

PCR-SSCP 作 HLA-DRB 基因分型的初步研究^①

林观平¹② 杨英浩¹ 孙筱放² 伍新尧¹
罗超权¹ 刘煦文¹ 张仕光³

(1 中山医科大学生化教研室,广州,510089; 2 广州市第二人民医院; 3 肾病研究所)

提 要 从 20 例人类白细胞抗原-DR(HLA-DR)血清学特异性不同的血痕样本中抽提基因组 DNA,经 PCR 扩增 HLA-DRB 基因第二外显子的高度多态区域。PCR 产物在 50%甲酰胺存在下加性获得单链 DNA 片段后,经 8%中性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染显色分析。结果显示,DR 血清学特异性不同的个体具有不同的电泳图型,而 DR 相同血清不同的个体却具有相同的电泳带型。在稳定条件下,单链电泳图型有着良好的重复性。与聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)或聚合酶链反应-序列特异寡核苷酸(PCR-SSO)探针法相比,聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)分析简单、快速、经济、不需探针和限制性内切酶,并可望成为临床上器官和骨髓移植寻找合适的 HLA 配型的一种工具。

关键词 聚合酶链反应-单链构象多态性; 人类白细胞抗原; 基因; 基因分型

中图分类号 R527.3; D919

在同种移植排斥及某些疾病的易感性中,人类白细胞抗原-DR 抗原的作用十分重要,肾移植能否成功,最重要的是依赖于合适的 DR 配型^[1]。传统的人类白细胞抗原-DR 血清学定型方法,繁琐、耗时,甚至有时因缺乏特异抗血清或标准分型细胞而无法分型^[2]。在临床器官和骨髓移植上确需一种快速可靠的分型技术。近年来,国内外常用的 PCR-SSO(ASO),即聚合酶链反应-序列特异寡核苷酸(等位基因特异寡核苷酸)探针法或聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法,虽有诸多优点^[3],但因大量探针设计和合成或大量使用限制性内切酶,使实验既费时又昂贵。近年来,国外报道了用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)技术作 HLA-DP 分型^[4]。现将 PCR-SSCP 技术对 20 例 HLA-DR 血清学特异性不同的样本进行基因分型报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

已知 HLA-DR 血清学特异性的人血痕标本由北京红十字会器官、骨髓移植配型中心提供。Taq DNA 聚合酶、dNTP(德国 BM 公司)Ladder DNA marker(美国 BRL 公司),丙烯酰胺(重结晶,浙江黄岩生化试剂厂),其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 血痕基因组 DNA 的制备 按孙光云等^[5]介绍的方法进行。

1.2.2 PCR 扩增 50 μl PCR 反应体系中含有:基因组 DNA 约 0.5 μg,5 μl 10×PCR buffer,6 μl 2 mmol/L dNTP,30 pmol 引物 DRB-1(5'-CCCCACAGCACGTTTCTTG-3')和 DRB-2(5'-TCGCCGCTGCACTGTG AAG-3')。98℃变性 5 min 后,加入 1.5 U Taq DNA 聚合酶,液体石蜡 50 μl,置 DNA 扩增仪(CA-330Y 型,西安正信公司)中,94℃60 s,55℃60 s,72℃90 s 循环 30 次。最后 1 次延伸(72℃)10 min。

① 卫生部和美国中华医学基金会基金资助课题

② 第一作者为国内访问学者,35 岁,男,讲师,现在广东医学院生化教研室(湛江,524023)

1.2.3 SSCP 分析 按 Hoshino 等^[4]的方法略加修改。PCR 产物 10 μ l 加 80% 甲酰胺至终浓度为 50%，混匀，96 $^{\circ}$ C 水浴 5 min，迅速置入冰水中冷却。然后加样于 8% 中性聚丙烯酰胺凝胶 (acr : bis = 49 : 1, 凝胶大小为 14 cm \times 13.5 cm \times 0.1 cm) 的加样槽中，0.5 \times TBE (1 \times TBE; 89 mmol/L Tris-硼酸盐, 89 mmol/L 硼酸, 2 mmol/L EDTA, pH 8.0) 10 V/cm, 室温下电泳 4h。凝胶中的 DNA 片段以银染色法^[4]显色。

2 结果

2.1 用 PCR-SSCP 法作基因分型的结果

20 例 HLA-DR 血清学特异性不同的 DNA 经 PCR-SSCP 技术分析后, 均出现独特的电泳带型, 部分结果如图 1 所示。

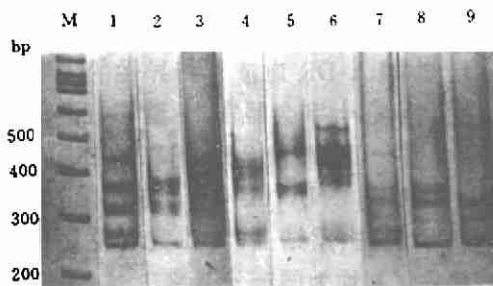


图 1 不同 HLA-DR 血清型的 DNA 单链构象多态性图谱

M: DNA 分子大小 (bp) 标准 1~9 的 HLA-DR 血清型分别为 DR1; DR6; DR2, 6; DR2; DR4, 7; DR3, 5; DR3, 9; DR8, 9; 和 DR7, 9

2.2 PCR-SSCP 分析的重复性

对 HLA-DR 血清学特异性不同的两种纯合子的 PCR 产物和兼有这两种血清学特异性的杂合子的 PCR 产物, 以及这两种纯合子的 PCR 产物的混合物分别进行 SSCP 分析, 在我们的检测条件下, 结果具有良好的重复性 (图 2)。

3 讨论

作者用自己设计的一对引物作 HLA-DRB 基因分型是成功的, 它能特异性地扩增

HLA-DRB 基因第 2 外显子中的高度多态区域, 而且这一区域的多态性与 HLA-DR 血清学特异性一致。

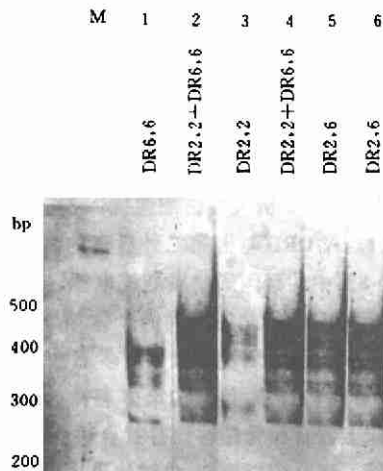


图 2 DNA 单链构象图谱的可重复性

样本的 HLA-DR 血清型分别为 1: DR6; 2: DR3, 2 和 4 均为 DR6 与 DR2 PCR 产物的混合物; 5 和 6 为杂合子 DR2, 6 的两个个体。M: DNA 分子大小 (bp) 标准

PCR 产物变性后的单链 DNA, 在一定条件下能自行折叠成独特的构象。在中性聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 单链 DNA 的迁移率除与片段大小有关外, 更主要的是取决于单链构象。DNA 片段内的碱基变异常常改变单链分子的构象, 从而影响电泳迁移率^[4]。这就是 SSCP 分析的理论根据。

本研究对 20 例 HLA-DR 特异性不同的样本作了 PCR-SSCP 分析, 每一血清学特异性均具有独特的电泳图型。HLA-DR 血清学特异性相同的个体, 具有相同的电泳带型, 且在本实验的条件下, 具有良好的重复性。与 Hoshino 等^[4]报道的结果相符。

本法从抽提到 DNA 算起, 7 个小时可获得结果。与 PCR-RFLP 或 PCR-SSO 探针法相比, PCR-SSCP 的优点是快速、精确、经济 (不需用限制性内切酶及探针)、灵敏度高。这些优点尤其适于大量样本筛查, 其应用前景是相当广阔的。

参 考 文 献

- 1 Tiercy JM, Gorski J, Betuel H. DNA typing of DRw6 subtypes. Correlation with DRB1 and DRB3 allelic sequence by hybridization with oligonucleotide prober. *Hum Immunol*, 1989, 24 : 1
- 2 Vartdal F, Gaudernack G, Funderud S, et al. HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation—a fast and reliable technique. *Tissue Antigens*, 1986, 28 : 301
- 3 Helmuth R, Fildes N, Blake E, et al. HLA-DQa allele and genotype frequencies in various human populations determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet*, 1990, 47 : 515
- 4 Hoshino S, Kimura A, Fukuda Y, et al. Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: A simple, economical, and rapid method for histocompatibility testing. *Hum Immunol*, 1992, 33 : 98
- 5 孙光云, 吴梅筠. 用 DNA 扩增法检测人类干血痕的性别. *华西医科大学学报*, 1990, 21(3) : 271
- 6 Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, et al. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet*, 1991, 48 : 137

(1993-09-25 收稿 1994-03-21 修回)

STUDIES OF HLA-DRB GENOTYPING WITH PCR-SSCP

Lin Guanping¹ Yang Yinghao¹ Sun Xiaofang² Wu Xinyao¹
Luo Chaoquan¹ Liu Xiwen¹ Zhang Shiguang³

(1 Department of Biochemistry, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089;

2 Second People's Hospital of Guangzhou City; 3 Sun Yet-Sen

University of Medical Sciences Kidney Research Institute)

Genomic DNA were extracted from 20 bloodstain samples known HLA-DR serological specificities. The second exon of HLA-DRB gene was amplified with primers covered about 277bp. The denatured PCR products were fractioned by 8% neutral polyacrylamide gel electrophoresis. The DNA bands were visualized by silver staining. The results showed that 10 homozygote and 10 heterozygote samples had different electrophoretic patterns. For a given specificity of HLA-DR, the single strand electrophoresis pattern was able to be repeated and stable in experimental batches. The advantages of the PCR-SSCP for HLA-DRB genotyping are simple, rapid, and economic. With this method the radioactive reagents and restriction enzymes are not required.

Key words polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP); HLA; genes; genotyping