文章编号:1000-5404(2006)08-0769-03

论著

两例疑为X连锁型视网膜色素变性家系的单倍型分析研究

陈翠敏[1],张晓莉[1],阴正勤[2],府伟灵[1],孟晓红[2] (第三军医大学西南医院:[1]检验科,[2]全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 应用遗传连锁分析方法对X连锁型视网膜色素变性家系进行分析,定位其致病基因的所在位点。**方法** 选取已知X连锁视网膜色素变性候选基因附近的短串联重复序列多态性标记(short tandem repeat polymorphism, STRP),即在RP2、RP3、RP6、RP23和RP24处分别选取具有高信息量的微卫星位标,对2例疑似为X连锁型视网膜色素变性家系进行遗传连锁分析;通过对家系成员的单倍型分析,并进行两点法连锁分析,确定其致病基因所在染色体的大致位置。**结果** 2例家系在DXS 993处得到的最大LOD值分别为:1.18和1.03;在DXS 1068处得到的最大LOD值分别为:0.58和-2.69;在DXS 1214处得到的最大LOD值分别为:-2.33和-2.45;在DXS 8051处得到的最大LOD值分别为:-2.34和-2.51;在DXS 8043处得到的最大LOD值分别为:-2.23和-2.62。**结论** ZCF家系的致病基因,可能不在RP3、RP6、RP23或RP24位点;而对于FYJ家系,我们则怀疑致病基因位于RP2位点,但也不排除与RP3连锁;用遗传连锁分析方法对确定致病基因所在染色体的范围起到重要的作用。

关键词: 视网膜色素变性;X连锁;微卫星多态位点;单倍型分析

中图法分类号: R446.9;R596;R774.130.4 **文献标识码:** A

Haplotype analysis of two families with X-linked retinitis pigmentosa

CHEN Cui-min[1], ZHANG Xiao-li[1], YIN Zheng-qin[2], FU Wei-ling[1], MENG Xiao-hong[2] ([1]Department of Clinical Laboratories, [2]Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the disease locus in X-linked retinitis pigmentosa (RP) families using genetic linkage analysis. **Methods** Five microsatellite markers were selected from the RP2, RP3, RP6, RP23 and RP24 gene loci, respectively. Haplotype analysis for two X-linked RP families was performed to determine the critical region. Two-point linkage analysis was performed using MLINK program. **Results** In FYJ and ZCF X-linked RP families, the LOD score was 1.18 and 1.03 at DXS 993, 0.58 and -2.69 at DXS 1068, -2.33 and -2.45 at DXS 1214, -2.34 and -2.51 at DXS 8051, -2.23 and -2.62 at DXS 8043. **Conclusion** The phenotype of ZCF family is not caused by mutation of RP3, RP6, RP23, RP24 gene, and FYJ family may be linked to RP2 or RP3 gene.

Key words: retinitis pigmentosa; X-linked; microsatellite polymorphic markers; haplotype analysis

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一类视功能进行性损害的遗传性视网膜病变,其典型的眼底改变为视乳头蜡黄,小血管变细以及赤道部附近骨细胞样色素斑沉着。夜盲和视野缩小是最主要的主诉,此病多累及双眼,是一种较常见的眼部遗传病。人群中的发病率较高,约1/3 500~1/4 000[1];目前对该病临床上尚无有效的治疗方法。RP同时又是具有高度遗传异质性的单基因遗传病,至今已定位或克隆的相关基因已多达30多个。在遗传方式上RP可有多种不同的类型:常染色体隐性、显性和性连锁隐性(X-linked retinitis pigmentosa, XLRP)3种,以隐性遗传最多(70%~90%);显性遗传次之(3%~20%);性连锁遗传最少(10%)。目前认为,XLRP发病年龄早,病程进展快,是青少年致盲的常见原因之一,也是临床表现最严重的类型。

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(30400491)
Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars (30400491)

作者简介: 陈翠敏(1977-),女,内蒙古省通辽市人,硕士研究生,主要从事遗传性疾病的基因诊断和基因治疗方面的研究。电话:(023)68754429,E-mail: chencuimin1977@yahoo.com.cn

通讯作者: 府伟灵,E-mail:weilingfu@yahoo.com

收稿日期: 2005-12-19;**修回日期:** 2006-02-22

RP 致病相关基因在人类 X 染色体上已发现了 5 个 XLRP 遗传位点[2]；分别为：RP2、RP3、RP6、RP23 和 RP24。其中，由 RP2、RP3 位点突变所致的 XLRP 患者分别为：10% ~18%，60% ~90% 并且这两个致病基因都已被克隆。因此利用 X 染色体上这 5 个已知疾病位点处的多态性标记对 X 连锁型视网膜色素变性家系进行连锁分析，确定致病基因的范围，特别是对家系成员个体的症状前、产前和携带者的诊断具有重要的意义。为此我们根据 RP2、RP3、RP6、RP23 及 RP24 位点的连锁定位信息，选取其附近的短串联重复序列多态性标记，对 2 例疑为 X 连锁型视网膜色素变性家系成员进行遗传连锁分析。

1 资料与方法

1.1 家系资料

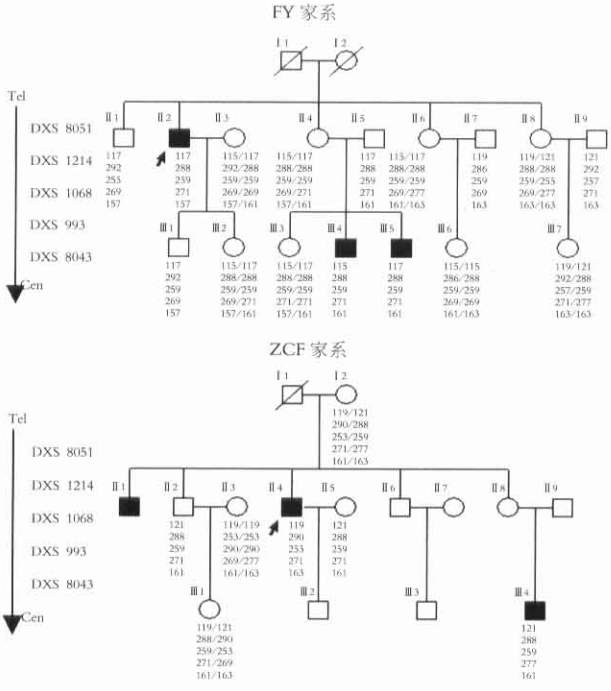
根据性连锁遗传的系谱特征：家系中患者为男性且至少两代，父母都健康，父亲不带致病基因，母亲是携带者，母亲的致病基因只能遗传给儿子。本研究的家系 ZCF 采自重庆市铜梁：先症者 40 岁，在 10 岁时开始出现夜盲症状，现在双眼的视力无光感；患同样 RP 的哥哥（Ⅱ1）42 岁，也是在 10 岁时出现夜盲症状，因在外地工作，没有采集到血样；男性患者（Ⅲ4）15 岁（先症者的外甥），在 13 岁时出现夜盲症状，双眼视力为 0.02，其母亲（Ⅱ8）患有高度近视 1 000 度。家系 FYJ 采自重庆市彭水：先症者 46 岁，在 10 岁时出现夜盲症状，现双眼视力无光感，两例男性患者为兄弟（Ⅲ4、Ⅲ5）分别为 22 岁和 20 岁（先症者的外甥），他们均在 10 岁时出现夜盲症状，现双眼的视力分别为 0.01 和 0.02，据先症者回忆其外公也是 RP 患者。两例家系的命名按其先症者的汉语拼音简写；家系图谱见图 1。我们通过家系图谱分析都符合性连锁遗传的特征。采集血样前对遗传家系进行详细的调查，所有的男性患者及女性携带者都经过了全面的眼部检查（包括夜盲史，视力，眼底镜检查，全视野视网膜电图测试，视野检查及暗适应检查等）。

1.2 样品 DNA 制备及微卫星染色体位标的选择

取各家系成员的外周静脉血 200 μl，采用杭州维特洁公司提供的 DNA 提取试剂盒，按照试剂盒说明进行分步提取 DNA。在 RP2、RP3、RP6、RP23 和 RP24 位点处选取的 5 个微卫星（V2.5 Individual panels 1-28 for MD 10）标记（Marker）为：DXS 993、DXS 1068、DXS 1214、DXS 8051 和 DXS 8043。引物序列及聚合酶链反应（PCR）条件均来源于美国 Applied Biosystems（ABI）公司。

1.3 聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）

① PCR 反应体系：10 × Buffer 0.5 μl，Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L，4 dNTPs 250 μmol/L，引物 1 pmol/L，*Taq* 酶 0.2 U，模板 DNA 15 ~20 ng，加消毒双蒸水至 5 μl。② PCR 反应条件：95 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，10 个循环；89 ℃ 变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃ 延伸 30 s，25 个循环；后延伸 72 ℃ 10 min。PCR 反应均在 PE-9700 仪器上进行。



□：正常男性；○：正常女性；■：男性患者；↗：先症者

图 1 2 例遗传家系图及家系成员的单倍型（LOD 值 >0.5）分析

1.4 微卫星染色体位标基因型检测

①PCR 产物纯化：使用 QFill-2 加液器加入 95% 乙醇/乙酸（30/1）15 μl，放入 4 ℃冰箱中静置 5 min，再放入离心机离心 30 min/4 300 r/min，完成第一次纯化；同样的方法加入 70% 乙醇 35 μl，离心机离心 4 300 r/min，15 min，避光静置 20 min，待乙醇挥发干净，完成第二次纯化。② 基因型检测：在 ABI 公司 3730XL 测序仪上进行基因扫描，使用 Genemapper 3.5 软件读出各自 DNA 位标的基因型。

1.5 遗传连锁分析

使用 Pedigree Editor4 软件绘制各家系图谱及基因型；遗传连锁分析采用 MLINK 软件，来计算两点最大对数（LOD SCORE）值[3]。

2 结果

根据各家系图谱及所检测的基因型结果分析（图 1 和表 1）：① FYJ 家系，根据家系图及 LOD 值结果分析，可以排除与 DXS 1214、DXS 8051、DXS 8043 的遗传连锁，RP6、RP23 和 RP24 基因可能不是此家系的致病基因；但是不排除致病基因分别位于 RP2 或 RP3；需另外选取位标以增加信息量，予以验证。② ZCF 家系，根据家系图及 LOD 值结果分析，可以排除与 DXS 1068、DXS 1214、DXS 8051、DXS 8043 的遗传连锁，RP3、

RP6、RP23、RP24 基因可能不是此家系的致病基因；但是不排除另外一个遗传位点，RP2 为该家系的致病基因位点。同样也需选取更多的位标以增加信息量，来验证此初步的分析结果。

表 1　两例遗传家系的 LOD 值

位标	FYJ 家系	ZCF 家系
DXS 993（RP2 基因）	1.182	1.037
DXS 1068（RP3 基因）	0.589	-2.698
DXS 1214（RP6 基因）	-2.332	-2.451
DXS 8051（RP23 基因）	-2.341	-2.512
DXS 8043（RP24 基因）	-2.234	-2.625

3　讨论

X 连锁型视网膜色素变性是与多个基因相关而由单个基因突变致病的一种疾病，尽管 RP2 和 RP3 基因已被克隆，目前对其功能和致病机制仍然知之甚少，而对于那些只有基因定位资料或其致病基因内部无明确的突变热点的遗传性疾病，使用家系连锁分析较为便捷[4]。微卫星 DNA 标记，又称为短串联重复序列多态性标记（short tandem repeat polymorphism，STRP），指 2～7 个碱基为核心单位串联重复而成的一类序列；使用微卫星序列确定遗传性变异基因，是很有用的方式，微卫星多态遗传标记及遗传连锁分析技术，可以使我们认识到在人类染色体的不同部位存在着 RP 的致病基因。

已被克隆的 2 个基因：RP2 型为 XLRP 的一种亚型，其致病基因位于 Xp11.2[5]；人 RP2 基因 mRNA 长度为 3 813 bp，包括 5 个外显子，编码一个含 350 个氨基酸的蛋白，这个蛋白虽然其功能与结构信息尚不清楚，但其与人辅助因子 C（cofactor C）有较高的同源性。RP3 基因又名视网膜色素变性 GTP 酶调节子（retinitis pigmentosa GTPase regulator，RPGR）；该基因位于 Xp21.1，RPGR 基因 DNA 长度是 60 kb，起初被确定含 19 个外显子，编码一含 815 个氨基酸的蛋白质[6]。尚未克隆的基因：1990 年，ott 等[7]对 XLRP 家系进行遗传连锁分析发现了第 3 个位点，既 RP6，定位于 Xp21.2-21.3。在 1998 年，Gieser 等[8]又发现一个新的位点 RP24；定位于 Xq26-27，RP24 与 COD2（X-linked cone dystrophy）基因有部分重叠，COD2 位于 Xq27，在 DXS292 和 DXS1113 之间 8 cM 区域。2000 年，Hardcastle 等[9]应用单倍型分析和连锁分析方法发现 XLRP 患者的 RP23 基因，位于 Xp22。

我们所收集的这 2 例遗传家系，从临床表现看符合 X 连锁隐性遗传的遗传方式，通常是由女性传递而男性表现，每个男性患者的母亲都是携带者，男性患者不会把该病传递给儿子却会传给女儿，每个女儿都是携带者。通过选取 X 染色体已知疾病位点处的微卫星标记，对家系进行遗传连锁分析；使用两点法 MLINK 软件计算各家系的 LOD 值[3]（测定已知标记和疾病性状的连锁关系），得出该疾病相关基因与遗传标记间的距离（表 1）。通过对家系成员的单倍型分析，确定了致病基因的大致范围。

目前，尽管我们尚未完全确定影响这 2 例遗传家系临床表型的致病基因，但是通过应用微卫星位标对各家系所进行的初步连锁分析，缩小了与该疾病相关基因位点的范围；为探索 XLRP 的分子病理和进一步研究与该疾病相关的基因提供了有利的资料，也可以起到症状前的诊断作用。

参考文献：

[1] RIVOLTA C, SHARON D, DEANGELIS M M, *et al*. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(10): 1219-1227.

[2] WANG Q, CHEN Q, ZHAO K, *et al*. Update on the molecular genetics of retinitis pigmentosa[J]. Ophthalmic Genet, 2001, 22(3): 133-154.

[3] 李宁东，李　杨，赵堪兴，等. 中国人一个显性视网膜色素变性家系 8 号染色体连锁分析[J]. 眼科研究，2004，22(1)：92-94.

[4] 刘木根，魏　勇，刘　立，等. 应用连锁分析方法对 X 连锁型视网膜色素变性进行基因诊断的研究[J]. 中华医学杂志，1999，79(1)：54-56.

[5] ANDREASSON S, BREUER D K, EKSANDH L, *et al*. Clinical studies of X-linked retinitis pigmentosa in three Swedish families with newly identified mutations in the RP2 and RPGR-ORF15 genes[J]. Ophthalmic Genet, 2003, 24(4): 215-223.

[6] PUSCH C M, BROGHAMMER M, JURKLIES B, *et al*. Ten novel ORF15 mutations confirm mutational hot spot in the RPGR gene in European patients with X-linked retinitis pigmentosa[J]. Hum Mutat, 2002, 20(5): 405.

[7] FARRAR G J, JORDAN S A, KENNA P, *et al*. Autosomal dominant retinitis pigmentosa: localization of a disease gene (RP6) to the short arm of chromosome 6[J]. Genomics, 1991, 11(4): 870-874.

[8] HOFFMAN D R, LOCKE K G, WHEATON D H, *et al*. A randomized, placebo-controlled clinical trial of docosahexaenoic acid supplementation for X-linked retinitis pigmentosa[J]. Am Ophthalmol, 2004, 137(4): 704-718.

[9] HARDCASTLE A J, THISELTON D L, ZITO H, *et al*. Evidence for a new locus for X-linked retinitis pigmentosa (RP23)[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(8): 2080-2086.

（编辑　陈聪连）