

# 新的良性家族性婴儿惊厥候选基因的突变筛查

向入平 资晓宏 余辉云 万燕 禹小杜

**【摘要】 目的** 为了克隆新的良性家族性婴儿惊厥(BFIC)致病基因,我们采用功能-候选克隆的方法,在已精确定位于1p36.12~35.1上D1S2864和D1S2830之间约12.4 cM的区域内,筛选了5个候选基因进行突变分析。**方法** 根据癫痫的病理生理机制、已克隆特发性癫痫致病基因特点以及结合该区域内各基因的生物学信息,筛选了GPATC3、SESN2、SFN、TAF12、TCEA3作为候选基因,应用聚合酶链反应(PCR)及DNA直接测序的方法进行基因突变分析。**结果** 在该BFIC家系中,5个候选基因的突变检测未发现任何致病突变,但发现了5个多态,其中TCEA3基因的IVS1-122C→A为新发现的多态。**结论** 排除了这5个基因为该BFIC家系致病基因的可能,为进一步功能候选克隆工作奠定了基础。

**【关键词】** 癫痫,正常新生儿; DNA突变分析; 候选基因

**Mutation screening of 5 candidate genes for one Chinese benign familial infantile convulsion family with a novel locus** XIANG Ru-ping, ZI Xiao-hong, YU Hui-yun, WAN Yan, YU Xiao-du. Department of Neurology, The Forth Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410006, China  
Corresponding author: YU Hui-yun, Email: xiangruping@126.com

**【Abstract】 Objective** In order to clone the new disease gene for BFIC, we used the approach of functional-candidate cloning and selected 5 candidate genes in chromosome 1p36.12-1p35.1 for mutation analysis. **Methods** Through looking up bioinformatics of all known genes in the locus interval, we chose 5 candidate genes (GPATC3, SESN2, SFN, TAF12, TCEA3) according to the pathogenesis of idiopathic epilepsy and the features of already cloned disease-causing genes for epilepsy. By polymerase chain reaction (PCR) and DNA direct sequencing, we performed mutation analysis of the 5 genes in the Chinese family. **Results** No mutation of the 5 candidate genes was found to cause BFIC in the family. Five single nucleotide polymorphisms (SNPs) was detected, among which IVS1-122C→A in TCEA3 was a novel SNP. **Conclusions** The five candidate genes are unlikely involved in the pathogenesis of the Chinese BFIC family with the novel BFIC locus.

**【Key words】** Epilepsy, benign neonatal; DNA mutational analysis; Candidate gene

良性家族性婴儿惊厥(benign familial infantile convulsion, BFIC)是一种罕见的常染色体显性遗传的特发性癫痫综合征,为婴儿期出现、可自行消失的、预后良好的无热性癫痫发作。在法国、日本、意大利等均有过该疾病的发现,我国也有少数BFIC家系的报道<sup>[1]</sup>。BFIC存在明显的遗传异质性,迄今为止国内外研究团体已定位了4个BFIC致病基因位点,分别为19q12~13.1(BFIC1)<sup>[2]</sup>、16p12~q12(BFIC2)<sup>[3]</sup>、2q24(BFIC3)<sup>[4]</sup>、1p(BFIC4)<sup>[5]</sup>。但目前尚未克隆BFIC致病基因。此外有研究发现部分BFIC家系致病基因与

上述位点均无连锁关系,说明BFIC可能存在其他致病基因位点。

我们运用全基因组扫描技术、连锁分析及单体型分析的方法,将一个来自中国湖南遗传了4代的BFIC大家系致病基因定位于1p36.12~1p35.1上D1S2864和D1S2830之间12.4 cM的区域,这是国际上定位的一个新位点。通过查询发现该区间内有315个已知基因,采用定位功能候选克隆策略克隆BFIC的致病基因,同时根据癫痫的病理生理机制及神经生物学基础,分析BFIC致病基因的生物学信息,选择了5个候选基因进行突变分析,它们分别为:SFN基因(stratiferin, SFN)、TCEA3基因(transcription elongation factor A 3, TCEA3)、GPATC3基因(G patch domain containing 3, GPATC3)、TAF12基因(TAF12 RNA polymerase II, TAF12)、sestrin家族基因(sestrin 2, SESN2)。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.01.028

作者单位:410006 湖南师范大学附属长沙市第四医院神经内科(向入平、余辉云、万燕、禹小杜);中南大学湘雅三医院神经内科(资晓宏)

通讯作者:余辉云,Email:xiangruping@126.com

## 对象和方法

### 一、研究对象

一个来自中国湖南的BFIC家系,该家系成员共33人,患者8例,男女各4例,无近亲婚配史,均为汉族,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<sup>[6]</sup>。

### 二、研究方法

1. 候选基因的选择:在UCSC数据库中查询位于D1S2864~D1S2830之间的基因信息,结果显示这个区间内有315个Known genes和174个Reference genes。我们通过综合分析候选区域内各个基因的生理结构基础、组织表达及生物学特性来选择候选基因。筛选标准如下:(1)位于候选区域内;(2)与离子转运有关的基因如离子通道、离子泵、转运体、神经递质及有关的受体;与髓鞘生成相关的基因;脑内特异性表达的基因等;(3)在脑中有一定表达丰度的基因。

2. 引物的设计与合成:我们使用加拿大生物研究所提供的在线软件Primer3(<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/>)进行设计引物,由上海生工生物技术有限公司合成。为了使PCR扩增有效性、特异性更好,我们对以下参数进行了设定:引物中的GC含量设定在40%~60%;退火温度设定在57~63℃;为了使引物更好地结合到模板链上,引物的3'端一般设定为以G或C结尾;为了便于测序,扩增片段一般设定在200~600bp。我们将每个基因的不同剪接型考虑在内,以完整扩增最大剪接本为目标,覆盖了5个候选基因不同剪接型系列的编码区及外显子与内含子交界区前后至少30个碱基,各候选基因的gDNA序列来自NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

3. PCR反应:选取先证者的gDNA为模板,扩增5

个候选基因的所有外显子及编码区,PCR反应条件见图1。

4. 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测PCR产物:取1.5 μl PCR反应产物,上样于6%非变性聚丙烯酰胺凝胶(6%聚丙烯酰胺凝胶:30%丙烯酰胺6ml,10×TBE 1.5ml,TEMED 30 μl,10%APS 300 μl,加蒸馏水至30ml),300V电泳40~60min后,进行固定(固定液:无水乙醇50ml+冰醋酸2.5ml+dH<sub>2</sub>O→500ml),染色(染色液:AgNO<sub>3</sub> 1g+dH<sub>2</sub>O→500ml),显色(显色液:NaOH 3.75g+30%甲醛2.7ml+dH<sub>2</sub>O→500ml),检测PCR产物结果。如产物为目的片段且特异性好,则可纯化送测序,而对扩增特异性差的PCR产物则进一步调整PCR反应条件重复如上步骤。

5. 测序:若PCR产物特异性好,且为所需片段,则将PCR产物用虾碱性磷酸酶和核酸外切酶处理(冰上操作),37℃孵育60min,80℃15min灭活虾碱性磷酸酶和核酸外切酶,4℃保存。酶切后的PCR产物送ABI3100自动测序仪进行测序。

6. DNA序列分析:测序结果用DNASTar软件中的EditSeq、SeqMan程序分析,以NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中的gDNA序列为参照,进行序列比对分析。

7. 序列变异的判断:发现的杂合序列变异先在NCBI(dbSNP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)进行已知的单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP)的排除分析,如为新的序列变异,即进行家系内另2例患者、家系内2例正常人及家系外正常对照的检测,观察序列变异与疾病表型有无共分离现象。

8. 候选基因的生物学信息:通过生物信息学查询,5个候选基因的Genebank登录号、OMIM登录号、最大剪接本(coding domain sequence, CDS)的长度、编码产物长度和该基因在脑中的组织表达及相关的分子生物学功能简介见表1。

表1 5个候选基因的生物信息简表

| 基因名称   | Genebank<br>登录号 | OMIM<br>登录号 | 肽链长度<br>(AA) | CDS(bp) | 脑中基因的组织表达(%) | 分子生物学功能简介                                  |
|--------|-----------------|-------------|--------------|---------|--------------|--|
| TAF12  | NM-005644       | 600773      | 161          | 486     | 1.21         | 调控基因转录                                     |
| GPATC3 | NM-022078       |             | 525          | 1578    | 3.28         | 对细胞的形状、迁移和维持正常的功能起重要作用                     |
| SFN    | NM-006142       | 601290      | 248          | 747     | 1.08         | 在细胞通信、分化等方面发挥作用                            |
| TCEA3  | NM-003196       | 604128      | 348          | 1586    | 0.52         | 转录延伸因子A3,具有限制组织基因的表达的作用                    |
| SESN2  | NM-031459       | 607767      | 480          | 1443    | 1.12         | 基因编码与PA26相关蛋白的sestrin家族,在调控细胞生长和存活方面发挥重要作用 |

## 结 果

通过直接测序法对5个候选基因进行突变分析,我们在其外显子及侧翼区共发现5个gDNA序列变异(表2),包括3个杂合变异、2个纯合变异,其中一个为新发现的序列变异。我们在SFN基因、SESN2基因及TAF12基因检测中没有发现任何序列变异,在GPATC3基因的1号外显子发现1个序列变异:IVS1+138G>T(图2),查询SNP数据库为已报道的多态;在TCEA3基因的1号外显子,5号及10号内含子区域和编码区发现4个序列变异,分别为:IVS1-122C>A、IVS5-22C>A、c.980G>A、IVS10+34T>C(图3~6),其中5号及10号内含子序列变异:IVS5-22C>A、IVS10+34T>C经查询为已报道的多肽;位于编码区的序列变异:c.980G>A导致氨基酸序列的改变(丝氨酸S→天冬酰胺酸N),为错义突变,但经查询NCBI的SNP数据库亦为已报道的多态;1号外显子的序列变异(IVS1-122C>A)经查询SNP数据库为新的多态,为了明确该变异是否对该家系的发病有影响,我们对家系内2例患者及家系内2例正常人进行了该序列的测序分析,尽管2例患者存在IVS1-122C>A变异,但在家系内2例正常人中同样发现同样变异(图7),说明该变异与该家系的表型无关,为数据库尚未报道的正常人群的多态。

表2 各基因的序列变异一览表

| 基因     | 碱基变异        | 位置     | 氨基酸改变   | 结果分析           |
|--------|-------------|--------|---------|----------------|
| GPATC3 | IVS1+138G>T | Exon1  | -       | SNP,rs1158421  |
| TCEA3  | IVS1-122C>A | 5'UTR  | -       | SNP,未见报道       |
|        | IVS5-22C>A  | intron | -       | SNP,rs1198423  |
|        | c.980G>A    | Exon10 | p.S327N | SNP,rs11341961 |
|        | IVS10+34T>C | intron | -       | SNP,rs605468   |

## 讨 论

BFIC是一种良性遗传性癫痫综合征,呈常染色体显性遗传的单基因遗传病,其临床特征是<sup>[6]</sup>:新生儿期出现的、可自行消失的、预后良好的无热性癫痫发作;发作间期脑电图正常;血生化及神经影像学检查正常;患儿精神运动发育一般不受影响。研究发现BFIC具有遗传异质性,于1997、2001、2012年定位了3个BFIC致病基因位点:分别为19q12~13.1(BFIC1)<sup>[2]</sup>、16p12~q12(BFIC2)<sup>[3]</sup>及2q24(BFIC3)<sup>[4]</sup>、1p(BFIC4)<sup>[5]</sup>目前尚未克隆。国内有学者在对一BFIC家系研究中排除了BFIC致病基因与19q连锁的可能<sup>[7]</sup>,提示可能存在新的致病基因位点。Malacarne

等<sup>[4]</sup>对新发现的意大利BFIC家系进行了连锁分析,结果发现其中4个小家系与2q存在连锁关系,将BFIC疾病基因定位于2q24,同时排除了另外4个小家系与2q的连锁关系。Zhou等<sup>[1]</sup>对一遗传4代的BFIC家系进行连锁分析,结果排除了与19q12~13.1、16p12~q12、2q24存在连锁关系可能,但不排除与20q13.3存在连锁关系可能。

良性婴儿惊厥还包括良性家族性新生儿惊厥(benign familial neonatal convulsions, BFNC)和良性家族性新生儿-婴儿癫痫综合征(benign familial neonatal-infantile seizures, BFNIS)。BFNC是新生儿期出现的、24个月之内可自行消失的一种良性癫痫综合征,其临床表现与BFIC十分相似,发病年龄亦有重叠,说明BFNC的致病基因也可能与BFIC的发病有关。离子通道功能障碍为其提供了生物学方面的病因<sup>[8]</sup>,目前研究已发现分别位于20q13.3及8q24的钾离子通道基因KCNQ2和KCNQ3是BFNC的致病基因<sup>[9]</sup>,Yum等<sup>[10]</sup>对一BFNC家系研究中发现KCNQ2为致病基因。Zhou等<sup>[11]</sup>于2006年在对我国一BFIC家系进行致病基因位点连锁分析和候选基因KCNQ2突变分析中发现KCNQ2与部分BFIC的发病有关,但也有研究者在BFIC家系中对BFNC的致病基因进行连锁分析或进行了KCNQ2及KCNQ3基因突变检测,均未有异常发现。

BFNIS为2d至4个月开始发病、介于BFNC和BFIC之间的一种变异型特发性癫痫综合征。近年来研究表明CACNA1A基因、ATP1A2基因、SCN2A基因等基因突变的患者癫痫的概率明显增加<sup>[12]</sup>。然而2007年Herlenius等<sup>[13]</sup>在对2个BFNIS大家系的研究中均未发现SCN2A存在基因突变,而Vecchi等<sup>[14]</sup>通过对一同时患有Dravet综合征及BFNIS的患者研究中发现,在位于染色体2q23、3q24.3上的SCN2A存在致病基因突变可能。2006年Striano等<sup>[15]</sup>在1个典型的BFIC家系中,对SCN2A基因进行突变检测,发现一个新的致病突变(T3003A),提示BFNIS与BFIC存在一定程度的遗传共性。

5个候选基因的生物学信息如下:(1)TAF12基因;即TAF12 RNA聚合酶II,TATA盒聚合体成分之一,位于染色体1p35.3上,由6个外显子和5个内含子组成,CDS全长为486bp,编码162个氨基酸,其在基因调控方面发挥重要作用。含RNA聚合酶II的蛋白形成多聚体,被位于转录起始部位附近的反式作用因子蛋白所调控,这些调控因子中有些直接与TATA盒聚合体结合,有些则成为一种连接反式作用因子到起始转录因子的桥连蛋白。这些转录因子有些与在TIFIID聚合体中的TBP(TATA box binding protein)紧密结合,

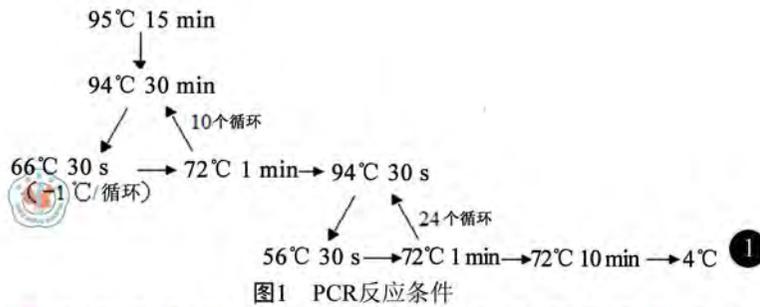


图1 PCR反应条件

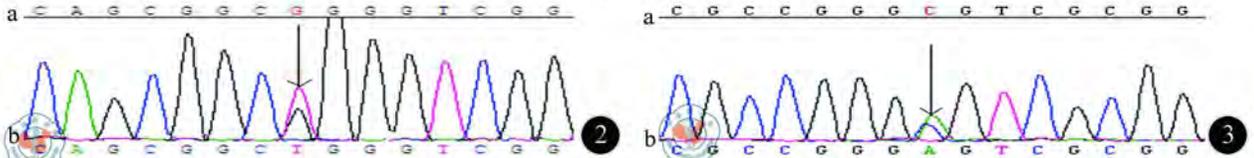


图2 GPATC3基因IVS1+138G>T: a: 正常序列; b: 变异序列 图3 TCEA3基因IVS1-122C>A: a: 正常序列;

b: 变异序列

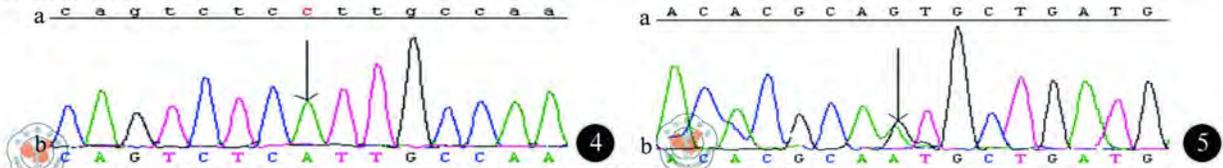


图4 TCEA3基因IVS5-22C>A: a: 正常序列; b: 变异序列 图5 TCEA3基因c.980G>A: a: 正常序列; b: 变异序列

变异序列

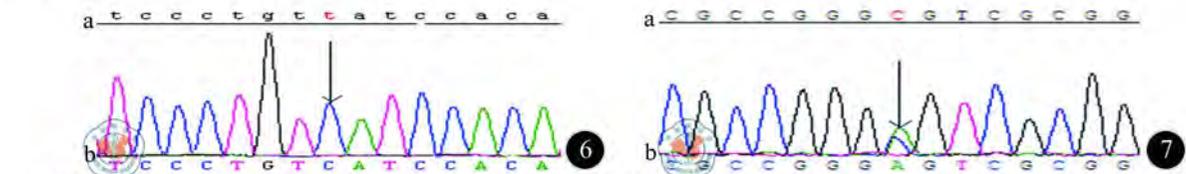


图6 TCEA3基因IVS10+34T>C: a: 正常序列; b: 变异序列 图7 TCEA3基因IVS1-122C>A: a: 正常序列;

b: 另一正常人变异序列

有些结合则较疏松。位于 TIF II D 聚合体最末端的为 TAF 蛋白体,在对果蝇细胞、HeLa 细胞的研究中发现了 TIF II D 复合物中 TAFs 的组件特点。已经预测,不同的 TAFs 具有调节多种基因启动子和 RNA 聚合酶的转录激活功能。Schmitz 等<sup>[16]</sup> 研究发现, TAF12 与 Gadd45a 蛋白结合导致 rDNA 甲基化发生,通过敲除 TAF12 基因可减少某些疾病的发生。

(2) SESN2 基因:位于染色体 1p35.3 上,由 10 个外显子和 9 个内含子组成, CDS 编码全长为 1443 bp, 编码 481 个氨基酸。此基因编码 sestrin 家族,在调控细胞生长和存活方面发挥重要作用。Cano 等<sup>[17]</sup> 发现通过抑制 SESN2 基因表达可促进肿瘤抑制因子 p53 发挥作用。Liu 等<sup>[18]</sup> 研究发现 SESN2 基因不仅可导致氧化应激发生,还可增加恶性胶质瘤细胞(U87 细胞)对电离放射的敏感性,从而增强放射治疗的效果,同时 SESN2 基因还可增强血小板生长因子 β 受体(PDGFRβ)的表达,从而保护细胞。

(3) SFN 基因:即层状蛋白基因,位于染色体 1p36.11 上,由 1 个外显子组成, CDS 编码全长为

747 bp, 编码 249 个氨基酸。层状蛋白基因是由 7 种亚基所组成的一种高度保守蛋白,在细胞循环周期、细胞凋亡、细胞信号传导、蛋白折叠、细胞增殖及分化等方面发挥重要作用。层状蛋白在表皮分化和细胞周期终止的调节时高度表达。Medina 等<sup>[19]</sup> 发现,在细胞角化过程中,此基因发挥了不可或缺的作用,而且在皮肤纤维细胞中导致 MMP-1、MMP-3、MMP-8 过度表达。

(4) GPATC3 基因:位于染色体 1p36.11 上,由 7 个外显子和 6 个内含子组成, CDS 编码全长 996 bp, 编码 331 个氨基酸。此基因主要调节内质网和线粒体与细胞外基质之间的蛋白质物质转运,该蛋白在各系统中广泛表达,神经系统中表达亦较丰富。神经系统通过突触传递神经递质而实现其功能,突触囊泡位于突触前隙中,主要贮存和释放神经递质或调质,此基因可上调或减弱突触囊泡中神经递质或神经调质的释放。

(5) TCEA3 基因:即转录延伸因子 A3 (SII) 基因,位于染色体 1p36.12 上,由 11 个外显子和 10 个内含子组成, CDS 编码全长 1047 bp, 编码 349 个氨基酸。研究发现通过克隆编码人类第三个 TF II S 亚基(TCEA3)

的 cDNA,发现这个亚基可以限制组织基因的表达,同时第一个亚基(TCEA1)与 RNA 聚合酶 II 结合可促进核酸酶活性而影响蛋白质复制及转录。

本研究中共发现 5 个 SNP,其中 4 个为已经报道过的 SNP,1 个为我们在中国人家系中首次发现的未报道 SNP,这对研究各个体间的遗传差异,为人种进化及种族差异研究提供了依据,同时对进一步研究特发性癫痫的分子病理机制及开发新的抗癫痫药物有重要意义。

#### 参 考 文 献

- [1] Zhou XH, Ma AQ, Liu XH, et al. Linkage analysis and gene mapping of one Chinese family with benign familial infantile convulsions. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2010, 12:89-92.
- [2] Guipponi M, Rivier F, Vigeveno F, et al. Linkage mapping of benign familial infantile convulsions (BFIC) to chromosome 19q. *Hum Mol Genet*, 1997, 6:473-477.
- [3] Caraballo R, Pavak S, Lemainque A, et al. Linkage of benign familial infantile convulsions to chromosome 16p12-q12 suggests allelism to the infantile convulsions and choreoathetosis syndrome. *Am J Hum Genet*, 2001, 68:788-794.
- [4] Malacarne M, Gennaro E, Madia F, et al. Benign familial infantile convulsions: mapping of a novel locus on chromosome 2q24 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*, 2001, 68:1521-1526.
- [5] Ono S, Yoshiura K, Kinoshita A, et al. Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions. *J Hum Genet*, 2012, 57:338-341.
- [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. *Epilepsia*, 2001, 42:796-803.
- [7] Tang B, Li H, Xia K, et al. A novel mutation in KCNQ2 gene causes benign familial neonatal convulsions in a Chinese family. *J Neurol Sci*, 2004, 221:31-34.
- [8] Berkovic SF, Mulley JC, Scheffer IE, et al. Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends Neurosci*, 2006, 29:391-397.
- [9] Singh NA, Westenskow P, Charlier C, et al. KCNQ2 and KCNQ3 Potassium Channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain*, 2003, 126:2726-2737.
- [10] Yum MS, Ko TS, Yoo HW. The first Korean case of KCNQ2 mutation in a family with benign familial neonatal convulsions. *J Korean Med Sci*, 2010, 25:324-326.
- [11] Zhou XH, Ma AQ, Liu XH, et al. A novel mutation in KCNQ2 gene causes benign familial infantile convulsions (BFIC) in a Chinese family. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2006, 44:487-491.
- [12] Deprez L, Weckhuysen S, Peeters K, et al. Epilepsy as part of the phenotype associated with ATP1A2 mutations. *Epilepsia*, 2008, 49:500-508.
- [13] Herlenius E, Heron SE, Grinton BE, et al. SCN2A mutations and benign familial neonatal-infantile seizures: the phenotypic spectrum. *Epilepsia*, 2007, 48:1138-1142.
- [14] Vecchi M, Cassina M, Casarin A, et al. Infantile epilepsy associated with Mosaic 2q24 duplication including SCN2A and SCN3A. *Seizure*, 2011, 20:813-816.
- [15] Striano P, Bordo L, Lispi ML, et al. A novel SCN2A mutation in family with benign familial infantile seizures. *Epilepsia*, 2006, 47:218-220.
- [16] Schmitz KM, Schmitt N, Hoffmann-Rohrer U, et al. TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Mol Cell*, 2009, 33:344-353.
- [17] Cano CE, Gommeaux J, Pietri S, et al. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function. *Cancer Res*, 2009, 69:219-226.
- [18] Liu SY, Lee YJ, Lee TC. Association of platelet-derived growth factor receptor $\beta$  accumulation with increased oxidative stress and cellular injury in sestrin 2 silenced human glioblastoma cells. *FEBS Lett*, 2011, 585:1853-1858.
- [19] Medina A, Ghaffari A, Kilani RT, et al. The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Mol Cell Biochem*, 2007, 305:255-264.

(收稿日期:2012-06-04)

(本文编辑:戚红丹)

向入平, 资晓宏, 余辉云, 等. 新的良性家族性婴儿惊厥候选基因的突变筛查[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(1):120-124.