

多重等位基因特异性 PCR-HLA- II DNA 分型

肖露露¹, 陈洪涛¹, 王长希², 郑克立², 谭茵¹

(1. 广州器官移植配型中心, 广东 广州 510095; 2. 中山医科大学附属第一医院, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】对人类组织相容性抗原(Human Leucocyte Antigen System) II类进行高分辨基因分析。【方法】用多重 PCR 和等位基因特异性 PCR 技术相结合^[1,2], 建立多重等位基因特异性 PCR 方法。【结果】24 对引物成功地分辨 43 份 DNA 的 HLA-DRB1、B3、B4、B5 *51 个等位基因和 DQB1 *15 个等位基因的 4 位数特异性, 识别基因片段长度为 281 bp。【结论】多重等位基因特异性 PCR 技术敏感、微量、节省和分辨能力高, 是进行复杂的 HLA 多态性研究中有价值的佐证试验。

关键词: HLA-A2 抗原; 核苷酸重复多态性; 聚合酶链反应

中图分类号: Q 503 R 392.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)03-0179-03

HLA- II DNA Typing by Multiplex Alle-specific Amplification

XIAO Lu-lu¹, CHEN Hong-tao¹, WANG Chang-xi², ZHENG Ke-li², TAN Yin¹

(1. Guangzhou Tissue Typing Centre Tissue Typing LAB, Guangzhou 510095, China; 2. First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To analyse type II HLA (Human Leucocyte Antigen) system genes in higher separative grades.【Method】By leaded multiplex PCR technique into allele specific PCR, the multiplex allele specific PCR (MAS-PCR) method is established.【Results】43 DNA samples were typing on HLA-DRB1, B3, B4, B5 and DQB1 seats by 24 primers, the identified gene fragment length is 281 bp.【Conclusions】MAS-PCR is sensitive, micro-quantitative and save time. MAS-PCR will be helpful on the DNA study of HLA system which has a large number of allele.

Key words: HLA-A2 antigen; nucleotids repeat polymorphism; polymerase chain reaction

PCR-HLA 分型技术已引人注目地冲击了广泛的临床医学领域, 由于各实验室技术设备和方法不同, 致使室间差异较大, 据统计, 国内室间差异在 5%~25%。例如, 1999 年中山三院成功地进行了广东首例非亲缘 BMT 术后 GVHD 仅为 I 的病例, 患者在术后 3 个月时已完全表达供者的遗传标志, 但是, 术前广州某实验室和本实验室对患者做的 HLA 分型结果之间有 50% 不一致。HLA 分型结果的差异不仅使各实验室的数据资料失去共享意义, 也直接影响临床医疗工作。为此, 我们参照文献建立多重等位基因特异性 PCR (Multiplex Alle-Specific Amplification, MAS-PCR) 用以佐证常规血清学和 PCR, 有效提高 HLA 分型准确率。

1 材料和方法

1.1 标本来源

采集需要器官移植的患者、拟捐献器官者血 0.5 mL/例, 脾脏组织 50 g/例, 共 43 例, 置 -20 °C 保存备用。

1.2 试剂来源

包含 51 个基因特异性的 24 对引物为美国加州大学(UCLA)组织分型实验室主任 Paol. Terasaki 教授赠送, 特异性为 DRB1 *0101, 0102, 0103, 0301, 0302, 401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0409, 0410, 0411, 0701, 0801, 0802, 0803, 0804, 0805, 0901, 1001, 1101, 1102, 1103, 1104, 1201, 1202, 1301,

收稿日期: 1999-09-28

基金项目: 广东省自然科学基金资助课题(960131)

作者简介: 肖露露(1954年), 女, 江西万年人, 主任医师, 1976 年中山医科大学毕业。

1302, 1303, 1304, 1305, 1401, 1402, 1403, 1405, 1406, 1501, 1502, 1503, 1601, 1602 DRB3* 0101, 0201, 0202, 0301; DRB4* 0101; DRB5* 0101, 0102, 02; DQB1* 0201, 0301, 0302, 0303, 0401, 0501, 0502, 0601, 0602, 0603, 0604, 0605 (*为经 WHO 命名委员会通过的 HLA 基因的特异性)。Marker 和 Gold Taq 酶分别为 Pharmacia 和 PE 公司产品。

1.3 制备 DNA 模板

改良的酚氯仿法提取模板 DNA^[3]。

1.4 MAS-PCR-HLA 分型

1.4.1 DNA 模板预处理 模板 100 ng, dNTP 200 mol, 引物 2 pmol, 反应体积 10 μ L, 镁离子 10 mol/L。置 PE-9600 扩增仪经 95 $^{\circ}$ C 5 min, 0 $^{\circ}$ C 5 min, 加入 Gold Taq 酶 0.5 U。

1.4.2 DNA 扩增程序 95 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 30 min, 73 $^{\circ}$ C 30 min, 共 32 个循环。

1.4.3 电泳 0.5 U TBE 琼脂糖制胶。加入 marker-phi-xheal 174(DNA 片段长度 bp 的标准品) 0.5 μ L 于第 1 泳道。150 V 电泳 40 min。紫外光下拍照分析结果。

2 结果

2.1 DNA 质量

经 Pharmacia 核酸定量仪检测, 43 份标本的 DNA 为 160~219 mg(平均 199 mg), 纯度 A260/A280 = 1.55~2.40(平均 1.98)。

2.2 DNA 扩增效果

从图 1、2 可见所有扩增条带均清晰, 其中 marker 由上至下片段长度依次为 1 353, 1 078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp。

图 1 第 7、10、12 和 13 泳道分别在 234、118、271 bp 位置各显现 1 条扩增带; 第 8 泳道在 271、194 bp, 第 11 泳道在 271、118 bp 位置均显现两条扩增带。

图 2 第 2、3、4、12 泳道上分别在 281、234、271、72 bp 位置各显现 1 条扩增带, 第 8、9、10、13 泳道分别在 234、127 bp, 281、194 bp, 271、118 bp, 194、118 bp 位置均显现 2 条扩增带。

2.3 分辨水平

43 例 HLA-II 分型中, 血清学、PCR-SSP 和 MAS-PCR 结果一致 34 例, 一致率 79%; 室间(3/9)或血清学与 PCR-SSP 结果(6/9)不一致共 9 例, 不一致率 21%, 均经 MAS-PCR 确定 HLA 特异性, 其中 2 例还

得到直接碱基测序技术(direct sequency by PE-ABI377 DNA sequencer)确证支持, 见表 1。

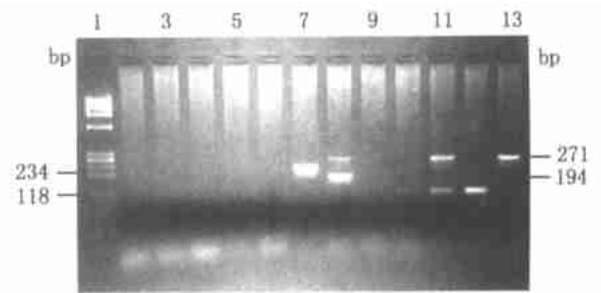


图 1 MAS-PCR-HLA-DRB 分型电泳

Fig. 1 The lectropheris of MAS-PCR-HLA-DRB Typing

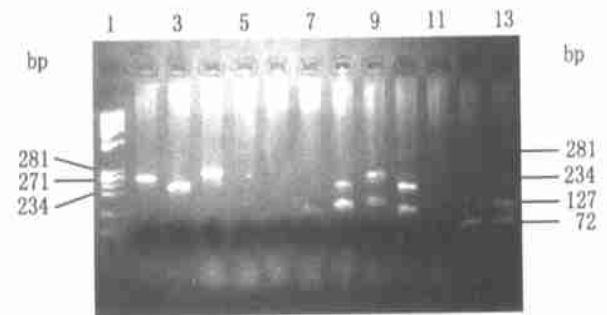


图 2 MAS-PCR-HLA-DR, DQ 分型电泳

Fig. 2 The lectropheris of MAS-PCR-HLA-DRB, DQB Typing

3 讨论

HLA 区高度复杂的多态性取决与其核苷酸序列的特异性及碱基长度, 其中 DR 座位片段 266 bp, DQ 座位片段 281 bp。80 年代末 PCR 渗透到 HLA-DNA 分析中, 使传统血清学方法中难度较大的问题, 既必须获得活性好、纯度高和大量的 B 淋巴细胞才能进行的 HLA-II 分型变得十分容易。通常的 PCR-HLA 分型, 是在 1 个反应系统含 1 对引物, 需要多于 51 个反应管和相应引物对才能达到表 1 所示的高分辨水平。此外, 受 DNA 扩增仪内置 96 孔扩增管的条件限制, 每次只能承担 1 份 DNA 的扩增工作。MAS-PCR 原理是在同一个反应系统中包含了 2 对以上引物扩增系统。即竞争 PCR 系统, 也就是将需要多个 PCR 反应的引物置于一个系统中完成。Gilbert-ST 等将 MAS-PCR 技术应用于对病毒及其变异体的识别^[1], 黄晓明等将此技术应用于人类疾病遗传的连锁分析中^[2]。我们将 MAS-PCR 引进 HLA-II-DNA 分型, 在 1 个反应系统含 2 对以上引物, 可

表1 几种 HLA 分型技术 HLA-DRB1^{*} 分型的比较
Table 1 The comparison with several HLA-DRB1^{*} typing techniques

Ssample No.	Serology lab 1/ lab 2	PCR-SSP	MAS-PCR	Direct Sequency
950705	12, Blank/ 12, 14	12, Blank	1202, Blank	1202, 1202
96010501	14, 16/ 3, 15	14, 16	1405, 1601	
96010502	14, 16/ 3, 15	14, 16	1405, 1601	
970627	4, Blank	04, 08	0401, 0801	
970414	12, Blank	12, 13	1202, Blank	1202, 1202
970433	9, 14	09, 15	0901, 1503	
970908	4, 16	04, 15	0405, 1501	
970851	14, Blank	12, 14	1202, 1404	
9714301	8, Blank	08, 12	0802, 1202	

同时扩增 4 份 DNA (每份 DNA 24 只反应管), 分型实验不仅简洁了许多, 并且避免了众多数量耗材、繁琐加样步骤和昂贵经费的重负。

MAS-PCR 在 1 个反应体系中所包含的各引物扩增时会发生相互制约, 弱势扩增往往会被强势扩增所掩盖, 造成某些 HLA 基因的分解产物 (allele) 不表达。为弥补缺陷, 我们以一种新型聚合酶—Gold Taq 酶替换常规的 Taq 酶, 从图 1~2 中可见单一或多条扩增条带均清晰, 显示出 Gold Taq 酶是一种超长的、精确的 DNA 聚合酶, 能够恢复活性, 用于热启动, 能有效地提高 PCR 反应的特异性、灵敏度和各产物的均一性, 发挥出 MAS-PCR 功能优势。表 1 中例 1 和例 5 用直接碱基测序技术检测支持 MAS-PCR 的结果, 也提示 MAS-PCR 可作为 HLA 分型的新技术。

从表 1 可见, 依靠 MAS-PCR 确认 DNA-HLA 分型的 9 例中, 例 1~3 是 2 间实验室的血清学结果不一致, 经过 MAS-PCR 和 PCR-SSP 方法确认正确结果, 占 33% (3/9); 例 4~9 为血清学和 PCR-SSP 结果不一致, 经过 MAS-PCR 确认正确结果, 占 67%

(6/9)。说明对 HLA-II 的识别, 传统血清学有抗原交叉反应组的影响 (如表 1 例 2), 虽然分子生物学技术具有优势, 但是普通 PCR 技术受到患者近期输血、既往移植等因素干扰 (如表 1 例 5), 因此有必要在组织分型实验室建立 MAS-PCR 技术, 作为一种新的、重复性好的 HLA 分型的佐证方法。表 1 中 2 例依靠直接碱基测序得到与 MAS-PCR 一致结果还提示 MAS-PCR 可发挥质量控制作用。

参考文献:

- [1] Gilbert S T, Larochelle R, Magar R, *et al.* Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR assay[J]. J Clin Microbiology, 1997, 5(1): 264.
- [2] 黄晓明, 胡向阳, 宗 卉, 等. 二核苷酸重复多态性的非同位素检测及其在基因诊断中的应用[J]. 遗传学报, 1995, 22(2): 81.
- [3] 陈洪涛, 肖露露, 于立新, 等. 快速 PCR-SSP-HLA-DR 分型于血清学比较[J]. 中华泌尿外科杂志, 1997, 19(1): 40.

(编辑 黄小延)