

人类血小板抗原 1~6 系统同步基因分型的研究

邓志辉, 吴国光, 李大成

(广东省深圳市输血医学研究所, 深圳 518035)

摘要: 为研究采用 PCR-SSP 技术, 建立可靠的人类血小板抗原 HPA-1, 2, 3, 4, 5, 6 系统的同步基因分型方法, 并以所建立的方法研究血小板抗原。设计合成 18 条序列特异性引物, 探索最佳退火温度, 通过调整引物浓度、 Mg^{2+} 离子浓度, 使 HPA-1~6 系统等位基因在同一条件下进行同步扩增和扩增产物在同一凝胶中进行同步电泳。引物的特异性和灵敏度采用基因型已知的质控 DNA 进行验证。应用此方法, 对 2000 年度国际输血协会 (ISBT) 第十届血小板基因定型与血清学工作组送检的 15 份考核样本 (其中血样 2 份, DNA 样本 13 份) 进行了基因分型。用此方法检测质控 DNA, 结果与已知的 HPA 基因型完全相符; 15 份第十届血小板基因定型与血清学工作组的考核样本的检测结果, 与 ISBT 公布的结果完全相同, 准确率达 100%。

关键词: 序列特异性引物-PCR; 人类血小板抗原; 基因分型

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2004)05-0594-05

Study on the Simultaneous Genotyping of Human Platelet Antigens of 1, 2, 3, 4, 5, 6 System by PCR-SSP and Its Applications

DENG Zhi-Hui, WU Guo-Guang, LI Da-Cheng

(ShenZhen Institute of Transfusion Medicine, ShezZhen, Guangdong Province 518035, China)

Abstract: To set up the simultaneous genotyping of human platelet antigens of 1, 2, 3, 4, 5, 6 system by PCR-SSP assay and use the genotyping method for the study of platelet antigens. In this study, 18 sequence-specific primers were designed and synthesized. The annealing temperature for all sequence-specific primer pair, the concentration of each primer pair and the concentration of Mg^{2+} were adjusted to the optimum so that HPA-1 to 6 systems could be amplified simultaneously under the same PCR cycling parameters. The electrophoresis of PCR products was conducted simultaneously on the same agarose gel. Control DNA samples that genotypes known were used to confirm the sensitivity and specificity of each sequence-specific primer. 15 coded samples (including 2 blood samples and 13 DNA samples) distributed by 10TH Platelet Genotyping and Serology Workshop of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) were typed for HPA-1 to 6 systems by this method. A concordance rate of 100 percent was observed between the results of control DNA samples typed by our PCR-SSP assay and the data of known specificity of control DNA. The results of 15 coded samples tested by our method agreed well with the results provided by ISBT report.

Key words: PCR-SSP; Human Platelet Antigens (HPA); Genotyping

在临床输血工作中, 为了新生儿同种免疫血小板减少症 (NAITP)、输血后紫癜 (PTP) 以及血小板输

注无效 (PTR) 等患者的及时诊断和治疗, 对患者及献血者进行血小板特异性抗原分型, 具有十分重要

收稿日期: 2003-07-24; 修回日期: 2004-03-15

基金项目: 广东省卫生厅科研课题基金项目 (编号 A2001642) [Supported by the Research Fund of Guang-Dong Health Department, No. A2001642]

作者简介: 邓志辉 (1967-), 男, 江西南昌人, 硕士, 主管技师, 专业方向: 免疫遗传学。Tel: 0755-83242567, E-mail: zhihui_deng@yahoo.com.cn

的意义。以往采用血清学方法进行血小板抗原分型,受到抗血清来源以及获取病人血小板困难等因素的制约,难以广泛应用。随着分子生物学技术的发展,人类血小板抗原(Human Platelet Antigen, HPA)的基因分型已日益普遍。本文建立的 PCR-SSP 方法通过探索最佳退火温度及调节 Mg^{2+} 离子浓度、引物浓度,可对 HPA-1,2,3,4,5,6 系统在同一扩增条件下进行同步扩增,扩增产物经同步电泳,一次性即可获得受检者 HPA-1~6 系统的基因型;克服了以往不同的 HPA 系统,须在不同退火温度下分别扩增的限制。应用本文建立的方法,对 2000 年度国际输血协会(ISBT)第十届血小板基因定型与血清学工作组送检的 15 份考核样本进行基因分型,检测结果与 ISBT 公布的结果完全相同,准确率达 100%,说明本文建立的方法是简便、快速和准确的,现将此基因分型方法报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

表 1 15 个考核样本的 DNA 浓度测定值

Table 1 The DNA concentration of 15 coded samples

样本编号 Code of sample	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15
DNA 浓度 (ng/ μ L) DNA Concentration (ng/ μ L)	24	30	28	120	24	32	120	136	24	84	28	24	96	16	64
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 比率 Ratio of A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1.8	1.8	1.4	1.7	1.6	1.5	1.9	1.8	1.6	1.8	1.7	1.8	1.9	1.7	1.8

注: D1、D2 样本为血样, D3~D15 样本为 DNA。

Note: D1 and D2 from blood, D3 to D15 from DNA.

1.2.3 引物

DNA 序列特异性引物共 18 条,委托中国科学院上海细胞生物学研究所合成,合成序列详见表 2。每个血小板抗原系统,设计 3 条引物,其中 2 条为序列特异性引物,另 1 条为公共引物。内对照为人类生长激素(HGH)基因特异性引物, HGH-A 链序列: 5'-TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3', HGH-B 链序列: 5'-CCACTCACGGAT TTCTGTTGTGTTTC-3'; 内对照扩增产物长度为 434bp。

1.2.4 HPA-1~6 系统同步 PCP 扩增

采用 25 μ L PCR 反应体系,包括 2.5 μ L 10 \times PCR Buffer, 0.20 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L $MgCl_2$ (其中 HPA-5 系统 $MgCl_2$ 浓度为 2.0 mmol/L), 0.5 μ mol/L 序列特异性引物 (HPA-2 系统为 1.0 μ mol/L), 0.2

1.1.1 基因型已知的质控 DNA

12 种基因型已知的质控 DNA,包括: 1a/1a、1b/1b、2a/2a、2b/2b、3a/3a、3b/3b、4a/4a、4b/4b、5a/5a、5b/5b、6a/6a 和 6b/6b,均由美国东南威士康星血液中心提供。

1.1.2 ISBT 送检的考核样本

共 15 份,包括 2 份抗凝血样(每份 1mL),13 份 DNA 样本(每份 100 μ L)。

1.2 方法

1.2.1 考核样本基因组 DNA 的提取

ISBT 送检的 2 份抗凝血样,采用 QIAGEN 试剂盒提取 DNA。

1.2.2 考核样本的 DNA 浓度、纯度测定

分别取 10 μ L 样本 DNA,10 倍稀释后,使用 DNA 测定仪 (Pharmacia 公司生产)测定 DNA 浓度和 A₂₆₀/A₂₈₀ 比率,结果详见表 1。

μ mol/L 内对照引物,1.25U 金牌 Taq 酶和 100ng 基因组 DNA。扩增采用 PE9700 型基因扩增仪(美国 ABI 公司),95 $^{\circ}$ C 9min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C 1min,61 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min 共 35 个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 PCR 产物的检测

取扩增产物 20 μ L,在 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 溴乙锭)中电泳 30min 后,置紫外检测仪上观察特异性条带,并记录实验结果。

2 结果

2.1 基因型已知的质控 DNA 的检测结果

按本文建立的反应体系及扩增条件,对 12 种 HPA 基因型已知的质控 DNA 进行扩增,扩增产物的特异性与已知的基因型完全吻合,详见图 1~ 图 6。

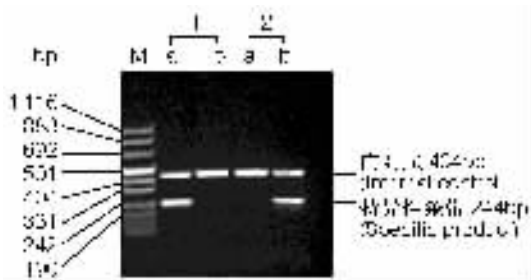


图 1 HPA-1 系统 PCR 产物电泳图谱

质控 DNA 1,2 的基因型分别为 1a/1a,1b/1b

Fig.1 Electrophoresis of PCR product for HPA-1 system

Genotype of control DNA 1: 1a/1a

Genotype of control DNA 2: 1b/1b

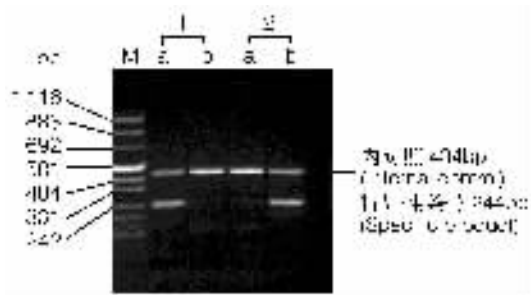


图 2 HPA-2 系统 PCR 产物电泳图谱

质控 DNA 1,2 的基因型分别为 2a/2a,2b/2b

Fig.2 Electrophoresis of PCR product for HPA-2 system

Genotype of control DNA 1: 2a/2a

Genotype of control DNA 2: 2b/2b

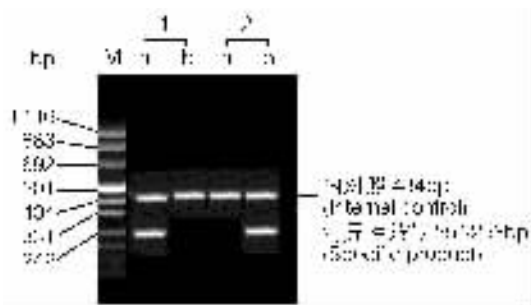


图 3 HPA-3 系统 PCR 产物电泳图谱

质控 DNA 1,2 的基因型分别为 3a/3a,3b/3b

Fig.3 Electrophoresis of PCR product for HPA-3 system

Genotype of control DNA 1: 3a/3a

Genotype of control DNA 2: 3b/3b

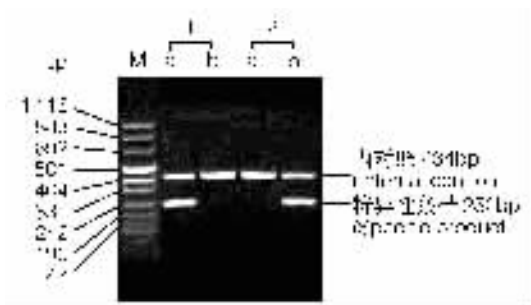


图 4 HPA-4 系统 PCR 产物电泳图谱

质控 DNA 1,2 的基因型分别为 4a/4a,4b/4b

Fig.4 Electrophoresis of PCR product for HPA-4 system

Genotype of control DNA 1: 4a/4a

Genotype of control DNA 2: 4b/4b

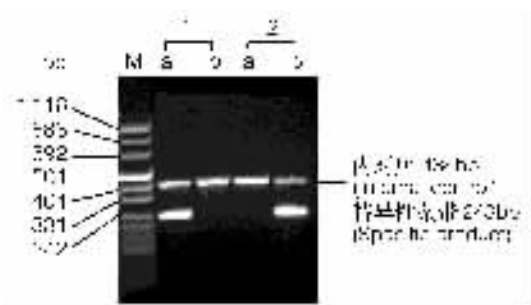


图 5 HPA-5 系统 PCR 产物电泳图谱

质控 DNA 1,2 的基因型分别为 5a/5a,5b/5b

Fig.5 Electrophoresis of PCR product for HPA-5 system

Genotype of control DNA 1: 5a/5a

Genotype of control DNA 2: 5b/5b

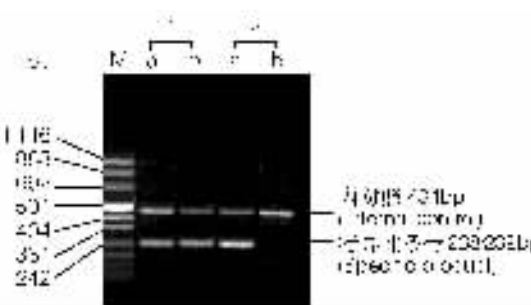


图 6 HPA-6 系统 PCR 产物电泳图谱

质控 DNA 1,2 的基因型分别为 6a/6b,6a/6a

Fig.6 Electrophoresis of PCR product for HPA-6 system

Genotype of control DNA 1: 6a/6b

Genotype of control DNA 2: 6a/6a

表 2 序列特异性引物及确定的 HPA 特异性

Table 2 Sequence-specific primers and its determined HPA specificity

HPA 系统 HPA system	引物 Primer	特异性 Specificity	碱基序列(5'-3') Sequence of nucleotide	引物长度(bp) Length of primer (bp)
HPA-1	PI ^{A1}	1a	CCTACAGGCCCTGCCTCT	18
	PI ^{A2}	1b	CCTACAGGCCCTGCCTCC	18
	PI ^{Ac}	公共的 common	TGCTTCAGGTCTCTCCCC	18
HPA-2	Ko ^a	2b	CCCCCAGGGCTCCTGAT	17
	Ko ^b	2a	CCCCCAGGGCTCCTGAC	17
	Ko ^c	公共的 common	GCAGCCAGCGACGAAAATA	19
HPA-3	Bak ^a	3a	GGACTGIGGGCTGCCCAT	18
	Bak ^b	3b	GTGGACTGGGGCTGCGAG	19
	Bak ^c	公共的 common	AGTGCTCCCAGGGACCAAG	19
HPA-4	Pen ^a	4a	CTGGCCACCCAGATGCG	17
	Pen ^b	4b	CTGGCCACCCAGATGCA	17
	Pen ^c	公共的 common	GGTAGAAAGGAGCTATGTTTGGC	24
HPA-5	Br ^a	5b	GAAGAGTCTACCTGTTTACTATCAATA	27
	Br ^b	5a	GAAGAGTCTACCTGTTTACTATCAATG	27
	Br ^c	公共的 common	AAATGGCAGTACACTATACATTCA	24
HPA-6	Ca/Tu ^a	6b	GGACGAGTGCAGCCCCCA	18
	Ca/Tu ^b	6a	GACGAGTGCAGCCCCCG	17
	Ca/Tu ^c	公共的 common	CCTATGTTTCCCAGTGGTTGCA	22

2.2 ISBT 送检的 15 份考核样本的基因分型结果

15 份考核样本的检测结果详见表 3, 检测结果与“ISBT”公布的结果完全吻合^[1]。

表 3 15 份 ISBT 考核样本的基因分型结果

Table 3 The genotyping results of 15 coded samples distributed by ISBT

序号 NO.	样本编号 Code of sample	HPA-1 系统 system	HPA-2 系统 system	HPA-3 系统 system	HPA-4 系统 system	HPA-5 系统 system	HPA-6 系统 system
01	D1	1ab	2ab	3ab	4aa	5ab	6aa
02	D2	1ab	2aa	3bb	4aa	5aa	6aa
03	D3	1aa	2ab	3aa	4aa	5aa	6ab
04	D4	1bb	2aa	3ab	4aa	5bb	6aa
05	D5	1aa	2aa	3ab	4aa	5ab	6aa
06	D6	1aa	2aa	3aa	4bb	5aa	6aa
07	D7	1bb	2aa	3bb	4aa	5aa	6aa
08	D8	1aa	2bb	3aa	4aa	5aa	6aa
09	D9	1aa	2aa	3ab	4aa	5aa	6bb
10	D10	1aa	2aa	3aa	4aa	5aa	6aa
11	D11	1aa	2aa	3bb	4aa	5bb	6aa
12	D12	1aa	2ab	3aa	4aa	5aa	6aa
13	D13	1bb	2aa	3ab	4aa	5aa	6aa
14	D14	1aa	2ab	3aa	4ab	5aa	6aa
15	D15	1aa	2aa	3bb	4aa	5aa	6aa

3 讨 论

人类血小板抗原(HPA)系统的分型方法有二,一是经典的血清学法,二是基因分型方法。血清学方法需要 HPA 抗血清以及足够数量的受检者血小板,由于 HPA 抗血清来源困难并且难于从 NAITP、PTP 患者中获得足够数量的血小板,因此,HPA 基因分型方法逐步开始代替血清方法。HPA 基因分型有多种方法,如 RFLP(限制性片段长度多态性分析)、PCR-ASO(等位基因特异性寡核苷酸点杂交)、PCR-SSP(序列特异性引物)等,其中 PCR-SSP 方法以其简便、快捷、准确的特点,应用日益广泛。目前,HPA 基因分型研究^[2~4]存在的问题有二:一是只对部分 HPA 系统进行了基因分型的研究;二是不能在同一扩增条件下对 HPA-1~6 系统进行同步扩增,不同的 HPA 系统须在不同退火温度下分别进行扩增。

本文建立的 PCR-SSP 方法可对 HPA-1~6 系统进行同步分型,即同步扩增、同步电泳,一次性可获得受检者 HPA-1~6 系统的基因型。同步分型的关键在于探索并确定一个折中的退火温度,通过调

节每个 HPA 系统的最佳 Mg^{2+} 离子浓度和序列特异性引物浓度来实现。本研究使用 12 种 HPA 基因型已知的质控 DNA, 采用 PE9700 型基因扩增仪, 逐一探索最佳的退火温度、 Mg^{2+} 离子浓度及引物浓度等。

研究发现, HPA-1~6 系统 PCR 扩增的退火温度从 58℃ 至 67℃, 逐一进行摸索, 结果以 61℃ 退火温度时, 扩增效果较好, 非特异性带少。当退火温度保持在 61℃、序列特异性引物浓度均为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、 Mg^{2+} 离子浓度按常规保持在 1.5 mmol/L、PCR 循环次数为 30 个循环时, HPA-1, 3, 4, 6 系统的特异性条带清晰、可辨, 但 HPA-2 系统的特异性条带偏弱, HPA-5 系统则未出现特异性条带。针对 HPA-2 系统特异性条带偏弱, 将扩增的循环次数提高到 35 个循环, 并增加序列特异性引物浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。针对 HPA-5 系统未见特异性条带, 增加 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时, 可检测出清晰的特异性条带, 这与 Mg^{2+} 离子影响 *Taq* 酶活性和延伸效率有关。此外, PCR 扩增采用了美国 ABI 公司的金牌 *Taq* 酶, 该酶需在 95℃ 下作用 9~11min 即热启动后才有活性, 明显地减少 HPA 非特异性扩增情况; 而使用其他的普通 *Taq* 酶则有非特异性扩增, 因而金牌 *Taq* 酶也是保证 HPA-1~6 系统同步扩增的重要因素之一。

采用美国东南威士康星血液中心提供的 12 种质控 DNA 予以验证, 扩增产物的特异性与已知的基

因型完全一致。按本文建立的方法, 对第 10 届国际输血协会 (ISBT) 血小板协作组送检的 15 份考核样本进行基因分型, 检测结果与 ISBT 公布的结果^[1] 完全相符, 准确率达 100%, 充分证明了本方法的正确性和可靠性。

采用 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA, 经 PCR 扩增、电泳、分析, 可在 4 小时内获得 HPA-1~6 系统基因型, 说明本文的方法是一种简便、快速、准确的 HPA 基因分型方法, 具有广泛的应用前景和推广价值。

参考文献 (References):

- [1] Panzer S. Report on the Tenth International Platelet Genotyping and Serology Workshop on behalf of the International Society of Blood Transfusion. *Vox Sang*, 2001, 80: 72~78.
- [2] Skogen B, Bellissimo DB, Hessner MJ, Santoso S, Aster RH, Newman PJ, McFarland JG. Rapid determination of platelet alloantigen genotypes by polymerase chain reaction using allele-specific primers. *Transfusion*, 1994, 34: 955~959.
- [3] Kluter H, Fehlau K, Panzer S, Kirchner H, Bein G. Rapid typing for human platelet antigen system -1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang*, 1996, 71(2): 121~125.
- [4] Metcalfe P. HPA genotyping by PCR-SSP: report of 4 exercise. *Vox Sang*, 1999, 77: 40~43.

欢迎阅读《医学综述》请您赐稿

《医学综述》杂志是由卫生部主管的国家级大型医学专业期刊。《医学综述》已被《中国学术期刊(光盘版)》和《中国期刊网》、《中文科技期刊数据库》、《中文生物学期刊文献库(CMCC)》全文刊载; 是中国学术期刊综合评价数据库统计源和中国期刊全文数据库全文收录期刊。本刊为月刊, 刊号: ISSN 1006-2084 CN 11-3553/R, 邮发代号: 6-106。

《医学综述》始终坚持宣传医学新理论、推广新技术; 为医学科学研究服务; 为临床医学实践服务; 为人民健康长寿服务; 创建中国特色医学理论的办刊宗旨。

创刊 10 年收到了巨大的社会效益。首先感谢广大作者辛勤写作和几十万读者的支持。为了进一步满足广大读者和作者的要求, 更好地为临床和科研人员服务, 缩短文章的刊载周期。《医学综述》自 2005 年起扩增页码加大载文量, 增加临床研究的论著文章, 欢迎作者踊跃投稿。

为使《医学综述》发挥更大的社会效益; 为使更多的聪明才智、科学思维方法与千百万读者共享; 为医学前沿提供更有价值的新理论、新成果, 请您多多赐稿。结合您的专业、特长, 赐予突出科学、实用的综述和论著文章。特别是立项课题及基金资助项目的文章优先刊登。设有栏目: 分子生物医学、免疫学、遗传学、心血管疾病、呼吸系疾病、消化系统疾病、血液肿瘤疾病、泌尿(生殖)系疾病、内分泌代谢病、风湿性疾病、临床药学、临床检验、影像学、中医中药、急救医学、传染性疾病预防等。

投稿请寄打印稿一份和介绍信, 同时附寄磁盘或 E-mail 及审稿费 20 元。并注明您的联系电话和电子信箱。

(对在国内或国外正式刊物公开发表的文章中引用《医学综述》作为文献的作者, 本刊免费赠送杂志。获赠办法: 将已发表的正式刊物复印件寄至本刊即可。)

投稿邮箱: 天津医科大学第二医院《医学综述》(300211)

联系电话: 022-24397446 13920554371

E-mail: sunhf@public.tpt.tj.cn yxzs@chinajournal.net.cn