

多个红细胞稀有血型系统抗原基因筛检与建库研究

孙昂, 苏湘晖, 陈宏伟, 易玲, 谭涛, 向雅香
岳阳市中心血站, 湖南 岳阳 414000

摘要: **目的** 筛检岳阳人群 Rh(C/c/E/e)、Kidd(Jk^a/Jk^b)、MNS(M/N/S/s/Mur)、Duffy(Fy^a/Fy^b)、Diego(Di^a/Di^b)、Kell(K/k/Kp^a/Kp^b)、Dombrock(Do^a/Do^b)、Scianna(Sc1/Sc2)、Colton(Co^a/Co^b)、Lutheran(Lu^a/Lu^b) 10 个红细胞稀有血型系统的抗原基因,为建立本地区稀有血型库提供数据。**方法** 采用 PCR-SSP 方法对 303 名岳阳汉族 RhD(+) 固定献血者进行 10 个稀有血型系统基因分型。**结果** 岳阳汉族人群 RhCE 血型系统基因频率为:C=0.6865,c=0.3135,E=0.2492,e=0.7508;MNS 血型基因频率为:M=0.4983,N=0.5017,S=0.0478,s=0.9521,Mur=0.0363;Duffy 血型的基因频率为 Fy^a=0.9472,Fy^b=0.0528;Dombrock 血型基因频率为:Do^a=0.0842,Do^b=0.9158;Diego 血型基因频率为:Di^a=0.0248,Di^b=0.9752;Kidd 血型基因频率为:Jk^a=0.4802,Jk^b=0.5198。303 名献血者 Lutheran 血型、Kell 血型、Scianna 血型和 Colton 血型均为纯合子,基因型分别为 Lu^b/Lu^b、k/k/Kp^a/Kp^a、Sc1/Sc1 和 Co^a/Co^a。**结论** 岳阳汉族人群的 RhCE、MNS、Duffy、Dombrock、Diego、Kidd 血型系统基因呈多态性分布,Lutheran 和 Colton、Kell、Scianna 血型系统基因呈单态性分布,对指导建立多个红细胞血型系统稀有血型库具有重要意义。

关键词: 红细胞稀有血型;基因频率;稀有血型库

中图分类号:R446.11 **文献标识码:**B **文章编号:**1006-3110(2020)10-1268-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2020.10.031

通过研究筛选岳阳地区固定献血者 RhCE、MNS、Duffy、Kell、Dombrock、Diego、Kidd、Scianna、Colton 和 Lutheran 10 个红细胞稀有血型系统的抗原基因,了解其基因频率和多态性特点,建立多种红细胞血型系统稀有血型库。

1 材料与方法

1.1 标本 2019 年 12 月,经无偿献血者知情同意,随机留取 303 份非血缘关系岳阳籍汉族、ABO 血型不限、RhD(+) 固定献血者 5mL EDTA 抗凝全血标本,年龄 18~50 岁,男性 131 名,女性 172 名,男、女性别比 0.76:1。

1.2 试剂与仪器 离心机(eppendorf 公司,5810R),凝胶成像仪(Bio-Rad 公司,Gel Doc XR+),PCR 仪(Life technologies,2720 和 9700 型)。主要试剂:TIANLONG EX-DNA Kit(天津TIANLONG 公司,批号:E0819040131);人类 Rh(C/c/E/e),Kidd(Jk^a/Jk^b),MNS(M/N/S/s/Mur),Duffy(Fy^a/Fy^b),Diego(Di^a/Di^b),Kell(K/k/Kp^a/Kp^b),Dombrock(Do^a/Do^b),Scianna(Sc1/Sc2),Colton(Co^a/Co^b),Lutheran(Lu^a/Lu^b) 血型系统抗原基因分型检测试剂(天津吉诺泰普生物技术有限公司,批号:E20191009)。

1.3 方法

- 1.3.1 样本 DNA 提取 按 TIANLONG EX-DNA Kit 试剂说明书提取全血基因组 DNA。
- 1.3.2 PCR 扩增及电泳 聚合酶链式反应-序列特异性引物法(polymerase chain reaction-sequence specific primers,PCR-SSP)按照试剂盒说明书操作,自动凝胶图像分析仪成像记录实验结果。
- 1.3.3 实验结果分析 每个 PCR 反应都产生强弱不一的 1 009 bp 内对照产物。根据有无 PCR 产物及产物长度按表 1 指定相应血型基因。在相应碱基对位置观察有无特异性条带,若出现特异性条带判读为阳性,未出现则判断为阴性,见表 1 和图 1。

表 1 红细胞血型分型试剂盒 PCR 引物及特异性扩增产物长度

血型系统	引物名称	PCR 产物长度 (bp)	血型系统	引物名称	PCR 产物长度 (bp)
RhCE	C	218	Diego	Di ^a	244
	c	194		Di ^b	244
	E	317	Kell	K	234
	e	427		k	234
Kidd	Jk ^a	322		Kp ^a	315
	Jk ^b	322		Kp ^b	315
MNS	M	162	Scianna	Sc1	155
	N	300		Sc2	155
	S	239	Dombrock	Do ^a	182
	s	239		Do ^b	182
	Mur1	638	Colton	Co ^a	191
	Mur2	646		Co ^b	191
Duffy	Fy ^a	167	Lutheran	Lu ^a	173
	Fy ^b	167		Lu ^b	173

基金项目:湖南省自然科学基金面上项目(2019JJ40292)
作者简介:孙昂(1972-),男,湖南岳阳人,硕士,主任技师,主要从事红细胞、白细胞血型基因研究工作。

注:内对照产物均为 1 009 bp。Mur1、Mur2 同时出现阳性条带判定为有 Mur 抗原,Mur1、Mur2 同时阴性反应或只出现 1 个阳性分型带,判定为没有 Mur 抗原。

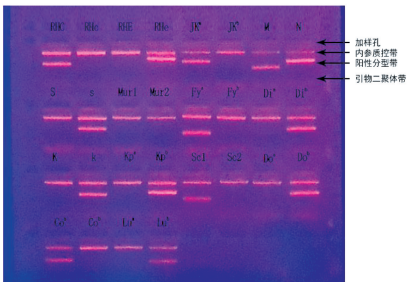


图 1 某个标本 10 个血型系统抗原检测凝胶电泳图片

1.4 统计学处理 按基因计数法计算基因频率,计算观察值与期望值,采用 χ^2 检验基因分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡法则, $P<0.05$ 为差异有统计学意

义,抗原不配合率计算按参考文献计算^[4]。

2 结 果

303 名岳阳汉族人群红细胞 RhCE、MNS、Duffy、Dombrock、Diego、Kidd 血型系统抗原基因频率具有多态性,其血型系统对偶抗原不配合率分别是 0.3378、0.3042、0.3750、0.0869、0.0950、0.1423、0.0470、0.3746; Kell、Scianna、Colton、Lutheran 血型系统抗原基因频率呈单态性分布。 χ^2 检验比较基因型分布的观察值与期望值,各血型系统的 P 值均大于 0.05,符合 Hardy-Weinberg 平衡法则,见表 2。

表 2 岳阳汉族人群红细胞血型系统抗原基因型和基因频率

血型系统	表现型	观察值	频率	期望值	Hardy-Weinberg 吻合度检验		基因频率		抗原不配合率
					χ^2 值	P 值	基因型	频率	
RhCE	CC	148	0.4884	142.80	2.0708	>0.05	C	0.6865	0.3378
	Cc	120	0.3960	130.43			C	0.3135	
	cc	35	0.1155	29.78					
	EE	20	0.0660	18.82			E	0.2492	
	Ee	111	0.3663	113.38			e	0.7508	
	ee	172	0.5677	170.80					
MNS	MM	70	0.2310	75.24	2.2231	>0.05	M	0.4983	0.3750
	MN	162	0.5437	151.50			N	0.5017	
	NN	71	0.2343	76.26					
	SS	0	0.0000	0.69			S	0.0479	
	Ss	29	0.0957	27.58			s	0.9521	
	ss	274	0.9043	274.67					
Duffy	Mur	11	0.0363		0.0297	>0.05			0.0950
	Fy(a+b-)	272	0.8977	271.85			Fy ^a	0.9472	
	Fy(a-b+)	1	0.0033	0.85			Fy ^b	0.0528	
Kell	Fy(a+b+)	30	0.0990	30.30	0.7303	>0.05			0.1423
	KK	0	0.0000				K	1.0000	
	kk	303	1.0000				k	0.0000	
	Kk	0	0.0000						
	Kp(a+b-)	0	0.0000				Kp ^a	1.0000	
	Kp(a-b+)	303	1.0000				Kp ^b	0.0000	
Dombrock	Kp(a+b+)	0	0.0000		0.0111	>0.05			0.0470
	Do(a+b-)	1	0.0033	2.15			Do ^a	0.0842	
	Do(a-b+)	253	0.8350	254.12			Do ^b	0.9158	
Diego	Do(a+b+)	49	0.1617	46.73	1.8253	>0.05			0.3746
	Di(a+b-)	0	0.0000	0.19			Di ^a	0.0248	
	Di(a-b+)	288	0.9505	288.16			Di ^b	0.9752	
Kidd	Di(a+b+)	15	0.0495	14.66	1.0000	>0.05			0.0000
	Jk(a+b-)	64	0.2112	69.87			Jk ^a	0.4802	
	Jk(a-b+)	76	0.2508	81.87			Jk ^b	0.5198	
Scianna	Jk(a+b+)	163	0.5380	151.26	1.0000	>0.05			0.0000
	Sc(1+2-)	303	1.0000				Sc1	1.0000	
	Sc(1-2+)	0	0.0000				Sc2	0.0000	
Colton	Sc(1+2+)	0	0.0000		1.0000	>0.05			0.0000
	Co(a+b-)	303	1.0000				Co ^a	1.0000	
	Co(a-b+)	0	0.0000				Co ^b	0.0000	
Lutheran	Co(a+b+)	0	0.0000		1.0000	>0.05			0.0000
	Lu ^a /Lu ^a	0	0.0000				Lu ^a	0.0000	
	Lu ^b /Lu ^b	303	1.0000				Lu ^b	1.0000	
	Lu ^a /Lu ^b	0	0.0000		1.0000	>0.05			0.0000

3 讨 论

随着血型学研究方法学的改进与发展,通过筛选献血者血型抗原、患者不规则抗体检测,新的血型系统不断被发现,目前已发现人类红细胞有 36 种血型系

统,360 种血型抗原^[1],具有高度的遗传多态性、不同民族和地区存在差异^[2],这给临床输血提出严重挑战:同种异体输注所有血型完全相同的血液几乎是不可能的。目前临床输血大都只关注具有较强免疫原性的 30 多个血型抗原^[3],我国临床输血主要关注 ABO、Rh 血型系统,对 Duffy、MNS 等其他稀有血型系统关注较少,所以我国输血反应中因血型不合所造成的输血不良反应占最高比例,常发现有抗-E、抗-C、抗-E 联合抗-c、抗-S、抗-M/N、抗-K、抗-Mur、抗-Fy^a 等不规则抗体^[4-5],甚至还发现由抗-Fy^b、抗-Jk^b、抗-Ce 联合抗体引起的溶血性输血反应个例报道^[6]。

稀有血型的广义定义为检出率很低、输血时难以找到配合血液的血型总称^[7]。稀有血型患者的输血途径首选是自体输血,其次是亲属互助献血,再就是相容性血液输注^[8]。稀有血型患者输血问题引起了国家卫生行政部门的高度重视,在国家“十一·五”和“十二·五”计划项目中,联合国内 13 家省级血液中心开展 ABO、Rh、MNS、Duffy、Diego、Kidd、Kell、gerbich、Colton、Yt、Lutheran、Ok 血型系统中高频抗原的筛选,建立了全国性的稀有血型信息库^[9]。同时启动了少数民族多个红细胞血型系统基因多态性的研究,2014 年完成了西藏藏族人群 RhCE、MNS、Duffy、Dombrock、Diego、Kidd、Kell、Scianna、Colton、Lutheran 10 个血型的研究^[10],2018 年完成了新疆哈萨克族人群 MNS、Duffy、Dombrock、Diego、Kidd、Kell、Scianna、Colton、Lutheran 9 个血型的研究^[11],这些研究为我国稀有血型库提供了珍贵的数据,也向国内外许多患者提供了宝贵的稀有血型血液输注。

研究发现,岳阳汉族人群的 RhCE、MNS、Duffy、Dombrock、Diego、Kidd 血型系统抗原基因频率具有多态性。RhCE 血型系统的 C/c、E/e、MNS 系统的 M/N、Dombrock 血型系统的 Do^a/Do^b、Kidd 血型系统的 Jk^a/Jk^b 对偶抗原不配合率较高,分别为 0.3378、0.3042、0.3750、0.1423、0.3746,这些血型系统的个体因随机相容性输血或妊娠,产生同种抗体的概率也较高,再次输血或妊娠时易引起溶血性输血反应或新生儿溶血病^[13]。Kell、Scianna、Colton、Lutheran 血型系统抗原基因频率呈单态性分布,这可能与样本数较少有关,后期将扩大研究样本量,以证实 Kell、Scianna、Colton、Lutheran 血型系统抗原基因频率呈单态性或多态性分布。在欧美 Kell 和 ABO、Rh 被列为 3 大血型系统^[3],我国汉族人群 K 抗原非常少见,几乎均为 k 抗原,但由抗-K 引起的新生儿溶血病也有报道^[14]。Scianna、Colton、Lutheran 血型系统产生的抗体在汉族人群中很

少见,但也可以引起新生儿溶血病和溶血性输血反应^[15]。

岳阳市中心血站于 2012 年建立 Rh(-) 稀有血型库^[12],当时库容为 324 人,经过多年的发展筛选,现已扩容至 719 人,满足了本地区临床 Rh(-) 血液输注的需求。但对其他稀有血型的患者,多次输注血液产生相应抗体后,再次输血时只能通过与多名供者进行盲配,寻求相容性血液输注,往往短时间内难以找到合适的血液、而危及患者的生命。因此,对固定献血者检测多种红细胞血型系统、建立本地区稀有血型库,供临床选择配合型血液输注具有重要意义。

随着输血技术学的发展,如何使临床精准输血、最大限度地避免免疫性输血不良反应发生,从而达到科学合理、效果更好是输血技术研究的重要方向^[16]。本研究初步建立了岳阳地区多种红细胞血型系统稀有血型库,充实了国家稀有血型献血者数据库,为临床精准输血提供了保障。

参考文献

- [1] Storry JR, Clausen FB, Castilho L, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings[J]. Vox Sang, 2019, 114(1): 95-102.
- [2] 张印则,徐华,周华友. 红细胞血型原理与检测策略[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,2019:58-109.
- [3] 杰夫·丹尼尔人类血型[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,2007:117-471.
- [4] 蒯迪文,郭黠,邓群. 56 例疑难交叉配血的血清学特点分析及输血对策[J]. 医学临床研究,2015,32(3):592-593.
- [5] 韩丽,宋雪. 输血前不规则抗体筛查的临床意义和试剂应用价值[J]. 中国社区医师,2019,35(28):118.
- [6] 张云聪,黄文庆,黎绍昌,等. 抗-Jk^b、抗-Fy^b、抗-Ce 联合抗体引起迟发型溶血性输血反应的报告 1 例[J]. 检验医学与临床,2019,16(9):1310-1312.
- [7] 徐爱蕾,王为. 稀有血型的研究进展[J]. 医学综述,2011,17(17):2658-2660.
- [8] 曹庆盛,杨涛,王明慧. 稀有血型及其在输血工作中的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志,2017,25(3):952-956.
- [9] 朱自严,王晨,叶璐夷,等. 红细胞稀有血型筛选、建库与应用[J]. 中国输血杂志,2014,27(11):1096.
- [10] 张嵘,田力,李晓娟,等. 西藏藏族人群多个红细胞血型系统基因多态性研究[J]. 中国输血杂志,2014,27(5):505-507.
- [11] 虞彬,单金晶,张雅楠,等. 中国新疆哈萨克族人 9 种稀有血型系统基因频率分布状况[J]. 解放军预防医学杂志,2018,36(1):4-10.
- [12] 孙昂,苏湘晖,栗玉萍,等. 岳阳地区汉族献血者 ABO、Rh 血型分布调查[J]. 中国输血杂志,2012,25(增刊):106.
- [13] 赵桐茂. 人类血型遗传学[M]. 北京:科学技术出版社,1987:102-116.
- [14] 李小飞,刁雪芹,刘兴莉,等. 抗-K 引起新生儿溶血病的研究—附报告 1 例[J]. 中国输血杂志,2015,28(9):1115-1117.
- [15] 胡丽华. 临床输血学检验[M]. 第 3 版. 北京:中国医药科技出版社,2018:31-34.
- [16] 杨丹波,陈明拓,刘陵,等. 中国血液产品自给自足的挑战与策略[J]. 中国输血杂志,2014,27(11):1096.