

强直性脊柱炎患者 16 号染色体区域遗传易感位点的大家系全基因组测序验证及筛选

吕青, 李秋霞, 郑栩琪, 林智明, 曹双燕, 廖泽涛, 魏秋静, 祁军, 方霖楷, 古洁若*
(中山大学附属第三医院风湿免疫科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】前期家系 GWAS 非参数分析结果提示在 16 号染色体 chr16:27836693-53825488, LOD=1.656。我们选择一个大的中国汉族强直性脊柱炎家系, 采用全基因组外显子测序进一步验证和筛选该区的疾病易感基因位点。【方法】选取一个具有 47 个成员的 5 代中国汉族强直性脊柱炎大家系, 其中先用家系中 3 名患者(1 名男性, 2 名女性, 分属 3 代)的基因组 DNA 进行外显子区高通量测序; 对于初筛的外显子组测序后所得到的 SNP 位点进行全家系成员验证, 并进行家系患者和非患者成员间比较, 及与健康人群数据进行比较。【结果】通过对数据所进行的分析, 发现在 16 号染色体强直性脊柱炎关联区域三个样本共有 SNP 165 个。对上述 165 个 SNP 进行初步筛选后, 对其中的位于 15 个基因的 29 个 SNP 位点, 在 1 个 AS 患者和 1 个非 AS 患者中进行初步验证, 进而在上述关联区域内得到 5 个在家系 AS 患者和其他非 AS 患者间差异有显著性的 SNP 位点 rs10163354、rs11863236、rs16945916、rs28654935 和 rs8043751 ($P < 0.05$), 位于 ABCC11 基因。【结论】该家系研究提示在 16 号染色体区域的 ABCC11 基因变异可能与 AS 易感性相关, 值得扩大样本进一步研究。

关键词:强直性脊柱炎; 外显子测序; 易感基因

中图分类号: R593.23 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2015)01-0033-09

Region of Chromosome 16 Associated with Genetic Susceptibility of Ankylosing Spondylitis: Exome Sequencing and Validation Study of A Family

LV Qing, LI Qiu-xia, ZHENG Xu-qi, LIN Zhi-ming, CAO Shuang-yan, LIAO Ze-tao, Wei Qiu-jing, QI Jun, FANG Lin-kai, GU Jie-ruo*

(Department of Rheumatology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510630)

Corresponding author: GU Jie-ruo, E-mail: gujieruo@163.com

Abstract:【Objective】This research selected a Chinese Han family as subject. The candidate region was chr16:27836693-53825488, LOD = 1.656, which was found by GWAS. Three family members was included in the exon sequencing (one male an three female, and belongs to three generation). SNPs were annotated, and validated by Sanger sequencing to find susceptible gene of AS.【Method】 This research included three family members in the exon sequencing (one male an three female, and belongs to three generation). Sequence all of candidate SNPs in one patient and one health volunteer of this family. The SNPs which were different in patient and healthy volunteer will be sequenced in all of family members.【Result】 Base on the research of our group, 165 SNPs were found in the susceptible region of AS. Filter these SNPs and sequence them in all of family members. Five SNPs, rs10163354, rs11863236, rs16945916, rs28654935, and rs8043751, in ABCC11 gene, was found ($P < 0.05$).【Conclusion】Base on the research of our group, Five SNPs, rs10163354, rs11863236, rs16945916, rs28654935, and rs8043751, in ABCC11 gene, was found. Provide the necessary clue to the future research.

Key words: ankylosing spondylitis; exome sequencing; susceptible gene

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(1):33-41]

收稿日期: 2014-10-06

基金项目: 中山大学临床医学研究“5010 计划”项目(编号: 2007023)

作者简介: 吕青, 住院医师, 研究方向: 内科学风湿免疫方向; * 通信作者: 古洁若, 教授, 主任医师, E-mail: gujieruo@163.com

强直性脊柱炎是我国常见多发的风湿性疾病,其患病率约 0.2% ~ 0.4%^[1],平均患病年龄为 26 ~ 29 岁^[2]。遗传和环境因素在本病的发病中发挥作用^[3-4]。强直性脊柱炎的发病机理至今不明,但对其易感性遗传因素占了大部分比例,HLA-B27 阳性者罹患强直性脊柱炎的概率是 HLA-B27 阴性者的 200 ~ 300 倍;尽管如此,仅有约 36% 的基因是 HLA 连锁基因,还有很多未知的非 HLA 连锁基因参与强直性脊柱炎的发病及疾病进程^[5-8]。Brown 等^[9-10]于 1997 年首先报道 HLA 区域及紧邻 TNF 基因区域均发现强直性脊柱炎相关位点,提示 HLA 区及非 HLA 区域均存在强直性脊柱炎易感基因位点。国内顾鸣敏等^[11]也用微卫星引物对 9 个强直性脊柱炎家系进行全基因组扫描,结果提示中国人 D6S1691、D6S276、D6S1618 区域存在强直性脊柱炎的易感基因位点,这与国外的某些研究相近;国外研究中未提及的连锁位点 D3S1292、D4S1535 和 D18S64,在国内的研究中却得出与强直性脊柱炎存在连锁的结果。第二代测序以 Sanger 测序方法为基础,测序的核心思想为边合成边测序。全过程包括基因组 DNA 剪切、杂交捕获、磁珠捕获、纯化几个关键步骤。测序后数据通过 Burrows-Wheeler Aligner (BWA)-short 和 BWA-SW 两种算法^[12-13],排列出有间隙的核苷酸序列,并通过 Sequence Alignment/Map(SAM)格式储存^[14-15]。二代测序目前已经广泛用于遗传相关疾病研究领

域^[16]。本研究选用外显子组测序的方法获得和参考序列存在差异的 SNP,并进行验证,为寻找强直性脊柱炎易感位点,明确易感基因及揭示发病机制等后续研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 临床资料

本实验选取一个具有 47 个成员的 5 代中国汉族强直性脊柱炎家系作为研究对象,家系中强直性脊柱炎患者均由至少 2 位风湿病学科专家明确诊断为强直性脊柱炎,诊断标准为 1984 年强直性脊柱炎纽约修订标准;家系中健康成员均由至少 2 位风湿病学科专家排除强直性脊柱炎诊断。所有在世患者及健康家系成员均进行临床资料采集,同时采集 EDTA 抗凝外周血标本 4 mL。外显子组测序共检测 47 人家系中的 3 名患者(1 名男性,2 名女性)分属 3 代,家系图中编号 7、8、18(图 1)。测序后筛选出的位于强直性脊柱炎易感区域内的 SNP 位点,在整个家系的强直性脊柱炎患者及非 AS 患者中进行验证。

1.2 外显子测序

盐析法提取基因组 DNA。将基因组 DNA 随机打断成 150 ~ 200 bp,参照 Ageilent <SureSelect Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library> Version 2.2 October 2010^[17-19]进

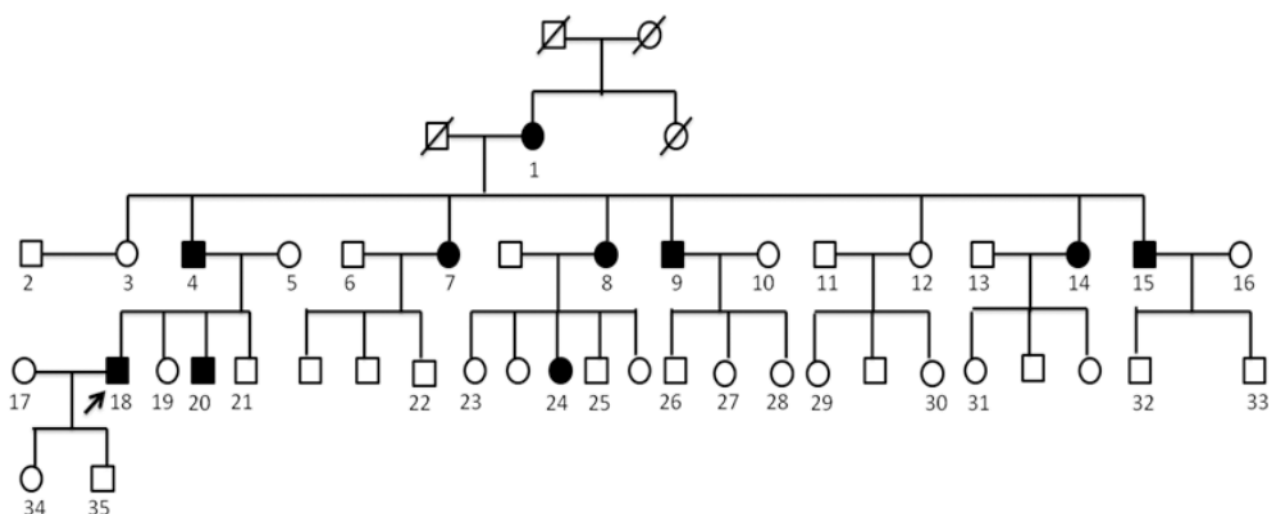


图 1 强直性脊柱炎家系图

Fig.1 Family tree of ankylosing spondylitis family

行文库制备、样品捕获,后选用 Illumina HiSeq 2000 测序仪捕获荧光信号,并通过计算机软件将光信号转化为测序峰,从获得待测片段的序列信息。

1.3 测序数据分析

产出数据去除读长末端 75 bp,滤去多于 4 次碱基错配的读长,以及重复序列得到高质量的产出数据。使用 BWA 软件与参考基因组序列比对,得出读长库。使用 SAMTools 软件中 vcftools 工具,

在测序深度大于 4X 的单碱基多态性位点中检测出候选突变。对 SNP 过滤 dbSNP、炎黄和 1000 genome 数据库。对高质量的 SNP 分别进行捕获区域、所在数据库、功能区域、基因功能以及编码氨基酸改变(AAS, Amino acid substitution)进行注释,选出亚洲人群 SNP 频率低于 0.05 的位点,进入后续验证。

1.4 测序数据验证

聚合酶链式反应(PCR)扩增 DNA 样本,按照测

表 1 验证 SNP 位点及引物设计
Table 1 Primer design of SNPs verification

SNP	chain	Primer	SNP	chain	Primer
rs235648	left	GATCAATCGGCCTTTTACCA	rs74017766	left	GTGGAAGTGGTTTTGCCACT
	right	CACCACATCCGGCTACTTTT		right	TGCCATGCTTCTGTACAACC
rs2450399	left	TGAAGACACTGCACCCAGAG	rs72622218	left	CCTCTTCACCCCTCATCCC
	right	TTGAGCTGGGCTTTAGGAAA		right	CTCTTCCCTTCTGCCTTTC
rs75331747	left	TTCTGACCCAAGACCCAGAC	rs7197010	left	TCCTGCATCATATCTTCCC
	right	ATCCCGTGGTGTCTTCACTC		right	CCTGAGTTCAAGCGATTCTT
rs12447833	left	GAAAGCTTACTGCGGGACAG	rs58456141	left	CCCACCTTCAGGGTTCTCG
	right	GCTAGAGTGGCAGCAGGACT		right	AAGCAGTCCTTCGGTCAT
rs4889535	left	CTGTGAGCAGCTGTGTTGGT	rs62042678	left	CCCACCTTCAGGGTTCTCG
	right	CTGTCTGGCTTCCAGTCTC		right	AAGCAGTCCTTCGGTCAT
rs2303221	left	AGTCGGAGAAGAGCCCCTAC	rs77880079	left	GGCTGAAGGCAGAGGATG
	right	AGCCTGAGTGTCTGGGAGAG		right	GCCAAAGTGAGGGAAAT
rs7188189	left	AACCCCCAGAAATCCAGAGT	rs28710096	left	CTGTCTGCCGCCCTTACACA
	right	CCCCTTCACTCATCATGTCC		right	TCGTCACCCACCAAACCC
rs10163354	left	CAGGTATCCAAGGCCAGTA	rs28482103	left	CTGTCTGCCGCCCTTACACA
	right	TGTGTCTCGAAGCTCCTTT		right	TCGTCACCCACCAAACCC
rs11866251	left	CAGCCTGGAGCTAAAGGAGA	rs2519366	left	CACCCATCTTACCTTCCC
	right	ATTTGAACCCAGGGCTCTCT		right	ACTCCCTCAGCCTTTTGT
rs11863236	left	AGCACATTCTGGGGAGAAGA	rs4785376	left	GCTAGTAACATCGCAAAT
	right	CCTTCCTTTCAAGCCTTCT		right	ATAGGGAATGAATGTAGGA
rs8043751	left	GTGAGGTCCATGATGGCAAAG	rs16945916	left	TTCTTCCGCAGTACCTCC
	right	TGTGGGTCAGAGCGAGTGC		right	CCGCTCTACTTTAGTTTCG
rs16945988	left	AAGACAGGAGGATGGAGG	rs57281432	left	TGAATGTCTTTATGCCTTTG
	right	AGAGGAAAGAGCAGGCAC		right	TAATCCAGCACTTTGTG
rs13338978	left	TGACACTACTGACTTGGCTCTA	rs28654935	left	AAGACATTACCGCCAGTG
	right	CAGACGCTGAGATGTGGA		right	TTGGGTCATGGTTTCAGT
rs1062348	left	CTTTATGGAAGGAGGTAA	rs9927238	left	TCCATCGCTAAACCTCTG
	right	ATTGAAGGTGTAGGCATT		right	ACCTCAAGTGATCCACCC
N	left	CACCTCATGGCACTCACC			
	right	TTCCTGGCATGTAGCACA			

表 2 家系 AS 患者临床资料统

Table 2 Clinical data of AS patients in the family

No.	Age/year	Gender	Onset age/year	Duration/year	Iritis	Dactylitis	Hip involved	Arthritis	IBP*	B27
1	80	Female	30	50	-	-	-	-	+	+
4	56	Male	10	46	-	-	-	-	+	+
7	52	Female	30	22	-	-	-	+	-	+
8	51	Female	40	11	-	-	-	-	+	+
9	48	Male	28	20	-	-	-	-	+	+
14	41	Female	25	16	-	-	-	-	+	-
15	36	Male	18	18	-	-	-	-	+	+
18	31	Male	20	11	-	-	-	+	+	+
20	26	Male	23	3	-	-	-	-	+	+
24	25	Female	12	13	-	-	-	-	-	+

IBP: inflammatory back pain.

序试剂盒 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 说明书及 <Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers Sequencing Chemistry Guide (Part Number 4331467Rev. B 11/2002)>进行一代测序验证。PCR 引物设计见表 1。

1.5 统计学分析处理

采用 SPSS 11.0 统计软件 χ^2 检验进行基因型和等位基因频率分布差异分析; 连锁不平衡分析采用 Haploview 软件。

2 结 果

2.1 家系患者临床资料

该家族中患者平均年龄(44.6 ± 16.6)岁, 男女比例 5:5, 平均起病年龄(23.6 ± 9.0)岁, 平均病程(21.0 ± 15.2)年; 所有患者均以中轴型脊柱关节炎为主要表现, 表现临床表现较一致, 8/10 患者有炎性背痛, 所有患者均未出现虹膜炎、指/趾炎、骶

关节受累; 该家系中患者 HLA-B27 阳性比例为 9/10。按图 1 进行家系成员编号, 患者临床资料统计如表 2。

2.2 外显子组测序结果

对外显子测序三个样本进行质量统计, 3 个样本产出总数据量分别为 13 962 874 600 bp、12 351 753 600 bp 和 11 813 262 600 bp, 目标区域平均测序深度分别为 65.9 \times 、67.0 \times 和 72.6 \times , 捕获碱基深度 4 \times 以上比例分别为 94.06%、93.76% 和 93.76%, 捕获碱基深度 10 \times 以上比例分别为 89.74%、88.19%和 88.53%, 符合质量要求。

使用 SAMTools 软件中 vcftools 工具, 在测序深度大于 4 \times 的单碱基多态性位点中检测出候选突变。过滤 dbSNP、yhSNP、1000genomeSNP 数据库后 3 个样本所得 SNP 数量分别为 956、939 和 896。基于本课题组前期研究, 将强直性脊柱炎易感区域定位于 chr16:27836693 -53825488 (GRCh37.p5); 对 3 个样本在于该区域中 SNP 位

表 3 一个 AS 全家系成员测序验证得出差异 SNPs

Table 3 The sequencing result of all of family members; different SNPs in patients and healthy volunteers

SNP	Ref. base	Validation	Validation Frequency	Validation Frequency in AS family		P value	Gene	Function	Amino acid
			in Asian populations	AS patients	Healthy volunteers				
rs10163354	A/A	A/G	0.000	10/10	7/25	0.00	ABCC11	intron	
rs11863236	G/G	G/T	0.023	10/10	7/25	0.00	ABCC11	synonymous	Phe [F]
rs16945916	T/T	T/C	0.000	10/10	6/25	0.00	ABCC11	missense	His [H]-Arg [R]
rs28654935	T/T	T/C	0.500	10/10	6/25	0.00	ABCC11	intron	
rs8043751	G/G	G/T	0.000	10/10	5/25	0.00	ABCC11	intron	

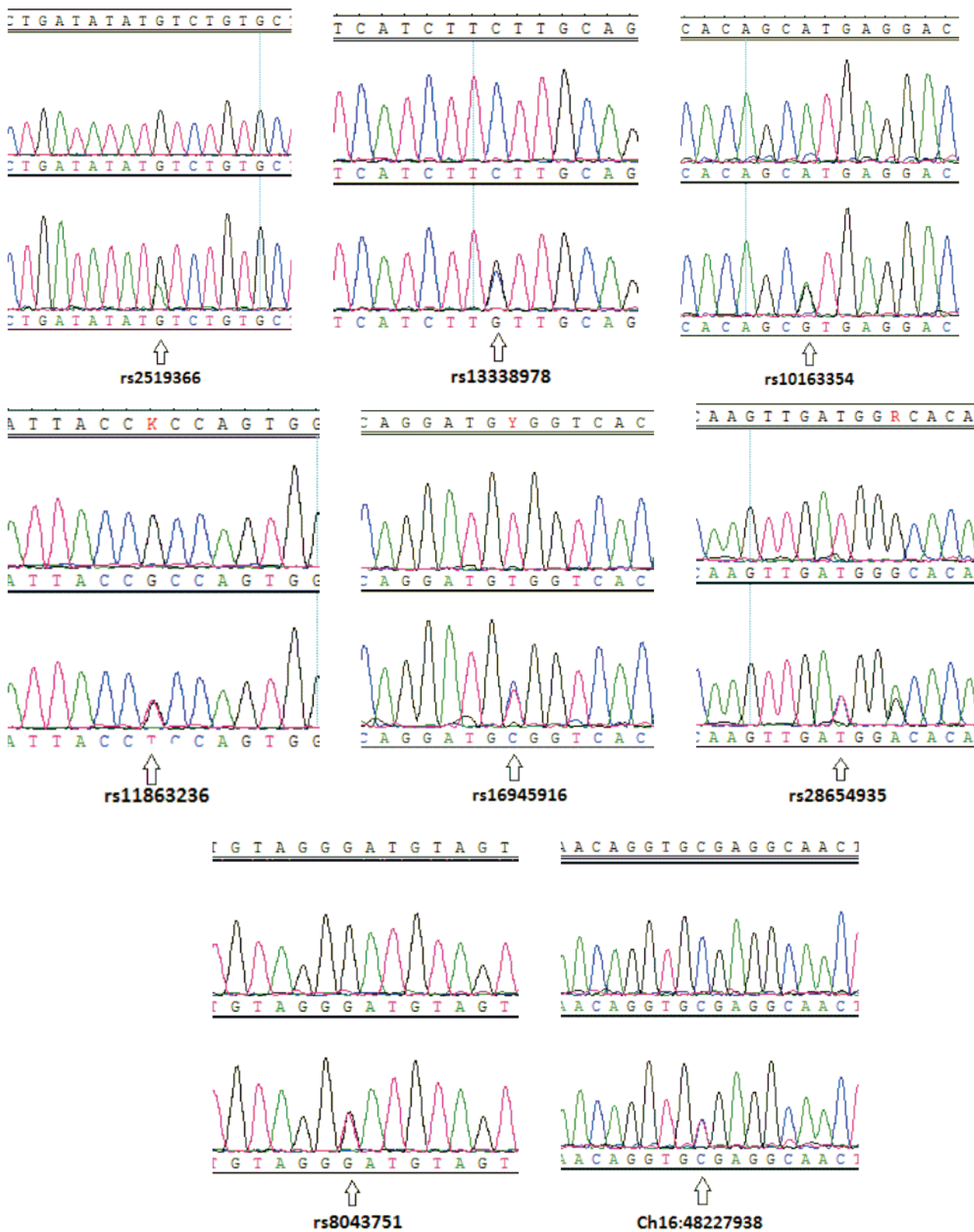


图 2 验证测序(1:1)测序图

Fig.2 Sequence diagram of verification test (1:1)

Inferior: Sequence diagram of AS patients, Superior: Sequence diagram of healthy control in AS family

点分别有 316、274、257 个。

2.3 测序数据验证结果

筛选出位于上述 chr16:27836693–53825488 (GRCh37.p5)区域内中国人群频率<0.05 或无相关

人群数据报道的 3 个个体共有的 SNP 位点共 29, 对这些位点在 1 个家系患者 (家系图中编号 1)及 1 个家系中非 AS 患者(家系图中编号 3)验证外显子组测序结果, 其中存在 8 个差异表达的位点 rs

	rs10163354	rs11863236	rs16945916	rs28654935	rs8043751
Human	A	G	T	T	G
Chimp	G	G	C	C	G
Gorilla	G	-	C	T	G
Orangutan	G	G	-	T	G
Rhesus	G	G	C	C	G
Baboon	G	G	C	C	G
Marmoset	-	G	C	C	G
Tree shrew	G	A	C	T	A
Squirrel	-	A	T	-	G
Rabbit	G	G	C	T	G
Pika	G	A	C	T	G
Alpaca	G	G	C	G	G
Dolphin	G	G	C	T	G
Cow	A	G	C	C	G
Horse	G	G	C	T	G
Cat	G	G	C	T	-
Dog	G	G	C	A	G
Hedgehog	G	G	C	-	G
Elephant	G	G	C	T	G
Rock hyrax	-	-	-	T	-
Armadillo	G	-	T	-	-
Opossum	A	G	C	-	G
Lizard	-	-	-	-	-
Tenrec	-	G	-	-	G
Platypus	-	C	C	T	-
Shrew	-	G	-	T	-
Guinea pig	-	G	-	-	-
Kangaroo rat	-	-	C	-	-
Mouse	-	G	A	-	A
Rat	-	G	A	-	-

图 3 SNP 保守型分析

Fig.3 Analysis of SNP conservative

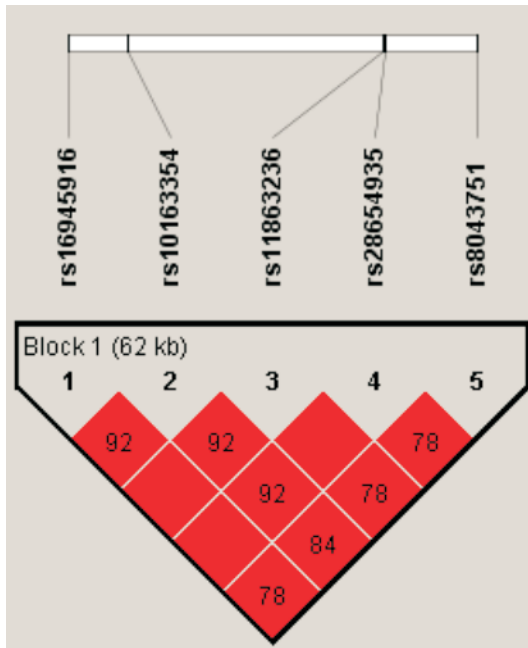


图 4 SNP 位点连锁不平衡分析

Fig.4 linkage disequilibrium of SNPs locus

Each square between SNPs loci on behalf of LD (range from 0 to 100), brunet color means strong LD, light color represents high LD, white represents low LD, the higher the LD values the stronger chain relationship.

2519366、ch16:48227938、rs10163354、rs11863236、rs16945916、rs28654935、rs8043751 和 rs13338978 (图 2)。

上述位点进行全家系验证,得到 5 个在家系 AS 患者和其他非 AS 患者间差异有显著性的 SNP 位点 rs10163354、rs11863236、rs16945916、rs28654935 和 rs8043751 ($P < 0.05$), 均位于 ABCC11 基因, 其功能(表 3)及保守性(图 3)注释见下。

2.4 连锁不平衡分析结果

对 rs10163354、rs11863236、rs16945916、rs28654935 及 rs8043751 位点进行连锁不平衡分析,考虑 5 个位点之间存在连锁(图 4)。

3 讨论

强直性脊柱炎最早的记录源于 1691 年,但它一直被认为是类风湿关节炎的变异类型。直到 1973 年,强直性脊柱炎与 HLA-B27 的强相关性被揭示后,强直性脊柱炎逐渐从类风湿关节炎中

独立出来,建立起脊柱关节病的概念^[20-23]。强直性脊柱炎的发病机理至今不明,但对其易感性遗传因素占了大部分比例,HLA-B27 阳性者罹患强直性脊柱炎的概率是 HLA-B27 阴性者的 200 ~ 300 倍;尽管如此,仅有约 36% 的基因是 HLA 连锁基因,还有很多未知的非 HLA 连锁基因参与强直性脊柱炎的发病及疾病进程。

DNA 测序作为基因水平上研究疾病的发病机制及干预手段的一项重要实验技术,在生物学、医学领域研究中有着广泛的应用。从 1977 年 Sanger 发明了具有里程碑意义的末端终止测序法开始^[24-25],DNA 测序向高效、准确、低成本方向不断改进。然而,随着现代科学技术对更高效、更低成本的 DNA 测序的需求,传统的 Sanger 测序已远远不能满足研究的需要。第二代测序技术应运而生。第二代测序以 Sanger 测序方法为基础,测序的核心思想为边合成边测序,能更加高效、低成本的完成高通量测序。外显子组测序的目标 DNA 片段,即外显子组序列,是利用外显子捕获芯片构建的外显子组 DNA 文库。测序后数据处理需经过核苷酸序列排列,并与相对较长的参考序列(例如人类基因组)进行匹配,及突变检测及注释等几个过程,得到可用的测序结果。

本实验选取一个具有 47 个成员的 5 代中国汉族强直性脊柱炎家系作为研究对象,其中包含强直性脊柱炎患者 11 人。家系中男性成员 23 人,女性成员 24 人;其中 4 人已故。家系中强直性脊柱炎患者均由至少 2 位风湿病学科专家明确诊断为强直性脊柱炎,诊断标准为 1984 年强直性脊柱炎纽约修订标准。本实验外显子组测序共检测 47 人家系中的 3 名患者,其中 1 名男性,2 名女性,分属 3 代。

本实验涉及 3 个样本,产出总数据量分别为 13.9G、12.4G 和 11.8G,其中高质量数据量分别为 12.4G、11.2G 和 10.7G,产出数据量较高,这是外显子组测序数据量、数据准确性、全面性及后续数据分析的基本保证;外显子组捕获效率分别为 47.49%、50.44% 和 56.08% (目标 +Flank 区域), 35.30%、37.64% 和 42.84% (目标区域),且覆盖外显子组捕获芯片 98% 以上区域,外显子区域获得

较高捕获效率,较高的捕获效率及覆盖范围是将有限的数量尽可能多的分布于目标区域,即研究的重点区域,以获取尽可能多的信息。以上两点是外显子测序得以高效、准确完成的基础。本实验目标区域平均测序深度分别为 65.9×、67.0×和 72.6×,其中捕获碱基深度 10×以上位点所占比例分别 89.74%、88.19%和 88.53%,这是测序数据准确性的根本保证,可认为测序深度达到 10×以上位点的准确性较可靠。

数据分析阶段将所得数据过滤 dbSNP、yhSNP、1000genomeSNP 三大正常人群 SNP 数据库,所得的 SNP 已除外了正常人群中常见 SNP 位点;这些 SNP 位点已去除了正常人常见核苷酸多态性,它们的出现很可能参与了疾病发生和疾病进程。对这些 SNP 进行位置、所在基因以及改变后引起的氨基酸表达及蛋白构型改变进行描述,对揭示其是否参与及怎样参与致病的机制有很大提示作用。

在课题组前期研究的基础上,本实验在 16 号染色体强直性脊柱炎关联区域 (chr16:27836693–53825488)发现三个样本共有 SNP 共 165 个。后续研究可围绕上述结果进行。对上述 165 个 SNP 进行初步筛选后,在该 47 个成员的 5 代中国汉族强直性脊柱炎家系的所有成员中进行初步验证,进而在该区域内得到 5 个 SNP 位点,位于 ABCC11 基因。这些位点均为罕见 SNP,但却在该强直性脊柱炎家系中以显著高于人群的频率出现,且强直性脊柱炎患者中较家系非 AS 患者又有较高的携带频率,具有统计学显著性差异,且 rs16945916 引起相应氨基酸改变,不能忽略其与强直性脊柱炎的关系。这为进一步寻找强直性脊柱炎易感位点,进行相关基因功能的研究,从而揭示其在强直性脊柱炎发病机制中发挥的作用,打下良好基础。

由于第二代测序技术的局限性及外显子组芯片捕获的局限性,本实验分析外显子核苷酸序列仅仅局限于芯片捕获及测序区域内,存在大量遗失的 DNA 分子信息;另第二代测序技术仍存在错配、错读等可能,所得数据分析结果中仍存在部分假阳性结果,仍需要进一步后需验证实验,提高实验准确性。而实验只验证了大量捕获 SNP 位点中

的一小部分,故仍然存在遗漏的可能。另本研究仅限于该家系内成员研究,未扩大样本验证,故所得结论尚存在一定局限性。

该家系研究提示在 ABCC11 基因共 5 个基因位点,为 rs10163354、rs11863236、rs16945916、rs28654935 和 rs8043751,可能与 AS 发病相关,值得扩大样本进一步研究。

参考文献:

- [1] Ng SC, Liao Z, Yu DT, et al. Epidemiology of spondyloarthritis in the People's Republic of China: review of the literature and commentary [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2007, 37(1): 39–47.
- [2] Hai-jun MA, Qing-feng YIN, Feng-ping HU, et al. Different clinical features in patients with ankylosing spondylitis from southern and northern China [J]. *Int J Rheum Dis*, 2012, 15(2): 154–162.
- [3] Brown MA. Progress in spondylarthritis. Progress in studies of the genetics of ankylosing spondylitis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(5): 254–260.
- [4] Hamersma J, Cardon LR, Bradbury L, et al. Is disease severity in ankylosing spondylitis genetically determined? [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(6): 1396–1400.
- [5] Brown MA, Brophy S, Bradbury L, et al. Identification of major loci controlling clinical manifestations of ankylosing spondylitis [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(8): 2234–2239.
- [6] Laval SH, Timms A, Edwards S, et al. Whole-genome screening in ankylosing spondylitis: evidence of non-MHC genetic-susceptibility loci [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(4): 918–926.
- [7] Reveille JD, Inman R, Khan M, et al. Family studies in ankylosing spondylitis: microsatellite analysis of 55 concordant sib pairs [J]. *J Rheumatol*, 2000, 27(Suppl 59): 5.
- [8] Wellcome Trust Case Control Consortium, Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium, Burton PR, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(11): 1329–1337.
- [9] Brown MA, Crane AM, Wordsworth BP. Genetic aspects of susceptibility, severity, and clinical expression in ankylosing spondylitis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2002,

- 14(4): 354–360.
- [10] Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment [J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(10): 1823–1828.
- [11] Gu MM, Yuan WT, Yang JQ. A genomewide scan for the susceptibility gene loci to ankylosing spondylitis in Chinese Han population [J]. *Yi Chuan Xue Bao*, 2004, 31(3): 217–220.
- [12] Heng Li, Richard Durbin. Fast and accurate long-read alignment with Burrows – Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(5): 589–595.
- [13] Li H, Durbin R. Burrows–Wheeler Aligner [S/OL]. (2010–02–28) [2013–06–20]. <http://bio-bwa.sourceforge.net>.
- [14] Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078–2079.
- [15] Li H, Handsaker B. SAMtools [S/OL]. (2009–09–09) [2013–06–20]. <http://samtools.sourceforge.net>.
- [16] Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(11): 745–755.
- [17] Agilent Technologies Inc. SureSelect target enrichment system for illumina paired –end sequencing library sureselect human all exon and human all exon plus. Version 2.0.1 [S/OL]. [2013–06–15]. <http://www.agilent.com/chem/contactus>.
- [18] Agilent Technologies Inc. SureSelectXT target enrichment system for illumina paired –end sequencing library illumina hiseq and miseq multiplexed sequencing platforms. Version 1.3.1 [S/OL]. [2013–06–15]. <http://www.agilent.com/chem/contactus>.
- [19] Agilent Technologies Inc. SureSelect target enrichment system for illumina paired –end sequencing library sureselect target enrichment for illumina paired –end multiplexed sequencing. Version 1.0 [S/OL]. [2013–06–15]. <http://www.agilent.com/chem/contactus>.
- [20] Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, et al. High association of an HLA antigen, W27, with ankylosing spondylitis [J]. *New Engl J Med*, 1973, 288(14): 704–706.
- [21] Calin A, Marder A, Becks E, et al. Genetic differences between B27 positive patients with ankylosing spondylitis and B27 positive healthy controls [J]. *Arthritis Rheum*, 1983, 26(12): 1460–1464.
- [22] van der Linden S, Valkenburg H, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA–B27 positive individuals: a family and population study [J]. *Br J Rheumatol*, 1983, 22(4 Suppl 2): 18–19.
- [23] Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment [J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(10): 1823–1828.
- [24] Sanger F, Coulson AR. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing [J]. *FEBS Lett*, 1978, 87(1): 107–110.
- [25] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain–terminating inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74(12): 5463–5467.

(编辑 刘清海)