

• 论著-研究报告 •

罕见的 A₃ 亚型的血清学和分子生物学研究

李茵¹ 赵倩¹ 苏蔓¹ 钱明明¹ 乔芳¹ 王远花¹ 郭霞¹ 王振雷¹

[摘要] 目的:对罕见的 A₃ 亚型进行血清学检测和 ABO 基因测序,探讨其分子生物学特性以及血清型表型和基因型的关系。**方法:**应用常规血清学定型方法进行 ABO 正反定型;对 4 例正反定型不符样本的第 6、7 外显子运用 PCR 扩增后直接测序,确定其基因型。**结果:**3 例血清学表型为 A_{sub} B,1 例为 A_{sub} 的样本其中一条单链序列与 ABO*A1.01 比对,发现其在 467 位和 745 位碱基均存在 C>T 的突变。**结论:**血清学和直接测序结果表明,此 4 例标本均包含罕见的 ABO*A3.07 等位基因。

[关键词] ABO 亚型;A₃ 亚型;血清型表型;基因测序

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.02.008

[中图分类号] R343.1 **[文献标志码]** A

Serological and molecular biological studies of rare A₃ subtype

LI Yin ZHAO Qian SU Man QIAN Mingming QIAO Fang

WANG Yuanhua GUO Xia WANG Zhenlei

(Hebei Blood Center, Shijiazhuang, 050000, China)

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

Abstract Objective: To study the relationship between serotype phenotype and genotype by detecting the rare A₃ subtype using serology and ABO gene sequencing. **Methods:** The forward and reverse ABO typing was carried out by routine serological typing. For the samples inconsistent with forward and reverse ABO typing, their exon 6 and exon 7 were amplified by PCR and sequenced directly to determine the genotypes. **Results:** Among the 4 samples, 3 cases were A sub-B serological phenotype, and 1 was A sub serological phenotype. One single strand sequence was compared with ABO*A1.01 and it was found that there was mutation of C>T at 467 and 745 sites in all four samples. **Conclusion:** The results of serology and direct sequencing showed that all the 4 samples contained rare ABO*A3.07 allele.

Key words ABO subtype; A₃ subtype; serotype phenotype; gene sequencing

ABO 血型系统除了正常的 A、B、AB、O 4 种血型之外,还存在一定数量的 ABO 亚型,ABO 亚型有明确的血清学特点,主要有正反定型不一致、混合凝集视野反应、抗原凝集强度减弱等表现,在临床上导致 ABO 定型或交叉配血困难,ABO 亚型虽然在人群中发生的频率不高,但在临床输血中具有一定的临床意义。笔者在工作中收集了 4 例血清学试验 ABO 正反定型不符,经直接测序证实为罕见的 A₃ 亚型的标本,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料

样本 1 号、2 号、3 号为本中心健康无偿献血者,检验科常规检测 ABO 血型,发现 ABO 正反定型不符,送本实验室进行确认;样本 4 号为患者,男,26 岁,外伤手术备血,无输血史,入院检测 ABO 血型正反不符,送我实验室进行 ABO 血型鉴定。

1.2 试剂和仪器

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 样本 DNA 提取

以 DNA 抽提试剂盒(天根生化科技有限公司)提取样本基因组 DNA,所有操作均严格按产品说明书进行。

1.5 ABO 基因 6、7 外显子测序

对样本 ABO 基因扩增产物直接进行进行 6、7

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

外显子测序,使用 Chromas Version 2.6.5 软件阅读测序图谱,并与国际输血协会(international society of blood transfusion,ISBT)网站“Names for ABO(ISBT 001) Blood Group Alleles”比对确定突变位点。

2 结果

2.1 血清学检测结果

对 4 例样本进行血清学检测,此 4 例样本红细胞均与抗-A 发生弱凝集,与抗-A1 不凝集,均存在

A 抗原减弱,与 O 细胞、自身细胞不凝集。反定型结果表明 1 号样本血清中有抗-A1,其他 3 例不存在抗-A1,见表 1。

2.2 ABO 基因测序结果

直接测序显示此 4 例样本其中一条单链序列与 ABO*A1.01 序列比对,发现其在 467 位和 745 位碱基均存在 C>T 的突变,见表 2。

主要突变位点峰图见图 1。

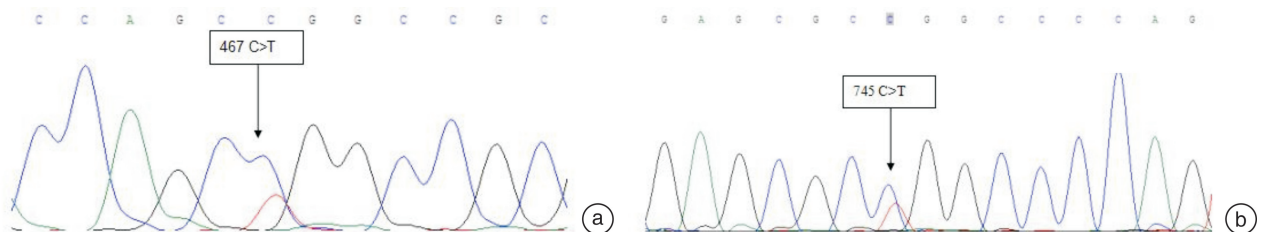
表 1 4 例 A3 血型的血清学检测结果

| 编号 | 正定型 | | | | | 反定型 | | | | | 血清型 |
|----|-----------------|-----|------|------|-----------------|-----|-----|-----------------|----|------|------------------|
| | 抗-A | 抗-B | 抗-AB | 抗-A1 | 抗-H | A1c | A2c | Bc | Oc | 自身细胞 | |
| 1 | 1+ ^s | 4+ | 4+ | 0 | 1+ ^s | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | A _亚 B |
| 2 | 1+ ^w | 4+ | 4+ | 0 | 1+ | 0 | / | 0 | 0 | 0 | A _亚 B |
| 3 | 1+ | 4+ | 4+ | 0 | 1+ | 0 | / | 0 | 0 | 0 | A _亚 B |
| 4 | 1+ ^w | 0 | / | 0 | 2+ ^s | 0 | / | 2+ ^s | 0 | 0 | A _亚 |

注:1+~4+表示凝集强度;0表示无凝集反应;s表示反应加强;w表示反应减弱;/表示未做。

表 2 4 例 A3 血型第 6,7 外显子基因测序结果

| 编号 | 碱基替换(以 ABO*A1.01 为参考序列) | 氨基酸替换 | 等位基因 | 样本表型 |
|----|---|--|-------------|------|
| 1 | c. 467C>T,c. 745C>T | p. Pro156Leu;p. Arg249Trp | ABO*A3.07 | A3 |
| | c. 297A>G;c. 526C>G;c. 657C>T; c. 703G>A;c. 796C>A;c. 803G>C; c. 930G>A | p. Arg176Gly;p. Gly235Ser; p. Leu266Met;p. Gly268Ala | ABO*B.01 | B |
| 2 | c. 467C>T,c. 745C>T | p. Pro156Leu;p. Arg249Trp | ABO*A3.07 | A3 |
| | c. 297A>G;c. 526C>G;c. 657C>T; c. 703G>A;c. 796C>A;c. 803G>C; c. 930G>A | p. Arg176Gly;p. Gly235Ser; p. Leu266Met;p. Gly268Ala | ABO*B.01 | B |
| 3 | c. 467C>T,c. 745C>T | p. Pro156Leu;p. Arg249Trp | ABO*A3.07 | A3 |
| | c. 297A>G;c. 526C>G;c. 657C>T; c. 703G>A;c. 796C>A;c. 803G>C; c. 930G>A | p. Arg176Gly;p. Gly235Ser; p. Leu266Met;p. Gly268Ala | ABO*B.01 | B |
| 4 | c. 467C>T,c. 745C>T | p. Pro156Leu;p. Arg249Trp | ABO*A3.07 | A3 |
| | c. 261delG;c. 297A>G;c. 646T>A; c. 681G>A;c. 771C>T;c. 829G>A | p. Val36Phe;p. Arg63His; p. Pro74Ser;p. Thr88Profs*31 | ABO*O.01.02 | O |



a:4 例样本均在 ABO*A1.01 基础上突变,c. 467C>T;b:4 例样本均在 ABO*A1.01 基础上突变,c. 745C>T。

图 1 ABO*A3 基因序列主要碱基替换位点

3 讨论

在血型鉴定工作中经常会出现正反定型不符的情况,原因之一是由于 ABO 亚型所致。ABO 亚

型的形成是由于血型基因一个或多个碱基发生改变,使糖基转移酶构象发生改变,或者导致改变的氨基酸位于 ABO 血型基因编码转移酶的活性区

域,影响酶的活性,即碱基的改变导致糖基转移酶活性部分丧失,使血型抗原的表达减弱,从而表现出弱凝集反应^[3]。

本研究中血清学 ABO 正定型结果显示此 4 例样本红细胞与抗-A1 出现弱凝集,表明其至少含有 A 抗原,反定型结果第 1 例样本血浆中含有弱的抗-A1 抗体,4 例样本与抗-H 的反应均弱于 O 细胞但强于正常的 B 细胞。参照有关判断标准^[2]初步判定此 4 例样本为 ABO 亚型。1 号标本在没有加做与 A2 细胞的实验时只能初步判断为 A_{sub}B 型或者 B(A)/B 型,两者的反应格局相似,区别在于 A_{sub}B 型与 A2 细胞不发生凝集,而 B(A)/B 型与 A2 细胞发生弱凝集反应,故对 1 号标本进行进一步区分判断为 A_{sub}B 型;2、3 号标本同为 A_{sub}B 型;4 号标本为 A_{sub}型。

对 4 例标本 ABO 基因的第 6、7 外显子扩增产物直接测序分析,与 ABO*A1.01 标准序列比对,发现在第 7 外显子第 467 位和 745 位均发生 C>T 的碱基突变,从而导致第 156 位密码子编码的脯氨酸(Pro)变为亮氨酸(Leu),第 249 位密码子编码的精氨酸(Arg)变为色氨酸(Trp),导致糖基转移酶活性改变,引起 A 抗原表达减弱。与 ISBT 网站比对分析,467C>T 合并 745C>T 突变为 ABO*A3.07 等位基因。

1936 年,Friedenreich 发现了 A3 亚型,A3 亚型与抗-A 反应较弱,是最罕见的弱 A 表现型,我国人群的 A3 频率还未见报道^[4],ABO*A3.07 等位基因由中国台湾地区于 2007 年首次报道^[5],A3 亚型的血清学反应主要特征是与抗-A 反应呈现混合凝集外观,而本研究中 4 例标本均未出现经典的混合视野,但是经测序证实均包含罕见的 ABO*A3.07 等位基因,血清学和基因型结果并不完全对应,提示血清学表现存在个体差异,同样的基因型可以有不同的血清学表现,同时也有报道存在 1 种血清学类别中包含多种不同的基因类型的情况^[6-8],这使得用血清学方法严格划分不同 ABO 亚型变得十分困难。血清学试验方法容易受主客观因素的影响,对实验人员的技术水平及经验

要求较高^[3],因此单纯依靠血清学方法确定 ABO 亚型无法做到十分精确,而基因分型技术可以在分子水平上对异常血清学表现进行解释,但也不能取代血清学方法,在实际工作中应该 2 种方法相结合,正确鉴定 ABO 及其亚型以保证临床输血安全。

ABO 亚型常可以引起交叉配血方面的困难,对于亚型的献血和输血问题应当谨慎对待。1 号、2 号、3 号如果作为受血者,可以输注 AB 型红细胞或者 B 型洗涤红细胞或者 O 型洗涤红细胞。作为献血者 1 号血浆含有抗-A1,不可输注给 AB 型患者,2 号和 3 号血浆可以作为正常 AB 型血浆输注给患者。4 号为 A3 亚型患者,其血浆中不含有抗-A1,可以给予 A 型红细胞或 O 型洗涤红细胞进行输注。如果其血浆中含有抗-A1,则应给予 O 型洗涤红细胞进行输注。

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] 章旭,李剑平. α -1,3-N-乙酰半乳糖胺转移酶基因 467C>T 和 745C>T 突变的研究[J]. 中华医学遗传学杂志,2017,34(4):602-605.
- [5] Li L, Yang MH, Chak KF, et al. Three missense mutations, including a novel 860C>T transition, and allelic enhancement phenomenon associated with ABO blood subgroups A in Taiwan[J]. Transfusion, 2007, 47(6):1014-1021.
- [6] 肖南,周世航,王霓,等. 1 例 A3 亚型的血清学和分子生物学鉴定分析[J]. 大连医科大学学报,2019,41(4):373-375.
- [7] 马晓莉,马宏伟,金新莉,等. A 抗原减弱表型的基因分析[J]. 郑州大学学报(医学版),2017,52(2):191-193.
- [8] 林晨蓓,王秀娣,朱碎永,等. A3 亚型血型的血清学和分子生物学鉴定分析[J]. 中国卫生检验杂志,2018,28(7):801-802,829.

(收稿日期:2020-05-08)