

## 2例ABO变异型Bw27亚型鉴定及基因测序与GTB空间结构分析研究

耿欣冉<sup>1</sup>, 田军<sup>2</sup>, 高占喜<sup>3</sup>, 苏佳怡<sup>2</sup>, 阎培培<sup>2</sup>, 郑娟娟<sup>2</sup>(1. 德州市妇幼保健院检验科, 山东德州 253011; 2. 山东大学齐鲁医院德州医院输血科, 山东德州 253000; 3. 德州市中心血站血型参比实验室, 山东德州 253055)

**摘要:** 目的 2例ABO变异型Bw27亚型的鉴定及相关分子机制研究。方法 通过血型血清学方法分析2例Bw亚型; 对其ABO基因第1~7外显子进行基因测序, 利用DynaMut在线分析野生型和突变型B糖基转移酶(GTB)的3D分子模型, 预测突变对酶稳定性的变化; 使用PyMOL软件进行可视化。结果 2例标本ABO血型鉴定符合Bw亚型, 基因型分别为Bw27/O.02, Bw27/O.01, 测序发现均存在c.905A>G杂合变异, 导致多肽链Asp302Gly替换; 通过对GTB空间结构分析, 认为D302G置换影响了第302位氨基酸与Ser-304, His-305的分子间作用力。结论 鉴定2例Bw27亚型, 其D302G的置换影响了蛋白稳定性, 导致酶活性异常, 从而引起血清学上B抗原表达减弱。

**关键词:** ABO血型; Bw27亚型; 基因测序; 分子模型

**中图分类号:** R457.11; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)01-128-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2026.01.024

### Identification, Gene Sequencing and GTB Spatial Structure Analysis of 2 Cases of ABO Variant Bw27 Subtype

GENG Xinran<sup>1</sup>, TIAN Jun<sup>2</sup>, GAO Zhanxi<sup>3</sup>, SU Jiayi<sup>2</sup>, YAN Peipei<sup>2</sup>, ZHENG Juanjuan<sup>2</sup> (1. Department of Clinical Laboratory, Maternity & Child Care Center of Dezhou, Shandong Dezhou 253011, China; 2. Department of Blood Transfusion, Qilu Hospital of Shandong University Dezhou Hospital, Shandong Dezhou 253000, China; 3. Blood Group Reference Laboratory, Dezhou Blood Center, Shandong Dezhou 253055, China)

**Abstract: Objective** To identify and investigate the molecular mechanism of 2 cases of ABO Variant Bw27 subtype. **Methods** Two cases of Bw subtype were analyzed by blood group serological methods. Exons 1 to 7 of the ABO gene were sequenced, and 3D molecular models of wild type and mutant B glycosyltransferase (GTB) were analyzed online by DynaMut to predict the changes of enzyme stability. Visualization using PyMOL software. **Results** ABO blood group identification of the 2 samples matched Bw subtype, and the genotypes were Bw27/O.02 and Bw27/O.01, respectively. The gene sequencing showed that there was a heterozygous mutation c.905A>G, which led to the substitution of polypeptide chain Asp302Gly. By analyzing the spatial structure of GTB, it was concluded that D302G displacement affected the intermolecular force between the 302nd amino acid with Ser-304 and His-305. **Conclusions** Two cases of Bw27 subtype are identified, and the substitution of D302G affects protein stability, resulting in abnormal enzyme activity and weakened B antigen expression in serology.

**Keywords:** ABO blood group; Bw 27 subtype; gene sequencing; molecular model

ABO血型系统在输血安全中具有重要的临床意义, 其常规检测以血清学方法为主。ABO亚型是ABO血型的弱表现型, 既有遗传学基础, 又有明确的血清学特点<sup>[1]</sup>。人类ABO血型抗原由特定的糖基转移酶决定, 其中B基因产生糖基转移酶B(glycosyltransferase B, GTB), 可使D-半乳糖连接到H物质的糖末端转变为B抗原<sup>[2]</sup>, B抗原变异的主要原因是由 $\alpha$ -1,3半乳糖基转移酶基因变异导致<sup>[3]</sup>。由于ABO基因变异使相应氨基酸改变, 导致A或B抗原表达减弱, 使常规血清学方法检测出现正反定型不一致的情况, 造成血型鉴定困难。分子生物学技术已成为疑难血型尤其是亚型鉴定的重要方法。

本研究对2例ABO变异型Bw27亚型进行报道, 并利用生物信息学对其GTB空间结构进行分析。

#### 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 例1为21岁女性, 妇科患者, 临床诊断“输卵管扭转”; 例2为27岁女性, 产科患者, 临床诊断“妊娠状态”。两位患者ABO血型常规鉴定时发现正反定型不一致, 分别征得知情同意后在随机状态下采集EDTA抗凝血2ml, 进行分子生物学检测。本研究通过了山东大学齐鲁医院德州医院医学伦理委员会的批准(2024072)。

**1.2 仪器与试剂** 全自动血型分析仪(型号: Microlab STARlet IVD, 瑞士HAMILTON), 恒温水

**作者简介:** 耿欣冉(1990-), 女, 主管技师, 硕士研究生, 研究方向: 临床输血与分子生物学, E-mail: 977530856@qq.com。

**通讯作者:** 郑娟娟(1991-), 女, 主管技师, 硕士研究生, 研究方向: 临床输血与分子生物学, E-mail: dzzhengjuanjuan@163.com。

浴箱(型号: XMD-6000, 北京长风仪器仪表公司), PCR仪(型号: nexus GX2, 美国Eppendorf), DNA测序仪(型号: ABI 3730XL, 美国ThermoFisher); 电泳仪(型号: DYY-5D, 北京六一生物科技), 凝胶成像系统(型号: GenoSens1810, 上海勤翔科学仪器有限公司)。ABO和RhD血型定型检测卡(单克隆抗体)(批号: 20230604, 长春博迅生物技术有限责任公司); 抗A、抗B血型定型试剂(单克隆抗体)(批号: 20240301, 上海血液生物医药有限责任公司); 人ABO血型反定型用红细胞试剂盒(批号: 20245335, 上海血液生物医药有限责任公司); 基因组DNA小量试剂盒(批号: 220822KC3, 苏州优逸兰迪生物科技有限公司); ABO血型外显子1~7 PCR引物及测序引物(上海生工生物工程股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 血清学实验: 微柱凝胶卡式法按照厂家说明书操作, 由全自动血型分析仪完成加样并判读; 采用手工试管法进行ABO血型正反定型复核, 操作步骤及结果判读严格按SOP文件和文献方法进行<sup>[4-5]</sup>。

1.3.2 基因检测: 使用DNA提取试剂盒提取样本全血基因组DNA, 分别使用ABO基因外显子1~7

引物进行PCR扩增。扩增程序: 94℃预变性5min; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 60s, 共35个循环; 72℃延伸5min。扩增产物经琼脂糖电泳检测条带均一旦清晰后, 使用DNA测序仪进行Sanger测序。测序序列使用SnapGene 6.0.2软件与ABO基因参考序列(NG\_006669.2)进行比对, 参照国际输血协会(International Society of Blood Transfusion, ISBT)数据库确定基因型及命名。

1.3.3 蛋白结构分析: 对ABO\*B基因突变c.905A>G导致的GTB突变体GTB-p.Asp302Gly进行蛋白质空间结构分析。GTB突变体以野生型GTB(PDB ID: 1LZ7)的三维分子结构作为基础模型。通过在线网站DynaMut (<https://biosig.lab.uq.edu.au/dynamut/>)对突变后的Bw27转移酶进行热力学稳定性改变(ΔΔG)的计算, ΔΔG值为负值意味着变异会降低蛋白质的结构稳定性, 而正值表明蛋白质热力学结构稳定<sup>[6]</sup>。再由PyMOL软件对野生型和突变型GTB可视化处理。

2 结果

2.1 血清学检测 2例患者的ABO血型血清学结果十分相似, 均表现为正定型B抗原减弱, 同时反定型存在抗-B抗体, 与抗-H抗体反应增强, 见表1。

表1 2例患者的ABO血型血清学结果

	检测方法	正定型					反定型			
		抗-A	抗-B	抗-D	抗-AB	抗-H	Alc	Bc	Oc	自身c
例1	微柱法	-	2+	4+	/	/	4+	2+	/	-
	试管法	-	3+	/	2+	3+	4+	2+	-	-
例2	微柱法	-	2+	4+	/	/	4+	1+	/	-
	试管法	-	2+	/	2+	3+	4+	1+	-	-

注: “+”=凝集强度; “”=strong; “/”=未做。

2.2 DNA测序分析 对2例患者的血液标本提取DNA并对1~7外显子进行测序, 结果与A1.01序列比对, 例1结果显示存在106G>T杂合、188G>A杂合、189C>T杂合、220C>T杂合、261delG杂合、297A>G纯合、526C>G杂合、646T>A杂合、657C>T杂合、681G>A杂合、703G>A杂合、771C>T杂合、796C>A杂合、

803G>C杂合、829G>A杂合、905A>G杂合、930G>A杂合; 例2结果显示存在261delG杂合、297A>G杂合、526C>G杂合、657C>T杂合、703G>A杂合、796C>A杂合、803G>C杂合、905A>G杂合、930G>A杂合。通过GeneBank序列比对确认, 例1基因型为Bw27/O.02, 例2基因型为Bw27/O.01, 见表2。

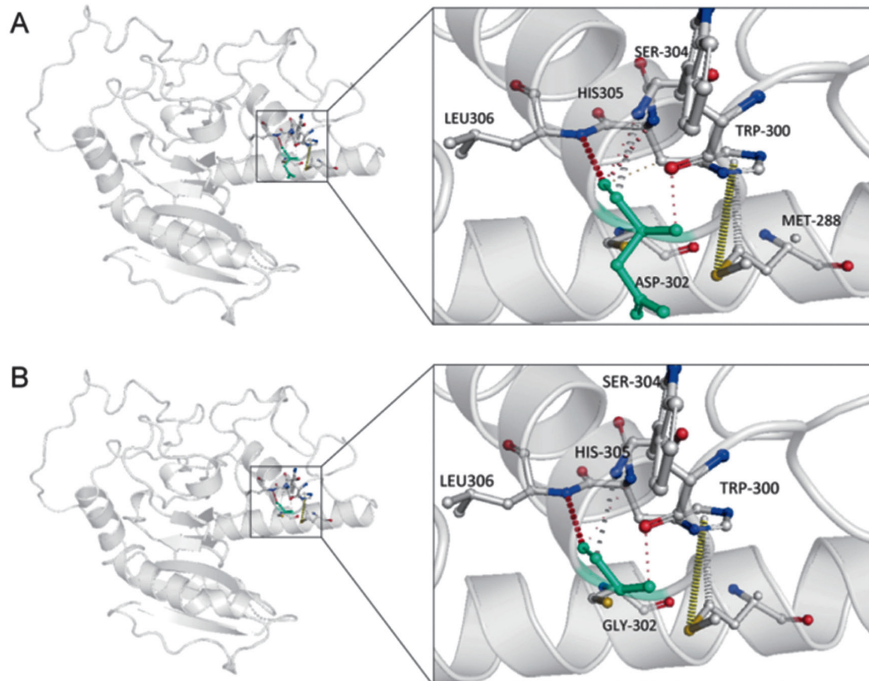
表2 2例患者的ABO基因测序结果

外显子	3	4	4	5	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
碱基位置	106	188	189	220	261	297	526	646	657	681	703	771	796	803	829	905	930	
A1.01	G	G	C	C	G	A	C	T	C	G	G	C	C	G	G	A	G	
B.01						G	G		T		A		A	C			A	
O.01					/													
O.02	T	A	T	T	/	G		A		A		T			A			
Bw27							G		T		A		A	C		G	A	
例1	T	A	T	T	/	G	G	A	T	A	A	T	A	C	A	G	A	
例2					/	G	G		T		A		A	C		G	A	

注: “/”表示“缺失”。

2.3 GTB空间模型结构分析 Bw27转移酶中D302G改变后  $\Delta \Delta G$  为  $-0.487 \text{ kcal/mol}$ , 提示该突变导致酶结构的热力学稳定性降低。野生型GTB和GTB突变体的局部催化位点的空间结构模型如图1

所示, D302G置换使 Asp-302与 Ser-304相连的1个氢键和1个水介导的氢键断开, Asp-302与 His-305相连的1个弱氢键也断开。



A为野生型GTB, 302位为Asp; B为突变型GTB, 302位为Gly; 图中绿色为野生型和突变型氨基酸残基, 旁边是参与任何形式的相互作用的周围残基; 红色虚线为氢键。

图1 GTB突变前后三维结构模型图

### 3 讨论

ABO血型鉴定中, 由于ABO亚型的抗原性较弱, 导致血清学试验出现血型正反定型不一致, 给输血工作造成困难, 影响临床治疗。国际输血协会依据血清学特征, 将B亚型分为B3、Bx、Bm和Bel, 将不符合上述4种亚型标准的其他弱B统称为Bw型<sup>[1]</sup>。Bw的遗传背景几乎都来自于B.01基因, 是一类频率相对较高的B变异型, 而且大多数都是由单个核苷酸的突变所致<sup>[6]</sup>。国内检出的Bw亚型有Bw03、Bw07、Bw11、Bw12和Bw34等<sup>[1,6-7]</sup>。我们首次报道了Bw27的检出特性, ABO基因检测结果显示其第7外显子存在c.905A>G杂合改变, 作为Bw亚型的一个补充。

不同的氨基酸在蛋白质结构中可能起着不同的作用<sup>[8]</sup>。三维分子结构模拟和分析蛋白质结构变异对于深入了解蛋白质变化的潜在机制至关重要。我们通过模拟GTB蛋白结构发现, 其302位氨基酸Asp被Gly替换, 而Gly体积相对于Asp的体积更小, 这使得GTB突变体GTB-p.Asp302Gly较野生型GTB具有更小且构象受限的活性位点。原本302位Asp与304位Ser相连的1个氢键和1个水介导的氢键断开; 302位Asp与305位His相连的1个弱氢键也断开, 而氨基酸残基与水分子介导产生的氢键, 在稳定蛋白质结

构上发挥重要作用<sup>[9-10]</sup>。我们推断, 这种取代可能改变了空间结构, 影响了糖基转移酶的稳定性或特异性, 进而导致GTB与抗B抗体结合减弱。因此, 通过对Bw27转移酶结构分析, 推测其形成的可能机制是c.905A>G突变后, 蛋白稳定性发生了改变, 导致酶活性异常, 从而引起血清学上B抗原表达减弱的表现。

考虑到Bw亚型血清中存在抗-B抗体, 临床输血治疗中, 若患者符合自体输血条件时, 首选自体血; 输注异体红细胞时, 建议输注O型洗涤红细胞; 输注血浆以及血小板时, 可选择AB型或Bw亚型对应的B型血浆及血小板<sup>[4,7]</sup>。由于条件限制, 未能对2例患者家系中Bw27亚型基因遗传展开调查, 是本研究的不足之处。

综上所述, 临床工作中为防止亚型漏判, 血型定型时必须做正反定型, 并注意红细胞与抗体凝集的程度。正反定型不一致时, 可进一步行血清学的吸收放散实验, 或联合应用分子生物学技术进行诊断, 也可借助生物信息学手段加深对亚型分子机制的研究, 推动输血医学发展。

#### 参考文献:

- [1] 陈静思, 袁雯靖, 贺冰冰, 等. 三例罕见ABO变异型Bw亚型的基因鉴定及序列分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2022, 39(9): 1021-1024.

- CHEN J S, YUAN W J, HE B B, et al. Genetic identification and sequence analysis of three individuals of rare ABO variant Bw subgroup[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2022, 39(9): 1021-1024.
- [2] 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.
- [3] YAMAMOTO F, MARKEN J, TSUJI T, et al. Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc alpha 1-2Gal alpha 1-3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA[J]. the Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(2): 1146-1151.
- [4] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[S]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 117-139.  
SHANG H, WANG Y S, SHENG Z Y National guide to clinical laboratory procedures[S]. 4th Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015: 117-139.
- [5] 李义深, 李好蓉, 张文菊, 等. 3例ABO血型鉴定正反不符患者基因序列分析——附1个新的ABO等位基因突变点位的发现[J]. 中国输血杂志, 2022, 35(10): 1075-1077.  
LI Y S, LI Y R, ZHANG W J, et al. Gene sequencing of three cases with discrepant ABO blood group identification results including discovery of a new ABO allele mutation[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2022, 35(10): 1075-1077.
- [6] 孔永奎, 朱鹏飞, 刘欣, 等. p.Arg352Gln突变对Bw07转移酶影响的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2024, 47(3): 286-292.  
KONG Y K, ZHU P F, LIU X, et al. Studies on the effect of the p.Arg352Gln mutation on Bw07 transferase[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2024, 47(3): 286-292.
- [7] 黄明珠, 孟祥红, 亢晓薇. Bw03/o2亚型一例报告[J]. 北京医学, 2023, 45(4): 356, 359.  
HUANG M Z, MENG X H, KANG X W. A case report of Bw03/o2 subtype[J]. Beijing Medical Journal, 2023, 45(4): 356, 359.
- [8] SHAO L N, YANG Y C, XIA Y X, et al. Novel missense mutation c.797T>C (p.Met266Thr) gives rise to the rare B(A) phenotype in a Chinese family[J]. Vox Sanguinis, 2024, 119(4): 383-387.
- [9] DARBY J F, HOPKINS A P, SHIMIZU S, et al. Water networks can determine the affinity of ligand binding to proteins[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(40): 15818-15826.
- [10] 刘昕, 王莲慧, 徐秀云, 等. ABO基因第6外显子c.278C>T突变导致BW.12亚型的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2022, 30(5): 1557-1561.  
LIU X, WANG L H, XU X Y, et al. Study on BW.12 subtype caused by c.278C>T mutation in exon 6 of ABO gene[J]. Journal of Experimental Hematology, 2022, 30(5): 1557-1561.

收稿日期: 2024-11-09

修回日期: 2024-12-13

## (上接第115页)

- rifampicin or isoniazid based on gene chip technology[J]. Anti-Infection Pharmacy, 2023, 20(10): 1108-1112.
- [12] KANJI A, HASAN R, HASAN Z. Efflux pump as alternate mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Indian Journal of Tuberculosis, 2019, 66(1): 20-25.
- [13] LI H R, YUAN J F, DUAN S J, et al. Resistance and tolerance of *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents—How *M. tuberculosis* can escape antibiotics[J]. WIREs Mechanisms of Disease, 2022, 14(6): e1573.
- [14] The Editors. Hetero-resistance: an under-recognised confounder in diagnosis and therapy?[J]. Journal of Medical Microbiology, 2001, 50(12): 1018-1020.
- [15] 蒋燕成, 张建明, 陈紫萱, 等. 结核分枝杆菌耐药基因突变特征及与耐药水平关系的研究[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(15): 2145-2148.  
JIANG Y C, ZHANG J M, CHEN Z X, et al. Study on characteristics of drug resistance gene mutation in *Mycobacterium tuberculosis* and its correlation with drug resistance level[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2023, 20(15): 2145-2148.
- [16] 田丽, 周伟, 黄星, 等. 中国异烟肼耐药结核分枝杆菌基因突变特征分析[J]. 中国防痨杂志, 2022, 44(4): 354-361.  
TIAN L, ZHOU W, HUANG X, et al. Gene mutation analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2022, 44(4): 354-361.
- [17] 王悦, 孟湃喆, 于艳红. 荧光PCR熔解曲线技术在结核病耐药诊断中的应用价值[J]. 中国当代医药, 2021, 28(20): 194-197.  
WANG Y, MENG P Z, YU Y H. Application value of fluorescence PCR melting curve analysis in detecting tuberculosis drug resistance[J]. China Modern Medicine, 2021, 28(20): 194-197.
- [18] 王丹吉, 刘巧, 卢鹏, 等. 基因芯片技术快速检测结核分枝杆菌耐药性的临床应用研究[J]. 现代预防医学, 2018, 45(11): 2047-2051.  
WANG D J, LIU Q, LU P, et al. Clinical study on rapid detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by gene chip technology[J]. Modern Preventive Medicine, 2018, 45(11): 2047-2051.
- [19] 董启珍, 赵承杰, 吴晓茹. 基因芯片技术在新发涂阳肺结核患者结核杆菌菌种鉴定及药敏试验中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(7): 1024-1028.  
DONG Q Z, ZHAO C J, WU X R. Application of gene chip technology in strain identification and drug sensitivity test of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with new smear positive pulmonary tuberculosis[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2021, 31(7): 1024-1028.
- [20] SHAO Y, LI Y S, SONG H H, et al. A retrospective cohort study of isoniazid-resistant tuberculosis treatment outcomes and isoniazid resistance-associated mutations in eastern China from 2013 to 2018 [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2020, 22: 847-853.  
收稿日期: 2025-03-05  
修回日期: 2025-05-06