

· 临床研究 ·

## 第二代测序技术在一中国先天性白内障家系致病基因检测中的应用

肖海 张卉 李涛 吴东 张朝阳 时伟丽 秦利涛 廖世秀

**【摘要】** **背景** 某些遗传性疾病具有高度遗传异质性,因此传统的 Sanger 测序技术已经不能满足医学研究及临床工作的需求。第二代测序(NGS)技术由于具有费用低及检测速度快的优点而得到广泛应用,但在先天性眼病突变基因的检测中的应用效果有待验证。**目的** 探讨 NGS 技术对先天性白内障患者进行致病基因诊断和产前诊断的可行性。**方法** 于 2013 年 1 月收集来自河南省洛阳市的一汉族先天性白内障家系,抽取家系中 3 例患者(Ⅱ2、Ⅲ3、Ⅲ4)和 3 名表型正常者(Ⅱ3、Ⅲ1、Ⅲ2)的外周血各 2 ml, EDTA 抗凝,在河南省医学遗传研究所应用 NGS 技术对先证者进行基因突变位点检测,并采用 Sanger 测序技术对 NGS 结果进行验证,然后用 Sanger 测序技术对该家系其他成员的外周血样本进行突变位点的序列分析,根据确定的致病突变位点对先证者的胎儿进行产前诊断。本研究遵循赫尔辛基宣言,检测方案经河南省人民医院医学伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。**结果** 该家系 4 代 14 位成员中共 5 例患者,其中男 2 例,女 3 例,分布于 I、II、III 代中,其他家系成员表型正常,符合常染色体显性遗传方式。NGS 检测发现先证者 III 3 *CRYBB1* 基因第 6 外显子上存在 c.682T>C(p. S228P) 杂合突变, Sanger 法验证了该点突变。Sanger 法检测发现家系中患者均存在 *CRYBB1* 基因 c.682 T>C 突变,而家系中表型正常者 *CRYBB1* 基因的 c.682 位点基因型为 T/T 野生型。产前诊断结果显示胎儿(IV1) *CRYBB1* 基因 c.682 位点基因型为 T/T 野生型。**结论** NGS 可用于先天性白内障基因突变的快速检测,该家系致病性基因为 *CRYBB1* 基因 c.682T>C 突变,应用 NGS 技术结合一代测序技术成功对先证者进行了产前诊断。

**【关键词】** 先天性白内障; 家系谱; 基因突变; DNA 测序分析方法; 第二代测序; 产前诊断

**Application of next-generation sequencing in detection of mutation gene in a Chinese pedigree with congenital cataract** Xiao Hai, Zhang Hui, Li Tao, Wu Dong, Zhang Chaoyang, Shi Weili, Qin Litao, Liao Shixiu. Medical Genetic Institute of Henan Province, Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Liao Shixiu, Email: ychslshx@126.com

**[Abstract]** **Background** Due to the genetic heterogeneity of many diseases, the Sanger sequencing technology is far from satisfying the needs of scientific research and clinical applications. The next-generation sequencing (NGS) technology is being widely used in relevant studies because of its lower cost and much higher throughput. **Objective** This study was to explore the feasibility of NGS technology for the detection of genetic cause of congenital cataract. **Methods** A Chinese congenital cataract pedigree was collected from Luoyang city in Medical Genetic Institute of Henan Province in January, 2013. The peripheral blood of 2 ml was obtained from each 3 patients with congenital cataract (Ⅱ2, Ⅲ3, Ⅲ4) and 3 subjects with normal phenotype (Ⅱ3, Ⅲ1, Ⅲ2) in this pedigree respectively using EDTA anticoagulant tube. The mutant gene of proband was detected by NGS, and the result was verified by Sanger sequencing. Sanger sequencing was employed to determine the mutation sites of other subjects in this pedigree and further to perform the prenatal diagnosis. The research followed the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Medical Ethics Committee of Henan Provincial People's Hospital. Written informed

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.08.008

基金项目: 国家自然科学基金项目(81170581、81450018); 河南省科技厅科技发展项目(1224)

作者单位: 450003 郑州大学人民医院 河南省人民医院 河南省医学遗传研究所

通信作者: 廖世秀, Email: ychslshx@126.com

consent was obtained from each subject prior to any medical examination. **Results** Total 5 patients were found in 14 family members of 4 generations in this pedigree, including 2 males and 3 females in generation of I, II, III, and the other family members showed normal phenotype, which followed autosomal dominant inheritance pattern. NGS revealed that the proband occurred a heterozygous mutation of c.682 (p. S228P) in the exon 6 of *CRYYB1* gene, and the outcome was further confirmed by Sanger sequencing. In addition, this heterozygous mutant gene was also found in other patients of this pedigree. However, the genotype of c.682 in the exon 6 of *CRYYB1* gene was T/T wild type in the subjects with normal phenotype in this pedigree. The genotype of *CRYYB1* gene was T/T wild type in the fetus (IV1) by prenatal diagnosis. **Conclusions** NGS is a useful tool for the detection of mutant gene in congenital cataractous pedigree. The heterozygous mutation of c.682T>C (p. S228P) in the exon 6 of *CRYYB1* gene is the causative mutation in this pedigree. NGS combined with Sanger sequencing enables prenatal diagnosis of the disease.

[**Key words**] Cataract/congenital; Pedigree; Mutation; DNA Sequence analysis; Next-generation sequencing; Prenatal diagnosis

先天性白内障是在胎儿时期各种因素所导致的晶状体发育异常,胎儿出生时或出生 1 年以内晶状体出现不同程度的混浊,是儿童盲的主要原因之一<sup>[1]</sup>。先天性白内障的发病率为 0.01%~0.06%<sup>[2]</sup>,临床可表现为单纯眼部异常,也可作为某些综合征的多种表型之一<sup>[3]</sup>。约 1/3 的先天性白内障与遗传因素有关,其遗传方式包括常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传和伴性遗传 3 种,是否存在 Y 连锁遗传尚有待探讨<sup>[4]</sup>,大多数先天性白内障呈常染色体显性遗传。先天性白内障具有显著的临床异质性和遗传异质性,目前已报道的致病基因超过 20 个,突变近百种<sup>[5]</sup>。目前大多数研究仍采用连锁分析筛选热点基因联合 Sanger 测序的方法对先天性白内障进行基因诊断,但该方法操作繁琐且工作量巨大。第二代测序(next-generation sequencing, NGS)技术有高通量、高性价比的特点,在临床基因诊断的应用日益广泛,但尚未用于先天性白内障的基因诊断。本研究中利用 NGS 技术对一先天性白内障家系进行突变基因检测,并利用 Sanger 测序法对 NGS 结果进行验证,探讨 NGS 联合 Sanger 测序用于先天性白内障突变基因检测和产前诊断的可行性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

先证者(Ⅲ3)来自河南省洛阳市一汉族先天性白内障家系,曾于 2010 年在河南省人民医院眼科诊断为双眼先天性核性白内障、弱视。2013 年 1 月先证者怀孕 3 个月余,因有先天性白内障家族史要求进行胎儿致病基因检测,故就诊于河南省人民医院医学遗传研究所。先证者(Ⅲ3),女,24 岁,自幼视力较差,并呈进行性发展,来诊时双眼裸眼视力均为 0.3,矫正无助,畏光;裂隙灯显微镜检查见晶状体核呈橘皮样灰白色混浊(图 1),眼部 B 型超声检查、眼压测定及扩瞳后眼

底检查均未见明显异常。本研究遵循赫尔辛基宣言,检测方案经河南省人民医院医学伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。



图 1 先证者(Ⅲ3)裂隙灯显微镜照片 可见晶状体核呈橘皮样灰白色混浊

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 抽取家系内 3 例患者(Ⅱ2、Ⅲ3、Ⅲ4)和 3 名正常人(Ⅱ3、Ⅲ1、Ⅲ2)的外周血各 2 ml, EDTA 抗凝。采用 DNA 提取试剂盒(DNeasy Tissue Kit DNA)(德国 Qiagen 公司)提取外周血 DNA。采用 Nandrop 2000 分光光度计(美国 Thermo 公司)进行 DNA 定量检测。

**1.2.2 NGS 高通量测序** 取 3 μg DNA 经 S2 超声仪(美国 Covaris 公司)将其随机打断,纯化后的 DNA 使用平末端修复反应缓冲液和末端修复酶混合物进行末端补平,进而在其 3' 端加入多聚 A 形成特有的悬垂结构,通过接头连接以形成标准的 Solexa 测序文库,用 Nanodrop 2000 分光光度计对文库样本进行定量检测。文库经 PCR 扩增后,应用先天性白内障基因检测试剂盒(北京迈基诺基因科技公司)进行杂交,洗脱的杂交文库经质量控制证实合格后用 Illumina HiSeq2000 基

因分析系统(美国 Illumina 公司)上机测序。

**1.2.3 Sanger 测序** 按照常规 Sanger 测序法检测患者及家系其他成员 DNA。针对 *CRYBB1* 基因第 6 外显子,用 Primer Premier 3 软件设计引物,引物由上海生工生物工程有限公司合成,上游引物:5'-GACAGAAGTGAGAGAGCAGCC-3',下游引物:5'-GTTGTAATTATTAAGAGCGAGGAA-3'。PCR 反应体系为 50.0  $\mu$ l,其中 DNA 模板 1.0  $\mu$ l、上下游引物各 1.0  $\mu$ l、10 mmol/L dNTP 1.0  $\mu$ l、Taq buffer 5.0  $\mu$ l、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5.0  $\mu$ l、5 U/ $\mu$ l(商品单位) Taq 酶 0.5  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 35.5  $\mu$ l。PCR 反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,57  $^{\circ}$ C 退火 35 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 50 s,循环 35 次;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4  $^{\circ}$ C 保存。所有样本的 PCR 产物经纯化后均送往上海生工生物工程有限公司进行测序。测序结果与 NCBI 上的标准序列进行 BLAST 分析。

**1.2.4 产前诊断** 羊膜腔穿刺术抽取羊水(IV1)(孕 19 周时),采用 DNA 提取试剂盒提取羊水(IV1)DNA。按照 PowerPlex<sup>®</sup> 21 基因分型系统(美国 Promega 公司)说明书对孕妇及其羊水标本 DNA 进行基因分型。PowerPlex<sup>®</sup> 21 基因分型系统包含 21 个基因座(20 个短串联重复序列位点和 1 个性别位点)进行复合扩增及检测,包括 D1S1656、D2S1338、D3S1358、D5S818、D6S1043、D7S820、D8S1179、D12S391、D13S317、D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、Amelogenin、CSF1PO、FGA、Penta D、Penta E、TH01、TPOX 和 vWA。对比羊水标本与母体外周血标本的基因分型结果,如果羊水标本中有 2 个以上的基因座出现 3 个等位基因且这 3 个等位基因中有 2 个来源于母亲,或者所有基因座分型与母亲完全一致,判定为存在母体污染。排除母体污染后,利用 Sanger 法对胎儿(羊水)的 *CRYBB1* 基因第 6 外显子进行扩增,扩增产物经纯化后送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

**2 结果**

**2.1 家系调查情况**

该家系 4 代共 14 位成员,其中 I 1、II 2、II 5、III 3(先证者)和 III 5 为患病者,其中男 2 例,女 3 例,其他家系成员表型正常,符合常染色体显性遗传方式(图 2)。

**2.2 先证者突变位点检测**

先证者 III 3 在 chr22-26995531 位点,即 *CRYBB1* 基因(NM\_001887.3)第 6 外显子存在 c.682T>C 杂合突变(图 3)。

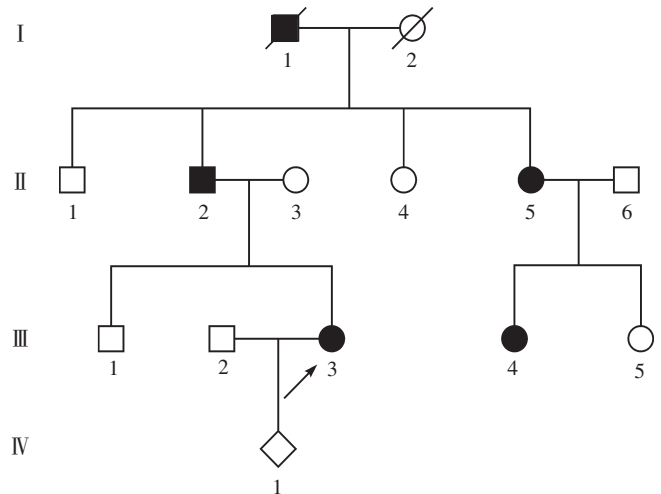


图 2 先天性白内障家系图谱 ■:患病男性 ●:患病女性 □:正常男性 ○:正常女性 ◇:胎儿 /:已去世 ↗:先证者



图 3 先证者 III 3 的 NGS 结果 红色区域为突变位点 c.682T>C

**2.3 Sanger 法验证家系成员 *CRYBB1* 基因突变位点**

通过 Sanger 法对先证者 III 3 的 NGS 结果进行验证,发现先证者 III 3 *CRYBB1* 基因第 6 外显子存在 c.682 T>C 杂合突变(图 4A)。对家系内其他成员 *CRYBB1* 基因的 c.682 位点进行检测,发现患者 II 2、III 4 均存在 c.682T>C 杂合突变(图 4B),表型正常的 II 3、III 1 和 III 2 c.682 位点的基因型均为 T/T 野生型(图 4C)。先天性白内障家系成员 *CRYBB1* 基因 c.682 位点基因型见表 1。

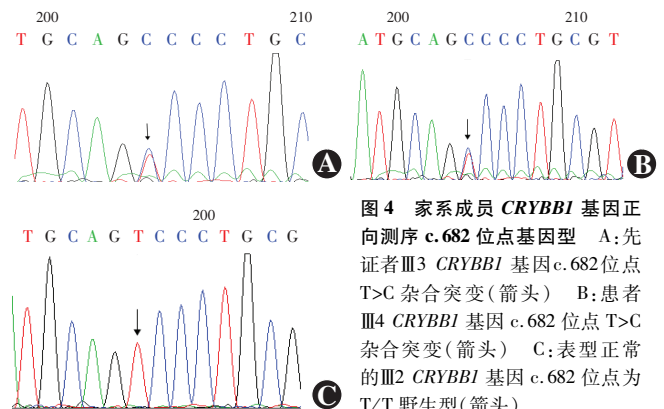


图 4 家系成员 *CRYBB1* 基因正向测序 c.682 位点基因型 A:先证者 III 3 *CRYBB1* 基因 c.682 位点 T>C 杂合突变(箭头) B:患者 II 2 *CRYBB1* 基因 c.682 位点 T>C 杂合突变(箭头) C:表型正常的 III 2 *CRYBB1* 基因 c.682 位点为 T/T 野生型(箭头)

表 1 家系成员 *CRYBB1* 基因 c.682 位点基因型

受检者	基因型	表型
Ⅱ 2	T/C	异常
Ⅱ 3	T/T	正常
Ⅲ 1	T/T	正常
Ⅲ 2	T/T	正常
Ⅲ 3	T/C	异常
Ⅲ 4	T/C	异常

### 2.4 PowerPlex® 21 基因分型

与母体(Ⅲ3)外周血基因分型结果(图 5A)比较,胎儿(Ⅳ1)基因分型结果显示 21 个基因位点均未出现 3 个或 3 个以上的等位基因(图 5B),所有基因座的分型结果不完全一致,羊水标本无母体污染,可以进行后续实验。

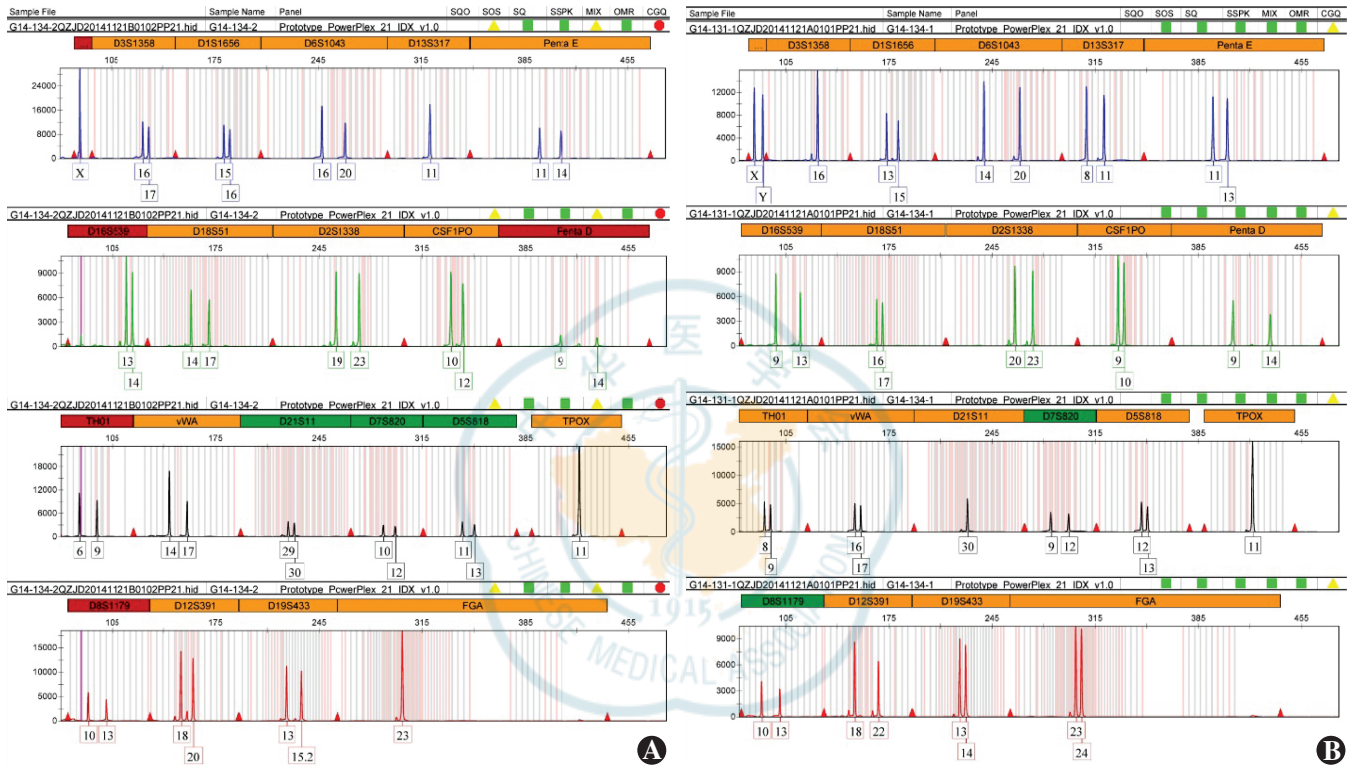


图 5 PowerPlex® 21 基因分型结果 A:母体Ⅲ3 PowerPlex® 21 基因分型结果 B:胎儿(Ⅳ1)PowerPlex® 21 基因分型结果 图中峰下所标数字代表各基因座的等位基因型

### 2.5 产前诊断

产前羊水诊断发现Ⅳ1 *CRYBB1* 基因的 c.682 位点未见异常(图 6),建议继续妊娠。先证者Ⅲ3在其他医院足月顺产一男婴,2014 年 10 月电话随访时Ⅳ1 1 岁余,外院体检视力正常。

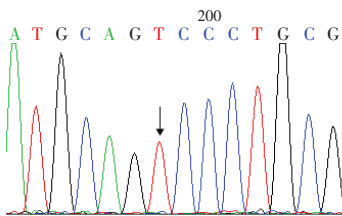


图 6 胎儿(Ⅳ1)的 *CRYBB1* 基因正向测序结果 *CRYBB1* 基因 c.682 位点基因型为 T/T 野生型(箭头)

### 3 讨论

与传统的 Sanger 测序法不同,NGS 通过构建 DNA 文库进行测序反应<sup>[6]</sup>,测序原理与焦磷酸测序技术相似,但是在生成新的 DNA 互补链时,加入的 dNTP 可

以释放出荧光信号,通过捕获荧光信号并转化为测序峰值,获得互补链序列信息,从而达到高通量测序的目的<sup>[7]</sup>。随着测序技术的不断进步和推广,NGS 在分子生物学研究、疾病的诊断等方面发挥了重要作用,已用于复杂性神经系统疾病、恶性肿瘤、免疫检测及微生物学研究等领域<sup>[8-9]</sup>。

遗传性先天性白内障可以呈现出不同的遗传方式,并且具有高度的遗传异质性<sup>[10]</sup>,即一种白内障可以由一种或多种致病基因引起,不同临床表型的白内障也可以由同一基因或同一基因家族发生突变所引起<sup>[11]</sup>,因此很难通过白内障的临床表型确定致病基因。1963 年,Renwick 等<sup>[12]</sup>通过连锁分析首次确定了与先天性白内障有关的一致致病基因突变位点,随着分子生物学技术的不断进展,目前已发现至少有 26 个基因与先天性白内障的发病有关。

本研究利用 NGS 技术同时对已知的先天性白内

障候选基因进行检测,发现先证者的 *CRYBB1* 基因存在 c. 682T>C 突变,利用一代测序技术对先证者的结果进行验证,发现 2 种测序结果一致。用一代测序方法对家系受检成员 *CRYBB1* 基因的 c. 682 位点进行检测,发现所有患者 *CRYBB1* 基因均存在 c. 682T>C 突变,而表型正常者该位点基因型均为野生型。*CRYBB1* 基因位于 22q12.1,包括 6 个外显子,其编码的 251 个氨基酸的  $\beta$ -B1 晶状体蛋白主要在发育早期的晶状体核中表达。 $\beta$ -晶状体蛋白家族共有  $\beta$ -A1 ~ A4 和  $\beta$ -B1 ~ B3 7 个成员,均为晶状体的主要结构蛋白,占晶状体蛋白质总量的 35%。c. 682T>C 点突变导致编码 *CRYBB1* 基因的 228 位氨基酸由极性的丝氨酸变为非极性的脯氨酸,可能是导致  $\beta$ -B1 晶状体蛋白功能发生改变的主要机制,Wang 等<sup>[13]</sup> 在另一中国先天性核性白内障家系中也发现了该突变,因此认为 *CRYBB1* 基因的 c. 682T>C 突变为该先天性白内障家系的致病性突变。

本研究中先证者因有先天性白内障家族史而要求对胎儿进行致病基因的检测。由于该家系先天性白内障致病基因不明,按照产前基因诊断流程,必须先通过先证者明确致病基因,才能针对性地对胎儿进行基因检测。传统的先天性白内障致病基因筛查的流程为根据家系分析寻找热点基因,然后通过连锁分析对热点基因进行筛选,最后通过测序来检测基因的突变位点。由于先天性白内障有高度遗传异质性,候选基因很多,并且存在基因重组的可能性,因此通过连锁分析进行检测费时、费力且有一定的漏检率。本研究中先证者就诊时已孕 16 周,羊水穿刺的最佳时间为孕 16 ~ 24 周,传统基因检测流程无法在最佳时机进行羊水穿刺术。NGS 技术无需电泳,可实时阅读检测信号,一次实验即可以检测 40 万 ~ 400 万条序列,阅读 1 G ~ 14 G 的碱基数,缩短了检测时间,并降低了测序费用,因此本研究中使用 NGS 技术代替传统的突变位点筛

选过程,可对所有已报道的先天性白内障致病基因同时进行检测,快速确定致病基因并用于产前诊断,为先天性白内障的基因诊断和产前胎儿的基因诊断提供了新的方法。

## 参考文献

- [1] 张振平. 晶状体病学[M]. 广州: 广东科技出版社, 2005: 47-48.
- [2] 姚克. 关注先天性白内障的疾病相关基因研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(6): 481-484. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 06. 001.
- [3] Hejtmancik JF. Congenital cataracts and their molecular genetics[J]. Semin Cell Dev Biol, 2008, 19(2): 134-149. doi: 10. 1016/j. semcdb. 2007. 10. 003.
- [4] 王云. 先天性白内障的分子遗传学研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(9): 891-896. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 09. 021.
- [5] 王开杰, 朱思泉, 程杰. 先天性白内障致病基因及功能研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2010, 46(3): 280-284. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2010. 03. 021.
- [6] Mardis ER. Next-generation sequencing platforms[J]. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif), 2013, 6: 287-303. doi: 10. 1146/annurev-anchem-062012-092628.
- [7] 王兴春, 杨致荣, 王敏, 等. 高通量测序技术及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 109-114.
- [8] Handel AE, Disanto G, Ramagopalan SV. Next-generation sequencing in understanding complex neurological disease[J]. Expert Rev Neurother, 2013, 13(2): 215-227. doi: 10. 1586/ern. 12. 165.
- [9] Chang F, Li MM. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing in cancer[J]. Cancer Genet, 2013, 206(12): 413-419. doi: 10. 1016/j. cancertgen. 2013. 10. 003.
- [10] Hejtmancik JF. Congenital cataracts and their molecular genetics[J]. Semin Cell Dev Biol, 2008, 19(2): 134-149. doi: 10. 1016/j. semcdb. 2007. 10. 003.
- [11] Shiels A, Mackay D, Ionides A, et al. A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(3): 526-532. doi: 10. 1086/301762.
- [12] Renwick JH, Lawler SD. Probable linkage between a congenital cataract locus and the duffy blood group locus[J]. Ann Hum Genet, 1963, 27: 67-84.
- [13] Wang J, Ma X, Gu F, et al. A missense mutation S228P in the *CRYBB1* gene causes autosomal dominant congenital cataract[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(9): 820-824.

(收稿日期: 2015-04-09)

(本文编辑: 刘艳 张宇)

## · 病例报告 ·

### 儿童三侧性视网膜母细胞瘤一例

肖亦爽 许江涛

患儿,女,2岁5个月,彝族,发现左眼瞳孔区发白2年余。2012年1月患儿家长发现其左眼瞳孔区有白色反光,至昆明市

儿童医院眼科就诊,经检查诊断为双眼视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB),建议手术摘除左眼,家属拒绝治疗。2014年3月再次至昆明市儿童医院眼科就诊。患儿,足月顺产,出生体质量3.7 kg,无吸氧史,否认白瞳或RB家族史。眼科检查:右眼外眼及眼前段正常;左眼眼睑红肿,眼球增大突出,角

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 08. 009

作者单位: 650034 昆明医科大学附属昆明市儿童医院眼科

通信作者: 许江涛, Email: xjt2003@. sina. com