

常州地区首例 cisAB 血型基因特征分析及家系调查

杨红梅, 邹昕, 徐立

常州市中心血站, 江苏 常州 213004

摘要: **目的** 研究 1 例 ABO 亚型及基因特征。 **方法** 采用试管法对家系 3 代共 7 例标本进行 ABO 血型血清学鉴定; 对正反定型不一致的标本运用聚合酶链式反应序列特异性引物 (polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP) 法基因分型; 并对 ABO 基因第 6 和 7 外显子扩增产物进行测序分析。 **结果** ABO 血型血清学发现 7 例标本中正反定型不符 3 例, 其中 2 例红细胞表型为 cisAB/A 或 ABx, 1 例为 cisAB/O 或 A2Bx; 基因分型为 ABO * cisAB01/A101、ABO * cisAB01/O01。ABO 基因序列分析: ABO * cisAB01/A101 第 7 外显子发生 467C>T、803G>C 的特征性突变, ABO * cisAB01/O01 第 6 外显子 261 位缺失 G, 第 7 外显子在 467C>T、803G>C 存在特征性突变。测序结果均携带有 ABO * cisAB01 基因。 **结论** ABO * cisAB01 基因能导致 A 抗原或者 B 抗原的弱表达并能稳定遗传, 因此应将血型血清学和分子生物学方法相结合才能准确鉴定 ABO 亚型。

关键词: cisAB 血型; PCR-SSP; 血型血清学; DNA 测序

中图分类号: R457.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2022)04-0439-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2022.04.014

Genetic characteristics and pedigree of the first case of cisAB blood group in Changzhou area

YANG Hong-mei, ZOU Xin, XU Li

Changzhou Blood Center, Changzhou, Jiangsu 213004, China

Corresponding author: XU Li, E-mail: xulion@126.com

Abstract: **Objective** To study a case of ABO subtype and its genetic characteristics. **Methods** Tube method was used to perform the serological identification of ABO blood group in 7 samples from 3 generations of one family. Polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) assay was used for genotyping the samples with inconsistent positive and negative results. The sequence of exon 6 and 7 of ABO gene was analyzed. **Results** Among the 7 samples detected, the positive and negative typing of 3 samples was not consistent, and the blood group serological test was different; 2 cases showed cisAB/A or ABx, and 1 case showed cisAB/O or A2Bx. The genotypes were ABO * cisAB01/A101 and ABO * cisAB01/O01. ABO gene sequence

基金项目: 江苏省英科新创科研基金课题 (JS2020001), 常州市中心血站课题 (xz202106)

作者简介: 杨红梅 (1982-), 女, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 副主任技师, 主要从事血液免疫学方面工作; 邹昕 (1982-), 女, 主管技师, 主要从事红细胞血型研究工作, 为共同第一作者。

通信作者: 徐立, E-mail: xulion@126.com。

- [12] 汤健闻. 百色市 1981—2004 年狂犬病流行病学分析[J]. 河南预防医学杂志, 2006, 17(6): 345-346.
- [13] 王哲, 朱雷, 孙昼, 等. 杭州市狂犬病暴露人群流行病学特征分析[J]. 预防医学, 2019, 31(11): 1150-1155.
- [14] 郑东方, 施达, 郭凤芝. 金华市狂犬病暴露者流行病学特征分析[J]. 预防医学, 2017, 29(12): 1243-1244, 1247.
- [15] 李革莉, 潘海, 刘颖, 等. 桂林市 2007—2010 年人狂犬病流行特征及监测分析[J]. 中国热带医学, 2013, 13(2): 166-168, 188.
- [16] 李世慧, 杨本立, 吴永良. 荔波县 2006—2010 年狂犬病流行病学特征及防控措施探讨[J]. 黔南民族医学, 2011, 24(3): 185-189.
- [17] 张高灵, 崔喜闻, 袁媛, 等. 2016—2018 年重庆市开州区狂犬病暴露处置门诊狂犬病暴露人群流行病学特征分析[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2020, 18(3): 176-180.
- [18] 王青海, 王旭, 王倩, 等. 北京市西城区 2010—2017 年狂犬病暴露人群流行病学特征分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(2): 165-168.
- [19] 肖雷, 王凤双, 唐莹, 等. 2008—2014 年北京市顺义区狂犬病暴露人群流行病学特征分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(3): 283-287.
- [20] 刘怡芳, 吕杰, 苏承. 天津市 2009—2016 年动物致伤处置门诊暴露人群流行病学分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2017, 28(6): 589-591.
- [21] 杨科明, 邓寿平, 曾文辉. 广东博罗县 19 例狂犬病流行病学分析[J]. 广西预防医学, 2005, 11(3): 191.
- [22] 胡向科, 罗平, 刘富强, 等. 湖南省 2010—2014 年狂犬病流行特征及暴露后免疫失败病例分析[J]. 实用预防医学, 2017, 24(2): 152-155.

analysis revealed that there were 467C>T and 803G>C mutations in exon 7 of ABO * cisAB01/A101, G was missing in 261 of ABO * cisAB01/O01 in exon 6, and there were mutations in 467C>T and 803G>C in exon 7. Sequence analysis displayed that ABO * cisAB01 was detected in all the samples. **Conclusion** ABO * cisAB01 can induce weak expression of A or B antigens, and can be inherited stably. Blood group serology and molecular biological methods should be combined to accurately identify ABO subtypes.

Keywords: cisAB blood group; polymerase chain reaction-sequence specific primer; blood group serology; DNA sequencing

ABO 血型系统是最早被发现的人类血型系统,其基因位于第 9 号染色体,同时也是最重要的一个血型系统,在临床输血、移植医学和产前诊断中起着重要作用。在日常 ABO 血型鉴定工作中,常常会遇到正反定型不一致,排除人为操作因素之外,亚型是考虑的方向之一。ABO 亚型是由于 ABO 基因的遗传变异影响酶活性和抗原抗体亲和力,导致 A 基因变异形成 A 亚型,B 基因变异形成 B 亚型,O 基因变异形成新的 O 等位基因。ABO 亚型是一种弱 A/B 的表现型,在人群中较为少见,但可能会严重影响输血安全性及有效性。亚型血清学格局很多,甚至不同亚型可能呈现相同的血清学反应格局,故传统的血型血清学方法有时不能完全确定亚型,而血型血清学结合基因检测则能较好地解决此问题^[1-4]。本研究室在 ABO 血型鉴定过程中发现罕见的 ABO 亚型一例,该标本血型血清学初判为 cisAB,结合序列特异性引物聚合酶链反应 (polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP)、ABO 基因测序及家系调查分析其遗传规律,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 对象 先证者,女性,36 岁,江苏常州人,汉族,2020 年 7 月 10 日因子宫肌瘤入院,术前常规备血过程中发现其 ABO 血型正反不符,于当日送输血研究室进行血型鉴定,血清学初步判定为 cisAB,经患者及亲属知情同意后,采集患者及亲属共 7 人全血标本提取 DNA 并进行以下相关实验(分别用 NO.1~7 编号)。

1.2 仪器与试剂 抗-A/B 单克隆抗体、抗-D(IgM)单克隆抗体、抗-A1 抗体(以上均购自上海血液生物医药有限责任公司);抗-H 抗体、抗-AB 抗体(以上均购自德国 CE-IMMUNDIAGNOSTIKA);ABO 血型反定型红细胞(北京金豪制药股份有限公司);抗体筛选细胞(匈牙利 REAGENS 公司);人类红细胞 ABO 血型-cisAB/B(A)基因分型试剂盒(PCR-SSP,天津秀鹏生物技术开发有限公司);DNA 提取试剂(美国 Invitrogen 生命技术公司)。9700 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司);DNA 浓度测定仪、凝胶成像系统、高速离心机(以上均来自美国贝克曼库尔特公司)。

1.3 血型血清学检测 采用试管法进行 ABO 正反定型实验。取 B 型献血者、O 型献血者和患者血细胞少许,生理盐水洗涤三次,配制成 2% 左右浓度红细胞悬液备用,并进行抗-H、抗-A1 和抗-AB 实验,离心观察凝集情况。所有实验均严格按照文献^[5]的方法和试剂操作说明书进行。

1.4 PCR-SSP 基因组 DNA 提取及 ABO 基因扩增、胶图比对分析 使用 DNA 提取试剂盒从先证者及家系成员共 7 人的外周血中提取基因组 DNA,调整 DNA 模板浓度为 30~35 ng/ μ l, A260/A280 比值为 1.60~1.80,根据人类红细胞 ABO 血型-cisAB/B(A)基因分型试剂盒设置参数进行 PCR 扩增,扩增条件为 96 $^{\circ}$ C 2 min;96 $^{\circ}$ C 20 s,68 $^{\circ}$ C 60 s(5 个循环);96 $^{\circ}$ C 20 s,65 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 30 s(10 个循环);96 $^{\circ}$ C 20 s,62 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 30 s(15 个循环);72 $^{\circ}$ C 3 min;扩增产物转移到 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像结果与试剂盒中提供的结果分型表对比分析。

1.5 ABO 基因测序分析和序列比对 ABO 基因第 6~7 外显子扩增片段大小约 2 019 bp,扩增反应体系根据天津秀鹏试剂盒说明书进行,采用引物:5'-CCT-GCCAGCTCCATGTGAC-3',下游引物:5'-CAGGACG-GACAAAGGA-3'。扩增产物经纯化后并测序,该实验部分在上海血液中心输血研究所进行,第 6 外显子测序上游和下游引物为:5'-CATGTGGGTGGCACCCT-GCC-3'和 5'-ATGTCCACAGTCACTCGCCA-3';第 7 外显子上游和下游引物为:5'-GCTCCCCAGCCCCGTC-CG-3'和 5'-GTTTACCCGTTCTGCTAA-3'。

2 结果

2.1 血型血清学结果 7 个成员中 3 个成员显示 ABO 正反定型不符,NO.1 和 NO.2 的血清学反应格局相似。盐水介质立即离心(Is),正定型 A 抗原表达强度与抗-A 反应可达 4+,B 抗原表达强度较弱。NO.1 的 B 抗原表达强度比 NO.2 稍强,放置 4 $^{\circ}$ C 后离心可达到 4+。反定型与 B 细胞(Bc)均有凝集,与 A 细胞(Ac)、O 细胞(Oc)均无反应。进一步实验发现,H 抗原表达强度很弱,与正常 Bc 几乎一致,并对 NO.2 进行吸收放散试验证实存在 B 抗原。根据血型血清学

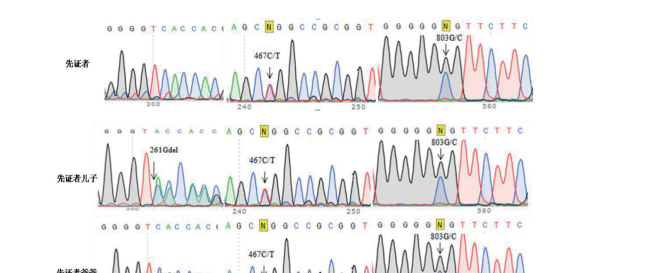
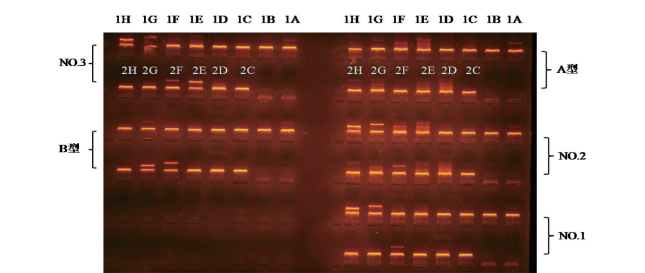
反应格局 3 位成员应均为 AB 亚型,2 位成员怀疑是 cisAB/A 或 ABx,1 位成员怀疑是 cisAB/O 或 A2Bx。为排除冷抗体,将反应样本离心后于 37 ℃ 孵育 15 min 看结果,正反定型结果仍不符,排除冷抗体因素,见表 1。

表 1 cisAB 血型先证者及其家系成员血型血清学实验结果

编号及身份	抗-A	抗-B	抗-AB	抗-H	抗-A1	Ac	Bc	Oc	自 c	血型
NO. 1(先证者)	4+	1+	4+	±	4+	0	2+	0	0	cisAB/A 或 ABx
NO. 2(先证者父亲)	4+	±	4+	±	4+	0	3+	0	0	cisAB/A 或 ABx
NO. 3(先证者儿子)	4+	3+	4+	3+	0	0	1+	0	0	cisAB/O 或 A2Bx
NO. 4(先证者母亲)	4+	0	4+	0	4+	0	3+ _s	0	0	A
NO. 5(先证者姐姐)	4+	0	4+	0	4+	0	3+ _s	0	0	A
NO. 6(先证者配偶)	0	0	0	3+	0	3+	3+	0	0	O
NO. 7(先证者外甥女)	4+	0	4+	0	4+	0	4+	0	0	A

2.2 PCR-SSP 基因分型 采用人类红细胞 ABO 血型-cisAB/B(A)基因分型试剂盒对本标本进行PCR-SSP检测,NO.1、NO.2、NO.3 在电泳图第 1H、1G 处均出现阳性条带(313、178 bp)与天津秀鹏试剂盒提供的胶图谱比对,条带 1H、1G 出现阳性是 cisABO1 型的特征条带。通过 PCR-SSP 对部分家庭成员基因检测发现 NO.1、NO.2、NO.3 均携带 cisAB 基因并稳定遗传。其中 NO.3 在 2E(196 bp)处出现特征性阳性条带,判为 O1,NO.1、NO.2 是否为 A101 需要结合 ABO 血型基因测序才能判断,见图 1。

2.3 ABO 基因测序分析 以 A101 作为测序标准序列,NO.3 基因测序在第 6 外显子 261 位缺失 G,造成 261 位前面出现连续套峰、297 位为 A/A,未发生突变,符合 O01 基因特征性序列;同时第 7 外显子 467 处有 C/T 突变(杂合峰)、803 处有 G/C 突变(杂合峰);NO.1、NO.2 测序结果均第 7 外显子存在 467C/T、803G/C 突变;而 467C/T 和 803G/C 突变位点是典型的 ABO * cisABO1 型基因特征序列,经与文献^[8] 比对,确定 NO.3 为 ABO * cisABO1/O01,NO.1、NO.2 为 ABO * cisABO1/A101,见表 2、图 2。



注:其中 A 型、B 型图谱为正常 A 型、B 型献血者。

图 1 NO.1、NO.2、NO.3 的 ABO 基因 PCR-SSP 扩增电泳

图 2 cisAB 家庭中 ABO 血型第 6、7 外显子部分测序结果

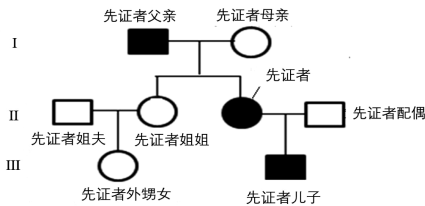
表 2 cisAB 家庭中 ABO 血型第 6、7 外显子核苷酸序列结果

等位基因	外显子 6		外显子 7													
	261	297	467	526	640	641	646	657	681	700	703	771	796	803	829	930
A101	G	A	C	C	A	T	T	C	G	C	G	C	C	G	G	G
B101	G	G	C	G	A	T	T	T	G	C	A	C	A	C	G	A
O01	Del	A	C	C	A	T	T	C	G	C	G	C	C	G	G	G
cisABO1	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-
cisABO2	-	-	-	G	-	-	-	T	-	-	A	-	-	C	-	-
cisABO3	-	G	-	G	-	-	-	T	-	T	A	-	A	C	-	A
cisABO4	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-
cisABO5	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-
cisABO6	-	G	-	-	-	-	T	-	-	T	A	-	A	C	-	A
NO. 1	G	A	T	C	A	T	T	C	G	C	G	C	C	C	G	G
NO. 2	G	A	T	C	A	T	T	C	G	C	G	C	C	C	G	G
NO. 3	Del	A	T	C	A	T	T	C	G	C	G	C	C	C	G	G

注:A101、B101、O01 等位基因外显子 6、7 的核苷酸为国际标准序列,cisABO1~06 的短横线代表在该位点未发生突变。

2.4 cisAB 血型患者家系分析 当 ABO * cisABO1 与 ABO * O01 基因杂合时,可同时表现出 A 基因和 B

基因性状,血清学呈 A 抗原强、B 抗原弱、H 抗原强的格局(即先证者儿子血清学特征)。当 ABO * cisAB01 与 ABO * A101 等位基因共存时,血清学呈 A 抗原强、B 抗原弱、A1 抗原强、H 抗原弱的格局(即先证者和先证者父亲血清学特征)。ABO * cisAB01 等位基因通过与 ABO * A101 和 ABO * B101 等位基因间同源交换形成,467T 和 803C 核苷酸的独特性决定了 cisAB01 亚型的分子遗传特征。先证者及 6 名亲属的血型血清学、PCR-SSP 基因分型及 ABO 基因测序结果符合家系 cisAB 血型遗传规律,见图 3。



注:圆形代表女性,方形代表男性;阴影部分代表为 cisAB 个体。

图 3 1 名 cisAB 血型先证者及其家系调查图谱

3 讨论

cisAB 是 AB 亚型中较为罕见的一类,文献报道在人群中发生频率为 1/580 000~1/17 000^[6-7],常州地区为首次报道。随着分子生物学技术发展,国外 Yamamoto 等报道了其分子遗传特点,国内许先国等^[6]率先报道了 cisAB 表型及分子机制。cisAB 的形成机制研究表明不是 A 基因和 B 基因简单的串联,而是基因发生错义突变后产生重组,是 A101 基因通过 467C>T、803G>C 两处核苷酸变异后重组(即 AAAB 单倍体组合)。当一条单倍体的 A 或 B 等位基因发生错义突变时,该基因编码的糖基转移酶具有双功能活性同时催化 2 种底物分别加到 L-岩藻糖上形成 A 和 B 抗原。目前,从 Zhao 等^[8]的文献中查到已经确定的 cisAB 等位基因共有 8 型 9 种都属于错义突变,分别为 01~08 型,其中 01、02、03 型在欧洲人较多,04、05、06 型在亚洲人较多,另外还有一个 cisAB01var 型其血清学表达为 AxBx。由于 cisAB 血型基因的一条单倍型是 AB 型,另一条单倍型可以是 A、B、O 型,从而造成该血型的血清学结果有一定的特点。当其与 O 基因杂交时,血清学常表现为 A2B3 或 A2Bx,血清学结果表现为 A 抗原强、B 抗原弱,以抗-H 增强为一标志;当 cisAB 等位基因与 A 或 B 等位基因杂交时,其血清学结果常表现为 ABx 或 AxB,有抗原剂量效应,而抗-H 不增强或较弱。cisAB 血型的另一个明显标志是标本中存在有针对弱抗原的抗体,如 B 抗原弱,则有抗-B 存在。本研究先证者儿子血型为 ABO * cisAB01 * O01,其与

A101 比较存在 Gly268Ala 改变,使酶侧链分支下的三维结构发生改变,表达弱的 B 酶活性与血清学结果吻合,其正定型试验中:抗-A 凝集,抗-A1 不凝集,这是 A2 血型特征;同时抗-B 反应弱。反定型中有较弱的抗-B,抗-H 与正常 B 型相比明显增强,考虑为 cisAB/O 或 A2Bx^[9-11]。而先证者及先证者父亲 B 抗原出现弱阳性或更弱的凝集,采用吸收放散实验证实有抗 B 存在于放散液中,结合血清学考虑为 cisAB/A 或 ABx。PCR-SSP 检测结果符合 cisAB01 型特征,基因测序的结果均出现 cisAB01 和 O01 应有的碱基突变,验证了 PCR-SSP 结果。虽然本文先证者为 cisAB01 基因,且与以往报道的大多数 cisAB01 一致,但在一个家族中发现 cisAB01 型 2 种基因型(A101 和 O01)却不多见。ABO 血型系统是临床中最重要的血型系统,血型血清学方法在亚型鉴定上有一定的局限性,尤其是 cisAB 型与其他 AB 型的不同主要表现在遗传方式上,在不同家庭有不同的多态性表型,甚至 cisAB 基因与 ABO 基因杂交后产生的表现型与非 cisAB 基因表达的表现型在血型血清学格局上完全一致,但在基因遗传学形状上却是完全不同,因此人类血型基因的调控会影响红细胞血型抗原的表达,造成血型鉴定的困难或误判,这时需借助分子生物学检测方法,才能更准确地鉴定血型,从而保证输血的安全。

志谢 以上所有测序均在上海市血液中心输血研究所完成,感谢郑皆伟老师指导

参考文献

- [1] 罗随莉,杨小勇,周君,等. 一例 cisAB 血型的鉴定及家系分析[J]. 临床输血与检验,2020,22(5):545-548.
- [2] 沈志辉,周小芹,张乃淙,等. cisAB04 型血清学鉴定和基因分析[J]. 中国输血杂志,2019,32(1):41-43.
- [3] 李浩儒,杨洁,陈燕林,等. 一例 ABO 血型系统 cisAB 亚型的基因变异研究[J]. 中华医学遗传学杂志,2018,35(5):741-743.
- [4] 谢毓滨,旷开其,邹彬彬,等. 3 例 cisAB 血型分子生物学鉴定及输血策略探讨[J]. 实用预防医学,2022,29(1):55-58.
- [5] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程第 4 版[M]. 人民卫生出版社,2015:118-137.
- [6] 许先国,洪小珍,朱发明,等. cisAB 亚型第 6,7 外显子及侧翼内含子序列分析[J]. 临床检验杂志,2003,21(2):69-71.
- [7] 武文,张志波,马红霞,等. cisAB 血型误判原因分析及其家系遗传规律研究[J]. 中国输血杂志,2019,32(6):542-545.
- [8] Zhao H, Miao T, Yan F, et al. The serological and genetic characterization of CisAB blood group in a Chinese family[J]. Transfus Apher Sci, 2015,53(2):220-224.
- [9] Jiao LX, Yu JH, Yu XL, et al. Gene analysis of two cases with CisAB/B blood subgroup[J]. Transfus Apher Sci, 2017,56(2):223-225.
- [10] 李君,曹立瀛,侯金友,等. 一例 ABO 亚型 cisAB 个体的分子遗传学分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2020,37(1):71-74.
- [11] 王晓华,马玲,王恩波,等. cisAB01 血型的血清学及基因型分析[J]. 临床血液学杂志,2017,30(2):161-163.

收稿日期:2021-07-14