

ABO 血型 B 抗原减弱分子生物学及家系分析

王雅茹¹ 李萌¹ 何婷¹ 王星¹ 吴莉珺¹

[摘要] 目的:探讨 ABO 血型 B 抗原表达减弱样本的分子生物学机制,并对其家系 ABO 血型反应格局特征进行分析。方法:采用微柱凝集法及盐水试管法进行 ABO 血型血清学检测;PCR 产物直接测序对 ABO 基因第 1~7 外显子进行 ABO 血型基因分型及序列分析。结果:血清学检测结果显示患儿为 ABweak,患儿母亲为 Bweak,患儿 B 抗原表达弱于母亲且有抗 B 抗体的产生;分子生物学结果显示患儿基因型为 $ABO^* A1.02/ABO^* B3.02$,患儿母亲基因型为 $ABO^* B3.02/ABO^* O.01.02$ 。结论:患儿及其母亲 ABO 血型 B 抗原表达减弱存在家系遗传性质,均表现为 B_s 型;但二者 B 抗原表达情况及抗 A 产生强度均有所不同,可能由于患儿 A 等位基因竞争抑制作用导致,同时是否与患儿免疫系统未发育完全有关,值得进一步关注。

[关键词] 儿童;B 抗原减弱;家系遗传;DNA 测序

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.08.014

[中图分类号] R339.31 **[文献标志码]** A

Molecular biology and pedigree analysis of ABO blood group B antigen weakening

WANG Yaru LI Meng HE Ting WANG Xing WU Lijun

(Department of Blood Transfusion, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210008, China)

Corresponding author: WU Lijun, E-mail: wljanother@163.com

Abstract Objective: To explore the molecular biological mechanism of ABO blood group B antigen expression weakening in samples, and analyze the characteristics of ABO blood group response pattern in their families. **Methods:** ABO blood group was detected by microcolumn agglutination method and saline test tube method. ABO blood group genotyping and sequence analysis were performed by direct sequencing of the PCR products of exon 1-7 of ABO gene. **Results:** Serological test results showed that the child had ABweak and the mother had Bweak, the expression of B antigen in the child was weaker than that in the mother, and the production of anti-B antibody was also produced. Molecular biological results showed that the genotype of the children was $ABO^* A1.02/ABO^* B3.02$, and the genotype of the mother was $ABO^* B3.02/ABO^* O.01.02$. **Conclusion:** The decreased expression of ABO blood group B antigen in the children and their mothers had a genealogical character, and all of them were B_s type. However, the expression of B antigen and the intensity of anti-A production were different between the two, which may be caused by the competitive inhibition of A allele in children. At the same time, whether it is related to the incomplete development of the immune system in children is worth further attention.

Key words children; B antigen attenuated; pedigree; DNA sequencing

ABO 血型系统是人类发现的第一个血型系统,由于 ABO 血型系统具有极强的免疫原性及独特的血清抗体性质、抗原分布特点等,其在临床输血、新生儿溶血病诊断等方面具有极为重要的意义,故正确的血型鉴定是确保患者输血安全的前提,也是基本原则^[1]。ABO 血型系统除常见 4 种表型之外还存在许多亚型或变异型,通常表现为红细胞上 A 和(或)B 抗原减弱或血清中出现不规则抗 A 和(或)抗 B 抗体,运用常规血清学手段无法准确鉴定血型,随着技术发展,分子生物学方法能有效弥补这一不足,为临床用血安全提供保障^[2]。本文以 1 例 ABO 疑难血型患儿为研究对象,分析其血清学特征,对其家系进行调查,并进一步延伸,

报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

4 例样本分别为:患儿(男,2 岁,拟行腺样体肥大手术治疗)、患儿母亲、父亲及姐姐。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 血清学检测 ABO-RhD 血型鉴定卡(伯乐公司,批号 50093.73.17)、低离子抗人球蛋白卡(伯乐公司,批号 50531.48.17)、抗体筛选红细胞(上海血液生物医药有限公司,批号 20207047)、抗 A 抗 B 血型定型试剂(上海血液生物医药有限公司,批号 20200202)、抗 D(上海血液生物医药有限公司,批号 20191809)、抗 H(上海血液生物医药有限公司,批号 20190114)、专用离心机(伯乐公司, ID-Centrifuge 12 S II)、专用孵育箱(伯乐公司,

¹南京医科大学附属儿童医院输血科(南京,210008)
通信作者:吴莉珺, E-mail: wljanother@163.com

ID-Incubator 37 S I)。

1.2.2 分子生物学检测 DNA 提取试剂盒[批号 R6903,天根生化科技(北京)有限公司]、2xGC Buffer[批号 A92010,宝日医生物技术(北京)有限公司(takara 中国)]、rTaq[批号 AJ30519A,宝日医生物技术(北京)有限公司(takara 中国)]、dNTP Mixture[批号 AIF1969A,宝日医生物技术(北京)有限公司(takara 中国)]、PCR 扩增仪[Gene-Amp9700PCR 系统(美国 ABI 公司)]、高速离心机(SIGMA1-14 台式小型离心机)、涡旋混匀器(VDRTEX-5)、电泳仪(JY300C、北京君意东方电泳设备有限公司)、凝胶电泳槽(JY-SP3、北京君意东方电泳设备有限公司)、紫外分析仪(JYO2S、北京君意东方电泳设备有限公司)、水浴箱(天津泰斯特三用恒温/电热恒温水箱 SHHW21.420A II)。

1.3 方法

1.3.1 血清学检测 采用微柱凝集法及盐水试管法进行 ABO 血型血清学鉴定。实验操作严格执行操作说明书要求。

1.3.2 基因测序 ①DNA 提取:取全血 200 μ L,按照天根生化科技(北京)有限公司试剂盒要求提取 DNA。②PCR 扩增及测序:委托天津吉诺泰普生物科技有限公司设计并合成针对 ABO 基因第 1~7 外显子设计特异性引物,PCR 扩增并直接测序,确定基因型。反应体系为:每个反应总体积 50 μ L,包括 Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.4

μ L,2xGC Buffer I 25 μ L,2.5 mmol/L dNTP 4 μ L,上、下游引物(20 μ mol/L)各 1 μ L,DNA 模板 5 μ L,ddH₂O 13.6 μ L。PCR 反应过程如下:96 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,96 $^{\circ}$ C 变性 30 s,54 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环反应,延伸 5 min。PCR 产物经 2.5%琼脂糖凝胶鉴定后测序,与 NCBI 在线比对数据库 nucleotide blast 确定其基因型。

2 结果

2.1 血清学试验结果

对患儿及其家系成员使用微柱凝集法及盐水试管法进行血型鉴定,结果显示患儿为 ABw,RhD 阳性,患儿母亲为 Bw,RhD 阳性,患儿抗 B 抗原表达弱于母亲且有抗 B 抗体的产生,母亲样本未检出抗 B 抗体;患儿及其母亲血样均与抗 H 发生不同程度凝集,分别疑为 AB 亚型及 B 亚型;患儿父亲为正常 A 型,患儿姐姐为正常 O 型,见表 1。

2.2 分子生物学检测结果

对患儿及其母亲样本进行 ABO 血型基因 1~7 外显子 PCR 产物直接测序结果,根据 ISBT 网站提供的 Names for ABO(ISBT 001) blood group alleles v1.1 171023 综合结果判定(以 ABO* A1.01 为参考序列),患儿结果为 ABO* A1.02/ABO* B3.02,患儿母亲结果为 ABO* B3.02/ABO* O.01.02,二者均发生了 646T>A 的变异。经对患儿及其母亲家系分析,可以确定该变异位点发生于 B 等位基因,见表 2,图 1。

表 1 4 例样本 ABO 血型血清学鉴定结果

样本	单克隆抗血清			试剂红细胞			抗体 筛查	自身	结果
	-A	-B	-H	A1c	Bc	Oc			
患儿	4+	±	1+w	0	1+w	0	0	0	ABw
患儿之母	0	2+	3+	4+	0	0	0	0	Bw
患儿之父	4+	0	-	4+	0	0	0	0	A
患儿之姐	0	0	-	4+	4+	0	0	0	O

1~4+表示凝集强度,w 表示弱凝集,0 表示未凝集。

表 2 2 例样本 ABO 血型 PCR 直接测序结果

样本	等位基因	碱基变异	氨基酸替换	表现型
患儿	ABO* A1.02/ABO* B3.02	c.467C>T c.646T>A	p. Pro156Leu p. Phe216Ile	A/Bweak
患儿之母	ABO* B3.02/ABO* O.01.02	c.646T>A c.261delG;c.297A>G; c.646T>A;c.681G>A; c.771C>T;c.829G>A	p. Phe216Ile p. Val36Phe; p. Arg63His; p. Pro74Ser; p. Thr88Profs* 31	Bweak

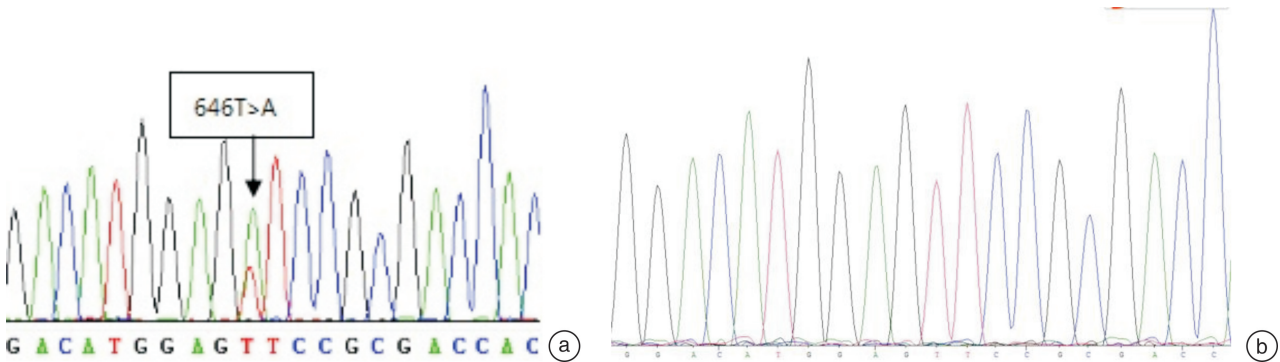
3 讨论

ABO 血型系统基因位于人类第 9 号染色体长

臂,其基因产物为氨基酸组成的糖基转移酶,特异性的 A、B 糖基转移酶与前体物质相作用,引导 A、

B 抗原的合成^[3], ABO 亚型多由蛋白编码区改变致抗原表达减弱,但也有报道表明内含子或启动子区域改变也可致亚型情况的发生,从而导致血清学正反定型不一致^[4-5]。分子生物学方法能够协助处理一些血清学无法解决的问题,通过提取样本外周

血基因组 DNA,进行 PCR 扩增反应,确定血型基因型。由于 ABO 血型基因由 7 个外显子和 6 个内含子组成,77% 的基因编码序列和 91% 的糖基转移酶催化系列位于第 6、第 7 外显子区域,因此往往直接对外显子 6、7 进行测序即能确定亚型基因^[6]。



a: 患儿及其母亲发生 646 T>A 变异; b: 646 T>A 比对标准序列峰图, 参考序列号 AY268591.1。

图 1 ABO 血型基因 EXON7 测序结果

本研究中患儿及其母亲 ABO 血型鉴定时,血清学检测结果均显示 B 抗原表达减弱,但与抗 B 反应强度不一致,同时患儿样本检出抗 B 抗体,其母亲样本未检出;二者与抗 H 发生不同程度的凝集反应,提示可能为亚型。分子生物学结果显示患儿及其母亲均发生第 7 外显子 646 T>A 变异,因其存在血缘关系,故而确定该碱基突变发生在 B 等位基因,导致第 216 位氨基酸由苯丙氨酸转变为异亮氨酸,氨基酸的改变引起蛋白质构象发生改变导致 B 抗原表达减弱。基因测序结果显示患儿为 ABO* A1.02/ABO* B3.02, 患儿母亲为 ABO* B3.02/ABO* O.01.02, 二者红细胞表面均存在 B₃ 抗原。有文献报道,当同时存在 A、B 基因时, A、B 糖基转移酶会竞争同一受体,如 A₂B 细胞上的 A 抗原比 A₂ 细胞上的 A 抗原弱, A₁B 上的 A 抗原比 A₁ 细胞上的 A 抗原弱^[7]。这种等位基因的竞争抑制作用可能是导致该患儿(血型 AB₃)B 抗原表达弱于其母亲(B₃ 型)的直接原因。同时,通过询问病史得知患儿为早产儿,且发育情况不佳,这是否也会影响其血型抗原的发育和成熟,有待后期进一步关注。

输血治疗在临床诊疗中具有举足轻重的地位,是治疗和抢救的重要措施之一。为患者选择相合的血液进行配合性输注尤为重要,否则可能会引起输血反应甚至危及生命^[8]。本次试验中,患儿样本检出不规则抗 B 抗体,其母亲样本并未检出。提示该患儿只能输注 O 型洗涤红细胞,其母亲则可以安全输注 B 型红细胞。由此可见,正确的血型鉴定是临床用血安全的首要保障^[9]。有必要时,应采用

血清学方法结合分子生物学方法综合判断,确保临床用血安全。

参考文献

- [1] 杨璇,郭思维,洪强. A 亚型患者血型鉴定流程及输血策略研究[J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10(23): 131-134.
- [2] 康丹,郝一文. 1 例 ABO 正反定不符的血型分子生物学鉴定[J]. 临床血液学杂志, 2019, 32(10): 810-812.
- [3] 赵倩,苏蔓,李茵等. B(A)血型与 cisAB 血型的血清学表型及基因型研究[J]. 临床血液学杂志, 2020, 33(8): 521-524.
- [4] 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(2): 171-180.
- [5] Cai X, Jin S, Liu X, et al. Molecular genetic analysis of ABO blood group variations reveals 29 novel ABO subgroup alleles [J]. Transfusion, 2013, 53: 2910-2916.
- [6] 张钰,李炜华,蔡杰等. 一例 B(A)血型的血清学及分子生物学鉴定[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(10): 758-760.
- [7] 许志远,刘凯,庄光艳,等. 一例 B(A)血型患者及其家系的血型血清学和分子生物学研究[J]. 北京医学, 2020, 42(2): 149-152.
- [8] 宁宇. ABO 血型亚型检测及血清学分析[J]. 中国医药指南, 2019, 17(35): 47-47.
- [9] Jiao LX, Zhang JY, Chen L, et al. Gene identification of rare B(A) blood group[J]. Transfus Apher Sci, 2017, 56(6): 855-857.

(收稿日期: 2021-02-02)