

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/11

C12N 15/09

C12P 19/34

C12Q 1/68

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310103531.5

[43] 公开日 2005 年 5 月 11 日

[11] 公开号 CN 1614017A

[22] 申请日 2003. 11. 7

[21] 申请号 200310103531.5

[71] 申请人 首都医科大学附属北京朝阳医院

地址 100020 北京市朝阳区白家庄路 8 号

共同申请人 北京诺赛基因组研究中心有限公司

[72] 发明人 张麟 沈岩

[74] 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理有限公司

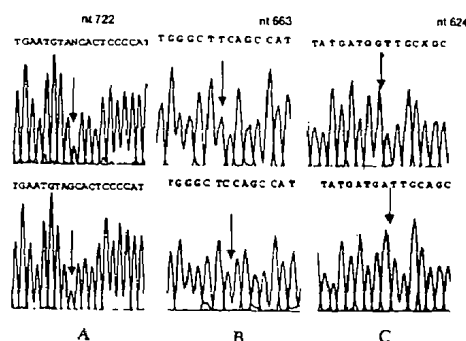
代理人 何文彬

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 5 页

[54] 发明名称 扩张性心肌病病人 M₂-乙酰胆碱能受体突变基因及其检测方法

[57] 摘要

本发明涉及扩张性心肌病病人 M₂-乙酰胆碱能受体突变基因及其检测方法, 突变位点及其检测方法详见说明书。本发明将 CHRM2 基因的突变与抗 CHRM2 自身抗体、DCM 联系起来, 进一步说明了三者之间的关系, 为进一步研究 DCM 的病因奠定了必要的基础。该突变基因可以作为探针制成试剂盒、或制作基因芯片, 用于体外检测生物样品中 CHRM2 突变基因的存在, 为制定新的诊断、预防、治疗 DCM 的方案, 筛选和开发新的药物提供依据。



ISSN 1008-4274

1. 扩张性心肌病病人 M₂-乙酰胆碱能受体突变基因,其中编码区的第 588-866 位核苷酸序列,其特征在于第 722 位核苷酸的碱基由 C 突变为 G,从而导致第 176 位半胱氨酸变为色氨酸,该核苷酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

2. 含有权利要求 1 所述的核苷酸序列 SEQ ID NO:4 的重组质粒。

3. 扩张性心肌病病人 M₂-乙酰胆碱能受体突变基因,其中编码区的第 588-866 位核苷酸序列,其特征在于第 663 位核苷酸的碱基由 C 突变为 T,第 624 位核苷酸的碱基由 A 突变为 G,从而导致第 157 位的脯氨酸变为丝氨酸,以及第 144 位的异亮氨酸变为缬氨酸,该核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示。

4. 含有权利要求 3 所述的核苷酸序列 SEQ ID NO:5 的重组质粒。

5. 一种检测扩张性心肌病病人 M₂ 乙酰胆碱能受体突变基因的方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

(1) 通过免疫分析,确定检测扩张性心肌病病人 M₂-乙酰胆碱能受体突变基因突变位点的候选序列;

(2) 根据步骤(1)确定的核苷酸的序列设计引物,从扩张性心肌病病人的血样提取 DNA 作为模板,通过 PCR 反应扩增该序列的 DNA 片段;

(3) 用单链构象多态性 SSCP 法筛选由步骤(2)所得的 PCR 产物中碱基突变阳性的 PCR 扩增片段;

(4) 定位克隆由步骤(3)筛选出的碱基突变阳性的 PCR 扩增片段,并测定其核苷酸序列;

(5) 将测得的序列与 GeneBank 中正常的人 CHRM2 基因中相应的序列比较,确定该核酸分子的突变位点,从而确定 CHRM2 突变基因的突变位点。

6. 根据权利要求 5 所述的检测扩张性心肌病病人 M₂-乙酰胆碱能受体突变基因的方法,其特征在于其中步骤(1)的免疫分析进一步包括以下步骤:

(a) 合成人 CHRM2 细胞外第二环 E2 区的表位肽段,该肽段以半胱氨酸为末端,包括位于 CHRM2 蛋白的第 168—192 位氨基酸残基;

(b) 用步骤(a)合成的肽段作为抗原,从扩张性心肌病病人组和健康人对照组的血清中筛选抗 **CHRM2** 自身抗体阳性的血清;

(c) 检测由步骤(b)筛选的扩张性心肌病患者的抗 **CHRM2** 自身抗体阳性血清的抗 **CHRM2** 自身抗体滴度。

扩张性心肌病病人 M₂-乙酰胆碱能受体突变基因及其检测方法

技术领域

本发明涉及基因工程技术，更具体地说，是涉及扩张性心肌病病人 M₂-乙酰胆碱能受体（CHRM2）突变基因及其检测的方法。

背景技术

扩张性心肌病（DCM）是一种病因不明的慢性心肌病，其临床症状是全心无明显诱因的扩大，主要为左心室的扩大，累及心功能，表现为心脏功能的明显下降，最终导致心力衰竭。由于病因不清楚，所以无特效的治疗方法，临床上治疗该病的方法是按常规方法用 β -受体阻断剂、利尿剂、洋地黄、ACEI（血管紧张素转化酶抑制剂）等药物对症治疗，但疗效不甚理想，病人的死亡率达 50% 以上。

目前普遍认为扩张性心肌病可能的病因有三个方面：家族性的遗传因子、病毒性心肌炎和其他细胞毒素侵染和免疫学异常。对于扩张性心肌病来说，必需要有病人中的 20-30% 为家族性的 DCM 时才能确定为遗传病，而另外两种病因又不能解释大部分患者。

近 10 年来对 DCM 的研究结果表明，抗 CHRM2 自身免疫抗体参与了 DCM 的致病过程。例如瑞典研究者发现在 DCM 病人的血清中含有抗 CHRM2 的自身抗体，而日本的研究者认为抗 CHRM2 和 β 1-肾上腺素受体的自身抗体对 DCM 是特异的，而对其他的心脏疾病不特异（Fu MLX 等 Clin Immunol Immunopathol, 1994,72: 15-20 ; Matsui S 等 Autoimmunity,1995, Vol 21:85-88）。这些都说明抗 CHRM2 的自身抗体与 DCM 有关。自身抗体的产生及功能的研究目前正是热点，其功能的研究已经表明，自身抗体具有“拟乙酰胆碱能”样作用，可以使体外培养的豚鼠心肌细胞的跳动频率下降和 cAMP 的产生减少，它的靶点是细胞外第二环表位肽段。已有报导兔抗人 CHRM2 的细胞外第二环的抗体具有刺激性的电生理效应，它可降低豚鼠心肌细胞 L 型 Ca^{2+} 电流（Nascimento,JHM. 等 Am J Physiol Cell Physiol 2001,281:c1251-1258），抗 CHRM2 的自身抗体通过降低心肌细胞 L 型 Ca^{2+} 电流而抑制心肌的收缩力，从而参与了

DCM 的致病过程。但该自身抗体产生的原因尚不清楚。

根据抗体与抗原免疫特异结合的原理,可以推测,该自身抗体的存在可能是由于其受体抗原 CHRM2 基因的突变而引起抗原组分改变的结果。但到目前为止,尚未有关于 CHRM2 基因突变与抗 CHRM2 自身抗体的产生、以及与 DCM 之间关系的报道。因此,有必要建立一种分离、检测扩张性心肌病病人 CHRM2 突变基因的方法,检测扩张性心肌病病人 CHRM2 突变基因的突变位点并分离该突变其因,进一步了解 CHRM2 基因的突变与抗 CHRM2 自身抗体的产生、以及与 DCM 之间关系,为制备用于诊断 DCM 的试剂盒和基因芯片提供必要的依据,也可为提供更好的诊断、治疗和预防 DCM 的方案、筛选和开发新的治疗和预防药物奠定基础。

发明内容

针对目前 DCM 的研究尚未涉及 CHRM2 基因突变的现状,本发明者建立了一种检测 CHRM2 突变基因的方法,并对大量 DCM 病人的血样进行了筛查,结果检测到两种类型的突变位点位于 nt588-nt866 的 CHRM2 突变基因,并测得 DCM 病人血清的抗 CHRM2 自身抗体阳性率为 55.8%,CHRM2 基因发生突变的 DCM 病人血清的抗 CHRM2 自身抗体阳性率为 100%,同时还测得该阳性血清在体外可降低豚鼠单个心肌细胞 L 型 Ca^{2+} 电流的峰强度及密度;而健康人对照组的 CHRM2 基因均未发生突变,其血清的抗 CHRM2 自身抗体阳性率仅为 9.7%,从而说明 CHRM2 基因的突变所引起抗原组分改变,可能是产生具有上述功能的自身抗体的原因之一。因此,

本发明的一个目的是提供扩张性心肌病病人 CHRM2 突变基因中发生突变的部分编码区序列;

本发明的另一个目的是提供一种检扩张性心肌病病人 CHRM2 突变基因的突变位点的方法。

本发明的目的通过以下方案实现:

为了分离 CHRM2 突变基因中发生突变的编码区部分序列,和检测其突变位点,本发明的检测方法包括以下步骤:

- (1) 通过免疫分析,确定检测扩张性心肌病病人 M_2 -乙酰胆碱能受体突变基因突变位点的候选序列;
- (2) 根据步骤(1)确定的候选序列设计引物,从扩张性心肌病病人

的血样提取 DNA 作为模板，通过 PCR 反应扩增该序列的 DNA 片段；

(3) 用单链构象多态性 SSCP 法筛选由步骤 (2) 所得的 PCR 产物中碱基突变阳性的 PCR 扩增片段；

(4) 定位克隆由步骤 (3) 筛选出的碱基突变阳性的 PCR 扩增片段，并测定其核苷酸序列；

(5) 将测得的序列与 GeneBank 中正常的人 CHRM2 基因中相应的序列比较，确定该核酸分子的突变位点，从而确定 CHRM2 突变基因的突变位点。

其中步骤 (1) 进一步包括以下步骤：

(a) 合成人 CHRM2 细胞外第二环 E2 区的表位肽段，该肽段以半胱氨酸为末端，包括位于 CHRM2 蛋白的第 168—192 位氨基酸残基；

(b) 用步骤 (a) 合成的肽段作为抗原，从扩张性心肌病病人组和健康人对照组的血清中筛选抗 CHRM2 自身抗体阳性的血清；

(c) 检测由步骤 (b) 筛选的扩张性心肌病患者的抗 CHRM2 自身抗体阳性血清的抗 CHRM2 自身抗体滴度。

根据以上检测方法，可以获得：

(1) 扩张性心肌病病人 M₂-乙酰胆碱能受体突变基因，其中编码区的第 588-866 位核苷酸序列，其第 722 位核苷酸的碱基由 C 突变为 G，从而导致第 176 位半胱氨酸变为色氨酸，该核苷酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

(2) 含有权利要求 1 所述的核苷酸序列 SEQ ID NO:4 的重组质粒。

(3) 扩张性心肌病病人 M₂-乙酰胆碱能受体突变基因，其中编码区的第 588-866 位核苷酸序列，其第 663 位核苷酸的碱基由 C 突变为 T，第 624 位核苷酸的碱基由 A 突变为 G，从而导致第 157 位的脯氨酸变为丝氨酸，以及第 144 位的异亮氨酸变为缬氨酸，该核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示。

(4) 含有权利要求 2 所述的核苷酸序列 SEQ ID NO:5 的重组质粒。

已知 CHRM2 属于 G 蛋白偶联受体家族，CHRM2 细胞外第二环相应于第 168—192 位氨基酸的区域对 G 蛋白偶联的受体的配体结合是至关重要的，其中的 EDXE 氨基酸片段 (172—175) 是抗原组分 (抗原决定部位)，根据已知的研究结果，抗 CHRM2 的自身抗体与 DCM 有关，DCM 病人的 CHRM2 基因有可能在该区域附近发生突变。因此，本发明通过免疫分析，测定与 CHRM2 突变基因的表达产物免疫特异性结合的抗 CHRM2 自身抗

体的存在及其滴度,来确定检测 CHRM2 突变基因的突变位点的候选区域。首先,根据已知的人 CHRM2 细胞外第二环 E2 区(参见图 1)肽段的氨基酸序列,体外合成 CHRM2 蛋白的第 168—192 位氨基酸残基的肽段,其氨基酸序列为序列表中的 SEQ IDNO:1。然后用此合成的肽段作为抗原,在体外通过酶联免疫吸附试验(ELISA),从 DCM 病人组和健康人对照组的血清样品中筛选抗 CHRM2 自身抗体阳性的血清,DCM 患者中抗 CHRM2 自身抗体的阳性率为 55.8% (29/52),而对照仅为 9.7% (4/41) ($P<0.01$); DCM 病人的抗 CHRM2 自身抗体的平均滴度为 1: 128,而健康人对照组为 1: 24 ($P<0.01$)。从统计学上分析,该结果具有显著性,说明 DCM 病人体内抗 CHRM2 自身抗体的产生与该肽段的组成改变相关,其 CHRM2 基因有可能发生突变,而突变位点有可能发生在编码上述肽段的编码区。因此本发明选取 CHRM2 基因编码区的 588-866 位核苷酸序列(相应于第 132-224 位氨基酸残基)作为候选的筛查序列,其中的第 696-768 位核苷酸片段相应于第 168-192 位氨基酸序列。

根据候选筛查序列设计引物,正向引物为序列表中的 SEQ ID NO:2,反向引物为 SEQ IDNO:3,从 DCM 病人和健康人(对照)的血样中分离白细胞,提取 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,所得 276bp 的 PCR 扩增产物(图 2)随后用于检测其突变位点。

已知单链核酸的二级结构根据其一级结构的不同而异,PCR 产物变性后产生二条单链,如果扩增的片段内含有单个或多个碱基的置换、插入或缺失,由此引起的一级结构的变化,在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率就会有所不同。根据该区别可以检测出甚至单个碱基的改变。因此,本发明利用 SSCP(单链构象多态性),通过非变性凝胶电泳检测单个碱基对的变化,根据异常条带的出现(图 3),从 PCR 扩增产物中筛选出发生突变的片段,采用 PCR 产物克隆试剂盒(pGEM-T7 Vector System,美国 Promega 公司产品)按产品说明书进一步进行定位克隆、测序并与正常人的 CHRM2 基因相应序列(Genbank NT007680 核苷酸 588-866)比较。

临床数据表明,DCM 有明显的家族遗传性,本发明利用上述方法,通过对一个 18 位成员的中国 DCM 家族(此家族有 4 个患者),和 67 位散发 DCM 病人的 CHRM2 基因突变位点进行检测,分离并检测出两种类型与 DCM 有关的 CHRM2 突变基因中发生突变的编码区部分序列。其中之一是该基因编码区的第 722 位核苷酸的碱基由 C 突变为 G,从而导致第 176

位的半胱氨酸突变为色氨酸(图5A),该序列设定为SEQ ID NO:4。DCM家族中的4位DCM患者和2位无临床表现的成员,以及5位散发的DCM患者的CHRM2突变基因属于这种类型的突变。另一种是从其他DCM散发病人分离出的CHRM2突变基因中发生突变的编码区部分序列,该基因编码区的第663位核苷酸的碱基由C突变为T(图5B),从而导致第157位的脯氨酸变为丝氨酸,以及第624位核苷酸的碱基由A突变为G(图5C),从而使第144位的异亮氨酸变为缬氨酸,该序列设定为SEQ ID NO:5。

DCM家族中其他成员和对照者的CHRM2基因的相应序列未发生变异。

根据本发明的上述检测结果,DCM病人中的一部分,其CHRM2基因在588-866位核苷酸区域内发生了碱基置换的突变,尤其是家族性的DCM病人,CHRM2基因突变的发生率为100%,而且该家族成员中还有二位未发病成员的CHRM2基因也发生了突变。与此同时,本发明还测定了CHRM2基因发生突变的DCM病人血清中的抗CHRM2自身抗体,其阳性率为100%。此外,本发明还使用全细胞膜片钳技术测定了CHRM2基因发生突变的DCM病人血清中的抗CHRM2自身抗体阳性血清在体外对豚鼠单个心肌细胞L型 Ca^{2+} 电流的峰强度及密度的影响,并进一步与CHRM2的激动剂碳酰胆碱、 β -肾上腺素的兴奋剂异丙肾上腺素、和CHRM2的阻滞剂阿托品,以及作为对照的CHRM2自身抗体阴性血清(健康人对照)对豚鼠单个心肌细胞L型 Ca^{2+} 电流的峰强度及密度的影响比较。结果表明,该自身抗体减少了心肌细胞L型 Ca^{2+} 电流,而且可以使异丙肾上腺素激动所增大的L型 Ca^{2+} 电流减小,而CHRM2的阻滞剂阿托品可以阻断此作用;由此证明了抗CHRM2自身抗体的该作用类似于CHRM2的激动剂碳酰胆碱,在DCM病人体内,它通过减少心肌细胞L型 Ca^{2+} 电流而降低其收缩力,从而参与DCM病人的致病机制。

根据本发明的检测方法和检测结果可知,中国DCM病人中部分病人的CHRM2基因发生了碱基置换的突变,其中DCM家族中发病者CHRM2基因突变的阳性率为100%,二名无临床表现的成员其CHRM2基因也发生了突变,而DCM家族中其他成员和46位对照者的CHRM2基因均未发生突变。DCM病人中,血清的抗CHRM2自身抗体阳性率为55.8%,健康人为9.7% ($P<0.01$),而CHRM2基因发生突变的DCM病人的阳性率为100%。说明CHRM2基因的突变与抗CHRM2自身抗体的产生有更直接的关系。由此可推论CHRM2基因的突变引起其表达产物CHRM2抗原

组分的改变,从而产生与该抗原组分特异结合的抗 CHRM2 自身抗体。

因此,本发明与现有技术相比有以下优点:

本发明利用其检测扩张性心肌病病人 CHRM2 突变基因的方法,首次获得了扩张性心肌病病人 CHRM2 突变基因,并将其与抗 CHRM2 自身抗体、DCM 联系起来,进一步说明了三者之间的关系,表明 CHRM2 基因的突变是 DCM 的病因之一,尤其是 DCM 的遗传病因之一。为进一步研究 DCM 的病因奠定了必要的基础。该突变基因可以作为探针制成试剂盒、或制作基因芯片,用于体外检测生物样品中 CHRM2 突变基因的存在,尤其是通过对 DCM 家族成员样本的体外检测,可以为制定新的诊断、预防、治疗 DCM 的方案,筛选和开发新的药物提供依据。

附图说明

图 1 是表示 CHRM2 的结构及其生物学特征的示意图。图中 E2 为 CHRM2 细胞外第二环,相应于氨基酸残基 168-192。

图 2 是 CHRM2 基因编码区第 588—866 位核苷酸片段的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图。图中第 1 泳道是 pBR322/Hinf 分子量标志,第 2、3、4 泳道是 PCR 产物。

图 3 是检测 CHRM2 基因编码区第 588—866 位核苷酸片段的 PCR 扩增产物单链构象多态性 (SSCP) 的非变性凝胶电泳图。图中第 1、2 泳道是碱基突变阳性的 PCR 扩增产物,箭头所指为异常条带;第 3、4 泳道为碱基未发生突变的 PCR 扩增产物;第 5 泳道是健康人(对照)血样的 PCR 扩增产物。

图 4 是 T-载体克隆 CHRM2 基因编码区第 588—866 位核苷酸片段的 PCR 扩增产物的示意图。

图 5 是正常 CHRM2 基因和 CHRM2 突变基因部分序列的测序图谱。
↓ 为碱基发生突变的位点,图 5A 为第 722 位核苷酸突变;图 5B 为第 663 位核苷酸突变;图 5C 为第 624 位核苷酸突变。

图 6 是遗传性 DCM 家族图。图中 □ 代表男性;○ 代表女性; / 表示已死亡的个体;黑色图标表示感染的个体;↗ 为先证者。

图 7 是在不同条件下的豚鼠心肌细胞 L 型 Ca^{2+} 的电流曲线。其中抗 CHRM2 自身抗体阳性血清取自 CHRM2 基因发生突变的 DCM 病人。

图中:

- A1、C1、D1：对照；
A2：加入抗 CHRM2 自身抗体阴性血清；
B1、C2、D2：加入 β_1 -肾上腺素的激动剂异丙肾上腺素；
B2：加入 β_1 -肾上腺素的激动剂异丙肾上腺素后，再加入抗 CHRM2 自身抗体阴性血清；
C3：加入 CHRM2 的激动剂碳酰胆碱；
D3：加入抗 CHRM2 自身抗体阳性血清；
C4：加入碳酰胆碱后再加入 CHRM2 的阻滞剂阿托品；
D4：加入自身抗体阳性血清后再加入阿托品。

具体实施方式

以下通过三个实施例，结合附图对本发明作进一步说明。

实施例一 DCM 病人 CHRM2 自身抗体阳性血清的筛选

1. 抗原肽的合成

由北京 SBSGenatech 有限公司采用 Merrifield 的固相法 (Fu MLX 等, Clin Immunol Immunopathol, 72:15-20(1994)) 合成相应于人乙酰胆碱受体 CHRM2 的细胞外第二环氨基酸序列的肽段 (氨基酸残基第 168-192 位), 然后用 HPLC 分析法在 Vydac C-18 柱上分析该合成肽段的纯度, 并用自动氨基酸分析仪 (Beckman instruments, Inc, Palo Alto, CA) 分析其氨基酸序列。该序列设定为 SEQ ID NO:1, 其末端为半胱氨酸:

V-R-T-V-E-D-G-C-Y-I-Q-F-F-S-N-A-A-V-T-F-G-T-A-I-C;

2. 样本的选择

从在医院就医的病人中选出 52 位 DCM 病人, 其中 33 位女性, 19 位男性。入选的标准为出现 CHF (充血性心力衰竭, 纽约心脏协会功能分级 II-IV) 症状 1 年以上。所有的病人呈现出心脏结构和功能的改变, 在超声心动图中, 左心室射血分数为 45% 以下。患有肥大性心肌病、糖尿病、自身免疫性疾病和某些感染疾病的病人除外。收集血清之前, 所有病人停用 β -肾上腺素受体拮抗剂和 ACEI。对照组为 41 位健康的血液提供者, 对照组的年龄和性别与 DCM 病人相配。其临床症状、ECG 和超声心动图检查都正常, 且不服用药物。

3. 样本血清的酶联免疫吸附试验 (ELISA)

酶联免疫吸附试验: 将上述病人组和对照组采集的血样在 -20°C 下储

存备用。取 50 μ l 溶于 100mM Na_2CO_3 (pH 11) 的肽溶液 (5 μ g/ml) 涂布在 NUNC 微量滴定板上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用 PBS-T 使孔饱和, PBS-T 是在磷酸盐缓冲的盐溶液 (PBS, pH7.3-7.4) 中添加了 0.2% (v/v) Tween-20 (Sigma, USA) 和 0.01% (v/v) 硫柳汞 (Sigma, USA) 的溶液。将 20 μ l 按 1: 20~1: 160 稀释的血清加入涂布了肽溶液的微量滴定板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置过夜。用 PBS-T 将孔洗涤三次后, 使其与亲和纯化的生物素化兔抗 IgG(H+L) 抗体(用 PMT 按 1: 500 稀释)反应 1 小时。PMT 是添加了胎牛血清的 PBS-T 液, 浓度 10%。洗涤三次后, 使平板与链霉抗生物素-过氧化物酶 (Jackson Laboratories, PA, USA) 的 PMT 溶液 (2 μ l/ml) 反应 1 小时。然后用 PBS 洗涤三次, 并加入底物 2.5mM H_2O_2 -2mM ABTS (Sigma's, Louis, MO, USA)。30 分钟后在微量板读数器中读出 405nm 下的光密度 (O.D) (Keeling PJ 等, Br Heart J 73:417-421(1995))。

4. 结果

抗 CHRM2 自身抗体阳性血清的分析数据如表 1 所示。

表 1 DCM 和 NC (对照) 抗 M_2 受体的自身抗体比较

	阳性率 (%)	几何平均滴度
DCM (n=52)	29(55.8)	128
NC (n=41)	4(9.7)	24
P	<0.01	<0.01

表中的数据以平均值 $\pm$ SD 表示。阳性定义为阳性 / 阴性 (p/n=样本 OD-空白 OD / 阴性对照 OD-空白 OD) 比 $\geq$ 2.1。

由以上数据可知, DCM 病人的抗 CHRM2 自身抗体阳性率为 55.8% (29 / 52), 而对照为 9.7% (4 / 41) ($p<0.01$)。这些结果表明, 在中国的 DCM 病人体内不仅存在抗 CHRM2 的自身抗体, 而且其抗体的几何平均滴度在蛋白水平上明显高于对照, 说明 DCM 病人体内抗 CHRM2 自身抗体的产生与其相应的抗原肽的组成改变相关。

实施例二 DCM 病人 CHRM2 基因突变位点的检测

1. 检测样本的选择

按实施例一同样的标准选择 67 位散发 DCM 病人 (其中包括 38 位女性和 29 位男性), 和一个 18 位成员的中国山西省 DCM 家族 (其中有 4 个 DCM 患者) 作为被检对象, 并选择 46 位年龄和性别与 DCM 病人相配的健康供血者, 作为对照组。

2、PCR 扩增

根据已知的编码人 CHRM2 细胞外第二环的第 588-866 位核苷酸的序列设计以下引物：

正向引物为：5'-AGTCAAGCGGACCACAAAAATGGC-3' 该序列设定为 SEQ ID NO:2

反向引物为：5'-GGCTCCTTCTTGTCCTTCTTTATCC-3' 该序列设定为 SEQ ID NO:3

参照文献 (Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, 等 Nucleic Acids Res. 1989(17), 8390) 所述的方法，从待测样本的血液中分离白细胞，用酚-氯仿抽提和乙醇沉淀法提取 DNA 用作模板。通过 PCR 反应，扩增相应于 CHRM2 基因编码区位于 588—866 核苷酸序列的 DNA 片段，PCR 反应条件为：

25 μ l PCR 反应总体积中含有：

DNA 模板	0.5 μ l
引物	0.7 μ l
dNTP	0.5 μ l
10 $\times$ 缓冲液 + Mg ²⁺	2.5 μ l
Tag 聚合酶	0.2 μ l
dH ₂ O	20.6 μ l

反应混合物在 95℃ 变性 5min 后，94℃ 变性 1min，51℃ 退火 1min，70℃ 延伸 1min，共进行 30 个循环，然后在 72℃ 延伸 10min 后，4℃ 保存。PCR 产物的 2% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示，图中泳道 1 为 pBR322/Hinf I 分子量标志，第 2、3、4 泳道为 PCR 产物，其片段为 276 bp。

3. SSCP 法筛选碱基突变阳性的 PCR 产物

用 SSCP 银染法 (Hayashi, K, 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic DNA. PCR Methods Appl. 1: 34-38) 筛选碱基突变阳性的 PCR 扩增产物。

将 DCM 病人组和对照组的 PCR 产物进行 SSCP 电泳，其步骤如以下所述。

(1) 按以下组分制备 8% 聚丙烯酰胺凝胶，(总体积 34 ml)：

20% 的丙烯酰胺 / 双丙烯酰胺(49: 1)	13.6ml
5 $\times$ TBE	3.4ml
20%APS	34 μ l

TEMED	34 μ l
dH ₂ O	17ml

(2) 将制备的凝胶在 160V 下预电泳 1h;

(3) 然后将 PCR 产物在 98℃ 下变性 10min 后, 按下述条件进行电泳、固定、染色:

单链 PCR 扩增产物 6ml + 变性剂 6ml → 电泳 10—12 小时后, 固定 15 分钟, 染色 4 分钟并显色。

图 3 为 PCR 产物的 SSCP 非变性凝胶电泳图, 电泳出现两种不同的 SSCP 模式, 模式 I (第 3 泳道: 对照; 第 4、5 泳道: DCM 病人, 碱基未发生突变) 的 DNA 序列与 GeneBank 中的完全相同, 而模式 II (第 1、2 泳道: DCM 病人, 碱基突变阳性, 箭头所指为异常条带) 的 DNA 序列则发生了变化。

4. PCR 产物的克隆

经过 SSCP 电泳检测, 挑选碱基突变阳性的 PCR 扩增产物, 采用 PCR 产物克隆试剂盒 (pGEM-T7 Vector System, 美国 Promaga 公司产品) 按产品说明书和 J.Sambrook 等的分子克隆: 实验室指南, 第二版中所述方法进行定位克隆。

(1) 连接:

碱基突变阳性的 PCR 扩增产物	7 μ l (1.377 μ g 或 1.89 μ g)
PGEM-T7	1 μ l
10×缓冲液	1 μ l
连接酶	1 μ l
连接反应温度、时间	室温、1 小时

(2) 细菌转化:

100 μ l DH5 α 感受态细胞加入 10ml 转化管中, 加入 5 μ l 连接反应液, 温和混合后在冰上放置 30 分钟, 然后在 42℃ (水浴) 静置 2 分钟, 再加入 900 μ l LB (无抗菌素), 37℃ 下振摇 45 分钟 (100-150rpm)。取 160 μ l 细菌转化液在含有氨苄青霉素 / IPTG / X-gal 的 LB 平板培养基上培养, 挑选白色克隆, 用 BstZ I 进行酶切、鉴定, 选出插入了碱基突变阳性的 PCR 扩增片段的阳性质粒进一步用于序列分析, 检测突变位点。用同样方法克隆健康人对照组相应的 PCR 产物, 构建含有 CHRM2 对照基因编

码区 588—866 位核苷酸片段的 PCR 产物的重组对照质粒。图 4 是 T-载体克隆 CHRM2 基因编码区 588—866 位核苷酸片段的 PCR 扩增产物的示意图。图中 1 是 pGEM-T7 载体, 2 是碱基突变阳性的 PCR 扩增产物或对照 PCR 扩增产物, 3 是含有 CHRM2 突变基因或对照基因编码区第 588—866 位核苷酸片段的 PCR 产物的重组质粒。黑色图标表示插入片段。

5. CHRM2 基因部分编码区序列的测定

用反向通用引物测定由上述 4 中筛选出的阳性质粒和对照质粒中 276bp 的 DNA 插入片段的序列, 其结果如图 5 所示。将 CHRM2 突变基因和对照基因的 nt588-nt866 与正常 CHRM2 基因 (Genbank NT007680) 的 nt588-nt866 的序列比较, 发现对照质粒的插入序列与正常基因的完全一致, 而阳性质粒的插入序列有两种类型的突变, 其中一种是 DCM 家族的 4 个 DCM 患者 (图 6 的 II: 1、III: 1、III: 3、III: 7) 和 2 个 12 岁以下的未发病的成员 (图 6 的 IV: 1 和 IV: 2), 以及 5 位 DCM 散发病人的 CHRM2 基因中的第 722 位核苷酸的碱基 C 突变为 G, 从而导致第 176 位的半胱氨酸变为色氨酸 (图 5A), 其 nt588-nt866 的序列为 SEQ ID NO:4; 另一种类型是在其他 DCM 散发病人的 CHRM2 基因中, 第 663 位核苷酸的碱基 C 突变为 T, 从而导致第 156 位脯氨酸变为丝氨酸 (图 5B), 以及第 624 位核苷酸的碱基 A 突变为 G, 导致第 144 位的异亮氨酸变为缬氨酸 (图 5C), 其 nt588-nt866 的序列为 SEQ ID NO:5。DCM 家族的未发病成员和对照组成员的 CHRM2 基因未发生突变。

实施例三 CHRM2 基因突变的 DCM 病人抗 CHRM2 自身抗对豚鼠心肌细胞 L 型 Ca^{2+} 电流峰强度和密度的影响

1. 抗 CHRM2 自身抗体阳性血清的制备

选择 9 例 CHRM2 基因突变的 DMC 病人和 9 例健康的供血者, 按照实施例一所述的 ELISA 方法筛选抗 CHRM2 自身抗体阳性血清, 其结果为所有病人的血清均为阳性, 健康供血者的血清为阴性。采集的阳性血清 (稀释度 1: 160) 作为研究对象保存在 -70°C 下备用。

2. 细胞的分离

(1) 选用健康成年豚鼠, 雌雄不拘, 体重 250~320g, 断头处死。

(2) 在室温 $20-25^{\circ}\text{C}$ 下, 迅速开胸取出心脏放入冰冷的无钙台氏液中, 心脏跳动几次排除心腔内血液, 转入无钙台氏液, 去除心包膜。

(3) 分辨主动脉, 将心脏安置于 Langedorff 灌流架上, 由主动脉逆行灌流心脏[灌流压为 $70\text{cmH}_2\text{O}$ ($1\text{cmH}_2\text{O}=0.098\text{kPa}$), 温度 37°C], 所有溶液通以 $95\%\text{O}_2+5\%\text{CO}_2$, 灌流滴速为 $7\text{ml}/\text{min}$, 循环液 37°C , 并确定灌流入心脏的管中无气泡。

(4) 无钙液灌流心脏 5 分钟, 心脏逐渐停止跳动。

(5) 改用含 $0.1\text{mg}/\text{mL}$ 蛋白酶 E, $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 去脂肪酸的牛血清白蛋白的低钙液灌液心脏 5 分钟。至心脏变得柔软, 松弛为止。

(6) 将心脏从灌流装置系统上取下, 剪去心房, 心室肌切为小块, 置于上述含酶溶液中, 37°C 条件下温孵、搅拌约 5 分钟。

(7) 吸取少量细胞悬液在显微镜下观察细胞的多少及形状, 细胞纹理, 可搅拌三次, 用滤膜过滤, 取细胞悬液。

(8) 将细胞悬液用含 $\text{Ca}^{2+}1.8\text{mM}$ 的无钙液台氏液稀释 5 倍, 静置 1 小时以备使用。

3. 电生理测定

用全细胞膜片钳技术(刘泰熹, 心肌电生理学, 北京大学出版社, 1988)测定了豚鼠心肌细胞在以下不同条件下的 L 型 Ca^{2+} 电流峰强度和密度:

(1) 不加任何试剂(对照)如图 7 中的 A1、C1、和 D1;

(2) 加入抗 CHRM2 自身抗体阴性血清, 如图 7 的 A2;

(3) 加入 β_1 -肾上腺素的激动剂异丙肾上腺素, 如图 7 中的 B1、C2 和 D2;

(4) 加入 β_1 -肾上腺素的激动剂异丙肾上腺素和抗 CHRM2 自身抗体阴性血清, 如图 7 的 B2;

(5) 加入 CHRM2 的激动剂碳酰胆碱, 如图 7 的 C3;

(6) 加入抗 CHRM2 自身抗体阳性血清, 如图 7 中的 D3;

(7) 加入碳酰胆碱后再加入 CHRM2 的阻滞剂阿托品; 如图 7 的 C4;

(8) 加入自身抗体阳性血清后再加入阿托品, 如图 7 的 D4。

4. 结果

电生理学测定结果如图 7 和表 2 所示。

表 2 在不同条件下豚鼠心肌细胞 L 型 Ca^{2+} 电流峰强度和密度

图 号	测定条件	L 型 Ca^{2+} 电流峰强度 pA	L 型 Ca^{2+} 电流峰密度 pA/pF
图 7A-1	对照	1466.62 ± 205.95	12.73 ± 1.11
图 7A-2	抗 CHRM2 自身抗体阴性血清	1466.62 ± 205.95	12.73 ± 1.11
图 7B-1	1.6 μM 异丙肾上腺素	2111.65 ± 203.15	18.83 ± 1.14
图 7B-2	1.6 μM 异丙肾上腺素+ 抗 CHRM2 自身抗体阴性血清	2111.65 ± 203.15	18.83 ± 1.14
图 7C-1	对照	1466.62 ± 205.95	12.73 ± 1.11
图 7C-2	1.6 μM 异丙肾上腺素	2111.65 ± 203.15	18.83 ± 1.14
图 7C-3	10 μM 碳酰胆碱	1230.87 ± 208.14	10.72 ± 1.06
图 7C-4	10 μM 碳酰胆碱+14 μM 阿托品	1843.27 ± 225.98	15.40 ± 1.01
图 7D-1	对照	1466.62 ± 205.95	12.73 ± 1.11
图 7D-2	1.6 μM 异丙肾上腺素	2111.65 ± 203.15	18.83 ± 1.14
图 7D-3	抗 CHRM2 自身抗体阳性血清	636.42 ± 110.07	5.54 ± 0.81
图 7D-4	抗 CHRM2 自身抗体阳性血清+阿托品	1251.37 ± 183.26	10.86 ± 1.04

参照图 7 和表 2, 加入自身抗体阴性血清 (图 7, A2) 对细胞 L 型 Ca^{2+} 电流 (图 7, A1) 无影响; 加入 β -肾上腺素受体的激动剂异丙肾上腺素, 再加入自身抗体阴性血清后 (图 7, B2) 对异丙肾上腺素的刺激作用产生的电流增大 (图 7, B1) 无影响; 加入异丙肾上腺素 (图 7, C2、图 7, D2), 细胞 L 型 Ca^{2+} 电流的峰强度和密度比对照 (图 7, C1、图 7, D1) 明显增加; 加入 CHRM2 的激动剂碳酰胆碱 (图 7, C3), 细胞 L 型 Ca^{2+} 电流峰强度和密度比对照 (图 7, C1) 降低; 加入自身抗体阳性血清 (图 7, D3), 细胞 L 型 Ca^{2+} 电流峰强度和密度明显降低; 其作用类似于 CHRM2 的激动剂碳酰胆碱; 加入激动剂碳酰胆碱后再加入 CHRM2 的阻滞剂阿托品 (图 7, C4), 和加入自身抗体阳性血清后再加入阿托品 (图 7, D4), 阻断了激动剂碳酰胆碱和自身抗体阳性血清对细胞 L 型 Ca^{2+} 电流的转移。由以上数据可证明, 循环的抗 CHRM2 自身抗体通过降低基础的收缩力, 参与 DCM 病人的病理生理改变, 其作用与 CHRM2 的激动剂碳酰胆碱类似。

本发明为进一步研究 DCM 的病因奠定了必要的基础。本发明的 CHRM2 突变基因可以作为探针制成试剂盒、或制作基因芯片, 用于体外检测生物样品中 CHRM2 突变基因的存在, 尤其是通过对 DCM 家族成员样本的体外检测, 可以为制定新的诊断、预防、治疗 DCM 的方案, 筛选和开发新的药物提供依据。

<110> 首都医科大学附属北京朝阳医院/北京诺赛基因组研究中心有限公司

<120> 扩张性心肌病病人 M2-乙酰胆碱能受体突变基因及其检测方法

<130> PatentIn 3.1

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val Arg Thr Val Glu Asp Gly Cys Tyr Ile Gln Phe Phe Ser Asn Ala

1

5

10

15

Ala Val Thr Phe Gly Thr Ala Ile Cys

20

25

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

agtcaagcgg accacaaaaa tggc

24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

agtcaagcgg accacaaaaa tggc

24

<210> 4
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 tcatcagctt tgacaggtac ttctgtgtca caaaacctct gacctacca gtcaagcgga 60
 ccacaaaaat ggcaggtatg atgattgcag ctgcctgggt cctctctttc atcctctggg 120
 ctccagccat tctcttctgg cagttcattg taggggtgag aactgtggag gatggggagt 180
 ggtacattca gttttttcc aatgctgctg tcacctttgg tacggctatt gcagccttct 240
 atttgccagt gatcatcatg actgtgctat attggcacat atcccagacc agcaagagca 300
 ggataaagaa ggacaagaag gagcctgttg ccaaccaaga ccccgtttct ccaagtctgg 360

<210> 5
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 tcatcagctt tgacaggtac ttctgtgtca caaaacctct gacctacca gtcaagcgga 60
 ccacaaaaat ggcaggtatg atgggtgcag ctgcctgggt cctctctttc atcctctggg 120
 cttcagccat tctcttctgg cagttcattg taggggtgag aactgtggag gatggggagt 180
 gctacattca gttttttcc aatgctgctg tcacctttgg tacggctatt gcagccttct 240
 atttgccagt gatcatcatg actgtgctat attggcacat atcccagacc agcaagagca 300
 ggataaagaa ggacaagaag gagcctgttg ccaaccaaga ccccgtttct ccaagtctgg 360

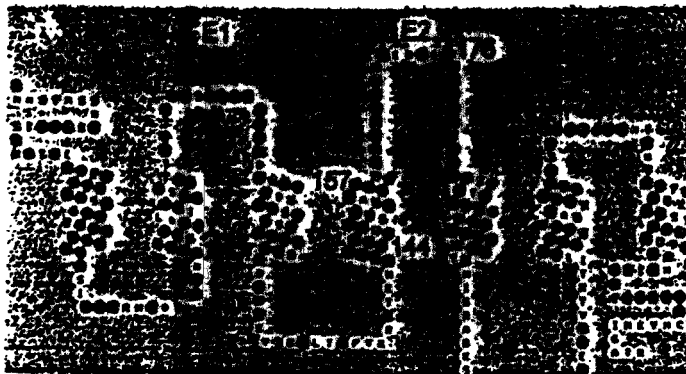


图 1

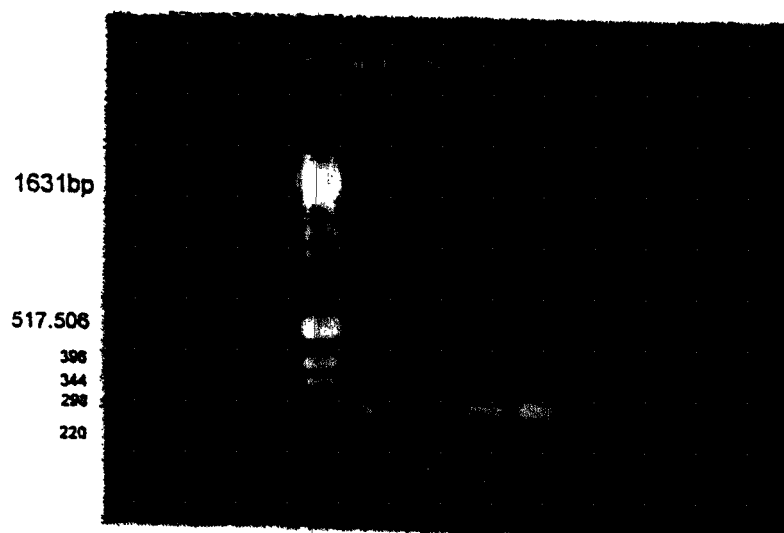


图 2



图 3

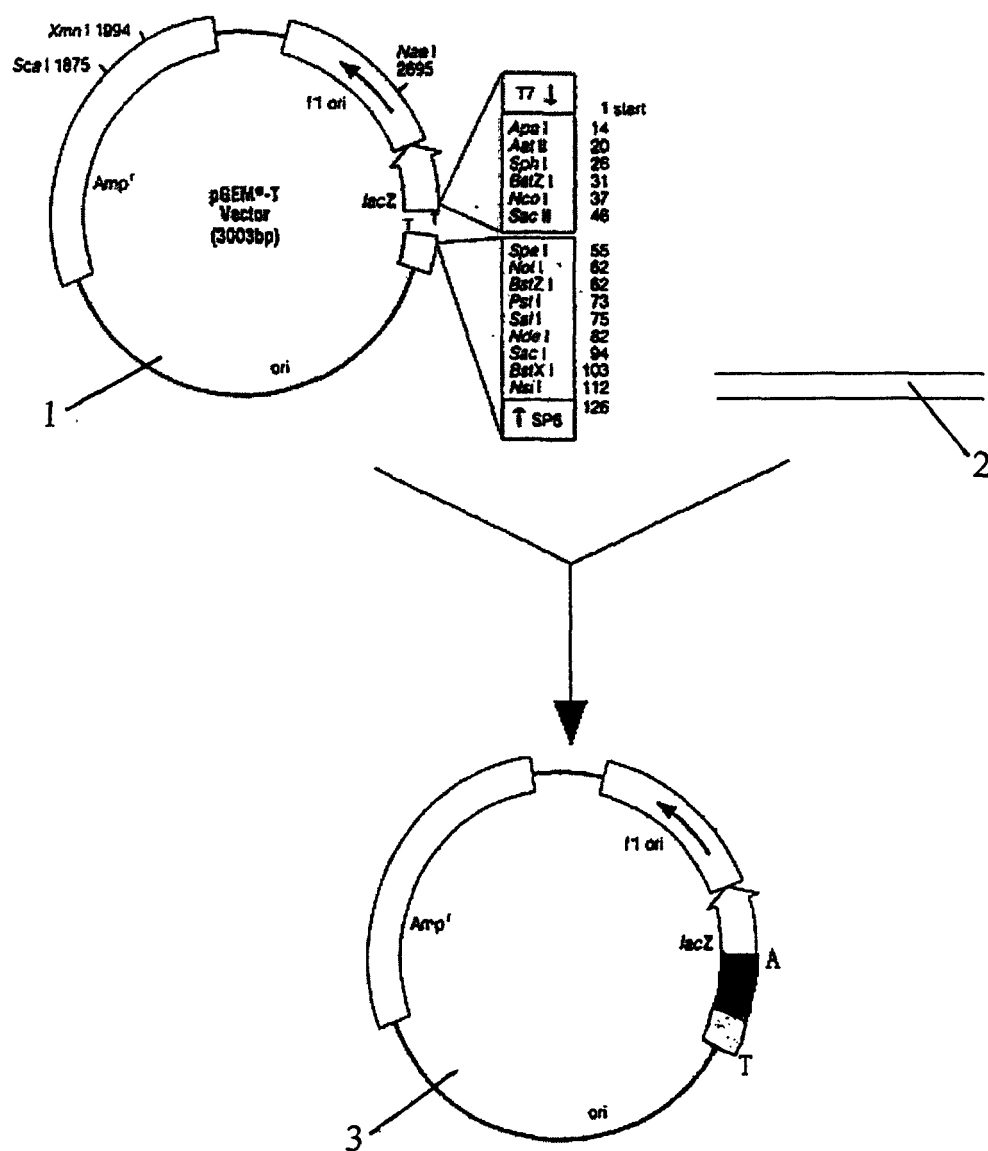


图 4

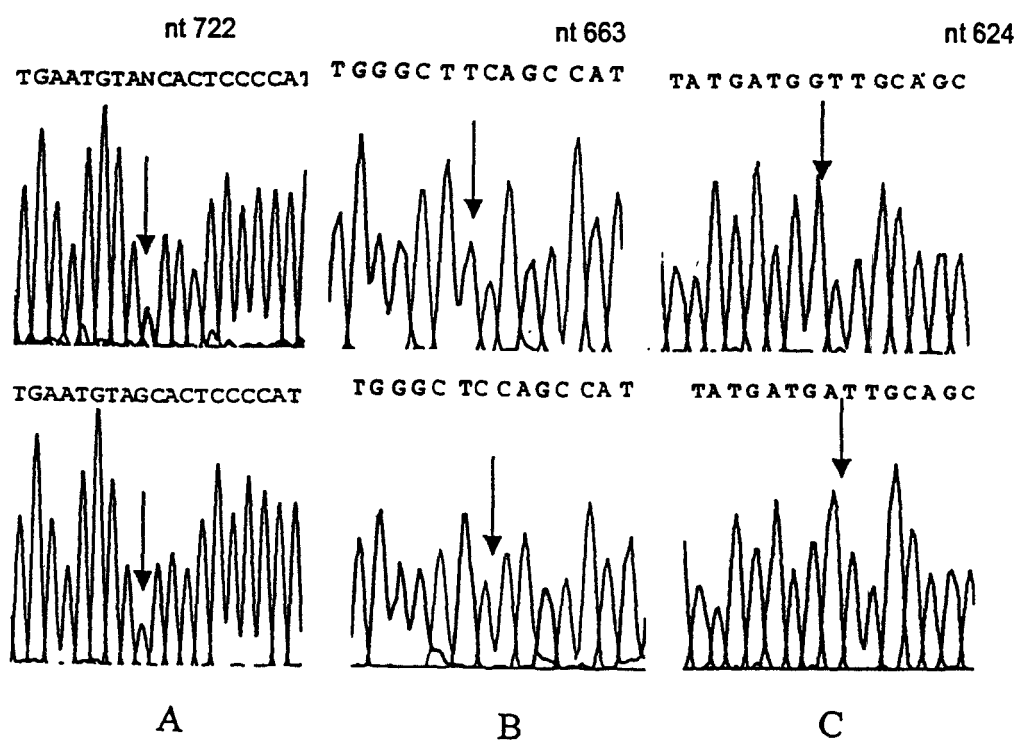


图 5

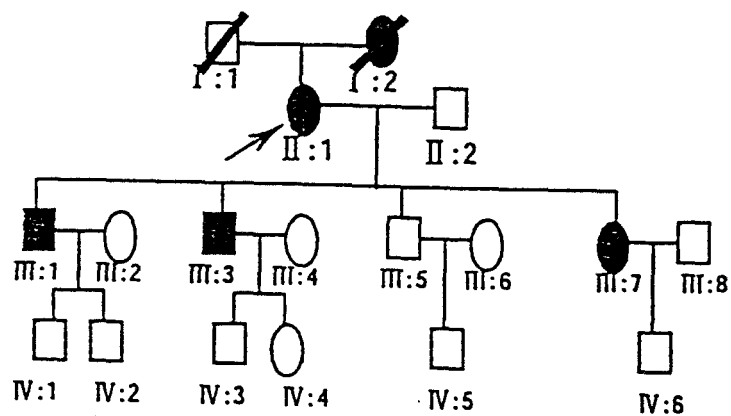


图 6

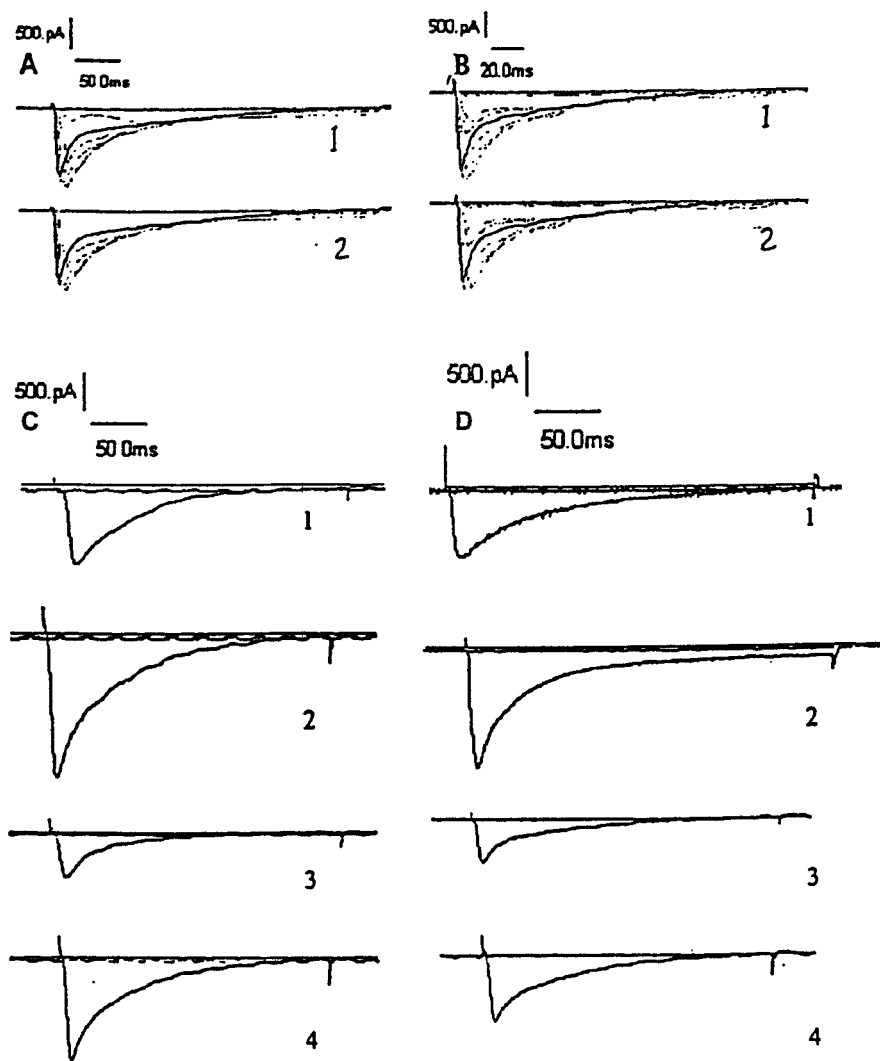


图 7

专利名称(译)	扩张性心肌病人M2 - 乙酰胆碱能受体突变基因及其检测方法		
公开(公告)号	CN1614017A	公开(公告)日	2005-05-11
申请号	CN200310103531.5	申请日	2003-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	首都医科大学附属北京朝阳医院 北京诺赛基因组研究中心有限公司		
申请(专利权)人(译)	首都医科大学附属北京朝阳医院 北京诺赛基因组研究中心有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	首都医科大学附属北京朝阳医院 北京诺赛基因组研究中心有限公司		
[标]发明人	张麟 沈岩		
发明人	张麟 沈岩		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/11 C12P19/34 C12Q1/68 G01N33/53		
代理人(译)	何文彬		
其他公开文献	CN100383245C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及扩张性心肌病人M2乙酰胆碱能受体突变基因及其检测方法，突变位点及其检测方法详见说明书。本发明将CHRM2基因的突变与抗CHRM2自身抗体、DCM联系起来，进一步说明了三者之间的关系，为进一步研究DCM的病因奠定了必要的基础。该突变基因可以作为探针制成试剂盒、或制作基因芯片，用于体外检测生物样品中CHRM2突变基因的存在，为制定新的诊断、预防、治疗DCM的方案，筛选和开发新的药物提供依据。

