

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03825166.3

[51] Int. Cl.  
C12Q 1/68 (2006.01)  
C12N 15/12 (2006.01)

[43] 公开日 2006年2月8日

[11] 公开号 CN 1732270A

[22] 申请日 2003.9.15 [21] 申请号 03825166.3

[30] 优先权

[32] 2002.9.16 [33] AU [31] 2002951411

[86] 国际申请 PCT/AU2003/001202 2003.9.15

[87] 国际公布 WO2004/024947 英 2004.3.25

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.16

[71] 申请人 遗传技术有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

[72] 发明人 凯瑟琳·南丝·诺思

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 41 页 序列表 1 页  
附图 1 页

[54] 发明名称

ACTN3 基因型筛选运动性能

[57] 摘要

本发明涉及用于为个体选择或匹配一种运动或运动项目(例如短距离赛跑/力量运动或耐力运动)以及用于预测运动性能的新方法,其包括评价 ACTN3 基因型。在另一个实施方案中,通过评价 ACTN3 基因型而为运动员优化设计训练计划。本发明的特定实施方案涉及将评价 ACTN3 基因型与其他已知的健康相关基因相结合来更好地评价个体的运动潜能。此外,可将 ACTN3 基因的基因型分析与生理学测试、物理测量和/或心理学评估相结合,以便为运动员个体设计更加优化的训练计划。

1. 一种预测个体的运动性能的方法，包括：
  - a) 筛选个体在 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3(ACTN3)基因中是否存在一种或多种遗传学变异；以及
  - b) 根据存在的一种或多种遗传学变异预测运动性能。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述个体是人。
3. 权利要求 1 的方法，其中所述个体是马、狗或骆驼。
4. 权利要求 1 到 3 中任一项的方法，进一步包括筛选个体的 ACTN3 基因内的 1747 C>T 单核苷酸多态性(SNP)。
5. 权利要求 1 到 4 中任一项的方法，进一步包括在 ACTN3 基因座对个体进行基因分型。
6. 权利要求 5 的方法，其中至少一份 ACTN3 基因的 577R 等位基因拷贝的存在与短距离竞赛或力量性能正相关。
7. 权利要求 6 的方法，其中个体的基因分型为 577RR 基因型与短距离竞赛或力量性能正相关。
8. 权利要求 6 的方法，其中个体的基因分型为 577XX 基因型与短距离竞赛或力量性能负相关。
9. 权利要求 6 的方法，其中个体的基因分型为 577XX 基因型与耐力性能正相关。
10. 权利要求 6 的方法，其中个体的基因分型为 577RX 基因型与雌性个体的短距离竞赛或力量性能正相关。
11. 权利要求 6 的方法，其中个体的基因分型为 577RX 基因型与雌性个体的耐力性能负相关。
12. 权利要求 1 到 11 中任一项的方法，进一步包括测定个体的骨骼肌内所具有的 ACTN3 蛋白的量。

13. 权利要求 12 的方法, 其中用特异于 ACTN3 蛋白的抗体测定 ACTN3 蛋白的量。

14. 权利要求 1 到 11 中任一项的方法, 进一步包括测定个体的骨骼肌内所表达的 ACTN3 信使 RNA(mRNA)的量。

15. 权利要求 4 的方法, 进一步包括用 DNA 测序、等位基因特异性杂交、等位基因特异性扩增或限制性片段长度多态性分析来鉴定个体基因组 DNA 中的 1747 C>T SNP 等位基因。

16. 权利要求 4 或 15 的方法, 进一步包括筛选个体在 ACTN3 基因中是否存在一个或多个额外的 SNP。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述一个或多个额外的 SNP 选自由表 3 中所列的 SNP 所构成的组。

18. 权利要求 1 到 17 中任一项的方法, 进一步包括筛选个体在至少一种其它的基因中是否存在一种或多种遗传学变异。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述至少一种其它的基因选自由表 4 中所列的基因所构成的组。

20. 权利要求 1 到 19 中任一项的方法, 进一步包括筛选个体是否存在 ACE(血管紧张素转化酶)I 等位基因和 ACE D 等位基因。

21. 权利要求 20 的方法, 其中 ACE I 等位基因与耐力性能正相关。

22. 权利要求 20 的方法, 其中 ACE D 等位基因与短距离竞赛或力量性能正相关。

23. 权利要求 19 的方法, 进一步包括筛选个体是否存在 ADRA2A( $\alpha$ -2A-肾上腺素能受体)等位基因。

24. 权利要求 1 到 23 中任一项的方法, 进一步包括用一种选自由 VO<sub>2</sub> 最大值、无氧阈值测试、Wingate 测试、临界力量、静息代谢率、身体组成、速度测试、力量测试、强度测试、灵活性测试、肌肉活检、快缩肌纤维测试和慢缩肌纤维测试所构成的组的测试对个体进行筛选。

25. 一种最优化训练计划的方法，包括：

a) 筛选个体在 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3(ACTN3)基因中是否存在一种或多种遗传学变异；以及

b) 选择个体的训练计划以最优化强度性能、力量性能或耐力性能。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述个体是人、马、狗或骆驼。

27. 权利要求 25 或 26 的方法，进一步包括筛选个体的 ACTN3 基因内的 1747 C>T 单核苷酸多态性(SNP)。

28. 权利要求 25 到 27 中任一项的方法，进一步包括在 ACTN3 基因座对个体进行基因分型。

29. 一种为个体选择运动或运动项目的方法，包括：

a) 筛选个体在 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3(ACTN3)基因中是否存在一种或多种遗传学变异；以及

b) 根据所述筛选的结果，选择短距离竞赛/力量型运动或项目或耐力运动或项目。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述个体是人、马、狗或骆驼。

31. 权利要求 29 或 30 的方法，进一步包括筛选个体的 ACTN3 基因内的 1747 C>T 单核苷酸多态性(SNP)。

32. 权利要求 29 到 31 中任一项的方法，进一步包括在 ACTN3 基因座对个体进行基因分型。

## ACTN3 基因型筛选运动性能

本申请要求在 2002 年 9 月 14 日提交的澳大利亚临时专利申请 No. 2002951411 的优先权。

### 发明背景

本发明涉及用于为个体选择或匹配一种运动或运动项目(例如短距离赛跑/力量运动或耐力运动)以增加他们的成功机会、优化个体的训练计划以及用于预测个体的运动性能的方法。本发明特定的实施方案涉及鉴定与潜在的运动性能相关的特异基因或所述的基因内的变异。更具体地, 本发明涉及根据编码骨骼肌蛋白 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3(ACTN3)的基因对个体进行基因分型的方法。在一个具体的实施方案中, 所测定的 ACTN3 基因型是单核苷酸多态性(SNP)位点 1747 C>T。

### 相关现有技术描述

在日益加剧的体育运动的竞争环境中, 发展出了天才搜索计划以确保能在早鉴定出那些具有成为杰出运动员潜能的人, 使得他们能尽早锻炼以达到他们的顶峰性能。目前这些天才搜索计划依据于实际的性能数据、进行的训练类型所决定的表型预测因素、以及特殊运动所需的要求。现有的训练计划和天才搜索标准所共有的一个缺点是不能确定出该个体是否已经达到他/她的性能潜能, 因此在进一步的训练中能否得到提高。

现有的天才搜索计划的另一缺点是选择的机会, 特别是在大地理区域内有着相对少的人口基础的国家里。在具有能广泛得到运动和训练设施的环境中成长的个体更能获得成功, 并因此比生长在相对隔离的区域

或可能具有穷困背景的个体更能得到教练和星探的注意。同样，可能简单地忽视那些在更不引人注目的运动例如划船中具有杰出潜能的个体，因为在大多数学校中没有这些运动计划。这也减少了早期鉴定和参与的机会，随后导致教练和星探的忽视。例如澳大利亚运动研究所(AIS)的运动组织正面临着这样的困境，因为年轻的潜在的杰出运动员被优选地选择并引入到相关的训练计划中。

在基因型或基因型标记物与特定的生理性状之间所存在的可能关联或联系可以增加或减弱杰出运动员的性能。这些发展可以容许发展出有助于选择出具有杰出运动员潜能的个体的 DNA 筛选。这些筛选可以有助于克服现有的天才搜索计划的一些选择局限。另外，这些筛选方法可以有助于识别谁或什么时候应当制定出个体训练计划中的可能是微小的但是关键的区别。

$\alpha$ -辅肌动蛋白是一种与肌营养不良蛋白和膜收缩蛋白相关的肌动蛋白结合蛋白家族(Blanchard, A. et al., *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 10, 280-289, 1989)。在骨骼肌中，家族成员 $\alpha$ -辅肌动蛋白-2 和 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 是肌原纤维 Z 线的主要结构成分，其中它们的作用是以组成方式锚定含肌动蛋白的细肌丝(Beggs, A. H. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 267, 9281-9288, 1992)。但是，最近的研究表明了 $\alpha$ -辅肌动蛋白在骨骼肌中有其他作用。

已经发现肌原纤维的 $\alpha$ -辅肌动蛋白与其他的细肌丝和 Z 线蛋白包括伴肌动蛋白、myotilin、CapZ 和 myozenin 结合(Nave, R. et al., *FEBS Letters*, 269, 163-166, 1990, Papa, J. et al., *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 20, 187-197, 1999, 和 Slikkangas, P. et al., *Heredity Molecular Genetics*, 8, 1329-1336, 1999); 与中间丝蛋白、联丝蛋白(synemin)和纽蛋白结合(Bellin, R. M. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 274, 29493-29499, 1999, 和 McGregor, A. et al., *Biochemical Journal*, 301, 225-233, 1994); 以及与肌纤维膜蛋白，肌营养不良蛋白和  $\beta$ 1 整联蛋白结合

(Hance, J. E. et al., *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 365,216-222, 1999, 和 Otey, C. A. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 268,21193-21197, 1993)。这些结合研究都说明 $\alpha$ -辅肌动蛋白在细肌丝组成以及肌原纤维细胞骨架与肌膜之间的相互作用中都发挥着作用。另外,肌原纤维的 $\alpha$ -辅肌动蛋白与磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(Fukami, K. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 269,1518-1522, 1994)、磷脂酰肌醇 3 激酶(Shibasaki, F. et al., *Biochemical Journal*, 302,551-557, 1994)、以及 PDZ-LIM 衔接蛋白(Pomies, P. et al., *Journal of Cell Biology*, 139,157-168, 1997, 和 Pomies, P. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 274,29242-29250)结合,这说明了它在肌纤维分化和/或收缩的调节中的作用。

在人体中, $\alpha$ -辅肌动蛋白-2 基因, ACTN2, 被所有的骨骼肌纤维所表达;而编码 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 的 ACTN-3 的表达被限定于一种 2 型肌纤维的亚组中(North, K. N. et al., *Nature Genetics*, 21,353-354, 1999)。最近已经证实, $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 存在于人群的 18%个体中,以及在至今所有被鉴定为真正的 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 缺乏病变的患者中都具有未成熟终止密码子(577X)的纯合子。另外还存在着与 577X 连锁不平衡的多态性(523R),但是当其与 577R 偶合的杂合状态被表达时,没有表现出有害作用。另外, $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 的缺乏没有与一种明显的疾病表型相关,说明 ACTN3 在人体中是冗余的(North, K. N. et al., 1999 *Nature Genetics* 21: 353-354)。

当两个基因具有重叠功能时就会出现功能冗余性,使得其他一个基因的失活对表型具有很小的或没有影响(综述见 Nowak, M. A. et al., *Nature*, 388,167-171, 1997)。在人体骨骼肌中, $\alpha$ -辅肌动蛋白-2 的表达完全重叠了 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3。ACTN2 与 ACTN3 还具有 80%相同性和 90%相似性(Beggs, A. H. et al., 1992,s7tpa),以及 $\alpha$ -辅肌动蛋白-2 和 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 在体外和体内都能形成异二聚体,说明两种骨骼肌辅肌动蛋白异构体之间的结构相似性以及缺乏明显的功能差异(Chan, Y. et

al., *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 248,134-139, 1998)。推测 $\alpha$ -辅肌动蛋白-2 能补偿人体 2 型(快)纤维的 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 的缺乏。

### 发明内容

尽管人 ACTN3 和 ACTN2 的显而易见的功能冗余性，但是在对杰出的澳大利亚运动员和著名白种人(Caucasian)短距离竞赛运动员(特别是短跑运动员、游泳运动员和自行车运动员)库的基因型筛选中注意到，与整体澳大利亚白种人人群比较，前者具有非常低频率的 ACTN3 未成熟终止密码子 577X 突变纯合子(即 ACTN3 无效突变，577XX)。因此认为对 ACTN3 基因型的筛选将有助于选择出具有具有短距离竞赛类型运动和项目的杰出性能的潜能的个体。基因型筛选也显示 577XX 基因型频率在白种人杰出耐力运动员中是相对更高的。因此，对 ACTN3 577XX 基因型的筛选方法也可以有助于鉴定出具有在耐力运动和项目中的杰出性能的潜能的年轻个体。

本发明通过提供用于筛选个体的运动员潜能的体外方法，解决了本领域的一个需求。在一个实施方案中，可以测定个体的基因 ACTN3 的基因型。在另一个实施方案中，从 2 型骨骼肌中分离出 mRNA 或蛋白并分析是否存在 ACTN3。在另一个实施方案中，通过从血或口腔拭子标本中分离 DNA 并扩增 DNA 以及分析 ACTN3 基因中是否存在未成熟终止密码子(577X)来鉴定个体。其他的实施方案提供了通过联合其他遗传学和生理学测试和筛选 ACTN3 来筛选个体的运动潜能的方法。另外，所描述的方法可用于通过遗传学评估、生理测试、体能测定和/或心理学评估发展出更适合于单个运动员的训练计划。

在另一个实施方案中，本发明用于筛选个体的杰出的运动员潜能，例如通过从个体中得到合适的肌肉细胞标本并测定标本中的 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 蛋白和/或编码蛋白的信使 RNA 来实施本发明的方法。

本发明特定的实施方案涉及一种预测是否存在特殊表型的方法。方法包括从个体中得到核酸标本并测定在此所述的核酸分子的特异(例如多态性)位点上的一个或多个碱基(核苷酸)的相同性,其中在该位点所存在的特殊碱基与特异表型相关,因此预测出该表型在个体中的存在、缺如、或可能存在或缺如。

## 附图说明

下面的图表构成了本说明书的一部分,并进一步地证实了本发明的特定方面。结合在此所述的具体实施方案的详尽描述并参照于一个或多个图表可以更好地理解本发明。

图1说明了 ACTN3 基因型在对照、杰出的短距离竞赛/力量运动员和杰出的耐力运动员中的频率。

表1显示了特殊项目的白种人杰出运动员的 ACTN3 中的 R577X SNP 的基因型。

表2显示了所测定个体的 ACTN3 等位基因在对照、杰出的短距离竞赛/力量和耐力运动员中的数目和频率(%)的概括。

表3显示了至今在 ACTN3 中所鉴定到的并汇编于 NCBI SNP 网址的列表上的 SNP。

表4显示了与性能和健康相关的适合度表型的 2002 年人类基因图谱的核及线粒体基因的缩写、全名和细胞定位。

表5显示了耐力表型和案例对照研究(DNA 多态性)。

表6显示了 ACTN3 577/R/X 等位基因在不同人群中的基因型和等位基因频率。

## 定义

在说明书中，“一个(种)”可以指一个(种)或多个(种)。在权利要求书中，与名词“包括”组合使用时，“一个(种)”可以指一个(种)或超过一个(种)。“另一个(种)”在此意思可以是至少一个第二个(种)或多个(种)。

“杰出运动员”或其不同表述形式指的是在耐力、速度和/或强度方面达到非常高水平的运动员(例如那些能参加他们的运动项目的省(州)、国家和/或国际水平比赛的运动员)。

术语“SNP”或“单核苷酸多态性”在此指的是在生物体(例如人)基因组的特异位点上的单个碱基的变化。

### 具体实施方案

在下面的部分中，例如描述了发明的一些实施方案以举例说明本发明的不同的实施方案、对本领域人员显而易见的是实践不同的实施方案并不需要采用在此所概述的所有的或甚至一些具体细节。在一些情况中，那些熟知的方法或成分并没有被写入本说明书中。

本发明公开了筛选个体的运动员潜能的方法和组合物。在本发明的一个实施方案中，公开了筛选个体是否存在 ACTN3 蛋白和/或 mRNA 的方法。在本发明的另一个实施方案中，公开了筛选个体是否存在 ACTN3 基因型变异的方法。在本发明的另一个实施方案中，公开了筛选个体是否存在特殊的 ACTN3 基因型例如 577RR、577XR 或 577XX 的方法。通过直接测定蛋白水平或通过间接测定蛋白水平(例如抗体等)可以完成对 ACTN3 蛋白的鉴定。

### ACTN3 多态性和其他遗传学变异

在人的编码只存在于 2 型(快)肌纤维中的骨骼肌蛋白 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3(ACTN3)的基因中已经鉴定出常见的多态性。已经鉴定出三种可能的基因型 577RR(野生型表达—— $\alpha$ -辅肌动蛋白-3)、577RX(存在杂合的 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3)、以及 577XX(在骨骼肌中为纯合的无效——无 $\alpha$ -辅肌动

蛋白-3)。在不同的人种中具有不同的等位基因频率(即约 18%的白种人是 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 缺如,而在非洲祖鲁人(见表 3)、西非洲人和非洲裔美国人中只有 1%)。和下面的实施例所讨论的一样,在白种人杰出的短距离竞赛/力量运动员中, 577XX 基因型的频率是非常低的。因此, ACTN3 577RR 基因型的筛选方法可以有助于鉴定出例如具有在短距离竞赛或力量型运动或项目中具有杰出性能的潜能的年轻白种人个体。相反地,在白种人杰出的耐力运动员中, 577XX 基因型的频率是相对更高的。因此, ACTN3 577XX 基因型的筛选方法也可以有助于鉴定出例如具有在耐力运动和项目中具有杰出性能的潜能的年轻白种人个体。另外,表 6 显示了 ACTN3 577R/X 等位基因在不同人群中的基因型和等位基因的频率。在表 6 和表 2 中,所筛选的非洲黑人(即祖鲁人)具有极低数目的 577XX 个体。因此,在非洲黑人(以及,或许相关的西非洲人和非洲裔美国人)中筛选 ACTN3 检测 577XX 基因型可能在鉴定具有耐力潜能的个体上是有用的。在一个实施方案中,可以单独使用筛选 ACTN3 等位基因(例如 577R、577X)的方法或联合使用其他的筛选方法选择或至少有助于选择具有杰出的短距离竞赛/力量潜能的年轻个体(例如,作为短跑运动员、短距离游泳运动员和自行车运动员的潜能)。

其他基因也可以对短距离竞赛/力量和/或耐力运动性能具有正面的影响。例如,据报血管紧张素转化酶(ACE)具有两个等位基因, I 和 D,它们影响运动性能。I 等位基因与血和组织中的低 ACE 活性相关(Reider et al., "Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme." *Nat Genet*, 1999 vol. 22 pp59-62)。据报在杰出的耐力运动员中, I 等位基因的频率增加(Gayagay et al. 1998 "Elite endurance athletes and the ACE I allele: the role of genes in athletic performance". *Hum Genet* 103: 48-50; Montgomery et al. 1998 Human gene for physical performance. *Nature* 393: 221-222; Myerson et al. 1999 Human angiotensin 1-converting enzyme gene and endurance performance. *J Appl Physiol* 87: 1313-1316; Nazarov et al.

2001 The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes *Eur J Hum Genet* 9: 797-801)。相反地, ACE D 等位基因频率的增加与杰出的短距离竞赛性能相关(Myerson et al. 1999 Human angiotensin 1-converting enzyme gene and endurance performance. *J Appl Physiol* 87: 1313-1316; Nazarov et al. 2001 The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes *Eur J Hum Genet* 9: 797-801; Woods et al. 2001 Elite swimmers and the D allele of the ACEI/D polymorphism. *Hum Genet* 108: 230-232)。

这可能是短距离竞赛和耐力性能之间的一种折衷, 这种折衷造成了对人和其他脊椎动物的体能进化的限制(Garland et al. 1990 "Heritability of locomotor performance and its correlates in a natural population" *Experientia* 46: 530-533)。来自世界级十项全能运动员的数据支持这种观点, 它证实了在 100m 短跑、铅球、和 110m 跨栏中的性能(依赖于爆发力和快的、易疲劳的肌纤维)与在 1,500m 赛跑中的性能(要求耐力和耐疲劳的慢纤维的活性)负相关(Van Damme et al. 2002 Performance constraints in decathletes. *Nature* 415: 755-756)。这说明一个个体可能只能在两个领域(短距离竞赛/力量对耐力)的其中一个领域中具有特殊的性能。在本发明特定的实施方案中, 可以联合使用对 ACTN3 的筛选试验与对其他的性能相关基因的一种或多种遗传学测试。这些测试可以包括任何本领域已知的与短距离竞赛/力量和/或耐力性能相关的基因(例如 Rankinen et al. 2002, "The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2001 update" *Med. Sci. Sports Exerc.* 34: 1219-33; Perusse et al. 2003, "The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2002 update" *Med. Sci. Sports Exerc.* 35: 1248-1264, 在此将其全部内容一同并入参考)。

两个报告(Rankinen et al. 2002; Perusse et al. 2003)已经概述了对性能和健康相关的适应性表型的研究的结果。图 1 显示了在 2002 年文章中

的人性能和健康相关的适应性基因图谱。图谱包括所有的已经显示出与运动相关表型相关或关联的基因数和 QTL(数量性状基因座)。染色体和它们的区域都来自 Bethesda, MD, 国立卫生研究所, 国立生物技术信息中心(NCBI)的人基因组基因图谱的网站。表 4 概括了可能与 ACTN3 筛选联合使用的基因的基因座的缩写和全名。在一个实施方案中, 可以与对个体 ACTN3 基因的评价联合进行对表 4 所引用的一个或多个基因的分析以预测个体的杰出的运动员潜能。

表 5 概括了一项对耐力运动员和惯于久坐的个体之间的 ADRA2A( $\alpha$ -2A-肾上腺素能受体)和 ACE(血管紧张素 1 转化酶)基因的等位基因和基因型频率的研究(Perusse et al., 2003)。表 5 显示了耐力运动员和惯于久坐的个体之间的差异。在本发明的一个实施方案中, 对潜在的杰出运动员的 ACTN3 基因型的检测可以联合对 ADRA2A 基因型或 ACR 基因型的测定以更准确地预测个体的运动员潜能。在另一个实施方案中, 对运动员的 ACTN3 基因型的测定可以联合对 ADRA2A 基因型和/或 ACR 基因型的测定和/或其他生理测定(例如  $VO_2$  最大值等)以制定出运动员的训练计划。

### ACTN3 和 ACTN2 的进化趋异

对非人灵长类动物的基因分型显示人类增加了 577X 无效突变。鼠基因组包含四个直系同源物, 所有的这些都被绘制于四个人类基因的进化保守区域。与人类不同, 在胚胎发育期间, 鼠的 ACTN2 和 ACTN3 在时间和空间上呈现不同的表达, 在出生后的骨骼肌中的 $\alpha$ -辅肌动蛋白-2 的表达没有完全重叠 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3, 说明了功能是独立的。此外, 人、鼠和鸡的 $\alpha$ -辅肌动蛋白基因的序列比较证实, ACTN3 在很长一段进化时间内都是保守的, 暗示了基因的连续功能对进化速度所施加的限制。这些观察提供了一个真实的框架, 其中测试了遗传学冗余性的理论模型, 当它们被应用于人群以及其他动物时(Mills et al Differential

Expression of the Actin-binding Proteins,  $\alpha$ -actinin-2 and-3, in Different Species: Implications for the Evolution of Functional Redundancy" 2001 Hum Mol Gene 13: 1335-1346)。

为了确定出 577X 等位基因(以及 523R 等位基因, 与 577X 具有强的连锁不平衡)的来源, 基因分型了 36 只无狒狒( $25 \times 10^6$ 年前从人类谱系中分出)和 33 只无猩猩( $5 \times 10^6$ 年前从人类谱系中分出)。所有的 69 只非人灵长类动物在外显子 15(523Q)和 16(577R)上都是“野生型”等位基因纯合子, 说明多态性起源于人类和猩猩谱系分离之后, 或它们在非人灵长类中有着非常低的频率(Mills et al 2001)。

对于小鼠而言, 小鼠 ACTN2 和 ACTN3 之间的相似性与人 ACTN2 和 ACTN3 之间的相似性相同, 即 88%相似性和 79%相同性。鼠蛋白是共线的, 并具有与人蛋白一样的功能区: 一个 N 末端的辅肌动蛋白结合区、四个中心重复区以及 C 末端的 EF 手(Mills et al 2001)。

在鸡中只有一个骨骼肌 ACTN 基因, 而鼠基因组含有四个直系同源物, 它们都被绘制于四个人类基因的进化保守的结合区域。鼠和人类 ACTN2 和 ACTN3 之间的序列比较说明与其他基因比较,  $\alpha$ -辅肌动蛋白的进化是慢的。ACTN3 中的低取代率的出现不能完全归结于该基因内的低突变率(Mills et al 2001)。

在其他哺乳动物例如兔和猪中, 也有  $\alpha$ -辅肌动蛋白的快肌和慢肌特异性异构体, 尽管没有分离到相关基因。但是两种肌原纤维的  $\alpha$ -辅肌动蛋白基因的出现可能只局限于哺乳动物。

在哺乳动物中, 已经存在基因的两个拷贝, 人类和鼠 ACTN2 及 ACTN3 序列的比较显示基因在整个哺乳动物进化的过程中都是高度保守的(Mills et al 2001)。

杰出的运动性能和马

除一些狗和骆驼以外，马是非常少数的因其运动性能而被育种、饲养、或买卖的动物之一，因此它是另一种研究基因表达与运动性能相关性的模型。例如，先前已经证实人的运动性能的运动标记物 ACTN3 和 ACTN2 基因在整个物种中的保守性。尽管在马中还没有鉴定出等同的基因，但是马中存在类似 ACTN3 但还没有被检测到的基因是高度可能的。在本发明特定的实施方案中，筛选了马的 ACTN3 样基因。在其他的实施方案中，可以筛选例如被训练用于在赛马比赛中比赛的马的赛马的 ACTN3 样基因。同样的，也可以筛选需要巨大力量进行短距离竞赛的马例如马球和障碍赛马的 ACTN3 样基因的差异表达。短距离竞赛的马表达一种稍微不同于耐力马的基因，因此对 ACTN3 样基因的分析可能是马的杰出的运动性能的一个提示。与在人运动员中所见的一样，筛选基因的微小变化，例如是否存在特异的核苷酸序列(例如，SNP 位点、缺失或插入)可能是动物例如马的杰出的运动性能的有用提示。ACTN3 样基因是其他物种中具有与 ACTN3 一样功能的基因或是具有与 ACTN3 基因相似序列的基因。

先前的研究表明马的血管紧张素转化酶基因可能是马的运动性能的一个理想的候选基因。人的该基因的变异体包含与增加杰出耐力运动员的运动能力以及增加对训练的反应相关的多态性标记物(Ellis et al, Characterization of the Equine Angiotensin-converting Enzyme 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 19-23,2002, Montpellier, France Session 05。Horse breeding Abstract of N 05-07 GENE. N: A.I. Tammen, F. W. Nicholas and H. W. Raadsma. ReproGen, University of Sydney, Camden, Australia)。至今为止，在马的 ACE 的表达与杰出的运动性能之间建立关联性已经是不成功的。其他的研究包括对马臀中肌的肌球蛋白重链基因(MyHC)的研究，其中已经鉴定了基因在马驹中的差异表达，但是运动能力与是否存在该基因的直接相关性仍是与运动性能无关的(Eizema et al “Differential Expression of Equine Myosin heavy-

chainmRNA and Protein Isoforms in a Limb muscle” J Histochem Cytochem 2003 Sept; 51 (9): 1207-1216)。

预计可以测定出对马的 ACTN3 样基因的分析和其他生理及遗传学参数，使得可以更准确地幼年时评测出马的杰出的运动能力。预计在将马用于育种目的之前可以预先筛选马以鉴定出更满意的遗传学匹配。另外，可以筛选子宫内驹使得在驹出生之前评测它的运动员潜能是有可能的。从这些筛选中所得到的信息可以节约马(骆驼、狗)育种者和研究者的无数时间和金钱，以及在发育的早期鉴定出动物的潜在能力。与人类一样，从马的基因型筛选中所得到的信息以及其他参数(血统等)可以帮助鉴定出潜在的杰出运动员和/或给特殊动物(马球赛马)设计出更好的训练方案。

### 单核苷酸多态性(SNP)

本发明不同的实施方案提供了用于测定多态性或遗传学变异(例如 SNP)和表型之间的相关性的方法，包括 a)提供：一个或多个对象的标本，一个或多个对象的可能的医学记录，确定出对象的表型以及测定多态性的检测方法； b)在使得可以发现至少一个多态性是否存在的条件下，检测标本；以及 c)确定出至少一种多态性和对象的表型之间的关联。

可以用任何合适的方法检测相关区域的核酸(例如含有相关遗传学变异的区域)，方法包括但不限于利用放射性标记核苷酸的人工测序、或自动测序。可以测定序列并确定是否存在给定的 SNP 或突变。为了评测个体的运动潜能或修改个体的训练方案，可以用基因的特殊 SNP 位点(例如，ACTN3 的 1747 C>T)评估特殊基因的存在、缺如或变化。在表 3 中列举了 ACTN3 的已知的 SNP。在本发明不同的实施方案中，对 ACTN3 基因的 1747 C>T SNP 的筛选可以联合于对 ACTN3 的其他任何

已知的多态性的筛选，这些多态性包括但不限于表 3 中所列举的任一 SNP。

例如在已发表的美国专利申请 No. 801274、No. 20020032319 中公开了其他可能用于实践权利要求的方法的 SNP，在此将其全部内容一同并入参考。可以与 ACTN3 基因的 1747 C>T SNP 联合检测这些位点中的任何一个或多个位点以预测个体的运动员潜能、为个体选择或匹配一种运动或运动项目(即增加个体的成功机会)和/或优化训练方案。

在本发明的另一个实施方案中，可以利用其他的检测方法筛选遗传学变异，例如等位基因特异性杂交检测法。在杂交检测中，根据标本中的 DNA 与互补 DNA 分子(例如寡核苷酸探针)杂交的能力确定出是否存在给定的 SNP 或其他的遗传学变异。各种利用各种杂交技术和测定的杂交检测法在本领域是已知的，在权利要求的方法中可以使用这些已知技术中的任一技术。下面举例说明一些检测法。

在一些实施方案中，检测法可以利用 DNA 芯片杂交检测。在这些检测法中，一组寡核苷酸探针被固定于固体支持物中。在一些实施方案中，寡核苷酸探针被设计为独特于一个给定的 SNP 或突变。相关的 DNA 标本与 DNA “芯片”接触并测定杂交。从商业渠道例如 Affymetrix (Santa Clara, CA)可以得到 DNA 芯片，包括特异于特殊 SNP 序列的专门 DNA 芯片。

在其他示例性的实施方案中，可以用 SNP-IT 引物延伸检测法 (Orchid Biosciences, Princeton, N. J.; 例如美国专利 Nos. 5,952, 174 和 5,919, 626)测定多态性。在这个检测法中，通过用特殊合成的 DNA 引物和 DNA 聚合酶在可疑的 SNP 位点选择性地、单碱基延伸 DNA 链来鉴定 SNP。扩增并变性相关区域内的 DNA。然后用微液态体系进行聚合酶反应。通过加入在 SNP 位点或突变位点的可疑核苷酸的探针完成测定。用任何合适的方法可以测定到整合到 DNA 内的探针(例如，如果核苷酸含有生物素探针，就通过荧光标记的生物素特异性抗体进行测定)。

也可以用其他的商业化试剂盒鉴定是否存在一种或多种 SNP(例如, Applied Biosystems: SNaPSHOT, Assay-on-Demand, Assay-By-Design, Pyrosequencing assays) (见: <http://www.pyrosequencing.com/pages/products96hs.html>)。

## 核酸

本发明不同的实施方案包括分离并分析核酸分子, 例如 DNA、mRNA 或 cDNA。相关核酸可以编码靶蛋白的一部分或全部(例如, ACTN3、ACE 等)。“核酸”在此包括单链和双链分子, 以及 DNA、RNA、化学修饰的核酸以及核酸类似物。预计在本发明范围内的核酸可以是长度为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、约 110、约 120、约 130、约 140、约 150、约 160、约 170、约 180、约 190、约 200、约 210、约 220、约 230、约 240、约 250、约 275、约 300、约 325、约 350、约 375、约 400、约 425、约 450、约 475、约 500、约 525、约 550、约 575、约 600、约 625、约 650、约 675、约 700、约 725、约 750、约 775、约 800、约 825、约 850、约 875、约 900、约 925、约 950、约 975、约 1000、约 1100、约 1200、约 1300、约 1400、约 1500、约 1750、约 2000、约 2250、约 2500 个或更长核苷酸残基的核酸, 以及最长到包括全长的染色体 DNA。

从复杂的混合物中部分或完全纯化 DNA 和/或 RNA 的方法在本领域是熟知的, 例如细胞匀浆或提取。(见例如 Guide to Molecular Cloning Techniques, eds. Berger and Kimmel, Academic Press, New York, NY,

1987; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., eds. Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。一般地，首先将细胞、组织或其他来源的材料匀浆化，例如通过在液氮中冷冻，随后用研钵和研棒碾磨。用韦林搅切器、Virtis 匀浆器、Dounce 匀浆器或其他匀浆器都可以将特定的组织匀浆化。用去污剂例如十二烷基硫酸钠(SDS)、Triton X-100、CHAPS (3-(3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基)-1-丙磺酸盐 (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate))、辛基葡糖苷或其他本领域已知的去污剂提取粗匀浆液。熟知的是，可以加入例如核糖核酸酶或脱氧核糖核酸酶抑制剂的核酶抑制剂预防靶核酸的降解。

用例如异硫氰酸胍的离液剂(chaotropic)或例如苯酚的有机溶剂也可以进行提取。在一些实施方案中，例如用蛋白酶 K 的蛋白酶处理可以被用于降解细胞蛋白。离心或超速离心可以去除颗粒污染。可用低离子强度的水缓冲液的透析去除盐或其他可溶性污染物。通过在-20℃加入乙醇或加入乙酸钠(pH 6.5, 约 0.3M)以及 0.8 体积的 2-丙醇可以沉淀核酸。离心收集所沉淀的核酸，或对染色体 DNA，可用玻璃吸液管或其他探针卷出所沉淀的 DNA。训练有素的本领域人员将认识到上面所列举的方法仅仅是举例说明的，并且根据所分析的特殊类型的核酸，可以进行多种变更。

在特定的实施方案中，所分析的核酸可以是天然存在的 DNA 或 RNA 分子。事实上，所阐述的方法可以分析任何天然存在的核酸，包括不限于染色体、线粒体或叶绿体 DNA 或核糖体 RNA、转运 RNA、核不均一 RNA 或信使 RNA。用本领域已知的标准方法可以从原核或真核细胞中获得核酸。同样的，例如用 PCRTM 或其他已知的扩增方法或通过制备含有相关核酸的文库例如 BAC、YAC、粘粒、质粒或噬菌体文库可以人工制备相关核酸。(见例如 Berger and Kimmel, 1987; Sambrook

etal., 1989.)。对于分析而言,核酸的来源并不重要的,预计在本发明的范围内,事实上可以分析任何来源的核酸。

### 核酸扩增

在特殊的实施方案中,可以首先扩增被分析的用于筛选的核酸-增加信号强度。根据标准的方法学,可以从生物学标本所含的细胞内分离到用作为扩增模板的核酸序列(例如骨骼肌的 DNA 或 mRNA)。核酸可以是基因组 DNA 或被分段的或完整的细胞 RNA。如果所用的是 RNA,需要将 RNA 转化为互补的 cDNA。在一个实施方案中, RNA 是完整的细胞 RNA 并被直接用作为扩增的模板。在一个实例中,通过扩增(例如通过 PCR) ACTN3 的多核苷酸序列或更优选的它的包括 1747 C>T SNP 的片段(例如外显子 16),并测序扩增产物或测定在扩增产物中是否存在 1747 C>T SNP。在另一个实例中,已知 577X 等位基因含有 DdeI 限制性位点,通过 DdeI 消化扩增产物以及对消化产物的大小分级(例如通过凝胶电泳)可容易测定到该基因。产物的大小可用于基因分型个体的 ACTN3 位点。各种形式的扩增在本领域是熟知的,并且可以使用任何一种已知的方法。一般地,扩增包括使用一种或多种与所扩增的靶核酸序列选择性或特异性杂交的引物。

### 引物

在此所定义的术语引物意思是包括任何一种在模板依赖过程中能引导新核酸合成的核酸。引物通常是长度从 10 到 20 个碱基对的寡核苷酸,但是可以采用更长的序列。引物可以是双链或单链形式,尽管单链形式是优选的。引物设计的方法在本领域是熟知的,依据从标准的沃森-克里克碱基配对中所得到的互补序列进行设计(即腺嘌呤与胸腺嘧啶或尿嘧啶结合,以及鸟嘌呤与胞嘧啶结合)。从本领域人员熟知的商业和/或公共渠道可得到选择和设计扩增引物的计算机程序。在下面的实施例中

提供了用于测定运动性能的遗传学变异的预测物例如 ACTN 的 1747 C>T SNP 的特殊引物序列。本领域人员将认识到所提供的特殊序列只是举例说明的以及在实践权利要求的方法中可以使用其他的引物和/或探针序列。

### 扩增方法

有多种模板依赖性方法可以扩增在给定的标本中所存在的标记序列。其中一个最熟知的扩增方法是聚合酶链反应(称为 PCR), 美国专利 Nos. 4,683, 195、4, 683,202 和 4,800, 159 对此有详细描述。

本发明的一个实施方案可以包括从一个个体中得到适合的标本并测定特异的信使 RNA, 例如 ACTN3 mRNA。本发明所用的示例性标本是肌肉组织标本(例如, 肌肉组织活检, 例如打孔活检)。一旦得到组织标本, 可以制备标本用于用标准技术(例如单细胞分离、外膜消化、mRNA 的寡 dT 分离等)分离核酸。也可以用本领域已知的试剂盒进行 mRNA 的分离(Pierce, AP Biotech 等)。为了定量所扩增的 mRNA 的量, 可以进行逆转录酶 PCR 扩增方法。将 RNA 逆转录为 cDNA 的方法是熟知的并被描述于 Sambrook et al., 1989。其他的用于逆转录的方法利用了热稳定的 DNA 聚合酶。在 1990 年 12 月 21 日提交的 WO 90/07641 中描述了这些方法。

用于扩增核酸的另一个方法是连接酶链反应(“LCR”), 欧洲申请 No. 320 308 公开了该方法。在 LCR 中, 制备两个互补的探针对, 当存在靶序列时, 每对都将与靶序列的反向互补链结合, 使得它们被连接。当存在连接酶时, 两个探针对会连接形成单一单元。和 PCR 一样, 通过温度循环, 从靶序列中脱离出结合连接的单元, 然后作用为连接过多探针对的“靶序列”。美国专利 4,883,750 描述了一种与 LCR 相似的将探针对与靶序列结合的方法。

在 PCT 申请 No.PCT/US87/00880 中所描述的 Qbeta 复制酶也可被用作为本发明的另一种扩增方法。在该方法中，当存在 RNA 聚合酶时，将具有靶序列的互补区域的 RNA 的可复制序列加入到标本中。聚合酶将复制可被测定的可复制序列。

等温扩增方法也可用于扩增本发明的核酸，其中用限制性内切酶和连接酶实现在限制性位点的一条链上含有 5'-[ $\alpha$ -硫]-三磷酸核苷的靶分子的扩增。(Walker et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 89: 392-396,1992)。

链置换扩增(SDA)是另一种进行核酸等温扩增的方法，它包括多轮的链取代和合成，即缺口转译。一种与之相似的方法是修复链反应(RCR)，包括将在整个靶向扩增的区域内的一些探针退火，紧接着是修复反应，其中只存在四种碱基中的两种碱基，所添加的其他的两种碱基可以是容易检测到的生物素化的衍生物。在 SDA 中使用了相似的方法。也可用循环探针反应(CPR)检测靶向特异序列。在 CPR 中，具有非特异 DNA 的 3'和 5'序列以及特异 RNA 的中间序列的探针与标本中所具有的 DNA 杂交。杂交后，紧接着 RNA 酶 H 处理反应物，所鉴定的探针产物是消化后所释放出的特征性产物。原始模板退火为另一个循环探针并重复反应。

在本发明中可用在 GB 申请 No. 2 202 328 和 PCT 申请 No.PCT/US89/01025 中所描述的其他扩增方法。在前一个申请中，“修饰的”引物被用于 PCR 样、模板和酶依赖性合成。可以用捕获基团(例如生物素)和/或检测基团(例如酶)标记修饰引物。在后一个申请中，将过量的标记探针加入到标本中。当存在靶序列时，探针结合靶序列并被催化降解。在降解后，靶序列被完整地释放并被过量探针结合。标记探针的降解表示着靶序列的存在。

其他核酸扩增方法包括基于转录的扩增体系(TAS)，包括核酸序列依赖的扩增(NASBA)和 3SR。Kwoh et al., Proc.Nat7 Acad. Sci. USA 86: 1173 (1989); Gingeras e tal., PCT 申请 WO 88/10315。在 NASBA 中，用

标准的苯酚/氯仿提取、临床标本的热变性、裂解缓冲液的处理以及用于分离 DNA 和 RNA 的 Minispin 柱或 RNA 的盐酸胍提取可以制备核酸。这些扩增技术包括退火具有靶向特异序列的引物。聚合后，用 RNA 酶 H 消化 DNA/RNA 杂合体，同时将双链 DNA 分子再次热变性。在每种情况中，通过加入第二种靶向特异引物将单链 DNA 完全双链化，随后聚合。然后用例如 T7 或 SP6 的聚合酶多次转录双链 DNA 分子。在等温循环反应中，RNA 被逆转录为双链 DNA，用例如 T7 或 SP6 的聚合酶再次转录。所形成的无论是被截断或完整的产物都提示靶向特异序列。

Davey 等欧洲申请 No. 329 822 公开了一种核酸扩增方法包括循环合成单链 RNA(“ssRNA”)、ssDNA 和双链 DNA(dsDNA)，本发明可使用此方法。ssRNA 是第一个引物寡核苷酸的第一个模板，用逆转录酶(RNA 依赖性 DNA 聚合酶)将其延伸。然后，通过核糖核酸酶 H(RNA 酶 H，一种特异于 DNA 或 RNA 双链体中的 RNA 的 RNA 酶)的活性从所得到的 DNA:RNA 双链体中去除 RNA。所形成的 ssDNA 是第二个引物的第二个模板，引物也包括 RNA 聚合酶启动子的序列(例如是 T7 RNA 聚合酶)以及 5'端与模板同源。用 DNA 聚合酶(例如是大肠杆菌 DNA 聚合酶 1 的大“Klenow”片段)延伸引物，生成具有与引物之间的原始 RNA 序列相同的序列以及在另一末端具有附加的启动子序列的双链 DNA(“dsDNA”)分子。该启动子序列可被合适的 RNA 聚合酶用于生产 DNA 的多个 RNA 拷贝。然后这些拷贝重新进入引起极快速扩增的循环。在正确选择酶后，可以等温地进行该扩增而在每个循环中都不需添加酶。因为该方法的循环性能，所选的起始序列可以是 DNA 或 RNA 形式。

Miller 等 PCT 申请 WO 89/06700 公开了一种核酸序列扩增方案，它根据启动子/引物序列与靶向单链 DNA(“ssDNA”)的杂交，紧接着是序列的多个 RNA 拷贝的转录。这个方案不是循环的，即所形成的 RNA 转录物不能生成新的模板。其他扩增方法包括“竞争”和“单侧 PCR”Frohman,

M. A., In:PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Academic Press, N. Y. (1990) 和 Ohara et al., Proc.NatZ Acad. Sci USA, 86: 5673-5677 (1989)。

在本发明的扩增步骤中也可以使用方法，方法根据存在具有所形成的“双寡核苷酸”序列的核酸时的两个(或多个)寡核苷酸的连接，并籍此扩增双寡核苷酸。(例如 Wu et al., Genomics 4: 560 1989)。

### 分离方法

在扩增之后，为了确定是否发生了特异性扩增的目的，可能需要将扩增产物从模板和过量引物中分离出来。在一个实施方案中，利用标准方法通过琼糖脂、琼糖脂-丙稀酰胺、或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物。(例如 Sambrook et al., 1989)。另外，可以采用色谱技术实现分离。本发明可以使用多种类型的色谱(Freifelder, 1982))。

### 鉴定方法

各种检测核酸序列变异体的方法在本领域是已知的，并且可以使用任何一种已知的方法。在一个实施方案中，检测可以是通过 Southern 印迹和标记探针的杂交。在 Southern 印迹中所涉及的技术对于本领域人员是熟知的(例如，Sambrook et al., 1989)。简言之，用凝胶电泳分离扩增产物。然后将凝胶与膜接触，例如硝酸纤维素膜，使得核酸转移并非共价结合到膜上。随后，将膜与能与靶向扩增产物杂交的结合有发光团的探针孵育。通过将膜暴露于 x 射线平片或离子发射检测装置完成检测。在美国专利 No. 5,279,721 中描述了上述的一个实例，它显示了一种用于自动化电泳和核酸转移的设备和方法。设备可以在不外处理凝胶下进行电泳和印迹，并适合于进行本发明的方法。

从不同的渠道例如 Third Wave、Pyrosequencing、Applied Biosystems、Affymetrix、Sequenom、Nanogen 等等可以商业化获得检测

核酸序列的方法和设备，任何一种商业化体系都可以被用于检测 ACTN3 或其他性能相关的基因中的序列变异。

## 蛋白和多肽

在特定的实施方案中，所阐述的方法可以包括检测和/或定量筛选标本中的特异蛋白(例如 ACTN3)的量。为了方便起见，在此可相替换地使用术语“蛋白”、“多肽”、和“肽”。尽管本领域已知有多种蛋白定量方法且都可以使用，但是基于抗体的检测法，例如 ELISA 对于蛋白定量是特别有用的。本领域人员将认识到以下的讨论只是举例说明的并且可以使用任何已知的蛋白鉴定/定量技术。

在特定的实施方案中，可以分离或纯化蛋白或多肽。本领域人员熟知蛋白纯化技术。在一个水平上，这些技术包括将细胞、组织或器官匀浆化并分段分离成多肽和非多肽片段。用色谱和电泳技术进一步纯化相关蛋白或多肽，以实现部分或完全纯化(或均一纯化)。特别适合于制备纯肽的分析方法是离子交换色谱法、凝胶排除色谱法、HPLC(高效液相色谱法)、FPLC (AP Biotech)、聚丙烯酰胺凝胶电泳、亲和色谱法、免疫亲和色谱法和等电聚焦法。在美国专利 No. 5,206,347 中公开了一种用亲和色谱纯化受体蛋白的实例，在此将其全部内容一同并入参考。其中一个更为有效的纯化肽的方法是快速蛋白液相色谱法(AKTA FPLC)或甚至 HPLC。

纯化的蛋白或肽被称为一种组分，它与其他成分分离的，其中蛋白或肽被纯化到相对于它的天然获得状态来说的任何一种程度。因此，分离的或纯化的蛋白或肽也被称为一种游离于它所天然存在的环境的蛋白或肽。一般的，“纯化的”指的是已经被级分分离并去除各种其他成分的蛋白或肽组分，以及这些组分基本上保留了它所表达的生物学活性。在使用术语“基本上纯化的”时，该术语指的是一种组合物，其中蛋白或

肽形成该组合物的主要成分，例如组合物中含有约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 95%或更多蛋白。

在特定的实施方案中，所阐述的方法可以包括纯化一种或多种蛋白或肽。当纯化蛋白或 DNA 标本时，可以用磁珠分离分子，随后鉴定或定量标本中的分子的量。本领域人员已知这些技术。

## 抗体

在特定的实施方案中，可能需要制备抗相关特殊蛋白或肽(例如 ACTN3)的抗体。合适的蛋白或它的一部分可以与一个或多个试剂共轭或化学连接，以增强它们的免疫原性，这一点在本领域是熟知的。优选的试剂是载体如钥孔戚血蓝素(KLH)或牛血清白蛋白(BSA)。

在一个实施方案中，利用一种或多种对所有或部分靶蛋白(例如 ACTN3)和特异抗体或它的片段(例如 Fab 片段或重组抗体片段例如 scFv)的特异抗体通过 Western 印迹或免疫细胞化学可以检测靶蛋白。可以使用的抗体的一个实例是抗 ACTN3 抗体(如在 North, K. N. et al., *Neuromuscular Disorders*, 6,229-235, 1996 中所阐述的一样)。在另一个实施方案中，通过从个体得到标本(例如肌肉活检)并将标本暴露于一种或多种抗靶蛋白的抗体，可以检测出靶蛋白的水平。

术语“抗体”在此指的是任何一种具有抗原结合区域的抗体样分子，并包括抗体片段例如 Fab'、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、单区抗体(DAB)、Fv、scFv (单链 Fv)等等。用于制备并使用各种基于抗体的构建体和片段的技术在本领域是熟知的。用于制备和定量抗体的方法在本领域也是熟知的(见，例如 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; 在此一同并入参考)。

## ELISA

在特定的优选的实施方案中，用各种类型的本领域已知的酶联免疫吸附测定法(ELISA)或放射免疫测定法(RIA)可以测定相关蛋白的量。利用组织切片的免疫组化检测也是特别有用的。但是，显而易见的是检测并不限于这些技术，Western 印迹、点印迹、FACS 分析等等也可以使用。

在一个示例性的 ELISA 中，将与靶蛋白(例如 ACTN3)结合的抗体固定到所选定的具有抗体亲和性的表面上，例如微滴定板的孔。将怀疑含有蛋白或蛋白的一部分的测试组合物导入到孔内。在结合并洗涤去除非特异结合的免疫复合物后，可以检测结合抗原(相关蛋白)。通常通过加入特异于靶蛋白的连接有可检测标记的第二抗体完成检测。这种类型的 ELISA 是“三明治 ELISA”。也可以通过添加第二抗体、之后添加具有与第二抗体的结合亲和力的连接有可检测标记的第三抗体完成检测。

在另一个示例性 ELISA 中，将怀疑含有蛋白(抗原)的标本固定到孔表面，然后与本发明的抗体接触。在结合并洗涤去除非特异性结合的免疫复合物后，检测被结合的抗原。如果初始抗体连接有可检测标记，则可以直接检测免疫复合物。同样，用具有与第一抗体的结合亲和力的第二抗体可以检测免疫复合物，其中第二抗体连接有可检测标记。

另一个其中蛋白或肽被固定的 ELISA 包括在检测中应用抗体竞争。在该 ELISA 中，标记抗体被加入到孔中，可以与靶蛋白结合，并通过它们的标记来检测。然后通过在与包被的孔孵育之前或期间将标本与标记抗体混和可以测定出靶抗原在未知标本中的量。标本中所存在的靶抗原作用为减少可与孔结合的抗体的量并因此减弱最终的信号。这方法适用于检测未知标本中的抗体，其中未标记抗体与抗原包被的孔结合，也减少了可与标记抗体结合的抗原的量。

在用抗原或抗体包被板时，通常要用抗原或抗体溶液孵育板的孔过夜或一个特定的时间段。然后洗涤板的孔去除未完全吸附的材料。然后用对测试的抗血清为抗原中性的非特异蛋白“包被的”孔的任何剩余表

面。这些蛋白包括牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或奶粉溶液。包被层可以阻断固定表面上的非特异性吸附位点，并因此减少抗血清与表面的非特异性结合所形成的背景。

在 ELISA 中，比直接操作更常用的是使用二级或三级检测。因此，在蛋白或抗体与孔结合，用无反应材料包被以减弱背景，以及洗涤去除未结合的材料后，在能有效地形成免疫复合物(抗原/抗体)的条件下将所测定的对照生物学标本与固定的表面接触。然后对免疫复合物的检测需要标记的第二结合配体或抗体、或与标记的第三抗体或第三结合配体共轭连接的第二结合配体或抗体。

“在能有效地形成免疫复合物(抗原/抗体)的条件下”意思是条件优选地包括用例如 BSA、牛丙种球蛋白(BGG)和磷酸缓冲液(PBS)/Tween 稀释抗原和抗体。这些添加的试剂也能有助于减弱非特异的背景。

“适合的”条件指的是孵育是在足以发生有效结合的温度和时间段下进行。孵育步骤通常是在优选的温度 25°C 到 27°C 时，为约 1 到 2 到 4 个小时，或可以在约 4°C 左右下过夜。

在 ELISA 的所有孵育步骤之后，洗涤接触表面以去除未复合的材料。一个优选的洗涤步骤包括用例如 PBS/Tween、或硼酸缓冲液洗涤。在测试标本和原始结合材料之间形成特异的免疫复合物以及随后的洗涤后，可以测定出所存在的甚至微小量的免疫复合物。

为了提供检测手段，第二或第三抗体含有容许检测的相关标记。优选的，标记是在与适当的发光底物孵育时能产生颜色的酶。因此，例如，需要将第一或第二免疫复合物与尿素酶、葡萄糖氧化酶、碱性磷酸酶或氢过氧化物酶共轭连接的抗体接触并孵育一段时间，孵育条件是有利于发生进一步的免疫复合物形成的条件(例如在室温下，在含 PBS 溶液例如 PBS-Tween 中孵育 2 个小时)。

在与标记抗体孵育以及随后的洗涤去除未结合的物质后，定量标记的量，例如当过氧化物酶作为酶标记时，通过与发光底物例如尿素和溴

甲酚紫或 2,2-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(2,2'-azido-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid [ABTS])和  $H_2O_2$  的孵育。然后通过测定产生颜色的程度(例如用可见光谱分光光度计)实现定量。

## 试剂盒

仍在其他的实施方案中,本发明涉及检测试剂盒,用于检测核酸或应用上述的免疫检测方法。根据所应用的检测类型,试剂盒可以包括一种或多种用于扩增靶核酸序列的引物对、一种或多种探针例如用于检测遗传学变异的标记探针、以及一种或多种确认扩增和/或探针结合条件的对照靶序列。对照可以包括,例如 ACTN3 的每个 1747 C>T 等位基因的特异靶序列。探针也可以与 1747 C>T 等位基因特异性杂交。也可以包括所用的各种试剂,例如缓冲液、核苷酸和聚合酶。

在用于免疫测定蛋白的试剂盒中,在适当容器形式中的免疫检测试剂盒可以包括一种靶蛋白或肽、或与靶蛋白或肽结合的第一抗体、以及免疫检测试剂。试剂盒可以包括特异于靶蛋白或肽的第一抗体和特异于第一抗体的标记的第二抗体。同样的,试剂盒可以包括特异于或选择性地针对于相关蛋白的第一和第二抗体,其中第二抗体被标记。同样的,第一和第二抗体可以是未标记的,可以包括特异于第二抗体的第三抗体。也可以包括其他标准的试剂例如缓冲液和各种用于形成标记抗体的底物和试剂。

试剂盒的容器形式通常可以包括至少一个玻璃瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其他容器形式,其中可以放入标本,并且优选的是可被分量的。当提供有第二或第三结合配体或其他附加成分时,试剂盒也通常包括第二、第三或其他的附加容器,其中可以放置该配体或成分。这些试剂盒可以包括注射液或固定所需的玻璃瓶的吹塑的塑料容器。

## 性能测试

在特定的实施方案中，除了 ACTN3 检测外，所用的筛选方法可以包括一种或多种基于性能测试。这些性能测试可以与例如 ACTN3 SNP 测定或 ACTN3 蛋白或 mRNA 检测联合使用。下面讨论了各种示例性性能测试。本领域人员要认识到这些实例并不受限定并可以使用本领域任一已知的性能检测法。

#### VO<sub>2</sub> 最大值测定

VO<sub>2</sub> 最大值测定提供给运动员对他们的生理潜能的直接测定。本领域熟知的方法可以测定在强运动的条件下最大的氧消耗率。数据包括需氧和无氧阈值、心率和速度、通气参数、最大心率和心率带。

#### 无氧阈值测定(血乳酸和通气)

无氧阈值指的是乳酸合成等于清除的运动点。根据适应性、技术和经验，该强度等于 60-120 分钟跑或骑车。通过同时测定通气以及血乳酸水平可以进行该测定。尽管通气和血乳酸方法生成了非常相似的结果，但是它们都能准确地确定出无氧阈值。该测定所提供的信息包括血乳酸阈值和通气阈值、无氧阈值时的心率以及无氧阈值时的速度(跑步)或功率(骑车)。

#### 无氧力量和能力测定(Wingate 测定)

Wingate 测试测定了小腿力量和能力，这是为力量型运动的运动员所设计的。该测试是在踏车测力仪上全力踏车 30 秒，测定峰值力量以及耐疲劳的能力。从 Wingate 测试中所收集到的数据包括：(30 秒测试)峰值力量(瓦特)、绝对的、相对的和疲劳指数(在 30 秒测试中力量减弱的有多快)和做功(焦耳)(能量消耗)。

#### 临界力量(Critical Power, CP)

CP 测试的目的是确定出运动员能保持一段给定的时间或距离的最佳做功负荷。最常用的 CP 测试可以包括 CP(60-180 秒)、时帧依赖于运动类型、以及 CP 时间试验。

#### 静息代谢率(RMR)

RMR 也指的是静息能量消耗量(REE)。这是测定个体每天所需用的最少量热卡(Kcal)的无创方法。RMR 越高,个体所燃烧的热卡就越多。通过 O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 的吸入和呼出可以直接测定出结果。一个测试方案包括无食物或酒精 12 个小时、无刺激物例如咖啡 24 个小时以及无运动 24-36 个小时。通常建议在清晨进行测试。当个体在静息状态平躺时,将其与代谢测定仪连接 30 分钟。在测试期间,个体通过口罩和适合的管路呼吸到代谢测定仪中。在完成测试时,收集以下信息:代谢率(RMR)-Kcal/天、呼吸频率(RR)、呼吸交换率(RER)、静息时的通气和心率、静息时所消化的糖和脂肪百分比。

#### 速度/力量测定

速度/力量测定包括最常见的三个测试:跑步速度:红外线计时灯(5-50 米);垂直跳和腿部力量:Vertec 设备;以及灵活性测试:标准的和运动特异的。这些测试有助于分析个体在例如力量运动方面的能力。

#### 韧力/灵活性测定

韧力/灵活性测定通常包括 RM(静息肌肉)力量:下蹲、坐位、上举、压腿;肌肉耐力:特殊重量上反复重复;Olympic 上举:挺举、抓举、Power Cleans、高抓;灵活性:标准的和运动特异的和腹部及下背部韧力。

#### 身体组成

身体组成测试可以包括 Harpenden 皮肤皱褶测径器测试(捏起身体一些部位的皮肤例如手臂下、臀部等)并评估身体脂肪百分比以及评估瘦肉含量和脂肪含量。另一种方法包括在深呼气后浸入水箱的水中。通过测定水置换的特殊测定装置测定身体脂肪。

#### 方法的适用性

所阐述的方法是特别适用于预测白种人个体在短距离竞赛/力量型运动和项目上的运动性能,方法也可适用于任何其他的通常表现出高频率

(即优选的至少 5%、更优选的至少 10%、以及最优选的至少 15%)的 577XX 基因型的人种。在分析了多个白种人和一些其他人种组后,如果个体运动员例如祖鲁人和某些白种女人缺乏无效基因型,说明这与成为短距离竞赛/力量型杰出运动员对耐力型运动员的潜能相关。例如,无效基因型常见于惯于久坐的美洲人(29%)、亚洲人(25%)、白种欧洲人(20%)、PNG 高地人(15%)、非洲裔美国人(13%)以及土著澳大利亚人(10%)。

天才搜索计划可以利用本发明的方法本身或联合利用通过其他与运动性能相关的基因将个体基因分型的相似方法。可以与所阐述的方法联合使用的其他方法是依据性能数据和表型预测值(例如高度和构造)等等。因此,可用本发明的方法的结果选择或至少有助于选择具有杰出运动员潜能的年轻个体和/或提供给年轻个体选择专门的运动类型的指导。

在另一个实施方案中,根据对预测个体的训练能力的遗传学因素的认识(例如 ACTN3 蛋白或 mRNA 的水平和/或 SNP 检测),可以为潜在的或现有的杰出运动员设计训练计划,使得他们有更多的成功机会。通过鉴定出最容易成功的训练类型,个体化的训练计划可能集中于特殊的天才(由遗传学组成所决定)。这有助于缩小在杰出水平上的成功和失败之间的微小差距,避免没有预期收益的过度训练所带来的不必要的疲劳(例如,遗传学潜能不在于此);减少资源浪费和过早的“耗尽”;以及可以强化个体运动员的长期目标和自我尊重。当因他/她不能实现成功而从计划中清除出具有杰出运动性能的个体时,那么时刻都在浪费资源。在个体水平上,这些个体所已经进行的努力和牺牲可能负向地影响他们的生活目标和自我尊重。在这些情形中,对遗传学组成的知识本身或联合于其他的预测因素可以有助于澄清为什么不能实现成功,以及将有助于指导个体制定更现实的生活目标,这可以包括更适合的运动。

因此,在一个实施方案中,为运动员制定出改进的训练计划,可以包括测定出运动员的靶基因的特异基因型(例如 ACTN3 基因型)。为潜在

的或现有的运动员发展训练计划的另一个实例可以包括联合一个或多个对靶分子的测试以及如前所述的其他性能评价测试并分析两个或多个测试的结果来制定计划。

## 实施例

### 实施例 1: 筛选杰出运动员的 ACTN3 无效(577XX)基因型

#### 材料和方法

通过在 Triton-X100 的细胞裂解和蛋白酶 K 的消化之后的苯酚: 氯仿的提取从杰出运动员库(108 位耐力运动员和 83 位短距离竞赛运动员)、88 位非洲祖鲁人和 152 位对照的澳大利亚白种人的血液中分离得到人基因组 DNA。从基因组 DNA 中扩增得到 ACTN3 的外显子 16。对应于外显子 16 的邻近内含子序列的引物为:

前向 5'CTGTTGCCTGTGGTAAGTGGG3' (SEQ ID NO : 1),

反向 5'TGGTCACAGTATGCAGGAGGG3' (SEQ ID NO : 2)。

引物的 PCR 反应循环是: 94°C 下 30 秒和 72°C 下 1 分钟, 以及在 94°C 下最后延伸 10 分钟共 35 个循环。通过在外显子 16 内存在(577X)或缺乏(577R)DdeI(C↓TNAG)限制性位点可以区分 R577X 等位基因(密码子相应地为 CGA 和 TGA)。577R(野生型)PCR 产物有 205bp 和 86bp 片段; 同时 577X PCR 产物有 108bp、97bp 和 86bp 片段。用 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并用溴化乙锭染色观察被消化的 PCR 片段。

#### 结果和讨论

表 2 显示了基因分型检测的结果。对杰出运动员进行 ACTN3 基因分型(即在耐力、速度和/或力量方面具有最高水平的个体)。与对照比较, 杰出的短距离竞赛运动员具有低频率的 ACTN3 无效突变 577XX(6%对对照白种人的 18%,  $p < 0.05$ ), 这与在祖鲁人群中所观察到的倾向相似。高速、高加速和高频率运动的 2 型肌纤维的产力能力, 以及个体适应于运动训练的能力, 所有的这些都显示是强烈地受遗传学影

响的，认为 ACTN3 基因型可能是影响正常人群中的肌肉功能的正常变异的因素。根据这些结果，ACTN3 基因分型在选择或至少有助于选择具有杰出运动员潜能的年轻个体上表现出相当的潜能。

## 实施例 2

### 方法

通过用 Mills 等(2001)所描述的基因分型的方法学将来自三个不同来源(150 位献血员、71 位参与无关研究的健康儿童、以及 215 位参与澳大利亚运动研究所的天才鉴定计划的健康成人)的 436 位无关的白种人对照基因分型。已知的性别分布是 292 位女性对照和 134 位男性对照。将来自 14 种不同运动的 429 位白种人运动员基因分型。为了实施例的目的，如果运动员代表澳大利亚参加了各自运动项目的国际比赛，他们就被认为是“杰出的”；50 位运动员参加了奥运会的比赛。

假定 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 定位于快骨骼肌纤维，假设 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 的缺失将削弱在短距离竞赛/力量项目上的性能，那么这在杰出的短距离竞赛运动员中将是更少见的。为了验证整个假说，分析了 107 位杰出运动员(72 位男性和 35 位女性)亚组的基因分型，他们先前被分类为专业短距离竞赛/力量运动员，并对基因分型的结果不知情。这个组包括 46 位参加 800m 项目的径赛运动员、42 位参加 200m 项目的游泳运动员、9 位柔道运动员、7 位短距离径赛自行车运动员、以及 3 位速滑运动员。为了对比，一个 194 位运动员的亚组(122 位男性和 72 位女性)被单独分类为专业耐力运动员并分析，它包括 77 位长距离自行车运动员、77 位划船运动员、18 位参加超过 400m 距离项目的游泳运动员、15 位参加 5,000m 项目的径赛运动员、以及 7 位越野滑雪运动员。32 位短距离竞赛运动员(25 位男性和 7 位女性)以及 18 位耐力运动员(12 位男性和 6 位女性)已经参加了奥运会水平的比赛。因为严格的分类标准，128 位杰出运

动员不能被准确地分到短距离竞赛/力量或耐力组，因此在随后的分析中将其排除。

为了测定运动员和对照组之间的 ACTN3 等位基因的均一性以及基因分型频率，使用了 Huttley 和 Wilson (2000)所描述的应用统计程序语言 R(1.6.2 版)的对数线性模型，通过使用数据包(J. Maindonald 设计的，available from The R Project for Statistical Computing Web site)。利用用于运动员和对照之间比较的基因型数目估测出“ $X_2$ ”值。三个对照组(150 位献血员、71 位健康儿童和 215 位健康成人)的基因分型资料彼此之间没有显著差异( $\chi^2=0.19$ ;  $P=0.996$ )，与既往被基因分型的 107 位欧洲白种人的组(Mills et al. 2001)之间也没有显著差异，说明对照组内的基因型频率是更广泛的白种人群的代表。ACTN3 基因型频率在男性和女性对照之间没有显著差异，以及总体而言，与 Hardy-Weinberg (H-W)平衡没有显著差异。

在表 2 和图 1 中概述了对照、短距离竞赛/力量、和耐力组的 ACTN3 基因分型的数据。在作为整体的杰出运动员组和对照组之间没有显著的等位基因或基因型频率的差异。但是，当运动员被分成短距离竞赛/力量和耐力组并与对照比较时，发现了等位基因频率变异的有力证据( $\chi^2_{[df=5]} = 23$ ;  $P<0.001$ )。在杰出运动员和对照男性( $\chi^2_{[df=1]} = 14.8$ ;  $P<0.001$ )和女性( $\chi^2_{[df=1]} = 7.2$ ;  $P<0.01$ )之间都有显著的等位基因频率差异。与对照比较，短距离竞赛运动员有着更低频率的 577XX( $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 无效)基因型(6%对 18%)，以及没有一个女性杰出短距离运动员或短距离竞赛奥运会运动员是 577XX。短距离竞赛运动员组也有更高频率的 577RR 基因型(50%对 30%)，以及更低频率的杂合的 577RX 基因型(45%对 52%)。杰出的耐力运动员的 577XX 基因型的频率(24%)比对照(18%)稍高。更重要的是，短距离竞赛和耐力运动员的等位基因频率在相反的方向偏离，并且在男性( $\chi^2_{[df=1]} = 13.3$ ;  $P<0.001$ )和女性( $\chi^2_{[df=1]} = 5.8$ ;  $P<0.05$ )

上都有着显著差异。两个组之间的差异有效地消除了彼此的偏离，这可以解释当整个杰出运动员组与对照组比较时相关性的缺乏。

总而言之，也有等位基因频率差异( $\chi^2_{[df=5]} = 16.7; P < 0.01$ )所不能解释的基因型变异的证据。这说明尽管总的没有偏离 H-W 平衡的证据，但是存在着组间的 H-W 失衡系数的变异。这个作用被限定于女性短距离竞赛运动员( $\chi^2_{[df=1]} = 7.4; P < 0.01$ )和耐力运动员( $\chi^2_{[df=1]} = 6.0; P < 0.05$ )，有着比 H-W 平衡所预期的更多的杂合的女性短距离竞赛运动员(20 对 15)，以及比预期的杂合的女性耐力运动员更少的女性运动员(25 对 36)。女性短距离竞赛运动员和耐力运动员之间的等位基因频率非依赖性的基因型差异是非常明显的( $\chi^2_{[df=1]} = 13.8; P < 0.001$ )。在男性中没有见到这样的结果，说明 ACTN3 基因型对性能的作用在男性和女性之间是不同的。

这些发现说明 ACTN3 577R 等位基因为力量和短距离竞赛活动提供了好处。在样本中没有一个杰出的女性短距离竞赛运动员是 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 缺乏的(比较于男性的 8%)。在男性中，对训练的肾上腺素激素反应可能对改善性能起到了明显的作用，因此可能减弱了 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 对肌肉力量的作用。有趣的是，组中所有的男性奥运会力量型运动员都具有至少一个 ACTN3 的功能性 577R 等位基因的拷贝(与骨骼肌内存在 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 相关)，说明在最高水平的运动竞技中的“每个变量都是重要的”。尽管至少 73 个遗传学基因座已经与适应性和性能表型相关(Rankinen et al. 2002 "The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2001 update". Med Sci Sports Exerc 34: 1219-1233)，但是 ACTN3 是第一个已经被证实具有这种相关性的结构性骨骼肌基因。

$\alpha$ -辅肌动蛋白-3 可以促进快缩肌纤维的形成或改变适应于训练的葡萄糖代谢。另外， $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 可以被进化最佳化使得离心性肌肉收缩所造成的损伤最小化。快、糖酵解的肌纤维的 Z 线是对运动诱导的损

伤最为敏感的结构，该损伤导致了形态学损伤和相关蛋白的降解，包括 $\alpha$ -辅肌动蛋白(Friden and Lieber 2001,"Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fiber components Acta Physiol Scand 171: 321-326)。

如果 577XX 基因型增加了耐力性能以及 577R 等位基因表现出增强短距离竞赛的能力，那么在人群中可以保留 577R 和 577X 等位基因，因为他们都具有在不同环境条件下的选择优势并且他们因此都被平衡选择保持于高的人群频率。

### 实施例 3

图 1 显示了对照、杰出短距离竞赛/力量运动员、和耐力运动员的 ACTN3 基因型频率的直方图。与健康白种人对照比较，在杰出的白种人短距离竞赛运动员中，ACTN3 577XX 基因型(与 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 缺乏相关)的频率被显著地减少；值得注意的是，没有一个女性短距离竞赛或参加了奥运会比赛的短距离竞赛运动员(25 位男性和 7 位女性)是 $\alpha$ -辅肌动蛋白-3 缺乏的。相反的，在耐力运动员中有增加 577XX 基因型的倾向，尽管这种相关性只在女性中达到了统计学差异。误差值代表 95% CI。

本领域人员要认识到，只要不脱离被明确描述的发明的精神或范围，可以对在具体实施方案中所显示的发明进行多种变异和/或变更。因此本实施方案只是作为举例说明的而不是限制的。

本领域人员根据本申请公开的内容，不必进行过多的实验，即可制备和实施在此所和权利要求书中阐述的所有组合物、方法和设备。当以优选实施方案的形式阐述本发明的组合物和方法时，对本领域人员显而易见的是，只要不脱离发明的概念、精神和范围，可以对组合物、方法和设备以及在此所描述的方法的步骤或步骤的顺序进行变更。更具体

地，显而易见的是，某些化学和生理相关的物质可以取代在此所描述的物质，只要达到相同或相似的结果。所有的对本领域人员显而易见的是这些相似的取代和变更被认为是在附录的权利要求书所定义的本发明的精神、范围和概念内。

表 1、对照和杰出短距离竞赛/力量和耐力运动员的 ACTN3 基因型数目和频率(%)以及 ACTN3 等位基因频率(%)

分组 (n)	基因型数目(%)			等位基因频率(%)	
	RR	RX	XX	R	X
男性:					
对照 (134)	40 (30)	73(54)	21(16)	57	43
短距离竞赛 (72)	38 (53)	28 (39)	6 (8)	72	28
耐力 (122)	34 (28)	63(S2)	25 (20)	54	46
女性:					
对照 (292)	88 (30)	147(50)	57 (20)	55	45
短距离竞赛 (35)	15 (43)	20 (57)	0 (0)	71	29
耐力 (72)	26 (36)	25(35)	21 (29)	53	47
总计:					
对照 (436)	30 (30)	226(52)	80 (18)	56	44
短距离竞赛 (107)	53 (50)	48(45)	6 (6)	72	28
耐力 (194)	60 (31)	88(45)	46 (24)	54	46

表 2、白种人杰出运动员的 ACTN3 中的 R577X 的基因分型

力量	运动	ID	运动 研究所	总数	577RR (%)	577RX (%)	577XX (%)
耐力	划船	RT492	AIS	64	22 (34.4%)	28 (43.8%)	14 (21.8%)
		-					
		RT556					
耐力	三项全能	RT977	AIS	13	3 (23.1%)	8 (61.5%)	2 (15.4%)
		-					
		rut989					
耐力	自行车	RT990	AIS	9	4 (44.4%)	2 (22.2%)	3 (33.35)
		-					
		RT998					
耐力	径赛	KN246	AIS	22	7 (31.8%)	7 (31.8%)	8 (36.4%)
	自行车	-					
		KN275					
耐力	马拉松	KN310	AIS	1	0	0	1
耐力	上述总计		AIS	108	36 (33.3%)	45 (41.7%)	27 (25.0%)
短距离竞赛	游泳	RT901	AIS	45	17 (37.8%)	25 (55.6%)	3 (6.6%)
		-					
		RT108					
短距离竞赛	径赛	KN246	AIS	8	4 (50.0%)	3 (37.5%)	1 (12.5%)
	自行车	-					
		KN275					
短距离竞赛	田径	KN276	AIS	30	16 (53.3%)	13 (43.3%)	1 (3.3%)
		-					
		KN309					
短距离 竞赛	上述总计		AIS	83	37 (44.6%)	41 (49.4%)	5 (6.0%)
非洲祖鲁人				88	69 (78.4%)	18 (20.5%)	1 (1.1%)
澳大利亚白 人对照				152	46 (30.0%)	78 (52.0%)	28 (18%)

表 3、至今在 ACTN3 基因中所鉴定到的 SNP  
NCBI SNP 簇 ID

rs2229456  
rs2229455  
rs2229454  
rs2228325  
rs1126675  
rs7949754  
rs7924602  
rs5792393  
rs4990284  
rs4990283  
rs4013815  
rs3937320  
rs3837428  
rs3814736  
rs3814735  
rs3782080  
rs2511217  
rs2511216  
rs2509559  
rs2509558  
rs2305537  
rs2305534  
rs2290463  
rs2275998  
rs2096583  
rs2000939  
rs1 815739  
rs1791690  
rs1671064  
rs1188610  
rs679228

rs678397

rs677488

rs647476

rs647029

rs618838

rs607736

rs597626

rs544021

rs540874

rs538330

rs531490

rs509556

rs490998

rs13897

rs4576

rs1189338

rs1201433

rs640213

rs3737525

rs3178740

rs3180065

rs3180064

rs3180063

rs3867132

rs608504

rs610293

rs3825065

[www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref)

*TSC : The SNP Consortium website*

表 4、性能和健康相关的适应性表型的 2002 年人类基因图谱的核及线粒体基因的缩写、全名和细胞定位。

基因或基因座	名称	定位
<b>A B</b>		
ACADVL	脂酰辅酶 A 脱氢酶, 非常长链	17p13-p11
ACE	血管紧张素 I 转化酶	17q23
ADRA2A	$\alpha$ -2A-肾上腺素能受体	10q24-q26
ADRB1	肾上腺素能 $\beta$ -1-受体	10q24-q26
ADRB2	$\beta$ -2-肾上腺素能受体	5q31-q32
ADRB3	$\beta$ -3-肾上腺素能受体	8p12-p11.2
AGT	血管紧张素原	1q42-q43
ANG	血管生成因子, 核糖核酸酶, RNA 酶 A 家族,	514q11.1-q11.2
APOE	载脂蛋白 E1	9q13.2
ATPIA2	ATP 酶, Na/K 转运, $\alpha$ -2 多肽	1q21-q23
ATPIB1	ATP 酶, Na/K 转运, $\beta$ -1 多肽	1q22-q25
BDKRB2	缓激肽受体 B2	14q32.1-q32.2
<b>C D E F G</b>		
CAS02	隐钙素 2 (心肌)	1p13.3-p11
CFTR	囊性纤维化跨膜通道调节因子, ATP-结合盒 (亚家族 C, 成员 7)	7q31.2
CKM	肌酸激酶, 肌肉	19q13.2-q13.3
CNTF	睫状神经营养因子	11q12.2
CPT2	肉毒碱棕榈酰基转移酶	21p32
COL1A1	胶原, I 型, $\alpha$ 1	17q21.3-q22.1
EDN1	内皮素 1	6p24.1
EN03	烯醇酶 3, ( $\beta$ , 肌肉)	17pter-p11
FABP2	脂肪酸结合蛋白	24q28-q31
FGA	纤维蛋白原, A $\alpha$ 多肽	4q28
FGB	纤维蛋白原, B $\beta$ 多肽	4q28
GDF8(MSTN)	生长分化因子 8 (筒箭毒碱)	2q32.2
GNB3	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白), $\beta$ 多肽	312p13
<b>H I K L M</b>		
HLA-A	主要组织相容性复合物, I 型, A	6p21.3
HP	结合珠蛋白	16q22.1
IGF1	胰岛素样生长因子 1	12q22-q23
IGF2	胰岛素样生长因子 2	11p15.5
IL-6	白介素-6	
KCNQ1	K <sub>v</sub> 电压门控通道, KQT-样亚族, 成员 1	11p15.5
LDHA	乳酸脱氢酶 A	11p15.4
LPL	脂蛋白脂肪酶	8p22

MTCO1 细胞色素 C 氧化酶 I mtDNA 5904-7445  
 MTCO3 细胞色素 C 氧化酶 III mtDNA 9207-9990  
 MTCYB 细胞色素 b mtDNA 14747-15887  
 MTND1 NADH 脱氢酶 1 mtDNA 3307-4262  
 MTND4 NADH 脱氢酶 4 mtDNA 10760-12137  
 MTND5 NADH 脱氢酶 5 mtDNA 12337-14148  
 MTTE 转移 RNA, 线粒体的, 谷氨酸 mtDNA 14674-14742  
 MTTI 转移 RNA, 线粒体的, 异亮氨酸 mtDNA 4263-4331  
 MTTK 转移 RNA, 线粒体的, 赖氨酸 mtDNA 8295-8364  
 MTTL1 转移 RNA, 线粒体的, 亮氨酸 1 (UUR) mtDNA 3230-3304  
 MTTL2 转移 RNA, 线粒体的, 亮氨酸 2 (CUN) mtDNA 12266-12336  
 MTTM 转移 RNA, 线粒体的, 蛋氨酸 mtDNA 4402-4469  
 MTTT 转移 RNA, 线粒体的, 苏氨酸 mtDNA 15888-15953  
 MTTY 转移 RNA, 线粒体的, 酪氨酸 mtDNA 5826-5891  
 MyHC 肌动蛋白重链  
 N O P Q R S T U V  
 NOS3 一氧化氮合酶 3 (内皮细胞) 7q36  
 NPY 神经肽 Y 7p15.1  
 PAI1 纤溶酶原激活物抑制剂 1 7q21.3-q22  
 PFKM 磷酸果糖激酶, 肌肉 12q13.3  
 PGAM2 磷酸甘油酸变位酶 2 (肌肉) 7p13-p12  
 PGK1 磷酸甘油酸酯激酶 1 Xq13  
 PHKA1 磷酸化酶激酶,  $\alpha$ 1 (肌肉) Xq12-q13  
 PON1 Paraxonase 1 7q21.3  
 PPARA 过氧化物酶体增殖活化受体,  $\alpha$  22q13.31  
 PPARG 过氧化物酶体增殖活化受体,  $\gamma$  3p25  
 PYGM 磷酸化酶, 糖原, 肌肉 11q12-q13.2  
 RYR2 Ryanodine 受体 2 (心脏) 1q42.1-q43  
 SGCA Sarcoglycan,  $\alpha$  (50kDa 肌营养不良蛋白相关性糖蛋白) 17q21  
 S100A1 S100 钙结合蛋白 A1 1q21  
 SUR 磺酰脲受体 11p15.1  
 TGFB1 转化生长因子  $\beta$ 1 19q13.2  
 UCP2 解偶联蛋白 2 11q13  
 UCP3 解偶联蛋白 3 11q13  
 VDR 维生素 D (1,25-二羟维生素 D<sub>3</sub>)受体 12q12-q14

基因缩写、名称以及细胞定位来自 Locus Link 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>), 来自国立生物技术信息研究所(NCBI)。对于线粒体 DNA, 定位来自人线粒体基因组数据库(<http://www.mitomap.org>)。

表 5、耐力表型合案例对照研究(DNA 多态性)

基因	定位	运动员			N	对照		P
		N	运动	频率		N	频率	
ADRA2A	10q24-q26	140	耐力	6.7/6.7:0.77	141	6.7/6.7:0.62	0.037	
				6.7/6.3:0.21		6.7/6.3:0.34		
				6.3/6.3:0.02		6.3/6.3:0.04		
				6.7:0.88		6.7:0.8		0.011
				6.3:0.12		6.3:0.2		
ACE	17q23	64	耐力	II:0.30	118	II:0.18	0.03	
				ID:0.55		ID:0.51		
				DD:0.16		DD:0.32		
				I:0.57		I:0.43		0.02
		79	跑步	D:0.43	D:0.57			
				I:0.57	Ref. I:0.49	0.039		
		25	登山	D:0.43	Pop. D:0.51			
				NA	Ref. NA	0.02		
		60	杰出的运动员 (自行车跑步手球)		II:0.25	Ref. II:0.16	0.0009	
								ID:0.58
DD:0.17	DD:0.39							
I:0.54	I:0.38							
D:0.46	D:0.62							
56	杰出的游泳者 (103位游泳者的亚组)							II:0.15
ID:0.39	ID:0.49							
DD:0.46	DD:0.27							
I:0.34	I:0.48							
D:0.66	D:0.52							

参考文献: Perusse et al. 2003 "The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2002 update" Med. Sci. Sports Exerc. 35: 1248-1264.

表 6、ACTN3 577R/X 等位基因在人群中的基因型及等位基因频率。

人种组	染色体数目	基因型数目		相对等位基因 577X 频率
		RX	XX	
亚洲	56	14	7	0.50±0.07
日本人	96	28	12	0.54±0.05
土著美洲人	14	2	2	0.43±0.14
亚洲/美洲人	166	44	21	0.52±0.04
西班牙人	64	16	5	0.41±0.06
白种人	214	47	21	0.42±0.03
欧洲人	278	63	26	0.41±0.03
土著	174	33	9	0.290±0.03
澳大利亚人				
PNG 高地人	78	16	6	0.36±0.05
大洋州人	252	49	15	0.31±0.03
非洲裔美国人	90	12	6	0.270±0.05
非洲班图人	156	14	1	0.10±0.05
非洲人	246	56	7	0.16±0.05
未知	152	50	11	0.47
总计	1094	232	80	

---

<110> 遗传技术有限公司

<120> ACTN3 基因型筛选运动性能

<130> 005493.P024PCT

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ctggtgcctg tggtaagtgg g

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tggtcacagt atgcaggagg g

21

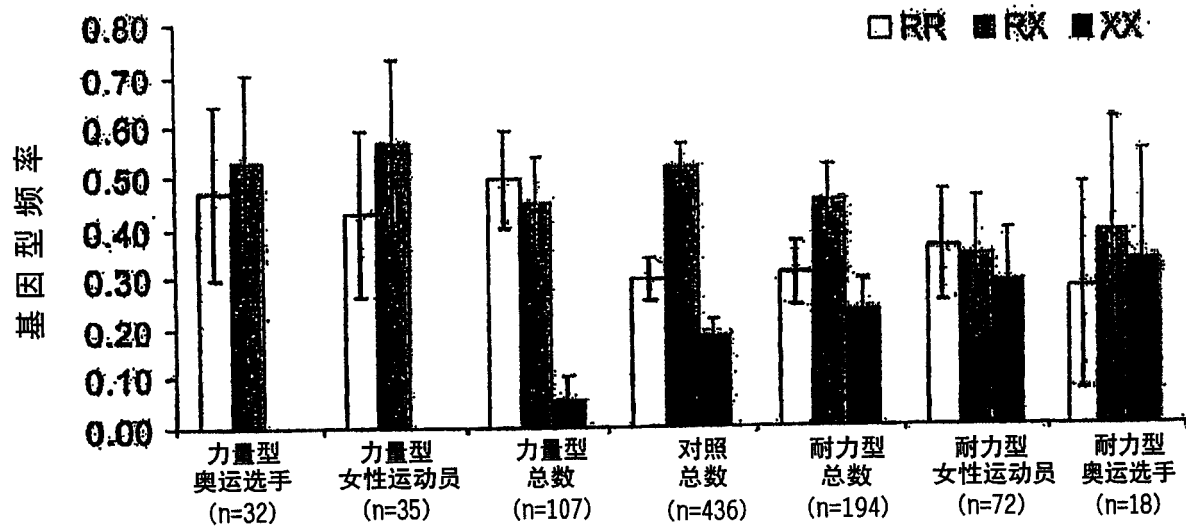


图1

专利名称(译)	ACTN3基因型筛选运动性能		
公开(公告)号	<a href="#">CN1732270A</a>	公开(公告)日	2006-02-08
申请号	CN03825166.3	申请日	2003-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	遗传技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	遗传技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	遗传技术有限公司		
[标]发明人	凯瑟琳南丝诺思		
发明人	凯瑟琳·南丝·诺思		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/12 A63B69/00 C12N15/09 G01N33/53 G06Q50/22		
CPC分类号	C12Q1/6888 C12Q2600/158 C12Q1/6876 G06Q50/22 C12Q2600/124 C12Q2600/156 G16H20/30 Y02A90/22		
代理人(译)	林晓红		
优先权	2002951411 2002-09-16 AU		
其他公开文献	CN1732270B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于为个体选择或匹配一种运动或运动项目(例如短距离赛跑/力量运动或耐力运动)以及用于预测运动性能的新方法,其包括评价ACTN3基因型。在另一个实施方案中,通过评价ACTN3基因型而为运动员优化设计训练计划。本发明的特定实施方案涉及将评价ACTN3基因型与其他已知的健康相关基因相结合来更好地评价个体的运动潜能。此外,可将ACTN3基因的基因型分析与生理学测试、物理测量和/或心理学评估相结合,以便为运动员个体设计更加优化的训练计划。

