

# 双特异探针技术早期检测先天性白内障晶状体蛋白突变基因的研究

曹雨娟<sup>1</sup>, 邵 珺<sup>2</sup>, 虞瑛青<sup>1</sup>, 姚 勇<sup>2</sup>, 朱 靖<sup>2</sup>, 田玉景<sup>1</sup>, 曹 葭<sup>1</sup>

基金项目: 无锡市卫生局青年项目(No. Q201405)

作者单位:<sup>1</sup>(214023) 中国江苏省无锡市儿童医院眼科;  
<sup>2</sup>(214023) 中国江苏省无锡市人民医院眼科

作者简介: 曹雨娟, 毕业于东南大学, 硕士, 住院医师, 研究方向: 小儿眼科。

通讯作者: 邵珺, 毕业于南京医科大学, 博士, 主治医师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病. shaojun1983@hotmail.com

收稿日期: 2017-10-23 修回日期: 2018-05-14

## Early detection using dual-specific probe technique for genetic mutation of congenital cataract lens protein

Yu-Juan Cao<sup>1</sup>, Jun Shao<sup>2</sup>, Ying-Qing Yu<sup>1</sup>, Yong Yao<sup>2</sup>, Jing Zhu<sup>2</sup>, Yu-Jing Tian<sup>1</sup>, Jia Cao<sup>1</sup>

Foundation item: Youth Project of Wuxi Health Bureau (No. Q201405)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Wuxi Children's Hospital, Wuxi 214023, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Wuxi People's Hospital, Wuxi 214023, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jun Shao. Department of Ophthalmology, Wuxi People's Hospital, Wuxi 214023, Jiangsu Province, China. shaojun1983@hotmail.com

Received: 2017-10-23 Accepted: 2018-05-14

## Abstract

• AIM: To screen congenital cataract in the early stage using dual-specific probe technique composed of DNA hybridization and chromogenic probe.

• METHODS: The mRNA was isolated from venous blood of 14 congenital cataract patients with autosomal dominant inheritance in 3 chromosomes. Based on genetic mutants of CRYAB gene, DNA probe, capture probe and signal probe were designed. The sandwich structures containing capture probe, DNA probe and signal probe was used to detect genetic mutants in 8 samples from one family; and ELISA was used to detect the contents fluctuation of Crystallin alpha B.

• RESULTS: The dual-specific probe technique detected the minimum genetic mutation of Crystallin alpha B in congenital cataract samples, various mutations detection rate was between 99.5% and 99.7%. In ELISA detection, serum Crystallin alpha B level increased, and detection rate was 85.9%. Compared with ELISA assay, this novel

assay was more sensitive.

• CONCLUSION: The novel dual-specific probe method is quite convenient for detection of genetic mutants of congenital cataract; and for its high sensitivity and repeatability, it is of great potential in clinically prenatal diagnosis, and it might play significant roles in eugenic and superior nurture.

• KEYWORDS: dual-specific probe technique; congenital cataract; lens protein gene

Citation: Cao YJ, Shao J, Yu YQ, et al. Early detection using dual-specific probe technique for genetic mutation of congenital cataract lens protein. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018; 18(6):1004-1009

## 摘要

目的: 利用 DNA 探针杂交技术, 结合显色探针技术建立一种新型、高灵敏的免疫检测体系, 用于早期先天性白内障的筛查。

方法: 选取 3 个常染色体显性遗传的先天性白内障家系中患者 14 例, 取静脉血并提取 mRNA, 建立 CRYAB 的捕获探针及显色探针。利用 DNA 探针, 通过碱基配对原则形成三明治结构(捕获探针-DNA 探针-显色探针)检测入选者的血样。1 家系 6 例患者静脉血利用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测 αB-晶状体蛋白。

结果: 最佳条件下, 双特异探针技术可检测到最低浓度的先天性白内障晶状体蛋白的突变基因, 各突变位点检测率为 99.5% ~ 99.7%; ELISA 法检测样本 αB-晶状体蛋白上调, 阳性率为 85.9%。双特异探针技术敏感性更高, 检测位点更多, ELISA 法仅局限于蛋白检测水平, 精确性不高。

结论: 双特异探针检测技术操作简单, 灵敏度高, 可重复性高, 经济实惠, 在临床上用于产前诊断、优生优育具有重要的应用价值。

关键词: 双特异探针技术; 先天性白内障; 晶状体蛋白基因

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.6.06

引用: 曹雨娟, 邵珺, 虞瑛青, 等. 双特异探针技术早期检测先天性白内障晶状体蛋白突变基因的研究. 国际眼科杂志 2018; 18(6):1004-1009

## 0 引言

先天性白内障是由于遗传、代谢、感染等原因, 导致胚胎发育过程中出现基因突变或染色体异常, 使晶状体

自身透明度下降而产生,是目前导致儿童失明的主要原因之一,已成为儿童第二位致盲眼病<sup>[1]</sup>。由于先天性白内障出生时即已存在,目前临床上仅是对发生白内障患儿进行白内障摘除手术治疗,而无法对其发病采取有效的预防措施。因此利用有效的筛查技术对产妇进行早期的筛查工作,对先天性白内障的早期诊断和防治具有重要意义。本课题组在前期研究中发现 $\alpha$ B-晶状体蛋白上调, $\beta$ A3和 $\beta$ B1晶状体蛋白下调可能与先天性白内障的发病相关<sup>[2]</sup>。基于以上研究结论,本课题组拟利用双特异探针技术建立先天性白内障早期筛查体系,此项技术可以早期有效地鉴定出先天性白内障相关基因特定位点的突变情况,为临床上进一步遗传性诊断提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

于2013-07/2017-04收集3个常染色体显性遗传的先天性白内障家系14例(其中男6例,女8例)和正常体检者100例。向患者和其家属介绍本研究目的,取得患者和家属同意,签署知情同意后,取患者静脉血,并进行详细的临床检查,包括视力、眼压、裂隙灯眼前节检查,复方托吡卡胺散瞳后晶状体混浊类型,并以前置镜进行眼底检查。本研究经医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞全 RNA 的提取

六孔板每孔细胞中加1mL Trizol,冰上放置5min,枪头吹打。将各孔裂解液吸到1.5mL EP管中,加入氯仿0.2mL/管,摇匀15s。15℃~30℃下孵育2~3min,离心(4℃,12000g,15min)。离心后液体分为三层(上层无色水样层为RNA,中层白色为DNA,底层红色为蛋白质),小心吸取上层无色液体移入一新的EP管中。加入等体积异丙醇,0.4~0.5mL,混匀,15℃~30℃下孵育10~30min,离心(4℃,12000g,10min)。其中如果加入等体积异丙醇后,置于试管架上用PE手套密封后,放于4℃冰箱中,沉淀30min效果更好。去上清,沉淀加入75%乙醇1mL,漩涡振荡30s,离心(4℃,7500g,5min)。小心去上清,管内沉淀在超净台中鼓风机静置干燥3~5min。最好是用枪头吸取上清,尽量除去。加入20 $\mu$ L DEPC水溶解,分装5 $\mu$ L/管,-80℃冰箱保存。

#### 1.2.2 DNA 探针和捕获探针与显色探针的设计

本课题组在前期研究中发现 $\alpha$ B-晶状体蛋白上调,可能与 $\alpha$ B基因变异有关。而根据文献记载 $\alpha$ B-晶状体蛋白由CRYAB基因编码,目前已知的CRYAB基因的突变位点约10个,包括R120G<sup>[3]</sup>、D109H<sup>[4]</sup>、D140N<sup>[5]</sup>、450delAb<sup>[6]</sup>、R11H<sup>[7]</sup>、P20S<sup>[8]</sup>、P20R<sup>[9]</sup>、Au171T<sup>[10]</sup>、R56W<sup>[11]</sup>、R69C<sup>[12]</sup>,R120G与D109H定位于同一外显子(A示丙氨酸或碱基,C示半胱氨酸或碱基,D示天冬氨酸,del示缺欠,G示片氨酸或碱基,H示组氨酸,P示脯氨酸,S示丝氨酸,T示碱基,W示色氨酸)。在NCBI中下载基因序列。DNA探针段来自保守区域段。将细胞提取液(含目标基因的mRNA)与含有突变位点的DNA探针结合,S1特异性核酸酶能够识别并清除一对碱基的错配,利用S1特异性工具酶,清除未完全配对的核酸,如检测探针不能与特定mRNA序列100%完全配对,将会被水解。此后将探针从双链状态解离为单链DNA探针。

我们选取了常见的7个突变位点,并针对上述探针设计捕获探针以及显色探针。各探针序列如表1。以上探针在上海生物工程和北大华大生物科技公司合成。

#### 1.2.3 固定捕获探针

将100 $\mu$ L、5 $\mu$ g/L链霉亲和素溶解在碳酸缓冲液中(0.05mol/L,pH=9.6)。被添加到小孔后用封口膜密封好。用PBS-Tween20(0.01mol/L,pH=7.2)冲洗3遍,每次用100 $\mu$ L牛血清蛋白溶于PBS(0.01mol/L,pH=7.2)中。37℃孵化30min后同样的方法洗涤。100 $\mu$ L 10nmol/L的具有生物素标签的捕获探针溶解在PBS里再添加到每个酶标板。最后,在37℃孵化30min后再次冲洗。微小探针存储在4℃备用。

#### 1.2.4 DNA 探针杂交实验

45 $\mu$ L细胞提取液,5 $\mu$ L 100nMaA的DNA探针溶解液,50 $\mu$ L矿物油装入离心管内,加热至94℃15min,30℃孵化1h。50 $\mu$ L S1核酸酶(60单位S1核酸酶在1.4mol/L NaCl,22.5mmol/L ZnSO<sub>4</sub>,250mmol/L CH<sub>3</sub>COONa中,pH=4.5)加入至各管,37℃孵化20min。加入200 $\mu$ L停止液后(62.5mmol/L NaOH,30mmol/L EDTA,0.5mol/L PBS,pH=7.2),离心管加热到94℃15min,冷却到室温(25℃)5min。100 $\mu$ L的上述混合液和10nmol/L显色探针溶解在杂交甲酰胺溶液(4 $\times$ SSC,10%甲酰胺,0.02% SDS,pH=7.2),再添加到每个涂以固定探针的基质中,再覆盖50 $\mu$ L的矿物油。最后,在45℃30min孵化后再冲洗。

在溶液中加入100 $\mu$ L的peroxidase(1:5000 PBS稀释液,0.1%牛血清白蛋白)吸附显色探针,37℃孵化15min,再冲洗。最后,将100 $\mu$ L TMB溶液(0.1mol/L柠檬酸,0.2mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,0.01% TMB)加入上述混合溶液中。37℃孵化15min后,加入50 $\mu$ L 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>用以停止显色反应。利用多功能酶标仪450nm波长处检测A<sub>450nm</sub>值,反应流程图见图1。

#### 1.2.5 酶联免疫吸附剂实验

利用酶联免疫吸附剂实验(ELISA)法检测先天性白内障患者CRYAB基因所编码的 $\alpha$ B-晶状体蛋白的表达。患者晶状体样本的浓度按照制造商(基础生物技术诊断有限公司)的指示。然后将50 $\mu$ L样品加入到存在抗体的预涂层中,再加入100 $\mu$ L的5% BSA。每孔中覆盖好并37℃孵化1h。然后每孔均洗五次蒸馏水。加入辣根过氧化物酶,每孔覆盖好再次37℃孵化1h。然后每孔均以蒸馏水洗5次。50 $\mu$ L的底物(0.1%四亚甲基化合物)加入每孔中。加入50 $\mu$ L的终止液(2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。30min内利用微板块于450nm波长处检测A<sub>450nm</sub>值。

## 2 结果

### 2.1 双特异探针杂交试验特异性

DNA探针可以通过与其他相关序列相似的mRNA结合检测特异性(图2)。DNA探针至少有两个碱基对与其他基因不同。通过核酸酶纠错方法,寡聚核苷酸探针可检测出两个碱基对以内的差异。我们的研究结果中显示在正常组血样中,未检出显色信号,而先天性白内障组中荧光信号显著。除此之外,DNA探针的(G+C)%为46.3%,捕获探针和显色探针分别为44.4%、40.7%。这表明当探针的(G+C)%在40%~60%,杂交试验能顺利进行,尤其当比例接近正反引物之间。

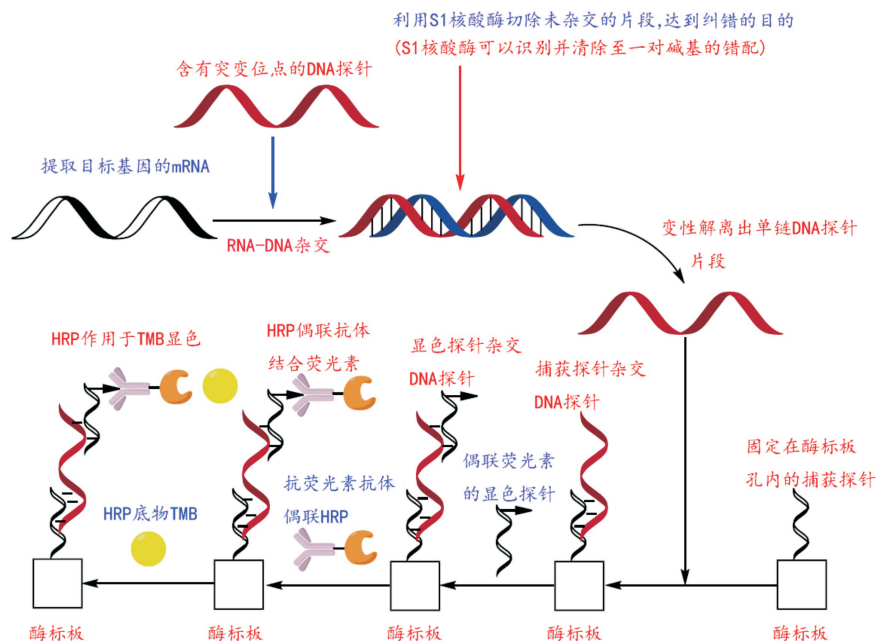


图1 DNA探针杂交原理图。

表1 各突变位点探针序列

突变位点 11 序列:5'-CACCACCCCTGGATCCACCGCCCTTCTTTCCT-3' 捕获探针:3'-GTGCTGGGACCTAGTGCGGGAAGAAAGGA-5' 结合探针:5'-TACGTCCACACCCCT-3' 显色探针:3'-CTTCTTTCCTAAGGC-5'-FITC
突变位点 20 序列:5'-TTTCCTTTCCTCCACTCCCCAGCCGCCTCTTTGAC-3' 捕获探针:3'-AAAGGAAAGGTGAGGGGGTTCGGC GGAGAAACTG-5' 结合探针:5'-AGACTTTTCCTTTC-3' 显色探针:3'-CCTCTTTGACATTAC-5'-FITC
突变位点 56 序列:5'-CCACCCTCCTTCCTGTGGGCACCCAGCTGGTTTGACA-3' 捕获探针:3'-GGTGGGAGGAAGGACACCCGTGGGTCGACAAACTGT-5' 结合探针:5'-ATTAGCCACCCTCCT-3' 显色探针:3'-TGGTTTGACATTAGT-5'-FITC
突变位点 69 序列:5'-GGACTCTCAGAGATGTGCCTGGAGAAGGACAGTTCT-3' 捕获探针:3'-CCTGAGAGTCTCTACACGGACCTCTTCTGTCCAAGA-5' 结合探针:5'-GGACTCTCAGATTAG-3' 显色探针:3'-GACAGTTCTAAGCA-5'-FITC
突变位点 109 序列:5'-CATGAAGAGCGCCAGCATGAACATGGTTTCATC-3' 捕获探针:3'-GTACTTCTCGCGGTCTGACTTGTACCAAAGTAG-5' 结合探针:5'-CATGAAGAGCATGAC-3' 显色探针:3'-TGGTTTCATCATCGA-3'-FITC
突变位点 120 序列:5'-TCCAGGGAGTTCCACGGGAAATACCGGATCCCA-3' 捕获探针:3'-AGGTCCCTCAAGGTGCCCTTTATGGCCTAGGGT-5' 结合探针:5'-TCCAGGGAGTAATGA-3' 显色探针:3'-CCGGATCCCATGACA-5'-FITC
突变位点 140 序列:5'-TCATCCCTGTCATCTAATGGGGTCTCACTGTG-3' 捕获探针:3'-AGTAGGGACACTAGATTACCCCA GGAGTGACAC-5' 结合探针:5'-TCATCCCTGTATGGA-3' 显色探针:3'-CCTCACTGTGAACCT-5'-FITC

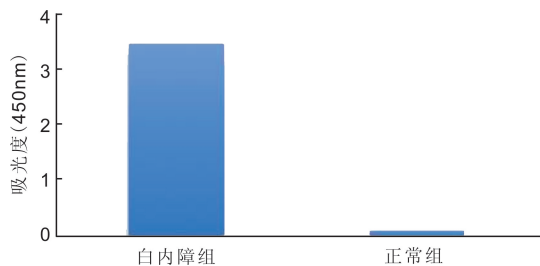


图2 双特异探针杂交试验特异性。

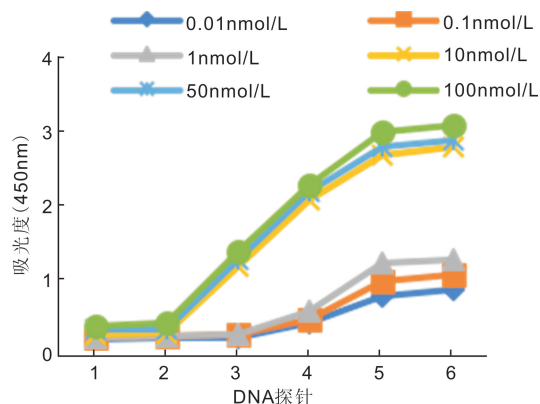


图3 不同浓度捕获探针对试验的影响。

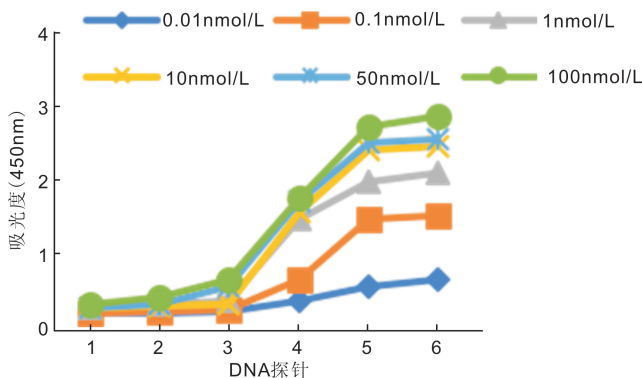


图4 不同浓度显色探针对试验影响。

**2.2 双特异探针杂交试验最佳浓度的选择** 本实验通过浓度梯度的改变来探索探针的最佳浓度,结果显示信号强度的增加随浓度的增加呈S形曲线增长,如图3~4。当捕获探针或显色探针浓度从1~10nmol/L增长时,信号迅速增长。当浓度低于1nmol/L时,检测信号减弱;当浓度高于10nmol/L,最大光吸收值变化不大。这可能是由于折叠结构易形成而且复合单元结构在高浓度下容易被保护。因此10nmol/L是捕获探针和显色探针的工作浓度。

**2.3 双特异探针杂交试验最佳时间的选择** 最理想的杂交时间是减少杂交试验的周期。在杂交梯度检测过程中,当杂交时间分别为10、30、60、90、180min时,杂交效率为31%、42.6%、90.2%、96.5%和81.3%(图5)。超过1h后可能与DNA探针的退化和浪费时间有关系。所以,60min作为双特异探针杂交试验过程中的最适宜时间,30min是杂交第二和第三步的时间。

**2.4 双特异探针杂交试验最佳温度的选择** 有文献报道温度能影响杂交反应的效率,温度改变了分子运动和探针的二级结构。最佳反应温度( $T_m$ )和G+C浓度、探针长度、离子浓度和甲酰胺浓度等其他因素相关。一般的反应

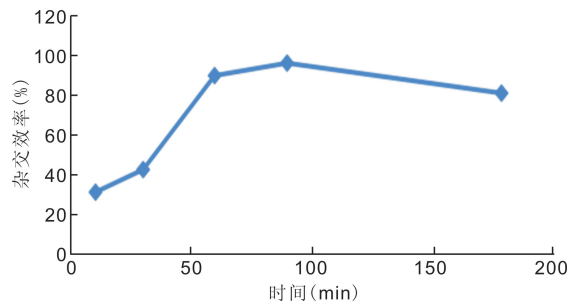


图5 双特异探针杂交试验最佳时间。

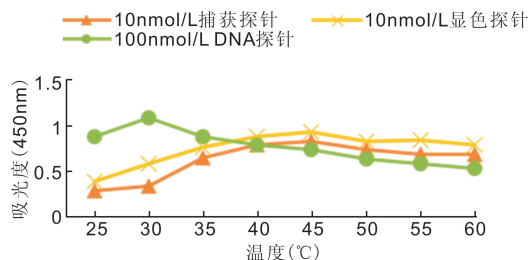


图6 双特异探针杂交试验最佳温度。

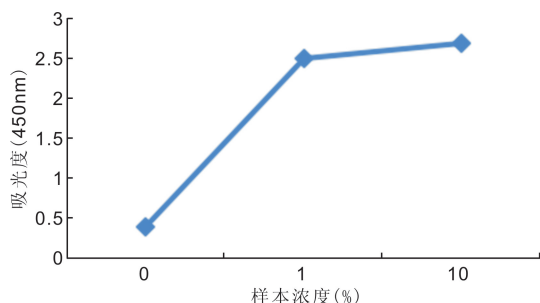
图7  $\alpha$ B-晶状体蛋白通过ELISA法检测。

表2 各突变基因位点检测杂交阳性率

基因位点	11	20	56	69	109	120	140
杂交效率(%)	99.5	99.6	99.5	99.7	99.7	99.5	99.5

温度是25°C。在我们的试验中, $T = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \times \lg M + 0.41 \times (G+C)\% - 500/n - 0.61$  (甲酰胺%) - 25°C; M为钠离子体积摩尔浓度(mol/L); n为探针长度。基于以上公式,算出29°C、46°C和45°C是三个阶段的反应温度,基本上与测试结果的30°C、45°C和45°C的反应温度一致(图6)。

**2.5 双特异探针杂交试验检测阳性率** 双特异探针杂交试验按照碱基互补原则,检测突变基因的阳性率较高,结果见表2。

**2.6 ELISA检测 $\alpha$ B-晶状体蛋白** 不同浓度样本中1%以上浓度检测结果阳性,阳性率可达85.9%,但只能检测到蛋白水平,推测 $\alpha$ B-晶状体蛋白上调由于CRYAB基因突变所致(图7)。

### 3 讨论

先天性白内障是儿童致盲性眼病,致病因素较多,包括风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒等所致宫内感染<sup>[13]</sup>、低体质量出生儿<sup>[14]</sup>、遗传因素<sup>[1]</sup>等,与先天性白内障的发生均具有一定的相关性,其中遗传因素占重要地位。晶状体发育过程中受多基因及其产物的调控,先天性白内障具有高度的遗传异质性和临床异质性,不同的基因

突变可导致同类型的先天性白内障发生,相同的基因突变可导致不同类型的先天性白内障的发生,已发现的突变基因已有30余种。双特异探针杂交试验具有较高特异性和灵敏性。原理包括三个步骤:核酸酶纠错,捕获探针的固定,显色探针的转移和检测(图1)。在核酸酶纠错阶段,第一次杂交反应是DNA探针和mRNA在粗糙的细胞溶解产物中进行,不稳定的mRNA信号可转换成同样数量的DNA信号,不完全匹配的DNA探针均被S1核酸酶清除掉。在捕获探针固定阶段,捕获探针以非共价键固定在链霉亲和素和生物素间的底部。这两个阶段可以在同样的条件下同时进行,试验的时间可以明显缩短。在信号转移和检测的阶段,第二次杂交反应是DNA探针和固定探针,第三次杂交反应是DNA探针和显色探针。抗荧光素抗体偶联HRP连接着显色探针的3'端。每个步骤中散发的探针和混合物,如方法中描述的步骤冲洗掉。虽然HRP和TMB系统中存在显色反应,但最后混合物的信号强度通过酶标仪测量。双特异探针技术检测突变基因的试验操作简单,灵敏度高,可重复性高,经济实惠,在临床上用于产前诊断、优生优育具有重要的应用价值。因此如果我们从基因学角度对先天性白内障进行早期筛查,并及时孕期进行干预,可有效降低先天性白内障患儿出生率。

随着分子生物学发展,生物检测技术在临床疾病中的应用可明显提高疾病检出率,为疾病的早发现、早诊断、早治疗提供了技术支持。然而早期的生物检测技术如全基因组扫描、全外显子测序、目标区域捕获测序、全基因组重测序等,可用于发现致病基因和突变位点,但是由于花费高、方法繁冗、效率低下等原因在临床中推广困难。临床上开始不断探索快速敏感有效的临床检测方法。Avelino等<sup>[15]</sup>利用DNA探针与靶基因结合,再通过纳米聚苯胺-金复合物的电化学DNA生物传感器检测早期白血病患者体内是否含有该染色体易位的基因。Kitajima等<sup>[16]</sup>开发了TaqMan探针小沟结合物(MGB)逆转录定量PCR(RT-qPCR)系统,该系统通过特异性探针和引物对两个基因型的AIV进行检测,为AIV在临床粪便标本和环境样品常规诊断提供快速、简便的方法。Srilohasin等<sup>[17]</sup>利用DNA芯片作为基因分型工具,评估结核分枝杆菌复合体(MTBC)临床分离株进化模式,利用单核苷酸多态性,鉴别MTBC的物种和基因型,DigiTag2测定是高弹性的,含有相同的探针和DNA阵列施加至高度富含GC的分支杆菌基因组中,能够简单、灵活、快速地检测出结核分枝杆菌分离株的基因型。因此DNA探针杂交试验具有较高的特异性和灵敏性、成本低、效率高的特点,临床上易于推广。

基于过往DNA探针的研究经验,本次研究我们设计的双特异探针是通过碱基配对原则,将提取的mRNA与含有突变位点的DNA探针结合,在S1核酸酶的帮助下,切除未配对及错配的单个碱基,双链DNA解离成含突变位点的单链DNA片段。分别与固定的捕获探针及偶联荧光素的显色探针通过碱基配对原则结合,形成捕获探针-DNA探针-显色探针三明治结构。抗荧光素抗体偶联

HRP连接着显色探针,HRP催化TMB发生反应,产生颜色变化,将信号放大。虽然HRP和TMB系统中存在显色反应,但最后通过多功能酶标仪测量混合物的信号强度。这种方法能够检测出血液中含有单个碱基突变mRNA,具有高效的特异性和灵敏性。

以往临床上常见的检测方法有酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),而ELISA法虽然操作简单,但是检测成本高,且大多用于蛋白表达量的检测,少有文献报道用这种方法来检测突变基因,而且基于物种抗体在这种技术上的特殊材料比较贵,且难以获得。双特异探针杂交技术是一种新型定性和定量检测的方法,具有原料简单、成本较低、快速准确等优点。利用PCR扩增技术筛选相关致病基因也是临床上常用的检测方法,该方法需大量引物,操作复杂、费用高、耗时长、风险大。Valero等<sup>[18]</sup>利用外显子测序方法检测基因变异率仅93.4%。Kumar等<sup>[19]</sup>对所有的外显子编码区域使用PCR扩增和直接测序法检测核苷酸变异,仅检出晶状体蛋白家族( $\alpha$ -和 $\gamma$ -晶状体蛋白)占66%的变异,而连接素占总变异的44%。Maruoka等<sup>[20]</sup>应用外显子测序的方法检测突变基因,突变检测率为92.1%。而利用双特异探针技术在本项研究中表明在合适的探针浓度、时间、温度下,双特异探针技术能够快速、灵敏地显示出有无三明治结构,同时检测出血样中是否含有突变基因,为具有先天性白内障家系的孕妇提供安全、有效的产前诊断,能够快速且灵敏地检测出胎儿是否携带先天性白内障突变基因,对先天性白内障的早期诊断和防治具有重要意义。我们利用双特异探针技术明显提高了突变位点的检出率,检出率高达99%以上。

目前临床上手术治疗先天性白内障的方法已然成熟,包括在摘除白内障的同时,进行前段玻璃体切割联合后囊膜切除,术后的弱视训练对于患者的视觉重建是最困难的部分,目前临床上仍缺乏对先天性白内障有效的预防措施。该试验高效、经济地为先天性白内障家系中的产妇进行筛查创造了良好的条件,为减少该疾病的发生率提供实验基础,对提高国人视觉质量具有重要意义。

#### 参考文献

- 1 Yi J, Yun J, Li ZK, et al. Epidemiology and molecular genetics of congenital cataracts. *Int J Ophthalmol* 2011;4(4):422-432
- 2 邵珺,朱靖,储兆东,等.先天性白内障患者和正常人晶状体蛋白质组的差异分析. *眼科新进展* 2013;33(4):327-330
- 3 Vicart P, Caron A, Guicheney P, et al. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene cause a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 1998;20(1):92-95
- 4 Saceoni S, Frasson L, Antoine JC, et al. A novel CRYAB mutation resulting in multisystemic disease. *Neuromuscul Disord* 2012;22(1):66-72
- 5 Liu Y, Zhang X, Luo L, et al. A novel ctB-crystallin mutation associated with autosomal dominant congenital lamellar cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(3):1069-1075
- 6 Berry V, Francis B, Reddy MA, et al. Alpha-B crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans. *Am J Hum Genet* 2001;69(5):1141-1145

7 Chen Q, Ma J, Yan M, *et al.* A novel mutation in CRYAB associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family. *Mol Vis* 2009;15:1359–1365

8 Liu M, Ke T, Wang Z, *et al.* Identification of a CRYAB mutation associated with autosomal dominant posterior polar cataract in a Chinese family. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(8):3461–3466

9 Xia XY, Wu QY, An LM, *et al.* A novel P20R mutation in the alpha-B crystallin gene causes autosomal dominant congenital posterior polar cataracts in a Chinese family. *BMC Ophthalmol* 2014;14:108

10 Devi RR, Yao W, Vijayalakshmi P, *et al.* Crystallin gene mutations in Indian families with inherited pediatric cataract. *Mol Vis* 2008;14:1157–1170

11 Safieh LA, Khan AO, Alkuraya FS. Identification of a novel CRYAB mutation associated with autosomal recessive juvenile cataract in a Saudi family. *Mol Vis* 2009;15:980–984

12 Sun W, Xiao X, Li S, *et al.* Mutation analysis of 12 genes in Chinese families with congenital cataracts. *Mol Vis* 2011;17:2197–2206

13 Mahalakshmi B, Therese KL, Devipriya U, *et al.* Infectious aetiology of congenital cataract based on TORCHES screening in a tertiary eye hospital in Chennai, Tamil Nadu, India. *Indian J Med Res* 2010;131:559–564

14 Prakalapakorn SG, Rasmussen SA, Lambert SR, *et al.* Assessment of risk factors for infantile cataracts using a case-control study: National

Birth Defects Prevention Study, 2000–2004. *Ophthalmology* 2010;117(8):1500–1505

15 Avelino KY, Frias IA, Lucena – Silca N, *et al.* Attomolar electrochemical detection of the BCR/ABL fusion gene based on an amplifying self-signal metal nanoparticle-conducting polymer hybrid composite. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016;148N:576–584

16 Kitajima M, Hata A, Yamashita T, *et al.* Development of a reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of aichi viruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(13):3952–3958

17 Srilohasin P, Chaiprasert A, Tokunaga K, *et al.* Novel DNA chip based on a modified DigiTag2 assay for high-throughput species identification and genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *J Clin Microbiol* 2014;52(6):1962–1968

18 Valero MC, Martin Y, Hernandez IE, *et al.* A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn* 2011;13(2):113–122

19 Kumar M, Agarwal T, Khokhar S, *et al.* Mutation screening and genotype phenotype correlation of  $\alpha$ -crystallin,  $\gamma$ -crystallin and GJA8 gene in congenital cataract. *Mol Vis* 2011;17:693–707

20 Maruoka R, Takenouchi T, Torii C, *et al.* The use of next-generation sequencing in molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: A Validation Study. *Genet Test Mol Biomarkers* 2014;18(11):722–735