

儿童顺式(Cis)AB 血型的血清学检测与分子生物学分析

任晓艳¹ 韩军¹ 李萌¹ 孙文杰¹

[摘要] 目的:分析 1 例儿童顺式(Cis)AB 血型的血清学鉴定及生物学机制。方法:采用微柱凝集法及盐水试管法进行患者血型血清学检测;采用分子生物学方法对 ABO 基因第 1~7 外显子 PCR 产物直接测序进行 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 AB_x 血型;分子生物学检测结果显示患儿样本 ABO 等位基因第 7 外显子发生 467C>T、803G>C 变异,鉴定结果为 *CisAB01/A102*。结论:通过基因分型,确定该患儿血型为 CisAB 型;婴幼儿 ABO 血型抗原发育不全,容易造成血型误判,必要时应结合分子生物学检测。

[关键词] 婴幼儿;CisAB 亚型;基因测序;血型血清学

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.08.016

[中图分类号] Q343.1 **[文献标志码]** A

Serological detection and molecular biological analysis of CisAB blood group in children

REN Xiaoyan HAN Jun LI Meng SUN Wenjie

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

Corresponding author: SUN Wenjie, E-mail: 78737577@qq.com

Abstract Objective: To analyze the serological identification and biological mechanism of CisAB blood group in children. **Methods:** The blood group serological test was carried out by micro column agglutination and brine test tube method. The PCR products of exon 1-7 of ABO gene were sequenced by molecular biology method to analyze the genotypes and sequence of ABO blood group. **Results:** The results of serological test showed that the children were AB_x. The results of molecular biology showed that the exon 7 of ABO allele in children had variations of 467C>T and 803G>C, and the results were *CisAB01/A102*. **Conclusion:** The blood type of the child was CisAB type by gene typing, and the development of blood-group-ABH antigens in infants was incomplete, which was easy to cause misjudgment of ABO blood type. If necessary, it should be combined with molecular biology detection.

Key words infant; CisAB subtype; gene sequencing; blood group serology

ABO 血型系统是人类最重要的血型系统,正确鉴定血型是安全、有效输血的前提。然而婴幼儿 ABO 血型鉴定中,常会因抗原或抗体发育不全而出现凝集减弱或消失的情况,造成血型鉴定困难,甚至干扰亚型的判断。临床工作中,同种亚型会有多种血清学表现形式,而相同的血清学反应格局也可能是不同的亚型所致^[1],所以必要时,应采用血清学方法结合分子生物学方法进行血型的正确鉴定。本试验系在临床工作中应用分子生物学技术,确定 1 例儿童顺式(Cis)AB 血型,结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

EDTA 抗凝血样本来源于我院住院患儿,女,2 岁,急性淋巴结炎。

1.2 方法

1.2.1 血清学检测 采用微柱凝集法(ABO-RhD

血型鉴定卡,美国伯乐,批号 50093.73.17;IH-1000 全自动血型鉴定仪,美国伯乐)及盐水试管法(ABO 血型反定型用红细胞试剂盒,上海血液生物医药有限公司;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 定型试剂,上海血液生物医药有限公司,批号 20191809;抗 H 定型试剂,上海血液生物医药有限公司,批号 20190114)进行 ABO 血型血清学鉴定。试验操作严格执行操作说明书要求。

1.2.2 分子生物学检测 ①DNA 抽提:基因组 DNA 提取使用全血基因组 DNA 提取试剂盒(天津秀鹏,批号:202001002),按照试剂盒说明书进行 DNA 提取过程,选取浓度在 20 ng/μL 以上,纯度在 1.7~1.9 的 DNA 样本进行检测。②ABO 基因测序:委托天津秀鹏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。测序扩增 PCR 反应体系如下:43.5 μL dNTP-Buffer 工作液中加入 0.5 μL Taq 酶(5 units/μL),再加入 5 μL 样本

¹南京医科大学附属儿童医院(南京,210008)

通信作者:孙文杰,E-mail:78737577@qq.com

DNA,和 1 μL 20 μmol/L 扩增引物,混匀,每孔加入 15~20 μL 石蜡油,并按以下循环参数进行 PCR 扩增:96℃ 2 min,1 cycle;96℃ 20 s/68℃ 60 s 5 cycles;96℃ 20 s/64℃ 50 s/72℃ 1.5 min,10 cycles;96℃ 20 s/61℃ 50 s/72℃ 1.5 min,25 cycles;72℃ 5 min,1 cycle。将产物及测序引物寄送至赛默飞世尔公司进行测序,测序仪为 Applied Biosystems 3730XL。使用 Chromas 软件进行结果分析,以 NG_006669.1 为参考序列来确定突变点信息。

2 结果

2.1 血清学检测结果

分别用微柱凝集法和盐水试管法对患儿样本进行 ABO 血型血清学鉴定。微柱凝胶法鉴定结

果,正定型:抗-A 4+,抗-B ±,抗-D 4+;反定型:Ctrl 0,Ac 0,Bc 2+。结果显示患者 B 抗原表达减弱,血清中含有不规则抗-B 抗体,正反血型不符;红细胞与抗 H 反应较 B 细胞(1+w)反应增强,而较 O 细胞(3+)反应减弱,符合亚型的血清学反应格局。见表 1。

2.2 基因测序结果

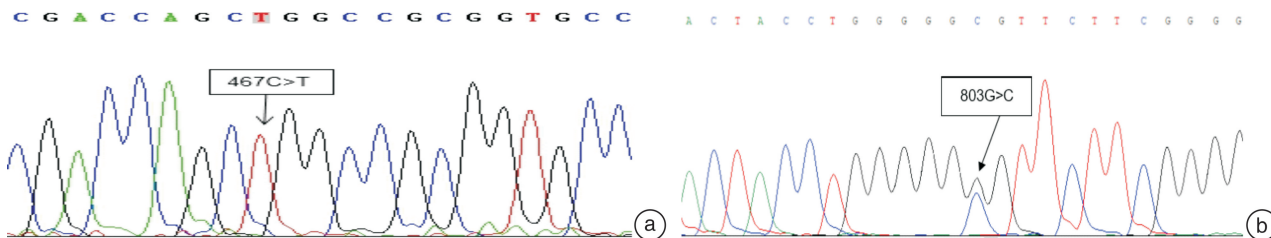
对患儿样本进行 ABO 血型基因 1~7 外显子 PCR 产物直接测序结果,根据 ISBT 网站提供的 Name for ABO (ISBT 001) blood group alleles v1.1 171023 综合判定(以 ABO* A1.01 为参考序列)血型结果为 ABO* CisAB01/ABO* A1.02。见表 2,图 1。

表 1 患儿盐水试管法 ABO 血型鉴定结果

| 反应条件 | 单克隆抗血清 | | | | 试剂红细胞 | | | 自身对照 |
|---------------|--------|-----|------|----|-------|-----|----|------|
| | -A | -B | -A,B | -H | A1c | Bc | Oc | |
| 室温,立即离心 | 4+ | 1+s | 4+ | 2+ | 0 | 2+s | 0 | 0 |
| 4℃,10 min 后离心 | 4+ | 2+ | 4+ | / | 0 | 3+ | 0 | 0 |

表 2 ABO 血型 PCR 直接测序结果

| 等位基因 | 碱基变异 | 氨基酸替换 | 表现型 |
|--------------|------------------|---------------------------|-------|
| ABO* CisAB01 | c. 467C>T;803G>C | p. Pro156Leu;p. Gly268Ala | CisAB |
| ABO* A1.02 | c. 467C>T | p. Pro156Leu | A1 |



a: EXON7 发生 467C>T 变异;b: EXON7 发生 803G>T 变异。

图 1 ABO 血型基因 EXON7 测序结果

3 讨论

CisAB 血型在人群中发生频率非常低,亚洲人群中比例约为 1/58 万~1/17 万^[2],日本人群约为 1.4/10 万^[3],CisAB 在韩国人群中较为常见^[4]。该血型往往会造成 ABO 定型正反定型不符,但有时不会表现出典型的血清学特征,故易被漏检、误判,影响输血的安全性和有效性。本次研究对 1 例儿童 ABO 血型血清学鉴定正反定型不符的样本进一步采用分子生物学方法分析,最终确定为 Cis-AB01/A1.02 型。

CisAB 血型基因的 1 条单倍型是 AB 型,另 1 条单倍体可以是 A、B 或 O 型,从而造成该血型的血清学结果表现出不同的血清学格局。当 CisAB 型单链与 O 基因杂合时,血清学常表现为 A₂B₃ 或

A₂B_x,与抗 H 反应表现增强;当其与正常的 A 或 B 等位基因杂合时,血清学结果常表现为 AB_x 或 A_xB,有剂量效应,与抗 H 反应表现不增强或较弱^[5]。本研究中,患儿样本血型血清学检测结果显示 B 抗原减弱,且有不规则抗 B 抗体,反应格局表现为 AB_x。分子生物学检测结果显示,ABO 血型第 7 外显子 467 位点出现单一峰,表示 ABO 等位基因在该位点均发生 467C>T 碱基变异;第 7 外显子 803 位点出现套峰,表明一个 A 等位基因发生 803G>C 的碱基变异。所以,综合判定 EXON7 测序结果 467C>T,803G>C 鉴定为 CisAB01;467C>T 鉴定为 A1.02。

近年来,血型基因检测的应用为疑难血型的鉴定带来很大帮助,进一步确保了临床输血安全^[6],

在婴幼儿 ABO 血型鉴定时尤显重要。胚胎 5~6 周时,即可在红细胞表面检出 ABO 血型抗原^[7],但是新生儿红细胞所带的抗原数目只有成人的 25%~50%^[8],因此婴幼儿血型抗原发育不完全可能会造成 ABO 血型鉴定时抗原表达减弱的现象,类似于亚型的血清学反应格局,此时容易被认定为是由于抗原发育未完全而造成,导致漏检亚型。我实验室前期研究也表明^[9],18 个月以内的婴幼儿 ABO 血型都可能存在血清学鉴定正反定型不一致性的情况,这无疑会干扰工作人员对婴幼儿 ABO 亚型的判断和检出。所以,在进行婴幼儿 ABO 血型鉴定时,对抗原表达减弱的现象要特别关注,必要时采用分子生物学方法进行鉴定,以区别亚型和抗原未发育完全所致的抗原减弱。准确的 ABO 血型鉴定是患儿临床输血安全的依据和保障,本研究中患儿为 CisAB 型,但血清中检出抗-B 抗体,故该患儿如需输血可选择输注 A 型或 O 型洗涤红细胞和 AB 型血浆。

史丽莉等^[10]报道,成人 ABO 亚型人群中,其血型基因编码相应的糖基转移酶活性减弱或无活性。儿童血型抗原存在逐渐发育成熟的特点,这是否也与糖基转移酶的成熟度具有相关性,我实验室将对此进行进一步关注。

参考文献

[1] 向东. ABO 亚型的检测[J]. 中国输血杂志,2010,23(8):577-580.

[2] Helmut Schenkel-Brunner. ABO (H) System [M]. Springer Vienna,2000:145-147.
 [3] GEOFF D. Human Blood Groups[M]. Second Edition,UK,Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company ,2002;39-42.
 [4] Chun S,Choi S,Yu H,Cho D,et al. Cis-AB,the Blood Group of Many Faces,Is a Conundrum to the Novice Eye[J]. Ann Lab Med,2019,39(2):115-120.
 [5] 王晓华,马玲,王恩波,等. CisAB01 血型的血清学及基因型分析——附 2 例报告[J]. 临床血液学杂志,2017,30(2):161-163.
 [6] 井忠翠,孙波,孟子凡,等. 血型基因检测在 ABO 和 RhD 血型鉴定困难患者输血中的应用价值[J]. 精准医学杂志,2019,34(4):337-340.
 [7] Klein HG,Anstee DJ. ABO, H, LE, P1PK, GLOB, I, and FORS Blood Group Systems [M]//Mollison's blood transfusion in clinical medicine. 12th ed. Oxford:Wiley-Blackwell,2014:118-166.
 [8] Cooling L. Polylactosamines, there's more than meets the "Ii": a review of the I system[J]. Immunohematology,2010,26:133-155.
 [9] 陈圆,杨云乐,冯丽,等. 18 月龄内婴幼儿 ABO 血型 IgM 抗体发育分析[J]. 临床检验杂志,2020,38(10):793-794.
 [10] 史丽莉,刘衍春,陈妍,等. A 血型亚型与糖基转移酶活性关系的初步研究[J]. 临床血液学杂志,2016,29(2):89-92.

(收稿日期:2021-02-03)

(上接第 589 页)

[8] Denis CV, Lenting PJ. von Willebrand factor: at the crossroads of bleeding and thrombosis[J]. Int J Hematol,2012,95(4):353-361.
 [9] Fan M, Wang X, Peng X, et al. Prognostic value of plasma von Willebrand factor levels in major adverse cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Cardiovasc Disord,2020,20(1):72.
 [10] Jin H, Chen Y, Wang B, et al. Association between brain-derived neurotrophic factor and von Willebrand factor levels in patients with stable coronary artery disease[J]. BMC Cardiovasc Disord,2018,18(1):23.
 [11] Rajpal S, Ahluwalia J, Kumar N, et al. Elevated Von Willebrand Factor Antigen Levels are an Independent Risk Factor for Venous Thromboembolism: First Report from North India[J]. Indian J Hematol Blood Transfus,2019,35(3):489-495.
 [12] 李德奎,朱名安,程多智. 冠心病患者发病 48 h 内 Hcy,vWF 和组织因子促凝活性的变化及其与冠心病发病的关系[J]. 心血管康复医学杂志,2018,27(6):

620-624.
 [13] 王璐,葛卫红,徐航. 基因多态性与静脉血栓相关性的研究进展[J]. 中国医药导报,2018,15(9):31-35.
 [14] Garcia J, Flood VH, Haberichter SL, et al. A rat model of severe VWD by elimination of the VWF gene using CRISPR/Cas9[J]. Res Pract Thromb Haemost, 2020,4(1):64-71.
 [15] Swystun LL, Lillcrap D. Genetic regulation of plasma von Willebrand factor levels in health and disease[J]. J Thromb Haemost,2018,16(12):2375-2390.
 [16] 王燕,金虎,黄时伟,等. 血管性血友病因子基因多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病的相关研究[J]. 中华医学遗传学杂志,2016,33(2):235-239.
 [17] van Loon JE, Kavousi M, Leebeek FW, et al. von Willebrand factor plasma levels, genetic variations and coronary heart disease in an older population[J]. J Thromb Haemost,2012,10(7):1262-1269.

(收稿日期:2020-08-12)