



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108642174 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 05

(21) 申请号 201810780632.2

(22) 申请日 2018.07.17

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108642174 A

(43) 申请公布日 2018.10.12

(73) 专利权人 大连医科大学附属第一医院  
地址 116011 辽宁省大连市西岗区中山路  
222号

(72) 发明人 刘晶 王亮 辛成齐 马静云

(74) 专利代理机构 大连东方专利代理有限责任  
公司 21212

代理人 刘慧娟 李馨

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106282349 A, 2017.01.04

Artemis D Gika等. White matter abnormalities and dystonic motor disorder associated with mutations in the SLC16A2 gene.《Dev Med Child Neurol》.2010,第52卷(第5期),第475-482页.

Marjolein H Willemsen等. Involvement of the kinesin family members KIF4A and KIF5C in intellectual disability and synaptic function.《J MED Genet》.2014,第51卷第487-494页.

审查员 刘远

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

一组神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍致病基因集合及其检测引物和试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一组神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍致病基因集合及其检测引物和试剂盒。本发明方法是通过全基因组测序和新一代光学图谱技术相结合的策略确定的SLC16A2、KIF4A、MED15和FAM83G的突变位点以及5个结构变异基因(CT55、DTX2P1-UPK3BP1-PMS2P11、EBF2、FAM173B和TMTTC1)。本发明获得神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍的致病基因,通过检测所述基因的突变可以用于神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍的辅助诊断。

1. PCR引物在制备筛选神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍的检测试剂盒中的应用,其特征在於,所述PCR引物的序列为:扩增SLC16A2基因序列的引物序列SEQ ID NO.5~6、扩增KIF4A基因序列的引物序列SEQ ID NO.7~8、扩增MED15基因序列的引物序列SEQ ID NO.9~10、扩增FAM83G基因序列的引物序列SEQ ID NO.11~12;

所述PCR引物用于检测以下突变:

SLC16A2基因序列的第5外显子区第1357位G突变为C;

KIF4A基因序列的第14外显子区第1472位C突变为T;

MED15基因序列的第6外显子区第573位插入CAG;

FAM83G基因序列的第6外显子区第2455位插入ACC。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述的检测试剂盒包括权利要求1所述PCR引物、PCR扩增酶及PCR扩增缓冲液。

## 一组神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍致病基因集合及其检测引物和试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药和基因检测领域,涉及一组神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍的致病基因及其检测引物和试剂盒。

### 背景技术

[0002] 神经精神发育的基础是神经系统的生长发育,而神经精神活动是神经系统对内外刺激反应的表现,包括感知、反射、动作、语言及对周围人的感情反应等。神经精神发育迟缓是小儿常见的一种发育障碍,主要临床表现为生长发育迟缓、智力发育迟滞、共济失调、手足徐动症、面部畸形、关节挛缩、认知障碍、构音障碍、癫痫发作等。

[0003] 能够导致神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍的病种很多,包括艾伦-赫恩登-达德利综合征(AHDS)、脑性瘫痪(CP)、遗传性痉挛性截瘫(HSP)等,具有家族性和终生性的特点,致残和致愚率极高,危害很大。这类疾病的遗传方式主要有单基因遗传、多基因遗传以及染色体变异等,然而其病因和发病机制尚未阐明,尤其是遗传致病因素亟待更加深入的研究和探讨。

### 发明内容

[0004] 本发明以一个类似AHDS伴发混合型CP的家系(包括一个患病哥哥和两个患病的同卵双胞胎弟弟,父母双亲表型正常)为研究对象,其主要临床症状表现为神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍,采用全基因组高通量测序(WGS)和新一代光学图谱(NGM)技术相结合的策略在全基因组范围内探究该家系的遗传致病因素,鉴定了SLC16A2的一个新的致病突变位点,以及KIF4A、MED15、FAM83G的突变位点和5个结构变异的基因(CT55、DTX2P1-UPK3BP1-PMS2P11、EBF2、FAM173B和TMTTC1),目前国际上还没有关于这些基因突变位点和结构变异导致神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍的报道。

[0005] 本发明的第一个目的在于提供一组神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍的致病基因集合。

[0006] 进一步的,本发明涉及一组神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍的致病基因集合,包括SLC16A2、KIF4A、MED15和FAM83G的突变位点,以及5个结构变异的基因(CT55、DTX2P1-UPK3BP1-PMS2P11、EBF2、FAM173B和TMTTC1)。

[0007] 进一步的,上述技术方案中,本发明涉及的SLC16A2突变型基因的cDNA编码区序列为:SLC16A2基因序列的第5外显子区第1357位核苷酸G突变为核苷酸C c.1357G>C (p.G453R)。

[0008] 进一步的,上述技术方案中,本发明涉及的KIF4A突变型基因的cDNA编码区序列为:KIF4A基因序列的第14外显子区第1472位核苷酸C突变为核苷酸T 1472C>T (p.A491V)。

[0009] 进一步的,上述技术方案中,本发明涉及的MED15突变型基因的cDNA编码区序列为:MED15基因序列的第6外显子区第573位插入CAG核苷酸c.573insCAG (p.191insQ)。

[0010] 进一步的,上述技术方案中,本发明涉及的FAM83G突变型基因的cDNA编码区序列为:FAM83G基因序列的第6外显子区第2455位插入ACC核苷酸c.2455insACC (p.819insH)。

[0011] 进一步的,上述技术方案中,本发明涉及的5个结构变异的基因为CT55、DTX2P1-UPK3BP1-PMS2P11、EBF2、FAM173B和TMTC1,具体信息如下表所示:

遗传方式	结构变异	起始位置	终止位置	覆盖基因
X 连锁遗传	插入	134294230	134346153	CT55
[0012] 常染色体隐 性遗传	插入	76621574	76629524	DTX2P1-UPK3BP1-PMS2P11
	插入	25862704	25867245	EBF2
	缺失	10227256	10232232	FAM173B
	缺失	29839167	29850639	TMTC1

[0013] 本发明的另一方面在于,保护一种筛选神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍致病基因的检测引物,其包括上述技术方案所述的致病基因集合中,针对突变基因序列设计的PCR引物,所述PCR引物序列选自:

[0014] 本发明涉及的SLC16A2基因的参考序列为SEQ ID NO.1:

[0015] 本发明涉及的检测SLC16A2基因突变位点的引物序列为:

[0016] 正向引物:5'-AAAGGAGATGTGATGCTATGTGG-3',SEQ ID NO.5

[0017] 反向引物:5'-TGATAAGGGGTTTCACGCACTCT-3'。SEQ ID NO.6

[0018] 本发明涉及的KIF4A基因的参考序列为SEQ ID NO.2:

[0019] 本发明涉及的检测KIF4A基因突变位点的引物序列为:

[0020] 正向引物:5'-ACTATTGGGGTTTCTGTA ACTAT-3',SEQ ID NO.7

[0021] 反向引物:5'-ACTAGCCTCTAACAAAGAAATCAG-3'。SEQ ID NO.8

[0022] 本发明涉及的MED15基因的参考序列为SEQ ID NO.3:

[0023] 本发明涉及的检测MED15基因突变位点的引物序列为:

[0024] 正向引物:5'-GAGACGGGGTTTCGCCAGGTTGT-3',SEQ ID NO.9

[0025] 反向引物:5'-GCGGGAGTTGTGATGGTTGGTTC-3'。SEQ ID NO.10

[0026] 本发明涉及的FAM83G基因的参考序列为SEQ ID NO.4:

[0027] 本发明涉及的检测FAM83G基因突变位点的引物序列为:

[0028] 正向引物:5'-CCCTTCTTGCTCAGCCTCACTCT-3',SEQ ID NO.11

[0029] 反向引物:5'-CTCCAGGACCATTGCCAACACCA-3'。SEQ ID NO.12

[0030] 本发明的第三个目的在于提供用于神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍检测的基因突变位点的试剂盒,包括上文所述PCR引物序列、PCR扩增酶及PCR扩增产用缓冲液。具体的,在本发明实施例中,是基于Takara-PrimeSTAR Max DNA Polymerase的PCR反应体系。

[0031] 有益效果:本发明采用了全基因组高通量测序(WGS)和新一代光学图谱(NGM)技术相结合的策略对该家系进行了全基因范围内基因突变和结构变异的研究,结合生物信息学分析发现了SLC16A2的一个新的突变位点,以及KIF4A、MED15、FAM83G的突变位点和5个结构变异的基因,并由此提供了一组神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍的致病基因,以及检测基因突变位点的引物及试剂盒。

## 附图说明

[0032] 图1、家系图；

[0033] 图2、Sanger测序验证结果。

## 具体实施方式

[0034] 下述非限定性实施例可以使本领域的普通技术人员更全面地理解本发明，但不以任何方式限制本发明。

[0035] 实施例1

[0036] 本发明收集到一个类似AHDS伴发混合型CP的家系，包括一个患病哥哥（图1中的III-2）和两个患病的同卵双胞胎弟弟（III-3和III-4），父母（II-2和II-3）表型均正常，患者的主要临床症状表现为神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍。

[0037] 患者III-2，男，孕42周足月顺产，出生体重4200g；颅神经查体基本正常；运动发育迟滞体现在躯干和四肢肌力均降低；安静状态下，肌张力降低，但主动活动和情绪紧张时，肌张力也会不均匀升高甚至出现震颤，很难完成日常生活自理（吃饭、上厕所）。

[0038] 患者III-3和III-4，男，同卵双胞胎，孕38周剖宫产，出生体重分别是2800g和2650g；颅神经查体基本正常；肌张力比III-2更差，甚至出现明显的不稳定姿势和不自主的摆头。三名患者均表现为杯形耳、额面狭长；肌张力减退、运动发育迟滞；面部流涎，头颈部前倾固定、运动缺陷无法独立走动可伴有共济失调，构音障碍和失语并存；手部表现为痉挛状态或手足徐动状态；智力认知功能严重损害；行为活动趋向于消极被动，少见暴躁激进状态；血清T3增高、T4正常。

[0039] 根据患者表型，初步判断3名患者均患有神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍。本发明采用Illumina HiSeq X Ten测序和Bionano Saphyr新一代光学图谱技术相结合的策略对患者（III-2、III3和III-4）及其父母（II-2和II-3）进行了全基因组测序和大片段结构变异分析。

[0040] 由于家系特点和遗传特征，鉴定该家系属于X连锁隐性遗传或者常染色体隐性遗传，应该优先考虑隐性纯合变异。所以，首先筛选出满足一下要求的突变：3个患者共有的纯合变异，同时在正常个体中为野生型或杂合变异（包括单核苷酸变异（SNVs）、小的插入缺失（indels）和大的结构变异（SVs））；然后过滤掉在千人基因组计划中最小等位基因频率大于5%的变异；再过滤掉位于基因间区和内含子区域的变异和同义突变；最后得到SLC16A2的一个新的突变位点，以及KIF4A、MED15、FAM83G的突变位点和5个结构变异的基因。

[0041] 实施例2

[0042] 样本收集

[0043] 根据世界医学会《赫尔辛基宣言》的要求，患者父母与大连医科大学附属第一医院伦理委员会签署了知情同意书。

[0044] 样品制备

[0045] 取患者（III-2、III3和III4）及其父母（II-2和II-3）的外周静脉血，根据Bionano Prep Blood DNA Isolation Protocol（Bionano Genomics Inc.）提取高分子量基因组DNA，分别用于高通量测序和新一代光学图谱分析，利用分光光度计测量DNA的纯度和浓度，并通过琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。

[0046] 全基因组高通量测序和新一代光学图谱分析

[0047] 1. 全基因组测序按照Illumina提供的说明书进行操作构建文库和上机测序,测序平台为Illumina HiSeq X Ten测序仪。原始数据经过质量过滤后,利用BWA-MEM软件比对到参考基因hg38,利用Picard和Samtools过滤掉PCR产生的重复序列,然后利用Bcftools确定SNP和indel的类型。

[0048] 2. 新一代光学图谱分析按照Bionano Genomics提供的说明书进行DNA标记,利用Saphyr产生单分子数据用于基因组的组装和结构变异的确定。原始数据经过质量过滤后,利用Bionano Solve软件进行基因组组装和分析。

[0049] Sanger测序验证

[0050] 1. DNA提取

[0051] 采集家系内的患者III-2、III-3和III4及其他正常人员II-1、II-2、II-3、II-4、II-5、III-1和III-5的外周血,利用常规酚-氯仿法抽提外周血中白细胞的基因组DNA,利用分光光度计测量DNA的纯度和浓度,并通过琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,所得的每个样本的基因组DNA的OD260/OD280均在1.8-2.0之间,浓度不低于50ng/u1。

[0052] 2. 引物设计和PCR反应

[0053] (1) 参考人类基因组序列hg38,针对SLC16A2、KIF4A、MED15和FAM83G的突变位点设计特异性引物,具体序列见下表:

基因名称	正向引物序列(5' -3')	反向引物序列(5' -3')
SLC16A2	AAAGGAGATGTGATGCTATGTGG	TGATAAGGGGTTTCACGCACTCT
KIF4A	ACTATTGGGGTTTCTGTA ACTAT	ACTAGCCTCTAACAAGAAATCAG
MED15	GAGACGGGGTTTCGCCAGTTGT	GCGGGAGTTGTGATGGTTGGTTC
FAM83G	CCCTTCTTGCTCAGCCTCACTCT	CTCCAGGACCATTGCCAACACCA

[0055] (2) PCR体系如下(基于Takara-PrimeSTAR Max DNA Polymerase):

[0056] 反应体系:50u1

试剂	使用量	终浓度
PrimeSTAR Max Premix (2X)	25u1	1X
正向引物(10uM)	1u1	0.2uM
反向引物(10uM)	1u1	0.2uM
模板DNA(50ng/u1)	1u1	
ddH <sub>2</sub> O	22u1	

[0058] (3) PCR反应条件如下:

[0059] (98°C 10s, 55°C 5s, 72°C 5s), 共计40个循环, 4°C 保持。

[0060] 由此获得所有样本(患者和家系内正常受试者)的PCR扩增产物。

[0061] 3. 将所有样本的PCR产物,通过Sanger测序的方法获得所有基因的相关序列,并根据测序结果判定样本属于野生型还是突变型。所有样本4个基因的Sanger测序验证峰图见图2。

[0062] 综上,在患者家族成员中对SLC16A2、KIF4A、MED15和FAM83G基因的突变位点验证发现:SLC16A2和KIF4A基因,患者均为突变型,而家系内其他正常受试者为杂合突变或野生型;MED15和FAM83G基因,患者均为纯合突变,而家系内其他正常受试者为杂合突变或野生

型。

[0063] 本发明采用了全基因组高通量测序 (WGS) 和新一代光学图谱 (NGM) 技术相结合的策略对该家系进行了全基因范围内基因突变和结构变异的研究, 结合生物信息学分析发现了SLC16A2的一个新的突变位点, 以及KIF4A、MED15、FAM83G的突变位点和5个结构变异的基因, 并由此提供了神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍的致病基因, 以及检测基因突变位点的试剂盒。

[0064] 本发明的第一个目的在于提供一组神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍的致病基因集合。

[0065] 本发明涉及一组神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍潜在的致病基因集合, 包括SLC16A2、KIF4A、MED15和FAM83G的突变位点, 以及5个结构变异的基因 (CT55、DTX2P1-UPK3BP1-PMS2P11、EBF2、FAM173B和TMTC1)。

[0066] 本发明涉及的SLC16A2突变位点为c.1357G>C (p.G453R)。

[0067] 本发明涉及的KIF4A突变位点为c.1472C>T (p.A491V)。

[0068] 本发明涉及的MED15突变位点c.573insCAG (p.191insQ)。

[0069] 本发明涉及的FAM83G突变位点为c.2455insACC (p.819insH)。

[0070] 本发明涉及的5个结构变异的基因为CT55、DTX2P1-UPK3BP1-PMS2P11、EBF2、FAM173B和TMTC1, 具体信息如下表所示:

遗传方式	结构变异	起始位置	终止位置	覆盖基因
X 连锁遗传	插入	134294230	134346153	CT55
[0071] 常染色体隐性遗传	插入	76621574	76629524	DTX2P1-UPK3BP1-PMS2P11
	插入	25862704	25867245	EBF2
	缺失	10227256	10232232	FAM173B
	缺失	29839167	29850639	TMTC1

[0072] 对于任何熟悉本领域的技术人员而言, 在不脱离本发明技术方案范围情况下, 都可利用上述揭示的技术内容对本发明技术方案作出许多可能的变动和修饰, 或修改为等同变化的等效实施例。因此, 凡是未脱离本发明技术方案的内容, 依据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何简单修改、等同变化及修饰, 均应仍属于本发明技术方案保护的范围内。

## 序列表

<110> 一组神经精神发育迟缓和高级认知功能障碍致病基因集合及其检测引物和试剂盒

<120> 大连医科大学附属第一医院

<130> 2017

<160> 12

<170> Patent In version 3.3

<210> 1

<211> 444

<212> DNA

[0073] <213> SLC16A2 基因的参考序列

<400> 1

aaaggagatg tgatgctatg tggctctggc tggccagcac aacctgacct caggcccttg	60
tttccagg tccttctct cctgctcctg ggcctgatgt ccatgatgat tcccctgtgc	120
cgggacttcg ggggccttat cgtcgtctgt ctttctctgg gcctttgcga tggcttcttc	180
atcacatca tggcccccattgcatgtgag ctggtgggcc caatgcaggc ctacaggcc	240
attggctacc tctgggcat gatggccctg ccaatgattg ctgggcccc cattgcaggt	300
gaggctgata ttccaggag ggcataatc agggagtct ttttcctg ggtactggca	360
ctctgagca tctctcctg aggcccttt tctcttacc gtctattaa gcagcttgt	420
cagagtgcgt gaaaccctt atca	444

<210> 2

<211> 482

<212> DNA



<213> KIF4A 基因的参考序列

<400> 2

actattgggg ttctgtaac tataaaatgg gtccaatac ttaaacagtc tctgtataca	60
cttaaaaaaa attaaataac caatataaaa tcaccagta agctttactt cagactctt	120
ccctaaacca aaacatttgt tactgcagga tgaactgtt gcttgcattg ctgcagccat	180
tgatactcgc gtggagcaag aagccgtaag taattggccc ctttgtgtag aaccaggagc	240
tctaactgcc gtttctata attatcact caactgaaaa agagaacctg tgattgttac	300
catcctccat agaatgcctg ttaaaccag aaactcttag tgtaaatctc agcttcataa	360
aatccctacc ttgatagggc tctaccacta atagtataac tggtaatggg gggcaggact	420
tctcaagaat gtaatgtcc atattgcaa cccagctgac tgattcttg ttagaggcta	480
gt	482

<210> 3

<211> 511

[0074]

<212> DNA

<213> MED15 基因的参考序列

<400> 3

gagacggggg ttcgccaggt tgcaccagct ggtctcgaac tcctgacctc aggtgatctg	60
cccgcctcgg cctcccaaag tgctgggatt acaggcgtga gccactgcac ccagccagga	120
aggctttctt gatggctctg cagatggcca cctgggcttc ctgaggccca gactgtcaca	180
gggaggagct ggtgccacag aggcagatga gtgataaccg agtgctgctt gttctgtctc	240
tagatacagc agcagcaaca gcagctgcag cgaatagcac agctgcagct ccaacaacag	300
caacagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagg ctttgcaggc ccagccacca	360
attcagcagc caccgatgca gcagccacag cctccgccct cccaggctct gccccagcag	420
ctgcagcaga tgcatacac acagcaccac cagccgccac cacagcccca gcagcctcca	480
gttgctcaga accaaccatc acaactcccg c	511

<210> 4

<211>	719	
<212>	DNA	
<213>	FAM83G 基因的参考序列	
<400>	4	
	cccttcttgc tcagcctcac tctctgctct ctctctcca gggccagcag ttcatcatc	60
	acagggtccc tgccctcaggg actagggata aagacggctt cccaggaccc cctaggtacc	120
	gctctgctgc tgacagcgtc cagagctcta ccagaaacgc tggcccagcc atggtggcc	180
	cccaccactg gcaggccaag ggaggtcagg taccccgctt gcttccggat cccggcagcc	240
	caagactggc caaaaatgcc cgccccatga ccgatggcag ggccaccgag gagcatccga	300
	gtcccttctgg aatcccatac tccaaactgt ctcagtcgaa gcacctaaag gccaggacgg	360
	gcggtagcca gtgggcctca tcggattcta aacggagggc tcaagcccc cgggaccgca	420
	aagacccta gcagcatgtc ccagcctgga gccacacctt ctgaggcccc agcccagact	480
	catgacgcgg agggcagaca ggccgcctgg gcctaccaga gccactggg acggcaggaa	540
	ggtgggatgg gcgggagacg ttggcaicta cctggtcggg gcaccagtac caggtggcca	600
[0075]	tgatggtcag gccaaagtc atcccgtcc acggcaggtc ccctgtgtgg ggtctcga	660
	acatgtgcat ggcgtctgta cgtggcaggt ggcaggtggt gttggcaatg gtcttgag	719
<210>	5	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	检测SLC16A2基因突变位点的正向引物	
<400>	5	
	aaaggagatg tgatgctatg tgg	23
<210>	6	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	检测SLC16A2基因突变位点的反向引物	
<400>	6	
	tgataagggg ttfcacgcac tct	23

	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 检测KIF4A基因突变位点的正向引物	
	<400> 7	
	actattgggg ttctgtaac tat	23
	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 检测KIF4A基因突变位点的反向引物	
	<400> 8	
	actagcctct aacaagaaat cag	23
	<210> 9	
[0076]	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 检测MED15基因突变位点的正向引物	
	<400> 9	
	gagacggggt ttcgccaggt tgt	23
	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 检测MED15基因突变位点的反向引物	
	<400> 10	
	gcgggagttg tgatggttg ttc	23
	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> DNA	

---

	<213> 检测FAM83G基因突变位点的正向引物	
	<400> 11	
	cccttcttgc tcagcctcac tct	23
[0077]	<210> 12	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 检测FAM83G基因突变位点的反向引物	
	<400> 12	
	ctccaggacc attgccaaca cca	23

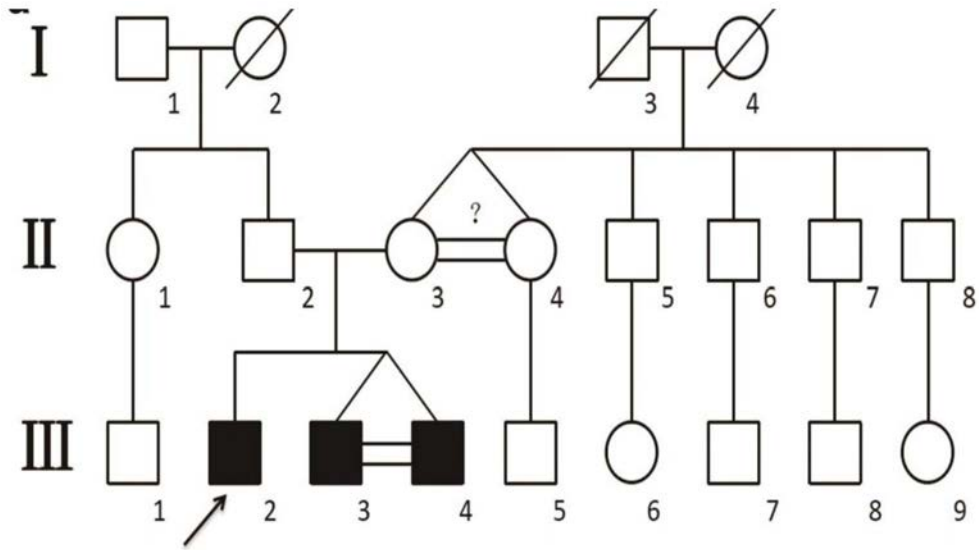


图1

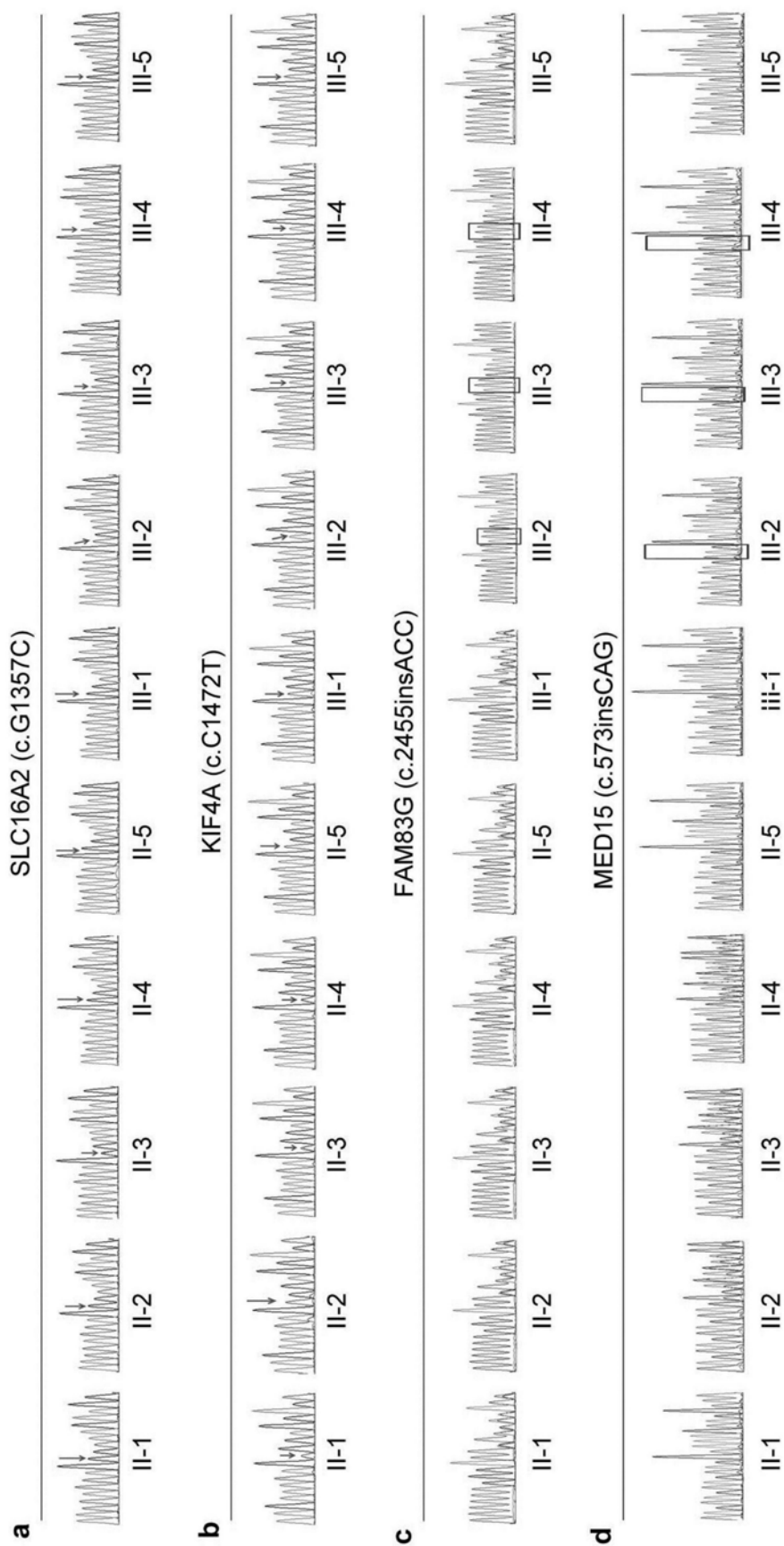


图2