



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111826378 B

(45) 授权公告日 2022.05.27

(21) 申请号 202010781480.5

(22) 申请日 2020.08.05

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111826378 A

(43) 申请公布日 2020.10.27

(73) 专利权人 武汉纽福斯生物科技有限公司  
地址 430074 湖北省武汉市东湖新技术开  
发区高新大道666号武汉国家生物产  
业基地项目BCD区研发楼B1栋3楼  
C270-C271

(72) 发明人 李斌 任盛

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限  
公司 11227  
专利代理师 刘猛

(51) Int.Cl.

G12N 15/12 (2006.01)

G12N 9/12 (2006.01)

G12N 15/864 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107002096 A, 2017.08.01

审查员 卢文倩

权利要求书1页 说明书7页  
序列表7页 附图7页

(54) 发明名称

一种编码人受体酪氨酸激酶Mer的核苷酸序  
列及其应用

(57) 摘要

本发明涉及生物医药基因治疗技术领域,公  
开了一种编码人受体酪氨酸激酶Mer的核苷酸序  
列及其应用。本发明所述核苷酸序列与SEQ ID  
NO:3所示核苷酸序列有 $\geq 95\%$ 相同性。本发明证  
实使用AAV-MERTK药物处理可以显著改善MERTK  
突变导致视网膜色素变性的大鼠的视网膜病理  
症状,以及视网膜功能的恢复。玻璃体腔注射  
AAV-MERTK药物,MERTK可以在视网膜色素上皮层  
高效表达,并且增加视网膜外核层厚度。同时,视  
网膜电位图显示,和对照组相比,AAV-MERTK药物  
处理组大鼠对刺激反应强烈。因此此AAV-MERTK  
药物具有预防或治疗视网膜色素变性的作用。

1. 一种编码人受体酪氨酸激酶Mer的多核苷酸,其特征在于,其序列如SEQ ID NO: 3所示。
2. 权利要求1所述多核苷酸在制备预防或治疗MERTK功能丧失突变导致的眼部疾病的病毒载体或药物制剂中的应用。
3. 根据权利要求2所述应用,其特征在于,所述MERTK功能丧失突变导致的眼部疾病为视网膜色素变性。
4. 一种病毒载体,其特征在于,其包含有权利要求1所述多核苷酸。
5. 根据权利要求4所述病毒载体,其特征在于,所述病毒载体为腺相关病毒载体。
6. 根据权利要求5所述病毒载体,其特征在于,所述腺相关病毒载体的血清型为AAV2野生型或AAV2-7M8。
7. 根据权利要求4~6任意一项所述病毒载体,其特征在于,所述病毒载体由启动子hRPE 65调控MERTK蛋白的表达。
8. 权利要求4~6任意一项所述病毒载体在制备预防或治疗MERTK功能丧失突变导致的眼部疾病的药物制剂中的应用。
9. 根据权利要求8所述应用,其特征在于,所述MERTK功能丧失突变导致的眼部疾病为视网膜色素变性。
10. 一种药物制剂,其特征在于,包含如权利要求1所述的多核苷酸或权利要求4~7任一项所述的病毒载体。
11. 根据权利要求10所述的药物制剂,其特征在于,所述药物制剂为液体制剂。
12. 根据权利要求10或11所述药物制剂,其特征在于,还包括药学上可接受的载体或赋形剂。

## 一种编码人受体酪氨酸激酶Mer的核苷酸序列及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药基因治疗技术领域,更具体的说是涉及一种编码人受体酪氨酸激酶Mer的核苷酸序列及其应用。

### 背景技术

[0002] MERTK编码受体酪氨酸激酶Mer,受体酪氨酸激酶通常情况下通过与几种配体(包括LGALS3、TUB、TULP1或GAS6)结合,将细胞外基质的信号转导到细胞质中。通过以上方式,受体酪氨酸激酶能够调节许多生理过程,包括细胞存活、迁移、分化和凋亡细胞的吞噬(效应细胞)。而在视网膜色素上皮细胞中,MERTK的功能是介导其吞噬视细胞外节段脱落碎片,维持视锥视杆细胞正常代谢更新。

[0003] MERTK突变会引起视网膜色素变性38(RP38),由于MERTK突变导致蛋白失去功能,RPE细胞无法正常吞噬视细胞外节段碎片,内区段与外区段之间存在大量碎片堆积;同时视网膜血管会出现密度与结构异常,具体表现为脱细胞毛细血管的数量增多,Müller细胞纤维通过视网膜延伸到视网膜下间隙。患者在眼底检查时可见视网膜色素沉积,初期表现为视杆细胞丢失,随后是视锥细胞丢失。患者通常有夜视盲和中周边视野丧失。随着病情的发展,远周边视野丧失,最终中央视力丢失。

[0004] 天然存在的AAV血清型通常无法在玻璃体腔一侧转导视网膜组织细胞,因为存在内限膜、神经胶质细胞等阻止AAV病毒粒子扩散的屏障。通过构建AAV2衣壳蛋白编码序列文库,在loop4的位置插入随机7氨基酸序列,将突变的血清型注入小鼠玻璃体腔进行筛选,富集到一种主要的突变亚型,称为AAV2/2-7M8,即AAV2~588LALGETTRP。AAV2/2-7M8血清型具有很强的视网膜组织趋性,该血清型包装的荧光报告蛋白通过玻璃体腔注射小鼠眼部,能够在整个视网膜中检测到荧光。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种编码人受体酪氨酸激酶Mer的核苷酸序列,使得所述核苷酸序列经过密码子使用偏好、DNA重复序列、mRNA二级结构、GC含量等多个参数的优化,可以使MERTK表达效率更高;

[0006] 本发明的另外一个目的在于提供承载上述核苷酸序列的病毒载体,并具备预防或治疗MERTK突变导致视网膜色素变性的作用;

[0007] 本发明的另外一个目的在于提供包含上述病毒载体或核苷酸序列的药物制剂,并具备预防或治疗MERTK突变导致视网膜色素变性的作用;;

[0008] 本发明的另外一个目的在于提供上述核苷酸序列、病毒载体以及药物制剂在预防或治疗MERTK突变导致视网膜色素变性领域的中相关应用,包括但不限于相关药品、试剂的制备以及预防或治疗方法中的应用;

[0009] 本发明的另外一个目的在于提供上述药物制剂的递送方法,将所述药物制剂注射至眼部如视网膜下或玻璃体腔注射。

[0010] 为实现上述发明目的,本发明提供如下技术方案:

[0011] 一种编码人受体酪氨酸激酶Mer的核苷酸序列,其与SEQ ID NO:3所示核苷酸序列有 $\geq 95\%$ 相同性。

[0012] 作为优选,其与SEQ ID NO:3所示核苷酸序列有 $\geq 98\%$ 相同性;进一步优选地,其与SEQ ID NO:3所示核苷酸序列有 $\geq 99\%$ 相同性;在本发明具体实施方式中,其序列如SEQ ID NO:3所示。

[0013] 作为优选,所述核苷酸序列为cDNA序列。

[0014] 同时,本发明还提供了一种病毒载体,其包含有本发明所述核苷酸序列。

[0015] 作为优选,所述病毒载体为腺相关病毒载体;在本发明具体实施方式中,所述腺相关病毒载体的血清型为AAV2野生型或AAV2-7M8。

[0016] 更具体地,所述病毒载体由启动子hRPE 65(序列如SEQ ID NO:4所示)调控MERTK蛋白的表达。

[0017] 此外,本发明还提供一种药物制剂,包含本发明所述的核苷酸序列或本发明所述的病毒载体。

[0018] 作为优选,所述药物制剂为液体制剂;所述药物制剂还可以包括药学上可接受的载体或赋形剂。

[0019] 本发明对MERTK cDNA序列进行密码子优化(codon optimization)得到coMERTK,对优化前后的序列wtMERTK/coMERTK进行细胞水平表达效率检测,发现优化后的序列表达效率显著提高。然后使用AAV2/2-7M8-coMERTK药物感染视网膜色素上皮细胞系APRE-19,MERTK蛋白可有效表达。对MERTK突变的大鼠进行玻璃体腔注射AAV2/2-7M8-MERTK,可在大鼠的视网膜色素上皮细胞检测到MERTK表达。6个月后检测大鼠视网膜外核层(ONL)厚度,发现和对照AAV处理相比,AAV2/2-7M8-MERTK处理的大鼠视网膜外核层厚度显著增加,同时视网膜电位图结果显示大鼠对刺激反应强烈。AAV2/2-7M8-MERTK处理的大鼠视网膜结构和功能均有显著的恢复,证明AAV2/2-7M8-MERTK药物具有预防或治疗视网膜色素变性的作用。

[0020] 基于上述各项优异的技术效果,本发明提出了如下相关应用:

[0021] 本发明所述核苷酸序列在制备预防或治疗MERTK突变导致的眼部疾病的病毒载体或药物制剂中的应用,或在预防或治疗MERTK突变导致的眼部疾病中的应用;

[0022] 本发明所述病毒载体在制备预防或治疗MERTK突变导致的眼部疾病的药物制剂中的应用,或在预防或治疗MERTK突变导致的眼部疾病中的应用;

[0023] 本发明所述的药物制剂在预防或治疗MERTK突变导致的眼部疾病中的应用。

[0024] 其中,所述MERTK突变导致的眼部疾病为MERTK突变导致视网膜色素变性。

[0025] 本发明还对应提供了一种本发明所述药物制剂的递送方法,将所述药物制剂注射至眼部,比如视网膜下或玻璃体腔注射。

[0026] 由以上技术方案可知,本发明证实使用AAV-MERTK药物处理可以显著改善MERTK突变导致视网膜色素变性的大鼠的视网膜病理症状的改善,以及视网膜功能的恢复。玻璃体腔注射AAV-MERTK药物,MERTK可以在视网膜色素上皮层高效表达,并且增加视网膜外核层厚度。同时,视网膜电位图显示,和对照组相比,AAV-MERTK药物处理组大鼠对刺激反应强烈。因此此AAV-MERTK药物具有预防或治疗视网膜色素变性的作用。

## 附图说明

[0027] 图1-图3所示为wtMERTK和coMERTK序列比对;优化后差异性的密码子序列加粗并用下划线标注;

[0028] 图4所示为AAV-coMERTK载体图谱(A)和AAV-wtMERTK载体图谱(B);载体包含AAV2 5' ITR,hRPE65启动子,密码子优化后的MERTK cDNA或野生型MERTK cDNA,bGH polyA序列和AAV2 3' ITR;

[0029] 图5所示为AAV-coMERTK和AAV-wtMERTK质粒在ARPE-19细胞中的表达效率;

[0030] A:在ARPE-19细胞中分别转染AAV-coMERTK和AAV-wtMERTK质粒,48小时后裂解细胞,Western blot检测MERTK蛋白表达水平;

[0031] B:AAV-coMERTK和AAV-wtMERTK质粒转染ARPE-19细胞表达MERTK蛋白相对丰度;

[0032] 图6所示为AAV2/2-7M8-coMERTK病毒可高效感染ARPE-19细胞;

[0033] 将不同血清型的蛋白外壳包装的AAV-coMERTK病毒分别感染ARPE-19细胞(MOI = 10<sup>4</sup>),48小时后裂解细胞,利用qPCR测定不同血清型感染的细胞和未感染的细胞中MERTK mRNA的含量;

[0034] 图7所示为AAV2/2-7M8-coMERTK病毒玻璃体腔注射后,视网膜MERTK基因表达检测;

[0035] 将AAV2/2-7M8-coMERTK病毒对RCS大鼠(MERTK缺陷型大鼠)进行玻璃体腔注射,注射6个月后取大鼠视网膜利用Western Blot对治疗眼(AAV-coMERTK)和未治疗眼(AAV-GFP)进行MERTK蛋白表达检测;

[0036] 图8所示为AAV2/2-7M8-coMERTK病毒处理后,RCS大鼠及野生型大鼠视网膜外核层厚度检测;

[0037] 注射后6个月取RCS大鼠以及野生型大鼠的药物注射眼和对照眼视网膜,进行免疫荧光染色,对距离视神经头不同距离的上段与下段外核层厚度进行定量分析;

[0038] 图9所示为AAV2/2-7M8-coMERTK病毒处理后,大鼠视网膜电位图检测;

[0039] 注射后6个月RCS大鼠的药物注射眼和对照眼以及野生型大鼠视网膜电图分析,在光照条件下和黑暗条件下给予特定强度的光刺激,记录光刺激下各大鼠(n=10)药物注射眼和对照眼的b波振幅。

## 具体实施方式

[0040] 本发明公开了一种编码人受体酪氨酸激酶Mer的核苷酸序列及其应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明所述核苷酸序列及其应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的核苷酸序列及其应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0041] AAV-MERTK药物可以有效的在视网膜细胞表达MERTK,修复患者因为MERTK突变造成的视网膜疾病,MERTK的cDNA编码的蛋白序列参见SEQ ID NO:1所示。

[0042] 本发明通过优化密码子使用偏好,DNA重复序列,mRNA二级结构,GC含量等多个参数,得到了和wtMERTK(序列如SEQ ID NO:2所示)序列显著不同的优化序列coMERTK(codon

optimized human MERTK cDNA, 序列如SEQ ID NO:3所示), 优化序列和野生型序列对比如图1-图3所示。把wt/co MERTK序列构建到AAV载体, 质粒图谱如图4所示, 然后在ARPE-19细胞中转染相同量的质粒, 并检测MERTK基因的表达, 序列优化后的MERTK表达效率更高, 证明密码子优化能够在不改变蛋白序列的情况下提高蛋白的表达水平, 为细胞提供更多的正常功能的蛋白, 从而更好地弥补基因突变造成的缺陷。

[0043] 通过体外实验检验了密码子优化与AAV2/2-7M8血清型两种手段结合提高MERTK表达效率的作用, 利用RCS大鼠模型 (MERTK缺陷型) 进行了体内实验, 进一步证明AAV-MERTK基因治疗药物对MERTK突变引起的视网膜色素变性的治疗作用。通过玻璃体腔注射药物, 6个月后观察药物治疗对大鼠眼部病变的改善情况。

[0044] 下面结合实施例, 进一步阐述本发明。

[0045] 实施例1: 密码子优化的MERTK载体构建和表达验证

[0046] (1) 质粒载体构建

[0047] 1. 将AAV-hRPE65质粒骨架, coMERTK片段和wtMERTK片段分别同时用HindIII与XhoI双酶切, 然后将酶切后的片段分别于骨架进行连接。

[0048] 2. 连接产物转化大肠杆菌, 挑取单菌落进行酶切验证与测序验证。

[0049] (2) 细胞转染

[0050] 1. 转染前一天, 胰酶消化细胞并计数, 细胞铺板, 使其在转染日密度为90%。

[0051] 2. 对于每孔细胞, 使用50 $\mu$ l无血清DMEM培养基稀释0.8 $\mu$ g-1.0 $\mu$ g DNA。

[0052] 3. 对于每孔细胞, 使用50 $\mu$ l DMEM培养基稀释1 $\mu$ l-3 $\mu$ l LIPOFECTAMINE 2000试剂。LIPOFECTAMINE 2000稀释后, 在5分钟内同稀释的DNA混合。

[0053] 4. 混合稀释的DNA和稀释的LIPOFECTAMINE 2000在室温保温20分钟。

[0054] 5. 直接将复合物加入到每孔中, 摇动培养板, 轻轻混匀。

[0055] 6. 在37 $^{\circ}$ C, 5%的CO<sub>2</sub>中保温24-48小时。

[0056] 7. 在细胞中加入复合物48小时后, 裂解细胞。

[0057] (3) Western Blot

[0058] 1. 蛋白样品制备, 按1:100的比例在裂解液中加入PMSF (按用量现配现用)。

[0059] 2. 使用强裂解液裂解细胞。

[0060] 3. 使用BCA法测定蛋白浓度。

[0061] 4. 电泳

[0062] a、根据所检测蛋白大小配制相应的分离胶(5ml/块), 待分离胶凝固。

[0063] b、配制5%的浓缩胶(2ml/块), 加满玻璃板, 插入梳子。

[0064] c、将5 $\mu$ l预染蛋白质分子marker SDS-PAGE加入加样孔内, 使用1x的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液10 $\mu$ l上样到样品孔边上的空白加样孔内。

[0065] 5. 转膜

[0066] 将转膜白夹子上面放上湿的垫层, 垫层上面铺三张叠在一起的湿滤纸, 滤纸上面依次放置湿pvdf膜、胶、滤纸、垫层、黑夹板, 将装好的夹板放入装有转膜缓冲液的电泳槽, 把转膜槽放置在冰浴中进行转膜。

[0067] 6. 封闭

[0068] 转膜完毕后, 漂洗1-2分钟, 用滴管吸尽缓冲液, 加入5%的脱脂奶粉, 在侧摆摇床

上缓慢摇动,室温封闭15-60min。加入TBS洗涤液洗涤5分钟。共洗涤3次。

[0069] 7.一抗孵育

[0070] 按照比例使用5%的脱脂奶粉/PBS+2%BSA稀释适量的一抗,4℃缓慢摇动孵育过夜或室温在侧摆摇床上缓慢摇动孵育2h。孵育后洗涤。

[0071] 8.二抗孵育

[0072] 加入稀释好的二抗,室温侧摆摇床上缓慢摇动孵育40min-1h。孵育后洗涤。

[0073] 9.蛋白检测

[0074] 使用ECL类试剂来检测蛋白,各取1ml混匀后,滴加在蛋白膜表面,避光孵育1-2min。用镊子将蛋白膜整齐的摆放在塑料纸上,放入凝胶成像仪上曝光。结果如图5A、图5B所示,序列优化后的MERTK表达效率更高。

[0075] 实施例2:AAV2/2-7M8-MERTK高效感染ARPE-19细胞

[0076] 将不同的蛋白外壳包装构成不同血清型的AAV-coMERTK病毒,其中包括AAV2/2-7M8,AAV2/5,AAV2/8和AAV2/9,将四种血清型病毒分别感染ARPE-19细胞(MOI=10<sup>4</sup>),未感染病毒的ARPE-19细胞作为对照。感染后48小时裂解细胞,利用qPCR方法测定不同血清型感染的细胞和未感染的细胞中MERTK mRNA的含量,具体实施方法如下:

[0077] (1) 病毒包装、病毒感染ARPE-19细胞

[0078] 1. 聚合度90%以上的ARPE-19细胞按1:3比例传盘。

[0079] 2. 转质粒前1-2h左右,换成无血清培养基,用转染试剂将目的基因质粒和辅助质粒转入ARPE-19中。

[0080] 3. 质粒转染24h后,换新的无血清培养基

[0081] 4. 转染72h收毒。带着培养基,吹下细胞,离心;然后分别收获培养基上清与细胞沉淀。用PEG8000沉淀培养基上清中的病毒,沉淀过夜后收集病毒沉淀。

[0082] 5. 将病毒的混合液用碘克沙醇密度梯度离心进行纯化,然后用超滤管进行浓缩。

[0083] 6. 铺板:将对数生长期的ARPE-19细胞消化重悬后,按1\*10<sup>5</sup>/mL密度接种于12孔板,生长过夜

[0084] 7. 感染:将70-80%铺满12孔板中的培养液吸除,换新鲜的培养液,同时加入PBS浓度梯度稀释的病毒液,混合均匀后即可放入孵箱培养。

[0085] (2) qPCR测定mRNA含量

[0086] 1、总RNA抽提

[0087] 1) 取匀浆器,加入1ml的Trizol Reagent,置冰上预冷。

[0088] 2) 取100mg组织或细胞,加入到匀浆器中,充分研磨直至无可见组织块,13000g离心10min取上清。

[0089] 3) 加入250μl三氯甲烷,颠倒离心管15s,充分混匀,静置3min;4℃下13000g离心8min。

[0090] 4) 将上清转移到一新的离心管中,加入0.8倍体积的异丙醇,颠倒混匀;-20℃放置15min;4℃下13000g离心10min,管底的白色沉淀即为RNA。

[0091] 5) 吸除液体,加入75%乙醇1.5ml洗涤沉淀;4℃下13000g离心5min;将液体吸除干净,将离心管置于超净台上吹3min;加入20μl无RNA酶的水溶解RNA;55℃孵育5min。

[0092] 2、反转录

[0093] 1) 取一PCR管,加入含2 $\mu$ g RNA的溶液;加入1 $\mu$ l oligo(dT);用无核糖核酸酶的去离子水补足至12 $\mu$ l。

[0094] 2) 于PCR仪上70 $^{\circ}$ C保温5min,迅速置冰上冷却;依次加入4 $\mu$ l 5 $\times$ buffer,2 $\mu$ l 10mM dNTPs,1 $\mu$ l RNA inhibitor和1 $\mu$ l反转录酶,用枪抽吸混匀;于PCR仪上42 $^{\circ}$ C保温60min,结束后80 $^{\circ}$ C保温5min灭活反转录酶。

[0095] 3、定量PCR

[0096] 1) 取0.2ml PCR管,配制如下反应体系,每个反转录产物配制3管。2 $\times$ qPCR Mix 12.5 $\mu$ l;7.5 $\mu$ M基因引物2.0 $\mu$ l;反转录产物2.5 $\mu$ l;ddH<sub>2</sub>O 8.0 $\mu$ l。

[0097] 2) PCR扩增预变性95 $^{\circ}$ C,10min循环(40次)95 $^{\circ}$ C,15s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C,60s溶解曲线75 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C,每20s升温1 $^{\circ}$ C;

[0098] 3) 结果处理 $\Delta\Delta$ CT法:A=CT(目的基因,待测样本)-CT(内标基因,待测样本);B=CT(目的基因,对照样本)-CT(内标基因,对照样本);K=A-B;表达倍数=2<sup>-K</sup>。

[0099] 结果如图6所示,AAV2/2-7M8血清型病毒感染细胞后MERTK的mRNA含量要显著高于其他血清型,说明AAV2/2-7M8血清型对ARPE-19细胞具有较强的趋性,能够促使携带的MERTK cDNA在ARPE-19细胞中高效表达。MERTK在视网膜中的表达主要位于视网膜色素表皮细胞(RPE),利用ARPE-19这一细胞系的验证表明,AAV2/2-7M8血清型相对于其他血清型更适合用于治疗MERTK突变引起的视网膜色素变性。

[0100] 实施例3:AAV-coMERTK基因治疗药物改善RCS大鼠眼部功能,修复视网膜结构

[0101] (1) 病毒药物注射大鼠

[0102] 1.准备好5 $\times$ 10<sup>12</sup>vg/ml的AAV-coMERTK药物和AAV-GFP。

[0103] 2.将1 $\mu$ l/眼的AAV-coMERTK药物和AAV-GFP病毒通过玻璃体腔注射进入适龄大鼠眼内。

[0104] 3.在大鼠6月龄时,处死大鼠,将大鼠视网膜组织分离出,染色检测视网膜视细胞数量以及目的蛋白含量。

[0105] (2) Western Blot

[0106] 方法同前所述。注射6个月后取大鼠视网膜利用Western Blot对治疗眼(AAV-coMERTK)和未治疗眼(AAV-GFP)进行MERTK蛋白表达检测,结果如图7所示,药物注射眼中(AAV-coMERTK)能够检测到MERTK蛋白而对对照眼中(AAV-GFP)检测不到MERTK的表达,说明药物注射能够正确传递药物到大鼠眼部组织。

[0107] (3) 视网膜组织免疫荧光染色

[0108] 1.取视网膜组织制片,用0.01M PBS冲洗5min $\times$ 3次。

[0109] 2.滴加10%正常山羊血清37 $^{\circ}$ C封闭45min。

[0110] 3.吸去多余液体,加入一抗(1:100),放入湿盒中,37 $^{\circ}$ C 1h后置于4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜(保持在湿盒中)。

[0111] 4.0.01M PBS冲洗5min $\times$ 3次。

[0112] 5.在黑暗条件下加入二抗(1:200),37 $^{\circ}$ C温育45min。

[0113] 6.在黑暗条件下吸弃二抗(注:不再冲洗),加入DAPI染液,室温作用20min。

[0114] 7.在黑暗条件下0.01M PBS冲洗5min $\times$ 6次。

[0115] 8.在黑暗条件下用防荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察。



[0116] 接受药物注射的RCS大鼠的眼部组织被用来进行视网膜免疫染色分析,对外核层厚度的定量分析表明,治疗眼的外核层厚度明显大于对照眼(图8),说明药物注射后治疗眼中表达的MERTK一定程度上恢复了视网膜色素上皮细胞的功能,使其能够正常吞噬视细胞脱落的外节段,从而阻止了视细胞的过度退化,相对于对照眼保留了更多的视细胞。

[0117] (4) 视网膜电图分析

[0118] 1. 对大鼠进行麻醉和瞳孔扩张处理,同时向眼部滴入包含电极的2.5%羟丙甲纤维素液体,记录角膜电位反应。

[0119] 2. 暗适应条件下让大鼠适应黑暗过夜,用LED灯给予 $3\log\text{ sc cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ 强度的短暂闪光刺激,记录暗适应ERG。

[0120] 3. 光适应条件下,LED灯给予 $2\log\text{ sc cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ 强度的短暂闪光刺激,记录光适应ERG。

[0121] 光照条件下和黑暗条件下,治疗眼的b波振幅在给予外界光刺激下均显著高于对照眼(图9),这说明药物治疗对眼部功能起到了明显的改善作用。

[0122] 综合以上各实施例结果,本发明证明了AAV-MERTK基因治疗药物对MERTK突变引起的视网膜色素变性的治疗作用,为进一步的临床应用开发奠定了基础。

[0123] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0001] 序列表

[0002] <110> 武汉纽福斯生物科技有限公司

[0003] <120> 一种编码人受体酪氨酸激酶Mer的核苷酸序列及其应用

[0004] <130> MP2016754

[0005] <160> 4

[0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0007] <210> 1

[0008] <211> 999

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 人的MERTK蛋白序列 (human MERTK protein)

[0011] <400> 1

[0012] Met Gly Pro Ala Pro Leu Pro Leu Leu Leu Gly Leu Phe Leu Pro Ala

[0013] 1 5 10 15

[0014] Leu Trp Arg Arg Ala Ile Thr Glu Ala Arg Glu Glu Ala Lys Pro Tyr

[0015] 20 25 30

[0016] Pro Leu Phe Pro Gly Pro Phe Pro Gly Ser Leu Gln Thr Asp His Thr

[0017] 35 40 45

[0018] Pro Leu Leu Ser Leu Pro His Ala Ser Gly Tyr Gln Pro Ala Leu Met

[0019] 50 55 60

[0020] Phe Ser Pro Thr Gln Pro Gly Arg Pro His Thr Gly Asn Val Ala Ile

[0021] 65 70 75 80

[0022] Pro Gln Val Thr Ser Val Glu Ser Lys Pro Leu Pro Pro Leu Ala Phe

[0023] 85 90 95

[0024] Lys His Thr Val Gly His Ile Ile Leu Ser Glu His Lys Gly Val Lys

[0025] 100 105 110

[0026] Phe Asn Cys Ser Ile Ser Val Pro Asn Ile Tyr Gln Asp Thr Thr Ile

[0027] 115 120 125

[0028] Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys Glu Leu Leu Gly Ala His His Ala Ile

[0029] 130 135 140

[0030] Thr Gln Phe Tyr Pro Asp Asp Glu Val Thr Ala Ile Ile Ala Ser Phe

[0031] 145 150 155 160

[0032] Ser Ile Thr Ser Val Gln Arg Ser Asp Asn Gly Ser Tyr Ile Cys Lys

[0033] 165 170 175

[0034] Met Lys Ile Asn Asn Glu Glu Ile Val Ser Asp Pro Ile Tyr Ile Glu

[0035] 180 185 190

[0036] Val Gln Gly Leu Pro His Phe Thr Lys Gln Pro Glu Ser Met Asn Val

[0037] 195 200 205

[0038] Thr Arg Asn Thr Ala Phe Asn Leu Thr Cys Gln Ala Val Gly Pro Pro

[0039] 210 215 220

[0040] Glu Pro Val Asn Ile Phe Trp Val Gln Asn Ser Ser Arg Val Asn Glu

[0041] 225 230 235 240

[0042]	Gln Pro Glu Lys Ser Pro Ser Val Leu Thr Val Pro Gly Leu Thr Glu		
[0043]		245	250 255
[0044]	Met Ala Val Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Asp Lys Gly Leu Thr Val		
[0045]		260	265 270
[0046]	Ser Lys Gly Val Gln Ile Asn Ile Lys Ala Ile Pro Ser Pro Pro Thr		
[0047]		275	280 285
[0048]	Glu Val Ser Ile Arg Asn Ser Thr Ala His Ser Ile Leu Ile Ser Trp		
[0049]		290	295 300
[0050]	Val Pro Gly Phe Asp Gly Tyr Ser Pro Phe Arg Asn Cys Ser Ile Gln		
[0051]		305	310 315 320
[0052]	Val Lys Glu Ala Asp Pro Leu Ser Asn Gly Ser Val Met Ile Phe Asn		
[0053]		325	330 335
[0054]	Thr Ser Ala Leu Pro His Leu Tyr Gln Ile Lys Gln Leu Gln Ala Leu		
[0055]		340	345 350
[0056]	Ala Asn Tyr Ser Ile Gly Val Ser Cys Met Asn Glu Ile Gly Trp Ser		
[0057]		355	360 365
[0058]	Ala Val Ser Pro Trp Ile Leu Ala Ser Thr Thr Glu Gly Ala Pro Ser		
[0059]		370	375 380
[0060]	Val Ala Pro Leu Asn Val Thr Val Phe Leu Asn Glu Ser Ser Asp Asn		
[0061]		385	390 395 400
[0062]	Val Asp Ile Arg Trp Met Lys Pro Pro Thr Lys Gln Gln Asp Gly Glu		
[0063]		405	410 415
[0064]	Leu Val Gly Tyr Arg Ile Ser His Val Trp Gln Ser Ala Gly Ile Ser		
[0065]		420	425 430
[0066]	Lys Glu Leu Leu Glu Glu Val Gly Gln Asn Gly Ser Arg Ala Arg Ile		
[0067]		435	440 445
[0068]	Ser Val Gln Val His Asn Ala Thr Cys Thr Val Arg Ile Ala Ala Val		
[0069]		450	455 460
[0070]	Thr Arg Gly Gly Val Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Lys Ile Phe Ile		
[0071]		465	470 475 480
[0072]	Pro Ala His Gly Trp Val Asp Tyr Ala Pro Ser Ser Thr Pro Ala Pro		
[0073]		485	490 495
[0074]	Gly Asn Ala Asp Pro Val Leu Ile Ile Phe Gly Cys Phe Cys Gly Phe		
[0075]		500	505 510
[0076]	Ile Leu Ile Gly Leu Ile Leu Tyr Ile Ser Leu Ala Ile Arg Lys Arg		
[0077]		515	520 525
[0078]	Val Gln Glu Thr Lys Phe Gly Asn Ala Phe Thr Glu Glu Asp Ser Glu		
[0079]		530	535 540
[0080]	Leu Val Val Asn Tyr Ile Ala Lys Lys Ser Phe Cys Arg Arg Ala Ile		
[0081]		545	550 555 560
[0082]	Glu Leu Thr Leu His Ser Leu Gly Val Ser Glu Glu Leu Gln Asn Lys		
[0083]		565	570 575

[0084]	Leu Glu Asp Val Val Ile Asp Arg Asn Leu Leu Ile Leu Gly Lys Ile
[0085]	580 585 590
[0086]	Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ser Val Met Glu Gly Asn Leu Lys Gln
[0087]	595 600 605
[0088]	Glu Asp Gly Thr Ser Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Leu Asp
[0089]	610 615 620
[0090]	Asn Ser Ser Gln Arg Glu Ile Glu Glu Phe Leu Ser Glu Ala Ala Cys
[0091]	625 630 635 640
[0092]	Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Ile Arg Leu Leu Gly Val Cys
[0093]	645 650 655
[0094]	Ile Glu Met Ser Ser Gln Gly Ile Pro Lys Pro Met Val Ile Leu Pro
[0095]	660 665 670
[0096]	Phe Met Lys Tyr Gly Asp Leu His Thr Tyr Leu Leu Tyr Ser Arg Leu
[0097]	675 680 685
[0098]	Glu Thr Gly Pro Lys His Ile Pro Leu Gln Thr Leu Leu Lys Phe Met
[0099]	690 695 700
[0100]	Val Asp Ile Ala Leu Gly Met Glu Tyr Leu Ser Asn Arg Asn Phe Leu
[0101]	705 710 715 720
[0102]	His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Arg Asp Asp Met Thr
[0103]	725 730 735
[0104]	Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Ser Gly Asp
[0105]	740 745 750
[0106]	Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala
[0107]	755 760 765
[0108]	Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp
[0109]	770 775 780
[0110]	Ala Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Met Thr Pro
[0111]	785 790 795 800
[0112]	Tyr Pro Gly Val Gln Asn His Glu Met Tyr Asp Tyr Leu Leu His Gly
[0113]	805 810 815
[0114]	His Arg Leu Lys Gln Pro Glu Asp Cys Leu Asp Glu Leu Tyr Glu Ile
[0115]	820 825 830
[0116]	Met Tyr Ser Cys Trp Arg Thr Asp Pro Leu Asp Arg Pro Thr Phe Ser
[0117]	835 840 845
[0118]	Val Leu Arg Leu Gln Leu Glu Lys Leu Leu Glu Ser Leu Pro Asp Val
[0119]	850 855 860
[0120]	Arg Asn Gln Ala Asp Val Ile Tyr Val Asn Thr Gln Leu Leu Glu Ser
[0121]	865 870 875 880
[0122]	Ser Glu Gly Leu Ala Gln Gly Ser Thr Leu Ala Pro Leu Asp Leu Asn
[0123]	885 890 895
[0124]	Ile Asp Pro Asp Ser Ile Ile Ala Ser Cys Thr Pro Arg Ala Ala Ile
[0125]	900 905 910

[0126] Ser Val Val Thr Ala Glu Val His Asp Ser Lys Pro His Glu Gly Arg  
 [0127] 915 920 925  
 [0128] Tyr Ile Leu Asn Gly Gly Ser Glu Glu Trp Glu Asp Leu Thr Ser Ala  
 [0129] 930 935 940  
 [0130] Pro Ser Ala Ala Val Thr Ala Glu Lys Asn Ser Val Leu Pro Gly Glu  
 [0131] 945 950 955 960  
 [0132] Arg Leu Val Arg Asn Gly Val Ser Trp Ser His Ser Ser Met Leu Pro  
 [0133] 965 970 975  
 [0134] Leu Gly Ser Ser Leu Pro Asp Glu Leu Leu Phe Ala Asp Asp Ser Ser  
 [0135] 980 985 990  
 [0136] Glu Gly Ser Glu Val Leu Met  
 [0137] 995  
 [0138] <210> 2  
 [0139] <211> 3000  
 [0140] <212> DNA  
 [0141] <213> 野生型人的MERTK cDNA序列(wild type human MERTK cDNA)  
 [0142] <400> 2  
 [0143] atggggccgg ccccgctgcc gctgctgctg ggcctcttcc tccccgcgct ctggcgtaga 60  
 [0144] gctatcactg aggcaaggga agaagccaag cttaccgcg tattccccgg accttttcca 120  
 [0145] gggagcctgc aaactgacca cacaccgctg ttateccttc ctcacgccag tgggtaccag 180  
 [0146] cctgccttga tgttttcacc aaccagcct ggaagaccac atacaggaaa ctagccatt 240  
 [0147] ccccaggtga cctctgtcga atcaaagccc ctaccgcctc ttgccttcaa acacacagtt 300  
 [0148] ggacacataa tactttctga acataaaggt gtcaaattta attgctcaat cagtgtacct 360  
 [0149] aatatatacc aggacaccac aatttcttgg tggaaagatg ggaaggaatt gcttggggca 420  
 [0150] catcatgcaa ttacacagtt ttatccagat gatgaagta cagcaataat cgcttccttc 480  
 [0151] agcataacca gtgtgcagcg ttcagacaat gggctgtata tctgtaagat gaaaataaac 540  
 [0152] aatgaagaga tcgtgtctga tcccatctac atcgaagtac aaggacttcc tcaacttact 600  
 [0153] aagcagcctg agagcatgaa tgtcaccaga aacacagcct tcaacctcac ctgtcaggct 660  
 [0154] gtgggcccgc ctgagcccgt caacatttcc tgggttcaaa acagtagccg tgttaacgaa 720  
 [0155] cagcctgaaa aatccccctc cgtgctaact gttccaggcc tgacggagat ggcgggtcttc 780  
 [0156] agttgtgagg cccacaatga caaagggtg accgtgtcca agggagtgca gatcaacatc 840  
 [0157] aaagcaatc cctccccacc aactgaagtc agcatccgta acagcactgc acacagcatt 900  
 [0158] ctgatctcct gggttcctgg ttttgatgga tactccccgt tcaggaattg cagcattcag 960  
 [0159] gtcaaggaag ctgatccgct gagtaatggc tcagtcatga tttttaacac ctctgcctta 1020  
 [0160] ccacatctgt accaaatcaa gcagctgcaa gccctggcta attacagcat tgggtgttcc 1080  
 [0161] tgcatgaatg aatagagctg gtctgcagtg agcccttga ttctagccag cacgactgaa 1140  
 [0162] ggagcccat cagtagcacc tttaatgtc actgtgttcc tgaatgaatc tagtgataat 1200  
 [0163] gtggacatca gatggatgaa gcctccgact aagcagcagg atggagaact ggtgggctac 1260  
 [0164] cggatatecc acgtgtggca gactgcaggg atttccaaag agctcttggga ggaagttggc 1320  
 [0165] cagaatggca gccgagctcg gatctctgtt caagtccaca atgctacgtg cacagtgagg 1380  
 [0166] attgcagccg tcaccagagg gggagttggg cccttcagtg atccagtgaa aatattttatc 1440  
 [0167] cctgcacacg gttgggtaga ttatgcccc tcttcaactc cggcgctg caacgcagat 1500

[0168]	cctgtgetca tcattcttgg ctgcttttgt ggatttattt tgattgggtt gattttatac	1560
[0169]	atctccttgg ccatcagaaa aagagtccag gagacaaagt ttgggaatgc attcacagag	1620
[0170]	gaggattctg aattagtggg gaattatata gcaaagaaat ccttctgtcg gcgagccatt	1680
[0171]	gaacttacct tacatagctt gggagtcagt gaggaactac aaaataaact agaagatggt	1740
[0172]	gtgattgaca ggaatcttct aattcttggg aaaattctgg gtgaaggaga gtttgggtct	1800
[0173]	gtaatggaag gaaatcttaa gcaggaagat gggacctctc tgaaagtggc agtgaagacc	1860
[0174]	atgaagttgg acaactcttc acagcgggag atcgaggagt ttctcagtga ggcagcgtgc	1920
[0175]	atgaaagact tcagccaccc aaatgtcatt cgacttctag gtgtgtgtat agaaatgagc	1980
[0176]	tctcaaggca tcccaaagcc catggtaatt ttacccttca tgaaatacgg ggacctgcat	2040
[0177]	acttacttac tttattcccg attggagaca ggaccaaagc atattcctct gcagacacta	2100
[0178]	ttgaagttca tgggtgatat tgccctggga atggagtatc tgagcaacag gaattttctt	2160
[0179]	catcgagatt tagctgctcg aaactgcatg ttgcgagatg acatgactgt ctgtgttgcg	2220
[0180]	gacttcggcc tctctaagaa gatttacagt ggcgattatt accgccaagg ccgattgct	2280
[0181]	aagatgcctg ttaaattgat cgccatagaa agtcttgcag accgagtcta cacaagtaaa	2340
[0182]	agtgatgtgt gggcatttgg cgtgacctatg tgggaaatag ctacgcgggg aatgactccc	2400
[0183]	tatcctgggg tccagaacca tgagatgtat gactatcttc tccatggcca caggttgaag	2460
[0184]	cagcccgaag actgcctgga tgaactgtat gaaataatgt actcttgctg gagaaccgat	2520
[0185]	cccttagacc gccccacctt ttcagtattg aggctgcagc tagaaaaact cttagaaagt	2580
[0186]	ttgcctgacg ttcggaacca agcagacgtt atttacgtca atacacagtt gctggagagc	2640
[0187]	tctgagggcc tggcccaggg ctccacctt gctccactgg acttgaacat cgacctgac	2700
[0188]	tctataattg cctcctgcac tccccgcgt gccatcagtg tggtcacagc agaagttcat	2760
[0189]	gacagcaaac ctcatgaagg acggtacatc ctgaatgggg gcagtgagga atgggaagat	2820
[0190]	ctgacttctg ccccctctgc tgcagtcaca gctgaaaaga acagtgtttt accgggggag	2880
[0191]	agacttgta ggaatggggg ctctctgtcc cattcgagca tgctgccctt gggaagctca	2940
[0192]	ttgcccgatg aacttttgtt tgctgacgac tctcagaag gctcagaagt cctgatgtga	3000
[0193]	<210> 3	
[0194]	<211> 3000	
[0195]	<212> DNA	
[0196]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0197]	<400> 3	
[0198]	atgggaccag caccattgcc acttcttttg ggtctcttctc ttcccgtctc gtggagaaga	60
[0199]	gctattacgg aagcaagaga agaggctaaa cttatcctc tgttcccagg cccctttcca	120
[0200]	gggtccctgc agactgatca taccctctc ctgtccctgc cacatgcatc tggctatcag	180
[0201]	cccgttttga tgttttctcc cactcagcct ggtagacccc ataccgaaa tgtcgcaatt	240
[0202]	ccacaggtca cctcagttga gtctaaacct ctgccccac tggcttttaa gcacaccgtt	300
[0203]	ggacatatta ttctgtcaga gcataaagga gtgaagtta actgtagcat ctccgtacca	360
[0204]	aatatttacc aggataccac tatttcttgg tggaggagc gaaaggagt gttgggcgc	420
[0205]	catcacgcaa tcacacagtt ttaccagat gatgaggtga ccgccattat tgcttcttctc	480
[0206]	tctatcatat ccgtacagag atccgataac ggctcataca tctgcaaaat gaagattaac	540
[0207]	aatgaggaga tcgtctccga tctatataat attgaggttc agggactccc ccatttcag	600
[0208]	aaacagccgg agtctatgaa tgtgacacgc aatactgcat tcaatcttac ttgtcaagca	660
[0209]	gttggcccac ccgaaccctg gaacatttctc tgggtgcaga acagctctcg cgtgaacgaa	720

[0210]	caaccagaga aatccccctc tgttctgacc gtgccgggtc tcacggaaat ggccgttttc	780
[0211]	tcctgtgagg cacacaacga caagggcctt accgtcagca aggggtgtgca gatcaatatt	840
[0212]	aaagcaattc cctctcctcc cacggaggtg tctattagga actctaccgc ccatagtatc	900
[0213]	ttgatttcat gggttcccgg gtttgacggc tattcccctt tccgcaactg ttctattcag	960
[0214]	gtaaaagaag cggatcccct ctcaaatggc tctgtgatga tctttaatac atccgcgctt	1020
[0215]	ccacacctgt atcagatcaa acagctgcaa gcaactggcaa actacagcat cgggggtgtct	1080
[0216]	tgcatgaatg agatcgggtg gtccgcagtg agtccttggg ttctcgcgtc aaccactgag	1140
[0217]	ggcgcaccaa gcgtggctcc tcttaatgta actgtgttcc tgaacgaatc tagtgacaac	1200
[0218]	gtcagatcc gctggatgaa gccccctacg aagcagcagg acggcgaact cgtgggttac	1260
[0219]	cggatcagcc atgtgtggca gtccgcaggt atatccaagg agctgctcga agaggtggga	1320
[0220]	caaaatggct ctggggccag aatatctgtc caggtgcaca atgccacatg cacagtgaga	1380
[0221]	atcgtctgtg ttactagggg aggagtagga ccatttagtg accctgtcaa aatatttattc	1440
[0222]	ccagcgcacg gctgggttga ttacgtccc agttctacgc ccgctcctgg caatgctgat	1500
[0223]	ccggttctca ttatattcgg gtgcttctgt ggattcattc ttatagggtc catcctgtac	1560
[0224]	atttctctcg caataaggaa gcgcgtgcag gagaccaagt tcgaaacgc ttttactgaa	1620
[0225]	gaagattccg agctgggtgt aaactatata gctaagaagt cattctgtcg ccgggcgata	1680
[0226]	gaactcacac tccacagcct cgggggtgtc agggagttgc agaataagtt ggaggatgtc	1740
[0227]	gtgatcgacc gcaacctgct catcttggga aagatcctgg gggaaggaga atttggttcc	1800
[0228]	gtgatggagg gcaatcttaa gcaggaggac ggaacctccc tgaaagtggc tgtgaagacg	1860
[0229]	atgaaactgg acaactcatc ccagagagag atagaagagt ttctctctga ggctgcctgc	1920
[0230]	atgaaggatt tctcccacc aaatgtgatt aggctgctgg ggggtgtgcat tgagatgtct	1980
[0231]	tctcagggta tacctaagcc tatggtaata ttgccattca tgaagtacgg tgatttgac	2040
[0232]	acatacctgc ttactctcg cctcgagact gggccaaagc acatccccct tcagacactg	2100
[0233]	cttaaatcca tgggtgatat cgcaactcgc atggagtacc tttccaacag aaacttcctc	2160
[0234]	catcgggatc tggcagcgcg caattgtatg ctccgggacg acatgactgt gtgtgtggcc	2220
[0235]	gattttgggc tgagcaaaaa gatctacagt ggggactatt acaggcaggg tcgcatagca	2280
[0236]	aagatgccgg tgaatggat cgcaattgaa tcaactcgtg atcgggttta tacctcaaag	2340
[0237]	tcagacgtgt gggcgttcgg cgtgacgatg tgggaaattg ccacacgcgg catgactccc	2400
[0238]	tatctggcg tccagaacca tgagatgtac gattacttgc tccatgggca cagactgaag	2460
[0239]	cagcccagg attgcctgga tgagctctat gagatcatgt acagttgctg gcggacagac	2520
[0240]	ccactcgaca gaccaacatt tagcgtcctg aggctgcagc tggaaaagct gctggaaagt	2580
[0241]	ttgccagacg tccgaaatca ggctgatgtg atttacgtga acaccagtt gctggagtct	2640
[0242]	agtgagggac tggcccaagg ttcaaccttg gccctctcg atctgaatat cgaccccgat	2700
[0243]	tccattattg cgagctgcac accgagagct gcaattagcg tggtgaccgc cgaagtccac	2760
[0244]	gacagtaagc cgcatgaagg aagatatatc cttaatgggg gatccgagga atgggaggat	2820
[0245]	ctgacatccg ctccctctgc agccgtaacc gctgagaaga attctgtgct cccaggcgaa	2880
[0246]	aggcttgtca gaaacggcgt ctctgtgtcc catagctcta tgctgcctct tgggtcctca	2940
[0247]	ctcccggacg agctgctgtt tgctgacgat agtagcgaag gcagtgaggt gctcatgtga	3000
[0248]	<210> 4	
[0249]	<211> 722	
[0250]	<212> DNA	
[0251]	<213> 人的RPE65启动子序列 (human PRE65 promoter)	

[0252] <400> 4  
[0253] agcagacagg cattagtac aagcaaagat atgcagaatt tcattctcag caaatcaaaa 60  
[0254] gtctcaacc tggttggaag aatattggca ctgaatggta tcaataaggt tgctagagag 120  
[0255] ggttagaggt gcacaatgtg cttccataac attttatact tctccaatct tagcactaat 180  
[0256] caaacatggt tgaatacttt gtttactata actcttacag agttataaga tctgtgaaga 240  
[0257] caggacagg gacaataccc atctctgtct ggttcatagg tggatatgtaa tagatatttt 300  
[0258] taaaaataag tgagttaatg aatgagggtg agaatgaagg cacagaggta ttagggggag 360  
[0259] gtgggcccc a gagaatggtg ccaaggtcca gtggggtgac tgggatcagc tcaggcctga 420  
[0260] cgctggccac tcccacctag ctcttttctt tctaactctgt tctcattctc cttgggaagg 480  
[0261] attgaggtct ctggaaaaca gccaaacaac tgttatggga acagcaagcc caaataaagc 540  
[0262] caagcatcag ggggatctga gagctgaaag caacttctgt tccccctccc tcagctgaag 600  
[0263] ggggtgggaa gggctcccaa agccataact ctttttaagg gatttagaag gcataaaaag 660  
[0264] gccctggct gagaacttcc ttcttcattc tgcagttggt gccagaactc tggatcctga 720  
[0265] ac 722



original	ATGGGGCCGGCCCGCTGCCGCTGCTGCTGGGCCTCTTCCTCCCGGCTCTGGGCTAGA	60
optimized	ATG <u>GGACCAGCACCAATTGCCACTTCTTTTGGGTCTC</u> <u>TTTCTT</u> <u>CCCGCTCTG</u> <u>GGAGAGA</u>	60
original	GCTATCACTGAGGCAAGGGAAAGCCAAAGCCTTACCCGCTATTCCCGGGACCTTTTCCA	120
optimized	GCT <u>ATTACGGAA</u> <u>GCAAGA</u> <u>GAAGAGGCTAAA</u> <u>CCTTATCCTCTG</u> <u>TTCCAGGGCCCTTTTCCA</u>	120
original	GGGAGCCTGCAAACTGACCACACACCGCTGTTATCCCTTCTCACGCCAGTGGGTACCAG	180
optimized	GGG <u>TCCCTGCAGACT</u> <u>GATCATACCCCTCTCCGT</u> <u>TCCCTGCCACATGCATCTGGCTAT</u> <u>CAG</u>	180
original	CCTGCCTTGATGTTTTCAACCAACCAGCCTGGAAGACCACATACAGGAAACGTAGCCATT	240
optimized	<u>CCCGCTTTGATGTTTCTCCCACT</u> <u>CAGCCTGGTAGA</u> <u>CCCATACCGGA</u> <u>AATGTCGC</u> <u>AATT</u>	240
original	CCCCAGGTGACCTCTGTGCAATCAAAGCCCCTACCGCCTCTTGCCTTCAAACACACAGTT	300
optimized	<u>CCA</u> <u>CAG</u> <u>GT</u> <u>CACC</u> <u>TCAGTTGAGTCTAAA</u> <u>CCTCTGCCCCCACTGGCTTTTAAG</u> <u>CAC</u> <u>ACG</u> <u>TT</u>	300
original	GGACACATAAATACTTTCTGAACATAAAGGTGTCAAATTTAATTGCTCAATCAGGTACCT	360
optimized	GGAC <u>CATATTAATCTGT</u> <u>CAGAG</u> <u>CATAAA</u> <u>GGAGTGAAG</u> <u>TTTAACTGTAGC</u> <u>ATCTCCGTACCA</u>	360
original	AATATATACCAGGACACCACAATTTCTTGGTGGAAAGATGGGAAGGAATTGCTTGGGGCA	420
optimized	AAT <u>ATT</u> <u>TACCAG</u> <u>GAT</u> <u>ACCA</u> <u>ACT</u> <u>TATTCTTGGTGG</u> <u>AAGGACGGAAAG</u> <u>GAG</u> <u>TTGTGGGGCC</u>	420
original	CATCATGCAATTACACAGTTTTATCCAGATGATGAAGTTACAGCAATAATCGTTCCTTC	480
optimized	CAT <u>CAG</u> <u>GCAAT</u> <u>CAC</u> <u>CAG</u> <u>TTTTAC</u> <u>CCAGATGAT</u> <u>GAGGTGAGCCGCA</u> <u>TTTAT</u> <u>GCTTCT</u> <u>TT</u>	480
original	AGCATAACCAGTGTGCAGCGTTCAGACAATGGGTGATATCTGTAAGATGAAAATAAAC	540
optimized	<u>TCTATCACATCCGTA</u> <u>CAGAGATCCGATAACGGCTC</u> <u>ATACATCTGCAAA</u> <u>ATGAAGATT</u> <u>AAC</u>	540
original	AATGAAGAGATCGTGTCTGATCCCATCTACATCGAAGTACAAGGACTTCCTCACTTACT	600
optimized	AAT <u>GAG</u> <u>GAGATCG</u> <u>CTCCGAT</u> <u>CCTATATATA</u> <u>TTGAGGTT</u> <u>CAGGG</u> <u>CTCCCCCATTT</u> <u>CAG</u>	600
original	AAGCAGCCTGAGAGCATGAATGTCACCAGAAACACAGCCTTCAACCTCACCTGTGAGGCT	660
optimized	<u>AAA</u> <u>CAG</u> <u>CCG</u> <u>GAGTCT</u> <u>ATGAATGTGACACGCAAT</u> <u>ACTGCA</u> <u>TTCAATCTACT</u> <u>TGTCAAGCA</u>	660
original	GTGGGCCCGCCTGAGCCCGTCAACATTTTCTGGGTTCAAACAGTAGCCGTGTTAACGAA	720
optimized	<u>GT</u> <u>TGGCCACCCGAA</u> <u>CCC</u> <u>GTGA</u> <u>ACATTTTCTGG</u> <u>GTGCA</u> <u>AAAC</u> <u>AGCTCTCCG</u> <u>GTGA</u> <u>ACGAA</u>	720
original	CAGCCTGAAAAATCCCCCTCCGTGCTAACTGTTCCAGGCCTGACGGAGATGGCGGTCTTC	780
optimized	<u>CAAC</u> <u>CAG</u> <u>GAAAT</u> <u>CCCC</u> <u>CTG</u> <u>TTCTG</u> <u>AGCCG</u> <u>TC</u> <u>CCG</u> <u>CTC</u> <u>AG</u> <u>GAA</u> <u>ATG</u> <u>CCG</u> <u>TT</u> <u>TC</u>	780
original	AGTTGTGAGGCCACAAATGACAAAGGGCTGACCGTGTCCAAGGGAGTGCAGATCAACATC	840
optimized	<u>TCT</u> <u>GTGAG</u> <u>GCAC</u> <u>AAC</u> <u>GAC</u> <u>AAGGG</u> <u>CTTAC</u> <u>CGT</u> <u>CAG</u> <u>CAAGG</u> <u>TTG</u> <u>TGCAGAT</u> <u>CAAT</u> <u>TT</u>	840
original	AAAGCAATCCCTCCCACTGAAAGTCAAGTCCGTAACAGCACTGCACACAGCATT	900
optimized	AAAGCAATCCCT <u>TCTCCTCC</u> <u>ACCGGGTGTATTAGG</u> <u>AATCTACCGCCATAGTATC</u>	900
original	CTGATCTCCTGGGTTCTGGTTTTGATGGATACTCCCGTTCCAGGAATGCAGCATTAG	960
optimized	<u>TTGATTTCA</u> <u>TGGGTTCCCGG</u> <u>TTTAC</u> <u>CGGCTAT</u> <u>TCCCT</u> <u>TTCCGCACTGT</u> <u>TTCT</u> <u>ATT</u> <u>CAG</u>	960
original	GTCAAGGAGCTGATCCGCTGAGTAAATGGCTCAGTCATGATTTTTAACACCTCTGCCTTA	1020
optimized	<u>GTA</u> <u>AAA</u> <u>GAAGCG</u> <u>GATCCCTCTCA</u> <u>AATGGCTCTGTGATG</u> <u>ATCTTTAATACATCCCGGCTT</u>	1020
original	CCACATCTGTACAAATCAAGCAGCTGCAAGCCCTGGCTAATTACAGCATTGGTGTTC	1080
optimized	CCAC <u>CAC</u> <u>CTGTAT</u> <u>CAGATCA</u> <u>AAAC</u> <u>AGCTGCAAG</u> <u>CACTGCAAACT</u> <u>TACAGC</u> <u>ATCCGGGGTGTCT</u>	1080
original	TGCATGAATGAAATAGGCTGGTCTGCAGTGAAGCCCTGGATTCTAGCCAGCAGACTGAA	1140
optimized	TGCATGAAT <u>GAGATCCGG</u> <u>TGGTCC</u> <u>GCAGT</u> <u>AGT</u> <u>TCTTGGATTCTCGCGTCA</u> <u>ACC</u> <u>ACT</u> <u>GAG</u>	1140

图1

original	GGAGCCCCATCAGTAGCACCTTTAAATGTCAGTGTGTTCTGAATGAATCTAGTGATAAT	1200
optimized	<u>GGCGCA</u> CCA <u>AGCGTGGCT</u> CTCTTAATGTA <u>ACTGTG</u> <u>TTC</u> CTG <u>AAC</u> GAATCTAGT <u>GACAA</u> C	1200
original	GTGGACATCAGATGGATGAAGCCTCCGACTAAGCAGCAGGATGGAGAAGCTGGTGGGCTAC	1260
optimized	<u>GTC</u> GACATC <u>CGC</u> TGGATGAAG <u>CCCCCTACGA</u> AGCAGCAG <u>GACGGG</u> GAA <u>CTC</u> GTG <u>GGT</u> TAC	1260
original	CGGATATCCCACGTGTGGCAGAGTGCAGGGATTTCCAAAGAGCTCTTGAGGAAGTTGGC	1320
optimized	CGG <u>ATCAGCCAT</u> GTGTGGCAG <u>TCC</u> GCAG <u>GGTATA</u> TCC <u>AAG</u> GAG <u>CTGCTCGA</u> AGAGG <u>TGGGA</u>	1320
original	CAGAATGGCAGCCGAGCTCGGATCTCTGTTCAAGTCCACAATGCTACGTGCACAGTGAGG	1380
optimized	<u>CAAA</u> ATGGC <u>TCTCGGGCCAGAATA</u> TCT <u>GTCCAGGTG</u> CACAAT <u>GCCACA</u> TGCACAGT <u>GAGA</u>	1380
original	ATTGCAGCCGTCCACCAGAGGGGGAGTTGGGCCCTTCAGTGATCCAGTGAAAATATTTATC	1440
optimized	<u>ATCCGCTGCTGT</u> TACTAGGGGA <u>GGAGTAGGACCATT</u> AGT <u>GACCCGTG</u> CAAAAATATTTATC	1440
original	CCTGCACACGGTTGGGTAGATTATGCCCCCTCTTCAACTCCGGCGCCTGGCAACGCAGAT	1500
optimized	<u>CCAGCG</u> CAC <u>GGC</u> TGG <u>GTT</u> GATT <u>TACGCT</u> CCC <u>AGTTC</u> TACGGCCGGTCTCTGGC <u>AATGCT</u> GAT	1500
original	CCTGTGCTCATCATCTTTGGCTGCTTTTGGGATTTATTTGATTGGGTTGATTTTATAC	1560
optimized	<u>CCGGTTC</u> CT <u>ATTATATTCGGG</u> TGC <u>TTC</u> TGTGGAT <u>TTC</u> ATT <u>CTTATA</u> GGG <u>CTCATCC</u> GTAC	1560
original	ATCTCCTTGGCCATCAGAAAAAGAGTCCAGGAGACAAAGTTTGGGAATGCATTACAGAG	1620
optimized	<u>ATTTCTCTCGCAATA</u> AGGAAGCGC <u>GTGC</u> AGGAG <u>ACC</u> AAG <u>TTCGGAAACGCTTTT</u> TACTGAA	1620
original	GAGGATTCTGAATTAGTGGTGAATTATATAGCAAAGAAATCCTTCTGTGGCGAGCCATT	1680
optimized	GAAGAT <u>TCCGAGCT</u> GTGTG <u>CTA</u> AACTATATAGCTAAG <u>AGTCA</u> TTCTGT <u>CGCCGGGGATA</u>	1680
original	GAACTTACCTTACATAGCTTGGGAGTCACTGAGGAACTACAAAATAAACTAGAAGATGTT	1740
optimized	GA <u>CTCACACTCC</u> CACAGC <u>CTCGGGGTGCA</u> GAG <u>GAGTTGC</u> AGAAATAG <u>TGGAG</u> GAT <u>GTC</u>	1740
original	GTGATTGACAGGAATCTTCTAATTCTTGGAAAAATCTGGGTGAAGGAGAGTTTGGGTCT	1800
optimized	GTG <u>ATC</u> GAC <u>CGCA</u> BCCTGCTCATC <u>TG</u> GGAA <u>AGATC</u> TG <u>GGG</u> GAAGGAGAA <u>TTTGGTTCC</u>	1800
original	GTAATGGAAGGAAATCTTAAGCAGGAAGATGGACCTCTCTGAAAGTGGCAGTGAAGACC	1860
optimized	<u>GTG</u> ATG <u>AGGGGCA</u> ATCTTAAGCAG <u>GAGGACGG</u> AACT <u>TCC</u> CTGAAAGT <u>GCT</u> GTGAAG <u>AGC</u>	1860
original	ATGAAGTTGGCAACTCTTACAGCGGGAGATCGAGGAGTTTCTCAGTGAGGCAGCGTGC	1920
optimized	ATG <u>AAACTG</u> GACAAC <u>TCA</u> TCCAGAGAGATAGAA <u>GAG</u> TTTCTC <u>TCTGAG</u> <u>GCTGCCT</u> GC	1920
original	ATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTTCGACTTCTAGGTGTGTATAGAAATGAGC	1980
optimized	ATG <u>AAGGAT</u> TTCTCCACCCAAATG <u>TG</u> ATT <u>AGGCTGCTGGGG</u> TG <u>TGCAT</u> TGAGAT <u>TCT</u>	1980
original	TCTCAAGGCATCCAAAGCCCATGGTAATTTTACCCTTCATGAAATACGGGGACCTGCAT	2040
optimized	TCT <u>CAGGGTATA</u> CTT <u>AAG</u> CCATGGTA <u>ATATTGCC</u> ATTTCATG <u>AAGTAC</u> <u>GGTGATTGCAC</u>	2040
original	ACTTACTTACTTTTATCCCGATTGGAGACAGGACCAAGCATATTCCTCTGCAGACACTA	2100
optimized	<u>ACATAC</u> CTGCTT <u>TACTCTCCCTC</u> GAGACTGGG <u>CCAAAG</u> <u>CACATCCCCCTT</u> CAGACACTG	2100
original	TTGAAGTTCATGGTGGATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAATTTCTTT	2160
optimized	<u>CTTAAA</u> TTTCATGGTGGAT <u>ATGGCAGTCCGG</u> ATGGAG <u>TACCTTTCCAAC</u> <u>AGAAACTTCCCTC</u>	2160
original	CATCGAGATTTAGCTGCTCGAAACTGCATGTTGCGAGATGACATGACTGTCTGTGTGCG	2220
optimized	CAT <u>CGG</u> GAT <u>CTGGCAGCGCCAA</u> TTGTATG <u>CTTCGGGAC</u> GACATGACT <u>GTGTGTG</u> <u>TGGCC</u>	2220
original	GACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATTACAGTGGCGATTATTACCGCCAAGGCCGCTATTGCT	2280
optimized	<u>GATTTTGGGCTGAG</u> CAAAAG <u>ATC</u> TACAGT <u>GGGAC</u> TATTAC <u>AGGCAGGGT</u> CGC <u>ATAGCA</u>	2280

图2

original	AAGATGCCTGTTAAATGGATCGCCATAGAAAGTCTTGACAGCCGAGTCTACACAAGTAAA	2340
optimized	AAGATG <u>CCGGTGA</u> AAATGGATG <u>CAATT</u> GAAT <u>TCACTCGCTGATCGGGTTTATACCTCAAG</u>	2340
original	AGTGATGTGTGGGCATTGGCGTGACCATGTGGGAAATAGCTACCGGGGAATGACTCCC	2400
optimized	<u>TCAGAC</u> GTGTGG <u>CGCTG</u> GGCGTG <u>ACG</u> ATGTGGGA <u>ATTGCCACACGGCGCAT</u> GACTCCC	2400
original	TATCCTGGGGTCCAGAACCATGAGATGTATGACTATCTTCTCCATGGCCACAGGTTGAAG	2460
optimized	TATCCT <u>GGC</u> TCCAGAACCATGAGATG <u>TACGATTACTG</u> CTCCAT <u>GGGCAC</u> <u>AGACTGAAG</u>	2460
original	CAGCCCGAAGACTGCCTGGATGAACTGTATGAAATAATGTACTCTTGCTGGAGAACCGAT	2520
optimized	CAGCCCG <u>GAGGAT</u> TGCCTGGAT <u>GAGCT</u> TAT <u>GAGAT</u> CATGTAC <u>AGT</u> TGCTGG <u>CGGACAGAC</u>	2520
original	CCCTTAGACCGCCCCACCTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAAAACTCTTAGAAAGT	2580
optimized	<u>CCACTG</u> GAC <u>AGACCAACA</u> TTT <u>AGCGTCTG</u> AGGCTGCAG <u>CTG</u> AAA <u>AAGCTGCTG</u> AAAAGT	2580
original	TTGCCTGACGTTCCGGAACCAAGCAGACGTTATTTACGTCAATACACAGTTGCTGGAGGC	2640
optimized	TTG <u>CCA</u> GAC <u>GTCCGAAATCAGGCTGATG</u> ATTAC <u>GTGAACACC</u> CAGTTGCTGGAG <u>TCT</u>	2640
original	TCTGAGGGCTGGCCAGGGCTCCACCCTTGCTCCACTGGACTTGAACATCGACCCTGAC	2700
optimized	<u>AGT</u> GAG <u>GG</u> CTGGCC <u>CAAGTTCA</u> ACC <u>TTGGCCCTCTCGATCTGAAT</u> ATCGAC <u>CCCGAT</u>	2700
original	TCTATAATTGCCTCCTGCACTCCCGCGCTGOCATCAGTGTGGTCACAGCAGAAGTTCAT	2760
optimized	<u>TCCATT</u> ATTGCG <u>AGCTGC</u> <u>ACACCGAGA</u> GCT <u>GCAATTAGC</u> GTG <u>GTGACCCGC</u> SAA <u>GTCCAC</u>	2760
original	GACAGCAAACCTCATGAAGGACGGTACATCCTGAATGGGGCAGTGAGGAATGGGAAGAT	2820
optimized	GAC <u>AGTAAGCCG</u> CATGAAGGA <u>AGATAT</u> ATC <u>CTT</u> AATGGG <u>GGATCC</u> GAGGAATGGG <u>GAG</u> GAT	2820
original	CTGACTTCTGCCCCCTTGCTGCAGTACAGCTGAAAAGAACAGTGTTTTACCGGGGGAG	2880
optimized	CTG <u>ACATCCGCT</u> CCCTCTG <u>CAGCCGTACC</u> GCTGAGAA <u>AAATCTGTGCTCCAGGGGAA</u>	2880
original	AGACTGTAGGAATGGGGTCTCCTGGTCCCATTCGAGCATGCTGCCCTGGGAAGCTCA	2940
optimized	<u>AGGCTTGT</u> CAGAAACGGGCTCCTGGTCCCAT <u>AGCTCT</u> ATGCTG <u>CTCTG</u> GGGCTCA	2940
original	TTGCCGATGAACTTTTGTGCTGACGACTCCTCAGAAGGCTCAGAAGTCTGATGTGA	3000
optimized	<u>CTCCCG</u> <u>GACGAGCTGCTG</u> TTTGTGCTGACGACTCCTCAGAAGGCTCAGAAGTCTGATGTGA	3000

图3

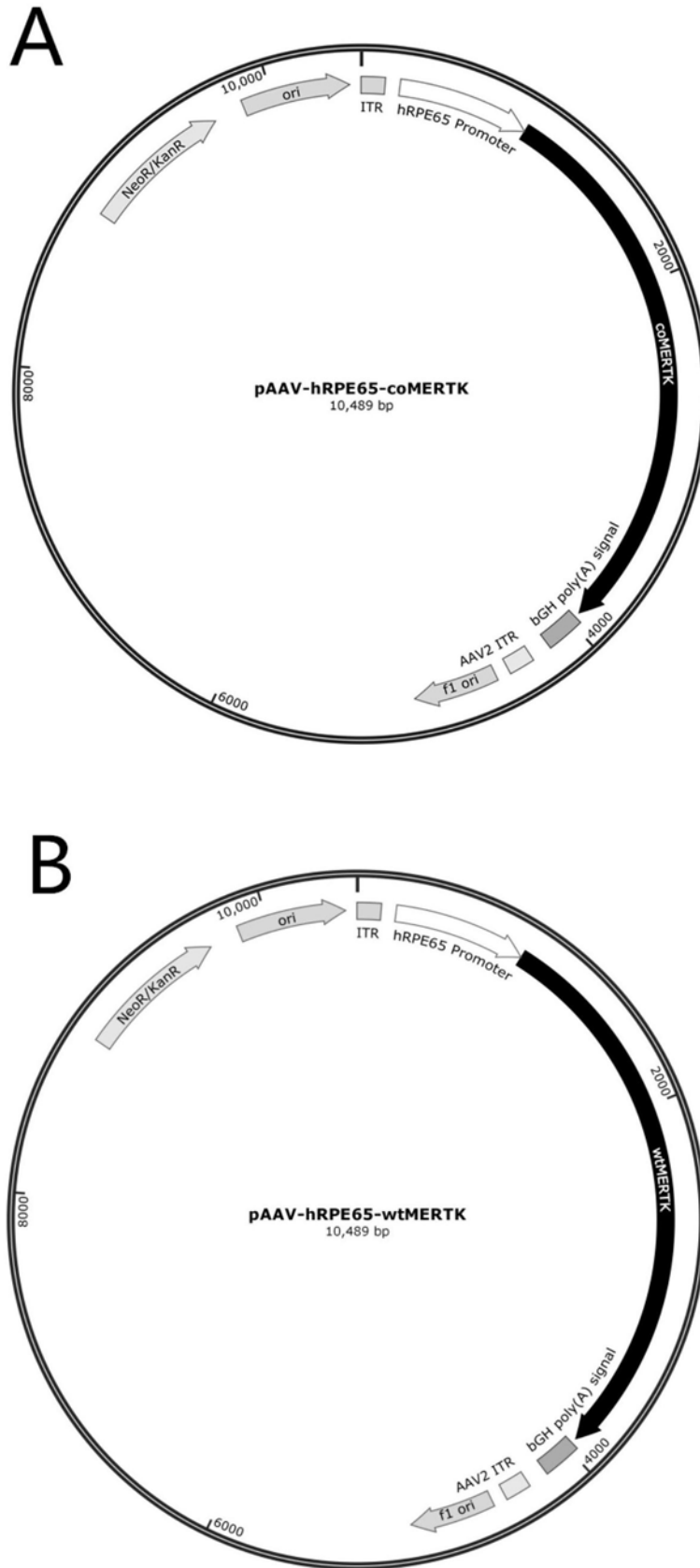


图4

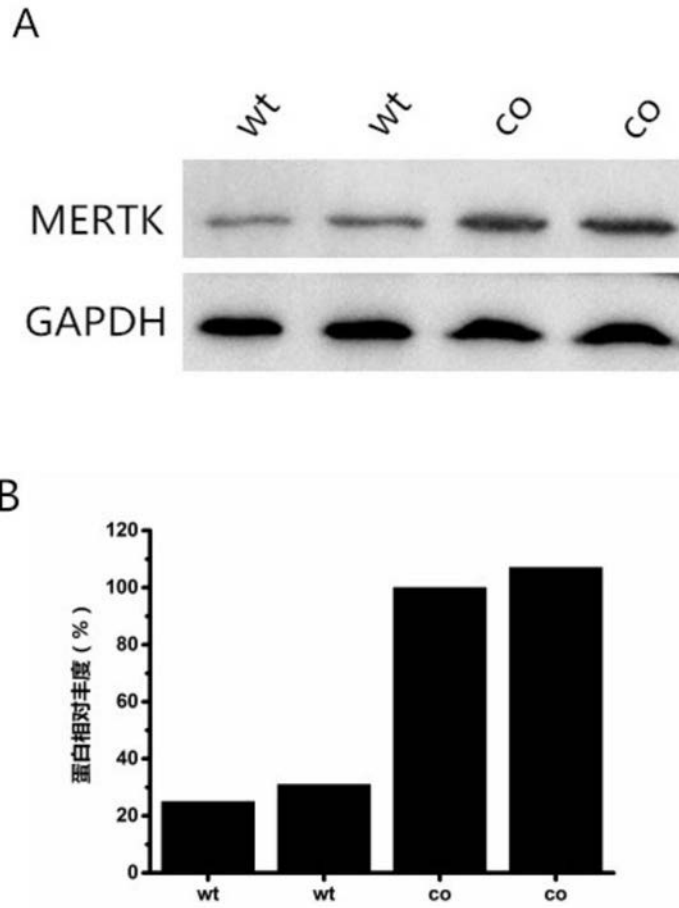


图5

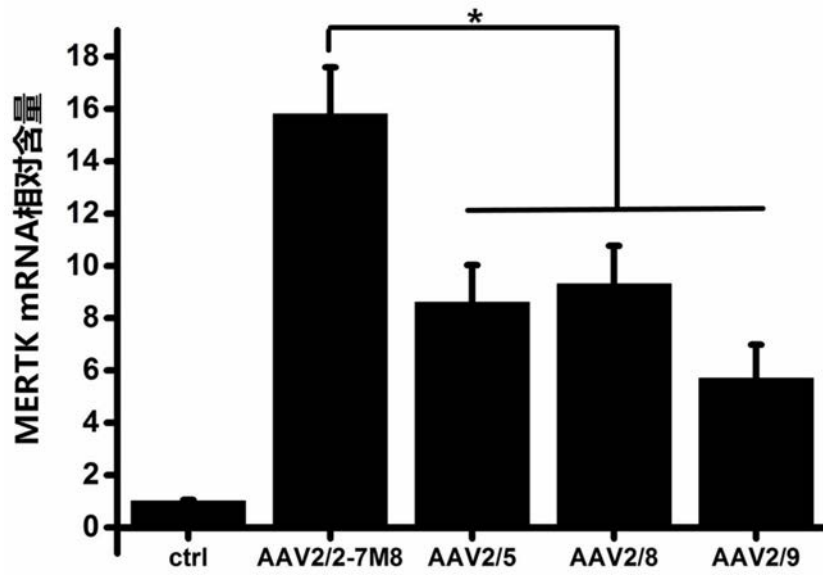


图6

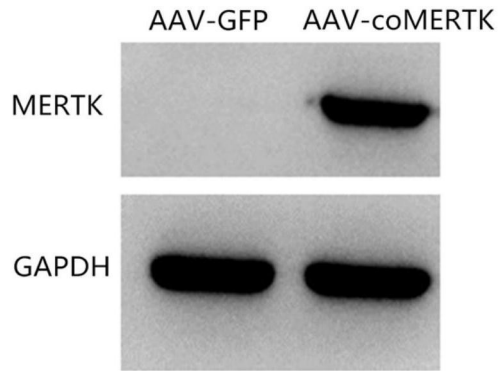


图7

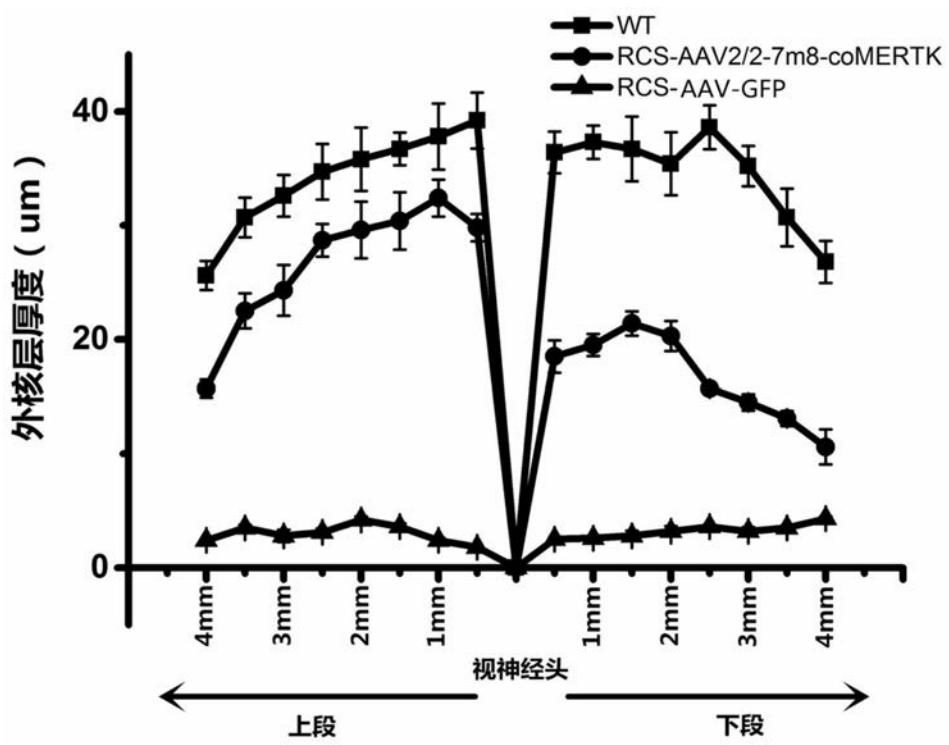


图8

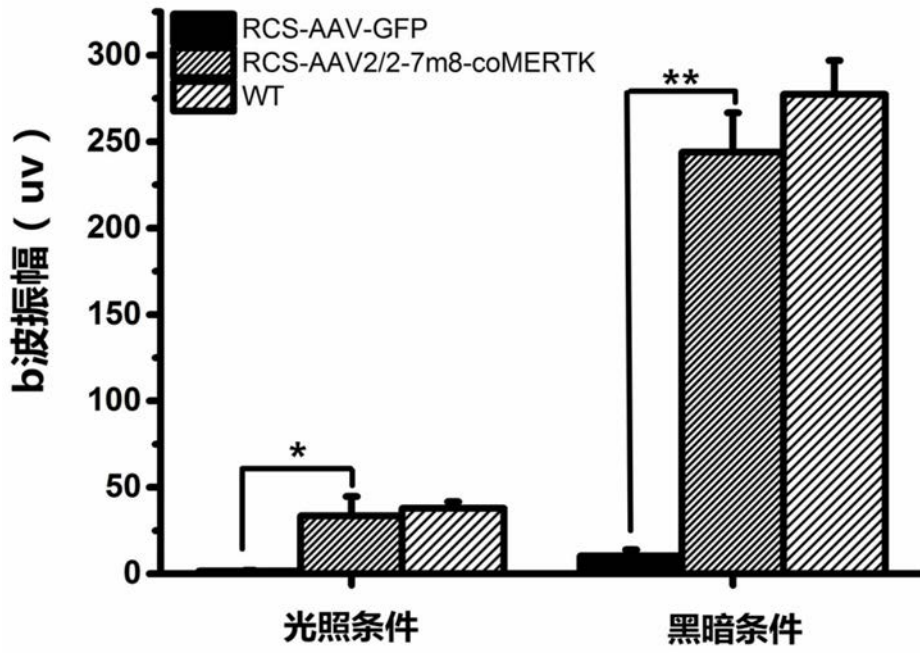


图9