DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.034
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
1394 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

技术方法

文章编号:1000-5404(2003)15-1394-02

采用PCR-SSP方法检测强直性脊柱炎患者HLA-B27亚型

Determination of HLA-B27 subtypes in patients with ankylosing spondylitis by PCR-SSP

韩军艳[1],熊 平[1],严 鹏[2],邵诗颖[2],熊 蓓[2],吴雄文[1],龚非力[1] (华中科技大学同济医学院:[1]免疫学系,免疫学研究所;[2]99级临床七年制班;武汉 430030)

提 要:目的 建立序列特异性引物-聚合酶链方法(PCR-SSP)检测湖北地区人白细胞抗原B27(Human leucocyte antigen-B27, HLA-B27)阳性强直性脊柱炎患者的HLA-B27亚型组成。方法 盐析法提取100例HLA-B27阳性的强直性脊柱炎患者外周血基因组DNA,采用PCR-SSP技术分别进行HLA-B位点基因型检测和HLA-B27基因亚型分析。结果 100例标本PCR-SSP扩增均获成功,历时3 h。共检出4种亚型:HLA-B *2704、HLA-B *2711、HLA-B *2715、HLA-B *2722。其中HLA-B *2704纯合子25例、HLA-B *2704杂合子63例;HLA-B *2711杂合子5例;HLA-B *2715杂合子6例;HLA-B *2722杂合子1例。四种亚型所占构成比分别为90.4%、4%、4.8%和0.8%。结论 PCR-SSP方法进行HLA-B27亚型分析,快速、经济、简单;HLA-B *2704是湖北地区强直性脊柱炎患者HLA-B27基因主要亚型。

强直性脊柱炎(Ankylosing spondylitis, AS)是一种类风湿因子阴性,主要累及中轴关节和肌腱韧带骨附着点的慢性炎症性疾病,是目前已知人白细胞抗原(Human leucocyte antigen, HLA)与疾病具有最强关联性的典型。其发病机制尚不清楚,可能与免疫及遗传有关。现已发现HLA-B27存在25种亚型(等位基因),编码23种蛋白质(B *2701-B *2723)[1]。在本研究中,我们采用PCR-SSP技术检测湖北地区HLA-B27阳性AS患者的亚型组成,以期为进一步探讨AS的发病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

100例,为2000—2003年经华中科技大学同济医学院附属同济、协和医院确诊的AS患者(按修订的纽约标准诊断)。其中男76例,女24例,男女比例约为3∶1,年龄16~60岁。均已采用PCR-SSP[2]方法检测为HLA-B27阳性。

1.2 基因组DNA的提取

抽取静脉血0.5 ml(10%的EDTA抗凝),盐析法提取外周血基因组DNA,测定DNA浓度及纯度。

1.3 引物

HLA-B位点序列特异性引物48对及HLA-B27亚型特异性引物24对[3],由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.4 PCR-SSP确定每个样本HLA-B位点的基因型

按照文献[3]的方法及反应体系进行PCR反应,取5 μl PCR产物进行琼脂糖凝胶(含0.5 μg/ml溴化乙锭)电泳,应用凝胶分析系统摄像分析结果。按照条带的大小、组合及内参照带(人生长激素基因,扩增产物为429 bp),判断每个样本HLA-B位点的基因型(HLA-B27是纯合子还是杂合子)。

1.5 PCR-SSP确定HLA-B27亚型

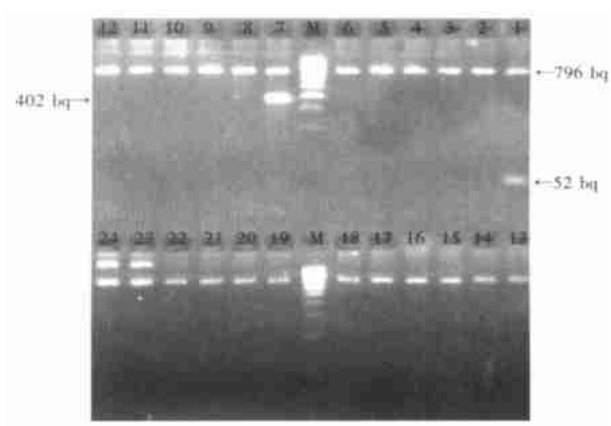
按照下述条件检测HLA-B27亚型:96 ℃,变性2 min;96 ℃ 30 s,70 ℃ 56 s,72 ℃ 56 s;5个循环,96 ℃ 30 s,65 ℃ 55 s,72 ℃ 50 s;21个循环,96 ℃ 30 s,55 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min;4个循环。每个引物对作为一个独立的PCR反应体系,每份样本DNA均同时做24管PCR反应,每管均包含内参照引物对[4](HLA-DRB1内含子,扩增产物为796 bp)。每个反应管取5 μl PCR产物进行琼脂糖凝胶(含0.5 μg/ml溴化乙锭)电泳,每份样品DNA点样24孔,应用凝胶分析系统摄像分析结果。按照条带的大小、组合及内参照带,判断HLA-B27的亚型[5]。

1.6 HLA-B27各亚型的组成比

直接计数法计算HLA-B27各亚型的构成比。

2 结果

2.1 HLA-B *2704亚型PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果见图1。



泳道1:52 bq;泳道7:402 bq;内参照:HLA-DRB1内含子3扩增产物,796 bq;M:100 bq DNA ladder

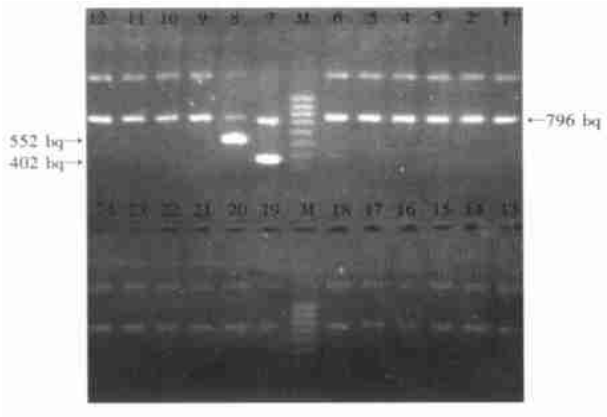
图1 HLA-B *2704亚型PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果

作者简介:韩军艳(1972—),女,河南省新乡市人,博士,讲师,主要从事人类白细胞抗原方面的研究。电话:(027)83692611

收稿日期:2003-04-13;修回日期:2003-06-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　HLA-B *2715 亚型 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。



泳道 7: 402 bq; 泳道 8: 552 bq; 内参照: HLA-DRB1 内含子 3 扩增产物, 796 bq; M: 100 bq DNA ladder

图 2　HLA-B *2715 亚型 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

2.3　HLA-B *27 各亚型的构成比

共检出 4 种亚型: HLA-B *2704、HLA-B *2715、HLA-B *2711 和 HLA-B *2722。各亚型的构成比见表 1。

表 1　HLA-B27 亚型在 AS(HLA-B27 阳性)病人中的组成比

	纯合子(例数)	杂合子(例数)	合　计	构成比(%)
HLA-B *2704	25	63	113	90.4
HLA-B *2715		6	6	4.8
HLA-B *2711		5	5	4.0
HLA-B *2722		1	1	0.8

3　讨论

研究 HLA-B-27 的亚型具有重要的理论和实践意义。早在 1973 年 Brewerton 即确定 AS 与 HLA-B27 具有强相关, 但长期以来对 AS 发病机制的研究却止步不前。随着 HLA 基因分型技术的成熟和发展, 从亚型水平探讨 AS 的发病机制成为可能。迄今已检出 25 个 HLA-B27 等位基因(亚型), 可编码 23 种蛋白质(B *2701～B *2723)。不同的 HLA-B27 亚型仅相差一个或几个氨基酸, 一般均位于其抗原肽结合槽处, 却显示出对 AS 的易感性或抗性。提示人们研究这些不同亚型的相同或不同之处, 可能会得到 HIA-B27 与 AS 关联的关键性致病因素[6]。另外, 由于不同亚型可表现出对 AS 的正相关和负相关, 所以在亚型水平上对疑为 AS 的病人作 HLA-B27 检测, 对 AS 的诊断和鉴别诊断会更具价值。

HLA-B27 各亚型的分布在不同地区、种群中存在差异, 这可能与历史上人群的不同迁徙路线有关。这些亚型在种群分布不一, B *2705 分布最广, 并呈现从北到南递减分布的特点[5]; B *2702 主要存在于白种人、中东犹太人和北非人, B *2703 存在于西非人群中; B *2704 主要限制在东方人中, 尤以在中国人中分布最为广泛。B *2722 被证实只存在于东南亚人中(印尼、台湾、新加坡等)[5], 该亚型可能起源于中国的 B *2704, 随着人群迁徙至东亚和南亚。我国上海地区 AS 患者的亚型主要为 B *2704(76.8%)和 B *2705(20.3%)[7]。本研究中, 湖北地区 AS 患者的主要亚型为 B *2704(90.4%), 其次为 B *2715(4.8%)和 B *2711(4%), 仅发现 1 例 B *2722(0.8%), 基本与已知人群资料相符。本研究中未检出分布相对广泛的 HLA-B *2705, 可能湖北地区具有独特的分布特点。

HLA-B27 的传统检测方法为血清学技术(微量淋巴细胞毒试验), 但该方法并不能检测亚型。目前检测 HLA-B27 亚型的主要方法为 PCR-SSO、SBT(Sequencing based typing)、PCR-SSCP 和 PCR-SSP。前几种方法的缺点主要是: ①需要特殊仪器设备(放射自显影及测序仪); ②检测所需时间长; ③价格高昂。不适合做大规模群体调查。④结果判读复杂。本实验中我们应用 PCR-SSP 法检测 HLA-B27 亚型则完全克服了上述弊端: ①只需 PCR 扩增仪和琼脂糖凝胶电泳设备; ②实验快捷简便, 提取 DNA, PCR 约 2 h, 电泳 30 min, 半天之内可出结果, 适于临床常规; ③费用中等, 适合在我国现有条件下开展。

本研究采用 PCR-SSP 技术分析了湖北地区 HLA-B27 阳性 AS 患者的亚型组成, 为进一步深入探讨 AS 的发病机制奠定了工作基础。

关键词: PCR-SSP; HLA-B27; 亚型; 强直性脊柱炎
中图法分类号: R446; R593.23　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Marsh S G, Bodmer J G, Albert E D, *et al*. Nomenclature for factors of the HIA system[J]. Hum Immunol, 2001, 62(4): 419－468.
[2] 王庆华, 谭建明. 采用 PCR-SSP 法检测 HLA-B27 基因[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(3): 149－150.
[3] Olerup O. HLA-B27 typing by a group-specific PCR amplification[J]. Tissue Antigens, 1994, 43(4): 253－256.
[4] Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers(PCR-SSP) in 2 hours[J]. Tissue Antigens, 1993, 41(3): 119－134.
[5] Carcia-Fernandez S, Gonzalez S, Blanco M, *et al*. New insights regarding HLA-B27 diversity in the Asian population[J]. Tissue Antigens, 2001, 58(4): 259－262.
[6] Sesma Laura, Montserrat Veronica, Lamas Jose Ramon, *et al*. The peptide repertoires of HLA-B27 subtypes differentially associated to spondyloarthropathy(B *2704 and B *2706) differ by specific changes at three anchor positions[J]. J Biol Chem, 2002, 277(19): 16744－16749.
[7] 蒋黎华, 范丽安, 杨珏琴, 等. 强直性脊椎炎与 HIA-B27 等位基因研究[J]. 中国免疫学杂志, 1997, 13(6): 345－348.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net