

# تشخیص آلل‌های HLA-DR با روش PCR-SSP و مقایسه نتایج روش سرولوژیک با آن

مینوادیب Ph.D.\*، مجید یاران M.T.\*، عباس رضایی Ph.D.\*، قاسم سلگی M.Sc.\*

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی

آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۴۴۷-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی

## چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۹/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۳/۲/۱۴

**هدف:** مقایسه نتایج بدست آمده در روش سرولوژیک جهت تشخیص آلل‌های HLA-DR با نتایج روش جدید PCR-SSP

**مواد و روشها:** تعداد ۵۵ نمونه خون محیطی بطور تصادفی از مراجعین به آزمایشگاه پیوند اعضا در اصفهان گرفته شد و تشخیص آلل‌های HLA-DR با هر دو روش مولکولی و سرولوژی صورت گرفت. روش سرولوژی با استفاده از ۳۰ نوع آنتی‌سرم مختلف جهت تشخیص آلل‌های HLA-DR انجام شد و برای روش PCR-SSP پرایمرهای اختصاصی برای آلل‌های HLA-DRB1\*01-10 (به غیر از 8, 10, DR6) و نیز HLA-DR52 و DR53 مورد استفاده قرار گرفت. پس از استخراج DNA با استفاده از سیزده جفت پرایمر اختصاصی برای هر نمونه و بطور جداگانه واکنش PCR انجام گردید. در این تحقیق کنترل مثبت داخلی قطعه‌ای از توالی سومین اینترون لوکوس DR بود. پس از انجام PCR محصولات واکنش بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و در نهایت عکسبرداری از ژل، تفسیر و مقایسه نتایج صورت گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج ۳۱ نمونه (۵۶/۳ درصد) کاملاً مطابق روش سرولوژی بود. ۱۲ مورد (۲۲ درصد) در سرولوژیک هتروزیگوت و در مولکولی هموزیگوت تشخیص داده شدند. ۷ مورد (۱۲/۷ درصد) در هر دو روش هتروزیگوت بودند اما در یک آلل اختلاف داشتند. ۲ مورد (۳/۶ درصد) در روش سرولوژیک هموزیگوت و در مولکولی هتروزیگوت بودند و نیز یک مورد (۱/۸ درصد) در هر دو روش هموزیگوت بود اما بدین صورت که در سرولوژی HLA-DR14 و در مولکولی HLA-DR11 مشخص شد. و نهایتاً ۲ مورد از ۵۵ نمونه (۳/۶ درصد) در روش سرولوژیک قابل تشخیص نبودند. در نهایت تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و به کمک آزمونهای غیر پارامتریک (تست Mc Nemar) انجام شد.

نتایج در مورد آلل‌های DR3 از نظر آماری تفاوت معنی داری را نشان داده است ( $P=0.035$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج بدست آمده از روش سرولوژیک معمول به میزان ۴۳/۷ درصد با نتایج روش PCR-SSP اختلاف داشت و این بیانگر خطای زیاد روش سرولوژی و یا به عبارت دیگر صحت بیشتر روش PCR-SSP برای DR-Typing می‌باشد.

**کل واژگان:** آلل‌های HLA-DR، PCR-SSP، روش سرولوژی

## مقدمه

کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (Major Histocompatibility Complex) یک قسمت از ژنوم است که اولین بار به دنبال رد پیوند پوست در موشهای غیر همسان از نظر ژنتیکی کشف شد. در انسان این کمپلکس را تحت عنوان آنتی ژنهای لکوسیتی انسان (Human Leukocyte Antigens) می‌شناسند که بر اساس ساختمان توزیع بافتی و عملکرد به دو دسته مجزا تقسیم می‌شوند (HLA class I and class II) (۱). ژنهای کدکننده مولکولهای HLA-I و HLA-II پلی مورف‌ترین سیستم ژنتیکی در ژنوم انسان هستند، به طوری که برخی از لوکوسها (مثلاً لوکوس B یا DRB1) بیش از ۳۰۰ آلل دارند (۱، ۲). در ابتدا این آنتی ژنها توسط روش‌های سرولوژیک شناسایی شدند اما با توجه به تنوع شدید آنها و محدودیت آنتی سرم‌های تک خاصیتی برای تشخیص هر یک از این آنتی ژنها در سالهای اخیر با استفاده از روش‌های مولکولی تشخیص آلل‌های HLA-I با صحت بیشتر در مقایسه با روش سرولوژی و در سطح DNA امکان پذیر شده است (۳، ۴).

روش‌های HLA Typing بر پایه DNA نسبت به روشهای سرولوژی از حساسیت، صحت و قدرت تشخیصی بسیار بیشتری برخوردار هستند (۵). با به کارگیری این‌گونه روشها ناسازگارهای فاحش و مشخص نشده از نظر HLA در میان بیماران و دهنده‌هایی که قبلاً با روش سرولوژی و (MLC) بعنوان سازگار در نظر گرفته شده بودند آشکار شده است (۵، ۶).

تکنیک‌های مولکولی نشان دادند که پلی مورفیم متنوع و مشخص شده برای HLA توسط روش‌های کلاسیک سرولوژی در حال حاضر بسیار کمتر از مقدار واقعی است (۷). بر پایه اطلاعات موجود در مورد تنوع مکانسی در بین آلل‌های HLA انواع روش‌های بر اساس PCR از جمله SSP، RFLP، SBT، SSCP، SSOP و DNA chip به منظور HLA Typing توسعه یافته و در کلینیک بکار می‌روند (۸). تکثیر به کمک پرایمرهای اختصاصی برای سکانس‌ها (SSP) از جمله تکنیک‌های مولکولی است که بطور گسترده انجام HLA Typing در حد سرولوژی نام متوسط و با کارایی بالا استفاده می‌شود (۹).

هدف از این مطالعه انجام HLA-DR Typing با روش PCR-SSP و مقایسه نتایج روش سرولوژیک با این روش در تشخیص آلل‌های مذکور بود. بدین منظور پرایمرهای اختصاصی برای سکانس‌های مطابق با آلل‌های تعریف شده در سرولوژی (DR1-18 و DR52 و DR53) مورد استفاده قرار گرفتند. به دلیل حذف مراحل تخصصی بعد از PCR انجام HLA Typing از روش ژنوم با حساسیت و اختصاصیت بیشتر ظرف مدت ۳ ساعت انجام پذیر است و همین دلیل استفاده از روش PCR-SSP را در آزمایشگاه پیوند ممکن می‌سازد (۱۰).

## مواد و روشها

در این تحقیق ۵۵ نفر از افراد دهنده و گیرنده که به آزمایشگاه پیوند اصفهان مراجعه کرده بودند و نیز یک خانواده ۶ نفری به صورت تصادفی انتخاب شده و به منظور تشخیص آلل‌های

HLA-DRB1/B3/B4 با دو روش سرولوژی (میرولنفوسیتوتوکسیتی) و PCR-SSP مورد آزمایش قرار گرفتند. یک خانواده ۶ نفری به عنوان افراد کنترل بوده و در این تست سالم بودن یا نبودن تاثیری در نتایج ندارد.

## \* روش سرولوژی

آنتی ژنهای HLA-DR1-DR18 علاوه بر DR52 و DR53 با روش میکروولنفوسیتوتوکسیتی و به کمک آنتی سرم‌های تجاری (میکروپلیت‌های تهیه شده از سازمان انتقال خون ایران) تشخیص داده شدند.

## \* روش PCR-SSP

ابتدا DNA ژنومی که به روش Salting out اصلاح شده از نمونه‌های خون محیطی استخراج شد. به این صورت که ۲ میلی لیتر خون را با ۸ میلی لیتر بافر لیز شماره یک

(0.32M Sucrose, 5mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 12mM Tris HCl pH 7.5, 1%

۷۷ Triton X-100) مخلوط کرده و پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰۰g لگوسپن‌ها رسوب داده می‌شوند بعد از شستن رسوب با آب مقطر آن را در ۹۰۰ میکرولیتر بافر لیز شماره دو (0.375M NaCl, 0.12 EDTA pH8.0) و ۲۵ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد و ۲۲۰ میکرولیتر ۴(NaClO<sub>4</sub>M) حل نموده و به شدت مخلوط می‌کنیم. پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰۰g بلافاصله با افزودن محلول (6M NaCl) پروتئین‌ها رسوب داده می‌شوند. مایع رویی حاوی DNA را به یک تیوب جدید منتقل کرده و دو برابر حجم آن اتانول مطلق اضافه می‌کنیم. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰g مایع رویی را به آرامی تخلیه نموده و ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد به DNA افزوده و چندین بار مخلوط می‌کنیم و پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰g رسوب داده می‌شود.

در نهایت پس از خشک شدن رسوب آن در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل می‌کنیم و بعد از تعیین غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر UV، مقدار ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی برای هر واکنش ۲۰ میکرولیتری جهت PCR استفاده شد. برای تشخیص آلل‌های HLA-DR توسط روش PCR-SSP ۱۴ تیوب واکنش به صورت جداگانه برای هر نمونه تهیه گردید. ده عدد برای تشخیص آلل‌های HLA- DRB1 01, 03, 04, 07, 09, 11, 15, 16 و سه عدد برای تشخیص DR52 و DR53 در نهایت یک تیوب کنترل منفی (فاقد DNA).

مخلوط ۲۰ میکرولیتری واکنش PCR شامل 1.5mM pH8.3 HCl 1.5mM Tris 0.01W/W gelatin 50mM KC1, 10mM MgCl<sub>2</sub>, از dNTP Mix (سیناژن) و ۱ میکرومولار از پرایمرهای اختصاصی برای هر یک از آلل‌های مذکور (سکانس پرایمرهای از منبع شماره ۱۰ و تهیه آنها از شرکت فرانسوی Genesetologies بوده است) ۰/۲ میکرومول از پرایمرهای کنترل داخلی (جهت تکثیر قطعه‌ای از سومین

کادب مریانند

جدول شماره یک انواع اختلاف برای آلل‌های HLA-DR بین دو روش سرولوژی و PCR-SSP را نشان می‌دهد.

جدول ۲: توزیع اختلاف دو روش در بین آلل‌های HLA-DR

HLA-DR specificity	Discrepancy Rate
HLA-DRB1*01(n=3)	33.0%
HLA-DRB1*15(n=15)	20.0%
HLA-DRB1*16(n=2)	0.0%
HLA-DRB1*03(n=21)	42.0%
HLA-DRB1*04(n=25)	28.0%
HLA-DRB1*11(n=33)	24.0%
HLA-DRB1*07(n=4)	0.0%
HLA-DRB1*09(n=1)	100.0%
HLA-DRB3* (n=43)	9.0%
HLA-DRB4* (n=26)	25.0%

در جدول شماره دو توزیع اختلاف در میان آلل‌های HLA-DR بین روش سرولوژی و PCR-SSP نشان داده شده است. بیشترین اختلاف در مورد آلل DR3 مشاهده می‌شود.

در ضمن تعداد ۳۰ نمونه در سه موقعیت زمانی مختلف توسط روش PCR-SSP مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج آنها به صورت Blind بررسی شد. تکرار پذیری نتایج در هر سه زمان ۱۰۰ درصد گزارش شد.

حساسیت و ویژگی روش سرولوژی در مقایسه با PCR-SSP به ترتیب ۷۷ درصد و ۹۲ درصد و ارزش اخباری مثبت و منفی آن به ترتیب ۸۰ درصد و ۹۳ درصد به دست آمد. در ضمن برای تأیید صحت روش PCR-SSP و حصول اطمینان از اینکه روش درست راه اندازی شده است یا نه تشخیص آلل‌های HLA-DR برای یک خانواده ۶ نفری انجام گرفت تا چگونگی انتقال ژنها از والدین به فرزندان مشخص شود. نتایج حاصله و توارث هاپلوتایپ‌ها کاملاً از الگوی ژنتیک مندلی تبعیت می‌کرد.

### بحث

آنتی‌ژن‌های HLA موانع اصلی در پیوند اعضا و بافتها در بین افراد هستند (۱۱). در رابطه با نقش تطابق HLA در عواقب پیوند مشخصات کیفیت DR Typing یک موضوع مهم می‌باشد. مطالعات اخیر در مورد نقش سازگاری HLA در پیوند کلیه متفقاً با هم نشان داده‌اند که به موازات افزایش عدم سازگاری HLA، کاهش در میزان بقاء پیوند دیده می‌شود (۴، ۱۲). مطالعات اولیه Opelz و همکارانش نشان داد که از میان ۱۰۷ پیوند سازگار از نظر DR، B، A با HLA سرولوژی وقتی که مجدداً با روش RFLP آزمایش شدند ۲۹ مورد عدم تطابق در آلل‌های اصلی DR داشتند. و پیوند در این گونه موارد که در آنها عدم تطابق در DR مشخص نشده نسبت به مواردی که سازگاری HLA در آنها تأیید شده بود میزان ۲۲ درصد بقاء کمتری را نشان دادند (۱۲). اختلاف قابل توجه در آزمایش HLA Typing برای افراد سالم دهنده‌های مغز استخوان و دهنده‌های داوطلب ضرورت به کارگیری

اینترن ژنهای DRB1) و در نهایت ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز و در نهایت ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک بود. مرحله تکثیر DNA در دستگاه PCR (مدل Techne Genius) انجام شد. به طوری که بعد از دناتور شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه DNA طی ۳۰ سیکل (دناتور شدن DNA در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه جسییدن پرایمر به DNA الگو در ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پلی‌مریزه شدن بازهای آلی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) تکثیر شد. بعد از تکثیر حضور یا عدم حضور محصول PCR با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد مشخص شد. با افزودن ۵ میکرولیتر (40% W/V Sucrose, 0.25% Bromophenol Blue) به مخلوط واکنش PCR مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن در را در چاهکهای ژل ریخته و ژل را به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در ۷۵ ولت و در بافرز (45mM Tris Base, 45mM Boric Acid, 1mM EDTA pH 8.0) 0.5X TBE الکتروفورز می‌کنیم. بعد از رنگ آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید (1ug/ml) به مدت ۱۵ دقیقه و پس از شستوی ژل، توسط دستگاه UV Transillumimatore مورد بررسی قرار گرفته و عکسبرداری از ژل به عمل آمد. در پایان نتایج به دست آمده از هر دو روش با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و تست Mc Nemar از دست آزمونهای غیر پارامتریک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

### یافته‌ها

ابتدا نمونه‌های تهیه شده از آزمایشگاه پیوند مورد آزمایش قرار گرفتند. در این تحقیق اختلاف نتایج بدست آمده از هر دو روش به شرح زیر بود: ۱۲ مورد از ۵۵ نمونه (۲۲ درصد) در سرولوژی هتروزیگوت و در روش SSP هموزیگوت تشخیص داده شدند. ۲ مورد (۳/۶ درصد) در سرولوژی هموزیگوت و در SSP هتروزیگوت بودند. ۷ مورد (۱۲/۷ درصد) در هر دو روش هتروزیگوت بودند اما در یک آلل اختلاف داشتند. تنها یک مورد (۱۸ درصد) در هر دو روش هموزیگوت بود اما به این صورت که در PCR-SSP آلل DR11 و در سرولوژی DR14 تشخیص داده شد. ۲ نمونه (۳/۶ درصد) در روش سرولوژی قابل تشخیص نبودند در حالی که همه ۵۵ نمونه در روش PCR-SSP تشخیص داده شدند. و در نهایت ۳۱ مورد (۵۶/۳ درصد) از ۵۵ نمونه در هر دو روش نتایج یکسان داشتند.

جدول ۱: درصد اختلاف دو روش PCR و سرولوژی در تشخیص آلل‌های HLA-DR

PCR-SSP Vs Serology	HLA-DRB1/B3/B4	
	No of case	%
Complete Matched Sample	31	56.3
Antigen Vs Blank	2	3.6
Antigen Vs Antigen	7	12.7
Blank Vs Antigen	12	22.0
Homozygote (DR11 Vs DR14)	1	1.8
Typed Vs Undetectable	2	3.6
Total	55	100

شرح جدول فوق به این صورت است:

Anti Vs Blank یعنی اینکه در سرولوژی یک آلل تشخیص داده نشده است (منفی کادب).  
Anti Vs Antigen به این معنی است که در سرولوژی آلل مذکور به اشتباه مشخص شده است.  
Blank VS Antigen یعنی اینکه مشخص در اصل هموزیگوت است و آلل دوم در سرولوژی مثبت





: an approach suitable for high throughput typing including unrelated bone marrow registry donors. Tissue Antigens 2001; 57(1): 46-52

10. Olerup O, Zetterquist H: HLA-DR Typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An Alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens 1992; 39: 225-235

11. Thorstby E: Invited Anniversary Review: HLA associated diseases. Human Immunol 1997; 53: 1-11

12. Michael Cecka J: The Role of HLA in Renal Transplantation. Human Immunol 1997; 56: 6-16

13. Noreen HJ, Yu N, Setterholm M, Ohashi M, Baisch J, Endres R, et al: Validation of DNA-based HLA-A and HLA-B testing of volunteers for a bone marrow registry Through parallel testing with serology. Tissue Antigens 2001; 57(3): 221-228

14. Chen M, Brian F, Duffy T: New aspects in Histocompatibility Testing. Laboratory Medicine Newsletter march 1996; 4: 3

15. Olerup O, Zetterquist H: HLA-DRB1\*01 subtyping by allele specific PCR amplification: A sensitive, specific and rapid technique. Tissue Antigens 1991; 37: 197-204

16. Katsuyama Y, Liu CY, Arakura A, Fukushima H, Ota M: Validation of HLA-DR locus typing in forensic specimens by combining PCR-SSP with PCR-RFLP. Journal of Forensic Sciences Philadelphia, 1997; 42(5): 929-934

17. Opelz G, Mytilineos J, Scherer S, Trejaut J, Dunckley H, Chapman J, Fisher G, et al: Analysis of

Discrepancy between serological and DNA-RFLP Typing for HLA-DR in kidney graft recipients. Transplant Proceeding 1992; 24: 2478

18. Opelz G, Mytilineos J, Scherer S, Schwarz V: Collaborative Transplant Study : Clinical Implication of DNA typing in organ transplantation. Transplantation Proceeding 1997; 29: 1524-1527

19. Mytilineos J, Lempert M, Scherer S, Schwarz V, Opelz G: Comparison of serological and DNA PCR-SSP Typing Results for HLA-A and HLA-B in 421 black individuals, A collaborative transplant study report. Human Immunol 1998; 59: 512-517

20. Schaffer M, Olerup O: HLA-AB typing by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing. Tissue Antigens 2001; 58(5): 299-307

21. Cermakova Z, Kolarikova H: Serological versus molecular HLA-DR typing of cadaveric donors in conditions of regional tissue typing laboratory. Bone Marrow Transplant 1998; 22 Suppl 4: S47-8

22. Savelkoul FHM, De Bruyn-Geraets DP, Van den Berg-Loonen EM: High resolution HLA-DRB1 SSP typing for cadaveric donor transplantatio. Tissue Antigens 1995; 45: 41-48

23. Knipper AJ, Hinney A, Schuch B, Enczmann J, Uhreberg M, Warnet P: Selection of unrelated bone marrow donors by PCR-SSP typing and subsequent non radioactive sequence-based typing for HLA-DRB 1/3/4/5, DQB1 and DPB1 alleles. Tissue Antigens 1994; 44: 275-284

