

## 人类白细胞抗原 A、B 和 DRB1 测序分型模棱两可结果的分布及解决\*

李恒聪,裴永峰,黄惠妮,吴国光<sup>△</sup>

(广西壮族自治区南宁中心血站/南宁输血医学研究所 530007)

**[摘要]** **目的** 调查广西人群 HLA-A、B、DRB1 基因测序分型中模棱两可结果的分布状况,提出解决方案。**方法** 采用聚合酶链反应-直接测序分型方法对 1 000 名中华骨髓库广西分库供者的 HLA-A、B、DRB1 基因进行测序分型,分析 3 个基因座模棱两可分型结果的分布情况,并分别采用高分辨聚合酶链反应-序列特异性引物法和组特异性测序引物法进行解决。**结果** 1 000 份标本中,96.7% 的标本 HLA-A、B、DRB1 基因至少有 1 个位点出现模棱两可结果,其中 HLA-A、B、DRB1 各位点出现模棱两可结果的比例分别为 65.7%、58.8%、77.2%。对于检出的模棱两可结果标本,单独采用组特异性测序引物法可以解决 87.37% HLA-A、93.54% HLA-B 和 60.49% 的 HLA-DRB1 基因模棱两可分型结果,使用高分辨聚合酶链反应-序列特异性引物法解决 12.63% HLA-A、4.76% HLA-B 和 15.29% HLA-DRB1 基因模棱两可分型结果,剩余 1.70% HLA-B 和 24.22% 的 HLA-DRB1 基因模棱两可分型结果联合使用组特异性测序引物法和高分辨聚合酶链反应-序列特异性引物法解决。**结论** 组特异性测序引物法和高分辨聚合酶链反应-序列特异性引物法分别对位于 HLA-A、B 和 HLA-DRB1 基因检测区内、外的模棱两可分型结果具有较高的解决能力,二者互为补充,可有效解决 HLA 高分辨基因分型结果模棱两可问题。

**[关键词]** 人类白细胞抗原;模棱两可;高分辨聚合酶链反应-序列特异性引物法;组特异性测序引物法

**[中图分类号]** R446.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)13-1759-03

## Ambiguity results distribution and its solutions of HLA-A, B and DRB1 sequence-based typing\*

Li Hengcong, Pei Yongfeng, Huang Huini, Wu Guoguang<sup>△</sup>

(Nanning Blood Center / Nanning Institute of Transfusion Medicine, Nanning, Guangxi 530007, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the ambiguity results distribution of HLA-A, B and DRB1 gene sequence-base typing in Guangxi population and to propose the way to resolve. **Methods** HLA-A, B and DRB1 genes of 1 000 donors in the Guangxi branch bank of China<sup>1</sup> bone marrow bank were genotyped by PCR-SBT, and then the ambiguity results distribution of the three loci was analyzed. The typing ambiguities results were resolved by high-resolution polymerase chain reaction- sequence-specific primers(PCR-SSP) and group specific sequencing primer(GSSP) methods, respectively. **Results** Among 1 000 samples, at least 1 locus in HLA-A, B and DRB1 genes in 96.7% samples appeared the ambiguity results, in which the proportions of HLA-A, B and DRB1 loci appearing ambiguity results were 65.7%, 58.8% and 77.2% respectively. For the samples of detected ambiguity results, single using the GSSP method could resolve the ambiguity typing results of 87.37% HLA-A, 93.54% HLA-B and 60.49% HLA-DRB1, using high-resolution PCR-SSP could resolve the ambiguity typing results of 12.63% HLA-A, 4.76% HLA-B and 15.29% HLA-DRB1, and the rest 1.70% HLA-B and 24.22% HLA-DRB1 ambiguity results were resolved by both GSSP and high-resolution PCR-SSPs method. **Conclusion** GSSP and high-resolution PCR-SSPs methods have high abilities to solve HLA ambiguity results both locate inside and outside the sequencing region, respectively. GSSP and high-resolution PCR-SSPs methods are supplement for each other, which can effectively resolve the problem of ambiguity results in high resolution HLA typing.

**[Key words]** HLA antigens; ambiguity; high-resolution polymerase chain reaction-sequence-specific primers; group specific sequencing primer

人类白细胞抗原(HLA)是迄今所知人类最复杂的免疫遗传多态性系统,并具有显著的种族特性。准确的 HLA 分型技术和分型数据,已被广泛用于器官和造血干细胞移植中寻找 HLA 相匹配的供者、HLA 与疾病相关性的研究等应用领域。HLA-A、B、DRB1 基因是造血干细胞移植中的 3 个最重要功能基因,供受者间 HLA 等位基因的配合程度与移植效果密切相关,精确的 HLA 分型有助于提高移植疗效<sup>[1-2]</sup>。近年来随着基因测序仪的普及和临床移植配型的要求,聚合酶链反应-直接测序分型法(PCR-SBT)在大规模 HLA 高分辨率分型工作中逐渐被广泛采用<sup>[3]</sup>。但与其他分型方法一样,PCR-SBT 并非完美,其中一个固有的问题是在分型判断时存在较高比例

的模棱两可组合的结果<sup>[4]</sup>,给 HLA 分型数据的精确判断带来了很大程度的困扰。

本文通过调查广西壮族自治区人群的 HLA-A、B、DRB1 基因直接测序分型中的模棱两可结果的分布状况,采用高分辨率聚合酶链反应-序列特异性引物法(PCR-SSP)和组特异性测序引物法(GSSP)<sup>[5]</sup>分别解决两类模棱两可分型结果,探讨 HLA 直接测序分型模棱两可分型结果的解决方案。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 1 000 名造血干细胞捐献者乙二胺四乙酸盐抗凝血液各 5 mL,全部来自中华骨髓库广西分库,所有供者按照中华骨髓库要求签署知情同意书。

**1.2 仪器与试剂** Gene Amp 9700 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司);3730 型基因测序仪(美国 ABI 公司)。DNA 提取试剂盒(批号:139309879)购自美国 Qiagen 公司;HLA-A、B 和 DRB1 基因的 SBT 分型试剂(批号:A 位点 1022134,B 位点 1034372,DRB1 位点 1037946)购自美国 Invitrogen 公司;高分辨聚合酶链反应-序列特异性引物法分型试剂(批号:1263281)购自美国 Invitrogen 公司;组特异性测序引物法引物(批号:1263282)购自美国 Invitrogen 公司。

**1.3 基因组 DNA 制备** 采用 DNA 提取试剂盒从全血中提取制备基因组 DNA,调节 DNA 浓度为 40~50 ng/ $\mu$ L,纯度( $A_{260}/A_{280}$  值)要求在 1.65~1.80,置-20℃冰箱冻存备用。

**1.4 HLA-A、B、DRB1 基因的直接测序分型** 常规检测 HLA-A、B 基因的第 2~4 外显子、HLA-DRB1 基因的第 2 外显子,PCR 扩增严格按照 HLA 测序试剂盒说明书操作。PCR 扩增产物采用 ExoSAP-IT 酶进行纯化,去除多余的游离 PCR 引物和底物 dNTPs。测序反应产物采用乙醇/醋酸钠/EDTA 沉淀法。经纯化后的测序反应产物于 ABI Prisma™ 3730 型基因测序仪电泳检测并收集电泳后的序列数据信息。电泳后的序列数据信息导入 HLA SBT uTYPE 6.1(Life Tech)分析软件,分析受检者 HLA 等位基因型。

**1.5 模棱两可结果解决** 对于常规检测区内(HLA-A、B 检测第 2~4 外显子,HLA-DRB1 检测第 2 外显子)的模棱两可结果,用 GSP 进行鉴定,按照试剂盒说明书操作。对于常规检测区外的模棱两可结果,用高分辨 PCR-SSP 方法进行鉴定,按照试剂盒说明书进行操作;扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,特异性阳性条带与说明书的阳性条带图谱比对,确定分型结果。

**1.6 统计学处理** 采用直接计数法,统计 HLA-A、B、DRB1 位点模棱两可结果的种类及比例。

## 2 结果

**2.1 HLA-A、B、DRB1 基因直接测序分型模棱两可结果分布** 1 000 份标本 HLA-A、B、DRB1 基因直接测序分型结果显示:96.7%的标本其 HLA-A、B、DRB1 基因至少有 1 个位点出现模棱两可结果。从单个 HLA 位点来看,HLA-A、B、DRB1 位点模棱两可结果的比例分别为 65.7%、58.8%、77.2%,见表 1。

表 1 HLA-A、B、DRB1 基因直接测序分型模棱两可结果分布

HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	标本数量	比例(%)
+	+	+	33	3.3
+	+	-	109	10.8
+	-	+	42	4.2
-	+	+	65	6.3
+	-	-	159	16.0
-	+	-	205	20.4
-	-	+	88	9.0
-	-	-	299	30.0
			1 000	100.0

-:模棱两可结果,+:无模棱两可结果。

**2.2 HLA-A、B、DRB1 基因的直接测序模棱两可分型结果的种类分布** 根据产生模棱两可分型结果的碱基序列是否在常规检测区内将所有模棱两可分型结果分为 3 类:检测区内、检测区外和两种情况并存。657 个 HLA-A、588 个 HLA-B、772 个 HLA-DRB1 模棱两可结果的分类分布情况见表 2。HLA-

A、B、DRB1 基因检测区内的模棱两可比例都高于检测区外。

表 2 HLA-A、B、DRB1 基因模棱两可的种类分布情况[n(%)]

HLA 位点	检测区内	检测区外	检测区内外同时存在
HLA-A	574(87.37)	83(12.63)	0(0)
HLA-B	550(93.54)	28(4.76)	10(1.70)
HLA-DRB1	467(60.49)	118(15.29)	187(24.22)

**2.3 HLA-A、B、DRB1 基因测序分型模棱两可结果解决** 组特异性测序引物法分型结果显示:位于检测区内的模棱两可分型标本 574 个 HLA-A、559 个 HLA-B 和 652 个 HLA-DRB1 采用 1~3 个组特异性测序引物分离法引物均获得清晰分离结果。说明组特异性测序引物法解决此类模棱两可结果的能力较强(超过了 99%),见表 3。但有个别模棱两可等位基因组合,如 B\*38:02/B\*57:01/B\*38:08/B\*57:43 由于现有组特异性测序引物法无法解决,采用高分辨聚合酶链反应-序列特异性引物法予以解决。

表 3 组特异性测序引物法解决模棱两可结果[n(%)]

HLA 位点	解决数量	总模棱两可标本数量	检测区内模棱两可标本数量
HLA-A	574	657(87.37)	574(100)
HLA-B	549	588(93.37)	550(99.82)
HLA-DRB1	465	772(60.23)	467(99.57)

高分辨聚合酶链反应-序列特异性引物法分型结果:83 例 HLA-A、38 例 HLA-B、305 例 HLA-DRB1 模棱两可标本通过 PCR-SSP 解决了检测区外的模棱两可(表 4),但其中有 10 例 HLA-B、187 例 HLA-DRB1 因同时还存在检测区内模棱两可,还使用了组特异性测序引物法来予以解决。

表 4 检测区外模棱两可等位基因的 PCR-SSP 分型结果

模棱两可等位基因	分型结果	数量
A*11:02/A*11:110	A*11:02	74
A*74:01/A*74:02	A*74:02	8
A*23:01/A*23:17	A*23:01	1
B*07:05/B*07:06	B*07:05	15
B*35:01/B*35:42	B*35:01	18
B*18:01/B*18:17N	B*18:01	2
B*27:05/B*27:13	B*27:05	2
B*15:03/B*15:103	B*15:03	1
DRB1*11:01/DRB1*11:97	DRB1*11:01	100
DRB1*12:01/DRB1*12:10	DRB1*12:01	31
	DRB1*12:10	1
DRB1*14:01/DRB1*14:54	DRB1*14:54	158
DRB1*04:06/DRB1*04:49	DRB1*04:06	15

## 3 讨论

HLA 基因测序分型技术是 HLA 基因分型的金标准,被公认为器官移植前和造血干细胞移植前 HLA 高分辨配型的最佳方法。供受者间 HLA 高分辨水平匹配相合程度对移植

效果具有显著影响<sup>[1-2]</sup>,精确的 HLA 分型有助于提高移植疗效。

HLA 模棱两可等位基因组合按形成原因主要分为两种:(1)常规检测区序列完全相同,差异碱基在常规检测区外导致(常规检测区外模棱两可);(2)由于 PCR 产物的杂合性,有时不同等位基因的组合可得到相同的杂合子序列,即检测区内杂合序列一致(检测区内模棱两可)<sup>[6]</sup>。目前用于解决 HLA 基因分型模棱两可的方法主要有 PCR-SSP 法、GSSP、GSA<sup>[7-8]</sup>、基因克隆测序法<sup>[9]</sup>、单倍型分离法<sup>[10]</sup>、焦磷酸测序法<sup>[11]</sup>、参照链介导构象分析法(RSCA)<sup>[12]</sup>等实验性方法,此外还有非实验性的统计学方法<sup>[13]</sup>。

本文对 1 000 名广西人群 HLA-A、B、DRB1 的直接测序分型结果显示,仅有 3.3% 的标本未出现模棱两可分型结果,96.7% 的标本至少有 1 个位点出现模棱两可结果,表明 PCR-SBT 方法存在较高比例的模棱两可分型结果。HLA-A、B、DRB1 位点模棱两可结果的比例分别为 65.7%、58.8%、77.2%,其中 HLA-A、BDRB1 位点的检测区范围内的模棱两可比例(87.37%,93.54%,60.49%)明显高于检测区外(12.63%,4.76%,15.29%)。

组特异性测序引物法是一种简单快捷、准确可靠、易实现高通量的解决模棱两可分型结果的方法。本文数据显示其解决位于检测区内的模棱两可分型结果的能力达到 99%,总体能解决 87.37% 的 HLA-A 基因,93.37% B 基因和 60.23% 的 HLA-DRB1 基因的模棱两可分型结果,因此需要采用聚合酶链反应-序列特异性引物法等其他方法来补充。

PCR-SSP 从理论上可以解决所有的模棱两可分型结果,但该方法本身存在如引物设计工作量大、难以实现高通量等明显缺点,使其难以作为大规模分型实验中解决模棱两可分型结果的主要方法,但可作为辅助方法少量应用,以弥补其他方法的不足。其他如组特异性扩增法存在未能解决同个扩增组内的模棱两可、实验工作量大等缺点,而基因克隆测序法、单倍型分离法等方法操作更为繁琐,部分存在与聚合酶链反应-序列特异性引物法相同的缺点,难以作为解决模棱两可分型结果的常规方法。

综上所述,在 HLA-A、B、DRB1 基因测序分型中,存在较高比例的模棱两可分型结果,影响了分型结果的准确性。GSSP 和 PCR-SSP 分别对 HLA-A、B 和 HLA-DRB1 基因的模棱两可分型结果具有较高的解决能力,两种方法互为补充、共同发挥作用,可较好解决基因测序分型模棱两可问题,为临床移植配型和骨髓库供者分型提供更好的技术保障。

## 参考文献

[1] Kanda J. Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease[J]. *Int J Hematol*, 2013, 98(3): 300-308.  
 [2] Buck K, Wadsworth K, Setterholm M, et al. High-resolution match rate of 7/8 and 9/10 or better for the be the

match unrelated donor registry[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016, 22(4): 759-763.

- [3] Zhou XY, Zhu FM, Li JP, et al. High-resolution analyses of human leukocyte antigens allele and haplotype frequencies based on 169 995 volunteers from the China bone marrow donor registry program[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0139485.  
 [4] Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future[J]. *Tissue Antigens*, 2012, 80(1): 1-11.  
 [5] Lebedeva TV, Mastromarino SA, Lee E, et al. Resolution of HLA class I sequence-based typing ambiguities by group-specific sequencing primers[J]. *Tissue Antigens*, 2011, 77(3): 247-250.  
 [6] 李恒聪, 吴国光. HLA 高分辨分型模棱两可组合研究和解决问题的进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(5): 1345-1349.  
 [7] Foster L, Tate D, Poulton K. A group-specific sequencing approach to investigate the presence of atypical human leukocyte antigen alleles[J]. *Int J Immunogenet*, 2013, 40(6): 453-459.  
 [8] Zhu F, He Y, Tao S, et al. Analysis of the complete cDNA sequences of HLA-DRB1 alleles with group-specific amplification primers in the Chinese Han population[J]. *Tissue Antigens*, 2011, 77(4): 329-332.  
 [9] Tao H, Chen LX, Xu YP, et al. Genomic full-length sequence of two HLA-A alleles, A\*02:07:01 and A\*02:10, identified by cloning and sequencing[J]. *Tissue Antigens*, 2015, 86(4): 293-295.  
 [10] Nagy M, Entz P, Otremba P, et al. Haplotype-specific extraction: a universal method to resolve ambiguous genotypes and detect new alleles-demonstrated on HLA-B[J]. *Tissue Antigens*, 2007, 69(2): 176-180.  
 [11] Vanni I, Ugolotti E, Larghero P, et al. HLA-B and HLA-C supratyping by pyrosequencing? [J]. *Methods Mol Biol*, 2015(1315): 133-151.  
 [12] Sun Y, Zhao D, Jin L, et al. Human leukocyte antigens A and B Loci genotyping by reference strand-mediated conformation analysis in hematopoietic stem cell transplantation donor selection[J]. *Int J Hematol*, 2007, 86(1): 77-83.  
 [13] Mack SJ, Cano P, Hollenbach JA, et al. Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue[J]. *Tissue Antigens*, 2013, 81(4): 194-203.

(收稿日期:2016-12-03 修回日期:2017-01-21)

(上接第 1758 页)

[19] Roy T, Lloyd CE. Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review[J]. *J Affect Disord*, 2012, 142(Suppl): S8-S21.  
 [20] Cooney GM, Dwan K, Greig CA, et al. Exercise for de-

pression[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(9): 1-160.

(收稿日期:2016-11-29 修回日期:2017-01-17)