



中国生命科学研究

中华民族永生 细胞库的建立 ——理论与实践

褚嘉祐 主编

上海科学技术出版社

国家科学技术学术著作出版基金资助出版

中国生命科学研究

中华民族永生 细胞库的建立 ——理论与实践

褚嘉祐 主编

上海科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

中华民族永生细胞库的建立:理论与实践 / 褚嘉祐主编. — 上海:上海科学技术出版社, 2009.2

(中国生命科学研究)

ISBN 978 - 7 - 5323 - 9643 - 6

I. 中... II. 褚... III. 细胞遗传学 - 研究 - 中国
IV. Q343

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 144916 号

上海世纪出版股份有限公司 出版、发行

上海科学技术出版社

(上海钦州南路 71 号 邮政编码 200235)

新华书店上海发行所经销

常熟市兴达印刷有限公司印刷

开本 787 × 1092 1/16 印张 7.25 插页 4

字数: 95 千字

2009 年 2 月第 1 版 2009 年 4 月第 2 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5323 - 9643 - 6/Q · 107

定价: 28.00 元

本书如有缺页、错装或坏损等严重质量问题,
请向工厂联系调换

内 容 提 要

本书全面反映建立中华民族永生细胞库的理论和实践,除系统介绍人类永生细胞库的基础理论外,还详尽介绍了建立永生细胞库所涉及的知情同意原则、采样标准、采样步骤和方法,建立永生细胞库所需实验室准备、应用器材、应用 EB 病毒转化建立永生细胞、永生细胞的传代、冻存和复苏等技术以及永生细胞的质量控制。并介绍应用人类遗传资源进行遗传多样性和疾病基因研究的进展。本书由第一线从事永生细胞库建立和相关研究的科技人员撰写,力求实用。阅读本书的科技人员不仅能了解中华民族永生细胞库的全貌,而且能够在需要时应用本书介绍的相关技术。

撰 稿 人

- 前 言 褚嘉祐:中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118
- 第 1 章 褚嘉祐:中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118
- 第 2 章 傅松滨:哈尔滨医科大学,哈尔滨 150081
杨壹羚:中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118
- 第 3 章 黄小琴,褚嘉祐:中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118
徐玖瑾:中国科学院遗传与发育生物学研究所,北京 100101
- 第 4 章 林克勤:中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118
徐玖瑾:中国科学院遗传与发育生物学研究所,北京 100101
- 第 5 章 徐玖瑾:中国科学院遗传与发育生物学研究所,北京 100101
林克勤:中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118
- 第 6 章 陶玉芬:中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118
徐玖瑾:中国科学院遗传与发育生物学研究所,北京 100101
- 第 7 章 黄小琴,李彦涵:中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118
徐玖瑾:中国科学院遗传与发育研究所,北京 100101
- 第 8 章 史 荔,钱 源,姚宇峰,史 磊:中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118
- 第 9 章 石铁流:中国科学院上海生命科学研究院生物信息中心,上海 200031
孙 浩,褚嘉祐:中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118
- 后 记 褚嘉祐:中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118

前 言

人类遗传资源是进行人类健康相关研究不可替代的资源。人类遗传资源指代表人类基因的遗传材料,人类永生细胞库包括不同民族群体正常个体材料以及具有异常表型或疾病,或者特殊群体(如隔离人群)的遗传材料,在国际国内越来越引起高度重视。国内相关研究工作迫切需要得到一本兼备理论与实践的参考书。

在主要由国家自然科学基金“九五”、“十五”两个重大项目的资助下,并得到国家 863 项目等的支持,中国医学科学院医学生物学研究所、哈尔滨医科大学、中国科学院遗传与发育生物学研究所共同承担的中国不同民族永生细胞库已经初具规模。项目组经过十余年的努力,走遍全国各省和边远少数民族地区,按照严格的采样标准和“知情同意”原则,建立了 70 个民族群体(含民族支系)的 3 982 株永生细胞株的细胞库,并保存了 7 210 份 DNA 样本,建立了较为成熟和稳定的利用 EB 病毒转化 B 淋巴细胞为永生细胞的技术。这是目前规模最大的较为完整的中国国家级中国各民族永生细胞库,可满足永久性研究的需要。现已向国内多家人类基因组研究相关单位提供了细胞株和 DNA,以做相关研究。

项目组还遵照中国人类基因组项目与欧洲人类多样性研究中心(CEPH)签订的合作协议,经国家人类遗传资源有关部门批准,向欧洲人类多样性研究中心提供了 149 株永生细胞,经检测都达到国际标准,得到了欧洲同行的高度赞扬。由其提取的 DNA 已为许多国际研究机构所使用,参与了国际合作研究。美国《科学》(*Science*)周刊 2002 年 4 月发表了包括中国永生细胞库的论文。这表明,本项目建立和保存中国不同民族群体永生细胞株的技术和水平已达到国际先进水平。

在上述工作的基础上,项目组还进行了包括微卫星 DNA、线粒体 DNA、Y 染色体、SNP 等遗传多样性研究,取得了一些重要成果,遗传多样性研究与疾病基因位点研究的结合深化了对疾病基因和疾病易感性的认识。

项目组还建立了数据库,由此根据不同管理层次,可以查询民族、标记、位点的研究情况并进行综合分析。

本书综合反映了建立中华民族永生细胞库的理论和实践,包括建立人类永生细胞库的基础理论、建立永生细胞库所涉及的知情同意原则、采样标准、采样步骤和方法,建立永生细胞库所需实验室准备、应用器材、应用 EB 病毒转化建立永生细胞、永生细胞的传代、冻存和复苏等技术以及永生细胞的质量控制和中华民族永生细胞库、数据库的全貌。

必须指出,虽然在国家自然科学基金等的支持下,已经对我国 70 个民族群体(含民族支系)的基因组进行了收集和保存,但仍有许多民族、民族支系或群体还没有进行这项工作,因此继续收集和保存我国民族群体的基因组还是一项有待完善的工作。特别是中华民族遗传资源的异地保存和全面的遗传结构研究,具有重要的战略意义和紧迫性,我们希望更多的同行团结协作,共同致力于这一工作的完成。

褚嘉祐

2008 年 3 月

目 录

前言

第 1 章 绪 论	1
§ 1.1 人类遗传资源是关系人类健康研究的不可替代的战略资源	1
§ 1.2 围绕人类遗传资源的国际竞争日趋激烈	2
§ 1.3 中国在人类遗传资源方面具有特殊优势	3
§ 1.4 我国人类遗传资源开发利用水平整体进入国际先进水平 ...	4
§ 1.5 人类遗传资源相关研究任重道远	5
参考文献	7
第 2 章 人类永生细胞库的理论基础	9
§ 2.1 永生细胞建立的原理	10
§ 2.2 国内外永生细胞库概况	16
参考文献	18
第 3 章 永生细胞库建立的实验室准备和采样	20
§ 3.1 实验室设计和建设	20
§ 3.2 采样标准	21
参考文献	26
第 4 章 建立永生细胞所需 EB 病毒的获取	27
§ 4.1 EB 病毒简介	27
§ 4.2 B95-8 细胞的培养和 EB 病毒液的获得	27
参考文献	29
第 5 章 应用 EB 病毒转化人 B 淋巴细胞	30
§ 5.1 细胞转化前的实验室准备	30

§ 5.2	淋巴细胞的分离	30
§ 5.3	转化细胞的悬浮培养	32
§ 5.4	细胞转化成功与否的观察	33
§ 5.5	相关常用试剂的配制	35
参考文献		37
第 6 章 永生细胞的传代、冻存与复苏		38
§ 6.1	细胞传代	38
§ 6.2	细胞冻存	38
§ 6.3	细胞复苏	40
参考文献		41
第 7 章 永生细胞株的质量管理		43
§ 7.1	细胞代次的计算与控制	43
§ 7.2	应用支原体检测监控永生细胞株质量	44
§ 7.3	监测永生细胞株的遗传稳定性	46
参考文献		50
第 8 章 应用不同民族遗传资源进行中华民族遗传多样性与疾病 基因研究		51
§ 8.1	血样 DNA 和细胞株 DNA 的提取	51
§ 8.2	应用不同民族遗传资源进行遗传多样性研究	55
§ 8.3	应用不同民族遗传资源进行疾病相关基因研究	69
参考文献		75
第 9 章 中华民族永生细胞库及中国人群遗传多样性数据库的 建立		79
§ 9.1	中华民族永生细胞库的建立及管理	79
§ 9.2	中华民族永生细胞库管理系统和数据库管理	83
§ 9.3	中国人群遗传多样性数据库的建立	93
参考文献		99
后 记		100
索 引		101

第 1 章 绪 论

§ 1.1 人类遗传资源是关系人类健康研究的 不可替代的战略资源

经过全球科学界的共同努力,人类基因组序列图谱测定已经完成。人类全部基因组测序工作的完成,对于人类了解自身健康,研究复杂性疾病或性状相关基因提供了极好的机会。但人类是一个具有多样性的群体,人类基因组具有高度的变异性,人类基因组的序列只反映了基因组稳定的一面,并未反映其变异多态的一面,即只反映“共性”,而未反映“个性”。要真正了解全部人群的基因组,还需研究和比较不同人种、人群的基因组,这就是“人类基因组多样性计划(Human Genome Diversity Project, HGDP)”,即研究人类在“同一性”前提下存在的“多样性”。任意两个人的染色体大约有 1/1 000 的碱基对是不相同的,DNA 的这种变异是在长期进化过程中积累起来的,绝大多数是无害的,或只引起蛋白质的微小改变,仅有很少一部分变异会影响到基因的功能。

基因组多样性的研究对阐明不同人群或个体在疾病的易感性和抵抗性,以及药物和疫苗敏感性方面的差异有重要意义。对基因组序列进行系统筛查,就有可能找出与疾病易感性有关的大量基因变异。对人类疾病的研究发现,罕见单基因疾病的频率分布与人类迁移史有关。当一个成员相对较少的人群扩展时,每个成员对下一代的遗传结构有的影响大,有的影响小,如果一个多产的创建者携带一种遗传异常,就会导致某一人群受染。因此,对隔离人口的研究可以得到大量特殊的信息资料。例如,芬兰人最初人数很少,并且是隔离的,近几个世纪发展到几百万人,却并没有真正的移民和混合。在其他地方很罕见的大约 24 种隐性遗传疾病,在芬兰却很常见;而一些其他地方很常见的遗传疾病,如欧洲的苯丙酮尿

症,在芬兰却几乎没有。同样地,对多基因疾病的研究发现,当人群隔离度大时,不同家系之间遗传疾病的信息可以进行累加分析,他们之间的相关性较两个不同地区同样疾病的家系要密切得多,这是从多基因疾病研究得到的宝贵资料。

随基因组计划而发展起来的基因定位克隆技术有可能在基因定位后找到致病基因,尤其是多基因疾病的研究更受到密切的重视。遗传隔离人群是研究各种遗传病,以及遗传因素参与的复杂疾病分子机理和易感基因的理想群体。国际上一些从事医药生产的著名公司对哮喘、糖尿病基因的成功克隆就是通过研究隔离人群资源取得的,既获得了知识产权,又得到了巨大的经济效益。在某种程度上说,我国能否在疾病的基因克隆以及药物开发中取得自主知识产权,甚至跻身世界生物医药产业先进之列,就看我们能否充分利用中国自己的宝贵遗传资源。如果我国能在疾病的基因克隆及药物研发等方面具有自主知识产权及专利技术,并在此基础研究领域占据一席之地,那么从长远角度讲,将给国家节约大笔用于购买知识产权及专利技术的经费,也必将对我国国民经济持续稳定发展产生积极影响。

如对艾滋病和2003年春季大爆发的SARS的流行病学研究表明,同样接触过艾滋病病毒或SARS病毒的人,并不是每个人都会患病;即使患病,每个人的症状轻重程度也不一样。不同个体表现出的这种对疾病的差异,除了年龄、体质等因素外,可能还有基因水平上的个体差异。如果我们在我国丰富的人类遗传资源基础上了解了较为全面的不同群体对疾病的易感差异情况,那么就能较快找到相应的高危人群,有重点地做好疾病预防工作,这也有利于相关疫苗的尽早开发。总之,寻找可导致疾病的基因或变异基因,并在此基础上探索疾病的基因水平的诊断和治疗方法是疾病基因组研究的重要内容之一^[1]。

§ 1.2 围绕人类遗传资源的国际竞争日趋激烈

国际上,尤其发达国家十分重视人类遗传资源,许多国家已投入大量资金和人力物力开展遗传资源的收集,并注意收集其他国家和地区的特殊遗传人群的遗传资源。发达国家凭借雄厚的经济基础和科技实力,除

了保护和利用本国遗传资源外,还往往采取合作研究、出资购买、甚至非法获取的方式,大量收集发展中国家的人类遗传资源。以获得的人类遗传资源为基础,发达国家利用先进技术开发出新的药品或生物制品,申请专利后,以专利技术和专利产品的形式高价向发展中国家销售,获取高额利润。在一定程度上说,谁占有了人类遗传资源,谁就占领了人类疾病基因研究以致药物研究的制高点。

发展中国家已经越来越深刻地意识到人类遗传资源的重要性。在达成联合国《生物多样性公约》的谈判中,发展中国家经多方努力,终将“生物遗传资源的国家主权原则”写入公约,资源的国家主权主要体现在遗传资源所有权和对研发成果、知识产权和经济利益的分享权。并据该公约还专门成立了“遗传资源获取与惠益分享工作组”,经多次研究和讨论,2001年10月22—26日在德国波恩通过了《关于获取遗传资源并公正和公平分享通过其利用所产生惠益的波恩准则》,其主要目的是保护和持续利用生物多样性,促进合法获取遗传资源,保证公正和公平地分享惠益。

国外一些机构展开的大规模的基因资源争夺已涉及中国的人类遗传资源。近年来,不断发生国外机构收集数以万计的健康和疾病人体基因样本的事件,值得质疑的是,这些收集机构是否让实验参与者充分了解研究的目的及参与研究的利弊情况;在收集参与者的血样或基因样本时,是否尊重了他们的知情同意权;这些收集机构的收集行为是否会造成中国基因遗传资源的流失^[2]。

§ 1.3 中国在人类遗传资源方面具有特殊优势

中国历史悠久、地域辽阔,有着得天独厚的丰富的人类遗传资源。中国有13亿人口、56个民族,许多民族有各自的聚居地,有自己的语言、文化及社会风俗习惯,其中一些群体基本上与其他人群隔绝,多在群体内通婚。研究表明一些群体存在着与其他群体不同的疾病易感性、发病率或疾病表现,一些群体存在对疫苗和药物的不同敏感性。我国丰富的人类遗传资源是研究人类基因组多样性、人类进化和人类疾病相关基因的宝贵材料。

近年来由于交通的改善和社会进步,一些隔离群体已逐渐与外界通

婚,或迁移到外地,这些民族或群体的相对单纯的基因组面临消失。同时,由于人口政策和家庭人口构成变化趋势的影响,遗传资源的收集和保存将会面临更大的困难。如果不对这些带有特异遗传表型的遗传资源进行抢救性的收集和保存,我们将永远失去这些可利用的宝贵遗传资源。所以建立覆盖全国的人类遗传资源收集和保存体系,并有系统有计划地加以完善和长期保存,将是一个功在当代、利在千秋的重要工程。

§ 1.4 我国人类遗传资源开发利用 水平整体进入国际先进水平

在生命科学领域,我国在人类遗传资源保存和利用方面的工作与国际上的差距不大,是中国基因组研究中最有特色的一块,也是最受国际关注的一块。我国已建立了规模化的中国不同民族永生细胞库和 DNA 库:包括 70 个民族群体(含民族支系)3 982 株永生细胞株的细胞库和 7 210 份 DNA 样本。取得的主要进展有:①建立了规范的人类遗传资源收集条例;②初步在全国建立起不同人群样品的收集网络;③掌握了国际标准的 EB 病毒(Epstein-Barr virus)转化建立永生细胞技术;④形成了一支研究团队;⑤参与了国际合作;⑥取得了一些高水平的研究成果。

如果在现有基础上继续加以完善,中国不同民族永生细胞库将成为国际上收集不同群体遗传资源最多的永生细胞库,成为中国生命科学研究亮点之一。从“九五”、“十五”重大项目、863 科技攻关项目开展至今,通过我国科学界的共同努力,取得了丰硕成果:申报发明专利数百项,在科学引文索引(*Science Citation Index*, *SCI*)收录的专业学术刊物(如 *Nature*, *Nature Genetics*, *Science*, *Proceedings of National Academy of Sciences*, *Genome Research*, *Blood*, *Journal of Biological Chemistry*, *Oncogene* 等)上发表研究论文上千篇。特别值得一提的是,我国科学家在人类遗传资源研究开发利用的基础上,多项研究取得了重大突破,整体进入国际先进水平^[3-6]。

从一定程度上说,我国能否在疾病基因鉴定以及基因药物开发中获得自主知识产权,甚至跻身世界先进之列,很重要的因素之一决定于我们是否能高效地开发利用中国自己宝贵的遗传资源。

§ 1.5 人类遗传资源相关研究任重道远

当前的主要任务是对全国的 56 个民族分地区、分来源地进一步采集有民族代表性的样本,采集包括民族支系和有遗传代表性的群体(例如对于中华民族的重要组成部分的汉族,就包括陕西、山东、四川、广东等 8 个群体),建立可以代表整个中华民族的细胞库。建立一系列与疾病、药物敏感性以及对疫苗和病毒有特征反应的群体的细胞库,并对其 DNA 进行抽提,供不同科研领域使用。

对已建立和今后将建立的细胞库和 DNA 库制定一系列切实可行的使用条例,包括知情同意原则、知识产权保护、伦理道德、防止资源流失等方面,制定一套完善的审核运用样本的机制,维护样本使用的安全,以及有效地利用这些严格采样的细胞株及 DNA,从而使国内外的相关研究具有可比性和整合性,避免重复采样,节约资源,最大限度地发挥已有的资源优势。

1. 建立和完善中国遗传资源收集网络

在全国建立西南、东北、华北、华东、华南几个采集点,由研究机构与医疗单位建立一个遗传资源的收集网络,继续采集少数民族及特殊群体的标本补充细胞库,各采集点按照统一制定的采集规程,按章操作。

建立遗传疾病资源的报告网络,通过互联网或其他途径,由各医院的义务工作者向采集点报告病例,由采集点和报告者共同收集样本,采集点负责转化和保存。经过“八五”、“九五”的项目锻炼,国内已形成一支具有较高水平的从事人类遗传资源保存和遗传多样性研究的队伍,应当充分重视运用这支队伍,同时继续整合国内各科研机构、大专院校、医疗单位从事这一领域工作的研究力量,建立统一的采样标准,进行系统研究。

2. 维护已建立的细胞库

与样本采集工作相比,样本的保存工作是一项长期的任务,为将这一宝贵资源保护好,应在现有基础上分几个地方对细胞和样本进行保存,以备在一个地方遭受意外后其他地方还可发挥作用。并制定统一的操作规程进行包括预防支原体污染、冻存和复苏细胞株、DNA 抽提以及交换细

胞株等一系列工作。

3. 收集和保存有特殊表型或疾病的群体样本

研究表明,一些民族或群体存在着与其他人群不同的疾病种类和发病率,不同人群对不同疾病的敏感性不同。中国现有一些很好的家系及有特殊表型的群体,它们有的带有某种表型特征,如长寿或某种疾病,这些都是进行基因定位和寻找致病基因的宝贵资源。目前利用这些家系的遗传资源中国科学家已经克隆出若干个疾病基因,如乳光牙基因、耳聋基因、房颤基因等。

4. 收集对药物、疫苗、病毒危害反应不同的特殊群体样本

不同个体或群体间的药物代谢反应有差异是产生药物毒副作用、药效降低或丧失的主要原因之一。同样,不同个体或群体间的遗传差异也是造成他们对疫苗、病毒有不同反应的主要原因。收集有一定代表性的对某一药物、疫苗、病毒有特殊反应的群体,对研究药物作用机制、药物代谢过程以及提高药物疗效、研发新药等方面将发挥重要作用,并将从根本上改变药物临床治疗模式和新药开发方式。同样,对病毒的传播机制和疫苗的作用机理研究也将发挥重要作用。

5. 收集和保存隔离人群和少数民族群体样本

隔离人群是指在遗传上隔离、与周围其他人群很少或没有基因交流的人群。遗传隔离人群是研究各种遗传病和遗传因素参与的复杂疾病分子机理和易感基因的理想群体。近年来,由于交通的改善和社会的进步,一些民族或隔离群体已逐渐与外族通婚,这些民族或群体的相对单纯的基因组面临消失,如果不对这些带有特异遗传表型的遗传资源进行收集和保存,我们将永远失去这些可利用的宝贵遗传资源。

6. 建立数据库,整合相关研究技术

对于样本信息和实验结果进行收集、统计和处理,建立中国不同民族遗传资源与遗传多样性数据库,可以为今后的相关研究、疾病诊断、治疗及预防提供依据和相关数据。要整合各方面研究力量,建立和引进国际上最先进的遗传多样性及基因研究技术,积极参与国际合作。继续进行中华民族遗传结构的研究、中国各民族的起源与迁徙及其与国外民族遗传关系的研究。继续进行重要功能基因和致病基因多态性的研究,为今后的研究工作提供技术平台。

7. 在已建立的资源平台上继续进行遗传多样性研究

应用不同遗传标记进行遗传多样性的综合比较研究,如常染色体的 STR(短串联重复序列),反映母系遗传的线粒体 DNA、反映父系遗传的 Y 染色体,最新一代与疾病密切相关的 SNP(单核苷酸多态性)等。具体的有:继续研究现代东亚人的起源和迁徙问题,研究中国民族群体的 HLA 上 SNP 的多态性及其构成的单倍型,建立这些群体 HLA 的基本数据,并归入已建立的数据库。同时,运用全基因组上的 STR 等遗传多样性位点对若干民族群体进行基因扫描和分型,分析其遗传结构,为研究这些民族群体对不同疾病有不同敏感性提供依据,得到比较全面的中国各民族遗传结构及其地理分布状况,对这些民族的起源和迁徙及他们的相互关系进行深入探讨。部分注意力集中在不同民族群体疾病相关基因上,找出疾病基因位点与遗传多样性之间的联系,比如系统性红斑狼疮、帕金森病等疾病和具有特殊遗传性状的隔离人群的基因研究。同时,注意联系上述中国人特有的 STR、SNP 信息库和所建立的遗传背景差异评估方法,比较和应用各种遗传分析方法(如关联分析、连锁分析),对所采集的隔离人群进行特殊遗传性状的分析。探讨不同民族间疾病基因位点与遗传多样性的关系^[7-9]。

所有上述这些工作都需要科技工作者的不懈努力,需要国家在政策、资金方面给予大力扶持,同时也需要广大作为志愿者的公民的理解和支持。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 人类遗传资源管理暂行办法[M]. 北京:人民卫生出版社,1998.
- [2] 薛达元. 中国生物遗传资源现状与保护[M]. 北京:中国环境科学出版社,2005.
- [3] Neitzel H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines[J]. *Hum Genet*, 1986, 73(4):320.
- [4] Chu JY, Huang W, Kuang SQ, et al. Genetic relationship of populations in China[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:11763.
- [5] 褚嘉祐,林克勤,初正韬,等. 中国不同民族基因组的保存及遗传多样性研究[J]. 医学研究通讯,1998, 27(4):1.
- [6] Cann HM, et al. A human genome diversity cell line panel[J]. *Science* 2002, 296

(12):261.

- [7] Zhang X, Zhao J, Li C, et al. DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta shields type II [J]. *Nat Genet.* 2001, 27(2):151.
- [8] Xia JH, Liu CY, Tang BS, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment[J]. *Nat Genet.* 1998, 20(4): 370. (Erratum in; *Nat Genet*, 1999, 21(2):241.)
- [9] Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, et al. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation[J]. *Science.* 2003, 299(5604):251.