

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C07H 21/04 C12P 19/34



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03102037.2

[43] 公开日 2004 年 8 月 18 日

[11] 公开号 CN 1521268A

[22] 申请日 2003.1.27 [21] 申请号 03102037.2

[71] 申请人 北京诺赛基因组研究中心有限公司
地址 100176 北京市经济技术开发区永昌北路 3 号 707

[72] 发明人 吴希如 沈 岩 陈育才 吴沪生
许克铭 潘 虹 张月华 刘晓燕
吕建军 姜玉武

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司
代理人 黄 健

权利要求书 3 页 说明书 17 页 附图 7 页

[54] 发明名称 检测儿童失神癫痫主效基因 CACNA1H 突变基因的方法及 CACNA1H 突变基因

[57] 摘要

本发明涉及一种检测儿童失神癫痫主效基因之一 CACNA1H 突变基因的方法，所述方法为直接测序法或限制内切酶法。本发明同时涉及 CACNA1H 突变基因。本发明进一步涉及检测上述突变基因的试剂盒及应用。另外，本发明还涉及上述检测方法和突变基因的应用。本发明将 CACNA1H 基因与儿童失神癫痫的药物疗法联系起来，为此病的药物疗法提供了新的靶点，同时也为儿童失神癫痫和其他类型的特发性全身性癫痫以及与 CACNA1H 基因相关的其他系统疾病的新药研发奠定了基础。

ISSN 1008-4274

1、一种检测儿童失神癫痫主效基因之一 CACNA1H 突变基因的方法，其中该方法为直接测序法或限制内切酶法。

2、如权利要求 1 所述 CACNA1H 突变基因的检测方法，其中所述 CACNA1H 突变基因的至少一个突变位点定位于结构域 I 跨膜区 2 和 3、结构域 I 跨膜区 S5 同核心区连接处、结构域 II 跨膜区 2、结构域 I 和 II 的连接部或结构域 III 跨膜区 S5 同核心区连接处。

3、如权利要求 2 所述 CACNA1H 突变基因的检测方法，其中所述 CACNA1H 突变基因的至少一个突变位点位于 C562A、G923A、T1445A、G1574A、C2022T、G2310A、C2322T、G2397A、G2429A、G2570A、G2621A、G4466A。

4、如权利要求 3 所述的 CACNA1H 突变基因的检测方法，其中所述 CACNA1H 突变基因的至少一个突变位点位于 C562A、G923A、G2570A、G2621A、T1445A、G4466A。

5、如权利要求 1-4 任一权利要求所述的 CACNA1H 突变基因的检测方法，其特征在于包括如下步骤：

A: 对 CACNA1H 基因的 35 个外显子设计 PCR 引物，进行 PCR 扩增；

B: PCR 反应产物经纯化后直接测序，将所得到的序列与 Genbank 中的序列比较，确定 CACNA1H 基因的突变位点。

6、如权利要求 5 所述 CACNA1H 突变基因的检测方法，其特征在于进一步包括如下步骤：

C: 按正常读码框架进行翻译以确定 CACNA1H 基因的突变位点。

7、如权利要求 1-4 任一权利要求所述的 CACNA1H 突变基因的检测方法，其特征在于，包括如下步骤：

A: 提取 DNA，在突变位点附近设计 PCR 引物，进行 PCR 反应；

B: PCR 反应产物经纯化后直接测序, 将所得到的序列与 Genbank 中的序列比较确定突变位点。

8、如权利要求 7 所述 CACNA1H 突变基因的检测方法, 其特征在于进一步包括如下步骤:

5 C: 按正常读码框架进行翻译以确定 CACNA1H 基因的突变位点。

9、一种儿童失神癫痫主效基因之一 CACNA1H 突变基因, 其含有 T-型钙通道基因 CACNA1H 序列, 并且至少一个突变位点定位于结构域 I 跨膜区 2 和 3、结构域 I 跨膜区 S5 同核心区连接处、结构域 II 跨膜区 2、结构域 I 和 II 的连接部、结构域 III 跨膜区 S5 同核心区连接处。

10 10、如权利要求 9 所述 CACNA1H 突变基因, 其中所述 CACNA1H 序列的至少一个突变位点位于 C562A、G923A、T1445A、G1574A、C2022T、G2310A、C2322T、G2397A、G2429A、G2570A、G2621A、G4466A。

11、如权利要求 10 所述的 CACNA1H 突变基因, 其中所述 CACNA1H 序列的至少一个突变位点位于 C562A、G923A、G2570A、G2621A、T1445A、
15 G4466A。

12、一种检测儿童失神癫痫主效基因之一 CACNA1H 突变基因的试剂盒, 其包括: 扩增用引物, dNTP, 用于 PCR 反应的 DNA 聚合酶及其缓冲液的一种或多种。

13、一种检测儿童失神癫痫主效基因之一 CACNA1H 突变基因的试剂盒,
20 其包括:

- 1) 扩增突变位点的引物;
- 2) PCR 扩增酶及相应缓冲液;
- 3) 酶切不同突变位点相应的限制内切酶;
- 4) 不同的突变位点酶切图谱。

14、如权利要求 12 或 13 所述的试剂盒在儿童失神癫痫检测和 / 或治疗方法中的应用。

15、权利要求 1-8 任一项所述的 CACNA1H 突变基因检测方法在儿童失神癫痫检测和 / 或治疗方法中的应用。

5 16、权利要求 9-11 任一项所述的突变基因在儿童失神癫痫检测和 / 或治疗方法中的应用。

检测儿童失神癫痫主效基因 CACNA1H 突变基因的方法及 CACNA1H 突变基因

5 发明领域

本发明涉及一种检测儿童失神癫痫突变基因的方法及其突变基因。更具体地说，本发明涉及一种检测儿童失神癫痫主效基因之一 CACNA1H 突变基因的方法及 CACNA1H 突变基因。本发明进一步涉及检测上述突变基因的试剂盒，以及该试剂盒的应用。另外，本发明还涉及上述检测方法和突变基因在儿童失神癫痫的检测和/或治疗方法中的应用。

背景技术

儿童失神癫痫 (childhood absence epilepsy, CAE) 是特发性全身性癫痫的一种，约占小儿癫痫的 5% - 15%，女孩受累多于男孩，发病年龄 3 - 12 岁多见，发病高峰年龄为 6 - 7 岁。临床表现为突然发生的意识丧失，但不跌倒，两眼凝视前方，停止正在进行的动作，持续数秒至 1 - 2 分钟后意识恢复，继续原来的活动，发作后无嗜睡或精神恍惚，发作频繁，每天数次甚至百余次。发作时脑电图表现为双侧对称弥漫性、同步高波幅 3Hz 棘慢波，持续 10 秒左右。棘慢波开始时较快，为 3.5 - 4Hz，中间为 3Hz，结束时可以慢到 2.5 - 2Hz。发作间期背景波正常，过度换气可诱发。失神发作频繁会影响学习，失神发作如未能及时控制或停药过早，40%可合并全身强直-阵挛发作，严重影响患者的学习和生活，给家庭和社会带来严重的经济负担。儿童失神癫痫 (CAE) 是特发性全身性癫痫的常见类型，有显著的遗传倾向，目前认为该病是一种复杂遗传病，发病机制十分复杂，其致病基因未明。

T-型钙通道的核苷酸序列同其它类型的钙通道不同，但其结构同其它类型的钙通道一样，也是由四个重复的结构域（I-IV）组成，每个域由6个跨膜区（S1-6）组成，表现为短暂、易于失活、易于被低电压激活的功能特性，在丘脑皮层节律性振荡的产生起了一个关键的作用。

- 5 至今为止，已有三种编码 T-型钙通道的基因家族已被克隆，它们是 CACNA1G, CACNA1H, CACNA1I。CACNA1H 定位在染色体 16p13.3，编码 alpha 1h 亚单位，由 35 个外显子组成，CACNA1H 基因在心脏，脑，肾脏广泛表达。尽管 CACNA1H 基因（genbank 登记号 AF051946）作为编码 T-型钙通道的基因家族成员之一已经克隆，但是其功能和疾病的联系尚未见报道，
- 10 至今还没有利用 CACNA1H 基因来研究儿童失神癫痫的报道。

发明内容

- 发明人从众多候选基因中选取 T-型钙通道基因 CACNA1H 作为研究对象，通过大量的实验，大样本的统计分析，在 118 名中国北方汉族 CAE 患
- 15 儿中对 CACNA1H 基因的 35 个外显子进行了直接测序，在 14 名 CAE 患儿中找到了 12 个不同的错义突变位点，进一步得到了突变的 CACNA1H 基因，其中两个突变位点均在两个不同的 CAE 患儿中出现，而 230 名正常对照均未发现上述突变，说明这些突变不是良性多态。其中，两个突变发生在跨膜区，六个突变位点高度保守。从而本发明找到了儿童失神癫痫的主效基
- 20 因之一。

本发明提供了一种检测儿童失神癫痫的主效基因之一 CACNA1H 突变基因的方法，该方法为直接测序法或限制酶内切法。

本发明还提供了儿童失神癫痫的主效基因之一 CACNA1H 突变基因。

- 本发明进一步提供了一种检测儿童失神癫痫的主效基因之一 CACNA1H
- 25 突变基因的试剂盒以及上述试剂盒在儿童失神癫痫检测和 / 或治疗方法中的应用。

本发明还提供了上述检测方法和突变基因在儿童失神癫痫检测和/或治疗方法中的应用。

根据本发明的一个方面,本发明提供了一种检测儿童失神癫痫的主效基因之一CACNA1H基因突变的方法,该方法为直接测序法或限制酶内切法。

5 优选直接测序法,具体的说,包括如下步骤:

A: 对CACNA1H基因的35个外显子设计PCR引物,进行PCR扩增;

B: PCR反应产物经纯化后直接测序,将所得到的序列与Genbank中的序列比较,确定CACNA1H基因的突变位点。

如实施例3所述,可以于基因水平直接确定基因的突变,还可进一步
10 按正常读码框架进行翻译后于蛋白质水平确定,包括如下步骤:

C: 按正常读码框架进行翻译以确定CACNA1H基因的突变位点。

另一方面,本发明提供了另一种检测儿童失神癫痫的主效基因之一CACNA1H的突变位点的方法,包括如下步骤:

A: 提取DNA,在突变位点附近设计PCR引物,进行PCR反应;

15 B: PCR反应产物经纯化后直接测序,将所得到的序列与Genbank中的序列比较确定突变位点。

如实施例3所述,可以于基因水平直接测定基因的突变,还可进一步按正常读码框架进行翻译后于蛋白质水平测定,包括如下步骤:

C: 按正常读码框架进行翻译以确定CACNA1H基因的突变位点。

20 优选突变位点定位于结构域I跨膜区2和3(I S2-I S3)、结构域II跨膜区2(II S2)、结构域I和II的连接部(linker I-II)、结构域I跨膜区S5同核心区连接处(IS5-SS1)或结构域III跨膜区S5同核心区连接处(IIIS5-SS1)。更优选其核苷酸突变位点至少位于C562A(氨基酸突变F161L)、G923A(氨基酸突变E282K)、T1445A(氨基酸突变C456S)、G1574A
25 (氨基酸突变G499S)、C2022T(氨基酸突变P648L)、G2310A(氨基酸突变R744Q)、C2322T(氨基酸突变A748V)、G2397A(氨基酸突变G773D)、G2429A

(氨基酸突变 G784S)、G2570A(氨基酸突变 V831M)、G2621A (氨基酸突变 G848S)、G4466A (氨基酸突变 D1463N)。最优选突变位点位于结构域 I 跨膜区 2 和 3 (I S2- I S3) 的突变 C562A (氨基酸突变 F161L)、结构域 I 跨膜区 S5 同核心区连接处 (IS5-SS1) 的突变 G923A(氨基酸突变 E282K)、
5 结构域 II 跨膜区 2(II S2) 的突变 G2570A(氨基酸突变 V831M) 和 G2621A (氨基酸突变 G848S)、结构域 I 和 II 的连接部(linker I-II) 的突变 T1445A(氨基酸突变 C456S) 以及结构域 III 跨膜区 S5 同核心区连接处 (IIIS5-SS1) 的突变 G4466A (氨基酸突变 D1463N)。

根据本发明的另一个方面, 通过本发明的直接测序方法, 在 CAE 患儿
10 中找到了 12 个不同的错义突变位点(如表 3 所示), 并进一步得到了突变的 CACNA1H 基因, 其中突变位点 R744Q 和 G773D 均在两个不同的 CAE 患儿中出现, 而 230 名正常对照均未发现上述突变, 说明这些突变不是良性多态。两个突变发生在跨膜区, 六个突变位点高度保守。从而本发明找到了儿童失神癫痫的主效基因之一 CACNA1H 突变基因, 其含有 T-型钙通道
15 基因 CACNA1H 序列, 并且至少一个突变位点定位于结构域 I 跨膜区 2 和 3 (I S2- I S3)、结构域 I 跨膜区 S5 同核心区连接处 (IS5-SS1)、结构域 II 跨膜区 2 (II S2)、结构域 I 和 II 的连接部 (linker I-II)、结构域 III 跨膜区 S5 同核心区连接处 (IIIS5-SS1)。优选其至少一个突变位点位于 CACNA1H 序列的 C562A(氨基酸突变 F161L)、G923A(氨基酸突变 E282K)、
20 T1445A(氨基酸突变 C456S)、G1574A (氨基酸突变 G499S)、C2022T (氨基酸突变 P648L)、G2310A (氨基酸突变 R744Q)、C2322T (氨基酸突变 A748V)、G2397A (氨基酸突变 G773D)、G2429A (氨基酸突变 G784S)、G2570A(氨基酸突变 V831M)、G2621A (氨基酸突变 G848S)、G4466A (氨基酸突变 D1463N) 其中之一。更优选至少一个突变位点位于结构域 I 跨膜区 2 和 3 (I S2- I
25 S3) 的突变 C562A (氨基酸突变 F161L)、结构域 I 跨膜区 S5 同核心区连接处 (IS5-SS1) 的突变 G923A(氨基酸突变 E282K)、结构域 II 跨膜区 2(II S2)

的突变 G2570A(氨基酸突变 V831M)和 G2621A (氨基酸突变 G848S)、结构域 I 和 II 的连接部 (linker I-II) 的突变 T1445A(氨基酸突变 C456S) 以及结构域 III 跨膜区 S5 同核心区连接处 (IIIS5-SS1) 的突变 G4466A (氨基酸突变 D1463N)。

5 本发明还提供了一种检测儿童失神癫痫的主效基因之一 CACNA1H 突变基因的试剂盒, 其内装有一个或多个容器, 容器内装有用以检测 CACNA1H 突变基因的一种或多种组分。按照检测方法及检测位点的不同, 试剂盒可含有不同组分。与之同时提供的可以是经政府药物管理机构审核的、有关药品或生物制品制造、使用及销售的信息。例如, 采用 PCR 扩增后 (参见
10 实施例 1), 直接检测样品中 CACNA1H 突变位点的试剂盒, 可含有如表 1 所示的扩增用引物, dNTP, 用于 PCR 反应的 DNA 聚合酶及其缓冲液等的一种或多种。本领域技术人员已知, 以上的组分仅是示意性的, 例如, 所述的引物可以依据已知的核苷酸序列设计, 通常为 15-30 个碱基, GC 含量为 45%-50%左右, 在适当的温度下与模板特异性结合, 其可以利用专门的
15 计算机程序设计, 例如 (OLIGO 4.06 引物分析软件, Primer 3 software); 所述的用于 PCR 反应的 DNA 聚合酶可以是 TaqDNA 聚合酶, 例如, Hotstar Taq 酶, Klenow 片段, Tth DNA 聚合酶, VENT DNA 聚合酶等能够用于 PCR 扩增的酶。

并说明使用方法如下:

20 1) PCR 扩增

用软件 Primer 3 对 CACNA1H 基因 35 个外显子设计 PCR 引物, 共 35 对引物 (表 1)。反应条件为 94℃变性 30 秒, 63℃退火 60 秒, 72℃延伸 110 秒, 前 15 个循环退火温度每次递减 0.5℃, 后 25 个循环退火温度固定为 56℃ 30 秒, 72℃延伸 40 秒。最后 72℃ 延伸 10 分钟。

25 2) PCR 产物的纯化

将含有 PCR 产物的 MultiScreen-PCR 板抽真空, 加入去离子水, 静置,

随后将 MultiScreen-PCR 板置于混合器上震荡，纯化后的 PCR 产物重新溶解后至另一洁净 96 孔板中。

3) 测序反应及验证

以 PCR 引物作为测序引物进行测序反应，在 Perkin Elmer 9700 热循环仪上进行测序反应。反应结束后，延伸产物上样于 ABI PRISM 3700 DNA 分析仪。将所得到的序列图谱进行分析，凡有杂合双峰处，说明该位点为杂合状态，需进一步验证，首先用另一侧 PCR 引物作为测序引物进行测序反应，如结果证实该位点为突变位点，再将该患儿父母的 DNA 进行该基因位点的测序反应，结果发现所有的突变均在患儿父母双亲之一出现，均为杂合突变。然后在 230 名正常对照进行该基因所有的突变位点的测序反应，结果没有发现任何突变位点。该试剂盒可简便快捷地检测儿童失神癫痫主效基因 CACNA1H 突变基因，从而应用于儿童失神癫痫检测和 / 或治疗方法中。

另外，也可直接针对某个或某些突变位点设计引物，例如可含有如表 1 所示的引物的一种或多种，dNTP，用于 PCR 反应的 DNA 聚合酶及其缓冲液等的一种或多种。进行 PCR 扩增、纯化和测序，从而制备包含扩增该突变位点的引物的试剂盒。

本发明的试剂盒还可以利用限制内切酶的方法制备，例如本发明的试剂盒可包括：

- 1) 扩增突变位点的引物；
- 2) PCR 扩增酶及相应缓冲液；
- 3) 酶切不同突变位点相应的限制内切酶；
- 4) 不同的突变位点酶切图谱。

本领域普通技术人员已知，对于不同的突变位点，上述引物和限制内切酶可以有利于检测为标准，有针对性设计；方法包括先 PCR 扩增来自病人的血 DNA 样本，然后酶切 PCR 产物，并同试剂盒酶切图谱比较等步骤。

本发明还提供了 CACNA1H 突变基因检测方法在儿童失神癫痫检测和 / 或治疗方法中的应用以及突变的 CACNA1H 基因在儿童失神癫痫检测和 / 或治疗方法中的应用。例如, 由于本发明证实 CACNA1H 基因是失神癫痫的主效基因, 尤其突变集中在 linker I-II 之间, 从而将 CACNA1H 基因与儿童失神癫痫的药物治疗联系起来, 为此病的药物治疗提供了新的靶点。今后可以研究相应的药物如寻找某些作用于这些位点的因子来治疗癫痫, 同时为儿童失神癫痫的新药研发提供了理论根据。

最后, 本发明也为其他类型的特发性癫痫的发病机制及易感基因的研究开辟了新的思路。例如, CACNA1H 基因其他位点突变可能引起特发性癫痫其他类型的临床发作。实际上, 在这个丘脑皮层环路上丰富表达的基因突变都有可能引起特发性癫痫的临床发作。

附图简述

图 1 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 C562A (氨基酸突变 F161L) 突变位点附近的部分测序图谱。其中, A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: F161L 突变位点附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。其中 nt 表示突变核苷酸在 AF051946 的位置。

图 2 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 G923A (氨基酸突变 E282K) 突变位点附近的部分测序图谱。其中, A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: E282K 突变位点附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。其中 nt 表示突变核苷酸在 AF051946 的位置。

图 3 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 T1445A (氨基酸突变 C456S) 突变位点附近的部分测序图谱。其中, A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: C456S 突变位点

附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。其中 nt 表示突变核苷酸在 AF051946 的位置。

图 4 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 G1574A (氨基酸突变 G499S) 突变位点附近的部分测序图谱。其中, A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: G499S 突变位点附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。其中 nt 表示突变核苷酸在 AF051946 的位置。

图 5 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 C2022T (氨基酸突变 P648L) 突变位点附近的部分测序图谱。其中, A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: P648L 突变位点附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。其中 nt 表示突变核苷酸在 AF051946 的位置。

图 6 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 G2310A (氨基酸突变 R744Q) 突变位点附近的部分测序图谱。其中, A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: R744Q 突变位点附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。其中 nt 表示突变核苷酸在 AF051946 的位置。

图 7 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 C2322T (氨基酸突变 A748V) 突变位点附近的部分测序图谱。其中, A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: A748V 突变位点附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。其中 nt 表示突变核苷酸在 AF051946 的位置。

图 8 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 G2397A (氨基酸突变 G773D) 突变位点附近的部分测序图谱。其中, A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: G773D 突变位点附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。其中 nt 表示突变核苷酸在

AF051946 的位置。

图 9 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 G2429A (氨基酸突变 G784S) 突变位点附近的部分测序图谱。其中, A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: G784S 突变位点附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。其中 nt 表示突变核苷酸在 AF051946 的位置。

图 10 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 G2570A (氨基酸突变 V831M) 突变位点附近的部分测序图谱。其中, A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: V831M 突变位点附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。

图 11 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 G2621A (氨基酸突变 G848S) 突变位点附近的部分测序图谱。其中; A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: G848S 突变位点附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。

图 12 显示儿童失神癫痫患者 CACNA1H 基因与正常对照的 G4466A (氨基酸突变 D1463N) 突变位点附近的部分测序图谱。其中, A: 患者的突变位点附近的部分测序图谱, B: 正常对照的部分测序图谱, C: D1463N 突变位点附近的部分核苷酸序列和相应氨基酸序列。其中 nt 表示突变核苷酸在 AF051946 的位置。

图 13 显示 CACNA1H 基因结构域示意图, 图中显示突变位点。

图 14 显示突变位点的保守性研究结果, 图中 a1A-homo-s、a1B-homo-s、a1C-homo-s、a1D-homo-s、a1E-homo-s、a1F-homo-s、a1G-homo-s、a1H-homo-s、a1I-homo-s、a1S-homo-s 代表人类的 a1A、a1B、a1C、a1D、a1E、a1F、a1G、a1H、a1I、a1S 基因; a1H-Mus-mu、a1G-Mus-mu 代表小鼠的 a1H、a1G 基因; a1G-Rattus、a1I-Rattus 代表大鼠的 a1G、a1I 基因。

实施例

实施例 1

1. CACNA1H 基因各外显子的 PCR 扩增

1. 对象： 118 例北方汉族 CAE 患儿，分别来自北京大学第一医院、北京儿童医院以及首都儿科研究所小儿神经专业门诊及病房。患儿年龄 2.9 - 14 岁，平均年龄 8.5 岁，平均发病年龄 7.2 岁。230 例正常人作为对照，也来自北方汉族同一地区，年龄 17 - 23 岁，平均年龄 19.5 岁。CAE 诊断依据 1989 年国际抗癫痫协会提出的癫痫及癫痫综合征分类诊断标准。CAE 患儿入选病例组的临床标准包括：（1）3 - 12 岁起病，以失神发作为首发类型，病程中可有少量全身强直-阵挛发作和/或肌阵挛发作；（2）发作期脑电图（EEG）为双侧对称同步 3Hz 节律性棘慢波爆发，也可有多棘慢波，一般开始部分可稍快于 3Hz（3.5 - 4Hz），结束前可稍慢于 3Hz（2.5Hz 左右），中间主体部分为 3Hz。背景活动正常。未经治疗的患者在过度换气时容易诱发出放电及临床发作；（3）神经系统检查正常；（4）神经影像学（CT 或 MRI）检查正常。

2. DNA 提取：采用 Miller 改良盐析法提取外周血白细胞基因组 DNA。

1) 取柠檬酸钠或 EDTA_{Na₂} 抗凝全血 5 - 15ml (尽量不用肝素抗凝)，置于 50ml 有盖离心管中。

2) 加入 3 - 5 倍体积冷蒸馏水，反复颠倒混匀，冰中放置 5 分钟，4℃ 2000rpm 离心 20 分钟。

3) 缓慢倾倒上清，沉淀加入预冷 0.1% Triton-X100 (体积同上)，轻柔混匀沉淀，如上离心，弃上清。

4) 沉淀中加入 4ml 裂解液 (50mM Tris-Cl—10mM EDTA, PH8.0)，彻底打碎沉淀，然后加入 10%SDS 至终浓度为 0.5%，混匀。

5) 加入蛋白酶 K (10mg/ml) 至终浓度为 200ug/ml，混匀，55℃ 3 小时或 37℃ 过夜消化 (以过夜为佳)。

- 6) 加入 6M NaCl 1.2ml。剧烈震荡 20 秒。
- 7) 2200rpm 离心 10 分钟，将上清移至另一有盖离心管中。
- 8) 加入 2 倍体积无水乙醇，反复颠倒混匀至出现絮状 DNA 沉淀，挑出 DNA 至一 Eppendorf 管中。
- 5 9) 75%乙醇洗涤 DNA 2 遍。
- 10) 以 0.5ml TE (10mM Tris-Cl-EDTA, pH8.0) 或蒸馏水溶解 DNA，电泳检测 DNA 片段大小，或测 260nm/280nm OD 比值。

3. PCR 扩增：用软件 Primer3 对 CACNA1H 基因 35 个外显子设计 PCR 引物，共 32 对引物 (表 1)。PCR 总体积 15 μ l，含有 50ng 基因组 DNA，10mM Tris-HCl (pH8.4)，50mM KCl，3.0mM MgCl₂，200 μ M of dNTPs (Amersham Pharmacia 公司产品)，0.6U HotStartaq™ DNA Polymerase，引物各 0.3 μ M 在 Perkin Elmer 9700 热循环仪产品上 (美国应用生物系统公司) 进行 PCR 反应。反应条件为 94℃ 变性 30 秒，63℃ 退火 60 秒，72℃ 延伸 110 秒，前 15 个循环退火温度每次递减 0.5℃，后 25 个循环退火温度固定为 56℃ 30 秒，72℃ 延伸 40 秒。最后 72℃ 延伸 10 分钟。

表 1 PCR 引物

外显子	正向引物	反向引物
外显子 1	5-gttggggagcagcaaaag	5-gtctcacctcgctctgct
外显子 2	5-gggcgcggtttgtctctaata	5-cccgccactctcagaaatta
外显子 3	5-acctgggtggctgctttca	5-cgccttgaaccataaacctc
外显子 4	5-gctgagctgagctgttcca	5-tctttacaggtgggacacagg
外显子 5	5-ttcctggccagtacaaggtc	5-ggagtgcctggtaaccttca
外显子 6	5-cgtggacacccactgtga	5-ggtggggcataatgtgcag
外显子 7	5-gactctgaccgtccctga	5-acgacccctcctcctcct
外显子 8	5-acttcgacaacatcggttac	5-cctggaccctgtctaggtg
外显子 9	5-cagctactgtatgccgtctg	5-aggcatagctggctctgtttc
外显子 10	5-tcctgtgtgtgagggttcc	5-ctaccatcaggtcaggcatc
外显子 11	5-agatcagtgccggtgagg	5-ctctgcaggtgggatttctg
外显子 12	5-agctgttcatgcaccttgat	5-cccaatcagtgcttctcaaa
外显子 13	5-tgagttgtagggcaggaagt	5-cgttgtagaggaccacggt

外显子 14	5-atccatagctgcctctgc	5-caggtaggtaggaatctgc
外显子 15	5-aggcagattcctcacctacc	5-aggaacacatcttcagctct
外显子 16	5-ctaggttgggggattcct	5-tcactcatcttcaggggaagg
外显子 17	5-aatagtgatgccaccaggtc	5-agagagacgaaggcgagtc
外显子 18	5-atggagaaggctgagaaggt	5-ggaaatatccacatgtgct
外显子 19	5-atccactctgccatccac	5-gatgtaattggagacgctga
外显子 20	5-tcctcgtcttcactcttcctc	5-caggttccagctgctctg
外显子 21	5-cggagatgatggtagaggta	5-gtcaggggactgtgcttc
外显子 22	5-cttgggacctttgctgag	5-cttcctttgaagagctgac
外显子 23-24	5-atcttgggtgtgcagggtgt	5-atccaggggttgtgggtc
外显子 25	5-tgggtcacctcaggggtct	5-tcctcgtggagtgaggact
外显子 26	5-cgagtcctcactccacgag	5-gagatgcaggcagactgtga
外显子 27	5-gccccaacttctaccctac	5-gggaggggagtttcaatca
外显子 28	5-ggagcacttctgtatgctg	5-cgttgcttctgcagacct
外显子 29-30	5-ttcaaggacaggtgtgtgtg	5-agcagggacacagcttca
外显子 31-32	5-ggagcacctggaagaaggt	5-tagctcaggcagtgtctgtc
外显子 33	5-agcggtttttcaggctct	5-acaccagcctcctcaat
外显子 34	5-attgaggaggctgggtgt	5-cagcaggcagaaaccttc
外显子 35	5-gtttggcctctccagtacc	5-ctctcccttgagaagctgag

实施例 2

PCR 产物的纯化

PCR 产物 1 μ l 经 1% 琼脂糖电泳检测并粗略定量后采用 96 孔 (millipore 公司) 纯化板进行纯化。纯化步骤如下:

- 5 (1) 在第一次 PCR (15 μ l) 中加入 80 μ l 去离子水, 振荡混匀后移入 Multiscreen-PCR 板孔中;
- (2) 将 Multiscreen-PCR 板置于真空抽滤支架上抽真空。压力: 0.085 Mpa, 时间: 5-10 分钟。待每个孔都抽干后再多抽 30 秒;
- (3) 将 Multiscreen-PCR 板从真空支架上取下, 每孔加入 15-30 μ l 去
10 离子水, 室温放置 30 分钟;
- (4) 将 Multiscreen-PCR 板置于混合器上振荡 5 分钟, 使纯化后的产物重新溶解。用移液器转移至一新的 96 孔板中;
- (5) 纯化后产物取 2 μ l 电泳定量。

实施例 3

测序反应及验证

1) 测序反应: 取以上纯化产物 $2\ \mu\text{l}$ 为模板, 用美国应用生物系统公司 (PE 公司) 生产的 Big-Dye 末端标记试剂盒, 以 PCR 反应一侧引物 (稀
5 释为 $2\ \mu\text{M}$) 为测序引物在 PE 公司生产的 3700 自动测序仪进行测序反应。

反应体系 $10\ \mu\text{l}$, 各组分如表 2 所示:

表 2 反应体系

名称	原液浓度	加样量 (μl)	体系终浓度
缓冲液	$5\times$	2	$1\times$
引物	$2\ \mu\text{M}$	2	$4\ \text{pmol}$
Big-Dye mix		1.2	
模板		2	$3-10\ \text{ng}$

ddH_2O 补齐至 $10\ \mu\text{l}$, 在 Perkin Elmer 9700 热循环仪 (美国应用生物系统公司产品) 上进行测序反应。

10 2) 测序反应产物纯化及序列测定: 测序反应产物经乙醇沉淀, ABI377 或 3700 自动测序仪 (美国应用生物系统公司产品) 行核苷酸序列测定。

3) 进一步按正常读码框架进行翻译后于蛋白质水平确定, 包括如下步骤: 按正常读码框架进行翻译以确定 CACNA1H 基因的突变位点。

结果分析

15 将所得到的序列图谱进行分析, 凡有杂合双峰处, 如图 1-图 12 所示, 说明该位点为杂合状态, 需进一步验证, 首先用另一侧 PCR 引物作为测序引物进行测序反应, 如结果证实该位点为突变位点, 再将该患儿父母的 DNA 进行该基因位点的测序反应, 结果发现所有的突变均在患儿父母双亲之一出现, 均为杂合突变。然后在 230 名正常对照进行该基因所有的突变位点
20 的测序反应, 结果没有发现任何突变位点。

本发明通过大量的实验, 大样本的统计分析, 在 118 名中国北方汉族 CAE 患儿中对该基因的外显子进行了直接测序, 在 14 名 CAE 患儿中找到了

12 个不同的错义突变位点, 其所在的外显子、核苷酸替换、氨基酸替换、结构定位如表 3 所示, 结构域示意图如图 13 所示:

表 3

患者号	外显子	核苷酸替换	氨基酸替换	结构定位
1	4	C562A	F161L	IS2-IS3
2	7	G923A	E282K	IS5-SS1
3	9	T1445A	C456S	连接部 I-II
4	9	G1574A	G499S	连接部 I-II
5	9	C2022T	P648L	连接部 I-II
6	10	G2310A	R744Q	连接部 I-II
7	10	G2310A	R744Q	连接部 I-II
8	10	C2322T	A748V	连接部 I-II
9	10	G2397A	G773D	连接部 I-II
10	10	G2397A	G773D	连接部 I-II
11	10	G2429A	G784S	连接部 I-II
12	11	G2570A	V831M	IIS2
13	1	G2621A	G848S	IIS2
14	23	G4466A	D1463N	(IIIS5-SS1)

注: 突变核苷酸和相应的氨基酸改变位置根据 genbank 的数据, 登记号是 AF051946.1.

实施例 4

突变位点的保守性研究

将人类 3 个 T 型钙通道基因 (CACNA1G、CACNA1H 和 CACNA1I) 编码氨基酸与小鼠和大鼠各 2 个 T 型钙通道基因编码氨基酸进行比较, 通过研究发现, 如图 14 所示, 位于结构域 I 跨膜区 2 和 3 (IS2-IS3) 的突变 F161L, 结构域 I 跨膜区 S5 同核心区连接处 E282K (IS5-SS1)、结构域 III 跨膜区 S5 同核心区连接处 D1463N (IIIS5-SS1), 结构域 II 跨膜区 2 (IIS2) 的突变 V831M 和 G848S 以及结构域 I 和 II 的连接部 (linker I-II) 的突变 C456S 都位于 7 个 T 型钙通道基因产物的高度保守的氨基酸位点。而且, 结构域 II 跨膜区 2 (IIS2) 的突变位点 G848S 在人类其他 7 个高电压激活 (high voltage-activated, HVA) 的钙通道基因产物中也是高度保守的。

实施例 5

检测儿童失神癫痫的主效基因之一 CACNA1H 突变基因的试剂盒及其应用

1. 试剂盒含有:

扩增用引物:

外显子	正向引物	反向引物
外显子 1	5-gttggggagcacgaaaag	5-gtctcacctcgctctgct
外显子 2	5-gggcgcgtttgtctctaata	5-cccgccactctcagaaatta
外显子 3	5-acctggtggctgctttca	5-cgcctgaaccataaacctc
外显子 4	5-gctgagctgagctgttcca	5-tctttacaggtgggacacagg
外显子 5	5-ttcttgccagtacaaggtc	5-ggagtgcctggtaaccttca
外显子 6	5-cgtggacaccactgtga	5-ggtggggcataatgtgcag
外显子 7	5-gactctgaccgtccctga	5-acgaccctcctcctcct
外显子 8	5-acttcgacaacatcggctac	5-cctggaccctgtctagggtg
外显子 9	5-cagctactgtatgccgtctg	5-aggcatagctggtctgtttc
外显子 10	5-tcctgtgtgtgagggttcc	5-ctaccatcaggtcagggcctc
外显子 11	5-agatcagtgccggtgagg	5-ctctgcaggtgggatttctg
外显子 12	5-agctgttcatgcaccttgat	5-cccaatcagtgcttctcaaa
外显子 13	5-tgagttgtagggcaggaagt	5-cgttgtacaggaccacgtt
外显子 14	5-atccatagctgcctctgc	5-caggtaggtgaggaaatctgc
外显子 15	5-aggcagattcctcacctacc	5-agggaacacatcttcagctct
外显子 16	5-ctaggttgggggattcct	5-tactcatcttcagggaaagg
外显子 17	5-aatagtgatgccaccaggtc	5-agagagacgaaggcgagtc
外显子 18	5-atggagaaggctgagaagggt	5-ggaaatatccacatgtgct
外显子 19	5-atccactctgccatccac	5-gatgtaattggagacgctga
外显子 20	5-tcctcgtcttcatcttcctc	5-caggttccagctgctctg
外显子 21	5-cggagatgatggtgaaggta	5-gtcaggggactgtgcttc
外显子 22	5-cttgggaccttctgtgag	5-cttcccttgaagagctgac
外显子 23-24	5-atcttgggtgtgcagggtgt	5-atccaggggttctgggttc
外显子 25	5-tgggtcacctcagggctct	5-tcctcgtggagtgaggact
外显子 26	5-cgagtcctcactccacgag	5-gagatgcaggcagactgtga
外显子 27	5-gccccaacttctaccctac	5-gggaggggagttcaatca
外显子 28	5-ggagcacttctgtatgctg	5-cgttcttctgcagacct
外显子 29-30	5-ttcaaggacagggtgtgtgtg	5-agcagggacacagcttca
外显子 31-32	5-ggagcacctggaagaagggt	5-tagctcaggcagtgcttctc
外显子 33	5-agcggtttttcaggctct	5-acaccagcctcctcaat
外显子 34	5-attgaggaggctgggtgt	5-cagcaggcagaaaccttc
外显子 35	5-gtttggcctctccagtacc	5-ctctcccttgagaagctgag

Hotstar Tag 酶 5U/μl;
10×缓冲液(含 15mM MgCl₂);
dNTP 2mM;
Big-Dye mix

5 2. 使用方法:

主要包括如下步骤:

A: 提取 DNA, 利用上述引物, 进行 PCR 反应;

B: PCR 反应产物经纯化后直接测序, 将所得到的序列与 Genbank (登记号 AF051946.1) 中的序列比较确定突变位点。

10 进一步包括 C: 按正常读码框架进行翻译以确定 CACNA1H 基因的突变位点。

具体方法参见实施例 1、2 和 3。

实施例 6

检测儿童失神癫痫的主效基因之一 CACNA1H 的突变位点 F161L 的试剂

15 盒及其应用

1. 试剂盒含有扩增外显子 4 的引物:

正向引物: 5-gctgagctgagctgttcca

反向引物: 5-tctttacaggtgggacacagg

Hotstar Tag 酶 5U/μl

20 10×缓冲液(含 15mM MgCl₂),

dNTP 2mM,

Big-Dye mix

2. 使用方法:

主要包括如下步骤:

25 A: 提取 DNA, 利用上述 PCR 引物, 进行 PCR 反应;

B: PCR 反应产物经纯化后直接测序, 将所得到的序列与 Genbank 中的序列比较确定突变位点。

进一步包括 C: 按正常读码框架进行翻译以确定 CACNA1H 基因的突变位点。

实施例 7

检测儿童失神癫痫的主效基因之一 CACNA1H 的突变位点 E282K 的试剂盒及其应用

1. 试剂盒含有扩增突变位点

5 正向引物: 5-GGGAAGTTCTACTACTGCGAGGGCCCCTATAGACACCAGG

反向引物: 5-CTGTGCGCACCTGCTGGTTCGACACCCACGGCATCCAGCCCCG

Hotstar Tag 酶 5U/μl

10×缓冲液(含 15mM MgCl₂),

dNTP 2mM,

10 限制内切酶 EcoRV

酶切图谱

2. 使用方法

A: 提取 DNA, 利用上述 PCR 引物, 进行 PCR 反应;

15 B: PCR 反应产物经纯化后直接测序, 将所得到的序列与 Genbank 中的序列比较确定突变位点。

C: EcoRV 酶切 PCR 产物;

D: 同试剂盒的酶切图谱比较。

20 本领域普通技术人员已知, 上述试剂盒的有些组分, 例如引物, 限制内切酶等可依据检测的突变位点不同, 作相应的改变, 先利用上述方法 PCR 扩增来自病人的血 DNA 样本, 然后酶切 PCR 产物, 并同试剂盒酶切图谱比较。

应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 但改动或修改的等价形式同样落在本申请权利要求书所限定的范围内。

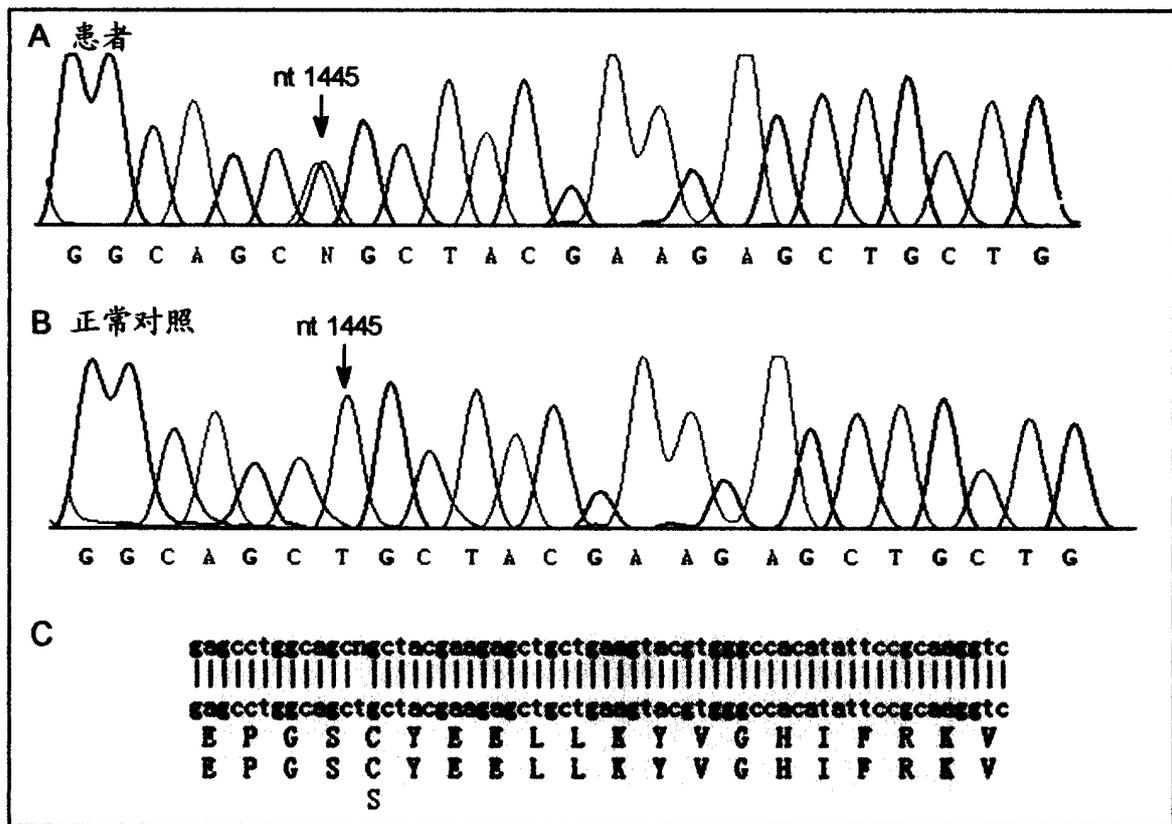


图 3

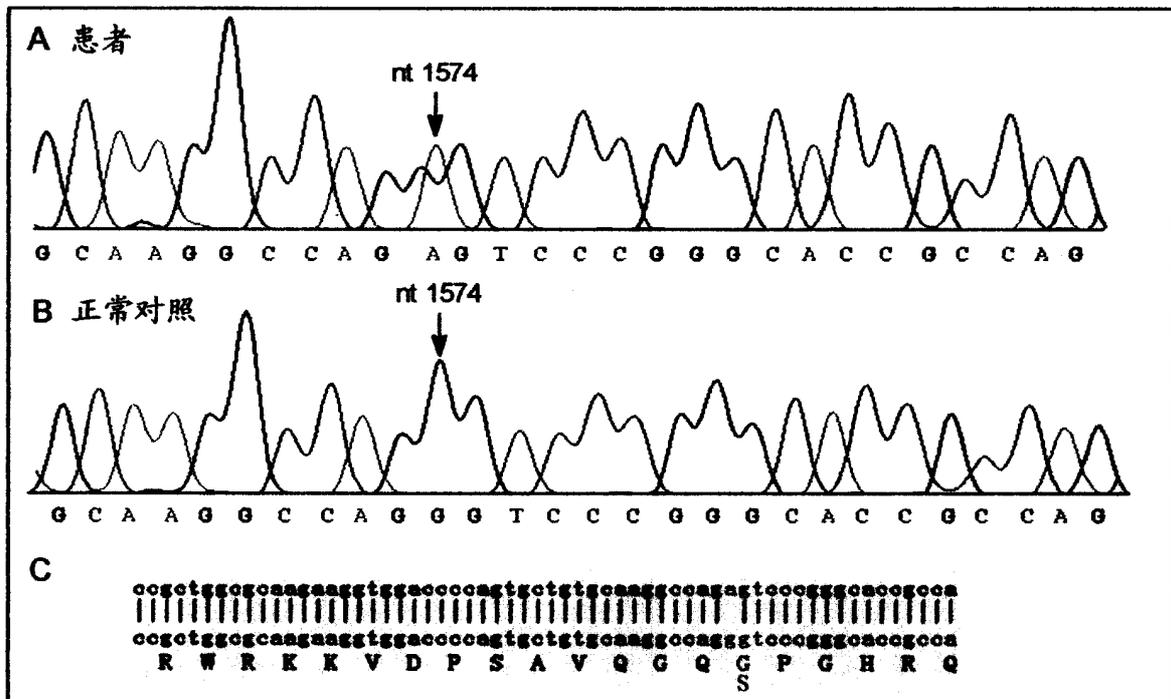


图 4

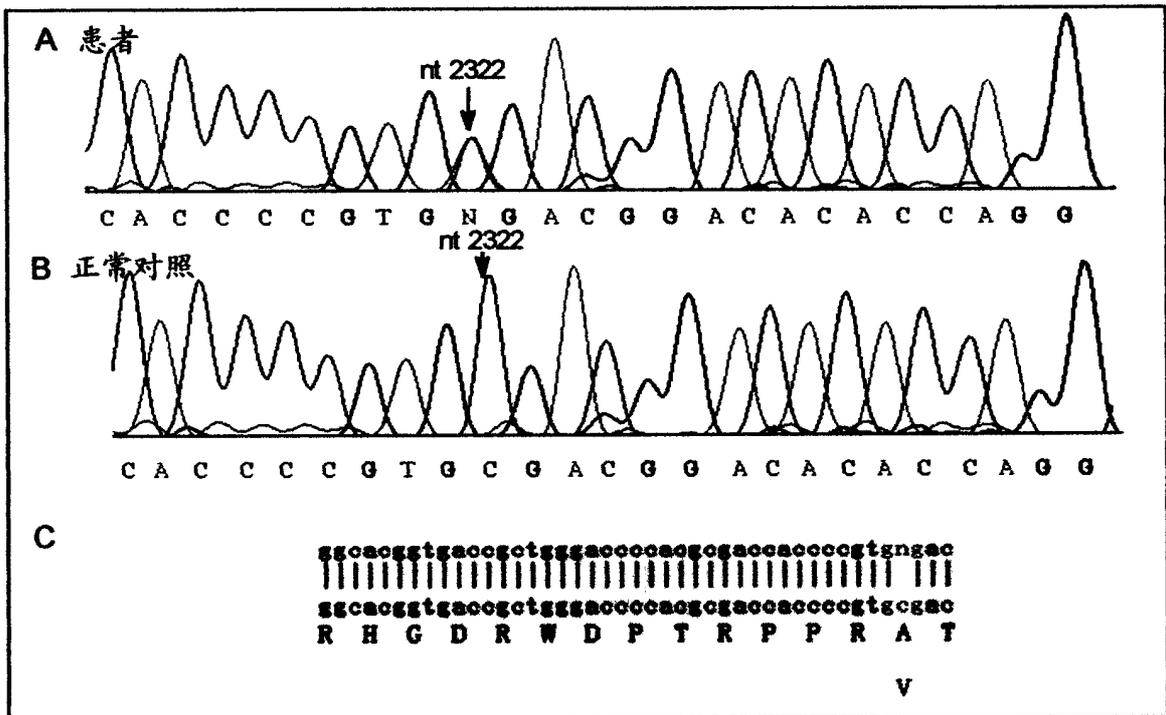


图 7

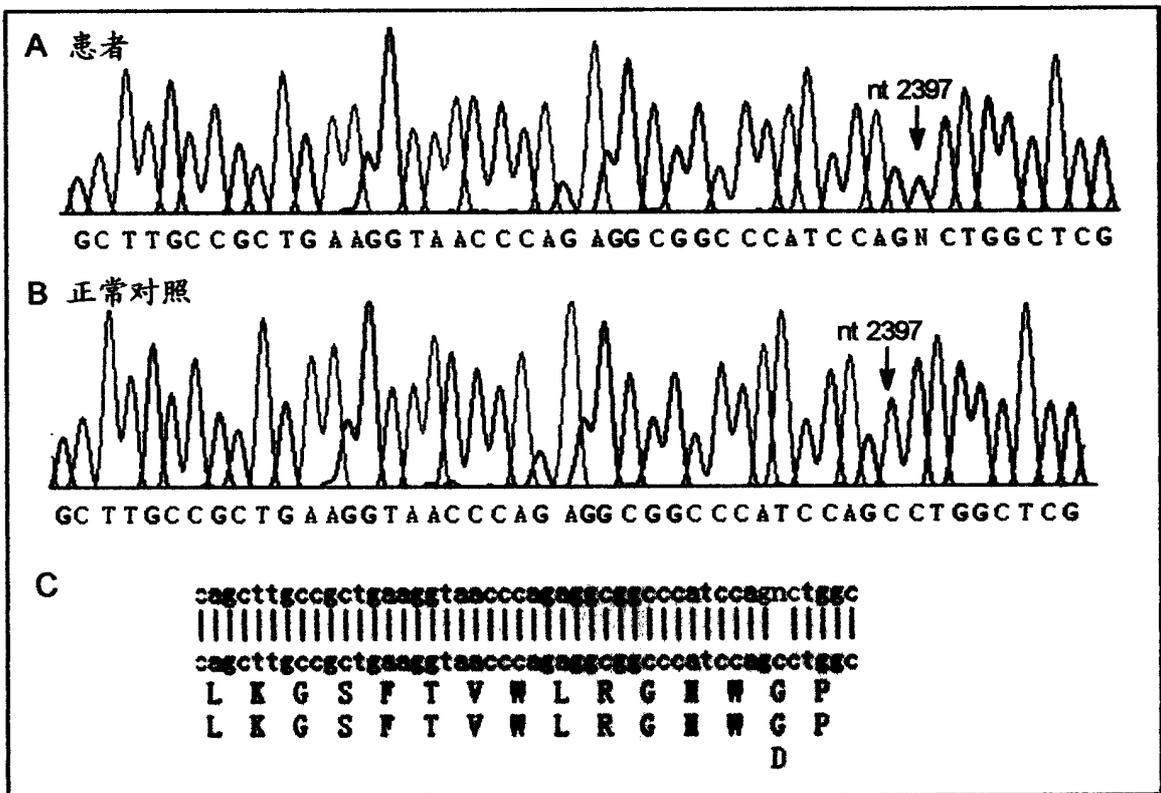


图 8

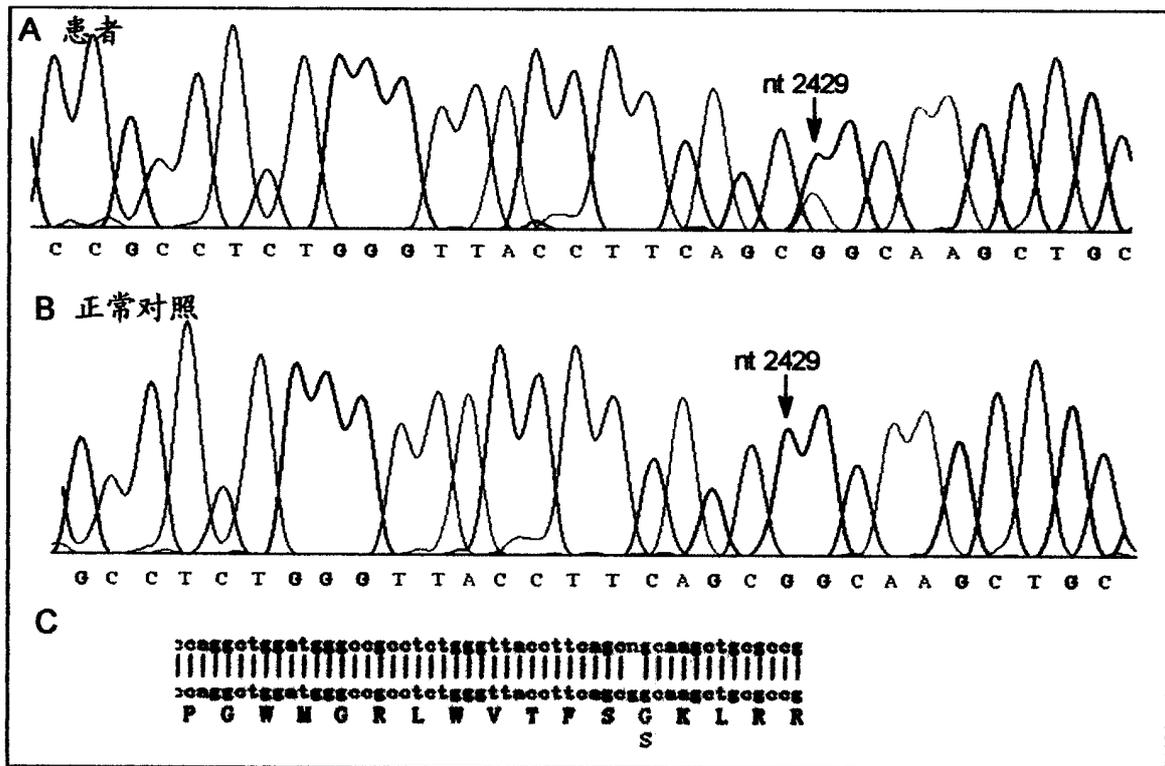


图 9

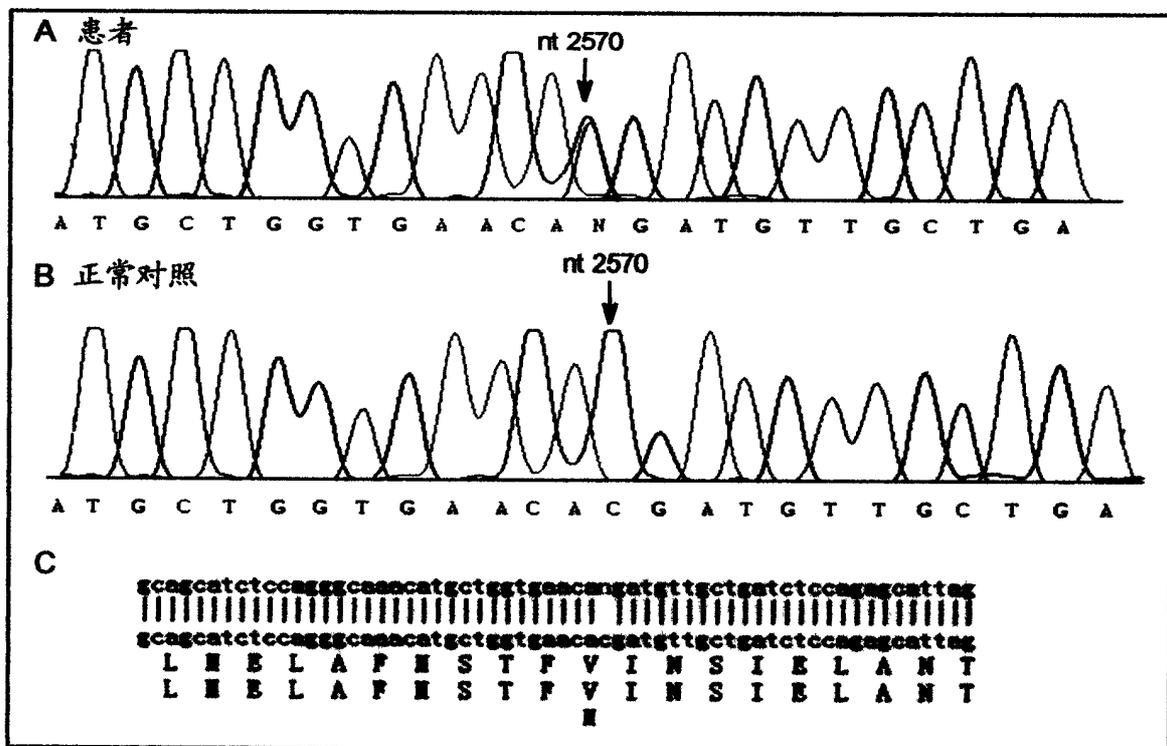


图 10

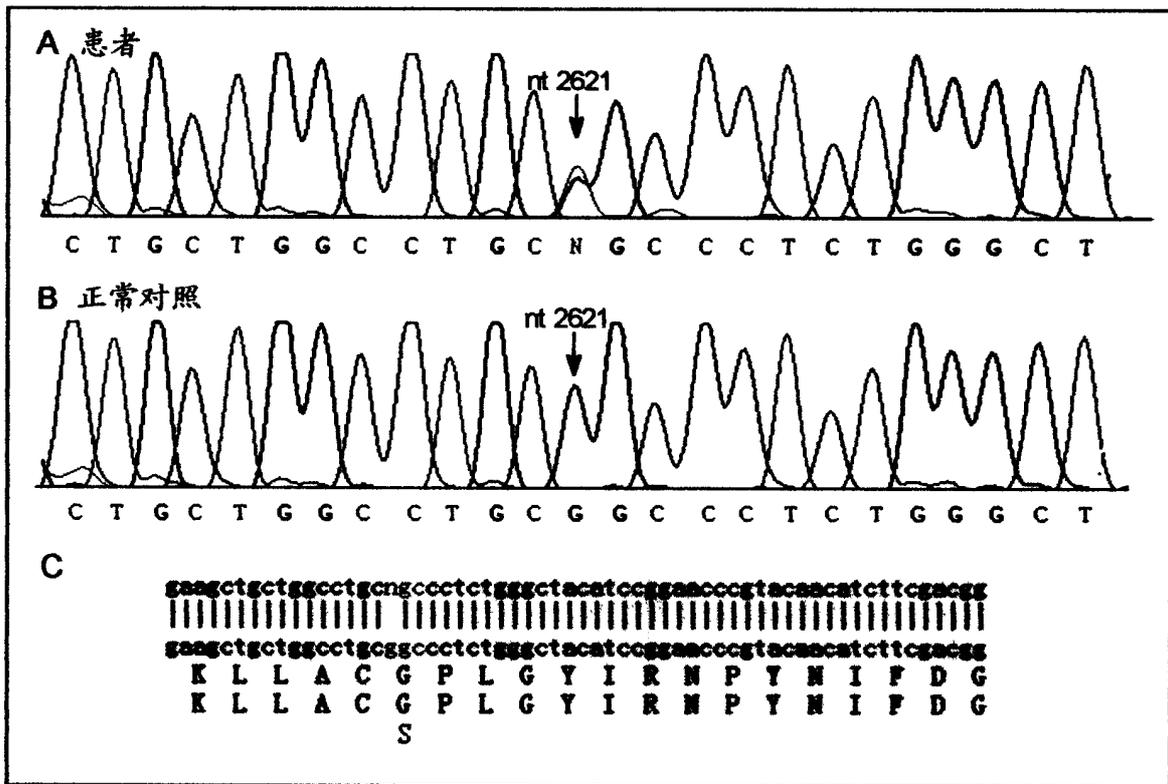


图 11

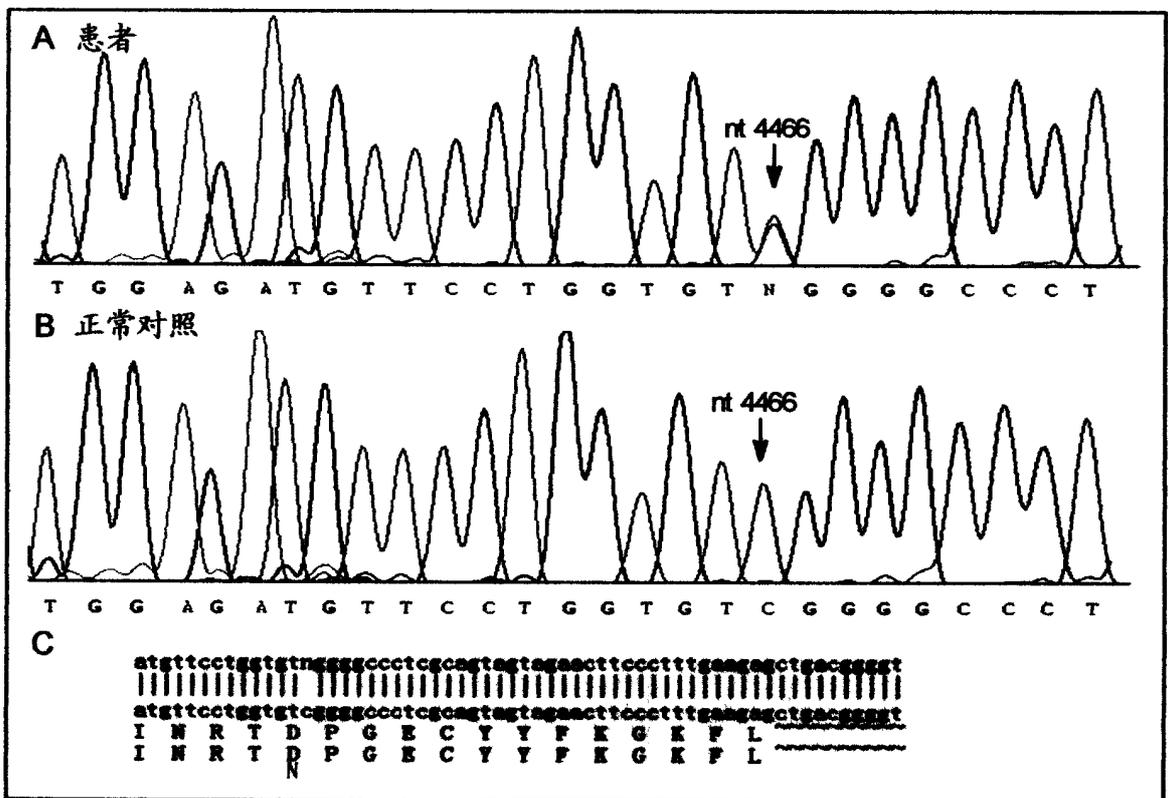


图 12

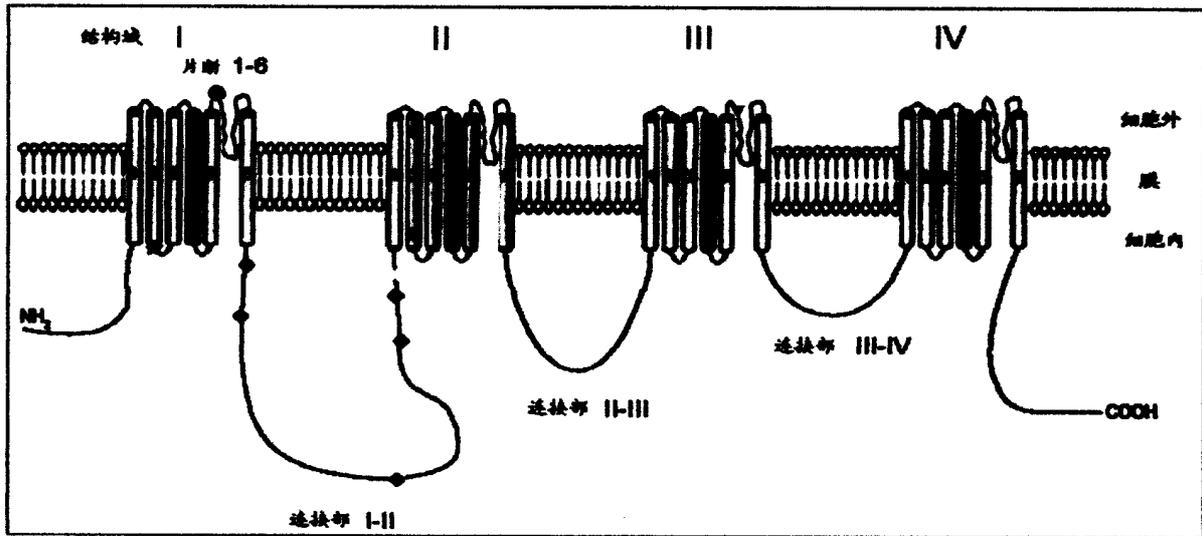


图 13

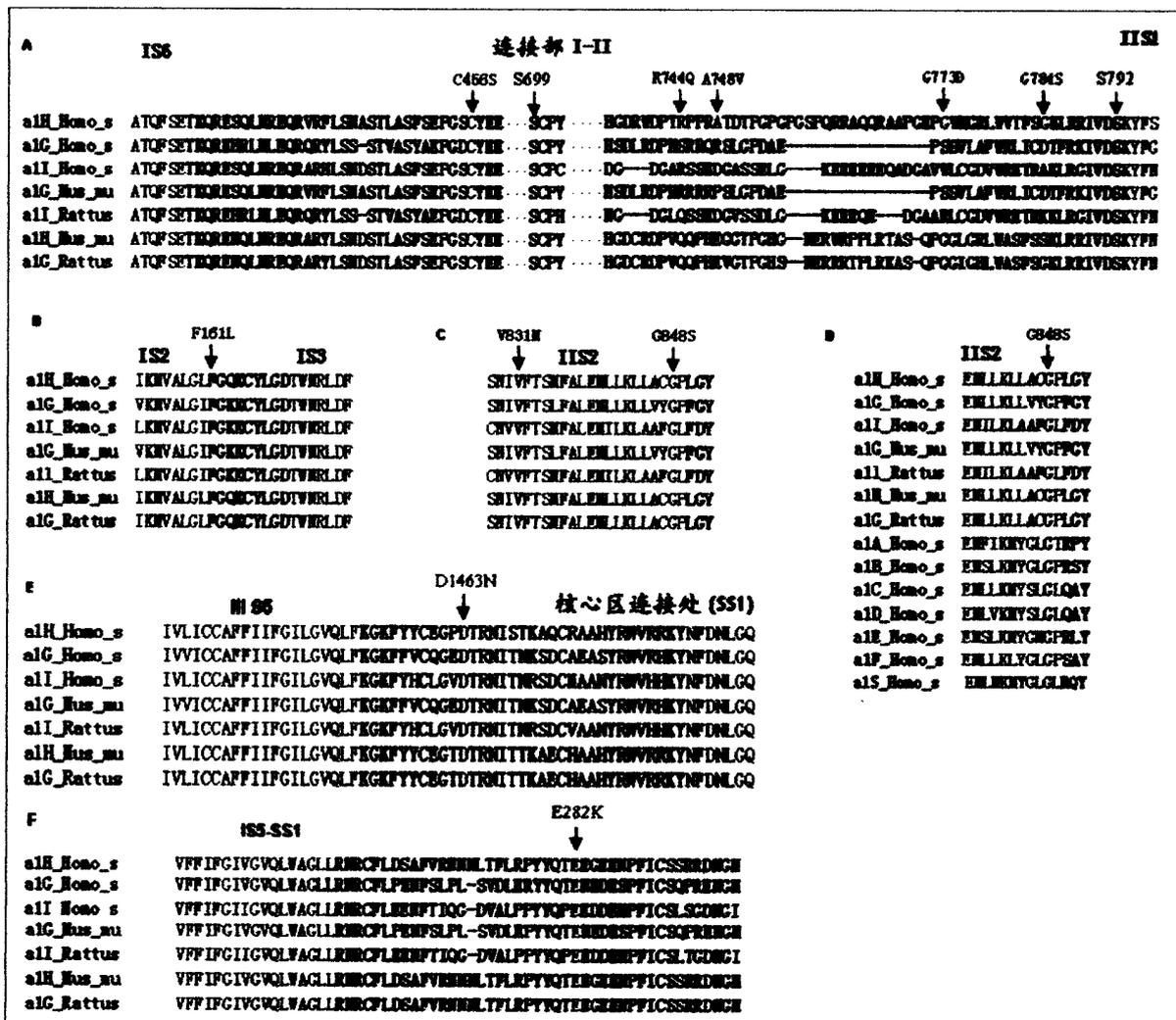


图 14