

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480007035.2

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 4 月 19 日

[11] 公开号 CN 1761760A

[22] 申请日 2004.2.5

[21] 申请号 200480007035.2

[30] 优先权

[32] 2003. 2. 7 [33] DE [31] 10305213.5

[86] 国际申请 PCT/EP2004/001051 2004.2.5

[87] 国际公布 WO2004/070057 德 2004.8.19

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.15

[71] 申请人 弗洛里安·朗

地址 德国蒂宾根

[72] 发明人 弗洛里安·朗 安德勒斯·巴斯亚恩

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 刘晓东

权利要求书 3 页 说明书 17 页 序列表 29 页

[54] 发明名称

hsgk1 基因中新的多态性在诊断高血压中的用途和 sgk 基因家族在诊断和治疗长 Q/T 综合征中的用途

[57] 摘要

本发明涉及含有 hsgk 片段的单链或双链核酸在诊断高血压中的用途, 所述片段的长度至少 10 个核苷酸/碱基对, 并且所述片段包含由 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位置处的核苷酸 G 插入的存在或缺乏而产生的多态性。 本发明含涉及 sgk 家族的人同系物的过表达或功能性分子修饰与 Q/T 间期长度之间的正相关性用于诊断长 Q/T 综合征的用途, 以及 sgk 基因家族的人同系物的核酸或它的片段用于诊断长 Q/T 综合征的用途。 sgk 基因家族的人同系物中单独核苷酸的多态性(单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms = SNPs)特别可用于诊断长 Q/T 综合征的先天性倾向。 在另一方面, 本发明涉及增加 sgk 家族基因表达的功能活化剂或转录因

子在制备治疗和/或预防长 Q/T 综合征的药物中的用途。

1. 含有 SEQ ID No.1 或 SEQ ID No.2 所述核酸序列的片段的分离的单链或双链核酸用于诊断高血压的用途,其特征在于所述片段的长度是至少 10 个核苷酸/碱基对,并且所述片段包含 hsgk1 基因内含子 2 中在 732/733 位置处有或没有核苷酸 G 插入的多态性。

2. 一种定量诊断高血压的试剂盒,其中包含至少一种如权利要求 1 定义的分离的单链或双链核酸。

3. 一种定量诊断高血压的试剂盒,其中包含至少一种针对 hsgk 蛋白的区域的抗体,其特征在于 hsgk1 蛋白中所述区域的存在取决于 hsgk 编码基因的内含子 2 中 732/733 位置处核苷酸 G 插入的存在。

4. 一种诊断高血压的方法,包括下列程序步骤:

- a) 取出身体样品,
- b) 合适时,从根据 a) 的身体样品分离和/或扩增基因组 DNA、cDNA 或 mRNA,
- c) 对在 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位置处具有核苷酸 G 插入的等位基因进行定量。

5. 如权利要求 4 的方法,其特征不在于 a) 步骤的身体样品选自血液、唾液、组织和细胞组成的组。

6. 如权利要求 4 或 5 的方法,其特征不在于通过对从身体样品分离的基因组 DNA 或 cDNA 进行直接测序而在 c) 步骤中对等位基因进行定量。

7. 如权利要求 4 至 6 的方法,其特征不在于通过特异性地杂交从身体样品分离的基因组 DNA 或 cDNA 而在 c) 步骤中对等位基因进行定量。

8. 如权利要求 4 至 7 的方法,其特征在于通过 PCR 寡核苷酸延伸试验或连接试验在 c) 步骤中对等位基因定量。

9. sgk 家族的人同系物的过表达或功能性分子修饰与 Q/T 间期长度之间的正相关性用于诊断长 QT 综合征的用途。

10. 单链或双链核酸在诊断长 QT 综合征中的用途,其中所述核酸包含 sgk 家族的人同系物的序列或它的长度至少为 10 个核苷酸/碱基对的片段。

11. 如权利要求 9 或 10 的用途,其特征不在于 sgk 家族的人同系物是 hsgk1 基因。

12. 如权利要求 11 的用途,其特征不在于核酸、hsgk1 基因或它的片段具有至少 10 个核苷酸/碱基对的长度,并且所述核酸包含 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位置处有或没有核苷酸 G 插入的多态性。

13. 针对 sgk 家族中人同系物的底物的抗体的用途,该抗体针对的是含有磷酸化形式或未磷酸化形式的磷酸化位点的该人同系物表位。

14. 如权利要求 13 的用途,其特征不在于 sgk 家族中人同系物的底物是 Acc No. BAA23711 的 Nedd4-2。

15. 一种诊断长 QT 综合征的试剂盒,其中包含针对 sgk 蛋白家族的人同系物的抗体,或在严格条件下能够与 sgk 基因家族的人同系物杂交的核酸,或者组合性地包含所述抗体和核酸。

16. 如权利要求 15 的试剂盒, 其特征在于 sgk 家族的人同系物是 hsgk1 基因。

17. sgk 家族的人同系物、尤其是 hsgk1 的功能活化剂或正向转录调节剂用于降低 Q/T 间期的用途。

18. 如权利要求 17 的用途, 其特征在于功能活化剂或正向转录调节剂选自糖皮质激素、盐皮质激素、醛固酮、促性腺激素和细胞因子, 尤其是 TGF- β 。

19. 选自由糖皮质激素、盐皮质激素、醛固酮、促性腺激素和细胞因子、尤其是 TGF- β 组成之组中的物质用于制备治疗和/或预防长 Q/T 综合征的药物的用途。

20. 一种包含至少一种选自糖皮质激素、盐皮质激素、醛固酮、促性腺激素和细胞因子、尤其是 TGF- β 组成之组中的物质的药物, 其用于治疗 and/或预防长 QT 综合征。

hsgk1 基因中新的多态性在诊断高血压中的用途和 sgk 基因家族在诊断和治疗长 Q/T 综合征中的用途

本发明涉及含有 hsgk 片段的单链或双链核酸在诊断高血压中的用途，所述片段长度至少 10 个核苷酸/碱基对，此外所述片段包含由 hsgk1 基因的内含子 2 中 732/733 位的核苷酸 G 插入的存在或缺乏而产生的多态性。

此外，本发明涉及 sgk 家族的人同系物的过表达或功能性分子修饰与 Q/T 间期长度之间的正相关用于诊断长 Q/T 综合征的用途，以及 sgk 基因家族的人同系物的核酸或其一个片段用于诊断长 Q/T 综合征的用途。特别是，sgk 基因家族的人同系物中单独核苷酸的多态性(单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms)= SNPs)在本发明的情况下也可以用于诊断长 Q/T 综合征的遗传决定的倾向性。

在进一步的方面，本发明涉及增加 sgk 家族基因表达的功能活化剂或转录因子在制备治疗和/或预防长 Q/T 综合征的药物的用途。

很多胞外信号引起细胞内磷酸化/脱磷酸级联反应，以确保这些信号从胞质膜及其受体快速转移到细胞质和细胞核内。通过许多个别蛋白，尤其是激酶（它们将磷酸基转移到各自底物上），使得这些可逆信号转移级联反应的特异性成为可能。

血清和糖皮质激素依赖性激酶 (sgk) 是丝氨酸/苏氨酸激酶，血清和糖皮质激素可增加它的表达，它最初是从大鼠乳腺癌细胞克隆的 (Webster et al. , 1993)。人型 sgk，即 hsgk1 是从肝细胞克隆的 (Waldegger et al. , 1997)。据发现调节细胞容积会影响 hsgk1 的

表达。迄今仍没能证明大鼠 sgk 表达涉及对细胞容积的依赖性。此外发现该大鼠激酶刺激上皮的 Na⁺通道 (ENaC) (Chen et al., 1999; Naray-Pejes-Toth et al., 1999)。ENaC 继而在肾 Na⁺排泄中起着重要作用。ENaC 活性的增加导致钠离子的肾潴留增加, 并因此导致高血压的发展, 如 W002/074987A2 所证明的。

最后, 已经克隆了人 sgk 人家族的另两个成员, 即 hsgk2 和 hsgk3 (Kobayashi et al., 1999), 二者如同 hsgk1 一样, 均经 PI3 激酶途径被胰岛素和 IGF1 活化。电生理学实验表明 hsgk2 和 hsgk3 的共表达同样导致 ENaC 活性显著增加。

由 DE 197 08 173 A1 明显可知 hsgk1 对其中细胞容积的改变起重要作用生理作用的很多疾病有坚实的诊断潜力, 所述疾病例如高钠血症、低钠血症、糖尿病、肾功能不全、分解代谢过度、肝性脑病和微生物或病毒感染。

WO 00/62781 报道了 hsgk1 活化内皮 Na⁺通道, 从而增加肾 Na⁺再吸收。由于这种肾 Na⁺再吸收增加伴随有高血压, 因此推测在这种情况下, hsgk1 表达的增加将导致高血压, 而 hsgk1 表达的降低将最终导致低血压。

DE 100 421 37 也报道了人同系物 hsgk2 和 hsgk3 的过表达或活性过强与 ENaC 过度活化之间的相似联系, 由此导致的肾 Na⁺再吸收增加和由此发展而来的高血压。此外, 这个文件已经探讨了激酶 hsgk2 和 hsgk3 对于原发性高血压的诊断潜力。

W002/074987 A2 公开了 hsgk1 基因中各个核苷酸的两种不同多态性(单核苷酸多态性 (SNP))的存在和高血压的遗传决定的倾向性之间的关系。在这种情况下, hsgk1 基因中多态性是内含子 6 中的多态性(T

→C)和外显子8中的多态性(C→T)。尤其是,从W002/074987 A2的表5明显可知,在已经分析的两个SNPs之间存在强相关性失衡:外显子8中SNP的大多数CC携带者也是内含子6 TT携带者(即64%),而只有少数外显子8 TT携带者同时也是内含子6 CC携带者(仅仅2%)。内含子6和外显子8中多态性存在情况之间的这些相关性证实,为了证明高血压倾向,有必要分析这两种多态性(内含子6和外显子8)的基因型,这样引起极度技术投入和时间消耗。

因此本发明的目的是提供hsgk1基因中进一步的多态性,其中一种或另一种形式的存在可比外显子8和内含子6中两个已知多态性更好地与患者中高血压的表型存在相关联。尤其是,提供与高血压倾向相关、并且以一种或另一种形式的存在具有对hsgk1蛋白的功能性分子修饰后果的单一SNP将非常有利。

通过提供hsgk1基因中的新多态性完成了这个目的,其中所述多态性包括在732/733位插入核苷酸G。已经发现在732/733位具有核苷酸G插入(InsG/InsG)的个体以更高频率存在,并且发展为高血压的倾向较低。另一方面,在732/733位不具有这种插入的个体(WT/WT)更罕见存在,并且发展为高血压的倾向明显较高。根据迄今获得的结果,有关内含子2中732/733位处多态性的基因型与发展为高血压的倾向性之间的这种相关性看起来比外显子8和内含子6中多态性的相应相关性具有明显较高的显著性(见表1)。

此外,根据使用已知预测程序获得的预测,推测hsgk1基因的特定剪接变体的表达取决于在hsgk1基因内含子2中732/733位存在还是缺乏G插入。hsgk1基因的这种特定剪接变体的表达可以导致hsgk1蛋白的功能性分子修饰,引起hsgk1活性改变,尤其是hsgk1活性增加。因此,hsgk1蛋白的这种分子修饰,尤其是hsgk1活性增加的生理后果最终可以导致高血压症状的发展。

在第一个方面，本发明涉及分离的单链或双链核酸在诊断高血压中的用途，该核酸包含如 SEQ ID No.1 描述或如 SEQ ID No.2 描述的核酸序列的片段，所述片段的长度是至少 10 个核苷酸/碱基对，优选至少 15 个核苷酸/碱基对，尤其是至少 20 个核苷酸/碱基对，并且所述片段包含 hsgk1 基因的内含子 2 中在 732/733 位有或无核苷酸 G 插入的多态性。

SEQ ID No. 1 描述了这样的 hsgk1 基因组 DNA 序列，其中在 hsgk1 基因内含子 2 的 732/733 位没有核苷酸 G (或 GTP) 的插入，即所谓的“野生型 (WT)”序列，SEQ ID No. 2 描述了这样的 hsgk1 的基因组 DNA 序列，其中在 hsgk1 基因内含子 2 的 732/733 位具有核苷酸 G (或 GTP) 的插入，即所谓的“G 插入 (InsG)”序列。

在第二个方面，本本发明涉及诊断高血压的试剂盒，该试剂盒包含至少一个分离的单链或双链核酸，该核酸包含如 SEQ ID No.1 或 2 描述的序列的片段。在这一点上，来自 SEQ ID No.1 或 2 的所述片段的长度是至少 10 个核苷酸/碱基对，优选至少 15 个核苷酸/碱基对，尤其是至少 20 个核苷酸/碱基对。此外，来自 SEQ ID No.1 或 2 的所述片段应该包含 hsgk1 基因内含子 2 中在 732/733 位有或没有核苷酸 G 插入的多态性。

或者，除上述单链或双链核酸之外，或与上述单链或双链核酸相反，诊断高血压的试剂盒也可以包含至少一种抗体，该抗体针对的是 hsgk 蛋白的某一区域，hsgk1 蛋白中所述区域的存在取决于相应 hsgk 编码基因的内含子 2 中 732/733 位核苷酸 G 插入的存在。例如，如果 hsgk1 基因中 732/733 位 G 插入的存在会诱导外显子被剪接掉，那么精确地针对该被剪接掉的蛋白区域的抗体可以用来检测该个体中的多态性形式。因此，这种抗体可以用来诊断发展高血压的倾向性。

在第三个方面，本发明涉及诊断高血压的方法，该方法包括下列程序步骤：

- a) 从个体中取出身体样品，
- b) 合适时，从根据 a) 的身体样品分离和/或扩增基因组 DNA、cDNA 或 mRNA，
- c) 对在 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位具有核苷酸 G 插入的等位基因进行定量。

在 a) 步骤中，从试验个体取出身体样品，优选该个体是哺乳动物，尤其是人。在根据本发明的这个诊断方法中，优选使用的来自患者的身体样品是血液样品或唾液样品，其中包含细胞物质，并可相对不太费劲地从患者获得。然而，也可以使用同样包含细胞的其它身体样品，如组织或细胞样品等等。

在 b) 步骤中，使用标准方法 (Sambrook J. and Russell D. W. (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press) 从来自 a) 的身体样品制备 (合适时) 和/或扩增 (合适时) 基因组 DNA 或 cDNA 或 mRNA。在这一点上，有可能使用熟练技术人员熟悉的任何合适方法。合适时，也可能省却这个 DNA 分离步骤或 DNA 扩增步骤，在 c) 步骤中使用本身包括 PCR 扩增步骤的检测方法时尤其如此。

在 c) 步骤中，最后对 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位具有核苷酸 G 插入的等位基因的数量进行定量。在这一点上，具有两个 WT 等位基因的那些个体应该具有发展为高血压的倾向。可使用熟练技术人员已知的各种方法来实现有关 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位置处多态性的等位基因的定量/鉴定。下面更详细解释一些优选方法。然而，hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位具有 G 核苷酸插入的等位基因数的定量不限于下面描述的优选方法。优选地，可以通过对来自身体样品

的 DNA、优选基因组 DNA 在 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位的直接测序，鉴定关于 732/733 位置处多态性的基因型(或等位基因数量)。为了完成此，有必要使用已知测序方法，以获得具有就在 hsgk1 基因 732/733 位置处附近的序列的短寡核苷酸作为测序引物。

基于来自身体样品的基因组 DNA 与特异性杂交探针杂交的任何已知方法构成同样优选的、用于鉴定关于在 732/733 位多态性的基因型(或用于定量等位基因数量)的进一步方法。

Southern 印迹是这种杂交方法的实例。例如，如果 hsgk1 基因内含子 2 中的 732/733 位置处 G 插入的存在破坏了或形成了限制性内切核酸酶的切割位点，那么将可能使用特异性杂交探针来检测长度不同于 WT 等位基因中相应片段长度的核酸片段。这样，将可能检测针对 732/733 位置处感兴趣的多态性而言特异的基因型。

如果由于在 732/733 位存在或缺乏 G 插入，导致表达出缺乏特定外显子的其它剪接变体，则也将可能使用来自在剪接变体中丧失的外显子的特异杂交探针来检测针对感兴趣的 732/733 位置处多态性的基因型。

杂交方法的另一个实例是来自身体样品的基因组 DNA 与被标记的单链寡核苷酸杂交的方法，该寡核苷酸优选长度为 15-25 个核苷酸，并且在 732/733 位有或没有 G 插入。在非常特异的杂交条件下，该条件可以使用已知方法用实验方法试验每一单独的寡核苷酸，有可能将完全杂交的寡核苷酸与具有单一碱基错配的寡核苷酸区分开来，这样的杂交条件可使用已知方法针对每种具体的寡核苷酸而实验性地测试出来。

尤其是，鉴定关于在 732/733 位置处多态性的基因型(或对等位基

因数量进行定量)的其它优选方法是 PCR 寡核苷酸延伸试验或连接试验。

在 PCR 寡核苷酸延伸试验的情况下,将可能例如提供具有来自 SEQ ID No. 2 中片段的序列的寡核苷酸,并在其 3' 末端具有 732/733 多态性位点处的 G。当这个寡核苷酸与 WT 等位基因的样品片段(无 G 插入)杂交时,因为 3' 末端的错配,在随后的 PCR 反应中将不可能延伸以及最终扩增这个片段。另一方面,当这个寡核苷酸与 InsG 等位基因杂交时,由于寡核苷酸 3' 末端的完美碱基配对,将有可能实现延伸,并最终获得 PCR 扩增产物。

连接试验最终基于的是与 PCR 寡核苷酸延伸试验相同的原理: 只有在其末端具有确切碱基配对的那些双链核酸片段可以与另一双链核酸片段连接。因此,取决于 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位置处 G 插入的存在与否,可以显现特定的连接产物。

除根据本发明的多态性与高血压倾向的相关性之外,意外发现了根据本发明的多态性与所谓的 Q/T 间期长度之间另有一种相关性。在关于 hsgk1 基因内含子 2 中的 732/733 位置具有 WT/WT 基因型的个体中观察到比具有 InsG/InsG 基因型的个体明显较短的 Q/T 间期。杂合 (WT/InsG) 个体具有中等 Q/T 间期(见表 3)。显著延长的 Q/T 间期导致所谓的长 Q/T 综合征的发展,表现为心脏节律失调,经由心室纤颤直到心源性猝死。因此,具有 InsG/InsG 基因型的个体应该具有发展长 Q/T 综合征的倾向。

由于已经证明的 Q/T 间期长度和 hsgk1 基因的基因组成之间的正相关性,尤其是 Q/T 间期长度和 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位置处的多态性之间的正相关性,可以推测 sgk 家族的另一人类同系物的核酸同样适用于诊断长 QT 综合征。

使用 ECG 测量仪器可以检测的 Q、R 和 S 波组成评估去极化的实验值。Q/T 间期定义为使用 ECG 测量仪器检测的从 T 波传播(Q 波出现)开始至以 T 波结束为特征的去极化结束之间的时间。因此 Q/T 间期构成心脏新的兴奋状态开始和恢复到休息状态之间的流逝时间。因此，Q/T 间期的明显延长会导致心脏节律失调，并最终导致已经提及的长 Q/T 综合征。

因此，本发明也涉及利用 sgk 家族的人同系物、尤其是 hsgk1 基因的过表达或功能性分子修饰与 Q/T 间期长度之间的正相关性诊断长 QT 综合征的用途。

在“sgk 家族的人同系物”中，同系物包括功能性的分子修饰，这样，这一完整术语应理解为 sgk 家族的同系物，其已被突变而改变了相应蛋白的性质，尤其是催化性质或底物特异性。

根据本发明，Q/T 间期和 sgk 家族人同系物的遗传组成之间的正相关性暗示将可能在患者个体中存在 hsgk1、hsgk2 或 hsgk3 基因的各个突变，这些突变改变了 hsgk1、hsgk2 或 hsgk3 激酶的表达水平或功能性质，并因此导致遗传性的 Q/T 间期延长，并最终导致长 Q/T 综合征发展的倾向性。例如，这种突变可以发生在 sgk 基因位点的调节基因区或在内含子序列中。另一方面，sgk 位点的遗传组成的个体差异还可以影响基因的编码区。然后，合适时，编码区中的突变能导致相应激酶的功能改变，例如激酶的催化性质被修饰，这些被改变的性质最终也影响 Q/T 间期。因此，上述两种突变类型都可以引起 Q/T 间期延长，并因此最终导致长 Q/T 综合征发展的倾向性。

导致患者发展长 Q/T 综合征的倾向性的 sgk 家族人同系物内上述突变照例是所谓的单核苷酸多态性 (SNPs)，所述多态性位于这些同系

物的外显子区或内含子区内。在它们的较少发生的形式、即稍后称作突变形式中, hsgk 基因外显子区内的 SNPs 在合适时可以引起相应 hsgk 蛋白中的氨基酸置换, 并因此使激酶受到功能性修饰。在它们的突变形式中, 合适时, hsgk 基因的内含子区或调节序列中的 SNPs 可以引起相应激酶的表达水平的改变。然而, 如果内含子区中的 SNPs 影响不成熟 mRNA 的可变剪接, 则它们也可以引起激酶的功能改变。

本发明也涉及单链或双链核酸用于诊断发展长 Q/T 综合征的倾向性的用途, 该核酸包含 sgk 家族人同系物的序列或它的一个片段, 尤其是 hsgk1 基因本身或它的一个片段。在这一点上, 单链或双链核酸优选具有至少 10 个核苷酸/碱基对的长度。

除上述的单链或双链核酸之外, 针对 sgk 家族人同系物的底物、尤其是针对 hsgk1 的底物的某些抗体也适于诊断发展长 Q/T 综合征和高血压的倾向性。优选这些诊断性抗体针对的是 sgk 家族人同系物的表位, 尤其是 hsgk1 的表位, 其中含有处于磷酸化形式或未磷酸化形式的底物磷酸化位点。

在优选实施方案中, 泛素蛋白连接酶 Nedd4-2 (登记号 BAA23711) 被用作 sgk 家族人同系物的底物。这个泛素蛋白连接酶是被 sgk 家族的人同系物特异性磷酸化的蛋白 [Debonneville et al., Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk 1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. EMBO J., 2001; 20: 7052-7059; Snyder et al., Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na(+) channel. J. Biol. Chem. 2002, 277: 5-8]。hsgk1 的磷酸化位点具有共有序列 (R X R X X S/T), 其中 R 是精氨酸, S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, X 是任何任意氨基酸。在 Nedd4-2 (登记号 BAA23711) 中, 存在符合上述共有序列标准的两个 hsgk1 潜在磷酸化位点: 在 382 位氨基

酸位置处的丝氨酸和在 468 位氨基酸位置处的丝氨酸。

因此，用于诊断发展长 Q/T 综合征的倾向性的上述抗体优选针对的是底物 Nedd4-2，特别优选针对的是具有 hsgk1 潜在磷酸化位点的序列、即共有序列 (R X R X X S/T) 的 Nedd4-2 蛋白的区域。特别是，这些抗体针对的是包含两个潜在磷酸化位点中的至少一个（即 382 位氨基酸的丝氨酸和/或 468 位氨基酸的丝氨酸）的 Nedd4-2 蛋白区。

此外本发明涉及诊断长 Q/T 综合征或表现为 Q/T 间期延长的其它疾病的试剂盒。这种诊断长 Q/T 综合征的试剂盒优选包含针对 sgk 蛋白家族的人同系物的抗体，或者尤其是在严格条件下能够与 sgk 基因家族的人同系物杂交的核酸。该试剂盒还可以共同包含针对 sgk 蛋白家族的人同系物的抗体和在严格条件下与 sgk 基因家族的人同系物杂交的核酸。特别优选地，根据本发明的诊断长 Q/T 综合征的试剂盒还可以包含针对 hsgk1 蛋白的抗体或在严格条件下能够与 hsgk1 基因杂交的核酸。

在这一点上，在严格条件下的杂交被理解为指在相关专业文献 (Sambrook J. and Russell D.W. (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press) 中已经描述的关于杂交温度和杂交液中甲酰胺含量的那些杂交条件下进行的杂交。

特别是，该诊断试剂盒可以包含具有如 SEQ ID No. 1 或 2 所述序列的单链或双链作为杂交探针，所述核酸的长度是至少 10 个核苷酸/碱基对，并包含 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位置处的存在或缺乏核苷酸 G 插入的多态性。

特别地，根据本发明的诊断试剂盒提供了特异性地针对 hsgk1 蛋白的某些区域的抗体，其中 hsgk1 蛋白中所述区域的存在取决于 hsgk1

基因内含子 2 中 732/733 位置处 G 插入的存在。特别地, 那些区域会由于未成熟 mRNA 中存在或缺乏该 G 插入而被剪接掉, 因此在成熟 mRNA 和由它产生的蛋白中并不存在, 故而适于用作诊断性抗体所针对的免疫原性表位。相应地, 能够与取决于 732/733 位置处 G 插入而被剪接掉的这种基因区域杂交的 hsgk1 基因的核酸区域也适合用作诊断性杂交探针。

作为特异性杂交探针, 优选用于诊断长 Q/T 综合征的试剂盒还可以包括包含 hsgk1 基因中已知 SNPs、尤其是外显子 8 中的 SNP (C2617T、D240D)、内含子 6 中的 SNP (T2071C) 和/或内含子 2 中 732/733 位置处的 SNP (G 插入) 的核酸片段。

本发明上下文里已经证明的 hsgk1 基因家族内基因的遗传组成和 Q/T 间期长度之间的相关性也使得有可能治疗性地使用 sgk 家族的功能活化剂或正向转录调节剂来治疗长 Q/T 综合征和同样伴有 Q/T 间期延长的类似疾病。在这一点上, “功能活化剂”被理解为活化 sgk 家族相应激酶的生理功能的物质。“正向转录调节剂”被理解为活化 sgk 家族相应激酶的表达的物质。

因此, 本发明也涉及 sgk 家族的人同系物, 尤其是 hsgk1 的功能活化剂或正向转录调节剂用于降低 Q/T 间期、尤其是治疗和/或预防长 Q/T 综合征的用途。sgk 家族人同系物、尤其是 hsgk1 的已知功能活化剂和/或正向转录调节剂是糖皮质激素、盐皮质激素、醛固酮、促性腺激素和很多细胞因子, 尤其是 TGF- β 。

因此本发明进一步涉及选自包括糖皮质激素、盐皮质激素、醛固酮、促性腺激素和细胞因子、尤其是 TGF- β 中的物质用于制备治疗和/或预防长 Q/T 综合征的药物的用途。本发明也涉及包含选自上述物质组中的物质用于治疗和/或预防长 Q/T 综合征的药物。

通过下列实施例详细说明本发明。

实施例 1

本发明上下文里进行相关性研究，其中将不同患者(双胞胎)中 hsgk1 基因的基因型与这些患者中测定的收缩和舒张压值相比较，然后进行统计学评价。

75 对双卵性双胞胎用于相关性分析 (Busjahn et al. , J. Hypertens 1996, 14: 1195-1199; Busjahn et al., Hypertension 1997, 29: 165-170)。实验受试者都属于德裔白种人并来源于德国的不同地区。为了证实双卵性以及更多的分子遗传分析，从双胞胎对和他们的父母取血。每个实验受试者经历在先医学检查。已知无一实验受试者罹患任何慢性的医学上公认的疾病。5 分钟后，受过训练的医生使用标准水银血压计测量处于坐姿的被测试受试者血压(以 1 分钟时间间隔测量 2 次)。两次测量的平均值用作血压值。

使用双卵性双胞胎进行相关性研究的优点是他们年龄相同，并且判定外界对他们表型的影响最小 (Martin et al. , Nat Genet 1997, 17: 387-392)。

Martin et al.1997 最近描述了研究双胞胎的研究对于解释复杂遗传性疾病的重要性。

使用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增五个微卫星标记来证实双胞胎对的双卵性。在这个微卫星标记的分析中，通过 PCR 使用含有在不同人个体中高度可变的区域的特异性寡核苷酸扩增脱氧核糖核酸 (DNA) 片段。通过扩增片段大小的微小差异可以检测这些基因组区域内的高程度变异性，这样，当相应基因位点存在多样性时，在对 PCR 产物进行凝胶电泳分离后将产生双条带，即所谓的微卫星条带 (Becker et al. ,

J. Reproductive Med 1997, 42: 260-266)。

为了进行靶基因的分子遗传分析, 在 hsgk1 基因目前的情况下, 通过 PCR 扩增 hsgk1 位点邻近区域中的另外三个微卫星标记区域 (d6s472、d6s1038、d6s270), 然后与来自另一双胞胎及其父母的相应样品相比较。用这种方法有可能判定双胞胎是否具有由他们的父母遗传的、与研究中的等位基因相同或不同的等位基因。使用结构方程模型 (SEM) 模型 (Eaves et al. , Behav Genet 1996, 26: 519-525; Neale, 1997: Mx: Statistical modeling, Box 126 MCV, Richmond, VA 23298: Department of Psychiatry. 4th edition) 进行相关性分析。这个模型依据的是测试对的变量-协变量矩阵, 其以他们不具有、或具有一个或两个相同等位基因的概率为特征。关于表型的方差可分为基于所有基因的遗传背景的方差 (A)、基于靶基因的遗传背景的方差 (Q) (在这种情况下靶基因是 hsgk1 基因) 和由于外界影响造成的方差 (E)。

$$\text{VAR} = A^2 + Q^2 + E^2$$

测试对的协变量定义为三种可能的等位基因组合 IBD_0 、 IBD_1 和 IBD_2 (IBD = 血统相同; 0、1 或 2 相同的等位基因) 如下:

$$\text{COV}(IBD_0) = 0.5 A^2 \quad \text{COV}(IBD_1) = 0.5 A^2 + 0.5 Q^2 \quad \text{COV}(IBD_2) = 0.5 A^2 + Q^2$$

为了评估 hsgk1 位点的遗传组成和测试受试者的血压之间的相关性, 分别考虑和不考虑靶基因 hsgk1 的遗传变异的模型之间的差异作为 χ^2 统计量计算。对于每对和每个基因位点, 通过基于父母基因型的所谓多点模型 (MAPMAKER/SIBS; Kruglyak et al. , Am J Hum Genet 1995, 57: 439-454) 计算等位基因比率。

最近在模拟研究 (Fulker et al., Behav Gen 1996, 26: 527-532) 中证实了, 与上述 χ^2 统计量 (S.A.G.E. Statistical Analysis for Genetic Epidemiology, Release 2.2. Computer program package, Department of Epidemiology and Biostatistics, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA, 1996) 比较, 基于变量-协变量评估的分析方法的更大信息价值。为了确保 Lander 和 Kruglyak 标准 (Lander et al., Nat Genet 1995, 11: 241-246) 方面的显著相关性, 采用 $p < 0.01$ 的误差概率。

表 1 显示了这个相关性研究的结果。

表 1:

表型	最大 χ^2	p
收缩压值(平躺)	4.44	0.04
舒张压值(平躺)	14.36	0.0002
收缩压值(坐位)	5.55	0.019
舒张压值(坐位)	4.92	0.027
收缩压值(站立)	1.91	0.17
舒张压值(站立)	4.83	0.028

如从表 1 可以看出, 所确定的误差概率 p 值低, 不超过或仅仅稍微超过采用的 $p < 0.01$ 的误差概率, 这证明 hsgk1 基因位点的遗传变异和表型确定的所测血压的变异之间存在正相关。

实施例 2

已经描述了 hsgk1 基因的基因组结构 (Waldegger et al., Genomics, 51, 299 [1998]), <http://www.ensembl.org/Homo-sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515>。

为了鉴定其存在与发展高血压的倾向性相关的 SNPs, 首先研究数据库中公开的 hsgk1 基因中的 SNPs, 以确定它们是否是真实的 SNPs, 而不是简单的测序误差, 以及确定 SNPs 是否足够多态而可以构成诊断性检测高血压倾向的基础。以这种方法已经定位了涉及 T 取代 C 的外显子 8 中的 SNP rs 1057293 (<http://www.ensembl.org/Homo-sapiens/snpview?snp=1057293>;
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp-ref.cgi?type=rs&rs=1057293>) 和另一个 SNP, 其位于 hsgk1 基因中与第一个 SNP 相距正好 551bp, 在内含子 6 至外显子 7 的供体剪接位点中, 并涉及 C 取代 T。

实施例 3

从 75 对双胞胎的随机样品中取血液样品。通过 PCR 从血液样品中扩增 hsgk1 基因的基因组 DNA 后, 使用合适的测序引物直接并且完全对 hsgk1 基因的外显子和内含子 (而不是启动子区) 进行测序。当比较来源于不同测试受试者的 hsgk1 基因序列时, 注意到了内含子 2 中的又一个多态性, 由 732/733 位置处的额外核苷酸 G 插入组成。此外, 各个测试受试者的 hsgk1 基因中 732/733 位置处这个 G 插入的存在或缺乏显示与各个测试受试者中测量的血压显著相关: 平均起来, InsG/InsG 基因型显示出比 WT/WT 基因型以及杂合 WT/InsG 基因型显著降低的收缩和舒张压值 (见表 3)。相反, hsgk1 基因中的其它多态性显示出与测量血压的相关性更不显著 (例如内含子 6 (C2071T) 和外显子 8 (T2617C、D240D)) 或与测量血压无相关性 (例如内含子 3 位置 Ins 13 + xT、T1300 - 1312 和内含子 4 (C1451T) 以及内含子 7 位置 2544delA), 如表 2 所示。

同样对测试受试者测量的 ECG 值也表明由各个测试受试者测定的 Q/T 间期与所测试受试者有关 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位置处的多态性的基因型有显著相关性: 在这一点上, 具有较不常见的 WT/WT

基因型的测试受试者显示出比杂合 WT/InsG 测试受试者明显更短的 Q/T 间期，而后者显示具有比更常见的 InsG/InsG 基因型的测试受试者显著更短的 Q/T 间期(见表 3)。较长的 Q/T 间期会增加收缩性心脏节律失调、尤其是长 Q/T 综合征的危险。因此，发现 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位置处的多态性的基因型一方面和长 Q/T 综合征倾向之间是负相关，另一方面和高血压倾向性之间是负相关。每种情况下，这些相关性均可以用于高血压和长 Q/T 综合征的诊断、治疗和预防。

表 2:

SNP/DNA 号	内含子 2 insG 732^733 位	内含子 3 ins13+XT T1300^1312 位	内含子 4 C1451T	内含子 6 C2071T	内含子 7 delA 2544delA 位	外显子 8 T2617C, D240D
1899	wt/wt	ins13+XT	C/C	C/T	wt/wt	T/C
2022	wt/wt	ins13+XT	C/C	C/C	wt/wt	C/C
2094	insG/wt	ins13+XT	C/C	C/C	wt/wt	T/T
1902	insG/wt	ins13+XT	C/C	T/T	wt/wt	C/C
2041	wt/wt	ins13+XT	C/C	C/C	wt/wt	C/C
2108	insG/wt	ins13+XT	C/C	C/T	wt/wt	T/C
1921	insG/wt	ins13+XT	C/C	C/T	delA/wt	C/C
2048	insG/wt	ins13+XT	C/C	T/T	wt/wt	C/C
2115	wt/wt	ins13+XT	C/C	C/T	wt/wt	T/C
1934	insG/wt	ins13+XT	C/C	C/T	wt/wt	T/C
2049	insG/wt	ins13+XT	C/C	C/T	wt/wt	C/C
2133	insG/insG	ins13+XT	C/C	T/T	wt/wt	C/C
1944	wt/wt	ins13+XT	C/C	C/T	wt/wt	C/C
2072	insG/insG	ins13+XT	C/C	T/T	wt/wt	C/C
2159	insG/wt	ins13+XT	C/C	T/T	wt/wt	C/C
1983	wt/wt	ins13+XT	C/C	C/C	wt/wt	T/C
2076	insG/wt	ins13+XT	C/C	C/T	wt/wt	T/C
2166	wt/wt	ins13+XT	C/C	C/C	wt/wt	T/C
2011	wt/wt	ins13+XT	C/C	C/C	wt/wt	T/C
2084	insG/wt	ins13+XT	C/C	C/T	wt/wt	C/C
2278	wt/wt	ins13+XT	C/C	C/C	wt/wt	T/T
2020	insG/insG	ins13+XT	C/C	T/T	wt/wt	C/C
2085	wt/wt	ins13+XT	C/C	C/T	wt/wt	T/C
2338	insG/insG	ins13+XT	C/T	T/T	wt/wt	C/C

表 3:

测定量/基因型	wt/wt	wt/ins	ins/ins	显著性
(平均值 $\pm$ 标准误差)	n=7	n=14	n=7	
收缩压	123 $\pm$ 17	116 $\pm$ 10	117 $\pm$ 15	< 0.05
舒张压	73 $\pm$ 14	70 $\pm$ 9	72 $\pm$ 9	n. s.
Q/T 间期	403 $\pm$ 13	411 $\pm$ 17	428 $\pm$ 10	< 0.05

<110> Lang, Florian

<120> hsgk1 基因中新的多态性在诊断高血压中的用途和 sgk 基因家族在诊断和治疗长 Q/T 综合征中的用途

<130> L62136

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5704

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> 外显子

<222> (36)..(155)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (303).. (378)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (806).. (881)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (1317).. (1421)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (1526).. (1609)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (1725)..(1856)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (2106)..(2218)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (2560)..(2683)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (3141)..(3236)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (3652)..(3807)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (3915)..(4004)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (4349)..(5526)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (156)..(302)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (379)..(805)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (882)..(1316)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (1422)..(1525)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (1610)..(1724)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (1857)..(2105)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (2219)..(2559)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (2684).. (3140)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (3237).. (3651)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (3808).. (3914)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (4005).. (4348)

<223>

<220>

<221> 突变

<222> (732).. (733)

<223> 在某些基因型中在位置 732/733 处插入 G

<220>

<221> 突变

<222> (1299).. (1300)

<223> 在某些基因型中插入同型 13 x T

<220>

<221> 突变

<222> (1451).. (1451)

<223> 在某些基因型中在位置 1451 处的 C/T-交换

<220>

<221> 突变

<222> (2071).. (2071)

<223> 在某些基因型中内含子 6 的位置 2071 处的 C/T-交换

<220>

<221> 突变

<222> (2543).. (2544)

<223> 在某些基因型中在内含子 7 的位置 2543/2544 处插入 A

<220>

<221> 突变

<222> (2617).. (2617)

<223> 在某些基因型中在外显子 8 的位置 2617 处的 T/C-交换
(不导致氨基酸交换, D240D)

<400> 1

ggccgagcgc gcggcctggc gcacgatacg ccgag ccg gtc ttt gag cgc taa	53
cg ttt tct gtc tcc ccg cgg tgg tga tga cgg tga aaa ctg agg ctg	101
cta agg gca ccc tca ctt act cca gga tga ggg gca tgg tgg caa ttc	149
tca tcg gtgagtgag gaatcttgcc ggacttctgc tccaggagac gcaaagtgga	205
aattttttga aagtcgccga tcagattagt gtgtgtggcg ccgggacgtt atgaagccgt	265
ctaaacgttt ctttttttct cctccttcta tccacag ctt tca tga agc aga gga	320
gga tgg gtc tga acg act tta ttc aga aga ttg cca ata act cct atg	368
cat gca aac a gtaagttcag accggattga ggaaataact agtatagttt	418
gaatttgcca gcggtaaaca ttctcatcac ggcgtttatc gggaaggcga agactttctc	478

tggggtgggg atctcatttc tccttaaatt ctaatatatt tgacacattt taaacattaa	538
agttaatttg ctgatttggc ttgaactgga gatgtaagat aaatgggtcg tgttggccga	598
attcacgctt tctccatgag caacaatcct tatttctgta tttaatgggg tttattattt	658
tctttaactg actaatgtat tggggatatt tcagtttaaa cagtgaatta tcgggtagaa	718
gtcggtagag ccagaaactc acttttgatg ttgggtgtgcc ccctagtggc gagctggatt	778
ctaaatcgtg ccctttattc cctgcag cc ctg aag ttc agt cca tct tga aga	831
tct ccc aac ctc agg agc ctg agc tta tga atg cca acc ctt ctc ctc	879
ca gtaagttttt gtatgtgccg tgcactctgtg gagaactgta agggagtcag	931
ttagtattcc tacattaatg gattaaaata gcatttctag aaattagtat caaggcagga	991
atgcttcatt atgcataaca gtgatataaa tatttaagta ttgagtcaga gtattatttt	1051
tatttttttc ctgggcataat ttacctcaa gtgggtattt taaaaggcat atttcataaa	1111
aaggttttat ctgtctgaaa caacatgact gtgtgcagtt tccatactca ttgaaatgt	1171
gatgaaatgt agttttgaat gtttatagat gtatggatcat ttgcatcagt catttgtaga	1231
tgtaacattt tctacatcgt ttatgttata gatgtcttcc tttgaagcaa tgggtattaaa	1291

agaaattcct agccaagtcc ttctc a gca aat caa cct tgg ccc gtc gtc caa	1344
tcc tca tgc taa acc atc tga ctt tca ctt ctt gaa agt gat cgg aaa	1392
ggg cag ttt tgg aaa ggt aat ttc aaa tc tgaagatctt ttggtacact	1441
tccttcatgt cctcttttat attctccctg gatgaggatc gaaaaatgat ttttttaa	1501
tgaaatttca ggttcttcta gcaa g aca caa ggc aga aga agt gtt cta tgc	1553
agt caa agt ttt aca gaa gaa agc aat cct gaa aaa gaa aga ggt gag	1601
atg tgc tt gatggggctg gcattggcgg tagacactcc ttgaataatc	1649
ttgattctgg aatgttggg ccagttgaac atgccactaa atctgaatcg tcatttcct	1709
aggagaagca tatta t gtc gga gcg gaa tgt tct gtt gaa gaa tgt gaa	1758
gca ccc ttt cct ggt ggg cct tca ctt ctc ttt cca gac tgc tga caa	1806
att gta ctt tgt cct aga cta cat taa tgg tgg aga ggt gag cag ggg	1854
gg atagaagtca actcttagtg tctctgcaca gcctgctttg ttttagtttg	1906
agaaaaaagt ttcaaagat ttttgggtggg gagaatgtta ccagaattag catttccttc	1966
aacctgtcag gttatagtta atagattact tggggccact tcctgcagtt gttcttttgc	2026
tgtgtatgtc aaaactaatt aaattacatt gcgcaacca gaatgacttt gttctgtctc	2086

ctgcagttgt tctaccatc t cca gag gga acg ctg ctt cct gga acc acg	2136
ggc tcg ttt cta tgc tgc tga aat agc cag tgc ctt ggg cta cct gca	2184
ttc act gaa cat cgt tta tag gta agc ctg aga g ctcttcaggc	2228
taccagtttt ggtataaagg agacgtagca ctggctgttt catagggcct taaaataatt	2288
tgtgtttatt tgcaacttgg ttgctaaaa ccagatcccc tagcacgtga gctggcttga	2348
cttaagtgcc aagggggaac agccaagtag gattgtgcct aatccagaat agatgagcag	2408
aacaagggt ccttttttct tcaactacaca actacagtga acctaaatgc ctctaatacc	2468
ttagcaatta tctttaagag gatatcttat gaagtgaat taacttgtgc aactactttt	2528
ctttcacttt ttacagaga cttaaaacca g ag aat att ttg cta gat tca	2579
cag gga cac att gtc ctt act gat ttc gga ctc tgc aag gag aac att	2627
gaa cac aac agc aca aca tcc acc ttc tgt ggc acg ccg gag gta ggc	2675
gct gtc tt ggittggtgc ctggtttacc cccgccttcc aagagagaga	2723
tgtacaatca tgcacttaac taccaaaaag agtaaaactcc tctcagagac ttettaatac	2783
agttcagtgc aaataaaata catttgctgt ttgatgtagc atgagaaatc ccaagtcctt	2843
ctgttccttt actgaaaagt agctgtttgt aagtaagatc tgcatcataa aaactttcta	2903

atcctaagta agagatatca agtgccagca gtttcctaaa tgtcagtaca cataggtagc	2963
cagtcaccct caaaaagtcc agcagtttta tcaggaagga atctaaagat atctatcttc	3023
caagctggct ctgggtctct cagctttttc aaactaaatg tgtggtcgtg ggattgcttg	3083
ctttcgcagg ttctaaacgc tgtttccctg gtctgttttt cagtatctcg cacctga g	3141
gtg ctt cat aag cag cct tat gac agg act gtg gac tgg tgg tgc ctg	3189
gga gct gtc ttg tat gag atg ctg tat ggc ctg gtg agt ggc aca tt	3236
gggaaccact ggaacactgc ctgctcccta caatattgcc ttcacacagc aaaagcagct	3296
aagaggcata ttggttattt tatagttcat aagaataatc acttacctgg ttcittttgtg	3356
catttcacat ttactagat aggaccacat tgaacctgtg tgggtggtgaa aaactaccac	3416
ttattaacat ctaccccta cctccacac acacacacac aaacacacac acgggttgca	3476
aagtagacac ttaaatagca agggaaaaga aagcattgag gtggggagag tttctcaa	3536
cgagccta atttattgcc gtttatatct ttttctctac tggtaatgtg tgccatatga	3596
aacttccaat taagtctaaa gtaattttcc ctttcttca gccgcctttt tatag c	3652
cga aac aca gct gaa atg tac gac aac att ctg aac aag cct ctc cag	3700

ctg aaa cca aat att aca aat tcc gca aga cac ctc ctg gag ggc ctc	3748
ctg cag aag gac agg aca aag cgg ctc ggg gcc aag gat gac ttc gtg	3796
agt gat gtt tt cctgtcctcc tgggccggcc gggacgtgca ctagacctcc	3847
ctgcccttat tgaatgcacc tgtctaaatt aatcttgggt ttcttatcaa cagatggaga	3907
ttaagag t cat gtc ttc ttc tcc tia att aac tgg gat gat ctc att aat	3957
aag aag att act ccc cct ttt aac cca aat gtg gtg agt atc tgt ct	4004
ctcttctaag tatagagaag ccaagcgatt tattttaatt cagaattgtc tgggggaggg	4064
ttggaaggaa tacattggca gatgttttct ccataaacct gttattttac ctacatagac	4124
acatttatca attcgaagca ccaaaaggca acaagtgaac attattctta tgtttaactg	4184
tgtgtagcct tttagatatt tgtgcttgaa gtgggtgatt atggaagttg atataagact	4244
taaacttggt atttaaagcc tggtaagat ttccctgtcc tgtgtctagt gtgagttctt	4304
gacaagagtg tttttccctt cccgtcacag agtgggccca acga g cta cgg cac	4358
ttt gac ccc gag ttt acc gaa gag cct gtc ccc aac tcc att ggc aag	4406
tcc cct gac agc gtc ctc gtc aca gcc agc gtc aag gaa gct gcc gag	4454
gct ttc cta ggc ttt tcc tat gcg cct ccc acg gac tct ttc ctc tga	4502

acc ctg tta ggg ctt ggt ttt aaa gga ttt tat gtg tgt ttc cga atg	4550
ttt tag tta gcc ttt tgg tgg agc cgc cag ctg aca gga cat ctt aca	4598
aga gaa ttt gca cat ctc tgg aag ctt agc aat ctt att gca cac tgt	4646
tcg ctg gaa ttt ttt gaa gag cac att ctc ctc agt gag ctc atg agg	4694
ttt tca ttt tta ttc ttc ctt cca acg tgg tgc tat ctc tga aac gag	4742
cgt tag agt gcc gcc tta gac gga ggc agg agt ttc gtt aga aag cgg	4790
acc tgt tct aaa aaa ggt ctc ctg cag atc tgt ctg ggc tgt gat gac	4838
gaa tat tat gaa atg tgc ctt ttc tga aga gat tgt gtt agc tcc aaa	4886
gct ttt cct atc gca gtg ttt cag ttc ttt att ttc cct tgt gga tat	4934
gct gtg tga acc gtc gtg tga gtg tgg tat gcc tga tca cag atg gat	4982
ttt gtt ata agc atc aat gtg aca ctt gca gga cac tac aac gtg gga	5030
cat tgt ttg ttt ctt cca tat ttg gaa gat aaa ttt atg tgt aga ctt	5078
ttt tgt aag ata cgg tta ata act aaa att tat tga aat ggt ctt gca	5126
atg act cgt att cag atg cct aaa gaa agc att gct gct aca aat att	5174
tct att ttt aga aag ggt ttt tat gga cca atg ccc cag ttg tca gtc	5222

aga gcc gtt ggt gtt ttt cat tgt tta aaa tgt cac ctg taa aat ggg	5270
cat tat tta tgt ttt ttt ttt tgc att cct gat aat tgt atg tat tgt	5318
ata aag aac gtc tgt aca ttg ggt tat aac act agt ata ttt aaa ctt	5366
aca ggc tta ttt gta atg taa acc acc att tta atg tac tgt aat taa	5414
cat ggt tat aat acg tac aat cct tcc ctc atc cca tca cac aac ttt	5462
ttt tgt gtg tga taa act gat ttt ggt ttg caa taa aac ctt gaa aaa	5510
tat tta cat ata ttg t gtc atgtgtt attttgtata ttttggttaa gggggtaac	5566
atgggttagt ttaaaattga aaaccatgaa aatcctgctg taatttcctg cttagtgggt	5626
tgctccaaca gcagtgggtt ctgactccag ggagtatagg atggcctaag ccaccacgtc	5686
caggccttta gcagcatt	5704

<210> 2

<211> 5701

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> 外显子

<222> (36)..(155)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (303)..(378)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (807)..(882)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (1318)..(1422)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (1527).. (1610)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (1726).. (1857)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (2107).. (2219)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (2561).. (2684)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (3142).. (3237)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (3653)..(3808)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (3916)..(4005)

<223>

<220>

<221> 外显子

<222> (4350)..(5527)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (156)..(302)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (379)..(806)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (883)..(1317)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (1423)..(1526)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (1611)..(1725)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (1858)..(2106)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (2220)..(2560)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (2685)..(3141)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (3238)..(3652)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (3809)..(3915)

<223>

<220>

<221> 内含子

<222> (4006)..(4349)

<223>

<220>

<221> 突变

<222> (733)..(733)

<223> 在某些基因型中在位置 733 处缺失核苷酸 G

<220>

<221> 突变

<222> (1300)..(1301)

<223> 在某些基因型中同型插入 13 x T

<220>

<221> 突变

<222> (1452)..(1452)

<223> 在某些基因型中在位置 1452 处的 C/T-交换

<220>

<221> 突变

<222> (2072).. (2072)

<223> 在某些基因型中在内含子 6 的位置 2072 处的 C/T 交换

<220>

<221> 突变

<222> (2544).. (2545)

<223> 在某些基因型中在内含子 7 的位置 2544/2545 处插入 A

<220>

<221> 突变

<222> (2618).. (2618)

<223> 在某些基因型中在外显子 8 的位置 2618 处的 T/C 交换
(不导致氨基酸交换, D240D)

<400> 2

ggccgagcgc gcgccctggc gcacgatacg ccgag ccg gtc ttt gag cgc taa 53

cgt ctt tct gtc tcc ccg cgg tgg tga tga cgg tga aaa ctg agg ctg 101

cta agg gca ccc tca ctt act cca gga tga ggg gca tgg tgg caa ttc 149

tca tcg gtgagtgcag gaatcttgcg ggacttctgc tccaggagac gcaaagtgga 205

aattttttga aagtcccgga tcagattagt gtgtgtggcg ccgggacgtt atgaagccgt 265

ctaaacgttt ctttatttct cctccttcta tccacag ctt tca tga agc aga gga 320

gga tgg gtc tga acg act tta ttc aga aga ttg cca ata act cct atg	368
cat gca aac a gtaagttcag accggattga ggaaataact agtatagttt	418
gaatttgcca gcggtaaaca ttctcatcac ggcgtttatc gggaaggcga agacttcttc	478
tggggtgggg atctcatttc tccttaaatt ctaatatatt tgacacattt taaacattaa	538
agttaatttg ctgatttggc ttgaactgga gatgtaagat aaatggttcg tgttggccga	598
attcacgctt tctccatgag caacaatcct tatttctgta tttaatgggg tttattattt	658
tctttaactg actaatgtat tggggtattt tcagtttaaa cagtgaatta tcgggtagaa	718
gtcggtagag ccaggaaact cacttttgat gttggtgtgc cccctagtgg cgagctggat	778
tctaaatcgt gccctttatt ccctgcag cc ctg aag ttc agt cca tct tga	829
aga tct ccc aac ctc agg agc ctg agc tta tga atg cca acc ctt ctc	877
ctc ca gtaagttttt gtatgtgccg tgcactctgtg gagaactgta agggagtcag	932
ttagtattcc tacattaatg gattaaaata gcatttctag aaattagtat caaggcagga	992
atgcttcatt atgcataaca gtgatataaa tatttaagta ttgagtcaga gtattatttt	1052
tatttttttc ctgggcatat ttacctcaa gtggttattt taaaaggcat atttcataaa	1112

aaggttttat ctgtctgaaa caacatgact gtgtgcagtt tccataactca ttgaaatgt	1172
gatgaaatgt agttttgaat gtttatagat gtatggtcac ttgcatcagt cattttaga	1232
tgtaacattt tctacatcgt ttatgttata gatgtcttcc ttggaagcaa tggattataa	1292
agaaattcct agccaagtcc ttctc a gca aat caa cct tgg ccc gtc gtc caa	1345
tcc tca tgc taa acc atc tga ctt tca ctt ctt gaa agt gat cgg aaa	1393
ggg cag ttt tgg aaa ggt aat ttc aaa tc tgaagatctt ttggtacact	1442
tccttcacgt cctcttttat attctccctg gatgaggatc gaaaaatgat ttttttaaat	1502
tgaaatttca ggttcttcta gcaa g aca caa ggc aga aga agt gtt cta tgc	1554
agt caa agt ttt aca gaa gaa agc aat cct gaa aaa gaa aga ggt gag	1602
atg tgc tt gatggggctg gcattggcgg tagacactcc ttgaataatc	1650
ttgattctgg aatgttggg ccagttgaac atgccactaa atctgaatcg tcattttcct	1710
aggagaagca tatta t gtc gga gcg gaa tgt tct gtt gaa gaa tgt gaa	1759
gca ccc ttt cct ggt ggg cct tca ctt ctc ttt cca gac tgc tga caa	1807
att gta ctt tgt cct aga cta cat taa tgg tgg aga ggt gag cag ggg	1855
gg atagaagtca actcttagtg tctctgcaca gcctgctttg ttttagtttg	1907

agaaaaaagt tticaaagat ttttggtggg gagaatgtta ccagaattag catttccttc	1967
aacctgtcag gttatagtta atagattact tggggccact tcctgcagtt gttcttttgc	2027
tgtgtatgtc aaaactaatt aaattacatt gcgcaacca gaatgacttt gttctgtctc	2087
ctgcagttgt tctaccatc t cca gag gga acg ctg ctt cct gga acc acg	2137
ggc tcg ttt cta tgc tgc tga aat agc cag tgc ctt ggg cta cct gca	2185
ttc act gaa cat cgt tta tag gta agc ctg aga g ctcttcaggc	2229
taccagtttt ggtataaagg agacgtagca ctggctgttt catagggcct taaaataatt	2289
tgtgtttatt tgcaacttgg ttcgctaaaa ccagatcccc tagcacgtga gctggcttga	2349
cittaagtgcc aagggggaac agccaagtag gattgtgcct aatccagaat agatgagcag	2409
aacaagggt ctttttttct tcaactacaca actacagtga acctaaatgc ctctaatacc	2469
ttagcaatta tctttaagag gatattctat gaagtgaat taacttgtgc aactactttt	2529
ctttcacttt ttacagaga cttaaaacca g ag aat att ttg cta gat tca	2580
cag gga cac att gtc ctt act gat ttc gga ctc tgc aag gag aac att	2628
gaa cac aac agc aca aca tcc acc ttc tgt ggc acg ccg gag gta ggc	2676
gct gtc tt gggttggtgc ctggtttacc cccgccttc aagagagaga	2724

tgtacaatca tgcacttaac taccaaaaag agtaaaactcc tctcagagac ttcttaatac	2784
agttcagtc aaataaaata catttgctgt ttgatgtagc atgagaaatc ccaagtcctt	2844
ctgttccttt actgaaaagt agctgtttgt aagtaagatc tgcatacataa aaactttcta	2904
atcctaagta agagatatca agtgccagca gtttcctaaa tgtcagtaca cataggtagc	2964
cagtcaccct caaaaagtcc agcagtttta tcaggaagga atctaaagat atctatcttc	3024
caagctggct ctgggtctct cagctttttc aaactaaatg tgtggtcgtg ggattgcttg	3084
ctttgcagg ttctaaacgc tgtttccctg gtctgttttt cagtatctcg cacctga g	3142
gtg ctt cat aag cag cct tat gac agg act gtg gac tgg tgg tgc ctg	3190
gga gct gtc ttg tat gag atg ctg tat ggc ctg gtg agt ggc aca tt	3237
gggaaccact ggaacactgc ctgctcccta caatattgcc ttcacacagc aaaagcagct	3297
aagaggcata ttggttattt tatagtteat aagaataatc acttacctgg ttcttttgtg	3357
catttcacat ttactagat aggaccacat tgaacctgtg tgggtgtgaa aaactaccac	3417
ttattaacat ctacccccta ccctccacac acacacacac aaacacacac acgggttgca	3477
aagtagacac ttaaatagca agggaaaaga aagcattgag gtggggagag tttctcaaat	3537

cgagcctaatt atttattgcc gtttatatct ttttctctac tggtaatgtg tgccatatga	3597
aacttccaat taagtctaaa gtaattttcc ctttctttca gccgcctttt tatag c	3653
cga aac aca gct gaa atg tac gac aac att ctg aac aag cct ctc cag	3701
ctg aaa cca aat att aca aat tcc gca aga cac ctc ctg gag ggc ctc	3749
ctg cag aag gac agg aca aag cgg ctc ggg gcc aag gat gac ttc gtg	3797
agt gat gtt tt cctgtcctcc tgggccggcc gggacgtgca ctagacctcc	3848
ctgcccttat tgaatgcacc tgtctaaatt aatcttgggt ttcttatcaa cagatggaga	3908
ttaagag t cat gtc ttc ttc tcc tta att aac tgg gat gat ctc att aat	3958
aag aag att act ccc cct ttt aac cca aat gtg gtg agt atc tgt ct	4005
ctcttctaag tatagagaag ccaagcgatt tattttaatt cagaattgtc tgggggaggg	4065
ttggaaggaa tacattggca gatgttttct ccataaacct gttattttac ctacatagac	4125
acatttatca attcgaagca ccaaaaggca acaagtgaac attattctta tgtttaactg	4185
tgtgtagcct ttgagattt tgtgcttgaa gtgggtgatt atggaagtig atataagact	4245
taaacttgggt atttaaagcc tggtaagat ttccctgtcc tgtgtctagt gtgagttctt	4305
gacaagagtg tttttccctt cccgtcacag agtgggcca acga g cta cgg cac	4359

ttt gac ccc gag ttt acc gaa gag cct gtc ccc aac tcc att ggc aag	4407
tcc cct gac agc gtc ctc gtc aca gcc agc gtc aag gaa gct gcc gag	4455
gct ttc cta ggc ttt tcc tat gcg cct ccc acg gac tct ttc ctc tga	4503
acc ctg tta ggg ctt ggt ttt aaa gga ttt tat gtg tgt ttc cga atg	4551
ttt tag tta gcc ttt tgg tgg agc cgc cag ctg aca gga cat ctt aca	4599
aga gaa ttt gca cat ctc tgg aag ctt agc aat ctt att gca cac tgt	4647
tcg ctg gaa ttt ttt gaa gag cac att ctc ctc agt gag ctc atg agg	4695
ttt tca ttt tta ttc ttc ctt cca acg tgg tgc tat ctc tga aac gag	4743
cgt tag agt gcc gcc tta gac gga ggc agg agt ttc gtt aga aag cgg	4791
acc tgt tct aaa aaa ggt ctc ctg cag atc tgt ctg ggc tgt gat gac	4839
gaa tat tat gaa atg tgc ctt ttc tga aga gat tgt gtt agc tcc aaa	4887
gct ttt cct atc gca gtg ttt cag ttc ttt att ttc cct tgt gga tat	4935
gct gtg tga acc gtc gtg tga gtg tgg tat gcc tga tca cag atg gat	4983
ttt gtt ata agc atc aat gtg aca ctt gca gga cac tac aac gtg gga	5031
cat tgt ttg ttt ctt cca tat ttg gaa gat aaa ttt atg tgt aga ctt	5079

ttt tgt aag ata cgg tta ata act aaa att tat tga aat ggt ctt gca	5127
atg act cgt att cag atg cct aaa gaa agc att gct gct aca aat att	5175
tct att ttt aga aag ggt ttt tat gga cca atg ccc cag ttg tca gtc	5223
aga gcc gtt ggt gtt ttt cat tgt tta aaa tgt cac ctg taa aat ggg	5271
cat tat tta tgt ttt ttt ttt tgc att cct gat aat tgt atg tat tgt	5319
ata aag aac gtc tgt aca ttg ggt tat aac act agt ata ttt aaa ctt	5367
aca ggc tta ttt gta atg taa acc acc att tta atg tac tgt aat taa	5415
cat ggt tat aat acg tac aat cct tcc ctc atc cca tca cac aac ttt	5463
ttt tgt gtg tga taa act gat ttt ggt ttg caa taa aac ctt gaa aaa	5511
tat tta cat ata ttg t gtc atgtgtt attttgtata ttttggttaa gggggtaatc	5567
atgggttagt ttaaaattga aaacatgaa aatcctgctg taatttcctg cttagtggtt	5627
tgctccaaca gcagtggttt ctgactccag ggagtatagg atggcttaag ccaccacgtc	5687
caggccttta gcag	5701