

二代测序技术在白化病家系检测中的应用及突变分析

曾玉坤 刘玲 余丽华 丁红珂 张彦*

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511442)

【摘要】 目的 采用二代测序技术对白化病家系进行相关基因突变的检测,了解携带者的突变类型,并依据检测结果提供相应的遗传咨询指导意见。**方法** 采集先证者及其家系成员外周血并提取基因组 DNA,对先证者进行白化病 18 个相关基因编码外显子序列分析,结合生物信息学分析基因突变位点,然后利用 Sanger 测序对可疑致病位点进行验证。**结果** 18 个相关基因编码外显子序列分析结果显示,先证者存在 *OCA2* 基因 c.406C>T(R136*)杂合复合 *OCA2* 基因 c.1922C>T(S641L)杂合突变,父母双方表型正常,父亲基因型为 *OCA2* 基因 c.406C>T(R136*)杂合突变,母亲基因型为 *OCA2* 基因 c.1922C>T(S641L)杂合突变,经生物信息学分析认为上述突变位点为致病性突变的可能性大。**结论** 借助于二代测序技术可以更加快速地检测基因突变位点,为临床指导白化病家庭进行优生优育、预防二胎白化病再发提供科学指导。

【关键词】 白化病;二代测序技术;*OCA2* 基因;遗传咨询

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To detect the pathogenic genes of a family with albinism by next-generation sequencing and provide genetic counseling according to the results. **Method** Collecting proband and family members peripheral blood and extraction of genomic DNA, all exons of the 18 albinism related genes were subjected to deep sequencing. The mutation sites were analyzed by bioinformatics and then verified by Sanger sequencing. **Results** Sequence analysis was carried out on the coding region of related genes. The proband genotype is *OCA2* gene c.406C>T(R136*) heterozygous complex c.1922C>T(S641L) heterozygous. Parents have normal phenotype, the father genotype is *OCA2* gene c.406C>T(R136*) heterozygous, and mother genotype is *OCA2* c.1922C>T(S641L) heterozygous. Bioinformatics analysis suggests that the above mutation is likely to be a pathogenicity mutation. **Conclusions** With the help of the next generation sequencing, we can detect gene mutations more quickly, it also provide scientific guidance for albinism family.

【Key words】 albinism; next-generation sequencing; *OCA2* gene; genetic counseling

白化病是由于酪氨酸酶缺乏或功能减退引起的一种皮肤及附属器官黑色素缺乏或合成障碍所导致的一种常染色体隐性遗传病。主要由于黑色素生物合成或转运相关基因突变所引起,有较强的异质性,国外相关报道发病率为 1/20 000~1/10 000^[1-3]。

目前相关研究明确的人类白化病亚型包括非综合征型的眼皮肤白化病(oculocutaneous albinism, OCA) 1~7 型、眼白化病(ocular albinism, OA)型以及综合征型的 Hermansky-Pudlak 综合征(Hermansky-Pudlak syndrome, HPS) 1~9 型、Chediak-Higashi 综合征等^[4]。由于白化病患者部分亚型临床表型往往存在较多的交叉,因而白化病仅通过临床症状很

难明确其亚型,基因检测成为明确家系白化病分型的唯一可靠方法。本研究拟通过二代测序技术方法对白化病家系进行分子遗传学研究,查明可能的致病原因,为该家庭尽可能预防二胎白化病再发风险提供科学的优生遗传咨询指导。

1 对象与方法

1.1 研究对象 先证者出生时临床表现为头发根部发白,发梢淡黄;3个月时整根头发白中带淡黄色,眉毛白色,睫毛白色,眼球水平震颤。父母否认双方家族存在其他患者,父母本人表型均正常,非近亲婚配,否认孕期存在用药史或不良环境接触史。本研究经广东省妇幼保健院医学伦理委员会批准,所有基因诊断工作均取得患者家属的同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本收集和 DNA 提取 抽取先证者外周血及父母外周静脉血各 2ml,以乙二胺四乙酸二钾抗凝。采用血液基因组 DNA 提取试剂盒(厦门致善生物科技股份有限公司)提取外周血标本基因组 DNA, -20℃ 保存备用。

1.2.2 相关基因编码外显子序列分析 将提取的父母双方及先证者外周血全基因组 DNA 使用 nanodrop2000(Thermo,美国)分光光度仪测得浓度均大于 100ng/μl, A260/A280 比值在 1.8~2.0 之间,送至广州嘉检医学检测有限公司进行 18 个相关致病基因全外显子及相应剪切位点的序列分析,检测基因包含: *AP3B1*、*HPS1*、*HPS3*、*HPS4*、*HPS5*、*HPS6*、*LYST*、*SLC45A2*、*BLOC1S3*、*MC1R*、*TYR*、*OCA2*、*TYRP1*、*SLC24A5*、*PLDN*、*C10orf11*、*GPR143*、*DTNBP1* 等。测序后获得的原始数据通过 BWA 软件进行序列比对,采用 GATK 和 VarScan 软件对突变及变异进行识别,包括对单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)、插入和缺失等进行检测、注释和统计分析。利用 Annovar 软件从外部数据库进行变异位点注释,以评估变异位点的影响。根据数据分析结果,参考 db SNP 数据库和 HGMD 数据库找出可能的致病突变。

1.2.3 Sanger 测序验证 根据相关基因编码外显

子测序结果,用 Sanger 测序对先证者及父母进行突变检测和验证。采用 Primer 5 软件设计引物,PCR 扩增 *OCA2* 基因的 4 号外显子和 18 号外显子及其侧翼序列,引物由天一辉远广州基因科技有限公司合成,引物序列为:*OCA2-EX4F*: GAGGAAAGCT-TGCTTTGTAGC, *OCA2-EX4R*: AGATG-GAGGGCCATGTAG, *OCA2-EX18F*: CGTAG-GTTATGACACGCTGC, *OCA2-EX18R*: ACAG-GCTCTGAAACCTTCCC。按以下条件进行 PCR 扩增:LA Taq 预混液 12.5 μl,甜菜碱 5μl,正、反向引物各 1 μl,模板 DNA 1 μl, ddH₂O 补总体积至 25 μl;PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 分钟,94℃ 30 秒,60℃ 30 秒,72℃ 40 秒,40 个循环,最后 72℃ 10 分钟。PCR 产物送至天一辉远广州基因科技有限公司进行 Sanger 测序。

2 结果

2.1 相关基因编码外显子测序结果

2.1.1 相关基因编码外显子测序数据质量 该白化病基因检测范围包括 18 个相关基因 232 个外显子及侧翼区,共 41421bp,目标捕获区平均覆盖深度为 218+/-95X,大于 20X 覆盖区间占 100%。

2.1.2 相关基因编码外显子检测突变结果 先证者外显子检测范围共检出 33 个变异位点,本研究重点关注非同义突变位点、剪切位点突变、插入和缺失突变位点,排除在 dbSNP144 数据库、1000 Genome Project 数据库、Esp6500 数据库、Hap Map Project 数据库等中存在的突变位点,经过一系列序列变异的生物信息学筛选后,发现先证者 *OCA2* 基因(NM_000275)存在复合杂合突变,基因型为:*OCA2* 基因 c.406C>T(R136*)杂合复合 *OCA2* 基因 c.1922C>T(S641L)杂合。*OCA2* 基因的致病突变与 II 型眼皮肤白化病相关,呈常染色体隐性遗传,主要临床特点是眼皮肤白化病,包括黄色毛发、白色皮肤(在所有种族中)、蓝色/浅褐色/浅棕色虹膜以及视神经传导通路异常引起的眼球震颤、斜视和视敏感性下降等。

2.2 Sanger 测序验证结果 对 PCR 产物进行 Sanger 测序,先证者 *OCA2* 基因(NM_000275)存在复合杂合突变:*OCA2* 基因 c.406C>T(R136*)杂

合复合 *OCA2* 基因 c. 1922C>T(S641L) 杂合。其中 *OCA2* 基因 c. 406C>T(R136*) 突变位点遗传

自父亲, *OCA2* 基因 c. 1922C>T(S641L) 突变位点遗传自母亲, 与二代测序技术结果一致(图 1)。

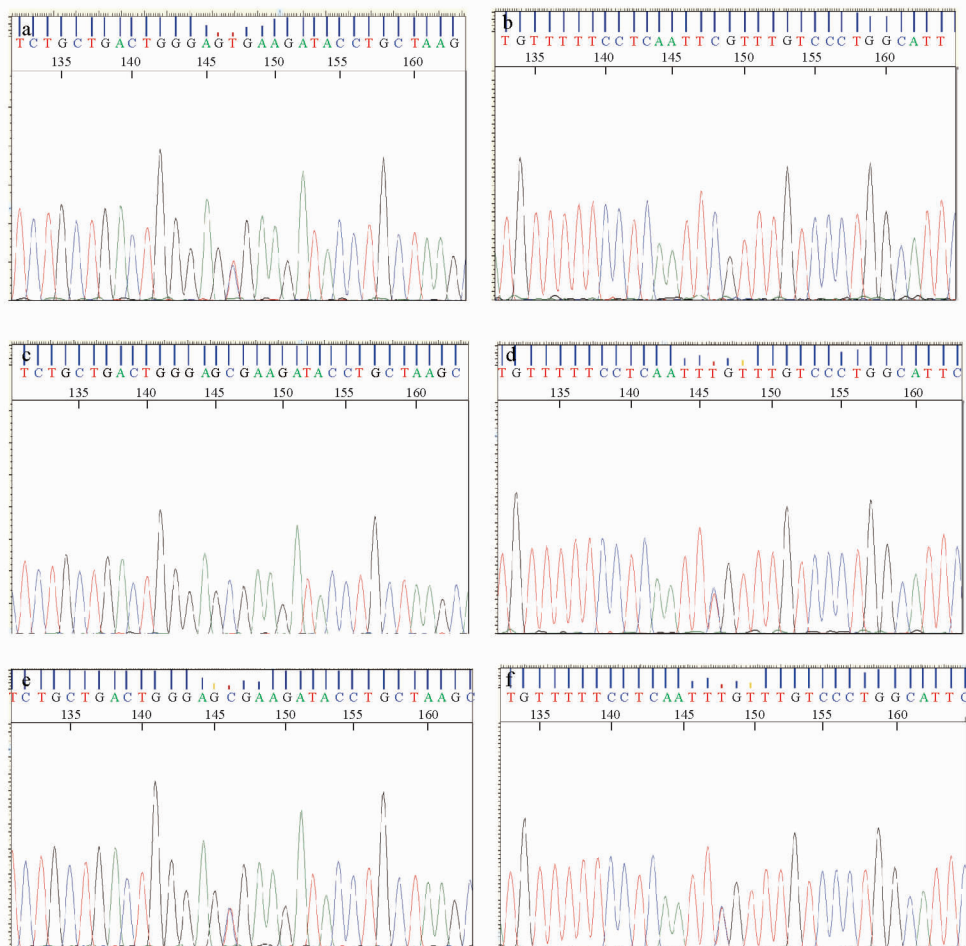


图 1 Sanger 测序验证结果

- a. 先证者父亲 *OCA2* 基因 c. 406C>T 杂合; b. 先证者父亲 *OCA2* 基因 c. 1922 野生型; c. 先证者母亲 *OCA2* 基因 c. 406 野生型; d. 先证者母亲 *OCA2* 基因 c. 1922C>T 杂合; e. 先证者 *OCA2* 基因 c. 406C>T 杂合; f. 先证者 *OCA2* 基因 c. 1922C>T 杂合

2.3 结果分析及遗传咨询 本研究先证者检测到 *OCA2* 基因 4 号外显子和 18 号外显子的两个突变位点, 基因型为: *OCA2* 基因 c. 406C>T 杂合复合 c. 1922C>T 杂合, 分别遗传自父亲和母亲。 *OCA2* 基因 c. 406C>T(R136*) 为无义突变, 它使位于第 136 位的密码子由编码精氨酸(Arg)转变为终止密码子, 可能导致肽链合成提前终止。查询白化病数据库(<http://www.ifpcs.org/albinism/>)未见有上述突变位点报道, NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (rs201791790) 未给出明确临床意义, HGMD 数据库(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>) (CM100997) Wei A 等^[5]报道在 1 例白化病患者中发现携带有该突变位点, MUTATION TASTER

(www.mutationtaster.org/) 生物信息学分析认为可致蛋白结构及功能异常, 可能为致病性突变。 *OCA2* 基因 c. 1922C>T(S641L) 可能导致第 641 位的氨基酸由丝氨酸(Ser)转变为亮氨酸(Leu), 该位点位于高度保守区域(图 2), 经 MUTATION TASTER 生物信息学分析及 PolyPhen-2 软件预测结果显示(图 3), 该氨基酸的改变可致蛋白功能的异常, 可能为致病性突变, 但该二位点均缺乏基因功能学研究。依据生物信息学及相关软件预测分析及结合现有文献报道和本病例家系情况, 初步判断两个突变位点的致病可能性较大, 因而建议若进行二胎生育, 在知情同意和自愿的前提下可行产前诊断, 明确胎儿是否有重复先证者的基因型, 间接为该

家庭提供优生遗传咨询参考。

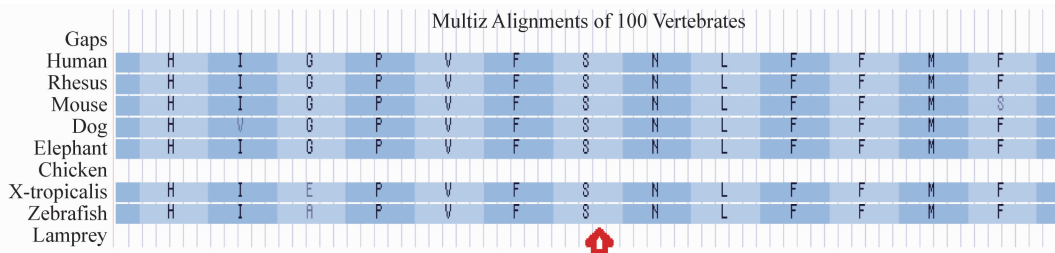


图 2 第 641 位丝氨酸在部分物种的保守性分析

This mutation is predicted to be PROBABLY DAMAGING with a score of 0.999 (sensitivity: 0.14; specificity: 0.99)

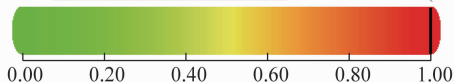


图 3 PolyPhen-2 软件预测分析结果

3 讨论

白化病患者由于外表的异常,内心的自卑感使其长期处于孤立、封闭的环境,进而影响工作、学习及社交活动。且目前白化病尚无有效的治疗手段,临床诊断因部分白化病表型存在交叉、重叠,也无法做出分型,因此明确致病基因、指导产前诊断是目前预防此类患儿出生唯一有效途径。然而白化病相关基因及编码区众多,传统的测序方法效率低下,应用于临床诊断费时费力,难以常规开展,二代测序技术因其检测覆盖范围广、高效,随着生物信息学分析能力的提高以及测序成本的下降,这一技术为白化病等具有高度遗传异质性的单基因病的快速检测提供了可能。

本研究中,我们使用二代测序技术的方法对一个白化病家系进行与白化病相关基因的全编码区序列分析,最终在 OCA2 基因上发现了 2 个疑似致病突变位点,分别为 c. 406C>T 与 c. 1922C>T, c. 406C>T 相关文献报道在白化病患者中发现有该突变位点,但 c. 1922C>T 未见相关文献报道。先证者父母分别是上述两种致病突变的杂合携带者,先证者同时获得了父母所携带的 OCA2 基因的相关突变。OCA2 基因 c. 406C>T(R136*) 为无义突变,它使位于第 136 位的氨基酸由 Arg(精氨酸)转变为终止密码子。OCA2 基因 c. 1922C>T(S641L)它可导致第 641 位的氨基酸由 Ser(丝氨酸)转变为 Leu(亮氨酸)。虽然上述突变位点目前研究并未肯定其致病意义,但依据生物信息学及相

关软件预测分析及结合现有文献报道和本病例家系情况,可以初步判断这 2 个突变位点的致病可能性较大。另外,现有的相关数据库资料均建立在外国人群基础上,由于遗传背景差异,中国人群白化病有自己独特的致病基因突变谱,因而借助于二代测序技术平台,有望发现新的致病基因,以进一步完善中国人群白化病基因突变谱,为临床服务白化病家庭预防再生育风险提供有力的科学依据。

参考文献

[1] Grønskov K, Ek J, Brøndum-Nielsen K. Oculocutaneous albinism[J]. Orphanet J Rare Dis,2007,2: 43.

[2] Zühlke C, Crieé C, Gemoll T, et al. Polymorphisms in the genes for oculocutaneous albinism type 1 and type 4 in the German population[J]. Pigment Cell Res,2007,20(3) : 225-227.

[3] Rooryck C, Morice-Picard F, Elcioglu NH, et al. Molecular diagnosis of oculocutaneous albinism: new mutations in the OCA1-4 genes and practical aspects [J]. Pigment Cell Melanoma Res,2008,21(5) : 583-587.

[4] Montoliu L, Grønskov K, Wei AH, et al. Increasing the complexity: new genes and new types of albinism [J]. Pigment Cell Melanoma Res,2014,27(1):11-18.

[5] Wei A, Wang Y, Long Y, et al. A comprehensive analysis reveals mutational spectra and common alleles in Chinese patients with oculocutaneous albinism[J]. J Invest Dermatol, 2010, 130 (3) :716-724.

(收稿日期:2018-08-10)

编辑:刘邓浩