

1 例 B(A)亚型的血清学及分子生物学特征分析

秦洪伟¹,迟媛媛³,崔海涛²,韩 斌⁴,徐全民¹

(青岛市胶州中心医院:1. 输血科;2. 检验科,山东青岛 266000;3. 青岛市妇女儿童医院输血科,山东青岛 266000;4. 青岛市中心血站输血医学研究所,山东青岛 266000)

关键词:ABO 亚型; ABO 基因; B(A)亚型; 血型血清学; 分子生物学
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 21. 056 文献标识码:C 文章编号:1673-4130(2017)21-3071-02

ABO 血型系统是最具临床意义的血型系统,供受者 ABO 血型不合常引起溶血性输血反应、新生儿溶血病和移植排斥反应等。ABO 血型除了常见的 A 型、B 型、O 型和 AB 型外,还会有一些抗原性较弱的亚型被发现,这些亚型通常表现为正反定型不一致或凝集强度的改变。ABO 亚型的出现给血型鉴定、交叉配血和临床输血带来极大困难,严重影响输血的安全性^[1-2]。2016 年,青岛市胶州中心医院输血科在血型鉴定工作中遇到 1 例 ABO 正反定型不符的标本,经青岛市中心血站血型参比实验室检测被确认为 B(A)04/O02 基因型。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者,女,52 岁,因患直肠癌并梗阻就诊于青岛市胶州中心医院,血型检查发现正反定型不符,遂于 2016 年 5 月 25 日送患者血样至青岛市中心血站血型参比实验室进行疑难血型鉴定。患者无输血史,无药物、食物过敏史,近期无感染史。

1.2 仪器与试剂 血型定型试剂卡(批号 ABR132A,美国强生公司),单克隆抗-A、单克隆抗-B、ABO 红细胞、抗-H、A2 细胞(上海血液生物医药有限责任公司),抗-D、多克隆抗人球、抗 A1、抗 AB(荷兰 Sanquin 公司),基因组 DNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司),Exon6、Exon7 直接测序引物(PAGE 级)。所有试剂使用均在有效期内。KA2200 型离心机(日本 KUBOTA 公司),Ortho BioVue system 离心机(美国强生公司),C1000 型 PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司),3100-Avant 型全自动 DNA 序列分析仪(美国 ABI 公司)。

1.3 方法

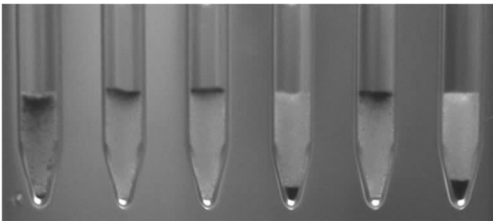
1.3.1 血清学试验 ABO 正反定型试验分别采用微柱凝集法和盐水试管法^[3]进行。

1.3.2 DNA 提取 采用 DNA 提取试剂盒,按照说明书进行 DNA 提取。

1.3.3 ABO 基因第 6、7 外显子直接测序 采用 Olsson 等^[4]设计的测序引物对 Exon6、Exon7 进行扩增。Exon6 引物序列:上游 5'-CGG AAT TCA CTC GCC ACT GCC TG-G GTC TC-3',下游 5'-CGG GAT CCA TGT GGG TGG CAC CCT GCC A-3'。Exon7 引物序列:上游 5'-CGG ATC CCC GTC CGC CTG CCT TGC AG-3',下游 5'-GGG CCT AGG CTT CAG TTA CTC-3'。PCR 扩增反应体系(50 μL):400 μmol/L dNTP,500 ng 模板 DNA,0.1 μmol/L 引物,2.5 μmol/L 镁离子,3 U Taq DNA 聚合酶。PCR 扩增反应程序:95℃ 预变性 10 min;94℃ 60 s,63℃ 90 s,72℃ 60 s,共 10 个循环;94℃ 60 s,61℃ 90 s,72℃ 60 s,共 25 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。对 PCR 扩增产物进行凝胶电泳,对目的片段进行纯化,使用 ABI3100-Avant 进行序列分析。

2 结 果

2.1 血清学检测结果 微柱凝集法和盐水试管法结果一致,ABO 正反定型不符,血清学表现为 AwB。患者标本正定型结果:抗-A、抗-B、抗-AB 与红细胞都凝集,凝集强度分别为 2+、4+、4+;抗-A1 与红细胞不凝集;红细胞与抗 H 凝集反应强于正常 B 型细胞,凝集强度为 2+。患者标本反定型结果:只与 A1c、A2c 凝集,凝集强度分别为 3+、2+;与 Bc、Oc、自身红细胞不反应。见图 1。



注:6 个反应孔由左至右分别为抗-A、抗-B、抗-D、对照、A1c、Bc。

图 1 微柱凝集法鉴定 ABO 和 RhD 血型

2.2 基因测序分析 第 7 外显子发生 640A>G 突变,导致第 214 位的甲硫氨酸转变为缬氨酸,其他杂合位点均符合 B101/O02 特征。经与血型抗原基因变异突变数据比对,确定在 B101 基础上的 640A>G 突变基因为 B(A)04 等位基因。见图 2。

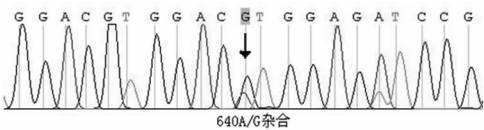


图 2 ABO 基因第 7 外显子部分序列

3 讨 论

ABO 亚型具有遗传基础和明确的血清学特点,一般可通过正反定型不符发现 ABO 亚型,其中正定型的凝集强度和凝集状态是很重要的判断信息^[5]。ABO 亚型的产生是由于 A 或 B 基因发生突变,导致红细胞上表达的 A 抗原或 B 抗原数目减少,与抗-A 或抗-B 的反应减弱,且通常在血清中存在针对弱抗原的抗体^[6]。

微柱凝集法血型鉴定具有快速、结果容易保存等优点,但同时具有不能反复离心观察等弊端,当用其鉴定血型出现正反定型不符时需用盐水试管法进行验证确认。盐水试管法被誉为 ABO 血型鉴定的“金标准”,经过离心能够保证血型抗原与抗体的充分反应,但其弊端就是反应结果不易保存,受操作人员经验水平影响较大。因此,在工作中可充分运用两种方法的优点,避免亚型漏检。有研究报道,盐水试管法结合柱凝集法在疑难血型鉴定中是一种高效、灵敏、简单易行的方法^[7]。为

更好地探讨其分子机制,可采用分子生物学方法检测来确定其基因型。

B(A)亚型最早由 Yamamoto 等^[8]于 1985 年发现,是一种发生率非常低的 ABO 亚型,被认为是遗传学上的 B 型,其红细胞上表达较强的 B 抗原和较弱的 A 抗原^[9-10]。B(A)主要血清学特点为:正定型与单克隆试剂及人源抗-A 均发生弱凝集,与试剂抗-A1 不发生凝集,与单克隆试剂及人源抗-B 发生强凝集;反定型血清中含有较强的抗-A,可与 A1 细胞发生较强凝集,与 A2 细胞发生较弱凝集^[11-12]。本研究, B 基因在 nt640 位发生 A>G 单碱基突变,导致第 214 位的甲硫氨酸被缬氨酸替代。突变的 B 基因具有编码双功能活性酶的功能,在血清学方面除了具有 B 抗原特异性以外,还具有少量的 A 抗原特异性^[13]。目前发现并报道的 B(A)型等位基因共 6 种,分别为 B(A)01-B(A)06,其中 B(A)04、B(A)02 型在青岛地区常见^[14]。

B(A)型患者在输血时多采用 O 型或 B 型洗涤红细胞进行输血治疗。在常规血型鉴定时,应严格把握 ABO 正反定型不符的标准,注意观察并记录反应凝集强度,尤其是正定型必须达到 4+ 的凝集强度,遇到 ABO 正反不符的标本时应用试管法进行进一步验证,必要时送到上级血型参比实验室进行血清学及分子生物学检测,从而保证输血安全。

参考文献

[1] Hult AK, Yazer MH, Jørgensen R, et al. Weak A phenotypes associated with novel ABO alleles carrying the A2-related 1061C deletion and various missense substitutions [J]. *Transfusion*, 2010, 50(7):1471-1486.

[2] Yazer MH, Triulzi DJ. Immune hemolysis following ABO mismatched stem cell or solid organ transplantation[J]. *Curr Opin Hematol*, 2007, 14(4):664-670.

[3] 刘达庄. 免疫血液学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2002:39-50.

[4] Olsson L, Irshaid M, 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):1585-1593.

[5] 向东. ABO 亚型的检测[J]. *中国输血杂志*, 2010, 23(8):577-580.

[6] 王憬惺. 输血技术[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2013:341-343.

[7] 王显荣, 许立, 李育, 等. 盐水法结合柱凝集法在 ABO 疑难血型鉴定中的应用[J]. *中国输血杂志*, 2006, 19(1):34-36.

[8] Yamamoto F, McNeill D, Yamamoto M, et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system; 3. A(X) and B(A) alleles[J]. *Vox Sang*, 1993, 64(3):171-174.

[9] 杰夫·丹尼尔. 人类血型[M]. 2 版. 朱自严, 译. 北京:科学出版社, 2007:45-46.

[10] Yu C, Lee L, Chan S, et al. The molecular basis for the B(A) allele: an amino acid alteration in the human histoblood group B alpha-(1,3)-galactosyltransferase increases its intrinsic alpha-(1,3)-N-acetylgalactosaminyltransferase activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262(2):487-493.

[11] 宿兰, 杨世英, 廉维, 等. 罕见的 B(A)表型血清学及基因检测[J]. *中国输血杂志*, 2010, 23(3):200-202.

[12] 郭忠慧, 向东, 朱自严, 等. 罕见的 CisAB 与 B(A)血型的基因型研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2004, 21(4):321-324.

[13] Deng ZH, Yu Q, Liang YL, et al. Characterization of a novel B(A) allele with BBBA type at the ABO blood group [J]. *J Hum Genet*, 2006, 51(8):732-736.

[14] 冯智慧, 刘培燕, 韩斌, 等. 青岛地区复合型 ABO 糖基转移酶基因的分析研究[J]. *中国输血杂志*, 2015, 28(10):19-22.

(收稿日期:2017-05-02 修回日期:2017-08-04)

(上接第 3065 页)

参考文献

[1] 曾蓉, 王薇, 王治国. 临床实验室危急值报告制度的建立[J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(4):112-115.

[2] 谢云燕, 李亚林. 危急值讨论制度在急诊留观病房中的应用[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(5):56-62.

[3] Wong WC, Yap CK, Eisenhaber B, et al. issectHMMER: a HMMER-based score dissection framework that statistically evaluates fold-critical sequence segments for domain fold similarity[J]. *Biol Direct*, 2015, 10(39):1186-1193.

[4] 申海燕, 刘亚珍, 张芳, 等. 危急值报告系统流程信息化管理的应用[J]. *中国实用护理杂志*, 2013, 7(11):890-893.

[4] 检验危急值在急危重病临床应用的专家共识组. 检验危急值在急危重病临床应用的专家共识(成人)[J]. *中华急诊医学杂志*, 2013, 22(10):90-97.

[5] Liebow EB, Derzon JH, Fontanesi J, et al. Effectiveness of

automated notification and customer service call centers for timely and accurate reporting of critical values; a laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Biochem*, 2015, 45(10):979-987.

[6] 高志琪, 周睿, 李勇, 等. 临床实验室危急值确立及其报告成功率评价[J]. *临床检验杂志*, 2013, 31(6):543-545.

[7] 黄希颖, 傅应裕, 沈凌炜. 急诊检验危急值报告流程优化及质量改进[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 10(6):87-88.

[8] Bach PB, Mirkin JN, Oliver TK, et al. Benefits and harms of CT screening for lung cancer; a systematic review[J]. *JAMA*, 2012, 307(22):2418-2429.

[9] 刘灿, 王炳龙, 林寿榕, 等. 临床实验室危急值的应用研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(6):565-568.

[10] 王培昌. 危急值报告若干问题的商榷[J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(2):117-122.

(收稿日期:2017-04-28 修回日期:2017-08-02)