

# 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<sup>Δ</sup>

(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<sup>+</sup>.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<sup>Δ</sup>

(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<sup>[1,2]</sup>,中国大陆地区实验室已报道发现 135 个人类 HLA 新基因<sup>[3]</sup>。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<sup>[4]</sup>。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*<sup>[5]</sup>。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

<sup>Δ</sup>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<sup>[1]</sup>, 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<sup>[6-8]</sup>。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<sup>[3]</sup>。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<sup>[9]</sup>。

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<sup>[7]</sup>。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<sup>[1]</sup>, 中国汉族人群中最常见的为 HLA-B \* 4001, B \* 4002, B \* 4003 和 B \* 4006<sup>[10]</sup>。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<sup>[11]</sup>。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

