

# 序列特异性引物-聚合酶链反应法用于广东汉族 人群 HLA *DQA1* 等位基因分析<sup>①</sup>

吴耀生<sup>②</sup> 罗超权 杨英浩 伍新尧

(中山医科大学生化教研室; 广州, 510089)

**摘要** 目的: 研究广东汉族人群中人类白细胞抗原(HLA) *DQA1* 等位基因频率分布, 为 HLA *DQA1* 相关疾病的研究及人类学的研究提供基础资料。方法: 用序列特异性引物-聚合酶链反应(SSP-PCR)法对广东汉族人群作 HLA *DQA1* 等位基因分型, 根据出现扩增产物所用的序列特异性引物, 直接分析判断受检查者的基因型别。结果: 146 例广东汉族健康无血缘关系个体中共检出 10 个等位基因, 以 *DQA1*\*0301 的频率(0.291)最高, 基因型的观察值与期望值相比, 符合 Hardy-Weinberg 平衡, 纯合基因型的观察值与期望值相比,  $P > 0.95$ 。家系调查及重复性试验显示结果可靠。结论: 广东汉族 HLA *DQA1* 基因与其他 10 组华人群体的资料比较, 总体检验有显著差异, 但均以 *DQA1*\*0301 的频率最高, 显示华人的遗传系统既有共性亦有各自的特点, 南方汉族人群体间或与南方一些少数民族比较均有显著差异, 显示南方华人群体遗传背景的复杂性。

**主题词** HLA-DQA 抗原/遗传学; 等位基因; 聚合酶链反应/方法

中图分类号 R 394.3

## HLA-DQA1 ALLELE ANALYSIS IN GUANGDONG HANS WITH SSP-PCR

Wu Yaosheng Luo Chaoquan Yang Yinghao Wu Xinyao

(Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510089)

**Abstract Objective:** Study the frequency distribution of HLA *DQA1* allele in Guangdong Hans to provide a basic data for further anthropologic study and the HLA *DQA1* associated disease. **Methods:** HLA *DQA1* alleles were typed by sequence specific primer PCR. The HLA *DQA1* allele can be directly recognized according to the primer pairs used in producing the PCR products. **Results:** 10 *DQA1* alleles were detected among 146 unrelated individuals of Guangdong Hans. The highest frequency among the alleles is *DQA1*\*0301 (0.291). The comparison of the observed and expected genotype data by  $\chi^2$  test was in accord with the Hardy-Weinberg equilibrium. The genotypes investigated in 10 nuclear families with SSP-PCR accorded with dominant Mendelian inheritance. It suggested that the results were reliable. **Conclusions:** The frequencies of HLA *DQA1* alleles between GD Han population and other 10 groups of Han population showed significant difference using the  $\chi^2$  test ( $P < 0.0001$ ), although the highest frequency is *DQA1*\*0301 in all Han population tested. These results suggested that there are common characterization and individual difference in the hereditary systems of Han population, and the complexity of genetic heredity in Han populations of south China. Our results provided some significant information for the anthropologic research on the ethnics and the with HLA *DQA1* associated diseases.

**Subject headings** HLA-DQA antigens/genetics; alleles; polymerase chain reaction/methods

人类白细胞抗原(HLA)的高度多态性在机体的免疫识别及免疫反应中均有重要作用。HLA 与器官、骨髓移植, 与多种自身免疫性疾病的关联, 与某些肿瘤发生的遗传素质的关系, 使其从 80 年代

以来一直是医学研究的一大热点。HLA II 类抗原中的 DQ 由于其组成中的  $\alpha$  及  $\beta$  链具有高度多态性而倍受关注。研究 *DQA* 的等位基因, 在人类学, 法医学, 某些疾病机理探讨, 器官、骨髓移植配

<sup>①</sup> 美国中华医学基金(CMB)资助课题; <sup>②</sup> 广西医科大学生化教研室(南宁, 530021)。

型中的应用均有着重要的理论及实践意义。国内关于 *DQA* 分型的资料还远不够完善, 技术方法有待改进, 基础资料极需充实。本文报告 SSP-PCR 技术用于广东健康汉族人群 HLA *DQA* 1 等位基因的频率分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 DNA 标本 从本校附一院献血员(广东汉族健康无血缘关系的个体)输血管中的血凝块, 用常规酚-氯仿法抽提。

1.1.2 引物 根据 Olerup 方案<sup>[1]</sup>合成 16 条核苷酸链, 组成 12 对引物, 配对方式, 扩增产物长度, 及其特异性扩增的等位基因见表 1。

### 1.2 方法

在 SSP-PCR 反应体系中, 每一 DNA 标本均作 12 支反应管, 每管反应液 10  $\mu$ L, 含 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L Tris-Cl, pH 8.3, dNTP 各 200  $\mu$ mol/L, 等位基因专一性引物各 0.25  $\mu$ mol/L, 内对照引物各 0.125  $\mu$ mol/L, DNA 约 50~100 ng, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U。PCR 循环参数为 94  $^{\circ}$ C 20 s, 65  $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环, 65  $^{\circ}$ C 延伸 6 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色。根据能出现扩增产物反应管所用引物对的特异性, 参照表 1, 直接判断结果。

### 1.3 数据处理

等位基因频率及基因型频率直接计数计算, 观察值与期望值的比较按[2]的程序进行 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验, 群体间的等位基因比较按上海出版社出版的《医用统计软件集》中  $R \times C$  卡方表统计软件处理。

## 2 结果

### 2.1 方法的可靠性

以 SSP-PCR 检测 12 个无争议家庭成员 HLA *DQA* 1 等位基因, 均显示符合孟德尔遗传规律, 同一标本在不同时间扩增结果一致。

### 2.2 等位基因频率

从 146 份无血缘关系的广东汉族健康人群 DNA 标本中检出 10 种 HLA *DQA* 1 等位基因, 以 *DQA* 1 \*0301 的频率 (0.291) 为最高, 其次为 *DQA* 1 \*0102 (0.188), 频率最低为 *DQA* 1 \*0601 (0.010)。各等位基因频率见表 2。

### 2.3 基因型频率

在可能的 HLA *DQA* 1 基因型中, 本组所检测的广东汉族人群, 共检出 37 种, 基因型电泳图谱见图 1。其中以 *DQA* 1 \*0301/\*0302 的频率最高, 占 13.0%, 其次为 *DQA* 1 \*0102/\*0301 及 *DQA* 1 \*0102/\*0501, 均为 8.2%。基因型的观察值与期望值的比较, 符合 Hardy-Weinberg 平衡, 纯合子的观察值与期望值的比较,  $P > 0.95$ , *DQA* 1 等位基因的杂合度为 0.8315, 父权排除率为 0.5113。

表 1 PCR 引物对及其特异扩增产物

Table 1 PCR primer pairs and the specificities of amplified products

No.	Primer pairs	Size of PCR products(bp)	Amplified specific allele
1	A-5' 01/A-3' 01	149	DQA1 *0101, *0104
2	A-5' 02/A-3' 01	172	DQA1 *0101, *0102, *0104
3	A-5' 03/A-3' 01	149	DQA1 *0102, *0103
4	A-5' 04/A-3' 01	172	DQA1 *0103
5	A-5' 04/A-3' 02	170	DQA1 *0201
6	A-5' 05/A-3' 03	183	DQA1 *0301
7	A-5' 06/A-3' 03	183	DQA1 *0302
8	A-5' 07/A-3' 04	190	DQA1 *0401
9	A-5' 02/A-3' 05	186	DQA1 *0501
10	A-5' 04/A-3' 06	117	DQA1 *0601
11	A-5' 08/A-3' 07	196	all DQA1 alleles but *0104
12	A-5' 09/A-3' 07	195	DQA1 *0104
13	C-5'/C-3'	796	DRB1 intron 3 as control

表2 中国汉族和某些少数民族中 HLA-DQA 1 等位基因频率分布

Table 2 The distribution of HLA-DQA 1 allele frequencies in 10 groups of Chines Hans and some minorities

Allele	Group and Number tested								
	Hans	Hans <sup>[3]</sup>					Hans <sup>[4]</sup>	ZZ <sup>[5]</sup>	BYZ <sup>[6]</sup>
	G D 292	HB 142	SH 196	BJ 182	HX 342	HKSGP 270	HN 126	GX 164	GZ 146
*0101	.072	.176	.112	.121	.117	.096	.191	.083	.203
*0102	.188	.162	.102	.148	.143	.230	.119	.169	.331
*0103	.106	.092	.092	.115	.120	.059	.119	.043	.046
*0104	.034							.243	
*0201	.024	.099	.061	.137	.117	.048	.024	.000	.070
*0301	.291	.254	.332	.286	.278	.285	.381	.310	.145
*0302	.116							.000	
*0401	.034	.000	.005	.011	.009	.007	.024	.031	
*0501	.123	.148	.214	.137	.181	.152	.064	.117	.180
*0601	.010	.070	.082	.044	.035	.122	.079	.000	.062

G D, HB, SH, BJ, HX, HKSGP, and HN stand for Guangdong, Haerbing, Shanghai, Beijing, Hebei & Xi'an, Hongkong & Singapore, and Hunan Hans respectively; ZZ; Zhuang Zu in Guangxi; BYZ; Buyi Zu in Guizhou



图1 HLA DQA 1 等位基因 A \*0301, \*0501; B \*0301, \*0302

Fig 1 HLA DQA 1 allele 1-12 stand for specific primer pairs used as table 1 showed M: DNA marker

### 3 讨论

广东汉族人群 HLA DQA 1 等位基因频率与其他 10 组华人群体<sup>[3~6]</sup>的资料比较, 总体检验有显著性差异( $P < 0.0001$ )。但均以 DQA 1 \*0301 的频率最高, 北方汉族群体间 DQA 1 等位基因的比较, 无显著性差异, 而南方汉族群体间, 或与南方一些少数民族比较均有显著性差异。若对各群体间的 DQA 1 等位基因逐项检验, 多存在 1 个至几个等位基因频率的显著性差异。

在各种以 PCR 为基础发展起来的 HLA 基因分型技术中, SSP-PCR 具有特异性好, 结果分析简便, 操作方便快捷等优点, 使其在 HLA DQA 分型

中得到较好应用, 其结果的判断可从琼脂糖凝胶电泳出现扩增带所用的引物对直接读出, 克服了 PCR-SSO 探针操作的繁琐及同位素污染, 也避免了 PCR-RFLP 的周期长, 结果分析烦杂的缺陷。由于同时设有内参照, 杂合子及纯合子均可一次识别。此外, 如果扩增效率较低, 用琼脂糖凝胶电泳检测不足以显示时, 可改用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)及高灵敏度的银染, 能获得清晰可辨的结果, 带型与琼脂糖凝胶电泳一致。在本研究中, 广东汉族人群 HLA DQA 1 基因型的期望值与观察值比较, 符合 Hardy-Weinberg 平衡, 说明基因型频率可从等位基因频率计算得出可靠结果。DQA 1 等位基因的杂合度与父权排除率均较高, 可用于亲权鉴

(下转第 157 页)

## 参 考 文 献

- 1 Elich H. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton, 1989. 45 ~ 60
- 2 Chsmczy P, Sacchi N. Single step method for RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987. 162: 156
- 3 Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour, 1989
- 4 Sarker F, Valdivieso M, Borders J, *et al*. A universal method for the mutational analysis of *K-ras* and *p53* gene

- in non-small-cell lung cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Diagn Mol Pathol, 1995, 4(4): 266
- 5 Villanueva A, Reyes G, Cuatrecasas M, *et al*. Diagnostic utility of *K-ras* mutations in fine-needle aspirates of pancreatic masses. Gastroenterology, 1996, 110: 1587
- 6 Bukh J, Pucell R, Miller R. Sequence analysis of 5' non-coding region of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 4942
- 7 Sarkar G, Kapelner S, Soumer S, *et al*. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. Nucleic Acids Res, 1990, 18(24): 7465

(1997-07-15 收稿 1997-12-25 修回)

(上接第 114 页)

定及法医学的个体识别等案例。

文献报道中国华人主要分为南、北两大群体<sup>[7]</sup>,根据对 HLA 系统 II 类抗原的研究表明,南北两群体有共同特点亦有差别,北方群体 HLA II 类抗原系统较均一,而南方群体则差异较大,遗传背景较复杂。广东汉族人群的 HLA *DQA* 1 等位基因频率分析结果显示,中国南方汉族人群迁移演化的复杂性 with 文献报道一致,与广西壮族的某些 *DQA* 1 等位基因频率有较大的差别。家系调查及重复性实验显示,本研究用 SSP-PCR 法获得的广东汉族人群 HLA *DQA* 1 等位基因频率分布的数据是可靠的。本文结果为中华汉族人类学研究及某些疾病的关联研究提供了有意义的资料。

## 参 考 文 献

- 1 Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA *DQA* 1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. Tissue Antigens, 1993, 41: 119

- 2 贺奇才,谭润初,伍新尧,等. 用计算机进行 Hardy-Weinberg 平衡吻合度测验的方法. 中国医学物理学杂志, 1997, 43(2): 91
- 3 潘星华,陆建荣,刘杰,等. 中国汉族两群体 HLA *DQA* 1 基因的遗传构成及有关 15 群体 *DQA* 1 基因频率的比较分析. 中华微生物和免疫学杂志, 1995, 15(4): 276
- 4 张修武,郭实士. 应用 PCR-SSO 方法分析湖南籍汉族人 HLA DQ 位点 DNA 的多态性. 中国免疫学杂志, 1993, 9(1): 18
- 5 龙桂芳,阿卜迪,李卫,等. 应用序列特异引物 PCR 法对广西壮族 HLA *DQA* 进行基因分型. 中华血液学杂志, 1995, 15(10): 532
- 6 徐星培,汪超英,曹剑峰,等. 中国布衣族 HLA II 类基因的 DNA 分型. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, 12: 285
- 7 孙逸平,高小红,秋季南,等. 中国人南北群体的 HLA Class II 基因的变异性. 中国免疫学杂志, 1992, 8(5): 283

(1997-10-18 收稿 1997-12-09 修回)