

• 临床检验研究论著 •

徐州地区汉族 RhD 阴性人群 *RHD* 基因多态性研究*高 勇¹, 孟宪军², 胡金萍², 毕星秀², 张言超³, 许彭城³, 耿跃春¹, 吴中梅¹, 王书安¹

(1. 徐州市医学科学研究所, 江苏徐州 221006; 2. 徐州市红十字血液中心, 江苏徐州 221006;

3. 徐州医学院, 江苏徐州 221006)

摘要:目的 研究徐州地区汉族 RhD 阴性人群 *RHD* 基因多态性。方法 采用常规血清学技术检测 RhD 抗原表型, 采用抗球蛋白试验(IAT)确认结果。采用序列特异性引物-聚合酶链反应(SSP-PCR)方法检测 *RHD* 基因。结果 110 例 RhD 阴性个体中, SSP-PCR 检测 *RHD* 基因结果为 *RHD* 阳性基因携带者 5 例, *RHD* 阴性基因携带者 47 例, *RHD-CE(2-9)-D* 基因携带者 22 例, *DVI III* 型基因携带者 17 例, 弱 *D15* 基因携带者 2 例, *DEL-1227A* 基因携带者 17 例。结论 徐州地区汉族人群 RhD 阴性个体呈现 *RHD* 基因结构复杂的多态性, 以变异体等位基因 *RH-CE(2-9)-D* 基因、*DVI III* 型基因、*DEL-1227A* 基因为主。

关键词: *RHD* 基因; RhD 分型; 聚合酶链反应; 江苏

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.021

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)12-1571-02

Study of *RHD* genes polymorphism among RhD negative Han individuals in Xuzhou area*

Gao Yong¹, Meng Xianjun², Hu Jinping², Bi Xingxiu², Zhang Yanchao³,

Xu Pengcheng³, Geng Yuechun¹, Wu Zhongmei¹, Wang Shu'an¹

(1. Medical Science Research Institute of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu 221006, China; 2. Red Cross

Blood Center of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu 221006, China; 3. Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the *RHD* gene polymorphism among the RhD negative Han individuals in Xuzhou. **Methods** The RhD antigen phenotypes were detected by routine serological techniques, and were identified with indirect antiglobulin test (IAT). The genotypes of *RHD* were detected by using sequence specific primer polymerase chain reaction(SSP-PCR). **Results** Among 110 RhD negative individuals, there were 5 cases carrying *RHD* positive gene, 47 cases carrying *RHD* negative gene, 22 cases carrying *RHD-CE(2-9)-D* gene, 17 cases carrying *DVI III* gene, 2 cases carrying weak *D15* gene, and 17 carrying *DEL-1227A* gene, respectively. **Conclusion** The RhD negative Han individuals present complex *RHD* gene polymorphism in Xuzhou region, and variant alleles such as *RHD-CE(2-9)-D*, *DVI III*, *DEL-1227A* are given priority.

Key words: *RHD* genotyping; RhD serotyping; polymerase chain reaction; Jiangsu

Rh 血型系统抗原具有很强的免疫原性和复杂而丰富的遗传多态性, 在临床输血及免疫性溶血疾病等方面具有重大意义。近年有文献报道, 在不同种族的 RhD 阴性个体中都发现存在 *RHD* 基因^[1-4], 这提示 RhD 阴性个体也具有遗传多态性和种族、地区间差异。笔者对 110 例徐州地区汉族 RhD 阴性个体应用分子生物学序列特异性引物-聚合酶链反应(SSP-PCR)检测技术进行分析, 研究本地区 RhD 阴性个体 *RHD* 基因多态性的情况, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2012~2013 年徐州地区自愿无偿献血者常规进行 RhD 阴性筛选定型, 经盐水法初筛、抗球蛋白试验(IAT)确证为 RhD 阴性表现型的献血者 110 例(编号 9002113022968~9002113040459), 其中男性 52 例, 女性 58 例, 年龄 18~59 岁; 确认均为汉族人群; 职业为不同行业; 学历为小学至研究生。

1.2 仪器与试剂 美国 ABI 9700 型 PCR 扩增仪; Thermo 离心机; AlphaImager 凝胶成像系统; Tanon EPS3000 电泳仪; 天津秀鹏生物技术有限公司 *RHD* 基因检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 血清学试验 采用单克隆抗-D 混合试剂进行常规的盐水法初筛, 盐水介质反应阴性者再经 IAT 确证: 将血样混匀

后, 洗涤 3 次, 配成 5% 的红细胞悬液, 取 1 滴加入试管中, 然后向试管中加入 2 滴 IgG 抗 D 试剂, 37 °C 孵育 30 min, 用生理盐水反复离心洗涤 3 次, 弃去上清液, 加入广谱抗人球蛋白试剂 2 滴, 混匀, 1 000 r/min 离心 1 min, 观察结果, 无凝集者为 RhD 阴性。

1.3.2 *RHD* 基因检测 (1) DNA 提取应用 DNA 抽提试剂盒(天津秀鹏生物技术有限公司), 采用盐析法, 取 0.3 mL EDTA 抗凝外周血, 加入 1 mL 红细胞裂解液, 离心弃上清液, 加入 170 μL 核裂解液及 4 μL SDS, 剧烈震荡后, 再加入 72 μL NaCl 溶解液, 离心后取上清液, 加入 210 μL 异丙醇沉淀 DNA, 将 DNA 溶于 TE 溶液中, -20 °C 保存待用。(2) SSP-PCR 检测 *RHD* 基因, 采用天津秀鹏生物技术有限公司 *RHD* 基因检测试剂盒, 按照说明书严格操作。PCR 循环参数为: 96 °C 2 min, 1 个循环; 96 °C 20 s, 68 °C, 60 s, 5 个循环; 96 °C 20 s, 65 °C 50 s, 72 °C, 45 s, 10 个循环; 96 °C 20 s, 62 °C 50 s, 72 °C 25 s, 15 个循环; 72 °C 5 min, 1 个循环; 4 °C 保存。(3) 电泳结果及判读, 将扩增产物转移到琼脂糖凝胶孔中(上样量 2.5 μL), 140~150 V 电泳 15~20 min, 内参带和阳性带清晰分开即停止电泳。在凝胶成像系统下观察结果, 865 bp 为内参带, 另一条为特异性扩增带, 有特异性扩增带者为 *RHD* 基因阳性, 否则为 *RHD* 基因阴性。根据试剂盒说明书提供的分

* 基金项目: 徐州市 2012 年科技计划项目(XM12B063)。作者简介: 高勇, 男, 主任技师, 主要从事医学检验与输血医学研究,

型方案,进行判读分型。

2 结 果

2.1 110 例 RhD 阴性个体 SSP-PCR 基因分型结果为:RHD 阳性基因携带者 5 例(4.5%),RHD 阴性基因携带者 47 例(42.7%),RHD-CE(2-9)-D 基因携带者 22 例(20.0%),DVI Ⅲ型基因携带者 17 例(15.5%),弱 D15 基因携带者 2 例(1.8%),DEL-1227A 基因携带者 17 例(15.5%)。

2.2 RhD 阴性个体 SSP-PCR 基因分型各型电泳图结果,见图 1~6(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

RhD 抗原表型除了正常的阳性和阴性外,近年来研究发现还存在多种 RhD 变异体^[5-7],这种 RhD 变异体的形成,涉及复杂的分子生物学变化,其机制主要为 RHD 和 RHCE 等位基因融合、细胞外环错义突变、外显子缺失和等位基因被错换等^[8-10],RhD 变异体主要包括为弱 D 型、部分 D 型和 D 放散(DEL)型。

本研究发现,上述 3 种类型的变异体在徐州地区汉族 RhD 阴性个体中均有存在。弱 D15 型是外显子 6 发生 845G>A 突变,引起 RhD 蛋白第 9 个跨膜区域 G282D 的氨基酸改变。据报道,弱 D15 为中国人最常见的弱 D 型,占有弱 D 型的 56%~88%^[9]。本研究发现了 2 例弱 D15 型基因携带者。DVI 型是高加索人群中与临床关系最常见的一种部分 D 表型,它是 RHD 基因第 3~6 外显子被 RHCE 基因相应部分替换形成的杂交基因,很容易产生针对缺失的 D 抗原表位的抗体^[10]。据报道^[11],DVI 型占海南地区 RhD 阴性个体的 7.55%,与本地区 15.5%的比例有差异。本地区 RHD-CE(2-9)-D 型的比例为 20.0%,与文献^[12]报道的深圳地区的 10.5%有较大差异,与文献^[13]报道邯郸地区的 22.2%相近。DEL 型发现于 1984 年,是一种变异的极弱的 RhD 阳性血型^[14]。因其红细胞膜 D 抗原数非常少,常规 IAT 检测为阴性,只有通过敏感的吸收放散试验才能检测出而得名。近几年来,国内报道不同地区的汉族人群 DEL 型在 RHD 阴性基因型中的比例分别为:辽宁 20.5%^[15],湖北 22.7%^[16],海南 29.2%^[11],云南 20.7%^[17],上海 17.6%^[18]。本地区这一比例为 15.5%,低于上述文献报道的结果,而与临沂地区 15.7%的结果相近^[19],这可能是因为徐州与临沂毗邻,与其他地区距离较远而产生的地域差异。

血型作为人类遗传的一种标记,具有种族及地域差异,本文数据对研究中国人群的 RhD 弱表现型的遗传规律和分布频率具有一定价值。另外,RhD 弱表现型按常规检测方法很难被检测出来,常被鉴定为 RhD 阴性。若该血液输给 RhD 阴性的受血者,将会产生抗 D 抗体,导致输血反应。国外有文献报道,血型学误判弱 D 型供者为 RhD 阴性,将其血液输注给 RhD 阴性受血者,结果产生原发性抗 D 抗体^[20]。因此,应用 SSP-PCR 技术来确认 RhD 阴性表型、鉴定其变异体,建立一套适用于中国人的 RhD 弱表现型输血策略,是预防出现输血反应的较好的途径。

参 考 文 献

- [1] 苏宇清,吴国光,邵超鹏. 中国人 RhD 阴性个体中 D 基因多态性的研究[J]. 临床输血与检验,2003,5(2):91-94.
- [2] Guinchart E,Bricca P,Monnier S,et al. Non-invasive fetal RHD

genotyping: Validation of the method with 200 patients[J]. Transfus Clin Biol,2014,21(1):1-14.

- [3] Goossens D,da Silva N,Metral S,et al. Mice expressing RHAG and RHD human blood group genes[J]. PLoS One,2013,8(11):e80460.
- [4] Pham BN,Roussel M,Gien D,et al. Molecular analysis of patients with weak D and serologic analysis of those with anti-D (excluding type 1 and type 2)[J]. Immunohematology,2013,29(2):55-62.
- [5] Shao CP,Maas JH,Su YQ,et al. Molecular background of Rh D-positive,D-negative,Del and weak D phenotypes in Chinese[J]. Vox Sang,2002,83(2):156-161.
- [6] Jain A,Kumawat V,Patil SS,et al. Significance of serological monitoring in a Bombay Rh (D) negative phenotype pregnant woman: a case report[J]. Transfus Apher Sci,2012,47(3):251-252.
- [7] Osaro E,Charles AT. Rh isoimmunization in Sub-Saharan Africa indicates need for universal access to anti-RhD immunoglobulin and effective management of D-negative pregnancies[J]. Int J Womens Health,2010,2:429-437.
- [8] Lan J,Chen Q,Wu D,et al. Genetic polymorphism of RhD-negative associated haplotypes in the Chinese[J]. J Hum Gen,2000,45(4):224-227.
- [9] Gassner C,Meyer S,Frey BM,et al. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping—the alternative approach[J]. Transfus Med Rev,2013,27(1):2-9.
- [10] Reid ME,Halter Hipsky C,Hue-Roye K,et al. The low-prevalence Rh antigen STEM (RH49) is encoded by two different RHCE * ce818T alleles that are often in cis to RHD * DOL[J]. Transfusion,2013,53(3):539-544.
- [11] 叶健忠,杨向萍,蔡于旭,等. 海南汉族 RhD 阴性个体 RHD 基因研究[J]. 中国输血杂志,2005,18(2):97-100.
- [12] 熊文,邵超鹏,周一炎. 中国人特异性的 RHD 基因定型方法的建立[J]. 中国输血杂志,2005,18(1):4-7.
- [13] 孙国栋,尹志柱,张彦平,等. 118 例汉族人群 IAT 检测 RhD 阴性个体 RHD 基因多态性分析[J]. 中国输血杂志,2007,20(4):292-294.
- [14] Okubo Y,Yamaguchi H,Tomita T,et al. AD variant,Del? [J]. Transfusion,1984,24(6):542-542.
- [15] 章旭,林凤秋,李剑平,等. DEL 型个体抗体筛选的调查分析[J]. 中国输血杂志,2009(10):796-799.
- [16] 沈钢,章俊华,张浩,等. 湖北汉族 RhD 阴性个体 Rh 表型及 RHD 基因多态性研究[J]. 中国输血杂志,2007,20(4):304-306.
- [17] 蔡玲君,丁权,陈文仙,等. 云南地区 RhD 阴性个体 RHD 基因研究[J]. 中国输血杂志,2007,19(6):452-453.
- [18] Li Q,Hou L,Guo ZH,et al. Molecular basis of the RHD gene in blood donors with DEL phenotypes in Shanghai[J]. Vox Sang,2009,97(2):139-146.
- [19] 郭明,李宏,宋宁,等. 临沂地区 RhD 初筛阴性献血人群分子遗传背景研究[J]. 中国输血杂志,2012,25(3):224-227.
- [20] Mota M,Fonseca NL,Rodrigues A,et al. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density[J]. Vox Sang,2005,88(2):130-135.