

• 基础研究论著 •

运用全长序列鉴定 HLA-C 罕见基因的实验研究

杨小柯¹△, 何柳媚², 张倩¹, 杨冬燕¹, 王大明²

(1. 深圳市疾病预防控制中心, 广东深圳 518055; 2. 深圳市血液中心, 广东深圳 518020)

摘要:目的 检测与分析 2 例骨髓志愿捐献者携带的罕见等位基因。方法 用快速 DNA 提取试剂盒从全血样本中提取基因组 DNA, 经 HLA-C 基因商品化测序分型试剂盒扩增, 纯化后的扩增产物作为模板用试剂盒配套的第 2、3、4 外显子正反向测序引物及自行研制的第 5 外显子正反向、第 6 外显子正向和第 7 外显子反向测序引物进行测序, 结果导入 Assign-SBT 3.5.1.45 软件分析, 并用 PCR 序列特异性引物技术 (SSP) 对本体进行确认。结果 分型结果显示其中一例为 HLA-C * 07 : 63, 另一例为 HLA-C * 01 : 24。结论 临床移植配型遇罕见基因时应测定全长序列以提高分型结果的准确性, 此两例罕见等位基因为中华骨髓库建立 HLA 高分辨数据库提供了有效依据。

关键词:HLA-C 抗原; 等位基因; 聚合酶链反应; 序列分析, DNA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)05-0519-03

Identification of rare HLA-C alleles by full-length sequencing

Yang Xiaoke¹△, He Liumei², Zhang qian¹, Yang Dongyan¹, Wang Daming²

(1. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518055, China;

2. Shenzhen Blood Center, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

Abstract: Objective To test and analysis 2 rare alleles that donors carry. Methods Genomic DNA was extracted from blood samples by quick DNA purified kit and then tested by HLA-C locus' commercial SBT (sequence-based typing) kit. The purified PCR product was used as the DNA template in the sequencing reaction, forward and reverse sequencing primers in commercial kit were used for the sequencing of exons 2, 3 and 4, 4 direct sequencing reactions of PCR product for exons 5 in both directions, exon 6 in forward direction and exon 7 in reverse direction were performed using self-developed kit. Sequencing result was analyzed with Assign-SBT 3.5.1.45 (Conexio Genomics) software. The samples were tested by PCR-sequence specific primer (PCR-SSP) again. Results HLA typing results of the samples were HLA-C * 07 : 63 and HLA-C * 01 : 24. Conclusion Full-length sequencing could be used to make sure the ambiguous SBT results. The 2 rare alleles also provide an available basis for the establishment of the HLA high resolution typing database for China Marrow Donor Program.

Key words:HLA-C antigens; alleles; polymerase chain reaction; sequence analysis, DNA

HLA-C 属于经典的 HLA-I 类基因, 位于 HLA-A、B 位点之间, 于 1970 年被发现, 1975 年确定了 C 座位。HLA-Cw 抗原为移植相关的抗原, 与自然杀伤(NK)细胞相互作用, 在细胞免疫反应中起重要作用^[1]。国际免疫遗传 IMGT/HLA 数据库 3.9.0 版 (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>) 显示截至 2012 年 7 月已发现 HLA-C 基因 1 551 个, 其中 C * 01 组的等位基因为 87 个, C * 07 组的等位基因为 341 个。美国国家骨髓库 (NMDP) 网站 (<http://bioinformatics.nmdp.org/>) 公布的罕见等位基因资料 3.7.0 版 (03/2012) 显示, 1987 年 1 月至 2012 年 3 月, 873 757 份标本中尚未发现过有 HLA-C * 07 : 63 及 HLA-C * 01 : 24 基因存在。C * 07 : 63 首次报道时间为 2008 年, C * 01 : 24 首次报道时间为 2009 年, 此 2 例罕见基因均在亚洲人群中首次发现, 但自上报基因库后未见有再次报道或发现, 笔者在为临床移植配型供/受者 HLA-A、B、-C、-DRB1 和 -DQB1 位点进行高分辨水平分型时, 发现 1 例供者携带 C * 07 : 63 基因, 另 1 例供者携带 C * 01 : 24 基因, 报道如下。

1 材料与方

1.1 标本来源 标本来源于参加临床无关供/受者对移植配型的 2 例骨髓库志愿捐献者, 均为男性。静脉血标本用 EDTA 抗凝。

1.2 仪器与试剂 全血基因组 DNA 提取试剂盒 (美国 QIA-GEN 公司), HLA-C 位点测序试剂盒 (美国 Atria Genetics 公

司), HLA-C * 07 序列特异性引物 (SSP) 检测试剂盒 (瑞典 Olerup 公司), Biophotometer 紫外分光光度仪 (德国 Eppendorf 公司), EmbiTec 电泳槽、9700 型 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司), 高速低温离心机 (德国 Eppendorf 公司), 紫外凝胶成像系统 (日本 BIO-RAD 公司) 及 ABI 3730 型基因分析仪 (美国 ABI 公司)。

1.3 基因组 DNA 制备 取 5 mL 抗凝外周血, 严格按照全血基因组 DNA 提取试剂盒说明书中 0.3 mL 全血制备基因组 DNA 的实验程序进行操作, 剩余全血于一 30 °C 冰箱冻存备用。DNA 浓度调节到 50 ng/μL 左右, A₂₆₀/A₂₈₀ 值控制在 1.80 左右, 琼脂糖电泳显示无降解。

1.4 HLA-C 位点高分辨水平基因测序分型

1.4.1 HLA-C 位点外显子 PCR 扩增 严格按照 HLA-C 位点测序试剂盒说明书操作。PCR 加样及扩增反应: (1) 将相关试剂从冰箱取出, 置于加样洁净台上。在 1 只容量为 1.5 mL 的离心管内加入 16 μL PCR 反应缓冲液和 0.3 μL Taq 酶, 混匀后离心。(2) 取 16 μL 混合液加入反应管中, 混合液中加入 4 μL 基因组 DNA, 混匀后, 离心。(3) 将反应板封盖后放入 PCR 扩增仪中, 扩增反应采用 20 μL 反应体系, PCR 反应条件: 95 °C 变性 10 min 后, 按 96 °C 20 s, 60 °C 30 s, 72 °C 3 min 进行 36 个循环。

1.4.2 PCR 产物的直接测序 PCR 产物的纯化采用 ExoSAP-IT 酶处理, 在反应管中加入 3 μL ExoSAP-IT, 去除多余

的游离 PCR 引物和底物 dNTPs。低速离心混合后,置 PCR 仪 37 °C 30 min, 80 °C 15 min。纯化处理后的产物作为测序反应模板。采用试剂盒的测序引物对 HLA-C 位点第 2、3、4 外显子的正向和反向进行序列测定。测序反应采用 10 μL 反应体系,该体系由 8 μL 测序引物和 2 μL 经 ExoSAP-IT 处理过的 PCR 产物组成,反应条件为:96 °C 20 s, 50 °C 30 s, 60 °C 2 min, 共 25 个循环。测序反应产物采用乙醇/醋酸钠/EDTA 沉淀法。加入 15 μL 超纯甲酰胺溶液,在 PCR 扩增仪上 95 °C 变性 2.5 min。经纯化后的测序反应产物于基因分析仪检测并收集电泳后的序列数据信息。HLA-C 位点的第 5 外显子正反向,第 6 外显子正向和第 7 外显子反向测序采用本实验室自行研制的测序引物进行^[3],测序的 PCR 反应采用 10 μL 反应体系,含 8 μL 测序引物和 2 μL 经 ExoSAP-IT 处理过的 PCR 产物组成,反应条件:95 °C 变性 1 min 后,按 95 °C 10 s, 50 °C 5 s, 60 °C 4 min 进行 25 个循环,产物于 4 °C 保存。

1.4.3 结果分析 采用 Assign-SBT 3.5.1.45 (Conexio Genomics) 分析软件,分析受检者 HLA-C 位点的等位基因型。

1.5 HLA-SSP 方法确认结果

1.5.1 采用 HLA-C*07 的 SSP 试剂盒对此标本结果进行确认 按 SSP 试剂盒说明书操作。每个 PCR 管反应体系为 10 μL,包括:2 μL 基因组 DNA, 3 μL PCR MasterMix, 0.08 μL Taq 酶及 0.042 μL 去离子水。混匀后按如下循环参数进行扩

增:94 °C 变性 2 min 后,按 94 °C 10 s, 65 °C 60 s 循环 10 次,再按 94 °C 10 s, 61 °C 50 s, 72 °C 30 s 循环 20 次。由于没有商品化的用于检测 HLA-C*01:24 的 SSP 试剂盒,因此该项检测未进行。

1.5.2 琼脂糖电泳 PCR 扩增产物经 SYBR Green I 染色,用 2% 琼脂糖凝胶电泳,根据产物有无及特异性条带的片段大小,与 HLA-C*07 的结果对照表进行比对,判断最终结果。

2 结 果

2.1 HLA-C*07:63 等位基因的序列分析 将电泳后的数据导入 Assign-SBT 3.5.1.45 (Conexio Genomics) 分析软件,通过与数据库中第 2-7 外显子的数据进行比对,得出的分型结果为 C*04:01, 07:63, 见图 1。

2.2 HLA-C*07 SSP 确认结果 由基因序列分析图可看出,数据库中无 C*07:63 的全长比对序列,因此,加做 SSP 进行结果验证,PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,与 HLA-C*07 的结果对照表进行比对,孔 1, 6, 16, 17 及 37 为阳性,与 HLA-C*07:63 的结果一致,见图 2。

2.3 HLA-C*01:24 等位基因的序列分析 将电泳后的数据导入 Assign-SBT 3.5.1.45 (Conexio Genomics) 分析软件,得出的分型结果为 C*01:24, 07:02, 第 2-7 外显子的结果与数据库中 C*01:24 的全长比对序列完全一致。

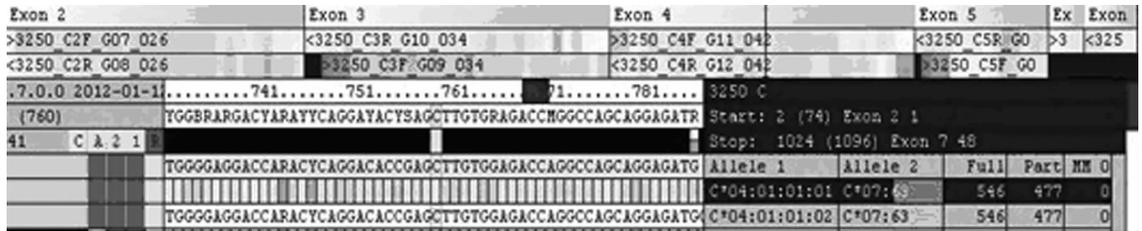


图 1 HLA-C*07:63 基因序列分析图

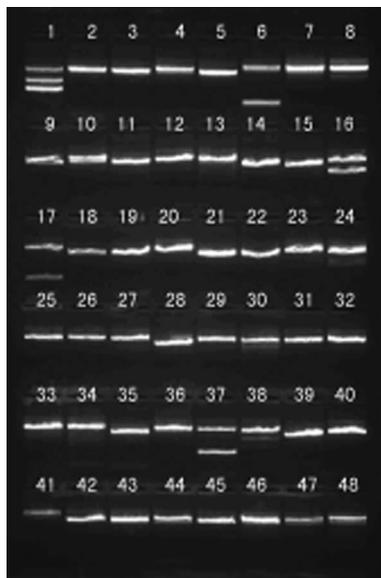


图 2 HLA-C*07 SSP 结果电泳图

Petersdorf 等^[6]研究认为 C 不相合是 CML 无关供者造血干细胞移植失败的危险因素之一 (OR=4.0, P=0.03)。Lee 等^[7]报道,造血干细胞移植供受者 HLA 位点相合程度越高移植效果越好。此外,HLA-C 与疾病相关性研究,在抗病毒、抗肿瘤免疫中的作用也日益受到重视。准确地指定 HLA-C 等位基因对于明确其可能作用具有重要的意义。HLA-SBT 基因测序分型技术被业内公认为造血干细胞移植前 HLA 高分辨配型的“金标准”,但由于商品化试剂盒通常只提供第 2、3 和 4 外显子的正、反向测序引物,只能检测此区域内的多态性,区域外的多态性无法检测,这就使部分分型结果模棱两可,不能得到最终确认。为保证结果的准确性,笔者加做了第 5、第 6 和第 7 外显子的测序,并与国际免疫遗传 IMGT/HLA 数据库提供的全长序列比对,结果完全相符,以此判定本研究的检测正确。PCR-SSP 分析法是使用能够特异识别特定等位基因的引物通过 PCR 扩增检测序列多态性的方法,也称作等位基因特异性引物 PCR 法,可通过电泳直接分析带型决定 HLA 型别。因此,两种方法结合能更准确进行 HLA 分型。

Moya-Quiles 等^[8]指出,HLA-C*07 对肝移植手术中的急性排斥反应起保护作用。爱尔兰学者的最新研究认为^[9],HLA-C*01:02 是精神分裂症的危险因子。截至 2012 年 7 月,C*07 组的等位基因为 341 个,C*01 组的等位基因为 87 个。HLA 具有高度的多态性,并且等位基因的数量也在逐年增加。其中,在中国乃至整个亚洲人群中最常见的基因是 HLA-C*07:02,其次为 HLA-C*01:02。美国国家骨髓库

3 讨 论

HLA-C 基因位于人类第 6 号染色体短臂。已有的临床研究资料表明,接受造血干细胞移植的供、受者 HLA-C 基因的匹配程度与移植效果相关^[2-5]。一项调查显示无关供者造血干细胞移植 HLA-A 和 HLA-B 位点相合时 HLA-C 位点不相合的概率约为 35%,说明 A 和 B 位点相合不能预期 C 位点相合。

公布的罕见等位基因资料显示,1987 年至 2012 年 3 月,囊括大部分人群的 873 757 份标本中尚未发现有 HLA-C * 07 : 63 及 HLA-C * 01 : 24 基因存在。自 Genebank 首次公布并命名此 2 例基因后,未再见有文献报道此基因,近 3 年中华骨髓库入库数据刚刚从低分辨率水平转为高分辨水平,骨髓库高分辨数据正在不断补充之中,一些首次被发现后再次出现而在美国国家骨髓库公布的数据中却显示,发现次数极少或被划为罕见的等位基因也陆续在中国被发现,例如 B * 51 : 39, C * 03 : 100, C * 08 : 22, DRB1 * 12 : 10 等,且发现次数逐渐增多。以往大家判断高分结果都是根据基因频率,取常见等位基因作为最终结果,直接舍弃罕见等位基因。随着以前被认为是罕见的等位基因发现的次数越来越多,有必要对结果进行再次确认。此次发现的 C * 07 : 63 及 C * 01 : 24 为 HLA-C 的相关研究及中华骨髓库建立 HLA 高分辨数据库都提供了有效依据。至于 C * 07 : 63 及 C * 01 : 24 等位基因频率是否会大于 1/50 000,并与相关科学研究发生关联,还需要 HLA-C 基因高分辨入库数据数量的逐渐提高^[10],才能进行进一步的验证。

参考文献

[1] Colonna M, Brooks EG, Ferrara GB, et al. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C[J]. Science, 1993, 260(5111) : 1121-1124.
 [1] Colonna M, Brooks EG, Falco M, et al. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C[J]. Science, 1993, 260(5111) : 1121-1124.
 [2] Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, et al. Association of HLA-C disparity with graft failure after marrow transplantation from unrelated donors[J]. Blood, 1997, 89(5) : 1818-1823.
 [3] Ferrara GB, Bacigalupo A, Lamparelli T, et al. Bone marrow transplantation from unrelated donors; the impact of mismatches with substitutions at position 116 of the human leukocyte antigen

class I heavy chain[J]. Blood, 2001, 98(10) : 3150-3155.
 [4] Chalandon Y, Tiercy JM, Schanz U, et al. Impact of high-resolution matching in allogeneic unrelated donor stem cell transplantation in Switzerland[J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 37(10) : 909-916.
 [5] Loiseau P, Busson M, Balere ML, et al. HLA association with hematopoietic stem cell transplantation outcome; the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2007, 13(8) : 965-974.
 [6] Petersdorf EW, Anasetti C. Tissue typing in support of unrelated hematopoietic cell transplantation[J]. Tissue Antigens, 2003, 61(1) : 1-11.
 [7] Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation[J]. Blood, 2007, 110(13) : 4576-4583.
 [8] Moya-Quiles MR, Alvarez R, Miras M, et al. Impact of recipient HLA-C in liver transplant; a protective effect of HLA-Cw * 07 on acute rejection[J]. Hum Immunol, 2007, 68(1) : 51-58.
 [9] Irish Schizophrenia Genomics Consortium and the Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genome-wide Association Study Implicates HLA-C * 01:02 as a Risk Factor at the Major Histocompatibility Complex Locus in Schizophrenia Genome-wide association study implicates HLA-C * 01:02 as a risk factor at the major histocompatibility complex locus in schizophrenia[J]. Biol Psychiatry, 2012, 72(8) : 620-628.
 [10] Cano P, Klitz W, Mack SJ, et al. Common and well-documented HLA alleles; report of the Ad-Hoc committee of the American society for histocompatibility and immunogenetics [J]. Hum Immunol, 2007, 68(5) : 392-417.

(收稿日期:2012-08-28)

(上接第 518 页)

作为捕获抗原的的则获得了很好的检测效果,在血清稀释 80 倍后仍能很好的检测到类鼻疽伯克霍尔德氏菌的鞭毛抗体。

有台湾的研究者克隆并表达 *B. pseudomallei* 鞭毛基因用于对患者的血清检测,结果得到了 93.8% 的敏感度和 96.3% 的特异度,从而证明了鞭毛是 *B. pseudomallei* 的一个非常特异的抗原^[13]。本研究用 *B. pseudomallei* 的鞭毛抗原作为检测抗原来检测血清中的 *B. pseudomallei* 抗体,并应用于 ELISA 试剂盒的研制中,获得了很好的检测结果。

本试剂盒的研制是为了用于出入境人员类鼻疽的筛查,检测的标本为人血清标本。由于本实验室不能获得人类鼻疽的病例材料,所以用新西兰大白兔作为模式动物,人为感染的兔血清作为检测样品,进行了本检测方法的研制,若要实际应用于人血清标本的检测还有待于进一步的研究。

参考文献

[1] 陈光远,曾夏杏,冯欣,等. 广东省雷州半岛地区类鼻疽病流行的调查[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(5) : 390.
 [2] 莫成锦,谷海瀛,王旭明,等. 类鼻疽病血清学调查[J]. 中国卫生工程学, 2002, 1(4) : 230.
 [3] Yang S. Melioidosis research in China[J]. Acta Trop, 2000, 77(2) : 157-165.
 [4] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13) : 1315-1317.

[5] Brent AJ, Matthews PC, Dance DA, et al. Misdiagnosing melioidosis[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(2) : 349-351.
 [6] 佟世德. 类鼻疽快速诊断的研究[J]. 中国兽医学报, 1996, 16(4) : 346-349.
 [7] 陈光远,曾夏杏. 类鼻疽病快速诊断的临床应用[J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(4) : 42-43.
 [8] 方瑶,顾江,王海光,等. 抗类鼻疽伯克霍尔德菌多抗血清的制备及评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(3) : 292-294, 296.
 [9] 陈金堂,程宏宇,莫成锦. 类鼻疽病误诊肺结核病 6 例分析[J]. 山东医药, 2009, 49(41) : 103-104.
 [10] Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, et al. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella[J]. Nature, 2010, 467(7314) : 426-429.
 [11] Wuthiekanun V, Desakorn V, Wongsuvan G, et al. Rapid immunofluorescence microscopy for diagnosis of melioidosis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(4) : 555-556.
 [12] Thepthai C, Smiththikarn S, Suksuwan M, et al. Serodiagnosis of melioidosis by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using a lipopolysaccharide-specific monoclonal antibody[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2005, 23(2-3) : 127-132.
 [13] Chen YS, Shiuan D, Chen SC, et al. Recombinant truncated flagellin of Burkholderia pseudomallei as a molecular probe for diagnosis of melioidosis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(3) : 423-425.

(收稿日期:2012-12-09)