

• 临床检验研究论著 •

序列特异引物聚合酶链反应在 HLA-B27 检测中的应用*

杨 菁,富显果,唐宝佳,曹罗元,黄宝英[△]

(福建医科大学附属宁德市医院细胞分子生物学实验室,福建宁德 352100)

摘 要:**目的** 探讨序列特异引物聚合酶链反应(PCR-SSP)方法在人类白细胞抗原 B27 检测中的应用。**方法** 对经流式细胞术分析定型的 279 例疑似强直性脊柱炎患者样本采用 PCR-SSP 法检测 HLA-B27 的表达。以流式细胞术检测结果为判断标准,对结果不一致样本,进一步应用 PCR-直接测序法进行 B27 测序分析。**结果** 与流式细胞术结果相比,只有 1 例结果不一致。经测序分析,其碱基序列与 PCR-SSP 法特异性引物 3' 末端错配;且发现该样本序列存在多个杂合碱基,经与 HLA-B27 等位基因数据库比对,该杂合序列与最相近 B*2733 亚型存在 2 个碱基差异。**结论** PCR-SSP 法可适用于 HLA-B27 的临床检测。

关键词:HLA-B27 抗原; 聚合酶链反应; 序列分析,DNA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.006 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)13-1645-02

Application of polymerase chain reaction using sequence-specific primers in detection of HLA-B27*

Yang Jing, Fu Xianguo, Tang Baojia, Cao Luoyuan, Huang Baoying[△]

(Laboratory of Cell and Molecular Biology, Ningde Municipal Hospital,
Fujian Medical University, Ningde, Fujian 352100, China)

Abstract:**Objective** To investigate the effect of polymerase chain reaction using sequence-specific primers (PCR-SSP) in detecting Human leukocyte antigen B27 (HLA-B27). **Methods** Peripheral blood samples from 279 cases of suspected patients with ankylosing spondylitis (AS) were collected, which had been identified by flow cytometry (FCM). Genomic DNA was analyzed by PCR-SSP. Comparing with the results of flow cytometry, the discrepancies were then analyzed by the sequence-based typing method. **Results** Except for one sample, the results of PCR-SSP were in agreement with flow cytometry. The sequencing results of the discrepancy showed its nucleotide sequence mismatch with the 3' end of the specific primer and several heterozygous nucleotides in exon 2 and 3. In alignment with HLA Alleles database, there are 2 nucleotide changes from B*2733 in heterozygous sequences. **Conclusion** The PCR-SSP technique is applicable for the clinical detection of HLA-B27.

Key words:HLA-B27 antigen; polymerase chain reaction; sequence analysis,DNA

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种以骶髋关节及中轴关节病变为主要特征的自身免疫性疾病。诊断主要建立在影像学检查基础上,缺乏早期实验室特异性诊断指标。现已证实 HLA-B27 与 AS 的发病密切相关,AS 患者的 HLA-B27 的阳性率高达 96% 以上,并有明显家族聚集倾向,而正常人群的 HLA-B27 阳性率则为 4%~7%^[1]。对疑似 AS 患者进行 HLA-B27 检测已成为临床重要的辅助诊断手段。本文应用序列特异引物聚合酶链反应(polymerase chain reaction using sequence-specific primers, PCR-SSP)方法检测人类白细胞抗原 B27 的表达情况,并对与流式细胞术检测不一致结果应用 PCR-直接测序法(sequence-based typing method, SBT)分别扩增该样本的 B*27 基因的外显子 2 和 3,且进行测序分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集从 2009 年 9 至 2012 年 3 月间来本院就诊的 279 例临床疑似 AS 患者,男 188 例,女 91 例,抽取 EDTA 抗凝外周血 2 mL。所有样本经流式细胞仪分析定型,其中 HLA-B27 阳性样本 256 例,阴性样本 23 例。

1.2 主要试剂与仪器 2720 型 PCR 热循环仪(美国 ABI 公司),全血 DNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司),DNA 胶回收

试剂盒和 DNA 分子量标准(上海生工生物工程有限公司)Taq 酶(日本 TaKaRa 公司)。

1.3 引物设计 HLA-B27 序列特异引物参照文献^[2],针对 B27 基因外显子 3 位点特异性序列设计,上游引物为 5'-GGG TCT CAC ACC CTC CAG AAT-3',下游引物为 5'-CGG CGG TCC AGG AGC T-3',PCR 扩增产物为 135 bp。内参为 β-珠蛋白基因特异性引物,上游引物为 5'-CTC AGG AGT CAG ATG CAC CA-3',下游引物为 5'-ACT CCT AAG CCA GTG CCA GA-3',PCR 扩增产物为 234 bp。HLA-B27 PCR-SBT 法扩增及测序引物参照文献^[3],见表 1。所有引物序列均由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 HLA-B27 外显子 2 和 3 扩增和测序引物

片段名	引物名	引物序列(5'→3')	预期长度 (bp)
Exon2	E2F	GGGAGGAGCGAGGGGACCGCAG	530
	E2R	ACTGAAAATGAAACCGGGTAAAC	
	测序引物 SF1	GCTCCCACTCCATGA	

* 基金项目:福建省宁德市科技计划资助项目(20100133)。 作者简介:杨菁,女,检验技师,主要从事检验基础研究。 [△] 通讯作者, E-mail:doctor_hby@yahoo.com.cn。

续表 1 HLA-B27 外显子 2 和 3 扩增和测序引物

片段名	引物名	引物序列(5'→3')	预期长度 (bp)
Exon3	E3F	TACCCGGTTTCATTTTCAGTTG	432
	E3R	GGAGGCCATCCCCGGCGACCTAT	
	测序引物 SF2	GGGCTGACCGCGGGG	

1.4 方法

1.4.1 基因组 DNA 的提取 使用 OMEGA 公司血液 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,具体步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.4.2 PCR-SSP 法检测 HLA-B27 表达 在 25 μL PCR 反应体系中,基因组 DNA 100 ng,引物各 20 pmol,4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L,2.5 U rTaq 酶。94 ℃ 预变性 5 min 后,按下列参数:94 ℃ 1 min,62 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 30 个循环,最后一个循环 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像仪上成像。所有反应均在 ABI 2720 型 PCR 扩增仪进行。

1.5 HLA-B27 基因外显子 2,3 测序分析 针对发现的结果不一致样本,分别采用等位基因特异性引物扩增 HLA-B27 基因第 2,3 外显子。在 50 μL PCR 反应体系中,基因组 DNA 100 ng,引物各 20 pmol,4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L,2.5 U rTaq 酶。96 ℃ 预变性 2 min 后,按下列参数:94 ℃ 30 s,63 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共 30 个循环,最后一个循环 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经胶回收并送上海生工生物工程有限公司进行测序,测序引物见表 1。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 11.5 软件对数据进行 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 PCR-SSP 法扩增产物分析 对流式细胞仪分析的 279 份样本 HLA-B27 基因进行 PCR 扩增。HLA-B27 阳性样本可以同时扩增出 135 bp 和 234 bp 两个片段;而 HLA-B27 阴性样本只能扩增出 234 bp 一个片段(图 1)。与流式细胞仪检测结果相对比:278 例 B27 结果完全相同;1 例结果不一致,流式细胞术检测阳性,而 PCR 扩增为阴性,两者经 χ^2 检验无统计学意义($P>0.05$)。

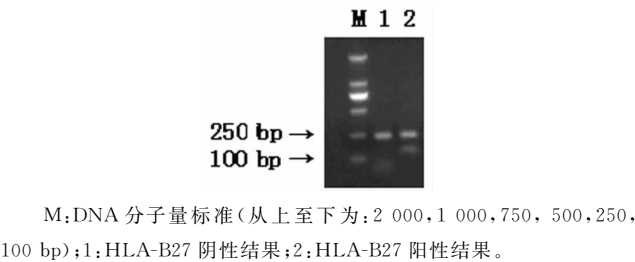


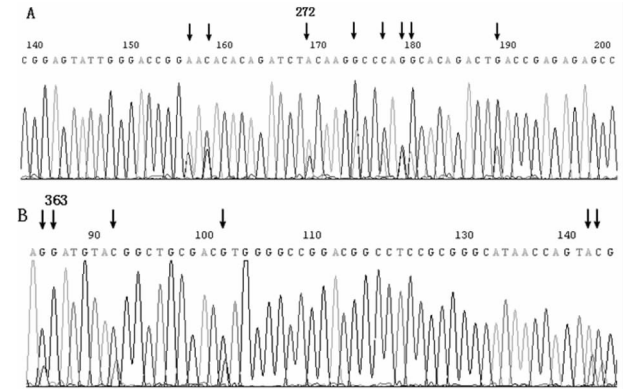
图 1 HLA-B27 PCR 扩增产物电泳图

2.2 HLA-B27 基因测序分析 对上述 1 例结果不致样本进行 HLA-B27 基因第 2,3 外显子等位基因特异性扩增及测序分析。测序结果经 OMEGA 软件比对,该样本碱基序列与 PCR-SSP 法 HLA-B27 基因扩增上游引物序列 3' 末端两个碱基错配,提示该样本无法扩增出目的片段,与 2.1 结果相符。(图 2)同时,测序发现该样本序列存在多个杂合碱基,与 IMGA/HLA Database Release 3.9.0 HLA-B27 等位基因序列相

比对,其中一杂合序列与最相近 HLA-B*2733 亚型存在 2 个碱基差异(272A>G,363C>G),见图 3。



图 2 HLA-B27 基因与引物序列的比对



A:外显子 2 杂合碱基序列;B:外显子 3 杂合碱基序列。其中箭头指示部分杂合碱基位置,带数字的箭头表示与最相近 HLA-B*2733 序列不同的两个碱基。

图 3 HLA-B27 基因杂合测序结果

3 讨 论

HLA-B27 抗原与 AS 具有强相关性,HLA-B27 阳性在 AS 诊断中具有较高的价值。目前,HLA-B27 检测方法主要有流式细胞术、微量淋巴细胞毒法和 PCR-SSP 法。流式细胞术检测 HLA-B27 已在各大型医院使用,但其缺点是需要昂贵的仪器和试剂,且需要新鲜的样本,不利其推广应用及重复检测。而 PCR-SSP 法与其他 HLA-B27 检测方法相比,它对样本的要求不高,血样及提取的 DNA 可长期保存,便于重复检测;而且加入内对照引物,降低了假阳性和假阴性结果的发生,使检测结果更可靠,重复性更好。在本研究中,对流式细胞术分析定型的 279 例疑似 AS 患者样本应用 PCR-SSP 法进行检测 HLA-B27,结果只有 1 例不相符,说明 PCR-SSP 法与流式细胞术有较高的一致性。

PCR-SSP 法的基本原理是 PCR 扩增时引物是否能延伸,主要取决于引物 3' 端的 1~2 个碱基是否与模板配对,若不配对则引物不能延伸,因而设计适当的等位基因特异性引物,即可区分不同的 HLA-B27 亚型^[1,4]。本研究中,PCR-SSP 法检测到的一例不相符样本,经 PCR-直接测序分析 B27 基因外显子 2 和 3,该样本序列确因与所采用的 B27 特异性上游引物 3' 端序列存在两个错配碱基,因而引物无法延伸,未能扩增出目的片段。

目前,依据 IMGA/HLA Database Release 3.9.0 HLA-B27 等位基因数据库^[5],HLA-B27 亚型的数目已由 1994 年的 7 个增加到现在的 92 个。因此,面对快速增加的新的 HLA-B27 等位基因,应用单一 PCR-SSP 法进行 HLA-B27 检测有一定的局限性。为应对日益复杂的 HLA 多态性序列,有学者采用多对等位基因特异性引物的 PCR 方法来检测 HLA-B27 基因,并用 PCR-直接测序法鉴定新的等位基因。^[6-7]针对本研究中的不相符样本,直接测序还显示该样本 B27 基因外显子 2 和 3 序列存在多个杂合碱基,经与 IMGA/HLA Database Release 3.9.0 HLA-B27 等位基因序列比对,其(下转第 1648 页)

表 2 22 株鲍氏不动杆菌对常用抗菌素药物的药敏率						
抗菌药物	耐药		中介		敏感	
	株数 (n)	耐药率 (%)	株数 (n)	中介率 (%)	株数 (n)	敏感率 (%)
头孢他啶	22	100.0	0	0.0	0	0.0
环丙沙星	22	100.0	0	0.0	0	0.0
亚胺培南	11	50.0	7	31.8	4	18.2
庆大霉素	22	100.0	0	0.0	0	0.0
阿米卡星	22	100.0	0	0.0	0	0.0
头孢吡肟	22	100.0	0	0.0	0	0.0
头孢噻肟	22	100.0	0	0.0	0	0.0
头孢哌酮/舒巴坦	12	54.6	7	31.8	3	13.5
磺胺甲唑/甲氧苄啶	22	100.0	0	0.0	0	0.0
美罗培南	9	40.9	8	40.9	5	22.7

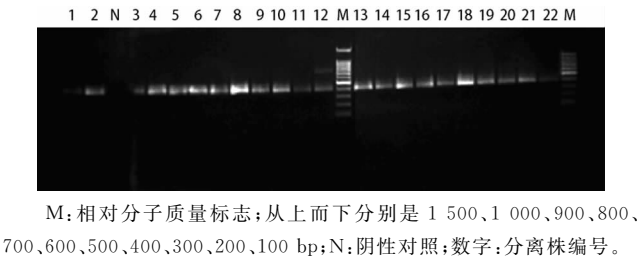


图 1 PDR-Ab 携带的 AAC(6)-Ib 基因的琼脂糖凝胶电泳图谱

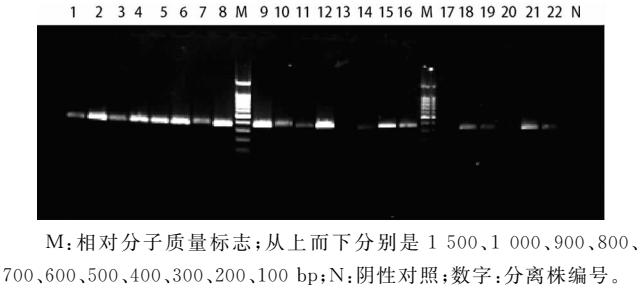


图 2 PDR-Ab 携带的 AAC(3)-Ia 基因的琼脂糖凝胶电泳图谱

(上接第 1646 页)

中一条杂合序列与最相近 HLA-B * 2733 亚型存在 2 个碱基差异,但具体的杂合型别还有待进一步研究。

总之,应用 PCR-SSP 法进行 HLA-B27 检测,虽然面对新增加的 HLA-B27 基因具有一定的局限性,但较其他 HLA-B27 检测方法,具有样本要求低、检测效率等优点,故可适用于 HLA-B27 的临床检测需要。

参考文献

[1] Liu Y, Li J, Chen B, et al. Familial aggregation of ankylosing spondylitis in Southern China[J]. J Rheumatol, 2001, 28(3): 550-553.

[2] Dominguez O, Coto E, Martinez-Naves E, et al. Molecular typing of HLA-B27 alleles[J]. Immunogenetics, 1992, 36(5): 277-282.

[3] Voorter CE, van der Vlies SA, van den Berg-Loonen EM. Se-

quence-based typing of HLA-B; the B7 cross-reacting group[J]. Tissue Antigens, 2000, 56(4): 356-362.

[4] Lucotte G, Burckel A. DNA typing of HLA-B27 by polymerase chain reaction[J]. Mol Cell Probes, 1997, 11(4): 313-315.

[5] Robinson J, Mistry K, McWilliam H, et al. The IMGT/HLA database[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39 (Database issue): D1171-1176.

[6] Voorter CE, Swelsen WT, van den Berg-Loonen EM. B * 27 in molecular diagnostics: impact of new alleles and polymorphism outside exons 2 and 3[J]. Tissue Antigens, 2002, 60(1): 25-35.

[7] 曾洋, 谭诗梦, 冯斌, 等. PCR-SSP 法检测 29 种 HLA-B27 基因亚型[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(5): 303-305.

3 讨 论

氨基糖苷类药物因抗菌谱广、疗效显著,在临床医学和畜牧兽医业得到广泛应用,因此研究氨基糖苷类修饰酶基因是否是本院鲍氏不动杆菌对氨基糖苷类的耐药主要机制,对了解鲍氏不动杆菌的耐药现象具有一定的可行性。22 株 MDRAB 对阿米卡星、庆大霉素等氨基糖苷类药物不敏感,不敏感率达到 100%。研究表明,携带氨基糖苷类修饰酶耐药基因是导致本组多药耐药鲍氏不动杆菌是氨基糖苷类抗生素耐药重要机制。氨基糖苷类修饰酶按功能可分成乙酰转移酶、磷酸转移酶、核苷转移酶 3 大类,其中前者最常见^[2]。实验结果显示, AAC(6)-Ib、AAC(3)-Ia 氨基糖苷类修饰酶编码基因携带率分别为 100%、86.3%,且 22 株 MDRAB 却对两类氨基糖苷类药物全部耐药,这说明本组 MDRAB 对氨基糖苷类药物的全耐药与携带 AAC(3)-Ia、AAC(6)-Ib 修饰酶基因相关。其中 AAC(3)-Ia、AAC(6)-Ib 两种基因已在本组 MDRAB 中流行^[3]。

参考文献

[1] 肖慈然, 邹玖明, 杨燕, 等. OXA-23 酶基因在多药耐药鲍氏不动杆菌的流行研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(4): 671-672.

[2] 刘丁, 陈萍, 等. 多重 PCR 检测鲍曼不动杆菌氨基糖苷乙酰转移酶相关基因[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(23): 2320-2322.

[3] 张强, 陆炜方, 朱晓珏. 多药耐药鲍氏不动杆菌中氨基糖苷类修饰酶基因的分析研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(22): 4655-4656.

(收稿日期: 2013-01-25)

(收稿日期: 2012-11-24)