(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2014 年 12 月 18 日 (18.12.2014)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2014/198049 A1

(51) 国际专利分类号:
C07H 21/04 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2013/077207

(22) 国际申请日: 2013 年 6 月 13 日 (13.06.2013)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: **深圳华大基因科技有限公司 (BGI SHENZHEN CO., LIMITED)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。 **鹿特丹伊拉斯姆斯大学医学中心 (ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM)** [NL/NL]; 荷兰鹿特丹格雷文迪克大街 230 号, Rotterdam NL-3015 CE (NL)。

(72) 发明人: **方明艳 (FANG, Mingyan)**; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。 **吴斌 (WU, Bin)**; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。 **徐凤萍 (XU, Fengping)**; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。 **王俊 (WANG, Jun)**; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。 **夸德里·玛利亚路易莎 (QUADRI, Marialuisa)**; 荷兰鹿特丹格雷文迪克大街 230 号, Rotterdam NL-3015 CE (NL)。 **奥尔贾蒂·西蒙尼 (OLGIATI, Simone)**; 荷兰鹿特丹格雷文迪克大街 230 号, Rotterdam NL-3015 CE (NL)。 **布里维尔德·基多·J (BREEDVELD, Guido J)**; 荷兰鹿特丹格雷文迪克大街 230 号, Rotterdam NL-3015 CE (NL)。 **巴罗内·保罗 (BARONE, Paolo)**; 荷兰鹿特丹格雷文迪克大街 230 号, Rotterdam NL-3015 CE (NL)。 **波尼法蒂·文森佐 (BONIFATI, Vincenzo)**; 荷兰鹿特丹格雷文迪克大街 230 号, Rotterdam NL-3015 CE (NL)。

(74) 代理人: **北京清亦华知识产权代理事务所（普通合伙） (TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROPERTY LLC)**; 中国北京市海淀区清华园清华大学照澜院商业楼 301 室, Beijing 100084 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

WO 2014/198049 A1

(54) **Title**: SYNJ1 GENE MUTATION AND APPLICATION THEREOF

(54) **发明名称** : SYNJ1 基因突变体及其应用

(57) **Abstract**: Provided are an SYNJ1 gene mutation and application thereof, in particular relating to a separated nucleic acid for coding an SYNJ1 gene mutation, a separated polypeptide, and a method, a system and a kit for screening a biological sample for susceptibility to early-onset Parkinson's disease, as well as a construct and a recombinant cell. Compared with SEQ ID NO: 1, the separated nucleic acid for coding the SYNJ1 gene mutation has a c.773G>A mutation.

(57) **摘要**: 提供了 SYNJ1 基因突变体及其应用，具体涉及分离的编码 SYNJ1 突变体的核酸，分离的多肽，筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法，筛选易患早发性帕金森病的生物样品的系统，用于筛选易患早发性帕金森病的生物样品的试剂盒，以及构建体和重组细胞。其中，该分离的编码 SYNJ1 突变体的核酸，与 SEQ ID NO：1 相比，具有 c.773G>A 突变。

SYNJ1 基因突变体及其应用

优先权信息

无

技术领域

本发明涉及 *SYNJ1* 基因突变体及其应用。具体地，本发明涉及分离编码 *SYNJ1* 突变体的核酸，分离的多肽，筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法，筛选易患早发性帕金森病的生物样品的系统，用于筛选易患早发性帕金森病的生物样品的试剂盒，构建体以及重组细胞。

背景技术

帕金森病（Parkinson's disease，PD）是一种中枢神经系统退行性疾病，其早期的症状多与运动相关，包括颤抖、僵硬、行动迟缓和走路困难。其后，思维和行为能力开始出现问题。随着病情发展，后期多出现痴呆症状，而抑郁症是最常见的症状，其他症状包括感官、睡眠和情绪方面的问题。PD 多发于年老群体，患者平均发病年龄在 60 岁以上。尽管如此，有超过 10%的 PD 患者年龄在 40 岁以下。这类发病年龄在 40 岁以下的帕金森病，被称为“早发性帕金森病”。早发性帕金森病的症状与一般帕金森病类似，其发展速度、症状严重程度均因人而异。由于早发性、带有其他临床症状（痴呆等）、非典型性致病机理等原因，早发性 PD 患者临床表现多样化，在不同家系之间甚至在同一家系的不同患者之间，都存在较大的表型差异，其临床诊断及治疗困难。

挖掘早发性帕金森病的致病基因并研究其致病机理，能够有效辅助临床诊断及治疗，意义重大。现阶段，已由多种基因被证实与早发性 PD 的发病相关，但仍存在着相当一部分未知致病基因及致病位点。

因而，目前对早发性帕金森病的研究仍有待深入。

发明内容

本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此，本发明的一个目的在于提出一种能够有效筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法。

本发明是基于发明人的下列工作完成的：发明人通过全基因组纯合子 Mapping 结合全外显子组测序，以及 Sanger 测序验证的方法确定了早发性帕金森病的新的致病基因——*SYNJ1* 基因，以及确定位于该基因 5 号外显子的 c.773G>A 的突变为致病突变。

根据本发明的第一方面，本发明提出了一种分离的编码 *SYNJ1* 突变体的核酸。根据本发明的实施例，所述核酸与 SEQ ID NO：1 相比，具有 c.773G>A 突变，即相对于野生型 *SYNJ1* 基因，本发明的 *SYNJ1* 基因突变体的第 773 位碱基从 G 突变为 A。根据本发明的实施例，发明人确定了 *SYNJ1* 基因的新突变体，该突变体与早发性帕金森病

的发病密切相关，从而通过检测该新突变体在生物样品中是否存在，可以有效地检测生物样品是否易患早发性帕金森病。

根据本发明的第二方面，本发明提出了一种分离的多肽。根据本发明的实施例，与SEQ ID NO：2 相比，所述分离的多肽具有 p.Arg258Gln 突变，即该突变是由于 c.773G>A 突变而引起的，具体地，该突变表示：该分离的多肽，由于野生型 SYNJ1 的第 258 位的 Arg 突变为 Gln。通过检测生物样品中是否表达该多肽，可以有效地检测生物样品是否易患早发性帕金森病。

根据本发明的第三方面，本发明提出了一种筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法。根据本发明的实施例，该方法包括以下步骤：从所述生物样品提取核酸样本；确定所述核酸样本的核酸序列；所述核酸样本的核酸序列与 SEQ ID NO：1 相比，具有 c.773G>A 突变是所述生物样品易患早发性帕金森病的指示。通过根据本发明实施例的筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法，可以有效地筛选易患早发性帕金森病的生物样品。

根据本发明的第四方面，本发明提出了一种筛选易患早发性帕金森病的生物样品的系统。根据本发明的实施例，该系统包括：核酸提取装置，所述核酸提取装置用于从所述生物样品提取核酸样本；核酸序列确定装置，所述核酸序列确定装置与所述核酸提取装置相连，用于对所述核酸样本进行分析，以便确定所述核酸样本的核酸序列；判断装置，所述判断装置与所述核酸序列确定装置相连，以便基于所述核酸样本的核酸序列与 SEQ ID NO：1 相比，是否具有 c.773G>A 突变，判断所述生物样品是否易患早发性帕金森病。利用该系统，能够有效地实施前述筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法，从而可以有效地筛选易患早发性帕金森病的生物样品。

根据本发明的第五方面，本发明提出了一种用于筛选易患早发性帕金森病的生物样品的试剂盒。根据本发明的实施例，该试剂盒含有：适于检测 *SYNJ1* 基因突变体的试剂，其中与 SEQ ID NO：1 相比，该 *SYNJ1* 基因突变体具有 c.773G>A 突变。利用根据本发明的实施例的试剂盒，能够有效地筛选易患早发性帕金森病的生物样品。

根据本发明的第六方面，本发明还提出了一种构建体。根据本发明的实施例，该构建体包含前面所述的分离的编码 SYNJ1 突变体的核酸。由此，利用本发明的构建体转化受体细胞获得的重组细胞，能够有效地用于筛选治疗早发性帕金森病的药物。

根据本发明的第七方面，本发明还提出了一种重组细胞。根据本发明的实施例，该重组细胞是通过前面所述的构建体转化受体细胞而获得的。根据本发明的一些实施例，利用本发明的重组细胞，能够有效地筛选治疗早发性帕金森病的药物。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明

显和容易理解，其中：

图 1 显示了根据本发明实施例的筛选易患早发性帕金森病的生物样品的系统及其组成部分的示意图，其中，

图 1A 为根据本发明实施例的筛选易患早发性帕金森病的生物样品的系统的示意图，

图 1B 为根据本发明实施例的核酸提取装置的示意图，

图 1C 为根据本发明实施例的核酸序列确定装置的示意图；

图 2 显示了根据本发明一个实施例的早发性帕金森病患者家系的家系图；

图 3 显示了根据本发明的一个实施例，早发性帕金森病患者家系中患者及家系内正常人的 *SYNJ1* 基因 c.773G>A 突变位点的 Sanger 测序验证峰图。

发明详细描述

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

SYNJ1 基因突变体

根据本发明的第一方面，本发明提出了一种分离的编码 SYNJ1 突变体的核酸。根据本发明的实施例，所述核酸与 SEQ ID NO：1 相比，具有 c.773G>A 突变。在本文中所使用的表达方式“编码 SYNJ1 突变体的核酸”，是指与编码 SYNJ1 突变体的基因相对应的核酸物质，即核酸的类型不受特别限制，可以是任何包含与 SYNJ1 突变体的编码基因相对应的脱氧核糖核苷酸和/或核糖核苷酸的聚合物，包括但不限于 DNA、RNA 或 cDNA。根据本发明的一个具体示例，前面所述的编码 SYNJ1 突变体的核酸为 DNA。根据本发明的实施例，发明人确定了 *SYNJ1* 基因的突变体，该突变体与早发性帕金森病的发病密切相关，从而通过检测该突变体在生物样品中是否存在，可以有效地检测生物样品是否易患早发性帕金森病，也可以通过检测该突变体在生物体中是否存在，可以有效地预测生物体是否易患早发性帕金森病。其中，当 c.773G>A 突变在生物体中为纯合突变时，可以预测该生物体罹患早发性帕金森病的可能性更大。

对于本发明说明书和权利要求书中，提及核酸，本领域技术人员应当理解，实际包括互补双链的任意一条，或者两条。为了方便，在本说明书和权利要求书中，虽然多数情况下只给出了一条链，但实际上也公开了与之互补的另一条链。例如，提及 SEQ ID NO:1，实际包括其互补序列。本领域技术人员还可以理解，利用一条链可以检测另一条链，反之亦然。

该编码 *SYNJ1* 突变体的核酸，是本申请的发明人通过全基因组纯合子 Mapping 结合全基因组外显子组测序，以及 Sanger 测序验证的方法确定的早发性帕金森病的新的致病基因，其携带的 c.773G>A 的致病突变位于该基因 5 号外显子中。该致病基因及突变位点在现有技术中并未被提到。

其中，野生型 *SYNJ1* 基因的 cDNA 具有如下所示的核苷酸序列：

ATGCGGAAGAGATGGGCCTGCTGGAGCGGAAGTGACGCTCCCGGCGGCTGTGGC
GGCGGCTGCGGGAGAAGGAGGAGGAGGAGCCGGAGGAAGAGGGCTGCCTCCGA
AGAAAGGAGAATGGCGTTCAGTAAAGGATTCCGGATCTATCACAAATTGGATCCC
CCACCTTTCAGCCTCATAGTGGAAACTAGGCATAAGGAAGAATGTCTCATGTTCG
AGTCTGGGGCTGTCGCTGTGCTCTCATCTGCAGAAAAAGAGGCAATCAAGGGTAC
ATACTCCAAAGTACTGGATGCATATGGACTCTTAGGTGTTCTGCGGTTAAATCTTG
GTGATACTATGTTACATTATCTGGTCCTAGTCACTGGATGTATGTCTGTTGGAAAA
ATTCAAGAATCTGAAGTTTTCCGAGTTACTTCCACTGAGTTTATATCACTGCGAAT
CGATTCTTCAGATGAGGATCGCATTTCAGAAGTGCGGAAAGTTTTGAATTCAGGA
AACTTTTATTTTGCATGGTCTGCATCTGGCATCAGTTTAGATTTGAGTCTTAATGCG
CATCGTAGCATGCAAGAACAGACAACTGATAATAGATTTTTCTGGAATCAGTCTTT
GCATTTGCATCTCAAACACTATGGCGTGAATTGTGATGACTGGTTATTACGTCTTA
TGTGTGGAGGAGTAGAAATCAGAACAATTTATGCTGCTCATAAACAGGCGAAGGC
TTGCCTCATTTCAAGATTAAGCTGTGAACGAGCTGGGACCAGGTTTAATGTCCGG
GGAACAAATGATGATGGTCATGTTGCCAATTTTGTAGAAACAGAACAGGTTGTGT
ACTTAGATGACTCAGTTTCTTCCTTCATACAAATCCGAGGATCTGTTCCATTGTTCT
GGGAGCAACCAGGGTTGCAAGTGGGATCTCATCGTGTCCGTATGTCAAGGGGATT
TGAAGCCAATGCACCTGCTTTTGACAGGCATTTTAGAACACTTAAGAACTTATATG
GTAAACAAATAATAGTAAATTTGCTTGGATCTAAGGAAGGTGAACATATGCTAAG
TAAAGCTTTCCAGAGTCATTTGAAAGCTTCTGAACATGCTGCTGATATCCAGATGG
TGAATTTTGACTATCATCAAATGGTTAAGGGAGGAAAGGCAGAAAAATTACATAG
TGTTCTTAAACCTCAAGTCCAGAAGTTTCTAGATTATGGATTTTTTTATTTCAATGG
AAGTGAAGTTCAAAGATGCCAGAGTGGTACAGTTCGAACAAACTGCTTGGATTGT
CTTGATAGAACAAATAGTGTGCAGGCATTTCTTGGCTTAGAGATGCTAGCTAAAC
AGTTGGAAGCTCTTGGTTTAGCTGAAAAGCCTCAGTTGGTGACTCGCTTTCAAGAA
GTTTTTCGGTCAATGTGGTCCGTGAATGGTGATTCAATCAGTAAGATATATGCAGG
AACTGGAGCTCTTGAAGGGAAAGCGAAGTTAAAAGATGGTGCTCGCTCTGTTACC
CGAACAATTCAGAATAACTTCTTTGACAGCTCCAAGCAAGAGGCCATTGATGTTTT
GCTACTGGGAAATACTCTGAATAGTGATTTAGCTGACAAAGCTCGAGCACTTTTA
ACTACTGGAAGTTTGCGTGTTTCTGAGCAGACATTACAGTCAGCATCTTCTAAAGT
ACTAAAGAGCATGTGTGAGAATTTCTACAAATATTCAAAGCCTAAGAAAATTCGA
GTATGTGTCGGAACCTGGAATGTGAATGGTGGGAAGCAATTTCGCAGCATAGCTT
TTAAGAATCAGACACTCACTGACTGGCTTCTTGATGCACCCAAGTTAGCTGGCATC
CAGGAGTTTCAAGATAAAAGAAGTAAGCCAACTGATATATTTGCAATTGGTTTTG
AAGAAATGGTAGAATTGAATGCTGGAAACATTGTGAGTGCAAGCACAACAAATC

AGAAGCTCTGGGCTGTAGAACTTCAGAAGACAATCTCCAGAGACAACAAGTATGT
GCTGCTGGCTTCTGAACAGTTGGTGGGCGTCTGTTTGTTTGTTTTTATCAGACCAC
AGCATGCTCCTTTTATCAGGGATGTTGCAGTTGATACTGTGAAGACTGGAATGGG
AGGTGCAACTGGAAATAAGGGAGCAGTTGCAATCCGAATGCTCTTCCATACAACC
AGCCTTTGCTTCGTCTGTAGCCACTTTGCTGCAGGGCAGTCACAAGTCAAAGAAA
GAAATGAAGATTTTATAGAAATAGCACGAAAATTGAGTTTTCCTATGGGAAGGAT
GCTATTTTCCCATGACTATGTATTTTGGTGTGGTGATTTCAACTATCGAATCGATCT
CCCTAACGAAGAAGTTAAAGAGCTCATAAGACAGCAAAATTGGGATTCTCTTATA
GCAGGAGATCAACTTATCAATCAGAAAAATGCTGGACAGGTTTTTAGAGGATTTT
TAGAAGGAAAGGTAACCTTTGCTCCGACATATAAGTATGACTTGTTTTCTGACGAC
TATGACACCAGTGAAAAGTGCCGCACCCCTGCCTGGACAGACCGTGTCCTTTGGA
GAAGGAGGAAATGGCCTTTTGATAGATCAGCTGAAGATCTAGATCTTCTAAATGC
TAGTTTTCAAGATGAAAGCAAAATTCTGTACACGTGGACTCCAGGCACTTTGCTGC
ACTATGGAAGAGCTGAGCTGAAGACTTCTGACCACAGGCCTGTCGTTGCCCTGAT
TGATATAGATATATTTGAAGTTGAAGCTGAAGAGAGGCAAAACATTTATAAAGAA
GTAATTGCAGTTCAGGGTCCACCAGATGGTACAGTATTGGTCTCAATCAAAAGTT
CTTTACCAGAAAATAATTTTTTTGATGATGCCTTGATTGATGAGCTTCTGCAGCAG
TTTGCAAGTTTTGGTGAAGTTATACTTATAAGATTTGTAGAAGATAAAATGTGGGT
TACATTTTTGGAGGGAAGCTCTGCCTTGAATGTTCTGAGCCTAAATGGTAAAGAGT
TATTGAATCGGACTATAACTATTGCTTTAAAAAGTCCAGACTGGATCAAAAATTTG
GAAGAAGAAATGAGTTTAGAGAAAATTAGCATTGCATTGCCATCATCAACAAGCT
CTACCCTGCTTGGTGAAGATGCAGAGGTTGCAGCAGATTTTGATATGGAAGGTGA
TGTTGATGACTATAGTGCTGAAGTGGAGGAACTTCTTCCTCAGCATCTCCAGCCAT
CTTCAAGTTCCGGCCTTGGTACTTCCCCCAGCTCTTCACCCCGAACTAGTCCCTGC
CAGTCACCTACAATATCAGAGGGTCCTGTACCTTCCCTTCCCATCAGACCAAGCCG
AGCACCGTCAAGAACTCCTGGGCCTCCCAGTGCACAGAGTTCTCCTATTGACGCG
CAGCCAGCAACGCCGCTGCCGCAGAAAGACCCCGCCCAGCCCTTGGAGCCCAAGC
GGCCGCCGCCGCCCCGCCCGGTCGCCCCTCCCACACGCCCGGCTCCCCCACAGAG
ACCTCCTCCGCCTTCAGGGGCTAGGAGTCCTGCACCCACTAGAAAGGAATTTGGA
GGTATTGGAGCCCCTCCCAGTCCTGGGGTAGCTAGGAGAGAGATGGAAGCACCCA
AAAGCCCTGGAACAACAAGGAAAGATAATATAGGACGCAGTCAGCCTTCACCTCA
AGCAGGACTTGCAGGCCCAGGACCTGCTGGATACAGTACAGCCAGACCGACGATT
CCTCCTCGTGCTGGAGTTATCAGTGCCCCACAGAGCCACGCGCGGGCATCTGCTG
GAAGACTGACTCCTGAAAGCCAAAGCAAAACATCAGAAACGTCGAAAGGTTCAA
CTTTCCTTCCTGAACCACTGAAGCCTCAGGCTGCTTTTCCTCCGCAGTCTTCTTTGC
CCCCGCCTGCTCAAAGGTTGCAAGAGCCTCTTGTCCCTGTGGCAGCACCTATGCCT

CAGTCTGGCCCCCAGCCAAATTTGGAAACCCCACCACAACCACCACCTCGAAGCA
GGTCATCCCATAGCTTGCCTTCAGAAGCTTCCTCACAACCGCAAGTAAAAACAAA
TGGAATCTCTGATGGCAAAAGAGAATCACCATTAAAGATTGACCCATTTGAAGAT
CTGTCATTTAATCTGCTTGCTGTATCAAAGGCTCAGCTATCTGTTCAAACGTCACC
TGTTCCCACCCCAGACCCAAAGAGGTTGATTCAGTTGCCTTCTGCAACGCAAAGT
AATGTTTTGAGTTCTGTAAGTTGCATGCCAACAATGCCTCCAATTCCAGCTCGGAG
TCAATCCCAGGAAAATATGCGAAGTTCTCCAAACCCATTTATTACTGGCTTGACCA
GGACAAATCCTTTCAGTGACAGGACTGCTGCTCCTGGAAACCCATTTAGAGCCAA
GTCTGAAGAATCAGAGGCAACTTCATGGTTCTCCAAAGAAGAGCCCGTTACTATC
AGTCCTTTCCCTTCTCTGCAGCCTCTTGGTCATAACAAAAGCAGGGCTTCATCTTC
ACTTGATGGCTTTAAGGACAGTTTTGATCTACAGGGCCAGTCTACATTAAAAATTA
GCAACCCGAAAGGATGGGTAACCTTCGAGGAAGAAGAGGATTTTGGTGTGAAAG
GGAAGTCAAAGTCAGCTTGTTCAGACTTACTGGGTAATCAGCCAAGTTCATTTTCT
GGCTCCAACCTGACATTGAATGATGACTGGAATAAAGGTACAAATGTCTCCTTCT
GTGTGTTGCCGTCAAGAAGACCTCCTCCACCTCCTGTCCCTCTGCTCCCGCCCGGC
ACCAGCCCTCCAGTAGATCCTTTCACGACCTTGGCCTCTAAGGCTTCACCCACACT
GGACTTTACAGAAAGATAA (SEQ ID NO：1)，

其编码的蛋白质具有如下所示的氨基酸序列：

MRKRWACWSGSDAPGGCGGGCGRRRRRSRRKRAASEERRMAFSKGFRIYHKLDPPP
FSLIVETRHKEECLMFESGAVAVLSSAEKEAIKGTYSKVLDAYGLLGVLRLNLGDTML
HYLVLVTGCMSVGKIQESEVFRVTSTEFISLRIDSSDEDRISEVRKVLNSGNFYFAWSA
SGISLDLSLNAHRSMQEQTTDNRFFWNQSLHLHLKHYGVNCDDWLLRLMCGGVEIR
TIYAAHKQAKACLISRLSCERAGTRFNVRGTNDDGHVANFVETEQVVYLDDSVSSFIQ
IRGSVPLFWEQPGLQVGSHRVRMSRGFEANAPAFDRHFRTLKNLYGKQIIVNLLGSKE
GEHMLSKAFQSHLKASEHAADIQMVNFDYHQMVKGGKAEKLHSVLKPQVQKFLDY
GFFYFNGSEVQRCQSGTVRTNCLDCLDRTNSVQAFLGLEMLAKQLEALGLAEKPQLV
TRFQEVFRSMWSVNGDSISKIYAGTGALEGKAKLKDGARSVTRTIQNNFFDSSKQEAI
DVLLLGNTLNSDLADKARALLTTGSLRVSEQTLQSASSKVLKSMCENFYKYSKPKKI
RVCVGTWNVNGGKQFRSIAFKNQTLTDWLLDAPKLAGIQEFQDKRSKPTDIFAIGFEE
MVELNAGNIVSASTTNQKLWAVELQKTISRDNKYVLLASEQLVGVCLFVFIRPQHAP
FIRDVAVDTVKTGMGGATGNKGAVAIRMLFHTTSLCFVCSHFAAGQSQVKERNEDFI
EIARKLSFPMGRMLFSHDYVFWCGDFNYRIDLPNEEVKELIRQQNWDSLIAGDQLINQ
KNAGQVFRGFLEGKVTFAPTYKYDLFSDDYDTSEKCRTPAWTDRVLWRRRKWPFDR
SAEDLDLLNASFQDESKILYTWTPGTLLHYGRAELKTSDHRPVVALIDIDIFEVEAEER
QNIYKEVIAVQGPPDGTVLVSIKSSLPENNFFDDALIDELLQQFASFGEVILIRFVEDKM
WVTFLEGSSALNVLSLNGKELLNRTITIALKSPDWIKNLEEEMSLEKISIALPSSTSSTL

LGEDAEVAADFDMEGDVDDYSAEVEELLPQHLQPSSSSGLGTSPSSSPRTSPCQSPTIS
EGPVPSLPIRPSRAPSRTPGPPSAQSSPIDAQPATPLPQKDPAQPLEPKRPPPPRPVAPPT
RPAPPQRPPPPSGARSPAPTRKEFGGIGAPPSPGVARREMEAPKSPGTTRKDNIGRSQP
SPQAGLAGPGPAGYSTARPTIPPRAGVISAPQSHARASAGRLTPESQSKTSETSKGSTF
LPEPLKPQAAFPPQSSLPPPAQRLQEPLVPVAAPMPQSGPQPNLETPPQPPPRSRSSHSL
PSEASSQPQVKTNGISDGKRESPLKIDPFEDLSFNLLAVSKAQLSVQTSPVPTPDPKRLI
QLPSATQSNVLSSVSCMPTMPPIPARSQSQENMRSSPNPFITGLTRTNPFSDRTAAPGN
PFRAKSEESEATSWFSKEEPVTISPFPSLQPLGHNKSRASSSLDGFKDSFDLQGQSTLKI
SNPKGWVTFEEEEDFGVKGKSKSACSDLLGNQPSSFSGSNLTLNDDWNKGTNVSFCV
LPSRRPPPPPVPLLPPGTSPPVDPFTTLASKASPTLDFTER (SEQ ID NO：2)。

发明人发现的新的新突变体与 SEQ ID NO：1 相比，具有 c.773G>A 突变，即相对于野生型 *SYNJ1* 基因，本发明的 *SYNJ1* 基因突变体的第 773 位碱基从 G 突变为 A。由此，其所编码的产物与野生型的 SYNJ1 相比，具有 p.Arg258Gln 突变，即该突变是由于 c.773G>A 突变而引起的，具体地，该突变表示：野生型 SYNJ1 的第 258 位的 Arg 突变为 Gln。

SYNJ1 基因编码突出小泡磷酸酶 1（SYNJ1），其是一种磷酸肌醇磷酸酶蛋白，在成人大脑内网格蛋白介导的内吞作用中起重要作用。SYNJ1 的可变剪接编码了该蛋白的 170 和 145kDa 两种亚型，这两种亚型均在大脑的突出前终端有表达。而该蛋白亚型的其他亚型在 Genbank 中也有注释。目前，尚未有 *SYNJ1* 的突变会引起早发性帕金森病的相关报道，EVS 外显子数据库中也未发现本发明的 *SYNJ1* 基因突变位点 c.C2671T。

根据本发明的第二方面，本发明提出了一种分离的多肽。根据本发明的实施例，与野生型 SYNJ1 相比，该分离的多肽具有 p.Arg258Gln 突变，即该突变是由于 c.C2671T 的无义突变而引起的，具体地，该突变表示：该分离的多肽野生型 SYNJ1 的第 891 位 Gln 氨基酸突变为终止密码子，翻译提前终止。根据本发明的一些具体示例，该多肽是由前述分离的编码 *SYNJ1* 突变体的核酸编码的。通过检测生物样品中是否表达该多肽，可以有效地检测生物样品是否易患早发性帕金森病，也可以通过检测这些多肽在生物体中是否存在，可以有效地预测生物体是否易患早发性帕金森病。其中，当 p.Arg258Gln 突变在生物体中为纯合突变，即当生物体中仅存在具有 p.Arg258Gln 突变的 SYNJ1 突变蛋白，不表达野生型 SYNJ1 蛋白时，可以预测该生物体罹患早发性帕金森病的可能性更大。

根据本发明的第三方面，本发明提出了一种筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法。根据本发明的实施例，该方法包括以下步骤：

从所述生物样品提取核酸样本。根据本发明的实施例，生物样品的类型并不受特别限制，只要从该生物样品中能够提取到反映生物样品 *SYNJ1* 是否存在突变的核酸样本即可。根据本发明的实施例，生物样品可以为选自人体血液、皮肤、皮下组织的至少一种，优选外周血。由此，可以方便地进行取样和检测，从而能够进一步提高筛选易患早

发性帕金森病的生物样品的效率。根据本发明的实施例，这里所使用的术语“核酸样本”应做广义理解，其可以是任何能够反映生物样品中 *SYNJ1* 是否存在突变的样本，例如可以是从生物样品中直接提取的全基因组 DNA，也可以是该全基因组中包含 *SYNJ1* 编码序列的一部分，可以是从生物样品中提取的总 RNA，也可以是从生物样品中提取的 mRNA。根据本发明的一个实施例，所述核酸样本为全基因组 DNA。由此，可以扩大生物样品的来源范围，并且可以同时对生物样品的多种信息进行确定，从而能够提高筛选易患早发性帕金森病的生物样品的效率。另外，根据本发明的实施例，针对采用 RNA 作为核酸样本，从生物样品提取核酸样本可以进一步包括：从生物样品提取 RNA 样本，优选 RNA 样本为 mRNA；以及基于所得到的 RNA 样本，通过反转录反应，获得 cDNA 样本，所得到的 cDNA 样本构成核酸样本。由此，可以进一步提高利用 RNA 作为核酸样本筛选易患早发性帕金森病的生物样品的效率。

接下来，在得到核酸样本之后，可以对核酸样本进行分析，从而能够确定所得到核酸样本的核酸序列。根据本发明的实施例，确定所得到核酸样本的核酸序列的方法和设备并不受特别限制。根据本发明的具体实施例，可以通过测序方法，确定核酸样本的核酸序列。根据本发明的实施例，可以用于进行测序的方法和设备并不受特别限制。根据本发明的实施例，可以采用第二代测序技术，也可以采用第三代以及第四代或者更先进的测序技术。根据本发明的具体示例，可以利用选自 Hiseq2000、SOLiD、454 和单分子测序装置的至少一种对核酸序列进行测序。由此，结合最新的测序技术，针对单个位点可以达到较高的测序深度，检测灵敏度和准确性大大提高，因而能够利用这些测序装置的高通量、深度测序的特点，进一步提高对核酸样本进行检测分析的效率。从而，能够提高后续对测序数据进行分析时的精确性和准确度。由此，根据本发明的实施例，确定核酸样本的核酸序列可以进一步包括：首先，针对所得到的核酸样本，构建核酸测序文库；以及对所得到的核酸测序文库进行测序，以便获得由多个测序数据构成的测序结果。根据本发明的一些实施例，可以采用选自 Hiseq2000、SOLiD、454 和单分子测序装置的至少一种对所得到的核酸测序文库进行测序。另外，根据本发明的实施例，可以对核酸样本进行筛选，富集 *SYNJ1* 外显子，该筛选富集可以在构建测序文库之前，构建测序文库过程中，或者构建测序文库之后进行。根据本发明的一个实施例，针对核酸样本，构建核酸测序文库进一步包括：利用 *SYNJ1* 外显子特异性引物，对核酸样本进行 PCR 扩增；以及针对所得到的扩增产物，构建核酸测序文库。由此，可以通过 PCR 扩增，富集 *SYNJ1* 外显子（尤其是第 5 号外显子的序列），从而能够进一步提高筛选易患早发性帕金森病的生物样品的效率。根据本发明的实施例，*SYNJ1* 外显子特异性引物的序列不受特别限制，根据本发明的优选实施例，这些 *SYNJ1* 外显子特异性引物（针对 *SYNJ1* 的 5 号外显子的序列）具有 SEQ ID NO：3 和 4 所示的核苷酸序列：

上游引物(5’→3’)	下游引物(5’→3’)
*SYNJ1*_exon5F:	*SYNJ1*_exon5R:

TCTCGTTTTATAGCCCTATC TTCTGATCC(SEQ ID NO：3)	AAGGCCCATAAGTAACCAAG AACAATC(SEQ ID NO：4)

发明人惊奇地发现，通过采用这些引物，可以在 PCR 反应体系中通过显著有效地完成对 *SYNJ1* 外显子的扩增。需要说明的是，这些 SEQ ID NO：3 和 SEQ ID NO：4 所示的核苷酸序列是本发明的发明人在付出了艰苦的劳动后，意外获得的。

关于针对核酸样本，构建测序文库的方法和流程，本领域技术人员可以根据不同的测序技术进行适当选择，关于流程的细节，可以参见测序仪器的厂商例如 Illumina 公司所提供的规程，例如参见 Illumina 公司 Multiplexing Sample Preparation Guide（Part#1005361; Feb 2010）或 Paired-End SamplePrep Guide（Part#1005063；Feb 2010），通过参照将其并入本文。根据本发明的实施例，从生物样品提取核酸样本的方法和设备，也不受特别限制，可以采用商品化的核酸提取试剂盒进行。

需要说明的是，在这里所使用的术语“核酸序列”应作广义理解，其可以是在对核酸样本进行测序得到的测序数据进行组装后，得到的完整的核酸序列信息，也可以是直接采用通过对核酸样本进行测序所得到的测序数据（reads）作为核酸序列，只要这些核酸序列中含有对应 *SYNJ1* 的编码序列即可。

最后，在确定核酸样本的核酸序列之后，将所得到的核酸样本的核酸序列与 SEQ ID NO：1 的序列相比对。如果在所得到的核酸序列中具有 c.773G>A 突变，则指示生物样品易患早发性帕金森病。其中，当 c.773G>A 突变在生物样品中为纯合突变时，可以预测该生物样品罹患早发性帕金森病的可能性更大。由此，通过根据本发明实施例的筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法，可以有效地筛选易患早发性帕金森病的生物样品。根据本发明的实施例，对核酸序列与 SEQ ID NO：1 进行比对的方法和设备并不受特别限制，可以采用任意常规的软件进行操作，根据本发明的具体实例，可以采用 SOAP 软件进行比对。

需要说明的是，根据本发明实施例的“筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法”的用途不受特别限制，例如可以用作非诊断目的的筛选方法。

筛选易患早发性帕金森病的生物样品的系统和试剂盒

根据本发明的第四方面，本发明提出了一种能够有效实施上述筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法的系统。

参考图 1，根据本发明的实施例，该筛选易患早发性帕金森病的生物样品的系统 1000 包括核酸提取装置 100、核酸序列确定装置 200 以及判断装置 300。

根据本发明的实施例，核酸提取装置 100 用于从生物样品提取核酸样本。如前所述，根据本发明的实施例，核酸样本的类型并不受特别限制，对于采用 RNA 作为核酸样本，则核酸提取装置进一步包括 RNA 提取单元 101 和反转录单元 102，其中，提取单元 101 用于从生物样品提取 RNA 样本，反转录单元 102 与 RNA 提取单元 101 相连，用于对 RNA 样本进行反转录反应，以便获得 cDNA 样本，所得到的 cDNA 样本构成核酸样本。

根据本发明的实施例，核酸序列确定装置 200 与核酸提取装置 100 相连，用于对核酸样本进行分析，以便确定核酸样本的核酸序列。如前所示，可以采用测序的方法确定核酸样本的核酸序列。由此，根据本发明的一个实施例，所述核酸序列确定装置 200 可以进一步包括：文库构建单元 201 以及测序单元 202。文库构建单元 201 用于针对核酸样本，构建核酸测序文库；测序单元 202 与文库构建单元 201 相连，用于对核酸测序文库进行测序，以便获得由多个测序数据构成的测序结果。如前所述，可以通过 PCR 扩增，富集 *SYNJ1* 外显子，进一步提高筛选易患早发性帕金森病的生物样品的效率。由此，文库构建单元 201 可以进一步包括 PCR 扩增模块（图中未示出），在该 PCR 扩增模块中设置有 *SYNJ1* 外显子特异性引物，以便利用 *SYNJ1* 外显子特异性引物，对所述核酸样本进行 PCR 扩增，根据本发明的具体实施例，*SYNJ1* 外显子特异性引物（针对 *SYNJ1* 的 5 号外显子的序列）号外显子）具有如 SEQ ID NO：3 和 4 所示的核苷酸序列。根据本发明的实施例，测序单元 202 可以包括选自 HISEQ2000、SOLiD、454 和单分子测序装置的至少一种。由此，结合最新的测序技术，针对单个位点可以达到较高的测序深度，检测灵敏度和准确性大大提高，因而能够利用这些测序装置的高通量、深度测序的特点，进一步提高对核酸样本进行检测分析的效率。从而，提高后续对测序数据进行分析时的精确性和准确度。

根据本发明的实施例，判断装置 300 与核酸序列确定装置 200 相连，适于将核酸样本的核酸序列进行比对，以便基于核酸样本的核酸序列与 SEQ ID NO：1 的区别判断生物样品是否易患早发性帕金森病。具体地，基于核酸样本的核酸序列与 SEQ ID NO：1 相比，是否具有 c.773G>A 突变，判断生物样品是否易患早发性帕金森病。其中，当 c.773G>A 突变在生物样品中为纯合突变时，可以判断该生物样品罹患早发性帕金森病的可能性更大。如前所述，根据本发明的一个实施例，核酸样本的核酸序列与 SEQ ID NO：1 相比，具有 c.773G>A 突变，是生物样品易患早发性帕金森病的指示。如前所述，根据本发明的实施例，对核酸序列与 SEQ ID NO：1 进行比对的设备并不受特别限制，可以采用任意常规的软件进行操作，根据本发明的具体实例，可以采用 SOAP 软件进行比对。

由此，利用该系统，能够有效地实施前述筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法，从而可以有效地筛选易患早发性帕金森病的生物样品。

根据本发明的第五方面，本发明提出了一种用于筛选易患早发性帕金森病的生物样品的试剂盒。根据本发明的实施例，该用于筛选易患早发性帕金森病的生物样品的试剂盒包括：适于检测 *SYNJ1* 基因突变体的试剂，其中与 SEQ ID NO：1 相比，该 *SYNJ1* 基因突变体具有 c.773G>A 突变。利用根据本发明的实施例的试剂盒，能够有效地筛选易患早发性帕金森病的生物样品。其中，当 c.773G>A 突变在生物样品中为纯合突变时，可以判断该生物样品罹患早发性帕金森病的可能性更大。在本文中，所使用的术语“适于检测 *SYNJ1* 基因突变体的试剂”应做广义理解，即可以是检测 *SYNJ1* 编码基因的试剂，也可以是检测 *SYNJ1* 突变体多肽的试剂，例如可以采用识别特异性位点的抗体。根据本发明的一个实施例，所述试剂为核酸探针或引物，优选地，所述核酸探针或引物具有如 SEQ ID NO：3-4 所示的核苷酸序列。由此，可以高效地筛选易患早发性帕金森病的生物样品。

需要说明的是，在本文前面筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法部分中所描述的特征和优点，同样适用于筛选易患早发性帕金森病的生物样品的系统或者试剂盒，在此不再赘述。

构建体及重组细胞

根据本发明的第六方面，本发明还提出了一种构建体。根据本发明的实施例，该构建体包含前面所述的分离的编码 SYNJ1 突变体的核酸，即本发明的 *SYNJ1* 基因突变体。由此，利用本发明的构建体转化受体细胞获得的重组细胞，能够有效地用于筛选治疗早发性帕金森病的药物。其中，所述受体细胞的种类不受特别限制，例如可以为大肠杆菌细胞、哺乳动物细胞，优选该受体细胞来源于哺乳动物。

在本发明中所使用的术语“构建体”是指这样的一种遗传载体，其包含特定核酸序列，并且能够将目的核酸序列转入宿主细胞中，以获得重组细胞。根据本发明的实施例，构建体的形式不受特别限制。根据本发明的实施例，其可以为质粒、噬菌体、人工染色体、粘粒（Cosmid）、病毒的至少一种，优选质粒。质粒作为遗传载体，具有操作简单，可以携带较大片段的性质，便于操作和处理。质粒的形式也不受特别限制，既可以是环形质粒，也可以是线性质粒，即可以是单链的，也可以是双链的。本领域技术人员可以根据需要进行选择。在本发明中所使用的术语“核酸”可以是任何包含脱氧核糖核苷酸或者核糖核苷酸的聚合物，包括但不限于经过修饰的或者未经修饰的 DNA、RNA，其长度不受任何特别限制。对于用于构建重组细胞的构建体，优选所述核酸为 DNA，因为 DNA 相对于 RNA 而言，其更稳定，并且易于操作。

根据本发明的第七方面，本发明还提出了一种重组细胞。根据本发明的实施例，该重组细胞是通过前面所述的构建体转化受体细胞而获得的。从而，本发明的重组细胞能够表达构建体所携带的 *SYNJ1* 基因突变体。根据本发明的一些实施例，利用本发明的重组细胞，能够有效地筛选治疗早发性帕金森病的药物。根据本发明的实施例，受体细胞的种类不受特别限制，例如可以为大肠杆菌细胞、哺乳动物细胞，优选所述受体细胞来源于非人哺乳动物。

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J.萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品，例如可以采购自 Illumina 公司。

实施例 1　确定早发性 PD 致病基因

1、样本收集

发明人收集到一个近亲结婚的意大利早发性帕金森病（在本文中有时也简称为早发性

PD）患者家系，其家系图见图 2。如图 2 所示，其中，◯表示正常女性，表示男性患者，● 表示女性患者，表示表现正常的已逝男性。先证者为 NAPO-16。

如图 2 所示，在该家系中，第三代的两个健康的堂兄妹结婚，共育有 1 子 3 女，其中两个患上了一种进行性神经疾病。且上几代均无神经类疾病病史，揭示有可能是常染色体隐性遗传病。

其中，先证者 NAPO-16 是一名 47 岁的男性，其出生和发育过程都很正常，但在 22 岁时，他很快变得进行性的行动迟缓，疲劳，下肢僵硬，步履艰难，手臂无意识地晃动，几个月后已经无法工作。不到一年，他的日常生活无法自理，同时出现了认知力下降和构音障碍，三年内逐渐变得口吃。在这些症状出现的两年内，该患者就接受了左旋多巴疗法，但对其运动障碍的疗效不明显。由于产生了致残性的副作用，如下颌骨缺损和足肌肉张力障碍，这些残疾进而影响进食和行走。

发明人第一次为先证者 NAPO-16 检查的时候，距离第一次发病已有 25 年之久。此时他弯着腰，行动困难和迈步细碎，四肢僵化，左侧尤为明显。身体条件反射能力受损。两手均有张力障碍，左侧比右侧严重。在患者休息或者活动的时候，上肢均存在不规则、大幅度的震颤。面部肌肉也能观察到大幅度无意识地抽筋现象。该患者目不斜视，其眼睑存在功能障碍，有明显的核上性垂直视觉障碍（向下比向上看更困难）。患者还存在轻微的吞咽困难，只能吃半流体食物。其深部腱反射正常，无巴彬斯基征，无小脑功能紊乱迹象。统一帕金森病测定(UPDRS-Ⅲ，运动量测定)得分为 78（最高为 108，得分越高，病情越重）。紧急使用 200mg 左旋多巴未能改善病情，反而诱发了下颌骨缺损、四肢肌张力障碍和低血压（血压从 110/80 降至 80/60mmHg）。由于患者有严重的行动和认知障碍，发明人无法做细微精神状态分级（Mini-Mental State Examination，MMSE）。三年后，他仍未接受治疗，其临床症状也基本未变。

患者 NAPO-17，是一个 31 岁的女性，其出生和发育皆正常。28 岁时，她开始出现活动迟缓，语言障碍，行动困难，右臂无意识地晃动。与其兄类似，对她的左旋多巴疗法因明显的副作用如下颌骨缺损，足肌张力障碍等而终止，这些副作用严重影响她的进食和行走。发明人为其做第一次检查是在她发病 3 年以后。当时她弯着腰、步态细碎、行动缓慢，姿势反射明显受损。她目不斜视，有中等程度的核上性垂直视觉障碍，但眼睑功能正常；舌头和嘴唇有连续、不规则、小幅度的无意识抽筋现象。在活动或者其他时候，右臂会发生间歇性的大幅度震颤。患者存在中等程度的轴向性和四肢僵硬(左侧更为明显)；手足均存在张力障碍（同样是左侧比右侧更严重）。患者 NAPO-17 还存在明显的构音障碍、低血压和轻微的吞咽困难，因而她食用半流体食物。其深部腱反射强烈，但没有巴彬斯基征，也没有小脑功能紊乱迹象。 UPDRS-Ⅲ 评分为 57，跟其兄一样，紧急施用 200mg 左旋多巴在下颌缺损部位和足部均诱发了严重的肌张力障碍。其血压由 110/70 降到 70/50mmHg，患者 MMSE 得分为 26（得分越低，认知能力越低）。三年后，她仍然没有服用抗帕金森药物，

发明人观察到她的帕金森症状恶化，如出现躯体肌肉无力，核上性直视麻痹。此时她的UPDRS-III得分已经上升至68， MMSE评分降至24。

上述两个患者测血液生化特性都正常。另外，两个患者的针刺肌电图、感官、运动神经传导、用中枢神经和胫骨神经刺激得到的体感诱发电位等指标均不显著。与此类似，在上下肢中测得的运动诱发电位为正常幅度值和传导时间值。大脑磁共振成像（MRI）发现扩散性脑皮层萎缩，患者NAPO-16中的症状更为严重。在两个患者中均发现了海马体回声增强和中脑四叠体板变薄（患者 NAPO-16 中更为显著），中脑被盖未见显著萎缩。对患者NAPO-16 进行 SPECT 成像检查发现，与正常对照相比，在纹状体中，其多巴胺转运体的浓度显著下降(V″3 在脑壳中下降 87%，在尾状核中下降 77%)。另外，FDG-PET 成像发现两个患者中存在大脑皮层基础代谢率减退，在患者NAPO-16的额前、顶枕和尾状核区域更为明显。

发明人收集获得上述早发型PD患者家系中的5个成员（患者NAPO-16和NAPO-17，表现正常的NAPO-18、NAPO-24和 NAPO-25）的外周血样本，并进行下述实验。

2、全基因组纯合子Mapping

发明人用Illumina HumanOmniExpress BeadChip 芯片数据（间隔为2.1 kb 的730,525 SNPs）对该家系的上述5个样品进行了全基因组纯合子Mapping，数据用ALLEGRO(version 1.2c)通过EasyLinkage Plus v.5.08做连锁分析分析，marker 间隔为0.3cM。我们选择为常染色体隐性-纯合模型，设置该病等位基因频率为 0.0001 并假定完全外显。用 Nexus Copy Number, Discovery Edition, ver. 7 (BioDiscovery, El Segundo, CA)进一步分析位于连锁区域内的纯合子片段。结果，发明人找出了5个LOD>2的 纯合区域，其分别位于4、7、16、19、21号染色体上。这些纯合区域存在于两个患者中，而在另外3个健康家庭成员中不存在。

3、全外显子组测序

发明人利用Agilent SureSelect Human All Exon Kit结合Solexa高通量测序技术，对图2所示的早发性PD患者家系中的2名患者（NAPO-16和NAPO-17）的外显子区域序列进行了测序。

具体如下：

3.1 DNA提取

采集图2所示早发性PD患者家系中的2名患者（NAPO-16和NAPO-17）的外周血，利用常规酚-氯仿法抽提外周血白细胞中的基因组DNA，并利用分光光度计测量DNA的浓度及纯度，所得各基因组DNA的OD_{260}/OD_{280}均应位于1.7-2.0之间，浓度不少于200纳克/微升，总量不少于30微克。

3.2 外显子捕获与测序

利用超声波仪（CovarisS2, Massachusetts, USA）将各基因组 DNA 样本随机打断成200-300bp左右的片段，随后按照制造商提供的操作说明书，在片段两端分别连接上接头制备文库（可参见：http://www.illumina.com/提供的 Illumina/Solexa 标准建库说明书，通过参照将其全文并入本文）。文库经纯化后经过Ligation-mediated PCR (LM-PCR)的线性扩增与捕

获试剂 SureSelect Biotinylated RNA Library (BAITS)进行杂交富集，再经过 LM-PCR 的线性扩增，文库检测合格后即可上机测序，以便获得原始测序数据。其中，测序平台为 Illumina Hiseq 2000，读取长度为 90bp，各样本的平均测序深度最少为 50×。

3.3、变异检测、注释及数据库比较

利用 Illumina basecalling Software 1.7 对上述获得的原始测序数据进行处理，经过过滤去污染后，使用 SOAPaligner/SOAP2（可参见：Li R, Li Y, Kristiansen K, et al, SOAP: short oligonucleotide alignment program. Bioinformatics 2008, 24(5):713-714；Li R, Yu C, Li Y, ea al, SOAP2:an improved ultrafast tool for short read alignment.Bioinformatics 2009, 25(15):1966-1967，通过参照将其全文并入本文）比对到 UCSC 人类参考基因组 Hg18(snp129, http://genome.ucsc.edu/)，以便获得比对到基因组上的唯一比对序列。然后利用 SOAPsnp(可参见：Li R, Li Y, Fang X, Yang H, et al, SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing.Genome Res 2009, 19(6):1124-1132，通过参照将其全文并入本文)确定靶区域的基因型。

结果，在这些样本中，发明人发现：对于 *SYNJ1* 基因来讲，在患者 II:4 中发现有 29 个单核苷酸多态性（SNPs）和 12 处的插入/缺失，在患者 III:2 中发现有 30 个 SNP 和 13 处的 Indels。随后通过 dbSNP 数据库（http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/database/snp135.txt.gz.）、HapMap 数据库（ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/hapmap）、千人基因组数据库（ftp://ftp.1000genomes.ebi.ac.uk/vol1/ftp）、炎黄数据库（http://yh.genomics.org.cn/）等公共数据库的过滤，去掉所有已知的且在数据库中等位基因频率大于 0.005 的变异。

结果，在病例 NAPO-16 中发现有 65860 个单核苷酸多态性（SNPs） 和 11162 处的 插入/缺失；在 NAPO-17 中发现有 62980 个单核苷酸多态性（SNPs） 和 3946 处的插入/缺失。随后通过 dbSNP 数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi），千人基因组数据库（www.1000genomes.org/ ），HapMap 8 数据库（http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/）等公共数据库的过滤，去掉所有已知的且在数据库中等位基因频率大于 0.005 的变异。去掉所有已知变异。同时利用两个患者的母亲（表现正常的 NAPO-16）的外显子组测序（方法同前述的步骤 3）的结果进行过滤，并利用 SIFT 软件进行 SNP 功能预测，最终得到多个杂合可能具有致病意义的 de novo SNP 位点。

4、外显子组测序分析结果和全基因组纯合子 Mapping 结果综合分析

结合上述获得的外显子组测序分析结果和全基因组纯合子 Mapping 结果，进行进一步的突变排查与分析，具体如下：

结合外显子组测序分析结果，我们在全基因组纯合子 Mapping 获得的 5 个纯合区段中找到了两个纯合外显子区/剪接位点突变。这两个纯合突变为两个患者共有，在 dbSNP129 和 1000 genomes project 中不存在。第一个是 ZNF439 上的 c.931C>T，相应的氨基酸突变是 p.Arg311Cys。该突变经过 Sanger 验证，不存在于公共数据库中。但根据多种软件的预测结果，该突变不具有致病性（sift 除外，其预测分值为 0.05，为临界点值）（表 2）。尽管该基

因编码的蛋白的功能尚属未知，但在 exome variant server(EVS，http://evs.gs.washington.edu/EVS/)找到了很多该基因的常见和罕见突变。据此，我们认为 ZNF439 不是早发性帕金森病的致病基因。

第二个纯合突变是 *SYNJ1* (MIM 604297)基因的 c.773G>A，其相应的氨基酸变异是 p.Arg258Gln。已知，*SYNJ1* 编码突出小泡磷酸酶 1，一种磷酸肌醇磷酸酶蛋白，在成人大脑内网格蛋白介导的内吞作用中其重要作用。SYNJ1 的可变剪接编码了该蛋白的 170 和 145kDa 两种亚型，两种亚型均在大脑的突出前终端有表达。该蛋白亚型的其他亚型在 Genbank 中也有注释。接着，发明人通过 Sanger 测序证实了在上述两个患者中的纯合突变和在 3 个正常个体中的杂合突变，也即该突变在家系内与疾病呈共分离。并且，通过上述 Sanger 测序，在两个患者中没有发现该基因的外显子区或外显子-内含子边界区有新的突变。进一步，发明人发现 p.Arg258Gln 突变在 dbSNP129，1000 genomes 和 EVS 数据库中均不存在，该突变的氨基酸位于 Synj1 蛋白的类 SAC1 磷酸酶结构域，该位点在 Synj1 蛋白和类 SAC1 磷酸酶结构域的进化上非常保守，表明该位点对磷酸酶结构域的重要性。

综上所述，发明人认为 *SYNJ1* 基因极有可能为早发性帕金森病的致病基因，*SYNJ1* 基因的 c.773G>A 突变为早发性帕金森病的致病突变。

实施例 2　Sanger 法测序验证

分别对实施例 1 中所述的早发性帕金森病患者家系中的 2 名患者（NAPO-16 和 NAPO-17）和 3 名家系内正常人（NAPO-18，NAPO-24，NAPO-25）的 *SYNJ1* 基因进行检测：针对 *SYNJ1* 基因的 5 号外显子上的 c.773G>A 突变设计引物，然后通过 PCR 扩增、产物纯化和测序的方法获得 *SYNJ1* 有关序列，根据确定序列测定结果属于突变型还是野生型，验证 *SYNJ1* 基因的 c.773G>A 突变与早发性帕金森病之间的相关性。

具体方法步骤如下：

1、DNA 提取

按照实施例 1 中所述的提取 DNA 的方法，分别提取制备受试者外周静脉血中的基因组 DNA，备用。

2、引物设计及 PCR 反应

首先，参考人类基因组序列数据库 Hg18/build36.3（http://genome.ucsc.edu/），设计得到具有 SEQ ID NO：3-4 所示的核苷酸序列的 *SYNJ1* 基因外显子特异性引物，具体序列见下表：

上游引物(5’→3’)	下游引物(5’→3’)
*SYNJ1*_exon5F: TCTCGTTTTATAGCCCTATC TTCTGATCC(SEQ ID NO：3)	*SYNJ1*_exon5R: AAGGCCCATAAGTAACCAAG AACAATC(SEQ ID NO：4)

接着，分别按照以下配比配制各基因组 DNA 样本的 PCR 反应体系以及进行 PCR 反应：

反应体系：50μL

10X PCR Gold Buffer	5 μL
25 mM MgCl	8 μL
2.5mM dNTP	4μL
正向引物（100ng/μL）	1 μL
反向引物（100ng/μL）	1 μL
AmpliTaq Gold DNA Polymerase, LD LA Taq 酶（5U/μL）	0.25 μL
DNA 模板	1 μL
H_2O	29.75 μL。

PCR 反应条件：

	96°C	7′30″	
9 个循环	96°C	30″	每个循环递减 1℃
	70°C	30″	
	72°C	1′30″	
25 个循环	96°C	30″	
	60°C	30″	
	72°C	1′30″	
	72°C	5′00″	
	4°C	∞	

由此，获得上述早发性帕金森病患者家系中的 2 名患者和 3 名家系内正常人的 PCR 扩增产物。

3、测序

将步骤 2 中获得的上述早发性帕金森病患者家系中的 2 名患者和 3 名家系内正常人的 PCR 扩增产物直接进行 DNA 测序。其中，测序采用 ABI Prism 3130XL 型测序仪进行。

结果，发明人发现，该早发性帕金森病患者家系中患者 NAPO-16 和 NAPO-17 均为 c.773G>A 纯合突变，患者母亲（NAPO-18）和其他两个表型正常的成员（NAPO-24 和 NAPO-25）皆为相应突变的杂合携带者。其中，图 3 显示了上述早发性帕金森病患者家系中患者和家系内正常人以及对照（家系外正常人）的 *SYNJ1* 基因 c.773G>A 突变位点的 Sanger 测序验证峰图。

此外，经查证 EVS 外显子数据库中未发现上述突变位点。

由此，进一步证明 *SYNJ1* 基因的 c.773G>A 突变是早发性帕金森病的致病突变。

实施例 3 检测试剂盒

制备一检测试剂盒，其包含能够检测 *SYNJ1* 基因的 c.773G>A 突变（位于 5 号外显子）的引物，用于筛选易患早发性帕金森病的生物样品，其中这些引物为 *SYNJ1* 基因外显子特异性引物，其序列如实施例 1 中所述 SEQ ID NO：3-4 所示。

利用上述试剂盒筛选易患早发性帕金森病的生物样品的具体步骤为：按照实施例 2 的步骤 1 所述的方法提取待测者 DNA，以所提取的 DNA 为模板与上述 *SYNJ1* 基因的外显子特异性引物进行 PCR 反应，并按照本领域常规方法对 PCR 产物纯化，将纯化的产物进行测序，然后通过观察测序所得到的序列是否具有 c.773G>A 突变，能够有效地检测本发明的 *SYNJ1* 基因突变体在待测者 DNA 中是否存在，从而能够有效地检测待测者是否易患早发性帕金森病，进一步，能够从待测者中筛选出易患早发性帕金森病的生物样品。

工业实用性

本发明的 *SYNJ1* 基因突变体，能够有效地应用于筛选易患早发性帕金森病的生物样品，即通过检测该突变体在生物样品中是否存在，可以有效地检测生物样品是否易患早发性帕金森病。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

权利要求书

1、一种分离的编码 SYNJ1 突变体的核酸，其特征在于，所述核酸与 SEQ ID NO：1 相比，具有 c.773G>A 突变，

任选地，所述核酸为 DNA。

2、一种分离的多肽，其特征在于，与 SEQ ID NO：2 相比，所述分离的多肽具有 p.Arg258Gln 突变，

任选地，所述多肽是由权利要求 1 所述的核酸编码的。

3、一种筛选易患早发性帕金森病的生物样品的方法，其特征在于，包括以下步骤：

从所述生物样品提取核酸样本；

确定所述核酸样本的核酸序列；

所述核酸样本的核酸序列与 SEQ ID NO：1 相比，具有 c.773G>A 突变是所述生物样品易患早发性帕金森病的指示，

任选地，所述生物样本为选自人体血液、皮肤、皮下组织的至少一种，

任选地，所述核酸样本为全基因组 DNA。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，从所述生物样品提取核酸样本进一步包括：

从所述生物样品提取 RNA 样本，优选所述 RNA 样本为 mRNA；以及

基于所述 RNA 样本，通过反转录反应，获得 cDNA 样本，所述 cDNA 样本构成所述核酸样本。

5、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，确定所述核酸样本的核酸序列进一步包括：

针对所述核酸样本，构建核酸测序文库；以及

对所述核酸测序文库进行测序，以便获得由多个测序数据构成的测序结果，任选地，采用选自 Hiseq2000、SOLiD、454 和单分子测序装置的至少一种对所述核酸测序文库进行测序，

任选地，针对所述核酸样本，构建核酸测序文库进一步包括：

利用 *SYNJ1* 基因外显子特异性引物，对所述核酸样本进行 PCR 扩增；以及

针对所得到的扩增产物，构建所述核酸测序文库，

任选地，所述特异性引物具有如 SEQ ID NO：3-4 所示的核苷酸序列。

6、一种筛选易患早发性帕金森病的生物样品的系统，其特征在于，包括：

核酸提取装置，所述核酸提取装置用于从所述生物样品提取核酸样本；

核酸序列确定装置，所述核酸序列确定装置与所述核酸提取装置相连，用于对所述核酸样本进行分析，以便确定所述核酸样本的核酸序列；

判断装置，所述判断装置与所述核酸序列确定装置相连，以便基于所述核酸样本的核酸序列与 SEQ ID NO：1 相比，是否具有 c.773G>A 突变，判断所述生物样品是否易患早发

性帕金森病，

任选地，所述核酸提取装置进一步包括：

RNA 提取单元，所述 RNA 提取单元用于从所述生物样品提取 RNA 样本；以及

反转录单元，所述反转录单元与所述 RNA 提取单元相连，用于对所述 RNA 样本进行反转录反应，以便获得 cDNA 样本，所述 cDNA 样本构成所述核酸样本。

7、根据权利要求 6 所述的系统，其特征在于，所述核酸序列确定装置进一步包括：

文库构建单元，所述文库构建单元用于针对所述核酸样本，构建核酸测序文库；以及

测序单元，所述测序单元与所述文库构建单元相连，用于对所述核酸测序文库进行测序，以便获得由多个测序数据构成的测序结果，

任选地，所述文库构建单元进一步包括：

PCR 扩增模块，所述 PCR 扩增模块中设置有 *SYNJ1* 基因外显子特异性引物，以便利用所述特异性引物，对所述核酸样本进行 PCR 扩增，

任选地，所述特异性引物具有如 SEQ ID NO：3-4 所示的核苷酸序列，

任选地，所述测序单元包括选自 HISEQ2000、SOLiD、454 和单分子测序装置的至少一种。

8、一种用于筛选易患早发性帕金森病的生物样品的试剂盒，其特征在于，含有：

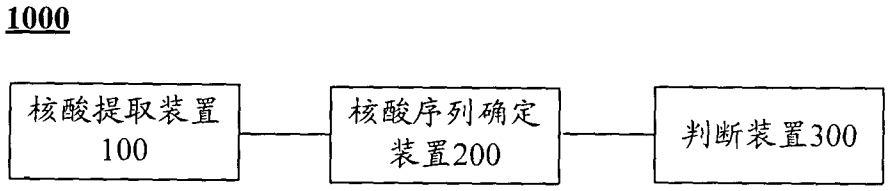
适于检测 *SYNJ1* 基因突变体的试剂，其中与 SEQ ID NO：1 相比，所述 *SYNJ1* 基因突变体具有 c.773G>A 突变，

任选地，所述试剂为核酸探针或引物，

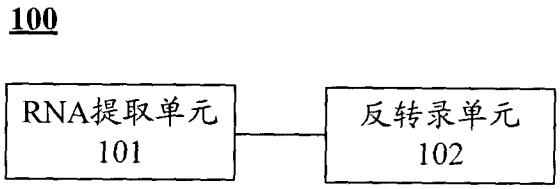
任选地，所述核酸探针或引物具有如 SEQ ID NO：3-4 所示的核苷酸序列。

9、一种构建体，其特征在于，包含权利要求 1 所述的分离的编码 SYNJ1 突变体的核酸。

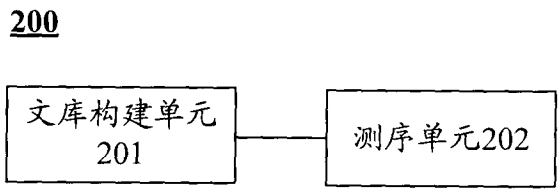
10、一种重组细胞，其特征在于，所述重组细胞是通过权利要求 9 所述的构建体转化受体细胞而获得的。


1000
核酸提取装置
100
核酸序列确定
装置200
判断装置300

A


100
RNA提取单元
101
反转录单元
102

B


200
文库构建单元
201
测序单元202

C

图 1

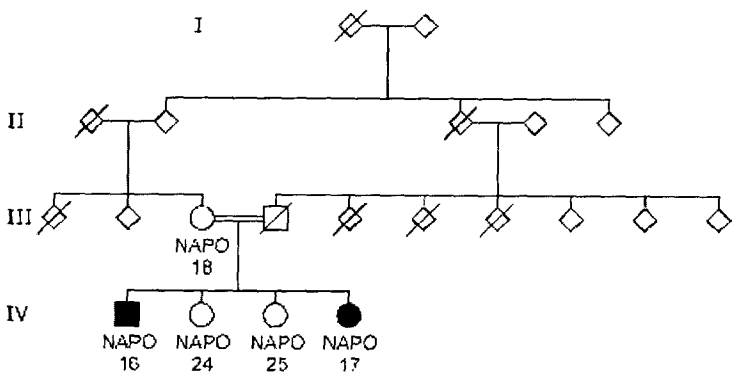
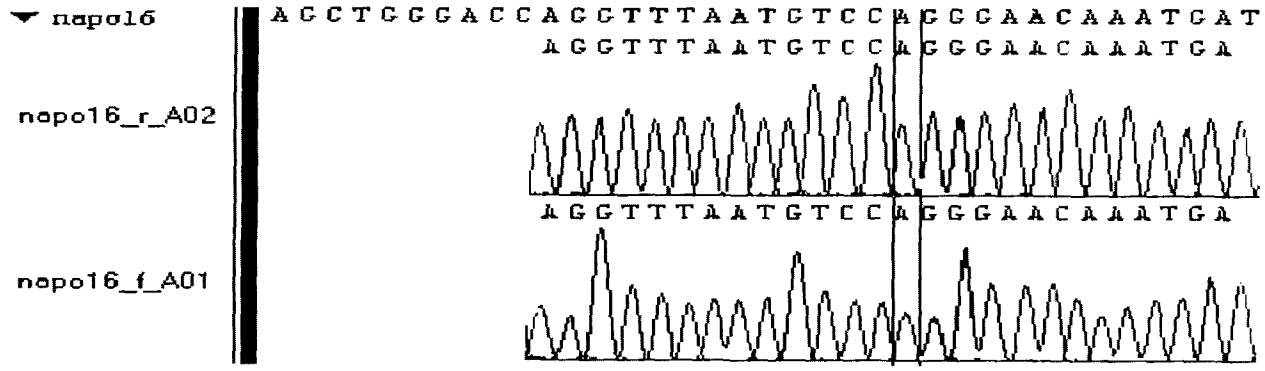
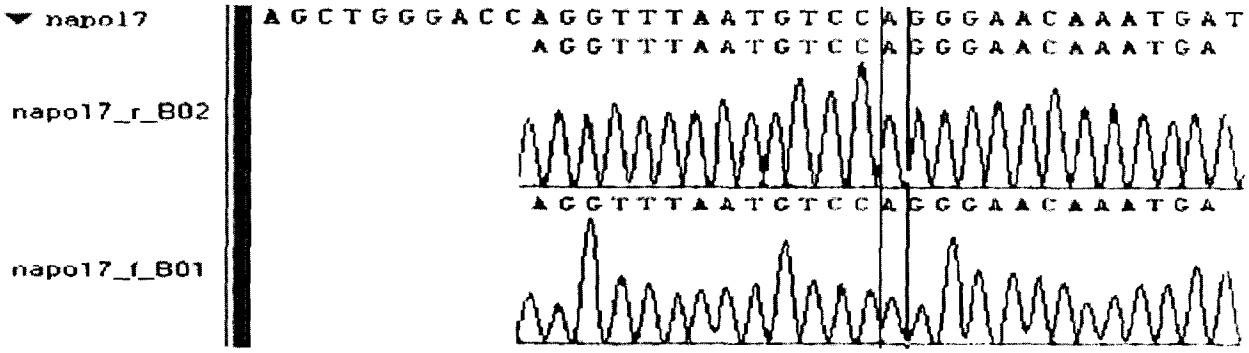

I
II
III
NAPO
18
IV
NAPO
16
NAPO
24
NAPO
25
NAPO
17

图 2

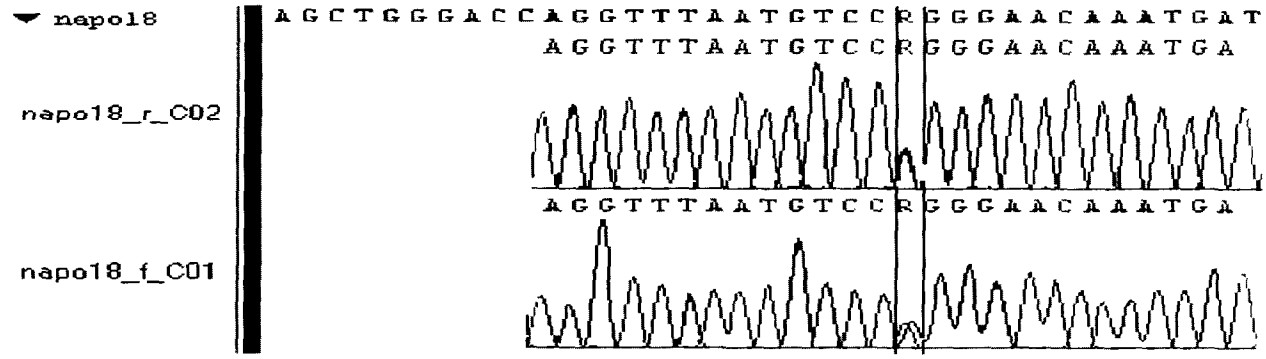
患者 NAPO-16（c.773G>A 纯合突变）



患者 NAPO-17（c.773G>A 纯合突变）



家系内正常人 NAPO-18（c.773G>A 突变杂合携带者）



家系内正常人 NAPO-24（c.773G>A 突变杂合携带者）

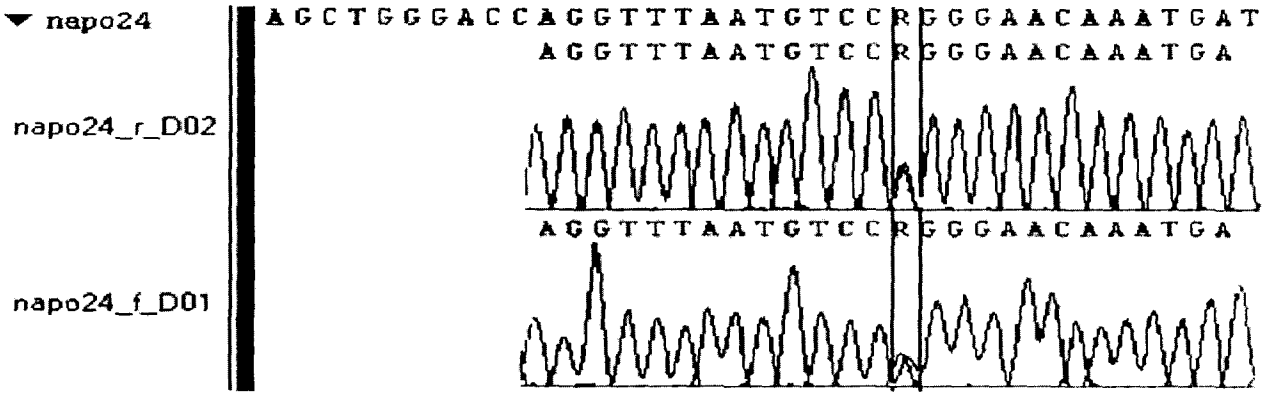
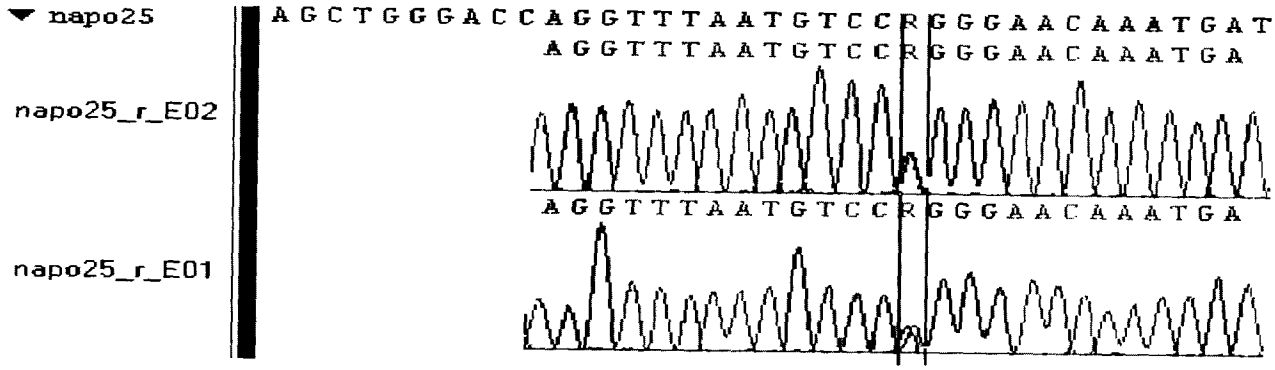


图 3

家系内正常人 NAPO-25（c.773G>A 突变杂合携带者）



对照：家系外正常人（无突变）

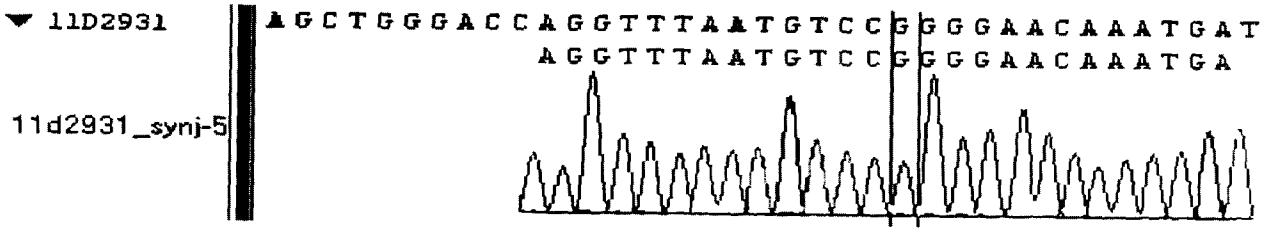


图 3（续）

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/077207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07H 21/-; C07K 14/-; C12Q 1/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI; EPODOC; CNPAT; CNKI; PubMed; ISI web of knowledge; GenBank; EMBL-Bank: EOP, SYNJ1, synaptojanin, 773C>T, Arg258Gln, R258Q, early-onset parkinson, parkinson, PD

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1519378 A (CHINESE NATIONAL HUMAN GENOME CENTRE AT SHANGHAI), 11 August 2004 (11.08.2004), description, page 1, line 5 to 7th line from the bottom	1-10
A	GenBank: NP_003886.3. synaptojanin-1 isoform a [Homo sapiens], MCINTIRE, L.B. et al., 17 April 2013 (17.04.2013), pages 1-3	1-10
A	CHANDRASEKARAN, S. et al, A Network View on Parkinson's Disease, COMPUTATIONAL AND STRUCTURAL BIOTECHNOLOGY JOURNAL, April 2013, vol. 7, no. 8, pages 1-18	1-10
A	US 2010/0166880 A1 (PLAITAKIS, A.), 01 July 2010 (01.07.2010), the whole document	1-10
A	MCINTIRE, L.B.J. et al., Reduction of Synaptojanin 1 Ameliorates Synaptic and Behavioral Impairments in a Mouse Model of Alzheimer's Disease, THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE, 31 October 2012, vol. 32, no. 44, pages 15271-15276	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 February 2014 (24.02.2014)	**20 March 2014 (20.03.2014)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **PAN, Hao** Telephone No.: (86-10) **82245455**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/077207

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1519378 A	11.08.2004	None	
US 2010/0166880 A1	01.07.2010	US 8361728 B2	29.01.2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/077207

CONTINUATION OF BOX A ON SECOND SHEET: CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

C07H 21/04 (2006.01) i

C07K 14/435 (2006.01) i

C12Q 1/68 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2013/077207

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07H 21/-;C07K 14/-;C12Q 1/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

WPI; EPODOC; CNPAT; CNKI; PubMed; ISI web of knowledge; GenBank; EMBL-Bank; 早发性帕金森病, EOP, 帕金森, PD, SYNJ1, synaptojanin, 773C>T, Arg258Gln, R258Q, early-onset parkinson, parkinson, PD

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN1519378A (上海人类基因组研究中心) 11.8 月 2004 (11.08.2004) 说明书第 1 页第 5 行至倒数第 7 行	1-10
A	GenBank: NP_003886.3, synaptojanin-1 isoform a [Homo sapiens], MCINTIRE, L. B. 等, 17. 4 月 2013 (17.04.2013), 第 1-3 页	1-10
A	SREEDEVI, Chandrasekaran 等. A Network View on Parkinson’s Disease. Computational and Structural Biotechnology Journal. 4 月 2013, 第 7 卷, 第 8 期, 第 1-18 页	1-10
A	US2010/0166880A1 (PLAITAKIS, Andreas) 01.7 月 2010 (01.07.2010) 全文	1-10
A	MCINTIRE, Laura Beth J.等. Reduction of Synaptojanin 1 Ameliorates Synaptic and Behavioral Impairments in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. The Journal of Neuroscience. 31. 10 月 2012, 第 32 卷, 第 44 期, 第 15271-15276 页	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
24.2 月 2014（24.02.2014）	**20.3 月 2014 (20.03.2014)**
ISA/CN 的名称和邮寄地址： 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号：　(86-10)62019451	受权官员 **潘浩** 电话号码：(86-10) **82245455**

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/077207

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1519378 A	11.08.2004	无	
US 2010/0166880 A1	01.07.2010	US 8361728 B2	29.01.2013

续第 2 页 A 栏主题的分类：

C07H 21/04 (2006.01) i

C07K 14/435 (2006.01) i

C12Q 1/68 (2006.01) i