

[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 200610057954.1

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)
A61P 25/20 (2006.01)
A61P 15/10 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 9 月 5 日

[11] 公开号 CN 101029336A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2006.3.1

[21] 申请号 200610057954.1

[71] 申请人 北京华安佛医药研究中心有限公司

地址 100026 北京市朝阳区甜水园街 6 号 707 室

共同申请人 安徽省生物医学研究所

[72] 发明人 刘平 王玉 洪秀梅 张善春
王滨燕 王燕 徐希平

权利要求书 3 页 说明书 14 页

[54] 发明名称

预测 5 - 羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种预测 5 - 羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒，含有下述组分：(1) 红细胞裂解液；(2) 白细胞裂解液；(3) 蛋白沉淀液；(4) 核酸储存液；(5) PCR 反应混合液(含 MgCl₂、dNTP、PCR 扩增引物和内标)；(6) DNA 聚合酶；(7) 阳性质控；(8) 阴性对照；(9) 内切酶缓冲体系；(10) 限制性内切酶；(11) PCR 用水；(12) 10 × 电泳上样缓冲液：0.25% 溴酚兰，40% (w/v) 蔗糖水溶液。本发明通过提取生物样品中的基因组 DNA，经过聚合酶链式反应 - 限制性酶切片多态性(PCR - RFLP) 分析方法，检测个体生物样品中 HTR1A 基因的多态性情况，预测 5 - 羟色胺再摄取抑制剂药物的作用效果。属于医药生物技术领域。

1. 一种预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒，含有下述组分：

(1) 红细胞裂解液： NH_4Cl ， KHCO_3 ，EDTA；

(2) 白细胞裂解液：蛋白酶 K、RNase A、NaCl、Tris、EDTA、SDS；

(3) 蛋白沉淀液：7.5M 乙酸胺 (pH 7.4)；

(4) 核酸储存液：1M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl, pH8.0)；

(5) 2× PCR 反应 混合液：1.0ml[100 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH8.3 (20° C)]；
5.0uM MgCl_2 ；各 0.4mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 无菌双蒸水配制, pH 7.0；HTR1A 基因的多态性位点基因型检测引物；

(6) Taq DNA 聚合酶 (5U/ul)；保存缓冲液：20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.5% NP40, 0.5% (v/v) Tween 20, 50% 甘油；

(7) 阳性质控：含有 HTR1A 基因的多态性位点杂合基因型个体全血标本，或者含有 HTR1A 基因的多态性位点杂合型的质粒；

(8) 阴性对照：经 DNAase I 处理的双蒸水；

(9) 内切酶缓冲体系 (10×)；

(10) 限制性内切酶；

(11) PCR 用水；

(12) 6×电泳上样缓冲液：0.25% 溴酚兰，40% (w/v) 蔗糖水溶液。

2. 如权利要求 1 所述的预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒，其特征在于：还可以进一步含有检测 HTR1A 基因的多态性位点基因型的特异性荧光探针序列。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的试剂盒，其特征在于：所述的 HTR1A 基因的多态性位点基因型至少包含选自 C1019G (rs6295)、C/T (rs878567)、A/G (rs6449693) 中的一个或者一个以上的多态性位点，优选为 C1019G (rs6295) 多态性位点。

4. 如权利要求 3 所述的试剂盒，其特征在于：所述的 HTR1A 基因的多态性位点基因型可以包含选自与上述多态性基因型位点存在连锁-不平衡的多态性位点，以及其他预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的基因多态性位点包括无义突变位点、错义突变位点以及位于基因内含子部位、基因调节部位的多态性位点。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的试剂盒，其特征在于：所述的 5-羟色胺再摄取抑制剂类

药物选自氟西汀、帕罗西汀、舍曲林、西酞普兰、氟伏沙明、左旋西酞普兰、万拉法新、米氮平、曲唑酮、度洛西汀、minacipran、噻奈普汀、氯米帕明、阿米替林、多虑平、多塞平、米帕明、丁螺环酮。

6. 如权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于：所述的 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物优选为选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物，选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物包括氟西汀、帕罗西汀、舍曲林、西酞普兰、氟伏沙明、左旋西酞普兰。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的试剂盒，其特征在于：所述的 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的作用效果包括抗抑郁症的疗效、起效时间、抗抑郁症伴发症状的疗效和性功能障碍的不良反应。

8. 如权利要求 7 所述的试剂盒，其特征在于：所述的抑郁症伴发症状包括抑郁症伴发的核心症状、抑郁症伴发的迟滞/躯体化症状、抑郁症伴发的睡眠症状、抑郁症伴发的精神焦虑症状和抑郁症伴发的躯体焦虑症状，尤其指抑郁症伴发的睡眠症状和抑郁症伴发的焦虑症状。

9. 如权利要求 1 或 2 所述的预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒，其特征在于：

(1) 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时，预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的疗效强；所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时，预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的疗效弱；

(2) 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时，预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的起效快；所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时，预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的起效慢；

(3) 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时，预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症伴发症状的疗效强；所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时，预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症伴发症状的疗效弱；

(4) 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时，预测应用 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物相关的性功能障碍的不良反应发生率较低；所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型

时，预测应用 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物相关的性功能障碍的不良反应发生率较高。

预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒

技术领域

本发明涉及一种预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒，属于医药生物技术领域。

背景技术

抑郁症是最常见的精神障碍之一，对于抑郁症的治疗，目前最常用的方法仍然是药物治疗。抗抑郁药效应主要与这类药物对 5-羟色胺（5-HT）和去甲肾上腺素（NE）系统的作用有关。抗抑郁药种类繁多，主要有以下几类：5-羟色胺再摄取抑制剂；去甲肾上腺素再摄取抑制剂；5-羟色胺/去甲肾上腺素双重再摄取抑制剂；三环抗抑郁药；其他环类抗抑郁药；单胺氧化酶抑制剂（经典/选择性）；其他无法归类的药物。5-羟色胺再摄取抑制剂中包括选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂（selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI）和同时作用于其他途径的抗抑郁药两类。SSRI 由于其药理活性的高度选择性，临床使用的安全性较好，不良反应较少。抗抑郁药的起效并非即刻性的，一般需要在服药 2~4 周方能出现实质性的临床改善，这给临床治疗选药，疗效判定和换用药物等带来严重的困难。同时，抗抑郁药在起效之前会由于其固有的药理学特性，带来一系列不良反应，包括加重失眠、焦虑、激越，甚至会由于抑郁症临床症状改善时间上的不一致导致一过性自杀危险增加。

目前在临床上最常应用的抗抑郁药是以氟西汀为代表的 SSRI 类药物包括氟西汀（fluoxetine）、帕罗西汀（paroxetine）、舍曲林（sertraline）、西酞普兰（citalopram）、氟伏沙明（fluvoxamine）和左旋西酞普兰（escitalopram）。SSRI 的主要作用机制是选择性阻断中枢 5-羟色胺（5-HT）神经元突触前膜 5-HT 的再摄取，进而升高突触间隙中可资利用的 5-HT 水平。长期用药过程中，在服药约 10~14 天左右，会出现某些 5-HT 受体密度/活性改变（如功能下调或上调）。这些受体功能在药物治疗过程中的变化，可能决定了抗抑郁治疗的效果。SSRI 类药物的抗抑郁有效率一般在 50%~70%。其主要不良反应包括：一过性焦虑、失眠、激越加重，胃肠道不良反应，性功能障碍等。由于抗抑郁药并非对于每个抑郁症病人都有良好的疗效，而且存在起效时间上的延搁，但在临床上医生仍只能凭经验选择药物，一般需要治疗观察至少 4~6 周后才能确定所选择药物的治疗是否有效，此后，对于疗效不好的病人再凭借经验换用第二个药物，再观察 4~6 周，所有实际上有大约 30%~40%的病人不能及时得

到最佳药物治疗，其后果是延误治疗时间，给病人带来痛苦，导致更多的不良反应，尤其可能因为抑郁症状没有较快较彻底地克服而加重病人的自杀危险性。

除 SSRI 类药物之外，还有一些抗抑郁药或具有抗抑郁作用的其他类药物的抗抑郁疗效也与其对 5-HT 再摄取的抑制作用或经由其他方式影响 5-HT 系统功能有关。这些药物包括（但不限于）：万拉法新（venlafaxine），米氮平（mirtazapine），曲唑酮（trazodone），度洛西汀（duloxetine），minacipran，tianeptine，氯米帕明（clomipramine），阿米替林（amitriptyline），多虑平（doxepine），多塞平（doxepine），米帕明（imipramine），丁螺环酮（buspirone）。

遗传背景不仅可能影响疾病的发生，而且影响药物疗效的个体差异。随着药物遗传学研究的不断深入和发展，在未来抑郁症的药物治疗中，将可能利用遗传学筛查方法，实现因人而异的个体化临床用药目标，有效避免不合理用药、错误用药乃至滥用药物倾向，减少用于治疗药物不良反应的费用，避免无效用药造成的浪费。

药物治疗的有效性和安全性极其重要，很多人在有效性方面属于无效用药，或者疗效较差；而在用药安全性方面，会出现各种不良反应、毒副作用甚至导致死亡。除外药物本身的原因以及患者的性别、年龄、其他疾病相互作用、妊娠、饮食状况和生活环境等，遗传因素在个体化医疗、特别是个体化用药方面起着极其重要的作用。临床上用于预测药物疗效的方法常常仅仅凭借医生的临床经验，严格遵守治疗指南，根据患者常规的临床检查和既往治疗，经验性地选择一种药物治疗，治疗一段时期之后，根据病情变化和相应的检查判断疗效，如果提示疗效不佳或副作用较大时才会考虑调整药物治疗，即改变药物剂量或者联合或更换其它药物治疗。这种预测方法具有明显的滞后性及盲目性，并且不能真正预测某一药物的疗效，更不能给医生选择药物提供准确的个体化信息。因此，基于目前临床药物疗效的预测方法，医生在用药时仍不能根据患者个体差异进行药物及其剂量的选择以及药物的配伍，不能迅速有效地控制或者治疗疾病并且降低或避免毒副作用的发生，而且不同程度地增加患者的痛苦和经济负担。

药物疗效和副作用的个体差异与遗传因素有关。药物遗传多态性表现为药物代谢酶的多态性、药物作用受体的多态性和药物靶标的多态性等。这些多态性的存在可能导致许多药物治疗中药效和不良反应的个体差异【Science, 2000; 287: 1977-1978】【J Clin Invest, 1994; 94: 1872-1882】。

药物基因组学是继人类基因组计划完成之后出现的功能基因组学研究的一个分支，是基于基因多态性的 DNA 检测手段，如对一些疾病相关基因的单核苷酸多态性（SNP）检测，或对特定药物具有敏感性或抵抗性的患病人群进行 SNP 检测，能够预测患者将对

某一特定的药物产生怎样的反应(疗效或副作用方面等),从而解决药物治疗的安全和有效两个问题,进而优选出最佳的治疗方法,指导医生为患者拟定个体化的给药方案;另外,还有助于减少临床用药不当,提高疗效,降低毒副作用,降低医疗费用,具有极高的社会效益和卫生经济学意义。

SNP 是指不同个体间在基因水平上的单核苷酸变异,平均每 1000 对碱基出现一个 SNP,两个无关个体间大约有 300 万个 SNP。SNP 在个体化用药上可谓是举足轻重。影响药物有效性的主要因素包括药物前体因代谢而激活,药物与靶细胞的结合能力,药物与药靶的结合和活性,活性药物被代谢、降解和排出;而安全性则取决于药物在体内的代谢、降解和排出环节以及药物在体内的非特异性结合和活性。不同个体在其中每一环节 SNP 的不同,最终都可能会造成对同一药物反应的差异,有时由于这种个体间遗传学上的差别,同一药物在不同个体内的效果和毒副作用的差异可以达到 300 倍之多。

已经证实抑郁症与遗传因素存在密切的关系。目前一致认为抑郁症为由遗传和环境交互作用所引起的一类复杂疾病,其中遗传因素决定了某些人具有易感性,在环境因素作用下导致最终疾病的发作。

近年来关于抑郁症的抗抑郁药物疗效的药物基因组学研究较多,主要集中于药物代谢酶基因、与药物作用受体有关的基因、与抑郁症相关的各神经递质的合成、代谢、受体等生物学通路基因。

口服氟西汀经肠道吸收后主要在肝脏代谢,经过CYP450 2D6同功酶代谢生成去甲氟西汀。去甲氟西汀具有与氟西汀类似的药理学活性,但水溶性更强,容易经过肾脏排泄。编码P450酶2D6的基因位于22号常染色体,目前已发现的等位基因从2D6-1到2D6-44。在欧美白人中最常见的是2D6-3A、2D6-4A、2D6-4B、2D6-5和2D6-6A。这些突变基因使酶的活性消失,并因此决定为慢代谢表型。中国人慢代谢型主要是2D6基因缺失,慢代谢型频率很低,发生率不到1%。CYP 2D6酶活性的个体差异显然会导致氟西汀等经过CYP 2D6代谢的抗抑郁药的血药浓度的差异。这样也就有可能影响到药物的疗效和不良反应。但是,迄今没有研究发现氟西汀的血药浓度与其抗抑郁临床疗效之间存在肯定的相关性。

由于存在药物反应的个体差异,医生选药时无法量体裁衣地进行药物选择和药物配伍,不能提高药物疗效并且降低毒副作用的发生,由此可能延误治疗时机,造成患者经济损失。因此迫切需要医生特别在选择降糖药时能够根据患者对特定的药物产生的反应选出最佳的治疗方法,指导医生为患者拟定个体化的给药方案。

发明内容

本发明要解决的技术问题是提供一种从分子水平辅助预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒。

为了实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

一种预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒，由以下组分组成：

- (1) 红细胞裂解液： NH_4Cl ， KHCO_3 ，EDTA；
- (2) 白细胞裂解液：蛋白酶 K、RNase A、NaCl、Tris、EDTA、SDS；
- (3) 蛋白沉淀液：7.5M 乙酸胺 (pH 7.4)；
- (4) 核酸储存液：1M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl, pH8.0)；
- (5) 2×PCR 反应混合液：1.0ml [100 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH8.3 (20° C)]；5.0uM MgCl_2 ；各 0.4mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 无菌双蒸水配制, pH 7.0；5-羟色胺 1A 受体(HTR1A) 基因的多态性位点基因型检测引物；
- (6) Taq DNA 聚合酶 (5U/ul)：保存缓冲液：20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.5% NP40, 0.5% (v/v) Tween 20, 50% 甘油；
- (7) 阳性质控：含有 HTR1A 基因的多态性位点杂合型个体全血标本，或者含有 HTR1A 基因的多态性位点杂合型的质粒；
- (8) 阴性对照：经 DNAase I 处理的双蒸水；
- (9) 内切酶缓冲体系 (10×)；
- (10) 限制性内切酶；
- (11) PCR 用水；
- (12) 6×电泳上样缓冲液：0.25% 溴酚兰，40% (w/v) 蔗糖水溶液。

本试剂盒还可以进一步含有检测 HTR1A 的多态性位点基因型的特异性荧光探针序列。

所述 HTR1A 基因的多态性基因型至少包含选自 C1019G (rs6295)、C/T (rs878567)、A/G (rs6449693) 中的一个或者一个以上的多态性位点。优选为 C1019G (rs6295) 多态性位点。

所述的 HTR1A 基因的多态性位点基因型还可以包含选自与上述多态性基因型位点存在连锁-不平衡的多态性位点，以及其他预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的基因多态性位点包括无义突变位点、错义突变位点以及位于基因内含子部位、基因调节部位的多态性位点。

本发明中的 5-羟色胺再摄取抑制剂包括选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂 (SSRI) 以及通过 5-HT 再摄取的抑制作用或以其他方式影响 5-HT 系统功能有关的其他抗抑郁药或具有抗抑郁作用的其他类药物, 这些药物包括 (但不限于): 氟西汀 (fluoxetine)、帕罗西汀 (paroxetine)、舍曲林 (sertraline)、西酞普兰 (citalopram)、氟伏沙明 (fluvoxamine)、左旋西酞普兰 (escitalopram)、万拉法新 (venlafaxine)、米氮平 (mirtazapine)、曲唑酮 (trazodone)、度洛西汀 (duloxetine)、minacipran、tianeptine、氯米帕明 (clomipramine)、阿米替林 (amitriptyline)、多虑平 (doxepine)、多塞平 (doxepine)、米帕明 (imipramine)、丁螺环酮 (buspirone)。本发明优选为选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂 (SSRI)。本发明中的 SSRI 类药物选自氟西汀 (fluoxetine)、帕罗西汀 (paroxetine)、舍曲林 (sertraline)、西酞普兰 (citalopram)、氟伏沙明 (fluvoxamine) 和左旋西酞普兰 (escitalopram)。

本发明中 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的作用效果主要为抗抑郁症的疗效、起效时间、抗抑郁症伴发症状的疗效和性功能障碍的不良反应。其中, 抑郁症伴发症状包括抑郁症伴发的核心症状、抑郁症伴发的迟滞/躯体化症状、抑郁症伴发的睡眠症状、抑郁症伴发的精神焦虑症状和抑郁症伴发的躯体焦虑症状, 尤其指抑郁症伴发的睡眠症状和抑郁症伴发的焦虑症状。本发明中的睡眠症状尤其包括失眠。本发明中的性功能障碍包括性高潮延迟或缺乏, 性欲减退等。

本发明中所述的预测是指:

(1) 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的疗效强; 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的疗效弱;

(2) 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的起效快; 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的起效慢;

(3) 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症伴发症状的疗效强; 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症伴发症状的疗效弱;

(4) 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和

/或 CG 杂合型时，预测应用 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物相关的性功能障碍的不良反应发生率较低；所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时，预测应用 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物相关的性功能障碍的不良反应发生率较高。

本发明的生物样品选自：血液样品、体液样品、组织样品和培养细胞，优选的，所述样品为血液样品。其中血液样品包括外周血细胞、白细胞、血清等，体液样品包括尿液、唾液、组织液、脑脊液、体腔渗出液等，组织样品包括口腔粘膜拭子、毛发、皮肤、活检组织、组织样分泌物、排泄物样本等。

本发明提到的试剂盒至少包括测定 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295)、C/T (rs878567)、A/G (rs6449693) 中一个或者一个以上的多态性位点，还可以进一步包括测定上述的 HTR1A 基因的其他多态性位点中的一个或者一个以上的多态性位点，也包括上述多态性位点的不同的排列组合。该试剂盒用于预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的作用效果。所述的 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物选自氟西汀、帕罗西汀、舍曲林、西酞普兰、氟伏沙明、左旋西酞普兰、万拉法新、米氮平、曲唑酮、度洛西汀、minacipran、噻奈普汀、氯米帕明、阿米替林、多虑平、多塞平、米帕明、丁螺环酮。所述的 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物优选为选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物，选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物包括氟西汀、帕罗西汀、舍曲林、西酞普兰、氟伏沙明、左旋西酞普兰。所述试剂盒除了包含测定上述多态性位点所需要的特定引物或者探针之外，还包含运用 PCR 扩增而进行检测的试剂盒的常规组件、试剂、缓冲液等，或者包含运用芯片、微检测系统等方法进行检测的试剂盒的常规组件、试剂、缓冲液等，本领域技术人员熟悉这些常规组件和检测方法。

基于 HTR1A 基因，针对其不同的多态性位点，可以设计并且获得各种诊断剂和试剂盒以用于预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的作用效果。基于本发明的预测方法和用途获得的各种诊断剂和试剂盒也属于本发明范围。

本发明中的“试剂盒”不限于试剂盒的固有形式，可以表现为微芯片、微检测系统或者依赖于各种载体的检测系统，以及包括前述检测系统的统一包装形式，如微孔板系统、纸质载体、玻璃载体、尼龙膜载体，塑料载体、硅胶载体、凝胶载体、膜质载体等。

本发明的优点是：本试剂盒运用聚合酶链式反应-限制性酶切片段长度多态性方法 (PCR-RFLP)，检测抑郁症患者外周血液样本中 HTR1A 基因多态性。本试剂盒采用外周微量全血提取基因组 DNA 作为 PCR 模板，制备方法简单可靠，无需特殊设备，PCR 扩增后采用 RFLP 方法检测 PCR 产物，根据电泳结果确定 HTR1A 基因的多态性位点基因型。根据 HTR1A 基因的多态性结果，结合个体的其他生物学指标对于 5-羟色胺再摄取抑制

剂类药物的作用效果进行预测，本发明中 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的作用效果包括抗抑郁症的疗效、起效时间、抗抑郁症伴发症状的疗效和性功能障碍的不良反应，而抑郁症伴发症状包括抑郁症伴发的核心症状、抑郁症伴发的迟滞/躯体化症状、抑郁症伴发的睡眠症状、抑郁症伴发的精神焦虑症状和抑郁症伴发的躯体焦虑症状，尤其指抑郁症伴发的睡眠症状和抑郁症伴发的焦虑症状。本发明克服了临床选择 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的盲目性，在多态性基因型分析的基础上可以预测患者使用 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的有效性和安全性，指导临床用药，使患者能够进行个体化医疗，提高抗抑郁症的疗效，减少毒副作用，减少医疗成本。本发明特别针对 HTR1A C1019G (rs6295) 多态性位点基因型分别设计了用于 PCR-RFLP 方法的特异性扩增引物以及用于 TaqMan 方法的特异性扩增引物和等位基因特异性探针，与常规的扩增引物和探针相比较，扩增效率高、特异性好、省时，有更好的使用价值。

由于 HTR1A C1019G (rs6295) 多态性位点本身缺乏限制性酶切位点，为了能够采用简便快捷可靠的 PCR-RFLP 方法进行该多态性位点的基因型检测，我们特意在 PCR 扩增的正向引物中成功设计并引入了 Bsl I 限制性酶切位点，HTR1A C1019G (rs6295) 多态性位点基因型的 PCR 扩增引物如下：

正向引物：5' - GAACGGAGGTAGCTCCTTAAAAA - 3'

反向引物：5' - AAAAGGAAGCATAGGGAGCC - 3'

其中，BslI 的限制性酶切位点为：5'-CCNNNNNNNGG-3'

另外，采用 TaqMan 方法检测的 HTR1A C1019G (rs6295) 多态性位点基因型的扩增引物和等位基因特异性探针如下：

正向引物：5' - TGTTGTCGTCGTTGTTTCGTTTG-3'

反向引物：5' - CAATTATTGCTAATTGATGGAAGAAGACCG - 3'

等位基因特异性探针的序列为：

VIC-5' - AGTGTGTCTTCGTTTTTA-3'-NFQ，

对应于“G”等位基因，携带 VIC 荧光报告基团。

FAM-5' - AGTGTGTCTTCCTTTTTA - 3'-NFQ

对应于“C”等位基因，携带 FAM 荧光报告基团。

下面结合具体实施方式对本发明作进一步说明，凡依照本发明公开内容所作出的本领域等同替换，均属于本发明的保护范围。

具体实施方式

· 实施例 1: 测定 HTR1A C1019G (rs6295) 多态性位点基因型预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒 (PCR-RFLP 方法)

(一) 试剂盒的组成成分:

(1) 红细胞裂解液: NH_4Cl , KHCO_3 , EDTA;

(2) 白细胞裂解液: 蛋白酶 K、RNase A、NaCl、Tris、EDTA、SDS;

(3) 蛋白沉淀液: 7.5M 乙酸胺 (pH 7.4);

(4) 核酸储存液: 1M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl, pH8.0);

(5) 2×PCR 反应混合液: 1.0ml [100 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH8.3 (20° C)]; 5.0uM MgCl_2 ; 各 0.4mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 无菌双蒸水配制, pH 7.0; HTR1A 基因的多态性位点基因型检测引物; 内标; 其中引物序列根据 HTR1A C1019G (rs6295) 基因序列设计, 包括 PCR 正向引物和 PCR 反向引物, 由上海生工公司合成:

正向引物: 5' - GAACGGAGGTAGCTCCTTAAAAA -3'

反向引物: 5' - AAAAGGAAGCATAGGGAGCC -3'

(6) Taq DNA 聚合酶 (5U/ul): 保存缓冲液: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.5% NP40, 0.5% (v/v) Tween 20, 50% 甘油; 购于上海生工公司;

(7) 阳性质控: 含有 HTR1A 基因的多态性位点杂合基因型个体全血标本, 或者含有 HTR1A 基因的多态性位点杂合基因型的质粒或者 PCR 产物片段;

(8) 阴性对照: 经 DNAase I 处理的双蒸水;

(9) 内切酶缓冲体系 (10×): 75μl NEB buffe#3;

(10) 限制性内切酶: Bsl I 内切酶 (10U/μl);

(11) PCR 用水;

(12) 6×电泳上样缓冲液: 0.25% 溴酚兰, 40% (w/v) 蔗糖水溶液。

其中阳性质控包括含有 HTR1A C1019G (rs6295) 杂合基因型个体全血标本或者含有 HTR1A C1019G (rs6295) 多态性位点杂合基因型的质粒或者 PCR 产物片段, 其具体的靶序列如下:

5'- GAACGGAGGTAGCTTTTTAAAAACGAAGACACACTCGGTCTTCTTCCATCAAT
TAGCAATAATTGGGAGACTGACCCAGGACTGTTACCTTCCCATTTCAGGCTCCCTATGC
TTCCTTTT -3'

(二) 检测的步骤:

(1) 微量全血基因组 DNA 的抽提:

- a) 取 400ul 红细胞裂解液加入 1.5ml 离心管中, 加入 100ul 左右新鲜全血或者抗凝全血。注意将移液器吸头内壁残留血样尽量清洗到离心管中。
- b) 37°C 水浴 5 分钟, 期间轻轻摇匀 3 次; 15000g 离心 1 分钟。
- c) 用移液器轻轻吸去上清液, 残留约 10ul 液体, 注意移液器吸头不可接触离心管底部可见的白色沉淀。
- d) 高速振荡 10 秒至离心管底部的白色沉淀消失; 加入 100ul 白细胞裂解液, 高速振荡 30 秒至液体均一, 37°C 水浴 5 分钟。
- e) 加入 35ul 蛋白沉淀液, 高速振荡 20 秒后 15000g 离心 90 秒, 离心管底可见褐色沉淀。
- f) 将上清液全部移入装有 100ul 异丙醇的 1.5ml 离心管中, 来回轻柔的摇匀数次, 至有白色絮状物出现; 15000g 离心 90 秒, 离心管底部可见白色沉淀。注意吸取上清液时避免吸入褐色沉淀。
- g) 弃上清液, 注意保留白色沉淀, 加入 100ul 75%乙醇 (以无水乙醇配制), 15000g 离心 90 秒。
- h) 弃上清液, 注意保留白色沉淀, 轻轻在吸水纸上敲干残液, 于空气中干燥 3 分钟。
- i) 加入提前预热至 65°C 的核酸储存液 100ul, 中速振荡 5 秒后低速离心 2 秒以收集液体于离心管底部; 65°C 孵化 5 分钟; 所得溶液即为高质量高产量的全血基因组 DNA。
(产量大约为 20~40ng/ul)。

(2) 使用聚合酶链式反应—限制性酶切片段长度多态性分析方法 (PCR-RFLP) 检测 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点:

PCR 反应体系:

样品 DNA 3ul (25ng~150ng), PCR 反应混合液 (2×) 12.5ul, Taq DNA 聚合酶 0.05~0.125ul, ddH₂O 补足总体积至 25ul。

PCR 反应条件:

94°C 预变性 3 分钟后; 94°C 变性 30~45 秒, 55°C ±5°C 退火 45 秒, 72°C 延伸 60 秒, 共 30~38 个循环周期; 最后 72°C 延伸 7 min。得到 120 bp 的片段。

酶切条件及体系 (15ul):

HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 位点 PCR 产物目的片段长度为 120bp, 总的酶切体系为 15ul, 其中 PCR 产物 10ul, 10×NEBuffer#3 1.5 ul, Bsl I 内切酶 5 U (0.5 ul, 10U/ul),

3ul ddH₂O 补足体积至 15ul, 55℃ 酶切 60 分钟(不得少于 60 分钟, 可以 55℃ 酶切过夜)。

酶切反应的终止: 80℃ 20 分钟灭活, 终止反应。

注: 酶切后如立即进行琼脂糖凝胶电泳溴化乙啶染色鉴别基因型, 则无需此灭活步骤。

(三) 基因型测定的结果判定:

将 DNA 酶切后的产物点样在 3.0% 琼脂糖胶上, 200V 电压下电泳 1 小时后, 在紫外灯下读取胶图并进行基因型分析。个体基因型鉴定如下:

酶切片段为 120 bp, HTR1A C1019G (rs6295) 基因型为 CC 纯合野生型;

酶切片段为 120+99+21 bp, HTR1A C1019G (rs6295) 基因型为 CG 杂合型;

酶切片段为 99+21bp, HTR1A C1019G (rs6295) 基因型为 GG 纯合突变型。

(四) 对于 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的预测:

HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的疗效强; 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的疗效弱。

所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的起效快; 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的起效慢。

所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症伴发症状的疗效强; 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症伴发症状的疗效弱。

所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时, 预测应用 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物相关的性功能障碍的不良反应发生率较低; 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时, 预测应用 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物相关的性功能障碍的不良反应发生率较高。

在本发明的实施例中, 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的作用效果包括抗抑郁症的疗效、起效时间、抗抑郁症伴发症状的疗效和性功能障碍的不良反应。

本发明的实施例中所述的抑郁症伴发症状包括抑郁症伴发的核心症状、抑郁症伴发的

迟滞/躯体化症状、抑郁症伴发的睡眠症状、抑郁症伴发的精神焦虑症状和抑郁症伴发的躯体焦虑症状，尤其指抑郁症伴发的睡眠症状和抑郁症伴发的焦虑症状。

实施例 2：测定 HTR1A C1019G (rs6295) 多态性位点基因型预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒 (Taqman 方法)

(一) 试剂盒的主要组成成分：

(1) 红细胞裂解液：NH₄Cl, KHCO₃, EDTA；

(2) 白细胞裂解液：蛋白酶 K、RNase A、NaCl、Tris、EDTA、SDS；

(3) 蛋白沉淀液：7.5M 乙酸胺 (pH 7.4)；

(4) 核酸储存液：1M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl, pH8.0)；

(5) Taqman 2× Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG 反应混合液：含有 dUTP 的 dNTPs，已优化的缓冲液，0.72 uM 的正向引物，0.72uM 的反向引物及两段带荧光报告基团的等位基因特异性探针各 0.16uM。

其中引物序列根据 HTR1A C1019G (rs6295) 基因序列设计，包括 PCR 正向引物和 PCR 反向引物，由上海生工公司合成：

正向引物：5'-TGTTGTCGTCGTTGTTTCGTTTG-3'

反向引物：5'-CAATTATTGCTAATTGATGGAAGAAGACCG-3'

其中等位基因特异性探针包括检测 HTR1A C1019G (rs6295) 多态性位点的野生型和突变型探针，本试剂盒中优选为 Taqman 探针，等位基因特异性探针的序列为：

VIC-5'-AGTGTGTCTTCGTTTTTA-3'-NFQ，

对应于“G”等位基因，携带 VIC 荧光报告基因。

FAM-5'-AGTGTGTCTTCCTTTTTA-3'-NFQ

对应于“C”等位基因，携带 FAM 荧光报告基因。

(6) Taq DNA 聚合酶 (5U/ul)：保存缓冲液：20 mM Tris-HCl (pH 8.0)，100mM KCl，0.1 mM EDTA，1mM DTT，0.5% NP40，0.5% (v/v) Tween 20，50% 甘油；购于上海生工公司。

(二) 检测的步骤：

(1) 提取微量全血中宿主细胞的基因组 DNA。

(a) 在全血中加入 30ml 红细胞裂解液，缓慢摇匀，室温静置 10 分钟，期间，摇动数次，彻底裂解红细胞。

(b) 于 4℃、2000 转/分离心 10 分钟，去上清，将沉淀之白细胞在旋转震荡器上打

散，加蛋白酶 40ul、RNA 酶 50ul，摇匀，加白细胞裂解液置 15ml，混匀 37℃水浴 20 分钟后取出，置冷水中。

(c) 加冷的蛋白沉淀液 4ml，混匀后放在-20℃冰箱 5 分钟，取出于 4℃、3000 转/分离心 10 分钟。将上清液倒入已加好 15 ml 异丙醇的 50ml 离心管中缓慢摇动数次，至 DNA 絮状物析出。

(d) 将析出的 DNA 絮状物移至另一 1.5ml 离心管中，加入 0.5ml 75%乙醇洗沉淀，弃去乙醇，室温空气干燥。

(e) 加 DNA 水化液 1.5 ml，置摇床，摇动过夜，备用。

(f) DNA 浓度的测定采用紫外分光光度法，分别测定 260nm 及 280nm 两个波长下的 OD 值,以 $OD_{260nm} \times 50$ 所得值为 DNA 浓度。并以 OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值估计 DNA 纯度。

(2) 使用 Taqman 方法检测 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型：

(a) 用 PCR 仪扩增 HTR1A 功能基因多态位点及其侧翼序列，在 5ul PCR 反应体系中含有基因组 DNA 10ng，2.5 ul 的 Taqman 2×Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (组成成份包括：AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTPs with dUTP, Passive Reference, 已优化的缓冲液)，及 0.72 uM 的正向引物，0.72uM 的反向引物及两段带荧光报告基团的等位基因特异性探针各 0.16uM。

引物序列为：

正向引物：5' - TGTTGTCGTCGTTGTTTCGTTTG-3'

反向引物：5' - CAATTATTGCTAATTGATGGAAGAAGACCG -3'

等位基因特异性探针的序列为：

VIC-5' - AGTGTGTCTTCGTTTTTA-3'-NFQ，

对应于“G”等位基因，携带 VIC 荧光报告基团。

FAM-5' - AGTGTGTCTTCCTTTTTA - 3'-NFQ

对应于“C”等位基因，携带 FAM 荧光报告基团。

PCR 反应条件：

95℃ 10 min，1 个循环；92℃ 15s，60℃ 1min，50 个循环。

(三) 基因型测定的结果判定：

在 7900 型荧光定量 PCR 仪上检测荧光信息。

将完成 PCR 反应的 PCR 板放入 7900 型荧光定量 PCR 仪上，选用“Allelic Discrimination”程序，进行扫描与结果的判断：

发出 FAM 荧光者的基因型为 CC (rs6295) 纯合野生型;

发出 VIC 荧光者的基因型为 GG (rs6295) 纯合突变型;

发出两种荧光者的基因型为 CG (rs6295) 杂合型。

(四) 对于 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的预测:

HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的疗效强; 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的疗效弱。

所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的起效快; 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症的起效慢。

所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症伴发症状的疗效强; 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时, 预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁症伴发症状的疗效弱。

所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 GG 纯合突变型和/或 CG 杂合型时, 预测应用 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物相关的性功能障碍的不良反应发生率较低; 所述的 HTR1A 基因的 C1019G (rs6295) 多态性位点基因型为 CC 纯合野生型时, 预测应用 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物相关的性功能障碍的不良反应发生率较高。

在本发明的实施例中, 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的作用效果包括抗抑郁症的疗效、起效时间、抗抑郁症伴发症状的疗效和性功能障碍的不良反应。

本发明的实施例中所述的抑郁症伴发症状包括抑郁症伴发的核心症状、抑郁症伴发的迟滞/躯体化症状、抑郁症伴发的睡眠症状、抑郁症伴发的精神焦虑症状和抑郁症伴发的躯体焦虑症状, 尤其指抑郁症伴发的睡眠症状和抑郁症伴发的焦虑症状。

实施例 3: 采用小试生产的试剂盒对于服用 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的抑郁症患者的药物作用效果进行预测

我们应用小试生产的试剂盒, 对服用 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的抑郁症患者的 HTR1A C1019G (rs6295) 的多态性位点基因型进行检测, 同时检测其他生理参数, 如年龄、

性别、身高、体重、吸烟史、饮酒史、职业、教育程度、基线 HAMD 总分、本次病程、既往抗抑郁药物治疗史、合并用药、是否复发抑郁症等。通过测定个体基因型参数及其他生理参数，预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的作用效果：

1、获得个体的 HTR1A C1019G (rs6295) 多态性位点基因型参数和基本生理参数：年龄、性别、身高、体重、吸烟史、饮酒史、职业、教育程度、基线 HAMD 总分、本次病程、既往抗抑郁药物治疗史、合并用药、是否复发抑郁症等。

2、根据多元线性回归分析，得到用来预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的作用效果的预测模型。

3、根据预测方程计算得到的结果定量预测 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的作用效果。

5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的总体疗效判定标准为：定义抗抑郁药治疗结束时 HAMD 总分小于或等于 7 分为临床缓解。

按照上述疗效判定标准，将根据预测方程计算得到的预测抗抑郁疗效的数据结果与实际根据上述疗效标准判定的抗抑郁疗效的数据结果进行比较，结果见表1。

表1 HTR1A C1019G (rs6295) 多态性位点基因型对
5-羟色胺再摄取抑制剂类药物抗抑郁疗效的预测结果

	实际临床缓解人数	实际无临床缓解人数	合计 (人数)
预测临床缓解 (阳性人数)	172	23	195
预测无临床缓解 (阴性人数)	26	51	77
合计 (人数)	198	74	272
敏感性=172/198×100%=86.9% 特异性=51/74×100%=68.9%			
PPV=172/195×100%=88.2% NPV=51/77×100%=66.2%			

由表1可见，测定个体 HTR1A C1019G (rs6295) 的多态性位点基因型，并且同时测定个体的某些生理参数，根据预测方程，预测对于 5-羟色胺再摄取抑制剂类药物的抗抑郁症的疗效的敏感性为 86.9%，特异性为 68.9%，阳性预测值 (PPV) 为 88.2%，阴性预测值 (NPV) 为 66.2%，有很好的准确性，因此有很高的实际应用价值。

专利名称(译)	预测5 - 羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒		
公开(公告)号	CN101029336A	公开(公告)日	2007-09-05
申请号	CN200610057954.1	申请日	2006-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	北京华安佛医药研究中心有限公司 安徽省生物医学研究所		
申请(专利权)人(译)	北京华安佛医药研究中心有限公司 安徽省生物医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	北京华安佛医药研究中心有限公司 安徽省生物医学研究所		
[标]发明人	刘平 王玉 洪秀梅 张善春 王滨燕 王燕 徐希平		
发明人	刘平 王玉 洪秀梅 张善春 王滨燕 王燕 徐希平		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K45/00 A61P25/24 A61P25/22 A61P25/20 A61P15/10 G01N33/53		
其他公开文献	CN101029336B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种预测5 - 羟色胺再摄取抑制剂类药物作用效果的试剂盒，含有下述组分：(1)红细胞裂解液；(2)白细胞裂解液；(3)蛋白沉淀液；(4)核酸储存液；(5)PCR反应混合液(含MgCl₂、dNTP、PCR扩增引物和内标)；(6)DNA聚合酶；(7)阳性质控；(8)阴性对照；(9)内切酶缓冲体系；(10)限制性内切酶；(11)PCR用水；(12)10×电泳上样缓冲液：0.25%溴酚兰，40%(w/v)蔗糖水溶液。本发明通过提取生物样品中的基因组DNA，经过聚合酶链式反应 - 限制性酶切片多态性(PCR - RFLP)分析方法，检测个体生物样品中HTR1A基因的多态性情况，预测5 - 羟色胺再摄取抑制剂药物的作用效果。属于医药生物技术领域。

	实际临床缓解人数	实际无临床缓解人数	合计 (人数)
预测临床缓解 (阳性人数)	172	23	195
预测无临床缓解 (阴性人数)	26	51	77
合计 (人数)	198	74	272
敏感性=172/198×100%=86.9% 特异性=51/74×100%=68.9%			
PPV=172/195×100%=88.2% NPV=51/77×100%=66.2%			