

第 2 代测序技术在甲基丙二酸尿症以及苯丙酮尿症诊断中的应用

高志杰 姜 茜 陈 倩 许克铭

摘 要 目的 探讨第 2 代测序技术在儿童常见遗传代谢病诊断中的价值,提出遗传代谢病诊断的新策略。方法 采用目标区序列捕获及第 2 代高通量测序技术对临床诊断的 3 例甲基丙二酸尿症、2 例苯丙酮尿症患儿进行检测,同时采用 Sanger 测序技术对患者突变进行验证。结果 3 例甲基丙二酸尿症患儿检测发现均为 MMACHC 基因突变,其中 1 例为 c. 80A > G (P. Q27R) 和 c. 609 G > A (P. W203X) 复合杂合突变,1 例为 c. 394C > T (P. R132X) 和 c. 567dupT (P. I190fs) 复合杂合突变,另 1 例为 c. 80A > G (P. Q27R) 和 c. 271dupA (P. R91fs) 复合杂合突变。2 例苯丙酮尿症患儿检测发现 PAH 基因突变,其中 1 例为 c. 158G > A (P. R53H) 和 c. 838G > A (P. E280K) 复合杂合突变,另 1 例为 c. 158G > A (P. R53H) 和 c. 1238 G > C (P. R413P) 复合杂合突变,上述突变均为已知致病突变位点杂合突变;Sanger 测序结果与第 2 代测序结果相符合。结论 本研究提示第 2 代测序技术具有低成本、高通量、高敏感度以及可灵活设计的特点,可作为儿科临床常见遗传代谢病基因诊断的首选工具。

关键词 遗传代谢病 儿童 基因诊断 第 2 代测序

中图分类号 R446

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.031

Application of Next-generation Sequencing in Methylmalonic Aciduria and PKU Diagnosis. Gao Zhijie, Jiang Qian, Chen Qian, et al. Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Abstract Objective To study the value of second generation sequencing technology in the common inherited metabolic diseases diagnosis in pediatrics, and put forward a new strategy of inherited metabolic diseases diagnosis. **Methods** Next-generation sequencing was used to detect gene mutation in three patients with methylmalonic aciduria and two patients with PKU. Sanger sequencing were applied to confirm the results. **Results** Compound heterozygous mutation in MMACHC gene was detected in three patients with methylmalonic aciduria. One patient had c. 80A > G (P. Q27R) and c. 609 G > A (P. W203X). One patient had c. 394C > T (P. R132X) and c. 567dupT (P. I190fs). One patient had c. 80A > G (P. Q27R) and c. 271dupA (P. R91fs). Compound heterozygous mutation in PAH gene was detected in two patients with PKU. One patient had c. 158G > A (P. R53H) and c. 838G > A (P. E280K). One patient had c. 158G > A (P. R53H) and c. 1238 G > C (P. R413P), all of which have been reported before. **Conclusion** Next-generation sequencing technology is a cost-effective, high throughput and quick diagnostic tool for screening inherited metabolic diseases. We would recommend next-generation sequencing technology for gene diagnose on common inherited metabolic diseases in pediatrics.

Key words Inherited metabolic diseases; Child; Genetic diagnose; Next-generation sequencing

遗传性疾病大体分为遗传代谢病、遗传变性病和遗传发育性疾病,多数为常染色体隐性遗传。近年来随着我国经济的发展和社会的进步,传染性疾病的发生率与病死率显著降低,遗传性疾病在病死率中所占的比例逐渐提高,尤其随着串联质谱联合气相色谱-质谱技术在我国应用的普及,越来越多的遗传代谢病患者得到早期诊断。甲基丙二酸尿症和苯丙酮尿症是儿科临床常见的遗传代谢病。本类疾病目前尚无

根治办法,因此通过产前诊断避免患儿出生至关重要,快速、准确的致病基因的检测、携带者的检出、产前诊断及遗传咨询是预防本病的关键。本研究采用第 2 代测序的方法对儿科临床较为常见的单基因遗传代谢病致病基因进行第 2 代高通量测序,同时采用 Sanger 测序技术对发现的患儿突变进行验证,旨在探讨第 2 代测序在临床检测中的应用。最终明确 5 例患儿均为点突变,且突变位点均为国内外已报道的致病突变,提出了该类疾病的新的诊断策略,同时为将来的产前诊断及遗传咨询提供基础,现报道如下。

资料与方法

1. 病例资料: 5 例,为 2013 年 10 月~2014 年 4 月于首都儿科研究所附属儿童医院神经内科就诊,根据诊断标准,综合患

作者单位:100020 北京,首都儿科研究所附属儿童医院神经内科(高志杰、陈倩、许克铭);100020 北京,首都儿科研究所遗传研究室(姜茜)

通讯作者:陈倩,电子信箱:chenqianxhl@163.com

儿临床症状、体征、血尿酸代谢筛查结果做出临床诊断^[1]。其中甲基丙二酸尿症 3 例、苯丙酮尿症 2 例。

2. 第 2 代测序(next-generation sequencing):利用目标区域捕获、测序法对 48 个遗传代谢病相关基因的外显子及外显子-内含子交接区进行检测。(1)文库构建:采集患儿及其父母的静脉血,应用 Qiagen 公司试剂盒(the QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Hilden, Germany)提取基因组 DNA,将质量检测合格的基因组 DNA 随机打断(Biorupter),纯化长度为 150~250bp 的片段;然后利用 T4 DNA polymerase、T4 phosphorylated polynucleotide kinase 和 E. coli DNA 聚合酶 Klenow 片段对纯化后的 DNA 片段进行末端修复,再按照美国 Illumina 公司第 2 代测序仪的操作说明在片段两端加上 A 碱基,最后在两端加上接头(adaptor)并对其进行磁珠纯化。(2)杂交:已加接头纯化后的模板首先进行捕获前 PCR 扩增,然后将 PCR 产物与自主设计的人类基因芯片(Roche NimbleGen, Madison, USA)在适宜条件下杂交 20~24h,此时目标片段因与芯片上的探针结合而被捕获,未杂交的片段则被洗掉,洗脱后保留在芯片上的目标片段再进行 1 次捕获 PCR 以显著增加待测片段的数量。(3)Sanger 测序验证:按照常规 Sanger 法对发现的点突变进行一代测序验证。(4)生物信息学分析:本实验中笔者使用的芯片捕获区包含 48 个遗传代谢病相关基因的外显子及其侧翼序列约 100bp。高通量测序数据使用 Illumina Pipeline(version 1.8.2)产生原始数据,去除低质量的数据后利用 BWA(Burrows wheeler aligner)将“干净的”读序与人类基因组参考序列比对(UCSC, hg19),再分别使用

SOAPsnp 软件和 GATK 软件进行 SNP 和 InDel 的收集。本实验中每个样品基因的平均测序深度约为 80 倍,捕获区覆盖度达 99% 以上,为了找出致病性的点突变,笔者参考 dbSNP 数据库、Hapmap、千人基因组数据库及 ESP(NHLBI Exome Sequencing Project)正常对照人群数据库,将频率<0.05 的变异视为可疑。

结 果

1. 第 2 代高通量测序结果:病例 1 发现甲基丙二酸尿症相关的 8 个突变位点,病例 2 发现甲基丙二酸尿症相关的 3 个突变位点,病例 3 发现 7 个甲基丙二酸尿症相关突变位点,病例 4 发现苯丙酮尿症相关的 3 个突变位点,病例 5 发现苯丙酮尿症相关的 3 个突变位点,详见表 1。加粗字为已报道的致病突变,正常字为同义突变或未见文献报道的错义突变。3 例甲基丙二酸尿症患儿检测发现均为 MMACHC 基因突变,1 例为 c. 80A>G(P. Q27R)和 c. 609 G>A(P. W203X)复合杂合突变;1 例为 c. 394C>T(P. R132X)和 c. 567dupT(P. I190fs)复合杂合突变;1 例为 c. 80A>G(P. Q27R)和 c. 271dupA(P. R91fs)复合杂合突变;2 例苯丙酮尿症患儿检测发现 PAH 基因突变,分别是:1 例为 c. 158G>A(P. R53H)和 c. 838G>A(P. E280K)复合杂合突变;1 例为 c. 158G>A(P. R53H)和 c. 1238 G>C(P. R413P)复合杂合突变。

表 1 5 例患者中发现的疾病相关突变结果

	基因名称	染色体	RS 编号	杂合/纯合	转录本	外显子	cDNA 改变	氨基酸改变
病例 1	MMACHC	Chr1		het	NM_015506	Exon4	c. 609G>A	p. W203X
	MMACHC	Chr1		het	NM_015506	Exon1	c. 80A>G	p. Q27R
	MUT	Chr6	Rs1141321	het	NM_000255	Exon9	c. 1595G>A	p. R532H
	MUT	Chr6	Rs2229384	het	NM_000255	Exon3	c. 636G>A	p. K212K
	MUT	Chr6	Rs8589	het	NM_000255	Exon12	c. 2011A>G	p. I671V
	MMADHC	Chr2	Rs11545261	hom	NM_015702	Exon5	c. 453G>A	p. Q151Q
病例 2	LMBRD1	Chr6	Rs12648	het	NM_018368	Exon14	c. 1407T>A	p. D469E
	LMBRD1	Chr6	Rs185334169	het	NM_018368	Exon13	c. 1192T>C	p. Y398H
	MMACHC	Chr1	Rs121918241	het	NM_015506	Exon3	c. 394C>T	p. R132X
	MMACHC	Chr1		het	NM_015506	Exon4	c. 567dupT	p. I190fs
	MMACHC	Chr1	Rs2275276	hom	NM_015506	Exon3	c. 321G>A	p. V107V
	MMACHC	Chr1		het	NM_015506	Exon1	c. 80A>G	p. Q27R
病例 3	MMACHC	Chr1		het	NM_015506	Exon2	c. 271dupA	p. r91fs
	MMAB	Chr12	Rs9593	hom	NM_052848	Exon9	c. 716T>A	p. M239K
	MMACHC	Chr1	Rs2275276	het	NM_015506	Exon3	c. 321G>A	p. V107V
	MMADHC	Chr2	Rs11545261	hom	NM_015702	Exon5	c. 453G>A	p. Q151Q
	MUT	Chr6	Rs8589	het	NM_000255	Exon12	c. 2011A>G	p. I671V
	MUT	Chr6	Rs2229384	het	NM_000255	Exon3	c. 636G>A	p. K212K
病例 4	PAH	Chr12	Rs62508698	het	NM_000277	Exon7	c. 838G>A	p. E280K
	PAH	Chr12	Rs118092776	het	NM_000277	Exon2	c. 158G>A	p. R53H
	PAH	Chr12		het	NM_000277	Exon3	c. 308G>A	p. G103D
病例 5	PAH	Chr12	Rs79931499	het	NM_000277	Exon12	c. 1238G>C	p. R413P
	PAH	Chr12	Rs118092776	het	NM_000277	Exon2	c. 158G>C	p. R53H
	QDPR	Chr4	Rs3733570	het	NM_000320	Exon4	c. 345G>A	p. S115S

2. Sanger 法突变验证:对于第 2 代测序发现点突变的患儿 DNA 采用 Sanger 法测序进行验证,结果均

与第 2 代测序结果一致,以病例 1 的 c. 80A > G 为例(图 1)。

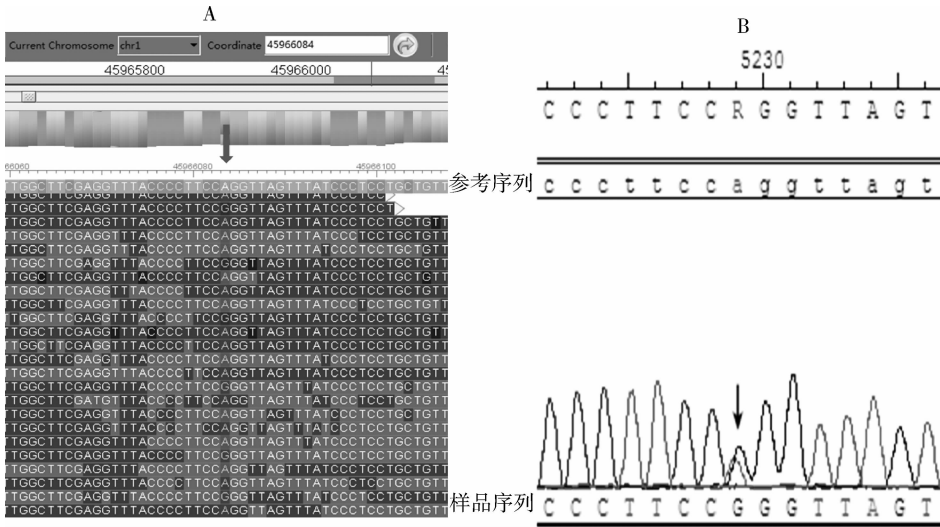


图 1 第 2 代测序发现点突变患儿 DNA 采用 Sanger 测序验证
A. 患儿第 2 代测序图,箭头所示为突变区;B. Sanger 测序验证 c. 80A > G

讨 论

遗传代谢病包括氨基酸、有机酸、脂肪酸、糖类、类固醇等数百种先天性代谢缺陷,虽然单一病种发生率,但是总体发生率很高,是导致神经系统损害的重要原因,常导致早期夭折或终身残疾,其中许多疾病可以急性发作,甚至猝死^[2,3]。近年来,随着医学遗传学尤其是分子遗传学的快速发展,现代的疾病诊疗模式发生了巨大的变化,发展为基于临床诊断-生化诊断-酶学诊断-基因诊断的模式,对于临床可疑患者,应及时进行有关检测,争取早期诊断、早期治疗。目前,对于多数遗传代谢病仍无特效治疗方法,只能给予相应的支持或对症治疗,部分疾患可得到有效控制,故遗传代谢病的预防极其重要。产前诊断是遗传代谢病预防的重要措施,但是产前诊断的先决条件是明确先证者的诊断,故对先证者的明确诊断非常重要,尤其是基因诊断极其重要。

第 2 代高通量测序技术(next-generation sequencing technology)具有快速准确、低成本的优点,可同时对各种类型突变进行检测。杨琳等^[4]采用第 2 代测序对临床诊断的肌营养不良、胆汁酸合成障碍和甲基丙二酸血症患儿进行基因诊断。都娟等^[5]采用第 2 代测序技术对 Alport 综合征患儿进行基因诊断。刘敏娟等^[6]采用第 2 代测序技术对假肥大型肌营养不良患者进行检测,结果均显示第 2 代测序是一种具有低成本、高通量、高敏感度以及可灵活设计的

适用于儿科临床常见遗传性疾病的检测。目前已知甲基丙二酸尿症的 7 个致病基因包括 MUT 基因、MMAA 基因(cblA)、MMAB 基因(cblB)、MMACHC 基因(cblC)、MMADHC 基因(cblD)、LMBRD1 基因(cblF)及 MCEE 基因;苯丙酮尿症有 5 个致病基因,包括 PAH 基因、PTS 基因、GCH1 基因、QDPR 基因及 PCBD1 基因,外显子数目庞大且无突变热点,采用传统 PCR 测序方法检测突变耗费大量的时间和精力。第 2 代测序技术可在同一张芯片上高特异性和高覆盖率捕获研究者感兴趣的目标外显子区域,进而利用第 2 代测序直接解析数据,筛选出突变位点。因此,采用第 2 代测序技术对甲基丙二酸尿症、苯丙酮尿症同时进行基因诊断,比传统的 PCR 测序法更为实用、便捷。

甲基丙二酸尿症是一种常见的先天性有机酸代谢病,各国发生率报道不同,美国为 1/48000,日本为 1/50000,德国为 1/169000,意大利为 1/61775,我国台湾为 1/85000,我国大陆发病情况不详^[7-9]。本研究 3 例患儿均为 1 岁以内起病,第 2 代测序以及 Sanger 法验证均证实为 MMACHC 基因突变,且 3 例患儿突变位点均为已知致病突变,均为复合杂合突变,结合临床证实为甲基丙二酸尿症合并同型半胱氨酸血症。甲基丙二酸尿症合并同型半胱氨酸血症是我国甲基丙二酸尿症患者的主要生化表型,国内报道的甲基丙二酸尿症患者中 60%~80% 为甲基丙二酸尿症

合并同型半胱氨酸血症^[9-11]。cblC 缺陷即 MMACHC 基因突变是导致甲基丙二酸尿症合并同型半胱氨酸血症的主要基因型,也是最常见 的钴胺素代谢障碍性疾病^[12-14]。2006 年明确了 MMACHC 基因突变是导致 cblC 缺陷的病因。该基因位于 1p34.1,由 4 个外显子组成,基因全长约 10.8kb,编码由 282 个氨基酸组成的 cblC 蛋白,若 MMACHC 基因突变则导致 cblC 蛋白功能缺陷,机体内甲基丙二酸及同型半胱氨酸蓄积,蛋氨酸降低^[15,16]。我国患者 MMACHC 基因突变谱与国外报道有所不同, Liu 等^[12]曾对 79 例中国 cblC 缺陷患者进行分析, c.609G > A (p. W203X) 突变的发生率最高 (48.1%), 其次为 c.658 ~ 660delAAG。韩连书等^[11]对 12 例甲基丙二酸尿症合并同型半胱氨酸血症患儿进行研究,其中 7 例存在 MMACHC 基因 c.609G > A 纯合突变。本研究中 3 例患儿中 2 例患儿存在 c.80A > G 突变, 1 例存在 c.609G > A 突变,与国内报道的 c.609G > A 热点突变不符,但是由于本组研究病例数少,尚无代表性。

苯丙酮尿症(PKU)是一种常见的先天性氨基酸代谢病,其发生率在北欧为 1/10000 左右,中国的发生率为 1/11188,国内各地的发生率略有不同^[17]。根据病因不同,可以从分子水平上将 PKU 分为苯丙氨酸羟化酶 (phenylalanine hydroxylase, PAH) 缺乏型 PKU 和四氢生物蝶呤 (tetrahydrobiopterin, BH4) 缺乏型 PKU,98% ~ 99% 的 PKU 都是由于肝细胞中 PAH 缺乏或活性降低造成,PAH 基因的突变类型主要包括点突变以及缺失突变,还有 1% ~ 2% 的 PKU 是由于 PAH 的辅助因子 BH4 缺乏造成,被称为 BH4 缺乏型 PKU。本组 2 例患儿均为 PAH 基因突变,均为复合杂合突变,均为已知致病突变。PAH 基因位于染色体 12q23.2,编码区包含 13 个外显子和 12 个内含子,编码由 452 个氨基酸组成的单体蛋白^[18]。该基因突变类型较多,以点突变为主,同时有大片段的重 复及缺失突变,我国各地区热点突变不一。国内多数应用聚合酶链反应/单链构象多态性分析、DNA 序列分析或联合应用 PAH 基因全部外显子及外显子-内含子交界区扩增测序和多重连接依赖式探针扩增 (MLPA) 法进行检测^[19,20]。由于检测技术本身的局限性,重复、缺失突变不能被检出,第 2 代测序技术则可同时检出点突变以及缺失突变,有效地弥补了技术上的缺陷。本研究中 2 例患儿均存在 c.158G > A (P. R53H) 突变,与国内报道的常见突变 R243Q、

R111X、Y356X 和 V399V 等不符,但是由于本组研究病例数少,尚无代表性。

本研究通过对临床诊断的 3 例甲基丙二酸尿症、2 例苯丙酮尿症患儿进行基因分析,最后证实 3 例甲基丙二酸尿症患儿突变均发生在 MMACHC 基因上, 2 例苯丙酮尿症患儿突变均发生在 PAH 基因上,早期基因诊断为患儿的分子水平诊断及分型提供依据,并对患儿的治疗及预后判断有指导意义。综上,本研究提示第 2 代测序技术可以快速、准确检测出常见氨基酸及有机酸代谢病的基因突变,尤其是对于点突变具有高准确性、高通量、高敏感度和低运行成本的优点,可以作为儿童遗传代谢病检测的首选工具,为携带者检出、遗传咨询以及进行产前诊断提供依据。

参考文献

- 1 吴希如,林庆. 小儿神经系统疾病基础与临床[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2009:610-633
- 2 杨艳玲. 北京市可治疗性遗传性疾病的诊疗现状[J]. 药物评价, 2011,8(8):4-8
- 3 彭晓音,朱彦丽,王立文,等. 遗传代谢病 146 例临床分析[J]. 临床儿科杂志, 2010,28(7):666-669
- 4 杨琳,王慧君,吴柏林,等. Ion Torrent PGM™ 平台在儿童遗传性疾病诊断中应用初探[J]. 中国循证儿科杂志,2013,8(3):210-215
- 5 都娟,黄建萍,赵晓艳,等. 儿童 Alport 综合征 COL4A5 基因 4 种新突变分析[J]. 中国循证儿科杂志,2013,8(1):27-30
- 6 刘敏娟,谢敏,毛君,等. 第二代测序技术在假肥大型肌营养不良基因诊断中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志,2012,29(3):249-254
- 7 Dionisi-Vici C, Rizzo C, Burlina AB, et al. Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: a national retrospective survey [J]. J Pediatr, 2002, 140(3):321-327
- 8 Cheng KH, Liu MY, Kao CH, et al. Newborn screening for methylmalonic aciduria by tandem mass spectrometry: 7 years' experience from two centers in taiwan[J]. J Chin Med Assoc, 2010,73(6):314-318
- 9 刘玉鹏,马艳艳,吴桐菲,等. 早发型甲基丙二酸尿症 160 例新生儿期异常表现[J]. 中华儿科杂志,2012,50(6):410-414
- 10 张尧,宋金青,刘平,等. 甲基丙二酸尿症合并同型半胱氨酸血症 57 例临床分析[J]. 中华儿科杂志,2007,45(7):513-517
- 11 韩连书,王斐,胡宇,等. 甲基丙二酸血症伴同型半胱氨酸血症患儿临床及基因突变分析[J]. 中华内分泌代谢杂志,2009,25(4):405-408
- 12 Liu MY, Yang YL, Chang YC, et al. Mutation spectrum of MMACHC in Chinese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria[J]. J Hum Genet, 2010,55(9):621-626
- 13 Yang Y, Sun F, Song J, et al. Clinical and biochemical studies on Chinese patients with methylmalonic aciduria[J]. J Child Neurol, 2006, 21(12):1020-1024
- 14 Martinelli D, Deodato F, Dionisi-Vici C. Cobalamin C defect: natural history, pathophysiology and treatment[J]. J Inher Metab Dis, 2011,34(1):127-135

(下转第 168 页)

芯片对创伤弧菌感染后小鼠血清及肝脏匀浆液进行了炎症因子检测,发现了几种重要的炎症因子,并对主要炎症因子的功能进行了探讨;在免疫机制方面,利用流式细胞仪检测了小鼠感染创伤弧菌后 Th 细胞亚群的变化,发现了一定的动态变化规律,并用抗体阻断的方法对其功能进行了初步验证。期望更多的同行能够关注创伤弧菌的致病机制研究,为创伤弧菌的诊断、治疗和预防提供新的理论依据。

参考文献

- 1 Stamm LV. Role of TLR4 in the host response to *Vibrio vulnificus*, an emerging pathogen[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2010,58(3):336-343
- 2 Jones MK, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis [J]. *Infection and Immunity*,2009,77(5):1723-1733
- 3 Inoue Y, Ono T, Matsui T, *et al.* Epidemiological survey of *Vibrio vulnificus* infection in Japan between 1999 and 2003[J]. *The Journal of Dermatology*, 2008,35(3):129-139
- 4 Lee SH, Chung BH, Lee WC. Retrospective analysis of epidemiological aspects of *Vibrio vulnificus* infections in Korea in 2001-2010 [J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2013,66(4):331-333
- 5 DaSilva L, Parveen S, DePaola A, *et al.* Development and validation of a predictive model for the growth of *Vibrio vulnificus* in postharvest shellstock oysters [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012,78(6):1675-1681
- 6 Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: death on the half shell. A personal journey with the pathogen and its ecology[J]. *Microbial Ecology*, 2013, 65(4):793-799
- 7 Horseman MA, Surani S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection[J]. *Int J Infect Dis*, 2011,15(3): e157-166
- 8 Matsuoka Y, Nakayama Y, Yamada T, *et al.* Accurate diagnosis and treatment of *Vibrio vulnificus* infection: a retrospective study of 12 cases[J]. *Braz J Infect Dis*, 2013,17(1):7-12
- 9 Anderson M, Knudson M, Friberg E, *et al.* Fatal *Vibrio vulnificus* sepsis in vertically acquired hepatitis C[J]. *Journal of Pediatric*

gastroenterology and Nutrition, 2013,56(5):e32-33

- 10 王永明,谢金楼. 创伤弧菌溶细胞素蓖麻毒素 B 活性模序的预测、克隆表达和功能鉴定[J]. *中华微生物和免疫学杂志*,2013, 33(5):367-368
- 11 Yun JH, Kim H, Park JE, *et al.* Solution structure and dynamics of C-terminal regulatory domain of *Vibrio vulnificus* extracellular metalloprotease[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,2013,430(2):541-546
- 12 Natividad-Bonifacio I, Fernandez FJ, Quinones-Ramirez EI, *et al.* Presence of virulence markers in environmental *Vibrio vulnificus* strains[J]. *Journal of Applied Microbiology*,2013, 114(5):1539-1546
- 13 Lee KJ, Kim JA, Hwang W, *et al.* Role of capsular polysaccharide (CPS) in biofilm formation and regulation of CPS production by quorum-sensing in *Vibrio vulnificus*[J]. *Molecular Microbiology*,2013, 90(4):841-857
- 14 Canton R, Ruiz-Garbajosa P, Chaves RL, *et al.* A potential role for daptomycin in enterococcal infections: what is the evidence? [J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,2010, 65(6):1126-1136
- 15 Lee BC, Kim MS, Choi SH, *et al.* Involvement of capsular polysaccharide via a TLR2/NF-kappaB pathway in *Vibrio vulnificus*-induced IL-8 secretion of human intestinal epithelial cells[J]. *International Journal of Molecular Medicine*,2010,25(4):581-591
- 16 Datta S, Crosa JH. Identification and characterization of a novel outer membrane protein receptor required for heme utilization in *Vibrio vulnificus*[J]. *Biometals*, 2012. 25(2): 275-283
- 17 Kim IH, Wen Y, Son JS, *et al.* The fur-iron complex modulates expression of the quorum-sensing master regulator, SmcR, to control expression of virulence factors in *Vibrio vulnificus*[J]. *Infection and Immunity*, 2013,81(8):2888-2898
- 18 Kim SM, Park JH, Lee HS, *et al.* LuxR homologue SmcR is essential for *Vibrio vulnificus* pathogenesis and biofilm detachment, and its expression is induced by host cells[J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(10):3721-3730

(收稿日期:2014-08-19)

(修回日期:2014-09-22)

(上接第 114 页)

- 15 Lerner-Ellis JP, Tirone JC, Pawelek PD, *et al.* Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type[J]. *Nat Genet*,2006,38(1):93-100
- 16 Kim J, Gherasim C, Baneev R. Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2008, 105(38): 14551-14554
- 17 顾学范. 苯丙酮尿症防治现状及进展[J]. *实用儿科临床杂志*, 2000,15:297-299
- 18 Kwok SC, Ledley FD, DiLella AG, *et al.* Nucleotide sequence of a full

-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase [J]. *Biochemistry*, 1985, 24(3): 556-561

- 19 瞿宇晋,宋昉,金煜炜,等. 北京地区苯丙酮尿症基因突变构成及基因型与表型相关分析[J]. *中华儿科杂志*,2009,46(2):115-119
- 20 韩连书,王斐,胡宇,等. 河北地区 55 例苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变的检测与分析 [J]. *中华医学杂志*,2011,91(42):2971-2976

(收稿日期:2014-07-14)

(修回日期:2014-09-22)