



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101918552 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 21

(21) 申请号 200880124016. 6

(22) 申请日 2008. 10. 29

(30) 优先权数据

2007-279850 2007. 10. 29 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2008/069654 2008. 10. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02009/057640 JA 2009. 05. 07

(73) 专利权人 独立行政法人理化学研究所

地址 日本埼玉县

(72) 发明人 田中敏博 中村祐辅 尾崎浩一

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 吴娟 郭文洁

(51) Int. Cl.

C12N 15/09(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/15(2006. 01)

G01N 33/50(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1871361 A, 2006. 11. 29, 全文.

《www.ncbi.nlm.nih.gov》. Reference SNP Cluster Report:rs3782886. NCBI Entrez SNP, ACCESSION No. rs3782886. 《www.ncbi.nlm.nih.gov》. 2006, 全文.

《www.ncbi.nlm.nih.gov》. Reference SNP Cluster Report:rs11066001. NCBI Entrez SNP, ACCESSION No. :rs11066001. 《www.ncbi.nlm.nih.gov》. 2003, 全文.

审查员 徐强一

权利要求书 1 页 说明书 13 页
序列表 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称

使用BRCA1相关蛋白(BRAP)基因内单核苷酸多态性判定炎症性疾病的方法

(57) 摘要

本发明的目的是鉴定与心肌梗塞等炎症性疾病的发病进展相关的新型单核苷酸多态性(SNP)。根据本发明,可以提供炎症性疾病的判定方法,该方法包含检测存在于BRCA1相关蛋白(BRAP)基因中的至少一种基因多态性。

1. SEQ ID NO :1 所示的 BRCA1 相关蛋白基因的外显子 5 的核苷酸序列中第 90 号核苷酸的 A/G 多态性序列在制备用于诊断心肌梗塞的试剂盒中的引物和 / 或探针的用途, 该多态性在 NCBI SNP Database 中的登记号为 rs3782886, 其中上述 BRCA1 相关蛋白简称 BRAP。

2. 心肌梗塞诊断用试剂盒, 该试剂盒含有:

下述寡核苷酸的 1 种以上, 所述寡核苷酸可以与连续的至少 10 个核苷酸序列或其互补序列互补, 作为探针用于心肌梗塞的诊断, 其中, 上述连续的至少 10 个核苷酸序列或其互补序列含有 SEQ ID NO :1 所示的 BRCA1 相关蛋白基因的外显子 5 的核苷酸序列中第 90 号核苷酸的 A/G 多态性; 或

下述寡核苷酸的 1 种以上, 所述寡核苷酸可以扩增连续的至少 10 个核苷酸序列和 / 或其互补序列, 作为引物用于心肌梗塞的诊断, 其中, 上述连续的至少 10 个核苷酸序列和 / 或其互补序列含有 SEQ ID NO :1 所示的 BRCA1 相关蛋白基因的外显子 5 的核苷酸序列中第 90 号核苷酸的 A/G 多态性,

其中, 上述 BRCA1 相关蛋白简称 BRAP。

使用 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因内单核苷酸多态性判定炎症性疾病的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及炎症性疾病的诊断方法,该方法包含检测存在于 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因中的基因多态性;还涉及该方法中使用的寡核苷酸、含有该寡核苷酸的炎症性疾病诊断用试剂盒、以及它们的应用。

背景技术

[0002] 即使生活方式变化以及新的药理学研究进展,包括心肌梗塞在内的冠状动脉疾病在很多国家仍成为主要的死亡原因。因此,人们强烈希望能够鉴定其发病中的遗传性以及环境性因子。

[0003] 已知共同(共通)的遗传变异与罹患糖尿病或高血压等生活方式病的危险性显著相关。鉴定多基因性疾病的易感基因可以有利用“连锁”的方法以及利用“相关”的方法。连锁分析是检测疾病易感基因的基因座与基因标记(主要是微卫星)的基因座是否连锁、即,研究基因座之间的关系;而相关性分析是检测特定的基因标记(主要是单核苷酸多态性:SNP)的哪一个态(等位基因)与疾病相关、即,研究等位基因之间的关系。因此可以说,使用共同的变异作为标记的相关性分析比疾病相关基因的局部存在的连锁分析强很多。单核苷酸多态性(SNPs)是研究与疾病的易罹患性或药物反应性相关的基因时有用的多态性标记。SNPs 对基因产物的质或量有直接影响,使某种疾病或药物的严重副作用产生的危险性增加。因此,期待通过研究多个 SNPs,有助于疾病相关基因的鉴定或建立避免药物副作用的诊断方法。

[0004] 关于基因变异与心肌梗塞的关系有以下方法:分析淋巴毒素- α (LT- α) 基因、I Kappa B-like (IKBL) 基因、或 BAT1 基因的多态性,判定心肌梗塞的遗传性因素的方法(WO2004/015100 号公报);分析半乳凝素-2 的多态性,判定心肌梗塞的遗传性因素的方法(国际公开 WO2005/017200 号公报)等。还有人报道了醛脱氢酶 2 基因内的 SNP 与心肌梗塞的相关性(S. Takagi 等人., Hypertens Res. Vol. 25, No. 5 (2002), 677 ~ 681 页)。但是这些报告中,样品数、P 值均不充分,数据的可靠性低。即,该文献中,只是用少量的样品数分析了 ALDH2 的 SNP,因此可以认为是基因分型错误,结果的可靠性低,其显著性也低。如上所述,与心肌梗塞有关的基因变异的研究尚不足够。

[0005] 非专利文献 1:S. Takagi 等人., Hypertens Res. Vol. 25, No. 5 (2002), 677 ~ 681 页

[0006] 专利文献 1:国际公开 WO2004/015100 号公报

[0007] 专利文献 2:国际公开 WO2005/017200 号公报

发明内容

[0008] 发明所要解决的课题

[0009] 本发明要解决的课题是鉴定与心肌梗塞等炎症性疾病的发病进展相关的新型单

核苷酸多态性 (SNP)。本发明进一步要解决的课题是利用鉴定的 SNP, 提供心肌梗塞等炎症性疾病的诊断方法、或炎症性疾病的治疗药物的开发方法。

[0010] 解决课题的方法

[0011] 本发明人等为解决上述课题进行了深入研究, 结果通过鉴定 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因内的单核苷酸多态性 (SNP) 与心肌梗塞的发病进展相关, 完成了本发明。

[0012] 即, 本发明提供以下的发明。

[0013] (1) 炎症性疾病的判定方法, 该方法包含检测存在于 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因中的至少一种基因多态性。

[0014] (2) 炎症性疾病的判定方法, 该方法包含检测存在于 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因中的至少一种单核苷酸多态性。

[0015] (3) 炎症性疾病的判定方法, 该方法包含检测以下任意一种多态性:

[0016] (i) SEQ ID NO:1 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的外显子 5 的核苷酸序列中第 90 号核苷酸的 A/G 多态性 (NCBI SNP Database 中的登记号为 rs3782886);

[0017] (ii) SEQ ID NO:2 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的内含子 3 的核苷酸序列中第 270 号核苷酸的 A/G 多态性 (NCBI SNP Database 中的登记号为 rs11066001); 或

[0018] (iii) 与上述 (i) 或 (ii) 所述的多态性的连锁不平衡的指标 r^2 为 0.8 以上 (优选为 0.9 以上) 的连锁不平衡状态的多态性。

[0019] (4) (1) ~ (3) 中任一项所述的方法, 其中, 炎症性疾病是心肌梗塞。

[0020] (5) 寡核苷酸, 该寡核苷酸可以与连续的至少 10 个核苷酸序列或其互补序列杂交, 在 (1) ~ (4) 中任一项所述的方法中作为探针使用, 其中, 上述连续的至少 10 个核苷酸序列或其互补序列含有 SEQ ID NO:1 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的外显子 5 的核苷酸序列中第 90 号核苷酸的 A/G 多态性、或 SEQ ID NO:2 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的内含子 3 的核苷酸序列中第 270 号核苷酸的 A/G 多态性。

[0021] (6) 寡核苷酸, 该寡核苷酸可以扩增连续的至少 10 个核苷酸序列和 / 或其互补序列, 在 (1) ~ (4) 中任一项所述的方法中作为引物使用, 其中, 上述连续的至少 10 个核苷酸序列和 / 或其互补序列含有 SEQ ID NO:1 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的外显子 5 的核苷酸序列中第 90 号核苷酸的 A/G 多态性、或 SEQ ID NO:2 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的内含子 3 的核苷酸序列中第 270 号核苷酸的 A/G 多态性。

[0022] (7) (6) 所述的寡核苷酸, 其中, 引物是正向引物和 / 或反向引物。

[0023] (8) 炎症性疾病诊断用试剂盒, 该试剂盒含有 (5) ~ (7) 中任一项所述的寡核苷酸的 1 种以上。

[0024] (9) (8) 所述的试剂盒, 其中, 炎症性疾病是心肌梗塞。

[0025] (10) BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的表达状态的分析方法, 该方法包含检测 SEQ ID NO:1 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的外显子 5 的核苷酸序列中第 90 号核苷酸的 A/G 多态性、或 SEQ ID NO:2 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的内含子 3 的核苷酸序列中第 270 号核苷酸的 A/G 多态性。

[0026] (11) 炎症性疾病的治疗药物的筛选方法, 该方法包含以下步骤: 在候选物质的存在下, 分析细胞内的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的表达量或 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的功能, 选择抑制该表达量的物质、或者抑制或修饰该功能的物质。

[0027] (12)BRAP 的转录活性的测定方法,该方法包含将 BRAP 基因片段导入细胞中,培养该细胞,分析该基因的表达,其中,所述 BRAP 基因片段含有 SEQ ID NO :2 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的内含子 3 的核苷酸序列中第 270 号核苷酸的 A/G 多态性。

[0028] (13) 抑制或促进 BRAP 的转录活性的物质的筛选方法,该方法包含将 BRAP 基因片段导入细胞中,在抑制或促进 BRAP 转录活性的候选物质的存在下培养该细胞,分析该基因的表达,其中,所述 BRAP 基因片段含有 SEQ ID NO :2 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的内含子 3 的核苷酸序列中第 270 号核苷酸的 A/G 多态性。

[0029] (14)BRAP 的转录控制因子的筛选方法,该方法包含使 BRAP 基因片段与预想存在 BRAP 的转录控制因子的试样接触,检测上述片段与转录控制因子的结合,其中,所述 BRAP 基因片段含有 SEQ ID NO :2 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的内含子 3 的核苷酸序列中第 270 号核苷酸的 A/G 多态性。

[0030] 发明效果

[0031] 根据本发明,新鉴定了与心肌梗塞等炎症性疾病的发病进展相关的单核苷酸多态性 (SNP)。通过利用本发明鉴定的 SNP,可以提供心肌梗塞等炎症性疾病的诊断方法、或炎症性疾病的治疗药物的开发方法。

附图说明

[0032] 图 1 表示通过 TAP 法鉴定 BRAP (a)、通过 COS7 强制表达系统确认 BRAP 和半乳凝素 -2 的结合 (b)、以及血管平滑肌细胞中半乳凝素 -2 与 BRAP 的共同存在 (c)。

[0033] 图 2 是表示冠状动脉血管平滑肌细胞中的 BRAP 内含子 3A/GSNP 的萤光素酶测定 (a)、冠状动脉血管平滑肌细胞提取液中的 BRAP 内含子 3A/G SNP 区的凝胶移位分析 (b)、冠状动脉血管内皮细胞中的 BRAP、ALDH2 敲除带来的 NF κ B 活性的变化。

具体实施方式

[0034] 本发明中,鉴定出 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因产物与作为心肌梗塞等炎症性疾病易感基因产物而已知的半乳凝素 -2 基因产物结合。通过利用本发明鉴定的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的 SNP,可以得到心肌梗塞等炎症性疾病的新型诊断、预防方法、以及治疗药物的开发。以下对于本发明的实施方案进一步具体说明。

[0035] [1] 炎症性疾病的判定方法

[0036] 本发明的方法是通过检测存在于显示与炎症性疾病相关性的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因中的基因多态性、特别是单核苷酸多态性 (SNPs),来判定炎症性疾病是否发病、或者炎症性疾病发病的可能性的方法。

[0037] 本发明中,“检测存在于 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因中的至少一种基因多态性 (单核苷酸多态性等)”是指:(i) 直接检测该基因多态性 (称为基因侧多态性)、以及 (ii) 检测存在于上述基因的互补序列一侧的基因多态性 (称为互补侧多态性),由该检测结果推定基因侧多态性。但是,基因侧的核苷酸与互补序列一侧的核苷酸并不一定完全是互补的关系,因此更优选直接检测基因侧多态性。

[0038] 存在于 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 2 基因中的基因多态性的优选具体例子有:

[0039] (i) SEQ ID NO :1 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的外显子 5 的核苷酸序列中

第 90 号核苷酸的 A/G 多态性 (NCBI SNP Database 中的登记号为 rs3782886) ;

[0040] (ii) SEQ ID NO :2 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的内含子 3 的核苷酸序列中第 270 号核苷酸的 A/G 多态性 (NCBI SNP Database 中的登记号为 rs11066001) ;或

[0041] (iii) 与上述 (i) 或 (ii) 所述的多态性的连锁不平衡的指标 r^2 为 0.8 以上 (优选为 0.9 以上) 的连锁不平衡状态的多态性。

[0042] 需要说明的是, SEQ ID NO :1 中第 90 号的核苷酸 r 表示为 A 或 G 的任意一种。SEQ ID NO :2 中第 270 号的核苷酸 r 表示为 A 或 G 的任意一种。

[0043] 与上述 (i) 或 (ii) 所述的多态性的连锁不平衡的指标 r^2 为 0.8 以上 (优选为 0.9 以上) 的连锁不平衡状态的多态性可以是 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因内的该多态性、以及 FLJ30092 基因内的该多态性,还可以是上述 2 种基因以外的基因内的该多态性。其中 FLJ30092 基因是 AF-1 特异性蛋白质磷酸酶基因。

[0044] 与上述 (i) 或 (ii) 所述的多态性的连锁不平衡的指标 r^2 为 0.8 以上 (优选为 0.9 以上) 的连锁不平衡状态的多态性的具体例子有 :FLJ30092 基因内的 SNP (NCBI SNP Database 中的登记号为 is2074356)、醛脱氢酶 2 家族 (ALDH2) 基因内的 2 个 SNP (NCBI SNP Database 中的登记号为 rs671 和 rs4646776) 等。

[0045] 例如,如后述的表 4 所示, SEQ ID NO :1 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的外显子 5 的核苷酸序列中第 90 号核苷酸为 A 时,则可以判定炎症性疾病不发病、或者发病的可能性低。

[0046] 与此相对, SEQ ID NO :1 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的外显子 5 的核苷酸序列中第 90 号核苷酸为 G 时,则可以判定炎症性疾病发病、或发病的可能性高。

[0047] 本发明中,可以使用与上述 (i) 或 (ii) 所述的多态性的连锁不平衡的指标 Δ^2 为 0.8 以上 (优选为 0.9 以上) 的连锁不平衡状态的多态性。

[0048] 假设有 2 个连锁的基因座。假设都存在两个等位基因 (如 SNP 的两个等位基因座 : 双等位基因座), 第一基因座的等位基因称为 1,2、第二基因座的等位基因称为 1,2 (当然第一基因座和第二基因座的等位基因 1 是不同的)。如果第一基因座和第二基因座没有连锁不平衡,则染色体具有第一基因座 1,2 的其中一个、还是第二基因座 1,2 的其中一个,这有四个单元型。各自单元型的频率如下。

[0049] [表 1] 单元型频率

	单元型(第一基因座-第二基因座)	频率
[0050]	1-1	p11
	1-2	p12
	2-1	p21
	2-2	p22

[0051] 这种情况下,各基因座的等位基因 1,2 的频率如下。

[0052] [表 2] 等位基因频率

	等位基因	频率
[0053]	第一基因座的等位基因 1	$p1 \cdot = p11 + p12$
	第一基因座的等位基因 2	$p2 \cdot = p21 + p22 = 1 - p1 \cdot$
	第二基因座的等位基因 1	$p \cdot 1 = p11 + p21$
	第二基因座的等位基因 2	$p \cdot 2 = p12 + p22 = 1 - p \cdot 1$

[0054] “ $\cdot$ ”不是乘积的符号,而是点。“ $p1 \cdot$ ”是一个变数。

[0055] 如果没有连锁不平衡,则 1-1 的单元型的频率是第一基因座、第二基因座的等位基因 1 的频率的界值(関)。即没有连锁不平衡,则

$$[0056] \quad p11 = p1 \cdot p \cdot 1$$

[0057] 但是如果有连锁不平衡,则上式不成立。如下式所示,用 D 表示其偏离程度,则

$$[0058] \quad D = p11 - p1 \cdot p \cdot 1$$

[0059] 这样,四个单元型的频率可以使用等位基因的频率和 D,如下表示。

[0060] [表 3] 连锁不平衡存在下的单元型频率

	等位基因	频率
[0061]	1-1	$p11 = p1 \cdot p \cdot 1 + D$
	1-2	$P12 = p1 \cdot p \cdot 2 - D$
	2-1	$P21 = p2 \cdot p \cdot 1 - D$
	2-2	$P22 = p2 \cdot p \cdot 2 + D$

[0062] 将 D 称为连锁不平衡系数。D 也可如下表示。

$$[0063] \quad D = p11p22 - p12p21$$

[0064] 没有连锁不平衡时, $D = 0$, $D > 0$ 时,称为正的连锁不平衡。

[0065] 以 r 作为重组比例,则 D 是每个世代以 r 的比例减少。即,以某一世代的连锁不平衡系数为 D,则 n 世代后的连锁不平衡系数 D_n 为:

$$[0066] \quad D_n = (1-r)^n D$$

[0067] 实际上都希望所有的单元型频率与等位基因频率取 0 和 1 之间的值,因此 D 的范围如下限定。

[0068] 即, $D > 0$ 或 $D = 0$ 时, D 的可取的最大值是:

$$[0069] \quad D_{\max} = \min(p1 \cdot p \cdot 2, p2 \cdot p \cdot 1)$$

[0070] $D < 0$ 时, D 的可取的最小值是:

$$[0071] \quad D_{\min} = \max(-p1 \cdot p \cdot 1, -p2 \cdot p \cdot 2)$$

[0072] 因此如下所述,将连锁不平衡系数用标准化的以下的值表示。

$$[0073] \quad D' = D/D_{\max} \quad (D \text{ 为正时})$$

$$[0074] \quad D' = D/D_{\min} \quad (D \text{ 为负时}) \quad [\text{也有论文称: } D < 0 \text{ 时, } D' = -D/D_{\min}]$$

[0075] 上述定义时, D' 一定为正或 0。[但是, [] 内则为 $D < 0$]

[0076] 除 D 或 D' 以外,还可使用以下的 ρ 。 ρ^2 等于 x^2/n ,常常用 Δ^2 表示。

$$[0077] \quad \Delta^2 = \rho^2 = D^2 / (p1 \cdot p2 \cdot p \cdot 1 p \cdot 2)$$

[0078] 包括这些都是常用的连锁不平衡的指标。

$$[0079] \quad D = p_{11}p_{22} - p_{12}p_{21} \quad \Delta = \frac{p_{11}p_{22} - p_{12}p_{21}}{(p_{1\bullet}p_{2\bullet}p_{\bullet 1}p_{\bullet 2})^{1/2}}$$

$$[0080] \quad \Delta^2 = \frac{(p_{11}p_{22} - p_{12}p_{21})^2}{p_{1\bullet}p_{2\bullet}p_{\bullet 1}p_{\bullet 2}} D' = \begin{cases} \frac{p_{11}p_{22} - p_{12}p_{21}}{\min(p_{1\bullet}p_{\bullet 2}, p_{\bullet 1}p_{2\bullet})} & D > 0 \\ \frac{p_{11}p_{22} - p_{12}p_{21}}{\min(p_{1\bullet}p_{\bullet 1}, p_{\bullet 2}p_{2\bullet})} & D < 0 \end{cases}$$

$$[0081] \quad \delta = \frac{p_{11}p_{22} - p_{12}p_{21}}{p_{\bullet 1}p_{22}} d = \frac{p_{11}p_{22} - p_{12}p_{21}}{p_{\bullet 1}p_{\bullet 2}}$$

$$[0082] \quad Q = \frac{p_{11}p_{22} - p_{12}p_{21}}{p_{11}p_{22} + p_{12}p_{21}}$$

[0083] 上述 Δ^2 (或 ρ^2) 与连锁不平衡的指标 r^2 同含义。

[0084] 上述多态性中,对于其中的等位基因频率,任意的患者群比任意的非罹患者群中都显著高,这可用作本发明的诊断方法。

[0085] 患者群与非罹患者群只要分别是含有可以产生统计学上可靠的结果的足够数量的群即可,其大小(样品数)、各样品的背景(例如籍贯、年龄、性别、疾病等)等没有特别限定。

[0086] 本说明书中,疾病的“判定”是指判断是否有疾病发病、判断疾病发病的可能性(罹患危险性的预想)、疾病的遗传因素的研究等。

[0087] 疾病的“判定”可以将上述单核苷酸多态性的检测结果与根据需要的其它的多态性分析(VNTR 或 RFLP)和/或其它的检查结果结合进行。

[0088] 本说明书中,“炎症性疾病”只要是可确认诱导了已知与炎症性病态相关的细胞粘着因子或细胞因子的疾病即可,没有特别限定,例如有慢性类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、炎症性肠炎、各种变态反应、细菌性休克、心肌梗塞或脑卒中等动脉硬化性疾病等,特别是心肌梗塞。

[0089] (检测对象)

[0090] 基因多态性的检测对象优选基因组 DNA,还可以根据情况(即多态性位点及其相邻区域的序列与基因组相同或完全互补时)使用 cDNA 或 mRNA。采集上述对象的试样可以是任意的生物学试样,例如有:血液、髓液、精液、腹腔液、尿等体液;肝脏等组织细胞;毛发等体毛等。基因组 DNA 等可按照常规方法由这些试样中提取、纯化,进行制备。

[0091] (扩增)

[0092] 检测基因多态性时,首先扩增含有基因多态性的部分。扩增例如通过 PCR 法进行,也可以按照其它公知的扩增方法、例如 NASBA 法、LCR 法、SDA 法、LAMP 法等进行。

[0093] 关于引物的选择,例如是可以扩增 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示的序列中含有上述单核苷酸多态性位点的连续的至少 10 个核苷酸以上、优选 10~100 个核苷酸、更优选 10~50 个核苷酸的序列和/或其互补序列的引物。

[0094] 引物只要是为了扩增含有上述单核苷酸多态性位点的规定核苷酸数的序列而发挥引物的功能即可,其序列中可以含有 1 或多个取代、缺失、添加。

[0095] 用于扩增的引物可以选择正向引物或反向引物的其中一方与单核苷酸多态性位点杂交,这样可以只在试样有一对等位基因型时扩增。引物可根据需要用荧光物质或放射

性物质等标记。

[0096] (基因多态性的检测)

[0097] 基因多态性的检测可通过与一对等位基因型特异性的探针杂交来进行。探针可以根据需要用荧光物质或放射性物质等适当的手段进行标记。探针只要是含有上述单核苷酸多态性位点、与被检试样杂交、具有在所采用的检测条件下可检测的程度的特异性即可,没有特别限定。探针可以使用寡核苷酸,该寡核苷酸可以与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示的序列中含有上述单核苷酸多态性位点的连续的 10 个核苷酸以上、优选 10 ~ 100 个核苷酸的序列、更优选 10 ~ 50 个核苷酸的序列或它们的互补序列进行杂交。还优选选择单核苷酸多态性位点几乎存在于探针的中心部的寡核苷酸。该寡核苷酸只要可发挥探针的功能,即、在与目标等位基因型的序列杂交、但与其它等位基因型的序列不杂交的条件下进行杂交即可,其序列中可以含有 1 或多个取代、缺失、添加。探针包含象 RCA(滚环扩增)法扩增中使用的单链探针(挂锁探针)那样,与基因组 DNA 退火、通过形成环状来满足上述探针的条件的探针。

[0098] 本发明中使用的杂交条件是足以区分等位基因型的条件。例如,试样为一个等位基因型时可杂交、而为其它等位基因型时则不杂交的条件,例如严格的条件。这里,“严格的条件”例如有分子克隆实验室手册第 2 版(Sambrook 等人.,1989)所记载的条件等。具体例如有:在含有 6×SSC(1×SSC 的组成:0.15M NaCl、0.015M 柠檬酸钠,pH7.0)、0.5% SDS、5×denhardt 和 100mg/ml 鲑鱼精子 DNA 的溶液中与探针一起在 65℃下保温过夜的条件等。

[0099] 探针可以将其一端固定在基板上,作为 DNA 芯片使用。此时,DNA 芯片中可以只固定与一个等位基因型对应的探针,也可以固定与两个等位型基因型对应的探针。

[0100] 基因多态性的检测可通过限制酶切片长度多态性分析法(RFLP:Restriction fragment length polymorphism)进行。该方法中,用限制酶来消化试样核酸,根据单核苷酸多态性是哪一种基因型,其可能或未被限制酶切割,通过研究消化物的片段的尺寸来研究试样核酸是否被该限制酶切割,由此分析试样的多态性。

[0101] 基因多态性的检测可以通过直接测序确定扩增产物来进行(直接测序法)。序列的确定例如可通过双脱氧法、Maxam-Gilbert 法等公知的方法来进行。

[0102] 基因多态性的检测还可以采用变性梯度凝胶电泳法(DGCE:denaturing gradient gel electrophoresis)、单链构象多态性分析(SSCP:single strand conformation polymorphism)、等位基因特异性 PCR(allele-specific PCR)、ASO(allele specific oligonucleotide,等位基因特异性寡核苷酸)的杂交法、错配位点的化学切割(CCM:chemical cleavage of mismatches,化学裂解错配)、HET(heteroduplex method,异源双链法)法、PEX(primer extension,引物延伸)法、RCA(rolling circle amplification,滚环扩增)法等。

[0103] [2] 炎症性疾病诊断用试剂盒

[0104] 作为上述引物和探针的寡核苷酸可以以含有该寡核苷酸的炎症性疾病诊断用试剂盒的形式提供,该试剂盒可以含有在上述基因多态性分析法中使用的限制酶、聚合酶、核苷三磷酸、标记物、缓冲液等。

[0105] [3] BRCA1 相关蛋白(BRAP)的表达状态的分析方法

[0106] 根据本发明,通过检测上述单核苷酸多态性,可以分析 BRCA1 相关蛋白(BRAP)的

表达状态。

[0107] 例如在 SEQ ID NO :2 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的内含子 3 的核苷酸序列中第 270 号核苷酸为 G 时 (BRAP 内含子 3270G), 可以判断 BRAP 的表达量高。与此相对, SEQ ID NO :2 所示的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的内含子 3 的核苷酸序列中第 270 号核苷酸为 A 时 (BRAP 内含子 3270A), 可以判断 BRAP 的表达量低。

[0108] [4] 炎症性疾病的治疗药物的筛选方法

[0109] 根据本发明, 通过在候选物质存在下分析细胞内 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的表达量、选择抑制该表达量的物质, 可以筛选炎症性疾病的治疗药物。例如分析在候选物质存在下细胞内 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的表达量, 可以选择使该表达量减少的物质。

[0110] 上述筛选的一个例子可通过以下步骤进行: 使细胞与候选物质接触的步骤; 分析细胞内 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因的表达量的步骤; 以及与候选物质非存在下的条件比较, 选择使该基因的表达量变化的候选物质作为炎症性疾病的治疗药物的步骤。

[0111] 候选物质可以使用任意的物质。对候选物质的种类没有特别限定, 可以是各个低分子合成化合物, 也可以是存在于天然产物提取物中的化合物, 或者还可以是化合物文库、噬菌体展示文库、组合文库。候选物质为低分子化合物, 优选为低分子化合物的化合物文库。化合物文库的构建是本领域技术人员公知的, 还可以使用市售的化合物文库。

[0112] [5] BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的转录活性的测定方法

[0113] 根据本发明, 还可以将上述含有单核苷酸多态性的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因片段导入细胞、培养该细胞, 通过分析该基因的表达来测定 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的转录活性。

[0114] 根据本发明的优选方案, 在上述 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因片段的下游结合报道基因, 得到转录单元, 将其导入细胞, 培养该细胞, 通过测定报道活性来分析该基因的表达。

[0115] 例如单核苷酸多态性存在于启动子位点时, 在含有该单核苷酸多态性的基因的下游插入报道基因, 培养导入了该体系的细胞, 测定报道活性, 则可以测定单核苷酸多态性导致的转录效率的差异。

[0116] 这里, 报道基因使用萤光素酶、氯霉素、乙酰转移酶、半乳糖苷酶等的基因。

[0117] [6] 抑制或促进 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的转录活性的物质的筛选方法

[0118] 本发明中, 将上述含有单核苷酸多态性的 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的基因片段导入细胞, 在抑制或促进 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的转录活性的候选物质的存在下培养该细胞, 通过分析该基因的表达, 可以筛选抑制或促进 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的转录活性的物质。

[0119] 根据本发明的优选方案, 在上述 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因片段的下游结合报道基因, 将所得转录单元导入细胞, 培养该细胞, 通过测定报道活性来分析该基因的表达。

[0120] 例如, 在具有可见 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 表达量显著高的单核苷酸多态性 (例如 BRAP 内含子 3270G) 的基因的下游插入报道基因, 将导入了该体系的细胞在候选物质的存在下或非存在下的两种情况下进行培养, 在候选物质存在下进行培养时, 如果报道活性降低, 则该候选物质可作为抑制 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 转录活性的物质被选择。

[0121] 这里, 报道基因可以使用上述例举的基因。

[0122] 候选物质可以使用任意的物质。对候选物质的种类没有特别限定, 可以是各个低分子合成化合物, 也可以是存在于天然产物提取物中的化合物, 或者还可以是化合物文库、

噬菌体展示文库、组合文库。候选物质为低分子化合物,优选为低分子化合物的化合物文库。化合物文库的构建是本领域技术人员公知的,还可以使用市售的化合物文库。

[0123] 由上述筛选方法得到的抑制或促进 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 转录活性的物质也在本发明的范围内。上述抑制 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 转录活性的物质可用作心肌梗塞治疗药物、抗炎症药、免疫抑制剂等各种药物的候选物质。

[0124] [7]BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的转录控制因子的筛选方法

[0125] 本发明中,还可以使上述含有单核苷酸多态性的基因片段与预想可能存在 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的转录控制因子的试样接触,通过检测上述片段与转录控制因子结合,来筛选 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的转录控制因子。上述含有单核苷酸多态性的基因片段与预想可能存在 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的转录控制因子的物质结合的检测可通过凝胶移位法 (电泳迁移率变动分析: electrophoretic mobility shift assay, EMSA)、DNase I 足迹法等进行,优选凝胶移位法。凝胶移位法中,如果结合有蛋白质 (转录控制因子),则分子尺寸增大,电泳中 DNA 的迁移率降低,因此可以将用 ^{32}P 标记的基因片段与转录控制因子混合进行凝胶电泳。通过放射自显影观察 DNA 的位置,则有因子结合的 DNA 缓慢移动,因此可检测出比平常的条带缓慢移动的条带。

[0126] [8]BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的抑制剂、修饰剂的筛选方法

[0127] 本发明中,分析候选物质的存在下 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的功能,通过选择抑制或修饰其机能的物质,可以筛选 BRCA1 相关蛋白的抑制剂、修饰剂。BRAP 的功能可例举与半乳凝素 -2 结合的功能、或者使 NFkB 的活性保持或提高的功能等,但并不限于此。因此,例如在候选物质的存在下或非存在下,分析 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 与半乳凝素 -2 的结合状态,可以选择抑制上述结合的物质作为 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的抑制剂。或者在候选物质的存在下或非存在下,测定表达 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的细胞、组织、器官或个体的 NFkB 的活性,可以选择使 NFkB 活性降低的物质作为 BRCA1 相关蛋白的抑制剂。

[0128] 通过以下实施例进一步具体地说明本发明,但本发明并不受实施例的限定。

[0129] 实施例

[0130] 以下通过实施例进一步详细地说明本发明。

[0131] [实施例 1] 与半乳凝素 -2 结合的蛋白质 -BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 的鉴定

[0132] 使用由 HeLa 细胞提取的蛋白质,通过串联亲和纯化筛选与心肌梗塞易感基因产物半乳凝素 -2 结合的新型蛋白质。

[0133] 具体而言,串联亲和纯化操作是以 Rigaut 等人所述的方法 (Rigaut, G. 等人. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nature Biotechnol. 17, 1030 ~ 1032 (1999)) 为基本,对该方法加以一些修正来实施。

[0134] 在 pCMV-Myc 载体 (シグマ) 中,构建编码 TEV 切割位点、S 标记和 His 标记的融合表达盒作为 TAP 标记序列。构建的 TAP 载体在巨细胞病毒启动子的控制下、在哺乳动物细胞内与 C 末端 TAP 标记一起表达 N 末端 Myc 标记的靶蛋白。在 150mm 皿内使用 Eugene (ロシユ),将半乳凝素 -2TAP 载体或作为负对照的 TAP 载体瞬时转染 HeLa 细胞 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク;自 JCRB9004 获得)。使用每 20ml 中含有 1 个完全蛋白酶抑制片 (Complete protease inhibitor tablet) (ロシユ) 以及 $5\mu\text{g/ml}$ MG-132 (カルビオケ

ム)の蛋白质提取试剂(クロンテク),在冰上溶解转染的细胞,使用S-蛋白结合/洗涤缓冲液(ノバジエン)稀释为10倍。将提取物在4℃下用S-蛋白琼脂糖(ノバジエン)温育12~18小时。将琼脂糖用S-蛋白质结合/洗涤缓冲液洗涤3次,再用TEV蛋白酶分解缓冲液(含有150mM NaCl、0.1% NP-40、0.5mM EDTA和1mM DTT的10mM Tris, pH8.0)洗涤,使用100单位的TEV蛋白酶(インビトロジエン)在17℃下温育2小时,洗脱结合的TAP-标记蛋白质。洗脱的蛋白质用磷酸盐缓冲液透析,进一步用TALON亲和纯化系统(クロンテク)纯化。将这些蛋白质复合物用SDS-PAGE和SimplyBlue(インビトロジエン)洗脱、浓缩、并分析。将蛋白质结合物用アプロ・ライフサイエンス・インステイトウートのMALDI/TOF质谱仪进行分析。

[0135] 分析的结果,作为与半乳凝素-2结合的蛋白,是BRCA1相关蛋白(BRAP)(参照图1a)。

[0136] [实施例2]BRAP基因内单核苷酸多态性与心肌梗塞的相关性

[0137] 已经了解了半乳凝素-2与BRAP结合,显示了BRAP的基因产物的功能变化可能与心肌梗塞易感性相关,因此使用BRAP基因内的单核苷酸多态性(SNPs),对患者(3362人)、对照(3823人)按照国际公开W02004/015100号公报所述的方法进行病例-对照关联研究。即,SNP的分型通过侵入者分析(Invader assay)进行、通过卡方检验进行分析。结果,BRAP基因内的外显子5第90号A>G的SNP(NCBI SNPDatabase中的登记号为rs3782886)的minor homozygote(GG等位基因)在心肌梗塞患者中显著多(表4)。由此显示了BRAP基因内的外显子5第90号A>G的SNP与心肌梗塞相关的可能性。该SNP(NCBI SNPDatabase中的登记号为rs3782886)与该基因的内含子3 270A/G SNP(NCBI SNP Database中的登记号为rs11066001)、以及在染色体上接近的基因醛脱氢酶2家族(ALDH2)基因内的2个SNP(NCBI SNPDatabase中的登记号为rs671和rs4646776)、FLJ30092基因内的一个SNP(NCBI SNP Database中的登记号为rs2074356)存在强的连锁不平衡的关系,这可通过HapMap数据库(<http://hapmap.org/>)确认。还可见ALDH2基因内的SNP(NCBI SNP Database中的登记号为rs671)和FLJ30092基因内的SNP(NCBI SNP Database中的登记号为rs2074356)与心肌梗塞有较强的相关性。

[0138] [表4]

[0139] 在心肌梗塞的12q24基因组区的SNPs的关联性

		基因型				统计				
		AA	AG	GG	总数	型	χ^2	P	OR*	95% CI**
rs3782996 (BRAP)										
MI	数目	1378	1596	388	3362	等位基因	101.1	8.6×10^{-24}	1.44	1.34-1.54
	%	41.0	47.5	11.5		显性	98.2	3.9×10^{-23}	1.60	1.46-1.76
对照	数目	2014	1516	293	3823	隐性	31.3	2.2×10^{-5}	1.57	1.34-1.84
	%	52.7	39.7	7.6		基因型	105.4	1.3×10^{-23}		
rs671 (ALDH2)										
MI	数目	1447	1573	365	3385	等位基因	105.3	1.2×10^{-24}	1.45	1.35-1.56
	%	42.7	46.5	10.8		显性	96.1	1.1×10^{-22}	1.59	1.45-1.75
对照	数目	2097	1507	259	3863	隐性	38.1	6.6×10^{-19}	1.68	1.42-1.99
	%	54.3	39	6.7		基因型	107.6	4.4×10^{-24}		
rs2074356 (FLJ30092)										
MI	数目	1587	1506	291	3383	等位基因	76.2	4.5×10^{-19}	1.4	1.30-1.50
	%	46.9	44.5	8.6		显性	79.8	4.9×10^{-19}	1.53	1.39-1.67
对照	数目	2196	1403	224	3823	隐性	20.3	6.5×10^{-6}	1.51	1.26-1.81
	%	57.4	36.7	5.9		基因型	83.8	6.4×10^{-19}		

[0141] * ; 优势比, ** ; 可信区间

[0142] [实施例 3] 对半乳凝素 -2 与 BRAP 在 COS7 共强制表达体系中的结合的确认

[0143] 在动物细胞内构建表达 Myc 标记的半乳凝素 -2 和 S- 标记的 BRAP 的载体, 在 COS7 细胞 (猴肾细胞株) 中共强制表达, 通过用特异性抗体免疫沉降来确认有否与各表达蛋白结合。

[0144] 为了在哺乳动物细胞中共免疫沉降, 使用 Eugene 将 Myc 标记的半乳凝素 -2 和 S- 标记的 BRAP 的表达质粒瞬时转染 COS7 细胞 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク; 自 JCRB9127 获得)。在每 40ml 中含有 1 个完全蛋白酶抑制片 EDTA (ロシユ) 以及 5 μ g/ml MG-132 (カルビオケム) 的溶解缓冲液 (含有 150mM NaCl、0.2% NP-40 的 20mM Tris, pH7.5) 内实施免疫沉降。转染 24 小时后, 使用 S- 蛋白 (ノバジエン) 或 Myc 琼脂糖 (サンタ・クルズ) 在 4℃ 下对转染的 COS7 细胞进行 2 小时的处理。将免疫沉降物用溶解缓冲液洗涤 3 次。使用由 S- 蛋白 (ノバジエン) 或抗 Myc 过氧化物酶共轭物 (サンタ・クルズ) 复合而成的辣根过氧化物酶, 使免疫混合物可见。

[0145] 使用与 BRAP 的 S 标记特异性结合的 S- 蛋白或与 Myc- 半乳凝素 -2 特异性结合的抗 myc 抗体进行免疫沉降时, 半乳凝素 -2 或 BRAP 分别同时沉降 (参照图 1b)。这表示具有半乳凝素 -2 与 BRAP 直接且特异性结合的可能性。

[0146] [实施例 4] BRAP 与半乳凝素 -2 在血管平滑肌细胞中的共同存在

[0147] 将半乳凝素 -2 特异性抗体用荧光素标记, 以及将 BRAP 特异性抗体用罗丹明标记, 免疫染色冠状动脉血管平滑肌细胞, 通过共焦激光显微镜观察半乳凝素 -2 和 BRAP 的表达。

[0148] 使用在大肠杆菌中合成的重组蛋白, 在兔中制备多克隆抗人半乳凝素 -2 和 BRAP 免疫血清。使用 EZ 标记™ 蛋白质标记试剂盒 (ピアース), 分别用荧光素和罗丹明标记多克隆抗半乳凝素 -2 免疫血清以及 BRAP。培养人冠状动脉平滑肌细胞 (HCASMC, カンプレシクス) 并固定。然后与在含有 3% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液溶液内标记的抗体一起培养该 HCASMC。将检样用 OLYMPUS FLUOVIEW 共焦激光扫描显微镜 (奥林匹斯) 观察。

[0149] 结果可观察到半乳凝素 -2 与 BRAP 在细胞质和核中共同存在 (参照图 1c)。

[0150] [实施例 5] 冠状动脉血管平滑肌细胞中的 BRAP 内含子 3SNP 的荧光素酶测定

[0151] 构建在 pGL3 基本载体 (荧光素酶) 中插入 BRAP 启动子区 (BRAP 启动子 - 荧光素

酶)得到的载体。进一步在该载体中分别插入含有 1 次或 3 次 SNP 的 A 等位基因或 G 等位基因的寡核苷酸,将该构建物转染血管平滑肌细胞,进行萤光素酶活性测定。

[0152] 为了构建 BRAP 启动子-pGL3 基本载体(BRAP 启动子-萤光素酶),通过使用基因组 DNA 作为模板的 PCR,扩增由 5' 一侧非编码区第 21 号核苷酸至启动子区-991 号所对应的 DNA 片段。将扩增的 PCR 产物在 pGL3- 基本载体(プロメガ)的 kpnI 和 SacI 限制酶切位点上沿 5' -3' 方向克隆。为了构建含有 BRAP 启动子-SNP- 萤光素酶的载体,在 BRAP 萤光素酶的载体构建物的 MluI 和 XhoI 限制酶切位点上克隆 1 或 3 次重复的双链寡核苷酸(内含子 3 的 264 ~ 278 号),构建载体。在 HCASMC 生长培养基(ペプチド研)中培养 HCASMC。然后使用 Nucleofector™ 系统(アマクサ),将 1 μg 载体构建物以及 0.1 μg pRL-TK 载体(转染效率的内部控制)转染细胞。24 小时后回收细胞,使用双萤光素酶报道分析系统(プロメガ)测定萤光素酶活性。

[0153] 结果, G 等位基因与 A 等位基因比较,可观察到较强的萤光素酶活性,这显示在具有 G 等位基因的个体中, BRAP 的表达比 A 等位基因高(参照图 2a)。

[0154] [实施例 6] 使用冠状动脉血管平滑肌细胞核提取液、通过 BRAP 内含子 3SNP 区序列寡核苷酸进行凝胶移位分析

[0155] 按照已报道的方法,将由 HCASMC 制备的核酸提取物在 1% 牛血清白蛋白的存在下、以及使用 DIG 凝胶移位试剂盒(ロシユ)、用地高辛(DIG)-11-ddUTP 标记的 16 个的寡核苷酸(BRAP 的内含子 3 的 264 ~ 276) 的 6 个串联拷贝一起进行温育。在室温下不使用 Poly[I(dc)] 试剂进行反应。比较实验是在 DIG 标记的寡核苷酸添加之前用核酸提取物预温育非标记的寡核苷酸(过量 125 倍)。使用非改性 6% 聚丙烯酰胺凝胶将蛋白质/DNA 复合物在 0.5 倍 Tris/ 硼酸/EDTA(TBE) 缓冲液内进行分离,然后转移至硝基纤维素膜上。按照制备者的指示用化学荧光检测系统(ロシユ)检测信号。

[0156] 结果可以确认存在与 A 等位基因强烈结合的未知因子(参照图 2b)。

[0157] [实施例 7] 冠状动脉血管内皮细胞中敲除 BRAP 和 ALDH2 的 mRNA 时的 NFκB 活性的变化

[0158] 使用 BRAP 和 ALDH2 的各 2 种 siRNA 敲除 BRAP 和 ALDH2,将在 NFκB 特异性的 E- 选择启动子序列上结合有萤光素酶的载体(NFκB 可以间接地用萤光素酶测定活性)转染,测定萤光素酶活性。

[0159] 为了敲除 BRAP 和 ALDH2 的 mRNA, 使用了合成 Stealth™ RNAi 寡核苷酸双链(BRAP 是使用 BRAP-HSS112138 和 BRAP-112139, ALDH2 是使用 ALDH2-HSS100369 和 ALDH2-HSS100370)。使用 Stealth™ RNAi 负对照含高 GC 的双链(インビトロジエン)作为阴性对照。在 HCACE 生长培养基中培养 HCACE。将各 Stealth™ RNAi 转染细胞。24 小时后,将各 Stealth™ RNAi、pNiFty 质粒载体以及通过 Nucleofector™ 系统(アマクサ)结合有 NFκB 特异性 E- 选择性启动子(インビボジエン)的萤光素酶报道基因共转染细胞。24 小时后回收细胞,并通过双萤光素酶报道分析系统测定萤光素酶活性。使用 SYBR Green 和 ABI7700 测序仪对 mRNA 进行定量。

[0160] 通过敲除 BRAP, NFκB 的活性降低,而敲除 ALDH2 则相反, NFκB 的活性升高(参照图 2c)。

[0161] 产业实用性

[0162] 通过利用本发明中鉴定的 SNP, 可以提供心肌梗塞等炎症性疾病的诊断方法或炎症性疾病的治疗药物的开发方法。

序列表

<110> 独立行政法人理化学研究所

<120> 使用 BRCA1 相关蛋白 (BRAP) 基因内单核苷酸多态性判定炎症性疾病的方法

<130>A81610A

<160>2

<210>1

<211>114

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>1

```
gctgatgcgg atagttttta tatgacatgc aatggccgcc agttcaactc aatagaagat 60
gacgtttgcc agctagtgtg tgtggaaagr gctgaagtgc tcaaactctga agat      114
```

<210>2

<211>2296

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>2

```
gtaagaaaac cctcttttct tgggggtag tcaatttttt tttttttttt tttgctttgc 60
tttagcatag tctcttgtcc tgaaggaaag tgggtatttt aagcttcaaa ataataatac 120
ttttgtctgt tgtatgttag agaattctca gatgttttac atttgattaa tcttgtggat 180
tgggtcaaag cttttcctta taaaagaaat gcttgtggat acacttaaga gaatatgtgg 240
gaaaaatgtt ttcttttttt ttttttgaar tggagtctcg gtctcgttgc ccaggttgga 300
gtgcaatggc gcgatctcag atcactgcat cttctgcctc ctgagttcaa gtgattctcc 360
ttcctcagcc tcccaagtag ctgggattac aggtgccac caccacacct agctaatttt 420
ttgtattttt agtagagatg gggtttcacc ctgttggcca ggctggctct gaactccgac 480
ctcaggttat cgccccgcct cagectccca aagtgcctgg attacaggcg tgagccactg 540
cgccctgcca ggaatgtt ttcttagcag ataggcatgg aaggtgatgg ggaattgaaa 600
ggacaaagaa aatgatccac agcatcttgc tagtctcatg tccccaccaa atctttactg 660
aagaggctgc taagaagtca gttaactcat tacaatttta ttacctctt tttaccattt 720
tctgtggttc aaacaaagct tgctagagcc ccaaggaaag gaagcatttg gctagataat 780
ccacaagccc agccactacc ttcttgggta atggtagctg ataccttaag gctgttcttg 840
tgctaactca ttgtccagat ctctactggg aaaacagtga ctattcaggt agccattttg 900
ttttttgttt tgttttttgt ttgtttttt gttttgtttt tttttgagac agggctctcac 960
tcataactc aggttggagt gcagtgtgac aatcctggct cactgcaacc tcccctcccc 1020
ggttcaagca attctcctgc ctcagagtag ctgggaccac aggtgcacac caccacgccc 1080
agttaatttt tttttttttt ttggcagaga tggggtttca tcatgttggc taggctggtc 1140
```

```

tcgaactcct aacctcaagt gatcagccca cctcagcctc ccaaagtgtt gggattacag 1200
gtgtgagtca ctgcacccgg cacaggtagc cattctggat cacagctgtc aagtgagttt 1260
gcagcatttc aaaaaacaaa ttgcattgtg ggaggatttt ctttcctctc tattccagcc 1320
atctcaactt ggtaaacactt cctgtaatcc tcagttacat cctcatgggt tagaattctc 1380
tcttgccggg cgtgggtggct cacgcctgta atcccagtac tttgggaggc cgaggcgggg 1440
gatcacgagg tcaggagttc gaaaccagcc tggccaacat agtgaaaccc catctctact 1500
aaaaatacaa aaattagccc ggcgtgggtg cacgcgtctg taatcccagc tacttgggag 1560
gctgagcagg agaattgctt gaaccagga gtcagagggt gcagtgagcc gagaccatgc 1620
agcaagactc tgaaaaaaaa aaagacagaa ttctctcgta tatttagagc tgttttttta 1680
ggccttttaa gagaggtcca tagccagagt tgtgctttta agttaaccag tgacagattt 1740
tttttttttt tttttttttt gagatggagt cttgctctgt ggcccaggct ggagtgcaat 1800
ggcgcgatat tggctcactg caagctctgc ctcccagggt cacaccattc tcctgcctca 1860
gcctcccaag tagctgggac tacaagcacc tgccaccatg cccggctaata tttttttgta 1920
tttttagtag agatgggggt tcaccgtgtt agccaggatg gtctcgatct cctgacctcg 1980
tgatccaccc gcctcggcct gccaaagtgc tgggattacg agcatgagct actgtgcctg 2040
gccaccagtg acagattatt attcaaacat tgatgagagt aaaacactgc aaatttaccg 2100
aatgcagatt tataaccgta ataatgttg aactgaagat taaaaagtcc aatgggggggt 2160
ataatataga acagttcatt aatgaaatat tacaattttt attttttcct gttttcttgg 2220
acataaaaagt tgtctagtat tgtttaaact aaccatacct catctattca agacactcta 2280
attdtttttt tgtttag 2296

```

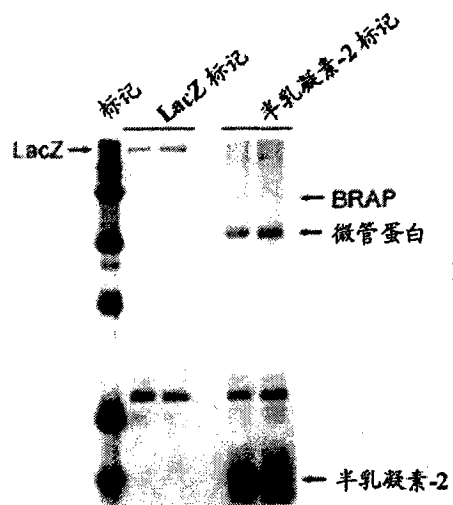
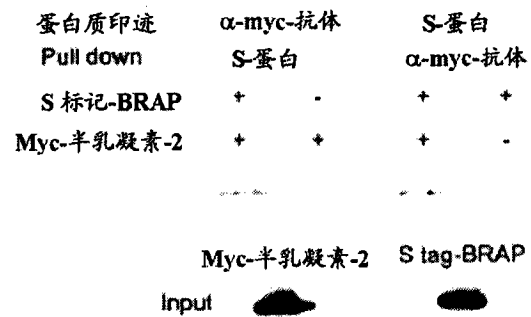
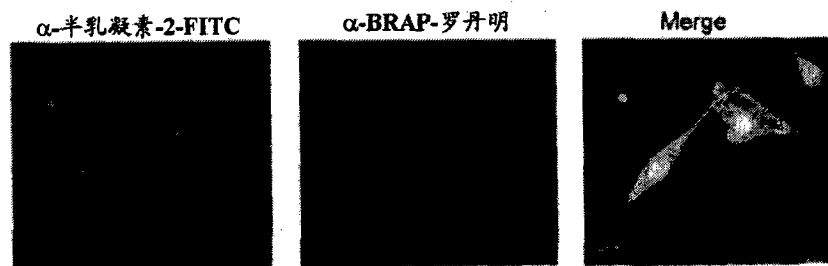
a 通过 TAP 法鉴定 BRAP**b 通过 COS7 强制表达系统确认 BRAP 和半乳糖素-2 的结合****c 血管平滑肌细胞中半乳糖素-2 与 BRAP 的共同存在**

图 1

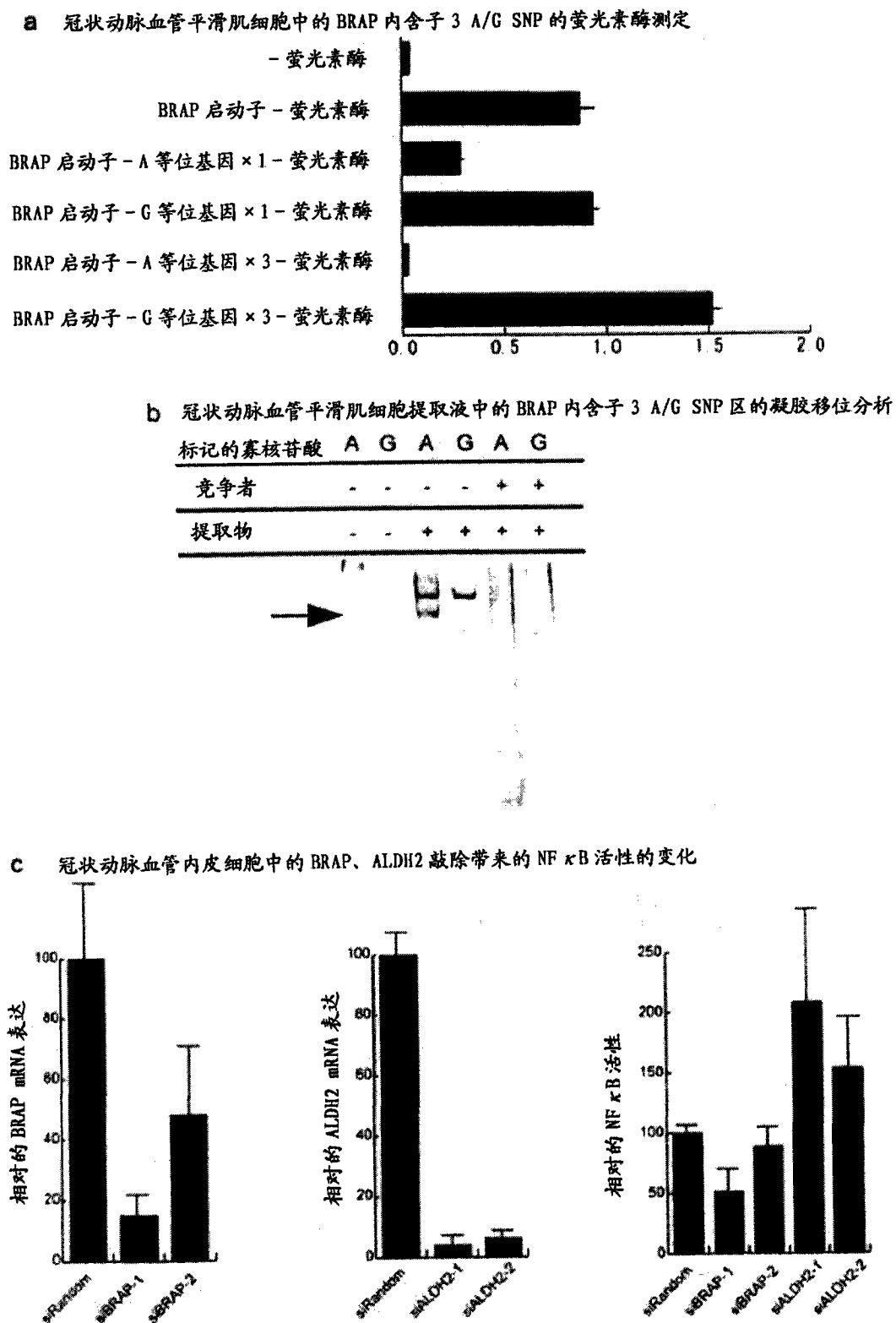


图 2