

ABO 血型变异与 B 糖基转移酶关系研究

金 飞(贵阳护理职业学院,贵阳 550081)

【摘要】 目的 研究 ABO 血型 B 亚型系统 Bw 亚型与 B 糖基转移酶的关系。方法 运用血型血清学鉴定方法鉴定 1 个家庭 2 例 ABO 血型的 Bw 亚型,运用聚合酶链式反应的方法扩增糖基转移酶 1~7 号外显子,送到试剂公司测序。结果 直接测序发现 2 例 ABO 血型的 Bw 亚型,其中 B 糖基转移酶基因第 721 位 C>T 的转变,导致糖基转移酶多肽链 Arg241Trp 的转变。结论 糖基转移酶基因第 721 位的 C>T 的突变引起糖基转移酶活性的消失或者减弱,导致 Bw 亚型。

【关键词】 ABO 血型; Bw 亚型; 糖基转移酶 B; 基因突变

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.01.012 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)01-0028-02

Study of relationship between variation of ABO blood group and B glycosyltransferase JIN Fei (Guiyang Nursing Vocational College, Guiyang, Guizhou 550081, China)

【Abstract】 Objective To study the relationship between Bw phenotypes in the B subtype system of ABO blood group and B glycosyltransferase. **Methods** The Bw phenotypes in 2 cases of ABO blood group in 1 family were identified by the blood type serological identification technique. glycosyltransferases 1-7 exons of ABO gene were amplified and directly sequenced after PCR amplified fragments. **Results** The direct sequencing found that genotypes of 2 cases of ABO group were Bw/O, in which the C>T transform of B glycosyltransferase gene at position 721 caused the transform of glycosyltransferase polypeptide chain Arg241Trp. **Conclusion** The mutation of 721 C>T in the glycosyltransferase gene induces the disappearance or attenuation of glycosyltransferase activity and leads to Bw phenotype.

【Key words】 ABO blood group; Bw subtype; B glycosyltransferase; gene mutation

Rh 血型和 ABO 血型是人类最重要的血型,主要分布于人类红细胞表面,天然抗体为 IgM 类抗体,其中 ABO 血型关系到临床的输血安全、法医鉴定等方面,其抗原决定簇为糖蛋白。A 型个体主要基因为表达糖基转移酶 A,其主要功能是将 GalNAc 从 UDP-GalNAc 分子上转移到 H 前体糖蛋白上形成 A 抗原;B 型个体表达,将 Gal 基因从 UDP-Gal 分子催化转移到 H 前体糖蛋白上形成 B 抗原^[1]。ABO 基因的 2 个等位基因 A101 和 B101 编码糖基转移酶 A 和 B。而在编码区仅有 7 个核苷酸的差异,分别为 297、526、657、703、796、803、930 位,导致 4 个氨基酸残基的不同,即 176、235、266、268 位。在常见的 ABO 血型的表型之外,在不同种族和人群之中,发现了很多因糖基转移酶基因 A 和糖基转移酶基因 B 低表达所致的 ABO 变异型。其中 B 血型的变异型包括 5 种,分别是 B3、Bx、Bm、Bel 和 Bw。Bw 亚型为弱 B 亚型。关于糖基转移酶基因单核苷酸多态性(SNP)与血型变异的分子遗传机制,国内外也有报道^[2-5]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年在本院收集的一个汉族家系的 2 个姐妹,无近期输血史,ABO 血型鉴定时发现,正、反定型不符,随即进行基因诊断,并对先证者进行家系调查;另取 101 例医院体检健康者,常见的 ABO 表型进行 SNP 的筛查。

1.2 常规血型血清学鉴定 进行常规 ABO 血型的正、反定型鉴定,姐妹和母亲表现为单克隆抗-B 侧出现弱凝集,人源性抗-B 侧未出现凝集。姐妹血清中抗-B 未见,母亲血清中抗-B 出现弱凝集。

1.3 标本基因组 DNA 和总 RNA 提取 用蛋白酶 K 法提取家系中共 4 例的全血的基因组总 DNA 和用试剂盒法提取全

血总 RNA。

1.4 聚合酶链反应(PCR)扩增条件 扩增反应总体体系为 50 μ L,其中标本 DNA 3 μ L,正向引物 2 μ L,反向引物 2 μ L,超纯水 30 μ L, Taq 酶 2 μ L, dNTP 1 μ L, MgCl₂ 5 μ L, Taq 酶 Buffer 5 μ L。95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,62 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,28 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.5 ABO 基因扩增和 PCR 产物纯化 ABO 血型基因采用 PCR 技术进行扩增,采用 Primer 5.0 设计扩增引物^[6],扩增产物经试剂盒常规纯化,送试剂公司测序。与 B101 基因比对,确定突变位点为 B 糖基转移酶基因第 721 位 C>T 的转变,导致糖基转移酶多肽链 Arg241Trp 的转变。

1.6 ABO 基因第 721 位 C>T 变异频率调查 取 101 例随机无血缘关系标本,以单链构象多态性(SSCP)的方法对 ABO 基因第 6 和 7 外显子进行序列分析,对结果进行比对。

2 结 果

2.1 血清学检查结果 2 个先证者的父亲显示正常 ABO 血型血清学反应,鉴定为 B 型;而母亲和姐妹反应鉴定为 Bw 亚型。见表 1。

2.2 PCR 产物直接序列分析 2 个先证者及先证者父亲、母亲的基因组 DNA 经过 PCR 测序后发现,父亲的基因序列与 GenBank 数据库中的序列完全一致,未发现突变。但是 2 个先证者和母亲 B 糖基转移酶与 GenBank AC000397 正常序列经过比对发现第 721 位 C>T 的转变,导致糖基转移酶多肽链 Arg241Trp 的转变。

2.3 SNP 筛查 经过 101 例 SNP 筛查,未发现在此位点的突变,说明此位点不是 SNP 位点。第 7 外显子不存在第 721 位 C>T 的转变。经过 PCR-SSCP 检测,发现 2 个先证者和其父亲

均有特异性的条带,说明 721 位点基因突变,但是在其余 101 例体检标本和父亲的 PCR 产物中,未发现此特异性的条带,随机挑取 10 个标本送测序公司测序,发现结果一致,证实 SSCP

的可靠性。说明 721 位点的等位基因频率小于 1/101,经过检索基因突变数据库,发现此基因型为 Bw03 亚型。

表 1 家系成员正反定型鉴定

标本	正定型			反定型		
	抗-A	抗-B	抗-AB	A 标准红细胞	B 标准红细胞	O 标准红细胞
先证者 1	0	weak	weak	++++	0	0
先证者 2	0	weak	weak	++++	+	0
母亲	0	weak	weak	++++	+	0
父亲	0	++++	++++	++++	0	0
对照	0	++++	++++	++++	0	0

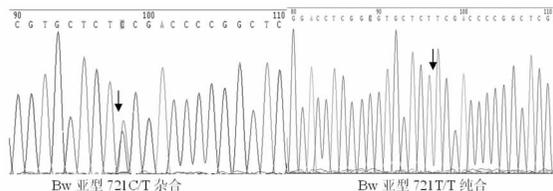


图 1

3 讨论

自从发现 ABO 血型之后,人类对血型的抗原认识飞速发展。ABO 血型存在 3 个等位基因,分别是 A、B 和 O 型。A 型由 A 糖基转移酶基因编码,B 型由 B 糖基转移酶基因编码。酶样蛋白质的长度为 354 个氨基酸。该蛋白质具有转移酶活性,能将相应的基因连接到前提物质 H 抗原之上,形成 A 和 B 抗原,进而形成 4 种血型。目前国际上,Olsson 等^[7]经过筛查发现几十例 Bw 亚型,其中大部分为 B 糖基转移酶的变异,大多数为错义突变导致的酶活性的降低和消失,其中十几例瑞典人为 721C>T 的突变;2005 年 Yazer 等^[8]进一步证实氨基酸变异(Met186val)能够导致的 Bw 变异型。而在国内,朱发明等^[6]发现 1 例 B 糖基转移酶基因第 721 位 C>T 的转变,导致 B 糖基转移酶活性结构域的改变^[9],进而导致其催化功能的减弱或者消失。本研究发现 2 例 Bw 亚型,且符合孟德尔遗传定律,是母传女的显性遗传形式。其中母亲为 C/T 杂合,而 2 个女儿均为 Bw/O 杂合。现已发现十几个与 Bw 亚型有关的 B 糖基转移酶基因的突变^[10-12],其中大多数位于第 7 外显子,包括 Bw01~Bw11,这些突变导致的氨基酸的变异,主要集中在一段区域之中,而本研究发现的第 721 位点的突变属于 Bw03 亚型,这说明 Bw03 亚型在中国人人群中分布较广,在临床输血时一定要注意此亚型,避免因为此亚型的存在,导致血型鉴定的错误,引起严重的输血反应。

值得注意的是,在作者大量收集 A 亚型或者 B 亚型的过程中,经过 PCR 扩增,发现外显子之间的内含子存在多处 SNP 位点,但内含子 SNP 位点是否会对糖基转移酶活性产生影响,这种影响是提高糖基转移酶活性,还是降低糖基转移酶活性均未见报道。作者认为,SNP 位点的大量存在一定会影响其酶活性,导致 A 亚型或者 B 亚型。另外,作者也发现 B 糖基转移酶的甲基化也很少有人报道,甲基化程度的改变也会影响转录的起始和酶的活性。作者认为,B 糖基转移酶的内含子 SNP 位点和甲基化程度将会是血型研究未来的方向,也将会成为各种亚型诊断的依据。

参考文献

[1] 许先国,洪小珍,刘瑛,等.一种新的 B3 变异型相关的 B

糖基转移酶基因 M142T 突变研究[J].中华医学遗传学杂志,2009,26(3):254-257.

[2] Yamamoto F,McNeil PD,Yamamoto M,et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system;1. Weak subgroup:A3 and B3 alleles[J]. Vox Sang,1993,64(2): 116-119.

[3] Ogasawara K,Yabe R,Uchikawa M,et al. Recombination and gene conversion-like events may contribute to ABO gene diversity causing various phenotypes[J]. Immunogenetics,2001,53(3):190-199.

[4] Yu LC,Twu YC,Chou ML,et al. Molecular genetic analysis for the B(3) allele[J]. Blood,2002,100(4): 1490-1492.

[5] Cho D,Kim SH,Ki CS,et al. A novel Bvar allele(547 G> A) demonstrates differential expression depending on the co-inherited ABO allele[J]. Vox Sang,2004,87(3): 187-189.

[6] 朱发明,许先国,洪小珍,等. α1,3 半乳糖基转移酶基因 721C>T 突变导致 Bw 亚型[J]. 中华医学遗传学杂志,2005,22(2):138-141.

[7] Olsson ML,Irshaid NM,Hosseini-Maaf B,et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies;identification of 15 novel A and B subgroup alleles[J]. Blood,2001,98(5):1585-1593.

[8] Yazer MH,Denomme GA,Rose NL,et al. Amino-acid substitution in the disordered loop of blood group B glycosyltransferase enzyme causes weak B phenotype[J]. Transfusion, 2005,45(7):1178-1182.

[9] 许先国,洪小珍,刘瑛,等. α1,3 半乳糖基转移酶基因新等位基因 278C>T 的鉴定[J]. 中华医学遗传学杂志,2006, 23(6):631-634.

[10] Seltsam A,Hallensleben M,Kollmann A,et al. The nature of diversity and diversification at the ABO locus[J]. Blood,2003,102(8):3035-3042.

[11] Estalote AC,Palatnik M,Chestery MA,et al. A novel blood group B subgroup;serological and genetic studies [J]. Transfusion Med,2004,14(2):173-180.

[12] 喻琼,吴国光,梁延连,等. 一个中国汉族 ABO 血型亚型家系中发现新的 B 等位基因[J]. 中华医学遗传学杂志, 2005,22(2):129-133.