

辽宁地区 *HLA-B*51:36* 的进一步调研分析

陈阳¹ 李剑平¹

[摘要] 目的:调查分析 *HLA-B*51:36* 在辽宁地区基因频率。方法:用 PCR-SSP、SSO 和 SBT 方法对 50 000 例辽宁健康人群进行 *HLA-A、B、DR* 基因分型,统计其中 *HLA-B*51:36* 的有关信息,并进行分析说明。使用微量淋巴细胞毒试验测定其中 1 例 *HLA-B*51:36* 样本的血清学 I 类抗原特异性。结果:检出 34 例 *HLA-B*51:36*,基因频率为 0.068%,占 *B*51* 位点的 0.42%。对其中 1 例先证者进行家系调查分析其单体型遗传规律为 *HLA-A*03-B*51:36-DRB1*01*,检测其中 1 例样本血清学结果为 B44、B51、B37。结论:*B*51-DRB1*01* 显著的连锁不平衡。*DRB1*01* 可能促使 *B*51:08* 更易发生基因位点特异性碱基突变从而形成了 *B*51:36*。抗原特异性出现三联体现象为检测样本特有还是 *HLA-B*51:36* 碱基突变影响氨基酸表达产生的位点特异性结果,仍需多个相关样本进一步试验分析原因。

[关键词] *HLA-B*51:36*;连锁不平衡;三联体

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.02.011

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Progressing investigation of *HLA-B*51:36* in Liaoning region

CHEN Yang LI Jianping

(Shenyang Central Blood [Station Liaoning Blood Center], Shenyang, 110044, China)

Abstract Objective: To analyze relevant information on *HLA-B*51:36* which was first found by the Hangzhou Blood Center in 2004. **Methods:** We performed low-and medium-resolution DNA typing of human leukocyte antigen(HLA) -A, B and DR alleles using polymerase chain reaction/sequence-specific primer or sequence-specific oligonucleotide probe and analyzed correlating information of *HLA-B*51:36*. At the same time, we identified the *HLA-B*51:36* phenotype of one sample by the microlymphocytotoxicity test. **Results:** We detected 34 cases of *HLA-B*51:36* within 50 000 voluntary donors of Liaoning hemopoietic stem cell or platelet from 2004 to 2018. **Conclusion:** The results showed that *HLA-B*51:36-DR01* expressed strong linkage disequilibrium. However, in Liaoning, *HLA-B*51-DR*01* trabant expressed no relationship of linkage. Our study suggested that *DRB1*01* may prompt *B*51:08* gene site-specific mutation into gene type *B*51:36*. The phenotype of the sample which had the *HLA-B*51:36* carried three *HLA-B* antigens, B44, B51 and B37. We need more samples to test so that we can analyze the causation of triple *HLA-B* antigen in the detected sample or the *HLA-B*51:36* allele.

Key words *HLA-B*51:36*; linkage disequilibrium; HLA triplet

人类白细胞抗原(human leucocyte antigens, HLA)基因是目前已认定的结构最复杂、多态性最高的基因。仅 *HLA-B* 位点等位基因已达 7431 个,而且各个位点的新基因还在不断被发现。2004 年 9 月中国杭州认定一个新等位基因 *HLA-B*51:36*。随后笔者在 50 000 例辽宁人群中检出 34 例 *HLA-B*51:36*,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 血样采集与基因组 DNA 制备

50 000 例辽宁地区造血干细胞或血小板志愿捐献者,征得捐献者知情同意,静脉采集其 EDTA 抗凝全血 5 mL。将制备的 DNA 浓度调为 50 ng/ μ L, DNA 纯度 A_{260}/A_{280} 比率在 1.6~1.9。

1.2 仪器设备

PE-9700PCR 基因扩增仪; MJ Research PTC-200 基因扩增仪; GeneQuan 核酸蛋白检测

仪;美国 UVP GD 8000 紫外透射凝胶成像分析仪;美国 Runone 电泳槽;比利时 INNO-LiPA 自动杂交仪;美国 Luminex 流式细胞仪;ABI 3730xl 基因测序仪。

1.3 分型试剂

Genra DNA 提取试剂盒;Pefreeze DNA 提取试剂盒;天为时代 DNA 提取试剂盒;微量 SSP 试剂盒(Pefreeze96、384 孔扩增板;Biotest96 孔扩增板;G&T384 孔扩增板);INNO-LiPASSO 杂交试剂盒;Onelambda 流式磁珠杂交试剂盒;OnelambdaHLA-I 抗原血清学检测试剂;Taq DNA 聚合酶(Premage 公司提供);荷兰 SBT excellerator[®] 测序试剂盒。

1.4 分型方法

应用 PCR 序列特异性引物分型(PCR-SSP)、序列特异性寡核苷酸探针聚合酶链分型(SSOP)和基因测序分型(SBT)方法,按照不同试剂盒的扩增要求配制反应体系,并在相对应的扩增条件下扩

¹沈阳中心血站(辽宁省血液中心)(沈阳,110044)

增。扩增后试剂盒要求进行检测并判断分析最终分型结果。

1.5 统计学分析

相关数据的详细计算公式参照文献[1]。HLA 抗原频率(f_i)由实验数据直接统计得出,HLA 基因频率 $P_i = 1 - \sqrt{1 - f_i}$,两座位单体型频率 $S = 1 + \sqrt{d/N} - \sqrt{B/N} - \sqrt{D/N}$,两座位连锁不平衡参数 $\Delta = \sqrt{d/N} - \sqrt{BD}/N$,连锁不平衡参数

$$\text{标准误 } \delta(\Delta) = \sqrt{\frac{a}{4N^2} - \frac{\Delta(B+D)}{N(2\sqrt{BD} - N)}}$$

$\Delta_{\max} = P_i(1 - P_j)(P_i < P_j)$,相对连锁不平衡参数 $\Delta_{\text{rel}} = \frac{\Delta}{\Delta_{\max}}$,当 $\frac{\Delta}{\delta(\Delta)} \geq 1.96$ 时,为显著连锁不平衡。

2 结果

50 000 例无偿捐献者中共检测出 HLA-B* 51 位点 8070 例(基因频率为 16.14%),其中 HLA-B* 51:36 共 34 例,基因频率为 0.068%,占 B* 51 位点的 0.42%。34 例样本的具体分型见表 1。

50 000 个样本中的 B* 51-DRB1* 01 单体型频率为 0.24%, $\Delta = 0.000228$, $\Delta_{\max} = 0.025$, $\Delta_{\text{rel}} = 0.9\%$, $\delta(\Delta) = 0.00023$, $\frac{\Delta}{\delta(\Delta)} = 0.99$ 。

采集样本 014917 的父母姐妹及孩子进行家系调查分析,结果见表 2。单体型遗传为 HLA-A* 03-B* 51:36-DRB1* 01。

采集样本 020766 的新鲜全血,分离制备淋巴细胞后做 HLA 血清分型,微量淋巴细胞毒试验显示,该供者检出 3 个 HLA-B 抗原,分别为 B44, B51, B37,见表 3。

3 讨论

我实验室采用 PCR-SSO 方法在日常工作中发现 B 位点出现一个反应格局不符的标本,提示结果为 B* 40(60)/51:21(-)(42 号探针假阴性,46 号探针假阳性)或者 B* 40(60)/51:34(-)(46 号探针假阳性,74 号探针假阳性)。由反应格局判断不支持提示给出的结果,怀疑可能为新基因。经测序确认为刚被发现的 HLA-B* 51:36。继而本实验

室又相继发现 33 个样本 B 位点均为 B* 51:36。

表 1 34 例样本 HLA 分型

样本号	HLA-A*		HLA-B*		HLA-DRB1*	
	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	DRB1 ₁	DRB1 ₂
P0230	03	24	40	51:36	01	15
014917	03	30	15	51:36	01	04
017131	03	24	40	51:36	01	08
017348	11	29	07	51:36	01	11
018290	01	24	15	51:36	01	15
020766	03	33	44	51:36	01	07
023366	03	11	51:36	52	01	12
025682	03	11	40	51:36	01	12
027060	03	11	51:36	52	01	15
027934	02	03	46	51:36	01	14
029166	03	24	51:36	58	01	16
034036	03	11	15	51:36	01	12
035201	03	11	13	51:36	01	16
036903	01	03	51:36	57	01	07
037822	02	03	51:36	54	01	04
039047	03	30	13	51:36	01	07
097313	02	03	15	51:36	01	15
097682	01	03	51:36	57	01	07
099289	03	11	48	51:36	01	09
100335	03	33	15	51:36	01	12
108471	11	33	44	51:36	01	13
109360	02	02	46	51:36	01	12
116228	02	03	51:36	54	01	04
116475	03	33	51:36	58	01	03
117476	03	11	40	51:36	01	09
118595	03	24	40	51:36	01	15
118837	03	68	27	51:36	01	04
119650	01	03	35	51:36	01	15
121238	03	33	51:36	58	12	13
125106	03	24	46	51:36	01	09
126419	03	24	51	51:36	01	09
127257	03	33	51:36	58	01	03
131775	03	11	51:36	55	01	12
131945	03	30	13	51:36	01	07

表 2 1 例样本家系调查结果

编号	标本来源	性别	A 位点结果	B 位点结果	DR 位点结果
1	先证者	男	03:30	15(75);51:36	01;04
2	先证者父亲	男	03:11	51:36;55	01;04
3	先证者母亲	女	02:30	15(75);15(71)	04;-
4	先证者大姐	女	02:11	15(71);55	04;-
5	先证者二姐	女	02:03	15(71);51:36	01;04
6	先证者女儿	女	02:03	50;51:36	01;07

表 3 微量淋巴细胞毒试验结果

抗体号	HLA 抗体特异性	记分
Z1573	B5,49,63,77	8
Z1444	B51	8
X9554	B12,76	6
Z2328	B44	4
X8301	B44,38-/+ ,27	8
Z1207	B37	8
Z4748	Bw4	8

注:样本的 HLA 型为 A3, A33; B44, B51, B37, Bw4。表中只列出相关抗体的试验结果。记分:8 代表死亡细胞 >80%, 6 代表死亡细胞 60%~80%, 4 代表死亡细胞 30%~40%。

据报道 *HLA-B*51:36* 与 *B*51:08* 同源性最高,仅在氨基酸第 527、559、560 和 583 位上发生了碱基改变^[2]。我实验室的 SSP 结果也支持该结论。我实验室 34 个 *HLA-B*51:36* 的样本均为使用 SSOP 及 SBT 试剂后发现的,集中在后 40 000 例样本中(在此 40 000 例样本中 *B*51:36* 的频率为 0.085%)。我实验室 *HLA-B*51:36* 基因频率为 0.068%,远高于中华骨髓库 CWD 表中 2012950 中国人人群中 *HLA-B*51:36* 的 0.009 9% 基因频率^[3]。

HLA 等位基因多态性主要源于碱基的突变和基因重组。*HLA-B* 等位基因的多态性主要表现在第 2、3 和 4 外显子,其序列可分为高度多态性位点和相对保守位点。人群中 *HLA-B*51* 位点最常见的是 *B*51:0101*。*B*51:36* 等位基因与 *B*51:08* 序列相比,第 2 和 4 外显子上完全相同,仅在第 3 外显子上有核苷酸的差异,第 527 位 T→A、559 位 C→A、560 位 T→C 和 583 位 C→T。分析 IMGT/HLA 序列数据库可发现 *HLA-B*51* 基因组在第 527、538、539 和 540 位为相对保守位点,第 559、560 和 583 位为高度多态性位点。仅有 *B*51:08*、*B*51:20* 和 *B*51:36* 在 538、539 和 540 位上发生了相同的碱基突变,在相对保守位点发生碱基突变的原因可待进一步研究分析。

目前 *B*51:36* 的血清学特异性尚未能指定。本实验室采集编号为 020766 的献血者的新鲜血样,进行血清学检测。该样本的 *HLA-B* 血清学出现了 3 个抗原表型。而 HLA 杂合子正常个体的有核细胞表面,都应带有 2 个 *HLA-A* 抗原、2 个 *HLA-B* 抗原和 2 个 *HLA-DR* 抗原。既往有发现 *HLA-A* 抗原三联体的报道^[4],分析为基因变异而产生,但相关类似报道非常少见。检测样本出现这个血清学结果,是该样本本身特有还是 *HLA-B*51:36* 碱基突变影响氨基酸表达产生的位点特异性结果,仍需多个相关样本进一步试验分析原因。

但 *HLA-B*51:36* 的抗原特异性初步认定应为 *HLA-B51*。

由于 HLA 各位点的等位基因存在不同的多态性频率及显著的连锁不平衡现象^[5]。观察本实验室的 34 个样本发现 *B*51:36* 与 *DR*01* 两者是显著的连锁不平衡,33 个样本的 *HLA-DRB1* 均为 *01:01; *XX。且家系调查的单体型也为 *HLA-A*03-B*51:36-DRB1*01*,可验证 *B*51:36* 与 *DR*01* 在同一基因座上连锁遗传。而辽宁地区 *HLA-B*51* 的基因频率较高^[6],*HLA-DR*01* 的频率较低,本实验 50 000 例样本中的 *B*51-DRB1*01* 单体型频率为 0.24%, $\frac{\Delta}{\delta(\Delta)} = 0.99$ (<1.96)两者之间无连锁遗传,而是随机出现。调查发现 34 例 *B*51:36* 样本来源分散,性别、年龄、职业均无统计学意义。既往未发现有报道在同一地区如此频繁地发现同一新基因。试验样本中 *B*51:36* 与 *DRB1*01:01* 有显著的连锁不平衡。有报道发现 *B/DRB1* 单体型基因间相关性强于 *A/B* 单体型,也许通过进一步研究可以发现不同位点间相互影响会使位点的碱基序列发生改变,表达的氨基酸不同,从而形成新基因。假设存在 *DRB1*01:01* 时,*B*51:08* 更易发生基因位点特异性碱基突变从而形成 *B*51:36*,这个假说需要更多的实验数据来证明。

随着中华骨髓库的入库数据量不断扩大以及分型检测试剂的精确度越来越高,有关中国人种的新基因不断被发现,相关的资料越来越详尽,可为科研提供进一步更为详实和准确的材料,使人类早日解开有关 HLA 遗传及变异的相关疑惑。

参考文献

[1] 杨颖,张工梁. HLA 的遗传学[M]//谭建明,周永昌,唐孝达. 组织配型技术与临床应用. 北京:人民卫生出版社,2002:91-95.

[2] Yan LX, Zhu FM, Lv QF, et al. Identification of *HLA-B*5136* in the Chinese population[J]. Tissue Antigens, 2005, 65(3):280-282.

[3] He Y, Li J, Mao W, et al. HLA common and well-documented alleles in China[J]. HLA, 2018, 92(4):199-205.

[4] 张辉,狄文英,张俭,等. 一个 *HLA-A* 抗原三联体家庭的分子遗传学研究[J]. 中国输血杂志, 2004, 17(6):404-407.

[5] Tao Y, Shi L, Liu S, et al. Distribution of *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, and *HLA-DRB1* alleles and haplotypes in Jingpo minority in Yunnan province of China [J]. Hum Immunol, 2020, 81(6):267-268.

[6] 陈阳,李剑平. 辽宁汉族人群 *HLA-B* 等位基因多态性的分布[J]. 中华医学遗传学杂志, 2006, 20(4):461-462.