

论著·临床研究

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

周熙惠¹ 马爱群¹ 刘小红¹ 黄辰² 张艳敏¹ 史瑞明¹

(1. 西安交通大学医学院第一附属医院新生儿科; 环境与疾病相关基因教育部重点实验室离子通道研究病室;
2. 西安交通大学医学院遗传与分子生物学系, 西安交通大学分子生物学研究中心实验室, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的 对1个良性家族性婴儿惊厥(benign familial infantile convulsions, BFIC)家系进行遗传连锁分析和基因定位,以探讨BFIC的分子发病机制。方法 调查一个4代BFIC家系。选择位于染色体19q12~q13.1的D19S245和D19S250,16p12~q12的D16S3131和D16S3133,2q24的D2S156和D2S286,20q13.3的D20S480和D20S481共8个短串连重复序列(short tandem repeat,STR)作为遗传标记,应用聚合酶链反应(PCR),变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和银染技术,采用LINKAGE软件包中的MLINK程序计算LOD值,根据LOD值判断连锁关系。结果 当重组率在0.000至0.01之间,在染色体19q12~13.1、16p12~q12及2q24区域的遗传标记LOD值均小于-2.0;在20q13.3(D20S481)区域,当重组率为0.000时,LOD值为0.3,当重组率为0.01时,LOD值为0.25。结论 排除该家系与染色体19q12~13.1、16p12~q12及2q24区域的遗传标记存在连锁关系的可能;在20q13.3区域,虽然没有显著性意义,但不能排除与20q13.3区域连锁的可能。[中国当代儿科杂志,2010,12(2):89-92]

[关键词] 惊厥;遗传标记;基因型;人类,汉族

[中图分类号] R748 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)02-0089-04

Linkage analysis and gene mapping of one Chinese family with benign familial infantile convulsions

ZHOU Xi-Hui, MA Ai-Qun, LIU Xiao-Hong, HUANG Chen, ZHANG Yan-Min, SHI Rui-Ming. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University/Ion Channel Disease Laboratory, Environment and Disease Associated Gene Ministry of Education Intensive Laboratory, Xi'an 710061, China (Email: zhouxih@mail.xjtu.edu.cn)

Abstract: Objective The present study performed linkage analysis and gene mapping to find the possible chromosome locus harboring in one family with benign familial infantile convulsions (BFIC) and investigate the possible molecular pathogenesis of BFIC. **Methods** A four-generation family with BFIC was investigated. The family was genotyped using eight hypervariable microsatellite markers covering four loci: D19S245 and D19S250 for the 19q12-13.1 region, D16S3131 and D16S3133 for the 16p12-q12 region, D2S156 and D2S286 for the 2q24 region, and D20S480 and D20S481 for the 20q13.3 region. Polymorphism fragments were amplified using polymerase chain reaction (PCR) method. PCR products for the markers were subjected to electrophoresis on 8% denatured polyacrylamide gel and silver staining for length judgment of amplification fragment. Linkage analysis was performed by use of MLINK in the LINKAGE computer package. Two-point LOD scores were calculated to estimate the linkage relationship. **Results** The two-point LOD scores were less than -2.0 for the genetic markers at chromosomes 19q12-13.1, 16p12-q12 and 2q24 at the recombination rate between 0.000 and 0.01. The two-point LOD scores for D20S481 at the 20q13.3 region were 0.3 and 0.25 at the recombination rate of 0.000 and 0.01, respectively. **Conclusions** There is no evidence that this family with BFIC is linked to one of the following loci: 19q12-13.1, 16p12-q12 and 2q24, but a possible linkage with 20q13.3 region cannot be excluded.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(2):89-92]

Key words: Convulsion; Genetic marker; Genotype; Humans, Han ethnic

良性家族性婴儿惊厥(benign familial infantile convulsions, BFIC)是一类常染色体显性遗传的特发性癫痫综合征,特征表现为初发于3~12月龄的无热惊厥,数周、数月后自行缓解^[1]。西方国家的连锁分析研究发现了至少3个疾病基因位点,分别位

于染色体19q12~q13.1,16p12~q12,和2q23~31区域,几个中国BFIC家系的连锁分析在这些区域却得到了阴性的结果^[2-3]。已有研究发现,另一种生后早期癫痫综合征-良性家族性新生儿惊厥与位于染色体20q13.3区域的钾离子通道基因KCNQ2突

[收稿日期]2009-07-13;[修回日期]2009-08-26

[基金项目]陕西省科学技术攻关项目(2007K14-05)。

[作者简介]周熙惠,女,博士,副主任医师。

变有关^[4]。2005年我们在陕西省定边县和宁夏省永宁县收集到一个BFIC大家系,先证者母亲和同父母的12个兄弟姐妹及其所生子女中有多人发病(家系系谱图见图1),本实验选择位于上述4个区域的8个STR作为遗传标记,即位于染色体

19q12~q13.1的D19S245和D19S250,16p12~q12的D16S3131和D16S3133,2q24的D2S156和D2S286,20q13.3的D20S480和D20S481对这个4代有17位患者的BFIC家系进行连锁分析和基因定位研究。

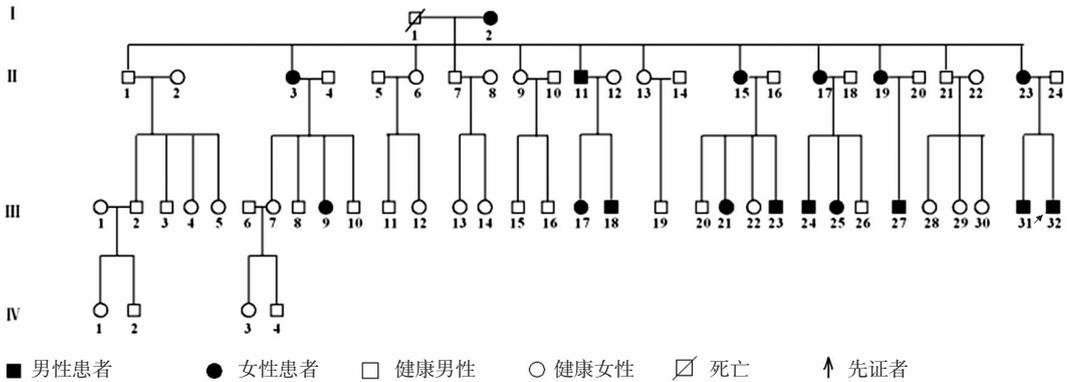


图1 BFIC家系系谱图

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料和标本 该家系17例患者来自陕西省定边县、宁夏省永宁县及陕西省西安市等地,均为汉族。所有BFIC患者均根据2001年国际抗癫痫联盟颁布的癫痫发作分类标准确诊^[5]。共采集到41份血样,包括全部17名患者和家系中24名健康人。

1.1.2 试剂 基因组纯化试剂盒由美国Gentra公司提供,乙二胺四乙酸(EDTA)、Tris、四甲基乙二胺(TEMED)、DNA Lodaing Buffer购自北京鼎国公司(进口分装),dNTP(20 mmol/L)、Taq DNA聚合酶(5 U/μL)、10×PCR缓冲液、MgCl₂(25 μmol)、标准DNA分子参照物购自Promega公司,8对引物由北京奥科生物有限公司合成。

1.1.3 仪器 垂直电泳仪、WD-9410凝胶真空干燥器为北京六一仪器厂产品;PCR扩增仪为美国基因公司PDC-200产品;AE-240精密分析天平为瑞

士梅特勒公司产品;高速微型离心机为美国Eppendorf 5414C公司产品;SW-CJ-IF型超净工作台为苏州净化设备公司产品;精密PH仪为美国Beckman公司产品。

1.2 方法

1.2.1 血样采集及DNA提取 41名家系成员每人抽取外周血3~5 mL(EDTA抗凝),采用Gentra公司提供的基因组纯化试剂盒抽提DNA,1×TE溶解,-20℃保存。

1.2.2 STR位点的选定和引物制备 本实验共选了8个STR作为标记位点,其中位于染色体19q12~q13.1的D19S245和D19S250,16p12~q12的D16S3131和D16S3133,2q24的D2S156和D2S286是目前已发现的白种人BFIC疾病基因位点,位于20q13.3的D20S480和D20S481是已发现的BFIC疾病基因位点。STR位点的引物序列从人类连锁中心数据库(<http://www.chlc.org>)查询获得。扩增这8个STR位点所需的引物见表1,由北京奥科生物工程有限公司合成。

表1 各微卫星DNA标记的引物序列

STR位点	前引物 P1	后引物 P2
D2S156	CCCTCTGTTTGCCTGAAATA	CCAGCCTTGATTGTCACAC
D2S286	TFAAAAATTGTTTCTATGACATGATG	TGGTGGTTTATCTTACCAGTC
D16S3131	CTAGCCCCAAATGTG	CTGCTTCCATCTTGCC
D16S3133	TGATCCACCTGCTTTG	GTTTTGTGTCTGGCTTAGAA
D19S245	ACTTCTTGCAGTCTGTGGC	TTCTAGACCTGCAATCAGCC
D19S250	ATTGCCCCTAACAAATGGTG	GATCTATCAATTTGTCTATC
D20S480	GTGGTGAACCAATAAATGG	AAGCAAATAAAACCAATAAACTCG
D20S481	TGGGTTATGAGTGCACACAG	AACAGCAAAAAGACACACAGC

1.2.3 DNA 样本扩增和 PCR 反应条件 将模板 DNA 样品约 0.2 μg 加入标记好 0.5 mL 的 Eppendorf 管中, 25 μL 总体积 PCR 反应体系的加样量如下: 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL、25 μmol/L MgCl₂ 2 μL、2.5 mmol/L dNTP 2 μL、10 μmol/L P₁ + P₂ 4 μL、0.2 μg/μL 模板 DNA 1 μL、2.5 μg/μL TaqDNA 多聚酶 1 μL、无菌去离子水 12.5 μL。混匀后进行扩增, 94℃ 预变性 5 min 后, 94℃ 变性 30 s, 55 ~ 61℃ 退火 30 s, 70℃ 延伸 30 s, 循环 33 次, 最后 72℃ 延伸 7 min。

1.2.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染 将 PCR 产物 2 ~ 3 μL 与 6 × 上样缓冲液 1 μL 混匀后, 95℃ 变性 5 min, 冰浴骤冷, 于 6% ~ 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳 2 ~ 4 h (维持凝胶温度约 30 ~ 40℃, 恒压 600 V)。电泳后将胶板放入银染盒中, 加入 1 000 mL 终止液, 25 ~ 30℃ 下水平振荡至二甲苯青消失; 用去离子水漂洗凝胶 3 次后, 现配制硝酸银染液 1 000 mL, 染色 30 min; 弃银染液, 用去离子水快速漂洗凝胶 1 次, 将预冷的显影液倒入方盆中显影, 观察并记录聚丙烯酰胺凝胶中的 DNA 条带的位置。

1.2.5 连锁分析及判断标准 根据个体 STR 等位基因片段所在位置, 确定等位基因编号, 将所观察到的等位基因分别从 1 标记直到最大。每种表型都由两种等位基因的编号构成, 其中纯合子由两个相同的等位基因编号标记。采用 LINKAGE 软件包 (version 5.1) 中的 MLINK 程序, 在常染色体显性遗传 (AD) 模式下, 设定致病基因频率为 0.0001, 计算在外显率为 90%, 重组率从 0.000 至 0.5, 男女重组率相等时的 LOD 值。根据 LOD 值判断连锁关系: LOD 值 ≥ 1, 可能存在连锁关系; LOD 值 ≥ 3, 肯定存在连锁关系; LOD 值 < -2, 肯定不存在连锁关系; -2 < LOD 值 < 1, 不能判断是否连锁。

2 结果

对 BFIC 家系两点间连锁分析示, 当重组率在 0.000 至 0.01 之间, 在染色体 19q12 ~ 13.1, 16p12 ~ q12, 2q24 区域的遗传标记 LOD 值均小于 -2.0, 排除了与以上位点连锁的可能, 各标记位点在不同重组率下的 LOD 值见表 2。

在 D20S481 标记处, 当重组率为 0.000 时, LOD 值为 0.3, 当重组率为 0.01 时, LOD 值为 0.25, 虽然没有显著性意义, 但不能排除该家系与 20q13.3 区域存在连锁关系的可能。

表 2 BFIC 家系各位点 STR 标记物的 LOD 值

位点	重组率								
	0.000	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	
D19S245	-7.50	-6.23	-4.84	-3.46	-1.13	-0.73	-0.32	-0.02	
D19S250	-6.48	-4.65	-3.78	-2.56	-1.55	-0.87	-0.38	-0.01	
D16S3131	-5.02	-4.17	-2.34	-0.54	-0.16	-0.09	-0.04	-0.02	
D16S3133	-8.66	-5.32	-3.28	-2.80	-1.59	-0.77	-0.31	-0.01	
D2S156	-9.08	-5.67	-3.21	-2.18	-1.15	-0.69	-0.34	-0.17	
D2S286	-6.32	-3.79	-1.29	-0.87	-0.23	-0.06	-0.04	-0.12	
D20S480	-2.48	-1.98	-1.23	-0.67	-0.34	-0.15	-0.07	-0.03	
D20S481	0.30	0.25	0.21	0.18	0.12	0.06	0.01	0.01	

3 讨论

本实验应用家系连锁分析法, 即以二代或二代以上的家系材料为基础, 观察标记位点与致病基因位点在家系内是否呈共分离, 并根据基因的重组率计算出它们之间的遗传距离及连锁程度。在同一条染色体上, 疾病基因与 STR 标记位点是呈线性排列的, 两者相距越远, 重组的可能性越大; 反之, 连锁的可能性越大。重组率可以反映出两者之间的遗传学距离。重组率为 0, 提示紧密连锁, 重组率大于 0.5, 提示不在同一条染色体上, 重组率为 0.01, 提示两者之间的遗传学距离为 1cM, 1cM 约相当于一百万碱基对。

LOD 连锁分析是在提供了疾病各有关参数 (基因频率、外显率等) 的前提下, 用标记基因与疾病基因连锁/随机遗传的两个概率之比的对数值, 来判断标记基因与疾病基因是否连锁, 以及在连锁的状态下重组率的大小, 并根据重组率的大小来计算两个基因座位之间的染色体图距。该法优点是对连锁的判断能力强, 能确定连锁程度, 适于呈孟德尔遗传、外显率高的单基因突变病分析。缺点是需要完整的系谱材料, 结果受遗传模型设定的影响, 对遗传参数如基因频率、基因传递率、外显率及表型模拟率等依赖较大。

BFIC 的临床特点为首发于 3 个月至 1 岁的无热惊厥, 发作形式多样, 以部分性发作多见, 抗癫痫药治疗后发作控制良好, 精神运动发育正常, 有婴儿惊厥家族史。最早在 1963 年, Fukuyama^[6] 报道了一个日本家系, 1992 年 Vigevano 等^[7] 报道了 5 个意大利家系, 并首次提出了该疾病的诊断标准。此后, 在法国、新加坡、瑞典、美国、德国、澳大利亚、英国等地也有该疾病的报道。2001 年 Engle^[8] 在国际抗癫痫联盟提出的癫痫综合征方案中新定义了这一疾病。BFIC 在中国人群中较罕见, 目前中国大陆地区仅有少数家系的报道。

BFIC 具有明显的遗传异质性, Guipponi 等^[9]对 5 个意大利家系在选用 40 多个微卫星 DNA 标记进行连锁分析后,证实了此家系的 BFIC 疾病基因定位于染色体 19q12.0 ~ 13.1,这是报道的第 1 个 BFIC 疾病基因位点。Szeptowski 等^[10]对 4 个来自法国的伴阵发性舞蹈手足徐动的 BFIC 家系进行连锁分析研究,在 D16S3133 处,重组率为 0 时,获得最大的 LOD 值 6.67。Carballo 等^[11]选取了 16 号染色体上的微卫星标记,对一个 BFIC 家系进行研究,将第 2 个 BFIC 疾病基因位点定位于 16p12 ~ q12。2001 年 Malacarne 等^[12]对 8 个意大利 BFIC 家系进行连锁分析,有 4 个家系在跨距 0.7 cm 的 D2S399 和 D2S2330 之间获得最大多点 LOD 值为 6.29,从而将第 3 个 BFIC 致病基因定位于染色体 2q24。由于不同的 BFIC 家系可能有不同的疾病基因位点,在 BFIC 的基因定位研究中,广泛的收集家系非常必要。

BFIC 的致病基因尚不明确。2003 年 Vanmolkot 等^[13]在一个伴有 BFIC 的家族性偏头痛 (familial hemiplegic migraine, FHM) 家系发现了钠钾 ATP 酶 $\alpha 2$ 亚单位 ATP1A2 基因突变,推测该基因可能是 BFIC 的致病基因,后来的研究推测 ATP1A2 基因与典型的 BFIC 发病关系不大^[14]。2006 年 Striano 等^[15]在 1 个典型的遗传了 3 代的 BFIC 家系中,通过直接测序的方法进行钠离子通道亚单位 SCN2A 基因突变检测,在 16 号外显子区发现一个新的致病突变 (T3003A),提示 SCN2A 与 BFIC 有一定关系,但尚需更多的家系来验证。

国内王家勤等^[16]、周军卫等^[17]选用微卫星 DNA 标记对 BFIC 家系进行连锁分析,研究结果发现,中国 BFIC 家系与国外已发现的 3 个 BFIC 致病基因位点无连锁关系。Li 等^[18]对 1 个中国湖南有 4 代遗传的 BFIC 大家系进行全基因组扫描、连锁分析及单体型分析,将致病基因定位于一新的位点: 1p36.12 ~ p35.1 上 D1S2864 和 D1S2830 之间约 12.4cM 的区域。本研究对 1 个 BFIC 家系两点间连锁分析同样排除了与国外发现的 3 个 BFIC 疾病基因位点连锁的可能,但不能排除与染色体 20q13.3 区域存在连锁关系的可能,研究结果为进一步通过定位—功能候选克隆途径研究该家系的致病基因奠定了基础。

致谢:感谢所有家系成员和陕西省定边县人民医院的大力协助和支持。

参 考 文 献

[1] Striano P, Lispi ML, Gennaro E, Madia F, Traverso M, Bordo L,

et al. Linkage analysis and disease models in benign familial infantile seizures: a study of 16 families [J]. *Epilepsia*, 2006, 47 (6):1029-34.

[2] Li HY, Li N, Jiang H, Shen L, Guo JF, Zhang RX, et al. A novel genetic locus for benign familial infantile seizures maps to chromosome 1p36.12-p35.1 [J]. *Clin Genet*, 2008, 74(5):490-492.

[3] Xiao B, Deng F-Y, Xiong G, Wang K, Zhang J, Chen XD, et al. Clinical and genetic study on a new chinese family with benign familial infantile seizures [J]. *Europ J Neurol*, 2005, 12:344-349.

[4] Heron SE, Cox K, Grinton BE, Zuberi SM, Kivity S, Afawi Z, et al. Deletions or duplications in KCNQ2 can cause benign familial neonatal seizures [J]. *J Med Genet*, 2007, 44(12):791-796.

[5] 周熙惠, 刘小红, 邹余粮, 马爱群, 张少雄, 丁建兵, 等. 良性家族性婴儿惊厥一家系临床研究和文献回顾 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2006, 14(2):153-156.

[6] Fukuyama Y. Borderland of epilepsy with special reference to febrile convulsions and so-called infantile convulsions [J]. *Seishin-Igaku (Clini Psychiatry)*, 1963, 5: 211-223.

[7] Vigeveno F, Fusco L, Di Capua M, Ricci S, Sebastianelli R, Lucchini P. Benign familial infantile convulsions [J]. *Eur J Pediatr*, 1992, 151(8): 608-612.

[8] Engel J Jr; International League Against Epilepsy (ILAE). 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.

[9] Guipponi M, Rivier F, Vigeveno F, Beck C, Crespel A, Echenne B, et al. Linkage mapping of benign familial infantile convulsion (BFIC) to chromosome 19q [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(3): 473-477.

[10] Szeptowski P, Rochette J, Berqun P, Piussan C, Lathrop GM, Monaco AP. Familial infantile convulsions and paroxysmal choreoathetosis: a new neurological syndrome linked to the pericentromeric region of human chromosome 16 [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 61(4): 889-898.

[11] Carballo R, Pavak S, Lemainque A, Gastaldi M, Echenne B, Motte J, et al. Linkage of benign familial convulsion to chromosome 16p12-q12 suggests allelism to the infantile convulsion and choreoathetosis syndrome. *Am J Hum Genet* [J]. 2001, 68(3): 788-794.

[12] Malacarne M, Gennaro E, Madia F, Pozzi S, Vacca D, Barone B, et al. benign familial infantile convulsions; mapping of a novel locus on chromosome 2q24 and evidence for genetic heterogeneity [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(6): 1521-1526.

[13] Vanmolkot KR, Kors EE, Hottenga JJ, Terwindt GM, Haan J, Hoefnagels WA, et al. Novel mutations in the Na⁺, K⁺-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions [J]. *Ann Neurol*, 2003, 54(3): 360-366.

[14] Martinelli Boneschi F, Aridon P, Zara F, Guerrini R, Marini C, De Fusco M, et al. No evidence of ATP1A2 involvement in 12 multiplex Italian families with benign familial infantile seizures [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 388(2):71-74.

[15] Striano P, Bordo L, Lispi ML, Specchio N, Minetti C, Vigeveno F, et al. A novel SCN2A mutation in family with benign familial infantile seizures [J]. *Epilepsia*, 2006, 47(1): 218-220.

[16] 王家勤, 李红梅, 尹景岗, 张红亚, 李冲, 顾仁骏, 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.

[17] 周军卫, 李晓文, 黄希顺, 陈辉, 宋国英, 魏建科, 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.

[18] Li HY, Li N, Jiang H, Shen L, Guo JF, Zhang RX, et al. A novel genetic locus for benign familial infantile seizures maps to chromosome 1p36.12-p35.1 [J]. *Clin Genet*, 2008, 74(5):490-492.

(本文编辑:黄 榕)