

# GJB2 基因在湖南地区非综合征耳聋患者中的突变分析

王树辉<sup>1</sup>, 胡正茂<sup>2</sup>, 肖自安<sup>1</sup>, 唐青来<sup>1</sup>, 夏昆<sup>2</sup>, 杨新明<sup>1</sup>

(中南大学 1. 湘雅二医院耳鼻咽喉科, 长沙 410001; 2. 医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

**[摘要]** 目的:为明确湖南地区人群中非综合征性耳聋(NSHL)患者发病的遗传学基础,分析患者间隙连接蛋白2(*GJB2*)基因突变的情况,并探索其发病的分子机制。方法:经过详细的病史询问和临床检查,收集符合要求、无亲缘关系的NSHL患者140例。PCR扩增患者*GJB2*基因的编码序列全长,纯化回收扩增产物,直接双向测序,用DNASar软件分析测序结果,统计患者*GJB2*基因突变情况。设计1对错配引物并酶切以证实该新发现的突变。结果:在140名无亲缘关系的NSHL患者中,共有56例检测到*GJB2*基因突变,检出率达40%(56/140);其中29例患者发现2个*GJB2*等位基因突变,另27例患者只有1个*GJB2*等位基因突变,等位基因突变率为30.4%(85/280)。总共发现10种不同的碱基变异,包括7种致病突变和3种多态。7种致病突变分别是无义突变c.139G>T,移码突变c.176\_191del16和c.235delC,错义突变c.109G>A,c.344T>G,c.550C>T和c.571T>C。c.344T>G是1个新报道的错义突变。最常见的突变是c.235delC,共有27名患者检测到该突变,达19.3%(27/140)。c.109G>A突变频率仅次于c.235delC,有25名患者检测到该突变,检出率达17.9%(25/140)。结论:*GJB2*突变是导致湖南地区人群NSHL的最常见的基因突变,其c.235delC突变是湖南地区人群NSHL最常见的突变类型,发现1个*GJB2*基因的世界首次报道的新突变c.344T>G(F115C)。

**[关键词]** 非综合征性耳聋; 间隙连接蛋白2; 突变分析

**[中图分类号]** R764.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2009)06-0498-06

## GJB2 (connexin 26) gene mutation screen in patients with nonsyndromic hearing loss in Hunan

WANG Shuhui<sup>1</sup>, HU Zhengmao<sup>2</sup>, XIAO Zi'an<sup>1</sup>, TANG Qinglai<sup>1</sup>, XIA Kun<sup>2</sup>, YANG Xinming<sup>1</sup>

(1. Department of Otolaryngology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410001;

2. State Key Lab of Medical Genetics, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract:** **Objective** To identify the genetic characteristics in patients with nonsyndromic hearing loss (NSHL) in Hunan province, to determine the prevalence and spectrum of mutations in *GJB2* gene, and to explore the pathogenic mechanism. **Methods** A total of 140 sporadic patients with NSHL were enrolled after clinical examination. Molecular studies were performed by amplifying the coding region of *GJB2* gene, purifying the PCR products, and sequencing directly. Sequences were analysed by DNASar software to determine *GJB2* mutations in the patients. Special method was designed to confirm the unreported mutation. **Results** We detected *GJB2* mutation in 56 out of the 140 patients (40%, 56/140). Both of the 2 alleles were mutated in 29 patients and 1 allele in the other 27 patients, and the rate of allele mutation was 30.4% (85/280). Ten variations were detected, including 7 mutations and 3 polymorphisms. The deaf-causing mutations were nonsense mu-

收稿日期 (Date of reception) 2008-11-12

作者简介 (Biography) 王树辉, 博士, 主治医师, 主要从事耳鼻咽喉科的临床与基础研究。

通讯作者 (Corresponding author) 唐青来, E-mail: tangqinglai586@126.com

基金项目 (Foundation item) 国家自然科学基金(30572021)。 This work supported by the National Nature Science Foundation of China (30572021)。

tation c. 139G > T; frameshift mutation c. 235delC and c. 176-191del16; and missense mutation c. 109G > A, c. 344T > G, c. 550C > T and c. 571T > C. The unreported missense mutation was c. 344T > G. The c. 235delC mutation was the most prevalent mutation found in the 27 patients (19.3%, 27/140). The frequency of c. 109G > A mutation was next to c. 235delC found in 25 patients (17.9%, 25/140). **Conclusion** GJB2 mutation is a major cause for NSHL. The most common-spot in Chinese patients with NSHL is c. 235delC. The unreported missense mutation is c. 344T > G.

**Key words:** nonsyndromic hearing loss; GJB2; mutation screen

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2009, 34(6):0498-06]

耳聋是影响人类健康和造成人类残疾的常见原因,世界卫生组织(WHO)估计目前全球中度以上听力损害的患者高达2.5亿。在我国,2006年第2次全国残疾人抽样调查显示,我国现有听力残疾人约2 004万,占残疾人总人数的24.16%,占全国总人口数的1.53%,其中聋哑人200多万。

造成耳聋的原因是多方面的,但是大致可以归为环境因素和遗传因素2大类。Van Camp等<sup>[1]</sup>统计在新生儿中听力丧失发生率约为0.05%,一半以上的听力损害是由遗传缺陷引起的。遗传性耳聋根据是否伴有耳外组织的异常或病变可分为综合征性耳聋(syndromic hearing loss, SHL)和非综合征性耳聋(nonsyndromic hearing loss, NSHL),其中SHL占25%,NSHL约占遗传性耳聋的75%。

NSHL具有高度的遗传异质性。迄今为止,已定位了134个NSHL相关位点,克隆了47个基因(<http://webh01.ua.ac.be/hhh/>)。间隙连接蛋白(gap junction beta 2, GJB2)是第1个克隆和鉴定的遗传性耳聋致病基因。由于GJB2基因突变频率的高发性,该基因一直是耳聋分子遗传学研究的热点。不同人种中该基因突变类型及发生频率不同,在我国人群中开展GJB2基因突变检测,对从分子水平阐明中国人群的耳聋病因具有重要的意义,可为基因诊断和今后的基因治疗打下基础。本实验对所收集的湖南地区的遗传性耳聋家系和散发病例进行GJB2基因的突变筛查。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器和试剂

3100基因分析仪和2720 PCR仪购自美国Perkin-Elmer公司,PTC-200 PCR仪购自美国MJ

Research公司,低电压电源电泳仪和Rotator购自美国Appligene公司,GS-700扫描仪购自美国Bio-Rad公司,移液器、低温台式离心机和Centrifuge5415D购自德国Eppendorf公司,J6-HC离心机和DU<sup>®</sup>640紫外分光光度仪购自美国Beckman公司。Hotstar polymerase, Taq DNA polymerase和dNTPs购自Takara生物工程(大连)有限公司,蛋白酶K为美国Sigma公司产品,Exonuclease I和Dra I为美国New England Biolabs公司产品。

### 1.2 研究对象

研究对象主要来自中南大学湘雅二医院耳鼻喉科门诊、湘雅医院耳鼻喉科门诊、湖南长沙某聋哑学校(应学校要求不注明)和湖南省益阳市聋哑学校。所有患者及其家系成员均按照笔者设计的耳聋临床调查表格进行详细的病史询问和临床检查,排除耳毒性药物应用史及其他病史。应用纯音测听或脑干诱发电位(6岁以下的小孩和纯音测听不合作者)、声导抗、耳声发射检查及影像学等检查,患者均诊断为双耳NSHL。在患者知情同意的情况下,每位采集外周静脉血10 mL。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 外周血DNA提取、纯化和保存

取肝素抗凝外周血10 mL装入50 mL离心管中,加2~3倍体积的1×红细胞裂解液,混匀,冰上静置30 min,直至溶液变透明。如果溶液不透明则于4℃,3 000 r/min离心10 min,去上清液,重复以上步骤。4℃,3 000 r/min离心10 min,小心去上清液。沉淀中加1×细胞核裂解液1 mL,混匀,再加1×细胞核裂解液2 mL和20% SDS 150 μL,摇匀,直至黏稠透明状。再加入20 g/L蛋白酶K 10 μL,摇匀,37℃消化6 h以上或过夜;加等体积饱和酚,轻摇混匀,室温3 000 r/min离心10 min。将上清移至另一离心管,加等体积

酚/氯仿(体积比 1:1)混匀,室温 3 000 r/min 离心 10 min。将上清移入另一离心管中,加 2 倍体积无水乙醇,摇匀,见白色絮状 DNA 后用火焰灭菌的玻璃钩针将 DNA 钩出,70% 乙醇洗 2 次,室温干燥 5 min,再将 DNA 溶于 500  $\mu$ L 的 1  $\times$  TE 中,转鼓溶解过夜,紫外测 OD 值,稀释至 50  $\mu$ g/L。

### 1.3.2 引物的设计

使用由加拿大生物研究所提供的 Primer3 在线引物设计软件(<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/>)设计覆盖 *GJB2* 基因的编码序列的引物 Cx26A 及外显子与内含子交界处的引物 Cx26B(表 1),引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

表 1 扩增 *GJB2* 基因编码区的引物序列

Tab. 1 Primer's sequence to amplify genetic coding region of *GJB2*

基因	引物序列	产物大小
Cx26A	F: 5'-TGCTTGCTTACCCAGACTCAG-3'	476 bp
	R: 5'-TGGGTTTTGATCTCCTCGATG-3'	
Cx26B	F: 5'-GCCTACCGGAGACATGAGAAG-3'	479 bp
	R: 5'-GCCACTGAGCCTTGACAGCT-3'	

### 1.3.3 PCR 反应条件及聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

采用热启动 PCR 程序在 10  $\mu$ L 反应体系中扩增各对引物。10  $\mu$ L 反应体系由 1.0  $\mu$ L 10  $\times$  Buffer, 2.0  $\mu$ L Q-Buffer, 0.5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ L dNTPs (10 mmol/L), 0.05  $\mu$ L hotstar polymerase (5 U/ $\mu$ L), 0.3  $\mu$ L /条 Primers (100  $\mu$ g/L) 及 1.0  $\mu$ L DNA 模板 (50  $\mu$ g/L) 加一蒸水至 10.0  $\mu$ L。取 2.5  $\mu$ L PCR 反应产物,在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上 300 V 电泳 40 min,剥胶银染。

### 1.3.4 测序和序列分析

电泳检测完后,对扩增特异性好的 PCR 产物用虾碱性磷酸酶和核酸外切酶处理,虾碱性磷酸酶和核酸外切酶处理的试剂组成为 10  $\times$  SAP Buffer (0.5  $\mu$ L), SAP (1 U/ $\mu$ L, 2.0  $\mu$ L), Exonuclease I (20 U/ $\mu$ L, 0.25  $\mu$ L) 及 7.25  $\mu$ L PCR 产物。37  $^{\circ}$ C 酶切 40 min, 80  $^{\circ}$ C 放置 15 min 灭活虾碱性磷酸酶和核酸外切酶,处理完后的产物用 3100 基因分析仪测序。测序结果用 DNASTar 软件中的 EditSeq 和 SeqMan 程序分析,以 NCBI 数据

库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中 *GJB2* 基因标准序列为参照,进行序列比对,检测基因的变异情况。

### 1.3.5 错配引物的设计及酶切

根据测序出现的新的突变 c. 344T > G 设计 1 对错配引物:在引物的 3' 端引入 1 个与模板错配的碱基,这个错配碱基位于引物的 3' 端的第 3 位,能在扩增时被带入扩增的目的片段中,并与包括突变碱基在内的邻近碱基构成 1 个限制性酶切位点。此酶切位点产生与否,取决于是否发生突变,故扩增片段经酶切后,即可产生区别正常与突变等位基因的限制性电泳谱带,其基本检测原理见图 1。

引物序列如下:F: 5'-GATCTTCGTCTCCACGC-CAG-3', R: 5'-GGTTTTGATCTCCTCGATGCTTT-3', 其中 R 为错配引物。扩增产物长度为 126 bp。序列内引入 1 个 Dra I (TTT  $\downarrow$  AAA) 的酶切位点,正常序列可被 Dra I 切成 102 bp 和 24 bp 片段,突变位点则不能被切开。

采用热启动 PCR 10 mL 反应体系扩增,PCR 条件同前述。酶切反应体系参照厂家提供的体系进行配制:1.0  $\mu$ L 的 10  $\times$  NEB, 0.1  $\mu$ L 的 10  $\times$  BSA, 1.0 U 的 Dra I,  $\leq$  1.0 mg 的 PCR 产物加一蒸水至 10.0  $\mu$ L。酶切条件为:37  $^{\circ}$ C 消化 4 h, 65  $^{\circ}$ C 孵育 20 min 使酶失活。酶切反应完后,取 3  $\mu$ L 酶切产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上 300 V 电泳 30 min,银染。

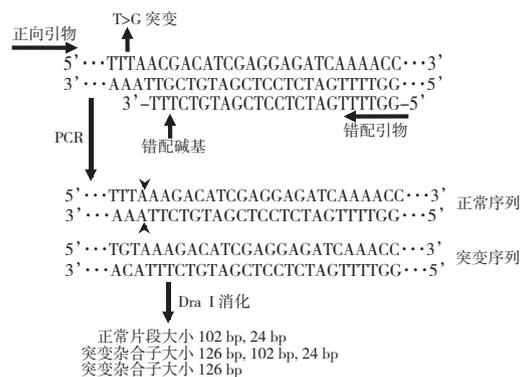


图 1 错配引物设计原理。

Fig. 1 Principle of designing mismatching primer.

## 2 结 果

笔者对 140 名 NSHL 患者进行 *GJB2* 基因突变检测,另外选取 115 名无耳聋症状及家族史的个体作为对照。总共发现了 10 种不同类型的碱基变异,包括 7 种致病突变和 3 种多态(表 2)。7 种致病突变包括 1 种无义突变(*c. 139G > T*), 2 种移码突变(*c. 176-191del16* 和 *c. 235delC*), 4 种错义突变(*c. 109G > A*, *c. 344T > G*, *c. 550C > T* 和 *c. 571T > C*)。140 例 NSHL 患者中检测到 56 例患者发生 *GJB2* 基因致病突变,其中 29 例患者 2 个 *GJB2* 等位基因发生突变(纯合突变或复合杂合突变),另外 27 例只携带 1 个 *GJB2* 等位基因突变,总突变率 40% (56/140),等位基因突变率为 30.4% (85/280)。*c. 344T > G* 是一种未见报道的错义突变,同时在两位患者中检测到,且均为杂合子,检测 115 位对照者未发现该突变(图 3)。*235delC* 为最常见的突变形式,共有 27 位患者检测到该突变,比例达 19.3% (27/140),其中纯合突变 20 例,复合杂合突变 2 例,杂合突变 5 例,该突变占有所有患者等位基因的 16.8% (47/280),占有致病性等位基因的 55.3% (47/85 等位基因)。另一个频率较高的突变是 *c. 109G > A* (*p. V37I*),有 25 个患者检测到该突变,检出率达 17.9% (25/140),其中纯合突变 7 例,杂合突变 18 例,占有致病性等位基因的 37.6% (32/85 等位基因)。*79G > A*

(*V27I*) 共 50 例,纯合 7 例,杂合 43 例;*341G > A* (*E114G*) 29 例,纯合 5 例,杂合 24 例;*79G > A* 和 *341G > A* 突变共有 28 例。

表 2 患者中各类 *Cx26* 变异

Tab. 2 *Cx26* mutations detected in patients with NSHL

碱基改变	氨基酸改变	突变等位基因数 (总数 280)	突变类型
<i>c. 79G &gt; A</i>	V27I	57	多态
<i>c. 109G &gt; A</i>	V37I	32	错义
<i>c. 139G &gt; T</i>	E47X	1	无义
<i>c. 176_191del16</i>	Frameshift	1	移码
<i>c. 235delC</i>	Frameshift	47	移码
<i>c. 341A &gt; G</i>	E114G	34	多态
<i>c. 344T &gt; G</i>	F115C	2	错义
<i>c. 550C &gt; T</i>	R184W	1	错义
<i>c. 571T &gt; C</i>	F191L	1	错义
<i>c. 608T &gt; C</i>	I203T	13	多态

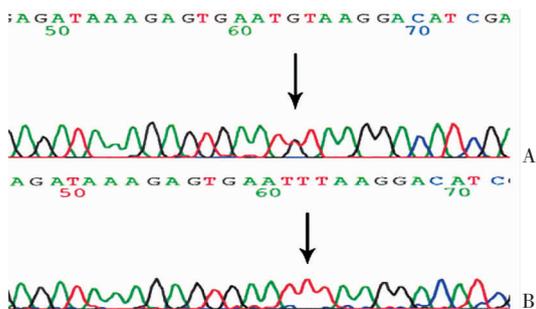


图 2 *c. 344T > G* 测序结果。A: 杂合突变 *c. 344T > G*; B: *c. 344T* 正常序列。箭头示突变位点。

Fig. 2 Sequences of *c. 344T > G*. A: Heterozygous mutation of *c. 344T > G*; B: Normal sequence of *c. 344T*. Arrow shows mutate site.

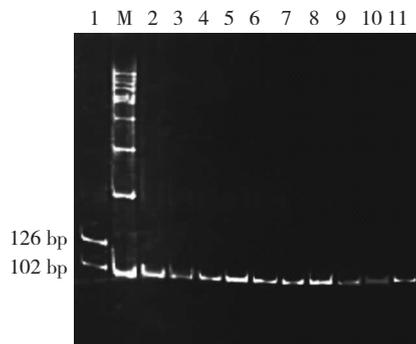


图 3 PCR 产物 *c. 344T > G* 位点 *Dra I* 的酶切检测图。1: 患者 *c. 344T > G* 杂合突变, 酶切后可见 102 bp 和 126 bp 两条带(24 bp 带已跑出); M: 100 bp ladder marker; 2 ~ 11: 10 名对照的酶切结果, 可见 102 bp 一条带(24 bp 带已跑出)。

Fig. 3 PCR products digested with *Dra I*. Lane 1: Heterozygous mutation of *c. 344T > G*; Lane M: 100 bp ladder marker; Lane 2 ~ 11: Normal controls.

### 3 讨 论

通过对 140 例 NSHL 患者进行 *GJB2* 基因突变筛查,笔者共发现 7 种致病突变(1 个无义、2 个移码、4 个错义突变)。正常情况下 *GJB2* 基因编码序列全长 681 bp,编码 226 个氨基酸。无义突变 c. 139G > T 导致 47 位密码子由谷氨酸的 GAG 变为终止密码子 TAG,产生无正常功能的蛋白质。移码突变 c. 176\_191del16 由于 175 位后缺失 16 个碱基,使得终止密码提前至 75 位,产生无正常功能的截短蛋白。c. 235delC 移码突变导致翻译提前终止于 81 号密码子,比野生型的 Cx26 截短 145 个氨基酸。4 种错义突变的拓扑学位置如下:p. V37I 和 p. F191L 位于第 1 和第 4 跨膜段,p. R184P 位于第 2 胞外段。上述突变都曾经有过报道<sup>[24]</sup>;c. 344T > G 是一种未见报道的错义突变,位于该蛋白的胞浆连接段,该突变导致 115 位的苯丙氨酸变成半胱氨酸(F115C)。c. 344T > G 突变仅在 140 例患者中的 2 例检测到,在 115 名对照组中未检测到,而且该突变位于蛋白胞浆连接段(IC2),该区间已发现多个致病突变,可能具有重要功能,因此该突变致病的可能性很大,但是该突变究竟是否致病及如何导致耳聋,有待功能研究证实。

本研究共在 140 例 NSHL 患者中检测到 56 例有 *GJB2* 基因突变,总突变率 40% (56/140),等位基因突变率为 30.4% (85/280)。Rabionet 等<sup>[5]</sup>分析了 576 位来自于意大利和西班牙的耳聋家系/散发患者,发现在这 1 152 个 *GJB2* 等位基因中,等位基因突变率达 37%。Liu 等<sup>[6]</sup>研究了 118 位来自中国的耳聋先证者,发现 39% 的先证者有 *GJB2* 基因突变,22.9% (27/118) 的先证者仅有单个等位基因发生改变。在笔者的研究中,*GJB2* 等位基因的突变率与其他研究结果基本一致,进一步证明了该基因是导致 NSHL 的最常见的基因。

不同人群中 *GJB2* 基因突变位点及发生频率有较大区别。35delG (也称为 30delG) 在大部分人群、特别在地中海人群中是最常见的突变。Kelley 等<sup>[2]</sup>研究了 58 名耳聋患者,结果表明 35delG 的发生频率达 28.4% (33/116),而且在 196 条对照染色体中,也发现 2 条染色体存在 35delG。Sobe 等<sup>[7]</sup>在以色列人群,Antoniadi 等<sup>[8]</sup>在希腊人群,Loffler 等<sup>[9]</sup>和 Janecke 等<sup>[10]</sup>分别在奥地利人群中都得到了类似的结果。但是 Medlej-Hash-

im 等<sup>[11]</sup>发现在约旦人群,Casale<sup>[12]</sup>发现在西西里岛人群,Lucotte 等<sup>[13]</sup>发现在 Corsica 岛上该突变的频率却远远低于上述报道。在本研究中没有发现 35delG,也是由于人群差异的原因。很多来自亚洲人群的研究都得到了类似结果。Kudo 等<sup>[4]</sup>在对日本人群的研究中未能发现该突变,Wang 等<sup>[14]</sup>在台湾人群中未能发现该突变。

在亚洲人群,特别是中国人群中,最常见的突变是 235delC。Liu 等<sup>[6]</sup>研究 118 个来自中国的耳聋先证者,发现 235delC 突变等位基因占有等位基因的 20.3%,在听力正常的对照中其携带频率为 1.3%。Kudo 等<sup>[4]</sup>研究 39 个语前聋患者,发现 5 个个体有 *GJB2* 基因突变,在 10 个突变等位基因中 235delC 突变就占 7 个。仅有少数报道<sup>[15]</sup>认为该变异在中国人群中不常见。本研究结果显示,235delC 为最常见的突变形式,共有 27 个患者检测到该突变,比例达 19.3% (27/140),其中纯合突变 20 例,复合杂合突变 2 例,杂合突变 5 例,该突变占有患者等位基因的 16.8% (47/280),占有致病性等位基因的 55.3% (47/85 等位基因)。该结果进一步证明在中国人群中 c. 235delC 是 *GJB2* 最常见的突变类型。

在本研究中,检测到的另一个频率较高的突变是 c. 109G > A (p. V37I),有 25 个患者检测到该突变,检出率达 17.9% (25/140),其中纯合突变 7 例,杂合突变 18 例,占有致病性等位基因的 37.6% (32/85 等位基因)。该突变目前存在一定争议。该突变在 1998 年首次被检测到,但却不是在耳聋患者中,而是在对照组中有 1 条染色体存在该突变,因而被归为多态<sup>[2]</sup>。但 1999 年 Abe 等<sup>[17]</sup>在对日本人进行 *GJB2* 的突变检测中发现这种杂合突变,该杂合突变和 R143W 杂合突变(在 1998 年 Brobby 等<sup>[16]</sup>证实了在 *GJB2* 的 R143W 突变可产生隐性非综合征型感音神经性耳聋)同时存在,构成复合杂合,且在家系中与疾病共分离,等位基因的频率为 1.04%。因此 Abe 等<sup>[17]</sup>认为 p. V37I 为致病突变;许多学者<sup>[18-19]</sup>也发现该突变在患者中的频率远远高于对照组,而将其归为隐性遗传基因。Huculak 等<sup>[20]</sup>检查了 15 个 p. V37I 纯合子个体的听力敏度图,发现他们均有轻度到中度的感觉性耳聋,因此他认为该突变可导致耳聋,不过临床症状要比 *GJB2* 基因的无义突变表现得更温和。对该突变进行的相关功能研究也支持这种观点<sup>[17]</sup>。因而本研究将该变异归于致病突变,具体是否致病,尚有待深入研究。

本实验发现 79G > A (p. V27I) 共 50 例,纯

合 7 例, 杂合 43 例; 341G > A (E114G) 29 例, 纯合 5 例, 杂合 24 例; 79G > A + 341G > A 有 28 例。大多数研究者倾向于认为 79G > A + 341G > A 是多态。Kelley 等<sup>[2]</sup> 和 Abe 等<sup>[17]</sup> 分别在 1998 年和 2000 年证实其为多态。在中国人群中他们也被认为是比较常见的多态, 肖自安等<sup>[22]</sup> 在正常人群中检测到该多态。本研究结果发现, 不但 79G > A + 341G > A 变异的患者比较多, 而且有部分患者还是 2 个变异的纯合改变或者 1 个纯合加上 1 个杂合改变, 甚至有 1 个个体既有 79G > A + 341G > A 的杂合改变, 还有 235delC 和 550C > T 杂合改变。因此, 笔者认为 79G > A + 341G > A 更可能是该基因的多态。

本研究发现 GJB2 基因突变在湖南地区人群的 NSHL 中突变率为 40%, 235delC 是最常见的突变, 109G > A 突变频率仅次于 235delC, 其他突变频率较低。79G > A 和 341G > A 是最常见的多态。c. 344T > G (F115C) 是世界首次报道的新突变。

## 参考文献:

- [1] Van Camp G, Willems P, Smith R. Nonsyndromic hearing impairment; unparalleled heterogeneity [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 60(4): 758-764.
- [2] Kelley P M, Harris D J, Comer B C, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(4): 792-799.
- [3] Denoyelle F, Weil D, Maw A, et al. Prelingual deafness; high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(12): 2173-2177.
- [4] Kudo T, Ikeda K, Kure S, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population [J]. *Am J Med Genet*, 2000, 90(2): 141-145.
- [5] Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene [J]. *Hum Genet*, 2000, 106(1): 40-44.
- [6] Liu X Z, Xia X J, Ke X M, et al. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population [J]. *Hum Genet*, 2002, 111(4-5): 394-397.
- [7] Sobe T, Vreugde S, Shahin H, et al. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population [J]. *Hum Genet*, 2000, 106(1): 50-57.
- [8] Antoniadis T, Gronskov K, Sand A, et al. Mutation analysis of the GJB2 (connexin 26) gene by DGGE in Greek patients with sensorineural deafness [J]. *Hum Mutat*, 2000, 16(1): 7-12.
- [9] Loffler J, Nekahm D, Hirst-Stadlmann A, et al. Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria [J]. *Eur J Hum Genet*, 2001, 9(3): 226-230.
- [10] Janecke A R, Hirst-Stadlmann A, Gunther B, et al. Progressive hearing loss, and recurrent sudden sensorineural hearing loss associated with GJB2 mutations-phenotypic spectrum and frequencies of GJB2 mutations in Austria [J]. *Hum Genet*, 2002, 111(2): 145-153.
- [11] Medlej-Hashim M, Mustapha M, Chouery E, et al. Nonsyndromic recessive deafness in Jordan: mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations [J]. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10(6): 391-394.
- [12] Casale M. Low prevalence of the deafness-associated 35delG mutation in the connexin-26 (GJB2) gene in a Sicilian population [J]. *Clin Genet*, 2003, 63(6): 541-542.
- [13] Lucotte G, Pinna A. Elevated frequencies of the 35delG allele of the connexin 26 gene in Corsica, France [J]. *Clin Genet*, 2003, 64(6): 517-518.
- [14] Wang Y C, Kung C Y, Su M C, et al. Mutations of Cx26 gene (GJB2) for prelingual deafness in Taiwan [J]. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10(8): 495-498.
- [15] Li Q Z, Wang Q J, Chi F L, et al. The roles of connexin genes in sporadic hearing loss population [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2007, 87(16): 1097-1101.
- [16] Brobby G W, Muller-Myhsok B, Horstmann R D. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa [J]. *N Engl J Med*, 1998, 338(8): 548-550.
- [17] Abe S, Usami S, Shinkawa S, et al. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese [J]. *J Med Genet*, 2000, 37(1): 41-43.
- [18] Marlin S, Garabedian E N, Roger G, et al. Connexin 26 Gene Mutations in Congenitally Deaf Children: Pitfalls for Genetic Counseling [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, 127(8): 927-933.
- [19] Kenna M A, Wu B L, Cotanche D A, et al. Connexin 26 Studies in Patients With Sensorineural Hearing Loss [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, 127(9): 1037-1042.
- [20] Huculak C, Bruyere H, Nelson T, et al. V37I connexin 26 allele in patients with sensorineural hearing loss: evidence of its pathogenicity [J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(22): 2394-2400.
- [21] Palmada M, Schmalisch K, Böhmer C, et al. Loss of function mutations of the GJB2 gene detected in patients with DFNB1-associated hearing impairment [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 22(1): 112-118.
- [22] 肖自安, 冯永, 潘乾. 非综合征性耳聋患者连接蛋白 26 基因突变的研究 [J]. *中华耳鼻咽喉科学杂志*, 2000, 35(3): 188-191.  
XIAO Zi'an, FENG Yong, PAN Qian. Connexin 26 gene mutations screen in patients with nonsyndromic hearing loss [J]. *Zhong Hua Er Bi Yan Hou Ke Xue Za Zhi*, 2000, 35(3): 188-191.