

[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 200480018514.4

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月2日

[11] 公开号 CN 1813071A

[22] 申请日 2004.4.29

[21] 申请号 200480018514.4

[30] 优先权

[32] 2003.4.29 [33] GB [31] 0309776.3

[86] 国际申请 PCT/GB2004/001848 2004.4.29

[87] 国际公布 WO2004/097044 英 2004.11.11

[85] 进入国家阶段日期 2005.12.29

[71] 申请人 奥克萨根有限公司

地址 英国牛津郡

[72] 发明人 西蒙·托马斯·班尼特
马克·爱德华兹

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 2 页

[54] 发明名称

骨损伤遗传易感性的诊断方法

[57] 摘要

本发明涉及 β -A (INHBA) 抑制素基因中新型核苷酸多态性的鉴定, 以及该核苷酸多态性在诊断骨损伤易感性, 特别是骨折易感性中的应用。本发明还提供了含本发明的多核苷酸的转基因非人动物, 以及用于诊断和/或确定骨损伤易感性的方法和试剂盒。

1. 一种确定骨损伤易感性的方法，包括确定男性或女性个体中 INHBA 基因的至少一个等位基因在第 39 位多态性的存在或缺失。
5
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中的多态性是核苷酸碱基 A 的存在。
3. 一种分离或重组的多核苷酸，包括 INHBA 序列的从至少 10
10 到 1000 个连续的核苷酸碱基，所述序列包括在第 39 位的核苷酸。
4. 如权利要求 3 所述的分离或重组的多核苷酸，包括 INHBA 序列的从至少 10 到 100 个连续核苷酸的碱基，所述序列包括在第 39 位的核苷酸。
15
5. 如权利要求 3 或 4 所述的多核苷酸，其中在第 39 位的核苷酸不是核苷酸 G。
6. 如权利要求 5 所述的多核苷酸，其中在第 39 位的核苷酸是核苷酸 A。
20
7. 载体，包括权利要求 3 到 6 任一项的多核苷酸。
8. 宿主细胞，包括权利要求 3 到 7 任一项的多核苷酸或载体。
25
9. 抗体或抗体片段，其与权利要求 3 到 6 任一项的序列优先结合。
10. 转基因的非人动物，包括权利要求 3 到 8 任一项的多核苷酸序列、载体或宿主细胞。
30

11. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其包括权利要求 3 到 9 任一项的多核苷酸、抗体或抗体片段的应用。
- 5 12. 权利要求 10 的转基因非人动物在筛选用于确定患有或易患包括骨折的骨损伤的男性或女性个体的药剂中的应用。
- 10 13. 筛选药剂的方法，所述药剂用于确定患有或易患骨损伤的男性或女性个体，所述方法包括：使假定药剂与权利要求 3 到 6 任一项的多核苷酸接触，并监控它们之间的反应。
14. 多核苷酸，其包括至少 18 个碱基的核酸序列，该核酸序列通过 PCR 可用于扩增含 39 位的 INHBA 基因的一部分。
- 15 15. 试剂盒，用于诊断患有或易患骨损伤的男性或女性个体，所述试剂盒包括用于确定至少一个等位基因在 39 位的多态性的存在或缺失的药剂。
- 20 16. 如权利要求 15 所述的试剂盒，其中的药剂包括权利要求 3 到 6 任一项的多核苷酸，权利要求 9 的抗体，用于消化权利要求 3 到 6 任一项的多核苷酸的限制酶，或权利要求 14 的多核苷酸引物。
17. 如权利要求 15 或 16 所述的试剂盒，其中的药剂是通过权利要求 13 的方法鉴定的。
- 25 18. 诊断和预防和/或治疗骨损伤的方法，该方法包括：
 1) 确定男性或女性个体中 INHBA 基因的至少一个等位基因在第 39 位多态性的存在；和
 2) 给个体施用预防和/或治疗骨损伤的药剂。

骨损伤遗传易感性的诊断方法

- 5 本发明涉及 β -A 抑制素 (INHBA) 基因中新型核苷酸多态性的鉴定，以及该核苷酸多态性在诊断骨损伤的易感性，特别是骨折易感性中的应用。本发明还提供了含本发明的多核苷酸的转基因非人动物，以及用于诊断和/或确定骨损伤易感性的方法和试剂盒。
- 10 β -A 抑制素亚基与 α 亚基结合形成垂体 FSH 分泌抑制因子。已显示抑制素负调节生殖基质细胞的增殖，并有肿瘤抑制因子的活性。此外，已显示抑制素的血清水平反映颗粒细胞肿瘤的大小，因此可用作原发和复发病的标记。因为在生殖组织和各种外生殖组织中的表达能够以组织特异的方式成倍变化，所以有人提出抑制素可以既是生长/
- 15 分化因子又是激素。此外， β -A 亚基形成同型二聚体，活化素 A， β -A 亚基也和 β -B 亚基结合形成异型二聚体，活化素 AB，两者均刺激 FSH 的分泌。最后，已显示 β -A 亚基 mRNA 与细胞分化因子亚基 mRNA 相同，并且在人类基因组中只存在该 mRNA 的一种基因。
- 20 骨质疏松症是一种常见疾病，其特征在于骨矿物质密度(BMD)的降低、骨微结构的损坏和骨损伤危险性的增加，如骨折。骨质疏松症是一个重要的公共健康问题，其影响生命质量并增加卫生保健提供者的费用。在欧洲，五十岁以上的人口中，每三位女性中就有一位和每
- 25 十二位男性中就有一位存在这种危险。在美国，该病影响二千五百万人，发病率比英国高 25%，该病还在欧洲和日本影响合计五千万人。据估计，到下个世纪中期，骨质疏松症患者的数量在西方将翻倍，但在亚洲和南美洲将增加六倍。骨折是骨质疏松症最严重的后果，尤其是髌骨折，该病每年在全球影响多达一百七十万人。据估计，到 2050 年，由于人类预计寿命和年龄的增长，全球髌骨折患者的数量将超过
- 30 六百万。

骨质疏松症的治疗并不理想。尤其是，一旦由于骨质疏松而发生骨损伤时，除了让骨愈合外医师没有其它更好的办法。对于老人而言，这将是一个漫长和痛苦的过程。对于存在患骨质疏松危险的人的诊
5 断，可使预防措施更有效。该病的预防措施包括在早期成年期增加骨密度，以及在生命后期使骨损失最小化。已显示生活方式的改变、营养和激素因子影响骨损失。

10 可认为骨质疏松症是有几种作为表型可变性的遗传决定基础的基因变体的复杂遗传性状。低骨矿物质密度，作为骨质疏松症在临床上最相关的特征，是骨折的重要危险因素。

15 鉴于骨矿物质密度的多基因控制和因此的疾病状态如骨质疏松，显然，对造成骨损伤易感性的其它遗传因素的鉴定将为这种疾病提供重要的新的了解，并可以应用预防措施，和开发新的诊断和/或预后检测以及治疗。

20 检测遗传易感性是重要的可实施的诊断手段。在许多情况下，优选的检测将针对涉及例如骨质疏松症的疾病的超过一个的因素。随着信息的增加，可提供关于男性或女性个体遗传易感性的更广的视角。遗传易感性是个体患有疾病或者将患疾病的危险。

25 本发明在其它方面提供了确定男性或女性个体的骨损伤易感性的方法。

30 在第一方面，本发明提供了确定骨损伤易感性的方法，包括确定 INHBA 基因的至少一个等位基因在第 39 位多态性的存在或缺失。在一个具体的实施方案中，多态性由在第 39 位核苷酸碱基 A 的存在构成。

第一方面的方法可应用于任何哺乳动物受试者。优选的，该哺乳动物患者是人类，最优选为成年人，优选为女性，或者男性。

5 已显示 INHBA 基因中的新型多态性是骨损伤及相关病症如骨质疏松症易感性增加的原因。尤其是，本发明的多态性，其自身或其它多态性相结合可用于鉴定易感或抵抗骨损伤的男性或女性个体以及用于该病的预防和/或治疗。

10 本发明可用于骨损伤为因素之一的任何疾病，例如骨质疏松症和骨质疏松性骨折。骨损伤可定义为由低的骨矿物质密度造成的任何形式的损伤，并包括除了正常磨损之外的任何形式的结构损伤，例如骨折或骨碎(fractures, bones or chips)，和骨的降解或损坏。

15 多态性通常定义为群体中基因的两种或多种可能的序列，或等位基因。多态性位点是基因中发生序列趋异的位置。多态性显示方式的例子包括限制性片段长度多态性、可变数目的串联重复、高度可变区、小卫星、双核苷酸重复或多核苷酸重复、插入元件和核苷酸缺失、添加或置换。通常将第一个鉴定出的等位基称为参考等位基因，或野生型。其它等位基因通常指定为可变或变异的等位基因。在本文中，第一方面的序列指定为参考基因，并且不是本发明的一部分。本发明的
20 在上述一个或多个位置与这些序列不同的核酸序列可称作这些序列的变体。

25 单核苷酸多态性是指在单核苷酸残基所占位点的等位基因间的序列的变异。单核苷酸多态性(SNP's)起因于在多态性位点核苷酸残基的置换、缺失或插入。典型地，单核苷酸多态性导致变体序列位点被除了参考碱基外的其它任意碱基所占据。例如，当参考序列在多态性位点包含碱基“T”时，变体可在该点包含碱基“C”、“G”或“A”。

30 本发明的多态性发生在非编码区，因此可能并不影响蛋白质的序

列，但是可通过影响复制、转录和/或翻译而施加表型作用。多态性可影响超过一个的表型特征或者可能与特定的表型相关。

表 1 INHBA02 SNP

5

10

15

	5'	SNP	3'
INHBA02	GTCATGAGAAGCTGGGCTTA TGCTTCAACTGTAGTCCTTC AAACAACCCCTCACCGTTCT TGTCAGAGGACCCCTTCCT CCTGTGTTATTTACCAGACT TGCCAACACCCCTCCCCCA CAAAAAAGCCTGACCAGC TTTACCCCTATTTCAAGGAG TGTTCACTTCTTTTCATTAAT CTGCTGTTATATTTGTAACA ATTTAGAAATTATAGGAGTT GAAGTTCTGGTAAAAAGA ATGATGCATGAGGGTTTTT GTTGTGTTGTTGTTGTGTG TGTGTGTGTGTGTGTGTGT GTTTGGTTAGTTAGAATGAG ATTCTAAAGACCTGGGAAG GATACTTATGAAGTTCATTT AAAGAGAATTACT	R	TTTCCAAAGTTCCTTGATTTATGAAGCAGGCATTCAATTTCA AGATGTAAAATAATAGTGTAAAGTTGGTTGGGGTCGGGGG AGACCATCATCATATGATTATACAGATTTTCCCAATTTTTT TCCTCAATGAAATAGCTTATTTAAAAATATAAAATTAGAA TCCCTATAAAGAACAACCTACCAATTTTCTTTCTGAAAGAA ACAATAAAATACTTTGTAATAGAAGCAACTTCATGAAGT AACAGATGTTTTATGTAAGACATAAACTGAACCTGAAT ATAAYGAGACGTGTGTGCGAGTAGTAAAAGTTGAAAGTT GGACACACTCATTGAGACATATCTATTTGATTCCAATGTT TTTCTAAAAGGTAGAGTAATCCTAGCCAGAGGGTTTCACTG GCTCAGTGCATCACCCAGTAGTGTCTCAGAAGCCAGGAA GGGCTTTCATTAGATAATGAATTATGAAATGTCTCACAC TGGAAAACCAGTCATCCGCTGATGTCATGCTGATTTCCA ACCAATCCCAAACAAAGCCCGCCCTCTCTGTTTCAG TGGTACCAATGTGTGGTGTACAAAATAAGTAGTACAGTATA AAACCTCACAGTGCCAATACCATGAAGAGGAGCTCAGRC AGCTCTTACCACATGATACAAGAGCCGGCTGGTGAAGA GTGGGGACCAGAAAGGTAATGCTTTTTAACTCTTACTTCT GAGCTCTTTACAGATTCAAAGATAGGAAAGCTAGGAGGA ATTTTACAACCTAATTGGC

其中 R 代表碱基 G 向碱基 A 的改变。

20

25

30

第一方面的方法通过本领域技术人员已知的方法实施。典型地，该方法包括：使来自男性或女性个体的 DNA 样品与药剂接触，所述药剂可确定表 1 和/或图 1 所述的多态性的存在或缺失。这种药剂可以是杂交核苷酸、抗体、PCR 药剂或其它药剂。关于药剂的进一步描述见下文，并且操作法的描述见本发明的实施例部分。

所述方法可包括确定一个或多个特定等位基因是否存在，或确定等位基因的哪一种组合(例如，单倍型)存在。该方法还包括确定受试者的特定等位基因或者单倍型是纯合子还是杂合子。在一个优选的实施方案中，该方法包括确定本发明多态性的哪一个/哪几个等位基因存在。

任何方法，包括本领域技术人员已知的方法，均可用于确定 INHBA 基因的哪一个(或哪几个)等位基因存在。优选地，该方法包括首先从受试者分离样品。更优选地，该方法包括获得分离的多核苷酸样品，以确定 INHBA 基因的哪一个(或哪几个)等位基因存在。因此，本发明涉及非侵入性的诊断方法，其结果提供了骨损伤易感性的指示，但并不能够提供需要立即进行医疗干预的诊断。

任何包括含有核酸或者蛋白的细胞的生物样品均适用于该目的。适合的样品的例子包括全血、精液、唾液、眼泪、口腔(buccal)、皮肤或毛发。样品和/或核酸可以固定于载体，例如固体载体上。

在一个优选实施方案中，用多核苷酸实施所述方法。可使用确定多核苷酸中等位基因的任何方法，包括本领域技术人员已知的方法。优选地，例如，该方法可包括如下定义的反义多核苷酸的应用。这些多核苷酸可以是可通过优先结合来区分 INHBA 基因的等位基因的序列或者是在严格条件下与等位基因两侧的任一侧区域杂交从而扩增一种或多种多态性的序列。

该实施方案的方法包括本领域技术人员已知的方法，例如，直接探测、等位基因特异性杂交、PCR 方法，包括等位基因特异性扩增(ASA)、等位基因特异性杂交、单个碱基延伸、遗传位分析法和 RFLP，或直接测序。适合的限制酶理所当然取决于多态性和限制位点，且包括本领域技术人员已知的限制酶。可使用本领域的任何方法进行消化片段的分析，例如凝胶分析或 southern 印迹。

用直接探测确定多态性的等位基因通常包括使用反义序列，例如本发明第三方面所述的反义序列。这些反义序列可通过合成或切口平移来制备。可利用例如放射性标记、酶标记、氟标记、生物素-亲和素标记适当标记反义探针，用于在随后的例如 southern 印迹程序中进行

观察。标记的探针可与样品 DNA 或样品 RNA 反应，并且携带互补序列的 DNA 或 RNA 区域将与探针杂交，从而使它们自身被标记。然后可通过例如放射自显影来观察被标记的区域。

5 上述方法可能需要扩增来自受试者的 DNA 样品，这可以通过本领域已知的技术如 PCR 来实现。其它适合的扩增方法包括连接酶链式反应(LCR)、转录扩增、自动维持序列扩增和核酸碱基序列扩增(NASBA)。后两种方法都包括基于等温转录的等温反应，该方法分别以 30 或 100:1 的比率分别产生单链 RNA 和双链 DNA 作为扩增产物。

10

 当需要确定受试者样品中多重单核苷酸多态性或单倍型的存在时，可优选使用阵列(arrays)。该阵列可含有许多探针，每个探针设计为鉴定本发明的上述单核苷酸多态性中的一种或多种。

15 本发明的第二方面提供了 INHBA 基因本身的片段或与该片段互补的序列。这些片段可用于本发明第一方面的方法。它们可被分离或重组。

 本发明的多核苷酸优选为 DNA，或可以是 RNA 或其它的选择。

20

 “分离”是指已经充分纯化到可以进行等位基因辨别的水平的多核苷酸序列。例如，分离的序列将基本不含任何其它 DNA 或蛋白质产物。这些分离的序列可通过 PCR 扩增、克隆技术或合成器上合成而得到。“重组”是指人工重组的多核苷酸。

25

 优选片段的长度为至少 10 到 1000 个核苷酸长度，更优选为 10 到 100 个核苷酸长度。更优选地，片段的长度为 10、20、30、40、50、60、70、80、或 90 个核苷酸长度。片段应当包括含多态性的序列。

30 根据本发明的第二方面，优选的片段是 INHBA 基因的互补序列，

该互补序列与图 1 给出的核酸序列的一部分杂交。这些“反义”序列可用作鉴定患有或易患骨损伤的男性或女性个体的药剂。

5 本发明的反义序列包括与本发明的多态性等位基因（优选为变异等位基因）杂交的序列。这些序列用作探针。为用作探针，该反义序列应当与本发明的一种或多种多态性的一个等位基因优先结合，并且优选地包括本发明的一种或多种多态性的一个等位基因的精确的互补序列。因此，例如，当变体在多态性位点包括残基“A”时，反义序列
10 优选包括残基“T”。可按照本领域已知的方法设计这些反义序列，其能够特异杂交以检测单个碱基错配。只要反义序列区别多态性等位基因的能力没有受到损害，就本发明的目的而言这些反义序列的序列变异是可以接受的。优选地，反义序列在下面定义的严格条件下与所需的序列杂交。

15 与本发明相关的“严格条件”是指用于杂交方案的洗涤条件。通常地，洗涤条件应当是温度和盐浓度的组合，以使变性温度比所研究的核酸的 T_m 计算值低约 5 到 20°C。根据针对短寡核苷酸的华莱士法则(Wallace Rules)，在标准条件(1M NaCl)下以 $[4(C \times (G+C) + 2(C \times (A+T))]$ 计算 20 个碱基或更少碱基的核酸探针的 T_m 。对于长 DNA 片段而言，可采用最邻近法，其组合了固体热力学和实验数据。可在预
20 备实验中容易地确定杂交的最佳盐和温度条件，在该预备实验中使固定在滤纸上的 DNA 样品与目的探针杂交，然后在不同的严格条件下洗涤。虽然 PCR 条件可能和标准条件不同，但 T_m 可作为引物预期相对稳定性的指导。对于大约 14 个核苷酸的短引物而言，使用约 44°C
25 到 50°C 的低退火温度。根据所用引物序列的碱基组成，温度可以更高。

在本发明的第三方面，本发明上述方面的多核苷酸可以是载体的形式，以进行多核苷酸序列的体外或体内表达。多核苷酸可与一个或多个调控元件可操作连接，所述调控元件包括启动子；启动子的上游
30 或下游区，例如调节启动子活性的增强子；复制起点；适当的限制位

点以克隆邻近多核苷酸序列的插入片段；标记物如抗生素抗性基因；核糖体结合位点；RNA 剪接位点和转录中止区；聚合位点；或其它任何促进多核苷酸序列克隆和/或表达的元件。当将本发明的两种或多种多核苷酸插入到同一载体时，每个序列均可由其自身的调节序列来控制，或者所有序列可由相同的调节序列来控制。同样地，每个序列可包括 3'聚腺苷酸化位点。可将载体引入到微生物、酵母或动物 DNA、染色体或线粒体中，或者载体也可作为质粒独立存在。适合的载体是本领域技术人员已知的，包括 pBluscript II、LambdaZap 和 pCMV-Script (Stratagene Cloning Systems, La Jolla (USA))。

10

适合的调节元件尤其是启动子通常根据表达载体所插入的宿主细胞进行选择。当使用微生物宿主细胞时，启动子如乳糖启动子系统、色氨酸(Trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或噬菌体 λ 启动子系统是适合的。当使用酵母细胞时，优选的启动子包括醇脱氢酶 I 或糖分解启动子。在哺乳动物宿主细胞中，优选的启动子来源于免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳突淋巴瘤病毒等。适用于不同宿主细胞的启动子对于本领域技术人员是显而易见的。

15

本发明的第四方面提供了用以表达多核苷酸的宿主细胞，其包括上述任一方面的多核苷酸。该宿主细胞可包括表达载体，或编码所述多核苷酸的裸 DNA。许多种宿主细胞可供选择，既有真核细胞又有原核细胞。例子包括诸如大肠杆菌的细菌、酵母、丝状真菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞，优选无限增殖化的，诸如小鼠、CHO、HeLa、骨髓瘤或 Jurkat 细胞系、人细胞系和猴细胞系以及它们的衍生物。这些宿主细胞可用于药物筛选系统以用于诊断或治疗患有或易患骨损伤的男性或女性个体的药剂。

20

25

将所述多核苷酸引入宿主细胞的方法通常取决于载体/DNA 和靶细胞的性质，并包括本领域技术人员已知的方法。适合的已知方法包括融合、接合、转染、转导、电穿孔或注射，如 Sambrook 等人所述。

30

本发明的第五方面提供抗体，其与诸如第二方面的多核苷酸的抗原反应(任选地或特异性地)。可通过标准程序制备抗体。简要地，将纯化的抗体以足以引发免疫应答的量和时间间隔注射动物。既可直接
5 纯化抗体，也可从动物中获取脾细胞。然后使细胞和无限增殖细胞系融合并筛选得到抗体分泌物。抗体可用于筛选 DNA 克隆文库以得到分泌抗原的细胞。然后可对这些阳性克隆测序。优选地，检测和/或用于产生特定抗体的抗原包括第二方面的多核苷酸或片段。

10 可用本领域已知的方法，例如使用与第一抗体结合的第二抗体，或使用配体，来帮助检测抗体和抗原的结合。免疫分析包括免疫荧光分析(IFA)和酶联免疫吸附分析(ELISA)，并且可用免疫印迹法检测抗原的存在。例如，当使用 ELISA 时，所述方法可包括：抗体与底物结合，使结合的抗体与含抗原的样品接触，使上述和结合于可检测部分(通常
15 是酶，如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶)的第二抗体接触，使上述与酶的底物接触，最后观察颜色变化，其显示样品中存在抗原。

本发明的第六方面提供了含本发明第二方面的多核苷酸的转基因非人动物。转基因非人动物可用于分析单核苷酸多态性及它们的表型
20 作用。在转基因非人动物中通常用如下方法表达本发明的多核苷酸：将多核苷酸与启动子序列和/或增强子序列可操作连接，优选产生前面所述的载体，然后用显微注射技术将载体引入宿主动物的胚胎干细胞。然后应当将转基因构建体与宿主的内源基因进行同源重组。可通过监控标记基因的表达来选择含所需多核苷酸序列的这些胚胎干细
25 胞，并将这些胚胎干细胞用于产生非人转基因动物。优选的宿主动物包括小鼠和其它啮齿类动物。

在优选的实施方案中，转基因非人动物可包括第二方面的反义核酸序列。在转基因非人动物中反义序列的表达可用于确定这些序列对
30 高的骨矿物质密度的影响，或用于中和动物体内基因变体的有害影

响。优选地，宿主动物易患骨损伤。该病可以是自然发生的，或是人工诱导的。

5 本发明的第七方面还提供了第六方面的转基因非人动物在筛选用于确定患有或易患骨损伤的男性或女性个体的药剂中的应用。

10 在一些优选的实施方案中，例如，当骨损伤易感性为人工诱导时，将调节转基因非人动物以使其不再表达相应的内生 INHBA 基因。这些动物可被称为“基因敲除的动物”。在某些情况下，调节内源基因的表达，或在特定组织里表达本发明的多核苷酸可能是适合的。如果基因表达在所有组织里被取消或被诱导时，该方法消除了可行性的 (viability)问题。

15 本发明的第八方面提供了筛选用于确定患有或易患骨损伤的男性或女性个体的药剂的方法，所述方法包括：使假定药剂与本发明第二方面的多核苷酸接触，并监控它们之间的反应。可能的药剂是与本发明的变体和与参考等位基因进行不同反应的药剂。参考等位基因可以是野生型等位基因(即，没有多态性)。可以预想，通过使假定药剂与包括本发明的多核苷酸或者蛋白的宿主细胞或者转基因动物接触可以实施本方法。假定药剂包括本领域技术人员已知的药剂，并且包括化学物质或者生物化合物，诸如与第一方面的编码序列互补的反义多核苷酸序列，或与诸如第二方面的蛋白质或蛋白质片段相结合的多克隆或单克隆抗体。它们还可用于确定骨损伤易感性，或用于诊断、预后或治疗相关病症。

25

本发明的第九方面提供了适于 PCR 反应的引物序列，以用于确定本文描述的多态性的存在或缺失。适合的序列应当包括至少 18 个核苷酸碱基，并可以是选自如下的一个或多个序列：

30 任何与 INHBA 基因杂交的序列。引物可与 INHBA 序列 100%互补，或与 INHBA 序列 80%或更高程度的互补。序列优选为 18 至 25

个碱基长度。

在另一方面，本发明提供了试剂盒，以用于诊断患有或易患骨损伤的男性或女性个体，该试剂盒包括用于确定本文描述的多态性存在或缺失的药剂。试剂盒的药剂可包括多核苷酸，最优选为反义序列，如第二方面的反义序列，以用作探针或引物；本发明第八方面的序列；与 INHBA 多肽的等位基因结合的抗体，如第五方面的抗体；或用于检测 INHBA 多肽存在的限制酶。优选地，试剂盒还包括反应的检测装置，例如核苷酸标记检测装置、标记二抗或尺寸检测装置。在又一优选的实施方案中，药剂可固定在底物如阵列上，如 WO95/11995 所述。试剂盒还包括显示受试者基因型与高骨矿物质密度之间关系的装置。这种装置可以是图表的形式或助视器的形式，显示 INHBA 基因的一种或多种等位基因的存在与骨损伤的易感性有关。

本发明的第十一方面提供了诊断，并随后用于对本文描述的多态性的任一诊断的方法而预防和/或治疗骨损伤。可用任何方法进行预防和/或治疗，包括用多态性取代等位基因。可通过添加等位基因或部分等位基因用骨损伤无关的 INHBA 基因的多肽进行取代。

每个方面的优选实施方案适用于本发明的其它方面，在细节上作必要的修正。

现在将通过非限定实施例结合下述的图 1 描述本发明，其中：

图 1 显示相关单核苷酸多态性位点的核苷酸序列

25

实施例 1

通过 Pyrosequencing™ 进行双等位基因多态性的基因型分型

在双等位基因多态性两侧的任一侧设计用于 PCR 扩增的一对寡核苷酸，以产生大小在 50bp 和 350bp 之间的产物。设计测序寡核苷

30

酸，其中止于距多态性位点 5'或 3' 的 30bp 内。用 5'-生物素标记所有用于产生测序引物互补链的扩增寡核苷酸(见表 2)。

表 2 PSQ 分析寡核苷酸和 PCR 退火温度

多态性 ID	未标记的 PCR 寡核苷酸	生物素 PCR 寡核苷酸	测序寡核苷酸	TA °C
INHBA G-692A	GACCCCAACC AACTTACAC	GAGATTCTAAA GACCTGGGAAG	CATAAATCAA GAACTTTGGA	54

5

使用 PCR 扩增寡核苷酸通过 PCR 扩增基因分型的样品。每个反应使用：在最终体积 10 μ l 中，20ng DNA (干重)、0.6 单位的 AmpliTaq Gold™ DNA 聚合酶、1X PCT 缓冲液 II、2.5 mM MgCl₂、1mM dNTP 和 10pmol 的每种 PCR 寡核苷酸。所用的 PCR 循环条件为：95°C 12 分钟，如下进行 45 次循环：94°C 15 秒、T_A 15 秒、72°C 30 秒和 72 °C 5 分钟。

10

15

扩增后，分离与测序引物互补的每个 PCR 模板的 DNA 链，以待高温酸测序(PSQ)。为此，1) 将 50 μ l 的 Dynabead 溶液(2mg/ml Dynabeads®、5mM Tris-HCl、1M NaCl、0.5mM EDTA、0.05%的吐温 20)添加到 PCR 产物中，并在 65°C 振荡 15 分钟，2)用磁体将模板转移至 50 μ l 的 0.5M NaOH 中 1 分钟，3)用磁体将模板转移至 100 μ l 的 1X 退火缓冲液(20mM Tris-乙酸盐，5mM MgAc₂)中 1 分钟，和 4)用磁体将模板转移至含 15pmol 测序寡核苷酸的 45 μ l 1X 退火缓冲液中(表 4)。

20

25

分离模板后，如下使测序寡核苷酸退火至模板上：在 80°C 变性 2 分钟，然后冷却到室温 10 分钟。在 PSQ96™ (Pyrosequencing AB)上通过 Pyrosequencing™ 对每个标记物/样品组合进行测序/基因分型(图 3)。基因分型结果储存于 PSQ oracle®数据库中以待统计分析。

实施例 2

INHBA 基因多态性以确定骨质疏松性骨折的遗传易感性

5 使用程序遗传(用于不确定单倍型遗传的遗传/不平衡检验的概括。Clayton D. Am J Hum Genet 1999 Oct; 65(4):1170-7)对一组谱系检验 INHBA02 SNP 的遗传畸变(transmission distortion), 该谱系起初被收集用于骨矿物质密度的全基因组连锁分析。疾病状况(affection status)定义为年龄在五十岁以上的女性所有自己报道的骨折。结果显示在表 3 中。

10 表 3 女性 INHBA02 的遗传畸变, 及年龄>50 岁的女性自己报道的骨折

稀有等位基因的频率	0.319
观察到的遗传, 稀有等位基因	104
期待的遗传, 稀有等位基因	92.23
观察到的遗传, 普通等位基因	166
期待的遗传, 普通等位基因	177.67
概率	0.003
本分析所包括的家族数量	815
受疾病影响的后代的数量	135
传递到受影响子女的家庭数量	123

这些结果表明非常显著的传递畸变, 说明很少的普通等位基因 (“A” 等位基因)与年龄大于 50 岁的女性增加的骨折危险有关。

实施例 3

15 SNP 与骨矿物质密度的联系

使用来自一组谱系的 2,812 位个体的基因型通过逻辑回归检测 INHBA02 SNP 与骨矿物质密度(BMD)的联系, 该谱系起初被收集用于骨矿物质密度的全基因组连锁分析。对腰脊柱的调整 BMD 和未调整的 BMD 的测量如下所示。

20

INHBA02 的等位基因 1(A)与男性中未调整的腰脊柱 BMD($p=0.034$, 影响程度=-2.1%)和调整的腰脊柱 BMD($p=0.035$, 影响程度=-0.121)的显著下降相关。

标记物	未调整的 BMD	调整的 BMD
	腰脊柱	腰-脊柱
平均值	1.083	-0.027
遗传率	0.736	0.729
INHA02	0.034	0.035

图1

AC005027.3的反相互补序列，显示在第39位的多态性定位。SNP位于cDNA序列NM_002192.1的外显子1起始处的上游第3235个碱基处(外显子序列以斜体表示)。

```

1  GGAAGGATAC TTATGAAGTT CATTTAAAGA GAATTACTRT TTCCAAAGTT
51  CTTGATTTAT GAAGCAGGCA TTCAATTTCA AGATGTAAAA TAATAGTGTA
101 AGTTGGTTGG GGTCGGGGGA GACCATCATC ATATGATTAT ACAGATTTTC
151 CCAATTTTFF TCCTCAATGA AATAGCTTAT TTTAAAAATA TAAAATTAGA
201 ATCCCTATAA AGAACACTAC CAATTTTCTT TCCTGAAAGA AACAAATAAA
251 TACTTTGTAA ATAGAAGCAA CTTCATGAAG TAACAGATGT TTTATGTAAA
301 GACATAAAAC TGAACCTGAA TATAACGAGA CGTGTGTGCG AGTAGTAAAA
351 GTTGAAAGTT GGACACACTC ATTGAGACAT ATCTATTTGA TTCCAATGTT
401 TTTCTAAAAG GTAGAGTAAT CCTAGCCAGA GGTTTCACTG GCTCAGTGCA
451 TCACCCAGTA GTGTCFCAGA AGCCAGGAAG GGCTTTCCAT TAGATAATGA
501 ATTATGAAAT GTCTCACACT GGAAAAACCA GTCATCCGCT GATGTCATGC
551 TGATTCCAAC CAATCCCAA CAAAGCCCCA GCCCTCCTCT GTTTCAGTGG
601 TACCAATGTG TGGTGTACAA ATAAGTAGTA CAGTATAAAA CTTCACAGTG
651 CCAATACCAT GAAGAGGAGC TCAGACAGCT CTTACCACAT GATACAAGAG
701 CCGGCTGGTG GAAGAGTGGG GACCAGAAAG GTAATGCTTT TTAACCTTA
751 CTTCTGAGCT CTTTACACAT TCAAAGATAG GAAAGCTAGG AGGAAITTTA
801 CAACTAATTG GCATTTCCAA TGTGCATTGT GATGTGTACC TTTTATATT
851 ATTCAAGCAG GTTAATACAG CTTTAAATAG TCCTAGAGCA TGCAAATAGA
901 TTATATGTTT ATACAAGCCA CTCAGCACAT ATATACAAGT ACATATGCCA
951 AAGAGAAAGC TATTTTAAAG AGTTACATTG GCAAACAGTA AATTCAGGGA
1001 ACACACACAT ACTCAGATGC AGAGAGAATC CAAATATTGA TAAGTTGCAC
1051 TTATCTAAAT GCTGCTATTA GGACTCCTGA GTTGTTTAGA GCCATTAAC
1101 TTTTGGTTGT ATTTTCAGACT TTCTTGTAAG ACTTAATTGA ACTGCAAAAC
1151 ATTTTGGGTA CTGTATATGT GACTCCAAAT AGGTGGATGA TGTTAAGTAT
1201 TATAGCACAA AGATTTTTTA TAAAACCATT GTAACACAAA TGTCCCCTGC
1251 CTCCCCCAT CTCTTTCCAC ATCCCCGTAA AAAATATGAG GCTTTTTAGG
1301 CAATGTTGAC AAAGTTTTAA CAATAATGGT GGAGTAATTG ATGTTTCTGG
1351 AGCTGAAACC CCAAAGGTGT TAGGTTACTT GTAACAGAAA AAGTCTTACA
1401 AATAGTTGTT TTGGAAAAGG GGACAGTATA TATAATTCAG AAAGCATGTG
1451 TAACCTGTGC AAAGTGTAA TATAACTTAG TGTACAAT TTCTTGCCCT
1501 CTCCCCTTG CACTCAGATC TTATCTTGTA GTAATGATAT TTATTAACTC
1551 TTTCCACCTA AACTGCATTG CTTGACTGTA ATGCTATGAA CACACTAGGT
1601 GTCAGATATA AGCTGAGTGT ATCTTCAGAA ACCAAGAGGG CTTATGTGTG
1651 GGAAAGAAAC CGAGAGGGAA GGAACGCTTT AACAGATGGA CCCCTTAAAG
1701 ATTCTTCTGC AAGATAAAAG CAATAAGACA GAAAATGAAA AAGAGGGGAG
1751 GGGGAAGAAT TTTTTTAAAG CTTAGAAAAG GCATTGTTAA AAAATTCACA
1801 TTTTCTTTT TCTGTGCACA CTAAAATCCA TGATGATTTT ATCTGCACTG
1851 TTCTTTTGAG GGAAAAGAA GCAGTCAAGG AGGCTGTCTA TGAATGCACT
1901 GTCCGGGACA GGCTTGGGGC AAGCTGAAAA AACTACCACA TGACAGAGAA
1951 AAATAATTTG CCAATATATT TTAGAGAGTC TTTTCCATA GGACCAGTTA
2001 TTCAAGTCAT ACGAGTGCAC TCTTTTATA AAAGGATGTG GGAAAGGCCA
2051 AGAGAATTTT GCATTTTATC TGTGAAGTCC GGCGAGTGGT GGTAGGCTGT
2101 AATGTGTGAG AGTGAGTGGG TCCCCGGCAG AAGGGGGCAG CTGAACGGCA
2151 CGGGGAGAAA GCGCTTCTGG AACTTGGGCT TGTGACAGGC TGCCTGCCCT
2201 CTGGTCCCTC AGTGCCCTGC TGCATTTAC AGTTGGGAAG AGTGGAGTGT
2251 ATTATATGAC CCCAAACAAA AGTTCCATTG CGTCTCCTC AGATTGCTGTG
2301 CCAGTGTTGA TGACCTGAAC ATTTAAATAT GAATGAATTG GGGGAAAGGA

```

2351 CCATCTCCCC TGGATCCCAT CAGGCCAGAA CAATCCTCTG TTACCCCTGA
 2401 GTCCTCTTTC CCTGACCTCC ACTACCTGTC CACTGGACCT CCCTGCACCC
 2451 TCTGCCCCAC CACGTGGCCA GGTGGGCGTT CTACCACCTA GGGCTGTGGC
 2501 TTGGCTGGGT GGAGGGGCGG TGGGAACACT TTTTCAATCA ATTCATCCCT
 2551 ATTGATTGAG ACACTGTGTT TGTGTGGGGT TTCTTTTCTC CCCTCCAAAA
 2601 AAGGAAGAAG GTGAAACCAG GAGACTGGGC AGAGAAAGAA AAAAAAATAG
 2651 TGAACAAAAT TAGGATAATT TATTTTAGAA GAGAAAGTAG AACCCCGAA
 2701 AATGGTGATA TTTGAAGAGA GGTGTCTGTG AGGAAGCTAA GAGCAGAAGG
 2751 AGAGCAGCCT GTCAGAAAAC GGGCTGTCCC TCCCTCCCTA ATCACAGCCC
 2801 TACTCACAGC AAACCTCCCTC CCTCTCCATT CACTCACTTA CTTAGGGCCA
 2851 ATCCTTTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTTTC
 2901 CCTCTCTCCC TCTCCCCCTC CCTTCCCTCC CTCTCTCCCT CTCTCTCCCC
 2951 CTTCTTTCCC TCTCTTCTTCT CTCCCCCTCT CTCTCTCTCT TCTGTCTCTG
 3001 TCTCCCTCCC ATCCTCTCTC TCTGTCTCTG TCTGTCTCCC CGCCACCCCTG
 3051 TCTCTCCCTC CCTCCCTGTC TCCCTCCCTC CCTCCCTCCT TCCTTCTCTC
 3101 TTACTCGGAG ACAGTCAGAA CTCTCCTCCC TGACAGCCAC AAACCTACAG
 3151 CACTGACTGC ATTCAGAGAG GAACCTGCAA ACAAACCTC ACAGAAAAC
 3201 TTTGTCTCTT GTTCCAGAGA ATTTGCTGAA GAGGAGAAGG AAAAAAATAA
 3251 CACCAAAAAA AAAAATAAAA AAATCCACAC ACACAAAAA ACCTGCGCGT
 3301 GAGGGGGGAG GAAAAGCAGG GCCTTTTAAA AAGGCAATCA CAACAACCTT
 3351 TGCTGCCAGG ATGCCCTTGC TTTGGCTGAG AGGATTTCTG TTGGCAAGTT
 3401 GCTGGATTAT AGTGAGGAGT TCCCCACCC CAGGATCCGA GGGGCACAGC
 3451 GCGGCCCCCG ACTGTCCGTC CTGTGCGCTG GCCGCCCTCC CAAAGGATGT
 3501 ACCCAACTCT CAGCCAGAGA TGGTGGAGGC CGTCAAGAAG CACATTTTAA
 3551 ACATGCTGCA CTTGAAGAAG AGACCCGATG TCACCCAGCC GGTACCCCAAG
 3601 GCGGCGCTTC TGAACCGGAT CAGAAAGCTT CATGTGGGCA AAGTCGGGGA
 3651 GAACGGGTAT GTGGAGATAG AGGATGACAT TGGAAGGAGG GCAGAAATGA
 3701 ATGAACTTAT GGAGCAGACC TCGGAGATCA TCACGTTTGC CGAGTCAGGT