

实时荧光 PCR 技术用于 RHc 检测的研究

周世航¹ 肖南¹ 邵林楠¹

[摘要] 目的:探讨实时荧光 PCR 方法用于中国人群 RHc 基因检测的可行性。方法:收集 144 例大连地区 RhD 阳性健康献血者血样,使用血清学分型方法检测样本 RhCcEe 血型表型。使用检测 $RHCE$ 基因第 2 外显子 178C>A 和 307C>T 多态性位点的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法对血液标本进行 RHc 基因分型,并将基因分型结果与血清学分型结果相比较。结果:经血清学检测,144 例样本中有 60 例为 CCee、48 例为 CcEe、17 例为 ccEE、11 例为 Ccee、7 例为 ccEe、1 例为 ccee;经 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法检测,发现 RHc 基因阳性为 84 例、阴性为 60 例,基因分型结果与血清学分型结果一致,该方法的灵敏度、特异度和准确度均为 100%。结论: TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法适用于检测中国人群 RHc 基因,可用于临床实验室对 Rhc 血型进行基因检测。

[关键词] RHc 基因;TaqMan 探针实时荧光 PCR;基因分型

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2023.12.010

[中图分类号] R446.11 **[文献标志码]** A

Genotyping of RHc by real-time PCR

ZHOU Shihang XIAO Nan SHAO Linnan

(Dalian Blood Center, Dalian, 116001, China)

Corresponding author: XIAO Nan, E-mail: xnee20029@hotmail.com

Abstract Objective: To determine the feasibility of RHc genotyping through real-time PCR in Chinese population. **Methods:** A total of 144 participants were recruited from RhD positive healthy blood donors in Dalian. Rh-CcEe phenotypes of the samples were tested by serological test. RHc of the samples were genotyped by targeting exon 2 178C>A and 307C>T mutation of the $RHCE$ gene through real-time PCR with TaqMan probe. The results of genotyping and serological typing were compared. **Results:** Serological test showed that 60 cases were CCee, 48 cases were CcEe, 17 cases were ccEE, 11 cases were Ccee, 7 cases were ccEe and 1 case was ccee among 144 samples. By genotyping through real-time PCR with TaqMan probe, RHc gene was positive in 84 cases and negative in 60 cases. The results of genotyping and serological typing were consistent. The sensitivity, specificity and accuracy of the PCR method were 100%. **Conclusion:** Real-time PCR with TaqMan probe might be feasible in RHc genotyping in Chinese population, which could be used for gene detection of Rhc blood group in clinical laboratory.

Key words RHc gene; real-time PCR with TaqMan probe; genotyping

在 Rh 血型系统中已发现 56 个抗原,其中与临床相关的主要是 D、C、c、E 和 e 抗原。对于多次输血的患者来说,用血清学方法检测 RhCcEe 抗原时可能会呈现混合外观或双群现象而无法准确定型。另外,在产前诊断中,用血清学方法鉴定胎儿血型时,需要侵入性方法进行取样,这对胎儿来说具有很大风险,而使用基因检测方法检测孕妇外周血中胎儿的游离 DNA 进行基因分型更有优势。

RhCcEe 抗原表达的多态性主要取决于 $RHCE$ 基因中碱基替换导致的氨基酸改变,具体表现在 RHE/e 等位基因上第 5 外显子中 676C>G 的改变和 RHC/c 等位基因在第 1 外显子和第 2 外显子中 6 种碱基的改变,其中 Rhc 抗原几乎完全依赖于 Pro103 位点,因此 307C>T 可以作为

RHC/c 基因分型的关键性位点^[1]。

国外的研究人员曾使用实时荧光 PCR 方法对 RHc 进行检测,并获得了良好的效果^[2]。但 $RHCE$ 基因在不同种族之间的遗传背景不完全相同,有研究发现同一方法在不同人群中的准确度也存在差异^[3],因此,国外其他种族的检测结果未必适合于中国人群。本研究使用检测 $RHCE$ 基因第 2 外显子 178C>A 和 307C>T 多态性位点的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法对中国人群进行 RHc 基因分型,以探讨该方法用于中国人群的可行性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2022 年 1 月 16 日—2022 年 2 月 10 日献血的 144 例 RhD 阳性汉族健康献血者,男 93 例,女 51 例,献血者平均年龄为 (36.33±10.41) 岁。

¹大连市血液中心(辽宁大连,116001)

通信作者:肖南,E-mail:xnee20029@hotmail.com

以上血样均为 EDTA-K₂ 抗凝全血样本。

1.2 仪器及试剂

抗-C(IgM)血型定型试剂(批号 20213002)、抗-c(IgM)血型定型试剂(批号 20213101)、抗-E(IgM)血型定型试剂(批号 20213202)、抗-e(IgM)血型定型试剂(批号 20213301);上海血液生物医药有限责任公司产品;DNA 提取试剂盒 Pre-Filled Cartridge Reagent 101;RBC Bioscience 生物医药股份有限公司产品;TaqManTM Universal Master Mix II, no UNG;Thermo Fisher Scientific 公司产品。核酸自动纯化系统(型号 MagCore HF-16);RBC Bioscience 生物医药股份有限公司产品;实时荧光定量 PCR 仪(型号 ABI Prism 7300);美国 Applied Biosystems 公司产品。

1.3 血清学方法

按照试剂说明书的方法,进行样本的 RhC、c、E、e 的血型鉴定。

1.4 DNA 的提取

使用全自动核酸仪及配套试剂盒,提取全血基因组 DNA。

1.5 TaqMan 探针实时荧光 PCR

TaqMan 引物和探针序列参考文献[2],具体序列见表 1,引物及探针由北京六合华大基因科技有限公司合成并荧光标记。

反应体系 20 μL,包括 Universal master mix

II (2 ×) 10 μL,引物各 0.3 μmol/L,探针各 0.1 μmol/L,DNA 1 μL。PCR 反应条件:95℃,10 min 预变性,变性 95℃,15 s,60℃,1 min,共 40 个循环。扩增结束后,依据扩增曲线,确定样本的 RHc 的基因型。

2 结果

2.1 血清学分型结果

利用 4 种 Rh 表型定型试剂(抗-C、抗-c、抗-E 和抗-e IgM 型单克隆试剂)对 144 例献血者的 Rh-CcEe 抗原进行检测,结果表型为 CCee 的样本共 60 例(41.7%),表型为 Ccee 的样本共 11 例(7.6%),表型为 CcEe 的样本共 48 例(33.3%),表型为 ccee 的样本共 1 例(0.7%),表型为 ccEE 的样本共 17 例(11.8%),表型为 ccEe 的样本共 7 例(4.9%)。其中 Rhc 阳性、阴性分别为 84 例(58.3%)和 60 例(41.7%)。

2.2 TaqMan 探针实时荧光 PCR 基因分型结果

血样 DNA 经过 TaqMan 探针实时荧光 PCR 扩增后,会产生 RHc 的扩增曲线(图 1a)以及内参基因 GAPDH 的扩增曲线(图 1b)。同时产生 RHc 以及 GAPDH 扩增曲线的样本为 RHc 阳性,仅产生 GAPDH 扩增曲线的样本为 RHc 阴性。

经过 TaqMan 探针实时荧光 PCR 基因分型,144 例样本中,RHc 基因阳性 84 例(58.3%),阴性 60 例(41.7%)。

表 1 TaqMan 探针实时荧光 PCR 探针与引物序列

探针/引物名称	序列(5'-3')
RHc_F	5'-TGGGCTTCCTCACCTCAA-3'
RHc_R	5'-TGATGACCACCTTCCCAGG-3'
RHc_P	5'-(FAM)CAATCCTGCTGGACGGCTTCTGA(BHQ1)-3'
GAPDH_F	5'-CCCCACACACATGCACTTACC-3'
GAPDH_R	5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3'
GAPDH_P	5'-(TAMRA)AAAGAGCTAGGAAGGACAGGCAACTTGGC(BHQ2)-3'

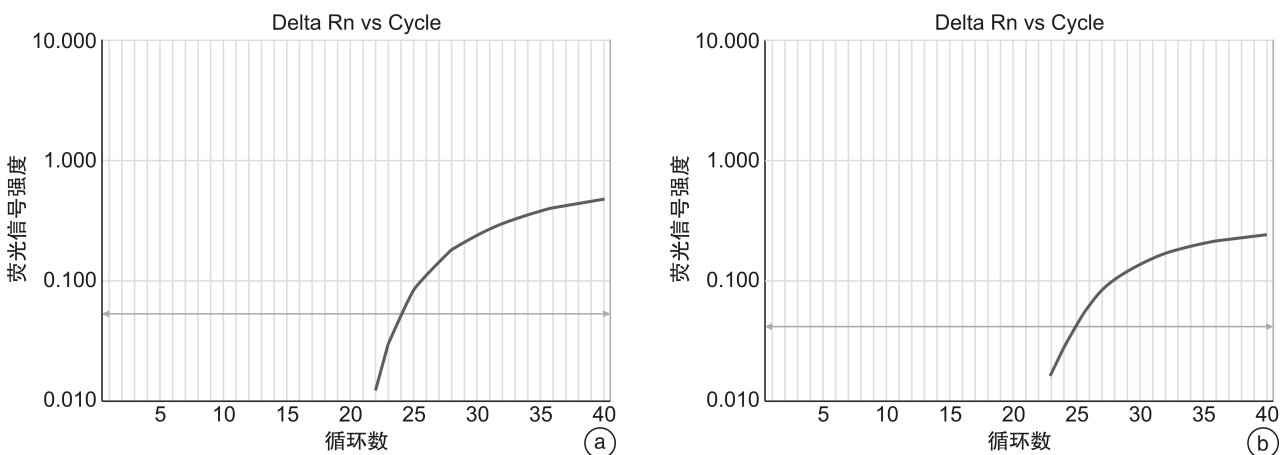


图 1 1 例 RHc 阳性样本的 RHc (a)及 GAPDH (b)扩增曲线

2.3 *RHc* 基因分型结果与血清学分型结果比较

将 TaqMan 探针实时荧光 PCR 基因分型结果与血清学分型结果进行对比(表 2),发现 144 例样本的基因分型结果与血清学分型结果完全一致。以血清学为参考, TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法用于 *RHc* 基因检测方法的灵敏度、特异度和准确度均为 100%。

表 2 *RHc* 基因分型结果与血清学分型结果比较
($n=144$)

血清学分型	例数	<i>RHc</i> 基因分型结果
CCee	60	-
Ccee	11	+
CcEe	48	+
ccee	1	+
ccEE	17	+
ccEe	7	+

3 讨论

自 20 世纪 90 年代左右, Rh 血型鉴定从传统的血清学方法进入到分子研究水平以来, 国内外对 *RH* 基因结构及多态性的研究发展迅猛, 人们对 *RH* 基因分子基础的认识也越来越深入。早期研究主要集中在 *RHD* 基因上, 直到近年来, 由针对 RhCcEe 抗原的抗体引起的输血不良反应和新生儿溶血症越来越受到临床的关注。在输血实践中, 对患者进行 RhCcEe 抗原匹配输注减少患者产生不规则抗体的机会, 提高输血安全性^[4-5]。此外, 许多研究人员开始重视 *RHCE* 基因方面的研究。对于 *RHE* 和 *RHe* 等位基因来说, 二者之间仅有 676 位一个碱基的改变, 该位点即为 *RHE/e* 分型的关键位点。而对于 *RHC* 和 *RHc* 等位基因来说, 二者之间有 6 种碱基突变, 分别为外显子 1 中 48G>C 和外显子 2 中 150C>T, 178C>A, 201A>G, 203A>G, 307C>T, 共导致 4 个氨基酸发生改变, 其中 307C>T 为 *RHC/c* 分型的关键性位点^[6]。

本研究使用针对 178C>A 和 307C>T 两个多态性位点的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法对 144 例 RhD 阳性汉族健康献血者的 *RHc* 基因进行检测, 结果发现 TaqMan 探针实时荧光 PCR 的基因分型结果与血清学分型结果一致, 且该方法的灵敏度、特异度和准确度均为 100%。国外的一项研究曾使用过 2 种 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法对 *RHc* 基因进行检测, 结果发现因其使用的针对 *RHc* 基因的引物和探针不同, 其检测的灵敏度和准确度也有很大差异。当其使用的 *RHc* 引物针对 178C>A 和 307C>T 两个多态性位点时, 其灵敏度和特异度均较高, 达到了 100%^[2]。

目前国内外应用最多的 *RHCE* 基因检测方法

是 PCR-SSP。PCR-SSP 方法操作简单, 成本较低, 具有良好的可行性。但该方法对不同人种 *RHCE* 基因分型时, 有一定比例的假阴性或假阳性结果^[7]。国内学者也发现许多表型为 CCee 的样本在基因检测中显示 *RHc* 基因阳性的情况^[8]。除了 PCR-SSP 方法, 日本学者也曾使用过 PCR-RFLP 方法对 *RHC/c* 进行基因分型, 但该研究结果显示, 仍出现 2.6% 表型为 cc 的样本被检测出 *RHC* 基因阳性的情况^[9]。除此之外, 上述 PCR-SSP 和 PCR-RFLP 方法在实验过程中还可能会发生 PCR 污染的情况, 而本研究使用的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法由于全程在封闭管内操作, 从而在一定程度上避免了此类污染的发生, 因此获得了更高的准确性。

对于多次输血的患者来说, RhCcEe 的血清学定型可能会出现混合视野, 导致血型鉴定困难, 而使用基因检测方法可以有效地提高血型鉴定的准确性^[10]。目前, 除了抗-D 抗体引起的新生儿溶血病之外, 由抗-c 抗体引起的新生儿溶血病也引起了人们的广泛关注^[11]。对于针对 Rh 血型抗原的抗-D、抗-c 等抗体导致新生儿溶血症的诊断及预防, 通常需要对胎儿进行血型鉴定, 而使用羊膜穿刺等侵入性方法采集胎儿血样, 进行血清学分型对胎儿来说有很大风险, 且有 20% 的概率会导致胎盘出血, 这可能导致母体抗体含量升高, 从而增加严重新生儿溶血症的风险^[12]。通过分析孕妇血浆中胎儿的游离 DNA 进行 Rh 分型是非侵入性方法, 其风险性也大大降低。因为在孕妇外周血中的胎儿游离 DNA 含量很少, 故更适合使用检出限更低的基因分型方法。Maeda 等^[13]的研究发现用于检测 SNP 的实时荧光 PCR 方法的检出限可以达到 100 pg, 可用于微量 DNA 的检测。Finning 等^[14]在研究实时荧光 PCR 方法检测孕妇血浆中胎儿 *RHc* 基因时, 结果显示该方法检测 *RHc* 基因时没有出现错误结果, 取得了很好的效果。因此本研究使用的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法也将适用于检测中国人群孕妇血浆中胎儿 *RHc* 基因。

本研究仅对 RhD 阳性人群进行 *RHc* 基因检测, 而对于 RhD 阴性人群, 该方法的可行性如何, 还需要进一步研究。另外, 本研究检测的样本量偏少、且样本仅是大连地区人群。在未来, 我们将对更多不同地区、不同人群进行检测, 以评估 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法用于检测中国人群 *RHc* 基因的可行性。总之, 本研究表明, TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法适用于检测中国人群 *RHc* 基因, 可用于临床实验室对 Rhc 血型进行基因检测。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Rodrigues ES, de Macedo MD, de Melo FU, et al.

- Rapid blood group genotyping by allelic discriminative real-time PCR in multiply-transfused patients [J]. *Transfus Med*, 2015, 25(2):111-114.
- [2] Gutensohn K, Müller SP, Thomann K, et al. Diagnostic accuracy of noninvasive polymerase chain reaction testing for the determination of fetal rhesus C, c and E status in early pregnancy [J]. *BJOG*, 2010, 117(6):722-729.
- [3] Tax MG, van der Schoot CE, van Doorn R, et al. RHC and RHc genotyping in different ethnic groups [J]. *Transfusion*, 2002, 42(5):634-644.
- [4] 刘丽娟, 杜肖刚, 马登峰, 等. Rh 表型分布分析及其临床意义 [J]. *临床血液学杂志*, 2021, 34(10):740-741.
- [5] 张利, 杨洪军, 彭涛, 等. Rh 抗原配型输血的临床应用分析 [J]. *临床血液学杂志*, 2022, 35(10):695-699.
- [6] 易品, 黎诚耀, 邵超鹏. RHCE 基因和 RhCcEe 抗原研究进展 [J]. *中国输血杂志*, 2014, 27(12):1283-1287.
- [7] Pham BN, Peyrard T, Juszczak G, et al. Analysis of RhCE variants among 806 individuals in France: considerations for transfusion safety, with emphasis on patients with sickle cell disease [J]. *Transfusion*, 2011, 51(6):1249-1260.
- [8] 王志红, 兰炯采. RhCE 抗原基因分型和表型不一致与等位基因变异的相关性研究 [J]. *中国输血杂志*, 2012, 25(11):1155-1160.
- [9] Tanaka M, Yamashita N, Takahashi J, et al. RHC/c genotyping based on polymorphism in the promoter region of the *RHCE* gene [J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2001, 3(4):205-212.
- [10] 赵桐茂. Rh 基因型匹配输血研究进展 [J]. *精准医学杂志*, 2019, 34(4):283-286, 301.
- [11] Koelewijn JM, Vrijkotte TGM, van der Schoot CE, et al. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands [J]. *Transfusion*, 2008, 48(5):941-952.
- [12] Daniels G, Finning K, Martin P, et al. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn [J]. *Vox Sang*, 2004, 87(4):225-232.
- [13] Maeda K, Nakamura S, Murakami C, et al. ABO genotyping by TaqMan assay and allele frequencies in a Japanese population [J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2013, 15(2):57-60.
- [14] Finning K, Martin P, Summers J, et al. Fetal genotyping for the K(Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma [J]. *Transfusion*, 2007, 47(11):2126-2133.
- (收稿日期:2023-03-24 修回日期:2023-09-13)

(上接第 888 页)

- [18] Kucukgergin C, Ademoglu E, Omer B, et al. Performance of automated urine analyzers using flow cytometric and digital image-based technology in routine urinalysis [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2019, 79(7):468-474.
- [19] Angeli P, Tonon M, Pilutti C, et al. Sepsis-induced acute kidney injury in patients with cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2016, 10(1):115-123.
- [20] Tinti F, Umbro I, D'Alessandro M, et al. Cholemic Nephropathy as Cause of Acute and Chronic Kidney Disease. Update on an Under-Diagnosed Disease [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(11):1200.
- [21] Kronen E, Wagner M, Eller K, et al. Bile acid-induced cholemic nephropathy [J]. *Dig Dis*, 2015, 33(3):367-375.
- [22] Fickert P, Kronen E, Pollheimer MJ, et al. Bile acids trigger cholemic nephropathy in common bile-duct-ligated mice [J]. *Hepatology*, 2013, 58(6):2056-2069.
- (收稿日期:2023-05-30)