

gy, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries[J]. JAMA, 2016, 315(8):788-800.

(收稿日期:2020-05-02 修回日期:2020-08-30)

• 个案分析 •

1 例 B(A)血型鉴定及家系分析

杨 倩, 戚 超, 徐 婷, 姚春艳
陆军军医大学第一附属医院输血科, 重庆 400038

关键词: B(A)血型; 血型血清学; 基因测序
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.02.031
文章编号: 1673-4130(2021)02-0254-03
中图法分类号: R457.1+1
文献标志码: C

ABO 血型系统是人类最重要的血型系统,除了 A 型、B 型、O 型、AB 型这 4 种常见血型外,还有一些罕见的抗原较弱的亚型,比如 B(A)血型^[1]。B(A)血型在人群中的出现频率约为 1/50 万,该人群血清中存在高度活性的 B 型糖基转移酶,同时也存在少量的 A 型糖基转移酶,因此,其红细胞上不仅存在 B 抗原,还存在很弱的 A 抗原^[2]。B(A)血型被认为是遗传学上的 B 型,血清学检测结果多表现为 AB 型,严重影响血型鉴定的准确性和输血安全^[3-4]。本文对 1 例 B(A)血型正反定型不符的患者进一步行血清学及分子生物学检测,同时对其进行了家系调查分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 先证者,秦某,31 岁,女,汉族,原发不孕,无输血史,术前血型检查中发现常规血清学鉴定正反定型不符。经患者及其父母同意后,笔者对该患者进行了分子生物学分析及家系调查。

1.2 仪器与试剂 主要仪器:LC-10C 血库配血专用离心机(安徽中科中佳),FQD-96A 荧光定量 PCR 检测系统(杭州博日科技),3130 基因测序仪(美国 ABI)。试剂:单克隆抗-A、抗-B 血型定型试剂(上海血液生物 20171023),单克隆抗-H、抗-A1 定型试剂(江苏力博 20180918),人 ABO 血型反定型用红细胞试剂(江苏力博 201807006),抗体筛查细胞 I、II、III 号(江苏力博 201808009),DNA 提取试剂盒(江苏中济万泰生物),人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒(江苏中济万泰生物),ABO1-7 外显子测序试剂盒(江苏中济万泰生物)。

1.3 方法

1.3.1 血型鉴定 采用试管法进行 ABO 血型血清学鉴定,采用抗人球蛋白法进行先证者血清的抗体筛查试验和抗人球蛋白试验。以上操作参照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)^[5]进行操作。

1.3.2 DNA 提取 使用 DNA 提取试剂盒(江苏中

济万泰生物)快速抽提乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血中的基因组 DNA,DNA 标本水平为 60 ng/mL,纯度为 1.6~2.0(A₂₆₀/A₂₈₀)。

1.3.3 ABO 基因分型 采用荧光定量 PCR 法进行 ABO 基因分型(采用人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒),按照试剂盒说明书进行检测。

1.3.4 ABO 基因第 6、7 外显子直接测序 采用 ABO1-7 外显子测序试剂盒,严格按照试剂盒说明书进行操作。

2 结果

2.1 血清学鉴定结果分析 先证者及其父母的血型血清学鉴定结果见表 1。通过血清学鉴定试验发现,先证者父亲为 A 型,母亲为 B 型,先证者为可疑 B(A)型。先证者的血清学检测结果不符合遗传定律,因此需要进一步对该家系进行分子生物学检测。

2.2 抗体筛查及抗人球蛋白试验结果分析 先证者及其父母的抗体筛查试验结果均为阴性,排除存在 ABO 血型系统以外不规则抗体的可能性;直接抗人球蛋白试验结果均为阴性,表明不存在红细胞上黏附的自身抗体对血型正定型造成干扰的现象;间接抗人球蛋白试验结果均为阴性,可排除血清中存在干扰反定型检测的不利因素。

2.3 ABO 基因分型结果分析 通过荧光定量 PCR 法进行 ABO 基因分型检测,A、A205、B、O(261G 缺失)、O1、O2 特异性引物只扩增引物 3'末端的第 1 个碱基互补的等位基因,而不扩增不互补的等位基因,1 次扩增就可以区分 ABO 的等位基因。PCR 掺入染料法将荧光染料通过掺入 DNA 的扩增产物来表示 DNA 的扩增效果。在扩增后进行熔解曲线分析,通过熔解曲线分析能确认目的产物是否被特异性扩增,以此判断 ABO 的等位基因。从熔解曲线来看,先证者 B 基因和 O02 基因被特异性扩增,先证者父亲 A 基因和 O02 基因被特异性扩增,先证者母亲只有 B 基因被特异性扩增,故先证者的基因分型结果为 BO02,

其父亲的基因型结果为 AO02,其母亲的基因型结果为 B/B。

表 1 先证者及其父母 ABO 血型血清学检测结果

项目	正定型		抗 A1	抗-H	反定型			血型 结果
	抗-A	抗-B			A1c	Bc	Oc	
先证者	+	++++	0	++++	++++	0	0	B(A)型?
父亲	++++	0	++++	1+w	0	++++	0	A 型
母亲	0	++++	0	1+w	++++	0	0	B 型

注: ? 为疑似; 0 为阴性; 1+w 为强度为 1 个“+”的弱凝集。

2.4 ABO 基因第 6、7 外显子直接测序结果分析
对 ABO 基因的第 6 和第 7 外显子直接测序,发现先证者及其母亲存在 261G/delG、297A/G、526G/C、640A/G、646T/A、657C/T、681G/A、703G/A、771C/T、796C/A、803G/C、829G/A 和 930G/A 杂合。与标准序

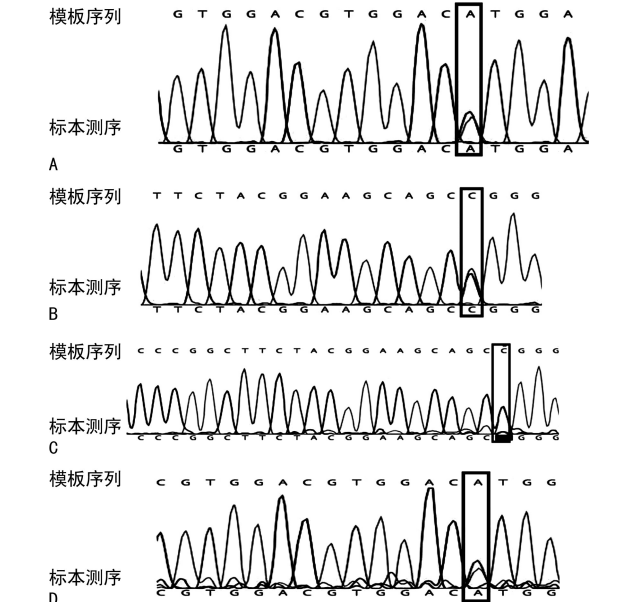
列比对,发现先证者存在 B(A)04 等位基因 640A>G 突变。先证者及其父亲存在特征性 721C>T 杂合,经与血型抗原基因突变数据库比对,未发现相同突变位点的 O 型等位基因,表明先证者及其父亲均含有 1 条新的 O 型等位基因。见表 2。

表 2 先证者及其父母 ABO 基因第 6、7 外显子直接测序结果

项目	第 6 外显子		第 7 外显子														
	261	297	467	526	640	646	657	681	700	703	721	771	796	803	829	930	
先证者	AG	GG	CC	CG	AG	AT	CT	AG	CC	AG	CT	CT	AC	CG	AG	AG	
先证者-B(A)04	G	G	C	G	G	T	T	G	C	A	C	C	A	C	G	A	
先证者-O02 新	del	G	C	C	A	A	C	A	C	G	T	T	C	G	A	G	
父亲	delG	AG	CT	CC	AA	AT	CC	AG	CC	GG	CT	CT	CC	GG	AG	GG	
父亲-A102	G	A	T	C	A	T	C	G	C	G	C	C	C	G	G	G	
父亲-O02 新	del	G	C	C	A	A	C	A	C	G	T	T	C	G	A	G	
母亲	GG	GG	CC	GG	AG	TT	TT	GG	CC	AA	CC	CC	AA	CC	GG	AA	
母亲-B(A)04	G	G	C	G	G	T	T	G	C	A	C	C	A	C	G	A	
母亲-B101	G	G	C	G	A	T	T	G	C	A	C	C	A	C	G	A	

注: O02 新代表 O02 新的基因型(721C>T)。

2.5 ABO 基因突变位点截图 见图 1。



注: A、B 为先证者特异性突变位点; C 为先证者父亲特异性突变位点; D 为先证者母亲特异性突变位点。

图 1 先证者及其父母 ABO 基因突变位点截图

2.6 家系调查 先证者家系的血型基因分型结果见

图 2。

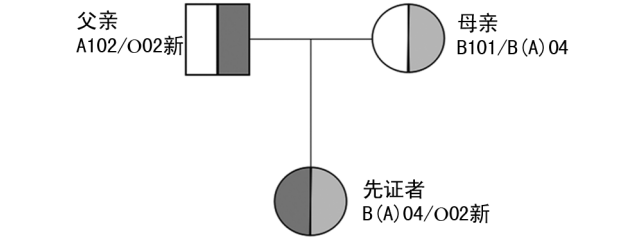


图 2 先证者家系的血型基因分析

3 讨论

ABO 血型基因共有 7 个外显子和 6 个内含子,位于第 9 号染色体长臂 3 区 4 带 1、2 亚带(9q34.1~9q34.2)^[6-7],核苷酸序列高度保守,等位基因之间只有几个核苷酸的差异,具有高度同源性。其中第 6、7 外显子约占编码区长度的 77%,编码 91%的糖基转移酶活性区域^[8],决定着 ABO 基因一级产物糖基转移酶的催化活性与性质。糖基转移酶活性的减弱或特异性改变将最终导致 A 或 B 抗原的减弱或转变,从而产生 ABO 亚型^[9-10]。

ABO 血型正定型的凝集强度通常应为 3~4 个

“+”，反定型则应该至少超过 2 个“+”，若结果异常，则判定为正反定型不符，应该从标本及试剂质量、红细胞亚型、疾病(导致抗原或抗体减弱)等因素进行全面分析^[11]。在本研究中，先证者的标本经过 2 次采集，病史回顾无特殊。正定型试验中，红细胞表面的 A 抗原较弱，B 抗原正常，H 抗原增强；反定型试验中，血清与 A1 细胞凝集，为 4 个“+”，与 B 细胞不凝集，结果判定为正反定型不符。为明确其血型，进一步对先证者进行了家系调查。

先证者父亲的基因分型结果为 AO02，测序结果有突变位点 721C>T 杂合，结合血清学结果抗-A 4 个“+”，推断其一条等位基因为 A102，另一条等位基因为 O02 的新基因型(721C>T)。先证者母亲的基因分型结果为 B/B，测序结果有突变位点 640A>G 杂合，其一条等位基因为 B(A)04(640A>G)，另一条等位基因为 B101。先证者的基因分型结果为 BO02，测序结果有突变位点 640A>G 杂合，721C>T 杂合。从家系分析推断：先证者一条等位基因为 B(A)04(640A>G)，另一条等位基因为 O02 的新基因型(721C>T)。先证者存在的 nt640 A>G 错义突变使 214 位甲硫氨酸被缬氨酸置换，从而导致了 B 等位基因具有编码 A 抗原和 B 抗原双功能活性酶的能力^[11]。对于另一条 O02 的新基因型(721C>T)等位基因，从先证者及其父亲的血清学检测结果来看，此突变可能为同义突变，不具有生物学意义。由此判断先证者血清学正反定型不符是由 640A>G 突变引起的。对于先证者母亲，测序基因型为 B(A)04/B，但其血型血清学结果显示正反定型相符，并没有表现出较弱的 A 抗原。可能的原因有两个：(1)此基因型表现为大量的 B 抗原和极少量的 A 抗原，在血清学试验中极少量的 A 抗原被大量的 B 抗原掩盖，故正定型为 B 型。(2)国产的单克隆抗体试剂存在对 B(A)血型的漏检现象。存在这种现象的原因是单克隆 ABO 血型定型试剂采用杂交瘤技术生产，针对的是 1 种血型抗原的单个抗原决定簇，无法识别所有的 ABO 血型抗原，尤其是 ABO 血型系统的弱 A、弱 B 抗原。B(A)亚型抗原表位上功能基因的不同、位置的差异，甚至

立体构象的变化等，都无法被单克隆抗体识别，从而出现漏检的情况^[1]。

在日常实验室工作中，若遇到血清学方法无法确定的疑难血型标本，应采用基因分型技术进一步鉴定，必要时需进行家系调查，以确保结果的准确性，保障临床输血安全。

参考文献

- [1] 张春燕,颜廷宇,赵素珍,等. B(A)血型研究进展[J]. 临床输血与检验,2017,19(1):95-99.
- [2] 胡丽华. 临床输血检验[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004:63-64.
- [3] HULT A K,YAZER M H,JORGENSEN 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.
- [4] YAZER M H,TRIULZI D J. Immune hemolysis following ABO-mismatched stem cell or solid organ transplantation[J]. Curr Opin Hematol,2007,14(6):664-670.
- [5] 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,2015:118-124.
- [6] 张印则,徐华,周华友. 红细胞血型原理与检测策略[M]. 北京:人民卫生出版社,2014:84.
- [7] CHEN Q,LI J,XIAO J,et al. Molecular genetic analysis and structure model of a rare B(A)02 subgroup of the ABO blood group system[J]. Transfus Apher Sci,2014,51(2):203-208.
- [8] 金沙,蔡晓红,刘曦,等. 上海地区献血人群 cisAB 和 B(A)血型的研究[J]. 中国输血杂志,2013,26(12):1198-1201.
- [9] 胡文健,傅广成,许先国,等. 一种 ABx 变异型相关的 B 糖基转移酶基因新突变研究[J]. 中华医学遗传学杂志,2012,29(5):566-569.
- [10] 丹尼尔,朱自严. 人类血型[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2007:42-45.
- [11] 何安华,潘健,田力. B(A)血型的血清学特点及基因分析:附 1 例报告[J]. 临床输血与检验,2018,20(3):252-255.

(收稿日期:2020-08-06 修回日期:2020-10-30)