

广西贵港地区人群 MN 血型等位基因多态性的调查研究

徐庆萍¹, 王 杰², 岑松光¹, 赵卫新¹, 陆 永¹, 黄冬梅¹, 梁延连³

(1. 贵港市平南县人民医院检验科, 广西平南 537300; 2. 大连医科大学检验医学系, 辽宁大连 116027;
3. 深圳市血液中心输血医学研究所, 广东深圳 518035)

摘要:目的 探讨广西贵港地区人群 MN 血型等位基因的分布特点。方法 收集 2018 年 9 月~2019 年 6 月期间广西贵港地区随机人群 300 人份血样, 采用血型血清学方法鉴定其 MN 表现型, 同时提取血样中的 DNA, 对 MN 血型相关基因 GYPA 的 exon-2 序列扩增后测序, 分析广西贵港地区人群 MN 等位基因的多态性并与中国西安、新疆、贵州、广东等地区随机人群的 MN 血型基因频率作比较。结果 广西贵港地区人群的 MN 血型血清学定型与基因测序结果完全一致, 300 例 MN 血型血清学鉴定中, MM 表型为 140 例, MN 表型为 121 例, NN 表型为 39 例; M 基因频率为 0.668, N 基因频率为 0.332。通过数据比较分析可知广西贵港地区人群基因各型的构成比与国内其他地区人群不同, MN 血型抗原在不同个体中存在明显的剂量效应。结论 广西贵港地区人群 MN 血型基因具有独特的多态性, 了解这种多态性有助于广西贵港地区临床的安全输血, 预防新生儿溶血性疾病, 为广西贵港地区人类群体遗传学特征及分子生物学研究奠定基础。

关键词: MN 血型; 红细胞血型糖蛋白; GYPA 第 2 外显子; MN 血型基因频率; 多态性
中图分类号: R457.11; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-048-05
doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.012

Investigation on Allele Polymorphism of MN Blood Group in Guigang Area of Guangxi

XU Qing-ping¹, WANG Jie², CEN Song-guang¹, ZHAO Wei-xin¹, LU Yong¹, HUANG Dong-mei¹, LIANG Yan-lian³

(1. Department of Clinical Laboratory, Pingnan County People's Hospital of Guigang City, Guangxi Pingnan 537300, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116027, China;
3. Institute of Transfusion Medicine, Shenzhen Blood Center, Guangdong Shenzhen 518035, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of MN alleles in Guigang area of Guangxi. **Methods** The areas random population of 300 blood samples were collected from September 2018 to June 2019 in Guangxi. Blood group serology was used to identify the MN phenotype and the DNA in the blood samples were extracted. The exon-2 sequence of MN blood group related gene GYPA were amplified and sequenced. The polymorphism of MN alleles for the population of Guigang in Guangxi were analyzed and compared with the frequency of MN blood group gene in random population with Xi'an, Xinjiang, Guizhou and Guangdong of China. **Results** The MN blood group were authenticated for the 300 blood samples by the serological methods and the genes were sequenced. The results showed that 140 people with MM phenotype, the 121 people with MN phenotype and the 39 people with NN phenotype were identified. The frequency of M gene was 0.668 and the N gene was 0.332. Through data comparison and analysis that can be seen the composition ratio of each genotype for the population in Guigang Area of Guangxi were different from that in other areas of China. The MN blood group antigens had obvious dose effect in different individuals. **Conclusion** The MN blood group genes in Guigang area of Guangxi have a unique polymorphism. Understanding this polymorphism is conducive to the safe clinical transfusion in Guigang Area of Guangxi and the prevention of hemolytic diseases in newborns. These results lay a foundation for the study of genetic characteristics and molecular biology of human population in Guigang Area of Guangxi.

Keywords: MN blood group; erythrocyte blood type glycoprotein; GYPA exon 2; MN blood group gene frequency; polymorphism

人类 MNS 血型系统已被证明了共有 46 种抗原, MNS 血型基因结构调控的相关抗原严重干扰血型鉴定、临床输血与新生儿同种免疫性疾病; 同时在器官移植、法医学鉴定等方面均有着重要的应用

基金项目: 贵港市科技局立项项目 (贵科转 1803016); 广东省医学科研基金 (B2020179)。

作者简介: 徐庆萍 (1978-), 女, 学士学位, 副主任技师, 从事医学检验及临床输血检验工作, E-mail: pnyyjk@163.com。

通讯作者: 梁延连 (1973-), 女, 副主任技师, 从事红细胞血型免疫遗传学及临床输血研究, E-mail: lianviky@126.com。

价值^[1-2]。在亚洲、欧洲、美洲和澳大利亚均有报道由MNS血型抗体引起的临床输血反应,胎儿和新生儿溶血病,在所报道的病例中至少有40%的病例报告了严重的病情。事实证明,由MNS血型基因变异所表达的糖蛋白(抗原)在临床输血与免疫性疾病中具有重大意义。MNS血型系统的抗体复杂多样,对应的临床有意义的抗体包括:抗-M,抗-N,抗-S,抗-s,抗-“Mia”,抗-Vw,抗-MUT,抗-Hil,抗-TSEN,抗-“Mi”等。因此,研究MNS血型等位基因多态性已成为迫切的问题。MN血型抗原的多态性是由编码血型糖蛋白A(glycoprotein A, GPA)的相关基因GYPA的第2外显子决定的,在遗传过程中发生的碱基突变、交换、错排、缺失等都会影响MN抗原的数量或型别的差异。本实验通过随机选择广西贵港地区人群的300例全血,以血清学与分子生物学手段来分析本地区人群的MN血型等位基因的多态性,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象 随机选取广西贵港地区300例无血缘关系的抗凝血,其中男性109例,女性191例,采集静脉血5ml并用EDTA-K₂抗凝。4℃保存,后进行MN血型鉴定及提取全血DNA。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂:单克隆鼠IgM性质血清Anit-M(批号:20190709),Anit-N(批号:20190428)均由上海血液生物科技有限责任公司提供;ID-Card(批号:50531.44.21)由BIO-RAD提供;Gentra DNA提取试剂盒(批号:106412)由Promega公司提供。

1.2.2 仪器:Eppendorf9700 PCR扩增仪与Prism™ ABI3730XL基因测序仪,Embitec电泳仪及D77W-WL-20-M凝胶成像仪。Diamed-ID 12SI卡式离心机;Diamed-ID 37SI孵育器。

1.3 方法

1.3.1 MN血型血清学剂量效应检测方法:定量血清与定量红细胞悬液检测M抗原与N抗原的凝集强度,以判断MN抗原在不同个体间的剂量效应,取5μl红细胞压积加入500μl生理盐水稀释成5%的红细胞悬液,吸取50μl稀释5%(v/v)的红细胞悬液加入ID-Card微板中,分别加入抗-M或抗-N血清,放入Diamed-ID 12SI卡式离心机中以1030r/min离心10min后判读结果,根据凝集强度判定MN抗原在不同个体间的表达。

1.3.2 基因频率计算方法:以m代表M基因频率,n代表N基因频率,根据基因频率的计算公式: $m = \frac{M + MN}{2}$, $n = \frac{N + MN}{2}$ 计算得到M,N的基因频率。

1.3.3 DNA提取与PCR扩增体系:使用Gentra

试剂盒提取300例广西贵港地区人群血样的DNA,并控制DNA的浓度在100ng/μl左右,以利于后续PCR扩增。参照深圳市血液中心梁延连^[3]设计的引物与扩增条件对贵港地区人群的MN血型相关基因GYPA第2外显子进行扩增,以直接测序碱基序列的多态性来验证MN血型的型别,PCR扩增引物的正向引物序列为:5'-CCACATAGCAATTCTCTAAAC-3';反向引物序列为:5'-GCATTTCTCAGTGTGTTGTCAC-3'。

1.3.4 PCR扩增体系与条件:PCR采用50μl体系:10×Buffer:5μl;MgCl₂:3μl,dNTP 4μl;正,反向引物各2μl;TaqDNA聚合酶:1μl;DNA模板:2μl;ddH₂O:31μl。扩增条件:94℃预变性5min;94℃×1min,56℃×1min,72℃×1min,30个循环;72℃延伸5min,4℃保存。

1.3.5 扩增产物验证:取3μl扩增产物经2g/dl琼脂糖凝胶电泳鉴定目的片段与产物的纯度。

1.3.6 扩增产物纯化与测序:使用离心过滤柱法(Millipore公司)纯化扩增产物,以纯化后的扩增产物作为测序反应模板,再一次进行扩增,测序引物与第一次扩增引物序列相一致,采用10μl反应体系:引物(终浓度为0.0625pmol/L):3μl;模板DNA:1μl;ddH₂O:2.0μl;ABI Big-Dye3.1测序反应液4μl。PCR扩增条件:94℃预变性10min;94℃变性10s,50℃退火5s,60℃延伸4min,运行25个循环后产物于4℃保存。对以上扩增产物用醋酸钠/乙醇沉淀法提纯后使用Prism™ ABI3730XL基因测序仪检测,并使用Oli6instatler分析软件进行分析。

2 结果

2.1 广西贵港地区人群的MN血型抗原剂量效应 通过红细胞与抗体血清定量试验,发现广西贵港地区人群的MN血型抗原在不同个体间存在明显的剂量效应,即MM型的红细胞结合抗-M抗体的凝集强度达到3+以上,MM型不同个体间的凝集强度在3+~4+之间;NN型的红细胞结合抗-N抗体的凝集强度也达到3+以上,NN型不同个体间的凝集强度在2+~4+之间;而MM型红细胞结合抗-M抗体比MN型红细胞结合抗-M抗体的凝集强度要高出2+,同样的NN型红细胞结合抗-N抗体比MN型红细胞结合抗-N抗体也高出2+的凝集强度,说明广西贵港人群不同个体间的MN抗原存在明显的表达差异,这与文献报道的相一致^[4]。

2.2 广西贵港地区人群MN血型基因频率调查结果 见表1。通过MN血型鉴定,得到本地区的MN血型基因频率,与已报道的中国新疆哈萨克族人群基因频率接近^[6],与西安地区人群^[5]、贵州省

区布依族人群^[7]、广东省河源地区人群^[8]、深圳地区人群^[9]等的 MN 表型及基因频率对比, 差异均有统计学意义。

表1 广西贵港地区人群 MN 血型基因分布与其他地区人群的比较

类别	n	MM	MN	NN	M 基因频率	N 基因频率
广西贵港地区	300	140	121	39	0.668 0	0.332 0
西安地区 ^[5]	200	54	79	67	0.467 5	0.532 5
中国新疆哈萨克族 ^[6]	196	73	107	16	0.645 4	0.354 6
贵州地区布依族 ^[7]	138	30	87	21	0.532 6	0.467 4
广东省河源地区 ^[8]	1 000	316	493	191	0.562 5	0.437 5
广东省深圳地区 ^[9]	246	59	116	71	0.475 6	0.524 4

2.3 基因测序结果 见表2。经 PCR 扩增后, 对

300 例广西贵港地区人群血样进行单特异性碱基序列分析, MN 血型基因特异性关键位点在 GYPA 基因的第2外显子1号位、22号位、34, 35号位的碱基区别。

表2 广西贵港地区人群 MN 血型 GYPA 基因的第2外显子位点区别

基因	1	22	34,35
MM	C/A	C	C,T
MN	C	T/C	A/G, G/T
NN	A	T	A,G

从测序结果可清晰的区分 MN 杂合子、MM 纯合子、NN 纯合子血型, 基因测序分型与血清学结果完全一致, MN 血型特异性鉴定在 GYPA 基因第2外显子上的碱基缩略图见图1。

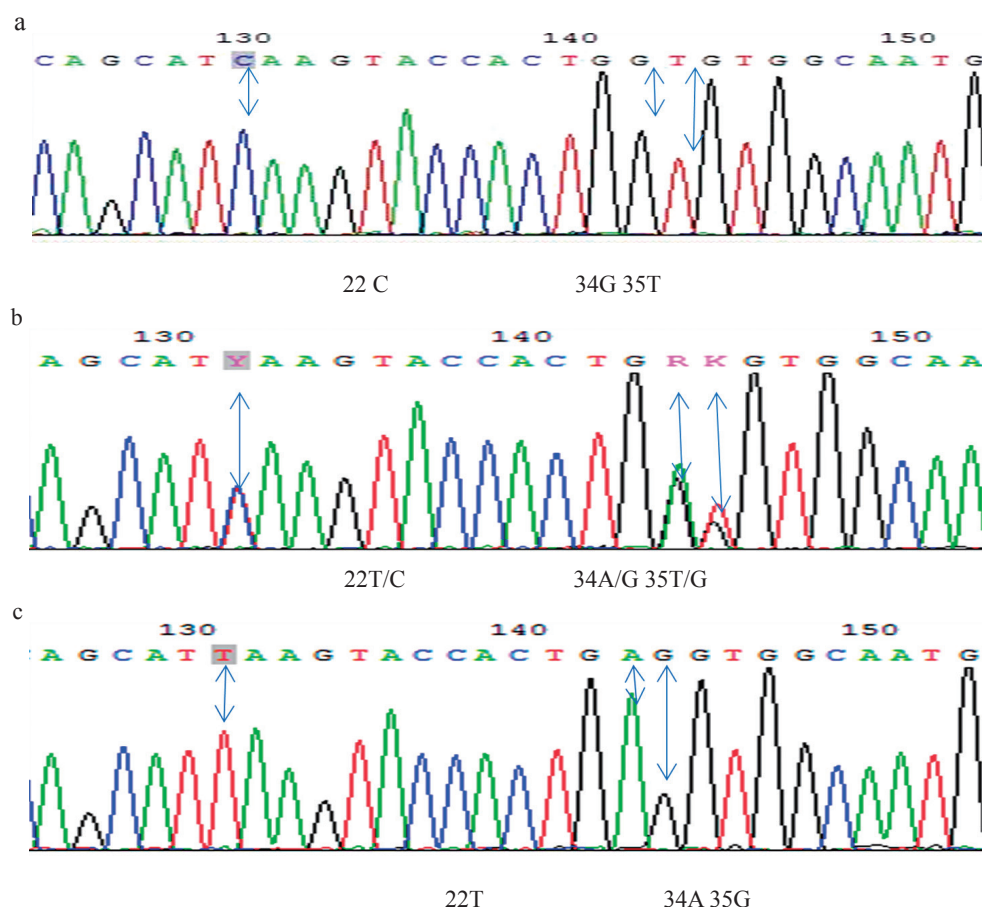


图1 MM, MN, NN 基因型测序代表图 (a. MM 纯合子表型; b. MN 杂合子表型; c. NN 纯合子表型)

通过基因测序 GYPA 第2外显子的碱基序列, 发现所选的广西贵港地区人群均在第22, 34/35位点上区分出 MN 血型的特异性, 准确地鉴定了 MM, MN, NN 基因型, 基因分型与血清学检测结果完全相符。

3 讨论

由 GPA 糖蛋白决定的 MN 血型系统抗原具有免疫原性, 在异型输血与妊娠后可以产生异源免疫 IgG 抗体, 引起临床输血反应与人类免疫性疾病。

MN 血型分布具有明显的地区与人类种族间的差异, 在分子水平上, 已有研究确定了 GPA 的结构和分子遗传基础, 同时证明 MNS 血型基因家族具有明显的多样性模式^[10-13]。MNS 血型的高度多态性, 主要由高度同源的 GYPA, GYPB 和 GYPE 基因之间的重组以及单核苷酸变化产生的多态抗原组成, 不同地区人群 GYPA 基因单核苷酸的变异会构成该区域人群的种族 MN 血型基因多态性特征^[14]。

决定 MN 血型抗原的相关基因 GYPA 由 7 个

外显子组成,红细胞膜中成熟的 GPA 仅由 GYPA 基因外显子 2 ~ 7 编码,每个红细胞中大约表达 2.5×10^5 个 GPA 糖蛋白^[15-17]。区分 M, N 抗原的血型糖蛋白在 GPA 的第 1 位和第 5 位氨基酸 (M:Ser1/Gly5, N:Leu/Glu5), 两个氨基酸均位于 GYPA 基因的第 2 外显子区间^[18]。遗传过程中 GYPA 基因与 GYPB 基因同源区域的交叉或转换会产生不同的混合型糖蛋白基因,这些基因编码的糖蛋白表现为不同的 MNS 变异表型^[19]。广西贵港地区人群的调查研究采用了血型血清学与碱基测序的方法分析了 GYPA 的第 2 外显子,并根据 GYPA 的第 2 外显子的碱基序列区分出 MN 型杂合子,MM 型纯合子与 NN 型纯合子。根据贵港地区人群 MN 血型抗原的定量检测发现:M 与 N 抗原在不同个体中具有明显的剂量效应,同时发现了广西贵港地区 M 基因频率明显偏高, N 基因频率相对较低的分布特征,这与中国新疆哈萨克族人群的 MN 血型基因频率接近^[6],与西安地区人群、贵州地区的布依族人群、广东河源地区人群、广东深圳地区人群的 MN 型基因频率均有差异^[5,7-9]。这说明:MN 血型存在地区的多态性特征,如果广西贵港地区的患者血浆中存在抗 -M 不规则抗体时,较难筛选到 M 抗原阴性的血液,因为 NN 型纯合子的频率只有 13%,这将给临床输血带来一定的困扰,以上结论是本研究的应用价值及推广性。随机选择广西贵港地区的 300 例人群从基因测序结果证实了 GYPA 基因第 2 外显子碱基序列的鉴定结果与抗 -M、抗 -N 抗体血清检测分型一致,而且未发现 GYPA 的第 2 外显子中存在特异性突变,其他外显子的碱基是否有异常表达有待进一步的研究。

综上,通过对广西贵港地区人群 MN 血型基因频率的调查分析和 GYPA 第 2 外显子结构特征的了解,明确了广西贵港地区人群的 MN 基因多态性,为临床输血前 MN 同型输血的储备用血做好铺垫,为广西贵港地区的器官移植、新生儿免疫性溶血性疾病的诊断、法医学鉴定以及群体遗传关系和种族迁移等领域的研究奠定了基础。基于 MN 血型的地域性特征比较明显,可能还有相关基因的碱基突变未被发现,有待增加标本量对广西贵港地区人群的 MN 血型进行深入与更广泛的研究。

参考文献:

- [1] ISHIDA A, OHTO H, YASUDA H, et al. Anti-M antibody induced prolonged anemia following hemolytic disease of the newborn due to erythropoietic suppression in 2 siblings[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2015, 37(6):e375-377.
- [2] WU K H, CHU S L, CHANG J G, et al. Haemolytic disease of the newborn due to maternal irregular antibodies in the Chinese population in Taiwan[J]. Transfusion Medicine, 2003, 13(5):311-314.
- [3] 梁延连, 苏宇清, 张印则. GPA, GPB 分子相关基因 GYPA, GYPB 外显子全长序列直接测序方法的建立及应用评价 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2013, 36 (2) : 102-105.
LIANG Yanlian, SU Yuqing, ZHANG Yinze. New DNA direct sequencing method of the GPA and GPB related gene GYPA, GYPB exons overall length[J]. International Journal of Blood Transfusion and Hematology, 2013, 36 (2) : 102-105.
- [4] 梁延连, 苏宇清, 喻琼, 等. 中国汉族人群红细胞 MNS 血型系统 M、N 抗原数量表达的研究 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2010, 33(5):391-394.
LIANG Yanlian, SU Yuqing, YU Qiong, et al. Study of the M and N antigen's quantities on the red cells of the MNSs human blood group in Chinese han population[J]. International Journal of Blood Transfusion and Hematology, 2010, 33 (5) : 391-394.
- [5] 彭进, 梁延连, 徐华, 等. 西安地区献血人群 MNS 血型基因多态性研究 [J]. 中国输血杂志, 2017, 30(6):590-592.
PENG Jin, LIANG Yan-lian, XU Hua, et al. Analysis of genetic polymorphism of blood donors in Xi'an based on the MNS human blood group system[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2017, 30 (6) : 590-592.
- [6] 虞彬, 单金晶, 张雅楠, 等. 中国新疆哈萨克族人 9 种稀有血型系统基因频率分布状况 [J]. 解放军预防医学杂志, 2008, 36 (1) : 4-10.
YU Bin, SHAN Jinjing, ZHANG Yanan, et al. Distribution of gene frequencies of nine rare blood groups in Kazak[J]. Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army, 2008, 36 (1) : 4-10.
- [7] 梁延连, 黄敏, 宋飞峰 等. 贵州地区布依族人群 MNS 血型基因 GYPA 和 GYPB 的群体遗传学研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3): 38-41.
LIANG Yanlian, HUANG Min, SONG Feifeng, et al. Study on the population genetics of GYPA and GYPB gene about the MNS blood group in Guizhou Buyi nationality[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(3): 38-41.
- [8] 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 Lu, CHEN Lihong, ZHUANG Yunfang, et al. Gene frequencies of MN blood group in Heyuan, Guangdong[J]. International Medicine and Health Guidance News, 2014, 20(14):2052-2054.
- [9] 张艳艳, 梁延连, 苏宇清 等. 广东省深圳地区汉族人群 MN 血型表现型的特点及基因频率调查 [J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(6):59-62.
ZHANG Yanyan, LIANG Yanlian, SU Yuqing, et al. Characteristic phenotype and gene frequencies of MN blood group in han population of Guangdong-Shenzhen Area [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2009, 24(6):59-62.