

PCR-SSP法 HLA-A、B 基因分型与血清学分型的比较

武大林¹, 凌汉新², 唐浩¹ (1 南方医科大学南方医院医学中心实验科, 广东 广州 510515; 2 广州市第十二人民医院肾内科, 广东 广州 510620)

摘要:目的 比较聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)进行 HLA-I 类 A、B 抗原位点分型的准确性,并探讨血清学分型错误发生的原因。方法 用 PCR-SSP 以及单克隆抗体血清学分型技术对 HLA-A、B 分型并比较。结果 34 例样本 PCR-SSP 基因分型无假阳性和假阴性出现。PCR-SSP 法与血清学比较,血清学检出错误或漏检率分别为 HLA-A 位点 23.5%, B 位点 26.5%。血清学发生错误或易混淆的抗原: A2 和 A68、A32 和 A33、B5、B60 和 61。结论 PCR-SSP 法进行 HLA-A、B 抗原等位基因分型具有分辨率高、特异性强、重复性好、实验过程简捷快速、分型结果较血清学更加准确可靠的优点。

关键词:HLA 抗原;聚合酶链反应;序列特异性引物;单克隆抗体;等位基因分型

中图分类号:R446.11 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)11-1267-04

Comparative studies of serological typing and HLA-A, B antigen genotyping with PCR using sequence-specific primers

WU Da-lin¹, LING Han-xin², TANG Hao¹

¹Central Laboratory, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Nephrology, Twelfth People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510620, China

Abstract: Objective To evaluate the accuracy of PCR with sequence-specific primers (PCR-SSP) for HLA-I genotyping and analyze the causes of the errors occurring in the genotyping. **Methods** DNA samples and were obtained from 34 clinical patients, and serological typing with monoclonal antibody (mAb) and HLA-A and, B antigen genotyping with PCR-SSP were performed. **Results** HLA-A and, B alleles were successfully typed in 34 clinical samples by mAb and PCR-SSP. No false positive or false negative results were found, and the erroneous and missed diagnosis rates were obviously higher in serological detection, being 23.5% for HLA-A and 26.5% for HLA-B. Error or confusion was more likely to occur in the antigens of A2 and A68, A32 and A33, B5, B60 and B61. **Conclusions** DNA typing for HLA-I class (A, B antigens) by PCR-SSP has high resolution, high specificity, and good reproducibility, which is more suitable for clinical application than serological typing. PCR-SSP may accurately detect the alleles that are easily missed or mistaken in serological typing.

Key words: HLA antigens; polymerase chain reaction; sequence-specific primers; monoclonal antibody; allele typing

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。

收稿日期:2003-05-26

基金项目:第一军医大学南方医院 1998 新技术攻关项目(98 字第 011 号)

This study was an item of 1998 year New Technology Research Program of Nanfang Hospital of First Military Medical University (No.11 of 1998 year)

作者简介:武大林(1954-),女,1986 年毕业于第三军医大学,主任检验技师,电话:020-85141042,E-mail: wksys@fimmu.com

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 μ 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 B*1301-04/06/07,B*1501,B*3510,B13,62,	B13,27,40
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*1513/16/17/23/24/36/43	B77
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 抗原具有显著性差别($\chi^2_{A2}=4.2, P<0.05; \chi^2_{B2}=5.1, P<0.01$)。

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。

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 programmer [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.

(责任编辑:杨金星)