

MN血型基因分型应用于河源地区临床输血检测*

黄璐¹, 刘丽华¹, 庄运芳¹, 陈丽红¹, 欧小懂¹, 梁延连²

(1. 河源市中心血站, 广东河源 517000; 2. 深圳市血液中心, 广东深圳 518035)

摘要:目的 应用基因分型技术鉴定产生抗-M抗体的患者样本MN血型, 协助解决MN血型相关的临床输血问题。方法 在血清学鉴定的基础上, 采用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)基因定型方法对14例产生抗-M抗体样本的MN血型进行基因分型, 并与血清学结果比较; 选取M抗原阴性的血液与之进行交叉配血。结果 14例样本基因分型结果与血清学分型结果相符, 其中11例为NN型, 2例为MN型, 1例为MM型。选取M抗原阴性的供血者血液与该14例患者血液配血均相合, 患者输血后无输血反应, 24 h内血红蛋白上升。结论 MN血型基因分型技术可作为血清学方法的补充, 有利于临床输血相关疑难样本的检测。

关键词: MN血型; 基因分型; 河源地区; 临床输血

中图分类号: R457.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)06-130-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.06.038

Genotyping of MN Blood Group Applied to Clinical Blood Transfusion in Heyuan Area

HUANG Lu¹, LIU Li-hua¹, ZHUANG Yun-fang¹, CHEN Li-hong¹, OU Xiao-dong¹, LIANG Yan-lian²

(1. Heyuan Blood Center, Guangdong Heyuan 517000, China;

2. Shenzhen Blood Center, Guangdong Shenzhen 518035, China)

Abstract: **Objective** To help solve the problem of clinical blood transfusion related to MN blood group, using genotyping technology to identify MN blood group of the patients' blood sample which exist anti-M antibody. **Methods** A total of 14 blood samples which exist anti-M antibody were detected for MN blood group by polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP) and serologic technique, respectively, and compared the genotyping results with serotyping results. Selected M antigen negative blood for cross matching with 14 cases. **Results** 14 cases' genotyping results and serotyping results were coincidental and in them, NN type of 11 cases, MN type of 2 cases, MM type of 1 cases. The M antigen negative blood cross matched with 14 cases were compatible. The patients had no blood transfuse reaction after blood transfusion, and the hemoglobin were increase within 24 hour. **Conclusion** Genotyping technology is helpful for detecting complicated samples related to clinical blood transfusion. It can be use for the compliment of serologic technique.

Keywords: MN blood group; genotyping; heyuan area; clinical blood transfusion

MNS血型系统是继ABO血型系统之后第二个被发现的血型系统, 其复杂性仅次于Rh血型系统, 迄今为止已发现47种抗原。在临床输血方面, MN血型具有重要意义, 抗-M或抗-N抗体的存在可影响输血前交叉配血, 甚至引起溶血性输血反应或新生儿溶血病^[1]。在欧洲、美洲等许多发达国家已将红细胞MN血型鉴定作为临床输血的常规检测项目^[2]。MN血型检测有血清学方法和基因分型方法, 有报道由于抗体的特异性, 大量输血患者或自身溶血性贫血患者检测MN血型时, 采用血清学方法得到的结果并不完全可靠^[3]。本文应用PCR-SSP基因分型技术鉴定因产生抗-M抗体影响交叉配血的患者样本的MN血型, 成功解决交叉配血问题, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 样本 本实验室收集交叉配血困难的患者标本14例, 经谱细胞鉴定血浆中均存在抗-M抗体。

1.2 试剂 单克隆IgM性质抗-M、抗-N血清及标准谱细胞试剂(上海血液生物医药公司), 抗人球蛋白试剂(美国Immucor公司), DNA抽提试剂盒(美国QIAGEN公司), PCR-SSP基因分型试剂盒(天津秀鹏生物技术公司)。

MN血型PCR-SSP基因分型试剂盒包括2种引物混合液: Mix-M与Mix-N, 分别用于扩增M、N血型基因片段, 其特异性扩增产物长度分别为162 bp和300 bp。试剂盒内参质控引物根据人类生长激素基因(HGH)的保守片段设计, 存在于每个引物中, 且在每次试验中运行, 其特异性扩增产物长度为865 bp。

1.3 仪器 KA-2200血清学离心机(日本KUB-

* 基金项目: 广东河源地区MN血型的基因研究与临床输血应用(2013-066)。

作者简介: 黄璐(1974-), 女, 副主任护师, 主要研究方向为采供血管理, Tel: 0762-3374999, E-mail: 874469381@qq.com。

OTA公司)、Eppendorf 高速离心机(美国 Eppendorf 公司),Eppendorf9700PCR 扩增仪(美国 Eppendorf 公司),Embitec 电泳仪(美国 Embitec 公司),D-77WWL-20M 凝胶成像仪(美国 Syngene 公司)。

1.4 方法

1.4.1 血型血清学鉴定:选取已知 MN 血型表现型血样作阴、阳对照,严格按照试剂说明书进行 MN 血型血清学鉴定;抗体筛查鉴定试验参考文献[4]方法。

1.4.2 PCR-SSP 基因分型

1.4.2.1 DNA 提取:吸取全血血样 300 μ l,按照全血基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取样本 DNA。

1.4.2.2 PCR 扩增体系:总反应体系 10 μ l,其中引物混合液 8 μ l;Taq 酶(1:10 稀释)1 μ l;模板 DNA(浓度 100 ng/L 以上)1 μ l。

1.4.2.3 PCR 扩增参数:采用热启动技术,96℃ 2 min,96℃ 20 s,68℃ 60 s,5 个循环;96℃ 20 s,65℃ 45 s,72℃ 30 s,10 个循环;96℃ 20 s,62℃ 45 s,72℃ 30 s,15 个循环;72℃ 3 min;降温至 4℃ 完成 PCR 扩增。

1.4.2.4 扩增产物电泳及结果分析:取扩增产物各加 1 μ l 荧光燃料后经 2 g/dl 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,每个 PCR 反应都应产生强度一致的 865 bp 内对照产物,每孔均出现内对照则认为扩增成功。根据试剂盒规定的 M,N 血型基因 PCR 产物位置判定对应的基因型。

1.4.3 交叉配血:选择 M 抗原阴性的血液与患者进行盐水法及间接抗人球法^[4]交叉配血试验。

2 结果

2.1 样本血清学与基因分型结果 见表 1。14 例样本血清学鉴定结果与基因分型结果一致,其中 11 例为 NN 型,2 例为 MN 型,1 例为 MM 型。12~14 号 3 例存在 M 抗原的患者样本血浆中的抗-M 抗体与自身的 M 抗原均不发生凝集反应,而与异体的 M 抗原发生特异性凝集反应。

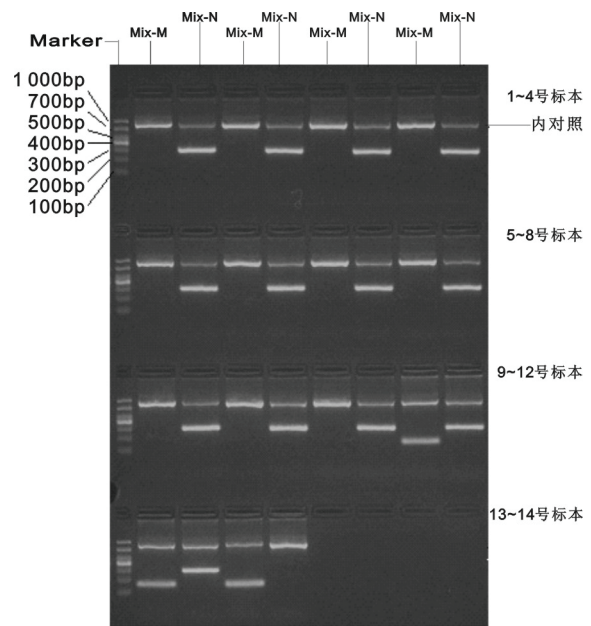
表 1 14 例样本 MN 血型检测结果

样本编号	血清学鉴定结果	基因分型结果
1~11	NN	NN
12~13	MN	MN
14	MM	MM

2.2 基因分型结果 见图 1。

2.3 配型结果 选择 M 抗原阴性的血液与该 14 例患者配血,盐水介质主、次侧无溶血、无凝集,抗

人球介质主、次侧无溶血、无凝集。患者输血后无输血反应,24 h 内血红蛋白上升。



(DNA Marker 组成片段为:1 000,700,500,400,300,200,100bp。)

图 1 样本 PCR-SSP 扩增结果

3 讨论 MNS 血型系统在临床输血、新生儿同种免疫性疾病诊断、法医学、遗传学、干细胞移植等领域中起着重要作用。MN 血型抗原在人出生时已发育成熟,据报道该血型系统抗原的功能涉及寄生虫、细菌和病毒感染等^[5]。MN 血型抗原对应的抗体都与输血反应有关,IgM 抗-M 可引起配血不合,M 抗原阴性患者接受 M 抗原阳性血液,可能产生潜在不良反应。如果患者处于低温麻醉状态下手术时应注意,因为此类抗体可激活补体,当患者的体温在冷抗体最适反应温度范围内(4℃~20℃)时,可发生溶血反应。免疫性 IgG 抗-M 可引起新生儿溶血病和溶血性输血反应。据上海等地大量筛查数据显示临床申请输血的患者抗-M 抗体的检出率为 0.73%~1.23%^[6~8],是继 Rh 血型系统抗体以外检出率最高的一种抗体。笔者前期调查显示河源地区 MN 血型的 M 和 N 基因频率分别为 0.562 5 和 0.43 75,当地人群临床随机输血 MN 血型抗原不配合概率高达 0.37 11^[9]。临床输血中血型抗体的产生与相应抗原免疫原性的强弱及抗原不配合概率的高低密切相关,理论上,抗原不配合概率越高,输血次数越多,其潜在产生抗体的机会也越高,为保障输血安全,应考虑逐步将红细胞 MN 血型鉴定作为临床输血的常规检测项目。

MN 血型系统的检测方法大多用传统的血清学方法,PCR 技术也逐步用于 MN 血型系统的检

测。血清学方法快速、经济、不受实验室条件等限制,可操作性强。但在大量输血、自身免疫性溶血性贫血等患者检测 MN 血型时,结果常难以确认,存在一定局限性。PCR-SSP 基因分型法能直接确定基因型,所需样本量小,取材更广泛。但所需耗时长,需要配套的仪器,使其应用受到一定限制。上述两种方法均有一定的优势和局限性。笔者采用 PCR-SSP 基因分型及血清学方法同时对 14 例因产生抗-M 抗体而影响交叉配血的患者样本进行 MN 血型鉴定,结果 14 例样本血清学鉴定结果与基因分型结果均一致。值得注意的是本文所选 14 例产生抗-M 的样本中,有 2 例为 MN 型,1 例为 MM 型,这 3 例血浆中的抗-M 抗体均不与自身红细胞发生凝集反应,而与异体的 M 抗原发生特异性凝集反应。通常情况下,红细胞表面存在相关的抗原,则血浆中不应存在该抗原对应的抗体。对于红细胞上既有 M 抗原又产生相应抗-M 抗体的现象,有研究^[10]表明人类红细胞 MNS 血型中抗-M 的产生与 M 抗原是否存在没有必然关联,与相关基因 GYPA 的表达也无明显关联。抗-M 抗体除了由输血、妊娠等免疫产生以外,还可以由自然界的类 M 物质或细菌感染所致,特别对于烧伤患者或儿童更为常见。此外,亦有报道提出这类抗体的产生是否与 M 或 N 的亚型分型相关的疑问^[11]。

临床上出现的抗-M 抗体可以以不同性质出现,可以是 IgM 性质也可以是 IgG 性质,但只要患者的血浆中检出抗-M,如果需要输血,都应输注 M 抗原阴性的红细胞。

本文检测结果显示 PCR-SSP 基因分型方法与血清学方法可实现相互验证,基因分型方法可作为血清学方法的补充。

致谢:本课题得到深圳市血液中心卢亮书记、梁延连教授、苏宇清教授的技术支持与帮助,在此一并表示感谢!

参考文献:

- [1] 杰夫·丹尼尔(英). 人类血型[M]. 2 版. 朱自严,译. 北京:科学出版社,2007:172.
Daniels G. Human Blood Groups[M]. Second edition. Zhu ZY, Translation. Beijing: Science Press, 2007: 172.
- [2] Lee E, Burgess G, Halverson GR, et al. Applications of murine and humanized chimaeric monoclonal antibodies for red cell phenotyping[J]. Br J Haematol, 2004, 126(2): 277-281.
- [3] 许德意,孙春霞,高家良,等. MN 血型四种方法检测比较分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(8): 37-39.
Xu DY, Sun CX, Gao JL, et al. Comparative analysis of four kinds of methods to detect the MN blood group[J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2015, 23(8): 37-39.
- [4] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[S]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:260-261.
Ye YW, Wang YS, Shen ZY. National Guide to Clinical Laboratory Procedures[S]. Third Edition. Nanjing: Southeast University Press, 2006: 260-261.
- [5] Reid ME. MNS blood group system; a review[J]. Immunohematology, 2009, 25(3): 95-101.
- [6] 王钰箐,蔡晓红,龚淞颂,等. 46 346 名患者不规则抗体筛查结果及分析[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(8): 1004-1006.
Wang YQ, Cai XH, Gong SS, et al. Result analysis of irregular antibody screening[J]. Chin J Blood Transfusion, 2015, 28(8): 1004-1006.
- [7] 李惠,徐焕铭,张毅,等. 输血前患者不规则抗体筛查及鉴定结果分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(3): 861-865.
Li H, Xu HM, Zhang Y, et al. Analysis of patients' irregular antibody screening and identification results before blood transfusion[J]. Journal of Experimental Hematology, 2015, 23(3): 861-865.
- [8] 王晓华,樊晶. 备血患者不规则抗体筛查及其结果分析[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(12): 1513-1515.
Wang XH, Fan J. Analysis of irregular antibody screening results in patients prepared for blood transfusion[J]. Chin J Blood Transfusion, 2015, 28(12): 1513-1515.
- [9] 黄璐,陈丽红,庄运芳,等. 广东省河源地区 MN 血型基因频率调查[J]. 国际医药卫生导报, 2014, 20(14): 2052-2054.
Huang L, Chen LH, Zhuang YF, et al. Gene frequencies of MN blood group in Heyuan, Guangdong[J]. International Medicine and Health Guidance News, 2014, 20(14): 2052-2054.
- [10] 陈云龙,梁延连,苏宇清,等. 人类红细胞 MN 血型中抗-M 与 GYPA 基因表达的相关性[J]. 临床输血与检验, 2014, 16(1): 8-10.
Chen YL, Liang YL, Su YQ, et al. A study of correlation of anti-M production and the GYPA expression in human MN blood type[J]. J Clin Transfus Lab Med, 2014, 16(1): 8-10.
- [11] 梁延连,苏宇清,吴凡,等. 中国人群 MN 血型中 M, N 等位基因多态性的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(2): 537-540.
Liang YL, Su YQ, Wu F, et al. Polymorphism of M, N allele in MN blood group of Chinese population[J]. Journal of Experimental Hematology, 2015, 23(2): 537-540.

收稿日期:2016-09-01

修回日期:2016-10-21