

本栏目由北京万泰生物药业有限公司赞助

## · 实验研究 ·

# 河南省造血干细胞资料库汉族捐献者 HLA 基因多态性调查

张伯伟 邢培清 郭如华 别立莉 赵磊 杨瑞云 杜鹃

(河南省红十字血液中心, 河南郑州 450053)

**摘要:**目的 了解河南造血干细胞资料库捐献者人类白细胞抗原 HLA-A、B、DRB1 等位基因多态性。方法 按《中国造血干细胞捐献者资料库, 组织配型实验室规程》(以下简称规程)的要求, 采用国际通用的序列特异性引物-聚合酶链反应(PCR-SSP), 检测 1626 名造血干细胞捐献者的部分等位基因, 计算各等位基因的频率, 分析与国内外不同地区汉族人群的调查结果对比。结果 检出 HLA-A 等位基因 17 个, 基因频率较高的有 A2/0.2947、A11/0.1593、A24/0.1544、A33/0.1193; B 位点共检出等位基因 41 个, 高频基因为 B13/0.1004、B51/0.0791、B46/0.0632、B40(60)/0.0741、B40(61)/0.0629、B35(0.0510)、B15/62(0.0694); DRB1 高频基因为 DR07/0.1377、DR04/0.1076、DR09/0.1270、DR12/0.1038、DR15/0.1715; 未检出的等位基因有 A36、A74、B4005、B15/70、B82。结论 河南造血干细胞库汉族 HLA 基因多态性分布符合其种族、地区特点。

**关键词:**干细胞, 造血 频率, HLA 基因 多态性, 基因 中华骨髓库 汉族, 河南

**中图分类号:**R457.1<sup>+</sup>1 R457.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2006)02-0115-03

本中心承担了中国造血干细胞捐献者资料库(以下简称资料库)中, 河南省干细胞捐献者的 HLA 分型检测工作, 并按照《中国造血干细胞捐献者资料库, 组织配型实验室规程》(以下简称规程)的要求, 建立了分子生物学实验室, 采用 PCR-SSP 方法对部分干细胞汉族志愿捐献者血样作 HLA-A、B、DRB1 基因分型, 现总结报告如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 样本来源** 来自 2003 年 10 月~2004 年 7 月河南省无偿献血者中志愿参加造血干细胞捐献者血样 1626 份。

**1.2 试剂与仪器** HLA-A、B、DRB1 基因分型试剂盒(美国 PEL-FREEZ 公司产, 中国进口许可证号 20033400120, 含特异性引物 159 对, 可检出 612 个等位基因, 涵盖了“规程”要求检出的全部等位基因, 并可指定出相应的血清学特异性); 人类基因组 DNA 提取纯化试剂盒(PEL-FREEZL 公司提供); Taq 酶(DNA 聚合酶, 美国 promager 公司); 琼脂糖(Agarose, 西班牙产, 上海分装); 溴化乙锭(EB, 美国 Promega 公司); 电泳液为 0.5%TBE 液, 按文献[1]配方自制; MJR PCR 扩增仪(4×384 孔, 美国); Syngene 凝胶成像分析系统(美国); Eppendorf 核酸蛋白测定仪(德国); Embitec 96 孔电泳仪(美国); Clnityper 分析软件(PEL FREEIL 公司)。

**1.3 血样采集与 DNA 提取** 采捐献者静脉血 5ml, EDTA 抗凝, 按 DNA 提取试剂盒操作说明取全血 500μl 加红细胞裂解液 1ml, 充分震荡使红细胞裂解完全, 13000/min 离心 10min, 弃上清, 加核裂解液 100 μl, 60℃水浴 10min; 加蛋白清除剂 300μl, 4℃放置 10min, 13000/min 离心 10 min; 分出上清于另一离心管, 加-20℃预冷的 95%乙醇沉淀 DNA,

13000/min 离心 10 min, 弃上清, 60℃水浴 10min 使乙醇挥发; 加无菌去离子水 300μl, 37℃过夜(或 60℃ 10min)溶解 DNA。测 DNA 浓度为(15~110)ng/μl(平均 60 ng/μl), 纯度 OD<sub>260/280</sub> 为 1.1~1.7(平均 1.2); -20℃保存备用。

**1.4 PCR 扩增与电泳分析** 将分型反应干板从-20℃取出室温平衡 10min, 融化 PCR Buffer 充分混匀后取 360μl 与 1.5ml Eppendorf 管中, 加 Taq 酶 4.5(5U/μl), 计算取 DNA、无菌去离子水的量共 565μl, 混合均匀, 使 DNA 终浓度为 4.5ng/μl; 用电子连续加样器每孔加样 8μl 贴封片震荡混匀, 平板离心机 3000r/min 5min, 上机扩增, 扩增参数: ① 96℃预变性 60s, ② 96℃ 25s, 70℃ 50s, 72℃ 45s 5 个循环, ③ 96℃ 25s, 65℃ 50s, 72℃ 45s 21 循环, ④ 96℃ 25s, 55℃ 60s, 72℃ 120s 4 个循环, 扩增完成及时电泳。2%琼脂糖凝胶制备: 称胶粉 2g 溶于 100mlTBE 液中, 煮沸 1~2min 使胶液透明, 冷却至 70℃ 加 EB 2μl 混匀, 到入 96 孔胶盒, 冷却 30min 备用; 点样 3μl 电压 150V 电泳 8~10 min, 在凝胶成像系统读结果并打印胶图照片, 根据反应格局用 Unityper 分析软件判读结果。

**1.5 结果分析** 规程要求检出 HLA-A 位点等位基因 19 个, B 位点等位基因 43 个, DRB115 个, 本实验室所选用试剂能全部检出。用该试剂对 2002 年 11 月国家发放的室间质控样本检测, 符合率为 100%, 说明实验数据可靠。抗原频率计算:  $f_i = \text{基因数} / \text{观察数}$ ; 基因频率计算: 用基因记数法  $p_i = \text{基因组数} / 2N$  ( $f_i$  为表型频率,  $p_i$  为相应基因频率,  $N$  为观察数)<sup>[2]</sup>。

## 2 结果(表 1~4)

表 1 造血干细胞捐献者 HLA-A 位点抗原频率和基因频率( n = 1626)

HLA/血清学	抗原数	抗原频率	基因频率	HLA/血清学	抗原数	抗原频率	基因频率
A01/A1	142	0.0873	0.0446	A32/A32	65	0.0399	0.0202
A02/A2	817	0.5025	0.2947	A33/A33	194	0.1193	0.0613
A03/A3	149	0.0916	0.0469	A34/A34	3	0.0018	0.0009
A11/A11	462	0.2841	0.1539	A36/A36	0	0	0
A23/A23	12	0.0074	0.0037	A66/A66	2	0.0012	0.0006
A24/A24	466	0.2866	0.1554	A68/A68	9	0.0233	0.0112
A25/A25	3	0.0018	0.0009	A69/A69	3	0.0013	0.0009
A26/A26	108	0.0664	0.0343	A74/A74	0	0	0
A29/A29	40	0.0246	0.0123	blank	386	0.2374	0.0434
A30/A30	254	0.1562	0.0814	合计	3252	2	1
A31/A31	110	0.0677	0.0338				

表 2 造血干细胞捐献者 HLA-B 频率和基因频率<sup>[3]</sup>( n = 1626)

HLA/血清学	抗原数	抗原频率	基因频率	HLA/血清学	抗原数	抗原频率	基因频率
07/B7	145	0.0892	0.0456	56/B56	4	0.0025	0.0012
08/B8	35	0.0215	0.0108	57/B57	45	0.0277	0.0139
13/B13	310	0.1907	0.1004	58/B58	102	0.0627	0.0319
18/B18	18	0.0107	0.0056	40/B60	232	0.1427	0.0741
27/B27	91	0.0560	0.0284	40/B61	198	0.1218	0.0629
35/B35	162	0.0099	0.0510	15/B62	218	0.1341	0.0694
37/B37	48	0.0295	0.0149	15/63	8	0.0049	0.0003
38/B38	87	0.0535	0.0271	67/B67	32	0.0197	0.0057
39/39	52	0.0031	0.0130	15/B70	0	0	0
1522/B1522	1	0.0006	0.0003	73/B73	4	0.0025	0.0012
41/B41	6	0.0037	0.0161	15/B75	118	0.0726	0.00370
42/B42	1	0.0006	0.0003	78/B78	1	0.0006	0.0013
44/B44	155	0.0953	0.0489	81/B81	2	0.0052	0.0026
45/B45	8	0.0049	0.0025	15/B71	50	0.0308	0.0155
46/B46	199	0.1224	0.0632	14/B65	19	0.0117	0.0059
48/B48	112	0.0689	0.0351	14/B64	3	0.0018	0.0009
49/B49	19	0.0117	0.0059	15/B72	14	0.0086	0.0043
4005/B4005	0	0	0	59/B59	1	0.0006	0.0003
50/B50	145	0.0892	0.0456	15/B76	5	0.0031	0.0015
51/B51	247	0.1519	0.0791	15/B77	1	0.0006	0.0003
52/B52	92	0.0566	0.0287	82/B82	0	0	0
54/B54	77	0.0474	0.0239	blank	249	0.1531	0.0595
55/B55	64	0.0394	0.0189	合计	3252	2	1

注:所用试剂可检出 44 个等位基因, 15/72 规程未作要求

表 3 造血干细胞捐献者 HLA-DRB1 频率和基因频率( n = 1626)

DRB1/血清学	抗原数	抗原频率	基因频率	DRB1/血清学	抗原数	抗原频率	基因频率
01/DR1	107	0.0658	0.0335	12/DR12	320	0.1968	0.1038
03/DR17	113	0.0959	0.0492	13/DR13	152	0.0935	0.0479
04/DR4	311	0.2036	0.1076	14/DR14	167	0.1027	0.0527
07/DR7	391	0.2565	0.1377	15/DR15	510	0.3137	0.1715
08/DR8	157	0.0966	0.0495	16/DR16	96	0.0590	0.0299
09/DR9	387	0.2380	0.1270	BLANK	283	0.0912	0.0376
10/DR10	45	0.0268	0.0139	合计	3252	2	1
11/DR11	193	0.1187	0.0612				

表 4 不同地区民族常见 HLA 基因频率比较

等位基因	本组(n=1626)	上海(n=3736) <sup>[4]</sup>	山东(n=4000) <sup>[5]</sup>	广东(n=406) <sup>[6]</sup>	日本(n=1023) <sup>[7]</sup>	高加索人(n=246) <sup>[7]</sup>	美国黑人(n=44) <sup>[7]</sup>
A2	0.2947	0.0311	0.2828	0.3078	0.2440	0.2830	0.1670
A11	0.1539	0.2011	0.1561	0.3331	0.1040	0.0550	0.0230
A24	0.1544	0.1719	0.1439	0.1676	0.3510	0.0960	0.0470
A33	0.0613	0.0941	0.0909	0.0833	0.0770	0.0100	0.0810
B13	0.1004	0.1111	0.1280	0.0674	0.0180	0.0300	0.0090
B51	0.0791	0.0651	0.0702	0.0453	0.0930	0.0370	0.0320
B46	0.0632	0.1200	0.0514	0.1676	0.0440	0	0
B40/60	0.0741	0.0837	0.0616	0.1676	0.0560	0.0450	0.0130
B40/61	0.0629	0.0659	0.0643	0.0478	0.1070	0.0330	0.0020
B35	0.0510	0.0459	0.0567	0.0274	0.0810	0.0850	0.0770
B15/62	0.0694	0.0729	0.0696	0.0504	0.0830	0.0550	0.0140
DRB104	0.1076	*	0.1071	0.1064	0.2280	0.1280	0.0340
DRB107	0.1377	—	0.1370	0.0223	0.0040	0.1510	0.0950
DRB109	0.1270	—	0.1165	0.1750	0.1330	0.0150	0.0290
DRB112	0.1038	—	0.1007	0.1189	0.0700	0.0160	0.0380
DRB115	0.1751	—	0.1804	0.1486	0.0100	0.1080	0.1170

\* 未观察 DR 位点

### 3 讨论

HLA-A 位点共检出等位基因 17 个, 较高基因频率的 ( $\pi > 0.1000$ ) 有 A2、A11、A24、A33; 低频率等位基因 ( $\pi < 0.0010$ ) 有 A25、A66、A34, 未检出的等位基因有 A36、A74 (表 1)。B 位点共检出等位基因 41 个, 高频基因 ( $\pi > 0.050$ ) 为 B13、B51、B46、B40/60、B40/61、B35、B15/62; 低频率 ( $\pi < 0.0010$ ) 基因有 B1522、B42、B78、B14/64、B59、B15/77, 未检出的基因有 B4005、B15/70、B82; B15 按所对应的不同血清学特异性划分为 B15/62、0.0649, B15/75、0.0370, B15/71、0.0155, B15/770、0.0003 (表 2)。DRB1 检出等位基因 13 个 较高频率有 DR07/0.1377、DR04/0.1076、DR09/0.1270、DR12/0.1038、DR15/0.1715。

目前我国的造血干细胞捐献者资料库的库容数量远低于欧美国家及我国台湾地区, 这使得寻求干细胞供者十分困难, 使大量患者长久等待移植治疗, 而且以往有关 HLA 基因多态性分布的研究资料也非常少, 已有的报道多为血清学方法, 观察数量较小<sup>[7,8]</sup>。HLA 基因多态性分布有地区种族差异, 本组资料与山东脐血库资料基本一致 (表 4), 这与两地汉族所处的地理位置相近不无关系。亚洲人特有基因 B46 存在种族和地区差异; 高加索、美国黑人基因频率均为 0, 广东、上海汉族则分别为 0.1676、0.1200 高于本组 0.0632 和山东 0.0514。建立适合本民族本地区的造血干细胞捐献者资料库, 可提高本地区移植者检索相和的机率, 同时也了解了 HLA 基因多态性分布情况, 为人类学、群体遗传学研究提供了参考资料。HLA 的某些等位基因与免疫系统疾病, 肿瘤、传染病的易感性相关 (如 B27 与强直性脊柱炎), 通过 HLA

多态性分析可了解某些疾病的发生发展、流行趋势, 以制定相应的防御、治疗对策。患者的 HLA 基因分型检测分析, 可为临床疾病, 特别是遗传、免疫性疾病的诊断提供重要的依据。PCR-SSP 方法为国际通用的 HLA 分型方法, 该方法操作简便、快捷, 加之严格按照规程操作, 实验数据应比以往的血清学检测数准确可靠。

### 参考文献

- 曹孟德, 秦东春, 孙含笑主编. HLA 分子生物学及临床应用 [M]. 郑州: 河南医科大学出版社, 1998, 103~104
- 赵桐茂. 人类血型遗传学 [M]. 北京: 科学出版社, 1987, 235~236
- 中国红十字会总会干细胞资料库管理中心. 中国造血干细胞捐献者资料库 (中华骨髓库) “组织配型实验室” 规则 (试行). 2001-01
- 冯明亮, 陆琼, 马俊, 等. 中华 (上海) 骨髓库北方汉族人群 HLA 多态性调查. 福州: 中国输血协会第二届输血年会论文集, 19
- 潘洁, 周胜龙, 沈柏均, 等. 山东脐血库保存 4000 人份脐血资料的统计分析 [J]. 中国实验血液学杂志, 2002, (10)3: 257
- 肖露露, 陈洪涛, 叶欣, 等. HLA 多态性在广东汉族人群分布的特殊性 [J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1999, (19)4:
- 谭建明, 周永昌, 唐孝达主编. 组织配型技术与临床应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 115~118
- 赵桐茂. HLA 分型原理和应用 [M]. 上海科技出版社, 1984, 121~126

(2005-01-06 收稿, 2006-02-27 修回)

本文编辑: 蔡辉