

1例ABO*B.01第4内含子近剪接区域c.204-1G>A突变导致红细胞B抗原减弱的家系分析

刘建成, 杨洁(宁夏血液中心血型参比实验室, 银川750011)

摘要:目的 对1例ABO血型正反定型不相符的献血者及其家系成员进行ABO血型精准鉴定,并探讨引起血型正反定型不相符的分子机制。方法 采用血清学方法对先证者和家系成员进行ABO血型鉴定,利用三代单分子测序技术对ABO血型基因全长序列进行检测分析突变位点。结果 先证者及其母亲表型均为Bel亚型,儿子为ABel亚型,3人均在ABO*B.01等位基因第4内含子发生了近剪接区域突变(c.204-1G>A)。其父亲和女儿均为O型。家系分析,先证者近剪接区域突变(c.204-1G>A)来源于其母亲,又遗传给其儿子。结论 先证者ABO*B.01等位基因第4内含子近剪接区域突变(c.204-1G>A)导致了红细胞表面B抗原的表达减弱。

关键词: ABO血型;内含子;抗原;家系分析;等位基因

中图分类号: R457.11; R781 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)05-164-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2026.05.028

A Pedigree Analysis of Weakened Erythrocyte B Antigen Caused by a c.204-1G>A Mutation in the Proximal Splicing Region of Intron 4 of the ABO*B.01 Allele

LIU Jiancheng, YANG Jie (Department of Blood Group Reference Laboratory, Ningxia Blood Center, Yinchuan 750011, China)

Abstract: **Objective** To accurately identify the ABO blood group of a blood donor with inconsistent positive and negative ABO blood group typing and his family members, and to elucidate the molecular mechanism underlying this inconsistent positive and negative ABO blood group typing. **Methods** ABO blood groups of the proband and the family members were identified by serological method. The full-length ABO gene was sequenced and analyzed using third-generation single-molecule sequencing technology to identify mutation sites. **Results** The proband and his mother exhibited the Bel subtype, while his son exhibited the ABel subtype. All three individuals carried a mutation (c.204-1G>A) in the proximal splicing region of intron 4 of the ABO*B.01 allele. The proband's father and daughter were both O-type. Pedigree analysis showed that the proband inherited the c.204-1G>A mutation from his mother and subsequently passed it to his son. **Conclusions** The c.204-1G>A mutation in the proximal splicing region of intron 4 of the ABO*B.01 allele results in decreased expression of the B antigen on the erythrocyte surface in the proband.

Keywords: ABO blood group; intron; antigen; pedigree analysis; allele

ABO血型系统是人类最早发现且临床意义最重要的血型系统,其精准鉴定对安全输血至关重要。ABO血型由ABO基因编码的糖基转移酶决定,基因变异可导致红细胞表面A或B抗原表达减弱,其中B抗原减弱的亚型如Bel因常规检测会漏检B抗原,只有吸收放散试验才能检出B抗原,极易引发血型误判,增加临床输血风险^[1]。Bel亚型表型罕见,分子机制复杂,已发现的突变多位于编码区或启动子区域,内含子剪接区域突变的报道较少^[2]。本研究对1例ABO血型正反定型不符的献血者及其家系进行血清学与分子生物学分析,探讨抗原减弱的分子机制,为ABO亚型的精准鉴定和临床输血安全提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 先证者为宁夏地区1名无偿献血者,男性,汉族,年龄40岁,无输血史。在进行ABO

血型检测时发现先证者血型正反定型不相符,随后采集其父母、女儿及儿子血液样本进行检测。所有受试者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 ABO血型正反定型试剂(上海血液生物制药有限公司),人类全血基因组DNA提取试剂盒(北京天根生物),红细胞基因分型检测试剂盒(单分子测序法)(西安浩瑞基因技术有限公司),质粒试剂Qubit dsDNA BR assay kit(Thermo Fisher Scientific),上机文库制备试剂:SEQUE II binding kit 3.2 and cleanup beads、测序试剂:SEQUE II sequencing kit、测序芯片:SMRT Cell 8M tray(PacBio),PCR扩增试剂PrimeSTAR GXL DNA Polymerase(TAKARA)。PCR扩增仪(Appliedbiosystems),凝胶成像系统(Bio-Rad),PacBio Sequel II测序仪器(PacBio)。

1.3 方法

1.3.1 血型血清学方法: ABO血型正反定型、吸收放散

基金项目: 宁夏卫生健康系统科研课题(2022-NWKY-040)。

作者简介: 刘建成(1983-),男,硕士,副主任技师,研究方向:输血免疫学和血型分子遗传学, E-mail: lj2060@163.com。

试验均按照《全国临床检验操作规程(第四版)》操作。

1.3.2 分子生物学方法: 先证者及其父母、女儿、儿子 ABO 血型分子生物学检测利用三代单分子测序技术对 ABO 基因全长序列进行测序分析, 包括 7 个外显子、6 个内含子及调控区域。操作如下: ①血液样本提取基因组 DNA 后, 先进行浓度和片段大小质检, 要求: 基因组 DNA 的片段 $\geq 15\text{Kb}$, DNA 纯度 A_{260}/A_{280} 在 1.7~2.0 之间, A_{260}/A_{230} 在 1.8~2.0 之间。以合格的基因组 DNA 为模板, 采用红细胞基因分型检测试剂盒进行多重 PCR 扩增, 获取目的基因全长序列。②PCR 产物经浓度检测和琼脂糖凝胶电泳质检合格后, 进入文库构建阶段。向 PCR 产物中加入红细胞基因分型检测试剂盒内的试剂, 使双链 DNA 分子两端连接特定接头, 形成哑铃状环形 DNA 分子。随后经外切酶消化未连接接头的序列, 再通过磁珠纯化得到文库。③在文库中加入上机文库制备试剂盒中的试剂, 孵育后经磁珠纯化获得上机文库。将上机文库加入测序芯片, 使用 PacBio Sequel II 测序仪测序, 最终将光信号转化为碱基序列。

1.3.3 数据分析和分型: 测序原始数据使用 PacBio Sequel II 测序仪配置的系统 (SMRT Link, v13.0, Pa-

cific Bioscience) 自动将荧光信号转换为碱基序列信息, 并进行校正及后续过滤。然后使用 PacBio 官方内置软件 lima 拆分 HIFI reads, 以区分不同样本。分型过程在一个具备多计算节点的集群环境下运行分析任务, 利用集群强大的计算能力, 使用西安浩瑞基因技术有限公司自研的红细胞基因分型流程对每个样本的数据展开分析。主要分型流程包括: 使用 pbmm2 version 1.16.0 软件将样本的 CCS 数据比对到 GRCh38 版本的参考基因组获得 ABO 基因的目标序列进行下游分析。使用 DeepVariant version 1.6.0 软件检测变异位点。使用 whatshap version 2.1 软件对变异位点进行分型。然后提取 CDS 区域的突变位点与 ISBT 分型数据库比对, 获取对应分型。

2 结果

2.1 ABO 血型血清学结果 先证者 ABO 血型正定型为 O 型, 反定型为 B 型, 正反定型不相符, 进一步采用吸收放散试验, 在红细胞表面检出 B 抗原, 定型为 Bel 亚型。其父亲和女儿均为 O 型。母亲和先证者血清学格局相同, 定型为 Bel 亚型。儿子红细胞检出正常 A 抗原, 吸收放散试验检出了 B 抗原, 定型为 ABel 亚型, 见表 1。

表 1 先证者及家系 ABO 血型血清学反应格局

样本	正定型				反定型				吸收放散			表型
	-A	-B	-AB	-H	A ₁ c	Bc	Oc	自身	A ₁ c	Bc	Oc	
先证者	-	-	-	4+	4+	-	-	-	-	2+	-	Bel 亚型
父亲	-	-	-	4+	4+	4+	-	-	/	/	/	O 型
母亲	-	-	-	4+	3+	-	-	-	-	1+	-	Bel 亚型
女儿	-	-	-	4+	4+	4+	-	-	/	/	/	O 型
儿子	4+	-	-	4+	2+	1+	-	-	-	2+	-	ABel 亚型

注: 1-4+ 表示不同的凝集强度; - 表示没有凝集; / 表示未进行吸收放散试验; el 表示吸收放散试验检出抗原。

2.2 分子生物学结果 先证者和母亲的 1 条单倍体为 O 等位基因 *ABO*O.01.02*, 另 1 条单倍体在 B 等位基因 *ABO*B.01* 基础上第 4 内含子发生了近剪接区域突变(c.204-1G>A), 基因型为 *ABO*B.01/ABO*O.01.02*。其父亲和女儿基因型均 *ABO*O.01.02/ABO*O.01.02*。其儿子 1 条单倍体为 *ABO*A1.02*, 另 1 条单倍体在 B 等位基因 *ABO*B.01* 基础上第 4 内含子发生了近剪接区域突变(c.204-1G>A), 基因型为 *ABO*A1.02/ABO*B.01*, 见表 2、图 1。先证者和家系成员 7 个外显子、其它内含子及调控区域未见异常突变。家系分析显示, 先证者近剪接区域突变(c.204-1G>A)来源于其母亲, 又遗传给其儿子, 见图 2。

3 讨论

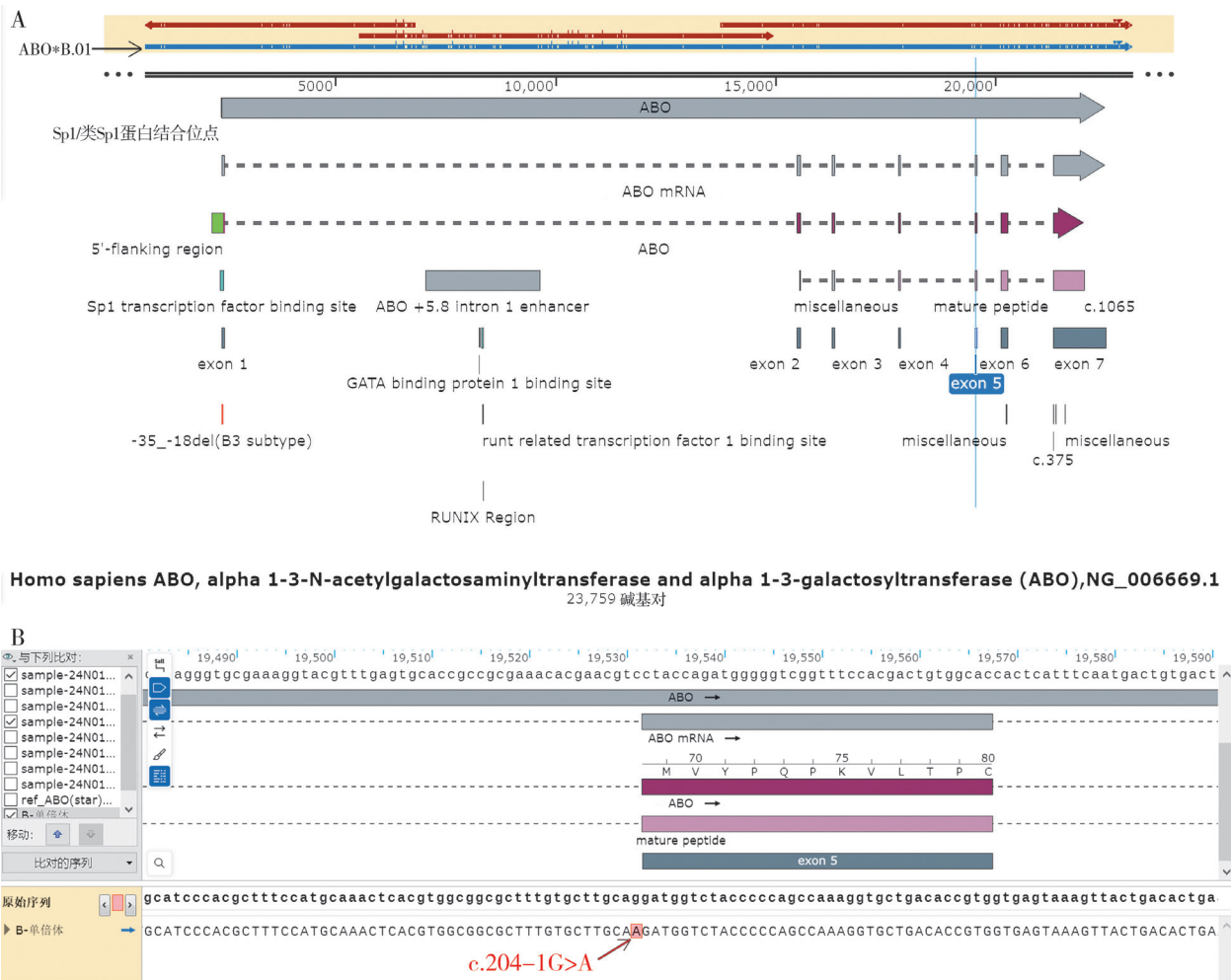
ABO 亚型是指在常见 A、B、AB、O 血型基础上, 由于 ABO 基因变异形成的进一步细化分类的血型^[3]。

这些变异会改变红细胞表面抗原的结构或表达水平, 进而影响血清学鉴定中的凝集表现。ABO 基因位于人类第 9 号染色体长臂(9q34.2), 全长约 18kb, 包含 7 个外显子和 6 个内含子, 该基因编码的糖基转移酶通过催化特定糖链修饰 H 抗原, 决定红细胞表面抗原类型, ABO 基因的变异主要发生在第 6 和 7 外显子^[4-5]。1990 年首次从分子层面阐明了人类 ABO 血型的遗传机制^[6]。1993 年首次揭示了 ABO 亚型抗原表达减弱的分子基础^[7]。

红细胞 B 型是由 *ABO*B.01* 等位基因编码的 B 转移酶将半乳糖转移至 H 抗原, 形成 B 血型^[8]。本研究发现的 c.204-1G>A 突变发生在 *ABO*B.01* 基础上第 4 内含子 3' 端近剪接区域, 该区域为前体 mRNA 剪接的关键位点, 其保守序列的改变可能干扰剪接复合体组装, 导致剪接异常。真核生物基因转录生

成的前体mRNA需经过剪接去除内含子,形成成熟mRNA。内含子3'端的剪接位点通常包含高度保守的AG二核苷酸,其上游为多嘧啶片段,共同参与剪接位点的识别^[9]。研究表明^[10-11],剪接位点附近的碱基突变可通过改变位点保守性或影响剪接因子结合,导致剪接异常,包括外显子跳跃、内含子滞留

表2 先证者及家系ABO基因三代单分子测序结果				
样本	单倍体1		单倍体2	
	等位基因	突变位点	等位基因	突变位点
先证者	ABO*B.01	c.297A>G、c.526C>G、c.657C>T、c.703G>A、c.796C>A、c.803G>C、c.930G>A 近剪接区域突变: c.204-1G>A	ABO*O.01.02	c.106G>T、c.188G>A、c.189C>T、c.220C>T、c.261delG、c.297A>G、c.646T>A、c.681G>A、c.771C>T、c.829G>A
父亲	ABO*O.01.02	c.106G>T、c.188G>A、c.189C>T、c.220C>T、c.261delG、c.297A>G、c.646T>A、c.681G>A、c.771C>T、c.829G>A	ABO*O.01.02	c.106G>T、c.188G>A、c.189C>T、c.220C>T、c.261delG、c.297A>G、c.646T>A、c.681G>A、c.771C>T、c.829G>A
母亲	ABO*B.01	c.297A>G、c.526C>G、c.657C>T、c.703G>A、c.796C>A、c.803G>C、c.930G>A 近剪接区域突变: c.204-1G>A	ABO*O.01.02	c.106G>T、c.188G>A、c.189C>T、c.220C>T、c.261delG、c.297A>G、c.646T>A、c.681G>A、c.771C>T、c.829G>A
女儿	ABO*O.01.02	c.106G>T、c.188G>A、c.189C>T、c.220C>T、c.261delG、c.297A>G、c.646T>A、c.681G>A、c.771C>T、c.829G>A	ABO*O.01.02	c.106G>T、c.188G>A、c.189C>T、c.220C>T、c.261delG、c.297A>G、c.646T>A、c.681G>A、c.771C>T、c.829G>A
儿子	ABO*A1.02	c.467C>T	ABO*B.01	c.297A>G、c.526C>G、c.657C>T、c.703G>A、c.796C>A、c.803G>C、c.930G>A 近剪接区域突变: c.204-1G>A



A: ABO 血型基因结构图谱; B: ABO 基因第4内含子 c.204-1G>A 近剪接区域突变。
图1 ABO 血型基因结构示意图和近剪接区域测序结果

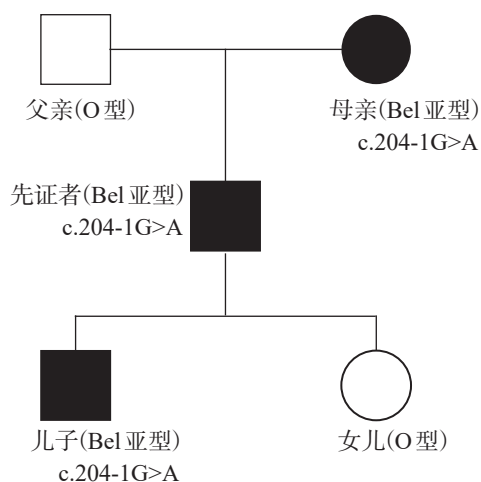


图2 先证者家系图

或使用隐蔽剪接位点等。本研究中, c.204-1G>A 突变使第4内含子3'端剪接位点的保守序列由AG变为AA, 直接破坏了剪接位点的核心结构。推测该突变可能导致ABO基因前体mRNA剪接异常, 使成熟mRNA中缺失部分外显子或包含异常序列, 进而影响B转移酶的合成或功能, 导致红细胞B抗原表达减弱。类似突变在其他基因中已被证实可显著降低剪接效率, 如凝血因子Ⅷ基因内含子22剪接位点突变可导致血友病A^[12]。ABO基因第4外显子编码B转移酶的第127~167位氨基酸序列, 该氨基酸序列参与了B转移酶蛋白结构的构象, 是维持其结构完整性的分子基础。同时, 还通过分子识别机制介导了B转移酶与受体底物H抗原的特异性结合。研究表明, 当第4外显子发生纯合缺失或与邻近外显子联合缺失时, 编码序列会发生截断, 导致第127~167位氨基酸完全丢失。这种结构性缺失会导致B转移酶无法形成催化反应必需的空间构象, 同时使酶与底物的结合能力降至检测阈值以下。本研究中, 若第4内含子剪接异常导致第4外显子缺失, 将直接破坏B转移酶的空间结构。若内含子滞留形成异常mRNA, 可能被无义介导的mRNA降解机制识别并降解, 导致B转移酶表达量下降。两种情况均可使B抗原合成减少, 表现为Bel亚型表型^[13-14]。

Bel亚型是B亚型中最罕见的类型之一, 其特征为红细胞表面B抗原极弱, 常规无法检测出B抗原, 易被误判为O型, 临床输血时需特别注意^[15]。目前已报道的Bel亚型分子机制主要涉及B等位基因的编码区突变, 如错义突变、无义突变或移码突变, 导致B转移酶活性降低或缺失^[16]。国际输血协会共收录了5种Bel等位基因, 分别为ABO*BEL.01、ABO*BEL.02、ABO*BEL.03、ABO*BEL.04、ABO*BEL.05。例如, ABO*BEL.01等位基因因c.641T>G(p.Met214Arg)突变导致酶活性下降^[17]。ABO*BEL.03因c.502C>T(p.Arg168Trp)突变影响底物

结合能力^[18]。此外, 部分Bel亚型与ABO基因启动子区域突变相关, 通过降低基因转录效率降低B转移酶活性, 导致红细胞表面B抗原的表达^[19]。本研究发现的c.204-1G>A突变位于内含子3'端剪接区域, 与已知的编码区或启动子突变机制不同, 是一种新的Bel亚型分子机制。另外与已报道的其他内含子剪接突变也存在差异。例如, ABO基因第1内含子剪接位点c.44+1G>A突变位于5'端, 引发第1外显子完全缺失, 导致A转移酶合成完全中断, 最终表现为红细胞A抗原完全缺失^[20], 而本研究的第4内含子c.204-1G>A突变位于3'端, 仅丢失部分催化结构域氨基酸, 残留的B转移酶仍保留基础活性, 表现为B抗原减弱, 通过吸收放散试验能够检测到弱B抗原。这也反映了ABO基因不同区域突变对表型影响的特异性。家系研究是验证基因突变的重要手段, 尤其对于罕见血型亚型, 通过分析突变与表型在家系中的共分离模式, 可显著提高结论的可靠性^[21-22]。本研究中, 先证者及其母亲为Bel亚型, 儿子为ABel亚型, 三者均携带c.204-1G>A突变。而父亲与女儿为O型, 未检测到该突变。表明, c.204-1G>A突变由母亲传给先证者, 再由先证者传给儿子, 严格遵循孟德尔遗传规律。在输血实践中, Bel亚型易被误判为O型, 作为受血者时误输O型血, 虽主侧配血可能无反应, 但供者血浆中的抗-B抗体可能与受者红细胞上的微弱B抗原反应, 引发迟发性溶血性输血反应。作为供血者, 其红细胞可能被受者的抗-B抗体破坏, 同样存在风险^[23]。因此, 准确鉴定Bel亚型对临床输血安全至关重要。在血型检测过程中对于正反定型不符的样本, 除检测编码区、启动子区域突变外, 还需关注内含子剪接区域的变异。

本研究也存在一定局限性: ①未进行体外功能实验直接证实该突变对mRNA剪接的影响。②未检测B转移酶的表达量及活性, 缺乏蛋白水平的验证。综上所述, 本研究成功鉴定分析了在ABO*B.01等位基因基础上第4内含子近剪接区域c.204-1G>A突变可导致Bel亚型。这不仅丰富了ABO血型的分子遗传图谱, 也为疑难血型鉴定提供了新的思路, 对保障血液安全具有重要意义。

参考文献

- [1] 刘欣, 靳慧芳, 王书亚, 等. Bel亚型新等位基因c.620T>C 1例的分子研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2024, 41(4): 411-416.
- [2] LIU X, JIN H F, WANG S Y, et al. Molecular study of an individual with Bel subtype due to a novel c. 620T>C variant[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2024, 41(4): 411-416.
- [3] HE Y L, DENG G, YU L, et al. A new missense variant c.278C>G on the ABO*B.01 allele associated with a Bel phenotype[J]. Transfusion, 2023, 63(4): e20-e22.
- [4] 向东. ABO亚型的检测[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(8):

- 577-580.
- XIANG D. Detection of ABO subtypes[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2010, 23(8): 577-580.
- [4] 洪毅. 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[J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(1):161-164.
- HONG Y. Serology and molecular mechanism of family blood group with weak expression of erythrocyte B antigen caused by ABO*BEL.11[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(1):161-164.
- [5] WANG Y Q, MOU Q J, LEI H, et al. Molecular biology analysis of ABO blood group variants caused by natural chimaerism[J]. Vox Sang, 2022, 117(11): 1310-1317.
- [6] HULT A K, HELLBERG Å, STORRY J R, et al. A new missense variant in exon 7 of the ABO gene, c.662G>A, in a family with Bw phenotype[J]. Transfusion, 2022, 62(10):e55-e58.
- [7] 李双玉,董磊,解金辉,等.一例罕见AB亚型的分子生物学研究分析[J].现代检验医学杂志, 2018, 33(4): 70-72.
- LI S Y, DONG L, XIE J H, et al. Study on the molecular mechanism of a case of rare AB subtype[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(4):70-72.
- [8] ZHANG J J, YING Y L, HONG X Z, et al. Identification of a novel B allele with a c.256G>A mutation on the ABO*B.01 allele[J]. Transfusion, 2022, 62(2): e10-e11.
- [9] WAN R X, BAI R, ZHAN X C, et al. How is precursor messenger RNA spliced by the spliceosome [J]. Annu Rev Biochem, 2020, 89: 333-358.
- [10] HONG X Z, YING Y L, ZHANG J J, et al. Six splice site variations, three of them novel, in the ABO gene occurring in nine individuals with ABO subtypes[J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 470.
- [11] KOMINATO Y, SANO R, TAKAHASHI Y, et al. Human ABO gene transcriptional regulation[J]. Transfusion, 2020, 60(4): 860-869.
- [12] 郭志萍,陈剑芳,秦秀玉,等.重型血友病A患者凝血因子Ⅷ基因内含子22倒位检测[J].中华血液学杂志, 2013, 34(11): 918-921.
- GUO Z P, CHEN J F, QING X Y, et al. Detection of intron 22 inversion of factor VIII gene in severe hemophilia A patients[J]. Chinese Journal of Hematology, 2013, 34(11): 918-921.
- [13] NAKAJIMA T, SANO R, TAKAHASHI Y, et al. ABO alleles are linked with haplotypes of an erythroid cell-specific regulatory element in intron 1 with a few exceptions attributable to genetic recombination[J]. Vox Sang, 2016, 110(1): 90-92.
- [14] SANJAYA A, NISHIJIMA R, FUJII Y, et al. Rare occurrence of cryptic 5' splice sites by downstream 3' splice site/exon boundary mutations in a heavy-ion-induced *egy1-4* allele of *Arabidopsis thaliana*[J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1388040.
- [15] 马晓莉,董文安,杨贺才,等.Bel亚型新等位基因(c.803G>T, p.Gly268Val)的家系研究[J].中国实验血液学杂志, 2025, 33(2): 504-510.
- MA X L, DONG W A, YANG H C, et al. Family studies of a new allele of the Bel subtype(c.803G>T, p.Gly-268Val)[J]. Journal of Experimental Hematology, 2025, 33(2):504-510.
- [16] 雷航,王学锋,程晓文,等.ABO血型变异的分子基础研究[J].中国输血杂志, 2024, 37(4): 385-391.
- LEI H, WANG X F, CHENG X W, et al. Molecular mechanism of ABO blood group variation[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2024, 37(4): 385-391.
- [17] 谷兰,刘凤霞.罕见Bel01亚型的血清学和基因分析[J].中国免疫学杂志, 2022, 38(4): 453-456.
- GU L, LIU F X. Serology and gene sequence analysis of rare Bel01 subtype[J]. Chinese Journal of Immunology, 2022, 38(4): 453-456.
- [18] 徐明菊,仇丰武,何鸣镝.BEL.03亚型的血清学特点及分子机制[J].临床血液学杂志, 2025, 38(6): 426-429.
- XU M J, QIU F W, HE M D. Serological characteristics and molecular mechanisms of BEL.03 subtype[J]. Journal of Clinical Hematology, 2025, 38(6): 426-429.
- [19] KONG Y K, WANG L, KONG C Q, et al. A novel c.29-3C>G variant on the B allele forms the Bel phenotype[J]. Transfusion, 2024, 64(7): e28-e29.
- [20] FENNELL K, KELLER M A, VILLA M A, et al. New ABO intron 1 variant alleles[J]. Immunohematology, 2021, 37(4): 178-184.
- [21] 王渊元,杨芳年,沈雨青,等.cisAB09亚型一个家系的ABO血型血清学特征及分子遗传学分析[J].中华医学遗传学杂志, 2023, 40(6): 750-755.
- WANG Y Y, YANG F N, SHEN Y Q, et al. Serological characteristics of ABO blood group and molecular genetic analysis of a Chinese pedigree with cisAB09 subtype[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2023, 40(6): 750-755.
- [22] 洪毅,张良子,左琴琴.ABO*AW等位基因突变致红细胞A抗原弱表达的血型血清学鉴定及分子机制研究[J].现代检验医学杂志, 2025, 40(3):173-176, 182.
- HONG Y, ZHANG L Z, ZUO Q Q. Serology identification and molecular mechanism of ABO blood group with weak expression of erythrocyte A antigen caused by ABO*AW allele[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2025, 40(3): 173-176, 182.
- [23] 陈雅新,李莺,许进明,等.Bel亚型血型鉴定分析及输血策略探讨[J].临床血液学杂志, 2023, 36(2): 87-90.
- CHEN Y X, LI Y, XU J M, et al. Identification of Bel subtype and blood transfusion strategy[J]. Journal of Clinical Hematology, 2023, 36(2): 87-90.

收稿日期: 2025-07-14

修回日期: 2025-09-17