

先天性白内障一家系全基因组扫描基因定位及候选基因序列分析

布娟 杨建军 李宁东 杨永佳 赵堪兴

Linkage analysis of a Chinese family with congenital cataract and mutation screening of BFSP1

Bu Juan, Yang Jianjun, Li Ningdong, Yang Yongjia, Zhao Kanxing. Third Hospital of Peking University, Beijing 100191, China

Abstract Objective Congenital cataract is one of the major causes of blindness in human being, and gene study on congenital cataract is helpful to understand its pathogenesis. This study was to identify the genetic location of the candidate gene by linkage analysis and describe the clinical phenotype in a Chinese family with autosomal dominant congenital cataract (ADCC). **Methods** Sixteen patients with ADCC and 26 normal subjects were collected from a Chinese family. A detailed clinical examination was performed for the family members. The genomic DNA of all family members was extracted from peripheral blood leukocytes. Linkage analysis and genome-wide linkage screening was conducted using fluorescent detection of 370 microsatellite markers representing all autosomes at an average resolution of approximately 10 cm. The polymerase chain reactions were carried out to amplify all 370 microsatellite markers. The allele sizes were determined on ABI 3130-avant genetic analysis according to an internal size standard and the results were analyzed using Genescan 3.1 and Genotyper 2.0 software. Multipoint LOD scores between the disease status and the marker alleles were calculated using the Linkage software package of Sim Walk 2, Version 3.35. Directly sequence was conducted on affected members of this family to determine the mutation in all exons of BFSP1 gene. The study followed the Helsinki Statement. **Results** The affected members in the family were born with classic phenotype of zonular ADCC. Linkage analysis showed the markers D20S163, D20S915, D20S152, D20S98, D20S904, D20S875, D20S112, D20S1140, D20S432 co-segregated with the disease locus in all affected members. The maximum Lod Score was 6.02 (D20S904), so the candidate region of disease gene in the family was located on 13.96 cm between 20p12 - 20p11.2. Directly sequence showed no mutations in all exons of BFSP1 gene in this family. **Conclusion** This is the first report that candidate region in the family is located in 20p12 - 20p11.2. No mutation in all exons of BFSP1 gene is found in the family. A new disease-causing gene may exist in this family.

Key words congenital cataract; autosomal dominant; linkage analysis; gene scan; BFSP1 gene

摘要 目的 应用全基因组扫描、连锁分析的方法对常染色体显性遗传性先天性白内障(ADCC)一家系进行基因定位、寻找候选基因并进行突变筛查。**方法** 提取该家系成员外周血 DNA, 进行全基因组扫描。在 ABI 3130-avant 全自动遗传分析仪上读取 370 对微卫星标记物的等位基因片段大小, 并采用 Genescan 3.1 和 Genotyper 2.0 软件进行两点法计算 LOD 值并构建单体型。根据连锁分析的结果, 对该区域内在晶状体中呈高表达, 且对维持晶状体纤维细胞的分化状态起重要作用的基因-BFSP1 进行直接的序列分析。**结果** 该家系的致病基因位于 20p12 ~ 20p11.2 的 13.96 cm 区域内。在该区域内的基因-BFSP1 全部外显子及外显子与内含子交界处均未发现任何突变。**结论** 首次将一常染色体显性遗传核型先天性白内障家系的致病基因定位于 20p12 ~ 20p11.2 的 13.96 cm 区域内。

关键词 先天性白内障; 常染色体显性遗传; 连锁分析; 全基因组扫描; BFSP1 基因

分类号 R 776.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)10-0919-04

作者单位:100191 北京大学第三医院 北京大学眼科中心(布娟);
750050 定西, 临洮县人民医院(杨建军); 300020 天津市眼科医院(李宁东、杨永佳、赵堪兴)

通讯作者:赵堪兴 (Email: ZKX@tjmu.edu.cn)

先天性白内障主要是由于胚胎期晶状体代谢异常而导致晶状体透明度下降的致盲性眼病, 发病率为 0.01% ~ 0.06%, 占儿童致盲性眼病的第二位^[1-2]。目前认为引起先天性白内障的原因有遗传因素、环境

因素和一些特发因素,其中大约 50% 的患者具有遗传性^[3-4]。目前已发现 5 类 30 多个位点和数十个位于不同染色体的致病基因与先天性白内障有关^[5-7]。其中与常染色体显性遗传性白内障 (autosomal dominant congenital cataract, ADCC) 有关的 14 个致病基因已被克隆。本研究对 ADCC 一家系进行全基因组扫描,报道如下。

1 资料与方法

1.1 对象

本研究遵循赫尔辛基宣言,研究对象取自在天津市眼科医院就诊的先天性白内障一家系。所有患者经全面体格检查,排除眼部以外的疾患。检查视力后,美多丽滴眼液散瞳后进行裂隙灯和检眼镜检查。

经家系谱调查和全面的眼科检查发现,该家系 36 例成员中有 16 例发病,其中男 10 例,女 6 例。其遗传方式符合常染色体显性遗传。该家系发病特点是自幼双眼患病,进行性加重。该家系患者晶状体混浊表现为绕核性白内障,部分患者胚胎核中央亦可见到细小粉尘状混浊。患者视力指数/眼前 ~1.0。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 的提取 与家系成员签署知情同意后,抽取 16 例患者和 26 例正常对照者 8~10 mL 外周血,采用 DNA 分离试剂盒(美国罗氏公司)进行 DNA 分步提取。紫外分光光度计和 0.6% 琼脂糖凝胶电泳检测样本 DNA 纯度和浓度后于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 全基因组扫描 采用高杂合度覆盖全基因组的微卫星位点引物(美国 PE 公司,ABI Linkage Mapping Set Version 2),即在全部常染色体范围内选取 370 对荧光标记的微卫星引物。采用 Touchdown 程序结合多重 PCR 反应,将 5~12 种不同引物混合,放入同一管中采用两相循环进行扩增,总反应体积 5 μL (表 1)。首先 94 °C 预变性 12 min,第一相循环时,94 °C 变性 30 s,起始退火温度 63 °C 1 min,以后每个循环减少 0.5 °C,72 °C 延伸 1 min 50 s,共 15 个循环。第 2 相循环 94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min 50 s,进行 24 个循环,最后 72 °C 延伸 15 min。利用 ABI 3130-avant 全自动遗传分析仪采集荧光信号。根据预先加入的标准片段 GeneScan™-500TAMRA™ (standard size) 计算出等位基因片段的长度以确定单体型,并利用 Genescan 3.1 和 Genotype 2.0 (Perkin Elmer) 软件分析结果。

1.2.3 连锁分析 单体型由 Cyrillic 2.1 软件绘制,连锁分析采用两点法计算,运用 SimWalk 2,3.35 版本

软件计算最大优势对数 LOD 值。将疾病模式设定为常染色体显性遗传,致病基因频率为 0.000 1,外显率为 100%,并假定所有标记物的等位基因频率和重组率无性别差异。

表 1 多重 PCR 反应体系
Table 1 Containing of multiplex PCR

Reagent	Volume(μL)
10 × GeneAmp PCR buffer II	0.50
10 mmol/L dNTPs	0.10
25 mmol/L MgCl ₂	0.60
5 ^u /μL Ampli Taq Gold™ polymerase	0.04
10 mmol/L primer	0.04 μL/pair
30 ng/μL Genomic DNA	1.00
sterile deionized H ₂ O	add ddH ₂ O to 5

1.2.4 基因序列分析 在 NCBI 数据库查询 D20S163~D20S432 的 13.96 cm 区域内的基因信息,并进一步筛选发现 BFSP1 基因在晶状体中的表达量较为丰富。于是将家系中先证者与另 1 例患者及 1 例正常同胞的 DNA 样本分别进行 BFSP1 基因的全部外显子及外显子与内含子交界处序列双向测序。根据 BFSP1 基因的序列设计 9 对引物(表 2),扩增其 8 个外显子及内含子与外显子拼接处序列。反应条件:反应总体积 10 μL,含有 50 ng 基因组 DNA 1 μL,3.0 mmol/L MgCl₂ 0.5 μL,10 mmol/L dNTPs 0.2 μL,5 mol/μL HotStarTaq 0.05 μL,100 ng/μL 正反引物各 0.3 μL,10 × Buffer 1 μL,Q-Buffer 2 μL。Touch-down PCR 程序:95 °C 预变

表 2 用于扩增 BFSP1 基因外显子的引物
Table 2 PCR primers used for the amplification of BFSP1 gene exons

Lob No	Primers sequence	Fragment size(bp)
Exon 1	F:AGGCAGCTGCATGCCCTTC R:CGCTTACTTGCTTCGGAACCT	577
Exon 2	F:GCATCGTACCCAGGTTGAAT R:AAACCTGCACTTCCACCATT	261
Exon 3	F:CATTGCAGGAAGCTGATGAA R:GCAGTCTGTTTTGAGCCACA	296
Exon 4	F:ACCAGCGCAGCTCAACTTAT R:TCACAGTCCAACCTGTGAGC	293
Exon 5	F:GACTCTGGCCTTCTCTGTGC R:CACCTCCATGAAACATGTGG	308
Exon 6	F:ACCGAGTCCAGGTTCCCTTTT R:AATCTCCTTGCGCAGTGTCT	421
Exon 7	F:GAAACTCCATTCCTCCCTGTT R:TGCATCTGAAGCAAGCATGA	286
Exon 8(1)	F:GCCCTGAAGAGAAACGTGAG R:CTGCTCCTAGTCCCAAGCAC	880
Exon 8(2)	F:GTGCTTGGGACTAGGAGCAG R:CATGGTCTCCACGATCACAG	564

F:forward primer;R:reverse primer

性 15 min, 94 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 前 10 个循环退火温度每次递减 0.5 °C, 后 25 个循环退火温度固定为 57 ~ 59 °C 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 最后 72 °C 延伸 10 min。测序结果用 DNA STAR 软件中的 EditSeq、SeqMan 程序分析。

2 结果

2.1 基因分型和连锁分析的结果

该家系经过全基因组扫描将致病基因定位在 20 号染色体短臂(初筛时的 LOD 值见表 3)。在微卫星标记物 D20S112 和 D20S195 取得正的 LOD 值, 其 LOD 值分别为 2.74 和 2.21, 在 D20S112 与 D20S195 附近选择了 14 对精细引物, 进行等位基因片段长度分析。当 $\theta=0$ 时, 在 D20S904 处得到最高 LOD 值 6.02 (表 4)。经单体型构建发现: 微卫星标记物 D20S163-D20S915-D20S152-D20S98-D20S904-D20S875-D20S112-

D20S1140-D20S432 与该家系中所有患者疾病表型共分离 (图 1)。

表 3 20 号染色体部分微卫星标记物两点法连锁分析 LOD 值
Table 3 Two-point LOD score with polymorphic DNA markers on chromosome 20

Marker	Different recombination frequency of the LOD score					
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
D20S117	-15.91	-1.88	-0.54	-0.05	0.06	0.00
D20S889	0.83	0.68	0.49	0.29	0.09	0.00
D20S115	-4.00	0.60	0.65	0.47	0.22	0.00
D20S186	-7.45	1.63	1.62	1.17	0.53	0.00
D20S112	-2.14	2.74	2.32	1.65	0.81	0.00
D20S195	-1.17	2.21	1.84	1.27	0.63	0.00
D20S107	-7.56	1.36	1.50	1.23	0.73	0.00
D20S119	-11.86	1.99	1.98	1.49	0.78	0.00
D20S178	-14.35	0.37	0.84	0.75	0.40	0.00
D20S196	-5.08	1.46	1.37	1.06	0.60	0.00
D20S173	-12.12	-1.49	-0.55	-0.18	-0.04	0.00
D20S171	-9.28	-0.51	0.34	0.53	0.39	0.00

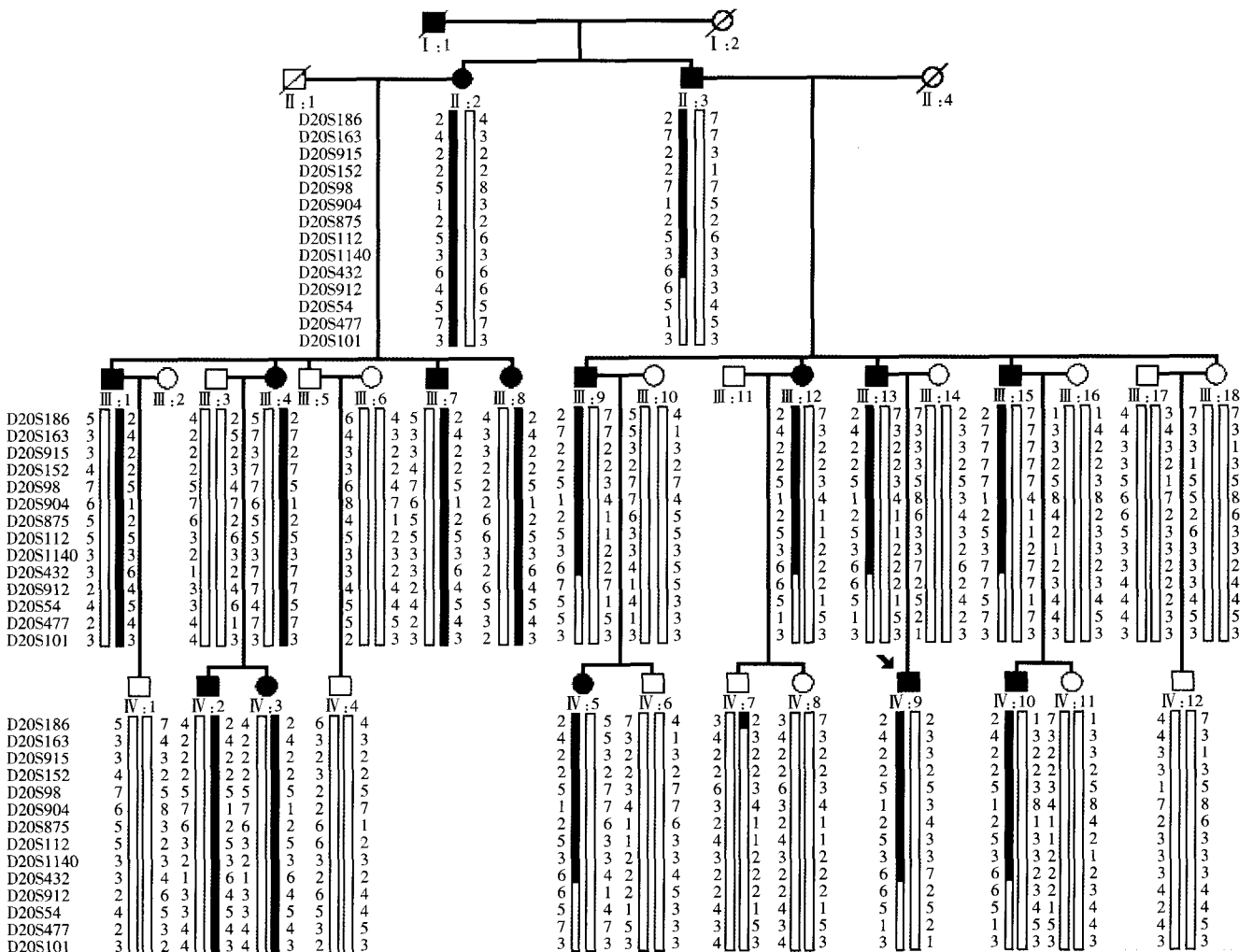


图 1 ADCC 家系单体型分析

Fig. 1 Haplotype analysis of the ADCC family

表4 两点法计算 D20S186 和 D20S101 之间的 LOD 值
Table 4 Two-point LOD score between D20S186 and D20S101

Marker	Different recombination frequency of the LOD score					
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
D20S186	2.39	3.50	2.82	1.91	0.86	0.00
D20S163	3.99	3.15	2.27	1.34	0.47	0.00
D20S915	2.23	1.81	1.34	0.84	0.35	0.00
D20S152	1.16	0.96	0.72	0.44	0.16	0.00
D20S98	2.79	2.51	1.95	1.25	0.51	0.00
D20S904	6.02	5.01	3.89	2.64	1.26	0.00
D20S875	2.89	2.38	1.84	1.27	0.66	0.00
D20S112	4.01	3.47	2.76	1.90	0.91	0.00
D20S1140	1.89	1.54	1.18	0.81	0.42	0.00
D20S432	4.45	3.69	2.86	1.94	0.95	0.00
D20S912	-2.22	2.99	2.31	1.49	0.73	0.00
D20S54	4.14	3.43	2.65	1.80	0.87	0.00
D20S477	-10.78	1.74	1.52	1.01	0.44	0.00
D20S101	0.20	0.14	0.08	0.04	0.01	0.00

2.2 对家系的先证者、1例患者及1例正常同胞个体的 BFSP1 基因全部外显子、外显子与内含子交界处测序,均未发现基因突变。

3 讨论

先天性白内障无论从临床表现还是从遗传基因角度均存在明显的异质性,这种异质性表现为不同致病基因决定同一临床表型,而同一基因的不同突变却可引起不同的疾病表型。正是由于这种异质性的存在,给先天性白内障的临床及分子发病机制的研究带来了许多困难。

本研究对中国四代(绕核型)ADCC 一家系进行了全基因组扫描和基因连锁分析,结果发现在 20 号染色体短臂上微卫星标记 D20S889 与 D20S196 处取得正的 LOD 值,并在 D20S163 ~ D20S432 区域内的微卫星标记取得最大 LOD 值 6.02。通过构建单体型,将致病基因定位在 20p12 ~ 20p11.2 的 13.96 cm 区域内,在该区域内尚无有关 ADCC 候选基因的报道。

以往有关绕核型白内障的基因被分别定位在 1、2、12、13、16、17、21 和 22 号染色体上,已克隆出的基因有 GJA8、CRYGC、MIP、GJA3、HSF4、CRYBA1/A3、CRYAA 和 CRYBB1。但将绕核型白内障的致病基因定位于 20p 处尚属首次。Yamada 等^[8]曾将日本常染色体显性遗传后极性白内障一家系的致病基因定位于 20p12 ~ q12 的 33.9 cm 较大范围内。但在随后的研究中尚未在此区域内发现导致先天性白内障的致病基因。

本研究进行 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

数据库的查询,结果显示在 20p12 ~ 20p11.2 共有 42 个已知基因,BFSP1 基因位于其间。串珠状纤维 (beaded filament, BF) 是晶状体特异性中间纤维,由 BFSP1 和 BFSP2 组成,分布于分化的晶状体纤维细胞,未分化的晶状体细胞及其他的组织器官不表达。已有报道 BFSP2 基因的点突变可导致人先天性白内障的发生^[9-11],提示 BF 蛋白的正常表达对维持晶状体的透明有重要意义。但测序后未发现 BFSP1 基因的外显子及剪切位点有突变。分析可能存在 2 方面的原因:(1)由于基因结构的复杂性,并不排除在该基因的调控区及内含子区可能存在致病的突变。(2)在所定位区域内可能存在新的基因突变导致该家系表型。因此,需要对 BFSP1 基因的调控区及内含子进行测序以发现致病性的突变。同时还应在 D20S163 ~ D20S432 选取更多的微卫星标记物进行精细定位,并对区域内候选基因进行直接测序来进一步寻找确定该家系的真正致病基因。

参考文献

- Hejtmanek JF, Smaoui N. Molecular genetics of cataract [J]. *Dev Ophthalmol*, 2003, 37: 67-82
- Francis PJ, Moore AT. Genetics of childhood cataract [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2004, 15(1): 10-15
- Wirth MC, Russe II, Eggitt IM, Craig JE, et al. Aetiology of congenital and paediatric cataract in Australian population [J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86: 782-786
- Rahi JS, Dezateaux C, British Congenital Cataract Interest Group. Measuring and interpreting the incidence of congenital ocular anomalies: lessons from a national study of congenital cataract in the UK [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42: 1444-1448
- Reddy MA, Francis PJ, Berry V, et al. Molecular genetic basis of inherited cataract and associated phenotypes [J]. *Surv Ophthalmol*, 2004, 49: 300-314
- Graw J. Congenital hereditary cataracts [J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48 (8-9): 1031-1044
- Roche O, Bely F, Orssaud C, et al. Congenital cataract: general review [J]. *J Fr Ophthalmol*, 2006, 29(4): 443-455
- Yamada K, Tomita H, Yoshiura K, et al. An autosomal dominant posterior polar cataract locus maps to human chromosome 20p12-q12 [J]. *Eur J Hum Genet*, 2000, 8(7): 535-539
- Jakobs PM, Hess JF, FitzGerald PG, et al. Autosomal-dominant congenital cataract associated with a deletion mutation in the human beaded filament protein gene BFSP2 [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(4): 1432-1436
- Conley YP, Erturk D, Keveline A, et al. A juvenile-onset, progressive cataract locus on chromosome 3q21-q22 is associated with a missense mutation in the beaded filament structural protein-2 [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(4): 1426-1431
- Zhang Q, Guo X, Xiao X, et al. Clinical description and genome wide linkage study of Y-sutural cataract and myopia in a Chinese family [J]. *Mol Vis*, 2004, 10: 890-900

(收稿:2008-12-20 修回:2009-08-21)

(本文编辑:王莉红)