

针对青少年黄斑变性致病基因的筛查

基于华大智造MGISEQ-2000测序平台实现37个新型ABCA4突变位点的鉴定

复旦大学医学院眼科与五官科医院眼科研究所的科研人员基于多年的研究积累，利用靶向外显子测序技术，基于华大智造MGISEQ-2000测序平台，在中国Stargardt病患者中发现了37个新型的ABCA4基因突变，并明确了该基因的突变频率和突变位点。

相关成果已于2019年发表在*Frontiers in Genetics*杂志，题为 *ABCA4 Gene Screening in a Chinese Cohort With Stargardt Disease: Identification of 37 Novel Variants*¹。

推荐应用：疾病组学(复杂疾病)

推荐机型：MGISEQ-2000RS

• 遗传病的快速检测与鉴定

MGISEQ-2000平台能够支撑遗传病的快速检测、变异位点的鉴定进而绘制更精细的突变图谱。

• 适配自动化建库设备

华大智造的自动化提取、建库设备能够极大的节约「大样本量实验」的人工成本并提升效率。



背景介绍

Stargardt 病 (STGD1, OMIM 248200), 也被称为青少年黄斑变性, 是一种遗传性黄斑营养不良。患者在青少年初期会出现双侧或连续的中枢性视力丧失的现象^{2, 3}。STGD1 是儿童黄斑营养不良最主要的原因之一, 约占视网膜营养不良患者的 7%, 发病率为 1:10 000。

STGD1 患者的眼底通常有黄斑病变的症状, 并有脂褐素在视网膜色素上皮细胞 (RPE) 中大量沉积, 导致 RPE 萎缩以及感光细胞死亡, 最终导致人失明¹。STGD1 是一种常染色体隐性遗传病, 患者的 ATP 结合盒亚家族 A 成员 4 (**ABCA4**) 基因发生了突变⁴。

ABCA4 (OMIM 601691) 位于染色体 1p22.1, 包含 50 个外显子并特异表达于视网膜感光细胞, 在维生素 A 的中间代谢物 N-视黄烷-磷脂乙醇胺 (NRPE) 的运输中起作用, **ABCA4** 可将 NRPE 从光感受器外段运输至细胞质, 因此 **ABCA4** 有助于感光细胞中毒性视网膜磷脂化合物的清除, 其功能的失活会导致感光细胞的变性^{5, 6}。**ABCA4** 的突变会导致 STGD1, 视网膜色素变性 (RP), 锥杆细胞营养不良 (CRD) 以及视网膜营养不良等疾病⁷。但就现有的研究成果表明, **ABCA4** 是唯一与 STGD1 相关的致病基因。目前, **ABCA4** 上已发现大概 1200 种突变类型, 其中近 900 种突变类型与 STGD1 有关联, 且大部分为错义突变。在不同的 STGD1 患者群体中, 检出至少一个 **ABCA4** 突变的概率为 70%~90%⁸。研究表明 **ABCA4** 基因的突变具有种族特异性, 如 c.2588G > C 在西欧人群中发生较多, p.Y808* 在中国群体中发生较多, c.5714+5G > A 在希腊人中发生较多等¹。

研究描述

为了确定中国队列 STGD1 患者的 **ABCA4** 基因的突变谱和突变频率，复旦大学医学院眼科与五官科医院眼科研究所的科研人员基于一个中国 STGD1 患者队列，在华大智造 DNBSEQ 测序平台上进行了 **ABCA4** 基因靶向外显子测序，发现了 37 个与 STGD1 病相关的新型 **ABCA4** 突变位点，拓展了 **ABCA4** 基因的突变谱，确定了华东地区 STGD1 患者的普遍 **ABCA4** 基因突变位点，并且发现了一个新生突变 c.4561delA。

实验方法

样本收集和 DNA 提取

该团队于2016至2018年在复旦大学眼科与耳鼻喉医院收集了153例志愿者的外周血样本, 包括25个家系 (25个原发病患及其亲属) 和71个散发病例。利用 DNA 提取试剂盒提取其基因组DNA, 利用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性，并将其保存在 -20℃用于后续分析。

靶向外显子文库制备与测序

该研究设计了覆盖792个常见的遗传性眼病基因外显子和非编码区 (UTRs) 的Target_Eye_792_V2 芯片。靶向外显子文库制备流程如下: 先将基因组 DNA 片段化，利用 Agilent SureSelect Target Enrichment 试剂盒对外显子，侧翼内含子，启动子区域进行捕获，富集到的靶向外显子文库在制备成DNA纳米球 (DNB) 后，加载至MGISEQ-2000 基因测序仪上完成测序流程。在样本量较大的情况下，华大智造提供的自动化提取、建库技术能够极大的节约人工成本并提高效率。

遗传分析

利用 Burrows-Wheeler Aligner (BWA, <http://bio-bwa.sourceforge.net/>) 将测序数据比对到人类参考基因组 (hg38) 上，所鉴定的突变体均用下述四个数据库进行标注释义: 1,000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org/>), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), ESP6500 (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) 以及 ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>)。

选出具有较小等位基因频率 (MAF) 的突变体以搜寻可能有害的突变 (MAF < 0.1%)。利用下述三个网站工具预测潜在的有害突变: Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT, <http://sift.jcvi.org/>)、Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、MutationTaster software (<http://www.mutationtaster.org/>)。剩下的突变则根据它们潜在的有害性，基因型关系，突变相关报道，利用 ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)、HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) 以及 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, <http://www.omim.org/>) 优先选择出来。根据美国医学遗传学学院 (ACMG) 以及基因组指南，这些突变被分为有害的、可能有害的、不确定是否有害的、可能会发生的和已发生的这几种类型，此外，Sanger 测序技术在本研究中也发挥了巨大的作用。

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
153例志愿者的外周血样本, 包括25个家系 (25个原发病患及其亲属) 和71个散发病例。	Agilent SureSelect Target Enrichment 试剂盒  MGISEQ-2000 基因测序仪	BWA SIFT PolyPhen-2 MutationTaster ClinVar HGMD OMIM	统计 ABCA4 的变异检出率 总结 ABCA4 突变类型 甄别 ABCA4 的新突变

仅供研究使用，不适用于临床诊断

结果分析

临床研究结果

该团队对 153 个志愿者（包括 25 个家庭及他们的亲属，71 个散发病例）进行采样，其平均年龄为 33 岁，且 87% 的志愿者来自于华东地区（如图 1），其中 101 个为确诊病例。

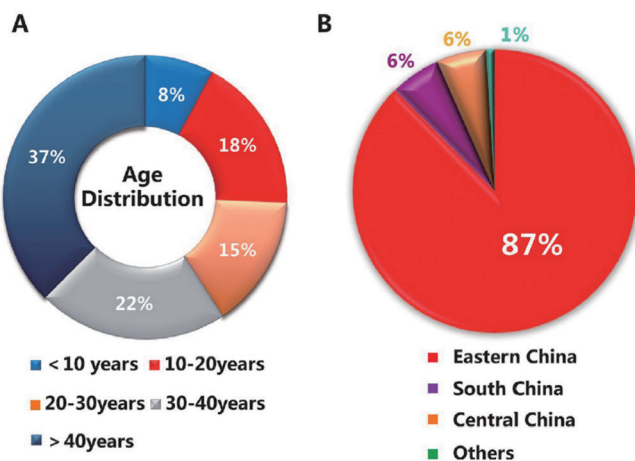


图1. 本研究中153名受试者的基本信息
(A)受试者的年龄分布。(B)受试者的地理分布

ABCA4 的变异检出率

本研究利用靶向外显子测序技术对 153 例志愿者进行遗传筛查，发现 129 名患者的 *ABCA4* 基因发生了突变，总变异检出率为 84.3%：其中发生 2 个或者 3 个等位基因突变的占 56.2%，一个等位基因突变的占 28.1%，未发生突变的占 15.7%，另外以家庭为单位的病例和散发病例中的突变检出率分别为 87.8% 和 80.3%（如表 1）。在 25 个家庭中的 25 个原发病患中，只有 1 个病例发生了 3 个等位基因突变，有 28 个病例发生了 2 个等位基因突变，还有 1 个病例没有发生突变；在散发病例中，有 80.3% 的病例具有可能有害的 *ABCA4* 突变。此结果与先前的研究一致，大部分的 STGD1 患者携带复杂的杂合突变。

遗传分析

本研究发现了 96 种 *ABCA4* 基因突变，其中包括 37 个新突变以及 59 个已知突变，它们分布在 *ABCA4* 的 50 个外显子中，在外显子 3 和 13 中各有 6 个不同的突变，在外显子 8, 22, 23 以及 35 中各有 4 个不同的突变，在剩下的 29 个外显子中各有 1~3 个不同的突变。*ABCA4* 蛋白有 6 个功能结构域，这些突变主要分布在跨膜结构域 1 (TMD1)、核苷酸结合域 1 和域 2 (NBD1 和 NBD2)（如图 2）。

Variance per cases	Families (no./percentage)	Sporadic cases (no./percentage)	Total cases (no./percentage)
3	1/1.2	2/2.8	3/2.0
2	28/34.2	55/77.5	83/54.2
1	43/52.4	0/0	43/28.1
0	10/12.2	14/19.7	24/15.7
	82/100	71/100	153/100

表1.本研究中*ABCA4*的变异检出率

这 96 种 *ABCA4* 基因突变包括错义突变 (64%), 无义突变 (6%), 剪接突变 (6%), 移码突变 (12%), 小片段插入或删除突变 (2%), 并且这些突变里有 38 个有害突变 (39.5%), 26 个可能有害的突变 (27.1%), 以及 32 个不确定是否有害的突变 (33.4%), 其中不确定是否有害的突变大部分为新的突变。这 64 个有害 / 可能有害的突变也包括错义突变 (53%), 剪接突变 (19%), 移码突变 (17%), 无义突变 (9%), 以及小片段缺失突变 (2%) (如图 3A)。本研究在 153 名志愿者中发现了 10 种普遍的 *ABCA4* 基因突变位点 (如表 2), 这 10 种普遍的突变位点均为有害突变, 且主要是错义突变。三个最普遍的突变是 c.101_106delCTTTAT p.Ser34_Leu35del (等位基因频率是 10.5%), c.2894A > G p.Asn965Ser (6.5%) 和 c.6563T > C p.Phe2188Ser (4.6%)。

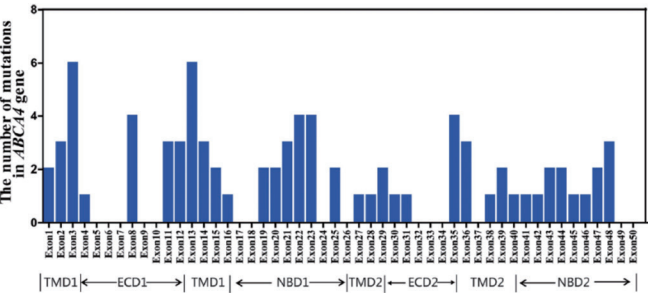


图2. 本研究中鉴定的*ABCA4*基因突变位点的分布及频率

Gene	Nucleotide change	Amino acid change	Clinical significance ¹	Allele frequency
<i>ABCA4</i>	c.101_106 delCTTTAT	p.(Ser34_Leu35del)	Pathogenic	10.5%
<i>ABCA4</i>	c.2894A>G	p.(Asn965Ser)	Pathogenic	6.5%
<i>ABCA4</i>	c.6563T>C	p.(Phe2188Ser)	Pathogenic	4.6%
<i>ABCA4</i>	c.1819G>A	p.(Gly607Arg)	Pathogenic	3.3%
<i>ABCA4</i>	c.1006delTT ²	p.(Ser336Profs*38)	Pathogenic	3.3%
<i>ABCA4</i>	c.5761G>A	p.(Val1921Met)	Pathogenic	2.6%
<i>ABCA4</i>	c.1804C>T	p.(Arg602Trp)	Pathogenic	2.6%
<i>ABCA4</i>	c.6282+1G>A	p.?	Pathogenic	2.6%
<i>ABCA4</i>	c.6389T>A	p.(Met2130Lys)	Pathogenic	2.6%
<i>ABCA4</i>	c.1561delG	p.(Val521Serfs*47)	Pathogenic	2.6%

表2. 153名志愿者中10种普遍的*ABCA4*基因突变位点

ABCA4 基因的新突变

在本研究中共鉴定到了 37 个新型 *ABCA4* 基因突变, 包括错义突变 (15/37, 40%), 移码突变 (8/37, 22%), 剪接突变 (7/37, 19%), 无义突变 (6/37, 16%) 以及小片段插入突变 (1/37, 3%) (如图 3B)。

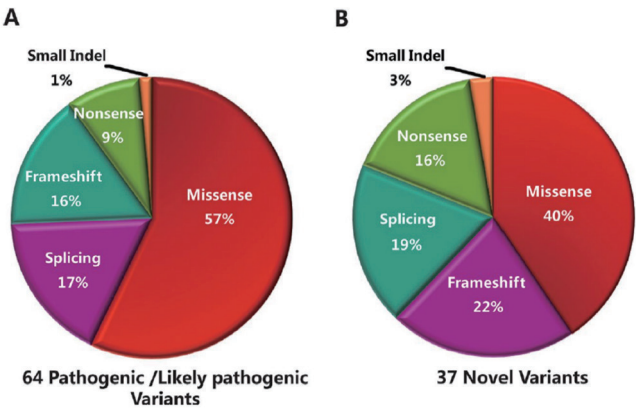


图3. *abca4*突变体突变位点的遗传分析

总结

本研究确定了中国人的 **ABCA4** 突变谱，并确定了总变异检出率为 84.3%；还发现了 37 个新型 STGD1 相关的变异，拓展了 **ABCA4** 的突变谱；同时发现了一个新的杂合子突变体 c.4561delA。对 STGD1 患者进行基因检测能够让临床诊断更精确，而本研究拓展了中国人群的 **ABCA4** 突变谱，这也使得 STGD1 患者能够更好地进行遗传筛查。

本研究基于华大智造自主研发的 MGISEQ-2000 测序平台，利用靶向外显子捕获技术对 **ABCA4** 基因进行测序。MGISEQ-2000 测序仪是一款综合、灵活、具备一定生产规模的测序仪。能够满足科研、医学临床、司法和农业等领域的测序应用需求和数据分析。



基因测序仪 MGISEQ-2000RS

参考文献

1. Hu, F. Y. *et al.* **ABCA4** Gene Screening in a Chinese Cohort With Stargardt Disease: Identification of 37 Novel Variants. *Frontiers in genetics* 10,773, doi: 10.3389/fgene.2019.00773 (2019).
2. North, V., Gelman, R. & Tsang, S. H. Juvenile-onset macular degeneration and allied disorders. *Developments in ophthalmology* 53, 44-52,doi: 10.1159/000357293 (2014).
3. Tanna, P., Strauss, R. W., Fujinami, K. & Michaelides, M. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *The British journal of ophthalmology* 101, 25-30, doi:10.1136/bjophthalmol-2016-308823 (2017).
4. Allikmets, R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nature genetics* 17, 122, doi:10.1038/ng0997-122a (1997).
5. Molday, R. S. ATP-binding cassette transporter ABCA4: molecular properties and role in vision and macular degeneration. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 39, 507-517,doi:10.1007/s10863-007-9118-6 (2007).
6. Molday, R. S., Zhong, M. & Quazi, F. The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 573-583, doi:10.1016/j.bbalip.2009.02.004 (2009).
7. Singh, H. P., Jalali, S., Hejtmancik, J. F. & Kannabiran, C. Homozygous null mutations in the **ABCA4** gene in two families with autosomal recessive retinal dystrophy. *American journal of ophthalmology* 141, 906-913, doi:10.1016/j.ajo.2005.12.009 (2006).
8. Smaragda, K. *et al.* Mutation Spectrum of the **ABCA4** Gene in a Greek Cohort with Stargardt Disease: Identification of Novel Mutations and Evidence of Three Prevalent Mutated Alleles. *Journal of ophthalmology* 2018, 5706142,doi:10.1155/2018/5706142 (2018).

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪 MGISEQ-2000RS	900-000035-00
	MGISP-100RS 自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-960RS 自动化样本制备系统	900-000100-00
软件	MegaBOLT 生信分析加速器(工作站式服务器)	970-000085-00
建库试剂	MGIEasy 环化模块 V2.0 (16 RXN)	1000005260
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100)	1000012554

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋



4000-688-114



www.mgi-tech.com



MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明: 本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有, 未经本公司书面许可, 任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本: 2023年2月版

撰稿: 张含菲 钟琦慧

责任编辑: 王其伟

审稿: 江遥