

PCR-SSP 方法作 HLA-DR 亚区的基因分型^①

陈汉奎^② 杨英浩 罗超权 伍新尧

(中山医科大学生化教研室, 广州, 510089)

摘要 采用序列特异性引物—聚合酶链反应(PCR-SSP)技术对 HLA-DR 亚区进行基因分型。使用鉴定 DR1 ~ DRw18 的序列特异性引物和阳性对照引物, 双盲检测了 22 例已知 DR 血清型的标本, 二者完全一致。并对未知血清型的标本作 DR 基因分型。本法具有较高分辨度、高特异性和简便快速的特点, 为临床器官组织移植配型、疾病相关性分析、法医鉴定和人类学研究提供了新的技术方法。

主题词 HLA-DR 抗原/遗传学; 聚合酶链反应/方法; 基因型

中图分类号 R 527.3; D 919

人类的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC), 又称人类白细胞抗原(human leukocyte antigens, HLA)系统, 是一簇组成和结构都非常复杂的基因复合体。HLA II 类抗原的多态性是个体间存在免疫应答差异的决定因素之一。HLA 的研究在器官组织移植配型、疾病相关性、法医鉴定和人类学等领域具有广泛的应用价值, 对 HLA 多态性的检测为这些领域的发展提供了可靠的技术方法和有价值的资料, 在医学实践和科研活动中有着重要的意义。HLA 分型首先采用血清学方法。随着发现的 HLA 等位基因数目的增多, 该方法的局限性和不足也就越来越明显地表现出来^[1]。HLA 基因分型的主要特点是能直接在 DNA 水平对 HLA 基因多态性进行分析。灵敏、准确, 能检出血清学无法检出的型别。目前应用的基因分型技术有多种, 各有特点和局限性。序列特异性引物—聚合酶链反应 PCR-SSP(sequence specific primers)分型的原理是根据 HLA 的核苷酸序列设计出一系列顺序特异性引物, 特异性扩增目的基因, 通过常规琼脂糖电泳检测扩增产物是否存在来直接判断 HLA 基因型别。与其它基因分型技术相比较, 此法具有较高分辨度, 高特异性和简便快速的特点, 从样品处理到报告分型结果只需几小时^[2]。因此受到众多学者的高度关注, 并得到很快的发展和广泛的应用^[3,4]。尤其在临床诊断和器官移植配型中具有无可比拟的优越性^[5]。作者建立准确、快速、简便地进行 HLA-DR 基因分型的 PCR-SSP 技术的实验方法, 希望以之代替血清学方法用于临床器官移植的组织配型工

作中。

1 材料与方法

1.1 标本来源

由北京红十字会器官、骨髓移植配型中心提供 22 例已知 DR 血清型的血液样本。由本校附一院血库提供 10 例未知 DR 型别的血液样本。

1.2 引物设计

按文献^[2]设计鉴定 DR1 ~ DRw18 以及 DR52、DR53 的 HLA-DR 等位基因的序列特异引物共 19 组和一对阳性对照引物。

1.3 DNA 提取

DNA 提取按常规抽提法和快速抽提法进行。常规抽提法按有关文献进行, 快速抽提法如下: 新鲜血液 300 μ L, 加入 1000 μ L 双蒸水, 迅速摇匀后 8 000 \times g 离心 1 min, 沉淀加 STE 300 μ L, 20% SDS 20 μ L, 蛋白酶 K 20 μ L (10 mg/mL), 55 $^{\circ}$ C 振荡保温 10 min, 然后用等体积酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提 1 次, 8 000 \times g 离心 3 min, 上清水相加 6 mol/L NaCl 100 μ L, 摇匀 10 s 后 8 000 \times g 离心 3 min 上清加入 1 mL 预冷(-20 $^{\circ}$ C)的无水乙醇, 离心沉淀, 沉淀溶于 100 μ L 三蒸水中备用。整个抽提过程可在 30 min 内完成。

1.4 HLA-DRB 基因特异性扩增

每个样本同时进行 19 个独立的 PCR 反应, 其中 17 个确定 DR1 ~ DRw18 型别, 2 个确定 DR52 和

① 广东省科委重点项目资助课题; ② 第一作者, 1968 年出生, 男, 硕士, 现在广州市肿瘤医院工作 (广州, 510095)

DR53 型别。每一个 PCR 反应管中均含有确定相应 DR 型别的特异性引物和阳性对照引物。反应体积为 15 μ L, 其中含有约 100 ng 基因组 DNA 2 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 1.5 μ L, 2 mmol/L dNTP 1.5 μ L, 5 μ mol/L 的特异性引物 1 μ L, 2 μ mol/L 的阳性对照引物 1 μ L 以及 0.5 U Taq DNA 聚合酶, 用三蒸水补足至 15 μ L。上层用 15 μ L 的液体石蜡覆盖。热循环参数为 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s 65 $^{\circ}$ C 退火 40 s 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 30 个循环。第一个循环前 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 最后一个循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 min。

1.5 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物

扩增完成后, 每管加入 2.5 μ L 的上样缓冲液, 混匀后用 w (琼脂糖凝胶)=1.5% 电泳检测扩增结果。电泳缓冲液用 0.5 \times TBE, 电压 8~12 V/cm, 电

泳时间 20 min。电泳结束后溴乙锭染色, 在紫外仪上观察并记录结果。

2 结果

2.1 HLA-DRB 基因特异性扩增

每个样本同时进行 19 个独立的 PCR 反应, 每次 PCR 反应的结果判断必须在有阳性对照引物扩增条带出现的前提下进行, 个体的 DR 型别直接由其相应的特异性引物扩增条带的出现确定, 图 1 所示的直读结果为 DR_w16/8。DR52 和 DR53 型别的确定还可以作为判断 DR1~DR_w18 特异性分型结果的附加对照。



图 1 PCR-SSP 基因分型的电泳结果

本例结果为 DR_w16/8

2.2 双盲法对已知血清型样本分型

对 22 例已知 DR 血清型的标准样本用 PCR-SSP 分型法作双盲测试, 结果完全一致, 表明本法不

仅能进行正确的分型, 还可以对某些 DR 型别作亚型分析, 将 1 例(12 号样本)血清学的空白分型确定为杂合子(表 1)。

表 1 22 例已知血清型样本的分型结果

样本编号	DR		样本编号	DR	
	血清学分型	PCR-SSP 分型		血清学分型	PCR-SSP 分型
1	2/4	w15/4	12	2/-	w15/w16
2	3/5	w17/w12	13	7/8	7/8
3	2/6	w15/w13.1	14	9/14	9/w14.2
4	2/6	w16/w14.2	15	2/4	w16/4
5	4/5	4/w11	16	2/5	w15/w11
6	2/3	w15/w17	17	2/9	w15/9
7	3/8	w18/8	18	4/6	4/w13.1
8	3/9	w17/9	19	2/8	w16/8
9	4/6	4/w13.1	20	7/9	7/9
10	4/7	4/7	21	1/2	1/w15
11	5/6	w11/w13.1	22	2/10	w15/10

2.3 快速抽提法的可靠性

对10例未知DR型别的血液样本分别用常规抽提法和快速抽提法抽提DNA,进行PCR-SSP分型,均获得一致的分型结果。说明快速抽提法得到的DNA的质量完全能满足PCR-SSP基因分型的需要。

3 讨论

与血清学以及其它以PCR为基础的HLA-DR基因分型技术相比,PCR-SSP分型技术有如下的特点:①有较高分辨度。在PCR-SSP的每次PCR反应中,每对引物只对特定的基因顺序进行百万倍以上的扩增,可以得到DR1~DRw18以及DR52和DR53的所有型别,使杂合子和纯合子的确定变得容易进行,可把血清学不能确定是纯合子或杂合子的个体区分开来,而把血清学方法确定的相同的杂合子型别进一步确定为不同的亚型(如表1中的第1、15号样本和第3、4号样本),②高度的特异性。PCR-SSP中的特异性引物针对DR1~DRw18各等位基因顺序而设计。DR52和DR53型别的确定还可作为DR1~DRw18特异性分型的附加对照。阳性对照引物包含在每一个PCR反应中,指示管内DNA聚合酶促反应是否正常进行,以避免假阴性结果发生。通过提高热循环的退火温度(高至65℃)又加强了扩增特异性,避免假阳性结果发生。③简便快速的实验操作和结果判断。本文PCR-SSP所需的DNA标本可用快速抽提法获取,PCR热循环前的加样采用快速混合加样法。一般的PCR扩增仪均可在2h左右即可完成PCR扩增。可在紫外线检测仪下直接读取分型结果。从样本处理到报告分型结果可在4h内完成。④高度重现性。在本实验中,用双盲法对22例已知血清型标本的DNA进行PCR-SSP分型,两次结果完全一致。⑤适于分型自动化操作。PCR-SSP分型的特点是PCR扩增和扩增后的处理快速而简便,整个分型过程的可自动化操作程度很高。如通过设计(半)自动化加样、自动化热循环扩增和自动化读取结果的操作程序,即可完成HLA-DR的自动化分型。

在肾/骨髓移植和其它器官移植中,HLA-DR相容性的重要性已经不言而喻。事实上,只相差一个氨基酸残基的移植体都能造成严重的供受体排斥反应^[9]。目前大多数用于临床的HLA-DR分型仍限

于血清学方法,从不同学者的研究发现到的DR匹配的不相符的资料早已说明了血清学分型的不足之处。这就迫切需要建立更为准确简便的DR分型技术以取代血清学方法用于临床移植配型中。同时,HLA定型本身所需的时间也是影响移植体成活率的一个重要因素。以PCR为基础的PCR-RFLP、PCR-SSCP和PCR-SSO等基因分型技术虽然对DR分型的分辨率、准确率和重复性都高于血清学方法,但因为这些方法都存在着操作繁琐、费时、结果判断复杂等缺点而难以替代血清学用于临床的DR配型^[7~9]。PCR-SSP方法,通过设计特异的引物,调整特异的PCR循环扩增体系等外部条件,可获得高特异性的等位基因扩增产物,能确定相对应于血清学分型的DR型别。Olerup等^[2,5]的实验也表明,PCR-SSP法可以区分DR1~DRw18的所有纯合子和杂合子个体,未发现等位基因的误检或漏检,也未发现纯合子个体的错误确定。其重现性是100%。并且,PCR-SSP能在4h内完成分型,完全能满足临床抢时间的要求,也为自动化的DR分型提供了技术可能性,因而完全可以代替血清学方法而成为临床移植前的配型技术。

参 考 文 献

- 1 Leivestad T, Spurkland A, Bratlie A. Does genomic HLA-DR matching further enhance the effects of serological DR matching in clinical renal transplantation? *Transplant Proc* 1994, 26:1748
- 2 Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP): an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992, 39:225
- 3 Bunce M, Craig J, Kenneth I. Rapid HLA-DQB typing by eight polymerase chain reactions amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP). *Hum Immunol* 1993, 37:201
- 4 Terasaki P, Acalinovich A. HLA-DR typing by polymerase chain reaction in Terasaki trays. *Transplant Proc* 1995, 27:696
- 5 Olerup O. Retrospective analysis of HLA-DR typing by serology, TaqI-RFLP analysis and PCR amplification with sequence-specific primers. *Transplant Proc* 1994, 26:1750
- 6 Sada M., Hashimoto M., Kinoshita T. Importance of

- HLA-DRB1 amino acid residue matching between recipient and donor in cadaveric renal transplantation. *Transplant Proc*, 1995, 27:698
- 7 Mytilineos J, Scherer S, Opelz G. Comparison of RFLP-DR beta and serological HLA-DR typing in 1 500 individuals. *Transplantation*, 1990, 50:870
- 8 Carrington M, Miller T, White M, *et al*. Typing of HLA-DQA1 and DQB using DNA single strand conformation polymorphism. *Hum Immunol*, 1992, 33:208
- 9 Angelini G, Cande DP, Gorski J, *et al*. High-resolution analysis of the human HLA-DR polymorphism by hybridization with sequence specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83:4489

(1996-10-02 收稿 1997-09-24 修回)

GENOTYPING FOR HLA-DR SUBREGION BY PCR-SSP METHOD

Chen Hankui^① Yang Yinghao Luo Chaoquan Wu Xinyao

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

HLA-DR antigens are classically detected by specific antisera with a microlymphocytotoxicity test. DNA typing of HLA class II antigens has recently been developed by polymerase chain reaction (PCR). In this paper, based on the absence or presence of amplified products, HLA-DR genotyping was carried out with PCR-sequence specific primer (SSP), in which 19 groups of SSPs were designed to identify DR1-DRw18 specificities and one pair of positive control primers were used in each PCR amplification. 22 samples whose DR specificities had already been serologically identified were typed by PCR-SSP blindly. Ten random individuals were typed respectively when DNA was isolated by rapid-extraction and by traditional phenol/chloroform extraction. The PCR-SSP typing gave completely concordant results with serological typing in the 22 samples. All homozygous and heterozygous combinations of DR1-DRw18 specificities were distinguished. The reproducibility was 100% in two separate occasions. No false-positive or false negative typing results were obtained. DNA isolated by rapid-extraction could be used in PCR-SSP amplification. It showed that PCR-SSP typing for HLA-DR subregion is a rapid and inexpensive method with high accuracy, high specificity and high reproducibility, and it can be used as an alternative to DR typing in routine clinical tissue typing.

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

^① Present address: Guangzhou Tumor Hospital (Guangzhou, 510095)