

定位于 1p36.12~1p35.1 的良性家族性婴儿惊厥家系

8 个候选基因的排除克隆 *

宋延民¹ 龙莉莉² 杨茜² 李海燕² 唐北沙²

(1 湖南省老年医院神经内科 湖南 长沙 410016 2 中南大学湘雅医院神经内科 湖南 长沙410008)

摘要 目的:克隆定位于 1p36.12~1p35.1 上微卫星标志 D1S2864 和 D1S2830 之间 12.4cM 的区间内的腓骨肌萎缩症 2L 型的致病基因。方法 应用生物信息学方法筛选 8 个候选基因(NHE1、SMN、STX12、OX1R、BDR2、DHH18、FLJ10315 和 SESN2),设计合成扩增 8 个基因外显子及外显子与内含子交界的引物, DNA 直接测序法进行序列变异分析。结果 未发现与 BFIS 共分离的致病突变,但发现 3 个已知的多态。结论 排除了 8 个候选基因为该 BFIS 致病基因的可能。

关键词 良性家族性婴儿惊厥;候选基因;突变分析;基因克隆

中图分类号:Q75 Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)07-1233-03

Cloning to Exclude 8 Candidate Genes Located in Chromosome 1p36.12~1p35.1 for BFIS*

SONG Yan-min¹, LONG Li-li², YANG Qian², LI Hai-yan², Tang Bei-sha²

(1 Department of Neurology, Hunan Province Geriatric Hospital; Changsha, 410016, China;

2 Department of Neurology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410008, China)

ABSTRACT Objective: To clone the disease-causing genes which was possibly existed in 12.4 cM distance between microsatellite markers D1S2864 and D1S2830 in chromosome 1p36.12~1p35.1 for benign familial infantile seizure (BFIS). **Methods:** 8 positional and functional candidate genes (NHE1, SMN, STX12, OX1R, BDR2, DHH18, FLJ10315 and SESN2) were chosen among all known genes in this locus region by bioinformatics inquiry. Mutation detection was performed by sequencing the exons and intron-exon junctions of the candidate genes. **Results:** There was no disease causative mutation, while 3 polymorphisms was identified. **Conclusion:** The candidate genes were excluded from disease gene for the BFIS family.

Key words: Benign familial infantile seizure(BFIS); Candidate gene; Mutation analysis; Gene cloning

Chinese Library Classification: Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)07-1233-03

前言

良性家族性婴儿惊厥 (benign familial infantile seizures, BFIS) 由 Vigeveno 等 1992 年首次报道的特发性癫痫综合征,呈常染色体显性遗传,外显率为 70%-90%^[1]。患者出生后 3~12 个月出现首次无热性癫痫发作,大部分为复杂部分性发作,可继发全身性发作,2~5 岁发作自然消失,智能和体格发育正常。目前已定位了三个 BFIS 基因位点,分别为 19q12-13.1、16p12-q12 和 2q24^[2-4],然而致病基因尚未找到。2008 年本课题组运用全基因组扫描技术、连锁分析和单体型分析的方法将一个来自中国湖南 BFIS 大家系定位于 1p36.12~1p35.1 上微卫星标志 D1S2864 和 D1S2830 之间 12.4cM 的区间内,这是国际上新定位的一个 BFIS 位点^[5]。为了进一步克隆该 BFIS 位点的致病基因,本研究运用功能候选基因克隆策略,筛选该区间内 8 个候选基因进行排除克隆。

1 对象与方法

1.1 研究对象

中国湖南省遗传了四代的 BFIS 家系,该家系共 33 个成员,患者 8 例,遗传方式符合常染色体显性遗传。诊断依据国际抗癫痫联盟(International league against epilepsy, ILAE)所提出的标准^[6]。

1.2 候选基因选择

在 UCSC 数据库中查询位于 1p36.12~1p35.1 上微卫星标志 D1S2864 与 D1S2830 之间的基因信息,结果显示在该区域内共有已知基因 315 个。通过分析人类特发性癫痫和自发突变小鼠癫痫模型中已克隆致病基因的生物学信息^[7-9],并结合候选区域内各个基因的表达、生物学特性来制定选择标准,如下:①位于该候选区域内;②在脑内有一定表达;③符合以下类型:①编码离子通道、离子泵、转运体的基因;②编码神经递质受体的基因;③与神经突触发生相关的基因;④与髓鞘生成相关的基因;⑤与神经元胞内兴奋性和囊泡转运相关的基因;⑥脑内特异性表达的基因等。选择的候选基因分别为 NHE1、SMN、

* 基金资助 国家自然科学基金青年项目(30400261)

作者简介 宋延民(1980-) 男,主治医师,主要从事神经遗传及变性疾病的研究

E-mail songyanmin8888@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-09-15 接受日期 2011-10-11)

STX12、OX1R、BDR2、DHHC18、FLJ10315 和 SESN2。

1.3 引物设计合成、PCR

抽取先证者外周静脉血 5ml，按常规酚 / 氯仿法提取 gDNA。应用 primer3 在线软件进行引物设计，由上海生工公司合成(引物序列略)。使用热启动 PCR，采用两相循环。引物均采用如下程序进行扩增：首先 95℃ 预变性 15min，第一相循环时，94℃ 变性 30s，退火温度 60℃ 30s，72℃ 延伸 1min，共 10 个循环。第二相循环 94℃ 变性 30s，56℃ 退火 30s，72℃ 延伸 1min，共 25 个循环，最后 72℃ 延伸 15min。聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，对扩增特异性好的 PCR 产物用虾碱性磷酸酶和核酸外切酶处理。

1.4 测序

酶切后的 PCR 产物经 ABI 3100 基因测序仪正反向测序。用 DNASTAR 软件中的 EditSeq 程序编辑候选基因各外显子扩增产物的正常参照序列，用 SeqMan 程序将测序结果与正常参照序列进行比对分析。如发现序列变异，先在突变数据库进行查询 (dbSNP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) 排除已知的多态，再进行家系内另两名患者、家系内两名正常人的检测，观察序列变异与疾病表型有无共分离。

2 结果

通过直接测序的方法，在 gDNA 水平分析了 5 个基因的序列变异情况，在 NHE1 基因 12 号外显子编码区和 3'UTR 区分别发现了 c.2205A>G 和 c.*2A>G，在 OX1R 基因 1 号外显子编码区发现了 c.111C>T。(详见图 1、2、3)。经生物信息学查询均为已报道的 SNPs。其他基因未见任何序列异常。

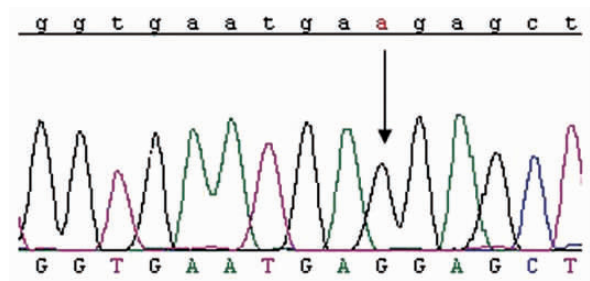


图 1 NHE1 基因 c.2205A>G
Fig. 1 NHE1 gene c.2205A>G

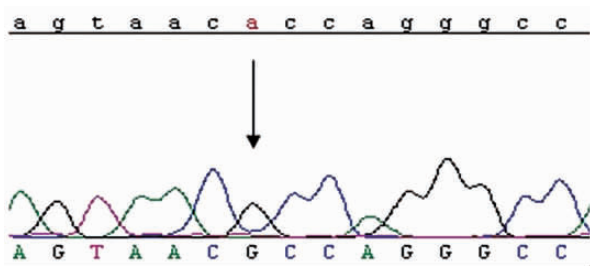


图 2 NHE1 基因 c.*2A>G
Fig. 2 NHE1 gene c.*2A>G

3 讨论

癫痫的发生主要是由于大脑神经元过度放电所致的短暂

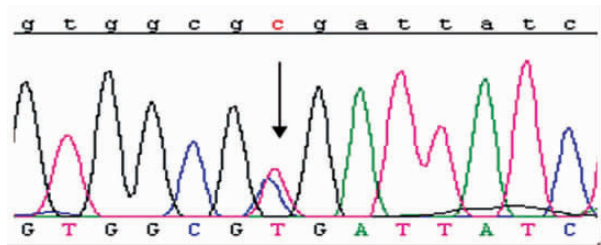


图 3 OX1R 基因 c.111C>T
Fig.3 OX1R gene c.111C>T

的中枢神经功能异常，是由生理、生化诸多因素综合产生的。BFIS 作为一种罕见的常染色体显性遗传的癫痫综合症，具有明显的遗传临床异质性和基因异质性。目前比较公认的其致病基因位点为 19q12-13.1、16p12-q12 和 2q24，至今尚无致病基因被克隆。国外至今已报道约 70 个 BFIS 家系，近年来国内也陆续有 BFIS 的家系定位研究，王家勤课题组发现有一 BFIS 家系可能与 20q13.3 连锁^[10]。周军卫^[11]、周熙惠^[12]、肖波^[13]的 BFIS 家系研究显示均与国外已发现的 3 个致病基因位点无连锁关系。周熙惠 BFIS 家系的致病基因已确定为 KCNQ2，而该基因是良性家族性新生儿惊厥的致病基因之一^[14]。本课题组将该 BFIS 家系定位于 1p36.12-1p35.1 上，这是国际上新定位的一个 BFIS 位点^[5]，但至今尚无发现与该基因位点连锁的 BFIS 报道。以上均表明 BFIS 具有明显的遗传异质性。

已知的特发性癫痫致病基因主要与离子通道和神经递质受体功能的改变、细胞信号传导异常、神经元的发育及突触的形成障碍等有关，具有以上分子生物学功能、与神经元兴奋性有关并在脑内有特异性表达的基因都可作为特发性癫痫的候选基因。故本研究通过对 1p36.12~1p35.1 区间内已知基因的生物信息学查询，选择了 NHE1、SMN、STX12、OX1R、BDR2、DHHC18、FLJ10315 和 SESN2 作为候选基因。

通过对上述 8 个候选基因的突变检测，发现 NHE1 基因 12 号外显子编码区 c.2205A>G，在 NHE1 基因 3'UTR 区发现了 c.*2A>G，在 OX1R 基因 1 号外显子编码区发现了 c.111C>G，均已证实为正常人群的 SNPs。其他基因未发现任何序列变异。总之，没有发现与本 BFIS 家系共分离的序列改变，从而排除了这 8 个候选基因为该 BFIS 家系致病基因的可能。克隆 BFIS 致病基因，对探讨原发性癫痫的分子发病机制具有重要意义。我们将继续对该区间内的其他候选基因进行突变检测，或者收集更多的 BFIS 家系进行连锁分析，以期进一步缩小该候选区间，为克隆该致病基因奠定基础。

参考文献(References)

[1] Commission on classification and terminology of the international league against epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes [J]. Epilepsia, 1989, 30 (4): 389-399
[2] Guipponi M, Rivier F, Vigeveno F, et al. Linkage mapping of benign familial infantile seizures (BFIC) to chromosome 19q[J]. Hum Molec Genet, 1997, 6(3): 473-477
[3] Caraballo R, Pavak S, Lemainque A, et al. Linkage of benign familial infantile seizures to chromosome 16p12-q12 suggests allelism to the infantile seizures and choreoathetosis syndrome[J]. Am J Hum Genet

- [J], 2001, 68(3): 788-794
- [4] Malacarne M, Gennaro E, Madia F, et al. Benign familial infantile seizures mapping of a novel locus on chromosome 2q24 and evidence for genetic heterogeneity [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(6): 1521-1526
- [5] Li HY, Li N, Jiang H, et al. A novel genetic locus for benign familial infantile seizures maps to chromosome 1p36.12-p35.1 [J]. *Clin Genet*, 2008, 74: 490-492
- [6] Engel J Jr. International League Against Epilepsy. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology[J]. *Epilepsia*, 2001, 42(6): 796-803
- [7] Sander T, Schulz H, Saar K, et al. Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(10): 1465-1472
- [8] Letts VA. Genes Underlying Monogenic and Multigenic Epilepsies in Mice[J]. *Current Genomics*, 2001, 2(1): 71-83
- [9] McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy [J]. *Nature*, 1999, 399(6738 Suppl): A15-22
- [10] 王家勤, 李红梅, 尹景岗, 等. 良性家族性婴儿惊厥一家系基因定位及钾离子通道基因测序研究[J]. *中华儿科杂志*, 2002, 40 (9) : 513-517
- Wang Jia-qin, Li Hong-mei, Yin Jing-gang, et al. Linkage mapping of benign familial infantile convulsions (BFIC) and sequencing analysis of KCNQ2 gene in a BFIC family [J]. *Chinese Journal of Pediatrics*, 2002, 40 (9) : 513-517(In Chinese)
- [11] 周军卫, 李晓文, 黄希顺, 等. 良性家族性婴儿惊厥和阵发性运动障碍综合征基因位点异质性: 5 个家系的研究(英文) [J]. *中国临床康复*, 2005, 9 (7) : 238-240
- Zhou Jun-wei, Li Xiao-wen, Huang Xi-shun, et al. Gene mapping and locus heterogeneity of benign familial infantile convulsion and paroxysmal dyskinesia-study on five Chinese pedigrees[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2005, 9 (7) : 238-240(In Chinese)
- [12] 周熙惠, 马爱群, 刘小红, 等. 良性家族性婴儿惊厥一家系遗传连锁分析和基因定位研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(2): 89-92
- Zhou Xi-Hui, Ma Ai-Qun, Liu Xiao-Hong, et al. Linkage analysis and gene mapping of one Chinese family with benign familial infantile convulsions [J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2010, 12 (2): 89-92(In Chinese)
- [13] Xiao B, Deng FY, Xiong G, et al. Clinical and genetic study on a new Chinese family with benign familial infantile seizures[J]. *Eur J Neurol*, 2005, 12(5): 344-349
- [14] Zhou X, Ma A, Liu X, et al. Infantile seizures and other epileptic phenotypes in a Chinese family with a missense mutation of KCNQ2[J]. *Eur J Pediatr*, 2006, 165 (10): 691-695

(上接第 1224 页)

- [7] Kabata T, Kubo T, Matsumoto T. Onset of steroid-induced osteonecrosis in rabbits and its relationship to hyperlipaemia and increased free fatty acids[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2005, 44(10): 1233-1239
- [8] Iwakiri K, Oda Y, Kaneshiro Y. Effect of simvastatin on steroid-induced osteonecrosis evidenced by the serum lipid level and hepatic cytochrome p4503a in a rabbit model [J]. *OrthopSci*, 13(5): 463-468
- [9] Kuribayashi M, Fujioka M, Takahashi KA. Vitamin e prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits [J]. *Acta Orthop*, 81 (1): 154-160
- [10] Takao M, Sugano N, Nishii T. Different magnetic resonance imaging features in two types of nontraumatic rabbit osteonecrosis models[J]. *Magn Reson Imaging*, 27(2): 233-239
- [11] Irida T, Yamamoto T, Miyaniishi K, Yamashita A, Iwamoto Y, Sugioka Y, Sueishi K (2001) Osteonecrosis induced by a single administration of low-dose lipopolysaccharide in rabbits [J]. *Bone*, 2001, 28(6): 641-649
- [12] Tsuji T, Sugano N, Sakai T, Yoshikawa H (2003). Evaluation of femoral perfusion in a non-traumatic rabbit osteonecrosis model with t2*-weighted dynamic mri[J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(2): 341-351
- [13] Sakaia T, Sugano N, Tsuji T, Nishii T, Yoshikawa H, Ohzono K (2000). Serial magnetic resonance imaging in a non-traumatic rabbit osteonecrosis model: an experimental longitudinal study [J]. *Magn Reson Imaging*, 2000, 18(7): 897-905
- [14] Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, Sugioka Y, (1995). Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with shwartzman reaction [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1995, (316): 235-243
- [15] Qin L, Zhang G, Sheng H. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone[J]. *Bone*, 39(4): 863-871. doi: S8756-3282(06) 00419-4.8