

HLA 新等位基因 B * 4086 的确认及家系调查

张毅 房云海 聂向民 刘艳 贺韦东 朱传福[△]

(山东省血液中心 HLA 研究室 济南 250014)

【摘要】 目的 识别和鉴定 HLA 新等位基因 B * 4086, 调查分析该基因的遗传情况。方法 应用聚合酶反应-序列特异性寡核苷酸探针(PCR-sequence specific oligonucleotide primer, PCR-SSOP)技术对中华骨髓库志愿捐献者血样进行 HLA 分型, 发现 1 例 HLA-B 疑似新等位基因, 用 DNA 测序技术鉴定新等位基因并对该基因的携带者进行家系调查。结果 经 DNA 测序确定为 HLA 新基因序列, 该基因与 HLA-B * 40060101 相比, 第 3 外显子 419 位碱基由 A→T, 导致相应的 140 位密码子编码的氨基酸由酪氨酸(Tyr)→苯丙氨酸(Phe)。家系分析表明该新基因来自携带者母亲一方。结论 DNA 测序表明被测样本含有 HLA-B 新等位基因, 于 2008 年 2 月被世界卫生组织 HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-B * 4086, 该新基因遗传于先证者母亲。

【关键词】 DNA 测序; 新等位基因; HLA-B * 4086; 家系调查

【中图分类号】 Q 523⁺.8 **【文献标志码】** A

Identification of a novel HLA allele, HLA-B * 4086, and investigation of its family pedigree

ZHANG Yi, FANG Yun-hai, NIE Xiang-min, LIU Yan, HE Wei-dong, ZHU Chuan-fu[△]

(HLA Lab, Blood Center of Shandong Province, Jinan 250014, Shandong Province, China)

【Abstract】 Objective To identify a novel HLA allele, HLA-B * 4086, in Chinese population and to investigate its pedigree. **Methods** An exceptional reaction pattern was detected in routine HLA typing of a CMDP (China Marrow Donor Programme) sample by PCR-sequence specific oligonucleotide primer (PCR-SSOP) assay. A new HLA-B allele was confirmed by sequence-based typing. Then family investigation was performed. **Results** DNA sequencing confirmed a new HLA allele. Compared with the closest matching allele HLA-B * 40060101, the novel allele has a difference at nt419 (A→T) in exon 3, which resulted in an amino acid change from Tyr to Phe at codon 140. Family investigation indicated the new allele derives from mother of the carrier. **Conclusions** One novel HLA allele was confirmed by sequencing based typing and it had been designated as HLA-B * 4086 by the WHO Nomenclature Committee. This novel allele was inherited from mother of the carrier.

【Key words】 DNA sequencing; new allele; HLA-B * 4086; pedigree investigation

HLA(human leukocyte antigen)是迄今为止人类最复杂遗传多态性系统,迄今已发现 3000 多个等位基因^[1,2],中国大陆地区实验室已报道发现 135 个人类 HLA 新基因^[3]。HLA 具有明显的种族特性,在不同种族或同一种族不同群体中基因频率各异,因此鉴定本地区 HLA 新等位基因并确定其血清型可以提高找到 HLA 相配合供者的机会^[4]。中华骨髓库山东省分库 HLA 组织配型实验室采用 PCR-SSOP(PCR-sequence specific oligonucleotide

primer)基因分型方法对 2007 年造血干细胞志愿捐献者血样进行 HLA 分型时,发现 1 例样本判读软件无法给出 HLA-B 一个等位基因的确切结果,经 DNA 序列分析并提交 Genbank,被确认为 HLA 新等位基因(序列号 EU434746)。2008 年 2 月该新等位基因被世界卫生组织(WHO)HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-B * 4086,并于 2008 年 7 月以简报形式报道于 *Tissue Antigens*^[5]。为了追溯新基因的来源,我们进一步对该先证者家系进行了

[△]Corresponding author E-mail:zhuchuanfu2008@tom.com

调查,现报告如下。

资料和方法

样本来源 先证者 1 例,造血干细胞志愿捐献者,山东籍男性,汉族,2007 年 5 月采集血样。家系分析对象为其一级亲属,包括其父亲,儿子,及同父母的 1 个胞兄和 2 个胞姐,2008 年 6 月采集血样。

材料和仪器 TIANamp Blood 血液基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化, Lot7116),Atria 公司的 2,3,4 外显子正反向测序引物, BigDye Sequencing kit (ABI 公司) 试剂盒, ABI PEISM3730 测序仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA USA)。

HLA 分型 HLA-A, B, DRB1 常规分型采用聚合酶反应-序列特异性寡核苷酸探针 (PCR-sequence specific oligonucleotide primer, PCR-SSOP) 方法 (One Lambda, CA USA), 严格按照试剂说明书进行操作, 采用自动分析软件判读结果。以聚合酶链反应-序列特异性引物 (PCR-sequence specific primer, PCR-SSP) 方法 (BAG, Lich Germany) 进行复试。

DNA 序列分析 首先用 Protrans S4 HLA-B 试剂盒对样本的 DNA 进行组特异性扩增, 然后以阳性组 PCR 产物为模板, 用 2,3,4 外显子正反向测序引物和 BigDye Sequencing kit 试剂盒进行测序反应。产物用乙醇-醋酸钠沉淀法纯化, 经热变性后在 ABI PEISM3730 测序仪上进行序列分析, 采用 Sequence Pilot 自动分析软件判读结果。将测序结果注册到 Genbank, 获得序列号后提交到世界卫生组织 (WHO) HLA 因子命名委员会。

家系调查 该家系有 3 代, 包括先证者及其父亲、同父母的 1 个胞兄、2 个胞姐及先证者的儿子共 6 人, 采集家系 3 代所有人的末梢血样本, 应用 PCR-SSOP 进行 HLA 低分辨分型。

结 果

HLA 低分辨分型 先证者样本 PCR-SSOP 分型, HLA-A 和 HLA-DRB1 位点可明确指定为 HLA-A * 02, 02 和 HLA-DRB1 * 12, 12; B 位点反应格局异常: 在假定 60 号探针阳性的情况下可判读为 HLA-B * 15, 40。重复 2 次实验, 60 号探针仍均为阴性, 故不能指定任何 B 位点等位基因, 但提示可能由 HLA-B * 15 和另一个与 B * 40 有关等位基因组成。进一步用 PCR-SSP 分型技术对 B 位点进行分型, 无法准确判读。

DNA 序列分析 结果表明 B * 15 组的等位基因为 B * 150101, B * 40 组的等位基因与现有等位基因序列均不相同, 表明该等位基因为新的 HLA-B 等位基因。经过在 Genbank 对比分析, 它与同源性最高的等位基因 B * 40060101 相比, 存在一个碱基的改变, 在第 3 外显子区域中的第 419 位碱基由 A→T, 结果导致相应 140 位密码子编码的酪氨酸 (Tyr) 变为苯丙氨酸 (Phe) (图 1)。新基因序列已递交 Genbank (序列号 EU434746), 该新等位基因已由 WHO 的 HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-B * 4086。

家系调查 先证者的胞兄和一位胞姐、先证者的儿子均携带新等位基因, 先证者的父亲和其另一个胞姐则不携带新基因, 先证者母亲已去世 (图 2)。该家庭成员的 A、B、DRB1 位点分型结果见表 1。

讨 论

HLA 是迄今已知人类最富多态性的遗传系统^[1], 至 2009 年 1 月已报道有 3 477 个等位基因, 并且仍在不断发现新的基因^[6-8]。基因分型技术的广泛应用和测序技术的快速发展, 特别是中华骨髓库的建立, 为研究我国各民族或某一地区的优势基因或消失基因提供了条件^[3]。新 HLA 基因的发现和研究, 可以丰富 HLA 基因数据库, 揭示一个地区 HLA 分布特性, 为器官移植和造血干细胞移植患者寻找 HLA 相匹配的供者, 提高移植成功率; 而且还可以为研究 HLA 与疾病相关性、亲子鉴定、个体识别以及群体遗传学等提供必需的基本数据^[9]。

HLA-B 基因属于 HLA-I 类基因, 其多态性主要表现在第 2, 3 外显子, 部分多态性位点在第 1, 4, 5 外显子^[7]。目前商品化的 PCR-SSOP 分型试剂主要利用第 2, 3 外显子已知碱基序列设计引物进行区分, 所以本例样本在常规分型中显示异常反应格局, 无法准确指定等位基因型别。HLA-B * 40 基因频率在中国汉族人群中分布较高, 在至今已检出的 B * 40 等位基因的 103 个亚型中^[1], 中国汉族人群中最常见的为 HLA-B * 4001, B * 4002, B * 4003 和 B * 4006^[10]。HLA-B40 抗原原有 2 个分解产物: B60 和 B61。B60 抗原频率, 欧洲白人为 0.034, 北美白人 0.057, 黑人为 0.014, 日本人 0.066, 中国汉族 0.129 4; B61 抗原欧洲白人为 0.017, 北美白人 0.01, 黑人 0.004, 日本人 0.088, 中国汉族 0.0408^[11]。由此可见, B40 在各种族、各民族甚至同一民族的不同人群中分布亦不均衡。本例先证者为北方汉族, 本实验室在 2008 年常

规 PCR-SSOP HLA 分型的 6 500 例样本中,未发现 在中国北方人群中属低频基因。
与 B* 4086 反应格局一致的样本,据此推测 B* 4086

```

Nuc. Pos.      345                360                375                390
B*40060101    GG TCT CAC ACT TGG CAG ACG ATG TAT GGC TGC GAC GTG GGG CCG GAC GGG
B*4086        -----

Nuc. Pos.                405                419                435
B*40060101    CGC CTC CTC CGC GGG CAT AAC CAG TAC GCC TAC GAC GGC AAG GAT TAC ATC
B*4086        ----- -T- -----

Nuc. Pos.                450                465                480                495
B*40060101    GCC CTG AAC GAG GAC CTG CGC TCC TGG ACC GCC GCG GAC ACG GCG GCT CAG
B*4086        -----

Nuc. Pos.                510                525                540
B*40060101    ATC ACC CAG CGC AAG TGG GAG GCG GCC CGT GTG GCG GAG CAG CTG AGA GCC
B*4086        -----

Nuc. Pos.                555                570                585
B*40060101    TAC CTG GAG GGC GAG TGC GTG GAG TGG CTC CGC AGA TAC CTG GAG AAC GGG
B*4086        -----

Nuc. Pos.      600                615
B* 40060101    AAG GAG ACG CTG CAG CGC GCG G
B*4086        -----
    
```

图 1 HLA-B* 4086 与 HLA-B* 40060101 第 3 外显子核苷酸序列的比较

Fig 1 The nucleotide sequence of exon3 of HLA-B* 4086 compared with that of HLA-B* 40060101

Dashes indicate identity with B* 40060101

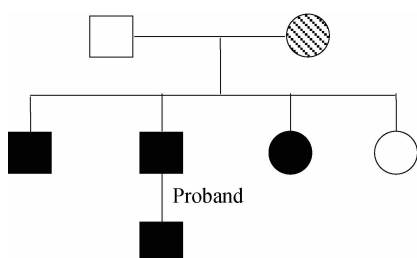


图 2 家系调查结果

Fig 2 Results of family pedigree investigation

Black indicates carriers of HLA-B* 4086

表 1 先证者家庭成员 A、B、DRB1 位点分型结果

Tab 1 Locus typing results of HLA-A, B and DRB1 in the family

Family member	Locus typing		
	A	B	DRB1
Proband	A* 02, A* 02	B* 15, B* 4086	DRB1* 12, DRB1* 12
Father	A* 02, A* 31	B* 15, B* 15	DRB1* 08, DRB1* 12
Brother	A* 02, A* 02	B* 15, B* 4086	DRB1* 12, DRB1* 12
Sister 1	A* 02, A* 02	B* 15, B* 4086	DRB1* 12, DRB1* 12
Sister 2	A* 31, A* 33	B* 15, B* 44	DRB1* 07, DRB1* 08
Son	A* 02, A* 11	B* 54, B* 4086	DRB1* 09, DRB1* 12

该基因的 DNA 序列已递交到 Genbank 并获得序列号 EU434746, 然后再将该基因 DNA 序列和 Genbank 序列号提交到 WHO 的 HLA 因子命名委

员会, 2008 年 2 月 WHO HLA 因子命名委员会将其正式命名为 HLA-B* 4086。为了追溯新基因的来源, 我们进一步以先证者为线索, 追踪其家族成员中的 B* 4086 的携带情况, 以确定新基因的来源。家系分析表明, 先证者、其胞兄、胞姐及儿子携带新等位基因, 但先证者的父亲和其另一位胞姐不携带新等位基因, 由此推测 HLA 新等位基因 B* 4086 遗传于先证者的母亲而不是先证者自身的突变产生。该等位基因的血清学特异性还有待于进一步确定。

致谢 新基因的测序工作在北京血液中心 HLA 研究室完成, 特此感谢!

参 考 文 献

[1] Robinson J, Waller MJ, Parham P, et al. IMGT/HLA Sequence Database—a sequence database for the human major histocompatibility complex[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29 (1):210-213.

[2] Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system. 2004[J]. *Tissue Antigens*, 2005, 65:301-369.

(下转第 714 页)