

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510080578.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 10 日

[11] 公开号 CN 1891822A

[22] 申请日 2005.7.5

[21] 申请号 200510080578.3

[71] 申请人 北京诺赛基因组研究中心有限公司

地址 100176 北京市经济技术开发区永昌北路 3 号 707

共同申请人 中国医学科学院阜外心血管病医院
中国科学院生物物理研究所

[72] 发明人 顾东风 李 彪 陈恕凤 陈润生
张鹏华

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司
代理人 黄 健

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 2 页

[54] 发明名称

具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因及其检测方法
和用途

[57] 摘要

本发明涉及一种内含子中具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因及其检测方法。本发明还涉及检测原发性高血压相关基因的方法。本发明还涉及体外检测待测样品中是否存在本发明的原发性高血压相关基因的易感位点的方法及体外预测待测个体原发性高血压相对危险性的方法。本发明最后涉及检测内含子中具有单核苷酸多态性的 TH 基因的试剂盒。

1、一种内含子中具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因，该基因与在 NCBI Gene 数据库中登记号为 7054 的 TH 基因相比，rs2070762 多态性位点的等位基因为 C。

2、如权利要求 1 所述的内含子中具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因，该基因为原发性高血压易感基因。

3、一种检测如权利要求 1 所述的内含子中具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因的方法，该方法为聚合酶链式反应与限制性片段长度多态性分析相结合。

4、一种体外筛查原发性高血压相关基因的方法，该方法包括：

(1) 针对潜在的功能性单核苷酸多态性位点，进行原发性高血压患者和对照组之间的关联研究；

(2) 确定统计学上具有显著差异的单核苷酸多态性位点。

5、如权利要求 4 所述的体外筛查原发性高血压相关基因的方法，所述原发性高血压相关基因为 rs2070762 位点具有单核苷酸多态性的 TH 基因。

6、一种体外检测待测样品中是否存在原发性高血压相关基因的易感位点的方法，该方法包括：

1) 提取待测样品的 DNA，针对 TH 基因 rs2070762 多态性位点设计引物进行 PCR 扩增；

2) 对所述的 PCR 产物进行分析；

3) 鉴定 TH 基因 rs2070762 多态性位点是否为 C。

7、如权利要求 6 所述的体外检测待测样品中是否存在原发性高血压相关基因的易感位点的方法，其中步骤(2)中对所述的 PCR 产物进行分析的方法为聚合酶链式反应与限制性片段长度多态性分析相结合。

8、一种体外预测待测个体原发性高血压危险性的方法,该方法包括体外检测来自待测个体的样品中 TH 基因 rs2070762 位点的多态性,其中 rs2070762 位点 C 等位基因携带者患原发性高血压危险性比非携带者显著增加。

9、如权利要求 8 所述的体外预测待测个体原发性高血压危险性的方法,其中检测来自待测个体的样品中 TH 基因 rs2070762 位点的多态性的方法为聚合酶链式反应与限制性片段长度多态性分析相结合。

10、一种体外检测内含子中具有单核苷酸多态性的 TH 基因的试剂盒,该试剂盒包含:

- 1) 扩增 rs2070762 多态性位点的引物;
- 2) PCR 扩增酶及相应缓冲液;
- 3) 检测 rs2070762 位点多态性的试剂。

具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因及其检测方法和用途

技术领域

本发明涉及一种具有特定单核苷酸多态性的基因及其检测方法和用途，特别涉及一种具有特定单核苷酸多态性的酪氨酸羟化酶 (TH) 基因及其检测方法和用途。

背景技术

高血压病是一种危害人类健康的常见多发病，其引起的冠心病和脑卒现已成为人类因病致死的首要病因。目前迫切需要能够预防、诊断或治疗原发性高血压的有效方法和药物。虽然人类为高血压的研究投入了大量的人力和物力，但迄今为止关于高血压的发病机理尚未完全阐明，也没有有效的预防、诊断及治疗方法。既往的流行病学和临床研究表明高血压病具有明显的家族聚集倾向，说明高血压病与遗传因素密切相关。从分子生物学观点来看，一些基因结构异常和/或表达异常是高血压病的根本原因，其中基因突变、基因移位和基因调控异常起着相当大的作用。现人们认为肾素基因异常、血管紧张素、血管紧张素转换酶基因和原癌基因可能与高血压形成有关。

酪氨酸羟化酶，英文：tyrosine hydroxylase，缩写：TH，别名缩写：TYH，蛋白产物：见表 1。

表 1、酪氨酸羟化酶基因蛋白产物的 4 种异构体

中文	英文
酪氨酸羟化酶 1 型异构体	tyrosine hydroxylase isoform 1
酪氨酸羟化酶 2 型异构体	tyrosine hydroxylase isoform 2
酪氨酸羟化酶 3 型异构体	tyrosine hydroxylase isoform 3
酪氨酸羟化酶 4 型异构体	tyrosine hydroxylase isoform 4

已知酪氨酸羟化酶基因定位在人类染色体 11p15.5, 在人类基因组上只有 1 个拷贝, 包含 14 个主要的外显子, 长度大约为 8K 碱基对(请参见图 1 所示)。在基因表达中它的第一个内含子内发生的 RNA 可变剪接产生了至少 3 种不同的 mRNA, 这些不同的 mRNA 的差异在于 12 个碱基对和 18 个碱基对的插入或缺失。在神经系统的不同部分酪氨酸羟化酶的基因表达存在差异。

酪氨酸羟化酶催化苯丙氨酸 (phenylalanine) 转变为多巴胺 (dopamine), 是儿茶酚胺 (catecholamines) 生物合成步骤中的限速酶, 在肾上腺素激导性神经的生理过程中起着关键作用。酪氨酸羟化酶与神经系统疾病, 例如精神分裂症、情感性精神障碍和尼古丁依赖症的关系已有了广泛的研究。目前针对高血压与酪氨酸羟化酶关联关系的研究并不多, 有限的几个实验均只涉及了酪氨酸羟化酶基因第一个内含子内 TCAT 重复序列和位于第 2 个外显子里的 Val81Met 多态性位点, 但是酪氨酸羟化酶基因其余多态性位点与原发性高血压间的关系, 以及这些多态性位点的检测方法、试剂盒在国内外均没有专利或报道。

发明内容

针对上述问题, 本发明的一个目的是提供一种内含子中具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因。

本发明的一个目的是提供一种检测本发明的内含子中具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因的方法。

本发明的一个目的是提供一种体外筛查原发性高血压相关基因的方法。

本发明的一个目的是提供一种体外检测待测样品中是否存在原发性高血压相关基因的易感位点的方法。

本发明的另一目的是提供一种体外预测待测个体原发性高血压危险性

的方法。

本发明的另一目的是提供一种体外检测内含子中具有单核苷酸多态性的 TH 基因的试剂盒。

附图说明

图 1 为人类 TH 基因的结构示意图。图中的数字 1-13 分别代表内含子 1-13。

图 2 为 TH 基因 rs2070762 多态性位点及其侧翼序列。图中加黑的 C/T 为 TH 基因 rs2070762 多态性位点，前后序列分别为其侧翼序列。

图 3 为扩增后，TH 基因 rs2070762 多态性位点的酶切图谱。其中，泳道 1 表示 T/T 基因型；泳道 2 表示 T/C 基因型；泳道 3 表示 C/C 基因型；M 表示 Marker，即标准电泳图谱。

具体实施方式

本发明通过大量的实验研究，提供了一种内含子中具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因 (NCBI Gene 数据库登记号为 7054)，本发明的基因与在 NCBI 中登记号为 7054 的 TH 基因相比，为内含子中具有特定单核苷酸多态性的基因，具体地，rs2070762 多态性位点的等位基因为 C。此多态性位点已被世界权威的生物学数据库 - 美国国立卫生研究院 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 收录，位于酪氨酸羟化酶基因第 13 个内含子内，为 C/T 的多态性，即位于 SEQ ID NO: 1 所示序列的 6701 个核苷酸处；另外，如图 2 所示，图中加黑的 C/T 为 TH 基因 rs2070762 多态性位点，前后分别为其侧翼序列，侧翼序列 (flanking sequence) 分别参见 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3。此多态性位点在人类基因组上能被唯一确定。此外由于该序列位于内含子区域，没有改变氨基酸的编码，因此它无氨基酸的改变编码。

本领域普通技术人员已知，所谓“基因多态性”指的是在人群中，各个体基因的核苷酸序列存在的差异。本领域普通技术人员已知，本发明所述的多态性位点为单核苷酸多态性(SNP)位点，即基因组序列中单个核苷酸发生改变；核苷酸序列的差异可以体现在DNA水平上或者RNA水平上，所以，本发明的TH基因可以体现在DNA水平，RNA水平上，优选DNA水平，更优选基因组DNA。

这里所说的“易感基因”是指决定易于罹患某种(某类)疾病的基因。原发性高血压易感基因的携带者表现为携带易感基因的个体患原发性高血压的危险因素增大。

本发明采用在遗传学研究中具有更大把握度的关联研究，其通过检测遗传标记在正常对照人群与疾病人群之间存在的频率分布差异，识别易感基因的位置。具体地，在本发明的一个实施方式中，单因素分析发现(参见实施例2)，rs2070762多态性位点C等位基因在病例组中的频率显著高于对照组($P = 0.005$)，多态性位点rs2070762位于内含子区，可能参与酪氨酸羟化酶基因在细胞内表达的调节或与可变剪切有潜在的关联，因而在高血压疾病预测预报和针对酪氨酸羟化酶的新药开发中具有很大的应用。

本发明还提供了一种检测本发明的内含子中具有特定单核苷酸多态性的TH基因的方法。本领域技术人员已知，可以用多种技术在DNA水平上体外检测TH基因序列的多态性位点。可以经与用放射性标记的反义RNA或DNA探针与扩增后的DNA序列杂交，以鉴别点多态性。也可以基于已知的核苷酸顺序的改变，合成正常的和具有特定单核苷酸多态性的PCR引物，在聚合酶链式反应(PCR反应)的底物中加入荧光标记的核苷酸，根据反应产物中是否有荧光出现，确定在扩增所用的引物中是否有碱基变化，从而检测特定单核苷酸多态性。通过DNA直接测序可以直接揭示对照基因和携带具有特定单核苷酸多态性基因之间的序列差异。当与PCR结合使用时，这种方法的灵敏性大大提高。各种DNA及DNA片段的核苷酸序列的测定也可用常规方

法如双脱氧链终止法(Sanger等人, PNAS, 1977, 74: 5463-5467)。此外, 核苷酸序列测定也可用商业测序试剂盒或自动测序仪等。常规的自动测序法用放射性标记或荧光标记来确定核酸序列。也可以采用限制性片段多态性分析(RFLP)来体外检测TH基因序列的多态性位点。

限制性片段长度多态性分析方法的原理为: 由于基因具有特定单核苷酸多态性, 导致限制性内切酶酶切位点改变、消失或产生新的位点, 若用某种限制性内切酶酶切基因组DNA, 则酶切后产生与正常基因组不同长度的DNA片段, 检测这DNA片段的大小和数量, 判断是否具有特定单核苷酸多态性。优选该方法与PCR技术结合(PCR-RFLP), 方法是: 在设计PCR扩增实验时, 引物位于基因多态性部位的两侧, 先将目的基因扩增, 使其易于检测, 由于特定单核苷酸多态性引起已有的限制性内切酶位点改变, 则可先用相应的限制性内切酶酶切扩增产物, 再进行琼脂糖凝胶电泳观察, 根据产物片段大小或数量与正常对照作出判断。本发明中优选检测所述TH基因rs2070762多态性位点的多态性的方法为聚合酶链式反应与限制性片段长度多态性分析相结合。

本发明同时也为获得原发性高血压相关基因提供了一个新的思路。目前寻找疾病相关疾病的方法多为寻找结构基因的变化。而本发明从一个侧面说明不仅基因的编码区具有特定多态性可以导致蛋白质水平具有特定多态性, 进而导致患原发性高血压的危险因素增大, 而且在非编码区的特定单核苷酸多态性, 也可以导致患原发性高血压的危险因素增大。在本发明中就是TH基因的内含子中具有特定单核苷酸多态性。

本发明还提供了一种体外筛查原发性高血压相关基因的方法, 该方法包括:

- (1) 针对潜在的功能性单核苷酸多态性位点, 进行原发性高血压患者和对照组之间的关联研究;
- (2) 确定统计学上具有显著差异的单核苷酸多态性位点。

为进一步从遗传学的角度探讨 TH 基因和原发性高血压发病之间的关系，并为国内外已有的同类研究提供遗传流行病学的证据，本实施例运用 PCR-RFLP 的国际通行的基因分型方法，在收集到的大样本原发性高血压病例 (n = 503) 对照 (n = 490) 研究中，体外检测来自待测个体的样品中 rs2070762 位点的多态性，从而分析 rs2070762 位点在原发性高血压患者和正常对照人群的分布差异。经过本发明的大量实验研究，本发明确定具有 rs2070762 多态性的 TH 基因为原发性高血压相关基因；而 TH 基因内含子区 rs2070762 多态性位点为 C 等位基因时的 rs2070762 多态性位点为原发性高血压的易感位点；rs2070762 多态位点为 C 等位基因的 TH 基因为原发性高血压的易感基因。

另一方面，本发明还提供了一种体外检测待测样品中是否存在原发性高血压相关基因的易感位点的方法，该方法包括：

- 1) 提取待测样品的 DNA，针对 TH 基因 rs2070762 多态性位点设计引物进行 PCR 扩增；
- 2) 对所述的 PCR 产物进行分析；
- 3) 鉴定 TH 基因 rs2070762 多态性位点是否为 C。

所述待测样品可以从来自试验者的细胞获得，如来自血液、尿、唾液、胃液、头发，活组织检查和尸体解剖材料的细胞。优选来自血液。

对所述的 PCR 产物进行分析的方法可以采用前述关于检测本发明的内含子中具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因的方法中提到的任何一种方法，例如，包括但不限于，利用放射性标记进行检测，利用荧光标记进行检测，直接测序进行检测，采用限制性片段多态性分析 (RFLP) 进行检测。优选对所述的 PCR 产物进行分析的方法为聚合酶链式反应与限制性片段长度多态性分析相结合。

在一个实施方式中，对所述 PCR 产物进行分析的方法为聚合酶链式反应与限制性片段长度多态性分析相结合 (PCR - RFLP)。将包含目的 SNP 位点

的 PCR 产物用特定的限制性内切酶作酶切，则包含有该 SNP 位点的个体会产生切成两个或三个或切不动三种情况。在本发明中对于 rs2070762 多态性位点，采用 PCR 扩增后，获得了 196 个碱基长的 PCR 产物，对该 196 个碱基长的 PCR 产物选用 PstI 限制性内切酶进行酶切，因为 rs2070762 位点的等位基因为 C 时在产物序列上存在一个 PstI 酶切位点，当切割后会产生 122bp 和 74bp 两种长度的片段，而当 rs2070762 位点的等位基因为 T 时，产物序列上无 PstI 酶切位点，酶切后产物序列长度不变，仍然为 196 碱基。所以，当同时存在 196、122 和 74bp 三种长度的片段时，说明 rs2070762 位点的等位基因型为 C/T 杂合子；当只存在 196bp 片段时，说明 rs2070762 位点等位基因 T；当只存在 122bp 和 74bp 片段时，说明 rs2070762 位点等位基因 C。（具体参见实施例 1）。

另一方面，本发明提供了一种体外预测待测个体原发性高血压危险性的方法，该方法包括体外检测来自待测个体的样品中 rs2070762 多态性位点的多态性，其中 rs2070762 位点 C 等位基因携带者原发性高血压的危险显著增加。优选所述待测个体为中国汉族。本发明通过大样本的统计分析，在排除实验误差的基础上，以确凿的实验证据证明了 rs2070762 多态性位点 C 等位基因在病例中的分布显著高于对照组 ($P=0.005$)，rs2070762 多态性位点与高血压的紧密相关性（参见实施例 2）；此外，rs2070762 多态性位点 C 等位基因携带者患原发性高血压的风险平均为非携带者的 2.66 倍，也就是说，增加了一倍多。（参见实施例 3）。

本领域普通技术人员已知，对所述的 PCR 产物进行分析的方法可以采用前述关于检测本发明的内含子中具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因的方法中提到的任何一种方法，例如，包括但不限于，利用放射性标记进行检测，利用荧光标记进行检测，直接测序进行检测，采用限制性片段多态性分析 (RFLP) 进行检测。优选对所述的 PCR 产物进行分析的方法为聚合酶链式反应与限制性片段长度多态性分析相结合。

在本发明大样本的统计分析的基础上，可以单独使用本发明的方法，即检测来自待测个体的样品中 rs2070762 多态性位点的多态性，以体外预测待测个体患原发性高血压危险性。

另一方面，本发明提供一种体外检测内含子中具有单核苷酸多态性的 TH 基因的试剂盒。所述试剂盒内可以装有一个或多个容器，容器内装有用以检测含有 rs2070762 多态性位点的 TH 基因的一种或多种组分。按照具体检测方法及检测多态性位点的不同，试剂盒可含有不同组分。与之同时提供的可以是经政府药物管理机构审核的、有关药品或生物制品制造、使用及销售的信息。在本发明的一个实施方式中，提供一种体外检测内含子中具有单核苷酸多态性的 TH 基因的试剂盒，该试剂盒包含：

- (1) 扩增 rs2070762 多态性位点的引物；
- (2) PCR 扩增酶及相应缓冲液；
- (3) 检测 rs2070762 多态性位点的试剂。

本领域普通技术人员已知，所述扩增多态性位点的引物，可以依据本发明已知的核苷酸序列设计，通常为 15-30 个碱基，GC 含量为 45%-50%左右，在适当的温度下与模板特异性结合，其可以利用专门的计算机程序设计，例如 (Oligo 6.53 软件)。如本发明实施例 1 所示，提供一种扩增 rs2070762 多态性位点的引物：

引物	序列	序列号
正向	5' CCTTCCTTCTGGCCTTGAGCAG 3'	SEQ ID NO: 4
反向	5' TGTCAGCACCTCCAAGACTGG 3'	SEQ ID NO: 5

本领域普通技术人员已知，PCR 扩增的酶可以为 Tag DNA 聚合酶、Klenow 片段、Tth DNA 聚合酶、VENT DNA 聚合酶等能够用于 PCR 扩增的酶。试剂盒中检测 rs2070762 多态性位点的试剂根据检测方法的不同而不同。例如，采用聚合酶链式反应与限制性片段长度多态性分析相结合方法来检测

rs2070762 多态性位点时,试剂盒中可以含有限制性内切酶和相应的酶切图谱,例如 PstI 限制性内切酶和相应的酶切图谱。

本发明的检测内含子中具有单核苷酸多态性的 TH 基因的试剂盒可以用于体外检测原发性高血压相关基因的多态性。

为了更清楚地理解本发明,现参照下列实施例及附图进一步描述本发明。实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。实施例中未注明具体条件的实验方法为本领域熟知的常规方法和常规条件,例如参见 Sambrook 等人,《分子克隆:实验手册》(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造商所建议的条件。

实施例 1、rs2070762 多态性位点的检测方法

rs2070762 多态性位点可通过 PCR 与限制性片段长度多态性方法结合进行检测。

1. rs2070762 多态扩增片段的获得

使用聚合酶链反应 (PCR) 获得 rs2070762 多态扩增片段 (196 bp), PCR 反应在 ABI 公司的 9700 型 PCR 仪上完成;每板 PCR 加待测样品 DNA 模板(取自被检测的对象,按照常规方法将白细胞内的 DNA 用苯酚-氯仿法或者用盐析法提取出来即可) 对照反应以及不加 DNA 样本的空白对照反应各 2 例。扩增所用引物和扩增条件见表 2 和表 3,其中所用 Taq 酶为宝生物公司出品的 HotStart Taq 酶,适宜于 Touch-down 方法。

表 2、rs2070762 多态性位点检测引物

引物	序列	序列号
正向	5' CCTTCCTTCTGGCCTTGAGCAG 3'	SEQ ID NO: 4
反向	5' TGTCAGCACCTCCAAGACTGG 3'	SEQ ID NO: 5

表 3、rs2070762 多态性位点 PCR 扩增体系和扩增条件

扩增体系		扩增条件
10 μ l	dNTP MIX	0.2 μ l (10 mM)
	引物	各 0.4 μ l (10 μ M)
	HotStartTaq 酶	0.1 μ l (10 u/ μ l)
	PCR 缓冲液	1.0 μ l (10X)
	DNA 模板	1.0 μ l (50 ng/ μ l)
	水补至 10 μ l	(6.9 μ l)
		起始 94 $^{\circ}$ C 2min, 接下来 10 个循环(94 $^{\circ}$ C 15s, 64 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 每个循环退火温度降 0.2 $^{\circ}$ C), 然后是 30 个循环(94 $^{\circ}$ C 15s, 62 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 30s), 最后 72 $^{\circ}$ C 保持 10min

2. 限制性片段长度多态性方法鉴定 rs2070762 多态基因型

成功扩增含有 rs2070762 多态性位点的 DNA 片段后, 首先使用商品 PCR 产物纯化板(例如: Millipore MultiScreenTM PCR, Millipore 公司)按照厂家推荐步骤进行产物纯化。纯化后的产物用 PstI 限制性内切酶(MBI 公司)进行酶切, 从凝胶电泳图谱即可分辨出此位点的基因型。rs2070762 多态酶切反应在 37 度恒温培养箱中进行, 酶切体系和酶切条件见表 4。

表 4、rs2070762 多态酶切体系和酶切条件

酶切体系		酶切条件
11 μ l	PstI 缓冲液	1.1 μ l (10 X)
	PstI	0.2 μ l (10u/ μ l)
	PCR 产物	6 μ l
	水补至 11 μ l	
		37 $^{\circ}$ C 保温 6 个小时

3. 琼脂糖凝胶电泳检查酶切产物

在浓度为 2.5% 的琼脂糖凝胶(称量普通琼脂糖粉 7.5 克, 溶于 300 毫升 0.5X 的 TB 液中, 加热至澄清透明, 室温放置约 2 分钟, 加入 25 微升 EB, 振荡混匀, 室温放置晾干)中电泳酶切产物, 电压 180 伏, 电泳时间为 1 小时。

结果：如图 3 所示，当 rs2070762 多态性位点出现 T 等位基因时，电泳为 196 bp 的条带（泳道 1）；出现 C/T 等位基因时，电泳为 196、122、74 bp 三条带（泳道 2）；出现 C 等位基因时，电泳为 122 bp 和 74 bp 的两条带（泳道 3）。

实施例 2、rs2070762 多态性位点与人类原发性高血压的相关性

1. 病例对照样本临床特征描述，参见表 5。

表 5、病例对照样本临床特征描述

	病例 (n = 503)	对照 (n = 490)	P
性别, 男/女	262/241	257/233	NS
年龄	53.6 ± 9.3	53.5 ± 9.2	NS
收缩压, mm Hg	177.1 ± 28.0	117.5 ± 11.6	< 0.001
舒张压, mm Hg	104.3 ± 12.3	75.0 ± 8.0	< 0.001
BMI, kg/m ²	26.3 ± 3.85	24.30 ± 3.56	< 0.001
总胆固醇, mmol/L	5.22 ± 0.98	5.06 ± 1.05	0.01
高密度脂蛋白胆固醇, mmol/L	1.25 ± 0.30	1.32 ± 0.34	< 0.001
低密度脂蛋白胆固醇, mmol/L	3.19 ± 0.85	3.09 ± 0.87	0.05
甘油三酯, mmol/L	1.70 ± 1.06	1.43 ± 0.86	< 0.001
血糖, mmol/L	5.93 ± 1.79	5.59 ± 1.68	0.003
血肌酐, μmol/L	70.8 ± 15.2	68.9 ± 12.1	0.03
吸烟者	204	211	NS
饮酒者	173	164	NS

数值为均值 ± 标准差。NS, 无统计学意义; BMI, 体重指数。

2. rs2070762 多态性位点在病例对照样本中的频率分布

采用实施例 1 中方法，分别对上述病例 (n=503) 和对照 (n=490) 的 rs2070762 多态性位点进行分析，并对结果进行统计分析，结果见表 6。

表 6、rs2070762 多态在病例对照样本中的频率分布

基因型	病例 (n=503) 合计	对照 (n=490) 合计	P
T/T	58	127	<0.0001
T/C	403	313	
C/C	42	50	
C 等位基因频率	487	413	0.005

结果：如表 6 所示，rs2070762 多态性位点 C 等位基因在病例中的分布显著高于对照组 ($P=0.005$)，由于本研究按照严格的标准挑选样本，在生活的地域环境，年龄，性别等方面进行了匹配，尽可能排除了非遗传因素对统计分析结果的影响，所以统计分析说明了 rs2070762 与人类原发性高血压密切相关。

实施例 3、rs2070762 多态性位点对于原发性高血压的相对危险性

1. 研究对象中 rs2070762 多态性位点对于原发性高血压的相对危险性采用实施例 1 中的方法对 rs2070762 多态性位点进行分析，并进一步进行统计分析(使用 SAS 软件包，多元 logistic 回归分析)，结果见表 7。

表 7、rs2070762 多态对于原发性高血压的相对危险性

变量	OR (%95 CI)	P
BMI, kg/m ²	1.15 (1.11 至 1.19)	<0.001
甘油三酯, mmol/L	1.18 (1.02 至 1.37)	0.01
血糖, mmol/L	1.12 (1.02 至 1.21)	<0.001
C/C vs. T/T	1.61 (0.94 至 2.76)	0.001
C/T vs. T/T	2.66 (1.86 至 3.80)	0.001

结论：如表 7 所示，在调整了原发性高血压传统的危险因素 BMI，甘油三酯和血糖后，rs2070762 多态性位点 C 等位基因携带者发生原发性高血压的相对危险性显著升高，即在其它条件一样的情况下，此位点携带 C 等位基因患原发性高血压的风险平均为非携带者的 2.66 倍，也就是说，增加了一倍多。

实施例 4 体外检测 TH 基因 rs2070762 多态性位点的试剂盒

体外检测 TH 基因的试剂盒，该试剂盒包含：

1. 扩增 rs2070762 多态性位点的引物：

引物	序列	序列号
正向	5' CCTTCCTTCTGGCCTTGAGCAG 3'	SEQ ID NO: 4
反向	5' TGTCAGCACCTCCAAGACTGG 3'	SEQ ID NO: 5

2. PCR 扩增酶及相应缓冲液：Tag DNA 聚合酶，10X 缓冲液，dNTP；

3. 检测 rs2070762 多态性位点的试剂：PstI 内切酶及其缓冲液。

并在试剂盒的使用说明中指出可以按照实施例 1 所述的方法进行检测。

应理解，在阅读了本发明的上述描述内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，但改动或修改的等价形式同样落在本申请权利要求书所限定的范围内。

序列表

- <110> 北京诺赛基因组研究中心有限公司
中国医学科学院阜外心血管病医院
中国科学院生物物理研究所
- <120> 具有特定单核苷酸多态性的 TH 基因及其检测方法和用途
- <130> GBI05CN0323
- <160> 5
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
<211> 7876
<212> DNA
<213> 智人
- <220>
<221> misc_feature
<222> (6701)..(6701)
<223> n = c 或 t
- <400> 1
cggacctcca cactgagcca tgcccacccc cgacgccacc acgccacagg ccaagggctt 60
ccgcagggcc gtgtctgagc tggacgcca gcaggcagag gccatcatgg taagagggca 120
ggtaggtgcc cggcggccgc agtggaccgg agcccagggc tgggtccagc tgcctctgct 180
actccccagc ctggctggca gccccaggct cagggtccat gcaaaccctt gggacgcggc 240
gtggatgtgg aggcctgggc acagcggcat ccctgtgcc tgggtgttga gtcctgttg 300
ggggaggggtg aggtgatgcc tgtccctgtg tgtgccctc ttagccgac ctctctcggg 360
ggtcgtgtgg gtctctgtgt ctgtttcat ctgaaatctt aacgatcga atgtgaaac 420
aaatccatcc aaaaaatcca agatggccag aggtccccgg ctgctgcacc cagccccac 480
cctactccca cctgcccctg cctccctctg ccccagctgc cctagtcagc acccaacca 540
gcctgcctgc ttggggaggc agccccaagg cccttcccag gctctagcag cagctcatgg 600
tgggggtcc tgggcaaata gggggcaaaa ttcaaagggt atctgggctc tggggtgatt 660

cccattggcc tgttctctcc ttatttcctt cattcattca ttcattcatt cattcattca 720
 ccatggagtc tgtgttccct gtgacctgca ctcggaagcc ctgtgtacag gggactgtgt 780
 gggccaggct ggataatcgg gagcttttca gcccacagga ggggtcttcg gtgcctcctt 840
 gggcactcag aaccttgggc tccttggcac atttaaatg ggtttttatt tatggacctt 900
 gattgaaatg tgggtgtgagt tntagcagtg tcatttcag gtaccttctc agggacacag 960
 ggcgccctcc cccgtcctcc cccgccctcc cctaccctcc ccaccaggc tccccatcag 1020
 gcatccccctc cccaggcgc cccggggccc agcctcacag gctctccgtg gcctggaact 1080
 gcagccccag ctgcatccta cccccacc ccaagggtaa gtaagagggg actctgggag 1140
 gggcttctgc tgctcccctt catgttccac aacctggaa gctcaggatg aagctgattc 1200
 ttctcttaca aggggcccag agccttcttg ggagttcagc tccaagggat gagccccagg 1260
 tgtctgcaa gtccccctct gtccaggcct gggacggctc tgggatcgag gggtcagagg 1320
 cgctgagccc agggagagac acctgcgcc agagctatga caaagggtgg agggatgaca 1380
 aggcagccag gagcgggcgc ctgcgggggtg gcacagaggg gcagggcccg aggacaggtg 1440
 tcctgatggg agtgtgagaa aggttcccct gtgcggcagc caggagggtg ggggggttgt 1500
 tcaactggggc cctgtggggg cagctccttc ctgagctgcc gttccctccc cggcagccga 1560
 tgccactgtc catcaagaca tcgccctctt cccatcacta atccagttag cgcttgccct 1620
 ggggatgagt gacacagcgt ctctgtctgt ctgctcgcca cagagtgggg agcaggcgag 1680
 caccttccca gccccactc ctccccacc accactgctt ctgactgggc tgccccatc 1740
 gggaaggggc tgcaatgcc gcaggcacct cggctagcat ctgcccagc aggcacacag 1800
 taggcgctca aaaacgtgct ctcatcccct gcctctgtgt gccatcagcg ctgcccgact 1860
 gtgggaccag ctgtgggtgg aggtccccgg gtctcagcag gtggaggagg catgggtgcc 1920
 ccttgtcccc acagtccccg cggttcattg ggccagggca gagcctcatc gaggacgccc 1980
 gcaaggagcg ggaggcggcg gtggcagcag cggccgctgc agtccccctc gagcccgggg 2040
 accccctgga ggctgtggcc tttgaggaga aggaggggaa ggccgtgcta aacctgctct 2100

tctccccgag gccaccaag ccctcggcgc tgtccccgagc tgtgaaggtg tttgaggtga 2160
gctggtggcc ttcgtgtccc tggggcaagt tcacctgtgg gtggggctgt gtgggctgag 2220
ttcctgacct ctctatagca gaggtgcagc tgcccaggcc cccgaggccg gcacaggatg 2280
cagcagggga gtctcaggcc tcagctcagc ccccatggca tctagccaca cccccgtgtt 2340
tttgagggat cctgagccca ccctagggc tgaggctacc aagccccact gtgcctcttg 2400
ccttgccat ccctggatc ccctcacc accatttccc acgtgggggg ctcccagcag 2460
ggcagcaca gaggcaggg cagggcagtg tgccctctcc caccacca gcacagtggc 2520
tcagtgacc actgattgca ttagtactc cgccccact gtgccccggg aggcaggtga 2580
cccagctccc ggaagaagct cccaatgac attaaagcca gactccccgc cccccagctc 2640
ccagagccag tttgtggcc cgagggccac tgcgaccac cgccttggtt gctaggcaac 2700
aggaggtggg ggtggagcgg acccttctgg ccagtgtcct ggacgctcag gggccagtga 2760
gactcagggc ccctctaca aacctggatg aggccaccag ggttgggggc accttctgac 2820
cagtggtga ggagccggac tgtgtggcat ggccttgga cacacacc gagccgcca 2880
gaaccaggtt aagcctcaag cggtgacaac tcctggttag gcacgtaaca caaatcaa 2940
cttgccagt gaaacctg gcctggtggc cgacagctga cctgagcctg gaagaacggg 3000
atctgtgtgc tgctagcaca aaagtcaagg gcagggcctg gccagccagc cagatgtgcc 3060
tcctccccgc ccacccacc ctctctctcc atctctgtct ctttctctt ctctctctct 3120
tcctgctttt gtccttaag acgttgaag ccaaatca ccatctagag acccgccccg 3180
cccagaggcc gcgagctggg ggccccacc tggagtactt cgtgcgctc gaggtgcgcc 3240
gaggggacct ggccgacctg ctcagtgggt tgcgccaggt gtcagaggac gtgcgcagcc 3300
ccgcggggcc caagggtgag gcggttttct gtccttgagg gccacaaat gaccttgaga 3360
ggctgggggtg caggggctcc tgcaggggga ccctacagt accacgtggg ggtggcctgg 3420
ttccctctct gcgggctcca ctccgaccc cgttttgcta cacatccgtg tccgggcctg 3480

gggccactcc aggatcccc cgcagctctc acagccccgg ctgcctctgc cccccggaag 3540
tctttaggg gaggtgctt caaggtgggt gacacagccc cacggctccg agctcaccaa 3600
gatctcttcc tccatcacc ataaagtccc ctggttccca agaaaagtgt cagagctgga 3660
caagtgtcat cacctggtca ccaagttcga ccctgacctg gacttggacc acccggtgag 3720
tggtgcgcc ctactcagg cctcctgccc ctgatcacat ccctaccet tagcccaacc 3780
ctggacagga gtctgtcggc tccaggagcc tccgtggcct gtgccccac cccagcacag 3840
cctcctgacc cgtgcatccc ctctgcctc agggcttctc ggaccaggtg taccgccagc 3900
gcaggaagct gattgctgag atgccttcc agtacaggca gtgaggggcc cctgcgctcg 3960
ggaccagac tccgtcctgc aggtgacgc tggacctggg gggtagggagg gaaggacaaa 4020
ggggaggacc catcttgtca ccagcatcag tgctcctgc caggcagctc tgctccaggg 4080
ctttccatgt ccccaaatcc cagtggggaa actgaggccc aggggggcta gagcaacctg 4140
ccgaggccac atagccggct cacggcacag tcagctgggg tgcacctcc tgtccatcct 4200
ccaacccaaa ggctcgtg cactaggcgg gtgtggacct gtgccagtg aagctcctc 4260
cctccctcct gcccttctca ctccccagg ggacctgctg accactggcc cctccccag 4320
cggcgacccg attccccgtg tggagtacac cgccaggag attgccacct ggtgagacct 4380
ccgtgcagct aggggctggg gaggagccc ggggatgcct cctggaatcc tggcgtgtga 4440
gggccgcctc caggacctt ggcacaacag gagagactaa ggccgggaag aagagggact 4500
tgcagggctc agaatgttg gttgggagga agaggctacc catcctgtcg ggccatcccc 4560
agtgtgctga gggaccgcc ctcatggccc cctatcccct gggattcct aaagccacca 4620
gcaaaagccc ctcccgggg cctgggtctt cagggtccc caagaggcct gcgttgtag 4680
gggctcaggc aggcagaggc acccacagtt caggaggggg gttcgggca ctggggtggg 4740
gcattagagg gccctgagcc tggctgccc caggaaggag gtctacacca cgctgaaggg 4800

cctctacgcc acgcacgcct gcggggagca cctggaggcc ttgctttgc tggagcgctt	4860
cagcggctac cgggaagaca atatcccca gctggaggac gtctcccgt tctgaaggg	4920
tgtgcccaga cgggaggggc gcagagccgg ggggcccggg atggtcagcc aagcgcccca	4980
ccccagcgcg gctccagccc gtcccggctc ggcagtgacc cgctggccc cttgcagagc	5040
gcacgggctt ccagctgcgg cctgtggccg gcctgctgtc cgcccgggac ttcctggcca	5100
gcctggcctt ccgcgtgttc cagtgcacc agtatatccg ccacgcgtcc tcgcccattc	5160
actcccctga gccgtgagtg cgcgccctgg ccgccagccc gaggggtgggg ggtgcgacgg	5220
gcggcccctc agcccccttc tccctcctac gcgcagggac tgctgccacg agctgctggg	5280
gcacgtgccc atgctggccg accgcacctt cgcgcagttc tcgcaggtac gccgcggcct	5340
cggagggagc cggggtcacc caggggctgg cttggcgccg ggggcgggcg gggatcgatg	5400
tgcgggtggg tgaagtgtgc tgcctgctcc cgggccccgc caaggaggct cggcgccccg	5460
agggtcgcgc ggcataaggc ggggctggag cggagcctcc cacggcctgt gctgccacct	5520
gccggctacc tgggaacggc gccacgggc ttaggaatgt ggtcaaggag ggctgcctgg	5580
aggaggagc ccggtggagg tgcggatcct gggcgccag ggaaggtctc tgccgccagg	5640
gaagtgccc agagaccct ggaggggctg ctgacacccc cggtgcccc acctcgagca	5700
tgaccaggg ctgcctctcc ccctcctca tctccctgc tccacaggac attggcctgg	5760
cgccctggg gcctcggat gaggaaattg agaagctgtc cacggtgggt tgaccctcc	5820
ctgcagggcc tggggtgtgg gtttgggggt ctgaatccag gcctaccct cttgccgtcc	5880
aggctgagc ctctccttcc acccagcaat tgtgaccctc accctggcct gcctgcatcc	5940
tggcctggcc tccctggggg tggatcctg gtcacgggtg accaggggct gcccggtggg	6000
cggcagctgt ctctgggctg atgctgcccg gcttccccgc agctgtactg gttcacggtg	6060
gagttcgggc tgtgtaagca gaacggggag gtgaaggcct atggtgccgg gctgctgtcc	6120
tcctacgggg agctcctggt gagagtctct ccttctgca gccccagca gaggggcagg	6180

gctgggggac ggtgcaggga ggggacaggc tcccagtggg aggaaactga ggcctggacc 6240
tccaggactc aggctctgtt tgggagaagg cttgtctctg cccagtcctc accccacatt 6300
atcccaggcc tccgaaggcc cggcggggga gatgggggtg actctacca aggaaccac 6360
ccagcgtcag gccacggtgc cccagttccc tcggggacct ggggtcagtg gagtcagtga 6420
tgccattggc ctctgccag cactgcctgt ctgaggagcc tgagattcgg gccttcgacc 6480
ctgaggctgc ggccgtgcag ccctaccaag accagacgta ccagtcagtc tacttcgtgt 6540
ctgagagctt cagtgcgcc aaggacaagc tcaggtgggc taggctgcta gggcaagccc 6600
cccatggtgc ccccaaactg ggccagccag gccttccttc tggccttgag cagggctgga 6660
cctgtgagcc caggtcacag atgagaaaac cgaccctgg ttgcagcagc cccacacag 6720
cagggacacc atccgtgaga aggaccccag cgtctgggga ggggcagacc tacaggactg 6780
ggggctgctg ggtggccggg tcaaggccag tcttgaggt gctgacagag cctgagcttt 6840
gtgaggacgt cctgtggaac ctgtcccggc ccctgcctt gggatgggga gaagtcaggg 6900
ggatagacag agtcaagggt ggggacaggg cgggagtggg gtccccaggg ctggggcct 6960
ttggtgcagt gaccagagtg tcaggagagg ggagcaaagc cctctagcct catcctcata 7020
aaaggtctca tcattttccc tccagcctct tatgcactgg ggaaactgag gccaggggct 7080
atgtgtccag cggacagggg tgctgaattc cacccacagg cttagggata tggtaagga 7140
aagcttcctg gaggaggccc agtggaggtt cagggagggga tggggtgcc ggcagtctct 7200
agtggaaaag ggcctagcc tatctcccc atgaacccc tcaccagcc ctggaagagg 7260
cctcagtgtc ccgctgtga ccagttggct cagaaaagcc ctgggagctc tgagccactg 7320
tgaaggtgga aacgcggccc ctggcctccc ctctcctgga ggctgcagac tctccccgcc 7380
agttgacgag ggctctgcc ctctcctccc caggagctat gcctcacgca tccagcggcc 7440
cttctccgtg aagttcgacc cgtacacgct ggccatcgac gtgctggaca gccccaggc 7500

cgtgcggcgc tccctggagg gtgtccagga tgagctggac acccttgccc atgcgctgag	7560
tgccattggc taggtgcacg gcgtccctga gggcccttcc caacctcccc tggctctgca	7620
ctgtcccgga gctcaggccc tggtagggg ctgggtccc ggtgcccc atgccctccc	7680
tgctgccagg ctcccactgc ccctgcacct gcttctcagc gcaacagctg tgtgtgcccc	7740
tggtagggtt gtgctgcctg tggtaggtc ctgtcctggc tcccagggtc ctgggggctg	7800
ctgcactgcc ctccgccctt ccctgacact gtctgctgcc ccaatcaccg tcacaataaa	7860
agaaactgtg gtctct	7876
<210> 2	
<211> 200	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 2	
ccctaccaag accagacgta ccagtcagtc tacttctgtg ctgagagctt cagtgcgccc	60
aaggacaagc tcaggtgggc taggctgcta gggcaagccc cccatggtgc ccccaaactg	120
ggccagccag gccttccttc tggccttgag cagggtgga cctgtgagcc caggtcacag	180
atgagaaaac cgaccctgg	200
<210> 3	
<211> 200	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 3	
tgcagcagcc cccacacagc agggacacca tccgtgagaa ggaccccagc gtctggggag	60
ggcagacct acaggactgg gggctgctgg gtggccgggt caaggccagt cttggaggtg	120
ctgacagagc ctgagctttg tgaggacgtc ctgtggaacc tgtcccggcc ccctgcctg	180
ggatggggag aagtcagggg	200

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 4
ccttccttct ggccttgagc ag

22

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 5
tgtcagcacc tccaagactg g

21



图 1

CCCTACCAAG ACCAGACGTA CCAGTCAGTC TACTTCGTGT CTGAGAGCTT CAGTGACGCC
 AAGGACAAGC TCAGGTGGGC TAGGCTGCTA GGGCAAGCCC CCCATGGTGC CCCCAAAGT
 GGCCAGCCAG GCCTTCCTTC TGGCCTTGAG CAGGGCTGGA CCTGTGAGCC CAGGTCACAG
 ATGAGAAAAC CGACCCCTGG

C/T

TGCAGCAGCC CCCACACAGC AGGGACACCA TCCGTGAGAA GGACCCAGC GTCTGGGGAG
 GGGCAGACCT ACAGGACTGG GGGCTGCTGG GTGGCCGGGT CAAGCCAGT CTTGGAGGTG
 CTGACAGAGC CTGAGCTTTG TGAGGACGTC CTGTGGAACC TGTCCCGGCC CCCTGCCCTG
 GGATGGGGAG AAGTCAGGGG

图 2

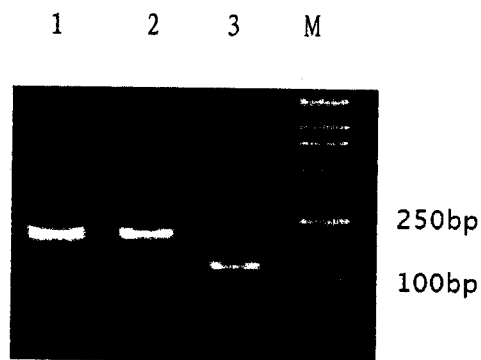


图 3