

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510055601.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/13 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/34 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 9 月 20 日

[11] 公开号 CN 1834244A

[22] 申请日 2005.3.18

[21] 申请号 200510055601.3

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院附属医院

地址 100039 北京市海淀区北太平路 2 号

[72] 发明人 奚永志 孙玉英 梁飞 金荔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 程泳

权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 8 页

[54] 发明名称

一种编码人类白细胞抗原 A * 11 的新等位基因 A * 110104 全长多核苷酸序列及其用途

[57] 摘要

本发明涉及一种编码人类白细胞抗原 A * 11 的新等位基因 A * 110104，其全长多核苷酸序列及其用途。

-
1. 一种编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104，其全长多核昔酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。
 2. 权利要求 1 所述的编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104 用于移植前进行精细的 HLA 分型的用途。
 3. 一种用于移植前进行精细的 HLA 分型的试剂盒，其含有权利要求 1 所述的编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104 或其片段。
 4. 权利要求 1 所述的编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104 用于法医学鉴定以及人类学和遗传学研究的用途。
 5. 一种用于法医学鉴定以及人类学和遗传学研究的试剂盒，其含有权利要求 1 所述的编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104 或其片段。
 - 6 权利要求 1 所述的编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104 用于制备诊断或治疗肿瘤和 / 或自身免疫疾病的药物的用途。

一种编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因

A*110104 全长多核苷酸序列及其用途

发明领域

本发明涉及一种编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104，其全长多核苷酸序列及其用途。

发明背景

毋容置疑，器官移植与造血干细胞移植已经成为迄今为止医治各种器官功能衰竭、脏器恶性肿瘤和多种恶性血液病等顽症的行之有效的重要措施之一。由于供-受者间组织相容性抗原 (MHC，在人类则称人白细胞抗原 (HLA)) 差异的主要作用，当然还有其它诸多已知与未知因素如次要组织相容性抗原 (mH)、组织特异性抗原等等影响，不可避免的要发生宿主抗移植物 (HVGD) 和移植抗宿主病 (GVHD 或 GVHR)，这是导致同种异体组织器官移植失败的最根本、最重要的原因之一！因此，HVGD 和 GVHD 已成为临幊上同种异体组织器官移植领域面临的最大障碍！业已证实，组织器官移植后，移植物能否存活很大程度上取决于供-受体之间 HLA 型别是否相符。在肾脏移植中，各 HLA 座位的重要性依次为 HLA-DRB1、HLA-B、HLA-A。在造血干细胞移植中，HLA 的匹配程度与 GVHR 发生的密切程度更大，一般状况下必须选择 HLA 完全相同的个体作为供者。然而在进行异基因脏器移植时，首先遇到的最大障碍就是难以寻找到一个白细胞抗原 (HLA) 完全相匹配的适宜供体，这已成为迄今为止似乎难以逾越和远未得以圆满解决的一个关键性问题！究其根本原因，则是由于人类主要组织相容性抗原 (在人类称为 HLA) 的高度复杂性、多态性 (polymorphism)、多样性 (diversity) 等遗传特点所决定的。

我们知道，人类白细胞抗原是一个复合体，是人体内最为复杂和最

具多态性的基因遗传系统。迄今为止，已发现了 1972 个等位基因，其编码的抗原参与机体的免疫应答、免疫反应和免疫调节，并决定组织相容性，是人体启动一系列免疫应答与免疫反应的门户与枢纽。在正常情况下，HLA 抗原与外来抗原（如病原微生物，细菌、病毒等）结合所形成的复合物可被自身 T 淋巴细胞识别，引发免疫应答反应，并将病原微生物杀灭或排出体外，从而保证人体的健康。当机体出现肿瘤等疾病时，HLA 可与肿瘤抗原相结合而被自身 T 淋巴细胞识别，从而杀伤或杀死肿瘤细胞，起到自身免疫监视的作用。当机体免疫系统出现异常时，HLA 与自身正常组织的抗原结合，导致自身 T 细胞攻击自身的器官或组织，从而引发自身免疫病，如糖尿病、类风湿性关节炎等。在进行器官及造血干细胞移植时，若供受体的 HLA 型别不匹配，移植后将会引发移植排斥反应，从而导致移植失败和病人死亡等严重后果。因此，移植前进行精细的 HLA 分型对于防止移植排斥反应、延长患者生命和提高移植成功率具有重要意义。另外，由于 HLA 抗原就如同人的指纹一样具有个体特异性，并以单倍体紧密连锁的方式遗传给下一代，因此 HLA 在法医学鉴定以及人类学和遗传学研究等方面同样具有重要意义。

应着重指出的是，为提高 HLA 分型的准确性、避免漏检尚未被发现的 HLA 等位基因，发现和鉴定特定人群中新的 HLA 等位基因已成为当前国际上 HLA 研究领域中的重要课题和研究热点。

自 1958 年法国科学家 Dausset 首次发现并报道了人类存在 HLA 现象后，直至十年后的 1968 年国际上才开始对 HLA 这一系统进行统一命名。最初仅是发现并鉴定出 10 个 HLA-I 类抗原。此后有关 HLA 结构与功能研究的发展是十分惊人的。现已证明，HLA 复合体位于人第 6 号染色体短臂 6p21.31，基因片段长度约 4 分摩或 3600kb，占人体整个基因组的 1/3000。HLA 复合体的结构十分复杂且具有多基因性、多态性和连锁不平衡性。迄今为止，HLA 复合体内共鉴定出 224 个基因座位，其中有产物表达的功能性基因为 128 个。39.8% 的基因是与免疫系统有关，特别是 II 类区域中几乎所有基因均显示免疫相关功能。在已

完成基因克隆并被命名的 HLA 基因座位数就已达 100 个之多，其中至少有 18 个基因座位显示复等位性，也就是说这些基因座位还各自有数量不等的等位基因，每种等位基因编码相应的 HLA 抗原产物，由此构成了人体内多态性最为丰富的基因系统。

在早期，对 HLA 基因产物的研究是以检测抗原特异性的血清学为基础的，并辅以细胞学分型的技术。而对 HLA 基因座位的等位基因进行系统的研究则是从 1987 年开始的，当时仅发现十几个等位基因；到 1989 年仅两年的时间有关 HLA-I、II 类等位基因的数量猛增到 100 个和 50 个；而到了 1990 年 HLA-I、II 等位基因的数量分别已达 100 个。随后，有关 HLA-I、II 等位基因数量的揭示呈指数方式攀升。2000 年 HLA-I、II 等位基因的数量已达 1028 个，2002 年 4 月其总数达 1528 个。截止到 2005 年 1 月其总数高达 1972 个，其中 A 位点 349 个、B 位点 626 个、C 位点 182 个、E 位点 5 个、F 位点 2 个、G 位点 15 个、DRA 位点 3 个、DRB 位点 470 个、DQA1 位点 28 个、DQB1 位点 60 个、DPA1 位点 22 个、DPB1 位点 116 个、DMA 位点 4 个、DMB 位点 6 个、DOA 位点 8 个、DOB 位点 8 个，此外 TAP1 和 TAP2 位点还各有 7 个和 4 个、MICA 位点还有 57 个。由此可见，即使仅以 HLA-I、II 类 12 个主要的功能基因来计算的话，如果各个座位基因的组合是随机的话，那么，人群中可能出现的 HLA 基因型就高达 10^8 - 10^{10} 个之多。因此从理论上讲，在无血缘关系的随机人群中要寻找到一个 HLA 基因型（等位基因型水平）完全一致的供体是十分不易的！

不过，由于 HLA 复合体是一个紧密连锁的基因群，这些连锁在一条染色体上的基因很少发生同源染色体间的交换。并且在遗传过程中，HLA 单倍体是作为一个完整的遗传单位由亲代传给子代。而且，在随机婚配的群体中，在无新的突变和自然选择的情况下，HLA 各等位基因的频率可代代维持不变。更况，事实上各基因并非随机地组成单倍体。所以也就会出现在不同的地域、不同的种族、不同的民族人群中保持各自的 HLA 等位基因频率。因此，也就不难理解不同的学者、不同的骨髓库会报道出不同的无关供体间 HLA 相匹配的概率，诸如

1/400、1/10000、1/1000000 乃至于几十万分之一。如此看来，只要在各国、各地、各民族所建立的骨髓库/脐血库中储有一定数量的供体，在无血缘关系的随机人群中寻找到一个 HLA 基因型(非等位基因水平)完全一致的供体则又不是不可能的。这已被国际骨髓库十余年的经验所证实。

随着我国无血缘关系供受体移植病例的迅猛增加，发现中国人群中特有的 HLA 等位基因，以提高 HLA 配型的精确度就显得格外重要。尤为重要的是，努力发掘中国人群中特有的 HLA 基因多态性，使得器官及造血干细胞移植患者能够更加准确地进行 HLA 精确配型以寻找最佳匹配供体，防止移植排斥反应发生和延长患者生命。同时，还将阐明人体中存在不同 HLA 抗原形式的具体意义，并且可广泛应用于法医学鉴定、人类种族迁移等相关研究中。

在这里应强调指出的是，HLA-A*11 抗原是最早被检测出来的 HLA 抗原之一，在蒙古人种(中国人归属蒙古人种)、高加索人种以及黑人中的基因频率分别为 10%-30%，4%-8% 和 <1%，故可被看作是中国人种的优势特有抗原。因此，HLA-A*11 新等位基因的发现对于人体免疫应答与调控、移植免疫、种族迁移研究以及法医学鉴定等都有十分重要的意义。

发明内容

本发明的一个方面，涉及一种编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104，其全长多核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

本发明的另一方面，还涉及所述编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104 用于移植前进行精细的 HLA 分型的用途。

本发明的再一方面，涉及一种用于移植前进行精细的 HLA 分型的试剂盒，其含有所述编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104 或其片段。

本发明的另一方面，涉及所述编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104 用于法医学鉴定以及人类学和遗传学研究的用途。

本发明的又一方面，还涉及一种用于法医学鉴定以及人类学和遗传学研究的试剂盒，其含有所述编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104 或其片段。

本发明的再一方面，涉及所述编码人类白细胞抗原 A*11 的新等位基因 A*110104 用于制备诊断或治疗肿瘤和 / 或自身免疫疾病的药物的用途。

附图说明

图 1 显示 HLA-A*110104 扩增片段的琼脂糖凝胶电泳结果。其中泳道 M 为 DNA 分子量大小 Marker，泳道 1 为阴性对照，泳道 2 和 3 为 HLA-A*110104 阳性扩增结果，泳道 4 为 HLA-A*110101 的扩增结果。HLA-A*110104 特异性扩增片段大小为 366bp，而内对照为 HLA-DRB1 内含子的序列，扩增片段为 796bp。从电泳结果可以看出，本发明已成功建立了 HLA-A*110104 的 PCR-SSP 分型方法。

图 2A、B、C 和 D 显示血清学反应格局表，其是新等位基因编码的抗原表达于细胞膜表面，表现出与 HLA-A11 抗原相似的血清学反应特性的血清学检测结果。

图 3A 和图 3B 为根据 2 个家系 HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 基因分型的结果，分别绘制的家系遗传图谱。从家系一的遗传图谱来看，HLA-A 新等位基因来源于父亲，而且为 HLA-A*11 特异性，有二代遗传，在遗传选择上具有一定优势；从家系二来看，HLA-A 新等位基因来源于祖母，而且为 HLA-A*11 特异性，有三代遗传，在遗传选择上具有一定优势。

图 4 显示为鉴定 HLA-A 位点新等位基因，采用位于 5' 及 3' 端非翻译区的序列位引物进行该位点全长 cDNA 序列的扩增的扩增产物电泳图。图中 M 代表 DNA 分子量大小，HLA-A 位点全长 cDNA 序列为 1098bp，加上两端的 5' 及 3' 端非翻译区的序列，长度增至 1323bp。从电泳图来看，扩增片断的大小位于 2000 bp 与 1000 bp 之间，与理

论值相符。

图 5 显示为验证所构建的载体中有无目标片段插入，以及插入片段的大小是否正确而对扩增质粒进行了酶切鉴定的电泳结果。从图中可以看到，1、4、5、6、7 电泳道的标本均出现酶切结果，片段大小均为 1323bp。

图 6 显示为证实本发明所建细胞株均未污染可作为永久性的标本来源，对所建细胞株进行支原体检测的结果。

实施例

以下结合具体实施例进一步阐明但不意在限制本发明的保护范围。

本发明实施例中涉及的反应试剂按如下所述配制：

1) RPMT1640 培养液的配制：1 小包装 RPMT1640 (GIBCO™ Invitrogen, 10.4g 含 L- glutamine) 溶于置于三角瓶内的 1000ml 三蒸水至充分溶解，通入 CO₂ 使 PH 值达到 6.0 左右，此时溶液呈桔黄色，待瓶底无未溶解的颗粒，加入 NaHCO₃ 2g 左右，使 PH 值回升到 7.1-7.2 左右，溶液由桔黄色转为桔红色。在超净工作台内用 0.45μm 膜过滤灭菌、分装，并记录抽滤日期。抽滤后的 1640 培养液，在 4°C 放置不要时间太长，一般抽滤一次 1-2 月内尽可能用完，如需保存时间较长，可放在-20°C 下保存。抽滤时留 3-5ml 检菌 (37°C, 三天)

2) 抗菌素：条件好的实验室可以不用抗菌素。一般浓度均为 10000 单位/ml。青霉素 1000000 单位，链霉素 1g=1000000 单位，加生理盐水 100ml 溶解，过滤灭菌，分装小瓶，-20°C 保存。用时每 100ml 全培养液基加 1ml。

3) 抗凝剂：采血时所用抗凝剂是肝素，一般采用每毫升血加 25 单位肝素。每毫升全血加肝素也可少于 25 单位。市售肝素钠每 2ml 含 12500 单位，取肝素钠 0.8ml (5000 单位) 加生理盐水 99.2ml 配成 0.8% 的肝素溶液。取 0.8% 肝素溶液 0.5ml 作抗凝剂，采 5ml 外周血后，置室温 (25°C - 30°C) 2-3 天后转化效果都很好。

4) 谷氨酰胺: 称谷氨酰胺 5.846g 加三蒸水 200ml (浓度为 200mM), 分装成小瓶, -20°C 保存。每 100ml 培养基加 0.5ml-1.0ml, 终浓度为 1mM-2mM。

5) 胎牛血清: 美国 HyClone 公司生产的特级或优级 FBS。购买血清时要注意是否对血清进行过内毒素、支原体、细菌和霉菌检测, 使用前还需要进行血清灭活处理 (+56°C, 30 分钟)。

6) 1M Hepes 液: 称 Hepes 23.85g, 溶解在 100ml 三蒸水中, 用 1N NaOH 调到 PH 到 7.0, 抽滤灭菌, 分装小瓶, 4°C 保存。

7) 淋巴细胞分离液 (Ficoll-Paque, Plus):
Pharmacia (17-1440-02) 产品, 分装在 10ml 的试管内, 每管 4ml, 避光保存。使用前在 37°C 水浴中加温用前要充分摇匀, 注意一定要选择无菌、低内毒素产品。

8) 环孢霉素 A (Cyclosporine A): 商品名 Sandimem, 瑞士生产。每支 5ml 含 250mg。将 5ml 环孢霉素分装成小瓶, 4°C 保存。使用时取, 浓度为 50mg/ml 的原液 20μl 加入 50ml 已经 0.45μm 膜抽滤灭菌的 1640 内, 配制成 20μg/ml 的贮存液, 分装成 0.4-0.8ml 小管内, -20°C 保存。如转化时样品量大, 也可分装在 10ml 的大管中。使用时终浓度为 2μg/ml。

9) Epstein-Barr Virus (EBV) 制备: 复苏 B-958 细胞株; 所用培养液同细胞株的培养液相同, 逐步增加培养液到所需要的毫升数时, 饥饿细胞 4-7 天后, 收集上清液, -70°C 及 37°C 冻融 3 次, 离心每分钟 1800 转/15 分, 过滤 (0.2μm), 除去细胞碎片, 分装后放置 -70°C 冰箱内保存待用。

10) PHA: 国产试剂, 10mg, 加生理盐水 5ml, +4°C 保存。

11) 二甲基亚砜: 注意避光保存, 室温下二甲基亚砜对细胞有毒。

12) 全培养基: 全培养基内含 RPMI 1640+15% 胎牛血清 1% 双抗 +1.6% 1M Hepes 液, 需要说明的是如果培养箱不通 CO₂ 则 Hepes 应少加一些。通常是 500ml 1640、90ml 胎牛血清、6ml 双抗, 6ml 谷氨酰胺, 9ml Hepes 液。在第一次转化每 100ml 全培养液中 0.5ml PHA。

13) 冻存液: 95%的胎牛血清, 5%的二甲基亚砜, 经 $0.2\mu\text{m}$ 抽滤, 避光保存(在 4°C 或 -20°C)。冻存细胞时, 一般 1ml 为一保存管为好(可控制复苏时的时间)。

实施例 1 带有 HLA-A 位点新等位基因的家系标本获得及分析

一、实验标本:

在 5000 例来我室拟进行造血干细胞移植前 HLA 配型的供受体中发现了 2 例 HLA-A 位点新等位基因的家系标本。为全面研究这 2 个新等位基因的家族遗传史及其相关免疫遗传特性尤其是为今后器官移植 HLA 配型试剂设计所需要, 本研究抽取了这两个家系祖孙三代共 13 人的外周血标本, 分别采用肝素抗凝和 EDTA 抗凝。

二、DNA 提取:

采用 QIAGEN 公司提供的 QIAamp Blood 试剂盒进行提取。取 0.5% EDTA 抗凝全血 $200\mu\text{l}$ Buffer AL, $200\mu\text{l}$ PK 混匀, 56°C 温育 10min, 加入 $200\mu\text{l}$ 无水乙醇混匀, 转移至树脂柱, $8000\text{r}/\text{min}$ 离心 1 min, 加入 $500\mu\text{l}$ Buffer AW1, $1,8000\text{r}/\text{min}$ 离心 1min, 加入 $500\mu\text{l}$ Buffer AW2, $8000\text{r}/\text{min}$ 离心 3min, 将树脂柱转移至 1.5ml 离心管中, 加入 $200\mu\text{l}$ Buffer AE, 室温放置 1min, $8000\text{r}/\text{min}$ 离心 1min, -20°C 保存。

三、PCR-SSP 基因分型:

1 HLA-A、B、C 位点 PCR-SSP 基因分型方法:

采用美国 PEL-FREEZ 公司提供的微量 SSPTM HLA-A、B、C 位点 SSP-PCR 基因分型试剂盒。先在微量管 (D_{MIX} 管) 中加入去离子水 $270\mu\text{l}$, 再加入 $7.5\mu\text{l}$ ($5\text{U}/\mu\text{l}$) 的 Taq DNA 聚合酶, 混合后取 $8\mu\text{l}$ 加入分型板的阴性对照孔中, 取 $80\mu\text{l}$ DNA ($75\text{--}125\text{ng}/\mu\text{l}$) 加入微量管中混匀, 在分型板每个反应孔中加入 $8\mu\text{l}$ 上述混合液, 阴性孔不加, 用封

口膜密封。将反应板置于 PE-9700 PCR 仪上进行 PCR 反应，反应参数为 (96℃ 60 秒) × 1 个循环 → (96℃ 25 秒 70℃ 50 秒 72℃ 45 秒) × 5 个循环 → (96℃ 25 秒 65℃ 50 秒 72℃ 45 秒) × 21 个循环 → (96℃ 25 秒 55℃ 60 秒 72℃ 120 秒) × 4 个循环。取 10μl PCR 反应产物加入 2.0% 琼脂糖凝胶电泳孔内，电压 140V，10 min，在紫外检测仪下观察结果，分析电泳带格局，指定等位基因（参见图 1）。

2 HLA-DR、DQ 位点 PCR-SSP 基因分型方法：

采用美国 PEL-FREEZ 公司提供的微量 SSP™ HLA- DR、DQ 位点 PCR-SSP 基因分型试剂盒。先在微量管 (D_{MIX} 管) 中加入去离子水 90 μl，再加入 2.5 μl (5U/μl) 的 Taq DNA 聚合酶，混合后取 8 μl 加入分型板的阴性对照孔中，取 27 μl DNA (75- 125ng/μl) 加入微量管中混匀，在分型板每个反应孔中加入 8 μl 上述混合液，阴性孔不加，用封口膜密封。将反应板置于 PE-9700 PCR 仪上进行 PCR 反应，反应参数为 (96℃ 60 秒) × 1 个循环 → (96℃ 25 秒 70℃ 50 秒 72℃ 45 秒) × 5 个循环 → (96℃ 25 秒 65℃ 50 秒 72℃ 45 秒) × 21 个循环 → (96℃ 25 秒 55℃ 60 秒 72℃ 120 秒) × 4 个循环。取 10 μl PCR 反应产物加入 2.0% 琼脂糖凝胶电泳孔内，电压 140V，10 min，在紫外检测仪下观察结果，分析电泳带格局，指定等位基因（参见图 1）。

四、血清学实验：

为检验新等位基因所编码抗原是否为功能抗原，对家系标本进行了血清学实验。本实验采用美国 One-lambda 公司生产的荧光免疫磁珠法，即取 2.5ml 肝素抗凝外周血与已标记好的 B 细胞磁珠 60-100 μl 以及 2.5ml PBS (PH7.0) 混匀，放入特制磁力架上，静置 2min，吸弃所有混合液；之后加入 PBS (PH7.0) 4ml，混匀后静置 2min，吸弃所有混合液；重复洗涤一次；加 PBS (PH7.0) 调细胞浓度为 2000-2500 个/ μl，取 1 μl 细胞液加入已含有 HLA-A, B, C 抗体和兔补体的 72 孔反应板中，37℃ 作用 1h；加入反应终止液，2h 后荧光倒置显微镜下观察结果。

血清学实验表明，该新等位基因编码的抗原表达于细胞膜表面，

表现出与 HLA-A11 抗原相似的血清学反应特性，血清学结果详见反应格局表（图 2A, B, C 和 D）。

实施例 2. EBV 转化建立永生化细胞株

为获得永久性的标本来源，同时方便与国际间的交流与合作，本文建立了 HLA 新等位基因的永生化细胞株。具体过程如下：

1. 采集标本：

如实施例 1 所述静脉采血 5ml，肝素抗凝，1ml 血提取 DNA，4ml 血转化用。

2. 分离淋巴细胞：

4ml 肝素抗凝血加 2ml RPMI1640 (Sigma, PH7.0) 混匀，然后缓缓加入到已加有 4ml 淋巴细胞分离液 (Ficoll-Paque, Plus, Pharmacia (17-1440-02)) 的 10ml 离心管中，2500r/min 30min；吸淋巴细胞层于另一离心管中，加入 5ml RPMI1640 (Sigma, PH7.0) 混匀，1500-1800r/min, 10min, 洗 3 次。

3. EBV 转化：

向分离的淋巴细胞中加入 2ml 完全培养基，1.2ml EBV 上清（中科院遗传所徐久瑾教授惠赠），0.4ml 环孢酶素 A (PHA 0.5%)，5% CO₂，37℃ 孵育。

转化成功的标志：在 EBV 感染 24 小时，首先为淋巴细胞增大，明显母细胞化；其次是增生的淋巴母细胞凝集现象迅速发生。在转化 3-4 天后，培养液 PH 值发生变化，呈橙黄色。

4. 培养

- (1) 悬浮培养：培养液的体积不超过培养瓶的 2/3。
- (2) 注意培养液的 PH 值的变化，一般从橙红色变化为橙黄色，如果 2-3 天内，PH 值没有变化，说明细胞状态不太好；如果变化得太快，可能是加液量不够。
- (3) 半量换液：培养瓶内的培养液达到了瓶体积的 2/3 时，就需要半量换液。从培养瓶中吸取液体体积的一半量或更多一点培养液弃去，

加入等量的培养液或多一点。细胞量逐渐增多，可分瓶培养，一般情况一周两次加液或半量换液。

5. 冻存：细胞株冻存必要条件是细胞要达到一定的数目。当本细胞株细胞数达到 300-600 万/cm³ 就可以冻存（用计数板计数，健康活细胞应达到 90 以上）。冻存前一天需加新鲜的培养液。冻存细胞离心速度不超过 1000 转/分，冻存液保持 4° C，细胞进入冻存液后，放置 -70° C 的冰箱 1 小时后或隔夜进入液氮柜中保存。冻存管上应标记细胞株的名称字母代码、顺序号数、冻存日期。

6 复苏：将细胞从液氮柜中取出，放入保温瓶或其他保温的容器中转移到实验室。在 37° C 水浴中解冻注意只浸没冻存管的下半部分，轻轻晃动，不要让水平面靠近冻存管盖，当冻存管中尚存有少量冰块（黄豆粒大小）时，用 1% 的新洁尔灭擦拭冻存管进入超净台中，整个时间约 1 分钟左右，解冻后的细胞直接进入全培养液中，无须离心洗涤。核对培养瓶上标记的细胞代码、号数及冻存日期后，进入 37° C 培养箱内。复苏成功标记：(1) 复苏 3 小时后，活细胞在 50% 以上；(2) 24 小时后 pH 值明显发生变化，细胞集合成团状。

支原体检测：

支原体污染会严重抑制细胞的生长。文献报道，世界各国有不少实验室的细胞株支原体污染率在 17%-63% 之间。检测支原体污染的方法有很多，如细胞培养法、免疫检测法、间接 DNA 染色（Hoechst 33258 染色）法及 PCR 法，各有千秋。本发明中采用的是细胞培养方法。

具体方法：选美国 GIBCOTM Invitrogen 公司支原体检测试剂盒。其原理基于支原体和宿主哺乳动物细胞的生化差异，支原体含有大量的腺苷三磷酸酶，而哺乳动物细胞中含量甚微。腺苷三磷酸酶可以将 6-MPDR（一种非毒性的腺苷同类）转化为两种物质：6-甲基嘌呤和 6-甲基嘌呤核苷，这两种物质对哺乳动物细胞均有害。

若检测细胞株中有无支原体污染，可通过其培养物与 6-MPDR 共同孵育后，检测哺乳动物的细胞毒性来判断。指示细胞选用的是 VERO（非洲绿猴肾细胞，中国医学科学院基础医学研究所细胞库），其对支原

体的感染十分敏感。具体步骤如下：

- a) 用无抗生素 DMEM 培养基 (GIBCO™ Invitrogen) 培养指示细胞 (VERO)，当其密度为 2.0×10^4 个细胞/ml 时，可将细胞移至 24 孔板中，使每孔密度为 3.0×10^4 个细胞/1.5ml；
- b) 将 24 孔板放于 37° C, 5% CO₂ 孵箱中培养，2h，使 VERO 细胞吸附于孔底；
- c) 24 孔板的第一行第一列作为阴性对照孔 (用 NC 表示)，每孔均加入 0.2ml 的 DMEM 培养基；
- d) 各行任选一孔为阳性对照孔 (用 PC 表示)，每孔各加入 0.2ml 的阳性对照稀释液 (1mM 腺苷三磷酸)；
- e) 其余每纵行的三个孔可加入同一样品，做平行对比实验。取无抗生素培养的待检细胞株悬液加入同一纵列的三个孔中，每孔 0.2ml。
- f) 37° C 5% CO₂ 孵箱中培养 24h；
- g) 24h 后，向第 2、3 行每孔中分别加入 50 μl 的 6-MPDR 稀释液
- h) 37° C 5% CO₂ 孵箱中培养 72-96h，直至阴性对照孔中细胞融合成片；
- i) 吸出培养基，不要破坏单细胞层，
- j) 加入 10% PBS (PH7.2) 配制的 0.2% 龙胆紫于各孔中，室温孵育 20min
- k) 吸出染料，生理盐水冲洗至干净为止，空气中干燥。
- l) 光镜下观察结果 (参见图 6)

实施例 3、提取人外周血总 RNA 并 RT-PCR (reverse transcript polymerase chain reaction) 合成 cDNA 第一链

肝素抗凝外周血 5ml，淋巴细胞分层液分离单个核细胞，使用 TRIZOL (GIBCO™ Invitrogen) 一步法试剂盒提取人外周血总 RNA，溶于 30 μl 无核酶水。

采用 RT-PCR 试剂盒 (GIBCO™ Invitrogen) 反转录合成 cDNA 第一链, 反应体系如下总 RNA 100ng, 01igodT₁₆₋₁₈ (500 μg/ml) 1 μl, 10mM dNTP_{MIX} 1 μl, 加灭菌水至 10 μl, 65℃ 5min; 冰浴大于 1min, 加入 10 × Buffer 2 μl, 25mM MgCl₂ 4 μl, 0.1M DTT 2 μl, Rinaseout (40U/ μl) 1 μl, 混匀后离心, 42℃ 2min, 加 Superscript II (200U/ μl), 42℃ 50min, 冰浴, 加 1 μl RNAH (2U/ μl), 37℃ 20min.

实施例 4、位点特异性引物扩增 HLA-A 位点全长 cDNA 序列

以 cDNA 为模板, PCR 扩增 HLA-A 位点基因全序, 反应体系如下: 1 × pyrobest buffer (含 2.5mM MgCl₂), 0.2 mM dNTPs, cDNA 第一链 3 μl, HLA-A 位点全长 cDNA 序列的上下游引物 (A-upper: 5'-GGACTCAGATTCTCCCCAGACGCCGAGG-3', A-lower: 5'-AGGGAGGCACAGGTCAGCGTGGGA AG-3') 各 10pM, pyrobest DNA 高保真聚合酶 (5U/ μl) 0.25 μl, 加去离子水至 50 μl. (94℃ 30sec, 66℃ 30sec, 72℃ 120sec) × 10 循环 → (94℃ 30sec, 61℃ 30sec, 72℃ 120sec) × 20 循环 → 72℃ 7min → 4℃ ∞。所用试剂均为 Takara 公司生产。

cDNA 扩增结果: 为鉴定 HLA-A 位点新等位基因, 本研究采用位于 5' 及 3' 端非翻译区的序列位引物进行该位点全长 cDNA 序列的扩增, 扩增结果见图 4

实施例 5 连接、转化、克隆鉴定并 DNA 序列测定

采用 promega 公司生产的 pGEM-T easy 载体连接试剂盒。由于 pyrobest DNA 高保真聚合酶合成的 PCR 产物为平末端, 故需加 “A” 尾才能与 T 载体连接。加 “A” 尾步骤如下: PCR 产物 3 μl, 25mM MgCl₂, 1 μl, 10 × buffer 1 μl, TaqDNA polymerase (5U/ μl) 1 μl, 去离子水 3 μl, 70℃ 30min. 连接 pGEM-T easy 载体过程如下: 2 × ligase buffer 5 μl, T4 vector 1 μl, 加 “A” 尾产物 3 μl, T4 ligase (5U/ μl) 1 μl, 4℃, 连接过夜。转化、克隆与酶切鉴定见分子克隆。

将扩增片断纯化回收后，连接 T-easy 载体，为验证载体中有无片断插入，以及片断大小是否正确，本研究对扩增质粒进行了酶切鉴定，由于该载体在插入片断的两端是先加入 EcoRI 酶切位点，故采用该核酸内切酶就可以将插入片断切下。酶切片断的鉴定结果参见图 5。

最后将鉴定克隆送 Invitrogen 公司测序鉴定。

HLA-A*11 新等位基因的核苷酸序列如下：

```

1      ATGCCCGTCA TGGCGCCCCG AACCCCTCCTC CTGCTACTCT CGGGGGCCCT GGCCCTGACC
61     CAGACCTGGG CGGGCTCCCA CTCCATGAGG TATTCTACA CCTCCGTGTC CGGGCCCGGC
121    CGCGGGGAGC CCCGCTTCAT CGCCGTGGC TACGTGGACG ACACGCAGTT CGTGCGGTTC
181    GACAGCGACG CCGCGAGCCA GAGGATGGAG CCGCGGGCGC CGTGGATAGA GCAGGAGGGG
241    CCGGAGTATT GGGACCAGGA GACACGGAAT GTGAAGGCC AGTCACAGAC TGACCGAGTG
301    GACCTGGGA CCCTGCCCGG CTACTACAAC CAGAGCGAGG ACGGTTCTCA TACCATCCAG
361    ATAATGTATG GCTGCGACGT GGGGCCGGAC GGGCGCTTCC TCCGCGGGTA CGGGCAGGAC
421    GCCTACGACG CCAAGGATTA CATGCCCTG AACGAGGACC TGCGCTCTTG GACCGCGGCG
481    GACATGGCAG CTCAGATCAC CAAGCGCAAG TGGGAGGCGG CCCATGCCGC GGAGCAGCAG
541    AGAGCCTACC TGGAGGCCCG GTGCGTGGAG TGGCTCCGCA GATACTGGA GAACGGGAAG
601    GAGACGCTGC AGCGCACGGA CCCCCCAAG ACACATATGA CCCACCACCC CATCTCTGAC
661    CATGAGGCCA CCCTGAGGTG CTGGGCCCTG GGCTTCTACC CTGCGGAGAT CACACTGACC
721    TGGCAGCGGG ATGGGGAGGA CCAGACCCAG GACACGGAGC TCGTGGAGAC CAGGCCTGCA
781    GGGGATGGAA CCTTCCAGAA GTGGGCGGCT GTGGTGGTGC CTTCTGGAGA GGAGCAGAGA
841    TACACCTGCC ATGTGCAGCA TGAGGGTCTG CCCAAGCCCC TCACCCCTGAG ATGGGAGCTG
901    TCTTCCCAGC CCACCATCCC CATCGTGGGC ATCATTGCTG GCCTGGTTCT CCTTGGAGCT
961    GTGATCACTG GAGCTGTGGT CGCTGCCGTG ATGTGGAGGA GGAAGAGCTC AGATAGAAAA
1021   GGAGGGAGTT ACACTCAGGC TGCAAGCAGT GACAGTGCCTT AGGGCTCTGA TGTGTCTCTC
1081   ACAGCTTGTAA AAGTGTGA

```

HLA-A*11 新等位基因编码的推定氨基酸序列如下：

MAVMAPRTLLLLSGALALTQTWAGSHSMRYFYTSVRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVR
FDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNVKAQSQTDRVDLGLRGYYNQSEDGSHT

IQIMYGCDVGPDRFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMMAQITKRKWEAAHAA
 EQQRAYLEGRCVEWLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAE
 ITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLT
 LRWELSSQPTIPIVGIIAGLVLLGAVITGAVVAAMWRRKSSDRKGGSYTQAASSDSAQ
 GSDVSLTACKV

从测序结果来看,出现 HLA-A*11 新等位基因的 2 个家系的测序结果完全一致,是同一个 HLA-A*11 新等位基因,而且出现在安徽与山西两个省份的 2 个不同家系中,可见该等位基因在中国人群中具有一定的频率和普遍性,而非罕见的 HLA 等位基因。

实施例 6、

1. 同源序列比较并注册 Genbank

本发明在克隆 HLA-A*11 新等位基因全长 cDNA 并测序分析后,先登陆 Genbank 进行同源序列比较,然后登陆 GenBank 国际网站: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>, 获得登录号 AY786585。

2. 注册 IMGT, 最终获得 WHO 正式命名

注册 IMGT (EMBL: <http://www.ebi.ac.uk/Submissions/index.html>) 生物信息学网站, WHO HLA 命名委员会正式命名 AY786585 为 HLA-A*110104, 并将公布于 *Human Immunology*、*European J Immunogenetics*、*Tissue Antige* 杂志上。

实施例 7、建立 HLA-A*110104 新等位基因的 PCR-SSP 基因分型方法

根据突变的碱基位于第三外显子的第 8 位 (C-T), 故将下游引物的 3' 端设计为 A, 又依据上下游引物的 Tm 值大小设计了如下引物对: 上游引物: 5'-GGGACCAGGAGACACCGAATG-3', 下游引物:

5'-GCAGCCATACATTATCTGGATGGTA-3', 扩增片断长度为 366bp。实验中设立内对照, 其 PCR 产物为 HLA-DRB1 内含子片段, 长度为 796bp, 上

下游引物分别为：5'-ACGGAATGTGAAGGCCAG-3'和5'-GCATCTTGCTCTGTGCAGATT-3'。反应体系如下：基因组 DNA 1 μ l (200ng/ μ l), 25mM MgCl₂ 4 μ l, 10 \times buffer 5 μ l, 2mM dNTP_{MIX} 5 μ l, HLA-A*110104 特异性引物对 1 μ l (20pmol/ μ l), 内对照引物对 1 μ l (10pmol/ μ l), TaqDNA polymerase (5U/ μ l) 1 μ l, 去离子水加至 50 μ l, 将反应板置于 PE-9700 PCR 仪上进行 PCR 反应, 反应参数为 (96℃ 25 秒 66℃ 50 秒 72℃ 60 秒) \times 10 个循环 \rightarrow (96℃ 25 秒 61℃ 50 秒 72℃ 60 秒) \times 20 个循环。取 10 μ l PCR 反应产物加入 2.0% 琼脂糖凝胶电泳孔内, 电压 100V, 10 min, 在紫外检测仪下观察结果, 分析电泳带格局, 指定等位基因。电泳结果如图 1 所示。

实施例 8 HLA-I, II 类基因分型结果:

本研究为探讨 HLA 新等位基因的来源, 分别对 2 个家系三代标本进行了 HLA-I, II 类低分辨率基因分型, 结果详见表 1 及表 2。从表 1 中可以看到, SBW(先证者)的 HLA-A 新基因来自其父亲, 而其祖父与祖母的 HLA-A 位点并未出现新的 HLA 等位基因, 也就是说该新等位基因在家系一中表现为 2 代遗传。从表 2 中可以看到, NWW(先证者)的 HLA-A 新基因来自其父亲, 而其父亲是由其祖母遗传而来, 也就是说该新等位基因在家系二中表现为 3 代遗传。

本研究为证实 HLA 新等位基因低分辨率的分型结果, 对 SBW、SRS、NHL、NWW 及 RXZ 标本的 HLA-A 位点进行了高分辨基因分型。从结果来看, 高分辨分析结果中无论指定 A11 或其它基因, 均有缺孔出现, 这进一步证明了 HLA-A 位点新等位基因的确存在。

表 1. 家系一的 HLA-I、II 类低分辨率基因分型结果

成员	关系	HLA-I 类分型结果			HLA-II 类分型结果	
		A	B	C	DRB1	DQB1
SJK	祖父	110101-03/-	400101-0103/-	07020101-03/-	01	05
		-	-	-	09	08
LYY	祖母	110101-03/-	350101-04/-	120301/-	15	02
		-	-	030301-0303/-	17	06
LDZ	外祖父	020101-02/-	15010101/-	080101/-	08	06
		-	4002-04/-	030301-0303/-	15	06
WCL	外祖母	03010101-0103/-	2701/-	020201-0205/-	01	06
		24020101-06/-	4002-04/-	030301-0303/-	15	05
SRS	父亲	110101-03/-	350101-04/-	120301/-	09	02
		-	400101-0103/-	07020101-03/-	17	08
LRY	母亲	020101-02/-	4002-04/-	030301-0303/-	15	06
		24020101-06/-	4002-04/-	080101/-	15	06
SBX	兄长	020101-02/-	350101-04/-	120301/-	15	02
		110101-03/-	4002-04/-	080101/-	17	06
SBW	先证者	020101-02/-	400101-0103/-	07020101-03/-	09	06
		11?	4002-04/-	080101/-	15	08

表 2. 家系二的 HLA-I、II 类低分辨率基因分型结果

成员	关系	HLA-I 类分型结果			HLA-II 类分型结果	
		A	B	C	DRB1	DQB1
NYQ	祖父	3001	070201-06/-	0102/-	15	06
		310102/-	5501/-	07020101-03/-	-	-
RXZ	祖母	03010101-0103/-	670101/-	07020101-03/-	09	
		11?	400101-0103/-	-	16	05
NHL	父亲	11?	070201-06/-	07020101-03/-	09	06
		310102/-	400101-0103/-	-	15	09
AW	母亲	020101-02/-	1301-04/-	0102/-	04	07
		110101-03/-	4601/-	07020101-03/-	12	-
NWW	先证者	020101-02/-	400101-0103/-	0102/-	04	07
		11?	4601/-	07020101-03/-	09	09
成员	关系	HLA-I 类分型结果			HLA-II 类分型结果	
		A	B	C	DRB1	DQB1
NYQ	祖父	3001	070201-06/-	0102/-	15	06
		310102/-	5501/-	07020101-03/-	-	-
RXZ	祖母	03010101-0103/-	670101/-	07020101-03/-	09	
		11?	400101-0103/-	-	16	05
NHL	父亲	11?	070201-06/-	07020101-03/-	09	06
		310102/-	400101-0103/-	-	15	09
AW	母亲	020101-02/-	1301-04/-	0102/-	04	07
		110101-03/-	4601/-	07020101-03/-	12	-
NWW	先证者	020101-02/-	400101-0103/-	0102/-	04	07
		11?	4601/-	07020101-03/-	09	09

实施例 9 绘制家系遗传图谱:

为进一步研究新等位基因的来源及其遗传选择的优势, 本研究根据 2 个家系 HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 基因分型的结果, 分别绘制了其家系遗传图谱。从家系一的遗传图谱来看, HLA-A 新等位基因来源于父亲, 而且为 HLA-A*11 特异性, 有二代遗传, 在遗传选择上具有一定优势; 从家系二来看, HLA-A 新等位基因来源于祖母, 而且为 HLA-A*11 特异性, 有三代遗传, 在遗传选择上具有一定优势 (参见图 3A 和 B)。

讨论

八十年代末随着分子生物学的飞速发展和在免疫遗传学研究领域中的广泛渗透, 对 HLA 结构与功能以及配型应用领域的研究也带来巨

大变化，PCR 技术及 DNA 序列测序方法的建立，已极大地改善了人们发现并鉴定 HLA 基因座位和等位基因的数量。同时也使配型的准确性和分辨率得到了极大地改观。回顾性对比研究已确证，既往被确定为完全相合的许多供-受体实质上其 HLA 等位基因并不相同。因为对于等位基因的检测而言，血清学方法根本无法实现。配型分辨率的极大提高和不断发现的大量新等位基因是空前的，从而极大地动摇了人们所讲的“临床” HLA 相合的概念。由于 HLA 基因分型方法比传统的 HLA 血清学分型方法准确，故已取代后者并被广泛用于骨髓移植中的 HLA 分型。根据 HLA 基因分型的精细程度，一般被分为低分辨分型和高分辨分型两种。低分辨分型是指被鉴定的等位基因相当于 HLA 抗原分解物 (split) 水平，即通常所说的 HLA 亚型 (即组基因)。在 WHO 基因命名中，HLA 亚型相当于星号后 2 位数的水平。高分辨分型是指精确到核苷酸顺序水平，即 WHO 命名的星号后 4 位数。临床资料表明，骨髓移植供者和受者的 HLA-A、B、DR 抗原相合程度越高，发生移植物抗宿主反应 (GVHD) 的机会越低，移植存活率也高。因此，为提高 HLA 分型的准确性、避免漏检尚未被发现的 HLA 等位基因，发现和鉴定特定人群中新的 HLA 等位基因已成为当前国际上 HLA 研究领域中的重要课题和研究热点。

近些年无关供者骨髓库和脐血库的迅猛成功发展给许多病人提供了挽救其生命的可能机遇。目前仅美国骨髓库 (NMDP) 就注册登记 3.5 万之多，国际骨髓库 (BMDW) 的库容已超过 7 百多万份。这些库容登记资料包括 HLA 配型结果，绝大多数库的资料可通过 www.marlow.org 及 www.bmdw.org 在网站上进行查询。从 NMDP 所查获的遴选供体 HLA 的配型资料>80% 均为 HLA-A、B、DR 中分辨水平。随后移植中心可获取候选供体及病人的新鲜标本再进行高分辨及更多信息的配型。美国西雅图华盛顿大学和 Fred Hutchinson 癌症研究中心的经验表明，从所筛选到的候选供体中一般约 50-60% 的病人能从中找到在等位基因水平相匹配的供体。然而，从国际上更多移植中心的查询结果来看，更多的病人则只能找到 HLA 基因位点部分匹配的供体。应强调指出的是，

这些确证的统计资料只适用于欧洲大陆和北美高加索人，因为无论是 NMDP 也好还是 BMDW 也罢，其绝大部分供体的来源组成就是由这些人种所构成的。言外之意也就是说，从上述库中找到与其它种族或少数民族相匹配供者的极率是很小很小。因此，应必须加快在世界各国进行无关供体捐赠的筹建。随着我国无血缘关系供受体移植病例的迅猛增加，发现中国人群中特有的 HLA 等位基因，以提高 HLA 配型的精确度就显得格外重要。尤为重要的是，努力发掘中国人群中特有的 HLA 基因多态性，使得器官及造血干细胞移植患者能够更加准确地进行 HLA 精确配型以寻找最佳匹配供体，防止移植排斥反应发生和延长患者生命。

的确在无关供体骨髓库或脐血库中能够寻找到来 HLA 相匹配的供体对等待接受造血干细胞移植的病人来讲是一个非常重要的治疗选择。但对于如何有效确定无关供-受体间 HLA 匹配程度的可接受范围以及这种移植的利和弊目前仍是亟待解决的难点之一。迄今为止对于 HLA 最小匹配度的可纳性尚无令人信服和意见统一的指导原则，当然这也是极其难做的大问题，需要大规模大宗的移植病例进行双盲随机的临床移植实验研究方能得出科学公正的结论。因为这种移植的结果会在不同年龄的病人、不同的病种、不同的病期、不同的预处理方案有明显的区别。1998 年在国际《血液》杂志上刊发了由美国 Fred Hutchinson 癌症研究中心及西雅图华盛顿大学联合对 300 例接受无关供体造血干细胞移植的 CML 病人进行了 HLA 等位基因错配对移植排斥反应影响的研究结果，总的排斥率为 5.6%，而 HLA-A、B、C、DRB1、DQB1 位点等位基因完全匹配者的排斥率仅为 2%；当 II 类的一个 DR 或 DQ 等位基因的不匹配时并未出现排斥反应；相反，当供-受体间 I 类基因如有 2 个或更多等位基因不合时则移植排斥率明显增加可高达 20%。此结果与该研究所 1997 年所发表的结果相一致，即 I 类 A、B 或 C 等位基因的不合比 II 类 DR 或 DQ 等位基因不合所引起的移植排斥会更高。

值得注意的是，同年日本学者在《新英格兰医学杂志》上首次报告了 HLA 等位基因匹配度与 GVHD 及生存率关联的报告，这组 473 例病

人是日本无关供体库 (JMDP) 的受体。由美国 Fred Hutchinson 癌症研究中心及西雅图华盛顿大学在国际《血液》杂志上报道的 300 例无关供受体主是高加索人。两组报告的结论均认为, 移植后 GVHD 的发生率及死亡率可因供-受体 HLA-A、B、C、DRB1 和 DQB1 等位基因的完全匹配而明显减少, 多位点等位基因的不匹配与移植后显著高发的并发症、低生存率相关。日本人的结果明显提示, aGVHD 和死亡率的高危险指数与 A 位点相关。而美国西雅图的结果却表明, DRB1 或 DQB1 位等位基因的不合是发生 GVHD 较大的因素, 而与 I 类单一等位基因的匹配与否无关, aGVHD 最危险的因素在美国西雅图是与 I、II 类等基因不匹配相关。同样, 生存率更明显地受至少一个 I 类等位基因和一个 II 类等位基因的影响, 而单个 I 类或一个 II 类等位基因的不合并不明显减少生存率, 两个或更多的 I 类等位基因的不合则会使生存率减少。为什么 GVHD 在日本人的研究中与 HLA-A 位点的等位基因不合相关, 而在美国西雅图却与 DRB1 或 DQB1 位点的等位基因密切相关。使人信服的理由是, 这两组病人在种族遗传上有明显的不同可以解释临床结果的不同。显然, 在日本移植病人错配的 A 位点等位基因和在美国高加索病人配错的 A 位点的等位基因是不一样的。这一发现提示, 不同错配的等位基因可能导致不同的同种免疫反应, 也就更加支持某些等到位基因是可允许错配 “permissive mismatches” 的这一观点。

根据国际骨髓供者协会 (WBDA) 以及欧洲免疫遗传学联盟 (EFI) 的标准 [5, 6], 在大规模的骨髓库供者分型中, 一般只要求鉴定到 WHO 命名星号后 2 位数, 即 HLA 抗原特异性亚型水平。但是对于患者及其 HLA 配合的供者, 应该做高分辨分型。此外, 在 HLA-I 类基因中还应该包括 C 座位。在选择供者时, HLA-I 类基因主要看抗原特异性是否配合; HLA-DRB1 基因要求尽量达到 WHO 命名星后 4 位数全相同。如果无其他选择, 取 DR 抗原相同者为佳。

HLA-A*11 抗原是中国人群常见的抗原, 其在中国人群中的发生频率为 10%-30%, 而在高加索人种以及黑人中的频率仅分别为 4%-8% 和 <1%。HLA-A*11 抗原属于 HLA-I 类抗原, 表达于所有有核细胞表面,

是人体重要的移植抗原，在器官与造血干细胞移植排斥反应中发挥重要作用。所以，在中国人群中发现 HLA-A*11 新等位基因就具有特别重要的意义。本研究所发现的 HLA-A*110104 新等位基因出现在安徽与山西两个省份的 2 个不同家系中，而且均有两到三代遗传史，可见该等位基因在中国人群中具有一定的频率和普遍性，而非罕见的 HLA 等位基因，所以更具有重要的医学与人类学研究价值。尤为重要的是，本研究所发现的 HLA-A*110104 新等位基因具有几种不同遗传编码形式，这可能会造成其编码抗原的不表达、低表达或引发细胞内信号传导的改变，从而造成不同的免疫应答现象，对于这一方面的深入研究正在进行之中。

总之，HLA-A*110104 新等位基因的发现不仅为人类遗传基因库增添了新的成员，而且，使得器官及造血干细胞移植患者能够更加准确地进行 HLA 精确配型以寻找最佳匹配供体，防止移植排斥反应发生和延长患者生命。同时，这项新发现还将阐明人体中存在不同 HLA 抗原形式的具体意义，并且可广泛应用于法医学鉴定、人类种族迁移等相关研究中。

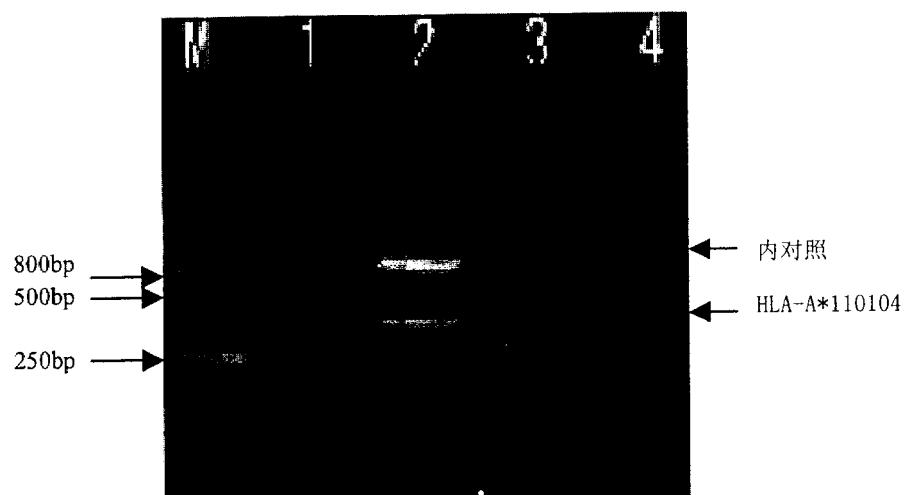


图 1

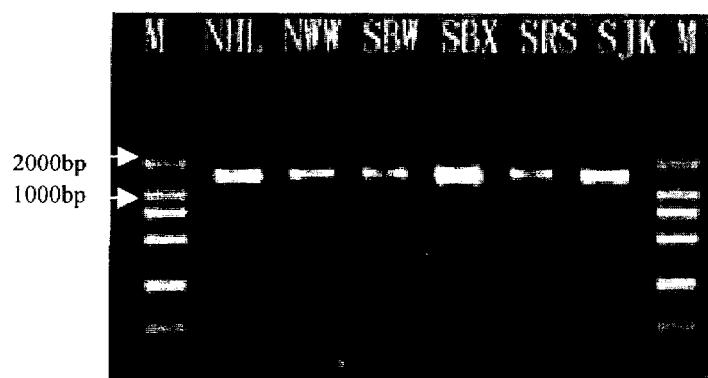


图 4

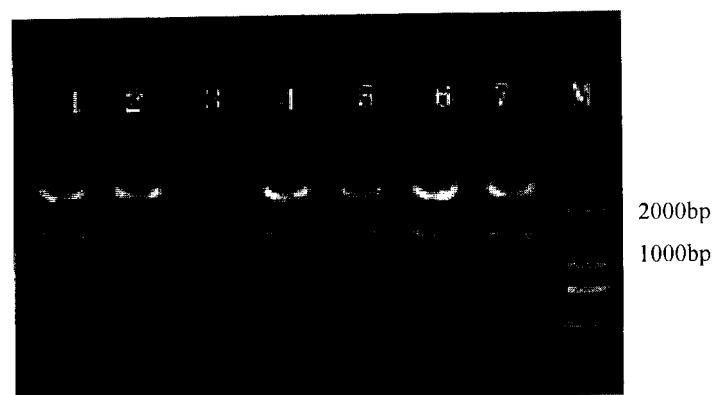


图 5

2A



Worksheet

Special Monoclonal Tray-Asian HLA Class I, Lot #4



Catalogue#

SMT72R

Name

Patient
□ Donor
□ FemaleLymphocyte Source
□ PBL Fresh
□ PBL Frozen
□ Spleen
□ Lymph Node
□ Other

Center/Institution

Sample I.D. NHL

Race

Birthdate

Test Method

Disease

Relationship to patient

ABORH

Room Temp

Tray Exp. Date

Cell Viability

All A31 B7 B60(44) B26

Phenotype Assignment

Center/Institution

HLA Broad Specificities and Their Spots		Bw4		Bw6																																
Serum I.D.	Tray Position	1A	1B	1C	1D	1E	1F	2F	2D	2C	2B	2A	3A	3B	3C	3D	3E	3F	4F	4E	4D	4C	4B	4A	5A	5B	5C	5D	5E	5F	6F	6E	6D	6C	6B	6A
A2	A2024-A2716	A2024	A2716																																	
A9	A223-A244-A2538	A223	A244	A2538																																
A10	A25-A26-A2650	A25	A26	A2650																																
A19	A27-A29-A31-A32-A33-A34	A27	A29	A31	A32	A33	A34																													
A28	A35-A36-A37-A38	A35	A36	A37	A38																															
B6	B671-B682-B693-B694-B695	B671	B682	B693	B694	B695																														
B7	B696-B697-B698-B699	B696	B697	B698	B699																															
B12	B700-B701-B702-B703	B700	B701	B702	B703																															
B14	B704-B705	B704	B705																																	
B17	B707-B708	B707	B708																																	
(B665) 5Y																																				
Refluent																																				
Serum I.D.																																				
HLA Broad Specificities and Their Spots																																				
A2																																				
A9																																				
A10																																				
A19																																				
A28																																				
B6																																				
B7																																				
B12																																				
B14																																				
B17																																				
(B665) 5Y																																				
Refluent																																				
Serum I.D.																																				
HLA Broad Specificities and Their Spots																																				
A2																																				
A9																																				
A10																																				
A19																																				
A28																																				
B6																																				
B7																																				
B12																																				
B14																																				
B17																																				
(B665) 5Y																																				
Refluent																																				
Serum I.D.																																				
HLA Broad Specificities and Their Spots																																				
A2																																				
A9																																				
A10																																				
A19																																				
A28																																				
B6																																				
B7																																				
B12																																				
B14																																				
B17																																				
(B665) 5Y																																				
Refluent																																				
Serum I.D.				</																																

2B

Worksheet
Special Monoclonal/Tray-Asian HLA Class I, Lot #4

Catalogue#
SMT72R

Name 17 Patient Male
 Donor Female

Sample I.D. NWW Race Birthdate

Disease

Relationship to patient

ABO/RH

Test Method

Room Temp

Tray Exp. Date

Cell Viability

Lymphocyte Source:
 PBL Fresh Spleen
 PBL Frozen Lymph Node Other

Center/Institution

A2. A11? B46, B66(Cy) Bu6

Tray/Position	1A	1B	1C	1D	1E	1F	2F	2D	2C	2B	2A	3A	3B	3C	3D	3E	3F	4F	4E	4D	4C	4B	4A	5A	5B	5C	5D	5E	5F	6F	6E	6D	6C	6B	6A			
	Region 1	1	8	1	8	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2+	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Specificity																																						
Serum I.D.	NS	ALS	X7993	X6736	X7849	X2635	X7975	X7215	X8038	X7852	Z0701	Z1412	X7535	X8902	20665	X7407	X8899	X8513	X4034	X7406	X2069	X2371	X6312	X5622	X9041	X8712	X2334	X72319	X1434	X72319	X1156	X1751	X8370	X842	X6309			
HLA Broad Specificities and Their Splices																																						
Bw4/Bw6 Associations																																						
Specificity																																						
Serum I.D.	X6746	X5087	X9133	X7574	Z5059	X9771	Z1171	Z3486	W8158	X9111	X8511	X7405	X8013	X8028	X8637	Z3073	Z22611	X6640	X6676	Z1162	X8635	X22057	X7920	Z0899	X8028	X6438	X7409	X1262	X9224	Z3475	Z1574	Z1249	X3936	X7023	Z8550	W6651		
ABO1 ABO	A23	A2034/A2310B	B15	B62	B63	B75	B57	B70	B150	B151	A23	A23	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57
A19	A22/A26/A34/A6001/A49802	B16	B38/B59	B17	B67/B68	B21	B44/B50	B54/B55	B15	B151	A24	A24	B37	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
A28	A26/A30/A31/A32/A33/A74	B22	B44/B50/B54/B55	B23	B59/B60	B24	B54/B55	B25	B55/B56	B26	A24	A24	B34	B54	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B5	B65/B68/B70/B75/B76/B78	B27	B59/B60	B28	B59/B60	B29	B59/B60	B30	B59/B60	B31	A25	A25	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B17	B70/B75/B76/B78	B32	B59/B60	B33	B59/B60	B34	B59/B60	B35	B59/B60	B36	A27	A27	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B12	B74/B75/B76/B78	B37	B59/B60	B38	B59/B60	B39	B59/B60	B40	B59/B60	B41	A29	A29	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B14	B74/B75/B76/B78	B42	B59/B60	B43	B59/B60	B44	B59/B60	B45	B59/B60	B46	A30	A30	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B15	B77/B78	B47	B59/B60	B48	B59/B60	B49	B59/B60	B50	B59/B60	B51	A31	A31	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B16	B77/B78	B52	B59/B60	B53	B59/B60	B54	B59/B60	B55	B59/B60	B56	A32	A32	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B17	B77/B78	B57	B59/B60	B58	B59/B60	B59	B59/B60	B60	B59/B60	B61	A33	A33	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B18	B77/B78	B62	B59/B60	B63	B59/B60	B64	B59/B60	B65	B59/B60	B66	A34	A34	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B19	B77/B78	B67	B59/B60	B68	B59/B60	B69	B59/B60	B70	B59/B60	B71	A35	A35	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B20	B77/B78	B72	B59/B60	B73	B59/B60	B74	B59/B60	B75	B59/B60	B76	A36	A36	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B21	B77/B78	B77	B59/B60	B78	B59/B60	B79	B59/B60	B80	B59/B60	B81	A37	A37	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B22	B77/B78	B82	B59/B60	B83	B59/B60	B84	B59/B60	B85	B59/B60	B86	A38	A38	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B23	B77/B78	B87	B59/B60	B88	B59/B60	B89	B59/B60	B90	B59/B60	B91	A39	A39	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B24	B77/B78	B92	B59/B60	B93	B59/B60	B94	B59/B60	B95	B59/B60	B96	A40	A40	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B25	B77/B78	B97	B59/B60	B98	B59/B60	B99	B59/B60	B100	B59/B60	B101	A41	A41	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B26	B77/B78	B102	B59/B60	B103	B59/B60	B104	B59/B60	B105	B59/B60	B106	A42	A42	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B27	B77/B78	B107	B59/B60	B108	B59/B60	B109	B59/B60	B110	B59/B60	B111	A43	A43	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B28	B77/B78	B112	B59/B60	B113	B59/B60	B114	B59/B60	B115	B59/B60	B116	A44	A44	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B29	B77/B78	B117	B59/B60	B118	B59/B60	B119	B59/B60	B120	B59/B60	B121	A45	A45	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B30	B77/B78	B122	B59/B60	B123	B59/B60	B124	B59/B60	B125	B59/B60	B126	A46	A46	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B31	B77/B78	B127	B59/B60	B128	B59/B60	B129	B59/B60	B130	B59/B60	B131	A47	A47	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B32	B77/B78	B132	B59/B60	B133	B59/B60	B134	B59/B60	B135	B59/B60	B136	A48	A48	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B33	B77/B78	B137	B59/B60	B138	B59/B60	B139	B59/B60	B140	B59/B60	B141	A49	A49	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B34	B77/B78	B142	B59/B60	B143	B59/B60	B144	B59/B60	B145	B59/B60	B146	A50	A50	B67	B68	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57	B150	B151	B27	B57				
B35	B77/B78	B147	B59/B60	B148	B59/B60	B149	B59/B60	B150	B59/B60	B151	A51	A51	B67	B68	B150</																							

图 2C

图 2D

图 3a

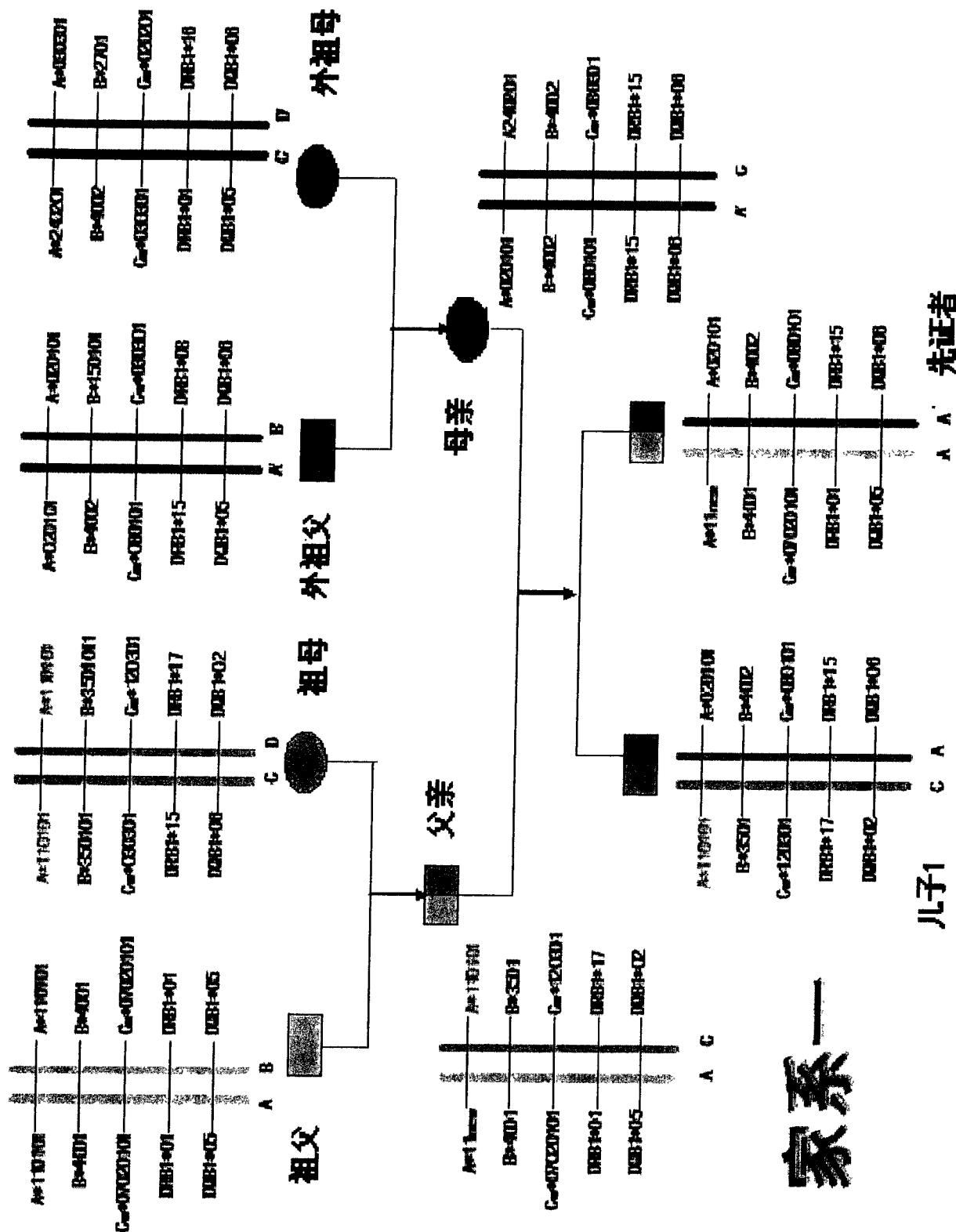
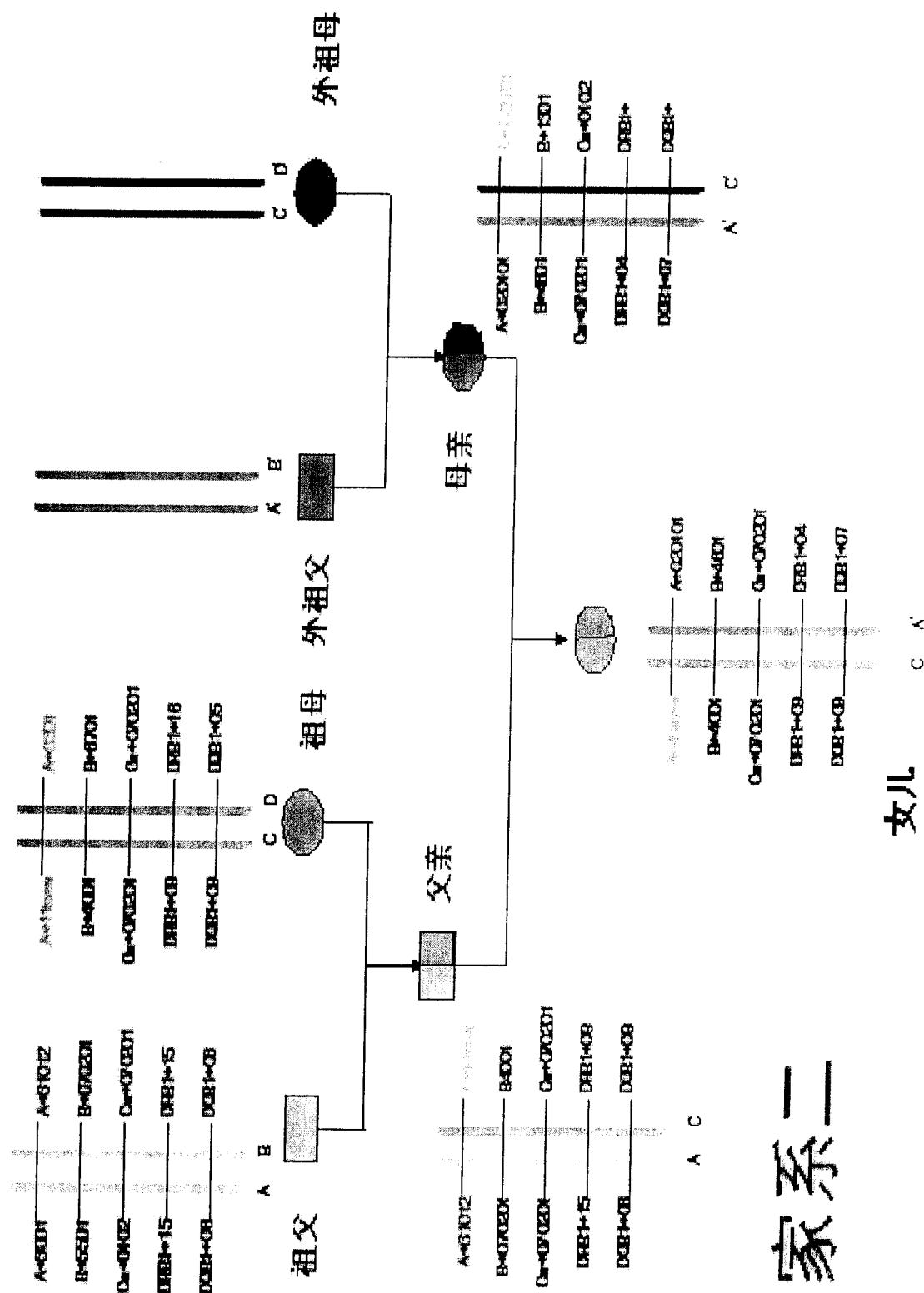
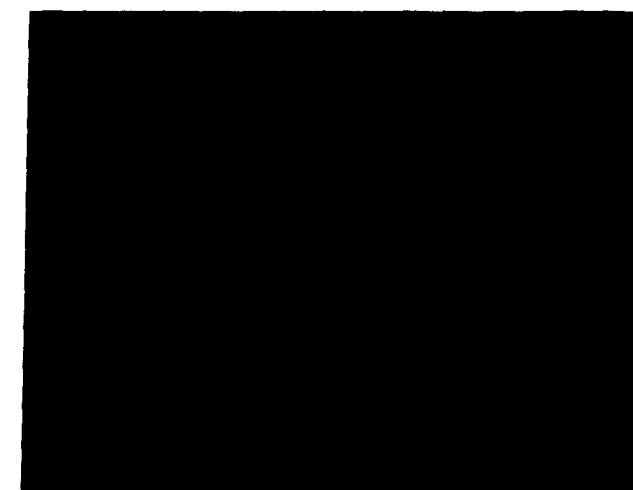


图 3b





阳性对照结果



阴性对照结果



所建细胞株枝原体检
测结果

图 6

专利名称(译)	一种编码人类白细胞抗原A*11的新等位基因A*110104全长多核苷酸序列及其用途		
公开(公告)号	CN1834244A	公开(公告)日	2006-09-20
申请号	CN200510055601.3	申请日	2005-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇七医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院附属医院		
[标]发明人	奚永志 孙玉英 梁飞 金荔		
发明人	奚永志 孙玉英 梁飞 金荔		
IPC分类号	C12N15/13 C12Q1/68 G01N33/53 A61P35/00 C07K16/28 C07K16/34		
代理人(译)	程泳		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种编码人类白细胞抗原A*11的新等位基因A*110104，其全长多核苷酸序列及其用途。

