



PCR-SSP法HLA-A、B基因分型与血清学分型的比较

近年来,随着HLA等位基因数目的不断发现,血清学方法的局限性和不足越来越明显地表现出来[1]。但由于HLA-I类基因间存在高度序列同源性和相似性,多态性分布于外显子2和3,有些还扩展到外显子4,同时有一定数量的假基因、断裂基因及基因片段,因此,这一类等位基因的DNA分型要比II类滞后很多[2]。为了提高临床移植配型水平,我们采用单克隆抗体血清学和序列特异引物聚合酶链反应(PCR-SSP)技术,对HLA-A、B等位基因进行了比较分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 对象

本院门诊和住院病人34例的血液样本。其中地中海贫血、拟行骨髓移植者30例,慢性肾功能不全、拟行肾移植者2例,无关供者2例,均为汉族广东籍人群。

1.2 淋巴细胞制备

采用免疫磁珠法分离T淋巴细胞,使其终浓度达到 $2 \times 10^6/\text{ml}$,试剂由美国One Lambda Inc提供。

1.3 基因组DNA制备

参照第12届国际组织相容性会议推荐的盐析法制备样本DNA(DNA纯度 $260/280 = 1.68$,达到试剂盒要求标准)。

1.4 试剂和方法

1.4.1 试剂 HLA-A、B等位基因定型试剂盒由美国PEL-FREEZ公司提供,该试剂设计合成130个特异性引物和1对阳性对照引物,其中A位点引物44个,组成22个PCR反应体系,B位点引物86个,组成43个PCR反应体系。每个反应体系 $13 \mu\text{l}$,包括4种dNTP-buffer缓冲体系、特异性引物、内对照引物和石蜡油。引物端、产物、被扩增的等位基因及对应血清学特异性见表1。HLA-A、B单克隆抗体血清学定型试剂由美国One Lambda Inc提供。

表 1 HLA-A、B 基因正义引物 3' 端、产物、被扩增的等位基因及对应血清学特异性

Tab.1 Sense primer 3' end, products, alleles amplified and its counter part serological specificities for HLA-A, B gene

Well	Sense primer 3'end	Product (bp)	Allele amplified	Corresponding serological specificity
1	GAA	650	A*01011-08	A1
2	GCA	490,495	A*02011-48,A*0242	A2
3	CTT	735	A*03011-04/07/08	A3
4	CCT	195	A*11011-09	A11
5	CAG	540	A*2301-06,A*2416	A23
6	CGG	410,445	A*2603/06,A*2607	A26
7	CAG	520,550	A*24021	A24
8	GAG	400	A*2501-03	A25
9	AAC	80	A*2601-05/08-17	A26
10	TTT	120	A*2901-03/04	A29
11	GGA	570	A*3001-04/06-09	A30
12	CTG	450,460	A*31012/02/05,A*3103/04	A31
13	CCA	100	A*3201-06	A32
14	CAC	200	A*3301/03-06	A33
15	AAA,ATA	435,100	A*3401,A*3402/03	A34
16	GAA	635	A*3601/02	A36
17	TGC	435	A*4301	A43
18	AAC	80	A*2603/06,A*3301/03-06,A*3401/03 A*6601-04,A*6801,A*6901	A26,A33,A34 A66,A68,A69
	AAC	575	A*6819	A68
19	CCA	140	A*2610,A*68011-19	A26,A68
20	CAG	355	A*2407/19/24	A24
	CAG	390	A*0234/35,A*6901	A2,A69
21	TTT	160	A*7401-05	A74
22	GGA	500	A*8001	A80
23	TTC	355		Bw4
24	TTC	350		Bw6
25	TGA	115,120	B*0719,B*0702,B*4015,B*4805	B7
26	TCG	605	B*0801/02/03/04-13	B8
27	ACC	515	B*1301-04/06/07,B*2714,B*4004/28	B13,27,40
			B*1301-04/06/07,B*1501,B*3510,B13,62,	
28	ACC	135	35B*3701,B*4021,B*4801,B*4901,B37, 40,49B*5201,B*7805	B52,78
29	CCT	80,540	B*4805,B*1401	B48,14
30	GAA	445	B*1401-062	B14
31	CTC	545	B*1501101-014/04	B62,76
32	GGC	130	B*1501101-02/04-08	B62
33	GGA	330	B*1503/09/10/18/23/29/37/46/47	B72
34	AGA	105	B*0804,B*1503,B*2718,B*3803, B*3902,B*4801	B8,72,27,38 B39,48
	AGA	575	B*4012,B*4801/03/04/06/07,B*8101	B40,48,81

35	GGA	440	B*4012,B*4801/03/04/06/07,B*8101	B40,48,81
36	GTC	195	B*1512/19,B*1514,B*4417	B75,44
37	CAA	465	B*1810-13	B18
38	GCT	155,525	B*2702-11,B*2701-054,B*4701-03	B27,47

Well	Sense primer 3'end	Product (bp)	Allele amplified	Corresponding serological specificity
39	GAC	145	B*1522/59,B*1801-08,B*3501,B*3705, B*3919,B*5606,B*7801-05	B63,18,35,37 B39,56,78
40	GAC	440,460	B*3505/16/17/22/30/31,B*3001, B*4903,B*5301-06,B*5801/02/04-06	B35,30,49,53, B58,49,53
41	GAC	445,485	B*3701,B*5307,B*3702	B37,53
42	GAT	515,505	B*3801/05-07,B*3802	B38
43	ACA	360,540	B*3924,B*3535,B*3801-07,B*3901	B39,38,35
44	CCA	780,585	B*4001,B*1517,B*4701-03	B40,47,63
45	CCG	130	B*4002-06/08/09	B40
46	CTC	610	B*4101-05	B41
47	AGG	600	B*4201/02	B42
48	TCA	260	B*4401,B*5707,B*8301	B44,57,83
49	GAA	615	B*4101-05,B*4402,B*4501-04	B41,44,45
50	CCA	205	B*4601/02	B46
51	GCT	640	B*2704,B*4005,B*5001	B27,40,50
52	AGG	420	B*5401/02,B*5501,B*5601,B*8201	B54,55,56,82
53	AAC	455	B*1509,B*5101,B*5605/06,B*7801-04	B70,51,56,78
54	AGT	430	B*2702,B*4013,B*4406,B*5101,B*5201 B*5301,B*5701,B*5801	B27,40,44,51 B52,53,57,58
55	CTC	445	B*1501,B*4026,B*5201,B*7805	B62,40,52,78
56	AGA	550	B*0702,B*0806,B*2701	B7,8,27
57	AAC	375	B*0712,B*1502,B*3501,B*4406,B5104 B*5301,B*8301	B7,75,35,44,51 B53,83
58	GGA	405	B*5401/02	B54
59	AGA	635	B*0719,B*0801,B*5401,B*2715,B*3801 B*3901,B*4201,B*5501,B*5901,B*6701	B7,8,54,27,38 B39,42,55,59,67
60	AGG	555	B*0720,B*5508,B*5601,B*8202,B*8301	B7,55,56,82,83
61	CCA	625	B*6702	B67
62	GCG	385	B*5705,B*5801/02	B57,58
63	AGG	365,540	B*8201/02,B*6701	B82,67
64	AAC	375	B*0809,B*3537,B*3906,B*5101,B*5401 B*5501,B*5601,B*5901,B*7301,B*7801	B8,35,39,51,54, B55,56,59,73,78
65	AGG	495	B*8101	B81
66			Negative control of HLA-A, B, C	

1.4.2 方法 采用免疫磁珠法分离T淋巴细胞,参照一步法[3]对34例患者进行HLA-A、B单克隆抗体血清学分型。荧光倒

置显微镜下观察细胞(红色为死亡细胞、绿色为活细胞),并按美国国立卫生院的标准评分(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%)。同时采用PCR-SSP法对34例样本DNA进行HLA-A、B等位基因分型。操作步骤按试剂说明进行。

1.5 统计学处理

采用配对设计的 χ^2 检验。

2 结果

2.1 HLA-A、B等位基因PCR-SSP分型结果

34份临床样本DNA,共检出A位点等位基因总数58个,其中纯合子5例(占14.7%),杂合子29例;B位点等位基因总数61个,其中纯合子1例(占2.9%),杂合子33例。无假阳性和假阴性出现,HLA-A、B等位基因特异性扩增产物大小与序列特异性引物设计的碱基(bp)片段完全相同,每批扩增均设有内源性阳性对照(1 200 bp)引物,以确保实验的准确稳定。本方法可辨别的A抗原特异性23个,B抗原特异性38个。

2.2 HLA-A、B血清学分型结果

血清学共检出A位点抗原总数55个,其中纯合子11例(占32.4%),杂合子23例;B位点抗原总数58个,其中纯合子8例(占23.5%),杂合子25例,有1例无法判断。34份样本单克隆抗体法血清学显示,26份样本记分6~8分,细胞活性强,结果易判断;8份样本记分在4分以下,细胞活性弱,结果难以判断。

2.3 HLA-A、B血清学分型与PCR-SSP分型结果比较

34份样本中有15例血清学分型与PCR-SSP分型不符,不符合率为44.12%(15/34例)。两种方法进行HLA-A、B分型的结果如下:(1)两法同时检出HLA-A双抗原23例、单抗原5例;PCR-SSP法检出单抗原、单抗法检出双抗原0例;PCR-SSP法检出双抗原、单抗法检出单抗原6例。(2)同时检出HLA-B双抗原25例、单抗原1例;PCR-SSP法检出单抗原、单抗法检出双抗原0例;PCR-SSP法检出双抗原、单抗法检出单抗原7例。(3)2例血清学A、B位点分型结果与DNA分型结果不同,经重复性实验验证血清学分型错误。配对 χ^2 检验结果显示两种方法检出HLA-A和B抗原有显著性差别($XA^2=4.2, P<0.05; XB^2=5.1, P<0.01$)。

3 讨论

良好的供受体HLA配型可减少急性排斥的发生,并可降低移植受体对供体HLA抗原的致敏性,有利于移植肾的长期存活,并对再次移植受体更有益。目前,人类HLA-I类DNA分型技术取得显著进展,并已经应用于HLA数据库[4]。

本实验34份血样本的血清学和DNA分型结果显示:A位点不一致者8例,占23.5%,包括6例血清学空白位点(血清学仅分辨出1个A位点),经DNA分型证实存在另1个A位点。B位点不一致者9例,占26.5%,包括7例血清学空白位点(血清学仅分辨出1个B位点),经DNA分型证实存在另1个B位点。美国1993~1997年间国家骨髓捐赠计划注册登记的42 160份个体样本报告中[5],HLA-I血清学和DNA分型结果不一致达24%(其中8%仅为A,13%仅为B,3%为A和B)。Schaffer等[6]的HLA-I血清学和PCR-SSP分型研究结果发现,血清学A、B分型较DR分型更易出现错误,错误率在10%~25%。Zafar等[7]发现,HLA-A、B、DR血清学错误率分别为24%、16%和35%;谭建明等[8]的525份样本比较结果显示,A、B血清学误差率分别为9.0%和12.2%。

目前明确的A位点特异性高达61种之多,而HLA-B位点各等位基因间高变区核苷酸顺序差别往往只有1至几个碱基,分型比其它位点困难。作者分析认为,血清学发生错误的原因主要有以下几个方面:(1)繁多的交叉反应。如本次实验中有2例样本血清学检出A24,而PCR-SSP检出A23。还有2例血清学检出B51,而PCR-SSP检出B52。B15中的62和75更是难以区分(另文报道)。(2)受实验条件影响血清学反应偏弱或漏检,本实验室的经验已经报道[9]。(3)受检者自身因素。如疾病使HLA抗原表达减弱、药物等干扰;34份血清学记分4分以下的8份样本中,2例是白血病完全缓解慢性期患者,2例是肾功能不全长期透析患者,是很好的佐证。

34份临床样本的结果分析显示,PCR-SSP进行HLA-A、B等位基因分型,既能分辨出血清学所能分辨出的所有抗原位点,又能对血清学存在明显交叉反应的抗原位点或漏检的空白位点作出准确分型。统计学结果显示,两种方法对HLA-A、B位点分型存在显著性差异,PCR-SSP优于血清学方法。本方法根据设计引物的反应格局组合引物混合物,一步法、一次扩增,具有分辨率高、特异性强、重复性好以及简便、快速、省时(总耗时3 h)等优点。

(责任编辑:杨金星)

参考文献:

[1] 武大林,凌汉新,丁红,等. HLA-II血清学分型与微量SSP法基因分型比较分析[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 247-9.

Wu DL, Ling HX, Ding H, et al. Comparative analysis of serologic typing and HLA-II typing by micro-PCR-SSP[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(3): 247-9.

[2] Pera C, Delfino L, Morabito 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(3): 372-8.

[3] Lee JH, 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(1): 34-42.

[4] Sathiamurthy M, Hickman HD, Cavett JW, et al. Population of the HLA ligand database[J]. Tissue Antigens, 2003, 61(1): 12-9.

[5] Noreen HJ, Yu N, Setterholm M, et al. Validation of DNA-based HLA-A and HLA-B testing of volunteers for a bone marrow registry through parallel testing with serology[J]. Tissue Antigens, 2001, 57(3): 221-9.

[6] Schaffer M, Olerup O. HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing[J]. Tissue Antigens, 2001, 58(5): 299-307.

[7] Zafar MN, Ahmed N, Abbas Y, et al. HLA-matching by DNA methods: impact on a living-related renal transplantation program- mer[J]. Tissue Antigens, 2002, 60(6): 555-8.

[8] 谭建明, 唐孝达, 谢桐. 血清学与DNA方法用于人类白细胞抗原-I类分型的比较研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 80(30): 187-9.

Tan JM, Tang XD, Xie T. Comparative analysis of serologic typing and DNA test for HLA-I typing[J]. Chin J Med, 2000, 80(30):187-9.

[9] 张泓, 武大林, 吴涛. 湿度对人类白细胞抗原II单克隆抗体配型技术的影响[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 2001, 21(8): 636.

参考文献:

[1] 武大林, 凌汉新, 丁红, 等. HLA-II血清学分型与微量SSP法基因分型比较分析[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 247-9.

Wu DL, Ling HX, Ding H, et al. Comparative analysis of serologic typing and HLA-II typing by micro-PCR-SSP[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(3): 247-9.

[2] Pera C, Delfino L, Morabito 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(3): 372-8.

[3] Lee JH, 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(1): 34-42.

[4] Sathiamurthy M, Hickman HD, Cavett JW, et al. Population of the HLA ligand database[J]. Tissue Antigens, 2003, 61(1): 12-9.

[5] Noreen HJ, Yu N, Setterholm M, et al. Validation of DNA-based HLA-A and HLA-B testing of volunteers for a bone marrow registry through parallel testing with serology[J]. Tissue Antigens, 2001, 57(3): 221-9.

[6] Schaffer M, Olerup O. HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing[J]. Tissue Antigens, 2001, 58(5): 299-307.

[7] Zafar MN, Ahmed N, Abbas Y, et al. HLA-matching by DNA methods: impact on a living-related renal transplantation program- mer[J]. Tissue Antigens, 2002, 60(6): 555-8.

[8] 谭建明, 唐孝达, 谢桐. 血清学与DNA方法用于人类白细胞抗原-I类分型的比较研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 80(30): 187-9.

Tan JM, Tang XD, Xie T. Comparative analysis of serologic typing and DNA test for HLA-I typing[J]. Chin J Med, 2000, 80(30):187-9.

[9] 张泓, 武大林, 吴涛. 湿度对人类白细胞抗原II单克隆抗体配型技术的影响[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 2001, 21(8): 636.