

· 基础研究 ·

基因芯片法检测 21 例耳聋患者 基因突变的研究

韩崇旭¹,任传利¹,李贵玲¹,汪 骅¹,张素华¹,孙 艳²,关 兵³

(江苏省苏北人民医院 1. 临床医学检测中心;2. 医学生殖中心;3. 耳鼻咽喉科,江苏 扬州 225001)

摘要: 目的 探讨基因芯片在耳聋基因筛查中的应用价值。方法 对扬州市聋哑学校 21 例 8~18 岁的耳聋患者中 4 个耳聋相关基因上的 9 个热点突变进行检测,包括 GJB2 (35delG、176del16、235delC 及 299delAT)、GJB3 (C538T)、SLC26A4 (IVS7-2A > G、A2168G) 以及线粒体 12S rRNA (A1555G、C1494T)。结果 SLC26A4 突变阳性率为 38% (8/21),其中 IVS7-2A > G 杂合突变 7 例,IVS7-2A > G 与 A2168G 杂合突变 1 例;GJB2 突变阳性率为 19% (4/21),其中 176 del16 杂合突变 1 例,299 delAT 杂合突变 1 例,176 del16 与 235 delC 杂合突变 1 例,235 delC 纯合突变 1 例。结论 基因芯片是一种筛查耳聋基因的高效、经济、简便、灵敏及特异性方法。

关键词: 耳聋;基因芯片;基因突变

中图分类号:R766.43

文献标识码:A

文章编号:1007-1520(2012)01-0001-05

Study of gene mutation in 21 deaf patients with DNA microarray

HAN Chong-xu, REN Chuan-li, LI Gui-ling, et al.

(Medical Laboratory, Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the application of DNA microarray to the screening of deafness gene mutations. **Methods** Twenty one deaf patients aged from 8 to 18 years were extracted for peripheral blood. DNA microarray was applied to detecting mutations of 9 hot-spots in four most common pathologic genes, namely GJB2 (35delG, 176del16, 235delC, 299delAT), GJB3 (C538T), SLC26A4 (IVS7-2A > G, A2168G) and mitochondrial 12S rRNA (A1555G, C1494T). **Results** SLC26A4 gene mutations were detected in 8 cases (38%), including IVS7-2A > G heterozygous mutation in 7 and IVS7-2A > G and 2168A > G heterozygous mutation in one. Four cases (19%) carried GJB2 gene mutations, including 176 del 16 heterozygous mutation (n = 1), 299 delAT heterozygous mutation (n = 1), 176 del 16 and 235 del C heterozygous mutation (n = 1), and 235 del C homozygous mutation (n = 1). **Conclusion** DNA microarray is a sensitive and specific method for screening sequence variation in deafness gene.

Key words: Deafness; Gene array; Gene mutation

基因芯片又称 DNA 芯片、生物芯片,基因芯片技术系指将已知探针分子固定于支持物上,与标记的待检分子进行杂交,通过检测每个探针分子的杂交信号强度进而获取待检分子的数量和序列信息。目前,基因芯片技术以

快速、准确等特点应用到生物学众多的领域,主要包括基因突变检测、表达检测、基因组多态性分析和基因文库作图以及杂交测序等方面。耳聋是由于听觉系统发生病变导致不同程度听力损失的总称,发病率为 1/1000^[1]。

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2007072);江苏省卫生厅“科教兴卫工程”医学重点学科“实验诊断学”开放性课题(XK200723/WKF0809);扬州市科技局攻关项目(YZ2009047);江苏省苏北人民医院院内基金(yzucms201039)。

作者简介:韩崇旭,男,副教授。

通讯作者:韩崇旭,Email:hanchongxu@126.com.

遗传性耳聋也称家族性青少年型耳聋,遗传因素是导致聋儿发生的主要原因,比例高达 60%^[2],因本病属于血缘遗传性疾病,预防和治疗难度大,病残率高,是影响人口素质的因素之一。分子流行病学调查结果表明,我国聋哑人群中遗传性耳聋比例较高,GJB2、SLC26A4、线粒体基因突变是造成中国人耳聋的主要遗传致病因素^[3-5]。本研究利用北京博奥生物有限公司的九项遗传性耳聋基因芯片检测试剂盒,检测 21 例耳聋患者,以探讨基因芯片在耳聋基因筛查中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取扬州市聋哑学校 21 例受检聋哑患者,其中男 8 例,女 13 例;年龄 8 ~ 18 岁,平均 13.1 岁。根据纯音测听结果和第二次全国残疾人抽样调查标准诊断为先天性耳聋。

1.2 病史采集

获得患者知情同意后,采集受检者外周静脉血 3 ml,EDTAk2 抗凝。应用小剂量全血基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,用 Beckman-DU800 紫外分光光度计进行定量和纯度检测,纯度 OD260/280 = 1.7 ~ 2.0,基因组 DNA - 80℃ 保存,避免反复冻融。

1.3 基因芯片检测

1.3.1 检测原理 以人基因组 DNA 为模板,采用带有 Tag 标签序列的基因位点特异性引物对相关基因位点所在基因片段进行扩增和荧光标记,然后与能够识别相应标签序列的通用基因芯片进行杂交,最后通过对芯片进行扫描和数据分析即可得到所检测的 9 个基因位点的检测结果。由于针对所检测的 9 个位点的野生型和突变型分别设计了引物和探针,因此试剂盒可以同时检测出这 9 个位点的野生型和突变型结果。

1.3.2 仪器及试剂 Life Express PCR 仪 (HANGZHOU BIOER TECHNOLOGY CO. LTD),德国 Heraeus Biofuge Stratos 高速冷冻离心机 (kedro laboratory products),晶芯® BioMixer™ II 芯片杂交仪,晶芯® SlideWasher™ 8 芯片洗干仪,晶芯® LuxScan™ 10 K-B 微阵列芯片扫描仪及相应软件系统,质控探针、DNA 芯片杂交试

剂盒由北京博奥生物有限公司提供。

1.3.3 PCR 反应 在 PCR 标准实验室配液区内,按照被检样品数目的 2 倍(两套管分别用来检测同一个样品的不同位点)准备 200 μ l 离心管,并在管上标记样品编号,两套管须一一对应;将针对 4 个突变位点的 4 组引物分成 A 和 B 两个反应体系并分别进行多重 PCR。将试剂盒中的 PCR 扩增引物混合物和扩增试剂混合物分别充分混合至 A 管和 B 管,在每个 17 μ l 反应体系中加入 3 μ l 的样品 DNA 作为 PCR 扩增模板。PCR 程序:37℃ 10 min、95℃ 15 min、96℃ 1 min 预变性,94℃ 30 s、55℃ 30 s、70℃ 45 s 共 32 个循环;60℃ 充分延伸 10 min、4℃ 保存。在扩增过程中参数设置使温度以 0.4℃/s 的速度从 94℃ 降温至 55℃,以 0.2℃/s 的速度从 55℃ 升温至 70℃。

1.3.4 杂交 杂交缓冲液 50℃ 加热使其完全融化,瞬时离心,每份 10 μ l 分别加到 200 μ l 离心管。PCR 产物 95℃ 5 min,立即取出浸入冰水混合物中冰浴 3 min。从 A、B 扩增体系管中各取 2.5 μ l PCR 产物加到对应样品编号的 10 μ l 杂交缓冲液管中充分混匀并瞬时离心,用移液器将杂交反应混合物经盖片上的加样孔垂直加入到芯片上,14 μ l/份;迅速盖上杂交盒上盖,并密封;将其立即放入 50℃ 预热杂交仪中保温 60 min。

1.3.5 洗片 取出上述芯片,放入芯片架中,在洗片机中洗涤,程序为:洗涤液 I,42℃ 2 min;洗涤液 II,42℃ 1 min \times 2 次。1000 g 离心 2 min 后甩干。

1.3.6 扫描 使用晶芯 Lux Scan™ 10 K-B 微阵列芯片扫描仪和相应的遗传性耳聋基因芯片检测判别系统,进行信号读取及判断。

2 结果

检测结果见表 1。21 例耳聋患者中 SLC26A4 突变阳性率为 38% (8/21),其中 IVS7-2A > G 杂合突变 7 例(图 1A),IVS7-2A > G 与 2168A > G 杂合突变 1 例(图 1B);GJB2 突变阳性率为 19% (4/21),其中 176 del 16 杂合突变 1 例(图 1C),299 delAT 杂合突变 1 例(图 1D),176 del 16 与 235 del C 杂合突变 1 例(图 1E),235 del C 纯合突变 1 例(图 1F)。

表 1 21 例耳聋患者基因突变检测结果

患者	性别	年龄	突变类型	突变基因名称	位点名称
1	男	18	纯合突变	GJB2	235 del C
2	女	12	杂合突变	GJB2	176 del 16 与 235 del C
3	女	13	杂合突变	SLC26A4	IVS7-2 A > G
4	男	15	杂合突变	SLC26A4	IVS7-2 A > G
5	女	8	杂合突变	SLC26A4	IVS7-2 A > G
6	女	9	杂合突变	SLC26A4	IVS7-2 A > G
7	男	9	杂合突变	SLC26A4	IVS7-2 A > G
8	男	11	杂合突变	SLC26A4	IVS7-2 A > G
9	男	15	杂合突变	SLC26A4	IVS7-2 A > G
10	男	10	杂合突变	SLC26A4	IVS7-2 A > G 与 2168 A > G
11	男	16	杂合突变	GJB2	299 del AT
12	女	14	杂合突变	GJB2	176 del 16
13	男	10	无突变	-	-
14	男	16	无突变	-	-
15	女	16	无突变	-	-
16	男	12	无突变	-	-
17	女	14	无突变	-	-
18	男	10	无突变	-	-
19	女	15	无突变	-	-
20	男	16	无突变	-	-
21	男	15	无突变	-	-

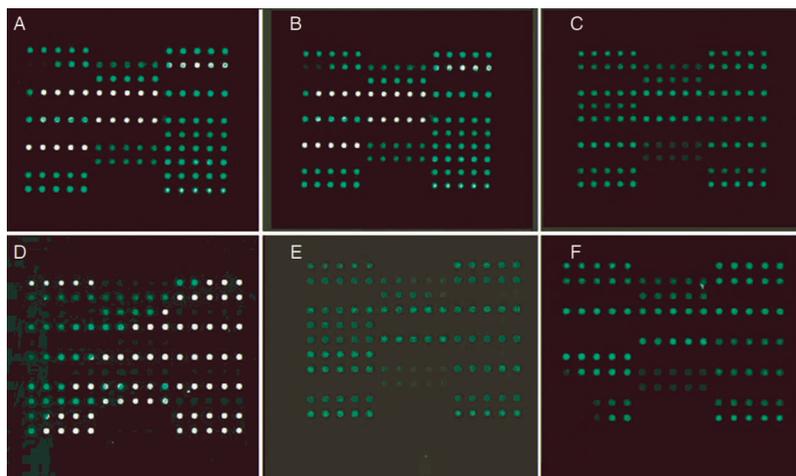


图 1 耳聋基因突变基因芯片结果(晶芯® LuxScan™ 10 K-B 微阵列芯片扫描仪)

A: IVS7-2 A > G 杂合突变; B: IVS7-2 A > G 与 2168 A > G 杂合突变; C: 176 del 16 杂合突变; D: 299 del AT 杂合突变; E: 176 del 16 与 235 del C 杂合突变; F: 235 del C 纯合突变

3 讨论

基因芯片是通过与一组已知序列的核酸探

针杂交进行测序的方法,针对不同突变位点设计两种带有不同标签的上游探针和一个下游带 Cy3 荧光标记的公共引物,进行多重等位基因特异性引物延伸 PCR, PCR 扩增产物在带上一段

标签序列的同时,被单色荧光所标记。将产物变性后,与固定有标签互补寡核苷酸序列的芯片杂交,通过激光扫描检测出突变位点。

中国人群约 80% 的遗传性耳聋与 4 个基因突变密切相关^[6-7]。即 GJB2 与先天性重度及极重度感音神经性耳聋, SLC26A4 (PDS) 与大前庭导水管综合征 (EVAS)、先天或后天重度及极重度感音神经性耳聋, 线粒体 12S rRNA 与药物性耳聋 (氨基糖甙类药物等), GJB3 与后天高频感音神经性耳聋密切相关。检测方法有高分辨率溶解曲线检测法、变性高效液相色谱法、限制性内切酶酶切法、荧光定量 PCR 等, 但仍以基因测序法为检测遗传性耳聋的金标准^[8-10]。本实验应用的九项遗传性耳聋基因芯片检测试剂盒, 每张芯片可以进行 4 份样品的检测, 每份样品同时检测以上 4 个基因的 9 个突变位点。与测序法的符合率达到 100%^[11]。

笔者检测了 21 例耳聋患者, 检测出 12 例突变基因携带者, 占 57.1%; 其中 SLC26A4 突变 8 例 (38%), 明显高于广州、太原、柳州和滨州地区 (检出率分别为 6.3%、16%、6.21% 和 5.4%); GJB2 突变 4 例 (19%), 明显高于柳州地区 (2.48%), 而与南通和滨州相近 (19.3% 和 21.6%)^[10,12-15]。

SLC26A4 基因也称 PDS 基因 (大前庭导水管综合征基因), 可引起大前庭导水管综合征 (large vestibular aqueduct Syndrome, LVAS), 为先天或后天重度及极重度感音神经性耳聋, 常染色体隐性遗传 (AR)。该基因纯合突变/复合杂合突变可确定受检者为 SLC26A4 相关遗传性耳聋。SLC26A4 基因含有 21 个外显子, ORF 为 2343 bp, 编码 780 个氨基酸, 属于离子转运体家族成员。热点突变为 VS7-2A > G、2168A > G、L676Q、H723R、IVS15 + SG > A、R40gH 和 M147V, 其中 IVS7-2A > G 和 2168A > G 突变的发生率最高^[13]。本研究 21 例耳聋患者 SLC26A4 基因突变率达到 38% (8/21), 说明 SLC26A4 是遗传性耳聋的易感基因; 但笔者检出 7 例 SLC26A4 基因单杂合突变及 1 例复合杂合突变患者, 表明这 7 例患者除 SLC26A4 基因外可能还存在与 LVAS 发病相关的其他基因或未知的 SLC26A4 基因突变位点。

GJB2 突变常引起非综合征型聋 (nonsyndromic hearing impairment, NSHI), 为先天性重度

及极重度感音神经性耳聋。GJB2 基因含 2 个外显子, ORF 为 678 bp, 编码缝隙连接蛋白 26 (CX26)。目前认为 CX26 在钾离子从毛细胞到耳蜗内淋巴的再循环中起重要的作用。当毛细胞受到外界刺激后, 钾离子经内耳毛细胞循环回流进入耳蜗内淋巴液, 缝隙连接蛋白通道在此过程中具有调控作用。GJB2 基因突变包括移码突变、缺失、插入等, 可产生有功能缺陷或无功能的 Connexin26 蛋白, 在其蛋白翻译及通道蛋白聚集水平产生影响。常见的突变热点有 35delG、235delC、33-35insG、167delT 等^[16]。本研究 GJB2 突变阳性率为 19% (4/21), 其中 176 del 16 杂合突变 1 例、299 delAT 杂合突变 1 例、176 del 16 与 235 del C 杂合突变 1 例、235 del C 纯合突变 1 例。表明前 2 例患者除 176 del 16 杂合突变和 299 delAT 杂合突变基因外还存在与耳聋发病相关的其他基因或未知的 GJB2 基因突变位点。

在 2006 年第二次全国残疾人抽样调查中, 听力残疾占 33%, 远高于肢体、视力、智力和精神残疾 (20%、15%、7%、7%)。唐江凤等^[17]研究表明, 疗效与就诊的时间呈正相关, 即发病后及早诊断治疗, 治疗效果越好。我国进行的耳聋病分子流行病学调查显示, 21% 的耳聋患者带有 GJB2 基因突变、14.5% 的患者带有 SLC26A4 基因突变^[12,16]。本研究 SLC26A4 突变阳性率为 38%, GJB2 突变阳性率为 19%; SLC26A4 突变高于 GJB2 突变与分子流行病学调查有较大差异; 但与江凌晓^[12], 王国建^[18] 研究结果相似, 建议扩大病例, 应用遗传性耳聋基因芯片做进一步研究, 从而达到早诊断早治疗, 减少或降低耳聋的发病。

参考文献:

- [1] 陈红胜, 冯永, 谢志国, 等. 一母系遗传非综合征耳聋大家系的临床特征和病因学研究 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2009, 15(1): 23-28.
- [2] Petit Christine. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand [J]. Nature Genetics, 1996, 14(4): 385-391.
- [3] 戴朴, 刘新, 于飞, 等. 18 个省市聋校学生非综合征性耳聋病分子流行病学研究 (I) - GJB2 235delC 和线粒体 DNA 12SrRNA1555G 突变筛查报告 [J]. 中华耳科学杂志, 2006, 4(1): 1-5.

(下转第 9 页)