

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

A61K 31/00 A61P 27/12

C07H 21/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02805722.8

[43] 公开日 2004 年 9 月 1 日

[11] 公开号 CN 1526023A

[22] 申请日 2002.3.29 [21] 申请号 02805722.8

[30] 优先权

[32] 2001.3.30 [33] US [31] 60/280,529

[86] 国际申请 PCT/CN2002/000214 2002.3.29

[87] 国际公布 WO2002/079506 英 2002.10.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.8.29

[71] 申请人 香港中文大学

地址 中国香港新界沙田

[72] 发明人 郭志良 伍楚贤 李少钦 郭克伦
陈重娥

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 4 页 说明书 20 页 序列表 1 页
附图 3 页

[54] 发明名称 通过醛糖还原酶基因型确定白内障
的风险率

[57] 摘要

本发明涉及用于确定哺乳动物中发生白内障风险的方法,更具体而言,涉及用于确定包括人在内的患有非胰岛素依赖型糖尿病的哺乳动物中发生白内障风险的方法。本发明方法的操作是确定基因组 DNA 中遗传标记的存在或缺乏。Z-2 等位基因是醛糖还原酶基因的微卫星标记,其存在表示发生白内障的风险增加。Z-4 等位基因是醛糖还原酶基因的微卫星标记,其存在表示发生白内障的风险降低。所述方法包含与编码哺乳动物醛糖还原酶基因的微卫星区的核酸杂交的核酸探针。探针也可固定于固相支持物上以形成微阵列。此外,本发明涉及的方法用于治疗有发生白内障遗传倾向的哺乳动物;在检测醛糖还原酶基因的 Z-2 微卫星标记的筛选方法之后,哺乳动物用醛糖还原酶的抑制剂治疗。

知识产权出版社出版

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种确定哺乳动物发生白内障的风险的方法，所述方法包括下列步骤：

5 评价含有所述哺乳动物核酸的样品是否存在醛糖还原酶基因的 Z4 等位基因和 Z2 等位基因中的至少一种，其中所述 Z4 等位基因的缺乏和所述 Z2 等位基因的存在中的至少一种表示所述哺乳动物发生白内障的风险增加，而其中所述 Z2 等位基因的缺乏和所述 Z4 等位基因的存在中的至少一种则表示所述哺乳动物发生白内障的风险降低。

10

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述哺乳动物患有非胰岛素依赖型糖尿病。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述哺乳动物是人。

15

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中所述人是华人血统。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述评价步骤的操作方法是将所述样品与一种或多种核酸探针接触，其中所述核酸探针各含有与编码醛糖还原酶基因的微卫星标记的核苷酸区域杂交的序列。

20

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述评价步骤的操作方法是选自下列技术：

25

探针杂交、原位杂交、核酸酶分析、色谱、放射自显影、荧光自显影、Southern 印迹分析、直接测序、限制性酶切片段分析、单基因座 DNA 图、多基因座 DNA 图、微阵列分析、片段电泳迁移率或迁移率变动分析。

30

7. 一种检测患有非胰岛素依赖型糖尿病的华人血统个体发生白内障的风险增加的方法，所述方法包括：

利用含有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的引物, 扩增所述个体核酸样品中醛糖还原酶基因的 Z2 等位基因, 由此获取扩增的序列;

在高度严格性条件下, 将所述扩增的序列与含有可检测标记的探针杂交, 其中所述探针包含与所述 Z2 等位基因杂交的序列; 和

5 对所述可检测标记进行筛选, 其中所述 Z2 等位基因的存在表示发生白内障的风险增加。

8. 一种检测患有非胰岛素依赖型糖尿病的华人血统个体发生白内障的风险增加的方法, 所述方法包括:

10 利用含有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的引物, 扩增所述个体核酸样品中醛糖还原酶基因的 Z4 等位基因, 由此获取扩增的序列;

在高度严格性条件下, 将所述扩增的序列与含有可检测标记的探针杂交, 其中所述探针包含与所述 Z4 等位基因杂交的序列; 和

15 对所述可检测标记进行筛选, 其中所述 Z4 等位基因的缺乏表示发生白内障的风险增加。

9. 一种检测患有非胰岛素依赖型糖尿病的华人血统个体发生白内障的风险增加的方法, 所述方法包括:

20 利用含有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的引物, 扩增所述个体核酸样品中醛糖还原酶基因的 Z2 等位基因, 由此获取扩增的序列;

在高度严格性条件下, 将所述扩增的序列与含有可检测标记的探针杂交, 其中所述探针包含与所述 Z2 等位基因杂交的序列; 和

25 对所述可检测标记进行筛选, 其中所述 Z2 等位基因的缺乏表示发生白内障的风险增加。

10. 一种检测患有非胰岛素依赖型糖尿病的华人血统个体发生白内障的风险增加的方法, 所述方法包括:

利用含有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的引物, 扩增所述个体核酸样品中醛糖还原酶基因的 Z2 等位基因, 由此获取扩增的序列;

30 在高度严格性条件下, 将所述扩增的序列与含有可检测标记的探

针杂交，其中所述探针包含与所述 Z2 等位基因杂交的序列；和
对所述可检测标记进行筛选，其中所述 Z2 等位基因的缺乏表示
发生白内障的风险增加。

5 11. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述一种或多种核酸探针
结合到固相支持物上。

12. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述方法还包括使所述 Z-
2 或 Z-4 等位基因与测序微阵列接触的步骤。

10

13. 一种用于治疗需要治疗的哺乳动物的方法，作为醛糖还原酶
的 Z-2 等位基因的存在或 Z-4 等位基因的缺乏的结果，所述哺乳动物
发生白内障的风险增加，所述方法包括：

给所述哺乳动物提供醛糖还原酶的抑制剂。

15

14. 一种引物对，其中所述引物对的第一引物包含 SEQ ID NO:1
以及第二引物包含 SEQ ID NO:2。

20

15. 一种用于扩增醛糖还原酶基因的微卫星标记的多核苷酸引
物，所述引物包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或其互补序列。

16. 一种核酸探针，其中所述探针包含与编码醛糖还原酶基因的
微卫星标记的核酸杂交的至少 10 个核苷酸碱基的核苷酸序列。

25

17. 根据权利要求 16 所述的核酸探针，其中所述探针是放射性
标记的。

30

18. 根据权利要求 16 所述的核酸探针，其中所述探针是非放射
性标记的，并且包含地高辛、酶、荧光、切口平移、光生物素、PCR
或末端标记。

19. 根据权利要求 16 所述的核酸探针，其中所述核苷酸序列包含不超过 3350 个碱基。

5 20. 根据权利要求 16 所述的核酸探针，其中所述核酸探针包括 DNA、RNA 或 cDNA。

 21. 一种寡核苷酸探针，其包括：
 至少 10 个连续核苷酸单位的核苷酸序列，其包含在 SEQ ID NO:3
10 及其互补序列中。

 22. 一种核苷酸探针的阵列，其包括：
 长度至少 10 个核苷酸碱基的核苷酸序列，其与编码醛糖还原酶
 基因的微卫星标记的核酸杂交，其中所述核酸包含显示发生白内障风
15 险的等位基因，以及其中所述核苷酸探针的阵列排列在固相支持物上的
 不同核酸链的多个离散区域中。

 23. 根据权利要求 22 所述的核苷酸探针的阵列，其中所述核苷
 酸探针的阵列为测序微阵列。
20

通过醛糖还原酶基因型确定白内障的风险率

5 技术领域

本发明涉及用于确定哺乳动物中发生白内障风险的方法和组合物，所述哺乳动物进一步包括患有非胰岛素依赖型糖尿病的病人。本发明的例证是哺乳动物醛糖还原酶基因的启动子区域中离散的微卫星标记与白内障发生的遗传诱因相关，尤其是在患有非胰岛素依赖型糖尿病

10 的个体，包括患有 II 型糖尿病的华人中。所述方法包括检测微卫星标记 Z-2 和 Z-4，它们包含哺乳动物醛糖还原酶基因的等位基因。利用在测个体的核酸样品，Z4 等位基因的缺乏和 Z2 等位基因的存在显示白内障发生的风险增加。相反，如果核酸样品中缺乏 Z2 等位基因或存在 Z4 等位基因则说明白内障发生的风险下降。

15

技术背景

眼球的晶状体是位于靠近眼球前方的拟蛋白（proteinaceous）结构，其负责把光和图像聚焦到眼球的后面及视网膜上。偶尔，由于不明的缘由，某些晶状体蛋白会随着时间的推延而凝结。这导致晶状体混浊度显著增加以及视力显著或完全丧失。这些结块的蛋白统称为白

20 内障。白内障的症状包括视觉朦胧或模糊、视觉发晕或复视觉，以及黑暗和彩色感觉差。在发达国家，白内障是视觉丧失的最常见原因。

手术及其相关风险仍是白内障患者的唯一选择。在少数情况下出现并发症。这些并发症可包括眼内炎（眼内感染）、囊样斑状浮肿（视网膜血管渗漏流体，所述流体累积在视网膜中区，导致中区视力下降）、视网膜脱离（玻璃状液体通过视网膜中的细泪，导致视网膜从眼球的后壁分离）、背部移位的晶状体物质（晶状体物质移位到眼球的玻璃状腔中）以及脉络膜出血（脉络膜或包括视网膜下血管在内的

25 纤细组织中的急性出血，以及其可导致视觉显著丧失）。

30

5 由于存在风险，手术一般直到视觉显著削弱后才进行。白内障手术和延迟治疗的内在风险使得白内障患者选择非手术治疗将是显著有利的，并且如果早期介入可用，则其是最理想的。然而，目前既没有药理的手段来治疗发生的白内障，也没有高度特异的方法来检测早期的白内障，更没有方法来筛选有这种疾病倾向的人。

10 动物研究获得的进展是鼓舞人心的，某些类型的晶状体乳浊化作用可得到延迟或预防，这给预防人的白内障的目标带来了可信性(Jacob(1999)同上)。药物治疗白内障的研究正在推进，提出了许多在研的治疗方法。特别是要关注与糖尿病相关的继发性白内障。

15 动物模型中有证据表明多元醇途径可能涉及与糖尿病有关的继发性白内障的发生。醛糖还原酶催化己糖 NADPH 依赖性还原成其多元醇，将 D-葡萄糖转化成山梨醇以及将半乳糖转化成半乳糖醇。山梨醇不易从眼球中扩散出来。幸运的是，醛糖还原酶对葡萄糖的亲合性低，并且在正常血糖(euglycemic)条件下很少有山梨醇产生。然而，在高血糖(hyperglycemic)条件下，山梨醇累积(Ko 等，(1995) Diabetes 44: 727)。作为多元醇途径中的第一限速酶，醛糖还原酶已成为调查研究的靶子(20 Lee 等(1995) PNAS 92: 2780; 和 Lee 等(1999) FASEB J. 13: 23)。监控该酶可提供需要治疗性介入的诊断指示剂(Cogan 等(1984) Ann. Intern. Med. 101: 82)。近来，Ko 及其同事已经发现，在患有早发性 II 型糖尿病的香港华人的病人组中，醛糖还原酶基因 5'端的微卫星多态性与增生性视网膜病相关(Ko 等，同上)。此种关联随后在日本人(25 Ikegishi 等(1999) Life Sci. 65: 2061)以及南美人(Olmos 等(1999) RevistaMedicade Chile 127: 399)中得到证实。

30 最近的研究已经提示，某些等位基因可用于确定一些视觉紊乱的遗传倾向。例如，Ko 等证实，醛糖还原酶基因 5'端的二核苷酸重复多态性微卫星标记与早发性糖尿病性视网膜病相关(Ko 等，同上)。微

5 卫星 DNA 序列通常是高度多态性的，因此，可能是研究基因与疾病之间关系的良好标记。这些标记的分布可显示特定疾病的遗传倾向，所以当有理由怀疑特定疾病发生的可能性高于平均水平时，例如，当疾病具有家族性关系时，或其他因素使个体易患遗传病，例如肥胖与糖尿病之间的联系，就可有效加以利用。

相关文献

10 醛糖还原酶抑制剂已显示，在动物模型中可有效用于防止视网膜病，一种位于眼球后部的视网膜疾病，以及白内障，一种位于眼球前部的晶状体疾病。药物介入的可能性已由 Robison 等(1995) Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 2368 进行了研究，他们检查了一种醛糖还原酶的抑制剂——索比尼尔(sorbinil)用于预防白内障和糖尿病性视网膜病的益处，Devamanoharan 等(1995) J Ocul Pharmacol Ther 11: 527，其中抗高血压药物戊脉安用于预防白内障，以及 Sato 等(1999) Exp Eye Res 15 68: 601，其中结构各异的醛糖还原酶抑制剂显示可防止白内障形成。这些研究表明，一旦有白内障的治疗方法开发出来，它们就可成功得到使用。然而，所有这些研究都是采用白内障的晚期形式而非早期形式进行的，并且个体是白内障受到诱导的动物模型，而非从总人群中经常规筛选和诊断的个体。

20

对于醛糖还原酶基因启动子区域的 Z-2 等位基因和视网膜病(视网膜的疾病，位于眼球后部的结构，其包含光受体、视网膜色素上皮细胞以及支持组织)之间关系的讨论，参见 Olmos 等(2000) Diabetes Res Clin Pract 47: 169，他将这种标记与快速发展的视网膜病联系起来，以及 Ko 等，(同上)阐述了 Z-2 等位基因与患有非胰岛素依赖型糖尿病的病人早发性视网膜病之间的关系。

25

发明概述

30 本发明涉及通过检测与糖尿病个体中白内障发生相关的遗传标记来确定患有非胰岛素依赖型糖尿病的哺乳动物中发生白内障风险的方

法和组合物。遗传标记包括醛糖还原酶基因启动子区域的微卫星多态性，这些多态性已被确定与白内障相关，尤其是在患有 II 型糖尿病的华人血统的成员中，他们处于糖尿病相关的白内障的特定风险中。

5 确定个体发生白内障风险的方法包括下列步骤：获得含有基因组核酸的样品，如尸检或活检样本的组织，或体液如人或非人哺乳动物的血液样品，以及将该样品与核酸引物对在一定条件下接触用于扩增目的 DNA 序列，所述条件如那些在聚合酶链式反应(PCR)中普遍采用的条件。然后，可将特异性扩增的 DNA 通过检测和/或鉴定 DNA 的
10 众多机理之一加以检测，包括探针杂交、原位杂交、核酸酶分析、色谱、放射自显影、荧光自显影、Southern 印迹分析、直接测序、限制性酶片段分析、单基因座 DNA 图(single-locus DNA profiling)、多基因座 DNA 图(multi-locus DNA profiling)、微阵列分析、片段电泳迁移率或迁移率变动分析。或者，将个体基因组的特定目的基因进行限制性
15 断裂，然后利用 PCR 引物对和 PCR 限制性片段长度多态性分析(RFLP)技术来鉴定目的多态性的存在或缺乏而加以筛选，在此情况下，特定目的基因是 Z-2 或 Z-4 等位基因，以用于确定发生白内障的哺乳动物的风险水平的目标。本发明也提供了采用醛糖还原酶的抑制剂来治疗
20 经鉴定具有发生白内障的遗传倾向的哺乳动物的方法。组合物包括与编码醛糖还原酶基因的核酸杂交的核酸探针，用于扩增 Z-2 和/或 Z-4 等位基因的探针、引物，以及含有探针的微阵列。

 本发明发现了用于鉴定患有非胰岛素依赖型糖尿病的哺乳动物个体发生白内障的风险水平，该信息可用来开发给哺乳动物定制的治疗
25 方案，以及用于治疗 and/或预防糖尿病性并发症，如经鉴定具有发生白内障风险增加的个体中的白内障。

附图简述

 图 1 示出人醛糖还原酶基因的启动子区域，其中黑体部分是(AC)_n
30 微卫星重复序列，下划线部分是一对正向引物和反向引物序列的位

置。

图 2A 示出图 1 的下划线区域，并且鉴定成正向引物，该引物可以用来扩增人醛糖还原酶基因的启动子区域的微卫星重复序列区域。

5 图 2B 示出图 1 的下划线区域，并且鉴定成反向引物(在图 2B 以 5'到 3'的方向显示)，该引物可用来扩增人醛糖还原酶基因的启动子区域的微卫星重复序列区域。

图 2C 示出人醛糖还原酶基因启动子，即微卫星重复序列区域。AC 微卫星重复序列以黑体出现。

10 具体实施方案描述

本发明提供组合物和方法，其中醛糖还原酶基因的微卫星标记用作患有非胰岛素依赖型糖尿病的哺乳动物，尤其是华人血统的人中白内障发生风险的指示剂。本发明的组合物包含：(1)用于扩增醛糖还原酶基因启动子区域的微卫星标记的多核苷酸引物，各个引物具有与哺乳动物醛糖还原酶基因的不同等位基因唯一相关的序列；(2)核酸探针，其含有与编码醛糖还原酶基因的微卫星标记的核酸杂交的核苷酸序列；(3)寡核苷酸探针，其含有核苷酸序列及其互补序列；和(4)核苷酸探针的微阵列，其含有与编码醛糖还原酶基因的微卫星标记的核酸杂交的核苷酸序列。本发明的方法包括：(1)从哺乳动物中获取核酸样品；(2)使核酸样品和引物组结合以用来扩增目的基因组 DNA 的区域，和/或(3)通过特异 DNA 序列检测所用的众多方法之一，使核酸样品与探针结合以用来鉴定与哺乳动物醛糖还原酶基因的启动子区域相关的特定等位基因的是否存在。可用方法的例子包括包括原位杂交、核酸酶分析、限制性酶片段分析、色谱、Southern 印迹分析、直接测序、单基因座 DNA 图(single-locus DNA profiling)、多基因座 DNA 图(multi-locus DNA profiling)、微阵列分析、片段电泳迁移率或迁移率变动分析。探针可附着于固相支持物上，而该固相支持物采用微阵列的形式。

30 短语“华人人群的成员”和“华人血统的人”旨在包括华人血统

的个体。华人群体的成员可由 HLA 单元型更特异性地加以鉴定。例如, HLA I 型和 II 型在香港华人群体中的频率已由 Chang 和 Hawkins (Hum Immunol (1997) 56: 125)研究。已进行了许多研究来确定 HLA I 型和 II 型等位基因, 它们在华人群体的成员中被频繁地或者甚至被唯一地发现, 以及确定具有高相关性的等位基因。Shaw 等和 Shen 等已研究了台湾华人群体的 HLA 多态性、等位基因频率及其关系(Tissue Antigens (1997) 50: 610; Tissue Antigens (1999) 53: 51; J Formos Med Assoc (1999) 98: 11)。中国大陆的华人个体中发现的等位基因频率及其关系的报道参见 Trejaut 等(Eur J Immunogenet (1996) 23: 437)、Shieh 等(Transfusion (1996) 36: 818)、Zhao 等(Eur J Immunogenet (1993) 20: 293)、Wang 等(Tissue Antigens (1993) 41: 223; Hum Immunol (1992) 33: 129)、Lee 等(Eur J. Immunogenet (1999) 26: 275)和 Gao 等(Hum Immunol (1991) 32: 269; Tissue Antigens (1991) 38: 24; Immunogenetics (1991) 34: 401)。另外, 华人个体可由本领域技术人员众所周知的“DNA 指纹识别”技术来客观地限定, 其中将特异于华人血统个体的微卫星、短同向重复序列(STR)和可变数同向重复序列(VNTR)基因座加以鉴定。这种种族的基因型研究的许多例子已有报道(Meng 等(1999) J Forensic Sci 44: 1273; Yoshimoto 等(1999) Int J Legal. Med 113: 15; Wu 等(1999) J Forensic Sci 44: 1039; Lee 等(1999) Eur J Immunogenet 26: 275; Evett 等(1996) Am J Hum Genet 58: 398; Shieh 等(1996) Transfusion 36: 818; Gill 和 Evett (1995) Genetica 96: 69; Balazs (1993) EXS 67: 193; Lan 等(1992) Arch Kriminol 189: 169; Fernandez-Vina 等(1992) Hum Immunol 33: 163; 和 Hwu 等(1992) J Formos Med Assoc 91: 839)。上述所有这些文献在此引作参考。因此, 风险评估可包括对 Z-2 和 Z-4 等位基因进行评估, 有或没有与华人血统相关标记的评估。

本发明的优点包括: 筛选方法将使早期检测白内障成为可能, 所以允许早期开始治疗方法, 因为白内障治疗可能在预防白内障病原学中是更有效的, 而及早治疗给处于风险的个体提供了更好诊断的可能性。白内障手术具有内在的风险, 因此一般是直到视觉受到显著削弱

时才进行。处于风险的患者可得到更有力的筛选以检测任何指示白内障发生的早期变化。对白内障患者选择非手术治疗和早期介入将是最理想的。本发明筛选方法与白内障的早期检测和治疗相结合，将使所述检测和提出的治疗在预防或早期介入白内障病原学中更有效。

5

本发明的优点也包括：筛选方法利用了表示白内障发生风险增加或降低的遗传标记。遗传标记的筛选方法是众所周知的，并可设定成非侵入性、快速和低成本的。这些方法当给患有非胰岛素依赖型糖尿病的哺乳动物，包括患有 II 型糖尿病的人施用，发现特别有价值。

10

鉴定哺乳动物特殊多态性存在与否的优点在于，有了这种信息卫生保健提供者，包括医师和兽医，能够给人和非人的单个患者提供更特异和合适的治疗方法，以及能够指导有关治疗和生活方式的调节以改善或延迟白内障的发生，或者当发生白内障的概率降低时，减少对不合适医学介入的担忧和可能。

15

本发明的优点另包括：指示白内障的遗传标记的典型性组合可用来筛选白内障发生风险可能增加的个体人群。这些个体包括患有 II 型糖尿病的病人，因此，在白内障形成或进一步发展之前，他们可采取预防性措施或给予合适的治疗。家族成员也可对患病个体的特殊多态性加以筛选，从而快速鉴定白内障发生风险增加的家族成员。本发明的优点还延伸到非人哺乳动物。狗和其他宠物易受到非胰岛素依赖型糖尿病和白内障的影响。例如，诊断患有非胰岛素依赖型糖尿病的动物的主人可对白内障的倾向加以筛选，以及主人咨询有关动物最适合的治疗方案。

20

25

为了筛选实验，从任何有核细胞源或体液中获取基因组 DNA 样品。临床实践中有用的细胞源的例子包括血细胞、口腔细胞、子宫颈阴道细胞、尿液中的上皮细胞、胎儿细胞或任何通过活检采得的组织中存在的细胞。体液包括血液、尿液、脑脊液、羊膜水以及感染或炎症部位的组织流出物。利用本领域众多标准方法中的任一种，将 DNA

30

从细胞源或体液中提取出来。应该理解，用于提取 DNA 的特定方法将依赖于来源的性质。对于从组织中分离总 DNA 的进一步讨论，参见 Rapley 和 Walker (同上)，第 2 章。

5 利用任意各种各样的技术，可操作筛选方法。在试图检测与白内障风险增加相关的遗传标记之前，可将哺乳动物样品内的核酸进行特异性扩增。举一个例子，醛糖还原酶启动子区域的微卫星重复区域含有特异序列，该序列提供了白内障的遗传诱因的指示。这些序列可由多核苷酸引物扩增。PCR 引物的长度应至少为 11 个碱基对，优选 15-
10 18 个碱基对，并且可长达 25-30 个碱基对。它们可设计成与 DNA 的靶区域，包括位于目的基因两侧的区域中的序列退火，或与基因序列本身退火；在任一情形下，延伸引物来扩增靶区域。本发明的示例是用于检测哺乳动物醛糖还原酶基因启动子区域的 Z-2 和 Z-4 微卫星等位基因存在与否的引物对。引物可设计成仅在 Z-2 或 Z-4 等位基因存在时其延伸才如所需地导致扩增的序列。实现此扩增的方法是设计在
15 3'端具有至少一个与 Z-2 序列错配但与 Z-4 序列匹配或反之亦然核苷酸的引物。特别的引物是核酸引物 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2。

20 众多鉴定 Z-2 和 Z-4 等位基因的方法中任一种可用来评价扩增的序列，用于检测哺乳动物醛糖还原酶基因的 Z-2 和 Z-4 等位基因的存在与否。举一个例子，扩增的序列可以与一种或多种核酸探针接触，所述探针包含与编码哺乳动物醛糖还原酶基因的 Z-2 和 Z-4 等位基因的核苷酸区域杂交的序列。探针可包含 DNA 或 RNA，包括寡核苷酸，
25 基因探针和 cDNA。探针可源自醛糖还原酶基因的启动子区域。它们至少长 10 个碱基对，但可长达 3350 个碱基对，这是人醛糖还原酶基因的启动子区域的长度。根据较短探针对碱基对错配辨别较好以及较长探针对双链体稳定性较好，对所选的探针长度进行优化(参见 USPN 6,156,601 和 USPN 6,197,506，在此引作参考)。所用探针的长度应使
30 有至少一个碱基对突变的突变基因和野生型基因之间能够辨别。优选

的寡核苷酸探针的例子包括 SEQ ID NO:3 及其互补序列。探针的制备方法包括寡核苷酸探针的合成(Sambrook 等 Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第 2 版), Cold Spring Harbor, 1989, 11.3-11.6)、cDNA 探针的合成(Sambrook 等, 同上, 10.38-10.50)和 RNA 探针, 其由体外转录合成(Sambrook 等, 同上, 10.27-10.38) 和由质粒载体合成(Sambrook 等, 同上, 10.29)。探针也可重新合成(Narang 等(1980) Methods Enzymol. 65: 610 和 Itakura 等(1984) Ann. Rev. Biochem. 53: 323)。放射性标记和使核酸探针与固相支持物上的靶序列杂交的方法在 Sambrook 等(同上) 11.3-11.57 和 Keller 等((1989) DNA Probes, Stockton, New York)中详细讨论。基因探针一般长于 500 个碱基, 包含靶基因的大部, 其可根据 Rapley 和 Walker (Chapter 6 of Molecular Biomethods Handbook (1998) Human Press, Totowa, New Jersey)的方法来进行合成。非放射性探针的制备可基于 Rapley 和 Walker, 第 6 章(同上)的方法, 以及如在非放射性原位杂交手册(Non-radioactive In Situ Hybridisation Manual)(1995), Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany))所述。上述所有这些文献在此引作参考。

其他用于鉴定 Z-2 和 Z-4 等位基因或其他与发生白内障风险相关的等位基因存在与否的有用技术包括单链构象多态性分析(SSCP)、梯度变性凝胶电泳(DGGE)、荧光原位杂交(FISH)、二维凝胶电泳、杂双链体分析、双脱氧指纹识别、酶错配切割(EMC)等。已知等位基因如 Z-2 和 Z-4 的检测是在足够严格的杂交条件下, 利用核酸探针和本发明实施方案中所述的方法进行。

对于 SSCP, 设计了引物, 使跨越目的基因的非复制区段、长度约 250-300 个碱基对的 DNA 产物得到扩增。对于各个扩增产物, 采用一个凝胶系统和两个跑胶条件。将各个扩增产物加样到含有 10%甘油的 10%聚丙烯酰胺凝胶上。分开的各个扩增引物的等分试样室温下以 8W 电泳 16 小时, 并在 4℃下以 30W 电泳 5.4 小时。这些条件的早先显示是用来鉴定 CFTR 基因中 98%的已知突变(Ravnik-Glavac 等

(1994) Hum Mol Gefaet 3: 801, 在此引作参考)。

5 可将与特异性遗传标记杂交的核酸探针安置在固相支持物上的不同核酸链的多个离散区域中。这种类型的阵列，也就是已知的微阵列，一般含有长度至少为 10 个核苷酸碱基的核苷酸序列。这种阵列含有与醛糖还原酶基因的 Z-2 和 Z-4 等位基因杂交或与编码当前未知的基因座的 DNA 杂交的核苷酸探针，所述基因座可能与发生白内障的风险相关。安置在固相支持物上的探针一般会含有寡核苷酸，并且可直接在固相支持物上生成或在固相支持物之外合成然后附着于支持物上。或者，附着于固相支持物上的探针可含有直接从醛糖还原酶基因分离或从 DNA 文库分离的核苷酸的同源序列。固相支持物上的探针的阵列可用作基因测序微阵列。

15 采用各种各样的技术来鉴定新的或已知的多态性的存在与否。首先，利用本领域标准方法可对醛糖还原酶的启动子区域直接测序。利用 PCR-RFLP 程序检测多态性，其中寡核苷酸对用来引发扩增反应，并把被限制性内切酶切割或未切割的扩增产物的大小与对照产物进行比较。

20 测序微阵列采用已知的重叠序列的标记 DNA 探针。通过在一端缺失一个核苷酸而在另一端添加一个核苷酸(因此是重叠的)，使 DNA 的短延伸作为区分于相邻探针的探针结合到固相支持物。然后，通过在高度严格条件下与重叠部分杂交，对核酸样品的 DNA 片段的序列进行测定，这使得仅正确互补的序列结合。因此，阵列上杂交的位置可以鉴定含有 DNA 样品的互补序列。以此方式，特异性多态性可以高通量的方式加以检测。此方法将发现在筛选大量的核酸样品中有特别的用途。若干核酸样品也可在微阵列上同时进行测序(参见 USPN 25 6,197,506, 在此引作参考)。

30 微阵列一般含有多个不同的核酸序列，通常为至少 10 个核苷酸、

更通常至少 20 个核苷酸、常常至少 50 个核苷酸，但可多达 100 个核苷酸或更多。本发明所用的微阵列是本领域公知的(参见 USPN 5,202,231、5,741,644、5,837,832 和 6,183,970，在此引作参考)。另外，其他固相基底可用于共价连接突变的目的核酸序列的代表性组合，包
5 括珠子和载玻片。通过导入与寡核苷酸反应的官能团，固相支持物可由玻璃或氧化硅或其他可适于共价连接寡核苷酸序列的材料制成。

各种各样的方法可用来使核酸结合到固相基底上。通过利用化学活性固相底物，可给核酸提供化学活性基团，该基团会与化学活性固
10 相基底表面反应。例如，通过利用硅酸酯、卤化物或其他表面上的活性硅种类，核酸可被修饰以与硅部分反应。让核酸共价键合到表面可形成硅酯。除了硅官能团，可使用有机加成聚合物，例如苯乙烯、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、乙烯基醚和酯等，其中有可与核酸上存在的官能团反应的官能团。例如，根据常规途径，可提供氨基、活化卤化
15 物、羧基、巯基、环氧化物等。键可以是酰胺、脒、胺、酯、硫醚、二硫醚等。形成这些共价键的方法可在 USPN 5,565,324 和 USPN 6,156,501 找到，在此引作参考。

在实践中，DNA 微阵列可用来检测完全杂交和未完全杂交的核
20 酸。这些微阵列包含大量的固定化核酸探针，所述探针结合核酸样品的标记 DNA，该样品本身一般含有大量的 DNA 片段。所以，这些组合物是序列的复合混合物。样品中高浓度的共有序列增加了其杂交程度以及与任何其他序列结合的这种序列的组分。微阵列表面上局部高浓度的探针也可诱捕错配结合的伙伴 DNA 序列。这些作用通过平均
25 或低于平均丰度的序列，可减少完全匹配序列结合的速率和程度。因此，DNA 微阵列是不完美的器件，但当大量样品需要快速处理的情形出现时则很有用。通过实验对杂交和漂洗步骤确定最佳的严格条件，在找到条件来限制与接近所需水平的序列相匹配的序列结合时，就可取得合理的成功水平。

30

对于杂交探针的检测，包括那些与固相支持物结合的探针，光可检测的装置是优选的，尽管可采用其他检测方法，如放射性、原子光谱等。对于光可检测装置，可利用荧光、磷光、吸附、化学发光等。最方便的是荧光，它可采取许多形式。可使用单个荧光剂或荧光对，尤其是在希望具有多个大斯托克司频移的发射波长的地方。可用的例证性荧光剂包括荧光素、罗丹明、德克萨斯红、花菁染料、藻红蛋白、噻唑橙和噻唑蓝等。当使用染料对时，可使一种染料在一个分子上，而其他染料在另一与第一分子结合的分子上。例如，可使一种染料在第一或结合的成分上而使其他染料在第二或配位的成分上。重要因素是当两个成分结合时两种染料对有效能量转移是足够近的(参见 USP 5,992,617，在此引作参考)。

单核苷酸多态性(SNP)，优选但不必出现在醛糖还原酶基因的启动子区域中，与白内障风险增加相关，也可用来评估白内障发生的风险。通过使已知基因中的多态性相关，这种 SNP 可得到鉴定，所述基因在有白内障或非胰岛素依赖型糖尿病阳性病史的家族成员中与白内障的发生共分离。如那些出现在非翻译和翻译区域如微卫星启动子区域的 SNP，通过基因组一宽扫描以及家谱相关连锁分析可加以鉴定。

因为有连带目的突变的鉴定，通过对基因组或互补 DNA 的所需区域进行核酸测序，可实现与白内障风险相关的等位基因中连带 SNP 的鉴定。微阵列技术能最有效地对 SNP 进行筛选，其中核酸序列附着于固相支持物如微阵列上，与杂交条件接触，所述条件可区分只有一个核苷酸不同的两个核酸序列(参见例如，Wang 等(1998) Science 280: 1077; 和 Hacia 等(1998) Nature Genet 18: 155)。或者，质谱分光光度计可用来鉴定具有 SNP 的 PCR 产物中的小的质量差异(参见 Kirpekar 等(1998)核酸研究(Nucleic Acids Res) 26: 2554; 在此引作参考)。

其他分析 SNP 的方法是“动态等位基因特异杂交”(DASH)。该技术多孔的格式中使用标记的寡核苷酸，当寡核苷酸以双链形式存

在时，其会发荧光，但当其是单链形式时则不发荧光。加入待测单链 DNA，使得链杂交。链变性的温度将允许鉴定 SNP 处的碱基。DASH 技术具有技术简单、不需昂贵设备的优点。其他可用于筛选与哺乳动物发生白内障的遗传诱因相关的 SNP 的技术包括核酸外切酶抗性、微测序、ddNTP 的液相或固相延伸以及寡核苷酸连接测定(如 USPN 5,952,174 中所述)。所有上述文献在此引作参考。

在通过上述任何技术检测连带突变或 SNP 的存在之后，包含突变的特异核酸变化由直接 DNA 序列分析或限制性分析或两者组合来进行鉴定。以此方式，醛糖还原酶基因中先前未鉴定的 SNP 可加以鉴定。

本发明可用来评价发生白内障总的风险和/或用于给诊断对象设计个性化的治疗方案。预防筛选方法可用于任何被视为白内障发生风险较高的个体，即那些可能具有白内障家族史个体，那些患有糖尿病的个体，或那些具有糖尿病相关表型特征(即肥胖)的个体。Z-2 或 Z-4 等位基因的检测与筛选对象的表型参数相关，并可理解为阳性或阴性家族病史或非胰岛素依赖型糖尿病病史所考虑的因素。当患者未显示发生疾病的症状，或显示疾病的初期症状时，获得基因型评估可使得医师或兽医能够开始治疗或提出防止明显症状的发作或进展的变化。对于人来说，治疗可包括生活方式的变化，如限制暴晒于阳光、氧化性应激、吸烟和饮酒，小心关注糖尿病发作的治疗，或通过饮食和锻炼来预防。治疗可在疾病发展的早期开始或在症状明显之前开始。

用于治疗有发生白内障风险的哺乳动物的方法的例子包括检测遗传标记的存在，其中包括醛糖还原酶基因相关的 Z-2 微卫星标记的检测，其后哺乳动物可用醛糖还原酶基因的抑制剂治疗。这种治疗是依据作为多元醇途径中第一限速酶的醛糖还原酶的活性。醛糖还原酶催化己糖 NADPH-依赖性还原成多元醇，将 D-葡萄糖转化为山梨醇以及将半乳糖转化为半乳糖醇。酶对葡萄糖的亲合性是低的，因此在正

常条件下不会有太多的山梨醇产生。然而，在高血糖症存在下，山梨醇累积，这是因为其不易扩散到眼球以外(Ko 等，同上)，从而导致白内障。因此，醛糖还原酶可用作药理介入的靶子，并且该酶的抑制剂已显示能防止哺乳动物形成白内障(Robison 等(1995) Invest Ophthalmol Vis Sci 12: 2368; Devamanoharan 等(1995) J Ocul Pharmacol Ther 4: 52; 以及 Sato 等(1999) Exp Eye Res 1999 68: 601)。这些文献在此引作参考。

核酸与互补链的杂交依赖于众多化学和物理因素，包括(i)温度；(ii)盐浓度；(iii)杂交序列的相似性或“同源性”；以及(iv)核酸浓度。杂交和漂洗条件的严格性(即，主要依赖的物理条件和盐浓度及温度)可用来确定结合标记的核酸物种的检测程度。该检测可在高度严格条件下进行，由此限制对序列的检测，所述序列几乎与标记序列相同，或通过降低严格性，可用来检测具有较低同源性的序列。杂交后漂洗条件的高严格性可用来使异源双链体去稳定，所述异源双链体可以杂交但含有错配碱基(即，低于一定所需的同源性的程度)。在要求杂交序列与探针是完全同源性的情况下，可采用很高程度的杂交和漂洗严格性。高度严格性条件在本领域中是众所周知的(Ausubel 等(1989) Current Protocols in Molecular Biology, 第 I 卷, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, N. Y., 第 2.10.3 页，在此引作参考)，并且包括高度严格性杂交和漂洗程序的例子：在 1% 十二烷基硫酸钠(SDS)和 1 mM EDTA 的 5×柠檬酸钠盐缓冲液(SSC)中，和滤膜结合 DNA 于 65℃下杂交，接着用 0.1×SSC/0.1% SDS 在 68℃下漂洗。

较低严格性漂洗可用来鉴定与探针具有较低同源性的序列。该序列包括相关等位基因。为了检测不完全杂交而采用较低严格性处理是本领域众所周知的(参见，Sambrook 等，同上；和 Ausubel 等，同上，第 2.10.3 页，两者皆以其全文在此引作参考)。适中严格性漂洗条件可通过在 0.1% SDS 的 0.2×SSC 中于 42℃下漂洗来实现，而低严格性漂

洗条件包括由 0.1% SDS 的 0.2×SSC 于室温下漂洗(Ausubel 等, 同上, 第 13.12.1-13.12.5 页, 在此引作参考)。

5 对于任何给定的基于杂交的检测机理, 需要提供理想结果的漂洗条件(即, 根据所需的杂交阈限获得正确的检测水平)对各组目的序列必须通过实验来确定。

10 这些方法可用来筛选下列对象的基因组 DNA: (i)一般的哺乳动物; (ii)患有非胰岛素依赖型糖尿病的哺乳动物; (iii)人; (iv)患有 II 型糖尿病的人, (v)已被诊断患有年幼发作成熟性糖尿病的华人 (MODY), 以确定其疾病的病原学, (vi)具有阳性 II 型糖尿病家族史的华人个体, 以确定发生糖尿病症状的可能性, 以及(vii)患有 II 型糖尿病的华人人群的成员。与白内障相关的多态性在具有阳性 II 型糖尿病史的华人家族中得到最有效的鉴定(即, 具有发生 MODY 的成员的家族)。
15 然而, 鉴定的连带多态性对鉴定任何人特别是华人人群的成员中风险增加是有用的。

下列实施例以说明本发明方式而非限制方式提供。

20 实施例 对象和诊断

25 香港威尔士王子医院糖尿病中心连续征召了 567 位患者, 并按世界卫生组织的标准对这些患者加以诊断(World Health Organization Technical Report Series (1985) 727)。为了增加 II 型糖尿病的均一性, 排除那些在 35 岁前已确诊糖尿病以及那些在样品采集时已确诊糖尿病 3 年或更少且已进行胰岛素治疗的患者。瞳孔放大后, 经直接检眼镜检查以及结合同样眼球中史奈仑氏视力表(Snellen's chart)≤20/70 上的最佳视力灵敏度发现晶状体混浊, 则表明有白内障。Fundoscopy 检查由眼科专家或经培训的糖尿病专家进行。

30

临床、生化测定以及人体测量

5 所有患者在临床检查前禁食至少 8 小时。保持坐姿至少 5 分钟后，测量血压。当患者身穿薄衣、光脚站立时进行身体测量。腰围是脐与髂嵴之间的最小周长，而臀围是环绕臀部的最大周长。利用葡萄糖氧化酶方法以及全自动离子交换层析方法分别测定血浆葡萄糖和 HbA_{1c}(正常范围：5.1-6.4%)。总胆固醇和甘油三酯的血浆水平以酶法测定。HDL-胆固醇的测定在硫酸葡聚糖-MgCl₂ 分级沉淀后进行，而 LDL-胆固醇则利用 Friedewald 等式计算(Friedewald 等(1972) Clin. Chem. 18: 499)。

10

基因表型

利用引物 5'-GAATCTTAACATGCTCTGAACC-3' (SEQ ID NO:1) 和 5'-

15

GCCCAGCCCTATACCTAGT-3' (SEQ ID NO:2)在 Ko 及其同事(Ko 等，同上)所述的 PCR 条件下对醛糖还原酶基因的 5'端微卫星进行基因型测定。把微卫星的等位基因在聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离并对照 DNA 分子量标准确定大小。

统计分析

20

分别采用斯氏 t 检验和曼-惠特尼等级和(Mann-Whitney Rank Sum)检验进行评价，将连续变量表达为适当的平均值±SD 或中值(范围)。进行卡方检验(Chisquare test)以分析比例。以白内障作为相依因素(有=1，无=0)，年龄、性别(男=1，女=0)、糖尿病病程长短、空腹血糖、HbA_{1c}、心脏收缩和舒张压、体重指数(BMI)、腰臀围比(WHR)、脂质和微卫星等位基因 Z 以及 Z4 作为独立因素，进行多元逻辑式回归分析。p< 0.05 视为统计学上显著。

25

30

在 567 位患有 II 型糖尿病的华人患者中，157 位(约占 28%)有视觉损伤的白内障临床症状。与没有白内障的患者比较，那些白内障患者诊断时年纪更大，并且有较长的糖尿病持续时间(全部在 p<0.01)。

白内障患者还有较高的心脏收缩压、较高水平的空腹血糖(两者均在 $p<0.01$)以及 HbA_{1c} ($p<0.05$) (所有上述指标都调节为显著性) (参见下表 1)。

5

表 1

567 位患有白内障或没有白内障的 II 型糖尿病患者的香港华人的临床和生化特征

	II 型糖尿病患者		
	总数	没有白内障	患有白内障
N	567	410	157
年龄(岁)	57 ± 12	54 ± 11	$64 \pm 10^{**}$
性别(男:女)	1:1.3	1:1.4	1:1.1 ^{**}
糖尿病持续时间(年)	5 ± 5	4 ± 4	$6 \pm 6^{**}$
HbA_{1c} (%)	7.90 ± 2.0	7.8 ± 1.9	$8.3 \pm 2.1^{**}$
空腹血糖 (mmol/l)	10 ± 3.7	8.8 ± 3.5	$9.5 \pm 4.1^*$
体重指数 (kg/m^2)	24.6 ± 3.6	24.7 ± 3.4	24.4 ± 3.5
腰臀围比	0.88 ± 0.06	0.88 ± 0.06	0.89 ± 0.07
心脏收缩压 (mmHg)	136 ± 22	134 ± 21	$143 \pm 22^{**}$
心脏舒张压 (mmHg)	82 ± 11	81 ± 11	84 ± 11
总胆固醇 (mmol/l)	5.6 ± 1.3	5.6 ± 1.3	5.7 ± 1.3
HDL-胆固醇 (mmol/l)	1.3 ± 0.34	1.3 ± 0.35	1.2 ± 0.33
LDL-胆固醇 (mmol/l)	3.5 ± 1.0	3.5 ± 1.0	3.6 ± 0.9
甘油三酯 (mmol/l)	1.9 (0.38,26)	1.9 (0.38,26)	2.0 (0.45,17)

如适当, 把数据表示成平均值 $\pm$ SD 或中值(范围)。

10

代谢参数的比较随年龄进行调整。除了年龄外, BMI 和 WHR 的

比较随性别进行调整，而 HbA1c 和空腹血糖的比较则随糖尿病病程长短进行调整。

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。

5 在患者中共检测到 14 个微卫星的等位基因。等位基因 Z 及携带 Z 的基因型(Z, Z 加上 Z, 非-Z)在白内障患者中过多出现(两者均在 $p < 0.01$)。相反，等位基因 Z-4 及其基因型(Z-4, Z-4 加上 Z-4, 非 Z-4)更频繁地出现在没有白内障的患者中(两者均在 $p < 0.05$) (表 2)。

10 表 2

567 位患有或未患有白内障的 II 型糖尿病华人中的微卫星的主要等位基因和基因型分布

	II 型糖尿病患者	
	没有白内障	患有白内障
等位基因频率 (%)		
Z+6	3.8	4.3
Z+4	4.8	6.3
Z+2	34.4	30.0
Z	22.6	29.6*
Z-2	23.9	21.7
Z-4	8.3	4.8*
其他	2.2	3.1
基因型分布		
Z ⁺ ,Z ⁺ :Z ⁺ ,Z ⁻ :Z ⁻ ,Z ⁻	9:53:103	37:169:204**
Z ⁺ :Z ⁻	62:103	206:204
Z-4 ⁺ ,Z-4 ⁺ :Z-4 ⁺ ,Z-4 ⁻ :Z-4 ⁻ ,Z-4 ⁻	1:24:132	0:39:371*
Z-4 ⁺ :Z-4 ⁻	25:132	39:371

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

15 利用多元逻辑式回归分析，发现白内障的发生与年龄正相关，但与微卫星等位基因 Z-4 的存在负相关(表 3)。在有等位基因 Z 和没有等位基因 Z 的患者之间的平均年龄中没有显著差异(58 ± 12 对 56 ± 12

岁)或 Z-4 (59±12 对 56±12 岁)。

表 3

利用多元逻辑式回归分析对华人 II 型糖尿病患者发生白内障的独立风险因素的鉴定

	β	标准误差(s.e.)	p 值
年龄	0.08	0.01	<0.01
Z-4 等位基因	-0.36	0.17	0.03

$R^2=0.23, p<0.01$

II 型糖尿病性白内障在高加索人群中并不罕见。在 UKPDS 研究中，在心脏收缩压数值范围之上，不同亚群中新诊断 II 型糖尿病患者的白内障发生率为 4.7-5.2/1000/年(Adler 等(2000) Brit Med. J. 321: 412)。Janghorbani 及其同事随访 II 型糖尿病门诊患者平均 5 年，并观察到有或没有胰岛素治疗的患者的白内障发生率分别为 1.7 和 17.8/1000 个体/年(Janghorbani 等，同上)。在香港华人患者的基于临床的一批人中，有 28%患有白内障(表 1)，这提示眼病在华人 II 型糖尿病人群中也是常见的。白内障患者似乎年龄较大，患有更严重的糖血控制和较高的心脏收缩压(表 1)。然而，年龄是唯一识别的独立风险因素(表 3)，这与其他人群中所观察的结果一致，在很大程度上，白内障是衰老相关的疾病(Janghorbani 等，同上；和 McCarty 等(1999) Am. J. OpAthalmol. 128: 446)。一直有证据表明氧化性应激可能有助于发生白内障(Lee 等(1994)同上，和 Lee 等(1999)同上)，以及衰老增加氧化性应激(Varmaetal (1995) Critical Rev. Food Nutri. Sci. 35: 111)。因此，II 型糖尿病性白内障的发生率与年龄之间的关系可反映出氧化性应激的效果(Shah 等(1998) J Clin. Endocrinol. Metabol. 83: 2886)。

除了年龄以外，等位基因 Z 和 Z-4 呈现的高和低分别(表 2 和 3)暗含华人 II 型糖尿病人群中白内障的发生可能受到醛糖还原酶基因的基因型的影响。这种遗传发现与多元醇途径参与糖尿病性白内障的发病机理的生理证据一致(Lee 等(1995)同上，Lee 等(1999)同上，以及

Cogan 等(1995)同上), 并且提示醛糖还原酶发挥了重要作用。醛糖还原酶催化葡萄糖转化成山梨醇。山梨醇不易跨越细胞膜, 并在胞内累积, 尽管它能被山梨醇脱氢酶以 NAD^+ 作为辅助因子生理性氧化成果糖。高血糖症促进葡萄糖通过多元醇途径的流入。这可促成多元醇的累积, 并通过修饰 NADPH 和 NAD^+ 的有用性导致慢性氧化性和渗透性应激, 最终使得组织损伤(Lee 等(1995)同上, Lee 等(1999)同上)。以此为背景, 假设等位基因 Z 可与醛糖还原酶的过度活跃相关, 而这夸大了白内障的发生。然而, 等位基因 Z-4 可能与酶的活性不足相关, 这是保护性的。有初步证据表明微卫星的多态性可能与醛糖还原酶基因的不同表达水平相关(Shah 等, 同上, 和 Ikegishi 等(1999) Life Sci. 65: 2061)。但是, 需要更多的研究来阐明特异等位基因和醛糖还原酶的基因表达及生物活性之间的关系。而且, 我们认为所观察到的微卫星与糖尿病性白内障之间的关系可反映出当前未知的基因座的效应, 所述基因座处于同患者发生白内障中二核苷酸重复多态性的连锁失衡。

15

总结上述数据, 在患有 II 型糖尿病的华人患者中检测到共 14 个微卫星的等位基因。等位基因 Z 和携带 Z 的基因型(Z, Z 加上 Z, 非-Z)在白内障患者中是高呈现的。相反, 等位基因 Z-4 及其基因型(Z-4, Z-4 加上 Z-4, 非 Z-4)在没有白内障的患者中更频繁。

20

白内障的发生率发现与年龄是正相关的, 但与微卫星等位基因 Z-4 的存在是负相关的。在有等位基因 Z 或 Z-4 的患者与没有等位基因 Z 或 Z-4 的患者之间平均年龄没有显著差异。

25

总之, 结果显示白内障发生在 II 型糖尿病的华人患者中是常见的。除了年龄以外, 醛糖还原酶基因似乎是这种眼病的重要决定因素。

<110>	香港中文大学 (THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG)	
<120>	通过醛糖还原酶基因型确定白内障的风险率 (DETERMINATION OF RISK FACTORS FOR CATARACT BY ALDOSE REDUCTASE GENOTYPE)	
<130>	SCT031983-47	
<150>	US 60/280,529	
<151>	2001-03-30	
<160>	3	
<170>	PatentIn version 3.1	
<210>	1	
<211>	19	
<212>	DNA	
<400>	1	
	gcccagccct atacctagt	19
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<400>	2	
	cttagaattg tacgagactt gg	22
<210>	3	
<211>	138	
<212>	DNA	
<400>	3	
	gcccagccct atacctagtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg	60
	tgtgttttcc tttaaatta tttccttagg aaaaattccc atgatgggag attactggtt	120
	cagagcatgt taagattc	138

图1

U72619: 人醛糖还原酶基因,启动子区域

```

1  tgttggacat  gtagcatata  acctttgttt  gtttatagaa  gottattgat  gtataattta
61  cgtaccatat  gattracctt  tttaaatatg  caattgggtg  gtttttttgt  atattcaaac
121 ttgtaccaga  tctcgagg  cttgaatgcc  aggctcaaga  gtttaggttt  tatcctatgg
181 gaattggaca  gttcataaga  agttgtcttt  taattcaaaa  tgtgttcatt  aaggaaataa
241 tctgacaaag  agtattcccc  atttccttct  gtcttcttcc  taaatttcc  aaatgttata
301 ggttgtattt  tccttcttag  catcattcca  tagctatatg  accttggttt  ctactttcac
361 cttaacatta  cctcatatac  atttttctct  gtgtctttgt  catctttact  tttgatggct
421 acaccttata  tcttgctatt  gttggatatt  tacagtttta  ctttaagtat  acagcatttt
481 aaaaatacat  acgcataatg  gtatatctgt  gtgcaggcct  gggactaagg  gaaggcaagt
541 gccaaaggaca  taaatgtaaa  aaagctccta  ccttctggca  tgaaaatttg  tacctgtgta
601 cctcatttgt  cttaccttgg  tcccagccca  gcccataacc  tagtgtgtgt  gtgtgtgtgt
661 gtgtgtgtgt  gtgtgtgtgt  gtgtgtgtgt  tttcctttta  aattatttcc  ttaggaaaaa
721 ttcccatgat  gggagattac  tgggtcagag  catgttaaga  ttccaattac  tagagtgttt
781 ctcaggagga  ttccattgaa  ggtttttttc  cctttttcaa  acaaaatttt  gatattgata
841 cttatcaaaa  gatgggagat  caaaaatcct  gagatcaaaa  attttggtat  gtgtacattt
901 taaaaagatt  acagaggcaa  tgggggatgt  tagggggcta  tcacaatagc  atgtcccaac
961 tagagtgcta  ttgttgctat  agaaattcca  ctgatacaac  ttttcattgc  tgcattggcc
1021 agccaaaata  ttctgggttt  atttatttat  ttacagaca  ggtcttgc  atgtgtcca
1081 ggctggctc  taactcctgg  gctcaagcag  tcatccacc  tcagcctc  gagaagctga
1141 gactacaggt  atcactccag  ctttagacac  agttataact  tcatgcaatc  aagctgtata
1201 ctcaattatt  atcaaaccaa  caacaaagcc  tctgatattg  agtccatgtc  cctaacagac
1261 gaccttctg  tgtgtacca  cctggccact  caaggtgtat  cattttcaca  agagattagc
1321 tctttggatt  tggaccagg  aggttcaatt  ggcagagcaa  cctccaagtc  aagaggactc
1381 tcatggagga  aggaacttgc  tgttttacac  aaagcaagt  cccagcttta  ggtcaagtc
1441 caaattctat  tacttgggga  caaatgaatt  tgcccaatag  caacaatttt  taaaaagtt
1501 acatggaaaa  atactctggc  tagtctgttc  tgtataaatt  ttccaggag  ggtgcttgag
1561 taaagaaagc  accaaatgga  aaatcacagg  catggagttt  agagagacct  ggtgcttgag
1621 tcaactaccag  gcagatggag  ttcccaatct  tgcataatta  ggggaaagat  cggaggggtga
1681 tggagcagaa  agagcagttg  gggtagggt  gagtatcatg  aagagaggtt  gttggaaaga
1741 aaccaaaatt  gtcttcaagg  atcttcaagt  gactttttct  taggctatct  tggaaaaaat
1801 gtgtgtttct  acctgccaat  tagggtgatc  aatttactat  tttgtacctt  ctaatttgaa
1861 atactggaag  ctacaatatt  agagtcaact  ttttctctg  tgggtttctg  tctgttcaat
1921 tttcttctc  tagagagttt  tgataagtta  ctgtaactga  acttactgct  ttgatagagt
1981 ctcaactttcc  aaagactgat  gaaatttgtc  ttactgattc  tgaatggaca  gcttactttt
2041 ccaaattctt  ctgagagttc  tggatcaagc  ccatacaagg  tttctaacct  caagaacatc
2101 aaaggatgct  ggcttttgg  ggaaggcttg  ctgaaccaca  cctagtatgc  acagacacag
2161 ctaacacct  gagtgggtg  caaagagaga  tctagaaggc  taaaaaagc  tgggcaaac
2221 catattttgt  gaaggtgctt  tgcaaaagga  ttgcaagcca  ttttctggc  atcacctttg
2281 tctaagaaca  aagtgcggt  aactatatgt  gtagtcagta  tgattcacat  agaattaagg
2341 acaaggatt  cgtcagattc  ccaaagagca  tcaaaactgg  gttggacaac  aaaggcattc
2401 ttctgggtc  ttaatgaaac  caaaacttat  ttctagtcta  tgtatttatg  ggtgctgtt
2461 tattttcgt  aaagcattcg  ctttccacc  agatacagca  gctgaggaa  tctttctgc
2521 cagcggggc  gcgggcgagc  gttgggggc  gaaagaatcc  gctgccaact  ggaccaggcg
2581 gaagaagcat  ccccgccgac  ccttggggaa  ggcggccg  gcacccccag  cgcaaccaat
2641 cagaaggctc  cttcgcgag  cggcgcgcca  accgcaggcg  cctttctgc  cgacctcag
2701 ggctatttaa  aggtacgcgc  cggcgccaag  gcgcacagt  actgggcggg  ggtctgggga
2761 gcgcagcagc  catggcaagc  cgtctcctgc  tcaacaacgc  cgccaagatg  cccatcctgg
2821 ggttgggtac  ctggaaggta  ggtgctcgtg  gggcgcggg  cccggggctc  gcctcacact
2881 ctccgcgcgc  cctgtattgg  cgaaggaccc  cgagtgaacc  tgagcagctc  gccccgcgga

```

```
2941 cgccccggcgt gctgggagcc acgcgcgggc ttgcagggtc cccagcgggc tggggtcggc
3001 cttgcagaga ccgggggcct tggctccccg ggttggccct gggcgtcagg gcagcatcct
3061 gcgagtgggg tttgggagca gctcacggga gccccgcc taccgcgggc aacccttgat
3121 gggcggccca ccagtccgca ttttgggtcc tagcgggcgc cccaagcggc acaacgcgag
3181 agggaggcgg ggaaagtggg cttcacagac cggtaggacct cgggcgcaga cagggacgtg
3241 gagccgtcgg caaggtgtgg gagcgcagac ccagcctcct tccctcgag gcacctgtag
3301 cccggttgcc tcacttgtaa atagttggtc tcaatcgttt cgattcctgc
```

图1

图2A

U72619: 人醛糖还原酶基因,启动子区域,正向引物

```
1   gccacagccct atacctagt
```

图2B

U72619: 人醛糖还原酶基因,启动子区域,反向引物

```
1   cttagaattg tacgagactt gg
```

图2C

U72619: 人醛糖还原酶基因启动子微卫星重复区域

```
1   gccacagccct atacctagtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg
61  tgtgttttcc ttttaaatta ttcccttagg aaaaattccc atgatgggag attactgggt
121 cagagcatgt taagattc
```

图2