

## 8 例家系中 A、B 血型基因连锁遗传多态性分析\*

彭及良<sup>1</sup> 梁延连<sup>2</sup> 苏宇清<sup>2</sup> 吴凡<sup>2</sup> 梁爽<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:通过调查 8 例 ABO 血型血清学正反定型不符,血清学鉴定结果与 PCR-SSP 基因分型结果不一致的家系成员,研究 A、B 亚型的血清学特征及 A、B 基因在家系中的遗传特点,深入了解 ABO 疑难血型的鉴定方法。方法:应用常规血型血清学检测为初步鉴定,对 A 或 B 抗原减弱的样本进行吸收放散试验与型物质试验来确证血型的型别,同时采用 PCR-SSP 方法进行 ABO 基因分型,对于血清学鉴定与 PCR-SSP 基因分型结果不一致的特殊标本通过 ABO 基因第 6 外显子(exon-6)、第 7 外显子(exon-7)的直接测序的方法解析 ABO 基因核苷酸序列特征。结果:血型血清学检测发现,8 例家系中先证者成员都以 ABO 定型正反定型不符、PCR-SSP 基因分型与血清学结果不相符、血浆中出现意外抗-A 或抗-B 抗体为主要特征,个别家系的型物质检测结果出现半分泌型特质的现象。ABO 基因 exon-6、exon-7 测序发现 8 个家系成员均具有同一特征:共存 A、B、O 3 个基因,A 与 B 基因在同一条染色体上连锁遗传、O 基在另一条染色体上以等位基因的方式遗传。其中一个家系相关成员的型物质出现半分泌现象。3 例家系的 A、B 基因分别以 CisAB \* 01(AAAB)、CisAB \* 02(BBAB)、CisAB t1se \* 03(BBAB)的模式遗传,其他 6 例家系有 1 例以 B(A) \* 02,3 例以 B(A) \* 01,1 例以 B(A)640,1 例以 B(A)700 的模式遗传。结论:ABO 疑难血型在中国人群中以血清学鉴定困难,常规血清学与基因分型结果不相符为主要特点,以 exon-6 的 261 位,exon-7 的 467、526、640、700、703、796、803 位核苷酸的突变决定了 A 与 B 基因连锁遗传的分子基础。

**[关键词]** ABO 疑难血型;B(A)亚型;CisAB 亚型;连锁遗传;家系调查

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2020.08.008

**[中图分类号]** R457.1 **[文献标志码]** A

## Analysis of linkage genetic polymorphism of A and B blood type genes in eight families

PENG Jiliang<sup>1</sup> LIANG Yanlian<sup>2</sup> SU Yuqing<sup>2</sup> WU Fan<sup>2</sup> LIANG Shuang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Shenzhen Longgang Central Blood Station & Institute of Transfusion Medicine, Shenzhen, 518172, China; <sup>2</sup>Shenzhen Blood Center)

Corresponding author: LIANG Shuang, E-mail: liangshuang0307@163.com

**Abstract Objective:** Eight family members whose ABO blood group serology was inconsistent with positive and negative stereotypes and whose serological identification results were inconsistent with PCR-SSP genotyping. The results were investigated to study the serological characteristics of subtypes A and B and the genetic characteristics of genes A and B in the family and conduct in-depth research on the identification of ABO difficult blood group. **Method:** The routine serological detection for blood group preliminary appraisal, weakened to A or B antigens samples absorb radiation type test and don't test to confirm the type of substances, and the PCR-SSP methods ABO genotyping, for serological identification are not consistent with the result of PCR-SSP genotyping of special specimens by ABO gene exon 6 and exon 7 of direct sequencing method resolution ABO gene nucleotide sequence features. **Result:** Blood group serological test results are all the proband members of the eight families were mainly characterized by ABO inconformity, PCR-SSP genotyping inconformity with serological results, and unexpected anti-A or anti-B antibodies in the plasma. While some families showed semi-secretory characteristics in the test results. The exon-6 and the exon-7 sequencing of ABO genes found that eight family members all have the same characteristics: coexistence of A, B and O genes, A and B genes are linked on the same chromosome and O group is inherited in the way of allele on another chromosome. One of the related members of the family was hemicine. The A and B genes of the three families were inherited by CisAB \* 01(AAAB), CisAB \* 02(BBAB) and CisAB t1se \* 03(BBAB), respectively. Among the other six families, one was inherited by B(A) \* 02, three by B(A) \* 01, one by B(A)640 and one by B(A)700. **Conclusion:** ABO difficult blood group in Chinese population is characterized by the difficulty of serological identification and the conventional serology and genotyping results were not consistent with the main characteristics. The 261 in the exon-6 and the 467, 526, 640, 700, 703, 796, 803 nucleotide mutations in the exon-7 were determined the molecular basis of A and B gene linkage.

**Key words** ABO difficult blood group; B(A) subtype; CisAB subtypes; chain inheritance; genealogical survey

\*基金项目:中国输血协会威高科研资助项目(No:CSBT-WG-2018-09)

<sup>1</sup>深圳市龙岗区中心血站(广东深圳, 518172)

<sup>2</sup>深圳市血液中心输血医学研究所

通信作者:梁爽, E-mail: liangshuang0307@163.com

ABO 3 种血型抗原的遗传分别受 3 个复等位基因控制:A、B 与 O 基因,相对位点上基因总和为 AA、BB、OO、AB、AO 或 BO 6 种组合形式,A 或 B 属显性基因,O 属隐性基因,子代各从亲代遗传到 1 条 A、B 或 O 基因形成双倍体复等位基因。然而,人类血型的遗传存在多态性,自 1929 年以来就有报道 O 型与 AB 型的双亲生下 O 型、AB 型的子代,提示了 A 和 B 基因在同 1 条染色体遗传的可能。直到 1965 年由 Yamaguchi 把 A、B 2 个基因在同 1 条染色体上的模式定义为 CisAB。继 1993 年 Yamamoto 继续发现了 CisAB 的遗传特征:根据检测的案例发现了 ABO 基因的最后 2 个编码外显子(exon-6、exon-7)的编码区域的核苷酸序列中有 2 个核苷酸发生了替换,而与 A1 等位基因不同,这 2 种核苷酸取代都导致了氨基酸发生变化。其中 1 个替换与 A2 等位基因中发现的替换相同,另 1 个替换位点区分于 A1 和 B 转移酶的 4 个氨基酸的第 4 个位置<sup>[1]</sup>。由于 A、B 基因的变异引起糖基转移酶的改变并导致 A、B 抗原在红细胞上的表达变异、血浆中出现意外抗-A、抗-B 抗体,这种正反定型不符并在血浆中出现意外的抗-A、抗-B 的血型统称为 ABO 系统的亚型,该亚型为临床血型鉴定与安全输血带来困扰。A、B 基因连锁遗传的表型不多,本研究经过多年的积累收集了 8 个家系,在血型血清学鉴定的基础上,通过分子生物学手段分析了这些家庭成员的 A、B 基因遗传多态性,现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 样本

8 例先证者为 ABO 血型正反定型不相符、序列特异引物引导的聚合酶链反应(PCR-SSP)基因分型与血清学结果不相符的无偿献血者,随后采集家系成员的血样,以血清学为基础结合基因测序的方法来深入分析 A、B 基因的遗传特征。

### 1.2 方法

**1.2.1 血清学定型** 分别以 EDTA 抗凝血 5 mL 为检材,对先证者与家系成员均以试管法 ABO 常规的正、反定型为基础,正定型中 A 或 B 抗原阴性的样本应用吸收放散的方法验证抗原是否存在<sup>[2]</sup>,同时采集抗凝血与唾液来检测型物质是否存在来结合判断血型。

**1.2.2 PCR-SSP 定型** 采用美国 Promega 公司生产的 Gentra DNA 提取试剂盒(批号:106412)提取 8 个家系成员血样中的 DNA,并控制 DNA 的浓度在 100 ng/μL 左右,后续 PCR 扩增;使用天津秀鹏生物技术开发有限公司生产的人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒(PCR-SSP 法,批号 K201912003)进行 PCR-SSP 基因分型。

**1.2.3 ABO 基因 exon-6、exon-7 测序** ①引物合

成:exon-6 上游引物:5'-CGGGATCCAGGGTG-GCACCCCTGCCA-3',下游引物:5'-CGGAAT-TCACCTCGCCACTGCCTGGGTCTC-3;exon-7 上游引物:5'-CGGGATCCCCGTCCGCCTGCCTT-GCAG-3';下游引物:5'-GGGCCTAGGCT-TCAGTTACTT-3'。②扩增体系与加样条件:PCR 扩增体系与条件:PCR 采用 50 μL 体系:10× Buffer:5 μL;MgCl<sub>2</sub>:3 μL,dNTP 2 μL;正、反向引物各 0.5 μL;TaqDNA 聚合酶:0.5 μL;DNA 模板:2 μL;ddH<sub>2</sub>O:36.5 μL。扩增条件:95℃预变性 5 min;95℃ 30 s,62℃ 40 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃延伸 5 min,4℃保存。③产物纯化与测序鉴定:使用离心过滤柱法(Millipore 公司)纯化扩增产物,以纯化后的扩增产物作为测序反应模板,再一次进行扩增,测序引物与第 1 次扩增引物序列相一致,采用 10 μL 反应体系:正、反向引物(终浓度为 0.062 5 pmol/L):各 3 μL;模板 DNA:1 μL;ddH<sub>2</sub>O:2.0 μL;ABI Big-Dye v3.1 测序反应液 4 μL。PCR 扩增条件:94℃预变性 10 min;94℃变性 10 s,50℃退火 5 s,60℃延伸 4 min,运行 25 个循环后产物于 4℃保存。对以上扩增产物用醋酸钠/乙醇沉淀法提纯后使用 Prism™ ABI3730XL 基因测序仪检测,并使用 Oli6instatler 分析软件进行分析。

## 2 结果

本研究的 8 例 ABO 疑难血型家系的血清学检测以正、反定型不相符,血浆中出现同种抗-A 或抗-B、缺失天然抗-A 或抗-B、A 或 B 抗原减弱、分泌或半分泌型特征为主要现象。通过吸收放散试验来验证被检者红细胞上是否存在相关抗原,以 PCR-SSP 基因分型来初步鉴定是否存在 A/B/O 基因,再通过 ABO 基因测序的方法来综合判定 ABO 疑难血型的型别,见表 1。

ABO 血型基因的遗传在家系中遵循孟德尔遗传的规律,该 8 例家系的遗传模式,确证具有亲代遗传的特征,见图 1。

从 ABO 基因全长外显子测序中发现鉴定 A、B 基因连锁遗传的关键突变点:exon-6 的 261 位,exon-7 的 467、526、640、700、703、796、803 位核苷酸代表图见图 2。

在 8 例家系的调查中发现,A、B 基因发生连锁遗传的个体,均为 ABO 血清学检测结果与 PCR-SSP 基因分型结果不一致:血清学表型为“AB”型,但 PCR-SSP 鉴定为 BO 型。在 ABO 血型基因的 exon-6、exon-7 序列中发现核苷酸突变的位点,这些突变点引起了 A、B 血型抗原表达强度的差异,对于抗原弱表达的个体在受到外界物质的免疫刺激下在血浆中会出现抗-A、抗-B 同种抗体,从而导致 ABO 的正反定型不相符。

表 1 8 例先证者的血清学与基因检测结果

家系先证者	ABO 血清学结果						型物质 结果	吸收放 散结果	PCR-SSP 结果	基因测 序结果	A、B 基因连 锁遗传模式
	抗-A	抗-B	抗-H	Ac	Bc	Oc					
先证者 1	4+w	2+	3+	-	1+	-	分泌 A、B、 H 物质	无	BO 型	CisAB	CisAB * 01 (AAAB)
先证者 2	2+	4+	1+	1+	-	-	分泌 A、B、 H 物质	无	BO 型	B(A)	B(A) * 01 (BABB)
先证者 3	4+w	4+	2+	4+w	-	-	分泌 A、B、 H 物质	无	BO 型	B(A)	B(A)700
先证者 4	1+	4+	3+	-	-	-	分泌 B 物质， 弱分泌 A、H 物质	无	BO 型	B(A)	B(A)640
先证者 5	4+	-	-	-	2+	-	分泌 A、 H 物质	B 抗原阳性	AO 型	CisAB	CisAB t1se * 03 (BBAB)
先证者 6	1+s	4+	1+	2+	-	-	分泌 A、B、 H 物质	无	BO 型	B(A)	B(A) * 01 (BABB)

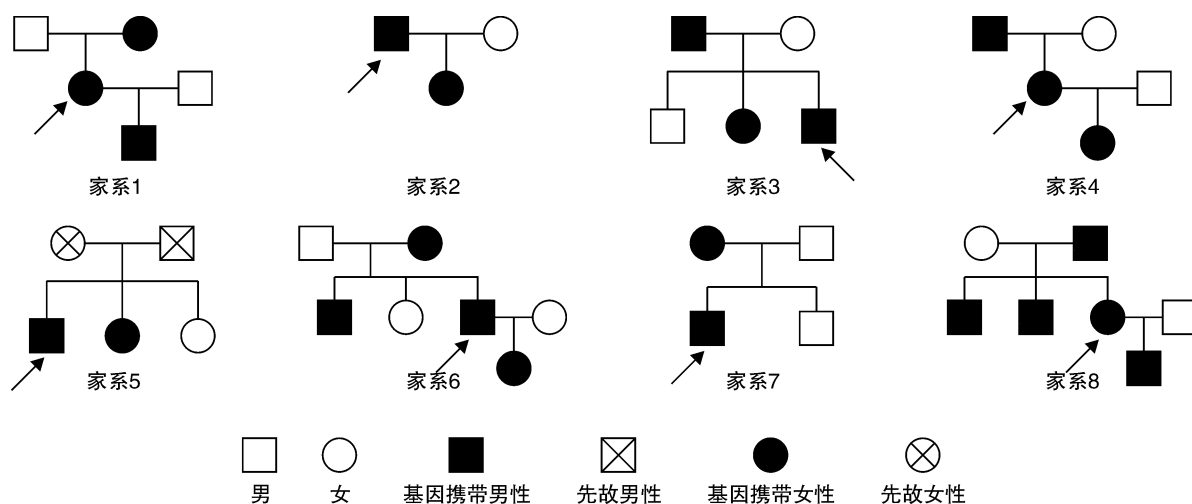
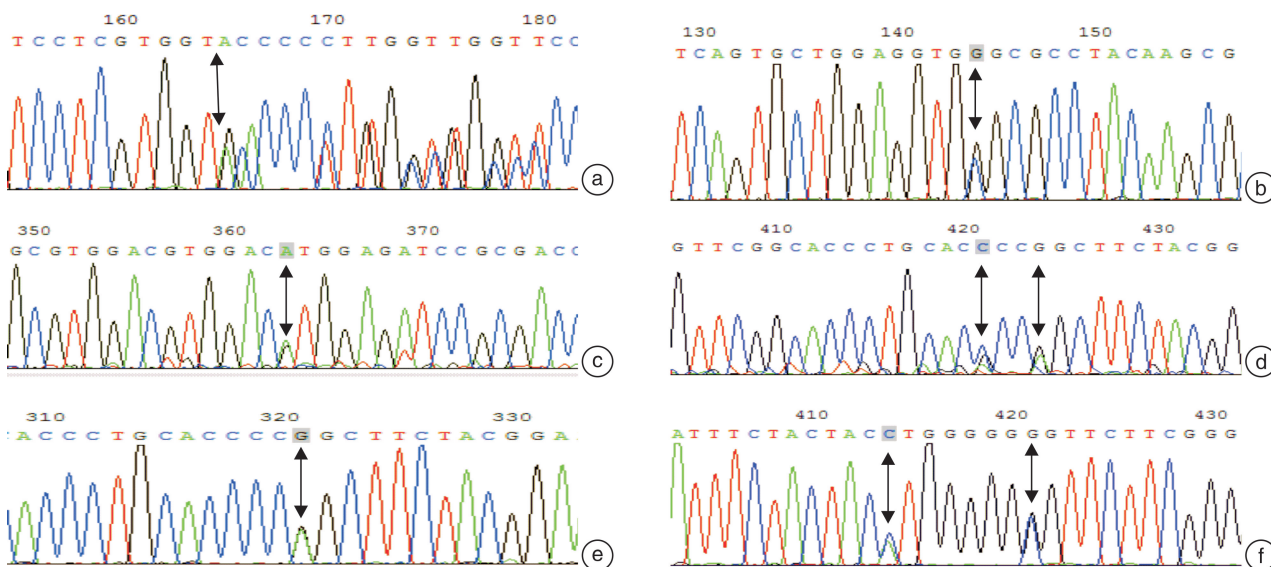


图 1 8 例 A、B 基因连锁遗传在家系中的遗传模式



a: exon-6 的 261 位缺 G; b: exon-7 的 526G/C 杂合突变; c: exon-7 的 640A/G 杂合突变; d: exon-7 的 700C/G; 703G/A 杂合突变; e: exon-7 的 703; f: exon-7 的 796 位 C/A 杂合突变; 803 位 G/C 杂合突变。

图 2 ABO 基因 exon-6 的 261 位, exon-7 的 467、526、640、700、703、796、803 位核苷酸



### 3 讨论

人类 ABO 血型基因位于染色体 9q34.1~34.2 的位置,其基因产物是糖基转移酶,由糖基转移酶控制 ABO 血型抗原的生物合成。A101 基因和 B101 基因具有高度的同源性,两者在基因编码区仅有 7 个核苷酸的差异:297、526、657、703、796、803、930,随着研究的广泛深入,逐渐地发现了更多的碱基变异可以影响 ABO 血型抗原的表达。在遗传过程中,ABO 血型基因出现替换、剪接的突变,碱基的插入、删除和杂交等情况,就有可能影响 A 或 B 糖基转移酶活性的变化而引起红细胞上 ABO 抗原表型的表达<sup>[1-2]</sup>。A、B 基因的连锁遗传最早被发现于亲代与子代的遗传规律无法按常规来解释,按照 ABO 3 个复等位基因学说和孟德尔遗传定律,AB 型和 O 型的双亲不可能生下 AB 型或 O 型的子代,但最近的研究通过基因克隆测序的方法可以区分 A、B、O 基因所在的染色体位置。最初有学者认为 A 和 B 2 个等位基因串联在同 1 条染色体遗传,并称之为 cisAB 表型(相应的 A 和 B 等位基因分别在 2 条同源染色体上的 AB 型称为 transAB)。cisAB 表型不是 A 或 B 2 个等位基因的简单串联,而是在 A101 等位基因的基础上,通过 467C>T 和 803G>C 的变异造成。已报道的 CisAB 的遗传机制可以归类为 3 种模式:CisAB \* 01(467C>T, 803G>C)、CisAB \* 02(528C>G, 703G>A, 803G>C)及 CisAB t1se \* 01(526C>G, 700C>T, 703G>A, 803G>C),均具有 nt803 位碱基突变。按照 nt526、nt703、nt796 和 nt803 4 个关键位置所决定的氨基酸特点,分别属于 AAAB、BBAB、BBAB 型<sup>[3-4]</sup>。现已报道的 B(A)有 2 种,分别为 B(A) \* 01 型:526C>G, 796C>A, 803G>C 为(BABB)型;B(A) \* 02 又称为 B(A)700 型:526C>G, 700C>G, 703G>A, 796C>A, 803G>C,这 4 个关键位置均表现 B 等位基因特点,仅 nt700 处含有一个错义突变。

ABO 血型变异的分布和多样性对准确阐明 ABO 血型表型和临床用血的正确选择至关重要<sup>[5]</sup>。本研究的 8 个家系成员,均表现为 A、B 基因在同 1 条染色体上连锁遗传,但是在血清学检测结果上有差异:抗原表达的强度差异与血浆中同种抗-A、抗-B 的产生与强度的不同。而 B(A)在血清学中的表达以 B 抗原为主,并且血清中包含弱的抗-A 抗体,这种抗-A 我们称其为不规则的抗体,可以和 A2 细胞发生凝集反应。CisAB 型家系 1、5 的先证者红细胞与抗-A 血清反应达 4+凝集,而与抗-B 血清反应相对较弱;而 B(A)型家系的先证者红细胞都以抗-B 的反应强于抗-A 的反应;CisAB 型与 B(A)型家系中携带相同类型基因的成员其血

清学与先证者均一致。该 8 例家系的基因测序发现共有 2 家为 CisAB 型,其余 6 家为 B(A)型。CisAB 型中有 1 家以 CisAB \* 01(AAAB)(467C>T, 803G>C);另 1 家以 CisAB t1se \* 03(BBAB)(526C>G, 700C>T, 703G>A, 803G>C)型进行表达,在基因的突变位点上有差异,从而血清学的表达上也存在相应的差异,与文献报道的相一致<sup>[4,6]</sup>。B(A)型中有 3 例为 B(A) \* 01(BABB)(526C>G, 796C>A, 803G>C);1 例为 B(A)700 型;2 例为 B(A)640 型,血清学反应主要以红细胞与抗-A 反应较弱,与抗-B 反应较强,家系 4 成员的类型物质特点为:分泌 B 物质,弱分泌 A、H 物质,较为特殊。从中可见,在收集到的 8 例家系中,以 B(A)型为主要特征,CisAB 型比较少。出现 1 例 B(A)700 型与 2 例 B(A)640 型与文献报道的一致<sup>[7]</sup>。

ABO 基因位点的变异可解释多年来众多血清学上出现弱 A 或弱 B 现象产生的原因:基因突变可以导致糖基转移酶活性的改变,从而影响到红细胞上 A、B 抗原的表达差异。而 ABO 基因中 exon-6 的 261 位,exon-7 的 467、526、640、700、703、796、803 位核苷酸的突变为 A 与 B 基因连锁遗传的主要决定因素。除了以上突变基因发生在外显子中会造成 ABO 抗原表达的影响之外,在内含子中的碱基变异也会引起糖基转移酶的活性与红细胞抗原特异性的表达<sup>[8-11]</sup>。在检测过程中,可以通过血清学结合分子生物学手段来鉴定 ABO 抗原减弱、抗体消失、出现意外抗-A、抗-B、Cis-AB、类孟买型、血型嵌合体等正反定型不符的现象,为临床解决了一些疑难血型鉴定与输血的相关问题。

### 参考文献

- [1] Cai X, Li F, Lei H, et al. p. R180C mutation of glycosyltransferase B leads to B subgroup, an in vitro and in silico study[J]. Vox Sang, 2018, 113:476-484.
- [2] Seltsam A, Blasczyk R. Missense mutations outside the catalytic domain of the ABO glycosyltransferase can cause weak blood group A and B phenotypes[J]. Transfusion, 2005, 45:1663-1669.
- [3] Sehmsam A, Hallensleben M, Eiz-Vesper B, et al. A weak blood group A phenotype caused by a new mutation at the ABO locus[J]. Transfusion, 2002, 42:294-301.
- [4] Roubinet F, Janvier D, Blancher A. A novel cisAB allele derived from a B allele through a single point mutation[J]. Transfusion, 2002, 42:239-246.
- [5] Ying YL, Hong XZ, Xu XG, et al. Molecular Basis of ABO Variants Including Identification of 16 Novel ABO Subgroup Alleles in Chinese Han Population. Transfus Med Hemother[J]. Transfus Med Hemother, 2020, 47:160-166.

## BP 神经网络模型对临床红细胞用量的预测可行情况分析

禩健蓉<sup>1</sup> 张滢心<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:探讨 BP 神经网络模型预测临床红细胞用量的可行性。方法:调取佛山市顺德区 2012-01—2018-12 临床去白细胞悬浮红细胞用量,并根据此数据采用 BP 神经网络模型预测 2019-01—2019-09 我区临床去白细胞悬浮红细胞用量。结果:只有 2019 年 2 月份预测值与实际值之间的偏差绝对值相对较大,为 27.6%,其余月份的偏差绝对值均<10%。结论:BP 神经网络可以有效地为血站采供血部门制定采、供血计划提供科学依据,以更好地促进血液资源的合理利用,并保障临床用血的及时、高效性。

**[关键词]** BP 神经网络;红细胞用量;预测

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2020.08.009

**[中图分类号]** R555 **[文献标志码]** A

## Exploration of feasibility of BP neural network model for predicting dose of clinical red blood cells

XUAN Jianrong<sup>1</sup> ZHANG Yingxin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Center Blood Station of Shunde District in Foshan, Foshan, 528000, China; <sup>2</sup>Grade 2017, School of Ophthalmology, Wenzhou Medical University)

**Abstract Objective:** To investigate the feasibility of BP neural network model for predicting the dose of clinical red blood cells. **Method:** The monthly dose of clinical leukocyte-suspended red blood cells in Shunde District of Foshan City from January 2012 to December 2018 was collected. BP neural network model was used to predict the amount of clinical leukocyte-suspended red blood cells in our district from January 2019 to September 2019 based on this data. **Result:** The absolute value of deviation between the predicted and actual values in February 2019 was relatively large, which was 27.6%, and the absolute value of deviation in the remaining months was 10%. **Conclusion:** The BP neural network can effectively provide a scientific basis for the blood collection and supply department to develop mining and blood supply plans, so as to better promote the rational use of blood resources and ensure the timely and efficient use of clinical blood.

**Key words** BP neural network; red blood cell dosage; predict

近些年,随着医疗技术的快速发展,临床对血液的需求量越来越大,自 2016 年以来,随着顺德医疗卫生改革、广东省著名医学高校接管我区二甲和三甲医院,我区面临的临床用血压力不断增大的形

势更为严峻。红细胞是临床输血成分中用量最多的血液制品,它能及时补充患者的血氧量,挽救患者生命,尤其在危重患者的抢救中具有不可替代的作用<sup>[1]</sup>。目前临床应用最多的红细胞为去白细胞悬浮红细胞,其保质期为 35 d。由于目前临床的用血只能来源于健康公民的无偿捐献,因此,血液资

<sup>1</sup>佛山市顺德区中心血站(广东佛山,528000)

<sup>2</sup>温州医科大学眼视光学院 2017 级

- [6] Mifsud NA, Watt JM, Condon JA, et al. A novel cis-AB variant allele arising from a nucleotide substitution A796C in the B II anserase gene[J]. *Transfusion*, 2000, 40:1276—1277.
- [7] 郭忠慧, 向东, 朱自严, 等. 罕见的 CisAB 与 B(A) 血型的基因型研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2004, 21(4):321—324.
- [8] Ying Y, Hong X, Xu X, et al. A novel mutation +5904 C>T of RUNX1 site in the erythroid cell-specific regulatory element decreases the ABO antigen expression in Chinese population[J]. *Vox Sang*, 2018, 113:594—600.
- [9] Sano R, Kuboya E, Nakajima T, et al. A 3.0-kb deletion including an erythroid cell-specific regulatory element in intron 1 of the ABO blood group gene in an individual with the Bm phenotype [J]. *Vox Sang*, 2015, 108:310—313.
- [10] Sano R, Nakajima T, Takahashi K, et al. The 3' flanking region of the human ABO histo-blood group gene is involved in negative regulation of gene expression [J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2011, 13:22—29.
- [11] Takahashi Y, Isa K, Sano R, et al. Presence of nucleotide substitutions in transcriptional regulatory elements such as the erythroid cell-specific enhancer-like element and the ABO promoter in individuals with phenotypes A3 and B3, respectively [J]. *Vox Sang*, 2014, 107:171—180.

(收稿日期:2020-04-30)