

• 案例分析 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.22.038

儿童 B(A) 新亚型基因变异及家系分析*

任倩, 李春苗, 刘兴莉[△]

山东省济南市儿童医院输血科, 山东济南 250022

关键词: B(A) 亚型; 基因测序; 基因变异分析; 家系分析
 中图分类号: R826.2+6 文献标志码: C 文章编号: 1672-9455(2022)22-3167-02

ABO 血型系统是输血医学中最重要的血型系统, 输注 ABO 血型不相合的血液会引起急性溶血性输血反应、肾衰竭甚至死亡。因此, ABO 血型的准确鉴定在临床输血、器官移植等方面起着重要作用。在婴幼儿血型鉴定过程中, 由于其抗原、抗体的形成特点, 给血型定型带来困难, 此时常规血清学方法可能无法准确鉴定, 需要应用基因测序的方法来确认。笔者对 1 例 ABO 血型定型困难的 10 个月婴儿进行了基因分型、家系及输血策略分析, 意在加强输血科工作人员对婴幼儿 ABO 血型正确定型的重视。

1 资料与方法

1.1 一般资料 先证者, 女, 10 个月 23 d, 因先天性室间隔缺损入院, 输血前检查发现 ABO 血型正反定型不符且正定型 A 抗原反应弱, 术前无输血史, 同时采集其父母血液标本进行血型分析, 家系成员均签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清学分型 抽取先证者及家长 2~3 mL 静脉血, EDTA 抗凝, 采用经典试管法进行 ABO 血型正反定型。所用试剂主要包括单克隆抗 A、抗 B (长春博迅生物技术有限责任公司), 抗 A₁、抗 AB、抗 H (瑞士 Sanquin 公司), 抗 D IgM (上海血液生物医药有限责任公司); 反定型 A₁ 型、B 型、O 型红细胞 (上海血液生物医药有限责任公司)。血型血清学分型方法和操作步骤参照《全国临床检验操作规程》。

1.2.2 荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 法基因分型 用人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒 (荧光定量 PCR 法) (江苏中济万泰生物医药有限公司) 进行基因分型。

1.2.3 全血基因组提取及扩增 用全血 DNA 提取试剂盒 (江苏中济万泰生物医药有限公司) 提取基因组 DNA。PCR 扩增目的基因, 产物经回收纯化用于序列测定, 用江苏中济万泰生物医药有限公司测序试剂盒对 ABO 基因第 1~5 外显子和第 6、7 外显子进行序列测定。ABO 基因参考序列为 ABO * A1.01.1 等位基因序列 (GenBank: AJ536122)。

2 结果

2.1 血清学定型结果 血型血清学结果见表 1。正定型, 先证者与其母亲红细胞与抗 A 发生弱凝集 (2+), 与抗 B 发生强凝集 (4+), 与抗 A、B 发生强凝集 (4+), 与抗 H 发生强凝集 (3+); 反定型, 先证者血清不与 A₁ 细胞凝集, 其母亲血清与 A₁ 细胞发生弱凝集 (±); 血清中无不规则抗体的存在。先证者父亲为正常的 B 型血反应格局。

表 1 先证者及其家族成员的血清学结果

项目	正定型					反定型			
	抗 A	抗 A ₁	抗 B	抗 AB	抗 H	A ₁ c	Bc	Oc	自身对照
先证者	2+	0	4+	4+	3+	0	0	0	0
母亲	2+	0	4+	4+	3+	±	0	0	0
父亲	0	0	4+	4+	0	4+	0	0	0

注: + 表示凝集强度; ± 表示弱凝集; 0 表示无凝集。

2.2 血型基因分型 荧光定量 PCR 法检测结果显示, 先证者及其母亲基因型为 B/B, 其父亲基因型为 B/O02。

2.3 基因测序结果及变异分析 先证者及其母亲基因型为 B/B, 测序结果显示其碱基序列同时存在 ABO * B101 和 ABO * B(A) 新的碱基特征。根据 NCBI 网站血型抗原基因突变数据库 (以 ABO * A1.01.1 为参考序列), 发现其 B(A) 序列中, 第 6 外显子 c. 297A>G 突变, 第 7 外显子的突变有 c. 526C>G、c. 657C>T、c. 803G>C、c. 930G>A。ABO * B(A) 新之所以为“新”, 是其序列结果与已知的 7 种 B(A) 亚型序列相比, 其 c. 796 并未出现 C>A 变异; 先证者的父亲基因分型为 B/O02, 测序结果显示其具有 ABO * B101 和 ABO * O02 的碱基特征。

2.4 家系分析 根据 ABO 血型基因第 1~7 外显子测序结果显示, 先证者与其母亲为 B101/B(A) 新, 先证者父亲为 B101/O02, 未采集到先证者姐姐的血样。见图 1。

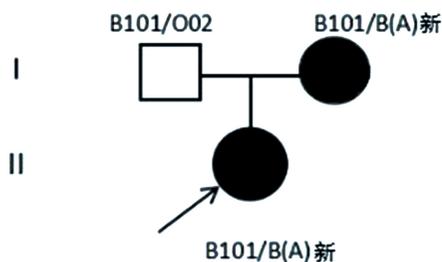
2.5 后续治疗 从输血的安全角度, 给先证者选用了 O 型洗涤红细胞和 AB 型血浆用于临床手术及后

* 基金项目: 山东省济南市临床医学科技创新计划 (202019062)。

△ 通信作者, E-mail: liuxingli100@126.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20221102.1501.002.html\(2022-11-03\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20221102.1501.002.html(2022-11-03))

期治疗,先证者痊愈出院。



注:罗马数字为世代顺序,箭头所指为先证者;“□”代表正常男性,“●”代表 B101/B(A)新基因携带的女性。

图 1 先证者家系分析图

3 讨 论

本研究中先证者为患有先天性室间隔缺损的新生儿,ABO 血型正定型,A 抗原 2+,B 抗原 4+;反定型,血清与 A₁ 细胞、B 细胞均不凝集,结果判定为正反定型不符。由于抗原、抗体生成的特点,在婴幼儿血型鉴定过程中,常常出现 ABO 血型正反定型不符的情况,排除标本及试剂质量、技术操作等原因外,还可能受疾病或亚型的影响。有研究显示,新生儿出生至 18 个月后 ABO 抗原才能充分发育,对于正定型抗原反应较弱的血型,笔者建议加做抗 H、抗 A₁、抗 AB 等,必要时进行 ABO 血型基因鉴定^[1-2]。

根据基因测序结果显示,先证者与其母亲为 B101/B(A)新。B(A)亚型由 YAMAMOTO 等^[3]发现,目前已被报道的 B(A)等位基因有 7 种^[4],其中 B(A) 02 和 B(A)04 是我国最常见的基因型^[5-6]。经与血型基因突变数据库比对,在已知的 7 种 B(A)亚型中,均存在 796C>A 位点的基因突变,但在本研究的基因序列里,未发现有相同突变位点的 B(A)亚型等位基因,表明先证者及其母亲均含有 1 条新的 B(A)亚型等位基因。

B(A)亚型产生的分子机制可能是 B 等位基因在正常基因序列的基础上发生了单碱基的突变,这种突变如果发生在关键核苷酸位置上,能够引起单个氨基酸的变化,改变糖基转移酶的酶学特点和催化活性,使同一底物催化形成不同的产物^[7],从而使 B 等位基因具备编码双功能活性酶的能力,即 B 等位基因可以编码具有 B 糖基转移酶活性的 B 抗原,还可编码具有 A 糖基转移酶活性的 A 抗原。有研究证实,ABO * A101 和 ABO * B01 两个等位基因在编码区仅有 7 个核苷酸的差异,其中 c. 297A>G、c. 657C>T 和 c. 930G>A 位于密码子的摇摆位置,不引起氨基酸的改变;而 c. 526C>G、c. 703 G>A、c. 796 C>A 和 c. 803G>C 核苷酸的变异,会引起 176、235、266 和 268 位点 4 个氨基酸的替换^[8-9]。其中 p. 176Arg、p. 235Gly、p. 266Leu、p. 268Gly 4 个氨基酸决定糖基转移酶 A 特异性,而 p176Gly、p. 235Ser、p. 266Met、p. 268Ala 4 个氨基酸决定糖基转移酶 B 特异性。研究中,先证者在 c. 526C>G、c. 657 C>T、c. 803G>C、c. 930 G>A 位点发生了核苷酸的变异,其中,c. 657 C>T 和 c. 930G>A 不引起氨基酸的改

变;c. 526C>G 和 c. 803G>C 核苷酸的变异其编码的氨基酸也随之改变,进而改变糖基转移酶的催化活性,使之具有编码 A、B 抗原双功能活性酶的功能。基于以上分子基础,B(A)亚型血清学主要特征为红细胞表面表达正常量的 B 抗原和少量 A 抗原,同时血清可能存在与 A₁ 细胞、A₂ 细胞均反应的抗 A 抗体,因此在血型血清学鉴定时,易被判定为 AB 型。在血型鉴定过程中,应注意反应的凝集强度,对于凝集强度改变或者正反定型不一致的标本,需结合血清学和基因测序方法进行血型鉴定,以提高鉴定的准确率。

王静等^[2]在 4 例 ABO 血型抗原弱化的患儿研究中发现,ABO 血型基因调控区的启动子、增强子发生了变异,其中 2 例为先天性心脏病患儿,推测此类疾病可能会导致 ABO 血型抗原的弱表达。本研究通过家系分析发现,先证者 B(A)亚型应来自于其母亲,与本身先天性室间隔缺损疾病可能没有关系。

一般而言,临床输血依据 ABO 血型相容性原则进行输注,这一原则可以解决绝大部分输血问题,但正确输血的基础是正确的血型鉴定。此病例中如果按常规原则,给 B(A)亚型患儿输注 AB 型红细胞,会引起急性溶血反应,甚至可能危及患儿的生命,因此准确鉴定患儿的 B(A)亚型,对于临床输血安全具有重要的意义,必须结合临床实际,选择适合的鉴定技术。

参考文献

- [1] 张印则,兰炯采,李伟,等. 婴儿 ABO 血型的鉴定及应用于临床输血[J]. 中国实验血液学杂志,2013,11(3):301-304.
- [2] 王静,顾玉微,游国岭,等. ABO 基因调控区变异对其表型的影响[J]. 中国输血杂志,2019,32(9):847-851.
- [3] YAMAMOTO F, MCNEILL P D, YAMAMOTO M, et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system:3. A(X) and B(A) alleles[J]. Vox Sang, 1993, 64(3):171-174.
- [4] LUO H, LUO G P, ZHANG R Q, et al. Identification of a novel ABO B(A)07 allele[J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2017, 34(6):894-896.
- [5] 刘长利,苗天红,刘亚庆,等. B(A)血型等位基因分型研究[J]. 中国输血杂志,2012,25(5):429-431.
- [6] 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.
- [7] 许志远,刘凯,庄光艳,等. 一例 B(A)血型患者及其家系的血型血清学和分子生物学研究[J]. 北京医学,2020,42(2):149-152.
- [8] FRANCHINI M, BONFANTI C. Evolutionary aspects of ABO blood group in humans[J]. Clin Chim Acta, 2015, 444:66-71.
- [9] YING Y L, HONG X Z, XU X, et al. Serological characteristic and molecular basis of A₂ subgroup in the Chinese population[J]. Transfus Apher Sci, 2013, 48(1):67-74.