

常染色体显性遗传视网膜色素变性家系的分子遗传学研究

王飞¹, 杜薇², 王春芳³ (1. 湖北省中医院检验科, 武汉 430061; 2. 湖北省武汉爱尔眼科医院 430070; 3. 右江民族医学院, 广西百色 533000)

【摘要】目的 对 1 例 4 代常染色体显性遗传视网膜色素变性家系进行致病基因定位, 并对候选基因进行突变筛查。**方法** 收集 1 例视网膜色素变性家系, 抽取家系成员外周血并提取 DNA, 用连锁分析法对与疾病相关联的 22 个已知基因进行定位, 并对定位区域内的候选基因进行突变筛查。**结果** 两点连锁分析结果显示, 在微卫星标记 D7S484 处取得最大 LOD 值为 1.51 ($\theta=0.00$ 时); 聚合酶链反应直接测序法筛查候选基因 RP9, 未发现突变。**结论** 该家系可能存在 RP9 基因大的碱基缺失突变或基因重排, 也可能存在 1 个新的致病基因。

【关键词】 视网膜色素变性; 连锁分析; RP9 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.13.028 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)13-1807-03

Molecular genetic analysis in a Chinese family of autosomal dominant retinitis pigmentosa WANG Fei¹, DU Wei², WANG Chun-fang³ (1. Department of Laboratory, Hubei Hospital of TCM, Wuhan, Hubei 430061, China; 2. Wuhan Aier Eye Hospital, Wuhan, Hubei 430070, China; 3. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

【Abstract】Objective To map the causative gene for a four-generation pedigree with autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP) and screen the mutation in candidate gene. **Methods** Blood samples were collected from all numbers of a ADRP family, then genomic DNA was extracted. Genetic linkage analysis was performed on the 22 known genes for ADRP with a panel of microsatellite markers. Subsequently, the mutation screening of retinitis pigmentosa 9 (RP9) gene was conducted by direct DNA sequencing. **Results** The maximal two-point LOD score was obtained at D7S484 with a value of 1.51 ($\theta=0.00$). However, no mutations were detected in RP9 gene. **Conclusion** There might be with large deletions or rearrangements in RP9 gene, or exist an additional gene which could be responsible for this disease.

【Key words】 retinitis pigmentosa; linkage analysis; retinitis pigmentosa 9 gene

视网膜色素变性(RP)是以夜盲、进行性视野损害、视网膜色素沉着、视盘呈蜡黄色萎缩和视网膜电图呈熄灭型为主要临床特征的遗传性致盲眼病^[1]。RP 在世界范围内的发病率约为 1/3 500, 我国 RP 的患病率为 1/3 784^[2]。估计可能有 100 种以上不同的基因可导致 RP。目前已经可以克隆 50 多个基因并阐释它们的功能。截止 2013 年 3 月, 已被定位克隆的常染色体显性遗传视网膜色素变性(ADRP)的致病基因有 22 个。本实验中作者对一个中国人 ADRP 家系 WHH(以先证者籍贯及姓氏拼音首字母表示该家系)进行遗传基础的研究, 以期找到该家系的基因缺陷。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本实验收集湖北省武汉市一 RP 家系 WHH。该家系共 4 代 27 例, 其中已发病 7 例, 经分析可判断为 ADRP。参与本研究的一共有 20 例家系成员, 包括 7 例患者, 9 例表型正常者, 4 例配偶。先证者的症状咨询、体格检查及视网膜电生理图检查在湖北省中医院进行, 眼底镜在武汉爱尔眼科医院进行。表型正常者的症状咨询均在当地进行。该家系中所有患者均有夜盲, 视野缩小。先证者于 2007 年因为白内障而导致失明, 经手术治疗白内障, 两眼视力恢复到 0.2,

其眼底图见图 1。本研究严格遵守赫尔辛基宣言, 血液标本的采集和患者的临床检查均在征得家系成员同意后进行。

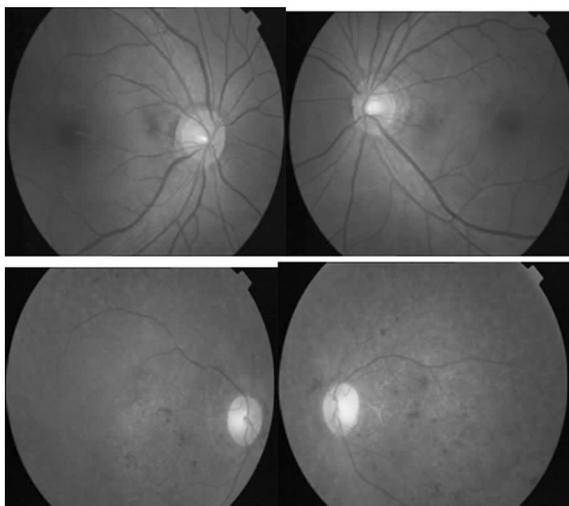
1.2 方法

1.2.1 外周静脉血白细胞 DNA 提取 分别采集该家系中 7 例患者, 9 例健康人, 4 例配偶的外周静脉血各 5 mL, 采用 Tiangen 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。采用紫外分光光度法检测 DNA 浓度与纯度, 以 A260/A280 在 1.7~1.9 为较高纯度。

1.2.2 微卫星标记的选用 截止 2013 年 3 月已被定位克隆的 ADRP 的致病基因有 22 个, 选择这 22 个已知基因所在的微卫星位点进行连锁分析, 选用的基因位点及微卫星标记点如表 1 所示。所有荧光微卫星标记均来自于 ABI 公司的 Linkage Mapping Set v2.5 MD10 试剂盒。

1.2.3 基因连锁分析 (1) 扩增微卫星标记。对家系所有成员基因组 DNA 进行微卫星标记聚合酶链反应(PCR)扩增, 反应体系为 7.5 μ L: primer pair mix(5 pmol/ μ L/primer) 0.5 μ L, True Allele PCR Premix 4.5 μ L, 模板 DNA(50 ng/ μ L) 0.5 μ L, 双蒸水 2.0 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 12 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 35 次, 最

后 72 °C 延伸 10 min。将所得 PCR 产物根据微卫星标记的不同片段大小及荧光颜色与 ddH₂O 按比例进行混合稀释,混合总体积为 20 μL;将内标 GS-500LIZ 与甲酰胺 (Hi-Di formamide) 按比例混合。将 0.5 μL 混合物与 10 μL 内标/Hi-Di formamide 混合液混合,95 °C 变性 5 min,迅速置于冰中冷却后上 ABI 3130 DNA 测序仪进行毛细管电泳。(2) 基因分型。采用 Gene Mapper v3.2 软件对电泳结果进行基因分型,记录微卫星标记的片段大小。(3) LOD 值计算及单体型构建。采用 LINKAGE Program Package (version 5.2) 中的 MLINK 程序进行致病基因位点和微卫星标记位点两点 LOD 值计算。基本参数设置:假设该家系完全外显,即外显率为 100%;致病基因频率为 0.000 1;男性与女性染色体重组率相等;微卫星标记各种基因型基因频率平均化。采用 Cyrillic (version 2.02) 软件绘制家系图及基因型。(4) 结果判定标准。当 $\theta \leq 0.1$ 时取得最大 LOD 值,若 LOD 值大于或等于 3 为肯定连锁;LOD 值大于或等于 1 为支持连锁;LOD 值小于或等于 -2 为肯定不连锁。



上图为患者左、右眼的眼底图;下图为先证者(II:10)左、右眼的眼底图(可见 RP 典型的眼底表现:骨细胞样色素沉着,血管变细)

图 1 健康人和先证者眼底图

2 结果

2.1 连锁分析结果 该家系为常染色体显性遗传,对与 ADRP 相关的 22 个基因进行连锁分析显示,在 D7S484 处, $\theta = 0.00$ 时取得最大 LOD 值 1.51,为支持连锁。因此,该家系的致病基因可能为 RP9,而其余 21 个位点均被排除。D7S484 位点的基因分型结果见图 2。

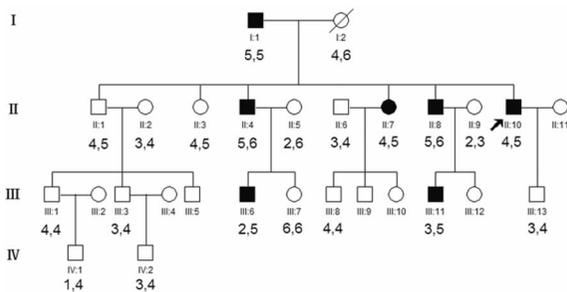
1.2.4 突变检测及序列分析 对 RP9 基因的 6 个外显子及其邻近拼接位点进行基因序列分析见表 2。PCR 扩增引物由北京赛百盛生物公司合成。PCR 反应在 25 μL 体积中进行,反应体系为:10×buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.0 μL, 4×dNTP (10 mmol/L) 1.0 μL, 引物 (10 μmol/L) 2.0 μL, Taq plus I DNA 聚合酶 1.0 μL (5 U/μL), 模板 DNA 80 ng, 加双蒸水至 25 μL。另外第 1 外显子的扩增体系加 10% 二甲基亚砜 (DMSO)。PCR 的反应条件:94 °C 预变性 7 min,而后按 95 °C 30 s,退火 45 s,72 °C 45 s 的顺序,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳证实扩增片段为目的片段。所有产物均正、反双向测序。采用软件 DNAMAN

v5.2.2 将所有测序结果与 NCBI 数据库中最新 GenBank 序列进行比对。

表 1 已定位克隆的 ADRP 基因染色体定位及其功能

基因名称	染色体定位	微卫星标记	LOD 值($\theta = 0.00$)
BEST1	11q12.3	D11S4191	-5.64
CA4	17q23.2	D17S944	-2.13
CRX	19q13.3	D19S420	-2.52
FSCN2	17q25.3	D17S784	-13.36
GUCA1B	6p21.1	D6S1610	-5.69
IMPDH1	7q32.1	D7S530	-3.56
KLHL7	7p15.3	D7S493	-4.98
NRL	14q11.2	D14S261	-8.45
NR2E3	15q23.0	D15S131	-6.54
PRPF3	1q21.2	D1S498	-5.90
PRPF31	19q13.4	D19S418	-3.58
PRPF8	17p13.3	D17S831	-9.58
RDH12	14q24.1	D14S258	-15.84
RDS	6p21.2	D6S1610	-9.63
RP1	8q12.1	D8S285	-2.40
RP9	7p14.3	D7S484	1.51
RHO	3q22.1	D3S1292	-3.96
ROM1	11q12.3	D11S4191	-6.90
SEMA4A	1q22.0	D1S498	-4.64
SNRNP200	2q11.2	D2S160	-7.41
TOPORS	9p21.1	D9S161	-4.73
PRPF6	20q13.3	D20S887	-8.54

注:数据来源于 <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/home.htm>,截止时间为 2013 年 3 月 22 日。



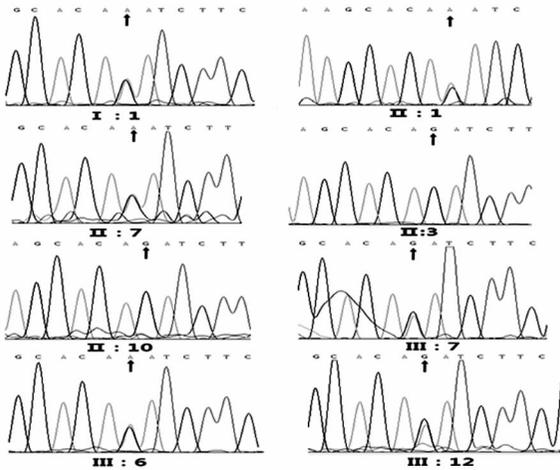
I: 第1代; II: 第2代; III: 第3代; IV: 第4代; ■: 男性患者; ●: 女性患者
□: 男性健康人; ○: 女性健康人; ∅: 已故女性健康人; ↗: 先证者

图 2 家系图及基因型(家系成员下标识为微卫星 D7S484 基因型)

2.2 突变筛查结果 在该家系患者的 RP9 上发现第 6 外显子的第 210 密码子的第 2 个碱基发生 G→A 错义突变,进一步研究发现该家系健康人中也可能存在同一位点的错义突变(部分患者及家系健康人的测序图见图 3)。RP9 基因的 c. 629 G→A, (Lys210Arg) 变异未与疾病“共分离”,只是单核苷酸多态性,在其他序列也未发现突变。据此可以排除该家系在 RP9 基因处存在单碱基或者小片段突变的可能性。

表 2 RP9 基因引物序列及扩增条件

外显子	上游引物	下游引物	扩增长度(bp)	退火温度(°C)
1	5'- GTT GCC CGA GCG GCG CT -3'	5'- TGG CCG CGC GCG GAC GGC -3'	213	64
2	5'- AAA TCT CTG ATT AAA AAT CCT ATA GCC -3'	5'- AAA AGG AGA TTT AAC ATC ATG C -3'	230	56
3	5'- CAG GAA AAA GCC AGG CAA G -3'	5'- GAG GGC TGT GAT GAG AAC AAG -3'	320	62
4	5'- TGC TGA TTC TTT ATC TTG AGT AGG TG -3'	5'- TGG TGA CTT TCT GCT TCA CTG -3'	231	62
5	5'- GGT TTT CAT AAC ATA GGC ATT TC -3'	5'- TGT TTA CTG CAC CAT TCC TCT -3'	245	60
6	5'- CAT CCT ATA CTG CTT TTG AAT GAC -3'	5'- TGC ATC TTC CTC TGT TCC TTG -3'	357	60



左边图为患者,右边为家系健康人。

图 3 部分患者及家系健康人测序图

3 讨 论

RP 是一种危害严重且目前尚无有效治愈方法的疾病,因此,其诊断和预防显得尤为重要。至今已知基因导致 ADRP 约占 60%,仍有约 40%的 ADRP 患者未确定其致病基因^[3]。因此,对 ADRP 致病基因的定位和克隆研究仍需深入。目前,对定位包括 RP 在内的单基因遗传病致病基因的主要实验方法是连锁分析。连锁分析的原理是通过寻找与某一遗传性状共同传递的遗传性标记物来确定疾病的致病基因在基因组中的位置,最常用的遗传标记是微卫星标记。

2002 年 Keen 等^[4]的研究发现,RP9 的 2 个错义突变(H137L、D170G)与 ADRP 相关。之后 Sullivan 等^[5]、Aldahmesh 等^[6]和 Bowne 等^[7]利用不同实验方法对 ADRP 家系进行大样本扫描分析,都未发现 RP9 突变,他们均认为在 ADRP 相关致病基因中,RP9 突变率极低。在本研究中,作者利用微卫星标记的连锁分析法扫描一个中国人 ADRP 家系的已知致病基因位点,假设外显率为 100%,致病基因频率为 0.000 1,RP9 位点的 LOD 值为 1.51,该值小于 3 而大于 1,说明该家系的致病基因只是可能与 RP9 连锁,本文继续对 RP9 进行直接序列分析未发现突变位点。但不能据此完全排除 RP9 是该家系的致病基因,因为直接序列分析只能发现基因中位于 PCR 上、下游引物之间小的突变,不能发现大的碱基缺失突变或基因重排。据统计,有接近 3%的 ADRP 家系中 PRPF31 存在大的碱基缺失突变或基因重排,这类突变不能被测序所发现^[8]。据此作者有理由怀疑同为剪接因子类型的 RP9 也存在高比例的大的碱基缺失突变或基因重排,所以,作者下一步的研究方向之一是用多重连接依赖探针扩增技术检测 WHH 家系中的 RP9。另外,该家系的致病基因只是可能与 RP9 连锁,并不是

完全连锁,作者还将利用连锁分析对该家系进行全基因组扫描,以期找到 LOD 值大于 3 的区域。

Keen 等^[4]在对 ADRP 家系 RP9 的研究过程中发现一个位于保守核苷酸序列的突变 c. 629 G→A,该突变虽然改变了蛋白质的结构,但其在健康人群中也会出现,健康人群中的突变率高达 30%。在本研究中也发现了这个单核苷酸多态性。

通过对已知 ADRP 家系的患者和其他成员进行基因突变筛查,明确其致病基因,从而可以对家系进行基因诊断和产前诊断,这对于 ADRP 的预测和预防是很有意义的。近年来,越来越多的 ADRP 的致病基因和致病位点被发现,将有助于对 ADRP 患者进行遗传咨询和基因诊断。

参考文献

- [1] 孙安,李寿玲,王渊,等.一视紫红质基因突变常染色体显性遗传视网膜色素变性家系的临床特征及其与基因型的关系[J].中华眼底病杂志,2010,26(6):567-569.
- [2] 李文生,郑钦象,孔繁圣,等.遗传性视网膜疾病的基因研究进展[J].中华眼科杂志,2010,46(2):186-192.
- [3] Anasagasti A,Irigoyen C,Barandika O,et al.Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa[J].Vision Res,2012,15(75):117-129.
- [4] Keen TJ,Hims MM,Mckie AB,et al.Mutations in a protein target of the Pim-1 kinase associated with the RP9 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa[J].Eur J Hum Genet,2002,10(4):245-249.
- [5] Sullivan LS,Bowne SJ,Birch DG,et al.Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa;a screen of known genes in 200 families[J].Invest Ophthalmol Vis Sci,2006,47(7):3052-3064.
- [6] Aldahmesh MA,Safieh LA,Alkuraya H,et al.Molecular characterization of retinitis pigmentosa in Saudi Arabia[J].Mol Vis,2009,24(15):2464-2469.
- [7] Bowne SJ,Sullivan LS,Koboldt DC,et al.Identification of disease-causing mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa(adRP) using next-generation DNA sequencing[J].Invest Ophthalmol Vis Sci,2011,52(1):494-503.
- [8] Daiger SP,Sullivan LS,Bowne SJ.Genes and mutations causing retinitis pigmentosa[J].Clin Genet,2013,84(2):132-141.