

WHO HLA 命名委员会命名的 新等位基因 HLA-A * 24 : 327 序列分析及确认^{*}

王天菊, 陈利萍, 王小芳, 王满妮, 齐 珺 (陕西省血液中心血型室, 西安 710061)

摘要:目的 发现一个人类白细胞抗原(HLA)-A 新等位基因并对其核苷酸序列进行分析及确认。方法 采用序列特异性寡核苷酸探针技术(SSO)对2015年中国造血干细胞捐献者资料库(CMDP)陕西分库入库数据进行HLA常规检测, 针对罕见结果进一步选择多聚酶链反应-测序(PCR-SBT)和组序列特异性引物(GSSP)进行确证试验, 明确突变位点。结果 SSO分型结果显示为罕见等位基因, 经PCR-SBT复核无完全匹配结果, 提示疑似新等位基因, 经GSSP确证发现该基因与同源基因HLA-B*24:02:01:01相比, 在第3外显子544位置发生碱基变异由G>A, 该突变造成氨基酸序列158位由丙氨酸(GCC)变成苏氨酸(ACC)。结论 确认了一个新的HLA-A等位基因, 2015年12月31日被世界卫生组织HLA命名委员会正式命名为HLA-A*24:327。

关键词:人类白细胞抗原; 测序; 组序列特异性引物; 新等位基因

中图分类号: Q781 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)05-018-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.005

Sequence Analysis and Identification of A Novel HLA-A * 24 : 327 Allele Been Designated by the HLA Nomenclature Committee of WHO

WANG Tian-ju, CHEN Li-ping, WANG Xiao-fang, WANG Man-ni, QI Jun
(Shaanxi Blood Center, Xi'an 710061, China)

Abstract: **Objective** To do analysis of sequence and identify a novel HLA-A allele in Chinese hematopoietic stem cell donors. **Methods** A rare HLA-A allele was initially detected by Luminex PCR-SSO typing, then the sample was sequenced by sequence-based typing (SBT) and the group-specific sequencing primer (GSSP) to confirm the mutation allele and locus. **Results** The sequence of the sample results showed that the allele compared with the highest homologous allele HLA-A * 24 : 02 : 01 : 01 was the difference in the exon 3 at position 544 G>A, resulting in an amino acid sequence of HLA-A * 24 : 02 : 01 : 01 at position 158 change Ala to Thr. **Conclusion** This allele is a new HLA-A allele and has been designated as HLA-A * 24 : 327 by the HLA Nomenclature Committee of World Health Organization (WHO)

Keywords: human leukocyte antigen; sequence based typing; group-specific sequencing primer; novel allele

人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)是人类主要组织相容抗原复合物, 位于第6号染色体短臂上6p21.3, 全长4 000 kb, 由200个以上基因座位组成的基因复合体, 是迄今为止发现多态性最高的基因系统之一。自1958年第一个HLA抗原被检出, 截至2016年7月更新的国际免疫遗传IMGT/HLA数据3.25.版显示, 共计检出HLA-A等位基因3 492种; HLA-B等位基因4 358种; HLA-C等位基因3 111种; HLA-DRB1等位基因1 929种和HLA-DQB1等位基因940种。我们在对中国造血干细胞捐献者资料库样本进行HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1位点常规检测时, 发现1个疑似新等位基因, 经确证试验验证后将序列上传到世界基因库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)

比对核准, 经向世界卫生组织(WHO)提交一系列信息后, 于2015年12月31日被WHO HLA因子命名委员会正式命名为HLA-A*24:327。

1 材料与方法

1.1 研究对象 先证者为中国造血干细胞捐献者资料库陕西分库的一名造血干细胞志愿捐献者, 陕西籍, 汉族, 男性, 年龄34岁。

1.2 主要仪器和试剂 主要仪器: BSC-10001型生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司); GeneQuant pro 核酸检测仪(Biochrom公司); SENSO QUEST PCR扩增仪(圣欧国际有限公司); IS-200 流式微磁珠分析仪(Luminex公司); 3730xl DNA测序分析仪(ABI公司)。试剂: 北京

* 基金项目: 本课题受中国造血干细胞捐献者资料库(CMDP)资助。

作者简介: 王天菊(1984—), 女, 主管技师, 硕士, 主要从事HLA分型确认工作, Tel: 15353557936, E-mail: wangtianju2007@163.com。

通讯作者: 齐 珺, 女, 博士, 副主任技师, Tel: 029-85253575, E-mail: qijun0802@163.com。

天根血液基因组 DNA 提取试剂盒(北京 TIAN-GEN); LABType™ RSSOH1A/1B/2B1 试剂盒(Luminex 公司); SeCore® HLA-SBT 分型试剂盒(life 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集和基因组 DNA 提取:采集志愿捐献者外周静脉血 5 ml(EDTA 抗凝),采用北京天根血液基因组 DNA 提取试剂盒(北京 TIAN-GEN,批号 DP318),严格按照试剂操作说明提取血液基因组 DNA,利用 GeneQuant pro 核酸蛋白测定仪测定所提取 DNA 的浓度和纯度,此标本的浓度为 48 ng/ μ l,纯度 A_{260nm}/A_{280nm} 为 1.86。

1.3.2 PCR-SSO 方法检测:选择基于 Luminex 平台的聚合酶链式反应-序列特异性寡核苷酸探针(polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probes, PCR-SSO)方法,应用 LAB-Type™ RSSOH1A/1B/2B1 试剂盒(009, 009, 009)进行样本的 HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 基因分型。将 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物与标记有荧光的特异性探针磁珠杂交后,用 Luminex IS-200 流式磁珠杂交仪检测,结果判读应用与试剂盒对应的 HLA Fusion 2.0 软件判读,根据 DNA 与每个磁珠探针的反应格局,自动给出 HLA 分型结果。

1.3.3 PCR 产物直接测序(sequence-based typing, SBT):采用 SeCore® HLA-SBT 分型试剂盒(批号 1249290, 1249289, 1275334)对该样本 HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 位点进行常规高分辨的 HLA 基因分型。对 1.3.1 提取的 DNA 进行

HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 位点的 PCR 扩增,扩增产物用 Exo I/SAP 酶纯化后,对 HLA-A, HLA-B 座位进行第 2, 3, 4 外显子正反向测序反应和对 HLA-DRB1 进行第 2 外显子正反向及 Condon86 正向测序反应,测序产物再经过乙醇/醋酸钠沉淀, 95℃ 热变性迅速冷却后的产物用 ABI 3737xl 测序仪进行毛细管电泳,将电泳序列导入 uTYPE® 分析软件进行分析后发现 HLA-A 位点无法生成一个确切的结果,与常见等位基因组合存在不可修改的不匹配碱基峰,所以进一步实验确定是否有碱基突变。

1.3.4 组序列特异性引物(group-specific sequencing primer, GSSP)DNA 单链测序:根据分析软件提示结果,我们选择组特异性引物 Z13 和 Z6 对 PCR 扩增纯化后的产物进行二次分离式测序反应,反应条件和后续的纯化步骤同 1.3.3,将 GSSP 结果与上一步测序反应的序列共同导入 uTYPE® 分析软件进行分析。

2 结果

2.1 样本 PCR-SSO 分型结果 用 PCR-SSO 的方法检测该样本,按照探针反应格局 HLA-A 位点的结果有三种组合,均属常见等位基因+非常见等位基因组合,分别是 A*02:01:01G, 24:02:16; A*02:01:01G, 24:13:01 和 A*02:01:01G, 24:278N(见图 1),提示该结果需要复核。HLA-B 位点和 DRB1 位点的结果分别为 B*15:11:01G, 51:01:01G 和 DRB1*04:03, 09:01:02G。

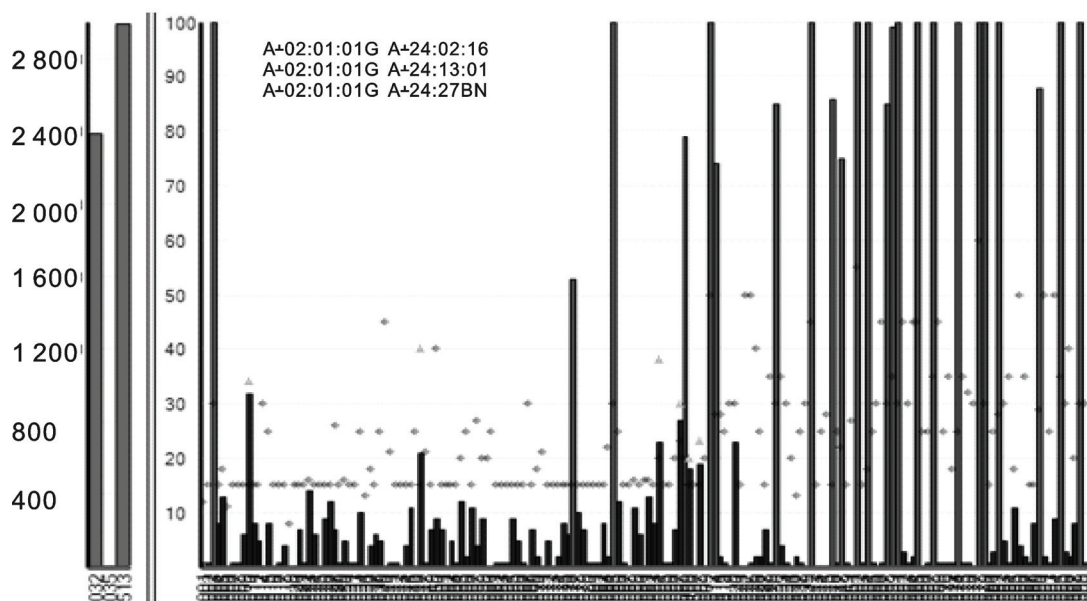


图1 HLA-A 位点 PCR-SSO 探针反应格局

2.2 PCR-SBT 分型结果 该样本 HLA-B, HLA-DRB1 位点的分型结果为 HLA-B * 15 : 11, 51 : 01 和 HLA-DRB1 * 04 : 03, 09 : 01, 与 SSO 结果一致。A 位点的测序结果无完全匹配组合, 与常见等位基因组合 A * 02 : 01 : 01 : 01, 24 : 02 : 01 :

01 的杂合序列相比, 在第 3 外显子 544 位碱基有一个碱基不匹配, 该位置应为纯合峰 G, 而先证者的正反向序列均为杂合峰 R(A+G)。见图 2, 可能该位置存在碱基突变, 进一步应用 GSSP 测序进行确证。

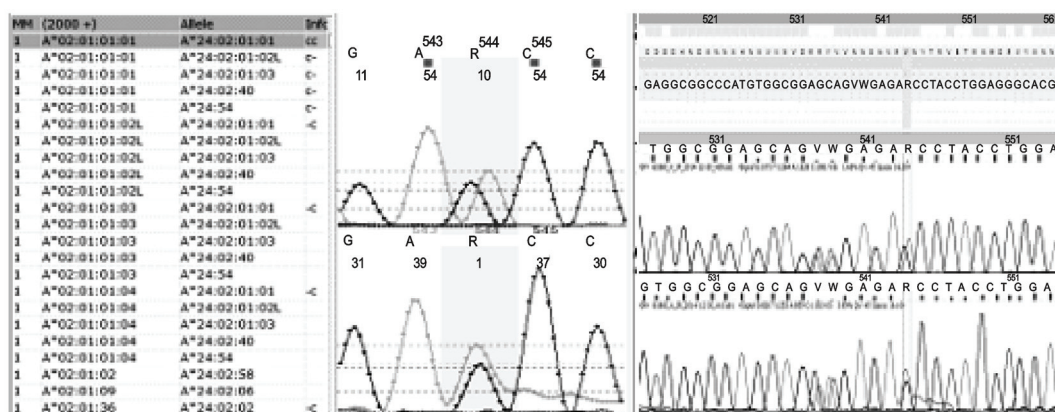


图2 先证者 HLA-A 位点杂合测序结果

2.3 组序列特异性引物单链测序确证试验 根据软件提示, 用组特异性引物 Z13 和 Z6 对此样本 A 位点双链扩增结果进行分离测序, Z13 是 HLA-A * 02 : 01 的特异性引物, Z6 是 HLA-A * 24 : 02 的特异性引物, 见图 3。Z6 扩增的等位基因序列该

位置则实为碱基 A, 与参考序列无匹配结果, 与最接近的同源序列 A * 24 : 02 : 01 : 01 相比, 先证者在第 3 外显子 544 位置发生了 G>A 碱基突变, 至此我们获得了先证者 A 座位的分离等位基因序列。

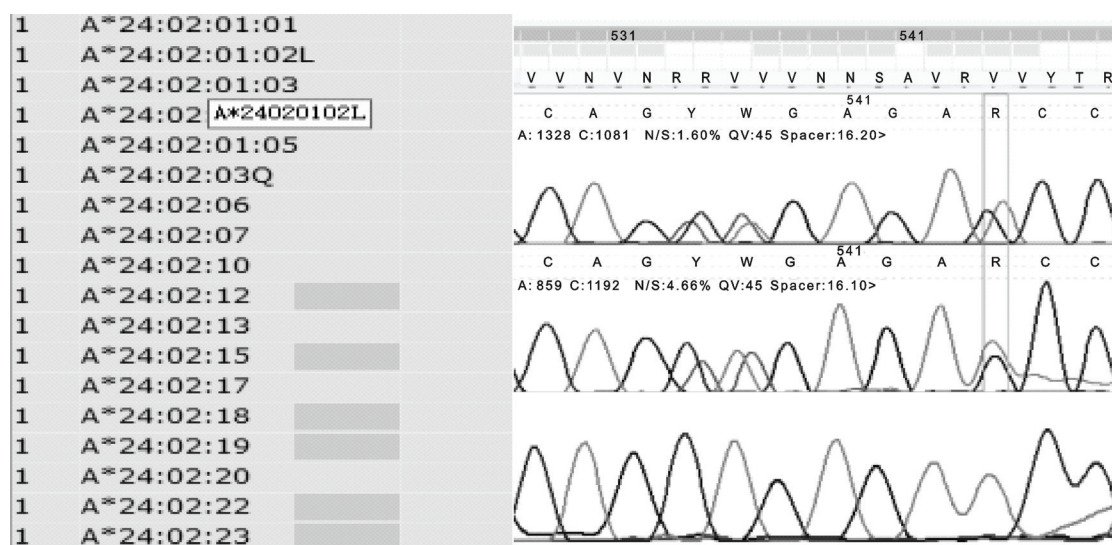


图3 先证者 GSSP 测序结果

2.4 新等位基因 HLA-B * 24 : 02 : 01 : 01 序列比对 A 位点的测序反应是对 2, 3, 4 外显子的正反向测序, 测序的长度分别为 270, 276 bp 和 276 bp, 未知基因与同源性最高的等位基因 HLA-B * 24 : 02 : 01 : 01 相比, 第 3 外显子编码序列发生 544 位 G>A 的突变, 见图 4; 二者的氨基酸序列比对见图 5, 第 3 外显子第 158 位密码子由 GCC>

ACC, 氨基酸由丙氨酸(Ala)变成苏氨酸(Thr)。将所检测到的 2, 3, 4 外显子序列提交给 GenBank, 获得登录号为 KR604698。将新等位基因相关数据上报给 WHO HLA 因子命名委员会, 被 WHO HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-A * 24 : 327。

cDNA	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
A*24:02:01:01	GTITCTCA	CACCTCCAG	ATGATGTTG	GCTGCGACGT	GGGGTGGAC	GGGCGCTTC	TCCGCGGGTA	CCACCACTAC	GCCTACGACG	GCAAGGATTA
A*24:327	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
cDNA	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540
A*24:02:01:01	CATCGCCCTG	AAAGAGGACC	TGCGCTCTTG	GACCGCGGCG	GACATGGCGG	CTCAGATCAC	CAAGCGCAAG	TGGGAGGCGG	CCCATGTGGC	GGAGCAGCAG
A*24:327	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
cDNA	550	560	570	580	590	600	610			
A*24:02:01:01	AGAGCCTACC	TGGAGGGCAC	GTGCGTGGAC	GGGCTCCGCA	GATACCTGGA	GAACGGGAAG	GAGACGCTGC	AGCGCACGG		
A*24:327	---A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		

图 4 HLA-A * 24 : 327 与 HLA-A * 24 : 02 : 01 : 01 核苷酸序列比对图

AA Pos.	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
A*24:02:01:01	GSHSMRYFST	SVSRPGRGEP	RFIAVGYVDD	TQFVRFDSDA	ASQRMEPRAP	WIEQEGPEYW	DEETGKVKAH	SQIDRENLR	ALRYYNQSEA	GSHTLQMF
A*24:327	*									
AA Pos.	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
A*24:02:01:01	CDVGSDFRFL	RGYHQYAYDG	KDYIALKEDL	RSWTAADMAA	QITKRKWEAA	HVAEQQRAYL	EGTCVDGLRR	YLENGKETLQ	RTDPPKTHMT	HHPISDHEAT
A*24:327	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AA Pos.	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
A*24:02:01:01	LRCWALGFYP	AEITLTWQRD	GEDQTQDTEL	VETRPAGDGT	FQKWAAVVVP	SGEEQRYTCH	VQHEGLPKPL	TLRWEPSQP	TVPIVGIIAG	LVLLGAVITG
A*24:327	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AA Pos.	310	320	330	340						
A*24:02:01:01	AVVAVMWRR	NSSDRKGGSY	SQAASSDSAQ	GSDVSLTACK	V					
A*24:327	*****	*****	*****	*****	*					

图 5 HLA-A * 24 : 327 与 HLA-A * 24 : 02 : 01 : 01 氨基酸序列比对图

3 讨论 目前,应用于临床 HLA 的检测方法主要有序列特异性寡核苷酸探针、序列特异性引物、测序等。流式磁珠反向序列特异性寡核苷酸探针具有 DNA 需求量少、快速、高通量等优点,广泛应用于造血干细胞志愿捐献者 HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 的批量检测,但是由于引物、探针只能基于已发现的等位基因序列而设计,对于尚未发现的新的多态性,PCR-SSO 技术虽然可以通过新的杂交格局发现,但是杂交可能会有假阳性或者假阴性。本次 SSO 实验得出先证者 A 位点的一组结果 A * 02 : 01 : 01G, 24 : 02 : 16; A * 02 : 01 : 01G, 24 : 13 : 01 和 A * 02 : 01 : 01G, 24 : 278N, 其中 A * 24 : 13 为中国常见及确认的 HLA 等位基因表 CWD(2.2 版)中的确认等位基因,但人群频率较低,而 A * 24 : 02 : 16 和 A * 24 : 278N 均未列入 CWD(2.2 版),为罕见等位基因。在探针反应良好排除实验原因的情况下,需运用其他方法进行结果复核,以鉴别罕见等位基因和疑似新等位基因。经 PCR-SBT 方法复核,发现无完全匹配等位基因组合,不匹配的碱基峰无法修改,进一步选择组序列特异性单链测序确认该样本 A 位点为与 HLA-A * 24 相关的新等位基因。

目前国际上已检出 HLA-A * 24 等位基因 455 个 (IPD-IMGT/HLA Release 3.24.0, 2016-04-15), 根据中国 CWD(2.2 版), HLA-A * 24 常见等位基因包括 29 种。HLA-A * 24 在北方汉族的基因频率为 16.12%; 在江苏汉族人群中的频率为

16.99%^[1]; 根据黑爱莲报道中华骨髓库造血干细胞捐献志愿者 HLA-A * 24 的频率为 17.06%。HLA 在不同的种族和地域有很强的差异性,但是从所查资料来看,HLA-A * 24 的频率对于不同区域不同人群的概率差异性不是很大。从 1991 年 HLA * 24 : 02 : 01 : 01 被报道以来,越来越多的 HLA * 24 新等位基因被报道, HLA-A * 24 : 248^[2]; HLA * 24 : 334^[3]; HLA * 24 : 333^[4]; HLA-A * 24 : 321^[5]; HLA-A * 24 : 02 : 96^[6]; A * 24 : 258^[7]; A * 24 : 305^[7] 和 HLA-A * 24 : 02 : 50^[8], 新等位基因的不断发现极大丰富了 HLA 基因多态性。HLA 按编码分子特性的不同分为 HLA-I, II, III 类基因, HLA-I 类基因包括 A, B, C 座位, HLA-I 类基因以糖蛋白的形式表达在有核细胞细胞膜表面。HLA-I 类分子重链 (α 链) 胞外段有 3 个结构域 (α1, α2, α3), 远膜端的两个结构域 α1 和 α2 构成抗原结合槽, 是抗原肽识别的部位; α3 和 β2-m 属于免疫球蛋白超家族 (IgSF) 结构域。已经证实 HLA-I 类基因的第 2, 3, 4 外显子分别编码 α 链的 α1, α2, α3 结构域, 本次实验发现的新等位基因是在第 3 外显子发生一个碱基突变, 并导致了相应的氨基酸发生了改变, α2 结构域氨基酸的替换可能会影响抗原结合的特异性。

HLA 抗原具有高度遗传多态性, 主要表现在同一基因座位等位基因的高度多态性, 在机体的免疫应答启动和免疫调节中发挥重要的作用, HLA 与疾病之间的相关性研究已有诸多报道。HLA-A

* 24 相关的等位基因的频率在不同种族不同地区不同人群之间相差不大,属于常见等位基因。1 型糖尿病患者的血液中可查出多种自身免疫性的抗体,如谷氨酸脱羧酶抗体、胰岛细胞抗体等,目前研究提示遗传缺陷是 1 型糖尿病的发病基础,这种遗传缺陷主要是第 6 号染色体 HLA 抗原异常。根据以往的研究表明 1 型糖尿病的发生和发展与 HLA-A * 24 相关,新近发生的和长期患病的个体如果携带 HLA-A * 24,对胰岛细胞相关的抗原体液免疫反应减弱,在 Jody 等^[9]针对罹患 1 型糖尿病高风险人群的研究显示,HLA-A * 24 与体液免疫减弱相关,而且与特定表型胰岛细胞减少相关。在 Katoh 等^[10]针对 HIV-1 感染者的研究中发现,HIV-1 逃避 CTL 杀伤的一个机制就是 135 位编码子由酪氨酸突变为苯丙氨酸,在 HLA-A * 24 : 02 阳性 HIV-1 感染者中,更容易发生突变,并且经过 5 年的追踪调查,在 HLA-A * 24 : 02 阳性 HIV-1 病毒突变感染患者相对于感染野生型 HIV-1 患者,CD4 数量明显下降。特定类型 HLA-I 与 HIV-1 感染后病毒突变、疾病进展相关。

HLA-A 位点是造血干细胞移植(HSCT)或器官移植配型中的关键 HLA 位点之一,该位点供受者间的精确配型对于减少移植物抗宿主病(GVHD),提高移植存活率具有重要作用。Stephanie J. Lee 对美国国家骨髓库 1988 年~2003 年之间进行造血干细胞移植的 3 857 对非亲缘无关供患者 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DQA1, HLA-DPB1, HLA-DPA1 共 8 个位点是否相合与移植后的存活率、无病生存率、急性移植物抗宿主反应等方面进行统计发现,相对于 8 个位点全相合供患者移植,HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 其中一个位点不相合移植与较高的死亡率和相对较低一年存活率相关;HLA-B, HLA-C 不相合相对于 HLA-A, HLA-DRB1 位点不相合有更好的相容性。在 Verneris 等^[11]研究中发现,在非亲缘造血干细胞移植中,相对于 8 个位点全相合的供患者移植,HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 其中一个位点不相合移植有较高的急性移植物抗宿主反应和较低的无病生存率,在复发率和慢性移植物抗宿主反应方面无差异。新等位基因的发现,不仅为人类基因库增加了新成员,提高 HLA 配型的准确性,也使得骨髓移植配型更加精准,避免漏检尚未发现和报道的 HLA 等位基因,减少急性移植物抗宿主反应,延长患者无病生存率。

参考文献:

- [1] 王晓艳,潘芹芹,樊 甦,等. 江苏汉族人群 HLA-A, B, DRB1 高分辨基因多态性和单体型研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2011,31(4):507-512.
Wang XY, Pan QQ, Fan S, et al. The high-resolution polymorphism and haplotypes analysis for HLA-A, B, and DRB1 genes of population resided in Jiangsu province of China[J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing(Natural Science),2011,31(4):507-512.
- [2] Pan J, Chen LN, Zhuo XF, et al. Identification of six novel human leukocyte antigen alleles, HLA-A * 24 : 248, B * 46 : 01 : 17, B * 46 : 58, C * 01 : 02 : 22, C * 01 : 02 : 25 and C * 01 : 91, in Chinese individuals [J]. Tissue Antigens, 2015, 85(2):132-135.
- [3] Yang KL, Huang JH, Lin PY. HLA-A * 24 : 334, a novel variant of HLA-A * 24, discovered in a Taiwanese individual[J]. HLA, 2015, 87(5):390-391.
- [4] Yang KL, Huang JH, Lin PY. HLA-A * 24 : 333, a novel HLA-A * 24 variant, discovered in a Taiwanese individual[J]. HLA, 2016, 87(6):458-459.
- [5] Azkarate M, Santos S, Eguizabal C, et al. The new HLA-A * 24 : 321 shows one conservative amino acid replacement compared with HLA-A * 24 : 02 : 01 [J]. HLA, 2016, 87(1):50-51.
- [6] Zhu YY, Qiang W, Shen G, et al. HLA-A * 24 : 02 : 96, a novel variant of HLA-A * 24 : 02 : 01 : 01, identified in a Chinese individual by sequence-based typing[J]. HLA, 2016, 87(3):171-172.
- [7] He JJ, Chen NY, Dong LN, et al. Two novel HLA-A alleles; A * 24 : 258 and A * 24 : 305 were identified in Chinese individuals [J]. HLA, 2016, 87(3):173-174.
- [8] Li JP, Li XF, Zhang X, et al. Identification of a novel allele, HLA-A * 24 : 02 : 50, by sequence-based typing[J]. HLA, 2016, 87(5):388-390.
- [9] Ye J, Long AE, Pearson JA, et al. Attenuated humoral responses in HLA-A * 24-positive individuals at risk of type 1 diabetes [J]. Diabetologia, 2015, 58(10):2284-2287.
- [10] Katoh J, Kawana-Tachikawa A, Shimizu A, et al. Rapid HIV-1 disease progression in individuals infected with a virus adapted to its host population [J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0150397.
- [11] Verneris MR, Lee SJ, Ahn KW, et al. HLA mismatch is associated with worse outcomes after unrelated donor reduced-intensity conditioning hematopoietic cell transplantation: an analysis from the center for international blood and marrow transplant research [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2015, 21(10):1783-1789.

收稿日期:2016-07-27

修回日期:2016-08-10