

· 临床研究 ·

应用外显子结合目标区域捕获测序芯片对一回族先天性白内障家系致病基因的检测

容维宁 邹刚 盛迅伦 李慧平 张芳霞

【摘要】 **背景** 先天性白内障是造成儿童盲和弱视的重要原因,其中约 50% 的先天性白内障具有遗传性。 **目的** 应用眼遗传病外显子结合目标区域捕获测序芯片检测一常染色体显性遗传先天性白内障家系的致病基因。 **方法** 于 2011 年在宁夏眼科医院收集一回族常染色体显性遗传先天性白内障家系,采集家系中患者及表型正常成员的临床资料。对家系成员进行眼科检查,抽取患者、表型正常家系成员及 300 名正常对照者的外周静脉血各 5 ml,提取 DNA,利用眼遗传病外显子结合目标区域捕获测序芯片筛查和检测候选致病突变位点。采用 PCR 和直接测序法对家系成员和正常对照者进行突变位点验证,最终确定致病突变位点。 **结果** 该家系共 6 代 61 名成员,均为回族,先天性白内障患者 18 例,为 5 代遗传,符合常染色体显性遗传特征。患者中合并眼球震颤和斜视者 7 例,合并高度近视者 4 例,来诊前均已实施白内障摘出术。利用眼遗传病外显子结合目标区域捕获测序芯片检测结合生物信息学方法筛查后共得到 8 个候选致病突变位点,其中 5 个在非编码区,3 个在编码区,通过 PCR 和直接测序法验证确定 *CRYGD* 基因上的 P24T 突变是该家系的致病突变位点。该突变与家系内所有患者表型共分离,在家系表型正常者及 300 名正常对照者均未发现此突变。 **结论** 外显子结合目标区域捕获测序技术快速检测 *CRYGD* 基因 P24T 突变为该先天性白内障家系致病突变,该技术为临床表型多样、致病基因众多的先天性白内障的致病基因检测提供新的手段。

【关键词】 白内障/遗传性; 家系谱; 外显子; 寡核苷酸序列分析/方法; 基因突变; 聚合酶链反应; 回族

Detection of disease-causing gene in a Hui congenital cataract pedigree by exon combined target region capture sequencing chip Rong Weining, Zou Gang, Sheng Xunlun, Li Huiping, Zhang Fangxia. Ningxia Eye Hospital, Ningxia People's Hospital, Yinchuan 750001, China

Corresponding author: Sheng Xunlun, Email: shengxunlun@163.com

【Abstract】 **Background** Congenital cataract is an important cause of blindness and amblyopia in children, and about 50% of congenital cataract is hereditary. **Objective** The aim of this study was to determine the disease-causing gene of one Hui congenital cataract pedigree by using exon combined target region capture sequencing chip of eye diseases. **Methods** This study was approved by Ethic Committee of Ningxia People's Hospital and followed Declaration of Helsinki. One Hui congenital cataract pedigree was recruited in Ningxia Eye Hospital in 2011. All the disease history of the members in this family were collected and recorded, and the eye examinations were performed. The peripheral blood specimens were collected from family members and 300 healthy individuals for the extraction of DNA. Exon combined target region capture sequencing chip of eye diseases was used to screen the candidate disease-causing mutations, then PCR and direct sequencing were used to confirm the disease-causing mutations. **Results** This Hui family included 61 members of 6 generations, and 18 patients were diagnosed in serial 5 passages, conforming to autosomal dominant inheritance pattern. Among 18 cataract patients, 7 individuals were associated with nystagmus and strabismus, and 4 patients had high myopia. Eight candidate pathogenetic mutations were detected by exon combined target region capture sequencing chip of eye diseases and bioinformatics method, with 5 mutations in

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.08.010

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(NZ11160); 宁夏科技攻关重大项目(2011ZYS175)

作者单位: 750001 银川, 宁夏人民医院 宁夏眼科医院

通信作者: 盛迅伦, Email: shengxunlun@163.com

noncoding regions and 3 in coding regions. The mutation P24T of *CYRGD* gene was confirmed as pathogenic mutation of this pedigree by using PCR and direct sequencing methods. These mutations co-segregated with affected members of the family, and the mutations were not found in the unaffected family members and 300 unrelated controls.

Conclusions P24T of *CYRGD* gene mutation is confirmed as pathogenic mutation of this pedigree. Exon combined target region capture sequencing chip provides a new approach to detect disease-causing mutations of congenital cataract with diversity clinical phenotypes.

[Key words] Cataract/genetics; Pedigree; Exons; Oligonucleotide array sequence analysis/methods; Mutations; Polymerase chain reaction; Hui nationality

先天性白内障是指出生前即存在或出生后逐渐形成的先天遗传性或发育障碍的白内障,是造成儿童盲和弱视的重要原因^[1-2]。天津、上海和北京儿童盲的病因调查显示,22%~30%儿童盲由先天性白内障导致,是儿童盲的第2位原因^[3]。新生儿中,单纯先天性白内障的发病率约为1/1918^[4]。根据晶状体混浊的形态和部位,先天性白内障可以分为前极白内障、后极白内障、核性白内障、绕核白内障、粉尘状白内障、膜性白内障、缝状白内障、冠状白内障、硬核液化白内障、全白内障和珊瑚状白内障等^[5]。先天性白内障的发病可为家族性或散发性、单眼或双眼发病,可伴或不伴全身其他先天性异常,其中约50%的先天性白内障是遗传性的。由于遗传性先天性白内障致病基因不会致命,不影响生育,因此基因外显率很高,并可以连续传代。以往针对遗传性疾病采用传统的研究方法需要对疾病相关致病基因的全部外显子区域进行分析,检测耗时较长,费用巨大,且效率低。近年来出现的外显子结合目标区域捕获测序技术能够获得特定区域的遗传信息,利用该技术对一回族常染色体显性遗传的先天性白内障家系进行基因突变检测分析,明确突变位点的同时可以检验外显子结合目标区域捕获测序这一技术的实用性和有效性。

1 资料与方法

1.1 资料

收集2011年在宁夏眼科医院就诊的一回族常染色体显性遗传先天性白内障家系作为研究对象,该家系来自于宁夏回族自治区吴忠市。所有患者及其他家系成员均接受详细的眼科检查,包括裂隙灯显微镜检查、眼压测量、眼底检查、验光等。详细询问并记录家族史、婚育史及其他疾病史,绘制家系图。正常对照组为同期300名无亲缘关系的健康者,于宁夏眼科医院行眼科检查,排除其他眼部疾病。本研究遵循赫尔辛基宣言,并经宁夏眼科医院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

采集受试者外周抗凝血各5 ml,利用QIAamp Blood试剂盒(德国Qiagen公司)提取全基因组DNA。DNA质量浓度 ≥ 50 ng/ μ l,吸光度A260/A280为1.8~2.0,DNA总量 ≥ 6 μ g。选取先证者(Ⅳ10)、另2例患者(Ⅲ7、Ⅳ24)和1名表型正常家系成员(Ⅴ10),运用眼遗传病外显子结合目标区域捕获测序芯片对目前已知的315个眼部遗传性疾病的相关基因进行筛查。采用华大基因研究院专门定制的合成芯片(美国NimbleGen公司),该芯片设计包含1.5 Mb的区域,共计283个眼部疾病的相关基因,其中白内障相关的基因23个,每个基因设计时包含向内含子区延伸的10 bp碱基。

基因组DNA用Covaris S2(美国Massachusetts公司)随机打断成200~300 bp的文库,文库经过纯化杂交后芯片捕获、洗脱、测序(Illumina HiSeq2000 Analyzers)(测序深度为150 \times),经过Illumina pipeline图像分析和碱基识别处理,得到原始数据。对于检测结果,优先关注目前已知的先天性白内障的相关致病基因,并按照以下条件进行筛选:db单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)选择频率 ≤ 0.001 以及dbSNP数据库未收录的SNP位点;HapMap选择频率 ≤ 0.001 以及数据库未收录的SNP位点;1000 genome选择频率 < 0.01 的突变位点;优先关注编码区突变位点,同时结合遗传方式确定候选致病突变位点。运用PCR和直接测序法在其他家系成员和正常对照组中进行突变位点验证,最终确定致病突变位点。

2 结果

2.1 家系成员的遗传特征

该家系共6代61名成员,均为回族,先天性白内障患者18例,分布于5代(图1),其中3例已去世,现有的15例患者中年龄最大者79岁(Ⅲ2),最小者8岁(Ⅴ12),所有患者在2008年以前均已行白内障手术。行白内障手术时,年龄最大者44岁(Ⅲ2),最小者3岁(Ⅴ12)。除Ⅲ2患者接受了单纯白内障摘出术外,

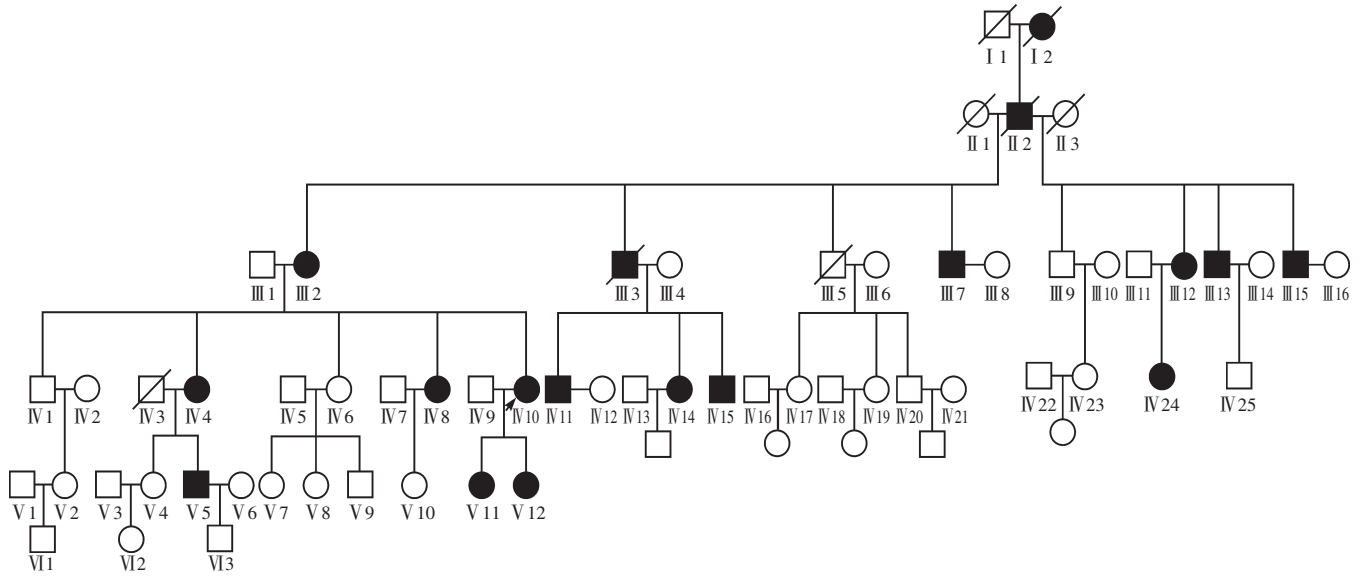


图 1 先天性白内障家系图 ■:患病男性 ●:患病女性 □:正常男性 ○:正常女性 /:已去世 ↗:先证者

其余患者均行白内障摘出联合人工晶状体植入术,患者的人工晶状体均在位,透明,无后发性白内障。该家系中除 1 例患者(Ⅲ7)外,其余患者的最佳矫正视力均低于 0.3,部分患者合并高度近视、眼球震颤及斜视(表 1)。所有患者眼压正常,角膜透明,前房中等深度。

先天性白内障的致病基因(*CTDP1* 基因和 *CRYBB1* 基因),3 个位于编码区的突变位点所在的基因分别是 *CRYGD* 基因和 *CTDP1* 基因,结合该家系显性遗传的模式,最终确定 *CRYGD* 基因上的 208988920 和 208989018 杂合突变位点为候选致病突变位点(表 2)。

表 1 先天性白内障家系中部分患者的临床资料

患者	性别	年龄(岁)	白内障手术时患者年龄(岁)	矫正视力		合并高度近视	合并眼球震颤	合并斜视
				OD	OS			
Ⅲ2	女	77	44	0.10	0.15	是	是	是
Ⅲ7	男	65	31	0.80	0.70	是	否	否
Ⅲ12	女	52	31	0.15	0.12	是	是	是
Ⅳ8	女	42	23	0.20	0.10	是	是	是
Ⅳ10	女	37	22	0.06	0.10	否	是	是
Ⅳ24	女	24	6	0.20	0.20	否	是	是
V11	女	13	4	0.20	0.30	否	是	是
V12	女	6	3	0.15	0.15	否	是	是

注:OD:右眼;OS:左眼

表 2 候选致病性突变位点

染色体	位置	基因	遗传方式	dbSNP	1000 基因组	HapMap
1	16482520	<i>EPHA2</i>	AD	未收录	0	未收录
2	208988920	<i>CRYGD</i>	AD	未收录	0.0073	未收录
2	208989018	<i>CRYGD</i>	AD	0	0	未收录
3	133185521	<i>BFSP2</i>	AD	0	0	未收录
11	31811645	<i>PAX6</i>	AD/AR	未收录	0	未收录
11	31811669	<i>PAX6</i>	AD/AR	未收录	0	未收录
18	77474714	<i>CTDP1</i>	AR	未收录	0	未收录
22	27004124	<i>CRYBB1</i>	AR	未收录	0	未收录

注:AD:常染色体显性遗传;AR:常染色体隐性遗传;SNP:单核苷酸多态性

2.2 受检者致病突变基因筛查

选取先证者Ⅳ10、患者Ⅲ7和Ⅳ24以及家系表型正常成员V10进行目标区域测序,共得到4133个SNP和613个插入缺失位点,其中70个SNP和13个插入缺失位点与白内障相关,参考dbSNP(<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/database/snp132.txt.gz>)、HapMap(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/hapmap>)、1000基因组(<ftp://ftp.1000genomes.ebi.ac.uk/vol1/ftp>)和本地数据库,将最小等位基因频率值大于0.005的位点去掉,最终确定了8个候选致病突变位点,其中5个在非编码区,3个在编码区,涉及6个基因,这些基因中有2个为常染色体隐性遗传

2.3 该家系中致病基因的验证

利用PCR和直接测序技术在其他家系成员中进行突变位点验证,发现*CRYGD*基因P24T突变与该家系中患者表型呈共分离状态,同时在正常对照组中进行该位点的验证,未检测到该位点突变,证实*CRYGD*基因的P24T突变为该家系的致病原因(图2)。

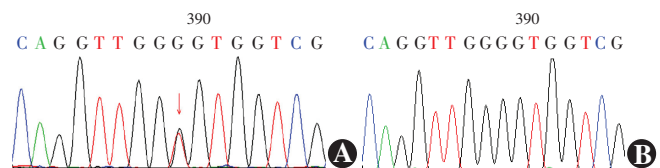


图 2 *CRYGD* 基因测序结果 A:先证者Ⅳ10 *CRYGD* 基因测序结果可见 *CRYGD* 基因 P24T 的 G→T 突变(箭头) B:正常家系成员 *CRYGD* 基因测序结果

3 讨论

先天性白内障患儿晶状体混浊干扰了正常的视网膜光觉和形觉刺激,从而影响患儿视觉系统的正常发育,产生形觉剥夺性弱视,同时还可能导致或加重斜视和眼球震颤。先天性白内障的治疗不同于成人白内障,早期诊断和治疗先天性白内障对于患儿双眼视功能的建立至关重要。

本研究中收集的一回族家系中的先天性白内障患者在就诊时均已实施先天性白内障手术,既往的临床病历资料对白内障的形态描述不清,因此不能对患者的临床表型做出正确判断。在进行基因研究时无法根据其表型优先选定某些特定的基因进行研究,如果逐一已知先天性白内障致病基因进行筛查将会耗费巨大的人力、物力、财力和时间。连锁分析、全基因组扫描筛选出候选致病基因的数目较多,给后期的验证工作带来了巨大的困难,同时,减数分裂期间的基因重组也会导致分析结果错误。近年来出现的外显子结合目标区域测序利用特制的探针针对某段特定的 DNA 序列进行捕获,富集后进行高通量测序,具有效率高、成本低、耗时短的优点^[6]。本研究中根据该家系的发病特点,最终选定外显子结合目标区域测序技术进行基因突变的检测分析,在很短的时间内成功发现该家系的致病基因和突变位点,提高了研究效率。外显子测序可用于发现疾病相关的基因信息,利用测序信息结合临床特征可对相关的遗传病做出正确的诊断,从而进一步提高临床诊断水平,但外显子测序会产生大量的数据,需要利用公共数据库结合一些网络测评软件对其结果进行分析和筛选以得到有用的信息,为进一步验证工作提供研究基础。

已证实的与先天性白内障相关的基因超过 40 个,其中常染色体显性遗传的致病基因有 26 个,其数量仍在逐年增加^[7],这些已知的致病基因中晶状体蛋白基因突变接近 50%。*CRYGD* 基因定位于 2q33-35,本研究中检测到的 P24T 突变位点在不同人群研究中均有报道,可引起不同的表型,但在中国回族人中尚属首次发现。Yang 等^[8]曾对 2 个常染色体显性遗传的珊瑚状先天性白内障家系进行基因突变检测分析,均检测到了 *CRYGD* 基因的 P24T 位点突变。目前文献已报道的珊瑚状表型的白内障都是由 *CRYGD* 基因突变引起的,提示珊瑚状表型和 *CRYGD* 基因型具有一定的相关性。之前报道过的与 *CRYGD* 基因 P24T 突变位点相关的 10 个先天性白内障家系中,除了 6 个先天性珊瑚状白内障家系外,还有 2 个为先天性蓝色点状白

内障,1 个为先天性板层白内障,1 个为先天性簇状混浊白内障^[9-12],说明 *CRYGD* 基因 P24T 突变位点是先天性白内障的热点突变,但也提示遗传性先天性白内障有着较大的遗传和临床表型的异质性。本研究中收集的家系中,所有先天性白内障患者均携带有 P24T 位点突变,但是患者的临床表型不尽相同,绝大多数患者幼年时即实施了白内障摘出联合人工晶状体植入术,但术后矫正视力仍很差,个别患者同时合并高度近视、眼球震颤和斜视,该家系中 1 例患者(Ⅲ7)术后保持了较好的矫正视力,且无其他并发症,充分证实了先天性白内障的遗传异质性。本研究为一回族家系,*CRYGD* 基因的 P24T 突变在回族和汉族先天性白内障的致病性是否相同还需要进一步扩大样本量和范围进行验证。

Yang 等^[8]通过对 P24T 突变体蛋白进行生物物理分析,结果显示突变型 *CRYGD* 蛋白的溶解性明显低于野生型。Evans 等^[13]采用同步射线圆二色性光谱法分析发现,P24T 突变体蛋白增加了一层 β -片层结构,可能与苏氨酸代替脯氨酸,从而引起蛋白某个边缘 β -链的延伸有关,提示 P24T 突变体引起的白内障是由蛋白不溶性增加所致,而非由蛋白的稳定性下降引起。Jung 等^[14]通过磁共振研究发现,P24T 突变体的关键局部构象和动力学与野生型不同,苏氨酸代替脯氨酸后改变了蛋白相关区域的运动,诱发了蛋白的聚集或多聚化,最终导致 *CRYGD* 蛋白的可溶性降低和高相对分子质量聚合体复合物的形成。

鉴于遗传性先天性白内障基因型与临床表型的关系尚不清晰,因此需要对更多的先天性白内障家系进行研究,以便发现更多的致病基因和突变位点,进而研究致病基因与其编码蛋白的功能,有助于更好地阐明其发病机制,从而为先天性白内障的防治提供基础。本研究中采用外显子结合目标区域捕获测序技术对中国一回族家系进行突变基因筛选,补充了相关研究中回族先天性白内障致病基因的信息,同时发现这个家系的突变基因与以往研究的汉族先天性白内障家系没有明显不同。外显子结合目标区域捕获测序技术在遗传性先天性白内障的基因研究方面具有快速、可靠、有效和实用的特点,可常规应用于遗传性先天性白内障的基因诊断和优生诊断。

参考文献

- [1] Scott MH, Hejtmancik JF, Wozencraft LA, et al. Autosomal dominant congenital cataract. Interocular phenotypic variability [J]. *Ophthalmology*, 1994, 101 (5): 866-871.
- [2] Hejtmancik JF. The genetics of cataract: our vision becomes clearer [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62 (3): 520-525.

- [3] Cobb BA, Petrash JM. Structural and functional changes in the alpha A-crystallin R116C mutant in hereditary cataracts [J]. *Biochemistry*, 2000, 39(51): 15791-15798. doi:10.1021/bi001453j.
- [4] Lambert SR, Drack AV. Infantile cataracts [J]. *Surv Ophthalmol*, 1996, 40(6): 427-458.
- [5] Hejtmančík JF, Smaoui N. Molecular genetics of cataract [J]. *Dev Ophthalmol*, 2003, 37: 67-82.
- [6] Chen X, Zhao K, Sheng X, et al. Targeted sequencing of 179 genes associated with hereditary retinal dystrophies and 10 candidate genes identifies novel and known mutations in patients with various retinal diseases [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(3): 2186-2197. doi:10.1167/iovs.12-10967.
- [7] Yang Z, Su D, Li Q, et al. A novel T→G splice site mutation of CRYBA1/A3 associated with autosomal dominant nuclear cataracts in a Chinese family [J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 1283-1288.
- [8] Yang G, Xiong C, Li S, et al. A recurrent mutation in CRYGD is associated with autosomal dominant congenital coralliform cataract in two unrelated Chinese families [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 1085-1089.
- [9] Mackay DS, Andley UP, Shiels A. A missense mutation in the gammaD-crystallin gene (CRYGD) associated with autosomal dominant "coral-like" cataract linked to chromosome 2q [J]. *Mol Vis*, 2004, 10: 155-162.
- [10] Shentu X, Yao K, Xu W, et al. Special fasciculiform cataract caused by a mutation in the gammaD-crystallin gene [J]. *Mol Vis*, 2004, 10: 233-239.
- [11] Khan AO, Aldahmesh MA, Ghadhfan FE. Founder heterozygous P23T CRYGD mutation associated with cerulean (and coralliform) cataract in 2 Saudi families [J]. *Mol Vis*, 2009, 15: 1407-1411.
- [12] Jia X, Zhang F, Bai J, et al. Combinational analysis of linkage and exome sequencing identifies the causative mutation in a Chinese family with congenital cataract [J/OL]. *BMC Med Genet*, 2013, 14: 107 [2015-01-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3851584/>. doi:10.1186/1471-2350-14-107.
- [13] Evans P, Wyatt K, Wistow GJ, et al. The P23T cataract mutation causes loss of solubility of folded gammaD-crystallin [J]. *J Mol Biol*, 2004, 343(2): 435-444.
- [14] Jung J, Byeon IJ, Wang Y, et al. The structure of the cataract-causing P23T mutant of human gammaD-crystallin exhibits distinctive local conformational and dynamic changes [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(12): 2597-2609. doi:10.1021/bi802292q.

(收稿日期:2015-01-31)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)

读者·作者·编者

本刊投稿方式

投稿请登录中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>),点击“业务中心”,经中华医学会远程稿件处理系统(<http://www.cma.org.cn/ywzx/index.html>)或中华医学会杂志社网站(<http://www.medline.org.cn/>),根据提示进行注册后投稿。投稿时请使用 Word 格式(.doc 文件类型),投稿后请注意自留原稿,并保留论文相关的原始资料,以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”,填写有关项目并请每位作者亲笔签字,加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部,其中作者签名顺序和作者单位署名名称应与投稿时文章中著录的相一致,如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意:(1)在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投,但投稿时应向编辑部说明,非中文文字期刊已发表的文稿须征得首次发表期刊的同意。(2)作者须告知与该研究有关的利益冲突,如该研究被某机构资金资助的声明或与审稿人的利益关系。(3)如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。

(本刊编辑部)

消息

第二届中国儿科发展国际论坛

儿童眼科分论坛暨儿童眼科诊疗常规及新技术学习班通知

为了进一步促进中国儿科事业的发展,搭建儿科同道交流的国际平台,首都医科大学附属北京儿童医院、美国波士顿儿童医院、美国丹娜法伯癌症研究院和美国洛杉矶儿童医院将于 2015 年 10 月 9—11 日在国家会议中心联合举办第二届中国儿科发展国际论坛(CIFPD)。本届论坛分为 42 个分论坛,10 月 10—11 日为儿童眼科分论坛暨儿童眼科诊疗常规及新技术学习班,特邀请加拿大 Brenda Gallie 教授,新加坡 Bridgette Yeoh 教授,美国 Norman B. Medow、Cheng Zhang、杨东升教授,国内知名眼科专家王宁利、赵堪兴、范先群、赵培泉、项道满、王乐今、李冬梅、黄一飞、唐焯、王军、李巧娴、付晶、吴夕、苏鸣、陈志钧、陶利娟、许江涛教授等授课,内容涵盖整合医学与眼科、儿童斜弱视、先天性眼球震颤、儿童眼部肿瘤、儿童眼整形、视光学、儿童眼底疾病、先天性青光眼、白内障、儿童角膜疾病等儿童眼科疾病的临床诊断及治疗,授课内容丰富,紧密结合临床,汇集专家多年临床经验,根据病案实例讲授新进展、新理论、新方法,教学方法包括讲座、手术视频演示及临床疑难问题答疑。学习班结束后将授予市级继续教育 I 类学分 6 分。

收费标准:培训费 1 000 元/人(含儿科发展国际论坛培训),食宿统一安排,费用自理。

报名方式:请将报名回执加盖单位公章后以传真或邮寄方式报名参会。会务组收到报名表后将于论坛开始前 14 d 发出正式报到通知,告知报到地点、乘车路线、授课专家及课程安排等具体事项。报名电话:(86)10-84228830。传真:(86)10-84228830。联系人:王楠、张研。联系电话:(86)10-13693335039、(86)10-13911318093。邮箱:cnfulton@163.com。地址:北京市东城区雍和家园二期 3 号楼 405 室。

(首都医科大学附属北京儿童医院)