

一个中国汉族家系共同性外斜视 KIF21A 基因的突变分析

王 慧, 李永蓉, 纪风涛

基金项目:安徽省科技攻关项目(No. 15011d04057)

作者单位:(230011)中国安徽省合肥市第二人民医院广德路院区眼科

作者简介:王慧, 硕士, 主治医师, 研究方向:白内障的临床和基础研究。

通讯作者:王慧. wanghuilx@163.com

收稿日期:2017-05-03 修回日期:2017-08-31

Screening of KIF21A gene mutation in a Han family with concomitant exotropia

Hui Wang, Yong-Rong Li, Feng-Tao Ji

Foundation item: Anhui Province Science and Technology Project (No. 15011d04057)

Department of Ophthalmology, Guangde Road Hospital, the Second People's Hospital of Hefei, Anhui Province, China

Correspondence to: Hui Wang. Department of Ophthalmology, Guangde Road Hospital, the Second People's Hospital of Hefei, Anhui Province, China. wanghuilx@163.com

Received:2017-05-03 Accepted:2017-08-31

Abstract

• AIM: To study the KIF21A gene mutation in a Han family with concomitant exotropia.

• METHODS: The genomic DNA of five family members was extracted from peripheral blood leukocytes and amplified with PCR. The PCR products were purified for DNA sequencing. DNA sequences were aligned with the human KIF21A gene sequences registered in GenBank.

• RESULTS: Mutation analysis of all exons of the pedigree's KIF21A gene reveals no gene mutation in any of the families.

• CONCLUSION: Our study demonstrates that the KIF21A gene maybe is not virulence gene in this pedigree.

• KEYWORDS: concomitant exotropia; KIF21A gene; gene mutation

Citation: Wang H, Li YR, Ji FT. Screening of KIF21A gene mutation in a Han family with concomitant exotropia. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(10):1973-1975

摘要

目的:研究一个汉族家系共同性外斜视 KIF21A 基因的外显子突变情况及其意义。

方法:收集就诊于合肥市第二人民医院眼科一共同性外斜视患者家系,提取家系中 5 位成员的外周血 DNA,通过 PCR 扩增,Sanger 测序与 NCBI 中的 KIF21A 基因序列进

行同源性比较。

结果:在我们收集的家系中没有检测到任何外显子基因突变,发现 4 个外显子附近的内含子突变,即 c. 735+85A>C、c. 2664-49T>C、c. 3985+45A>T、c. *472A>G。

结论:KIF21A 基因可能不是我们收集的共同性外斜视家系的致病基因。

关键词:共同外斜视;ARIX 基因;基因突变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.10.46

引用:王慧,李永蓉,纪风涛. 一个中国汉族家系共同性外斜视 KIF21A 基因的突变分析. *国际眼科杂志* 2017;17(10):1973-1975

0 引言

斜视是指由于各种原因所致眼外肌作用不平衡,斜视的发病率高达 1%~4%,因常常伴发弱视而成为损害儿童及青少年视功能的主要原因。斜视具有明显的家庭聚集性,据外文文献报道具有外斜视阳性家族史者占 16.6%^[1]。越来越多的研究表明共同性外斜视的发生有一定的遗传因素,且属于多基因遗传,并发现一些敏感的染色体位点,如 4q28.3、7q31.2、11q24.2、12q24.32、19q13.11、6q26 等,但仍未找到明确的基因定位^[2-4]。近年,一些特殊类型斜视病因研究取得突破性进展,如:CFEOM、Duane 综合征等基因突变位点确定,KIF21A 基因参与了 CFEOM I、III 型的发病^[5-6]。KIF21A 基因 c. 2680C>T (p. Arg 954Trp) 突变导致了汉族家系中的先天性广泛眼外肌纤维化^[7],这个突变同样导致了先天性动眼神经麻痹^[8]。本研究对一个中国汉族共同性外斜视遗传家系进行 KIF21A 基因外显子突变筛查,以探讨该家系中是否存在 KIF21A 基因改变以及这些改变的意义。

1 对象和方法

1.1 对象 研究家系来自就诊于合肥市第二人民医院眼科共同性外斜视患者,询问家系成员病史,并绘制家系图谱(图 1)。征得患者的同意,我们采集 5 位家系成员的外周血,分别命名为 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 外周血液 DNA 的提取采用 OMEGA 试剂盒(E. Z. N. A.® Blood DNA Mini Kit),按照说明书提取 DNA 后测量基因组 DNA 的浓度和 OD 值(Nanodrop 2000, Thermo)。提取的 DNA 取 2μL 进行电泳检测。基因组 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均为 1.72~2.01 之间,浓度为 40~75ng/μL。1%琼脂糖凝胶电泳检测显示条带单一,基因组 DNA 于-20℃保存。

1.2.2 引物设计及 PCR 扩增 设计 26 对引物扩增 KIF21A 基因的所有外显子,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,PCR 扩增引物见表 1。PCR 扩增反应体系为 20μL,包括 1μL 模板 DNA(10~60ng/μL),10μL

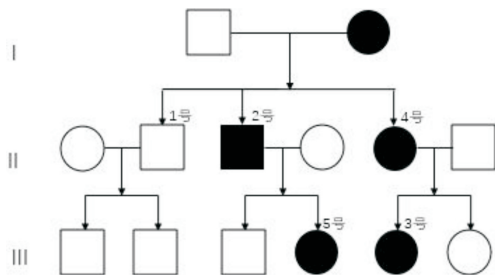


图1 患者家系图谱 ■男性患者;□男性正常;●女性患者;○女性正常。

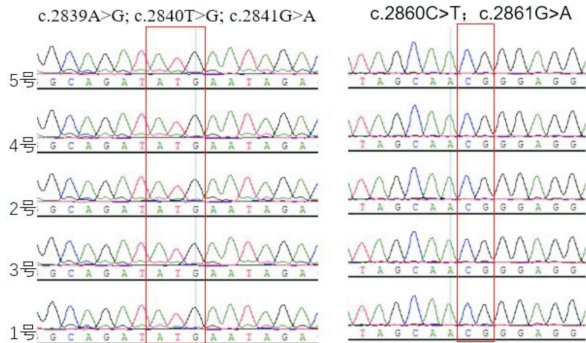


图2 c.2860C>T; c.2861G>A; c.2841G>A; c.2840T>G; c.2839A>G 突变情况。

Takara 2×PCR Premix (RR003A), 1μL 引物 (2.5pmol/μL), 9μL ddH₂O。使用 ABI 公司的 9700 PCR 仪进行 PCR 反应。反应程序为:95℃ 5min→(94℃ 30s→65℃ 30s→72℃ 60s)×10 个循环→(94℃ 30s→60℃ 30s→72℃ 60s)×10 个循环→(94℃ 30s→55℃ 30s→72℃ 60s)×10 个循环→(94℃ 30s→52℃ 30s→72℃ 60)×9 个循环→72℃ 5min→终止反应。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定条带均单一。扩增产物按照 PCR 产物回收试剂盒 (OMEGA D2500-01) 说明书的操作步骤进行回收纯化。

1.2.3 测序 PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳检测有目的条带后,送到奥美德诺(北京)基因科技有限公司进行切胶纯化双向测序。测序 PCR 的条件为:预变性 96℃ 30s、95℃ 变性 30s、退火温度 50℃ 30s、60℃ 延伸 4min, 25 个循环后,最后 60℃ 延伸 5min,16℃ 结束反应,纯化后上 3730xl (BigDye Version3.1, Applied Biosystems) 遗传分析仪器进行测序。

2 结果

与 GenBank 中公布的人野生型 KIF21A 基因序列比较,我们筛查的家系中在热点突变区域 NM_001173464.1 (KIF21A): c.2861G>A (p.Arg954Gln); c.2860C>T (p.Arg954Trp); c.2841G>A (p.Met947Ile); c.2840T>G (p.Met947Arg); c.2839A>G (p.Met947Val) 没有出现突变,见图2;在对比分析的时候发现少数几个突变位点,位于检测外显子附件的内含子区域,不引起氨基酸的任何改变,如 c.735+85A>C、c.2664-49T>C、c.3985+45A>T、c.*472A>G(图3)。

3 讨论

KIF21A 基因在基因组中全长 150、187bp,包含 38 个外显子,可编码 1674 个氨基酸。从结构上分,可分为 N 端的运动结构域、中央为一卷曲螺旋的蒂和 C 端的 WD-40 重复区域,N 端能与微管的管道相互作用,C 端能与运输的物质相互作用。按照功能上划分,KIF21A 编码的微管

表1 KIF21A 基因外显子扩增引物表

引物名称	外显子	引物序列(5'-3')	扩增长度(bp)
KA-1F	exon1	CCAGAAGAGCCTGGAAGG	800
KA-1R		CACTGCCTCAGTTTCCTCAG	
KA-2&3F	exon2&3	TGGCCAAGAGTTTTAACT	698
KA-2&3R		AAGCCAACAGTATAAAATCAT	
KA-4F	exon4	AATAATAGCCTCATTTCATTTT	422
KA-4R		ATGTCATGCTTCAGGATAT	
KA-5&6F	exon5&6	CTTAACATGGTGGGTTTTAG	1026
KA-5&6R		TTCATTTCTTGGTTCAGTATC	
KA-7F	exon7	CAAAACCAACACAAATAT	362
KA-7R		AGTTCCTCATCCTATTAGTT	
KA-8F	exon8	CAATATTTTGGTATCTTGAAG	513
KA-8R		CAAAACAGTTGTTAAGTTAGAC	
KA-9&10F	exon9&10	GAAAACGCTCTTGGTTAGAG	837
KA-9&10R		ACCAAAGGCTGAAAATATC	
KA-11F	exon11	GATTTGCTTAGTGCTACAG	486
KA-11R		GAGATAAACCATTAATAAACTAG	
KA-12&13F	exon12&13	TGATGGCTTCTAAAAATCTG	838
KA-12&13R		GAAGGCAAATGTAGGTCAGT	
KA-14&15F	exon14&15	CCTAGTTGATGGTTTTTATG	1131
KA-14&15R		GGGTTACCTTATCGAATAT	
KA-16F	exon16	GCATGTTCCATGTAAAGT	336
KA-16R		GTCCCTAACCTGCAATTAGT	
KA-17&20F	exon17&20	TTCTGCTAAGAACTCATACT	1295
KA-17&20R		TAGATTAGACCAGGAAATAG	
KA-21F	exon21	TGAGTTCATCTGATGCACCT	916
KA-21R		CTTCATGTAAAAACTGAAAGTGCT	
KA-22&23F	exon22&23	TGGGATGACTCGAGGCTCTAT	917
KA-22&23R		TCATGCAAAAACCACCTTGAC	
KA-24&25F	exon24&25	ATGTTGAGCTGTTGTTTATT	687
KA-24&25R		GCCCTCTTGCTAATCTATTA	
KA-26F	exon26	CACACCTAGGAAAAGACAC	463
KA-26R		TATTTGCAAAAACCAGAGATC	
KA-27F	exon27	CTTTCTGAGGTTCCAGTTAT	314
KA-27R		GCCTAAATCTGGAAAATAAT	
KA-28F	exon28	AAGGAAAAGAAGAGTCTCT	376
KA-28R		AATATGGCAACAGGTCACAC	
KA-29&30F	exon29&30	ATGCTGTTGATTTTGAGTC	957
KA-29&30R		GCAAATTGTACAACAGACT	
KA-31F	exon31	AGAGACTCTGGATTTTATT	399
KA-31R		GGGTTGAACCAGATTATC	
KA-32F	exon32	ATTTCTTCCCATAGAAGAG	412
KA-32R		TGGGAAGCTGGACAGGTAT	
KA-33F	exon33	AAGCAGACTGTCTTGTGTTG	377
KA-33R		TCTGGGGTCATAAAAATTG	
KA-34F	exon34	GATCCCATCTCTAAACATAT	383
KA-34R		AAAGAAAAAGCAAAGACTAG	
KA-35F	exon35	ACAAACCAGAAACAATAGAT	427
KA-35R		AGGCCTGATTAATATTATCT	
KA-36F	exon36	GCCAATCCAATATCAAGT	479
KA-36R		GTGCCACATGTACATCAG	
KA-37F	exon37	TACTTGGATTTCTTGAAGAC	1517
KA-37R		CCAGATAACCAAAAATATGT	

依赖驱动蛋白,是依赖于微管的物质运输的分子发送机,利用 ATP 水解释放的能量沿着微管运动,分别负责神经元的正向及逆向轴突运输^[9]。截止目前为止,已经在 KIF21A 基因中发现 13 个突变与 CFEM I 和 CFEM 3B 致病性相关^[10-12],包括 1 个缺失突变和 12 个错义突变。

本研究中,在 KIF21A 基因中没有检测到任何外显子

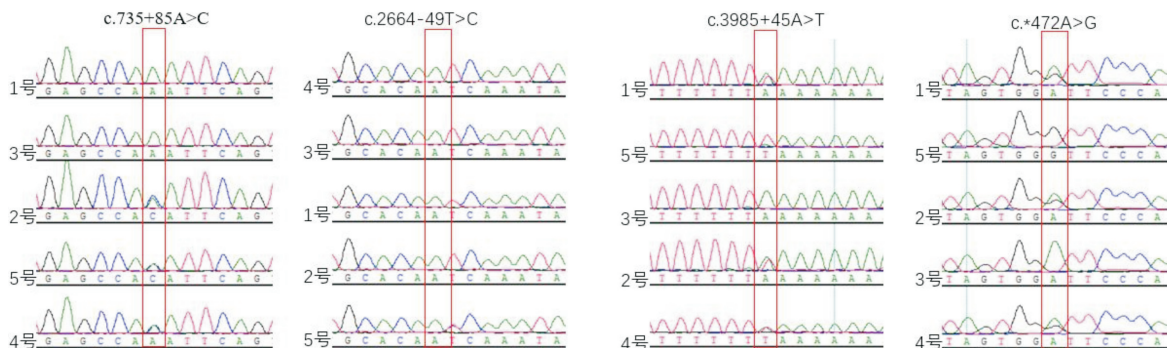


图3 c.735+85A>C、c.2664-49T>C、c.3985+45A>T、c.*472A>G 突变情况。

基因突变,仅仅发现4个外显子附近的内含子突变,即c.735+85A>C、c.2664-49T>C、c.3985+45A>T、c.*472A>G,表明KIF21A基因可能不是我们收集的共同性外斜视家系的致病基因,在Yamada等^[13]的研究结果中,通过分析对45个无亲缘关系的CFEOM I先证者进行研究,44例(98%)存在KIF21A基因的6种不同突变,改变了4个氨基酸序列。其中32例(73%)携带c.2860C>T(R954W)突变和6例(13%)携带c.2861G>A(R954Q)突变。这两个突变位点分别发生在CpG双核苷酸的C位和G位。同时也与陆秀兰等^[8]的研究结果有出入,他们通过对家系KIF21A基因全部外显子进行的突变检测分析显示21号外显子存在c.2680C>T(p.Arg954Trp)的碱基改变,从而得出KIF21A基因c.2680C>T(p.Arg954Trp)突变是导致该先天性动眼神经麻痹的致病因素。吴燕鸿等^[14]在KIF21A基因突变筛查中发现患者在第21外显子携带c.2861G>A(R954Q)杂合性突变,正常成员没有,进一步认为KIF21A基因中的R954W突变是导致该家系患者眼外肌纤维化致病的遗传基础。出现这种情况的原因可能与我们选择的家系致病因子不同有关,共同外斜视是多个因素遗传导致的。我们将进一步扩大筛查基因的范围,争取找到该家系的致病基因。为进一步阐述该家系的分子发病机制及进行家系产前诊断提供理论依据。

参考文献

- Ziakas NG, Woodruff G, Smith LK, et al. A study of heredity as a risk factor in strabismus. *Eye* 2002;16(5):519-521
- Mansoor B, Majid F, Mostafa S, et al. A study of consanguineous marriage as a risk factor for developing comitant strabismus. *Community Genetics* 2015;6(2):177-180
- Fujiwara H, Matsuo T, Sato M, et al. Genome-wide search for strabismus susceptibility loci. *Acta Med Okayama* 2003;57(3):109-116

- Parikh V, Shugart YY, Doheny KF, et al. A strabismus susceptibility locus on chromosome 7p. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(21):12283-12288
- Koki Y, Chan WM, Caroline A, et al. Identification of KIF21A Mutations as a rare cause of congenital fibrosis of the extraocular muscles type 3 (CFEOM3). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(7):2218-2223
- Yang X, Koki Y, Bradley K, et al. KIF21A mutations in two Chinese families with congenital fibrosis of the extraocular muscles (CFEOM). *Mol Vis* 2010;16(3):2062-2070
- Zhang XQ, Peng JH, Tang ZH, et al. Mutation p. Arg954Trp of KIF21A causes congenital fibrosis of the extraocular muscles in a Chinese family. *Acta Genetica Sinica* 2006;33(8):685-691
- 陆秀兰, 徐承启, 张明昌, 等. KIF21A 基因 p. Arg954Trp 突变引起先天性动眼神经麻痹. *华中科技大学学报(医学版)* 2010;39(5):644-648
- Ying M, Han RF, Hao P, et al. Inherited KIF21A and PAX6 gene mutations in a boy with congenital Fibrosis of extraocular muscles and aniridia. *BMC Medical Genetics* 2013;14(1):63-67
- 李宁东, 赵军, 王犁明, 等. 先天性眼外肌广泛纤维化综合征的 KIF21A 基因 R954 突变. *中华眼科杂志* 2012;48(12):43-46
- Yan YS, Hao SJ, Wang G, et al. Mutation analysis of KIF21A gene in a Chinese family with congenital fibrosis of the extraocular muscles type I. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2011;28(5):490-492
- Mahmood A, Conjeevaram P, Venkatesh AR, et al. Mutation analysis of the KIF21A gene in an Indian family with CFEOM1: Implication of CpG methylation for most frequent mutations. *Ophthalmic Genetics* 2004;25(4):247-255
- Yamada K, Andrews C, Chan WM, et al. Heterozygous mutations of the kinesin KIF21A in congenital fibrosis of the extraocular muscles type 1 (CFEOM1). *Nature Genetics* 2003;35(4):318-321
- 吴燕鸿, 李谦益, 付冰冰, 等. 先天性眼外肌纤维化伴少年白发家系的 KIF21A 基因突变分析. *福建医科大学学报* 2012;46(2):81-84