



HLA方法学进展及其DNA分型应用

人类白细胞抗原 (HLA) 作为一种移植抗原, 首先被列为临床移植供/受者组织相容性匹配检测项目之一。由于它具有较强的同源性和复杂的多态性, 又被广泛用于亲子鉴定和个体识别。它的一些遗传性状与疾病密切相关, 故又可用于疾病易感性群体分布调查和疾病相关研究。HLA方法学随着科学技术的发展和新学科知识的渗透, 已经从传统血清学发展到现代分子生物学, 从细胞水平的检测提高到基因水平, 其应用也日益受到临床各学科的重视。现就HLA方法学进展以及DNA分型的应用作一综述。

1 HLA方法学的进展

1.1 传统的HLA血清学分型方法

传统的HLA分型方法主要是采用已知标准抗体检测待检淋巴细胞或已知型别的淋巴细胞与待检细胞混合培养确定其抗原特异性。经国际协作会上标准化后的参比试剂, 可检测表达于淋巴细胞表面的HLA分子的特异性表位, 但其局限性是已知的同种抗血清仅能检出一小部分HLA等位基因[1]。血清学检测到的只是细胞膜上分子末端氨基酸的差异, 而不是等位基因本身。同种抗血清的特征依赖于一组优质的谱细胞的检定, 反之, 标准的血清学试剂又可揭示新的特异性。以往大多数同种抗血清和谱细胞是由欧美和日本的一些实验室或商家提供, 这些试剂对于证实其他人种群体中的新HLA特异性并不完全适合。20世纪90年代, 单克隆抗体(McAb)和免疫磁珠分离技术的应用[2], 虽然使HLA I、II类分型趋于简便, 但越来越多的实验表明, HLA血清学表型相同, 其核苷酸序列却不一定完全相同[3]。

1.2 HLA-DNA分型方法

近10年来, HLA研究的重点已转向分析编码类等位基因, 760多个新的等位基因通过DNA序列分析得到证实。HLA-I类等位基因的核苷酸序列变异集中在外显子2和3, 而II类则集中在外显子2, 这是造成HLA分子多态性的主要原因。直接以DNA为基础的技术引入, 使人们更深入研究HLA成为可能。HLA-DNA分型方法都是针对其核苷酸顺序差异而设计的, 主要可分为以下5种。

1.2.1 DNA-限制性片段长度多态性分析(DNA-RFLP) 1989年Wake等[4]首先将RFLP分析应用于HLA-II类基因定型, 这是HLA基因分型的开端。初期的RFLP使用cDNA全长探针与经限制性内切酶消化的基因组DNA酶解片段杂交, 由于HLA各等位基因间核苷酸序列的同源性, 全长探针杂交会显示出许多杂交片段, 电泳结果较难分析。20世纪90年代PCR技术的日益成熟和HLA复合体各等位基因核苷酸顺序的阐明, PCR-RFLP技术相应建立, 使限制性内切酶切割片段减小到只有几万个碱基的短核苷酸, 直接电泳分离即可显示明显的带型。

Uryn[5]利用特异性引物扩增DRB第2外显子, 分别用Fok I、Hinf I、Hha I、Hph I、Kpn I及Sac II内切酶消化扩增产物, 电泳分析出20种不同的限制性片段, 对应检出DR1~DR18共18种血清学特异性抗原。Date等[6]建立了半嵌套式PCR-RFLP技术, 通过第一次30个, 第二次20个循环的两次扩增, 而得到所需产物。这种方法仅仅用10 pg的DNA, 便可对HLA-DRB1分型。改良的PCR-RFLP因其快速、简便、经济、适用于所有纯合子和杂合子的个体而显示出更多的优越性。

1.2.2 PCR-序列特异性寡核苷酸探针(SSOP) SSOP是人工合成的具有HLA型特异性的探针,与PCR扩增的HLA基因片段在一定条件下特异性杂交,通过放射自显影判定结果。早期的PCR-SSOP法对DRB这样复杂的基因分型多采用整个DRB基因扩增,且DRB3和B4、B5某些等位基因的第2外显子DNA顺序的第二可变区与DRB1极为相似,故导致针对DRB1第二可变区的SSO与上述不同的等位基因交叉杂交,这是影响精确分辨HLA基因的主要因素。随着非同位素检测方法,主要是化学发光法的出现,PCR-SSOP技术已广泛用于HLA-I、II类基因定型[6][7]。Garcia[8]报道的正向杂交是将PCR扩增DNA点样至许多小块尼龙膜上,然后再将不同类型连接有“生物素-14-dATP”尾的SSOP分别加入各微量板的孔内完成杂交,通过链霉亲和素(SA)-酶和底物反应显色判断结果,大大简化了传统杂交的反应周期,也避免了放射污染。Peponnet等[9]则利用生物素标记探针建立了两种反向PCR-SSOP,即扩增法和分组扩增法,其原理类似于ELISA,先将特异性探针吸附至微量反应板各孔,再加PCR扩增产物杂交,通过酶底物反应判定结果,比正向杂交节省了特异性探针的使用量。经108个样品HLA-DRB分组实验,分型结果完全相同,二者结合还可提高准确性。Bugawan等[10]利用反向杂交法,采用51个特异性寡核苷酸探针特异性扩增HLA-A第1~3外显子,结合计算机分析,能检出所有HLA-A等位基因。目前PCR-SSO技术已能用67种探针确定98个II类等位基因,而确定HLA-A和B等位基因的PCR-SSO分别需要40个和90个以上的探针才能达到中分辨率。Allen等[11]使用组特异性扩增和微板SSOP杂交,得出高分辨的HLA-DRB1基因分型。该技术解决了精确配型,但最大缺点是对杂合子的检测及分析困难,未知等位基因会误导对结果的解释。

1.2.3 PCR-序列特异性引物(SSP) PCR-SSP是根据不同的等位基因设计特异性引物进行体外扩增。1992年, Olerup[12]根据HLA基因序列设计出合成一套针对HLA-DRB1、DRB3和DRB4的特异性引物,能检出DR1~DR18间所有纯合子和杂合子。对30个纯合子细胞系和121份个体标本进行19个PCR扩增反应,分别检出DR1~DR18及DR52、DR53,重复率为100%,无假阳性及假阴性,与RFLP复合率为100%。另有人利用其基本原理建立巢式PCR-SSP,用以鉴定与HLA-B5有血清学交叉反应的其它HLA-I类抗原[13]: HLA-B35、B51、B52、B53和B7801。来自一份9个实验室的报告中报道,采用PCR-SSP的360份结果分析,DR正确分型为351/360(98%),DQ为320/360(89%)[14]。这种方法的主要优点是快速,但PCR-SSP仅能检测已知多态性序列,不能检出新的等位基因。

1.2.4 PCR-单链构象多态性(SSCP) PCR-SSCP是1989年日本Orita等人建立的一种检测点突变的新技术,曾成功地检测了肺癌病人的ras基因突变。用变性剂解开DNA双链,由于各等位基因间核苷酸序列不同,二级结构产生差异,因这种差异呈现出不同的电泳迁移率而可以用分子筛凝胶分析结果。因此,它能检出目的基因任何部位发生的单个碱基至数个碱基的突变,具有较高的分辨率,同时也易于检出未知的基因型。但影响PCR-SSCP识别力的因素很多,且用于该方法的DNA片段大小限制在200~400 bp之间[15],而HLA-I类等位基因的分析包括外显子2、3和中间的内含子,序列长度超过800 bp,故PCR-SSCP技术用于I类的供受者交叉配型,需与标准品比较,才能作等位基因分型。

1.2.5 PCR-DNA测序 DNA测序可使HLA分型达到最高的分辨率。将扩增产物先克隆于M13噬菌体,再进行序列分析或通过使用复杂的计算机软件和已发表的HLA等位基因信息来分析HLA基因多态性。Pera等[16]提出一种简单快速基本序列定型法(Sequence-based typing, SBT),先用一个PCR反应扩增外显子1和外显子5之间序列,产生一个2 kb DNA片段,后用4个测序反应对其中的外显子2和3进行测序,就能检测出大多数样本的HLA等位基因。Luo[35]等利用测序成功地检出HLA-DQA1等位基因(DQA1*0106)水平以及HLA-DQA1等位基因44密码子多态性,并确定出新的DQA1等位基因(DQA1*01021/2)。

1.3 血清学分型和DNA分型方法可靠性比较

大量的研究表明,以前血清学方法确定的HLA相合的供受者,采用HLA-DNA分型都发现不同程度的不吻合。美国《国家骨髓捐赠计划》捐赠者库的2 486份标本,经血清学重复分型,发现390例(15.7%)HLA-A分型结果不一致。其中238例用PCR-SSP以及PCR-SSOP分型复试,发现184例为杂合子,54例为纯合子,总共指定422个特异性。在此422次指定中,PCR-SSP和PCR-SSOP分型结果一致;血清学分型错误为35%(147/422)[17]。在40例HLA-B分型比较中,PCR-SSP和PCR-SSOP结果一致,血清学分型错误率22.5%[18],但在HLA-B15和HLA-B40特异性分析中,PCR-SSP具有更高分辨力,它能检定所有HLA-B15(HLA-B1524、1525、1526、1528、1529)抗原的亚特异性。在血清学分型鉴定为HLA-B位点纯合子的40例标本中,使用PCR-SSP分型以及

DNA 测序证明其中1%为杂合子, 血清学分型错误率25%(10/40), 用变性梯度凝胶电泳后直接测序证实, PCR-SSP结果可靠[19]。Nathalang 等[20]报道在泰国人群中, 血清学分型错误为18/120(15%)。Pera等[16]用SBT检测了36名供血者、58名非亲属骨髓移植的供者和58名受者及36个HLA同源细胞株的HLA-A型并与血清学分型和PCR-SSP分型结果进行了比较, SBT能确认所有83个HLA-A等位基因, 包括白种人罕见的A34、A66、A74或A80, 并发现一个新的HLA-A等位基因, 命名为HLA-A*2608。经统计分析, 血清学发生错误主要集中在: ①交叉反应抗原或未能正确指定属于A9和A19的亚型, 如A2、A23、A24、A25、A26、A30、A31、A33、A34、A36、A66、A68、A69、A74、A80; B35、B46、B48、B50、B54、B55、B57、B58、B61、B63、B67、B70、B73、B75、B76、B77以及很难获得相应特异性抗血清的B71、B72、B78、B81, 这些特异性抗原多在交叉组(Cross-reactive epitope group, CREG)内, 或是宽特异性抗原(Broad antigen)的裂解产物; ②未能检出WHO命名的全部基因; ③纯合子细胞中, 存在假阳性反应; ④易漏检的抗原HLA-B41, B40, B52, B14, B46, B82, B56和B47。长期以来, 人们接受HLA-C座位上存在大量“空白”基因的事实, 因为没有相应的抗血清检测出它们的产物。HLA-C“空白”基因频率可高达50%左右。DNA分型技术促进和改善了HLA多态性的分辨率, 已经使C座位上的“空白”不复存在。

2 HLA-DNA分型的应用

2.1 移植配型中的应用

器官、骨髓移植供受者之间HLA配合程度作为同种异体移植与排斥反应密切关联的危险程度, 已得到共识。为减少发生移植物抗宿主病(GVHD)的机率, 要求骨髓移植病人和供者的HLA抗原必须全相同[21][22]。Adorno等[23]研究了尸体肾移植术后, 供者特异性抗体产生和患者急性排斥时HLA-DRB1氨基酸残基差异所起的作用, 该研究采用SBT测定DRB1等位基因的高分辨技术, 分析了51对肾移植供受者, 结果显示, DRB1残基的相容性总是与未发生急性排斥相关, 而一个或多个氨基酸差异的存在与急性排斥出现的频率相一致。Fleischhauer等[24]报告1例血清学匹配的非亲属供受者只是由于HLA-B44亚型不同, 产生一个氨基酸之差发生GVHD, 导致患者死亡。PCR-SSOP分型发现供者是B44.1型, 而受者是B44.2型, 序列分析表明二者差异是核苷酸195~197位发生改变: B44.1序列是CTG(编码亮氨酸), B44.2序列是GAC(编码天门冬氨酸), 这种改变导致密码子156编码的 α 2功能区的一个氨基酸发生改变。因此, 高分辨的HLA-DNA分型对移植中血清学HLA相合的校正可以起到积极的补充, 对研究哪些HLA等位基因不相合是可耐受的具有临床意义。

2.2 用于骨髓库和脐血库的HLA分型

骨髓移植供者, 首先在同胞或亲属中挑选, 如无合适来源, 再根据受者的HLA型别, 在骨髓库或脐血库中选择与其配合的无关供者。世界各国制定的选择标准不尽相同, 但基本上都选择HLA-A与HLA-B抗原相同、DR血清学分型和DRB1基因分型也相同的供者。如果供受者的A、B和DR抗原属于同一个交叉反应组, 被认为是“次要错配”, 虽然配合程度不如无错配, 但亦可接受。美国国家骨髓供者组要求对36~55岁的病人, 供受者A、B、DR必须相同; 小于36岁的病人, 允许有一个A、B或DRB不合。该供者组的研究人员采用高分辨的HLA-DNA分型技术分析了大约1 300对骨髓移植受者的HLA-II类基因的第2外显子。血清学与HLA-DNA分型不吻合者, DRB1~DQB1占20.1%[25]。Hurley等[26]对国际骨髓无关供者登记处的6个实验室, 采用HLA-SSOP分型, 首批12个月的质控结果分析, 11 545份样本HLA-A和11 428份样本HLA-B的错误率分别为1.1%和1.9%, 证明HLA-DNA技术在骨髓库和脐血库的无关供体间配型准确度增高。

2.3 HLA-DNA技术用于人类基因多态性、疾病关联及移植物植活指标研究

人类群体遗传研究中的一种高信息量系统之一被认为是HLA区微卫星。微卫星DNA是一类广泛存在于原核和真核生物基因组中的由1~6 bp串联重复排列而成的DNA顺序, 重复顺序可达100次, 又被称为短的串联重复顺序(Short tandem repeats, STR)。它作为一种新的多态性标记已广泛应用于人类基因组多样性研究中。用于人类基因组多样性(HGD)研究中的HLA区第一个STR是TNF微卫星标记。1993年, Grouau等[27]对四种欧洲人群的HGD进行了TNF微卫星多态性分析。之后又有人对意大利人群进行了相似的分析。Dib等[28]建立在5 264个STR基础上的人类基因组的一个综合性遗传图谱显示, 6号染色体上有311个CA重复顺序, 其中定位在HLA

附近的有30多个。

随着HLA区STR的不断被发现和分类的系统化,HLA微卫星标记在HLA连锁或HLA关联的疾病基因定位的研究中已经取得可喜成果。Zamani等[29]对糖尿病-I型易感人群不同个体HLA-II类等位基因和氨基酸多态性重要性进行了重新评价研究,证实了胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)与HLA-DQA1精氨酸52和DQB1天冬氨酸57呈强关联,但这些结果不能构成个体差异,如DRB1赖氨酸71⁺等位基因危险系数增高的IDDM患者,只与比利时人、丹麦人、希腊人、中国人有关,而与挪威人、沙特人和阿尔及利亚人无关,因为沙特和阿尔及利亚人DRB1*0401等位基因编码赖氨酸71⁺非常稀有。日本人最近采用PCR-RFLP对90名I型糖尿病儿童和136名正常人进行了HLA-DRB1*0201分型,发现危险系数为2.29[30]。HLA-DR与类风湿关节炎(RA)的关联研究已得到证实,临床大约54%的RA患者表达DR4(对照组26%),亦有部分显示DR4和DR1两者都有较高表达[31][32]。用定位于HLA-II类或III类区域的STR进行群体调查对比分析发现,TNF微卫星等位基因分布在腹腔病病人与对照组之间存在差异[33]。Concha等[34]研究了121名溃疡性结肠炎患者和275名正常人的HLA-DRB1、DRB3,证实不同HLA-DRB1等位基因的溃疡性结肠炎与其关联不容易确认,结果显示,HLA-DR2等位基因中DRB1*15与该疾病关联而不是DRB1*16,同样,在HLA-DR1型中,这些病人仅有DRB1*0103增加。进一步研究发现,溃疡性结肠炎与HLA关联涉及到DRB链高变区内更强的氨基酸残基,尤其是DRB71阳性患者。HLA区微卫星标记还可作为器官、骨髓移植的植入物标记或嵌合体的评估以及残留白细胞检测的指标。

3 结语

HLA-DNA技术发展日新月异,其应用领域不断拓展。随着这一技术的不断创新和完善,作为常规技术全面进入临床应用已为期不远。HLA等位基因水平上的不合程度与器官、骨髓移植的排斥关系及免疫耐受等各类研究会逐步深入。HLA微卫星标记作为无关供体间移植配型新方法的建立和应用;HLA-DNA分型鉴别一些自身免疫性疾病及其他疾病的高危人群,预防或阻止疾病发展,将是临床研究HLA领域的另一新课题。

参考文献:

- [1] Bodmer TG, Marsh SGE, Albert ED, et al. Nomenclature for factors of the HLA system[J]. Vox Sang, 1997, 73(2):105-30.
- [2] Lee JT, Lias M, Deng CT, et al. A one-step monoclonal antibody typing procedure that simplifies HLA class I and class II typing[J]. Tissue Antigens, 1994, 44(7):134-42.
- [3] Otten HG, Tilanus MG, Barnstiji M, et al. Serology versus PCR-SSP in typing for HLA-DR and HLA-DQ practical evaluation[J]. Tissue Antigens, 1995, 45(1):36-41.
- [4] Wake C, Long E, Mach B. Allelic polymorphism and complexity genes for HLA-DR β -chains — direct analysis by DNA-DNA hybridization [J]. Nature, 1989, 300(5890):372-4.
- [5] Uryn N. A simple and rapid method for HLA-DRB and DQB typing by digestion of PCR-amplified DNA with alleles specific restriction endonucleases[J]. Tissue Antigens, 1990, 35(1):20-32.
- [6] Date Y, Kimura A, Kato H, et al. DNA typing of the HLA-A gene: population study and identification of four new alleles in Japanese. Tissue Antigens, 1996, 49(2):93-101.
- [7] Fernandez VM, Lazaro AM, Sun Y, et al. Population diversity of B-locus alleles observed by high-resolution DNA typing[J]. Tissue Antigens, 1995, 45(3):153-68.
- [8] Garcia PJ, Mamtilla P, Garcia OE, et al. Routine HLA DRB/DQB oligonucleotide typing by a non-radioactive dot-blot micromethod[J]. J Immunol Methods, 1995, 180(1):35-43.
- [9] Peponnet C, Schaeffer V, Lepage V, et al. Comparison of two HLA-DRB high resolution microtiter reverse hybridization typing method advantage of a codon-86 value of glycine PCR segregation[J]. Tissue Antigens, 1995, 45(2):129-38.
- [10] Bugawan TL, Apple R, Erlich HA. A method for typing polymorphism at the HLA-A

using PCR amplification and immobilized oligonucleotide probes[J]. *Tissue Antigens*, 1994, 44(3):137-47.

[11] Allen M, Eriksson I, Liu L, et al. High resolution genetic typing of the class II HLA-DRB1 locus using group-specific amplification and SSO-hybridisation in microplates [J]. *Hereditas*, 1998, 129(11):2161-7.

[12] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers(PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation[J]. *Tissue Antigens*, 1992, 39(3): 225-35.

[13] Hein J, Bottcher K, Grunolmann R, et al. Low resolution DNA typing of the HLA-B5 cross-reactive group by nested PCR-SSP[J]. *Tissue Antigens*, 1995, 45(1): 27-35.

[14] Zetterquist H, Bengtsson M, Olerup O, et al. Report from the HLA class II typing by PCR-SSP multicentre study[J]. *Eur J Immunogenet*, 1997, 24(7):3191-9.

[15] Ganguly A, Prockop DJ. Detection of mismatched bases in double stranded DNA by gel electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(10):1830-5.

[16] Pera C, Deffins L, Marabito A, et al. HLA-A typing: comparison between serology, the amplification refractory mutation system with polymerase chain reaction and sequencing [J]. *Tissue Antigens*, 1997, 50(4):372-9.

[17] Yu N, Ohashi M, Alosco S, et al. Accurate typing of HLA-A antigens and analysis of serological deficiencies[J]. *Tissue Antigens*, 1997, 50(4):380-6.

[18] Bozon MV, Dolgado JC, Selvakumler A, et al. Error rate for HLA-B antigen assignment by serology: implications for proficiency testing and utilization of DNA-based typing methods[J]. *Tissue Antigens*, 1997, 50(4):387-94.

[19] Lorentzen DF, Iwanaga KK, Meuer KJ, et al. A 25% error rate in serologic typing of HLA-B homozygotes[see comments][J]. *Tissue Antigens*, 1997, 50(10):4359-65.

[20] Nathalang O, Kupatawintu P, Charoen O, et al. Comparative analysis of serological and molecular results for HLA-DR typing in 120 Thai subjects[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1999, 30(6):2311-33.

[21] Hansen JA, Matsubara K, Mickelson E, et al. Hematopoietic stem cell transplants from unrelated donors[J]. *Immunol Rev*, 1997, 155(1): 141-4.

[22] Thomas ED. Stem cell transplantation: past, present and future[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 1997, 45(1): 1.

[23] Adorno D, Piazza A, Canossi A, et al. The role of DRB1 amino acid residue differences on donor-specific antibody production and acute rejection after cadaveric renal transplant[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1999, 13(1):132-6.

[24] Fleischhauer K, Agostino A, Zino E, et al. HLA-I characteristics of molecular biology[J]. *Tissue Antigens*, 1999, 53(6):519-26.

[25] Baxter-lowie LA, Awdeh Z, Chopek M, et al. Compare error rate with serologic typing and DNA typing of HLA-DR, DQ[J]. *Hum Immunol*, 1996, 49(Suppl 1):82-4.

[26] Hurley CK, Mawamura 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):4352-8.

[27] Crouau RB, Briant L, Bouissou C, et al. Analysis of HLA-A/B recombinant families with new polymorphic markers[J]. *Hum Immunol*, 1993, 38(2):132-6.

[28] Dib C, Faur'e S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human

genome based on 5264 microsatellites[J]. Nature, 1996, 380(6570):152-4.

[29] Zamani M, Cassiman JJ. Reevaluation of the importance of polymorphic HLA class II allele and amino acids in the susceptibility of individuals of different populations to type I diabetes[J]. Am J Med Genet, 1998, 76(5):2183-94.

[30] Nishimaki K, Kawamura T, Inada H, et al. HLA DRB1*0201 gene confers disease susceptibility in Japanese with childhood onset type I diabetes, independent of HLA-DR and DQ genotypes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2000, 47(1):149-55.

[31] van Jaarsveld CH, Otten HG, Jacobs JW, et al. Is there an indication for HLA-DR typing for individual patients with rheumatoid arthritis[J]? Clin Exp Rheumatol, 1998, 16(7):4483-8.

[32] van Jaarsveld CH, Otten HG, Jacobs JW, et al. Association of HLA-DR with susceptibility to and clinical expression of rheumatoid arthritis: re-evaluation by means of genomic tissue typing[J]. Br J Rheumatol, 1998, 37(4):1411-6.

[33] McManus R, Moloney M, Borton M, et al. Association of celiac disease with microsatellite polymorphisms close to the tumor necrosis factors genes[J]. Hum Immunol, 1996, 45(1):24-31.

[34] Concha EG, Fernandez AM, Martinez A, et al. Amino acid polymorphism at residue 71 in HLA-DR beta chain plays a critical role in susceptibility to ulcerative colitis[J]. Dig Dis Sci, 1999, 44(11):2324-9.

[35] Luo M, Blanchard J, Madean I, et al. Identification of a novel HLA-DQA1 allele (DQA1*0106) by sequence-based DQA1 typing[J]. Tissue Antigens, 1999, 53(6):595-6.

Inoue S, Yamamoto Y, Okamoto O, et al. Improvement of sensitivity in HLA-DRB1 typing by semi-nested PCR-RFLP[J]. Acta Med Okayama, 1998, 52(12):6289-96.

参考文献:

[1] Bodmer TG, Marsh SGE, Albert ED, et al. Nomenclature for factors of the HLA system[J]. Vox Sang, 1997, 73(2):105-30.

[2] Lee JT, Lias M, Deng CT, et al. A one-step monoclonal antibody typing procedure that simplifies HLA class I and class II typing[J]. Tissue Antigens, 1994, 44(7):134-42.

[3] Otten HG, Tilanus MG, Barnstijl M, et al. Serology versus PCR-SSP in typing for HLA-DR and HLA-DQ practical evaluation[J]. Tissue Antigens, 1995, 45(1):36-41.

[4] Wake C, Long E, Mach B. Allelic polymorphism and complexity genes for HLA-DR β -chains — direct analysis by DNA-DNA hybridization [J]. Nature, 1989, 300(5890):372-4.

[5] Uryn N. A simple and rapid method for HLA-DRB and DQB typing by digestion of PCR-amplified DNA with alleles specific restriction endonucleases[J]. Tissue Antigens, 1990, 35(1):20-32.

[6] Date Y, Kimura A, Kato H, et al. DNA typing of the HLA-A gene: population study and identification of four new alleles in Japanese. Tissue Antigens, 1996, 49(2):93-101.

[7] Fernandez VM, Lazaro AM, Sun Y, et al. Population diversity of B-locus alleles observed by high-resolution DNA typing[J]. Tissue Antigens, 1995, 45(3):153-68.

[8] Garcia PJ, Mamtilla P, Garcia OE, et al. Routine HLA DRB/DQB oligonucleotide typing by a non-radioactive dot-blot micromethod[J]. J Immunol Methods, 1995, 180(1):35-43.

[9] Peponnet C, Schaeffer V, Lepage V, et al. Comparison of two HLA-DRB high resolution microtiter reverse hybridization typing method advantage of a codon-86 value of

glycine PCR segregation[J]. Tissue Antigens, 1995, 45(2):129-38.

[10] 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.

[11] Allen M, Eriksson I, Liu L, et al. High resolution genetic typing of the class II HLA-DRB1 locus using group-specific amplification and SSO-hybridisation in microplates [J]. Hereditas, 1998, 129(11):2161-7.

[12] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers(PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation[J]. Tissue Antigens, 1992, 39(3): 225-35.

[13] Hein J, Bottcher K, Grunolmann R, et al. Low resolution DNA typing of the HLA-B5 cross-reactive group by nested PCR-SSP[J]. Tissue Antigens, 1995, 45(1): 27-35.

[14] Zetterquist H, Bengtsson M, Olerup O, et al. Report from the HLA class II typing by PCR-SSP multicentre study[J]. Eur J Immunogenet, 1997, 24(7):3191-9.

[15] Ganguly A, Prockop DJ. Detection of mismatched bases in double stranded DNA by gel electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1995, 16(10):1830-5.

[16] Pera C, Deffins L, Marabito A, et al. HLA-A typing: comparison between serology, the amplification refractory mutation system with polymerase chain reaction and sequencing [J]. Tissue Antigens, 1997, 50(4):372-9.

[17] Yu N, Ohashi M, Alosco S, et al. Accurate typing of HLA-A antigens and analysis of serological deficiencies[J]. Tissue Antigens, 1997, 50(4):380-6.

[18] Bozon MV, Dolgado JC, Selvakumler A, et al. Error rate for HLA-B antigen assignment by serology: implications for proficiency testing and utilization of DNA-based typing methods[J]. Tissue Antigens, 1997, 50(4):387-94.

[19] Lorentzen DF, Iwanaga KK, Meuer KJ, et al. A 25% error rate in serologic typing of HLA-B homozygotes[see comments][J]. Tissue Antigens, 1997, 50(10):4359-65.

[20] Nathalang O, Kupatawintu P, Charoen O, et al. Comparative analysis of serological and molecular results for HLA-DR typing in 120 Thai subjects[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1999, 30(6):2311-33.

[21] Hansen JA, Matsubara K, Mickelson E, et al. Hematopoietic stem cell transplants from unrelated donors[J]. Immunol Rev, 1997, 155(1): 141-4.

[22] Thomas ED. Stem cell transplantation: past, present and future[J]. Arch Immunol Ther Exp, 1997, 45(1): 1.

[23] Adorno D, Piazza A, Canossi A, et al. The role of DRB1 amino acid residue differences on donor-specific antibody production and acute rejection after cadaveric renal transplant[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 1999, 13(1):132-6.

[24] Fleischhauer K, Agostino A, Zino E, et al. HLA-I characteristics of molecular biology[J]. Tissue Antigens, 1999, 53(6):519-26.

[25] Baxter-lowie LA, Awdeh Z, Chopek M, et al. Compare error rate with serologic typing and DNA typing of HLA-DR, DQ[J]. Hum Immunol, 1996, 49(Suppl 1):82-4.

[26] Hurley CK, Mawamura 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):4352-8.

[27] Crouau RB, Briant L, Bouissou C, et al. Analysis of HLA-A/B recombinant families

with new polymorphic markers[J]. Hum Immunol, 1993, 38(2):132-6.

[28] Dib C, Faur'e S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites[J]. Nature, 1996, 380(6570):152-4.

[29] Zamani M, Cassiman JJ. Reevaluation of the importance of polymorphic HLA class II allele and amino acids in the susceptibility of individuals of different populations to type I diabetes[J]. Am J Med Genet, 1998, 76(5):2183-94.

[30] Nishimaki K, Kawamura T, Inada H, et al. HLA DRB1*0201 gene confers disease susceptibility in Japanese with childhood onset type I diabetes, independent of HLA-DR and DQ genotypes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2000, 47(1):149-55.

[31] van Jaarsveld CH, Otten HG, Jacobs JW, et al. Is there an indication for HLA-DR typing for individual patients with rheumatoid arthritis[J]? Clin Exp Rheumatol, 1998, 16(7):4483-8.

[32] van Jaarsveld CH, Otten HG, Jacobs JW, et al. Association of HLA-DR with susceptibility to and clinical expression of rheumatoid arthritis: re-evaluation by means of genomic tissue typing[J]. Br J Rheumatol, 1998, 37(4):1411-6.

[33] McManus R, Moloney M, Borton M, et al. Association of celiac disease with microsatellite polymorphisms close to the tumor necrosis factors genes[J]. Hum Immunol, 1996, 45(1):24-31.

[34] Concha EG, Fernandez AM, Martinez A, et al. Amino acid polymorphism at residue 71 in HLA-DR beta chain plays a critical role in susceptibility to ulcerative colitis[J]. Dig Dis Sci, 1999, 44(11):2324-9.

[35] Luo M, Blanchard J, Madean I, et al. Identification of a novel HLA-DQA1 allele (DQA1*0106) by sequence-based DQA1 typing[J]. Tissue Antigens, 1999, 53(6):595-6.

Inoue S, Yamamoto Y, Okamoto O, et al. Improvement of sensitivity in HLA-DRB1 typing by semi-nested PCR-RFLP[J]. Acta Med Okayama, 1998, 52(12):6289-96.