

• 临床研究 •

# 中国人非综合征型学语前聋患者 Taperin 基因突变筛查研究\*

汪芹<sup>1</sup> 聂智樱<sup>1</sup> 丁艳<sup>1</sup> 卿洁<sup>1</sup> 赖若沙<sup>1</sup> 谢鼎华<sup>1</sup> 胡鹏<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:应用耳聋基因芯片联合 DNA 测序法对 134 例非综合征型聋患者进行静纤毛表达的 Taperin 基因的突变检测,分析该基因在中国人遗传性聋患者中的突变率及类型特点。方法:采集 134 例非综合征型聋患者和 100 例听力正常者的外周血,提取基因组 DNA。用遗传性耳聋基因芯片排除常见的 4 个致聋基因突变患者,对未携带或仅带有单个杂合 GJB2 或 SLC26A4 突变的患者应用 PCR-DNA 测序法对 Taperin 基因序列进行测定,分析有无突变。结果:在 134 例非综合征型聋患者组中,基因芯片方法排除出 19 个患者携带常见致聋基因突变;剩下 115 例患者应用 DNA 测序法对 Taperin 基因进一步检测,结果在 2 例患者中发现 A187S 杂合突变。经同源性分析,A187S 发生在保守的氨基酸残基。在家族成员中也检出携带了上述突变的杂合子。此外,在患者和对照组中发现 2 种多态 157C>T 和 318C>T。结论:在中国人非综合征型聋患者中发现 Taperin 基因 1 种新突变 A187S,可能与耳聋有关。还在中国人中发现 Taperin 基因的 2 种多态 157C>T 和 318C>T。在中国人非综合征型耳聋患者中 Taperin 基因的突变携带率约为 1.74%。

**[关键词]** 基因;静纤毛;突变;耳聋,遗传性  
**doi:**10.13201/j.issn.1001-1781.2014.10.002  
**[中图分类号]** R764.43 **[文献标志码]** A

## Mutation screening in Taperin gene in Chinese with prelingual nonsyndromic hearing impairment

WANG Qin NIE Zhiying DING Yan QING Jie LAI Ruosha XIE Dinghua HU Peng  
(Department of Otorhinolaryngology, the Second Hospital of Xiangya, Central South University, Changsha, 410011, China)

Corresponding author: HU Peng, E-mail: hupeng726@yahoo.com

**Abstract Objective:** To screen and identify the frequency and characteristic of mutation in stereocilium-related gene Taperin of Chinese prelingual nonsyndromic hearing impairment with DNA microarray combined with PCR. **Method:** One hundred and thirty-four patients of prelingual nonsyndromic deafness and one hundred health individuals in China were investigated in this study. Genomic DNA was extracted from the patients and was subjected to DNA microarray to screen mutations in 4 most common genes. The samples that carried none of the common mutant alleles were subjected to PCR and sequenced to detect mutations in Taperin gene. **Result:** Nineteen out of one hundred and thirty-four patients of prelingual nonsyndromic deafness were detected carrying common deafness gene with DNA microarray. Taperin gene were detected in one hundred and fifteen patients with PCR. A187S was detected in Taperin as heterozygous state in 2 patients and their unaffected members of their family. It occurred at the evolutionary conservation of the amino acids of taperin according to alignment analysis. Two polymorphism, 157C>T and 318C>T, were found in the patients and the control group. **Conclusion:** A novel Taperin mutation, A187S was detected in Chinese patients with prelingual nonsyndromic hearing loss, which may be relevant to hearing loss. Two polymorphism, 157C>T and 318C>T, were found in Chinese in our research. The carrier frequency for Taperin mutation is about 1.74% of prelingual nonsyndromic deafness in Chinese patients.

**Key words** gene; stereocilium; mutation; hearing loss, hereditary

21 世纪以来耳聋的遗传学研究取得了很大的

进展,人类基因组计划的实施使得大量耳聋相关基因被定位克隆。Taperin 是表达在毛细胞静纤毛上的一种蛋白。Rehman 等<sup>[1]</sup>采用靶向基因捕获和碱基的序列分析确定了 Taperin 基因是常染色体隐性遗传性聋 79 型(DFNB79)的病因。目前已在荷兰、摩洛哥和巴基斯坦的几个家系中检出 Taperin 基因

\* 基金项目:国家自然科学基金(No:81100716);湖南省十一五期间人工耳蜗植入援助计划资助研究项目;国家重大科学研究计划资助(No:2012CB967900, No:2012CB967904)

<sup>1</sup>中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉科(长沙,410011)  
通信作者:胡鹏, E-mail: hupeng726@yahoo.com

突变,但其功能和致聋机制目前尚未明确<sup>[2]</sup>。我们对中国人非综合征型学语前聋患者进行了 Taperin 基因的突变筛查分析,以期了解该基因在我国的发病情况,并且进一步探讨其致聋机理。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

非综合征性学语前聋家系 22 个,每个家系中抽取先证者和家属中的部分患者,共 37 例,其中常染色体隐性遗传 32 例,显性遗传 5 例。另有散发患者 97 例,合计 134 例学语前聋患者。大部分病例来自湖南地区,少数来自浙江、湖北、江西等省。其中男 79 例,女 55 例;年龄 2~25 岁,均为感音神经性聋。耳聋分级<sup>[3]</sup>:语言频率平均听阈(听力级) 20~40 dB 为轻度聋,>40~70 dB 为中度聋,>70~95 dB 为重度聋,>95 dB 为极重度聋。其中中度聋 3 例,重度聋 36 例,极重度聋 95 例。所有研究对象行纯音测听或 ABR 检查,全身检查排除综合征性耳聋,耳科学检查排除其他致聋因素,如中耳炎、耳外伤、药物中毒性聋和梅尼埃病等。抽取外周静脉血 5 ml。从医学遗传学国家重点实验室 DNA 库中随机挑选健康中国成人 100 例的 gDNA 为对照组,男 60 例,女 40 例。年龄 18~60 岁;均接受全身检查及耳科检查排除耳科疾病。

### 1.2 方法

gDNA 提取:用含枸橼酸钠抗凝剂的采血管采集受检者外周血 5 ml,应用试剂盒(北京天根生物工程技术有限公司)提取 gDNA。经紫外分光光度计进行定量和纯度检测后,gDNA 保存于-20℃备用。

基因芯片检测:应用耳聋基因芯片(北京博奥生物有限公司)进行遗传性聋基因突变热点检测。操作按试剂盒说明书进行。该耳聋基因芯片可检测 4 个国人中常见的致聋基因的 9 个热点突变,包括 GJB2 (35delG, 176del16bp, 235delC 及 299delAT)、GJB3 (538C>T)、SLC26A4 (IVS7-2A>G 及 2168A>G) 和线粒体 DNA12SrRNA (1494C>T 及 1555A>G)。134 例患者中有 19 例患者携带常见致聋基因上述 9 个热点突变,被排除出我们的下一步检测,而未携带 9 种突变的患者则接受 Taperin 基因测序分析。

引物设计与合成:Taperin 基因总共有 4 个外显子,需合成 6 对引物进行扩增。其中 1 号外显子较大,达到 1 725 bp,一次扩增困难。所以将其分为 1A、1B、1C 3 个片段进行扩增。1A 片段由于 GC 碱基含量高,扩增难度大,多次扩增均失败,后由 Esther Pohl 提供引物序列后扩增成功<sup>[4]</sup>。1 B、1C 片段及 2~4 号外显子的扩增引物采用 Primer3 软件设计。扩增片段包含外显子全长以及两端的部分剪接区(长约 20 bp),引物由华大基因生物科技有限公司合成,序列见表 1。

PCR 扩增:PCR 扩增待分析 DNA 靶序列。总反应体系均为 50  $\mu$ l。1 号外显子 C 片段、2~4 号外显子的反应体系:DNA 模板(20 mg/L)4  $\mu$ l,正反向引物(100 mg/L)各 2  $\mu$ l,2 $\times$ Taq Master-Mix 25  $\mu$ l,双蒸水加至 50  $\mu$ l。反应条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,(Tm-2)℃复性 30 s,72℃延伸 45 s,30 个循环,反应终止后再 72℃延伸 7 min,4℃保存。

1 号外显子 A、B 片段 PCR 反应体系:DNA 模板(20 mg/L)4  $\mu$ l,正反向引物(100 mg/L)各 2  $\mu$ l,TaKaRa hot start 酶 0.5  $\mu$ l,Buffer 25  $\mu$ l,10 mmol/L dNTP 8  $\mu$ l,DMSO 4  $\mu$ l,双蒸水加至 50  $\mu$ l。反应条件:96℃预变性 5 min,96℃变性 30 s,(Tm-2)℃复性 30 s,72℃延伸 45 s,32 个循环,反应终止后再 72℃延伸 7 min,4℃保存。

测序:以 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。经电泳检测产物片段大小符合,特异性好的,送南京金斯瑞测序公司纯化及测序。应用 DNASTar 软件中的 Seqman 软件及 Bioedit 软件将测序得到的结果与 NCBI 检索到的标准序列(Gene bank accession number: NG\_Q27801)进行对比分析。

## 2 结果

### 2.1 DNA 测序

134 例耳聋患者中有 2 例被检出携带 559G>T 杂合突变,突变的测序图见图 1。先证者 1,男,2 岁,从出生时即无明显听力,不能说简单的词语。先证者 2,女,4 岁,出生后无听力。双耳 ABR 100 dB 均未引出,双耳 ASSR117 dB 均未引出;纯音测听示极重度感音性耳聋;声导抗双耳为 A 型

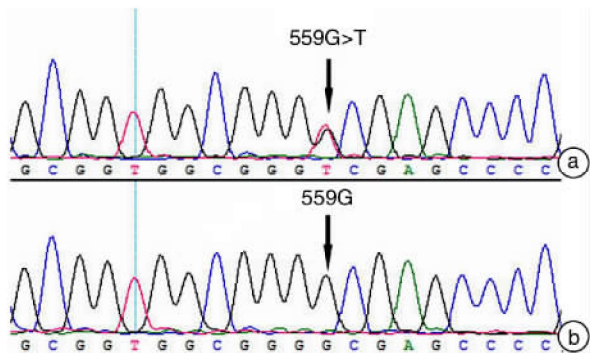
表 1 Taperin 基因 PCR 扩增引物

外显子	正向引物	反向引物	产物长度/bp	温度/℃
1A	AGCGGGCTTTCCCAATG	CTTGCTCTGGGGATGACC	1134	56
1B	GCTCTCCAACGGGCACTC	CCTCCGAGTCTACCTCATCG	734	60
1C	TGCTTCGGAAGAAGCTGAG	TCTGTGAGCTGTCACTCTCTCC	506	58
2	CCTCGTTACAGTACTCTCA	ATGCAGACGTGGACACAGAC	335	60
3	GTCTGTGTCCACGTCTGCAT	GGTGGGTGGGATACAGTGAG	410	60
4	GACTACTGCACCCGCTTCTG	TGGCATAGACGTGCAAACTG	536	60

图,CT 及 MRI 检查双侧中、内耳形态结构未见异常。2 例患儿家族均未见其他听力损失患者,其母孕期无药物使用及毒物接触史。另在患者和对照组中发现 2 种多态 157C>T 和 318C>T。

### 2.2 结果分析

根据氨基酸编码比对,559 G>T 的突变导致 187 位丙氨酸变为丝氨酸(A187S),为一新发现的突变。采用欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute, EBI)网站的蛋白质比对软件 CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)对人、小鼠、大鼠的 Taperin 蛋白序列进行同源性分析,突变 A187S 发生在保守的氨基酸残基(图 2)。此外,157C>T 和 318C>T 在 NCBI 的 SNP 数据库也没有检索到,为新发现的多态。



a: 杂合突变型; b: 野生型。

图 1 突变 559 G>T 正向测序图

### 2.3 统计分析

对患者的父母抽血后检测 A187S 在耳聋患者的检出率为 1.74%,2 例患者的父母有 1 例为该突变携带者,另 1 例则未发现突变。正常人群中 A187S 突变的检出率为 2%。

### 3 讨论

2010 年 Khan 等<sup>[2]</sup>在巴基斯坦发现一个遗传性

重度感音神经性聋家系,其致病基因定位于 9q34.3。Rehman 等<sup>[1]</sup>采用靶向基因捕获和序列分析法确定 Taperin 基因为导致 DFNB79 的病因。免疫组织化学检测显示:Taperin 蛋白在小鼠所有组织均有表达,具有多种剪接异构体,但其在 Corti 器和前庭的感觉上皮表达最高,特别是内毛细胞静纤毛的锥型区,并因此命名<sup>[3-4]</sup>。

毛细胞静纤毛分为毛顶、毛体和毛根 3 部分。毛顶和毛体为露出部分,毛根穿入表皮板。毛顶较粗,毛体基底部最细,形成锥型区<sup>[5]</sup>。静纤毛顶部彼此分开,但在中、下段有桥样结构相连,构成顶连接和侧连接<sup>[6]</sup>。静纤毛是使声波转化为动作电位的主要结构,不但直接参与毛细胞离子通道的开、闭及去极化过程,还参与毛细胞的频率选择特征及影响细胞的共振特性<sup>[6]</sup>。目前 Taperin 在内耳听觉形成中的作用目前已有一些研究。人体中至少有 70% 的蛋白被磷酸化,大多数蛋白被蛋白激酶和磷酸酶调节。Taperin 蛋白的一种异构体与蛋白磷酸酶 1 的高度保守区域结合,抑制磷酸酶的活性。Taperin 蛋白主要存在于细胞核内,但可以穿插于细胞核与细胞质之间,作为 PP1 的结合蛋白,Taperin 还在 DNA 损伤修复中起作用<sup>[7]</sup>。Rehman 等<sup>[1]</sup>发现 Taperin 与 Phostensin(I 型蛋白质磷酸水解酶调节蛋白)结构相似,基因部分序列有同源性,推测 Taperin 与静纤毛中肌动蛋白丝的尖端相互作用,调节肌动蛋白的运动功能,并参与静纤毛之间踝状连接的形成和维持。

目前 Taperin 基因突变导致的耳聋无特征性的临床表现,暂无特异性的临床诊断方法,其基因的检测将成为诊断 Taperin 基因突变致聋的唯一证据。Taperin 基因外显子较少,只有 4 个,适合进行 PCR 扩增后,采用 DNA 测序法进行基因突变检测。我们采用遗传性耳聋基因芯片排除以上 4 个常见致聋基因引起的耳聋患者后,对患者 DNA 样本进行 Taperin 基因测序,可以提高检测的效率。

Accession	Position	Sequence	Position	Sequence	Position	Sequence	Position	Sequence	Position
NP_001121700	157	PPPPPPPA	PP—RP	PPAAPSPPAA	PGPRGGASPG	<b>A</b> RRSDFLQKTGSNSFTVHPRGLHRGAGARLLS	222		
NP_780495	158	PALPQLPVA[15]	PASPVR[4]	PPISPVPVAQ[10]	PAHPDGTAGPG	<b>A</b> RRSDFLQKTGSNSFTVHPRGLPRSAVNRSLS	255		
NP_001019480	158	PALPQLPVA[15]	PAPPVLP[4]	PPISPVPVAQ[10]	PAHPDGTAGPG	<b>A</b> RRSDFLQKTGSNSFTVHPRGLPGSAVNRSLS	255		
XP_004048999	75	—————	———RP	PPAAPSLPAA	PGPRGGASPG	<b>A</b> RRSDFLQKTGSNSFTVHPRGLHRGTGARLLS	129		
XP_003911102	91	PPPPPPPP	PPAQRL	PPAAPSPPVA	PGPRGGASPG	<b>A</b> RRSDFLQKTGSNSFTVHPRGLHRGADAHLLS	159		

NP\_001121700:人 Taperin; NP\_780495:小鼠 Taperin; NP\_001019480:大鼠 Taperin; XP\_004048999:大猩猩 Taperin; XP\_003911102:狒狒 Taperin。

图 2 Taperin 同源性分析

Taperin 基因中 1 号外显子是突变热点区域,已报道的突变类型有 c. 1056G>A、11bp deletion (c. 42-52del)、1bp deletion (c. 1347delG) 等<sup>[1]</sup>。但是 1 号外显子富含 G-C 碱基对(约 75%),并且具有重复性,给 PCR 扩增及测序增加了难度。本研究中发现 2 个耳聋患者的 Taperin 基因 1 种突变,突变点均位于 1 号外显子,突变的检出率为 1.74%,比例较小,可能不是中国人耳聋突变的热点。并未发现国外已报道的突变类型,可能与种族差异有关。

氨基酸同源性分析发现,A187S 突变位于保守区域。所谓蛋白质的保守区域是指:蛋白质中的氨基酸片段,在进化过程中它们基本保持不变,在生物学中,这些序列高度相似,却来自不同物种或同一种生物体产生的不同分子物质。从跨种保留的角度看,这种序列意味着在不同物种的形成的进化过程中,存在一种特殊的基因序列被保留下来。保守序列的基因突变可能会导致生命体无法继续存活或被自然选择淘汰,故该突变可能与耳聋有关。但由于我们未发现纯合的突变体与耳聋共分离,还不能确定这种突变就是致聋突变。我们可进一步加大样本进行抽血检测,如对有多个患者的大家系进行连锁分析也许会有更深层次的发现,这对遗传性聋的防治和 Taperin 的结构及功能研究有重要的意义。

本研究发现中国人非综合征性聋患者中 Taperin 基因突变携带率约为 1.74%。Taperin 基因 1 号外显子是突变热点区域,适合 DNA 测序法检

测。本次研究发现的突变 A187S 可能与耳聋有关,但有待进一步研究证实。

#### 参考文献

- [1] REHMAN A U, MORELL R J, BELYANTSEVA I A, et al. Targeted capture and next-generation sequencing identifies C9orf75, encoding taperin, as the mutated gene in nonsyndromic deafness DFNB79 [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86: 378-388.
- [2] KHAN S Y, RIAZUDDIN S, SHAHZAD M, et al. DFNB79: reincarnation of a nonsyndromic deafness locus on chromosome 9q34. 3 [J]. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18: 125-129.
- [3] 王秋菊. 关于非综合征型遗传性聋家系遗传学及听力学描述术语建议案 [J]. *中华耳科学杂志*, 2003, (1): 46-47.
- [4] LI Y, POHL E, BOULOUIZ R, SCHRADERS M, et al. Mutations in TPRN cause a progressive form of autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86: 479-484.
- [5] TILNEY L G, DEROSIER D J, MULROY M J. The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells [J]. *J Cell Biol*, 1980, 86: 244-259.
- [6] VOLLRATH M A, KWAN K Y, COREY D P. The micromachinery of mechanotransduction in hair cells [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2007, 30: 339-365.
- [7] FERRAR T, CHAMOUSSET D, DE WEVER V, et al. Taperin (c9orf75), a mutated gene in nonsyndromic deafness, encodes a vertebrate specific, nuclear localized protein phosphatase one alpha (PP1 $\alpha$ ) docking protein [J]. *Biol Open*, 2012, 15: 128-139.

(收稿日期:2013-10-28)

## 北京大学人民医院第 21 期鼻内镜微创外科培训班通知

由卫生部批准的国家级继续教育项目“第 21 期鼻内镜微创外科培训班”将于 2014 年 8 月 21 日—8 月 25 日在北京如期举行(项目编号 2014-07-01-171(国),国家级继续教育学分 8 分)。主要培训内容:鼻腔鼻窦解剖及影像学,鼻内镜外科手术操作技巧、围手术期处理,鼻内镜在鼻-鼻窦炎以及鼻眼、鼻颅底和鼻腔鼻窦肿瘤方面的应用,鼻内镜微创外科技术新进展,鼻-鼻窦炎和变应性鼻炎规范诊治,国内知名专家专题讲座,一对一尸头解剖训练,手术示教等。鼻科学乃我院传统优势学科,此培训项目已连续举办 20 期,学员遍布全国,深受好评,许多学员经过培训已经成为所在医院的学术骨干,欢迎有一定鼻内镜外科基础的国内同道参加,学习期满合格者,授予 I 类继教学分,本期拟招收学员 40 人,因名额有限,尸头标本紧张,请报名者从速。培训费:2500 元/每人(含解剖、资料费),800 元/人(不参加解剖)。外地来京学员可安排食宿(费用自理)。

地址:北京大学人民医院耳鼻咽喉科(北京市西直门南大街 11 号,邮政编码 100044)。联系电话:(010) 66583750(66583751, 66583754) 13661025303(电话或短信)Email:szuchi1228@hotmail.com, happytudi@163.com,联系人:邵森垚、王思祁、王旻报名方式:需要学分证的学员,必须网上报名注册。注册网址:http://jjgl.bjmu.edu.cn(项目报名→鼻窦内镜微创外科学习班),可电话或 Email 索取纸板通知。