DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.10.09

· 临床实验研究 ·

一例 B(A)血型的血清学及分子生物学鉴定

张钰[1],李炜华[2],蔡杰[1],杜海林[1],何晓露[1],傅强[1],戴宇东[1],何成涛[1](1.南京红十字血液中心研究室,南京 210000;2.宿迁市中心血站质管科,宿迁 223800)

摘要:目的 对 1 例血型血清学正反定型不符的标本进行 ABO 血型鉴定。**方法** 运用血型血清学方法鉴定标本 ABO 血型;用 PCR-序列特异性引物(SSP)基因定型和 ABO 基因直接测序的方法确定该标本的基因型。**结果** 血型血清学检测结果表现为 B(A)亚型的特点;PCR-SSP 分型结果定为 B(A)04/O1 型;测序发现标本 ABO 基因的第 6 和第 7 外显子存在变异:第 6 外显子存在 261delG、297A>G;第 7 外显子存在 526C>G、640A>G、657C>T、703G>A、796C>A、803G>C、930G>A,判断该样本血型为 B(A)04/O01 血型。**结论** 该血型血清学初步鉴定为 B(A)的标本用 PCR-SSP 法和 ABO 基因直接测序法确认为 B(A)04/O01 型。

关键词:B(A);血型血清学;PCR-序列特异性引物;DNA 测序
中图分类号:R446 **文献标志码**:A

ABO 血型系统是人类最主要的血型系统之一[1],ABO 血型不合的输血会导致严重的输血反应及其他并发症。因此,ABO 血型的准确分型对于安全输血至关重要[2]。除了 A、B、AB、O 等正常的 ABO 表型外,还有一些罕见的亚型[3]。B(A)是一种较为罕见的 ABO 亚型,其可能是由于底物特异性的酶转变所导致[4]。其血清学的特点主要是正定型红细胞与抗 B 出现强凝集反应,与抗 A 出现弱凝集反应,反定型血清能够凝集 A1 和 A2 细胞[5-6]。在血清学分型中,B(A)常与 CisAB、AxB 等发生混淆,分子生物学技术则可以帮助区分各种亚型。本研究使用血型血清学和分子生物学的方法检测了 1 例正反定型不符的标本,最后鉴定其为B(A)04/O01,报道如下。

1 材料与方法

1.1 样本来源 2020 年 1 月 19 日 1 例自愿无偿献血的 21 岁男性血液标本。

1.2 试剂与仪器 单克隆抗 A、抗 B、抗 H、抗 A1、A1 细胞、A2 细胞、B 细胞、O 细胞、抗筛细胞(O1、O2、O3)试剂(上海血液生物医药公司),抗 AB(Rapid Labs 公司),凝聚胺试剂盒(合肥天一生物技术研究所公司),抗人球蛋白检测卡(长春博迅生物技术公司),血液基因组 DNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司),人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒(天津秀鹏公司),实验所有试剂均检验合格,按要求保存并在有效期内使用。

免疫微柱孵育器、血型血清学离心机(长春博研科学仪器公司),低速全自动离心机(日本 Kubota 公司),离心机(德国 SIGMA 公司),核酸蛋白定量检测仪(德国 Eppendorf 公司),基因扩增仪(美国 ABI 公司),凝胶成像仪(上海复日科技公司)。

1.3 方法

1.3.1 血型血清学试验 参照《全国临床检验操作规程》第 4 版及各试剂说明书用试管法进行血型血清学试验。

1.3.2 分子生物学试验

1.3.2.1 基因组 DNA 的提取 采用商品试剂盒并严格按照试剂盒说明书快速提取 DNA,DNA 浓度调为 30~100 ng/μL,DNA 纯度 $A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$ 值为 1.6~2.0,25 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示无 DNA 降解现象。

1.3.2.2 PCR-SSP 基因分型 严格按照人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒进行操作。按照以下循环参数进行 PCR 扩增:96 ℃ 2 min,1 个循环;96 ℃ 20 s,68 ℃ 60 s,5 个循环;96 ℃ 20 s,65 ℃ 45 s,72 ℃ 30 s,10 个循环;96 ℃ 20 s,62 ℃ 45 s,72 ℃ 30 s,15 个循环;72 ℃ 3 min,1 个循环。凝胶电泳:PCR 产物经 25 g/L 琼脂糖凝胶、140~150 V 电泳 10~15 min,凝胶成像仪拍照并观察结果。

1.3.2.3 标本 ABO 基因测序 采用直接测序法对标本 ABO 血型基因 1~7 外显子进行测序,由天津秀鹏公司完成。PCR 产物纯化:在每个反应管每孔中加入 3 μL ExoSAP-IT(Exonuclease Ⅰ 和 Shrimp Alkaline Phosphatase 的混合溶液),以去除多余的 PCR

作者简介:张钰,1992 年生,女,技师,硕士,主要从事输血免疫学研究;李炜华,1976 年生,女,副主任技师,大学本科,主要从事血站质量管理;二者对该文具有同等贡献,同为第一作者。
通信作者:何成涛,硕士,副主任技师,E-mail:hechengtao413@126.com。

引物和底物 dNTPs。低速离心混合溶液后，运行以下热循环程序：37 ℃ 3 min，80 ℃ 15 min，1 个循环。测序反应：纯化的 PCR 产物用作测序反应 DNA 模板。采用 20 μL 反应体系，内含：16 μL BigDye terminator v3.1 sequencing Kit 提供的测序反应混合液和 4 μL 经 ExoSAP-IT 处理的 PCR 产物。测序反应扩增条件：96 ℃ 20 s，50 ℃ 30 s，60 ℃ 2 min，25 个循环。

2　结果

2.1　血型血清学结果　血型血清学反应格局见表 1、2。正定型中红细胞与抗 A 发生较弱凝集(±)，与抗 B 发生强凝集(4+)，反定型血清能够凝集 A1 细胞(1+)和 A2 细胞($1+^{w}$)；血清中无不规则抗体的存在；红细胞与抗 H 的反应强度(3+)接近正常的 O 型红细胞($3+^{s}$)而高于正常的 B 型红细胞(2+)。

表 1　血型血清学检测

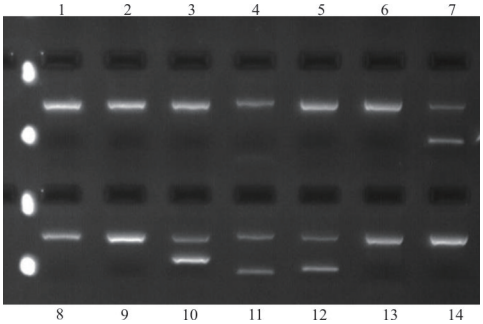
反应条件	ABO 正定型				ABO 反定型				
	抗 A	抗 B	抗 A1	抗 AB	A1 细胞	A2 细胞	B 细胞	O 细胞	自身细胞
立即离心	±	4+	0	4+	1+	$1+^{w}$	0	0	0
多次离心	±	4+	0	4+	1+	$1+^{w}$	0	0	0

表 2　抗 H 与 P 细胞、DO 细胞、DB 细胞反应结果

反应条件	抗 H		
	P 细胞	DO 细胞	DB 细胞
立即离心	3+	$3+^{s}$	2+

注：P 细胞为被检标本红细胞；DO 细胞为相同采血时间 5 个 O 型献血者的混合红细胞；DB 细胞为相同采血时间 5 个 B 型献血者的混合红细胞。

2.2　PCR-SSP 结果　见图 1。第 7、10、11、12 孔位呈阳性反应，其余孔位呈阴性反应。



注：1～14 泳道分别为 Cis-AB01、Cis-AB01/B(A)01、B(A)01/B(A)03、Cis-AB02、B(A)02、Cis-AB03、B(A)04、B(A)06、Cis-AB04、B1、B2、O1、O2、阴性对照。

图 1　标本 PCR 电泳结果

2.3　ABO 基因测序结果　见图 2、3。根据 NCBI 网站血型抗原基因突变数据库(以 A101 为参考序列)，结果发现第 6 外显子 261 处缺失 G，297 处出现 A/G 突变。外显子 7 的突变有 526C>G、640A>G、657C>T、703G>A、796C>A、803G>C、930G>A。

3　讨论

B(A)血型最早是 1956 年由 Yamamoto 等[7]发现，是一种较为罕见的 ABO 亚型。迄今为止，已发现 6 种 B(A)等位基因，分别为 B(A)01、B(A)02、B(A)03、B(A)04、B(A)05、B(A)06，其中 B(A)02 和 B(A)04 在我国最为常见[8]。B(A)血型的形成主要是由于 B 基因的特定突变，变异的 B 基因具有编码双功能活性酶的能力，使血清学中有正常 B 抗原和较弱 A 抗原的特征，因为关键位点的突变及其引起的单个氨基酸的改变，从而改变了糖基转移酶的酶学特点和催化活性，使相同的底物被催化形成不同的产物[9]。

本研究分析了 1 例正反定型不符的献血者标本，血型血清学结果发现其红细胞可以凝集抗 A 和抗 B(与抗 B 的凝集强度强于抗 A)，与抗 H 反应的凝集强度接近 O 细胞而强于 B 细胞，反定型血清能凝集 A1 细胞和 A2 细胞。因此根据血清学的结果，我们初步判定其为 B(A)型。

目前，血型血清学的检测是血型鉴定的主要方法，但是其只能对 ABO 亚型进行初步定型，还需借助分子生物学的方法对 ABO 亚型进行基因分型。因此我们使用了 PCR-SSP 方法进行检测，检测结果与分型表相比对，发现该样本为 B(A)04/O1 杂合。为进一步证实 PCR-SSP 的结果，我们对标本 DNA 进行测序，ABO 基因由 7 个外显子和 6 个内含子组成，其功能区域分别位于第 6 外显子和第 7 外显子中，而 ABO 等位基因和所有的亚型基因也主要分布在这个区域[10]。本研究测序结果显示，第 6 外显子中有 1 个单核苷酸缺失，即 261delG，这与 O01 等位基因相一致[11]，第 7 外显子存在 526C>G、640A>G、657C>T、703G>A、796C>A、803G>C、930G>A 的突变，第 6、7 外显子的突变导致了 5 个氨基酸发生变化(Arg176Gly、Met214Val、Gly235Ser、Leu266Met、Gly268Ala)，从而形成了 B(A)04 等位基因。

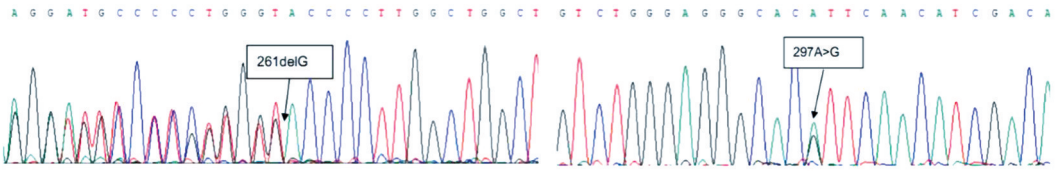


图 2　外显子 6 测序结果

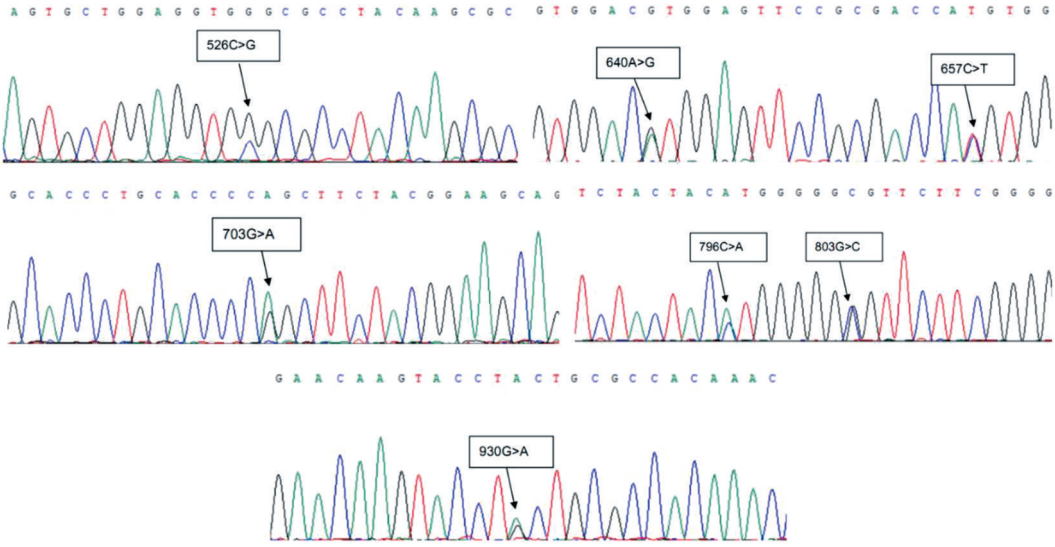


图 3　外显子 7 测序结果

综上所述，本研究结合血型血清学和分子生物学的结果，判定该献血者的血型为 B(A)04/O01。在临床实践中，当出现正反定型不符的情况时，除进行必要的血清学检测外，可结合分子生物学的方法进一步检测，正确分析血型，避免出现误检或漏检，以确保临床输血的安全性。

4　参考文献

[1] Moller M, Joud M, Storry JR, *et al*. Erythrogene: a database for in-depth analysis of the extensive variation in 36 blood group systems in the 1000 Genomes Project[J]. Blood Adv, 2016, 1(3): 240-249.

[2] Jiao LX, Yu JH, Yu XL, *et al*. Gene analysis of two cases with Cis-AB/B blood subgroup[J]. Transfus Apher Sci, 2017, 56(2): 223-225.

[3] Nair R, Gogri H, Kulkarni S, *et al*. Detection of a rare subgroup of a phenotype while resolving ABO discrepancy[J]. Asian J Transfus Sci, 2019, 13(2): 129-131.

[4] 郭忠慧，向东，朱自严，等.中国汉族人群检出新的 B(A)641T>C 等位基因[J].中国输血杂志，2006，19(1)：17-20.

[5] Jain A, Gupta A, Malhotra S, *et al*. An ABO blood grouping discrepancy: Probable B(A) phenotype[J]. Transfus Apher Sci, 2017, 56(3): 459-460.

[6] 熊莉，周小英，吴红，等.罕见 B(A)血型的鉴定[J].临床检验杂志，2018，36(6)：426-428.

[7] Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, *et al*. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system[J]. Vox Sang, 1993, 64(3): 175-178.

[8] 刘乐霞，梁俊杰，肖玮，等.罕见 B(A)04 血型家系遗传规律调查[J].临床输血与检验，2014，16(2)：173-175.

[9] Guo ZH, Xiang D, Zhu ZY, *et al*. Serologic and molecular characterization of the B(A) blood group in the Chinese population[J]. Immunohematology, 2007, 23(2): 69-74.

[10] 宋艳艳，周雪莹，欧阳旭，等.B(A)02 亚型分子生物学鉴定 1 例[J].临床输血与检验，2016，18(4)：338-340.

[11] 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.

（**收稿日期**：2020-07-29）

（**本文编辑**：王海燕）