

• 临床研究 •

分子生物学鉴定急性白血病患者 ABO 血型抗原^{*}

陈青¹ 李平² 陆乐² 肖建宇¹ 王树亚² 黄成垠¹ 姚根宏²

【摘要】 目的:应用分子生物学方法鉴定急性白血病患者 ABO 血型抗原,确定患者 ABO 血型正反定型不符的原因。**方法:**选取临床正反定型不一致白血病患者,常规血清学 ABO 血型正反定型;直接和间接抗人球蛋白试验检测不规则抗体;吸收放散法鉴定弱血型抗原;PCR 方法扩增 ABO 基因的 7 个外显子及侧翼内含子,扩增产物进行测序及序列分析。**结果:**患者正定型为 AB 亚型,反定型为 AB 型;直抗和间抗为阴性;吸收放散试验证明红细胞上存在弱 A 和 B 抗原;ABO 基因扩增产物测序结果表明其基因型为 ABO* A102/B101。**结论:**该白血病患者经分子生物学方法确定为正常 AB 型,其血型抗原减弱由白血病所致。基因分型法可以正确区分血型抗原减弱或亚型。

【关键词】 白血病;血型抗原减弱;基因分型

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2015.02.001

【中图分类号】 R733.7 **【文献标志码】** A

Molecular genetic analysis of ABO blood group antigens of a patient with acute leukemia

CHEN Qing¹ LI Ping² LU Le² XIAO Jianyu¹ WANG Shuya²
HUANG Chengyin¹ YAO Genhong²

(¹Jiangsu Province Blood Center, Nanjing, 210042, China; ²Department of Transfusion, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School)

Corresponding author: YAO Genhong, E-mail: yaogenhong@126.com

Abstract Objective: To identify ABO blood group antigen by genotyping, and explore the mechanism of ABO discrepancy in a patient due to acute leukemia. **Method:** A acute myeloid leukemia patient with ABO typing discrepancy was selected. Routine serological test was carried out to analyze ABO blood group. Both direct and indirect anti-globulin tests were performed to screen irregular antibodies. The presence of the blood group determinants on the red blood cells were determined by adsorption-elution test. Exons 1-7 and adjacent introns of the ABO gene were amplified by PCR and sequenced. **Result:** ABO forward typing indicated that the patient was AB subgroup. However the reverse typing defined AB. Direct and indirect anti-globulin tests were negative. The RBCs could adsorb anti-A and anti-B, which were able to be eluted subsequently. ABO genotyping was ABO* A102/B101. **Conclusion:** The leukemia patient with ABO discrepancy by serological test was defined as AB by molecular genetic analysis. The suppressed expressions of A and B antigens on RBCs were due to acute myeloid leukemia. The genotyping could be used to differentiate the subgroup and suppressed expressions of blood group antigens.

Key words leukemia; suppressed expression of blood group antigens; genotyping

正确鉴定 ABO 血型对于临床安全、有效输血具有重要意义。但是,常规血清学方法常常会遇到正反定型不一致,如血型抗原减弱、血清抗体减弱

或存在不规则抗体等^[1-2]。目前,国内绝大多数输血机构对于 ABO 正反定型不一致的个体仍然采用分析分泌液中存在的可溶性抗原、吸收放散试验等血清学方法。但是,对于非分泌型个体、血清学亚型相似个体之间的患者,血清学方法就很难区分。因此,应用分子生物学方法进行基因定型可区分血清学亚型或由疾病导致的抗原减弱等。本研究对 1 例出现 ABO 血型正反定型不一致的急性白血病患

^{*} 基金项目:江苏省科教兴卫工程医学重点人才(No: RC2011088);江苏省第 4 期 333 高层次人才培养工程, 2010 年度江苏省卫生国际交流支撑计划项目资助

¹ 江苏省血液中心(南京,210042)

² 南京大学医学院附属鼓楼医院输血科

通信作者:姚根宏, E-mail: yaogenhong@126.com

者进行基因分型,报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

患者,男,汉族,41岁,无输血史。因牙龈出血伴皮肤瘀点、瘀斑入院。经临床分析和骨髓检查,诊断为急性髓细胞白血病-M₁。染色体检查正常。患者入院时常规血型检查,发现正反定型不一致。

1.2 主要试剂

单克隆抗-A、抗-B、抗-A₁、抗-H抗体和筛选红细胞购自上海血液生物医药有限责任公司。抗AB购自法国Diagast公司。O、A和B型标准红细胞为本室自制。单克隆抗D抗体购自Bio-Rad公司;微胶凝柱血型卡和抗体筛查卡来自瑞士达亚美有限公司。基因组DNA提取试剂盒(北京天根公司);HF Taq聚合酶(Thermo Fisher Scientific公司);琼脂糖(BIOWEST公司);AxyPrep PCR纯化试剂盒(爱思进生物技术有限公司)。

1.3 ABO、Rh血型鉴定

血型检测采用达亚美血型卡在全自动血型仪上进行。本例中,由于卡式法检测结果示红细胞与抗A和抗B凝集强度弱,再应用试管法进行ABO正反定型。抗AB、A₁和H检测也采用试管法。

1.4 直接和间接抗人球蛋白试验

按照操作规范进行。

1.5 吸收和放散试验

因患者与抗A和B血清凝集强度弱,对A和B抗原进行吸收。生理盐水洗涤患者红细胞3遍,取洗涤后的压积红细胞分别与单克隆抗A或抗B血清混合,充分混匀后置4℃冰箱2h(期间每15

min混匀1次,使其充分作用),离心后,用4℃生理盐水洗涤红细胞5次,保留最后1次洗涤液,用3%A和B标准红细胞检测其中是否残留抗体。确认没有抗体残留后,在压积红细胞中加入等体积的生理盐水,56℃放散10min,离心后放散液采用试管法分别与A、B和O标准红细胞作用。离心后观察结果。

1.6 ABO基因测序及序列分析

基因组DNA提取试剂盒提取全血DNA,严格按照试剂说明书进行。PCR方法扩增该白血病患者ABO基因的7个外显子及侧翼内含子。扩增引物及测序引物均由上海生工生物技术有限公司合成。PCR扩增条件,扩增引物及测序引物序列见参考文献^[3-4]。PCR反应结束后,取5μl PCR产物,经1%琼脂糖凝胶,0.5×TBE缓冲液中电泳(100V,30min),通过凝胶电泳成像系统观察并鉴定产物的特异性。扩增产物的纯化严格按照试剂说明书进行。委托北京六合华大基因公司对纯化的扩增产物进行测序。使用Chromas软件阅读测序图谱,BioEdit软件对比分析测序结果,与GenBank中的序列(ID:NG_006669.1)比对、分析结果。

2 结果

2.1 血清学检测结果

患者的红细胞与单克隆抗A和B血清呈1+/mf,血清与O、A和B型红细胞都不起反应,详细的血清学检测结果见表1。患者的直接和间接抗人球蛋白试验结果均为阴性。患者的红细胞能吸收并放散抗A和抗B,这些结果表明患者的红细胞上有很弱的A和B抗原。

表1 ABO血型正反定型结果

	正定型					反定型			
	抗A	抗B	抗A、B	抗A ₁	抗H	A ₁	B	O	自身
卡式法	1+/mf	1+/mf	1+	1+	2+	0	0	0	0
试管法	±/mf	±/mf	1+	1+	2+	0	0	0	0

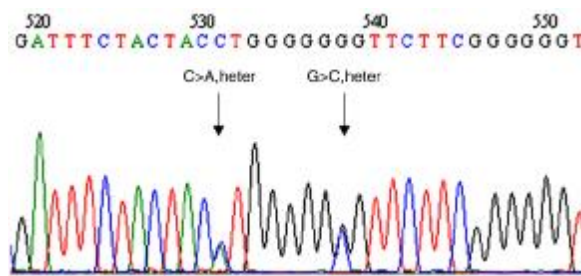
mf:混合视野外观。

2.2 基因分型

该患者ABO血型的基因分型为ABO* A102/B101,说明该患者的血型表型为AB型。A和B等位基因部分测序结果见图1。

3 讨论

本报道中的患者在正定型时,表现为红细胞与抗A和抗B呈弱凝集反应,反定型与O、A和B型红细胞均不凝集,吸收放散证明了红细胞存在A和B抗原。但是,血清学上难以区分患者是AB亚型或疾病导致的抗原减弱。研究表明,白血病患者



箭头所示为核苷酸序列796位C/A和803位G/C杂合。

图1 该白血病患者ABO基因的部分测序结果

ABO 血型的基因存在许多变异体, Novaretti^[5] 等采用基因分型的方法分析了 108 例白血病患者 ABO 血型的等位基因, 发现 25 例(23%) 患者有 22 种新的 ABO 变异体, 表明白血病患者 ABO 基因有较高水平的重组活性。此外, 某些白血病患者 ABO 基因并未发生突变, A 或 B 抗原表达减弱甚至缺失, 可能与恶性疾病引起的红细胞系增生降低, 导致 A 或 B 基因产物不足或者欠缺所致, 而不是由于酶作用底物缺乏所致^[6-7]。因此, 我们对该患者进行 ABO 血型的基因分型。经测序分析该患者具有正常的 A102 和 B101 等位基因, 这表明该患者 ABO 血型的基因未发生突变, 而是其红细胞上血型抗原表达减弱。但是, 导致该患者红细胞上 A 和 B 抗原表达减弱的具体机制尚不清楚。

总之, 血清学作为血型鉴定的经典方法在输血医学中起重要作用。但是, 在分析一些疑难血型时, 血清学方法尚存在不足, 如我们报道的该例白血病患者, 血清学方法就不能区分出该患者是 AB 亚型还是疾病导致的抗原减弱所致。因此, 必须依赖基因分型方法正确区分。使用基因分型的方法, 可以正确进行 ABO 疑难血型的定型, 给临床正确输血提供理论依据, 保障患者输血的安全性和有效性。为今后真正实现临床患者的个体化血液管理, 保障医疗安全、提高医疗质量提供有力支撑。

参考文献

- [1] 杜雪冰, 刘志生. 血液病患者疑难配血 1 例[J]. 临床血液学杂志(输血与检验版), 2014, 27(2): 166—166.
- [2] 刘乐霞, 梁俊杰, 肖玮, 等. 沧州地区患者 ABO 血型正反定型不符调查研究[J]. 临床血液学杂志(输血与检验版), 2014, 27(2): 90—93.
- [3] Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-maaf B, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles [J]. Blood, 2001, 98: 1585—1593.
- [4] Chen Q, Xiao J, Wang S, et al. ABO sequence analysis in an AB type with anti-B patient [J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127: 971—972.
- [5] Novaretti MCZ, Domingues AE, Manhani R, et al. ABO genotyping in leukemia patients reveals new ABO variant alleles [J]. Genetics and Molecular Research, 2008, 7: 87—94.
- [6] Sonker A, Dubey A, Singh A, et al. A rare case report of chronic variable immunodeficiency divulged by ABO discrepancy [J]. Transfus Apher Sci, 2014, 50: 225—227.
- [7] Bianco T, Farmer BJ, Sage RE, Dobrovic A. Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies [J]. Blood, 2001, 97: 3633—3639.

(收稿日期: 2014-06-24; 2014-07-29)

《临床血液学杂志(输血与检验)》第3届编委会名单

主 编 胡丽华

副主编 王 琳 王学峰

编 委 (按姓氏字母排序)

王宝燕	王学峰	王燕宁	王全立	王 琳	文 军	白连均	刘凤华
刘铁梅	闫 石	吕先萍	李志强	李碧娟	李 捷	张循善	宋卫青
汪德清	严力行	陈凤花	杨江存	郑山根	林甲进	周吉成	周小玉
单桂秋	胡丽华	胡安华	骆 群	宫济武	赵树铭	赵国华	郝一文
饶绍琴	秦 莉	栾建凤	钱宝华	唐长玖	夏 琳	夏 荣	夏 兰
崔徐江	焦晋山	董伟群	谢 珏	曾小菁	楚中华	穆士杰	魏 晴