit3表达的小鼠模型的体重。当小鼠模型到达7周龄时,处死雄性组合和雌性组,从各个的趾长伸肌(EDL,extensor digitorum longus)及腓肠肌和比目鱼肌(GC+SOL,gastrocnemius和soleus)获取肌肉并测量重量。为了将与小鼠体重相关的肌肉量表示为百分比,肌肉减少指标(sarcopenic index)使用"sarcopenic index(%)=100×肌肉的重量×体重"。

[0160] 其结果如图1、图2、下表1及表2所示,在缺乏Slit3的小鼠模型中,雄性组及雌性组整体体重低于正常对照组小鼠,趾长伸肌的重量及腓肠肌和比目鱼肌的重量也低,与正常对照组相比,趾长伸肌的肌肉减少指标及腓肠肌和比目鱼肌的肌肉减少指标显著减少(图1、图2、下表1及表2)。由此,可确认无论性别及肌肉种类如何,当生物体缺乏Slit3时,骨骼肌的肌肉质量也减少。

[0161] 表1

[0162] 在Slit缺乏雄性小鼠中的体重变化及肌肉减少指标的比较

[0163]

实验组	体重(g)	肌肉重量(g)		肌肉减少指标(%)	
		EDL	GC+SOL	EDL	GC+SOL
正常对照组	22.8±0.7	0.058±0.002	0.131±0.001	0.257±0.011	0.578±0.015
Slit3 缺乏组	19.8±1.0	0.041±0.003	0.101±0.008	0.207±0.014	0.507±0.022

[0164] 表2

[0165] 在Slit缺乏雌性小鼠中的体重变化及肌肉减少指标的比较

[0166]

实验组	体重(g)	肌肉重量(g)	肌肉减少指标(%)

[0167]

		EDL	GC+SOL	EDL	GC+SOL
正常对照组	18.6±0.5	0.047±0.006	0.104±0.007	0.250±0.026	0.558±0.028
Slit3 缺乏组	18.2±0.4	0.031±0.003	0.083±0.004	0.171±0.020	0.458±0.028

[0168] <1－2>在Slit3缺乏小鼠模型中确认肌肉面积变化

[0169] 由于确认了Slit3缺乏小鼠的骨骼肌减少,因此通过染色肌肉比较肌肉区域以具体确认这一点。

[0170] 具体地,处死7周龄的缺乏Slit3的雄性小鼠模型组,获取趾长伸肌及腓肠肌和比目鱼肌肌肉组织后,用4%的甲醛(Formaldehyde)固定并包埋(embedding)在OCT化合物中。之后,处理苏木精(hematoxylin)及伊红(Eosin),并通过通过苏木精—伊红染色(Hematoxylin&Eosin staining)来染色肌肉组织。拍摄染色的肌肉组织的照片,使用ImageJ软件比较肌肉组织的核和纤维质部分的数量,并确认面积。

[0171] 并且,为了更具体地比较细胞数,免疫组织化学染色作为肌纤维膜(sarcolemma)、核(nucleus)及肌肉母细胞的干细胞的卫星细胞的标记蛋白质。在GC肌肉组织的的剖面作为一次抗体分别处理抗层粘连蛋白(laminin)抗体和抗PAX7抗体,并按照制造商的协议反应后,染色二次抗体,以染色作为肌纤维膜及肌肉母细胞的干细胞的的卫星细胞的标记蛋白质,处理4'6－二脒基－2－苯基吲哚(4'6－diamidino－2－phenylindole,DAPI)并染色核后,用荧光显微镜(fluorescence microscope)获得GC肌肉组织内细胞中肌肉母细胞的干细胞的比率。

[0172] 其结果如图3至图5所示,在Slit缺乏小鼠模型中,趾长伸肌及腓肠肌和比目鱼肌的肌纤维及核的数量与常对照组小鼠相似(图3及图4)。腓肠肌组织剖面的免疫组织化学染色时,在Slit3缺乏小鼠中通过层粘连蛋白染色肌纤维的面积显著减少,相反的,通过染色核及PAX7确认了组织内整体核的数量及PAX7阳性细胞的数量上没有显著差异(图5)。由此,可确认在活体水平当缺乏Slit3时,肌纤维的面积虽然显著减少,但肌肉母细胞及其卫星细胞的数量并没有变化,因而基于Slit3缺乏的肌肉量减少与肌肉母细胞的增殖、其卫星细胞的增殖及增加(resruitment)无关。

[0173] <实施例2>确认促进Slit3的肌肉母细胞分化的效果

[0174] <2－1>确认基于Slit3的肌肉母细胞的生存能力是否变化

[0175] 由于确认了骨骼肌的量随着Slit3缺乏而减少,因此确认了Slit3如何在增加肌肉量中发挥作用。首先,确认了Slit3在增加肌肉量中的作用是否是增加肌肉细胞生存能力。

[0176] 具体地,将C2C12细胞株(购自ATCC,美国)接种到包含10%胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)的细胞培养基(DMEM)中并在37℃保持5%的CO_2中培养。培养24小时后,在以1μg/ml或3μg/ml浓度培养的细胞处理重组Slit3(Abcam公司,Cambridge,Ma,USA;及R&D System Inc.,Minneapolis,MN,USA),并进一步培养24小时。之后用磷酸盐缓盐水溶液洗涤两次,用四甲基偶氮唑盐试剂处理,并进一步培养2小时,用酶联免疫吸附测定板读数器在450nm处测量吸光度。作为未处理的对照组,在相同条件下培养未用Slit3处理的C2C12细胞株,用TNF－α处理的C2C12细胞株用作阳性对照组。

[0177] 其结果如图6所示,在用TNF－α处理的阳性对照组中,与未处理的对照组相比,细

胞生存能力显着增加，相反的，在Slit3处理的实验组中细胞生存能力没有观察到显着变化(图6)。

[0178] <2－2>确认在肌肉母细胞到肌肉肌纤维(myotube)的分化中的Slit3的分化增加效果。

[0179] 由于确认了骨骼肌的量随着Slit3缺乏而减少，因此确认了Slit3如何在增加肌肉量中发挥作用。Slit3没有显着改变肌肉母细胞的生存，因此确认了Slit3对肌肉母细胞分化为肌肉肌纤维的过程中的效果。

[0180] 具体地，将C2C12细胞接种到包含10％的胎牛血清的细胞培养基中并培养至100％的饱和(confluent)。之后，将培养基替换为包含1μg/ml的Slit3重组蛋白及2％的马血清(horse serum)的细胞培养基，并培养以诱导C2C12细胞分化成肌肉肌纤维。诱导后，获得分化细胞，用包含4％的甲醛的磷酸盐缓盐水(PBS)处理，在室温下固定15分钟，用0.1％的聚乙二醇辛基苯基醚(triton X－100)处理后，向细胞膜赋予渗透性(Permeability)。之后，将4％的正常驴血清加入到处理过的细胞中，在室温下将细胞阻隔(blocking)1小时，然后用作为一次抗体的肌球蛋白重链(myosin heavy chain，MyHC)抗体进行处理，在4℃下培养过夜，用作为包含0.1％的吐温－20(Tween－20)的磷酸盐缓盐水的磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗涤数次。洗涤后，处理与Alexa Fluor 594结合的二次抗体并孵育1小时，以免疫细胞化学染色(ICC staining，immunocytochemistry)肌球蛋白重链。之后，处理4’6－二脒基－2－苯基吲哚以染色细胞核并用荧光显微镜观察。

[0181] 其结果如图7所示，与没有添加Slit3重组蛋白的未处理对照组相比，用Slit3处理分化的实验组中细胞数没有变化，但肌纤维面积显着增加并且融合指数(fusion index)显着增加(图7)。

[0182] <实施例3>确认肌肉母细胞的分化过程中Slit3参与自因子

[0183] 已知，在肌肉母细胞分化为肌肉肌纤维的过程中，Myf5、Mrf4、MyoD、肌细胞生成素(myogenin)、Mef2A及Mef2c等的多种肌源性调节因子(myogenic regulatory factor，MRF)诱发肌肉母细胞的分化，因此通过诱导这些调节因子的表达来确认Slit3是否诱导肌肉母细胞的分化。

[0184] 具体地，将C2C12细胞接种至包含10％的胎牛血清细胞培养基，培养至饱和度为100％后，用包含1μg/ml的Slit3重组蛋白及2％的牛血清的细胞培养基交换培养基，共培养5天以诱导C2C12细胞分化为肌肉肌纤维。培养过程中，每24小时获取细胞，悬浮在TRIzol(Invitrogen，美国)试剂，根据制造商的方案提取分化的肌肉肌纤维的总核糖核酸(RNA)，使用1μg的核糖核酸作为模板，使用相应的引物及上标III试剂盒(superscript III kit，Invitrogen公司，美国)通过逆转录来分别合成了Myf5、Mrf4、MyoD、肌细胞生成素(myogenin)、Mef2A及Mef2c的脱氧核糖核酸(cDNA)。合成的扩增条件为在95℃变性(denaturation)30秒，在60℃退火(annealing)30秒，以及在72℃延伸(extension)30秒进行30个循环。合成的脱氧核糖核酸在使用Light Cycler 480SYBR Green I Master Mix(Roche)在95℃下预反应10分钟，在95℃下10秒，在55℃下15秒，以及在72℃下20秒作为一套进行45个循环的扩增反应条件下，在Light Cycler 480(Roche)进行实时聚合酶链反应(real－time PCR)，以在诱导分化的肌肉母细胞中根据是否进行Slit3处理确认肌源性调节因子的表达水平变化。

[0185] 并且，获取分化诱导2天的C2C12细胞，以与上述实施例<2－2>相同的方法，使用抗肌细胞生成素抗体在分化诱导的细胞中荧光免疫染色通过Slit3表达增加诱导的肌细胞生成素，以在蛋白质水平确认其表达。

[0186] 其结果如图8至图10所示，显示Slit3对Myf5、Mrf4、MyoD、Mef2A及Mef2c等的表达没有显著变化，但是在处理Slit3的实验组中显示肌细胞生成素信使核糖核酸表达水平显著增加，与未处理对照组中的肌细胞生成素信使核糖核酸表达水平相比增加了约1.8倍(图8)。并且，当通过荧光免疫染色确认肌细胞生成素蛋白质表达水平时，与未处理对照组相比，处理Slit3的实验组的肌细胞生成素－阳性细胞的数量显著增加(图9及图10)，Slit3通过增加肌细胞生成素的表达来促进肌肉母细胞的分化，从而诱导肌肉形成。

[0187] <实施例4>确认基于Slit3的β－连环蛋白(β－catenin)活性化的肌肉母细胞分化诱导效果

[0188] <4－1>确认在肌肉母细胞中表达的钙粘蛋白(Caderin)的种类及表达水平Slit蛋白的受体众所周知为作为细胞膜蛋白的Robo蛋白。已知Robo蛋白以与细胞膜中钙粘蛋白(Caderin)结合的形态存在于细胞膜，当Slit与Robo结合时，发生Robo与钙粘蛋白的结合，与钙粘蛋白结合的β－连环蛋白移动至细胞内并被活性化。由于在肌肉母细胞表达的钙粘蛋白为N－钙粘蛋白及M－钙粘着蛋白，因此确认了与Robo蛋白相关的肌肉母细胞中Slit3可以影响那种种类的钙粘蛋白。

[0189] 具体地，将C2C12细胞株、HEK297细胞株(肾细胞株)接种到包含10％的胎牛血清的细胞培养基，并在37℃培养以维持5％的CO_2。培养24小时后，获取各自的细胞及脑组织，并通过与<实施例3>中相同的过程进行实时聚合酶链反应，以确认C2C12细胞、HEK293细胞或脑组织中的M－钙粘着蛋白及N－钙粘蛋白的信使核糖核酸表达水平。

[0190] 并且，在上述获取的每个细胞混合溶解缓冲液(20mM Tris[pH 7.5]，150mM NaCl，1mM EDTA，1％Triton X－100，2.5mM sodium pyrophosphate，1mM－glycerophosphate，1mM Na3VO4，1mM NaF，及a protease－inhibitor mixture)，在4℃反应20分钟制备细胞裂解液，使用二喹啉甲酸(BCA)蛋白分析试剂盒确认了裂解液内蛋白质的浓度。通过10％的凝胶十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS－PAGE)分离包含10μg至20μg蛋白质的细胞裂解液试样后，移动懂硝酸纤维素膜(Amersham Biosciences，Buckinghamshire，UK)。之后，在包含5％的脱脂乳的洗涤缓冲液(TBST)(500mM Tris－HCL[pH 7.4]，1.5M NaCl，0.1％Tween－20)膜处理，并在室温下封闭1小时后，用作为一次抗体的抗－M－钙粘着蛋白抗体或抗－N－钙粘蛋白抗体进行处理，并在4℃培养过夜，用洗涤缓冲液洗涤，将羊抗小鼠免疫球蛋白(goat anti－mouse IgG)作为二次抗体，与包含1％的牛血清白蛋白(bovine serum albumi，BSA)的洗涤缓冲液一同在膜处理，培养1小时以进行蛋白质印迹(western blot)。

[0191] 其结果如图11a及图11b所示，确认了与N－钙粘蛋白相比，在C2C12细胞中M－钙粘着蛋白具有显著更高的信使核糖核酸表达水平(图11a)，在蛋白质表达水平中，M－钙粘着蛋白的蛋白质表达显著高于N－钙粘蛋白(图11b)。

[0192] <4－2>确认根据添加Slit3的肌肉母细胞中的β－连环蛋白活性

[0193] 已知Slit蛋白使β－连环蛋白活性化，β－连环蛋白也与肌细胞生成素的启动子部位结合，以增加肌细胞生成素的表达并促进肌肉母细胞的划分，因此在本发明中也确认肌肉母细胞的β－连环蛋白活性是否借助Slit3发生了变化。

[0194] 具体地，使用包含β－连环蛋白－荧光素酶(luciferase，luc)报告基因的β－连环蛋白表达载体转染C2C12细胞。之后，将转染的C2C12细胞接种到包含10％的胎牛血清的细胞培养基中并培养至它100％的饱和，用包含1μg/ml的Slit3重组蛋白及2％的马血清的细胞培养基交换培养基并培养，将上述培养的C2C12细胞悬浮在报告基因裂解缓冲液(reporter lysis buffer)以提取细胞蛋白。将荧光素酶底物(luciferase substrate；promega公司，美国)与10μl的上述提取的细胞蛋白混合，并用发光计(luminometer)测量发光度(luminescence)以确认β－连环蛋白－荧光素酶的活性。

[0195] 其结果如图12a所示，Slit3使肌肉母细胞中β－连环蛋白－荧光素酶的活性增加至未处理对照组的1.5倍水平(图12a)。

[0196] <4－3>确认根据Slit3处理的M－钙粘着蛋白及β－连环蛋白的结合水平的变化

[0197] 当用Slit3处理C2C12细胞时，通过β－连环蛋白的高活性确认了Slit3与Robo受体结合，可使β－连环蛋白的活性增加，C2C12细胞中M－钙粘着蛋白的表达水平高于N－钙粘蛋白的表达水平，因此进行免疫共沉淀(co－immunoprecipitation)以确认M－钙粘着蛋白与β－连环蛋白的结合是否根据Slit3处理变化。

[0198] 具体地，购买绿色荧光蛋白标记的(GFP－tagged)M－钙粘着蛋白的人类脱氧核糖核酸，用脂质体(lipofectamine)2000(Gibco，Grand Island，NY，USA)转化到C2C12细胞后，并用1μg/ml的Slit3重组蛋白处理，以培养细胞。之后，获取培养的细胞，用包含蛋白酶抑制剂混合物(protease inhibitor cocktail；Sigma－Aldrich，St.Louis，MO，USA)及磷酸酶抑制剂(phosphatase inhibitors；1mM Na3VO4，1mM NaF)的TNE缓冲液(25mM Tris－HCl，pH 7.4，150mM NaCl，1％Triton X－100，1mM EDTA)溶解。将溶解的裂解液用M－钙粘着蛋白抗体及免疫球蛋白免疫沉淀4分钟至30分钟，并使用上述实施例<4－1>的方法，使用抗－β－连环蛋白抗体进行蛋白质印迹。

[0199] 其结果如图12b所示，确认了处理Slit3的实验组中与M－钙粘着蛋白结合的β－连环蛋白水平显著减少，通过Slit3发生M－钙粘着蛋白与Robo蛋白的结合，β－连环蛋白也可以从M－钙粘着蛋白游离，并使活性增加(图12b)。

[0200] <4－4>确认根据β－连环蛋白表达存在与否的促进Slit3的肌肉母细胞分化效果差异

[0201] 在Slit3促进肌肉母细胞的分化的过程中，已确认了β－连环蛋白参与，因此当处理Slit3时，确认肌肉形成效果是否根据β－连环蛋白表达存在与否出现差异。

[0202] 具体地，包含10％的胎牛血清的细胞培养基中培养C2C12细胞后，加入包含与β－连环蛋白相关的小干扰RNA(CTNNB1siRNA)的脂质体2000(Invitrogen)混合物后，将C2C12细胞进一步培养6个小时。培养后，用新鲜的细胞培养基替换培养基，进一步培养2天，以制备敲除β－连环蛋白的C2C12细胞。为了用作表达β－连环蛋白的正常对照组，通过转化乱序的(scrambled)SiRNA而不是CTNNB1siRNA来制备正常对照组细胞。

[0203] 之后，将制备的敲除β－连环蛋白的C2C12细胞或正常对照组细胞接种到包含10％的胎牛血清的细胞培养基并培养至100％的饱和后，将培养基替换为包含1μg/ml的Slit3重组蛋白及2％的马血清的细胞培养基。培养后，获取细胞，使用抗－MyHC抗体作为一次抗体，并用上述实施例<2－2>的方法进行免疫细胞化学染色(ICC staining)。之后，处理4'6－二脒基－2－苯基吲哚以染色细胞的核，用荧光显微镜观察并以荧光值定量书包的数量。融合

指数(fusion index,%)将以与总MyHC表达细胞的核数量相关的MyHC表达肌肉肌纤维的核数量显示为百分比。并且,以上述实施例<4－1>,使用抗－肌细胞生成素抗体对上述培养后获取的细胞进行蛋白质印迹。

[0204] 其结果如图12c至图12e及图12f所示,确认了在用β－连环蛋白siRNA抑制β－连环蛋白的表达的实验组中,借助Slit3促进的肌纤维的肥大化及融合指数被显著抑制,肌细胞生成素的表达也显著减少(图12c至图12e及图12f)。由此,确认了Slit3游离(release)与M－钙粘着蛋白结合的β－连环蛋白,使肌肉母细胞的β－连环蛋白活性化,增加肌细胞生成素的表达,并诱导肌肉母细胞的分化,从而参与促进肌肉形成。

[0205] <实施例5>确认与肌肉母细胞中的Slit3结合的Robo受体亚型

[0206] <5－1>确认肌肉母细胞中表达的Robo受体亚型

[0207] 确认了在肌肉母细胞的分化过程中,Slit3可以增加β－连环蛋白活性及肌细胞生成素的表达,其可以通过Slit3－Robo受体的结合诱导。Slit蛋白的受体作为Robo蛋白,目前已知存在Robo1至Robo4等的四种亚型,因此为了确认肌肉母细胞中Slit3相关受体为何种亚型,确认了肌肉母细胞中表达的Robo受体。

[0208] 具体地,将C2C12细胞株、HEK297细胞株(肾细胞株)接种到包含10%的胎牛血清的细胞培养基,并在37℃培养以维持5%的CO_2。培养24小时后,获取各自的细胞,并通过与<实施例4>相同的过程,使用抗－Robo1抗体、抗－Robo2抗体、抗－Robo3抗体及抗－Robo4抗体进行蛋白质印迹,在C2C12细胞、HEK293细胞或脑组织中确认了Robo1、Robo2、Robo3及Robo4的蛋白质表达水平。

[0209] 其结果如图13a所示,Robo1及Robo2蛋白在C2C12细胞中以显著水平表达,但Robo3及Robo4蛋白质未表达(图13a)。

[0210] <5－2>确认肌肉母细胞中Slit3－Robo1与Slit3－Robo2是否结合

[0211] 由于确认了Robo1及Robo2蛋白在肌肉母细胞中表达,因而判断Slit3蛋白的受体是Robo1及Robo2。为了确认这一点,确认了当Robo1及Robo2的表达被抑制时Slit3的作用是否丧失。

[0212] 具体地,通过进行上述实施例<4－4>相同的方法分别转化为与Robo1或Robo2相关siRNA,来制备敲除Robo1或Robo2的C2C12细胞,将其接种到包含10%的胎牛血清的细胞培养基并培养至100%的饱和后,用包含1μg/ml的Slit3重组蛋及2%的马血清的细胞培养基交换培养基并培养。培养后,获取细胞,通过与<实施例3>相同的过程进行实时聚合酶链反应,确认了当Robo1及Robo2的表达被抑制时,Robo1、Robo2及肌细胞生成素的信使核糖核酸表达水平。

[0213] 其结果如图13b及图13c所示,借助Slit3基因表达增加的肌细胞生成素的表达根据Robo1及Robo2的表达被抑制,从而表达被显著抑制,使得肌细胞生成素的表达与Slit3未处理对照组类似(图13b及图13c、图13d)。

[0214] <实施例6>确认Robo受体在生物体内基于Slit3促进肌肉形成效果中的作用

[0215] 为了在生物体内具体确认本发明中确认的结果,在缺乏Robo的小鼠模型中确认了肌肉量的变化。

[0216] 具体地,通过从突变小鼠区域资源中心(Stock number 030759－MU;columbia,MO,USA)购买敲除Robo1或Robo2小鼠的胚胎,使雄性及雌性slit3+/－C57BL/6J小鼠交配,

来制造分别敲除Robo1或Robo2小鼠模型。其中选雄性作为实验组，并用于上述实施例<1－1>相同的方法确认了7周龄的小鼠模型的体重及肌肉重量和与肌肉减少相关的指标。由于Robo2缺乏组未能生存至7周，因而未能用作实验组，仅对Robo1缺乏组进行实验后，与正常对照组进行比较。

[0217] 其结果如下表3及图14所示，在缺乏Robo1的小鼠模型中，体重低于正常对照组小鼠，趾长伸肌的重量及腓肠肌和比目鱼肌的重量也更低，而且，与正常对照组相比，趾长伸肌的肌肉减少指标及腓肠肌和比目鱼肌的肌肉减少指标也显著减少(图14及表3)。由此，Slit3参与骨骼肌形成的肌肉母细胞的受体是Robo1及Robo2，尤其在缺乏Robo1的情况下，肌肉量在活体水平减少，因此确认了可通过Slit3及Robo1或Robo2的结合系统显示出肌肉减少症的改善效果。

[0218] 表3

[0219] 缺乏Robo1的雄性小鼠中的体重变化及肌肉减少指标的比较

[0220]

实验组	体重（g）	肌肉重量（g）		肌肉减少指标（%）	
		EDL	GC＋SOL	EDL	GC＋SOL
正常对照组	21.1±0.6	0.048±0.002	0.117±0.001	0.206±0.009	0.541±0.014
Robo1 缺乏组	17.6±0.9	0.029±0.003	0.085±0.002	0.162±0.011	0.474±0.024

[0221] <实施例7>确认基于Slit3的LRRD2结构域的肌肉母细胞分化及肌肉量增进效果

[0222] 人类Slit3蛋白由1,523个氨基酸组成，并且是具有约170kDa的分子量的非常大的物质，因此使用Slit3蛋白全长的药物被判断为实用性不高，从而选择被判断为Slit3全长中可显示出肌肉母细胞分化及肌肉量增进效果的结构域片段。Slit3蛋白包含四个富含亮氨基酸的结构域(Leucine－rich domain)，其中，由130个氨基酸组成的富含亮氨酸的结构域2(Leucine rich domain 2,LRRD2))是与受体结合的部分，由此判断出可进行多种细胞作用，在本发明的促进肌肉母细胞分化及肌肉量增进效果中，确认LRRD2是否表现出Slit3全长的效果。

[0223] <7－1>确认Slit3在试管内水平的基于LRRD2的肌肉母细胞的分化效果

[0224] 具体地，将C2C12细胞接种到包含10％的胎牛血清并培养至100％的饱和后，用包含10nM的重组LRRD2(专利文献1)及2％的马血清的细胞培养基交换培养基并培养。培养后，获取细胞，使用抗－MyHC抗体作为一次抗体，并用上述实施例<2－2>的方法进行免疫细胞化学染色(ICC staining)。之后，处理4'6－二脒基－2－苯基吲哚以染色细胞的核，用荧光显微镜观察并以荧光值定量书包的数量。融合指数(fusion index,％)将以与总MyHC表达细胞的核数量相关的MyHC表达肌肉肌纤维的核数量显示为百分比。

[0225] 其结果如图15所示，与未处理对照组相比，处理重组LRRD2蛋白实验组的肌肉肌纤维的面积及融合指数水平显著增加，这与处理Slit3蛋白全长的情况类似(图15)。

[0226] <7－2>确认Slit3在生物体内水平的基于LRRD2的体重及肌肉减少指标增加效果

[0227] 具体地，将8周龄雌性C57BL/6小鼠开腹并切除卵巢，以制造缺乏性激素的肌肉减少症小鼠模型，从9周龄起，重组LRRD2结构域按照2μg或10μg给药量静脉内注射，每日一次，每周五次，持续四周。四周后，用与上述实施例<1－1>相同的方法，确认了13周龄小鼠模型

的体重及肌肉重量和肌肉减少指标。

[0228] 其结果如下表4及图16所示，与未给药LRRD2的对照组相比，给药LRRD2的小鼠模型的体重没有显示出显著变化，但是相对于肌肉量及肌肉减少指标，与未给药LRRD2的对照组相比，给药LRRD2的小鼠模型的趾长伸肌的重量及腓肠肌和比目鱼肌的重量显著增加，趾长伸肌的肌肉减少指标及腓肠肌和比目鱼肌的肌肉减少指标也显著增加(图16及表4)。

[0229] 表4

[0230] 切除卵巢雌性小鼠中的基于LRRD2的肌肉减少指标的比较

[0231]

实验组		肌肉重量（g）		肌肉减少指标（%）	
		EDL	GC＋SOL	EDL	GC＋SOL
正常对照组		0.040±0.001	0.109±0.003	0.196±0.006	0.540±0.017
LRRD2 处理组	2 μg	0.041±0.005	0.121±0.001	0.200±0.010	0.596±0.011
	10 μg	0.047±0.002	0.119±0.002	0.235±0.013	0.594±0.015

[0001] 序列表

[0002] <110> 财团法人峨山社会福祉财团

[0003] 蔚山大学校产学协力团

[0004] <120> 使用SLIT－ROBO系统的预防或治疗肌肉减少症的组合物

[0005] <130> PCT5036842

[0006] <150> KR 10-2016-0071252

[0007] <151> 2016-06-08

[0008] <150> KR 10-2017-0013799

[0009] <151> 2017-01-31

[0010] <160> 8

[0011] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0012] <210> 1

[0013] <211> 1523

[0014] <212> PRT

[0015] <213> 人工序列(Artificial)

[0016] <220>

[0017] <223> 人类 slit3 氨基酸(Human Slit3 amino acid(AAQ89243))

[0018] <400> 1

[0019] Met Ala Pro Gly Trp Ala Gly Val Gly Ala Ala Val Arg Ala Arg Leu

[0020] 1 5 10 15

[0021] Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Ser Val Leu Ser Gly Pro Pro Ala Val

[0022] 20 25 30

[0023] Ala Cys Pro Thr Lys Cys Thr Cys Ser Ala Ala Ser Val Asp Cys His

[0024] 35 40 45

[0025] Gly Leu Gly Leu Arg Ala Val Pro Arg Gly Ile Pro Arg Asn Ala Glu

[0026] 50 55 60

[0027] Arg Leu Asp Leu Asp Arg Asn Asn Ile Thr Arg Ile Thr Lys Met Asp

[0028] 65 70 75 80

[0029] Phe Ala Gly Leu Lys Asn Leu Arg Val Leu His Leu Glu Asp Asn Gln

[0030] 85 90 95

[0031] Val Ser Val Ile Glu Arg Gly Ala Phe Gln Asp Leu Lys Gln Leu Glu

[0032] 100 105 110

[0033] Arg Leu Arg Leu Asn Lys Asn Lys Leu Gln Val Leu Pro Glu Leu Leu

[0034] 115 120 125

[0035] Phe Gln Ser Thr Pro Lys Leu Thr Arg Leu Asp Leu Ser Glu Asn Gln

[0036] 130 135 140

[0037] Ile Gln Gly Ile Pro Arg Lys Ala Phe Arg Gly Ile Thr Asp Val Lys

[0038] 145 150 155 160

[0039] Asn Leu Gln Leu Asp Asn Asn His Ile Ser Cys Ile Glu Asp Gly Ala

[0040] 165 170 175

[0041] Phe Arg Ala Leu Arg Asp Leu Glu Ile Leu Thr Leu Asn Asn Asn Asn

[0042] 180 185 190

[0043] Ile Ser Arg Ile Leu Val Thr Ser Phe Asn His Met Pro Lys Ile Arg

[0044] 195 200 205

[0045] Thr Leu Arg Leu His Ser Asn His Leu Tyr Cys Asp Cys His Leu Ala

[0046] 210 215 220

[0047] Trp Leu Ser Asp Trp Leu Arg Gln Arg Arg Thr Val Gly Gln Phe Thr

[0048] 225 230 235 240

[0049] Leu Cys Met Ala Pro Val His Leu Arg Gly Phe Asn Val Ala Asp Val

[0050] 245 250 255

[0051] Gln Lys Lys Glu Tyr Val Cys Pro Ala Pro His Ser Glu Pro Pro Ser

[0052] 260 265 270

[0053] Cys Asn Ala Asn Ser Ile Ser Cys Pro Ser Pro Cys Thr Cys Ser Asn

[0054] 275 280 285

[0055] Asn Ile Val Asp Cys Arg Gly Lys Gly Leu Met Glu Ile Pro Ala Asn

[0056] 290 295 300

[0057] Leu Pro Glu Gly Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys

[0058] 305 310 315 320

[0059] Ala Ile Pro Ala Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile

[0060] 325 330 335

[0061] Asp Ile Ser Lys Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln

[0062] 340 345 350

[0063] Gly Leu Lys Ser Leu Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr

[0064] 355 360 365

[0065] Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu

[0066] 370 375 380

[0067] Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln

[0068] 385 390 395 400

[0069] Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln

[0070] 405 410 415

[0071] Thr Ile Ser Lys Gly Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu

[0072] 420 425 430

[0073] His Leu Ala Gln Asn Pro Phe Val Cys Asp Cys His Leu Lys Trp Leu

[0074] 435 440 445

[0075] Ala Asp Tyr Leu Gln Asp Asn Pro Ile Glu Thr Ser Gly Ala Arg Cys

[0076] 450 455 460

[0077] Ser Ser Pro Arg Arg Leu Ala Asn Lys Arg Ile Ser Gln Ile Lys Ser

[0078] 465 470 475 480

[0079] Lys Lys Phe Arg Cys Ser Gly Ser Glu Asp Tyr Arg Ser Arg Phe Ser

[0080] 485 490 495

[0081] Ser Glu Cys Phe Met Asp Leu Val Cys Pro Glu Lys Cys Arg Cys Glu

[0082] 500 505 510

[0083] Gly Thr Ile Val Asp Cys Ser Asn Gln Lys Leu Val Arg Ile Pro Ser

[0084] 515 520 525

[0085] His Leu Pro Glu Tyr Val Thr Asp Leu Arg Leu Asn Asp Asn Glu Val

[0086] 530 535 540

[0087] Ser Val Leu Glu Ala Thr Gly Ile Phe Lys Lys Leu Pro Asn Leu Arg

[0088] 545 550 555 560

[0089] Lys Ile Asn Leu Ser Asn Asn Lys Ile Lys Glu Val Arg Glu Gly Ala

[0090] 565 570 575

[0091] Phe Asp Gly Ala Ala Ser Val Gln Glu Leu Met Leu Thr Gly Asn Gln

[0092] 580 585 590

[0093] Leu Glu Thr Val His Gly Arg Val Phe Arg Gly Leu Ser Gly Leu Lys

[0094] 595 600 605

[0095] Thr Leu Met Leu Arg Ser Asn Leu Ile Ser Cys Val Ser Asn Asp Thr

[0096] 610 615 620

[0097] Phe Ala Gly Leu Ser Ser Val Arg Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Arg

[0098] 625 630 635 640

[0099] Ile Thr Thr Ile Thr Pro Gly Ala Phe Thr Thr Leu Val Ser Leu Ser

[0100] 645 650 655

[0101] Thr Ile Asn Leu Leu Ser Asn Pro Phe Asn Cys Asn Cys His Leu Ala

[0102] 660 665 670

[0103] Trp Leu Gly Lys Trp Leu Arg Lys Arg Arg Ile Val Ser Gly Asn Pro

[0104] 675 680 685

[0105] Arg Cys Gln Lys Pro Phe Phe Leu Lys Glu Ile Pro Ile Gln Asp Val

[0106] 690 695 700

[0107] Ala Ile Gln Asp Phe Thr Cys Asp Gly Asn Glu Glu Ser Ser Cys Gln

[0108] 705 710 715 720

[0109] Leu Ser Pro Arg Cys Pro Glu Gln Cys Thr Cys Met Glu Thr Val Val

[0110] 725 730 735

[0111] Arg Cys Ser Asn Lys Gly Leu Arg Ala Leu Pro Arg Gly Met Pro Lys

[0112] 740 745 750

[0113] Asp Val Thr Glu Leu Tyr Leu Glu Gly Asn His Leu Thr Ala Val Pro

[0114] 755 760 765

[0115] Arg Glu Leu Ser Ala Leu Arg His Leu Thr Leu Ile Asp Leu Ser Asn

[0116] 770 775 780

[0117] Asn Ser Ile Ser Met Leu Thr Asn Tyr Thr Phe Ser Asn Met Ser His

[0118] 785 790 795 800

[0119] Leu Ser Thr Leu Ile Leu Ser Tyr Asn Arg Leu Arg Cys Ile Pro Val

[0120] 805 810 815

[0121] His Ala Phe Asn Gly Leu Arg Ser Leu Arg Val Leu Thr Leu His Gly

[0122] 820 825 830

[0123] Asn Asp Ile Ser Ser Val Pro Glu Gly Ser Phe Asn Asp Leu Thr Ser

[0124] 835 840 845

[0125] Leu Ser His Leu Ala Leu Gly Thr Asn Pro Leu His Cys Asp Cys Ser

[0126] 850 855 860

[0127] Leu Arg Trp Leu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Tyr Lys Glu Pro Gly

[0128] 865 870 875 880

[0129] Ile Ala Arg Cys Ser Ser Pro Glu Pro Met Ala Asp Arg Leu Leu Leu

[0130] 885 890 895

[0131] Thr Thr Pro Thr His Arg Phe Gln Cys Lys Gly Pro Val Asp Ile Asn

[0132] 900 905 910

[0133] Ile Val Ala Lys Cys Asn Ala Cys Leu Ser Ser Pro Cys Lys Asn Asn

[0134] 915 920 925

[0135] Gly Thr Cys Thr Gln Asp Pro Val Glu Leu Tyr Arg Cys Ala Cys Pro

[0136] 930 935 940

[0137] Tyr Ser Tyr Lys Gly Lys Asp Cys Thr Val Pro Ile Asn Thr Cys Ile

[0138] 945 950 955 960

[0139] Gln Asn Pro Cys Gln His Gly Gly Thr Cys His Leu Ser Asp Ser His

[0140] 965 970 975

[0141] Lys Asp Gly Phe Ser Cys Ser Cys Pro Leu Gly Phe Glu Gly Gln Arg

[0142] 980 985 990

[0143] Cys Glu Ile Asn Pro Asp Asp Cys Glu Asp Asn Asp Cys Glu Asn Asn

[0144] 995 1000 1005

[0145] Ala Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Asn Tyr Val Cys Ile Cys Pro Pro

[0146] 1010 1015 1020

[0147] Asn Tyr Thr Gly Glu Leu Cys Asp Glu Val Ile Asp His Cys Val Pro

[0148] 1025 1030 1035 1040

[0149] Glu Leu Asn Leu Cys Gln His Glu Ala Lys Cys Ile Pro Leu Asp Lys

[0150] 1045 1050 1055

[0151] Gly Phe Ser Cys Glu Cys Val Pro Gly Tyr Ser Gly Lys Leu Cys Glu

[0152] 1060 1065 1070

[0153] Thr Asp Asn Asp Asp Cys Val Ala His Lys Cys Arg His Gly Ala Gln

[0154] 1075 1080 1085

[0155] Cys Val Asp Thr Ile Asn Gly Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Gln Gly Phe

[0156] 1090 1095 1100

[0157] Ser Gly Pro Phe Cys Glu His Pro Pro Pro Met Val Leu Leu Gln Thr

[0158] 1105 1110 1115 1120

[0159] Ser Pro Cys Asp Gln Tyr Glu Cys Gln Asn Gly Ala Gln Cys Ile Val

[0160] 1125 1130 1135

[0161] Val Gln Gln Glu Pro Thr Cys Arg Cys Pro Pro Gly Phe Ala Gly Pro

[0162] 1140 1145 1150

[0163] Arg Cys Glu Lys Leu Ile Thr Val Asn Phe Val Gly Lys Asp Ser Tyr

[0164] 1155 1160 1165

[0165] Val Glu Leu Ala Ser Ala Lys Val Arg Pro Gln Ala Asn Ile Ser Leu

[0166] 1170 1175 1180

[0167] Gln Val Ala Thr Asp Lys Asp Asn Gly Ile Leu Leu Tyr Lys Gly Asp

[0168] 1185 1190 1195 1200

[0169] Asn Asp Pro Leu Ala Leu Glu Leu Tyr Gln Gly His Val Arg Leu Val

[0170] 1205 1210 1215

[0171] Tyr Asp Ser Leu Ser Ser Pro Pro Thr Thr Val Tyr Ser Val Glu Thr

[0172] 1220 1225 1230

[0173] Val Asn Asp Gly Gln Phe His Ser Val Glu Leu Val Thr Leu Asn Gln

[0174] 1235 1240 1245

[0175] Thr Leu Asn Leu Val Val Asp Lys Gly Thr Pro Lys Ser Leu Gly Lys

[0176] 1250 1255 1260

[0177] Leu Gln Lys Gln Pro Ala Val Gly Ile Asn Ser Pro Leu Tyr Leu Gly

[0178] 1265 1270 1275 1280

[0179] Gly Ile Pro Thr Ser Thr Gly Leu Ser Ala Leu Arg Gln Gly Thr Asp

[0180] 1285 1290 1295

[0181] Arg Pro Leu Gly Gly Phe His Gly Cys Ile His Glu Val Arg Ile Asn

[0182] 1300 1305 1310

[0183] Asn Glu Leu Gln Asp Phe Lys Ala Leu Pro Pro Gln Ser Leu Gly Val

[0184] 1315 1320 1325

[0185] Ser Pro Gly Cys Lys Ser Cys Thr Val Cys Lys His Gly Leu Cys Arg

[0186] 1330 1335 1340

[0187] Ser Val Glu Lys Asp Ser Val Val Cys Glu Cys Arg Pro Gly Trp Thr

[0188] 1345 1350 1355 1360

[0189] Gly Pro Leu Cys Asp Gln Glu Ala Arg Asp Pro Cys Leu Gly His Arg

[0190] 1365 1370 1375

[0191] Cys His His Gly Lys Cys Val Ala Thr Gly Thr Ser Tyr Met Cys Lys

[0192] 1380 1385 1390

[0193] Cys Ala Glu Gly Tyr Gly Gly Asp Leu Cys Asp Asn Lys Asn Asp Ser

[0194] 1395 1400 1405

[0195] Ala Asn Ala Cys Ser Ala Phe Lys Cys His His Gly Gln Cys His Ile

[0196] 1410 1415 1420

[0197] Ser Asp Gln Gly Glu Pro Tyr Cys Leu Cys Gln Pro Gly Phe Ser Gly

[0198] 1425 1430 1435 1440

[0199] Glu His Cys Gln Gln Glu Asn Pro Cys Leu Gly Gln Val Val Arg Glu

[0200] 1445 1450 1455

[0201] Val Ile Arg Arg Gln Lys Gly Tyr Ala Ser Cys Ala Thr Ala Ser Lys

[0202] 1460 1465 1470

[0203] Val Pro Ile Met Glu Cys Arg Gly Gly Cys Gly Pro Gln Cys Cys Gln

[0204] 1475 1480 1485

[0205] Pro Thr Arg Ser Lys Arg Arg Lys Tyr Val Phe Gln Cys Thr Asp Gly

[0206] 1490 1495 1500

[0207] Ser Ser Phe Val Glu Glu Val Glu Arg His Leu Glu Cys Gly Cys Leu

[0208] 1505 1510 1515 1520

[0209] Ala Cys Ser

[0210] <210> 2

[0211] <211> 1651

[0212] <212> PRT

[0213] <213> 人工序列(Artificial)

[0214] <220>

[0215] <223> Robo1氨基酸(Robo1 amino acid (AAC39575))

[0216] <400> 2

[0217] Met Lys Trp Lys His Val Pro Phe Leu Val Met Ile Ser Leu Leu Ser

[0218] 1 5 10 15

[0219] Leu Ser Pro Asn His Leu Phe Leu Ala Gln Leu Ile Pro Asp Pro Glu

[0220] 20 25 30

[0221] Asp Val Glu Arg Gly Asn Asp His Gly Thr Pro Ile Pro Thr Ser Asp

[0222] 35 40 45

[0223] Asn Asp Asp Asn Ser Leu Gly Tyr Thr Gly Ser Arg Leu Arg Gln Glu

[0224] 50 55 60

[0225] Asp Phe Pro Pro Arg Ile Val Glu His Pro Ser Asp Leu Ile Val Ser

[0226] 65 70 75 80

[0227] Lys Gly Glu Pro Ala Thr Leu Asn Cys Lys Ala Glu Gly Arg Pro Thr

[0228] 85 90 95

[0229] Pro Thr Ile Glu Trp Tyr Lys Gly Gly Glu Arg Val Glu Thr Asp Lys

[0230] 100 105 110

[0231] Asp Asp Pro Arg Ser His Arg Met Leu Leu Pro Ser Gly Ser Leu Phe

[0232] 115 120 125

[0233] Phe Leu Arg Ile Val His Gly Arg Lys Ser Arg Pro Asp Glu Gly Val

[0234] 130 135 140

[0235] Tyr Val Cys Val Ala Arg Asn Tyr Leu Gly Glu Ala Val Ser His Asn

[0236] 145 150 155 160

[0237] Ala Ser Leu Glu Val Ala Ile Leu Arg Asp Asp Phe Arg Gln Asn Pro

[0238] 165 170 175

[0239] Ser Asp Val Met Val Ala Val Gly Glu Pro Ala Val Met Glu Cys Gln

[0240] 180 185 190

[0241] Pro Pro Arg Gly His Pro Glu Pro Thr Ile Ser Trp Lys Lys Asp Gly

[0242] 195 200 205

[0243] Ser Pro Leu Asp Asp Lys Asp Glu Arg Ile Thr Ile Arg Gly Gly Lys

[0244] 210 215 220

[0245] Leu Met Ile Thr Tyr Thr Arg Lys Ser Asp Ala Gly Lys Tyr Val Cys

[0246] 225 230 235 240

[0247] Val Gly Thr Asn Met Val Gly Glu Arg Glu Ser Glu Val Ala Glu Leu

[0248] 245 250 255

[0249] Thr Val Leu Glu Arg Pro Ser Phe Val Lys Arg Pro Ser Asn Leu Ala

[0250] 260 265 270

[0251] Val Thr Val Asp Asp Ser Ala Glu Phe Lys Cys Glu Ala Arg Gly Asp

[0252] 275 280 285

[0253] Pro Val Pro Thr Val Arg Trp Arg Lys Asp Asp Gly Glu Leu Pro Lys

[0254] 290 295 300

[0255] Ser Arg Tyr Glu Ile Arg Asp Asp His Thr Leu Lys Ile Arg Lys Val

[0256] 305 310 315 320

[0257] Thr Ala Gly Asp Met Gly Ser Tyr Thr Cys Val Ala Glu Asn Met Val

[0258] 325 330 335

[0259] Gly Lys Ala Glu Ala Ser Ala Thr Leu Thr Val Gln Glu Pro Pro His

[0260] 340 345 350

[0261] Phe Val Val Lys Pro Arg Asp Gln Val Val Ala Leu Gly Arg Thr Val

[0262] 355 360 365

[0263] Thr Phe Gln Cys Glu Ala Thr Gly Asn Pro Gln Pro Ala Ile Phe Trp

[0264] 370 375 380

[0265] Arg Arg Glu Gly Ser Gln Asn Leu Leu Phe Ser Tyr Gln Pro Pro Gln

[0266] 385 390 395 400

[0267] Ser Ser Ser Arg Phe Ser Val Ser Gln Thr Gly Asp Leu Thr Ile Thr

[0268] 405 410 415

[0269] Asn Val Gln Arg Ser Asp Val Gly Tyr Tyr Ile Cys Gln Thr Leu Asn

[0270] 420 425 430

[0271] Val Ala Gly Ser Ile Ile Thr Lys Ala Tyr Leu Glu Val Thr Asp Val

[0272] 435 440 445

[0273] Ile Ala Asp Arg Pro Pro Pro Val Ile Arg Gln Gly Pro Val Asn Gln

[0274] 450 455 460

[0275] Thr Val Ala Val Asp Gly Thr Phe Val Leu Ser Cys Val Ala Thr Gly

[0276] 465 470 475 480

[0277] Ser Pro Val Pro Thr Ile Leu Trp Arg Lys Asp Gly Val Leu Val Ser

[0278] 485 490 495

[0279] Thr Gln Asp Ser Arg Ile Lys Gln Leu Glu Asn Gly Val Leu Gln Ile

[0280] 500 505 510

[0281] Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Thr Gly Arg Tyr Thr Cys Ile Ala Ser

[0282] 515 520 525

[0283] Thr Pro Ser Gly Glu Ala Thr Trp Ser Ala Tyr Ile Glu Val Gln Glu

[0284] 530 535 540

[0285] Phe Gly Val Pro Val Gln Pro Pro Arg Pro Thr Asp Pro Asn Leu Ile

[0286] 545 550 555 560

[0287] Pro Ser Ala Pro Ser Lys Pro Glu Val Thr Asp Val Ser Arg Asn Thr

[0288] 565 570 575

[0289] Val Thr Leu Ser Trp Gln Pro Asn Leu Asn Ser Gly Ala Thr Pro Thr

[0290] 580 585 590

[0291] Ser Tyr Ile Ile Glu Ala Phe Ser His Ala Ser Gly Ser Ser Trp Gln

[0292] 595 600 605

[0293] Thr Val Ala Glu Asn Val Lys Thr Glu Thr Ser Ala Ile Lys Gly Leu

[0294] 610 615 620

[0295] Lys Pro Asn Ala Ile Tyr Leu Phe Leu Val Arg Ala Ala Asn Ala Tyr

[0296] 625 630 635 640

[0297] Gly Ile Ser Asp Pro Ser Gln Ile Ser Asp Pro Val Lys Thr Gln Asp

[0298] 645 650 655

[0299] Val Leu Pro Thr Ser Gln Gly Val Asp His Lys Gln Val Gln Arg Glu

[0300] 660 665 670

[0301] Leu Gly Asn Ala Val Leu His Leu His Asn Pro Thr Val Leu Ser Ser

[0302] 675 680 685

[0303] Ser Ser Ile Glu Val His Trp Thr Val Asp Gln Gln Ser Gln Tyr Ile

[0304] 690 695 700

[0305] Gln Gly Tyr Lys Ile Leu Tyr Arg Pro Ser Gly Ala Asn His Gly Glu

[0306] 705 710 715 720

[0307] Ser Asp Trp Leu Val Phe Glu Val Arg Thr Pro Ala Lys Asn Ser Val

[0308] 725 730 735

[0309] Val Ile Pro Asp Leu Arg Lys Gly Val Asn Tyr Glu Ile Lys Ala Arg

[0310] 740 745 750

[0311] Pro Phe Phe Asn Glu Phe Gln Gly Ala Asp Ser Glu Ile Lys Phe Ala

[0312] 755 760 765

[0313] Lys Thr Leu Glu Glu Ala Pro Ser Ala Pro Pro Gln Gly Val Thr Val

[0314] 770 775 780

[0315] Ser Lys Asn Asp Gly Asn Gly Thr Ala Ile Leu Val Ser Trp Gln Pro

[0316] 785 790 795 800

[0317] Pro Pro Glu Asp Thr Gln Asn Gly Met Val Gln Glu Tyr Lys Val Trp

[0318] 805 810 815

[0319] Cys Leu Gly Asn Glu Thr Arg Tyr His Ile Asn Lys Thr Val Asp Gly

[0320] 820 825 830

[0321] Ser Thr Phe Ser Val Val Ile Pro Phe Leu Val Pro Gly Ile Arg Tyr

[0322] 835 840 845

[0323] Ser Val Glu Val Ala Ala Ser Thr Gly Ala Gly Ser Gly Val Lys Ser

[0324] 850 855 860

[0325] Glu Pro Gln Phe Ile Gln Leu Asp Ala His Gly Asn Pro Val Ser Pro

[0326] 865 870 875 880

[0327] Glu Asp Gln Val Ser Leu Ala Gln Gln Ile Ser Asp Val Val Lys Gln

[0328] 885 890 895

[0329] Pro Ala Phe Ile Ala Gly Ile Gly Ala Ala Cys Trp Ile Ile Leu Met

[0330] 900 905 910

[0331] Val Phe Ser Ile Trp Leu Tyr Arg His Arg Lys Lys Arg Asn Gly Leu

[0332] 915 920 925

[0333] Thr Ser Thr Tyr Ala Gly Ile Arg Lys Val Pro Ser Phe Thr Phe Thr

[0334] 930 935 940

[0335] Pro Thr Val Thr Tyr Gln Arg Gly Gly Glu Ala Val Ser Ser Gly Gly

[0336] 945 950 955 960

[0337] Arg Pro Gly Leu Leu Asn Ile Ser Glu Pro Ala Ala Gln Pro Trp Leu

[0338] 965 970 975

[0339] Ala Asp Thr Trp Pro Asn Thr Gly Asn Asn His Asn Asp Cys Ser Ile

[0340] 980 985 990

[0341] Ser Cys Cys Thr Ala Gly Asn Gly Asn Ser Asp Ser Asn Leu Thr Thr

[0342] 995 1000 1005

[0343] Tyr Ser Arg Pro Ala Asp Cys Ile Ala Asn Tyr Asn Asn Gln Leu Asp

[0344] 1010 1015 1020

[0345] Asn Lys Gln Thr Asn Leu Met Leu Pro Glu Ser Thr Val Tyr Gly Asp

[0346] 1025 1030 1035 1040

[0347] Val Asp Leu Ser Asn Lys Ile Asn Glu Met Lys Thr Phe Asn Ser Pro

[0348] 1045 1050 1055

[0349] Asn Leu Lys Asp Gly Arg Phe Val Asn Pro Ser Gly Gln Pro Thr Pro

[0350] 1060 1065 1070

[0351] Tyr Ala Thr Thr Gln Leu Ile Gln Ser Asn Leu Ser Asn Asn Met Asn

[0352] 1075 1080 1085

[0353] Asn Gly Ser Gly Asp Ser Gly Glu Lys His Trp Lys Pro Leu Gly Gln

[0354] 1090 1095 1100

[0355] Gln Lys Gln Glu Val Ala Pro Val Gln Tyr Asn Ile Val Glu Gln Asn

[0356] 1105 1110 1115 1120

[0357] Lys Leu Asn Lys Asp Tyr Arg Ala Asn Asp Thr Val Pro Pro Thr Ile

[0358] 1125 1130 1135

[0359] Pro Tyr Asn Gln Ser Tyr Asp Gln Asn Thr Gly Gly Ser Tyr Asn Ser

[0360] 1140 1145 1150

[0361] Ser Asp Arg Gly Ser Ser Thr Ser Gly Ser Gln Gly His Lys Lys Gly

[0362] 1155 1160 1165

[0363] Ala Arg Thr Pro Lys Val Pro Lys Gln Gly Gly Met Asn Trp Ala Asp

[0364] 1170 1175 1180

[0365] Leu Leu Pro Pro Pro Pro Ala His Pro Pro Pro His Ser Asn Ser Glu

[0366] 1185 1190 1195 1200

[0367] Glu Tyr Asn Ile Ser Val Asp Glu Ser Tyr Asp Gln Glu Met Pro Cys

[0368] 1205 1210 1215

[0369] Pro Val Pro Pro Ala Arg Met Tyr Leu Gln Gln Asp Glu Leu Glu Glu

[0370] 1220 1225 1230

[0371] Glu Glu Asp Glu Arg Gly Pro Thr Pro Pro Val Arg Gly Ala Ala Ser

[0372] 1235 1240 1245

[0373] Ser Pro Ala Ala Val Ser Tyr Ser His Gln Ser Thr Ala Thr Leu Thr

[0374] 1250 1255 1260

[0375] Pro Ser Pro Gln Glu Glu Leu Gln Pro Met Leu Gln Asp Cys Pro Glu

[0376] 1265 1270 1275 1280

[0377] Glu Thr Gly His Met Gln His Gln Pro Asp Arg Arg Arg Gln Pro Val

[0378] 1285 1290 1295

[0379] Ser Pro Pro Pro Pro Pro Arg Pro Ile Ser Pro Pro His Thr Tyr Gly

[0380] 1300 1305 1310

[0381] Tyr Ile Ser Gly Pro Leu Val Ser Asp Met Asp Thr Asp Ala Pro Glu

[0382] 1315 1320 1325

[0383] Glu Glu Glu Asp Glu Ala Asp Met Glu Val Ala Lys Met Gln Thr Arg

[0384] 1330 1335 1340

[0385] Arg Leu Leu Leu Arg Gly Leu Glu Gln Thr Pro Ala Ser Ser Val Gly

[0386] 1345 1350 1355 1360

[0387] Asp Leu Glu Ser Ser Val Thr Gly Ser Met Ile Asn Gly Trp Gly Ser

[0388] 1365 1370 1375

[0389] Ala Ser Glu Glu Asp Asn Ile Ser Ser Gly Arg Ser Ser Val Ser Ser

[0390] 1380 1385 1390

[0391] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Thr Asp Ala Asp Phe Ala Gln Ala Val Ala

[0392] 1395 1400 1405

[0393] Ala Ala Ala Glu Tyr Ala Gly Leu Lys Val Ala Arg Arg Gln Met Gln

[0394] 1410 1415 1420

[0395] Asp Ala Ala Gly Arg Arg His Phe His Ala Ser Gln Cys Pro Arg Pro

[0396] 1425 1430 1435 1440

[0397] Thr Ser Pro Val Ser Thr Asp Ser Asn Met Ser Ala Ala Val Met Gln

[0398] 1445 1450 1455

[0399] Lys Thr Arg Pro Ala Lys Lys Leu Lys His Gln Pro Gly His Leu Arg

[0400] 1460 1465 1470

[0401] Arg Glu Thr Tyr Thr Asp Asp Leu Pro Pro Pro Pro Val Pro Pro Pro

[0402] 1475 1480 1485

[0403] Ala Ile Lys Ser Pro Thr Ala Gln Ser Lys Thr Gln Leu Glu Val Arg

[0404] 1490 1495 1500

[0405] Pro Val Val Val Pro Lys Leu Pro Ser Met Asp Ala Arg Thr Asp Arg

[0406] 1505 1510 1515 1520

[0407] Ser Ser Asp Arg Lys Gly Ser Ser Tyr Lys Gly Arg Glu Val Leu Asp

[0408] 1525 1530 1535

[0409] Gly Arg Gln Val Val Asp Met Arg Thr Asn Pro Gly Asp Pro Arg Glu

[0410] 1540 1545 1550

[0411] Ala Gln Glu Gln Gln Asn Asp Gly Lys Gly Arg Gly Asn Lys Ala Ala

[0412] 1555 1560 1565

[0413] Lys Arg Asp Leu Pro Pro Ala Lys Thr His Leu Ile Gln Glu Asp Ile

[0414] 1570 1575 1580

[0415] Leu Pro Tyr Cys Arg Pro Thr Phe Pro Thr Ser Asn Asn Pro Arg Asp

[0416] 1585 1590 1595 1600

[0417] Pro Ser Ser Ser Ser Ser Met Ser Ser Arg Gly Ser Gly Ser Arg Gln

[0418] 1605 1610 1615

[0419] Arg Glu Gln Ala Asn Val Gly Arg Arg Asn Ile Ala Glu Met Gln Val

[0420] 1620 1625 1630

[0421] Leu Gly Gly Tyr Glu Arg Gly Glu Asp Asn Asn Glu Glu Leu Glu Glu

[0422] 1635 1640 1645

[0423] Thr Glu Ser

[0424] 1650

[0425] <210> 3

[0426] <211> 1394

[0427] <212> PRT

[0428] <213> 人工序列(Artificial)

[0429] <220>

[0430] <223> Robo2 氨基酸(Robo2 amino acid (NP_001122401.1))

[0431] <400> 3

[0432] Met Ala Arg Arg His Glu Arg Val Thr Arg Arg Met Trp Thr Trp Ala

[0433] 1 5 10 15

[0434] Pro Gly Leu Leu Met Met Thr Val Val Phe Trp Gly His Gln Gly Asn

[0435] 20 25 30

[0436] Gly Gln Gly Gln Gly Ser Arg Leu Arg Gln Glu Asp Phe Pro Pro Arg

[0437] 35 40 45

[0438] Ile Val Glu His Pro Ser Asp Val Ile Val Ser Lys Gly Glu Pro Thr

[0439] 50 55 60

[0440] Thr Leu Asn Cys Lys Ala Glu Gly Arg Pro Thr Pro Thr Ile Glu Trp

[0441] 65 70 75 80

[0442] Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Val Glu Thr Asp Lys Asp Asp Pro Arg Ser

[0443] 85 90 95

[0444] His Arg Met Leu Leu Pro Ser Gly Ser Leu Phe Phe Leu Arg Ile Val

[0445] 100 105 110

[0446] His Gly Arg Arg Ser Lys Pro Asp Glu Gly Ser Tyr Val Cys Val Ala

[0447] 115 120 125

[0448] Arg Asn Tyr Leu Gly Glu Ala Val Ser Arg Asn Ala Ser Leu Glu Val

[0449] 130 135 140

[0450] Ala Leu Leu Arg Asp Asp Phe Arg Gln Asn Pro Thr Asp Val Val Val

[0451] 145 150 155 160

[0452] Ala Ala Gly Glu Pro Ala Ile Leu Glu Cys Gln Pro Pro Arg Gly His

[0453] 165 170 175

[0454] Pro Glu Pro Thr Ile Tyr Trp Lys Lys Asp Lys Val Arg Ile Asp Asp

[0455] 180 185 190

[0456] Lys Glu Glu Arg Ile Ser Ile Arg Gly Gly Lys Leu Met Ile Ser Asn

[0457] 195 200 205

[0458] Thr Arg Lys Ser Asp Ala Gly Met Tyr Thr Cys Val Gly Thr Asn Met

[0459] 210 215 220

[0460] Val Gly Glu Arg Asp Ser Asp Pro Ala Glu Leu Thr Val Phe Glu Arg

[0461] 225 230 235 240

[0462] Pro Thr Phe Leu Arg Arg Pro Ile Asn Gln Val Val Leu Glu Glu Glu
[0463] 245 250 255
[0464] Ala Val Glu Phe Arg Cys Gln Val Gln Gly Asp Pro Gln Pro Thr Val
[0465] 260 265 270
[0466] Arg Trp Lys Lys Asp Asp Ala Asp Leu Pro Arg Gly Arg Tyr Asp Ile
[0467] 275 280 285
[0468] Lys Asp Asp Tyr Thr Leu Arg Ile Lys Lys Thr Met Ser Thr Asp Glu
[0469] 290 295 300
[0470] Gly Thr Tyr Met Cys Ile Ala Glu Asn Arg Val Gly Lys Met Glu Ala
[0471] 305 310 315 320
[0472] Ser Ala Thr Leu Thr Val Arg Ala Pro Pro Gln Phe Val Val Arg Pro
[0473] 325 330 335
[0474] Arg Asp Gln Ile Val Ala Gln Gly Arg Thr Val Thr Phe Pro Cys Glu
[0475] 340 345 350
[0476] Thr Lys Gly Asn Pro Gln Pro Ala Val Phe Trp Gln Lys Glu Gly Ser
[0477] 355 360 365
[0478] Gln Asn Leu Leu Phe Pro Asn Gln Pro Gln Gln Pro Asn Ser Arg Cys
[0479] 370 375 380
[0480] Ser Val Ser Pro Thr Gly Asp Leu Thr Ile Thr Asn Ile Gln Arg Ser
[0481] 385 390 395 400
[0482] Asp Ala Gly Tyr Tyr Ile Cys Gln Ala Leu Thr Val Ala Gly Ser Ile
[0483] 405 410 415
[0484] Leu Ala Lys Ala Gln Leu Glu Val Thr Asp Val Leu Thr Asp Arg Pro
[0485] 420 425 430
[0486] Pro Pro Ile Ile Leu Gln Gly Pro Ala Asn Gln Thr Leu Ala Val Asp
[0487] 435 440 445
[0488] Gly Thr Ala Leu Leu Lys Cys Lys Ala Thr Gly Asp Pro Leu Pro Val
[0489] 450 455 460
[0490] Ile Ser Trp Leu Lys Glu Gly Phe Thr Phe Pro Gly Arg Asp Pro Arg
[0491] 465 470 475 480
[0492] Ala Thr Ile Gln Glu Gln Gly Thr Leu Gln Ile Lys Asn Leu Arg Ile
[0493] 485 490 495
[0494] Ser Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Val Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu
[0495] 500 505 510
[0496] Thr Ser Trp Ser Ala Val Leu Asp Val Thr Glu Ser Gly Ala Thr Ile
[0497] 515 520 525
[0498] Ser Lys Asn Tyr Asp Leu Ser Asp Leu Pro Gly Pro Pro Ser Lys Pro
[0499] 530 535 540
[0500] Gln Val Thr Asp Val Thr Lys Asn Ser Val Thr Leu Ser Trp Gln Pro
[0501] 545 550 555 560
[0502] Gly Thr Pro Gly Thr Leu Pro Ala Ser Ala Tyr Ile Ile Glu Ala Phe
[0503] 565 570 575

[0504] Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser Trp Gln Thr Val Ala Asn His Val Lys
[0505] 580 585 590
[0506] Thr Thr Leu Tyr Thr Val Arg Gly Leu Arg Pro Asn Thr Ile Tyr Leu
[0507] 595 600 605
[0508] Phe Met Val Arg Ala Ile Asn Pro Gln Gly Leu Ser Asp Pro Ser Pro
[0509] 610 615 620
[0510] Met Ser Asp Pro Val Arg Thr Gln Asp Ile Ser Pro Pro Ala Gln Gly
[0511] 625 630 635 640
[0512] Val Asp His Arg Gln Val Gln Lys Glu Leu Gly Asp Val Leu Val Arg
[0513] 645 650 655
[0514] Leu His Asn Pro Val Val Leu Thr Pro Thr Thr Val Gln Val Thr Trp
[0515] 660 665 670
[0516] Thr Val Asp Arg Gln Pro Gln Phe Ile Gln Gly Tyr Arg Val Met Tyr
[0517] 675 680 685
[0518] Arg Gln Thr Ser Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Trp Gln Asn Leu Asp
[0519] 690 695 700
[0520] Ala Lys Val Pro Thr Glu Arg Ser Ala Val Leu Val Asn Leu Lys Lys
[0521] 705 710 715 720
[0522] Gly Val Thr Tyr Glu Ile Lys Val Arg Pro Tyr Phe Asn Glu Phe Gln
[0523] 725 730 735
[0524] Gly Met Asp Ser Glu Ser Lys Thr Val Arg Thr Thr Glu Glu Ala Pro
[0525] 740 745 750
[0526] Ser Ala Pro Pro Gln Ser Val Thr Val Leu Thr Val Gly Ser Tyr Asn
[0527] 755 760 765
[0528] Ser Thr Ser Ile Ser Val Ser Trp Asp Pro Pro Pro Pro Asp His Gln
[0529] 770 775 780
[0530] Asn Gly Ile Ile Gln Glu Tyr Lys Ile Trp Cys Leu Gly Asn Glu Thr
[0531] 785 790 795 800
[0532] Arg Phe His Ile Asn Lys Thr Val Asp Ala Ala Ile Arg Ser Val Ile
[0533] 805 810 815
[0534] Ile Gly Gly Leu Phe Pro Gly Ile Gln Tyr Arg Val Glu Val Ala Ala
[0535] 820 825 830
[0536] Ser Thr Ser Ala Gly Val Gly Val Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ile Ile
[0537] 835 840 845
[0538] Ile Gly Arg Arg Asn Glu Val Val Ile Thr Glu Asn Asn Asn Ser Ile
[0539] 850 855 860
[0540] Thr Glu Gln Ile Thr Asp Val Val Lys Gln Pro Ala Phe Ile Ala Gly
[0541] 865 870 875 880
[0542] Ile Gly Gly Ala Cys Trp Val Ile Leu Met Gly Phe Ser Ile Trp Leu
[0543] 885 890 895
[0544] Tyr Trp Arg Arg Lys Lys Arg Lys Gly Leu Ser Asn Tyr Ala Val Thr
[0545] 900 905 910

[0546] Phe Gln Arg Gly Asp Gly Gly Leu Met Ser Asn Gly Ser Arg Pro Gly
[0547] 915 920 925
[0548] Leu Leu Asn Ala Gly Asp Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Ala Asp Ser Trp
[0549] 930 935 940
[0550] Pro Ala Thr Ser Leu Pro Val Asn Asn Ser Asn Ser Gly Pro Asn Glu
[0551] 945 950 955 960
[0552] Ile Gly Asn Phe Gly Arg Gly Asp Val Leu Pro Pro Val Pro Gly Gln
[0553] 965 970 975
[0554] Gly Asp Lys Thr Ala Thr Met Leu Ser Asp Gly Ala Ile Tyr Ser Ser
[0555] 980 985 990
[0556] Ile Asp Phe Thr Thr Lys Thr Ser Tyr Asn Ser Ser Ser Gln Ile Thr
[0557] 995 1000 1005
[0558] Gln Ala Thr Pro Tyr Ala Thr Thr Gln Ile Leu His Ser Asn Ser Ile
[0559] 1010 1015 1020
[0560] His Glu Leu Ala Val Asp Leu Pro Asp Pro Gln Trp Lys Ser Ser Ile
[0561] 1025 1030 1035 1040
[0562] Gln Gln Lys Thr Asp Leu Met Gly Phe Gly Tyr Ser Leu Pro Asp Gln
[0563] 1045 1050 1055
[0564] Asn Lys Gly Asn Asn Gly Gly Lys Gly Gly Lys Lys Lys Lys Asn Lys
[0565] 1060 1065 1070
[0566] Asn Ser Ser Lys Pro Gln Lys Asn Asn Gly Ser Thr Trp Ala Asn Val
[0567] 1075 1080 1085
[0568] Pro Leu Pro Pro Pro Pro Val Gln Pro Leu Pro Gly Thr Glu Leu Glu
[0569] 1090 1095 1100
[0570] His Tyr Ala Val Glu Gln Gln Glu Asn Gly Tyr Asp Ser Asp Ser Trp
[0571] 1105 1110 1115 1120
[0572] Cys Pro Pro Leu Pro Val Gln Thr Tyr Leu His Gln Gly Leu Glu Asp
[0573] 1125 1130 1135
[0574] Glu Leu Glu Glu Asp Asp Asp Arg Val Pro Thr Pro Pro Val Arg Gly
[0575] 1140 1145 1150
[0576] Val Ala Ser Ser Pro Ala Ile Ser Phe Gly Gln Gln Ser Thr Ala Thr
[0577] 1155 1160 1165
[0578] Leu Thr Pro Ser Pro Arg Glu Glu Met Gln Pro Met Leu Gln Ala His
[0579] 1170 1175 1180
[0580] Leu Asp Glu Leu Thr Arg Ala Tyr Gln Phe Asp Ile Ala Lys Gln Thr
[0581] 1185 1190 1195 1200
[0582] Trp His Ile Gln Ser Asn Asn Gln Pro Pro Gln Pro Pro Val Pro Pro
[0583] 1205 1210 1215
[0584] Leu Gly Tyr Val Ser Gly Ala Leu Ile Ser Asp Leu Glu Thr Asp Val
[0585] 1220 1225 1230
[0586] Ala Asp Asp Asp Ala Asp Asp Glu Glu Glu Ala Leu Glu Ile Pro Arg
[0587] 1235 1240 1245

[0588] Pro Leu Arg Ala Leu Asp Gln Thr Pro Gly Ser Ser Met Asp Asn Leu
[0589] 1250 1255 1260
[0590] Asp Ser Ser Val Thr Gly Lys Ala Phe Thr Ser Ser Gln Arg Pro Arg
[0591] 1265 1270 1275 1280
[0592] Pro Thr Ser Pro Phe Ser Thr Asp Ser Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ser
[0593] 1285 1290 1295
[0594] Gln Ser Gln Arg Pro Arg Pro Thr Lys Lys His Lys Gly Gly Arg Met
[0595] 1300 1305 1310
[0596] Asp Gln Gln Pro Ala Leu Pro His Arg Arg Glu Gly Met Thr Asp Glu
[0597] 1315 1320 1325
[0598] Glu Ala Leu Val Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Phe Pro Ser Pro Gly Gly
[0599] 1330 1335 1340
[0600] His Ser Ser Ser Gly Thr Ala Ser Ser Lys Gly Ser Thr Gly Pro Arg
[0601] 1345 1350 1355 1360
[0602] Lys Thr Glu Val Leu Arg Ala Gly His Gln Arg Asn Ala Ser Asp Leu
[0603] 1365 1370 1375
[0604] Leu Asp Ile Gly Tyr Met Gly Ser Asn Ser Gln Gly Gln Phe Thr Gly
[0605] 1380 1385 1390
[0606] Glu Leu
[0607] <210> 4
[0608] <211> 130
[0609] <212> PRT
[0610] <213> 人工序列(Artificial)
[0611] <220>
[0612] <223> LRRD2 氨基酸(LRRD2 amino acid)
[0613] <400> 4
[0614] Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala Ile Pro Ala
[0615] 1 5 10 15
[0616] Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp Ile Ser Lys
[0617] 20 25 30
[0618] Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly Leu Lys Ser
[0619] 35 40 45
[0620] Leu Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys
[0621] 50 55 60
[0622] Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala
[0623] 65 70 75 80
[0624] Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn
[0625] 85 90 95
[0626] Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys
[0627] 100 105 110
[0628] Gly Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His Leu Ala Gln
[0629] 115 120 125

[0630] Asn Pro

[0631] 130

[0632] <210> 5

[0633] <211> 4842

[0634] <212> DNA

[0635] <213> Artificial

[0636] <220>

[0637] <223> slit3 gene(AY358884)

[0638] <400> 5

[0639] cgcgctcccc gcgcgcctcc tcgggctcca cgcgtcttgc cccgcagagg cagcctcctc 60

[0640] caggagcggg gccctgcaca ccatggcccc cgggtgggca ggggtcggcg ccgccgtgcg 120

[0641] cgcccgcctg gcgctggcct tggcgctggc gagcgtcctg agtgggcctc cagccgtcgc 180

[0642] ctgccccacc aagtgtacct gctccgctgc cagcgtggac tgccacgggc tgggcctccg 240

[0643] cgcggttcct cggggcatcc cccgcaacgc tgagcgcctt gacctggaca gaaataatat 300

[0644] caccaggatc accaagatgg acttcgctgg gctcaagaac ctccgagtct tgcatctgga 360

[0645] agacaaccag gtcagcgtca tcgagagagg cgccttccag gacctgaagc agctagagcg 420

[0646] actgcgcctg aacaagaata agctgcaagt ccttccagaa ttgcttttcc agagcacgcc 480

[0647] gaagctcacc agactagatt tgagtgaaaa ccagatccag gggatcccga ggaaggcgtt 540

[0648] ccgcggcatc accgatgtga agaacctgca actggacaac aaccacatca gctgcattga 600

[0649] agatggagcc ttccgagcgc tgcgcgattt ggagatcctt accctcaaca acaacaacat 660

[0650] cagtcgcatc ctggtcacca gcttcaacca catgccgaag atccgaactc tgcgcctcca 720

[0651] ctccaaccac ctctactgcg actgccacct ggcctggctc tcggattggc tgcgacagcg 780

[0652] acggacagtt ggccagttca cactctgcat ggctcctgtg catttgaggg gcttcaacgt 840

[0653] ggcggatgtg cagaagaagg agtacgtgtg cccagccccc cactcggagc ccccatcctg 900

[0654] caatgccaac tccatctcct gcccttcgcc ctgcacgtgc agcaataaca tcgtggactg 960

[0655] tcgaggaaag ggcttgatgg agattcctgc caacttgccg gagggcatcg tcgaaatacg 1020

[0656] cctagaacag aactccatca aagccatccc tgcaggagcc ttcacccagt acaagaaact 1080

[0657] gaagcgaata gacatcagca agaatcagat atcggatatt gctccagatg ccttccaggg 1140

[0658] cctgaaatca ctcacatcgc tggtcctgta tgggaacaag atcaccgaga ttgccaaggg 1200

[0659] actgtttgat gggctggtgt ccctacagct gctcctcctc aatgccaaca agatcaactg 1260

[0660] cctgcgggtg aacacgtttc aggacctgca gaacctcaac ttgctctccc tgtatgacaa 1320

[0661] caagctgcag accatcagca aggggctctt cgcccctctg cagtccatcc agacactcca 1380

[0662] cttagcccaa aacccatttg tgtgcgactg ccacttgaag tggctggccg actacctcca 1440

[0663] ggacaacccc atcgagacaa gcggggcccg ctgcagcagc ccgcgccgac tcgccaacaa 1500

[0664] gcgcatcagc cagatcaaga gcaagaagtt ccgctgctca ggctccgagg attaccgcag 1560

[0665] caggttcagc agcgagtgct tcatggacct cgtgtgcccc gagaagtgtc gctgtgaggg 1620

[0666] cacgattgtg gactgctcca accagaagct ggtccgcatc ccaagccacc tccctgaata 1680

[0667] tgtcaccgac ctgcgactga atgacaatga ggtatctgtt ctggaggcca ctggcatctt 1740

[0668] caagaagttg cccaacctgc ggaaaataaa tctgagtaac aataagatca aggaggtgcg 1800

[0669] agagggagct ttcgatggag cagccagcgt gcaggagctg atgctgacag ggaaccagct 1860

[0670] ggagaccgtg cacgggcgcg tgttccgtgg cctcagtggc ctcaaaacct tgatgctgag 1920

[0671] gagtaacttg atcagctgtg tgagtaatga cacctttgcc ggcctgagtt cggtgagact 1980

[0672] gctgtccctc tatgacaatc ggatcaccac catcacccct ggggccttca ccacgcttgt 2040

[0673] ctccctgtcc accataaacc tcctgtccaa ccccttcaac tgcaactgcc acctggcctg 2100

[0674] gctcggcaag tggttgagga agaggcggat cgtcagtggg aaccctaggt gccagaagcc 2160

[0675] atttttcctc aaggagattc ccatccagga tgtggccatc caggacttca cctgtgatgg 2220

[0676] caacgaggag agtagctgcc agctgagccc gcgctgcccg gagcagtgca cctgtatgga 2280

[0677] gacagtggtg cgatgcagca acaaggggct ccgcgccctc cccagaggca tgcccaagga 2340

[0678] tgtgaccgag ctgtacctgg aaggaaacca cctaacagcc gtgcccagag agctgtccgc 2400

[0679] cctccgacac ctgacgctta ttgacctgag caacaacagc atcagcatgc tgaccaatta 2460

[0680] caccttcagt aacatgtctc acctctccac tctgatcctg agctacaacc ggctgaggtg 2520

[0681] catccccgtc cacgccttca acgggctgcg gtccctgcga gtgctaaccc tccatggcaa 2580

[0682] tgacatttcc agcgttcctg aaggctcctt caacgacctc acatctcttt cccatctggc 2640

[0683] gctgggaacc aacccactcc actgtgactg cagtcttcgg tggctgtcgg agtgggtgaa 2700

[0684] ggcggggtac aaggagcctg gcatcgcccg ctgcagtagc cctgagccca tggctgacag 2760

[0685] gctcctgctc accacccccaa cccaccgctt ccagtgcaaa gggccagtgg acatcaacat 2820

[0686] tgtggccaaa tgcaatgcct gcctctccag cccgtgcaag aataacggga catgcaccca 2880

[0687] ggaccctgtg gagctgtacc gctgtgcctg cccctacagc tacaagggca aggactgcac 2940

[0688] tgtgcccatc aacacctgca tccagaaccc ctgtcagcat ggaggcacct gccacctgag 3000

[0689] tgacagccac aaggatgggt tcagctgctc ctgccctctg ggctttgagg ggcagcggtg 3060

[0690] tgagatcaac ccagatgact gtgaggacaa cgactgcgaa aacaatgcca cctgcgtgga 3120

[0691] cgggatcaac aactacgtgt gtatctgtcc gcctaactac acaggtgagc tatgcgacga 3180

[0692] ggtgattgac cactgtgtgc ctgagctgaa cctctgtcag catgaggcca agtgcatccc 3240

[0693] cctggacaaa ggattcagct gcgagtgtgt ccctggctac agcgggaagc tctgtgagac 3300

[0694] agacaatgat gactgtgtgg cccacaagtg ccgccacggg gcccagtgcg tggacacaat 3360

[0695] caatggctac acatgcacct gcccccaggg cttcagtgga cccttctgtg aacacccccc 3420

[0696] acccatggtc ctactgcaga ccagcccatg cgaccagtac gagtgccaga acggggccca 3480

[0697] gtgcatcgtg gtgcagcagg agcccacctg ccgctgccca ccaggcttcg ccggccccag 3540

[0698] atgcgagaag ctcatcactg tcaacttcgt gggcaaagac tcctacgtgg aactggcctc 3600

[0699] cgccaaggtc cgaccccagg ccaacatctc cctgcaggtg gccactgaca aggacaacgg 3660

[0700] catccttctc tacaaaggag acaatgaccc cctggcactg gagctgtacc agggccacgt 3720

[0701] gcggctggtc tatgacagcc tgagttcccc tccaaccaca gtgtacagtg tggagacagt 3780

[0702] gaatgatggg cagtttcaca gtgtggagct ggtgacgcta aaccagaccc tgaacctagt 3840

[0703] agtggacaaa ggaactccaa agagcctggg gaagctccag aagcagccag cagtgggcat 3900

[0704] caacagcccc ctctaccttg gaggcatccc cacctccacc ggcctctccg ccttgcgcca 3960

[0705] gggcacggac cggcctctag gcggcttcca cggatgcatc catgaggtgc gcatcaacaa 4020

[0706] cgagctgcag gacttcaagg ccctcccacc acagtccctg ggggtgtcac caggctgcaa 4080

[0707] gtcctgcacc gtgtgcaagc acggcctgtg ccgctccgtg gagaaggaca gcgtggtgtg 4140

[0708] cgagtgccgc ccaggctgga ccggcccact ctgcgaccag gaggcccggg acccctgcct 4200

[0709] cggccacaga tgccaccatg gaaaatgtgt ggcaactggg acctcataca tgtgcaagtg 4260

[0710] tgccgagggc tatggagggg acttgtgtga caacaagaat gactctgcca atgcctgctc 4320

[0711] agccttcaag tgtcaccatg ggcagtgcca catctcagac caaggggagc cctactgcct 4380

[0712] gtgccagccc ggctttagcg gcgagcactg ccaacaagag aatccgtgcc tgggacaagt 4440

[0713] agtccgagag gtgatccgcc gccagaaagg ttatgcatca tgtgccacag cctccaaggt 4500

[0714] gcccatcatg gaatgtcgtg ggggctgtgg gccccagtgc tgccagccca cccgcagcaa 4560

[0715] gcggcggaaa tacgtcttcc agtgcacgga cggctcctcg tttgtagaag aggtggagag 4620

[0716] acacttagag tgcggctgcc tcgcgtgttc ctaagcccct gcccgcctgc ctgccacctc 4680

[0717] tcggactcca gcttgatgga gttgggacag ccatgtggga ccccctggtg attcagcatg 4740

[0718] aaggaaatga agctggagag gaaggtaaag aagaagagaa tattaagtat attgtaaaat 4800

[0719] aaacaaaaaa tagaacttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 4842

[0720] <210> 6

[0721] <211> 4956

[0722] <212> DNA

[0723] <213> 人工序列(Artificial)

[0724] <220>

[0725] <223> Robo1 基因(AF040990)(Robo1 gene(AF040990))

[0726] <400> 6

[0727] atgaaatgga aacatgttcc ttttttggtc atgatatcac tcctcagctt atccccaaat 60

[0728] cacctgtttc tggcccagct tattccagac cctgaagatg tagagagggg gaacgaccac 120

[0729] gggacgccaa tccccacctc tgataacgat gacaattcgc tgggctatac aggctcccgt 180

[0730] cttcgtcagg aagattttcc acctcgcatt gttgaacacc cttcagacct gattgtctca 240

[0731] aaaggagaac ctgcaacttt gaactgcaaa gctgaaggcc gccccacacc cactattgaa 300

[0732] tggtacaaag ggggagagag agtggagaca gacaaagatg accctcgctc acaccgaatg 360

[0733] ttgctgccga gtggatcttt atttttctta cgtatagtac atggacggaa aagtagacct 420

[0734] gatgaaggag tctatgtctg tgtagcaagg aattaccttg gagaggctgt gagccacaat 480

[0735] gcatcgctgg aagtagccat acttcgggat gacttcagac aaaaccccttc ggatgtcatg 540

[0736] gttgcagtag gagagcctgc agtaatggaa tgccaacctc cacgaggcca tcctgagccc 600

[0737] accatttcat ggaagaaaga tggctctcca ctggatgata aagatgaaag aataactata 660

[0738] cgaggaggaa agctcatgat cacttacacc cgtaaaagtg acgctggcaa atatgtttgt 720

[0739] gttggtacca atatggttgg ggaacgtgag agtgaagtag ccgagctgac tgtcttagag 780

[0740] agaccatcat ttgtgaagag acccagtaac ttggcagtaa ctgtggatga cagtgcagaa 840

[0741] tttaaatgtg aggcccgagg tgaccctgta cctacagtac gatggaggaa agatgatgga 900

[0742] gagctgccca aatccagata tgaaatccga gatgatcata ccttgaaaat taggaaggtg 960

[0743] acagctggtg acatgggttc atacacttgt gttgcagaaa atatggtggg caaagctgaa 1020

[0744] gcatctgcta ctctgactgt tcaagaacct ccacattttg ttgtgaaacc ccgtgaccag 1080

[0745] gttgttgctt tgggacggac tgtaactttt cagtgtgaag caaccggaaa tcctcaacca 1140

[0746] gctattttct ggaggagaga agggagtcag aatctacttt tctcatatca accaccacag 1200

[0747] tcatccagcc gattttcagt ctcccagact ggcgacctca caattactaa tgtccagcga 1260

[0748] tctgatgttg gttattacat ctgccagact ttaaatgttg ctggaagcat catcacaaag 1320

[0749] gcatatttgg aagttacaga tgtgattgca gatcggcctc ccccagttat tcgacaaggt 1380

[0750] cctgtgaatc agactgtagc cgtggatggc actttcgtcc tcagctgtgt ggccacaggc 1440

[0751] agtccagtgc ccaccattct gtggagaaag gatggagtcc tcgtttcaac ccaagactct 1500

[0752] cgaatcaaac agttggagaa tggagtactg cagatccgat atgctaagct gggtgatact 1560

[0753] ggtcggtaca cctgcattgc atcaaccccc agtggtgaag caacatggag tgcttacatt 1620

[0754] gaagttcaag aatttggagt tccagttcag cctccaagac ctactgaccc aaatttaatc 1680

[0755] cctagtgccc catcaaaacc tgaagtgaca gatgtcagca gaaatacagt cacattatcg 1740

[0756] tggcaaccaa atttgaattc aggagcaact ccaacatctt atattataga agccttcagc 1800
[0757] catgcatctg gtagcagctg gcagaccgta gcagagaatg tgaaaacaga aacatctgcc 1860
[0758] attaaaggac tcaaacctaa tgcaatttac cttttccttg tgagggcagc taatgcatat 1920
[0759] ggaattagtg atccaagcca aatatcagat ccagtgaaaa cacaagatgt cctaccaaca 1980
[0760] agtcaggggg tggaccacaa gcaggtccag agagagctgg gaaatgctgt tctgcacctc 2040
[0761] cacaacccca ccgtcctttc ttcctcttcc atcgaagtgc actggacagt agatcaacag 2100
[0762] tctcagtata tacaaggata taaaattctc tatcggccat ctggagccaa ccacggagaa 2160
[0763] tcagactggt tagtttttga agtgaggacg ccagccaaaa acagtgtggt aatccctgat 2220
[0764] ctcagaaagg gagtcaacta tgaaattaag gctcgccctt tttttaatga atttcaagga 2280
[0765] gcagatagtg aaatcaagtt tgccaaaacc ctggaagaag cacccagtgc cccaccccaa 2340
[0766] ggtgtaactg tatccaagaa tgatggaaac ggaactgcaa ttctagttag ttggcagcca 2400
[0767] cctccagaag acactcaaaa tggaatggtc caagagtata aggtttggtg tctgggcaat 2460
[0768] gaaactcgat accacatcaa caaaacagtg gatggttcca ccttttccgt ggtcattccc 2520
[0769] tttcttgttc ctggaatccg atacagtgtg gaagtggcag ccagcactgg ggctgggtct 2580
[0770] ggggtaaaga gtgagcctca gttcatccag ctggatgccc atggaaaccc tgtgtcacct 2640
[0771] gaggaccaag tcagcctcgc tcagcagatt tcagatgtgg tgaagcagcc ggccttcata 2700
[0772] gcaggtattg gagcagcctg ttggatcatc ctcatggtct tcagcatctg gctttatcga 2760
[0773] caccgcaaga agagaaacgg acttactagt acctacgcgg gtatcagaaa agtcccgtct 2820
[0774] tttaccttca caccaacagt aacttaccag agaggaggcg aagctgtcag cagtggaggg 2880
[0775] aggcctggac ttctcaacat cagtgaacct gccgcgcagc catggctggc agacacgtgg 2940
[0776] cctaatactg gcaacaacca caatgactgc tccatcagct gctgcacggc aggcaatgga 3000
[0777] aacagcgaca gcaacctcac tacctacagt cgcccagctg attgtatagc aaattataac 3060
[0778] aaccaactgg ataacaaaca aacaaatctg atgctccctg agtcaactgt ttatggtgat 3120
[0779] gtggacctta gtaacaaaat caatgagatg aaaaccttca atagcccaaa tctgaaggat 3180
[0780] gggcgttttg tcaatccatc agggcagcct actccttacg ccaccactca gctcatccag 3240
[0781] tcaaacctca gcaacaacat gaacaatggc agcggggact ctggcgagaa gcactggaaa 3300
[0782] ccactgggac agcagaaaca agaagtggca ccagttcagt acaacatcgt ggagcaaaac 3360
[0783] aagctgaaca aagattatcg agcaaatgac acagttcctc caactatccc atacaaccaa 3420
[0784] tcatacgacc agaacacagg aggatcctac aacagctcag accggggcag tagtacatct 3480
[0785] gggagtcagg ggcacaagaa aggggcaaga acacccaagg taccaaaaca gggtggcatg 3540
[0786] aactgggcag acctgcttcc tcctccccca gcacatcctc ctccacacag caatagcgaa 3600
[0787] gagtacaaca tttctgtaga tgaaagctat gaccaagaaa tgccatgtcc cgtgccacca 3660
[0788] gcaaggatgt atttgcaaca agatgaatta gaagaggagg aagatgaacg aggccccact 3720
[0789] ccccctgttc ggggagcagc ttcttctcca gctgccgtgt cctatagcca tcagtccact 3780
[0790] gccactctga ctcccctccc acaggaagaa ctccagccca tgttacagga ttgtccagag 3840
[0791] gagactggcc acatgcagca ccagcccgac aggagacggc agcctgtgag tcctcctcca 3900
[0792] ccaccacggc cgatctcccc tccacatacc tatggctaca tttcaggacc cctggtctca 3960
[0793] gatatggata cggatgcgcc agaagaggaa gaagacgaag ccgacatgga ggtagccaag 4020
[0794] atgcaaacca gaaggctttt gttacgtggg cttgagcaga cacctgcctc cagtgttggg 4080
[0795] gacctggaga gctctgtcac ggggtccatg atcaacggct ggggctcagc ctcagaggag 4140
[0796] gacaacattt ccagcggacg ctccagtgtt agttcttcgg acggctcctt tttcactgat 4200
[0797] gctgactttg cccaggcagt cgcagcagcg gcagagtatg ctggtctgaa agtagcacga 4260

[0798] cggcaaatgc aggatgctgc tggccgtcga cattttcatg cgtctcagtg ccctaggccc 4320
[0799] acaagtcccg tgtctacaga cagcaacatg agtgccgccg taatgcagaa aaccagacca 4380
[0800] gccaagaaac tgaaacacca gccaggacat ctgcgcagag aaacctacac agatgatctt 4440
[0801] ccaccacctc ctgtgccgcc acctgctata aagtcaccta ctgcccaatc caagacacag 4500
[0802] ctggaagtac gacctgtagt ggtgccaaaa ctcccttcta tggatgcaag aacagacaga 4560
[0803] tcatcagaca gaaaaggaag cagttacaag gggagagaag tgttggatgg aagacaggtt 4620
[0804] gttgacatgc gaacaaatcc aggtgatccc agagaagcac aggaacagca aaatgacggg 4680
[0805] aaaggacgtg gaaacaaggc agcaaaacga gaccttccac cagcaaagac tcatctcatc 4740
[0806] caagaggata ttctacctta ttgtagacct acttttccaa catcaaataa tcccagagat 4800
[0807] cccagttcct caagctcaat gtcatcaaga ggatcaggaa gcagacaaag agaacaagca 4860
[0808] aatgtaggtc gaagaaatat tgcagaaatg caggtacttg gaggatatga aagaggagaa 4920
[0809] gataataatg aagaattaga ggaaactgaa agctga 4956
[0810] <210> 7
[0811] <211> 8393
[0812] <212> DNA
[0813] <213> 人工序列(Artificial)
[0814] <220>
[0815] <223> Robo2 基因 (NM_001128929.3)(Robo2 gene (NM_001128929.3))
[0816] <400> 7
[0817] agtagcacgg gcagctcgcg cgctggagga gggaggcgga aggacagcgc tgcgccacca 60
[0818] cccggaggag ggagcgcggt agctgcaggc aggggaggga gaggaaagaa aaggaaggac 120
[0819] ggctcccaga cagagagtgg gagaaaccgg ggagcagcgg gagcagcagg tccgggggga 180
[0820] gctgttccgc tgcgctgccc tcgttattca cacggacgct gcggagcttc ccagggctgc 240
[0821] ttccctgtcc ccctgggtgg aggctgccgt ctaaacctga ctccagagtt taagatgcaa 300
[0822] tggccagaag acatgaacgt gtcactagaa ggatgtggac atgggctccg ggactgttga 360
[0823] tgatgactgt ggtgttttgg ggtcatcagg ggaatggaca aggccaagga tcgcgtcttc 420
[0824] gccaggagga ctttcccccg cggattgtgg agcatccttc cgatgtcatc gtctctaagg 480
[0825] gcgagcccac gactctgaac tgcaaggcgg agggccggcc aacgcccacc attgagtggt 540
[0826] acaaagatgg ggagcgagtg gagactgaca aggacgatcc ccggtcccac aggatgcttc 600
[0827] tgcccagcgg atccttattc ttcttgcgca tcgtgcacgg gcgcaggagt aaacctgatg 660
[0828] aaggaagcta cgtttgtgtt gcgaggaact atcttggtga agcagtgagt cgaaatgcgt 720
[0829] ctctggaagt ggcattgtta cgagatgact tccgacaaaa ccccacagat gttgtagtgg 780
[0830] cagctggaga gcctgcaatc ctggagtgcc agcctccccg gggacaccca gaacccacca 840
[0831] tctactggaa aaaagacaaa gttcgaattg atgacaagga agaaagaata agtatccgtg 900
[0832] gtggaaaact gatgatctcc aataccagga aaagtgatgc agggatgtat acttgtgttg 960
[0833] gtaccaatat ggtgggagaa agggacagtg acccagcaga gctgactgtc tttgaacgac 1020
[0834] ccacatttct caggaggcca attaaccagg tggtactgga ggaagaagct gtagaatttc 1080
[0835] gttgtcaagt ccaaggagat cctcaaccaa ctgtgaggtg gaaaaaggat gatgcagact 1140
[0836] tgccaagagg aaggtatgac atcaaagacg attacacact aagaattaaa aagaccatga 1200
[0837] gtacagatga aggcacctat atgtgtattg ctgagaatcg ggttggaaaa atggaagcct 1260
[0838] ctgctacact caccgtccga gctcccccac agtttgtggt tcggccaaga gatcagattg 1320
[0839] ttgctcaagg tcgaacagtg acatttccct gtgaaactaa aggaaaccca cagccagctg 1380

[0840] tttttggca gaaagaaggc agccagaacc tacttttccc aaaccaaccc cagcagccca 1440

[0841] acagtagatg ctcagtgtca ccaactggag acctcacaat caccaacatt caacgttccg 1500

[0842] acgcgggtta ctacatctgc caggctttaa ctgtggcagg aagcatttta gcaaaagctc 1560

[0843] aactggaggt tactgatgtt ttgacagata gacctccacc tataattcta caaggcccag 1620

[0844] ccaaccaaac gctggcagtg gatggtacag cgttactgaa atgtaaagcc actggtgatc 1680

[0845] ctcttcctgt aattagctgg ttaaaggagg gatttacttt tccgggtaga gatccaagag 1740

[0846] caacaattca agagcaaggc acactgcaga ttaagaattt acggatttct gatactggca 1800

[0847] cttatacttg tgtggctaca agttcaagtg gagagacttc ctggagtgca gtgctggatg 1860

[0848] tgacagagtc tggagcaaca atcagtaaaa actatgattt aagtgacctg ccagggccac 1920

[0849] catccaaacc gcaggtcact gatgttacta agaacagtgt caccttgtcc tggcagccag 1980

[0850] gtacccctgg aacccttcca gcaagtgcat atatcattga ggctttcagc caatcagtga 2040

[0851] gcaacagctg gcagaccgtg gcaaaccatg taaagaccac cctctatact gtaagaggac 2100

[0852] tgcggcccaa tacaatctac ttattcatgg tcagagcgat caacccccaa ggtctcagtg 2160

[0853] acccaagtcc catgtcagat cctgtgcgca cacaagatat cagcccacca gcacaaggag 2220

[0854] tggaccacag gcaagtgcag aaagagctag gagatgtcct tgtccgtctt cataatccag 2280

[0855] ttgtgctgac tcccaccacg gttcaggtca catggacggt tgatcgccaa ccccagttta 2340

[0856] tccaaggcta ccgagtgatg tatcgtcaga cttcaggtct gcaggcgaca tcttcgtggc 2400

[0857] agaatttaga tgccaaagtc ccgactgaac gaagtgctgt cttagtcaac ctgaaaaagg 2460

[0858] gggtgactta tgaaattaaa gtacggccat attttaatga gttccaagga atggatagtg 2520

[0859] aatctaaaac ggttcgtact actgaagaag ccccaagtgc cccaccacag tctgtcactg 2580

[0860] tactgacagt tggaagctac aatagcacaa gtattagtgt ttcctgggat cctcctcctc 2640

[0861] cagatcacca gaatggaatt atccaagaat acaagatctg gtgtctagga aatgaaacgc 2700

[0862] gattccatat caacaaaact gtggatgcag ccattcggtc cgtaataatt ggtggattat 2760

[0863] tcccaggtat tcaataccgg gtagaggttg cagctagtac cagtgcaggg gttggagtaa 2820

[0864] agagtgagcc acagccaata ataatcggga gacgcaatga agttgtcatt actgaaaaca 2880

[0865] ataacagcat aactgagcaa atcactgatg tggtgaagca accagccttt atagctggta 2940

[0866] ttggtggtgc ctgctgggta attctgatgg gttttagcat atggttgtat tggcgaagaa 3000

[0867] agaagaggaa gggactcagt aattatgctg ttacgtttca aagaggagat ggaggactaa 3060

[0868] tgagcaatgg aagccgtcca ggtcttctca atgctggtga tcccagctat ccatggcttg 3120

[0869] ctgattcttg gccagccacg agcttgccag taaataatag caacagtggc ccaaatgaga 3180

[0870] ttggaaattt tggccgtgga gatgtgctgc caccagttcc aggccaaggg gataaaacag 3240

[0871] caacgatgct ctcagatgga gccatttata gtagcattga cttcactacc aaaaccagtt 3300

[0872] acaacagttc cagccaaata acacaggcta ccccatatgc cacgacacag atcttgcatt 3360

[0873] ccaacagcat acatgaattg gctgtcgatc tgcctgatcc acaatggaaa agctcaattc 3420

[0874] agcaaaaaac agatctgatg ggatttggtt attctctacc tgatcagaac aaaggtaaca 3480

[0875] atggtgggaa aggtggaaaa aagaagaaaa ataaaaactc ttctaaacca cagaaaaaca 3540

[0876] atggatccac ttgggccaat gtccctctac ctccccccccc agtccagccc cttcctggca 3600

[0877] cggagctgga acactatgca gtggaacaac aagaaaatgg ctatgacagt gatagctggt 3660

[0878] gcccaccatt gccagtacaa acttacttac accaaggtct ggaagatgaa ctggaagaag 3720

[0879] atgatgatag ggtcccaaca cctcctgttc gaggcgtggc ttcttctcct gctatctcct 3780

[0880] ttggacagca gtccactgca actcttactc catccccacg ggaagagatg caacccatgc 3840

[0881] tgcaggctca cctggatgag ttgacaagag cctatcagtt tgatatagca aaacaaacat 3900

[0882] ggcacattca aagcaataat caacctccac agcctccagt tccaccgtta ggttatgtgt 3960
[0883] ctggagcctt gatttctgat ttggaaacgg atgttgcaga tgatgatgcc gacgacgaag 4020
[0884] aggaagcttt agaaatcccc aggcccctga gagcactgga ccagactcct ggatccagca 4080
[0885] tggacaatct agacagctct gtgacaggaa aagcctttac ctcctctcaa agacctcgac 4140
[0886] ctaccagccc attttctact gacagtaaca ccagtgcagc cctgagtcaa agtcagaggc 4200
[0887] ctcggcccac taaaaaacac aagggagggc ggatggacca acaaccagca ttgcctcatc 4260
[0888] gaagggaagg aatgacagat gaggaggcct tggtgcccta tagcaagccc agtttcccat 4320
[0889] ctccaggtgg ccacagctca tcaggaacag cttcttctaa gggatccact ggacctagga 4380
[0890] aaaccgaggt gttgagagca ggccaccagc gcaatgccag cgaccttctt gacataggat 4440
[0891] atatgggctc caacagtcaa ggacagttta caggtgaatt atagtaaatg agaggagaca 4500
[0892] tacaaagctg ctctgaagga ccatcaggtc cggactcatg gaagtgatga ctctaaacag 4560
[0893] tgcaatgaac aatttattta tgtactatta aaagaactgt aaatgcaatg taaagacaca 4620
[0894] cagccacaca tatcccacag atattttcat tgtgttcttc tcttaagtac accacccacc 4680
[0895] ttaactcttt cttgtcagga gtatataaaa aagaaagaaa acaaaactcg ccctacagga 4740
[0896] agaaaaggat tctcctctgt atataatttc ttttgtgcat tgctatgcaa gctcactctt 4800
[0897] tttagctctg ctcatattat tgtctgttct tattggtctg ttgtactata tgtgaattaa 4860
[0898] taggctgtgg tgccatatat taacttttaa ttgtgtaact tttatgttta aattttgcac 4920
[0899] tgcaatttta tttggtgata agcacaaatc tctactcctc atgacatgaa gaaaaagact 4980
[0900] gaatgtgaag ggagtttctg tactgtaagc tagattggat aatgatggct gtaacaaatc 5040
[0901] atgttagatg gttttcagtt ggggtgtaga aataggaaga tgcaaaggaa caatggtgtt 5100
[0902] ggcaaagtct tctttgaata tcagggactg agtcaataaa aaaaatagta gaaaggtggc 5160
[0903] ttttactatt gacaaaagcc ggggtcaaaa aaagtagttt aagtcttaag actgaatatg 5220
[0904] cattaaagta tgcaggtagc aaagatgtaa taaatttgct taaaaaaaga aattaaagtt 5280
[0905] ttatttagaa tcaattttac ctgtcattgt aattgaccca tctgagaatt acaataagca 5340
[0906] agaggaaatt aaggtgtttt gcaagagctg tatttatatt acagtttttt aaaaacattt 5400
[0907] tctgaattat cgtaattaag ctctccaact cgttaagtca gaatataata tgaagttccc 5460
[0908] caaggaaacg aacaaaatga actctagaat atctagcaaa tagttaaaga agcaatttat 5520
[0909] tattagggca tactcgggct gtttccaaat ataaactcta ttgcaatatc ttatttcatc 5580
[0910] tttctaatac atgtacagtg cacactagag gatagagctg catcacttaa attcatgact 5640
[0911] taaaaaataa tacagtttat atacaacttg ttttttattt gattaagaag tgaagtttac 5700
[0912] gccacccaat gtatagccaa attgtacgtg cttaaaaaac agtgccgaga gtatgttcag 5760
[0913] ttcgcagtaa gtagatttat tggaataaat attctatggt acattctcag aaattggctt 5820
[0914] ccaactaaaa tacgtttgac ccattttgaa taaggaaatt gaaaagaaaa atttaaaagg 5880
[0915] agaaaaaaat gcatgtttat aaacttttta aataaaacca gaccttgtaa gtggacatta 5940
[0916] ataattgtcc tgcctcattt gttttcacga ctttgacaac aagaagttcc tgaacattag 6000
[0917] tcatgtatgc tcagaataaa tgtgactttg aaatatatgt tagctactgt acatgtatag 6060
[0918] tcagtcaagt agaagaggac cttcctgaaa ttcccacttg tgacattttc ccatgggttt 6120
[0919] cctacacaat cttaaatttt atttctgtct atactttctc aaatttttcc tatgataagt 6180
[0920] tcagttgttg gtactcttct aaaaatattc aacgtgatta ggatcagttc taaaatacgg 6240
[0921] gacccctttg agtgacaatt cgcactccat gcattattgg ctcagtagcc aatttttgtc 6300
[0922] acgtcgttat aacaaggaga tgacataatt aaacatttcc atcctttcta ttccctgaga 6360
[0923] ctgcatcagc acaggcaagt atagaatgta atgttcttca tgggccccac cagctttttg 6420

[0924] gtgccatgta atttatttct tcgctgaaga gaaaaagaat tctgagacac agttattaaa 6480
[0925] ccctttatca actttctacc atcagtgcct gaattctaat gcagtgtgat ttctctggga 6540
[0926] caaagagact gaggaagatg aaaagtttct tcaaagagtg aatacatact tattcacaac 6600
[0927] tctaggatgt gaggacttta aatatctctt tatgaagttc cctgcctaac ctctttctat 6660
[0928] ttaaaggcaa acaaatttcg aagaggtttt gtgttccctc tttatgtttc tctatgaccc 6720
[0929] agtttagtct aaaaccttag ttcattacat atacaacaca tagcctttga tccctggtaa 6780
[0930] ctggcaggtg ttggtgatta ataaaccaag gcttcaaagt gaagtatgtg tgtgcagatg 6840
[0931] acttttggaa taacgtgggc atagcatcat accttcctga ttgtcttcag catataaaaa 6900
[0932] ttaactgttg tagttaaaat tatgtcagtg cagagcttgt ggttacttgg aatgttcttt 6960
[0933] cagaatagtc catgttgcct attaaaccta gttttaaaca cattgggcag tcaatttatg 7020
[0934] cacccaaaat atcaccctca ggtagattga gggcaagata aaatgctgta tgtagctata 7080
[0935] caaaggaatt cagaaacatt actggaaagc aaagcctttg tcagcttgct actgacaaag 7140
[0936] tagtaaaaag ctactaatca gtgttgagtc agatgtcaac agaaaaatac aaatacctat 7200
[0937] gagagccaca gcagtttctc gtttcatagc cgattcaatg aatatgatta gaaattcact 7260
[0938] gagctcactc ttgcaggttt aaatggaggc ctgcataagg actgcaagag gaaatctggg 7320
[0939] tgggagagaa tgtaatctga tcttgcactc ataggcaatg ctgcaatgca atcatgtcca 7380
[0940] atacaagcac agcttcattc ataacaggaa acgtcttctt tgggaaaata gctctattgg 7440
[0941] tgcccaaact caggtatgcc agtgtatgca ggtggagtcg ccctacccct cttccaaaca 7500
[0942] tgtcctgtga gatttttaaa ataagatggg atagtacagg ggcatgaaaa gaattgattc 7560
[0943] cttcacagga tttgaatcca gttcaaggga gaatgtagaa aattcaaaac caacatataa 7620
[0944] ggtatcacac aaccaagaaa agtaaaacca ttgcaagttt acttgcgttg agtacaaaac 7680
[0945] agatttaatg gtgttctatg tcatagttta atgctctggg tatttaaata tgttttcaac 7740
[0946] aggatttgag ttgaaagttt gtaatgtgct ttgatggaac acctctcaat ttctattcaa 7800
[0947] taaacttatg taattgtcca ttgacaatat aatgataaca gtaccattga actctaaact 7860
[0948] gtggtttatc ttcactactg ggaagcaact gtgcatcagt attaaagata tgcagaaaca 7920
[0949] taatattcac taatttgttc atctgcttct gtatattgtt tatggaatta catggcaaga 7980
[0950] actgttctaa agcaacatgt ctttccacat tattttagag gtgaaattac ttttgttttg 8040
[0951] cttctctata atgtgtactt caaatgaaac accatacttt tttctaaaaa aagatgttca 8100
[0952] atttactaat ttttttaaat ctcataattt aaaaagcatt tgttgtgatt ttaaagtgtt 8160
[0953] gcaagaaaag ggattttgtg gccgtgggta gacttttttat actttgtttt atagatggat 8220
[0954] tttttttaac tgtagtttgt ttaagtcacc aagcagcatc caaaatctta atgtgtttca 8280
[0955] tttgatgttg ttagatcaga gaagaaattg gcataaaatc ggttaatagt attgtcaaag 8340
[0956] aattgtgtat tgtgtactca ctgggaaaaa ataaaatata ttcacatttc aaa 8393
[0957] <210> 8
[0958] <211> 390
[0959] <212> DNA
[0960] <213> 人工序列(Artificial)
[0961] <220>
[0962] <223> LRRD2 基因(LRRD2 gene)
[0963] <400> 8
[0964] atcgtcgaaa tacgcctaga acagaactcc atcaaagcca tccctgcagg agccttcacc 60
[0965] cagtacaaga aactgaagcg aatagacatc agcaagaatc agatatcgga tattgctcca 120

[0966] gatgccttcc agggcctgaa atcactcaca tcgctggtcc tgtatgggaa caagatcacc 180

[0967] gagattgcca agggactgtt tgatgggctg gtgtccctac agctgctcct cctcaatgcc 240

[0968] aacaagatca actgcctgcg ggtgaacacg tttcaggacc tgcagaacct caacttgctc 300

[0969] tccctgtatg acaacaagct gcagaccatc agcaaggggc tcttcgcccc tctgcagtcc 360

[0970] atccagacac tccacttagc ccaaaaccca 390

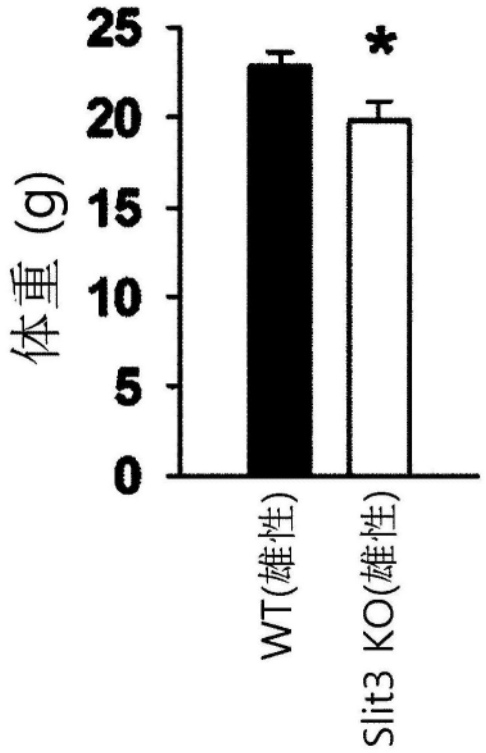

25
20
15
10
5
0
体重 (g)
*
WT(雄性)
Slit3 KO(雄性)

图1a

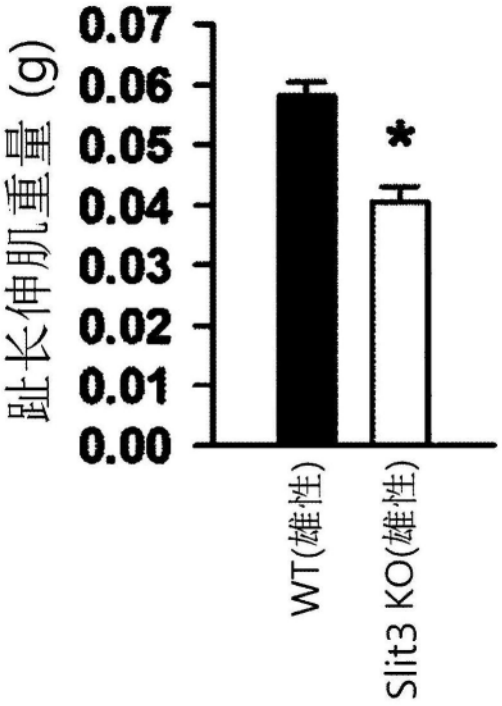

0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
趾长伸肌重量 (g)
*
WT(雄性)
Slit3 KO(雄性)

图1b

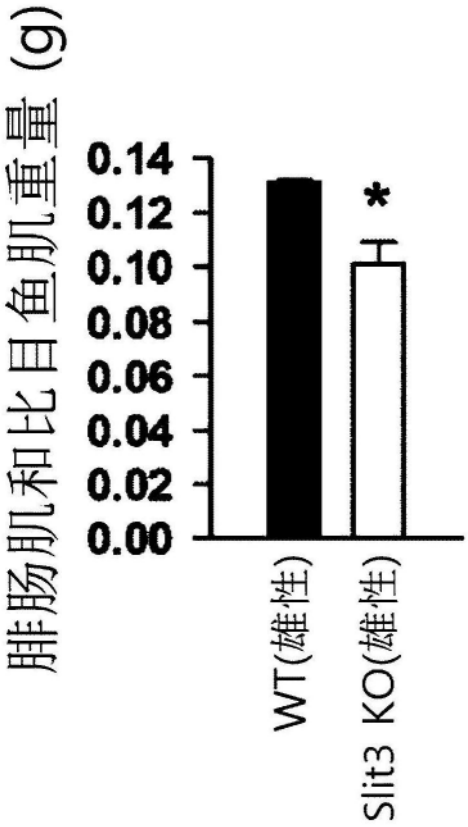

腓肠肌和比目鱼肌重量 (g)
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
*
WT(雄性)
Slit3 KO(雄性)

图1c

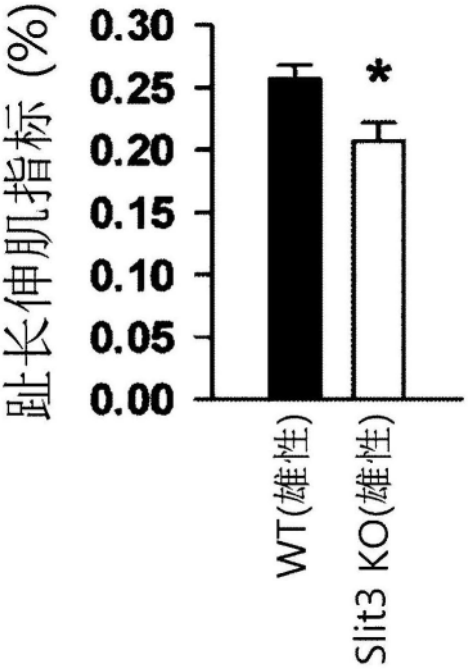

趾长伸肌指标 (%)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
*
WT(雄性)
Slit3 KO(雄性)

图1d

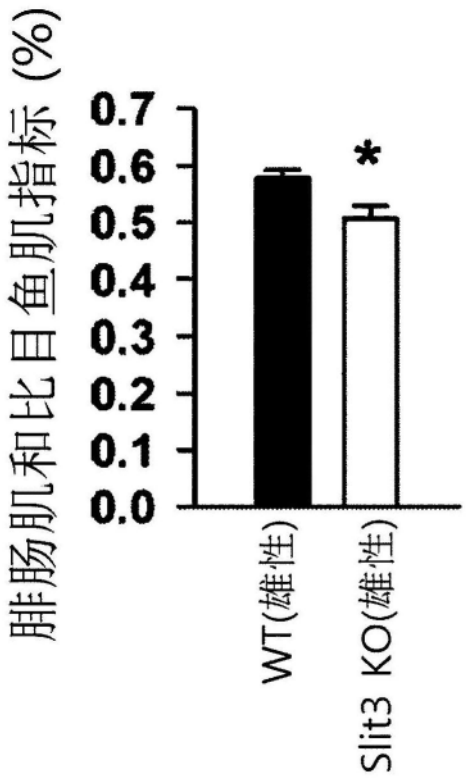

腓肠肌和比目鱼肌指标 (%)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
WT(雄性)
Slit3 KO(雄性)

图1e

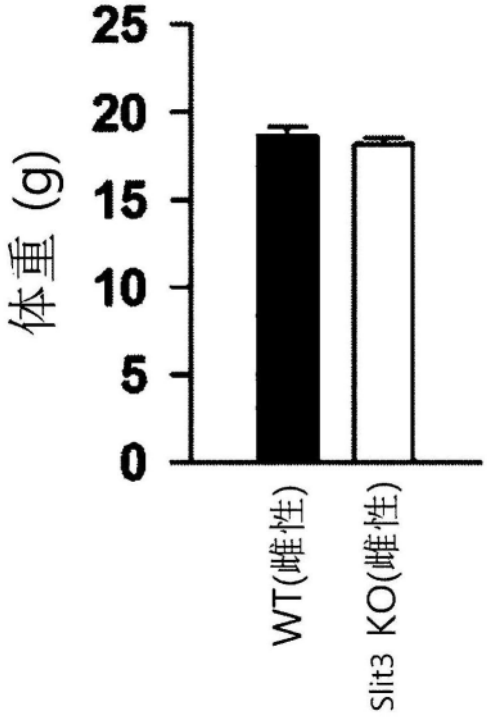

体重 (g)
25
20
15
10
5
0
WT(雌性)
Slit3 KO(雌性)

图2a

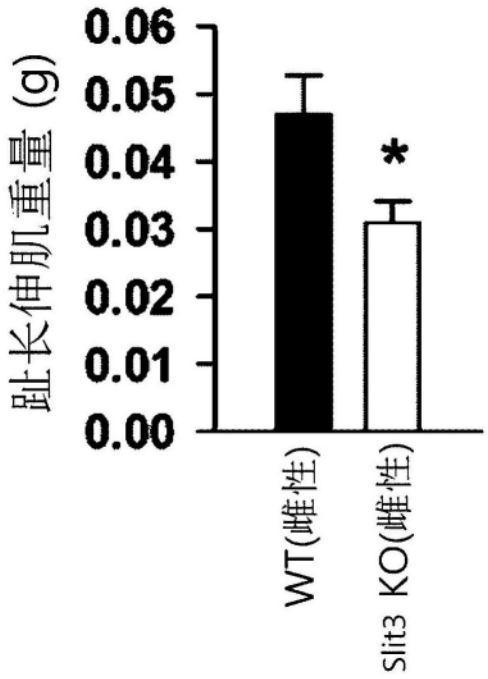

趾长伸肌重量 (g)
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
*
WT(雌性)
Slit3 KO(雌性)

图2b

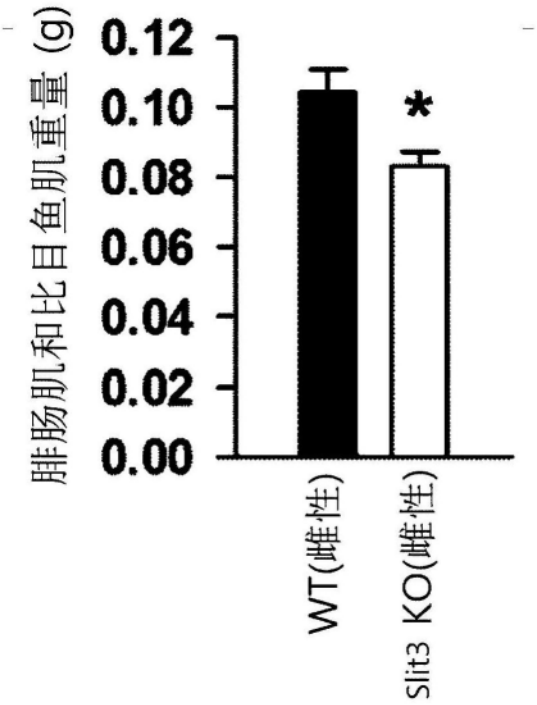

腓肠肌和比目鱼肌重量 (g)
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
*
WT(雌性)
Slit3 KO(雌性)

图2c

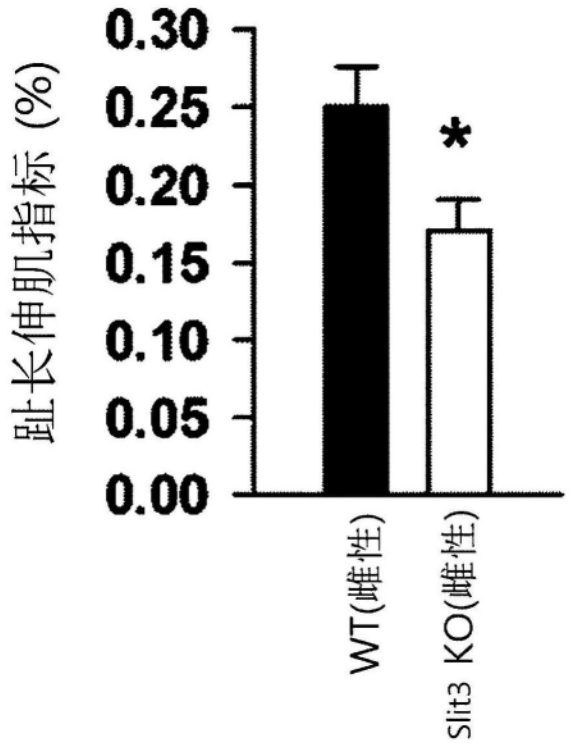

趾长伸肌指标 (%)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
*
WT(雌性)
Slit3 KO(雌性)

图2d

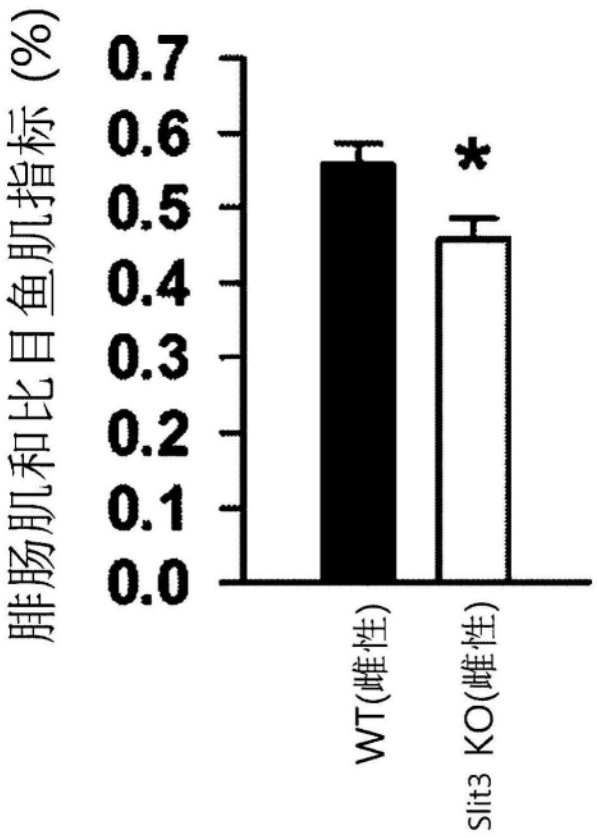

腓肠肌和比目鱼肌指标 (%)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
WT(雌性)
Slit3 KO(雌性)

图2e

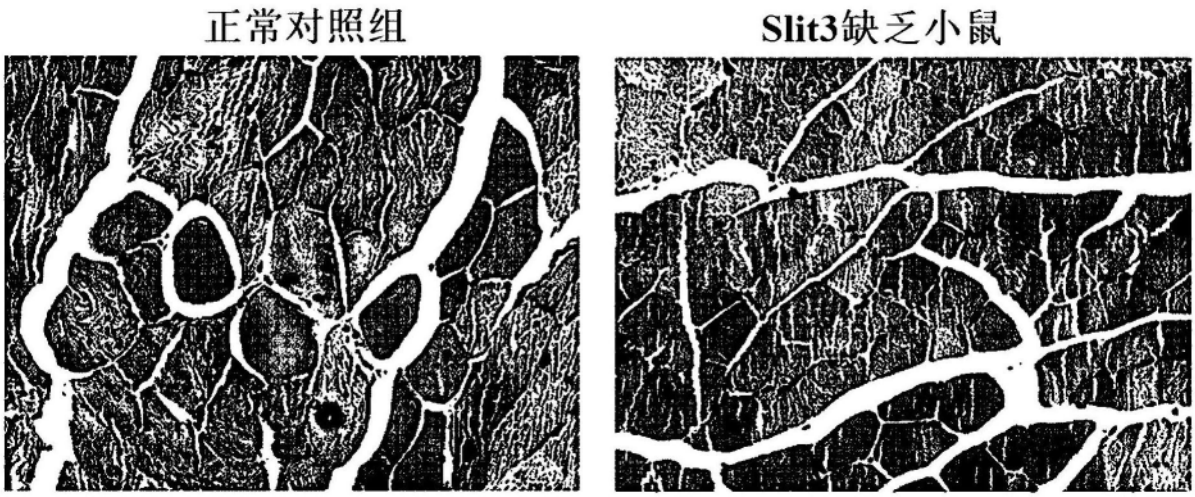


图3a

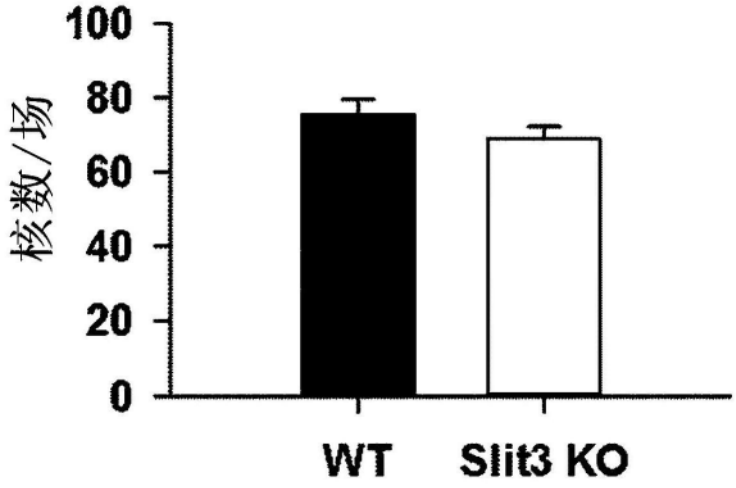


图3b

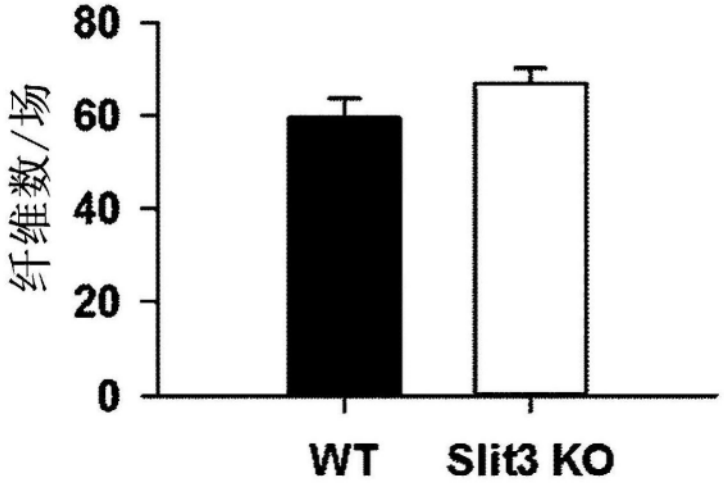

80
60
40
20
0
纤维数/场
WT
Slit3 KO

图3c

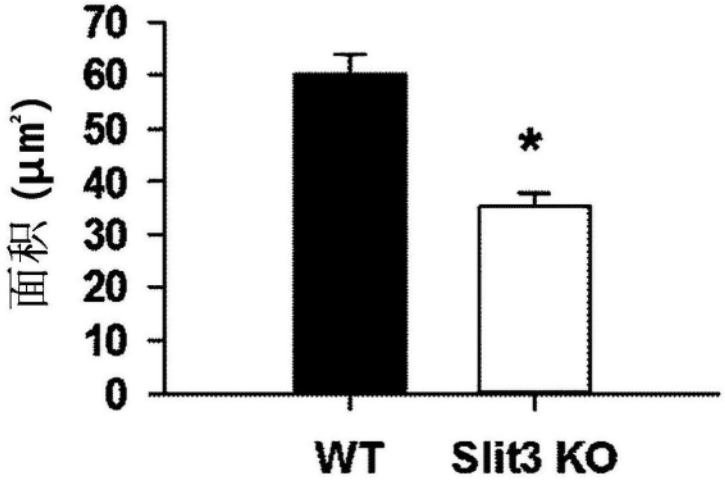

70
60
50
40
30
20
10
0
面积 (μm²)
*
WT
Slit3 KO

图3d

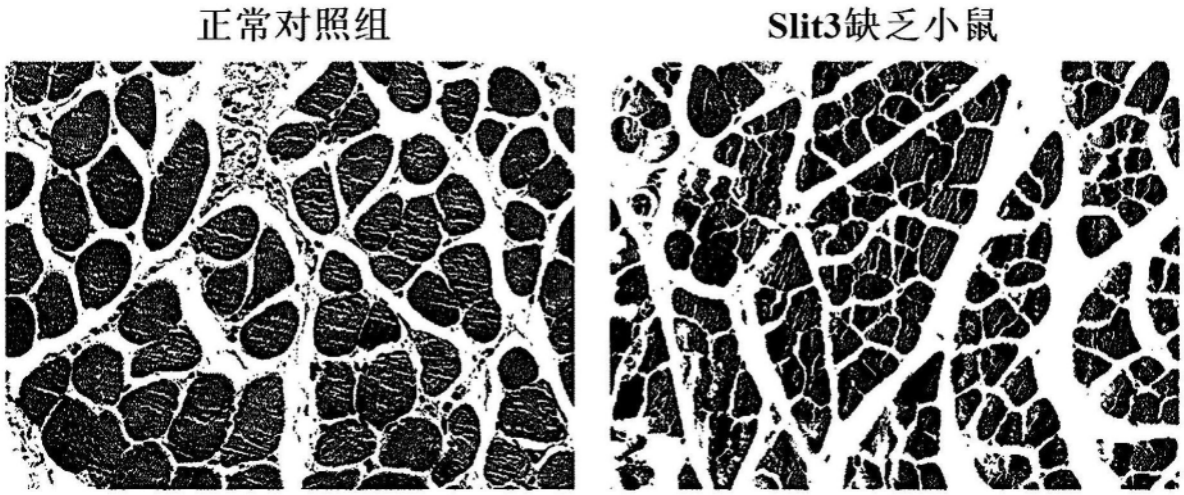


图4a

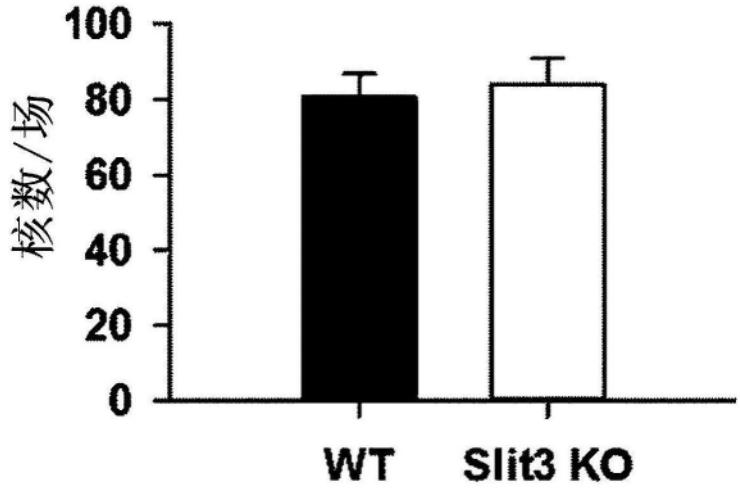


图4b

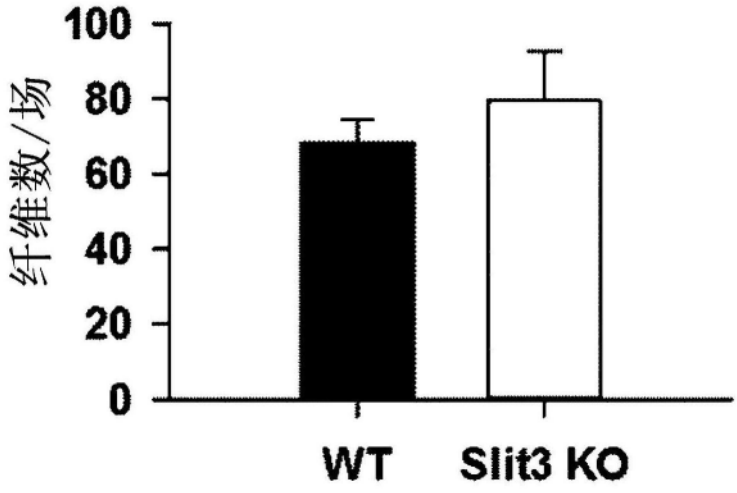

纤维数/场
100
80
60
40
20
0
WT
Slit3 KO

图4c

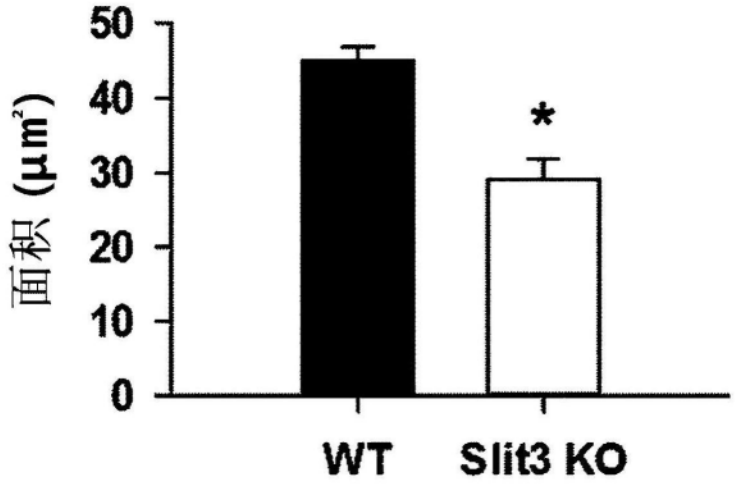

面积 (μm²)
50
40
30
20
10
0
*
WT
Slit3 KO

图4d

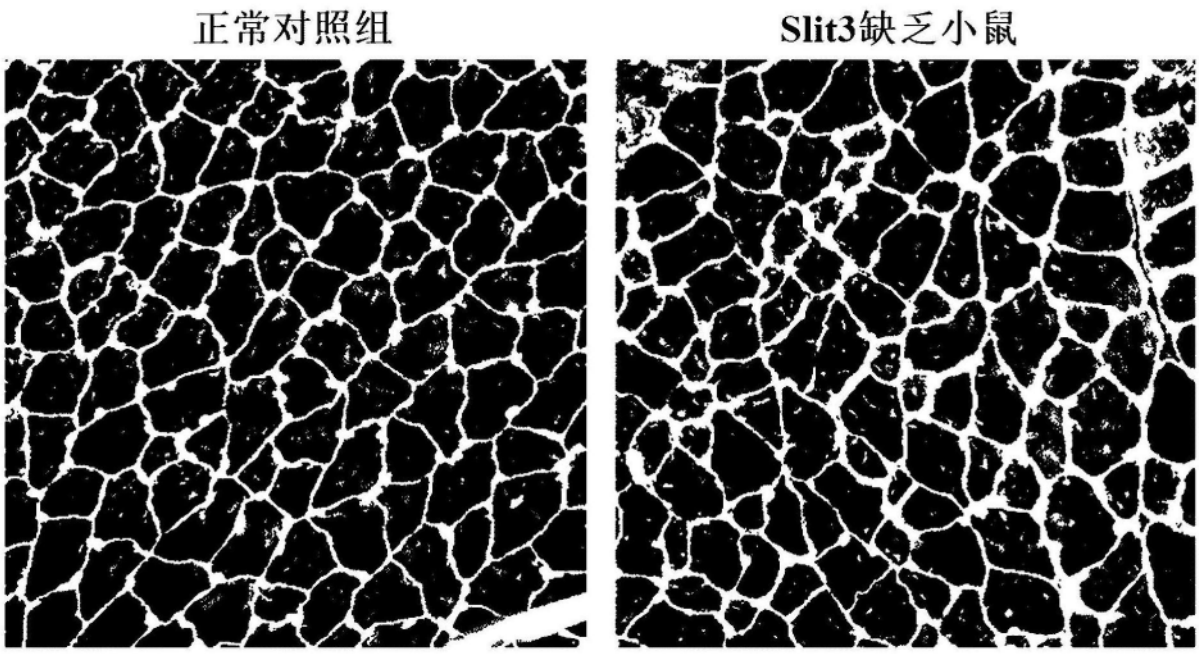

正常对照组
Slit3缺乏小鼠

图5a

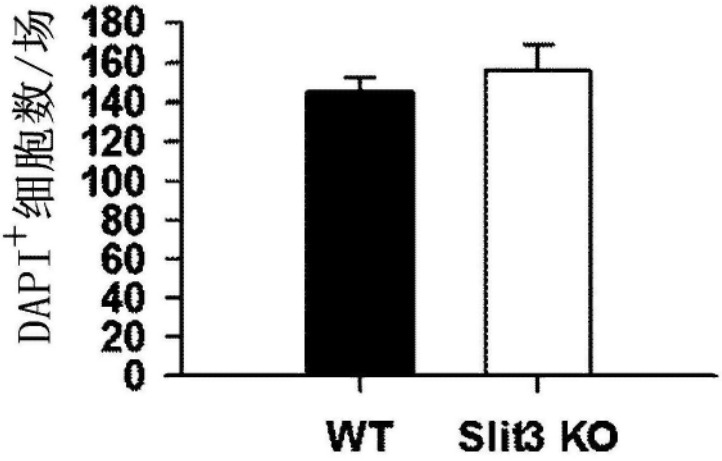

DAPI+细胞数/场
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
WT
Slit3 KO

图5b

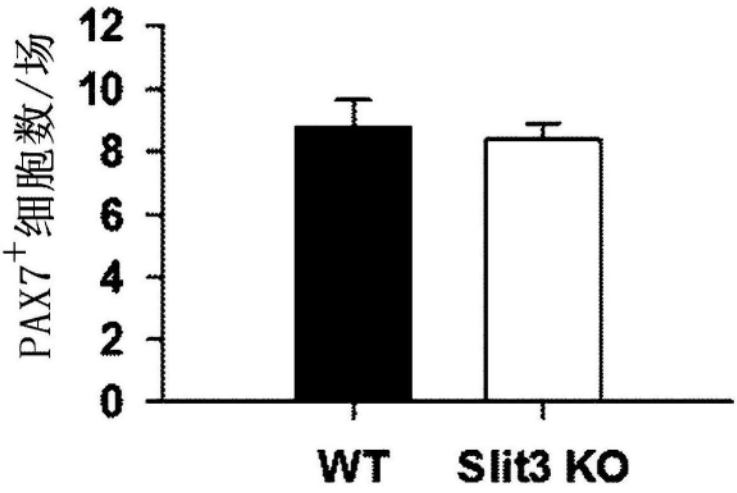

PAX7+细胞数/场
12
10
8
6
4
2
0
WT
Slit3 KO

图5c

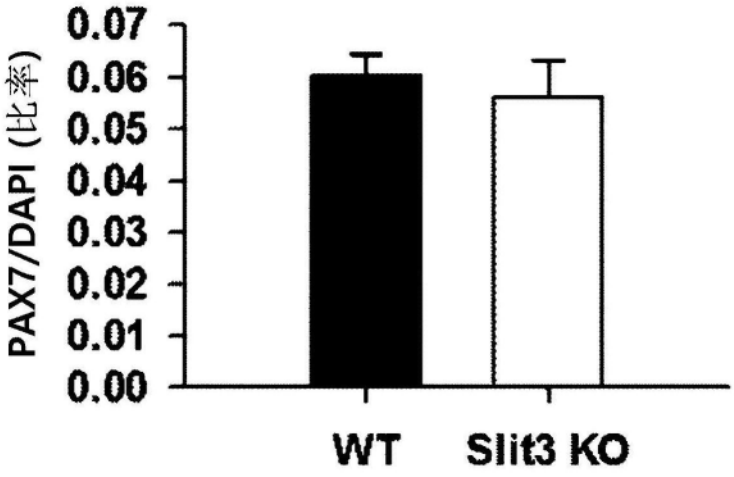

PAX7/DAPI (比率)
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
WT
Slit3 KO

图5d

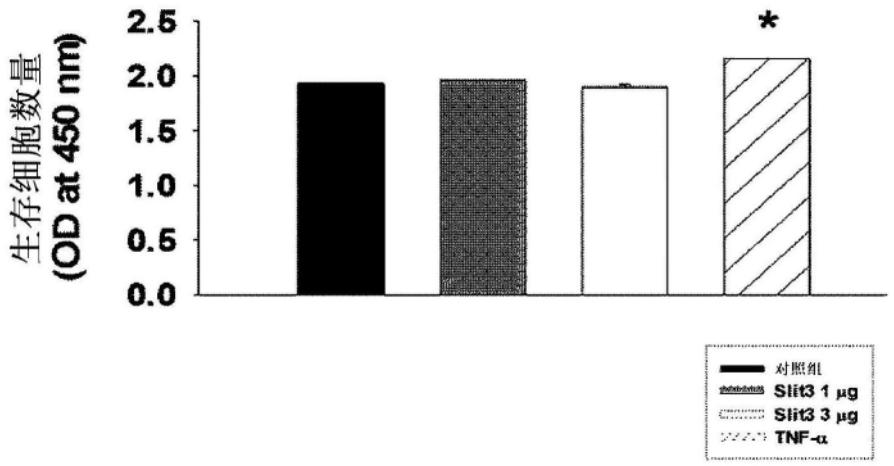

生存细胞数量
(OD at 450 nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
对照组
Slit3 1 μg
Slit3 3 μg
TNF-α

图6

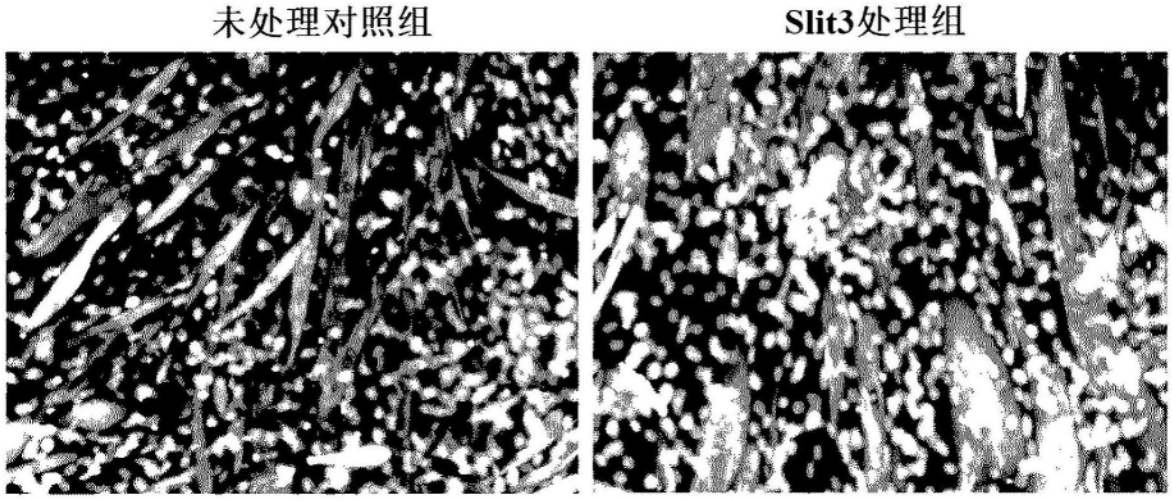

未处理对照组
Slit3处理组

图7a

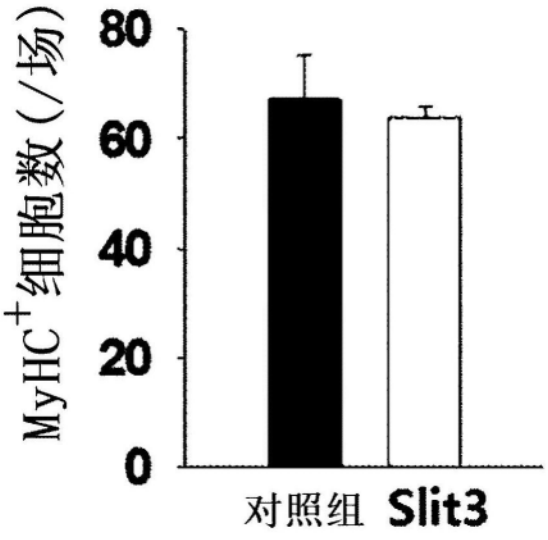

MyHC+细胞数(/场)
80
60
40
20
0
对照组
Slit3

图7b

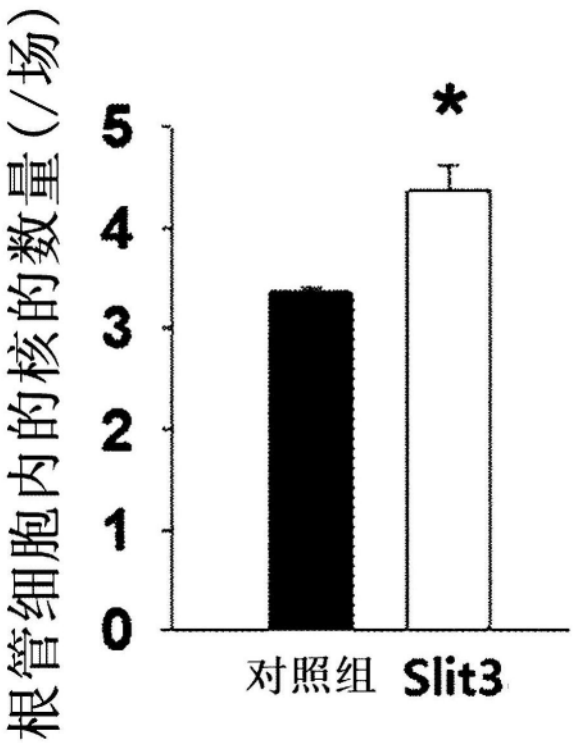

根管细胞内的核的数量(/场)
5
4
3
2
1
0
*
对照组
Slit3

图7c

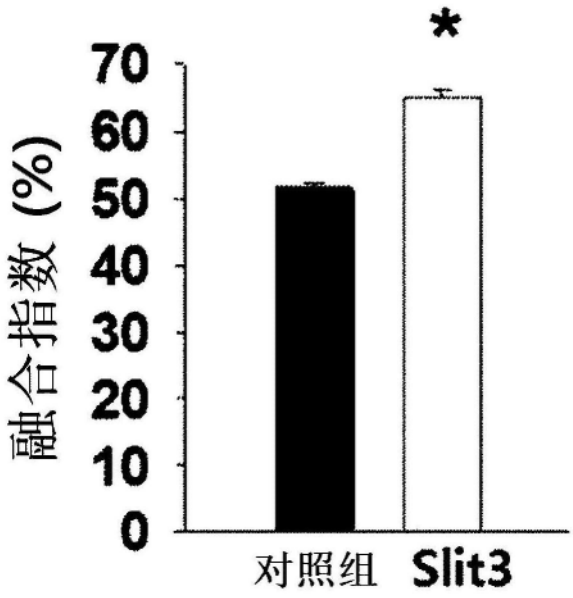

融合指数 (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
*
对照组
Slit3

图7d

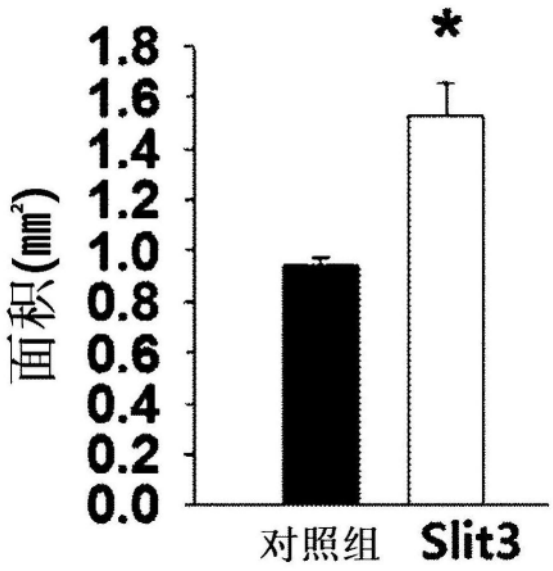

面积(mm²)
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
对照组
Slit3

图7e

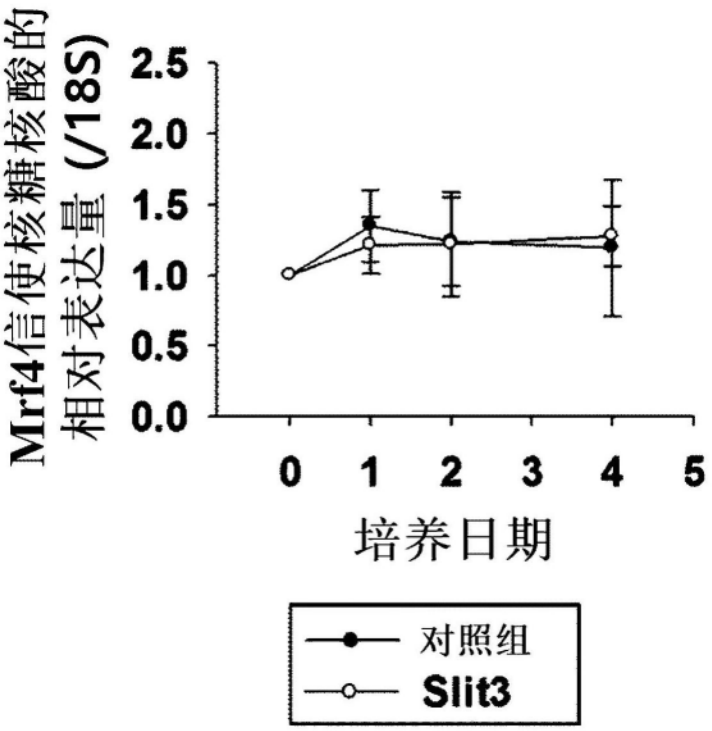

Mrf4信使核糖核酸的
相对表达量 (/18S)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
培养日期
对照组
Slit3

图8a

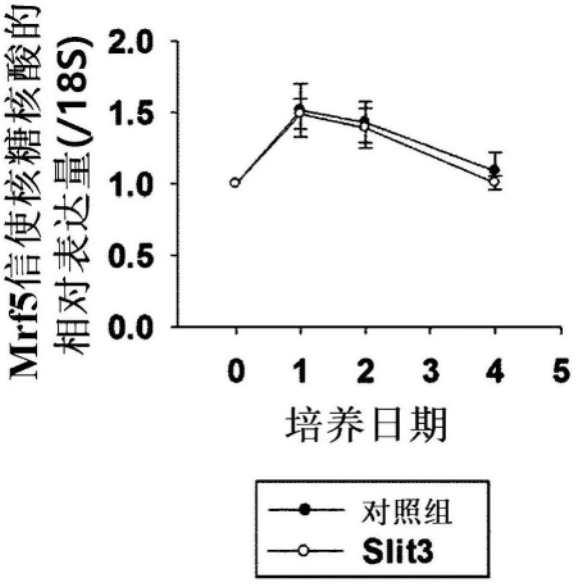

Mrf5信使核糖核酸的
相对表达量(/18S)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
培养日期
对照组
Slit3

图8b

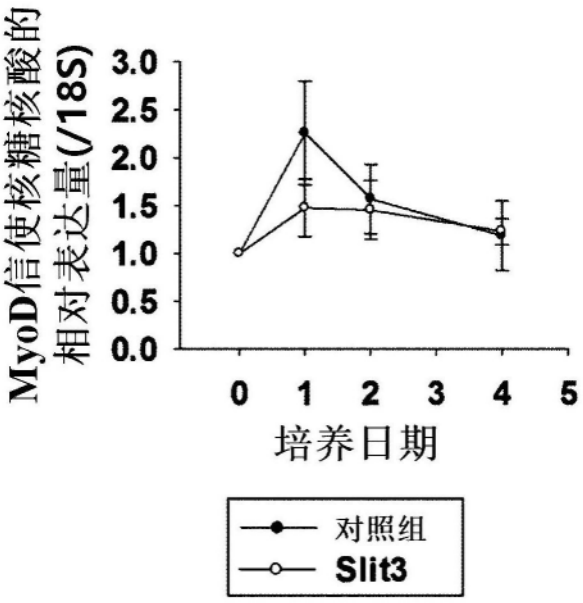

MyoD信使核糖核酸的
相对表达量(/18S)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 1 2 3 4 5
培养日期
对照组
Slit3

图8c

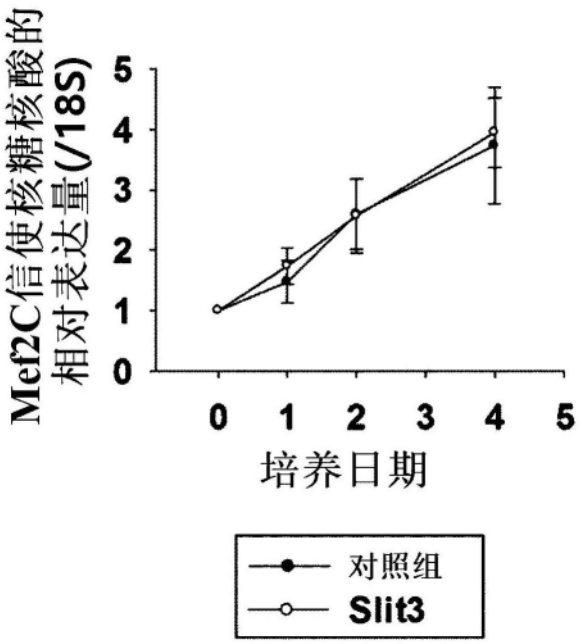

Mef2C信使核糖核酸的
相对表达量(/18S)
5
4
3
2
1
0
0 1 2 3 4 5
培养日期
对照组
Slit3

图8d

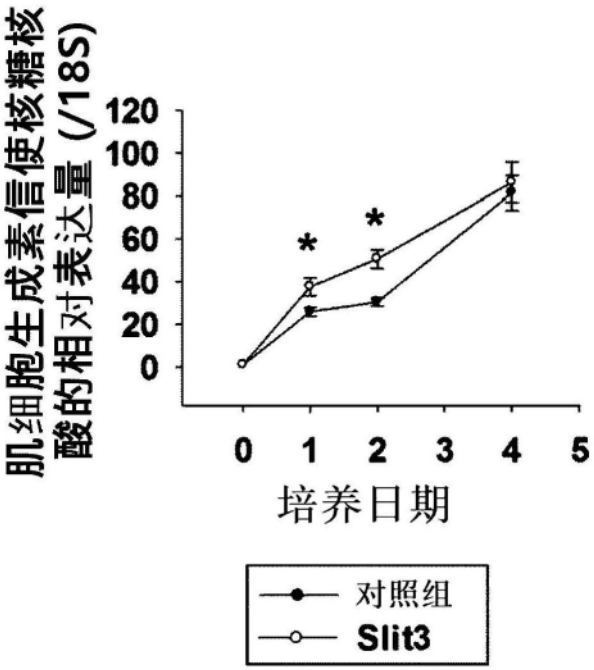

肌细胞生成素信使核糖核酸的相对表达量 (/18S)
120
100
80
60
40
20
0
*
*
0 1 2 3 4 5
培养日期
对照组
Slit3

图8e

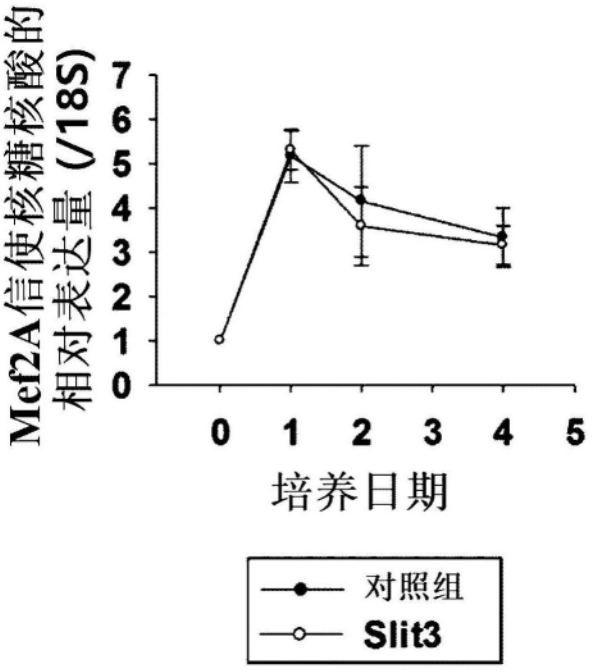

Mef2A信使核糖核酸的相对表达量 (/18S)
7
6
5
4
3
2
1
0
0 1 2 3 4 5
培养日期
对照组
Slit3

图8f

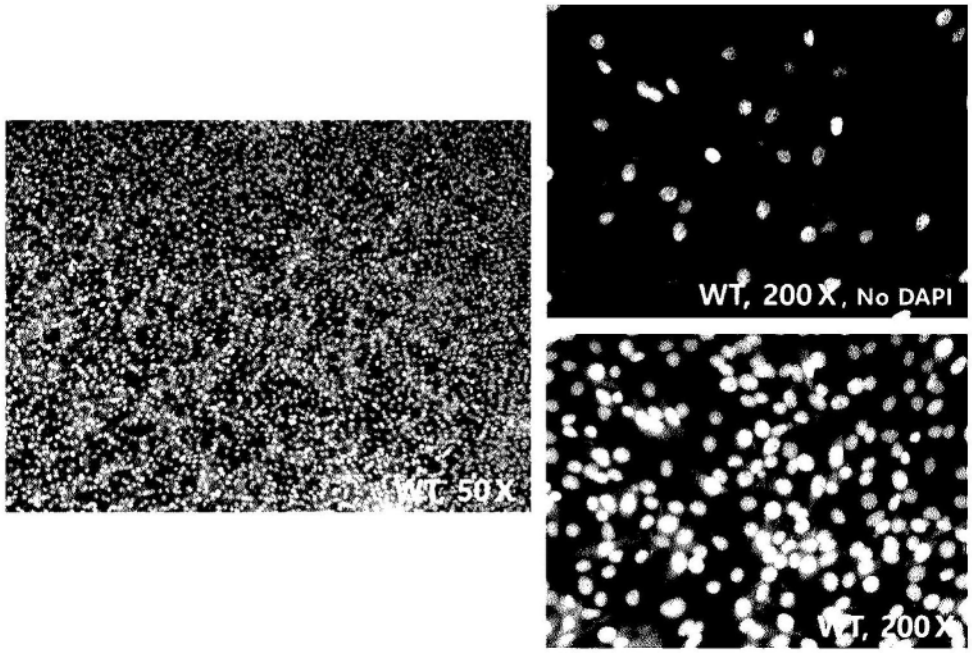

WT, 50X
WT, 200X, No DAPI
WT, 200X

图9a

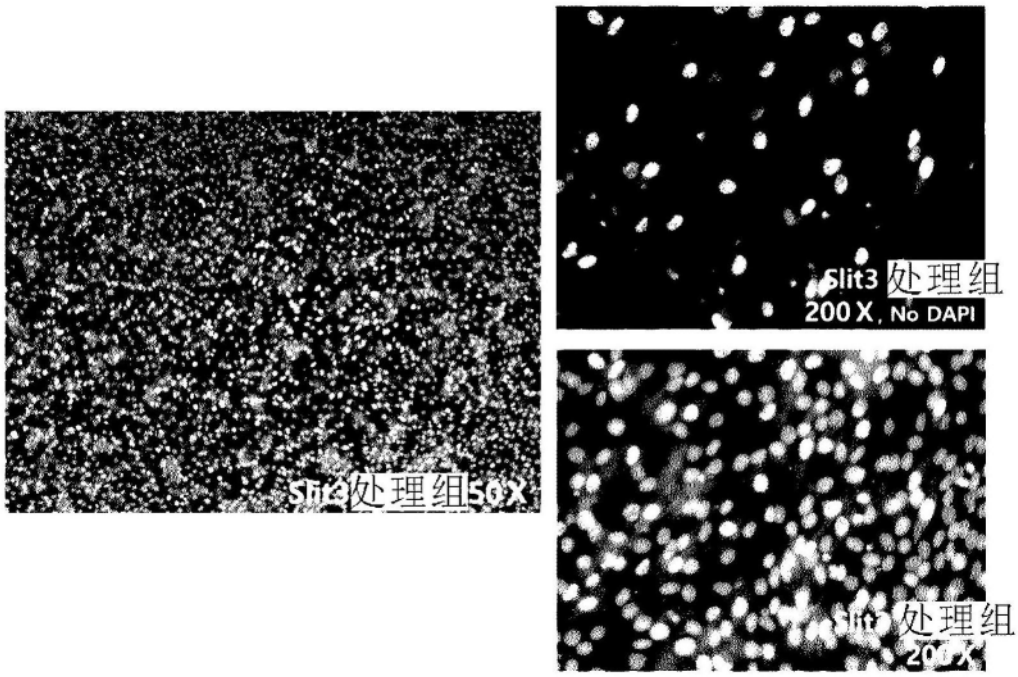

Slit3处理组50X
Slit3 处理组
200X, No DAPI
Slit3 处理组

图9b

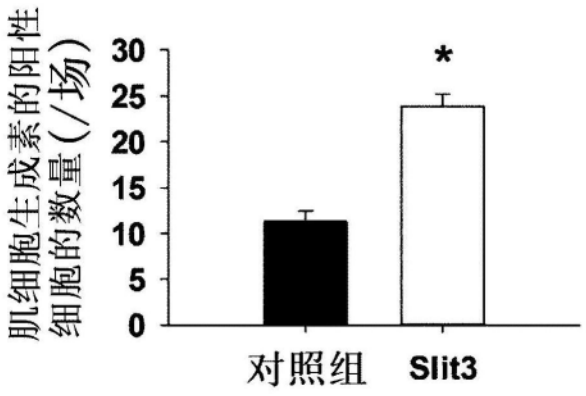

肌细胞生成素的阳性细胞的数量(/场)
30
25
20
15
10
5
0
*
对照组
Slit3

图10

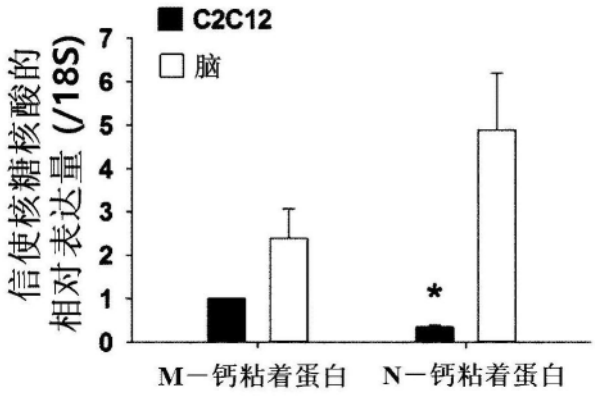

信使核糖核酸的相对表达量 (/18S)
C2C12
脑
7
6
5
4
3
2
1
0
*
M－钙粘着蛋白
N－钙粘着蛋白

图11a

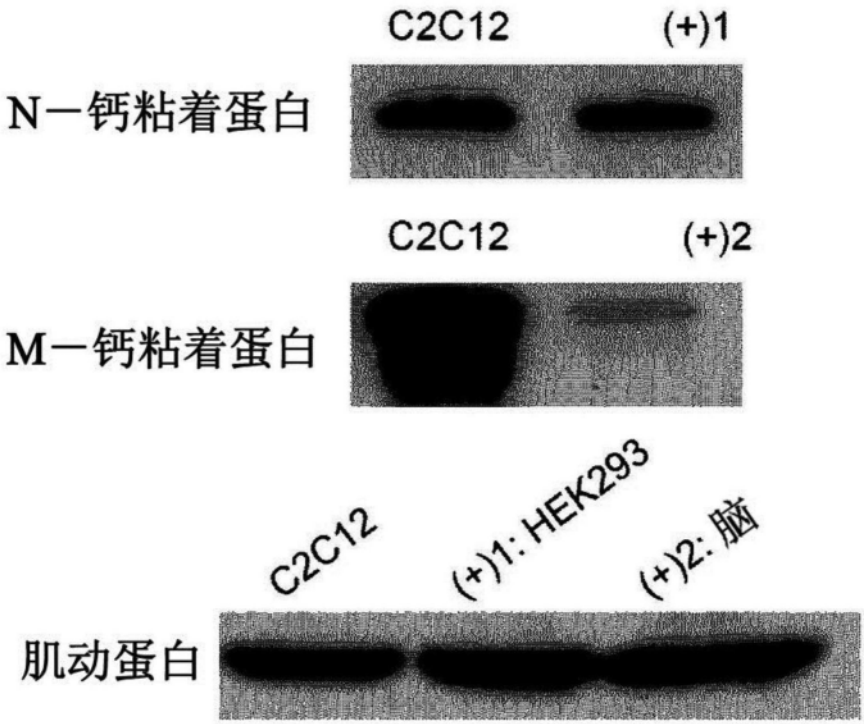

C2C12
(+)1
N－钙粘着蛋白
C2C12
(+)2
M－钙粘着蛋白
C2C12
(+)1: HEK293
(+)2: 脑
肌动蛋白

图11b

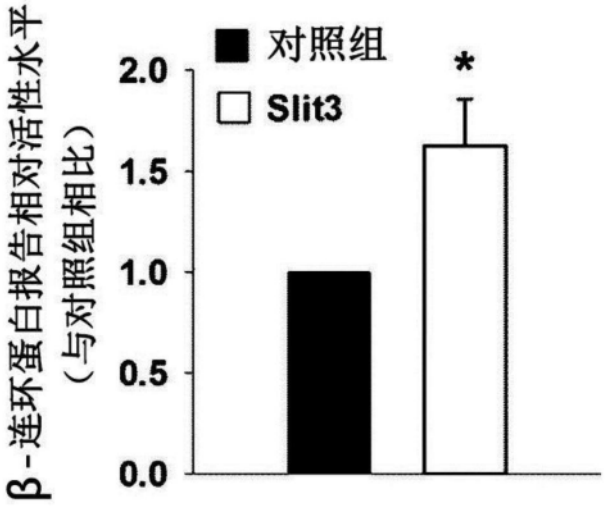

β-连环蛋白报告相对活性水平
（与对照组相比）
对照组
Slit3
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*

图12a

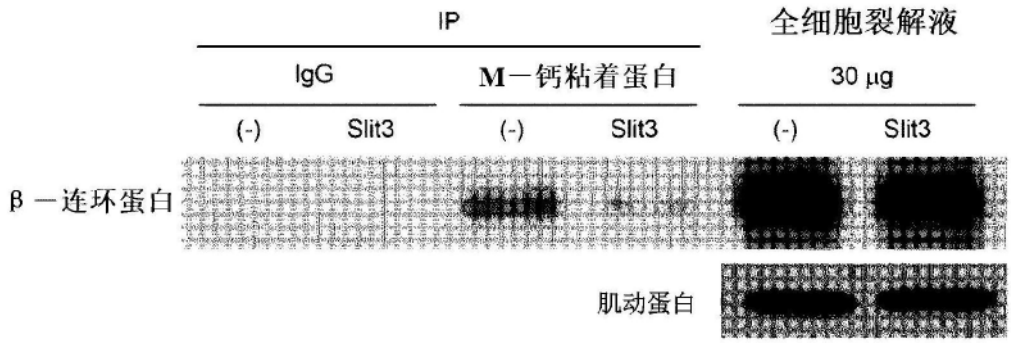

IP
全细胞裂解液
IgG
M－钙粘着蛋白
30 μg
(-)
Slit3
(-)
Slit3
(-)
Slit3
β－连环蛋白
肌动蛋白

图12b

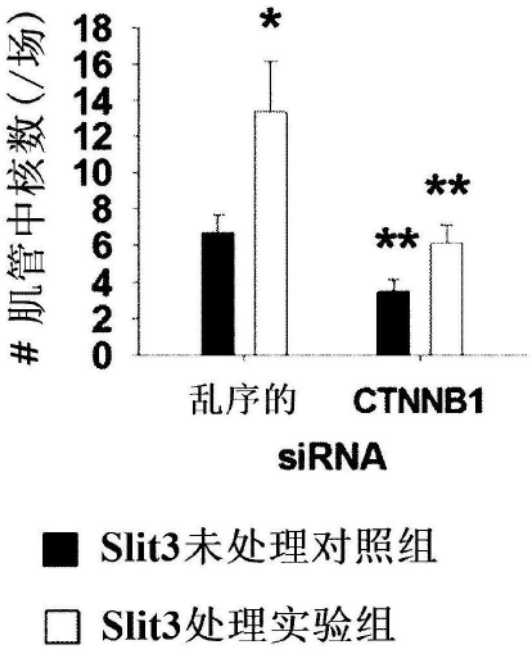

肌管中核数(/场)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*
**
**
乱序的
CTNNB1
siRNA
Slit3未处理对照组
Slit3处理实验组

图12c

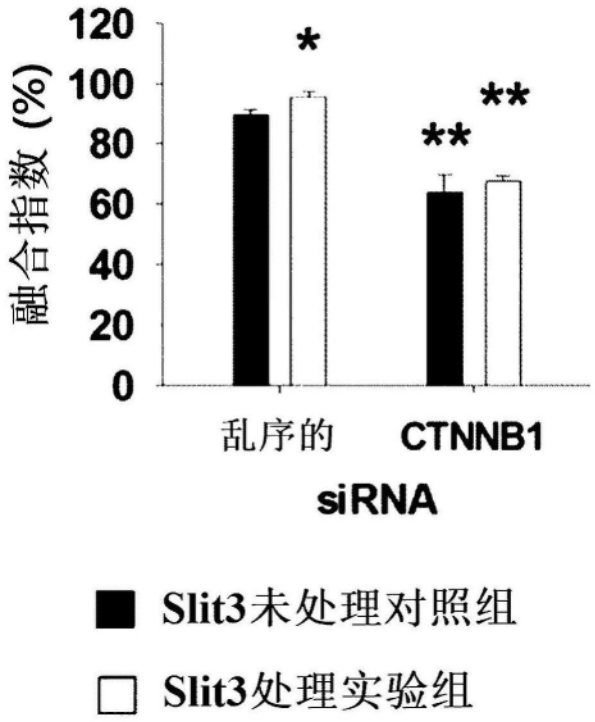

120
100
80
60
40
20
0
融合指数 (%)
*
**
**
乱序的
CTNNB1
siRNA
Slit3未处理对照组
Slit3处理实验组

图12d

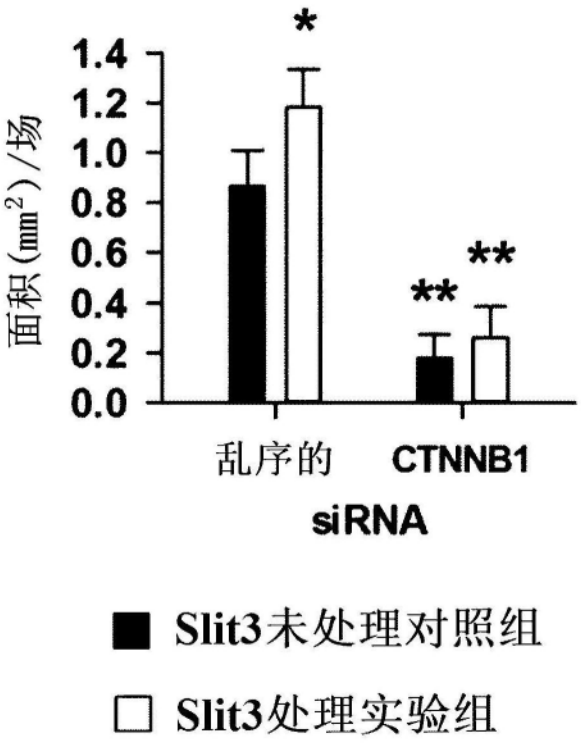

1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
面积(mm²)/场
*
**
**
乱序的
CTNNB1
siRNA
Slit3未处理对照组
Slit3处理实验组

图12e


乱序的 siRNA
CTNNB1 siRNA
(-)
Slit3
(-)
Slit3
肌细胞生成素
肌动蛋白

图12f

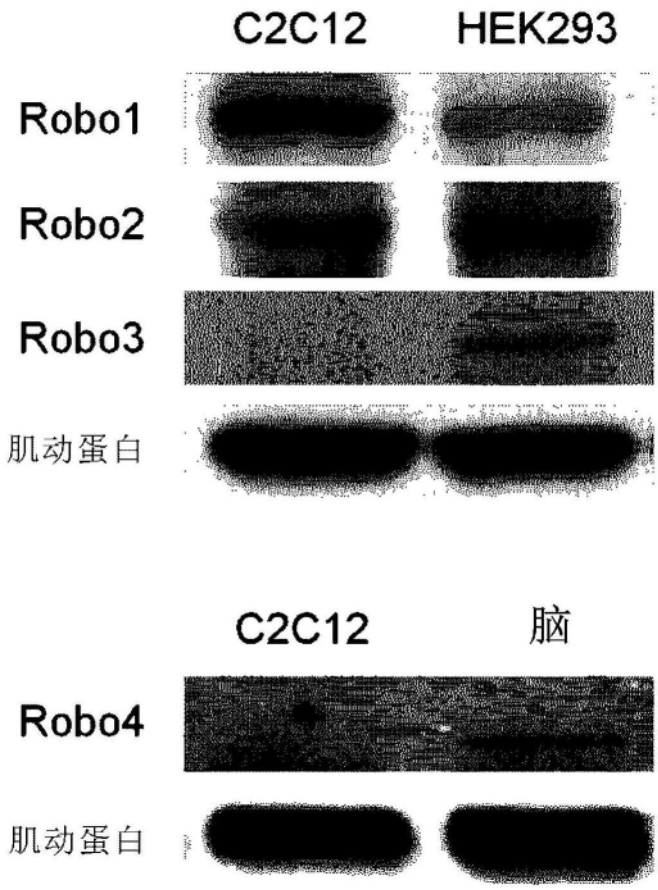

C2C12
HEK293
Robo1
Robo2
Robo3
肌动蛋白
C2C12
脑
Robo4
肌动蛋白

图13a

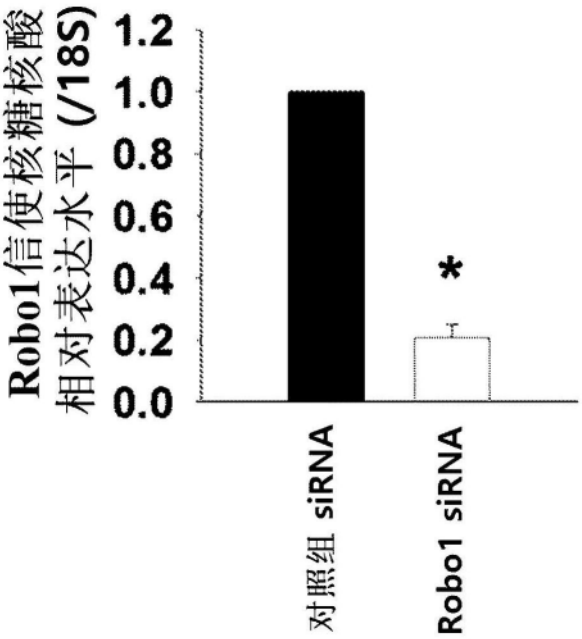

Robo1信使核糖核酸
相对表达水平 (/18S)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
对照组 siRNA
Robo1 siRNA

图13b

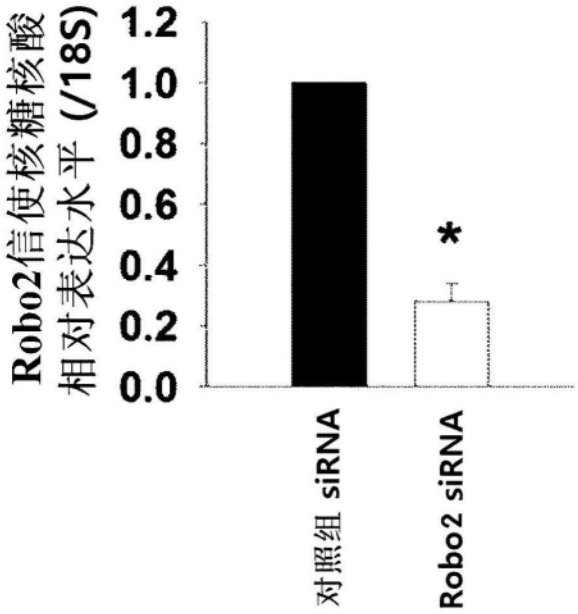

Robo2信使核糖核酸
相对表达水平 (/18S)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
对照组 siRNA
Robo2 siRNA

图13c

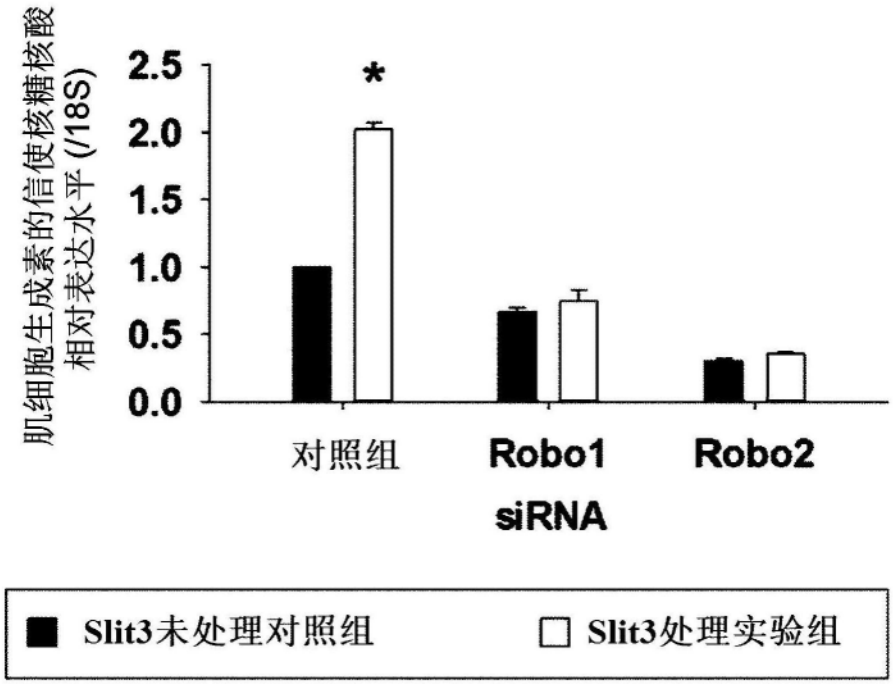

肌细胞生成素的信使核糖核酸
相对表达水平 (/18S)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
对照组
Robo1
Robo2
siRNA
Slit3未处理对照组
Slit3处理实验组

图13d

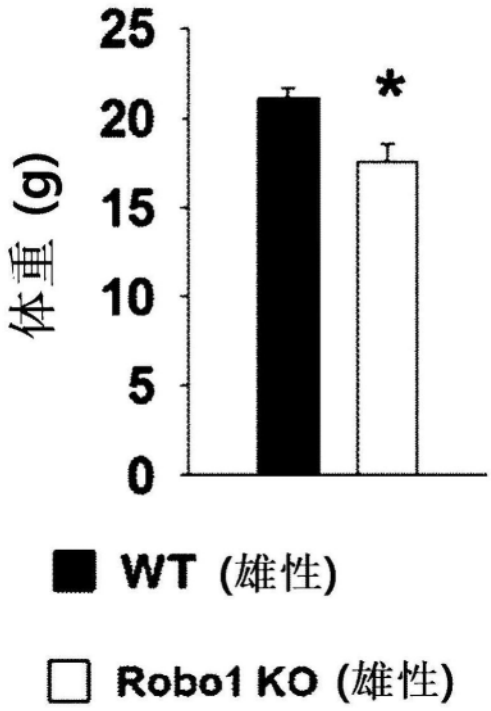

体重 (g)
25
20
15
10
5
0
*
WT (雄性)
Robo1 KO (雄性)

图14a

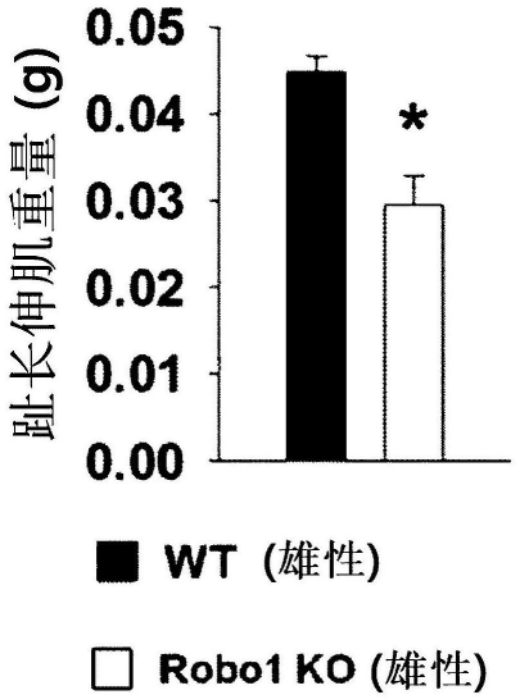

趾长伸肌重量 (g)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
*
WT (雄性)
Robo1 KO (雄性)

图14b

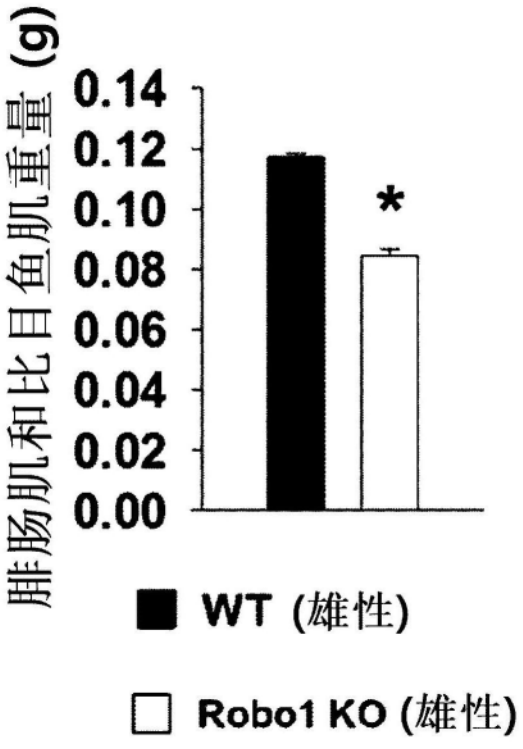

腓肠肌和比目鱼肌重量 (g)
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
*
WT (雄性)
Robo1 KO (雄性)

图14c

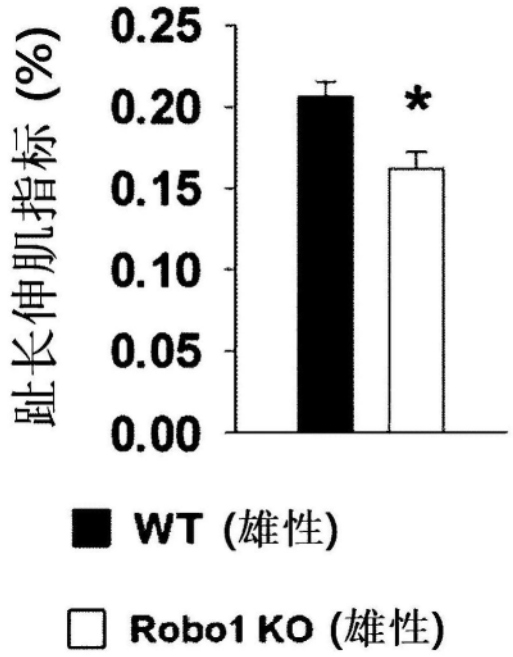

趾长伸肌指标 (%)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
*
WT (雄性)
Robo1 KO (雄性)

图14d

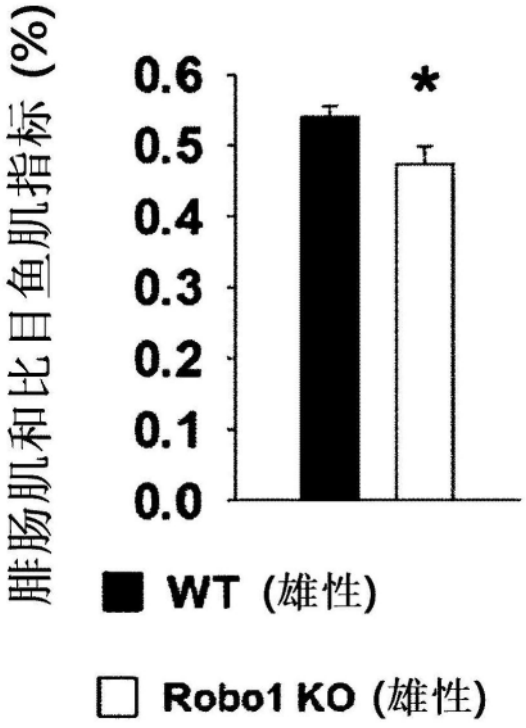

腓肠肌和比目鱼肌指标 (%)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
WT (雄性)
Robo1 KO (雄性)

图14e

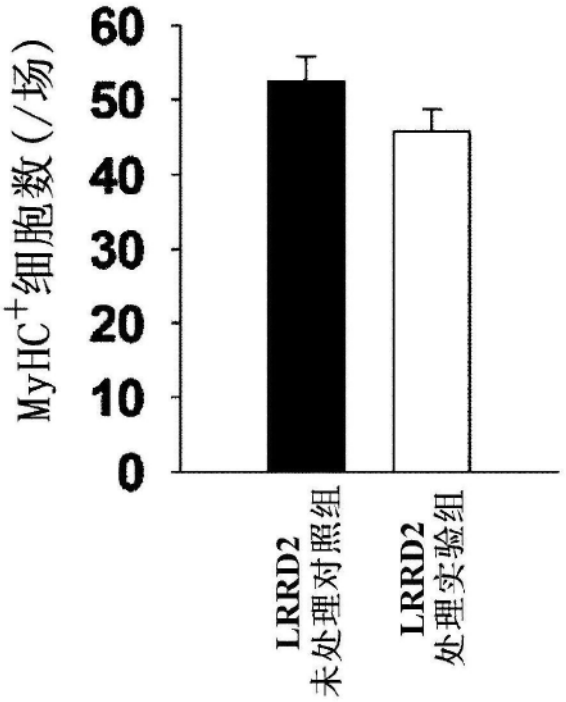

MyHC+细胞数(/场)
60
50
40
30
20
10
0
LRRD2
未处理对照组
LRRD2
处理实验组

图15a

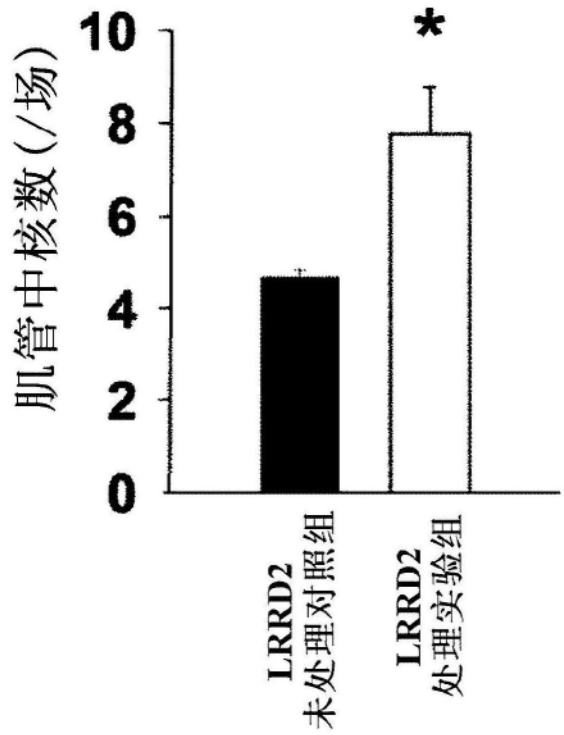

肌管中核数(/场)
10
8
6
4
2
0
*
LRRD2
未处理对照组
LRRD2
处理实验组

图15b

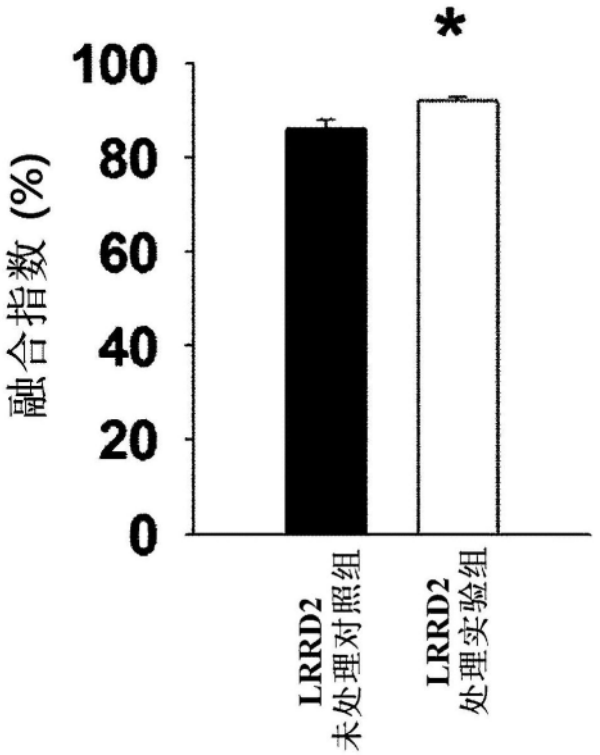

融合指数 (%)
100
80
60
40
20
0
*
LRRD2
未处理对照组
LRRD2
处理实验组

图15c

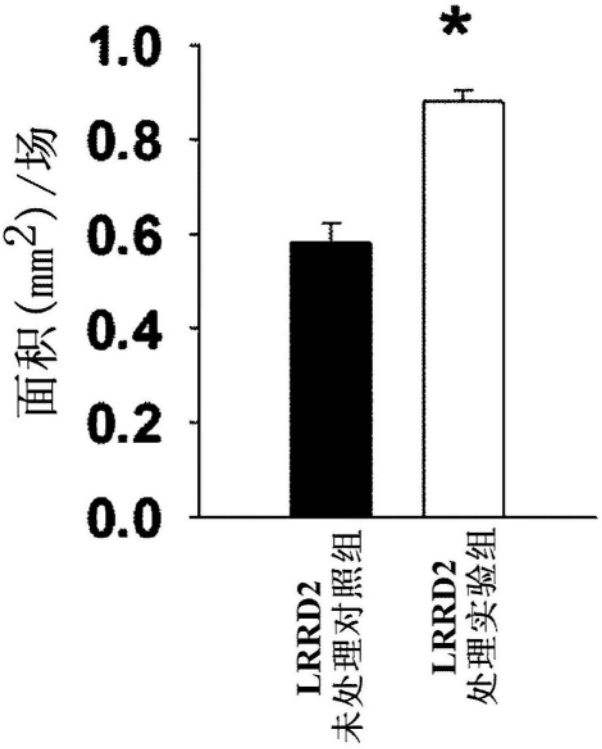

面积 (mm^2) /场
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
LRRD2
未处理对照组
LRRD2
处理实验组

图15d

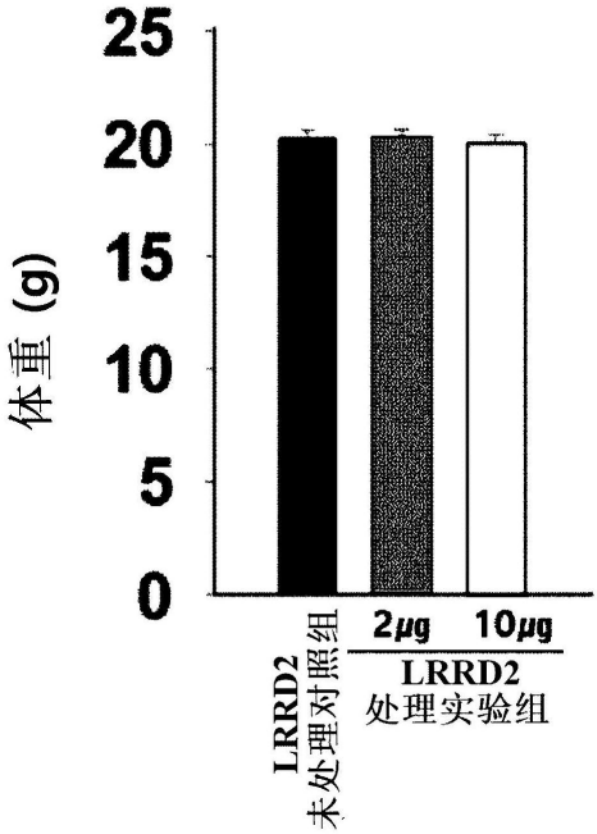


图16a

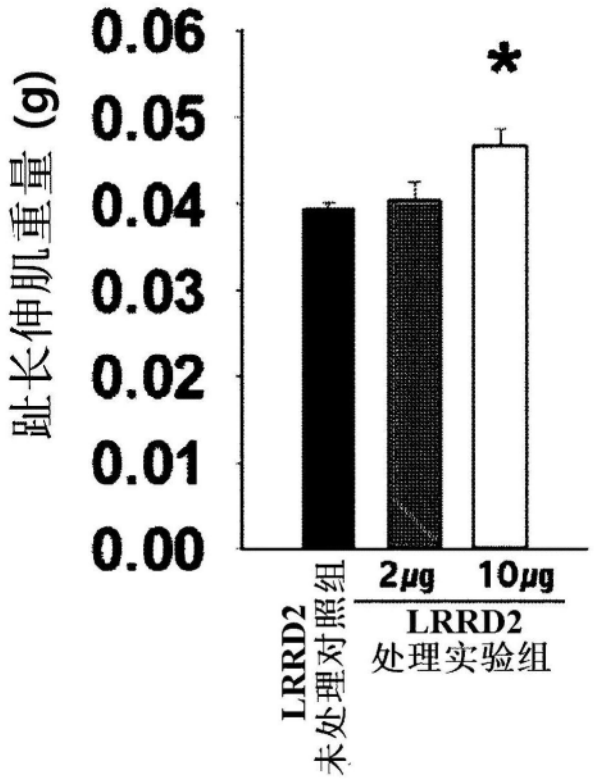

趾长伸肌重量 (g)
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
*
LRRD2
未处理对照组
2μg
10μg
LRRD2
处理实验组

图16b

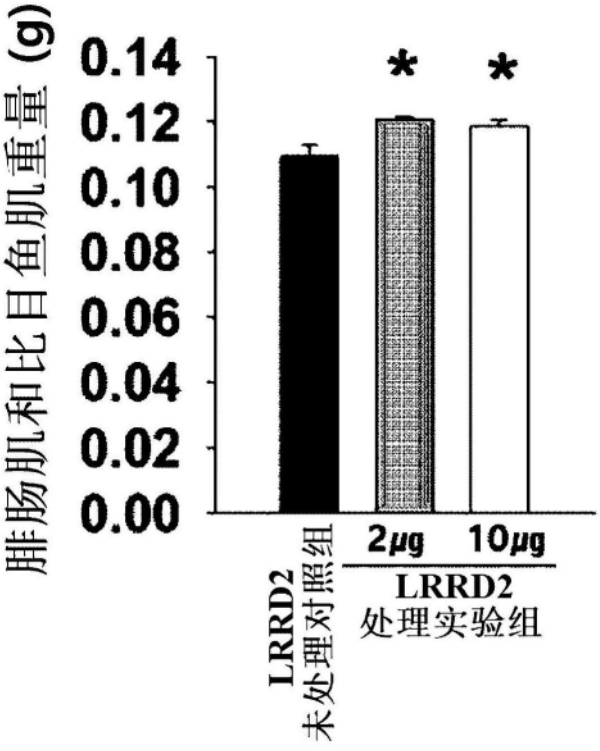

腓肠肌和比目鱼肌重量 (g)
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
*
*
LRRD2
未处理对照组
2μg
10μg
LRRD2
处理实验组

图16c

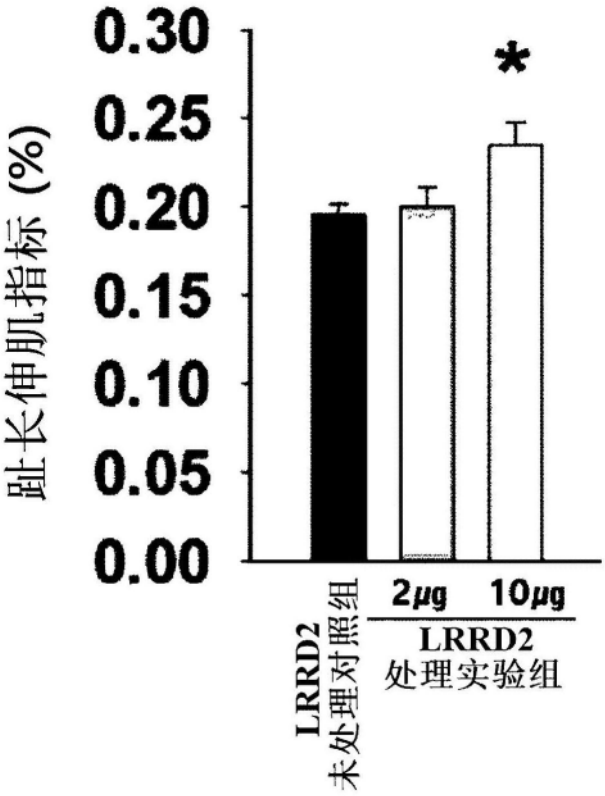

0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
趾长伸肌指标 (%)
*
LRRD2
未处理对照组
2μg
10μg
LRRD2
处理实验组

图16d

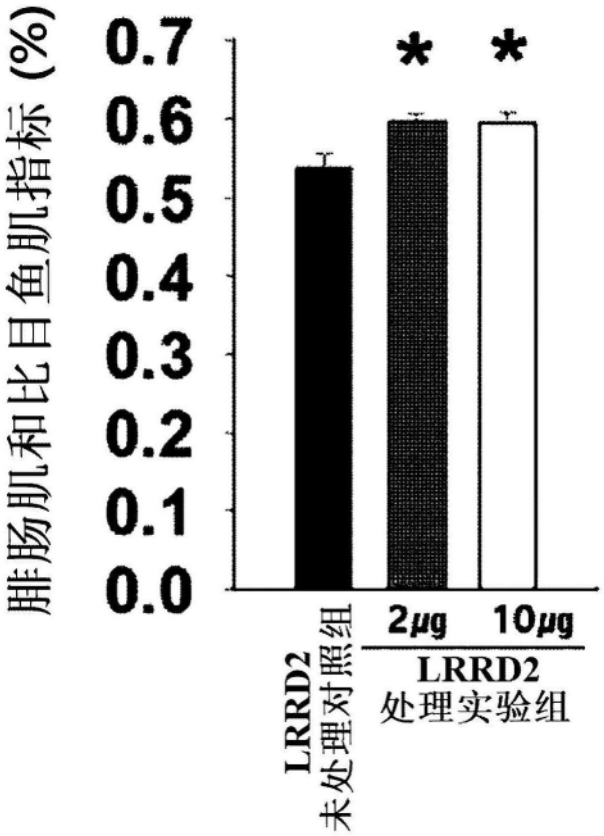

腓肠肌和比目鱼肌指标 (%)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
*
LRRD2
未处理对照组
2μg
10μg
LRRD2
处理实验组

图16e