

DNA 微阵列芯片法检测遗传性耳聋基因*

韩光宇¹, 徐 湛¹, 李全双¹, 沈红艳¹, 张 巍², 梁 军³(1. 徐州市医学科学研究所, 江苏徐州 221006; 2. 徐州市急救医疗中心, 江苏徐州 221009;
3. 徐州市中心医院, 徐州市糖尿病研究所, 江苏徐州 221000)

摘要:目的 应用基因芯片技术对临床散发性耳聋患者进行基因检测, 评价在临床检测中的应用价值。方法 抽取患者静脉血, EDTA 抗凝, 在万级洁净间内进行 DNA 提取和 PCR 扩增杂交, 对中国人常见的 4 个耳聋基因的 9 个突变位点进行检测。结果 24 例患者中, 共检出突变 7 例, 阳性率为 29.17%, 检出 GJB2 基因突变 4 例(16.67%), 其中 176 del 16 位点杂合突变型 1 例, 235 del C 位点纯合突变型 1 例, 299 del AT 位点杂合突变型 2 例。1 例(4.17%) SLC26A4 基因 IVS7-2A>G 位点杂合突变型; 2 例(8.33%) 线粒体 12SrRNA 基因 1555A>G 位点均质突变型, 未检出 GJB3 基因突变。结论 遗传性耳聋基因芯片技术可快速、高通量检出耳聋相关突变位点, 满足临床耳聋基因检测需求。

关键词:耳聋; 基因芯片; 基因突变; 携带者

中图分类号: R764.43; Q754 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)04-047-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.04.012

Detection of Hereditary Hearing Loss Gene by DNA Microarray

HAN Guang-yu¹, XU Zhan¹, LI Quan-shuang¹, SHEN Hong-yan¹, ZHANG Wei², LIANG Jun³

(1. Xuzhou Institute of Medical Sciences, Jiangsu Xuzhou 221006, China;

2. Xuzhou Emergency Medical Center, Jiangsu Xuzhou 221009, China;

3. Xuzhou Central Hospital, Xuzhou Institute of Diabetes, Jiangsu Xuzhou 221000, China)

Abstract: Objective To screen genes in patients with clinically sporadic deafness using DNA microarray and evaluate the application value in the clinical detection. **Methods** Patient's venous blood was drawn up and EDTA for anticoagulation was added in. DNA extraction and PCR amplification were carried out in a myriad class clean room. Four deaf genes and 9 mutation sites commonly seen in Chinese people were tested. **Results** Among 24 patients, 7 patients have mutations, with a positive rate of 29.17%, including 4 patients with GJB2 gene mutation (16.67%) of which 1 with 176 del 16 site heterozygous mutation; 1 with 235 del C site homozygous mutation; 2 with 299 del AT site heterozygous mutation; 1 with SLC26A4 gene IVS7-2A>G site heterozygous mutation (4.17%), 2 with mitochondrion 12SrRNA gene 1555A>G site homogeneous mutation (8.33%). No GJB3 gene mutation was detected. **Conclusion** Hereditary hearing loss-related mutation sites can be fast, high throughput screening by DNA microarray which meets the demands of deaf gene detection.

Keywords: deafness; DNA microarray; gene mutation; carrier

耳聋是人类最常见的感觉神经系统缺陷, 严重影响沟通、交流和生活质量。耳聋约有 60% 由遗传因素造成, 它可以由单一基因突变或不同基因的复合突变引起, 常表现为常染色体遗传, 伴 X 染色体遗传及线粒体遗传等方式^[1]。国内耳聋分子流行病学调查显示, 我国常见的致聋基因是 GJB2, SLC26A4, 线粒体 DNA 12s rRNA 及 GJB3 等少数几个基因的数个突变位点^[2]。本研究采用微阵列芯片法对徐州市中心医院耳鼻喉科散发的 24 例患者进行基因位点测定, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2015 年 9 月~2016 年 3 月, 徐州市中心医院耳鼻喉科就诊的散发性耳聋患者 24

例, 其中男性 16 例, 女性 8 例, 年龄 2 个月~35 岁, 平均年龄 17.2 ± 9.9 岁, 经知情同意并填写耳聋基因检测申请单, 运用 DNA 微阵列芯片法(基因芯片技术)对遗传性耳聋基因进行检测。

1.2 试剂和仪器 晶芯九项遗传性耳聋基因检测试剂盒、BioMixer II 杂交仪、SlideWasher 8 芯片洗干仪、LuxScan-10K/B 扫描仪均购自北京博奥生物公司。PCR 基因扩增仪(DL9700 Touch)由北京东林昌盛生物公司生产, microfuge 20 高速离心机由 Beckman Coulter 生产。该基因芯片可检测中国人常见的 4 个耳聋基因中的 9 个热点突变, 这 9 个位点为: GJB2 (35delG, 176del16, 235delC, 299delAT), SLC26A4 (2168A>G, IVS7-2A>

* 基金项目: 徐州市社会发展项目 KC15SH090。

作者简介: 韩光宇(1975-), 男, 本科, 副主任技师、副研究员, 主要从事临床检验和肿瘤生物治疗的实验研究工作, Tel: 0516-85796056, E-mail: mrxzhgy@163.com。

通讯作者: 梁 军, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: mwlj521@163.com。

G), 线粒体 DNA 12S rRNA 的(1494C>T, 1555A>G)及 GJB3 基因的 538C>T 位点。基因提取过程在万级洁净间的生物安全柜(BIOBASE)内操作, 避免交叉污染。

1.3 方法

1.3.1 样本采集及 DNA 提取: 采集患者静脉血 2 ml, EDTA 抗凝, 吸取 600 μ l 全血, 加入等量细胞裂解液, 12 000 r/min 离心去上清, 再加入 900 μ l 裂解液, 离心去上清, 加入 300 μ l 缓冲液和蛋白酶的混合液, 混匀 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 离心取上清与 300 μ l 异丙醇颠倒混匀至看到絮状 DNA。离心弃上清, 加入 300 μ l 70 g/dl 乙醇, 混匀、离心去上清, 空气干燥 DNA 沉淀, 加入 60 μ l 洗脱缓冲液, 65 $^{\circ}$ C 水浴 30~60 min 使 DNA 完全溶解, 要求浓度 100~200 ng/ μ l, 纯度 $A_{260nm}/A_{280nm}=1.7\sim 2.0$ 。如不能立即检测, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 PCR 扩增: 按照试剂盒说明书配制反应体系, 反应体系包含扩增引物混合物 12.5 μ l, 扩增试剂混合物 4.5 μ l 及基因组核酸提取物 3 μ l 共 20 μ l。按照 PCR 扩增程序: 37 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 min, 96 $^{\circ}$ C 1 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 45 s 共 32 个循环进行 DNA 扩增, 60 $^{\circ}$ C 10 min 后完成扩增。在扩增过程中, 设置参数使温度以 0.4 $^{\circ}$ C/s 的速度从 94 $^{\circ}$ C 降至 55 $^{\circ}$ C, 并以 0.2 $^{\circ}$ C/s 的速度从 55 $^{\circ}$ C 升至 70 $^{\circ}$ C, 总反应时间约为 3 h 20 min。

1.3.3 杂交: 将 PCR 产物在 PCR 仪中 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后, 冰水混合物冰浴 3 min。从两个扩增体系中各吸取 2.5 μ l 组成 PCR 产物, 加入 10 μ l 杂交缓冲液, 充分混匀吸取 14 μ l 混合液从芯片加样孔垂直加入到芯片的微阵列区域, 密封放入预热 60 $^{\circ}$ C 杂交仪中, 转速 5 r/min 杂交 60 min。

1.3.4 芯片洗涤: 杂交芯片在芯片洗干仪中按照洗涤液 1, 42 $^{\circ}$ C 2 min, 洗涤液 2, 42 $^{\circ}$ C 1 min \times 2 次洗涤。1 000 r/min 离心 2 min 甩干。

1.3.5 芯片扫描: 将洗干的芯片放入 LuxScan 10K-B 微阵列芯片扫描仪卡槽中, 进行芯片扫描。

1.3.6 结果判读及解释: 遗传性耳聋基因检测芯片判读系统自动判读扫描结果, 位点检测探针 W 阳性, 判读该位点为野生型(两条等位基因上该位点均未发生突变), 探针 M 阳性, 该位点为纯合突变型(该位点两条等位基因均发生突变); 若探针 W 和 M 均阳性, 则为杂合突变型(该位点有一条等位基因发生突变)。对于线粒体 12S rRNA 基因突变位点, 若 M 阳性为均质突变型, 表示线粒体 12S rRNA 基因上该位点均发生突变; M 和 W 两者同为阳性, 则为异质突变, 该位点部分发生了突

变。

1.3.7 质量控制: 每张基因芯片均自带质控探针, 包括表面化学质控探针(QC), 杂交阳性质控探针(PC), 空白对照探针(BC)和阴性对照探针(NC)。

2 结果 24 例患者样本中共检出 7 例遗传性耳聋基因突变携带者, 阳性检出率为 29.17%, 其中 GJB2 基因突变 4 例(16.67%), 包括 176 del 16 杂合突变型 1 例, 235 del C 纯合突变型 1 例, 299 del AT 杂合突变型 2 例。SLC26A4 基因 IVS7-2 A>G 检出杂合突变型 1 例(4.17%), 线粒体 12SrRNA 基因 1555 A>G 位点检出均质突变型 2 例(8.33%)。

3 讨论 耳聋在新生儿中的发病率约为 1~3%, 且以每年>3 万的新生聋儿递增。听力语音障碍导致的残疾约占全国残疾总人口的 30%, 居各类残疾之首, 是严重威胁人类健康的常见病^[3]。耳聋约有 60% 由遗传因素所致, 常表现为非综合征型(NSHI)听觉丧失, 其遗传方式主要为常染色体显性、隐性、性连锁和线粒体母系遗传。目前, NSHI 定位的基因座已超过 170 多个, 涉及 90 个基因 1 000 多个突变位点^[4]。中国耳聋人群主要涉及 GJB2, SLC26A4, 线粒体 DNA 12s rRNA 及 GJB3 等 4 个基因的 9 个突变位点。

GJB2 高频突变与 NSHI 密切相关, 约 50% 患者由此基因突变所致^[5], 因此被称为耳聋易感基因。本研究中, 7 例耳聋基因携带者中 GJB2 基因突变 4 例, 阳性构成比 57.14%, 与文献接近。GJB2 突变可表现为常染色体隐性和显性遗传, 大部分为隐性遗传, 导致许多散在患病个体并无家族史。正常人群中 GJB2 的突变携带率为 2.55%, 即使非亲属关系之间婚配, 子代也会出现耳聋的可能性。因此有必要对年轻夫妇进行耳聋基因筛查, 可更好地指导婚配生育, 减少耳聋患儿出生。GJB2 基因突变的耳聋患者耳蜗听神经正常, 助听效果良好, 移植电子耳蜗可很好改善此类患者的听力^[6]。

SLC26A4 基因与前庭水管综合征(EVAS)和 Pendred 综合征(PDS)密切相关, 因此又称为 PDS 基因, 是仅次于 GJB2 突变引起的常染色体隐性遗传耳聋的病因^[7]。前庭导水管是联系颅腔和内耳的通道, SLC26A4 基因突变可导致前庭导水管异常扩大, 颅内压的变化可引起 EVAS 患者听力下降。因此, 对于携带 SLC26A4 基因突变的患者, 应避免剧烈运动、头部碰撞、注意防止感冒等外界因素导致的病情加重^[8,9]。本研究检出 1 例 IVS7-2 A>G 杂合突变型患儿, 提醒患儿家长应做好必要的防护。

线粒体 12S rRNA 基因具有严格的母系遗传

特征,女性可将突变基因传给儿子和女儿,但只有女儿能传给下一代。该基因的主要突变位点是1555A>G,携带者对氨基糖苷类抗生素异常敏感,常导致一针致聋。平均每发现一个携带者可为10个以上的未发病的母系成员提供预警和用药指导^[3,8,9]。本研究检出2例线粒体12S rRNA 1555 A>G均质突变型,提示患者及其母系亲属终生禁止使用氨基糖苷类抗生素,可防止该类耳聋发生。

GJB3基因是夏家辉院士发现的首个中国本土耳聋相关基因^[10],是后天高频感音神经性耳聋患者的常见突变基因之一,其主要表现为语后进行性高频听力感音神经性耳聋。GJB3基因的突变率较之其他常见的遗传性耳聋致病基因低^[11],本研究24个样本中未检出该基因位点突变,与此结论一致,GJB3基因与遗传性耳聋的发生是否有其他基因的突变作用参与,尚需进一步的研究。

基因芯片技术是随着基因组计划发展起来的生物技术,其基本原理是核酸杂交。是以人基因组DNA为模板,采用带有Tag标签序列的基因位点特异性引物对相关基因位点所在基因片段进行扩增和荧光标记,与能够识别相应标签序列的通用基因芯片杂交,通过对芯片进行扫描和数据分析得到基因表达或突变的信息。

微阵列芯片法针对中国人常见遗传性耳聋的4个基因的9个突变位点的野生型和突变型设计引物和探针,可同时检测出9个位点的野生型和突变型结果。每张芯片可同时检测4个样本,每次可检测多张芯片,具有快速、高准确性、高通量、平行高效等优点,可满足临床耳聋基因检测需求。但是由于人类基因组的复杂性和耳聋基因遗传的高度异质性,基因芯片技术只能检测已知突变,不能发现未知突变。目前仅能对GJB2,SLC26A4,线粒体12S rRNA及GJB3等少数几个基因的突变位点进行检测,对于其他携带率低的非热点突变或未知的突变谱尚不能检测,造成数据的失实或漏诊,因此对检测结果为野生型者,应谨慎解释检验结果^[12]。

参考文献:

- [1] 闻小慧,戚红,杨镨,等. 孕妇人群中常见耳聋基因突变检出率的分析[J]. 中国医科大学学报,2015,44(2):152-155.
Wen XH, Qi H, Yang K, et al. Analysis of the rate of common genetic mutations of deaf in pregnant women [J]. Journal of China Medical University, 2015, 44(2):152-155.
- [2] 张艳,卞颖华,许鹏飞,等. 应用耳聋基因芯片技术检测非综合征型耳聋基因突变[J]. 生物技术通讯,2010,21(1):22-26.
Zhang Y, Bian YH, Xu PF, et al. Study on the gene mutations of non-syndromic deafness using DNA microarray [J]. Letters in Biotechnology, 2010, 21(1):22-26.
- [3] 李朔,赵炜,张凯,等. 孕期遗传性耳聋基因突变携带者筛查以降低耳聋患儿出生缺陷的可行性研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2015,23(4):94-95,117.
Li S, Zhao W, Zhang K, et al. Feasibility study of the deafness genes mutation carriers screening of pregnant women to decrease the born of deaf children [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2015, 23(4):94-95,117.
- [4] 高慧,王沙燕. 非综合征型遗传性耳聋基因及分子诊断研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2015,23(2):125-127.
Gao H, Wang SY. Advances of study in gene and molecular diagnosis of non-syndromic hearing impairment [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2015, 23(2):125-127.
- [5] Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review [J]. Genet Med, 2002, 4(4):258-274.
- [6] 胡煜,孙敬武,孙家强,等. 非综合征型聋患者常见耳聋基因突变分析[J]. 中华耳科学杂志,2013,11(1):121-125.
Hu Y, Sun JW, Sun JQ, et al. Common deafness genes mutations in non-syndromic deafness patients [J]. Chinese Journal of Otology, 2013, 11(1):121-125.
- [7] Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? [J]. Mutation Research, 2009, 681(2/3):189-196.
- [8] 马琳,安会波,刘征燕,等. 我国常见耳聋基因及其在临床预防和阻断耳聋中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2015,23(1):126-127,111.
Ma L, An HB, Liu ZY, et al. Common deafness genes in China and its application in clinical prevention and treatment of deafness [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2015, 23(1):126-127,111.
- [9] 付华钰,许涓涓,李娇,等. 四个家系的耳聋基因检测及产前诊断分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2015,23(8):18-20.
Fu HY, Xu JJ, Li J, et al. Deafness gene testing and prenatal diagnosis analysis of four families [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2015, 23(8):18-20.
- [10] He YY, He XJ, Guo PF, et al. The decidual stromal cells-secreted CCL2 induces and maintains decidual leukocytes into Th2 bias in human early pregnancy [J]. Clinical Immunology, 2012, 145(2):161-173.

- [11] 陈鑫苹,符 征,符生苗,等.海南地区非综合征遗传性耳聋四个常见基因突变的分析[J].现代检验医学杂志,2014,29(5):34-37.
Chen XP, Fu Z, Fu SM, et al. Study the mutation screening of GJB3, GJB2, mtDNA, SLC26A4 gene in Hainan population with non-syndromic hearing impairment[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5):34-37.
- [12] 江凌晓,凌月仙,蔡桂君,等.遗传性耳聋基因芯片检测的临床应用研究[J].分子诊断与治疗杂志,2011,3(3):170-172.
Jiang LX, Ling YX, Cai GJ, et al. Research on the clinical application of DNA microarray on deafness gene mutations[J]. Journal of Molecular Diagnosis and Therapy, 2011, 3(3):170-172.
收稿日期:2016-04-28 修回日期:2016-05-25
- (上接 46 页)
- [5] Shelver WL, Smith DJ, Berry ES. Production and characterization of a monoclonal antibody against the beta-a drenergic agonist ractopamine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(9):4020-4026.
- [6] Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, et al. Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries[J]. EMBO J, 1993, 12(2):725-734.
- [7] Mcelhiney J, Lawton LA, Porter AJR. Detection and quantification of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) with recombinant antibody fragments isolated from a native human phage display library [J]. FEMS Microbiology Letter, 2000, 193(1):83-88.
- [8] Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, et al. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents [J]. EMBO J, 1994, 13(3):692-694.
- [9] Tomlinson IM, Walter G, Marker JD, et al. The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops[J]. J Mol Biol, 1992, 227(3):776-798.
- [10] Sun Y, Li WJ, Ma JS, et al. Soluble expression, purification and characterization of single-chain Fv catalytic antibody (sFv-2F3) [J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2004, 20(3):317-322.
- [11] Tordsson JM, Ohlsson LG, Abrahmsen LB, et al. Phage-selected primate antibodies fused to superantigens for immunotherapy of malignant melanoma [J]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 48(12):691-702.
- [12] Walewski JL, Gutierrez JA, Branch-Elliman W, et al. Mutation master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core: alternate reading frame, and NS2 coding regions [J]. RNA, 2002, 8(5):557-571.
- [13] 乔媛媛,王 琰,陈晓穗,等.大容量噬菌体抗体库的构建及鉴定[J].中华微生物学与免疫学杂志,2004,24(3):194-197.
Qiao YY, Wang Y, Chen XS, et al. Construction of a large singlechain phage antibody library[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2004, 24(3):194-197.
- [14] 张建琼,谢 维,张雪萍,等.人源抗丙型肝炎病毒噬菌体抗体库的构建、筛选及表达[J].上海免疫学杂志,2000,20(5):304-307.
Zhang JQ, Xie W, Zhang XP, et al. Construction, screening and expression of hepatitis C virus specific phage antibody combinatorial library [J]. Shanghai Journal of Immunology, 2000, 20(5):304-307.
- [15] 傅 蓉,刘 刚,戴红梅,等.利用 HER2/neu 胞外配体结合区 2 从噬菌体抗体库中筛选抗体及其初步鉴定[J].生物技术通讯,2006,17(4):574-576.
Fu R, Liu G, Dai HM, et al. Screening and identifying of anti-RLDS antibodies from phage antibody libraries [J]. Letters in Biotechnology, 2006, 17(4):574-576.
- [16] 葛晓冬,刘友生,王晓东,等.人源噬菌体抗体库的构建及抗人 NH-LBP 抗体的筛选与鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2005,21(2):180-184.
Ge XD, Liu YS, Wang XD, et al. Construction of human phage antibody library and screening and characterization of phage antibodies against N terminal fragment of human lipopolysaccharide binding protein [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2005, 21(2):180-184.
- [17] Meulemans EV, Slobbe R, Wastervall P, et al. Selection of phage-displayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody [J]. J Mol Biol, 1994, 244(4):353-360.
- [18] 马巍娜,刘雪林,宋宏彬,等.抗甲硝唑人源 scFv 抗体筛选与鉴定[J].现代检验医学杂志,2010,25(4):7-10.
Ma WN, Liu XL, Song HB, et al. Screening and characterization of human phage antibody to metronidazole [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(4):7-10.
- [19] 马巍娜,刘雪林,宋宏彬,等.三聚氰胺人源 scFv 抗体筛选与鉴定[J].现代检验医学杂志,2012,27(3):10-13.
Ma WN, Liu XL, Song HB, et al. Screening and characterization of human phage antibody to melamine [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(3):10-13.
收稿日期:2016-01-10 修回日期:2016-03-28