

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ОПИСАНИЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ АЛЛЕЛЕЙ

Логинава М.А.<sup>1, 2</sup>, Трофимова Н.П.<sup>1</sup>, Парамонов И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГУ «Приволжский окружной медицинский центр экспертизы качества препаратов крови и исследования фракционирования донорской плазмы Росздравнадзора», Киров

<sup>2</sup> Вятский государственный университет, Киров

В ходе проведения скринингового типирования потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, проживающих на территории Приволжского федерального округа, по локусам (HLA)-A, B, DRB1, DRB345 у образца № 1758 выявлен новый аллель по локусу A. Использование базовых наборов реагентов AlleleSEQR HLA-A Sequencing в сочетании с HARP – A2F98A позволило установить генотип указанного образца – A\*30:01:01, новый аллель A\*25, B\*13, 44, DRB1\*03, 09, DRB3\*02, DRB4\*01.

*Ключевые слова:* HLA, SBT-типирование, новый аллель.

## THE USE OF NEW REAGENT KITS FOR DETECTION AND DESCRIPTION OF ADDITIONAL ALLELES

Loginova M.A.<sup>1, 2</sup>, Trophimova N.P.<sup>1</sup>, Paramonov I.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Volga Regional Medical Center of Expertise Quality of Preparation of Blood and Investigation of Donor Plasma, Kirov

<sup>2</sup> Viatsky State University

During the screening typing of recruited volunteers with Volga Federal District for unrelated hematopoietic stem cell registry on the loci (HLA)-A, B, DRB1, DRB345 in sample № 1758 identified a new allele at locus A. The use of basic kit AlleleSEQR HLA-A Sequencing in combination with HARP – A2F98A allowed to determine the genotype of this sample – A\*30:01:01, a new allele A\*25, B\*13, 44, DRB1\*03, 09, DRB3\*02, DRB4\*01.

*Keywords:* HLA, SBT-typing, new allele.

### ВВЕДЕНИЕ

Главный комплекс гистосовместимости расположен у человека на 6-й хромосоме и занимает значительный участок ДНК, включающий около 50 генов [3]. Основной особенностью комплекса является значительная полигенность (наличие нескольких неаллельных близко сцепленных генов, белковые продукты которых сходны в структурном отношении и выполняют идентичные функции) и ярко выраженный полиморфизм – присутствие многих аллельных форм одного и того же гена [3, 11].

Необходимо отметить, что если со времени открытия системы антигенов лейкоцитов человека (HLA – human leukocyte antigen) до середины 80-х годов было открыто менее 150 HLA-специфичес-

тей [14], то за последующий период их количество приблизилось к 6 500 [5]. Примечательно, что это увеличение произошло как за счет открытия новых генов HLA, так и за счет установления многочисленных аллельных вариантов уже известных генов. В последние годы внедрение в лабораторную практику метода прямого секвенса генов значительно ускорило процесс открытия новых аллельных вариантов и повысило качество данных о новых аллелях. Так, по данным Комитета по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ (The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System), на март 2010 года HLA-локусы I класса насчитывали в своем составе 3411 аллелей, II класса – 1222, а по данным на апрель 2011 года, эти цифры уже состав-

*Статья поступила в редакцию 18.04.11 г.*

**Контакты:** Логинава Мария Александровна, к. б. н., биолог лаборатории HLA-типирования ФГУ «ПОМЦЭКПКИФДП Росздравнадзора».

**Тел.** (8332) 36-80-77, **e-mail:** [loginova-ma@rosplasma.ru](mailto:loginova-ma@rosplasma.ru)

ляют 4946 и 1457 соответственно [5]. Практически в каждом номере официального журнала Европейской ассоциации иммуногенетиков (EFI – European Federation of Immunogenetics) Tissue Antigens появляется два-три сообщения об открытии новых аллелей. Большинство этих сообщений описывают аллели, открытые в Китае [13, 15, 17], Южной Корее [4, 9] и других странах [8, 16], изучение популяций которых началось значительно позже американских и европейских популяций.

В связи с малой изученностью популяционных особенностей генов HLA в России вероятность выявления новых аллелей также велика. Технология SBT, основанная на определении полной нуклеотидной последовательности (секвенировании) ДНК-мишени, обладает максимальной разрешающей способностью и является «золотым стандартом» для выявления и описания новых аллелей [10]. В то же время технология SBT на сегодняшний день является самой дорогой из имеющихся и в связи с этим самой малораспространенной в практике российских HLA-лабораторий [1, 2]. Это значительно усложняет задачу выявления и описания новых аллелей.

В данной работе мы хотим показать возможность использования наборов реагентов AlleleSEQR HLA Sequencing для описания нового аллеля, согласно требованиям международного банка данных HLA-аллелей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ДНК из замороженного образца цельной крови (антикоагулянт – ЭДТА<sub>Na</sub>) проводили методом колоночной фильтрации с помощью станции QIAcube с использованием набора реагентов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN).

Концентрацию и показатель чистоты ( $A_{260}/A_{280}$ ) препаратов ДНК определяли с помощью спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Япония). Средняя концентрация препаратов ДНК (первичное и повторное выделения ДНК для проведения типирования по технологии SSO, первичное и повторное выделения ДНК для проведения типирования по технологии SBT) составляла 20,399 нг/мкл, среднее значение показателя чистоты –  $A_{260}/A_{280} = 1,8073$ .

HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DRB345 (до второго знака) по технологии SSO проводили с использованием наборов реагентов LABType SSO (One Lambda, США) с разрешением метода от среднего к высокому. Интенсивность флуоресценции идентифицировали с использованием системы диагностической Luminex 200 (в модификации LABScan 200 с XY платформой). Обработка данных, полученных на проточном флуориметре Luminex 200, производилась с помощью программного обеспечения HLA Fusion v. 1.2.

HLA-типирование по локусу HLA-A по технологии SBT проводили с использованием набора реагентов AlleleSEQR HLA-A Sequencing (Abbott, США). Капиллярный электрофорез осуществляли на четырехкапиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США), полученные данные анализировали в программном обеспечении Assign SBT v. 3.5+.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В июле 2010 года при проведении скринингового HLA-типирования потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, проживающих на территории Приволжского федерального округа, был выявлен образец № 1758, имеющий генотип В\*13, 44, DRB1\*03, 09, DRB3\*02, DRB4\*01 и необычный аллельный паттерн по локусу А. Результаты типирования указанного образца по локусу А в программном обеспечении HLA Fusion v. 1.2 представлены на рис. 1.

Из данных, представленных на рис. 1, следует, что программное обеспечение HLA Fusion v. 1.2 не может подобрать возможный аллельный код (Possible Allele Code – NMDP Not Assigned), однако подсказывает, что результат мог бы быть А\*25, 30 (вкладка Pairs), в случае если бы микросфера № 021 была положительной. Из диаграммы сигналов микросфер видно, что сигнал микросферы № 021 настолько низок, что в принципе не может быть ложноотрицательным, это свидетельствует о возможной мутации во втором экзоне локуса А.

Повторное типирование с момента выделения ДНК из образца цельной крови подтвердило полученный результат.

Для получения более подробной информации о локусе А указанного образца использовали базовые наборы реагентов AlleleSEQR. Результаты типирования по локусу А в программном обеспечении Assign SBT v. 3.5+ представлены на рис. 2.

Из данных, представленных на рис. 2, следует, что при общем достаточно высоком качестве сиквенса (BCS = 86) в библиотеке HLA-аллелей (IMGT/A 3.3.0 2011-01-14) не найдено полного соответствия. Однако последовательность имеет только одно несовпадение с аллельным вариантом А\*25:01:01, 30:01:01 в основании 269 (экзон 2, позиция 196). Для аллелей А\*25:01:01 и 30:01:01 в этой позиции должен стоять А (аденин), в то время как в полученной консенсусной последовательности образец имеет смесь А и G (сигнал очень четкий в обоих сиквенсах – как в прямом, так и в обратном направлении).

В связи с тем, что при использовании наборов реагентов AlleleSEQR не секвенируется каждая аллель в отдельности, а создается консенсусная по-

следовательность, при определении новой аллели в гетерозиготе с уже известной не всегда получается выявить, какая из аллелей новая, а какая уже известная.

В нашем случае мы сравнили последовательности 2-го экзона аллелей A\*25:01:01 и 30:01:01 в программном обеспечении IMGT/HLA Sequence Alignments, доступном в on-line режиме в глобаль-

ной сети Интернет [6], результаты сравнения представлены на рис. 3. Аллели A\*25:01:01 и 30:01:01 во 2-м экзоне имеют 22 отличающиеся позиции. Наибольший интерес в нашем случае представляет основание в позиции 98, так как в указанной позиции последовательности аллелей различаются, и на выявление этого различия существует праймер для разрешения гетерозиготных неоднозначностей

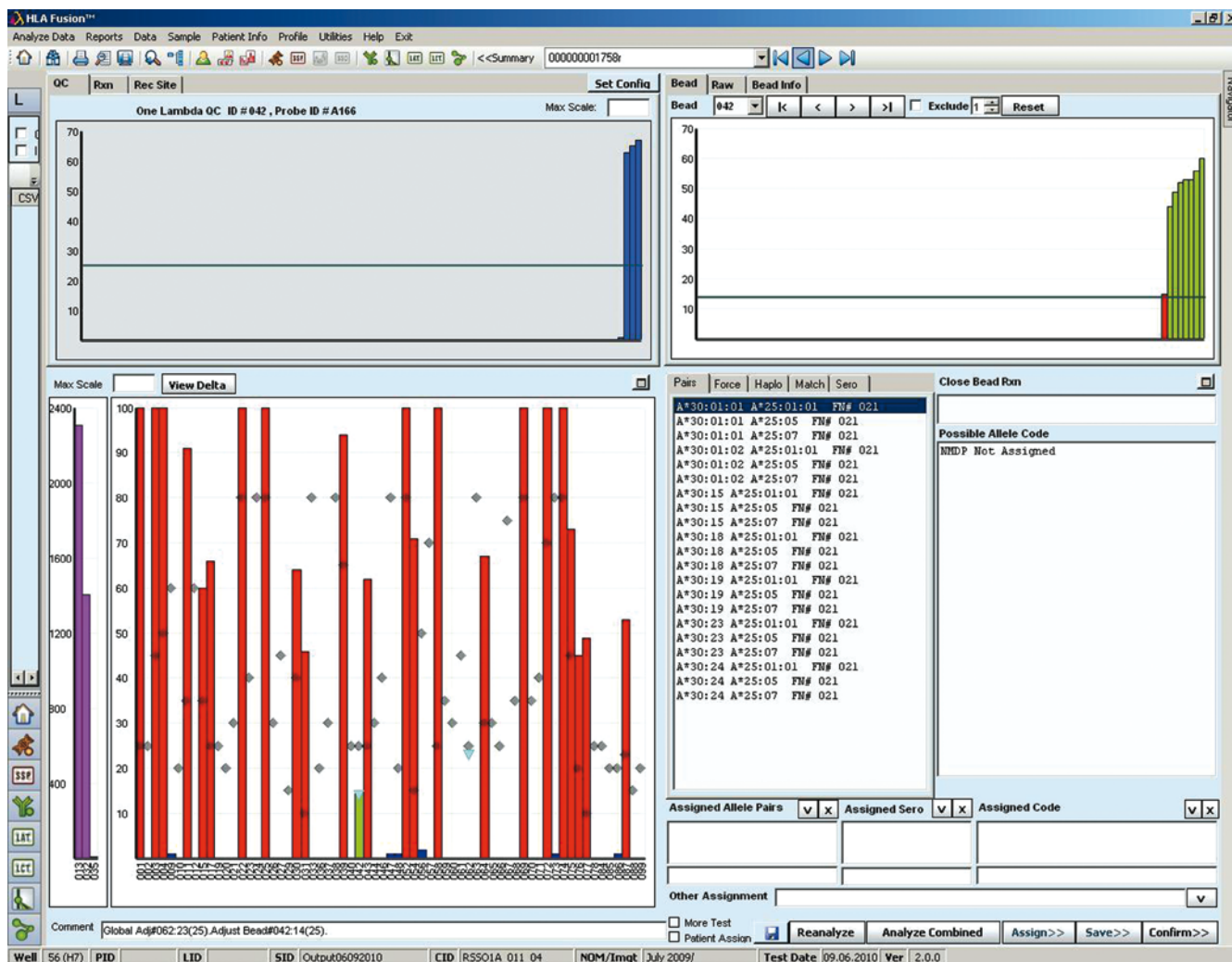


Рис. 1. Результаты типирования образца № 1758 по локусу A в программном обеспечении HLA Fusion v. 1.2

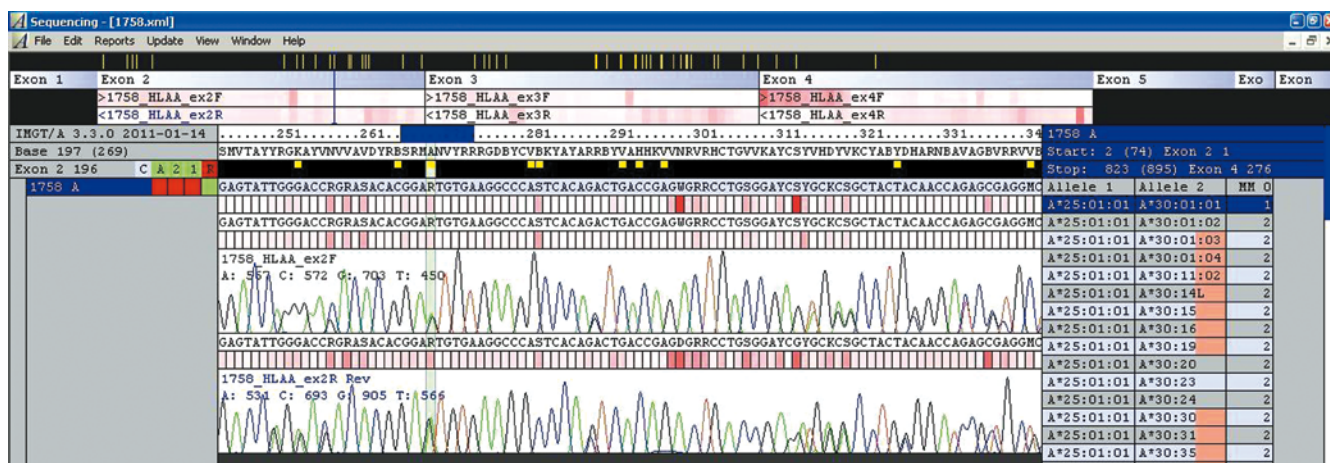


Рис. 2. Результаты типирования образца № 1758 по локусу A в программном обеспечении Assign v. 3.5+

## IMGT/HLA Sequence Alignments: Release 3.4.0 (08-April-2011)

## Sequence Alignment Results

SUBMIT ANOTHER ALIGNMENT JOB

For most browsers hold 'Ctrl' or 'Apple' and press '+' or '-' to change the size of the text. Further instructions are available here.

```

cDNA             80           90           100          110          120          130          140          150          160          170
A*25:01:01      GCTCCCA CTCCATGAGG TATTTCTACA CCTCCGTGTC CCGGCCCGGC CGCGGGGAGC CCCGCTTCAT CGCGTGGGC TACGTGGAGC ACACGCAGTT
A*30:01:01      -----C-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----
cDNA             180           190           200          210          220          230          240          250          260          270
A*25:01:01      CGTGC GGTTCC GACAGCGACG CCGCGAGCCA GAGGATGGAG CCGCGGGGCGC CGTGGATAGA GCAGGAGGGG CCGGAGTATT GGGACCGGAA CACACGGAAT
A*30:01:01      -----G-----A-----G-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----G-----G-----
cDNA             280           290           300          310          320          330          340
A*25:01:01      GTGAAGGCC ACTCACAGAC TGACCGAGAG AGCCTGCGGA TCGCGCTCCG СТАТАСААС CAGAGCGAGG ACG
A*30:01:01      -----G-----T-----GA-----G-----C-----CT-----G-----G-----C-----

```

Рис. 3. Результаты сравнения последовательностей 2-го экзона аллелей A\*25:01:01 и A\*30:01:01 в программном обеспечении IMGT/HLA Sequence Alignments

(HARP – Heterozygous ambiguity resolution primer) – A2F98A. То есть при постановке секвенирующей ПЦР аллель A\*30:01:01, имеющий в позиции 98 – С (цитозин) не будет амплифицироваться с праймером A2F98A, а соответственно аллель A\*25:01:01, имеющий в позиции 98 – А (аденин) – будет.

Ретроспективный анализ сиквенса с праймером A2F98A в программном обеспечении Assign SBT v. 3.5+ показал, что в позиции 269 стоит G (гуанин), что свидетельствует о том, что образец имеет аллель A\*30:01:01 и новый аллельный вариант A\*25, отличающийся от аллеля A\*25:01:01 в позиции 269, где вместо А (аденин) стоит G (гуанин). И 66 кодон будет выглядеть как AGT (=серин), вместо AAT (=аспарагин). Обе аминокислоты являются полярными с незаряженными боковыми цепями, поэтому возможно, что эта замена не вызовет глобальных структурных изменений молекулы белка.

Повторное типирование по технологии SBT с момента выделения ДНК из образца цельной крови подтвердило полученный результат.

Подводя итог всему вышесказанному, делаем вывод, что полученные данные удовлетворяют требованиям для официального заявления о новом аллеле [12]:

- 1) секвенирование выполнено в обоих направлениях (прямые и обратные праймеры на 2, 3, 4-й экзон в базовых наборе реагентов AlleleSEQR HLA-A Sequencing);
- 2) выполнено два повторных типирования ДНК, выделенной из биоматериала;
- 3) последовательность 2-го экзона нового аллеля секвенирована отдельно от второго уже известного аллеля (сиквенс, полученный с использованием HARP – A2F98A);
- 4) при формировании отчета в программном обеспечении Assign SBT v. 3.5+ последовательность

создается с исключением последовательности праймеров;

- 5) результаты типирования подтверждены наборами реагентов, основанных на технологии SSO;
- 6) представлен полный HLA-A, -B, -DRB1 генотип изученного образца.

Дальнейшую работу целесообразно направить на составление официальной заявки на получение регистрационного номера нового аллеля в международный банк данных – GenBank [7].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абрамов В.Ю., Гулидова О.В., Лебедева Л.Л. и др.* Итоги межлабораторной программы контроля качества тканевого типирования // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010. Т. XII, № 3. С. 89–93.
2. *Логонова М.А., Парамонов И.В., Трофимова Н.П.* Неоднозначности локусов при проведении HLA-типирования по технологии SSO и попытка их разрешения // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010. Т. 12, № 4. С. 33–38.
3. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология. М.: Мир, 2000.
4. *Cha C.H., Ko S.Y., Oh H.B. et al.* HLA-C\*03:93, a novel allele identified by sequence-based typing // Tissue Antigens. 2011. Vol. 77, № 3. P. 266–267.
5. <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.
6. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>.
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank.html>.
8. *Jakubauskas A., Vilkeviciene R., Juskevicius D., Griskevicius L.* Identification of a novel HLA-B allele, B\*56:31, by sequence-based typing in a Lithuanian individual // Tissue Antigens. 2011. Vol. 77, № 3. P. 262.
9. *Ko S.Y., Oh H.B., Heo Y.S. et al.* HLA-DRB1\*13:99, a novel HLA-DRB1\*13 allele identified by sequence-based typing // Tissue Antigens. 2011. Vol. 77, № 4. P. 343.

10. *Laboratory Manual American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. 4th edition.
11. Mackay I., Rosen F.S. The HLA system // *The New England Journal of Medicine*. 2000. Vol. 343, № 11. P. 782–787.
12. Marsh S.G.E., Albert E.D., Bodmer W.F. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010 // *Tissue Antigens*. 2010. Vol. 75, № 4.
13. Qu J.H., Li J., Chen H. et al. Identification of nine novel HLA-DRB1 alleles, HLA-DRB1\*04:91, DRB1\*07:18, DRB1\*11:01:12, DRB1\*12:02:05, DRB1\*12:22, DRB1\*12:23, DRB1\*13:100, DRB1\*15:45, and DRB1\*15:46 by polymerase chain reaction – sequence based typing // *Tissue Antigens*. 2011. Vol. 77, № 3. P. 264–265.
14. Rodey G.E. HLA Beyond Tears. – 2000.
15. Tang Zh.H., Li G.Y., Wang M.L. et al. Identification of a novel HLA-B\*35:42:02 allele in a Chinese bone marrow donor // *Tissue Antigens*. 2011. Vol. 77, № 4. P. 341.
16. Veiga T.R., Rampim G.F., Gerbase-DeLima M. Identification of a novel HLA-B\*52 allele in a Brazilian individual: B\*52:21 // *Tissue Antigens*. 2011. Vol. 77, № 4. P. 342.
17. Zhu F.M., Zhang W., Wang W. et al. Characterization of a novel HLA allele, HLA-B\*40:128, in a Chinese individual // *Tissue Antigens*. 2011. Vol. 77, № 3. P. 260.

*Авторы благодарят компанию ООО «Эбботт Лэбораториз» в лице сотрудников Екатерины Старцевой и Льва Оловянного за оказание технической поддержки при работе с программным обеспечением Assign SBT v. 3.5+.*