

(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
2014 年 2 月 6 日 (06.02.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/019108 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/12 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/001311
- (22) 国际申请日: 2012 年 9 月 26 日 (26.09.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210279449.7 2012 年 7 月 28 日 (28.07.2012) CN
- (71) 申请人: 深圳华大基因研究院 (BGI SHENZHEN)
[CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (72) 发明人: 祁鸣 (QI, Ming); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 易鑫 (YI, Xin); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 王娟 (WANG, Juan); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 陈洋 (CHEN, Yang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 陈演华 (CHEN, Yanhua); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 钟晶 (ZHONG, Jing); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 吴仁花 (WU, Renhua); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 杨焕明 (YANG, Huanming); 中国广

东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

- (74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司 (PEK-SUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区学院路 35 号世宁大厦 908 室, Beijing 100191 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

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: NMNAT1 MUTANT GENE, PRIMERS, KIT, AND METHOD FOR DETECTING SAME AND USE THEREOF

(54) 发明名称: NMNAT1 突变基因、检测其的引物、试剂盒和方法以及其用途

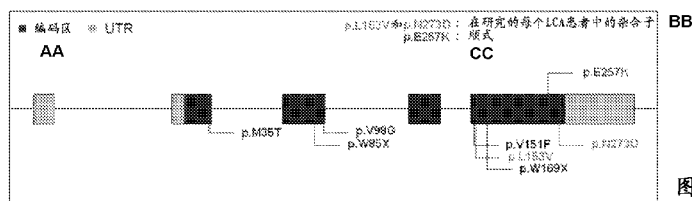


图 2 / FIG. 2

AA CODING REGION
BB PL183V AND PN273D: THE HETEROZYGOE OF EACH LCA PATIENT IN THE STUDY
CC CIS-

(57) Abstract: Provided is a mutant gene relating to a disease, in particular a mutant gene relating to Leber congenital amaurosis. Provided are the mutant gene, primers, kit, and method for detecting same and the use thereof.

(57) 摘要: 提供了疾病相关突变基因, 具体而言是利伯先天性黑矇相关突变基因。提供了突变基因、检测其的引物、试剂盒和方法以及其用途。

WO 2014/019108 A1

NMNAT1 突变基因、检测其的引物、试剂盒和方法以及其用途

技术领域

5 本发明涉及疾病相关突变基因，具体而言涉及利伯先天性黑矇相关突变基因。

背景技术

利伯先天性黑矇 (Leber congenital amaurosis, LCA) 是一种常染色体隐性视网膜营养不良，其表现为遗传异质性。利伯先天性黑矇是儿童遗传性失明的最常见原因之一¹，是一种严重的视网膜营养不良，表现为在出生时或婴儿期低视力和眼震。迄今为止，发现 LCA 与至少 17 个基因有关。在 20-30% 的筛查到的 LCA 病例中缺乏可辨认的分子病因，表明仍有未被发现的 LCA 致病基因²⁻⁴。现在的临床试验通常通过基因替换寻找分子缺陷，或者对于 RPE65 和 LRAT 不足的情况通过口服 9-顺式视黄醛绕过代谢阻断。

15 因此，本领域仍然需要发现 LCA 相关的基因突变，以及检测相关突变基因的引物、试剂盒和方法。

发明内容

20 发明人测序了患 LCA 个体的外显子组，鉴定出 NMNAT1 基因中的无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*) 和错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys)，发现这种突变基因与 LCA 有关。

因此，在第一方面，本发明涉及 LCA 的生物标记物，即突变的 NMNAT1 基因或 NMNAT1 蛋白，所述生物标记物是具有选自如下的突变的 NMNAT1 基因或 NMNAT1 蛋白：

25 无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*)；
错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys)。

在一个实施方案中，本发明的突变 NMNAT1 基因的序列是具有以下突变的 SEQ ID NO:1：

30 无义突变 c.507G>A；和/或
错义突变 c.769G>A。

在另一个实施方案中，本发明的突变的 NMNAT1 蛋白的序列是具有以下突变的 SEQ ID NO:2:

无义突变 p.Trp169*; 和/或

错义突变 p.Glu257Lys。

5 在第二方面，本发明涉及一种检测 LCA 的方法，所述方法包括检测受试者的 *NMNAT1* 基因或 NMNAT1 蛋白中是否存在突变位点，如果有突变位点，则所述受试者被鉴定为患有 LCA 或易患 LCA，或者其后代会患有 LCA 或易患 LCA，所述突变位点选自如下任一种或其组合：

无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和

10 错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys)。

在一个实施方案中，所述检测 LCA 的方法包括步骤：

提取受试者的 DNA 样品，

对所述 DNA 样品进行 PCR 扩增得到扩增产物，得到 *NMNAT1* 基因外显子和外显子/内含子边界，

15 将上述 PCR 扩增的扩增产物进行序列测定得到测序结果，

对所述测序结果进行分析，确定 *NMNAT1* 基因中是否存在突变位点，如果有突变位点，则所述受试者被鉴定为患有 LCA 或易患 LCA，或者其后代会患有 LCA 或易患 LCA，所述突变位点选自如下任一种或其组合：

无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和

20 错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys)。

在一个更优选的实施方案中，PCR 使用 KAPA2G Robust HotStart (KAPABIOSYSTEMS, Woburn, MA) 进行。

在一个更优选的实施方案中，PCR 扩增的引物参考人基因组进行设计，例如如下至少一组引物：

25 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4;

SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6;

SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10。

在一个更优选的实施方案中，序列测定是 Sanger 序列测定。

30 在一个更优选的实施方案中，序列分析使用 Mutation Surveyor program (State College, PA) 进行。

在一个实施方案中，NMNAT1 蛋白为 SEQ ID NO:2 的序列表示。

在另一个实施方案中，*NMNAT1* 基因为 SEQ ID NO:1 的序列表示。

在又一个实施方案中，本发明的检测 LCA 的方法包括如下至少一组引物扩增的步骤：

SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4;

5 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6;

SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10。

10 在再一个实施方案中，本发明的检测 LCA 的方法中检测突变位点通过选自如下的技术进行：测序、电泳、核酸杂交、原位杂交、PCR、逆转录酶链反应和变性高效液相色谱。

在本发明第二方面的方法中，优选检测纯合的突变 *NMNAT1* 基因。

在第三方面，本发明涉及一种检测突变 *NMNAT1* 基因或 *NMNAT1* 蛋白的方法，所述方法包括检测受试者的 *NMNAT1* 基因或 *NMNAT1* 蛋白中是否存在突变位点，所述突变位点选自如下任一种或其组合：

15 无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和

错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys)。

在一个实施方案中，本发明的检测突变 *NMNAT1* 基因的方法包括步骤：提取受试者的 DNA 样品，

20 对所述 DNA 样品进行 PCR 扩增得到扩增产物，得到 *NMNAT1* 基因外显子和外显子/内含子边界，

多上述 PCR 扩增的扩增产物进行序列测定得到测序结果，

对所述测序结果进行分析，确定 *NMNAT1* 基因中是否存在突变位点，所述突变位点选自如下任一种或其组合：

无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和

25 错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys)。

在一个更优选的实施方案中，PCR 使用 KAPA2G Robust HotStart (KAPABIOSYSTEMS, Woburn, MA) 进行。

在一个更优选的实施方案中，PCR 扩增的引物参考人基因组进行设计，例如如下至少一组引物：

30 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4;

SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6;

SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10。

在一个更优选的实施方案中，序列测定是 Sanger 序列测定。

在一个更优选的实施方案中，序列分析使用 Mutation Surveyor program (State College, PA) 进行。在一个实施方案中，NMNAT1 蛋白为
5 SEQ ID NO:2 的序列表示。

在另一个实施方案中，NMNAT1 基因为 SEQ ID NO:1 的序列表示。

在又一个实施方案中，本发明的检测突变 NMNAT1 基因或 NMNAT1 蛋白的方法包括如下至少一组引物扩增的步骤：

SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4;

10 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6;

SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10。

在再一个实施方案中，本发明的检测突变 NMNAT1 基因或 NMNAT1 蛋白的方法中检测突变位点通过选自如下的技术进行：测序、电泳、核酸杂
15 交、原位杂交、PCR、逆转录酶链反应和变性高效液相色谱。

本发明第三方面所述检测突变 NMNAT1 基因或 NMNAT1 蛋白的方法可以用于诊断 LCA 的目的，也可以用于非诊断疾病的目的。在一些实施方案中，本发明中所述的非诊断疾病的目的包括但不限于研究 SNP 分布和多肽性，用于家族演化研究。这样的应用是本领域技术人员可以理解的。

20 根据本文的描述可以看出，有些个体携带本发明所述的突变 NMNAT1 基因但不患 LCA，例如仅一条染色体携带所述突变的杂合基因型。对这部分人群的检测可以不涉及任何诊断疾病的目的，因为这些个体本身并不患病。但对于他们进行检测的结果可以作为有用的信息使用，例如作为育前检查的重要指标，指导生育，或者用于突变携带者筛查，或者作为 SNP 分布
25 和多态性研究的工具或者追踪基因突变或家族演化。这样的应用也是本领域技术人员可以理解的。因此，本发明第三方面所述检测突变 NMNAT1 基因或 NMNAT1 蛋白的方法涉及检测杂合突变。

但本发明第三方面所述检测突变 NMNAT1 基因或 NMNAT1 蛋白的方法也包括检测纯合突变。

30 在第四方面，本发明涉及通过 PCR 检测突变 NMNAT1 基因或 NMNAT1 蛋白中使用的引物对，所述突变是选自如下任一种或其组合：

无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和/或

错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys),

其中所述引物对分别基于选自如下的位置在基因组序列或 cDNA 序列上前后设计, 使得扩增该位置: cDNA 序列第 507 位和第 769 位。

在一个实施方案中, 所述引物对是:

- 5 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4;
 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6;
 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8; 或
 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10。

10 在第五方面, 本发明涉及与突变 *NMNAT1* 基因互补的核酸探针, 所述突变是选自如下任一种或其组合:

 无义突变 c.507G>A; 和/或

 错义突变 c.769G>A,

 所述探针与突变 *NMNAT1* 基因的互补区包括选自如下的基因组序列或 cDNA 序列上的位置: cDNA 序列第 507 位和第 769 位。

15 在第六方面, 本发明涉及检测突变 *NMNAT1* 基因或 NMNAT1 蛋白的试剂盒, 包含一组或多组引物对, 其中所述突变是选自如下任一种或其组合:

 无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和

 错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys),

20 其中所述引物对分别基于选自如下的位置在基因组序列或 cDNA 序列上设计, 使得其扩增产物涵盖该位置: cDNA 序列第 507 位和第 769 位。

 在一个实施方案中, 所述检测突变 *NMNAT1* 基因或 NMNAT1 蛋白的试剂盒包含选自如下的至少一组引物:

- 25 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4;
 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6;
 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8;
 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10。

 在第七方面, 本发明涉及检测突变 *NMNAT1* 基因的试剂盒, 包含一个或多个核酸探针, 所述突变是选自如下任一种或其组合:

30 无义突变 c.507G>A; 和

 错义突变 c.769G>A,

 所述探针与突变 *NMNAT1* 基因上包含选自如下位置的基因组序列或 cDNA 序列上的区域互补: cDNA 序列第 507 位和第 769 位。

在第八方面，本发明涉及一种检测基因外显子和外显子/内含子边界突变的方法，包括步骤：

1. 从受试者提取 DNA 样品，

2. 对上述 DNA 样品的外显子组和所有外显子/内含子边界序列进行
5 测序得到测序片段，

3. 将上述测序片段与参考序列比对，得到基因外显子和外显子/内含子边界突变。

在一个实施方案中，在第 2 步骤之前对上述样品进行外显子组捕获以收集人基因组 DNA 的 CDS 区，将富集外显子的 DNA 文库进行第二文库构建，用于序列测定。
10

在一个实施方案中，第 2 步骤中的测序按如下进行：

1) 将样品 DNA 随机打断成 200-300 bp 左右的片段，随后在片段两端分别连接上接头制备杂交文库；

2) 文库经纯化后经过连接反应介导的 PCR (LM-PCR) 的线性扩
15 增与生物素标记的 DNA 文库进行杂交富集，再经过 LM-PCR 的线性扩
增后进行上机测序，读取长度为 90 bp，每个样本的平均测序深度最少
为 50。

在一个实施方案中，在第 3 步骤中去除重复测序片段。

20 附图说明

图 1. 患者 1 的视网膜表现，表明视网膜血管减少、视网膜黄斑色素沉着和萎缩性黄斑损害。

图 2. 在 NMNAT1 基因中被确认的突变的原理图。对无以前鉴定的突变的 LCA 患者通过 Sanger 序列测定筛查 NMNAT1 基因突变。对于可得到的家庭成员也进行基因组 DNA 的分离和分析。自患者 6 的亲本样品不可获得。患者 9 和 10 仅目前样品可获得。
25

图 3. 对无以前鉴定的突变的 LCA 患者通过 Sanger 序列测定筛查 NMNAT1 基因突变。对于可得到的家庭成员也进行基因组 DNA 的分离和分析。自患者 6 的亲本样品不可获得。患者 9 和 10 仅目前样品可获得。

图 4. 图像表示显示了与人 NMNAT1 原聚体结构上鉴定的 LCA 突变相关的残基。总体结构显示为灰色带状物，结合的 NAD 为橙色棒状物。所有 8 个突变位点显示为棒状物（无义蓝绿色，错义绿色）。红色虚线显示三
30

个残基和结合的 NAD 之间的最小距离（见下文）。

具体实施方式

在本发明中，采用本领域通用表示法表示基因突变和蛋白质突变。在本发明中，c.507G>A表示cDNA第507位核苷酸由G变成A；p.Trp169*和p.Trp169stop都表示编码蛋白质第169位的密码子由编码Trp的密码子变成终止密码子；c.769G>A表示cDNA第769位核苷酸由G变成A；p.Glu257Lys表示编码蛋白质第169位密码子由编码Glu的密码子变成编码Lys的密码子，或者表示蛋白质第169位由Glu变成Lys。

因此，在一个实施方案中，本发明的突变NMNAT1基因的编码第169位氨基酸的密码子可以是AAA或AAG。

野生型人NMNAT1基因的cDNA序列如SEQ ID NO:1所示。野生型人NMNAT1蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。野生型人NMNAT1基因的mRNA序列如SEQ ID NO:11所示。

对于本发明说明书和权利要求书中，提及基因序列，本领域技术人员应当理解，实际包括互补双链的任意一条或者两条。为了方便，在本说明书和权利要求书中，虽然多数情况下只给出了一条链，但实际上也公开了与之互补的另一条链。例如提及NMNAT1基因的cDNA序列，实际上包括该序列以及其互补序列。例如，提及SEQ ID NO:1，实际包括其互补序列。本领域技术人员还可以理解，利用一条链可以检测另一条链，反之亦然。

本申请中的基因序列包括DNA形式或RNA形式，公开其中一种，意味着另一种也被公开。例如提及NMNAT1基因的cDNA序列，实际也包括相应的RNA序列。

在本发明中，外显子/内含子边界是指从外显子-内含子边界开始1-200，例如10-100，例如20-80，例如30-70，例如40、50、60个内含子核苷酸。

为了发现已知LCA相关基因中的突变，发明人对17个已知LCA相关基因的编码区和所有外显子/内含子边界（从外显子-内含子边界开始至少50个内含子核苷酸）进行测序，所述17个基因即AIPL1、CABP4、CEP290、CRB1、CRX、GUCY2D、IQCB1、LCA5、LRAT、RD3、RDH12、RPE65、RPGRIP1、SPATA7、TULP1、IMPDH1和OTX2，这些基因的相关信息可以从孟德尔人类遗传数据库（OMIM）获得。在所研究的220名LCA个体中，在160个病例的两条染色体上发现了突变体等位基因，在10个病例中发现一个突变体等位

基因。

因为在患者1（临床表型信息见后文表5）中未鉴定到已知LCA基因，对其进行了全外显子组序列分析（参见表1和2和实施例）。总共鉴定了2460个未报道基因变异。发明人优选了10个基因，每个均具有以前未报道的无义变异，预计会截短产物，对这些基因进一步进行分析。GeneCards表明，这10个基因中的5个在视网膜中表达，其中包括NMNAT1，该基因遗传图谱在1p36区。LCA9是唯一在分子上仍不明确的基因座，以前在同族的巴基斯坦家族中的遗传图谱在染色体1p36⁵。

基因NMNAT1编码烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）生物合成通路中的一种酶，被认为可抗轴突变性。

通过外显子组序列测定在NMNAT1基因中鉴定了无义变异（c.507G>A, p.Trp169*）和错义突变变异（c.769G>A, p.Glu257Lys），并通过Sanger序列测定（PCR引物在表3中提供）进行了确认。亲本测试确定，父本携带所述无义变异的杂合子，而母本携带所述错义变异的杂合子，因NMNAT1基因突变造成的LCA是常染色体隐性遗传病，因此父母不会致病。但子代同时遗传了这两个变异，因此造成NMNAT1基因功能异常，从而致病的。分析表明，未受影响的胞亲不携带变异。总之，这些结果支持了NMNAT1基因是LCA候选基因。

表 1. 通过外显子组测序筛查 LCA 基因

过滤	患者 1
全部	58780
在 dbSNP 中	56320
新的	2460
Alt_start	3
同义	7161
错义	5726
无义	29
通读	6
间接	1654
内含子	41612
5-UTR	537
3-UTR	1845
基因间的	1861

表 2. 通过外显子组测序鉴定的新无义突变。RNA 表达模式通过 GeneCards 分析。

基因	染色体定位	无义突变	视网膜中
NMNAT1	1p36.22	p.W169X	表达
KIAA0090	1p36.13	p.R660X	表达
TCHHL1	1q21.3	p.Q656X	不表达
DUSP27	1q22-q24	p.R897X	不表达
SLC26A6	3p21.3	p.R216X	表达
HYAL4	7q31.3	p.R210X	不表达
IFNA10	9p22	p.C20X	不表达
KRT83	12q13	p.E201X	不表达
PABPC1	8q22.2-q23	p.E345X	表达
TPTE	21p11	p.R62X	表达

上述基因的相关信息可以从孟德尔人类遗传数据库（OMIM：www.omim.org）获得。

X表示翻译终止。

表3. PCR引物序列

SEQ ID NO:3	NMNAT1-F1	GGTTGCATCACTACACTCTAGCC
SEQ ID NO:4	NMNAT1-R1	TTCTCTAGTCTTAAGCCACTTTTGG
SEQ ID NO:5	NMNAT1-F2	TTGATCGTAATATTTCTGTGCAT
SEQ ID NO:6	NMNAT1-R2	GCAACATTGAAACATGGTAAAAA
SEQ ID NO:7	NMNAT1-F3	TGTGCCCAGCTATAAATAATGTT
SEQ ID NO:8	NMNAT1-R3	GCTCAGCTACAGAATCTTATCAACTC
SEQ ID NO:9	NMNAT1-F4	GGGGAAGAAAAAGCATACCC
SEQ ID NO:10	NMNAT1-R4	TTGTTTCAGATCCCCAAATG

为了进一步评估NMNAT1基因在LCA中作用,通过Sanger序列测定分析了在已知LCA相关基因中无以前鉴定突变的50个不相干LCA病例。另外10名患者被鉴定在NMNAT1基因中有复合的杂合突变(图2和表4)。值得注意的是,所有11名患者携带共同错义突变突变c.769G>A (p.Glu257Lys),这是所鉴定的两个变异等位基因中的一个。如谱系分析所示,所述鉴定的突变都与LCA表型共分离(图3)。

表 4. 鉴定的突变#患者的国家来源和种族总结。

患者	突变 1		突变 2		国家/种族/祖先
	DNA	蛋白	DNA	蛋白	
1	c.507G>A (父系)	p.Trp169Stop	c.769G>A (母系)	p.Glu257Lys (0.089)	父系: USA/亚洲人(中国人)、西班牙人、高加索人 母系: 彻罗基印第安人、西班牙人、高加索人
2	c.507G>A (父系)	p.Trp169Stop	c.769G>A (母系)	p.Glu257Lys (0.089)	父系: 巴西/土耳其、德国、意大利、葡萄牙 母系: 巴西/波兰、葡萄牙、黎巴嫩、意大利
3	c.507G>A (母系)	p.Trp169Stop	c.769G>A (母系)	p.Glu257Lys (0.089)	父系: 巴西/巴西人祖先 母系: 巴西/巴西人祖先
4	c.457C>G (父系) c.817A>G (父系)	p.Leu153Val (0.987) p.Asn273Asp (0.915)	c.769G>A (母系)	p.Glu257Lys (0.089)	父系: 加拿大/西欧人 母系: 加拿大/西欧人
5	c.293T>G (父系)	p.Val98Gly (0.909)	c.769G>A (母系)	p.Glu257Lys (0.089)	父系: 巴西/非洲人和葡萄牙人 母系: 巴西/西班牙人高加索人
6	c.451G>T (亲本样品 不可获)	p.Val151Phe (0.986)	c.769G>A (亲本样品不 可获)	p.Glu257Lys (0.089)	父系: 加拿大/希腊人 母系: 加拿大/希腊人
7、8	c.104T>C (父系)	p.Met35Thr (0.601)	c.769G>A (母系)	p.Glu257Lys (0.089)	父系: USA/高加索人 母系: USA/高加索人
9、10	c.255G>A (母系)	p.Trp85Stop	c.769G>A (父系)	p.Glu257Lys (0.089)	父系: 加拿大/英国人和荷兰人 母系: 加拿大/英国人和荷兰人
11	c.507G>A (母系)	p.Trp169Stop	c.769G>A (父系)	p.Glu257Lys (0.089)	父系: 澳大利亚/澳大利亚人 母系: 澳大利亚/英国人

提供了所鉴定的错义变异的PolyPhen-2预测。预测的损伤变异的最大值是1.0。然而，应注意数据解释。变异p.Glu257Lys最初被预测可能损伤，分值为0.903。然而，最后预测表明，该变异是良性，分值为0.089。相反，变异p.Met35Thr最初被预测是良性，分值为0.059。最后预测可能损伤，分值为0.601。

NMNAT1 (烟酰胺单核苷酸腺苷酰转移酶1) 包含4个编码外显子，编码279残基蛋白质，在NAD⁺生物合成中具有重要作用，其中它催化从烟酰胺单核苷酸 (NMN) 和ATP形成NAD⁺。*NMNAT1*基因以前未与LCA关联，但与轴突变性有关⁶。纯合的*Nmnat1*基因敲除小鼠不能活到出生，纯合的*nmnat*基因突变黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 也是致死的；这些结果支持了*Nmnat1*基因在一些物种中有必需功能的观点⁷。*NMNAT1*基因的遗传图谱在1p36.22，在以前确定遗传图谱的LCA9基因座附近。所述LCA9家族中受影响的个体都有先天的非进行性严重视觉损伤⁵。类似地，本文报道的11个LCD病例都具有非常早发的严重视觉损失 (表5)。

通过在9个无关家族和来自4个不同国家的共11名病例中发现疾病相关突变，本公开提供了*NMNAT1*基因是引起LCA的基因的证据 (表4)。

在临床上,所有11个病例具有严重表象(表5)。虽然数据很少,但疾病严重性可能与突变的性质有关。本文使用的术语“等位基因钳(allele clamping)”涉及如下过程:通过该过程在存在第二变异等位基因下检查具有相同变异(例如p.Glu257Lys)的个体的表型,以推断所述第二等位基因的效应。携带无义突变p.Trp169*的所有4名个体都在出生时失明,仍然存在光感至不同程度。对于仅携带错义变异的5名个体,在出生后数年内视觉降低。所有受影响个体的视网膜具有边缘黄斑外观和萎缩性黄斑缺损样损害(图1;在患者8中描述为黄斑瘢痕形成)。黄斑损害的扩大在随访检查中在患者2年龄6-9个月和患者4年龄5-7岁时被记录到。患者4在第二染色体上有两个变异等位基因,在8岁时有20/200 OD(右眼)和20/400 OS(左眼)的视敏度,是唯一视网膜电流图(ERG)显示原发锥体机能不良而不是所有反应都深度丢失的病例;该个体的诊断被修正为视锥视杆营养不良。患者5在3岁时出现左眼渗出性视网膜炎(Coats' disease)。患者6是唯一携带c.451G>T(p.Val151Phe)等位基因的个体,在18-24岁持续丧失大部分与光感有关的视觉。

c.769G>A(p.Glu257Lys)的等位基因频率估计是0.001(dbSNP:rs150726175)。在本文中,本发明人没有发现有个体为纯合c.769G>A(p.Glu257Lys)等位基因。本发明人鉴定的其他变体均未在任何公共数据库中报道。p.Trp169*变异出现在9个家族的4个中;如此高发生率的原因未知。

涉及数个不同生物的多项研究已将NMNAT1基因的功能与轴突变性相关联⁶。在*Wlds*小鼠模型中,通过将Ube4b序列与Nmnat1蛋白融合形成的杂合蛋白的作用是保护切断外显子^{9, 10}。同时,果蝇眼中Nmnat基因功能丧失会导致严重的神经变性表型,但催化功能不是光感受器分化或发育必需的。相反,Nmnat蛋白参与天然神经元的维持和完整性。果蝇光感受器Nmnat基因功能丧失导致已发育的神经元细胞退化——一种可以被认为是视网膜营养不良的表型¹¹。在本申请之前,NMNAT1未与人疾病关联。因此,发明人已经将眼鉴定为体内研究NMNAT1功能的生物相关器官。

NMNAT1基因是普遍表达的,在催化NAD⁺生物合成的最后步骤中显示最高特异性活性。人NMNAT1是一种同六聚体,每个原聚体包含中央六股平行β折叠,侧面是数个螺旋^{12, 13}(图4)。在本文中,所有11名患有LCA的个体都携带p.Glu257Lys变异。根据人NMNAT1的晶体结构,Glu257位于短

C末端螺旋中的外表面。值得注意的是, 相邻残基Ser256被预测是磷酸化位点, 并且可能参与与其他相关蛋白质例如多(ADP-核糖)聚合酶或蛋白激酶的物理相互作用^{12、13}。以带正电荷的赖氨酸置换带负电荷的谷氨酸残基可能改变表面的静电性质, 从而影响所提出的物理相互作用。Asn273位于最后的短螺旋(残基267-274)中, 参与协调活性部位水分子^{12、13}。以酸性残基(天冬氨酸)置换该残基将很可能影响酶活性。Met35和Val151位于所述蛋白的疏水核心中, 而Val98和Leu153非常靠近配体结合部位(距离大约6-7 Å) 4种变异(p.Met35Thr、p.Val98Gly、p.Val151Phe和p.Leu153Val)最有可能干扰局部相互作用, 后果是改变活性部位, 从而影响酶活性。

将NMNAT1基因鉴定为患LCA个体亚组的成因基因对于研究其生物功能提供了一个新的方向。由于NMNAT1不大, 它是基因替代疗法的有希望靶。因为NMNAT1在神经蛋白中有作用并且是一种酶, 所以药物介入也是可能的。限制对视网膜的临床表现可以有利于这些治疗方法。最近在基因治疗介导的视网膜功能发现中的进展^{14、15}凸显了发现所有患LCA的个体背后的遗传原因的重要性。

表 5. 患者表型详情总结。

患者1	男性。婴儿LCA, ERG不可记录, 萎缩性黄斑损害, 光感(?)。
患者2	男性。婴儿LCA, 眼颤, 6个月裸眼光感, 1岁无光感, 萎缩性黄斑损害。
患者3	女性。4个月表现眼手征兆, 使用Teller卡测量没有视觉, 眼颤, 眼窝凹陷, 视网膜色素沉着, 黄斑呈现被击打的铜表象(早期萎缩性损害), 儿童期无视觉(有触觉)。
患者4	男性。婴儿期患LCA, 2个月眼震和弱视觉, 6个月出现色素减少的黄斑损害, 可以看到颜色, 从7岁开始夜视力变弱, 视网膜血管减弱, ERG上视锥主要功能障碍, 在8岁时视敏度20/200 OD和20/400 OS, 视野丧失, 诊断修正为视锥-杆营养不良。
患者5	男性。婴儿期患LCA, 3个月时无成像, 1岁时黄斑萎缩和细视网膜黄斑色素沉着。4岁时渗出性视网膜炎OS。
患者6	女性。6个月时诊断为RP, 儿童早期诊断为LCA。至22和24岁时分别只能看到颜色和形状。26岁时仅有光感。萎缩性黄斑损害, 视网膜血管萎缩, 有骨头针状物的色素沉着现象。
患者7、8 (胞亲)	患者7: 女性。在2岁半视网膜血管萎缩, 萎缩性黄斑损害, 并且周边视网膜正常, 被诊断为黄斑变性。在10岁时视觉LP, ERG深度异常, 黄斑损害扩大, 诊断修改成LCA。患者8: 男性。在4.5个月时诊断为LCA: 巡回眼运动, 无成像, 深度异常ERG。
患者9、10 (胞亲)	患者9: 男性。婴儿期弱视觉。儿童早期诊断为LCA。之后失去色觉。在21岁萎缩性黄斑损害, 视神经乳头苍白, 视网膜血管萎缩, 周围视网膜色素(沉着)。在22岁时报告视光感。在25岁患者有瞳孔呆滞, 反常瞳孔反应。患者10: 患病的兄弟。
患者11	女性。在8周时, 她不能注视和跟随, 并且被观察到眼震和巡回眼运动。ERG表明严重的双侧视网膜功能障碍, 有光感但无图形知觉。观察到有萎缩性黄斑损害。

患者详细说明

LCA 的诊断是基于临床评估（缺乏有限成像、眼颤和婴儿瞳孔弱反应、眼底检查与诊断一致），疑似病例再用视网膜电流图（ERG）确认。患者被诊断为黄斑缺损，这是萎缩性损害，而不是真正的先天缺损。患者 1 - 6 和患者 11 是单个病例。患者 7 和 8 是胞亲。患者 9 和 10 是胞亲。患者 1、7 和 8 来自 USA；患者 2、3 和 5 来自巴西；患者 4、6、9 和 10 来自。患者 11 来自澳大利亚。书面的知情同意书由他们的父母或监护人签署，所述研究得到了 BGI 和 OHSU (P-WC) 伦理委员会（the Institutional Ethics Committee）批准。

患者 1 来自 Children's Hospital of Los Angeles

该男性婴儿，其母亲是彻罗基印第安人、西班牙人和高加索人后代，其父亲是亚洲人（中国人）、西班牙人和高加索人后代，足月妊娠生产，并发有破裂的绒毛膜下血肿，需要卧床直至 7 个月。该母亲注意到孩子出生后数小时内缺乏明显的视觉。在几个月之内，Claremont Eye Associates 儿科眼科医生和 Children's Hospital Los Angeles 视网膜专家对孩子进行诊断发现视网膜电流图（ERG）在噪音以上没有记录。基于缺乏视觉反应、视网膜外观（图 1）和 ERG 测试，患者被诊断为 LCA。患者 1 可能仍然具备光感。患者 1 是家庭唯一患病者。他的哥哥表现正常。

患者 2 由 JS 提供

该男性为巴西高加索人种婴儿，其母系祖先来自波兰、葡萄牙、黎巴嫩和意大利，父系祖先来自土耳其、德国、意大利和葡萄牙，为正常妊娠和剖宫产出生。父母在头 3 个月注意到孩子眼颤。在 6 个月时，由于眼颤和无成像咨询 Sao Paulo 眼遗传专家，该专家发现孩子双眼裸光感、黄斑萎缩（所谓的黄斑缺损）和视网膜细黄斑色素沉着，因此确认为 LCA。到 9 月龄，照片显示黄斑萎缩面积增加。患者 2 没有胞亲，是家里唯一患 LCA 的病人。在一岁期间，无光感。

患者 3 由 LG 提供

患者 3 是巴西女婴，其母亲注意到其在 4 个月时压眼。检查发现 Teller 卡检测无视觉、有 Franceschetti 眼手征兆、眼颤、眼窝凹陷、视网膜的椒盐色素沉着以及黄斑呈现被锤击过的铜表象。在儿童时，她已经失明。她是家里唯一患者。

患者 4 由 EH 提供

患者 4 是其祖先是西欧人的男性, 有一个胞亲, 是唯一患病的家庭成员。亲代是无血缘关系的西欧人祖先。在其 2 个月时发现水平眼颤和弱视觉。6 个月龄检查显示色素减少黄斑损害, 患者被诊断为 LCA。5 岁时, 调整下巴头部姿势能明显看到颜色。外侧边界色素沉着过度并双侧萎缩性黄斑损害 (缺损)。7 岁时, 夜视力变弱。检查显示, 色素沉着过度萎缩性黄斑损害增加, 视网膜血管系统萎缩。视野约 145 度。ERG 显示了视锥系统主要功能障碍, 有轻微的视杆-视锥 b 波潜伏期时间延迟, 所有明视反应的振幅和视锥分离的 b 波都降低和 30Hz 闪烁反应延迟。在 8 岁时, 远处视敏度是 20/200 OD 和 20/400 OS, 在近处双侧是 20/100, 视野降低至 95 度。诊断改为视锥-视杆营养不良, 而不是 LCA。仍可以看到颜色。双亲 ERG 正常。一个亲代具有不确定的显著的中外周色素斑点。

患者 5 由 JS 提供

患者 5 是巴西男性, 其母系祖先是西班牙人、高加索人, 父系背景是非洲人和葡萄牙人。他是足月妊娠和正常分娩出生。在 3 月龄时, 其母亲观察到他不看她和任何物体。1 岁时送去 Sao Paulo Hospital 诊断为 LCA。最初视网膜显示黄斑萎缩和细视网膜色素沉着。4 岁时, 他左眼有渗出性视网膜炎。患者 5 的萎缩性黄斑缺损样损害与患者 2 类似。患者 5 是唯一患 LCA 的家庭成员。

患者 6 由 EH 提供

在 6 个月时被诊断为视网膜色素变性, 后来改为 LCA。在 18 岁时失去大部分视觉。20 岁时只能可以看到颜色和形状, 这时患者开始使用导盲犬。22 岁失去看颜色的能力, 24 岁失去看形状的能力。26 岁仅能区分光暗。眼测试显示游动性眼运动、黄斑萎缩性损害、血管萎缩和有骨头针状物的色素沉着现象。无家族史。患者是唯一患 LCA 家庭成员。患者有 5 个胞亲。患者有希腊人祖先, 不是近亲。父亲有 2 个胞亲, 母亲有 8 个胞亲。她的一个祖父母的亲属有视觉障碍。

患者 7 和 8: 由 DW 提供

患者 7 是女性, 年龄 10 岁, 在她弟弟被诊断为 LCA 后, 她被送去 Retina Foundation 进行视觉功能测试和评估。在测试时, 双眼视敏度被评估为 LP。全视野 ERG 显示对单闪蓝光无视杆反应, 并且视锥对 30 Hz 闪烁光的反应下降 99% 并且有延时。这些症状与 LCA 一致。她就诊的临床医生的记录表

明，2岁半眼检查时，双眼视网膜血管高度萎缩、黄斑中大脉络膜视网膜萎缩性损害（与前次就诊相比有恶化）且周边视网膜正常，初始诊断为黄斑变性。

患者7的兄弟（患者8）1岁时在 Retina Foundation 进行测试时发现患病。他在4.5个月时因巡回眼运动且缺乏成像被儿科医生发现。视敏度为 LP。左眼全视野 ERG 对于视杆反应检测没有反应，视锥反应对 30 Hz 闪光幅度降低 99%且 b 波潜伏期时间显著延迟。

患者9和10：由 EH 提供

患者9是高加索男性，他从婴儿期视觉就很弱，在儿童期被诊断为利伯先天性黑矇（LCA）。他在初学走路时仅能够指认亮色，但之后很快失去该能力。21岁时，视网膜镜检查显示双眼黄斑瘢痕形成、视神经乳头苍白和视网膜血管萎缩。22岁时，视敏度报告有光感。25岁进行遗传评估时，发现瞳孔反应呆滞，该反应有时反常，其中当光照进来时瞳孔变大。存在混合的垂直和水平高频、小振幅的匀称眼球震颤。视网膜扩大检查显示黄斑缺损样损害、视网膜血管减少、视神经乳头小且苍白和周围色素结团。眼压正常。双暗适和光适ERG对所有刺激在噪音以上都没有检测结果。他不能完成 Goldmann视野测试。健康和智力等其他方便正常。一个兄弟，30岁，患有疑似LCA；一个姊妹未亦患病。父母祖先为英国人和荷兰人。母亲有1个姊妹和2个兄弟。父亲是被收养的，有1个兄弟和1个姊妹。

患者11：由CB提供

该女性婴儿，其母亲是英国人后裔，其父亲是澳大利亚人后裔，足月妊娠生产，无并发症。在8周时，她不能注视和跟随，并且观察到眼球震颤和巡回眼运动。然后，儿科眼科医生诊断为疑似 LCA。婴儿其他方面是健康的。进行 ERG 检测显示严重的双侧视网膜功能障碍，有光感但无图形感知。脑 MRI 正常。在2岁7个月时，存在一定的光感。患者有两名不患病的哥哥，没有 LCA 家族史。与患者1、2和3的临床表象类似，患者11呈现严重的 LCA。重要的是，在其父母中也观察到黄斑萎缩（黄斑瘢痕形成或黄斑缺损）。事实上，怀疑有 *NMNAT1* 基因突变，基于对眼底成像的分析建议测试 *NMNAT1* 基因。

实施例

方法

1. 样品制备

采集患者及相关亲属外周血，利用试剂盒抽提外周血白细胞中的基因组 DNA (RelaxGene Blood DNA System DP319-02. TIANGEN, China)，利用 NanoDrop 2000 测量 DNA 的浓度及纯度 (Thermo Scientific, USA)，所得的每个标本基因组 DNA 的 OD260/OD280 值均位于 1.7-2.0 之间，浓度不少于 100 ng/μl，总量不少于 30 μl。

2. 测序

然后，对上述样品的外显子组序列进行了测序。

使用 Agilent 38M (Agilent 公司) 芯片，对上述样品进行外显子组捕获以收集人基因组 DNA 的 CDS 区。然后，将富集外显子的 DNA 文库进行第二文库构建，用于 Illumina GA 序列测定。测序平台为 Illumina Genome Analyzer II，依照 Illumina/Solexa 标准建库说明书 (参见 <http://www.illumina.com/>) 进行测序，简述如下：

1) 将样品 DNA 随机打断成 200-300 bp 左右的片段，随后在片段两端分别连接上接头制备杂交文库；

2) 文库经纯化后经过连接反应介导的 PCR (LM-PCR) 的线性扩增与生物素标记的 DNA 文库进行杂交富集，再经过 LM-PCR 的线性扩增后进行上机测序，读取长度为 90 bp，每个样本的平均测序深度最少为 50。

3. 信息分析

人参考基因组及其基因注释下载自 UCSC 数据库 (<http://genome.ucsc.edu/>)，版本 hg19 (build 37)。将来自 LCA 患者样品的序列用 BWA (Burrows-Wheeler Alignment) 与参照序列比对，然后除去重复测序片段 (reads)。将 SNP 调入使用缺省参数的 SOAPsnpc 组件 (Li R, Li Y, Fang X, Yang H, et al, SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing. Genome Res 2009, 19(6):1124-1132)。将插入缺失 (Indel) 调入 Dindel (Albers CA, Lunter G, MacArthur DG, McVean G, Ouwehand WH, Durbin R., Dindel: accurate indel calls from short-read data, Genome Res. 2011 Jun;21(6):961-73)。用于过滤 SNP 的阈值包括如下：

- 1) 一致质量值必须为 ≥ 20 (质量值是 Phred 值，由程序 SOAPsnpc 生成，质量值 20 代表 99% 的基础调用准确性)；
- 2) 支持 SNP 的唯一匹配测序片段的数目必须为 ≥ 4 ；
- 3) 估计的拷贝数不大于 2；
- 4) 两个 SNP 之间的距离应大于 5。

对于 indel，仅提取有由 Dindel 提供的 “PASS” 标签的那些，这表

明高可靠性。

4. 用于确认外显子测序结果并鉴定其他 LCA 患者中 *NMNAT1* 基因突变的方法:

突变分析通过 PCR 扩增和对所有编码外显子和所有外显子/内含子边界 (≥50 nt) 双向 Sanger DNA 序列测定进行。PCR 使用 KAPA2G Robust HotStart (KAPABIOSYSTEMS, Woburn, MA) 进行。引物设计参考人基因组, *NMNAT1* 基因的 PCR 引物见表 3。Sanger 序列测定反应在 SeqWright (Houston, TX) 进行。序列分析使用 Mutation Surveyor program (State College, PA) 进行。

PCR 扩增体系:

10* Ex Taq 缓冲液	3 µl
dNTP (2.5 mM)	2 µl
正向引物 (10mM)	1 µl
反向引物 (10mM)	1 µl
DNA	2 µl
Ex Taq	0.2 µl
H ₂ O	20.8 µl
总计	30 µl

PCR反应条件:

94 °C:	5 分钟;
30 个循环:	94 °C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 45 秒;
72°C:	10 分钟;
12°C:	持续。

序列表说明

SEQ ID NO:1: 野生型人 *NMNAT1* 基因的 cDNA 序列 (其中下划线表示该位置可能发生突变) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95113669>)

ATGGAA AATTCCGAGA AGACTGAAGT GGTTCCTCCTT GCTTGTGGTT
 CATTCAATCC CATCACCAAC ATGCACCTCA GGTTGTTTGA
 GCTGGCCAAG GACTACATGA ATGGAACAGG AAGGTACACA
 GTTGTCAAAG GCATCATCTC TCCTGTTGGT GATGCCTACA
 AGAAGAAAGG ACTCATTCCT GCCTATCACC GGGTCATCAT
 GGCAGAACTT GCTACCAAGA ATTCTAAATG GGTGGAAGTT

GATACATGGG AAAGTCTTCA GAAGGAGTGG AAAGAGACTC
 TGAAGGTGCT AAGACACCAT CAAGAGAAAT TGGAGGCTAG
 TGA CTGTGAT CACCAGCAGA ACTCACCTAC TCTAGAAAGG
 CCTGGAAGGA AGAGGAAGTG GACTGAAACA CAAGATTCTA
 5 GTCAAAAGAA ATCCCTAGAG CCAAAAACAA AAGCTGTGCC
 AAAGGTCAAG CTGCTGTGTG GGGCAGATT ATTGGAGTCC
 TTTGCTGTTC CCAATTTGTG GAAGAGTGAA GACATCACCC
 AAATCGTGGC CAACTATGGG CTCATATGTG TTA CTGGGC
 TGGAAATGAT GCTCAGAAGT TTATCTATGA ATCGGATGTG
 10 CTGTGGAAAC ACCGGAGCAA CATTACGTG GTGAATGAAT
 GGATCGCTAA TGACATCTCA TCCACAAAAA TCCGGAGAGC
 CCTCAGAAGG GGCCAGAGCA TTCGCTACTT GGTACCAGAT
 CTTGTCCAAG AATACATTGA AAAGCATAAT TTGTACAGCT
 CTGAGAGTGA AGACAGGAAT GCTGGGGTCA TCCTGGCCCC
 15 TTTGCAGAGA AACACTGCAG AAGCTAAGAC ATAG

SEQ ID NO:2: 野生型人NMNAT1蛋白的氨基酸序列(其中下划线表示
 该位置可能发生突变)(来自:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAH14943.1>)

MENSEKTEVVLLACGSFNPITNMHLRLFELAKDYMNGTGRTVVKGII
 20 SPVGDAYKKKGLIPAYHRVIMAELATKNSKWVEVDTWESLQKEWKET
 LKVLRRHHQEKLEASDCDHQQNSPTLERPGRKRKWTETQDSSQKKSLE
 PKTKAVPKVKLLCGADLLESFAVPNLWKSEDTQIVANYGLICVTRAGN
 DAQKFIYESDVLWKHRSNIHVVNEWIANDISSTKIRRALRRGQSIRYLVP
 DLVQEYIEKHNLYSSESEDRNAGVILAPLQRNTAEAKT

25 SEQ ID NO:11: 野生型人NMNAT1基因的mRNA序列
 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95113669>)

1 GAGAGTGCGA CCGAGATGTT CCACTCGCTG GCGTCCGGGC CGCTGGTGAT CTCCGGTAGC
 61 ACTCGGGCCG GCGGACAGTG AGGGCGCGAC AACAAGGGAG GTGTCACAGT TTTCCATTTA
 121 GATCAACAAC TTCAAGTTCT TACCATGGAA AATTCCGAGA AGACTGAAGT GGTTCCTCTT
 30 181 GCTTGTGGTT CATTCAATCC CATCACCAAC ATGCACCTCA GGTTGTTTGA GCTGGCCAAG
 241 GACTACATGA ATGGAACAGG AAGGTACACA GTTGTCAAAG GCATCATCTC TCCTGTTGGT
 301 GATGCCTACA AGAAGAAAGG ACTCATTCTT GCCTATCACC GGGTCATCAT GGCAGAACTT
 361 GCTACCAAGA ATTCTAAATG GGTGGAAGTT GATACATGGG AAAGTCTTCA GAAGGAGTGG
 421 AAAGAGACTC TGAAGGTGCT AAGACACCAT CAAGAGAAAT TGGAGGCTAG TGA CTGTGAT
 35 481 CACCAGCAGA ACTCACCTAC TCTAGAAAGG CCTGGAAGGA AGAGGAAGTG GACTGAAACA

541 CAAGATTCTA GTCAAAAGAA ATCCCTAGAG CCAAAAACAA AAGCTGTGCC AAAGGTCAAG
 601 CTGCTGTGTG GGGCAGATTT ATTGGAGTCC TTTGCTGTTC CCAATTTGTG GAAGAGTGAA
 661 GACATCACCC AAATCGTGGC CAACTATGGG CTCATATGTG TTA CTGGG C TGGAAATGAT
 721 GCTCAGAAGT TTATCTATGA ATCGGATGTG CTGTGGAAAC ACCGGAGCAA CATTACAGTG
 5 781 GTGAATGAAT GGATCGCTAA TGACATCTCA TCCACAAAAA TCCGGAGAGC CCTCAGAAGG
 841 GGCCAGAGCA TTCGCTACTT GGTACCAGAT CTTGTCCAAG AATACATTGA AAAGCATAAT
 901 TTGTACAGCT CTGAGAGTGA AGACAGGAAT GCTGGGGTCA TCCTGGCCCC TTTGCAGAGA
 961 AACACTGCAG AAGCTAAGAC ATAGGAATTC TACAGCATGA TATTTTCAGAC TTCCCATTG
 1021 GGGATCTGAA ACAATCTGGG AGTTAATAAC TGGGGAAAGA AGTTGTGATC TGTTGCCTAA
 10 1081 ACTAAAGCTT AAAAGTTTAG TAAAAATCGT CTGGGCACAG TGGCTCACGC CTGTAATCCC
 1141 AGCACTTTGG GAGGCTGAGG CAGGTGGATC ACGGGGTCAA GAGATCGAGA CCATCCTGGC
 1201 CAATATGGTG AAACCCCATC TCTACTAAAA ATACAAAAAT TAGCTGTGTG TGGTGGCAGC
 1261 TGCCTGTAGT CCCAGCTACT TGGGAGGCTG AGGCAGGAGA ATCACTTGAC CCCAGGTGGT
 1321 GGAGGTTGCA GTGAGCCAAG ATTGCACCAT TGCCTCCAG CCTGGCGACA GAGCAAGACT
 15 1381 CTGTCTCAA AAAAAAAAAA AATTTAGTAA AAATCAATGG TAAGCTAAAA TAAGTTTTTG
 1441 TTTGTTTATT TGTTTTTGAG ATGGAGTCTC TACTAAAAAT ACAAAAAATT AGCCAGGCAT
 1501 GGTGCCGCAT AACTATAATC CCAGCTACTT GGGAGGCTGA GGCAGGAGAA TCGCTTGAAC
 1561 CCGGGAGGCA CAGGTTCCAG TGAGCCAAGG TTGTGCCACT GCACTCCAGC CTGGGCAAAA
 1621 AAGCAAACT CCATCTCAA GAGAAAAAAA AAAAAGACCG GGTGTGGTGG CTCACACCTG
 20 1681 TAATCCCAGC ACTTTGGGAG GCCTAAGTGG GTGGATCACG TGAGGTCAAG AGTTCAAGAC
 1741 CAGCCTGGCC AATATGGTGA AACCCTATCT CTAATAAGAA TACAAAAAAT TAGCTGAGCA
 1801 TGGTGGTGGG CTCCTGTAGT CCCAGCTACT TGGGAGGCTG AGGCAGGAGA ATCGCTTGAA
 1861 CCTGGGAGGC AGAGGTTGCA GTAAGCCAAG ATCGTGCCAT TGCACTCCAG CCTGGGTGAC
 1921 AGAGCGAGAC TCCATCTCAA AAAAAAAAAA AAGCCTGACA GCTAGCAGGT TTCAGGATCC
 25 1981 ATCTGCCAAG TTAGTGAAAG GCTGGAGCCT CAAATCATAC AGATGAGGGT CATTTTCTCC
 2041 TCCTTAGCTT CTTGGAGTTT AAGAGTTGAA GGAGTCCTGA AAAGTAATGA TAGAGCAAGA
 2101 TGAAGCTATC AGAACTGAAT TTGGACTTCC TCTGGGAAAC TACACCTAGT TCATCTGAAG
 2161 TGTCACGTAA ACTGCAGAAA GTTTCCAATG CTGGAACTT CTCTCATACT ATCGTGCCTT
 2221 CCTACTCAGA AGTGCTGTG CCCTGCTCAG CTGTGACTAC TGACCTCAGG ACCTCACTGG
 30 2281 ACAAGGCATG TGGGGACCCT TGCAGGAGCC CTGGTAAGGG TACAATGATC CTATTGTTTT
 2341 TTGTTTTTGA GATGGAGTCT CACTCTGTCT CCCAGGCTGG AGTGCAGTGG TGCGATCTCC
 2401 GCTCACTGCA ACCTCCGCCT CCGGGTTCA AGCAATTCTC CTGCCTCAGC CTGCTGAGTA
 2461 GCTGGGATTA CAGGCACCCA CTACCATGTC CGGCTAATTT TGTATTTTGA GTAGAGATGG
 2521 GGTTCGCCA TGTTAGACAG GCTGGTCTTG AACTCCTGAC CTCAGGTGAT CTGCCCACCT
 35 2581 CGGCCTTCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGCA TGAGCCACTG CACCCAGCCT GATCCTATTG
 2641 TTGCACTATT TATGGAGCAA CAACTTTGTA CAAAGAACAA GCTTTGTACA GAGAACAAGC
 2701 TTGGCTTTTT CTCCCAACGC CGAGGATGCT GTTGATGCTG CCACGTAATA GCATAATTTT
 2761 GGGTGTCTC AAGGACAGAA CTTCCACTTT GAATAATGGA AGTTAGAACA ATGAATTTCA
 2821 CAGGGGAATA AATATTAATG ACTGACGTGA AGAAAAATATG CCATTGTTTA TTCCCTCCTG
 40 2881 CATCATTTCC ATAATTTGCT TTTGTACTGT CAATTTAGAG GAAATGTGTG ATGCTGGTGT
 2941 TTTGTTTGGC CTGTTTGTGTT GATGCTGGGG GTTTTATGTG TTGTACCCTT TACCCTTAC
 3001 ATTGTGTAAT TTGAAAGTGG CAAACAAACC TGCAGTAAAA GTCCTTGATT GGCATCTTCA
 3061 TTCGGATGAT GGAGAGCCTT TGTGGTAGTG TTTGCTTATG TGAACAGCAG GCCTTTCAGA
 3121 TAAGAGAAGT GGCTTTTCCT TGGTGATGAA GGGGTAGAGA TTGAGCCATG GGGATGGTTT
 45 3181 AGGTTAAAGA ATGCTTTTTT TTGGCCATCA TGAGGATCTA ACAACAGAGT AGAAGGAAGG
 3241 ATGCCCTAGG TCAGCATGCA GGGTGGTGGG AGGGCTTTCA TCTTCCTTAC CCAAGCCTCT

3301 CTTTTCACCTT TTCTAGAAGT CCAGAAGTTG TTATATGATG AAATAGCCTC CTTTAAACGTT
 3361 TATTTCTGGG TGCCAACGGA GGCCCATTC TCTAACATTG TCATAATTTT TCTCAAAGGC
 3421 CTATGATCTA AACATTTTAC CACGGCATCC ACTCAGCTGT GAGGCTGCGT ACACAGTCTC
 3481 CACCTCTGAA ATCTGAAGT CGTTTACCAG TGGTGCTGTT TGAAGTTCAT AATGTCAGCA
 5 3541 CTTCTGAAC ACTTACTGTG TGCTTGGCTT GTGCTCCTGA GTGCCTTATA TCATAAGGAA
 3601 ACGGCAAAAT CAGGGGACTG GTATAAATGG TGAGCTGAGC TTGAATCTAA GCTTTGTCTT
 3661 CAGAGCCAGT ACCCCTAATC TCTCTTTCTG TAAATATTA CTTTCAAAG AATGAAGTTG
 3721 TAGCCAAATC TTGAAATTTT TCATTTACCC TAAGTGAGGA CAAATAAAGC TTTCAACAAC
 3781 A

参考文献

1. Weleber, R.G., Francis, P.J. & Trzupek, K.M. *GeneReviews* (eds Pagon, R.A., Bird, T.D., Dolan, C.R. & Stephens, K.) (University of Washington, Seattle, Washington, USA, 1993–2010) .

2. Stone, E.M. *Am. J. Ophthalmol.* 144, 791-811 (2007) .

3. Berger, W., Kloeckner-Gruissem, B. & Neidhardt, J. *Prog. Retin. Eye Res.* 29, 335-375 (2010) .

4. den Hollander, A.I., Black, A., Bennett, J. & Cremers, F.P. *J Clin Invest* 120, 3042-3053 (2010) .

5. Keen, T.J. et al. *Eur. J. Hum. Genet.* 11, 420-423 (2003) .

6. Coleman, M.P. & Freeman, M.R. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 245-267 (2010) .

7. Conforti, L. et al. *FEBS J.* 278, 2666-2679 (2011) .

8. Schindler, E.I. et al. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3693-3701 (2010) .

9. Conforti, L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11377-11382 (2000) .

10. Mack, T.G. et al. *Nat. Neurosci.* 4, 1199-1206 (2001) .

11. Zhai, R.G. et al. *PLoS Biol.* 4, 2336-2348 (2006) .

12. Garavaglia, S. et al. *J. Bio. Chem.* 277, 8524-8530 (2002) .

13. Zhou, T. et al. *J. Biol. Chem.* 277, 13148–13154 (2002) .

14. Maquire, A.M. et al. *N. Engl. J. Med.* 358, 2240-2248 (2008) .

15. Maquire, A.M. et al. *Lancet.* 374, 1597-1605 (2009) .

权 利 要 求 书

1. 一种具有选自如下的突变的 *NMNAT1* 基因或 NMNAT1 蛋白:

无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和

错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys)。

2. 权利要求 1 的 *NMNAT1* 基因, 为 SEQ ID NO:1 的序列中具有以下突变:

无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和

错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys)。

3. 权利要求 1 的 NMNAT1 蛋白, 为 SEQ ID NO:2 的序列中具有以下突变:

无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和

错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys)。

4. 一种检测突变 *NMNAT1* 基因或 NMNAT1 蛋白的方法, 所述方法包括检测 *NMNAT1* 基因或 NMNAT1 蛋白中是否存在突变位点, 所述突变位点选自如下任一种或其组合:

无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和

错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys)。

5. 权利要求 4 的方法, 包括如下至少一组引物扩增的步骤:

SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4;

SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6;

SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10。

6. 检测突变 *NMNAT1* 基因或 NMNAT1 蛋白中使用的引物对, 所述突变是选自如下任一种或其组合:

无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和/或

错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys),

其中所述引物对分别基于选自如下的位置在基因组序列或 cDNA 序列上前后设计, 使得扩增该位置: cDNA 序列第 507 位和第 769 位。

7. 与突变 *NMNAT1* 基因互补的核酸探针, 所述突变是选自如下任一种或其组合:

无义突变 c.507G>A; 和/或

错义突变 c.769G>A,

所述探针与突变 *NMNAT1* 基因的互补区包括选自如下的基因组序列或 cDNA 序列上的位置: cDNA 序列第 507 位和第 769 位。

- 5 8. 检测突变 *NMNAT1* 基因或 NMNAT1 蛋白的试剂盒, 包含一组或多组引物对, 其中所述突变是选自如下任一种或其组合:

无义突变 (c.507G>A, p.Trp169*); 和

错义突变 (c.769G>A, p.Glu257Lys),

其中所述引物对分别基于选自如下的位置在基因组序列或 cDNA 序列上设计, 使得其扩增产物涵盖该位置: cDNA 序列第 507 位和第 769 位。

- 10 9. 权利要求 8 的试剂盒, 包含选自如下的至少一组引物:

SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4;

SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6;

SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10。

- 15 10. 检测突变 *NMNAT1* 基因的试剂盒, 包含一个或多个核酸探针, 所述突变是选自如下任一种或其组合:

无义突变 c.507G>A; 和

错义突变 c.769G>A,

- 20 所述探针与突变 *NMNAT1* 基因上包含选自如下位置的基因组序列或 cDNA 序列上的区域互补: cDNA 序列第 507 位和第 769 位。

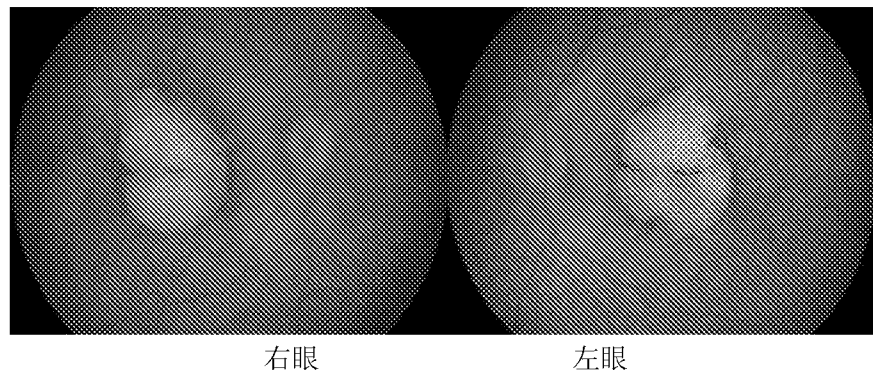


图1

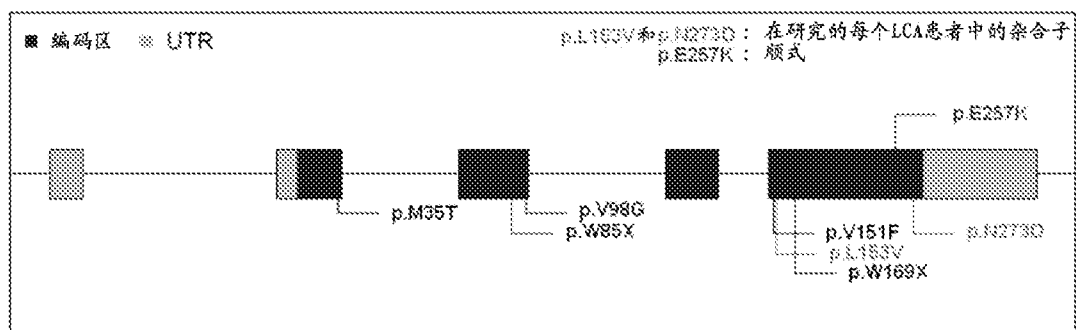


图2

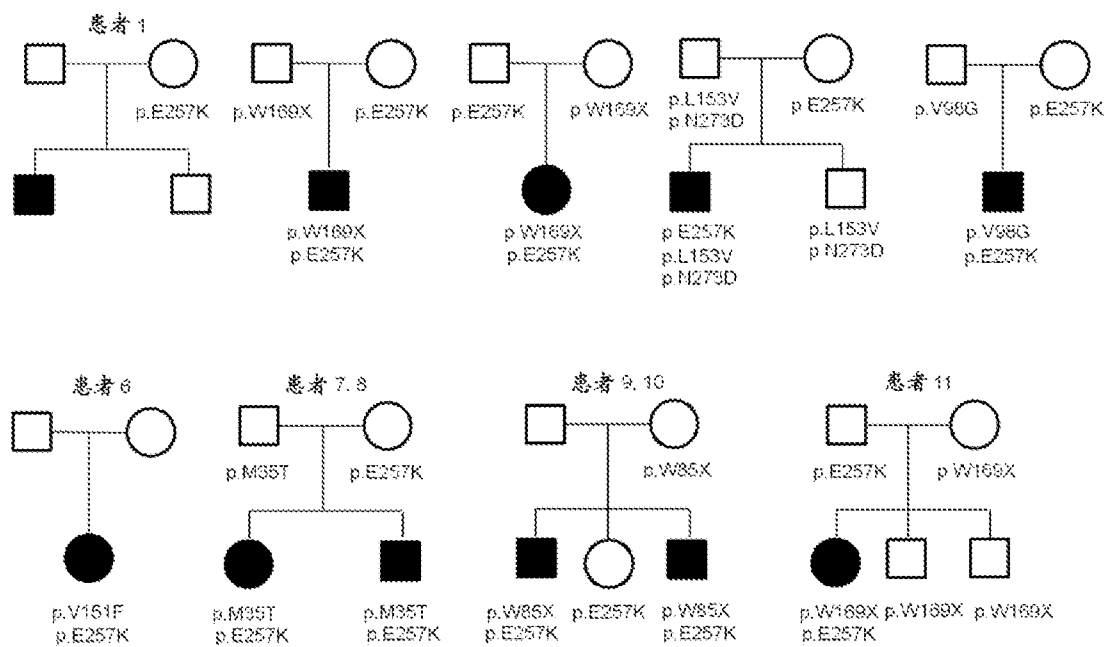


图3

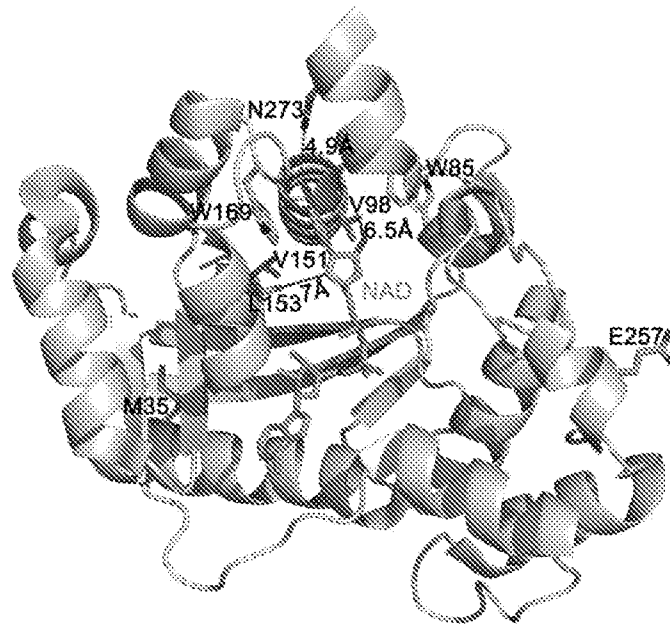


图4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/001311

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: C12N, C07K, C12Q

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)

Data bases: CNABS, CPRASBS, CNMED, CJFD, CNKI, DWPI, SIPOABS, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, EMBASE, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ+PDB

Search terms: nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase, single nucleotide polymorphism, NMNAT1, NMNAT, nicotinamide mononucleotide adenylyl transfer, c.507G>A, p.Trp169*, G507A, Trp169*, W169*, 507, 169, SNP, SNPs, leber congenital amaurosis, LCA; sequence search on SEQ ID NOs: 1-10

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CHIANG, P.W. et al., Exome sequencing identifies NMNAT1 mutations as a cause of Leber congenital amaurosis, NATURE GENETICS, 29 July 2012 (29.07.2012), vol. 44, no. 9, pages 972-974, ISSN 1061-4036, see abstract, Supplementary Methods	1-10 (partial)
A	CN 1964627 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON), 16 May 2007 (16.05.2007), see the whole document	1-10 (partial)
A	WO 03082187 A2 (INDIANA UNIVERSITY), 09 October 2003 (09.10.2003), see the whole document	1-10 (partial)

☒ 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	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 11 April 2013 (11.04.2013)	Date of mailing of the international search report 25 April 2013 (25.04.2013)
Name and mailing address of the ISA/CN: 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 ZHAO, Shuo Telephone No.: (86-10) 62411070

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/001311

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011017313 A1 (COPERNICUS THERAPEUTICS INC.), 10 February 2011 (10.02.2011), see the whole document	1-10 (partial)
A	SHAN, Haidong et al., Progress in gene study of Leber congenital amaurosis, FOREIGN MEDICAL SCIENCES (SECTION OF OPHTHALMOLOGY), 22 April 2005 (22.04.2005), vol. 29, no. 2, pages 113-116, ISSN 1001-1196, see the whole document	1-10 (partial)
A	SCHWEIGER, M. et al., Homo sapiens nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase mRNA, complete cds, GENBANK DATABASE, 15 March 2001 (15.03.2001), Accession No. AF314163, see sequences	1-10 (partial)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/001311

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of 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

International application No.

PCT/CN2012/001311

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See the extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1-10 (partial) relate to the technical solution of a mutant *NMNATI* gene having a nonsense mutation (c.507G>A, p.Trp169*).

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/001311

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This present application comprises 2 inventions, as follows:

invention 1: claims 1-10 (partial), relating to a mutant NMNAT1 gene or NMNAT1 protein having a nonsense mutation (c.507G>A, p.Trp169*), a test method, a primer pair, a nucleic acid probe, and a kit thereof.

Invention 2: claims 1-10 (partial), relating to a mutant NMNAT1 gene or NMNAT1 protein having a missense mutation (c.769G>A, p.Glu257Lys), a test method, a primer pair, a nucleic acid probe, and a kit thereof.

D1: SCHWEIGER, M. et al., Homo sapiens nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase mRNA, complete cds, GENBANK DATABASE, 15 May 2001 (15.05.2001), Accession No. AF314163, see sequences.

The same or corresponding technical feature involved in invention 1 and invention 2 is the NMNAT1 gene, D1 discloses a wild-type human NMNAT1 gene, and the sequences thereof are completely consistent with SEQ ID NO.: 1 of this application. Therefore, invention 1 and invention 2 do not share a special technical feature that makes a contribution over the prior art. Therefore, the above 2 inventions are not linked technically, and do not belong to a single general inventive concept, and do not meet the requirement of unity of invention as defined in PCT Rule 13.1.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/12 (2006.01) i

C07K 14/47 (2006.01) i

C12Q 1/68 (2006.01) i

C12N 15/11 (2006.01) i

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/001311

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1964627 A	16.05.2007	US 7776326 B2	17.08.2010
		WO 2006001982 A3	17.08.2006
		US 2006002914 A1	05.01.2006
		WO 2006001982 A2	05.01.2006
		CN 1964627 B	19.10.2011
		EP 1755391 A2	28.02.2007
		AU 2005257883 A1	05.01.2006
		JP 2008501343 A	24.01.2008
WO 03082187 A2	09.10.2003	AU 2003220201 A8	20.10.2005
		WO 03082187 A3	04.12.2003
		AU 2003220201 A1	13.10.2003
WO 2011017313 A1	10.02.2011	None	

A. 主题的分类

参见附加页

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)

IPC: C12N, C07K, C12Q

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))

数据库: CNABS, CPRASBS, CNMED, CJFD, CNKI, DWPI, SIPOABS, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, EMBASE, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ+PDB

检索词: 烟酰胺单核苷酸腺苷酰转移酶, 先天性黑矇, 先天性黑蒙, 先天黑蒙, 先天性黑, 先天黑矇, 单核苷酸多态性, NMNAT1, NMNAT, nicotinamide mononucleotide adenylyl transfer, c.507G>A, p.Trp169*, G507A, Trp169*, W169*, 507, 169, SNP, SNPs, leber congenital amaurosis, LCA; 对 SEQ ID NO: 1-10 的序列检索

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
PX	CHIANG, Pei-Wen 等, Exome sequencing identifies <i>NMNAT1</i> mutations as a cause of Leber congenital amaurosis, Nature Genetics, 29.7 月 2012 (29.07.2012), 第 44 卷, 第 9 期, 第 972-974 页, ISSN 1061-4036, 参见摘要, Supplementary Methods	1-10 (部分)
A	CN1964627A (华盛顿大学), 16.5 月 2007 (16.05.2007), 参见全文	1-10 (部分)
A	WO03082187A2 (INDIANA UNIVERSITY), 9.10 月 2003 (09.10.2003), 参见全文	1-10 (部分)

☒ 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

11.4 月 2013 (11.04.2013)

国际检索报告邮寄日期

25.4 月 2013 (25.04.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

赵硕

电话号码: (86-10) 62411070

C(续). 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	WO2011017313A1 (COPERNICUS THERAPEUTICS INC.), 10.2 月 2011 (10.02.2011), 参见全文	1-10 (部分)
A	单海冬等, Leber 先天性黑蒙基因研究进展, 国外医学眼科学分册, 22.4 月 2005 (22.04.2005), 第 29 卷, 第 2 期, 第 113-116 页, ISSN 1001-1196, 参见 全文	1-10 (部分)
A	SCHWEIGER, M.等, Homo sapiens nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase mRNA, complete cds, GenBank Database, 15.3 月 2001 (15.03.2001), Accession No. AF314163, 参见序列	1-10 (部分)

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. 序列表的提交或提供

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. 提交或提供时间

☒ 包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

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

参见附加页

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：
权利要求1-10（部分）涉及具有无义突变（c.507G>A, p.Trp169*）的突变 *MMVATI* 基因的技术方案

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

第III栏 缺乏发明单一性的意见

本申请包括以下 2 项发明：

发明 1：权利要求 1-10（部分），涉及具有无义突变（c.507G>A, p.Trp169*）的突变 NMNAT1 基因或 NMNAT1 蛋白，检测其的方法、引物对、核酸探针、试剂盒。

发明 2：权利要求 1-10（部分），涉及具有错义突变（c.769G>A, p.Glu257Lys）的突变 NMNAT1 基因或 NMNAT1 蛋白，检测其的方法、引物对、核酸探针、试剂盒。

D1：SCHWEIGER, M.等, Homo sapiens nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase mRNA, complete cds, GenBank Database, 15.5 月 2001 (15.05.2001), Accession No. AF314163, 参见序列。

发明 1 与发明 2 之间相同或相应的技术特征为 NMNAT1 基因，D1 公开了野生型人 NMNAT1 基因，其序列与本申请 SEQ ID NO: 1 完全一致，因此，发明 1 与发明 2 之间不存在体现发明对现有技术做出贡献的特定技术特征。因此，上述 2 项发明之间不存在技术关联，不属于一个总的发明构思，因而不满足发明单一性的要求，不符合细则 13.1 的规定。

A. 主题的分类

C12N 15/12 (2006.01)i

C07K 14/47 (2006.01)i

C12Q 1/68 (2006.01)i

C12N 15/11 (2006.01)i

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/001311

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1964627 A	16.05.2007	US7776326 B2	17.08.2010
		WO2006001982 A3	17.08.2006
		US2006002914 A1	05.01.2006
		WO2006001982 A2	05.01.2006
		CN1964627 B	19.10.2011
		EP1755391 A2	28.02.2007
		AU2005257883 A1	05.01.2006
		JP2008501343 A	24.01.2008
WO03082187 A2	09.10.2003	AU2003220201 A8	20.10.2005
		WO03082187 A3	04.12.2003
		AU2003220201 A1	13.10.2003
WO2011017313 A1	10.02.2011	无	