

40 例血友病乙患者的基因分析及发病机制研究

王朝荣, 余自强*, 孙玲, 张威, 苏健, 白露, 阮长耿

苏州大学附属第一医院, 江苏省血液研究所, 卫生部血栓与止血重点实验室, 江苏苏州 215006

摘要 血友病乙(Hemophilia B, HB) 为 X 染色体连锁的隐性遗传性出血性疾病, 其发病机制多为凝血因子 IX (F9) 基因突变致凝血因子 IX 缺乏或结构功能的异常。本研究对 40 例明确诊断为血友病乙的男性患者进行基因序列分析以寻找其分子发病机制并为遗传学咨询奠定基础。2009 年 6 月–2012 年 6 月收集血友病乙男性患者 40 例, 均根据临床表现、血浆凝血因子 IX 活性检测及家族史等资料确诊。常规方法收集患者及亲属血样, 分离血细胞和血浆, 提取 DNA, 用聚合酶链反应(PCR) 扩增结合直接测序法分析先证者的 F9 基因的所有外显子及其侧翼序列, 并将测序结果和国际 F9 基因突变数据库进行比对, 发现突变后排除多态性。结果表明, 对 40 例 HB 患者基因分析共发现 34 种基因突变, 突变类型包括插入框移突变 2 种, 无义突变 6 种, 剪切位点的突变 2 种, 错义突变 24 种, 其中 29 种突变为已报道的突变类型, 5 种突变在国际上未见报道。34 种突变中发生在信号肽序列的有 2 种, 前肽及 γ -羧基化结构域的有 7 种突变, 表皮生长因子样结构域有 7 种, 活化肽区域有 3 种, 丝氨酸蛋白酶催化结构域有 15 种突变。结论: 40 例 HB 患者的基因分析表明 F9 基因突变具有明显的异质性, 且错义突变仍是目前 F9 基因的主要突变方式, 与重型 HB 有更密切的联系。F9 基因突变所常见的外显子部位与他们编码的氨基酸在蛋白行使功能时所起的作用有关。直接进行基因测序及短串联重复序列连锁分析将会对血友病乙的携带者诊断及产前诊断提供了一种快速、准确的诊断方法。

关键词 血友病乙; 基因突变; 基因诊断

中图分类号 R554.1

文献标识码 A

doi: 10.7534/j.issn.1009-2137.2013.04.029

Gene Analysis and Pathogenesis in 40 Patients with Hemophilia B

WANG Chao-Rong, YU Zi-Qiang*, SUN Ling, ZHANG Wei, SU Jian, Bai Xia, RUAN Chang-Geng

Jiangsu Institute of Hematology, Key Laboratory of Thrombosis and Hemostasis of Ministry of Health, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

* Corresponding Author: YU Zi-Qiang, Senior Physician. Tel: (0512) 67780419. E-mail: ziqiangyu63@hotmail.com

Abstract Hemophilia B (HB) is a recessive X-linked inherited disorder, the pathogenesis of HB is deficiency or functional abnormalities of coagulation factor IX, which is caused by F9 gene mutations. To explore the mechanism of its molecular pathology, 40 patients with HB were studied with polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. The diagnosis of HB patients were based on clinical manifestation and deficient factor IX activity in plasma. DNA was routinely extracted from peripheral blood cells of the patients and their relatives, all the 8 exons and their flanking boundaries were amplified by PCR, and the PCR products were screened by direct sequencing. Mutations which were found in study need to exclude polymorphism. The results showed that 34 mutations were confirmed in 40 HB patients, including 6 nonsense mutations, 24 missense mutations, 2 splice site mutations and 2 frame mutations for 1 or 2 nucleotide insertion. After retrieved, 4 missense mutations and 1 frameshift mutation were found for the first time. Among the 34 mutations, 2 mutations in signal peptide, 7 mutations in propeptide and gla domain, 7 mutations in epidermal growth factor-like domain, 3 mutations in activation domain, 15 mutations in serine protease or catalytic domain. It is concluded that gene analysis can directly explain molecular mechanism of hemophilia B and also provides the foundation for further studies to the function of coagulation factor IX. There is obvious heterogeneity in F9 gene mutation and missense mutation is still the main way of mutation, which are closely related to clinical features. DNA sequencing and linkage analysis are efficient methods for HB carriers and prenatal gene diagnosis.

Key words hemophilia B; gene mutation; gene diagnosis

J Exp Hematol 2013; 21(4): 963–968

血友病乙(Hemophilia B, HB) 是一种 X 染色体连锁的隐性遗传性出血性疾病, 其发病机制是由于 X 染色体上的凝血因子 IX (factor IX, F9) 基因缺陷导致血浆中该凝血因子质和量的异常。HB 在男性

基金项目: 江苏省科教兴卫工程—临床医学中心(编号 ZX201102) 资助; 临床医学科技专项资助(编号 BL2012005)

* 通讯作者: 余自强, 主任医师, 硕士生导师。电话: (0512) 67780419。E-mail: ziqiangyu63@hotmail.com

2012–10–17 收稿; 2012–11–28 接受

中的发病率为 1/30000^[1,2],而女性患者非常罕见。*F9* 基因位于 X 染色体 q27.1 – q27.2,全长 34 Kb,含 8 个外显子及 7 个内含子^[3,4],该基因的突变是血友病乙患者发病的根本原因^[5]。*F9* 基因突变方式包括插入、缺失、点突变,主要以点突变为主,大片的缺失和重排较少见,目前已发现逾 1000 种突变类型,其中点突变占 80% 左右^[6,7]。国内相关大宗病例研究资料报道较少,本研究利用直接基因测序技术对 40 例 HB 患者的 *F9* 基因进行基因突变的研究,以明确其分子发病机制。

材料和方法

研究对象

2009 年 6 月 – 2012 年 6 月收集 40 例确诊为血友病乙的男性患者,其中重型 21 例 (FIX: C < 1%),中型 13 例 (FIX: C 1% – 5%),轻型 6 例 (FIX: C 5% – 25%)。临床上均有不同程度的出血表现,根据临床表现、血浆凝血因子 IX 活性及家族史等资料确诊^[8]。父母均非近亲结婚。

标本的采集和处理

静脉采取 HB 患者外周血 5 ml,枸橼酸盐 (1:9) 抗凝,3000r/min 离心 5 min,分离血细胞和乏血小板血浆,–20℃ 保存备用。

基因组 DNA 的提取

用 DNA 提取试剂盒 (美国 Qiagen 公司产品) 提取

HB 患者外周血基因组 DNA,严格按照试剂盒内操作说明书进行操作。基因组 DNA 提取物 –20℃ 冻存储用。

实验室检查

活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT)、纤维蛋白原 (Fg)、凝血酶时间 (TT) 及 FIX 活性 (FIX: C) 检测采用全自动凝血检测仪 (Stago 公司,法国) 及配套试剂检测。

聚合酶链反应 (PCR)

引物设计 根据 *F9* 基因序列 (Gene Bank K02402),参照文献 [9],应用 Primer 5 软件,共设计 8 对引物以覆盖 *F9* 基因的各外显子区域及其侧翼序列,由上海生工公司合成,序列见表 1。

PCR 反应 反应体系,总体积 25 μl,包括 10 × Taq buffer 2.5 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl,基因组 DNA 提取物 2 μl, 10 mmol/L dNTP 0.5 μl, Taq DNA 聚合酶 1 U,正反引物各 10 pmol/L 2 μl,加双蒸水至 25 μl。反应条件为 95℃ 预变性 5 min; 然后 95℃ 变性 30 s, 54℃ – 60℃ 退火 30 s (表 1), 72℃ 延长 30 s, 共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

电泳检测 为验证基因扩增效果,扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,100 V 电压电泳 30 min,经 GelRed (美国 Biotium 公司产品) 显色, Bio-RAD 公司全自动凝胶成像系统照相。

Table 1. Primer sequence used for amplification of *F9* gene

Primer	Sequence	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)
FIX – 1 – a	5'-CCCATTCTCTTCACTTGTC-3'	407	58
FIX – 1 – b	5'-CCTAGCTAACAAGAACAGT-3'		
FIX – 2 + 3 – a	5'-AGAGATGTAAATTTTCATGATGTT-3'	513	58
FIX – 2 + 3 – b	5'-CAGAGAAAAACCCACATAAT-3'		
FIX – 4 – a	5'-CTACAGGGGAGGACCGGCATTCTA-3'	242	60
FIX – 4 – b	5'-AGTTTCAACTTGTTCAGAGGGAA-3'		
FIX – 5 – a	5'-CATGAGTCAGTAGTTCATGTACTTT-3'	275	58
FIX – 5 – b	5'-GTAGGTTTGTAAAATGCTGAAGTT-3'		
FIX – 6 – a	5'-TTAAATACTGATGGGCTG-3'	455	58
FIX – 6 – b	5'-GTTAGTGCTGAACTTGCCT-3'		
FIX – 7 – a	5'-AAGTCACATTTCCAGAAAC-3'	396	58
FIX – 7 – b	5'-TGGGTTCTGAAATTATGA-3'		
FIX – 81 – a	5'-TAAGAATGAGATCTTTAACA-3'	394	54
FIX – 81 – b	5'-CTAAGGTACTGAAGAACTAA-3'		
FIX – 82 – a	5'-GAAGAGTCTCCACAAAGGG-3'	397	58
FIX – 82 – b	5'-AAGATGGGAAAGTGATTAGTTA-3'		

a: forward; b: reverse.

基因测序

将 PCR 产物送上海裕晶生物科技有限公司,采取 ABI3700 自动激光荧光测序仪测序。通过 Chromas 软件将测序结果与 NCBI 基因文库公布的 *F9* 基因序列(GenBank K02402) 进行比对,寻找基因突变。

排除基因多态性

发现基因突变后采用反向测序证实,并检索 NCBI 中的 SNP 数据库,将发现的突变与之进行比对,排除现有的多态性。对新发现的基因突变,扩增 50 名正常人的 2 + 3 号及 8 号外显子排除未知的多态性。

结 果

实验室检查

40 例患者均出现 APTT 测定值延长(48.0 s – 180.0 s , 平均为 114.0 s) ,PT 测定值正常(11.2 s – 14.5 s ,

平均为 12.9 s) ,FIX: C 测定值减低(1% – 13% ,平均 7%) 。

基因测序结果

将 40 例患者的 *F9* 基因各外显子及侧翼序列的直接测序结果与 NCBI 基因库(gene bank) 所公布的 K02402 序列进行比对,并参考 FIX Mutation Database(<http://www.kcl.ac.uk/ip/pretergreen/haemB-database.html>) 及相关文献。40 名 HB 患者均发现了各自的基因突变位点,共发现基因突变 34 种,包括插入框移突变 2 种,无义突变 6 种,剪切位点的突变 2 种,错义突变 24 种。34 种突变中发生在信号肽序列的有 2 种,前肽及 γ -羧基谷氨酸区域的有 7 种突变,表皮生长因子样结构域有 7 种,活化肽区域有 3 种,丝氨酸蛋白酶催化结构域有 15 种突变(表 2) 。34 种突变中,发现 5 种基因突变国际上未见报道,为首次发现具体测序见附图: 6329_6330InsertT

Table 2. Thirty four kinds of *F9* mutations and FIX: C level

Number	Nucleotide change	Amino acid change	Exon	CpG island	Novel mutation	No. of patients	FIX: C level	Clinical type
1	111T > C	Cys(- 19*) Arg	1	N	N	1	4	Moderate
2	116A > G	—(- 18)	splicing	N	N	1	7	Mild
3	6329_6330insT	Asp(- 14) X	2 + 3	N	Y	1	1	Severe
4	6365G > T	Arg(- 4) Leu	2 + 3	Y	N	1	1	Severe
5	6365G > A	Arg(- 4) Gln	2 + 3	Y	N	1	1	Severe
6	6409G > C	Gly12Arg	2 + 3	N	N	1	1	Severe
7	6410G > A	Gly12Arg	2 + 3	N	N	1	2	Moderate
8	6451G > A	Glu26Lys	2 + 3	N	N	1	1	Severe
9	6460C > T	Arg29X	2 + 3	Y	N	1	1	Severe
10	10458A > G	Tyr69Cys	4	N	N	1	2	Moderate
11	17963G > A	Gly93Asp	5	N	N	3	1	Severe
12	17704C > A	Glu97Lys	5	N	N	1	1	Severe
13	17755G > A	Gly114Arg	5	N	N	2	2/3	Moderate
14	17756G > A	Gly114Glu	5	N	N	1	7	Mild
15	17761C > T	Arg116X	5	Y	N	1	5	Moderate
16	17796A > G	—(127)	splicing	N	N	1	3	Moderate
17	20414G > A	Arg145His	6	Y	N	2	1/2	Severe/moderate
18	20519G > A	Arg180Gln	6	Y	N	1	1	Severe
19	20522T > C	Val181Ala	6	N	N	1	2	Moderate
20	30150G > A	Ala233Thr	7	Y	N	2	9/12	Mild
21	30863C > T	Arg248X	81	Y	N	1	1	Severe
22	30863C > G	Arg248Gly	81	N	N	1	3	Moderate
23	30857C > T	Arg252X	81	Y	N	1	7	Mild
24	30945T > C	Leu275Pro	81	N	N	1	1	Severe
25	31020T > C	Leu300Pro	82	N	Y	1	1	Severe
26	31118C > T	Arg333X	82	Y	N	1	1	Severe
27	31133C > T	Arg338X	82	Y	N	1	13	Mild
28	31143_31144insAA	Lys341X	82	N	N	1	2	Moderate
29	31146T > G	Phe342Cys	82	N	Y	1	4	Moderate
30	31169T > G	Cys350Gly	82	N	Y	1	1	Severe
31	31187G > A	Gly356Arg	82	N	N	1	1	Severe
32	31221G > A	Gly367Glu	82	N	N	2	1	Severe
33	31227A > G	His369Arg	82	N	N	1	1	Severe
34	31314A > G	Tyr398Cys	82	N	Y	1	3	Moderate

* The number of amino acids is based on the initiation site of mature FIX protein.

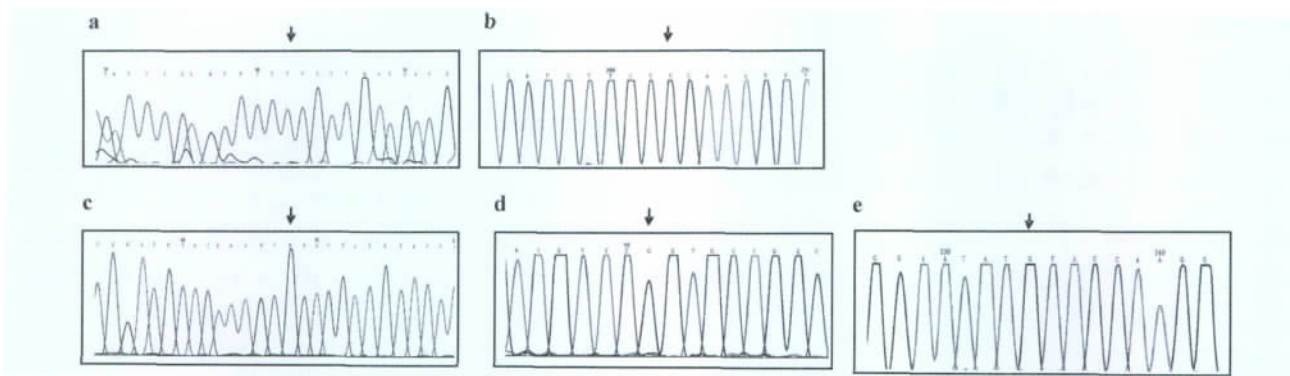


Figure. Five novel mutations and sequencing map. a. (NO. 3) 6329_6330insert(T) . The arrow indicates the mutation ,it is frameshift mutation. b. (NO.25) 31020T > C. The arrow indicates the point mutation ,the base group C replaces normal T ,led to Leu300Pro. c. (NO.29) 31146 T > G. The arrow indicates the point mutation ,the base group G replace mutation ,the normal T ,led to Phe342Cys . d. (NO.30) . 31169 T > G. The arrow indicates that the point base group G replace normal T ,led to Cys350Gly. e. (NO.34) . 31314 A > G. The arrow indicate the point mutation ,the base group G repalces normal A ,led to Tyr398Cys.

(Leu (-15) serfs* 2) , 31020T > C (Leu300Pro) , 31146T > G(Phe342Cys) , 31169T > G(Cys350Gly) , 31314A > G(Tyr398Cys) 。

基因多态性的排除

34 种突变在 SNP 数据库中均未发现。50 名正常人 F9 基因的 2 + 3 号及 8 号外显子直接扩增、测序均正常,未发现多态性变化。

讨 论

血友病乙是一种与 X 染色体连锁有关的隐性遗传性出血功能障碍,主要因 F9 基因改变致血浆 FIX 活性缺乏所致。根据血浆中 FIX: C 的水平,可分为重型(FIX: C < 1%) ,中型(FIX: C 为 1% - 5%) 轻型(FIX: C 为 5% - 40%) 。血友病患者的出血表现与血浆中 FIX: C 水平密切相关,主要表现有皮肤、粘膜的出血,关节、肌肉的出血,严重者可出现内部脏器的出血或颅内出血。

F9 基因位于 X 染色体(Xq27. 1 - 27. 2) ,全长 34 Kb,由 8 个外显子、7 个内含子及其侧翼序列中的调控区域组成。编码 FIX 蛋白的 415 个氨基酸残基有 6 个主要结构域: 信号肽和前肽区、 γ -羧基谷氨酸区(GLA 区域) 、两个表皮样生长因子区(EGF 区域) 、激活肽区及催化区,其中 GLA 区域由 12 个 γ -羧基谷氨酸残基组成, FIX 通过此部位与钙离子连接形成钙桥并与磷脂表面连接。EGF 区域可分为 EGF-1 和 EGF-2 区域, EGF-1 区域可与钙离子紧密结合,目前认为 EGF-1 区域在 FIX 被 FVIIIa-tF 复合物激活及 FIX 与 FVIIIa 的结合中起着重要作用^[7];

EGF-2 区的 Gln97、Phe98、Tyr115 及 Leu117 4 个氨基酸位点对于 FIX 的分泌起着重要的作用^[10]。激活肽区域与 FIX 蛋白活化有关, FIXIa、VIIa 和组织因子的共同作用下使 FIX 在 Arg145-Ala146 和 Arg180-Val181 之间的肽键断裂,形成重链和轻链,变成有活性的 FIX。催化区域包含有该蛋白的活性中心,是维护 FIX 结构和功能的重要部分^[11],在活化凝血因子 X 的过程中起着重要作用^[12]。目前所报道的 HB 患者中均发现了基因异常,且基因缺陷种类繁多,目前 F9 基因突变数据库中,有 1000 多种不同类型的突变, 80% 左右为单个碱基突变^[6, 7],点突变中错义突变占 68% ,无义突变占 14% ,其他突变类型占 18%^[13, 14]。

本研究在 40 例患者中共发现 34 种突变类型,包括插入框移突变 2 种,无义突变 6 种,剪切位点的突变 2 种,错义突变 24 种,其中错义突变发生率为 70. 6% ,是 F9 基因主要的突变方式, 6 种无义突变均发生在 CGA 密码处。各个外显子均有突变发生,其中发生在 8 号外显子的最多,占 41% ,与文献报道相符^[15],这是由于外显子 8 编码催化区域,此区域对 FIX 蛋白功能的发挥有着重要作用,因此突变发生的频率较高,也提示外显子 8 是该基因突变的热点区域。另外 EGF 和 GLA 区域分别是与钙离子、磷脂结合的部位,因此编码此部位的 5 号、2 + 3 号外显子突变发生率也较高。34 种突变中发生在信号肽序列的有 2 种,前肽及 GLA 区域有 7 种,其中有 6 种在临床上表现为重型,另外 1 例表现为中型,与此区域在 FIX 蛋白行使功能时发挥着重要作用有关; EGF 区域有 7 种,激活肽区域有 3 种,丝氨酸蛋白酶催化结构域有 15 种。从本研究结果来看,

F9 基因突变有明显的异质性,没有发现突变率高的共同突变,但发现有 11 个热点突变,这 11 个热点突变均位于 CG 双核苷酸区域,其中 10 个热点突变为精氨酸发生的突变,可能的机制是精氨酸中甲基化的胞嘧啶或鸟嘌呤易自发的脱氨基变成胸腺嘧啶或腺嘌呤,导致精氨酸的密码子的突变率高。且这 11 个热点突变均位于 CpG 岛,表明 CpG 岛是 *F9* 基因突变的热点^[15-17]。有 3 例 HB 患者均发生了 17963G > A (Gly93Asp) 突变,此部位为 GC 双核苷酸区域,可能是 *F9* 基因突变新的突变热点。另外,血友病乙临床表现的严重程度与翻译后的 mRNA 的水平、氨基酸的保守性等密切相关^[18]。而与临床表现有关的常见突变均在本研究中证实,如 Arg180Gln, Arg333Gln 与重型关系密切,而 Arg145His, Arg233Thr 与非重型有联系。本研究中的 24 种错义突变类型中有 14 种突变临床表型为重型(58.3%),21 例重型 HB 患者中有 17 例为错义突变(81.0%),3 例为终止突变,1 例插入框移突变,表明 HB 临床表型与错义突变可能有更密切的联系,但还需更多的临床病例资料及相关测序结果证实,其中 7 位重型患者发现有热点突变(Number 4、5、9、17、18、21、26),由于样本量少,不能确定重型血友病乙与突变热点有密切的关系,需更多的样本进行分析验证。Chang 等^[19]在研究 FIXa 与 FVIIIa 的结合位点时却发现当第 338 位的 Arg 突变为 Ala 后凝血活性比野生型提高了 2.5-3 倍,而在本研究中 338 位编码 Arg 的密码子突变为终止密码,患者临床表现为轻型(FIX: C 为 13%),具体的机制还需进一步研究。

在本研究中发现的 5 种新突变: 6329_6330InsertT, 31020T > C (Leu300Pro), 31146T > G (Phe342Cys), 31169T > G (Cys350Gly), 31314A > G (Tyr398Cys), 国际上还未见报道。这 5 种新突变均非发生在 CpG 岛。其中 6329_6330InsertT 发生在 2 号外显子起始部位, 6329_6330insT 导致读码框的改变,使 6333-6335 碱基成为终止密码子,出现 Leu(-15) serfs* 2,从而使翻译终止,导致 FIX 合成、分泌障碍,患者表现为重型 HB(FIX: C < 1%)。另外 4 种突变发生在 FIX 蛋白的催化区,可能是通过影响该区域的空间结构导致 HB 的发生。催化区域的 His221、Asp269、Ser365 组成"催化三联体",在 β 片层结构的表面形成酶活性中心,具有高度的保守性。此外,活化中心附近的氨基酸形成由 6 个环状结构形成的"底物结合袋",分别由 199-204、223-229、235-245、256-268、312-322 和 340-347 位氨基酸组

成。Rohlena 等^[20]发现 Phe342-Asn346 部位是 FIX 与低密度脂蛋白受体相关蛋白相互间作用的关键性结构。31146T > G (Phe342Cys) 为错义突变,使丝氨酸蛋白酶样结构区域的"底物结合袋"的空间结构发生改变,可能形成错配的二硫键,导致 FIX 蛋白的催化活性受损,不能正常的和底物及相应抑制物结合,从而导致 FIX 蛋白的活化或分泌障碍,临床表现为中型(FIX: C 为 4%)。

FIXa 在磷脂表面与 FVIIIa 结合,在钙离子的存在下活化 FX, FIX 重链的催化区 301-303 位氨基酸与 α 螺旋内的 333-339 位氨基酸残基主要与 FVIIIa 重链的 A2 区结合,使 FIXa 催化区构象发生改变,使其有利于与底物 FX 结合并使其活化。300 位氨基酸残基在 31019C > T 有突变^[21],此部位氨基酸残基与 FIX 重链区紧邻, 31020T > C (Leu300Pro) 的改变可能导致重链区的空间结构发生变化,影响其与底物的结合,使凝血过程异常,导致疾病的发生,表现为重型。

FIX 分子催化区域有 3 个链内二硫键,对维持催化区域形成正确的结构有重要作用, Cys350 正好位于第 2 个二硫键形成部位(Cys336-Cys350),突变为 Gly 后使得二硫键不能正确形成从而影响 FIX 生物学活性,患者表现为重型(FIX: C 1%)。而 398 位 Tyr 突变为 Cys 后会导致二硫键之间错配导致催化区域的结构发生变化致 FIX 活性异常,是该患者的发病机制,表现为中型(FIX: C 3%)。

目前基因直接测序具有快速、准确的优点,成为基因突变分析的主要方法,也为产前诊断 HB 及携带 HB 者诊断提供了可靠的方法。本组 40 例 HB 患者,经直接基因测序均发现有 *F9* 基因突变存在,并发现了 5 种新的 *F9* 基因突变类型,其致病机制与 FIX 合成及功能异常有关,这为 HB 患者家系调查和产前诊断奠定了基础。

参 考 文 献

- Matrai J, Chuah MK, Driessche TV. Preclinical and clinical progress in hemophilia gene therapy. *Curr Opin Hematol* 2010; 17(5): 387-392.
- Giannelli F, Green PM, High KA, et al. Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions-third edition. *Nucleic acids Res* 1992; 20(Suppl): 2027-2063.
- Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, et al. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX. *Biochemistry* 1985; 24(14): 3736-3750.
- Chen SH, Thompson AR, Zhang M, et al. Three point mutations in the factor IX gene of five hemophilia B patients. *J Clin Invest* 1989;

- 84(1): 113–118.
- 5 Chen SH, Yoshitake S, Chance PF, *et al.* An intragenic deletion of the factor IX gene in a family with hemophilia B. *J Clin Invest* 1985; 76(6): 2161–2164.
- 6 Haemophilia B mutation database. Version 13 [DB/OL]. London: King's College 2004 [2010-07]; <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>.
- 7 张媛, 杨林花, 陆晔玲, 等. 应用 DNA 测序技术检测血友病 B 患者 FIX 基因突变. *中国实验血液学杂志* 2009; 17(2): 476–478.
- 8 张之南, 沈悌. 血液病诊断与疗效标准, 第三版. 北京: 科学出版社 2007: 193–194.
- 9 Vidal F, Farssac E, Altisent C, *et al.* Factor IX gene sequencing by a simple and sensitive 15-hour procedure for haemophilia B diagnosis: identification of two novel mutations. *Br J Haematol* 2000; 111(2): 549–551.
- 10 Chang YJ, Wu HL, Hamaguchi N, *et al.* Identification of Functionally Important Residues of the Epidermal Growth Factor-2 Domain of Factor IX by Alanine-scanning Mutagenesis. *J Biol Chem* 2002; 277(28): 25393–25399.
- 11 Schmidt AE, Bajaj SP. Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13(1): 39–45.
- 12 颜景斌. 人凝血因子 IX 突变型研究现状. *遗传* 2005; 27(5): 833–838.
- 13 王莉, 侯巧芳, 廖世秀, 等. 血友病 B 携带者及产前基因诊断的研究. *中国现代医学杂志* 2011; 21(26): 3279–3283.
- 14 张耀方, 杨林花. 无义突变在血友病的研究进展. *血栓与止血学* 2010; 15(4): 177–179.
- 15 Tingting Yu, Jing Dai, Hongjing Liu, *et al.* Spectrum of F9 mutations in Chinese haemophilia B patients of 20 novel mutations. *Pathology* 2012; 44(4): 342–347.
- 16 Bicocchi MP, Pasino M, Bottini F, *et al.* Mutation analysis impact on the genetic counseling of sporadic hemophilia B families. *Am J Med Genet A* 2003; 118A(4): 328–331.
- 17 Ljung R, Petrini P, Tengborn L, *et al.* Haemophilia B mutations in Sweden: a population-based study of mutational heterogeneity. *Br J Haematol* 2001; 113(1): 81–86.
- 18 Hamasaki-katagiri N, Salari R, Simhadri VL, *et al.* Analysis of F9 point mutations and their correlation to severity of haemophilia B disease. *Haemophilia* 2012; 18(6): 933–940.
- 19 Chang J, Jin J, Lollar P, *et al.* Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity. *J Biol Chem* 1998; 273(20): 12089–12094.
- 20 戴菁, 刘湘帆, 王学峰, 等. 两种新突变导致血友病的分子发病机制. *中华检验医学杂志* 2010; 33(9): 878–883.
- 21 Karin W, Winnie S, Manfred W, *et al.* Two-Five Novel Mutations of the Factor IX Gene in Haemophilia B. *Hum Mutat* 1995; 6(4): 346–348.