

• 论 著 •

1 种人类血小板抗原 1~17 及 Cab 等位基因全血直接检测方法的建立*

张肄鹏¹, 黄志平¹, 聂冬梅², 郑望春³, 刘卫东¹

(1. 广东省深圳市龙华区中心医院检验科 518110; 2. 广东省深圳市血液中心检验科 518172;

3. 广东省深圳市龙岗区中心血站检验科 518035)

摘要:目的 结合靶序列富集多重聚合酶链反应(TEM-PCR)、荧光探针溶解曲线 SNP 分型和血液直接 PCR 技术,建立一种方便、准确的人类血小板抗原(HPA)等位基因分型方法。方法 TEM-PCR 方法设计 HPA1~17、Cab 这 18 种 HPA 亚型等位基因的引物及荧光探针,使用血液直接 PCR 酶同时扩增血液标本中的 18 个等位基因目标片段,并利用荧光探针的溶解温度变化区分不同 SNP 位点。结果 TEM-PCR 可同时扩增 18 个等位基因的目标片段,并通过溶解峰的 T_m 值变化区分 SNP 位点,结果与序列特异性引物聚合酶链反应位点相比较有相同的准确度,且操作更为简便,无需提取血液基因组 DNA,无 PCR 后续电泳步骤,减少污染风险。结论 成功建立了 1 种基于 TEM-PCR、血液直接 PCR 和荧光探针溶解曲线分析技术检测 HPA1~17、Cab 等位基因。

关键词:人类血小板抗原; Cab; 亚型; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.14.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)14-1895-04

Establishment of a direct detection method for human platelet antigen1-17, Cab allele whole blood*

ZHANG Yipeng¹, HUANG Zhiping¹, NIE Dongmei², ZHENG Wangchun³, LIU Weidong¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Longhua District Central Hospital, Shenzhen,

Guangdong 518110, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen City Blood Center,

Shenzhen, Guangdong 518172, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Central Blood

Station of Longgang District, Shenzhen, Guangdong 518035, China)

Abstract: **Objective** To establish an accurate and convenient method to distinguish human platelet antigen(HPA) SNPs based on Target Enriched Multiplex-PCR(TEM-PCR), fluorescent probe melting curve analysis and blood direct PCR. **Methods** Design TEM-PCR primers and probes of HPA1-17, Cab alleles, amplify target sequences of all 18 alleles by blood direct PCR and distinguish different SNPs by melting curve of probes. **Results** The TEM-PCR could amplify all target sequences of 18 alleles and the melting curve analysis could distinguish those SNPs, the accuracy was equal to PCR-SSP method and the process was more convenient without blood genomic DNA extraction and subsequent gel electrophoresis thus decrease the cross-contamination risk. **Conclusion** Successfully established a HPA1-17, Cab alleles distinguishing method based on TEM-PCR, blood direct PCR and fluorescent probe melting curve analysis technique.

Key words: human platelet antigen; Cab; subtype; polymerase chain reaction

人类血小板抗原(HPA)是由血小板糖蛋白携带的一类特异性抗原,由血小板特有的抗原决定簇组成,HPA 不匹配可引起血小板同种免疫反应,产生血小板同种抗体,导致同种免疫性血小板减少,诱发输血后血小板减少性紫癜(PTP)、血小板输注无效(PTR)及新生儿同种免疫血小板减少性紫癜(NAITP)、移植排斥等疾病。因此,临床输血需要准确检测和鉴定 HPA^[1-3]。以往临床常用血清学方法鉴定 HPA 亚型,但各亚型血清往往难以全部获得,造成临床使用不便。随着分子生物学技术的发展,临床转而使用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)、序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)等方法鉴定 HPA 亚型,但这些方法大多存在检测时间长、容易污染的缺点,不能很好满足临床检验的要求。本研究拟建立一套基于靶序列富集多重聚合酶链反应(TEM-PCR)、血液直接 PCR 和荧光探针溶解曲线分析技术,以便准确、方便、快速地检测 HPA1~17、Cab 这 18 种 HPA 等位基因位点

的情况,该方法无需提取血液标本基因组 DNA,敏感性及特异性强,操作简单快速,无交叉污染风险等优点,可弥补目前临床 HPA 检测技术的不足。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2016 年 1-12 月深圳市血液中心献血标本 200 份,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, -20℃ 保存。

1.2 仪器与试剂 PCR 引物及荧光探针由上海生工合成,其他试剂包括 PCR-SSP 分型检测试剂盒(天津秀鹏),Blood-Direct PCR 试剂盒(成都福际),荧光定量 PCR 仪(上海宏石 SLAN 96p),HPA1~17 及 Cab 各亚型质粒标准品由本实验室自行制备。

1.3 方法

1.3.1 引物及探针 根据 HPA 各亚型基因组序列,使用 AlleleID 6.0 软件设计 TEM-PCR 引物及探针,每个 SNP 位点各占用一个荧光通道,共分为 5 组反应管,见表 1。

* 基金项目:2014 年度深圳市科技研发资金基础研究项目(JCYJ20140415091921388)。

作者简介:张肄鹏,男,副主任技师,主要从事临床检验方面研究。

1.3.2 PCR 实验流程 (1)反应体系为:12.5 μ L 2X Blood-Direct PCR Mix,1 μ L 全血,5 μ L 引物探针 Mix(各亚型的 Fo、Fi、Ro、Ri 引物各 100 nmol/L,对应的荧光探针各 150 μ mol/L,通用 Fs 引物 50 μ mol/L,Rs 引物 500 μ mol/L),补 ddH₂O 至 25 μ L。(2)反应条件为:第一阶段 95 $^{\circ}$ C 3 min,第二阶段 95 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 10 个循环,第三阶段 95 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 90 s。共 10 个循环,第四阶段 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s。共 30 个循环。PCR 反应完成后进行溶解曲线分析:95 $^{\circ}$ C 变性 3 min,然后 35~85 $^{\circ}$ C 溶解曲线分析,检测通道为 FAM、ROX、HEX、CY5,SLAN 全自动医用 PCR 分析系统自动判读溶解曲线峰温度,噪音阈值设为 10。

1.3.3 溶解峰检测 取 10⁴ copies HPA1~17,Cab 各亚型 a/b 混合标准品质粒作为模版进行实验,实验条件同 1.3.2,观测荧光探针在结合不同亚型 SNP 位点时的溶解峰 T_m 值变化。

1.3.4 灵敏度实验 取 10~10⁶ copies 各亚型 a/b 混合标准品质粒作为模版进行敏感度实验,实验条件同 1.3.2,研究本实验方法的检测灵敏度。

1.3.5 HPA 分型对照实验 用 HPA 分型试剂盒(PCR-SSP)对提取的核酸进行检测,操作方法及判读标准均按照试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件分析溶解曲线方法和 PCR-SSP 方法的差异,使用交叉表检验计算 *Kappa* 值。

2 结 果

2.1 溶解峰检测结果 以 HPA1~17、Cab 各亚型标准品 a/b 型质粒各 10⁴ copies 混合作为模版进行实验,可见不同亚型 a/b 型的溶解峰 T_m 值差异在 5 $^{\circ}$ C 左右,可根据软件判读的溶解

峰温度分辨不同亚型的 aa、ab、bb 3 种基因型,见图 1。

表 1 HPA 各亚型基因分布、突变位点、反应管编号及荧光探针通道

HPA 亚型	基因名称	突变位点	荧光通道	反应管编号
1	ITGB3	176T>C	FAM	3
2	GP1BA	482C>T	ROX	1
3	ITGA2B	2621T>G	CY5	2
4	ITGB3	506G>A	HEX	3
5	ITGA2	1600G>A	CY5	1
6	ITGB3	1544G>A	HEX	4
7	ITGB3	1297C>G	ROX	4
8	ITGB3	1984C>T	HEX	4
9	ITGA2B	2602G>A 2621T>G	HEX	2
10	ITGB3	263G>A	ROX	3
11	ITGB3	1976G>A	ROX	5
12	GP1BB	119G>A	HEX	1
13	ITGA2	2483C>T 2484A>G	FAM	2
14	ITGB3	1909 del AAG	FAM	4
15	CD109	2108C>A	FAM	1
16	ITGB3	497C>T	FAM	5
17	ITGB3	662C>T	CY5	3
Cab	ITGA2	2235G>T	ROX	2

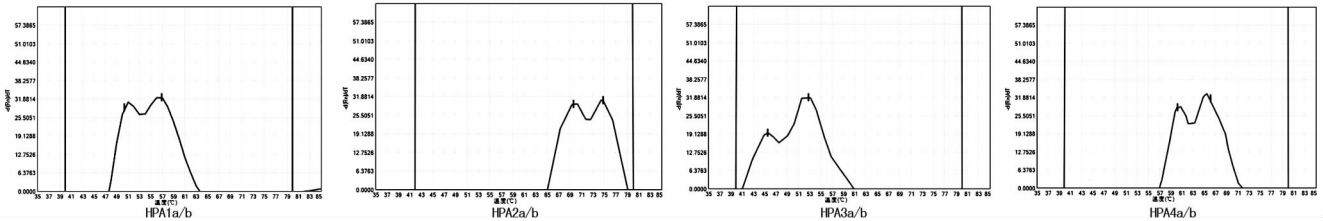


图 1 HPA1~4 亚型的 a/b 质粒标准品各 10⁴ copies 混合模板实验溶解曲线图

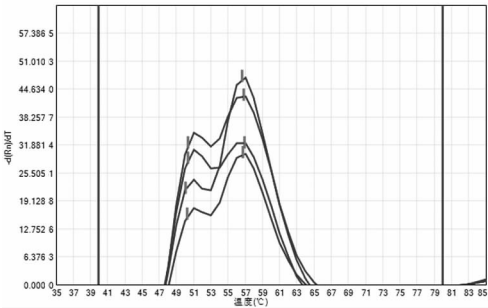
表 2 溶解曲线法、PCR-SSP 法检测 200 份临床标本结果对比(n)

基因型	aa 荧光探针	aaPCR-SSP	ab 荧光探针	abPCR-SSP	bb 荧光探针	bbPCR-SSP	<i>Kappa</i>
1	195	195	5	5	0	0	1
2	182	182	18	18	0	0	1
3	102	102	82	82	16	16	1
4	199	199	0	0	1	1	1
5	197	197	1	1	2	2	1
6	186	186	10	10	4	4	1
7	200	200	0	0	0	0	1
8	200	200	0	0	0	0	1
9	200	200	0	0	0	0	1
10	200	200	0	0	0	0	1
11	200	200	0	0	0	0	1
12	200	200	0	0	0	0	1

续表 2 溶解曲线法、PCR-SSP 法检测 200 份临床标本结果对比 (n)

基因型	aa 荧光探针	aaPCR-SSP	ab 荧光探针	abPCR-SSP	bb 荧光探针	bbPCR-SSP	Kappa
13	200	200	0	0	0	0	1
14	200	200	0	0	0	0	1
15	55	55	95	95	50	50	1
16	200	200	0	0	0	0	1
17	200	200	0	0	0	0	1
Cab	200	200	0	0	0	0	1

2.2 灵敏度实验结果 取 10~10⁶ copies 不同浓度 a/b 混合标准品质粒为模版进行敏感度实验,当质粒浓度大于或等于 10³ copies/μL 时可见明显的溶解峰,随着质粒浓度上升峰的高度也有所增加,但当质粒浓度为 10 copies/μL 和 10² copies/μL 时,没有溶解峰出现,见图 2。



注:按溶解峰高度从上至下依次为 10⁶、10⁵、10⁴、10³ copies 浓度模板,10²、10 copies 未出现明显溶解峰。

图 2 HPA 1 亚型 a/b 质粒标准品混合模版溶解曲线结果

2.3 溶解曲线法与 PCR-SSP 法的 HPA 分型结果对比 在 200 份临床标本检测中溶解曲线法与 PCR-SSP 法结果完全一致,见表 2。

3 讨论

近年来,随着临床用血量的日益增加,血小板输注无效已成为困扰临床的一大难题。据文献报道,血小板输注无效 20%~30% 为免疫因素^[4],同时 HPA 不匹配可引起血小板同种免疫反应,产生血小板同种抗体,导致同种免疫性血小板减少,还可诱发如 NAITP、PTP 等疾病,在临床移植中还会引起移植排斥等相关疾病。准确检测和鉴定 HPA 对于临床医学和输血实践具有重要意义^[5]。目前血站常用的 PCR-SSP 法操作繁琐、费时,不仅要提取每份标本的血液基因组 DNA,而且针对每个等位基因位点都要进行一次 PCR 反应,并进行琼脂糖凝胶电泳观测结果,不利于高通量快速检测标本的需要^[6]。

荧光探针溶解曲线分析技术通过荧光探针结合序列变化所造成的溶解曲线 Tm 值变化来分辨不同的 SNP 位点。这种方法通过不同荧光通道和不同荧光探针组合,可在一管反应内同时检测多个 SNP 位点,甚至发现不常见的 SNP 变异^[7-8]。在突变型地中海贫血、HPV 亚型检测等方面已得到良好应用并进入临床使用^[9-10]。本实验室之前研究中利用这项技术已开发出分辨 HPA1~5、15 亚型的检测方法,准确率与 PCR-SSP 方法相同^[11]。

为进一步优化 HPA 亚型检测方法,本研究尝试省略临床标本的基因组 DNA 提取环节,直接以全血作为模板进行分型

检测。传统 PCR 反应中的 Taq 酶因为无法克服血液中各种抑制因子的干扰作用,无法直接对全血标本进行扩增,因此必须增加血液基因组 DNA 提取步骤以纯化标本 DNA。而 Thermo 等公司近年推出的 Blood-Direct PCR 试剂盒通过生物工程改造技术,使 Taq 酶可以耐受 40% 体积全血的干扰而进行扩增,从而节省了 DNA 提取环节,大大减轻了临床工作量^[12]。本研究使用的成都福际公司的血液直接扩增 PCR 试剂盒可以直接将全血标本作为模板进行扩增,扩增效率与之前研究中使用的 Multiplex PCR Mastermix 扩增纯化后的 DNA 模板相比更强,但 Blood-Direct PCR 试剂盒对多重 PCR 优化不足,导致 HPA6 个亚型之间的扩增效率不一,部分亚型目标序列得不到有效扩增,无法进行检测,为此本研究引入 TEM-PCR 技术以改善多重 PCR 扩增能力。TEM-PCR 是一种多重 PCR 引物设计技术,最早用于多重病原体的检测^[13],该技术针对每个扩增片段设计 2 对低浓度的巢式特异性引物 Fo、Ro、Fi、Ri 进行富集,然后用高浓度的通用引物 Fs 和 Rs 进行扩增,可有效避免传统多重 PCR 中各引物扩增效率不均一的问题(图 3),使多个待检测位点均能得到有效扩增。本研究通过使用 TEM-PCR 方法设计引物取代之前的多重 PCR 引物,使 18 个 HPA 亚型的目标区域都能得到有效扩增,实现在 5 管反应中同时检测 18 种 HPA 亚型的 SNP 基因型。

参考文献

[1] Boehlen F, Bulla O, Michel M, et al. HPA-genotyping and antiplatelet antibodies in female blood donors[J]. Hematol J, 2003, 4(6): 441-444.

[2] Hurd CM, Cavanagh G, Schuh A, et al. Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms [J]. Vox Sanguinis, 2002, 83(1): 1-12.

[3] Rozman P. The role of human platelet alloantigens(HPA) in blood transfusion and transplantation[J]. Trans Immun, 2002, 10(2/3): 165-181.

[4] Petz LD, Garratty G, Calhoun L, et al. Selecting donors of platelets for refractory patients on the basis of HLA antibody specificity [J]. Transfusion, 2000, 40 (12): 1446-1456.

[5] 王清, 旷开其, 徐朝霞, 等. HPA 基因分型与配型在临床的应用[J]. 吉林医学, 2016, 37(3): 524-526.

[6] Jones DC, Bunce M, Fuggle SV, et al. Human platelet al-loantigens(HPAs): PCR-SSP genotyping(下转第 1900 页)

着重要作用,有效地控制可以降低 ICS 的发生。

研究表明 ICS 组 Hcy、hs-CRP、Lp-PLA2 水平及阳性率明显高于对照组,证实三者作为炎性指标,在 ICS 的发病中起到一定作用。而且三者的水平及阳性率处于较高水平,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),说明 ICS 疾病的发生与 Hcy、hs-CRP、Lp-PLA2 水平有关,且阳性率较高,可作为传统危险因素的有力补充。三者作为 ICS 诊断及病情评估的指标,有助于临床医生合理评估病情、合理诊疗,同时在高危人群的筛选方面也起到重要作用。

本研究同时进行了 ROC 曲线分析,结果显示联合检测血浆 Hcy、hs-CRP、Lp-PLA2 水平对诊断 ICS 的 AUC、灵敏度、特异度均高于 3 项指标单独检测,提示联合检测 3 项指标可提高其对 ICS 的诊断价值,在提高特异性的同时,增加了灵敏度,更加有利于临床进行及时有效的预防、治疗。但 ICS 的发病机制复杂,三者之间的联系及作用机制尚需大数据的进一步探讨研究。

综上所述,ICS 患者血浆 Hcy、hs-CRP、Lp-PLA2 水平及阳性率均升高,三者的联合检测更能提高对 ICS 的早期诊断价值,尽早治疗,改善预后。

参考文献

[1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国缺血性脑卒中风险评估量表使用专家共识[J]. 中华神经科杂志,2016,49(7):519-525.

[2] Kruse S, Mao Q, Heinzmann A, et al. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasmatc PAF-acetylhydrolase impair catalytical activities and are associated with atopy and asthma[J]. Am J Hum Genet, 2000, 66(5):1522-1530.

[3] Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(8):1646-1654.

[4] Zhou J, Austin C. Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: Causal relationship and potential mech-

anisms[J]. Biofactors, 2009, 35(2):120-129.

[5] 李萍珠,徐炜新,徐晓萍,等. 脑卒中患者血同型半胱氨酸、叶酸及维生素 B12 水平的分析[J]. 检验医学, 2009, 24(11):838-840.

[6] 杨怀芹,李娜. 高同型半胱氨酸血症与脑卒中的关系及临床意义(附 106 例临床观察)[J]. 中国全科医学, 2005, 8(3):236-237.

[7] 姚涛,任明山,李淮玉. 缺血性脑卒中急性期超敏 C-反应蛋白水平变化与进展性卒中的相关性[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(5):735-738.

[8] 王爱民,周颖,肖波,等. 脑梗死患者血清高敏 C 反应蛋白水平的变化及其临床意义[J]. 临床神经病学杂志, 2005, 18(2):153-154.

[9] Sertic J, Skoric B, Lovric J, et al. Does Lp-PLA2 determination help predict atherosclerosis and cardiocerebrovascular disease? [J]. Acta Med Croatica, 2010, 64(4):237-245.

[10] Polupanov G, Lomteva N, Khalmatov N, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2: relation to development of ischemic stroke in patients with essential hypertension [J]. Kardiologija, 2014, 54(6):29-34.

[11] 叶芸,李苏亮. 脑卒中患者血浆 Lp-PLA2 水平及临床意义探讨[J]. 检验医学, 2014, 29(3):249-253.

[12] 陈仁玉,王惠娟,于慧丹,等. 人血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 与缺血性脑血管病的关系[J]. 脑与神经疾病杂志, 2014, 22(2):109-113.

[13] Corson MA, Jones PH, Davidson MH. Review of the evidence for the clinical utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 as a cardiovascular risk marker[J]. Am J Cardiol, 2008, 101(12A):41F-50F.

(收稿日期:2017-01-25 修回日期:2017-03-31)

(上接第 1897 页)

of a UK population for 15 HPA alleles[J]. Eur J Immunogenet, 2004, 30(6):415-419.

[7] Kojo SJ, Sandra DB, Carl TW, et al. Multiplex PCR by multicolor fluorimetry and fluorescence melting curve analysis[J]. Nat Med, 2001, 7(2):249-253.

[8] Hiyam HE, Salvatore AEM, Sanjay T, et al. Use of Sloppy Molecular Beacon Probes for Identification of Mycobacterial Species[J]. J Clin Microb, 2009, 47(4):1190-1198.

[9] Fu X, Qiu YH, Xiaoyun C, et al. A melting curve analysis-based PCR assay for one-step genotyping of-thalassemia mutations[J]. J Mol Diagn, 2011, 13(4):427-435.

[10] Yiqun L, Yulin Z, Qiwei G, et al. Simultaneous detection, genotyping, and quantification of human papilloma viruses

by multicolor real-time PCR and melting curve analysis [J]. J Clin Microb, 2013, 51(2):429-435.

[11] 张肄鹏,黄志平,聂冬梅,等. 基于荧光探针溶解曲线分析技术的 HPA 1~5, 15 等位基因检测方法的建立[J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(15):1489-1492.

[12] Fuehrer HP, Fally MA, Habler VE, et al. Novel nested direct PCR technique for malaria diagnosis using filter paper samples[J]. J Clin Microb, 2011, 49(4):1628-1630.

[13] Han J, Swan DC, Smith SJ, et al. Simultaneous amplification and identification of 25 human papillomavirus types with templex technology[J]. J Clin Microb, 2006, 44(11):4157-4162.

(收稿日期:2017-02-09 修回日期:2017-04-09)