

· 临床研究 ·

# 全外显子组测序法对一中国常染色体显性遗传先天性白内障家系 *GJA3* 基因突变位点的分析

刘宇莹 万文萃 杨鸽 庞雪娜 杨果果 金学民

450052 郑州大学第一附属医院眼科

通信作者:金学民, Email:2740913223@qq.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.10.011

**【摘要】** **背景** 先天性白内障是儿童致盲的重要原因,多数先天性白内障与遗传有关。目前已知的与常染色体显性遗传先天性白内障(ADCC)有关的基因有 39 个。**目的** 采用全外显子组测序法对一 ADCC 家系的致病突变基因进行筛查和分析。**方法** 纳入 2014 年 8 月—9 月在郑州大学第一附属医院就诊的一 ADCC 家系,分别采集家系中 14 例患者和 14 名表型正常成员外周静脉血各 10 ml,同期同法采集 100 名健康体检者 10 ml 的外周静脉血作为对照。用标准酚-氯仿提取法提取所有受检者基因组 DNA,并采用全外显子组测序法将先证者的 DNA 进行全外显子组测序,与数据库对比后筛选出候选基因突变位点,设计突变基因位点引物后采用 PCR 技术对家系中受检者及 100 名健康对照者的该基因位点进行扩增并测序,以验证候选基因的致病性并分析其致病机制。**结果** 该家系共 5 代 68 名成员,患病者 20 例,遗传方式符合常染色体显性遗传方式。患者均双眼发病,晶状体混浊以皮质性为主。先证者全外显子组测序后分析发现,13 号染色体 *GJA3* 基因的 2 号外显子第 143 位核糖核苷酸 A 突变为 G(c.143A>G),导致其编码的第 48 位氨基酸由谷氨酸变为甘氨酸(p.E48G)。PCR 扩增产物测序结果显示该家系中患病受检者 DNA 均有此突变,但该家系中表型正常的受检者及 100 名健康对照者该候选基因均不存在此突变。**结论** *GJA3* 基因 c.143A>G 为该 ADCC 家系的致病基因突变位点,增补了 *GJA3* 基因的突变谱。

**【关键词】** 白内障/遗传;连接蛋白/基因;错义突变;全外显子组测序;氨基酸序列

**Analysis of *GJA3* mutation associated with a Chinese family with autosomal dominant congenital cataract by whole-exome sequencing** Liu Yuying, Wan Wencui, Yang Ge, Pang Xuena, Yang Guoguo, Jin Xuemin

Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Jin Xuemin, Email:2740913223@qq.com

**【Abstract】** Congenital cataract is one of the important reasons for the blindness of children, and most congenital cataracts are genetic. At present, thirty-nine genes have been identified relating to autosomal dominant congenital cataract (ADCC). **Objective** This study was to identify and analyze the virulence gene of a Chinese family pedigree with ADCC by whole-exome sequencing. **Methods** A Chinese ADCC family was recruited in Affiliated First Hospital of Zhengzhou University from August to September in 2014. The family disease history and clinical data were recorded. The peripheral venous blood of 10 ml was collected in 14 patients with congenital cataract and 14 families with normal phenotype, and the peripheral blood samples were obtained from 100 healthy examined people as controls. The genomic DNA was extracted from all subjects using standard phenol chlorum method, and proband DNA was screened by whole-exome sequencing. Then mutation locus of the candidate gene was selected after compared with the information of database in the proband. The mutation locus of the candidate gene from 14 normal families and 100 healthy controls were amplified and sequenced by PCR technique based on the primer sequence of mutation locus of proband to verify the pathogenic gene of this ADCC family. This study protocol was approved by Ethic Committee of Affiliated First Hospital of Zhengzhou University and complied with Helsinki Declaration. Written informed consent was obtained from subjects or custodian before any medical examination. **Results** The family had a total of 5 generations of 68 members, in which 20 subjects were found with congenital cataract. The inheritance mode consisted with autosomal dominant inheritance. Cortical cataract was found in both eyes in the patients. Whole-exome sequencing showed that the 143rd ribonucleotide A of exon 2 explicit factor of chromosome 13 *GJA3* gene mutated into

G (c.143A>G) in the proband, which resulted in the 48th amino acids changed from glutamate into glycine (p.E48G). PCR amplification product sequencing displayed that the same mutation of DNA appeared in all the patients of this family, while not the same mutation was seen in the candidate genes of normal phenotype families and 100 healthy controls. **Conclusions** *GJA3* gene c.143A>G is a virulence mutation site in this ADCC family, it is a supplement of the mutation spectrum of *GJA3* gene.

[Key words] Cataract/genetics; Connexins/genetics; Mutation, missense; Whole-exome sequencing; Amino Acid Sequence

先天性白内障是儿童致盲的重要原因,多数先天性白内障与遗传有关。据统计,全球先天性白内障的发病率为 0.012%~0.136%,其中发展中国家先天性白内障的发病率明显高于发达国家<sup>[1-4]</sup>。先天性白内障的遗传方式有常染色体显性遗传 (autosomal dominant, AD)、常染色体隐性遗传 (autosomal recessive, AR) 及 X 连锁隐性遗传 (X-linked recessive, XR),其中以 AD 为主。目前已知的与常染色体显性遗传先天性白内障 (autosomal dominant congenital cataract, ADCC) 有关的基因有 39 个,主要分为晶状体蛋白基因 (*CRYAA*、*CRYAB*、*CRYBA1/A3*、*CRYBA4*、*CRYBB1*、*CRYBB2*、*CRYBB3*、*CRYGC*、*CRYGD*、*CRYGS*)、晶状体细胞骨架蛋白基因 (*MAF*、*TX3*、*TMEM114*、*PAX6*)、晶状体膜内蛋白基因 (*GJA3*、*GJA8*、*LIM2*、*MIP*) 以及晶状体发育过程中的调控蛋白基因 (*BFSP1*、*BFSP2*、*HSF4*) 4 种类型。先天性白内障具有高度的遗传异质性<sup>[5-7]</sup>,为先天性白内障的发病机制研究及其防治带来了一定困难。为了更好地了解先天性白内障的发病过程,本研究中对一 ADCC 家系进行突变基因的筛查和分析。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

于 2014 年 8—9 月收集在郑州大学第一附属医院就诊的一先天性白内障汉族家系,该家系共 5 代 68 名成员,均行详细的眼部检查,包括视力、眼位、眼球运动、眼压、眼前节裂隙灯显微镜检查及眼底检查,同时收集 100 名与本家系成员无亲缘关系的健康体检者 (无高血压、糖尿病等系统性疾病及眼部疾病等) 作为正常对照。本研究方案经郑州大学第一附属医院伦理委员会审查批准 (2014 年科研第 43 号),严格遵循赫尔辛基宣言,所有参与者或其监护人均签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 纯化、提取及测序** 采集该家系中 28 名成员外周静脉血各 10 ml,其中包括患病者 14 例和表型正常的家系成员 14 名,年龄 3~78 岁。采用标准酚-氯仿提取法对外周血逐步进行白细胞重悬、裂解和分

离蛋白质,提取基因组 DNA 并用紫外分光光度计进行定量。取先证者 DNA 行全外显子组测序,用外显子捕获系统 (美国 Agilent 公司) 捕获全基因组外显子区域序列并建立数据库。利用 Kit Agilent SureSelect Human All ExonV5 平台进行 DNA 的高通量测序。

**1.2.2 基因突变位点筛查** 查找 dbSNP、1000 Genomes、NCBI SNP 数据库,对已证实的正常对照生物体的突变位点、公共遗传突变位点及外显子范围之外的碱基进行过滤和清除;通过生物信息学统计分析,在先天性白内障基因中筛选出候选突变基因位点。

**1.2.3 PCR 扩增基因突变位点** 采用 Primer3 软件针对筛选的 *GJA3* (c:A143G) 突变位点设计引物,上游引物为 5'-CTCATGGACGCTTGCCTTG-3';下游引物为 5'-AGAAGCGGATGTGGGAGATG-3',产物大小为 331 bp。使用上述引物对家系中的其他成员及健康对照者的 DNA 样本进行 PCR 扩增。扩增体系:10 倍 PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ l、2 mmol/L 脱氧核糖核苷酸 1.0  $\mu$ l 及 10  $\mu$ mol/L 的混合液,包括正向和反向引物各 1.0  $\mu$ l、2 U/ $\mu$ l (商品单位) Taq 聚合酶 0.5  $\mu$ l、50 mg/L 基因组 DNA 1.0  $\mu$ l。PCR 反应采用两相循环,首先 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,此后第一相循环反应条件为 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,起始退火温度 63  $^{\circ}$ C 40 s,之后每个循环降低 0.5  $^{\circ}$ C,72  $^{\circ}$ C 延伸 25 s,共 10 个循环;第二相循环反应条件为 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,58  $^{\circ}$ C 退火 40 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 25 s,共 25 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经质量分数 1.0% 琼脂糖凝胶分离切胶进行验证,并采用 QIAquick Gel 回收试剂盒 (德国 Qiagen 公司) 纯化目的条带,纯化产物采用相应的 PCR 扩增引物在 ABI 3100/3130 自动测序仪上进行 DNA 测序。

## 2 结果

### 2.1 先天性白内障家系患者临床表现

该家系共 5 代 68 名成员,48 名家系成员表型正常,20 例患病者,各代均有患病者,男女患病机会接近,符合 AD 遗传方式 (图 1)。患者多在幼年即发现晶状体混浊,且均为双眼发病,但双眼晶状体混浊程度不同 (图 2)。

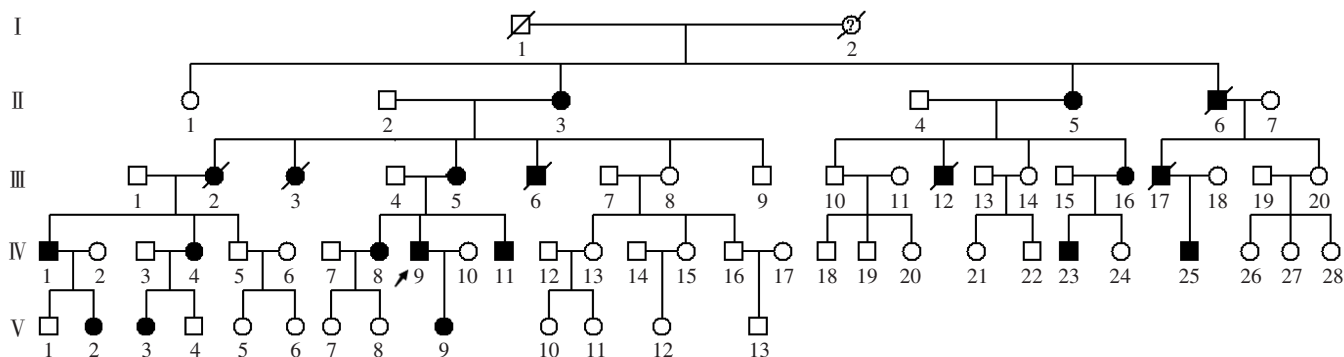


图 1 先天性白内障家系图谱 □:正常男性;○:正常女性;■:患病男性;●:患病女性;♂:不能确定是否正常;/:已去世;↗:先证者

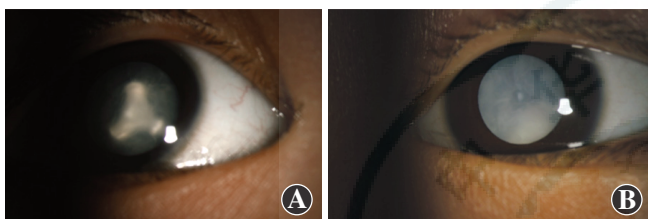


图 2 家系中年龄最小患者双眼眼前节照片 右眼呈倒 Y 字形混浊,左眼呈皮质性混浊 A:右眼 B:左眼

### 2.2 先证者的全外显子组测序

先证者在 13 号染色体 *GJA3* 基因的 2 号外显子第 143 位上出现一个杂合性突变 c. A143G, 导致其编码的第 48 位氨基酸由谷氨酸变为甘氨酸 (p. E48G), 其他与先天性白内障相关的基因均未发现有意义的突变。

### 2.3 PCR 扩增产物的验证

PCR 扩增产物条带清晰明亮,均为单条带,扩增的 DNA 片段长度与预期片段长度一致,证实 PCR 扩增产物为特异性 DNA 条带。

### 2.4 PCR 扩增产物的测序分析

通过家系成员及正常对照者 PCR 扩增产物测序结果进行对比,发现该家系中所有患者的 13 号染色体 *GJA3* 基因第 143 位核糖核苷酸由 A 变成 G, 突变位点及突变类型与先证者相同,而表型正常的家系成员及 100 名正常对照者未发现此基因突变 (图 3)。

## 3 讨论

本研究中对一 ADCC 家系成员的致病基因进行分析。考虑到目前已发现的先天性白内障的致病突变位点数目多且分布不集中,而本研究中纳入的家系成员较多,亲缘关系好,家系中患病者与表型正常者的比例适中,故选用全外显子组测序的方法,通过排除其他疾病及无意义的基因突变位点,在目标基因内筛出了先证者 DNA 的可疑突变位点,通过特定 DNA 片段 PCR 扩增产物测序并与家系中的未发病成员及 100 名健康

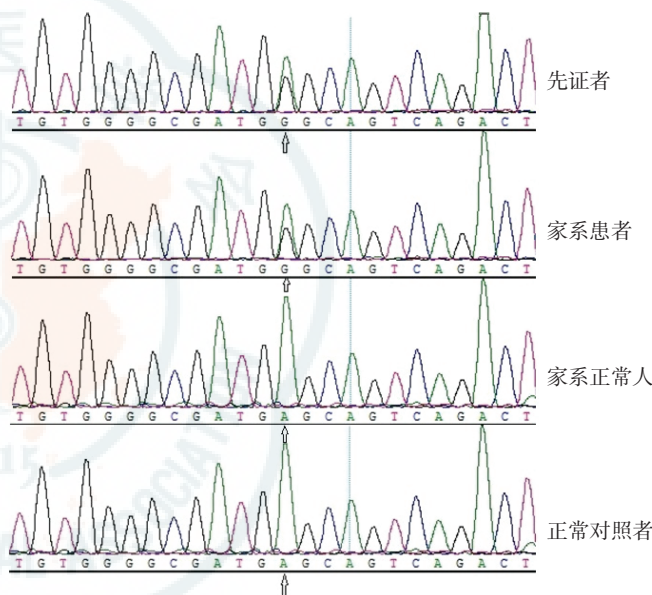


图 3 PCR 扩增产物测序结果对比分析 可见先证者和家系中患者 *GJA3* 基因第 143 位核糖核苷酸由 A 变成 G (箭头)

正常人群进行比对和验证,发现 *GJA3* 基因 c. 143A>G 是该家系的致病突变位点。

研究证实,该家系中的突变基因位点在哺乳动物中高度保守<sup>[8-9]</sup>,使用 Polyphen program (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) 对 p. 48E>G 进行了蛋白危害性预测,预测结果为有损害的可能,得分值为 1.0,提示该突变很有可能影响蛋白的功能。由此推断此变异可能是该先天性白内障家系的致病突变。

*GJA3* 是位于 13 号染色体长臂 11 区 (13q11) 的连接蛋白基因,它只包含 1 个外显子区域,主要表达于人的晶状体纤维细胞,编码一个由 435 个氨基酸组成的连接蛋白 Cx46。连接蛋白的主要作用是促进细胞间的物质交换和代谢,近年来研究发现,Cx46 和 Cx50 改变导致的细胞间隙连接功能异常可能是发生白内障的机制之一。Cx46 主要表达于晶状体蛋白中,且对纤维细胞间的缝隙连接功能产生影响。连接蛋白含有 M1、

M2、M3 和 M4 4 个跨膜域、E1 和 E2 2 个胞外环及 1 个氨基端和 1 个羧基端, 目前为止, 已知的与白内障有关的 *GJA3* 基因突变位点有 21 个。这 21 个突变位点分别导致了与 *GJA3* 基因对应的连接蛋白 Cx46 在 20 个跨膜区及胞外环区和 1 个胞质循环区的改变 (G143R)<sup>[11-13]</sup>。

本研究中通过多个氨基酸序列进行比对, 发现 *GJA3* 基因的 2 号外显子第 143 位上错义突变 (c. 143A>G) 导致了 Cx46 第一胞外环区 (E1) 的第 48 位谷氨酸变为甘氨酸 (p. 48E>G)。在连接蛋白六聚体中, E1 和 E2 区域通过二硫键在细胞间隙间形成缝隙连接通道<sup>[14-23]</sup>, 这些细胞外区域的改变会影响 Cx46 对晶状体纤维细胞间耦合透明功能的调节。目前, 尚无明确自发或诱发的与 *GJA3* 基因突变相关的白内障动物模型, *GJA3* 基因近端 6 cm 处可能存在的 2 个隐性等位基因突变也给动物模型的建立增加了难度<sup>[24-25]</sup>。

本研究中发现了一 ADCC 家系的致病性 *GJA3* 基因 c. 143A>G 突变位点, 可为其他先天性白内障家系的突变基因筛查提供参考依据, 同时也为 *GJA3* 基因 c. 143A>G 突变位点细胞模型的构建提供了新的思路, 将来有可能利用 Western blot 技术及免疫荧光技术验证此突变是否导致翻译成蛋白质的量的改变, 并进一步探讨由此引起的蛋白质结构的改变。

综上所述, 本研究中发现了一 ADCC 家系的 *GJA3* 基因突变 (c. 143A>G), 不仅扩增了 *GJA3* 基因的突变谱, 进一步验证了 *GJA3* 基因在晶状体发育过程中的重要作用, 同时也对先天性白内障的分子生物学研究提供了有用的信息。

## 参考文献

- [1] Ren Q, Riquelme MA, Xu J, et al. Cataract-causing mutation of human connexin 46 impairs gap junction, but increases hemichannel function and cell death [J/OL]. PLoS One, 2013, 8 (9) : e74732 [2016-02-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760834/>. DOI:10.1371/journal.pone.0074732.
- [2] Graw J. Genetics of crystallins: cataract and beyond [J]. Exp Eye Res, 2009, 88 (2) : 173-189. DOI:10.1016/j.exer.2008.10.011.
- [3] Shiels A, Hejtmancik JF. Genetics of human cataract [J]. Clin Genet, 2013, 84 (2) : 120-127. DOI:10.1111/cge.12182.
- [4] 张晓慧, 刘卫华, 董冰, 等. 中国北方一常染色体显性遗传先天性核性白内障家系 *CRYGD* 基因突变的鉴定 [J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33 (8) : 722-726. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.08.012.  
Zhang XH, Liu WH, Dong B, et al. A recurrent mutation of *CRYGD* gene in a northern Chinese family with autosomal dominant congenital nuclear cataract [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33 (8) : 722-726. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.08.012.
- [5] Huang B, He W. Molecular characteristics of inherited congenital cataracts [J]. Eur J Med Genet, 2010, 53 (6) : 347-357. DOI:10.1016/j.ejmg.2010.07.001.
- [6] Zhou G, Zhou N, Hu S, et al. A missense mutation in *CRYBA4* associated with congenital cataract and microcornea [J]. Mol Vis, 2010, 16 : 1019-1024.
- [7] Ge XL, Zhang Y, Wu Y, et al. Identification of a novel *GJA8* (Cx50) point mutation causes human dominant congenital cataracts [J/OL]. Sci Rep, 2014, 4 : 4121 [2016-01-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3927206/>. DOI:10.1038/srep04121.
- [8] Guleria K, Sperling K, Singh D, et al. A novel mutation in the connexin 46 (*GJA3*) gene associated with autosomal dominant congenital cataract in an Indian family [J]. Mol Vis, 2007, 13 : 1657-1665.
- [9] Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel [J]. Cell, 1996, 84 (3) : 381-388.
- [10] Devi RR, Reena C, Vijayalakshmi P. Novel mutations in *GJA3* associated with autosomal dominant congenital cataract in the Indian population [J]. Mol Vis, 2005, 11 : 846-852.
- [11] Mathias RT, Kistler J, Donaldson P. The lens circulation [J]. J Membr Biol, 2007, 216 (1) : 1-16. DOI:10.1007/s00232-007-9019-y.
- [12] Paul DL, Ebihara L, Takemoto LJ, et al. Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes [J]. J Cell Biol, 1991, 115 (4) : 1077-1089.
- [13] Ponnamp SP, Ramesha K, Matalia J, et al. Mutational screening of Indian families with hereditary congenital cataract [J]. Mol Vis, 2013, 19 : 1141-1148.
- [14] Mackay D, Ionides A, Kibar Z, et al. Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract [J]. Am J Hum Genet, 1999, 64 (5) : 1357-1364. DOI:10.1086/302383.
- [15] Zhou D, Ji H, Wei Z, et al. A novel insertional mutation in the connexin 46 (*gap junction alpha 3*) gene associated with autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family [J]. Mol Vis, 2013, 19 : 789-795.
- [16] Kumar M, Agarwal T, Kaur P, et al. Molecular and structural analysis of genetic variations in congenital cataract [J]. Mol Vis, 2013, 19 : 2436-2450.
- [17] Zhang X, Wang L, Wang J, et al. Coralliform cataract caused by a novel connexin46 (*GJA3*) mutation in a Chinese family [J]. Mol Vis, 2012, 18 : 203-210.
- [18] Jiang H, Jin Y, Bu L, et al. A novel mutation in *GJA3* (connexin46) for autosomal dominant congenital nuclear pulverulent cataract [J]. Mol Vis, 2003, 9 : 579-583.
- [19] Bennett TM, Mackay DS, Knopf HL, et al. A novel missense mutation in the gene for gap-junction protein alpha3 (*GJA3*) associated with autosomal dominant "nuclear punctate" cataracts linked to chromosome 13q [J]. Mol Vis, 2004, 10 : 376-382.
- [20] Li Y, Wang J, Dong B, et al. A novel connexin46 (*GJA3*) mutation in autosomal dominant congenital nuclear pulverulent cataract [J]. Mol Vis, 2004, 10 : 668-671.
- [21] Bennett TM, Shiels A. A recurrent missense mutation in *GJA3* associated with autosomal dominant cataract linked to chromosome 13q [J]. Mol Vis, 2011, 17 : 2255-2262.
- [22] Zhang L, Qu X, Su S, et al. A novel mutation in *GJA3* associated with congenital Coppock-like cataract in a large Chinese family [J]. Mol Vis, 2012, 18 : 2114-2118.
- [23] Rees MI, Watts P, Fenton I, et al. Further evidence of autosomal dominant congenital zonular pulverulent cataracts linked to 13q11 (*CZP3*) and a novel mutation in connexin 46 (*GJA3*) [J]. Hum Genet, 2000, 106 (2) : 206-209.
- [24] Foote CI, Zhou L, Zhu X, et al. The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions [J]. J Cell Biol, 1998, 140 (5) : 1187-1197.
- [25] Tusnády GE, Simon I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server [J]. Bioinformatics, 2001, 17 (9) : 849-850.

(收稿日期: 2016-05-24)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)