

ABO*BEL.11 等位基因突变致红细胞 B 抗原弱表达的家系血型血清学及分子机制研究

洪 毅 (西安高新医院输血科, 西安 710075)

摘要: 目的 探讨由 ABO*BEL.11 等位基因导致的 ABO 正反定型不符样本及家系的血清学和分子生物学特性, 研究其遗传方式。方法 常规血型血清学方法和吸收放散试验鉴定样本的 ABO 血型表型; PCR 方法扩增 ABO 基因 7 个外显子及其侧翼内含子, 对扩增产物进行直接测序和克隆测序分析, 并对先证者的亲属进行家系调查。结果 先证者血型血清学结果为 B 弱; 测序显示: 存在 ABO*B.01/O.01.01 杂合且伴 c.586C/T 突变; 克隆测序: c.261delG, 297A>G, c.526C>G, c.586T>C, c.657C>T, c.703G>A, c.796C>A, c.803G>C 和 c.930G>A 共 9 个突变, 基因型结果为 ABO*BEL.11/O.01.01。家系调查显示先证者父亲、母亲、妻子和女儿血型血清学结果分别为 B 型、O 型、A 型及 B 弱, 其中先证者父亲及女儿的 ABO 基因存在 ABO*BEL.11 等位基因。结论 ABO*B.01 等位基因上 c.586T>C 的突变产生 ABO*BEL.11 等位基因, 从而导致红细胞上 B 抗原的弱表达, 且能够稳定遗传突变。

关键词: ABO 血型; 表型; 等位基因; 家系调查

中图分类号: R457.1; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 01-161-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2023.01.030

Serology and Molecular Mechanism of Family Blood Group with Weak Expression of Erythrocyte B Antigen Caused by ABO*BEL.11

HONG Yi (Department of Blood Transfusion, Xi'an High-Tech Hospital, Xi'an 710075, China)

Abstract: **Objective** To investigate the serological and molecular biological characteristics of ABO positive and negative stereotypes and lineages caused by ABO*BEL.11 alleles, and study their genetic patterns. **Methods** The ABO blood group phenotype of the samples was identified by conventional blood group serology and absorption-elution test. The seven exons and their flanking introns of the ABO gene were amplified by PCR, and the amplified products were analyzed by direct sequencing and cloning sequencing. A pedigree investigation was carried out on the relatives of the proband. **Results** The blood group serology of the proband was Bweak. Sequencing showed that there was: ABO*B.01/O.01.01 heterozygosity with c.586C/T. Clone sequencing were c.261delG, c.297A>G, c.526C>G, c.586T>C, c.657C>T, c.703G>A, c.796C>A, c.803G>C and c.930G>A, a total of 9 mutations, and the genotype result was ABO*BEL.11/O.01.01. The pedigree investigation showed that the blood group serological results of the proband's father, mother, wife and daughter were B, O, A and B weak, and the ABO*BEL.11 allele existed in the ABO gene of the proband's father and daughter. **Conclusion** The mutation of c.586T>C on the ABO*B.01 could generate the ABO*BEL.11, resulting in weak expression of B antigen on erythrocytes. It can stabilize genetic mutation.

Keywords: ABO blood group; phenotype; allele; pedigree investigation

人类红细胞血型系统最重要的血型系统就是 ABO 血型系统, 在该系统中除 A, B, O 及 AB 常见表型外, 还存在一些少见的 ABO 亚型, 这些亚型有一定的遗传基础以及明确的血清学特点, 主要特点为因抗原表达减弱造成 ABO 血型正反定型不符, 导致血型鉴定困难引发血型错判或交叉配血不合^[1-2]。ABO 基因的位置在人类第 9 号染色体 9q34.1-q34.2, 长度约有 19.5kb, 其中编码区有 1 062bp 长, 由 7 个外显子和 6 个内含子组成, 编码 354 个氨基酸, 其中外显子 6 和 7 对糖基转移酶的活性有着重要作用^[3]。近年来血型基因分型技术的发展为 ABO 亚型及稀有血型的检测提供了新的方

向。在临床血型鉴定工作中遇到 1 例血清学血型为 B 弱, 基因型为 ABO*BEL.11/O.01.01 的标本, 国内关于 ABO*BEL.11 导致 B 抗原弱表达的相关报道较少, 本研究对此样本进行了 ABO 血型血清学检测及基因分析和家系调查, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 男性患者, 汉族, 45 岁, 无输血史。ABO 血型常规卡式鉴定发现正反定型不符。征得患者本人和其家系成员知情同意后, 采集先证者、先证者父亲、母亲、妻子及其女儿 EDTA-K2 抗凝血各 5ml。

1.2 仪器与试剂 ABO 血型卡 (瑞士达亚美有限

公司,批号:50093.03.24);抗A,B定型试剂、抗-A1,抗-H及人ABO反定型用红细胞(上海血液生物医药有限责任公司,批号:20201018,20201125,20200422,20210801007);血液基因组DNA提取离心柱型试剂盒(Roche,德国);Taq酶(0000328560, Promega Corporation, 上海);DL2000(AL14425A, TaKaRa Bio Inc, 日本)。离心机(ID-Centrifuge 12 S II, 瑞士达亚美有限公司);孵育器(ID-Incubator 37 SI 瑞士达亚美有限公司);全自动血型检测仪(型号: IH-1000, 瑞士达亚美有限公司);台式离心机(KA-2200型, 日本久保田);PCR扩增仪(Sensoquest Labcycler, 德国);水浴箱(GFL 1004, 德国);全自动血细胞洗涤离心机(MC 450, 日本日立);台式离心机(L600A, 湖南湘仪离心机仪器有限公司)。试验中扩增所使用的引物^[3]交由公司合成。

1.3 方法

1.3.1 血型血清学试验: ABO正反定型的初次检测使用达亚美全自动血型仪进行,按文献[4]方法,采用试管法进行ABO正反定型试验的复检,同时先证者及其女儿的ABO血型使用吸收放散试验的方法进行确认。

1.3.2 DNA制备: 使用德国Roche血液基因组DNA离心柱型提取试剂盒从EDTA-K₂抗凝血中提取先证者及各家系成员样本基因组DNA。

1.3.3 基因分型: 方法按照文献[5]方法,对先证者及各家系成员样本ABO基因的7个外显子及侧翼序列进行特异性扩增后直接测序,同时先证者及其父亲、女儿样本的外显子6,7进行克隆测序。引物合成和产物的测序由生工生物工程(上海)股

份有限公司西安测序部完成。

1.3.4 序列比对与分析: 使用Chromas软件阅读分析测序图谱,与GenBank中ABO基因的参考序列(NG_006669.1)进行比较,分析确认各样本的基因型。

1.3.5 家系调查: 先证者父亲、母亲、妻子及女儿的血液标本分别进行ABO血型检测及ABO基因的外显子测序。

2 结果

2.1 血型血清学检测结果 见表1。先证者与其女儿试管法ABO正定型抗-A,抗-B,抗-AB,抗-A1无凝集,与抗-H反应强凝集,反定型A1c强凝集,Bc,Oc和自身细胞均不凝集,吸收放散试验显示红细胞上存在有B抗原,血型血清学结果为:B弱。先证者父亲、母亲、妻子的ABO血型正反定型相符,分别为B型、O型、A型。

2.2 ABO基因测序结果 与ABO**A1.01*等位基因标准序列一一比对,先证者ABO基因外显子1~5测序未发现存在突变位点,外显子6,7发现存在有突变位点。直接测序:ABO*B.01/O.01.01杂合且存在c.586C>T突变;克隆测序: c.261delG, c.297A>G, c.526C>G, c.586T>C, c.657C>T, c.703G>A, c.796C>A, c.803G>C 和 c.930G>A 共计9个突变位点,与ABO*B.01等位基因比对,该序列仅有c.586T>C的突变,该位点的突变导致p.C196R的改变,基因型结果判定为ABO*BEL.11/O.01.01。先证者父亲、母亲、妻子、女儿基因型结果分别为:ABO*B.01/BEL.11, ABO*O.01.01/O.01.02, ABO*A1.01/O.01.02和ABO*BEL.11/O.01.02。

表1 血型血清学检测结果

类别	正定型					反定型			吸收放散试验	自身对照
	抗-A	抗-B	抗-AB	抗-A1	抗-H	A1c	Bc	Oc	Bc	
先证者	0	0	0	0	4+	4+	0	0	2+ _s	0
父亲	0	4+	4+	0	3+	4+	0	0	/	0
母亲	0	0	0	0	4+	4+	4+	0	/	0
妻子	4+	0	4+	4+	2+w	0	4+	0	/	0
女儿	0	0	0	0	4+	4+	0	0	2+	0

注: “w”=weak; “s”=strong; “/”=未做

2.3 家系调查 家系调查显示先证者c.586T>C的突变产生的ABO*BEL.11等位基因来自父亲一方,女儿ABO基因型中有ABO*BEL.11单倍体的存在,说明其可稳定的遗传给女儿(家系调查图谱见图1)。

3 讨论

ABO血型是由奥地利学者LANDSTEINER K于1900年发现的。ABO血型抗原是ABO基因的

“第二产物”,是由糖基转移酶催化的糖生物化学合成反应的结果。ABO基因于1990年被克隆鉴定,长度约为19.5 kb,有一个1 062 bp的编码区以及7个外显子和6个内含子。其中外显子6和7、外显子的边缘序列、增强子(CBF/NF-Y,约-3800 bp)和ABO的启动子(在-149和-2 bp之间)对糖基转移酶的催化活性至关重要,他们的变化不仅可以

改变 ABO 基因的表达和糖基转移酶活性, 还能影响 ABO 抗原的表达强弱^[6]。ABO 亚型的出现主要是由于糖基转移酶基因 EXON 6, 7 存在的突变引起对应的糖基转移酶出现活性降低或活性改变, 从

而导致了红细胞膜上的 A 或 B 抗原的数量减少或种类变化的表达, 导致血型血清学实验常出现正反定型不符^[7]。

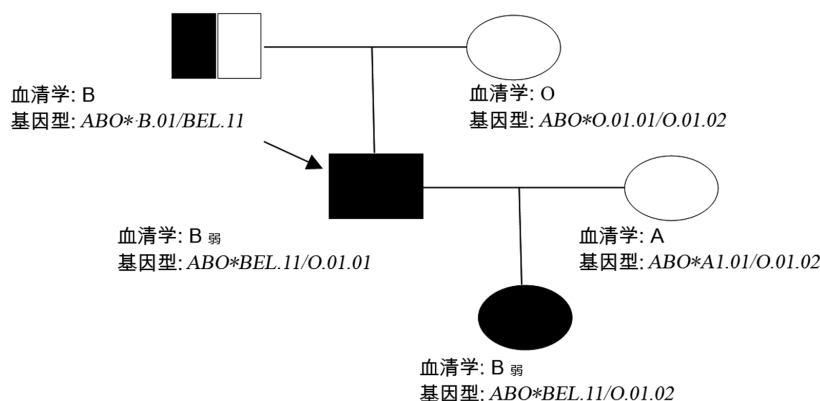


图1 家系图谱

在 ABO 血型系统中, 抗原表达较弱的型别被称为 ABO 亚型。目前发现的 ABO 等位基因有 400 多种, 多是由 ABO 基因上有 1 个或几个核苷酸的变化所引起的, 如碱基的替换、插入、缺失以及基因的重组等^[8]。目前 B 亚型表型已由国际输血协会 (ISBT) 确认的主要是 B3, Bx, Bm 和 Bel, 其中 B3, Bx, Bm 都可以和抗 B 抗体发生弱凝集, 在唾液中能检测到 B 和 H 血型物质的存在; Bel 亚型唾液中仅能检测到 H 血型物质, 红细胞上的 B 抗原不能通过常规的血清学检测发现, 只能通过更加灵敏的吸收放散试验检测发现^[9]。Bel 型基因学特点主要是糖基转移酶基因的 EXON 7 发生点突变后致酶的催化活性降低, 最终导致 B 抗原的弱表达。

本研究中先证者及其女儿血型血清学反应格局正定型为 O 型, 反定型为 B 型, 正反定型结果不符, 不能准确判定其血型, 故进行吸收放散试验, 同时对 ABO 基因进行了测序分析。经吸收放散试验及基因测序证实先证者与女儿的 ABO 血清学结果为 B 弱, 基因型分别为 *ABO*BEL.11/O.01.01* 和 *ABO*BEL.11/O.01.02*。先证者父亲、母亲、妻子 ABO 血型正反定型相符, 基因测序发现先证者父亲携带 *ABO*BEL.11* 等位基因, 因其另一等位基因为 *ABO*B.01*, 故血清学表现为 B 型。*ABO*BEL.11* 的产生是因为 ABO 基因的第 7 外显子出现 c.586T>C 突变造成的。该突变导致氨基酸第 196 位半胱氨酸 (Cys, C) 被精氨酸 (Arg, R) 替换, 半胱氨酸为极性不带电荷氨基酸, 精氨酸为极性碱性氨基酸, 氨基酸电荷的变化可能导致对水亲和力的改变, 最终引起 B 糖基转移酶活性的改变, 使 B 抗原的表达减弱。

当日常工作中遇到 ABO 正反定型不符的标本

时, 可使用不同厂家的抗 A 抗 B 血清进行 ABO 血型正定型检测, 必要时进行吸收放散试验, 有条件的实验室可以进行基因分析来判定样本的 ABO 血型^[10]。ABO 亚型抗原的结构、性质以及红细胞膜表面抗原的数量和正常 ABO 血型抗原都存在有差异, 导致差异的原因为基因突变、糖基转移酶的数量与活性变化、底物等。本研究只从基因突变的方面探讨了 *ABO*BEL.11* 导致 B 抗原弱表达的分子机制, 后期将从 mRNA 的表达水平以及糖基转移酶活性等方面继续展开, 进一步研究 *ABO*BEL.11* 与 B 抗原弱表达的相关性。对 ABO 亚型分子机制的研究有利于正确认识 ABO 亚型以及亚型的检测方法, 把常规检测的血型血清学技术与分子生物学的血型基因分型技术有机结合, 更准确地鉴定临床上遇到的疑难血型。总之, 两种方法互相补充, 可以有效地保障临床输血的安全性、有效性。

参考文献:

- [1] RAY S, GORAKSHAKAR A C, VASANTHA K, et al. Molecular genotyping of ABO blood groups in some population groups from India[J]. The Indian Journal of Medical Research, 2014, 139(1): 105-111.
- [2] 向东. ABO 亚型的检测 [J]. 中国输血杂志, 2010, 23(8): 577-580.
XIANG Dong. Detection of ABO subtypes[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2010, 23(8): 577-580.
- [3] ZHANG Yanan, WANG Nuochuan, TIAN Yongyi. Accurate cis AB typing is essential to ensure the safety of a transfusion: A case of a cisAB01 neurosurgery pediatric patient and family study [J]. Clin Case Rep, 2021, 9(10): e04940.
- [4] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检测操作规程 [S]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 118-143.
SHANG Hong, WANG Yusan, SHEN Ziyu. National

- Guide to Clinical Laboratory Procedures[S]. 4th ed. Beijing: People's Health Press, 2015:118-143.
- [5] ZUO Qinqin, DUAN Yong, WANG Baoyan, et al. Genomic analysis of blood samples with serologic ABO discrepancy identifies 12 novel alleles in a Chinese Han population[J]. Transfusion Med, 2020, 30(4): 308-316.
- [6] HATA Y, KOMINATO Y, YAMAMOTO F I, et al. Characterization of the human ABO gene promoter in erythroid cell lineage [J]. Vox Sang, 2002,82(1):39-46.
- [7] 冯晨晨, 史丽莉, 李慧, 等. c.955C>G 变异致 ABO 等位基因增强现象的研究及文献复习 [J]. 临床输血与检验, 2022, 22(2): 147-150.
- FENG Chenchen, SHI Lili, LI Hui, et al. A c.955C>G variation causing ABO allelic enhancement phenomenon :a case and literature review [J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2022, 22(2):147-150.
- [8] HULT A K, YAZER M H, JØRGENSEN R, et al. Weak a phenotypes associated with novel ABO alleles carrying the A2-related 1061C deletion and various missense substitutions[J]. Transfusion, 2010, 50(7): 1471-1486.
- [9] 孙嘉峰, 张爱, 杨晓俊, 等. Bel 亚型的鉴定及分析 [J]. 实用医技杂志, 2019, 26(11): 1375-1377.
- SUN Jiafeng, ZHANG Ai, YANG Xiaojun, et al. Identification and analysis of Bel subgroup of the ABO blood group [J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2019,26(11):1375-1377.
- [10] 左琴琴, 吴大洲, 赵京文, 等. 三种 ABO 血型定型试剂检测能力的评价 [J]. 中国输血杂志, 2019, 32(12): 1231-1233.
- ZUO Qinqin, WU Dazhou, ZHAO Jingwen, et al. Evaluation of detection ability for three ABO blood grouping reagents [J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2019,32(12):1231-1233.

收稿日期:2022-06-15

修回日期:2022-08-03

(上接第150页)

- XU Wanzhong, BAI Yanli, WANG Xiaoqi. Role of IL-6 gene polymorphism in predicting prognosis of elderly severe heart failure patients [J]. Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases, 2020,22 (7): 722-724.
- [9] 熊秋臻, 钟灵, 付静, 等. 慢性心力衰竭患者血清 sST2, IL-6 和肽素水平的变化及临床意义 [J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(24): 4673-4676.
- XIONG Qiucan, ZHONG Ling, FU Jing, et al. Changes and clinical significance of serum levels of sST2, IL-6 and peptide in patients with chronic heart failure [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2018,18 (24): 4673-4676.
- [10] 任继欣, 郭彦言. 外周血 HBP, IL-6, CD64 指数, PCT, CRP 和 SAA 水平检测在血流感染诊断中的应用价值研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(2): 56-59.
- REN Jixin, GUO Yanyan. Application value of peripheral blood HBP, Interleukin-6, CD64 index, PCT, CRP, SAA level detection in blood stream infection diagnosis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020,35 (2): 56-59.
- [11] 莉敏, 方斌, 方海啸, 等. 单胺氧化酶 A/B 亚型的活性检测在神经系统疾病诊疗中的应用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(9): 1052-1058.
- WANG Limin, FANG Bin, FANG Haixiao, et al. Application of activity detection of monoamine oxidase A/B subtype in diagnosis and treatment of nervous system diseases [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2020,25(9): 1052-1058.
- [12] 李斌, 张鹏. 血清透明质酸, IV 型胶原, 单胺氧化酶及转化生长因子 $\beta 1$ 联合检测对肝纤维化的诊断价值分析 [J]. 实用医院临床杂志, 2019, 16(5): 37-39.
- LI Bin, ZHANG Peng. The diagnostic value of combined detection of serum HA, IV -C, MAO and TGF- $\beta 1$ for liver fibrosis [J]. Practical Journal of Clinical Medicine, 2019,16 (5): 37-39.
- [13] 阚民强, 杨润华, 时良玺, 等. 单胺氧化酶 B 抑制剂对急性脑出血患者 APACHE II 评分和 GCS 评分的影响 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2017, 25(11): 704-706.
- KAN Minqiang, YANG Runhua, SHI Liangxi, et al. Effect of APACHE II and GCS scores in patients with acute intracerebral hemorrhage by monoamine oxidase B inhibitor [J]. Journal of Brain and Nervous Diseases, 2017,25 (11): 704-706.
- [14] WANG Tao, GAO Wen, XIAO Kun, et al. Interaction between interleukin-6 and angiotensin II receptor 1 in the hypothalamic paraventricular nucleus contributes to progression of heart failure[J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 15(6): 4259-4265.
- [15] 王大强, 王革新, 张庆远, 等. 血清 TNF- α 与 IL-6 和 BNP 指标在检测心力衰竭合并感染患者中的应用价值分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(21): 3219-3221.
- WANG Daqiang, WANG Gexin, ZHANG Qingyuan, et al. Value of serum TNF- α , IL-6 and BNP in diagnosis of heart failure patients complicated with infection [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2018,28 (21): 3219-3221,3125.

收稿日期:2021-04-20

修回日期:2022-09-14