



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1548552 B

(45) 授权公告日 2010.06.16

(21) 申请号 03136093.9

(22) 申请日 2003.05.20

(73) 专利权人 北京大学精神卫生研究所  
地址 100083 北京市海淀区花园北路 51 号

(72) 发明人 张岱 杨建中

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 黄健

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(56) 对比文件

李飞等. 精神分裂症患者核心家系的 5-羟色胺 2A 受体基因的传递 / 不平衡检验分析. 中华精神科杂志第 34 卷 第 4 期. 2001, 第 34 卷 (第 4 期), 第 201-203 页.

周儒伦等. 151 个精神分裂症家系中多巴胺

D3 受体基因 Ser9 Gly 多态的传递不平衡研究. 北京医科大学学报第 32 卷 第 5 期. 2000, 第 32 卷 (第 5 期), 第 455-457 页.

审查员 魏春宝

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 2 页

(54) 发明名称

精神分裂症易感基因检测方法及其易感基因和用途

(57) 摘要

本发明提供了精神分裂症易感基因 NRG1 基因的检测方法, 体外检测试验者精神分裂症易感性的方法以及精神分裂症易感基因 NRG1 基因和用途。本发明提供的检测精神分裂症易感基因的方法为通过聚合酶链式反应 - 直接测序法和 / 或聚合酶链式反应 - 限制性片段长度多态性分析方法体外检测 NRG1 基因序列, 其中有位于第二个外显子第 12 位的 rs3924999 多态性位点和 / 或位于第五个内含子的 rs2954041 多态性位点。本发明满足了本领域对于正确识别精神分裂症易感基因的需求, 为精神分裂症的深入研究和防治, 甚至诊断治疗提供了新的思路。

1. 检测精神分裂症易感性的试剂盒,其包括:

1) 引物:扩增 neu 基因调节剂 1 基因 rs3924999 多态性的引物分别为:

AACTGGTTTCACACCGAAGGAC;

CCAAGATGAGATCCATTTTCGC;

扩增 neu 基因调节剂 1 基因 rs2954041 多态性的引物分别为:

TGACATTATTCATTGTTTGTTGCTGA;

GGATGCCATGGATATACTATGCAGA;

2) PCR 扩增酶和限制性内切酶 MunI 和 TruII,以及相应缓冲液;

3) dNTP;

4) 所述多态性位点酶切图谱。

## 精神分裂症易感基因检测方法及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及精神分裂症易感基因检测方法,体外检测试验者精神分裂症易感性的方法以及精神分裂症易感基因和用途,具体的说,本发明涉及精神分裂症易感基因 NRG1 基因多态性位点的检测方法,体外检测试验者精神分裂症易感性的方法以及精神分裂症易感基因 NRG1 基因和用途。

### 背景技术

[0002] 据 1999 年底,我国卫生部的统计资料显示:按伤残所调整的生命年限指标,评价各类疾病在我国疾病社会负担中所占的比例,精神疾患约占疾病总负担的 1/5,已超过心血管、呼吸系统及恶性肿瘤等疾患,排名居首位。精神分裂症发病率仅次于抑郁症,占整个精神疾患的第二位。精神分裂症的症状包括:思维紊乱、狂想以及情绪与行动改变等。

[0003] 一个世纪以来,人们对精神疾病的生理、生化、影像、药物治疗以及社会家庭、环境等方面的观察,对精神疾病的发病机理作出了各种假说和推断。随着科技的进步,人们越来越认识到基因缺陷是许多严重精神疾病产生的重要原因,人在遇到心理和社会环境压力时,那些携带疾病易感基因的人比不携带疾病易感基因的人更可能罹患精神卫生疾患。遗传因素还基本上得到家系、双生子及寄养子的流行病学调查结果的支持,80 年代后期,对精神疾病遗传流行病学的大规模调查,更充分显示了精神疾病的遗传基础。在科技日益发展的今天如何对精神疾患,尤其是精神分裂症,如何从遗传角度检测易感基因以及个体的疾病易感性,以至于进行进一步风险预测和诊断治疗,成为广大科技人员和医疗卫生人员面临的严峻问题。尽管国内外疾病易感基因研究开展多年,但尚未取得突破性进展,鲜有价值的研究结果。对于怎样鉴定遗传易感基因以及鉴定试验者的遗传易感性,本领域一直缺乏全面、系统、有效的识别方法,对于精神分裂症易感性的研究成果更少。

[0004] 最近基因组扫描结果提示,8p22-21 是精神分裂症的易感区域之一。neu 基因调节剂 1 基因 (Neuregulin 1, NRG1),基因定位于 8p21, genbank 登记号:CI:22048149,全长 216361bp,已知在神经发育、分化、营养和突触可塑性调节及学习记忆中占有重要的作用,为一种多功能因子。

### 发明内容

[0005] 针对上述问题,本发明提供一种检测精神分裂症易感基因的方法,从而,满足了本领域对于正确识别精神分裂症易感基因的需求,为精神分裂症的深入研究和防治,甚至诊断治疗提供了新的思路。

[0006] 本发明同时提供了一种体外检测试验者精神分裂症易感性的方法。

[0007] 本发明还提供了按照本发明的方法制备而成的试剂盒。

[0008] 另一方面,本发明进一步提供了一种精神分裂症易感基因。

[0009] 本发明提供的体外检测精神分裂症易感基因的方法还可以用于精神分裂症的预防、诊断和治疗。

[0010] 本发明提供的体外检测试验者精神分裂症易感性的方法可以用于精神分裂症的患病风险预测、诊断和治疗。

[0011] 本发明提供的本发明的精神分裂症易感基因可以用于精神分裂症的预防、诊断和治疗。

[0012] 本发明通过大样本的统计分析,研究了 NRG1 基因序列第二个外显子第 12 位的 rs3924999 多态性位点和第五个内含子的 rs2954041 多态性位点在精神分裂症核心家系的等位基因频率,并根据父母基因型在患病子女中的传递情况,进行传递不平衡检验 (TDT) 和单体型分析。结果发现,全部样本的基因型分布和等位基因频率均符合 Hardy-Weinburg 平衡;经过 Bonferroni 法矫正后,两个多态性位点的 TDT 分析仍然有显著的统计学显著性;单个单体型分析也显示在患者中 AG 单体型传递过多,差异有显著型;从而以试验证明了 NRG1 基因序列的 rs3924999 多态性位点和 / 或 rs2954041 多态性位点影响精神分裂症的易感性,其中 NRG1 基因序列中 rs3924999 多态性位点和 / 或 rs2954041 多态性位点为精神分裂症易感基因。

[0013] 因此,本发明提供了一种检测精神分裂症易感基因的方法,该方法为通过聚合酶链式反应-直接测序法和 / 或聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析方法体外检测 NRG1 基因序列,其中有位于 NRG1 基因第二个外显子第 12 位的 rs3924999 多态性位点和 / 或位于第五个内含子的 rs2954041 多态性位点。

[0014] 所谓“基因多态性”指的是在人群中,各个体基因的核苷酸序列存在的差异。本领域普通技术人员已知,本发明所述的多态性位点为单核苷酸多态性 (SNP) 位点,即基因组序列中单个核苷酸发生改变;核苷酸序列的差异可以体现在 DNA 水平上或者 RNA 水平上,所以,可以通过检测 DNA、RNA 检测多态性,优选 DNA,更优选基因组 DNA。

[0015] 本领域技术人员已知,可以用多种技术在 DNA 水平上体外检测 NRG1 基因序列的多态性位点。可以经与用放射性标记的反义 RNA 或 DNA 探针与扩增后的 DNA 序列杂交,以鉴别点多态性。也可以基于已知的核苷酸顺序的改变,合成正常的和多态性的 PCR 引物,在聚合酶链式反应 (PCR 反应) 的底物中加入荧光标记的核苷酸,根据反应产物中是否有荧光出现,确定在扩增所用的引物中是否有碱基变化,从而检测多态性。通过 DNA 直接测序可以直接揭示对照基因和携带多态性基因之间的序列差异。当与 PCR 结合使用时,这种方法的灵敏度大大提高。例如,将测序引物和双链 PCR 产物或者不对称扩增法产生的单链模板分子一起使用。各种 DNA 及 DNA 片段的核苷酸序列的测定也可用常规方法如双脱氧链终止法 (Sanger 等人,PNAS,1977,74 :5463-5467)。此外,核苷酸序列测定也可用商业测序试剂盒或自动测序仪等。常规的自动测序法用放射性标记或荧光标记来确定核酸序列。

[0016] 由于基因多态性,导致限制性内切酶酶切位点改变、消失或产生新的位点,若用某种限制性内切酶酶切基因组 DNA,则酶切后产生与正常基因组不同长度的 DNA 片段,经用适当的探针杂交检测,就可检测这些条带的位置和大小。聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLP) 方法的原理为:在设计 PCR 扩增实验时,引物位于基因多态性部位的两侧,现将目的基因扩增,使其易于检测,由于多态性引起已有的限制性内切酶位点改变,则可用相应的限制性内切酶酶切扩增产物,再进行琼脂糖凝胶电泳观察,根据产物片段大小或数量与正常对照作出判断。本发明优选采用聚合酶链式反应-直接测序法,聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析方法。更优选聚合酶链式反应-限制性片段长度

多态性分析方法。

[0017] 在本发明的一个实施方式中,利用聚合酶链式反应-限制性片断长度多态性分析方法检测精神分裂症易感基因的方法,所述多态性分析方法包括:

[0018] A:提取 DNA,在 rs3924999 多态性位点和 / 或 rs2954041 多态性位点附近设计 PCR 引物,进行 PCR 反应;

[0019] B:针对上述多态性位点,利用限制性内切酶进行酶切;

[0020] C:凝胶电泳分离与鉴定酶切结果;

[0021] 其中,rs3924999 多态性位点和 / 或 rs2954041 多态性位点为精神分裂症易感性等位基因。

[0022] 本发明所述的检测精神分裂症易感基因的方法,可以进一步包括在多态性分析之后,利用传递不平衡检验分析 NRG1 基因的等位基因的传递频率和单体型传递频率,具有显著性差异为精神分裂症易感基因。如实施例 1 所述,本发明对 246 个家系(每例都含有血缘关系的父母双亲和 1 个患病子/女)中的 2 个单核苷酸多态性位点进行了单体型频率分析。结果得出,经过 Bonferroni 法矫正后,两个多态性位点的 TDT 分析仍然有统计学显著性(rs3924999 : $X^2 = 9.0905$ ,  $P = 0.005168$ ;rs2954041 : $X^2 = 22.0458$ ,  $P = 0.0006206$ );单个单型型的分析也显示在患者中 AG 单体型传递过多,差异有显著性( $X^2 = 26.114$ , 自由度 = 1,  $p < 0.00001$ )。

[0023] 本发明同时提供了一种体外检测试验者精神分裂症遗传易感性的方法,该方法为检测试验者 NRG1 基因序列 rs3924999 和 / 或 rs2954041 多态性,其中 rs3924999 位点核苷酸传递 G,和 / 或 rs2954041 位点核苷酸传递 T 的试验者,为精神分裂症易感性高者。

[0024] 这里所说的“遗传易感性”是指由遗传决定的易于罹患某种(某类)疾病的倾向性(susceptibility),即过去人们常谓的“素质”(diathesis)。遗传易感基因的存在,是遗传易感性的基础。人在遇到心理和社会环境压力时,那些携带精神分裂症易感基因的人比不携带易感基因的人更可能罹患精神分裂症疾患。

[0025] 含有待测 NRG1 基因序列的样品可以从来自试验者的细胞获得,如来自血液、尿、唾液、胃液、头发,活组织检查和尸体解剖材料的细胞。优选来自血液。

[0026] 通过本发明大样本的统计分析,可以单独使用本发明的方法,即检测试验者 NRG1 基因序列 rs3924999 和 / 或 rs2954041 多态性来检测相关精神分裂症遗传易感性,同时,本领域技术人员已知,精神分裂症的发生、发展是多因素共同作用的结果,遗传易感性也有其自身的复杂性,所以本发明也可以与其它方法联合使用,以达到检测精神分裂症易感性的目的。

[0027] 本发明提供的体外检测试验者精神分裂症遗传易感性的方法,检测 NRG1 基因序列 rs3924999 和 / 或 rs2954041 多态性的方法可以采用上述检测基因序列的多态性位点的方法,例如直接测序法,限制性片断长度多态性分析方法。优选聚合酶链式反应-直接测序法,聚合酶链式反应-限制性片断长度多态性分析方法,更优选聚合酶链式反应-限制性片断长度多态性分析方法。

[0028] 在本发明的一个实施方式中,利用聚合酶链式反应-限制性片断长度多态性分析方法检测试验者精神分裂症易感性,其中所述多态性分析方法包括:

[0029] A:提取试验者 DNA,在 rs3924999 多态性位点和 / 或 rs2954041 多态性位点附近

设计 PCR 引物,进行 PCR 反应;

[0030] B:针对上述多态性位点,利用限制性内切酶进行酶切;

[0031] C:凝胶电泳分离与鉴定酶切结果。

[0032] 本发明还提供一种用于检测精神分裂症易感性的试剂盒。所述试剂盒内装有一个或多个容器,容器内装有用以检测 NRG1 基因序列 rs3924999 和 / 或 rs2954041 多态性的一种或多种组分。按照具体检测方法及检测多态性位点的不同,试剂盒可含有不同组分。与之同时提供的可以是经政府药物管理机构审核的、有关药品或生物制品制造、使用及销售的信息。优选含有利用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析方法,检测 NRG1 基因序列 rs3924999 和 rs2954041 多态性的组分:

[0033] 1) 扩增 rs3924999 多态性位点和 / 或 rs2954041 多态性位点的引物;

[0034] 2) PCR 扩增酶,酶切多态性位点相应的限制性内切酶,及相应缓冲液;

[0035] 3) dNTP;

[0036] 4) 所述多态性位点酶切图谱。

[0037] 本领域普通技术人员已知,上述扩增引物,可以依据已知的核苷酸序列设计,通常为 15-30 个碱基,GC 含量为 45% -50% 左右,在适当的温度下与模板特异性结合,其可以利用专门的计算机程序设计,例如 (OLIGO 4.06 引物分析软件);如本发明实施例 1 所示,

[0038] 扩增 rs3924999 多态性的引物可以分别为:

[0039] AACTGGTTTCACACCGAAGGAC;(SEQ ID No3)

[0040] CCAAGATGAGATCCATTTTCGC;(SEQ ID No4)

[0041] 扩增 rs2954041 多态性的引物可以分别为:

[0042] TGACATTATTCATTGTTTGTGCTGA;(SEQ ID No5)

[0043] GGATGCCATGGATATACTATGCAGA;(SEQ ID No6)

[0044] 所述的 TagDNA 聚合酶可以是 Klenow 片段,Tth DNA 聚合酶,VENT DNA 聚合酶等能够用于 PCR 扩增的酶。酶切多态性位点相应的限制性内切酶本领域普通技术人员也可以按照已知技术设计,例如,按照实施例 1 中所述的可以分别为限制性内切酶 MunI 和 TruII,限制性内切酶确定后,与之相对的内切图谱也相应确定。

[0045] 本发明同时提出一种精神分裂症易感基因,其为 NRG1 基因序列,并且有一位位于 NRG1 基因第二个外显子第 12 位的 rs3924999 多态性位点,和 / 或位于第五个内含子的 rs2954041 多态性位点。本发明 NRG1 基因的多态性可以表现在 DNA 水平或 RNA 水平。优选 DNA,更优选基因组 DNA。

[0046] 本发明提供的体外检测精神分裂症易感性的方法可以用于精神分裂症的预防、诊断和治疗。

[0047] 本发明提供的体外检测试验者精神分裂症易感基因的方法可以用于精神分裂症患病风险预测、诊断和治疗。

[0048] 本发明提供的精神分裂症易感基因可以用于精神分裂症的预防、诊断和治疗。

## 附图说明

[0049] 图 1 显示 NRG1 基因的基因示意图,其中黑色条形框代表外显子,白色条形框代表内含子,箭头所指为单核苷酸多态性位点 (SNP) 所在位置。

[0050] 图 2 显示利用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析方法检测试验者精神分裂症易感性的流程图。

[0051] 图 3 显示多态性位点 rs3924999 位点的酶切图,其中,1 为 100bp 分子量标准(marker),2 为 246/65/181 杂合子,3 为 246 纯合子,4 为 65/181 纯合子。

[0052] 图 4 显示多态性位点 rs2954041 位点的酶切图,其中,1 为 25bp 分子量标准(marker),2 为 60/127 纯合子,3 为 29/31/60/127 杂合子,4 为 29/31/127 纯合子。

## 具体实施方式

[0053] 实施例 1

[0054] 1. 研究对象

[0055] 此阶段的研究对象均为 2001 年-2002 年在北京大学精神卫生研究所门诊和住院部进行诊治的患者,和前一阶段的样本合并后共有精神分裂症核心家系 246 例(每例都含有血缘关系的父母双亲和 1 个患病子/女),均为汉族。所有患者都符合国际疾病分类手册第 10 版(ICD-10)中精神分裂症的诊断标准,并接受了结构式临床访谈。在患者中,男性为 138 例(56%),女性 108 例(44%),平均年龄为 29 岁。平均病程为 5 年。

[0056] 所有研究对象都签署了知情同意书。该研究得到北京大学医学部伦理委员会批准。

[0057] 2. 方法

[0058] 用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-based RFLP)分析方法检测所有研究对象 2 个多态性位点 rs3924999、rs2954041 的基因型。流程参见附图 2。

[0059] 2.1 血液标本的采集及处理

[0060] 所有患者都抽取了外周静脉血 5-10ml,置于抗凝管中,于 4℃冰箱保存,1 周内提取基因组 DNA。

[0061] 2.2 基因组 DNA 的提取及鉴定

[0062] 2.2.1 基因组 DNA 的提取

[0063] 在前一阶段基因组 DNA 的提取中,需要 5ml 血液,未能留下部分血液冻存。为了减少血液用量,此阶段的提取用基因组 DNA 抽提纯化试剂盒(上海华舜生物工程有限公司,血液基因组 DNA 抽提纯化试剂盒)完成。方法如下:在 5ml 离心管中加入 1ml 含抗凝剂的新鲜全血,再加入 3ml 预冷的 1\*BP(红细胞裂解液)液,来回颠倒离心管以彻底混匀。冰浴 10 分钟后,4500g 离心 2 分钟,将上层液体彻底吸出,在离心管中加入 1ml 预冷的 1\*BP(红细胞裂解液)液。彻底混匀后,4500g 离心 2 分钟,将上层液体彻底吸出。在沉淀中加入 200  $\mu$ l DT(悬浮液)液,彻底振荡悬浮。加入 400  $\mu$ l DL(裂解液)液和 25  $\mu$ l 蛋白酶 K,迅速振荡混匀,置 65℃温浴 15-30 分钟,期间来回颠倒离心管多次。加入 400  $\mu$ l 异丙醇,剧烈颠倒离心管使溶液混匀后,移取 600  $\mu$ l 至吸附柱中,离心 30 秒,弃去收集管中的液体,将吸附柱放入同一个收集管中,将剩余的全部移至吸附柱中,离心 30 秒。弃掉收集管中的液体,将吸附柱放入同一个收集管中。加入 500  $\mu$ l W1(洗涤液)液,静置 1 分钟后,离心 30 秒。将吸附柱移入另一个干净的收集管中,加入 500  $\mu$ l W1 液,离心 15 秒。弃掉收集管中的液体,再将吸附柱放入同一个收集管中,离心 1 分钟。将吸附柱移入一个干净的 1.5ml 离心管中,在吸附膜中央加入 100  $\mu$ l T1(洗脱液)液,65℃静置 5 分钟后,离心 1 分钟。加入 60  $\mu$ l T1

液,离心 1 分钟。将 1.5ml 离心管 (DNA) 放于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

[0064] 2.3 目的片段的扩增

[0065] 2.3.1 聚合酶链式反应 (PCR)

[0066] 25- $\mu\text{l}$  的 PCR 扩增反应体系如下:10mM Tris-HCl (pH8.3),50mM KCl,1.5mM 氯化镁,200  $\mu\text{M}$  每种 dNTP,0.4  $\mu\text{M}$  引物,1.0U Taq DNA 聚合酶,30-50ng 基因组 DNA。PCR 扩增反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 分钟,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 秒,55 $^{\circ}\text{C}$  -62 $^{\circ}\text{C}$  退火 40 秒,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 分钟,35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$  后延伸 7 分钟。

[0067] 2.3.2 引物

[0068] 通过生物信息学的检索,分别选取了 NRG1 基因上的 2 个单核苷酸多态性位点:rs3924999 和 rs2954041,具体资料见表 1。

[0069] 表 1 2 个 SNPs 引物的序列及相关信息

[0070]

SNP	引物序列 (5' → 3')	产物 (bp)	退火温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	内切酶	等位基因 (bp)	
					A	G
rs3924999	AACTGGTTTCACACCGAAGGAC (SEQ ID No 3) CCAAGATGAGATCCATTTTCGC (SEQ ID No 4)	246	55	MunI	65/181	246
rs2954041	TGACATTATTCATTGTTTGTGCTGA (SEQ ID No 5) GGATGCCATGGATATACTATGCAGA (SEQ ID No 6)	187	62	TruI	60/127	29/31/127

[0071] 2.3.3 PCR 产物的全序列

[0072] rs3924999:参见 (SEQ ID No 1)

[0073] rs2954041:参见 (SEQ ID No 2)

[0074] 2.4 多态性位点在基因上的位置

[0075] rs3924999 位于 NRG1 基因的第二外显子第 12 位 (G38A), rs2954041 位于第五内含子,具体位置见图 1。

[0076] 2.5 限制性片段长度多态性分析

[0077] 2.5.1 限制性内切酶酶切反应

[0078] 取 15  $\mu\text{l}$  PCR 产物置于 5  $\mu\text{l}$  内切酶及酶切缓冲液体系中,于 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱过夜反应。

[0079] 2.5.2 琼脂糖凝胶电泳分离、鉴定

[0080] 取 6-8  $\mu\text{l}$  酶切产物,用 3% 琼脂糖凝胶电泳分离目的片段,经凝胶成相系统扫描后读取基因型。

[0081] 结论:

[0082] 如图 3 所示,为 3% 琼脂糖凝胶电泳后,多态性位点 rs3924999 位点的酶切图,其中,1 为 100bp 分子量标准 (marker),2 为 246/65/181 杂合子,3 为 246 纯合子,4 为 65/181 纯合子。

[0083] 如图 4 所示,为 3%琼脂糖凝胶电泳后,多态性位点 rs2954041 的酶切图,其中 1 为 25bp marker,2 为 60/127 纯合子,3 为 29/31/60/127 杂合子,4 为 29/31/127 纯合子。

[0084] 2.6 统计学分析

[0085] 遗传统计数理分析

[0086] 用传递不平衡检验 (the transmission disequilibrium test, TDT) 分析所有精神分裂症核心家系中等位基因与疾病的关系,分析过程与第一阶段研究相同。在以连锁不平衡为基础的关联研究中,由于单体型比单个的 SNP 位点更精确,而且具有更高的统计效力,因此本发明用 2 个单核苷酸多态性位点进行了单体型频率的分析。单体型频率采用 TRANSMIT 软件 (2.5.2) 进行分析。在多次统计分析后,用 Bonferroni 法进行矫正。

[0087] 结果:

[0088] 1. 三个 SNPs 基因型分布和等位基因频率

[0089] 表 2NRG1 基因 2 个多态性位点的基因型分布和等位基因频率

[0090]

	基因型分布 (%)	等位基因频率 (%)
rs3924999	GGGAAA	GA
患者	2612694	178 (0.36) 314 (0.64)
父母	33243216	309 (0.31) 675 (0.69)
总数	59369310	487 (0.33) 989 (0.67)
rs2954041	TTTGGG	TG
患者	5113164	233 (0.47) 259 (0.53)
父母	64262166	390 (0.40) 594 (0.60)
总数	115393230	623 (0.42) 853 (0.58)

[0091] 2. 三个 SNPs 的 TDT 检验

[0092] 根据父母基因型在患病子女中的传递情况,在 246 个家系中进行传递不平衡检验 (TDT)。如表 3 所示,经过 Bonferroni 法矫正后,两个多态性位点的 TDT 分析仍然有统计学显著性 (rs3924999 : $X^2 = 9.0905$ ,  $P = 0.005168$ ; rs2954041 : $X^2 = 22.0458$ ,  $P = 0.0006206$ )。

[0093] 表 3NRG1 基因的等位基因的传递不平衡检验

[0094]

SNPs	等位基因	传递	不传递	$X^2$	P 值
Rs3924999	G	145	98	9.0905	0.002584
	A	98	145		
Rs2954041	T	169	93	22.0458	0.0003103
	G	93	169		

[0095] 3. NRG1 基因的单体型分析

[0096] 单体型传递的总体检验显示 NRG1 基因与精神分裂症有较强的关联 ( $X^2 = 33.651$ , 自由度 = 3,  $p < 0.000001$ )。单个单体型的分析也显示在患者中 AG 单体型传递过多, 差异有显著性 ( $X^2 = 26.114$ , 自由度 = 1,  $p < 0.00001$ ) (见表 4)。

[0097] 表 4 NRG1 基因的单体型传递频率分析

[0098]

单体型	观察值	期望值	$X^2$	P 值
总 $X^2$ 检验			33.651	< 0.000001
GT	74.314	52.507	22.032	
GG	103.69	101.99	0.071993	
AT	158.69	142.49	5.1339	
AG	155.31	195.01	26.114	

[0099] 注: GT 为 rs3924999 的 G+rs2954041 的 T; GG 为 rs3924999G+rs2954041 的 G; AT 为 rs3924999 的 A+rs2954041 的 T; AG 为 rs3924999 的 A+rs2954041 的 G。

[0100] 结论:

[0101] 上述试验证明了 NRG1 基因序列的 rs3924999 多态性位点和 / 或 rs2954041 多态性位点影响精神分裂症的易感性, 其中 NRG1 基因序列中 rs3924999 多态性位点和 / 或 rs2954041 多态性位点为精神分裂症易感基因。

[0102] 实施例 2 检测试验者精神分裂症易感性的方法

[0103] 方法

[0104] 用聚合酶链式反应 - 限制性片段长度多态性 (PCR-based RFLP) 分析方法检测试验者 2 个多态性位点 rs3924999、rs2954041 的基因型。

[0105] 主要方法如下:

[0106] 1. 血液标本的采集及处理

[0107] 2. 基因组 DNA 的提取及鉴定

[0108] 3. 目的片段的扩增

[0109] 4. 限制性片段长度多态性分析

[0110] 具体方法参见实施例 1 的 2.1-2.5。

[0111] 其中 rs3924999 位点核苷酸为 G, 和 / 或 rs2954041 位点核苷酸为 T 的试验者, 为精神分裂症易感性高者。

[0112] 实施例 3 体外检测精神分裂症易感基因的试剂盒

[0113] 1) 引物: 扩增 rs3924999 多态性的引物可以分别为:

[0114] AACTGGTTTCACACCGAAGGAC; (SEQ ID No 3)

[0115] CCAAGATGAGATCCATTTTCGC; (SEQ ID No 4)

[0116] 扩增 rs2954041 多态性的引物可以分别为:

- [0117] TGACATTATTCATTGTTTGTGCTGA ;(SEQ ID No 5)  
 [0118] GGATGCCATGGATATACTATGCAGA ;(SEQ ID No 6)  
 [0119] 2)PCR 扩增酶,限制性内切酶 MunI 和 TruI,以及相应缓冲液  
 [0120] 3) dNTP  
 [0121] 4) 所述多态性位点酶切图谱 :  
 [0122]

SNP	等位基因 (bp)	
rs3924999	A 65/181	G 246
rs2954041	G 60/127	T 29/31/127

- [0123] 并说明使用方法如下包括 :  
 [0124] 1. 血液标本的采集及处理  
 [0125] 2. 基因组 DNA 的提取及鉴定  
 [0126] 3. 目的片段的扩增  
 [0127] 4. 限制性片段长度多态性分析  
 [0128] 具体方法参见实施例 1 方法 2. 1-2. 5。  
 [0129] 应理解,在阅读了本发明的上述讲述内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,但改动或修改的等价形式同样落在本申请权利要求书所限定的范围内。  
 [0130] 序列表  
 [0131] <110> 张岱  
 [0132] 北京大学精神卫生研究所  
 [0133] <120> 精神分裂症易感基因检测方法及其易感基因和用途  
 [0134] <130>D0305022F  
 [0135] <160>6  
 [0136] <170>PatentIn version 3.1  
 [0137] <210>1  
 [0138] <211>246  
 [0139] <212>DNA  
 [0140] <213>Homo sapiens(智人)  
 [0141] <400>1  
 [0142] ccaagatgag atccatttct gctcatccat tttgaaattg ttttctctc tgtaataaa 60  
 [0143] accttggaa tgggtccttg atcaggctaa ctccagatta aatgttctc tttgaaagat 120  
 [0144] tgctgtgtga tcagagttgt ttttcattct cttttctct tttagccttg cctccccgat 180  
 [0145] tgaaagagat gaaaagccag gaatcggtc caggttccaa actagtcctt cgggtgtgaaa 240

[0146]	ccagtt	246
[0147]	<210>2	
[0148]	<211>187	
[0149]	<212>DNA	
[0150]	<213>Homo sapiens(智人)	
[0151]	<400>2	
[0152]	tgacattatt cattgtttgt tgctgatgaa tgaacacctt ttcgagtgt gtgttcctt	60
[0153]	taataggcac tggtaattta tgtactaaga tttatttctg tatggaaatt acaagtgaaa	120
[0154]	tttcatattg aatttatatt tagcctgttc tagtacatag tctctgcata gtatatccat	180
[0155]	ggcatcc	187
[0156]	<210>3	
[0157]	<211>22	
[0158]	<212>DNA	
[0159]	<213>artificial(人工序列)	
[0160]	<220>	
[0161]	<223>引物	
[0162]	<400>3	
[0163]	aactggtttc acaccgaagg ac	22
[0164]	<210>4	
[0165]	<211>22	
[0166]	<212>DNA	
[0167]	<213>artificial(人工序列)	
[0168]	<220>	
[0169]	<223>引物	
[0170]	<400>4	
[0171]	ccaagatgag atccattttc gc	22
[0172]	<210>5	
[0173]	<211>26	
[0174]	<212>DNA	
[0175]	<213>artificial(人工序列)	
[0176]	<220>	
[0177]	<223>引物	
[0178]	<400>5	
[0179]	tgacattatt cattgtttgt tgctga	26
[0180]	<210>6	
[0181]	<211>25	
[0182]	<212>DNA	
[0183]	<213>artificial(人工序列)	
[0184]	<220>	

- 
- [0185] <223> 引物
- [0186] <400>6
- [0187] ggatgcatg gatatactat gcaga 25

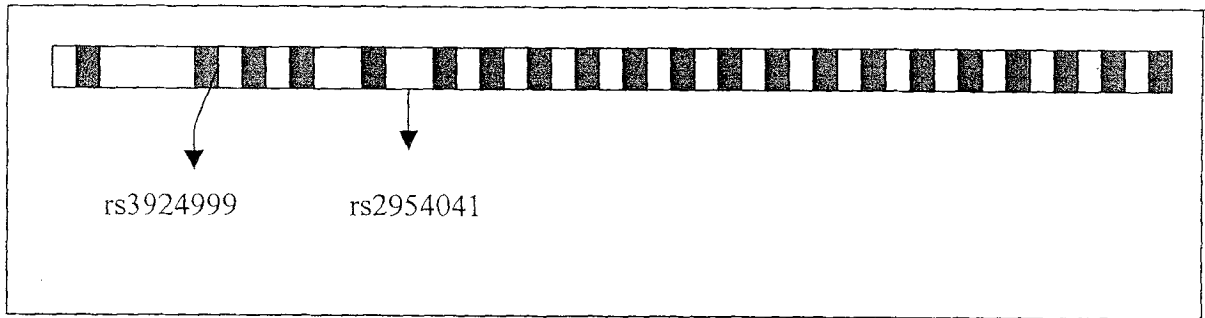


图 1

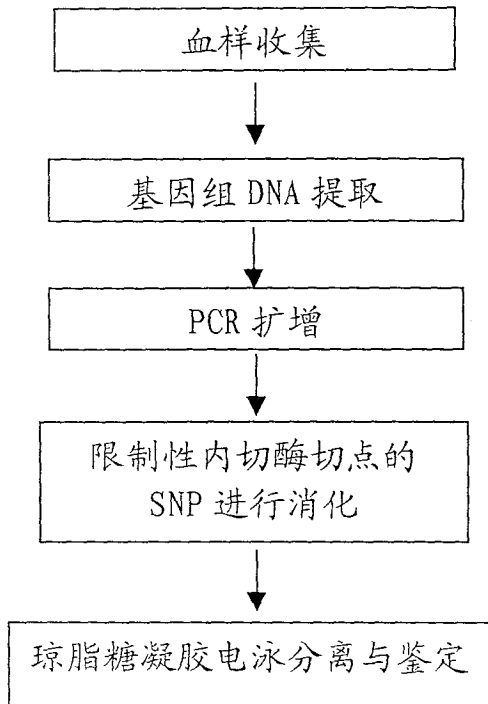


图 2

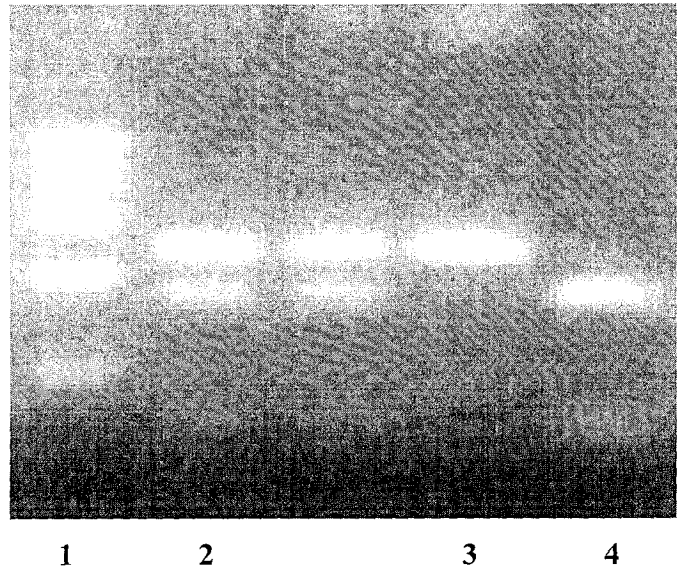


图 3



1 2 3 4

图 4