

# 非综合征型遗传性耳聋基因诊断研究进展

何凌 综述 尹爱华 校审

(广州医科大学附属广东省妇儿医院 医学遗传中心, 广东 广州 511442)

**【摘要】** 耳聋是常见的致残性疾病,约 60%的耳聋为遗传因素所致。目前人类研究被定位的非综合征型遗传性耳聋基因座已有 100 余个,在中国人群中最常见的致聋基因为 *GJB2*、*SLC26A4* 和线粒体 DNA 基因。分子诊断技术是目前检测非综合征型遗传性耳聋的主要方法。对非综合征型遗传性耳聋的准确快速诊断有利于指导对患者进一步治疗,从而改善其生活质量。本文对非综合征型遗传性耳聋的基因诊断技术进行综述。

**【关键词】** 非综合征型遗传性耳聋;基因诊断;检测技术

**【中图分类号】** R714.55 **【文献标识码】** A

耳聋是常见的致残性疾病<sup>[1]</sup>,可导致言语交流障碍,严重影响生活质量。世界范围内,每 1000 个新生儿中就有 1~2 个为听力障碍患儿<sup>[2]</sup>。据 2006 年第二次全国残疾人抽样调查报告,我国听力残疾人多达 2780 万人,约占全国人口的 1.54%<sup>[3, 4]</sup>。耳聋的原因有遗传因素和环境因素,或遗传和环境因素共同作用的结果<sup>[5]</sup>。约 60%的早发型耳聋为遗传因素所致,很多迟发性听力下降也与基因缺陷造成患者对致聋因素易感有关<sup>[6]</sup>。在遗传性耳聋患者中,70%的患者除耳聋外不伴有其他症状,这类耳聋为非综合征型耳聋,另外 30%为伴其他症状的综合征型耳聋。大部分的非综合征型遗传性耳聋符合孟德尔遗传方式,即单基因突变导致耳聋,约 80%为常染色体隐性遗传,15%~20%为常染色体显性遗传,X 连锁遗传比较少见,约占 1%<sup>[7]</sup>,而遵循母系遗传的线粒体 DNA 基因突变致聋约占 1%~4%<sup>[8, 9]</sup>。随着人类基因组计划的完成,耳聋基因的定位和克隆取得了巨大的进步。分子诊断技术是目前检测非综合征型遗传性耳聋的主要方法,通过确定耳聋患者及高危人群的相关突变位点,给予正确的指导及干预,可在一定程度上预防耳聋发生,并可对耳聋患者进行有针对性的治疗<sup>[10]</sup>。

## 1 非综合征型遗传性耳聋致病基因概述

非综合征型遗传性耳聋具有高度遗传异质性。目前已被定位的与非综合征型遗传性耳聋相关的基因座已有 100 余个(<http://hereditaryhearingloss.org/>)。不同的种族、地区均有不同的致聋基因和突变位点。在众多的耳聋致病基因中,*GJB2*、*SLC26A4* 和线粒体 DNA 基因是被研究最多的<sup>[11-13]</sup>。*GJB2* 基因是第一个被发现的遗传性耳聋致病基因,也是导致非综合征型遗传性耳聋最常见的致病基因<sup>[14]</sup>。据世界各国对本国耳聋患者的 *GJB2* 基因进行的大规模调查研究报道,*GJB2* 基因突变约占非综合征型耳聋的 10%~25%<sup>[5, 12]</sup>。*GJB2* 基因在不同地区及种族有不同的突变热点<sup>[11]</sup>:c.35delG 是欧洲、中东、北美等最常见的突变位点;c.167delT 是犹太人中最常见的突变热点;c.235delC 是东亚人群(中国、日本及韩国)最常见的突变热点;c.427C>T 是加纳人最常见的突变位点。据 Pu Dai 等<sup>[15]</sup>对中国 26 个不同地区的耳聋人群大规模调查发现,我国常见的 *GJB2* 基因突变类型有:c.235delC、c.299-300delAT、c.176-191del16、c.109G>A 等,可占 *GJB2* 基因突变人群的 80%以上。*SLC26A4* 基因是第二常见的耳聋致病基因。*SLC26A4* 基因突变与大前庭水管综合征和 Pendred 综合征密切相关<sup>[16]</sup>。目前发现的 *SLC26A4* 基

因突变已有 170 多种,其突变类型也是多种多样。在欧美高加索人中,最常见的突变是 c. 707T>C、c. 1246A>C、IVS8+1G>A 等;而在东亚(中国、日本和韩国)人群中,IVS7-2A>G 及 c. 2168A>G 最常见<sup>[11, 16]</sup>。线粒体 DNA 基因与氨基糖苷类抗生素药物致聋及非综合征型遗传性耳聋密切相关<sup>[9]</sup>,其遗传方式为母系遗传。常见的突变有 12S rRNA 基因的 m. 1555A>G 和 m. 1494C>T 两种,其中 m. 1555A>G 在我国耳聋患者中发生率约为 3.9%<sup>[17]</sup>。*GJB2*、*SLC26A4* 和线粒体 DNA 12S rRNA 基因突变在我国遗传性非综合征型耳聋患者中约占全部致聋基因的 33%<sup>[18]</sup>。明确致聋基因及突变位点,这使遗传性耳聋筛查成为可能。

## 2 非综合征型遗传性耳聋的基因诊断

分子诊断是目前诊断非综合征型遗传性耳聋的主要方法。对非综合征型遗传性耳聋患者的准确快速诊断有利于指导对患者进一步治疗,从而改善其生存质量,并通过确定耳聋患者及高危人群的相关突变位点,指导优生优育,对提高我国人口质量有重大意义。目前,针对耳聋患者的遗传基因诊断已在国内外开展,新生儿免费耳聋基因筛查也在一些城市如北京、上海进行,但由于检测成本的原因未能在全国全面展开。耳聋基因筛查技术仍需不断改进和完善。非综合征遗传性耳聋基因诊断的方法主要有以下几种。

2.1 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 是遗传性耳聋传统的基因诊断方法。该技术是针对已知突变位点的染色体片段的检测,对含有突变位点的片段及野生型片段进行 PCR 扩增,采用相应的限制性内切酶,分别对突变和野生的 DNA 片段进行酶切,由于 DNA 序列变异而引起酶切位点的改变,故有不同长度的酶切产物,对产物进行琼脂糖凝胶电泳,根据电泳条带区分出对应的基因型。Pandya 等<sup>[19]</sup>早在 1997 年利用该技术对三家系的线粒 DNA 12S rRNA 基因的 m. 1555A>G、m. 663 A>G 及 16S rRNA 基因的 m. 1736 A>G 突变位点进行检测。Vivero R. J

等<sup>[20]</sup>对 217 名非综合征型耳聋患者采用 PCR-RFLP 法检测线粒体 DNA 基因的 3 个常见突变点(A1555G、G7444A、A3243G),并用直接测序法加以验证,3 个常见线粒体 DNA 基因突变的检出率为 1.84%。此法的优点是:快速、简单,适合小批量样本的分型试验,不需要特殊仪器。但存在的缺点有:不能同时检测不同基因的多个突变位点,如要检测多个突变位点,则需要多次 PCR,工作量大;多态性过分依赖限制性内切酶的种类和数量,对位点要求高,没法准确鉴别假阳性情况(酶切不完全)。

2.2 多重定量连接酶链反应(multiplex quantitative ligase chain reaction, MQ-LCR) 定量连接酶链反应是在检测位点两侧的寡核苷酸探针标记上一个荧光基团,该荧光基团在发生连接反应时,两个荧光基团被拉进则荧光消失,若有碱基错配则不能发生连接反应而荧光不消灭<sup>[21]</sup>。在荧光技术和 LCR 技术结合的基础上,针对不同的检测位点,选择不同波段的荧光基团来标记探针,便可以在一次反应中检测多个基因位点<sup>[22]</sup>。杨晓林等<sup>[23]</sup>以 MQ-LCR 法对 98 名耳聋患儿进行检测,检测到 *GJB2* 基因突变致聋的有 29 例,线粒体 DNA A1555G 致聋的有 4 例,*SLC26A4* 致聋的有 15 例。该方法操作简单、快速、经济,但检测一次需要较多的探针,且相近波段的荧光基团可能会有一定程度的相互干扰,定量判断基因结果有待完善。

单核苷酸多态分型(single nucleotide polymorphisms scan, SNPscan)技术由上海天昊生物科技有限公司自主研发,该技术基本原理是采用连接酶连接反应的高特异性实现对 SNP 位点等位基因的识别,然后通过连接探针末段引入不同长度的非特异序列以及通过连接酶加接反应获得位点对应的不同长度连接产物,利用标记荧光的通用引物对连接产物进行 PCR 扩增,通过荧光毛细管电泳对扩增产物进行电泳分离,最后通过对 GeneMapper 软件分析获取各个 SNP 位点的基因型(<http://www.geneskies.com/index.php/Index/fenxing/fid/60.html>)。具有高通量、高效、高准确性、低成本等特点。张迪等<sup>[24]</sup>对天津市 225 例非综合征型耳聋患者进行耳聋基因筛查,利用 SNPscan 技术对 *GJB2*、

SLC26A4 和线粒体 DNA 12S rRNA 3 个基因的 115 个位点进行突变检测,共找到明确基因致聋者 111 例(49.3%,111/225),经 Sanger 测序验证,符合率达 100%。

2.3 变性高效液相色谱分析(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC) 变性高效液相色谱分析是一项在单链构象多态性分析和变性梯度凝胶电泳基础上发展起来的新的杂合双链突变检测技术。其工作原理是在部分变性的条件下,利用杂合双链与纯合双链在柱中保留时间的差异,可以快速分析单个核苷酸的突变和多态性<sup>[25]</sup>。Zainal 等<sup>[26]</sup>采用变性高效液相色谱法对 91 例非综合征型遗传性耳聋儿童及 91 例听力正常儿童进行 GJB2 基因检测,对筛查出的突变位点进行 DNA 测序,在 32 例患儿及 37 例正常听力儿童中检测出 GJB2 基因突变。戴朴等<sup>[27]</sup>对来自 35 个家庭的 38 例中重度感音性耳聋患者以高效液相色谱分析结合序列分析进行 SLC26A4 基因分析,发现 32 个先证者携带有 SLC26A4 基因突变,在所有受检患者中突变发现率 91.4%(32/35)。此法具有高通量检测、快速筛查等优点。但只是一个定性的筛查技术,无法确定具体突变类型及突变位点,有异常峰形的样本需进行 DNA 测序;许多片段有多个主要解链温度,需要筛查的温度较多,操作仍较繁琐;其仪器设备昂贵,对技术人员要求高,在临床中的应用受限制,多用于实验室研究。

2.4 多重等位基因特异性 PCR 技术(multiplex allele-specific PCR, MAS-PCR) 多重等位基因特异性 PCR 技术结合了多重 PCR 和等位基因特异性 PCR 的原理,其根据突变类型设计和合成多组 PCR 引物,通过适当的组合和调整,组成一个 MAS-PCR 体系,通过凝胶电泳检测 PCR 产物中是否产生相应的特异长度扩增带,可以检测出被检样品是否具有这种突变,还可判断出这种突变是杂合子还是纯合子。1999 年,Scrimshaw 等<sup>[28]</sup>首次将多重等位基因 PCR 技术应用于线粒体 12S rRNA 基因 A1555G 突变检测,发现新西兰人中 12S rRNA 基因 A1555G 突变率与其他国家普通人群发病率相似,表示 MAS-PCR 是一种快速、经济、有效的检测技

术。Esteves MC 等<sup>[29]</sup>也报道了应用多重等位基因 PCR 技术对 101 个耳聋患者进行 GJB2 基因和 GJB6 基因突变检测,6.93%的患者为 GJB2 基因 c.35delG 杂合突变,1%的患者为 GJB2 基因与 GJB6 基因双重杂合突变(c.35delG/Del(D13S1830))。郑静等<sup>[30]</sup>采用多重等位基因特异性 PCR 同时检测 138 例非综合征型耳聋患者线粒体 DNA 12S rRNA 基因 A1555G 和 C1494T 突变,A1555G 和 C1494T 突变的检出率为 7.97%,以 DNA 测序法验证,两种方法具有良好的一致性。此技术只需两次 PCR 和一次凝胶电泳即可确定基因型,具有简便、快速、经济、有效等优点,也不需要昂贵的实验设备。但由于特异引物的特异性较差,在某些情况下,即使引物的 3' 末端碱基与模板不互补,延伸仍可进行,产生不可靠的结果。

2.5 高分辨率熔解曲线分析(high resolution melting, HRM) 是犹他大学和爱德华科技公司合作开发的专门用于突变研究的技术,主要原理:利用双链 DNA 受热解离成为单链的核酸物理特性,采集解链时释放的荧光信号绘制熔解曲线,再通过熔解曲线的变化来反映核酸性质的差异<sup>[31]</sup>。国内外均有文献报道利用高分辨熔解曲线技术分析致聋基因<sup>[32, 33]</sup>。有学者结合染料熔解曲线  $T_m$  值分型技术及荧光 PCR 多色多通道的双重优点,建立了多色荧光熔解曲线分析技术(multiplex fluorescence melting curve analysis, FMCA),实现了多位点的检测<sup>[34, 35]</sup>。该技术具有高通量、高灵敏度、自动化程度高、完全闭管操作等优点,适合于临床使用。存在的缺点是:检测位点仍有局限,易受退火温度、引物、镁离子浓度、DNA 模板质量、PCR 产物等多因素影响。

2.6 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 此技术的基本原理是:用一定强度的激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量,样品解吸附,基质-样品之间发生电荷转移使得样品分子电离,电离的样品在电场作用下加速飞过飞行管道,根据到达检测器的飞行时间不同来加以区分检测(离子的质量电荷比与其飞行时间成正比),并可

获得样品分子的相对分子质量,从而确定突变位点<sup>[36]</sup>。曾云等<sup>[37]</sup>采用MALDI-TOF MS对454例非综合征型耳聋患者检测常见的4个耳聋致病基因的20个位点,包括:*GJB2*(c. 35delG、c. 167delT、c. 176-191del16、c. 235delC、c. 299-300delAT),*GJB3*(c. 538C>T、c. 547G>A),*SLA26A4*(c. 281C>T、c. 589G>A),*IVS7-2A*>G、c. 1174A>T、c. 1226G>A、c. 1229C>T,*IVS15+5G*>A、c. 1975G>C、c. 2027T>A、c. 2162C>T、c. 2168A>G),线粒体DNA 12S rRNA(m. 1494C>T、m. 1555A>G),通过用直接测序法证实,两者符合率达100%。该技术具有检测位点多、覆盖率高、准确、高通量、低成本、周期短等特点,适合大范围、大规模的检测项目。但此法对分析样品的分离纯化程度要求高,样品需反复层析,仪器设备价格昂贵,需专业人员进行操作,其应用受到限制。

2.7 生物芯片技术 是20世纪90年代发展起来的一种新型、简便的实用生物技术。按检测载体可分为固相基因芯片和液相芯片。基因芯片基本原理:通过光刻原位合成或点样技术,将大量已知序列的DNA或寡核苷酸片段按特定顺序密度固定在玻璃等载体上,待测基因经扩增、荧光标记后与探针杂交、洗样后通过激光扫描,根据荧光强弱或荧光的种类可获得样品基因信息<sup>[38]</sup>。该技术具有高通量、高集成、微型化、连续化和自动化等特点,应用于临床可以在短时间内完成大样本的多基因筛查、诊断,操作简单,结果容易判读,检测成本低,大大提高了诊断效率。国内外学者均有利用基因芯片对耳聋基因进行了大量的应用研究。Phyllis Gardner等<sup>[39]</sup>2006年报道应用该技术实现了同时对8个耳聋基因(*GJB2*、*GJB6*、*GJB3*、*GJA1*、*SLC26A4*、*SLC26A5*和线粒体DNA 12S rRNA、tRNA-Ser基因)198个突变位点的检测。也有报道<sup>[40, 41]</sup>采用A-PEX、Invader等芯片检测技术,可以同时针对数百个突变位点进行高通量检测,但检测周期较长、检测成本也较高。目前国内应用较多的有北京博奥生物有限公司研发的晶芯耳聋基因芯片,可同时检测4个基因(*GJB2*、*GJB3*、*SLC26A4*和线粒体DNA 12S rRNA基因)9个突变位点<sup>[42]</sup>。为涵盖足够多

的位点以提高耳聋基因突变检出率,学者们不断改进技术增加检测位点,检测位点最多可达16个<sup>[43]</sup>。但固相基因芯片技术目前仍存在许多缺点:检测的信噪比较高,信号稳定性较差,同一探针往往需要重复4~5个点方可判读;试剂成本也较高,结果需要依赖于昂贵的激光扫描仪才能判读;只能将一定数目的DNA探针固定于支持物上,检测位点有限,对除点突变之外的其他突变类型的检出能力有限,容易造成漏诊。

2.8 MassARRAY®分子量阵列技术 MassARRAY®分子量阵列技术是Sequenom公司推出的基因分析工具,通过引物延伸或切割反应与MALDI-TOF质谱技术相结合,实现基因分型检测。其采用单碱基延伸反应,仅次于SNP位点设计一段探针,在反应体系中以ddNTP替代dNTP,使探针在SNP位点处仅延伸一个碱基即终止。根据SNP位点的不同,探针将结合不同的ddNTP,从而具有不同的分子量,质谱仪即可检测出这种分子量差异,从而实现SNP分型的目的。可以设计最高多达40种PCR反应和基因型检测。具有准确性高、通量高、灵敏度高、操作简单、反应灵活等优点。Svidnicki MC等<sup>[44]</sup>采用MassARRAY iPLEX®分子量阵列技术对180名耳聋患者进行17个基因94个突变点检测,发现*GJB2*基因突变发病率最高,其次为*SLC26A4*、*CDH23*、*MT-RNR1*、*MYO15A*和*OTOF*基因,准确性和灵敏度可达97%。

2.9 SNaPshot技术 是一种基于荧光标记单碱基延伸原理的分型技术,也称小测序。其原理是:多重PCR扩增目的区域后,经寡核苷酸引物延伸标记扩增,突变位点匹配上一个荧光标记的双脱氧核苷酸后终止延伸。然后通过毛细血管电泳进行片段分析,相当于单个位点的微测序,可以检测单核苷酸的突变。根据电泳峰的移动位置确定该延伸引物的片段长度,根据峰的颜色确定延伸位点的碱基类型,从而确定该样本的基因型<sup>[45]</sup>。具有高通量、高效、快速、准确等优点。Bardien S等<sup>[46]</sup>在南非人群中利用此技术检测与氨基糖甙类药物致聋相关的5个线粒体DNA基因突变[A1555G、C1494T、T1095C、961delT+C(n)和A827G],发现在南非黑人血统

中 A1555G 突变的携带率为 0.9%。Borum S 等<sup>[47]</sup>报道采用此技术在韩国 197 名听力正常人及 139 名新生儿中筛查 7 个常见致病突变点 (GJB2-c. 235delC、SLC26A4-c. 439A>G、c. 919-2A>G、c. 1149+3A>G、c. 1229C>T、c. 2168A>G 和线粒体 DNA 基因 m. 1555A>G) 的携带率,检出率分别为 4.06% 和 4.32%。

2.10 DNA 测序 即分析特定 DNA 片段的碱基序列。目前用于测序的技术主要有 Sanger 等发明的双脱氧链末端终止法和 Maxam 及 Gilbert 发明的化学降解法。运用最多的是 Sanger 测序法。现 Sanger 测序技术的测序长度可达 1000bp,碱基的读取准确率达 99.99%,已成为测序的金标准。其具有技术平台标准化、结果直观、准确率极高等优点,但由于耳聋相关致病突变分散于数个基因上,或一个基因包含数个外显子,测序成本高、检测效率低、耗时长、对技术人员要求高以及检测设备有限,应用受到限制。

2.11 下一代测序技术(next generation sequencing, NGS) 也叫高通量测序,或深度测序,使耳聋基因研究和基因诊断步入一个新的高速发展阶段。包括全基因组重测序技术(whole genome sequencing, WGS)、全外显子测序技术(whole exome sequencing, WES)、目标序列捕获测序技术(targeted gene capture, TGC)等<sup>[48]</sup>。全外显子组测序又称为定向外显子组捕获(targeted exome capture),是优先选择编码区的基因为目标基因,利用外显子捕获技术获取全基因组区域的全部外显子序列并进行高通量测序。由于大部分孟德尔遗传性疾病都是由致病基因的外显子或者剪切区域的突变引起,外显子组测序捕获的目标区域只占人类基因组长度的约 1%,因此比进行全基因组序列测序更经济,且对目标区域的覆盖率高,便于变异检测。目标序列捕获测序技术是利用微阵列技术合成大量寡核苷酸探针,与基因组上的特定区域互补结合,从而富集到特定区段,然后用第二代测序技术对这些区段进行测序<sup>[49]</sup>。目前认为目标序列捕获测序技术的最大优势在于,任何一个感兴趣的基因组区域都可以被设计出来而被富集,目标区域更有针对性,测序深度更

高,测序的数据分析计算量较小,与生物学表型结合更为直接,而且费用也大大降低。卢宇等<sup>[50]</sup>应用全外显子组测序技术鉴定 2 位患者的一个家系的致聋基因,对 11 名家系成员进行全外显子组测序确定候选基因,并对所有家系成员进行候选基因突变的 Sanger 测序验证,确定耳聋基因 ACTG1 第 4 外显子 c. 364A>G(p. I122V)突变为该耳聋家系的致病原因。Baek JI 等<sup>[51]</sup>2012 年报道了在 8 个韩国家系中以 80 个已知耳聋基因为目标区域的大规模平行测序研究,检出了 5 个耳聋家系为常染色体显性遗传,为 5 种不同致病基因的 5 个突变所致,其中 4 个基因是未曾报道的,此研究中未检出热点突变基因。Xue Gao 等<sup>[52]</sup>对一中国家系进行常染色体非综合征性耳聋分析,采用目标捕获技术捕获 82 个已知耳聋基因,采用二代测序分析及生物信息学分析,确定 TMC1c. 1714G>A 为致病基因,在家系中共分离。Gu X 等<sup>[53]</sup>也报道了对 63 名散发的非综合征耳聋患者进行检测,应用目标序列捕获技术捕获 131 个已知耳聋基因,采用大规模平行序列分析,检出 14 个致病基因,其中 10 个为新发致病突变。二代测序技术降低了测序成本,极大地提高了耳聋致病基因的研究效率,能够获得编码区测序覆盖度更深、准确性更高的数据。但目前仍存在不足:①目标序列捕获技术在目标区域捕获时存在偏倚,尽管增加测序深度可以一定程度弥补偏倚,但是仍有部分区域难以捕获;②大规模平行测序对基因组结构变异的检测具有局限性,通过增加测序深度和改进数据分析算法已显著提高了其检测能力,但其灵敏度和特异度仍然低于点突变的检测;③大多数非编码序列和表观遗传学的修饰尚无法应用该技术检出,可能因此存在一定的假阴性结论;④该技术获得的检测结果仍然需要通过 Sanger 测序等方法进行验证;⑤在大量的检出数据中仍有部分突变未确定是否与耳聋相关,或部分突变的致病性尚存争议,需要更加大量的数据和详尽的分析。

### 3 展望

耳聋是一种严重影响人类生活质量的常见疾病,其对个人、社会的影响之大是不言而喻的。流行

病学研究显示,我国正常人群中至少4%~5%为耳聋相关基因携带者<sup>[54]</sup>。在新生儿中普遍开展耳聋致病基因筛查,做到早期诊断,可指导携带致病基因的儿童行为,预防疾病的发生。对确诊的耳聋患者及早进行语言训练和干预治疗(耳蜗移植、配戴助听器等),也可极大提高患者的生活质量。产前诊断和遗传咨询的开展,也会大大降低先天性耳聋患儿的出生率,从而提高我国人口质量,减轻社会压力。非综合征型遗传性耳聋具有高度的遗传异质性,各突变位点在不同种族、不同地域均有极大差异。在非综合征型遗传性耳聋诊断中,分子诊断作为查找致病原因、协助临床诊断和开展产前诊断的主要手段发挥了重要作用。上述的各种基因检测技术存在各自的优缺点,应根据病人的自身特点,结合以上各种技术的优势,制定个性化的检测方案。下一代测序技术能发现新基因、新突变点,能检测所有耳聋相关基因,具有广泛的应用前景,必将是未来很长一段时间内非综合征型遗传性耳聋基因研究的主要手段,但该技术的临床应用目前仍充满挑战,诸多方面的问题有待解决及完善。

### 参 考 文 献

- [1] Matsunaga T. Value of genetic testing in the otological approach for sensorineural hearing loss[J]. Keio J Med, 2009, 58(4):216-222.
- [2] Tekin D, Yan D, Bademci G, et al. A next-generation sequencing gene panel (MiamiOtoGenes) for comprehensive analysis of deafness genes[J]. Hear Res, 2016,333:179-184.
- [3] Yuan Y, Zhang X, Huang S, et al. Common molecular etiologies are rare in nonsyndromic Tibetan Chinese patients with hearing impairment[J]. PLoS One, 2012,7(2):e30720.
- [4] 孙喜斌,于丽玫,曲成毅,等. 中国听力残疾构成特点及康复对策[J]. 中国听力语言康复科学杂志, 2008(2):21-24.
- [5] Usami S, Nishio SY, Nagano M, et al. Simultaneous screening of multiple mutations by invader assay improves molecular diagnosis of hereditary hearing loss: a multicenter study[J]. PLoS One, 2012,7(2):e31276.
- [6] Reardon W, Pembrey M. The genetics of deafness[J]. Arch Dis Child, 1990, 65(11): 1196-1197.
- [7] Dai ZY, Sun BC, Huang SS, et al. Correlation analysis of phenotype and genotype of GJB2 in patients with non-syndromic hearing loss in China[J]. Gene, 2015,570(2):272-276.
- [8] Chen K, Zong L, Liu M, et al. Developing regional genetic counseling for southern Chinese with nonsyndromic hearing impairment: a unique mutational spectrum[J]. J Transl Med, 2014,12:64.
- [9] Usami S, Abe S, Akita J, et al. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients[J]. J Med Genet, 2000,37(1):38-40.
- [10] Nance WE. The genetics of deafness[J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2003,9(2):109-119.
- [11] Tsukada K, Nishio SY, Hattori M, et al. Ethnic-specific spectrum of GJB2 and SLC26A4 mutations: their origin and a literature review[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2015, 124(5S):61S-76S.
- [12] Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening—a silent revolution[J]. N Engl J Med, 2006,354(20):2151-2164.
- [13] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331.
- [14] Ouyang XM, Yan D, Yuan H J, et al. The genetic bases for non-syndromic hearing loss among Chinese[J]. J Hum Genet, 2009,54(3):131-140.
- [15] Dai P, Yu F, Han B, et al. GJB2 mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment[J]. J Transl Med, 2009,7:26.
- [16] Lu YJ, Yao J, Wei QJ, et al. Diagnostic value of SLC26A4 mutation status in hereditary hearing loss with EVA: a PRISMA-compliant meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2015,94(50):e2248.
- [17] Lu J, Qian Y, Li Z, et al. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A→G mutation[J]. Mitochondrion, 2010,10(1):69-81.
- [18] Yuan Y, You Y, Huang D, et al. Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China[J]. J Transl Med, 2009,7:79.
- [19] Pandya A, Xia X, Radnaabazar J, et al. Mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in two families from Mongolia with matrilineal aminoglycoside ototoxicity[J]. J Med Genet, 1997,34(2):169-172.
- [20] Viviero RJ, Ouyang X, Yan D, et al. Mitochondrial DNA mutation screening in an ethnically diverse nonsyndromic deafness cohort[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2012, 16(9):1146-1148.

- [21] Masasyesva BG, Tong BC, Brock MV, et al. Molecular margin analysis predicts local recurrence after sublobar resection of lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2005,113(6):1022-1025.
- [22] Abravaya K, Carrino J J, Muldoon S, et al. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR)[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995,23(4):675-682.
- [23] Yang XL, Xu ZM. Establishment of the multiplex quantitative ligase chain reaction for detecting mutations of deafness genes[J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2010,27(5):530-534.
- [24] 张迪, 段宏, 林鹏, 等. 新型多基因检测技术在 225 例非综合征型耳聋患者基因检测中的应用[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016,51(3):203-208.
- [25] Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review[J]. *Hum Mutat*, 2001,17(6):439-474.
- [26] Zainal SA, Md DM, Abd RN, et al. Mutation detection in GJB2 gene among Malays with non-syndromic hearing loss [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2012,76(8):1175-1179.
- [27] 戴朴, 韩东一, 冯勃, 等. 大前庭水管综合征的基因诊断和 SLC26A4 基因突变分析[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2006,13(5):303-307.
- [28] Scrimshaw BJ, Faed JM, Tate WP, et al. Rapid identification of an A1555G mutation in human mitochondrial DNA implicated in aminoglycoside-induced ototoxicity [J]. *J Hum Genet*, 1999,44(6):388-390.
- [29] Esteves MC, de Lima IM, Francisco AM, et al. Analysis of the presence of the GJB6 mutations in patients heterozygous for GJB2 mutation in Brazil[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2014,271(4):695-699.
- [30] 郑静, 杨爱芬, 张婷, 等. 多重等位基因 PCR 检测线粒体 12S rRNA 基因突变[J]. *中华检验医学杂志*, 2011,34(7):628-632.
- [31] Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes[J]. *Clin Chem*, 2003,49(3):396-406.
- [32] Chen N, Tranebjaerg L, Rendtorff ND, et al. Mutation analysis of SLC26A4 for Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss by high-resolution melting[J]. *J Mol Diagn*, 2011,13(4):416-426.
- [33] 郑璐, 罗光华, 张俊, 等. 碱基淬灭探针技术单管检测线粒体 DNA 12S rRNA A1555G 及 C1494T 突变[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2012,47(4):326-329.
- [34] Huang Q, Liu Z, Liao Y, et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes[J]. *PLoS One*, 2011,6(4):e19206.
- [35] 高慧, 刘晶晶, 沈姗姗, 等. FMCA 技术分析大前庭水管综合征家系及产前诊断[J]. *中华耳科学杂志*, 2015(03):536-540.
- [36] De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2014,8(9):1081-1088.
- [37] Zeng Y, Jiang D, Feng DF, et al. Application of MALDI-TOF-MS in gene testing for non-syndromic hearing loss[J]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2013,48(12):985-990.
- [38] Choi SY, Kim YE, Ahn DB, et al. Construction of a DNA chip for screening of genetic hearing loss[J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2009,2(1):44-47.
- [39] Gardner P, Oitmaa E, Messner A, et al. Simultaneous multigene mutation detection in patients with sensorineural hearing loss through a novel diagnostic microarray: a new approach for newborn screening follow-up [J]. *Pediatrics*, 2006,118(3):985-994.
- [40] Rodriguez-Paris J, Pique L, Colen T, et al. Genotyping with a 198 mutation arrayed primer extension array for hereditary hearing loss: assessment of its diagnostic value for medical practice[J]. *PLoS One*, 2010,5(7):e11804.
- [41] Abe S, Yamaguchi T, Usami S. Application of deafness diagnostic screening panel based on deafness mutation/gene database using invader assay[J]. *Genet Test*, 2007,11(3):333-340.
- [42] Yin A, Liu C, Zhang Y, et al. Genetic counseling and prenatal diagnosis for hereditary hearing loss in high-risk families [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2014,78(8):1356-1359.
- [43] 满荣军, 张增, 路荣忠, 等. 非综合征型耳聋患儿十六项遗传性耳聋基因突变检测分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015(04):319-324.
- [44] Svidnicki MC, Silva-Costa SM, Ramos PZ, et al. Screening of genetic alterations related to non-syndromic hearing loss using MassARRAY iPLEX (R) technology[J]. *BMC Med Genet*, 2015,16:85.
- [45] Wu CC, Lu YC, Chen PJ, et al. Application of SNaPshot multiplex assays for simultaneous multigene mutation screening in patients with idiopathic sensorineural hearing impairment[J]. *Laryngoscope*, 2009,119(12):2411-2416.
- [46] Bardien S, Human H, Harris T, et al. A rapid method for detection of five known mutations associated with aminoglycoside-induced deafness[J]. *BMC Med Genet*, 2009,10:2.

- [47] Sagong B, Baek JI, Oh SK, et al. A rapid method for simultaneous screening of multi-gene mutations associated with hearing loss in the Korean population[J]. PLoS One, 2013,8(3):e57237.
- [48] Chang MY, Choi BY. Strategy for the customized mass screening of genetic sensorineural hearing loss in Koreans[J]. Korean J Audiol, 2014,18(2):45-49.
- [49] Tekin D, Yan D, Bademci G, et al. A next-generation sequencing gene panel (MiamiOtoGenes) for comprehensive analysis of deafness genes[J]. Hear Res, 2016,333:179-184.
- [50] 卢宇, 张旭, 燕志强, 等. 外显子组测序一个常染色体显性遗传非综合征型聋家系致病基因 ACTG1[J]. 中华耳科学杂志, 2013, 3:340-344.
- [51] Baek JI, Oh SK, Kim DB, et al. Targeted massive parallel sequencing: the effective detection of novel causative mutations associated with hearing loss in small families[J]. Orphanet J Rare Dis, 2012,7:60.
- [52] Gao X, Huang SS, Yuan YY, et al. Targeted gene capture and massively parallel sequencing identify TMC1 as the causative gene in a six-generation Chinese family with autosomal dominant hearing loss[J]. Am J Med Genet A, 2015,167A(10):2357-2365.
- [53] Gu X, Guo L, Ji H, et al. Genetic testing for sporadic hearing loss using targeted massively parallel sequencing identifies 10 novel mutations[J]. Clin Genet, 2015,87(6):588-593.
- [54] Yin A, Liu C, Zhang Y, et al. The carrier rate and mutation spectrum of genes associated with hearing loss in South China hearing female population of childbearing age[J]. BMC Med Genet, 2013,14:57.