

产生抗 D 的 RhD 阴性者 D 基因及抗体变化的分析

魏鹏¹ 刘衍春¹ 郑凌¹ 马玲¹ 吴敏慧¹ 刘毅¹

[摘要] 目的:了解 RhD 血清学阴性的个体抗体产生的 D 基因基础及体内抗体的水平。方法:RhD 血清学确认采用抗人球蛋白试验;抗 D 效价检测采用试管凝集法;RHD 基因检测采用 PCR-SSP 法。结果:3 名无偿献血者的 RhD 血清学检测确认均为阴性,RHD 基因外显子 D1~7、D9/1227G、D10、270A、1227A 进行分型,结果均无阳性条带出现;4 年的抗 D 抗体检测均大于 1:8 以上。结论:本文中产生抗 D 的个体均为 RhD 表型阴性、D 基因缺失的个体;抗 D 一经产生在体内存在是长期的。

[关键词] Rh 血型;D 基因;PCR-SSP

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)10-0642-02

Characteristics of D gene and antibody level of Rh negative individuals

WEI Peng¹ LIU Yanchun¹ ZHENG Ling¹ MA Ling¹ WU Minhui¹ LIU Yi¹

(Jiangsu Province Blood Center, Nanjing, 210042, China)

Corresponding author: LIU Yanchun, E-mail: lyc60@126.com

Abstract Objective: To assess the characteristics of D gene and the level of antibody among Rh negative individuals. **Method:** Indirect antiglobulin test (serological test) was used to identify Rh status among voluntary blood donors. The tube haemagglutination was used to test anti-D level of individuals. RhD molecular genetic testing was performed by PCR-SSP. **Result:** Three volunteer donors were confirmed as RhD negative by the serological test. Result from the genetic typing of RhD gene exons D1—7, D9/1227G, D10, 270A, 1227A showed no positive bands. The levels of RhD antibody were higher than 1:8 in 4 years. **Conclusion:** The production of antibodies might be due to the individuals without RhD gene. The anti-D in the body would be long lasting once it is produced.

Key words RhD; blood group; PCR-SSP

Rh 系统的抗体通常是由免疫所产生,RhD 抗体的性质是 IgG,大多数 RhD 阴性的人并无抗 D 抗体的存在。我们在实际工作中遇到 3 例血清学 RhD 阴性且产生抗 D 的献血者,对其 RhD 抗原的分子基础进行了分析并对其抗 D 在体内存在的情况进行了检测。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源

本中心的汉族女性健康无偿献血者 3 人,无亲缘关系。均为知情同意。

1.2 主要试剂和仪器

IgM 单克隆抗-D、单克隆抗-C、抗-c、-E、抗-e、抗球蛋白试剂(IgG + C₃d)、IgG 单克隆抗-D(上海输血技术有限公司);IgG/IgM 抗-D(Millpore);IgG 抗-D(Biotest);IgG 抗-D(Eryclone);基因组 DNA 提取试剂盒(原平皓公司);RHD 基因外显子分型试剂盒(天津秀鹏生物技术公司)。ID-Incubator 37S I 孵育器、ID-centrifuge 12S II 离心机(DiaMed Switzerland);PE9600PCR 扩增仪(Applied Biosystem Corp. USA);Alphamager HP 凝胶成像系统(Alphamager Corp. USA);ND-100-

Spectrophotometer DNA 定量分析仪(NanoDrop Corp. USA);Labofuge 400R 低温高速离心机(Heraeus Corp. German)。

1.3 方法

1.3.1 Rh 表型血清学鉴定 RhD 初筛阴性的标本分别以 4 个不同厂家的抗 D 试剂进行确认,血清学结果阴性者用单克隆抗-C、抗-c、抗-E、抗-e 抗体检测其 RhC、Rhc、RhE 和 Rhe 4 个抗原确定其表型。

1.3.2 DNA 制备及 RHD 基因外显子检测 采集献血者外周静脉血 5 ml 经 EDTA 抗凝,取 0.5 ml 全血用 DNA 提取试剂盒提取 DNA,4℃ 保存待用。根据 RHD 外显子基因分型试剂盒要求,调整 DNA 模板浓度约 70 ng/μl,进行 PCR-SSP(引物序列及基因定位见试剂盒说明书)。PCR 条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。取 10 μl 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统拍照分析。

2 结果

2.1 Rh 表型检测

3 名女性的 RhD 表型均为 ccdee。RhDel 的吸收放散试验均为阴性。

¹ 江苏省血液中心(南京,210042)

通信作者:刘衍春,E-mail:lyc60@126.com

2.2 RHD 基因外显子检测

3 名女性的 RHD 基因外显子 D1、D2~7、D9/1227G、D10、270A、1227A 均无阳性条带出现。

2.3 RhD 抗 D 抗体的检测效价结果

4 年 RhD 抗 D 抗体的检测效价结果见表 1。

表 1 4 年 IgG 抗 D 效价检测结果

序号	年龄 /岁	ABO 血型	Rh 表型	2007 年	2008 年	2010 年	2011 年
1	39	A	ccdee			1:32	1:128
2	50	O	ccdee		1:16	1:16	1:64
3	38	A	ccdee	1:32	1:16	1:8	1:32

3 讨论

现在已知 RhD 血型的表型抗原与其基因并非完全一致,RhD 阴性的 D 基因分子结构主要有 3 种类型:D 基因的全缺失、D 基因和 CE 基因的融合重排、有 D 基因而无 D 抗原表达。何种 RhD 基因型能够产生抗 D 是我们所关心的。

本文所观察的 3 份标本均来自健康女性无偿献血者,在第 1 次献血时血清学筛查及吸收放散检测的结果是 RhD 阴性,表型均为 ccdee 且有 RhD 抗体。采用 PCR-SSP 方法对标本的 RHD 基因 D1、D2~7、D9/1227、D10、del270A、del1227A 进行扩增分型。结果显示外显子 D1、D2~7、D9/1227、

D10 及针对 Del 的 270A、1227A 均无阳性条带出现,应该是完整的 RHD 基因全部缺失。有关抗 D 抗体在体内长期存在的情况,则极少有报道。本文对有抗 D 存在的此 3 名女性献血者进行了几年的抗 D 跟踪随访,抗 D 的效价检测情况见表 1。关于 3 名女性的免疫史,经了解例 1 于 1993 年 1 月曾因病治疗输 A 型血 400 ml,由于当时没有对献血者普遍检查 RhD,且中国人 RhD 阴性的比例在 0.33%^[1]左右,故输入 RhD 阳性血的可能性是很大的。例 3 于 1992 年生育第 1 胎时就发生了 HDN,由于条件所限未对引起 HDN 的血型进行分析。2010 年检查 RhD 效价后的下半年有意外流产史。例 2 免疫史不详。由 2~4 年的效价检测情况再结合 3 人的免疫史来看,RhD 抗体一经产生将长期存在于体内。

本文对近年来产生抗 D 的 3 位表型为 RhD 阴性无偿献血者的 D 基因进行了分析,同时对抗 D 在体内的情况进行了初步的检测。从中可以看出产生 D 抗体的表型为 RhD 阴性的人,其 D 基因是完全缺失的;D 抗体一经产生将长期存在于体内。

参考文献

[1] 郑凌,刘衍春,刘毅,等.24 万献血者 ABO、Rh 血型调查分析[J].现代诊断与治疗,2006,17(6):379-379.
(收稿日期:2012-05-15)

2000,14:135-138.

[5] 刘志贤,李剑鸿,曾建武.例新生儿网织红细胞计数参考范围的探讨[J].生物医学工程与临床,2008,6(12):487-489.

[6] 周建中.红细胞参数在缺铁性贫血诊断中的应用评价[J].国际检验医学杂志,2006,32(7):805-806.

[7] JELKMANN W. Erythropoietin after a century of research:younger than ever[J]. Eur J Haematol,2007,78:183-205.

[8] HIRAKATA H,YAO H,OSATO S,et al. CBF and oxygen metabolism in hemodialysis patients:effects of anemia correction with recombinant human EPO[J]. Am J Physiol,1992,262:737-743.

[9] BRINES M,GHEZZI P,KEENAN S,et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury[J]. Proc Natl Acad Sci,2000,97:526-531.

[10] ERBAYRAKTAR S,GRASSO G,SFACTERIA A,et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci,2003,100:741-746.

(收稿日期:2012-03-02)

(上接第 641 页)

血氧饱和度以及各种充血性心力衰竭等方面发挥其作用。尽管 EPO 的治疗是多方面的,然而评价指标一直未被确定,本实验通过对不同年龄组小鼠的网织红细胞数量观察发现成年的小鼠对 EPO 的作用稳定,网织红细胞计数的指标很敏感。作为更早期的指标,本实验可以建议在相应的靶器官,如超过 50%即有诊治意义。作为长期监测红细胞的指标,本实验的数据支持 MCH,这是因为未成熟红细胞由靶器官到达外周成熟约需要一周时间甚至更长,这种监测的意义远远高于免疫学检测方面的定量技术。本实验通过网织红细胞计数和 MCH 这种双相互补分析,可以为临床上 EPO 药物功效提供科学的依据。

参考文献

[1] SCHMIDT W,BIERMANN B,WINCENBACH P,et al. Int[J]. Sports Med,2000,2:133-138.

[2] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:130-132.

[3] 王彬,宓捷波,常文保,等. EPO 检测技术的研究进展[J]. 化学进展,2005,15(2):117-122.

[4] BREYMANN C. Bailliere's. Clin Endocrinol Metab,