论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0980-03

1例X连锁型视网膜色素变性家系的分子遗传学研究

朱 静[1],张晓莉[1],府伟灵[1],赵红霞[2],张 峰[3],贾若愚[3],李 新[3] ([1]第三军医大学西南医院基因诊断治疗中心,重庆 400038;[2]云南省红十字会医院眼科,昆明 650021;[3]中科院北京基因组研究所,北京 101300)

摘 要:目的 对1例来自云南省的X连锁型视网膜色素变性家系进行相关分子遗传学研究。**方法** 在本研究小组前期工作中对该家系已初步确定的X连锁型遗传位点——RP2和RP3处选取具有高信息量的9个微卫星位标进行精细单倍型分析。在定位的候选基因RP3基因即RPGR基因上,使用构象敏感凝胶电泳(conformation sensitive gel electrophoresis,CSGE)的方法对其1~14号外显子进行突变筛选的同时对已有报道的突变热点区——外显子ORF15进行直接测序以寻找致病突变。**结果** 通过精细定位扫描及相关单倍型分析,将该例家系的致病基因定位在RP3位点。RPGR基因1~14号外显子经CSGE的方法进行突变筛选,未发现有异常电泳条带;通过直接对突变热点区外显子ORF15的测序,在该例家系中检测到1个在国内外均有报道的热点突变:g. ORF15+483_484delGA。**结论** g. ORF15+483_484delGA移码突变导致了该家系产生X连锁型视网膜色素变性。

关键词: 视网膜色素变性;微卫星DNA;单倍型;RPGR基因;突变

中图法分类号: R446.9;R596.1;R774.13 **文献标识码:** A

Molecular genetics analysis of a Chinese family with X-linked retinitis pigmentosa

ZHU Jing[1], ZHANG Xiao-li[1], FU Wei-ling[1], ZHAO Hong-xia[2], ZHANG Feng[3], JIA Ruo-yu[3], LI Xin[3] ([1]Treatment Center of Gene Diagnosis, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Ophthalmology, Red Cross Hospital of Yunnan Province, Kunming 650021; [3]Beijing Genomics Institute of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China)

Abstract: Objective To identify the disease locus and detect the mutations in an X-linked retinitis pigmentosa (XLRP) family. Methods Nine microsatellite markers were selected from the related RP2 and RP3 genes that have been identified to be linked with XLRP in this family by our previous research. Mutations were identified by CSGE and direct sequencing. Results Significant two-point Lod score was generated using marker DXS8113 ($Z_{max}=2.42$, $\theta=0.01$). The disease gene locus was confined to RPGR gene with further analysis of genetic linkage and haplotyping. Direct sequencing of the essential exon ORF15 of RPGR gene in this family revealed a GA deletion at ORF15+483_484, which has been detected by several researches. Conclusion This frame-shift mutation may be the cause of XLRP in this family.

Key words: retinitis pigmentosa; microsatellite DNA; haplotype; RPGR; mutation

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一种常见的遗传性致盲眼底病,在大多数种族中的患病率约为1/3 500[1]。它的临床表现主要有早期出现夜盲、进行性视野缩小、视网膜骨细胞状色素沉着、视盘呈蜡黄色萎缩和视网膜电图(electroretinogram, ERG)记录异常等。RP有多种遗传方式,大多数为单基因遗传,包括常染色体显性遗传RP、常染色体隐性遗传RP、X染色体连锁遗传RP(X-linked retinitis pigmentosa, XLRP)及线粒体连锁遗传RP。少数遗传方式较为复杂,如双基因遗传及不完全显性遗传。若无家族史,则称为散发性RP。其中XLRP发病早,损害最为严重,是青少年致盲的常见原因之一。本实验通过对1例XLRP家系的分子遗传学研究,在RP3基因又名视网膜色素变性GTP酶调节子(retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR)发现了1个热点突变g. ORF15+483_484delGA[2-4],现将结果报告如下。

基金项目: 国家自然科学基金(30400491)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400491)

作者简介: 朱 静,女,四川省宜宾市人,硕士研究生,主要从事X连锁型视网膜色素变性的分子遗传学方面的研究。电话:(023)68754429,E-mail:zj6900@163.com

通信作者: 府伟灵,E-mail:weilingfu@yahoo.com

收稿日期: 2007-11-23;**修回日期:** 2008-02-26

1　对象与方法

1.1　家系资料

本研究的家系 ZLK 采自云南省昆明市(家系的命名按其先证者的汉语拼音简写)家系图谱(图 1)。先证者Ⅱ1(51 岁),记忆中 7 岁左右表现为夜盲症,就诊时视觉敏感度只有光感,视野明显缩窄。2 个侄儿Ⅲ3(15 岁)和Ⅲ4(17 岁)自述在 6 ~7 岁时出现夜盲症状,视觉敏感度在较早的时候就有所下降,校正后的双眼视觉敏感度为 20/40 和 20/50,同时伴有高度的近视和散光。3 个患者 ERG 的 a、b 波均检测不到。这 2 个男孩的母亲,即先证者的妹妹Ⅱ5 和Ⅱ7 视觉敏感度分别为 20/20 和 20/30,色觉检查和视野测试均正常;ERG 检测异常,视杆 b 波波峰降至正常的 73%,而视锥 b 波波峰降至正常的 46%;眼底镜观察发现视网膜有轻微的色素改变。采集血样前对遗传家系进行详细的调查,并对各家系的成员进行临床检查(包括夜盲史、视力、眼底检查和全视野 ERG 等)。

1.2　样品 DNA 制备及微卫星位标的选择

取各家系成员的外周静脉血 200 μl,采用德国 QIAGEN 公司提供的 QIAamp® Blood Kit DNA 提取试剂盒,按照试剂盒说明进行分步提取 DNA。

由于本研究小组在前期研究工作中已将该家系的致病基因定位在 RP2 或 RP3 位点[5],因此我们针对这 2 个位点联合选取其周边 9 个具有高度信息性的微卫星位标(RP2 位点:DXS993、DXS8054、DXS1055、DXS1003、DXS426; RP3 位点:DXS1110、DXS1068、DXS8113、DXS8025)(数据库源自 CEPH 基因图谱和 Genethon 连锁图谱)用于精细单倍型的分析。

1.3　微卫星 DNA 的 PCR 扩增

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。PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,55 ~58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,10 个循环;89 ℃变性 30 s, 55 ~58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,25 个循环;后延伸 72 ℃ 10 min。PCR 反应均在自动热循环仪(PE9700)上进行。

1.4　微卫星位标基因型检测

PCR 产物纯化:使用 QFill-2 加液器加入 95% 乙醇/乙酸铵(30 /1) 15 μl,放入 4 ℃冰箱中静置 5 min,再放入离心机 4 300 r/min 离心 30 min,弃上清,完成第 1 次纯化;同样的方法加入 70% 乙醇 35 μl,离心机 4 300 r/min 离心 15 min,弃上清,避光静置 20 min,待乙醇挥发干净,完成第 2 次纯化。基因型检测:在 ABI 公司 3730XL 测序仪上进行基因扫描,使用 GeneMarker V 1.51 软件读出各自 DNA 位标的基因型。

1.5　遗传连锁分析

在得出的基因型原始结果的基础上,用 PedCheck 软件检查并校正家系中每个成员的分型结果是否符合孟德尔遗传规律,然后用 Linkage 软件包(5.2 版)中的 mLink 程序进行遗传连锁分析, 以计算两点最大对数(LODscore)值。使用 pED 软件绘制各家系图谱及基因型。

1.6　RPGR 基因的突变分析

在连锁分析将致病基因定位在 RP3 位点的基础上,我们对 RP3 基因即 RPGR 基因进行突变的检测。对 RPGR 基因的 1 ~14 号外显子我们采用构象敏感凝胶电泳(conformation sensitive gelelectrophoresis,CSGE)的方法进行突变筛选,实验方法参考文献[6];同时针对突变热点区域 ORF15 外显子我们直接采用测序的方法来检测突变:ORF15 外显子结构的特殊性(在全长 1 706 bp 的序列片段中至少有 1 000 bp 以上为高度嘌呤重复区)给测序带来了异常的困难。我们在参考德国研究小组提供的对外显子 ORF15 测序策略的基础上[2],用 BigDye Terminator CycleSequencing v3.1 kit (Applied Biosystems) 和 ABI 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)对其进行序列测定。

2　结果

2.1　两点连锁分析

两位点 Lodsore 计算结果显示家系中 RP 与 DXS8113 位点在 $\theta = 0.01$ 时,获得 Lodscore 2.42,支持与 RP3 基因的连锁。

2.2　单倍型分析

家系 ZLK 中,比较先证者Ⅱ1 和其母亲Ⅰ2 的单倍型,发现在 DXS1033 处发生了重组。由于 RP2 基因位于 DXS1033 和 DXS426 位标之间,因此可排除疾病位点位于 RP2 的可能性。比较患者Ⅱ1、Ⅲ3、Ⅲ4 和携带者Ⅰ2、Ⅱ5、Ⅱ8 的单倍型,发现在 DXS1110 和 DXS1055 之间,他们拥有共同的基因型——2323243,而 RPGR 基因位于 DXS1110 和 DXS1055 之间,表明 RPGR 为该家系的致病位点。见图 1。

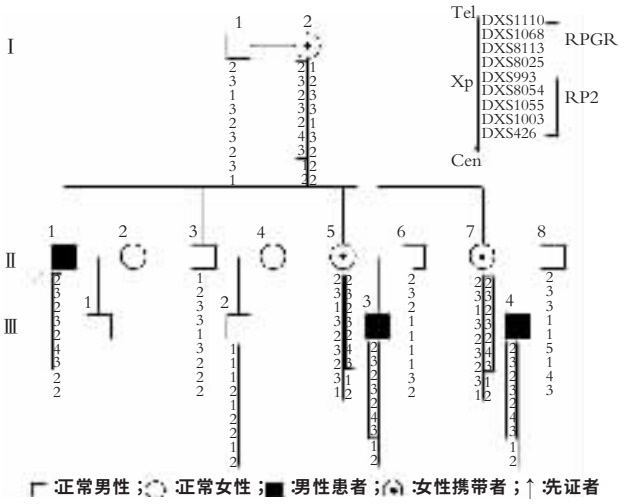
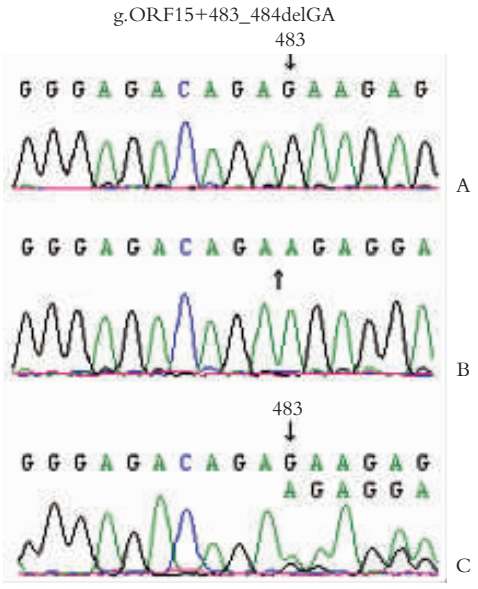


图 1　ZLK 家系的单倍型分析图

2.3　RPGR 基因突变序列分析

对该家系患者的 RPGR 基因的 1 ~14 号外显子进行 CSGE 筛选突变位点,未见出现异常带型的 PCR 产物。同时对突变热点区域 ORF15 外显子直接测序,发现了 3 个患者在 RPGR 基因的 ORF15 外显子(GenBank 收录号 AF286472)的第 483 位和第 484 位都有碱基缺失,为确认这一突变,进一步扩大受试者范围。针对该突变的区域对家系的其余成员的 RPGR 基因 ORF15 外显子进行测序(图 2),结果在正常家系成员中未发现该突变,而在患者的母亲(由临床表型推测均有携带者可能)发现了该突变的杂合子,表明该突变与 RP 疾病呈共分离(co-segregation)。



A:正常对照; B:患者; C:携带者

图2 ZLK 家系成员的 RPGR 基因 ORF15 外显子的部分序列 (↑:突变对应位置)

3 讨论

RPGR 基因起初被确定含 19 个外显子,编码 815 个氨基酸,在人视杆和视锥细胞的外节、支气管的黏膜上皮层、窦道组织、胎儿的耳蜗血管纹等均有表达[7]。RPGR 基因在不同的组织细胞中有不同的选择性剪接产物,其中在视网膜细胞中以 ORF15 转录子为主。该转录子与光感受器细胞的功能密切相关[8]。ORF15 转录子包括前 14 个外显子和外显子 ORF15(3′末端外显子紧临近原内含子 14,序列范围囊括了原外显子 15 和部分内含子 15 的区域)。RPGR 基因的氨基端有 6 个高度保守的串联重复顺序,与染色体固缩调控因子(RCC1)有同源性,因此把这段称为 RCC1 相似结构(RCC1-like domain, RLD)。RCC1 是一种鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF),可促进 GDP 与 Ras 相关核蛋白(ras-related nuclear protein, RAN)解离和 GTP 与 Ran 的结合,因而推测 RPGR 可能与 RCC1 一样是一种新的 GEF,起调节相关 GTP 酶的作用。

ORF15 外显子全长 1 706 bp,序列包含一段高度嘌呤重复区,推测可能编码富含谷氨酸和甘氨酸的结构域。在欧洲地区 XLRP 人群中对外显子 ORF15 进行的突变研究表明,该区域是 RPGR 中的一个突变热点区,60% ~80% 的患者在该外显子内都存在致病突变[9]。

本研究在对 ZLK 家系前期研究工作的基础上[8]通过锁定 RP2 和 RP3 位点,加大扫描密度,利用微卫星位标对该家系进行精细单倍型分析得出该家系与 RP3 位点连锁。对 RP3 位点的 RPGR 基因的 1 ~14 号外显子用 CSGE 的方法进行突变筛选未见异常带型的 PCR 产物;在该家系中通过对 RPGR 突变热点区 ORF15 外显子测序检测到 1 个国内外均有报道的热点突变:g. ORF15 +483_484delGA。该缺失出现在家系的男性患者中,而在正常的男性成员中未检出,患者的母亲为该突变的杂合子,表明该缺失在家系中与疾病呈现共分离。同时这 2 个碱基的缺失引起了移码突变,导致氨基酸编码的提前终止——正常人的 ORF15 外显子编码 567 个氨基酸而该突变体据推测只编码 183 个氨基酸[2]。该突变曾经被国内外多次报道[2-4]表明该突变是 XLRP 常见突变,提前终止的氨基酸序列直接影响到 ORF15 所编码氨基酸的 C 末端保守区域,影响 RPGR 的正常生理功能。

本研究不仅对患者家系做出了较为完整的分子遗传学分析,而且突变的检出有助于以后对 RPGR 蛋白的功能分析和 X 连锁型视网膜色素变性疾病的基因诊断。

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] Bader I, Brandau O, Achatz H, *et al*. X-Linked retinitis pigmentosa: RPGR mutations in most families with definite X linkage and clustering of mutations in a short sequence stretch of exon ORF15 [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(4): 1458 -1463.

[3] Li Y, Dong B, Hu A L, *et al*. A novel RPGR gene mutation in a Chinese family with X-linked dominant retinitis pigmentosa [J]. Chin J Med Genet , 2005 , 22 (4): 396 -398.

[4] Pelletier V, Jambou M, Delphin N, *et al*. Comprehensive survey of mutations in RP2 and RPGR in patients affected with distinct retinal dystrophies: genotype-phenotype correlations and impact on genetic counseling[J]. Hum Mutat, 2007, 28(1): 81 -91.

[5] 陈翠敏,府伟灵,张晓莉. 应用微卫星多态位点对 X 连锁型视网膜色素变性疾病进行遗传连锁分析的研究[J]. 重庆医学,2006, 35(6): 501 -502.

[6] Zhang X L, Liu M, Meng X H, *et al*. Mutational analysis of the rhodopsin gene in Chinese ADRP families by conformation sensitive gel electrophoresis[J]. Life Sci, 2006, 78(13): 1494 -1498.

[7] Iannaccone A, Breuer D K, Wang X F, *et al*. Clinical and immunohistochemical evidence for an X linked retinitis pigmentosa syndrome with recurrent infections and hearing loss in association with an RPGR mutation[J]. J Med Genet, 2003, 40(11): e118.

[8] Hong D H, Pawlyk B S, Adamian M, *et al*. A single, abbreviated RPGR-ORF15 variant reconstitutes RPGR function *in vivo*[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(2): 435 -441.

[9] Sharon D, Sandberg M A, Rabe V W, *et al* . RP2 and RPGR mutations and clinical correlations in patients with X-linked retinitis pigmentosa[J]. Am J Hum Genet, 2003, 73(5): 1131 -1146.

(编辑 郭建秀)