

O 等位基因表达弱 A 抗原伴 c. 859G>T 新突变 1 例的分子学研究*

陈萍¹ 王渊元² 蔡晓红³ 张水木⁴ 沈雨青⁵ 雷航³

[摘要] 为研究 1 例 ABO 正反定型不符的先证者弱 A 抗原可能的分子机制,应用血型血清学方法对其进行 ABO 血型鉴定,采用聚合酶链式反应(PCR)扩增 ABO 基因的 CDS 区域并直接测序分析标本的基因型;通过克隆和测序对先证者的单倍型进行确认;通过短串联重复试验(STR)和液滴数字聚合酶链式反应(ddPCR)研究先证者的嵌合状态。血型血清学结果显示先证者血型正反不符,室温环境中,先证者血清与 B 细胞呈强凝集(4+),而与 A 细胞则没有凝集反应,吸收放散试验表明先证者红细胞上存在痕量的 A 抗原(±)。直接测序和克隆后测序结果表明先证者含有基于 ABO * O. 01. 02 背景的新突变 c. 859G>T,其 ABO 基因型为 ABO * O. 01. 02-var/O. 01. 01。ddPCR 和 STR 的结果表明先证者不含有 A 等位基因,弱 A 表达不是由嵌合体引起的。因此我们发现了一种不寻常的弱 A 表型,该表型先证者仅携带 2 个含有 c. 261delG 的 O 等位基因,且该罕见现象不是由嵌合体引起的,261 缺失型 O 等位基因亦可表达出弱 A 抗原。

[关键词] ABO 血型;正反定型不符;基因分型;嵌合体

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2023.10.014

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** D

Molecular study of a case of O allele expressing weak A antigen with a new mutation of c. 859G>T

CHEN Ping¹ WANG Yuanyuan² CAI Xiaohong³ ZHANG Shuimu⁴
SHEN Yuqing⁵ LEI Hang³

(¹Department of Clinical Laboratory, Xiamen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Xiamen, 361009, China; ²Department of Blood Transfusion, Zhongshan Hospital School of Medicine Xiamen University; ³Department of Blood Transfusion, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; ⁴Department of Blood Transfusion, Xiamen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine; ⁵Department of Blood Transfusion, Women and Children's Hospital School of Medicine Xiamen University)

Corresponding author: LEI Hang, E-mail: leihang8914@163.com

Abstract To study the possible molecular mechanism of the weak A antigen in a proband with inconsistent ABO positive and negative stereotypes, the blood group phenotype of the proband was identified by blood group serology, the CDS region of ABO gene was amplified by polymerase chain reaction(PCR) and the genotypes of the samples were analyzed by direct sequencing. The haplotype of the proband was confirmed by cloning and sequencing. Short tandem repeat tests(STR) and droplet digital polymerase chain reaction(ddPCR) were used to study the chimerism status of the proband. The blood group serological results showed that the blood group of the proband was inconsistent. At room temperature, the serum of the proband showed strong agglutination(4+) with B cells, but no agglutination reaction with A cells. Absorption and release test showed trace amount of A antigen(±) on the red blood cells of the proband. The results of direct sequencing and post-cloning sequencing showed that the proband contained a new mutation c. 859G>T based on the ABO * O. 01. 02 background, and its ABO genotype was ABO * O. 01. 02-var/O. 01. 01. The ddPCR and STR results showed that the proband did not

*基金项目:国家自然科学基金青年项目(No:82000183);中国输血协会威高科研基金(No:CSBT-WG-2019-01);厦门市科技局医疗卫生项目(No:3502Z20194047)

¹北京中医药大学厦门医院检验科(福建厦门,361009)

²厦门大学附属中山医院输血科

³上海交通大学医学院附属瑞金医院临床输血科

⁴北京中医药大学厦门医院输血科

⁵厦门大学附属妇女儿童医院输血科

通信作者:雷航,E-mail:leihang8914@163.com

contain the A allele and weak A expression was not caused by chimeras. Thus an unusual weak A phenotype was found in which the proband carried only two O alleles containing c. 261delG, and this rare phenomenon was not caused by chimera. The O allele 261 deletion also expressed weak A antigen.

Key words ABO blood group; mismatch of positive and negative stereotypes; genotyping; chimera

ABO 血型系统在输血和移植中发挥着重要作用,ABO 血型系统除常见的 A、B、O 和 AB 血型外,还存在很多亚型表型,全球已报道的 ABO 亚型等位基因已有 300 多个。A 和 B 基因为共显性基因,O 基因为隐性基因^[1],与常见的 ABO 等位基因相比,大多数亚型等位基因是由一个或多个碱基突变引起的,这些突变可能会影响所表达酶的活性或特异性,导致 A/B 抗原表达减弱。O 等位基因纯合子没有合成 A/B 糖基转移酶的功能,个体不表达 A/B 抗原。最常见的 O 等位基因为 O¹[O. 01. 01]和 O^{1v}[O. 01. 02],两者的主要特点是在 6 号外显子上存在 c. 261delG 单碱基缺失突变^[2]。本次报道中,我们发现 1 例血清学格局表现为弱 A 表型的个体,但其基因型为 ABO * O. 01. 02-var/O. 01. 01,该弱 A 抗原可能是由 O. 01. 02 等位基因 c. 859G>T 突变导致的。

1 资料与方法

1.1 资料

先证者,女,34 岁,怀孕 39⁺¹ 周。经知情同意后,采集先证者血液样本、口腔黏膜细胞、尿液脱落细胞,并收集先证者女儿的口腔黏膜细胞。

1.2 方法

1.2.1 血型血清学鉴定 血型正反定型、吸收放散试验均按照相关操作手册(全国临床检测操作规程,4 版)进行,试验所涉及的试剂:单克隆抗 A、抗 B、抗 D 和 ABO 红细胞试剂盒(上海血液制药生物有限公司,中国上海)。

1.2.2 ABO 基因测序分析 使用血液 DNA 试剂盒(康威,中国江苏)从先证者及其女儿的外周血样本中提取基因组 DNA。并对 ABO 基因的所有编码区进行 PCR,PCR 产物进行直接测序分析。PCR 所涉及到的引物均参照相关文献^[3]。

1.2.3 ABO 单倍型序列分析 使用凝胶纯化 PCR 产物,PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体(TaKaRa,中国大连)后测序以鉴定先证者 ABO 基因的单倍型。

1.2.4 核型或嵌合状态分析 通过短串联重复试验(STR)和液滴数字聚合酶链式(ddPCR)反映研究先证者的核型或嵌合状态。

STR 试验采用 AmpF STR Identifiler PCR 扩增试剂盒(英国,Applied Biosystems 骨公司)进行,具体操作严格依据说明书。ddPCR(12 000 ~ 15 000 nL 液滴反应)则是通过仪器 QX200(BIO-RAD, Hercules, 美国加利福尼亚州)对样本中可能存在的目标等位基因 ABO * A 进行量化检测。相

关引物和探针采用 Primer Premier 5.0 软件设计。ABO 基因多态性 c. 261G 碱基由 ABO-261G-P-VIC-5'-TCCTCGTGGTGACC-3' 探针检测,而多态性 c. 261delG 由 ABO-P-FAM-5'-TCGTGG-TACCCCTT-3' 探针检测。常规 PCR 引物则是 ABO-261G-F: 5'-GTGACCGCACGCCTCTCT-3' 和 ABO-261G-R: 5'-TGCCCTCCCAGACAAT-GG-3'。ddPCR 步骤如下:95℃ 预热变性 10 min; 94℃, 30 s, 然后 60℃, 1 min, 该部分共 40 个循环; 98℃, 10 min; 4℃ 保存结束反应。对空白极限(LOB)、检测极限(LOD)和线性关系进行了评估,以避免假阳性和假阴性结果,并可靠和批判性地描述使用这种方法可以检测到的最小嵌合体。具体实验方法和步骤参照相关文献进行^[4-5]。

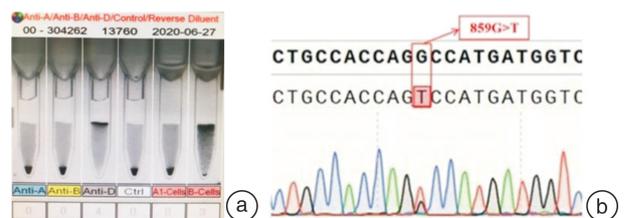
2 结果

2.1 先证者血清学检测结果

ABO 血型的血清学结果显示该患者存在正反定型不一致的表型(图 1a)。在微柱凝胶卡和试管法试验中,红细胞不被抗 A 和抗 B 凝集,与抗 H 强凝集(4+)。常温下血清与 B 细胞表现出很强的凝集作用(4+),与 A 细胞无反应;而在 4℃ 条件下,8 滴血清与 A 细胞孵育 10 min 后存在非常弱的凝集(±)。吸收-放散试验显示红细胞上存在痕量的 A 抗原(±)。

2.2 基因测序分析

直接测序结果显示,先证者存在 9 个杂合突变, c. 106G > T, c. 188G > A, c. 189C > T, c. 297A > G, c. 646T > A, c. 681G > A, c. 681G > A. 771C > T, c. 829G > A, c. 859G > T 和 1 个 c. 261delG 纯合突变(图 1b)。而先证者女儿则是 2 个正常的 O 等位基因,其 ABO 基因型为 ABO * O. 01. 01/O. 01. 01。



a:通过凝胶卡测试输入 ABO 的结果。b:ABO 基因外显子 7 部分 DNA 序列和克隆结果。上半部分表明在 c. 859 检测到杂合子序列(G 和 T)。下半部分揭示了克隆后单倍型 O 等位基因的序列。框中的 nt. 表示突变位点。

图 1 血清学和测序的结果

2.3 先证者单倍型分析

PCR 产物克隆后测序分析结果表明,新突变 c. 859G>T 存在于 ABO * O. 01. 02 等位基因。且在 120 例随机健康中国个体中未发现该新突变。该新等位基因的核苷酸序列已提交至 GenBank,并获取序列号 MT787301。故该先证者的基因型疑为 ABO * O. 01. 02-var/O. 01. 01,见图 1b。

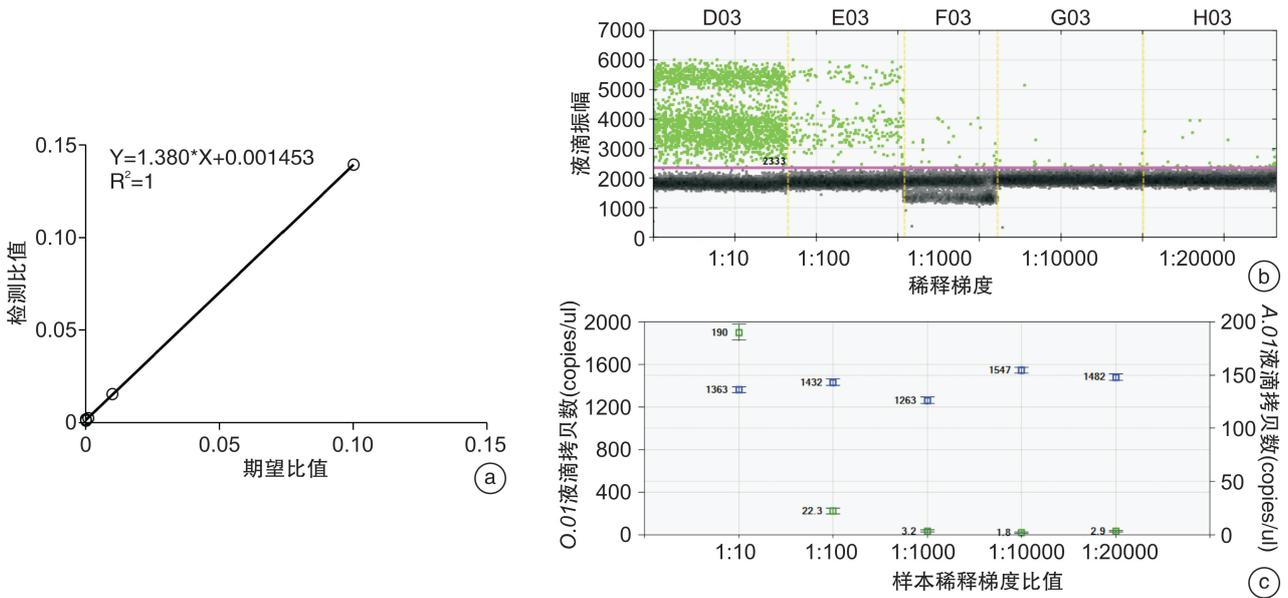
2.4 STR 核型分析

对来自先证者血细胞、尿道和口腔的细胞 DNA 进行 STR 分析,结果显示,在先证者中只检

测到 2 个带有 c. 261delG 的 O 等位基因,不存在嵌合现象。

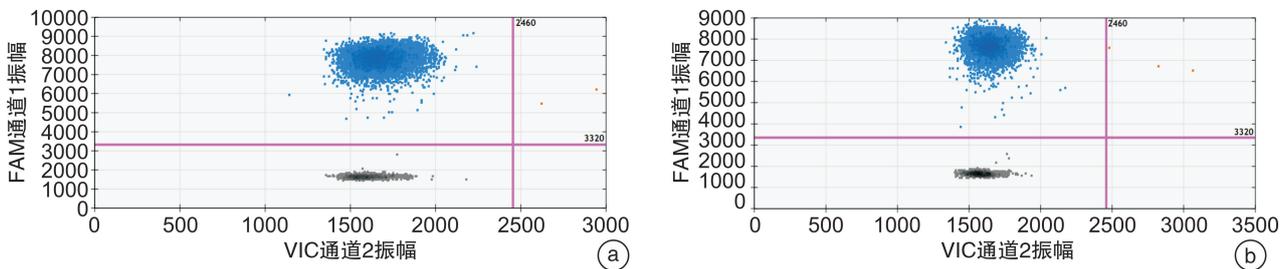
2.5 ddPCR 检测

通过 ddPCR 检测,分析 3 个非模板控制复制品,LOB 为 2.052 份/20 μL。根据公式,LOD 被计算为 5.543 份/20 μL。线性分析表明,在这种情况下,A. 01/O. 01 DNA 的理论和实际比率具有良好的线性关系(图 2)。在此基础上,先证者的测试结果 为 3.4 份/20 μL,见图 3。



a:线性动态范围和稀释线性的估值。ddPCR 是在已知比例(0.100 00、0.010 0、0.001 0、0.000 1、0.000 05)的 A. 01 DNA 和 O. 01 DNA 的混合物上进行的。观察到 A. 01 DNA 与总 DNA 的预期比率与实际比率之间存在线性关系。b:不同浓度的模板的液滴散射图,并通过数字 PCR 放大。c:ddPCR 的 A. 01 DNA 和 O. 01 DNA 的定量混合物的浓度。

图 2 ddPCR 输出比和实际 DNA 比率之间的线性回归



a:先证者样本;b:阴性对照,FAM 中的 1 通道振幅,带有 O. 01 等位基因特异性引物,VIC 中的 2 通道振幅,带有非 O. 01 等位基因特异性引物。结果表明,样本中没有 ABO * A. 01。

图 3 先证者的液滴数字 PCR 分析

3 讨论

本次报道的先证者表现出 ABO 基因型与表型不一致的现象,即含 261delG 的基因型 O. 01. 02-var/O. 01. 01 个体却表达弱 A 抗原。2005 年,国外第 1 次报道了 261 位非缺失性的 O 等位基

因可导致红细胞上的弱 A 表达,如 ABO * O. 03^[6-7],但在本例中,新突变位于 261delG 的 O 等位基因中,与既往报道的案例不相符。261 缺失型的 O 等位基因转录本应该被 NMD(无义介导的 mRNA 衰变)^[8]或编码非功能性糖基转移酶,

导致缺失型 O 型个体红细胞不能表达 A/B 抗原,然而先证者红细胞却检测到非常弱的 A 抗原。为了排除人为因素,所有血清学实验均以非相同人员重复操作 1~2 次进行验证。另外,先证者女儿是正常的 O 型,表明只有先证者表现出异常表型并携带新突变。为了探索先证者是否为 A 血型嵌合状态,对来自先证者的血细胞、尿液和口腔的细胞 DNA 进行了 STR 和 ddPCR 检测,结果显示先证者不含有 A 等位基因,这表明先证者的罕见现象不是由嵌合体引起的,此弱 A 表型可能与 O.01.02 等位基因 c.859G>T 突变有关。

目前国内已有多例报道 261delG 的 O 等位基因表达 A 或 B 抗原^[9-13]。2006 年,喻琼等^[9]报道了第 1 例 O.01.02 等位基因与表达 A_e 血清学表型相关。而王天菊等^[10]发现基因型为 O.01.01/O.01.05,且 O.01.01 链携带 IVS6-25 A>G 突变的个体表达弱 B 抗原,推测可能由于 O-B-O 重组导致 B 糖基转移酶表达;但杜忻等^[13]证明了 O.01.01/O.01.01 基因型个体在不含有 IVS6-25 A>G 突变的情况下,同样可以表达出 B 型抗原,推测 IVS6-25 A>G 单核苷酸突变不是缺失型 O 等位基因表达 B 抗原的原因。缺失型 O 等位基因与弱表达 A/B 抗原相关的报道集中存在于我国汉族人群,可能与中国汉族人群放散型 A、B 血型分子遗传结构具有独特的基因多态性有关^[13]。这些报道表现出 261 位缺失型 O 亚型等位基因也能表现血清学 A/B 亚型特征,虽然认为这样的血清学结果命名为 O 亚型存在争议^[14]。261 位缺失型 O 等位基因表达弱 A/B 抗原的可能机制有:①基因表达调控中发生了未知的变化,不同的 O 等位基因在有丝分裂期发生遗传物质相互交换(自体嵌合),使某些细胞重建了糖基转移酶的活性^[8];②ABO 基因的 CDS 区域外存在未检测到的突变,内含子在等位基因转录和错位修复也有重要作用;③后天获得的可能性(例如胎儿出血、试剂的特异性);④ABO 基因各外显子的剪切位点或 5'端增强子发生突变^[15]。

本研究通过血清学结合基因测序的方法发现 1 例含 261 位缺失型 O 等位基因但表型却表达弱 A 抗原的个体。但由于并未将突变序列构建质粒转染细胞来证实 A 抗原的表达,且由于得不到先证者的家属配合,不能构建详尽的谱系,故本例中 261 缺失型 O 等位基因表达弱 A 抗原的现象背后的机制需要在未来得到进一步的研究。但该研究提示在遇到血型血清学正反定型不一致时,需要谨慎对待,需增加相关检测试验,如吸收放散试验、基因分型等,将传统的血清学检测技术与分子生物学检测技术相结合进行综合判断,可以使 ABO 血型

鉴定更加准确可靠^[16]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张爽,马怡然,郝一文. A 亚型鉴定与临床输血[J]. 中国医科大学学报,2021,50(4):378-381.
- [2] Olsson ML, Alan Chester M. Frequent occurrence of a variant O¹Gene at the blood group ABO locus[J]. Vox Sang,1996,70(1):26-30.
- [3] Cai XH, Jin S, Liu X, et al. Molecular genetic analysis for the B_x subgroup revealing two novel alleles in the ABO gene[J]. Transfusion,2008,48(11):2442-2447.
- [4] Milosevic D, Mills JR, Champion MB, et al. Applying Standard Clinical Chemistry Assay Validation to Droplet Digital PCR Quantitative Liquid Biopsy Testing[J]. Clin Chem,2018,64(12):1732-1742.
- [5] Mio C, Cifu A, Marzinotto S, et al. Validation of a One-Step Reverse Transcription-Droplet Digital PCR (RT-ddPCR) Approach to Detect and Quantify SARS-CoV-2 RNA in Nasopharyngeal Swabs[J]. Dis Markers,2021;2021:8890221.
- [6] Hosseini-Maaf B, Irshaid NM, Hellberg A, et al. New and unusual O alleles at the ABO locus are implicated in unexpected blood group phenotypes[J]. Transfusion,2005,45(1):70-81.
- [7] Seltsam A, Das Gupta C, Wagner FF, et al. Nondeletional ABO * O alleles express weak blood group A phenotypes[J]. Transfusion,2005,45(3):359-365.
- [8] Lykke-Andersen S, Jensen TH. Nonsense-mediated mRNA decay:an intricate machinery that shapes transcriptomes[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2015,16(11):665-677.
- [9] 喻琼,吴国光,梁延连,等. A 放散型血型分子遗传结构的研究[J]. 中华医学遗传学杂志,2006,23(2):173-176.
- [10] 王天菊,左琴琴,齐璐,等. O 新等位基因与 B 抗原弱表达的研究[J]. 中国输血杂志,2017,30(10):1149-1152.
- [11] 章旭,李剑平. ABO * O04 等位基因表达弱 A 抗原的序列分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2015,32(4):558-561.
- [12] 王志江,彭沫溱,赵梓昕,等. 一例罕见的 O02 等位基因表达弱 A 抗原及其家系调查[J]. 中国输血杂志,2019,32(12):1278-1281.
- [13] 杜忻,徐晶,王静. 一例 O 等位基因表达弱 B 抗原的原因分析[J]. 中国输血杂志,2020,33(11):1213-1215.
- [14] 宫济武. 血型基因检测与质量控制[M]. 南京:江苏凤凰科学技术出版社,2020:90-142.
- [15] 向东. ABO 亚型的检测[J]. 中国输血杂志,2010,23(8):577-580.
- [16] 陈雅新,李莺,许进明,等. Bel 亚型血型鉴定分析及输血策略探讨[J]. 临床血液学杂志,2023,36(2):87-90.

(收稿日期:2023-02-09)