

# 基于HLA组特异性单倍体全长测序方法对模棱两可结果的准确定型

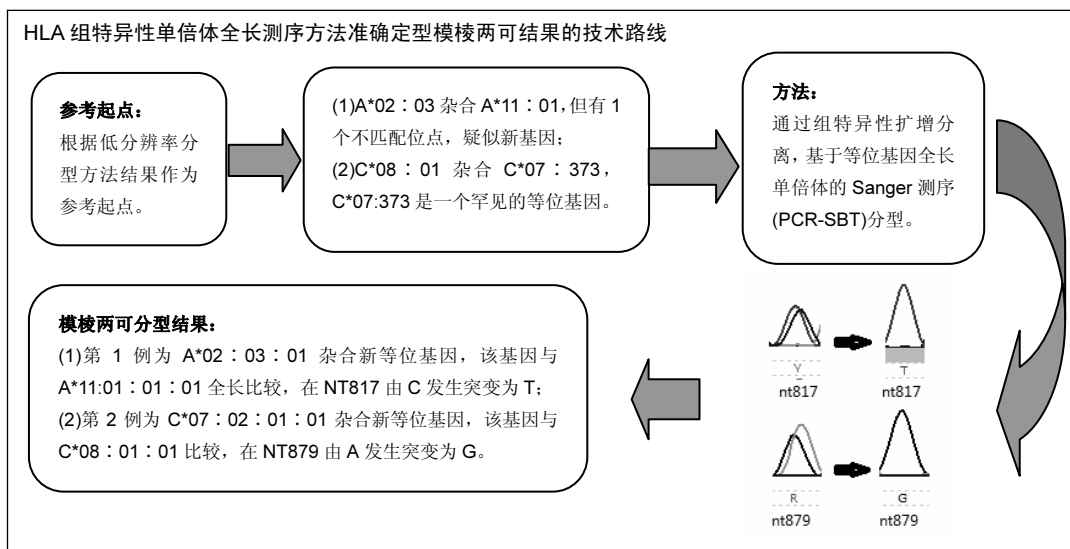
· 研究原著 ·

王宋兴<sup>1</sup>, 阳辉<sup>2</sup>, 何柳媚<sup>1</sup>, 洪文旭<sup>1</sup>, 邹红岩<sup>1</sup>, 徐筠婷<sup>1</sup> (<sup>1</sup>深圳市血液中心输血医学研究所, 广东省深圳市 518035; <sup>2</sup>深圳市晋百慧生物有限公司, 广东省深圳市 518035)

引用本文: 王宋兴, 阳辉, 何柳媚, 洪文旭, 邹红岩, 徐筠婷. 基于HLA组特异性单倍体全长测序方法对模棱两可结果的准确定型[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(20):3208-3215.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.20.016 ORCID: 0000-0001-5064-7917(邹红岩)

文章快速阅读:



王宋兴, 1987 年生, 广东省揭西县人, 汉族, 2010 年南方医科大学毕业, 主管技师, 主要从事组织配型与免疫遗传学研究。

通讯作者: 邹红岩, 主任技师, 深圳市血液中心输血医学研究所, 广东省深圳市 518035

并列通讯作者: 徐筠婷, 博士, 副主任技师, 深圳市血液中心输血医学研究所, 广东省深圳市 518035

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2017)20-03208-08

稿件接受: 2017-05-18

文题释义:

**单倍体全长测序方法:** 根据 HLA-A、-B、-C、-DRB1 和 -DQB1 基因的组特异性分类, 分别设计基因全长单倍体组特异性扩增引物对 HLA-A、-B、-C、-DRB1 和 -DQB1 基因需要分型的外显子及内含子区域进行 PCR 扩增; 完成扩增后, 为每个基因设计一套通用正反向全长测序引物对 HLA 基因所有外显子及内含子进行测序。

**模棱两可结果:** 所谓的 HLA 模棱两可结果产生的原因可分为两类, 一是等位基因的差异碱基位于测序范围之外; 二是测序范围内不同等位基因碱基序列的组合可以获得相同的杂合序列。本文中的低分辨率结果 HLA-A\*02 杂合 HLA-A\*11 就属于第一类, 而 HLA-C\*08 杂合 HLA-C\*07 : 373 就属于第二类。

摘要

**背景:** 传统的 HLA 测序分型技术都是对父系母系双倍体进行扩增, 由于 HLA 多样性高, 产生了大量的模棱两可难题, 而采用基于组特异性单倍体全长测序分型方法来解决模棱两可结果的准确定型鲜有报道。

**目的:** 分析基于组特异性单倍体全长测序分型方法对 HLA 基因分型模棱两可结果准确定型的效果。

**方法:** 对 2 例模棱两可结果标本以低分辨率分型方法结果作为参考起点, 通过组特异性扩增分离, 基于等位基因全长单倍体的 Sanger 测序(PCR-SBT)分型。

**结果与结论:** ①2 例模棱两可分型结果分别为 A\*02 : 03 : 01 及 C\*07:02 : 01 : 01 杂合新等位基因; ② A\*02 : 03 : 01 杂合新等位基因与 A\*11 : 01 : 01 : 01 全长比较, 在 NT817 由 C 发生突变为 T; ③ C\*07 : 02 : 01 : 01 杂合新等位基因与 C\*08 : 01 : 01 比较, 在 NT879 由 A 发生突变为 G; ④结果表明, 以低分辨率分型方法结果作为参考起点, 通过组特异性扩增分离, 基于组特异性单倍体全长测序分型方法能准确定型 HLA 基因分型模棱两可结果并发现新等位基因。

**关键词:**

组织构建; 组织工程; 基因多态性; HLA; 组特异性扩增; 单倍体全长测序; 模棱两可结果

**主题词:**

HLA 抗原; 基因; 组织工程

**基金资助:**

广东省医学科研基金(A2016222); 深圳市战略新兴产业发展专项资金(JSGG20160328103642937); 深圳市科技研发资金(JCYJ20160427172335974); 深圳市卫生计生系统科研项目(201401077)

Wang Song-xing,  
Technician-in-charge,  
Institute of Transfusion  
Medicine of Shenzhen Blood  
Center, Shenzhen 518035,  
Guangdong Province, China

Corresponding author:  
Zou Hong-yan, Chief  
technician, Institute of  
Transfusion Medicine of  
Shenzhen Blood Center,  
Shenzhen 518035,  
Guangdong Province, China

Corresponding author:  
Xu Yun-ping, M.D., Associate  
chief technician, Institute of  
Transfusion Medicine of  
Shenzhen Blood Center,  
Shenzhen 518035,  
Guangdong Province, China

## Accurate determination of HLA ambiguous results based on group-specific haploid full-length sequencing

Wang Song-xing<sup>1</sup>, Yang Hui<sup>2</sup>, He Liu-mei<sup>1</sup>, Hong Wen-xu<sup>1</sup>, Zou Hong-yan<sup>1</sup>, Xu Yun-ping<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Institute of Transfusion Medicine of Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Shenzhen Jin Baihui Biological Co., Ltd., Shenzhen 518035, Guangdong Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Due to the polymorphism of HLA, a large number of ambiguities have been generated by conventional HLA typing techniques, and confirmed stereotypes of ambiguous results based on group-specific haploid full-length typing are rarely reported.

**OBJECTIVE:** To analyze the accuracy of HLA-typing ambiguity based on group-specific haploid full-length sequencing.

**METHODS:** The low-resolution results were used as the starting point for two ambiguous samples. Sanger sequencing (PCR-SBT) based on haploid full-length was performed after group-specific amplification.

**RESULTS AND CONCLUSION:** One case showed a new A\*02:03:01 allele, which was found a mutation in NT817 from C to T in comparison with A\*11:01:01:01. The other case indicated another new C\*07:02:01:01, which was found a mutation in NT879 from A to G in comparison with C\*08:01:01. In conclusion, these results indicate that the group-specific haploid full-length sequencing method can be used to accurately classify HLA alleles and to discover new alleles.

**Subject headings:** HLA Antigens; Genes; Tissue Engineering

**Funding:** the Medical Research Foundation of Guangdong Province, No. A2016222; the Special Foundation for Strategic Emerging Industries Development in Shenzhen, No. JSGG20160328103642937; the Science and Technology Research and Development Foundation of Shenzhen, No. JCYJ20160427172335974; the Research Project of Shenzhen Health and Family Planning System, No. 201401077

**Cite this article:** Wang SX, Yang H, He LM, Hong WX, Zou HY, Xu YP. Accurate determination of HLA ambiguous results based on group-specific haploid full-length sequencing. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(20):3208-3215.

## 0 引言 Introduction

人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)基因是迄今为止人类最复杂的遗传系统之一, 具有高度的多态性。HLA在器官移植和造血干细胞移植中起重要的作用, HLA抗原相容性程度与移植效果密切相关, 相合程度越高, 移植物越容易存活<sup>[1-5]</sup>。目前以DNA为基础的HLA基因分型方法已被广泛应用, 其中直接测序分析基础上的基因分型技术(PCR-SBT)是WHO推荐的高分辨率水平HLA基因分型的金标准实验方法, 可直接获得DNA序列。但实际操作过程中, 由于目的基因序列的特殊性、引物设计等多种因素, 使得传统的PCR-SBT金标准基因测序分型存在着模棱两可的结果<sup>[6-8]</sup>。

为了解决存在的模棱两可结果问题, 深圳市血液中心与荷兰马斯特里赫特大学医学中心免疫移植和组织配型实验室以及深圳市晋百慧生物有限公司联合探索开发了HLA全长测序分型试剂盒(组特异性单倍体PCR-SBT法), 文章将对该方法作简要介绍并采用该方法对2例模棱两可结果标本进行确认分型, 现报告如下。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 基因学实验。

1.2 时间及地点 于2016年12月在深圳市血液中心输血医学研究所实施, 并于2017年1月完成。

1.3 材料 DNA提取试剂盒(美国Gentra公司); A、B和DRB1座位PCR-SBT HLA分型试剂(Atria公司, 批号A531C08, B514D08和R27L07); PCR-SSPHLA低分辨分

型试剂(G&T, 批号RF16); HLA 全长测序分型试剂盒(组特异性单倍体PCR-SBT法, 深圳市晋百慧生物公司); ABI 9700、ABI Veriti 96 型号PCR扩增仪及ABI 3730型基因测序仪等实验相关仪器。

### 1.4 试验方法

1.4.1 试验原理 采用HLA测序分型(PCR-SBT)方法, 根据HLA-A和-C基因的组特异性分类, 分别设计基因全长单倍体组特异性扩增引物对HLA-A和-C基因需要分型的外显子及内含子区域进行PCR扩增; 完成扩增后, 为每个基因设计一套通用正反向全长测序引物对HLA基因所有外显子及内含子进行测序。

本研究以低分辨分型结果作为参考和起点, 可对HLA-A和-C所有等位基因进行测序分型, 有效解决模棱两可, 达到绝对高分, 数据更加准确可靠。

1.4.2 HLA位点PCR扩增 按29  $\mu$ L PCR预混液和0.5  $\mu$ L DNA聚合酶的比例配置PCR反应体系混合液, 加1  $\mu$ L模板DNA(20-100 mg/L)到相应的反应管, 使最终PCR反应体积为30.5  $\mu$ L。扩增程序: 98  $^{\circ}$ C 2 min; 98  $^{\circ}$ C 15 s, 63  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 4 min, 10个循环; 98  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 10个循环; 98  $^{\circ}$ C 15 s, 57  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 10个循环; 最后再72  $^{\circ}$ C延伸 2 min, 4  $^{\circ}$ C保存。扩增结束后, 取2  $\mu$ L PCR产物, 采用1%琼脂糖凝胶电泳的方法确认扩增效果, 电泳可见清晰的条带时可进行纯化步骤。

1.4.3 PCR产物纯化 每个反应孔加入60  $\mu$ L磁珠, 吹打混匀。室温静置5 min后放置于磁力架上, 磁珠吸附1 min

表 1 HLA 全长测序分型试剂盒(组特异性单倍型 PCR-SBT 法)A 位点测序引物信息表  
Table 1 HLA-A sequencing primers of Full-length Sequencing Kit (Group-specific Haplotype PCR-SBT Method)

Specificity	Mix	Sequencing primer	Direction	Region / Comment	
A*01, *36	MSA101	SA01	FW	EX1 - I2	Standard
		SA02	REV	EX1 - I1 - E2	
		SA03	FW	I1 - EX2 - I2 - EX3	
		SA04	REV	EX1 - I1 - E2 - I2	
		SA05	FW	I2 - EX3 - I3	
		SA06	REV	EX2 - I2 - EX3 - I3	
		SA07	FW	I3 - EX4	
		SA08	REV	EX3 - I3	
		SA09	FW	I3 - EX4 - I4 - EX5 - I5	
		SA10	REV	I3 - EX4 - I4	
		SA11	FW	I4 - EX5 - I5 - EX6 - I6	
		SA12	REV	EX4 - I4 - EX5 - I5	
		SA13	FW	I5 - EX6 - I6 - EX7 - I7	
		SA14	FW	EX6 - I6 - EX7 - I7 - EX8	
		SA15	REV	I5 - EX6 - I6 - EX7 - I7 - EX8	
A*02, *68, *69, *80	MSA102	Standard			
		SA16	FW	EX4 - I4 - EX5 - I5	instead of SA09 if A*80 is present
If individual is A*02,*68 use mixes MSA103 and MSA104					
A*02, *69, (*68)	MSA103	Standard			In few instances coamplification of A*68
A*01,*30 *36, *68, *69, *80	MSA104	Standard			
		SA16	FW	EX4 - I4 - EX5 - I5	instead of SA09 if A*80 is present
A*23, *24	MSA105	Standard			
A*31, *33	MSA106	Standard			
Except A*33:07		SA17	REV	I5 - EX6 - I6 - EX7 - I7	instead of SA15
A*29, *32, *74	MSA107	Standard			
		SA17	REV	I5 - EX6 - I6 - EX7 - I7	instead of SA15
A*03, *30	MSA108	Standard		Gene up to intron 7	
		SA01	FW	EX1 - I2	Cannot be used, primer not included in PCR product
		SA18	REV	I4 - EX5 - I5 - EX6 - I6	instead of SA15
If individual is A*03,*30 use mixes MSA109 and MSA110					
A*01, *02, *03, *11, *36, *68, *69, *80	MSA109	Standard			
		SA16	FW	EX4 - I4 - EX5 - I5	instead of SA09 if A*80 is present
A*30	MSA110	Standard			
A*11	MSA111	Standard			
A*29, *80	MSA112	Standard			
		SA16	FW	EX4 - I4 - EX5 - I5	instead of SA09 if A*80 is present
A*25, *26, *29, *31, *32, *33, *34, *66, *74,*43?	MSA113	Standard			
		SA17	REV	I5 - EX6 - I6 - EX7 - I7	instead of SA15
Heterozygous	MSA114	Standard			

后吸弃上清液。加入体积分数70%乙醇200 μL/孔洗涤第1次，磁珠吸附1 min后吸弃上清洗液。再加入体积分数70%乙醇200 μL/孔洗涤第2次，磁珠吸附1 min后完全吸弃上清液。室温静置20 min待乙醇完全挥发后，加入ddH<sub>2</sub>O 40 μL/孔溶解产物，吹打混匀。静置5 min后置于磁力架上，纯化产物即完全溶解在上清ddH<sub>2</sub>O中。磁珠吸附2 min后吸取上清液到新的反应孔中。纯化后产物可以在-20 °C保存15 d。

**1.4.4 HLA位点测序反应** 根据HLA全长测序分型试剂盒(组特异性单倍型PCR-SBT法)A位点测序引物信息表(表1)和HLA全长测序分型试剂盒(组特异性单倍型PCR-SBT法)C位点测序引物信息表(表2)提供的测序引物信息，选择每个位点相应的测序引物，根据4.5 μL ddH<sub>2</sub>O、1 μL测序引物、0.5 μL测序混合液、2 μL 5×测序缓冲液配置总体积

为8 μL测序反应体系混合液。加2 μL的纯化后的PCR产物至相应的反应管中，使最终测序反应体积为10 μL。充分混匀测序反应体系混合液，短暂离心后，置于PCR仪样品孔上。测序反应程序：98 °C 2 min；96 °C 10 s，50 °C 5 s，60 °C 2 min，共30个循环；4 °C 保存。测序反应完成后，进行测序反应产物的纯化。测序产物可以在2-8 °C过夜保存。

**1.4.5 测序反应产物纯化** 每孔测序反应产物中加入2 μL NaAc/EDTA和25 μL 无水乙醇，充分振荡混匀，室温放置15 min。2 000×g，离心30 min。倒置反应板，100×g，离心1 min。每孔测序反应产物中加入50 μL 体积分数80%的乙醇，2 000×g，离心5 min。倒置反应板，100×g，离心1 min。每孔内加入甲酰胺15 μL，95 °C，变性2 min，变

表 2 HLA 全长测序分型试剂盒(组特异性单倍型 PCR-SBT 法)C 位点测序引物信息表  
Table 2 HLA-C sequencing primers of Full-length Sequencing Kit (Group-specific Haplotype PCR-SBT Method)

Specificity	Mix	Sequencing primer	Direction	Region / Comment	
C*01, (*02)	MSC301	SC01	FW	EX1 - I1 - EX2 - I2 - EX3 - I3	Standard
		SC02	REV	5' UT - EX1 - I1	
		SC03	FW	EX2 - I2 - EX3	
		SC04	REV	5' UT - EX1 - I1 - EX2	
		SC05	FW	I2 - EX3 - I3	
		SC06	REV	EX2 - I2 - EX3	
		SC07	FW	I3 - EX4	
		SC08	REV	EX3 - I3	
		SC09	FW	I3 - EX4 - I4 - EX5 - I5	
		SC10	REV	I3 - EX4	
		SC11	FW	EX5 - I5 - EX6 - I6 - EX7 - I7	
		SC12	REV	I3 - EX4 - I4 - EX5	
		SC13	FW	I5 - EX6 - I6 - EX7 - I7 - EX8	
		SC14	REV	EX4 - I4 - EX5 - I5	
		SC15	FW	EX7 - I7 - EX8	
		SC16	REV	I5 - EX6 - I6 - EX7 - I7	
C*02	MSC302	Standard			
C*03	MSC303	Standard			
		SC17	FW	EX1 - I1 - EX2 - I2	instead of SC01
C*03	MSC304	Standard		Gene up to intron 7, alternative for MSC304	
		SC17	FW	EX1 - I1 - EX2 - I2	instead of SC01
		SC18	FW	I5 - E6 - I6 - EX7 - I7	instead of SC15
		SC19	REV	EX5 - I5 - EX6 - I6 - EX7	instead of SC16
C*04,*18	MSC305	Standard			
		Standard			
		Standard		Gene up to intron 7	
C*05,*08	MSC306	Standard			
		Standard			
C*06,*12	MSC307	Standard			
		SC18	FW	I5 - E6 - I6 - EX7 - I7	instead of SC15
		SC19	REV	EX5 - I5 - EX6 - I6 - EX7	instead of SC16
C*07,*18	MSC308	Standard			
		SC20	FW	EX1 - I1 - EX2 - I2 - EX3	instead of SC01
C*07	MSC309	Standard		Gene up to intron 7, alternative for MSC309	
		SC20	FW	EX1 - I1 - EX2 - I2 - EX3	instead of SC01
		SC18	FW	I5 - E6 - I6 - EX7 - I7	instead of SC15
		SC19	REV	EX5 - I5 - EX6 - I6 - EX7	instead of SC16
C*14	MSC310	Standard		Gene up to intron 7	
		SC18	FW	I5 - E6 - I6 - EX7 - I7	instead of SC15
		SC19	REV	EX5 - I5 - EX6 - I6 - EX7	instead of SC16
C*15	MSC311	Standard			
C*16	MSC312	Standard			
C*17	MSC313	Standard			
Heterozygous	MSC314	Standard			

性完成后迅速放到冰上冷却。变性后产物需在1 h内上机测序, 如不能当日上机, 请置于-20 °C条件下保存。

**1.4.6 测序仪读板检测** 为便于及时上机检测, 测序仪正式读取数据前30 min请打开测序仪, 相连电脑, 最后打开软件。编辑Sample Sheet, 请特别注意核对待检测的标本编号为对应测序反应管号。将变性后的测序反应管按顺序放入测序仪上进行测序检测。按下启动按钮, 收集原始数据。使用Assign SBT软件进行数据分析, 并最终产生HLA分型报告。

**1.4.7 质量控制**

**阳性质控品:** HLA-A阳性质控品检测结果为A\*01 : 01 : 01 : 01, HLA-C阳性质控品检测结果为C\*03 : 02 :

02 : 01。阴性质控品: HLA-A、HLA-C阴性质控品检测结果均为阴性, 即PCR扩增结束后, 根据步骤1.4.2的方法进行电泳检测, 电泳结果无条带。以上要求须在同一次实验中同时满足, 检测结果才有意义; 否则, 应重复检测。每次实验均需检测阴性质控品和阳性质控品, 质控品结果满足质量控制要求时方可进行检测结果的判定。检测结果阳性: 电泳结果显示约3 kb条带, 测序峰图清晰, 无背景杂峰, 经软件分析后能得到HLA型别。检测结果阴性: 电泳结果不显示扩增带, 无测序峰图。

**1.5 主要观察指标** 对2例模棱两可结果标本以低分辨率分型方法结果作为参考起点, 通过组特异性扩增分离, 基于等位基因全长单倍体的Sanger测序(PCR-SBT)分型。

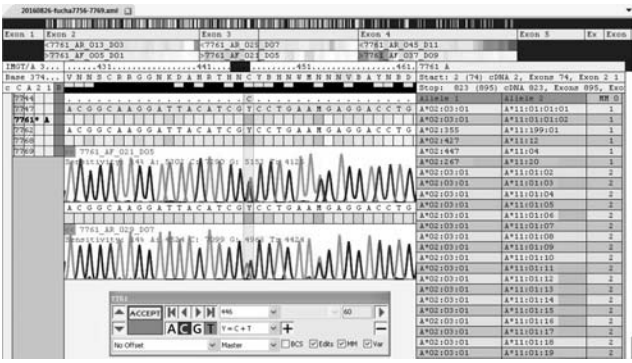


图1 标本1低分辨率试剂盒扩增第2, 3, 4外显子后测序结果

Figure 1 Sample 1 sequencing results by low-resolution kit  
图注: 如图所示, 标本1低分辨率试剂盒扩增第2, 3, 4外显子得出的最接近结果为 A\*02 : 03 杂合 A\*11 : 01, 但有 1 个不匹配位点, 疑似新基因。

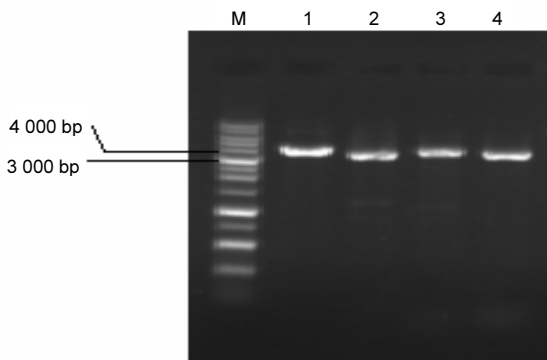


图2 标本1低分辨率试剂盒扩增第2, 3, 4外显子后测序结果

Figure 2 Sample 1 sequencing results by low-resolution kit  
图注: 如图所示, 各孔均可见单一、清晰的约 3 kb 电泳条带, 其中 M 为 DL10 000 DNA marker; 1: MSA102(A\*02 : 03); 2: MSA11(A\*11 : 01); 3: MSC306(C\*08 : 01); 4: MSC308(C\*07 : 373)。

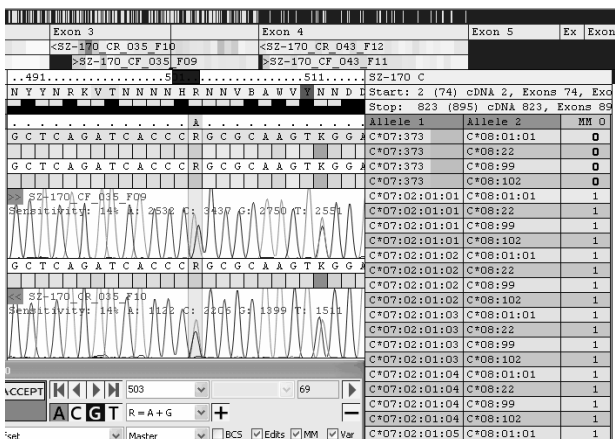


图4 标本2低分辨率试剂盒扩增第2, 3, 4外显子后测序结果

Figure 4 Sample 2 sequencing results by low-resolution kit  
图注: 如图所示, 标本2低分辨率试剂盒扩增第2, 3, 4外显子得出的最接近结果为 C\*08 : 01 杂合 C\*07 : 373, 但 C\*07 : 373 在广东汉族人群中是一个相对罕见的等位基因; 而图中右侧 C\*07 : 02 杂合 C\*08:01 虽有一个错配碱基, 但其为常见等位基因。

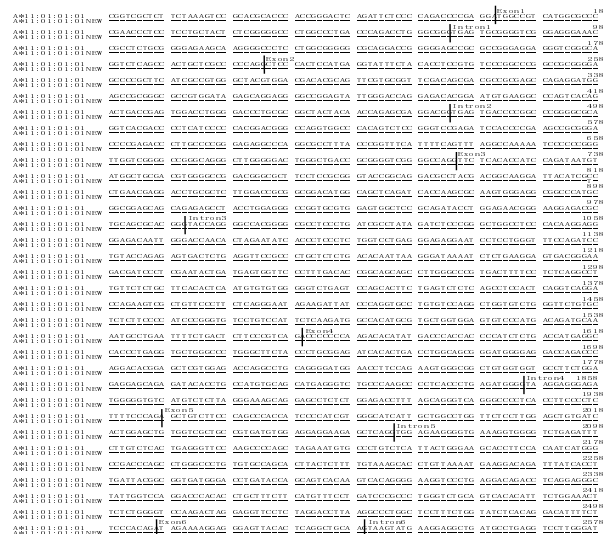


图3 新基因与 A\*11 : 01 : 01 : 01 全长比对图

Figure 3 The new allele full-length comparison with HLA-A\*11:01:01:01  
图注: 如图所示, 该新基因与 A\*11 : 01 : 01 : 01 全长比较, 在 NT817 由 C 发生突变为 T, 由于其发生在第三外显子上, 故引起第 125 位密码子由 GCC 变为 GTC, 从而引起其编码的氨基酸由脯氨酸变成缬氨酸。



图5 新基因与 C\*08 : 01 : 01 全长比对图

Figure 5 The new allele full-length comparison with HLA-C\*08:01:01  
图注: 如图所示, 该新基因与 C\*08 : 01 : 01 比较, 在 NT879 由 A 发生突变为 G, 由于其发生在第三外显子上, 故引起第 144 位密码子由 CAG 变为 CGG, 从而引起其编码的氨基酸由谷氨酰胺变成精氨酸。

## 2 结果 Results

**2.1 HLA组特异性单倍体全长测序分型方法解决A位点模棱两可结果** 标本1低分辨试剂盒扩增第2, 3, 4外显子得出的结果为A\*02:03杂合A\*11:01(图1), 但有1个不匹配位点, 疑似新基因。根据HLA全长测序分型试剂盒(组特异性单倍体PCR-SBT法)A位点测序引物信息表(表1)用MSA102扩增A\*02, MSA111扩增A\*11, 扩增产物电泳图分别如图2中第1、2泳道所示, 然后进行测序分析得出分型结果为A\*02:03:01杂合新等位基因, 该基因与A\*11:01:01全长比较, 在NT817由C发生突变为T(图3), 由于其发生在第三外显子上, 故引起第125位密码子由GCC变为GTC, 从而引起其编码的氨基酸由脯氨酸变成缬氨酸。

**2.2 HLA组特异性单倍体全长测序分型方法解决C位点模棱两可结果** 标本2低分辨试剂盒扩增第2, 3, 4外显子得出的结果为C\*08:01杂合C\*07:373(图4), 但C\*07:373在中国汉族人群中是一个相对罕见的等位基因; 而图4中右侧黄色背景结果C\*07:02杂合C\*08:01为常见等位基因, 虽有一个错配碱基, 疑似新基因。根据HLA全长测序分型试剂盒(组特异性单倍体PCR-SBT法)C位点测序引物信息表(表2)用MSC306扩增C\*08, MSC308扩增C\*07, 扩增产物电泳图分别如图2中第3、4泳道所示, 然后进行测序分析得出分型结果为: C\*07:02:01:01杂合新等位基因, 该基因与C\*08:01:01比较, 在NT879由A发生突变为G(图5), 由于其发生在第三外显子上, 故引起第144位密码子由CAG变为CGG, 从而引起其编码的氨基酸由谷氨酰胺变成精氨酸。

## 3 讨论 Discussion

HLA是存在于人类基因组中最多态的基因系统之一。HLA的功能分子消除外来入侵者是复杂的移植。HLA-A, -B, -C, -DRB1和-DQB1在等位基因水平被认为是对干细胞移植效果有重要作用<sup>[9-10]</sup>。此外, 最近的研究表明, 在允许和不允许错配的细胞间相互作用的基础上, DPA1和DPB1匹配可能在供体干细胞正确移植中起重要作用<sup>[11-13]</sup>。研究也表明HLA-DRB1等位基因高分辨率分型与脐带血移植有相关性<sup>[14]</sup>, 目前正在研究评估其他等位基因位点高分辨率分型的需要。由于HLA的高度多态性, 在等位基因水平上基于测序的分型技术(SBT)已经是并且仍然是金标准, 测序能够呈现等位基因核苷酸全长序列。虽然肽结合槽外的多态性与临床是否存在相关性还没定论, 但是等位基因的识别取决于全基因多态性和超高分辨率分型结果很毫无疑问的。IMGT 3.9.0数据表明, HLA-I类除了第2和第3外显子, 第1, 第4和第5外显子也具有高度多态性水平。

在HLA组织配型产业领域, 目前国际市场中的产品都只针对HLA基因的部分外显子进行分型, 如只对HLA I类基因的2, 3, 4三个外显子进行分型检测, 而实际上HLA-

I类全长基因总共含有7个外显子, 因此若HLA单核苷酸多态性位于该两种试剂所检测外显子以外的区域, 便很容易产生模棱两可无法判定的结果。目前的HLA分型产品模棱两可比例高达40%-60%<sup>[15]</sup>。另一方面, 目前市场上HLA的分型产品PCR扩增引物设计的都是通用的, 很容易产生部分等位基因的漏检。最后, 传统的HLA测序分型技术都是对父系母系双倍体进行扩增, 由于HLA多样性高, 密度极高的杂合子峰增加了软件开发和结果分析的难度和时间<sup>[16-23]</sup>。在2008至2009年, 作者的合作方荷兰马斯特里赫特大学医学中心免疫移植和组织配型实验室统计发现, 通过杂合SBT模棱两可的结果百分比分别为HLA-A 66%, HLA-B 71%, HLA-C 58%, 在所有这些情况下必须附加测序以获得明确的定型结果。

所谓的HLA模棱两可结果产生的原因可分为两类, 一是等位基因的差异碱基位于测序范围之外; 二是测序范围内不同等位基因碱基序列的组合可以获得相同的杂合序列。本文中的低分辨结果HLA-A\*02杂合HLA-A\*11就属于第一类, 而HLA-C\*08杂合HLA-C\*07:373就属于第二类。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、基因克隆测序法、单倍体分离法、焦磷酸测序法、参照链介导构象分析法(RSCA)等实验性方法, 此外还有非实验性的统计学方法<sup>[24]</sup>。有研究表明, 下一代测序(NGS)方法可用于整个基因组的测序<sup>[25-31]</sup>。但是NGS可获得的目标序列长度有限、有序列连接错误的可能以及耗时长等主要缺点使得NGS不太适合于常规诊断分型<sup>[32-33]</sup>。虽然实验方法是解决模棱两可分型结果的直接手段, 但各种实验方法都会一定程度上增加分型成本、延长分型时间, 不利于其在大规模供者HLA-直接测序分型中的应用。由于HLA等位基因的分布具有种群、地理差异性, 同时大部分新发现等位基因仅存在于少数群体而且频率较低<sup>[34-35]</sup>, 因而根据等位基因频率进行非实验鉴别模棱两可分型结果成为一种可能。美国国家骨髓库(NMDP)制定的“罕见等位基因排除法则”规定可以直接排除模棱两可等位基因组合中的一个或两个均为罕见等位基因的组合。按照NMDP的规定: 频率<1/5万的HLA-I类等位基因和频率<1/10万的HLA-II类等位基因为罕见等位基因<sup>[36]</sup>。那么, 在分析分型结果时也应综合考虑大规模群体HLA等位基因分布数据和罕见等位基因。

在本文中, 根据HLA全长测序分型试剂盒(组特异性单倍体PCR-SBT法)A位点和C位点测序引物信息表分别用MSA102扩增A\*02, MSA111扩增A\*11, MSC306扩增C\*08, MSC308扩增C\*07, 扩增产物电泳图显示扩增效果好, 然后测序分析得出第1例模棱两可分型结果为A\*02:03:01杂合新等位基因, 该基因与A\*11:01:01:01全长比较, 在NT817由C发生突变为T, 由于其发生在第三外显子上, 故引起第125位密码子由GCC变为GTC, 从而导致其编码的氨基酸由脯氨酸变成缬氨酸; 第2例模棱

两可分型结果为C\*07:02:01:01杂合新等位基因,该基因与C\*08:01:01比较,在NT879由A发生突变为G,由于其也发生在第三外显子上,故引起第144位密码子由CAG变为CGG,从而导致其编码的氨基酸由谷氨酰胺变成精氨酸。然而这两个氨基酸的改变是否也会影响相应的蛋白表达,仍需更深入的进行后续的跟踪试验。

在本研究中,因为试验实施期间其他位点样本短缺,所以仅列举采用该试剂盒基于HLA Ⅱ特异性单倍体全长测序方法能解决HLA-A和HLA-C模棱两可结果,而实际上,根据作者前期的试验和试剂说明书的说明,对于HLA-B、-DRB1和-DQB1模棱两可结果也是同样有效的。前面作者描述了联合开发用于HLA-A、-B、-C、-DRB1和-DQB1基因分型的基于HLA Ⅱ特异性单倍体全长测序的无歧义SBT Sanger方法,该试剂盒根据HLA-A、-B、-C、-DRB1和-DQB1基因的组特异性分类,分别设计基因全长单倍体组特异性扩增引物对HLA-A、-B、-C、-DRB1和-DQB1基因需要分型的外显子及内含子区域进行PCR扩增;完成扩增后,为每个基因设计一套通用正反向全长测序引物对HLA Ⅱ基因所有外显子及内含子进行测序。该试剂盒以低分辨分型结果作为参考和起点,可对HLA-A、-B、-C、-DRB1和-DQB1基因所有等位基因进行测序分型,有效解决模棱两可,达到绝对高分;组特异性扩增引物的设计可避免发生漏检;单倍体扩增测序结果,单峰一目了然,分析方便快捷。该方法已被涵盖所有不同的等位基因组样品验证可行,并已自2011年开始在常规实验室诊断中实施使用。通过这种改进的方法,模棱两可结果被显著的减少,HLA-A为4.4%,HLA-B为4.4%,HLA-C为0%<sup>[37]</sup>。剩余的极少部分模棱两可结果就需要采用聚合酶链反应一序列特异性引物法(PCR-SSP)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<sup>[38-42]</sup>。

综上所述,基于HLA Ⅱ特异性单倍体全长测序分型方法可以准确定型模棱两可结果并发现新等位基因。本文使用高分辨分型技术对低分辨分型技术的模棱两可结果进行鉴定,是因为目前低分辨分型结果基本能满足临床需要,而且低分辨试剂盒价格也相对低廉,但是越来越多的研究表明,高分辨分型结果对临床骨髓以及组织移植等指导意义重大,所以现在国内各配型实验室也在陆续更换使用高分辨分型试剂。另外,原来许多低分辨分型试剂厂家也不断改进和更新试剂盒,使其也能达到高分辨分型效果,从而大大降低模棱两可结果的出现,为临床移植配型和骨髓库供者分型提供更好的技术保障。

**致谢:** 感谢荷兰马斯特里赫特大学医学中心免疫遗传和组织配型实验室 Marcel GJ Tilanus 教授、Christina EM Voorter 博士以及深圳晋百慧生物有限公司于浩洋博士提供的支持。

**作者贡献:** 实验设计由第一作者完成,实验实施为所有作者共同完成,评估为两位共同通讯作者一起完成,均接受过正规培训。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 研究用人体组织的实验方案符合相关伦理学要求,文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究与报告与医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Jun Z,Brian D,Michael S, et al. Rapid Detection of Donor Cell Free DNA in Lung Transplant Recipients with Rejections Using Donor-recipient HLA Mismatch. Human Immunol. 2017; 78(4):342-349.
- [2] Jan S,Robert D,Anna K, et al. Role of HLA match on results of hematopoietic stem cell transplantations from unrelated donors in children with acute leukemia and bone marrow failure syndromes. Acta Haematologica Polonica. 2017;48(1): 48-53.
- [3] Paolo F,Linda C,Joseph T, et al. Providing Better-Matched Donors for HLA Mismatched Compatible Pairs Through Kidney Paired Donation. Transplantation. 2017;101(3): 642-648.
- [4] Katharina F,Dietrich W. HLA mismatching as a strategy to reduce relapse after alternative donor transplantation. Semin Hematol. 2016;53(2):57-64.
- [5] Varyani UT, Kute VB, Patel HV, et al. Participation of compatible donor to improve HLA matching can increase kidney transplant rate of O blood group patients. Clin Quer Nephrol. 2015;4(3-4):38-40.
- [6] Paunić V, Gragert L, Schneider J, et al. Charting improvements in US registry HLA typing ambiguity using a typing resolution score. Human immunology. 2016;77(7):542-549.
- [7] Wang D, He L, Zou H, et al. Analysis of ambiguities in HLA sequencing-based typing and its solutions. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2015;32(1): 44-48.
- [8] Jun J, Hwang K, Kim S, et al. Estimation of the 6 - digit level allele and haplotype frequencies of HLA - A, - B, and - C in Koreans using ambiguity - solving DNA typing. Tissue Antigens. 2014;84(3):277-284.
- [9] Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. Blood. 2007;110(13): 4576-4583.
- [10] Petersdorf EW. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. Curr Opin Immunol. 2008;20(5):588-593.

- [11] Crocchiolo R, Zino E, Vago L, et al. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;114(7):1437-1444.
- [12] Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, et al. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol*. 2012;13(4):366-374.
- [13] Hollenbach JA, Madbouly A, Gragert L, et al. A combined DPA1-DPB1 amino acid epitope is the primary unit of selection on the HLA-DP heterodimer. *Immunogenetics*. 2012;64(8):559-569.
- [14] Spellman SR, Eapen M, Logan BR, et al. A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation. *Blood*. 2012;120(2):259-265.
- [15] Lucan C, Pop L, Florian A, et al. HLA Genotyping using Next Generation Sequencing. *Roman J Int Med*. 2016,54(2): 98-104.
- [16] McGinnis MD, Conrad MP, Bouwens AG, et al. Automated, solid-phase sequencing of DRB region genes using T7 sequencing chemistry and dye-labeled primers. *Tissue antigens*. 1995;46(3 Pt 1):173-179.
- [17] Versluis LF, Rozemuller E, Tonks S, et al. High-resolution HLA-DPB typing based upon computerized analysis of data obtained by fluorescent sequencing of the amplified polymorphic exon 2. *Human Immunol*. 1993;38(4):277-283.
- [18] Voorter CE, Rozemuller EH, de Bruyn-Geraets D, et al. Comparison of DRB sequence-based typing using different strategies. *Tissue Antigens*. 1997;49(5):471-476.
- [19] Scheltinga SA, Johnston-Dow LA, White CB, et al. A generic sequencing based typing approach for the identification of HLA-A diversity. *Human Immunol*. 1997;57(2):120-128.
- [20] Voorter CE, Kik MC, van den Berg-Loonen EM. High-resolution HLA typing for the DQB1 gene by sequence-based typing. *Tissue Antigens*. 1998;51(1):80-87.
- [21] Swelsen WT, Voorter CE, van den Berg-Loonen EM. Sequence analysis of exons 1, 2, 3, 4 and 5 of the HLA-B5/35 cross-reacting group. *Tissue Antigens*. 2002;60(3):224-234.
- [22] Swelsen WT, Voorter CE, van den Berg-Loonen EM. Ambiguities of human leukocyte antigen-B resolved by sequence-based typing of exons 1, 4, and 5. *Tissue Antigens*. 2004;63(3):248-254.
- [23] Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, et al. The IMGT/HLA database. *Nucl Acids Res*. 2013;41(Database issue): D1222-1227.
- [24] Mack SJ, Cano P, Hollenbach JA, et al. Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalog. *Tissue Antigens*. 2013;81(4): 194-203.
- [25] Raphael C, Mirjana R, Seiamak B. Next-Generation Sequencing of the HLA locus: Methods and impacts on HLA typing, population genetics and disease association studies. *Human Immunol*. 2016;77(11):1016-1023.
- [26] Sharifeh K, Mansour S, Mahboobeh R, et al. Novel Multiplex Fluorescent PCR-Based Method for HLA Typing and Preimplantational Genetic Diagnosis of  $\beta$ -Thalassemia. *Arch Med Res*. 2016;47(4):293-298.
- [27] Eric T, Maureen M, Rosanne P, et al. Performance Characteristics and Validation of Next-Generation Sequencing for HLA typing. *J Mol Diagn*. 2016;18(5):668-675.
- [28] Moalic-Allain V, Mercier B, Gueguen P, et al. Next generation sequencing with a semi-conductor technology (Ion Torrent PGM™) for HLA typing: overall workflow performance and debate. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2016;74(4): 449-456.
- [29] Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens*. 2012;80(1):1-11.
- [30] De Santis D, Dinauer D, Duke J, et al. 16(th) IHIW : review of HLA typing by NGS. *Int J Immunogenet*. 2013;40(1):72-76.
- [31] Smith LK. HLA typing by direct DNA sequencing. *Methods in molecular biology*. 2012;882:67-86.
- [32] Bentley G, Higuchi R, Hoglund B, et al. High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. *Tissue antigens*. 2009;74(5):393-403.
- [33] Lind C, Ferriola D, Mackiewicz K, et al. Next-generation sequencing: the solution for high-resolution, unambiguous human leukocyte antigen typing. *Human Immunol*. 2010; 71(10):1033-1042.
- [34] Leenam D, Sunil P. Study of HLA allele frequency in Patel sub-population from India: Marrow Donor Registry India data. *Indian J Transplant*. 2016;10(3):73-74.
- [35] González-Galarza FF, Takeshita LY, Santos EJ, et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D784-788.
- [36] 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. *Tissue Antigens*. 2007;69:176-180.
- [37] Voorter CE, Palusci F, Tilanus MG. Sequence-based typing of HLA: an improved group-specific full-length gene sequencing approach. *Methods Mol Biol*. 2014;1109:101-114.
- [38] Profaizer T, Lázár-Molnár E, Close D, et al. HLA genotyping in the clinical laboratory: comparison of next-generation sequencing methods. *HLA*. 2016;88(1-2):14-24.
- [39] Dalva K, Beksac M. Sequence-specific primed PCR (PCR-SSP) typing of HLA Class I and Class II alleles. *Methods Mol Med*. 2007;134: 51-60.
- [40] Saunders PM, Pymm P, Pietra G, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1 polymorphism defines distinct hierarchies of HLA class I recognition. *J Exp Med*. 2016;213(5):791-807.
- [41] Shiina T. Next generation sequencing based HLA genomic and polymorphism analyses. *MHC*. 2015;22(2):84-94.
- [42] Assia G, Rachida R, Habiba A, et al. HLA Polymorphism in Algerian Children With Lymphomas. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015;37(8):458-461.