

ABO 变异型 B305 亚型的血清学特点及基因序列分析*

陈芊芊¹ 林甲进¹ 王秀娣¹

[摘要] 目的:探讨分析 ABO 血型变异型 B305 亚型的血清学特点及基因序列,为后续输血奠定策略。方法:采用盐水试管凝集法进行 ABO 血型正反定型,采用聚合酶链反应直接测序技术(PCR-SBT)进行 B 抗原基因分型,采用 Sanger 测序法进行 B 抗原基因测序,采用盐水法和凝聚胺法进行交叉配血。结果:3 例先证者红细胞上含有弱 B 抗原,血清中存在抗-A 抗体;等位基因结果为 $ABO * B3.05$,与标准序列比较其 c. 425 T>C 发生突变,引起其多肽链 P. Met142Thr 的氨基酸替换。与 B 型、O 型红细胞交叉配血无凝集无溶血反应。结论:ABO 血型第 7 外显子 c. 425 T>C 突变是导致 B305 亚型抗原弱表达的分子机制,基因测序结合亚型血清学特点对其后续输血策略具有重要意义。

[关键词] ABO 血型;B305 亚型;分子生物学

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2024.10.010

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Serological characteristics and gene sequence analysis of
ABO variant B305 subtype

CHEN Qianqian LIN Jiajin WANG Xiudi

(Department of Blood Transfusion, the Second Affiliated Hospital, Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, 325027, China)

Corresponding author: WANG Xiudi, E-mail: wxd19661963@163.com

Abstract Objective: To explore and analyze the serological characteristics and gene sequence of the ABO variant B305 subtype and propose strategies for subsequent blood transfusions. **Methods:** ABO blood group typing was performed using the saline test tube agglutination method. B antigen genotyping was conducted using the PCR-SBT method, and B antigen gene sequencing was carried out using the Sanger sequencing method. Cross-matching was performed using the polybrene method. **Results:** Three probands exhibited weak B antigens on their red blood cells and had anti-A antibodies in their serum. The allele result was identified as $ABO * B3.05$, and a c. 425 T>C mutation was detected compared to the standard sequence. This mutation resulted in the substitution of amino acid P. Met142Thr in the polypeptide chain. Cross-matching experiments with type A red blood cells displayed agglutination reactions, while no agglutination or hemolysis reactions were observed with type B and type O red blood cells. **Conclusion:** The weak expression of the B305 subtype antigen may be attributed to the ABO blood group exon 7 c. 425 T>C mutation. These findings hold significant implications for the study of subsequent blood transfusion strategies.

Key words ABO blood group; B305 subtype; molecular biology

目前已报道的 ABO 抗原弱表达亚型,如 A_3 ^[1]、 A_x ^[2]、 $cisAB$ ^[3]、 B_3 ^[4]、 B_w ^[5]、 B_x ^[6]、 BeI ^[7] 等,其中 B_3 是 B 亚型中比较特殊的一种。随着 PCR 分子技术的发展和推进,血型基因分型和测序技术为 ABO 亚型的鉴定开拓了新的诊断技术方法^[8],也发现了与 B 亚型相关的新突变基因^[9-11]。我们收集 ABO 血型检验时疑似 B_3 亚型的 3 例血样,采用血型血清学鉴定、聚合酶链反应直接测序技术(PCR-SBT 法)、Sanger 测序法对其进行 ABO 血型、基因分型及基因测序,分析其血型基因突变致

B 抗原减弱的血清学特点及遗传机制,探讨其后续输血策略。现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料

先证者 1:男,38 岁;先证者 2:女,28 岁;先证者 3:女,62 岁。既往无输血史,在 ABO 血型鉴定时发现抗-B 血型试剂与先证者红细胞发生凝集减弱,表现出 B 亚型特征,随后对先证者进行血型复验、基因检测以及测序分析。血液采集遵循先证者知情同意原则。

1.2 仪器试剂

主要仪器:PCR 扩增仪、3730 基因测序仪由美国 ABI 公司提供。主要试剂:抗-A、抗-B 血型定型试剂(批号 20211230)、抗-A₁ 凝集素(批号

*基金项目:温州市科技局科研项目(No:Y20210732)

¹温州医科大学附属第二医院育英儿童医院输血科(浙江温州,325027)

通信作者:王秀娣,E-mail: wxd19661963@163.com

20210221)、抗-H 单克隆抗体(批号 20201126)等由上海市血液生物医药有限责任公司提供,A、B、O 型标准反定型红细胞由我科室选取健康供血者 3 人份同型红细胞依据试剂要求制备,基因组提取 DNA 试剂盒、B 亚型基因试剂盒及分型试剂盒由江苏省伟禾生物科技有限公司提供,凝聚胺介质试剂贝索试剂有限公司(批号 20210221),所有实验严格按操作程序进行、在有效期内使用。

1.3 血清学鉴定方法

抗-A、抗-B、抗-H、抗-A₁ 试剂、ABO 标准红细胞采用试管盐水凝集法;采用先证者 1、2、3 的血清分别与 B 型、O 型等红细胞进行盐水法和凝聚胺法交叉配血,严格依据试剂的说明书方法进行操作。

1.4 DNA 提取

依据核酸试剂的提取说明书操作,OD A₂₆₀/A₂₈₀、1.6~2.0,DNA 浓度 30 μg/μL,采用磁珠法。

1.5 B 亚型基因分型和测序

采用 PCR-SBT 法进行基因分型,采用 Sanger 法进行基因测序,按 B 亚型基因及分型试剂盒说明书进行操作,全部委托江苏伟禾生物科技有限公司提供技术服务及基因测序。

1.6 结果判读

根据 Chromas Version 2.6.5 软件判读测序图谱,与 GeneBank 序列号 NG006669.1 标准序列

比较确认突变位点。结合 ISBT 网站 Names for ABO(ISBT001) blood group alleles v1.1171023 的数据库,综合判读基因型结果。

2 结果

2.1 血清学鉴定

先证者 1、2、3 红细胞与单克隆抗-A 血型试剂分别出现 4+、0、0 凝集反应,与单克隆抗-B 血型试剂分别出现 mf、1+、2+凝集反应;ABO 正反定型血清学结果见表 1。

2.2 基因测序

先证者 1 测序结果 c. 297A>G、c. 425T>C、c. 526C>G、c. 657C>T、c. 703G>A、c. 796C>A、c. 803G>C、c. 930G>A,等位基因 ABO * B3.05/ABO * A1.01;先证者 2、3 测序结果 c. 261delG、c. 297A>G、c. 425T>C、c. 526C>G、c. 657C>T、c. 703G>A、c. 796C>A、c. 803G>C、c. 930G>A,等位基因 ABO * B3.05/ABO * O.01.01;与 B101 等位基因比 c. 425T>C 突变,导致多肽链 142 位的甲硫氨酸(Met)转变为苏氨酸(Thr)(P. Met142Thr),见图 1。

2.3 交叉配血

先证者 1、2、3 的血清分别与 B 型、O 型悬浮红细胞进行盐水及凝聚胺交叉配血,结果主侧均无凝集无溶血反应。

表 1 先证者 1~3 ABO 正反定型血清学结果表

先证者	正定型				反定型			血型
	抗-A	抗-B	抗-A ₁	抗-H	A 细胞	B 细胞	O 细胞	
先证者 1	4+	mf	3+	3+	0	0	0	AB 亚
先证者 2	0	1+	0	4+	4+	0	0	B 亚
先证者 3	0	2+	0	3+	4+	0	0	B 亚

注:凝集强度“1+~4+”表示;混合视野“mf”表示;无凝集“0”表示。

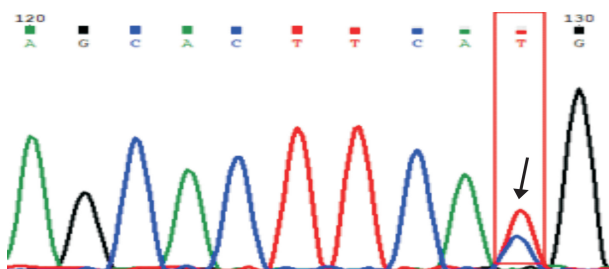


图 1 基因测序 c. 425T>C 突变

3 讨论

B 亚型是指 B 抗原凝集强度反应弱的变异型,主要是在第 7 外显子糖基转移酶基因突变,改变和(或)降低了酶的活性,表现出弱表达的 B 抗原,血清学特点表现在红细胞与抗-B 抗体发生弱的凝集或无凝集反应。B₃ 亚型特点是具有明显的凝集混合外观表现,即其红细胞与抗-B 血型试剂反应时,出现微小凝集小块,周围大部分以游离红细胞为

主,是非常罕见的一种 B 亚型,相关文献报道检出频率低,而相对中国台湾 B₃ 变异型频率较高,中国大陆 B₃ 变异型频率相对也较低^[12]。

本组先证者 1~3 ABO 血型检测血清学表现为 B 抗原凝集减弱,基因测序分别为 ABO * B3.05/ABO * A1.01、ABO * B3.05/ABO * O.01.01、ABO * B3.05/ABO * O.01.01,与标准序列比较在第 7 外显子 c. 425 T>C 发生突变,引起其多肽链 P. Met142Thr 的氨基酸替换,导致 B305 亚型抗原弱表达。根据国际输血协会(ISBT) ABO 血型抗原的基因数据库显示,c. 425T>C 基因突变有 2 种等位基因表现,分别是 ABO * Ael06、ABO * B305,B305 等位基因于 2008 年^[13]发现,同时作者报道对 113 例随机样本检测 ABO 基因第 6、7 外显子基因序列,发现其变异位点率<0.004 4(1/226)。A 等位基因 c. 425T>C 突变表现 Ael 表型,B 等位基因 c. 425T>C 突变表现 B₃ 表型,学者认为血清学与基因检测结果不一致可能

是弱凝集判读差异、不同克隆株单克隆血清的应用以及竞争现象在 ABO 等位基因中的发生,如基因型 ABO * A1.01/ABO * B3.05、ABO * A1.02/ABO * B3.05 报道^[13],血清学依然表现为 B₃。本组患者血清学反应显示为 mf~2+凝集特点,先证者 1 等位基因与 A₁(A101)等位基因组合表现 B₃变异型,出现混合凝集外观现象,与文献报道一致^[14];先证者 2~3 血清学凝集反应较弱(1~2+),没有出现混合视野 B₃ 亚型特性,与文献报道不一致^[14],B305 亚型的血清学凝集反应强弱不同,没有全部显示凝集混合视野,可能是存在一定的多态性,其结果有待后续继续收集血样本观察探讨。

ABO 血型变异主要原因由 ABO 亚型、类孟买血型等引起^[15-16],通常具有独特的血清学特点,所以在临床用血前需特别关注其血清学特点,如正反定型不一致及凝集度减弱现象^[17-18],必要时采用基因测序技术结合 ABO 血型血清学特点综合判断正确血型结果^[19-20]。ABO 亚型鉴定一直是输血技术中的难点及易弄错的地方,甚至会造成严重的输血安全隐患,作为 B 亚型受血者,从血清学特点、基因分型及测序结果来看,合适血源是 B 亚型,但来源困难,根据患者的病情可选择自身输血、同型输血及配合型输血原则;本文 3 例 B 亚型先证者根据与 B 型、O 型红细胞交叉配血结果,可选 B 型或 O 型 RhD 阳性红细胞,如将 B 亚型误定成正常 B 型,且反定型中又没检出血清中存在的不规则抗体,会引起溶血输血反应发生^[21]。因此对 B 亚型鉴定,分析其血清学特点及血型基因突变致 B 抗原减弱的分子遗传机制^[22-24],对后续患者输血策略具有重要的意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李茵,赵倩,苏蔓,等.罕见的 A3 亚型的血清学和分子生物学研究[J].临床血液学杂志,2021,34(2):109-111.
- [2] 陈静思,林甲进.罕见 Ax03 亚型血清学和基因序列分析[J].临床血液学杂志,2020,33(5):707-709.
- [3] 潘英芳,邵静茹,周娜,等.围产期孕妇检出罕见 Cis-AB 血型及其备血策略探讨[J].临床血液学杂志,2023,36(4):283-287.
- [4] 秦洪伟,李守蕾,薛杰,等.疑似 B3 亚型标本的 ABO 基因检测与输血策略分析[J].临床血液学杂志,2022,35(4):294-296.
- [5] 陈静思,袁雯靖,贺冰冰,等.三例罕见 ABO 变异型 Bw 亚型的基因鉴定及序列分析[J].中华医学遗传学杂志,2022,39(9):1021-1024.
- [6] 闫玉珠,赵和平,于燕.Bx02 等位基因的鉴定及其编码 GTB 酶 3D 建模[J].中国输血杂志,2022,35(8):817-821.
- [7] 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.
- [8] Shen YQ, Gong JS, Zhang YY, et al. Identification of the novel c. 300C>G variation on the ABO * A1.02 allele associated with an A weak B phenotype[J]. Blood Transfus, 2024 Feb 28. doi: 10.2450/Blood-Transfus.642. Epub ahead of print.
- [9] Liu HB, Liu FX, Chen W, et al. Identification of a novel c. 259G>T mutation in the ABO * B.01 allele giving rise to a B₃ phenotype[J]. Transfusion, 2022, 62(7):E34-E36.
- [10] Hao X, Diao XQ, Cui CC, et al. Identification of a novel c. 77T>G mutation on the ABO * B.01 allele associated with a B subtype[J]. Transfusion, 2024, 64(5):E21-E22.
- [11] 王立萍,于晓梅,李书杰,等. B 亚型新等位基因 803delC 的分子生物学研究[J].中国输血杂志,2024,37(3):344-347.
- [12] 王春海,王文梅,孙然. B3 亚型患者血型血清学及家系分析[J].中国现代医生,2021,59(11):147-149.
- [13] Zhu FM, Xu XG, Hong XZ, et al. A 425T>C mutation in the B allele for the ABO transferase is associated with the B3 phenotype in Han Chinese persons[J]. Transfusion, 2008, 48(11):2476-2477.
- [14] 史丽莉,陆乐,肖建宇,等.一例 ABO * B3.05/0.01.01 基因型鉴定及其遗传学特点[J].中国输血杂志,2020,33(12):1229-1231.
- [15] 雷航,王学锋,程晓文,等. ABO 血型变异的分子基础研究[J].中国输血杂志,2024,37(4):385-391.
- [16] 宿军,王夕钢,杨红霞,等. ABO 亚型分子遗传学分析及罕见等位基因鉴定[J].中国输血杂志,2024,37(2):145-150.
- [17] 秦洪伟,刘玉峰,张树超.青岛市某三级医院就诊患者 ABO 血型正反定型不符原因分析[J].临床血液学杂志,2023,36(12):896-901.
- [18] 刘桂芳,王薇薇,王峻霞,等.微柱凝胶卡式法 20 例正反定型不符原因分析及对策[J].临床血液学杂志,2024,37(2):113-116,122.
- [19] Yuan XH, Cong H, Sun XY. Molecular genetic mechanism analysis and pedigree investigation of rare B_{weak} subgroup[J]. Transfus Apher Sci, 2022, 61(6):103509.
- [20] 刘欣,靳慧芳,王书亚,等. Bel 亚型新等位基因 c. 620T>C 1 例的分子研究[J].中华医学遗传学杂志,2024,41(4):411-416.
- [21] McCullagh J, Cardigan R, Brunskill SJ, et al. Assessing the risks of haemolysis as an adverse reaction following the transfusion of ABO incompatible plasma-containing components-A scoping review[J]. Blood Rev, 2022, 56:100989.
- [22] 安宁,陈扬,杨世明,等. B 亚型患者血清不规则抗 B 抗体的检测分析[J].细胞与分子免疫学杂志,2024,40(2):158-162.
- [23] 解金辉,李双玉,薛孟丽,等. 23 例 B 亚型的分子生物学分析[J].中华医学遗传学杂志,2022,39(5):546-547.
- [24] 陈琼,黎勤云,黄晓晨,等.疑难血型标本的基因测序分析[J].山西医科大学学报,2023,54(12):1653-1657.

(收稿日期:2024-03-13 修回日期:2024-07-08)