

中国汉族人群人类白细胞抗原新等位基因A*1155的确认

周丹

Identification of a novel human leukocyte antigen allele A*1155 in a Chinese Han population

Zhou Dan

Abstract

BACKGROUND: Most of novel alleles in China are found due to abnormal reaction patterns in low-resolution human leukocyte antigen (HLA) typing and identified by further gene sequencing or gene cloning. Thus, some novel alleles may be missed. Gene sequencing is considered to be the golden standard for HLA typing, which can obtain exact nucleotide sequence.

OBJECTIVE: To detect the samples in Chinese Bone Marrow Bank by gene sequencing typing, and to identify novel allele in Chinese Han population.

METHODS: Blood (5 mL) suspected as a new gene were redraw. An unknown HLA-A allele was detected by sequence-based typing (SBT) in a Chinese bone marrow donor. SBT showed that there was 1 difference compared with database in exon 2. Its anomalous patterns suggested the possible presence of either a novel A*03 or a novel A*11. To separate the two alleles and to determine whether the allele was novel, TOPO TA cloning was performed. The sequencing result was compared with known HLA allele sequence.

RESULTS AND CONCLUSION: Heterozygous allele was separated by cloning. A novel allele was identified with sequencing. The novel allele was most similar to A*1155 except for one nucleotide exchange in exon 2 at position nt 330 C>G, codon 86 N (AAC)>K (AAG), resulting in amino acid exchange. This allele is a novel HLA-A allele and has been officially named HLA-A*1155 by the Nomenclature Committee of World Health Organization on 31 October 2009.

Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China

Zhou Dan, Associate chief technician, Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China
zd_ky@hotmail.com

Received:2010-03-12
Accepted:2010-04-20

Zhou D. Identification of a novel human leukocyte antigen allele A*1155 in a Chinese Han population. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(44): 8241-8244. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 在国内发现的新等位基因中, 大部分都是先采用人类白细胞抗原分型低分辨方法进行分型, 如发现反应格局异常后, 再进一步用基因测序或基因克隆方法进行确认, 这样有可能导致一些新等位基因未被发现。基因测序分型方法被认为是人类白细胞抗原分型的金标准, 它可得出精确的核苷酸序列。

目的: 直接采用基因测序分型方法对中华骨髓库标本进行检测, 识别和确认中国汉族人群中新发现的等位基因。

方法: 应用中国造血干细胞捐献者测序结果可疑为新等位基因的重采血样 5 mL, 采用基因测序分型技术, 发现一样本 HLA-A 位点的杂合结果 HLA-A*030101/A*110101 在外显子上有 1 个位置与数据库不符, 为了区别哪一个为新等位基因, 采用基因克隆(TOPO TA Cloning)技术对两个等位基因 1-8 外显子进行 DNA 双向测序, 发现 1 个与 HLA-A*110101 序列相近的新等位基因, 分析两者核苷酸序列的差异。并将测序结果与已知人类白细胞抗原等位基因序列比较分析。

结果与结论: 通过克隆分离杂合等位基因, 再进行测序确认发现新的序列与 A*110101 相比, 在第 2 外显子第 330 碱基位置上 C→G, 密码子 86AAC→AAG, 发生了氨基酸的改变, 由天冬酰胺变为赖氨酸。提示该等位基因为新的 HLA-A 等位基因, 2009-10-31 被世界卫生组织人类白细胞抗原命名委员会正式命名为 HLA-A*1155。

关键词: 人类白细胞抗原; HLA-A*1155; 基因测序; 克隆; 外显子

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.44.018

周丹. 中国汉族人群人类白细胞抗原新等位基因 A*1155 的确认[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(44):8241-8244. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 系统是迄今所知人类最复杂的免疫遗传多态性系统, 在遗传学、法医学和移植免疫学中起着非常重要的作用。截止目前, 人类白细胞抗原 A 位点已有 767 个基因, A*11 组中有 54 个等位基因 (release 2.25.1, April 2009)^[1]。作者在对骨髓库供者采用基因测序分型技术进行高分辨常规检测时, 发现 1 例反应格局异常的标本, 2-4 外显子测序结果显示 A*030101/A*110101 在第 2 外显子有 1 个碱基与数据库 (IMGT/HLA release2.26, July 2009)

不相符, 作者采用聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸探针 (PCR-sequence specific oligonucleotide probe, PCR-SSOP) 基因试剂进行人类白细胞抗原低分辨分型及聚合酶链反应-序列特异性引物 (PCR-sequence specific primer, PCR-SSP) 方法做人类白细胞 A 抗原高分辨分型, 格局未发现异常。为了进一步确认这两个等位基因中哪一个为新等位基因, 作者将标本进行基因克隆, 对两个等位基因的 1-8 外显子分别进行双向测序, 发现该样本中 1 个等位基因为 A*030101, 另一个为新的等位基因, 该新等位基因与 A*110101 在第 330 位碱基上有改变 C→G, 密码子 86 AAC→AAG, 导致了氨基酸的改变。该新等位基因已于 2009-

深圳市血液中心, 广东省深圳市 518035

周丹, 女, 1967 年生, 湖南省长沙市人, 汉族, 1990 年广西医学院毕业, 副主任技师, 主要从事输血医学研究。
zd_ky@hotmail.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2010)44-08241-04

收稿日期: 2010-03-12
修回日期: 2010-04-20
(20091014005/G · Z)

10-31 被世界卫生组织人类白细胞抗原因子命名委员会正式命名为人类白细胞抗原 A*1155。此样本的人类白细胞抗原基因分型结果为 A*030101/A*1155, B*070201/B*150101, DRB1*0405/DRB1*150101。本文采用随机方法对骨髓库标本进行人类白细胞抗原 A, B, DRB1 基因测序分型, 并对其中反应格局异常的等位基因做进一步确认试验。

1 材料和方法

设计: 验证实验。

地点: 在深圳市血液中心完成。

材料: 样本来自于中国造血干细胞捐献者资料库广东分库骨髓志愿捐献者, 男性, 汉族, 籍贯为湖北省。骨髓志愿捐献者按照中华骨髓库要求签署知情同意书。

主要仪器: 9700 聚合酶链反应扩增仪(PE 公司产品), 3730 测序仪(Applied Biosystems 公司产品), 电泳仪(美国 Embi 公司产品), 流式磁珠分析仪(Luminex 100 液相分析平台, 美国)。

方法:

基因组 DNA 提取: 50 g/L EDTA 抗凝外周全血, 采用美国 Genra 公司提供的 DNA 快速提取试剂盒, 从 300 μ L 全血中提取基因组 DNA, DNA 浓度为 110 mg/L, A_{260/280} 为 1.79。

HLA 分型: 常规 PCR-SSOP 分型采用 R-SSO-LUMINEX 基因分型试剂盒(One-lambda Inc CA USA)。PCR-SSP 高分辨使用 Pel-Freez A high (Lot#011, Kit Batch#45687)分型试剂。HLA-A 外显子测序基因测序分型试剂盒采用 Atria Genetics AlleleSEQR HLA-A SBT Pack (Atria Genetics, South San Francisco, CA), 分析软件使用 Assign 3.5+HARPS 版本 (Conexio Genomics Pty Ltd, Copyright 2006 Release Version, Applecross, Western Australia, Australia)。均严格按试剂说明书进行操作。

基因克隆: 根据 EMBL Nucleotide Sequence Database 设计聚合酶链反应引物, 扩增 HLA-A 位点 1-8 外显子。

引物由上海生工生物工程公司合成:

正向引物: 5'-GGA CTC AGA ATC TCC CCA GAC GCC GAG -3',

反向引物: 5'-GAA GGG CAG GAA CAA CTC TTG CC -3'。

使用 TaKaRa LA Taq 酶(大连宝生物), 25 μ L 反应体系, 其中 2 \times GC 缓冲液 12.5 μ L(含 Mg²⁺), dNTP 终浓度 0.3 μ mol/L, LA Taq 酶 1.5 U, DNA 150 ng, 引物浓度为 10 pmol/L。聚合酶链反应扩增条件: 96 $^{\circ}$ C

5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 150 s, 32 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。产物由 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收目标条带, 连接于 PGEM-T Vector System I (T-载体), 转化 E. coli DH5 α , 挑选阳性克隆经序列特异性聚合酶链反应(SSP)证实为目标等位基因后(SSP 具体方法见参考文献[2])进行测序。每个等位基因选取 3 个阳性克隆进行正反向测序。

主要观察指标: 双链聚合酶链反应-基因测序分型结果, 常规 PCR-SSOP 分型结果, PCR-SSP 高分辨分型结果, 基因组克隆测序结果。

设计、实施、评估者: 设计、实施、评估均为第一作者, 经过正规培训。

2 结果

2.1 双链聚合酶链反应-基因测序分型结果 用商品基因测序分型试剂盒对第 2-4 外显子进行双向测序, 分析软件显示与之最接近的杂合结果为 HLA-A*030101/A*110101, 但在第 2 外显子有 1 个碱基位置(碱基 330)与数据库(IMGT/HLA release 2.25.1, April 2009)不相符。杂合测序结果见图 1。

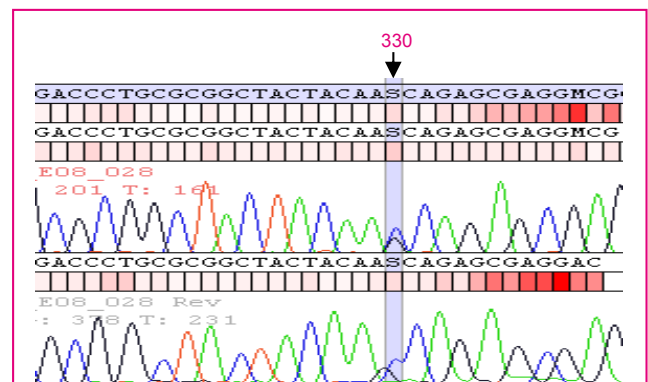


Figure 1 Result of heterozygous sequencing of HLA-A*030101, 1155 (one nucleotide change in exon 2:330)

图 1 HLA-A*030101, 1155 的杂合测序结果(一个核苷酸改变在第 2 外显子第 330 位碱基上)

2.2 常规 PCR-SSOP 分型结果 根据判读软件结果分析, 明确捐献者样本 HLA-A, B 和 DRB1 位点结果为 HLA-A*3, 11; B*7, 62; DRB1*4, 15, 未发现格局异常。

2.3 PCR-SSP 高分辨分型结果 阳性孔为 22, 23, 24, 28, 分析软件显示杂合结果为 HLA-A*03010101, A*110101/0102, 结果未发现异常格局。电泳胶图见图 2。

2.4 基因组克隆测序结果 2 个等位基因选取 3 个阳性克隆进行正反向测序, 两个等位基因被确定, 1 个等位基因为 HLA-A*030101, 另一个为新等位基因, 与其最接近的等位基因 A*110101 相比, 在第 2 外显子 330

位碱基位置上存在基因突变, C→G, 密码子 AAC→AAG, 导致相应氨基酸的改变, 由天冬酰胺变为赖氨酸, 见图 3。

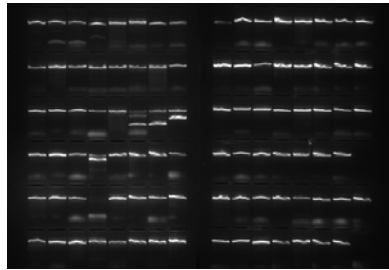


Figure 2 High resolution electrophoretogram of HLA-A*03010101, A*110101/0102 PCR-SSP A-site
图 2 HLA-A*03010101, A*110101/0102 PCR-SSP A 位点高分辨电泳图



Figure 3 Alignment of the nucleotide sequences of exon 2 (A) and the amino acid sequences (B) of A*1155 with those of A*110101
图 3 A*1155 和 A*110101 第 2 外显子核苷酸序列比对(A)和氨基酸序列比对(B)

2.5 新等位基因的命名及频率 该新等位基因序列已被 GenBank 接受, 编号为 GU074394。根据世界卫生组织(WHO)HLA 因子命名委员会命名原则的要求, 将新等位基因有关材料上报给(WHO)HLA 因子命名委员会, 最终该基因于 2009-10-31 被正式命名为 HLA-A*1155^[3]。

3 讨论

HLA 复合体是人体最复杂和最具多态性的遗传系统, 其多态性形成的机制主要是碱基突变、链间转换以及基因重组。目前国内发现的 HLA 新等位基因绝大多数为碱基突变。有一些碱基突变发生在三联密码子的第 3 位, 往往造成同义突变, 也就是氨基酸不发生变化, 而有一些碱基突变则为有意义突变, 会造成氨基酸的改变, HLA 分子结构和功能也将发生相应的改变。HLA 系统中 I 类分子外显子 2, 3 具有多态性, 血清学特异性主要由 2, 3 外显子决定, 而外显子 4 显示进化上的保守性^[4]。作者发现的这例新等位基因与最接近的 HLA-A*110101 序列相比, 第 3 和 4 外显子上完全相同, 仅在第 2 外显子上有 1 个碱基突变, 即在第 330 位碱基上有改变 C→G, 密码子 AAC→AAG, 导致相应氨基酸的改变, 由天冬酰胺变为赖氨酸, 为有意义突变。

自 1958 年法国医生 J.Dausset 发现人类第一个 HLA 抗原至今, 截至 2009-07, HLA 等位基因数量已达到 3 864 个(<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>), 其中 A 位点已有 767 个基因, A*11 组中有 54 个等位基因。A*11 是最早被检测出来的 HLA 抗原, A11 抗原又称黄种人抗原, 主要存在于亚洲人群中, 在不同种族或同一种族不同人群中分布不同, 具有高度多态性, 并存在明显的地区和民族差异。A11 抗原在黑色人种、白色人种中比例仅为 0.006, 0.059, 而在亚洲人群中情况就不同了, 台湾人群中比例为 0.332, 在国内汉族人群中比例为 0.240, 其中北方汉族人群比例为 0.179, 南方汉族人群比例为 0.317^[5]。根据全国各造血干细胞志愿捐献者资料库报道的 HLA 等位基因结果显示, A11 抗原频率呈现由南向北逐渐降低趋势, 在内蒙古、新疆、甘肃、河南、江苏、四川、安徽、江西、广东的基因频率分别为 0.121 3, 0.164 2, 0.173 8, 0.154 9, 0.186 0, 0.237 5, 0.198 9, 0.308 1, 0.321 1^[6-12]。本实验室此次发现的新等位基因 A*1155 捐献者也是南方汉族人。

国内从 1994 年范丽安教授^[13]发现第 1 个 HLA 等位基因 DRB1*1504 到 2009-04, 共发现 HLA 等位基因 162 个^[14], 虽然跨越近 15 年的时间, 但绝大部分是在 2005/2009 发现的, 这基于国家骨髓库和 HLA 分型技术的进步, 从最初的血清学方法到基因分型方法, 又从基因分型方法中的 PCR-SSCP、PCR-RFLP 到

PCR-SSP、PCR-SSOP 再到基因测序分型方法、基因克隆技术。从 HLA 新等位基因发现的过程和方法来看,大多为通过常规的 HLA 分型技术对无关造血干细胞移植供体(志愿者)或移植供受体进行 HLA 分型时出现了难以判定的结果,最后通过基因测序分析发现了新的 HLA 等位基因。本实验室自 2002 年在国内率先发现 3 个新等位基因开始^[15-17],陆续又发现了 30 多个 HLA-A, B, C, DRB1 位点的新等位基因^[18-21]。此次发现的新等位基因 HLA-A*1155 则是直接采用基因测序分型技术测序时发现格局的异常,随后采用 PCR-SSOP 基因分型方法进行常规 HLA 低分辨分型未发现格局异常,另外采用 PCR-SSP 方法进行 HLA-A 位点高分辨分型时也未发现格局异常,最后通过基因克隆后 DNA 测序确认,由此推测既往采用低分辨试剂分型的标本中很有可能会出现新等位基因未被发现的情况。

随着中华骨髓库的不断壮大和发展,无关供者数量不断增加、实验室分型技术的不断完善以及临床骨髓配型的要求不断提高,有条件的骨髓分库实验室应开展基因测序方法直接对标本进行测序,提高中华骨髓库的质量,避免新等位基因的漏检。本实验室自 2006 年开始直接采用基因测序分型方法进行骨髓库捐献者 HLA 高分辨分型。随着基因测序分型技术在中华骨髓库的广泛应用,相信会有更多的新等位基因被发现。

HLA 新等位基因的发现为 HLA 大家族提供了新成员,极大促进了 HLA 多态性的研究,为研究疾病发生、发展、预防和治疗有重要的帮助,同时在人类学、移植免疫学、输血医学的研究领域也有着重要的意义^[14]。

4 参考文献

[1] Robinson J, Waller MJ, Parham P, et al. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res.* 2003;31: 311-314.

[2] Powis SH, Vaughan RW. *Methods in Molecular Biology: MHC Protocols.* Totowa: Humana Press Inc. 2002:143-171.

[3] Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens.* 2005;65: 301-69.

[4] Cao MD, Qin DC, Sun HX. *Zhengzhou: Henan Medicine University Press.* 1998: 16-17.
曹孟德, 秦东春, 孙含笑. 分子生物学与临床应用[M]. 河南: 河南医科大学出版社, 1998: 16-17.

[5] Yuan F, Sun YY, Liang F, et al. *Zhongguo Yiyao Shengwu Jishu.* 2008;3(5): 343-349.
袁方, 孙玉英, 梁飞, 等. 我国部分省份(地区)汉族人群HLA-I类基因多态性地区差异分析[J]. *中国医药生物技术*, 2008, 3(5): 343-349.

[6] Zhao LH, Shan XY, Wang L, et al. *Zhongguo Shuxue Zazhi.* 2007;20(3): 202-203.
赵丽红, 单小燕, 王玲, 等. 中华骨髓库(内蒙古)蒙古人群HLA-A, B, DRB1等位基因多态性分析[J]. *中国输血杂志*, 2007, 20(3): 202-203.

[7] Zhao L, Zhang BW, Ma R, et al. *Zhongguo Shuxue Zazhi.* 2007;20(1): 26-29.
赵磊, 张伯伟, 马茹, 等. 河南、甘肃、新疆造血干细胞捐献者HLA基因频率[J]. *中国输血杂志*, 2007, 20(1): 26-29.

[8] Li W, Tang WC, Yu MG, et al. *Zhongguo Shuxue Zazhi.* 2007;20(4): 276-281.
李维, 唐维才, 余梅贵, 等. 江苏骨髓分库汉族造血干细胞捐献志愿者HLA-A, B, DRB1基因多态性和单倍型研究[J]. *中国输血杂志*, 2007, 20(4): 276-281.

[9] Zhou QX, Li ZR, Liao Y, et al. *Guoji Jianyan Yixue Zazhi.* 2006;27(1): 86-88.
周琼秀, 李执如, 廖耘, 等. 四川汉族HLA基因频率和显著连锁不平衡单倍型分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(1): 86-88.

[10] Cheng LH, Wu GG, Li XM, et al. *Linchuang Shuxue yu Jianyan.* 2006;8(1): 5-12.
程良红, 吴国光, 李兴茂, 等. 2210例江西籍汉族骨髓供者的HLA-A, B, DRB1等位基因和单倍型频率[J]. *临床输血与检验*, 2006, 8(1): 5-12.

[11] Gao SQ, Wu GG, Li XM, et al. *Linchuang Shuxue yu Jianyan.* 2005;7(3): 161-169.
高素青, 吴国光, 李兴茂, 等. 安徽汉族HLA-A, B, DRB1基因多态性和单倍型的分布特征[J]. *临床输血与检验*, 2005, 7(3): 161-169.

[12] Jin SZ, Wu GG, Lan YX, et al. *Guangdong Yixue.* 2006;27(9): 1289-1291.
金士正, 吴国光, 蓝欲晓, 等. 广东汉族人群人类白细胞抗原-A, B, DRB1基因多态性和单倍型分布[J]. *广东医学*, 2006, 27(9): 1289-1291.

[13] Fan LA, Smith AG, Chandanayingyong D, et al. DRB1*1504: a new DR2 allele identified in the Dai minority opulation of southwest China. *Tissue Antigens.* 1994;44:326-328.

[14] Zhang ZX. *Zhongguo Shuxue Zazhi.* 2008;21(2): 81-84.
张志欣. HLA新等位基因的确认与研究及其在我国的开展. *中国输血杂志*, 2008, 21(2): 81-84.

[15] Wu GG, Cheng LH, Zhou D, et al. Identification of a novel allele HLA-B*5610 in a Chinese potential bone marrow donor. *Tissue Antigens.* 2003;61: 256-258.

[16] Wu GG, Cheng LH, Li Z, et al. Identification of a new HLA allele, A*1114, in a Chinese family. *Tissue Antigens.* 2003;61: 253-255.

[17] Wu GG, Cheng LH, Deng ZH, et al. Cloning and complete sequence of a novel HLA-A null allele, A*0253N, with a termination codon generated by a C to G mutation in exon 2. *Tissue Antigens.* 2002;59: 328-330.

[18] Li Z, Zou HY, Cheng LH, et al. A New HLA-A*24 variant, A*2485, identified by sequence-based typing in a Chinese individual. *Tissue Antigens.* 2008;72(1): 75-76.

[19] Zhen L, Zhang LH, Zou HY, et al. HLA-A*3318, a novel allele, identified by sequence-based typing in a Chinese individual. *Tissue Antigens.* 2008;72(6): 600-602.

[20] Zou HY, Li Z, Shao CP, et al. A new HLA-A*30 variant, A*3018, identified by sequence-based typing in the Chinese population. *Tissue Antigens.* 2007;69: 281-282.

[21] Li Z, Zou HY, Shao CP, et al. Identification of a novel HLA-B*56 allele, B*5618, and an extension of B*2736 by sequence-based typing. *Tissue Antigens.* 2007;69: 365-366.

来自本文课题的更多信息一

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 随着国内骨髓库的建立,无关供者数量的不断增加以及 HLA 分型技术的标准化,具有中国人群特异性的 HLA 新等位基因发现的数量必将进一步增加。在国内发现的新等位基因中,大部分都是先采用 HLA 分型低分辨方法进行分型,如发现反应格局异常后,再进一步用基因测序或基因克隆方法进行确认,这样有可能导致一些新等位基因未被发现。文章直接采用基因测序分型方法对中华骨髓库标本进行检测,发现核苷酸序列与数据库不符,进一步用基因克隆及测序方法进行确认。

课题评估的“金标准”: 人类白细胞抗原分型方法主要包括序列特异性引物方法、序列特异性寡核苷酸方法及基因测序分型方法等,但基因测序分型方法被认为是人类白细胞抗原分型的金标准,它可得出精确的核苷酸序列。

设计或课题的偏倚与不足: 由于条件所限,没能对该新等位基因进行家系调查,也没能建立新等位基因 HLA-A*1155 的无限增殖化 B 淋巴细胞系。

提供临床借鉴的价值: 为分析 HLA 与疾病的相关性,以及亲子鉴定、个体识别、群体遗传学研究提供了更加准确的数据。