DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.037
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

文章编号:1000-5404(2000)09-0905-03

技术方法

应用特异性核酸探针杂交分析法进行献血员HLA分型的初步报告

HLA typing by sequence-specific oligonucleotide probe hybridization for blood donors

赵树铭[1],楼 宏[2],肖瑞卿[1],林武存[1] ([1]第三军医大学附属西南医院输血科,重庆 400038;[2]日本鹿儿岛大学病毒学教研室)

提 要:目的 探讨利用特异性核酸探针杂交分析法检测HLA等位基因的可行性。方法 10例西南某地献血员,提取DNA后经PCR扩增,采用酶联探针免疫杂交分析法检测HLAⅠ和HLAⅡ等位基因。结果 10例标本经检测HLAⅠ和HLAⅡ等位基因,表现为A*02、A*24、A*11、B*35、B*15、B*51、B*52、B*40、DRB1*1101、DRB1*0901、DQB1*0303、DQB1*0301等类型,为常见蒙古人种类型。结论 利用特异性核酸探针杂交分析法可方便快速地对HLA分型,值得推广使用。

人类白细胞抗原(Human leucocyte antigen,HLA)是由位于第6号染色体短臂远端基因编码的两类独立的对T细胞表面具有高亲和性的多肽抗原,分为HLAⅠ和HLAⅡ。HLA在免疫系统的调控、器官移植、许多疾病如自身免疫性疾病和癌症以及人类遗传学研究中具有重要作用,对HLA的研究也有助于提高成分输血的疗效和防止输血反应等[1~3]。HLA分型可采用血清学、细胞学和分子生物学方法进行,传统的血清学HLA分型方法因高质量血清来源困难,且存在交叉反应,导致较高的分型错误率,限制了在临床的广泛应用[4]。随着分子生物学技术的发展,近年来HLA分型逐渐采用基因序列分析法,其原因是该类方法结果准确可靠[5~7]。我们采用酶联探针杂交分析法(ELPHA)对西南某地献血员进行了初步实验,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 血标本

选取献血员10名(年龄23~48岁,平均35岁,男4例,女6例),分别采集静脉血5 ml于肝素抗凝管中,按常规法分离淋巴细胞,置液氮中保存。

1.2 DNA制备

采用异硫氰酸胍法按宝灵曼试剂盒说明书进行。取10 μg DNA用于HLAⅠ和Ⅱ型鉴定。

1.3 HLA定型

HLAⅠ型采用Dynal RELI™ SSO HLA-A和HLA-B试剂盒(Dynal A.S.,Oslo,Norway),按使用说明书进行,PCR仪为美国P-E公司9600型。使用生物素标记探针混合物,于PCR反应液50 μl中加200 ng DNA标本。HLAⅠ型扩增反应条件为95 ℃变性15 s、60 ℃退火45 s、72 ℃延伸15 s,反应共进行35次循环,最后在72 ℃延伸5 min。扩增产物经加入变性液处理5 min。将产物置于反应槽内,放入检测条,依次进行预杂交、杂交和显色检测。最后将结果进行计算机分析,得出HLAⅠ型基因谱。HLAⅡ型采用ELPHA方法(Biotest Diagnostics Co. Germany),参照试剂盒说明书进行。该反应使用生物素化引物,在PCR扩增和产物变性后,生物素化的单链分子可与包被有链霉亲合素的微孔板相结合,加入PCR产物于微孔中可将固态FITC标记寡核苷酸探针溶解。混合所加试剂,即可进行寡核苷酸探针的杂交。该法的特异性依赖于所用寡核苷酸探针,没有与PCR产物足够同源性的探针被洗去,杂交探针经FITC特异性抗体片段与辣根过氧化物酶显色反应进行检测,HLA DRB和DQB等位基因经酶标仪测定后用计算机判读。HLAⅡ型扩增反应条件为95 ℃变性15 s、55 ℃退火15 s、72 ℃延伸15 s,反应共进行35次循环,最后在72 ℃延伸6 min。扩增产物经加入变性液室温处理5 min,转移至微孔反应板中,加入经(46±1) ℃预孵育45 min的杂交液进行杂交,经水洗后再加入显色剂,于450 nm波长处测定吸光度值,与标准图谱对比得出HLA DRB1和DQB1类型。

2 结果

HLA定型结果见表1。采用PCR扩增HLA基因片段,经特异性探针对扩增产物进行杂交,根据对不同探针组合的阳性结果,经计算机分析可得出标本的HLA等位基因图谱。在HLAⅠ分析中,对HLA-A采用了针对外显子2和外显子3在内的35个探针,包括各1个对照质控探针;对HLA-B采用了56个探针,包括针对外显子2和外显子3各1个对照质控探针。本实验为了探索HLA实验条件,仅取10名献血员进行实验,实验结果见图1。

作者简介:赵树铭(1965—),男,四川省西充县人,博士,副主任技师,主要从事临床输血学方面的研究,发表论文20篇。
电话:(023)68754000-73116

收稿日期:2000-04-10;修回日期:2000-06-04

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

可见在本实验室条件下, HLAⅠ的分析结果较为满意。HLAⅡDQB 和 DRB 实验采用 ELPHA, 含有 439 bp 的人生长激素基因作为对照。对 10 名献血员标本的实验结果表明, 在本实验条件下可开展 HLA 定型试验, 可有效地报告结果, 但由于本实验要求条件严格, 任何环节的污染均可导致结果的判断困难。

表 1 西南某地 10 名献血员 HLA 分析结果

标本	HLAⅠ				HLAⅡ	
	A		B		DRB1	DQB1
1	A *02	A *02	B *35	B *51	DRB1 *1101 DRB1 *0901	DQB1 *0301 DQB1 *0303
2	A *02	A *11	B *18	B *40	DRB1 *1604 DRB1 *0403	DQB1 *0301 DQB1 *0302
3	A *02	A *02	B *3915	B *4803	DRB1 *1407 DRB1 *0403	DQB1 *0301 DQB1 *0304
4	A *11	A *24	B *4801	B *51	DRB1 *1110 DRB1 *0901	DQB1 *0303 DQB1 *0502
5	A *02	A *31	B *51	B *52	DRB1 *1601 DRB1 *0403	DQB1 *0301 DQB1 *0202
6	A *02	A *24	B *1538	B *5110	DRB1 *1603 DRB1 *0401	DQB1 *0303 DQB1 *0304
7	A *11	A *24	B *1538	B *3517	DRB1 *1101 DRB1 *1401	DQB1 *0301 DQB1 *0502
8	A *0103	A *11	B *35	B *5001	DRB1 *0101 DRB1 *0701	DQB1 *0501 DQB1 *0201
9	A *24	A *68	B *3701	B *4002	DRB1 *0901 DRB1 *1001	DQB1 *0303 DQB1 *0501
10	A *24	A *24	B *35	B *40	DRB1 *1112 DRB1 *1301	DQB1 *0301 DQB1 *0502

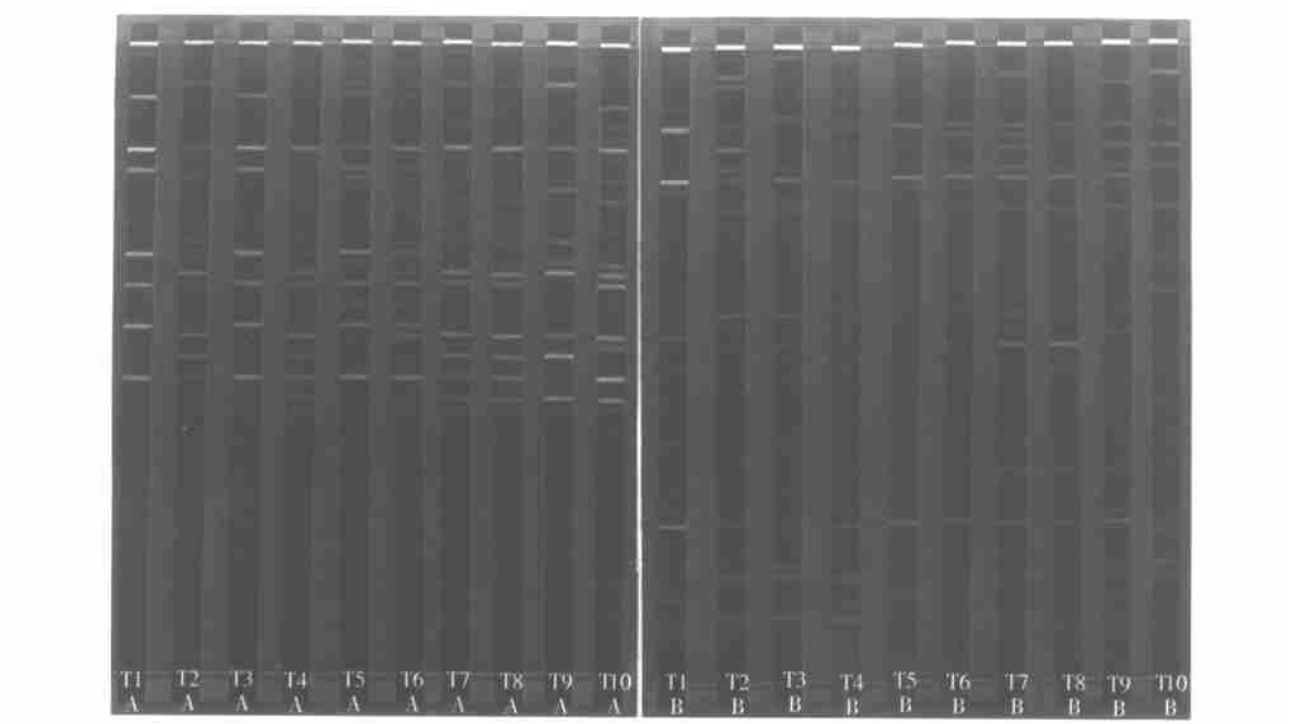


图 1 Dynal RELI™ SSO 检测献血员 HLA-A 和 HLA-B 结果

图下方标示为标本号

3 讨论

HLA 分析广泛应用于器官移植和成分输血等领域[1]。在许多有核细胞中, HLA Ⅰ类抗原的存在形式有 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C, 它们是细胞表面糖蛋白, 可结合和提呈由内源性蛋白质(如病毒和肿瘤多肽)诱生的多肽给 $CD8^+$ T 细胞。这些异二聚体含有 HLA 编码的 α-链和非组织相容性复合体编码的多肽, β_2-微球蛋白。β_2-微球蛋白是单型性的, 而 α-链基因则呈多态性, 据 1998 年 WHO 报道 HLA-A 有 107 个等位基因、HLA-B 有 240 个等位基因、HLA-C 有 67 个等位基因。这种变异性主要是外显子 2 和 3 引起的, 它们编码的多肽是具有肽结合位点的氨基端细胞外部分。在这两个外显子中, 多态变异性主要集中在相对保守框架区域的独立部分。对 HLAⅠ类抗原分子结构分析表明, 多态性残基主要位于多肽结合区, 参与多肽和 T 细胞

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

受体直接结合。HLA Ⅱ类基因产物为 HLA-DR、HLA-DQ 和 HLA-DP，由 α 和 β 两条糖蛋白链组成。DRα 链无多态性，DQα 和 DPα 链有多态性，α 链由 1 个基因位点控制。β 链有多态性，由 4 个基因位点控制，基因产物为 B1、B2、B3 和 B4。本实验对 HLA-A 采用了针对外显子 2 和外显子 3 在内的 35 个探针，对 HLA-B 采用了 56 个探针，增加了本法的检测特异性和准确性，同时由于采用 DNA 扩增法和标记寡核苷酸探针杂交法提高了检测灵敏度。国外大多采用分子生物学方法进行 HLA 定型，国内采用此类方法的单位还不多，主要原因是该方法成本较高。在该项试验中，10 名献血员 HLA Ⅰ和Ⅱ等位基因表现有 A *02、A *24 、A *11、B *35、B *15、B *51、B *52、B *40、DRB1 *1101、DRB1 *0901、DQB1 *0303、DQB1 *0301 等类型。这些类型为常见的蒙古人种所具有。可以认为，用分子生物学方法进行 HLA 配型，可为临床器官移植和成分输血提供可靠的 HLA 定型结果，虽然该类方法价格较高，仍值得推广使用。

（致谢：本实验数据由日本鹿儿岛大学病毒学教研室李洪川博士进行计算机分析处理，特此致谢。）

关键词：献血员；人类白细胞抗原；HLA 分型

中图法分类号：R392.11 文献标识码：B

参考文献：

[1] 杨天楹，杨成民，田兆嵩 主编. 临床输血学[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1993. 100－133.

[2] 曹 琼，武大林，丁 红，等. PCR-SSP 检测 HLA-B27 对强直性脊髓炎的临床诊断价值[J]. 中国输血杂志，1999，12(3)：152－153.

[3] Lou H, Li H C, Kuwayama M, *et al*. HLA class Ⅰ and class Ⅱ of the Nivkhi, an indigenous population carrying HTLV-Ⅰ in Sakhalin, Far Eastern Russia[J]. Tissue Antigens, 1998, 52(7): 444－451.

[4] Koelman C A, Ensink W, Mulder A, *et al*. Anti-HLA antibodies interfere in the detection of soluble HLA class I molecules[J]. Hum Immunol, 1999, 60(5): 414－423.

[5] Moribe T, Kaneshige T, Inagawa A, *et al*. Rapid HLA class I DNA typing using microtiter plate-reverse hybridization assay (MRHA) by simple thermoregulation: High-resolution subtyping of the HLA-A2 and -B40 antigen groups[J]. Hum Immunol, 1999, 60(6): 539－549.

[6] Prasad V K, Kernan N A, Heller G, *et al*. DNA typing for HLA-A and HLA-B identifies disparities between patients and unrelated donors matched by HLA-A and HLA-B serology and HLA-DRB1[J]. Blood, 1999, 93(1): 399－409.

[7] Ono T, Zambenedetti M R, Yamasaki K, *et al*. Molecular analysis of HLA class Ⅰ (HLA-A and -B) and HLA class Ⅱ (HLA-DRB1) genes in Japanese patients with multiple sclerosis (Western type and Asian type)[J]. Tissue Antigens, 1998, 52(6): 539－542.

（编辑 谢义霞）

文章编号：1000-5404(2000)09-0907-01

经验与短篇

中西药治疗经前失眠症 30 例分析

Treatment of premenstrual insomnia with the Chinese traditional herbs and western medicine: An analysis of 30 cases

周 均[1]，罗 妩[2] （[1] 第三军医大学附属西南医院药学部，重庆 400038；[2] 北京空军总医院，北京 100036）

许多妇女在经期前由于受下丘脑和卵巢内分泌变化的生理影响，常出现烦燥、焦虑、精力不集中和失眠症状。本研究用速效枣仁安神胶囊和安定结合治疗，取得较好疗效，现将结果报告如下。

1 临床资料与方法

30 例年龄在 20～40 岁左右的妇女，记下每个月经周期天数，在月经来临前发药，按 10 人一组分成 3 组，同时进行 3 个月跟踪调查。

（下转 911 页）

作者简介：周 均（1963－），女，湖南省湘阴县人，主管药师，主要从事中西药结合治疗方面的研究，发表论文 9 篇。电话：(023)68754474

收稿日期：1999-12-12；修回日期：2000-05-18

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