



(43)申请公布日 2020.04.10

权利要求书1页 说明书30页 附图13页

[illegible]

1. 用于在受试者中诊断或预后KC的方法,所述方法包括检测来自受试者的样品中的两个或多个遗传变体,其中所述两个或多个遗传变体选自图1所列的组,并且其中所述两个或多个遗传变体的存在指示所述受试者中KC的诊断或预后。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述变体检测是通过测序方法进行的。

3. 根据权利要求1或2的方法,其中所述两个或多个遗传变体选自图2所列的组并且所述受试者是非裔美国人(Afro-American)。

4. 根据权利要求1或2的方法,其中两个或多个遗传变体选自图3所列的组并且所述受试者是白种人(Caucasian)。

5. 根据权利要求1或2的方法,其中所述两个或多个遗传变体选自图4所列的组并且所述受试者是西班牙裔(Hispanic)。

6. 根据权利要求1或2的方法,其中所述两个或多个遗传变体选自图5所列的组并且所述受试者是东亚人(East Asian)。

7. 根据前述权利要求中任一项的方法,其进一步包括从来自所述受试者的样品中扩增核苷酸分子。

8. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述检测包括检测来自所述受试者的样品的核苷酸分子或其扩增子中的两个或多个遗传变体。

9. 预测受试者中发生KC的风险的方法,所述方法包括检测来自受试者的样品中的两个或多个遗传变体,其中两个或多个遗传变体选自图1所列的组,并且其中所述两个或多个遗传变体的存在指示所述受试者中发生KC的风险。

10. 根据权利要求9的方法,其中所述两个或多个遗传变体选自图2所列的组并且所述受试者是非裔美国人。

11. 根据权利要求9的方法,其中所述两个或多个遗传变体选自图3所列的组并且所述受试者是白种人。

12. 根据权利要求9的方法,其中所述两个或多个遗传变体选自图4所列的组并且所述受试者是西班牙裔。

13. 根据权利要求9的方法,其中所述两个或多个遗传变体选自图5所列的组并且所述受试者是东亚人。

14. 根据权利要求9-13中任一项的方法,其进一步包括从来自所述受试者的样品中扩增核苷酸分子。

15. 根据权利要求9-14中任一项的方法,其中所述检测包括检测来自所述受试者的样品的核苷酸分子或其扩增子中的两个或多个遗传变体。

16. 开发用于在受试者中治疗KC的治疗方案的方法,所述方法包括检测来自受试者的样品中的两个或多个遗传变体,其中所述两个或多个遗传变体选自图1中的组,并且其中所述两个或多个遗传变体的存在指示所述受试者中需要KC治疗方案。

17. 用于在受试者中治疗KC的方法,所述方法包括检测来自受试者的样品中的两个或多个遗传变体,其中所述两个或多个遗传变体选自图1所列的组,并且在受试者中治疗KC。

## 用于检测与圆锥角膜相关的等位基因的方法

### 发明领域

[0001] 该申请一般涉及用于分离和检测疾病相关的遗传等位基因的方法。具体而言,该申请涉及用于检测与圆锥角膜(keratoconus)诊断和预后相关的等位基因的方法。

### [0002] 发明背景

[0003] 圆锥角膜(KC)是最常见的角膜扩张病症(disorder),其中约6-23.5%的受试者携带阳性家族史(Wheeler,J.,Hauser,M.A.,Afshari,N.A.,Allingham,R.R.,Liu,Y.,Reproductive Sys Sexual Disord 2012;S:6)。报道的KC发病率在8.8-54.4/100,000的范围内。发病率的这种变化部分原因是由于用于诊断疾病的不同标准。(Wheeler,J.,Hauser,M.A.,Afshari,N.A.,Allingham,R.R.,Liu,Y.,Reproductive Sys Sexual Disord 2012;S:6;和Nowak,D.,Gajecka,M.,Middle East Afr J Ophthalmol 2011;18(1):2-6)。文献中存在许多研究,其尝试明确KC的遗传原因。这些研究已经发现许多可能的遗传变异或SNP,根据实验参数相信其有助于疾病的病因。

[0004] KC是常见的角膜病症,其中中央或中央旁角膜经历逐渐变薄和变陡(steeptening),引起不规则散光。遗传模式既不明显也是不可预测的,但已报道具有阳性的家族史。据报道,KC的发病率通常为2000人中的1人。KC可显示以下病理学发现,包括Bowman层碎片化(fragmentation)、基质(stroma)变薄和上皮覆盖、Descemet膜的折叠或断裂以及数量不等的弥漫性角膜瘢痕(diffuse corneal scarring)。

[0005] 组织病理学研究展示了Bowman层破裂或完全缺失、胶原蛋白紊乱、瘢痕和变薄。这些变化的病因尚不清楚,尽管导致角膜中胶原蛋白降解的酶具有一些可疑的变化。虽然提示KC具有遗传倾向性,但尚未鉴定出特定基因。大多数KC病例是双侧的(bilateral),但通常是不对称的。受影响较小的眼睛可能显示大量散光或轻度变陡。发病通常在青春期早期,并发展到20多岁和30多岁。然而,病例可能会在生命的更早期或更晚期开始。每个个体都有不同的进展。经常有频繁更换眼镜的历史,其不能充分矫正视力。另一个常见的进展是从软性隐形眼镜到复曲面或散光矫正隐形眼镜,再到硬性透气性隐形眼镜。

[0006] 迄今为止,尚未证明预防策略有效。有些人认为揉搓或按压(例如,睡觉时手压着眼睛)会引起和/或导致KC进展,因此应告知受试者不要揉搓眼睛。在一些受试者中,避免过敏原可以帮助减少眼睛刺激,并从而减少眼睛揉搓。

[0007] 目前,可以通过裂隙灯(slit-lamp)检查和观察中央或下角膜变薄作出诊断。计算机辅助角膜地形图系统(videokeratography)还可用于检测早期KC,并允许跟踪其进展。超声测厚法(Ultrasound pachymetry)也可用于测量角膜上最薄的区域。已经设计出了使用计算机辅助角膜地形图系统的新算法,该算法现在允许检测顿挫型(forme fruste)、亚临床或可疑的圆锥角膜。这些设备可以允许对受试者进行更好的筛查以进行前瞻性屈光手术,但是在本领域中仍然需要更好的预后和诊断方法。

[0008] 本公开满足了这种需求并且通过提供用于通过检测与圆锥角膜相关的突变的等位基因来预后和诊断KC的方法。

### [0009] 发明概述

[0010] 本公开内容提供了用于检测与KC相关的一个或多个等位基因的改进方法。

[0011] 在一些实施方案中,本公开提供了用于在受试者中检测与KC有关的变体的方法,该方法包括检测来自受试者的样品中的两个或多个遗传变体(例如,单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism) (SNP) 和插入/缺失(indels)),其中两个或多个遗传变体选自图1中列出的遗传变体,并且其中两个或多个遗传变体的存在指示受试者中的KC。

[0012] 在一些实施方案中,本公开提供了用于在受试者中诊断或预后KC的方法,该方法包括检测来自受试者的样品中的两个或更多个遗传变体(例如,单核苷酸多态性(SNP) 和插入/缺失),其中两个或更多个遗传变体选自图1中列出的遗传变体,其中两个或更多个遗传变体的存在指示受试者中KC的诊断或预后。

[0013] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图2中列出的遗传变体。在另外的实施方案中,受试者是非裔美国人(Afro-American,或美国黑人)。在进一步的实施方案中,通过检测对非裔美国人特异的两个或多个遗传变体来鉴定非裔美国人。

[0014] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图3中列出的遗传变体。在另外的实施方案中,受试者是白种人(Caucasian)。在进一步的实施方案中,通过检测对白种人特异的两个或多个遗传变体来鉴定白种人。

[0015] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图4中列出的遗传变体。在另外的实施方案中,受试者是西班牙裔(Hispanic)。在进一步的实施方案中,通过检测对西班牙裔特异的两个或多个遗传变体来鉴定西班牙裔。

[0016] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图5中列出的遗传变体。在另外的实施方案中,受试者是东亚人(East Asian)或韩国人(Korean)。在进一步的实施方案中,通过检测对东亚人或韩国人特异的两个或多个遗传变体来鉴定东亚人或韩国人。

[0017] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自本文所述的突变(例如,遗传变体)的任何组合(例如,图1-5)。

[0018] 在一些实施方案中,所述遗传变体检测是通过测序方法进行的。

[0019] 在一些实施方案中,本公开提供了用于在受试者中检测与KC有关或引起KC的方法,该方法包括在来自受试者的样品中检测两个或多个遗传变体(例如,单核苷酸多态性(SNP) 和插入/缺失),其中两个或多个遗传变体选自图1中列出的遗传变体,并且其中两个或多个遗传变体的存在指示受试者中的KC。

[0020] 在一些实施方案中,本公开提供了用于在受试者中预测发生KC的风险的方法,该方法包括检测来自受试者的样品中的两个或多个遗传变体,其中两个或多个遗传变体选自图1中列出的遗传变体,并且其中两个或多个遗传变体的存在指示受试者中KC发生的风险。

[0021] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图2中列出的遗传变体。在另外的实施方案中,受试者是非裔美国人。

[0022] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图3中列出的组。在另外的实施方案中,受试者是白种人。

[0023] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图4中列出的遗传变体。在另外的实施方案中,受试者是西班牙裔。

[0024] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图5中所列的组。在另外的实施方案中,受试者是东亚人或韩国人。

[0025] 在一些实施方案中,两个或多个遗传变体选自本文所述的突变(例如,遗传变体)的任何组合(例如,图1-5)。

[0026] 在一些实施方案中,所述变体检测是通过测序方法进行的。

[0027] 在一些实施方案中,本公开提供了用于开发在受试者中治疗KC的治疗方案的方法,该方法包括检测来自受试者的样品中的两个或多个遗传变体,其中所述两个或多个遗传变体选自图1中列出的遗传变体,并且其中两个或多个遗传变体的存在指示受试者中对KC治疗方案的需求。

[0028] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图2中列出的遗传变体。在另外的实施方案中,受试者是非裔美国人。

[0029] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图3中列出的遗传变体。在另外的实施方案中,受试者是白种人。

[0030] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图4中列出的遗传变体。在另外的实施方案中,受试者是西班牙裔。

[0031] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体选自图5中列出的遗传变体。在另外的实施方案中,受试者是东亚人或韩国人。

[0032] 在一些实施方案中,所述两个或多个遗传变体(例如,SNP)选自本文所述的突变(例如,遗传变体)的任何组合(例如,图1-5)。

[0033] 在一些实施方案中,所述变体检测是通过测序方法进行的。

[0034] 在一些实施方案中,本公开提供了用于在受试者中治疗圆锥角膜的方法,该方法包括在受试者中诊断或预后KC并且治疗KC。在进一步的实施方案中,治疗可包括戴眼镜或隐形眼镜,和/或进行胶原蛋白交联或角膜移植。

[0035] 附图简述

[0036] 图1描绘了一张表格,其列出了在研究队列中发现的按染色体、基因符号、dbSNP id和种族(ethnicity)排序的每个变体的频率。该列表被分为种族之间的共有变体,即白种人(C)、东亚人(EA)、西班牙裔(H)、非裔美国人(African American)(AA)和南亚人(SA),然后是对各组特异的变体。列出了横跨整个外显子组的259个基因中的总共1,117个非同义单核苷酸变体(SNV)和插入/缺失(INDEL)。提供了RefSeq(ncbi.nlm.nih.gov/)登录号,以及从Exome Aggregation Consortium(ExAC,exac.broadinstitute.org/)获取的次等位基因频率(minor allele frequency)(MAF)。N=每组的总等位基因。

[0037] 图2列出了对患有圆锥角膜的非裔美国人受试者特异的遗传变体。

[0038] 图3列出了对患有圆锥角膜的白种人受试者特异的遗传变体。

[0039] 图4列出了对患有圆锥角膜的西班牙裔受试者特异的遗传变体。

[0040] 图5列出了对患有圆锥角膜的东亚人受试者特异的遗传变体。

[0041] 图6列出了患有圆锥角膜的所有受试者共有的其他遗传变体。

[0042] 图7描绘了一张表格,其列出了在白种人组中鉴定的角膜基因的罕见变体的比值比(odds ratio)(OR)和风险评分分配。变体取自与角膜结构和功能相关的48个基因,并取自白种人研究队列中较大的变体列表。根据其在1个或多个病例样本中以及0个种族匹配的对照中的存在情况进一步选择变体。风险评分来自一种算法,其结合了来自贝叶斯(Bayesian)模型中的保护先验(conservation priors)的调整OR,和通过红色和黄色圆圈

指示的7种生物信息学工具的计算机预测。

[0043] 缩写:A=非裔美国人,C=白种人,H=西班牙裔,EA=东亚人。

[0044] 发明详述

[0045] 疾病(disease)相关变体的检测对于各种医学状况(conditions)的诊断和预后是越来越重要的工具。关于KC,本公开提供了这样的方法,其用于检测突变体等位基因和将该信息用于患有KC的受试者或诊断患有KC的受试者以及预测个体发生KC的风险。

[0046] 如本文所使用的术语“发明”或“本发明”并不旨在限制本发明的任何一个特定实施方案,而是通常应用于权利要求书和说明书中所描述的本发明的任何和所有实施方案。

[0047] 如本文所用,除非上下文清楚地另行指明,单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”包括复数指代对象。因此,例如提及“所述方法”包括本文所述的一种或多种方法和/或类型的步骤,其在本领域技术人员阅读本公开后将变得显而易见。应该理解,“和/或”的使用被包括在内,以使得术语“a、b和/或c”应被理解为包括“a”、“b”、“c”、“a和b”、“b和c”、“c和a”和“a、b和c”。

[0048] 如本文所用,术语“约”是指修饰例如核苷酸序列的长度、错误程度、尺寸、组合物中成分的量、浓度、体积、处理温度、处理时间、产率、流速、压力和类似值并且其范围是指数量变化,其例如可能通过以下发生:通过用于制备化合物、组合物、浓缩物或使用制剂的典型测量和处理程序;通过这些程序中的无意错误;通过用于执行该方法的起始材料或成分的制造、来源或纯度上的差异;和类似的考虑。术语“约”还涵盖由于例如具有特定初始浓度或混合物的组合物、制剂或细胞培养物的老化而不同的量,以及由于混合或处理具有特定初始浓度或混合物的组合物或制剂而不同的量。无论是否由术语“约”修饰,所附的权利要求包括这些量的等量值。术语“约”还可以指与所述参考值相似的值范围。在某些实施方案中,术语“约”是指落在所述参考值的50%、25%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的范围内的值。

[0049] 如本文所用,术语“多态性”及其变体是指在不同基因组或个体之间或之中存在两个或多个替代基因组序列或等位基因。术语“遗传突变”或“遗传变异”及其变体包括多态性。

[0050] 如本文所用,术语“单核苷酸多态性”(“SNP”)及其变体是指在等位基因之间变化的一个核苷酸的位点。单核苷酸多态性(SNP)是单个碱基变化或点突变,但变体也包括所谓的“插入/缺失”突变(插入或缺失1至几个,最多75个核苷酸),导致个体之间的遗传变异。占所有人类遗传变异约90%的SNP在30亿个碱基的人类基因组中每100至300个碱基出现一次。但是,SNP在病毒等其他生物中可以更频繁地发生。SNP可以出现在基因组的编码或非编码区域。编码区中的SNP可以改变或不改变蛋白质产物的氨基酸序列。非编码区中的SNP可以改变启动子或加工位点,并可能影响基因转录和/或加工。有关个体在目的基因组区域中是否具有特定SNP的知识可以提供足够的信息,以开发针对多种疾病的诊断、预防和治疗应用。

[0051] 术语“引物”及其变体是指在聚合酶链反应(PCR)中充当DNA合成起始点的寡核苷酸。引物的长度通常为约10至约35个核苷酸,并与与靶序列互补的区域杂交。

[0052] 术语“探针”及其变体(例如,检测探针)是指在PCR反应中与靶核酸杂交的寡核苷酸。靶序列是指待分析的核酸区域,并且包含目的多态性位点。

[0053] 杂交以可以修饰探针组内的探针以形成新的更大的分子实体(例如探针产物)的方式发生。本文中的探针可以在严格条件下与目的核酸区域杂交。如本文所用,术语“严格性”用于指温度、离子强度和其他化合物如有机溶剂的存在的条件,在该条件下进行核酸杂交。“严格性”典型地发生在从大约 $T_m^{\circ}\text{C}$ 至 $T_m$ 以下约 $20^{\circ}\text{C}$ 至 $25^{\circ}\text{C}$ 的的范围内。严格杂交可用于分离和检测相同的多核苷酸序列或分离和检测相似或相关的多核苷酸序列。在“严格条件”下,核苷酸序列的全部或部分将与其精确互补和紧密相关的序列杂交。低严格条件包含这样的条件,其等同于在由 $5\times\text{SSPE}$  (43.8g/l NaCl, 6.9g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 和1.85g/l EDTA, pH用NaOH调节至7.4)、0.1% SDS、 $5\times\text{Denhardt}$ 试剂(每500ml  $5\times\text{Denhardt}$ 试剂:5g Ficoll (400型), 5g BSA) 和 $100\mu\text{g/ml}$ 变性鲑精DNA组成的溶液中在 $68^{\circ}\text{C}$ 下结合或杂交,然后在当使用长度为约100至约1000个核苷酸的探针时,在包含 $2.0\times\text{SSPE}$ , 0.1% SDS的溶液在室温下洗涤。在本领域中众所周知的是,可以采用许多等同条件来包含低严格条件;可以改变这样的因素,如探针的长度和性质(DNA、RNA、碱基组成)和靶标的性质(DNA、RNA、碱基组成、存在于溶液中或固定化的等)以及盐和其他组分的浓度(例如存在或不存在甲酰胺、硫酸葡聚糖、聚乙二醇),以及杂交溶液的组分以产生不同于但等同于上文所列条件的低严格杂交条件。另外,在高严格性条件下促进杂交的条件(例如,提高杂交和/或洗涤步骤的温度,在杂交溶液中使用甲酰胺等)是本领域众所周知的。当用于核酸杂交时,高严格性条件包含这样的条件,其等同于在由 $5\times\text{SSPE}$ 、1% SDS、 $5\times\text{Denhardt}$ 's试剂和 $100\mu\text{g/ml}$ 变性鲑精DNA组成的溶液中在 $68^{\circ}\text{C}$ 下结合或杂交,然后当使用长度为约100至约1000个核苷酸的探针时,在包含 $0.1\times\text{SSPE}$ 和0.1% SDS的溶液在 $68^{\circ}\text{C}$ 下洗涤。

[0054] 除非另外定义,否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文所述的任何方法和材料相似或等同的任何方法和材料均可用于实践或测试本发明,但本文中仍然特别描述了方法和材料的多种实施方案。

[0055] 如上所述,KC是最常见的角膜扩张病症,其中约6-23.5%的受试者携带阳性家族史(Wheeler, J., Hauser, M.A., Afshari, N.A., Allingham, R.R., Liu, Y., Reproductive Sys Sexual Disord 2012;S:6)。报道的KC发病率在8.8-54.4/100,000的范围内。发病率的这种变化部分原因是由于用于诊断疾病的不同标准。(Wheeler, J., Hauser, M.A., Afshari, N.A., Allingham, R.R., Liu, Y., Reproductive Sys Sexual Disord 2012;S:6;和Nowak, D., Gajacka, M., Middle East Afr J Ophthalmol 2011;18(1):2-6)。文献中存在许多研究,其尝试明确KC的遗传原因。这些研究已经发现许多可能的遗传变异或SNP,根据实验参数相信其促进疾病的病因。

[0056] 总的来说,到目前为止进行的工作主要是利用微卫星基因分型和微芯片技术(SNP阵列)来查询基因组内目的区域。相比之下,本文描述的研究利用下一代测序(Next Gen Sequencing) (NGS) 技术来鉴定和验证有助于疾病病因的遗传变体。该研究涉及完整的外显子组测序(WES)方法(ACE Platform<sup>TM</sup>; Personalis Inc., Menlo Park, CA),其中捕获并测序了包含人类外显子组的约22,000个基因;鉴定了单点突变或变体,包括INDELS。

[0057] 公认的是,在人类基因组中,存在携带基因突变的各种基因座,这些基因突变有助于KC的表型特征。在文献中记录的那些基因座中是作图到染色体15q2.32和15q22.33-q24.2、13q32、16q22.3-q23.1、3p14-q13、5q14.3-q21.1、5q21.2和5q32-q33、1p36.23-

36.21和8q13.1-q21.11、9q34、14q11.2和14q24.3上的区域(参见例如,Bisceglia L,De Bonis P,Pizzicoli C等人,Invest Ophthalmol Vis Sci.2009;50:1081-1086;Hughes AE,Dash DP,Jackson AJ,Frazer DG,Silvestri G,Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44:5063-5066;Gajecka M,Radhakrishna U,Winters D等人,Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50:1531-1539;Czugala,M.,Karolak,J.A.,Nowak,D.A.,等人,European Journal of Human Genetics 2012;20:389-397;Tyynismaa H,Sistonen P,Tuupanen S等人;Invest Ophthalmol Vis Sci 2002;43:3160-3164;Brancati F,Valente EM,Sarkozy A等人,J Med Genet 2004;41:188-192;Tang YG,Rabinowitz YS,Taylor KD等人,Genet Med 2005;7:397-405;Burdon KP,Coster DJ,Charlesworth JC等人;Hum Genet 2008;124:379-386;Li,X.,Rabinowitz,Y.S.,Tang,Y.G.,Picornell,Y.,Taylor,K.D.,Hu,M.,Yang,H.;Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:3791-3795;和Liskova P,Hysi PG,Waseem N,Ebenezer ND,Bhattacharya SS,Tuft SJ,Arch Ophthalmol 2010;128:1191-1195.)

[0058] 如上所解释,这些研究大多利用微卫星基因分型与阵列芯片技术相结合来查询基因组内的目的区域。

[0059] 除上述参考研究外,已经通过在诊断患有KC的患者中靶向筛选该基因鉴定了视觉系统同源盒基因1(VSX1)中的突变。迄今为止,在VSX1基因上进行的研究尚未明确发现病因,事实上,许多文献都提出了相互矛盾的结果。参见,例如,Bisceglia,L.,Ciaschetti,M.,De Bonis,P.,Campo,P.A.,Pizzicoli,C.,Scala,C.,Grifa,M.,Ciavarella,P.,Delle Noci,N.,Vaira,F.等人,Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:39-45,Heon,E.,Greenberg,A.,Kopp,K.K.,Rootman,D.,Vincent,A.L.,Billingsley,G.,Priston,M.,Dorval,K.M.,Chow,R.L.,McInnes,R.R.等人,Hum Mol Genet 2002;11(9):1029-1036,Tang,Y.G.,Picornell,Y.,Su,X.,Li,X.,Yang,H.and Rabinowitz,Y.S.Cornea 2008;27:189-192;Aldave,A.J.,Yellore,V.S.,Salem,A.K.,Yoo,G.L.,Rayner,S.A.,Yang,H.,Tang,G.Y.,Piconell,Y.,Rabinowitz,Y.S.,Invest Ophthalmol Vis Sci2006;47(7):2820-2;Tanwar,M.,Kumar,M.,Nayak,B.,Pathak,D.,Sharma,N.,Titiyal,J.S.and Dada,R.,Mol Vis 2010;16:2395-2401;Mok,L.W.,Baek,S.J.,Joo,C.K.,J Hum Genet 2008;53:842-849;Jeoung,J.W.,Kim,M.K.,Park,S.S.,Kim,S.Y.,Ko,H.S.,Won Ryang Wee,W.R.,Jin Hak Lee,J.H.,Cornea 2012;31,7:746-750;Dehkordi,F.A.,Rashki,A.,Bagheri,N.,Chaleshtori,M.H.,Memarzadeh,E.,Salehi,A.,Ghatreh,H.,Zandi,F.,Yazdanpanahi,N.,Tabatabaiefar,M.A.,Chaleshtori,M.H.Method.Acta Cytologica 2013;57:646-651;Saeed-Rad,S.,Hashemi,H.,Miraftab,M.,Noori-Dalooi,M.R.,Chaleshtori,M.H.,Raoofian,R.,Jafari,F.,Greene,W.,Fakhraie,G.,Rezvan,F.,Heidari,M.,Mol Vis 2011;17:3128-3136;Wang,Y.,Jin,T.,X.Zhang,X.,Wei,W.,Cui,Y.,Geng,T.,Liu,Q.,Gao,J.,Liu,M.,Chen,C.,Zhang,C.,Zhu,X.,Ophthalmic Genetics 2013;34,3:160-166;Dash,D.P.,S George,S.,O'Prey,D.,Burns,D.,Nabili,S.,Donnelly,U.,Hughes,A.E.,Silvestri,G.,Jackson,J.,Frazer,D.,Heon,E.,Willoughby,C.E.,Eye,2010;24,6:1085-1092。

[0060] 尽管已对VSX1基因在KC病因中的可能作用进行了大量研究工作,但这并不是唯一已被靶向分析的基因。

[0061] 在文献中已研究的基因中最突出的是与胶原结构有关的各种基因。胶原蛋白是人类角膜的主要蛋白质组分,并且存在编码各种胶原蛋白的几种类型的胶原基因。这里感兴趣的是COL4A3和COL4A4(Štabuc-Šilih, M., Ravnik-Glavač, M., Glavač, D., Hawlina, M., Stražišar M., Mol Vis 2009;15:2848-2860; Štabuc-Šilih, M., Stražišar, M., Ravnik Glavač, M., Hawlina, Glavač, D.; Acta Dermatoven APA 2010;19(2):3-10; Vitart, V., Bencic, G., Hayward, C., Herman, J.S., Huffman J., Campbell, S., Bucan, K., Navarro, P., Gunjaca, G., Marin, J., Zgaga, L., Kolcic, I., Polasek, O., Kirin, M., Hastie, N.D., Wilson, J.F., Rudan, I., Campbell, H., Vataavuk, Z., Fleck, B., Wright, A., Hum Mol Genet 2010;19(21):4304-4311), 其作图到2q36.3上(Vitart, V., Bencic, G., Hayward, C., Herman, J.S., Huffman J., Campbell, S., Bucan, K., Navarro, P., Gunjaca, G., Marin, J., Zgaga, L., Kolcic, I., Polasek, O., Kirin, M., Hastie, N.D., Wilson, J.F., Rudan, I., Campbell, H., Vataavuk, Z., Fleck, B., Wright, A., Hum Mol Genet 2010;19(21):4304-4311), 以及作图到13q32基因座上的COL4A1和COL4A2(Gajecka M, Radhakrishna U, Winters D等人, Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50:1531-1539; Czugała, M., Karolak, J.A., Nowak, D.A., 等人, European Journal of Human Genetics 2012;20:389-397; Karolak, J.A., Kulinska, K., Nowak, D.M., Pitarque, J.A., Molinari, A., Rydzanicz, M., Bejjani, B.A., Gajecka, M., Mol Vis 2011;17:827-843)。关于COL4A3和COL4A4基因, Štabuc-Šilih 等人在2009年发表的研究中鉴定了带有显著p值的几个SNP。在这项包括104名无关诊断患者和157名健康献血者的研究中,定位在COL4A4基因中等位基因3979上的多态性M1327V具有p值<0.0001,在该病例的总共208个等位基因中有134个点突变,在对照的314个等位基因中有132个点突变(Štabuc-Šilih, M., Ravnik-Glavač, M., Glavač, D., Hawlina, M., Stražišar M., Mol Vis 2009;15:2848-2860)。话虽如此, Štabuc-Šilih 等人在2010年发表的后续论文中排除了COL4A3和COL4A4在KC发病机理中起重要作用(Štabuc-Šilih, M., Stražišar, M., Ravnik Glavač, M., Hawlina, Glavač, D., Acta Dermatoven APA 2010;19(2):3-10)。

[0062] 类似地, Karolak 等人记录与厄瓜多尔(Ecuadorian)家庭中的COL4A1和COL4A2基因相关的发现:来自一个家庭的23个人,来自其他厄瓜多尔家庭的25个患病个体以及64个厄瓜多尔对照受试者被纳入了这项研究(Karolak, J.A., Kulinska, K., Nowak, D.M., Pitarque, J.A., Molinari, A., Rydzanicz, M., Bejjani, B.A., Gajecka, M., Mol Vis 2011;17:827-843)。这项研究鉴定了重要的COL4A1和COL4A2基因内的几个突变。例如,在患者中比在其中检查了二十三个人的家庭中的健康个体中更频繁地观察到COL4A1基因上4002等位基因上发现的Gln1334His多态性( $p=0.056$ )。但是,来自其余KC家族的经分析患病个体与厄瓜多尔对照受试者之间的c.4002A>C等位基因分布没有差异( $p=0.17$ )。

[0063] 结合上述工作(Karolak, J.A., Kulinska, K., Nowak, D.M., Pitarque, J.A., Molinari, A., Rydzanicz, M., Bejjani, B.A., Gajecka, M., Mol Vis 2011;17:827-843), Czugała 等人在同一个厄瓜多尔族群上进行了研究,揭示了除COL4A1和COL4A2以外的八个

候选基因 (Czugala, M., Karolak, J.A., Nowak, D.A., 等人, *European Journal of Human Genetics* 2012;20:389-397)。这些基因是MBNL1、IP05、FARP1、RNF113B、STK24、DOCK9、ZIC5和ZIC2。在这八个基因中鉴定出92个序列变体。在这项研究中提到的92个变体中至少有4个显示出与KC表型的统计学相关性。这些基因和与之相关的SNP定位于13q32基因座上,但这项研究以及对COL4A1和COL4A2基因进行的工作的另一个重要方面是,结果主要来自厄瓜多尔一个大家庭的遗传分析 (Czugala, M., Karolak, J.A., Nowak, D.A., 等人, *European Journal of Human Genetics* 2012;20:389-397)。

[0064] 进行此处引用的案例研究来进一步阐明胶原蛋白基因的作用及其在角膜中起的作用,并研究13q32基因座的作用,该基因座可能是人类基因组中的重要热点的基因组中的位置 (Gajecka M, Radhakrishna U, Winters D 等人, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:1531-1539; 和Czugala, M., Karolak, J.A., Nowak, D.A., 等人, *European Journal of Human Genetics* 2012;20:389-397)。已知在KC患者中失调的COL4A3和COL4A4基因通常会发生染色体畸变,并且还可能导致I型和III型胶原蛋白的减少,这是该疾病中经常检测到的特征 (Critchfield, J.W., Calandra, A.J., Nesburn, A.B., Kenney, M.C., *Exp Eye Res* 1988;46:953-63; Kenney, M.C., Nesburn, A.B., Burgeson, R.E., Butkowski, R.J., Ljubimov A.V., *Cornea* 1997;16:345-51; Meek, K.M., Tuft, S.J., Huang, Y., Gill P.S., Hayes, S., Newton, R.H., Bron, A.J., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1948-56; Bochert, A., Berlau, J., Koczan, D., Seitz, B., Thiessen, H.J., Guthoff, R.F., *Ophthalmologe* 2003;100:545-9; Stachs, O., Bocher, A., Gerber, T., Koczan, D., Thiessen, H.J., Guthoff, R.F., *Ophthalmologe* 2004;101:384-9; Pettenati, M.J., Sweatt, A.J., Lantz, P., Stanton, C.A., Reynolds, J., Rao, P.N., Davis, R.M., *Hum Genet* 1997;101:26-9)。

[0065] 根据家族谱系,对定义KC子集的遗传连接 (genetic link) (标记为家族性KC) 的寻找主要导致对不同的SNP候选者的鉴定。例如,基于少数独立的家庭研究认为VSX1基因是主要候选基因 (Bisceglia, L., Ciaschetti, M., De Bonis, P., Campo, P.A., Pizzicoli, C., Scala, C., Grifa, M., Ciavarella, P., Delle Noci, N., Vaira, F. 等人, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:39-45; Heon, E., Greenberg, A., Kopp, K.K., Rootman, D., Vincent, A.L., Billingsley, G., Priston, M., Dorval, K.M., Chow, R.L., McInnes, R.R. 等人, *Hum Mol Genet* 2002;11 (9):1029-1036);但是,也对该基因进行了非家族研究,其涉及不同种族和地理位置的无关个体。这些研究试图鉴定基因中的特定SNP,其会更好地定义VSX1的作用 (Aldave, A.J., Yellore, V.S., Salem, A.K., Yoo, G.L., Rayner, S.A., Yang, H., Tang, G.Y., Piconell, Y., Rabinowitz, Y.S., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47,7:2820-2; Tanwar, M., Kumar, M., Nayak, B., Pathak, D., Sharma, N., Titiyal, J.S. and Dada, R., *Mol Vis* 2010;16:2395-2401; Mok, L.W., Baek, S.J., Joo, C.K., *J Hum Genet* 2008;53:842-849; Jeoung, J.W., Kim, M.K., Park, S.S., Kim, S.Y., Ko, H.S., Won Ryang Wee, W.R., Jin Hak Lee, J.H., *Cornea* 2012;31,7:746-750; Dehkordi, F.A., Rashki, A., Bagheri, N., Chaleshtori, M.H., Memarzadeh, E., Salehi, A., Ghatreh, H., Zandi, F., Yazdanpanahi, N., Tabatabaiefar, M.A., Chaleshtori, M.H., *Acta Cytologica* 2013;57:646-651; Wang, Y., Jin, T., X. Zhang, X., Wei, W., Cui, Y., Geng, T., Liu, Q., Gao, J., Liu, M., Chen, C., Zhang,

C., Zhu, X., Ophthalmic Genetics 2013;34,3:160-166; Dash, D.P., S George, S., O' Prey, D., Burns, D., Nabili, S., Donnelly, U., Hughes, A.E., Silvestri, G., Jackson, J., Frazer, D., Heon, E., Willoughby, C.E., Eye, 2010;24,6:1085-1092)。通常,源自这些研究的出版物尚无定论,并且实际上已经驳斥了VSX1基因内发现的某些非同义候选SNP的致病作用(Tang, Y.G., Picornell, Y., Su, X., Li, X., Yang, H. and Rabinowitz, Y.S., Cornea 2008;27:189-192; Aldave, A.J., Yellore, V.S., Salem, A.K., Yoo, G.L., Rayner, S.A., Yang, H., Tang, G.Y., Piconell, Y., Rabinowitz, Y.S., Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47(7):2820-2; Tanwar, M., Kumar, M., Nayak, B., Pathak, D., Sharma, N., Titiyal, J.S. and Dada, R. VSX1 gene analysis in keratoconus. Mol Vis 2010;16:2395-2401)。

[0066] 没有家庭关联的KC是执业临床医生发现的最常见的疾病形式(Rabinowitz, Y.S., Ophthalmol Clin N Am. 2003;16(4):607-620)。话虽如此,由于KC的未检测形式,很可能的是家族性聚集(familial aggregation)被报道的少。诊断技术(如角膜地形图系统)的最新进展可能有助于更好地了解其他形式的疾病是否实际上是遗传的。

[0067] 涉及VSX1基因(Bisceglia, L., Ciaschetti, M., De Bonis, P., Campo, P.A., Pizzicoli, C., Scala, C., Grifa, M., Ciavarella, P., Delle Noci, N., Vaira, F.等人, Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:39-45; Heon, E., Greenberg, A., Kopp, K.K., Rootman, D., Vincent, A.L., Billingsley, G., Priston, M., Dorval, K.M., Chow, R.L., McInnes, R.R.等人; Hum Mol Genet 2002;11(9):1029-1036; Tang, Y.G., Picornell, Y., Su, X., Li, X., Yang, H. and Rabinowitz, Y.S. Cornea 2008;27:189-192; Aldave, A.J., Yellore, V.S., Salem, A.K., Yoo, G.L., Rayner, S.A., Yang, H., Tang, G.Y., Piconell, Y., Rabinowitz, Y.S. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47(7):2820-2; Tanwar, M., Kumar, M., Nayak, B., Pathak, D., Sharma, N., Titiyal, J.S. 和 Dada, R. Mol Vis 2010;16:2395-2401; Mok, L.W., Baek, S.J., Joo, C.K. J Hum Genet 2008;53:842-849; Jeoung, J.W., Kim, M.K., Park, S.S., Kim, S.Y., Ko, H.S., Won Ryang Wee, W.R., Jin Hak Lee, J.H. VSX1 Gene and Keratoconus: Genetic Analysis in Korean Patients Cornea 2012;31(7):746-750; Dehkordi, F.A., Rashki, A., Bagheri, N., Chaleshtori, M.H., Memarzadeh, E., Salehi, A., Ghatreh, H., Zandi, F., Yazdanpanahi, N., Tabatabaiefar, M.A., Chaleshtori, M.H., Acta Cytologica 2013;57:646-651; Saeed-Rad, S., Hashemi, H., Mirafteb, M., Noori-Dalooi, M.R., Chaleshtori, M.H., Raoofian, R., Jafari, F., Greene, W., Fakhraie, G., Rezvan, F., Heidari, M. Mol Vis 2011;17:3128-3136; Wang, Y., Jin, T., X. Zhang, X., Wei, W., Cui, Y., Geng, T., Liu, Q., Gao, J., Liu, M., Chen, C., Zhang, C., Zhu, X., Common single nucleotide polymorphisms and keratoconus in the Han Chinese population. Ophthalmic Genetics 2013;34(3):160-166)和各种COL基因(Štabuc-Šilih, M., Ravnik-Glavač, M., Glavač, D., Hawlina, M., Stražišar M., Mol Vis 2009;15:2848-2860; Štabuc-Šilih, M., Stražišar, M., Ravnik Glavač, M., Hawlina, Glavač, D. Acta Dermatoven APA 2010;19(2):3-10; Karolak, J.A., Kulinska, K., Nowak, D.M., Pitarque, J.A., Molinari, A., Rydzanicz, M., Bejjani, B.A., Gajecka, M., Mol Vis 2011;17:827-843; Critchfield, J.W., Calandra, A.J., Nesburn, A.B., Kenney, M.C., Exp Eye Res 1988;46:953-63;

Kenney, M.C., Nesburn, A.B., Burgeson, R.E., Butkowski, R.J., Ljubimov A.V., Cornea 1997;16:345-51; Meek, K.M., Tuft, S.J., Huang, Y., Gill P.S., Hayes, S., Newton, R.H., Bron, A.J., Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:1948-56; Bochart, A., Berlau, J., Koczan, D., Seitz, B., Thiessen, H.J., Guthoff, R.F., Ophthalmologe 2003;100:545-9; Stachs, O., Bocher, A., Gerber, T., Koczan, D., Thiessen, H.J., Guthoff, R.F., Ophthalmologe 2004;101:384-9; Pettenati, M.J., Sweatt, A.J., Lantz, P., Stanton, C.A., Reynolds, J., Rao, P.N., Davis, R.M., Hum Genet 1997;101:26-9; Li, X., Bykhovskaya, Y., Caiado Canedo, A.L., Haritunians, T., Siscovick, D., Anthony J. Aldave, A.J., Szczotka-Flynn, L., Iyengar, S.K., Rotter, J.I., Taylor, K.D., Yaron S. Rabinowitz, Y.S., Invest Ophthalmol Vis Sci 2013;54:2696-2704) 的上述工作只是其中基因内突变可能导致疾病表型的少数实例。这些研究主要集中在一个或两个目的基因的结构和功能上,而这样做忽略了基因组内可能导致疾病病因的其他基因突变的可能性。许多文献规定,从遗传上讲,KC是复杂疾病(Bisceglia L, De Bonis P, Pizzicoli C等人, Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50:1081-1086; Tang YG, Rabinowitz YS, Taylor KD等人, Genet Med 2005;7:397-405; Li, X., Rabinowitz, Y.S., Tang, Y.G., Picornell, Y., Taylor, K.D., Hu, M., Yang, H., Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:3791-3795; Liskova P, Hysi PG, Waseem N, Ebenezer ND, Arch Ophthalmol 2010;128:1191-1195; Wheeler, J., Hauser, M.A., Afshari, N.A., Allingham, R.R., Liu, Y., Reproductive Sys Sexual Disord 2012; S:6; Nowak, D., Gajecka, M., Middle East Afr J Ophthalmol 2011;18(1):2-6; Burdon, K.P. and Vincent, A.L. Clin Exp Optom 2013;96:146-154), 其涉及多于一个基因中的多个突变。HGF和LOX基因带有SNP, 其在被诊断患有KC的患者中被鉴定为具有重要意义(Burdon, K.P., Macgregor, S., Bykhovskaya, Y., Javadiyan, S., Li, X., Laurie, K.J., Muszynska, D., Lindsay, R., Lechner, J., Haritunians, T., Henders, A.K., Dash, D., Siscovick, D., Anand, S., Aldave, A., Coster, D.J., Szczotka-Flynn, L., Mills, R.A., Iyengar, S.K., Taylor, K.D., Phillips, T., Grant W. Montgomery, G.W., Rotter, J.I., Hewitt, A.W., Sharma, S., Rabinowitz, Y.S., Willoughby, C., Craig, J.E., Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52(11):8514-8519; Sahebjada, S., Schache, M., Richardson, A.J., Snibson, G., Daniell, M., Baird, P.N., PLoS ONE 2014;9,1; Dudakova, L., Palos, M., Jirsova, K., Stranecky, V., Krepelova, A., Hysi P.G., Liskova, P., Eur J Hum Genet. 2015; Bykhovskaya, Y., Li, X., Epifantseva, I., Haritunians, T., Siscovick, D., Aldave, A., Szczotka-Flynn, L., Iyengar, S.K., Taylor, K.D., Rotter, J.I., Rabinowitz, Y.S., Invest Ophthalmol Vis Sci; 2012;53(7):4152-4157; Hao XD, Chen P, Chen ZL, Li SX, Wang Y., Ophthalmic Genet. 2015;36(2):132-136)。

[0068] 已知HGF基因在角膜中由所有三个细胞层表达(Wilson SE, Walker JW, Chwang EL, He YG., Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993;34,8:2544-2561)。该蛋白质还在泪腺中产生,并且角膜角质形成细胞中的HGF表达响应角膜损伤而上调,表明其参与上皮伤口愈合过程(Burdon, K.P., Macgregor, S., Bykhovskaya, Y., Javadiyan, S., Li, X., Laurie, K.J., Muszynska, D., Lindsay, R., Lechner, J., Haritunians, T., Henders, A.K., Dash, D., Siscovick, D., Anand, S., Aldave, A., Coster, D.J., Szczotka-Flynn, L., Mills, R.A.,

Iyengar, S.K., Taylor, K.D., Phillips, T., Grant W. Montgomery, G.W., Rotter, J.I., Hewitt, A.W., Sharma, S., Rabinowitz, Y.S., Willoughby, C., Craig, J.E., Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52(11):8514-8519; Li Q, Weng J, Mohan RR, 等人, Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996;37(5):727-739。此外,与HGF基因相关的某些SNP已与远视和近视(Yanovitch, T., Li, Y.J., Metlapally, R., Abbott, D., Tran Viet, K.N., Young, T.L., Mol Vis 2009;15:1028-1035; Veerappan, S., Pertile, K.K., Islam, A.F., **Schäche**, M., Chen, C.Y., Mitchell, P., Dirani, M., Baird, P.N., Ophthalmology 2010;117(2):239-245)以及原发性闭角型青光眼(PACG)(Awadalla, M.S., Thapa, S.S., Burdon, K.P., Hewitt, A.W., Craig, J.E., Mol Vis 2011;17:2248-2254)相关。

[0069] 在KC患者的基因组中也发现了与这些各种眼部病况相关的SNP的子集(Burdon, K.P., Macgregor, S., Bykhovskaya, Y., Javadiyan, S., Li, X., Laurie, K.J., Muszynska, D., Lindsay, R., Lechner, J., Haritunians, T., Henders, A.K., Dash, D., Siscovick, D., Anand, S., Aldave, A., Coster, D.J., Szczotka-Flynn, L., Mills, R.A., Iyengar, S.K., Taylor, K.D., Phillips, T., Grant W. Montgomery, G.W., Rotter, J.I., Hewitt, A.W., Sharma, S., Rabinowitz, Y.S., Willoughby, C., Craig, J.E., Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52(11):8514-8519)。

[0070] 关于HGF蛋白在眼中的作用,Burdon等人指出:“眼睛的屈光力至少部分取决于角膜的形状,而角膜的形状在KC中会发生严重变化,因此表明这些复杂眼科疾病的遗传决定因素之间存在重叠”(Burdon, K.P., Macgregor, S., Bykhovskaya, Y., Javadiyan, S., Li, X., Laurie, K.J., Muszynska, D., Lindsay, R., Lechner, J., Haritunians, T., Henders, A.K., Dash, D., Siscovick, D., Anand, S., Aldave, A., Coster, D.J., Szczotka-Flynn, L., Mills, R.A., Iyengar, S.K., Taylor, K.D., Phillips, T., Grant W. Montgomery, G.W., Rotter, J.I., Hewitt, A.W., Sharma, S., Rabinowitz, Y.S., Willoughby, C., Craig, J.E., Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52(11):8514-8519)。文献中发表了至少另外两项研究,其提供了HGF基因与KC相关的验证(Sahebjada, S., Schache, M., Richardson, A.J., Snibson, G., Daniell, M., Baird, P.N. PLoS ONE 2014, 9(1); Dudakova, L., Palos, M., Jirsova, K., Stranecky, V., Krepelova, A., Hysi P.G., Liskova, P., Eur J Hum Genet. 2015)。

[0071] LOX编码这样的酶,其在包括角膜在内的多种组织中引发胶原蛋白和弹性蛋白的交联(Hamalainen, E.R., Jones, T.A., Sheer, D., Taskinen, K., Pihlajanemi, T., Kivirikko, K.I. Genomics. 1991;11:508-516)。Li等人进行了全基因组连锁扫描,其将若干基因座作图到KC,包括LOX基因所定位的5q23.2基因座(Li, X., Rabinowitz, Y.S., Tang, Y.G., Picornell, Y., Taylor, K.D., Hu, M., Yang, H. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:3791-3795)。另外,在微阵列上分析KC上皮的研究中发现LOX表达水平上调(Nielsen, K., Birkenkamp-Demtroder, K., Ehlers, N., Orntoft, T.F. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:2466-2476)。Bykhovskaya等人在涉及两个独立的患有KC患者和对照组以及KC家族的研究中发现了该基因内与KC相关的至少四个SNP(Bykhovskaya, Y., Li, X., Epifantseva, I., Haritunians, T., Siscovick, D., Aldave, A., Szczotka-Flynn, L., Iyengar, S.K., Taylor, K.D., Rotter, J.I., Rabinowitz, Y.S. Invest Ophthalmol Vis Sci; 2012;53,7:4152-4157)。该工作在一个小组中一式两份进行,其发现rs2956540SNP与欧洲血统的人群中的KC

有关(Dudakova,L.,Palos,M.,Jirsova,K.,Stranecky,V.,Krepelova,A.,Hysi P.G.,Liskova,P.,Eur J Hum Genet.2015),并再次在针对汉族人群进行的研究中进行了重复(Hao XD1,Chen P,Chen ZL,Li SX,Wang Y.,Ophthalmic Genet.2015;36,2:132-136)。

[0072] 自从核黄素/紫外线 $\alpha$ 诱导的角膜胶原蛋白交联(CXL)已经成为KC患者的普遍治疗方法(Ashwin,P.T.,McDonnell,P.J.Collagen cross-linkage:a comprehensive review and directions for future research.Br J Ophthalmol.2010;94:965-970),人们对诸如LOX的基因感兴趣,所述LOX基因编码导致角膜中胶原蛋白交联的分子途径。据相信,了解KC患者中LOX基因的基因型可能会对CXL治疗的结果产生影响并提供见解(Bykhovskaya,Y.,Li,X.,Epifantseva,I.,Haritunians,T.,Siscovick,D.,Aldave,A.,Szcotka-Flynn,L.,Iyengar,S.K.,Taylor,K.D.,Rotter,J.I.,Rabinowitz,Y.S.Invest Ophthalmol Vis Sci;2012;53,7:4152-4157)。。

[0073] 一方面,本公开提供了用于分离基因组样品以鉴定和验证单核苷酸多态性检测的方法。在一些实施方案中,基因组样品可以选自分离的细胞、全血、血清、血浆、尿液、唾液、汗液、粪便和眼泪。

[0074] 在一些实施方案中,基因组样品是血浆或血清,并且该方法进一步包括从受试者的血液样品中分离血浆或血清。

[0075] 在一些实施方案中,该方法包括提供来自受试者的细胞样品。在一些实施方案中,通过使受试者的细胞表面与能够将细胞可逆地固定在基质上的基质接触来收集细胞。

[0076] 所公开的方法适用于从多种样品获得的多种细胞类型。在一些实施方案中,用于所公开方法的细胞类型包括但不限于上皮细胞、内皮细胞、结缔组织细胞、骨骼肌细胞、内分泌细胞、心脏细胞、泌尿细胞、黑素细胞(melanocytes)、角质细胞(keratinocytes)、血细胞(blood cells)、白细胞(white blood cells)、白膜层(buffy coat)、毛细胞(包括,例如,发根细胞)和/或唾液细胞。在一些实施方案中,细胞是上皮细胞。在一些实施方案中,细胞是囊下-血管周围的(subcapsular-perivascular)(上皮1型);苍白的(pale)(上皮2型);中间的(上皮3型);深色的(dark)(上皮4型);未分化的(上皮5型);和大髓的(large-medullary)(上皮6型)。在一些实施方案中,细胞是颊上皮细胞(例如,使用颊拭子收集的表皮细胞)。在一些实施方案中,在公开的方法中使用的细胞样品包括以上鉴定的细胞类型的任何组合。

[0077] 在一些实施方案中,该方法包括提供来自受试者的细胞样品。在一些实施方案中,提供的细胞是颊上皮细胞。

[0078] 通过多种方法中的任何一种收集细胞样品,这些方法允许受试者细胞与基质可逆结合。在一些实施方案中,基质应用于与含有受试者细胞的样品进行物理相互作用,以使细胞可逆地结合至基质。在一些实施方案中,基质应用于与受试者的身体直接进行物理相互作用以使细胞可逆地结合至基质。在一些实施方案中,样品是颊细胞样品,并且通过使受试者的颊膜(例如,其脸颊内部)与能够可逆地固定从膜上脱落的细胞的基质接触来收集颊细胞样品。在这样的实施方案中,拭子以与刷牙等同的力(例如,少量的力或压力)在受试者的脸颊内部摩擦。考虑将允许受试者的细胞可逆地结合至基质的任何方法与公开的方法一起使用。

[0079] 在一些实施方案中,以非侵入性方式有利地收集样品。这样,样品收集几乎可以在

任何地方和由任何人完成。例如,在一些实施方案中,样品在医师办公室、受试者家中或在其中执行或将要执行医疗程序的设施中收集。在一些实施方案中,受试者、受试者的医生、护士或医师的助手或其他临床人员收集样品。

[0080] 在一些实施方案中,基质由细胞可逆地结合到其上的多种材料中的任何一种制成。示例性基质包括由人造丝(rayon)、棉、二氧化硅、弹性体(elastomer)、虫胶(shellac)、琥珀、天然或合成橡胶、纤维素、BAKELITE、NYLON、聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯腈或其他材料或其组合制成的那些。在一些实施方案中,基质是具有人造丝尖端或棉签尖端的拭子。

[0081] 在一些实施方案中,将含有样品的基质冷冻融化一次或多次(例如,冷冻后,将含有样品的基质融化,根据本方法使用并再冷冻)和/或用于本方法中。

[0082] 在另一方面,已经描述了多种裂解溶液并且是本领域技术人员已知的。本方法可使用这些众所周知的裂解溶液中的任何一种,以从样品中分离核酸。示例性裂解溶液包括市售的那些,如由 INVITROGEN®、QIAGEN®、LIFE TECHNOLOGIES® 和其他制造商出售的那些,以及可以由实验室技术人员产生的那些。也已经被很好地描述了裂解缓冲液,并且所公开的方法可以使用多种裂解缓冲液,包括例如在Molecular Cloning(三卷册,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2012)和Current Protocols(Genetics and Genomics;Molecular Biology;2003-2013),出于所有目的将两者通过引用并入本文。

[0083] 细胞裂解是从细胞内回收核酸的常用实践方法。在许多情况下,细胞与裂解溶液接触,裂解溶液通常是包含去污剂的碱性溶液或裂解酶溶液。这种裂解溶液通常包含盐、去污剂和缓冲剂,以及技术人员会理解使用的其他试剂。完全和/或部分裂解后,从裂解溶液中回收核酸。

[0084] 在一些实施方案中,将细胞重悬于水性缓冲液中,pH在约pH 4至约10、约5至约9、约6至约8或约7至约9的范围内。

[0085] 在一些实施方案中,缓冲液盐浓度为约10mM至约200mM,约10mM至约100mM或约20mM至约80mM。

[0086] 在一些实施方案中,缓冲液还包含螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA)或乙二醇四乙酸(EGTA)。

[0087] 在一些实施方案中,裂解溶液还包含其他化合物以帮助核酸从细胞中释放,如多元醇,例如包括但不限于蔗糖,以及糖醇如麦芽糖醇、山梨糖醇、木糖醇、赤藓糖醇和/或异麦芽酮糖醇。在一些实施方案中,多元醇在约2%至约15%w/w,或约5%至约15%w/w或约5%至约10%w/w的范围内。

[0088] 在一些实施方案中,裂解溶液还包含表面活性剂,如例如但不限于Triton X-100、SDS、CTAB、X-114、CHAPS、DOC和/或NP-40。在一些实施方案中,这样的表面活性剂在约1%至约5%w/w,约1%至约4%w/w或约1%至约3%w/w的范围内。

[0089] 在实施方案中,裂解溶液还包含离液剂 chaotropes),如例如但不限于尿素、十二烷基硫酸钠和/或硫脲。在一些实施方案中,离液剂以约0.5M至8M,约1M至约6M,约2M至约6M或约1M至3M范围内的浓度使用。

[0090] 在一些实施方案中,裂解溶液还包含一种或多种另外的裂解试剂,并且此类裂解试剂是本领域众所周知的。在一些实施方案中,此类裂解试剂包括细胞壁裂解酶,如例如但

不限于溶菌酶。在一些实施方案中,裂解试剂包括碱性去污剂溶液,如含有0.5%十二烷基硫酸钠的0.1氢氧化钠水溶液。

[0091] 在一些实施方案中,裂解溶液还包含水性糖溶液,如蔗糖溶液和螯合剂如EDTA,例如STET缓冲液。在某些实施方案中,通过将细胞悬浮液与具有两倍于所需浓度的等体积的溶解溶液(例如0.2氢氧化钠,1.0%十二烷基硫酸钠)混合来制备溶解试剂。

[0092] 在一些实施方案中,在已经达到所需的裂解程度之后,使包含裂解溶液和裂解细胞的混合物与中和或淬灭试剂接触以调整条件,使得裂解试剂不会不利地影响所需产物。在一些实施方案中,将pH调节至约5至约9、约6至约8、约5至约7、约6至约7或约6.5至7.5的pH以最小化和/或防止细胞内含物,包括例如但不限于核酸降解。在一些实施方案中,当裂解剂包括碱性溶液时,中和剂包括酸性缓冲剂,例如碱金属乙酸盐/乙酸缓冲液。在一些实施方案中,选择裂解条件,如裂解试剂的温度和组成,以使得裂解基本完成,同时最小化所需产物,包括例如但不限于核酸的降解。

[0093] 本领域技术人员可以采用上述任何组合,以及与其他已知和常规方法组合,并且本发明考虑了这种组合。

[0094] 在另一方面,在进行后续分析之前,从裂解缓冲液中分离核酸,其包括例如但不限于基因组DNA。在一些实施方案中,在进行另外的分析,如例如但不限于实时PCR分析之前,从裂解缓冲液中分离核酸。所公开方法的各种实施方案使用了可用于分离少量核酸的多种方法中的任何一种。这些包括但不限于沉淀、凝胶过滤、密度梯度和固相结合。此类方法也已经描述于例如Molecular Cloning(三卷册,Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)和Current Protocols (Genetics and Genomics;Molecular Biology;2003-2013),出于所有目的通过引用并入本文。

[0095] 核酸沉淀是本领域技术人员已知的众所周知的分离方法。多种固相结合方法在本领域中也是已知的,包括但不限于利用珠(例如,二氧化硅珠、磁珠)、柱、膜形式的固相或本领域已知多种其他物理形式中任何一种的固相结合方法。在一些实施方案中,在公开的方法中使用的固相可逆地结合核酸。此类固相的实例包括所谓的“混合床(mixed-bed)”固相,其是至少两种不同固相的混合物,每种固相在不同溶液条件下对核酸的能力,以及在不同条件下释放核酸的能力(ability)和/或能力(capacity);如美国专利申请号2002/0001812中描述的那些,出于所有目的通过引用整体并入本文。根据公开的方法,对核酸的固相亲和力可以通过通常用于将溶质结合至基质的多种手段中的任一种。此类手段的实例包括但不限于离子相互作用(例如,阴离子交换色谱)和疏水相互作用(例如,反相色谱)、pH差异和变化、盐差异和变化(例如,浓度变化,离液盐/剂的使用)。基于pH的示例性固相包括但不限于INVITROGEN ChargeSwitch Normalized Buccal Kit磁珠中使用的固相,在低pH(<6.5)时其上结合核酸并在高pH(>8.5)时释放核酸,和单氨基-N-氨基乙基(MANAE),其可在小于7.5的pH下结合核酸并在大于8的pH下释放核酸。示例性的基于离子交换的基质包括但不限于来自PHARMACIA (Piscataway, N.J.)的DEA-SEPHAROSE™、Q-SEPHAROSE™和DEAE-SEPHADEX™、来自The Dow Chemical Company (Midland, Mich.)的DOWEX® I、来自Rohm&Haas (Philadelphia, Pa.)的AMBERLITE®、来自Duolite International, Inc. (Cleveland, Ohio)的DUOLITE®、DIALON TI和DIALON TII。

[0096] 考虑将任何单独的方法单独使用或与其他方法组合使用,并且这种重要的组合是本领域技术人员众所周知的并且可以理解的。

[0097] 在另一方面,所公开的方法用于分离核酸,如基因组DNA (gDNA),所述核酸用于多种核酸分析,包括基因组分析。在一些实施方案中,此类分析包括检测多种遗传突变,其包括但不限于缺失、插入、转变(transitions)和颠换(transversions)。在一些实施方案中,突变是单核苷酸多态性(SNP)。

[0098] 用于分析这种分离的核酸,例如但不限于基因组DNA (gDNA)的多种方法在本领域中是已知的并且包括核酸测序方法(包括Next Generation Sequencing方法)、PCR方法(包括实时PCR分析、微阵列分析、杂交分析)以及本领域已知的任何其他核酸序列分析方法,其包括其中分析核酸组成的多种其他方法并且其为本领域技术人员已知。参见例如Molecular Cloning(三卷册,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2012)和Current Protocols (Genetics and Genomics;Molecular Biology;2003-2013)。

[0099] 一方面,本文所述的SNP可以通过测序检测。例如,高通量测序或Next Generation Sequencing (NGS)代表了用于检测基因内突变的有吸引力选择。与PCR、微阵列、高分辨率熔解和质谱法(其均间接推断序列内容)不同,NGS直接确定每个碱基的身份以及它们在基因内的顺序。市场上最新的平台具有覆盖10,000倍以上的外显子区域的能力,这意味着序列中每个碱基位置的内容都经过数千次不同的测量。如此高的覆盖率可确保共有序列非常准确,并能够检测异质样品中的稀有变异。例如,在从福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 组织中提取的样品中,目的突变通常仅以1%的频率出现。当以10,000X的覆盖率对该样品进行测序时,即使仅占样品1%的稀有等位基因也被独特地测量了100次以上。因此,NGS以非常高的灵敏度提供可靠准确的结果,使得其非常适合FFPE和其他混合样品的临床诊断测试。

[0100] 通常称为Next Generation Sequencing (NGS) 技术的测序技术的实例,包括但不限于Sequencing by Synthesis (SBS)、Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS)、Polony测序、焦磷酸测序(pyrosequencing)、可逆染料终止子测序、SOLiD测序、离子半导体测序、DNA纳米球测序、Helioscope单分子测序、单分子实时 (SMRT) 测序、单分子实时 (RNAP) 测序和纳米孔DNA测序。

[0101] MPSS是基于珠子方法,其使用了复杂的衔接子(adapter)连接方法,然后进行衔接子解码,以四个核苷酸的增量读取序列;这种方法使得其容易受到序列特异性偏倚或特定序列丢失的影响。

[0102] Polony测序,将体外配对标签文库与乳化PCR(emulsion PCR)、自动显微镜和基于连接的测序化学相结合,以大于99.9999%的准确度对大肠杆菌(E.coli)基因组进行测序,成本约为Sanger测序的1/10。

[0103] 作为焦磷酸测序的并行版本,该方法在油溶液中扩增水滴内的DNA,每个液滴含有单个DNA模板,该DNA模板附着在单个引物包被的珠子上,其然后形成克隆集落(colony)。测序仪包含许多皮升体积的孔,每个孔中都含有单个珠子和测序酶。焦磷酸测序使用荧光素酶以产生光用于检测添加到新生DNA中的各个核苷酸,并且组合的数据用于产生序列读出(read-outs)。与在一个末端的Sanger测序和另一末端的Solexa和SOLiD相比,该技术提供了中等的读取长度和每碱基的价格。

[0104] SBS是基于可逆染料终止子的测序技术。DNA分子首先附着在流动池(flowcell)上

的引物上并扩增,从而形成局部克隆集落。添加四种类型的可逆终止子碱基(RT-碱基),并洗去未掺入的核苷酸。与焦磷酸测序不同,DNA一次只能延伸一个核苷酸。照相机拍摄荧光标记核苷酸的图像,然后从DNA中化学去除染料和末端3'阻滞剂(blocker),从而进行下一个循环。

[0105] SOLiD技术采用通过连接进行的测序。在此,根据测序位置标记固定长度的所有可能的寡核苷酸库。

[0106] 将寡核苷酸退火并连接;DNA连接酶对匹配序列的优先连接产生提供该位置上核苷酸的信息的信号。在测序之前,通过乳化PCR扩增DNA。所得的珠子(每个仅含有相同DNA分子的拷贝)沉积在载玻片上。结果是数量和长度与Illumina测序相当的序列。

[0107] 离子半导体测序基于使用标准测序化学,但具有基于半导体的新型检测系统。这种测序方法基于检测DNA聚合过程中释放的氢离子,这与其他测序系统中使用的光学方法相反。含有待测序的模板DNA链的微孔充满了单一类型的核苷酸。如果引入的核苷酸与前导模板核苷酸互补,则将其掺入正在生长的互补链中。这会引发氢离子的释放,其触发超敏离子传感器,这表明已发生反应。若模板序列中存在均聚物重复,则在单个循环中掺入多个核苷酸分子。这导致相应数目的释放的氢以及比例较高的电子信号。

[0108] DNA纳米球测序是一种高通量测序技术类型,其用于确定生物体的整个基因组序列。该方法使用滚环复制将基因组DNA的小片段扩增为DNA纳米球。然后使用通过连接的解链(Unchained)测序来确定核苷酸序列。这种DNA测序方法允许每次运行对大量DNA纳米球进行测序。

[0109] Helicos Biosciences Corporation的单分子测序使用带有添加的polyA尾衔接子的DNA片段,该衔接子附着在流动池表面。下一步涉及基于延伸的测序,其中荧光标记的核苷酸循环洗涤流动池(与Sanger方法一样,一次为一种核苷酸类型)。读取由Helioscope测序仪进行。

[0110] 单分子实时(SMRT)测序基于SBS方法。DNA在零模波导(zero-mode wave-guides)(ZMW)-其中捕获工具位于孔底的小孔状容器中合成。利用未修饰的聚合酶(附着在ZMW底部)和在溶液中自由流动的荧光标记核苷酸进行测序。以检测仅在孔底部出现的荧光的方式构造孔。荧光标记在其掺入DNA链中时与核苷酸分离,留下未修饰的DNA链。

[0111] 基于RNA聚合酶(RNAP)的单分子实时测序,所述RNA聚合酶附着到聚苯乙烯(polystyrene)珠子上,所测序DNA的远端附着到另一个珠子上,两个珠子都置于光阱(optical traps)中。转录过程中的RNAP运动使珠子更近,并且它们的相对距离发生变化,其然后可以以单核苷酸分辨率被记录下来。基于降低浓度的四个核苷酸类型中每种类型的四个读出推导序列(类似于Sangers方法)。

[0112] 纳米孔测序基于电信号的读出,该电信号出现在通过与环糊精共价结合的 $\alpha$ -溶血素(hemolysin)孔的核苷酸处。穿过纳米孔的DNA会改变其离子电流。这种变化取决于DNA序列的形状、大小和长度。每种类型的核苷酸都会在不同的时间段内阻止离子流过孔。

[0113] VisiGen Biotechnologies使用特殊改造的DNA聚合酶。该聚合酶充当传感器-通过其活性中心已经掺入了供体荧光染料。这种供体染料通过FRET(荧光共振能量转移)起作用,诱导不同标记核苷酸的荧光。该方法允许以聚合酶将核苷酸掺入序列的速度(每秒数百个)进行读取。核苷酸荧光染料在掺入DNA链后释放。

[0114] 质谱可用于确定链终止反应中产生的DNA片段之间的质量差异。

[0115] SBS技术能够克服现有基于焦磷酸测序的NGS平台的局限性。

[0116] 此类技术依赖于复杂的酶级联反应进行读出,对于准确确定均聚物区域中核苷酸的数量并不可靠,并且需要过多时间才能使单个核苷酸跨过正在生长的DNA链。SBS NGS平台使用直接测序方法来产生具有非常高的准确性、快速和低成本的测序策略。

[0117] 通过将模板DNA片段化成片段、扩增、DNA测序引物退火,以及例如最后以高密度点阵列将其固定在玻璃芯片上来初始化一种示例性的SBS测序。通过用修饰的核苷酸延伸每个片段来对DNA片段阵列进行测序,所述修饰的核苷酸含有与能够区分所有四个可能核苷酸的荧光染料连接的可切割化学部分。用高分辨率电子相机(Measure)连续扫描该阵列,以确定新掺入延伸的DNA片段中的每个碱基(A、C、G或T)的荧光强度。掺入每个修饰的碱基后,将阵列暴露于裂解化学作用(cleavage chemistry)以分解荧光染料和端帽(end cap),允许添加额外的碱基。然后重复该过程,直到片段被完全测序或已经达到最大读取长度。

[0118] 在另一方面,实时PCR用于检测基因突变,包括例如但不限于SNP。在一些实施方案中,通过使用束缚(tethered)的淬灭部分,基于荧光分子的分子内淬灭的使用,使用实时PCR进行特定基因候选物中SNP的检测。因此,根据示例性实施方案,实时PCR方法还包括分子信标(beacon)技术的使用。分子信标技术利用具有内部猝灭的荧光团(fluorophore)的发夹状分子,其荧光通过与目的DNA靶标结合而得以恢复(参见,例如,Kramer,R.等人Nat.Biotechnol.14:303-308,1996)。在一些实施方案中,分子信标探针与积累的PCR产物的增加的结合用于特异性检测基因组DNA中存在的SNP。

[0119] 为了设计实时PCR测定,协调几个部分,包括位于两个引物侧翼并随后被扩增的DNA片段(通常称为扩增子)、两个引物以及待使用的一个或多个检测探针。

[0120] 在一些实施方案中,可以通过本文所述的扩增方法或本领域已知的任何其他扩增方法扩增来自受试者的样品中的SNP位点。使用通用扩增方法(例如,全基因组扩增和全基因组PCR),在使SNP位点与本文所述的探针接触之前,可以扩增或不扩增样品中的核酸。

[0121] 实时PCR依赖于与短多核苷酸(称为“检测探针”)缀合的荧光染料,所述短多核苷酸以序列特异性方式与基因组等位基因结合,或者依赖于插入双链DNA的荧光分子的可视发射(visual emission),称为定量或qPCR。可以通过缀合和检测以不同波长发出荧光的探针,在实时PCR测定中区分因单个核苷酸而不同的实时PCR探针。实时PCR可用于检测应用(诊断应用)、定量应用和基因分型应用。

[0122] 本领域公开了用于进行实时PCR的几种相关方法,包括依赖于以下的测定:  
**TAQMAN®**探针(美国专利号5,210,015和5,487,972,和Lee等人,Nucleic Acids Res.21:3761-6,1993)、分子信标探针(美国专利号5,925,517和6,103,476,和Tyagi和Kramer,Nat.Biotechnol.14:303-8,1996)、自探测扩增子(蝎子(scorpions))(美国专利号6,326,145,和Whitcombe等人,Nat.Biotechnol.17:804-7,1999)、Amplisensor(Chen等人,Appl.Environ.Microbiol.64:4210-6,1998)、Amplifluor(美国专利号6,117,635,和Nazarenko等人,Nucleic Acids Res.25:2516-21,1997)、置换杂交探针(Li等人,Nucleic Acids Res.30:E5,2002)、DzyNA-PCR(Todd等人,Clin.Chem.46:625-30,2000)、荧光限制酶检测(Cairns等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.318:684-90,2004)和邻近杂交探针(美国专利号6,174,670和Wittwer等人,Biotechniques 22:130-1,134-8,1997)。

[0123] 许多合适的基因分型方法之一是TAQMAN®等位基因鉴别测定。在该测定的一些情况下,利用了探针的5'末端标记有荧光报告染料并且在探针的3'末端标记有淬灭染料的寡核苷酸探针。淬灭剂与完整探针的接近程度对报告基因维持低的荧光。在PCR反应过程中,DNA聚合酶的5'核酸酶活性可切割探针,并分隔染料和淬灭剂。这导致报告分子的荧光增加。通过监测报告染料荧光的增加直接检测PCR产物的积累。仅当探针与靶标杂交并在PCR期间扩增时,DNA聚合酶的5'核酸酶活性才能在报告子和淬灭剂之间切割探针。仅当存在特定的SNP等位基因时,才将探针设计为跨越靶SNP位置并与核酸分子杂交。

[0124] 实时PCR方法包括多个步骤或循环,作为扩增方法的一部分。这些循环包括使双链核酸变性,将正向引物、反向引物和检测探针退火至靶基因组DNA序列,并从退火的正向引物和反向引物合成(即复制)第二链DNA。这三个步骤的过程在本文中称为循环。

[0125] 在一些实施方案中,采用大约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60个循环。在一些实施方案中,采用约10至约60个循环、约20至约50或约30至约40个循环。在一些实施方案中,采用40个循环。

[0126] 在一些实施方案中,变性双链核酸步骤在约80℃至100℃,约85℃至约99℃,约90℃至约95℃的温度下发生约1秒至约5秒,约2秒至约5秒,或约3秒至约4秒。在一些实施方案中,变性双链核酸步骤在95℃的温度下发生约3秒。

[0127] 在一些实施方案中,将正向引物、反向引物和检测探针退火至靶基因组DNA序列步骤在约40℃至约80℃,约50℃至约70℃,约55℃至约65℃下发生约15秒至约45秒,约20秒至约40秒,约25秒至约35秒。在一些实施方案中,将正向引物、反向引物和检测探针退火至靶基因组DNA序列步骤在约60℃下发生约30秒。

[0128] 在一些实施方案中,从退火的正向引物和反向引物合成(即复制)第二链DNA在约40℃至约80℃,约50℃至约70℃,约55℃至约65℃下发生约15秒至约45秒,约20秒至约40秒,约25秒至约35秒。在一些实施方案中,将正向引物、反向引物和检测探针退火至靶基因组DNA序列步骤在约60℃下发生约30秒。

[0129] 在一些实施方案中,发现根据本文所述的本发明方法制备的约1μL,约2μL、约3μL、约4μL或约5μL基因组DNA样品与仅约0.05μL、约0.10μL、约0.15μL、约0.20μL、约0.25μL或约0.25μL的30X、35X、40X、45X、50X或100X实时PCR测定混合物和蒸馏水组合以形成PCR预混合物(master mix)。在一些实施方案中,PCR预混合物具有约5μL、约6μL、约7μL、约8μL、约9μL、约10μL、约11μL、约12μL、约13μL、约14μL、约15μL、约16μL、约17μL、约18μL、约19μL或约20μL或更多的终体积。在一些实施方案中,发现将如上所述制备的2μL基因组DNA样品与仅约0.15μL的40X实时PCR测定混合物和2.85μL蒸馏水混合以形成PCR预混合物。

[0130] 尽管本文描述了示例性反应,但是本领域技术人员将理解如何基于探针设计来改变温度和时间。此外,本方法考虑上述时间和温度的任何组合。

[0131] 在一些实施方案中,在实验室环境中测试和设计引物。在一些实施方案中,通过基于计算机的计算机方法设计引物。引物序列基于待扩增的扩增子或靶核酸序列的序列。与较长的扩增子相比,较短的扩增子通常更有效地复制并导致更有效的扩增。

[0132] 在设计引物时,技术人员会理解需要基于被设计的引物的GC和AT含量以及二级结构(增加的GC含量可以导致增加的二级结构)考虑解链温度(melting temperature) (T<sub>m</sub>;引物-靶标双链体的一半解离并变成单链的温度,并且这是双链体稳定性的指示;增加的T<sub>m</sub>表

明增加的稳定性)。可以使用本领域中已知的多种方法来计算 $T_m$ 并且本领域技术人员将容易理解此类各种方法用于计算 $T_m$ ;此类方法包括例如但不限于在线工具(如可从 [promega.com/techserv/tools/biomath/calcl1.htm](http://promega.com/techserv/tools/biomath/calcl1.htm) 的World Wide Web上获得的 $T_m$ 计算器)中获得的方法。引物特异性由其完整序列与3'末端序列(由Taq聚合酶延长的部分)组合定义。在一些实施方案中,3'末端应具有在靶序列的其他任何地方均未发现的至少5至7个独特的核苷酸,以帮助减少错误引发和错误扩增产物的产生。正向和反向引物通常以相似的效率结合靶标。在一些情况下,可采用如NCBI BLAST之类的工具(位于 [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) 的World Wide Web上)进行比对并协助引物设计。

[0133] 本领域技术人员将充分了解关于靶核酸序列的引物设计的基础,并且各种参考手册和文本对此类方法具有广泛的教导,包括例如Molecular Cloning(三卷册,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2012)和Current Protocols(Genetics and Genomics; Molecular Biology;2003-2013)和Real-Time PCR in Microbiology:From Diagnostics to Characterization(Ian M.MacKay,Calster Academic Press;2007);在 [primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.html](http://primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.html) 的World Wide Web和Kalendar R,等人(Genomics,98(2):137-144(2011)上可获得的PrimerAnalyser Java工具),出于所有目的将其全部全文并入本文。

[0134] 引物设计的另一个方面是引物复杂性或语言序列复杂性(参见,Kalendar R,等人(Genomics,98(2):137-144(2011))。具有较大语言序列复杂性(例如,核苷酸排列和组成)的引物通常更有效。在一些实施方案中,使用语言(linguistic)序列复杂性计算方法来搜索比较的序列之间的保守区以检测低复杂性区域,包括简单的序列重复、不完美的直接或反向重复、聚嘌呤和聚嘧啶三链cDNA结构,以及四链结构(如G-四链体(quadruplexes))。在一些实施方案中,使用alphabet-capacity L-gram方法沿整个序列长度执行语言复杂性(LC)测量(参见A.Gabrielian,A.Bolshoy,Computer&Chemistry 23:263-274(1999)和Y.L.Orlov,V.N.Potapov,Complexity:an internet resource for analysis of DNA sequence complexity,Nucleic Acids Res.32:W628-W633(2004)),并将其计算为序列中从1到L个大小字的观察范围(xi)的总和除以该序列长度的预期(E)值的总和。一些富含G的(和富含C的)核酸序列折叠成四链DNA结构,其含有G-quartets的stacks(参见quadruplex.org的World Wide Web)。在一些情况下,这些四链体是通过两个或四个DNA分子的分子间结合,含有两个G碱基的序列的二聚化或通过含有四个鸟嘌呤区块的单链的分子间折叠形成的(参见P.S.Ho,PNAS,91:9549-9553(1994);I.A.Il'icheva,V.L.Florent'ev,Russian Journal of Molecular Biology 26:512-531(1992);D.Sen,W.Gilbert,Methods Enzymol.211:191-199(1992);P.A.Rachwal,K.R.Fox,Methods 43:291-301(2007);S.Burge,G.N.Parkinson,P.Hazel,A.K.Todd,K.Neidle,Nucleic Acids Res.34:5402-5415(2006);A.Guédin,J.Gros,P.Alberti,J.Mergny,Nucleic Acids Res.38:7858-7868(2010);O.Stegle,L.Payet,J.L.Mergny,D.J.MacKay,J.H.Leon,Bioinformatics 25:i374-i382(2009);在一些情况下,由于其语言复杂性低,(TTAGGG)<sub>4</sub>的LC=32%,从引物设计中删除这些。

[0135] 这些方法包括各种生物信息学工具,其用于在关于CG含量和熔解温度方面具有GC偏移、(G-C)/(G+C)、AT偏移、(A-T)/(A+T)、CG-AT偏移、(S-W)/(S+W),或嘌呤-嘧啶(R-Y)/(R

+Y) 偏移的序列中进行模式分析,并且所述方法提供用于确定语言序列复杂性概况的工具。例如,在n的滑动窗口中的GC偏移(其中n是一个正整数),根据公式  $(GC)/(G+C)$  用一个碱基的步长计算碱基,其中G是鸟嘌呤的总数并且C是窗口中所有序列的胞嘧啶的总数(Y.Benita,等人,Nucleic Acids Res.31:e99(2003))。正的GC偏移值表示G碱基过量,而负的GC偏移值代表C碱基过量。类似地,在序列中计算其他偏移。在一些实施方案中,采用此类方法以及其他方法来确定引物复杂性。

[0136] 根据非限制性实例实施方案,使用核酸外切酶引物(TAQMAN®探针)进行实时PCR。在这样的实施方案中,引物利用热稳定聚合酶(如Taq)的5'核酸外切酶活性来切割扩增反应中存在的双标记探针(参见,例如,Wittwer,C.等人Biotechniques 22:130-138,1997)。尽管与PCR产物互补,但此测定法中所用的引物探针与PCR引物不同,并被能够发荧光的分子和能够猝灭荧光的分子双重标记。当探针完整时,DNA探针内的荧光信号的分子内猝灭导致几乎没有信号。当扩增过程中荧光分子通过Taq的核酸外切酶活性释放时,猝灭大大降低,导致荧光信号增加。荧光探针的非限制性实例包括6-羧基荧光素部分等。示例性猝灭剂包括Black Hole Quencher 1部分等。

[0137] 各种PCR引物可用于所公开的方法。示例性引物包括但不限于本文所述的那些。

[0138] 各种检测探针可用于所公开的方法,并用于基因分型和/或定量。本领域技术人员通常采用的检测探针包括但不限于水解探针(也称为TAQMAN®探针、5'核酸酶探针或双标记探针)、杂交探针和Scorpion引物(其在一分子中组合引物和检测探针)。

[0139] 在一些实施方案中,检测探针含有各种修饰。在一些实施方案中,检测探针包括修饰的核酸残基,如但不限于2'-O-甲基核糖核苷酸修饰、硫代磷酸酯(phosphorothioate)主链修饰、二硫代磷酸酯(phosphorodithioate)主链修饰、氨基磷酸酯(phosphoramidate)主链修饰、甲基膦酸酯(methylphosphonate)主链修饰、3'末端磷酸酯修饰和/或3'烷基取代。

[0140] 在一些实施方案中,由于修饰,检测探针对靶序列具有增加的亲和力。此类检测探针包括具有增加的长度的检测探针,以及含有化学修饰的检测探针。此类修饰包括但不限于2'-氟(2'-脱氧-2'-氟-核苷)修饰、LNA(锁定核酸(locked nucleic acids))、PNA(肽核酸)、ZNA(拉链(zip)核酸)、吗啉、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯、聚阳离子(polycationic)缀合物和2'-芘(pyrene)修饰。在一些实施方案中,检测器探针含有一种或多种修饰,包括2'氟修饰(又名,2'-脱氧-2'-氟-核苷)、LNA(锁定核酸)、PNA(肽核酸)、ZNA(拉链核酸)、吗啉、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯和/或聚阳离子缀合物。

[0141] 在一些实施方案中,检测探针包含可检测的部分,例如本文所述的那些,以及本领域技术人员已知的任何可检测的部分。这样的可检测部分包括例如但不限于荧光标记和化学发光标记。这样的可检测部分的实例还可包括FRET对的成员。在一些实施方案中,检测探针包含可检测的实体。

[0142] 荧光标记的例子包括但不限于AMCA、DEAC(7-二乙基氨基香豆素-3-羧酸);7-羟基-4-甲基香豆素-3;7-羟基香豆素-3;MCA(7-甲氧基香豆素-4-乙酸);7-甲氧基香豆素-3;AMF(4'-(氨基甲基)荧光素);5-DTAF(5-(4,6-二氯三嗪基)氨基荧光素);6-DTAF(6-(4,6-二氯三嗪基)氨基荧光素);6-FAM(6-羧基荧光素;又名FAM;包括TAQMAN®FAMTM);TAQMANVIC®;5(6)-FAM尸胺(cadaverine);5-FAM尸胺;5(6)-FAM乙二胺;5-FAM乙二

胺;5-FITC (FITC异构体I;荧光素5-异硫氰酸酯);5-FITC尸胺;荧光素5-马来酰亚胺;5-IAF (5-碘乙酰氨基荧光素);6-JOE (6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素);5-CR110 (5-羧甲基罗丹明110);6-CR110 (6-羧甲基罗丹明110);5-CR6G (5-羧甲基罗丹明6G);6-CR6G (6-羧甲基罗丹明6G);5(6)-羧甲基罗丹明6G尸胺;5(6)-羧甲基罗丹明6G乙二胺;5-ROX (5-羧基-X-罗丹明);6-ROX (6-羧基-X-罗丹明);5-TAMRA (5-羧四甲基罗丹明);6-TAMRA (6-羧四甲基罗丹明);5-TAMRA尸胺;6-TAMRA尸胺;5-TAMRA乙二胺;6-TAMRA乙二胺;5-TMR C6马来酰亚胺;6-TMR C6马来酰亚胺;TR C2马来酰亚胺;TR尸胺;5-TRITC;G异构体(四甲基罗丹明5-异硫氰酸酯);6-TRITC;R异构体(四甲基罗丹明6-异硫氰酸酯);丹磺酰尸胺(5-二甲氨基萘-1-(N-(5-氨基戊基))磺酰胺);EDANS C2马来酰亚胺;氟胺;NBD;和吡咯二烯及其衍生物。

[0143] 化学发光标记的例子包括但不限于Southern Blot和Western Blot方案使用的那些标记(参见,例如,Sambrook和Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,(第3版)(2001);以其整体通过引用并入本文)。实例包括但不限于-(2'-螺金刚烷(spiroadamantane))-4-甲氧基-4-(3"-磷酸氧基(phosphoryloxy))苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMPPD);吖啶酯(acridinium)和金刚烷基(adamantyl)稳定的1,2-二氧杂环丁烷,及其衍生物。

[0144] 探针的标记是本领域已知的。标记的探针用于在扩增过程中在扩增区域内杂交。修饰探针以免它们充当扩增用引物。检测探针用两种荧光染料进行标记,其中之一能够猝灭另一种染料的荧光。一种染料附着在探针的5'末端,而另一种染料附着在内部位点,因此当探针处于非杂交状态时会发生淬灭。

[0145] 通常,实时PCR探针由参与荧光共振能量转移(FRET)的一对染料(报告染料和受体染料)组成,由此受体染料猝灭报告染料的发射。通常,荧光标记的探针会增加扩增子定量的特异性。

[0146] 鉴于本公开,在本公开方法的一些实施方案中使用的实时PCR还包括使用一种或多种杂交探针(即,检测探针),如本领域技术人员所确定的。作为非限制性实例,此类杂交探针包括但不限于所描述的方法中提供的一种或多种。示例性探针,如HEX通道和/或FAM通道探针是本领域技术人员所理解的。

[0147] 根据示例实施方案,方便地选择检测探针和引物,例如,使用计算机分析,其使用引物设计软件并针对保存在National Center for Biotechnology Information (NCBI)的基因和基因组的可用核苷酸数据库进行交叉引用。在一些实施方案中,一些额外的指导方针可用于选择引物和/或探针。例如,在一些实施方案中,选择引物和探针以使它们靠近在一起但不重叠。在一些实施方案中,引物可以具有相同的(或接近的 $T_m$ ) (例如,在约58°C和约60°C之间)。在一些实施方案中,探针的 $T_m$ 大约比引物的 $T_m$ 选择的 $T_m$ 高约10°C。在一些实施方案中,选择探针和引物的长度在约17至39个碱基对之间,等等。在一些情况下,本领域技术人员在选择合适的引物和/或探针时使用这些和其他指导方针。

[0148] 在一些实施方案中,本文所述的SNP可以通过使用上述检测探针的熔解曲线(melting curve)分析来检测。例如,可以分析与含有目的SNP的区域杂交的短寡核苷酸探针的熔解曲线。在这些反应中使用了两种探针,每种探针与所讨论的SNP处的特定等位基因互补。与错配的探针相比,完全匹配的探针更稳定并且具有更高的解链温度。因此,根据通

过退火和熔解匹配的或错配的寡核苷酸探针产生的特征性熔解曲线推断SNP基因型。

[0149] 一方面,本文所述的方法可包括通过使至少一种检测探针与来自样品的核苷酸分子或其扩增子杂交并检测至少一种检测探针来检测本文所述的两个或多个SNP。

[0150] 在另一方面,诊断测试用于通过检测多种突变中的任一种来确定一个或多个遗传状况。在一些实施方案中,当基于例如身体表现、体征和/或症状以及家族史信息而怀疑特定状况时,使用诊断测试来确认诊断。在一些实施方案中,诊断测试的结果帮助医学领域的技术人员为给定受试者确定合适治疗方案,并允许更个性化和更有效的治疗方案。在一些实施方案中,治疗方案包括由本领域技术人员确定的多种药物治疗、外科治疗、生活方式改变或其组合中的任何一种。

[0151] 通过公开的方法获得的核酸可用于多种诊断测试,包括用于检测突变如缺失、插入、转换(transversion)和转变(transition)的测试。在一些实施方案中,此类诊断可用于鉴定携带疾病(其需要表达该疾病的两个拷贝)基因的一个拷贝的未受影响的个体,鉴定携带疾病基因的一个拷贝的未受影响的个体,其中该信息可以用于开发治疗方案,植入前遗传学诊断,产前诊断测试,新生儿筛查,家谱DNA测试(用于遗传家谱目的),症状前(presymptomatic)测试用于预测或诊断KC。

[0152] 在一些实施方案中,可以对新生儿进行筛查。在一些实施方案中,新生儿筛查包括刚出生后采用的任何遗传筛查,以鉴定遗传病症。在一些实施方案中,新生儿筛查可用于鉴定遗传病症,从而在生命的早期确定治疗方案。此类测试包括但不限于对婴儿进行苯丙酮酸尿症(phenylketonuria)和先天性甲状腺功能减退症(congenital hypothyroidism)的测试。

[0153] 在一些实施方案中,携带者测试用于鉴定携带基因突变的单个拷贝的人。在一些情况下,当以两个拷贝出现时,突变会引起遗传病症。在一些情况下,一个拷贝就足以引起遗传病症。在一些情况下,对于特定的治疗方案,如存在阿韦利诺(Avellino)突变和在进行外科手术之前进行预筛查以确保对给定的受试者采用适当的治疗方案,则禁止两个拷贝的存在。在一些实施方案中,此类信息对于个体考虑生育也有用,并且帮助个体做出明智的决定,以及帮助医学领域的技术人员向个体受试者以及受试者的亲属提供重要的建议。

[0154] 在一些实施方案中,预测和/或症状前类型的测试用于检测与多种病症相关的基因突变。在一些情况下,这些测试对有遗传病家庭成员但在测试时可能没有任何病症特征的人有帮助。在一些实施方案中,预测性测试鉴定这样的突变,其增加人发生具有遗传基础的病症的机会,所述病症包括例如但不限于某些类型的癌症。在一些实施方案中,症状前测试用于在任何身体征兆或症状出现之前确定人是否会发生遗传病症。预测性和症状前测试的结果提供了关于人发生特定病症的风险的信息,并有助于受试者以及受试者的亲属做出有关适当医学治疗方案的决定。在一些实施方案中,还采用预测测试来检测某些治疗方案所禁忌的突变,例如阿韦利诺突变的存在是进行LASIK手术和/或其他屈光手术,如但不包括仅限于光疗性角膜切除术(Phototherapeutic keratectomy) (PTK) 和/或光折射性角膜切除术(Photorefractive keratectomy) (PRK) 禁忌的。例如,表现出阿韦利诺突变的受试者不应进行LASIK手术或其他屈光手术。同样,在一些情况下,具有KC突变的受试者不应进行LASIK手术或其他屈光手术。

[0155] 在一些实施方案中,诊断测试还包括药物基因组学(pharmacogenomics),其包括

确定遗传变异对药物反应的影响的遗传测试。来自此类药物基因组学分析的信息可用于确定和开发适当的治疗方案。医学领域的技术人员在设计适当的治疗方案时采用有关遗传变异存在与否的信息。

[0156] 在一些实施方案中,使用本公开的方法确定其遗传概况的疾病包括KC。

[0157] 在一些实施方案中,本方法通过提供用于确定个体的遗传概况(profile)的基因组DNA用于个性化药物治疗方案的开发。在一些实施方案中,本领域技术人员采用这此类遗传概况信息来确定和/或开发治疗方案。在一些实施方案中,本领域技术人员使用在通过所述方法分离的核酸中鉴定的各种遗传变异和突变的存在和/或缺失作为个性化药物治疗方案或计划的一部分。例如,在一些实施方案中,将使用所公开的方法获得的信息与数据库或其他已建立的信息进行比较,以确定对特定疾病的诊断和/或确定治疗方案。在一些情况下,将有关特定受试者中遗传突变的存在或缺失的信息与数据库或其他标准信息源进行比较,以确定有关提议治疗方案的信息。在一些情况下,遗传突变的存在表明正在执行特定的治疗方案。在一些情况下,遗传突变的缺失表明未执行特定的治疗方案。

[0158] 在一些实施方案中,关于特定遗传突变的存在和/或缺失的信息用于确定用治疗实体进行治疗的治疗功效,以及调整用于用治疗实体进行治疗的治疗方案。在一些实施方案中,关于遗传突变的存在和/或缺失的信息用来确定是否执行治疗方案。在一些实施方案中,关于遗传突变的存在和/或缺失的信息用于确定是否继续治疗方案。在一些实施方案中,遗传突变的存在和/或缺失用于确定是否终止治疗方案。在一些实施方案中,遗传突变的存在和/或缺失用于确定是否修改治疗方案。在一些实施方案中,遗传突变的存在和/或缺失用于确定是否增加还是减少作为治疗方案的一部分施用的治疗的剂量。在其他实施方案中,遗传突变的存在和/或缺失用于确定是否改变作为治疗方案的一部分施用的治疗的给药频率。在一些实施方案中,遗传突变的存在和/或缺失用于确定是否改变治疗的每天、每周的剂量数、每天的次数。在一些实施方案中,遗传突变的存在和/或缺失用于确定是否改变治疗的剂量。在一些实施方案中,在开始治疗方案之前和/或在治疗方案开始之后确定遗传突变的存在和/或缺失。在一些实施方案中,确定遗传突变的存在和/或缺失,并将其与关于遗传突变的存在或缺失的预定标准信息进行比较。

[0159] 在一些实施方案中,使用所公开的方法产生多于一个遗传突变的存在和/或缺失的组合,并且此类组合包括关于多于一个遗传突变的存在和/或缺失的信息的任何收集。在一些实施方案中,检查2个或多个、3个或多个、4个或多个、5个或多个、6个或多个、7个或多个、8个或多个、9个或多个、10个或多个、20个或多个、30个或多个或40个或多个遗传突变,例如图1-5中那些的存在或缺失,并将其用于产生组合。在一些实施方案中的示例性信息包括核酸或蛋白质信息,或关于核酸和/或蛋白质遗传突变的信息的组合。通常,组合包括有关遗传突变的存在和/或缺失的信息。在一些实施方案中,这些组合用于与预定的标准信息进行比较,以执行、维持或停止治疗方案。

[0160] 在一些实施方案中,例如通过检测本文所述的两个或多个遗传变体来预测和/或检测KC,所述变体例如,包括选自但不限于图1中所列的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、100、150、200或250个变体。

[0161] 本公开还提供了方法以辅助鉴别诊断。在一些实施方案中,通过检测本文所述的两个或多个遗传变体,例如包括选自但不限于图1中所列的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、

12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、100、150、200个变体将KC与准分子激光治疗后的透明质边缘变性、球形角膜、隐形眼睛诱导的角膜弯曲和/或角膜扩张(ectasia)区别开来。

[0162] 在一些实施方案中,两个或多个遗传变体是选自图2所列的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、100、150、200或250个变体,并且受试者是非裔美国人。

[0163] 在一些实施方案中,两个或多个遗传变体是选自图3所列的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、100、150、200或250个变体,并且受试者是白种人。

[0164] 在一些实施方案中,两个或多个遗传变体是选自图4所列的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、100、150、200或250个变体,并且受试者是西班牙裔。

[0165] 在一些实施方案中,两个或多个遗传变体是选自图5所列的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、100、150、200或250个变体,并且受试者是东亚人。

[0166] 在一些实施方案中,将两个或多个遗传变体的检测与身体检查结合以诊断KC或预测发生KC的风险。这种身体检查可以包括眼睛检查以及辅助检查,以评估角膜曲率(curvature)、散光和厚度。在一些实施方案中,评估受试者的最佳潜在视力。眼科检查的组成部分可以包括但不限于病史(medical history)(包括,例如,眼镜处方的改变、下降的视力、眼睛揉搓的历史、医疗问题、过敏和/或睡眠方式);受试者心理和身体状况的相关方面的评估;在远处以及适当时在近距离和远距离进行当前(current)校正(记录当前校正的功效(power))的视敏度(visual acuity);佩戴眼镜和/或硬性或透气性隐形眼镜(当指示时具有折射)的最佳矫正视力的测量;针孔(pinhole)视力的测量;外部检查(眼睑、睫毛、泪腺、眼眶);眼球对准和运动的检查;瞳孔功能的评估;眼内压(IOP)的测量;前段(anterior segment)的裂隙灯生物显微镜检查;扩张检查(dilated examination)(包括例如,晶状体、黄斑、周围视网膜、视神经和玻璃体的扩张检查);和Keratometry/Computerized Topography/Computerized Tomography/Ultrasound Pachymetry。

[0167] 在一些实施方案中,将两个或多个遗传变体的检测与一种或多种KC发展的适应症或征兆组合以诊断KC或预测发生KC的风险。在一些实施方案中,征兆是KC的早期征兆。在一些实施方案中,KC的早期征兆包括但不限于具有高度或进行性散光的不对称屈光不正;显示高度散光和不规则性的角膜曲率(相加不等于180度的轴);在眼底镜或检影镜上剪断(scissoring)红色反射(red reflex);轻度变陡、倾斜的轴,或K读数和计算机角膜地形图上升高的角膜曲率值;角膜变薄,特别是在下角膜中(最大角膜变薄对应于最大变陡或突出的部位);从颞侧射出笔光(penlight)时,Rizzuti征兆或鼻角膜上的圆锥反射;Fleischer环,其是通常存在于圆锥体基部周围的上皮细胞内的铁沉积物。其颜色为棕色,用钴蓝色滤光片进行最佳显示;或Vogt条纹(striae),在基质中呈细小,大致垂直平行的条纹(这些在眼球上施加稳定压力时通常消失,并在压力停止时重新出现)。在一些实施方案中,征兆是KC的晚期征兆。在一些实施方案中,KC的晚期征兆包括但不限于Munson征兆(向下凝视中的下眼睑突起);表面瘢痕;Bowman膜破裂;急性积液(病况,其中Descemet膜破裂允许房水进

入造口,引起严重的角膜增厚/视力下降和疼痛);或在急性积液消失后的基质瘢痕形成(自相矛盾的是,这在一些情况下可通过改变角膜曲率和减少不规则散光而提高视力)。

[0168] 在一些实施方案中,与发生KC风险增加相关的两个或多个遗传变体的检测可以用于帮助确定疑似患有KC或预计将来发生KC的个体的治疗方案。

[0169] KC治疗方案包括旨在提供视敏度和维持视力的各种治疗方案。在轻度病例(mild cases)中,可以使用眼镜或柔软的复曲面隐形眼镜。在大多数病例中需要刚性透气性隐形眼镜来中和不规则的角膜散光。可以佩戴硬质或透气性隐形眼镜的大多数受试者其视力都有显著提高。已经开发出特殊的隐形眼镜以更好地适应在KC中发现的不规则和变陡的角膜;这些包括(但不限于)RoseKTM、定制设计的隐形眼镜(基于地形图和/或波前测量)、半巩膜(semi-scleral)隐形眼镜、背驮式眼镜使用(同时使用的软硬镜(soft and hard lens))和巩膜镜。变得不能接受隐形眼镜或视力不佳(例如,由于中央疤痕)的受试者可进行外科手术选项。

[0170] 在一些实施方案中,如本文所述的两个或多个遗传变体的检测可用于在疑似发生KC风险的个体中早期开始适当的治疗。在一些实施方案中,治疗针对于停止角膜形状的改变。在一些实施方案中,对预测和发生KC风险增加的两个或多个遗传变体的检测可以允许更早和/或更频繁地监测角膜,以便在早期鉴定疾病发作。(即,鉴定早期的疾病发作)。

[0171] 在一些实施方案中,治疗包括用于患有角膜积液发作(episode)的受试者的药物治疗,其涉及疼痛和肿胀的急性处理(management)。通常给予受试者睫状肌麻痹剂、5%的氯化钠(Muro)软膏,并可能提供压力贴片(pressure patch)。移除压力贴片后,受试者可能仍需要持续数周至数月的时间继续使用氯化钠滴剂或药膏,直至积液发作消退。建议受试者避免剧烈的眼睛揉搓或外伤。

[0172] 在另一方面,如本文所述的两个或多个SNP的检测可用于在疑似发生KC风险的个体中开始早期或定期监测。在一些实施方案中,可以在6个月至每年的基础上随访受试者,以监测角膜变薄和变陡的进程以及所产生的视觉变化,并重新评估隐形眼镜的佩戴和护理。在一些实施方案中,更频繁地观察到已经发生积液的受试者直到症状消退。

[0173] 在另一方面,如本文所述的两个或多个遗传变体的检测可以用于在受试者中诊断KC。在一些实施方案中,在诊断之后,治疗方案包括外科干预。最初的治疗方案侧重于微创手术(less invasive procedures),如佩戴隐形眼镜,如果受试者未表现出角膜瘢痕。然而,随着受试者变得不耐受或不再受益于隐形眼镜,手术是下一个选择。手术选择可以包括但不限于INTACS(即植入物,也称为ICRS或角膜环)、前板层(Anterior lamellar)角膜移植或穿透性角膜移植。治疗还可以包括未经FDA批准的治疗,其包括但不限于使用角膜的UV/核黄素胶原蛋白交联来使角膜变硬并可能防止形状的逐渐改变,并且该治疗可以与准分子(excimer)激光治疗、传导性角膜移植和/或INTACS组合。在一些实施方案中,外科医生还可以使用有晶状体眼人工晶状体(phakic intraocular lenses) (IOL) 来解决高度近视和一些散光。

[0174] 在一些实施方案中,外科干预包括角膜内环段(intracorneal ring segments) (INTACS;可从Addition Technology商购),其也已被批准用于在不耐受隐形眼镜的受试者中治疗轻度至中度KC。在这些情况下,受试者必须在其中大约7mm的光学区内插入区段的地方具有清晰的中央角膜,并且角膜厚度大于450微米。INTACS的优势在于它们不需要去除角

膜组织,不需要眼内切口,并且保持角膜中央不被接触。为了获得最佳视力,大多数受试者术后需要戴眼镜和/或隐形眼镜,但将具有较平整的角膜并且手术后更容易使用眼镜。在一些情况下,可以移除INTACS,然后再考虑其他手术选择。

[0175] 在一些实施方案中,外科干预包括前板层角膜移植,其已经重新出现成为治疗KC的选项。它涉及中央前角膜的置换,使受试者的内皮完好无损。优点是消除了内皮移植物排斥的风险,并且切口处的球体创伤破裂的风险较小,这是因为内皮和Descemet以及一些基质保持完整,并且视觉恢复更快。有几种技术,包括深前板层角膜移植(DALK)和大气泡角膜移植(BBK)以去除前基质,同时保持Descemet层和内皮不变。然而,该过程在技术上可能具有挑战性,需要与穿透性角膜移植进行对话,并且术后会有界面雾化的可能性,导致最佳矫正视力(BCVA)降低;尚不清楚前角膜移植相对于穿透性角膜移植能否更好地治疗散光。穿透性角膜移植具有很高的成功率,并且是具有长期安全性和有效性跟踪记录的标准外科治疗。该过程的风险包括感染和角膜排斥以及伤口边缘创伤破裂的风险。由于残留的不规则散光,穿透性角膜移植(PK)后的许多受试者可能仍需要硬性或透气性隐形眼镜。由于结果的不可预测性以及导致增加的和/或不稳定的不规则散光的风险,任何类型的屈光手术都被认为是圆锥角膜受试者的禁忌症。

[0176] 另外,圆锥角膜的治疗包括胶原蛋白交联和角膜移植。胶原蛋白交联是新疗法,其使用特殊的激光和眼药水来促进构成角膜的胶原纤维的“交联”或增强作用。这种治疗可以使角膜变平或变硬,防止进一步突出。当其他治疗再也不可能提供良好的视力时,则可以建议进行角膜移植。在角膜移植中,从眼睛中移除患病的角膜并用健康的供体角膜代替它。

[0177] 一方面,本公开提供了用于在受试者中治疗圆锥角膜的方法,所述方法包括在受试者中诊断或预后KC和治疗KC。在进一步的实施方案中,所述治疗可包括佩戴眼镜或隐形眼镜、施用睫状肌麻痹剂、应用角膜内环段、进行前板层角膜移植(anterior lamellary keratoplasty)和/或进行胶原蛋白交联或角膜移植。

[0178] 在另一方面,本公开提供了用于诊断、预后和/或治疗KC的诊断试剂盒。可以将上述任何或所有试剂包装到诊断试剂盒中。此类试剂盒包括本文所述的任何和/或所有引物、探针、缓冲液和/或其他试剂。在一些实施方案中,试剂盒包括用于检测选自但不限于图1所列的那些的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个变体的试剂。

[0179] 在一些实施方案中,试剂盒中的试剂以冻干粉形式包括在内。在一些实施方案中,试剂盒中的试剂以冻干粉形式包括在内,并带有用于重构的说明书。在一些实施方案中,试剂盒中的试剂以液体形式包括在内。在一些实施方案中,试剂被包括在塑料和/或玻璃小瓶或其他合适的容器中。在一些实施方案中,引物和探针全部包含在试剂盒的单独容器中。在一些实施方案中,引物被一起包装在一个容器中,而探针在被一起包装在另一容器中。在一些实施方案中,引物和探针被一起包装在单个容器中。

[0180] 在一些实施方案中,试剂盒进一步包括对照gDNA和/或DNA样品。在一些实施方案中,对照DNA样品是正常的(例如,来自不具有KC的受试者)。在一些实施方案中,对照DNA样品对应于检测到的突变,包括选自图1所列组的任何变体。

[0181] 在一些实施方案中,对照DNA样品的浓度为5ng/ $\mu$ L、10ng/ $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L、30ng/ $\mu$ L、40ng/ $\mu$ L、50ng/ $\mu$ L、60ng/ $\mu$ L、70ng/ $\mu$ L、80ng/ $\mu$ L、90ng/ $\mu$ L、100ng/ $\mu$ L、110ng/ $\mu$ L、120ng/ $\mu$ L、

130ng/μL、140ng/μL、150ng/μL、160ng/μL、170ng/μL、180ng/μL、190ng/μL或200ng/μL。在一些实施方案中,对照DNA样品的浓度为50ng/μL、100ng/μL、150ng/μL或200ng/μL。在一些实施方案中,对照DNA样品的浓度为100ng/μL。在一些实施方案中,对照DNA样品具有相同浓度。在一些实施方案中,对照DNA样品具有不同的浓度。

[0182] 在一些实施方案中,试剂盒可以进一步包括缓冲液,例如GTXpress **TAQMAN®** 试剂混合物或任何等效缓冲液。在一些实施方案中,缓冲液包括本文所述的任何缓冲液。

[0183] 在一些实施方案中,试剂盒可进一步包括用于克隆的试剂,如载体(包括例如,M13载体)。

[0184] 在一些实施方案中,试剂盒进一步包括用于DNA纯化的试剂。

[0185] 在一些实施方案中,试剂盒进一步包括使用试剂盒在受试者中检测角膜营养不良的说明书。在一些实施方案中,这些说明书包括本文所述的方案的各个方面。

[0186] 初步研究

[0187] 研究队列由219例病例和60例对照组成。白种人组由70例个人病例和33例家庭病例组成,总共104例,外加38例对照;东亚人队列由70例个人病例和5例家庭病例组成,总共75例,外加20例对照;西班牙裔组由13例个人病例和5例家庭病例组成,总共18例,外加1例对照;非裔美国人(African-American,或美国黑人)组由15例个人病例和3例家庭病例,总共18例;南亚人组由3例个人病例和2例家庭病例组成,总计5例病例和1例对照(图1-6)。

[0188] 从美国、加拿大、捷克共和国、希腊、巴西、北爱尔兰、韩国和墨西哥的诊所收集样品和对照。从既无个人眼部疾病病史也无家族眼部疾病病史的个体收集对照。每个诊所都基于CLEK研究以及有关KC和直肠疾病的全球共识研究,利用标准来诊断KC。总之,所有受试者均接受全面的眼科检查,并且KC的诊断基于具有基于Placido盘的反射的角膜地形图、角膜层析成像以及裂隙灯检查的临床发现。利用Scheimpflug照相系统,如Oculyzer II (Alcon Surgical,Ft.Worth,Tex.,USA) 或 **Pentacam®** HR (OCULUS **Optikgeräte** GmbH, Wetzlar,Germany) 测量角膜地形图和厚度测量法、平均角膜厚度值(K)、狭窄(steepest)K、最大K、最薄角膜厚度和中央角膜厚度。在一些地方,还利用Schwind Sirius (Schwind Eye-Tech Solutions,Kleinostheim,Germany) 来诊断高阶像差(high order aberrations) (HOA)。如果已知家族病史,则患者在采集样本时会予以披露。

[0189] 使用iSWAB收集试剂盒(Mawi DNA Technologies,Hayward,CA,USA) 进行样品收集。简而言之,收集试剂盒含有4个颊拭子和在专门的1.5mL Eppendorf管中含有未公开防腐剂的1mL溶液。需要用4个拭子中的每一个擦拭患者的内颊,收集足够的上皮组织,以确保DNA产量介于0.5至3.0μg基因组DNA之间。将每个拭子放入Eppendorf管中,其被设计用于从每个颊拭子上刮下所收集的细胞。将含有所收集的上皮细胞的试管保存在4℃直至准备使用。

[0190] 使用来自QIAGEN Inc. (Hilden,Germany) 的**QIAamp®** DNA血液迷你试剂盒进行基因组DNA提取。所有样品均利用推荐用于全血的DNA提取方案,并在试剂盒中提供的150μl 洗脱缓冲液中从旋转柱上洗脱DNA。3.4ng/μl的浓度是最低可接受的DNA浓度以产生至少0.5μg,这是WES文库制备所需的最低量。

[0191] ACE Platform™ (Personalis Inc.,Menlo Park,CA) 用于整个外显子组测序(WES)

运行,其由Personalis在Illumina HiSeq 2000上进行。整个外显子组ACE Platform™为外显子组以外的区域提供扩大的覆盖,包括8,000多个基因的调控区域。所得序列数据由Personalis处理,并为所有病例和对照生成了变体调用格式(VCF)文件。每个VCF文件由在构成人类外显子组(exome)的大约22,000个基因内发现的大约150,000个变体组成。

[0192] 使用VCF BCFtools版本1.3.1处理VCF以左对齐和标准化插入/缺失,将多个等位基因位点分成多个调用(calls),并检查参考碱基是否匹配已知参考(1000Genomes Phase 1和3GRCh37参考)。然后使用VCFtools版本0.1.15清除在chr1-22XY之外的重叠群上的所有参考碱基调用和变体。然后使用BCFtools版本1.3.1将所有样本合并到单独的变体“数据库”中,从所述数据库中将各个种族的样本提取为亚组(sub-groups)。然后将每个亚组转换为PLINK格式,并使用PLINK v1.90b3.38为病例和对照计数每个变体的等位基因计数(tally)。然后使用自定义BASH脚本修改PLINK结果文件,然后使用ANNOVAR注释所有变体。

[0193] 用三种不同的评分系统注释变体,以确定每个变体周围区域的保守程度。这些是GERP++(其中得分在-12.3到6.17范围内,最保守的是6.17)、PhyloP(其基于包括脊椎动物和哺乳动物在内的40+基因组比对计算得分),和SiPhy(其利用29个基因组比对(哺乳动物)并产生一个对数比值比,值越高表示保存性越高)。如Exome Aggregation Consortium (ExAC,<http://exac.broadinstitute.org/>)所证明,其他过滤基于 $\leq 0.05$ 或NA的次要等位基因频率(MAF),其含有来自60,706个无关个体的数据。ExAc亚群与样本族群如下匹配:ExAc AFR(非洲/非裔美国人)、非裔美国人;ExAc NFE(非芬兰欧洲人)、白种人;ExAc EAS(东亚人)、东亚人;和ExAc AMR(西班牙裔(混杂美国人)、西班牙裔。

[0194] 为了选择最有可能造成伤害并因此与疾病相关的变体,应用了以下标准:聚焦归类为错义,STOP得/失,无意义或移码/非移码插入/缺失(InDel)的变体。使用Database for Annotation、Visualization和Integrated Discovery通过基因组富集分析,将这些变体进一步过滤为与角膜或KC相关的基因内的那些关键术语。以默认类别外加‘GAD\_Disease’和‘GAD\_Disease\_Class,’使用功能注释图表工具,并使用基因计数1和EASE 1.0导出了所有富集术语的列表。最后,根据来自7种公开方法的计算机模拟预测来评估每个变体的病理:SIFT、PolyPhen 2HDIV、PolyPhen 2HVar、LRT、MutationTaster、MutationAssessor和FATHMM。每种工具旨在确定由于外显子DNA序列的错义变化而对转录的氨基酸序列和翻译的蛋白质的可能影响,每种工具在做出预测时都会考虑不同的指标。如果变体满足每个工具的以下预测,则将被分类为100%致病的:SIFT,有害(deleterious);PolyPhen 2HDIV,很可能(probably)会损坏/可能(possibly)会损坏;PolyPhen 2HVar,很可能会损坏/可能会损坏;LRT,有害;MutationTaster,自动致病、引起疾病;MutationAssessor,高;FATHMM,有害。仅在与疾病概况相关并且比ExAC中记录的更高的MAF水平在病例样本中存在的情况下,才考虑分类为良性和/或常见的变体。对于本研究,常见的变体被定义为ExAC内具有大于1%的MAF,即 $MAF(ExAC\_All) > 0.01$

[0195] 为了概述每个样本的种族特点,使用了可公开获得的Genomes Phase 3VCF数据(The 1000Genomes Project Consortium,2015)( $n=2,504$ ),其可在逐个染色体基础上获得。将研究队列中的样本与这些数据进行比较。根据KC样本对个体1000个基因组(Genomes)染色体VCF进行归一化。然后使用PLINK v1.90b3.38执行所有进行的分析。

[0196] 将归一化的VCF转换为PLINK格式,然后仅保留基于1000个基因组和圆锥角膜样本

中dbSNP rs数量的匹配变体。基于以下参数从每1000个基因组染色体和圆锥角膜数据集中修剪(pruned)变体:仅保留MAF>0.2的变体和基于以下未处于连锁不平衡下的那些:窗口大小,50;步长(变量计数),5;方差扩大因子(VIF)阈值,1.5。进一步去除了多等位基因变体。然后将所有1000个基因组染色体和KC数据集合并到单个项目中。然后进行主成分分析(PCA)。使用R版本3.2.5(2016-04-14)绘制了前3个主成分的样本特征值。将1000个基因组分为其各自的超级种群,即非洲/非裔美国人、西班牙裔(混杂美国人)、东亚人、欧洲人和南亚人。

[0197] 为了预测KC样本的种族特点(其中在诊所提供的临床记录中未提及种族特点),使用如上所过滤的1000个基因组数据建立了简单的多类别逻辑回归模型。在该模型中,1000个基因组是超级群体,并且前20个主成分是预测因子。使用正反向(forward-backward)逐步回归分析和Bayesian信息准则(BIC)选择了预测超级群体的最佳主成分。通过接收器工作特性(ROC)分析,该模型获得了0.987的曲线下面积(AUC)(95%CI:0.982-0.992)。然后使用该模型预测所有1000个基因组和KC样本的种族特点,并绘制其各自的预测值。在除一种情况外的所有情况下,KC样本的预测种族特点均与基于样本装运来源的假定种族特点相匹配。所有建模均使用R进行。

[0198] 为用于与角膜结构和功能直接相关的基因内发现的变体子集的疾病预测分配定量值的目产生相对危险(RR)评分。(图7)以下步骤用于计算危险评分。首先以病例/对照状态为结果,选择用于下游分析的变体作为预测因子来构建Bayesian逻辑回归模型。对于在模型中用作预测因子的每个变体,在对数比值规模上应用PhyloP保守性评分,均值先验是被分析的各个种族亚组中调用的所有变体的平均PhyloP得分。因此,该模型为每个变体产生了一个比值比(OR),该比值考虑了病例和对照之间的相对等位基因计数,还考虑了其中鉴定该变体的区域的保守性(“保守OR”),从而:较高的保守性导致OR的增加;较低的保守性导致减少。然后,通过乘以计算机工具的数量直接从保守性OR中计算危险评分,通过前面提到的明确标准预测破坏性结果。插入/缺失的危险评分保留为其各自的保守OR,因为当前的计算机工具无法提供对这些的预测。解释的圆锥角膜变异由McFadden's  $R^2$ 定义。

[0199] WES数据的异质性和种族亚群的建立:该研究队列由5个族群组成:白种人、东亚人、西班牙裔、非裔美国人和南亚人。鉴于这项研究的种族多样性,并根据不同种族群体之间KC发生率和患病率的已知变化,确定了种族特点如何影响研究组的遗传特征。PCA双图用于针对1000Genomes Phase 3VCF数据绘制整个KC队列;基于自然发生的种群变体模式,将样本队列分为亚组。

[0200] 在整个外显子组中鉴定了遗传变体,其在每个种群内具有不同的频率。在研究队列中鉴定了定位在259个基因中的共1,117个变体,这些基因已知与综合征性眼病和非综合征性眼病有关(图1)。变体在本文中被定义为错义的单核苷酸多态性(SNP)和编码插入和缺失,其预测会改变蛋白质功能。如果以比Exome Aggregation Consortium(ExAC)中记录的高的次要等位基因频率(MAF)存在于病例样本中时,则包括分类为良性的变体。

[0201] 基因或基因所定位的基因座被鉴定为与疾病有关。例如,结果支持ZNF469基因内的常见变体(如rs3812954)在KC的病因中起作用。该变体以18.3%的比率存在于所有病例样本中(表3),在白种人队列中的比率为25.5%,在东亚人队列中的比率为18.1%。这些类型变体中的许多为种族之间共享。

[0202] VSX1基因内的一个常见变体rs6138482以20.8%的MAF存在于研究队列中。它在白种人、西班牙裔和非裔美国人三个种群中发现,在白种人中最普遍,占33.3%或102例中有34例。当考虑单个基因组中任何变体的存在时,还必须考虑基因型,无论是以杂合还是纯合形式发现变体。

[0203] 稀有变体和提供风险评分策略来预测病理:大多数变体是在特定个体中发现的,即私人变体;因此,通常应用于GWAS和常见变体的传统统计方法无法为数据提供给我们的异质模型提供重要意义。考虑到在如此广泛的基因中发现的程度,对与角膜的结构和功能有关的基因进行了深入分析。由于KC是其表型影响角膜的疾病,因此在一些实施方案中,定量角膜基因内变体的风险因子在临床环境中用作诊断措施。

[0204] 为了评估对一组变体的重要性,创建了分配风险因子的方法,其可在预测所选变体的病理中起作用。对于此分析,描绘了与角膜结构和功能有关的48个基因中的共199个变体(图7)。

[0205] 图7列出了针对每个变体基因组区域的保守性调整的OR。这组变体的灵敏度和基于ROC的AUC告诉我们,对于白种人群(103个病例样本),专家组在95%的时间内成功鉴定了变体。

[0206] 遗传测试:此外,这项工作支持对因家族史而处于风险之中或是接受屈光手术的候选人的有症状前的个体进行遗传测试。在症状出现之前了解患KC的风险将有助于确保正确的诊断和治疗,并有助于减轻该疾病带来的身体不适和视力丧失的创伤。定量风险评分可用于评估与角膜的结构和功能有关的基因中稀有变体的病理。该模型可以扩展为包括其他稀有变体,甚至常见变体。由于研究队列数量有限,因此保守地选择了变体用于演示该工具,并且必须强调的是,风险评分是相对于从其中获得它们的样本组而言的。

[0207] 表1:病例样本中存在的角膜基因的稀有变体的平均数量

[0208]

| 种族    | 平均变体数量 | St.Dev. |
|-------|--------|---------|
| 白种人   | 2.17   | 2.53    |
| 东亚人   | 3.43   | 2.63    |
| 西班牙裔  | 4.78   | 3.86    |
| 非裔美国人 | 11.11  | 5.17    |

[0209] 从研究队列中发现的较大变体列表中抽取与角膜结构和功能有关的稀有变体。根据其在1个或多个案例样本中的存在以及在种族匹配的对照中为0进一步选择变体。除非裔美国人队列外,平均变体计数范围为每个病例2至5个变体(表1)。

[0210] 在一些实施方案中,基于患者基因组内的3个或多个变体的较高阶风险图用作KC的预测因子。

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 | 426 | 427 | 428 | 429 | 430 | 431 | 432 | 433 | 434 | 435 | 436 | 437 | 438 | 439 | 440 | 441 | 442 | 443 | 444 | 445 | 446 | 447 | 448 | 449 | 450 | 451 | 452 | 453 | 454 | 455 | 456 | 457 | 458 | 459 | 460 | 461 | 462 | 463 | 464 | 465 | 466 | 467 | 468 | 469 | 470 | 471 | 472 | 473 | 474 | 475 | 476 | 477 | 478 | 479 | 480 | 481 | 482 | 483 | 484 | 485 | 486 | 487 | 488 | 489 | 490 | 491 | 492 | 493 | 494 | 495 | 496 | 497 | 498 | 499 | 500 | 501 | 502 | 503 | 504 | 505 | 506 | 507 | 508 | 509 | 510 | 511 | 512 | 513 | 514 | 515 | 516 | 517 | 518 | 519 | 520 | 521 | 522 | 523 | 524 | 525 | 526 | 527 | 528 | 529 | 530 | 531 | 532 | 533 | 534 | 535 | 536 | 537 | 538 | 539 | 540 | 541 | 542 | 543 | 544 | 545 | 546 | 547 | 548 | 549 | 550 | 551 | 552 | 553 | 554 | 555 | 556 | 557 | 558 | 559 | 560 | 561 | 562 | 563 | 564 | 565 | 566 | 567 | 568 | 569 | 570 | 571 | 572 | 573 | 574 | 575 | 576 | 577 | 578 | 579 | 580 | 581 | 582 | 583 | 584 | 585 | 586 | 587 | 588 | 589 | 590 | 591 | 592 | 593 | 594 | 595 | 596 | 597 | 598 | 599 | 600 | 601 | 602 | 603 | 604 | 605 | 606 | 607 | 608 | 609 | 610 | 611 | 612 | 613 | 614 | 615 | 616 | 617 | 618 | 619 | 620 | 621 | 622 | 623 | 624 | 625 | 626 | 627 | 628 | 629 | 630 | 631 | 632 | 633 | 634 | 635 | 636 | 637 | 638 | 639 | 640 | 641 | 642 | 643 | 644 | 645 | 646 | 647 | 648 | 649 | 650 | 651 | 652 | 653 | 654 | 655 | 656 | 657 | 658 | 659 | 660 | 661 | 662 | 663 | 664 | 665 | 666 | 667 | 668 | 669 | 670 | 671 | 672 | 673 | 674 | 675 | 676 | 677 | 678 | 679 | 680 | 681 | 682 | 683 | 684 | 685 | 686 | 687 | 688 | 689 | 690 | 691 | 692 | 693 | 694 | 695 | 696 | 697 | 698 | 699 | 700 | 701 | 702 | 703 | 704 | 705 | 706 | 707 | 708 | 709 | 710 | 711 | 712 | 713 | 714 | 715 | 716 | 717 | 718 | 719 | 720 | 721 | 722 | 723 | 724 | 725 | 726 | 727 | 728 | 729 | 730 | 731 | 732 | 733 | 734 | 735 | 736 | 737 | 738 | 739 | 740 | 741 | 742 | 743 | 744 | 745 | 746 | 747 | 748 | 749 | 750 | 751 | 752 | 753 | 754 | 755 | 756 | 757 | 758 | 759 | 760 | 761 | 762 | 763 | 764 | 765 | 766 | 767 | 768 | 769 | 770 | 771 | 772 | 773 | 774 | 775 | 776 | 777 | 778 | 779 | 780 | 781 | 782 | 783 | 784 | 785 | 786 | 787 | 788 | 789 | 790 | 791 | 792 | 793 | 794 | 795 | 796 | 797 | 798 | 799 | 800 | 801 | 802 | 803 | 804 | 805 | 806 | 807 | 808 | 809 | 810 | 811 | 812 | 813 | 814 | 815 | 816 | 817 | 818 | 819 | 820 | 821 | 822 | 823 | 824 | 825 | 826 | 827 | 828 | 829 | 830 | 831 | 832 | 833 | 834 | 835 | 836 | 837 | 838 | 839 | 840 | 841 | 842 | 843 | 844 | 845 | 846 | 847 | 848 | 849 | 850 | 851 | 852 | 853 | 854 | 855 | 856 | 857 | 858 | 859 | 860 | 861 | 862 | 863 | 864 | 865 | 866 | 867 | 868 | 869 | 870 | 871 | 872 | 873 | 874 | 875 | 876 | 877 | 878 | 879 | 880 | 881 | 882 | 883 | 884 | 885 | 886 | 887 | 888 | 889 | 890 | 891 | 892 | 893 | 894 | 895 | 896 | 897 | 898 | 899 | 900 | 901 | 902 | 903 | 904 | 905 | 906 | 907 | 908 | 909 | 910 | 911 | 912 | 913 | 914 | 915 | 916 | 917 | 918 | 919 | 920 | 921 | 922 | 923 | 924 | 925 | 926 | 927 | 928 | 929 | 930 | 931 | 932 | 933 | 934 | 935 | 936 | 937 | 938 | 939 | 940 | 941 | 942 | 943 | 944 | 945 | 946 | 947 | 948 | 949 | 950 | 951 | 952 | 953 | 954 | 955 | 956 | 957 | 958 | 959 | 960 | 961 | 962 | 963 | 964 | 965 | 966 | 967 | 968 | 969 | 970 | 971 | 972 | 973 | 974 | 975 | 976 | 977 | 978 | 979 | 980 | 981 | 982 | 983 | 984 | 985 | 986 | 987 | 988 | 989 | 990 | 991 | 992 | 993 | 994 | 995 | 996 | 997 | 998 | 999 | 1000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|

图1

[illegible]

图1续

|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29   | 30   | 31   | 32   | 33   | 34   | 35   | 36   | 37   | 38   | 39   | 40   | 41   | 42   | 43   | 44   | 45   | 46   | 47   | 48   | 49   | 50   | 51   | 52   | 53   | 54   | 55   | 56   | 57   | 58   | 59   | 60   | 61   | 62   | 63   | 64   | 65   | 66   | 67   | 68   | 69   | 70   | 71   | 72   | 73   | 74   | 75   | 76   | 77   | 78   | 79   | 80   | 81   | 82   | 83   | 84   | 85   | 86   | 87   | 88   | 89   | 90   | 91   | 92   | 93   | 94   | 95   | 96   | 97   | 98   | 99   | 100  |
| 101  | 102  | 103  | 104  | 105  | 106  | 107  | 108  | 109  | 110  | 111  | 112  | 113  | 114  | 115  | 116  | 117  | 118  | 119  | 120  | 121  | 122  | 123  | 124  | 125  | 126  | 127  | 128  | 129  | 130  | 131  | 132  | 133  | 134  | 135  | 136  | 137  | 138  | 139  | 140  | 141  | 142  | 143  | 144  | 145  | 146  | 147  | 148  | 149  | 150  | 151  | 152  | 153  | 154  | 155  | 156  | 157  | 158  | 159  | 160  | 161  | 162  | 163  | 164  | 165  | 166  | 167  | 168  | 169  | 170  | 171  | 172  | 173  | 174  | 175  | 176  | 177  | 178  | 179  | 180  | 181  | 182  | 183  | 184  | 185  | 186  | 187  | 188  | 189  | 190  | 191  | 192  | 193  | 194  | 195  | 196  | 197  | 198  | 199  | 200  |
| 201  | 202  | 203  | 204  | 205  | 206  | 207  | 208  | 209  | 210  | 211  | 212  | 213  | 214  | 215  | 216  | 217  | 218  | 219  | 220  | 221  | 222  | 223  | 224  | 225  | 226  | 227  | 228  | 229  | 230  | 231  | 232  | 233  | 234  | 235  | 236  | 237  | 238  | 239  | 240  | 241  | 242  | 243  | 244  | 245  | 246  | 247  | 248  | 249  | 250  | 251  | 252  | 253  | 254  | 255  | 256  | 257  | 258  | 259  | 260  | 261  | 262  | 263  | 264  | 265  | 266  | 267  | 268  | 269  | 270  | 271  | 272  | 273  | 274  | 275  | 276  | 277  | 278  | 279  | 280  | 281  | 282  | 283  | 284  | 285  | 286  | 287  | 288  | 289  | 290  | 291  | 292  | 293  | 294  | 295  | 296  | 297  | 298  | 299  | 300  |
| 301  | 302  | 303  | 304  | 305  | 306  | 307  | 308  | 309  | 310  | 311  | 312  | 313  | 314  | 315  | 316  | 317  | 318  | 319  | 320  | 321  | 322  | 323  | 324  | 325  | 326  | 327  | 328  | 329  | 330  | 331  | 332  | 333  | 334  | 335  | 336  | 337  | 338  | 339  | 340  | 341  | 342  | 343  | 344  | 345  | 346  | 347  | 348  | 349  | 350  | 351  | 352  | 353  | 354  | 355  | 356  | 357  | 358  | 359  | 360  | 361  | 362  | 363  | 364  | 365  | 366  | 367  | 368  | 369  | 370  | 371  | 372  | 373  | 374  | 375  | 376  | 377  | 378  | 379  | 380  | 381  | 382  | 383  | 384  | 385  | 386  | 387  | 388  | 389  | 390  | 391  | 392  | 393  | 394  | 395  | 396  | 397  | 398  | 399  | 400  |
| 401  | 402  | 403  | 404  | 405  | 406  | 407  | 408  | 409  | 410  | 411  | 412  | 413  | 414  | 415  | 416  | 417  | 418  | 419  | 420  | 421  | 422  | 423  | 424  | 425  | 426  | 427  | 428  | 429  | 430  | 431  | 432  | 433  | 434  | 435  | 436  | 437  | 438  | 439  | 440  | 441  | 442  | 443  | 444  | 445  | 446  | 447  | 448  | 449  | 450  | 451  | 452  | 453  | 454  | 455  | 456  | 457  | 458  | 459  | 460  | 461  | 462  | 463  | 464  | 465  | 466  | 467  | 468  | 469  | 470  | 471  | 472  | 473  | 474  | 475  | 476  | 477  | 478  | 479  | 480  | 481  | 482  | 483  | 484  | 485  | 486  | 487  | 488  | 489  | 490  | 491  | 492  | 493  | 494  | 495  | 496  | 497  | 498  | 499  | 500  |
| 501  | 502  | 503  | 504  | 505  | 506  | 507  | 508  | 509  | 510  | 511  | 512  | 513  | 514  | 515  | 516  | 517  | 518  | 519  | 520  | 521  | 522  | 523  | 524  | 525  | 526  | 527  | 528  | 529  | 530  | 531  | 532  | 533  | 534  | 535  | 536  | 537  | 538  | 539  | 540  | 541  | 542  | 543  | 544  | 545  | 546  | 547  | 548  | 549  | 550  | 551  | 552  | 553  | 554  | 555  | 556  | 557  | 558  | 559  | 560  | 561  | 562  | 563  | 564  | 565  | 566  | 567  | 568  | 569  | 570  | 571  | 572  | 573  | 574  | 575  | 576  | 577  | 578  | 579  | 580  | 581  | 582  | 583  | 584  | 585  | 586  | 587  | 588  | 589  | 590  | 591  | 592  | 593  | 594  | 595  | 596  | 597  | 598  | 599  | 600  |
| 601  | 602  | 603  | 604  | 605  | 606  | 607  | 608  | 609  | 610  | 611  | 612  | 613  | 614  | 615  | 616  | 617  | 618  | 619  | 620  | 621  | 622  | 623  | 624  | 625  | 626  | 627  | 628  | 629  | 630  | 631  | 632  | 633  | 634  | 635  | 636  | 637  | 638  | 639  | 640  | 641  | 642  | 643  | 644  | 645  | 646  | 647  | 648  | 649  | 650  | 651  | 652  | 653  | 654  | 655  | 656  | 657  | 658  | 659  | 660  | 661  | 662  | 663  | 664  | 665  | 666  | 667  | 668  | 669  | 670  | 671  | 672  | 673  | 674  | 675  | 676  | 677  | 678  | 679  | 680  | 681  | 682  | 683  | 684  | 685  | 686  | 687  | 688  | 689  | 690  | 691  | 692  | 693  | 694  | 695  | 696  | 697  | 698  | 699  | 700  |
| 701  | 702  | 703  | 704  | 705  | 706  | 707  | 708  | 709  | 710  | 711  | 712  | 713  | 714  | 715  | 716  | 717  | 718  | 719  | 720  | 721  | 722  | 723  | 724  | 725  | 726  | 727  | 728  | 729  | 730  | 731  | 732  | 733  | 734  | 735  | 736  | 737  | 738  | 739  | 740  | 741  | 742  | 743  | 744  | 745  | 746  | 747  | 748  | 749  | 750  | 751  | 752  | 753  | 754  | 755  | 756  | 757  | 758  | 759  | 760  | 761  | 762  | 763  | 764  | 765  | 766  | 767  | 768  | 769  | 770  | 771  | 772  | 773  | 774  | 775  | 776  | 777  | 778  | 779  | 780  | 781  | 782  | 783  | 784  | 785  | 786  | 787  | 788  | 789  | 790  | 791  | 792  | 793  | 794  | 795  | 796  | 797  | 798  | 799  | 800  |
| 801  | 802  | 803  | 804  | 805  | 806  | 807  | 808  | 809  | 810  | 811  | 812  | 813  | 814  | 815  | 816  | 817  | 818  | 819  | 820  | 821  | 822  | 823  | 824  | 825  | 826  | 827  | 828  | 829  | 830  | 831  | 832  | 833  | 834  | 835  | 836  | 837  | 838  | 839  | 840  | 841  | 842  | 843  | 844  | 845  | 846  | 847  | 848  | 849  | 850  | 851  | 852  | 853  | 854  | 855  | 856  | 857  | 858  | 859  | 860  | 861  | 862  | 863  | 864  | 865  | 866  | 867  | 868  | 869  | 870  | 871  | 872  | 873  | 874  | 875  | 876  | 877  | 878  | 879  | 880  | 881  | 882  | 883  | 884  | 885  | 886  | 887  | 888  | 889  | 890  | 891  | 892  | 893  | 894  | 895  | 896  | 897  | 898  | 899  | 900  |
| 901  | 902  | 903  | 904  | 905  | 906  | 907  | 908  | 909  | 910  | 911  | 912  | 913  | 914  | 915  | 916  | 917  | 918  | 919  | 920  | 921  | 922  | 923  | 924  | 925  | 926  | 927  | 928  | 929  | 930  | 931  | 932  | 933  | 934  | 935  | 936  | 937  | 938  | 939  | 940  | 941  | 942  | 943  | 944  | 945  | 946  | 947  | 948  | 949  | 950  | 951  | 952  | 953  | 954  | 955  | 956  | 957  | 958  | 959  | 960  | 961  | 962  | 963  | 964  | 965  | 966  | 967  | 968  | 969  | 970  | 971  | 972  | 973  | 974  | 975  | 976  | 977  | 978  | 979  | 980  | 981  | 982  | 983  | 984  | 985  | 986  | 987  | 988  | 989  | 990  | 991  | 992  | 993  | 994  | 995  | 996  | 997  | 998  | 999  | 1000 |
| 1001 | 1002 | 1003 | 1004 | 1005 | 1006 | 1007 | 1008 | 1009 | 1010 | 1011 | 1012 | 1013 | 1014 | 1015 | 1016 | 1017 | 1018 | 1019 | 1020 | 1021 | 1022 | 1023 | 1024 | 1025 | 1026 | 1027 | 1028 | 1029 | 1030 | 1031 | 1032 | 1033 | 1034 | 1035 | 1036 | 1037 | 1038 | 1039 | 1040 | 1041 | 1042 | 1043 | 1044 | 1045 | 1046 | 1047 | 1048 | 1049 | 1050 | 1051 | 1052 | 1053 | 1054 | 1055 | 1056 | 1057 | 1058 | 1059 | 1060 | 1061 | 1062 | 1063 | 1064 | 1065 | 1066 | 1067 | 1068 | 1069 | 1070 | 1071 | 1072 | 1073 | 1074 | 1075 | 1076 | 1077 | 1078 | 1079 | 1080 | 1081 | 1082 | 1083 | 1084 | 1085 | 1086 | 1087 | 1088 | 1089 | 1090 | 1091 | 1092 | 1093 | 1094 | 1095 | 1096 | 1097 | 1098 | 1099 | 1100 |
| 1101 | 1102 | 1103 | 1104 | 1105 | 1106 | 1107 | 1108 | 1109 | 1110 | 1111 | 1112 | 1113 | 1114 | 1115 | 1116 | 1117 | 1118 | 1119 | 1120 | 1121 | 1122 | 1123 | 1124 | 1125 | 1126 | 1127 | 1128 | 1129 | 1130 | 1131 | 1132 | 1133 | 1134 | 1135 | 1136 | 1137 | 1138 | 1139 | 1140 | 1141 | 1142 | 1143 | 1144 | 1145 | 1146 | 1147 | 1148 | 1149 | 1150 | 1151 | 1152 | 1153 | 1154 | 1155 | 1156 | 1157 | 1158 | 1159 | 1160 | 1161 | 1162 | 1163 | 1164 | 1165 | 1166 | 1167 | 1168 | 1169 | 1170 | 1171 | 1172 | 1173 | 1174 | 1175 | 1176 | 1177 | 1178 | 1179 | 1180 | 1181 | 1182 | 1183 | 1184 | 1185 | 1186 | 1187 | 1188 | 1189 | 1190 | 1191 | 1192 | 1193 | 1194 | 1195 | 1196 | 1197 | 1198 | 1199 | 1200 |
| 1201 | 1202 | 1203 | 1204 | 1205 | 1206 | 1207 | 1208 | 1209 | 1210 | 1211 | 1212 | 1213 | 1214 | 1215 | 1216 | 1217 | 1218 | 1219 | 1220 | 1221 | 1222 | 1223 | 1224 | 1225 | 1226 | 1227 | 1228 | 1229 | 1230 | 1231 | 1232 | 1233 | 1234 | 1235 | 1236 | 1237 | 1238 | 1239 | 1240 | 1241 | 1242 | 1243 | 1244 | 1245 | 1246 | 1247 | 1248 | 1249 | 1250 | 1251 | 1252 | 1253 | 1254 | 1255 | 1256 | 1257 | 1258 | 1259 | 1260 | 1261 | 1262 | 1263 | 1264 | 1265 | 1266 | 1267 | 1268 | 1269 | 1270 | 1271 | 1272 | 1273 | 1274 | 1275 | 1276 | 1277 | 1278 | 1279 | 1280 | 1281 | 1282 | 1283 | 1284 | 1285 | 1286 | 1287 | 1288 | 1289 | 1290 | 1291 | 1292 | 1293 | 1294 | 1295 | 1296 | 1297 | 1298 | 1299 | 1300 |
| 1301 | 1302 | 1303 | 1304 | 1305 | 1306 | 1307 | 1308 | 1309 | 1310 | 1311 | 1312 | 1313 | 1314 | 1315 | 1316 | 1317 | 1318 | 1319 | 1320 | 1321 | 1322 | 1323 | 1324 | 1325 | 1326 | 1327 | 1328 | 1329 | 1330 | 1331 | 1332 | 1333 | 1334 | 1335 | 1336 | 1337 | 1338 | 1339 | 1340 | 1341 | 1342 | 1343 | 1344 | 1345 | 1346 | 1347 | 1348 | 1349 | 1350 | 1351 | 1352 | 1353 | 1354 | 1355 | 1356 | 1357 | 1358 | 1359 | 1360 | 1361 | 1362 | 1363 | 1364 | 1365 | 1366 | 1367 | 1368 | 1369 | 1370 | 1371 | 1372 | 1373 | 1374 | 1375 | 1376 | 1377 | 1378 | 1379 | 1380 | 1381 | 1382 | 1383 | 1384 | 1385 | 1386 | 1387 | 1388 | 1389 | 1390 | 1391 | 1392 | 1393 | 1394 | 1395 | 1396 | 1397 | 1398 | 1399 | 1400 |
| 1401 | 1402 | 1403 | 1404 | 1405 | 1406 | 1407 | 1408 | 1409 | 1410 | 1411 | 1412 | 1413 | 1414 | 1415 | 1416 | 1417 | 1418 | 1419 | 1420 | 1421 | 1422 | 1423 | 1424 | 1425 | 1426 | 1427 | 1428 | 1429 | 1430 | 1431 | 1432 | 1433 | 1434 | 1435 | 1436 | 1437 | 1438 | 1439 | 1440 | 1441 | 1442 | 1443 | 1444 | 1445 | 1446 | 1447 | 1448 | 1449 | 1450 | 1451 | 1452 | 1453 | 1454 | 1455 | 1456 | 1457 | 1458 | 1459 | 1460 | 1461 | 1462 | 1463 | 1464 | 1465 | 1466 | 1467 | 1468 | 1469 | 1470 | 1471 | 1472 | 1473 | 1474 | 1475 | 1476 | 1477 | 1478 | 1479 | 1480 | 1481 | 1482 | 1483 | 1484 | 1485 | 1486 | 1487 | 1488 | 1489 | 1490 | 1491 | 1492 | 1    |      |      |      |      |      |      |      |

图1续

图1续

图2

图3



40



图6

| 基因       | 位置 | ref         | 变体    | rsID        | unadjORs    | 调整的OR       | 保守     | 风险评估        |
|----------|----|-------------|-------|-------------|-------------|-------------|--------|-------------|
| PIKFYVE  |    | 209204738 T | G     | rs61752191  | 7.445221988 | 10.99075775 | 1.061  | 65.94454648 |
| GSN      |    | 124072992 G | A     | rs41305623  | 7.297884642 | 10.92000131 | 1.048  | 65.52000786 |
| ABC85    |    | 20698170 T  | G     | rs199799182 | 3.998479589 | 7.098680693 | 1.043  | 56.78944555 |
| COL5A1   |    | 137708884 C | T     | rs61739195  | 4.523907939 | 8.320947224 | 0.927  | 49.92568334 |
| CHST6    |    | 75513395 A  | A     | novel       | 6.060676854 | 7.640481078 | 0.833  | 45.84288647 |
| PRDM5    |    | 121739667 T | G     | rs146268537 | 6.509351654 | 11.36403959 | 1.061  | 45.45615835 |
| ZEB1     |    | 31810782 A  | C     | rs118020901 | 4.938973916 | 6.70820032  | 1.088  | 40.24920192 |
| MAP3K19  |    | 135744373 G | A     | rs55867035  | 4.843600489 | 7.493452549 | 1.048  | 37.46726274 |
| ABC85    |    | 20793011 G  | C     | novel       | 2.082456433 | 4.91028734  | 1.048  | 34.37201138 |
| AGBL1    |    | 86813160 G  | A     | rs199769049 | 2.082456433 | 5.583851032 | 1.048  | 33.50310619 |
| ABC85    |    | 20782629 A  | G     | rs189610663 | 1.711374705 | 4.068369126 | 1.088  | 32.54695301 |
| COL8A2   |    | 36565674 C  | T     | rs779010935 | 2.392104822 | 4.468752836 | 0.807  | 31.28126985 |
| PXDN     |    | 1652088 G   | T     | novel       | 2.56661194  | 4.431902898 | 1.048  | 31.02332029 |
| CHST6    |    | 75512734 C  | CHST6 | rs140699573 | 1.8720208   | 4.195130203 | 0.729  | 29.36591142 |
| ZEB1     |    | 31809258 T  | C     | rs747652843 | 3.998479589 | 7.168892246 | 1.061  | 28.67556898 |
| RAF1     |    | 12626632 T  | G     | rs745876012 | 1.794445831 | 4.086675957 | 1.061  | 28.6067317  |
| KRT12    |    | 39022440 T  | C     | rs147584242 | 2.082456433 | 4.022893898 | 1.061  | 28.16025729 |
| LTBP2    |    | 74968234 C  | TBP2  | rs779067555 | 2.56661194  | 3.958356999 | 0.935  | 27.70849899 |
| COL4A3   |    | 228172594 T | C     | rs200302125 | 1.604740677 | 3.424322794 | 1.061  | 27.39458236 |
| COL5A1   |    | 137688701 A | G     | rs61736966  | 3.468364707 | 8.953770474 | 1.185  | 26.86131142 |
| ABC85    |    | 20793113 A  | G     | rs58795451  | 1.046941737 | 3.349730584 | 1.199  | 26.79784467 |
| COL5A1   |    | 137706719 C | G     | rs140797509 | 2.114088993 | 4.394124008 | 0.843  | 26.36474405 |
| COL8A2   |    | 36565837 C  | T     | rs115156902 | 3.998479589 | 6.269469962 | 0.807  | 25.07787985 |
| COL4A4   |    | 227973980 G | A     | rs537557592 | 2.307095162 | 4.990955086 | 0.953  | 24.95477543 |
| MTOR     |    | 11272469 C  | T     | rs768076455 | 4.064729967 | 4.981143262 | 0.852  | 24.90571631 |
| TLN1     |    | 35719525 G  | T     | novel       | 1.683748741 | 4.146703411 | 1.048  | 24.88022046 |
| GSN      |    | 124073007 G | A     | rs368197143 | 1.82601854  | 4.823411974 | 1.048  | 24.11705987 |
| MTOR     |    | 11189856 C  | T     | rs139043855 | 2.082456433 | 4.810711794 | 0.935  | 24.05355897 |
| ABC85    |    | 20784936 C  | A     | rs144219498 | 1.308920715 | 3.400600861 | 0.935  | 23.80420602 |
| COL4A3   |    | 228158021 C | T     | rs55816283  | 2.142152929 | 3.920587843 | 0.935  | 23.52352706 |
| AGBL1    |    | 86800154 C  | T     | rs185896474 | 2.082360271 | 3.825850037 | 0.935  | 22.95510022 |
| LTBP2    |    | 74968213 C  | G     | novel       | 2.082456433 | 4.385626379 | 0.935  | 21.9281319  |
| ITGB1    |    | 33209254 A  | C     | rs201578528 | 1.865372055 | 5.454938693 | 1.14   | 21.81975477 |
| V5X1     |    | 25058398 T  | C     | rs148957473 | 1.604740677 | 3.052325405 | 0.946  | 21.36627783 |
| MYLK     |    | 123419283 G | A     | rs200423083 | 3.998479589 | 7.071660106 | 1.036  | 21.21498032 |
| TGFB1    |    | 135394841 G | A     | rs200887459 | 1.154942389 | 2.946252613 | 1.048  | 20.62376829 |
| KRT12    |    | 39023030 C  | G     | rs58038639  | 2.082456433 | 2.477953003 | 0.069  | 19.82362403 |
| LTBP2    |    | 74976898 G  | A     | rs149991486 | 2.279315324 | 3.964228931 | 0.953  | 19.82114466 |
| SHC1     |    | 154942911 G | A     | rs115641580 | 1.864098582 | 3.952476297 | 0.953  | 19.76238149 |
| ZNF469   |    | 88504062 A  | G     | novel       | 1.308920715 | 3.943040553 | 1.083  | 19.71520277 |
| ABC85    |    | 20685484 C  | A     | rs2074000   | 2.283378403 | 3.883383715 | 0.935  | 19.41691858 |
| ZEB1     |    | 31810385 C  | G     | novel       | 1.711374705 | 3.21311931  | 0.852  | 19.27871586 |
| KRT12    |    | 39021137 G  | A     | rs61735165  | 1.21045438  | 3.153619442 | 1.048  | 18.92171665 |
| V5X1     |    | 25058389 G  | C     | rs576300014 | 1.254396383 | 2.697861991 | 0.935  | 18.88503393 |
| ABC85    |    | 20793107 C  | A     | rs377131299 | 1.787209265 | 3.138963926 | 0.935  | 18.83378356 |
| COL5A1   |    | 137721882 G | C     | novel       | 2.082456433 | 3.611060581 | 0.953  | 18.0553029  |
| DIAPH1   |    | 140908492 C | A     | rs370578225 | 1.473988805 | 3.000034183 | 0.935  | 18.0002051  |
| IL1A     |    | 113539246 C | T     | rs3783531   | 1.689042027 | 3.587871277 | 0.935  | 17.93935639 |
| MTOR     |    | 11272422 G  | A     | rs746532612 | 1.49705933  | 2.911007097 | 0.953  | 17.46604258 |
| ZNF469   |    | 88501431 C  | A     | rs201943633 | 3.998479589 | 4.346781561 | -0.044 | 17.38712625 |
| PTK2     |    | 141711018 C | T     | rs200596356 | 1.49471852  | 2.874564966 | 0.935  | 17.2473898  |
| COL5A1   |    | 137693848 C | T     | novel       | 1.357747888 | 2.866115753 | 0.843  | 17.19669452 |
| MTOR     |    | 11298591 G  | A     | rs780398729 | 1.041086412 | 2.863362877 | 1.048  | 17.18017726 |
| ABC85    |    | 20691167 G  | A     | rs151326874 | 1.111915537 | 2.777956166 | 0.993  | 16.66773699 |
| ITGB1    |    | 33209192 T  | C     | rs372397463 | 1.346903435 | 2.761361763 | 1.011  | 16.56817058 |
| COL4A4   |    | 227973559 G | T     | rs749481247 | 1.308920715 | 3.290212458 | 0.902  | 16.45106229 |
| ZNF469   |    | 88503039 A  | C     | rs139565761 | 1.308920715 | 3.962805126 | 1.088  | 15.8512205  |
| ADAMTS18 |    | 77465400 G  | A     | novel       | 1.341477853 | 3.157090028 | 0.998  | 15.78545014 |
| ROCK1    |    | 18619444 G  | A     | rs113763420 | 1.046941737 | 2.619228791 | 0.953  | 15.71537275 |
| TLN1     |    | 35712890 T  | A     | rs756028633 | 1.467040886 | 3.142039112 | 1.061  | 15.71019556 |
| LTBP2    |    | 74973503 T  | G     | rs761055280 | 1.473988805 | 3.088308972 | 0.964  | 15.44154486 |
| PXDN     |    | 1651959 C   | T     | rs6723697   | 1.046941737 | 2.572504453 | 0.935  | 15.43502672 |
| ITGB1    |    | 33218888 T  | C     | novel       | 1.308920715 | 3.669121058 | 1.011  | 14.67648423 |
| KRT3     |    | 53186577 G  | A     | rs199614200 | 1.803075446 | 2.414136373 | 0      | 14.48481824 |
| ZNF469   |    | 88502468 C  | G     | rs751901105 | 2.024731814 | 3.508898137 | 0.852  | 14.03559255 |
| CYP4V2   |    | 187122332 G | A     | rs34745240  | 16.40655143 | 13.89348218 | 0.953  | 13.89348218 |
| MYLK     |    | 123385116 C | T     | rs780094038 | 1.090838209 | 2.699693866 | 0.935  | 13.49846933 |
| SHC1     |    | 154942864 G | A     | rs563504056 | 1.117543639 | 2.691266377 | 0.953  | 13.45633189 |
| ZNF469   |    | 88501344 G  | A     | rs547492890 | 1.782822912 | 3.360192143 | 0.902  | 13.44076857 |
| PIKFYVE  |    | 209179036 G | A     | rs146158348 | 1.154942389 | 2.679242385 | 0.953  | 13.39621192 |
| MYLK     |    | 123471343 C | T     | rs779602599 | 1.052918689 | 2.665950592 | 0.935  | 13.32975296 |
| TLN1     |    | 35706215 T  | C     | novel       | 1.346903435 | 2.613587897 | 0.956  | 13.06793948 |
| FYN      |    | 112041046 G | A     | rs762290632 | 1.418211561 | 3.233273169 | 1.048  | 12.93309268 |
| COL4A4   |    | 227912247 G | A     | rs79143859  | 1.117543639 | 2.959474903 | 1.048  | 11.83789961 |
| PIKFYVE  |    | 209168938 T | C     | novel       | 1.346903435 | 2.902939808 | 1.061  | 11.61175923 |

图7

|          |           |              |                    |             |             |             |             |             |
|----------|-----------|--------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| COL5A1   | 137727030 | G            | A                  | rs143859495 | 1.573609109 | 2.880022245 | 0.953       | 11.52008898 |
| GSN      | 124083642 | C            | T                  | rs116185403 | 1.227180183 | 2.763027329 | 0.75        | 11.05210932 |
| PXDN     | 1664701   | G            | A                  | rs373022614 | 1.924925542 | 1.807466353 | -0.017      | 10.84479812 |
| COL5A1   | 137726950 | C            | T                  | rs2229817   | 1.49471852  | 2.645609165 | 0.852       | 10.58243666 |
| LTBP2    | 74967651  | C            | T                  | rs143010135 | 1.111915537 | 2.62141819  | 0.935       | 10.48567276 |
| MYLK     | 123512528 | C            | T                  | rs767453947 | 1.041086412 | 2.557414444 | 0.935       | 10.22965778 |
| IL1A     | 113535653 | C            | A                  | rs1801715   | 1.467040886 | 2.549435566 | 0.852       | 10.19774226 |
| PXN      | 120652725 | C            | T                  | rs111674215 | 1.328544696 | 2.536643925 | 0.831       | 10.1465757  |
| ZNF469   | 88505454  | C            | T                  | novel       | 2.307095162 | 3.367008187 | 0.807       | 10.10102456 |
| KRT3     | 53184043  | C            | T                  | rs367763143 | 2.082456433 | 3.21504366  | 0.772       | 9.64513098  |
| FYN      | 112041022 | G            | C                  | rs376255649 | 1.368071308 | 3.173268878 | 1.048       | 9.519806634 |
| COL4A3   | 228142188 | T            | C                  | novel       | 1.467040886 | 3.142039112 | 1.061       | 9.426117335 |
| ZNF469   | 88504766  | C            | T                  | rs200668806 | 5.380113481 | 4.604499134 | -0.031      | 9.208998269 |
| PXN      | 120653019 | C            | T                  | rs192670913 | 1.025676306 | 2.301614601 | 0.831       | 9.206458404 |
| ZEB1     | 31810514  | A            | G                  | rs138507868 | 1.177127237 | 3.031148131 | 1.088       | 9.093444393 |
| WNT9B    | 44952657  | C            | G                  | novel       | 1.341477853 | 2.964329077 | 0.935       | 8.892987232 |
| TLN1     | 35704761  | C            | T                  | rs771374255 | 1.23224986  | 2.93999823  | 0.847       | 8.819994689 |
| ITGB1    | 33214913  | A            | T                  | novel       | 1.729798129 | 1.757236511 | 0.195       | 8.786182556 |
| KRT12    | 39017974  | T            | C                  | rs150149178 | 2.082456433 | 2.192140991 | 0.113       | 8.768563962 |
| ZNF469   | 88496148  | T            | G                  | rs753664726 | 1.473988805 | 2.896849256 | 0.9         | 8.690547767 |
| COL4A4   | 227872865 | G            | C                  | rs200973262 | 2.082456433 | 1.703765732 | 0.137       | 8.518828659 |
| FYN      | 111983038 | G            | A                  | rs28763975  | 3.92270113  | 2.633880723 | 0.154       | 7.90164217  |
| ABC85    | 20767954  | G            | A                  | rs17143304  | 2.355592989 | 1.535984426 | 0.076       | 7.679922129 |
| MAP3K19  | 135744416 | C            | G                  | rs1112542   | 1.346903435 | 2.559274834 | 0.935       | 7.677824502 |
| PIKFYVE  | 209138313 | G            | A                  | rs199642033 | 4.529884427 | 7.506924039 | 1.048       | 7.506924039 |
| LCAT     | 67973896  | C            | T                  | rs755270091 | 2.082456433 | 3.735347816 | 0.922       | 7.470695632 |
| SLC4A11  | 3208967   | C            | T                  | rs34224785  | 1.096019601 | 2.472050348 | 0.847       | 7.416151043 |
| NLRP1    | 5424936   | C            | T                  | rs114529583 | 4.186377725 | 3.698122133 | -0.768      | 7.396244266 |
| SHC1     | 154938662 | T            | C                  | rs8191979   | 8.452547266 | 7.340202295 | 0.118       | 7.340202295 |
| ABC85    | 20666226  | A            | G                  | rs201244034 | 1.513413173 | 3.547948014 | 1.088       | 7.095896029 |
| LTBP2    | 74972796  | C            | T                  | novel       | 1.346903435 | 2.355431529 | 0.852       | 7.066294588 |
| WNT9B    | 44949945  | A            | G                  | rs118185468 | 5.235665827 | 7.043191906 | 1.083       | 7.043191906 |
| TGFB1    | 135391462 | A            | G                  | rs188677757 | 1.254396383 | 3.512962168 | 1.199       | 7.025924335 |
| ZNF469   | 88495372  | G            | A                  | novel       | 4.164888985 | 7.021802026 | 0.998       | 7.021802026 |
| PXN      | 120651699 | C            | A                  | novel       | 1.007933509 | 2.30692467  | 0.837       | 6.92077401  |
| WNT9A    | 228109286 | C            | T                  | rs552502207 | 1.177127237 | 2.247776418 | 0.789       | 6.743329254 |
| V5X1     | 25062560  | G            | A                  | rs369865672 | 1.864098582 | 2.210697578 | 0.084       | 6.632092734 |
| COL4A4   | 227924228 | G            | A                  | rs36121515  | 1.49471852  | 1.307730722 | 0.067       | 6.538653609 |
| PXN      | 120653371 | C            | T                  | rs200855138 | 1.54404072  | 3.18728751  | 0.831       | 6.374575021 |
| COL4A4   | 227927294 | C            | T                  | rs34236495  | 1.49471852  | 3.115200019 | 0.935       | 6.230400038 |
| ZNF469   | 88498277  | C            | T                  | rs761094844 | 1.740280194 | 1.5349284   | -0.007      | 6.1397136   |
| ZNF469   | 88504203  | G            | C                  | rs199528724 | 1.309996605 | 2.958473106 | 0.949       | 5.916946212 |
| MAP3K19  | 135744007 | T            | C                  | rs3905317   | 1.346903435 | 2.902939808 | 1.061       | 5.805879616 |
| KERA     | 91449949  | A            | G                  | rs377616201 | 3.205470899 | 5.675950174 | 1.199       | 5.675950174 |
| PIK3CG   | 106509082 | G            | A                  | rs144565710 | 1.03344886  | 2.597448039 | 0.953       | 5.194896079 |
| ADAMTS18 | 77401554  | C            | T                  | rs200404040 | 1.346903435 | 2.559274834 | 0.935       | 5.118549668 |
| RHOA     | 49398403  | G            | A                  | novel       | 1.729798129 | 2.508644107 | 0.551       | 5.017288215 |
| ZNF469   | 88504204  | G            | C                  | rs56236932  | 5.504470701 | 4.890054144 | 0.014       | 4.890054144 |
| ZNF469   | 88495361  | C            | T                  | rs202205643 | 2.082456433 | 2.430047393 | 0.049       | 4.860094785 |
| AGBL1    | 87066168  | G            | A                  | rs144777747 | 2.954390882 | 2.382412923 | 0.135       | 4.764825847 |
| COL8A2   | 36564213  | C            | G                  | rs199786966 | 1.144729549 | 2.359501305 | 0.834       | 4.719002609 |
| MAPK3    | 30133311  | C            | T                  | rs200617125 | 1.009661703 | 2.344843255 | 0.852       | 4.689686509 |
| ABC85    | 20682892  | C            | T                  | rs141511940 | 2.082456433 | 2.30230492  | -0.005      | 4.60460984  |
| ZNF469   | 88496681  | G            | A                  | rs117995699 | 1.689042027 | 1.144032232 | -0.208      | 4.576128929 |
| LTBP2    | 75018994  | G            | A                  | rs137854861 | 3.998479589 | 4.517087187 | 0.063       | 4.517087187 |
| COL5A1   | 137591755 | C            | T                  | rs41306397  | 3.205470899 | 2.254839914 | 0.02        | 4.509679827 |
| LTBP2    | 75017841  | G            | A                  | rs147534770 | 1.346903435 | 1.110404041 | 0.1         | 4.441616166 |
| COL4A4   | 227872887 | C            | T                  | rs77104306  | 1.117543639 | 1.1073966   | 0.065       | 4.4295864   |
| MYLK     | 123453061 | A            | G                  | rs3796164   | 5.808400022 | 4.332955894 | -0.276      | 4.332955894 |
| ADAMTS18 | 77468556  | C            | G                  | rs751818903 | 1.54404072  | 1.374610262 | -0.01       | 4.123830785 |
| ROCK1    | 18564483  | G            | C                  | rs45562542  | 1.963895092 | 3.878559436 | 0.998       | 3.878559436 |
| ABC85    | 20767981  | T            | C                  | rs117749018 | 2.082456433 | 1.930627453 | 0.022       | 3.861254906 |
| ZNF469   | 88495094  | T            | C                  | novel       | 1.238309099 | 1.267184001 | 0.133       | 3.801552002 |
| AGBL1    | 86697745  | A            | G                  | novel       | 1.158986639 | 3.718537372 | 1.199       | 3.718537372 |
| ZNF469   | 88504239  | G            | A                  | rs75288466  | 1.21045438  | 1.207498449 | 0.088       | 3.622495348 |
| KRT3     | 53183951  | C            | CGCTGCCACCGCTGAACT | rs570613061 | 3.58380065  | 3.183962839 | 0.207102714 | 3.406840238 |
| ABC85    | 20666206  | G            | T                  | rs369958537 | 2.082456433 | 1.650223545 | -0.338      | 3.300447089 |
| DIAPH1   | 140953564 | GGAGGAGGAGGA | -                  | rs766218160 | 2.89520377  | 3.06823822  | 0.207102714 | 3.283014895 |
| ZNF469   | 88504578  | G            | A                  | rs199610834 | 1.513413173 | 3.099898634 | 0.953       | 3.099898634 |
| MYLK     | 123419062 | T            | C                  | rs75370906  | 1.090838209 | 3.062214612 | 1.061       | 3.062214612 |
| ZNF469   | 88496786  | GGCGGC       | -                  | rs775423936 | 3.312136684 | 2.816841544 | 0.207102714 | 3.014020452 |
| ABC85    | 20784910  | T            | C                  | rs60197951  | 2.760947676 | 1.476473208 | -0.215      | 2.952946415 |
| ZNF469   | 88504350  | C            | G                  | rs183437633 | 1.308920715 | 0.977215713 | -0.312      | 2.931647138 |
| COL4A4   | 227917090 | T            | C                  | rs80243096  | 1.404954624 | 1.392540836 | -0.121      | 2.785081673 |
| V5X1     | 25062342  | G            | T                  | rs6050307   | 1.489353914 | 1.276285464 | -0.071      | 2.552570928 |
| AGBL1    | 87099508  | G            | A                  | rs73459659  | 5.369607585 | 2.440852996 | -0.983      | 2.440852996 |

图7续

|          |                         |   |             |             |             |             |             |
|----------|-------------------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| COL8A2   | 36563777 G              | A | rs117860804 | 1.096019601 | 1.203276084 | 0.127       | 2.406552167 |
| DIAPH1   | 140953259 G             | A | rs200606811 | 1.117543639 | 2.36555308  | 0.824       | 2.36555308  |
| COL4A3   | 228029515 C             | T | rs139271412 | 1.117543639 | 1.10518402  | 0.063       | 2.21036804  |
| LTBP2    | 74975983 C              | T | rs761500203 | 1.099224002 | 1.101726802 | 0.025       | 2.203453603 |
| COL4A3   | 228029513 C             | G | rs184704920 | 1.82601854  | 1.101289269 | -0.429      | 2.202578538 |
| MTOR     | 11307762 T              | C | rs146393749 | 1.534103874 | 2.116584728 | 0.144       | 2.116584728 |
| IL6      | 22767134 C              | A | rs142759801 | 1.090838209 | 0.699869341 | -0.415      | 2.099608024 |
| GSN      | 124074641 A             | G | rs11550199  | 2.082456433 | 2.053268302 | -0.119      | 2.053268302 |
| AGBL1    | 86687049 C              | T | rs186767486 | 1.117543639 | 0.657711992 | -0.456      | 1.973135977 |
| ZNF469   | 88502583 C              | T | rs536725615 | 1.275893308 | 0.968259966 | -0.455      | 1.936519933 |
| ZNF469   | 88502234 G              | A | novel       | 1.887718324 | 1.834672844 | 0.032       | 1.834672844 |
| ZNF469   | 88502972 CTTCGGGGAACACC | - | rs281865162 | 2.082456433 | 1.712756795 | 0.207102714 | 1.83264977  |
| ZNF469   | 88497404 C              | G | novel       | 2.082456433 | 1.815630549 | -0.242      | 1.815630549 |
| LTBP2    | 75052587 G              | A | rs149952751 | 1.23682719  | 1.701930387 | 0.429       | 1.701930387 |
| NLRP1    | 5463226 A               | - | novel       | 1.49471852  | 1.504402901 | 0.207102714 | 1.609711104 |
| PAX6     | 31814881 A              | C | rs763811795 | 1.513413173 | 1.470308329 | 0.207102714 | 1.573229912 |
| FOXEO    | 47882574 G              | C | rs281865461 | 1.473988805 | 0.769221498 | -0.426      | 1.538442996 |
| PAX6     | 31814918 G              | A | rs767105283 | 1.49471852  | 1.38819461  | 0.207102714 | 1.485368232 |
| LTBP2    | 75078581 G              | C | novel       | 2.024731814 | 1.470058311 | -0.018      | 1.470058311 |
| MYLK     | 123419782 G             | A | rs3732485   | 2.950545845 | 1.46681334  | -0.275      | 1.46681334  |
| MBNL1    | 152150657 CTGCAGCTG     | - | rs532866577 | 1.238309099 | 1.364652518 | 0.207102714 | 1.460178194 |
| ZNF469   | 88500137 G              | A | rs144986357 | 1.308920715 | 1.407692923 | 0.053       | 1.407692923 |
| ZNF469   | 88502573 G              | A | rs202129382 | 2.082456433 | 0.673904049 | -0.938      | 1.347808098 |
| COL4A4   | 227973575 CCGGAGG       | - | novel       | 1.046941737 | 1.242322528 | 0.207102714 | 1.329285105 |
| LTBP2    | 74995228 C              | T | rs145507464 | 2.082456433 | 1.321602553 | -0.357      | 1.321602553 |
| PIK3R1   | 67575499 T              | A | novel       | 1.254396383 | 1.223186824 | 0.144       | 1.223186824 |
| ADAMTS18 | 77468362 G              | C | rs766063430 | 1.154942389 | 1.202657946 | 0.152       | 1.202657946 |
| ZNF469   | 88504673 G              | T | rs199760004 | 1.308920715 | 1.174628749 | -0.128      | 1.174628749 |
| PXN      | 120653416 C             | T | rs770650321 | 1.23224986  | 1.168135607 | -0.076      | 1.168135607 |
| DIAPH1   | 140953681 C             | T | rs182139018 | 1.573609109 | 1.068010976 | -0.039      | 1.068010976 |
| ZNF469   | 88502882 A              | C | rs141776185 | 1.117543639 | 1.052335369 | 0.014       | 1.052335369 |
| NLRP1    | 5461675 G               | T | rs201368394 | 1.177127237 | 1.035559095 | 0.014       | 1.035559095 |
| ADAMTS18 | 77401479 G              | A | rs35701343  | 1.717201969 | 0.999699969 | -0.206      | 0.999699969 |
| MYLK     | 123444833 C             | T | rs199988497 | 1.341477853 | 0.490981282 | -0.863      | 0.981962564 |
| ZNF469   | 88495487 G              | A | rs184458982 | 1.21045438  | 0.488483699 | -0.817      | 0.976967398 |
| IL6      | 22771038 A              | T | rs2069860   | 1.534103874 | 0.962524087 | -0.644      | 0.962524087 |
| LTBP2    | 75052569 G              | A | rs143282840 | 2.082456433 | 0.946370334 | -0.727      | 0.946370334 |
| CYP4V2   | 187118720 G             | A | rs34331648  | 1.117543639 | 0.822844413 | -0.232      | 0.822844413 |
| ZNF469   | 88494769 C              | G | rs770483852 | 1.534103874 | 0.780987458 | -0.853      | 0.780987458 |
| ZNF469   | 88504853 G              | A | rs3812951   | 1.052918689 | 0.749432286 | -0.334      | 0.749432286 |
| IL1RN    | 113890284 G             | A | rs45507693  | 1.090838209 | 0.626966846 | -0.525      | 0.626966846 |
| NLRP1    | 5463093 C               | T | rs140628502 | 1.683748741 | 0.625823848 | -0.843      | 0.625823848 |
| ZNF469   | 88498704 G              | A | rs748403721 | 1.308920715 | 0.500549962 | -0.981      | 0.500549962 |
| AGBL1    | 87217666 C              | T | rs185919705 | 1.158986639 | 0.165023137 | -1.916      | 0.495069412 |
| ZNF469   | 88498076 C              | A | rs145158875 | 1.308920715 | 0.427822084 | -1.138      | 0.427822084 |
| ZNF469   | 88504205 G              | C | rs532857190 | 1.803075446 | 0.404680106 | -1.786      | 0.404680106 |
| ZNF469   | 88501038 G              | A | rs111828626 | 1.130110896 | 0.395391108 | -1.182      | 0.395391108 |
| ZNF469   | 88505284 C              | A | rs141042464 | 1.308920715 | 0.110576481 | -2.491      | 0.110576481 |

图7续