

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

G01N 33/573 G01N 33/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02808648.1

[43] 公开日 2004 年 6 月 9 日

[11] 公开号 CN 1503848A

[22] 申请日 2002.3.21 [21] 申请号 02808648.1

[30] 优先权

[32] 2001. 3. 21 [33] DE [31] 10113876.8

[86] 国际申请 PCT/EP2002/003180 2002. 3. 21

[87] 国际公布 WO02/074987 德 2002. 9. 26

[85] 进入国家阶段日期 2003. 10. 21

[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 A·布斯耶恩

F·C·卢夫特

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 2 页 说明书 13 页 序列表 6 页
附图 1 页

[54] 发明名称 高血压的定量诊断分析

[57] 摘要

本发明涉及人 *sgk* 家族同系物的过量表达或功能性分子修饰与高血压之间的正相关性在特定形式的遗传决定性高血压的定量诊断中的应用。本发明尤其涉及 *hsgk1* 基因中 2 种不同的单核苷酸多态性与遗传决定性的高血压易感性之间的正关联。本发明还涉及提供含有可用于检测诊断性靶子 *hsgk1*、*hsgk2* 和 *hsgk3* 的抗体或多核苷酸的诊断试剂盒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. *sgk* 家族人同系物的过量表达或功能性分子修饰与高血压之间的正相关性在定量诊断特定形式的遗传决定性高血压中的用途。
2. 根据权利要求 1 的用途，其特征在于 *sgk* 家族人同系物是 *hsgk1* 基因。
3. 根据权利要求 2 的用途，其特征在于过量表达或功能性修饰是由 *hsgk1* 基因中内含子 6 内的核苷酸多态性 (SNP) ($T \rightarrow C$) 引起的。
4. 根据权利要求 2 的用途，其特征在于过量表达或功能性修饰是由 *hsgk1* 基因中外显子 8 内的核苷酸多态性 (SNP) ($C \rightarrow T$) 引起的。
5. 用于对特定形式的遗传决定性高血压进行定量诊断的试剂盒，其含有针对 *sgk* 蛋白家族的人同系物的抗体或能够在严紧条件下与 *sgk* 基因家族的人同系物杂交的多核苷酸或这些抗体和多核苷酸的联合以用于定量确定这些同系物的过量表达或功能性分子修饰。
6. 根据权利要求 5 的试剂盒，其特征在于 *sgk* 家族人同系物是 *hsgk1* 基因。
7. 根据权利要求 6 的试剂盒，其特征在于所述抗体针对由 SNP 引起的突变 *hsgk1* 蛋白或所述多核苷酸可在严紧条件下与由 SNP 引起的突变 *hsgk1* 基因杂交。
8. 根据权利要求 7 的试剂盒，其特征在于所述多核苷酸能在严紧条件下与由内含子 6 中的 SNP ($T \rightarrow C$) 引起的突变 *hsgk1* 基因杂交。
9. 根据权利要求 7 的试剂盒，其特征在于所述多核苷酸能在严紧条件下与由外显子 8 中的 SNP ($C \rightarrow T$) 引起的突变 *hsgk1* 基因杂交。
10. 对特定形式的遗传决定性高血压进行定量诊断的方法，其中对 *sgk* 家族人同系物的过量表达或这些同系物的功能性分子修饰进行检测，方式是：用针对这些同系物蛋白的抗体或者用可在严紧条件下与这些同系物的 DNA 或 mRNA 杂交的多核苷酸定量检测患者身体样品中的这些同系物。
11. 根据权利要求 10 的方法，其特征在于 *sgk* 家族人同系物为 *hsgk1* 基因。

12. 根据权利要求 10 的方法，其特征在于所述多核苷酸能在严紧条件下与具有 hsgk1 基因内含子 6 内的 SNP (T→C) 的一种形式的 DNA 或 mRNA 杂交。

13. 根据权利要求 10 的方法，其特征在于所述多核苷酸能在严紧条件下与具有 hsgk1 基因外显子 8 内的 SNP (C→T) 的一种形式的 DNA 或 mRNA 杂交。

高血压的定量诊断分析

本发明涉及 *sgk* 家族中人同系物的过量表达或其功能性分子修饰与高血压之间的正相关性。本发明尤其涉及到对 *hsgk1* 基因中两种不同的单个核苷酸多态性（单核苷酸多态性 = SNP）与遗传决定的高血压易感性之间的正相关性的检测。

许多细胞外信号能引起胞内磷酸化/去磷酸化级联，以此保证这些信号能快速通过质膜以及其受体传递到细胞质和细胞核。这些可逆的信号转导级联的特异性通过大量的独特蛋白，尤其通过将磷酸基团转移到独特底物上的激酶而成为可能。

因血清和糖皮质激素而表达升高的血清-和糖皮质激素-依赖性激酶（*sgk*），丝氨酸/苏氨酸激酶，首先从鼠乳腺癌细胞中得到克隆（Webster 等，1993）。*sgk* 的人类形式被称作 *hsgk1*，其克隆自肝细胞（Waldegger 等，1997）。已发现 *hsgk1* 的表达受细胞体积调节的影响。迄今，在鼠 *sgk* 的表达中尚未检查到此种对细胞体积的依赖。另外，还发现大鼠激酶刺激上皮 Na^+ 通道（ENaC）（Chen 等，1999；Naray-Pejes-Toth 等，1999）。而 ENaC 在肾脏 Na^+ 排泄中扮演了决定性的角色。增高的 ENaC 活性导致钠离子的肾脏滞留量增高，并因此导致高血压的发生。

最后，另外两个人类 *sgk* 家族成员：*hsgk2* 和 *hsgk3* 已被克隆（Kobayashi 等，1999），此两者可以被胰岛素和 IGF1 通过 PI3 激酶途径激活，*hsgk1* 亦如此。电生理学实验证实 *hsgk2* 和 *hsgk3* 的共表达也导致 ENaC 活性的显著增高。

据 DE 197 08 173 A1 可知，在细胞体积的变化扮演了决定性病理生理学角色的许多疾病，例如高钠血症、低钠血症、糖尿病、肾功能不全、分解代谢过度、肝性脑病和微生物感染或病毒感染中，*hsgk1* 具有显著的诊

断潜力。

WO 00/62781 已经描述了 hsgk1 对内皮 Na⁺通道的激活，这可导致肾 Na⁺吸收的增高。因为此增高的肾 Na⁺吸收与高血压相关，所以认为 hsgk1 表达的增高应当能导致高血压，而且 hsgk1 表达的降低应当最终导致低血压。

人同系物 hsgk2 和 hsgk3 的过量表达或过高活性与 ENaC 的过度激活、所致的肾 Na⁺吸收增高和最终引发的高血压之间有类似的关系，这在未出版的、具有较早优先权的 28.08.00 德国申请中有描述，此申请的标题为“用作诊断和治疗性靶子的 hsgk2 和 hsgk3”（内部编号 A 35 048）。另外，激酶 hsgk2 和 hsgk3 在动脉高血压中的诊断潜力也已被论述。

本发明的任务是找到对正相关性，即人 sgk 家族同系物的过量表达或功能性分子修饰与高血压之间的正关联性的实验性检验方法。

人 sgk 家族同系物在上面的含义中包括功能性分子修饰，其在本文中应理解为具有突变的 sgk 家族同系物，所述突变使相应蛋白质的性质，尤其是催化性质或者甚至是底物特异性发生了改变。

本发明的另一个任务是将人 sgk 家族同系物的过量表达或功能性分子修饰与高血压之间的正相关性或关联性用于诊断遗传决定性高血压的易感性的方法中。

在本发明框架中给出了对人 sgk 基因的过量表达或功能性分子修饰与高血压之间的正相关性的检测，并且针对 hsgk1 基因实例用实验对此进行了具体的证明。

因此，针对上面任务的一个技术方案是在遗传决定形式的高血压的诊断中应用人 sgk 家族同系物，尤其是 hsgk1 基因的过量表达和功能性分子修饰与高血压之间的这种正相关性。

具体地，上述任务因如下发现而得以实现，即在本发明的范围内，在 hsgk1 基因内鉴定出两个不同的 SNP——如果它们以特定形式在 hsgk1 基因中出现的话，将导致患者有明确的高血压患病倾向。这样，可以在取自

患者的身体样本中检测 hsgk1 基因或者甚至其他的 sgk 基因家族人同系物中这些 SNP 的存在，并视其为高血压发生中遗传决定的易感性的诊断指征。

上面的任务可以进一步通过提供对特定形式的遗传决定性高血压进行定量诊断的诊断方法而实现，其中，人 sgk 家族同系物的过量表达或这些同系物的功能性分子修饰通过定量检测患者身体样品中的这些同系物来检测，所述定量检测通过使用针对同系物蛋白质的抗体或与同系物的 DNA 或 mRNA 在严紧条件下杂交的多核苷酸以及适用于执行本方法的试剂盒来进行。

本发明的试剂盒优选包含所述针对 hsgk1 蛋白质的抗体或所述能够与 hsgk1 基因在严紧条件下杂交的多核苷酸。

尤其是，此诊断试剂盒含有特异性针对 hsgk1 蛋白质的区域的抗体，所述区域包括对应于 hsgk1 基因中特定 SNP 的突变 hsgk1 蛋白片段。但是，试剂盒还可含有针对 hsgk1 基因或其他 sgk 家族人同系物的更高频率等位基因的抗体，利用此抗体可定量检测 hsgk1 或这些同系物的表达水平的改变。

另外，本发明的诊断试剂盒优选含有具有特定区域的多核苷酸，此特定区域包含 hsgk 基因中的一种或者另一种高血压相关 SNP，因此此多核苷酸适宜对患者 hsgk1 基因中的特定 SNP 通过用来自身体样品的基因组 DNA、cDNA 或 mRNA 在严紧条件下杂交进行检测。

本发明中高血压与人 sgk 家族同系物之间的正相关性表明，在一些患者中 hsgk1、hsgk2 或 hsgk3 基因可能发生个体突变，从而改变激酶 hsgk1、hsgk2 或 hsgk3 的表达水平或功能性质，并因此遗传性地导致高血压患病倾向。例如这种突变可发生在 sgk 基因基因座的调节基因区域或内含子序列中并因此导致相应激酶的过量表达以及 ENaC 的过度激活。另一方面，sgk 基因座位的遗传构成的个体差异也可能影响基因的编码区域。而编码区域的突变可能导致相应激酶的功能改变，例如改变激酶的催化活性。因

此，上面所述的两种类型的突变都能引起 ENaC 激活的增高并因此最终在患者身上造成遗传性原因的高血压。

在患者身上引起遗传决定性高血压发生的 *sgk* 家族人同系物中的这些突变通常是所谓的单核苷酸多态性 (SNP)，它们位于同系物的外显子或内含子区域。*hsgk* 基因外显子中的 SNP 的较少频率发生的形式 (下文中称之为突变型) 可能会引起相应 *hsgk* 蛋白中的氨基酸替换从而导致激酶的功能改变。*hsgk* 基因的内含子或调节序列中的 SNP 的突变型可能会引起相应激酶表达水平的改变。

在本发明的范围内，进行相关性的研究，研究中将不同患者 (双生) 的收缩压测定值和舒张压测定值与患者的 *hsgk1* 基因的基因型作比较，其中每种情况下血压值为在身体处于不同姿势 (坐，站，卧) 时测量的并进行了统计学评估。

因此，在本发明范围内，证实在外显子 8 的两个等位基因上同时具有 (C→T) 的交换 (第一 SNP，参见 SEQ ID NO.1) (在外显子 8 的 SNP 上的纯合 TT 携带者) 虽不引起蛋白质水平的氨基酸交换 (参见 SEQ ID NO.2)，但引起血压值显著地升高并因此导致遗传决定的高血压患病倾向 (表 3)。

此外，还证实存在 (T→C) 改变 (第二 SNP) 的纯合形式可导致较低的血压值并由此导致较低的遗传决定性高压患病倾向 (表 3)，所述 (T→C) 改变距第一 SNP 5516p，位于内含子 6 向外显子 7 过渡的供体剪接侧。

因为本发明的 *hsgk1* 基因中的两个 SNP 都不在蛋白质水平上引起氨基酸交换，因此由它们引起的较高或较低的高血压遗传易感性的基础可能是 *hsgk1* 基因的表达水平的变化。

图 1 更详细地对外显子 8 上的第一 SNP (C→T) 进行了解释。图 1 显示 *hsgk1* 基因的各个外显子并按外显子编号 (外显子 ID) 对每个的相关“毗连序列群”和链以及外显子的起点、终点和长度进行了描述。在外显子 8 的 SNP 框架中的 (C→T) 交换的确切位置用黑色标记的 C 标示在外

显子 8 中。在图 1 中外显子 8 上的浅色标记指示的是 hsgk1 基因中位于 SNP 侧翼的序列，其明确地界定了此 SNP 在基因组中所处的位置。

在内含子 6 中的第二 SNP (T→C) 由直接测序鉴定，而且可以明确地表征为：在 hsgk1 基因（包含外显子和内含子）中准确地位于外显子 8 的第一 SNP 上游 551bp 处，即，hsgk1 基因的内含子 6 到外显子 7 的供体剪接位点内，而且与 T 向 C 的交换有关。

而且，证实，在不同姿势下身体的收缩血压和舒张血压测量数值都显示对 hsgk1 基因的基因型有同等程度的依赖性（表 4）。因此，从表 4 中可以看出，患者血压测量值与患者 hsgk1 基因中存在的前述多态性 (SNP) 之间的相关性实际上有统计学显著性。

另外，所分析的 hsgk1 基因中的两个 SNP 显示出在相关发生率方面有很大的不平衡（表 5）。尽管外显子 8 中的 SNP 的 CC 携带者多数也是内含子 6 中 SNP 的 TT 携带者（64%），但反之则不是这样（仅有 2% 的外显子 8 的 TT 携带者也是内含子 6 的 CC 携带者）。

首次查明的在患者血压与其个人 hsgk1 基因座位的基因型之间的相关性说明，针对 hsgk1 的特异性抗体或多核苷酸适用于对特定的、遗传决定的高血压患病倾向进行诊断。这种特定的、遗传引起的高血压可以由 hsgk1 的表达增高，即，hsgk1 的过量表达或者可能地以及 hsgk1 的改变的功能性质来表征。

因为 sgk 家族的 2 个同源激酶，hsgk2 和 hsgk3，也能够激活 ENaC，所以根据本发明，针对 hsgk2 和 hsgk3 的特异性的抗体和多核苷酸同样也适用于特定的遗传决定性高血压的诊断分析。

根据本发明，hsgk1 基因中这 2 个 SNP 的发生与高血压患病倾向有关的这一发现特别说明了：具有 hsgk1 基因中的这 2 个 SNP 的一个或另一个的多核苷酸尤其适用于通过与来自患者身体样本的内源 DNA (cDNA 或基因组 DNA) 或 mRNA 杂交对遗传决定性高血压进行诊断。

类似的，根据本发明结果，抗体也适用于对遗传决定的高血压易感性

进行诊断，所述抗体针对 hsgk1 蛋白或其任一种人同系物中的特定高血压-相关多态性 (SNP)。这些 SNP 也在蛋白质水平上导致高血压相关的多态性，它们特别可能与 hsgk1 蛋白的功能改变有关并因此造成高血压易感性。

本发明因此涉及将正相关性，即人 sgk 家族同系物，尤其是 hsgk1 的过量表达或功能性分子修饰与高血压之间的正关联应用在对特定形式的遗传决定性高血压的定量诊断上。

具体的，将 hsgk1 基因中与高血压患病倾向相关的 2 个 SNP 用于遗传决定性高血压的定量分析。

本发明还涉及到对遗传决定性高血压的定量诊断方法，其中，对 sgk 家族人同系物的过量表达或这些同系物的功能性分子修饰通过在患者身体样品中定量检测同系物来进行检测，对同系物的定量检测是使用针对同系物蛋白的抗体或可在严紧条件下与同系物的基因组 DNA、cDNA 或 mRNA 杂交的多核苷酸进行的。

在本发明的诊断方法中，使用的患者身体样品优选为血液样品或唾液样品，这些样品含有细胞材料且能以相对低廉的费用从患者身上获得。但是，也可以使用其他也含有细胞的身体样品，如组织样品等。从含细胞材料的身体样品出发，根据标准方法 (Sanbrook, J. 和 Russel, D. W. (2001) 冷泉港, NY, CSHL 出版社) 能够制备基因组 DNA 或 cDNA 或甚至 mRNA，而且如果需要的话可对之进行扩增，然后在严紧条件下和能够与此基因组 DNA、cDNA 或甚至 mRNA 特异性地杂交的多核苷酸杂交。另外，也可以通过标准方法 (Sanbrook, J. 和 Russel, D. W. (2001) 冷泉港, NY, CSHL 出版社) 从含细胞材料的身体样品 (血液、唾液、组织等) 中分离出蛋白提取物，然后其中的相应 sgk 蛋白可通过与针对此蛋白的抗体一起孵育进行定量检测。

在本发明的方法中，优选使用针对 hsgk1 蛋白的抗体或能与 hsgk1 基因的基因组 DNA、cDNA 或 mRNA 杂交的多核苷酸。

在本发明的方法中，尤其使用如下多核苷酸，其能够在严紧条件下与具有 hsgk1 基因内含子 6 中的一种 SNP 形式或 hsgk1 基因外显子 8 中的一种 SNP 形式的 DNA、cDNA 或 mRNA 杂交。

在本文中，严紧条件下的杂交意味着在杂交温度和杂交溶液的甲酰胺含量如相关技术文献所述（Sanbrook, J. 和 Russel, D. W. (2001)冷泉港, NY, CSHL 出版社）的杂交条件下进行杂交。

另外，本发明还涉及对特定形式的遗传决定性高血压进行定量诊断的试剂盒，此试剂盒含有针对 sgk 蛋白家族的人同系物的抗体或能在严紧条件下与 sgk 基因家族人同系物杂交的多核苷酸或者这些抗体和多核苷酸的联合，它们可以用于对这些同系物的过量表达或功能性分子修饰作定量测定。

试剂盒中含有的抗体优选针对 hsgk1 蛋白，试剂盒中含有的多核苷酸优选能与 hsgk1 基因杂交。

特别优选地诊断试剂盒可以含有能与具有内含子 6 中的 SNP (T→C) 的一种形式或外显子 8 中的 SNP(C→T) 的一种形式的基因组 DNA, cDNA 或 mRNA 杂交的多核苷酸。

本发明通过下面的实施例进行详细的解释。

实施例 1

征选 75 对二卵双生子进行相关性分析(Busjahn 等, J. Hypertens. 1996, 14: 1195-1199; Busjahn 等, Hypertension, 1997, 29: 165-170)。受试人员全部属于德国高加索人种，来自于德国各个区域。抽取每对双生子及其父母的血液样品用来验证他们是二卵双生的并用于进一步的分子遗传学分析。每个参加的受试人员均事先进行了医学检查。已知，受试人员无一患有慢性医学疾病。5 分钟后由熟练医生用标准的水银血压测量计测量受试人的坐姿血压（进行 2 次测量，间隔 1 分钟）。两次测量的平均值用作血压数值。

二卵双生子用于相关性研究的优点是他们严格地同龄而且外部对于他们表型的影响可被视为最低 (Martin 等, *Nat. Genet.*, 1997, 17: 387-392)。

最近 Martin 等 (1997) 描述了双生子研究对解释复杂遗传疾病的重要性。

每对双生子是否为二卵双生通过用聚合酶链反应 (PCR) 扩增 5 个微卫星标记来进行确认。在这个微卫星标记分析中, 使用特定寡核苷酸通过 PCR 扩增脱氧核糖核酸 (DNA) 片段, 该片段含有在不同的人类个体中高度可变的区域。在基因组的这些区域中的高可变性可以通过所扩增片段的大小的微小差异检测到, 如果基因的相应位点上有多多样性的话, 则通过凝胶电泳分离 PCR 产物之后将形成称作微卫星带的双带 (Becker 等, *J. Reproductive Med.* 1997, 42: 260-266)。

对靶基因——此处为 *hsgk1* 基因的分子遗传学分析, 用 PCR 方法扩增紧邻 *hsgk1* 基因座位的另外 3 个微卫星标记区域 (d6s472, d6s1038, d6s270), 然后将其与另一个双生子及其父母的相应样品进行比较。用这种方法可以确定就所研究的等位基因而言, 此对双生子从其父母遗传到的等位基因是相同的还是不同的。用名为“结构方程模拟” (SEM) 的模型进行相关性研究 (Eaves 等, *Behav. Genet.* 1996, 26: 519-525; Neale, 1997: *Mx: Statistical modeling*. Box 126 MCV, Richmond, VA 23298: 精神病系, 第 4 版)。此模型的基础是受试对的方差-协方差矩阵, 其特征在于他们具有一个或两个或完全不具有相同等位基因的可能性。与表型有关的方差被分成基于所有基因的遗传背景的方差 (A)、基于靶基因——此处为 *hsgk1* 基因的遗传背景的方差 (Q) 以及由外界影响产生的方差 (E)。

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

对于 3 种可能的等位基因的组合 IBD_0 、 IBD_1 、 IBD_2 (IBD = “遗传得到的相等等位基因”; 0、1 或 2 个相同的等位基因), 受试对的协方差定义如下:

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

为了评价 *hsgk1* 基因座位的遗传构成与受试人血压之间的相关性，以 χ^2 统计形式计算考虑和不考虑 *hsgk1* 靶基因的遗传方差的两个模型的差别。对于每一对双生子和每一个基因座位，等位基因比率在亲本基因型的基础上用所谓的“多点”模型进行计算(MAPMAKER/SIBS; Kruglyak 等, *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, 57: 439-454)。

最近在模拟研究中 (Fulker 等, *Behav. Gen.* 1996, 26: 527-532) 确认了基于方差-协方差估计的分析方法与上述 χ^2 统计 (S.A.G.E. 遗传流行病学的统计学分析, 2.2 版, 计算机程序包, 流行病学与生物统计学学部, Case Western Reserve 大学, Cleveland, OH, USA, 1996) 相比有更多的信息价值。为了保证相对于 Lander 和 Kruglyak 标准 (Lander 等, *Nat. Genet.*, 1995, 11: 241-246) 具有显著的相关性，而采用 $p < 0.01$ 的显著性水平。

此相关性研究的结果列于表 1 中。

表 1:

表型	最大 χ^2	P
收缩压数值 (卧姿)	4.44	0.04
舒张压数值 (卧姿)	14.36	0.0002
收缩压数值 (坐姿)	5.55	0.019
舒张压数值 (坐姿)	4.92	0.027
收缩压数值 (站姿)	1.91	0.17
舒张压数值 (站姿)	4.83	0.028

由表 1 可知，显著性水平 p 的低值，即仅略超过或者完全没有超过所接受的 $p < 0.01$ 显著性水平的值证明关于 *hsgk1* 基因座位的遗传方差与表型确定的血压测量值方差之间有正相关性。

实施例 2

hsgk1 基因的基因组结构已被描述 (Waldegger 等, *Genomics*, 51, 29 [1998])，

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515).

为了鉴定与高血压易感性相关的 SNP，首先研究数据库中公布的 hsgk1 基因的 SNP 是否是真正的 SNP 而不仅仅是测序错误，以及这些 SNP 是否有足够的多态性使其能够提供高血压易感性的诊断检测基础。外显子 8 中的 SNP rs 1057293 与 C 替换 T 有关，它满足所要求的前提条件

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/snpview?snp=1057293; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=1057293)。另外，通过直接测序得到第二个 SNP，其在 hsgk1 基因中距第一个 SNP 准确的 551bp，位于内含子 6 到外显子 7 的供体剪接位点中，而且其与 T 替换 C 相关。对内含子 6 (T→C) 和外显子 8 (C→T) 中的这两个 SNP 的分析如下所述。

在所有情况下，PCR 扩增之后，加入 1 单位碱性磷酸酶和 1 单位核酸外切酶以降解 PCR 引物和使 dNTP 去磷酸化。在下面的条件中进行 PCR：在 9600 热循环仪 (Applied Biosystems) 中 95°C 10 分钟，然后 95°C 下 15 秒、62°C 下 15 秒、72°C 下 30 秒循环 35 次，及 72°C 下 10 分钟延伸步骤。

用针对内含子 6 的 SNP (T→C) 的引物 5'-CTC CTT GCA GAG TCC GAA 和针对外显子 8 的 SNP (C→T) 的引物 5'-ACC AAG TCA TTC TGG GTT GC 进行微型测序反应。用 0.15 pmol 的 PCR 纯化产物作为测序 PCR 中的模板。对于测序 PCR，用下面各步骤进行 25 个扩增循环：在 9600 热循环仪中 96°C 下变性 10 秒，50°C 退火 10 秒，60°C 下延伸步骤 30 秒。

对于同一个已确定了 hsgk1 基因的 SNP 基因型的患者，测量其在躺姿、站姿和坐姿时的收缩血压和舒张血压数值，以确定 hsgk1 基因的 SNP 基因型与血压之间的相关性。

表 2 显示双生子的一些人口统计学数据以及 hsgk1 基因座位的遗传构成与血压测量值之间的相关性分析结果。在受试人员中证实每种姿势的血压测量值都受到强烈的遗传影响。

表 2:

表型	单卵双生	二卵双生	a ² (r _{单卵} /r _{二卵})	P (相关性)
N	200	132		
年龄 (年)	29 ± 12	31 ± 12		
性别(男/女)	52/148	85/47		
身高(cm)	169 ± 8	170 ± 8		
体重 (kg)	65 ± 11	67 ± 12		
身体质量指数 (BMI) 体重/身高 ² (kg/m ²)	22.4 ± 3.5	22.8 ± 3.4		
收缩血压 (卧姿) (mmHg)	128 ± 17	124 ± 14	0.69 (0.69/0.31)	0.04
舒张血压 (卧姿) (mmHg)	71 ± 12	71 ± 11	0.66 (0.66/0.42)	0.0002
收缩血压 (坐姿) (mmHg)	125 ± 16	123 ± 13	0.74 (0.74/0.38)	0.019
舒张血压 (坐姿) (mmHg)	73 ± 11	73 ± 10	0.72 (0.72/0.51)	0.027
收缩血压 (站姿) (mmHg)	124 ± 15	122 ± 14	0.67 (0.66/0.48)	0.04
舒张血压 (站姿) (mmHg)	80 ± 10	79 ± 10	0.64 (0.63/0.40)	0.0002

表 3 显示本发明相关性研究的其他结果。外显子 8 中的 SNP 的等位基因频率是 C 为 91%、T 为 9%，而对于内含子 6 中的 SNP 则是 T 为 79%、C 为 21%（两个多态性都保持 Hardy-Weinberg 平衡）。

每个姿势（坐姿、卧姿和站姿）的血压测量值都显示同样的趋势。外显子 8 中的 SNP 的纯合 CC 携带者和杂合 CT 携带者在血压数值上未显示有任何差异，但是他们确实比外显子 8 中的 SNP 的纯合 TT 携带者有低得多的收缩血压和舒张血压数值。

与外显子 8 中的 SNP 相比，对于内含子 6 中的 SNP，相关性研究的相应结果较不一致。但是，发现内含子 6 中的 SNP 的纯合 CC 携带者通常比内含子 6 中的 SNP 的纯合 TT 携带者和杂合 TC 携带者有低的血压数值。

CPN 031429

表 3:

表型	外显子 8 中 第一 SNP CC	外显子 8 中 第一 SNP CT	外显子 8 中 第一 SNP TT	外显子 8 中 第一 SNP CC/CT	内含子 6 中 第二 SNP TT	内含子 6 中 第二 SNP CT	内含子 6 中 第二 SNP CC	内含子 6 中 第二 SNP TT/CT
收缩血压 (卧)	125 ± 15	125 ± 18	132 ± 14	125 ± 16	125 ± 16	128 ± 18	119 ± 6	126 ± 16
舒张血压 (卧)	70 ± 10	72 ± 13	74 ± 12	71 ± 11	71 ± 10	72 ± 13	67 ± 10	71 ± 11
收缩血压 (坐)	124 ± 14	123 ± 15	129 ± 13	124 ± 14	124 ± 14	125 ± 17	117 ± 6	124 ± 14
舒张血压 (坐)	72 ± 10	74 ± 10	79 ± 9	73 ± 10	73 ± 10	74 ± 11	72 ± 9	73 ± 10
收缩血压 (站)	123 ± 15	123 ± 14	129 ± 13	123 ± 15	123 ± 14	126 ± 16	119 ± 8	123 ± 15
舒张血压 (站)	79 ± 10	81 ± 10	84 ± 8	80 ± 10	80 ± 10	82 ± 11	78 ± 8	80 ± 10

表 4 详细地显示了不管在哪一种姿势下测量血压(坐姿、站姿、卧姿), 内含子 6 中的 SNP 的遗传构成对于收缩血压和舒张血压数值有实质上等同的显著性。外显子 8 中的 SNP 的遗传构成的显著性结果与此类似, 但是与内含子 6 中的 SNP 相比不同姿势下收缩血压测量值与舒张血压测量值之间的显著性关联却要稍小一些。

表 4:

表型	内含子 6 中的第二 SNP	外显子 8 中的第一 SNP
收缩压数值 (卧姿)	<0.01	<0.05
舒张压数值 (卧姿)	<0.05	0.08
收缩压数值 (坐姿)	<0.05	<0.05
舒张压数值 (坐姿)	<0.01	0.08
收缩压数值 (站姿)	<0.05	0.07
舒张压数值 (站姿)	<0.05	0.09

如表 5 所示, 在分析的 2 个 SNP 之间有强相关性平衡: 尽管外显子 8 中的 SNP 的多数 CC 携带者也是内含子 6 中的 SNP 的 TT 携带者(64%), 但反之却不是这样(外显子 8 的 TT 携带者中仅有 2% 也是内含子 6 的 CC 携带者)。

表 5:

	内含子 6 的 TT	内含子 6 的 TC	内含子 6 的 CC
外显子 8 的 CC	197 (64%)	59 (19%)	3 (1%)
外显子 8 的 CT	2 (1%)	30 (10%)	11 (4%)
外显子 8 的 TT	0 (0%)	0 (0%)	6 (2%)

<110> 弗洛里安·朗 (FLORIAN LANG)

<120> 高血压的定量诊断分析

<130> L61882

<140> DE 101 13 876.8

<141> 2001-03-21

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2354

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(1335)

<223>

<220>

<221> 变异

<222> (762)..(762)

<223> 第一 SNP (C 到 T), 沉默突变,
即, SNP 的两种形式均在第 240 位氨基酸位置处导致氨基酸 Asp

<400> 1

```

ggctctttgag cgctaacgctc tttctgtctc cccgcggtgg tg atg acg gtg aaa      54
                                                Met Thr Val Lys
                                                1

act gag gct gct aag ggc acc ctc act tac tcc agg atg agg ggc atg      102
Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg Met Arg Gly Met
5          10          15          20

gtg gca att ctc atc gct ttc atg aag cag agg agg atg ggt ctg aac      150
Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg Met Gly Leu Asn
          25          30          35

gac ttt att cag aag att gcc aat aac tcc tat gca tgc aaa cac cct      198
Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala Cys Lys His Pro
          40          45          50

gaa gtt cag tcc atc ttg aag atc tcc caa cct cag gag cct gag ctt      246
Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln Glu Pro Glu Leu
          55          60          65

atg aat gcc aac cct tct cct cca cca agt cct tct cag caa atc aac      294
Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser Gln Gln Ile Asn
          70          75          80

```

ett ggc ccg tcg tcc aat cct cat gct aaa cca tct gac ttt cac ttc Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser Asp Phe His Phe 85 90 95 100	342
ttg aaa gtg atc gga aag ggc agt ttt gga aag gtt ctt cta gca aga Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val Leu Leu Ala Arg 105 110 115	390
cac aag gca gaa gaa gtg ttc tat gca gtc aaa gtt tta cag aag aaa His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val Leu Gln Lys Lys 120 125 130	438
gca atc ctg aaa aag aaa gag gag aag cat att atg tcg gag cgg aat Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met Ser Glu Arg Asn 135 140 145	486
gtt ctg ttg aag aat gtg aag cac cct ttc ctg gtg ggc ctt cac ttc Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val Gly Leu His Phe 150 155 160	534
tct ttc cag act gct gac aaa ttg tac ttt gtc cta gac tac att aat Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu Asp Tyr Ile Asn 165 170 175 180	582
ggt gga gag ttg ttc tac cat ctc cag agg gaa cgc tgc ttc ctg gaa Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg Cys Phe Leu Glu 185 190 195	630
cca cgg gct cgt ttc tat gct gct gaa ata gcc agt gcc ttg ggc tac Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Tyr 200 205 210	678
ctg cat tca ctg aac atc gtt tat aga gac tta aaa cca gag aat att Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile 215 220 225	726
ttg cta gat tca cag gga cac att gtc ctt act gac ttc gga ctc tgc Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp Phe Gly Leu Cys 230 235 240	774
aag gag aac att gaa cac aac agc aca aca tcc acc ttc tgt ggc acg Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr Phe Cys Gly Thr 245 250 255 260	822
ccg gag tat ctc gca cct gag gtg ctt cat aag cag cct tat gac agg Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln Pro Tyr Asp Arg 265 270 275	870
act gtg gac tgg tgg tgc ctg gga gct gtc ttg tat gag atg ctg tat Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr Glu Met Leu Tyr 280 285 290	918
ggc ctg ccg cct ttt tat agc cga aac aca gct gaa atg tac gac aac Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu Met Tyr Asp Asn 295 300 305	966

att ctg aac aag cct ctc cag ctg aaa cca aat att aca aat tcc gca Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile Thr Asn Ser Ala 310 315 320	1014
aga cac ctc ctg gag ggc ctc ctg cag aag gac agg aca aag cgg ctc Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg Thr Lys Arg Leu 325 330 335 340	1062
ggg gcc aag gat gac ttc atg gag att aag agt cat gtc ttc ttc tcc Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His Val Phe Phe Ser 345 350 355	1110
tta att aac tgg gat gat ctc att aat aag aag att act ccc cct ttt Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile Thr Pro Pro Phe 360 365 370	1158
aac cca aat gtg agt ggg ccc aac gac cta cgg cac ttt gac ccc gag Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Asp Leu Arg His Phe Asp Pro Glu 375 380 385	1206
ttt acc gaa gag cct gtc ccc aac tcc att ggc aag tcc cct gac agc Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys Ser Pro Asp Ser 390 395 400	1254
gtc ctc gtc aca gcc agc gtc aag gaa gct gcc gag gct ttc cta ggc Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu Ala Phe Leu Gly 405 410 415 420	1302
ttt tcc tat gcg cct ccc acg gac tct ttc ctc tgaaccctgt tagggcttgg Phe Ser Tyr Ala Pro Thr Asp Ser Phe Leu 425 430	1355
ttttaaagga ttttatgtgt gtttccgaat gttttagtta gccttttggt ggagccgcca	1415
gctgacagga catcttaca gagaatttgc acatctctgg aagcttagca atcttattgc	1475
acactgttcg ctggaagctt tttgaagagc acattctctc cagtgagctc atgaggtttt	1535
catttttatt ctctcttcca acgtggtgct atctctgaaa cgagcgtag agtgccgcct	1595
tagacggagg caggagtttc gttagaaagc ggaagctggt ctaaaaaagg tctcctgcag	1655
atctgtctgg gctgtgatga cgaatattat gaaatgtgdc tttctgaag agattgtggt	1715
agctccaaag ctttctctat cgcagtgttt cagttcttta ttttcccttg tggatatgct	1775
gtgtgaaccg tcgtgtgagt gtggtatgcc tgatcacaga tggattttgt tataagcadc	1835
aatgtgacac ttgcaggaca ctacaacgtg ggacattggt tgtttcttcc atatttggaa	1895
gataaattta tgtgtagact tttttgtaag atacgggttaa taactaaaat ttattgaaat	1955
ggtcttgcaa tgactcgtat tcagatgctt aaagaaagca ttgctgctac aaatatttct	2015
atttttagaa agggttttta tggaccaatg cccagttgt cagtcagagc cgttggtggt	2075
tttcattggt taaaatgtca cctgtaaaat gggcattatt tatgtttttt tttttgcatt	2135

cctgataatc gbatgtattg tataaagaac gtctgtacat tgqgttataa cactagtata 2195
 tttaaactta caggettatt tgtaatgtaa accaccattt taatgtactg taattaacat 2255
 ggttataata cgtacaatcc ttcctcctc ccatcacaca actttttttg tgtgtgataa 2315
 actgattttg gtttgcaata aaccttgaa aaatattta 2354

<210> 2

<211> 431

<212> PRT

<213> 人(homo sapiens)

<400> 2

Met Thr Val Lys Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg
 1 5 10 15

Met Arg Gly Met Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg
 20 25 30

Met Gly Leu Asn Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala
 35 40 45

Cys Lys His Pro Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln
 50 55 60

Glu Pro Glu Leu Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser
 65 70 75 80

Gln Gln Ile Asn Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser
 85 90 95

Asp Phe His Phe Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val
 100 105 110

Leu Leu Ala Arg His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val
 115 120 125

Leu Gln Lys Lys Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met
 130 135 140

Ser Glu Arg Asn Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val
 145 150 155 160

Gly Leu His Phe Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu
 165 170 175

Asp Tyr Ile Asn Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg
 180 185 190

Cys Phe Leu Glu Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser
 195 200 205

Ala Leu Gly Tyr Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys
 210 215 220

Pro Glu Asn Ile Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp
 225 230 235 240

Phe Gly Leu Cys Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr
 245 250 255

Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln
 260 265 270

Pro Tyr Asp Arg Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr
 275 280 285

Glu Met Leu Tyr Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu
 290 295 300

Met Tyr Asp Asn Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile
 305 310 315 320

Thr Asn Ser Ala Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg
 325 330 335

Thr Lys Arg Leu Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His
 340 345 350

Val Phe Phe Ser Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile
 355 360 365

Thr Pro Pro Phe Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Asp Leu Arg His
 370 375 380

Phe Asp Pro Glu Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys

385					390					395					400
Ser	Pro	Asp	Ser	Val	Leu	Val	Thr	Ala	Ser	Val	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu
				405					410					415	
Ala	Phe	Leu	Gly	Phe	Ser	Tyr	Ala	Pro	Pro	Thr	Asp	Ser	Phe	Leu	
			420					425					430		

1 ENSE00000798789 AL135839.15.1.113673 -1 27517 27634 118 bp
GGTCTTTGAGCGCTAACGTCTTTCTGTCTCCCCGCGGTGGTGATGACGGT
GAAAACCTGAGGCTGCTAAGGGCACCTCACTTACTCCAGGATGAGGGGCA
TGGTGGCAATTCTCATCG

2 ENSE00000798790 AL135839.15.1.113673 -1 27296 27371 76 bp
CTTTTCATGAAGCAGAGGAGGATGGGTCTGAACGACTTTATTCAGAAGATT
GCCAATAACTCCTATGCATGCAAAACA

3 ENSE00000798791 AL135839.15.1.113673 -1 26790 26865 76 bp
CCCTGAAGTTCAGTCCATCTTGAAGATCTCCAACCTCAGGAGCCTGAGC
TTATGAATGCCAACCTTCTCCTCCA

4 ENSE00000798792 AL135839.15.1.113673 -1 26247 26351 105 bp
CCAAGTCTTCTCAGCAAATCAACCTTGGCCCGTGTCCAATCCTCATGC
TAAACCATCTGACTTTCACTTCTTGAAGTGATCGGAAAGGGCAGTTTTG
GAAAG

5 ENSE00000798793 AL135839.15.1.113673 -1 26059 26142 84 bp
GTTCTTCTAGCAAGACACAAGGCAGAAGAAGTGTTCATGCAGTCAAAGT
TTTACAGAAGAAAGCAATCTGAAAAAGAAAGAG

6 ENSE00000798794 AL135839.15.1.113673 -1 25808 25939 132 bp
GAGAAGCATAATATGTTCGGAGCGGAATGTCTGTTGAAGAATGTGAAGCA
CCCTTTCCCTGGTGGCCCTTCACTTCTCTTCCAGACTGCTGACAAATTGT
ACTTTGTCTAGACTACATTAATGGTGGAGAG

7 ENSE00000798795 AL135839.15.1.113673 -1 25447 25559 113 bp
TTGTTCTACCATCTCCAGAGGGAACGCTGCTTCCTGGAACCACGGGCTCG
TTTCTATGCTGCTGAAATAGCCAGTGCCTTGGGCTACCTGCATTCACTGA
ACATCGTTTATAG

8 ENSE00000798796 AL135839.15.1.113673 -1 24978 25101 124 bp
AGACTTAAACCCAGAGAATATTTTGCTAGATTCACAGGGACACATTGTCCCTT
ACTGATTCCGACTCTGCAAGGAGAACATTGAACACAACAGCACAACA
TCCACCTTCTGTGGCACGCCGGAG

9 ENSE00000798797 AL135839.15.1.113673 -1 24422 24517 96 bp
TATCTCGCACCTGAGGTGCTTCATAAGCAGCCTTATGACAGGACTGTGGA
CTGGTGGTGCCCTGGGAGCTGTCTTGTATGAGATGCTGTATGGCCTG

10 ENSE00000798798 AL135839.15.1.113673 -1 23808 23963 156 bp
CCGCCTTTTATAGCCGAAACACAGCTGAAATGTACGACAACATTCTGAA
CAAGCCTCTCCAGCTGAAACCAAATATTACAAATTCGGCAAGACACCTCC
TGGAGGGCCTCTGCAGAAGGACAGGACAAAGCGGCTCGGGGCCAAGGAT
GACTTC

11 ENSE00000798799 AL135839.15.1.113673 -1 23611 23700 90 bp
ATGGAGATTAAGAGTCAATGCTTCTTCTCCTTAATTAACCTGGGATGATCT
CATTAAATAAGAAGATTACTCCCCCTTTTAACCCAAATGTG

12 ENSE00000798800 AL135839.15.1.113673 -1 22037 23220 1184 bp
AGTGGGCCCAACGACCTACGGCACTTTGACCCCGAGTTTACCGAAGAGCC
TGTCCCCAACTCCATTGGCAAGTCCCCTGACAGCGTCCCTCGTACAGCCA
GCGTCAAGGAAGCTGCCGAGGCTTTCCCTAGGCTTTTCCCTATGCGCCTCCC
ACGGACTCTTCCCTCTGAACCTGTTAGGGCTTGGTTTTAAAGGATTTTA
TGTGTGTTTCCGAATGTTTGTAGTTAGCCTTTTGGTGGAGCCGCCAGCTGA
CAGGACATCTTACAAGAGAAATTTGCACATCTCTGGAAGCTTAGCAATCTT
ATTGCACACTGTTTCGCTGGAAAGCTTTTGAAGASCACATCTCTCCTCAGTG
AGCTCATGAGGTTTTCAATTTTATTTCTTCCCTTCCAACGTGGTGCATCTC
TGAAACGAGCGTTAGAGTGCCGCCCTTAGACGGAGGCAGGAGTTTCGTTAG
AAAGCGGACGCTGTTCTAAAAAAGGTCTCCTGCAGATCTGCTCGGGCTGT
GATGACGAATATTATGAAATGTGCCTTTTCTGAAGAGATTGTGTTAGCTC
CAAAGCTTTTCCCTATCGCAGTGTTCAGTCTTTATTTTCCCTTGTGGAT
ATGCTGTGTGAACCGTCTGTGAGTGTGGTATGCTGATCAGATGGAT
TTTGTATATAAGCATCAATGTGACACTTGACAGGACACTACACGTGGGACA
TTGTTTGTCTTCCATAATTTGGAAGATAAAATTTATGTGTAGACTTTTTT
GTAAGATACGGTTAATAACTAAAATTTATGAAATGCTCTGCAATGACT
CGTATTCAGATGCTTAAAGAAAGCATTGCTGCTACAAATATTTCTATTTT
TAGAAAGGGTTTTTATGGACCAATGCCCCAGTTGTGAGTACAGAGCCGTTG
GTGTTTTTCATTGTTTAAAAATGTCACCTGTAAAATGGGCATTTATTAATGT
TTTTTTTTTTCATCCTGATAATTTGTATGATTTGTATAAAGAACGCTCTG
TACATTGGGTTATAACACTAGTATATTTAAACTTACAGGCTTATTTGTAA
TGTAACCACCATTTTAAATGTAAGTAAATTAACATGGTTATAAATACGTAC
AAATCCTTCCCTCATCCCATCACACAACCTTTTTTGTGTGTGATAAAGCTGA
TTTTTGGTTTTGCAATAAAACCTTGAATAAATATTTTA

图 1

