

应用新一代半导体靶向测序技术检测枫糖尿症致病基因突变的研究*

王彦云, 孙云, 杨冰, 蒋涛[△](南京医科大学附属南京市妇幼保健院新生儿筛查中心 210004)

【摘要】目的 应用 Ion Torrent 半导体靶向测序技术检测 1 例枫糖尿症(MSUD)患儿的致病基因突变, 明确其致病突变, 并探讨该技术用于复杂单基因病检测的可行性。**方法** 采集患儿外周血, 提取基因组 DNA, 经多重 PCR 扩增富集目的基因片段, 构建平均片段大小为 300 bp 左右的文库, 经乳液 PCR 及磁珠颗粒富集, 最后采用 318 半导体测序芯片进行高通量测序, 应用 Ion Torrent Suite v3.0 软件进行数据提取、序列比对及 SNPs 和 Indels 提取, 再用 dbSNP 137 数据库过滤得到 SNPs 和 Indels, 可疑突变经 Sanger 法测序验证。**结果** 检出患儿 1 个新发错义点突变并通过 Sanger 测序验证, 突变是 BCKDHB 基因第 6 外显子的 NM183050:c. 586C>T(p. His196Tyr)。**结论** Ion Torrent 半导体靶向测序技术可对复杂单基因遗传病进行快速、准确地基因诊断。

【关键词】 枫糖尿症; 支链氨基酸 α -酮酸脱氢酶复合体基因; Ion Torrent 半导体靶向测序技术

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.02.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)02-0163-03

Study on detection of pathogenic gene mutations in maple syrup urine disease by new-generation semiconductor targeted sequencing* WANG Yan-yun, SUN Yun, YANG Bing, JIANG Tao[△] (Neonatal Screening Center, Affiliated Nanjing Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210004, China)

【Abstract】Objective To detect the pathogenic gene mutations of maple syrup urine disease(MSUD) by using the Ion Torrent new-generation semiconductor targeted sequencing for validating the pathogenic mutation and to investigate the feasibility of application of this technique in the detection of complex monogenic diseases. **Methods** Peripheral blood sample was collected from the MSUD patient, genomic DNA was extracted, the target gene fragments were amplified and enriched by multiple PCR for constructing the library with the mean fragment size of 300 bp, which was enriched by microemulsion PCR and magnetic bead, finally the 318 semiconductor sequencing chip was adopted to conduct the high-throughput sequencing. The Ion Torrent Suite v3.2 software was applied to conduct the data extract, sequence alignment and SNPs and Indels extraction. Then the SNPs and Indels were filtered by the dbSNP 137 database. The suspected mutation was sequenced and verified by the Sanger method. **Results** One novel missense mutation in this patient was detected and verified by the Sanger sequencing, the mutation was NM183050:c. 586C>T(p. His196Tyr) in exon 6 of the BCKDHB gene. **Conclusion** The Ion Torrent semiconductor targeted sequencing can conduct the rapid and accurate gene diagnosis of complex single gene inheritance diseases.

【Key words】 maple syrup urine disease; BCKDHB gene; Ion Torrent semiconductor targeted sequencing

枫糖尿症(MSUD)是一种罕见的常染色体隐性遗传病,最早在 1954 年由 Menkes 等^[1]报道。Peinemann 等^[2]证明其为一种氨基酸代谢病,是由于支链氨基酸 α -酮酸脱氢酶复合体(BCKDH)基因缺陷,致使支链氨基酸(包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)转氨基反应后形成的相应支链 α -酮酸不能氧化脱羧,从而导致支链氨基酸和支链 α -酮酸在体内蓄积,临床上以体液枫糖尿及神经系统损害为主要表现^[3]。全世界新生儿 MSUD 的发病率在 1/185 000 左右,具有种族差异性^[4]。近年来,我国 MSUD 的散发病例报道也在增加,但尚无具体发病率统计数据。经典型 MSUD 均在新生儿期发病,且多在新生儿期或婴儿期死亡,目前可以通过串联质谱技术来分析滤纸干血斑中的总亮氨酸(Leu+Ile+Pro-OH)浓度,以进行 MSUD 的筛查及诊断,同时还可以进一步通过基因诊断来明确基因分型、指导治疗及产前诊断。MSUD 涉及的基因突变类型已超过 150

种,突变频率高,同时国内受限于传统的 Sanger 测序技术,对 MSUD 的基础研究仍然不足,目前对枫糖尿患儿进行基因诊断的报道较少^[5-7]。但是随着大规模平行新一代测序技术的应用,使遗传代谢病的快速诊断成为可能, Ion AmpliSeq™ Inherited Disease Panel 利用 3 个引物池共 10 000 多对引物,可对 328 个基因的编码外显子进行扩增,无需进行引物设计和靶序列选择,即可在 3.5 h 内完成目标文库的构建,在 2 d 内完成突变的检测。对于本院收治的 1 例 MSUD 患儿,作者应用 Ion Torrent 半导体测序平台对目的区域进行测序分析,建立起高效、经济的基因筛查诊断体系,并探讨 Ion Torrent 半导体靶向测序技术用于复杂单基因病检测的可行性。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患儿,男,系第二胎第二产,胎龄 40⁺3 周,自然分娩,出生体质量 3.72 kg。父母非近亲结婚,否认遗传代谢

* 基金项目:江苏省医学创新团队与领军人才课题(LJ201109);江苏省临床医学重点项目(BL2012039);江苏省卫生厅医学科研项目课题(H201343);江苏省南京市医学重点科技发展项目(201405041)。

作者简介:王彦云,女,硕士,检验技师,主要研究方向是遗传代谢病的检验及诊断。 [△] 通讯作者, E-mail:jiangzhang784@163.com。

病家族史,第一胎体健。生后 6 d 因“吃奶差”收住院治疗,入院后精神反应差和呼吸困难持续加重,可闻及香甜味,肌张力低下伴时有阵发性增强交替,动态监测三大常规、C 反应蛋白、降钙素原、生化、培养、脑脊液、血气分析等指标正常。生后 22 d 串联质谱结果:血亮氨酸为 2 718.68 mol/L(正常参考值 67~257 mol/L),血总亮氨酸/苯丙氨酸为 63.88(正常参考值 1.57~4.88),缬氨酸 209.49 mol/L(正常参考值 56~233 mol/L),缬氨酸/苯丙氨酸为 0.18(正常参考值 1.42~4.30),MSUD 临床诊断明确。给予低支链氨基酸鼻饲喂养,同时辅以呼吸机辅助通气,但患儿自主呼吸无明显恢复,治疗第 24 天患儿家属要求放弃治疗,签字出院。

1.2 方法

1.2.1 外周血 DNA 提取 采集患儿外周血,乙二胺四乙酸二钠抗凝,-20 °C 冻存。采用基因组 DNA 提取试剂盒(美国 OMEGA 生物技术公司)提取患儿及其父母外周静脉血的基因组 DNA。

1.2.2 新一代半导体测序 (1)目的基因聚合酶链反应(PCR)扩增:采用 Life technologies 公司发布的 Ion AmpliSeq™ Inherited Disease Panel 试剂盒对 MSUD 的致病基因 BCKDHA、BCKDHB、DBT、DLD 和 BCKD 激酶基因的所有外显子进行扩增,PCR 扩增反应体系及条件按说明书进行,PCR 扩增反应体系为 20 μL,包括 10 ng 基因组 DNA,1× Ion AmpliSeq™ HiFi Master Mix 和 1× Ion AmpliSeq™ Primer Pool,各种成分混匀后进行如下反应:9 °C 酶激活 2 min,99 °C 变性 15 s,60 °C 退火及延伸 8 min,共 12 个循环,最后 10 °C 保持。PCR 反应完毕后加 2 μL FuPa Reagent™ 进行引物消化,去除部分引物,反应条件为 50 °C 10 min;55 °C 10 min,最后 65 °C 20 min。采用 Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit (4471250,Life Technologies)对样品加上序列标签及 Ion Torrent 个体化基因组测序仪(PGM)测序平台兼容的测序接头。(2)文库构建:采用 Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (4475345,Life Technologies)进行文库构建。制备的文库平均片段大小应该为 300 bp 左右。(3)乳液 PCR 和磁珠颗粒(ISPs)富集:采用 Ion PGM 200 Xpress Template Kit (4474280,Life Technologies)在 Ion OneTouch(Life Technologies)上进行乳液 PCR,挂有模板的 ISPs 富集在 Ion OneTouch ES(Life Technologies)上完成。(4)Ion Torrent PGM 平台测序:采用 Ion PGM 200 Sequencing Kit(4474004,Life Technologies)及 Ion Torrent 318 芯片在 Ion Torrent PGM 平台进行测序反应,共 65 个测序循环。

1.2.3 测序结果分析及 Sanger 法测序验证 采用 Ion Torrent Suite v3.0 软件进行 Ion Torrent 数据提取、序列比对及单核苷酸多态性(SNPs)和插入/缺失多态性(Indels)提取,得到的 SNPs 和 indels 经 dbSNP 137 数据库过滤后,检索 HGMD、LOVD 等数据库及 Pubmed 相关文献,匹配已报道的致病位点,确定的致病突变及可疑致病突变均经 Sanger 法测序验证。

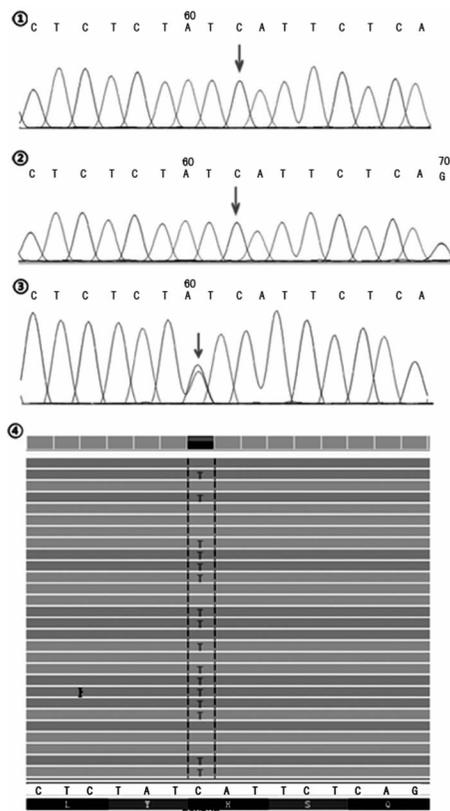
2 结果

选用人类基因组(GRCh37, hg19)的基因序列为参考序列,MSUD 5 个致病基因(BCKDHA、BCKDHB、DBT、DLD 和 BCKD 激酶)的检测范围,见表 1。原始数据经 Ion Torrent Suite v3.0 软件分析,检测发现 BCKDHB 基因的一个错义突变位点,经数据库比较后发现该位点未见报道,为可疑致病位点。通过 Sanger 测序验证结果显示,该突变为 BCKDHB 基因第 6 外显子编码区第 586 位,检测到 C>T 突变,基因型杂合,

组氨酸突变为酪氨酸,错义突变,见图 1; c. 586C>T(p. His196Tyr)经检索 Pubmed 及相关数据库未见报道,为新突变。100 例无血缘关系的健康人中未检测到该突变,排除多态性位点。同时,通过父母 MSUD 基因相应位点的 Sanger 测序证实:该患儿的突变位点在其父母中均未发现突变,说明患儿为一散发病例。该位点需进一步行功能研究以明确其致病性。

表 1 MSUD 5 个致病基因的检测范围

基因	外显子数	外显子编码区覆盖度(%)	未覆盖区域
BCKDHA	9	100.00	无
BCKDHB	10	100.00	无
DBT	11	96.55	chr1:100701002~100701026;25 bp;exon3 chr1:100696289~100696313;25 bp;exon4
DLD	14	96.41	chr7:107543923~107543941;19 bp;exon5 chr7:107546712~107546747;36 bp;exon8
BCKD 激酶	12	100.00	无



注:①为患儿父亲 BCKDHB 基因,c. 586 位点 Sanger 法测序视图,基因型为野生型;②为患儿母亲 BCKDHB 基因,c. 586 位点 Sanger 法测序视图,基因型为野生型;③为患儿 BCKDHB 基因突变 c. 586C>T,基因型为杂合型;④为患儿 BCKDHB 基因突变 c. 586C>T 位点高通量测序视图。

图 1 受检者家系测序结果

3 讨论

BCKDH 有 3 种催化成分,即 E1、E2、E3,其中 E1 又由 E1α 和 E1β 组成;另外,BCKDH 还有两种调节酶,BCKD 激酶和 BCKD 磷酸酶,MSUD 正是由这几个基因中的某一个突变引起的。值得注意的是,到目前为止,虽然已经发现的突变类型超过 150 种,但是所报道的 MSUD 患者病变位点均集中于

前 4 种蛋白,这 4 种蛋白分别由 BCKDHA(19q13.1~13.2)、BCKDHB(6q14)、DBT(1p31)及 DLD 基因(7q31~32)编码,其中有 34% 在 BCKDHA(E1 α 基因)上,29% 在 BCKDHB(E1 β 基因)上,24% 在 E2 基因上,13% 在 E3 基因上^[8],而在 BCKD 磷酸酶基因(4q22.1)的突变仅有 1 例报道,未见 BCKD 激酶基因(16p11.2)突变的报道^[9]。部分 MSUD 患者未能检出突变位点。国内上海新华医院报道了 16 例 MSUD 患者的基因检测结果,4 例为 BCKDHA 基因突变,8 例为 BCKDHB 基因突变,3 例为 DBT 基因突变,1 例未检测到明确致病位点突变^[7]。

在临床表现上,目前的研究倾向认为 BCKDHA、BCKDHB 基因突变患者多表现为经典型,DBT 基因变异患者临床表现较轻,多为硫胺素有效型。经典型 MSUD 的 BCKDH 活性小于 3%,是最为严重的类型,表现为生后 12~24 h 出现枫糖浆体味;48~72 h 出现酮症、易激惹及喂养困难;4~5 d 出现嗜睡、间歇性呼吸困难、角弓反张及刻板动作等脑病症状并逐步加重;7~10 d 可出现昏迷、中枢性呼吸衰竭等,强调诊断后立即干预,改善预后。其他表型包括中间型、硫胺素有效型和间歇型的严重程度取决于残余酶活性。

若 MSUD 患儿血中亮氨酸显著升高(>1 000 $\mu\text{mol/L}$)即可确诊^[10],故本例患者 MSUD 诊断明确,本次检测范围内未检测到已报道的致病突变,仅检测出 1 个暂未明确其致病性的新发突变位点 c.586C>T(p. His196Tyr)。进一步家系分析显示,此位点在患儿父母中均为野生型,故该位点为患儿自身的新发突变。由于该突变位点处于氨基酸序列高度保守区域,同时患儿临床表型为经典型,提示该突变位点可能为有害突变,即对酶活性影响较大。本次检测对 BCKDHA、BCKDHB 基因全外显子 100% 覆盖,均未发现另外一个致病位点,暂不排除在本检测范围外(如内含子)可能存在罕见致病突变位点或者特殊突变类型(如大片段插入、缺失等)。此外,本次检测鉴于既往 MSUD 病例报道中均未对 BCKD 磷酸酶基因进行检测,故对该基因未行检测,不排除 BCKD 磷酸酶基因存在致病突变位点的可能。

由于 MSUD 涉及的基因数较多,突变频率高及突变位置无固定规律的特点,传统的测序技术对其进行测序时,耗时长,成本高。本研究中作者应用 Ion Torrent 半导体测序技术针对患儿的 5 个基因进行全外显子测序,目的区域覆盖度接近 100%,快速、经济、有效地完成了对该例患儿的基因诊断。

从 DNA 序列的角度分析,遗传病的基因改变可以视为单核苷酸的取代和 DNA 片段的插入或缺失。本研究使用的是 Life technologies 公司发布的 Ion AmpliSeqTM 平台,利用 Ion AmpliSeq 技术使得成千上万个目标基因的选择性扩增能在单管多重 PCR 反应内完成。通过目的基因 PCR 扩增、文库构建、乳液 PCR 和测序流程,得到检测结果仅需 2 d。从本研究的检测结果来看,Ion Torrent 测序技术在 5 个基因中检测到 1 个杂合突变,与 Sanger 直接测序结果完全一致。

综上所述,采用 Ion Torrent 半导体测序技术快速、经济、准确地对该例 MSUD 患者进行了分子检测,为将来新一代 Ion Torrent 测序平台在复杂单基因遗传病的分子诊断及临床治疗方面提供了应用依据。

参考文献

- [1] Menkes JH, Hurst PL, Craig JM, et al. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance [J]. *Pediatrics*, 1954, 14(5): 462-467.
- [2] Peinemann F, Danner DJ. Maple syrup urine disease 1954 to 1993 [J]. *J Inher Metab Dis*, 1994, 17(1): 3-15.
- [3] Zinnanti WJ, Lazovic J. Interrupting the mechanisms of brain injury in a model of maple syrup urine disease encephalopathy [J]. *J Inher Metab Dis*, 2012, 35(1): 71-79.
- [4] Nellis MM, Kasinski A, Carlson M, et al. Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression [J]. *Mol GeneT Metab*, 2003, 80(1): 189-195.
- [5] 杨楠, 张立琴, 韩连书, 等. 枫糖糖尿病患者家系基因突变分析及产前诊断 [J]. *中华围产医学杂志*, 2012, 15(8): 494-499.
- [6] 惠秦, 谷为岳, 侯新琳, 等. 新生儿枫糖尿症 1 例 [J]. *中国循证儿科杂志*, 2014, 9(1): 64-67.
- [7] Yang N, Han L, Gu X, et al. Analysis of gene mutations in Chinese patients with maple syrup urine disease [J]. *Mol Genet Metab*, 2012, 106(4): 412-418.
- [8] Georgiou T, Chuang JL, Wynn RM, et al. Maple syrup urine disease in Cypriot families: identification of three novel mutations and biochemical characterization of the p. Thr211Met mutation in the Elalpha subunit [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2009, 13(5): 657-664.
- [9] Oyarzabal A, Martinez PM, Merinero B, et al. A novel regulatory defect in the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex due to a mutation in the PPMIK gene causes a mild variant phenotype of maple syrup urine disease [J]. *Hum Mutat*, 2012, 34(2): 355-362.
- [10] Sowell J, Pollard L, Wood T. Quantification of branched-chain amino acids in blood spots and plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the diagnosis of maple syrup urine disease [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(6): 631-639.

(收稿日期:2015-05-07 修回日期:2015-08-29)

(上接第 162 页)

- [15] Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4⁺ CD25 (hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients [J]. *Blood*, 2006, 107(6): 2409-2414.
- [16] Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of Foxp3 expression in naive human CD4⁺ Foxp3 T cells by T cell

receptor stimulation is TGF-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype [J]. *Blood*, 2007, 110(8): 2983-2990.

(收稿日期:2015-07-24 修回日期:2015-09-15)