

·论 著·

# 南宁地区人群血小板抗原 HPA 1—16 bw 基因分布频率的研究\*

廖燕 申卫东 李丽兰 李恒聪 李彬 吴国光 (南宁市中心血站 南宁输血医学研究所,广西南宁 530003)

**摘要:**目的 研究南宁地区人类血小板抗原基因分布频率,为临床同种免疫血小板减少症患者提供诊断依据和 HPA 相容的成分血。方法 采用序列特异性引物聚合酶链反应 (PCR-SSP)对南宁地区 1 500名无血缘关系的成年人做 HPA 1—16bw 基因分型研究。在包含引物混合液的 96孔反应板中,按照相同的循环条件扩增 PCR 产物。结果 每份血液标本均可在 4 h 内获得分型结果。在 16个 HPA 系统中,HPA-15 基因型杂合频率最高,HPA 15a / 15a, HPA 15a /15b和 HPA 15b /15b的频率分别为 0.252 7, 0.500 7和 0.246 7。HPA-3的杂合程度仅次之,HPA 3a/ 3a, HPA 3a/3b和 HPA 3b/3b的频率分别为 0.284 0, 0.508 0和 0.208 0。其余 14个 HPA 系统均以 a/a 纯合子为主,其 a 基因频率范围为 0.916 7—0.999 3。除了 HPA-3b/3b和 HPA-15b/15b的纯合子以外,还检测出了 HPA-2b/2b 5例和 HPA-1b/1b 1例。HPA-7bw 至 -14bw, -16bw 的 a/a 等位基因纯合率为 1.000 0。结论 在临床工作中我们仍需警惕可能由 HPA-1, -2, -3, -5, -6和 -15同种抗体引起的疾病,HPA 基因分型将有助于更好地诊断同种免疫血小板减少症和建立相容的 HPA 血小板供者库,提供更有效的血小板输注方法。

**关键词:** 人类血小板同种抗原 (HPA); PCR-SSP; 基因分型; 南宁人群

**中图分类号:** R457.1<sup>+</sup>1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2010)06-0424-06

**Genetic frequency distribution of human platelet antigens 1—16bw in Nanning population in China** LIAO Yan, SHEN Weidong, LILilan, et al Corresponding author: WU Guoguang Nanning Institute of Transfusion Medicine, Nanning Blood Center, Nanning 530003, China

**Abstract: Objective** To study the genetic frequency distribution of human platelet antigens in Nanning area, and to provide diagnosis and HPA-matched blood components for patients with alloimmune thrombocytopenic syndromes **Methods** A total of 1 500 blood samples from unrelated adults in Nanning were included in the study. Polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) was employed for simultaneous HPA-1 to HPA-16bw genotyping. All PCR amplifications were carried out under identical thermo-cycle condition in 96-well plates containing primer mixture. **Results** The typ-

ing results were available within 4 hours each time after blood samples tested. Among the 16 HPA systems, HPA-15 had the greatest heterozygosity with a gene frequency of 0.252 7, 0.500 7 and 0.246 7 for HPA-15a /15a, HPA-

\*基金项目:血小板免疫学诊断技术难题的国际合作研究与应用 (08160-05); 通信作者:吴国光 (1943—),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,联系电话:0771-3217522;传真:0771-3219687, Email: guangwu@szonline.net

[7] 刘丽媛,张凤奎. 继发铁过载研究进展. 中国实用内科杂志, 2009, 29(6): 560-562

[8] Fischer R, Hamatz PR. Non-invasive assessment of tissue iron overload [OL]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009-01 [215-221] [2010-04-30]. <http://asheducationbook.hematologylib.org/cgi/content/full/2009/1/215>.

[9] 郭晓强,王利青,黄凯. Hcpidin检测研究进展. 临床检验杂志, 2007, 25(6): 474-475.

[10] Papakonstantinou O, Alexopoulou E, Economopoulos N, et al Assessment of iron distribution between liver, spleen, pancreas, bone marrow, and myocardium by means of R2 relaxometry with MRI in patients with beta-thalassemia major. J Magn Reson Imaging, 2009, 29(4): 853-859.

[11] Leung AW, Chu WC, Lam WW, et al Magnetic resonance imaging assessment of cardiac and liver iron load in transfusion dependent patients. Pediatr Blood Cancer, 2009, 53(6): 1054-1059.

[12] National Comprehensive Cancer Network NCCN clinical practice guidelines in oncology (Version 2.2010): myelodysplastic syndromes [OL]. NCCN, 2009, 2010-02-16 [2010-04-30]. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp#site](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site)

[13] Bennett JM. Consensus statement on iron overload in myelodysplastic syndromes. Am J Hematol, 2008, 83(11): 858-861.

[14] Raptis A, Duh MS, Wang ST, et al Treatment of transfusional iron overload in patients with myelodysplastic syndrome or severe anemia: data from multicenter clinical practices. Transfusion, 2010, 50(1): 190-199.

[15] Gattemann N. The treatment of secondary hemochromatosis. Dtsch Arztebl Int, 2009, 106(30): 499-504.

(2010-05-10收稿, 05-20修回)

本文编辑:尚云

15a/15b, HPA-15b/15b, respectively; followed by HPA-3, which showed the heterozygosity with a gene frequency of 0.284 0, 0.508 0, and 0.208 0, respectively. For the remaining 14 HPAs, the predominance of a/a homozygosity was noted for HPA-1, -2, -4, -5 and -6, with a frequency ranged from 0.916 7 to 0.999 3. Besides HPA-3b/3b and HPA-15b/15b homozygosity, five cases was detected as HPA-2b/2b homozygosity, and only one case was found as HPA-1b/1b homozygosity in this study. The frequency of a/a homozygosity was 1.000 0 for HPA-7bv to -14bv, -16bv. **Conclusion** We still have to be alert for the possible events caused by antibodies against HPA-1, -2, -3, -5, -6 and -15 in future clinical practice. HPA genotyping may facilitate better diagnosis of alloimmune thrombocytopenia and set up a useful HPA matched plateletpheresis donor registry, therefore, a more effective platelet transfusion program.

**Key words:** Human platelet antigen (HPA); PCR-SSP; Genotypes; Nanning population

血小板表面具有复杂的血型抗原,其中包括血小板特异性抗原(human platelet antigen, HPA),它们分布在血小板膜糖蛋白 GP<sub>b</sub>、GP<sub>b</sub>、GP<sub>a</sub>上。目前经血清学鉴定出的 24 个 HPA 抗原中有 23 个 HPA 抗原基因多态性的分子生物学基础已经阐明<sup>[1]</sup>,除 HPA-14bv 基因是因核苷酸 1909—1911 位置上 AAG 缺失外,其他的 HPA 基因均具有单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)<sup>[2]</sup>。每种 HPA 抗原是由于碱基改变导致在蛋白质水平上氨基酸的置换,从而引起血小板膜糖蛋白结构的改变产生了不同的肽,引发了同种免疫识别和免疫攻击<sup>[3]</sup>。根据 HPA 基因结构的特点,序列特异性引物(SSP)-PCR 以其快速简便的特点成为目前 HPA 基因分型最常使用的方法<sup>[4]</sup>。我们采用 PCR-SSP 对南宁地区的 1 500 名无血缘关系的成年人进行了 HPA1—16bv 基因分型检测,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 2008 年 3 月,采集南宁中心血站机采血小板献血者静脉血 473 份,10 ml/份。2008 年 5 月在南宁地区上林县、马山县和武鸣县等壮、瑶族聚集区,采集了无血缘关系的成年人静脉血 1 027 份,5 ml/份,用 EDTA 抗凝, -80 保存。

**1.2 试剂与仪器** Puregene DNA 抽提试剂盒(美国 Gentra,批号:158389), 10 ×PCR buffer, dNTP, HPA 基因 PCR-SSP 试剂盒(美国 G&T Biotech Rockville,批号:H03-H05), Taq DNA 聚合酶(大连宝生物,批号:CK3801AA),琼脂糖凝胶、溴乙锭(上海生工,批号:111860、0907G29)。384 孔板(美国 Axygen,批号:090627), B iophotometer 蛋白核酸测定仪(德国 Eppendorf), GeneAmp9700 型 PCR 扩增仪(美国 ABI), Thermo mixer comfort 半导体温控混匀仪(德国 Eppendorf), Vortex Genie2 涡旋振荡器(德国 Industries), 5415D 常温高速台式离心机(德国 Eppendorf), Runone 全套水平电泳仪(美国 Embitec),

BD-BEST 凝胶成像仪(德国 Simen)。

**1.3 DNA 提取** 在 300 μl 抗凝血中加入红细胞裂解液 900 μl,混匀,离心弃上清。震荡残留液使细胞悬浮后加入细胞裂解液 300 μl,震荡混匀使细胞充分裂解后加入蛋白沉淀液 100 μl,震荡混匀后离心,取上清加入 100% (v/v)异丙醇 300 μl 沉淀 DNA,离心弃上清后用 70% (v/v)乙醇清洗 DNA,离心,吸干乙醇。将 DNA 溶于 DNA 溶解液 100 μl 中,充分溶解后用紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度, -20 保存。

**1.4 PCR-SSP 扩增** 用 2 个 PCR 扩增反应和 3 种检测引物对每对 HPA 等位基因进行分型,PCR 体系中包含 1 个内参照来确认 PCR 反应的有效性。在 384 孔板分装 HPA1—16bv 引物混合物 7 μl,PCR 缓冲液包括 10 ×PCR buffer, 0.2 mmol/L dNTP, 0.5 mmol/l 甲酚红, 5% 甘油,提前分装置于 -20 保存。每个标本进行 PCR 前,将所有备用的反应溶液解冻,加入 DNA 标本(40—60ng) 1 μl 稀释的 Taq DNA 聚合酶(0.25—0.33 U) 1 μl,所有 HPA 的 PCR 循环条件一致:95 变性 5 min; 95 变性 30 s, 60 复性 30 s, 72 延伸 1.5 min; 30 个 PCR 循环; 72 延伸 5 min。

**1.5 电泳** 取扩增产物 5 μl,加样于 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/ml 溴乙锭)孔中, 0.5 ×TBE 缓冲液, 10 v/cm 电泳 20 min 后,置于 UVP 凝胶成像仪观察特异性条带,打印并记录实验结果。

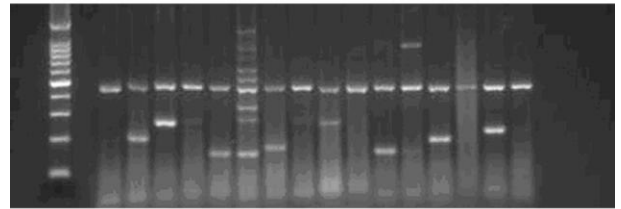
**1.6 统计学分析** 基因频率按群体遗传基因计数法计算  $\chi^2$  值,比较基因型分布的期望值和观察值,验证其是否符合 Hardy-Weinberg (HW) 平衡法则<sup>[5]</sup>。

## 2 结果

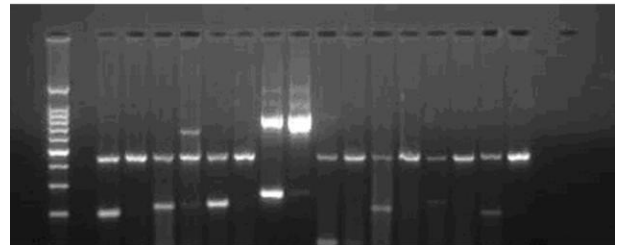
**2.1 分型** 见表 1, 2 和图 1。HPA-1、-2、-4、-5 和 HPA-6 以 a/a 纯合子为主,发现 HPA-1bb 纯合子基因型 1 例(图 1),和 HPA-2bb 纯合子 5 例。在

HPA1—16bw 抗原中,具有最高杂合度的是 HPA-15,其次是 HPA-3。其余 HPA7—14bw 和 16bw 只检测到 a 等位基因,其基因频率均为 1.000 0。经 HW 吻合度检验,比较观察值和期望值,除 HPA-1 系统外,其余各系统 P 值均 > 0.05,说明本次研究的 HPA 2—16bw 符合 HW 群体遗传平衡法则,并表明南宁地区人群 HPA1—6bw, -15 系统具有多态性,其中 HPA-3 和 HPA-15 具有较高的杂合度。

2.2 验证分型实验结果 我们用来验证 HPA1—16bw 分型实验结果的 DNA 参照品均来自于 ISBT 第 14 届血小板免疫学研讨会基因检测项目 DNA 标准品。另外,应用直接测序法对一些罕见或有代表性的 HPA 分型标本作进一步核实<sup>[6]</sup>。



1a 1b 2a 2b 3a 3b 4a 4b 5a 5b 6a 6b 7a 7b 8a 8b



9a 9b 10a 10b 11a 11b 12a 12b 13a 13b 14a 14b 15a 15b 16a 16b

图 1 HPA 1bb 标本的 HPA1—16bw 等位基因分型结果电泳图

表 1 南宁地区 1 500 名健康成年人 HPA1—16bw 基因分型结果

	观察频率 (n)	预期频率 (n)	等位基因频率	
1a/1a	0.984 7(1 477)	0.984 1(1 476.096)	1a = 0.992 0	$\chi^2 = 9.157 9$
1a/1b	0.014 7(22)	0.015 9(23.808)	1b = 0.008 0	P < 0.005
1b/1b	0.000 7(1)	0.000 064(0.096)		
2a/2a	0.916 7(1 376)	0.914 5(1 371.764 5)	2a = 0.956 3	$\chi^2 = 1.969 9$
2a/2b	0.079 3(119)	0.083 6(125.370 9)	2b = 0.043 7	P > 0.05
2b/2b	0.004 0(5)	0.019 2(2.864 5)		
3a/3a	0.284 0(426)	0.289 4(434.166)	3a = 0.538 0	$\chi^2 = 0.719 6$
3a/3b	0.508 0(762)	0.497 1(745.668)	3b = 0.462 0	P > 0.05
3b/3b	0.208 0(312)	0.231 4(320.166)		
4a/4a	0.999 3(1 499)	0.999 2(1 498.800 2)	4a = 0.999 6	$\chi^2 = 0.033 4$
4a/4b	0.000 7(1)	0.000 8(1.199 5)	4b = 0.000 4	P > 0.05
4b/4b	0.000 0(0)	0.000 000 16(0.000 2)		
5a/5a	0.967 3(1 451)	0.967 5(1 451.203 4)	5a = 0.983 6	$\chi^2 = 0.411 1$
5a/5b	0.032 7(49)	0.032 3(48.393 1)	5b = 0.016 4	P > 0.05
5b/5b	0.000 0(0)	0.002 7(0.040 34)		
6a/6a	0.965 3(1 448)	0.965 5(1 448.254 1)	6a = 0.982 6	$\chi^2 = 0.463 9$
6a/6bw	0.034 7(52)	0.034 2(51.291 7)	6bw = 0.017 4	P > 0.05
6bw/6bw	0.000 0(0)	0.000 3(0.454 1)		
7a/7a	1.000 0(1 500)	1.000 0(1 500)	7a = 1.000 0	NA
7a/7bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	7bw = 0.000 0	
7bw/7bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)		
8a/8a	1.000 0(1 500)	1.000 0(1 500)	8a = 1.000 0	NA
8a/8bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	8bw = 0.000 0	
8bw/8bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)		
9a/9a	1.000 0(1 500)	1.000 0(1 500)	9a = 1.000 0	NA
9a/9bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	9bw = 0.000 0	
9bw/9bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)		
10a/10a	1.000 0(1 500)	1.000 0(1 500)	10a = 1.000 0	NA
10a/10bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	10bw = 0.000 0	
10bw/10bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)		
11a/11a	1.000 0(1 500)	1.000 0(1 500)	11a = 1.000 0	NA
11a/11bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	11bw = 0.000 0	
11bw/11bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)		
12a/12a	1.000 0(1 500)	1.000 0(1 500)	12a = 1.000 0	NA
12a/12bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	12bw = 0.000 0	
12bw/12bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)		

(下页续)

(续表 1)

	观察频率 (n)	预期频率 (n)	等位基因频率	
13a/13a	1.000 0(1 500)	1.000 0(1 500)	13a = 1.000 0	NA
13a/13bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	13bw = 0.000 0	
13bw/13bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)		
14a/14a	1.000 0(1 500)	1.000 0(1 500)	14a = 1.000 0	NA
14a/14bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	14bw = 0.000 0	
14bw/14bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)		
15a/15a	0.252 7(379)	0.253 0(379.5)	15a = 0.503 0	$\chi^2 = 0.002 7$
15a/15b	0.500 7(751)	0.500 0(750)	15b = 0.497 0	$P > 0.05$
15b/15b	0.246 7(370)	0.247 0(370.5)		
16a/16a	1.000 0(1 500)	1.000 0(1 500)	16a = 1.000 0	NA
16a/16bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	16bw = 0.000 0	
16bw/16bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)		

注: NA:无法评估

表 2 不同人群 HPA 等位基因频率

	n	HPA-1a	HPA-1b	HPA-2a	HPA-2b	HPA-3a	HPA-3b	HPA-4a	HPA-4b	HPA-5a	HPA-5b	HPA-6a	HPA-6b	HPA-15a	HPA-15b
南宁	1 500	0.9920	0.0080	0.9563	0.0437	0.5380	0.4620	0.9996	0.0004	0.9836	0.0164	0.9826	0.0174	0.5030	0.4970
中国汉族 <sup>[7]</sup>	1 000	0.9940	0.0060	0.9515	0.0485	0.5945	0.4055	0.9955	0.0045	0.9860	0.0140	0.9865	0.0135	0.5320	0.4680
中国台湾 <sup>[8]</sup>	300	0.9967	0.0033	0.9600	0.0400	0.5750	0.4250	0.9983	0.0017	0.9850	0.0150	0.9633	0.0367	/	/
越南京族 <sup>[9]</sup>	107	0.9860	0.0140	0.9530	0.0470	0.4860	0.5140	1.0000	0	0.9720	0.0280	0.9860	0.0140	0.5230	0.4770
印度尼西亚 <sup>[10]</sup>	107	0.9910	0.0090	0.9390	0.0610	0.5050	0.4950	1.0000	0	0.9950	0.0050	0.9670	0.0330	0.4500	0.5500
泰国 <sup>[10]</sup>	137	0.9850	0.0150	0.9380	0.0620	0.5070	0.4930	1.0000	0	0.9630	0.0370	0.9850	0.0150	0.4630	0.5370
菲律宾 <sup>[10]</sup>	100	0.9800	0.0200	0.9750	0.0250	0.5300	0.4700	0.9950	0.0050	0.9650	0.0350	0.9800	0.0200	0.5200	0.4800
韩国 <sup>[11]</sup>	200	0.9880	0.0120	0.9230	0.0770	0.5550	0.4450	0.9780	0.0220	0.9800	0.0200	/	/	/	/
日本 <sup>[12]</sup>	56	0.9910	0.0090	0.9000	0.1000	0.7180	0.2820	0.9730	0.0270	0.9730	0.0270	/	/	/	/
印度 Parsi族 <sup>[13]</sup>	200	0.8600	0.1400	1.0000	0	/	/	0.9750	0.0250	0.9050	0.0950	0.9600	0.0400	/	/
印度 Mahara族 <sup>[13]</sup>	764	0.9365	0.0635	0.9967	0.0033	/	/	0.9993	0.0007	0.9437	0.0563	0.9987	0.0013	/	/
贝宁 <sup>[14]</sup>	154	0.8960	0.1040	0.7080	0.2920	0.6790	0.3210	1.0000	0	0.8180	0.1820	1.0000	0	0.6460	0.3540
喀麦隆 <sup>[14]</sup>	118	0.9070	0.0930	0.7630	0.2370	0.6140	0.3860	1.0000	0	0.7460	0.2540	1.0000	0	0.6910	0.3090
刚果 <sup>[14]</sup>	125	0.9040	0.0960	0.7760	0.2240	0.5960	0.4040	1.0000	0	0.7320	0.2680	1.0000	0	0.7010	0.2990
中非 <sup>[14]</sup>	111	1.0000	0	0.6070	0.3930	0.5000	0.5000	1.0000	0	0.5950	0.4050	1.0000	0	0.6980	0.3020
澳洲土著 <sup>[15]</sup>	185	0.9970	0.0030	1.0000	0	0.9320	0.0680	1.0000	0	0.7540	0.2460	/	/	/	/
澳洲高加索人 <sup>[15]</sup>	1 000	0.8580	0.1420	0.9270	0.0730	0.6190	0.3810	1.0000	0	0.9050	0.0950	/	/	/	/
波兰 <sup>[16]</sup>	134	0.8740	0.1260	0.8980	0.1020	0.5920	0.4080	1.0000	0	0.9370	0.0630	/	/	0.4850	0.5150
法国 <sup>[17]</sup>	800	0.8480	0.1520	0.9200	0.0800	0.6200	0.3800	/	/	0.8740	0.1260	/	/	0.4550	0.5450
德国 <sup>[18]</sup>	126	0.8200	0.1800	0.9200	0.0800	0.6350	0.3650	/	/	0.9000	0.1000	/	/	/	/
斯洛文尼亚 <sup>[19]</sup>	152	0.8090	0.1910	0.8910	0.1090	0.5930	0.4070	0.9970	0.0030	0.9340	0.0660	/	/	/	/
英国 <sup>[20]</sup>	134	0.8400	0.1600	0.9250	0.0750	0.6270	0.3730	1.0000	0	0.9140	0.0860	1.0000	0	/	/

### 3 讨论

我们利用 PCR-SSP方法来分析 HPA1—16bw 基因频率,发现 HPA-1a、-2a、-4a—14a、-16a是最常见的等位基因,HPA 3a/3b和 HPA 15a/15b分布频率相似。HPA-1是引起免疫性血小板减少的主要血型系统,HPA-1b在高加索人种、非洲贝宁人、喀麦隆人和刚果人中频率较高<sup>[14, 15]</sup>,但在亚洲人和中部非洲人中分布很低<sup>[7-12, 14]</sup>。南宁人群 HPA-1a基因频率为 0.992 0,而 HPA-1b仅为 0.008 0,与以往的 HPA-1基因分布研究结果大致相似<sup>[7-12]</sup>,HPA-1bb纯合子罕见可解释免疫性血小板减少症在亚洲人中发病率低的原因<sup>[7]</sup>。上述文献报道均未发现 HPA-1bb纯合子,但在本研究中我们发现了 1例,经调查该献血

者为瑶族,其家庭 3代均无与外民族通婚史,这是否说明本地区瑶族血小板抗原基因具有独特的分布频率和群体结构特点呢?对此我们将做进一步调查。

HPA-2b基因频率在中部非洲人中分布最高,在澳大利亚土著人中分布为 0<sup>[15]</sup>,而其在亚洲人群中的分布也比较低<sup>[7-12]</sup>。从表 2看出,HPA-2a/2b基因的杂合程度高于 HPA-1a/1b,说明在亚洲人群中,因 HPA-2系统血型不合引起免疫性血小板减少症的发病率可能明显高于 HPA-1系统。HPA-3系统在 HPA1—16bw 中杂合度较高,在亚洲人中 HPA-3a/-3b基因频率分布大体相同,本地区 HPA-3a基因频率(0.538)高于 HPA-3b(0.462),与高加索人种(3a=0.67, 3b=0.33)<sup>[21]</sup>和贝宁人<sup>[14]</sup>相比较,差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.64, P < 0.005$ )。澳大

利亚土著人 *HPA-3b* 基因频率在所有文献中频率最低<sup>[15]</sup>, 表明 *HPA-3* 分布具有一定的地区特点应引起高度重视<sup>[22]</sup>。*HPA-4* 抗原首先在日本人群中被发现, Shibada等<sup>[23]</sup>报道在日本, 胎母 *HPA-4b* 血型不相容是导致新生儿同种免疫血小板减少症 (NAIT) 的主要病因, 且发现了抗 *HPA-4b* 引起的 NAIT 19例<sup>[23]</sup>。在高加索人<sup>[15]</sup>和非洲人<sup>[14]</sup>中很少发现 *HPA-4b* 等位基因, 但印度 Parsi族<sup>[13]</sup> *HPA-4bb* 纯合子的基因频率却高达 1%<sup>[24]</sup>。我们仅发现了 *HPA-4ab* 1例。本地区 *HPA-4b* 的基因频率 (0.0004), 与中国台湾<sup>[8]</sup>及冯明亮等<sup>[7]</sup>报道的分布频率相近, 到目前为止, *HPA-4* 系统引起的 NAIT 国内尚未见报道。*HPA-5* 在亚洲人群中以 *a/a* 纯合子为主, 在本研究中我们未发现 *HPA-5bb* 纯合子, *HPA-5a* 基因频率为 0.9836, 与日本、韩国、越南等亚洲国家的分布频率相似, 与非洲喀麦隆人、刚果人、贝宁人以及高加索人相比, 差异有统计学意义 ( $\chi^2$  值分别为 190.22, 212.33, 124.45 和 121.82,  $P$  均  $< 0.005$ )。另外, *HPA-5* 也是引起高加索人和非洲人免疫性血小板减少症的主要原因之一<sup>[24]</sup>。

本地区 *HPA-6b* 基因频率为 0.0174, 与以往文献报道的较高频率吻合<sup>[8,10-13]</sup>, 而在高加索人和非洲黑人中基因频率非常低<sup>[14,15]</sup>。这提示我们: 亚洲人有较高的 *HPA-6b* 基因分布频率, 而由 *HPA-6* 血型不合引起的免疫性血小板减少症应引起重视。*HPA-15* 为具有最高杂合度的血型系统, 其在亚洲人中的基因频率分布大体相同, 与高加索人和亚洲其他国家人群的分布频率相似, 但与刚果人相比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 18.18$ ,  $P < 0.005$ )。*HPA-15* 系统是多次输注血小板制品患者发生免疫性血小板减少症的主要血型系统, 在临床配合性血小板输注中必须加以高度重视<sup>[25]</sup>。其余 *HPA-7-14bw*, *16bw* 和 *17bw* 抗原基因型在人群中通常为 *a/a* 纯合子, *a/b* 杂合子较罕见, *b/b* 纯合子未见报道。据 Kaplan等<sup>[26]</sup>报道, 临床严重的新生儿血小板减少症与这些稀有抗原有关, 预后较差, 由稀有抗原引起的免疫性血小板减少症的检测和诊断, 应给予足够重视。

我们根据 *HPA* 在本地区的分布频率来预测血小板同种免疫发生的可能性, 可确定在临床上可能具有重要免疫学意义的血小板抗原系统, 并由此寻找更适合的血小板输注方法, 避免血小板同种免疫的产生, 以保证输血的安全性和有效性, 并建立广西地区血小板基因频率数据库和血小板供者库。*HPA* 还可作为次要组织相容性抗原和遗传标记, 应用于造血干细胞移植、亲子鉴定, 以及人类起源进化等研

究中。

## 参 考 文 献

- [1] Stafford P, Gamer S, 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.
- [2] Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al Nomenclature of human platelet antigens *Vox Sang*, 2003, 85 (2): 240-246.
- [3] Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection *Vox Sang*, 2004, 87 (Suppl 1): S82-S86.
- [4] 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.
- [5] 温特 PC. 遗传学. 谢雍, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 208-215.
- [6] Wu Gg, Tang Qm, Shen Wd, et al DNA sequencing-based typing of *HPA-1* to *HPA-17w* systems *Int J Hematol*, 2008, 88 (8): 268-271.
- [7] Feng ML, Liu DZ, Shen W, et al Establishment of an *HPA-1* to *-16*-typed platelet donor registry in China *Transfus Med*, 2006 (5), 16: 369-374.
- [8] Lyou JY, Chen YJ, Hu HY, et al PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen *-1* to *-13w*. *Transfusion*, 2002, 42 (8): 1089-1095.
- [9] Halla H, Bach K, Martageix, et al Eleven human platelet systems studied in the Vietnamese and Ma'ohis Polynesian populations *Tissue Antigens*, 2004, 63 (1): 34-40.
- [10] Shih MC, Liu TC, Lin L, et al Gene frequencies of the *HPA-1* to *HPA-13*, *Oe* and *Gov* platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, Filipino and Thai populations *Int J Mol Med*, 2003, 12 (4): 609-614.
- [11] Seo DH, Park SS, Kim DW, et al Gene frequencies of eight human platelet-specific antigen in Koreans *Transfus Med*, 1998, 8 (2): 129-132.
- [12] Legler TJ, Kohler M, Mayr WR, et al Genotyping of the human platelet antigen systems 1 through 5 by multiplex polymerase chain reaction and ligation-based typing *Transfusion*, 1996, 36 (5): 426-431.
- [13] Kulkarni B, Mohanty D, Ghosh K, et al Frequency distribution of human platelet antigens in the Indian population *Transfus Med*, 2005, 15 (2): 119-124.
- [14] Halle L, Bigot A, Mullen Mandy G, et al *HPA* polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies *Tissue Antigens*, 2005, 65 (3): 294-298.
- [15] Bennett JA, Palmer LJ, Musk AW, et al Gene frequencies of human platelet antigens 1-5 in indigenous Australians in Western Australia *Transfus Med*, 2002, 12 (3): 199-203.
- [16] Drzewek K, Erojer E, Zupanska B, et al The frequency of human platelet antigen (*HPA*) genotypes in the Polish population *Transfus Med*, 1998, 8 (4): 339-342.

# 稀有血型筛选用小鼠单克隆抗体的制备及鉴定\*

吕红娟<sup>1</sup> 朱海峰<sup>1</sup> 高桥英夫<sup>2</sup> 高桥顺子<sup>2</sup> 谷慶彦<sup>2</sup>

(1 山东省血液中心, 山东 济南 250014; 2 日本大阪府红十字血液中心)

**摘要:**目的 制备血型单克隆抗体,用于筛选稀有血型。方法 用人红细胞作为免疫原免疫 6周龄 Balb/c小鼠(雌),通过小鼠 B淋巴细胞杂交瘤技术制备单克隆抗体,用免疫原红细胞筛选阳性克隆,用已知表型的稀有血型红细胞筛选鉴定抗体特异性。用 1 L培养袋扩大培养,以硫酸铵法粗提培养上清。以商品试剂盒检测抗体的免疫球蛋白亚类。检测抗体反应性,摸索在全自动血型仪上进行抗原筛选的使用条件。结果 建立了 3株单克隆抗体细胞株。抗-GPA/GPB(IgG1, )盐水法反应,抗体效价为 102 400;抗-En<sup>a</sup>TS(IgM, )盐水法反应,抗体效价为 204 800;抗-K14(IgG1, )菠萝酶法反应,抗体效价为 20 480。结论 利用得到的单抗可在自动血型仪上实施快速高通量抗原筛选,可用于筛选 M<sup>k</sup>M<sup>k</sup>型、En(a-)、Ko及 K:-14型等稀有血型。

**关键词:**单克隆抗体;稀有血型;抗原筛选;杂交瘤技术;抗体特异性

中图分类号:R457.1<sup>+</sup> R446.62 文献标识码:A 文章编号:1004-549X(2010)06-0429-05

**Preparation and identification of murine monoclonal antibodies for the antigen screening of rare donors** LÜ Hongjuan<sup>1</sup>, ZHU Hai Feng<sup>1</sup>, TAKAHASHI Hideo<sup>2</sup>, et al 1. Shandong Blood Center, Jinan 250014, China; 2. Japanese Red Cross Osaka Blood Center

**Abstract: Objective** To prepare monoclonal antibodies (mAb) against human blood group antigens for the establishment of rare blood bank. **Methods** Three 6 week-old female Balb/c mice were immunized with human red blood cells (RBCs). Mouse splenocytes were fused with P3U1 myeloma cells and the positive hybridoma clones were screened with the immunized RBCs. Rare RBCs with known phenotypes were used to screen and identify the specificity of mAbs. The subclasses were identified by monoclonal antibody isotyping kit. **Results** Three mouse hybridoma cell lines were established by lymphocyte hybridoma technology. The specificity and titers of these mAbs were anti-GPA/GPB of  $\times 102\ 400$ , anti-En<sup>a</sup>TS of  $\times 204\ 800$  and anti-K14 of  $\times 20\ 480$ , respectively. **Conclusion** These mAbs can be used to screen rare donors by automatic blood grouping machine.

\*基金项目:日中笹川医学奖学金项目(第31期)提供部分资助课题

- [17] Merieux Y, Debost M, Bemaud J, et al Human platelet antigen frequencies of platelet donors in the French population determined by polymerase chain reaction with sequence specific primers. *Pathol Biol*, 1997, 45 (9): 697-700.
- [18] Chen DF, Pastucha LT, Chen HY, et al Simultaneous genotyping of human platelet antigens by hot start sequence-specific polymerase chain reaction with DNA polymerase AmpliTaq Gold. *Vox sang*, 1997, 72 (3): 192-196.
- [19] Rozman P, Drabbel J, Schipper RF, et al Genotyping for human platelet-specific antigens HPA-1, -2, -3, -4 and -5 in the Slovenian population reveals a slightly increased frequency of HPA-1b and HPA-2b compared to other European populations. *Eur J Immunogenet*, 1999, 26 (4): 265-269.
- [20] Jones DC, Bunce M, Fuggle SV, et al Human platelet alloantigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. *Eur J Immunol Gene*, 2003, 30 (6): 415-419.
- [21] Kim HO, Jin Y, Kickler TS, et al Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, White and Korean population. *Transfusion*, 1995, 35 (10): 863-867.
- [22] Berry J, Allen D, Porcelijn L, et al Collaborative studies to establish the first World Health Organization International Standard for detection of human antibody against human platelet antigen-3a. *Vox sang*, 2007, 93 (4): 309-315.
- [23] Shibata Y. Platelet-specific antigens and its clinical implications. The 6th Regional Congress International Society of Blood Transfusion Western Pacific Region, Bangkok, 1995, 1 (5): 73.
- [24] Casto V, Kroll H, Origa AF, et al A prospective study on the prevalence and risk factors for neonatal thrombocytopenia and platelet alloimmunization among 9332 unselected Brazilian newborns. *Transfusion*, 2007, 47 (1): 59-66.
- [25] Tomicic M, Bingulac-Popovic J, Drazic V, et al Frequency of HPA-15a and HPA-15b (Gova/b) Human Platelet Alloantigens in the Croatian Population. *Arch Med Res*, 2006, 37 (1): 172-174.
- [26] Kaplan C, Porcelijn L, Vanlieferinghen P, et al Anti-HPA-9bw (Maxa) fetomaternal alloimmunization, a clinically severe neonatal thrombocytopenia: difficulties in diagnosis and therapy and report on eight families. *Transfusion*, 2005, 45 (11): 1799-1803.

(2010-02-06收稿, 2010-04-20修回)

本文编辑:夏玲