

聚合酶链式反应-特异性序列引物基因定型在新生儿溶血病 ABO 血型定型中的应用

廖扬勋¹, 王洋洋², 陈立强², 梁结玲² (1. 广东省肇庆市中心血站 506020; 2. 广东省肇庆市第一人民医院检验科 520621)

【摘要】 目的 研究聚合酶链式反应-特异性序列引物(PCR-SSP)基因定型在新生儿溶血病(CHDN)ABO 血型定型中的应用。**方法** 收集 20 例来自广东省肇庆市第一人民医院新生儿溶血病(HDN)的样本,对这些样本进行 ABO 血型鉴定等一系列血型血清学方法进行检测,然后用 PCR-SSP 基因定型技术进行样本的基因分型。**结果** 与其血型的血清学分型结果进行比较,新生儿溶血病 ABO 血型的定型是新生儿输血的必要保障,而 PCR-SSP 基因分型较血型血清学方法更快捷、准确。**结论** PCR-SSP 基因正型技术将不再局限于疑难血型的鉴定中,并会越来越多地应用于 HDN 的鉴定中。

【关键词】 聚合酶链式反应-特异性序列引物; 新生儿溶血病; ABO 血型

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.13.008 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)13-1552-02

The application of PCR-SSP genotyping on ABO blood group typing of the neonatal hemolysis disease LIAO Yang-xun¹, WANG Yang-yang², CHEN Li-qiang², LIANG Jie-ling² (1. Center Blood Station of Zhaoqing City, Guangdong 506020, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Zhaoqing City, Guangdong 526021, China)

【Abstract】 Objective To study the application of polymerase chain reaction-specific sequence primer (PCR-SSP) genotyping on ABO blood group typing of the neonatal hemolysis disease. **Methods** 20 patients with neonatal hemolysis disease from the First People's Hospital of Zhaoqing city were collected, and we applied micro-column gel method for the ABO blood group identification and a series of blood type serological methods for testing, then used PCR-SSP technology to do sample genotype. **Results** Compared with the results of serotype, genotyping on ABO blood group typing of the neonatal hemolysis disease was necessary in newborn infant transfusion. **Conclusion** The PCR-SSP genotyping will be widely used in blood type identification.

【Key words】 PCR-SSP; neonatal hemolysis disease; ABO blood group

新生儿溶血病(HDN)在临床上比较多见,是早期新生儿胆红素升高的常见原因。不少学者都研究了血型血清免疫性抗体与新生儿溶血病的关系^[1-3]。临床上对 HDN 常需进行输血治疗,一般 ABO 溶血病临床输血应用与婴儿同型或 O 型红细胞、AB 型血浆^[4](病程 2 周内宜输注 O 型洗涤红细胞;2 周后则可输同型洗涤红细胞);这时对 ABO 血型的快捷、准确定型显得尤其重要。常用的 ABO 血型血清学检测受影响因素较多,有其一定的局限性。应用目前血型基因检测的常用方法聚合酶链式反应-特异性序列引物(PCR-SSP)基因分型技术,它是根据血型基因序列不同的突变位点,使用序列特异性引物,直接扩增目的基因片断,使判型更准确^[5]。

1 材料和方法

1.1 样本来源 12 例来自广东省肇庆市第一人民医院临床确诊为 HDN 正反定型不相符样品,每份样本取乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血。

1.2 试剂与仪器 单克隆抗 A、抗 B 标准血清(上海血液生物医药有限责任公司产品)、ABO 反定型用红细胞(上海血液生物医药有限责任公司产品)、基因组 DNA 提取试剂盒(大连宝生物公司产品)、TaqDNA 聚合酶(大连宝生物公司产品)、MaKrer(大连宝生物公司产品)、ABO 血型基因分型试剂盒(美国 G&T 公司产品)、MJ OPTICON II 扩增仪(美国 MJ 公

司产品)。

1.3 血型血清学试验 检测 12 份样品均出现正反定型不相符。

1.4 基因分型实验

1.4.1 按美国 G&T 公司试剂说明书进行提取样品基因组 DNA。

1.4.2 运用血型 PCR-SSP 方法,用反应混合液(Mix-A, Mix-A 201, Mix-O, Mix-B 基因,内对照物、dNTPs、PCR 缓冲液等)7 μ L;样本 DNA 提取液 1 μ L;0.5 U TaqDNA 聚合酶 1 μ L 混匀。在 PCR 扩增仪扩增,参数如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后 95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.4.3 PCR 扩增产物经 4% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,在凝胶成像系统下拍照记录结果。

2 结果

20 例血型样本的 PCR-SSP 基因分型结果见图 1。从图 1 可见凝胶电泳照片图中,内对照约 207 bp,阳性 A:75 bp;阳性 B:90 bp;阳性 O:127 bp。样本有 7 例的基因型为 A/O 型,4 例为 B/O 型和 1 例为 BB 型。基因分型结果与血型血清学血型实验结果见表 1。由表 1 可以看出,其中 17 例样品血清学血型与基因分型相符,1 例样品血清学血型与基因分型不

相符。

表 1 样品血清学正定型血型与基因分型基因型						
血清学血型	基因型	PCR-Mix 产物长度(bp)				内对照产物长度(bp)
		A(75)	A201(117)	B(90)	OC(127)	
1 A 型	A/O	+	—	—	+	207
2 A 型	A/O	+	—	—	+	207
3 A 型	A/O	+	—	—	+	207
4 A 型	A/O	+	—	—	+	207
5 A 型	A/O	+	—	—	+	207
6 A 型	A/O	+	—	—	+	207
7 O 型	A/O	+	—	—	+	207 ^a
8 B 型	B/O	—	—	+	+	207
9 B 型	B/O	—	—	+	+	207
10 B 型	B/B	—	—	+	—	207
11 B 型	B/O	—	—	+	+	207
12 B 型	B/O	—	—	+	+	207

注：^a 为 7 号样本；+表示阳性，—表示阴性。

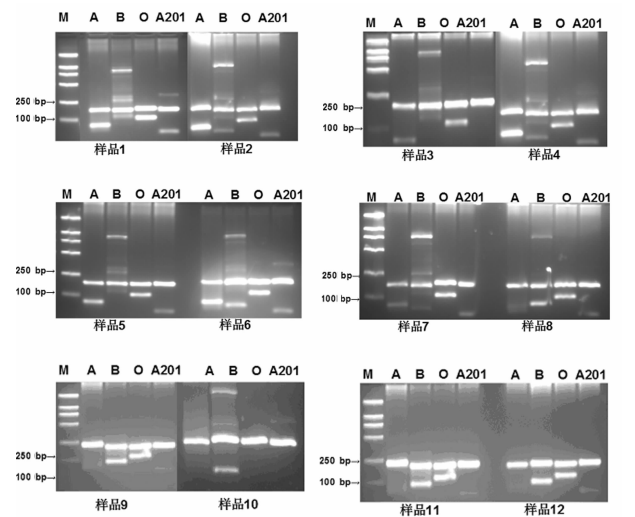


图 1 PCR-SSP 基因分型结果

3 讨 论

HDN 在临床上比较多见，亦较常对患儿进行输血治疗。HDN 以母婴 ABO 血型系统不合引起者较多见，Rh 及其他血型系统不合引起者较少，但溶血症状较 ABO 血型不合溶血病严重^[6]。HDN 的 ABO 血型鉴定在临床诊断及临床输血就显得尤其重要。但新生儿的 ABO 血型由于血清中的抗体一般要在出生后 4~6 月后才能产生自身抗体，而且患儿体内有母体产生的 IgG 血型免疫性抗体。这样对于血型血清学来讲就有其局限性了。临床上婴幼儿 ABO 血型正反定型不符比较

常见，多因抗体尚未产生或产生量太少，不足以引起肉眼可见的凝集反应所致^[7]。血型血清学检测只能通过正定型检测红细胞表面抗原来鉴定。单纯的血型血清学正定型会造成误判血型，如本实验中一例 A 亚型的如只用血型血清学正定型会误判为 O 型。临床上现多对 HDN 患儿输注 O 型洗涤红细胞、AB 型血浆，这样可以减少因血型误判而带来的输血反应性溶血。但输血的最佳选择仍然是同型输血，因此选择最佳又最快速最准确的血型鉴定方法仍然是最好的。新生儿换血量较大，常是患儿血量的 2 倍，同型输血保证了新生儿输血的安全性，减少输血反应。近年血型基因检测的常用 PCR-SSP 技术有其简便快捷，准确不受抗体影响等优点而越来越多地应用于血站和血库的疑难血型鉴定中。当今，经典免疫血液学和分子免疫血液学很自然地整合在一起，形成了“后基因组时代免疫血液学”。

在整合的前提下，血清学方法和基因分型方法取长补短，相互补充，不存在谁取代谁的问题。从提高输血安全性方面考虑，向临床提供基因分型的血液制品，从供受者表型匹配逐步升级到基因型匹配，是今后的发展方向。血清学技术相对比较普及，当前加强分子生物学教育显得刻不容缓^[8]。所以 PCR-SSP 基因定型技术将不再局限于疑难血型的鉴定中，而会越来越多地应用于 HDN 的鉴定中。

参考文献

[1] 张勇萍,杨世明,苏小花,等. 新生儿溶血病 ABO 血型免疫性抗体检测分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2010,26(11):1154-1155.

[2] 赵媛,李代红,刘伟. 出生 1 周内新生儿 ABO 血型 IgM 抗体分析[J]. 广东医学,2011,32(15):2012-2013.

[3] 冯丽. 新生儿血型抗体产生情况分析[J]. 检验医学与临床,2009,6(18):1557-1558.

[4] 李志强. 简明临床输血理论与实践[M]. 上海:上海世界图书出版公司,2010:73

[5] 喻琼. ABO 血型基因研究进展[J]. 中国输血杂志,2006,19(1):78-81.

[6] 张勇萍,苏小花,杨世明,等. 微柱凝胶法检测 Rh 血型免疫性抗体的分析[J]. 临床血液学杂志:输血与检验版,2010,23(8):449-453.

[7] 张印则,兰炯采,李伟,等. 婴儿 ABO 血型的鉴定及应用用于临床输血[J]. 中国实验血液学杂志,2003,11(3):301-304.

[8] 赵柯茂. 后基因组时代的免疫血液学[J]. 中国输血杂志,2010,23(10):848-849.

(收稿日期:2012-03-30)

(上接第 1511 页)

北京:化学工业出版社,2008:56-66.

[13] Petippo JM,McCarthy DB,Rinker CM,et al. Modulation of behavioral and neruochemica measures of forbrain dopamine function in mice by species specific interleukin-2 [J]. J N euroimmunol,1997,73(1-2):183-190.

[14] Cazzullo CL,Scarone S,Grassi B,et al. Cytokines production in chronic schizophrenia patients with or without paranoid behaviour [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,1998,22(6):947-957.

(收稿日期:2011-12-26)