

多重 PCR-SSP 技术应用于 HPA-1 ~ 17bw 基因分型研究和广西壮族人群 HPA 多态性的分布*

申卫东^{1#} 李丽兰^{1#} 廖燕¹ 赵桐茂² 吴国光^{1△}

(1. 南宁输血医学研究所 广西 南宁 530007; 2. 美国国立卫生研究院)

摘要:目的 建立应用于 HPA-1 ~ 17bw 基因分型的多重聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)技术,对广西壮族人群 HPA 多态性分布进行调查。方法 设计多种 HPA 序列特异性引物的组合,在 1 个 PCR 反应体系中同时扩增多个 HPA 基因,根据扩增片断的有无和大小,指定相应的 HPA 基因型,并以 17 例国际合作研究项目提供的 HPA 参比 DNA 配组标本,以及 100 例已知 HPA 型的血小板供者的 DNA 标本作验证。使用验证后的技术对 2 659 名无血缘关系的广西壮族人群展开 HPA-1 ~ 17bw 的基因分型和抗原多态性研究。结果 建立了由 16 种 PCR 引物混合液,其中有 6 种多重 PCR 引物混合液组成的 PCR-SSP 反应体系,可用于 HPA-1 ~ 17bw 等位基因的检测。以 HPA 参比 DNA 配组标本,以及已知 HPA 型的供者的 DNA 标本的检测作验证,HPA 分型结果完全一致;在 2 659 名广西壮族人群中各 HPA 等位基因频率分布为:HPA-1a 和 -1b 为 0.991 5 和 0.008 5,HPA-2a 和 -2b 为 0.956 9 和 0.043 1,HPA-3a 和 -3b 为 0.512 2 和 0.487 8,HPA-5a 和 -5b 为 0.985 0 和 0.015 0,HPA-6a 和 -6b 为 0.985 1 和 0.014 9,HPA-15a 和 -15b 为 0.525 6 和 0.474 4;HPA-4、HPA-7 ~ 14bw、HPA-16 ~ 17bw 只有 a/a 的纯合子;HPA-2 ~ 3、HPA-6bw 以及 HPA-15 均存在 a/a 和 b/b 纯合子基因型个体。结论 多重 PCR-SSP 技术应用于 HPA 基因分型减少了 PCR 扩增反应数量,节省了人力、物力,HPA 分型系统性强,可用于大量标本的 HPA-1 ~ 17bw 基因分型等研究和筛查工作;应用该方法研究证明广西壮族人群 HPA 多态性分布具有民族特征,有助于对壮族人群血小板免疫学特点的了解。

关键词:人类血小板特异性抗原(HPA);HPA 基因分型;多重 PCR-SSP;壮族;广西

中图分类号:R457.1+1“218” Q503 文献标识码:A 文章编号:1004-549X(2014)1-0008-07

Study on multi-PCR-SSP technique for HPA-1 ~ 17bw genotyping and the distribution of HPAs polymorphism in Chinese Zhuang population SHEN Weidong^{1#}, LI Lilan^{1#}, LIAO Yan¹, ZHAO Tongmao², WU Guoguang^{1△}. 1. Nanning Institute of Transfusion Medicine, Guangxi 530007, China; 2. National Institutes of Health, NIH, USA. Joint first Author: SHEN Weidong, LI Lilan; Corresponding author: WU Guoguang

Abstract: Objective To develop a multi-PCR-SSP technique for human platelet antigens (HPAs) -1 to -17bw genotyping. And study on the distribution of HPAs polymorphism in Zhuang population by this technique. **Methods** We designed various combinations of HPA sequence-specific primers in order to simultaneously amplify several target HPA gene fragments in one PCR reaction by using one multi-primers combination. The results of HPA genotype were read and assigned according to the size of the target fragment and the presence or absence of the fragment. The effectiveness of the multi-PCR-SSP technique was evaluated by using 17 HPA reference DNA samples that were provided in 14th Platelet Immunology Workshop and 100 HPA-known DNA samples of platelet donors. Total of 2 659 random samples from unrelated and healthy adults of Zhuang population in Guangxi region were studied for HPA -1 to -17bw genotype and antigens polymorphism by the developed technique. **Results** There are 16 primers mixes in the multi-PCR-SSP method, and 6 of them are multi-PCR primers combinations mixes in our technical system. 100% concordance of genotyping results were showed by the evaluation of using 17 reference DNA samples and 100 DNA samples of known-HPA-genotype platelet donors. The HPAs allele frequencies in Zhuang population were 0.991 5 and 0.008 5 for HPA-1a and -1b; 0.956 9 and 0.043 1 for HPA-2a and -2b; 0.512 2 and 0.487 8 for HPA-3a and -3b; 0.985 0 and 0.015 0 for HPA-5a and -5b; 0.985 1 and 0.014 9 for HPA-6a and -6b; 0.525 6 and 0.474 4 for HPA-15a and -15b, respectively. There only a/a homozygosis was detected in HPA-4, HPA-7 ~ 14bw, -16 ~ 21bw. And a/a and b/b homozygosis in HPA-2 ~ 3, HPA-6bw and HPA-15 were found. **Conclusion** In this study, we successfully established a multi-PCR-SSP technique for HPA-1 to -17bw genotyping. It was a rapid and accurate method for HPA genotyping, particularly suitable for large

doi: 10. 13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2014. 01. 004

* 基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(主席基金)(08160-05)、南宁市科学研究与技术开发计划项目(201003048C-2)、广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题(Z2010197) #共同第一作者; △ 通信作者: 吴国光(1943. 3 ~) ,男,研究员,主要从事输血医学、免疫血液学和免疫遗传学研究,电话: 0771-3217522,传真: 0771-3219687,Email: guangwu@szonline.net

quantity samples' *HPA-1 ~ 17bw* genotyping. This study showed that the HPAs polymorphism in Zhuang population had their own national characteristics and the data helps us to know the characteristics of platelet immunological in Zhuang population.

Key words: human platelet antigen (HPA) ; HPA genotyping; multi-PCR-SSP; Zhuang population; Guangxi

自 1959 年第 1 个人类血小板特异性抗原(HPA) 被鉴定至今,已使用血小板同种抗体(抗-HPA) 检测出 35 个血小板抗原^[1,2]。抗-HPA 是造成同种免疫血小板减少症的直接原因,可以导致新生儿同种免疫血小板减少症(NAIT)、新生儿同种免疫血小板减少紫癜(NAITP)、输血后紫癜(PTP)、被动性血小板减少症(PAIT),以及骨髓移植造成的血小板减少症(TAIT) 等临床疾病;此外抗-HPA 是造成血小板输注无效的主要原因之一^[3]。近年来,陆续有 HPA 的罕见抗原被发现的报道,目前已有 34 个抗原被正式命名^[1],但 HPA-48bw ~ 28bw 十分罕见,对临床有重要意义的是 HPA-1 ~ 17bw。在所发现的 HPA 中,除了 HPA-14bw 是因在核苷酸 1901 ~ 1911 位置上 AAG 等 3 个碱基缺失外,其他抗原均由于单核苷酸取代而产生,表现为单核苷酸多态性(SNP)^[4,5]。HPA 基因分型技术已日趋成熟,并被用于群体调查、临床案例的基因分型以及建立已知 HPA 型血小板供者库。HPA 的基因分型多以聚合酶链反应(PCR) 为基础,目前已报告的方法包括 PCR-SSP、PCR-RFLP、PCR-SSO、SSCP 以及实时 PCR 和以基因测序为基础的 HPA 分型等技术^[6-9],其中以 PCR-SSP 最为常见,第 14 届 ISBT 血小板免疫学研讨会国际合作项目也对此方法作了全面比较和评估^[10,11]。PCR-SSP 具有简便快速等特点,但如作 *HPA-1 ~ 17bw* 基因分型,通常需要使用 34 个 PCR 反应体系,费时和实验室工作量大,不利于大量标本的分型工作。为克服此缺陷,我们通过建立 *HPA-1 ~ 17bw* 基因分型的多重 PCR-SSP 技术,将检测所需的 PCR 反应体系减少到 16 个,提高了 HPA 基因分型效率,加强了 HPA 分型的系统性,现将我们所建立的方法和应用此方法作广西壮

族人群 HPA 多态性分布调查的结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 DNA 标本的来源与制备 用于技术验证的 DNA 标本,分别来自于第 14 届 ISBT 血小板免疫学研讨会国际合作项目的 17 份 HPA 参比 DNA 配组标本(表 1)(100 μL/份、-80℃ 冻存,所有标本均为本所承办的该届血小板免疫学国际合作项目向各国参加该项目实验室分发的 HPA 参比 DNA 配组标本) 和南宁市中心血站的 100(人) 份血小板单采献血者的血样(5 mL/份、EDTA 抗凝、于 -80℃ 冻存备用);前者的基因型由全球的 42 个实验室采用包括基因测序等技术作 HPA 分型鉴定确认(表 1)^[10,11],后者均已用不同的 PCR-SSP 的 HPA 基因分型试剂盒(G&T Biotech, Inc. Rockville, USA 及 HPA READY GENE 试剂盒, inno-TRAIin Diagnostik GmbH, Germany, 批号分别为 H03 ~ 05、HP018) 反复鉴定后,收入南宁市中心血站血小板单采献血者数据库,应用 Puregene DNA Purification Kit (Gentra, Minneapolid, USA, 批号为 GS22256、158389) 作血样的 DNA 分离和提纯。操作按试剂盒使用说明书。

1.2 广西壮族人群标本的来源与 DNA 的制备 2007 年 3 月 ~ 2007 年 10 月,由南宁输血医学研究所从居住于广西地区的无血缘关系(不能是父母、子女和兄弟姐妹间的关系) 的壮族人群中随机采集 2 659(人) 份静脉血 5 mL/份,采血前均已取得知情同意,血样使用 EDTA 抗凝,于 -80℃ 冻存待检,血样的 DNA 抽提方法同上。

表 1 第 14 届 ISBT 血小板免疫学研讨会国际合作项目提供的 HPA 参比 DNA 配组标本

	HPA-1	HPA-2	HPA-3	HPA-4	HPA-5	HPA-6	HPA-7	HPA-8	HPA-9	HPA-10	HPA-11	HPA-12	HPA-13	HPA-14	HPA-15	HPA-16	HPA-17
SYD HPA-1 Var	1bb	2aa	3ab	4aa	5bb	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15aa	16aa	17aa
AN-BM000152	1bb	2aa	3ab	4aa	5aa	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15bb	16aa	17aa
J. A-645	1ab	2aa	3bb	4aa	5bb	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15ab	16aa	17aa
F1	1ab	2aa	3aa	4aa	5aa	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15ab	16aa	17aa
M1	1aa	2aa	3bb	4aa	5aa	6ab	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15aa	16aa	17aa
Giessen 1	1aa	2bb	3aa	4aa	5aa	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15bb	16aa	17aa
Giessen 2	1aa	2ab	3bb	4aa	5aa	6aa	7aa	8aa	9ab	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15ab	16aa	17aa
NNITM-1	1aa	2bb	3bb	4aa	5aa	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15ab	16aa	17aa
NNITM-2	1aa	2aa	3ab	4aa	5aa	6bb	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15bb	16aa	17aa
NNITM-3	1ab	2aa	3ab	4aa	5aa	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15ab	16aa	17aa
NNITM-4	1bb	2aa	3ab	4aa	5aa	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15aa	16aa	17aa
NNITM-5	1aa	2ab	3aa	4aa	5ab	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15ab	16aa	17aa
NNITM-6	1aa	2bb	3aa	4aa	5aa	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15bb	16aa	17aa
NNITM-7	1aa	2aa	3ab	4aa	5ab	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15ab	16aa	17aa
NNITM-8	1aa	2ab	3ab	4aa	5aa	6bb	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15bb	16aa	17aa
NNITM-9	1aa	2aa	3ab	4ab	5aa	6aa	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15ab	16aa	17aa
NNITM-13	1aa	2aa	3aa	4aa	5aa	6ab	7aa	8aa	9aa	10aa	11aa	12aa	13aa	14aa	15aa	16aa	17aa

1.3 PCR 引物混合液的设计 共使用 16 种 PCR 引物混合液(表 2,3)(由美国 G&T Biotech, Inc. Rockville 制备,批号: HM02), 检测已被正式命名的 *HPA-1 ~ 17bw* 等位基因,其中含 6 种多重 PCR-SSP 引物混合液的组合,分别为多重 4a、4b、

5a、5b、6a 和 6b 组合。引物: GHF (5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3') 和 GHR (5'-TCA CCG ATT TCT GTT GTG TTT C-3') 扩增 429 bp 的内对照, DRBF (5'-CCA AGT GGA GCA CCC AA-3') 和 DRBR (5'-ATC TTG CTC TGT GCA GAT

T-3') 扩增 792 bp 的内对照; PCR 混合液: 含有 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、50 mmol/L KCl ,1.5 mmol/L MgCl₂ , 0.001% (wt/vol) gelatin、0.2 mmol/L dNTPs 及 (0.1 ~ 0.2) μmol/L SSP 引物。每种 PCR 引物混合液检测 HPA 的相应基因以及扩增基因片段的位置(表 3)。

表 2 多重 PCR-SSP HPA 基因分型引物

特异性引物序列 (5'-3')		共同引物序列 (5'-3')		SNP 或缺失	
<i>HPA-1a</i>	1aF	ACTTACAGGCCCTGCCTCT	1R	GTGCAATCCTCTGGGGACT	176T
<i>HPA-1b</i>	1bF	ACTTACAGGCCCTGCCTCC			176C
<i>HPA-2a</i>	2aF	CCCCCAGGGCTCCTGAC	2R	CCAGCGACGAAAATAGAGG	482C
<i>HPA-2b</i>	2bF	CCCCCAGGGCTCCTGAT			482T
<i>HPA-3a</i>	3aR	GGGGGAGGGGTGGGGA	3F	GAAAGACCTGGGAAGGCGG	2621T
<i>HPA-3b</i>	3bR	GGGGGAGGGGTGGGGC			2621G
<i>HPA-4a</i>	4aF	GCTGCCACCCAGATGCG	4R	GCTGTCTGGCGTCTGGAG	506G
<i>HPA-4b</i>	4bF	GCTGCCACCCAGATGCA			506A
<i>HPA-5a</i>	5aF	GTCTACCTGTTTACTATCAAAAG	5R	TCTCATGGAAAATGGCAGTA	1600G
<i>HPA-5b</i>	5bF	GTCTACCTGTTTACTATCAAAA			1600A
<i>HPA-6a</i>	6aF	GACGAGTGCAGCCCCCG	6R	GCGGACACAGGAGAACTC	1544G
<i>HPA-6b</i>	6bF	GACGAGTGCAGCCCCCA			1544A
<i>HPA-7a</i>	7aF	CAAGGTGCGAGGCTGTC	7R	GGGCCTGGCAGGCACAG	1297C
<i>HPA-7b</i>	7bF	CAAGGTGCGAGGCTGTG			1297G
<i>HPA-8a</i>	8aR	CTGACTCAATCTCGTCACA	8F	TGTGTGTGTTTTAATGGAGG	1984C
<i>HPA-8b</i>	8bR	CTGACTCAATCTCGTCACG			1984T
<i>HPA-9a</i>	9aR	GGCAGCCCCCAGTCCAC	9F	GGATATACAGCCCCAGGG	2602G
<i>HPA-9b</i>	9bR	GGCAGCCCCCAGTCCAT			2602A
<i>HPA-10a</i>	10aF	CCCAGTGAGTGAGGCCCG	10R	GTGCAATCCTCTGGGGACT	263G
<i>HPA-10b</i>	10bF	CCCAGTGAGTGAGGCCCA			263A
<i>HPA-11a</i>	11aF	ACCGAAAATACCTGCAACCG	11R	CAGCTCACATCAAGTCTCC	1976G
<i>HPA-11b</i>	11bF	ACCGAAAATACCTGCAACCA			1976A
<i>HPA-12a</i>	12aF	GACGCTCGTGGACTGCGG	12R	GCAACGCAGGTGCGGCTAG	119G
<i>HPA-12b</i>	12bF	GACGCTCGTGGACTGCGA			119A
<i>HPA-13a</i>	13aF	AAAAGGTTAACATTTTCAGTAAC	13R	CCGGTAGGGAGAATGATGC	2483C
<i>HPA-13b</i>	13bF	AAAAGGTTAACATTTTCAGTAAT			2483T
<i>HPA-14a</i>	14aR	AGACTCCACACTCACTTCTT	14F	AGCCTGCTGCCATGGGAGTG	1909-1911 AAG
<i>HPA-14b</i>	14bR	AGACTCCACACTCACTTAAA			1909-1911 del.
<i>HPA-15a</i>	15aF	CAAATTCTTGGTAAATCTCTG	15R	GACCTTATGATGACCTATTC	2108C
<i>HPA-15b</i>	15bF	CAAATTCTTGGTAAATCTCTG			2108A
<i>HPA-16a</i>	16aR	GTGAGCTTTCGCATCTGGG	16F	GAGAAGAAGATAAAAACTAAC	497C
<i>HPA-16b</i>	16bR	GTGAGCTTTCGCATCTGGA			497T
<i>HPA-17a</i>	17aR	GGTCACCTGCTCAGTTAGCG	17F	TTTGTCCCTCTCTTTCCTCC	622C
<i>HPA-17b</i>	17bR	GGTCACCTGCTCAGTTAGCA			622T

1.4 PCR 扩增 PCR 反应的总体积 9 μL ,含有 PCR 引物混合液 7 μL、DNA 样品 [含 (70 ~ 100) ng DNA] 1 μL 和已稀释的 rTaq DNA 聚合酶 [TaKaRa Biotechnology (Dalian) ,批号 CK7601AA] (含 0.5 U) 1 μL。使用 PCR 扩增仪(美国 ABI , GeneAmp9700 型) 扩增 ,扩增程序为 95℃ 5 min 后 ,依次做 30 个循环: 1) 95℃ 30 s 2) 60℃ 30 s 3) 72℃ 90 s; 30 个循环后置 72℃ 再延长 5 min 降温至 4℃ 完成扩增。

1.5 PCR 扩增产物的检测和基因型指定 使用琼脂糖(西班牙 Biowest 批号 111860) 和 0.5 × TBE 缓冲液配制 3% 琼脂糖凝胶 [每 100 mL 凝胶中含 5 μL DNA green 绿如蓝核酸染料(北京天恩泽基因科技有限公司 ,批号 108111)] ,取 5 μL PCR 产物直接点样到凝胶孔中 ,DNA 长度标记(Marker) 点样 5 μL。使用 0.5 × TBE 缓冲液以 Runone 全套水平电泳仪(美国 Embitec ,Runone) 于 100 V 电泳 30 ~ 40 min ,然后在凝胶成像分析系统(美国西蒙 , BIO-BEST 型) 下拍照记录。

根据是否产生 PCR 扩增产物以及产物的长度 ,解读和指定相应基因型(表 3)。

1.6 技术的验证 使用所建立的多重 PCR-SSP 方法对第 14 届 ISBT 血小板免疫学研讨会国际合作项目的 17 份 HPA 参比 DNA 配组标本和 100 例已知 HPA 型的小血小板单采献血者 DNA 标本作 *HPA-1 ~ 17bw* 基因分型 ,步骤同 1.4 和 1.5 ,比较分型结果与标本 HPA 基因型别的一致性 ,并对前一组标本重复 3 次分型检测试验 ,观察重复试验结果的一致性。

1.7 广西壮族群标本 *HPA-1 ~ 17bw* 基因分型检测及统计分析 使用所建立的多重 PCR-SSP 方法对广西壮族群标本作 *HPA-1 ~ 17bw* 基因分型 ,步骤同 1.4 和 1.5。

1.8 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计学软件进行统计分析 ,其基因频率按群体遗传基因计数法计算 χ^2 值 ,比较基因分布的期望值和观察值 ,验证其是否符合 Hardy-Weinberg (HW) 平衡法则; 不同人群基因频率分布比较采用 χ^2 检验 ,

以显示多态性分布的差异性。

表 3 PCR 扩增产物长度和检测的相应 HPA 等位基因

PCR 引物 混合液	HPA 特异型	基因位置		特异性产 物长度 (bp)	内对照产物 长度 (bp)
		糖蛋白	外显子		
1a	HPA-1a	GP III a	2	188	429
1b	HPA-1b	GP III a	2	188	429
2a	HPA-2a	GP I b	2	241	429
2b	HPA-2b	GP I b	2	241	429
3a	HPA-3a	GP II b	26	136	429
3b	HPA-3b	GP II b	26	136	429
多重 4a 组合	HPA-4a	GP III a	3	158	429
	HPA-7a	GP III a	9	117	429
	HPA-11a	GP III a	11	219	429
	HPA-14a	GP III a	10	306	429
多重 4b 组合	HPA-4b	GP III a	3	158	429
	HPA-7bw	GP III a	9	117	429
	HPA-11bw	GP III a	11	219	429
	HPA-14bw	GP III a	10	306	429
多重 5a 组合	HPA-5a	GP I a	13	249	429
	HPA-9a	GP II b	26	200	429
	HPA-13a	GP I a	20	112	429
	HPA-17a	GP III a	4	153	429
多重 5b 组合	HPA-5b	GP I a	13	249	429
	HPA-9bw	GP II b	26	200	429
	HPA-13bw	GP I a	20	112	429
	HPA-17bw	GP III a	4	153	429
多重 6a 组合	HPA-6a	GP III a	9	163	429
	HPA-8a	GP III a	11	290	429
	HPA-10a	GP III a	2	103	429
	HPA-16a	GP III a	3	194	429
多重 6b 组合	HPA-6bw	GP III a	9	163	429
	HPA-8bw	GP III a	11	290	429
	HPA-10bw	GP III a	2	103	429
	HPA-16bw	GP III a	3	194	429
12a	HPA-12a	GP I b	2	252	792
12b	HPA-12b	GP I b	2	252	792
15a	15a	CD109	19	225	429
15b	15b	CD109	19	225	429

2 结果

2.1 应用国际合作项目 HPA 参比 DNA 配组标本作 HPA 基因分型验证 17 份 HPA 参比 DNA 配组标本分型结果与其 HPA 基因型完全一致(图 1 ~ 4)。

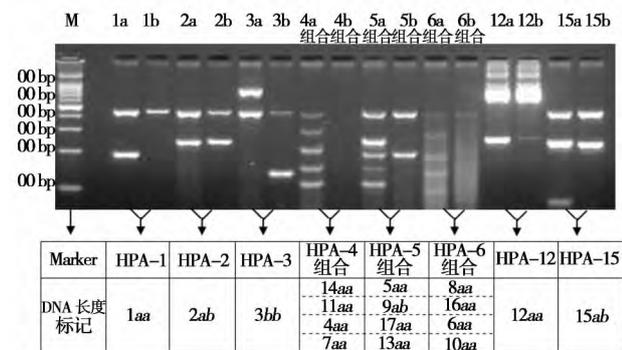


图 1 标本 Giessen 2 基因分型凝胶电泳图谱和 HPA 分型结果解读

2.2 应用已知 HPA 型血小板单采献血者标本作 HPA 基因分型验证 100 例已知 HPA 型的血小板单采献血者的分型结果与已知 HPA 型完全一致。

2.3 重复性试验 应用国际 HPA 参比 DNA 配组标品重复

HPA 基因分型试验 3 次: 结果完全相同。

2.4 广西壮族人群 HPA-1 ~ 17bw 基因频率分布情况 HPA-1 ~ 17bw 各等位基因频率分别为: HPA-1a 0.991 5、1b 0.008 5、2a 0.986 9、2b 0.013 1、3a 0.512 2、3b 0.487 8、5a 0.985 0、5b 0.015 0、6a 0.985 1、6bw 0.014 9、15a 0.525 6、15b 0.4744 经 HW 吻合度校验,证明广西壮族人群上述系统的基因多态性分布均符合 HW 群体遗传平衡法则;其中 HPA-3 和-15 显示有着较高的杂合度,HPA-4、HPA-7 ~ 14bw、HPA-16 ~ 17bw 只有 a/a 的纯合子,未见 b/b 纯合子个体;HPA-2 ~ 3 和-6 以及-15 均存在 a/a 和 b/b 纯合子个体,并检出罕见的 6b/6b 纯合子基因型个体(表 4)。

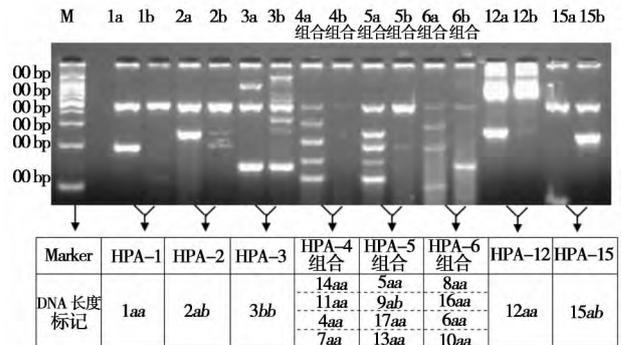


图 2 标本 NNITM-2 基因分型凝胶电泳图谱和 HPA 分型结果解读

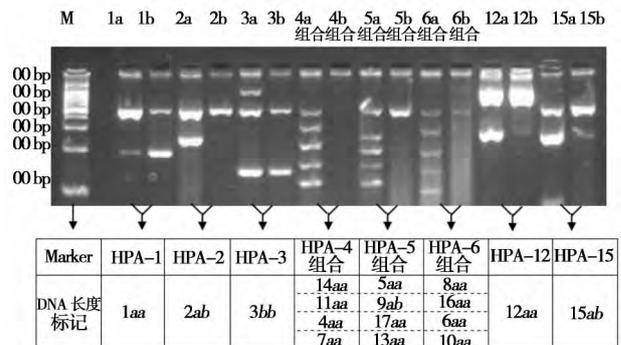


图 3 标本 NNITM-4 基因分型凝胶电泳图谱和 HPA 分型结果解读

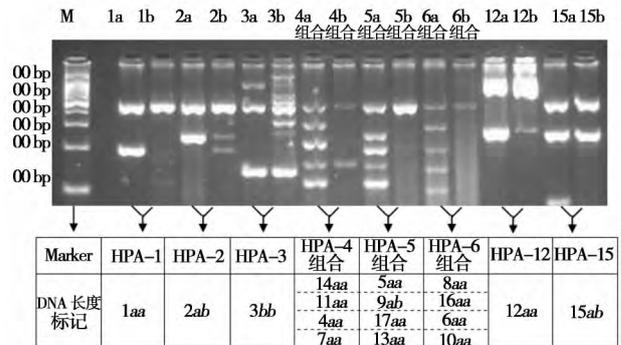


图 4 标本 NNITM-9 基因分型凝胶电泳图谱和 HPA 分型结果解读

2.5 广西壮族人群与其他人群 HPA-1 ~ 6bw、HPA-15 的基因多态性比较 见表 5 6。

表 4 广西壮族人群 HPA 1 ~ 17bw 基因频率分布

(n = 2 659)

Table with 8 columns: Observation frequency (n), Expected frequency (n), Allele frequency, HW analysis, Observation frequency (n), Expected frequency (n), Allele frequency, HW analysis. Rows list various HPA alleles (1a/1a, 1a/1b, etc.) and their frequencies.

NA 无法评估

表 5 不同人群 HPA1-6, 15 等位基因频率

Table with 15 columns: n, HPA-1a, HPA-1b, HPA-2a, HPA-2b, HPA-3a, HPA-3b, HPA-4a, HPA-4b, HPA-5a, HPA-5b, HPA-6a, HPA-6bw, HPA-15a, HPA-15b. Rows list different ethnic groups and their allele frequencies.

表 6 广西壮族人群与不同人群 HPA-1 ~ 6bw 和-15 基因频率相比较的统计分析 χ^2 值列表

Table with 8 columns: n, HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, HPA-6bw, HPA-15. Rows compare the Guangxi Zhuang population with other groups like Chinese Han, Malaysian, etc.

NA 无法评估; * 本组壮族人群与该人群比较 P > 0.05, ** 本组壮族人群与该人群比较 P < 0.05

3 讨论

一般的 PCR-SSP 的 HPA 基因分型技术,除内参照引物对外,仅应用 1 对引物,通过 PCR 扩增产生 1 个目的核酸片段,主要用于单一 HPA 等位基因的鉴定。我们所建立的多重 PCR-SSP 的 HPA 基因分型技术是在同一 PCR 反应体系里加上 ≥2 对引物,同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应,对多个 HPA 等位基因作鉴定,其反应原理、反应试剂和操作过程与一般 PCR-SSP 相同,是 1 种相对简便快捷的 HPA 等位基因鉴定方法。建立多重 PCR-SSP 的 HPA 基因分型技术需

要特别注意的因素包括用于扩增不同基因的引物的组合、不同引物对之间的相对浓度、PCR 缓冲液的浓度、循环温度、MgCl2 和 dNTP 浓度间的平衡等,在应用大量已知 HPA 型标本试验的基础上,才能建立 1 套标准方法。尤其须考虑在多重 PCR 中,同 1 个反应管中含有多个 PCR-SSP 引物,由于引物对 DNA 扩增模板以及 DNA 聚合酶的竞争作用,或引物之间产生非特异性扩增,都会导致产生错误的分型结果。在我们设计引物组合中,采用的原则之一是避免引物所扩增的基因片段在同 1 个基因的同 1 个外显子,可以减少可能存在的引物之间的相互干扰;经过预筛选试验,最终我们选择了 6

种多重 PCR 引物组合,结果显示可以避免漏检或错误定型(表 2、3)。

考虑到多重 PCR 反应系统中,由于多重 PCR 扩增产物的长度相差仅 40~50 bp,为了区分这些条带,我们使用了较高浓度的琼脂糖凝胶及较长时间的电泳。在解读和指定相应 HPA 等位基因时,必须正确区分内对照条带、目的基因的特异性扩增条带和额外反应条带的位置,应用 DNA 长度标记(Marker)作参照比对(图 1~4);若遇到标本分型结果难以判读和指定,在复核该标本时,最好同时增加已知 HPA 型的标准参比标本作比对检测和判读。

为了验证所建立的多重 PCR-SSP *HPA-1~17bw* 基因分型技术的特异性、系统性和正确性,我们分别采用了第 14 届 ISBT 血小板免疫学研讨会国际合作项目提供的 HPA 参比 DNA 配组的 17 例标本,以及 100 例已知 HPA 型的小血小板供者标本作检测,其中国际合作项目标本大多是罕见 HPA 基因型,结果为 100% HPA 分型正确,说明该技术的试验重复性好(表 1、图 1~4)。

HPA 多态性的分布有种族和地区特异性,因此所介导的血小板免疫减少症的抗-HPA 的主要特征也有所差别,如白种(高加索)人群,同种免疫产生的同种抗体以抗-HPA-1 为主,其次为抗-HPA-5^[19];亚洲的日本人中,主要涉及到 HPA-4^[20-23]。我国壮族人群的主要聚居地在广西壮族自治区^[24],我们应用所建立的多重 PCR-SSP *HPA-1~17bw* 基因分型技术对本组壮族人群的 HPA 多态性分布作了研究:壮族人群的 HPA-1、-2、-5 和 -6bw 等血小板抗原中 *a* 等位基因均为高频率分布;HPA-3 和 -15 的杂合率最高,其 *a* 和 *b* 等位基因频率几乎各占一半;而 HPA-4、-7~14bw、-16~17bw 等均未见 *b* 等位基因(表 4)。本组壮族人群的 *HPA-1b* 基因频率仅为 0.008 5,明显低于德国高加索人(0.202)^[17] 及美国白人(0.11)^[18] ($P < 0.05$),而与中国汉族^[12]、越南京族^[14]、日本人^[15]、韩国人^[16] 相似($P > 0.05$);*HPA-2b* 基因频率为 0.043 1,低于韩国人^[16]、德国高加索人^[17] 及美国白人^[18] ($P < 0.05$);*HPA-3a* 和 -3*b* 基因频率分别为 0.512 2 和 0.487 8,后者稍高于中国汉族^[12] 与美国白人^[18] ($P < 0.05$);*HPA-15a* 和 -15*b* 基因频率分别为 0.525 6 和 0.474 4,与我们所比对的人群^[12-14,17] 均无明显差别($P > 0.05$)(表 5、6)。*HPA-3* 和 -15 作为杂合率较高的 2 个血小板抗原系统,较有可能介导同种免疫血小板减少症问题,如国内曾报道抗-HPA-3*a* 引起 NAITP 的案例^[25]。*HPA-4b* 主要见于亚洲人群中,其参与的 NAIT 案例多见于日本^[20-23],本组广西壮族人群 *HPA-4b* 基因频率为 0.000 0(表 4),提示在广西壮族人群中由 *HPA-4* 参与的同种免疫血小板减少症的几率极小。抗-HPA-5*b* 可引发 NAITP,本组广西壮族人群 *HPA-5 a* 和 -5*b* 等位基因频率分别为 0.985 0 和 0.015 0,均与中国汉族^[12]、越南京族^[14] 和韩国^[16] 人群无明显差异($P > 0.05$),但 *HPA-5b* 基因频率低于马来西亚人(0.050 0)^[13]、德国高加索人^[17] (0.084) 和美国白人^[18] (0.11) ($P < 0.05$)(表 5)。本组壮族人群 *HPA-6b* 基因频率为 0.014 9,稍低于日本人(0.027)^[15] ($P < 0.05$),与中国汉族^[12]、马来西亚^[13]、越南京族^[14] 和韩国^[16] 等人群虽然无明显差异($P > 0.05$),但在这些比对的人

群目前尚未发现的 *HPA-6bb* 基因型个体,我们在本组人群中却检测到了(表 5),提示壮族人群由抗-HPA-6 引发的血小板同种免疫疾病的发生率可能相对较高,应当引起重视。

在常规的 PCR-SSP *HPA-1~17bw* 的基因分型中,每例标本需要 34 个 PCR 反应才能完成 HPA 分型。使用多重 PCR-SSP 技术可以将总的 PCR 分型反应数减少到 16 个,为常规的 PCR-SSP *HPA* 分型技术的一半,使工作效率提高了 1 倍,不但节省时间,同时也节约了人力和物力。我们应用多重 PCR-SSP 技术,成功地对 2 659 名无血缘关系的广西壮族人群个体所作的 *HPA-1~17bw* 基因分型及对其 HPA 基因多态性民族特征的研究,显示该技术有助于输血医学和临床医学专业人员对我国多民族人群的血小板免疫学特点的认识和深入研究,这将是我们的研究工作的主要目的之一。

参 考 文 献

- [1] The HLA Informatics Group of the Anthony Nolan Research Institute, the European Bioinformatics Institute. All HPA-alloantigen/protein data [DB/OL]. [2013-11-26]. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table1.html>.
- [2] Masters R, Taaning E. Three cases of platelet alloimmunisation associated with the presence of a novel platelet-specific antibody. *Vox Sang*, 1998, 75(3): 242-246.
- [3] Santoso S, Kiefel V. Human platelet-specific alloantigens: update. *Vox Sang*, 1998, 74(Suppl2): 249-253.
- [4] Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang*, 2003, 85(3): 240-245.
- [5] Stafford P, Garner SF, Rankin A, et al. A single-nucleotide polymorphism in the human ITGB3 gene is associated with the platelet-specific alloantigen Vaa (HPA-17bw) involved in fetal maternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2008, 48(7): 1432-1438.
- [6] Hurd CM, Cavanagh G, Schuh A, et al. Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms. *Vox Sang*, 2002, 83(1): 1-12.
- [7] Unkelbach K, Kalb R, Santoso S, et al. Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens ZW(PLA), Ko, Bak and Br (HPA-1, 2, 3, 5). *Br J Haematol*, 1995, 89(1): 169-176.
- [8] 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(1): 72-78.
- [9] Wu GG, Tang QM, Shen WD, et al. DNA sequencing-based typing of HPA-1 to HPA-17w systems. *Int J Hematol*, 2008, 88(3): 268-271.
- [10] Wu GG, Kaplan C, Curtis BR, et al. Report on the 14th International Society of Blood Transfusion Platelet Immunology Workshop. *Vox Sang*, 2010, 99(4): 375-381.
- [11] Kaplan C. Platelet Immunology Working Party (PIWP), 14th International Platelet Workshop organized by Pr Gu-Guang WU, Nan-Ning, China. *Transfus Today*, 2008, 76: 19.
- [12] Feng ML, Liu DZ, Shen W, et al. Establishment of an HPA-1 to -16 typed platelet donor registry in China. *Transfus Med*, 2006, 16(5): 369-374.
- [13] Tan JY, Lian LH, Nadarajan VS. Genetic polymorphisms of human platelet antigens-1 to -6 and -15 in the Malaysian population. *Blood Transfus*, 2012, 10(3): 368-376.

[14] Halle L ,Bach HK ,Martageix C ,et al. Eleven human platelet systems studied in the Vietnamese and Ma'ohis Polynesian populations. *Tissue Antigens* 2004 63(1) : 34-40.

[15] Tanaka S ,Ohnoki S ,Shibata H ,et al. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein III a in Japanese. *Transfusion* , 1996 36(9) : 813-817.

[16] Seo DH ,Park SS ,Kim DW ,et al. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med* ,1998 8(2) : 129-132.

[17] Hauck-Dlimi B ,Hammon K ,Eckstein R ,et al. Human platelet antigen genotypes in Turkish and Caucasian blood donors in Germany. *Tissue Antigens* 2012 80(3) : 214-218.

[18] Kim HO ,Jin Y ,Kickler TS .Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American ,white and Korean populations. *Transfusion* ,1995 35(10) : 863-867.

[19] Kaplan C. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: a 50-year story. *Immunohematology* 2007 23(1) : 9-13.

[20] Shibata Y ,Matsuda I ,Miyaji T ,et al. Yuka ,a new platelet antigen involved in two cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang* ,1986 50(3) : 177-180.

[21] Shibata Y ,Miyaji T ,Ichikawa Y ,et al. A new platelet antigen system ,Yuka/Yukb. *Vox Sang* ,1986 51(4) : 334-6.

[22] Matsuda T ,Yonaha H ,Azuma E ,et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura associated with sensitization against the platelet-specific antigen Yuk(a) . *Am J Hematol* ,1990 35(3) : 199-202.

[23] Kiyoshi Matsui ,Etsuro Ohsaki ,Akiko Goto ,et al. Perinatal intracranial hemorrhage due to severe neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura (NAITP) associated with anti-Yukb (HPA-4a) antibodies. *Brain Develop* ,1995 17(5) : 352-355.

[24] 梁望庭. 中国壮族. 银川: 宁夏人民出版社 2012: 13-15.

[25] 周燕,钟周琳,李丽兰,等. 抗 HPA-3a 抗体引发的新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜一例并文献复习. *中华血液学杂志* , 2013 34(1) : 45-48.

(2013-10-30 收稿 2014-01-15 修回)

本文编辑: 蔡辉

• 论著 •

广西地区汉、壮和瑶族人群 CD36 缺失结构实验分析和特征研究*

钟周琳 申卫东 周燕 刘金莲 黎海燕 卢芳 吴国光[△](南宁输血医学研究所 广西 南宁 530007)

摘要:目的 建立 CD36 缺失结构的试验鉴定方法,调查广西地区汉、壮、瑶族人群 CD36 缺失频率及分布特征。方法 建立血小板流式细胞荧光免疫检测试验(PIFT-FC)对广西地区 4 621 名无血缘关系的汉、壮、瑶等民族献血者血小板 CD36 的表达作筛查,以血小板抗原单克隆抗体特异性免疫固定试验(MAIPA)对初筛 CD36 缺失者复检,以单核细胞流式细胞荧光免疫检测试验(MIFT-FC)检测 CD36 缺失者的单核细胞 CD36 的表达,对 CD36 缺失型个体作缺失型的亚型分型及 CD36 缺失结构的研究。结果 PIFT-FC 和 MAIPA 筛查出广西汉、壮、瑶族个体 CD36 的总体缺失率是 4.13% (191/4 621) ,其中汉族人群的缺失率为 3.59% (109/3 036) 、壮族为 5.76% (80/1 389) 、瑶族为 2.38% (2/84) 。对其中 117 名 CD36 缺失个体分型检测: I 型 CD36 缺失的总体比例为 41.03% (48/117) ,分别是汉族人群 39.19% (29/74) 、壮族 43.90% (18/41) 、瑶族 50% (1/2) ; II 型 CD36 缺失的总体比例 58.97% (69/117) ,分别是汉族人群 60.81% (45/74) 、壮族 56.10% (23/41) 、瑶族 50% (1/2) 。结论 成功建立 PIFT-FC、MAIPA 和 MIFT-FC 试验;广西汉、壮、瑶族人群间的 CD36 缺失结构有差异,壮族人群 CD36 缺失率较高,显示出其民族特征。

关键词:CD36 缺失;血小板流式细胞荧光免疫检测试验(PIFT-FC);单核细胞流式细胞荧光免疫检测试验(MIFT-FC);血小板抗原单克隆抗体特异性免疫固定检测技术(MAIPA);汉族;壮族;瑶族;广西

中图分类号: R457.1⁺1 R446.6 R331.1⁺43 文献标识码: A 文章编号: 1004-549X(2014)1-0014-04

Characteristic and structure analysis of CD36 deficiency in Han ,Zhuang and Yao population from Guangxi region in China ZHONG Zhoulin ,SHEN Weidong ,ZHOU Yan ,LIU Jinlian ,LI Haiyan ,LU Fang ,WU Guoguang. Corresponding author: Wu Guoguang. Nanning Institute of Transfusion Medicine ,Nanning 530007 ,China

Abstract: Objective To investigate the incidence of CD36 deficiency and characteristics of Han ,Zhuang and Yao nationality individuals from Guangxi region. **Methods** Platelet immunofluorescence test-flow cytometry (PIFT-FC) assay was

setup to screen CD36 deficiency from Han ,Zhuang ,and Yao nationality non-related donors ,and the results were checked by monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA) assay ,then expression of CD36 on monocyte was analysed by Monocyte Immunofluorescence Test-Flow Cytometry (MIFT) to classify the types of CD36 deficiency. **Results**

doi: 10. 13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2014. 01. 005

* 基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(首席基金)(081 60-06) 、南宁市科学研究与技术开发计划项目(科技惠民重大科技专项)(20133141) ; [△] 通信作者: 吴国光(1943. 3 ~) ,男,研究员,主要从事输血医学、免疫血液学和免疫遗传学研究,电话: 0771-3217522 ,传真: 0771-3219687 ,Email: guangwu@ szonline. net