



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106947741 A

(43)申请公布日 2017. 07. 14

(21)申请号 201710163507.2

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2011.11.04

C12N 5/10(2006.01)

(30)优先权数据

C12N 15/86(2006.01)

61/410,736 2010.11.05 US

C12N 15/62(2006.01)

61/410,744 2010.11.05 US

61/511,912 2011.07.26 US

(62)分案原申请数据

201180061697.8 2011.11.04

(71)申请人 斯坦福大学托管董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 K·戴瑟罗斯 O·伊扎尔

L·芬诺 P·黑格曼 M·普里格

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 郑天松

权利要求书1页 说明书40页

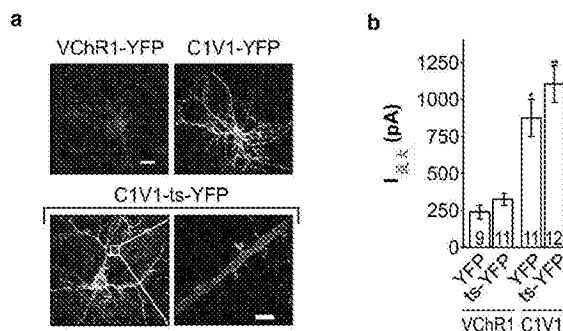
序列表15页 附图11页

(54)发明名称

光活化嵌合视蛋白及其使用方法

(57)摘要

本文提供包含在质膜上表达的光活化嵌合蛋白的组合物;和使用所述组合物来选择性地使兴奋性或抑制性神经元去极化的方法。



1. 一种动物细胞,其包含在细胞膜上表达的光活化蛋白,其中所述蛋白:
是来源于来自强壮团藻的VChR1和来自莱茵衣藻的ChR1的嵌合蛋白,其中所述蛋白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列;
对光可响应;并且
当用光照射所述细胞时,能够介导所述细胞中的去极化电流。
2. 如权利要求1所述的动物细胞,其中所述蛋白进一步在位于所述嵌合光响应性蛋白的第二跨膜螺旋与第三跨膜螺旋之间的细胞内环结构域中包含置换,其中所述细胞内环结构域的至少一部分置换为来自所述ChR1的相应部分。
3. 如权利要求2所述的动物细胞,其中所述细胞内环结构域的所述部分置换为来自所述ChR1的延伸至所述ChR1的氨基酸残基A145的相应部分。
4. 如权利要求2所述的动物细胞,其中所述蛋白进一步在所述嵌合光响应性蛋白的第三跨膜螺旋中包含置换,其中所述第三跨膜螺旋的至少一部分置换为ChR1的相应序列。
5. 如权利要求4所述的动物细胞,其中所述细胞内环结构域的所述部分置换为来自所述ChR1的延伸至所述ChR1的氨基酸残基W163的相应部分。
6. 如权利要求1所述的动物细胞,其中所述嵌合蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
7. 如权利要求6所述的动物细胞,其进一步包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基E122和/或E162上的突变。
8. 如权利要求7所述的动物细胞,其中氨基酸E122上的所述突变是突变为苏氨酸。
9. 如权利要求7所述的动物细胞,其中氨基酸E162上的所述突变是突变为苏氨酸。
10. 如权利要求1所述的动物细胞,其中所述嵌合蛋白包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

光活化嵌合视蛋白及其使用方法

[0001] 本申请是2011年11月4日提交的同名发明专利申请201180061697.8的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2010年11月5日提交的美国临时专利申请号61/410,736;于2010年11月5日提交的美国临时专利申请号61/410,744;以及于2011年7月26日提交的美国临时专利申请号61/511,912的优先权,这些专利申请各自的公开内容以引用的方式全部并入本文。

技术领域

[0004] 本申请涉及包含在质膜上表达光活化嵌合蛋白的动物细胞的组合物;和使用所述组合物来选择性地使存在于前额叶皮质中的相同微回路中的兴奋性或抑制性神经元去极化的方法。

[0005] 背景

[0006] 对大多数精神障碍的神经生理学底物的了解不多,尽管关于与复杂的行为表型,如在孤独症和精神分裂症中所观察到的那些表型相关的遗传因素的信息快速涌现(Cichon等,The American Journal of Psychiatry 166(5):540(2009);O'Donovan等,Human Genetics 126(1):3(2009))。一个正显露的值得注意的原则是极为广泛的看起来似乎不相关的遗传异常可以引起同一类别的精神病表型(如社会行为机能障碍;Folstein和Rosen-Sheidley,Nature Reviews 2(12):943(2001))。这个出人意料的型态指出需要鉴别出可以在普通病理生理学原则下统一不同的遗传因素的简化回路级(circuit-level)见解。

[0007] 一种这样的回路级假设是皮质细胞的兴奋与抑制的比率(细胞的E/I平衡)提高可以引起孤独症的社会性和认知性缺陷(Rubenstein,Current Opinion in Neurology 23(2):118;Rubenstein和Merzenich,Genes,Brain,and Behavior 2(5):255(2003))。这种假设可以潜在地统一大量不同的病理生理学证据,包括观察到许多孤独症相关基因与离子通道和突触蛋白的功能获得性表型有关(Bourgeron,Current Opinion in Neurobiology 19(2),231(2009))并且约30%的孤独症患者还表现出临床上明显的癫痫发作(Gillberg和Billstedt,Acta Psychiatrica Scandinavica,102(5):321(2000))。然而,还不清楚此种不平衡(与疾病症状相关的)是可以在长期(例如在发展过程中)还是在短期时间跨度上操作。此外,这种假设并未得到普遍接受,部分是因为它还不易于直接测试。在社会性和认知性任务期间,无论在临床环境中还是在自由行为的实验哺乳动物中,药理学和电学的干预缺乏必要的特异性来选择性地促进新皮质兴奋性细胞而非抑制性细胞的活性(以根本不同于受体调节的方式)。这也许涉及到多种挑战,如已证明孤独症和精神分裂症的社会性和认知性缺陷对于临床中的常规精神药理学治疗基本上无反应。

[0008] 光遗传学是遗传学方法和光学方法的组合,被用来控制活组织(甚至是自由移动的哺乳动物和其它动物体内的活组织)的靶细胞中的特定事件,具有为比肩功能完整的生物系统所需要的时间精确度(毫秒时间跨度)。光遗传学的特点是将快速光活化通道蛋白引

入靶神经元细胞的质膜,从而允许在时间上精确地操纵神经元膜电位同时通过使用特异性靶向机制来维持细胞类型解析。可以用来研究神经系统的功能的微生物视蛋白包括被用来促进响应于光的去极化的视紫红质通道蛋白(ChR2、ChR1、VChR1、以及SFO)。在短短的几年中,光遗传学领域已深化了对特定细胞类型如何在活体内促进生物组织(如神经回路)的功能的基础性科学理解。此外,在临床方面,光遗传学带动的研究使得对帕金森氏(Parkinson's)病和其它神经障碍和精神病障碍获得了深入了解。

[0009] 然而,现有的用于探究皮质E/I平衡的比率提高可能与孤独症和其它障碍(如精神分裂症)的社会性和认知性缺陷相关的假设的光遗传学工具存在限制。常规的视紫红质通道蛋白光电流展现出显著的脱敏作用,这妨碍了E/I平衡的阶梯状变化的产生(转为要求斜坡或脉冲,这将不适合用于研究细胞的E/I平衡的稳定变化);此外,SFO和常规的ChR两者均由蓝光驱动,这妨碍了驱动不同回路元件(如兴奋性和抑制性神经元)群体的作用的制剂内比较。因此,需要允许操纵皮质E/I平衡和监测皮质切片中的 γ 振荡的工具,以便容许研究这些操纵如何影响存在于前额叶皮质中的相同微回路中的下游神经元。

[0010] 发明概述

[0011] 本文提供一种组合物,其包含嵌合光活化蛋白阳离子通道,当用光照射细胞时,所述嵌合光活化蛋白阳离子通道能够介导细胞中的去极化电流。

[0012] 本文提供包含在细胞膜上表达的光活化蛋白的动物细胞,其中所述蛋白是(a)来源于来自强壮团藻(*Volvox carteri*)的VChR1和来自莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的ChR1的嵌合蛋白,其中所述蛋白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列;(b)对光可响应;并且(c)当用光照射细胞时,能够介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,所述细胞是分离的或在细胞培养基中。

[0013] 本文还提供包含在细胞膜上表达本文所描述的嵌合蛋白的细胞的细胞群。本文还提供包含在细胞膜上表达本文所描述的嵌合蛋白的细胞的非人动物和脑组织切片。

[0014] 本文提供包含编码在细胞膜上表达的光活化蛋白的核苷酸序列的多核苷酸,其中所述蛋白是来源于来自强壮团藻的VChR1和来自莱茵衣藻的ChR1的嵌合蛋白,其中所述蛋白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列;对光可响应;并且当用光照射细胞时,能够介导细胞中的去极化电流。还提供包含所述多核苷酸的载体(如表达载体)。在一些实施方案中,所述表达载体是病毒载体(例如,AAV载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、HSV载体、或慢病毒载体)。

[0015] 本文还提供使用在细胞膜上表达本文所描述的嵌合蛋白的动物细胞的方法,所述方法包括用光活化所述嵌合蛋白。

[0016] 本文还提供选择性地使存在于相同微回路中的兴奋性或抑制性神经元去极化的方法,所述方法包括:选择性地使包含第一光活化蛋白的兴奋性神经元去极化,其中所述第一光活化蛋白当被曝露于具有第一波长的光时被去极化;或选择性地使包含第二光活化蛋白的抑制性神经元去极化,其中所述第二光活化蛋白当被曝露于具有第二波长的光时被去极化。在一些实施方案中,所述第一光活化蛋白或所述第二光活化蛋白是来源于来自强壮团藻的VChR1和来自莱茵衣藻的ChR1的嵌合蛋白,其中所述蛋白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列。在一些

实施方案中,其中所述第一光活化蛋白包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中所示的序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述第二光活化蛋白包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14中所示的序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0017] 一种选择性地使存在于相同微回路中的兴奋性或抑制性神经元去极化的方法,所述方法包括:在兴奋性神经元中表达第一光活化蛋白;并且在抑制性神经元中表达第二光活化蛋白,其中所述第一光活化蛋白当被暴露于具有第一波长的光时被独立地去极化,并且其中所述第二光活化蛋白当被暴露于具有第二波长的光时被独立地去极化。在一些实施方案中,所述第一光活化蛋白或所述第二光活化蛋白是来源于来自强壮团藻的VChR1和来自莱茵衣藻的ChR1的嵌合蛋白,其中所述蛋白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述第一光活化蛋白包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中所示的序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述第二光活化蛋白包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14中所示的序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0018] 本文还提供用于鉴别选择性地抑制存在于相同微回路中的兴奋性或抑制性神经元的去极化的化合物的方法,所述方法包括:(a)用具有第一波长的光选择性地使包含第一光活化蛋白的兴奋性神经元去极化,或用具有第二波长的光选择性地使包含第二光活化蛋白的抑制性神经元去极化;(b)测量响应于选择性地使包含第一光活化蛋白的兴奋性神经元去极化的兴奋性突触后电位(EPSP),或测量响应于选择性地使包含第二光活化蛋白的抑制性神经元去极化的抑制性突触后电流(IPSC);(c)使兴奋性神经元或抑制性神经元与化合物接触;(d)测量兴奋性突触后电位(EPSP)或测量抑制性突触后电流(IPSC)以确定使兴奋性神经元或抑制性神经元与化合物接触是否选择性地抑制任一神经元的去极化。在一些实施方案中,所述第一光活化蛋白或所述第二光活化蛋白是来源于来自强壮团藻的VChR1和来自莱茵衣藻的ChR1的嵌合蛋白,其中所述蛋白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述第一光活化蛋白包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中所示的序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述第二光活化蛋白包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14中所示的序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0019] 应理解,可以将本文描述的不同实施方案的一种、一些或全部特性进行组合以形成本发明的其它实施方案。本发明的这些和其它方面对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0020] 附图简述

[0021] 图1描绘了用于组合性光遗传学的改进型红移视紫红质通道蛋白的工程化。(a)用受CaMKIIa启动子控制的VChR1-eYFP或C1V1-eYFP转染的培养海马神经元的共焦图像。方框表示最后一幅图中放大的区域,其示出C1V1-tsYFP的树突状膜定位。比例尺:20 μ m(左),4 μ m(右)。(b)来自表达指定视蛋白的培养海马神经元中的全细胞膜片钳记录的峰值光电流。(c)ChR1、ChR2以及VChR1的序列比对。指出两种C1V1变异体的剪接位点。推定跨膜螺旋1-7(TM1-7)用条栏指示;突变的氨基酸用灰色指示。(d)在表达C1V1剪接变异体1和2的HEK细胞中所记录的光电流振幅。(e)用与EYFP融合的指定视蛋白转染的培养海马神经元的单个共

焦平面图像。DNA浓度在构建体间匹配。(f) ChR2、VChR1、C1V1wt、C1V (E122T)、C1V1 (E162T)、以及C1V1 (E122T/E162T)的作用谱。在HEK293细胞中,用2ms光脉冲来收集光电流。(g) C1V1剪接变异体1的离子渗透,所述离子渗透是使用阳离子分离外部溶液通过全细胞膜片钳在HEK细胞中在-40mV下测得的光电流幅值所测量。将数据归一化为最大峰值Na电流。(h) C1V1嵌合体的示意图,其中点突变位置用白色指示。ChR1序列用黑色指示;VChR1序列用灰色指示。

[0022] 图2描绘了测试用于组合光遗传学的改进型红移视紫红质通道蛋白。(a) 表达指定视蛋白的培养神经元中的通道闭合时间常数($t_{\text{去活}}$ (t_{off}))的代表性迹线和汇总图线(summary plot);将迹线归一化为峰值电流。(b) C1V1-E122T钝化与ChR2去活的比较。(c) C1V1双重变异体E122T/E162T与其它C1V1变异体中的电流钝化的比较。(d) 在表达指定视蛋白的培养神经元中所记录到的响应于2ms 542nm光脉冲的平均峰值光电流。

[0023] 图3描绘了在前额叶锥体神经元中进行短期切片记录获得的光电流。(a) 峰值光电流显示始终与积分荧光强度相关。(b) ChR2 (H134R) 与C1V1 (E122T/E162T) 中的荧光-光电流关系。黑色线是对数据的线性拟合。(c) 在用指定频率的560nm光脉冲列或电流注入所刺激的前额叶锥体神经元中进行的短期切片记录。汇总图形示出了群数据($n=6$)。(d) 在指定波长和光功率密度下,成功尖峰相对于电流注入(200pA, 10ms脉冲;左上)或2ms光脉冲的分数。所有脉冲列由 $20 \times 2\text{ms}$ 脉冲组成,所述脉冲通过使用萨特(Sutter) DG-4光源的显微镜物镜递送、使用20nm带通滤光片和额外的中性密度滤光片过滤以使光功率减弱(在2种切片中 $n=6$ 个细胞)。(e) 在表达C1V1-E122T或C1V1-E122T/E162T的细胞中的电压钳对542nm和630nm光脉冲的响应(上部)。在表达C1V1-E122T的细胞中的电流钳记录显示响应于 3.2mW mm^{-2} 下的50ms 630nm光的5Hz列的尖峰(底部)。(f) C1V1 (E122T) 中的红光响应的动力学。在540nm和630nm下,从表达C1V1 (E122T) 的培养神经元中记录到的光电流的活化时间常数($\tau_{\text{活化}}$)。应注意,光功率在630nm下是 3.2mW mm^{-2} 并且在540nm下是 7.7mW mm^{-2} ($n=5$ 个细胞, $p=0.0006$ 成对t-检验)。(g) 电压钳迹线显示在表达C1V1 (E122T) 的神经元中对630nm光脉冲的响应。脉冲长度指示于迹线上方。从150ms迹线计算出的 $\tau_{\text{活化}}$ 是67ms。(h) 来自表达C1V1 (E122T) 的神经元的电流钳记录,显示在630nm下由50ms脉冲(功率密度 3.2mW mm^{-2})引发的尖峰。

[0024] 图4描绘了兴奋性锥体神经元和表达小白蛋白的抑制性细胞的独立活化。(a) 响应于560nm或405nm下的2ms光脉冲(5Hz;在两个波长下 7.6mW/mm^2),由表达C1V1 (E122T/E162T) 或ChR2 (H134R) 的培养海马神经元得到的电流钳记录。(b) 在皮质锥体神经元中表达C1V1并且在抑制性小白蛋白阳性中间神经元中表达ChR2 (H134R) 的双重注射动物中的记录配置。为了独立地表达视蛋白,给PV::Cre小鼠注射含有Lenti-CaMKII α -C1V1 (E122T/E162T) 和AAV5-EF1 α -DIO-ChR2 (H134R) 的双病毒混合物。(c) 由非表达性PYR神经元得到的电压钳记录,所述神经元接受来自表达C1V1的PYR-细胞和表达ChR2的PV-细胞的突触输入。在0mV、405nm光脉冲下钳制引发短潜伏期IPSC,而560nm脉冲仅引起小的、长潜伏期的抑制性突触响应。(d) 由在c中所示的相同细胞得到的电压钳记录。在-65mV、560nm光脉冲下钳制引发EPSC,但405nm脉冲不能引起可检测到的突触电流。灰色线示出个别事件;黑色线示出光脉冲引发的平均值。(e) 在注射CaMKII α ::C1V1 (E162T)-ts-eYFP和Ef1 α -DIO::ChR2-eYFP的被麻醉的PV::Cre小鼠中的mPFC光极记录(图表说明实验设置)。紫色(405nm)光脉冲

相对于绿光脉冲(实例迹线)呈现出可变延迟(A_t)。(f)汇总图形示出了在紫光脉冲领先绿光脉冲所指示的延迟的情况下绿光引发的尖峰的概率。个别点是来自单个的记录。黑色线示出所有记录的平均值(每分区(bin)>3个记录位点)。(g)来自注射病毒的小鼠的光电极记录,示出一个推定锥体单元和一个推定PV单元分别响应于561nm刺激(右侧,上方波形)和405nm刺激(右侧,下方波形)而放电。

[0025] 图5描绘了在不同完整系统制剂中的组合光遗传学激发。(a)在活体外用C1V1-E122T/E162T和ChR2-H134R进行的组合投射控制。实验性范例分别示出C1V1和ChR2在皮层丘脑(CT)和腹侧基底(VB)丘脑皮质的细胞(TC)中的表达。(b)由从CT和TC细胞两者中接收投射的nRT细胞得到的电压钳记录。同时刺激($A_t=0$ ms)导致来自两个投射的所引发的EPSC的线性叠加。(c)当输入是精确重合的时候,来自TC和CT纤维的个别低于阈值的输入仅在nRT神经元中产生尖峰。(d)CT与TC输入之间的延迟指示于左侧。水平短划线指示切去顶端的尖峰。由以可变潜伏期(A_t)活化的CT和TC纤维引发的归一化数目的动作电位(来自6个nRT细胞)指示只有在5ms内重合的情况下,CT和TC输入才产生有效的整合。汇总数据表示平均 $\pm$ SEM。

[0026] 图6描绘了光谱时间分离和组合控制:正进行的突触活动下的E/I状态改变的回路调节和出射型态。(a)针对PV神经元的SSFO活化和锥体神经元中的C1V1活化的实验性范例。(b)在来自表达CaMKIIa::C1V1(E162T)和DIO-SSFO的PV::Cre小鼠的短期切片制剂中,在0mV下由锥体神经元得到的电压钳记录。SSFO和C1V1由蓝光脉冲活化(2),并且通过持续的SSFO活性使IPSC频率增加(3;比较插图中针对活化前和活化后IPSC活性的上方和下方迹线)。持续的黄光脉冲使SSFO去活,并且活化C1V1和瞬时增加IPSC频率(4)。群功率谱(右侧)示出光学兴奋性神经元活化(590nm脉冲)过程中的 γ 频率活性,所述 γ 频率活性在兴奋性和PV神经元(470nm脉冲)共同活化过程中增加。在迹线下方的图表示出实验过程中的C1V1和SSFO的预测活性。(c)所观察到的 γ 频率峰与先前经由SSFO对PV神经元的刺激无关。(d)基线时和初始蓝光或橙色光脉冲后来自(b)和(c)的汇总IPSC频率。在迹线下方的图表示出实验过程中的C1V1和SSFO的预测活性。

[0027] 详述

[0028] 本发明特别提供包含在质膜上表达光活化嵌合蛋白的动物细胞的组合物;和使用所述组合物来选择性地使存在于前额叶皮质中的相同微回路中的兴奋性或抑制性神经元去极化的方法。本发明人开发了具有独特物理化学特性的嵌合蛋白,所述嵌合蛋白首次容许实验性操纵皮质E/I提高并且能够监测皮质切片中的 γ 振荡。这些独特的光敏性嵌合蛋白可以在非人动物的前额叶皮质中的兴奋性或抑制性神经回路中表达,然后可以响应于具有特定波长的光使所述兴奋性或抑制性神经回路去极化。此外,来自非人动物的含有表达本文公开的嵌合光敏性蛋白的皮质兴奋性或抑制性神经元的脑切片可以被用来搜寻可以选择性地抑制存在于相同神经回路内的兴奋性或抑制性神经元的去极化的化合物。

[0029] 一般技术

[0030] 除非另外指出,否则本发明的实践将采用本领域技术人员所熟知的分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学以及免疫学的常规技术。所述技术已在文献中得到充分说明,如Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版(Sambrook等,1989)和Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第三版(Sambrook和Russel,2001)(本文统称

为“Sambrook”);Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel等编著,1987,包括2001年增刊);PCR:The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等编著,1994);Harlow和Lane (1988)Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications, New York;Harlow和Lane (1999)Using Antibodies:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY (本文统称为“Harlow和Lane”),Beaucage等编著,Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley&Sons, Inc.,New York,2000),Handbook of Experimental Immunology,第四版 (D.M.Weir和C.C.Blackwell编著,Blackwell Science Inc.,1987);以及Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller和M.P.Calos编著,1987)。

[0031] 定义

[0032] 如本文所使用,除非另外指出,否则单数形式“一个/一种(a/an)”和“所述(the)”包括复数个指示物。

[0033] “动物”可以是脊椎动物,如任何常见的实验室模式生物或哺乳动物。哺乳动物包括但不限于:人、农场动物、运动动物、宠物、灵长类动物、小鼠、大鼠、以及其它啮齿类动物。

[0034] 如本文所使用的“氨基酸取代”或“突变”意指指定氨基酸序列中的至少一个氨基酸组分改变或取代为另一个氨基酸,从而在细胞内产生活性或表达水平改变的由所述氨基酸序列编码的蛋白质。

[0035] “嵌合蛋白”是包含一个或多个来源于一种或多种不同蛋白的部分的蛋白。嵌合蛋白可以通过培养转染有编码所述嵌合蛋白的核酸的重组细胞来产生。

[0036] 意欲在本说明书通篇中给出的每个最大数值限制包括每个较低的数值限制,如同所述较低的数值限制被清楚地写在本文中一般。在本说明书通篇中给出的每个最小数值限制将包括每个较高的数值限制,如同所述较高的数值限制被清楚地写在本文中一般。在本说明书通篇中给出的每个数值范围将包括每个落在所述较宽的数值范围之内的较窄的数值范围,如同所述较窄的数值范围都被清楚地写在本文中一般。

[0037] VIC1嵌合蛋白和表达所述VIC1嵌合蛋白的细胞

[0038] 在一些方面中,本文所公开的动物细胞包含嵌合光敏性蛋白(称为“C1V1”),所述嵌合光敏性蛋白是来源于来自强壮团藻的VChR1阳离子通道和来自莱茵衣藻的ChR1阳离子通道。所述蛋白可以由VChR1的氨基酸序列构成,但另外VChR1多肽的至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋可以置换为ChR1的相应第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋。C1V1嵌合视蛋白是从单独不能在神经元中很好地表达并且是有效、红移且稳定的视紫红质通道蛋白的其它视蛋白的片段组装而来。在一些实施方案中,所述动物细胞可以在细胞的质膜上表达第二光活化蛋白。所述第二光活化蛋白可以能够介导细胞质膜响应于光活化发生超极化。能够介导细胞质膜的超极化的光活化蛋白的实例可以例如在国际专利申请号PCT/US2011/028893中找到,所述专利申请的公开内容以引用的方式全部并入本文。

[0039] 本公开内容的实施方案还可以是针对C1V1的修饰或突变型式。这些蛋白可以单独或与多种其它视蛋白组合使用,以确保对神经元进行光学控制。具体来说,联合其它视蛋白使用修饰的C1V1被认为适用于对神经系统障碍进行光学控制。C1V1的具体用途涉及光遗传学系统或方法,所述光遗传学系统或方法使对神经回路的时间、空间和/或细胞类型特异性的控制与可测量的指标关联起来。

[0040] V1C1嵌合蛋白

[0041] 本文提供在动物细胞质膜上表达的光活化嵌合蛋白。在一些方面中,所述光活化蛋白是来源于来自强壮团藻的VChR1和来自莱茵衣藻的ChR1的嵌合蛋白。在一些实施方案中,所述嵌合蛋白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的相应第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述嵌合蛋白包含第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的相应第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列,并且进一步包含置换为ChR1的相应部分的位于第二跨膜螺旋与第三跨膜螺旋之间的细胞内环结构域的至少一部分。在一些实施方案中,在嵌合光活化蛋白的第二跨膜螺旋与第三跨膜螺旋之间的整个细胞内环结构域可以置换为ChR1的相应细胞内环结构域。在其它实施方案中,位于第二跨膜螺旋与第三跨膜螺旋之间的置换为ChR1的相应部分的细胞内环结构域的所述部分可以延伸至SEQ ID NO:1的A145。在其它实施方案中,所述嵌合蛋白包含第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋以及细胞内环结构域置换为ChR1的相应第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋以及细胞内环结构域的VChR1的氨基酸序列,并且进一步包含置换为ChR1的相应部分的第三跨膜螺旋的至少一部分。在另一个实施方案中,置换为ChR1的相应部分的第三跨膜螺旋的所述部分可以延伸至SEQ ID NO:1的W163。在一些实施方案中,所述光活化嵌合蛋白包含ChR1的氨基酸1-145和VChR1的氨基酸102-316。在一些实施方案中,所述光活化嵌合蛋白包含ChR1的氨基酸1-162和VChR1的氨基酸119-316。在一些实施方案中,所述光活化嵌合蛋白可以包含与SEQ ID NO:1中所示的序列在没有信号肽序列的情况下至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述光活化嵌合蛋白可以包含与SEQ ID NO:1中所示的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列。

[0042] 在其它实施方案中,当用光照射细胞时,光活化嵌合蛋白能够介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,所述光可以是绿光。在其它实施方案中,所述光的波长可以在约540nm至约560nm之间。在一些实施方案中,所述光的波长可以为约542nm。在一些实施方案中,当用紫光照射细胞时,嵌合蛋白可能不能介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,当用波长为405nm的光照射细胞时,嵌合蛋白可能不能介导细胞中的去极化电流。

[0043] 在一些实施方案中,蛋白可以进一步包含C末端荧光蛋白。在一些具体的实施方案中,所述C末端荧光蛋白可以是增强型黄色荧光蛋白(EYFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、青色荧光蛋白(CFP)、或红色荧光蛋白(RFP)。在一些实施方案中,通过添加增强蛋白质向细胞质膜的转运的转运信号(ts)来修饰光活化嵌合蛋白。在一些实施方案中,所述转运信号是来源于人向内整流钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述转运信号包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。在一些实施方案中,所述蛋白中的信号肽序列可以置换为不同信号肽序列。

[0044] 在一些实施方案中,动物细胞可以是神经元细胞、肌肉细胞、或干细胞。在一个实施方案中,动物细胞是神经元细胞。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在其它的实施方案中,抑制性神经元可以是小白蛋白神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的抑制性神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的抑制性神经元。

[0045] 在一些实施方案中,动物细胞可以进一步包含在细胞的质膜上表达的第二光活化蛋白。在一些实施方案中,当用光照射细胞时,所述第二光活化蛋白可以能够介导细胞中的超极化电流。在一些实施方案中,所述第二光活化蛋白可以是NpHr、eNpHr2.0、eNpHr3.0、eNpHr3.1或Gtr3。关于其它光活化阳离子通道、阴离子泵、以及质子泵的另外的信息可以在美国专利申请公布号2009/0093403;和国际专利申请号PCT/US2011/028893中找到,所述专利申请的公开内容由此以引用的方式全部并入本文。在一些实施方案中,相对于表达其它光活化阳离子通道蛋白的细胞,所述光活化嵌合蛋白在曝露于光的神经细胞中可以具有增强的光电流。在一些实施方案中,由光活化嵌合蛋白提供的光电流增强可以比表达其它光活化阳离子通道蛋白的细胞大1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、或15倍中的任一者,包括所述倍数在内。

[0046] 本文还提供在动物细胞质膜上表达的一种或多种光活化蛋白,其中所述一种或多种光活化蛋白包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14中所示的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核心氨基酸序列,并且进一步包含转运信号(例如,增强向质膜转运的转运信号)。所述转运信号可以融合至核心氨基酸序列的C末端或可以融合至核心氨基酸序列的N末端。在一些实施方案中,所述转运信号可以通过连接子连接至核心氨基酸序列。所述连接子可以包含5个、10个、20个、30个、40个、50个、75个、100个、125个、150个、175个、200个、225个、250个、275个、300个、400个、或500个氨基酸中的任一长度。所述连接子可以进一步包含荧光蛋白,例如但不限于:增强型黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白、或青色荧光蛋白。在一些实施方案中,所述转运信号可以来源于人向内整流钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述转运信号可以包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。

[0047] V1C1嵌合突变型变异体

[0048] 在一些方面中,本发明包括包含取代的或突变的氨基酸序列的多肽,其中所述突变型多肽保留了前体C1V1嵌合多肽的特征性光可活化性质,但在一些具体方面中也可以具有改变的特性。例如,本文所描述的突变型光活化嵌合蛋白可以展现出在动物细胞内或在动物细胞质膜上的表达水平均增加;当被曝露于不同波长的光(特别是红光)时,响应性改变;和/或性状的组合,其中嵌合C1V1多肽具有以下特性:低脱敏作用、快速去活、低紫光活化以便与其它光活化阳离子通道的交叉活化作用最低,和/或在动物细胞中具有强表达。

[0049] 包含氨基酸取代或突变的光活化嵌合蛋白包括一个或多个氨基酸残基经历过氨基酸取代同时保留对光可响应的能力和控制质膜的极化状态的能力的那些蛋白。例如,可以通过将一个或多个氨基酸取代为对应于SEQ ID NO:1的氨基酸序列来制备包含氨基酸取代或突变的光活化蛋白。在一些实施方案中,本发明包括包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:1中的氨基酸序列相比改变的蛋白质,其中所述改变的光活化嵌合蛋白保留了具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的蛋白的特征性光活化性质和/或调控穿过质膜的离子流的能力,但在一些具体方面中可以具有改变的特性。

[0050] 天然蛋白序列中的氨基酸取代可以是保守性或非保守性的,并且所述取代的氨基酸残基可以是或可以不是由遗传密码编码的氨基酸残基。基于侧链的化学特性,将标准的二十种氨基酸“字母表”分为化学家族。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸:碱性侧链(例

如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及具有芳香族基团的侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。“保守性氨基酸取代”是其中氨基酸残基置换为具有化学上类似的侧链的氨基酸残基(即,使具有碱性侧链的氨基酸置换为具有碱性侧链的另一种氨基酸)。“非保守性氨基酸取代”是其中氨基酸残基置换为具有化学上不同的侧链的氨基酸残基(即,使具有碱性侧链的氨基酸置换为具有芳香族侧链的氨基酸)。氨基酸取代可以是保守性或非保守性的。另外,氨基酸取代可以位于C1V1视黄醛结合袋、一个或多个C1V1细胞内环结构域和/或视黄醛结合袋或细胞内环结构域两者中。

[0051] 相应地,本文提供在嵌合多肽的VChR1部分的整个视黄醛结合袋的关键位置上具有特定氨基酸取代的C1V1嵌合光活化蛋白。在一些实施方案中,所述C1V1蛋白可以在SEQ ID NO:1的氨基酸残基E122上具有突变。在一些实施方案中,所述C1V1蛋白可以在SEQ ID NO:1的氨基酸残基E162上具有突变。在其它实施方案中,所述C1V1蛋白可以在SEQ ID NO:1的氨基酸残基E162和E122两者上具有突变。在一些实施方案中,所公开的突变型C1V1嵌合蛋白各自可以具有可用于使响应于光的动物细胞的膜去极化的具体特性和特征。

[0052] C1V1-E122突变型多肽

[0053] 本文提供在动物细胞质膜上表达的本文所公开的光活化C1V1嵌合蛋白,其中一个或多个氨基酸残基经历过氨基酸取代同时保留了C1V1活性(即,能够催化动物细胞响应于光活化的去极化),并且其中突变可以是在对应于SEQ ID NO:1的E122(C1V1-E122)的谷氨酸残基上。在一些实施方案中,所述C1V1-E122突变型嵌合光活化蛋白包含在氨基酸E122上引入SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的取代,所述取代可以引起嵌合蛋白对光的敏感性增加、对特定波长的光的敏感性增加、和/或相对于在E122上不具有突变的C1V1嵌合光活化蛋白调控细胞质膜的极化状态的能力增加。在一些实施方案中,突变可以是保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,突变可以是非保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,在氨基酸残基E122上的突变可以是突变为苏氨酸(C1V1-E122T)。在其它实施方案中,所述光活化嵌合蛋白可以包含与SEQ ID NO:3中所示的序列在没有信号肽序列的情况下至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述光活化嵌合蛋白可以包含与SEQ ID NO:3中所示的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述C1V1-E122突变型嵌合光活化蛋白可以融合至C末端转运信号。在一些实施方案中,所述转运信号可以通过连接子连接至C1V1-E122突变型嵌合光活化蛋白。所述连接子可以包含5个、10个、20个、30个、40个、50个、75个、100个、125个、150个、175个、200个、225个、250个、275个、300个、400个、或500个氨基酸中的任一长度。所述连接子可以进一步包含荧光蛋白,例如但不限于:增强型黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白、或青色荧光蛋白。在一些实施方案中,所述转运信号可以来源于人向内整流钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述转运信号可以包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。

[0054] 在其它实施方案中,当用光照射细胞时,C1V1-E122嵌合蛋白能够介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,光可以是绿光。在其它实施方案中,光的波长可以在约540nm

至约560nm之间。在一些实施方案中,光的波长可以为约546nm。在其它实施方案中,当用红光照射细胞时,C1V1-E122嵌合蛋白可以介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,红光的波长可以为约630nm。在一些实施方案中,当用紫光照射细胞时,C1V1-E122嵌合蛋白可能不能介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,当用波长为405nm的光照射细胞时,嵌合蛋白可能不能介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,动物细胞可以是神经元细胞、肌肉细胞、或干细胞。在一个实施方案中,动物细胞可以是神经元细胞。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的抑制性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在其它实施方案中,抑制性神经元可以是小白蛋白神经元。在一些实施方案中,动物细胞可以进一步包含在细胞的质膜上表达的第二光活化蛋白。在一些实施方案中,当用光照射细胞时,第二光活化蛋白可以能够介导细胞中的超极化电流。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以是NpHr、eNpHr2.0、eNpHr3.0、eNpHr3.1或GtR3。

[0055] C1V1-E162突变型多肽

[0056] 本文提供在动物细胞质膜上表达的本文所公开的光活化C1V1嵌合蛋白,其中一个或多个氨基酸残基经历过氨基酸取代同时保留C1V1活性(即,能够催化动物细胞响应于光活化的去极化),其中突变可以是在对应于SEQ ID NO:1的E162(C1V1-E162)的谷氨酸残基上。在一些实施方案中,C1V1-E162突变型嵌合光活化蛋白包含在氨基酸E162上引入SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的取代,所述取代可以引起嵌合蛋白对光的敏感性增加、对特定波长的光的敏感性增加、和/或相对于在E162上不具有突变的C1V1嵌合光活化蛋白调控细胞质膜的极化状态的能力增加。在一些实施方案中,突变可以是保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,突变可以是非保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,在氨基酸残基E162上的突变可以是突变为苏氨酸(C1V1-E162T)。在其它实施方案中,光活化嵌合蛋白可以包含与SEQ ID NO:5中所示的序列在没有信号肽的情况下至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列。在其它实施方案中,光活化嵌合蛋白可以包含与SEQ ID NO:5中所示的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列。在其它实施方案中,C1V1-E162突变型嵌合光活化蛋白可以融合至C末端转运信号上。在一些实施方案中,转运信号可以通过连接子连接至C1V1-E162突变型嵌合光活化蛋白。连接子可以包含5个、10个、20个、30个、40个、50个、75个、100个、125个、150个、175个、200个、225个、250个、275个、300个、400个、或500个氨基酸中的任一长度。连接子可以进一步包含荧光蛋白,例如但不限于:增强型黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白、或青色荧光蛋白。在一些实施方案中,转运信号可以来源于人内向整流钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在一些实施方案中,转运信号可以包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。

[0057] 在其它实施方案中,当用光照射细胞时,C1V1-E162嵌合蛋白能够介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,光可以是绿光。在其它实施方案中,光的波长可以在约540nm至约535nm之间。在一些实施方案中,光的波长可以为约542nm。在其它实施方案中,光的波长可以为约530nm。在一些实施方案中,当用紫光照射细胞时,C1V1-E162嵌合蛋白可能不能介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,当用波长为405nm的光照射细胞时,嵌合蛋

白可能不能介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,C1V1-E162嵌合蛋白可以进一步包含C末端荧光蛋白。在一些实施方案中,动物细胞可以是神经元细胞、肌肉细胞、或干细胞。在一个实施方案中,动物细胞可以是神经元细胞。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的抑制性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在其它实施方案中,抑制性神经元可以是小白蛋白神经元。在一些实施方案中,动物细胞可以进一步包含在细胞的质膜上表达的第二光活化蛋白。在一些实施方案中,当用光照射细胞时,第二光活化蛋白可以能够介导细胞中的超极化电流。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以是NpHr、eNpHr2.0、eNpHr3.0、eNpHr3.1或GtR3。在一些实施方案中,相对于缺乏E162上的突变的C1V1蛋白或相对于其它光活化阳离子通道蛋白,C1V1-E162光活化嵌合蛋白可以具有加速的光循环。在一些实施方案中,C1V1-E162光活化嵌合蛋白可以具有比缺乏E162上的突变的C1V1蛋白或相对于其它光活化阳离子通道蛋白快多于1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、或5倍的光循环,包括所述倍数在内。

[0058] C1V1-E122/E162双重突变型多肽

[0059] 本文提供在动物细胞质膜上表达的本文所公开的光活化C1V1嵌合蛋白,其中一个或多个氨基酸残基经历过氨基酸取代同时保留C1V1活性(即,能够催化动物细胞响应于光活化的去极化),其中突变可以是在对应于SEQ ID NO:1的E122和E162(C1V1-E122/E162)的谷氨酸残基上。在一些实施方案中,C1V1-E122/E162突变型嵌合光活化蛋白可以包含在氨基酸E122和E162上引入SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的取代,所述取代可以引起嵌合蛋白对光的敏感性增加、对特定波长的光的敏感性增加、和/或相对于不具有E122和E162上的突变的C1V1嵌合光活化蛋白调控细胞质膜的极化状态的能力增加。在一些实施方案中,突变可以是保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,突变可以是非保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,突变可以是保守性和非保守性的氨基酸取代两者。在一些实施方案中,在氨基酸残基E122和E162上的突变均可以是突变为苏氨酸(C1V1-E122T/E162T)。在其它实施方案中,光活化嵌合蛋白可以包含与SEQ ID NO:7中所示的序列在没有信号肽序列的情况下至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列。在其它实施方案中,光活化嵌合蛋白可以包含与SEQ ID NO:7中所示的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列。在其它实施方案中,C1V1-E122/E162突变型嵌合光活化蛋白可以融合C末端转运信号上。在一些实施方案中,转运信号可以通过连接子连接至C1V1-E122/E162突变型嵌合光活化蛋白。连接子可以包含5个、10个、20个、30个、40个、50个、75个、100个、125个、150个、175个、200个、225个、250个、275个、300个、400个、或500个氨基酸中的任一长度。连接子可以进一步包含荧光蛋白,例如但不限于:增强型黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白、或青色荧光蛋白。在一些实施方案中,转运信号可以来源于人向内整流钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在一些实施方案中,转运信号可以包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。

[0060] 在其它实施方案中,当用光照射细胞时,C1V1-E122/E162嵌合蛋白能够介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,光可以是绿光。在其它实施方案中,光的波长可以在约540nm至约560nm之间。在一些实施方案中,光的波长可以为约546nm。在一些实施方案中,

当用紫光照射细胞时,C1V1-E122/E162嵌合蛋白可能不能介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,当用波长为405nm的光照射细胞时,嵌合蛋白可能不能介导细胞中的去极化电流。在一些实施方案中,相对于缺乏E122/E162上的突变的C1V1蛋白或相对于其它光活化阳离子通道蛋白,当被曝露于紫光时C1V1-E122/E162嵌合蛋白可以展现出较低程度的活化。在一些实施方案中,动物细胞可以是神经元细胞、肌肉细胞、或干细胞。在一个实施方案中,动物细胞可以是神经元细胞。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的抑制性神经元。在其它实施方案中,抑制性神经元可以是小白蛋白神经元。在一些实施方案中,动物细胞可以进一步包含在细胞的质膜上表达的第二光活化蛋白。在一些实施方案中,当用光照射细胞时,第二光活化蛋白可以能够介导细胞中的超极化电流。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以是NpHr、eNpHr2.0、eNpHr3.0、eNpHr3.1或GtR3。在一些实施方案中,相对于缺乏E122/E162上的突变的C1V1蛋白或相对于其它光活化阳离子通道蛋白,C1V1-E122/E162突变型光活化嵌合蛋白可以具有减少的钝化。在一些实施方案中,与缺乏E122/E162上的突变的C1V1蛋白相比或相对于其它光活化阳离子通道蛋白,C1V1-E122/E162突变型光活化嵌合蛋白可以钝化约15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、或30%中的任一者,包括所述数据在内。在一些实施方案中,C1V1-E122/E162光活化嵌合蛋白可以具有比缺乏E122/E162上的突变的C1V1蛋白或相对于其它光活化阳离子通道蛋白快多于1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、或10倍的光循环,包括所述倍数在内。

[0061] 增强型细胞内转运氨基酸基序

[0062] 本公开内容提供通过添加一个或多个增强向哺乳动物细胞的质膜的转运的氨基酸序列基序而对细胞中表达的光活化嵌合蛋白进行修饰。具有来源于进化上较低等生物的组分的光活化嵌合蛋白可能不能由哺乳动物细胞表达或耐受,或当在哺乳动物细胞中高水平表达时可能展现出亚细胞定位障碍。因此,在一些实施方案中,在细胞中表达的嵌合光活化蛋白质融合至一个或多个氨基酸序列基序,所述氨基酸序列基序选自由以下组成的组:信号肽、内质网(ER)输出信号、膜转运信号、以及N末端高尔基(golgi)输出信号。增强光活化嵌合蛋白向哺乳动物细胞的质膜的转运的一个或多个氨基酸序列基序可以融合至光活化蛋白的N末端、C末端、或N末端和C末端两者。任选地,光活化蛋白和一个或多个氨基酸序列基序可以由连接子分开。在一些实施方案中,通过添加增强蛋白质向细胞质膜的转运的转运信号(ts)来修饰光活化嵌合蛋白。在一些实施方案中,转运信号来源于人向内整流钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在一些实施方案中,转运信号包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。可以增强光活化蛋白向细胞的质膜转运的另外的蛋白质基序描述于美国专利申请号12/041,628中,所述专利申请以引用的方式全部并入本文。在一些实施方案中,嵌合蛋白中的信号肽序列被缺失或取代为来自不同蛋白质的信号肽序列。

[0063] 动物细胞、非人动物、以及脑切片

[0064] 本文提供包含本文所公开的光活化嵌合蛋白的细胞。在一些实施方案中,细胞是动物细胞。在一些实施方案中,动物细胞包含对应于SEQ ID NO:1的C1V1蛋白。在其它实施方案中,动物细胞包含对应于SEQ ID NO:3的突变型C1V1-E122T蛋白。在其它实施方案中,

动物细胞包含对应于SEQ ID NO:5的突变型C1V1-E162T蛋白。在其它实施方案中,动物细胞包含对应于SEQ ID NO:7的突变型C1V1-E122T/E162T蛋白。在一些实施方案中,动物细胞可以是神经元细胞、肌肉细胞、或干细胞。在一个实施方案中,动物细胞可以是神经元细胞。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的抑制性神经元。在其它实施方案中,抑制性神经元可以是小白蛋白神经元。

[0065] 本文还提供包含在动物的细胞的细胞膜上表达的本文所公开的光活化嵌合蛋白的非人动物。在一些实施方案中,动物细胞包含对应于SEQ ID NO:1的C1V1蛋白。在其它实施方案中,动物细胞包含对应于SEQ ID NO:3的突变型C1V1-E122T蛋白。在其它实施方案中,动物细胞包含对应于SEQ ID NO:5的突变型C1V1-E162T蛋白。在其它实施方案中,动物细胞包含对应于SEQ ID NO:7的突变型C1V1-E122T/E162T蛋白。在一些实施方案中,包含本文所描述的光活化嵌合蛋白的动物是以转基因方式表达所述光活化嵌合蛋白。在其它实施方案中,包含本文所描述的光活化嵌合蛋白的动物已通过病毒用携带光活化蛋白的载体(如,但不限于腺病毒载体)进行了转染。

[0066] 本文提供来自非人动物的活脑切片,所述活脑切片包含在这些切片中的细胞的细胞膜上表达的本文所描述的光活化嵌合蛋白。在一些实施方案中,脑切片是来自以转基因方式表达本文所描述的光活化嵌合蛋白的非人动物。在其它实施方案中,脑切片是来自已通过病毒用携带所述光活化蛋白的载体(如,但不限于腺病毒载体)转染的非人动物。在一些实施方案中,脑切片是冠状脑切片。在一些实施方案中,脑切片具有约100 μ m、约150 μ m、约200 μ m、约250 μ m、约300 μ m、约350 μ m、约400 μ m、约450 μ m、或约500 μ m中的任一厚度,包括所述在内,包括在这些数值之间的任何厚度。

[0067] 分离的多核苷酸

[0068] 本文提供分离的C1V1多核苷酸,所述分离的C1V1多核苷酸编码本文所描述的例如具有C1V1多肽的至少一种活性的任何嵌合多肽。本公开内容提供分离的、合成的、或重组的多核苷酸,所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的核酸在至少约10个,例如至少约15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、75个、100个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、550个、600个、650个、700个、750个、800个、850个、900个、950个、或1000个核苷酸的区域上具有至少约70%,例如至少约71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%或完全(100%)序列同一性的核酸序列。

[0069] 本公开内容特别提供编码C1V1和/或其突变型变异体的核酸。例如,本公开内容提供分离的核酸分子,其中所述核酸分子编码:(1)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的多肽;(2)包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的多肽;(3)包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的多肽;或(4)包含与SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列具有

至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0070] 启动子和载体

[0071] 本公开内容还提供包含上述核酸的表达序列盒和/或载体。适合的是,编码本公开内容的嵌合蛋白的核酸可操作地连接至启动子。启动子是本领域众所周知的。在宿主细胞中起作用的任何启动子都可以用于表达本公开内容的C1V1和/或其任何变异体。有大量适用于驱动C1V1嵌合蛋白或其变异体在特定动物细胞中表达的启动子并且是本领域的技术人员所熟悉的。可以使用几乎任何能够驱动这些核酸的启动子。

[0072] 具体来说,在希望在兴奋性神经细胞中重组表达C1V1嵌合蛋白的情况下,可以使用人钙调素依赖性蛋白激酶II α (CaMKII α) 启动子。在其它实施方案中,可以将延长因子1a (EF-1a) 启动子与Cre诱导性重组AAV载体联合用于小白蛋白-Cre转基因小鼠来使表达C1V1嵌合蛋白靶向抑制性神经元。

[0073] 本文还提供包含编码C1V1嵌合多肽或其任何变异体的本文所公开的多核苷酸的载体。可以根据本发明施用的载体还包括包含编码当从载体的多核苷酸中转录时将引起光活化嵌合蛋白在靶动物细胞的质膜上积聚的RNA (例如, RNAi、核酶、miRNA、siRNA) 的多核苷酸的载体。可以使用的载体包括,但不限于:慢病毒载体、HSV载体、以及腺病毒载体。慢病毒包括但不限于:HIV-1、HIV-2、SIV、FIV以及EIAV。慢病毒可以是具有其它病毒的包膜蛋白的假型病毒,所述其它病毒包括但不限于:VSV、狂犬病病毒、Mo-MLV、杆状病毒以及埃博拉病毒(Ebola)。可以使用本领域中的标准方法来制备此类载体。

[0074] 在一些实施方案中,载体是重组AAV载体。AAV载体尺寸相对较小的DNA病毒,所述DNA病毒可以稳定和位点特异性的方式整合至它们感染的细胞的基因组中。所述AAV载体能够感染一系列细胞而不会诱导对细胞生长、形态学或分化的任何影响,并且它们似乎不参与人病理学。AAV基因组已进行了克隆、测序和表征。所述AAV基因组涵盖约4700个碱基并且在每个末端包含具有约145个碱基的反向末端重复(ITR)区,其用作病毒的复制起点。基因组的其余部分分为承载衣壳化功能的两个必需区域:基因组的左边部分,所述左边部分包含参与病毒基因的病毒复制和表达的rep基因;和基因组的右边部分,所述右边部分包含编码病毒的衣壳蛋白的cap基因。

[0075] AAV作为基因疗法的载体的应用已在近年来得到快速发展。野生型AAV可以用相对高的滴度感染分裂的或未分裂的细胞、或哺乳动物(包括人)的组织,并且还可以整合至人细胞中的特定位点(在染色体19的长臂上) (Kotin, R.M.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2211-2215, 1990) (Samulski, R. J等, EMBO J. 10: 3941-3950, 1991, 所述参考文献的公开内容由此以引用的方式全部并入本文)。没有rep和cap基因的AAV载体失去位点特异性整合的特异性,但仍然可以介导外源基因的长期稳定表达。AAV载体以两种形式存在于细胞中,其中一种是染色体外的游离基因;另一种被整合至染色体中,其中前者作为主要的形式。此外,迄今为止尚未发现AAV与任何人疾病相关,也没有观察到整合引起生物学特征发生任何变化。在文献中报道了十六种血清型AAV,分别命名为AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、以及AAV16,其中AAV5是最初从人中分离出来的(Bantel-Schaal和H. zur Hausen. 1984. Virology 134: 52-63),而AAV1-4和AAV6均是在腺病毒的研究中发现的(Ursula Bantel-Schaal, Hajo Delius以及Harald

zur Hausen.J.Virol.1999,73:939-947)。

[0076] 可以使用本领域中的标准方法来制备AAV载体。任何血清型的腺相关病毒都是适合的(参见,例如Blacklow,“Parvoviruses and Human Disease”J.R.Pattison编著(1988)的第165-174页;Rose,Comprehensive Virology 3:1,1974;P.Tattersall“The Evolution of Parvovirus Taxonomy”于Parvoviruses(JR Kerr,SF Cotmore.ME Bloom,RM Linden,CR Parrish编著)第5-14页,Hudder Arnold,London,UK(2006);以及DE Bowles,JE Rabinowitz,RJ Samulski“The Genus Dependovirus”(JR Kerr,SF Cotmore.ME Bloom,RM Linden,CR Parrish编著)第15-23页,Hudder Arnold,London,UK(2006),所述参考文献的公开内容由此以引用的方式全部并入本文)。用于纯化载体的方法可以见于例如美国专利号6566118、6989264和6995006以及名称为“Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors”的W0/1999/011764,所述专利文献的公开内容以引用的方式全部并入本文。杂交载体的制备描述于例如PCT申请号PCT/US2005/027091中,所述申请的公开内容以引用的方式全部并入本文。使用来源于AAV的载体用于在活体外和活体内转移基因已有描述(参见例如,国际专利申请公布号91/18088和W0 93/09239;美国专利号4,797,368、6,596,535和5,139,941,全部所述专利文献均以引用的方式全部并入本文)。这些公布描述了rep和/或cap基因被缺失并且置换为相关基因的各种AAV来源的构建体;以及使用这些构建体用于在活体外(转移至培养细胞中)或活体内(直接转移至生物体中)转移相关基因。根据本发明的复制缺陷型重组AAV可以通过将含有侧接有两个AAV反向末端重复(ITR)区的相关核酸序列的质粒和带有AAV衣壳化基因(rep和cap基因)的质粒共转染至用人辅助病毒(例如腺病毒)感染的细胞系中来制备。然后,通过标准的技术来纯化所产生的AAV重组体。

[0077] 在一些实施方案中,使供本发明方法使用的载体衣壳化成病毒粒子(例如AAV病毒粒子,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、以及AAV16)。因此,本发明包括包含本文所描述的任何载体的重组病毒粒子(重组是因为它包含重组多核苷酸)。产生所述粒子的方法在本领域中是已知的,并且描述于美国专利号6,596,535中。

[0078] 关于本文所描述的动物细胞,应理解可以对神经细胞、心脏细胞、或干细胞施用一种或多种载体。如果使用多于一种载体,应理解它们可以同时或在不同的时间里施用至动物细胞。

[0079] 本发明的方法

[0080] 本文提供用于通过在存在于相同微回路中的兴奋性或抑制性神经元中表达本文所描述的光活化嵌合蛋白而选择性地使那些神经元去极化的方法。在一些实施方案中,第一光活化蛋白(如本文所公开的那些)可以在兴奋性神经元中表达,而第二光活化蛋白可以在抑制性神经元中表达。在一些实施方案中,在兴奋性神经元中表达的第一光活化蛋白可以由不同于在抑制性神经元中表达的第二光活化蛋白的波长的光活化。在一些实施方案中,第一光活化蛋白和第二光活化蛋白可以在活的非人动物或在来自非人动物的活脑切片中表达。

[0081] 在其它实施方案中,提供用于鉴别选择性地抑制通过在存在于相同神经回路的兴奋性或抑制性神经元中表达本文所描述的光活化嵌合蛋白而引起的那些神经元的去极化

的化合物的方法。在一些实施方案中,第一光活化蛋白可以在兴奋性神经元中表达,而第二光活化蛋白可以在抑制性神经元中表达。在一些实施方案中,在兴奋性神经元中表达的第一光活化蛋白可以由不同于在抑制性神经元中表达的第二光活化蛋白的波长的光活化。在一些实施方案中,第一光活化蛋白和第二光活化蛋白可以在活的非人动物或在来自非人动物的活脑切片中表达。

[0082] 用于选择性地改变存在于相同微回路中的神经元中的E/I平衡的方法

[0083] 在一些方面中,提供用于选择性地使存在于相同微回路中的兴奋性或抑制性神经元去极化的方法,所述方法包括:选择性地使包含第一光活化蛋白的兴奋性神经元去极化,其中所述第一光活化蛋白当被曝露于具有第一波长的光时被去极化;或选择性地使包含第二光活化蛋白的抑制性神经元去极化,其中所述第二光活化蛋白当被曝露于具有第二波长的光时被去极化。在一些实施方案中,第一光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在其它实施方案中,第一光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第一光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。关于其它光活化阳离子通道的公开内容的更多信息可见于美国专利申请公布号2007/0054319;美国专利申请号61/410,704;以及国际专利申请公布号W0 2010/056970中,所述专利文献各自的公开内容由此以引用的方式全部并入。

[0084] 在其它方面中,提供用于选择性地使存在于相同微回路中的兴奋性或抑制性神经元去极化的方法,所述方法包括:在兴奋性神经元中表达第一光活化蛋白;并且在抑制性神经元中表达第二光活化蛋白,其中第一光活化蛋白当被曝露于具有第一波长的光时,被独立地去极化,并且其中第二光活化蛋白当被曝露于具有第二波长的光时,被独立地去极化。在一些实施方案中,第一光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在其它实施方案中,第一光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第一光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。

[0085] 在一些实施方案中,可以通过绿光来活化第一光活化蛋白。在一个实施方案中,可以通过波长为约560nm的光来活化第一光活化蛋白。在一个实施方案中,可以通过红光来活化第一光活化蛋白。在另一个实施方案中,可以通过波长为约630nm的光来活化第一光活化蛋白。在其它实施方案中,可以通过紫光来活化第二光活化蛋白。在一个实施方案中,可以通过波长为约405nm的光来活化第二光活化蛋白。在其它实施方案中,可以通过绿光来活化第二光活化蛋白。在一些实施方案中,通过光脉冲来活化光活化蛋白,所述光脉冲可以具有约1毫秒(ms)、约2ms、约3ms、约4ms、约5ms、约6ms、约7ms、约8ms、约9ms、约10ms、约15ms、约20ms、约25ms、约30ms、约35ms、约40ms、约45ms、约50ms、约60ms、约70ms、约80ms、约90ms、约100ms、约200ms、约300ms、约400ms、约500ms、约600ms、约700ms、约800ms、约900ms、约1秒、约1.25秒、约1.5秒、或约2秒中的任一持续时间,包括所述数值在内,包括在这些数值之间的任何时间。在一些实施方案中,通过光脉冲来活化光活化蛋白,所述光脉冲的光功率密度可以为约 0.05mW mm^{-2} 、约 0.1mW mm^{-2} 、约 0.25mW mm^{-2} 、约 0.5mW mm^{-2} 、约 0.75mW mm^{-2} 、约 1mW mm^{-2} 、约 2mW mm^{-2} 、约 3mW mm^{-2} 、约 4mW mm^{-2} 、约 5mW mm^{-2} 、约 6mW mm^{-2} 、约 7mW mm^{-2} 、约 8mW mm^{-2} 、约 9mW mm^{-2} 、约 10mW mm^{-2} 、约 11mW mm^{-2} 、约 12mW mm^{-2} 、约 13mW mm^{-2} 、约 14mW mm^{-2} 、约 15mW mm^{-2} 、约 16mW mm^{-2} 、约 17mW mm^{-2} 、约 18mW mm^{-2} 、约 19mW mm^{-2} 、约 20mW mm^{-2} 、约 21mW mm^{-2} 、约 22mW mm^{-2} 、约 23mW mm^{-2} 、约 24mW mm^{-2} 、或约 25mW mm^{-2} 中的任一者,包括所述数值在内,包括这些数值之间的任何值。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的抑制性神经元。在其它实施方案中,抑制性神经元可以是小白蛋白神经元。在一些实施方案中,抑制性和兴奋性神经元可以是在活的非人动物中。在其它实施方案中,抑制性和兴奋性神经元可以是在来自非人动物的脑切片中。

[0086] 用于鉴别选择性地改变存在于相同微回路中的神经元中的E/I平衡的化合物的方法

[0087] 在一些方面中,提供用于鉴别选择性地抑制存在于相同微回路中的兴奋性或抑制性神经元的去极化的化合物的方法,所述方法包括:(a)用具有第一波长的光选择性地使包含第一光活化蛋白的兴奋性神经元去极化,或用具有第二波长的光选择性地使包含第二光活化蛋白的抑制性神经元去极化;(b)测量响应于选择性地使包含第一光活化蛋白的兴奋性神经元去极化的兴奋性突触后电位(EPSP)或测量响应于选择性地使包含第二光活化蛋白的抑制性神经元去极化的抑制性突触后电流(IPSC);(c)使兴奋性神经元或抑制性神经元与化合物接触;(d)测量兴奋性突触后电位(EPSP)或测量抑制性突触后电流(IPSC)以确定使兴奋性神经元或抑制性神经元与化合物接触是否选择性地抑制任一神经元的去极化。在一些实施方案中,第一光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在其它实

施方案中,第一光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第一光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些方面中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以包含与SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的蛋白。在一些实施方案中,化合物可以是组合化学文库中的成员。在其它实施方案中,所述方法进一步包括测定化合物以确定它是否不利地影响心脏组织的功能或哺乳动物的心脏动作电位。

[0088] 在一些实施方案中,可以通过绿光来活化第一光活化蛋白。在一个实施方案中,可以通过波长为约560nm的光来活化第一光活化蛋白。在一个实施方案中,可以通过红光来活化第一光活化蛋白。在另一个实施方案中,可以通过波长为约630nm的光来活化第一光活化蛋白。在其它实施方案中,可以通过紫光来活化第二光活化蛋白。在一个实施方案中,可以通过波长为约405nm的光来活化第二光活化蛋白。在一些实施方案中,可以通过光脉冲来活化光活化蛋白,所述光脉冲可以具有约1毫秒(ms)、约2ms、约3ms、约4ms、约5ms、约6ms、约7ms、约8ms、约9ms、约10ms、约15ms、约20ms、约25ms、约30ms、约35ms、约40ms、约45ms、约50ms、约60ms、约70ms、约80ms、约90ms、约100ms、约200ms、约300ms、约400ms、约500ms、约600ms、约700ms、约800ms、约900ms、约1秒、约1.25秒、约1.5秒、或约2秒中的任一持续时间,包括所述数值在内,包括在这些数值之间的任何时间。在一些实施方案中,可以通过光脉冲来活化光活化蛋白,所述光脉冲的光功率密度可以为约 0.05mW mm^{-2} 、约 0.1mW mm^{-2} 、约 0.25mW mm^{-2} 、约 0.5mW mm^{-2} 、约 0.75mW mm^{-2} 、约 1mW mm^{-2} 、约 2mW mm^{-2} 、约 3mW mm^{-2} 、约 4mW mm^{-2} 、约 5mW mm^{-2} 、约 6mW mm^{-2} 、约 7mW mm^{-2} 、约 8mW mm^{-2} 、约 9mW mm^{-2} 、约 10mW mm^{-2} 、约 11mW mm^{-2} 、约 12mW mm^{-2} 、约 13mW mm^{-2} 、约 14mW mm^{-2} 、约 mW mm^{-2} 、约 16mW mm^{-2} 、约 17mW mm^{-2} 、约 18mW mm^{-2} 、约 19mW mm^{-2} 、约 20mW mm^{-2} 、约 21mW mm^{-2} 、约 22mW mm^{-2} 、约 23mW mm^{-2} 、约 24mW mm^{-2} 、或约 25mW mm^{-2} 中的任一者,包括所述数值在内,包括这些数值之间的任何值。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的抑制性神经元。在其它实施方案中,抑制性神经元可以是小白蛋白神经元。在一些实施方案中,抑制性和兴奋性神经元可以是在活的非人动物中。在其它实施方案中,抑制性和兴奋性神经元可以是在来自非人动物的脑切片中。

[0089] 示例性实施方案

[0090] 本公开内容涉及光活化嵌合体视蛋白,所述光活化嵌合体视蛋白当在膜表达时改变膜电压。虽然本公开内容不必限制于这些背景,但可以通过使用这些背景和其它背景对实施例进行讨论来理解本公开内容的不同方面。

[0091] 本公开内容的不同实施方案涉及经过修饰以供在细胞膜(包括哺乳动物细胞)中表达的光活化视蛋白。所述视蛋白来源于两种不同的视蛋白(团藻视紫红质通道蛋白(VChR1)和莱茵衣藻视紫红质通道蛋白(ChR1))的组合。所述视蛋白可以适用于以高于它来源的任一个别视蛋白的速率水平表达。

[0092] 在某些更具体的实施方案中,ChR1/VChR1嵌合体(C1V1)的遗传序列主要是VChR1。VChR1序列中与转运相关的部分置换为来自ChR1的同源序列。

[0093] 不同实施方案涉及针对添加转运信号以促进在哺乳动物细胞中的表达的修饰。

[0094] 本公开内容的某些方面针对C1V1的进一步修饰型式。例如,某些实施方案包括C1V1的突变E162T,实验表明所述突变E162T提供了加速的光循环(例如,几乎3倍)。

[0095] 本公开内容的不同实施方案涉及使对神经回路的时间、空间和/或细胞类型特异性控制与可测量的指标相关的光遗传学系统或方法。光遗传学系统使用多种视蛋白(包括C1V1和/或C1V1变异体)来确保对神经回路的多个部分进行控制。例如,不同的指标或症状可能与神经病症相关。光遗传学系统靶向患者体内的神经回路用于对其进行选择性控制。光遗传学系统涉及对患者的与神经病症相关的指标或症状进行监测。以此方式,光遗传学系统可以提供关于神经回路、其功能和/或神经病症的详细信息。

[0096] 与本文所讨论的实施方案一致,特定实施方案涉及使用多种视蛋白来研究和探测病症。其它实施方案涉及对表型和内在表型的鉴别和/或研究。其它实施方案涉及治疗靶标的鉴别。

[0097] 本公开内容的方面针对在快速时间尺度上人工诱导病症/疾病病况。基于关于加速的光循环的特征,使用视蛋白(如C1V1)可能特别有用。此外,某些实施方案允许用于可逆的疾病病况,这可以特别适用于建立用于测试和/或用于测试治疗对展现出疾病病况时和没有展现出疾病病况时的相同动物的作用的基线/控制点。使用视蛋白(如C1V1)允许使用光源对细胞进行控制。C1V1对光有反应,从而引起细胞的膜电位变化。去除光并且随后停止活化C1V1允许细胞返回至它的基线状态。存在各种其它的可能性,本文更详细地讨论了一些所述可能性。

[0098] 本公开内容的不同方面针对C1V1视蛋白的E122T突变。在本公开内容的某些实施方案中,相对于未突变的视蛋白,E122T突变使C1V1或其变异体的最大吸收移向红光光谱。

[0099] 本公开内容的不同实施方案涉及经过修饰以供在哺乳动物细胞中表达并且相对于ChR2,绿光光谱中的最大吸收得到迁移的视蛋白。C1V1视蛋白来源于视蛋白的组合,并且以高于它来源的任一视蛋白的速率表达。视蛋白C1V1来源于团藻视紫红质通道蛋白(VChR1)和莱茵衣藻视紫红质通道蛋白(ChR1)。所得到的视蛋白C1V1以及其变异体在530nm与546nm之间的波长下具有最大吸收。

[0100] 本公开内容的某些方面针对C1V1的进一步修饰型式。例如,某些实施方案包括突变E122T,所述突变E122T使C1V1的最大吸收移向红光光谱。其它修饰可以包括另一突变E162T,实验表明除了由E122T突变提供红移之外,所述另一突变E162T提供了加速的光循环。

[0101] 在一些实施方案中,提供来源于VChR1并且转运序列置换为来自ChR1的同源序列的跨膜蛋白。在一些实施方案中,分子进一步包括突变E122T。在其它实施方案中,分子进一步包括E162T和E122T上的突变。在某些实施方案中,分子响应于绿光而活化离子通道。在一

个实施方案中,分子的最大光吸收为约546nm。在另一个实施方案中,分子的最大光吸收为约535nm。

[0102] 在一些实施方案中,提供一种动物细胞,所述动物细胞包含:表达对红光可响应的离子通道的整合外源分子;来源于VChR1并且包括其置换为来自ChR1的同源序列的跨膜转运序列的外源分子。在一些实施方案中,外源分子进一步包括E122T。在其它实施方案中,响应于分别具有405nm和560nm波长的光,细胞的神经放电比率为约14%至94%。在其它实施方案中,分别响应于具有405nm和560nm波长的光,细胞的神经放电比率为约11%至72%。

[0103] 本公开内容的其它示例实施方案涉及使用杂交ChR1/VChR1嵌合体,所述杂交ChR1/VChR1嵌合体完全不包含ChR2序列,来源于不能单独良好表达的两种视蛋白基因并且在本文中称为C1V1。本公开内容的实施方案还涉及通过添加来源于Kir2.1通道的膜转运信号而改进VChR1的膜靶向。与ChR2相比,由表达VChR1-EYFP的培养神经元得到的共焦图像揭示细胞内蛋白的比例较大;因此,使用来源于Kir2.1通道的膜转运信号(ts)来改进VChR1的膜靶向。与VChR1-EYFP相比,这种VChR1-ts-EYFP的膜靶向稍微有所增强;然而,从表达VChR1-ts-EYFP的培养海马神经元中记录到的平均光电流仅稍微大于VChR1-EYFP的平均光电流。因此,本公开内容的实施方案涉及通过将螺旋更换为来自其它ChR的相应螺旋而修饰的VChR1。例如,在螺旋1和螺旋2置换为来自ChR1的同源区段的两个嵌合体中发现了稳定的改进。发现无论剪接位点是在螺旋2与螺旋3之间的细胞内环中(在ChR1残基Ala145上)或是在螺旋3内(在ChR1残基Trp163上),所得到的嵌合体均稳定地表达并且显示出类似增强的光电流和光谱特性。这种结果是出人意料的,因为ChR1仅具有弱表达并且不容易整合至大多数哺乳动物宿主细胞的膜中。

[0104] 本公开内容的特定方面涉及适合于神经科学的微生物视蛋白基因,从而允许在完整哺乳动物脑内的特定细胞类型中使光脉冲列转变为毫秒时间尺度的膜电位变化(例如,视紫红质通道蛋白(ChR2)、团藻视紫红质通道蛋白(VChR1)以及盐细菌视紫红质(NpHR))。ChR2是来源于单细胞绿藻莱茵衣藻的视紫红质。本文所使用的术语“视紫红质”是包含至少两个构建嵌段(即视蛋白和共价结合的辅因子,通常是维生素A醛(视黄醛))的蛋白质。视紫红质ChR2来源于衣藻基因组中的视蛋白通道视蛋白-2(Chop2),最初命名为衣藻视蛋白-4(Cop4)。一种去极化视紫红质通道蛋白(ChR2)的时间特性包括活化和去活的快速动力学,从而给予精确定时的动作电位列的产生。针对寻求长时间尺度活化的应用,发现可以使视紫红质通道蛋白的通常快速的解离动力学变慢。例如,视紫红质通道蛋白的某些实施例应用1mW/mm²的光持续希望去极化的几乎全部时间,这可能不太合乎需要。

[0105] 本文的大多数讨论是针对ChR2。除非另外指明,否则本公开内容包括许多类似的变异体。实例包括但不限于:Chop2、ChR2-310、Chop2-310、以及团藻视紫红质通道蛋白(VChR1)。为了对VChR1进一步详细说明,可以参考“Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*,”*Nat Neurosci.* 2008年6月,11(6):631-3. Epub 2008年4月23日,所述参考文献的公开内容以引用的方式全部完全地并入本文。在其它实施例中,可以对其它视蛋白分子进行类似的修饰。例如,可以对ChR2或VChR1变异体进行修饰/突变。此外,修饰的变异体可以与光活化离子泵组合使用。

[0106] 本公开内容的实施方案包括天然存在的序列的相对次要氨基酸变异体。在一个例

子中,变异体与天然存在的序列的蛋白质序列的同源性大于约75%。在其它变异体中,同源性大于约80%。其它的变异体具有大于约85%、大于90%、或甚至高达约93%至约95%或约98%的同源性。在此上下文中的同源性意指序列相似性或同一性,其中同一性是优选的。可以使用序列分析中已知的标准技术来确定这种同源性。本公开内容的实施方案的组合物包括本文所提供的蛋白质和核酸序列,包括与所提供的序列的同源性高于约50%、与所提供的序列的同源性高于约55%、与所提供的序列的同源性高于约60%、与所提供的序列的同源性高于约65%、与所提供的序列的同源性高于约70%、与所提供的序列的同源性高于约75%、与所提供的序列的同源性高于约80%、与所提供的序列的同源性高于约85%、与所提供的序列的同源性高于约90%、或与所提供的序列的同源性高于约95%的变异体。

[0107] 如本文所使用,“刺激靶细胞”通常被用来描述对细胞的特性进行修饰。例如,靶细胞的刺激物可以造成细胞膜特性的变化,这可以引起靶细胞的去极化或极化。在一个具体的例子中,靶细胞是神经元,并且刺激物通过促进或抑制神经元的脉冲(动作电位)的产生来影响脉冲的传递。

[0108] 关于对光活化视蛋白的进一步详细描述,可以参考Deisseroth等,名称为“Optically-Based Stimulation of Target Cells and Modifications Thereto,”的PCT公布号WO 2010/056970,所述专利文献以引用的方式全部完全地并入本文。

实施例

[0109] 实施例1:嵌合视紫红质通道蛋白变异体C1V1的开发

[0110] 在本实施例中,寻求将容许在皮质切片中以及在活动物实验中活体内驱动皮质E/I升高和监测 γ 振荡的工具,其中具有三个关键特性:1) 实现剂量-响应研究的效力高得多; 2) 低脱敏作用,以允许E/I平衡的阶梯状变化;以及3) 红移激发,以允许类似地驱动相同制剂中的不同的群。

[0111] 这些实验最初尝试使用VChR1,所述VChR1显示红移和降低的脱敏作用¹⁴,但先前研究表明表达VChR1的细胞中的光电流较小(-100 – 150 pA¹⁴),并且不能在下游细胞(未示出)中引发稳定的突触活性。实际上,当首先尝试在细胞中表达VChR1时,仅观察到小的光电流(图1A),这与先前的发现一致。与VChR1-EYFP相比,添加来源于Kir2.1通道的膜转运信号以便产生VChR1-is-EYFP仅实现了不高的光电流增强的趋向(图1B)。然而,要注意在ChR2中,来自ChR1的同源区域置换跨膜区段增强了膜靶向并且增强了光电流,假设在VChR1的螺旋与来自其它ChR的相应螺旋之间的类似系统性交换可以类似地引起HEK细胞中的膜表达增强。

[0112] 材料和方法

[0113] 通过重叠延伸PCR将野生型或人的密码子优化的视紫红质通道蛋白-1与人密码子改适的VChR1 (GenBank™保藏编号ACD70142.1) 融合来产生嵌合视紫红质通道蛋白变异体C1V1。通过重叠PCR产生C1V1剪接变异体。变异体一包含ChR1的前145个氨基酸和VChR1的氨基酸102至316。变异体二包含ChR1的前162个氨基酸和VChR1的氨基酸119至316。将所得到的嵌合PCR片段克隆至pECFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA) 和慢病毒表达载体中的CaMKII α 启动子下。膜转运信号来源于Kir2.1通道。通过对编码序列和剪接位点进行测序来确认突变。对于AAV介导的基因递送,将视蛋白-EYFP融合物连同CaMKII α 启动子一起亚克隆

到pAAV2-MCS载体的修饰型式中。通过以相反的方向在不相容lox位点对(loxP和lox2722)之间克隆视蛋白-EYFP序列盒以便产生在延长因子1a(EF-1a)启动子控制下的双floxed倒置开放阅读框(D10)来实现Cre-依赖性视蛋白表达。所有构建体可从戴瑟罗斯实验室(Deisseroth Lab)(www.optogenetics.org)获得。

[0114] 在补充有10%胎牛血清、2mM谷氨酰胺(Biochrome, 柏林, 德国)、以及1% (w/w) 青霉素(penicillin)/链霉素(streptomycin)的杜尔贝科氏最低必需培养基中培养HEK293细胞。将细胞以 0.175×10^6 个细胞/毫升的浓度接种到盖玻片上, 并且补充1 μ M全反式维生素A醛。用Fugene 6 (罗氏(Roche)公司, 曼海姆, 德国)来进行瞬时转染, 并且在20至28小时后做记录。通过常规的全细胞膜片钳来记录瞬时转染的HEK293细胞中的光电流。外部溶液包含[mM]: 140NaCl、2CaCl₂、2MgCl₂、2KCl、10HEPES (pH 7.2)。内部溶液包含[mM]: 110NaCl、10EGTA、2MgCl₂、1CaCl₂、5KCl、10HEPES (使用CsOH或HCl将pH调至7.2)。用P-97型拉针仪(micropipette puller) (萨特仪器公司(Sutter Instrument Co.), 诺瓦托, 加拿大)将膜片吸管从具有1.5M Ω 至2M Ω 电阻的分血器微管(Hecht-Assistent, 桑德海姆, 德国)中拉出。用EPC 7 (HEKA, Elektronik GmbH, 兰布雷希特, 德国)放大器进行HEK细胞的全细胞膜片钳。以20kHz对类似数据进行取样, 用Digidata 1440 (分子仪器公司(Molecular Devices), 福斯特市, CA)进行数字化并且使用pClamp10.1软件(分子仪器公司, 福斯特市, CA)来显示。为了记录波长相关性, 将来自Polychrome V单元(TILL Photonics公司, 普拉内格, 德国)的光导管安装在奥林巴斯IX70显微镜的表皮发光端口上。为了将光反射进入物镜中, 使用分光镜(70%R/30%T)从而在盖玻片上在470nm下产生大约 1×10^{22} 个光子 $m^{-2}s^{-1}$ 的最终光子密度。为了记录作用光谱, 使用仅50%的光强度。用Tillvision软件(TILL Photonics, 普拉内格, 德国)与pClamp软件同步来对polychrome V单元进行控制。

[0115] 结果

[0116] 有趣的是, 发现了嵌合体的最稳定的改进, 在所述嵌合体中螺旋1和螺旋2置换为来自ChR1的同源物(图1C至图1D)。在培养HEK293细胞中测试了用于膜靶向的两种嵌合ChR1-VChR1通道和光电流大小。第一种嵌合ChR1-VChR1通道被接合在ChR1的A1a145之后的第二细胞内环中, 并且第二种嵌合ChR1-VChR1通道被接合在ChR1的Trp163之后的螺旋三内(图1C)。然而, 这两种变异体在HEK293细胞中接近同等良好地表达(图1D), 在培养的神经元中第二变异体更稳定地表达(图1E), 并且与VChR1-EYFP相比显示大为增强的峰值光电流(888 ± 128 pA, $n=11$ 个细胞; $p<0.0005$) (图1B)。相对于ChR2, 作用光谱峰保持稳定的红移(表1; 图1F), 并且嵌合体的离子选择性类似于先前针对ChR2和VChR1所报道的离子选择性(图1G)。将Kir2.1转运序列添加至这种杂交体中倾向于进一步增加光电流(1104 ± 123 pA, $n=12$ 个细胞; 与VChR1-EYFP相比 $p<0.0005$, 与C1V1-EYFP相比 $p=0.23$; 图1B; 表1至表2)。所得到的杂交ChR1/VChR1嵌合体完全不包含ChR2序列, 明显来源于不能单独地良好表达的两种视蛋白基因, 并且在本文被称为C1V1(图1A、图1H)。

[0117] 实施例2: C1V1的光电流动力学的优化

[0118] 这种红移的视蛋白的快速去活化特性²⁸将是最大时间以及由位于向着可见光谱蓝光端的波长活化的其它视蛋白光谱分离所需要的。然而, 发现由C1V1-ts-EYFP显示的光电流展现出比ChR2慢>10倍的衰变, 并且甚至比原始VChR1慢的衰变(图2A; 针对C1V1-ts-EYFP ($n=4$) 和VChR1-EYFP ($n=5$), $T_{\text{去活}}$ 分别为 156 ± 12 ms和 132 ± 12 ms; 表1), 潜在地排除了使用

C1V1用于要求迅速放电速率的应用。为了校正C1V1的光电流动力学,使用已知的结构模型^{22,28}(图1H) 搜寻发色团区域,用于具有光循环动力学更快、钝化减小以及蓝光吸收减少的突变。接下来,基于螺旋2中富含谷氨酸的基序的研究将谷氨酸-122突变为苏氨酸,显示这种突变减小了钝化³。

[0119] 材料和方法

[0120] 通过定点诱变(安捷伦科技(Agilent Technologies),帕洛阿尔托,CA)在质粒中产生C1V1载体的所有点突变。膜转运信号来源于Kir2.1通道。通过对编码序列和剪接位点进行测序来确认突变。

[0121] 结果

[0122] ChETA同源性突变E162T²⁸明显使光循环加速了几乎3倍($T_{去活}58 \pm 4.7\text{ms}$, $n=7$ 个细胞;图2A,表1)。出人意料地,鉴于ChR2或其它微生物视蛋白中的类似突变引起红移^{28,29},在C1V1中这种突变使作用光谱在不希望的方向上移动,蓝移至530nm(图1F;表1)。与ChR2去活46%相比,C1V1-E122T仅钝化26%(图2B,表1);另外,光谱进一步红移至546nm(图1F,表1)并且显示C1V1作用光谱有问题的蓝肩峰明显消失。最后,在双重突变体E122T/E162T中,电流的钝化甚至低于在E122T突变体中的钝化,并且与E162T相比光循环仍然更快($T_{去活}34 \pm 4.9\text{ms}$, $n=7$ 个细胞;图2A,图2C,表1),同时保留红移并且不存在作用光谱的蓝肩峰。此外,当E122突变体大幅减少光电流振幅(图2D)时,双重突变体恢复原始C1V1-ts所特有的极高电流。因此,在双重突变体、转运增强的C1V1嵌合体中保留个别突变体的多种出人意料和有利的特性。

[0123] 表1:ChR2、VChR1以及C1V1变异体的光谱/动力学特性。

[0124] 使用峰值活化波长下的2ms光脉冲,在HEK细胞中记录峰值活化波长。使用最大活化波长下的2ms光脉冲,在培养海马神经元中记录去活动动力学($\tau_{去活}$)和峰值光电流。为了鉴别出用于与ChR2组合活化的最优变异体,在HEK细胞中记录405nm和560nm下的响应百分比。使用300ms光脉冲来记录光电流的脱敏作用,从而对峰值光电流($I_{最大}$)向稳定状态的衰变进行定量。

	最大吸收(nm)	$T_{去活}$ 动力学 pH7.2 (ms)	在-60 mV*下的 峰值电流(pA)	比率 405/560	脱敏作用 %
ChR2	460±6 (N=5)	10±1(N=5)	816±181 (N=5)	60% : 8% (N = 7)	65±8 (N=5)
VChR1	543±7 (N=7)	85±11 (N=6)	284±54 (N=5)	9% : 82% (N = 7)	53±10 (N=18)
[0125] C1V1	539±4 (N=10)	60±6 (N=6)	1035±158 (N=6)	28% : 86% (N = 10)	46±12 (N=14)
C1V1(E162T)	530±4 (N=6)	23±5 (N=4)	1183±53 (N=6)	20% : 71% (N = 6)	41±12 (N=7)
C1V1(E122T)	546±5 (N=4)	55±8 (N=5)	572±21 (N=5)	14% : 94% (N = 4)	26±6 (N = 4)
C1V1(E122T, E162T)	535±5 (N=7)	12±1 (N=5)	1072±89 (N=9)	11% : 72% (N = 7)	11±9 (N=9)

[0126] 表2:针对表1中所示的所有视蛋白的峰值光电流振幅,由未配对t-检验比较得到的p值的汇总。使用540nm(VChR1和C1V1变异体)或470nm(ChR2(H134R))下的2ms光脉冲,记录培养神经元中的光电流。

[0127]

VChR1-YFP	VChR1-ts-YFP	C1V1-YFP	C1V1-ts-YFP	C1V1 (E162T)-ts-Y	C1V1 (E162T/E122T)-ts-YFP	ChR2 (H134R)-YFP	
1.0000	0.5770	0.0188	0.0029	6.5E-06	1.1E-05	0.0448	VChR1-YFP
	1.0000	0.266	0.0039	1.1E-06	0.0015	0.0579	VChR1-ts-YFP
		1.0000	0.3372	0.0399	0.0788	0.8175	C1V1-YFP
			1.0000	0.4099	0.8442	0.4222	C1V1-ts-YFP
				1.0000	0.3254	0.1490	C1V1(E162T)-ts-Y
					1.0000	0.3001	C1V1(E162T/E122T)-ts-YFP
						1.0000	ChR2(H134R)-YFP

[0128] 因此,个别突变的多种有用特性被一同保留在双重突变体中。

[0129] 实施例3:在前额叶皮质神经元中使用新型C1V1嵌合体

[0130] 为了在神经元中测试这些新型C1V1视蛋白基因,产生编码C1V1-ts-EYFP和以上点突变组合的慢病毒载体。然后在培养海马神经元中表达这些视蛋白并且在相同刺激条件(2ms脉冲,542nm光,5.5mW mm⁻²)下记录全细胞光电流,以便确定与VChR1相比光电流振幅的提高是否直接由C1V1的表达增加引起。

[0131] 材料和方法

[0132] 动物

[0133] 将野生型或转基因的小白蛋白::Cre C57/BL6J雄性小鼠分成三至五个为一组圈养,并且在随意取用食物和水的情况下维持相反的12小时光/暗循环。实验方案由斯坦福大学IACUC批准并且符合国家卫生研究院的照顾和使用实验动物的准则。

[0134] 海马神经元和皮质神经元中的全细胞膜片钳电生理学

[0135] 从P0斯普拉-道来(Sprague-Dawley)大鼠中分离出初级海马培养物,涂铺在涂有基质胶(英杰公司(Invitrogen))的玻璃盖玻片上并且用FUDR处理以抑制神经胶质过度生长。使用HEPES缓冲盐水/CaP04混合物,在培养神经元中转染不含内毒素的质粒DNA。在3MΩ至5MΩ玻璃吸管中使用标准内部溶液([mM]130K葡萄糖酸盐、10KCl、10HEPES、10EGTA、2MgCl₂,用KOH使pH为7.3),在Tyrode培养基([mM]150NaCl、4KCl、2MgCl₂、2MgCl₂、10D-葡萄糖、10HEPES,用NaOH使pH为7.35)中获得来自通过荧光蛋白表达所鉴别出的个别神经元的电生理学记录。针对皮质切片生理学,使用振动切片机(徕卡公司(Leica)),在冰冷蔗糖切削溶液([mM]11D-葡萄糖、234蔗糖、2.5KCl、1.25NaH₂PO₄、10MgSO₄、0.5CaCl₂、26NaHCO₃)中获得来自先前注射病毒的8至9周龄野生型C57BL/6J或PV::Cre小鼠的短期300μm冠状切片。在32℃下,使切片在充氧的人工脑脊液(ACSF; [mM]124NaCl、3KCl、1.3MgCl₂、2.4CaCl₂、1.25NaH₂PO₄、26NaHCO₃、10D-葡萄糖)中恢复一小时。在恒定ACSF灌注下,从指定前额叶皮质层中鉴别荧光蛋白表达之后获得个别神经元膜片。将来自宽波长氙光源(萨特仪器(Sutter Instruments)DG-4)的过滤光联接至显微镜(Leica DM-LFSA)的荧光端口上。带通滤光片(Semrock)具有20nm带宽,并且用另外的中性密度滤光片(索雷博光公司(ThorLabs))调节以便使整个光谱范围内的光功率输出均衡。

[0136] 在具有30增益的100ms曝光下使用Retiga Exi CCD照相机(Qimaging有限公司),在相同显微镜上得到培养细胞图像。使用标准EYFP滤光片组时,在500nm下的照射功率密度是12mW mm⁻²。通过标记含有体细胞和近侧神经突的区域,用ImageJ软件进行荧光定量,并且为每个细胞计算所述区域中的总积分像素强度而不是平均荧光,因为光电流可能与膜结

合通道的总数而不是单元面积的平均通道表达相关。

[0137] 病毒制备和注射

[0138] 使用慢病毒-和AVV-介导的基因递送用于在小鼠中异源表达视蛋白。指定视蛋白由人钙调素依赖性蛋白激酶II α (CaMKII α) 启动子驱动以靶向皮质兴奋性神经元或由延伸因子1 α (EF-1 α) 连同Cre可诱导序列盒及随后土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE) 驱动。Cre可诱导重组AAV载体由北卡罗来纳大学载体中心(教堂山,NC,USA) 制备,并且连同小白蛋白::Cre转基因小鼠一起使用以便靶向小白蛋白阳性中间神经元。简单地说,在北卡罗来纳大学将AAV构建体亚克隆至pAAV2-MCS的修饰型式中,用AAV5外壳蛋白进行血清分型并且由病毒载体核心封装。AAV载体的最终病毒浓度为 1×10^{12} 个基因组拷贝(gc)/mL。如所报道产生慢病毒构建体。所有构建体可从瑟罗斯实验室(Deisseroth Lab) (www.optogenetics.org) 获得。按照斯坦福大学批准的方案进行立体定向病毒注射。将保持在异氟烷麻醉下的幼年(4至6周) 小鼠安排在立体定向框架(科夫仪器(Kopf Instruments)) 中,并且使用前囟点和后囟点颅骨界标来瞄准。进行颅骨切开术以便使对皮质组织的损伤最小。使用10 μ L注射器和35g斜面针头(世界精密仪器公司(World Precision Instruments)) 靶向下边缘前额叶皮质(infralimbic prefrontal cortex) (IL;自前囟点:前面1.8mm,侧面0.35mm,腹面-2.85mm)。在0.1 μ L/min的速率下输注病毒。另外对用于行为研究的注射病毒的受试者植入长期光纤联接装置以有利于光递送,用或不用用于局部递送以如所述靶向皮质区域的附接穿透性脑纤维(Doric Lenses,加拿大)。将穿透性纤维立体定向地插入自相同的前面和侧面坐标-2.5mm的深度中,并且使用粘结剂(C&B MetaBond) 固定,随后粘合闭合头皮(Vetbond,3M)。从手术中恢复之后,对动物施用镇痛缓解。

[0139] 结果

[0140] 从每个个别细胞中获得来自表达个别构建体的培养海马神经元的记录和积分荧光读数。在个别细胞中,荧光水平与在整个构建体上测得的光电流振幅紧密相关(图3A)。因此得出结论,C1V1的光电流潜在增加主要由神经元中的表达提高引起。因为根据所有测试的方面(光电流大小、钝化动力学以及作用光谱),双重变异体C1V1-E122T/E162T显示优越的性能,所以针对ChR2(H134R) 的性能也直接通过测量积分体细胞YFP荧光和峰值光电流而进行比较。出人意料地,在同等的荧光水平下,C1V1-E122T/E162T细胞显示光电流比ChR2-H134R细胞强(图3B),潜在地表明单元传导性增加。

[0141] 为了检查C1V1-E122T/E162T是否将适用于在锥体神经元中光学驱动尖峰,产生具有在CaMKII α 启动子控制下的C1V1-E122T/E162T-ts-EYFP基因的腺相关病毒载体(AAV5-CaMKII α -C1V1-E122T/E162T-ts-EYFP) 并且将病毒注入小鼠的前额叶皮质中。用2ms光脉冲列,从短期切片中的表达神经元中记录响应,并且与在相同频率下对电流注入(10ms, 200pA) 列的响应进行比较。发现神经元对560nm脉冲列的频率响应与在相同频率下对电流注入的响应不能区分(图3C;在2种切片中n=6个细胞),从而表明细胞的固有特性和非C1V1动力学限制了在高速率下的尖峰性能。在一系列的绿色、黄色以及琥珀色照射条件下见到类似的性能特性,其中在适于哺乳动物中的活体内应用的中等光强度(<10mW/mm²) 下具有强性能(图3D)。实际上,在540nm和590nm下的响应在引起精确定时动作电位方面的有效性类似,其中如所预计,在较低光功率下保真度较低(图3D)。

[0142] 针对显著红移的作用光谱,考虑了甚至可能使用C1V1来用红光驱动尖峰的可能

性,先前没有用任何视蛋白报道过并且对于允许光谱分离提高以及在更深的组织中控制神经元可能是重要的。因此检查是否任何C1V1变异体都可以被用来使用远红外光驱动尖峰。虽然C1V1-E122T的动力学比C1V1-E122T/E162T的动力学慢,但它的作用光谱是所有变异体中红移最远的(图1F),并且实际上发现表达C1V1-E122T的细胞比表达双重突变体的细胞对红光(630nm)响应更强(图3E,顶部)。虽然E122T突变体在630nm下的动力学比在545nm下慢(图3F),但使用中等强度的630nm光的更长脉冲使光电流得到补偿(图3G),所述更长脉冲足以引发指定尖峰列(图3H;图3E,底部)。

[0143] 实施例4:在来自小鼠前额叶皮质神经元的活脑切片中使用新型C1V1嵌合体

[0144] 本研究寻求确定存在于相同微回路内的抑制性和兴奋性神经元是否可以通过引入C1V1变异体来靶向。探究了活脑切片内的两种神经元群的独立活化,在这种情况下,在PV::Cre小鼠的mPFC中表达CaMKII α -C1V1-E122T/E162Tts eYFP和EF1 α -DIO-ChR2-H134R-EYFP。

[0145] 材料和方法

[0146] 使用振动切片机(徕卡公司(Leica)),在冰冷蔗糖切削溶液([mM]11D-葡萄糖、234蔗糖、2.5KCl、1.25NaH₂PO₄、10MgSO₄、0.5CaCl₂、26NaHCO₃)中获得从先前注射病毒的8至9周龄野生型C57BL/6J或PV::Cre小鼠中分离的短期300 μ m冠状切片。在32°C下,将切片在充氧的人工脑脊液(ACSF;[mM]124NaCl、3KCl、1.3MgCl₂、2.4CaCl₂、1.25NaH₂PO₄、26NaHCO₃、10D-葡萄糖)中恢复一小时。在恒定ACSF灌注下,从指定前额叶皮质层中鉴别荧光蛋白表达之后获得个别神经元膜片。将来自宽波长氙灯源(萨特仪器(Sutter Instruments)DG-4)的过滤光联接至显微镜(Leica DM-LFSA)的荧光端口上。将切片生理学数据输入至Matlab中并且使用自行编写的软件进行分析。使用由Sohal等⁵⁵所描述的小波方法计算功率谱。简单地说,针对每种频率f,用f $\pm$ 5Hz之间的带通滤光片首先过滤所记录的迹线。然后用小波函数卷积过滤的迹线:

[0147] $W(f, t) = s(t) * g(f, t)$

[0148] $g(f, t) = e^{-(t^2)/(2\sigma^2) - (2\pi f)^2 t^2}$

[0149] 其中*表示卷积, $\sigma=5/(6f)$ 。然后使用经过500毫秒窗口范围内的W(f,t)平方振幅来测量不同频率下的功率。将来自切片记录的所有功率谱归一化为1/f。

[0150] 在具有30增益的100ms曝光下使用Retiga Exi CCD照相机(Qimaging公司),在相同显微镜上获取培养细胞图像。使用标准EYFP滤光片组时,在500nm下的照射功率密度是12mW mm⁻²。通过标记含有体细胞和近侧神经突的区域,用ImageJ软件进行荧光的定量,并且为每个细胞计算所述区域中的总积分像素强度而不是平均荧光,因为光电流可能与膜结合通道的总数而不是单位面积的平均通道表达相关。

[0151] 使用电流钳,用模拟EPSC波形来刺激单个锥体细胞。个别sEPSC事件的峰值电流幅值为200pA并且以2ms时间常数衰变。将每个实验分为10次扫描,每次10秒长的时间,并且间隔5秒以便使衰退减至最小。将每次扫描分为500ms区段。在每个500ms区段中的sEPSC的总数随机地选自0与250之间的均匀分布。接着,在500ms区段内的sEPSC的时间随机地选自在整个区段内延伸的均匀分布,从而模拟来自非同步神经元的群体的兴奋性输入。从经验上来说,这些刺激参数可靠地以0Hz至30Hz的放电速率驱动锥体神经元。在被标记为基线的条件下,递送590nm光的10秒脉冲,以便完全地使视蛋白钝化,随后进行sEPSC方案。在视蛋白

被活化的条件中,470nm光的1秒脉冲先于sEPSC方案。

[0152] 为了理解改变的E/I平衡对信息处理的净影响,计算每个神经元的输入sEPSC速率与输出尖峰速率之间的共有信息,所述共有信息捕获I-O曲线的形状和响应可变性的相关变化。首先,估算时间分区内sEPSC速率和尖峰速率的联合分布、sEPSC速率、以及尖峰速率,并且建立联合直方图。时间分区是125ms宽,并且sEPSC速率被分为从0至500Hz的10个等同间隔的分区,不过共有信息结果在广泛分区参数范围内一致。考虑时间分区组距(time bin width),使用最小有意义组距(例如,针对125ms时间分区为8Hz组距)对尖峰速率进行分区。从这个联合直方图中,计算如先前描述的计算共有信息,使得响应熵与噪音熵之间的差异等同。

[0153] 响应熵定量神经元的输出尖峰速率中的不确定性总量。噪音熵定量保留在考虑输入速率的情况下输出尖峰速率中的不确定性。要注意的是,与输入刺激相关的神经响应可以传送的最大信息是刺激组的熵。针对10个等同间隔的输入sEPSC速率分区和在这些分区范围内的输入速率的均匀分布,输入速率的熵是 $\log_2(10) = 3.322$ 比特。

[0154] 从抽样不足的概率分布中计算出的共有信息可以是偏向上的。因此,对由于取样不足而引起的共有信息、响应熵以及噪音熵的所有报道值的偏差进行校正。通过计算来自全数据的较小部分(一半至八分之一)的值并且外推至无穷大数据的限制来进行这种校正。使用125ms时间窗口,校正因子始终小于0.07比特。

[0155] 生成载体,并且如上进行注射。

[0156] 结果

[0157] 使用这批多重工程化的视蛋白基因,探究了在完整哺乳动物系统内组合控制细胞和投射的可能性。首先,问到存在于相同微回路内的兴奋性和抑制性神经元是否可以通过分别引入C1V1变异体和常规ChR至这两种细胞群中而分别靶向。发现表达C1V1-E122T/E162T的培养海马神经元响应于2ms绿光脉冲(560nm)但非紫光脉冲而产生尖峰。相反,表达ChR2-H134R的细胞响应于2ms 405nm光脉冲,但不响应于2ms 561nm光脉冲而产生尖峰(图4A)。因此,在活脑切片内测试这种原则;在这种情况下AAV5-CaMKIIa::C1V1-E122T/E162T-ts-mCherry连同AAV5-EF1a-DIO::ChR2-H134R-EYFP在PV::Cre小鼠的mPFC中一起表达(图4B)。在不表达任何视蛋白的锥体神经元中,由于直接活化PV细胞,405nm光脉冲引发稳定并且快速的抑制性突触后电流(图4C),而561nm光脉冲引发短潜伏期EPSC(图4D)和由表达C1V1的锥体细胞驱动局部抑制性神经元而引起的预期长潜伏期多突触IPSC(图4C)。

[0158] 然后探究了用光电极记录在活体内激发这些独立的细胞元件(图4E,左)。为了检查PV细胞活性对锥体神经元尖峰的抑制性作用,设计了一种实验方案,其中5Hz紫光脉冲(用于活化PV细胞中的ChR2)先于5Hz绿光脉冲(用于活化兴奋性锥体神经元中的C1V1)并且具有变化的脉冲间间隔。当紫光脉冲和绿光脉冲间隔100ms时(图4E,上部迹线),对绿光脉冲的响应不受紫光脉冲影响。然而,随着紫光脉冲与绿光脉冲之间的延迟减小,绿光诱导的事件变得更易于抑制并且当光脉冲呈现出足够同步时完全消除(图4E,底部迹线;图4F中的汇总数据)。这些数据证明完整哺乳动物内的组合光遗传学活化(单独或与另一个群中的精确时间组合而驱动一个群),从而利用了视蛋白的速度和所递送的光脉冲的特性。

[0159] 实施例5:独立活化皮质丘脑(CT)和丘脑皮质(TC)的谷氨酸能轴突入射对丘脑网状核的神经元的影响

[0160] 为了证实轴突投射而不是直接细胞体细胞刺激的组合控制特性,在丘脑切片中研究独立活化皮质丘脑(CT)和丘脑皮质(TC)的谷氨酸能轴突入射对丘脑网状核的神经元(nRT)的影响(图5A)。

[0161] 材料和方法

[0162] 用戊巴比妥(100mg/kg,腹膜内)使C57BL/6J野生型小鼠(产后90-120天)麻醉并且去头。进行丘脑切片制备和全细胞膜片钳记录。从用蔡司(Zeiss)(上科亨,德国)、Axioskop显微镜和红外摄像机使用微分对比光学器件视觉鉴别出的nRT(网状丘脑)和TC(中继丘脑皮层)神经元中获得记录。针对EPSC和电流钳记录,内部溶液含有(以mM计):120K-葡萄糖酸盐、11KCl、1MgCl₂、1CaCl₂、10Hepes、1EGTA。用KOH(290mOsm)将pH调节至7.4。基于能斯特方程, E_{Cl^-} 估算为约-60mV。将电位校正为-15mV液接电位。针对电压钳实验,在-80mV下钳制神经元,并且通过浴应用GABAA受体拮抗剂苦味素(50 μ M,Tocris)来以药理学方式分离EPSC。在所有的记录条件中,监测了接入电阻并且只有当接入电阻<18M Ω 并且实验过程中电阻变化<25%时,包括细胞用于分析。

[0163] 在出生后第30至35天之间,在活体内将600nL rAAV5/CaMKII α -hChR2(H134R)-EYFP或900nL rAAV5-CaMKII α C1V1(E122T/E162T)-TS-mCherry病毒分别立体定向注入C57BL/6J野生型小鼠的腹侧基底丘脑(VB)或桶状皮质中。在相同的小鼠(n=6)中进行皮质内和丘脑内(VB)注射。(自前囟点)在后面1.3mm、侧面3mm、皮质表面以下1.15mm进行皮质内注射。丘脑内注射是后面1.7mm、侧面1.5mm、皮质表面以下3.5mm。注射后约2至3个月处死小鼠,并且制备水平脑丘脑切片用于如上所述的光学刺激和活体外记录。经由CT-TC-nRT途径将VB丘脑去除,以避免nRT神经元的双突触活化。从切片中切下VB丘脑,从制剂中去除所有光敏性细胞体,使得直接检查CTnRT和TC-nRT投射,并且不影响nRT神经元(未示出)的电膜特性。分别用405nm和560nm激光刺激进行表达ChR2的TC和表达C1V1的CT轴突的光学活化,(5ms持续时间光脉冲,2mW至3mW)(OEM激光系统,MI),所述激光刺激是用光纤(BFL 37-300,索雷博光公司(ThorLabs))沿着投射至nRT的CT和TC途径向上递送。使用最小的刺激强度,如引起50%至70%失败(30%至50%成功)、固定的响应动力学以及低响应振幅可变性的光功率所定义。随之引发的最小EPSC可能由选择性光学活化在所记录的细胞的突触前的单一CT或TC轴突引起。刺激光功率稍微增加(高于最小刺激大约5%)直到失败数变为0。(同时)刺激CT和TC输入,并且在nRT细胞中记录引发的最小EPSC和EPSP(各自分别是动作电位放电的亚阈值)。

[0164] 适用时,使用配对或未配对的双尾t-检验计算统计显著性。使用Matlab统计工具箱或Microsoft Excel分析数据。

[0165] 结果

[0166] 在nRT神经元中对TC轴突进行最小刺激引起大而快的兴奋性突触后电流(EPSC),然而在nRT神经元中对CT轴突进行最小刺激引起小而慢的EPSC(图5B),对于这些途径来说都是典型的。

[0167] 接下来检查这两种输入之间的可变延迟条件下的CT和TC输入的突触整合。仅当5ms内重合时,来自各途径的亚阈值EPSP变为动作电位放电的超阈值(图5C至图5D)。C1V1和ChR2活化的时间精确性允许对TC与CT输入之间的延迟进行可靠控制,并且因此允许确定nRT细胞中的有效突触整合的窄窗口(-5ms),这是先前用现有的电学、药理学、或光学技术

所不能观察到的,这是因为皮质与丘脑相互连接并且CT与TC轴突密切近似。这些结果首次证明了在相同的完整制剂中,独立活化不同的轴突投射以检查它们对相同靶细胞的组合影响。

[0168] 实施例6:使用C1V1和SSF0达成相同回路内神经活化的光谱时间分离

[0169] 在以上两种制剂中,均使用可见光谱紫色(405nm)和绿色(560nm)激光来达成两种视蛋白的可分开活化。虽然405nm激光递送安全的非UV光,但对于许多应用,可能优选使用470nm激光用于对蓝色响应的视蛋白,因为470nm光会穿透组织更深、散射更少、并且更容易和经济地从普通蓝光源递送。虽然这可能似乎不可能,因为470nm光将部分地活化C1V1(图1G)以及ChR2,但即使使用470nm光也可能达成组合控制,从而利用SSF0的时间特性和C1V1的红移性质来达成完整哺乳动物组织内的“光谱时间分离”。为了检验这种可能性,决定在相同制剂内直接比较对稳定强化兴奋性或抑制性细胞的节律性活性的影响(图6A)。

[0170] 材料和方法

[0171] 使用定点诱变(Quikchange II XL;Stratagene),通过将点突变插入pLenti-CaMKII α -ChR2-EYFP-WPRE载体中而产生ChR2-D156A和SSF0。如上进行病毒基因递送、冠状脑分割、以及膜片钳记录。进行双重病毒注射以便在PV::Cre小鼠的mPFC中表达CaMKII α ::C1V1和DIO-SSF0。

[0172] 当处理表达SSF0的细胞或组织时,小心使光曝露减至最少以避免由环境光引起的活化。在每个实验之前,施加590nm光的20s脉冲以使SSF0通道全部转化为黑暗状态,并且防止光电流变弱。为了得到SSF0活化和去活光谱,在电压钳模式下由培养神经元得到记录。为了记录活化光谱,施加不同波长的1s脉冲,随后是10s 590nm脉冲。通过首先施加1s 470nm脉冲以活化SSF0,随后是不同波长的10s脉冲来得到去活光谱。通过分别将第一次脉冲或第二次脉冲之后的光电流变化除以由针对所述细胞的峰值波长诱导的最大光电流变化来计算净活化或去活。去活光谱中的负值由例如10s 470nm脉冲引起光电流稍微增加而不是使通道去活的迹线引起。这可能是用于使用萨特(Sutter)DG-4进行这些记录的相对较宽(20nm)带通滤光片宽度的结果。出于相同原因,中间波长(在470nm与520nm之间)预期对通道群有混合影响。

[0173] 通过计算每种光功率下穿过显微镜物镜的光子通量,并且然后基于所记录的细胞的直径和将细胞形状近似为球状体而划分以获得细胞表面上的光子通量来进行SSF0整合特性的光子通量计算。

[0174] 结果

[0175] SSF0是具有29分钟衰变常数的新型多重工程化的视紫红质通道蛋白,它可以在活化C1V1的相同波长下被有效去活并且容许使神经元双稳态兴奋很多分钟,并具有增强的光敏性。关于SSF0的信息可见于国际专利申请公布号W0 2010/056970和美国专利申请号:61/410,704和61/410,711中,所述专利文献的内容由此以引用的方式全部并入本文。进行双重病毒注射以便在来自PV::Cre小鼠的mPFC的短期切片中表达CaMKII α ::C1V1和DIO::SSF0。在这些条件下,兴奋性锥体细胞应该对红移的光有响应,并且抑制性PV细胞对蓝光有响应。实际上,在PV细胞中响应于1s 470nm光脉冲活化SSF0,所发生的IPSC的速率稳定地从基线时的 8.5 ± 1.2 Hz(周期3,图6B)增加至蓝光脉冲后的 16.8 ± 2.1 Hz(周期2;n=4次记录,p<0.005,配对t-检验;图6C),从而显示持久性活化表达SSF0的抑制性细胞。即使470nm光也将

短暂活化C1V1,但这种活化仅可以发生在光脉冲本身的过程中,这是因为光离开之后C1V1非常快速地去活;延长的光后周期特征仅在于SSF0活性(图6B),从而说明光遗传学控制模式的时间分离。有趣的是,在PV神经元活性提高的这个延长周期中,没有引发IPSC功率谱中明显升高的峰,表明在这种减少制剂中单独直接活化PV神经元不足以引发网络中的 γ 同步。然而,与此形成鲜明对比,在470nm光脉冲本身的过程中,当也预计到相同水平的PV神经元活化以及表达C1V1的锥体细胞的部分活化时,始终观察到延伸至高 γ 范围(>60Hz)的显著的 γ 峰(峰频率 $39.2 \pm 3.5\text{Hz}$; $n=4$ 次记录;)。

[0176] 此外,在相同的实验中(事实上,在相同的记录扫描之后),在C1V1锥体细胞的这种情况下单独用590nm光(所述光同时活化PY细胞中的C1V1并且使PV细胞中的SSF0去活)直接活化导致稳定 γ 同步,其中峰频率较低($26.6 \pm 1\text{Hz}$, $n=6$ 次记录)。证明了与PV细胞中的SSF0活化的先前历史有关的任何残余PV神经元活性不是这种作用所必需,仅具有锥体细胞中的C1V1活化的历史并且没有IPSC速率升高的历史的本来相同的扫描引发相同结果。这些结果说明了光谱时间组合控制的整合原则,并且也表明提高锥体神经元的活性可以通过网络特性引起 γ 振荡³¹。有趣的是,在470nm光脉冲过程中,当预计活化PV和锥体细胞两者时,在高于当仅有兴奋性神经元被活化时的频率下始终观察到 γ 同步,从而支持并且扩展了关于PV和锥体细胞两者对引发 γ 振荡的协调重要性的信息³¹⁻³³。

[0177] 结论

[0178] 在本研究的过程中,产生了被称为C1V1变异体的一系列新的工具。C1V1是明显地由不能单独地在神经元中很好地表达,但在早期基因组搜寻中鉴别出来的其它视蛋白基因(VChR1和ChR1)的片段组装的红移视蛋白基因。C1V1完全不包含ChR2序列,而如今在本文所报道的它的多重工程化的变异体代表已知的最有效、红移最远、以及最稳定的视紫红质通道蛋白。在整个视黄醛结合袋的关键氨基酸位置进行诱变引起以下各项的产生:(1) C1V1(E162T),作为ChETA突变的快速同源物产生的高表达性红移视蛋白基因;(2) C1V1(E122T),其显示红移最远的作用光谱肩峰并且甚至可以用于使用红光来放出动作电位;(3) C1V1(E122T/E162T)一具有最低脱敏作用、最快去活作用、最少紫光活化从而与ChR2的交叉活化最少、以及强表达的组合同变体。实际上,可以基于考虑电流大小、去活动力学、以及作用光谱(表1)来选择C1V1变异体用于不同的应用—例如,在双光子研究中,因为ChR2的2P活化是困难的(由于电流大小和通道闭合的快速动力学),所以可能关注C1V1(E162T)。C1V1变异体能够直接检验细胞E/I平衡提高的水平增加将引起 γ 节律性的强度增加(先前与精神分裂症和孤独症两者有关的现象)的假设。当然,不同的工具也可协同作用;连同ChR2一起使用C1V1变异体容许可靠并分别地驱动本研究中所处理的两种不同神经元群—兴奋性锥体神经元和快速尖峰、表达小白蛋白的抑制性中间神经元中的尖峰,并且确认了稳定提高的细胞E/I平衡在产生 γ -带回路活性方面是有效的,从而利用光遗传学工具的动力学差异和光谱差异。这种类型的组合活化可以延及多种细胞类型至多种神经途径类型—例如,分别活化单个脑区域内由不同位置发出的两个汇聚轴突传入途径中的尖峰—系统神经科学的长期寻求目标。

[0179] 实施例意欲纯粹是对本发明进行示例并且因此不应视为以任何方式限制本发明,所述实施例还描述并且详细说明了以上所讨论的本发明的多个方面和实施方案。提供上述实施例和详述是用以说明而非用以限制。在本说明书中引用的所有公布、专利申请以及专

利是以引用的方式并入本文,如同明确并个别地指示每个个别公布、专利申请或专利是以引用的方式并入一般。以上所描述的和在随附的附录中所讨论的各种实施方案可以一同和/或按其它方式实施。本公开内容和附录中的一个或多个方面还可以按更加分开的或整合的方式实施,这应该是显而易见的并且适用于特定靶标应用。具体地说,本文所引用的所有公布和附录明确地以引用的方式并入本文用于描述和公开可能结合本发明使用的组合物和方法的目的。虽然前述发明已经借助于说明和实施例在一定程度上详细描述用于清楚理解的目的,但本领域的普通技术人员根据本发明的教导将显而易见,可以在不背离随附权利要求的精神或范围的情况下对其作出某些变化和修改。

[0180] 参考文献

[0181] Deisseroth, K. Optogenetics. *Nat Methods* 8, 26–29 (2011)。

[0182] Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. 和 Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8, 1263–1268 (2005)。

[0183] Nagel, G. 等 Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* 15, 2279–2284 (2005)。

[0184] Li, X. 等 Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 17816–17821 (2005)。

[0185] Bi, A. 等 Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 50, 23–33 (2006)。

[0186] Schroll, C. 等 Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae. *Curr Biol* 16, 1741–1747 (2006)。

[0187] Zhang, F. 等 Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446, 633–639 (2007)。

[0188] Douglass, A. D., Kraves, S., Deisseroth, K., Schier, A. F. 和 Engert, F. Escape behavior elicited by single, channelrhodopsin-2-evoked spikes in zebrafish somatosensory neurons. *Curr Biol* 18, 1133–1137 (2008)。

[0189] Hagglund, M., Borgius, L., Dougherty, K. J. 和 Kiehn, O. Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nature neuroscience* 13, 246–252, doi:10.1038/nn.2482 (2010)。

[0190] Huber, D. 等 Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature* 451, 61–64 (2008)。

[0191] Hira, R. 等 Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex. *J Neurosci Methods* 179, 258–263 (2009)。

[0192] Higley, M. J. 和 Sabatini, B. L. Competitive regulation of synaptic Ca^{2+} influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nature neuroscience* 13, 958–

966,doi:10.1038/nn.2592(2010)。

[0193] Petreanu,L.,Huber,D.,Sobczyk,A.和Svoboda,K.Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections.Nat Neurosci 10,663-668(2007)。

[0194] Ishizuka,T.,Kakuda,M.,Araki,R.和Yawo,H.Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels.Neurosci Res 54,85-94(2006)。

[0195] Nagel,G.等Channelrhodopsin-2,a directly light-gated cation-selective membrane channel.Proc Natl Acad Sci U S A 100,13940-13945(2003)。

[0196] Rickgauer,J.P.和Tank,D.W.Two-photon excitation of channelrhodopsin-2at saturation.Proc Natl Acad Sci U S A 106,15025-15030(2009)。

[0197] Yonehara,K.等Spatially asymmetric reorganization of inhibition establishes a motion-sensitive circuit.Nature 469,407-410,doi:10.1038/nature09711(2011)。

[0198] Yaroslavsky,A.N.等Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range.Phys Med Biol 47,2059-2073(2002)。

[0199] Wang,H.等Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from chlamydomonas.J Biol Chem 284,5685-5596(2009)。

[0200] Wen,L.等Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin.PLoS One 5,e12893(2010)。

[0201] Zhang,F.等Red-shifted optogenetic excitation:a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*.Nat Neurosci 11,631-633(2008)。

[0202] Berndt,A.,Yizhar,O.,Gunaydin,L.A.,Hegemann,P.和Deisseroth,K.Bi-stable neural state switches.Nat Neurosci 12,229-234(2009)。

[0203] Barnann,C.,Gueta,R.,Kleinlogel,S.,Nagel,G.和Bamberg,E.Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2by an interhelical hydrogen bond.Biochemistry 49,267-278(2010)。

[0204] Schoenenberger,P.,Gerosa,D.和Oertner,T.G.Temporal control of immediate early gene induction by light.PLoS One 4,e8185(2009)。

[0205] Stehfest,K.,Ritter,E.,Berndt,A.,Bartl,F.和Hegemann,P.The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2mutant C128T.J Mol Biol 398,690-702(2010)。

[0206] Sohal,V.S.,Zhang,F.,Yizhar,O.和Deisseroth,K.Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance.Nature 459,698-702(2009)。

[0207] Lin,J.Y.,Lin,M.Z.,Steinbach,P.和Tsien,R.Y.Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics.Biophys J 96,1803-1814(2009)。

[0208] Gunaydin,L.A.等Ultrafast optogenetic control.Nat Neurosci 13,387-392 (2010)。

[0209] Tittor,J.,Schweiger,U.,Oesterhelt,D.和Bamberg,E.Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N,D85T,and D85,96N.Biophys J 67,1682-1690 (1994)。

[0210] Sugiyama,Y.等Photocurrent attenuation by a single polar-to-nonpolar point mutation of channelrhodopsin-2.Photochem Photobiol Sci 8,328-336 (2009)。

[0211] Adesnik,H.和Scanziani,M.Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits.Nature 464,1155-1160 (2010)。

[0212] Colgin,L.L.等Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus.Nature 462,353-357 (2009)。

[0213] Cardin,J.A.等Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses.Nature 459,663-667 (2009)。

[0214] Bamann,C.,Kirsch,T.,Nagel,G.和Bamberg,E.Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2and its implication for channel function.J Mol Biol 375,686-694 (2008)。

[0215] 序列

[0216] SEQ ID NO:1 (人源化C1V1氨基酸序列)

[0217] MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPN
NGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWEEIYVATIEMIKFIIEYFHEFDEPAV
IYSSNGNKTVWLRYAEWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSY
GMYTYFHAAKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVWGMFPVLFLLGTEFGHISPYGSAIGHSILDLIAKNMWG
VLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVELVAEEED

[0218] SEQ ID NO:2 (人源化C1V1核苷酸序列)

[0219]

atgtcgcgacgcccgtggctccttgctctcgcatcggcggtggcgcttgccagcgggatcggcaggagcgtcaaccgg
aagcgatgcgaccgtccccgtggctacgcaagacggaccagattacgtgttcacagagcccacgagcggatgttgt
ttcagacatcatacacacttgaaaacaatggtagcgtcatttgcatccctaacaatgggcagtggttttgccctggcc
tggttgaaatcgaaacggtacgaacgccgagaagctggcggcgaacattctgcagtggatcacattcgactctcggc
gctctgccttatgtttctatggctaccagacttggaatccacgtgtggttggaagagatctacgtagcaaccattg
aaatgatcaagtttatcattgagtatttccatgagtttgacgaaccggccgtaatctactcatcgaaatgggaataag
acagtctggttgaggtagcgagtggtcctcacctgcccggtccttctgatccatctgagcaacctcacaggcct
gaaggacgattatagcaaaaggactatgggcctgttggtttctgatgtgggatgcacgtgtggggcgcaaccagcg
ccatgtgtacggggtggacgaagatcctgttcttctcatctcattgagctatggtatgtatacctattttcatgct
gctaaagtttatatcgaaacattccacacagttccaaaagggatttgcgagaactggtccgagtgtggcctggac
attctttgtggcttggaatgtttccagtcctgtttctgctgggcacggaaggattcggtcatatcagcccttatg
gatctgccattgggcactccatcctcgacctgattgcaaagaacatgtggggtgtgctggggaattacctgcgcgtc
aaaatccacgagcacatcctgttgatggcgacatcagaaagaagcagaaaattacgatcgccggccaagagatgga
ggttgagacactggtggctgaagaggaggactaa

[0220] SEQ ID NO:3 (人源化C1V1 E122T氨基酸序列)

[0221] MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYILENNGSVICIPN
NGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWETIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAV
IYSSNGNKTVWLRYAEWLLTCPVLLIHLNLTLGLKDDYSKRTMGLLVSDVGGCIVWGATSAMCTGWTILFFLISLS
YGMITYFHAAKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSLDLIAKNMW
GVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVELVAEEED

[0222] SEQ ID NO:4 (人源化C1V1E122T核苷酸序列)

[0223]

atgtcgcgacgcccgtggctccttgctctcgcatggcggtggcgcttgccagcgggatcggcaggagcgtcaaccgg
aagcgatgcgaccgtccccgtggctacgcaagacggaccagattacgtgttccacagagcccacgagcggatgttgt
ttcagacatcatacacacttgaaaacaatggtagcgctcatttgcatccctaacaatgggcagtggttttgccctggcc
tggttgaaatcgaacggtacgaacgcccagagaagctggcgggcgaacattctgcagtggatcacattcgactctcggc
gctctgccttatgttctatggctaccagacttggaatccacgtgtggttgggaaccatctacgtagcaaccattg
aaatgatcaagtttatcattgagtatttccatgagtttgacgaaccggccgtaattctactcatcgaatgggaataag
acagtctggttgaggtatgcggagtggtcctcaccctgcccggtccttctgatccatctgagcaacctcacaggcct
gaaggacgattatagcaaaaggactatgggcctgttggtttctgatgtgggatgcacgtgtggggcgcaaccagcg
ccatgtgtacggggtggacgaagatcctgttcttctcatctcattgagctatggtatgtatacctattttcatgct
gctaaagtttatatcgaagcattccacacagttccaaaagggatttgcgagaactggtccgagtgatggcctggac
attctttgtggcttggggaatgtttccagtcctgttctgctgggcacggaaggattcggtcatatcagcccttatg
gatctgccattgggcactccatcctcgacctgattgcaaagaacatgtggggtgtgctggggaattacctgcgcgtc
aaaatccacgagcacatcctgttgatggcgacatcagaaagaagcagaaaattacgatcgccggccaagagatgga
ggttgagacactggtggctgaagaggaggactaa

[0224] SEQ ID NO:5 (人源化C1V1 E162T氨基酸序列)

[0225] MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYILENNGSVICIPN
NGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAV
IYSSNGNKTVWLRYATWLLTCPVLLIHLNLTLGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTILFFLISLSY
GMYTYFHAAKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSLDLIAKNMWG
VLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVELVAEEED

[0226] SEQ ID NO:6 (人源化C1V1 E162T核苷酸序列)

[0227]

atgtcgcgacgcccgtggctccttgctctcgcatggcggtggcgcttgccagcgggatcggcaggagcgtcaaccgg
aagcgatgcgaccgtccccgtggctacgcaagacggaccagattacgtgttccacagagcccacgagcggatgttgt
ttcagacatcatacacacttgaaaacaatggtagcgctcatttgcatccctaacaatgggcagtggttttgccctggcc
tggttgaaatcgaacggtacgaacgcccagagaagctggcgggcgaacattctgcagtggatcacattcgactctcggc
gctctgccttatgttctatggctaccagacttggaatccacgtgtggttgggaagagatctacgtagcaaccattg
aaatgatcaagtttatcattgagtatttccatgagtttgacgaaccggccgtaattctactcatcgaatgggaataag
acagtctggttgaggtatgcgacgtggctcctcaccctgcccggtccttctgatccatctgagcaacctcacaggcct
gaaggacgattatagcaaaaggactatgggcctgttggtttctgatgtgggatgcacgtgtggggcgcaaccagcg
ccatgtgtacggggtggacgaagatcctgttcttctcatctcattgagctatggtatgtatacctattttcatgct

gctaaagtttatatcgaagcattccacacagttccaaaagggatttgtcgagaactggtccgagtgatggcctggac
attctttgtggcttggggaatgtttccagtcctgtttctgctgggcacggaaggattcggtcatatcagcccttatg
gatctgccattgggcactccatcctcgacctgattgcaaagaacatgtggggtgtgctggggaattacctgcgcgtc
aaaatccacgagcacatcctgtttgtatggcgacatcagaaagaagcagaaaattacgatcgccggccaagagatgga
ggttgagacactggtggctgaagaggaggactaa

[0228] SEQ ID NO:7 (人源化C1V1 E122T/E162T氨基酸序列)

[0229] MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPN
NGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQWKSTCGWETIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAV
IYSSNGNKTVWLRATWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSY
GMYTYFHAARKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVGMFPVLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLIAKNMWG
VLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVELVAEEED

[0230] SEQ ID NO:8 (人源化C1V1 E122T/E162T核苷酸序列)

[0231]

atgtcgcgacgcccgtggctccttgcctcgcattggcgggtggcgcttgacgcgggatcggcaggagcggtcaaccgg
aagcgatgcgaccgtccccgtggctacgaagacggaccagattacgtgttcacagagcccacgagcggtatgttgt
ttcagacatcatacacacttgaaaacaatggtagcgtcatttgcattccctaacaatgggcagtgtttttgcctggcc
tggttgaaatcgaacggtacgaacgccgagaagctggcggcgcaacattctgcagtggatcacattcgactctcggc
gctctgccttatgttctatggctaccagacttggaatccacgtgtggttgggaaaccatctacgtagcaaccattg
aaatgatcaagtttatcattgagttttccatgagtttgacgaacggcgctaatctactcatcgaatgggaataag
acagtcctggttgaggtatgcgacgtggctcctcacctgcccggctcctctgatccatctgagcaacctcacaggcct
gaaggacgattatagcaaaaggactatgggcctgttggtttctgatgtgggatgcatcgtgtggggcgcaaccagcg
ccatgtgtacggggtggacgaagatcctgttcttccatctcattgagctatggtatgtataacctattttcatgct
gctaaagtttatatcgaagcattccacacagttccaaaagggatttgtcgagaactggtccgagtgatggcctggac
attctttgtggcttggggaatgtttccagtcctgtttctgctgggcacggaaggattcggtcatatcagcccttatg
gatctgccattgggcactccatcctcgacctgattgcaaagaacatgtggggtgtgctggggaattacctgcgcgtc
aaaatccacgagcacatcctgtttgtatggcgacatcagaaagaagcagaaaattacgatcgccggccaagagatgga
ggttgagacactggtggctgaagaggaggactaa

[0232] SEQ ID NO:9 (替代性人源化C1V1氨基酸序列 (C1V1_25))

[0233] MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPN
NGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQWKSTCGWEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAT
LWLSSNGNVVMRYGEWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWYKILFFLISLSY
GMYTYFHAARKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVGMFPVLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLIAKNMWG
VLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVELVAEEED

[0234] SEQ ID NO:10 (替代性人源化C1V1核苷酸序列 (C1V1_25))

[0235]

Atgagcagacggccctggctgctggccctggctctcgctgtggccctggccgcccgcagcgccggagccagcaccgg
cagcgacgccaccgtgcccgttgccacacaggacggccccgactacgtgttcaccggggcccacgagcggtatgctgt
tccagaccagctacacccttgaaaacaacggcagcgtgatctgcattcccaacaacggccagtgtcttctgcctggcc
tggttgaagtccaacggcaccaacgccgagaagctggccgccaacatcctgcagtggatcaccttcgcctgtctgc

cctgtgcctgatgttctacggctaccagacctggaagtccacctgcggtgggaggaaatctacgtggccaccatcg
agatgatcaagttcatcatcgagtacttccacgagttcgacgagcccgccaccctgtggctgtccagcggaacggc
gtggtgtggatgagatacggcgagtggtgctgacctgccctgtgctgctgatccacctgagcaacctgaccggact
gaaggatgactacagcaagagaacctatgggactgctgggtgtccgatgtgggatgcatcgtgtggggagccacctccg
ccatgtgcaccggatggaccaagatcctgttcttctgatcagcctgagctacggaatgtacacctacttccacgcc
gccaaggtgtacattgaggcctttcacaccgtgcctaagggaatctgcagagaactggtcagagtgtggcctggac
cttcttctgtggcctggggaatgttccctgtgctgttctgctgggaaccgagggattcggacacatcagcccttacg
gaagcgccatcggaacacagcatcctggatctgatcgccaagaacatgtggggagtgtgggaaactacctgagagt
aagatccacgagcacatcctgctgtacggcgacatcagaaagaagcagaagatcacatcgccggacaggaaatgga
agtcgagaccctggtggccgaggaagaggat

[0236] SEQ ID NO:11ChR2氨基酸序列

[0237] MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAA

[0238] GFSILLLMFYAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR

[0239] YAEWLLTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCCL

[0240] GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFILGPEGFGVL

[0241] SVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV

[0242] EDEAEAGAVP

[0243] SEQ ID NO:12ChR2 (H134R)

[0244] MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMF
YAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR

[0245] YAEWLLTCPVILIRLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCCL

[0246] GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFILGPEGFGVL

[0247] SVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV

[0248] EDEAEAGAVP

[0249] SEQ ID NO:13SFO

[0250] MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMF
YAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR
YAEWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYS
RRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCCL
GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSW
GMFPILFILGPEGFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV
EDEAEAGAVP

[0251] SEQ ID NO:14 (SSFO)

[0252] MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMF
YAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLVTGHRVQWLR
YAEWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYS
RRTMGLLVSAIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCCL
GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSW
GMFPILFILGPEGFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV
EDEAEAGAVP

[0253] 本说明书还包括下列内容:

[0254] 1. 一种动物细胞,其包含在细胞膜上表达的光活化蛋白,其中所述蛋白:

[0255] 是来源于来自强壮团藻的VChR1和来自莱茵衣藻的ChR1的嵌合蛋白,其中所述蛋

白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列；

[0256] 对光可响应；并且

[0257] 当用光照射所述细胞时，能够介导所述细胞中的去极化电流。

[0258] 2.如实施方式1所述的动物细胞，其中所述蛋白进一步在位于所述嵌合光响应性蛋白的第二跨膜螺旋与第三跨膜螺旋之间的细胞内环结构域中包含置换，其中所述细胞内环结构域的至少一部分置换为来自所述ChR1的相应部分。

[0259] 3.如实施方式2所述的动物细胞，其中所述细胞内环结构域的所述部分置换为来自所述ChR1的延伸至所述ChR1的氨基酸残基A145的相应部分。

[0260] 4.如实施方式2所述的动物细胞，其中所述蛋白进一步在所述嵌合光响应性蛋白的第三跨膜螺旋中包含置换，其中所述第三跨膜螺旋的至少一部分置换为ChR1的相应序列。

[0261] 5.如实施方式4所述的动物细胞，其中所述细胞内环结构域的所述部分置换为来自所述ChR1的延伸至所述ChR1的氨基酸残基W163的相应部分。

[0262] 6.如实施方式1所述的动物细胞，其中所述嵌合蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0263] 7.如实施方式6所述的动物细胞，其进一步包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基E122和/或E162上的突变。

[0264] 8.如实施方式7所述的动物细胞，其中氨基酸E122上的所述突变是突变为苏氨酸。

[0265] 9.如实施方式7所述的动物细胞，其中氨基酸E162上的所述突变是突变为苏氨酸。

[0266] 10.如实施方式1所述的动物细胞，其中所述嵌合蛋白包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0267] 11.如实施方式1所述的动物细胞，其中所述嵌合蛋白包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0268] 12.如实施方式1所述的动物细胞，其中所述嵌合蛋白包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0269] 13.如实施方式1至12中任一项所述的动物细胞，其中所述蛋白进一步包含C末端膜转运信号。

[0270] 14.如实施方式13所述的动物细胞，其中所述C末端膜转运信号包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。

[0271] 15.如实施方式13或14所述的动物细胞，其中所述膜转运信号是通过连接子连接至所述蛋白的C末端上。

[0272] 16.如实施方式1至15中任一项所述的动物细胞，其中所述蛋白进一步包含选自由以下组成的组的C末端荧光蛋白：EYFP、GFP、CFP、以及RFP。

[0273] 17.如实施方式1至16中任一项所述的动物细胞，其中所述动物细胞选自由以下组成的组：神经元细胞、肌肉细胞、以及干细胞。

[0274] 18.如实施方式1至17中任一项所述的动物细胞，其进一步包含在所述细胞膜上表达的第二光活化蛋白。

[0275] 19.如实施方式18所述的动物细胞，其中所述第二光活化蛋白是当用光照射所述

细胞时能够介导所述细胞中的超极化电流的蛋白。

[0276] 20.如实施方式19所述的动物细胞,其中所述第二光活化蛋白选自由以下组成的组:NpHr、eNpHr2.0、eNpHr3.0、eNpHr3.1以及GtR3。

[0277] 21.一种细胞群,其包含如实施方式1至20中任一项所述的细胞。

[0278] 22.一种非人动物,其包含如实施方式1至20中任一项所述的细胞。

[0279] 23.一种脑组织切片,其包含如实施方式1至20中任一项所述的细胞。

[0280] 24.一种分离的多核苷酸,其包含编码在细胞膜上表达的光活化蛋白的核苷酸序列,其中所述蛋白是来源于来自强壮团藻的VChR1和来自莱茵衣藻的ChR1的嵌合蛋白,其中所述蛋白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列;对光可响应;并且当用光照射所述细胞时,能够介导所述细胞中的去极化电流。

[0281] 25.如实施方式24所述的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含与编码SEQ ID NO:1的氨基酸序列的核苷酸序列至少95%相同的序列。

[0282] 26.如实施方式24所述的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含编码SEQ ID NO:3的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0283] 27.如实施方式24所述的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含编码SEQ ID NO:5的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0284] 28.如实施方式24所述的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含编码SEQ ID NO:7的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0285] 29.一种表达载体,其包含如实施方式25至28所述的任何多核苷酸。

[0286] 30.如实施方式29所述的表达载体,其中所述表达载体是病毒载体。

[0287] 31.如实施方式30所述的表达载体,其中所述病毒载体选自由以下组成的组:AAV载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、HSV载体、以及慢病毒载体。

[0288] 32.一种使用如实施方式1至20中任一项所述的细胞的方法,所述方法包括用光来活化光活化蛋白。

[0289] 33.如实施方式32所述的使用细胞的方法,所述方法包括用红光来活化所述光活化蛋白。

[0290] 34.如实施方式32所述的使用细胞的方法,所述方法包括用绿光来活化所述光活化蛋白。

[0291] 35.一种选择性地使`的兴奋性或抑制性神经元去极化的方法,所述方法包括:选择性地使包含第一光活化蛋白的兴奋性神经元去极化,其中所述第一光活化蛋白当被曝露于具有第一波长的光时被去极化;或选择性地使包含第二光活化蛋白的抑制性神经元去极化,其中所述第二光活化蛋白当被曝露于具有第二波长的光时被去极化;其中所述第一光活化蛋白或所述第二光活化蛋白是来源于来自强壮团藻的VChR1和来自莱茵衣藻的ChR1的嵌合蛋白,其中所述蛋白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列。

[0292] 36.一种选择性地使存在于相同微回路中的兴奋性或抑制性神经元去极化的方法,所述方法包括:在兴奋性神经元中表达第一光活化蛋白;并且在抑制性神经元中表达第二光活化蛋白,其中所述第一光活化蛋白当被曝露于具有第一波长的光时被独立地去极

化,并且其中所述第二光活化蛋白当被曝露于具有第二波长的光时被独立地去极化;其中所述第一光活化蛋白或所述第二光活化蛋白是来源于来自强壮团藻的VChR1和来自莱茵衣藻的ChR1的嵌合蛋白,其中所述蛋白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列。

[0293] 37.如实施方式35或36所述的方法,其中所述第一光活化蛋白包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中所示的序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述第二光活化蛋白包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14中所示的序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0294] 38.如实施方式37所述的方法,其中所述第一光活化蛋白由绿光活化,并且所述第二光活化蛋白由紫光活化。

[0295] 39.如实施方式35至38中任一项所述的方法,其中所述抑制性和兴奋性神经元是在活的非人动物中。

[0296] 40.如实施方式35至39中任一项所述的方法,其中所述抑制性和兴奋性神经元是在来自非人动物的活脑切片中。

[0297] 41.如实施方式35至40中任一项所述的方法,其中所述抑制性和兴奋性神经元是来自前额叶皮质。

[0298] 42.如实施方式35至41中任一项所述的方法,其中所述兴奋性神经元包含锥体神经元,并且所述抑制性神经元包含小白蛋白神经元。

[0299] 43.一种用于鉴别选择性地抑制存在于相同微回路中的兴奋性或抑制性神经元的去极化的化合物的方法,所述方法包括:

[0300] (a) 用具有第一波长的光选择性地使包含第一光活化蛋白的兴奋性神经元去极化,或用具有第二波长的光选择性地使包含第二光活化蛋白的抑制性神经元去极化;其中所述第一光活化蛋白或所述第二光活化蛋白是来源于来自强壮团藻的VChR1和来自莱茵衣藻的ChR1的嵌合蛋白,其中所述蛋白包含至少第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋置换为ChR1的第一跨膜螺旋和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列;

[0301] (b) 测量响应于选择性地使包含第一光活化蛋白的所述兴奋性神经元去极化的兴奋性突触后电位 (EPSP),或测量响应于选择性地使包含第二光活化蛋白的抑制性神经元去极化的抑制性突触后电流 (IPSC);

[0302] (c) 使所述兴奋性神经元或所述抑制性神经元与化合物接触;以及

[0303] (d) 测量所述兴奋性突触后电位 (EPSP) 或测量所述抑制性突触后电流 (IPSC) 以确定使所述兴奋性神经元或所述抑制性神经元与所述化合物接触是否选择性地抑制任一神经元的去极化。

[0304] 44.如实施方式43所述的方法,其中所述第一光活化蛋白包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中所示的序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述第二光活化蛋白包含与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14中所示的序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0305] 45.如实施方式44所述的方法,其中所述第一光活化蛋白由绿光活化,并且所述第二光活化蛋白由紫光活化。

[0306] 46.如实施方式43至45中任一项所述的方法,其中所述抑制性和兴奋性神经元是

在活的非人动物中。

[0307] 47.如实施方式43至46中任一项所述的方法,其中所述抑制性和兴奋性神经元是在来自非人动物的活脑切片中。

[0308] 48.如实施方式43至47中任一项所述的方法,其中所述抑制性和兴奋性神经元是来自前额叶皮质。

[0309] 49.如实施方式43至48中任一项所述的方法,其中所述兴奋性神经元包含锥体神经元,并且所述抑制性神经元包含小白蛋白神经元。

[0310] 50.如实施方式43至49中任一项所述的方法,其中所述化合物是组合化学文库中的成员。

[0311] 51.如实施方式43至50中任一项所述的方法,其进一步包括在心脏组织上测定所述化合物以确定所述化合物是否不利地影响心脏动作电位。

序列表

<110> Deisseroth, Karl

Yizhar, Ofer

<120> 光活化嵌合视蛋白及其使用方法

<130> STAN-905W0

<140> US2011/059276

<141> 2011-11-04

<150> 61/410,736

<151> 2010-11-05

<150> 61/410,744

<151> 2010-11-05

<150> 61/511,912

<151> 2011-07-26

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 344

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 1

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu

1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro

20 25 30

Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu

35 40 45

Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val

50 55 60

Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys

65 70 75 80

Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp

85 90 95

Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln

100 105 110

Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Glu Ile Tyr Val Ala Thr Ile

115 120 125

Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro		
130	135	140
Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr		
145	150	155
Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn		
165	170	175
Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu		
180	185	190
Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys		
195	200	205
Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly		
210	215	220
Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His		
225	230	235
Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp		
245	250	255
Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly		
260	265	270
Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His		
275	280	285
Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn		
290	295	300
Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile		
305	310	315
Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu		
325	330	335
Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp		
340		

<210> 2

<211> 1035

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 2

```

atgtcgcgac gcccgtggct ccttgetetc geattggcgg tggcgcttgc agcgggatcg 60
gcaggagcgt caaccggaag cgatgcgacc gtccccgtgg ctacgcaaga cggaccagat 120
tacgtgttcc acagagccca cgagcggatg ttgtttcaga catcatacac acttgaaaac 180
aatggtagcg tcatttgcac ccctaacaat gggcagtgtt tttgcctggc ctggttgaaa 240

```

```

tcgaacggta cgaacgccga gaagctggcg gcgaacattc tgcagtggat cacattcgca 300
ctctcggcgc tctgccctat gttctatggc taccagactt ggaaatccac gtgtgggttg 360
gaagagatct acgtagcaac cattgaaatg atcaagttaa tcattgagta tttccatgag 420
tttgacgaac cggccgtaat ctactcatcg aatgggaata agacagtctg gttgaggtat 480
gcggagtggc tcctcacctg cccggtcctt ctgatccatc tgagcaacct cacaggcctg 540
aaggacgatt atagcaaaag gactatgggc ctgttggttt ctgatgtggg atgcatcgtg 600
tggggcgcaa ccagcgccat gtgtacgggg tggacgaaga tcctgttctt cctcatctca 660
ttgagctatg gtatgtatac ctattttcat gctgctaaag tttatatcga agcattccac 720
acagttccaa aagggtttg tcgagaactg gtccgagtga tggcctggac attctttgtg 780
gcttggggaa tgtttccagt cctgtttctg ctgggcacgg aaggattcgg tcatatcagc 840
ccttatggat ctgccattgg gcactccatc ctcgacctga ttgcaaagaa catgtggggg 900
gtgctgggga attacctgcg cgtcaaaatc cacgagcaca tcctgttgta tggcgacatc 960
agaaagaagc agaaaattac gatcgccggc caagagatgg aggttgagac actggtggct 1020
gaagaggagg actaa 1035

```

<210> 3

<211> 344

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 3

```

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

```

Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr			
145	150	155	160
Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn			
	165	170	175
Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu			
	180	185	190
Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys			
	195	200	205
Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly			
	210	215	220
Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His			
225	230	235	240
Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp			
	245	250	255
Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly			
	260	265	270
Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His			
	275	280	285
Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn			
	290	295	300
Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile			
305	310	315	320
Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu			
	325	330	335
Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp			
	340		

<210> 4

<211> 1035

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 4

```

atgtcgcgac gcccgtggct ccttgetetc gcattggcgg tggcgcttgc agcgggatcg 60
gcaggagcgt caaccggaag cgatgcgacc gtccccgtgg ctacgcaaga cggaccagat 120
tacgtgttcc acagagccca cgagcggatg ttgtttcaga catcatacac acttgaaaac 180
aatggtagcg tcatttgcac ccctaacaat gggcagtgtt tttgcctggc ctggttgaaa 240
tcgaacggta cgaacgccga gaagctggcg gcgaacattc tgcagtggat cacattcgca 300
ctctcggcgc tctgccttat gttctatggc taccagactt ggaaatccac gtgtggttgg 360

```

gaaaccatct acgtagcaac cattgaaatg atcaagttaa tcattgagta tttccatgag 420
 tttgacgaac cggccgtaat ctactcatcg aatgggaata agacagtctg gttgaggtat 480
 gcggagtggc tcctcacctg cccggtcctt ctgatccatc tgagcaacct cacaggcctg 540
 aaggacgatt atagcaaaag gactatgggc ctgttggttt ctgatgtggg atgcatcgtg 600
 tggggcgcaa ccagcgccat gtgtacgggg tggacgaaga tcctgttctt cctcatctca 660
 ttgagctatg gtatgtatac ctattttcat gctgctaaag tttatatcga agcattccac 720
 acagttccaa aagggatttg tcgagaactg gtccgagtga tggcctggac attctttgtg 780
 gcttggggaa tgtttccagt cctgtttctg ctgggcacgg aaggattcgg tcatatcagc 840
 ccttatggat ctgccattgg gcactccatc ctgcacctga ttgcaaagaa catgtggggg 900
 gtgctgggga attacctgcg cgtcaaaatc cagcagcaca tcctgttgta tggcgacatc 960
 agaaaagaagc agaaaattac gatcgccggc caagagatgg aggttgagac actggtggct 1020
 gaagaggagg actaa 1035

<210> 5

<211> 344

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 5

Met	Ser	Arg	Arg	Pro	Trp	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Leu
1				5				10					15		
Ala	Ala	Gly	Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Thr	Gly	Ser	Asp	Ala	Thr	Val	Pro
				20				25					30		
Val	Ala	Thr	Gln	Asp	Gly	Pro	Asp	Tyr	Val	Phe	His	Arg	Ala	His	Glu
				35				40					45		
Arg	Met	Leu	Phe	Gln	Thr	Ser	Tyr	Thr	Leu	Glu	Asn	Asn	Gly	Ser	Val
				50				55					60		
Ile	Cys	Ile	Pro	Asn	Asn	Gly	Gln	Cys	Phe	Cys	Leu	Ala	Trp	Leu	Lys
65				70				75					80		
Ser	Asn	Gly	Thr	Asn	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala	Ala	Asn	Ile	Leu	Gln	Trp
				85				90					95		
Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Cys	Leu	Met	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Gln
				100				105					110		
Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Cys	Gly	Trp	Glu	Glu	Ile	Tyr	Val	Ala	Thr	Ile
				115				120					125		
Glu	Met	Ile	Lys	Phe	Ile	Ile	Glu	Tyr	Phe	His	Glu	Phe	Asp	Glu	Pro
				130				135					140		
Ala	Val	Ile	Tyr	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Lys	Thr	Val	Trp	Leu	Arg	Tyr
145				150				155					160		

Ala Thr Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn		
165	170	175
Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu		
180	185	190
Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys		
195	200	205
Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly		
210	215	220
Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His		
225	230	235
Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp		
245	250	255
Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly		
260	265	270
Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His		
275	280	285
Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn		
290	295	300
Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile		
305	310	315
Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu		
325	330	335
Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp		
340		

<210> 6

<211> 1035

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 6

```

atgtcgcgac gcccgtggct ccttgccttc gcattggcgg tggcgcttgc agcgggatcg 60
gcaggagcgt caaccggaag cgatgcgacc gtccccgtgg ctacgcaaga cggaccagat 120
tacgtgttcc acagagccca cgagcggatg ttgtttcaga catcatacac acttgaaaac 180
aatggtagcg tcatttgcac ccctaacaat gggcagtgtt tttgcctggc ctggttgaaa 240
tcgaacggta cgaacgccga gaagctggcg gcgaacattc tgcagtggat cacattcgca 300
ctctcggcgc tctgccttat gttctatggc taccagactt ggaaatccac gtgtggttgg 360
gaagagatct acgtagcaac cattgaaatg atcaagttaa tcattgagta tttccatgag 420
tttgacgaac cggccgtaat ctactcatcg aatgggaata agacagtctg gttgaggtat 480

```

gcgacgtggc tctcacctg cccggtcctt ctgatccatc tgagcaacct cacaggcctg 540
 aaggacgatt atagcaaaag gactatgggc ctgttggttt ctgatgtggg atgcatcgtg 600
 tggggcgcaa ccagcgccat gtgtacgggg tggacgaaga tcctgttctt cctcatctca 660
 ttgagctatg gtatgtatac ctattttcat gctgctaaag tttatatcga agcattccac 720
 acagttccaa aagggtttg tcgagaactg gtccgagtga tggcctggac attctttgtg 780
 gcttggggaa tgtttccagt cctgtttctg ctgggcacgg aaggattcgg tcatatcagc 840
 ccttatggat ctgccattgg gcactccatc ctcgacctga ttgcaaagaa catgtgggggt 900
 gtgctgggga attacctgcg cgtcaaaaatc cacgagcaca tcctgttgta tggcgacatc 960
 agaaagaagc agaaaattac gatcgccggc caagagatgg aggttgagac actggtggct 1020
 gaagaggagg actaa 1035

<210> 7

<211> 344

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 7

Met	Ser	Arg	Arg	Pro	Trp	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Leu
1				5				10					15		
Ala	Ala	Gly	Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Thr	Gly	Ser	Asp	Ala	Thr	Val	Pro
				20				25					30		
Val	Ala	Thr	Gln	Asp	Gly	Pro	Asp	Tyr	Val	Phe	His	Arg	Ala	His	Glu
				35				40					45		
Arg	Met	Leu	Phe	Gln	Thr	Ser	Tyr	Thr	Leu	Glu	Asn	Asn	Gly	Ser	Val
				50				55					60		
Ile	Cys	Ile	Pro	Asn	Asn	Gly	Gln	Cys	Phe	Cys	Leu	Ala	Trp	Leu	Lys
65				70				75					80		
Ser	Asn	Gly	Thr	Asn	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala	Ala	Asn	Ile	Leu	Gln	Trp
				85				90					95		
Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Cys	Leu	Met	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Gln
				100				105					110		
Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Cys	Gly	Trp	Glu	Thr	Ile	Tyr	Val	Ala	Thr	Ile
				115				120					125		
Glu	Met	Ile	Lys	Phe	Ile	Ile	Glu	Tyr	Phe	His	Glu	Phe	Asp	Glu	Pro
				130				135					140		
Ala	Val	Ile	Tyr	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Lys	Thr	Val	Trp	Leu	Arg	Tyr
145				150				155					160		
Ala	Thr	Trp	Leu	Leu	Thr	Cys	Pro	Val	Leu	Leu	Ile	His	Leu	Ser	Asn
				165				170					175		

Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
 180 185 190
 Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
 195 200 205
 Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
 210 215 220
 Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
 245 250 255
 Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
 260 265 270
 Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
 275 280 285
 Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
 290 295 300
 Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
 305 310 315 320
 Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
 325 330 335
 Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
 340

<210> 8

<211> 1035

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 8

atgtcgcgac gcccggtggt ccttgctctc gcattggcgg tggcgcttgc agcgggatcg 60
 gcaggagcgt caaccggaag cgatgcgacc gtccccgtgg ctacgcaaga cggaccagat 120
 tacgtgttcc acagagccca cgagcggatg ttgtttcaga catcatacac acttgaaaac 180
 aatggtagcg tcatttgcac ccctaacaat gggcagtggt tttgcctggc ctggttgaaa 240
 tcgaacggta cgaacgccga gaagctggcg gcgaacattc tgcagtggat cacattcgca 300
 ctctcggcgc tctgccttat gttctatggc taccagactt ggaaatccac gtgtgggttg 360
 gaaaccatct acgtagcaac cattgaaatg atcaagttta tcattgagta tttccatgag 420
 tttgacgaac cggccgtaat ctactcatcg aatgggaata agacagtctg gttgaggtat 480
 gcgacgtggc tctcacctg cccggtcctt ctgatccatc tgagcaacct cacaggcctg 540
 aaggacgatt atagcaaaag gactatgggc ctgttggttt ctgatgtggg atgcatcgtg 600

tggggcgcaa ccagcgccat gtgtacgggg tggacgaaga tcctgttctt cctcatctca 660
 ttgagctatg gtatgtatac ctattttcat gctgctaaag tttatatcga agcattccac 720
 acagttccaa aagggatttg tcgagaactg gtccgagtga tggcctggac attctttgtg 780
 gcttgggggaa tgtttccagt cctgtttctg ctgggcacgg aaggattcgg tcatatcagc 840
 ccttatggat ctgccattgg gcactccatc ctcgacctga ttgcaaagaa catgtgggggt 900
 gtgctggggga attacctgcg cgtcaaaatc cagcagcaca tcctgttgta tggcgacatc 960
 agaaagaagc agaaaattac gatcgccggc caagagatgg aggttgagac actggtggct 1020
 gaagaggagg actaa 1035

<210> 9

<211> 344

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

Met	Ser	Arg	Arg	Pro	Trp	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Leu
1				5				10					15		
Ala	Ala	Gly	Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Thr	Gly	Ser	Asp	Ala	Thr	Val	Pro
			20					25					30		
Val	Ala	Thr	Gln	Asp	Gly	Pro	Asp	Tyr	Val	Phe	His	Arg	Ala	His	Glu
			35					40					45		
Arg	Met	Leu	Phe	Gln	Thr	Ser	Tyr	Thr	Leu	Glu	Asn	Asn	Gly	Ser	Val
			50					55					60		
Ile	Cys	Ile	Pro	Asn	Asn	Gly	Gln	Cys	Phe	Cys	Leu	Ala	Trp	Leu	Lys
65				70						75				80	
Ser	Asn	Gly	Thr	Asn	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala	Ala	Asn	Ile	Leu	Gln	Trp
				85						90				95	
Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Cys	Leu	Met	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Gln
			100					105					110		
Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Cys	Gly	Trp	Glu	Glu	Ile	Tyr	Val	Ala	Thr	Ile
			115					120					125		
Glu	Met	Ile	Lys	Phe	Ile	Ile	Glu	Tyr	Phe	His	Glu	Phe	Asp	Glu	Pro
			130					135					140		
Ala	Thr	Leu	Trp	Leu	Ser	Ser	Gly	Asn	Gly	Val	Val	Trp	Met	Arg	Tyr
145				150						155				160	
Gly	Glu	Trp	Leu	Leu	Thr	Cys	Pro	Val	Leu	Leu	Ile	His	Leu	Ser	Asn
				165						170				175	
Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Asp	Asp	Tyr	Ser	Lys	Arg	Thr	Met	Gly	Leu	Leu
			180							185				190	

Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys		
195	200	205
Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly		
210	215	220
Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His		
225	230	235
Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp		
	245	250
Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly		
	260	265
Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His		
	275	280
Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn		
	290	295
Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile		
305	310	315
Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu		
	325	330
Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp		
	340	

<210> 10

<211> 1032

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 10

```

atgagcagac ggccctggct gctggccctg gctctcgtg tggccctggc cgccggcagc 60
gccggagcca gcaccggcag cgacgccacc gtgcccgttg ccacacagga cggccccgac 120
tacgtgttcc accggggccca cgagcggtat ctgttccaga ccagctacac cttgaaaac 180
aacggcagcg tgatctgcat cccaacaac ggccagtgt tctgcctggc ctggctgaag 240
tccaacggca ccaacgccga gaagctggcc gccaacatcc tgcagtggat caccttcgcc 300
ctgtctgccc tgtgcctgat gttctacggc taccagacct ggaagtcac ctgcggctgg 360
gaggaaatct acgtggccac catcgagatg atcaagtcca tcatcgagta cttccacgag 420
ttcgacgagc ccgccaccct gtggtgttcc agcggaacg gcgtggtgtg gatgagatac 480
ggcgagtggc tgctgacctg cctgtgtgtg ctgatccacc tgagcaacct gaccggactg 540
aaggatgact acagcaagag aaccatggga ctgctggtgt ccgatgtggg atgcacgtg 600
tggggagcca cctccgccat gtgcaccgga tggaccaaga tcctgttctt cctgatcagc 660
ctgagctacg gaatgtacac ctacttccac gccgccaagg tgtacattga ggcctttcac 720

```

accgtgccta agggaaatctg cagagaactg gtcagagtga tggcctggac cttcttcgtg 780
 gcctggggaa tgttccctgt gctgttcctg ctgggaaccg agggattcgg acacatcagc 840
 ccttacggaa gcgccatcgg acacagcatc ctggatctga tcgccaagaa catgtgggga 900
 gtgctgggaa actacctgag agtgaagatc cagagacaca tcctgctgta cggcgacatc 960
 agaaagaagc agaagatcac catcgccgga caggaaatgg aagtcgagac cctggtggcc 1020
 gaggaagagg at 1032

<210> 11

<211> 310

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

Met	Asp	Tyr	Gly	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Leu	Leu	Phe
1				5					10					15	
Val	Thr	Asn	Pro	Val	Val	Val	Asn	Gly	Ser	Val	Leu	Val	Pro	Glu	Asp
			20					25					30		
Gln	Cys	Tyr	Cys	Ala	Gly	Trp	Ile	Glu	Ser	Arg	Gly	Thr	Asn	Gly	Ala
		35					40					45			
Gln	Thr	Ala	Ser	Asn	Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Ala	Ala	Gly	Phe	Ser	Ile
	50					55				60					
Leu	Leu	Leu	Met	Phe	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Cys	Gly
65				70					75					80	
Trp	Glu	Glu	Ile	Tyr	Val	Cys	Ala	Ile	Glu	Met	Val	Lys	Val	Ile	Leu
			85						90					95	
Glu	Phe	Phe	Phe	Glu	Phe	Lys	Asn	Pro	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu	Ala	Thr
			100					105					110		
Gly	His	Arg	Val	Gln	Trp	Leu	Arg	Tyr	Ala	Glu	Trp	Leu	Leu	Thr	Cys
			115				120					125			
Pro	Val	Ile	Leu	Ile	His	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Ser	Asn	Asp
		130				135					140				
Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Met	Gly	Leu	Leu	Val	Ser	Asp	Ile	Gly	Thr	Ile
145				150					155					160	
Val	Trp	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Met	Ala	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Val	Ile
			165						170					175	
Phe	Phe	Cys	Leu	Gly	Leu	Cys	Tyr	Gly	Ala	Asn	Thr	Phe	Phe	His	Ala
			180					185						190	
Ala	Lys	Ala	Tyr	Ile	Glu	Gly	Tyr	His	Thr	Val	Pro	Lys	Gly	Arg	Cys
		195					200							205	

Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
 210 215 220
 Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
 245 250 255
 Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
 260 265 270
 Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
 275 280 285
 Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
 290 295 300
 Glu Ala Gly Ala Val Pro
 305 310

<210> 12

<211> 310

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

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

Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile			
145	150	155	160
Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile			
	165	170	175
Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala			
	180	185	190
Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys			
	195	200	205
Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly			
	210	215	220
Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu			
225	230	235	240
Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser			
	245	250	255
Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His			
	260	265	270
Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn			
	275	280	285
Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala			
	290	295	300
Glu Ala Gly Ala Val Pro			
305	310		
<210> 13			
<211> 310			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 13			
Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe			
1	5	10	15
Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp			
	20	25	30
Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala			
	35	40	45
Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile			
	50	55	60
Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly			
65	70	75	80

Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu			
85	90	95	
Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr			
100	105	110	
Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Ser			
115	120	125	
Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp			
130	135	140	
Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile			
145	150	155	160
Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile			
165	170	175	
Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala			
180	185	190	
Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys			
195	200	205	
Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly			
210	215	220	
Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu			
225	230	235	240
Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser			
245	250	255	
Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His			
260	265	270	
Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn			
275	280	285	
Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala			
290	295	300	
Glu Ala Gly Ala Val Pro			
305	310		
<210> 14			
<211> 310			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 14			
Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe			
1	5	10	15

Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp			
20	25	30	
Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala			
35	40	45	
Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile			
50	55	60	
Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly			
65	70	75	80
Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu			
	85	90	95
Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr			
	100	105	110
Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Ser			
	115	120	125
Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp			
	130	135	140
Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Ala Ile Gly Thr Ile			
145	150	155	160
Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile			
	165	170	175
Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala			
	180	185	190
Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys			
	195	200	205
Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly			
	210	215	220
Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu			
225	230	235	240
Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser			
	245	250	255
Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His			
	260	265	270
Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn			
	275	280	285
Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala			
	290	295	300
Glu Ala Gly Ala Val Pro			
305	310		

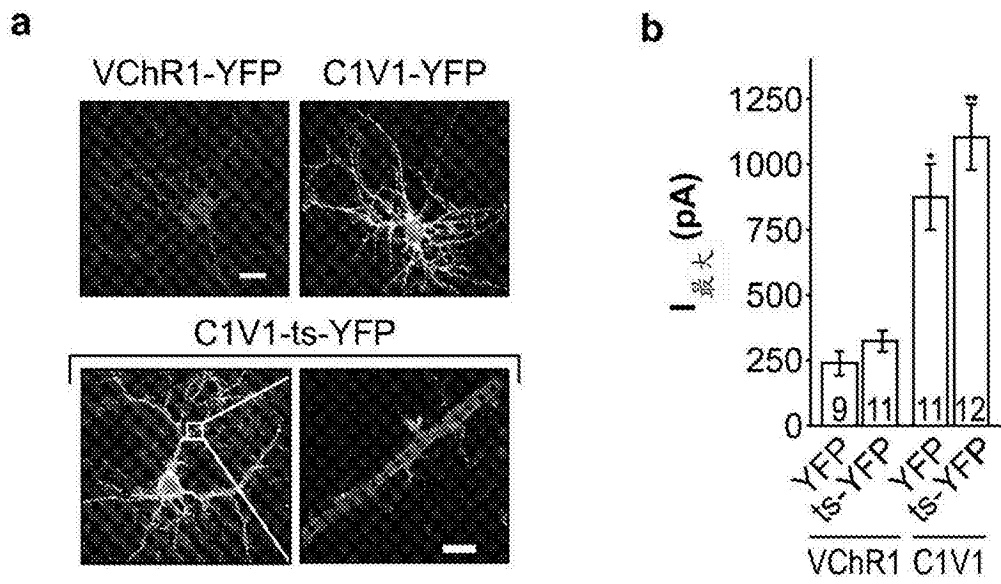


图1

C

Chr1	MSRRPWLLAL ALAVALAAGS AGASTGSDAT VPVATQDGPD YVFHRAHERM	60
Chr2	MDYGG ALSAVG.....REL	14
VChr1	MDYPVARS	8
Chr1	LFQTSYTLN NGSVICIPNN GQCPCLAWLK SNGTNAEKLA ANILQWITFA	100
Chr2	LFVTNPVVVN .GSVLVP..E DQCYCAGWIE SRGTNGAQT A SNVLQWLAAG	61
VChr1	LIVRYPTDLG NGTVCMP..R GQCYCEGWLR SRGTSIEKTI AITLQWVFEA	56
	TM1	
Chr1	LSALCLMEYG YQTKWSTCGW EEIYVATIEM IKFIIEYFHE FDEPAVIYSS	150
Chr2	FSILLMPYA YQTKWSTCGW EEIYVCAIEM VKVILEFFFF FKNPSMLYLA	111
VChr1	LSVACLGWYA YQAWRATCGW EEVYVALIEM MKSIIIEAFHE FDSPATLWLS	106
	剪接1	
	剪接2	
Chr1	NGNKTVWLR Y AEWLLTCRVI LIHLSNLTGL ANDYNKRTMG LLVSDIGTIV	200
Chr2	TGHRVQWLR Y AEWLLTCRVI LIHLSNLTGL SNDYSKRTMG LLVSDIGTIV	161
VChr1	SCNGVVMRY GEWLLTCRVI LIHLSNLTGL KDDYSKRTMG LLVSDVGCIV	156
	TM3	TM4
Chr1	WGTTAALSKG YVRVIFFLMG LCYGIYTFN AAKVYIEAYH TVPKGICRDL	250
Chr2	WGATSAMATG YVKVIFFCLG LCYGANTFFH AAKAYIEGYH TVPKGRCRQV	211
VChr1	WGATSAMCTG WTKILFFLIS LSYGMYTYFH AAKVYIEAFH TVPKGICREL	206
	TM5	
Chr1	VRYLAWLYFC SWAMFPVLFL LGPEGFGHIN QFNSAIAHAI LDLASKNAWS	300
Chr2	VTGMAWLEFV SWGMFPILFI LGPEGFGVLS VYGSTVGHTI IDLMSKNCWG	261
VChr1	VRVMAWTEFV AWGMFPVLFL LGTEGFGHIS PYGSAIGHSI LDLIAKNMWG	256
	TM6	TM7
Chr1	MMGHFLRVKI HEHILLYGDI RKKQKVNAG QEMEVEVMVH EEDD	344
Chr2	LLGHYLRVLI HEHILINGDI RKTTLNIGG TEIEVETLVE DEAEAGAVP	310
VChr1	VLCNYLRVKI HEHILLYGDI RKKQKITIAG QEMEVEVLVA EEED	300

图1 (续1)

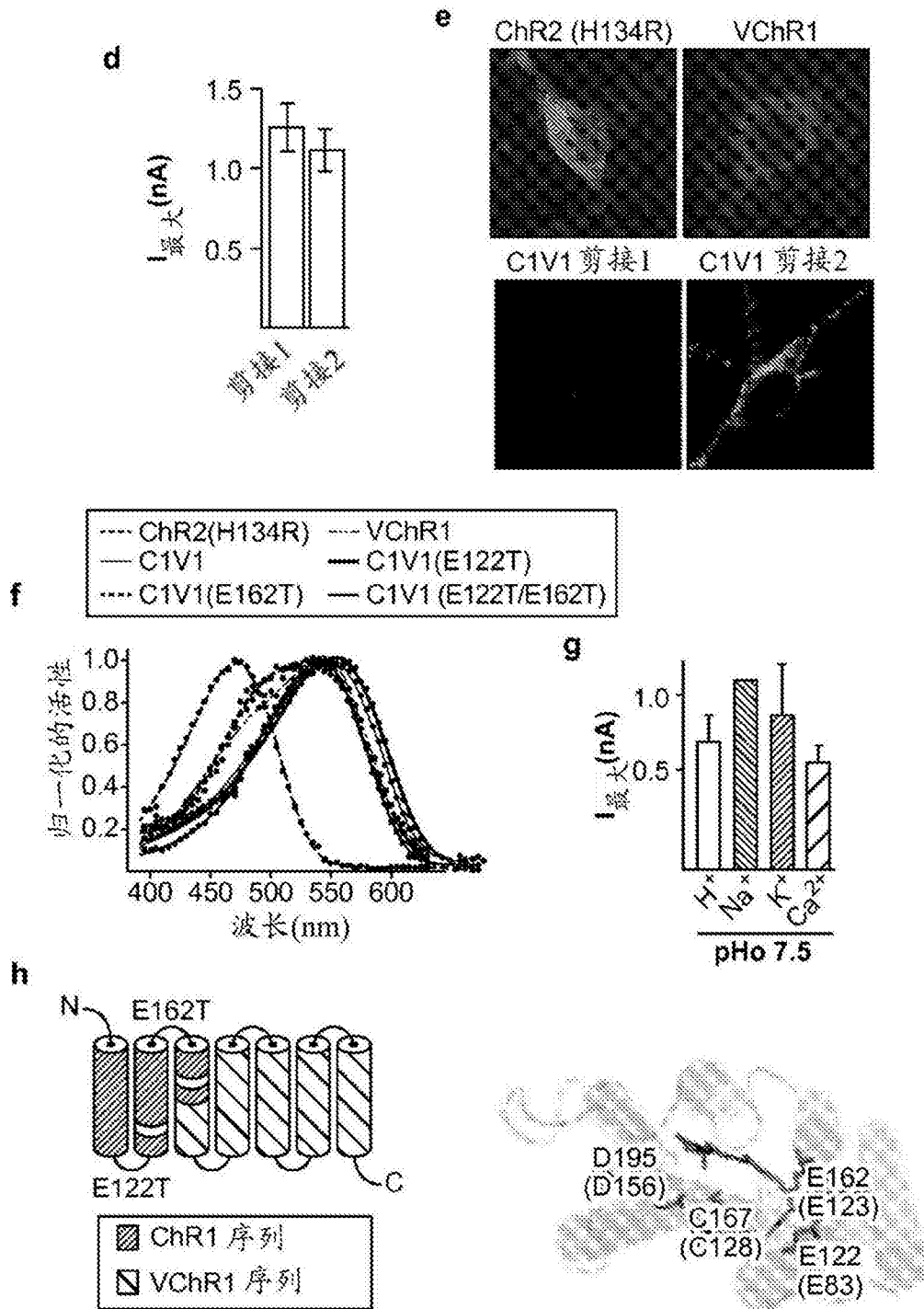


图1 (续2)

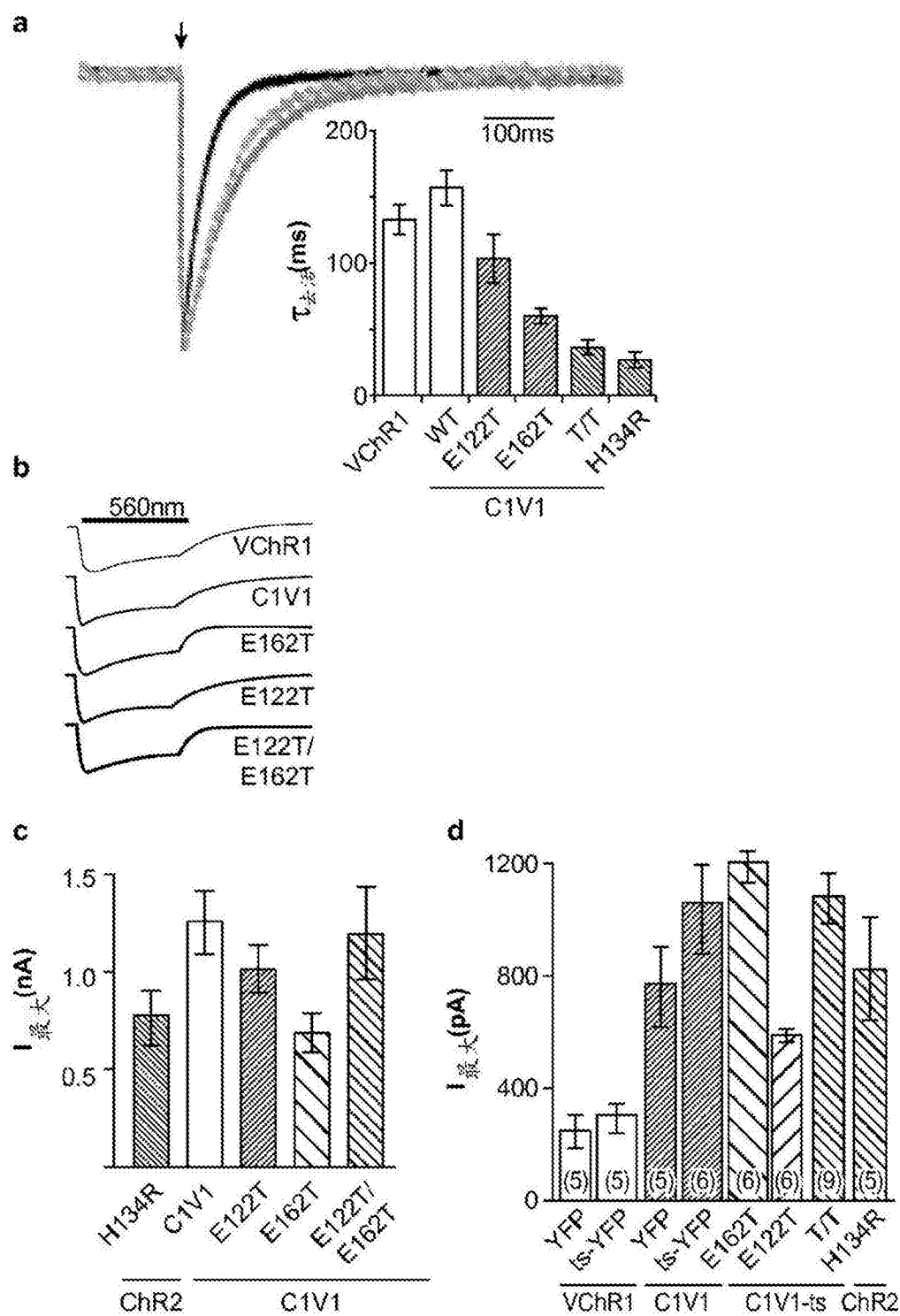


图2

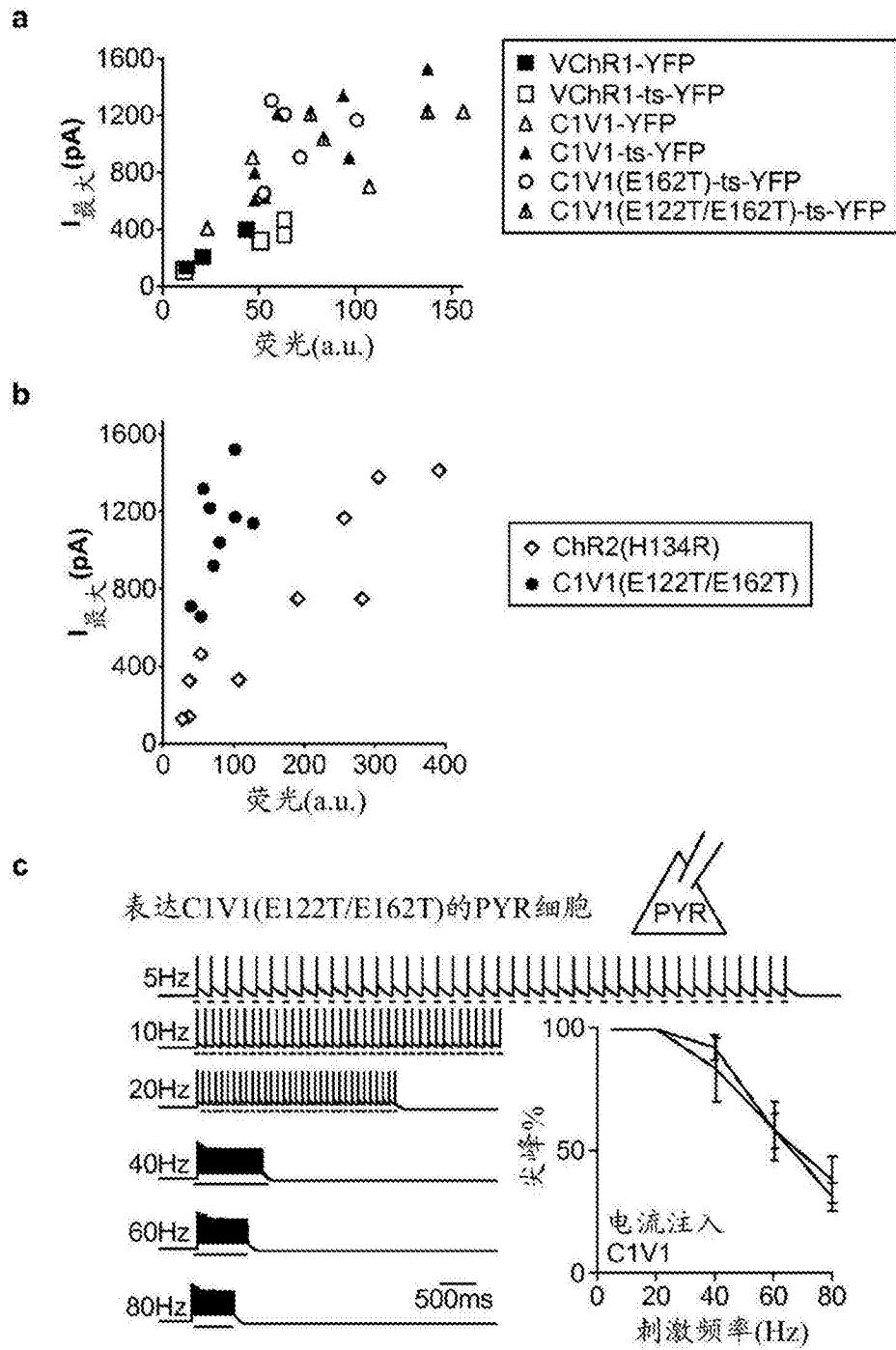


图3

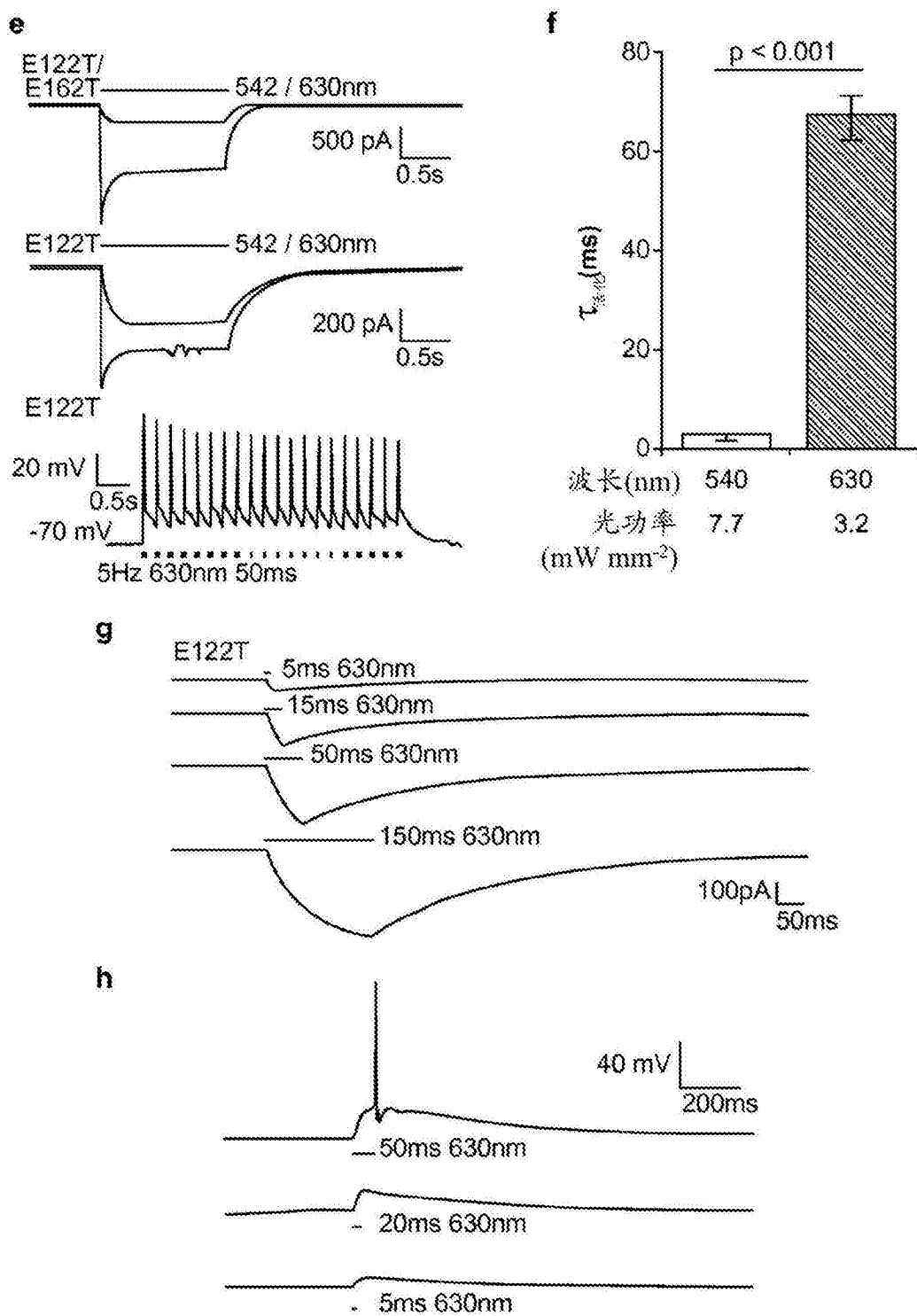


图3 (续2)

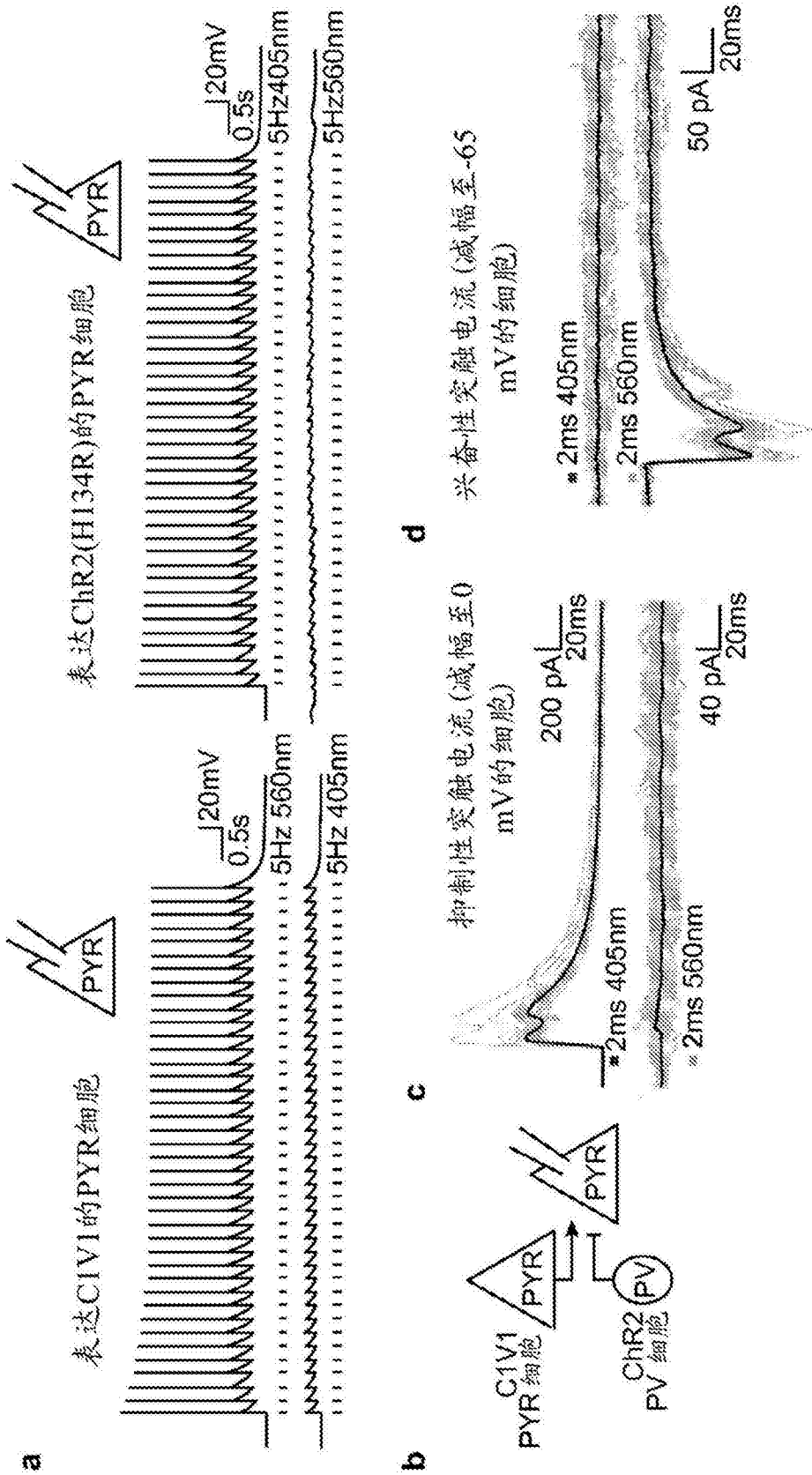


图4

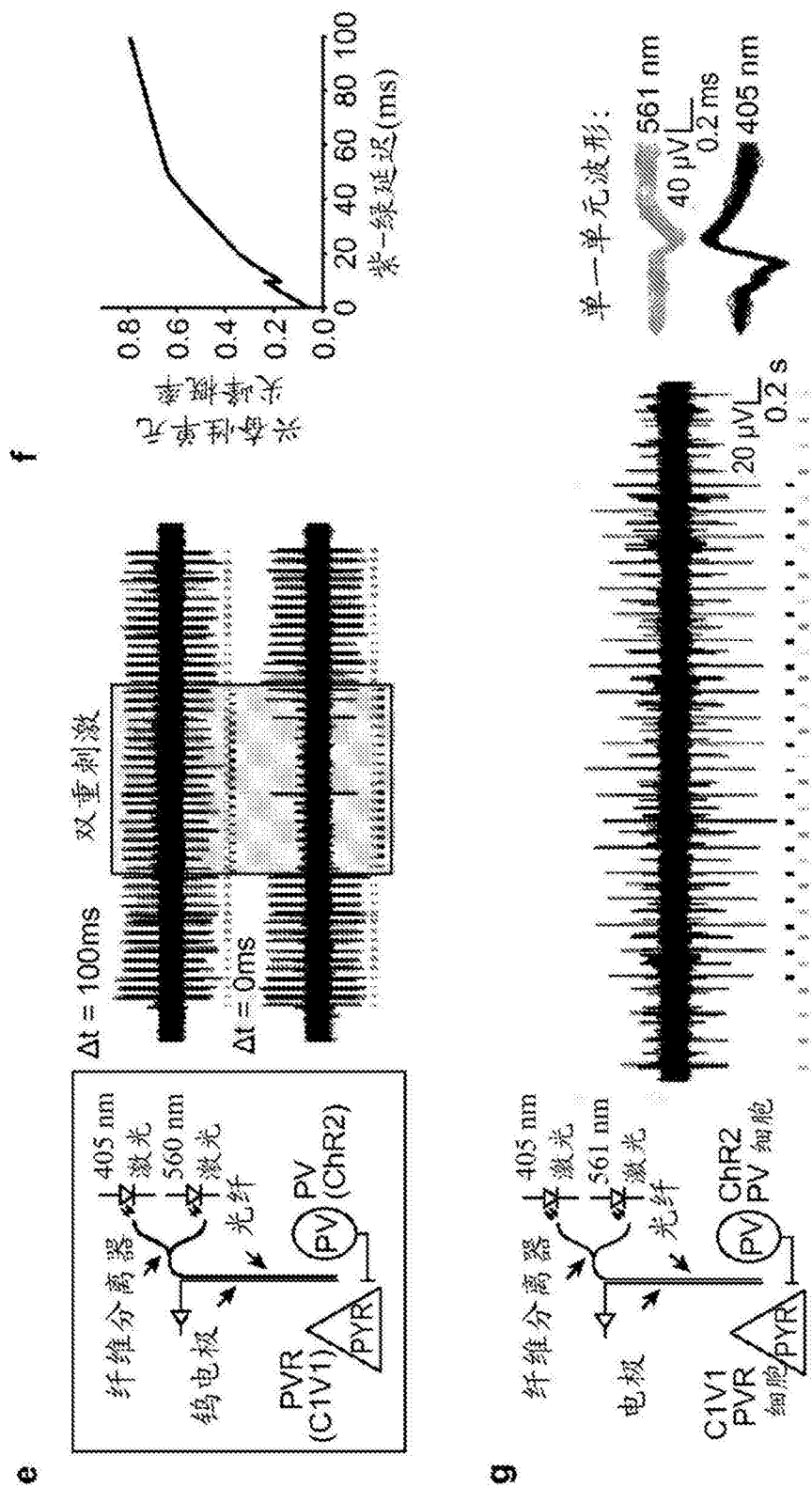


图4(续)

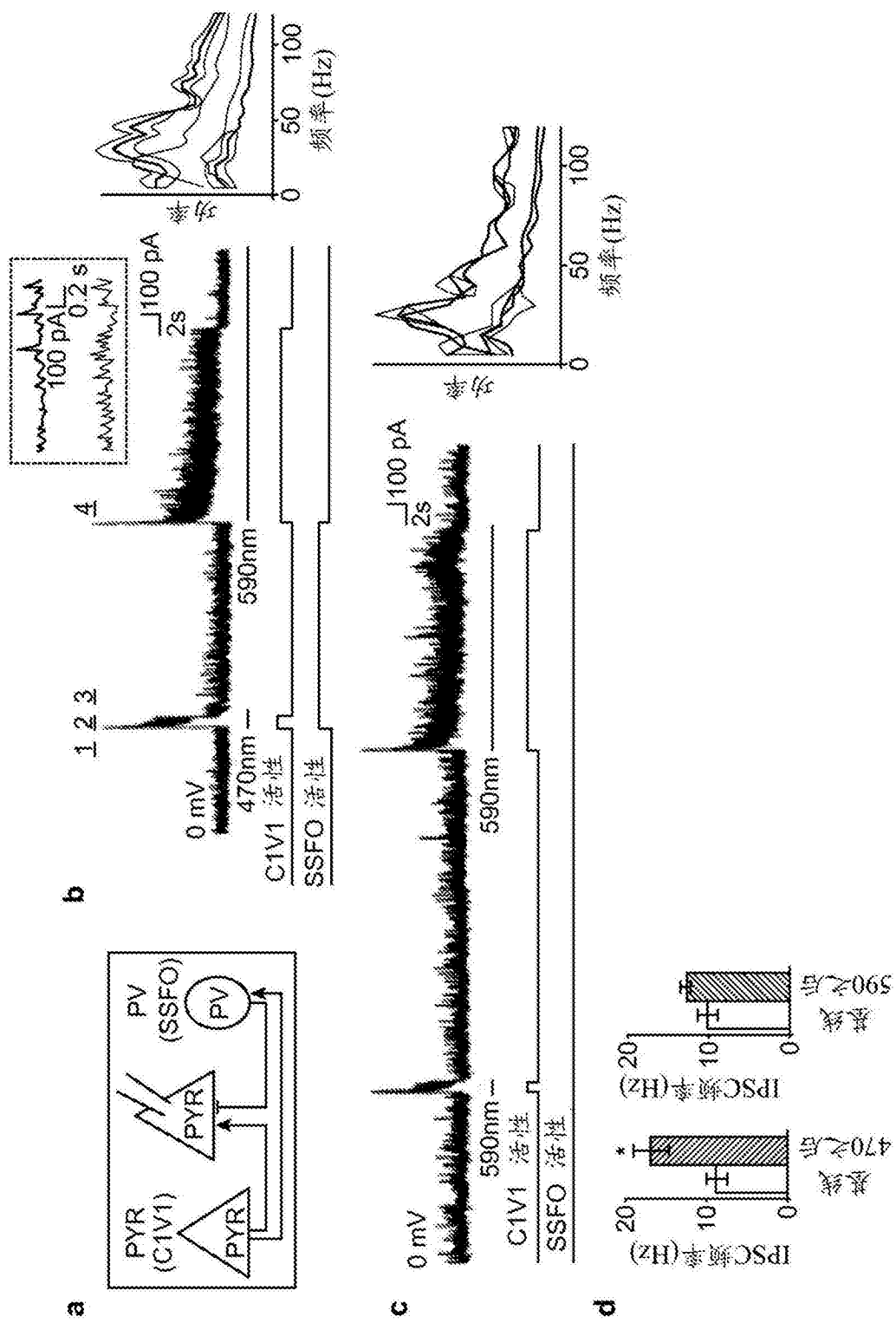


图6