

B(A)血型与 cisAB 血型的血清学表型及基因型研究*

赵倩¹ 苏蔓¹ 李茵¹ 钱明明¹ 赵佳¹ 张泓楠¹ 胡光磊¹ 王振雷¹

[摘要] 目的:研究罕见 B(A)和 cisAB 血型的血清学特性和分子机制,对表型和基因型的关联性进行分析。方法:采用血型血清学方法进行 ABO 血型正反定型,对其中血清学表型为 AB 亚型的标本,应用 PCR-SBT 法扩增 ABO 基因第 6、7 外显子,进行基因测序,确定突变位点和类型,并对表型和基因型关联性进行分析。结果:16 例血清学表型为 AB 亚型的标本中,经分子生物学鉴定确定为 B(A)血型的 12 例,包括 3 种 B(A)型等位基因,分别为 ABO * BA. 03(1 例)、ABO * BA. 04(5 例)、ABO * BA. 02(6 例),这 3 种等位基因所对应的表型有 B(A)、AB_x、正 O 反 B。确定为 cisAB 血型的 4 例,4 例样本基因型全部为 ABO * cisAB. 01,血清学表型为 A_xB 和 A₂B_x,未发现其他变异型。结论:本研究显示了 16 例 B(A)型和 cisAB 型的血清学表型和基因型特点,通过基因测序了解突变位置及类型。相同的基因型可表现出多种不同的血清学反应特点,对于 ABO 亚型等疑难血型的鉴定,采用血清学方法和分子生物学方法相结合的方式能够准确鉴定血型。

[关键词] B(A)血型; cisAB 血型; 血清学表型; 基因型

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2020.08.001

[中图分类号] R457.1 [文献标志码] A

Study on serological phenotype and genotype of B(A) blood group and cisAB blood group

ZHAO Qian SU Man LI Yin QIAN Mingming ZHAO Jia ZHANG Hongnan
HU Guanglei WANG Zhenlei

(Hebei Blood Center, Shijiazhuang, 050000, China)

Corresponding author: WANG Zhenlei, E-mail: lei123456789101112@sina.com

Abstract Objective: To study the rare B(A) and cisAB blood groups' serological characteristics and molecular mechanism and analyze the association of phenotype and genotype. **Method:** The positive and negative typing of ABO blood group was carried out by blood group serological method. The samples of AB subgroup were typed with PCR-SBT method. We amplified the 6 and 7 exon on ABO gene by PCR-SBT method to confirm mutation site and type and analyze the association of the phenotype and genotype. **Result:** There were 12 cases of B(A) blood group and 4 cases of cisAB blood group by molecular biological identification among 16 AB subgroup samples in serology. 12 B(A) type cases included 3 kinds of allele of ABO * BA. 03 (1 case), ABO * BA. 04 (5 cases) and ABO * BA. 02 (6 cases), with the phenotype of B(A), AB_{sub} and positive definite type O and inverse type B. 4 cisAB type cases were ABO * cisAB. 01 genotype with the phenotype of A_{sub}B and A₂B_{sub}, no variant. **Conclusion:** The serological phenotypes and genotypic characteristics of 16 cases of B(A) and cisAB groups show the mutation site and type in this study by gene sequencing. The same genotype could show various serological phenotypes. The identification of ABO subgroup doubt samples can be correctly identified by combination of serological method and molecular biology identification.

Key words B(A) blood group; cisAB blood group; serological phenotype; genotype

ABO 血型系统是人类最早认识的一种极为复杂的红细胞血型系统, ABO 血型的准确鉴定是输血安全的重要保障。尤其近年来在基因领域的不断研究, 一些不为人知的 ABO 等位基因不断被发现。按照抗原不同, ABO 血型主要分为 4 种表型: A 型、B 型、O 型及 AB 型。但在临床实践中发现, 除了常见的 4 种 ABO 血型之外, 还存在着很多

ABO 弱表达的亚型, 导致血清学试验出现正反不符, 混合凝集视野等现象, 给血型鉴定工作带来困难并对临床用血带来很大困扰。其中, B(A) 与 cisAB 型是 2 种比较罕见的 ABO 亚型, 二者的血清学表现不同而遗传方式相似, 均以顺式遗传为特点。我中心收集了近年来在血型鉴定工作中正反定型与反定型结果不一致的标本 80 例, 通过血清学方法和分子生物学方法证实了其中 12 例为 B(A) 血型, 4 例为 cisAB 血型, 并对两者的血清学表型和基因型的关系进行了分析, 现报告如下。

*基金项目: 河北省医学科学研究重点课题指令性计划 (No: ZL20140218)

¹河北省血液中心配型中心(石家庄, 050000)

通信作者: 王振雷, E-mail: lei123456789101112@sina.com

1 资料与方法

1.1 对象

收集我中心 2015—2018 年的无偿献血者和患者 ABO 正反定型不符标本 80 例,进行初步血清学分型,对于鉴定为 ABO 亚型的标本应用分子生物学方法进一步鉴定,对确定为 B(A)、cisAB 血型的 16 例标本进行血清学表型和基因型的关联性研究。

1.2 试剂与仪器

单克隆抗-A、抗-A₁、抗-B、抗-H(上海血液生物医药有限公司),ABO 血型反定型细胞试剂盒(美国 IMMUCOR 公司),血型鉴定室内质控品(荷兰 Sanquin 公司),血液基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化(北京)有限公司],血清学专用离心机(日本久保田,KA2200),台式低温离心机(德国 Eppendorf 公司,5804R 型),基因测序仪(美国 AB 公司,3730 型)。

1.3 ABO 血型及 H 抗原鉴定

ABO 血型正反定型及 H 抗原鉴定采用试管法,正定型增加抗-A₁,反定型增加自身对照,H 抗原的鉴定用 O 细胞和 B 细胞分别做强阳性和弱阳性对照,具体方法按照文献[1]及试剂说明书操作,按血清学诊断标准判断结果并做 ABO 亚型鉴定和分类^[2],见表 1。

1.4 提取基因组 DNA

按照血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书,提取基因组 DNA,调整其浓度为 50 ng/μL 左右,纯

度为 1.7~1.8(260/280)。

1.5 ABO 基因扩增和直接测序

采用文献[3]的方法对 ABO 基因第 6、7 外显子进行扩增并测序。使用 Chromas Version 1.7 软件阅读测序图谱,用 DNAMAN 8.0 软件将序列与 ISBT 网站中的 ABO * A1.01 序列进行比对,确定突变位点和类型。

2 结果

16 例正反定型不符的标本,其血清学表现除 7 号样本外,均有一种抗原(B 或 A)血清学表现正常,相应的另一种抗原(A 或 B)表现弱于正常;除 5 号、6 号、15 号、16 号样本外,多数样本与抗-H 反应增强、接近或稍弱于 O 细胞;另外,A_xB 型个体反定型常产生强弱不一的抗-A₁ 抗体,而 AB_x 型个体反定型常产生弱的抗-B 抗体。

基因分型结果显示:9 例(1~4 号、8~12 号)血清学表现为 B(A)的样本,1 例(7 号)血清学表现为正 O 反 B 的样本,基因型为 B(A)/O;2 例(5、6 号)血清学表型 AB_x 的样本,基因型为 B(A)/A;2 例(13、14 号)血清学表型为 A₂B_x 的样本,基因型为 cisAB/O,2 例(15、16 号)血清学表型为 A_xB 的样本,基因型为 cisAB/B。

16 例样本血清学表现与基因分型结果见表 1,PCR-SBT 基因测序图(主要碱基替换位点)见图 1~4,B(A)、cisAB 等位基因第 6、7 外显子突变位点及氨基酸变异见表 2。

表 1 16 例 B(A)与 cisAB 血型血清学结果及对应基因型

样本号	正定型				反定型					血清学表现型	基因型
	抗-A	抗-B	抗-A ₁	抗-H	A ₁ 细胞	A ₂ 细胞	B细胞	O细胞	自身细胞		
1	2+	4+	0	4+	1+	±	0	0	0	B(A)	ABO * BA. 02/ABO * O. 01. 02
2	2+	4+	0	4+	2+	±	0	0	0	B(A)	ABO * BA. 02/ABO * O. 01. 02
3	1+	4+	0	4+	3+	±	0	0	0	B(A)	ABO * BA. 02/ABO * O. 01. 02
4	1+	4+	0	4+	1+	±	0	0	0	B(A)	ABO * BA. 02/ABO * O. 01. 01
5	4+	3+	4+	1+	0	/	±	0	0	AB _x	ABO * BA. 02/ABO * A1. 02
6	4+	2+	1+	1+	±	/	±	0	0	AB _x	ABO * BA. 02/ABO * A1. 02
7	0	0	/	4+	2+	/	0	0	0	正 O 反 B	ABO * BA. 03/ABO * O. 01. 01
8	2+	4+	0	4+	3+	±	0	0	0	B(A)	ABO * BA. 04/ABO * O. 01. 02
9	1+	4+	0	4+	2+	±	0	0	0	B(A)	ABO * BA. 04/ABO * O. 01. 02
10	1+	4+	0	4+	2+	±	0	0	0	B(A)	ABO * BA. 04/ABO * O. 01. 02
11	1+	4+	0	3+	2+	±	0	0	0	B(A)	ABO * BA. 04/ABO * O. 01. 01
12	1+	4+	0	3+	3+	±	0	0	0	B(A)	ABO * BA. 04/ABO * O. 01. 01
13	4+	3+	0	3+	0	/	0	0	0	A ₂ B _x	ABO * cisAB. 01/ABO * O. 01. 02
14	4+	2+	0	3+	0	/	0	0	0	A ₂ B _x	ABO * cisAB. 01/ABO * O. 01. 02
15	3+	4+	0	1+	±	/	0	0	0	A _x B	ABO * cisAB. 01/ABO * B. 01
16	2+	4+	0	1+	0	/	0	0	0	A _x B	ABO * cisAB. 01/ABO * B. 01

注:0 为阴性结果,/为未做。

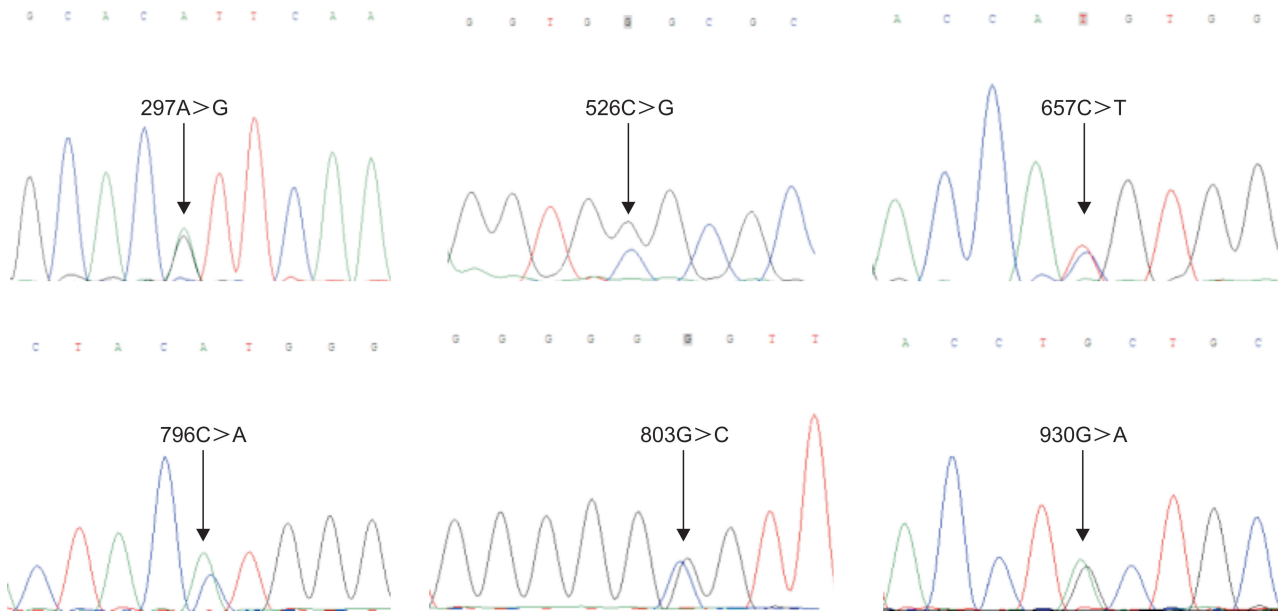


图 1 ABO * BA.03 基因序列主要碱基替换位点

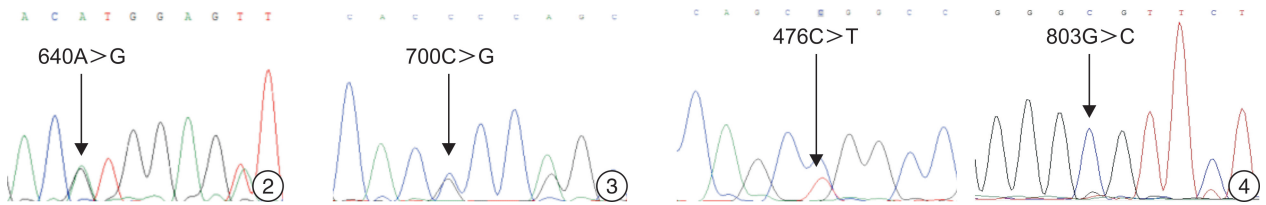


图 2 ABO * BA.04 基因序列主要碱基替换位点;图 3 ABO * BA.02 基因序列主要碱基替换位点;图 4 ABO * cisAB.01 基因序列主要碱基替换位点

表 2 B(A)、cisAB 等位基因第 6、7 外显子突变位点及氨基酸变异

等位基因	核苷酸位置									
	297	467	526	640	657	700	703	796	803	930
ABO * A1.01	A	C	C	A	C	C	G	C	G	G
ABO * B.01	G	—	G	—	T	—	A	A	C	A
ABO * BA.02	G	—	G	—	T	G	A	A	C	A
ABO * BA.04	G	—	G	G	T	—	A	A	C	A
ABO * BA.03	G	—	G	—	T	—	—	A	C	A
ABO * cisAB.01	—	T	—	—	—	—	—	—	C	—
氨基酸变异	NC	p. Pro 156Leu	p. Arg 176Gly	p. Met 214Val	NC	p. Pro 234Ala	p. Gly 235Ser	p. Leu 266Met	p. Gly 268Ala	NC

注:NC 为氨基酸没有改变。

3 讨论

ABO 基因的编码产物为特异性糖基转移酶,这些糖基转移酶将糖基转移到红细胞膜的前体物质上,引导合成 ABO 抗原。ABO 基因上的某 1 个或某几个碱基突变影响了糖基转移酶活性和特异性,改变了抗原的表达,血清学试验出现弱凝集导致的正反定型不一致的现象。B(A)与 cisAB 是 2 种较为罕见的 ABO 亚型,遗传方式相似,而血清学表现略有差异。

ABO * B.01 序列与 ABO * A1.01 序列相比存在 7 个单碱基突变,分别为 c. 297A>G;c. 526C>G;c. 657C>T;c. 703G>A;c. 796C>A;c. 803G>C;c. 930G>A,其中 4 个 SNPs 为错义突变,造成氨基酸的替换,分别为 p. Arg176Gly、p. Gly235Ser、p. Leu266Met 和 p. Gly268Ala。B(A)血型被认为是遗传学上的 B 型,在 ABO * B.01 序列基础上发上了单碱基突变,导致的氨基酸改变使编码的糖基转移酶在合成 B 抗原的同时,

也能够催化可以引导合成 A 抗原的酶形成糖基而具有 A 活性的抗原结构,其红细胞上除了表达 B 抗原外,尚有弱 A 抗原表达^[4-5]。目前国际报道的 B(A)亚型基因型别有 6 种,分别是 ABO * BA.01、ABO * BA.02、ABO * BA.03、ABO * BA.04、ABO * BA.05、ABO * BA.06;国内报道以 ABO * BA.02、ABO * BA.04 为主^[6]。本研究中,1~4 号样本、8~12 号样本血清学表型为 B(A),基因型为 B(A)基因与 O 基因杂合,除具有 O 基因(ABO * O.01.02 或 ABO * O.01.01)外,4 例为 ABO * BA.02,4 例为 ABO * BA.04。ABO * BA.02 序列与 ABO * B.01 相比有 c.700C>G 的突变,造成氨基酸变异为 p.Pro234Ala;ABO * BA.04 序列与 ABO * B.01 相比有 c.640A>G,造成氨基酸变异为 p.Met214Val。当 B(A)基因与 O 基因或 B 基因共同表达时,血清学表现为有较强 B 抗原,较弱 A 抗原^[7],需要与 A_xB 亚型相鉴别。正定型其红细胞能与抗-B 和抗-H 发生强凝集,表现为 3+~4+,与抗-A 发生较弱凝集,表现为 1+~2+,而与抗-A₁ 不凝集;反定型其血清中含有的抗-A 与 A₁ 细胞可有较强凝集表现为 1+~3+,并且通常与 A₂ 细胞有弱凝集。而 A_xB 亚型红细胞上的 H 抗原不增强,其血清与 A₁ 细胞反应较弱,与 A₂ 细胞不凝集,这是 A_xB 亚型区别于 B(A)型的血清学表现^[8]。5 号、6 号样本基因型为 ABO * BA.02/ABO * A1.02,表型为 AB_x,血清学表现有正常 A 抗原,较弱 B 抗原,正定型均与抗-A₁ 有凝集,反定型有弱的抗-B 抗体。B(A)型与正常的 A 抗原共同表达时,由于正常 A 酶的竞争作用,导致 B(A)酶生成 B 抗原减少可能是形成 AB_x 表型的机制。

7 号样本基因型为 ABO * BA.03/ABO * O.01.01,血清学表现为正 O 反 B,正定型与抗-A、抗-B 均不凝集,反定型有抗-A₁ 抗体。ABO * BA.03 较为罕见,而其序列与 ABO * B.01 序列相比少 1 个 c.703G>A 的单碱基突变。本例血清学表现与其他 B(A)型不同之处在于正定型未检出 A、B 抗原,该例标本来源于血液病患者,可能是由于疾病的原因导致红细胞上抗原减弱而表现为 O 型。

cisAB 型是指编码 A 和 B 糖基转移酶的基因位于一条染色体上,突变的基因导致其编码的糖基转移酶特异性下降,能同时催化 A、B 2 种糖基底物而形成 2 种抗原。有研究显示 cisAB01/O 型常表

现为 A₂B₃ 或 A₂B_x,这说明 cisAB01 酶具有转化 A 抗原强于 B 抗原的特性。13、14 号样本血清学表现为 A 抗原接近正常,而 B 抗原较弱,与抗 H 有较强的凝集反应。血清学表型为 A₂B_x。基因测序结果显示,与 ABO * A1.01 序列相比,一条链为 ABO * O.01.02 型;另一条链为 ABO * cisAB.01 型,在第 7 外显子存在 c.467C>T 和 c.803G>C 的杂合突变,氨基酸变异为 p.Pro156Leu 和 p.Gly268Ala。在 15、16 号样本中,正定型与抗-A 反应为 2+~3+,与抗-A₁ 反应阴性,与抗-B 反应均为 4+,与抗-H 反应为 1+。反定型与 A₁ 细胞凝集较弱或阴性,与 B 细胞均为阴性,血清学表型为 A_xB。基因测序结果显示,与 ABO * A1.01 序列相比,一条链为 ABO * cisAB.01 型,另一条链为 ABO * B.01 型,具有正常的 B 基因,所以血清学表现中 B 抗原表达正常,掩盖了 B 抗原的变异。

此次试验研究主要针对 cisAB 和 B(A)这 2 种亚型,相同的基因型有不同的血清学反应特点。其血清中往往存在弱的不规则抗体。传统血清学方法虽然经典,但存在一定的局限性,加上不同实验室及操作者对血清学试验凝集强度判断易受主观因素的影响,容易对结果判断产生偏差。因此对于 ABO 疑难血型的鉴定,有条件应进一步进行分子生物学鉴定,以保证临床输血安全。对于罕见 ABO 亚型患者的输血,一般可使用 O 型洗涤红细胞和 AB 型血浆,主、次侧交叉配血相合即可。

参考文献

- [1] 尚红,王毓三,申子瑜,等.全国临床检验操作规程[M].4版.北京:人民卫生出版社,2015:118-123.
- [2] 向东.ABO亚型的检测[J].中国输血杂志,2010,23(8):577-580.
- [3] 王鹤,章旭.ABO亚型分析及基因测序研究方法的建立[J].临床血液学杂志,2017,30(4):254-257.
- [4] 朱自严.人类血型[M].北京:科学出版社,2007:45-46.
- [5] 李勇,马学严.实用血液免疫学[M].北京:科学出版社,2006:138-138.
- [6] 熊莉,周小英,吴红,等.罕见 B(A)血型的鉴定[J].临床检验杂志,2018,36(6):426-428.
- [7] 金沙,蔡晓红,刘曦,等.上海地区献血人群 cisAB 和 B(A)血型的研究[J].中国输血杂志,2013,26(12):1198-1201.
- [8] 李丽春,章旭,李剑平.罕见 B(A)血型的鉴定及临床安全输血的研究[J].中国输血杂志,2016,29(7):689-692.

(收稿日期:2019-11-29)