



MN基因型定型在异基因脐血干细胞移植植活证据检测中的应用

异基因造血干细胞移植是治疗某些遗传性疾病、恶性血液病的有效手段。移植成功的重要指标之一是受者体内查到供者源性细胞。传统的血清学植活证据检测方法灵敏度低, 有较大的局限性[1][2]。近年普遍采用的串联可变序列、短重复片段、DNA指纹等方法, 样本量需要较大、成本高、时限长、操作复杂[3][4]。本研究根据供、受者的情况, 选用PCR序列特异性引物(PCR-SSP)对供、受者进行MN血型基因分型, 旨在探讨移植植活证据的监测方法。

1 对象和方法

1.1 受检对象

受者男, 5岁。外周血及骨髓象检查示急性淋巴细胞白血病, 术前骨髓涂片检查为ALL完全缓解象。血型: O, MM型, HLA-A(08, 33), HLA-B(40, 17), HLA-DR(03, 05)。

供者: 脐血, 血型: O, NN型, HLA-A(08, 33), HLA-B(40, 17), HLA-DR(03, 05)。复温洗涤, 清除二甲亚砜后, 快速输入患者体内。

受者获得有核细胞数(NC)为 $0.51 \times 10^8/\text{kg} \cdot \text{b. w.}$, $\text{CD}34^+$ 细胞数为 0.46×10^6 个/ $\text{kg} \cdot \text{b. w.}$, $\text{CD}45^+$ 细胞数为 0.58×10^8 个/ $\text{kg} \cdot \text{b. w.}$, CFU-GM 细胞数为 0.50×10^8 个/ $\text{kg} \cdot \text{b. w.}$ 。

1.2 方法

1.2.1 采血 分别采集受者移植前、移植后15 d、移植后300 d外周血和供者脐血各0.5 ml, EDTA抗凝。

1.2.2 DNA抽取 采用美国G&T公司DNA抽提试剂盒。盐析法取0.2 ml EDTA抗凝外周血加入1 ml红细胞裂解液中, 离心, 弃上清; 沉淀加入170 μl 核裂解液及4 μl SDS, 剧烈振荡, 再加入72 μl NaCl溶解液, 10 000 r/min离心; 取上清加入20 μl 异丙醇沉淀DNA, 将DNA溶于100 μl TE溶液中, 保存待用。

1.2.3 引物设计 MN基因序列特异性引物设计参照文献[5], 委托美国G&T公司合成。两对引物序列如下, M基因: 5' GCATCAAGTACCACTGGT3' 和5' GA GAAGTTGAGAAAGGGT3'; N基因: 5' GCATTAA GTACCACTGAG3' 和5' GAGAAGTTGAGAAAGGG GT3', 扩增产物片段长度均为781 bp。内对照采用人类生长素基因, 扩增产物片段为429 bp。

1.2.4 PCR扩增体系 反应体系10 μl , 每份标本取两管分别加入MIX-M和MIX-N混合液, 在混合液中加入1 μl DNA(含100 ng DNA), 1 μl Taq酶(0.5 U/ μl)。扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸90 s, 30个循环后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。

1.2.5 扩增产物鉴定 取扩增产物10 μl , 在2%的琼脂糖凝胶上点样, 同时采用PE公司100 bp DNA Ladder作为标记。150 V电泳30 min。在紫外灯下观察结果。

2 结果

所有受检样品都产生429 bp的内对照片段，M型个体与M基因引物反应产生781 bp的片段，与N基因引物反应无PCR扩增产物；N型个体与N基因引物反应产生781 bp的片段，与M基因引物反应无PCR扩增产物；MN型个体与M和N基因引物反应都将产生781 bp的片段。结果见图1。

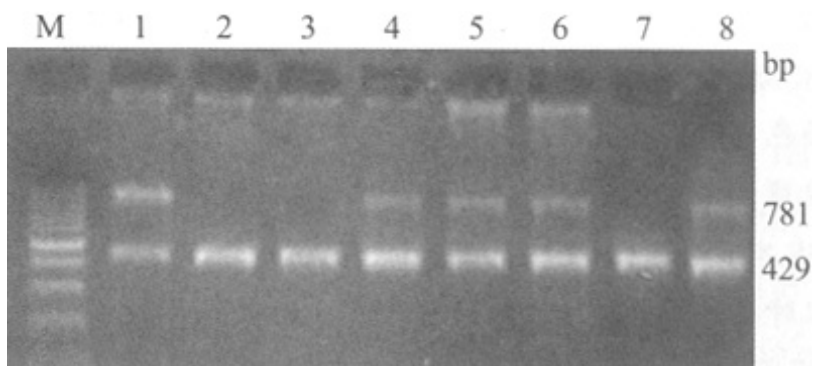


图1 脐血干细胞移植后MN基因型的转变

Fig.1 Alteration of MN genotype after umbilical stem cell transplantation

M: Marker; Lane 1, 2: Recipient before transplantation, MM; Lane 3, 4: Donor, NN; Lane 5, 6: Recipient at 15 d after transplantation, MN (mixed chimerism); Lane 7, 8: Recipient at 300 d after transplantation, NN (donor origin)

受者于术后5 d白细胞数降至 0.03×10^9 个/L；15 d血小板及白细胞计数开始上升，白细胞数达到 1.4×10^9 个/L，血小板数达到 28×10^9 个/L；300 d后，患者外周血象恢复正常，骨髓象未见异常，无移植抗宿主病表现。

3 讨论

异基因脐血移植成功的关键是受者的造血系统被供者所取代，即移植后受者的骨髓造血功能起源于供者的造血细胞[1]。移植后，血型的转变要经过一个由嵌合状态到完全转为供者血型的过程[6]。本例中，患者移植前为MM型，供者为NN型。患者在移植后15 d，MM血型变为MN型，处于一种供者与受者的造血细胞共存于受者体内的嵌合状态；移植后300 d，受者MN血型已完全转变为供者型。这种血型的逐渐转变过程，直接反映了移植的骨髓成活与否及造血功能的恢复状态，在临床上可根据其结果决定下一步的治疗方案。同时，也提示对于脐血移植术后血型转变的病人，要根据血型的变化来选择相应血型的血液制剂。

传统植活证据靠监测性别染色体、红细胞、白细胞表面抗原、同功酶等判断，这些标志物易受多种因素影响，如多次输血、性别、血型、HLA全相合等，有一定的局限性，而且检测方法灵敏度低，移植后早期白细胞数少[1][2]。

目前国内大多采用串联可变序列、短重复片段、DNA指纹图等方法分析移植状态[3][4][7][8]，其多态性高，特异性好，大多用于亲子鉴定、个体识别，同时也是一个较好的移植植活检测指标方法。但其需要标本量较大(大于0.5 ml)、费用高、时间长(DNA指纹图还需限制内切酶酶切等)，临床应用受到限制。MN血型是继ABO血型后被检出的第2个血型，在血清学、遗传学和生物学方面都表现出一定的复杂性。编码MN系统抗原的基因GPA位于第4号染色体4q28.2-31.1上。M、N抗原蛋白在氨基端1和5位的氨基酸不同，M抗原蛋白为Ser(TCA)和Gly(GGT)，N抗原蛋白为Leu(TTA)和Glu(GAG)。本研究正是基于这种差别设计出引物来区分M和N基因型。近期，随着对MN血型基因型结构的进一步研究，又发现了很多亚型，其应用有待于进一步探讨。

本例中，供、受者ABO血型相同，故选用MN血型的转变为植入证据的检测。MN血型的检测大多采用血清学方法检测红细胞表面抗原，但因移植后患者需大剂量输血，因此，在作为植活证据检测时，血清学检测不可

靠。本方法采用PCR-SSP法直接检测其基因型,只需0.2 ml 全血,一步PCR扩增便可直接测出MN血型的基因型,其结果准确可靠,且技术操作简单、省时,15 d即可检测,是早期证明植入的敏感方法。在实验中应注意严格控制反应条件,防止假阳性或假阴性的发生。

参考文献:

- [1] Rothberg PG, Gams AS, Baker D. Use of DNA polymorphism to monitor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation[J]. Clin Lab Med, 1997, 17(1): 109-18.
- [2] Lo YM, Patel P, Baigent CN, et al. Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using the polymerase chain reaction[J]. Hum Genet, 1993, 90(5): 483-8.
- [3] Gleissner B, Blau IW, Sindram A, et al. Analysis of chimerism during the early period after allogeneic peripheral stem cell transplantation[J]. Clin Lab Haematol, 2001, 23(6): 401-6.
- [4] 王建增, 王健民, 章卫平, 等. 可变数串联重复序列检测异基因外造血干细胞移植后植活证据的研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 11(11): 823-5.
- Wang JZ, Wang JM, Zhang WP, et al. Variable number of tandem repeats as an evidence of engraftment status after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation[J]. Chin Med J, 2000, 11(11): 823-5.
- Corfield VA, Moolman JC, Martell T, et al. Polymerase chain reaction-based detection of MN blood group-specific sequences in the human genome[J]. Transfusion, 1993, 33(2): 119-21.
- [6] Amitage JB. Bone marrow transplantation[J]. N Engl J Med, 1994, 330(3): 827-38.
- [7] Goltsov AA, Eisensmith RC, Konecki DS, et al. Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene[J]. Am J Hum Genet, 1992, 51(3): 627-36.
- [8] van-Deerlin VM, Leonard DG. Bone marrow engraftment analysis after allogeneic bone marrow transplantation[J]. Clin Lab Med, 2000, 20(1): 197-225.

参考文献:

- [1] Rothberg PG, Gams AS, Baker D. Use of DNA polymorphism to monitor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation[J]. Clin Lab Med, 1997, 17(1): 109-18.
- [2] Lo YM, Patel P, Baigent CN, et al. Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using the polymerase chain reaction[J]. Hum Genet, 1993, 90(5): 483-8.
- [3] Gleissner B, Blau IW, Sindram A, et al. Analysis of chimerism during the early period after allogeneic peripheral stem cell transplantation[J]. Clin Lab Haematol, 2001, 23(6): 401-6.
- [4] 王建增, 王健民, 章卫平, 等. 可变数串联重复序列检测异基因外造血干细胞移植后植活证据的研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 11(11): 823-5.
- Wang JZ, Wang JM, Zhang WP, et al. Variable number of tandem repeats as an evidence of engraftment status after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation[J]. Chin Med J, 2000, 11(11): 823-5.
- Corfield VA, Moolman JC, Martell T, et al. Polymerase chain reaction-based detection of MN blood group-specific sequences in the human genome[J]. Transfusion, 1993, 33(2): 119-21.
- [6] Amitage JB. Bone marrow transplantation[J]. N Engl J Med, 1994, 330(3): 827-38.
- [7] Goltsov AA, Eisensmith RC, Konecki DS, et al. Associations between mutations and

a VNTR in the human phenylalanine pheydroxylase gene[J]. Am J Hum Genet, 1992, 51(3): 627-36.

[8] van-Deerlin VM, Leonard DG. Bone marrow engraftment analysis after allogeneic bone marrow transplantation[J]. Clin Lab Med, 2000, 20(1): 197-225.

[回结果列表](#)