论著

文章编号:1000-5404(2012)02-0096-03

新生儿中常见的9个耳聋基因突变位点筛查分析

胡华梅,胡 华,董艳玲,徐 刚,胡 斌,龙 洋,姚 宏 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科,产前诊断中心)

[摘要] **目的** 采用遗传性耳聋基因芯片对新生儿进行突变筛查,评估新生儿中9个常见耳聋基因突变的频率、突变类型以及其与耳聋的相关性。**方法** 经产妇及家属的知情同意,并自愿要求行耳聋基因检测,收集本科室2010年8月至2011年9月出生的新生儿脐带血756例,提取DNA,用遗传性耳聋基因芯片检测中国人群中常见的4个耳聋相关基因的9个突变位点,包括GJB2(35 del G、176 del 16、235 del C、299 del AT)、GJB3(538 C>T)、SLC26A4(IVS7-2A>G、2168 A>G)、线粒体DNA 12S rRNA(1555 A>G 、1494 C>T),对阳性结果进行测序验证。**结果** 756例新生儿检测出GJB2(235 del C)突变15例,GJB2(176 del 16)突变1例,GJB2(299 del AT)突变4例,SLC26A4(IVS 7-2 A>G)突变13例,SLC26A4(2168 A>G)突变1例,12S rRNA(1555 A>G) 均质突变型1例,测序结果与基因芯片结果一致。**结论** 在没有耳聋家族史的新生儿中,GJB2基因的杂合突变率高于SLC26A4基因突变率,GJB3基因的突变较为少见。

[关键词] 耳聋;GJB2基因;SLC26A4基因;突变
[中图法分类号] R722.104;R764.43;R446.9 [文献标志码] A

Mutation analysis of 9 mutation spots related to neonatal deafness by DNA microarray

Hu Huamei, Hu Hua, Dong Yanling, Xu Gang, Hu Bin, Long Yang, Yao Hong (Center of Prenatal Diagnosis, Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To screen the hereditary deafness genes by DNA microarray in newborns, evaluate the mutation types and frequencies of 9 mutation spots, and identify the relationship between these mutations and deafness. **Methods** A total of 756 umbilical cord blood samples of newborns without hereditary deafness history were collected after informed consent was signed by their parents. Genomic DNA was extracted and then 9 hot mutation spots in 4 deafness genes were detected by microarray, which included GJB2 (35 del G, 176 del 16, 235 del C and 299 del AT), GJB3 (538 C>T), SLC26A4 (IVS 7-2 A>G, 2168 A>G), and mitochondial 12S rRNA (1555 A>G ,1494 C>T). Positive microarray results were verified by DNA sequencing. **Results** Fifteen cases had GJB2 mutation (235 del C), 13 cases SLC26A4 mutation (IVS 7-2 A>G), 4 cases GJB2 mutation (299 del AT), 1 case GJB2 mutation (176 del 16), 1 case SLC26A4 mutation (2168 A>G), and 1 case 12S rRNA mutation (1555 A>G). The sequencing results were consistent with the microarray results. **Conclusion** Among those newborns without family history of deafness, the mutation frequency of GJB2 is higher than SLC26A4 in this study, and mutation of GJB3 is rare. Mutation screening for hereditary deafness related genes play an important role in the early detection and proper treatment for neonatal deafness, and in the instruction for marriage and breeding.

[**Key words**] deafness; GJB2; SLC26A4; mutation

Corresponding author: Yao Hong, Tel: 86-23-68765907, E-mial: yaohong6319@sina.com

先天性耳聋是最常见的出生缺陷之一,也是一种最常见的人类感觉系统疾病,其发病率为0.1% ~0.3%,且某些地区的发病率处于逐步上升态势[1-2]。单一基因的突变、不同基因的复合突变、环境因素,以及基因和环境两者共同作用均能导致耳聋。50%的儿童期耳聋被认为与遗传因素有关[3]。遗传性耳聋分为综合型与非综合型。非综合型耳聋具有高度的遗传异质性。非综合型耳聋(non-syndromic inherited hearing)70%不伴有其他症状,且几乎都属于单基因遗传。与非综合型耳聋相关的已被克隆的基因包括28个染色体隐性基因和22个常染色体显性基因,1个X连锁基因。国内研究表明大部分非综合型耳聋与GJB2、SLC26A4、GJB3、线粒体DNA(mt DNA)12S rRNA等基因相关。对新生儿进行耳聋基因的筛查可以预知部分

[通信作者] 姚 宏,电话:(023)68765907,E-mial:yaohong6319@sina.com

遗传相关的迟发性耳聋。听力障碍的发现早晚是影响语言能力的最重要因素,早期诊断和干预能够提高听力障碍儿童的语言、语音水平。进行线粒体 DNA(mt DNA)12S rRNA 1555 A>G、1494 C>T 药物敏感突变位点的筛查,对新生儿出生后的用药安全具有重要的指导意义。本研究采用快速、高效的检测方法—耳聋基因芯片法,对 756 个刚出生的新生儿进行筛查,发现 GJB2、SLC26A4 的突变较其他几个基因常见,对耳聋患儿的早期发现、早期诊断和早期治疗具有很好的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

经产妇及家属的知情同意并签订知情同意书后,收集本科 2010 年 8 月至 2011 年 9 月出生的新生儿脐带血 756 例,利用 Promega 基因组抽提试剂盒提取 DNA,测定浓度和纯度,被检测基因组 DNA 需满足浓度 100 ~ 200 ng/μl,纯度 $D(260)/D(280)=1.7\sim2.0$,储存于 -20 ℃备用。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 9 项遗传性耳聋基因检测试剂盒(微阵列芯片法,由北京博奥有限公司提供),杂交缓冲液,杂交芯片,洗液:20×SSC,10% SDS 组成。洗液配置,洗涤液Ⅰ:SSC 终浓度为 0.3×,SDS 终浓度为 0.1%;洗涤液Ⅱ:SSC 终浓度为 0.06×。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 反应体系 20 μl,每个 DNA 标本分别配置 A、B 两个反应体系,进行多重 PCR。A 体系:引物混合物 A1 12.5 μl,引物混合物 A2 4.5 μl,模板 DNA 3.0 μl。B 体系:引物混合物 B1 12.5 μl,引物混合物 B2 4.5 μl,模板 DNA 3.0 μl。

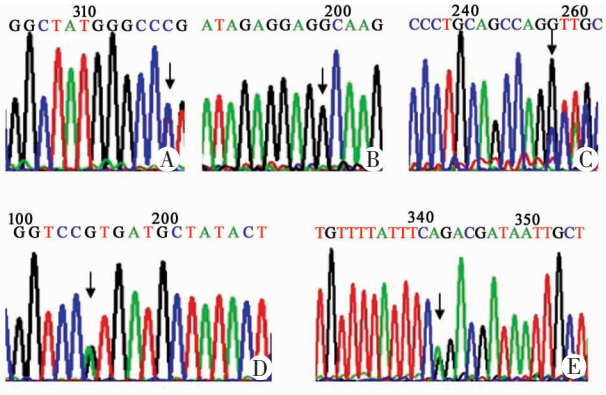
1.2.3 PCR 扩增条件 37 ℃ 10 min,95 ℃ 15 min,96 ℃ 1 min预变性,94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 45 s 共 32 个循环,72 ℃ 45 s,60 ℃ 10 min。其中 94 ℃降到 55 ℃时,速率为 0.4 ℃/s, 55 ℃升至 70 ℃时,速率为 0.2 ℃/s。

1.2.4 杂交 PCR 产物 95 ℃变性 5 min 后放入冰水混合物中冰浴 3 min。杂交缓冲液 50 ℃加热使其完全融化,按每份 10 μl 分装。从同 1 个样品模板的 2 个不同扩增体系管(A、B)中各取 2.5 μl PCR 产物加入到对应编号的 10 μl 杂交缓冲液中,混匀后加到芯片的微阵列区域,将盖玻片平整的压于芯片上方,封闭杂交盒,放入 50 ℃水浴锅中水浴 1 h。

1.2.5 洗片 将洗涤液Ⅰ和洗涤液Ⅱ放入 42 ℃恒温水浴摇床中,80 r/min 匀速振摇。芯片取出后,先放入洗涤液Ⅰ中 80 r/min 振摇洗涤 2 min 后,放入洗涤液Ⅱ中 80 r/min 振摇洗涤 2 min,甩干后扫描。用晶芯 LuxScan™ 10K-B 微阵列芯片扫描仪和相应的遗传性耳聋基因芯片判别系统进行信号读取和判断。若在同一位点中只有探针 W 出现阳性性号,判读为该位点野生型;若在同一位点中只有探针 M 出现阳性信号,判读为该位点纯合突变型;二者均出现阳性信号判读为杂合突变。

2 结果

选择芯片结果提示为杂合突变和线粒体 DNA 均质突变的阳性标本进行测序验证,结果显示测序结果与芯片结果一致(图 1、2)。对 756 个新生儿进行耳聋基因筛查(表 1),GJB2 基因杂合突变频率约为 2.6%, SLC26A4 基因杂合突变频率为 1.9%。



A:GJB2(235 del C)杂合突变;B:mt DNA 12S rRNA 1555 A>G 均质突变;C:GJB2(176 del 16)杂合突变;D:SLC26A4(2168 A>G)杂合突变;E:SLC26A4(IVS 7-2 A>G)杂合突变

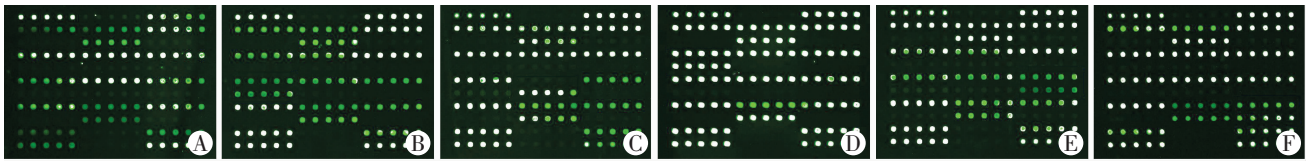
图 2 几种常见的突变类型的测序结果

表 1 耳聋基因突变在 756 例新生儿中的检出情况 [例(%)]

基因	突变类型	检出情况
GJB2(235 del C)	杂合突变	15(2.0)
GJB2(176 del 16)	杂合突变	1(0.1)
GJB2(299 del AT)	杂合突变	4(0.5)
SLC26A4(IVS 7-2 A>G)	杂合突变	13(1.7)
SLC26A4(2168 A>G)	杂合突变	1(0.1)
12S rRNA(1555 A>G)	均质突变	1(0.1)

3 讨论

听力是人们日常生活中不可缺少的能力。研究发现听力障碍发现的早晚是影响语言能力的最重要因素,早期诊断和干预能够提高听力障碍儿童的语言和语音水平。流行病学调查资料显示,我国听力障碍患者中,5% ~12% 由线粒体 DNA 12S rRNA 1555 A>G



A:野生型;B:GJB2(235 del C)杂合突变;C:mt DNA 12S rRNA 1555 A>G 均质突变;D:GJB2(176 del 16)杂合突变;E:SLC26A4(2168 A>G)杂合突变;F:SLC26A4(IVS 7-2 A>G)杂合突变

图 1 几种常见的突变类型的芯片结果

引起,20% 由 GJB2 基因突变导致[4]。Guo 等[5]对我国西北地区聋校 514 例耳聋患者进行 SLC26A4 的突变研究发现,致病突变率为 8.95%。

GJB2 是引起非综合性遗传性耳聋最常见的耳聋基因[6],表现为隐性遗传。235 del C 突变类型在听力正常人群中其携带率为 1% ~2%[7]。在我国人群中,常见 GJB2 基因突变类型主要有 235 del C、176 del 16、299 del AT[8]。本研究收集 756 例新生儿脐带血,进行耳聋基因筛查发现 GJB2 突变具有较高的携带率,约为 2.6%,提示正常新生儿中 GJB2 的突变占有一定的比例。而 2 个 GJB2 基因突变携带者婚配有 25% 的概率生育 1 个耳聋患儿,提示若夫妻双方都为该基因的杂合突变时,建议行耳聋基因产前筛查,可以有效地避免耳聋患儿的出生。

编码 cx31 的基因(GJB3)的突变可以引起常染色体显性或者隐性遗传性非综合征型遗传性耳聋。在正常人群中该基因的突变频率较小。本研究暂未发现新生儿中 GJB3 基因的突变。

SLC26A4 基因属于离子转运体家族[9],目前认为 SLC26A4 基因是仅次于 GJB2 突变而引起感音神经性聋的遗传学病因[10-12]。袁永一等[13]发现前庭岛水管扩大与 SLC26A4 基因突变相关联。除已知的热点突变 IVS7-2 A > G 外,我国人群中 SLC26A4 基因热点突变还包括 2168 A > G,1226 G > A 等。本研究在新生儿中也检出了 SLC26A4 基因的突变携带,占总筛查人数的 1.9%,仅次于新生儿中 GJB2 的突变携带率。由于患有大前庭水管综合征的儿童即使感冒、头部轻微撞击等外界因素都会导致听力的下降。因此通过对 SLC26A4 基因突变的筛查,可以提示对该基因有突变的患儿采取严格的防护措施,保护听力不受外因影响。同时可以对患儿的听力损失进行有效地早期干预。

线粒体 DNA 突变为母系遗传,线粒体 DNA 12S rRNA 1494 C > T、1555 A > G 与药物性耳聋相关[14]。另有研究报道一部分的 12S RNA 基因 1555 A > G 突变患者即使不使用氨基糖苷类药物,同样也会出现感音神经性耳聋[15]。本研究发现新生儿线粒体 DNA 12S rRNA 1555 A > G 均质突变型 1 例,询问家族遗传史发现该新生儿的外婆为氨基糖苷类药物致耳聋患者。新生儿中开展 DNA 12S rRNA 1494 C > T、1555 A > G 突变的筛查,可以对临床用药起到重要的预警作用。同时筛出人群中的敏感个体,运用线粒体疾病的母系遗传规律,进一步明确先证者家族中尚未发病的母系家庭成员,给予宣教,是一种有效的前瞻性的预防手段。

我们采用耳聋基因芯片法,检测了 756 例新生儿中的耳聋基因突变,结果显示在健康人群中 GJB2 和 SLC26A4 具有较高的突变率,但这 2 个基因均未检测到纯合突变型。对新生儿进行耳聋基因的突变筛查具有重要意义。筛出携带致聋因素的易感人群,可以对其进行早期的听力损失防护和干预。筛出致聋基因的携带者,对其未来婚配和生育后代有中重要的指导作用。在健康人群中开展耳聋基因筛查,可以有效降低耳聋患儿的出生率,为优生优育做出重要贡献。

参考文献:

[1] Khabori M A, Patton M A. Consanguinity and deafness in Omani children[J]. Int J Audiol, 2008, 47(1): 30-33.

[2] Sajjad M, Khattak A A, Bunn J E, *et al*. Causes of childhood deafness in Pukhtoonkhwa Province of Pakistan and the role of consanguinity [J]. J Laryngol Otol, 2008, 122(10): 1057-1063.

[3] Marazita M L, Ploughman L M, Rawlings B, *et al*. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U. S. school-age population [J]. Am J Med Genet, 1993, 46(5): 486-491.

[4] 李庆忠, 王秋菊, 迟放鲁, 等. 中国散发听力损失患者中 GJB2 基因突变分子流行病学研究[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2006, 6(5): 310-313.

[5] Guo Y F, Liu X W, Guan J, *et al*. GJB2, SLC26A4 and mitochondrial DNA A1555G mutations in prelingual deafness in Northern Chinese subjects[J]. Acta Otolaryngol, 2008, 128(3): 297-303.

[6] Morton C C, Nance W E. Newborn hearing screening--a silent revolution[J]. N Engl J Med, 2006, 354(20): 2151-2164.

[7] Huculak C, Bruyere H, Nelson T N, *et al*. V37I connexin 26 allele in patients with sensorineural hearing loss: evidence of its pathogenicity [J]. Am J Med Genet A, 2006, 140(A): 2394-2400.

[8] Dai P, Yu F, Han B, *et al*. GJB2 mutation spectrum in 2063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment [J]. J Transl Med, 2009, 7: 26.

[9] Yoon J S, Park H J, Yoo S Y, *et al*. Heterogeneity in the processing defect of SLC26A4 mutants[J]. J Med Genet, 2008, 45(7): 411-419.

[10] Yang T, Vidarsson H, Rodrigo-Blomqvist S, *et al*. Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4) [J]. Am J Hum Genet, 2007, 80(6): 1055-1063.

[11] Wang Q J, Zhao Y L, Rao S Q, *et al*. A distinct spectrum of SLC26A4 mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct in China[J]. Clin Genet, 2007, 72(3): 245-254.

[12] Hilgert N, Smith R J, Van-Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? [J]. Mutat Res, 2009, 681(2/3): 189-196.

[13] 袁永一, 戴朴, 朱庆文, 等. 1552 例重度感音神经性聋患者与 SLC26A4 基因 IVS7-2 A > G 突变相关的全序列分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009, 44(6): 449-454.

[14] Wang Q, Li Q Z, Han D, *et al*. Clinical and molecular analysis of a four-generation Chinese family with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss associated with the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(2): 583-588.

[15] Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M, *et al*. Deafness due to A1555G mitochondrial mutation without use of aminoglycoside [J]. Laryngoscope, 2004, 114(6): 1085-1091.

(**收稿**:2011-07-28;**修回**:2011-09-12)

(编辑 栾 嘉)