

PCR-SSP 法检测吉林省汉族人群 血小板抗原 1~6 系统研究*

张冬霞¹ 黄氏敏¹ 于红¹ 李颖¹ 史立英¹ 刘冰²

[摘要] 目的:应用 PCR-SSP 法对吉林省汉族人群人血小板同种抗原系统(HPA)1~6 进行基因及其多态性分布特征研究。方法:用 DNA 试剂盒提取外周血标本中 DNA,通过特异性引物(PCR-SSP)扩增 HPA 等位基因。检测 200 名 HPA1~6 抗原系统共 12 个抗原的基因分型。结果:200 名无偿献血并无血缘关系的吉林省汉族人群 HPA 基因频率为:HPA-1a 0.9900、1b 0.0100;2a 0.9300、2b 0.0700;3a 0.5575、3b 0.4425;4a 1.0000、4b 0.0000;5a 0.9900、5b 0.0100;6a 0.9875、6b 0.0125。结论:吉林地区血小板志愿捐献者 HPA1~6 抗原系统的基因频率符合 Hardy-Weinberg 遗传定律,与其他地区和国家的同类资料相比显示出种族和地域性差异,由此建立起了吉林地区已知 HPA 基因型的人血小板捐献者资料库。

[关键词] PCR-SSP 法;人血小板同种抗原;基因频率

[中图分类号] R596 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2013)04-0240-03

Study on genotyping of HPA1~6 system by PCR-SSP in Jilin Han population

ZHANG Dongxia¹ Huang Shimin¹ YU Hong¹ LI Ying¹ SHI Liying¹ LIU Bing²

(¹Department of Blood Transfusion, Jilin Province Cancer Hospital, Changchun, 130012, China; ²Department of Blood Transfusion, the First Hospital, Jilin University)

Corresponding author: LIU Bing, E-mail: liubing1204@163.com

Abstract Objective: To analyze the gene polymorphism distribution characteristics of human platelet antigen (HPA)1~6 using polymerase chain reaction with sequence specific primers (PCR-SSP) in Jilin Han population. **Method:** DNA was extracted from peripheral blood samples from 200 Han donors in Jilin Province by DNA kit and PCR-SSP was introduced to analyze the genotypes of HPA 1~6. **Result:** HPA allele frequencies of 200 Han donors in Jilin Province were HPA-1a 0.9900, 1b 0.0100; 2a 0.9300, 2b 0.0700; 3a 0.5575, 3b 0.4425; 4a 1.0000, 4b 0.0000; 5a 0.9900, 5b 0.0100; 6a 0.9875, 6b 0.0125. **Conclusion:** HPA allele frequencies of Han population in jilin province fit Hardy-Weinberg equilibrium, and compared with other regions and countries, they had race and regional differences. Thus a database of platelet donors with known HPA genotype was established in Jilin province.

Key words PCR-SSP; human platelet antigen; gene frequency Jilin province

HPA 为血小板自身特异性抗原,位于血小板膜糖蛋白(GP)上。是由多个基因座位决定,每个基因座位上存在共显性遗传的双等位基因,具有较高的多态性。这些抗原系统的共同特点是常染色体显性遗传,多数已证实由共显性双等位基因控制,表现血小板独特的遗传多态性^[1],至 2000 年已报道了 19 个血小板抗原系统,其中 18 个为双等位基因,其多态性均由核苷酸中一个碱基被置换所致^[2]。已有的报道^[2-3]显示,HPA 基因多态性具有种族和区域差别。为建立吉林省汉族人群 HPA 基因多态性资料数据库,分析本地区基因分布特点,并计算比较我国其他地区和其他国家 HPA 基因频率多态性情况,为减少吉林省汉族人发生 HPA 同种免疫的可能风险,提高血小板输注安全

性、有效性。我们应用 PCR-SSP 技术进行了以下研究。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2009-10-2011-10 我省汉族人群中无偿献血并无血缘关系者的 200 份标本。取外周血 5 ml,枸橼酸钠抗凝。分装后-60℃以下保存。

1.2 主要试剂及仪器

人类基因组 DNA 提取试剂盒、TaqDNA 酶为 Pro-mega 公司产品;人类血小板同种抗原 HPA(1-17)基因检测试剂盒(天津市秀鹏生物技术开发有限公司 SUPER-020);Genequant 基因定量仪(阿法玛西亚公司);ABI9700 PCR 扩增仪(ABI 公司,美国);BIO-RADPowerPac 电泳仪(Biorad 公司,美国);Genius 全自动凝胶成像系统(Gene 公司)。

1.3 DNA 提取方法

按人类基因组 DNA 提取说明书操作,用基因定量仪检测制备 DNA 的浓度和纯度。

* 基金项目:吉林省卫生厅课题(No:2009z029)

¹ 吉林省肿瘤医院输血科(长春,130012)

² 吉林大学第一医院输血科

通信作者:刘冰, E-mail: liubing1204@163.com

1.4 目的基因的扩增

应用天津市秀鹏生物技术有限公司(BIO-SUPER)人类血小板同种抗原 HPA(1~17)基因检测试剂盒操作说明书进行。

1.5 电泳

配制 2%琼脂糖凝胶,取 5 μl PCR 产物直接点样到凝胶孔中,使用 0.5 × TBE 缓冲液电泳 20 min。凝胶图像分析系统紫外光下拍照记录,观察结果。

1.6 统计学分析

基因频率采用基因计数法计算,并用 χ^2 检验进行基因分布的 Hardy-Weinberg 平衡验证;不同人群间基因频率分布的差异比较采用 χ^2 检验(以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义)。各系统对偶抗原不配合率计算 $P=2ab(1-ab)$ (a、b 分别代表 a 和 b 基因频率)。

2 结果

根据人类生长激素基因(HGH)的保守片段设计内参引物,内参扩增产物大小为 434 bp,存在于每个引物孔中,在每次实验中运行。在阴性孔可见,阳性孔可能会很弱或不存在。阳性孔有两条带,一条为内参带,另一条为特异性扩增带。阴性空只有一条带,为内参带,无特异性扩增带。详见图 1。

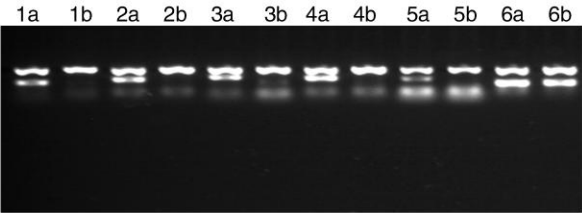


图 1 PCR-SSP 方法同步扩增的 HPA-1~6 基因型

HPA 1~6,15 系统 PCR-SSP 法基因分型结果见表 1。不同人群 HPA 等位基因频率比较见表 2。

表 1 200 名吉林省汉族人群 HPA 1~6 基因型和基因频率

HPA	HPA 基因型			HPA 基因频率	
	aa	ab	bb	a	b
1	196	4	0	0.9900	0.0100
2	172	28	0	0.9300	0.0700
3	65	93	42	0.5575	0.4425
4	200	0	0	1.0000	0.0000
5	196	4	0	0.9900	0.0100
6	196	3	1	0.9875	0.0125

3 讨论

人类血小板抗原是一个复杂的血型系统,包括血小板共同抗原和血小板特异抗原。其中血小板共同抗原又分为 HLA 抗原和 ABO 血型抗原,而血小板特异性抗原仅存在于血小板表面,具有型的特异性,是血小板膜糖蛋白(GP)的构成部分。研究表明,HPA 抗原表型多态性是由一对碱基的置换导致 GP 多肽链上单个氨基酸的改变所引起,这也是 HPA 多态性的分子生物学基础。

准确检测和鉴定 HPA,对于临床医学和输血实践具有十分重要的意义^[4-6]。目前普遍采用的 HPA 基因分型方法。PCR-SSP 法可在极短时间内获得 HPA 系统的基因型,该方法快速,准确,可广泛应用与血小板志愿捐献者和临床患者的常规 HPA 分型。HPA 基因定型技术在诊断与治疗由 HPA 不合所引起的各种临床疾患以及研究人类起源和遗传学方面具有广泛的应用前景。

应用 PCR-SSP 技术研究了吉林汉族人群 HPA 1~6 基因频率,并计算其理论杂合率和实际杂合率。初步描绘吉林地区汉族人群 HPA 基因多态性的频率分布情况,各基因频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传定律($P>0.05$)。其中 HPA-3 与我国其他地区同类资料相比,差异无统计学意义($P>0.05$),与亚洲的印尼、泰国;英国及刚果等资料相比,差异也无统计学意义($P>0.05$),但 HPA-5 和

表 2 不同人群 HPA 等位基因频率

人群	n	HPA1		HPA2		HPA3		HPA4		HPA5		HPA6	
		-a	-b	-a	-b	-a	-b	-a	-b	-a	-b	-a	-b
中国吉林	200	0.9900	0.0100	0.9300	0.0700	0.5575	0.4425	1.0000	0.0000	0.9900	0.0100	0.9875	0.0125
中国南方 ^[7]	100	0.9970	0.0030	0.9800	0.0200	0.6300	0.3700	0.9970	0.0030	0.9970	0.0030	/	/
中国北方 ^[8]	148	0.9797	0.0203	0.9054	0.0946	0.6419	0.3581	1.0000	0.0000	0.9932	0.0068	/	/
中国台湾 ^[9]	93	0.9967	0.0033	0.9600	0.0400	0.5750	0.4250	0.9983	0.0017	0.9850	0.0150	0.9633	0.0360
印尼 ^[10]	107	0.9910	0.0090	0.9390	0.0610	0.5050	0.4950	1.0000	0	0.9950	0.0050	0.9670	0.0330
泰国 ^[10]	137	0.9850	0.0150	0.9380	0.0620	0.5070	0.4930	1.0000	0	0.9630	0.0370	0.9850	0.0150
英国 ^[11]	134	0.8400	0.1600	0.9250	0.0750	0.6270	0.3730	1.0000	0	0.9140	0.0860	1.0000	0
刚果 ^[12]	125	0.9040	0.0960	0.7760	0.2240	0.5960	0.4040	1.0000	0	0.7320	0.2680	1.0000	0
喀麦隆 ^[12]	118	0.9070	0.0930	0.7630	0.2370	0.6140	0.3860	1.0000	0	0.7460	0.2540	1.0000	0

刚果,喀麦隆相比显示出种族和地域性差异($\chi^2 = 55.06, P < 0.01$)。

我们目前已经建立了 300 余人的血小板捐献者 HLA 资料库,今后将继续大规模的建立已知 HPA 基因型的小血小板供者库,可为临床提供 HLA 以及 HPA 都配合的小血小板进行配合性输注,解决血小板输注无效(PRT)、输血后紫癜(PTP)和新生儿同种免疫血小板减少症(NAIT),并可根据基因库探索个体识别,人类遗传及法医学鉴定研究。

参考文献

- [1] 刘达庄. 免疫血液学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:103-104.
- [2] BENNETT J A, PALMER L J, MUSK A W, et al. Gene frequencies of human platelet antigens 1-5 in indigenous Australians in Western Australia [J]. Transfus Med, 2002, 12:199-203.
- [3] KULKARNI B, MOHANTY D, GHOSH K. Frequency distribution of human platelet antigens in the Indian population[J]. Transfus Med, 2005, 15, 119-124.
- [4] BOEHLEN F, BULLA O, MICHEL M, et al. HPA-genotyping and anti-platelet antibodies in female blood donors[J]. Hematol, 2003, 12:441-444.
- [5] SALAMA A. Alloimmune thrombocytopenias[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2003, 25(Suppl1):S39-41.
- [6] ROZMAN P, PLATELET ANTIGENS. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation[J]. Transpl Immunol, 2002, 10: 165-181.
- [7] 李执如,王乃红,杨群身,等. HPA 抗原基因频率和不配合率[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(4):236-237.
- [8] SUN G D, DUAN X M, ZHANG Y P, et al. Analysis of genetic polymorphism in randomized donors' Hpa 1-16 antigens and establishment of typed platelet donor data bank[J]. J Exp Hematol, 2005, 13:889-895.
- [9] LYOU J Y, CHEN Y J, HU H Y, et al. PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to-13w [J]. Transfusion, 2002, 42:1089-1095.
- [10] SHIHMC, LIUTC, LIN I L, et al. Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-13, Oe and Gov platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, Filipino and Thai populations[J]. Int J Mol Med, 2003, 12:609-614.
- [11] JONES D C, BUNCHEM, FUGGLE S V, et al. Human platelet alloantigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles[J]. Eur J Immunol Gene, 2003, 30:415-419.
- [12] HALLE L, BIGOT A, MULENIMANDY G, et al. HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies[J]. Tissue Antigens, 2005, 65:294-298.

(收稿日期:2012-07-12)

(上接第 239 页)

Mh 的单纯感染、Mh 和 Uu 的混合感染阿奇霉素、红霉素还有克拉霉素均耐药,这与 Mh23SrRNA 的 V 区基因突变可能有关,这种突变是使其对大环内脂类抗生素具有一定的抵抗力^[9-10]。而强力霉素、交沙霉素和美满霉素无论对于单纯的 Uu 感染、Mh 感染还是 Uu 和 Mh 的混合感染都有很高的敏感性。

综上所述,女性生殖道内支原体检出率较高,且以单纯 Uu 感染为主;治疗方面,强力霉素、交沙霉素和美满霉素具有很高的敏感性,可以作为一线药物进行使用。

参考文献

- [1] 郝金中,韩晶. 泌尿生殖道支原体感染的特征及耐药分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(6):705-707.
- [2] 周明莉,蔡爱玲,王雪峰,等. 泌尿生殖道支原体分离鉴定及药敏分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(5):589-590.
- [3] 余玲玲,王慧燕,杨锦红,等. 2263 例成年女性宫颈分泌物支原体检测及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(12):1616-1617.
- [4] 王辉. 阴道分泌物支原体检测及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(7):864-865.
- [5] 王勇,袁红瑛,张青晓,等. 性病高危人群泌尿生殖道支原体、衣原体感染研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(1):117-118.
- [6] 史训忠,李春仙,陈敏,等. 解脲支原体耐药性变化分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(3):325-327.
- [7] 王新,韩丽华,熊传郑. 581 例泌尿生殖道支原体、衣原体感染耐药性分析及对策[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(6):752-754.
- [8] 高会霞,袁文芳,刘腾飞. 石家庄地区 2006 至 2008 年泌尿生殖道支原体感染的检测及耐药趋势[J]. 河北医药, 2009, 31(14):1830-1831.
- [9] 李江,许岩丽,程艳丽. 女性生殖道解脲支原体及人型支原体的分离及耐药性分析[J]. 中国实验诊断, 2009, 13(6):782-783.
- [10] 张凤云,王杰,柴程良. 孕期解脲支原体感染与妊娠结局的关系[J]. 浙江预防医学, 2007, 19(1):61-62.

(收稿日期:2012-10-19)