



## ABO血型基因突变导致正反定型不符分析

柳森龙, 任凯, 刘迪, 李凌波

引用本文:

柳森龙, 任凯, 刘迪, 等. ABO血型基因突变导致正反定型不符分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(12): 1685-1688.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.12.024>

---

### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### O型孕妇血清中IgG抗A(B)效价与新生儿溶血病的关系

蚌埠医学院学报. 2016, 41(1): 104-105 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.01.033>

#### 高胆红素血症新生儿326例血清学检测结果分析

蚌埠医学院学报. 2015(6): 805-806 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.06.036>

#### COL4A5基因c.4518\_c.4519insC新突变所致X连锁显性遗传Alport综合征的分子遗传学及临床分析

Molecular genetics and clinical analysis of X-linked dominant Alport syndrome caused by a new mutation of COL4A5 gene c. 4518\_c. 4519 insC

蚌埠医学院学报. 2019, 44(9): 1217-1220 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.09.020>

#### 新生儿溶血病阳性检出率的差异分析

Variance analysis of the positive detection rate of hemolytic disease

蚌埠医学院学报. 2017, 42(4): 505-507 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.04.026>

#### 肺腺癌表皮生长因子受体基因突变与组织病理学的相关性研究

Study on the correlation between the epidermal growth factor receptor gene mutation and histopathological characteristics in lung adenocarcinoma

蚌埠医学院学报. 2020, 45(12): 1642-1645 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.12.013>

## ABO 血型基因突变导致正反定型不符分析

柳森龙<sup>1</sup>,任 凯<sup>2</sup>,刘 迪<sup>3</sup>,李凌波<sup>3</sup>

**[摘要]**目的:对临床检测中 1 例 ABO 血型正反定型不符病人进行血清学及分子生物学研究,明确病人 ABO 血型,阐述其正反定型不符原因及分子生物学机制。方法:采用血清学及分子生物学技术,鉴定正反定型不符病人血型及血清中意外抗体,并对病人样本进行 ABO 血型基因直接测序,PCR 扩增编码 ABO 基因第 6、第 7 外显子编码区序列,以公认的 A101 (ABO \* A1.01) 等位基因序列做为参考序列比对,分析待测样本 DNA 序列,明确样本 ABO 表型及基因型。结果:病人样本血清学结果正反定型为 A 型,样本红细胞与单克隆抗-A 反应弱阳性,但其红细胞与抗-A1 抗体反应阴性;样本反定型为 O 型,血清与 A1 试剂红细胞反应弱阳性、与 A2 试剂细胞反应阴性,其血清不规则抗体筛查阴性,证实样本血清存在抗-A1 意外抗体;样本测序结果显示病人在 ABO 基因第 6 外显子出现 c. 297A > G (ACA > ACG)、第 7 外显子出现 c. 771C > T (CCC > CCT) 及 c. 646T > A (AGT > AGA) 的等位基因突变。结论:血清学试验检测病人 ABO 血型为 A 亚型,血清中产生抗-A1 意外抗体,导致病人正反定型不符。病人 ABO 基因 6 号外显子的 c. 297A > G 及 7 号外显子的 c. 771C > T 突变,氨基酸编码并无改变,属于无义突变。而通过对血型抗原基因突变资料库注册的 ABO 表型,分析病人为 Ax/Aweak 表型,该表型基因 ABO \* AW. 30.01 第 7 外显子的 c. 646T > A 突变(导致氨基酸 Phe216Ile 改变)正是其表型形成的分子基础。

**[关键词]** ABO 血型;表型;血清学;分子生物学

**[中图分类号]** R 457.11 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.12.024

ABO 血型系统在临床输血中具有重要的意义,在临床常规检测中常会遇到一些 ABO 亚型,它们表现为正反定型不一致或抗原、抗体反应强度减弱等。其中 A1 和 A2 是血型血清学方法确定的最重要的 A 型红细胞亚型,其余不太常见的 A 亚型包括 A3、Ax、Am、Ael 等,其 A 抗原表达逐渐减弱<sup>[1]</sup>。A 亚型的典型血清学特征是在正定型中红细胞与抗-A 和抗-AB 血清不发生凝集或仅发生弱凝集,在反定型中 A 亚型的血清与正常人的 A 型红细胞不发生凝集或发生弱凝集,而 ABO 亚型的分子机制主要是 ABO 血型基因上碱基的改变。ABO 基因有 7 个外显子,绝大多数 A 和 B 亚型是由第 7 外显子中的核酸突变导致糖基转移酶的催化结构域改变所致。目前国际输血协会正式命名的 ABO 等位基因已超过 200 个,其中等位基因 AW 有 47 个(表型分别为 Aweak、Ax/Aweak、Afinn/Aweak、Abantu/Aweak)<sup>[2-3]</sup>。我们在日常血型检测中发现了 1 例 ABO 血型正反定型不符病人样本,采用成熟的血清学及分子生物学方法,鉴定为 Ax/Aweak 亚型。现

作报道。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 病人男,51 岁,肝病引起消化道出血入院。根据病情需输血治疗,输血前血型鉴定发现病人 ABO 正反定型不相符:正定型为 A 型,样本红细胞与单克隆抗-A 反应弱阳性,样本反定型为 O 型。遂抽取病人血样本 5 mL (EDTA 抗凝) 进一步鉴定分析。

### 1.2 试剂与仪器

1.2.1 血清学实验 ABODE 血型检测卡,ABO 血型反定型试剂红细胞,不规则抗体检测试剂红细胞(长春博迅生物技术有限责任公司);单克隆抗-A、抗-A1、A2 试剂细胞(上海血液生物医药有限责任公司);TD-A 型血型血清学用离心机、FYQ 型免疫微柱孵育器(长春博研科学仪器有限责任公司);LDZ4-1.2 低速自动平衡离心机(北京雷勃尔离心机有限公司)。

1.2.2 分子生物学实验 TransStart® FastPfu DNA polymerase 快速 PCR 扩增高保真 DNA 聚合酶(北京全式金生物技术有限公司)、AxyPrep 基因组 DNA 小量试剂盒(杭州爱思进生物技术有限公司)、QIAquick 胶体 DNA 回收试剂盒、高速离心机(Centrifuge 5415D 型,德国 Eppendorf);Mastercycler nexus GX2 梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf)、凝胶成像系统(Bio-Rad Gel Doc XR + 型,美国伯乐);电泳仪

[收稿日期] 2020-02-20 [修回日期] 2020-06-01

[基金项目] 吉林省科技厅重点科技成果转化项目(20150307011YY)

[作者单位] 1. 安徽省阜阳市第二人民医院 输血科,236000;2. 吉林大学第二医院 输血科,吉林 长春 130041;3. 长春博迅生物技术有限责任公司 研发部,吉林 长春 130102

[作者简介] 柳森龙(1985-),男,主管检验技师。

[通信作者] 李凌波,研究员, E-mail: lilingbo@bioxun.com

(DYY-8C型,北京市六一仪器厂);引物合成与基因测序均由吉林省库美生物科技有限公司完成。

1.3 实验方法

1.3.1 血清学实验 病人 ABO 血型鉴定按血型检测卡试剂说明书操作和判读。样本红细胞与抗-A1 抗体反应、血清盐水不规则抗体筛查均采用试管法,均按《全国临床检验操作规程》第四版进行操作与判读。

1.3.2 分子生物学实验 DNA 提取按照试剂盒说明书提取血液标本基因组。引物设计:ABO 基因编码区共有 7 个外显子,其中最大的 2 个外显子 6 和 7 构成全部编码区的 77%,故在第 6、7 外显子设计 2 对通用引物对目的基因进行扩增,参照美国国立生物技术信息中心 GenBank 中 ABO 基因第 6、7 外显子编码区碱基序列在 IDT 网站设计引物(见表 1),PCR 反应条件为 95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环,72 ℃ 延伸 10 min,延伸结束后,将上述 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后分析,将目的片段进行胶回收实验,并以胶回收产物为模板继续进行 PCR 扩增,将目的片段送测序,结果以 A101 (ABO \* A1.01) 等位基因序列做为参考序列,DNASar 软件进行序列比对。

表 1 第 6、7 外显子引物设计

引物名称	引物序列
ABO-EXON-7-740-F	CCG TGT CCA CTA CTA TGT CTT CAC C
ABO-EXON-7-740-R	ACA ACA GGA CGG ACA AAG GAA ACA G
ABO-EXON-6-720-F	CAT TTG CCT CTG GTT GGT TTC
ABO-EXON-6-720-R	ACA TCT GGA GCC TTG TAT TGA G

2 结果

2.1 血清学检测结果 病人样本血清学结果正定型为 A 型,样本红细胞与单克隆抗-A 反应弱阳性 (≤2+),但其红细胞与抗-A1 抗体反应阴性;样本反定型为 O 型,血清与 A1 试剂红细胞反应弱阳性 (≤2+)、与 A2 试剂细胞反应阴性,其血清盐水不规则抗体筛查阴性,证实样本血清存在抗-A1 意外抗体(见表 2)。

2.2 分子生物学检测结果 ABO 基因外显子 6、7 序列扩增,琼脂糖凝胶电泳显示,第 3、4 孔在 750 bp 条带分别为外显子 7、6 扩增条带(见图 1)。将目的条带切下并进行胶回收 DNA 纯化后,经过琼脂糖凝

胶电泳检测结果(见图 2),第 3、4 孔条带分别为外显子 7、6 扩增条带。ABO 血型基因直接测序以公认的 A101 (ABO \* A1.01) 等位基因序列做为参考序列比对:样本 ABO 基因 6 号外显子的 c. 297A > G (见图 3),氨基酸编码没有改变;7 号外显子的 c. 646 A > T (见图 4),氨基酸 p. Phe216Ile 改变;以及 c. 771T > C (见图 5),氨基酸编码没有改变(见表 3)。经过分析该样本基因型为 ABO \* AW.30.01。

表 2 病人样本血清学检测结果

	正定型			反定型			盐水不规则抗体筛查		
	抗-A	抗-B	抗-A1	A1c	Bc	A2c	O I	O II	O III
室温	1+	-	-	1+	4+	-	-	-	-
4 ℃	2+	-	-	2+	4+	-	-	-	-

注:“+”代表阳性,“-”代表阴性

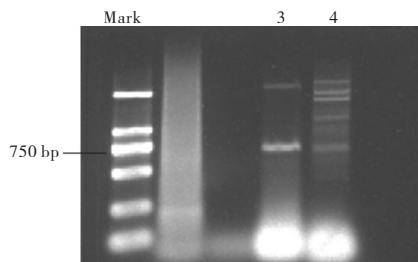


图 1 ABO 基因外显子 6、7 扩增序列

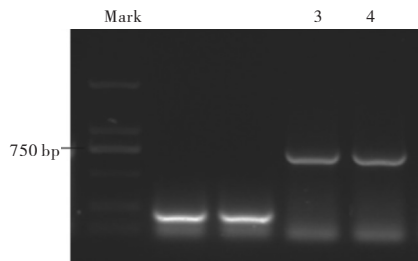


图 2 ABO 基因外显子 6、7 DNA 纯化后扩增序列

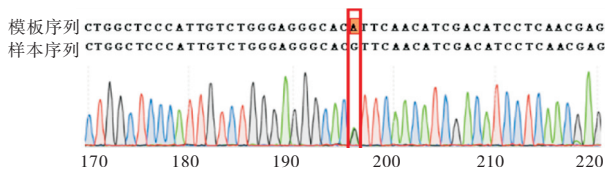


图 3 样本 ABO 血型基因 6 号外显子的 c.297A > G 突变

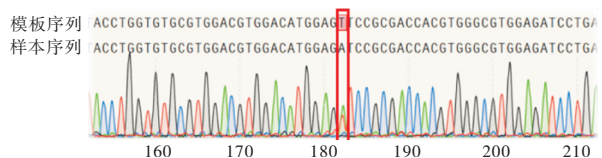


图 4 样本 ABO 血型基因 7 号外显子的 c.646 T > A 突变

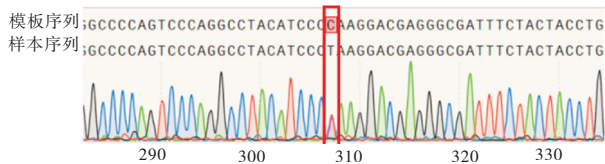


图5 样本ABO血型基因7号外显子的c.771 C&gt;T突变

表3 ABO 基因测序结果判定

外显子	碱基替换	氨基酸替换
EXON-6	c. 297 A > G	同义突变
EXON-7	c. 646 T > A	p. Phe216Ile
EXON-7	c. 771 C > T	同义突变
外显子	碱基替换	氨基酸替换
EXON-6	c. 297 A > G	同义突变
EXON-7	c. 646 T > A	p. Phe216Ile
EXON-7	c. 771 C > T	同义突变

### 3 讨论

病人 ABO 血型的正确鉴定是输血相容性检测的最重要环节,关系着病人的用血安全,病人在输血前应常规血清学检测 ABO 正定型和反定型,只有正反定型结果一致,才能确定红细胞 ABO 血型<sup>[4]</sup>。但病人 ABO 血型鉴定会受到年龄、疾病、遗传等诸多因素的影响,如传统 ABO 亚型检测的血清学方法是通过血清学检测来确定血型抗原或红细胞表型,血清学检测的基础是检测可见的血凝或溶血。然而,由于某些药物暴露于病人红细胞或存在其他可能改变红细胞膜的疾病,或是虽然常规单克隆抗体试剂可以识别和凝集弱的亚型,但仍存在定型错误的风险。如错定病人血型,或 A<sub>x</sub> 型供者错定为 O 型向 O 型病人输血时可能会产生不良后果。另外,如要准确地确定病人 ABO 血型,或在临床检测中出现正反定型不相符,仍需借助分子生物学方法确定病人血型<sup>[5-6]</sup>。

本文病人样本正反定型不符为疑难血型,血清学结果正定型为 A 型,样本红细胞与单克隆 IgM 抗-A 反应弱阳性,但其红细胞与抗-A1 抗体反应阴性;样本反定型为 O 型,血清与 A1 试剂红细胞反应弱阳性、与 A2 试剂细胞反应阴性,其血清盐水不规则抗体筛查阴性,证实样本血清存在抗-A1 意外抗体。因此,血清学方法确定为 A 亚型,疑似为 A<sub>x</sub> 表型。A<sub>x</sub> 表型的主要血清学特征为:红细胞与 B 型人血浆中抗-A 不凝集,大多数红细胞与 O 型人血浆中抗-

AB 凝集,与 IgM 抗-A 试剂反应弱;红细胞只能呈现弱凝集反应,没有混合凝集;血清中含有抗-A1,可能含有抗-A,血清可与 A1 细胞反应,也许个别能与 A2 细胞反应<sup>[7-8]</sup>。本例样本 ABO 血型正反定型不符,疑似亚型,作为病人若按照正定型结果定型为 A 型,输入正常 A 型红细胞,则病人血浆中存在的抗-A1 抗体可能会与输入的 A 型供者红细胞反应,进而有发生严重溶血反应的风险,威胁病人输血安全。

为进一步准确确定病人 ABO 血型亚型,本研究应用分子生物学检测进行判定。每一种 A 亚型的抗原基因都是由多个基因突变后产生的多态性基因,不同 A 等位基因编码翻译出不同的糖基转移酶,其作用底物都是 N-乙酰半乳糖,但所合成的糖链其抗原性具有一定差异。目前已发现的 A 等位基因超过 200 个,最常见的 A 基因是 ABO \* A1.01 (A1 表型)、ABO \* A2.01 (A2 表型),主要的基因突变发生在外显子 6、7 上<sup>[7]</sup>。本例 ABO 血型基因直接测序以公认的 A101 (ABO \* A1.01) 等位基因序列做为参考序列比对,样本测序结果显示病人在 ABO 基因第 6 外显子出现 c. 297A > G (ACA > ACG)、第 7 外显子出现 c. 771C > T (CCC > CCT) 及 c. 646T > A (AGT > AGA) 出现共 3 个特异性等位基因突变。ABO 基因 6 号外显子的 c. 297A > G 及 7 号外显子的 c. 771C > T 突变,氨基酸编码并无改变,属于无义突变<sup>[3]</sup>。而通过比对血型抗原基因突变资料库注册的 ABO 表型,分析病人为 A<sub>x</sub> 表型,该表型基因 ABO \* AW.30.01 第 7 外显子的 c. 646T > A 突变(导致氨基酸 p. Phe216Ile 改变)是其表型形成的分子基础<sup>[3,9]</sup>。A<sub>x</sub> 在 A 型中的频率分布为法国人约 1/77 000,中国人约 1/50 000<sup>[4]</sup>。中国上海 CAI 等<sup>[10]</sup>共筛选了 322 个 ABO 亚型个体,A 型相关表型包括了 A3、Aint、A<sub>x</sub>、Ael 等,得出中国上海检出率约为 0.015%。2018 年王鹤<sup>[8]</sup>分析 1 例 A<sub>x</sub>04 亚型的血清学特性及分子机制,发现该例正反定型不一致的 A<sub>x</sub> 亚型,其 α-1,3-N-乙酰半乳糖胺转移酶基因 c. 646T > A 突变导致 A 抗原表达减弱,与本例样本血清学及分子生物学检测结果相仿。对于临床需要输血的病人而言,准确鉴定 ABO 血型具有重要意义,A<sub>x</sub> 亚型往往由于抗原表达极弱血型鉴定困难而导致误判血型。且 A<sub>x</sub> 亚型病人血浆中常含有抗-A1 抗体,可能会导致病人发生溶血性输血反应,需在确认该抗-A1 抗体在 37 °C 无反应情况下才能输入正常 A 型红细胞或输入 O 型红细胞,以防止发生

输血不良后果<sup>[11]</sup>。

根据已有报道<sup>[8-9]</sup>及本例样本的鉴定说明,在临床输血中包括疑难血型鉴定、红细胞直抗阳性和多次输血病人的血型鉴定等诸多方面,仅依靠血清学结果难于确定病人准确血型。因此,有学者建议应用分子生物学的血型基因分型<sup>[6]</sup>,并认为有助于预防输血的同种免疫反应,提高输血的安全性,推动精准医学的发展。

#### [参 考 文 献]

- [1] FUWG MK, GROSSMAN BJ, HILLYER CD, *et al.* Technical Manual [M]. 19th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2017:265.
- [2] 李君,曹立瀛,侯金友,等.一例 ABO 亚型 CisAB 个体的分子遗传学分析[J].中华医学遗传杂志,2020,37(1):71.
- [3] ISBT. Names for ABO (ISBT 001) blood group alleles v1. 1 170123. <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>
- [4] 吕先萍,宫济武,李志强.红细胞 ABO 疑难血型检测分析与记录流程[J].中国输血杂志,2014,27(2):127.

- [5] OSMAN NH, SATHAR J, LEONG CF, *et al.* Importance of extended blood group genotyping in multiplytransfused patients [J]. Transfus Apher Sci, 2017, 56(3):410.
- [6] 赵桐茂.红细胞血型基因分型在精准输血医学中的应用[J].精准医学杂志,2018,33(1):12.
- [7] DANIELS G. Human Blood Groups [M]. 3th edition. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2013:11.
- [8] 王鹤. Ax04 亚型的血清学特征及基因序列分析[J].中国输血杂志,2018,31(7):788.
- [9] OLSSON ML, IRSHAID NM, HOSSEINI-MAAF B, *et al.* Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies; identification of 15 novel A and B subgroup alleles [J]. Blood, 2001, 98(5):1585.
- [10] CAI X, JIN S, LIU X, *et al.* Molecular genetic analysis of ABO blood group variations reveals 29 novel ABO subgroup alleles [J]. Transfusion, 2013, 53(11 Suppl 2):2910.
- [11] 张秋会,夏爱军,穆士杰,等. Ax 亚型与 A 抗原减弱的血型鉴定 2 例[J].临床血液学杂志,2011,24(4):251.

(本文编辑 刘畅)

### 本刊参考文献著录格式

作者(1~3名均列出,4位或以上者在第3位作者后加“等”或“*et al*”,英文的姓氏均应大写,且出现在正文中也应改为大写).文题[J].刊名(英文期刊请注意按规范缩写刊名),出版年,卷(期):起页.

- [1] 李辉,康品芳,徐庆梅,等.厄贝沙坦对糖尿病大鼠心肌损伤中 MAPKs 信号通路及相关因子的影响[J].蚌埠医学院学报,2020,45(11):1453.
- [2] SACERDOTE P, BIANCHI M, GASPANI L, *et al.* The effects of tramadol and morphine on immune responses and pain after surgery in cancer patients[J]. Anesth Analg, 2019, 109(6):1411.

《蚌埠医学院学报》编辑部