

HLA-DPA1 和 -DPB1 基因第 2、第 3 外显子 同步测序分型的研究*

鲍自谦¹ 蔡思齐¹ 钟艳平¹ 陈瑞¹ 甄建新² 邓志辉¹

[摘要] 目的:建立可靠的 HLA-DPA1 和 -DPB1 基因第 2、第 3 外显子同步测序分型的方法。方法:采用一对位点特异性引物扩增 HLA-DPA1 基因的第 2 外显子、第 2 内含子、第 3 外显子及其两翼的部分内含子序列,采用 2 对位点特异性引物扩增 HLA-DPB1 目的基因片段;第 1 对引物扩增 HLA-DPB1 基因第 2 外显子及两翼的部分内含子序列,第 2 对引物扩增 HLA-DPB1 基因第 3 外显子及两翼的部分内含子序列。PCR 产物经核酸外切酶和碱性磷酸酶纯化,用本文的测序引物分别对 HLA-DPA1 和 -DPB1 第 2、第 3 外显子进行双向测序。纯化的测序反应产物,经 ABI 3730 测序仪电泳,用 Assign 4.7.1 分析软件判定基因型。结果:HLA-DPA1 及 -DPB1 基因的 PCR 扩增获得了清晰的目的条带,对其第 2、第 3 外显子进行测序,所获的序列中无背景杂峰。用本文的方法对随机的 96 人份造血干细胞志愿捐献者标本进行 HLA-DPB1 测序分型,与采用 SeCore™ DPB1 商品化测序分型试剂盒平行对照检测的结果相一致。结论:本文的方法在群体遗传学及疾病关联研究等领域具有广泛的使用价值。

[关键词] 人类白细胞抗原;HLA-DPA1;HLA-DPB1;测序分型

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.12.011

[中图分类号] R331.1 **[文献标志码]** A

Study on simultaneous sequence-based typing at exons 2 and 3 of HLA-DPA1 and -DPB1 genes

BAO Ziqian¹ CAI Siqi¹ ZHONG Yanping¹ CHEN Rui¹
ZHEN Jianxin² DENG Zhihui¹

(¹ Shenzhen Blood Center, Shenzhen, 518035, China; ² Shenzhen Baoan District Maternal and Child Health Care Hospital)

Corresponding author: DENG Zhihui, Email: zhihui_deng@sina.cn

Abstract Objective: To establish a reliable assay for simultaneous sequence-based typing (SBT) at exons 2 and 3 of HLA-DPA1 and -DPB1 genes. **Method:** One pair of HLA-DPA1 specific PCR primers was utilized to amplify the target sequence encompassing the entire exon 2, intron 2, exon 3 and partial flanking intronic sequences of HLA-DPA1. Two pairs of HLA-DPB1 specific PCR primers, namely, the first PCR primer pair specially amplified exon 2 and its partial flanking intronic sequences, the second PCR primer pair specially amplified exon 3 and its partial flanking intronic sequences of HLA-DPB1. PCR amplicons purified by exonuclease I and Alkaline phosphatase were then subjected to sequencing reaction using the in-house sequencing primers at exons 2 and 3 of HLA-DPA1 and -DPB1 genes in both directions. The purified products of sequencing reactions were run electrophoresis on the ABI 3730 DNA sequencer and the genotype was determined using the Assign 4.7.1 SBT software. **Result:** The specific target sequences of HLA-DPA1 and -DPB1 could be obtained in the PCR procedure. No background and noise was observed in the obtained sequences. 96 randomly-selected samples from stem cell voluntary donors subjected to HLA-DPA1 and -DPB1 genotyping using the present SBT method, the genotyping results were completely in accordance with the results typed by the SeCore™ HLA-DPB1 commercial kit. **Conclusion:** Our results implied that the established simultaneous HLA-DPA1 and -DPB1 SBT method showed a broad application in the further genetic population and HLA-DP associated disease studies.

Key words human leukocyte antigens; HLA-DPA1; HLA-DPB1; sequence-based typing

HLA-DP 分子是由 HLA-DPA1 基因编码的 α 链和 HLA-DPB1 基因编码的 β 链组成的异二聚体,递呈抗原肽给 CD4⁺ T 淋巴细胞。HLA-DPA1

和 -DPB1 基因均具有丰富的遗传多态性。截至 2018 年 4 月,国际 IMGT/HLA database (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>, Release 3.32.0) 公布的 HLA-DPA1 和 -DPB1 等位基因分别为 65 个和 975 个。HLA-DPA1 和 -DPB1 基因的单核苷酸多态性位点 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 不仅存在于第 2 外显子,而且还

* 基金项目:深圳市科技计划项目 (No: JCYJ20160427144249175)

¹ 深圳市血液中心 (广东深圳, 518035)

² 深圳市宝安区妇幼保健院

通信作者: 邓志辉, E-mail: zhihui_deng@sina.cn

广泛存在于第 3 外显子;如 HLA-DPA1 基因的第 2、第 3 外显子存在的 SNP 位点分别为 28 和 10 个,HLA-DPB1 基因的第 2、第 3 外显子存在的 SNP 位点数分别为 206 和 41 个。

测序分型(PCR-SBT)技术为国际公认的高分辨率、高精度的 HLA 分型方法,以往文献报道的 HLA-DPA1 和 -DPB1 测序分型方法大多仅限于针对第 2 外显子进行测序^[1,2],由于 HLA-DPA1 和 -DPB1 基因的第 3 外显子也存在丰富的 SNP 多态性,增加 HLA-DPA1 和 -DPB1 基因的第 3 外显子的测序分型可减少模棱两可的 HLA 测序分型结果,提高唯一性分型结果的比例。因此,本文的研究目的是为了建立操作简便、可靠、适合于高通量化的 HLA-DPA1 和 -DPB1 基因第 2、第 3 外显子同步测序分型的方法,以应用于人类群体遗传学、造血干细胞移植、疾病关联研究等领域。

1 对象与方法

1.1 样本来源

96 份南方汉族随机无关个体血样,源于深圳的健康志愿捐血者。根据知情同意原则,每人采集

外周血样 5 mL,用 5% EDTA 抗凝,于-20℃冰箱中冻存。

1.2 试剂与仪器

包括台湾瑞宝 Magcore™ DNA 提取试剂盒(批号: S4101-17356);核酸外切酶(Exonuclease I)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase)、测序终止液(BigDye Terminator 3.1)和 SeCore™ DPB1 商品化测序分型试剂盒,均由美国 ThermoFisher 公司提供,试剂批号分别为: 00605901、00598219、1709132 及 004。主要仪器包括 ABI 9700 型基因扩增仪、ABI 3730 测序仪(均为美国 ABI 公司)。

1.3 PCR 引物和测序引物

采用一对位点特异性引物扩增 HLA-DPA1 基因的第 2 外显子、第 2 内含子、第 3 外显子及其两翼的部分内含子序列。采用 2 对位点特异性引物扩增 HLA-DPB1 目的基因片段:第 1 对引物扩增 HLA-DPB1 基因第 2 外显子及两翼的部分内含子序列,第 2 对引物扩增 HLA-DPB1 基因第 3 外显子及两翼的部分内含子序列。引物序列分别见表 1 和表 2,均由大连宝生物公司合成。

表 1 HLA-DPA1 及 -DPB1 基因测序分型采用的 PCR 扩增引物

扩增引物(5'→3')		引物在基因组全长 序列中的位置	目的扩增片段 长度/bp
HLA-DPA1			
第 2~3 外显子	正向:5'-TTAGAAGGATGCCTGGCACAA-3'	nt3336~nt3356	1 421
	反向:5'-AATGAAGAGATAGGGTCAGGAGG-3'	nt4734~nt4756	
HLA-DPB1			
第 2 外显子	正向:5'-AGGACCACAGAACTCGGTACTAGGA-3'	nt4483~nt4507	546
	反向:5'-TGAATCCCCAACCCAAAGTCCCC-3'	nt5006~nt5028	
第 3 外显子	正向:5'-TGGAGGTTGCAGTGAGCCAAT-3'	nt8685~nt8705	603
	反向:5'-TGGCTTCAAACATGCTCAGG-3'	nt9267~nt9287	

表 2 HLA-DPA1 及 -DPB1 基因测序分型采用的测序引物

测序分型引物(5'→3')		引物在基因组全长序列中的位置
HLA-DPA1		
第 2 外显子	正向:5'-TTTCAAAGACCAGGAAGCAGC-3'	nt3425~nt3445
	反向:5'-GCAGAGAGGCCCTCTCATC-3'	nt3975~nt3993
第 3 外显子	正向:5'-ASAGCTGCCATAAAATCTAAGGC-3'	nt4160~nt4182
	反向:5'-GTTAATTGGATGTTAGGACGAGG-3'	nt4655~nt4677
HLA-DPB1		
第 2 外显子	正向:5'-GAGAGTGGCGCCTCCGCTC-3'	nt4596~nt4614
	反向:5'-CCGGCCCAAAGCCCTCACTC-3'	nt4902~nt4921
第 3 外显子	正向:5'-CAGCACCACAACCTGCTTG-3'	nt8895~nt8913
	反向:5'-GAAGAAAGATGRGGTTTGGAC-3'	nt9236~nt9256

1.4 基因组 DNA 制备

采用 Magcore™ DNA 提取试剂盒提取,紫外

分光光度仪测定 DNA 浓度和纯度,DNA 终浓度调整为 50~100 ng/μL。

1.5 PCR 扩增

目标序列涵盖了 HLA-DPA1 和 -DPB1 基因的第 2、第 3 外显子。扩增采用 10 μ L 反应体系,包括:10 $\times$ PCR Buffer 1.0 μ L,dNTP(2.5 mmol/L) 0.8 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L) 0.6 μ L,PCR 引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L,基因组 DNA 2 μ L,Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.20 μ L,加 ddH₂O 至 10 μ L。扩增于 ABI9700 型 PCR 仪进行,循环参数:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,62 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 PCR 产物的纯化

采用虾酶纯化的方法 10 μ L 扩增产物中加入 4.25 μ L 碱性磷酸酶及核酸外切酶混合液,混匀后在 ABI9700 型 PCR 仪上运行以下循环参数:37 $^{\circ}$ C 45 min;85 $^{\circ}$ C 15 min,4 $^{\circ}$ C 保存。运行结束后,在纯化的 PCR 产物中加入 35 μ L ddH₂O 进行稀释。

1.7 测序反应及测序产物的纯化

测序反应采用 10 μ L 反应体系。含测序引物 (10 μ mol/L) 0.32 μ L,纯化了的测序模板 DNA 4.0 μ L,ABI PRISM BigDye3.1 Terminator 0.25 μ L,5 $\times$ BigDye Sequencing Buffer 2.075 μ L,补 ddH₂O 至 10 μ L。测序反应条件:95 $^{\circ}$ C 1 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,50 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 4 min,25 个循环;4 $^{\circ}$ C 保存。

测序反应产物用酒精醋酸钠/EDTA 法进行纯化,加入甲酰胺溶液 (Hi-Di Formamide, 美国 ThermoFisher scientific 公司) 15 μ L,混匀、离心后,95 $^{\circ}$ C 变性 2 min,在 ABI 3730 测序仪上进行电泳检测。

1.8 HLA 基因型的判读

HLA 分型结果确定等位基因前 4 位数。电泳后得到的碱基序列导入 Assign 4.7.1 分析软件 (Conexio Genomics, Western Australia),判定结果。

1.9 质控对照

HLA-DPB1 的测序分型,采用美国 ONE LAMBDA SeCore™DPB1 商品化测序分型试剂盒进行平行对照,并分析 HLA-DPB1 的基因分型结果的一致性。

2 结果

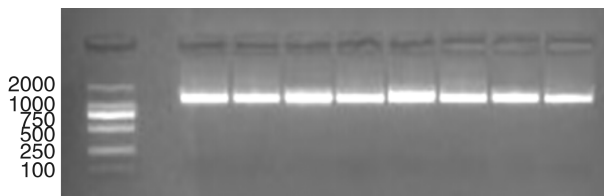
2.1 PCR 产物的特异性扩增

取 3 μ L PCR 扩增产物,于 2% 琼脂糖凝胶中电泳,可见清晰的特异性扩增产物条带,见图 1、2。

2.2 HLA-DPA1 和 -DPB1 测序分型的结果

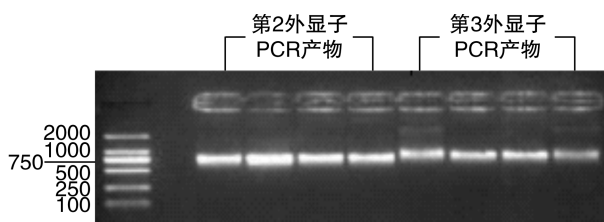
检测 96 人份南方汉族无关个体 HLA-DPA1 和 -DPB1 基因的第 2、3 外显子,所获的测序序列中无背景信号和杂峰,导入 Assign 4.7.1 SBT 分析软件,均能分析出受检者的基因型(HLA-DPA1 分型见图 3a 所示,HLA-DPB1 分型见图 3b 所

示)。采用本文合成的 PCR 引物和测序引物进行 HLA-DPB1 基因测序分型,检测结果与采用 SeCore™DPB1 商品化测序分型试剂盒的结果完全一致。



左起第 1 孔为 TaKaRa 2 000 bp DNA ladder,第 2~9 孔为 8 个随机样本的 HLA-DPA1 的扩增产物条带(1.4 kb)。

图 1 HLA-DPA1 基因第 2~3 外显子的扩增产物条带



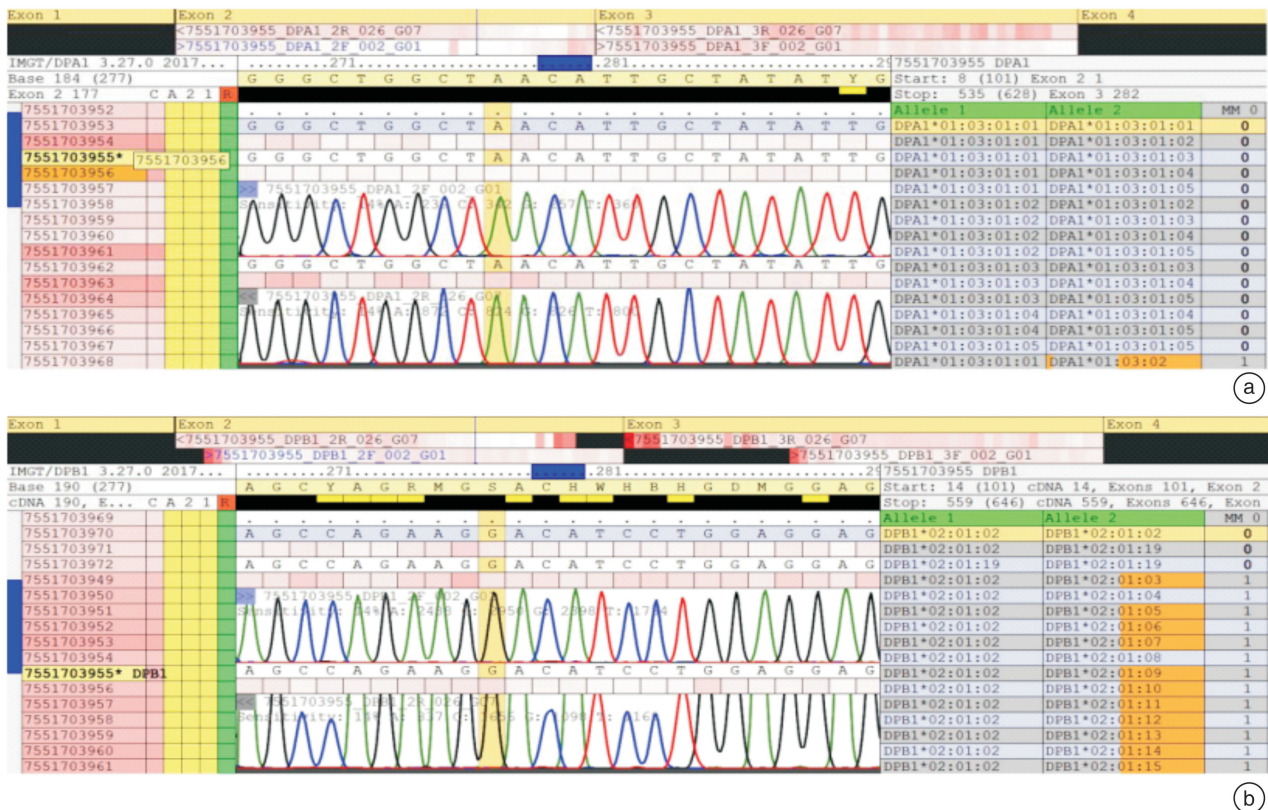
左起第 1 孔为 TaKaRa 2 000 bp DNA ladder,第 2~5 孔为第 2 外显子的扩增产物条带(546 bp),第 6~9 孔为第 3 外显子的扩增产物条带(603 bp)。

图 2 HLA-DPB1 基因的扩增产物条带

3 讨论

HLA-DP 分子为经典的 HLA II 类分子,在慢性乙型肝炎病毒的清除中发挥了至关重要的作用^[3,4]。Kamatani 等^[3]基于人类全基因组关联的研究(GWAS),发现日本人群和泰国人群中 HLA-DPA1 及 -DPB1 基因中的 HLA-DPA1 * 02:02 -DPB1 * 05:01 和 HLA-DPA1 * 02:02 -DPB1 * 03:01 为慢性乙型肝炎的易感性单倍体,而 HLA-DPA1 * 01:03 -DPB1 * 04:02 及 HLA-DPA1 * 01:03 -DPB1 * 04:01 为保护性单倍体。中国人群中持续性慢性乙型肝炎的感染与 HLA-DP 位点也存在强关联^[4]。

在无关供者骨髓移植中,HLA-DPB1 的匹配程度对无关供者骨髓移植的效果具有显著影响^[5],Kawase 等^[6]回顾性分析日本骨髓库(JMDP)5 210 例无关供者造血干细胞移植病例,发现了 15 种与严重急性排斥反应相关的 HLA 等位基因组合,其中 DPB1 * 0301 -DPB1 * 0501、DPB1 * 0501 -DPB1 * 0901 为 HLA-DP 位点供/受者间“不允许错配”的等位基因组合。当前,国内造血干细胞(骨髓)移植的无关供/受者对 HLA 配型中,HLA-DPB1 基因分型尚未被纳入常规检测。国外虽已有商品化 HLA-DPB1 测序分型试剂盒,但价格较为昂贵,限



a: 1 例样本 HLA-DPA1 基因的分型结果(DPA1 * 01:03,01:03); b: 1 例样本 HLA-DPB1 基因的分型结果(DPB1 * 02:01, 02:01)。

图 3 合成的 PCR 引物和测序引物进行测序分型结果

制了 HLA-DP 基因测序分型在群体遗传学、骨髓库、疾病关联研究中的大规模应用。

HLA-DPA1 的基因分型以往文献^[7,8]大多采用 PCR-序列特异性引物(PCR-SSP)方法检测 HLA-DPA1 * 01:03,02:01,02:02,03:01 和 04:01 等 5 个等位基因,用于 HLA-DPA1 基因多态性与疾病关联的研究,所检测的等位基因有限,而且不能发现和鉴定新等位基因。HLA-DPB1 基因的测序分型方法国内虽已有报道,但只进行单向测序,PCR 扩增产物的纯化采用凝胶纯化、不适合于高通量化^[1];或仅对第 2 外显子进行测序,未增加第 3 外显子的测序分型^[2]。

本文的 HLA-DPA1 及 -DPB1 测序分型技术的特点:①扩增片段长度短(0.5~1.5 kb),扩增效率高。本文采用 1 对 PCR 引物扩增 DPA1 基因的第 2 外显子、第 3 内含子、第 3 外显子以及部分第 1、第 3 内含子的序列;采用 2 对 PCR 引物即第 1 对引物扩增 HLA-DPB1 基因第 2 外显子及其两翼的部分内含子序列,第 2 对产物扩增第 3 外显子及其两翼的部分内含子序列。② HLA-DPA1 及 -DPB1 基因可在同一 PCR 循环参数条件下进行同步扩增,并且采用简便、可靠的酶纯化法对 PCR 产物进行纯化,适合于高通量化。③分别对 HLA-DPA1 及 -DPB1 基因的第 2、第 3 外显子双向测

序,所获得的碱基序列无背景信号和杂峰,便于对序列进行碱基错误排查和结果判读,提高了实验的成功率和结果的准确性。④对测序反应中使用的主要试剂——BigDye Terminator 的用量进行了优化,10 μ L 反应体系仅需 0.25 μ L 时,可获得稳定可靠的结果,有助降低了实验成本和推广应用。

本文 HLA-DPB1 基因测序分型的结果,与采用 SeCore™ DPB1 商品化测序分型试剂盒的分型结果进行平行对照,取得了完全一致的结果。本文所建立的测序分型方法,可为开展大样本量的中国人群 HLA-DPA1 及 -DPB1 的群体遗传多态性研究及其与移植、疾病关联研究,提供重要的参考,具有良好的实用价值和应用前景。

参考文献

- [1] 何援利,宗利丽,彭冬先,等.中国广东妇女子宫内异位症与 HLA-DPB1 的相关性研究[J].第一军医大学学报,2002,22(5):432-433.
- [2] 喻琼,王大明,邓志辉.人类白细胞抗原 HLA-DPA1 和-DPB1 基因高通量测序分型的研究[J].中华医学遗传学杂志,2012,29(3):323-327.
- [3] Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, et al. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians[J]. Nat Genet, 2009, 41: 591-595.

(下转第 935 页)

这种抗 M 抗体的产生大多无红细胞刺激,是天然产生的,抗 M 血清通常以 IgM 形式存在。据统计,每年我中心献血者中检出抗 M 抗体阳性者几十例,占不规则抗体阳性标本 40%~50%。根据本中心相关规定,这些抗 M 抗体阳性的血液红细胞和血浆以及相关血液制品都必须全部报废,这样不仅产生了大量医疗废弃物以及报废所需的必须开支(运输、销毁等费用),而且在一定程度上造成了资源的浪费。

本实验是将这些报废的抗 M 抗体阳性的血浆再利用,通过中和稀释,冻融浓缩等一系列方法,制备成人源化的抗 M 试剂血清。我们选取了抗 M 抗体阳性的 A 型、B 型血浆标本各 2 例,AB 型血浆标本 2 例。抗 M 抗体的 A 型 B 型血浆中由于有抗 B、抗 A 抗体,所以用中和稀释法可显著降低抗 B、抗 A 效价。中和前后抗 B、抗 A 效价从 1:64 降至 1:2,而抗 M 效价基本未变。混合后的血浆用 AB 型 M 阴性红细胞分别在 4℃、37℃ 吸收,以去除抗 A、抗 B 抗体,吸收后的血浆基本不含抗 A 抗 B。然后用冻融法可以浓缩抗 M 抗体,效价可提高 2 倍。有报道称用海藻糖-PEG 浓缩抗体,可将 IgM 类抗体提高 2~6 倍,IgG 类抗体提高 2~4 倍。本实验中混合血浆和 AB 型血浆经浓缩后可

将抗 M 抗体效价提高 2 倍。效果测定显示自制抗 M 血清与 M 阳性红细胞凝集强度与市售试剂血清相比效果有提高。可能人源的抗体亲和力较强缘故。本实验将废弃的抗 M 抗体阳性的血清,制备成抗 M 试剂血清在一定程度上达到了废血再利用的目的,开源节流避免浪费,可适当用于日常标本的检测。但广泛应用于日常,还需要进一步的纯化和实验。

参考文献

- [1] 张璐,袁红,伍钢. 抗 M 抗体、抗 lea 抗体以及自身冷抗体引起的输血交叉配血不合 1 例[J]. 临床血液学杂志,2017,30(4):325-326.
- [2] 肖瑞卿,林武存,许聘,等. 用中和浓缩吸收法制备抗 M 血清试剂的研究[J]. 重庆医学,2006,35(2):1064-1065.
- [3] 孙爱农. 低浓度聚乙二醇法检测红细胞 Rh 血型[J]. 皖南医学院学报,1993,12(1):70-71.
- [4] 余朝晖,孙爱农. 低浓度红细胞同种抗体的浓缩提纯[J]. 中国生物制品学杂志,2009,22(7):719-721.
- [5] 陈黎忠,李梅,边广珠,等. 海藻糖对干燥后单克隆抗体血型试剂的保活作用[J]. 临床检验杂志,2002,20(16):363-364.

(收稿日期:2018-07-24)

(上接第 932 页)

- [4] Guo X,Zhang Y,Li J,et al. Strong influence of human leukocyte antigen(HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the Han Chinese population[J]. Hepatology,2011,53:422-428.
- [5] Shaw BE,Marsh SG,Mayor NP,et al. HLA-DPB1 matching status has significant implications for recipients of unrelated donor stem cell transplants[J]. Blood,2006,107:1220-1226.
- [6] Kawase T,Morishima Y,Matsuo K,et al. Japan Marrow Donor Program. High-risk HLA allele mismatch

combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism[J]. Blood,2007,110:2235-2241.

- [7] 刘爱民,禰国维,陈达灿,等. HLA-DQ/DP 等位基因与粤籍汉族斑秃及中医证型的相关性研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志,2010,9(5):289-292.
- [8] 张力,刘淑芸,陈强,等. 成都地区妊娠肝内胆汁淤积症家庭 HLA-DPA1 基因多态性研究[J]. 四川大学学报,2003,34(3):530-532.

(收稿日期:2018-09-16)