



## HLA- II 血清学分型与微量SSP法基因分型的比较分析

1995年以来,HLA单克隆抗体血清学分型技术因其操作简便,商品化试剂标准、规范等优点而迅速在我国推广应用,本科室也已将该技术应用于临床 [1]。

1999~2000年间,我们对上千例样本进行了HLA分型,但是因血清学分型抗原的漏检和额外反应而导致配型错误,尤其是在HLA-II类抗原分型方面的错误非常突出。为此,我们采用聚合酶链反应结合微量序列特异性引物技术(简称微量PCR-SSP法)检测了部分样本HLA-II类等位基因,并对其血清学分型错误发生的原因进行了分析,现报告如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 对象

本院门诊和住院病人110例血样样本,其中慢性肾功能不全者53例、白血病患者12例、地中海贫血者6例、正常供体39例。

#### 1.2 淋巴细胞制备

采用免疫磁珠法分离法对全血样本分别进行T、B淋巴细胞制备,使其终浓度达到 $2 \times 10^6$ 个/L,分离试剂盒由美国One Lambda Inc提供,步骤参照试剂盒说明书。

#### 1.3 基因组DNA制备

参照第十二届国际组织相容性会议推荐的盐析法制备(DNA纯度 $260/280=1.67$ ,达到试剂盒要求标准)。

#### 1.4 材料及试剂

HLA-I、II类单克隆抗体试剂和Micro SSPTM Generic HLA Class II Typing Tray(简称定型板)均由美国One Lambda. Inc提供。单抗试剂可检出HLA- DR1、103~DR18; DRW51、52、53; DQ2、4~9的抗原特异性。SSP试剂引物0.2 ml事先包被于96孔Terasaki微板并经干燥处理;PCR扩增用的4种dNTP-buffer体系(Micro SSPTM D-mix)备用,可检出HLA-DRB1、DRB3、DRB4、DRB5、DQB1等位基因特异性(表1)。

表 1 HLA-DR,DQ 等位基因的序列特异性引物  
**Tab.1 Sequence-specific primers for HLA-DR  
and-DQ alleles**

Serology equivalent	Primer	Alleles
DR1,103	DRB1*01	*0101,0102,0103,0104,0105
DR17,18	DRB1*03	*0301-0314, *03021-0303
DR4	DRB1*04	*0401-0432
DR7,9,10	DRB1*07,09,10	*0701, *09012, *1001
DR8	DRB1*08+* 1415	*0801-0819, *1415
DR11	DRB1*11	*1101-1132
DR12	DRB1*12	*1201-1206
DR13	DRB1*13	*1301-1332
DR14	DRB1*14	*1401-1433
DR15	DRB1*15	*1501-1508
DR16	DRB1*16	*1601-1605,1607,1608
DR <sub>w</sub> 52	DRB3*	*0101-0105, *0201-0208, *0301-0302
DR <sub>w</sub> 53	DRB4*	*0101-0104, *0103102N, *0201N
DR <sub>w</sub> 51	DRB5*	*0101-0109, *0201-0204
DQ2,4,5,6,7,8,9	DQB1*	*0201-0203, *0401, *0402, *0501-0504 *0601-0612, *0301-0306

## 1.5 方法

1.5.1 单克隆抗体血清学HLA-II类分型 参照一步法[2]对110例样本中的67例患者淋巴细胞进行分型, 荧光显微镜下观察细胞(红色为死亡细胞、绿色为活细胞)并按照美国国立卫生院(NIH)的标准评分(具体标准为: 阴性、弱阴性、弱阳性、阳性、强阳性所对应的死细胞数的百分比依次为0~10%、11%~20%、21%~40%、41%~80%、81%~100%)。

1.5.2 微量PCR-SSP 法行基因分型 采用微量PCR-SSP 法对110例DNA样本进行基因分型。按试剂盒说明步骤进行: 取Taq DNA聚合酶2 μl(浓度为5 U/μl)于Micro SSP™ D-mix管中混匀, 取混合液9 μl、水1 μl加入96孔Taresaki微孔板的阴性质控孔中; 取基因组DNA 39 μl加入上述D-mix管中, 轻轻旋转混匀约5 s, 取该混合液10 μl, 分别加入到96孔Taresaki微孔板的其余31孔中, 加盖; 置入PCR热循环扩增仪中, 按下列程序进行循环: 96 °C 130 s、63 °C 60 s 1个循环; 96 °C 10 s、63 °C 60 s 9个循环; 96 °C 10 s、59 °C 50 s、72 °C 30 s 20个循环, 共计30个循环完成扩增。

1.5.3 PCR产物扩增产物鉴定 取出扩增产物于2.5%琼脂糖凝胶中点样, 在Micro SSP™ 凝胶系统中电泳3~5 min(电压140~150V)后, 置紫外透射仪上观察产物结果(图1)。

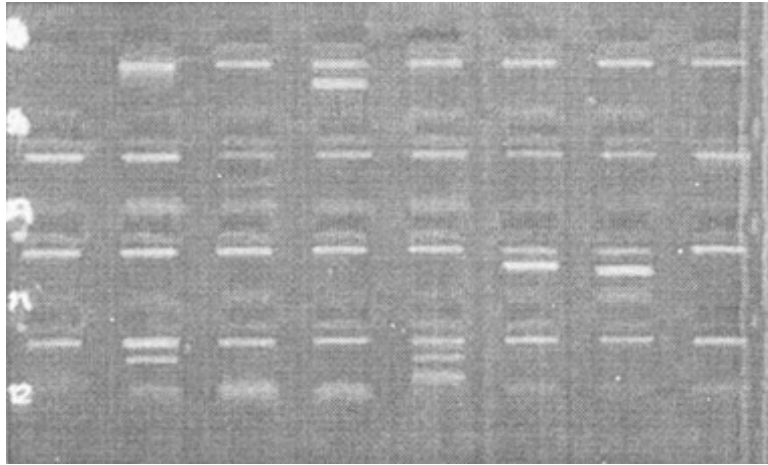


图1 1名慢性粒细胞白血病患者HLA-DRB1、DQB1电泳图(micro-PCR-SSP)  
Fig.1 Electrophoretogram of HLA-DRB1, DQB1 in a patient with chronic granulocytic leukemia patient (micro-PCR-SSP)

According to worksheet tabel, the patient's HLA-DRB1,DQB1 gene typing is as the following:

DRB1\*1501~08, 1201~04; DRB5\*0101~07, 0202~04; DRB3\*0101~05, 0201~08, 0301~03;  
DQB1\*0501~04, 0301~09

## 1.6 统计学处理

采用配对设计的 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 微量PCR-SSP法 HLA-DRB1, DQB1分型的结果

110例样本中, 99例(90%)分别检出HLA- DRB1、DQB1两个区域的杂合等位基因, 共计396个; 11例(10%)分别检出HLA-DRB1、DQB1两个区域的纯合等位基因, 共计22个。110例中检出HLA-DRB3, 4, 5三个区域中两个、一个、零个等位基因的分别为: 43例(39.09%)86个等位基因、64例(58.18%)64个等位基因、3例(2.73%)零个等位基因。

### 2.2 单克隆抗体血清学HLA-DR, DQ分型结果

67份样本荧光染色后评分弱阳性~强阳性者41例、弱阳性以下17例、弱阴性或反应格局上没有规律, 不能做出判断的9例。

### 2.3 微量PCR-SSP法与单克隆抗体(mAb)法检出抗原比较

两种方法对67样本进行HLA-DR, DQ分型的结果如下: (1)两法同时检出HLA-DR双抗原35例、单抗原4例; PCR-SSP法检出单抗原、单抗法检出双抗原6例; PCR-SSP法检出双抗原、单抗法检出单抗原13例; PCR-SSP检出双抗原而单抗法未检出9例; (2)同时检出HLA-DQ双抗原23例、单抗原8例; PCR-SSP检出单抗原、单抗法检出双抗原10例; PCR-SSP检出双抗原、单抗法检出单抗原13例; PCR-SSP检出双抗原而单抗法未检出9例; PCR-SSP检出单抗原、单抗法检出零抗原的3例。

配对 $\chi^2$ 检验结果显示两种方法检出HLA-DR和-DQ抗原有显著性差别( $P=0.005$ ,  $P=0.037$ ), PCR-SSP法优于单抗法。单抗法的错误为HLA-DR=38.81%, HLA-DQ=50.75%。

## 3 讨论

自从1992年Olerup [3]根据HLA基因序列设计出合成一套针对HLA-DRB1, DRB3和DRB4的特异性引物并利用其检出DR1~DR18, DQ2, 4~9间所有纯合子和杂合子等位基因以来, PCR-SSP技术迅速发展, 成为目前HLA-DNA分型最常用的技术。

本研究采用微量PCR-SSP法对110例样本进行HLA-DR、DQ基因分型, 结果进一步证明了该方法的准确性。110例样本共检出396个等位基因, 其中90%样本分别检出DRB1、DQB1两个等位基因, 为杂合子; 10%样本分别检出DRB1, DQB1一个等位基因, 为纯合子; HLA-DRB1与DRB3、4、5等位基因, DRB1与DQB1等位基因之间存在良好的关联关系。

另外, 本研究对67例样本进行单抗血清学分型的结果显示, 41例弱阳性以上的样本细胞活性较好、结果判断清晰; 17例弱阳性以下的样本细胞活力降低, 出现较多额外反应, 结果难以判定; 9例记分在弱阴性以下且无规律, 其中2例正常供体除阴性对照孔外, 细胞全部死亡, 猜测可能与该供体自身因素有关。此外, 上述26例弱阳性以下的样本个体, 除2例正常供体外, 7例为白血病完全缓解慢性期患者, 17例为肾功能不全长期透析患者。这一现象提示, 白血病患者可因化疗药物或疾病本身导致细胞免疫功能降低, 使HLA抗原表达减弱。关于肾功能不全患者, 已有研究证明[4], 淋巴细胞增殖反应低下是尿毒症免疫功能障碍的主要表现之一, 多种尿毒素可抑制淋巴细胞转化而导致免疫功能缺陷。由此可见, 血清学试验常受受体自身因素, 如标本中细胞活力、数量和药物等影响而干扰结果判定。

本组单抗血清学分型的错误在HLA-DR和DQ分别是38.81%、50.75%, 错误主要集中在HLA-DR2、5、6、8和DQ1、3上, 即血清学对DR15(2)和16(2), DR11(5)和12(5); DR13(6)和14(6), 以及DR8; DQ5(1)和6(1), 8(3)和9(3)抗原难以准确定型; 同时发现DR易漏检的抗原多为: DR8、DR11、DR13、DR14; 额外反应出现的抗原为: DR1, DR103。DQ易漏检的抗原多为DQ5; 额外反应常出现的抗原为DQ4。

对于血清学结果的错误, 国外已有文献报道。一份对美国《国家骨髓捐赠计划》捐赠者库2486份标本的调查报告发现, 经血清学复检分型, 390例HLA-A分型结果不一致, 其中238例经PCR-SSP和PCR-SSOP分型复试, 发现184例杂合子、54例纯合子, 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, 血清学错误为35%(147/422)] [5]。Lorentzen [6]等报告, 血清学分型鉴定为HLA-B位点纯合子的40份标本中, 经PCR-SSP分型及DNA测序证明其中10%为杂合子, 血清学分型错误为25%(10/40), 采用变性梯度凝胶电泳后直接测序证实, PCR-SSP结果可靠。Nathalang [7]等报告泰国人群中血清学分型错误为15%(18/120)。

综上所述, 笔者认为, 对于临床移植配型, 微量PCR-SSP虽有其方法快速准确, 试剂规范标准, 操作简便易行的技术优势, 但必须遵照分子生物学实验条件, 严格掌握操作技术[8], 才能获得准确可靠的结果。另外, 须注意的是, 基因分型有时不能完全代表表型, 基因分型与表型分型相结合效果才会更佳。

致谢: 本文在免疫教研室陈仁馨教授指导下完成, 特此致谢!

#### 参考文献:

- [1] 武大林, 丁红, 张泓, 等. 异基因骨髓移植单克隆抗体试剂进行HLA分型[J]. 临床血液学杂志, 1998, 11(增刊): 86-7.
- [2] Lee JH, Lias M, Deng CT, et al. A one-step monoclonal antibody typing procedure that simplifies HLA class I and class III typing[J]. Tissue Antigens, 1994, 44(1): 134-42.
- [3] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primer(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(5): 225-35.
- [4] 伍凌云, 张训, 侯凡凡. 尿毒症毒素在维持性血透患者细胞免疫缺陷中的作用[J]. 中华肾脏病杂志, 1995, 11(增刊): 3-6.
- [5] 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.
- [6] Lorentzen DF, Iwanaga KK, Meuer KJ, et al. A 25% error rate in serologic typing of HLA-B homozygotes[J]. Tissue Antigens, 1997, 50(4): 359-65.

[7] Nathalang O, Kupatawintu P, O, Charoen R, 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(2): 311-3.

[8] 武大林, 丁红, 张泓. 因Taq DNA聚合酶导致HLA-DRB, DQB DNA分型错误的1例报告分析[J]. 中国输血杂志, 2001, 14(5): 191-2.

#### 参考文献:

[1] 武大林, 丁红, 张泓, 等. 异基因骨髓移植单克隆抗体试剂进行HLA分型[J]. 临床血液学杂志, 1998, 11(增刊): 86-7.

[2] Lee JH, Lias M, Deng CT, et al. A one-step monoclonal antibody typing procedure that simplifies HLA class I and class III typing[J]. Tissue Antigens, 1994, 44(1): 134-42.

[3] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primer (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(5): 225-35.

[4] 伍凌云, 张训, 侯凡凡. 尿毒症毒素在维持性血透患者细胞免疫缺陷中的作用[J]. 中华肾脏病杂志, 1995, 11(增刊): 3-6.

[5] 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.

[6] Lorentzen DF, Iwanaga KK, Meuer KJ. et al. A 25% error rate in serologic typing of HLA-B homozygotes[J]. Tissue Antigens, 1997, 50(4): 359-65.

[7] Nathalang O, Kupatawintu P, O, Charoen R, 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(2): 311-3.

[8] 武大林, 丁红, 张泓. 因Taq DNA聚合酶导致HLA-DRB, DQB DNA分型错误的1例报告分析[J]. 中国输血杂志, 2001, 14(5): 191-2.