

卵黄样黄斑营养不良一家系的 *BEST-1* 基因突变分析

魏英华¹, 林 英²

作者单位:¹(121000)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院附属第三医院眼科;²(510060)中国广东省广州市,中山大学中山眼科中心

作者简介:魏英华,女,主治医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:魏英华. weiyinghua81@163.com

收稿日期:2013-11-28 修回日期:2014-05-12

Analysis of *BEST-1* gene mutations with vitelliform macular dystrophy in one Chinese family

Ying-Hua Wei¹, Ying Lin²

¹Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; ²Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Ying-Hua Wei. Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. weiyinghua81@163.com

Received:2013-11-28 Accepted:2014-05-12

Abstract

• **AIM:** To identify intragenic mutation loci of the *BEST-1* gene with congenital vitelliform macular dystrophy by molecular genetic analysis at one family in Northeast China.

• **METHODS:** Genomic DNA was extracted from peripheral leukocyte of 2 patients and 5 healthy members in the family with vitelliform macular dystrophy and 100 normal controls. Ten exon sequences of *BEST-1* amplified by polymerase chain reaction (PCR) were made direct DNA sequencing to define the gene mutation loci and compared with gene screening performed on 100 normal controls.

• **RESULTS:** After the direct DNA sequencing, no mutation loci was found in all the patients of this family with vitelliform macular dystrophy.

• **CONCLUSION:** There is no mutation in the exons of *BEST-1* gene causing disease genes in this family.

• **KEYWORDS:** *BEST-1* gene; congenital vitelliform macular dystrophy; mutation; Best disease

Citation: Wei YH, Lin Y. Analysis of *BEST-1* gene mutations with vitelliform macular dystrophy in one Chinese family. *Guoji*

Yanke Zazhi(Int Eye Sci) 2014;14(6):1154-1156

摘要

目的:通过分子遗传学分析,确定中国东北地区一个先天性卵黄样黄斑营养不良家系在 *BEST-1* 基因的突变位点。

方法:采集一先天性卵黄样黄斑营养不良家系 2 例患者及 5 例健康成员和 100 个正常对照者的外周静脉血,提取基因组 DNA。应用聚合酶链反应(PCR)扩增 *BEST-1* 基因的 10 个编码外显子,直接测序确定致病的基因突变,并与 100 名正常对照者的基因筛查结果进行比较。

结果:直接测序后发现该先天性卵黄样黄斑营养不良家系 *BEST-1* 基因的外显子中,未发现任何突变。

结论:*BEST-1* 基因的外显子不存在在该先天性卵黄样黄斑营养不良家系的致病突变。

关键词:*BEST-1* 基因;先天性卵黄样黄斑营养不良;突变;Best 病

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.06.50

引用:魏英华,林英.卵黄样黄斑营养不良一家系的 *BEST-1* 基因突变分析.国际眼科杂志 2014;14(6):1154-1156

0 引言

先天性卵黄样黄斑营养不良(Best vitelliform macular dystrophy, BVMD)又称为 Best 病,是一种临床少见的常染色体显性遗传性黄斑部疾病,同时也有一些散发病例^[1]。典型临床表现为幼年期双眼黄斑区卵黄样病变,缓慢进展晚期形成瘢痕,继发形成脉络膜新生血管,导致视力严重损害^[2,3]。眼电生理检查,视网膜电图(electroretinogram, ERG)正常而眼电图(electrooculogram, EOG)异常,在所有阶段均表现为 Arden 比(即光峰/暗谷比值)下降,低于 1.55^[4]。近年来的研究表明, *BEST-1* 基因是先天性卵黄样黄斑营养不良(BVMD)的致病基因,定位于 11q13,约 980kb,包含 11 个外显子^[5,6]。本研究选择 *BEST-1* 基因的外显子作为候选基因,对一个卵黄样黄斑营养不良家系进行 *BEST-1* 基因突变筛查,现报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象 来自在辽宁医学院附属第三医院就诊的一个具有显性遗传性特点的先天性卵黄样黄斑营养不良家系,两代共 7 人,其中患者 2 例。在征得此家系所有成员及健康对照者知情同意后,对所有患者及家属和 100 名健康成员进行全面的体格检查,排除其他疾病,行眼部检

表1 BEST1 引物序列及 PCR 产物的长度

外显子编号	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	产物长度(bp)	退火温度(°C)
1	CCCTACAAACCCCAATCG	CCAGCCACATCCTTCCCAG	271	59
2	AGTCTCAGCCATCTCCTCGC	TGGCCTGTCTGGAGCCTG	212	61
3	GGGACAGTCTCAGCCATCTC	CAGCTCCTCGTGATCCTCC	238	58
4	AGAAAGCTGGAGGAGCCG	GCGGCAGCCCTGTCTGTAC	408	59
5	ATCCCTTCTGCAGTTCTCC	AAACCTTGTTCCTGGACC	150	59
6	GGGCAGGTGGTGTTCAGA	CCTTGGTCCTTCTAGCCTCAG	181	59
7	CATCTGATTTCAGGGTTC	CTCTGGCCATGCCTCCAG	257	60
8	AGCTGAGGTTTAAAGGGGA	TCTCTTTGGGTCCACTTTGG	215	61
9	ACATACAAGGTCTGCCTGG	GCATTAAGTACTGCTATTCTAAGTTCC	298	59
10A	GGTGTGGTCCTTTGTCCAC	CTCTGGCATATCCGTCAGGT	591	60
10B	CTTCAAGTCTGCCCACTGT	TAGGCTCAGAGCAAGGGAAG	457	58
11	CATTTTGGTATTTGAAATGAAG	CCATTTGATTCAGGCTGTTG	216	59

查并详细记录。2例患者双眼底均呈现典型病变:黄斑部对称性的卵黄样病灶,约1/2~1/3个视盘直径(Papilladiameter,PD)大小。EOG显示Ardon比值降低。对照组100名健康者没有黄斑部病变,EOG检查正常。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取 抽取该家系成员及100名正常者外周血8~10mL,在辽宁医学院附属第三医院中心实验室以高盐沉淀法提取血液中的DNA。紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测样本DNA的浓度和纯度,并于-20°C保存备用。

1.2.2 BEST-1基因的突变筛查 根据BEST-1基因的序列设计11对引物(表1)^[7],应用聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)分别扩增BEST-1基因的外显子序列,以及外显子两端的部分内含子序列,其中外显子10由两对引物扩增。PCR反应的总体系为:Taq Premix 25μL,引物(每个10nmol/L)2μL/个;模板DNA(50ng)2μL;去离子水补足至50μL。引物序列以及扩增片段的长度见表1。PCR反应过程为:95°C预变性10min;然后30个循环,每个循环为94°C变性30s~1min,50°C~60°C退火30s~1min,72°C延伸40s~1min;循环后72°C延伸5~10min。把PCR扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上,恒压100V电泳40min。在紫外透射仪下观察到目的基因片段扩增成功,如扩增出目的基因片段的量很好,无杂带和引物二聚体出现,则继续下面的实验步骤,且避光在冰上操作。产物纯化后,测序在华大基因实验室进行,测序仪的型号为CEQ8800。将测得的DNA序列与BEST-1基因序列比较,根据波形判断是否发生基因突变。并在对照组中进行同一位点筛查。

2 结果

2.1 家系特点 系谱调查发现,该家系患者在两代中均连续出现,而且患者双亲有一位发病,其子女中有1/2的人患病,男女患病的几率相等,这符合常染色体显性遗传的特点。家系中患者共2例,男1例,女1例(图1),进行全面的眼科检查,均是双眼发病,且双眼底均呈现黄斑部卵黄样病变(图2),患者都有不同程度的白内障,但是晶状体混浊的程度不一,形态也各异;每个患者不同眼别之间的混浊程度也有不同。

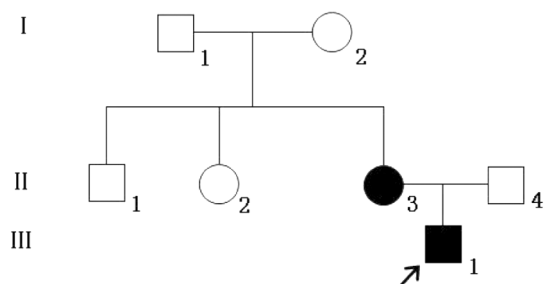


图1 先天性卵黄样黄斑营养不良家系。

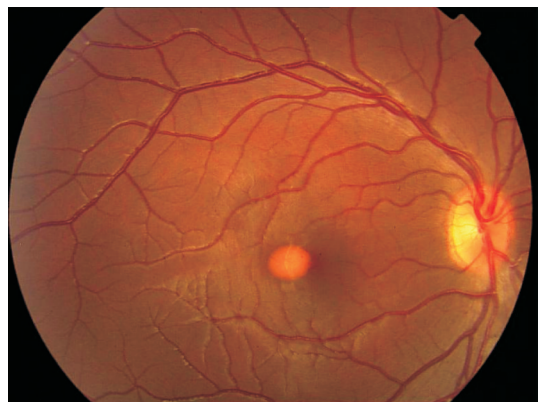


图2 先天卵黄样黄斑营养不良家系先证者眼底照片。

2.2 试验结果 将该家系中所有患者的基因测序结果与网上基因组数据库对比,发现BEST-1基因的外显子以及临近的内含子的剪接位点序列都同Genebank提供的序列相同,从而表明该先天性卵黄样黄斑营养不良家系并非是由BEST-1基因的外显子突变引起。

3 讨论

BVMD与突变的抗肌萎缩蛋白1基因(BEST-1)相关,BEST-1基因位于常染色体11q13,它编码一个由585个氨基酸构成的跨通道转运蛋白,并在青少年和成年人的视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium,RPE)细胞膜上均有特异性表达^[8-10]。据推测BEST-1基因变异可能引起通道功能障碍,从而导致RPE细胞膜上液体及离子的转运异常、眼球发育缺陷以及后发性视网膜营养不良^[11]。迄今为止,在家族性或是散发的BVMD患者中

BEST-1 基因变异超过 100 种^[12], 根据 Krämer 等^[13] 报道, 在 BVMD 家族患者中 *BEST-1* 基因变异的检出率为 96%, 在散发的患者检出率为 69%。而关于 *BEST-1* 基因变异位点, 多集中在 4 个特定的热点区域: 即外显子序列的 2, 4, 6 和 8^[14,15]。

目前国内外报道在几乎所有 BVMD 家族患者中均发现 *BEST-1* 基因变异, 且变异集中在外显子。本研究选择 *BEST-1* 基因的全部外显子作为候选基因进行突变筛查, 却未发现基因突变。因此考虑该家系的基因突变可能发生在其他基因, 或者该基因的内含子, 有待通过进一步的全基因组筛查确定该家系的致病基因。

参考文献

- 1 Boon CJF, Klevering BJ, Leroy BP, *et al*. The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene. *Prog Retin Eye Res* 2009; 28(3):187-205
- 2 Souied E, Kaplan J, Coscas G, *et al*. Macular dystrophies. *J Fr Ophthalmol* 2003; 26(7):743-762
- 3 Booi JC, Boon CJ, van Schooneveld MJ, *et al*. Course of visual decline in relation to the Best 1 genotype in vitelliform macular dystrophy. *Ophthalmology* 2010; 117(7):1415-1422
- 4 Blodi CF, Stone EM. Best's vitelliform dystrophy. *Ophthalmic Paediatr Genet* 1990; 11(1):49-59
- 5 Davidson AE, Millar ID, Burgess - Mullan R, *et al*. Functional characterization of bestrophin - 1 missense mutations associated with autosomal recessive bestrophinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(6):3730-3736
- 6 Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, *et al*. Identification of the gene

- responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet* 1998; 19(3):241-247
- 7 Sodi A, Menchini F, Manitto MP, *et al*. Ocular phenotypes associated with biallelic mutations in BEST1 in Italian patients. *Mol Vis* 2011; 17:3078-3087
- 8 Sun H, Tsunenari T, Yau KW, *et al*. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(6):4008-4013
- 9 MacDonald IM, Gudiseva HV, Villanueva A, *et al*. Phenotype and genotype of patients with autosomal recessive bestrophinopathy. *Ophthalmic Genet* 2012; 33(3):123-129
- 10 Marmorstein AD, Cross HE, Peachey NS. Functional roles of bestrophins in ocular epithelia. *Prog Retin Eye Res* 2009; 28(3):206-226
- 11 Hartzell HC, Qu Z, Yu K, *et al*. Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to Best disease and other retinopathies. *Physiol Rev* 2008; 88(2):639-672
- 12 Doumanov JA, Zeitz C, Dominguez Gimenez P, *et al*. Disease-causing mutations in BEST1 gene are associated with altered sorting of Bestrophin-1 protein. *Int J Mol Sci* 2013; 14(7):15121-15140
- 13 Krämer F, White K, Pauleikhoff D, *et al*. Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet* 2000; 8(4):286-292
- 14 Schatz P, Klar J, Andrasson S, *et al*. Variant phenotype of Best vitelliform macular dystrophy associated with compound heterozygous mutations in VMD2. *Ophthalmic Genet* 2006; 27(2):51-56
- 15 Kramer F, Mohr N, Kellner U, *et al*. Ten novel mutations in VMD2 associated with Best macular dystrophy (BMD). *Hum Mutat* 2003; 22(5):418