

• 临床检验研究论著 •

## PCR-SSP 与血清学技术用于 ABO 血型分型的比较\*

毛征宇<sup>1</sup>, 万本愿<sup>2</sup>, 王文丁<sup>2</sup>, 陈 会<sup>3</sup>, 徐红萍<sup>1</sup>

(1. 江西省人民医院输血科, 南昌 330006; 2. 江西省临床检验中心, 南昌 330006;

3. 江西省人民医院检验科, 南昌 330006)

**摘要:**目的 探讨 ABO 血型基因分型技术应用于临床检验的可行性。方法 随机抽样 100 例江西健康汉族个体, 并收集 20 例正反定型不符的标本, 采用血清学和序列特异性引物 PCR 法(PCR-SSP)鉴定血型。结果 100 例健康个体的基因分型结果与血清学分型结果一致, 19 例正反定型不符标本的基因分型结果准确。分型结果表明江西地区以 O 型为多, 100 例健康个体中, O 型 36 例(36%), A 型 32 例(32%), B 型 24 例(24%), AB 型 8 例(8%), 基因频率: p(A) 基因为 0.225 3, q(B) 基因为 0.175 3, r(O) 基因为 0.599 8, 且符合 Hardy-Weinberg 平衡。结论 基因分型技术应用于临床检验具有可行性, 在鉴定疑难血型方面可以作为血清学分型的补充。

**关键词:** ABO 血型; 序列特异性引物聚合酶链反应; 基因分型

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.007

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2012)12-1425-02

Comparison of PCR-SSP and serology technique for ABO blood group genotyping<sup>†</sup>Mao Zhengyu<sup>1</sup>, Wan Benyuan<sup>2</sup>, Wang Wending<sup>2</sup>, Chen Hui<sup>3</sup>, Xu Hongping<sup>1</sup>

(1. Department of Transfusion, People's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330006, China;

2. Clinical Examination Center of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 3. Department of

Clinical Laboratory, People's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**Abstract:** **Objective** To discuss the possibility of applying ABO blood group genotyping by PCR-SSP in clinical. **Methods** 100 Han nationality people were extracted randomly, and 20 cases of samples with unconformity of positive and reverse ABO blood typing were collected at the same time. PCR-SSP and serology technique were applied to identify the blood grouping respectively. **Results** Blood grouping results of 100 ordinary cases detected by PCR-SSP and serology were coincident, and 19 common identification suspiciously cases' genotyping results were accurately. Blood grouping results proved that blood group O was preponderance in Jiangxi. In 100 cases of healthy individuals, there were 36 cases of blood group O, 32 cases of blood group A, 24 cases of blood group B, and 8 cases of blood group AB, respectively. The gene distribution frequencies of p(A), q(B) and r(O) were 0.225 3, 0.175 3, and 0.599 8 respectively, which were proved to be credible verified by Hardy-Weinberg Law. **Conclusion** The application of PCR-SSP in ABO blood group genotyping is viable in clinical, which could be a supplement to remedy the shortcomings of serology.

**Key words:** ABO blood group; polymerase chain reaction-sequence specific primer; genotyping

准确鉴定血型是保证临床输血安全、防止重大医疗事故发生的重要保证。常规应用的 ABO 血型血清学正反定型技术, 具有简单实用的特点, 但亦存在一定的局限性, 而基因分型技术在某种程度上克服了血清学实验的某些弱点, 可以作为血清学实验的有益补充。本研究采用血清学实验和序列特异性引物 PCR(PCR-SSP)对比鉴定 ABO 血型, 旨在为江西地区临床输血工作建立稳定的 ABO 血型基因分型方法提供实验依据, 现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2006 年 10 月至 2011 年 10 月, 随机选取 100 例江西地区健康汉族无关个体, 年龄 18~55 岁, 抽取静脉血 3 mL, EDTA 抗凝。此外, 收集 20 例正反定型不符标本。

**1.2 仪器与试剂** 1000-Series Thermal Cyclers 型 PCR 仪(美国 Bio-rad 公司); 抗 A、抗 B 血型定型试剂(北京金豪制药股份有限公司, 批号 20091014); AC、BC、OC 及正反定型微柱凝胶卡(长春博讯生物技术有限责任公司, 批号分别为 20091001、20100107); ABO 基因分型试剂盒(美国 G&T 公司, 批号 B9801A); 基因组 DNA 提取试剂盒(批号 DV811A)、Taq

酶和标记物(TaKaRa 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 DNA 提取** 严格按基因组 DNA 提取试剂盒说明书的要求进行操作。DNA 终浓度调节至 40~70 ng/ $\mu$ L。

**1.3.2 PCR 扩增** PCR 反应体系总体积为 9  $\mu$ L, 包含 1  $\mu$ L DNA 样品, 1  $\mu$ L Taq 酶, 7  $\mu$ L 引物混合液。PCR 扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 按 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s 的条件扩增 30 个循环, 然后 72  $^{\circ}$ C 终末延伸 5 min, 最后 4  $^{\circ}$ C 保温。

**1.3.3 PCR 产物的电泳分析** PCR 产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 以 100 V 电压电泳 25 min 后, 于紫外灯下观察条带, 扩增条带与内对照 207 bp 人生长激素基因(hGH)及 DL 500 DNA 标记物比较并读取结果, 紫外灯下拍照记录。

**1.3.4 结果判断** 根据是否产生特异性目的片段以及片段的长度大小来确定基因分型, 判读标准如表 1~2 所示。

**1.3.5 血清学分型方法** 正反定型凝胶微柱法、盐水凝胶集试管法和吸收放散实验, 操作过程和判读标准参照文献[1-2]。

\* 基金项目: 江西省卫生厅普通计划资助项目(200503010)。

表 1 ABO 基因分型的判读参数

引物缩写	特异性产物长度(bp)	内对照产物长度(bp)	检测的 ABO 等位基因
A	75	207	A101、A102、A103、A105; A201-203、A205、A207-211; A301-307 等
B	90	207	B101、B102、B103、B107、B110; B301-307; Bel01-05; Bw02-21 等
O	127	207	O01、O02、O04-07、O09-13、O16、O18、O21-36; O39-47、O54-59 等
A201	117	207	A201、A206、A209; A302、A304; A banut 01; Aw01-03、Aw07 等

表 2 基因分型的电泳格局

表型	基因型	A (75 bp)	B (90 bp)	O (127 bp)	A201 (117 bp)	hGH (207 bp)
A 型	A/A	+	-	-	-	+
	A/A201	+	-	-	+	+
	A/O	+	-	+	-	+
	A201/O	+	-	+	+	+
B 型	B/B	-	+	-	-	+
	B/O	-	+	+	-	+
AB 型	A/B	+	+	-	-	+
	A201/B	+	+	-	+	+
O 型	O/O	-	-	+	-	+

+: 有相应条带; -: 无相应条带。

2 结 果

2.1 健康个体血型鉴定结果 100 例江西健康汉族个体的基因分型结果与血清学分型(正反定型凝胶微柱法和盐水凝集试管法)结果一致,江西地区人群以 O 型为多,100 例中 A 型 32 例(32%), B 型 24 例(24%), AB 型 8 例(8%), O 型 36 例(36%)。基因频率(Bernstein 法):p(A)基因为 0.225 3, q(B)基因为 0.175 3, r(O)基因为 0.599 8。经 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验,  $\chi^2 = 0.002 < \chi^2_{df=1, P=0.05} = 3.841$ , 说明该群体是符合 Hardy-Weinberg 平衡的随机婚配群体, 依此得到的基因频率是可信的<sup>[3]</sup>。采用 PCR-SSP 法进行基因分型, 共检出 4 个等位基因 9 种基因型: A/O 型 14 例(14.0%), A/A201 型 11 例(11.0%), A201/O 型 6 例(6.0%), A/A 型 1 例(1.0%), B/O 型 17 例(17.0%), B/B 型 7 例(7.0%), A/B 型 5 例(5.0%), A201/B 型 3 例(3.0%), O/O 型 36 例(36.0%)。

2.2 疑难血型鉴定结果 20 例正反定型不符标本中, 19 例基因分型结果与血清学分型一致, 定型准确, 造成正反定型不符的原因包括: 冷凝集 12 例, 多发生在冬春季节, 经 37℃ 温育后凝集消失; 串钱状凝集 2 例, 在试管中加生理盐水稀释或用生理盐水洗涤红细胞后重新试验后凝集消失; 试剂因素 2 例, 表现为正定型 A 型反定型 AB 型, 采用金标准——盐水凝集试管法重新鉴定<sup>[4]</sup>, 均为 A 型, 输 A 型血后未发生输血反应; 2 例获得性类 B 抗原为卵巢肿瘤患者和直肠癌患者各 1 例, 前者正定型 AB 型, 反定型 A 型, 吸收放散实验结果表明类 B 抗原吸附在 A 型红细胞表面, 其血型结果判断为 A 型, 基因分型结果为 A/O 型, 后者正定型 B 型, 反定型 O 型, 吸收放散实验结果表明类 B 抗原吸附在 O 型红细胞表面, 血型判断为 O 型, 基因分型结果为 O/O 型, 2 例患者输血后均未见输血反应; 1 例骨髓增生异常综合征患者, 正定型 O 型, 反定型 B 型, 吸收放散实验结果表明红细胞表面 B 抗原减弱, 血型判定为 B 型, 基因分型为 B/O, 患者输血后未见输血反应。未准确定型的 1 例为

白血病患者, 于 3 个月前进行了 ABO 血型不合的异基因骨髓移植, 供体 A 型, 受体 O 型, 2011 年 10 月 9~13 日因发热头痛入院, 血红蛋白(Hb)25 mg/L, 正定型 O 型, 反定型 A 型, 输注 O 型红细胞 6 U, 未见输血反应, 第 1 次 DNA 提取失败, 因标本量太少, 无法进行重复实验, 未能准确定型。

3 讨 论

ABO 血型基因分型技术在国内进展迅速, 甚至有国外学者撰文探讨对于具有百年历史的凝集试验是否该说“再见”<sup>[5]</sup>。本研究采用血清学和基因分型两种方法对 100 例江西健康汉族个体进行血型鉴定, 结果显示: 血清学分型与基因分型结果一致, 江西地区人群以 O 型为多, 基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡, 依此得到的基因频率可信, 这也符合 ABO 血型在中国的分布特点<sup>[6]</sup>: 从北向南方向, B 基因频率逐渐下降, 而 O 基因频率升高, 云、贵、川和长江中下游地区 A 基因频率升高。

冷凝集是造成正反定型不符最常见的原因, 是血型鉴定工作中应首先考虑排除的因素<sup>[7-8]</sup>。采用基因分型的方法可以直接确定类 B 抗原及弱 B 抗原的血型基因型。有国外学者通过 PCR 技术扩增 ABO 血型基因, 对 DNA 片段进行变性梯度凝胶电泳, 可以证实具有获得性类 B 抗原的患者不存在编码 B 抗原的基因。Garratty 等<sup>[9]</sup>报道了 1 例获得性类 B 抗原的 A 型患者, 因输血前未检测出红细胞上的类 B 抗原, 误输入 AB 型血液后发生严重溶血性输血反应, 导致死亡。因此, 准确鉴定血型能够有效防止临床输血反应的发生。

异基因骨髓移植患者的输血是一个值得注意的问题。毛晓露和胡丽华<sup>[10]</sup>报道了 2 例异基因骨髓移植, 均为供者 A 型, 受者 O 型, 第 1 例于移植后 7 d, 第 2 例于移植后 10 d, 分别采用 DNA 基因分型方法鉴定血型, 结果均为 A/O 型。由此可见, ABO 基因分型技术可以用于造血干细胞移植存活的证明, 在接受不同 ABO 血型的造血干细胞移植患者体内出现供者 ABO 基因的时间大大短于出现 ABO 血型的时间。通常供者血型出现在移植后 22~42 d, 约 80 d 后受者血型可以完全转变为供者血型<sup>[11]</sup>。本院于 2011 年 10 月 9~14 日收治的 1 例异基因骨髓移植患者, 也是供者 A 型, 受者 O 型, 第 1 次 DNA 提取失败, 因标本量太少, 无法进行重复实验而未能准确定型, 但本例的意义在于患者骨髓移植后的血型转换时间已经远超过了一般认为的 80 d 上限, 提示在临床检验工作中应根据患者的实际情况进行分析, 血型转换期间的输血一定要遵循符合当时抗原、抗体格局的原则。从这个角度来看, 基于 PCR-SSP 法的基因分型, 在分子水平上从基因, 也就是遗传本质的角度对血型进行鉴定, 相对于传统的仅能鉴定表型的血清学方法来说, 无疑具有很大的优越性。

但是应用 PCR-SSP 法进行基因分型有两个需要注意的问题: 一是要高度重视 DNA 抽提的质量控制, 操作过程要小心谨慎、严格遵循试剂盒说明书的要求, 抽提完成后应立即进行琼脂糖凝胶电泳并测定其浓度, 以保证后续(下转第 1429 页)

CD14 在 M4、M5 中有较高表达率,CD14 和 CD64 联合检测可在髓系白血病中鉴别 M4 及 M5。CD64 敏感性最好,但它同时表达于其他类型 AML 中,特异性较差,CD4 和 CD14 仅在 M4 和 M5 两型中有高表达,特异性较好,与国外报道相符<sup>[9]</sup>。

白血病细胞中白细胞抗原的异常表达表现在许多方面,部分可作为鉴别诊断和预后不良的指标<sup>[10]</sup>。CD7 和 CD56 常在 M2 中大量表达,对 M2 的诊断可提供一定的依据,AML 免疫标记中伴淋系抗原 CD7、CD56 阳性被认为是预后不良的表现<sup>[11]</sup>。CD2 和 CD9 仅在 M3 中高表达,与国外报道相似<sup>[12]</sup>。

FCM 免疫分型可以根据特异性白细胞抗原将 ALL 分为 ALL-B 和 ALL-T,而根据 FAB 标准则很难区分二者。本研究 110 例 ALL-B 和 27 例 ALL-T 均至少表达 2 项以上特异性白细胞抗原。CD19 和 CD7 分别在 ALL-B、ALL-T 中表达量最高,因此可作为除特异性膜内抗原外最具诊断价值的抗原,cCD79a 作为 B 淋巴系特异性最高的膜内抗原在 ALL-B 中的表达占到了 81.8%,在 ALL-T 中无表达,因此 cCD79a 可作为 FCM 免疫分型区分 ALL-B 和 ALL-T 的主要指标<sup>[13]</sup>。CD23 在 ALL 中不表达,经 FAB 分型和临床确诊为 CLL 的患者中,CD5 和 CD23 双阳性表达率为 60.9%(28/46),所以 CD5 和 CD23 可作为 CLL 的辅助鉴别诊断指标。

本研究中有混合型白血病 6 例,占 1.8%(6/339),其中 2 例形态学诊断为 AML,4 例形态学诊断为 AML,但经免疫学表型检测确诊为急性混合型白血病,证明过去疗效差的 ALL 及 AML 病例中部分可能是急性混合型,采用 FCM 进行免疫学分型有其实用价值<sup>[14]</sup>。综上所述,利用 FCM 进行白血病免疫学分型能够弥补形态学诊断的不足,使白血病的分型更为精确,有利于判断预后及治疗方案的选择。对于免疫分型诊断与形态学分型诊断不一致的,要以免疫分型诊断为准。

参考文献

[1] 许文荣,王建中. 临床血液学与检验[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2007;240-245.

[2] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007;103-107.

[3] 刘贵建. 急性白血病的 MICM 分型[J]. 中华检验医学杂志,2004,27(6):399-400.

[4] Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemia. European Group for the immunological characterization of leukemias(EGIL)[J]. Leukemia, 1995,9(10):1783-1786.

[5] 朱易萍. 急性白血病的形态学免疫学细胞遗传学分型[J]. 实用儿科临床杂志,2004,19(5):340-341.

[6] 刘艳荣,于弘,常艳,等. 四色荧光标记抗体在白血病免疫分型中的应用及意义[J]. 中国实验血液学杂志,2002,10(5):423-425.

[7] 王建中. 临床流式细胞分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:296-306.

[8] Kuriyama K, Tomonaga M, Kobayashi T, et al. Morphological diagnoses of the Japan adult leukemia study group acute myeloid leukemia protocols: central review[J]. Int J Hematol, 2001,73(1):93-99.

[9] Kiehl KA, Liddle PF, Hopfinger JB. Error processing and the rostral anterior cingulate: an event-related fMRI study[J]. Psychophysiology, 2000,37(2):216-223.

[10] 江雁,穆红,唐志琴,等. 急性白血病系列特异性抗原表达分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,6(6):532-534.

[11] 承璐雅,王伟光,庄静丽,等. CD7<sup>+</sup>急性髓细胞性白血病临床及实验室特征分析[J]. 内科急危重症杂志,2006,12(2):85-86.

[12] Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH, et al. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data[J]. Arch Pathol Lab Med, 2003,127(1):42-48.

[13] 黄欣. 流式细胞术用于急性白血病免疫分型现状[J]. 检验医学与临床,2006,3(4):160-162.

[14] 唐娟,李山. 流式细胞术在急性双表型白血病诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(6):568-570.

(收稿日期:2011-09-19)

(上接第 1426 页)

步骤的顺利进行;二是检验操作人员需要培训上岗,掌握相关的基因分型理论和技能,这有利于准确判断基因分型结果。

综上所述,基因分型方法具有操作简单、检测周期短、灵敏度高、结果可靠、重复性良好、分型结果可长期保存等优点,在鉴定血型尤其是疑难血型时,可以弥补血清学分型的不足之处。

参考文献

[1] 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,2006:246-256.

[2] 夏琳. 临床输血诊疗技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:62-84.

[3] 王亚馥,戴灼华. 遗传学[M]. 北京:高等教育出版社,1998:464-470.

[4] 李勇. 临床红细胞血型相容性试验中基因和血清学技术孰重孰轻[J]. 中国输血杂志,2007,20(4):338-340.

[5] 赵桐茂. 人类血型分型的新纪元[J]. 中国输血杂志,2007,20(1):

1-2.

[6] 陈雅勇,赵桐茂,张工梁. 中国人 ABO 血型分布[J]. 遗传,1982,4(2):4-7.

[7] 闫朝春,蒋玲,陈丽梅,等. 导致微柱凝胶卡式交叉配血试验假阳性结果的原因分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(15):1737-1738.

[8] 王军梅,马亚平,钟万芬. 冷凝集致 ABO 正反定型和交叉配血不符原因分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(3):303.

[9] Garratty G, Arndt P, Co A. Fatal hemolytic transfusion reaction resulting from ABO mistyping of a patient with acquired B antigen detectable only by some monoclonal anti-B reagents[J]. Transfusion, 1996,36(4):351-353.

[10] 毛晓露,胡丽华. ABO 血型不合的造血干细胞移植引起免疫性溶血的研究进展[J]. 临床血液学杂志:输血与检验,2010,23(4):251-253.

[11] 田兆嵩. 临床输血学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1998:218.

(收稿日期:2012-01-31)