

一例罕见 AB 亚型的分子生物学研究分析*

李双玉,董 磊,解金辉,赵 瑛 (天津市血液中心,天津 300110)

摘要:目的 分析研究一名献血者 ABO 血型形成的分子生物学机制。方法 用血清学方法检测 ABO 和 H 抗原,应用聚合酶链式反应(polymerase chain reation,PCR)检测其基因型,再对 ABO 基因第 6,7 外显子进行直接测序。结果 该献血员血清学检测为 AB 亚型,PCR 结果为 A2/Bw12,直接测序结果为 A205/Bw12。结论 该献血员血型是一例比较罕见的 AB 双侧亚型。为保障输血安全,在该献血员不含抗体的情况下,其血液可以输注给配血相合的 AB 型患者。

关键词:ABO 血型;亚型;分子生物学技术

中图分类号:R457.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)04-070-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.018

Study on the Molecular Mechanism of a Case of Rare AB Subtype

LI Shuang-yu, DONG Lei, XIE Jin-hui, ZHAO Ying

(Tianjin Blood Center, Tianjin 300110, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of a blood donor's ABO blood group. **Methods** The serological test was applied to test the ABO and H antigens of the blood donor. The polymerase chain reation (PCR) was applied to exam the ABO genotype, and the direct sequencing was applied to test the exon6 and exon7 sequence of the blood donor's ABO gene. **Results** The results of the serological test indicated that the donor's ABO blood was AB subtype. The A2/Bw12 genotype was acquired with PCR and the A205/Bw12 genotype was acquired with the direct sequencing. **Conclusion** The donor's blood type is a rare AB subtype with both A and B are subtypes.

Keywords: ABO blood group; subtype; molecule biology

ABO 血型系统在临床输血中占有极其重要的地位,其血型鉴定是保障输血安全的必要前提。临床上,一般通过正反定型即可确定 ABO 血型,但是,有时会遇到正反定型不符或凝集强度弱于正常的情况,难以准确鉴定血型,这时就需要应用其他检测方法来帮助鉴定血型。下面是我们遇到的一例献血员标本,虽然正反定型一致,但是凝集强度发生变化,影响血型鉴定,详情如下。

1 材料与方法

1.1 对象 本中心检验科送检的一例献血员 ABO 疑难血型标本。

1.2 试剂与方法

1.2.1 试剂:单克隆抗 A,抗 B 血清(批号 20170408,上海血液生物医药有限公司),反定型细胞(批号 20175327,上海血液生物医药有限公司),抗 H 血清(批号 OHM117,德国 CE-IMMUNODI-AGNOSTIKA),全血基因组 DNA 抽提试剂盒(批号 151048736, QIAGEN),ABO 基因分型试剂盒(批号 201609025,20170614,秀鹏生物技术有限公

司)。ABO 血型,H 抗原鉴定按照相关试剂说明书和参考书^[1]进行。

1.2.2 血清学检测:采用试管法做正反定型,同时设 O 细胞和自身细胞作对照。

1.2.3 基因分型:抽提该献血者全血基因组 DNA,用聚合酶链式反应(polymerase chain reation PCR)进行基因分型。

1.2.4 直接测序:针对第 6,7 外显子设计引物,第 6 外显子正向引物 CCCGTTGGAGTCG-CATTT,反向引物是 ATGAGCTCAGTAAGAT-GCTGCA;第 7 外显子正向引物 AAGCCTTC-CAATGGCCGCT,反向引物 TCACGGGTTCGG-GACCGCCT,先对该标本进行 PCR 反应,然后将 PCR 产物和第 6,7 外显子引物送英潍捷基(上海)贸易有限公司直接测序。

2 结果

2.1 血清学结果 见表 1。正定型是 AB 型,反定型也是 AB 型,但是凝集强度有变化,提示可能是亚型。

表 1 该献血者正反定型试验结果

方 法	抗-A	抗-B	抗-AB	抗-A1	抗-H	A1c	Bc	Oc	自身c
献血员正反定型试管法	4+	2+	-	w+	3+w	0	0	0	0

* 作者简介:李双玉(1977-),女,中级,研究方向:红细胞血型 and 血小板相关研究,E-mail:lsy77618@sina.com。

2.2 PCR 分型结果 分别用秀鹏生物技术有限公司的两种试剂盒 ABO-II 代和 B 亚型做基因分型,按照试剂说明书操作。对照其结果分型表(试剂盒每一孔所含引物已标注在电泳胶图上)判断

ABO 的基因型。ABO-II 代试剂盒的基因分型结果是 A2/B,见图 1,A 侧是亚型,具体是 A2 中的哪一种亚型不能确定。B 亚型试剂盒的基因分型结果是 A/Bw12,见图 2。

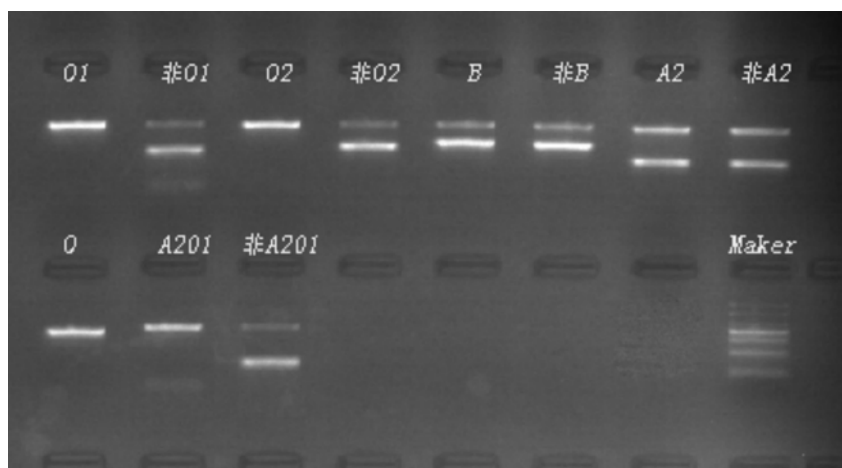


图1 ABO-II 基因分型结果

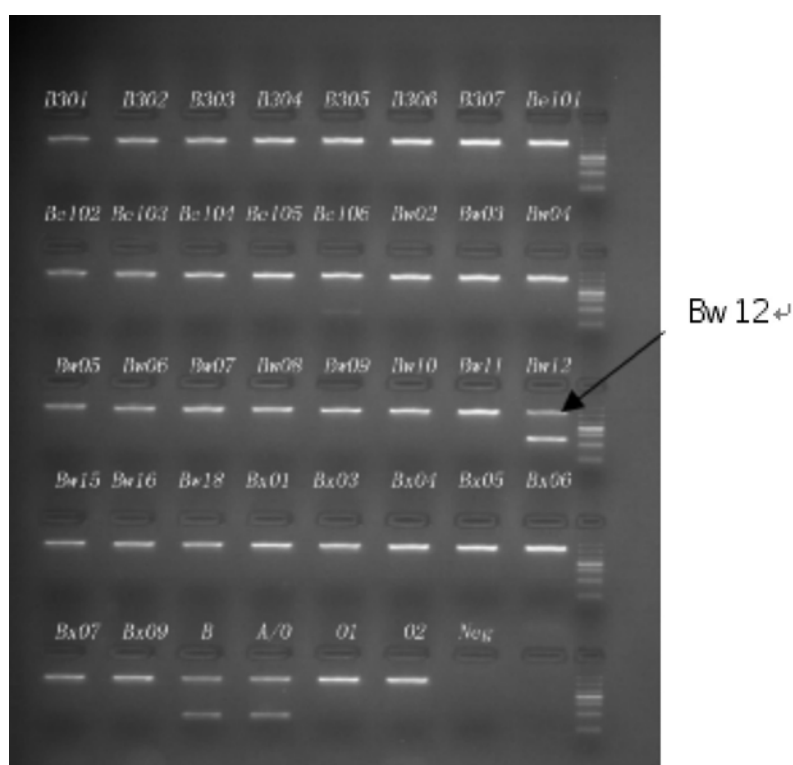


图2 B 亚型基因分型结果

2.3 测序结果 第467碱基C突变T,1009碱基A突变G,引起第156氨基酸由脯氨酸(P)变成了亮氨酸(L),337位由精氨酸(R)变成甘氨酸(G),符合A205的变化。B侧突变位置比B101多一个,即278碱基C突变T,导致93位的脯氨酸(P)变为亮氨酸(L),与Bw12一致。测序结果是A205/Bw12。

3 讨论 ABO血型系统是最早发现的血型系统,也是临床输血中最重要的血型系统之一。ABO血型基因位于染色体9q34,其编码区包含有7个外显子,第6和第7外显子就包含糖基转移酶77%的氨基酸序列^[3],因此这两个外显子在ABO血型基因定型方面非常重要。A基因和B基因分别编码N-乙酰氨基半乳糖转移酶和α-1,3-D-半乳糖基

转移酶,这两种酶催化底物分子转移至H抗原上,形成了A抗原和B抗原。当基因的外显子中有碱基发生改变时,就会引起形成糖基转移酶的氨基酸发生变化,进而影响转移酶的性质和活性,导致细胞表面抗原质量或数量变化。ABO亚型是指红细胞表面A抗原或者B抗原存在的数量不同于正常A型或者B型,以至于在检测过程中表现为凝集强度弱于正常血型。

在血型亚型中,A亚型比B亚型更常见,而A2是最常见的一个亚型。A1和A2的抗原决定簇在数量上是有区别的,其中A1的抗原点位约为 $8 \times 10^5 \sim 12 \times 10^5$,而A2的抗原点位约为 $1 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$,但是在用单克隆抗A血清检测A2时,这些抗原点位足以能够产生很强的凝集而无法与A1相区别。A1和A2的区别不仅仅是抗原决定簇数量上的差别,同样存在质的区别,现在应用最广泛的抗A1试剂是双花扁豆外源性凝集素,很容易将A1和A1B与A2和A2B细胞区分开。国外有文献报道高加索人中几乎所有A2亚型的遗传基因皆为A201^[4],而国内的研究与此不同,中国人群中的A2等位基因以A205为主^[5,6]。弱的B变异型相对较少,而且难以分类,目前较多报道的有B(A),B3,Bel,Bw等。

为保障输血安全,正确鉴定ABO血型,避免出现因ABO血型不合而导致严重的输血反应非常重要。临床上常用血清学方法鉴定ABO血型,这种方法易受实验室操作不当、不规范操作、生理因素、疾病、治疗措施等诸多因素影响,出现正反定型不符或凝集强度变化的情况^[2]。对于患者而言,出现上述情况时不仅要考虑亚型的可能性,还要考虑年龄、疾病、药物等多种因素带来的影响。而对无偿献血者(健康人)来讲,相对简单些,亚型的可能性比较大。

本文中的献血者红细胞与单克隆抗A血清反应呈强凝集,而与抗A1血清反应呈弱凝集结果,故血清学倾向于A2型,而与抗B血清反应凝集强度明显低于正常凝集,又怀疑有B亚型,通过PCR和直接测序验证了这一结果。本文中献血者虽然是AB双侧亚型,但没有抗体,其与AB型患者盐水、凝聚胺和卡式交叉配血均阴性,其血液可以输注给交叉配血相合的AB型患者。如果献血员体内有抗体,为了输血安全,最好不要给患者输注这种血液。如果患者是这种血型,我们首选主侧配血阴性的洗涤O型红细胞,血浆、单采血小板选AB型;有条件再寻找交叉配血阴性的同型红细胞。有文献报道在紧急情况而又无库存洗涤红细胞时,也可以输注O型去白悬浮红细胞^[7]。

在日常工作中,当出现正反定型不符时,很容易引起实验人员的注意,但是对出现正反定型一致,只是凝集强度发生变化,加之实验人员经验不足,容易被忽略、漏检,应该引起注意。目前,红细胞血型鉴定的方法很多,当通过抗人球试验、吸收放散、酶化实验等多种血清学方法无法鉴定血型时,可以利用分子生物学技术作为补充,帮助鉴定血型。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中国输血技术操作规程(血站部分)[S]. 天津:天津科学技术出版社,1997:60-63.
Ministry of Health, People's Republic of China, China Transfusion Technology Operational Procedure(Blood Station Part)[S]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1997: 60-63.
- [2] Schenkel - Brunner Helmut . Human Blood Groups [M]. 朱自彦,译. 北京:科学出版社,2007:22.
Schenkel - Brunner Helmut . Human Blood Groups [M]. Zhu ZY, Translate [J]. Beijing: Science Press, 2007:22.
- [3] Reid ME. The blood group antigen(facts book)[M]. New York: Harcourt Brace & Company, 1997:98.
- [4] 莫锦政,谢敬文,蓝文莉,等. 广州市番禺地区A2亚型频率调查[J]. 广西医学,2015,37(6):810-812.
Mo JZ, Xie JW, Lan WL, et al. Survey on frequency of A2 subgroup in Panyu prefecture, Guangzhou [J]. Guangxi Medical Journal, 2015, 37(6): 810-812.
- [5] 黄颖,林甲进,朱碎永,等. A2亚型的血清学和分子生物学的对比分析[J]. 中国卫生检验杂志,2017,27(4):518-520.
Huang Y, Lin JJ, Zhu SY, et al. Comparison of serological characteristic and molecular basis in A2 subgroup [J]. Chin J Health Lab Tec, 2017, 27(4): 518-520.
- [6] 田静辉. 探讨ABO血型鉴定的影响因素[J]. 世界最新医学信息文摘,2016,16(91):129,134.
Tian JH. To explore the influencing factors of ABO blood type identification [J]. World Latest Medicine Information (electronic Version), 2016, 16(91): 129, 134.
- [7] 何燕京,王秋实,白英哲,等. ABO疑难血型患者紧急抢救输血回顾性分析[J]. 中国输血杂志,2016,29(5):465-467.
He YJ, Wang QS, Bai YZ, et al. Retrospective analysis on the application of emergency blood transfusion in patients with difficult ABO blood typing [J]. Chin J Blood Transfusion, 2016, 29(5): 465-467.

收稿日期:2017-11-13

修回日期:2018-03-05