

• 临床检验研究论著 •

羊水细胞处理方法对 ABO 血型基因鉴定的影响*

陈江, 逯心敏, 胡伟, 郭渝

(四川宜宾市第二人民医院, 四川宜宾 644000)

摘要:目的 探讨不同羊水细胞处理方法对 ABO 血型基因鉴定的影响。方法 选取孕 16~25 周年龄 21~38 岁的孕妇 53 例, 每例采集羊水标本 2 份, 一份进行羊水细胞培养 2~5 d, 收集培养的羊水细胞; 另一份直接离心分离羊水细胞, 然后提取羊水细胞 DNA, 采用序列特异引物引导的 PCR 反应(PCR-SSP)基因检测技术鉴定羊水细胞的 ABO 基因型, 待婴儿出生后, 抽取其外周血或脐带血进行微柱凝胶 ABO 血型检测。结果 羊水细胞培养法有 5 例未检出, 检出率为 90.5%(48/53); 直接法中有 9 例未检出, 其中有 3 例结果无法识别, 结果检出率为 83.0%(44/53); 24 例新生儿的外周血或脐带血的微柱凝胶 ABO 血型检测结果显有 1 例无结果, 与基因型的结果比对完全一致。结论 羊水细胞可直接进行 PCR-SSP 检测 ABO 血型, 细胞培养法优于直接分析法。

关键词: 羊水; ABO 血型系统; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.008

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)02-0146-03

Effect of different treatment methods for amniotic fluid cells on ABO gene identification*

Chen Jiang, Lu Xinmin, Hu Wei, Guo Yu

(The No. 2 People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of different treatment methods for amniotic fluid cells on ABO gene identification by polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP). **Methods** Fifty three pregnant women with gestational age from 16 to 25 weeks were selected. To extract double amniotic fluid specimens, one was for in vitro cell culture and the other was for separating amniotic cell using centrifuge. ABO genotypes were detected by PCR-SSP after DNA was extracted from the amniotic cells. After fetus gave birth, peripheral blood was collected from these newborns and was analyzed by microcolumn gel agglutination assay. **Results** Among the 53 specimens from cell culture method, ABO genotype of 5 cases were not detected. The detection rate was 90.5%(48/53). There were nine cases that were not detected in direct centrifuge method group and the detection rate was 83.0%(44/53). Among them, results of 3 cases could not identify. Among the twenty-four neonatal peripheral blood or cord blood cases detected by microcolumn gel agglutination assay, there was one case that not detected. The results were same with that of PCR-SSP. **Conclusion** ABO genotype can be analyzed in amniotic fluid cells by PCR-SSP, and the cell culture method is advanced than direct centrifuge method.

Key words: amniotic fluid; ABO blood group system; polymerase chain reaction

母婴血型不合以 ABO 型较多见, 是我国新生儿溶血病的主要致病原因。有资料报道, 由该病所致的死胎占 0.3%, 新生儿期死亡率占 1.4%^[1]。为了有效预防新生儿溶血病的发生, 产前确定胎儿血型十分必要, 为此笔者随即抽取了 53 例孕妇羊水, 通过序列特异引物引导的 PCR 反应(PCR-SSP)基因检测技术检测胎儿羊水细胞 ABO 血型基因型, 来判断胎儿血型。本文通过对羊水细胞进行不同的处理探讨了 PCR-SSP 基因技术^[2]在羊水细胞 ABO 血型基因鉴定中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取孕 16~25 周, 年龄 21~38 岁的孕妇 53 例, 采集羊水样本每人 2 份, 取样注意避免母血污染, 收集新生儿脐血 3 mL 或者静脉血 2 mL, 抽取父母静脉血各 2 mL。

1.2 细胞培养 取羊水专用培养基, 加入新鲜小牛血清(56℃, 30 min 灭活补体), 使终浓度达到 10%。将羊水 5~10 mL 接种于上述培养基中, 置 5% CO₂ 孵箱中, 饱和湿度及 37℃ 培养, 每隔 48 h 换培养基。培养 3~5 d 后, 在倒置显微镜下观察, 如细胞大部分或全部贴壁生长良好后, 即可进行传代生长。

1.3 引物设计 参照天津秀鹏 PCR-SSP 试剂, 见表 1。

1.4 羊水细胞的收集 羊水细胞的收集采用两种方法, 直接法为直接将选取羊水 5~10 mL 经过离心、沉淀, 收集羊水细胞; 细胞培养法为将经过细胞培养后的羊水细胞收集离心后获取, 2 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 再加入生理盐水 5~10 mL, 2 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液。采用博日 DNA 提取试剂盒快速提取羊水细胞 DNA, 通过 2% 琼脂电泳鉴定提取的质量。

1.5 PCR 扩增 PCR 反应体系为 20 μL, 含模板 2 μL(约 50 ng), 引物各 1.5 μL, dNTP 1.6 μL(0.4 mmol/L), 10× Buffer 缓冲液 2 μL, Taq 酶 1.0 U, 加双蒸水至 20.0 μL; PCR 反应条件为 94℃ 变性 4 min, 94℃ 1.5 min, 52℃ 2.0 min, 72℃ 2.0 min 30 个循环。

1.6 PCR 扩增产物的检测 取 PCR 扩增产物 2 μL, 2.5% 琼脂糖凝胶电泳(T=6%, C=3.3%, 凝胶规格为 82 mm×64 mm×0.75 mm)。电极缓冲液为 1×TBE。将加有 1/5 体积上样缓冲液的酶切产物进行电泳, 220 V 电压, 电泳 20~30 min。紫外线下成像。

* 基金项目: 四川省卫生厅基金资助项目(20100583); 四川省宜宾市科技局基金资助项目(2010SF011)。 作者简介: 陈江, 男, 副主任检验技师, 主要从事分子诊断学研究。

1.7 外周血微柱凝胶 ABO 血型检测^[3] 采集新生儿的脐带血或静脉血标本,取 ABO/Rh 血型鉴定卡一个,在空白位置写上受试者姓名等,撕去卡上部的锡纸膜。在 A、B、D 孔分别加入已配制的 0.5%受试者红细胞悬液 50 μ L。在专用的孵育器中孵育 15 min,然后在专用离心机离心 10 min(1 024 r/min)。离心完成后取出卡片按说明书进行结果判读并拍照留存。

2 结 果

2.1 直接法和细胞培养法检测结果 53 例羊水细胞分别采用专用羊水培养基培养 72~96 h 和直接离心羊水后提取羊水细胞 DNA。然后,采用 PCR-SSP 基因技术检测胎儿羊水细胞 ABO 血型。细胞培养法除 5 例未能检测出结果外,其余 48 例均检测出了结果,结果清晰可靠。直接法有 9 例标本未能检测出结果,见表 2。

表 1 ABO 基因 PCR-SSP 引物

引物名	PCR-SSP 引物序列
01	5'-TTA AGG GGA AGG ATG TCC TCG TCG TA-3'
Non 01	5'-TAA GTG GAG GAG TGA GTT GTG-3'
共同引物	5'-ATA TAT ATG GCA AAC ACA GIA ACC AAT G-3'
02	5'-GAC CCC CGG AAG AAG CTA TTG GA -3'
Non-02	5'-CGA CCC CCG CAA GAA GGC C-3'
共同引物	5'-AGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC-3'
B	5-ATC GAC CCC AGG GGA AGA CAG G-3'
Non-B	5'-CC GAC CCC CCG AAG AGC C-3'
A2	5'-GAG GCG GTC CGG AAG CG-3'
Non-A2	5'-GAG GCG GTC CGG AAC ACG-3'
共同引物	5'-GGG TGT GAT TTG AGG TGG GGA C-3'

表 2 胎儿羊水细胞直接法与细胞培养法 ABO 血型检出率

方法	<i>n</i>	检出(<i>n</i>)	未检出(<i>n</i>)	检出率(%)
直接法	53	44	9	83.0
细胞培养法	53	48	5	90.5

2.2 结果比对 53 例羊水标本中,有 3 例标本细胞培养法和直接法均无检测结果,直接法有 3 例结果无法有效判断,2 例标本直接法有结果而细胞培养法无结果。检测结果见表 3。

表 3 胎儿羊水细胞直接法与细胞培养法 ABO 血型基因型结果比对

表型	基因型	直接法(<i>n</i>)	细胞培养法(<i>n</i>)
A	O1A1	5	7
	A1A1	2	2
	A1O2	8	9
B	O1B	2	4
	O2B	4	4
O	O1O1	3	3
	O1O2	11	11
	O2O2	7	5
AB	A1B	2	3
合计	—	44	48

—:无数据。

2.3 血清学检测结果 本次实验研究共收集到 24 例新生儿的脐带血或静脉血,其中脐带血 6 例,静脉血 18 例。24 例新

生儿的脐带血或外周血通过微柱凝胶 ABO 血型检测技术和玻片法血型检测技术检测鉴定。通过结果比对,其中直接法有 3 例标本无正确检测结果,细胞培养法的 24 例标本结果均正确。见表 4。

表 4 胎儿羊水细胞与外周血 ABO 血型比对

方法	不正确	正确	正确率(%)
直接法	3	21	87.5
细胞培养法	0	24	100.0

3 讨 论

血型是以血液抗原形式表现出来的一种遗传性状,已经发现并为国际输血协会承认的血型系统有 30 多种^[4]。ABO 血型是最早发现的一个血型系统,也是应用最广,与临床输血最密切、最重要且研究和认识较深入的一个血型系统^[5]。ABO 血型抗原在 5~6 周胎儿 RBC 中已可测出,出生时抗原性已达到成人的 25%~50%,在生后 18 个月时才能充分表现出抗原性^[3]。在本实验中笔者共检测了 24 例新生儿的 ABO 血型,其中 3 例未能正确检出,原因可能为新生儿免疫系统不完善,还未产生相应的血型抗体或者血型抗体的效价较低,达不到试剂的检测灵敏度。因此,为了准确鉴定新生儿血型建议进行采用基因血型鉴定。

母婴 ABO 血型不相容是临床新生儿溶血症的常见原因,新生儿溶血病起源于胎儿从父亲方面继承了一些母亲没有的红细胞抗原,使得母婴血型不合。母体存在与胎儿 RBC 血型抗原相应的免疫性抗体,此免疫性抗体可以通过胎盘进入胎儿体内,并包被在胎儿 RBC 上,在分娩前后加速胎儿 RBC 破坏发生溶血,造成胎儿发生以溶血为主要损害的一种被动免疫性疾病^[6-7],常常导致胎儿宫内感染,早产、胎儿智力低下,严重的造成胎儿死亡。国内常见的血型不合引起的新生儿溶血为 ABO 及 Rh 血型不合,其中以 ABO 不合者居多,Rh 不合者次之^[8]。因此及早分析胎儿的血型,对于预防和治疗具有重要的临床意义。

胎儿的血型鉴定以前主要是通过胎儿父母的血型,按照孟德尔遗传规律推算出的子代血型,具有一定的盲目性和主观性。通过宫内穿刺采集胎儿血液进行胎儿血清学的 ABO 鉴定,有较大的风险性,容易造成胎儿损伤,甚至导致胎儿死亡^[9],且胎儿 ABO 血型抗原发育不成熟,红细胞的凝聚力只有成人的 20%^[10],常常导致血型鉴定困难容易造成错判或误判。

随着分子生物学技术的发展,通过基因技术检测胎儿羊水细胞的 ABO 血型技术已成为可能,胎儿的血型表型来自于父母的基因遗传,人类 ABO 基因定位于第九对染色体长臂末端,ABO 血型系统的 3 个基因,由 7 个外显子组成^[11]。ABO 血型系统不同的表型是由其基因水平上的几个核苷酸的不同所决定^[12]。PCR-SSP 技术检测 ABO 血型基因型是利用 ABO 基因发生突变位点的不同核苷酸,分别设计一系列序列特异性引物,直接扩增 ABO 血型基因型物质片段从而测得 ABO 血型及其亚型。

为了探讨不同方法提取羊水细胞 DNA 对 PCR-SSP 基因检测结果的影响,笔者共收集到 53 例羊水标本,来自 16~25 孕周的健康孕妇,均分离了部分羊水进行了直接提取 DNA,另外一部分进行了细胞培养,然后再提取羊水细胞 DNA。结果表明,直接法有 9 例标本未能检测出结果,细胞培养法有 5 例没能检测出结果。其中有 3 例标本两种方法均未能检测出结果,原因可能为细胞较少,提取的 DNA 量不(下转第 151 页)

文献报道一致。药物干预后血清 Cys C、PEDF、VEGF 水平明显下降,推测缬沙坦联合阿魏酸钠还可能通过抑制肾脏异常血管生成,改善血管通透性发挥肾脏保护作用,且这种保护作用与蛋白尿的降低有关,具体机制仍需进一步研究。

总之, DN 时,患者血清 Cys C、PEDF 和 VEGF 水平显著升高,血清 PEDF、VEDF 水平与 DN 相关指标(GHbA1c、葡萄糖、肌酐、尿素、Cys C)相关,且呈正相关。缬沙坦联合阿魏酸钠治疗可显著降低患者血清 Cys C、PEDF 及 VEGF 水平,提示缬沙坦联合阿魏酸钠还可能通过改善糖尿病肾脏异常血管新生发挥肾脏保护作用,且缬沙坦与阿魏酸钠联合用药效果优于缬沙坦单药。

参考文献

- [1] 俞雨生,季大玺.终末期糖尿病肾病与透析治疗[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2006,15(4):376-379.
- [2] Nowak JZ, Wiktorowska-Owczarek A. Neovascularization in ocular tissues; mechanisms and role of proangiogenic and antiangiogenic factors[J]. Klin Oczna, 2004, 106(1/2): 90-97.
- [3] 姚毅, 关明, 赵秀琴, 等. 缺氧和高浓度葡萄糖对体外培养人视网膜色素上皮衍生因子表达的影响[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(22): 1989-1992.
- [4] Wang JJ, Zhang SX, Lu K, et al. Decreased expression of pigment epithelium-derived factor is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2005, 54(1): 243-250.
- [5] 胡可斌, 刘志红. 血管内皮细胞生长因子与糖尿病微血管并发症[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2000, 9(3): 273-276.
- [6] 李春北, 张燕燕. 胱抑素 C 与超敏 C-反应蛋白对 2 型糖尿病早期肾损害的诊断意义[J]. 检验医学与临床, 2011, 32(4): 639-640.

(上接第 147 页)

够,影响了检测结果。可以看出细胞羊水细胞 PCR-SSP 基因检测 ABO 血型技术中,细胞培养法优于直接法。直接法基本能够满足实验的要求,可以直接应用于临床的检测,但标本需先进行显微镜观察羊水细胞数量,细胞数量较少的应需细胞培养后再进行 PCR-SSP ABO 血型基因检测,经过细胞培养后,羊水细胞增殖, DNA 提取量较多,因此笔者推荐羊水细胞培养后进行 PCR-SSP 检测 ABO 血型基因检测,有利于得到更为准确的结果。

参考文献

- [1] 邱洪涛, 岳亚飞. PCR-SSP 法检测羊水细胞 ABO 血型基因型[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12(1): 22-23.
- [2] Prager M. Molecular genetic blood group typing by the use of PCR-SSP technique[J]. Transfusion, 2007, 47(Suppl 1): S54-59.
- [3] Bugert P, McBride S, Smith G, et al. Microarray-based genotyping for blood groups: comparison of gene array and 5'-nuclease assay techniques with human platelet antigen as a model[J]. Transfusion, 2005, 45(5): 654-659.
- [4] Qureshi MA, Bhatti R. Frequency of ABO blood groups among the diabetes mellitus type 2 patients[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2003, 13(8): 453-455.
- [5] Matyskova M, Zavrelova J, Pejchalova A, et al. ABO/H blood groups and factor V Leiden[J]. Cas Lek Cesk, 2002, 141(5): 146-

- [7] 李瑞霞, 陆俊茜, 于浩泳, 等. 血清色素上皮源性因子与 2 型糖尿病胰岛素抵抗的关系[J]. 中国临床保健杂志, 2012, 15(2): 119-122.
- [8] 杨廷强. 糖尿病足患者血清色素上皮衍生因子水平的变化及意义[J]. 海南医学院学报, 2012, 18(11): 1568-1570, 1573.
- [9] 李艳, 李筱荣, 袁佳琴, 等. 糖尿病大鼠视网膜中 VEGF、PEDF 的表达与血-视网膜屏障损伤[J]. 眼科新进展, 2013, 33(1): 29-32.
- [10] Zhang SX, Wang JJ, Gao G, et al. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor(VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy[J]. J Mol Endocrinol, 2006, 37(1): 1-12.
- [11] Liu Y, Leo LF, McGregor C, et al. Pigment epithelium-derived factor(PEDF) peptide eye drops reduce inflammation, cell death and vascular leakage in diabetic retinopathy in Ins2(Akita) mice[J]. Mol Med, 2012, 18(18): 1387-1401.
- [12] Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, et al. Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor[J]. J Biol Chem, 2006, 281(49): 38022-38037.
- [13] ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling[J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29(5): 265-273.
- [14] Ye X, Xu G, Chang Q, et al. ERK1/2 signaling pathways involved in VEGF release in diabetic rat retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(10): 5226-5233.
- [15] 李竞, 李珍瑾, 崔静, 等. VEGF 和色素上皮衍生因子的表达失衡对糖尿病肾病的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2009, 25(2): 203-205.

(收稿日期: 2013-11-04)

151.

- [6] Stasi R. Rozrolimupab, symphobodies against rhesus D, for the potential prevention of hemolytic disease of the newborn and the treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Curr Opin Mol Ther, 2010, 12(6): 734-740.
- [7] Berberovic L, Redzic A, Bojan S. ABO blood groups and haemolytic disease of newborns-population-genetic analysis[J]. Med Arh, 2004, 58(3): 141-142.
- [8] Urbaniak SJ. Noninvasive approaches to the management of RhD hemolytic disease of the fetus and newborn[J]. Transfusion, 2008, 48(1): 2-5.
- [9] Banerjee S, Datta UK. A study of distribution of ABO and Rh(D) blood groups amongst Sikkimese[J]. J Indian Med Assoc, 2008, 106(8): 506-507, 515.
- [10] Denomme GA, Fernandes BJ. Fetal blood group genotyping[J]. Transfusion, 2007, 47(Suppl 1): S64-68.
- [11] Jeremiah ZA. Abnormal haemoglobin variants, ABO and Rh blood groups among student of African descent in Port Harcourt, Nigeria[J]. Afr Health Sci, 2006, 6(3): 177-181.
- [12] Jukic I, Bingulac-Popovic J, Dogic V, et al. Evaluation of ABO blood groups as a risk factor for myocardial infarction[J]. Blood Transfus, 2012, 20(1): 1-2.

(收稿日期: 2013-09-08)