



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112695081 B

(45) 授权公告日 2022.08.26

(21) 申请号 202011603589.6

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.30

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112695081 A

(56) 对比文件

WO 2007095032 A2, 2007.08.23

US 2019078093 A1, 2019.03.14

WO 2018129887 A1, 2018.07.19

NCBI Reference Sequence: NG_029510.2.Homo sapiens protein tyrosine kinase 2 beta (PTK2B), RefSeqGene on chromosome 8.《NCBI》.2020,

高琪等.原发性胆汁性胆管炎易感基因多态性的研究现状.《分子诊断与治疗杂志》.2020,第12卷(第1期),118-122.

(43) 申请公布日 2021.04.23

(73) 专利权人 中国医学科学院北京协和医院
地址 100730 北京市东城区王府井帅府园1号

审查员 张丽玮

(72) 发明人 张奉春 张学 边赛男 陈志磊
陈华 费允云 王立 刘素英
贺成美 杨岩磊 彭琳一 杨云娇
杨华夏

(74) 专利代理机构 北京智为时代知识产权代理
事务所(普通合伙) 11498
专利代理师 王加岭 杨静

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表6页 附图5页

(54) 发明名称

原发性胆汁性胆管炎新的易感基因及其应
用

(57) 摘要

本发明提供一种原发性胆汁性胆管炎的新突变SNP位点,其特征在于,所述新突变SNP位点为人PTK2B基因外显子24,NM_173174.2,c.1679C→G,p.560,Pro (P)→Arg (R)。本发明发现一个原发性胆汁性胆管炎患者新的易感基因,为疾病诊断新增了一个新的标志物,由于该病早期常无明显症状,且现有抗体检测敏感性有限,在部分患者中仍呈阴性,待患者血清学指标(碱性磷酸酶、γ-谷氨酰转肽酶、胆红素)有明显升高时往往已进入疾病中晚期,对药物反应不佳,严重影响预后,因此新的标志物有助于实现疾病早期诊断,以早期治疗,从而改善患者预后。

1. 一种用于鉴定原发性胆汁性胆管炎的新突变SNP位点的引物对,其特征在于,所述新突变SNP位点为人PTK2B基因外显子24,NM_173174.2,c.1679C→G,p.560,Pro (P) →Arg (R),所述引物对的核苷酸序列如SEQ ID No. 2-3所示。

2. 一种用于鉴定原发性胆汁性胆管炎的新突变SNP位点的试剂盒,其特征在于,含有权利要求1所述的引物对,所述新突变SNP位点为人PTK2B基因外显子24,NM_173174.2,c.1679C→G,p.560,Pro (P) →Arg (R)。

3. 一种用于鉴定原发性胆汁性胆管炎的新突变SNP位点在制备原发性胆汁性胆管炎检测和/或诊断产品中的应用,其特征在于,所述新突变SNP位点为人PTK2B基因外显子24,NM_173174.2,c.1679C→G,p.560,Pro (P) →Arg (R)。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,所述产品为试剂盒,所述试剂盒包括用于扩增权利要求1所述的新突变SNP位点的引物对。

5. 如权利要求4所述的应用,其特征在于,所述引物对的核苷酸序列如SEQ ID No. 2-3所示。

6. 如权利要求4或5所述的应用,其特征在于,所述试剂盒还包括dNTPs、Taq酶、Mg²⁺和/或PCR反应缓冲液。

7. 一种原发性胆汁性胆管炎的动物模型的构建方法,其包括如下步骤:

1) 设计PTK2b基因19号外显子靶向的sgRNA识别序列,构建sgRNA,其中,sgRNA的序列如SEQ ID No.4-5所示;

2) 设计构建有PTK2B-P560R片段的供体质粒;其中,中靶载体序列如SEQ ID No.6所示

3) 将Cas9 mRNA,sgRNA和供体共注射到小鼠受精卵,受精卵在交配后0.5天被移植到ICR雌性小鼠的输卵管中,移植后的19-21天F0代小鼠出生;

4) 将携带有PTK2B基因点突变的F0代小鼠和C57BL/6J回交以得到杂合突变小鼠;

5) 将携带有PTK2B基因点突变的F1代雌雄小鼠进行繁育,得到携带基因突变的后代小鼠。

原发性胆汁性胆管炎新的易感基因及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,具体涉及一种原发性胆汁性胆管炎新的易感基因及其应用。

背景技术

[0002] 原发性胆汁性胆管炎(Primary biliary cholangitis,PBC),又称原发性胆汁性肝硬化(Primary biliary cirrhosis,PBC),是好发于中年女性的一种慢性自身免疫性疾病,患病率在世界不同地区为20-40/10万,中国患病率数据有限,中国南方为49.2/10万。

[0003] PBC是主要以肝内小胆管的慢性非化脓性炎症为特征的自身免疫病,临床主要为胆汁淤积和肝功能减退的表现如黄疸、瘙痒、乏力等,血清学有碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase,ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase,GGT)升高,多有抗线粒体抗体(Anti-mitochondrial antibody,AMA)阳性。病理表现为肝内小胆管非化脓性肉芽肿性慢性炎症。

[0004] 该病目前病因不明,较公认的观点是遗传因素及环境因素共同作用所致。有研究发现,PBC患者一级亲属PBC发生率高于正常人群约100倍,姐妹患病的相对风险为10左右,同卵双胞胎中同病一致率为63%,且发病年龄相似,而在异卵双生胎中没有共同发病。以上,均提示遗传因素在PBC中起重要作用。近年来随着第二代DNA测序技术(Next generation sequencing,NGS)的发展,加速和改变了对遗传性疾病的研究模式,提高了疾病研究效率。在不同种族的PBC人群中筛查到了不同的易感基因位点,如欧洲PBC患者中的易感基因为IL12A,IL12RB2,CD80,STAT4,CXCR5等,日本PBC患者中的易感基因为TNFSF15和POU2AF1,而在中国汉族PBC人群中,通过对14个SNPs检测显示存在易感基因TNFSF15和CD80,但并未发现POU2AF1和IL12A等易感基因,提示中国汉族PBC患者与欧洲、日本人群存在某些共同的易感基因,但同时又有自己不同的遗传易感性特征。

[0005] 全外显子测序(Whole exome sequencing,WES)技术是以人类基因组中蛋白质编码序列为目的序列的第二代测序技术,外显子组(Exome)仅占不到人类整个基因组的1%,但在已知的人类单基因遗传病中,位于外显子区域的致病突变基因占绝大多数,该技术快速、高效、性价比高,被Science杂志评为2010年十大科学突破之一。散发PBC人群的NGS结果均显示PBC存在遗传易感性,而针对PBC的家族聚集现象,目前国际上尚无通过全外显子测序筛查中国汉族PBC家系易感基因的研究,因此,拟针对PBC患者家系进行全外显子测序,以筛查易感基因,更好的阐释该病的遗传学特征。

[0006] 现有研究认为原发性胆汁性胆管炎是一种由于遗传因素和环境因素共同作用导致的疾病,而该病的一级亲属发病率远远高于普通人群,提示遗传因素在发病中起着重要作用。在现有的全基因组关联分析研究中,报道了原发性胆汁性胆管炎散发患者的相关易感基因,但目前尚没有关于中国汉族人群原发性胆汁性胆管炎患者家系易感基因的报道,且前期全基因组关联分析研究报道的相关易感基因后续暂未有关于基因功能进一步的动物实验。此外,目前该病尚没有非常好的动物模型。

发明内容

[0007] 为解决上述问题,本发明提供一种原发性胆汁性胆管炎的新突变SNP位点。

[0008] 本发明提供了一种原发性胆汁性胆管炎的新突变SNP位点为人PTK2B基因外显子24,NM_173174.2,c.1679C→G,p.560,Pro (P) →Arg (R)。

[0009] 本发明还提供一种用于鉴定所述的原发性胆汁性胆管炎的新突变SNP位点的引物对,引物序列如下:

[0010] 引物-F:ACAGTGTAGGCAACAGCACAGAAG (SEQ ID No.2)

[0011] 引物-R:CGTGAAGCGTCGGAAGTTAATGGA (SEQ ID No.3)

[0012] 本发明还提供一种用于鉴定所述的原发性胆汁性胆管炎的新突变SNP位点的试剂盒,其含有所述的引物对。任选地,所述试剂盒还可包括dNTPs、Taq酶、Mg²⁺和/或PCR反应缓冲液。

[0013] 本发明还提供所述的新突变SNP位点在制备原发性胆汁性胆管炎检测、诊断、治疗和/或预后产品中的应用。

[0014] 其中,所述产品为试剂盒,所述试剂盒包括用于扩增基因PTK2B外显子24新突变SNP位点的引物对。

[0015] 其中,所述引物对的核苷酸序列如SEQ ID No.2-3所示。任选地,所述试剂盒还可包括dNTPs、Taq酶、Mg²⁺和/或PCR反应缓冲液。

[0016] PCR反应体系 (25μl):

LA Taq Premix	12.5μl
Primer-F	0.75μl
[0017] Primer-R	0.75μl
DNA	1μl
ddH ₂ O	10μl

[0018] PCR循环反应条件:98℃变性2分钟;98℃10秒,60℃30秒,72℃30秒,共35个循环;72℃延伸7分钟。

[0019] 对于疑诊原发性胆汁性胆管炎的患者,但抗线粒体抗体 (AMA)、抗sp100、抗gp210等抗体检测呈阴性无法明确诊断,可通过抽取外周血2-4ml进行该基因突变位点检测,若检测到C→G点突变,则为疾病诊断更进一步增加了证据。检测的引物和PCR反应体系和程序如前所述。

[0020] 本发明还提供一种原发性胆汁性胆管炎的动物模型的构建方法,其包括如下步骤:

[0021] 1) 设计PTK2b基因19号外显子靶向的sgRNA识别序列,构建sgRNA;

[0022] 2) 设计构建有PTK2B-P560R片段的供体质粒;

[0023] 3) 将Cas9 mRNA,sgRNA和供体共注射到小鼠受精卵,受精卵在交配后0.5天被移植到ICR雌性小鼠的输卵管中,移植后的19-21天F0代小鼠出生;

[0024] 4) 将携带有PTK2B基因点突变的F0代小鼠和C57BL/6J回交以得到杂合突变小鼠;

[0025] 5) 将携带有PTK2B基因点突变的F1代雌雄小鼠进行繁育,得到携带基因突变的后

代小鼠。

[0026] 其中,sgRNA的序列如SEQ ID No.4-5所示。

[0027] 本发明发现一个原发性胆汁性胆管炎患者新的易感基因,为疾病诊断新增了一个新的标志物,由于该病早期常无明显症状,待患者血清学指标(碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰转肽酶、胆红素)有明显升高时往往已进入疾病中晚期,严重影响预后,因此新的标志物有助于实现疾病早期诊断,以早期治疗,从而改善患者预后。

[0028] 本发明成功建立了携带基因突变的小鼠繁育体系,携带基因突变的小鼠出现了原发性胆汁性胆管炎疾病的表型,更加证实了突变基因在发病机制中的作用。并且利用该基因构建的小鼠解决了现有关于原发性胆汁性胆管炎动物模型不够理想的现状,从而为后续疾病研究提供了有效的动物模型,解决了由于患者肝脏穿刺为有创操作、存在风险而不易获取患者肝脏组织标本的困难,有利于更好的开展疾病深入研究。

附图说明

[0029] 图1为本发明专利在家系中发现的新基因示意图;图中,A,原发性胆汁性胆管炎患者家系图;B,家系内发现的原发性胆汁性胆管炎患者存在的突变位点;C,与突变位点对应的正常序列图。

[0030] 图2所示为含有PTK2B-P560R片段的供体质粒示意图。

[0031] 图3所示为电泳图。B6为阴性对照,是B6基因组DNA;N为空白对照,无模板的对照;DL2000条带:2000bp,1000bp,750bp,500bp,250bp,100bp;P:阳性质粒对照;Trans2K条带:8000bp,5000bp,3000bp,2000bp,1000bp,750bp,500bp,250bp,100bp。A,利用ZMK2F4及3004Ptk2b-KITR1引物进行PCR产物的电泳图,提示29、37、38、39号F1代小鼠携带突变;B,利用3004ptk2b-wtTF及3004ptk2b-wtTR引物进行PCR产物的电泳图,提示29、37、38、39号F1代小鼠为杂合突变;C及D,29、37、38、39号F1代小鼠分别利用3004ptk2b-5InF1、3004ptk2b-5InR1引物及ZMK2F4、3004ptk2b-3InR2引物进行PCR的产物的电泳图,以进行后续测序;E,利用ZMK2F4及3004Ptk2b-KITR1引物进行PCR产物的电泳图,提示40、41、43号F1代小鼠携带突变;F,利用3004ptk2b-wtTF及3004ptk2b-wtTR引物进行PCR产物的电泳图,提示40、41、43号F1代小鼠为杂合突变;G,40、41、43号F1代小鼠分别利用3004ptk2b-5InF1、3004ptk2b-5InR1引物及ZMK2F4、3004ptk2b-3InR2引物进行PCR的产物的电泳图,以进行后续测序。

[0032] 图4所示为小鼠基因型Sanger测序结果。

[0033] 图5为将该基因敲入小鼠后小鼠表型示意图。图中,A,携带基因突变的雌性10月龄小鼠肝脏病理;B,携带基因突变的雌性8月龄小鼠肝脏病理;C,携带基因突变的雌性3月龄小鼠血清抗线粒体抗体结果。

具体实施方式

[0034] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0035] 实施例1原发性胆汁性胆管炎新的易感基因筛选

[0036] 家系内所有成员采集外周血,提取外周血DNA,家系内3个患者(I-2,I-3,I-4)和1个健康对照者(I-6)基因组DNA进行全外显子测序,包括:

[0037] 1.文库制备:1)基因组片段化:Cavoris仪打断至200bp左右。2)末端补平修复:片

段化DNA在Klenow Fragment, T4 DNA polymerase和T4PNK的作用下进行末端补平修复。3) 3'端腺苷化:在聚合酶体系下,使上一步得到的修复产物在3'末端加上A碱基,为下一步连接做好准备。4) 加接头:配置T4DNA连接酶反应体系,在Thermo mixer中适温反应一定时间使adapter和加“A”产物连接。5) 扩增:连接产物经4-6轮LM-PCR扩增。6) 杂交:文库与探针混于杂交体系中65℃,60-68h杂交。7) 洗涤磁珠和洗脱DNA:使用链霉素磁珠,与杂交样本孵育后洗脱液洗脱。8) 洗脱产物扩增:洗脱产物经10轮LM-PCR扩增。

[0038] 2. Illumina平台测序:1) 测序, Illumina hiseq2500平台标准化上机测序操作流程。2) 测序得到图像原始数据, Illumina官方basecall分析软件BclToFastq得到原始数据(raw data)。3) 数据分析:去接头污染,去低质量的数据;数据与参考序列比对统计(比对软件BWA),参考基因组为hg19基因组;SNP检测及注释:分析软件samtools;Indel检测及注释:分析软件pindel;突变假阳性过滤:根据测序深度,突变质量,对检测得到的SNP, Indel进行过滤筛选,得到高质量可靠的突变;突变注释:SNP和Indel根据在基因上的位置,分析得到氨基酸变化影响,剪切影响,UTR,内含子突变影响等;筛选出的变异对蛋白功能影响的预测:使用SIFT利用基于同源比对,蛋白结构的保守性等算法,预测筛选出的变异对蛋白质的影响;对剪切位点附近的突变,做剪切危害性预测。SOAPaligner (soap2.21)能够对彻底读出的序列输出进行有效对比,比对参照序列为人类参考基因组hg19。

[0039] 基于SOAP的对比结果,再使用SOAPsnp软件进行SNP分析,获得每个样本中外显子组SNP数据及相应SNP的基因分型。SOAPsnp不仅对SNP进行识别,还可以注释和重新校准SNP。比对出的SNP结果进行第一步的过滤,过滤挑选出SNP的标准为:1) 基础质量数值超过20;2) 测序深度在4-200之间;3) 计算获得的SNP拷贝数等于或小于2;4) 相邻SNP的距离不小于5bp。有关SOAPaligner和SOAPsnp的计算参数的可以在以下网址获得(<http://soap.genomics.org.cn/>)。经过一步过滤的SNP数据再过滤除去公共数据中已记录的SNP。过滤的公共数据库包括dbSNP、1000Genome Project和HAPmap。dbSNP、1000Genome Project公共数据中SNP相关数据可以通过NCBI下载(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。SNP对应相应蛋白质功能的影响可通过SIFT软件来预测。在经过SNP分析后,对所研究家系中的样本的全外显子组数据进行indel变异分析。

[0040] 分别得到较为可靠的突变结果(突变深度至少2x,突变率至少10%以上)36022、36604、36265、37737个。筛选出I-2, I-3, I-4共有,而I-6未携带的突变146个。去掉已有rs号(已报告的SNPs)的突变,MAF选择0,千人基因组频率(中国),千人基因组频率(中国南方),千人基因组频率(中国北方)选择0,筛选出突变24个。突变类型去掉非编码区突变(保留错义、剪切位点、缺失移码),筛选出可能与PBC疾病发病相关的候选突变17个。将这17个突变位点通过Sanger测序在家系内非患者成员中进行验证,得到家系内共分离的基因PTK2B外显子24, NM_173174.2, c.1679C→G, p.560, Pro (P) →Arg (R), 错义突变,序列如SEQ ID No.1所示。

[0041] 实施例2

[0042] 将PTK2B的基因突变位点利用Cas9/RNA系统基因定位敲入小鼠,具体制作流程:

[0043] 1. sgRNA设计及构建:设计PTK2b基因19号外显子靶向的sgRNA识别序列,构建sgRNA;

[0044] 表1 sgRNA序列

[0045]	sgRNA名称	sgRNA序列(5' →3')	荧光探针(PAM)
	PTK2B-S1	ctcggggtcatgagctcaa	GGG
	PTK2B-S2	tgctgtccggaacatcctgg	TGG

[0046] 2. 供体设计及构建:设计构建有PTK2B-P560R片段的供体质粒,质粒示意图如图2所示。中靶载体序列如SEQ ID No.6所示,其中2159位的C突变成G。

[0047] 3. 将Cas9 mRNA,sgRNA和供体共注射到受精卵。之后受精卵在交配后0.5天被移植到ICR雌性小鼠的输卵管中,移植后的19-21天F0代小鼠出生。

[0048] 4. F0代小鼠鉴定及繁育:通过取鼠尾DNA进行PCR和测序验证携带有PTK2B基因点突变的小鼠;将阳性F0代小鼠和C57BL/6J回交以得到杂合突变小鼠;

[0049] 表2 PCR引物信息

引物名称	引物序列	条带大小	引物说明
ZMK2F4 3004Ptk2b-KITR1	GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG TGGGAAGCCCTCACCTTGT	KI=754bp WT=0bp	初筛引物
3004ptk2b-5InF1 3004ptk2b-5InR1	GGTGGTGGAACACTTGCCTG CTCAGACAATGCGATGCGGGA	KI=1097bp Wt=0bp	5'端巢式 第二轮
ZMK2F4 3004ptk2b-3InR2	GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG GAAAGGCTGCTTCCCAAAGC	KI=1820bp Wt=0bp	3'端巢式 第二轮
3004ptk2b-wtTF 3004ptk2b-wtTR	CTCCACCCTAGTTCTCTGGTG CCATGGCTCTGCACAGAATC	KI=220bp Wt=197b	鉴定基因型

[0051] 表3测序引物信息

序列产物	引物名称	引物序列	测序位置
5'端	3004ptk2b-5InF1 3004ptk2b-5InR1	GGTGGTGGAACACTTGCCTG CTCAGACAATGCGATGCGGGA	5'端同源臂 Exon18
3'端	3004ptk2b-seqF1 3004ptk2b-3InR1	GGTCCAGGTCAGCAGATACTC GGAGGGACCAGCTTGCTCTC	点突变及 exon19-20
			3'端同源臂

[0054] 表3 F0代小鼠基因型检测

编号	性别	基因型	代数
1	雄	+	F0
2	雄	+	F0
4	雌	+	F0
10	雄	+	F0
13	雄	+	F0
14	雌	+	F0

[0056] 5. F1代小鼠鉴定:通过PCR和测序验证阳性小鼠。将F1代雌雄小鼠进行繁育,得到携带基因突变的后代小鼠。

[0057] 表4 F1代小鼠基因型检测

[0058]

编号	性别	基因型	代数
29	雌	杂合突变	F1
37	雄	杂合突变	F1
38	雄	杂合突变	F1
39	雌	杂合突变	F1
40	雄	杂合突变	F1
41	雄	杂合突变	F1
43	雌	杂合突变	F1

[0059] 通过对肝脏病理及血清学进行观察检测,发现携带基因突变的小鼠肝脏病理符合原发性胆汁性胆管炎的病理表现(图5A),主要包括门脉炎症、胆管破坏、肝小叶炎症、肉芽肿形成等(图5B),血清学有抗线粒体抗体阳性(图5C),出现了该病的表型。

[0060] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 中国医学科学院北京协和医院	
[0003]	<120> 原发性胆汁性胆管炎新的易感基因及其应用	
[0004]	<160> 18	
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 3912	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> Homo sapiens	
[0010]	<400> 1	
[0011]	atgtctgggg tgtccgagcc cctgagtcga gtaaagtgg gcacgttacg ccggcctgaa	60
[0012]	ggccctgcag agcccatggt ggtggtacca gtagatgtgg aaaaggagga cgtgcgtatc	120
[0013]	ctcaaggtct gcttctatag caacagcttc aatcctggga aaaacttcaa actggtcaaa	180
[0014]	tgcactgtcc agacggagat ccgggagatc atcacctcca tcctgctgag cgggcgatc	240
[0015]	gggccaaca tccggttggc tgagtgtat gggctgagg tgaagcat gaagtccgat	300
[0016]	gagatccact ggctgcaccc acagatgacg gtgggtgagg tgcaggaaa gtatgagtgt	360
[0017]	ctgcacgtgg aagccgagtg gaggtatgac cttcaaatcc gctacttgcc agaagacttc	420
[0018]	atggagagcc tgaaggagga caggaccag ctgctctatt ttaccaaca gctccggaac	480
[0019]	gactacatgc agcgtacgc cagcaaggtc agcgaggca tggccctgca gctgggctgc	540
[0020]	ctggagctca ggcggttctt caaggatatg cccacaatg cacttgaaa gaagtccaac	600
[0021]	ttcagctcc tagaaaagga agtgggctg gacttgttt tccaaagca gatgcaggag	660
[0022]	aacttaaagc ccaaacagtt ccggaagatg atccagcaga cttccagca gtacgcctcg	720
[0023]	ctcaggagg aggagtgcgt catgaagttc ttcaacactc tcgccgctt cgccaacatc	780
[0024]	gaccaggaga cctaccctg tgaactcatt caaggatgga acattactgt ggacctggtc	840
[0025]	attggcccta aaggatccg ccagctgact agtcaggacg caaagccac ctgcctggcc	900
[0026]	gagttcaagc agatcaggtc catcaggtgc ctcccgtgg aggaggcca ggcagtactt	960
[0027]	cagctgggca ttgaaggtgc ccccaggcc ttgtcatca aaacctatc cctagcagag	1020
[0028]	gctgagaaca tggctgacct catagacggc tactgccggc tgcagggtga gcaccaaggc	1080
[0029]	tcttcatca tccatcctag gaaagatggt gagaagcga acagcctgcc ccagatccc	1140
[0030]	atgctaaacc tggaggccc gcggtcccac ctctcagaga gctgcagcat agagtcagac	1200
[0031]	atctacgag agattcccga cgaaacctg cgaaggccc gaggtccaca gtatggcatt	1260
[0032]	gcccgtgaag atgtggtcct gaatcgtatt cttggggaag gcttttttg ggaggtctat	1320
[0033]	gaaggtgtct acacaaatca caaagggag aaaatcaatg tagctgtcaa gacctgcaag	1380
[0034]	aaagactgca ctctggaaa caaggagaag ttcatgagcg aggcagtgat catgaagaac	1440
[0035]	ctgaccacc cgcacatcgt gaagctgac ggcatcattg aagaggagcc cacctggatc	1500
[0036]	atcatggaat tgtatcccta tggggagctg ggccactacc tggagcggaa caagaactcc	1560
[0037]	ctgaaggtgc tcaccctcgt gctgtactca ctgcagatat gcaaagccat ggcctacctg	1620
[0038]	gagagcatca actgcgtgca caggacatt gctgtccgga acatcctggt ggcctcccgt	1680
[0039]	gagtggtgca agctggggga ctttggctt tcccggtaca ttgaggacga ggactattac	1740
[0040]	aaagcctctg tgactcgtct cccatcaaa tggatgtccc cagagtccat taacttccga	1800
[0041]	cgcttcacga cagccagtga cgtctggatg ttcgccgtgt gcatgtggga gatcctgagc	1860

[0042]	tttgggaagc agcccttctt ctggctggag aacaaggatg tcatcggggt gctggagaaa	1920
[0043]	ggagaccggc tgcccaagcc tgatctctgt ccaccgtcc ttataacct catgaccgc	1980
[0044]	tgctgggact acgacccag tgaccggccc cgcttcaccg agctggtgtg cagcctcagt	2040
[0045]	gacgtttatc agatggagaa ggacattgcc atggagcaag agaggaatgc tcgctaccga	2100
[0046]	acccccaaaa tcttggagcc cacagccttc caggaacccc cacccaagcc cagccgacct	2160
[0047]	aagtacagac cccctccgca aaccaacctc ctggctccaa agctgcagtt ccaggttcct	2220
[0048]	gagggtctgt gtgccagctc tectacgctc accagcccta tggagtatcc atctcccgtt	2280
[0049]	aactcactgc acaccccacc tctccaccgg cacaatgtct tcaaacgcca cagcatgcgg	2340
[0050]	gaggaggact tcatccaacc cagcagccga gaagaggccc agcagctgtg ggaggctgaa	2400
[0051]	aaggtcaaaa tgcggcaaat cctggacaaa cagcagaagc agatggtgga ggactaccag	2460
[0052]	tgctcaggc aggaggagaa gtccctggac cccatggttt atatgaatga taagtcccca	2520
[0053]	ttgacccag agaaggaggt cggctacctg gaggttcacag ggccccaca gaagccccg	2580
[0054]	aggctggcg cacagtccat ccagcccaca gtaacctgg accggactga tgacctggtg	2640
[0055]	tacctcaatg tcatggagct ggtgcgggcc gtgctggagc tcaagaatga gctctgtcag	2700
[0056]	ctgcccccg agggctacgt ggtggtggtg aagaatgtgg ggctgacct gcggaagctc	2760
[0057]	atcgggagcg tggatgatc cctgccttc ttgccgtcat cttcacggac agagatcgag	2820
[0058]	ggcaccaga aactgctcaa caaagacctg gcagagctca tcaacaagat gcggctggca	2880
[0059]	cagcagaacg ccgtgacctc cctaagttag gaggcaaga ggacagatgct gacggcttca	2940
[0060]	cacacctgg ctgtggacgc caagaacctg ctcgacgtg tggaccaggc caaggttctg	3000
[0061]	gccaatctgg cccaccacc tgcagagtga cggagggtgg gggccacctg cctgcgtctt	3060
[0062]	ccgccctgc ctgccatgta cctcccctgc cttgctgttg gtcatgtggg tcttcaggg	3120
[0063]	ggaaggcaa ggggagtcac cttccctgc cactttgac gacgccctc cccaccct	3180
[0064]	accctggct gtactgctca ggctgcagct ggacagagg gactctgggc tatggacaca	3240
[0065]	gggtgacggt gacaaagatg gctcagagg ggactgctgc tgccctggcca ctgctcccta	3300
[0066]	agccagcctg gtccatgcag ggggctcctg ggggtgggga ggtgtccat ggtgccccta	3360
[0067]	gctttatata tggacatggc aggccgattt gggaaccaag ctattcctt ccttctct	3420
[0068]	tcggccctca gatgtccctt gatgcacaga gaagctggg aggagcttg ttttgggggt	3480
[0069]	caggcagcca gtgagatgag ggatggcct ggcattctg tacagtgtat attgaaattt	3540
[0070]	atthaatgtg agtttgtct ggactgacag catgtgccct cctgaggag gacctggg	3600
[0071]	acagtccagg aacaagctaa ttgggagtc aggcacagga tgctgtgttg tcaacaacc	3660
[0072]	aagcatcagg gggaagaagc agagagatgc ggccaagata ggacctggg ccaaatccgc	3720
[0073]	tctctctcgc cccctcttc tcttcttcc tttacttcc cttgctttc cctctttct	3780
[0074]	tactctcct cttctctcc ccaacccca ttctcatctg caccctctt ttctcatgtg	3840
[0075]	ttgcataaa cattcttta acttcttct atttgactg tggttgaatt aaaattgtcc	3900
[0076]	catttgcttt gc	3912
[0077]	<210>	2
[0078]	<211>	24
[0079]	<212>	DNA
[0080]	<213>	Homo sapiens
[0081]	<400>	2
[0082]	acagtgtagg caacagcaca gaag	24
[0083]	<210>	3

[0084] <211> 24
[0085] <212> DNA
[0086] <213> Homo sapiens
[0087] <400> 3
[0088] cgtgaagcgt cggaagttaa tgga 24
[0089] <210> 4
[0090] <211> 20
[0091] <212> DNA
[0092] <213> Mus musculus
[0093] <400> 4
[0094] ctcggggctc atgagctcaa 20
[0095] <210> 5
[0096] <211> 20
[0097] <212> DNA
[0098] <213> Mus musculus
[0099] <400> 5
[0100] tgctgtccgg aacatcctgg 20
[0101] <210> 6
[0102] <211> 3700
[0103] <212> DNA
[0104] <213> Mus musculus
[0105] <400> 6
[0106] cagtcaggag ccacattggt tgcctaggct ggtaatcaag tctgagatgg ttgtgctgag 60
[0107] actgaaggga agacaccttc ttctgaaaag cattgtggtc cctgaacaca cacttctatt 120
[0108] gcagaaaggg gaaaaatta atgtggccgt caagacctgt aagaaagact gtaccagga 180
[0109] caacaaggag aagttcatga gtgaggcagg taggcatccc ctggggagag gccctgaga 240
[0110] tgctccagcc cccggaatgg gagctgggag gctgggaagg aagtccgagc agcaacggga 300
[0111] cccaccccc cactcttgat tgcaaaaggt ctcttgtccc atgttccaca gctggggcag 360
[0112] gaaactgtgt ttctctttat gtgtctagga ggggaggetg tgttggtggt ggaacacttg 420
[0113] cctggcatgc ataagtcct gtttgcctc cagcactggg gagagaaaag ccaagtgttt 480
[0114] tctgtatgac ctttaacctg cttcatctcc ctgcacctcc ttcagtgatc atgaagaatc 540
[0115] ttgaccaccc tcacatcgtg aagctgattg gcatcattga agaggaaccc acctggatta 600
[0116] tcatggaact gtatccttat ggggaggtaa gctcaggggc cttgataagg gacttcatgt 660
[0117] gacaaccggg ctgcggtgga gcaaggcatg ggaggcattt acagcaaagg gtttttctta 720
[0118] ttaagtgtct ttctttaac tattaggtgg aggaattgcc gaaacatatt accatctttg 780
[0119] aattgcccc tcaaggaat tgaagggtca gtggctatca gtagcctggt gccttggtgc 840
[0120] catgctggga cagaaagtca ttctgggtgc ctatctcttc ctgcagctgg gacactacct 900
[0121] ggaacgaaat aaaaactccc tgaaggatcc cactctggtc ctgtacaccc tacagatatg 960
[0122] caaagccatg gcctatctgg agagcatcaa ctgtgtgcac aggtaggagg ggtgtgagac 1020
[0123] ttaacctgg ttcccagag ggagacagt catagaattt aagagtgata tggctcctaag 1080
[0124] ccaggcccc agcccgtct gtgcctggca actgagagtg ctgggtactc cagactcaga 1140
[0125] tagtetccat gaaacatttc ctaccggga aacttgaaag gtccaaggat actgagagga 1200

[0126] agtccaaagt ctgaggtctc actgtagctc tgtgccttct gctgcatcct ggcaagtgct 1260
 [0127] gggggcgggg gctgcctctt ggctcagagc tccagctcct ccactttgct ctctgcatga 1320
 [0128] cacacagtct aggaagaagg aagtgggcta gagaagtgtc tggagcttcc tagggctctt 1380
 [0129] tggctctccac cctagttctc tgggtttcct gaaccacctt ctactttaac tatagctaca 1440
 [0130] cgggtggctc ttccctgctc tccactggct ttgtttctcat tcccgcacgc cattgtctga 1500
 [0131] gtaggtgttg agctcatgag ccccgaggag actacactgg gatgctcacc ccaccacaga 1560
 [0132] catggcctgt gtggctttga gcctgattct gtgcagagcc atggaggaat tacaacaac 1620
 [0133] tactccccgc atccccact tcatccatca acttccttgg aaataccttc tcaatccage 1680
 [0134] ctgtgtccta gaacaaagtc acgaccaaca gaaacaagaa tcctttccct ttggaatcac 1740
 [0135] attctagtgt gagggtcaaa tgggggttcc acacggcctg gggctagggg gatgtgctca 1800
 [0136] caggtttcct ttatgtatct gaagctgtgt gttttaagaa tcatcctttt agtagcagaa 1860
 [0137] actgcaggaa gtggcatggc ctgtgagaag caggagggcc ctttggggtt ggtgtgccc 1920
 [0138] tatgaatgca gccggtccag gtcagcagat actcctcaag gagagctaga tacctatgtg 1980
 [0139] ttttagaact tatactacc tgggtggcact ctcttctgt cagaaacctc ttggtatgtt 2040
 [0140] cttcaggcc gatgcctggc tctctcagcg tgtaccaggg tcctgaggca gtgcctcata 2100
 [0141] ttagccctcg attcctcttt cagggatatt gctgtccgga acatcctcgt cgcctctcgt 2160
 [0142] gagtgtgtga agctggggga ctttgggctc tcccgtaca ttgaggacga agactattac 2220
 [0143] aaaggtgagg gcttcccagt ggccagtatg gtttatagaa ctcaaaattc cagagcaagg 2280
 [0144] aagttgggtt caggcagcct cggccagtgg tctctgaaga gtaggaatac aattctagat 2340
 [0145] cttacatccc taataatcc cttaaacctc tttgtcaaag cctctgtgac ccgtctacc 2400
 [0146] atcaaatgga tgtccccga gtccatcaac ttccgccgt tcacaaccgc cagtgatgtc 2460
 [0147] tggatgtttg gtgagtggcg attagaatcg ggtggcctg ggaaagtgtc gatttctatg 2520
 [0148] tctgtggcct gagcaggagg gcagaagaga gaacaagggt cttacgtgtg ccctcaggt 2580
 [0149] cccagtgtca ctgagaagtc ccaaaggctc agagagtcag agcagccatg acatgggcaa 2640
 [0150] gggcccgtt gggataaact gggctcactc cctcgtaaag actcttgtca aaagcttggg 2700
 [0151] ctacatcagc catccccagg gactgtgtgg gaaaggctc atggagacct taaagaaagc 2760
 [0152] tggccagctt cttttgatga ggaggctcaa gaagagagag aagccagctg atgtgatgga 2820
 [0153] catttccgcc tgcagctatg tctgggaac aacatcactg ctccccctga gcattctcca 2880
 [0154] cttgagggaa tgaaggetca gaggagccag gaccttgcc aaggacacag gcaacaagt 2940
 [0155] tcagtactag tattagaact ctttaaccct tgaagaagag gttttgtgtc ctacctgcc 3000
 [0156] atgaggaagt tctgatcata cagataatag cctcctctgg atccccagca tcttagtagc 3060
 [0157] tctacagga gggttctaag gagcagattg tagttcatgt actatagta taggctgtag 3120
 [0158] ttgtcttggc ctggaccatt gtgatgggca ggacctcaag ggagattgtg cctcctccag 3180
 [0159] ttgggacca ccagtggcca cagttatcgc tagggagagc aagctggctc ctccccctgag 3240
 [0160] tcttccctct ctgctctcag ctgtatgcat gtgggagatc ctacagcttg ggaagcagcc 3300
 [0161] tttctcttgg ctgaaaata aggatgtcat cggagtgtc gagaaagggg acaggctgcc 3360
 [0162] caagcccga ctctgtccgc ctgtccttta cacactcatg actcgtctg gggactacga 3420
 [0163] ccccagtgac cggccccgt tcacggagct tgtgtgcagc ctcaggtgag cataaggtgg 3480
 [0164] ggaactctaa gtagaggatg acgctgcaga tgctgtgggg gtctccagcc ctgtgcagt 3540
 [0165] ggtatctttg ttcccctttg tcaggagagt tcgggttaa gttggtgact tgatgcctaa 3600
 [0166] tagtgacagg taaaatggca cttataccag aacttccttc tgatcagcaa gaggaaggtg 3660
 [0167] ccctctcttc cagtagaagc aactgggtg gcagtgttg 3700

[0168] <210> 7
[0169] <211> 23
[0170] <212> DNA
[0171] <213> Mus musculus
[0172] <400> 7
[0173] gcatcgatt gtctgagtag gtg 23
[0174] <210> 8
[0175] <211> 20
[0176] <212> DNA
[0177] <213> Mus musculus
[0178] <400> 8
[0179] tgggaagccc tcaccttgt 20
[0180] <210> 9
[0181] <211> 20
[0182] <212> DNA
[0183] <213> Mus musculus
[0184] <400> 9
[0185] ggtggtgaa cactgcctg 20
[0186] <210> 10
[0187] <211> 21
[0188] <212> DNA
[0189] <213> Mus musculus
[0190] <400> 10
[0191] ctcagacaat gcgatgcggg a 21
[0192] <210> 11
[0193] <211> 23
[0194] <212> DNA
[0195] <213> Mus musculus
[0196] <400> 11
[0197] gcatcgatt gtctgagtag gtg 23
[0198] <210> 12
[0199] <211> 20
[0200] <212> DNA
[0201] <213> Mus musculus
[0202] <400> 12
[0203] gaaagctgc ttccaaagc 20
[0204] <210> 13
[0205] <211> 21
[0206] <212> DNA
[0207] <213> Mus musculus
[0208] <400> 13
[0209] ctccacccta gttctctggt g 21

[0210] <210> 14
[0211] <211> 20
[0212] <212> DNA
[0213] <213> Mus musculus
[0214] <400> 14
[0215] ccatggctct gcacagaatc 20
[0216] <210> 15
[0217] <211> 20
[0218] <212> DNA
[0219] <213> Mus musculus
[0220] <400> 15
[0221] ggtggtggaa cacttgctg 20
[0222] <210> 16
[0223] <211> 21
[0224] <212> DNA
[0225] <213> Mus musculus
[0226] <400> 16
[0227] ctgagacaat gcgatgcggg a 21
[0228] <210> 17
[0229] <211> 21
[0230] <212> DNA
[0231] <213> Mus musculus
[0232] <400> 17
[0233] ggtccaggtc agcagatact c 21
[0234] <210> 18
[0235] <211> 20
[0236] <212> DNA
[0237] <213> Mus musculus
[0238] <400> 18
[0239] ggaggacca gcttgctctc 20

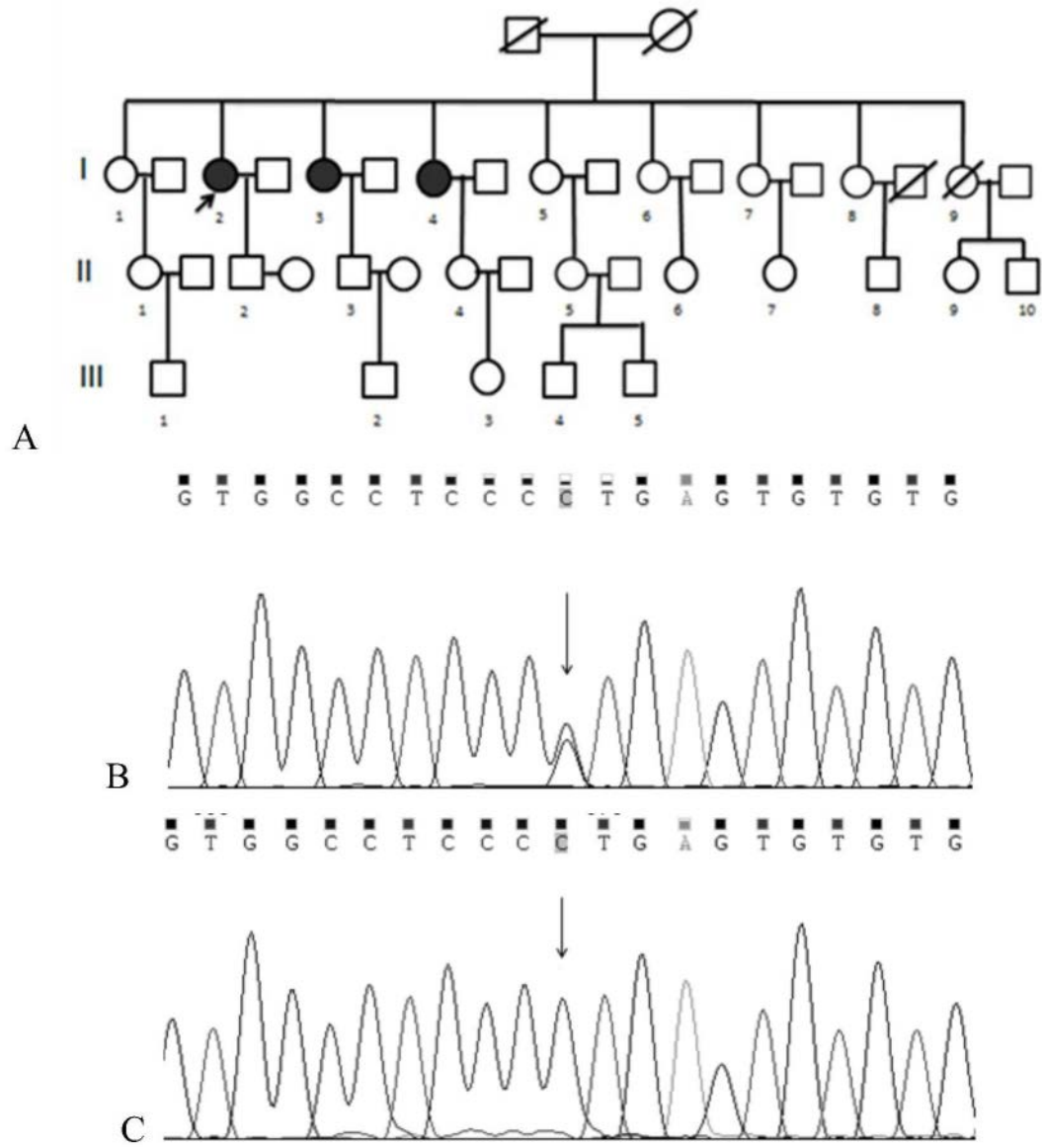


图1

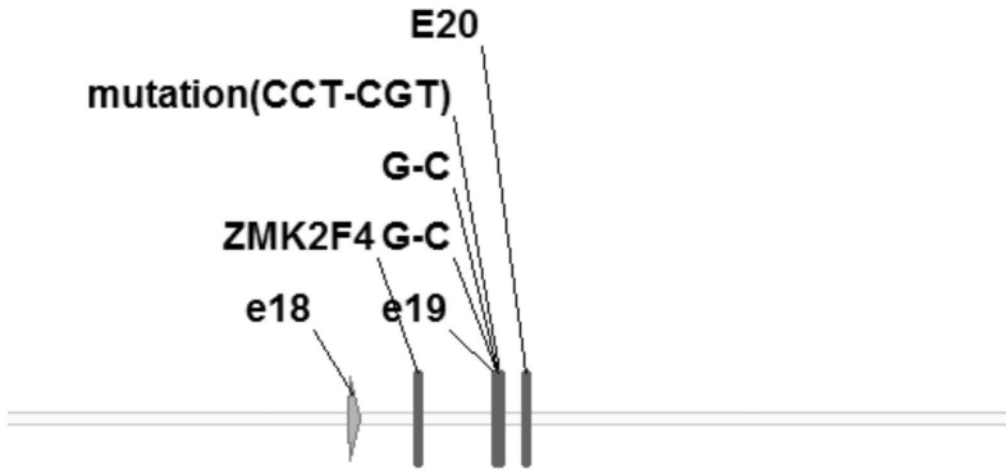
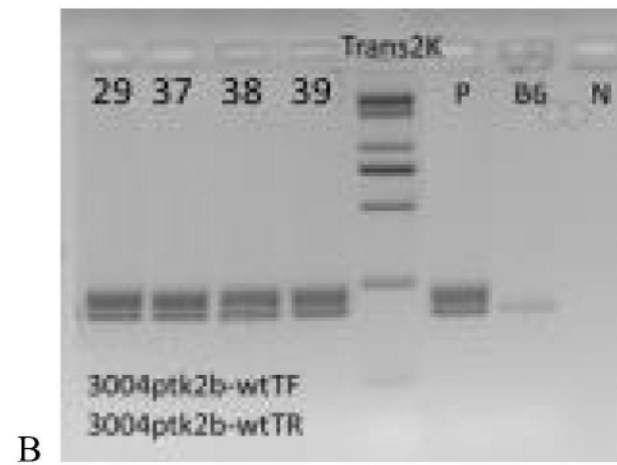
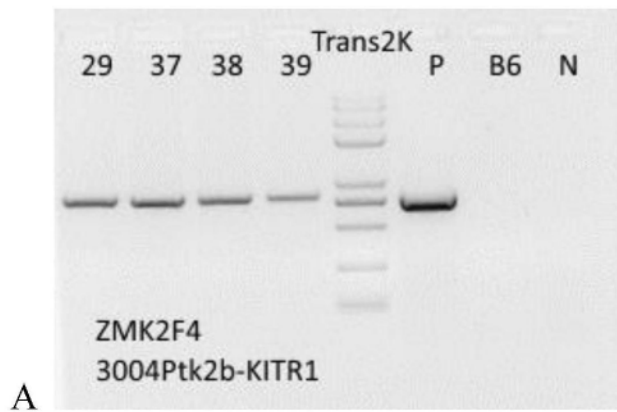
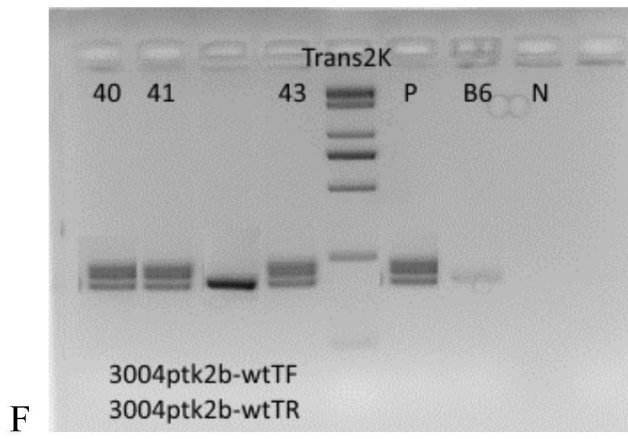
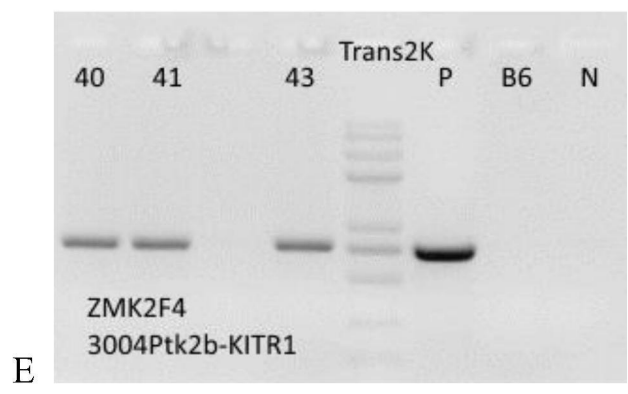
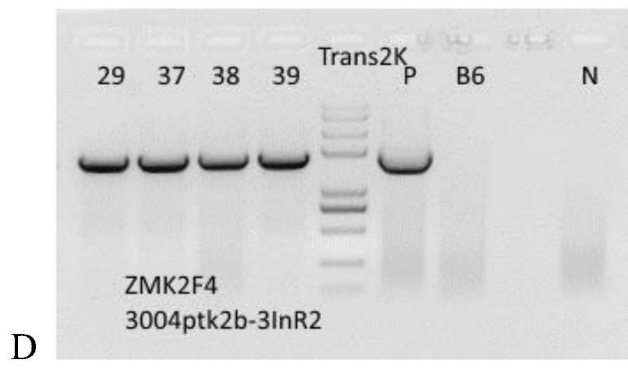
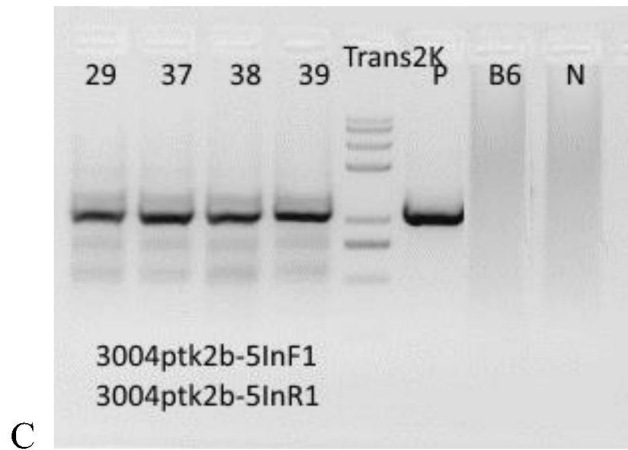


图2





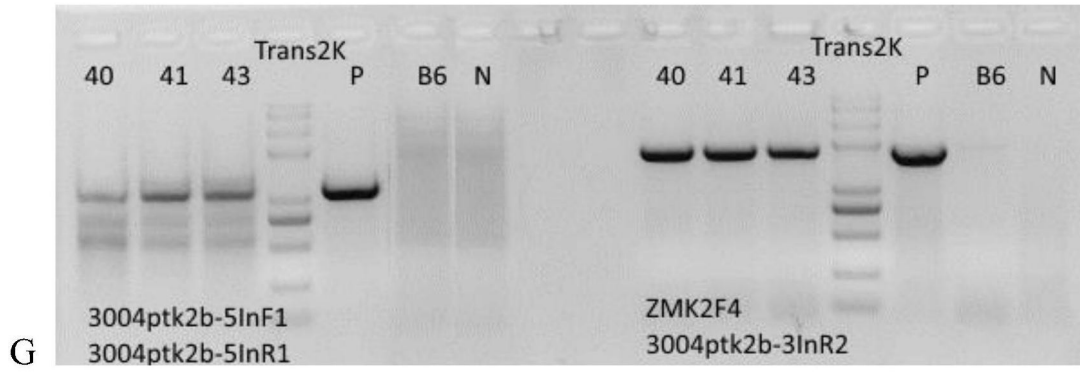


图3

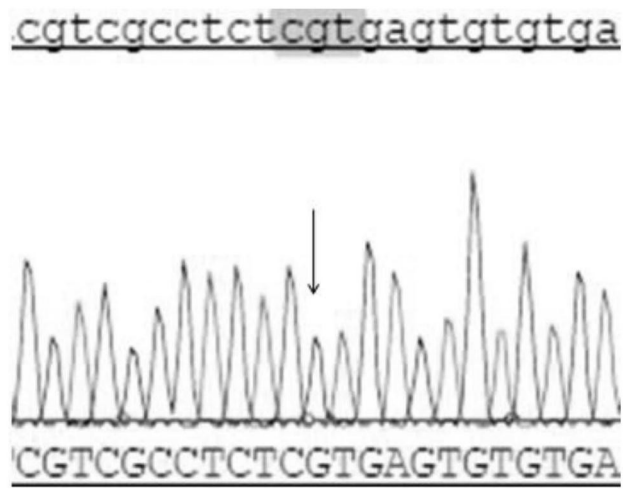


图4

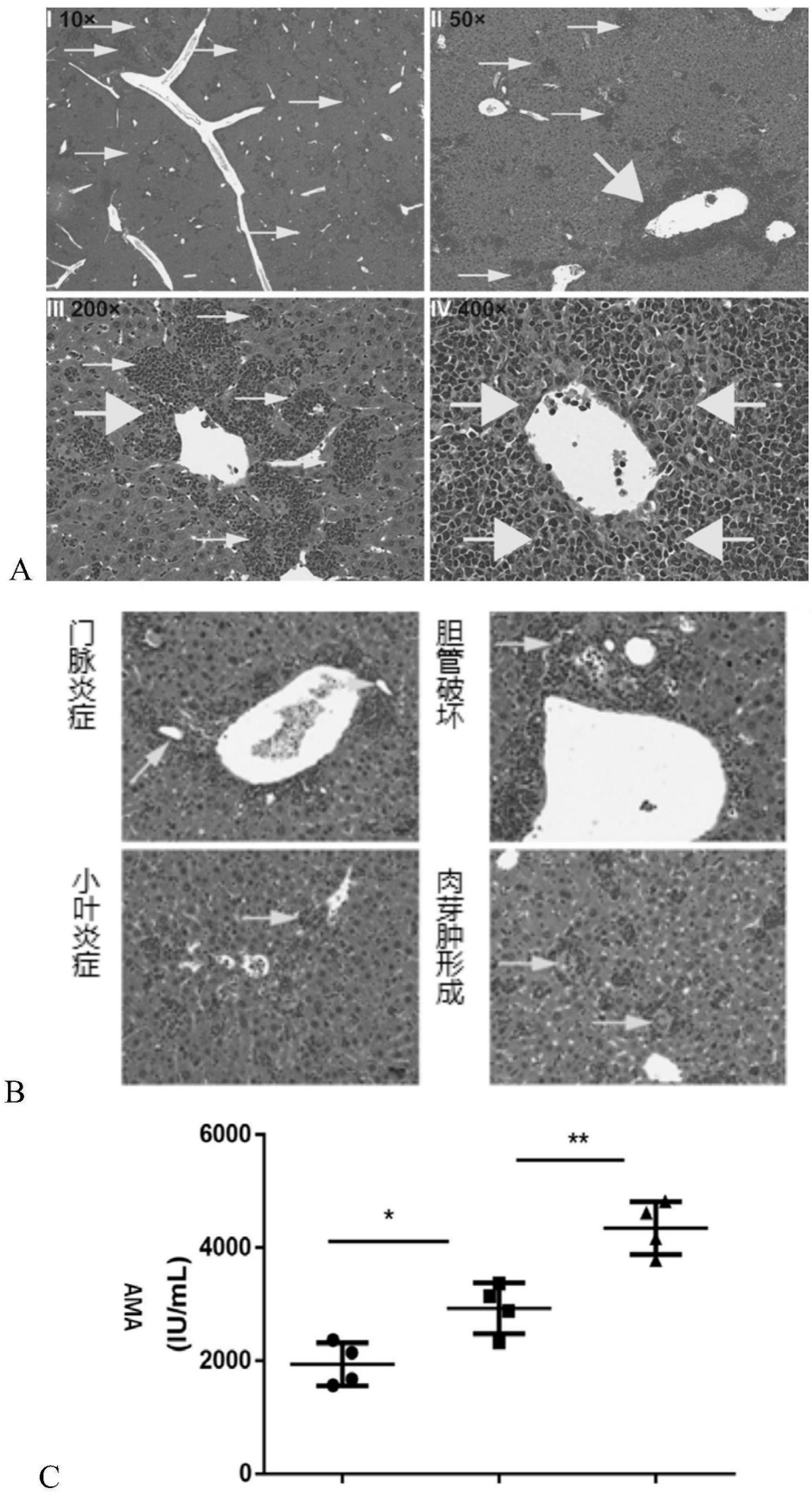


图5