

PCR-SSP 快速 HLA-DR 基因分型法的建立及临床初步应用

王晓波^① 陈规划 郑克立

(中山医科大学附属第一医院外科; 广州, 510080)

编者按 本刊同时收到并在本期同时发表的两篇文章, 第一作者分别是王晓波和陈汉奎。两文题目基本相同, 实验设计和技术路线也大致相同。该两文分送 3 位以上专家审稿, 都给予良好评价并同意刊登。常务编委会认真讨论了审稿人意见及分析了两文内容, 认为 PCR-SSP 法作 HLA-DR 基因分型, 有一定临床应用价值。两文的取材各有特点; 经核实, 两文作者是在互不知晓对方工作情况下各自独立完成的。编委会决定: 为尊重作者们的劳动成果和便于读者作比较, 两文同期刊出。

摘要 采用序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)方法, 对 22 份国际标准细胞株 DNA 及 23 例临床血标本 DNA 进行 HLA-DR 基因分型, 扩增条件为 94 °C, 30 s, 58 °C, 30 s 共 30 个循环。对各个标准 DNA 的分型结果显示, 符合率为 100%, 无假阳性及假阴性, 提示本方法快速、准确, 适合于临床应用。

主题词 聚合酶链反应/方法; HLA-DR 抗原/遗传学; 基因型

中图分类号 R 617

HLA-DR 血清特异性抗原分别由各自的 α -链及 β -链组成, 各血清特异性抗原之间差异, 主要是 β -链氨基酸组成的不同所致。编码 DR 抗原 β -链的基因称为 DRB 基因, 而该基因的多态性主要集中在其亚型 DRB1、DRB3、DRB4 上。HLA-DR 位点的相配, 对提高移植长期存活率具有重要影响。目前, 采用的 HLA-DR 抗原的血清学分型存在较高的误差率。聚合酶链反应—等位基因特异性探针检测法(PCR-ASO)、聚合酶链反应—单链构象多态性分析(PCR-SSCP)等 DNA 分型技术, 因耗时太长难以应用于临床。为了探索快速的基因分型方法, 我们建立了序列特异性引物—聚合酶链反应方法(PCR-SSP)以用于 HLA-DRB1、DRB3、DRB4 基因的分型, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 标准 DNA

代表 HLA-DRB1、DRB3 及 DRB4 各亚型的国际标准细胞株 DNA 共 22 种, 由同济医科大学免疫学教研室提供。

1.2 DNA 提取

根据 John 等^[1]报道的 NP-40 破裂细胞法, 进行

了部分改进。其步骤简述如下:

取 0.5 mL EDTA 抗凝血, 加 0.5 mL 溶液 I [10 mmol/L Tris-HCl (pH7.6), 10 mmol/L 氯化钾, 10 mmol/L 氯化镁], 加入 16 μ L NP-40 混匀; 3 000 $\times$ g 低速离心 10 min, 去上清液, 加 80 μ L 溶液 II [10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 氯化钾, 10 mmol/L 氯化镁, 0.5 mol/L 氯化钠, 0.5% SDS, 2 mmol/L EDTA] 悬浮沉淀; 加 80 μ L 饱和酚混匀 5 min, 12 000 $\times$ g 离心, 1 min, 上清转入新管; 分别加 80 μ L 酚、氯仿/异戊醇(25:24:1)混匀, 12 000 $\times$ g 离心, 1 min, 上清转入新管; 100 μ L 无水乙醇(-20 °C)沉淀 DNA, 70% 乙醇洗 1 次, 吹干 5 min; 加 100 μ L 三蒸水溶解 DNA, 60 °C, 20 min。另采用传统的酚—氯仿/异戊醇法抽提 DNA 作为对照研究。

1.3 引物

根据已发表的 HLA-DRB 等位基因核苷酸序列^[2], 参照 Olerup 的引物序列^[3], 由本实验室采用 DNA 合成仪(ABI 391A 型)自行合成(表 1)。

1.4 PCR 扩增

每份标本同时 20 管 PCR 反应(19 管 DRB 基因分型, 1 管阴性对照), 每管反应体积 30 μ L, 包括: 10 $\times$ 缓冲液 3 μ L, 特异引物 30 pmol, 阳性对照引物 30 pmol(扩增 p53 基因的保守序列, 408 bp), dNTP

^① 第一作者, 1963 年出生, 男, 博士, 副研究员

200 μmol/L(终浓度), Taq 酶 1.0 U, 模板 DNA 0.1 μg; 扩增条件: 94 ℃, 30 s 58 ℃, 30 s 共 30 个循环; 琼脂糖凝胶电泳时, 我们按相应的抗原编排各加

样孔序号, 分别加入相应的扩增产物 10 μL, 共 20 个加样孔, 其中一个加入阴性对照, 电泳 20 min, 紫外线灯下观察结果, 拍照及记录。

表 1 引物、扩增产物长度及扩增的相应基因及其抗原

相应抗原	引物(primer)	产物长度 (碱基对/ bp)	扩增的特异基因 ¹⁾
DR1	PIP2	255	DRB1 *0101— DRB1 *0103
	PIP6	255	
DR15	P3P4	197	DRB1 *1501— DRB1 *1502
DR16	P5P7	214	DRB1 *1601— DRB1 *1602
DR3	P8P11	151	DRB1 *0301— DRB1 *0302
DR17	P10P6	217	DRB1 *0301
DR18	P8P2	189	DRB1 *0302, DRB1 *1302
			DRB1 *1305, DRB1 *1402
			DRB1 *1403
DR4	P12P2	260	DRB1 *0401— DRB1 *0411
	P12P6	260	
DR7	P13P15	232	DRB1 *0701— DRB1 *0702
DR8	P14P16	214	DRB1 *0801— DRB1 *0802
DR9	P9P17	236	DRB1 *0901
DR10	P18P31	207	DRB1 *1001
DR11	P19P20	176	DRB1 *1101— DRB1 *1104
DR12	P14P21	248	DRB1 *1201— 1202
DR13. 1	P8P22	130	DRB1 *1301— DRB1 *1302
DR13. 2	P19P23	171	DRB1 *1303— DRB1 *1304
DR14. 1	P19P24	224	DRB1 *1401, DRB1 *1404
	p14P24	215	DRB1 *1405
DR14. 2	P8P25	142	DRB1 *1305, DRB1 *1402
			DRB1 *1406
DR52. 1	P26P27	177	DRB3 *0101, DRB3 *0301
52. 2	P29P30	172	DRB3 *0202
DR53	P28P6	213	DRB4 *0101

1) * 为等位基因符号

2 结 果

2.1 特异性和灵敏度

22 份 HLA-DRB 各亚型标准 DNA 的 PCR-SSP 基因分型均成功, 特异性扩增产物大小与引物设计的理论值大小相同(图 1)。随机挑取 22 份标准 DNA 中的 10 份, 分别进行 HLA-DR 分型, 所得结果与各标准

DNA 相符, 无假阳性及假阴性存在。23 例血液 DNA 的基因分型也取得成功, 无假阳性存在(图 2), 1 mL EDTA 抗凝血样本即可满足检测要求。

2.2 重复性

22 份标准 DNA 经重复 PCR-SSP 配型 1 次, 结果完全相同。分别采用传统酚—氯仿法及 NP-40 破裂细胞快速法抽提的 DNA 进行 PCR-SSP 基因分型, 重复结果完全一致。

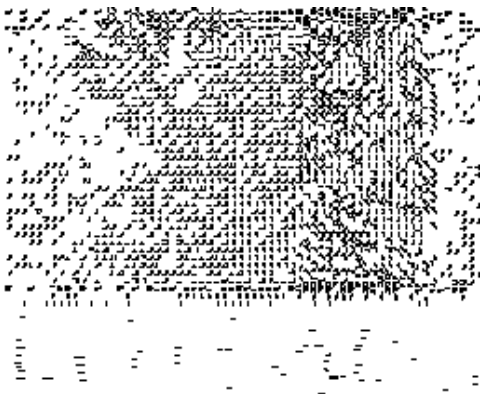


图 1 各标准 DNA 扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定
下排 M, a~j 由左至右依次为: M (123 ladder DNA Marker), DR1, DR15, DR16, DR3, DR17, DR18, DR4, DR7,

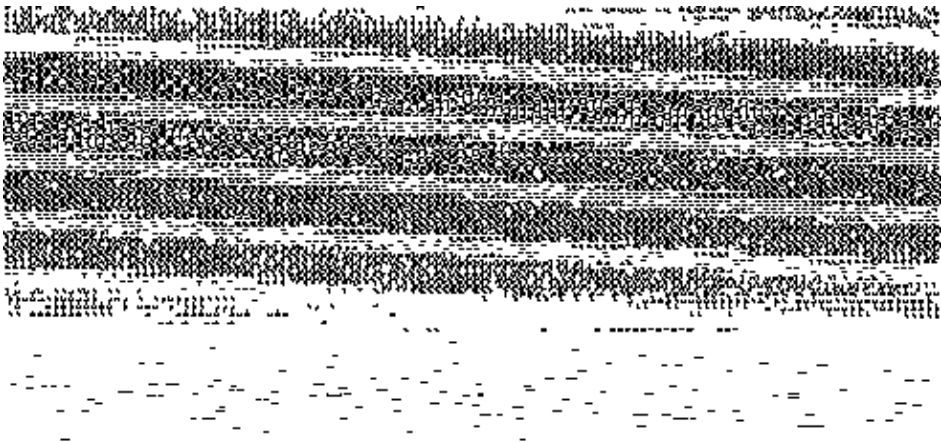


图 2 两例血液 DNA 的 HLA-DR 配型结果
A: 供者, 第 3, 8 电泳道有阳性带, 即 DR12、DR52 阳性; B: 受者, 第 3, 8 电泳道有阳性带, 即 DR8、DR12、DR52 阳性; P: 内源性阳性对照 (408 bp); N (negative, 阴性对照)

3 讨论

3.1 PCR-SSP 方法的特点

大多数的研究结果显示 MHC 的相配, 尤其是 HLA-DR 的相配对移植物的长期存活具有重要影响。目前临床上 HLA-DR 的分型仍以血清学方法为主, 但血清学方法分型结果存在较高的误差率。

DR8, DR9; 上排 M, 1~9, P 由左至右依次分别为 M (同上), DR10, DR11, DR12, DR13-1, DR13-2, DR14-1, DR14-2, DR52, DR53, P (阳性对照, 408 bp)。2% 琼脂糖凝胶电泳

2.3 对照

每个反应管中均加入内源性阳性对照引物, 以确保观察到每管酶促反应是否正常进行; 另设 DR52 和 DR53 两对引物以判断组间等位基因分型的准确性, 即凡 DR11, DR12, DR13, DR14, DR17, DR18 阳性者则 DR52 阳性; 凡 DR4, DR7, DR9 阳性者则 DR53 阳性。

2.4 检测所需时间

约需 2.5 h, 其中包括: NP-40 法快速抽提 DNA 60 min (传统酚-氯仿抽提法: 14~16 h, 两种方法抽提的 DNA 分型结果相同), PCR 扩增 65 min, 电泳与结果观察 25 min。

Mytilineos 等^[4] 报告在 14 000 次血清学 HLA-DR 分型中, 误差率在供者为 25%, 受者高达 27.6%。近年发展起来的 DNA 分型技术诸如聚合酶链反应-限制性片段长度多态分析 (PCR-RFLP)、聚合酶链反应-特异性寡核苷酸探针检测 (PCR-SSO)、PCR-SSCP 等方法, 虽然提高了准确率, 但分型结果需要数天或数周才能得到, 因而满足不了临床的要求^[5,6]。我们参照 Olerup 所述的 PCR-SSP 方法, 进

行了改进,设计并合成了所需的 31 条引物(部分引物的序列与 Olerup 所述相同),建立了 PCR-SSP 进行 HLA-DR 快速分型的方法。经国际标准细胞株 DNA 予以确证,无一例假阴性及假阳性出现,重复率 100%,总耗时 2.5 h 左右(国内报道需耗时 4~5 h^[7])。实验结果显示,该方法较血清学方法有两个显著特点:①高特异性:因 DNA 聚合酶(常用 Taq 聚合酶)缺乏 3'-5' 外切酶活性,如果引物的 3' 末端不能与靶 DNA 正确互补配对,那么靶 DNA 就不能被有效的扩增。我们是根据基因的多态性 3' 端来设计相应的引物,因此,该引物对相应的基因有很高的特异性结合力,可有效避免假阳性结果。②分型过程快速:结果仅根据是否有该基因的扩增带来判断,因此该方法简单、方便。

3.2 关于 DNA 快速抽提方法

引物的特异性确定之后,血液 DNA 快速抽提的成败是快速分型的关键。我们曾采用 Olerup^[3] 报道的快速盐析法进行抽提,但结果并不满意。我们也曾尝试了低渗煮沸法及碘化钠抽提法,但结果均不稳定,其中低渗煮沸法对新鲜血标本效果良好,模板准备时间仅需 30 min,但对较陈旧(室温放置超过 4 h)或冻存过的血标本效果则不稳定,用本文介绍的 NP-40 法快速抽提 DNA,无论是新鲜还是陈旧血标本均可得到稳定的结果,耗时约 1 h 可以满足快速分型的要求。

本方法建立后对 23 例血液标本的 DNA 进行了 HLA-DR 分型,效果满意,适合于临床应用,本方法

在对大量临床标本的检测应用中将会得到进一步完善,同时,其可靠性也将得到进一步检验。

参 考 文 献

- 1 John S W M, Weitzner G, Rozen R, *et al*. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acid Res*, 1991, 19(2):408
- 2 Marsh S G E, Bodmer J G. HLA class II nucleotide sequences. *Tissue Antigens*, 1992, 39:229
- 3 Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR-amplification with sequence-specific primers in 2 hours:an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 1992, 39:225
- 4 Mytilineos J, Scherer S, Dunckley H, *et al*. DNA HLA-DR typing results of 4 000 kidney transplants. *Transplantation*, 1993, 55:778
- 5 Bein G, Glaser R, Eiermann T H, *et al*. Molecular matching in renal transplantation. *Transplant Proc*, 1992, 24(6):2475
- 6 Clay T M, Pursall M C, Culpan D, *et al*. DNA conformation analyses for rapid semiautomated matching of HLA class I and class II for transplantation. *Transplant Proc*, 1995, 27(1):671
- 7 谭建明, 谢 桐, 徐琴君, 等. 肾移植供受者 DNA 水平人类白细胞抗原 DR 配型的研究. *中华医学杂志*, 1996, 76(5):338

(1996-12-18 收稿 1997-08-29 修回)

A METHOD FOR THE RAPID HLA-DR TYPING WITH PCR-SSP

Wang Xiaobo Chen Guihua Zheng Keli

(Department of Surgery, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen
University of medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Genotyping for HLA-DR alleles by polymerase chain reaction with sequence-specific primer(PCR-SSP) was carried out in 23 individuals of donor-recipients for organ transplantation and 22 standard cell line DNA. Twenty separate PCR reactions were performed per sample. Genomic DNA from leukocytes was extracted by a rapid procedure (NP-40 Method). The amplification was accomplished by 30 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing and extension at 58 °C for 30 s. HLA-DR alleles could be accurately distinguished. The overall time of genotyping was only 2.5 h. The specificity of matching was determined with 22 standard cell line DNA. No false positive or false negative typing results were obtained. These results showed that genotyping by PCR-SSP is a rapid and accurate matching technique, suitable for clinical practice.

Subject headings polymerase chain reaction/ methods; HLA-DR antigens/ genetics; genotype