

# 应用 SSP-PCR/ SSO 方法进行中国辽宁汉族人 HLA-DRB1 基因的遗传多态性研究<sup>①</sup>

刘利民<sup>1)</sup> 梁 健<sup>2)</sup> 宋芳吉<sup>2)</sup> 贾静涛<sup>1)</sup>

(1. 中国医科大学法医血清学教研室; 2. 中国医科大学附属第一医院, 沈阳 110001)

**摘 要** 对 159 名中国辽宁汉族个体的基因组 DNA 进行分析, 共检出 42 种等位基因, 其中以 *DRB1* \*09012(12.8%)、\*0701(10.7%)、\*1501(10.4%) 最为常见, 其次为 *DRB1* \*1201(7.9%)、\*1202(7.5%)、\*1101(6.6%)、\*0301(5.0%)。并发现辽宁汉族人 *DRB1* 等位基因频率与白种人间存在明显差异, 揭示不同人种有其自己的主要等位基因。同时对本技术在 HLA-DRB1 分型应用中的优点进行了讨论。

**关键词** HLA-*DRB1* 基因分型, SSP-PCR, 寡核苷酸探针

**中图分类号** Q986, R392.2

## Polymorphic Analysis of HLA-*DRB1* Gene in Chinese Liaoning Han Population by Sequence Specific Primers-PCR and Sequence Specific Oligonucleotide Probes

LIU Li-Min<sup>1)</sup> LIANG Jian<sup>2)</sup> SONG Fang-Ji<sup>2)</sup> JIA Jing-Tao<sup>1)</sup>

(1. Department of Forensic Serology; 2. First Hospital, China Medical University, Shenyang 110001)

**Abstract** HLA-*DRB1* alleles of 159 Chinese donors from Liaoning Han population were determined by using a set of 23 sequence specific oligonucleotide probes directed to various *DRB1* alleles. The samples were first amplified and divided into 8 groups by allele/group specific primers. The SSOs enable us to identify 58 different *DRB1* subtypes. 42 alleles were detected in the study of this population. Among them, the *DRB1* \*09012(12.8%), \*0701(10.7%), \*1501(10.4%), \*1201(7.9%), \*1202(7.5%), \*1101(6.6%), \*0301(5.0%) are the most frequent. The significant difference was found in Chinese northern Han population by comparing the gene frequencies in Caucasoid samples, suggesting that there were principal *DRB1* alleles in different races.

**Key words** HLA-*DRB1*, Genotyping, SSP-PCR, SSO

人类白细胞抗原是人体内最复杂的遗传多态性系统。HLA II 类抗原中的 DR 亚区包含有功能的一个 A 基因和几个 B 基因(*DRB1*, *DRB3*, *DRB4*, *DRB5* 和 *DRB6* 基因座)以及几个假基因, 其中 HLA-*DRB1* 基因具有极大的多态性。已通过序列分析得到 WHO 命名委员会正式命名的就有 70 余种特异性<sup>①</sup>。这些等位基因在白种人中已经有了比较多的研究。HLA 群体资料表明, 不同人种、不同民族甚至同一民族不同地域人群间的 HLA 各等位基因频率也有很大差异<sup>②</sup>。因此, 检测 HLA-*DRB1* 的分布不仅对民族起源分析很有必要, 而且对器官移

<sup>①</sup>本研究为国家教委留学归国人员科研基金和辽宁省科委自然科学基金资助项目。

本文承蒙瑞典乌普萨拉大学生物医学中心 Gyllensten U 教授和中国上海第二医科大学免疫遗传研究室陈仁彪教授的指导和帮助, 在此致谢。

植配型及某些疾病相关性研究具有重要意义。同时也可作为法医学亲子鉴定和个人识别提供重要的统计学数据。

本文采用序列特异性引物(SSP)作 PCR 扩增分组,再用 SSO 杂交的方法,对辽宁汉族人群中 HLA-DRB1 分布进行了研究。结果报告如下。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 材料

1.1.1 样本 159 名无血缘关系的辽宁地区汉族人,取自中国医科大学第一附属医院健康献血员和本教研室收检的亲生子女案例血样。

1.1.2 PCR 引物 PCR 引物序列见表 1。设计选自高度多态的 HLA-DRB1 第二外显子区<sup>(1)</sup>。为组特异性和等位基因特异性扩增引物。

表 1 PCR 扩增引物及其序列

引物	序 列	特异性
UG115	5'-CGTTTCTTGGGAGCCTTAAGTT-3'	DR1
UG116	5'-CCACGTTTCTGTGGCAGCCTAAGAGG-3'	DR2
UG205	5'-AGACCACGTTTCTTGGAGTACTCTACGTC-3'	DR3,5,6
UG117	5'-CGTTTCTTGGAGCAGGTTAAACA-3'	DR4
UG118	5'-CAACCACGTTTCTGTGGCAGGG-3'	DR7
UG206	5'-CCACGTTTCTTGGAGTACTCTACGGG-3'	DR8,12
UG119	5'-CAACCACGTTTCTTGAAGCAGGA-3'	DR9
DR10new	5'-ACCAGACCACGTTTCTTGGAGG-3'	DR10
DR RIGHT	5'-ACTCGCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC-3'	右侧翼全部

1.1.3 SSO 探针 23 个辣根过氧化物酶(HRP)标记的序列特异性寡核苷酸探针序列及其杂交相对应的特异性等位基因<sup>(1)</sup>列于表 2。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 制备 取每个体静脉抗凝血 0.5ml,分离白细胞。按常规酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 反应体系包含 10mmol/L Tris-HCl(pH8.3), 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50mmol/L KCl, 10% glycerol, 200μmol/L dNTP, 0.5μM primer 和 2.5 u Taq 聚合酶。模板 DNA 为 0.1μg。总体积为 50μl。扩增条件是 95℃ 变性 1min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 循环 30 个周期,最后 72℃ 延伸 7 min。扩增产物用 4% 琼脂糖(FMC)凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色检测。

1.2.3 斑点杂交 将 5μl PCR 产物加入 50μl 0.4N NaOH / 25mmol/L EDTA 溶液中变性后,打点固定于尼龙膜(Pall, Glen COve, NY, USA)上。再用 HRP 标记的序列特异性寡核苷酸探针与之杂交。然后用增强化学发光试剂(ECL, Amersham)检测,在暗盒内使用光敏感型感光胶片(Kodak Xomat-S)曝光显示杂交信号<sup>(3)</sup>。

1.2.4 数据处理 等位基因检出率用直接计数法。

## 2 结 果

### 2.1 样本的基因组 DNA

用组特异性引物扩增分成 8 组后,与相应 SSO 探针杂交,确定等位基因特异性。本研究 159 名辽宁汉族人群的 HLA-DRB1 等位基因频率结果列于表 3。这一群体中共检出 42 个等位基因。其中最常见型别有 DRB1 \* 09012(12.8%)、DRB1 \* 0701(10.7%)、DRB1 \* 1501(10.4%),其次为 DRB1 \* 1201(7.9%)、DRB1 \* 1202(7.5%)、DRB1 \* 1101(6.6%)、DRB1 \* 0301(5.0%)。

### 2.2 DRB1-DR1 特异性检测

用 UG115-DR RIGHT 扩增样本 DNA,检出 9 例 DR1(2.8%)。用 SSO 探针杂交,发现以 DRB1 \* 0101

为主(1.9%)，同时检出 \* 0103(0.9%)，但未见 *DRB1* \* 0102。

表 2 寡核苷酸探针序列

探针	序列	等位基因
DR1N	5'B-GGAGTTCCGGGC-3'	1501,1502,1503,0301,1201,1202,1101,1102,1103,1104,1301,1302,1304,1305,1306
DR2	5'B-AAGGACTTCTTGGA-3'	1601,1101,1103,1104,1202,1305,0801,0802,0804,0805,09012
DR3N1	5'B-GCCTAGCGCCGAGTAC-3'	0405,0409,0410,0411,0412,1303,1304,0801,0803,0805
DR4	5'B-CCTGATGAGGAGTAC-3'	1101,1102,1103,1104
DR5N	5'B-GGCCTGCTGCGGAGC-3'	1401,1404,1407,1410
DR6N	5'B-CTGTCGCCGAGTCC-3'	1201,1202,0701,09012
DR7	5'B-GCAGAGGCGGGC-3'	0101,0102,0404,0405,0408,0410,1402,1406,1409
DR8	5'B-GAAGACGAGCGGG-3'	0103,0402,1102,1103,1301,1302,1304
DR9	5'B-CTGGAAGACAGGCG-3'	1601,1602,0412,1101,1104,1201,1202,1305,1306,1403,0801,0802,0803,0804,0805
DR10	5'B-AAGCGGGGCCGG-3'	0301,0302,0303
DR11	5'B-CGGGCCGAGGTG-3'	0403,0406,0407,0411,1401,1404,1405,1407,1408,1410,09012
DR12	5'B-CAGAAGCGGGCC-3'	0401,0409
DR13	5'B-GGGTTGGTGAGAGC-3'	0101,0103,1502,1601,1602,0302,0401,0405,0407,0408,0409,1101,1302,1303,1305,1402,1403,1407,1409,0701,0801,0802,0803,0805,09012,1001
DR14	5'B-GGGTTGTGGAGAGC-3'	1501,1503,0301,0303,0402,0403,0404,0406,0410,0411,0412,1102,1103,1104,1301,1304,1306,1401,1404,1405,1406,1408,1410,0804
DR15	5'HRP-GGGACGGAGCGGGTGC-3'	全部等位基因
DR16	5'B-CAGCTTAAAGTTTGAATG-3'	0101,0102,0103
DR17	5'B-CCTAAGAGGGAGTGT-3'	1501,1502,1503,1601,1602
DR18	5'B-TCTACGTCTGAGTGTC-3'	0301,0302,0303,1101,1102,1103,1104,1301,1302,1303,1304,1305,1306,1401,1402,1403,1404,1405,1406,1407,1408,1409,1410
DR19	5'B-CAGGTTAAACATGAGTG-3'	0401,0402,0403,0404,0405,0406,0407,0408,0409,0410,0411,0412
DR20	5'B-TGGCAGGGTAAAGTATAA-3'	0701,
DR21	5'B-TCTACGGGTGAGTGTT-3'	0801,0802,0803,0804,0805,1201,1202,1404
DR22	5'B-TTCTTGAAGCAGGATAA-3'	09012
DR23N	5'B-GGAGGAGGTTAAGTTTT-3'	1001

### 2.3 *DRB1-DR2* 特异性检测

用 UG116-DR RIGHT 扩增和 SSO 探针杂交，为 *DR2* 组确定了 4 种特异性：*DRB1* \* 1501、\* 1502、\* 1601 和 \* 1602(表 3)。*DRB1* \* 1501 是 *DR2* 组的主要等位基因，占 67.3%。

### 2.4 *DRB1-DR4* 特异性检测

UG117-DR RIGHT 扩增和探针杂交可精确区分 14 个 *DR4* 等位基因。其中以 *DRB1* \* 0405、\* 0403(6)最为常见。*DRB1* \* 0402、\* 0404、\* 0409、\* 0410、\* 0413 和 \* 0414 频率很低。而 \* 0407、\* 0408、\* 0411、\* 0412 和 \* 0415 未在本群体中检出。

### 2.5 *DRB1-DR3、5、6* 组特异性检测

用 UG205-DR RIGHT 引物能够扩增 *DR3*、*DR5*(11)、*DR6*(13,14)特异性的等位基因。用 SSO 探针杂交后，本群检出 3 种 *DR3* 特异性中的 2 个，6 种 *DR5*(11)中的 5 个，17 种 *DR6* 中的 11 个等位基因。其中以 *DRB1* \* 0301(10.1%)、\* 1101(13.2%)、\* 1302(4.4%)及 \* 1401(4.4%)较为常见(表 3)。

### 2.6 *DRB1-DR7* 特异性检测

UG118-DR RIGHT 可扩增 *DR7* 特异性的 *DRB1* \* 0701 等位基因。*DRB1* \* 0701 的检出率较高，为 21.4%。

### 2.7 *DRB1-DR8* 和 *DR12* 组特异性检测

UG206-DR RIGHT 可扩增出 *DR8* 和 *DR12* 的等位基因。SSO 寡核苷酸探针杂交后检测出 3 个 *DR8* 和 2 个 *DR12* 的等位基因特异性。以 *DRB1* \* 0803(7.5%)较为常见。*DRB1* \* 1201 和 \* 1202 在本群体中的检出率也

较高。

DR9 有 1 种亚型, 命名为 DRB1 \* 09012(23.9%)。DR10(DRB1 \* 1001)的检出率为 4.4%。

表 3 中国辽宁汉族 HLA-DRB1 等位基因和基因频率

DRB1	DR	等位基因频率 (%)	基因频率	DRB1	DR	等位基因频率 (%)	基因频率
0101	DR1	3.8	0.019	1106	DR11(5)	0.6	0.003
0102	DR1	0.0	0.000	1201	DR12(5)	15.7	0.082
0103	DR103	1.9	0.009	1202	DR12(5)	15.1	0.079
1501	DR15(2)	20.8	0.110	1301	DR13(6)	2.5	0.013
1502	DR15(2)	6.9	0.035	1302	DR13(6)	4.4	0.022
1601	DR16(2)	0.6	0.003	1303	DR13(6)	0.6	0.003
1602	DR16(2)	2.5	0.013	1304	DR13(6)	1.3	0.006
0301	DR17(3)	10.1	0.052	1306	DR13(6)	0.6	0.003
0303	DR18(3)	0.6	0.003	1401	DR14(6)	4.4	0.022
0401	DR4	3.2	0.016	1403	DR1403	1.3	0.006
0402	DR4	0.6	0.003	1404	DR1404	2.5	0.013
0403 / 0406	DR4	5.7	0.029	1405	DR14(6)	3.8	0.019
0404	DR4	1.3	0.006	1407	DR14(6)	1.3	0.006
0405	DR4	3.8	0.019	1411	DR14(6)	0.6	0.003
0409	DR4	0.6	0.003	0701	DR7	21.4	0.113
0410	DR4	1.3	0.006	0801	DR8	3.8	0.019
0413	DR4	0.6	0.003	0802	DR8	2.5	0.013
0414	DR4	0.6	0.003	0803	DR8	7.5	0.038
1101	DR11(5)	13.2	0.068	09012	DR9	23.9	0.128
1102	DR11(5)	1.3	0.006	1001	DR10	4.4	0.022
1104	DR11(5)	1.9	0.010	空白			0.000
1105	DR11(5)	0.6	0.003				

### 3 讨 论

HLA 系统的高度多态性, 使其作为一种遗传标记, 不仅被用来研究人类的遗传现象 (包括人类的起源和进化), 还被应用于法医学亲子鉴定和个人识别, 同时在临床上也用于器官移植配型和 HLA 疾病相关的研究。在近年逐步推广应用的 HLA II 类抗原的 DNA 分型方法中, 使用 PCR 扩增和非同位素标记的 SSO 探针作斑点杂交法, 不仅具有快速、灵敏和精确的优点, 尤其适用于大样本群体研究。而且根据杂交格局的改变, 还有可能发现新的等位基因。SSP-PCR<sup>(4)</sup> 是一种较新的基因分析技术, 可以提高检测方法的特异性。作者采用这一方法, 先区分出 HLA-DRB1 的组特异性和等位基因特异性, 再借助 SSO 探针杂交进一步分析亚型。不但减少了因等位基因间存在相同序列而出现交叉杂交的问题发生, 增加了分型结果的可靠性和精确性, 还提高了等位基因的检出率。

本文研究了中国辽宁地区汉族人群 HLA II 类抗原 DRB1 位点的基因分布状况。研究结果表明, 大多数存在于其他群体中的 DRB1 等位基因, 在我们所研究的群体中也被检出。但许多等位基因频率与其他人群比较具有明显的差异 (见表 4), 特别是各种不同亚型的分布, 反映了不同种族间的遗传差异。比较发现, 中国辽宁汉族人的 DRB1 \* 1201、\* 1202、\* 0901 的基因频率明显高于白种人, 而 DRB1 \* 0101、\* 0301、\* 1302 明显低于白种人。又如 DR4 组特异性, 其总基因频率中国人低于白种人, 但观察其亚型分布有着更大的差异。在白种人 DR4 等位基因中, 以 DRB1 \* 0401 为主要特异性, 占总数的 78.6%。中国人则以 DRB1 \* 0405 和 \* 0403(6) 为主, \* 0401 频率明显降低, 而前两种等位基因在白种人中频率很低甚至完全缺如<sup>(5)</sup>。我们还发现在中国汉族群体和日本人中, DR9 基因频率明显高于白种人。这一特异性是否具有东方人的特征, 有待更多的群体资料证实。与日本人群比较<sup>(6)</sup>, 我们的结果显示, HLA-DRB1 基因的分布情况相近。但仍有一些等位基因频率存在差异。中国辽宁汉族人群的 DR3、DR5、DR7 的基因频率高于日本人, 尤其以 DR7 的基因频率差异显著。而

DR4 特异性的基因频率显著低于日本人群。关于中华民族起源早有我国汉族包含南北两大群体之说。将我们的研究结果与湖南籍汉族群体的 DR 基因频率比较<sup>(7)</sup>, 发现辽宁汉族人的 DR1、DR11 和 DR7 的基因频率高于湖南汉族人群, 而 DR9 则低于其相应的基因频率。这些差异可能与来自不同地区的人群有关。中国北方和东北人群有与高加索人混血的较大可能。而在南方地区, HLA 的分布可能会与东南亚人群更为相似。中国地域如此广大, 期望看到更多的来自于中国不同地区的研究数据。这对于探究人类的起源、迁移和进化将具有重要的意义与实际价值。

表 4 HLA-DRB1 位点基因频率的比较

DR 特异性	SSO 基因型			
	湖南人 n=67	沈阳人 n=159	日本人 n=376	瑞典人 n=170
DR1	0.007	0.028	0.066	0.091
DR2	0.172	0.161	0.175	0.194
DR3	0.022	0.055	0.002	0.115
DR4	0.105	0.088	0.215	0.236
DR11(5)	0.022	0.090	0.031	0.062
DR12(5)	0.119	0.161	0.052	0.015
DR13(5)	0.037	0.047	0.089	0.127
DR14(5)	0.029	0.069	0.072	0.017
DR7	0.045	0.113	0.004	0.096
DR8	0.037	0.070	0.116	0.047
DR9	0.209	0.127	0.142	0.003
DR10	0.000	0.022	0.007	0.003
Blank		0.000	0.002	0.000

### 参 考 文 献

- 1 Marsh SGE, Bodmer J G. HLA Class II region nucleotide sequences, 1994, European Journal of Immunogenetics, 1994, (21): 519~551
- 2 陈仁彪, 叶根跃, 庚镇城等. 我国大陆主要少数民族 HLA 多态性聚类分析和频率分布对中华民族起源的启示. 遗传学报, 1993, 20(5): 389~398
- 3 Scharf S J, Griffith R L, Erlich H A. Analysis of DNA Sequence Polymorphism at the HLA-DRB1 Locus Using the Polymerase Chain Reaction and Non-Radioactive Oligonucleotide Probes. Human Immunology, 1991, (30): 190~201
- 4 Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. Tissue Antigens, 1992, 39: 225
- 5 Allen M, Saldeen T, Pettersson U *et al.* Genetic Typing of HLA Class II Genes in Swedish Populations: Application to Forensic Analysis. Journal of Forensic Sciences, 1993, (38): 554~570
- 6 Obata F, Abe A, Ohkubo M *et al.* HLA-DR gene frequencies in the Japanese population obtained by oligonucleotide genotyping. Tissue Antigens, 1991, (38): 124
- 7 郭实士, 张修武. 应用 PCR / SSO 方法进行湖南籍汉族人 HLA-DR 亚区的 DNA 分型. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, (13): 47~52

1998-02-25 收稿, 1998-06-25 修回.

## “第十届基因、基因族、同工酶国际研讨会”预报

“第十届基因、基因族、同工酶国际研讨会”将于 1999 年 10 月 5~10 日在北京召开, 大会的主题是“基因组研究进展及其对 21 世纪生物学的意义”。本届大会由中国科学院发育研究所、水产科学院长江水产研究所和国际生物科学联合会中国全国委员会联合主办, 大会主席为中国科学院副院长许智宏教授。有兴趣参加者请尽快和大会组委会联系: 100080 北京中关村 中国科学院发育研究所, 联系人: 薛国雄, 王宁, 电话: 010-62551158