



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111378020 A

(43)申请公布日 2020.07.07

(21)申请号 202010025519.0

(22)申请日 2013.03.05

(30)优先权数据

61/606,663 2012.03.05 US

(62)分案原申请数据

201380022635.5 2013.03.05

(71)申请人 韦恩州立大学

地址 美国密歇根州

(72)发明人 Z-h.潘

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

C07K 14/405(2006.01)

权利要求书1页 说明书29页 附图5页

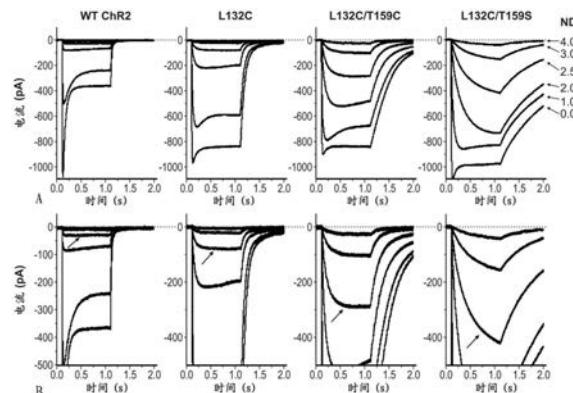
(54)发明名称

通道视蛋白-2(Chop2)突变的鉴定及使用方

法

(57)摘要

本发明提供了组合物和试剂盒，其包含至少一种编码突变体ChR2蛋白的核酸或多肽分子。本发明的方法包括对受试者施用包含突变体ChR2的组合物以保护，改善，或恢复光转导。优选地，对具有受损视觉的受试者提供本发明的组合物和方法，由此将视觉恢复到正常水平。



1. 一种分离的多肽分子,其包含SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L)。
2. 权利要求1的多肽分子,其中所述第132位氨基酸是半胱氨酸(C)或丙氨酸(A)。
3. 权利要求2的多肽分子,其中所述第132位氨基酸是半胱氨酸(C),且其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:13。
4. 权利要求2的多肽分子,其中所述第132位氨基酸是丙氨酸(A),且其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:20。
5. 一种分离的多肽分子,其包含SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第159位氨基酸不是苏氨酸(T)。
6. 权利要求5的多肽分子,其中所述第159位氨基酸是半胱氨酸(C),丝氨酸(S),或丙氨酸(A)。
7. 权利要求6的多肽分子,其中所述第159位氨基酸是半胱氨酸(C),且其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:14。
8. 权利要求6的多肽分子,其中所述第159位氨基酸是丝氨酸(S),且其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:17。
9. 权利要求6的多肽分子,其中所述第159位氨基酸是丙氨酸(A),且其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:23。
10. 一种分离的多肽分子,其包含SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L)且所述第159位氨基酸不是苏氨酸(T)。

通道视蛋白-2(Chop2)突变的鉴定及使用方法

[0001] 本申请是申请日为2013年3月5日提交的、申请号为201380022635.5的、发明名称为“通道视蛋白-2(Chop2)突变的鉴定及使用方法”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2012年3月5日提交的美国临时申请No.61/606,663的优先权和权益，其内容完整并入本文。

[0004] 政府支持

[0005] 本发明是在国立健康研究所/国立眼科研究所拨款NIH EY 17130下得到美国政府支持进行的。政府具有本发明的某些权利。

发明领域

[0006] 一般而言，本发明涉及分子生物学领域。鉴定了通道视蛋白-2(Channelopsin-2, Chop2)基因中的突变。在治疗方法中使用包含突变体Chop2基因的组合物以改善和恢复视觉丧失。

[0007] 发明背景

[0008] 视网膜由光感受器(或光感受器细胞，杆和锥体)组成。光感受器是高度特化的神经元，该神经元负责光转导，或光(为电磁辐射形式)转化成电和化学信号，其在视觉系统内传播事件级联，最终产生我们世界的画像。

[0009] 光感受器丧失或变性若不完全抑制也是严重危及视网膜内视觉信息的光转导。光感受器细胞的丧失和/或光感受器细胞功能的丧失是降低的视觉敏锐度，降低的光敏感性，和盲的主要原因。本领域中长期需要恢复经历视觉丧失的受试者的视网膜的光敏感性的组合物和方法。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了对恢复和/或提高光感受器细胞的光敏感性的方法的长期需要的解决方法，其通过表达通道视蛋白-2(Chop2)基因的有利突变，和/或其组合，随后提供基于通道视蛋白-2(Chop2)的基因疗法的方法进行。

[0012] 基于通道视蛋白-2(Chop2)的基因疗法提供了用于恢复光感受器变性后视黄醛光敏感性的卓越策略。Chop2基因的蛋白质产物在与光可异构化发色团全反式视黄醛结合时形成功能性光门控通道，称作通道视紫红质-2(ChR2, channelrhodopsin-2)。天然ChR2显示较低的光敏感性。最近，报告了两种突变体ChR2，即L132C和T159C显著提高其光敏感性(Kleinlogel等(2011)Nat Neurosci.14:513-8; Berndt等(2011)Proc Natl Acad Sci USA.108:7595-600; Prigge等(2012)J Biol Chem.287(38)3104:12;每篇的内容完整并入本文)。检查这两种ChR2突变体(即L132C和T159C)的特性，并且与多种在这两个位点处的双重突变体比较以鉴定治疗方法的合适候选物。为了恢复视觉，对有此需要的受试者提供包含这些中一种或多种突变的组合物。具体地，将Chop2基因中的期望突变引入细胞和/或整合到细胞的基因组DNA中以改善或恢复视觉。Chop2基因中引入细胞以改善或恢复视觉的期望突变也可以保持为附加体的，尚未整合到基因组DNA中。

[0013] Chop2的L132或T159氨基酸位置处的突变(且因此所得的ChR2)显著降低引发ChR2介导的光电流需要的阈值光强度。氨基酸位置L132和T159处的双重突变体进一步提高低光强度时的光电流,其超过任一种相应单突变的。表达L132和T159位置处的双重突变体的视网膜神经节细胞可以响应适合于恢复有用视觉的光强度,其落入正常户外光照条件的范围内,但是应当仍然维持足够的,且高的时间分辨率(temporal resolution)。因此,形成具有改善的光敏感性的突变体ChR2的本发明突变体Chop2蛋白单独或组合使用以恢复或改善视觉。

[0014] 具体地,本发明提供了分离的多肽分子,其包含或组成为(consisting of) SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L)。在分离的多肽分子的某些实施方案中,所述第132位氨基酸是半胱氨酸(C)或丙氨酸(A)。在第132位氨基酸是半胱氨酸(C)时,多肽分子可以包含或组成为SEQ ID NO:13。在第132位氨基酸是丙氨酸(A)时,多肽分子可以包含或组成为SEQ ID NO:20。

[0015] 本发明提供了分离的多肽分子,其包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第159位氨基酸不是苏氨酸(T)。在分离的多肽分子的某些实施方案中,第159位氨基酸是半胱氨酸(C),丝氨酸(S),或丙氨酸(A)。在第159位氨基酸是半胱氨酸(C)时,多肽分子可以包含或组成为SEQ ID NO:14。在第159位氨基酸是丝氨酸(S)时,多肽分子可以包含或组成为SEQ ID NO:17。在第159位氨基酸是丙氨酸(A)时,多肽分子可以包含或组成为SEQ ID NO:23。

[0016] 本发明提供了分离的多肽分子,其包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L),且第159位氨基酸不是苏氨酸(T)。在分离的多肽分子的某些实施方案中,所述分离的多肽分子包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L),且第159位氨基酸不是苏氨酸(T),第132位氨基酸是半胱氨酸(C),且第159位氨基酸是半胱氨酸(C)。在此分离的多肽分子的优选的实施方案中,多肽分子包含或组成为SEQ ID NO:16。本发明提供了编码分离的多肽的分离的核酸分子,所述分离的多肽包含或组成为SEQ ID NO:16。优选地,编码包含或组成为SEQ ID NO:16的分离的多肽的分离的核酸分子是包含或组成为SEQ ID NO:15的核酸分子。

[0017] 在分离的多肽分子的某些实施方案中,所述分离的多肽分子包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L),且第159位氨基酸不是苏氨酸(T),第132位氨基酸是半胱氨酸(C),且第159位氨基酸是丝氨酸(S)。分离的多肽分子可以包含或组成为SEQ ID NO:19,所述分离的多肽分子包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L),且第159位氨基酸不是苏氨酸(T)。或者/另外,分离的多肽分子可以包含或组成为SEQ ID NO:19,所述分离的多肽分子包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L),且第159位氨基酸不是苏氨酸(T),其中第132位氨基酸是半胱氨酸(C),且其中第159位氨基酸是丝氨酸(S)。本发明提供了编码分离的多肽的分离的核酸分子,所述分离的多肽包含或组成为SEQ ID NO:19。优选地,核酸分子包含或组成为SEQ ID NO:18。

[0018] 在分离的多肽分子的某些实施方案中,所述分离的多肽分子包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L)且第159位氨基酸不是苏氨酸(T),第132位氨基酸是丙氨酸(A)且第159位氨基酸是半胱氨酸(C)。分离的多肽分子可以包

含或组成为SEQ ID NO:22,所述分离的多肽分子包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L)且第159位氨基酸不是苏氨酸(T)。或者/另外,分离的多肽分子可以包含或组成为SEQ ID NO:22,所述分离的多肽分子包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L)且第159位氨基酸不是苏氨酸(T),其中第132位氨基酸是丙氨酸(A)且其中第159位氨基酸是半胱氨酸(C)。本发明提供了编码分离的多肽的分离的核酸分子,所述分离的多肽包含或组成为SEQ ID NO:22。优选地,核酸分子包含或组成为SEQ ID NO:21。

[0019] 在分离的多肽分子的某些实施方案中,所述分离的多肽分子包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L)且第159位氨基酸不是苏氨酸(T),第132位氨基酸是半胱氨酸(C)且第159位氨基酸是丙氨酸(A)。分离的多肽分子可以包含或组成为SEQ ID NO:25,所述分离的多肽分子包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L)且第159位氨基酸不是苏氨酸(T)。或者/另外,分离的多肽分子可以包含或组成为SEQ ID NO:25,所述分离的多肽分子包含或组成为SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L)且第159位的氨基酸不是苏氨酸(T),其中第132位氨基酸是半胱氨酸(C)且其中第159位氨基酸是丙氨酸(A)。本发明提供了编码分离的多肽的分离的核酸分子,所述分离的多肽包含或组成为SEQ ID NO:25。优选地,核酸分子包含或组成为SEQ ID NO:24。

[0020] 本发明提供了本文中描述的任一种分离的多肽分子,其中所述多肽分子编码突变体Chop2蛋白,该突变体Chop2蛋白形成突变体ChR2,该突变体ChR2响应比野生型ChR2蛋白的阈值低的阈值光强度而引发电流。此外,电流传导阳离子。例示性的阳离子包括但不限于H⁺,Na⁺,K⁺,和Ca²⁺离子。本文中描述的ChR2野生型和突变体蛋白非特异性传导阳离子。因此,电流传导下列一种或多种:H⁺,Na⁺,K⁺,和Ca²⁺离子。

[0021] 本发明提供了本文中描述的任一种分离的多肽分子,其进一步包含药学可接受载体。本发明还提供了组合物,其包含本文中描述的至少一种分离的多核苷酸分子。组合物可以进一步包含药学可接受载体。

[0022] 本发明提供了分离的核酸分子,其编码本文中描述的任何分离的多肽。此外,分离的核酸分子可以进一步包含药学可接受载体。本发明还提供了组合物,其包含本文中描述的至少一种分离的核酸分子。组合物可以进一步包含药学可接受载体。

[0023] 本发明提供了细胞,其中该细胞已经接触或包含本发明的分离的多肽分子。此外,本发明提供了细胞,其中该细胞已经接触或包含本发明的分离的核酸分子,其编码本发明的分离的多肽分子。本发明提供了组合物,其包含,组成基本上为(consisting essentially of),或组成为细胞,该细胞包含本发明的分离的多肽分子或编码本发明的分离的多肽分子的核酸分子。本发明的细胞可以在体外,离体,在体内,或原位与分离的多肽或编码多肽的分离的核酸接触。在本发明的某些实施方案中,细胞是光感受器;水平细胞;双极细胞(bipolar cell);无长突细胞,和特别是AII无长突细胞;或视网膜神经节细胞,包括感光性视网膜神经节细胞。优选地,细胞是视网膜神经节细胞,感光性视网膜神经节细胞,双极细胞,ON型双极细胞,杆状双极细胞,或AII无长突细胞。在本发明的某些方面,细胞是光感受器,双极细胞,杆状双极细胞,ON型锥体双极细胞,视网膜神经节细胞,感光性视网膜神经节细胞,水平细胞,无长突细胞,或AII无长突细胞。

[0024] 本发明提供了改善或恢复视觉的方法,其包括对受试者施用本文中描述的任一种组合物。本发明进一步提供了保护视觉的预防方法,其包括对受试者施用本文中描述的任一种组合物。

[0025] 本文中描述的方法也可以应用于那些健康的盲(部分或完全)的受试者,和/或那些患有视网膜变性(以杆状和/或锥体光感受器细胞丧失为特征)的受试者,但是可以依赖于感光性视网膜神经节细胞的活性以测定周围光水平。例如,可以使用本文中描述的方法来保护,改善,或恢复感光性视网膜神经节细胞的活性,其介导用于将生理节奏(circadian rhythm)同步到24小时光照/黑暗周期的光照信息的转换,瞳孔控制和反射,和黑素释放的光调节。

[0026] 在本发明的方法的某些实施方案中,受试者可以具有正常的视觉或受损的视觉。或者/另外,受试者可以有风险形成导致视觉损伤的眼科疾病。例如,受试者可以具有眼科疾病,包括黄斑变性(macular degeneration)和色素性视网膜炎(retinitis pigmentosa)的家族史。受试者可以有风险招致眼损伤,其对视网膜中的感光性细胞引起损伤。受试者可以具有遗传标志物或遗传/先天性状况,其导致受损的视觉,低视觉,法定盲(legal blindness),部分盲(partial blindness),或完全盲。受试者可以具有屈折缺陷(refractive defect),其导致近视(myopia)(近视眼(near-sightedness))或远视(hyperopia)(远视眼(far-sightedness))。

[0027] 可以对受试者系统或局部施用本发明的方法的组合物。局部施用的优选路径是玻璃体内(intravitreal)注射。

[0028] 本发明还提供以下内容:

[0029] 1. 一种分离的多肽分子,其包含SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L)。

[0030] 2. 项1的多肽分子,其中所述第132位氨基酸是半胱氨酸(C)或丙氨酸(A)。

[0031] 3. 项2的多肽分子,其中所述第132位氨基酸是半胱氨酸(C),且其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:13。

[0032] 4. 项2的多肽分子,其中所述第132位氨基酸是丙氨酸(A),且其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:20。

[0033] 5. 一种分离的多肽分子,其包含SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第159位氨基酸不是苏氨酸(T)。

[0034] 6. 项5的多肽分子,其中所述第159位氨基酸是半胱氨酸(C),丝氨酸(S),或丙氨酸(A)。

[0035] 7. 项6的多肽分子,其中所述第159位氨基酸是半胱氨酸(C),且其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:14。

[0036] 8. 项6的多肽分子,其中所述第159位氨基酸是丝氨酸(S),且其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:17。

[0037] 9. 项6的多肽分子,其中所述第159位氨基酸是丙氨酸(A),且其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:23。

[0038] 10. 一种分离的多肽分子,其包含SEQ ID NO:26,其中SEQ ID NO:26的第132位氨基酸不是亮氨酸(L)且所述第159位氨基酸不是苏氨酸(T)。

- [0039] 11. 项10的多肽分子,其中所述第132位氨基酸是半胱氨酸(C),其中所述第159位氨基酸是半胱氨酸(C)。
- [0040] 12. 项10或11的多肽分子,其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:16。
- [0041] 13. 一种分离的核酸分子,其编码项12的分离的多肽。
- [0042] 14. 项13的核酸分子,其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:15。
- [0043] 15. 项10的多肽分子,其中所述第132位氨基酸是半胱氨酸(C),其中所述第159位氨基酸是丝氨酸(S)。
- [0044] 16. 项10或15的多肽分子,其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:19。
- [0045] 17. 一种分离的核酸分子,其编码项16的分离的多肽。
- [0046] 18. 项17的核酸分子,其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:18。
- [0047] 19. 项10的多肽分子,其中所述第132位氨基酸是丙氨酸(A),其中所述第159位氨基酸是半胱氨酸(C)。
- [0048] 20. 项10或19的多肽分子,其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:22。
- [0049] 21. 一种分离的核酸分子,其编码项22的分离的多肽。
- [0050] 22. 项21的核酸分子,其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:21。
- [0051] 23. 项10的多肽分子,其中所述第132位氨基酸是半胱氨酸(C),其中所述第159位氨基酸是丙氨酸(A)。
- [0052] 24. 项10或23的多肽分子,其中所述多肽分子包含SEQ ID NO:25。
- [0053] 25. 一种分离的核酸分子,其编码项24的分离的多肽。
- [0054] 26. 项25的核酸分子,其中所述核酸分子包含SEQ ID NO:24。
- [0055] 27. 一种分离的核酸分子,其编码项1,3,4,5,6,7,8,9,10,11,15,16,19,20,23,和24中任一项的分离的多肽。
- [0056] 28. 项27的分离的核酸分子,其中所述分离的多肽长约315,310,300,275,250,225,200,175,或160个氨基酸。
- [0057] 29. 项27或28的分离的核酸分子,其进一步包含药学可接受载体。
- [0058] 30. 项1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,15,16,19,20,23,和24中任一项的分离的多肽分子,其中所述多肽分子编码突变体ChR2蛋白,其响应比野生型ChR2蛋白的阈值低的阈值光强度而引发电流。
- [0059] 31. 项30的分离的多肽分子,其中所述多肽分子长约315,310,300,275,250,225,200,175,或160个氨基酸。
- [0060] 32. 项30或31的分离的多肽分子,其进一步包含药学可接受载体。
- [0061] 33. 一种组合物,其包含项27,28,和29中任一项的分离的核酸分子。
- [0062] 34. 一种组合物,其包含项1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,15,16,19,20,23,24,29,30和31中任一项的分离的多肽分子。
- [0063] 35. 一种细胞,其包含项1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,15,16,19,20,23,24,29,30和31中任一项的分离的多肽分子。
- [0064] 36. 一种细胞,其包含分离的核酸分子,该分离的核酸分子编码项1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,15,16,19,20,23,24,29,30和31中任一项的分离的多肽分子。
- [0065] 37. 一种细胞,其包含项27或28的分离的核酸分子。

- [0066] 38.一种组合物,其包含项35,36,和37中任一项的细胞。
- [0067] 39.项35,36,和37的细胞,其中所述细胞在体外,离体,在体内,或原位与所述分离的多肽或编码所述多肽的分离的核酸接触。
- [0068] 40.项35,36,和37的细胞,其中所述细胞是光感受器,双极细胞,杆状双极细胞,ON型锥体双极细胞,视网膜神经节细胞,感光性视网膜神经节细胞,水平细胞,无长突细胞,或AII无长突细胞。
- [0069] 41.项40的细胞,其中所述细胞是视网膜神经节细胞或感光性视网膜神经节细胞。
- [0070] 42.一种改善或恢复视觉的方法,其包括对受试者施用项33的组合物。
- [0071] 43.一种改善或恢复视觉的方法,其包括对受试者施用项34的组合物。
- [0072] 44.一种改善或恢复视觉的方法,其包括对受试者施用项38的组合物。
- [0073] 45.项42,43和44的方法,其中所述受试者具有正常的视觉。
- [0074] 46.项42,43和44的方法,其中所述受试者具有受损的视觉。
- [0075] 47.项42,43和44的方法,其中所述受试者患有眼疾病。
- [0076] 48.项47的方法,其中所述眼疾病是黃斑变性(macular degeneration)或色素性视网膜炎(retinitis pigmentosa)。
- [0077] 49.项42,43和44的方法,其中通过玻璃体内或视网膜下注射施用所述组合物。
- [0078] 50.项42,43和44的方法,其中所述改善或恢复视觉包括下列任一项:提高光敏感性;降低引发光电流需要的阈值光强度;及提高视皮质中的视觉诱发电位。
- [0079] 本发明的其它特征和优点从以下详细描述和权利要求书看会是显而易见的,并且由以下详细描述和权利要求书涵盖。
- [0080] 附图简述
- [0081] 图1显示了用于比较其光敏感性的HEK细胞中来自野生型(WT) ChR2,L132C,L132C/T159C,和L132C/159S突变体的光引发电流(light-evoked current)的代表性记录(A)。光刺激(光子/cm².s,于460nm)由氙弧灯产生并且通过中性密度滤光片(neutral density filter)减弱:ND4.0 (2.8x10¹⁴),ND3.0 (1.4x10¹⁵),ND2.5 (4.8x10¹⁵);ND2.0 (1.6x10¹⁶),ND1.0 (1.3x10¹⁷),ND0 (1.2x10¹⁸) (B)。以不同电流比例显示了相同的电流迹线。以箭头指向的迹线通过相同的光强度(ND2.5)引发。
- [0082] 图2显示了用于比较其失活时间过程(deactivation time course)(光照关闭后的衰减时间过程)的HEK细胞中针对10ms光脉冲(1.2x10¹⁸个光子/cm²/s,于460nm)的来自野生型(WT) ChR2,T159C,L132C,L132C/T159C,和L132C/T159S突变体的光引发电流的代表性记录。
- [0083] 图3显示了用于比较其光敏感性的视网膜整装(retinal whole-mount)中来自视网膜神经节细胞的WT ChR2,L132C,L132C/T159C,和L132C/T159S介导的尖峰形成活性(spiking activities)的代表性多通道阵列记录。光刺激(光子/cm²/s)由473nm蓝色激光产生,并且通过中性密度滤光片减弱:ND0 (6.3x10¹⁶),ND1.0 (7.4x10¹⁵),ND1.5 (2.7x10¹⁵),ND2.0 (7.3x10¹⁴),ND2.5 (3.2x10¹⁴),ND3.0 (8.5x10¹³),ND3.5 (3.8x10¹³),和ND4.0 (9.5x10¹²)。
- [0084] 图4显示了用于比较其时间动态(temporal dynamics)的视网膜整装中来自视网膜神经节细胞的WT ChR2,L132C,L132C/T159C,和L132C/T159S介导的尖峰形成活性的代表

性多通道阵列记录。在每个小图中，显示了源自单个光子的10个连续光引发尖峰(light-elicited spike)的光栅图(顶部)和平均尖峰率(averaged spike rate)直方图(底部)。以高于每个突变体的阈值强度约1个对数单位的强度通过473nm蓝色激光产生不同频率的光脉冲。WT Chr2和L132C的记录显示于(A)，且L132C/T159C和L132C/T159S的记录显示于(B)。

[0085] 发明详述

[0086] 视觉系统

[0087] 中枢神经系统经由视觉系统中存在的特化细胞和信号转导的独特方法介导视觉(在本文中又称为视力)。视觉系统的责任是将电磁辐射形式的光转化成周围世界的画像或图像。在此系统的“视觉”功能外，视觉系统还调节瞳孔光反射(pupillary light reflex,PLR)，向周期性光照/黑暗周期的生理节奏光牵引(circadian photoentrainment to periodic light/dark cycle)，和激素褪黑素的释放。

[0088] 视网膜的细胞是视觉或神经系统遇到光(不同波长和强度的电磁辐射)的第一种细胞。光子在达到视网膜前穿过角膜，瞳孔，和晶状体。视网膜由于直接吸收光子的光感受器细胞位于视网膜的外层而具有独特的结构。在达到光感受器细胞(又称为杆和椎体)的外层前，穿过晶状体的光子首先遇到视网膜神经节细胞(少数视网膜神经节细胞通过表达视蛋白黑视蛋白(melanopsin)而为感光性)的内层和双极细胞的中间层。杆状光感受器在暗淡照明条件(暗适应视觉)中起作用，而椎体光感受器在明亮照明条件(光适应视觉)中起作用，负责颜色视觉。椎体光感受器直接对ON和OFF型锥体双极细胞上形成突触，其继而直接对ON和OFF型视网膜神经节细胞上形成突触。杆状光感受器向杆状双极细胞(一种独特类型的双极细胞，其为ON型)形成突触，所述杆状双极细胞向AII无长突细胞形成突触。AII无长突细胞然后通过缝隙连接对ON型锥体双极细胞及通过抑制性甘氨酸能突触对OFF型锥体双极细胞及OFF神经节细胞中继(relay)视觉信号。视网膜神经节细胞负责将视觉信号与脑神经元关联。

[0089] 光转导

[0090] 在视网膜内，光感受器细胞吸收光子颗粒，并将光频率和波长的原始数据转化成化学及随后电信号，其遍及视觉和神经系统传播此种初始信息。具体地，位于光感受器(杆状，椎体，和/或感光性视网膜神经节细胞)表面上的蛋白质视蛋白吸收光子，并且启动胞内信号传导级联，其导致光感受器的超极化。在黑暗中，蛋白质视蛋白不吸收光子，光感受器是去极化的。光感受器的视觉信号然后经由双极细胞，无长突细胞，和神经节细胞中继到脑的高视觉中心。具体地，当杆状和椎体光感受器去极化(在黑暗中)时，它们引起杆状双极细胞和ON型锥体双极细胞的去极化，但OFF型锥体双极细胞的超极化，这继而引起AII无长突细胞的去极化和ON型视网膜神经节细胞的尖峰形成(spiking)增加和OFF型视网膜神经节细胞的尖峰形成减少。当杆状和椎体光感受器超极化(响应光)时，发生相反的事情(就杆状，ON和OFF双极细胞，AII无长突细胞及ON和OFF神经节细胞而言)。

[0091] 光照信息通过光感受器，双极细胞，水平细胞，无长突细胞，和视网膜神经节细胞的作用被显著加工和提炼(refine)。为了增加此系统的复杂性，光感受器以三种主要种类发现，包括杆状，椎体(其中三类最强烈响应不同的光波长)，和感光性视网膜神经节细胞。因此，在差异响应某些光波长和强度的光感受器水平发生第一层信息加工。视网膜的双极细胞接受来自光感受器细胞和水平细胞两者的信息。视网膜的水平细胞接受来自多种光感

受器细胞的信息,且因此整合视网膜中细胞类型和穿过距离之间的信息 (information between cell types and across distances in the retina)。双极细胞通过对视网膜神经节细胞产生主要分段电势 (mainly graded potential) 进一步整合直接来自光感受器细胞和水平细胞的信息,尽管一些最近的研究指示一些双极细胞可以产生作用电势。锥体双极细胞在视网膜神经节细胞和无长突细胞上形成突触,而杆状双极细胞仅对AII无长突细胞形成突触。类似于水平细胞,大多数无长突细胞在视网膜内侧向整合信息。不同于水平细胞,大多数无长突细胞是抑制性 (GABA能) 中间神经元。无长突细胞也比水平细胞更为特化,因为每个无长突细胞在特定类型的双极细胞 (双极细胞的10个种类之一) 上特异性形成突触。特别地,AII无长突细胞是杆状途径 (在暗适应视觉下,此时椎体光感受器不响应) 中的一种重要中继神经元。AII无长突细胞接受来自杆状双极细胞的突触输入,然后将信号捎带确认 (piggy-back) 到如上文描述的从ON和OFF锥体双极细胞至ON和OFF神经节细胞的椎体途径。因此,杆状双极细胞或AII无长突细胞中的Chop2的表达和所得的ChR2形成可以在视网膜神经节细胞中创建开启 (ON) 和关闭 (OFF) 响应。此外,视网膜神经节细胞整合来自双极细胞及来自无长突细胞的信息。虽然视网膜神经节细胞就大小,连接性 (connectivity), 和对视觉刺激 (例如视野) 的响应而言显著变化,所有视网膜神经节细胞将长的轴突延伸到脑中。除了转导关于瞳孔光反射和生理节奏光牵引的非视觉信息的一小部分视网膜神经节细胞外,从视网膜神经节细胞延伸的全部轴突形成中枢神经系统的视神经,视交叉,和视束。因此,视网膜自身中发生大量的信息加工。

[0092] 光感受器细胞表达内源视蛋白蛋白质,诸如视紫红质。本发明的突变体Chop2蛋白可以在任何细胞类型中表达,并且形成功能性ChR2通道。优选地,细胞是视网膜细胞。例示性的细胞包括但不限于光感受器细胞 (例如杆状,椎体和感光性视网膜神经节细胞), 水平细胞, 双极细胞, 无长突细胞, 和视网膜神经节细胞。

[0093] 通道视蛋白-2 (Chop2)

[0094] 通道视蛋白-2 (Chop2) 首次从绿藻莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 分离。通道视蛋白-2是一种七跨膜域蛋白质,其在与发色团全反式视黄醛结合时变为光可转换的 (光敏感性)。Chop2在经由Schiff碱连接与视网膜分子连接时形成光门控的,非特异性,内部整流的阳离子通道,称作通道视紫红质-2 (Channelrhodopsin-2) (Chop2 retinalidene, 缩写为ChR2)。

[0095] 如本文中提及的,“通道视蛋白-2”或“Chop2”指编码通道视蛋白-2的基因,所述通道视蛋白-2在结合视黄醛后然后形成通道视紫红质-2 (ChR2)。本发明的基因构建体主要指通道视蛋白-2 (即,没有视黄醛),并且本文中公开的所有Chop2变体形成功能性通道视紫红质-2变体。本文中公开的方法可以包括将Chop2投递到没有外源视黄醛的细胞。应当理解,在细胞 (即视网膜神经元) 中表达Chop2后,内源可用的视黄醛结合野生型Chop2或本发明的Chop2突变体以形成功能性光门控通道WT ChR2或突变体ChR2。因此,如本文中提及的Chop2蛋白与ChR2也可以是同义的。

[0096] 如本文中使用的,“通道视紫红质-2”或“ChR2”指视黄醛结合的功能性光敏感性通道。在一个实施方案中,可以外源提供结合的视黄醛。在一个优选的实施方案中,从细胞中可用的内源水平提供结合的视黄醛。本发明还涵盖由编码本文中描述的Chop2突变体的多肽和多核苷酸形成的功能性通道视紫红质-2通道。

[0097] 在通过优选剂量的光发射照明后,ChR2开放通道的孔, H^+ , Na^+ , K^+ ,和/或 Ca^{2+} 离子通过该孔从胞外空间流到细胞中。ChR2通道的活化通常引起表达通道的细胞的去极化。去极化的细胞产生分段电势和或作用电势(action potential)以将信息从Chop2/ChR2表达细胞携带到视网膜或脑的其他细胞。

[0098] ChR2的野生型形式或具有高时间分辨率的突变体ChR2已经变为神经科学研究中心焦点。在哺乳动物神经元中表达时,ChR2介导体外或离体培养物的光控制去极化。野生型ChR2或具有高时间分辨率的突变体ChR2(后者通常展现出低光敏感性)提出了使其能够用于视觉恢复目的必须解决的几项挑战。为了视觉恢复,具有较高光敏感性而非高时间分辨率的ChR2是期望的。

[0099] 野生型ChR2蛋白需要来自较高蓝光强度的照明以实现完全活化(即 10^{18} - 10^{19} 个光子 $s^{-1}cm^{-2}$,于480nm的波长)。此类连续照明可以损伤细胞。

[0100] 野生型ChR2蛋白的动力学对于使通道效力最大化是次优的。效力可以通过修饰野生型ChR2蛋白的一个或多个氨基酸以延长通道的开放状态或者提高通道的单位电导,或两者提高。野生型ChR2的单通道电导是小的。因此,体内的神经元活化应当需要野生型通道的高表达或用优选的蓝光波长的非常强烈的活化。更简单的解决办法可以通过改变通道电导发现或延长通道开放时间。这些机制的任一种及特别是这些机制的组合使得能使用更低且更安全的光强度达到相同水平的细胞去极化。

[0101] 例如,本发明的突变体ChR2蛋白经由通道开放状态的延长实现更大的光敏感性。因此,在被相同光强度活化时,每个突变体ChR2通道比野生型ChR2通道传导更大的光电流。因此,突变体通道被比野生型ChR2通道活化需要的光强度低的光强度活化。可以通过比引发来自表达野生型ChR2的视网膜神经节细胞的尖峰形成活性需要的光强度低1.5-2个对数单位的光强度引发表达突变体ChR2蛋白的视网膜神经节细胞的数量上可检测的尖峰形成活性。因此,活化突变体ChR2蛋白需要的光强度选择为或落入正常户外光照条件的范围。

[0102] 以下序列提供了野生型和突变体Chop2蛋白,和编码本发明的所述WT和突变体Chop2蛋白的多核苷酸,并形成本发明的WT和野生型ChR2的多核苷酸的非限制性例子。

[0103] 本发明的野生型(WT)Chop2可以由以下莱茵衣藻衣视蛋白4(chlamyopsin 4)光门控离子通道(COP4)mRNA序列(GenBank登录号XM_001701673和SEQ ID NO:1)编码:

[0104]

```

1 gcagcaccat acttgacatc tgcgccaag caagcattaa acatggatta tggaggcgcc
61 ctgagtgcg ttggcgca gctgttattt gtaacgaacc cagtagtcgt caatggctct
121 gtacttgtgc ctgaggacca gtgttactgc gcgggctgga ttgagtcgcg tggcacaaac
181 ggtgccaaa cgccgtcgaa cgtgtcgaa tggcttgcg ctggcttctc catcctactg
241 cttatgttt acgcctacca aacatggaa tcaacctgcg gctgggagga gatctatgt
301 tgcgtatcg agatggtcaa ggtgatttctc gagttttctc tcgagttaa gaaccctgc
361 atgctgtatc tagccacagg ccaccgcgtc cagtggtgc gttacgcga gtggcttctc
421 acctgcccgg tcattctcat tcacctgtca aacctgacgg gcttgcgcgaa cgactacagc
481 aggccacca tgggtctgtat tggtctgtat attggcaca ttgtgtggg cgccacttcc
541 gccatggcca ccggatacgt caaggtcata ttcttcgtcc tgggtctgtg ttatgggtct
601 aacacgttct ttcacgcgtc caaggcctac atcgagggtt accacaccgt gccgaaggc
661 cggtgtcgcc aggtggtgc tggcatggct tggctttctc tcgtatcatg gggtatgttc
721 cccatctgt tcatcctcg ccccgagggc ttccggcgtcc tgacgtgtc cggctccacc
781 gtcggccaca ccatcatga cctgtatgtc aagaactgtc ggggtctgtc cggccactac
841 ctgcgtgc tgatccacga gcatatcctc atccacggcg acattcgaa gaccacaaa
901 ttgaacattt gttgcactga gattgggtc gagacgttgg tggaggacga ggccgaggct
961 ggcgcggta acaaggcgc cggcaagtac gcctcccgcg agtccttc ggtcatgcgc
1021 gacaagatga aggagaaggg cattgacgtc cgccctctc tggacaacag caaggagggt
1081 gagcaggagc aggccgcag ggctgccatg atgatgtatga acggcaatgg catgggtatg
1141 ggaatggaa tgaacggcat gaacggatg ggcgttatga acggatggc tggcggcc
1201 aagccggcc tggagctcac tccgcagcta cagccccggc gcgtcatcct ggcgggtcc
1261 gacatcagca tgggtactt ctccgcgag cagtttgcg agtatacggt gacgtacgag
1321 ctggtgcggg ccctggcgcc tgacaacaca ctggcgttgg ttacgcaggc gcagaacctg
1381 ggcggcgtgg actttgtt gattcacccc gagttcctgc gcgaccgcgc tagcaccaggc
1441 atcctgagcc gcctgcgcgg cgccggccag cgtgtggctg cttccggctg ggcgcagctg
1501 gggcccatgc gtgacctgtat cgagtccgc aacctgacgc gctggcttgg gggccctcg
1561 ttccggacagg gcatcctcgcc ggcccacatc gttccctgg tggccaagat gcaagcagatg
1621 cgcaagatgc agcagatgc gcaattggc atgatgaccg gcccgtatgaa cggcatggc
1681 ggcgtatgg gcggcgccat gAACGGCATG ggcggccgc acggcatgaa caacatggc
1741 aacggcatgg gcggcgccat gggcaacggc atggcgccatg atggcatgaa cggaaatggg
1801 ggcggcaacg gcatgaacaa catggcgcc aacggatgg cccgcaacgg aatggcgcc
1861 ggcattggcg gcaacggat gggtggtcc atgaacggc ttagctccg cgtggggcc
1921 aacgtgacgc cttccgcgcg cggcgccatg ggcggcatgatg tgaacggcg catggctgcg
1981 cccagtcgc cggcatgaa cggcgccgc ctgggtacca acccgctt caacccgcgc
2041 ccctcaccgc tcaagtcgc gctcggtgcc gaggcaggc tggcagcat gggaggcatg
2101 ggcgaaatga gcggaaatgg aggcatgggt ggaatgggg gcatggcg cggccggcc
2161 gccacgacgc aggctgcggg cggcaacgcg gaggcggaga tgcgtcagaa tctcatgaac
2221 gagatcaatc gcctgaagcg cgagcttggc gagtaaaagg ctggaggccg tgcgtcgc
2281 acctgcgagc tgcgcgcct gactgtcgat acacacggc caggagcagc cggcgttgg
2341 cttctcaacc tgggtgcac gtatcttagag cggcctgtc gcgaccgtcc tgcgtcgc
2401 cggtgcgatc ttccgcctt cgcaccgc aatggcttgc gtcgtcgc
2461 catcgccga acggaaaggcc ggttgcata gtaaagcattt gaaactgaa gtcgtcgc
2521 cgtagtgcata tggctctgcg cgtaaatgggg cgctccctg cttaactacgc attgccaag
2581 actgttccct tttgggtggcc gagggccctgg tccacatca ttcatttgca taacgtactg
2641 ttttagttaca tacgcttgc ttaacctcgaa caattgcaat atgggtcgat agtccgtacg
2701 gcggtatgg acgaagggtt tattggatgt gatttagaat ctcgggtgaa aggcttcgag
2761 aaagttagt tcatctgtgg ctctgttgg ggtcataaag aagaacgc gtaaggcaaa
2821 cgaggtaaaa gtggcacgtc tttgtgcaca acgggcccgt ggaggtggg ggagtcgc
2881 tgtgcgtcc taacacgcg gtcggaaagcg ggctttctg gagctgggtt acggcttgc
2941 tcggcaactg ctctgtttaa accacacgc ttcggaaatc tgggtatgtt ttgttggc
3001 aaacatttgg gtaacttgag ggtgattcg ttcggatcg acaacatggc tggcgtccgt
3061 gtgcaggac ggtaatcaat gagctggagc tgcgtatgc accacacgtt gcataccct
3121 gcttacaaaa acacttgcgat gtcgtggcca aactatgcgt gagcaaaagag ttaaagaggc
3181 atgagtgcat ggttgcggac gtgcgcacaa attgcataa gtatttgac cttcaagcc
3241 aacaagtgcg cgcgcggca ctgattaaac acggcgcgc acgtgggtgg ggcgttaca
3301 gtgttatga gtcgcattt tgcgtatgcg agtggtaggt tgcgtgtac gccgcgcgc
3361 tgtggccct tacatggaga gttgggtgt tcaccacacg gtcggccgc ctgaagggtg
3421 tgctatgttt tggtaaagcc gggccctga agacccgac cgtagaaccc tactgaaagg
3481 gtgtcagccc gggtaactg gatgcctgg gacatacgta ttaatgttga agtgaaggccg
3541 tcaagccgag tgcgtgcgc cgctgtatca ccaaggcccg tccta

```

[0105]

[0106] 本发明的野生型(WT)ChR2可以由以下莱茵衣藻衣视蛋白4光门控离子通道(COP4)

氨基酸序列(GenBank登录号XP_001701725,和SEQ ID NO:2)编码:

[0107] 1 mdyggalsav grellfvtnp vvvngsvlp edqcycagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
 61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiivcaine mvkvilefff efnkpsmlyl atghrvqwlr
 121 yaewlltcpv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviffcl
 181 glcygantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlf vswgmpilf ilgpefgv1
 241 svygstvght iidlmsknw gllghylrwl ihehilihg dirkttklnid gteievetlv
 301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveeqq aaraammnn
 361 gngmgmcmg ngnmgmcmg mn gmaggakpgl eltpqlqpgr vilavpdism vdffreqfaq
 421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlgvd fvlihpeflr drsstsilsr lrgagqravaa
 481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfgqg ilpahivalv akmqqmrmkq qmqqigmmtg
 541 gnmngmcmg gnmngmcmg mn mn gnmngmcmg gnmngmcmg mn mn gnmngmcmg
 601 gngmgmcmg ngnmgmcmg ssgvvanvtp saaggmcmg mn ngmnaapqsp gnmngmcmg
 661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmgmgmgs gmgmcmg mgagaattq aaggnaeaem
 721 lqnlmneinr lkrelge

[0108] 本发明的野生型(WT)Chop2可以由以下莱茵衣藻视黄醛结合蛋白(cop4)基因序列(GenBank登录号AF461397,和SEQ ID NO:3)编码:

[0109] 1 gcatctgtcg ccaagcaagc attaaacatg gattatggag gcgccttag tgccgttgg
 61 cgcgagctgc tattttaac gaacccagta gtcgtcaatg gctctgtact tgtgccttag
 121 gaccagtgtt actgcgcgg ctgatttag gtcgtggca caaacggc ccaaacggcg
 181 tcgaacgtgc tgcaatgct tgctgctgg ttctccatcc tactgcttat gttttacgcc
 241 taccaaacat ggaagtcaac ctgcggctgg gaggagatct atgtgtgc tatcgatg
 301 gtcaaggtga ttctcgagtt ctcttcgag tttaagaacc cgtccatgct gtatctagcc
 361 acaggccacc gcgtccagtg gttcggttac gcccagttgc ttctcacctg cccggcatt
 421 ctcattcacc tgtcaaacct gacgggcttg tccaaacact acagcaggcg caccatggg
 481 ctgcttgtgt ctgatattgg cacaattgtg tggggcgcca cttccgcat ggcacccgga
 541 tacgtcaagg tcatcttctt ctgcctgggt ctgtgttatg gtgctaacac gtttttcac
 601 gctgccaagg cctacatcga gggtaaccac accgtgccga agggccgtg tcgcacccgt
 661 gtgactggca tggcttgct ctcttcgta tcatgggta tggccat cctgttcatc
 721 ctcgcccccg agggttcgg cgtcctgagc gtgtacggct ccaccgtcgg ccacaccatc
 781 attgacactga tgcgaaactgatgggct ctgcctgggct ctgcctggcc actacactgcg cgtgctgatc
 841 cacgagcata tcctcatcca cggcgacatt cgcaagacca ccaaattgaa cattggcggc
 901 actgagattg aggtcgagac gctgggtggag gacgaggccg aggctggcgc ggtcaacaag
 961 ggcacccggca agtacgcctc cggcgactcc ttccctggta tgcgcgacaa gatgaaggag
 1021 aaggccattg acgtgcgcgc ctctctggac aacagcaagg aggtggagca ggagcaggcc
 1081 gccaggctg ccatgatgat gatgaacggc aatggcatgg gatggaaat gggaaatgaaac
 1141 ggcataacg gaatggccgg tatgaacggg atggctggcg ggcaccaagcc cggccctggag
 1201 ctcactccgc agtacagcc cggccgcgtc atccctggcg tgcggacat cagcatggtt
 1261 gacttcttcc gcgcgcgtt tgcgcgttca tgggtgacgt acgagctggt gcccggctg
 1321 ggcgcgtaca acacactggc gctggttacg caggcgacaa acctggccgg cgtggacttt
 1381 gtgttgattt acccccgatgtt cctgcgcgtc cgctctagca ccagcatcct gagccgcctg
 1441 cgcggcgcgg ggcgcgtgt ggctgcgttc ggctggccgc agctggggcc catgcgtgac
 1501 ctgatcgagt cgcacccctt ggacggctgg ctggaggggcc cctcggttcgg acaggccatc
 1561 ctgcggccccc acatcgatgc cttggcgcc aagatgcgcg agatgcgcgaa gatgcgcgc
 1621 atgcagcaga ttggcgatgat gacggccggc atgaacggca tggccggccgg tatggccggc
 1681 ggcataacg gcatggccgg cggcaacggc atgaacaaca tggcaacgg catggccggc
 1741 ggcataggca acggcatggg cggcaatggc atgaacggaa tgggtggccgg caacggcatg
 1801 aacaacatgg gcccacacgg aatggccggc aacggaaatgg gcccggccat gggccggcaac
 1861 ggtatgggtg gctccatgaa cggcatgagc tccggcggtt tggccaaacgt gacgcctcc
 1921 gcccggccgg gcatggccgg catgatgaaac ggcggcatgg ctgcggccca gtcgcggcc
 1981 atgaacggccgg gcccggccgg taccaccccg ctcttcacgg cccgcgcctc accgctcagc
 2041 tcgcgcgtcg tgccgcggc aggcacggc acatggggag gcatggccgg aatgagcgg
 2101 atgggaggca tgggtggaaat gggggccatg ggcggccggc gcccggccac gacgcaggct
 2161 gcccggccggca acggcgaggc ggagatgctg cagaatctca tgaacggat caatgcctg
 2221 aacgcgcgac ttggcgagta a

[0110] 本发明的野生型(WT)Chop2可以由以下莱茵衣藻视黄醛结合蛋白(cop4)氨基酸序列(GenBank登录号AAM15777,和SEQ ID NO:4)编码:

[0111] 1 mdyggalsav grellfvtnp vvvngsvlp edqcycagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiivcaine mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcpv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviffcl
181 glcygantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlf vswgmpilf ilgpefgv1
241 svygstvght iidlmsknw gllghylrwl ihehilihg dirkttklnig gteievetlv
301 edeaeeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveeqq aaraammnn
361 gngmgmgm gmngmgmgn gmaggakpgl eltpqlqpgr vilavpdism vdffreqfaq
421 lsvtyelvpa lgadntla1v tqaqnlgvd fvlihpeflr drsstilsr lrgagqravaa
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfgqg ilpahivalv akmqqmrkmq qmqqigmmtg
541 gmngmgggmg ggmgngmggn gmnnmgngmg ggmgngmggn gmngmgggng mnmgngmna
601 gngmgggmgg ngmggsmnmg ssgvvanvtp saaggmgggm nggmaapqsp gmnggrlgtn
661 plfnaapspl ssq1gaaeagm gsmggmggms gmggmgggmgg mggagaattq aaggnaeaem

[0112] 721 lqnlmneinr lkrelge

[0113] 本发明的野生型(WT)Chop2可以由以下莱茵衣藻感觉视蛋白B(CSOB)mRNA序列(GenBank登录号AF508966, 和SEQ ID N0:5)编码:

1 ttgacatctg tcgccaagca agcattaaac atggattatg gaggcgccct gagtgccgtt
 61 gggcgcgac tgctatttgt aacgaaccca gtagtcgtca atggctctgt acttgtgcct
 121 gaggaccagt gttactgcgc gggctggatt gagtcgcgtg gcacaaaacgg tgcccaaacg
 181 gcgtcaacg tgctgcaatg gcttgctgt ggcttctcca tcctactgct tatgtttac
 241 gcctaccaaa catggaagtc aacctgcggc tgggaggaga tctatgtgtg cgctatcgag
 301 atggtaagg tgattctcgat gttttcttc gagtttaaga acccgccat gctgtatcta
 361 gccacaggcc accgcgtcca gtgggtcgat tacgcccagt ggcttctcac ctgcccgtc
 421 attctcatc acctgtcaaa cctgacgggc ttgtccaaacg actacagcag ggcacccat
 481 ggtctgcttg tggatgtat tggacaatt gtgtgggctg ccacttccgc catggccacc
 541 ggatacgtca aggtcatctt ctgtgtcgat ggtctgtgtt atgggtctaa cacgttctt
 601 cacgctgcca aggccatcat cgagggttac cacaccgtgc cgaaggcccg gtgtcgccag
 661 gtggtgactg gcatggcttg gctttcttc gtatcatggg gtatgttccc catcctgttc
 721 atcctcgccg ccgagggtt cggcgtctg agcgtgtacg gctccaccgt cggccacacc
 781 atcattgacc tgatgtcgaa gaactgctgg ggtctgtcg gccactacact ggcgtgtcg
 841 atccacgagc atatcctcat ccacggcgcac attcgcaaga ccaccaaatt gaacattgg
 901 ggcactgaga ttgagggtcgaa gacgctggg gaggacgagg ccgaggctgg cgcggtaac
 961 aaggcaccg gcaagtaacgc ctccccgcgag tccttctgg tcatgcgcga caagatgaag
 1021 gagaaggccg ttgacgtcgat cgcctctcg gacaacagca agaggtgga gcaggagcag
 1081 gcccgcaggc ctgcatgat gatgtgaac ggcaatggca tgggtatggg aatgggaatg
 1141 aacggcatga acggaatggg cggatgtaaac gggatggctg gcccgcctaa gcccggcctg
 1201 gagctcactc cgcagctaca gcccggccgc gtcatctgg cgtgtccggc catcagcatg
 1261 gttgacttct tcccgagca gtttgcctcgat ctatcggtgat cgtacgagct ggtgcggcc
 1321 ctggcgctg acaacacact ggcgtgggtt acgcagcgc agaacctggg cggcgtggac
 1381 tttgtgttga ttccacccga gttcctgcgc gaccgcctta gcaccagcat cctgagccgc
 1441 ctgcgcggcg cgggcacggc tgggtgtcgat ttgggtgggg cgcagctggg gcccattgcgt
 1501 gacctgatcg agtccgcggg cctggacggc tggctggagg gcccctcgat cggacaggc
 1561 atcctgcccgg cccacatcgat tgccctggg gccaagatgc agcagatgcg caagatgcg
 1621 cagatgcgc acattggcat gatgaccggc ggcataacgc gcatggcgg cggatgggg
 1681 ggcggcatga acggcatggg cggcggcaac ggcataacgc acatgggcaaa cggcatgggg
 1741 ggcggcatgg gcaacggcat gggcggcaat ggcataacgc gaatgggtgg cggcaacggc
 1801 atgaacaaca tgggcccggaa cggaatggcc ggcacacggaa tgggcccggg catggggcc
 1861 aacgttatgg tgggtctcat gAACGGCAGT AGCTCCGGCG TGGTGGCCAA CGTACGCCC
 1921 tccggccggc gcgccatggg cggcatgtat gacggccgc tggtgcgc ccagtgcggcc
 1981 ggcataacgc gcgccggcct gggtaccaac cgcgttctca acgcggccgc ctcaccgc
 2041 agctcgacgc tgggtgcgc ggcaggcatg ggcacatgg gaggcatggg cggaaatgago
 2101 ggaatgggag gcatgggtgg aatggggggc atgggcccgc cggccggcgc cacgacgc
 2161 gctgcggcg gcaacgcggg gggggagatg ctgcagaatc tcatgaacgc gatcaatgc
 2221 ctgaagcgcg agttggcgat gtaaaaggct ggaggccggt actgcgatac ctgcgagctc
 2281 ggcgcctga ctcgtcgat acacggctca ggacgcacgc cgcgtggact tctcaacctg
 2341 tgtcaacgt atctagagcg gcctgtgcgc gaccgtccgt gacgttccg gtgcgatctt
 2401 cccgccttcg caccgcataat tcccttcgt gcccgtcgc gctgcacgc tcgtccgaa
 2461 ggaaggccgg cttgtatcgat aaagcattga agactgaatgc cgtgcacccg tagtgc
 2521 gctctgcacg taagtggcg ctggccctgt tactacgc tggccaaagac tgcttcctt
 2581 tgggtggccga ggccctggc ccacatcatt catttcgcata acgtactgtt tagttacata
 2641 cgcttgcgtt aacctcgaca attgcacat gggctgagag tccgtacggc ggctatggac
 2701 gaagggttta tggatgtga ttaggaatct cgggtggaaat gcttcgagaa agttagctt
 2761 ttctgtggct tctgttgggg tcatcaagaa gacgacggg aaggcaacg agttaaaatg
 2821 ggcacgttgc tggcacaac gggccctgtt agagtgaaaa agtgcatgtg tgccgttca
 2881 acacgcgatg gcaaaacggg ctttctggat gctgggttac ggtctggctc ggcaactgct
 2941 ctgtttta accacagctt cggaaatgtcg ggtatgtttt gttggcagaa acattgggt
 3001 aacttgaggg tgattcgat gggatcgac aacatgcgtt ccgtccgtgt gcaaggacgg
 3061 taatcaatga agtgcataat gttatgtca ccacacgtt cataccctt cttacaaaaaa
 3121 cacttgcgtt tggcggccaa actatgcgtt agcaaaatgt taaagaggca tgagtgc
 3181 gttgcggacg tggcacaacaa ttgcataatg tatttgcacgc ctcaagccaa acaagtgc
 3241 ggcggcaac ttgatataaca cgcggacgc agtgggggg gctgtacag tggatgtatg
 3301 ctgcatttc gcatccgtt gtgttaggtt gctgtgcgtt ccgcgcggct gtcggccctt
 3361 acatggagag tgggtggctt caccacacgg ttggccggc tgaagggtgt gctatgttt
 3421 ggtaaagccg gggccctgaa gaccgcaccc gtagaaccgt actgaaagggg tgcaccccg
 3481 gggtaactgg atgccttggg acatagctat taatgttgc gttggcagaa acatgggt
 3541 ggcgtgcgc gctgtatcac caaggccgtt caaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa

[0114] [0115] [0116] 本发明的野生型(WT)Chop2可以由以下莱茵衣藻感觉视蛋白B(CSOB)氨基酸序列

(GenBank登录号AAM44040,和SEQ ID NO:6)编码:

[0117] 1 mdyggalsav grellfvtnp vvvngsvlvp edqcycagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
 61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiivcaine mvkvilefff efnpsmlyl atghrvqwlr
 121 yaewlltcpv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviffcl
 181 glcygantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlf vswgmpilf ilgpefgv1
 241 svygstvght iidlmsknw gllghylrwl ihehilihg dirkttklnig gteievetlv
 301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammnn
 361 gngmwmgm gmngmwmgnm gmaggakpgl eltpqlqpgr vilavpdism vdffreqfaq
 421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlgvd fvlihpeflr drsstilsr lrgagqrava
 481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfgqg ilpahivalv akmqqmrkmq qmqqiqgmmtg
 541 gmngmwmgm gmngmwmgnm gmnmngmngm ggmngmwmgnm gmngmwmgnm mnmmgngmna
 601 gngmwmgm gmngmwmgnm ssgvvanvtp saaggmwmgnm nggmaapqsp gmnggrlgtn
 661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmgwmwmgs gmngmwmgm mggagaattq aaggnaeaem
 721 lqnlmneinr lkrelge

[0118] 本发明的野生型(WT)Chop2可以由古细菌型视蛋白2核酸序列(GenBank登录号AB058891,和SEQ ID NO:7)的以下莱茵衣藻acop2 mRNA编码:

[0119] 1 catctgtcgc caagcaagca taaaacatgg attatggagg cgcctgagt gccgttggc
 61 gcgagctgct attttaacg aacccttag tcgtcaatgg ctctgtactt gtgcctgagg
 121 accagtgtta ctgcgcggc tggattgagt cgctggcac aaacgggtcc caaacggcgt
 181 cgaacgtgct gcaatggctt gctgtggct tctccatctt actgtttatg ttttacgcct
 241 accaaacatg gaagtcaacc tgccgtggg aggagatcta tgggtgcgt atcgagatgg
 301 tcaaggtgat tctcgatgtt ttcttcgagt ttaagaaccc gtccatgtt tatctagcca
 361 caggccaccg cgtccagttt ttgcgttacg ccgagtttgc tctcacctgc ccggcatttc
 421 tcattcacct gtcaaacctg acgggtttgtt ccaacgacta cagcaggcgc accatgggtc
 481 tgcttgttc tgatattggc acaattgtgtt ggggcggccac ttccgcattt gcccacccgat
 541 acgtcaaggt catcttcctc tgccgtggc tgggttatgg tgctaaacacg ttctttcacy
 601 ctgccaaggc ctacatcgag gtttaccaca ccgtgccaa gggccgggtt cggcagggtgg
 661 tgactggcat ggcttggctt ttcttcgtat catgggttat gttccccatc ctgttccatcc
 721 tcggcccccga gggcttcggc gtccctgagcg tgggttgcgtt caccgtcggc cacccatca
 781 ttgacactgat gtcgaagaac tgggtttttt tgggttgcgtt caccgtcggc gtgttgcgttcc
 841 acgacatat cctcatccac ggcacattt gcaagaccac caaattttaac attgggtggca
 901 ctgagattga ggtcgagacg ctgggtggagg acgaggccga ggctggcgcgt gtcaacaagg
 961 gcaccggcaa gtacgcctcc cgcgacttcc tcctggcat ggcgacaagg atgaaggaga
 1021 agggcattga cgtgcgcgc tctctggaca acagcaagga ggtggagcag gagcaggccg
 1081 ccagggtgc catgtatgtt atgaacggca atggcatggg tatggaaatg ggaatgaacg
 1141 gcatgaacgg aatggggcgtt atgaacggga tggctggcgg cgcctggcgc
 1201 tcactccgca gctacagccc ggccgcgtca tcctggcgtt gccggacatc agcatgggtt
 1261 acttcttcgg cggcgtttt gtcagctat cggtaatcgta cggactgggtt ccggccctgg
 1321 cgcgtacaa cacactggcg ctgttacgc aggcgcagaa cctggggcggc gtggactttt
 1381 tggattca ccccgatgtt ctgcgcgcacc gctctagcac cagcatctt agccgccttc
 1441 gcccgcggg ccagcgtgtt gtcgttgcgtt gctggggcga gtcggggccc atgcgtgacc
 1501 tgatcgagtc cggcaaacctg gacggctggc tggaggccc ctcgttccgaa caggcatcc
 1561 tgccggccca catcggttcc ctgttggcca agatcgacgat gatcgcaag atgcagcaga
 1621 tgcagcagat tggcatgtt accggcggca tgaacgcgtt gggcggcgtt atggcggcgtt
 1681 gcatgaacgg catggggcggc ggcaacggca tgaacaacat gggcaacggc atggcggcgtt
 1741 gcatggcaa cggcatggc ggcaatggca tgaacgaaat gggtggcggc aacggcatga
 1801 acaacatggg cggcaacggca atggccggca acggaatggg cggcggcatg ggcggcaacg
 1861 gtatgggtgg ctccatgaac ggcatgagct cggcgttgc gccaacgtt acggccctccg
 1921 ccgcggcgg catggggcggc atgatgaacg cggcatggc tgcgtttccatc tcgcccggca
 1981 tgaacggcgg cgcctgggtt accaaccggc tcttcaacgc cgcctccatc cgcctcgtt
 2041 cgcagctgg tgccgaggca ggcatggca gcatggagg catggggcga atgagcggaa
 2101 tggaggcat ggggtggatg gggggcatgg gggcggccgg cggccggcactg acgcaggctg
 2161 cggcggcaa cgcggaggcg gagatgttc gaaatctcat gaacgagatc aatcgccctga
 2221 agcgcgagct tggcgatata aaggctggag gccggacttgc cgtatctgc gagctcgcgc
 2281 gcctgactcg tcgttacacac ggctcaggag caccgcgcgc tgacttctc aacctgtgt
 2341 caacgtatct agagcggct gtgcgcgacc gtccgttgcgatccggatc gatctcccg
 2401 ctttcgcacc gcaagtcccc ttctggccc tgctgcgcct gacgcata

[0121] 本发明的野生型(WT)Chop2可以由古细菌型视蛋白2氨基酸序列(GenBank登录号

BAB68567, 和SEQ ID NO:8)的以下莱茵衣藻acop2 mRNA编码:

[0122] 1 mdyggalsav grellfvtnp vvvngsvlvp edqcycagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
 61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiivcaine mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
 121 yaewlltcpv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviffcl
 181 glcygantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlf vswgmpfpilf ilgpefgv1
 241 svygstvght iidlmsknkw gllghylrwl ihehilihgdrirkttklnig gteievetlv
 301 edeaeeagavn kgtgkyasre sflvmrdrkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammnn
 361 gngmgmgmgn gngmngmgnm gmaggakpgl eltpqlqpgr vilavpdism vdffreqfaq
 421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlggvd fvlihpeflr drsstilsr lrgagqravaa
 481 fgwaqlgpmr driesanldg wlegpsfgqg ilpahivalv akmqqmrmkmg qmqqiqgmmtg
 541 gmnmgmgmgn ggmngmgnm gmnngmngm ggmngmgnm gmnngmgnmgn mnngmgnmgn
 601 gngmngmgnm gngmgsnmgm ssgvvanvtp saaggmgnm nggmaapqsp gmngrglgn
 661 plfnnaapspl ssqqlgaaeagm gsmggmgnm gmgmgnmgn mggagaattq aaggnaeaem
 721 lqnlmneinr lkrelge

[0123] ChR2突变体

[0124] 本发明提供了Chop2突变体,其中一个或多个氨基酸是突变的。在一些实施方案中,Chop2是具有至少一个氨基酸突变的全长多肽,诸如SEQ ID NO:2,4,6,和8。在一些实施方案中,突变在氨基酸132和/或氨基酸159处。在一些优选的实施方案中,第132位氨基酸从亮氨酸突变为半胱氨酸或丙氨酸。在一些优选的实施方案中,第159位氨基酸从苏氨酸突变为丙氨酸,半胱氨酸,或丝氨酸。在所有实施方案中,Chop2突变体形成功能性ChR2通道。

[0125] 本发明还涵盖Chop2蛋白和编码Chop2的生物学活性片段或保守氨基酸取代或其它突变变体的核酸。有用片段的非限制性例子包括编码野生型Chop2(即SEQ ID NO:26)的氨基酸1-315的多肽,其中至少一个氨基酸是突变或保守取代的,例如在氨基酸位置132和/或159。野生型Chop2的较小片段,其中至少一个氨基酸是突变或保守取代的(即在氨基酸位置132和/或159),也可用于本发明。因而,本发明的Chop2多肽和核酸进一步包括但不限于编码野生型Chop2的氨基酸1-315,1-310,1-300,1-275,1-250,1-225,1-200,1-175,或1-160的生物学活性片段,其中至少一个氨基酸是突变或保守取代的,例如在氨基酸位置132和/或159。在其它实施方案中,本发明的Chop2多肽和核酸可以多达或约长315个氨基酸,长310个氨基酸,长300个氨基酸,长275个氨基酸,长250个氨基酸,长225个氨基酸,长200个氨基酸,长175个氨基酸,或长160个氨基酸。

[0126] 本发明的单一突变体Chop2可以由以下合成构建体hVChR1-mKate-beta hChR2(L132C)基因序列(GenBank登录号JN836746,和SEQ ID NO:9)编码,具有以下注释,GFP序列为粗体,L132C Chop2序列是有下划线的:

1 atggattacc ctgtggcccg gtccttgatt gtaagatacc ccaccgatct gggcaatgga
 61 accgtgtgca tgcccagagg acaatgctac tgcgagggtt ggctgaggag ccggggact
 121 agtatacgaaa aaaccatcg c tatcaccctc c agtgggttag tttcgctct gtccgtagcc
 181 tgtctcggt ggtatgcata c caaggctgg agggctaccc ttgggtggaa ggaagtatac
 241 gtggccctga tcgagatgtt gaagtccatc atcgaggctt tccatgagtt cgactcccc
 301 gccacactct ggctcagcag tggaaatggc gtagtggta tgagatatgg agagtggctg
 361 ctgacctgtc ccgtccctgtt cattcatctg tccaatctga cccggctgaa agatgactac
 421 tccaagagaa caatggact gctggtagt gacgtgggtt gtattgtgt gggagccacc
 481 tcccccattgt gcactggatg gaccaagatc ctcttttcc tgattccct ctcctatggg
 541 atgtatacat acttccacgc cgctaaggta tatattgagg ccttccacac tgcacaaaa
 601 ggcacatgtgta gggagctcg gccgggtgatg gcatggaccc tctttgtggc ctggggatg
 661 ttccccgtgc tggtccctt cggcactgag ggatttggcc acattagtc ttacgggtcc
 721 gcaattggac actccatctt ggatctgatt gccaagaata tgcgggggt gctggaaat
 781 tatctgcggg taaagatcca cgagcatatc ctgctgtatg gcatatcag aaagaagcag
 841 aaaatcacca ttgctggaca gggaaatggag gtggagacac tggtagcaga ggaggaggac
 901 gggaccggg tggccaccat ggtgtctaa ggcgaagagc **tgattaagga** **gaacatgcac**
 961 **atgaagctgt** **acatggaggg** **caccgtgaac** **aaccaccact** **tcaagtgcac** **atccgaggc**
 1021 **gaaggcaagc** **cctacgaggg** **caccagacc** **atgagaatca** **agtggtcga** **gggcggccct**
 1081 **ctcccccctcg** **ccttcgacat** **cctggctacc** **agcttcatgt** **acggcagcaa** **aaccttcatc**
 1141 **aaccacaccc** **agggcatcc** **cgacttctt** **aagcgtcct** **tccctgaggg** **cttcacatgg**
 1201 **gagagagtca** **ccacatacga** **agacggggc** **gtgctgaccg** **ctacccagga** **caccagcctc**
 1261 **caggacggct** **gcctcatcta** **caacgtcaag** **atcagagggg** **tgaacttccc** **atccaaacggc**
 1321 **cctgtgatgc** **agaagaaaac** **actcggctgg** **gaggcctcca** **ccgagatgct** **gtaccccgt**
 1381 **gacggcggcc** **tggaaggcag** **agccgacatg** **gccctgaagc** **tcgtggcgg** **ggcccacctg**
 1441 **atctcaact** **tgaagaccac** **atacagatcc** **aagaaacccg** **ctaagaaccc** **caagatgccc**
 1501 **ggcgtctact** **atgtggacag** **aagactggaa** **agaatcaagg** **agccgacaa** **agagacctac**
 1561 **gtcgagcagc** **acgagggtggc** **tgtggccaga** **tactgcgacc** **tccttagcaa** **actggggcac**
 1621 **aaacttaatt** **gcctgcagga** **gaagaagtca** **tgcagccagc** **gcatggccga** **attccggcaa**
 1681 **tactgttgg** **accggacac** **tggcagatg** **ctggccgca** **ccccagccc** **gtgggtgtgg**
 1741 **atcagcctgt** **actatgcagc** **tttctacgt** **gtcatgactg** **ggctcttgc** **cttgtgcata**
 1801 **tatgtgctga** **tgcagaccat** **tgatccctac** **accccccact** **accaggacca** **gtttaaagtca**
 1861 **ccggggtaa** **ccttgagacc** **ggatgtgtat** **ggggaaagag** **ggctgcagat** **ttcctacaac**
 1921 **atctctgaaa** **acagctctag** **acagggccag** **atcaccggac** **gtccggagac** **tgagacattg**
 1981 **ccaccgggtgg** **actacgggg** **ggccctgagc** **gctgtggca** **gagaactcct** **gttcgtgaca**
 2041 **aatccagtcg** **tggtaacgg** **ctccgtactc** **gtacccgagg** **atcgtgcta** **ttgcgcagga**
 2101 **tggatcgaga** **gcagaggcac** **aaacggcgca** **cagactgcat** **ccaacgtcgt** **ccagtgggt**
 2161 **gcccgaggct** **tttccatct** **cctgctcatg** **ttttacccct** **accagacttg** **gaagtcacca**
 2221 **tgtggctgg** **aggaaatcta** **cgtgtgtc** **atcgaatgg** **tgaaggtgt** **cctggagtt**
 2281 **ttcttcgaat** **ttaaaaaaccc** **aagcatgctg** **tacctgct** **ctggccacag** **agtgcagtgg**
 2341 **ctgcgttatg** **ccgaatgct** **gctgacttgc** **ccagtgattt** **gatccaccc** **gtccacacctg**
 2401 **actgggtctgt** **ctaacgat** **cagtaggaga** **acaatggac** **tgcgtatc** **cgacatcgcc**
 2461 **actatcgat** **ggggcgcaac** **tagtgcct** **gccactggat** **acgtgaaagt** **gatcttcttc**
 2521 **tgcctggac** **tctgctacgg** **agcaaacaca** **tttttccatg** **ccgcaaaagc** **atatatcgag**
 2581 **gggtatcata** **ccgtcccaaa** **ggggccgggt** **agacaagtgg** **tgactggcat** **ggcttggctg**
 2641 **ttcttcgtgt** **cctggggat** **gttcccata** **ctctttatcc** **tggccca** **aggcttcggg**
 2701 **gtgctgagtg** **tgtatggcag** **taccgttag** **cacactatca** **ttgacctgt** **gagcaaaaac**
 2761 **tgctgggggc** **tgctcgccca** **ctacctgaga** **gtactcatcc** **accagcatat** **cctgattcat**
 2821 **ggcgatatacc** **ggaaaactac** **caagctcaat** **atcggggca** **ccgagattga** **agtggagaca**
 2881 **ctcggtgg** **acgaggccga** **ggccggagca** **gtgaacaaag** **gcactggca** **gtatgcctcc**
 2941 **agagaatcct** **ttctgggtat** **gcgggacaaa** **atgaaggaga** **aaggcattga** **tgtacgggt**
 3001 **agtaatgcca** **aagccgtcga** **gactgtatgt** **tag**

[0128]

[0129] 本发明的单一突变体ChR2可以由以下合成构建体hVChR1-mKate-betaChR2(L132C)氨基酸序列(GenBank登录号AER29839,和SEQ ID NO:10)编码,具有以下注释,GFP序列为粗体,L132C Chop2序列是有下划线的:

1 mdypvarsli vryptdlgng tvcmprgqcy cegwlrsrgt siektiaitl qwvvfalsva
 61 clgwyaqaw ratcgweevy valiemmksi ieafhefdsp atlwlssqng vvwmyrgewl
 121 ltcpvllihl snltglkdd skrtmgllvs dvgcivwgat samctgwtki lfflislsyg
 181 mytyfhaakv yieafhtvpk gicrelrvrm awtffvawgm fpvlfllgte gfghispygs
 241 aighsildli aknmwgvlgn ylrvihehi llygdirkq kitiaqgeme vetlvaeed
 301 gtavatmvsk **geelikenmh mklymegtvn nhhfkctseg egkpyegtqt mrikvveggp**
 361 **lpfafdilat sfmygsktfi nhtqgipdff kqsfpiegftw ervttyedgg vltatqdtsl**
 421 **qdgcliynvk irgvnfpnsng pvmqkktlgw eastemlypa dgglegradm alklvggghl**
[0130] 481 icnlkttys kkpaknlkmp gvyyvdrrle rikeadkety veghevavar ycdlpsklgh
 541 klnclqekks csqrmaefrq ycwnpdgqm lgrtparww islyyaafyv vmtglfalci
 601 yvlmqtidpy tpdyqdqlks pgvtlrdpdy gerglqisyn isenssrqaq itgrpetetl
 661 **ppvdyyggals avgrellfvt npvvvnsgsvl vpedqcycag wiesrgtnga qtasnvlqw**
 721 **aagfsillm fyayqtwkst cgweeiywca iemvkvilef ffefknpsml ylatghrvqw**
 781 **lryaewlltc pvicihlsnl tglsndysrr tmglvsdig tivwgatsam atgykvifff**
 841 **clglcygant fffaakayie gyhtvpkgrc rqvvtgmawl ffvswgmpfpi lfilgpefgf**
 901 **vlsvygstvg htiidlmskn cwglghylr vlihehilih gdirkttkln iggteievet**
 961 **lvedeaeaga vnkgtgkyas resflvmrdk mkekgidvrc snakavetdv**

[0131] 本发明的单一突变体Chop2可以由以下合成构建体hVChR1-mKate-betahChR2 (L132C) 基因序列 (GenBank登录号JN836745和SEQ ID NO:11) 编码, 具有以下注释, GFP序列为粗体,L132C Chop2序列是有下划线的:

1 atggattacc ctgtggcccg gtccttgatt gtaagatacc ccaccgatct gggcaatgg
 61 accgtgtgca tgcccagagg acaatgctac tgcgagggggt ggctgaggag ccggggact
 121 agtatacgaaa aaaccatcgc tatcaccctc cagtgggttag tgttcgctct gtccgtagcc
 181 tgtctcggt ggtatgcata ccaaggctgg agggctaccc tgggggtggga ggaagtatac
 241 gtggccctga tcgagatgtt gaagtcaccc atcgaggctt tccatgagtt cgactcccc
 301 gccacactct ggctcagcag tggaaatggc gtatgttggta tgagatatgg agagtggctg
 361 ctgacactgtc cccgtcctgtc cattcatctg tccaatctga ccgggctgaa agatgactac
 421 tccaaagagaa caatgggact gctggtgagt gacgtgggggt gtattgtgtg gggagccacc
[0132] 481 tccgcctatgt gcactggatg gaccaagatc ctcttttcc tgattttccct ctccatatggg
 541 atgtatacat acttccacgc cgctaagggt tatattgagg ccttccacac tgtacccaaa
 601 ggcacatgtgta gggagctgt gccccgtatg gcatggaccc tctttgtggc ctggggatg
 661 ttccccgtgc tggtccctc cggcactgag ggatttggcc acattagtcc ttacgggtcc
 721 gcaattggac actccatctt ggatctgatt gccaagaata tgggggggt gctggaaat
 781 tatctgcggg taaagatcca cgagcatatc ctgtgtatg gcatggatcgg aaagaagcgg
 841 aaaatcacca ttgtctggaca gggaaatggag gtggagacac tggtagcaga ggaggaggac
 901 gggaccggcgg tcgccaccat ggtgtctaa ggcgaagagc **tgattaagga gaacatgcac**
 961 **atgaagctgt acatggaggg caccgtgaac aaccaccact tcaagtgcac atccgaggc**

1021 **gaaggcaagc cctacgaggg cacccagacc atgagaatca aggtggtcga gggcgccc**
 1081 **ctccccc** tcg cttcgacat cctggctacc agcttcatgt acggcagcaa aaccttcata
 1141 aaccacaccc agggcatccc cgacttctt aagcagtcc tccctgaggg ctacccatgg
 1201 gagagagtca ccacatacga agacggggc gtgctgaccg ctacccagga caccagcctc
 1261 caggacggct gcctcatcta caacgtcaag atcagagggg tgaacttccc atccaacgc
 1321 cctgtatgc agaagaaaac actcggctgg gaggcctca ccgagatgct gtaccccgt
 1381 gacggcggcc tggaaaggcag agccgacatg gccctgaagc tcgtggcgg gggcacctg
 1441 atctgcaact tgaagaccac atacagatcc aagaaacccg ctaagaacct caagatgccc
 1501 ggcgtctact atgtggacag aagactggaa agaatcaagg aggccgacaa agagacctac
 1561 **gtcgagcagc acgagggtggc tggccaga** tactgcgacc tccctagcaa actggggcac
 1621 aaacttaatt gcctgcagga gaagaagtca tgcagccagc gcatggccga attccggcaa
 1681 tactgttga acccggacac tggcagatg ctggccgca ccccagcccg gtgggtgtgg
 1741 atcagcctgt actatgcagc ttctacgtg gtcatgactg ggctcttgc cttgtgcata
 1801 tatgtgctga tgcagaccat tgatccctac acccccact accaggacca gttaaagtca
 1861 ccggggtaa ccttgagacc ggatgtgtat gggaaagag ggctgcagat ttctacaac
 1921 atctctgaaa acagctctag acaggcccag atcaccggac gtccggagac tgagacattg
 1981 ccaccgggtgg actacggggg ggcctgagc gctgtggca gagaactcct gttcgtgaca
 2041 aatccagtgc tggtaacgg ctccgtactc gtacccgagg atcagtgcata ttgcgcagga
 2101 tggatcgaga gcagaggcac aaacggcgca cagactgcat ccaacgtct ccagtggttg
 2161 gcccaggct tttccattct cctgctcatg ttttacgc accagacttg gaagttccaca
 2221 tgtggctgg aggaaatcta cgtgtgtgca atcgaatgg tgaagggtat cctggagtt
 2281 ttctcgaat taaaaaaccc aagcatgctg tacctgctca ctggccacag agtgcagtgg
 2341 ctgcggatg ccgaatgct gctgacttgc ccagtgattc tgcattccacct gtccaaacctg
 2401 actggctgt ctaacgatta cagtaggaga acaatggac tgcgtatc cgacatcgcc
 2461 actatcgat ggggcqcaac tagtgccatg gccactggat acgtgaaagt gatcttcttc
 2521 tgcctggac tctgctacgg agcaaacaca tttttcatg ccgcaaaagc atatatcgag
 2581 gggatatacata ccgtcccaa gggccgggt agacaagtgg tgcactggcat ggcttggctg
 2641 ttctcgtgt cctggggat gttcccatc ctcttatcc tggcccaaga aggcttcggg
 2701 gtgcgtgatg tgcgtggcag taccgttaga cacactatca ttgacctgat gagcaaaaac
 2761 tgctggggc tgctggcca ctacctgaga gtactcatcc acgagcatat cctgattcat
 2821 ggcgatatacc gaaaaactac caagctcaat atcggggca ccgagattga agtggagaca
 2881 ctcgtggagg acgaggccga ggccggagca gtgaacaaag gcactggcaa gtatgcctcc
 2941 agagaatcct ttctggat gcgggacaaa atgaaggaga aaggcattga tgtacggtgc
 3001 agtaatgcca aagccgtcga gactgtatgt tag

[0134] 本发明的单一突变体Chop2可以由以下合成构建体hVChR1-mKate-betaChR2(L132C)氨基酸序列(GenBank登录号AER29838和SEQ ID NO:12)编码,具有以下注释,GFP序列为粗体,L132C Chop2序列是有下划线的:

1 mdypvarsli vryptdlng tvcmprgqcy cegwlrsrgt siektiaitl qwvvfalsva
 61 clgyayqaw ratcgweevy valiemmksi ieafhefdsp atlwlssng vvwmyrgewl
 121 ltcpvliihl snltglkddy skrtmgllvs dvgcivwgat samctgwtki lfflislsyg
 181 mytyfhaakv yieafhtvpk gicrelrvrm awtffvawgm fpvlfllgte gfghispygs
 241 aighsildli aknmwgvlgn ylrvihehi llygdirkkq kitiaqgome vetlvaeed
 301 gtavatmvsk ge~~elikenmh~~ **mklymegtvn nhhfkctseg egkpyegtqt mrikvveggp**
 361 **lpfafdilat sfmygsktfi nhtqgpdff kqsfpegtw ervttyedgg vltatqdtsl**
 421 **qdgcliynvk irgvnfpsng pvmqkktlgw eastemlypa dgglegradm alkvggghl**
 481 **icnlkttysr kkpaknlkmp gvyyvdrrle rikeadkety veghevavar ycdlpsklgh**
 541 klnclqekks csqrmaefrq ycwnpdgtqm lgrtparww islyyaafyv vmtglfalci
 601 yvlmqtidpy tpdylqdqlks pgvtlrdpdy gerqlqisyn isenssrqaq itgrpetetl
 661 ppvdyggals avgrellftv npvvvnsgsvl vpeditcycag wiesrgtnga qtasnvqlqwl
 721 aagsflllm fyayqtwkst cgweeiyvca iemvkvilef ffefknpsml ylatghrvqw
 781 lryaewlltc pvilihsnl tglsndysrr tmglivsdig tivwgatsam atgyvkviff
 841 clglcygant ffhaakayie gyhtvpkgrc rqvvtgmawl ffpvswgmpfi lfilgpefgf
 901 vlsvygstvg htiidlmskn cwglighylr vlihehilih gdirkttkln iggteievet
 961 lvedeaeaga vnkgtgkyas resflvmrdk mkekgidvrc snakavetdv

[0136] 本发明的L132C单一突变体Chop2可以由以下氨基酸序列(第132位加下划线且粗体,SEQ ID NO:13)编码:

[0137] 1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
 61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
 121 YAEWLLTCPV **I**CIHLNSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFCL
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILF ILGPEGFGV
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

[0138] 本发明的T159C单一突变体Chop2可以由以下氨基酸序列(第159位加下划线且为粗体,SEQ ID NO:14)编码:

[0139] 1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
 61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
 121 YAEWLLTCPV **I**LIHLNSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIG**C**I VWGATSAMAT GYVKVIFFCL
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILF ILGPEGFGV
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

[0140] 本发明的L132C/T159C双重突变体Chop2可以由以下核苷酸序列(SEQ ID NO:15)编码:

[0141] 1 atggactacg ggggggctct gtctgtgtc gggaggaaac tgctgtttgt gactaacccct
 61 gtcgtcgtga acgggagtgt gctggccct gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc 121
 gaatcaccgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct 181
 gggtttagta tcctgtgtc gatgttctac gcctatcaga cttggaaagtc aacctgcggc 241
 tgggaggaaa tctacgtgtc cgctatttag gatgtgaaag tgatcctgga gttcttcttc 301
 gagttcaaga acccaacgcat gctgtacctg gctactggac accgagtgcgat gttggctgaga 361
 tatgcagaat ggctgtgtac atgccccgtc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc 421
 ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgtgg tgtccgacat cggctgcatt 481
 gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga agtcatctt tttctgcctg 541
 gggctgtgtat atggcgcaaa taccttttc cacgcagcca aggcctacat tgaggggat 601
 cataccgtgc caaaaggccg gtgccgacag gtggtcacag gaatggcttg gctgttttc 661
 gtctcttggg gaatgtttcc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg 721
 tctgtctacg gaagtacagt ggggcataact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttgg 781
 ggcctgtgg gacactatct gagagtgtct atccacgacg atatcctgat tcatggcgt 841
 attcggaaaga ccacaaaact gaatatccgc ggaaccgaga ttgaagtggaa aacactggtg 901
 gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaa

[0142] 本发明的L132C/T159C双重突变体Chop2可以由以下氨基酸序列(第132位和第159位加下划线且为粗体,SEQ ID NO:16)编码:

[0143] 1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
 61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
 121 YAEWLLTCPV **I**CIHLNSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIG**C**I VWGATSAMAT GYVKVIFFCL
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILF ILGPEGFGV
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

[0144] 本发明的T159S单一突变体Chop2可以由以下氨基酸序列(第159位加下划线且为粗体,SEQ ID NO:17)编码:

[0145] 1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
 61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
 121 YAEWLLTCPV **I**LIHLNSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIG**S**I VWGATSAMAT GYVKVIFFCL
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILF ILGPEGFGV
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

[0146] 本发明的L132C/T159S双重突变体Chop2可以由以下核苷酸序列(SEQ ID NO:18)编码:

[0147] 1 atggactacg ggggggctct gtctgctgtc gggagggAAC tgctgtttgt gactaacccct
 61 gtcgtcgtga acgggagtgt gctggccct gaggaccagt gctactgtgc cggctggatC 121
 gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtG gctggccgct 181
 gggtttagta tcctgctgtc gatgttctac gcctatcaga cttggaagtc aacctgcggc 241
 tgggaggaaa tctacgtgtc cgctatttgag atggtaaaAG tgatccttggaa gttttcttc 301
 gagttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtgca gtggctgaga 361
 tatgcagaat ggctgctgac atgccccgtc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc 421
 ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgctgg tgcgtgacat cggcagcatt 481
 gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt tttctgcctg 541
 gggctgtgct atggcgaaa taccttttc cacgcagcca aggctacat tgaggggtat 601
 cataccgtgc caaaaggccg gtgccgacag gtggtcacag gaatggcttg gctgttttc 661
 gtctcttggg gaatgttcc catcctgttc attctgggc ctgaagggtt cggcgtctg 721
 tctgtctacg gaagtacagt ggggcataact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttgg 781
 ggcctgctgg gacactatct gagagtgtc atccacgagc atatcctgat tcatggcgat 841
 attcggaaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtggaa aacactgggtg 901
 gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaa

[0148] 本发明的L132C/T159S双重突变体Chop2可以由以下氨基酸序列(第132位和第159位加下划线且为粗体,SEQ ID NO:19)编码:

[0149] 1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
 61 GFS~~ILLLMFY~~ AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
 121 YAEWLLTCPV **I**CIHLNSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGSI VWGATSAMAT GYVKVIFFCL
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILE ILGPEGFGVL
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

[0150] 本发明的L132A单一突变体Chop2可以由以下氨基酸序列(第132位加下划线且为粗体,SEQ ID NO:20)编码:

[0151] 1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
 61 GFS~~ILLLMFY~~ AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
 121 YAEWLLTCPV **I**AIHLNSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFCL
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILE ILGPEGFGVL
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

[0152] 本发明的L132A/T159C双重突变体Chop2可以由以下核苷酸序列(SEQ ID NO:21)编码:

[0153] 1 ATGGACTACG GGGGGGCTCT GTCTGCTGTc GGGAGGGAAc TGCTGTtTGT GACTAACCCt
 61 GTCGTcGTGA ACgggAGTGT GCTGGCCCT GAGGACCAGt GCTACTGTGC CGGCTGGATC 121
 GAATCACGCG GAACCAACGG GGCCCAGACA GCTAGCAATG TGCTGCAGTG GCTGGCCGCT 181
 GGGTTTAGTA TCCTGCTGTc GATGTtCTAC GCCTATCAGA CTTGGAAGTC AACCTGCggc 241
 TGGGAGGAAA TCTACGTGTc CGCTATTGAG ATGGTAAAG TGATCCTGGa GTTCTTCTTC 301
 GAGTTCAAGA ACCCAAGCAT GCTGTACCTG GCTACTGGAC ACCGAGTGCA GTGGCTGAGA 361
 TATGCAGAAAT GGCTGCTGAC ATGCCCGTC ATGCCATTC ACCTGTCCAA CCTGACAGGC 421
 CTGAGCAATG ACTACTCCAG GAGAACTATG GGACTGCTGG TGTCCGACAT CGGCTGCATT 481
 GTCTGGGGAG CAACCTCTGC TATGGCAACC GGATACGTGA AGGTCACTTT TTTCTGCCTG 541
 GGGCTGTGCT ATGGCGAAA TACCTTTTC CACGCAGCCA AGGCCTACAT TGAGGGGTAT 601
 CATACCGTGC CAAAAGGCCG GTGCCGACAG GTGGTCACAG GAATGGCTTG GCTGTtTTC 661
 GTCTCTTGGG GAATGTTCC CATCCTGTTC ATTCTGGGGC CTGAAGGGTT CGGCGTGCTG 721
 TCTGTCTACG GAAGTACAGT GGGGCATACT ATCATTGACC TGATGTCCAA AAACtGTtGG 781
 GGCCTGCTGG GACACTATCT GAGAGTGCTG ATCCACGAGC ATATCCTGAT TCAcGGCGAT 841
 ATTcGGAAAGA CCACAAAAct GAATATCggc GGAACCGAGA TTGAAGTGGAA AACACTGGTG 901
 GAAGACGAGG CTGAGGCTGG GGCTGTGAAC AAGGGGACTG GCAAA

[0154] 本发明的L132A/T159C双重突变体Chop2可以由以下氨基酸序列(第132位和第159位加下划线且为粗体,SEQ ID NO:22)编码:

[0155]

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV IAIHLNSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGCI VWGATSAMAT GYVKVIFFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

[0156] 本发明的T159A单一突变体Chop2可以由以下氨基酸序列(第159位加下划线且为粗体,SEQ ID NO:23)编码:

[0157]

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLNSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGAI VWGATSAMAT GYVKVIFFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

[0158] 本发明的L132C/T159A双重突变体Chop2可以由以下核苷酸序列(SEQ ID NO:24)编码:

[0159]

```

1 atggactacg ggggggcctct gtctgtgtc gggagggAAC tgctgtttgt gactaacccct
61 gtcgtcgtga acgggagtgt gctggccct gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc 121
gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct 181
gggttagta tcctgctgct gatgttctac gcctatcaga ctggaaagtc aacctgcggc 241
tgggaggaaa tctacgtgtg cgctatttag atggtaaaatg tgatccttggaa gttttttttc 301
gagttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtgca gtggctgaga 361
tatgcagaat ggctgctgac atgccccgtc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc 421
ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgctgg tgtccgacat cggcgccatt 481
gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt tttctgcctg 541
gggctgtgtat atggcgaaaa taccttttc cacgcagcca aggctacat tgaggggtat 601
cataccgtgc caaaaggccg gtgccgacag gtggtcacag gaatggcttg gctgtttttc 661
gtctcttggg gaatgtttcc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg 721
tctgtctacg gaagtacagt ggggcataact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttgg 781
ggcctgtgtgg gacactatct gagagtgtctg atccacgagc atatcctgat tcatggcgat 841
attcggaaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtggaa aacactgggtg 901
gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaa

```

[0160] 本发明的L132C/T159A双重突变体Chop2可以由以下氨基酸序列(第132位和第159位加下划线且为粗体,SEQ ID NO:25)编码:

[0161]

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ICIHLNSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGAI VWGATSAMAT GYVKVIFFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

[0162] 本发明的野生型(WT)Chop2可以由以下氨基酸序列(SEQ ID NO:26)编码:

[0163] 1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV IILHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMFPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

[0164] 本发明的突变体ChR2蛋白还表明了较慢的通道动力学。发现较高的光敏感性与较慢的通道动力学相关联,这指示光敏感性和通道动力学之间的平衡。形成本发明的ChR2蛋白的Chop2蛋白还可以包含能改善ChR2的通道动力学,或提高其失活速率的其它突变或修饰。特别优选的ChR2突变体平衡光敏感性阈值与通道动力学。

[0165] 组合物和试剂盒

[0166] 本发明的组合物和试剂盒包含至少一种核酸分子或多肽分子,其编码本发明的突变体Chop2蛋白和所得的ChR2。编码本发明的突变体Chop2蛋白的至少一种核酸分子或多肽分子可以进一步包含药学可接受载体。本发明的试剂盒进一步包含关于对受试者施用本发明的组合物的用法说明。

[0167] 治疗用途

[0168] 对经密码子优化的Chop2-GFP融合蛋白进行突变以创建L132(亮氨酸132)和T159(苏氨酸159)位点处的单一和双重突变。首先在HEK细胞中检查每个突变体ChR2或其组合的功能性特性。将AAV2病毒载体生成,并玻璃体内注射到成年小鼠的眼中,所述AAV2病毒载体携带由CAG启动子驱动的突变体Chop2-GFP构建体。通过使用来自整装视网膜的多电极阵列记录检查突变体Chop2介导的光应答。

[0169] 单一突变体ChR2,即L132和T159C显著降低引发ChR2介导的光电流需要的阈值光强度。此外,发现几种双重突变体ChR2变体,包括L132C/T159C,L132A/T159C,和L132C/T159S进一步提高光电流,其在低光强度时高于任何单一突变体ChR2的结果。双重突变体展现出较慢的关闭速率(off-rate),其可能促成在低光强度时升高的光电流。在 10^{13} 个光子/ cm^2/s 的光强度和473nm的波长观察到由L132C/T159C双重突变体介导的视网膜神经节细胞的尖峰形成活性。此光水平比在野生型ChR2情况下引发尖峰形成活性需要的光水平低约1.5至2个对数单位。表达L132C/T159C的视网膜神经节细胞的尖峰激发(spike firing)可以因多达15Hz的光闪烁频率而起。正在进行的研究评估本发明的突变体ChR2在视网膜神经元中的长期表达和安全性。

[0170] 此外,发现本发明的突变体Chop2蛋白和所得的ChR2蛋白的表达在小鼠中病毒注射后没有引起长达2个月的神经毒性,这证明了本发明对于治疗用途的安全性。

[0171] 本发明中使用的载体可以包括各种病毒载体,诸如质粒和重组病毒,即重组腺伴隨病毒(rAAV),重组腺病毒,重组逆转录病毒,重组慢病毒,和本领域中已知的其他病毒。

[0172] 在一些实施方案中,本发明的Chop2蛋白的表达由组成型启动子,即CAG启动子,CMV启动子,LTR驱动。在其他实施方案中,启动子是诱导性或细胞特异性启动子。在细胞的特定亚群,即视网膜神经元细胞或变性细胞中实现Chop2蛋白表达的细胞类型特异性启动子可以是优选的。这些细胞可以包括但不限于视网膜神经节细胞,光感受器细胞,双极细胞,杆状双极细胞,ON型锥体双极细胞,视网膜神经节细胞,感光性视网膜神经节细胞,水平细胞,无长突细胞,或AII无长突细胞。细胞类型特异性启动子是本领域中公知的。特别优选

的细胞类型特异性启动子包括但不限于mGluR6,NK-3,和Pcp2(L7)。

[0173] 在一些实施方案中,在本发明的突变体Chop2蛋白外不同视蛋白基因的使用和靶向基因表达可以进一步提高光敏感性或改善视觉。视觉信息通过视网膜经由两种途径加工:发出光开启(ON)信号的ON途径,和发出光关闭(OFF)信号的OFF途径。ON和OFF途径的存在对于对比灵敏度的增强是重要的。ON途径中的视觉信号从ON锥体双极细胞中继到ON神经节细胞。ON锥体双极细胞和ON神经节细胞两者响应光而去极化。在另一个方面,OFF途径中的视觉信号从OFF-锥体双极细胞携带到OFF神经节细胞。OFF锥体双极细胞和OFF-神经节细胞两者响应光而极化不足的(hypolarized)。负责暗淡光(暗适应视觉)中观看的能力的杆状双极细胞是ON双极细胞(响应光而去极化)。杆状双极细胞将视觉信号从AII无长突细胞(ON型视网膜细胞)中继到ON,OFF锥体双极细胞。

[0174] 因而,可以使用双重视紫红质系统重演对于视觉加工和锐度而言完整的ON和OFF途径。简言之,本发明的Chop2蛋白可以特异性靶向到ON型视网膜神经元(即ON型神经节细胞和/或ON型双极细胞),而极化不足光传感器(即盐细菌视紫红质(halorhodopsin)或本领域中已知的其他氯化物泵)可以靶向到OFF型视网膜神经元(即OFF型神经节细胞和/或OFF型双极细胞)以创建ON和OFF途径。可以通过使用不同细胞类型特异性启动子实现对优选细胞亚群的特异性靶向。例如,Chop2表达可以由mGluR6启动子驱动以在ON型视网膜神经元(即ON型神经节细胞和/或ON型双极细胞)中靶向表达,而极化不足通道(诸如盐细菌视紫红质)表达由NK-3启动子驱动以在OFF型视网膜神经元(即OFF型神经节细胞和/或OFF型双极细胞)中靶向表达。

[0175] 在视网膜中恢复ON和OFF途径的备选方法通过对杆状双极细胞或AII无长突细胞表达去极化光传感器,诸如ChR2实现。在此方法中,杆状双极细胞或AII无长突细胞的去极化可以在锥体双极细胞和下游视网膜神经节细胞水平上导致ON和OFF应答。因此,视网膜中固有的ON和OFF途径得到维持。

[0176] 本发明可以配制为适合于对受试者或患者施用的药物组合物或药物。合适的施用路径包括例如玻璃体内,眼内,或视网膜下注射。

[0177] 此类制剂包含药学和/或生理学可接受媒介物,稀释剂,载体或赋形剂,诸如缓冲盐水或其他缓冲液,例如HEPES,以维持生理pH。为了讨论此类组分及其配制,一般参见Gennaro, AE., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2003或最近版本)。还可参见WO00/15822。若制剂要贮存较长的时段,则可以将其例如在存在甘油的情况下冷冻。

[0178] 根据靶向的视网膜层,通过任何合适的路径,优选通过玻璃体内或视网膜下注射对具有视觉或失明疾病的受试者施用上文描述的药物组合物。

[0179] 来自Bennett及同事(本文引用)的公开内容关注视网膜色素上皮(距离玻璃体(vitreal)空间的最远端层)的靶向。根据本发明,将Chop2构建体或多肽靶向到视网膜细胞,即视网膜神经节细胞或双极细胞。已知此类细胞适当好地经受如本文中公开的玻璃体内注射。玻璃体内和/或视网膜下注射可以提供对双极细胞的必要接近,尤其是在光感受器细胞层由于变性而缺乏的情况下,在本发明意图克服的某些变性形式中正是如此。

[0180] 为了通过AAV介导的递送测试载体表达本发明的Chop2突变体的能力,特别是在哺乳动物视网膜神经元中,可以将优选的启动子序列,与其连接的报告基因诸如LacZ或GFP,

与其连接的SV40多聚A序列的组合插入质粒中，并包装到rAAV病毒颗粒中，浓缩，测试污染性腺病毒，并使用感染中心测定法(infectious center assay)对rAAV滴定。可以对多个测试受试者(优选近交小鼠)的右眼在视网膜下注射约1 μ l rAAV制剂(例如大于约10¹⁰个感染单位ml)。2周后，可以将半数动物的右眼(测试)和左眼(对照)取出，固定并用合适的底物或抗体或其它物质染色以揭示报告基因的存在。注射眼中的大多数测试视网膜会展现出焦点染色区，例如蓝色(对于LacZ/Xgal)，或绿色(对于GFP)，其与创建局部视网膜分开的注射病毒的视网膜下起泡一致。所有对照眼在报告基因产物方面可以呈阴性。在后来的时段中处死的小鼠中检查的报告基因表达在注射后检出至少10周，这提示了报告转基因的持久表达。

[0181] 在一个实施方案中，将Chop2构建体在腺病毒载体中包装以进行转基因递送。优选地，rAAV病毒体的有效量的范围为每次注射的约150-约800 μ l的体积中约10¹⁰至约10¹³个rAAV感染单位，所述rAAV病毒体携带选择启动子，优选组成性CMV启动子或细胞特异性启动子诸如mGluR6的控制下编码Chop2 DNA的核酸序列。rAAV感染单位可以依照McLaughlin, SK等, 1988, J Virol 62:1963测量。更优选地，有效量是约10¹⁰-约10¹²个rAAV感染单位，并且注射体积优选是约250-约500 μ l。其它剂量和体积优选在这些范围内，但是可能在它们外部，可以考虑所治疗的受试者(优选人)的身体状态，包括年龄，重量，一般健康，和特定眼病的性质和严重性，由治疗专业人员选择。

[0182] 也可以期望施用本核酸或rAAV组合物的额外剂量(“加强”)。例如，根据盐靶细胞内的转基因表达的持续时间，可以在6个月后或每年施用第二治疗，并且可以类似重复。鉴于使用的路径和剂量，预期不产生针对AAV的中和性抗体，由此容许重复治疗轮次。

[0183] 例如，治疗专业人员可以使用公知的电生理学和其它视网膜和视觉功能测试和视觉行为测试监测对此类额外剂量的需要。治疗专业人员会能够选择应用本领域常规技术的合适测试。可以期望在单一或多次剂量中注射更大体积的组合物，以进一步改善相关的结果参数。

[0184] 眼病症

[0185] 目前的Chop2蛋白和所得的ChR2蛋白意图针对并且可以用于改善一种或多种视觉参数的眼病症包括但不限于影响眼的前段和后段两者的发育异常。前段病症(anterior segment disorder)包括青光眼(glaucoma)，白内障(cataract)，角膜营养失调(corneal dystrophy)，圆锥形角膜(keratoconus)。后端病症(posterior segment disorder)包括由光感受器机能失常引起的盲病症(blinding disorder)和/或由视网膜营养失调和变性引起的死亡。视网膜病症包括先天性静止性夜盲(congenital stationary night blindness)，年龄相关黄斑变性(age-related macular degeneration)，先天性椎体营养失调(congenital cone dystrophy)，和一大批色素性视网膜炎(RP)相关病症。这些病症包括各个年龄发生的视网膜中光感受器细胞，杆和椎体的有遗传素因的死亡。那些之一是重度视网膜病，诸如随年龄进展并引起儿童和早期成人失明的RP亚型自身和RP相关疾病，诸如LCA的遗传亚型，其经常导致儿童(早到生命的第一岁)期间的视觉丧失。后一种病症一般以光感受器细胞，杆和椎体的严重减少及经常完全丧失为特征。(Trabulsi, EI编, Genetic Diseases of the Eye, Oxford University Press, NY, 1998)。

[0186] 特别地，本发明的Chop2和ChR2蛋白可用于对受试者治疗和/或恢复至少部分视

觉,所述受试者由于眼病症,诸如RPE相关视网膜病(其以眼组织结构的长期保持尽管功能丧失为特征且以受试者的眼细胞中功能丧失与正常基因的缺陷或缺乏之间的关联为特征)而丧失视觉。多种此类眼病症是已知的,诸如幼发性失明疾病(childhood onset blinding disease),色素性视网膜炎,黄斑变性(macular degeneration),和糖尿病性视网膜病(diabetic retinopathy),及本领域中已知的眼失明疾病。预期的是,这些其它病症及目前未知原因但以后以如上文的相同描述表征的失明病症也可以通过本发明的Chop2和ChR2蛋白成功治疗。因此,通过本发明治疗的特定眼病可以包括上文提及的病症和许多尚未如此表征的疾病。

[0187] 光遗传学(Optogenetics)

[0188] 光遗传学的新兴领域牵涉组合遗传和光学方法来控制活组织的靶定细胞中的特定事件。光遗传学可以在自由活动的哺乳动物和其它动物内使用。此外,光遗传方法的时间精确性(毫秒-时间量程)足以在完整的生物学系统内发挥功能。

[0189] 本发明对眼的视网膜组织提供Chop2基因疗法,其通过对视网膜细胞导入编码至少一种Chop2突变体形式的核酸或多肽。本发明的突变体Chop2/ChR2蛋白特别适合于在比起野生型对应物低的光强度阈值被光活化。因而,可以使用本发明的突变体Chop2/ChR2蛋白来活化视网膜和视觉系统的细胞,其使用损害较小的照明源进行。突变体Chop2/ChR2蛋白在活化后也传导较大的光电流,导致来自突变体Chop2/ChR2表达细胞的更稳健(robust)或有效的应答。

[0190] 例如,通过局部,玻璃体内或视网膜下注射编码突变体Chop2的核酸分子,突变体Chop2多肽分子,或表达突变体Chop2/ChR2的细胞对受试者施用本发明的突变体Chop2蛋白。受试者的视网膜细胞在质膜内表达突变体Chop2蛋白。在经转染的或经转化的视网膜细胞遇到光发射时,经转染的或经转化的视网膜细胞转导改善的或恢复的信号。

[0191] 这些方法可以在正常和/或受损视觉的受试者中使用。本发明的Chop2/ChR2突变体可以保持,改善,或恢复视觉。此外,使用本发明的Chop2/ChR2突变体来保持,改善,或恢复非视觉信息从感光性视网膜神经节细胞转导到脑。

[0192] 如本文中使用的,术语“视觉”定义为生物体有用检测光作为区别或作用的刺激的能力。视觉意图涵盖下列各项:

[0193] 1.光检测或感知:辨别是否存在光的能力;

[0194] 2.光投射:辨别光刺激来到的方向的能力;

[0195] 3.分辨率(Resolution):在格子(grating)或字母靶标(letter target)中检测不同光亮水平(即对比度)的能力;和

[0196] 4.识别:通过参考靶物内的不同对比度水平识别视觉靶物形状的能力。

[0197] 如此,“视觉”包括简单检测光存在的能力。可以使用编码本发明的突变体Chop2的多肽和多核苷酸来改善或恢复视觉,其中视觉的改善或恢复包括例如光检测或感知的升高,响应光刺激的光照敏感性或光敏感性的升高,分辨光刺激来源的方向的能力升高,检测不同光亮水平的能力的升高,识别视觉靶物的形状的能力升高,和视觉诱发电位或从视网膜传输到皮质的升高。因此,视觉的改善或恢复可以或不可以包括视力的完全恢复,即其中将用本发明治疗的患者的视觉在程度上恢复到未受累个体的视觉。下文描述的动物研究中描述的视觉恢复就人而言可以将个体置于视觉功能的低端,通过提高视觉的一个方面(即,

光敏感性,或视觉诱发电位)而不恢复完全视力进行。不过,在此水平的放置会是一种重大益处,因为这些个体可以在活动性中以及潜在地在可给他们提供与全盲相比大大改善的视觉独立水平的低阶分辨率任务中受训练(because these individuals could be trained in mobility and potentially in low order resolution tasks which would provide them with a greatly improved level of visual independence compared to total blindness)。使用本组合物和方法改善其视觉的视觉受损个体使用甚至可以基本光感知来完成特定的每日任务,并改善一般活动性,能力,和生命质量。

[0198] 可以在施用包含例如编码Chop2的DNA的载体之前且优选之后通过测量视觉测定视觉恢复的程度。可以使用本领域中公知的许多方法或尚未建立的方法测量视觉。如通过本发明改善或恢复的视觉可以通过下列任一种视觉应答测量:

[0199] 1. 在暴露于光刺激后受试者的光检测应答:其中寻求如下的证据,其关于在光被开启时受试者个体对光的一般方向的指示或移动的可靠应答;

[0200] 2. 在暴露于光刺激后受试者的光投射应答:其中寻求如下的证据,其关于在光被开启时个体对光的特定方向的指示或移动的可靠应答;

[0201] 3. 受试者对光照与黑暗图案的视觉刺激(light vs dark patterned visual stimuli)的光分辨率,其测量受试者分辨光照与黑暗图案的视觉刺激的能力,如以下证明的:

[0202] a. 存在可论证的可靠视动产生眼球震颤样(nystagmoid)眼运动和/或相关的头或身体运动,其证明靶物的追踪(参见上文)和/或

[0203] b. 存在分辨图案视觉刺激及通过口头或非口头手段(包括指向,或按下条或按钮)指出此类区别的可靠能力;或

[0204] 4. 对光闪光刺激或图案视觉刺激的视皮质应答的电记录,其是从恢复视网膜到视皮质的电传输的端点,又称为视觉诱发电位(VEP)。测量可以通过视皮质区的头皮表面,皮质表面上的电记录,和/或视皮质细胞内的记录。

[0205] 因此,依照本发明的视觉改善或恢复可以包括但不限于:视网膜细胞中响应光刺激的光电流或电应答的振幅或动力学升高,视网膜细胞的光敏感性升高(即降低启动响应光刺激的光电流或电应答需要的阈值光强度,由此需要更少或更低的光来引发光电流),光引发的尖峰形成或尖峰激发的数目或幅度的升高,对视皮质的光应答的升高,其包括从视网膜或视网膜细胞传输到视皮质或脑的视觉诱发电位升高。

[0206] 可以使用用于评估本发明的各种参数的体外和体内研究两者,包括公认的盲人眼病动物模型。人视网膜病(例如儿童失明)的大动物模型是有用的。本文中提供的例子容许本领域技术人员容易地预期此方法可以在治疗一大批视网膜疾病中类似使用。

[0207] 虽然其他人的早期研究已经证明了视网膜变性可以通过基因疗法技术延迟,但是本发明证明了明确的生理学功能恢复,预期其产生或改善视觉的各种参数,包括行为参数。

[0208] 行为测量(behavioral measure)可以使用已知的动物模型和测试中获得,例如在水迷宫中的表现,其中其视觉已经被保持或恢复到不同程度的受试者会游向光(Hayes, JM等, 1993, Behav Genet 23:395-403)。

[0209] 在失明在成年生命期间诱导或先天性失明缓慢形成得足以使个体在其丧失前经历视觉的模型中,可以完成受试者在各项测试中的训练。这样,在这些测试在视觉丧失后再

次施行以对本组合物和方法的效力测试其视觉恢复效果时,动物没有必要重新而在盲的状态中学习任务。其它行为任务不需要学习,并且依赖于某些行为的本能性(instinctiveness)。一个例子是视动眼球震颤测试(optokinetic nystagmus test)(Balkema GW等,1984,Invest Ophthalmol Vis Sci.25:795-800;Mitchiner JC等,1976,视觉Res.16:1169-71)。

[0210] 本发明也可以与本领域中已知的其它形式的视觉疗法组合使用以改善或恢复视觉。例如,使用视觉假体(visual prostheses),其包括视网膜植入物,皮质植入物,外侧膝状核(lateral geniculate nucleus)植入物,或视神经植入物。因此,在使用本方法使视网膜神经元存活的遗传修饰外,可以在采用分子方法之前,同时,或之后给所治疗的受试者提供视觉假体。可以通过训练个体改善视觉假体的有效性,如此增强如本文中涵盖的患者细胞的Chop2转化的潜在影响。训练方法,诸如适应训练(habituation training),其以训练受试者以识别(i)不同水平的光和/或图案刺激,和/或(ii)如本领域技术人员会理解的来自常见光源或物体的环境刺激为特征;和方向和活动性训练,其以训练受试者以检测视觉局部物体并且比在不训练情况下更有效地在所述物体间移动为特征。实际上,通常用于低视觉复原领域的任何视觉刺激技术在本文是可适用的。

实施例

[0211] 实施例1:经标记的突变体Chop2构建体的产生。

[0212] 对密码子优化的Chop2-GFP融合蛋白进行突变以创建L132(亮氨酸132)和T159(苏氨酸159)位点处的单一和双重突变。产生几个突变体,例如单一突变体,诸如L132A,L132C,T159A,T159C,和T159S,和双重突变体,诸如L132C/T159C,L132C/T159S,L132A/T159C,和L132C/T159A。使用本领域中已知的方法将Chop2-GFP转基因克隆到rAAV载体中,在CAG启动子的控制下。

[0213] 实施例2:突变体Chop2构建体的体外分析。

[0214] 首先,在HEK细胞中检查每种突变体Chop2或其组合的功能性特性。例如通过腺病毒感染将Chop2构建体递送到HEK细胞。在表达WT或突变体Chop2后,形成功能性WT和突变体ChR2通道。如本文中描述的,评估ChR2通道的光敏感性和其它特性的测量。光刺激(光子/cm².s,于460nm)由氙弧灯产生并且通过中性密度滤光片减弱:ND4.0(2.8x10¹⁴),ND3.0(1.4x10¹⁵),ND2.5(4.8x10¹⁵);ND2.0(1.6x10¹⁶),ND1.0(1.3x10¹⁷),ND0(1.2x10¹⁸)。从野生型ChR2,T159C,L132C,L132C/T159C,和L132C/T159S测量光引发的电流。使用本领域中已知的方法实施膜片钳(patch clamp)记录。

[0215] 来自比较Chop2构建体间的光敏感性的此实验的代表性记录证明单独或与T159突变组合的L132突变与WT相比显示升高的光电流(图1A和1B)。图1B显示了在不同刻度的相同电流迹线以更清楚显示WT ChR2和ChR2突变体之间的光电流幅度的差异。图1B特别比较使用中性密度滤光片(ND 2.5)源自光刺激(等同于4.8x 10¹⁵个光子/cm²/s)的电流迹线;迹线以箭头标示。L132C突变体的光电流的幅度大于WT的;双重突变体L132C/T159C的光电流幅度大于L132C的;而L132C/T159S突变体的光电流幅度大于L132/T159C。ChR2突变体,特别是双重突变体L132C/T159C和L132C/T159S的电流迹线在与WT和L132C比较时也显示更慢的失活动力学。

[0216] 图2显示了通过10ms光脉冲(1.2×10^{18} 个光子/ cm^2/s ,于460nm波长)刺激后来自WT ChR2,L132C,L132C/T159C,和L132C/T159S的光引发电流的代表性记录以比较失活时间过程,或光关闭后的衰减时间过程。突变体ChR2显示更长的失活时间过程,双重突变体L132C/T159S具有最长的。如由L132C/T159C和L132C/T159S表明的较高光敏感性可以与较慢的通道动力学相关联。

[0217] 实施例3:突变体Chop2构建体的体内眼施用和分析。

[0218] 制备AAV2病毒载体,并玻璃体内注射到C57BL/6J成年小鼠的眼中,所述AAV2病毒载体携带由CAG启动子驱动的突变体Chop2-GFP构建体。通过氯胺酮(ketamine)(100mg/kg)和甲苯噻嗪(10mg/kg)的IP注射麻醉成年小鼠。在解剖显微镜下,通过剪刀经由眼睑产生切口以暴露巩膜。用针在晶状体后的巩膜区中进行小穿孔,并用具有32号钝末端针的Hamilton注射器将约 10^{11} 个基因组颗粒/ml的浓度的0.8-1.5 μl 病毒载体悬浮液经由孔注射到玻璃体内空间中。对于每只动物,通常仅对一只眼注射携带Chop2构建体的病毒载体,并且对另一只眼不注射或注射仅携带GFP的对照病毒载体。在表达本发明的WT或突变体Chop2后,利用内源视黄醛形成功能性WT或突变体ChR2通道,并且评估这些ChR2蛋白的特性,如本文中描述的。

[0219] 通过使用来自整装视网膜的多电极阵列记录检查ChR2介导的光应答。光刺激(光子/ cm^2/s)由473nm蓝色激光产生,并且通过中性密度滤光片减弱:ND0(6.3×10^{16}),ND1.0(7.4×10^{15}),ND1.5(2.7×10^{15}),ND2.0(7.3×10^{14}),ND2.5(3.2×10^{14}),ND3.0(8.5×10^{13}),ND3.5(3.8×10^{13}),和ND4.0(9.5×10^{12})。

[0220] 多电极阵列记录基于由Tian和Copenhagen(2003)报告的规程。简言之,将视网膜剖开,并在硝酸纤维素滤纸条(Millipore Corp.,Bedford,MA)上光感受器侧向下放置。将安放好的视网膜置于间隔200 μm 放置的30 μm 直径电极的MEA-60多电极阵列记录室(Multi Channel System MCS GmbH,Reutlingen,Germany)中,其中神经节细胞层面向记录电极。将视网膜在充氧胞外溶液中于34°C在所有实验期间连续灌注。胞外溶液含有(以mM计):NaCl,124;KCl,2.5;CaCl₂,2;MgCl₂,2;NaH₂PO₄,1.25;NaHCO₃,26;和葡萄糖,22(pH 7.35以及95% O₂和5% CO₂)。通常在记录室中放置视网膜后60分钟开始记录。每个光刺激的启动间的时间间隔是10-15s。将信号在200Hz(低截留)和20kHz(高截留)之间过滤。使用Offline Sorter软件(Plexon, Inc., Dallas, TX)分析来自各个神经元的应答。

[0221] 单一突变体Chop2/ChR2突变体,即L132和T159C显著降低引发ChR2介导的光电流需要的阈值光强度。此外,发现几个双重突变体,包括L132C/T159C,L132A/T159C,和L132C/T159S进一步提高低光强度的光电流。使用不同中性密度滤光片减弱光刺激以区别低光照中的Chop2构建体的光引发应答。在比野生型ChR2情况下引发尖峰形成活性需要的光水平低约1.5至2个对数单位的光强度观察到由本发明的突变体介导的视网膜神经节细胞的尖峰形成活性(图3)。特别地,展现的WT ChR2没有展现响应中性密度滤光片2.5得到的光刺激(3.2×10^{14} 个光子/ cm^2/s)的任何尖峰形成活性,而ChR2突变体(L132C,L132C/T159C,和L132C/T159S)表明尖峰形成活性。实际上,ChR2突变体在中性密度滤光片3.0和3.5的情况下仍展现出响应光的尖峰形成活性。因此,本发明的ChR2突变体拥有较高的光敏感性及因此明显较低的引发ChR2介导的光电流需要的阈值光强度。此外,ChR2双重突变体比单一突变体,即L132C拥有更高的光敏感性。另外,表达L132C/T159C和L132/T159S的视网膜神经节

细胞的尖峰形成激发可以分别在多达15Hz和5Hz的光闪烁频率后(图4)。

[0222] L132C/T159A突变体显示高的光敏感性,可能是这些突变体间最为光敏感的,但是其也显示极慢的关闭速率(off-rate)(通道连续开放以实现通道关闭后的许多许多次发送)。令人感兴趣地,它可以使用具有长波长的光,诸如黄光更快速关闭。L132C/T159A突变体(由SEQ ID NO:24和25编码)表明显著的潜力。

[0223] 鉴于光敏感性和通道动力学之间的折衷,表明光敏感性和通道动力学之间平衡的Chop2/ChR2突变体,诸如L132C/T159C或L132C/T159S可适合于视觉恢复的应用。

[0224] 实施例4:在小鼠疾病模型中分析突变体Chop2构建体。

[0225] 变性性眼病的小鼠模型是本领域中已知的。例如,纯合rd1(rd1/rd1)小鼠是常用的光感受器变性(degeneration)模型。Rd1小鼠携带环GMP磷酸二酯酶PDE6的无效突变,类似于人色素性视网膜炎的一些形式。可以特别有兴趣证明ChR2突变体安全性和效力的其他公知小鼠眼病模型包括rds(又称为Prph^{Rd2}),rd3,rd4,rd5,rd6,rd7,rd8,rd9,Pde6b^{rd10}或cpf11小鼠。

[0226] 可以将本发明的Chop2-GFP构建体在玻璃体内注射到2-12月龄的新生(P1)或成年小鼠的眼中。可以在注射有Chop2-GFP的视网膜中观察到GFP信号,以测定特定细胞群体,诸如视网膜神经节细胞中ChR2表达水平或表达。可以对突变体Chop2-GFP表达监测预定的时间量,即病毒注射后3-6个月,或1年。膜片钳和多通道阵列记录可以使用本领域中已知和本文中描述的方法实施以测量体内突变体Chop2-GFP表达细胞的光引发应答。

[0227] 其他技术和测试是本领域中完善建立的,用以测试光敏感性或视觉的恢复。可以检查来自Chop2-GFP表达细胞或视皮质的视觉诱发电位,如记载于PCT公开文本W0 2007/131180的。其他测试包括小鼠的视觉敏锐度的行为评估,即视觉视动(optomotor)测试和视觉水迷宫。

[0228] 实施例5:突变体Chop2构建体的长期表达和对视网膜神经元施用的安全性的分析

[0229] 在注射本发明的Chop2构建体的C57BL/6J成年小鼠中评估神经毒性。通过暴露于强蓝光2周后的免疫染色和细胞计数评估视网膜中的Chop2突变体的表达安全性。发现小鼠无一在注射后长达2个月展现出神经毒性症状。

[0230] 其他进行中的研究评估本发明的Chop2/ChR2突变体在视网膜神经元中的长期表达和安全性。

[0231] 其它实施方案

[0232] 虽然本发明已经结合其详细描述进行了描述,但是前述描述意图例示而不限制本发明的范围,其以所附权利要求书的范围限定。其它方面,优点和修改在所附权利要求书的范围内。

[0233] 本文中提及的专利和科学文献建立了本领域技术员可用的知识。本文中引用的所有美国专利和公开或未公开的美国专利申请通过提及并入。本文中提及的所有公开的外国专利和专利申请在此通过提及并入。本文中引用的所有其他公开参考文献,文件,手稿和科学文献在此通过提及并入。

[0234] 虽然本发明已经参考其具体实施方案具体显示并描述,但是本领域技术人员应当理解,可以在不偏离所附权利要求书涵盖的本发明范围的前提下对其进行形式和详情的各种变化。

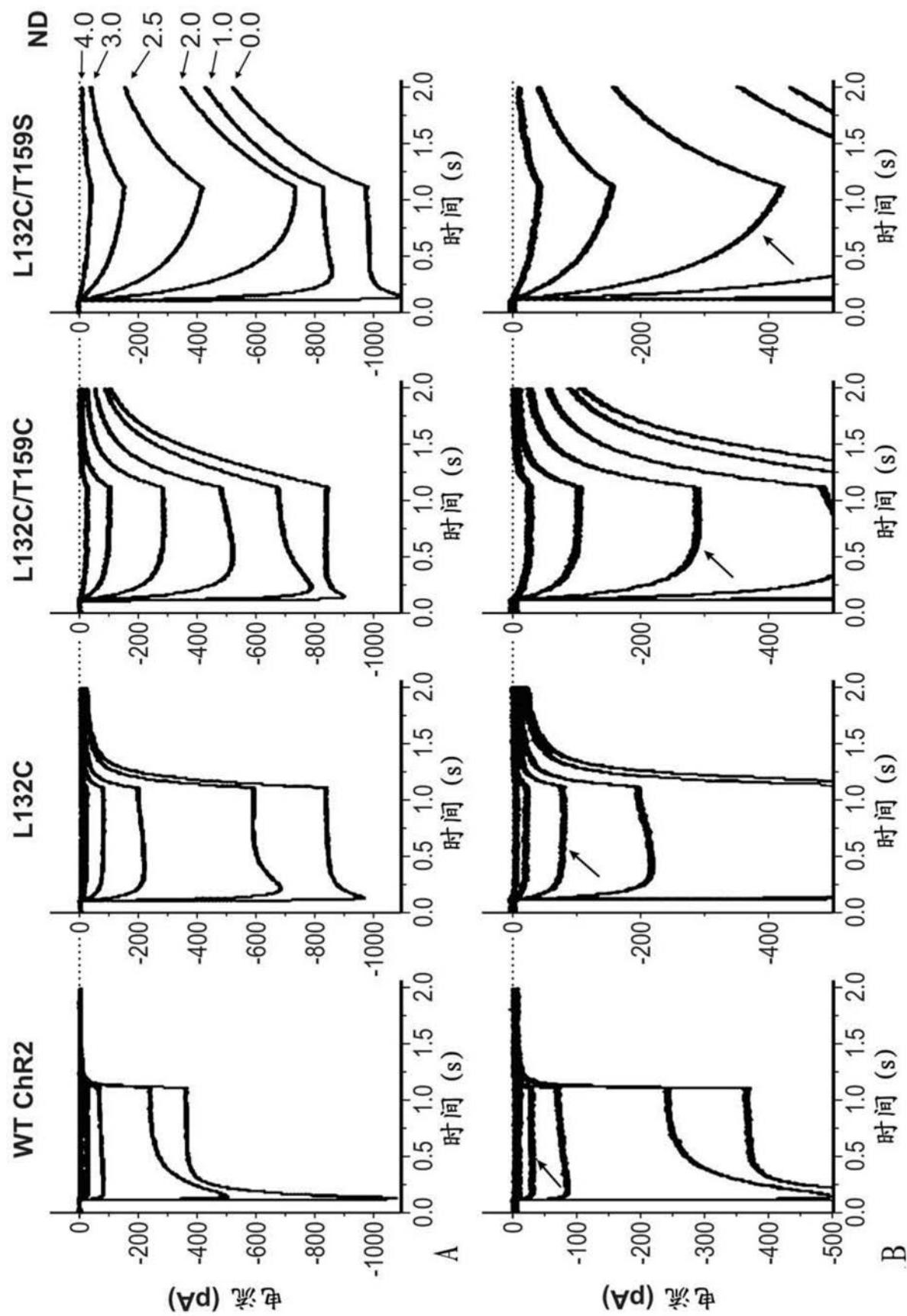


图1

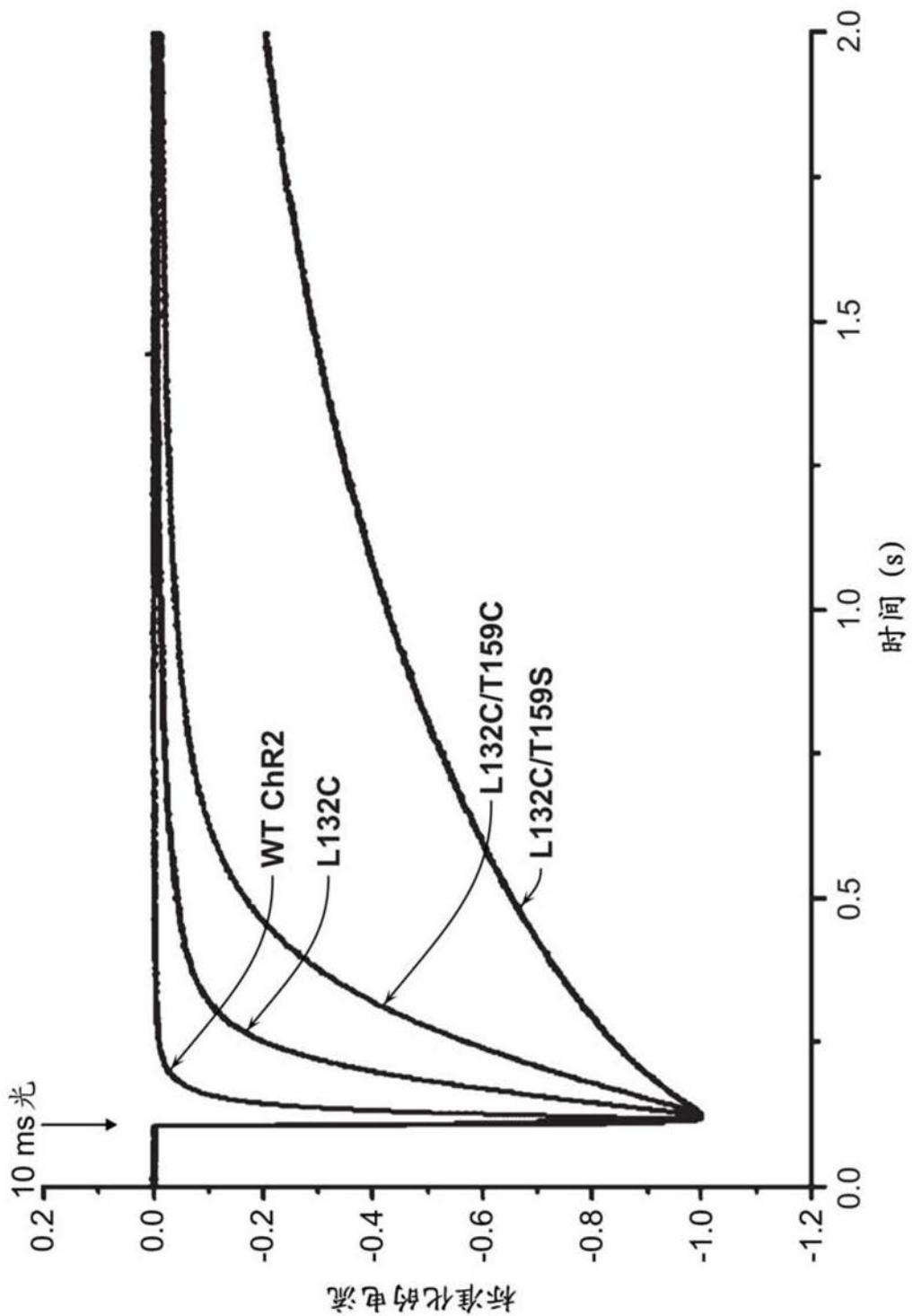


图2

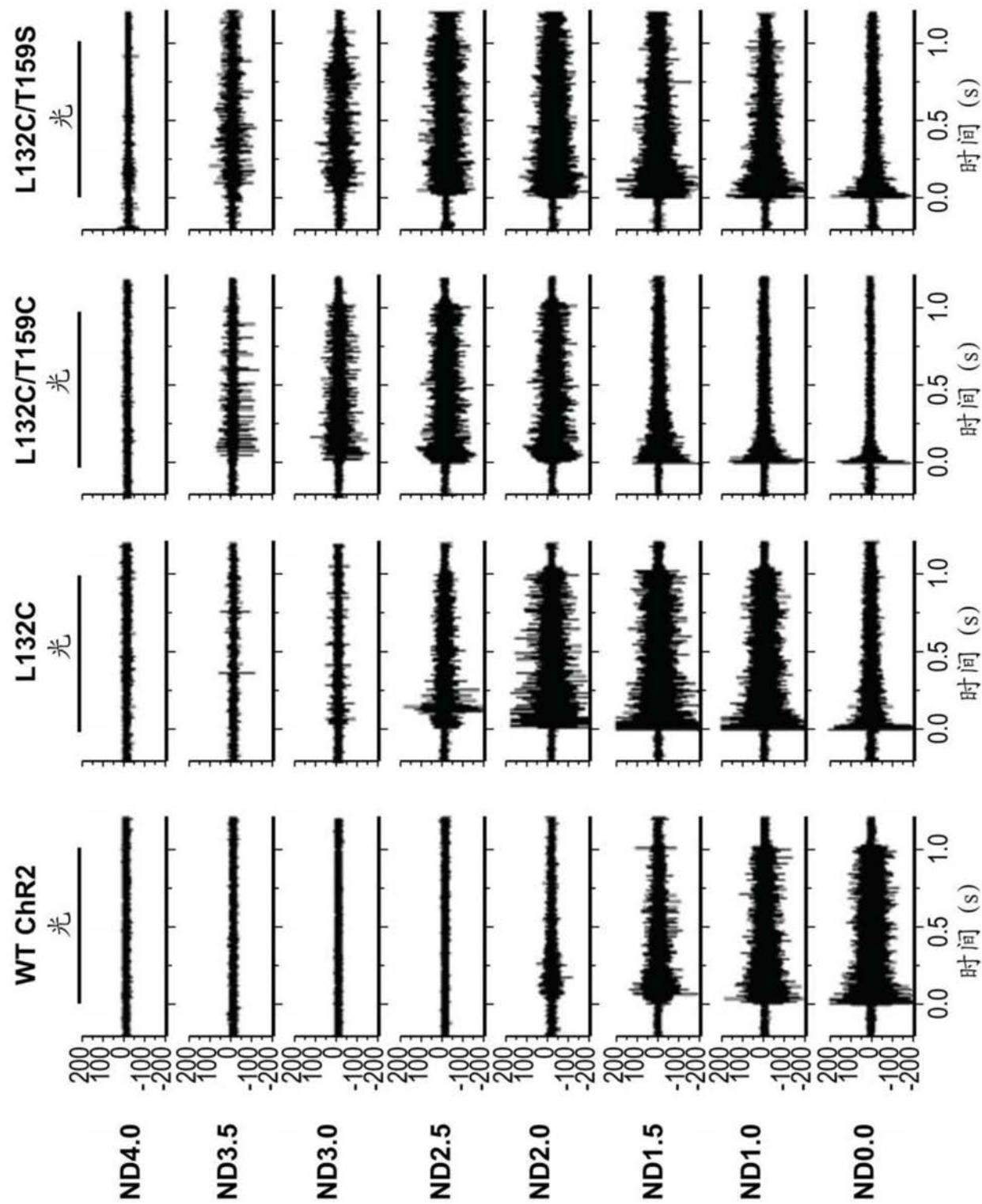


图3

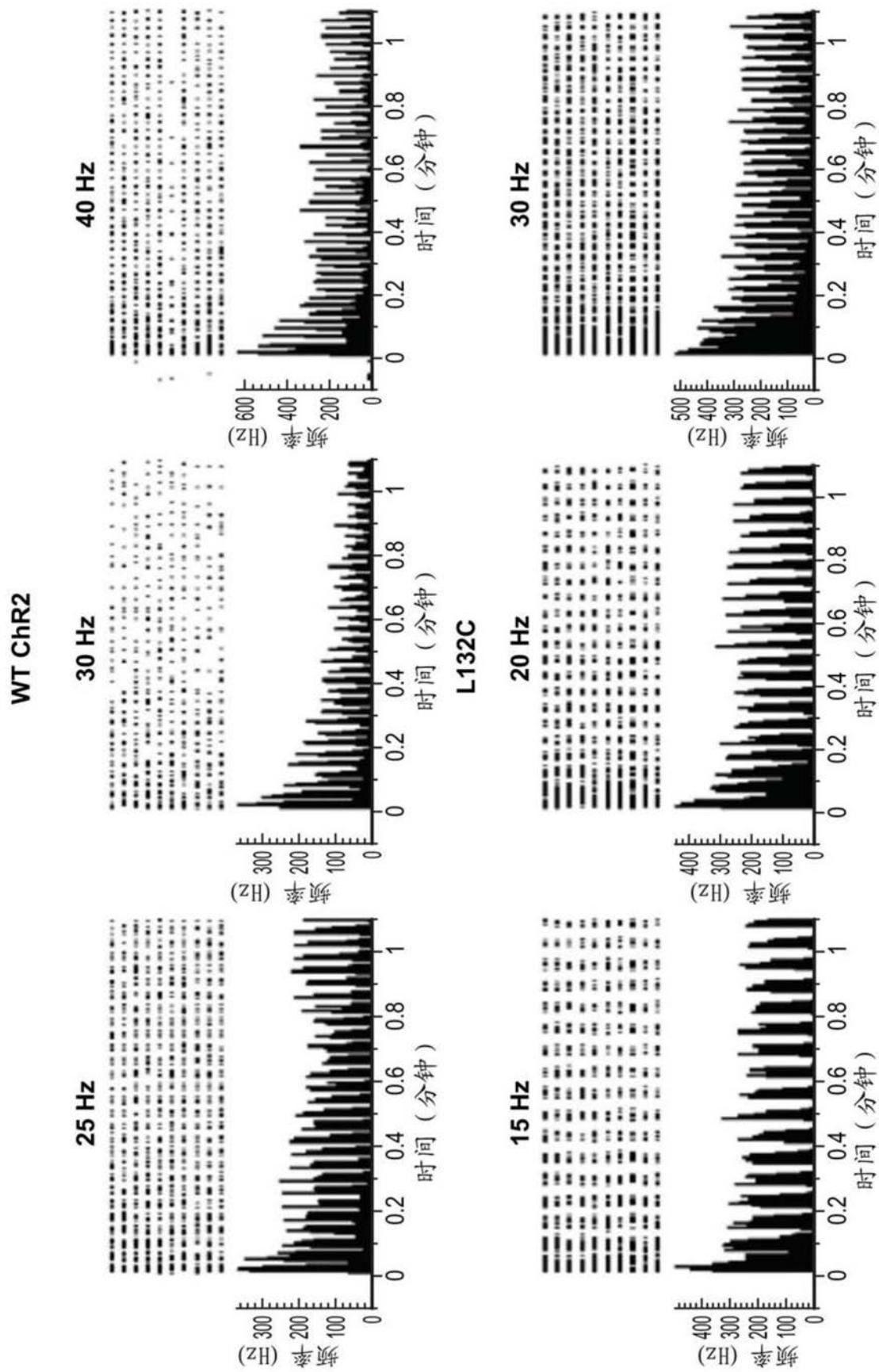


图4a

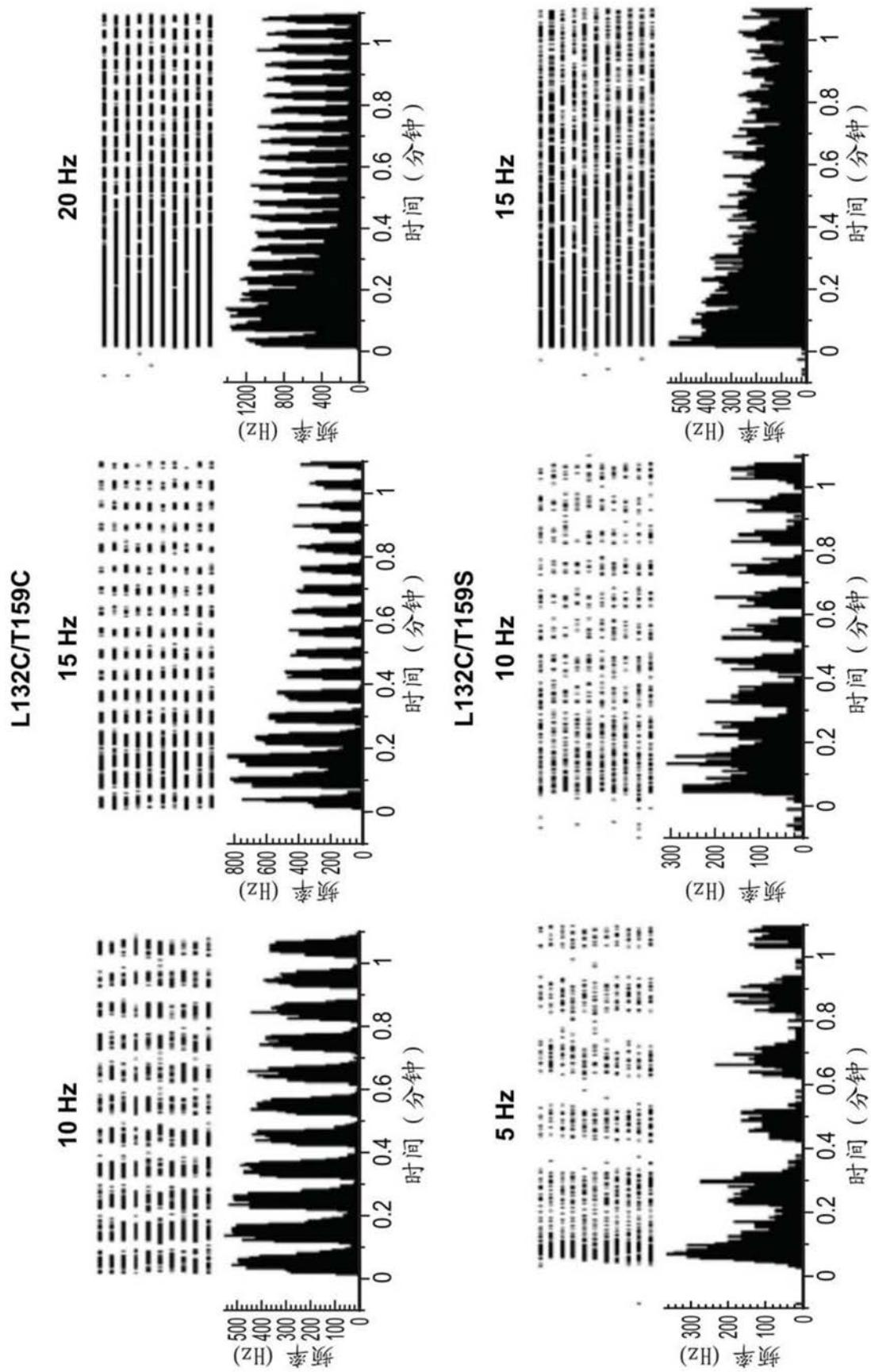


图4b