

用聚合酶链反应-指纹图法 分析 HLA-DRB 基因型*

刘晓荣 王申五 李丹 于燕

(北京医科大学血液病研究所, 北京 100034)

摘要 将不同个体的 DNA 经聚合酶链反应 (PCR) 扩增其 HLA-DRB 基因的高度多态区域, 扩增产物经 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 照像后分析不同个体的指纹图型。PCR-指纹图法 (PCR-Fingerprinting) 为一种简便, 快速的基因分析方法, 可加速无关骨髓供者的筛选, 它在器官移植及法医的个体识别中有一定实用价值。

关键词: PCR-指纹图; DRB 基因配型

骨髓移植已成为治疗白血病的一项重要手段。其移植成功率与是否发生排斥反应和合并移植物抗宿主病 (GVHD) 有直接关系, 因此移植前的 HLA 配型尤为重要。随着分子生物学的研究进展, 国际上发展了 HLA 分型的基因配型方法: 如 DNA-RFLP^[1]、RCR-SSO^[2]、PCR-RFLP^[3] 等, 这些方法不受机体免疫状态的干扰, 较血清学配型各有其一定的优越性。我室已报道了 PCR-SSO^[4] 配型法, 最近, 我们又建立了一种新的简便、快速的 HLA-DRB 基因分析法, 即 PCR-Fingerprinting^[5]。现将有关方法及初步应用结果报告如下。

材料与 方法

一、基因组 DNA 的制备

DNA 提取参照 Fernandez-Vina 等人的方法^[6]略有改进。取 2% EDTA 抗凝血 5mL 加等体积 3% 葡聚糖 (20万) 静置 30min 至 1h, 取上清液加 40—50mL 细胞裂解液 (10m mol/L Tris, 400m mol/L NaCl, 2m mol/L EDTA-Na₂, pH8.2), 3000r/min 离心 10min, 弃上清, 每 0.5 mL 白细胞沉淀加 3mL 细胞裂解液, 400 μ L 10% SDS, 1.2mg 蛋白酶 k。上述混合液置 37 $^{\circ}$ C 过夜或 55 $^{\circ}$ C 3h, 而后每 4mL 标本加 1mL 饱和醋酸钠, 迅速振摇 15s, 离心 3000r/min, 15min, 上清经乙醇沉淀, DNA 析出干燥后, 适量三蒸水溶解至 0.2 μ g/ μ L, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

二、PCR-指纹图

50 μ L PCR 体系中含: 基因组 DNA 0.4 μ g, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, 500m mol/L dNTP,

* 此研究受卫生部青年科学基金资助

收稿日期: 1991-12-02, 修回日期: 1992-04-02

0.5m mol/L DRB-A 引物 (CCCACAGCACGTTTCTTG) 和 DRB-B 引物 (CCGCTGCACTGT-GAAGCTCT) (购自日本 KYUSHU 大学), 上液混合均匀后 100°C 变性 5min, 加 TagDNA 聚合酶 (Promega 公司) 2.5 μ L, 液体石蜡 50 μ L。将样本置 DNA 扩增仪 (北京新技术所生产) 中 72°C, 120s, 94°C, 30s, 54°C, 60s, 共循环 30 次, 最后一个循环在 70°C 池中增加延伸时间 5min。

三、交叉匹配 (Crossmatching)

将供者与受者的上述放大产物各取 10 μ L 混合, 94°C 变性 60s, 54°C 退火 90s, 72°C 延伸 120s, 循环 2 次。

四、聚丙烯酰胺凝胶电泳

取放大产物及交叉匹配样品各 10 μ L, 加 2 μ L 6 \times 上样缓冲液 (0.25% 溴酚兰, 0.25% 二甲基苯胺兰, 15% 葡聚糖), 经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 200V, 约 3h。电泳后, 用 0.5 μ g/ μ L 溴化乙锭 (EB) 将胶染色 30min, 照像分析图型。

结 果

一、DRB PCR-指纹图的个体差异性

用 DRB PCR-指纹图随机分析了 7 个个体的 DNA。各个体都具有特有的指纹图 (Fig. 1)。说明使用相同的 DRB 基因的引物, 经 PCR 后不同个体可以产生 DNA 片段序列不同的多态性。

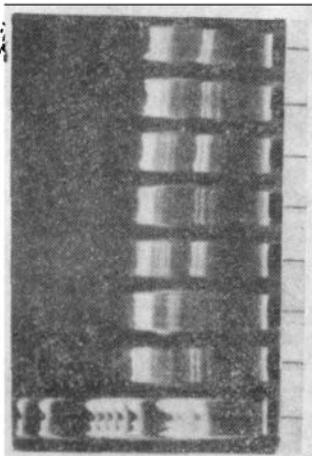


Fig.1 PCR-Fingerprints in 7 unrelated individuals

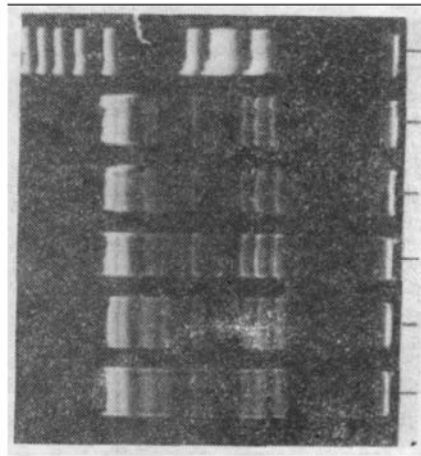


Fig.2 recipient 1-2 donors pair showing negative DNA crossmatch results

pBR322/Hae I digest
recipient 1
donor 1-1
donor 1-2
crossmatch with donor 1-1
crossmatch with donor 1-2

二、异基因骨髓移植供受者的 PCR-指纹图及 DNA 交叉匹配

我们选择了四组供、受骨髓者进行 PCR-指纹图及交叉匹配 (见 Fig. 2、3、4、5)。Fig. 2 示病例 1 与 2 个供者 DRB 放大产物完全一致, 交叉匹配后的带型也相同。该组供、受者经血清学 A、B、DR 及混合淋巴细胞 (MLC) 配型均相合, 用 PCR-SSO 法检测三者 DQA 基因型分别为 1、1, 1、1, 1、1。从 Fig. 3 中可见病例 2 与其供者的 PCR-指纹图不一致的带型,

再经交叉配合后可见与二者皆不一致的带型。该供、受者血清学配型除A位点不合外，B、C及DR位点基本相合，但二者MLC的RR值增高达50%，PCR-SSO检测DQA的基因型：受者为DQA 1、3，供者为DQA 1、4。Fig.4是病例3的供、受者的PCR-指纹图，其带型明显不一致，其血清学配型A、B、DR虽相合，但MLC不相合(GVH 50%)。PCR-SSO DQA基因型分别为1、3，1、1。Fig.5示病例4的PCR-指纹图，供受者带型一致，交叉配亦改变，其血清学、MLC及PCR-SSO均相合(详见Table1)。结果表明PCR-指纹图与DNA交叉配型能发现血清学未能检出的基因型变异。

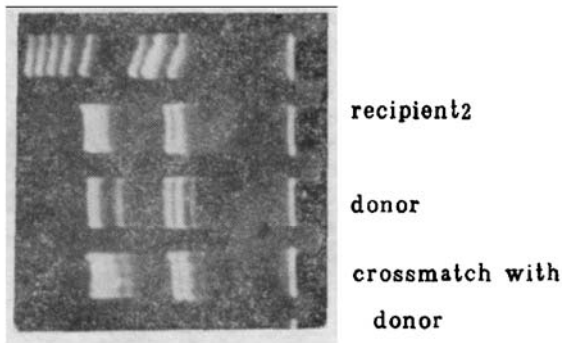


Fig.3 Recipient 2-donor pairs showing positive DNA crossmatch result

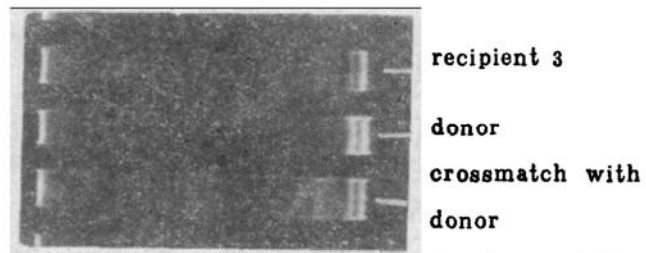


Fig.4 recipient 3-donor pairs showing positive DNA crossmatch

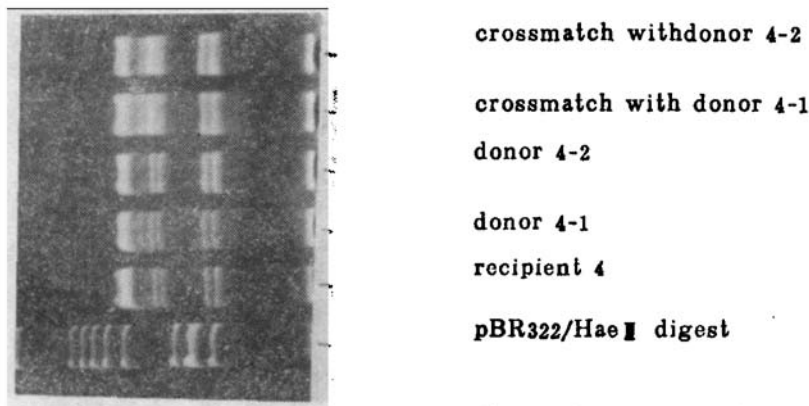


Fig.5 recipient 4-donor pairs with negative crossmatch

Table1 The Serologic, Cytologic and Gene Typing for Donors and Recipients

	PCR-Fingerprinting	Serology			MLC (GVH%)	PCR-SSO DQA
		A	B	DR		
Recipient 1		11,w19	7,17	2,7		1,1
Donor 1-1	M*	11,w19	7,17	2,7	-2.22	1,1
Donor 1-2	M	11,w19	7,17	2,7	1.94	1,1
Recipient 2		2,-	5,46	3,7		1,3
Donor 2	Mis*	2,9	5,46	3,7	50	1,3,4
Recipient 3		2,9	15,22	4,-		1,3
Donor 3	Mis	2,9	15,22	4,-	52.7	1,1
Recipient 4		2,33	40,12	w6,7,w53		1,1
Donor 4-1	M	2,33	40,12	w6,7,w53	-1.16	1,1
Donor 4-2	M	2,33	40,13	w6,7,w53	-6.42	1,1

M*, matched with recipient Mis*, mismatched with recipient

讨 论

HLA-D 基因簇有高度多态性, 其多态性主要位于 DRB, DQB, DQA, DPA 和 DPB 五个等位基因。我们采用 DRB 基因第二个外显子一段高度多态区域的两侧端作为引物进行基因扩增。实验结果表明: HLA-DRB 基因相合者的 DRB 基因产物在聚丙烯酰胺凝胶电泳中可产生一致的带型, 这种多条带型(PCR-Fingerprinting)的产生是由于各种 HLA 单倍体中 HLA-DRB 基因的不同亚型以及假基因拷贝上的多态性所致。当 PCR 最后两个匹配循环退火时, 这些基因的单链 DNA 产物复性, DRB 基因互补的个体形成同型双链, 而不同的 DRB 基因之间的不同序列形成异形双链。因此, 混合匹配可进一步证实 HLA-DRB 是否相合。

受检个体同时进行了血清学 A、B、DR 位点、MLC 以及 PCR-SSO DQA 的检测, 其结果与 PCR-指纹图一致。目前我们正进一步研究 PCR-SSO DRB 与 DRB PCR-指纹图的一致性。

PCR-指纹图是一种简单、快速的配型方法, DNA 分离后 6 h 即可出结果, 这对寻找无关供者所致的配型拖延时间而影响病人的治疗有重要意义, 且除 DNA 扩增仪外, 无需其它特殊设备, 同时又避免了使用放射性同位素、内切酶、寡核苷酸探针等昂贵试剂, 为无关个体的基因配型, 基因库的建立创造了基础。

参 考 文 献

- 1 Bidwell J L. *Transplantation*, 1988, 45:640-45
- 2 Clay T R. *Eur J Immunogenet*, 1991, 18:97-104
- 3 Uryu N. *Tissu Antigens*, 1990, 35:20-31
- 4 刘晓荣. 生物化学杂志, 1990, 6:538
- 5 Clay T M. *The Lancet*, 1991, 337:1049
- 6 Marcelo F V. *Hum Immun*, 1991, 30:60-8

HLA-DRB Gene Typing with PCR-Fingerprinting

Liu, Xiao-rong Wang, Shen-wu Li, Dan Yu, Yan

(Beijing Medical University, Institute of Hematology, Beijing 100034)

Abstract A simple and rapid method for HLA-DRB gene typing is discussed in this paper. After isolating DNAs from recipient and donors, the PCR with DRB primers were carried out. The partial products of patient and donors can be mixed for DNA crossmatching. The products were, then, analysed on 12% polyacrylamide gel electrophoresis. The fingerprinting of seven unrelated individuals were showed in different pattern. In four cases of patient-donor pairs, the two pairs gave matched pattern and the other pairs gave mismatched one. The results could be compared with HLA serologic typing, MLC and PCR-SSO DQA typing. This method would be useful to screen unrelated donor for BMT.

Key words, PCR-Fingerprinting; DRB gene typing