

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 7 月 19 日 (19.07.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/129888 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01) **C12N 15/11** (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/092505

(22) 国际申请日: 2017 年 7 月 11 日 (11.07.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710015653.0 2017 年 1 月 10 日 (10.01.2017) CN

(71) 申请人: 东南大学 (SOUTHEAST UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国江苏省南京市四牌楼 2 号,
Jiangsu 210096 (CN)。

(72) 发明人: 刘向东 (LIU, Xiangdong); 中国江苏省南京市四牌楼 2 号, Jiangsu 210096 (CN)。马雄 (MA, Xiong); 中国江苏省南京市四牌楼 2 号, Jiangsu 210096 (CN)。陈卫昌 (CHEN, Weichang); 中国江苏省南京市四牌楼 2 号, Jiangsu 210096 (CN)。史兴娟 (SHI, Xingjuan); 中国江苏省南京市四牌楼 2 号, Jiangsu 210096 (CN)。

(74) 代理人: 南京苏高专利商标事务所 (普通合伙) (NANJING SUGAO PATENT AND TRADEMARK FIRM (ORDINARY PARTNERSHIP)); 中国江苏省南京市中山东路 198 号龙台国际大厦 1912 室, Jiangsu 210005 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格 (细则 4.17 (iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
— 包括说明书序列表部分 (细则 5.2 (a))。

(54) Title: PRIMARY BILIARY CHOLANGITIS-ASSOCIATED INTERLEUKIN 21 RECEPTOR AND APPLICATION THERE-OF

(54) 发明名称: 与原发性胆汁性胆管炎关联的白细胞介素 21 受体及其应用

(57) Abstract: Provided is an application of interleukin 21 receptor (IL21R) in preparing a product for detecting or assisting in detecting, screening or predicting primary Biliary Cholangitis (PBC). Mononucleotide polymorphic sites of interleukin 21 receptor which are significantly correlated with the susceptibility of primary biliary cholangitis are: rs1859308, rs201883233, rs10852316, rs2189521, and rs58579343. The gene polymorphic sites of the IL21R have significant correlation with the occurrence of PBC and can be used as an indicator for PBC attack risk prediction.

(57) 摘要: 提供了白细胞介素 21 受体 (IL21R) 在制备检测或辅助检测、筛查或预测原发性胆汁性胆管炎 (Primary Biliary Cholangitis, PBC) 的产品中的应用。与原发性胆汁性胆管炎易感性显著相关的白细胞介素 21 受体的单核苷酸多态位点为: rs1859308、rs201883233、rs10852316、rs2189521、rs58579343。IL21R 的所述基因多态性位点与 PBC 的发生显著相关, 可用于 PBC 发病风险预测的指标之一。



WO 2018/129888 A1

与原发性胆汁性胆管炎关联的白细胞介素 21 受体及其应用

技术领域

本发明属于免疫学领域，具体涉及与原发性胆汁性胆管炎关联的白细胞介素21受体（IL21R）及其应用。

背景技术

原发性胆汁性胆管炎（primary biliary cholangitis, PBC），旧称原发性胆汁性肝硬化（primary biliary cirrhosis），是一种累及肝内胆管系统的慢性进展性自身免疫性疾病，主要表现为肝内小胆管进行性破坏伴门脉炎症性改变，最终导致纤维化及肝硬化。本病主要发生于中年以上女性，男性病例仅占 10%。随着对 PBC 疾病认识的不断提高和诊断方法的建立，PBC 的发病率和患病率在全球呈上升趋势。2003 年，在上海地区对 5011 个健康体检者的（26-85 岁）PBC 特异性抗线粒体抗体（AMA）（PDC-E2）进行筛查，发现 AMA 阳性率高于 0.16%，在中年女性中高于 0.3%[5]。2006 年，在广东地区对 8126 个成年人（18-83 岁）的普查中发现 AMA（PDC-E2）的阳性率高于 0.05%，在中年女性中高于 0.15%。最近在上海地区对 19012 个居民的 AMA 筛查结果发现 0.40%的男性和 0.94%的女性 AMA 阳性，其中 25 人（0.13%）患有 PBC。随着我国人口老龄化的加剧，PBC 在我国将迅速发展成一种较常见的疾病，在 2025 年可能达到 20-30 万患者，到 2050 年可能高达 35-50 万患者。

早期诊断和治疗是控制 PBC 疾病发展的最有效手段。目前对 PBC 的治疗缺少有效的办法，熊去氧胆酸是唯一对早期 PBC 患者（尤其是黄疸没有出现的患者）进行有效控制的药物，但无治愈作用，而挽救晚期 PBC 患者的唯一手段是实施肝脏移植。我国是病毒性肝炎高发的国家，PBC 的临床症状与病毒性肝炎相似，PBC 患者早期常被误诊为病毒性肝炎或药物性肝炎，严重影响了 PBC 患者的诊疗。因此，对 PBC 患者进行早期诊断和治疗，具有重要的社会意义。

PBC 具有很强的遗传易感性，患者的第一代亲属的 PBC 发病率比一般人群高 100 倍。综合北美、欧洲和日本的报道，PBC 的家族发病率为 3.8-9%。2005 年，一项在北美的大规模调查结果显示，PBC 病人直系亲属发病的相对危险度(odds ratio)高达 10.7。通过 PBC 患者的同卵双生子进行分析，发现其共同发病率达 63%。我们团队在过去四年对国内 PBC 患者的调查中发现了 3 对同卵双生的 PBC 患者，三对患者的姐妹发病症状和发病时间都非常接近，结合国际已有数据，PBC 患者的同卵双生子共同发病率高达

72.7%。

自 2009 年以来，对白人 PBC 患者全基因组关联分析（GWAS）的一系列结果显示 PBC 具有很强的遗传易感性。以申请人为核心成员的北美 PBC 合作组采用 GWAS 和特定位点高密度基因多态性分析的方法，对北美 PBC 患者和对照人群进行队列分析，证实了 PBC 的遗传易感性与 HLA-II 类抗原、IL12A、IL12RB2、STAT4、IRF5、ch17q12-21、MMEL1 和 SPIB 等位点密切相关，而且揭示了 IL12R 信号传导通路和 Toll-like 受体（TLR）/TNF 信号传导通路的异常可能导致 PBC 的发生。日本学者的小规模的 GWAS 研究也发现了 TNFSF15 位点与 PBC 密切相关。我国对 PBC 的遗传学研究已有一定的基础，国内的学者分别就 HLA 和 CTLA4 等基因位点与汉族 PBC 遗传易感性进行了初步研究。

我们启动并完成了对 1122 例汉族 PBC 样品的 Illumina 中华芯片扫描工作，结合 4046 例对照数据，进行了大规模的队列分析，在国际上首次发现并证实了 IL21R 的基因位点达到了 GWAS 显著性，并首次发现 IL21R 在 PBC 患者血液中异常高表达，其表达程度与肝脏组织纤维化程度呈正比。

目前国际上尚无专利文献提及 IL21R 基因位点以及 IL21R 与 PBC 的关系。

发明内容

发明目的：本发明所要解决的第一个技术问题是提供了 IL21R 在制备检测或辅助检测、筛查或预测原发性胆汁性胆管炎的产品中的应用。

本发明所要解决的第二个技术问题是提供了一系列与原发性胆汁性胆管炎显著相关的单核苷酸多态位点（SNP），并找出其中与原发性胆汁性胆管炎易感性关联最显著的代表性位点，从而提供将所述的单核苷酸多态位点（SNP）用于评估原发性胆汁性胆管炎易感性的用途。

本发明所要解决的第三个技术问题是提供了 IL21R 在制备 PBC 动物模型中的应用。

本发明所要解决的第四个技术问题是提供了 IL21R 在制备 PBC 治疗药物方面的应用。

技术方案：为了解决上述技术问题，本发明所采用的技术方案为：第一方面，提供了 IL21R 在制备检测或辅助检测、筛查或预测原发性胆汁性胆管炎的产品中的应用。我们启动并完成了对 1122 例汉族 PBC 样品的 Illumina 中华芯片扫描工作，结合 4036 例对照数据，进行了大规模的队列分析，在国际上首次发现并证实了 IL21R 的基因位点达到了 GWAS 显著性，并首次发现 IL21R 在 PBC 患者肝脏组织中表达程度与肝脏组织纤维化程度呈正比；具体通过全基因组关联分析，发现 IL21R 的基因多态性与 PBC 发

病有密切关系。

第二方面提供了一系列与原发性胆汁性胆管炎易感性显著相关的 IL21R 的单核苷酸多态位点,通过对 1122 例中国汉族 PBC 患者样品和 4036 例正常人样品为研究对象,使用了 HumanOmniZhongHua-8 (v1.1) 扫描进行全基因组关联数据分析,进行基因多态性 (SNP) 的分型,利用芯片得到的数据,采用 PLINK 软件对所有多态位点的对比分析,发现 IL21R 基因的多个 SNP 的频数在 PBC 和正常人群中有显著差异。与 IL21R 的单核苷酸多态位点为: rs1859308, 等位基因为 C/ T; rs201883233, 等位基因为 A/ C; rs10852316, 等位基因为 C/A; rs2189521, 等位基因为 A/G; rs58579343, 等位基因为 A/G。

第三方面,本发明通过对 IL21R 位点的 SNP 进行连锁不平衡分析,发现多个 SNP 与 rs10852316,rs2189521 的连锁关系。采用 Sequenom 的 iPLEX 方法,针对其中 rs10852316, rs2189521 多态性位点进行验证试验;并使用 Impute2 和 PLINK 软件,逻辑回归原理进行,以性别为共变量,按叠加效应模型分析;同样发现有显著差异;表 1 中的所有 SNP 均为在 PBC 和对照间有显著差别的基因多态位点,可用于对 PBC 的风险预测。

第四方面,本发明通过使用 PLINK 软件,逻辑回归原理进行分析评估每个 SNP 位点与原发性胆汁性胆管炎的关系,计算危险等位基因的相对危险度 (Odd ratio, OR) 和 95% 的可信区间,得到这一系列 SNP 位点的危险等位基因。IL21R 的 SNP 位点的危险等位基因分别是: rs1859308 多态性位点为 C; rs201883233 多态性位点为 A; rs10852316 多态性位点为 C; rs2189521 多态性位点为 A; rs58579343 多态性位点为 A。

第五方面,本发明通过对 IL21R 特异的组织化学分析对 30 例 PBC 患者,30 例自身免疫肝炎患者(AIH),25 例慢性乙型肝炎患者(CHB),和 6 例正常对照(HC)的肝脏组织切片进行 IL21R 蛋白的表达进行测定,发现 IL21R 在 PBC 患者肝脏组织中显著升高 ($P<0.01$), IL21R 的表达水平与 PBC 患者肝脏组织的炎症程度和纤维化程度呈正相关。

第六方面,本发明建立的动物模型中引入 IL21R 表达或激活制备 PBC 动物模型,并将此模型用于 PBC 治疗药物的筛选。

有益效果: 本发明具有如下的特色和优点:

1) 本发明首次发现 IL21R 的多个基因多态性位点与 PBC 的发生显著相关,可用于 PBC 发病风险预测的指标之一。

2) 本发明发现 IL21R 在 PBC 患者肝脏组织中显著升高,是可用于 PBC 靶向治疗的靶点。

3)发明的发现有可能通过在动物模型中引入 IL21R 表达或激活制备 PBC 动物模型,并将此模型用于 PBC 治疗药物的筛选。

附图说明

图 1 为实施例 1 中所确定的 IL21R 基因区域单核苷酸多态性位点与 PBC 的关联图;图 1 中:横坐标“Position on chr”为染色体上的位置(单位 Mb);纵坐标为单核苷酸多态性位点与 PBC 的关联显著性 P 值 ($-\log_{10}(p\text{-value})$),右侧 Recombination rate 为重组率,单位 (CM/Mb);代表位点 rs2189521 以◆表示。

图 2 为实施例 3 中组织化学分析 IL21R 在 30 例 PBC 患者,30 例自身免疫肝炎(AIH)患者,25 例慢性乙型肝炎(CHB)患者,和 6 例正常对照(HC)肝脏组织切片中的表达。图 2A 为实施例 3 中在 1 例 PBC 患者组织肝脏组织切片的 IL21R 的表达。图 2B 为实施例 3 中在 1 例 AIH 患者组织肝脏组织切片的 IL21R 的表达。图 2C 为实施例 3 中在 1 例 CHB 患者组织肝脏组织切片的 IL21R 的表达。图 2D 为实施例 3 中在 1 例 HC 组织肝脏组织切片的 IL21R 的表达。图 2E 为实施例 3 中 IL21R 在 30 例 PBC 患者,30 例 AIH 患者,25 例慢性乙型肝炎(CHB)患者,和 6 例正常(HC)肝脏组织切片中的表达的统计分析结果 (**为 $P<0.01$, ***为 $P<0.001$)。图 2F 为实施例 3 中 IL21R 在 30 例 PBC 患者的肝脏组织切片中的表达与 PBC 患者的肝脏组织炎症程度相关性的分析结果。图 2G 为实施例 3 中 IL21R 在 30 例 PBC 患者的肝脏组织切片中的表达与 PBC 患者的肝脏组织纤维化程度相关性的分析结果。

具体实施方式

下面通过具体的实施例和附图对本发明进一步说明。

本发明实施例中所用实验材料、主要试剂及配方如下:

主要实验材料和主要试剂:

- 1、原发性胆汁性胆管炎患者和正常对照人群的 DNA 样品和血清;
- 2、全基因组关联分析芯片分析试剂盒:由 Illumina 公司生产的

HumanOmniZhongHua-8 (v1.1) 分析试剂盒包括芯片和试剂。

主要溶液配制:

- 1、磷酸缓冲液(PBS, 1L): 8g NaCl, 0.2g KCl, 0.24g KH_2PO_4 , 3.628g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 双蒸水定容至 1L;
- 2、饱和氯化钠溶液(5M NaCl, 1L): 292.5g NaCl, 双蒸水溶解定容至 1L;
- 3、1M Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0): 30.3g Tris base 溶于 200ml 双蒸水中, 盐酸调节 pH

值至 8.0，定容至 250ml；

4、0.5M EDTA (PH 8.0)：36.5g EDTA 溶于 NaOH 溶液中，调节 pH 至 8.0，定容至 250ml；

5、核裂解缓冲液(Nuclei Lysis Buffer, 500ml)：40ml 5 M NaCl ，2ml 0.5M EDTA(PH 8.0)，5ml 1M Tris-HCl (pH 8.0)，453ml 双蒸水；

6、蛋白酶 K 缓冲液(Proteinase K buffer, 100ml)：50ml glycerol, 100ul 1M Tris-HCl(pH 7.5)，200ul 1M CaCl₂，47ml 双蒸水；

7、蛋白酶 K(Proteinase K Solution, 10 mg/ml)：100mg 蛋白酶 K 粉末溶于 10ml 蛋白酶 K 缓冲液中；

8、消化液(Nuclei-SDS-Proteinase K-Master Mix Lysis buffer, 504ml)：420ml Nuclei Lysis Buffer, 3.5ml Proteinase K (10 mg/ml)，17.5ml 10% SDS, 0.35ml 0.5M EDTA(PH 8.0)，62.65ml 双蒸水；

9、TE 缓冲液(PH 8.0)：1ml 1M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)，0.2ml 0.5M EDTA(PH 8.0)，双蒸水定容至 100ml；

10、6×DNA 点样缓冲液(10ml)：88mg EDTA，5mg 溴酚蓝，5mg 二甲苯青，溶于 4ml 双蒸水中，再加入 3.6ml 甘油后使用 NaOH 调节至 PH7.0，定容至 10ml；

11、50×TAE 缓冲液：242g Tris-base，57.1ml 冰乙酸，200ml 0.5M EDTA(PH 8.0)，双蒸水定容至 1L。

实施例 1 全基因组关联分析

本发明通过下述方法和步骤发现 IL21R 基因位点与原发胆汁性胆管炎的关联。

一、方法

首先在中国汉族人群中选取了 1122 例中国汉族 PBC 患者样品和 4036 例正常人样品为研究对象，进行 HumanOmniZhongHua-8 (v1.1) 扫描，进行基因多态性 (SNP) 的分型，采用 PLINK 软件对所有多态位点的对比分析，发现 IL21R 基因的多个 SNP 的频数在 PBC 和正常人群中有显著差异。

二、病例和对照样本入选标准

所有纳入研究的 PBC 患者均符合以下标准：1)、所有患者均为汉族；2)、AMA-M2 血清学检测呈阳性；3)、生化指标显示胆汁淤积证据，主要表现为 ALP, GGT 升高；5)、各类肝炎病毒感染以及人类免疫缺陷病毒感染指标阴性(乙肝病毒表面抗原阴性、血清

中乙肝病毒 DNA 小于 200 拷贝数/毫升、血清中丙肝病毒 RNA 小于 500 拷贝数/毫升、戊肝抗原阴性、人类免疫缺陷病毒抗体阴性)；6)、无血吸虫感染史；7) 病人主诉饮酒量小于 100ml/日。

全基因组扫描对照人群样品来自安徽, 江苏, 山东的正常体检人群, 生化指标正常, 无临床疾病表征, 自述体健。病例是 22~85 岁之间筛选, 平均年龄为 54.7 岁; 对照为 15 岁到 96 岁之间筛选, 平均年龄为 34.8 岁。

三、测试人群的基本特征

测试人群为芯片检测样本其基本特征如下:

表 1

测试阶段	筛查阶段	
	病例	对照
样本量	1122	4036
男性/女性	146/976	2389/1647
年龄	54.7 (22-85)	34.8 (15-96)
原发性胆汁性胆管炎	100%	0

四、原发性胆汁性胆管炎 (PBC) 患者和正常对照人群的基因组 DNA 样品的制备

1、病人和正常人的非抗凝血由各医院采集在非抗凝血收集管中。将收集管离心, 分离血清和血凝块。在超净工作台内将解冻的血样上层的血清用移液器轻轻混匀, 均分装入 4 个 1.5ml 螺盖保存管, 保存于 -80℃。

2、用长柄勺取出分离胶, 将血块倒入称量舟, 用剪刀将血块充分剪碎, 再用塑料吸管将碎血块转移至 50ml 离心管中。

3、用 PBS 缓冲液冲洗称量舟及采血管, 回收清洗液至 50ml 离心管, 用塑料吸管混匀液体, 离心, 2500rpm, 15min, 4℃, 弃上清。

4、加 5 ml 消化液, 混匀, 放入水浴恒温振荡器, 50℃, 200rpm, 过夜消化。

5、消化完全后加 1.5ml 5M NaCl, 混匀; 室温静置 10min, 期间颠倒混匀多次, 离心, 3800rpm, 30min, 室温。

6、转移上清于 50ml 离心管, 加 2 倍体积无水乙醇, 充分混匀。

7、用移液器将可见的絮状 DNA 沉淀转移至含有 500 μ l 70%乙醇的 2ml EP 管进行清洗。

8、离心，13000rpm，5min，室温，弃上清；再离心，13000rpm，1min，室温，用移液器弃尽残液，晾干，用双蒸水溶解。

五、HumanOmniZhongHua-8 (v1.1) 芯片扫描分型和全基因组关联数据分析

HumanOmniZhongHua-8 (v1.1) 芯片购自 ILLUMINA 公司，分型按照产品方法进行。具体操作严格步骤按 Illumina 公司 HumanOmniZhongHua-8 (v1.1) 芯片的实验步骤进行，相关描述可同样见发表的文献[Adler, A. J., Wiley, G. B., Gaffney, P. M. Infinium Assay for Large-scale SNP Genotyping Applications. J. Vis. Exp. (81), e50683, doi:10.3791/50683 (2013).]。每个 DNA 样品采用 200 纳克 (ng)，严格按照 Illumina 公司 HumanOmniZhongHua-8 (v1.1) 芯片的说明实验步骤进行处理。

HumanOmniZhongHua-8 (v1.1) 芯片分型数据由 ILLUMINA 公司的 BeadStudio 软件处理并输出，关联数据分析按发表的文献同样进行[Zuo, X. et al. Whole-exome SNP array identifies 15 new susceptibility loci for psoriasis. Nat Commun 6, 6793, 2015]。BeadStudio 输出的分型数据采用 PLINK 分析，根据状态同一配对原理 (pairwise identity-by-state)，排除重复样品和亲缘样品。采用 smartpca 软件，根据主成分分析原理 (principal component analysis)，排除群体异质样品，共有 1,122 PBC 病人和 4,036 正常对照的结果，用于统计分析。排除分型成功率低于 98% 的 SNP，排除在分析样品中频率 (minor allele frequency, MAF) 低于 0.01 的 SNP，排除在正常对照样品中 Hardy-Weinberg equilibrium 值 $P < 1 \times 10^{-4}$ 的 SNP。经过排除，共有 776,516 个常染色体的 SNP 用于比较。采用 PLINK 软件，SNP 相关分析采用线性回归的原理，以性别为共变量 (covariate)，采用加性效应原理 (additive allelic effect)，评估每个 SNP 位点与 PBC 关联的显著性，计算危险等位基因的相对危险度 (Odds ratio, OR) 和 95% 的可信区间，分析中直接获得 OR 值、可信区间和 P 值，从而得到所述位点的危险等位基因。通过全基因组关联 (GWAS) 分析计算获得 SNP 芯片中每个位点与 PBC 关联显著性水平 (P 值)，按照显著性水平 (P 值小于 0.0001) 找出与 PBC 之间存在潜在关联的染色体区域，并得到 PBC 易感性显著关联的单核苷酸多态性位点及其等位基因。SNP 的推算 (Imputation) 是以千人基因组项目中汉族人结果为参考值 (Reference)，采用 IMPUTE2 软件，结合 1,122 PBC 病人和 4,036 正常对照的结果进行推算。

分析结果参见表 2 和图 1，结果显示在 IL21R 基因区，有 5 个单核苷酸多态性位点

(rs1859308, rs201883233, rs10852316, rs2189521, rs58579343) 的疾病相关单倍体频率在PBC中显著高于对照人群, p 值为 9.88×10^{-7} - 5.40×10^{-9} 。有 15 个 SNP 与 rs1859308, rs201883233, rs10852316, rs2189521, rs58579343 连锁不平衡 ($r^2=0.9-1$) 推算出对应的 p 值, 均在 PBC 中显著高于对照人群 ($p=9.63 \times 10^{-7}$ - 6.41×10^{-8})。染色体区域单核苷酸多态性位点间的连锁不平衡(Linkage disequilibrium, LD) 情况, 指的是不同单核苷酸多态性位点间存在着的非随机组合, 用 r^2 表示 (0-1)。这一系列单核苷酸多态性位点及其等位基因是: rs6498017, 等位基因为 G/A; rs757374, 等位基因为 G/A; rs722516, 等位基因为 A/G; rs722517, 等位基因为 C/T; rs1107788, 等位基因为 T/C; rs11074854, 等位基因为 C/G; rs1859309, 等位基因为 T/C; rs1859308, 等位基因为 C/T; rs1859307, 等位基因为 A/G; rs201883233, 等位基因为 A/C; rs1859306, 等位基因为 G/A; rs11074855, 等位基因为 T/C; rs10852316, 等位基因为 G/T; rs7199163, 等位基因为 G/T; rs982204, 等位基因为 A/G; rs72535012, 等位基因为 CTT/C; rs1116973, 等位基因为 T/A; rs2382582, 等位基因为 A/C; rs2189521, 等位基因为 A/G; rs58579343, 等位基因为 T/C。其中危险等位基因分别是: rs6498017 多态性位点为 G; rs757374 多态性位点为 G; rs722516 多态性位点为 A; rs722517 多态性位点为 C; rs1107788 多态性位点为 T; rs11074854 多态性位点为 C; rs1859309 多态性位点为 T; rs1859308 多态性位点为 C; rs1859307 多态性位点为 A; rs201883233 多态性位点为 A; rs1859306 多态性位点为 G; rs11074855 多态性位点为 T; rs10852316 多态性位点为 G; rs7199163 多态性位点为 G; rs982204 多态性位点为 A; rs72535012 多态性位点为 CTT; rs1116973 多态性位点为 T; rs2382582 多态性位点为 A; rs2189521 多态性位点为 A; rs58579343 多态性位点为 T。(见表 2)。携带这些危险等位基因的个体发生 PBC 的相对风险是没有携带者的 1.32-1.41 倍。

IL21R 基因区域单核苷酸多态性位点序列:

如序列表中的 SEQ ID NO.1 所示:

rs6498017

ATGATCCAGCCCAAATGTCAACACT[A/G]TCAAGGTGGAGAAACCCTGCCAAAT

如序列表中的 SEQ ID NO.2 所示

rs757374

TTGGTCCCTATCCAACCTGGGCTGGG[A/G]ACTTGTAGGGTCCTGGGAGACTGTC

如序列表中的 SEQ ID NO.3 所示

rs722516

GGGGCATGATATCTCAGAAACAGCC[A/G]GGATACAGTGACCAGGAGAAGAGTA

如序列表中的 SEQ ID NO.4 所示

rs722517

ATACTAGTCTAGTAAACAGCAACAA[C/T]TATAAGTACCTTTATTTTTTAGATG

如序列表中的 SEQ ID NO.5 所示

rs1107788

CAGCAACCACTGAGCTGATTGGGCA[C/T]CTCTGCAAGCTTTCTCTTAGGGGAC

如序列表中的 SEQ ID NO.6 所示

rs11074854

CCAGCTCTGCAGTCAGAAAAGAAAG[C/G]CAGCTGAATCCATGCCTGATGAAGG

如序列表中的 SEQ ID NO.7 所示

rs1859309

TGATTCTTAGAAAGACATAGGAGGG[C/T]TTACCATGGAGGGAGATAATTATGG

如序列表中的 SEQ ID NO.8 所示

rs1859308

GGTCATGAGCAGGTCCAGACCAGCA[C/T]AGTCAGAGTTGATGAACTGGAGAAG

如序列表中的 SEQ ID NO.9 所示

rs1859307

TTTGGAAGAGAAGACTCAGGGTGG[A/G]GGTCATGAGCAGGTCCAGACCAGCA

如序列表中的 SEQ ID NO.10 所示

rs 201883233

TTCCAAATACTTCTGCTGTCTCATG[A/C]TTTTTTTTACTGTCTCCACACCAGC

如序列表中的 SEQ ID NO.11 所示

rs1859306

GAACAGGCAACCGAGAAGGTAGAGC[A/G]GCTGGTGTGGAGACAGTAAAAAAAAA

如序列表中的 SEQ ID NO.12 所示

rs11074855

TGAATATCTGGCTTGAAGTAAAGGA[C/T]GTCACATGCTTCAGGGGGACCATGG

如序列表中的 SEQ ID NO.13 所示

rs10852316

AAAATGGAAATAGCTTGGTTATTTTCCCAGATTCCAGAAGTAAGA[G/T]ATCATTTT
AAAAATCAGATAATACAGAATAACATAAAAAATTAAAAA

如序列表中的 SEQ ID NO.14 所示

rs7199163

aataaaaGGTGGTTTTGATAGCTTA[G/T]TGCAGATGGCAAGTCCCTTACAAC

如序列表中的 SEQ ID NO.15 所示

rs982204

GCAATCATTTGTCTCTAGACTTCTC[A/G]TTCCATAAAGGAATTAGCTCTTAAG

如序列表中的 SEQ ID NO.16 所示;

rs72535012

AATTTACAAAGACTAGGGGAGTAT[C/CTT]TTTTATTTTGTTTTCTTTTTGGCT

如序列表中的 SEQ ID NO.17 所示;

rs1116973

aattttccagttttccttctgctat[A/T]gatacctaacttcattgtgatcaga

如序列表中的 SEQ ID NO.18 所示

rs2382582

aaagcatttgacaaaatttaacacc[A/C]tttcatgataaaaacactcagtaaa

如序列表中的 SEQ ID NO.19 所示

rs2189521

CACTCAGGGAGAGGCAGGCAGAGGGCCAGACGCCGAGCTTAC[A/G]GTCACCTCAG
CAGAGAGACGCCAGTGGGTCTGTCTGAGGCCGCT

如序列表中的 SEQ ID NO.20 所示

rs58579343

TTTGCTTTTGTAATGTTTATGGATC[C/T]TTTCCTTTGCTAATCTAACAAGAGA

表 2 与原发性胆汁性胆管炎显著关联的 IL21R 基因区域单核苷酸多态性位点

编号	染色体	单核苷酸多态性位点	碱基位置	风险等位基因单倍体	正常等位基因单倍体	风险等位基因单倍体频率(PBC)	风险等位基因单倍体频率(对照)	P 值	OR (95% CI)	分型方法	注释	基因位点
1	16	rs6498017	27394858	G	A	0.733	0.679	9.63E-07	1.30 (1.16-1.45)	推算	intergenic	IL21R
2	16	rs757374	27395178	G	A	0.733	0.679	9.63E-07	1.30 (1.16-1.45)	推算	intergenic	IL21R
3	16	rs722516	27396461	A	G	0.621	0.557	6.41E-08	1.30 (1.18-1.43)	推算	intergenic	IL21R
4	16	rs722517	27396595	C	T	0.733	0.679	9.63E-07	1.30 (1.16-1.45)	推算	intergenic	IL21R
5	16	rs1107788	27397235	T	C	0.621	0.557	6.41E-08	1.30 (1.18-1.43)	推算	intergenic	IL21R
6	16	rs11074854	27397539	C	G	0.733	0.679	9.63E-07	1.30 (1.16-1.45)	推算	intergenic	IL21R
7	16	rs1859309	27397821	T	C	0.621	0.557	6.41E-08	1.30 (1.18-1.43)	推算	intergenic	IL21R
8	16	rs1859308	27397998	C	T	0.733	0.679	9.63E-07	1.30 (1.16-1.45)	分型	intergenic	IL21R
9	16	rs1859307	27398024	A	G	0.621	0.557	7.60E-08	1.30 (1.18-1.43)	推算	intergenic	IL21R
10	16	rs201883233	27398068	A	C	0.619	0.557	1.24E-07	1.30 (1.18-1.43)	分型	intergenic	IL21R
11	16	rs1859306	27398094	G	A	0.643	0.579	1.11E-07	1.32 (1.19-1.45)	推算	intergenic	IL21R
12	16	rs11074855	27398390	T	C	0.621	0.557	7.60E-08	1.30 (1.18-1.43)	推算	intergenic	IL21R
13	16	rs10852316	27398555	G	T	0.621	0.557	9.83E-08	1.30 (1.18-1.43)	分型	intergenic	IL21R
14	16	rs7199163	27399100	G	T	0.733	0.679	9.63E-07	1.30 (1.16-1.45)	推算	intergenic	IL21R
15	16	rs982204	27399648	A	G	0.62	0.557	8.24E-08	1.30 (1.18-1.43)	推算	intergenic	IL21R
16	16	rs72535012	27403216	CTT	C	0.644	0.579	7.56E-08	1.32 (1.19-1.45)	推算	intergenic	IL21R
17	16	rs1116973	27405916	T	A	0.644	0.578	7.21E-08	1.32 (1.19-1.45)	推算	intergenic	IL21R
18	16	rs2382582	27406971	A	C	0.644	0.578	7.21E-08	1.32 (1.19-1.45)	推算	intergenic	IL21R

1 9	16	rs2189521	2741356 6	A	G	0.758	0.69 5	5.98E-0 9	1.37 (1.23-1.54)	分型	5'UTR	IL21 R
2 0	16	rs58579343	2742192 7	T	C	0.685	0.62 5	1.39E-0 7	1.30 (1.18-1.45)	分型	5'UTR	IL21 R

其中“OR (95%CI)”，表示与携带正常的单倍体的个体相比，携带疾病相关单倍体的个体发生 PBC 的相对风险。染色体位置为参照 Human Genome GRCh37/hg19.。

实施例 2rs10852316, rs2189521 的验证实验

通过针对其中的 rs10852316, rs2189521 在 907 个 PBC 患者和 2027 个正常对照的验证，同样发现有显著差异。PBC 患者验证样品与实施例 1 中的标准一样；分析正常对照样品来自东南大学教师体检，生化指标正常，B 超检查无肝脾异常，无临床疾病表征，自述体健。验证实验实施中的材料和时间如无说明，均由 Sequenom 公司提供。

1、验证 IL21R 基因区域单核苷酸多态性位点序列

rs10852316 序列

AAAATGGAAATAGCTTGGTTATTTTTCCCAGATTCCAGAAGTAAGA[G/T]ATCATTTT
AAAAATCAGATAATACAGAATAACATAAAAAATTAAAAA

rs2189521

CACTCAGGGAGAGGCAGGCAGAGGGCCAGACGCCGAGCTTAC[A/G]GTCACCTCAG
CAGAGAGACGCCAGTGGGTCTGTCTGAGGCCGCT

2、引物设计

使用 Sequenom 公司 Genotyping Tools 及 MassARRAY Assay Design 软件设计待测 SNP 位点的 PCR 扩增引物及单碱基延伸引物，并交由 Integrated DNA Technologies 合成。

设计使用 DNA 引物和探针如下：

rs10852316:

引物 1 序列，ACGTTGGATGGGTATTTTTCCCAGATTCC;

引物 2 序列，ACGTTGGATGCTGGGTGGTGGGAATTTTA;

探针序列，aggggTCCCAGATTCCAGAAGTAAGA

rs2189521:

引物 1 序列，ACGTTGGATGTGTCAGCCACACTCAGGGA;

引物 2 序列, ACGTTGGATGAGACCCACTGGCGTCTCTCT;

探针序列, tctttCCAGACGCCGAGCTTAC

3、PCR 扩增

PCR 扩增采用多重 PCR 技术,在 384 孔板中进行,每个反应体系总体积为 5 μ l。在一个新的 1.5ml EP 管中配制 PCR master mix 溶液。

配制 PCR master mix 液:

PCR Mix 对每个反应, μ L

10 $\times$ PCR Buffer 0.5 μ L

MgCl₂ (25mM)0.4 μ L

dNTP mix (25 mM) 0.1 μ L

HotStar Taq (5U/ μ L)0.1 μ L

Water 1.9 μ L

PCR primer mix (引物 1 和 2 各 0.5pmol) 1 μ L

Total Volume4 μ L

使用 24 通道加样器,调节加样体积为 4 μ L,在 384 孔板的每个加样孔中加入 PCR master mix 液。该 384 孔板即为 PCR 反应板。取出已经制备好的 DNA 样品 384 孔板,使用 24 通道加样器,调节加样体积为 1 μ L,每个 5 μ lPCR 反应体系中包含模板 DNA 20-50 ng, Hotstar Taq 0.5 U, 每条扩增引物 0.5pmol, 0.1 μ l 的 25mM dNTPs。在兼容 384 孔板的 PCR 仪上设定 PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 分钟; 94 $^{\circ}$ C 20 秒, 56 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分钟, 45 个循环; 72 $^{\circ}$ C 3 分钟; 4 $^{\circ}$ C 保持。将 384 孔 PCR 反应板放置于 PCR 仪上,启动 PCR 反应。

4、PCR 产物碱性磷酸酶处理

在 PCR 反应结束后,将 PCR 产物用 SAP (shrimp alkaline phosphatase, 虾碱性磷酸酶) 处理,以去除体系中游离的 dNTPs。

(1) 配制碱性磷酸酶处理反应液, SAP Mix。

SAP Mix 对每个反应, μ L

H₂O1.53

SAP Buffer (10 $\times$) 0.17

SAP Enzyme (1.7U/ μ L)0.3

Total Volume 2

- (2) 使用 24 通道加样器, 调节加样体积为 2 μ L, 将 SAP Mix 加入 384 孔 PCR 反应板。对于每个碱性磷酸酶处理反应孔, 反应体系总体积为 7 μ l, 其中 PCR 产物 5 μ l, SAP Mix 2 μ l。
- (3) 将 384 孔板放置在兼容 384 孔板的 PCR 仪上, 设定 PCR 反应条件: 37°C 40 分钟; 85°C 5 分钟; 4°C 维持, 启动 PCR 仪进行碱性磷酸酶处理。

5、单碱基延伸

- (1) 在碱性磷酸酶处理结束后, 进行单碱基延伸反应, 反应体系总体积 9 μ l。
- (2) 配制单碱基延伸反应液, EXTEND Mix。

EXTEND Mix 对每个反应, μ l

水	0.619
各延伸反应引物混合物	0.94
iPLEX terminator	0.2
iPLEX 酶	0.041
总体积	2

- (3) 使用 24 通道加样器, 调节加样体积为 2 μ L, 将 EXTEND Mix 对应加入 384 孔反应板。对于每个反应孔, 单碱基延伸反应体系包含 SAP 处理后 PCR 产物 7 μ l 及 EXTEND Mix 液 2 μ l (其中各延伸反应引物混合物 0.94 μ l, iPLEX 酶 0.041 μ l, 延伸混合物 0.2 μ l)。
- (4) 将 384 孔板放置在兼容 384 孔板的 PCR 仪上, 设定 PCR 反应条件:
- I. 94° C for 30 seconds;
 - II. 94° C for 5 seconds;
 - III. 52° C for 5 seconds;
 - IV. 80° C for 5 seconds;
 - V. GOTO III, 4 more times;
 - VI. GOTO II, 39 more times;
 - VII. 72° C for 3 minutes;
 - VIII. 4° C forever;

启动 PCR 仪进行单碱基延伸反应。

6、树脂纯化

- (1) 将 Clean Resin 树脂平铺到 6mg 的树脂板中;

(2) 加 16 μ l 水到延伸产物的对应孔内;

(3) 将干燥后的树脂倒入延伸产物板中, 封膜, 低速垂直旋转 30 分钟, 使树脂与反应物充分接触;

(4) 离心使树脂沉入孔底部。

7、芯片点样

启动 MassARRAY Nanodispenser RS1000 点样仪, 将树脂纯化后的延伸产物移至 384 孔 SpectroCHIP 芯片上。

8、质谱检测

将点样后的 SpectroCHIP 芯片使用 MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight, 基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱) 分析, 检测结果使用 TYPER 4.0 软件 (sequenom) 分型并输出结果。共 907 个 PBC 样品和 2127 个对照样品得到了有效的结果。

采用 PLINK 软件, 逻辑回归原理进行, 以性别为共变量, 按叠加效应模型对 907 个 PBC 样品和 2127 个对照样品的结果进行了统计分析。rs10852316 的疾病相关单倍体 (G) 频率在 PBC 中 (0.626) 显著高于对照人群 (0.556), p 值为 5.59×10^{-7} 。rs2189521 的疾病相关单倍体 (A) 频率在 PBC 中 (0.754) 显著高于对照人群 (0.680), p 值为 9.87×10^{-9} 。将 1,122 PBC 病人和 4,036 正常对照的 GWAS 结果, 与在 907 个 PBC 样品和 2127 个对照样品的结果进行叠加分析, 采用 fixed-effect model ($I^2 < 25\%$) 的原理, 统计分析共包括 2029 个 PBC 样品和 6163 个对照样品。结果表明: rs10852316 的疾病相关单倍体 (G) 频率在 PBC 中显著高于对照人群, p 值为 2.76×10^{-13} , 相对危险度值 (96%CI) 为 1.32 (1.22-1.41); rs2189521 的疾病相关单倍体 (A) 频率在 PBC 中显著高于对照人群, p 值为 4.00×10^{-16} , 相对危险度值 (96%CI) 为 1.41 (1.28-1.52) (见表 3)。

表 3: IL21R 多态位点 rs10852316, rs2189521 在全基因组关联分析和验证发现中的结果

染色体	多态位点	碱基位置*	基因位点	疾病相关的单倍体	正常的单倍体	全基因组扫描 (1122 PBC 和 4036 对照)			验证分析 (907 PBC 和 2127 对照)			叠加分析 (2029 PBC 和 6163 对照)	
						疾病相关单倍体频率 (PBC)	疾病相关单倍体频率 (对照)	P 值 [#]	疾病相关单倍体频率 (PBC)	疾病相关单倍体频率 (对照)	P 值 [#]	P 值 [#]	OR (95% CI)
16	rs10852316	27398555	IL21R	C	A	0.621	0.557	9E-08	0.626	0.556	6E-07	2.8E-13	1.32 (1.22-1.41)
16	rs2189521	27413566	IL21R	A	G	0.758	0.695	5E-09	0.754	0.68	1E-08	4E-16	1.41 (1.28-1.52)

实施例 3 原发性胆汁性胆管炎患者肝脏组织中 IL21R 的表达分析

所有肝组织，包括 30 例 PBC 患者，30 例自身免疫肝炎(AIH)患者，25 例慢性乙型肝炎(CHB)患者均为在上海仁济医院超声指导的肝活检组织。6 例健康对照(HC)的肝脏组织来自肝脏移植供体。肝组织经福尔马林固定和石蜡包埋保存。肝组织的炎症和纤维化程度按照“Scheuer”评分系统评定。

- 1、肝组织切片在柠檬酸钠缓冲液中浸泡 20 分钟；
- 2、加入 1:150 稀释的抗 IL21R 抗体 (ab13268, Abcam, Cambridge, USA)，室温保持 20 分钟；
- 3、用磷酸钠缓冲液清洗玻片；
- 4、加入 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体（全自动免疫组化机二抗组合，47101, Leica），采用 Leica 全自动免疫组化机进行免疫组化染色操作；
- 5、对染色的玻片进行分析，在 40*10 放大的显微镜下随即选取 5 个镜下区域，记录染色的阳性细胞数，最终结果按平均值加标准差表述。Mann-Whitney U 分析原理 (Mann-Whitney U-test) 用于数据的统计分析，P 值小于 0.05 被认为统计学显著差异。所有分析采用 Prism 软件系统 (Prism software Version 6.0, Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) 进行处理。

结果表明,相比于乙型肝炎,自身免疫性肝炎和正常肝组织,IL21R 在 PBC 患者肝组织中表达显著升高。在 PBC 患者中,IL21R 表达的细胞通常是聚集在炎症的肝脏门管区中,尤其是在损伤的小叶间胆管周边。实验结果表明,IL21R 阳性细胞的数目与肝脏的炎症程度和肝脏的纤维化程度呈正比。统计分析发现 IL21R 阳性细胞的数目与肝脏的炎症程度正相关 ($r=0.43$, $p<0.05$); 与肝脏的纤维化程度正相关 ($r=0.60$, $p<0.01$), 相关结果见图 2。

上述仅为本发明优选的实施例,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出其它不同形式的变化或变动,这些也应属于本发明的保护范围。

SEQUENCE LISTING

<110> 东南大学

<120> 与原发性胆汁性胆管炎关联的白细胞介素 21 受体及其应用

<130> SG20161226001

<160>26

<170> PatentIn version 3.3

<210>1

<211> 51

<212> DNA

<213>rs6498017

<221> misc_feature

<223> n is a or g

<400>1

atgatccagc ccaaattgtca acactntcaa ggtggagaaa ccctgccaaa t 51

<210>2

<211> 51

<212> DNA

<213>rs757374

<221> misc_feature

<223> n is a or g

<400>2

ttggtcccta tccaactggg ctgggnactt gtagggctct ggagactgt c 51

<210>3

<211> 51

<212> DNA

<213>rs722516

<221> misc_feature

<223>n is a or g

<400>3

ggggcatgat atctcagaaa cagccnggat acagtgacca ggagaagagt a 51

<210>4

<211> 51

<212> DNA

<213>rs722517

<221> misc_feature

<223> n i s c o r t

<400>4

atactagtct agtaaacagc aacaantata agtaccttta ttttttagat g 51

<210>5

<211> 51

<212> DNA

<213>rs1107788

<221> misc_feature

<223>n i s c o r t

<400>5

cagcaaccac tgagctgatt gggcancctc gcaagctttc tcttagggga c 51

<210>6

<211> 48

<212> DNA

<213>rs11074854

<221> misc_feature

<223> n i s c o r g

<400>6

ccagctctgc agtcagaaaa gaaagncagc tgaatccatg cctgatgaag g 51

<210>7

<211> 51

<212> DNA

<213>rs1859309

<221> misc_feature

<223> n i s c , o r t

<400>7

tgattcttag aaagacatag gagggnttac catggaggga gataattatg g 51

<210>8

<211> 51

<212> DNA

<213>rs1859308

<221> misc_feature

<223> n i s c o r t

<400>8

ggatcatgagc aggtccagac cagcanagtc agagttgatg aactggagaa g 51

<210>9

<211> 51

<212> DNA

<213>rs1859307

<221> misc_feature

<223> n is a or g

<400>9

tttgaaaga gaagactcag ggtggnggtc atgagcaggt ccagaccagc a 51

<210> 10

<211> 51

<212> DNA

<213>rs 201883233

<221> misc_feature

<223> n is a or c

<400> 10

ttccaaataactttctgtgtctcatgnttttttttactgtctccacaccagc 51

<210> 11

<211> 51

<212> DNA

<213>rs1859306

<221> misc_feature

<223> n is a org

<400> 11

gaacaggcaa ccgagaaggt agagcngctg gtgtggagac agtaaaaaa a 51

<210> 12

<211> 51

<212> DNA

<213>rs11074855

<221> misc_feature

<223> n is c or t

<400> 12

tgaatatctg gcttgaagta aaggangtca catgcttcag ggggaccatg g 51

<210> 13

<211>94

<212> DNA

<213>rs10852316

<221> misc_feature

<223> n is g or t

<400> 13

aaaatggaaa tagcttggtt atttttccca gattccagaa gtaaganatc attttaaaaa 60

tcagataata cagaataaca taaaaaatta aaaa 94

<210> 14

<211> 51

<212> DNA

<213>rs7199163

<221> misc_feature

<223> n is g or t

<400> 14

aataaaaggt ggttttgata gcttantgca gatggcaagt cccttacaac t 51

<210> 15

<211> 51

<212> DNA

<213>rs982204

<221> misc_feature

<223> n is a or g

<400> 15

gcaatcattt gtctctagac ttctcnttcc ataaaggaat tagctcttaa g 51

<210>16

<211> 50

<212> DNA

<213>rs72535012

<221> misc_feature

<223> n is c or ctt

<400>16

aatttacaaa gactagggga gtatntttta ttttgttttt ctttttggt 50

<210>17

<211> 51

<212> DNA

<213>rs1116973

<221> misc_feature
 <223> n is a or t
 <400>17
 aattttccag ttttccttct gctatngata cctaacttca ttgtgatcag a 51

<210>18
 <211> 51
 <212> DNA
 <213>rs2382582
 <221> misc_feature
 <223> n is a or c
 <400>18
 aaagcatttg acaaaattta acacntttc atgataaaaa cactcagtaa a 51

<210>19
 <211> 51
 <212> DNA
 <213>rs2189521
 <221> misc_feature
 <223> n is a or g
 <400>19
 cactcaggga gaggcaggca gagggccaga cgccgagctt acngtcactc agcagagaga 60

cgccagtggg tctgtctgag gccgct 86

<210> 20
 <211> 51
 <212> DNA
 <213>rs58579343
 <221> misc_feature
 <223> n is c or t
 <400> 20
 tttgcttttg taatgtttat ggatcntttc ctttgctaata ctaacaagag a 51

<210>21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213>rs10852316 的引物 1 序列

<400>21
 acgttggatg ggttatTTTTT cccagattcc 30

<210>22

<211> 30	
<212> DNA	
<213>rs10852316 的引物 2 序列	
<400>22	
acgttggatg ctgggtggtg ggaattttta	30
<210>23	
<211>26	
<212> DNA	
<213>rs10852316 的探针序列	
<400>23	
aggggtccca gattccagaa gtaaga	26
<210>24	
<211>29	
<212> DNA	
<213>rs2189521 的引物 1 序列	
<400>24	
acgttggatg tgtcagccac actcaggga	29
<210>25	
<211> 30	
<212> DNA	
<213>rs2189521 的引物 2 序列	
<400>25	
acgttggatg agaccactg gcgtctctct	30
<210>26	
<211>22	
<212> DNA	
<213>rs2189521 的探针序列	
<400>26	
tctttccaga cgccgagctt ac	22

权利要求书

- 1、IL21R 在制备检测或辅助检测、筛查或预测原发性胆汁性胆管炎的产品中的应用。
- 2、IL21R 基因多态位点 rs1859308 的试剂在制备检测或辅助检测、筛查或预测原发性胆汁性胆管炎的产品中的应用，rs1859308 序列如序列表中的 SEQ ID NO.8 所示，其中，单核苷酸 n 为 C 的携带者原发性胆汁性胆管炎的风险高于等位基因 T。
- 3、IL21R 基因多态位点 rs201883233 的试剂在制备检测或辅助检测、筛查或预测原发性胆汁性胆管炎的产品中的应用，rs201883233 序列如序列表中的 SEQ ID NO.10 所示，其中，单核苷酸 n 为 A 的携带者原发性胆汁性胆管炎的风险高于等位基因 C。
- 4、IL21R 基因多态位点 rs10852316 的试剂在制备检测或辅助检测、筛查或预测原发性胆汁性胆管炎的产品中的应用，rs10852316 序列如序列表中的 SEQ ID NO.13 所示，其中，单核苷酸 n 为 C 的携带者原发性胆汁性胆管炎的风险高于等位基因 A。
- 5、IL21R 基因多态位点 rs2189521 的试剂在制备检测或辅助检测、筛查或预测原发性胆汁性胆管炎的产品中的应用，rs2189521 序列如序列表中的 SEQ ID NO.19 所示，其中，单核苷酸 n 为 A 的携带者原发性胆汁性胆管炎的风险高于等位基因 G。
- 6、IL21R 基因多态位点 rs58579343 的试剂在制备检测或辅助检测、筛查或预测原发性胆汁性胆管炎的产品中的应用，rs58579343 序列如序列表中的 SEQ ID NO.20 所示，其中，单核苷酸 n 为 A 的携带者原发性胆汁性胆管炎的风险高于等位基因 G。
- 7、IL21R 在制备 PBC 动物模型中的应用。
- 8、IL21R 在制备 PBC 治疗药物方面的应用。

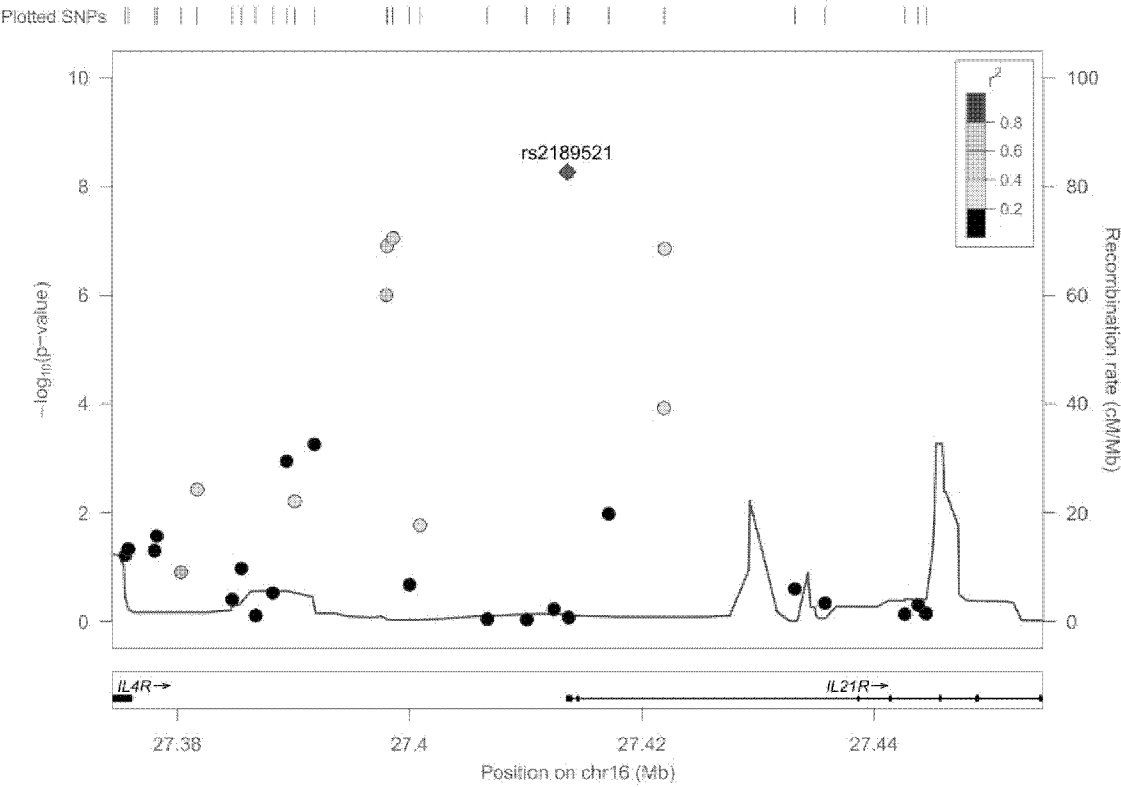


图 1

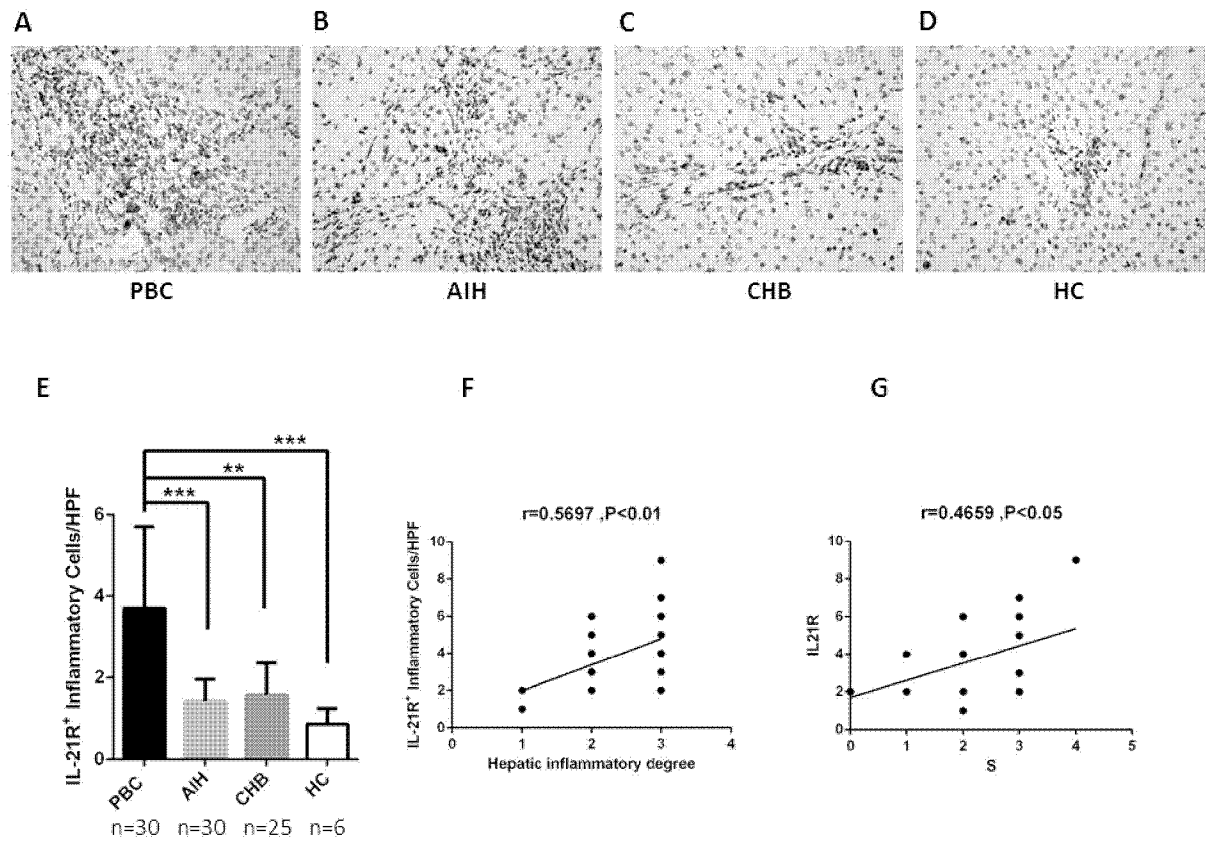


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/092505

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) i; A61P 1/16 (2006.01) i; C12N 15/11 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q; A61K; C12N

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

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

CNABS, DWPI, VEN, CNKI, PubMed, ISI Web of Knowledge, GenBank, EBI: 东南大学, 刘向东, 马雄, 陈卫昌, 史兴娟, 原发性胆汁性胆管炎, primary biliary cholangitis, PBC, 原发性胆汁性肝硬化, primary biliary cirrhosis, 白细胞介素 21 受体, IL21R, interleukin, rs1859308, rs201883233, rs10852316, rs2189521, rs58579343, SNP, polymorphic, polymorphism, SEQ ID NOs: 8, 10, 13, 19, 20

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YANG, Y. Q. et al. Dysregulation of Peritoneal Cavity Bla Cells and Murine Primary Biliary Cholangitis. Oncotarget. 20 April 2016 (20.04.2016), 7(19), pp. 26992-27006	1, 7, 8
PX	CN 106834449 A (SOUTHEAST UNIVERSITY) 13 June 2017 (13.06.2017), claims 1-8	1-8
PX	QIU, F. et al. A Genome-wide Association Study Identifies Six Novel Risk Loci for Primary Biliary Cholangitis. Nature Communications. 20 April 2017 (20.04.2017), pp. 1-8	1-8
A	CN 103602671 A (THE FOURTH MILITARY MEDICAL UNIVERSITY OF THE CHINESE PEOPLE'S LIBERATION ARMY) 26 February 2014 (26.02.2014), entire document	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 04 September 2017	Date of mailing of the international search report 28 September 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WU, Xuemei Telephone No. (86-10) 62414290

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2017/092505

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103749388 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 30 April 2014 (30.04.2014), entire document	1-8
A	WO 2010102387 A1 (UNIVERSITY HEALTH NETWORK et al.) 16 September 2010 (16.09.2010), entire document	1-8
A	CN 1404400 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V. et al.) 19 March 2003 (19.03.2003), entire document	1-8
A	HIRSCHFIELD, G. M. et al. Primary Biliary Cirrhosis Associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 Variants. The New England Journal of Medicine. 20 May 2009 (20.05.2009), 360(24), pp. 2544-2555	1-8
A	MELLS, G. F. et al. Genome-wide Association Study Identifies 12 New Susceptibility Loci for Primary Biliary Cirrhosis. Nature Genetics. 30 April 2011 (30.04.2011), 43(4), pp. 329-332	1-8
A	LI, Y. Y. et al. CXCL13 Promotes Intrahepatic CXCR5+ Lymphocyte Homing and Aberrant B Cell Immune Responses in Primary Biliary Cirrhosis. Hepatology. 30 June 2015 (30.06.2015), 61(6), pp. 1998-2007	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/092505

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☒ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/092505

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106834449 A	13 June 2017	None	
CN 103602671 A	26 February 2014	None	
CN 103749388 A	30 April 2014	CN 103749388 B	09 September 2015
WO 2010102387 A1	16 September 2010	None	
CN 1404400 A	19 March 2003	CY 1111687 T1	07 October 2015
		CA 2683009 A1	30 August 2001
		IL 151388 A	01 September 2009
		KR 20070087256 A	27 August 2007
		MX PA02008079 A	27 February 2003
		BG 107018 A	30 September 2003
		JP 4744763 B2	10 August 2011
		TR 200202030 T2	21 January 2003
		NZ 520122 A	29 April 2005
		EA 005583 B1	28 April 2005
		HK 1051965 A1	28 September 2007
		BR 0108514 A	17 December 2002
		NO 20023962 A	20 August 2002
		KR 20070057282 A	04 June 2007
		EA 200200890 A1	27 February 2003
		SK 12082002 A3	02 May 2003
		HU 0300061 A3	28 September 2005
		EE 05423 B1	15 June 2011
		IL 151388 D0	10 April 2003
		HU 0300061 A2	28 April 2003
		RS 51737 B	31 October 2011
		EP 1257292 B1	27 April 2011
		DK 1257292 T3	18 July 2011
		EE 200200463 A	15 December 2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/092505

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		AU 2001240636 B8	03 November 2005
		AU 4063601 A	03 September 2001
		CZ 304485 B6	28 May 2014
		YU 60402 A	19 September 2005
		JP 2003523403 A	05 August 2003
		CZ 20022843 A3	12 February 2003
		NO 331971 B1	14 May 2012
		CA 2399298 A1	30 August 2001
		WO 0162285 A1	30 August 2001
		CN 1322897 C	27 June 2007
		US 2003157094 A1	21 August 2003
		AT 506959 T	15 May 2011
		PT 1257292 E	05 July 2011
		BG 66134 B1	30 June 2011
		TR 200502508 T2	24 April 2007
		SI 1257292 T1	31 August 2011
		EP 1257292 A1	20 November 2002
		NO 20023962 D0	20 August 2002
		HR P20020652 A2	31 December 2004
		NZ 535299 A	30 June 2006
		AU 2001240636 B2	13 October 2005
		PL 206549 B1	31 August 2010
		PL 357554 A1	26 July 2004
		SK 288032 B6	03 December 2012
		CA 2683009 C	23 September 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/092505

A. 主题的分类 C12Q 1/68(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																				
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12Q; A61K; C12N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, DWPI, VEN, CNKI, PubMed, ISI Web of Knowledge, GenBank, EBI; 东南大学, 刘向东, 马雄, 陈卫昌, 史兴娟, 原发性胆汁性胆管炎, primary biliary cholangitis, PBC, 原发性胆汁性肝硬化, primary biliary cirrhosis, 白细胞介素21受体, IL21R, interleukin, rs1859308, rs201883233, rs10852316, rs2189521, rs58579343, SNP, polymorphic, polymorphism, SEQ ID NOs:8, 10, 13, 19, 20																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>YANG, Y.Q. 等. "Dysregulation of peritoneal cavity Bla cells and murine primary biliary cholangitis." Oncotarget., 第7卷, 第19期, 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20), 第26992-27006页</td> <td>1, 7-8</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 106834449 A (东南大学) 2017年 6月 13日 (2017 - 06 - 13) 权利要求1-8</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>QIU, F. 等. "A genome-wide association study identifies six novel risk loci for primary biliary cholangitis." NATURE COMMUNICATIONS., 2017年 4月 20日 (2017 - 04 - 20), 第1-8页</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103602671 A (中国人民解放军第四军医大学) 2014年 2月 26日 (2014 - 02 - 26) 全文</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103749388 A (中国科学技术大学) 2014年 4月 30日 (2014 - 04 - 30) 全文</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	YANG, Y.Q. 等. "Dysregulation of peritoneal cavity Bla cells and murine primary biliary cholangitis." Oncotarget., 第7卷, 第19期, 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20), 第26992-27006页	1, 7-8	PX	CN 106834449 A (东南大学) 2017年 6月 13日 (2017 - 06 - 13) 权利要求1-8	1-8	PX	QIU, F. 等. "A genome-wide association study identifies six novel risk loci for primary biliary cholangitis." NATURE COMMUNICATIONS., 2017年 4月 20日 (2017 - 04 - 20), 第1-8页	1-8	A	CN 103602671 A (中国人民解放军第四军医大学) 2014年 2月 26日 (2014 - 02 - 26) 全文	1-8	A	CN 103749388 A (中国科学技术大学) 2014年 4月 30日 (2014 - 04 - 30) 全文	1-8
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	YANG, Y.Q. 等. "Dysregulation of peritoneal cavity Bla cells and murine primary biliary cholangitis." Oncotarget., 第7卷, 第19期, 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20), 第26992-27006页	1, 7-8																		
PX	CN 106834449 A (东南大学) 2017年 6月 13日 (2017 - 06 - 13) 权利要求1-8	1-8																		
PX	QIU, F. 等. "A genome-wide association study identifies six novel risk loci for primary biliary cholangitis." NATURE COMMUNICATIONS., 2017年 4月 20日 (2017 - 04 - 20), 第1-8页	1-8																		
A	CN 103602671 A (中国人民解放军第四军医大学) 2014年 2月 26日 (2014 - 02 - 26) 全文	1-8																		
A	CN 103749388 A (中国科学技术大学) 2014年 4月 30日 (2014 - 04 - 30) 全文	1-8																		
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																				
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期																		
2017年 9月 4日		2017年 9月 28日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员																		
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		武雪梅 电话号码 (86-10)62414290																		

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2010102387 A1 (UNIVERSITY HEALTH NETWORK等) 2010年 9月 16日 (2010 - 09 - 16) 全文	1-8
A	CN 1404400 A (应用研究系统ARS股份公司等) 2003年 3月 19日 (2003 - 03 - 19) 全文	1-8
A	HIRSCHFIELD, G.M. 等. "Primary Biliary Cirrhosis Associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 Variants." The New England Journal of Medicine., 第360卷, 第24期, 2009年 5月 20日 (2009 - 05 - 20), 第2544-2555页	1-8
A	MELLS, G.F. 等. "Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis." Nature Genetics., 第43卷, 第4期, 2011年 4月 30日 (2011 - 04 - 30), 第329-332页	1-8
A	LI, Y.Y. 等. "CXCL13 Promotes Intrahepatic CXCR5+ Lymphocyte Homing and Aberrant B Cell Immune Responses in Primary Biliary Cirrhosis." Hepatology., 第61卷, 第6期, 2015年 6月 30日 (2015 - 06 - 30), 第1998 - 2007页	1-8

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐

纸件形式

☒

电子形式

b. (提交时间)

☐

含在申请提交时的国际申请中

☐

以电子形式与国际申请一起提交

☒

为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/092505

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106834449	A	2017年 6月 13日	无			
CN	103602671	A	2014年 2月 26日	无			
CN	103749388	A	2014年 4月 30日	CN	103749388	B	2015年 9月 9日
WO	2010102387	A1	2010年 9月 16日	无			
CN	1404400	A	2003年 3月 19日	CY	1111687	T1	2015年 10月 7日
				CA	2683009	A1	2001年 8月 30日
				IL	151388	A	2009年 9月 1日
				KR	20070087256	A	2007年 8月 27日
				MX	PA02008079	A	2003年 2月 27日
				BG	107018	A	2003年 9月 30日
				JP	4744763	B2	2011年 8月 10日
				TR	200202030	T2	2003年 1月 21日
				NZ	520122	A	2005年 4月 29日
				EA	005583	B1	2005年 4月 28日
				HK	1051965	A1	2007年 9月 28日
				BR	0108514	A	2002年 12月 17日
				NO	20023962	A	2002年 8月 20日
				KR	20070057282	A	2007年 6月 4日
				EA	200200890	A1	2003年 2月 27日
				SK	12082002	A3	2003年 5月 2日
				HU	0300061	A3	2005年 9月 28日
				EE	05423	B1	2011年 6月 15日
				IL	151388	D0	2003年 4月 10日
				HU	0300061	A2	2003年 4月 28日
				RS	51737	B	2011年 10月 31日
				EP	1257292	B1	2011年 4月 27日
				DK	1257292	T3	2011年 7月 18日
				EE	200200463	A	2003年 12月 15日
				AU	2001240636	B8	2005年 11月 3日
				AU	4063601	A	2001年 9月 3日
				CZ	304485	B6	2014年 5月 28日
				YU	60402	A	2005年 9月 19日
				JP	2003523403	A	2003年 8月 5日
				CZ	20022843	A3	2003年 2月 12日
				NO	331971	B1	2012年 5月 14日
				CA	2399298	A1	2001年 8月 30日
				WO	0162285	A1	2001年 8月 30日
				CN	1322897	C	2007年 6月 27日
				US	2003157094	A1	2003年 8月 21日
				AT	506959	T	2011年 5月 15日
				PT	1257292	E	2011年 7月 5日
				BG	66134	B1	2011年 6月 30日
				TR	200502508	T2	2007年 4月 24日
				SI	1257292	T1	2011年 8月 31日
				EP	1257292	A1	2002年 11月 20日
				NO	20023962	D0	2002年 8月 20日
				HR	P20020652	A2	2004年 12月 31日
				NZ	535299	A	2006年 6月 30日
				AU	2001240636	B2	2005年 10月 13日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际申请号
PCT/CN2017/092505

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		PL 206549 B1	2010年 8月 31日
		PL 357554 A1	2004年 7月 26日
		SK 288032 B6	2012年 12月 3日
		CA 2683009 C	2014年 9月 23日