

## PCR-RSSO基础上HLA-I、II基因分型的研究

在器官移植和造血干细胞移植中,供、受者人类白细胞抗原(HLA)基因配合程度是影响移植物功能、存活时间及存活率的重要因素,因此HLA分型的准确性受到普遍重视。2000年美国联邦政府立法规定,器官移植前必须进行HLA配型,包括群体反应性抗体测定、细胞毒细胞交叉配型和HLA分型。我国自1995年开始,将HLA分子生物学技术应用于临床实体器官移植以改善移植效果。序列特异性寡核苷酸探针技术(PCR-sequence specific oligonucleotide, PCR-SSO)是1994年被引进的HLA分子生物学分型方法[1]。由于正向SSO操作繁琐、程序耗时24 h,而反向SSO技术(PCR-RSSO)进行探针杂交仅需8 h,且1次杂交便能检测HLA-A等位基因195个、B等位基因399个、Cw等位基因94个、DR等位基因210个、DQ等位基因38个[2],大大简化了操作步骤而被推崇。我们以PCR-RSSO为基础研究HLA-I、II基因分型,配合计算机分析软件,达到生物芯片技术水平。

### 1 材料和方法

#### 1.1 标本收集

635份DNA源于1999年12月~2001年6月间广东地区各移植中心的肾移植和骨髓移植供、受者475例及脐血标本160例。复方枸橼酸钠抗凝血。

#### 1.2 方法

1.2.1 模板DNA提取 全血提取基因组DNA使用QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, Germany), Pharmacia Biotech公司Gene Quant II RNA/DNA Calculator测定DNA质量。

1.2.2 手工PCR-RSSO分型 DNA扩增体系:采用DYNAL SS0-A、B、C、DR、DQ特异性引物KIT[3],可识别HLA等位基因A位点119个、B位点309个、Cw位点66个、DRB位点181个和DQ位点31个。每个位点为独立扩增体系,即A、B、C、DR、DQ需分做5个扩增体系,每管扩增体积60  $\mu$ l,包括6.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 15  $\mu$ l, Master Mix 30  $\mu$ l(根据不同位点选用HLA-A、B、C、DR和DQ Mix)和待测DNA模板15  $\mu$ l。扩增条件:95  $^{\circ}$ C变性15 s, 60  $^{\circ}$ C退火45 s, 72  $^{\circ}$ C延伸15 s,共35个循环,最后72  $^{\circ}$ C延伸5 min。变性:向PCR产物中加入60  $\mu$ l碱性变性液,室温变性10 min。杂交:将固化特异性探针的杂交条(Dynal RELITM SS0 kit, Norway)置于48通道杂交盒中,然后上样,即在杂交盒中加入120  $\mu$ l变性PCR产物,在每个通道中加入预热的杂交液5 ml, 50  $^{\circ}$ C、60~80 r/min振荡45 min;吸去杂交液,加入室温洗膜液5 ml, 30 s;吸去液体后加5 ml预热的洗膜液后, 50  $^{\circ}$ C、60~80 r/min振荡30 min;吸去洗膜液,加入5 ml辣根过氧化物酶,室温、60~80 r/min振荡15 min,然后用室温洗膜液5 ml洗膜2次,每次5 min;加入柠檬酸缓冲液5 ml洗涤5 min,加杂交显色液5 ml,室温、60~80 r/min振荡10 min,然后用无菌纯水洗涤3次。全过程均在15 $^{\circ}$ 水平振荡状态下8 h完成。HLA基因型采用DYNAL公司PMP503版本和美国骨髓库编码软件分析后经人工技术判断结果。

1.2.3 全自动半量PCR-RSSO分型 与手工方法不同之处是将扩增条件体积和杂交体积均改良为半量,即每管扩增体积30  $\mu$ l(6.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 7.5  $\mu$ l, Master Mix 15  $\mu$ l和待测DNA模板7.5  $\mu$ l),碱性变性液加入量为30  $\mu$ l。变性:向PCR产物中加入30  $\mu$ l碱性变性液,室温变性10 min。将原5 mm宽度探针条裁成2.5 mm(原体积1/2)。由DYNAL RELI 48杂交仪机械臂自动加样4.5 h完成。

1.2.4 PCR-SSP(sequence specific primer)分型 为避免单一厂家引物设计的缺陷影响RSSO与SSP方法学之间比较的客观性,选用3个不同厂家SSP-A、B、DR、DQ特异性引物[4](Biotest AG Dreieich Germany Lot No 4270101; Micro SSPTM One Lambda, CA.USA Lot No 51106; Texas BioGene Inc HLA-SSP kit Lot No 10612),均达到中分辨率:A位点35个,B位点208个、DRB位点56个和DQ位点7个。A、B、DR使用96个扩增体积,每一扩增管含DNA 130~204  $\mu$ l、PE Taq酶0.4 U、dNTP 60 pmol、特异性引物2 pmol。PCR反应:94  $^{\circ}$ C预变性120 s;94  $^{\circ}$ C变性10 s,65  $^{\circ}$ C退火60 s,10个循环;94  $^{\circ}$ C变性10 s,61  $^{\circ}$ C退火50 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s,20个循环。在120~150 V电压下电泳3~5 min。经紫外灯观察结果、拍照、保存结果,并进行分型。

#### 1.3 统计学处理

采用SPSS10.0行 $\chi^2$ 检验。

### 2 结果

## 2.1 DNA提取质量

635份DNA体积均为200  $\mu\text{l}$ /份, 经DNA定量仪检测, DNA平均浓度为152.8 (56.4~267.1)  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , 平均纯度( $D_{260}/D_{280}$ )为1.43 (0.78~2.12)。其中475份静脉血提取的DNA平均浓度为159.6  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , 平均纯度为1.69; 160份脐血提取的DNA平均浓度为135.8  $\text{ng}/\mu\text{l}$  (80.3~178.3), 平均纯度为1.29 (0.90~1.69)。两组DNA的浓度和纯度之间无统计学差异( $P>0.05$ )。

## 2.2 PCR-RSSO分型结果(图1)

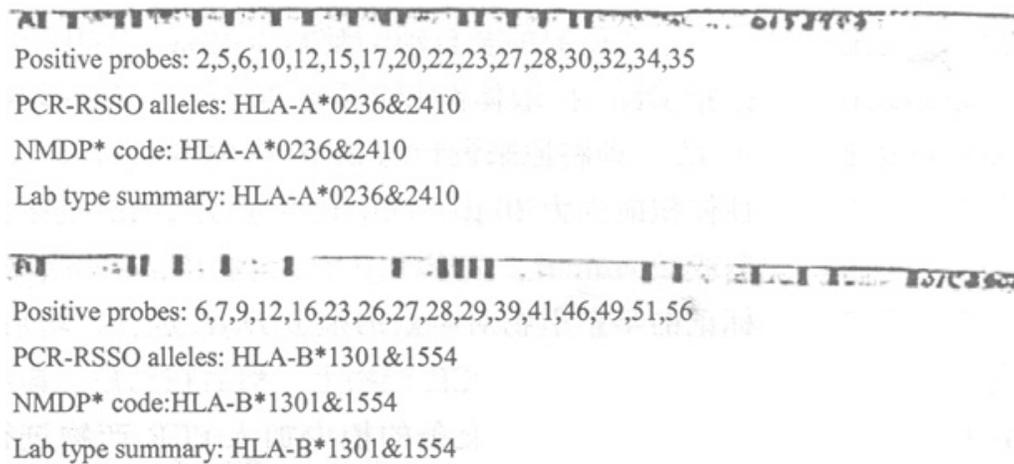


图1 PCR-RSSO HLA-A和半量RSSO-HLA-ABCDRDQ的基因图  
Fig.1 The genotyping of PCR-RSSO-HLA-A and semiquantity-RSSO-HLAABCDRDQ

RSSO分辨率为等位基因2~4位数。各位点的阳性对照, 即外显子探针的位置为: A位点17 (Exon2) 和35 (Exon3), B位点27 (Exon2) 和56 (Exon3), C位点17 (Exon2) 和36 (Exon3), DRB位点45 (Exon2), DQB位点25 (Exon2)。

在166份手工PCR-RSSO中, A、B、C、DR & DQ反应成功率分别为87.3% (145/166)、81.3% (135/166)、89.8% (149/166)、85.5% (142/166) 和97.6% (162/166), 反应总成功率为88.3% (733/830)。全自动半量PCR-RSSO的475份静脉血则依次为97.5% (463/475)、98.1% (466/475)、99.8% (474/475)、97.3% (462/475) 和99.4% (472/475); 160份脐血分别为97.5% (156/160)、98.8% (158/160)、98.8% (158/160)、98.1% (157/160) 和98.8% (158/160)。

所有位点总反应成功率为98.4%, 其中4份质量不良的DNA在手工、全量PCR和半量PCR-RSSO均失败。

## 2.3 PCR-SSP分型结果

SSP分辨率为等位基因2位数。166份PCR-SSP技术分型的A、B、DR和DQ各位点成功率分别为98.8% (164/166)、98.1% (163/166)、98.8% (164/166) 和99.4% (165/166), 总反应成功率为98.8%。

## 2.4 PCR-RSSO与PCR-SSP两种技术分辨力比较

两者的一致率为84%; 而在两者不一致的2个基因型中, 1个为依靠SSP纠正RSSO的误判, 另1个为依靠RSSO纠正SSP的误判。

## 2.5 实验效率的比较

全自动半量PCR-RSSO-ABDR消耗DNA数量为22.5  $\mu\text{l}$ , 最佳DNA纯度1.6~1.8, 完成16份DNA HLA-A、B、DR分型需要8 h (含DNA提取、PCR、探针杂交和软件分析), 其中手工操作时间为2 h。而PCR-SSP完成1份HLA分型消耗110  $\mu\text{l}$  DNA/96孔、纯度0.9~1.6和2 h, 增加1份样本需增加1 h, 16份DNA-HLA分型需要至少连续工作24 h, 其中人工操作16 h。对采用全自动半量PCR-RSSO和PCR-SSP技术的DNA实验成功率进行两两比较, 其各个位点和总的实验成功率之间均无统计学差异( $P>0.05$ )。全自动半量与手工PCR-RSSO成功率相比较结果见表1。RSSO与SSP之间的中分辨分型结果吻合率为99.8%。此外, 635例PCR-RSSO实验中有4份A、B、C、DR和DQ全量PCR和半量PCR全部失败, 而PCR-SSP均获得成功, 这些DNA均来自血液肿瘤患者。用分光光度计在260 nm处测定DNA浓度为56.4~70.9  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , 纯度( $D_{260}/D_{280}$ )为0.779~0.849。另外475份静脉血与160份脐血采用全自动半量PCR-RSSO分型, 两者的分型成功率无统计学差异( $P>0.05$ )。

表1 自动PCR-RSSO、PCR-SSP和手工PCR-RSSO比较

Tab.1 Comparison of automatic PCR-RSSO, PCR-SSP and manual PCR-RSSO

Group	n	Success rate(%)					Time(h)		DNA	
		A	B	Cw	DR	DQ	1 sample	16 samples	Concentration(ng/ $\mu$ l)	Purity
Auto PCR-RSSO	635	97.5	98.3	99.5	97.5	99.2	8	8	37.5	1.6
PCR-SSP	166	98.8*	98.1*	-	98.8*	99.4*	2	24	156	1.0
Manual PCR-RSSO	166	87.3#	81.3#	89.8#	85.5#	97.6	6	12	37.5	1.6

\* $P>0.05$  vs the success rate by auto PCR-RSSO; # $P<0.01$  vs the success rates of auto PCR-RSSO and PCR-SSP; RSSO: Reverse sequence specific oligonucleotide; SSP: Sequence specific primer

表1 自动PCR-RSSO、PCR-SSP和手工PCR-RSSO比较

Tab.1 Comparison of automatic PCR-RSSO, PCR-SSP and manual PCR-RSSO

\* $P>0.05$  vs the success rate by auto PCR-RSSO; # $P<0.01$  vs the success rates of auto PCR-RSSO and PCR-SSP; RSSO: Reverse sequence specific oligonucleotide; SSP: Sequence specific primer

### 3 讨论

#### 3.1 PCR-RSSO的实验原理

采用位点特异性引物进行单个HLA位点的DNA扩增，以扩增该位点1个或多个外显子编码的所有等位基因的序列，所以A、B、C、DR和DQ须分5管扩增，每一位点需要1对引物扩增DNA。但是，每个位点的特异性等位基因必须用多个探针，这些被固化的寡核苷酸探针可以是斑点杂交，也可以是线性杂交，探针的数目30~70个不等，因此RSSO可达到中~高分辨率(等位基因水平)。然后将特异性等位基因或等位基因组扩增产物与固定在尼龙膜上的寡核苷酸探针进行反向杂交和严格洗膜后，经颜色反应或荧光化学物质检测而确定HLA的特异性[1]。

近年来，也有人将反向SSO与ELISA技术相结合，称为PCR-MRHA (microtiter plate-reverse hybridization assay)，即生物素标记的PCR产物与固定在微量孔中的特异性探针进行杂交。由于探针被分别固定于孔内，减少交叉污染的机会，经抗蛋白链菌素结合酶与杂交显色底物结合后，酶标仪读取各孔D( $\lambda$ )，然后由计算机根据反应孔判断HLA等位基因[5]。

本文研究的全自动半量PCR-RSSO，其中“半量”是指DNA扩增体系和特异性杂交反应条带均减少了1/2，即将原来设计的60  $\mu$ l扩增体积和120  $\mu$ l变性体积减少为30  $\mu$ l和60  $\mu$ l，将宽为5 mm的杂交条带剪成2.5 mm的2条窄的杂交条带。这样，5'末端生物素标记的半量引物对半量的模板DNA进行扩增后，生物素即被标记于PCR产物上，然后在已放入减半体积的线性探针杂交条带的槽内加入PCR产物进行杂交，经过与全量抗蛋白链菌素结合的辣根过氧化物酶和催化底物显色条带后，经计算机软件分析HLA等位基因。这种“半量”技术源于在不影响实验准确率前提下减低实验成本的思路而进行改良的。实验证实，半量与全量PCR-RSSO的阳性杂交条带一样清晰，达到2~4位等位基因型分辨力。研究证明，将DNA、引物和探针改良为半量符合RSSO技术质量标准。

#### 3.2 方法学比较

3.2.1 成功率 手工RSSO(88.3%)与全自动RSSO(98.4%)或SSP(98.8%)成功率之间均呈显著性差异；手工RSSO与另2种方法比较，各位点之间的成功率仅DQ无显著差异，其他位点的失败率从高到低依次为B>DR>A>Cw。由于探针杂交温度和洗膜温度对实验成功与否起重要作用，显然探针数目越多，受温度影响越大，自动化机器便于恒定在50  $^{\circ}$ C，所以成功率明显提高。全自动RSSO与SSP的成功率之间没有显著性差异，说明自动化可提高PCR-RSSO技术的成功率。此外，从实验结果可看出，无论是静脉血还是脐血标本，采用全自动半量PCR-RSSO都能得出理想结果，二者的成功率无统计学差异，表明RSSO对标本来源无特殊要求，适用范围广。

3.2.2 实验时间 在单个或零散样本实验时SSP优于SSO，而多个或集中样本实验时SSO有优势，而且提高工作效率的同时又减轻了劳动强度。

3.2.3 对DNA数量和质量的要求 使用QIAamp DNA Mini kit提取DNA的总量为200  $\mu$ l。半量PCR-RSSO、全量PCR-RSSO和PCR-SSP完成HLA-A、B、DR分型所需的DNA分别为22.5、45、117  $\mu$ l。假如实验失败，使用SSP技术需重新提取DNA，而半量SSO技术有足够的DNA便于再次实验。但是，本研究中有4份DNA由于纯度小于0.1，导致RSSO失败，重新上SSP全部获得成功，说明RSSO需要较高的DNA纯度，SSP需要较多的DNA数量。此外，全自动半量PCR-RSSO的杂交条带可作为原始结果长期保存，而PCR-SSP必须电泳结束后使用紫外成像系统拍照才能保留原始资料，增加了额外的劳动和实验成本。

#### 3.3 分型准确性比较

RSSO能分辨WHO命名委员会2000年公布的936个等位基因的75.43%，达到中~高分辨水平；PCR-SSP为中分辨水平。Hurley等[6]报道，PCR-RSSO是一种非常准确、特异和可靠的技术，对HLA-A、B位点分型的错误率仅为1.1%和1.9%。我们的研究获得同样的结论。SSP和RSSO各自的分型结果可归纳为4种类型：(1)对DR位点高分辨；(2)RSSO能识别纯合子等位基因；(3)RSSO与SSP在分型分析中具有互补作用；(4)RSSO在不能明确高分辨等位基因时，可以做等位基因组分析。

## 4 小结

全自动半量PCR-RSSO成功率高、分辨率高、准确性高、成本低、劳动强度轻且自动化程度高,为骨髓移植、非急诊肾移植、脐血库和骨髓库等大量标本的HLA基因分型提供了一种理想、高效和具有独特优势的新技术,将会成为我国骨髓库和脐血库HLA实验室实用的常规方法,并促进HLA分型标准化,而且会广泛应用于人类学研究和疾病关联等基础医学研究。

(责任编辑:黄开颜)

参考文献:

- [1] Bugawan TL, Apple R, Erlich HA. A method for typing polymorphism at the HLA-A locus using PCR amplification and immobilized oligonucleotide probes[J]. Tissue Antigens, 1994, 44(3): 137-47.
- [2] Anthony nolan bone marrow trust website[EB/OL]. <http://www.anthonynolan.org.uk>. 2002.
- [3] Dynal SSO[EB/OL]. <http://www.tissue-typing.com>.2002.
- [4] Bunce M, O'neill CM, Barnado MC, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)[J]. Tissue Antigens, 1995, 46(5): 355-67.
- [5] Moribe T, Kaneshige T, Inagawa A, et al. Rapid HLA class I DNA typing using microtiter plate-reverse hybridization assay (MRHA) by simple thermoregulation: high-resolution subtyping of the HLA-A2 and -B40 antigen groups[J]. Hum Immunol, 1999, 60(6): 539-49.
- [6] Hurley CK, Maiers M, Ng J, et al. Large-scale DNA-based typing of HLA-A and HLA-B at low resolution is highly accurate specific and reliable[J]. Tissue Antigens, 2000, 55(4): 352-8.

参考文献:

- [1] Bugawan TL, Apple R, Erlich HA. A method for typing polymorphism at the HLA-A locus using PCR amplification and immobilized oligonucleotide probes[J]. Tissue Antigens, 1994, 44(3): 137-47.
- [2] Anthony nolan bone marrow trust website[EB/OL]. <http://www.anthonynolan.org.uk>. 2002.
- [3] Dynal SSO[EB/OL]. <http://www.tissue-typing.com>.2002.
- [4] Bunce M, O'neill CM, Barnado MC, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)[J]. Tissue Antigens, 1995, 46(5): 355-67.
- [5] Moribe T, Kaneshige T, Inagawa A, et al. Rapid HLA class I DNA typing using microtiter plate-reverse hybridization assay (MRHA) by simple thermoregulation: high-resolution subtyping of the HLA-A2 and -B40 antigen groups[J]. Hum Immunol, 1999, 60(6): 539-49.
- [6] Hurley CK, Maiers M, Ng J, et al. Large-scale DNA-based typing of HLA-A and HLA-B at low resolution is highly accurate specific and reliable[J]. Tissue Antigens, 2000, 55(4): 352-8.

---

[回结果列表](#)