

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160791

Bx 亚型 1 例血清学与分子生物学分析

乔郑磊¹, 戎瑞明², 吴肇颀¹, 陆 琼³, 蒋 密^{1*}

1. 复旦大学附属中山医院输血科, 上海 200032

2. 复旦大学附属中山医院上海市器官移植重点实验室, 上海 200032

3. 上海市血液中心, 上海 200051

[关键词] ABO 血型; Bx 亚型; 正反定型不符

[中图分类号] R 457.1⁺1 [文献标志码] B

Serological and molecular biological studies of Bx subtype: case report

QIAO Zheng-lei¹, RONG Rui-ming², WU Bo-ting¹, LU Qiong³, JIANG Mi^{1*}

1. Department of Blood Transfusion, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

2. Shanghai Key Laboratory of Organ Transplantation, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

3. Shanghai Blood Center, Shanghai 200051, China

[Key Words] ABO blood group; Bx subtype; blood typing discrepancy

输血是现代医疗中重要的救治手段之一, 正确的血型鉴定在输血工作中有极其重要的意义。ABO 血型有多个亚型^[1-2]。若血清学显示 ABO 血型正反定型不符及抗原性减弱, 很容易造成忽视和漏检, 给临床血型鉴定、交叉配血及器官移植等带来极大的困扰, 给临床输血带来危险。最近我们在临床送检样本中发现了 1 例正反定型不符的样本, 并对其进一步做血清学以及基因测序分析, 最终确定为 Bx 亚型, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者女性, 68 岁, 汉族, 2014 年 12 月 14 日开始无明显诱因出现胸闷不适伴心前区隐痛, 经检查确认为主动脉夹层, 2014 年 12 月 26 日入院准备手术治疗。

1.2 试剂与仪器 微柱凝胶卡: ABO 正定型(Biorad, 批号: 50053.71.09, 美国), ABO 反定型(Grifols, 批号: 71351116024011841, 瑞典); 低离子抗人球蛋白凝胶卡(Biorad, 批号: 500531.07.15, 瑞典); 标准细胞 ABO(上海血液生物医药有限责任公司, 批号: 20145327), 抗体筛选细胞(上海血液生物医药有限责任公司, 批号: 20147829)。抗-A、抗-B

(上海血液生物医药有限责任公司, 批号: 20145120), 人源抗-A、抗-B(上海市血液中心自制), ABO 正定型采用 IH-1000 全自动血型仪(Biorad, AHC973A, 美国), ABO 反定型采用 WADiana 全自动配血仪(Grifols, ACC73A, 瑞典)。

1.3 血清学试验

1.3.1 血型鉴定 初次血型鉴定中 ABO 正定型采用 IH-1000 全自动血型仪, ABO 反定型采用 WADiana 全自动配血仪。试管法按文献^[3]方法进行, 应用筛选细胞和一组试剂谱细胞进行抗体筛选和抗体鉴定, 明确或排除不规则抗体。

1.3.2 吸收放散试验 取 2 mL 患者红细胞, 用 0.9% 氯化钠溶液洗涤 3 次。取等体积的抗 A 与抗 B 血型定型试剂, 与压积红细胞混合, 4℃ 吸收 1 h, 将压积红细胞用足量的 4℃ 0.9% 氯化钠溶液充分洗涤 5 次, 取最后 1 次洗液 2 滴, 分别加入 4% A1 细胞与 B 细胞, 离心观察。将吸收后的压积红细胞加 1 mL 0.9% 氯化钠溶液, 于 56℃ 水浴中放散 10 min, 期间轻轻振荡 1 min, 1 000×g 离心 1 min。取放散液各 2 滴, 分别加入 4% A1 细胞与 B 细胞, 振荡混匀, 1 000×g 离心 1 min, 观察结果。

1.4 基因组 DNA 提取 采用天根生化科技(北

[收稿日期] 2016-08-08

[接受日期] 2016-09-13

[作者简介] 乔郑磊, 硕士, 技师. E-mail: qiao.zhenglei@zs-hospital.sh.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64041990-2829, E-mail: jiang.mi@zs-hospital.sh.cn

京)有限公司 DNA 提取试剂盒快速抽取基因组 DNA。紫外分光光度计检测 DNA 浓度。

1.5 外显子 6、7 扩增与测序 采用的引物按照 Olsson 等^[4]的设计(表 1),均由上海生物工程公司合成。PCR 反应体系包括:dNTP 终浓度为 400 μmol/L、Mg²⁺ 终浓度为 2.5 μmol/L、10×PCR 缓冲液 5 μL、Taq 酶终浓度为 0.5 U、模板 DNA 终浓度为 100~300 ng/L、引物终浓度为 0.1 μmol/L,终反应体系为 50 μL。PCR 反应在 PE 9600 扩增仪上进行,循环参数为:95℃ 10 min,94℃ 60 s,63℃ 90 s,72℃ 60 s,10 个循环;94℃ 60 s,61℃ 90 s,72℃ 60 s,25 个循环;72℃ 10 min,4℃ 保存。10 μL 产物经 2%琼脂糖电泳鉴定产物的特异性。扩增产物经 TaKaRa DNA Fragment Purification Kit[宝生物工程(大连)有限公司]纯化,然后送上海生工生物工程公司测序。并分别以 A101、B101、O101 等位基因序列作对照,按照文献^[5]中的方法进行结果分析。

表 1 第 6、7 号外显子引物序列

引物名称	引物序列
exon 6F	5'-CGGAATTCACCTGCCACTGCCTGGGTCTC-3'
exon 6R	5'-CGGGATCCATGTGGGTGGCACCCCTGCCA-3'
exon 7F	5'-GGGCCTAGGCTTCAGTTACTC-3'
exon 7R	5'-CGGGATCCCGTCCGCTGCCTTGCAG-3'

2 结果

2.1 血清学试验结果 见表 2。

表 2 血型血清学试验结果

方法	正定型			反定型		
	抗 A	抗 B	抗 D	A1c	Bc	Oc
微柱凝胶卡式法	-	-	4+	4+	-	-
试管法(室温)	-	1+ ^s	4+	4+	1+ ^w	-
试管法(4℃)	-	1+	4+	4+	1+ ^w	-
不规则抗体筛查	阴性					
直接抗人球蛋白试验	阴性					

2.2 吸收放散试验结果 放散液与标准 B 细胞反应强度为 1+^s,与 O 细胞不反应,表明患者红细胞的放散液中有抗-B 抗体存在,证实其细胞表面存在 B 抗原。

2.3 H 抗原强度比较 患者细胞与标准 B 细胞、标准 O 细胞的抗-H 反应强度依次为:标准 O 细胞(4+)、患者细胞(3+)、标准 B 细胞(2+)。

2.4 基因测序结果 ABO 基因测序结果显示,外显子 6 出现 261 G 缺失与 297 A>G 两个突变位点。外显子 7 出现 526 C>G,646 T>A,657 C>T,681 G>A,703 G>A,771 C>T,796 C>A,803 G>C,905 A>G,930 G>A,1 096 G>A 共 11 个突变位点(图 1)。

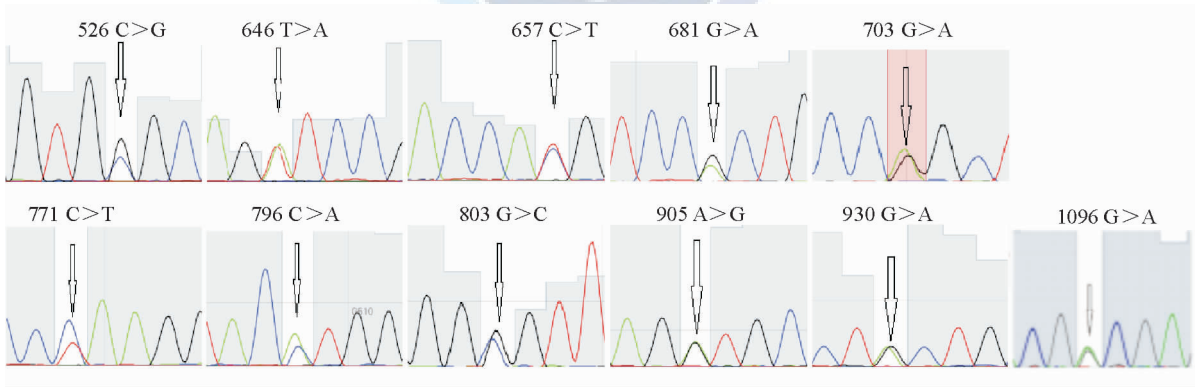


图 1 第 7 号外显子基因测序图

3 讨论

B 亚型是正常 ABO 抗原以外的抗原较弱的亚型或变异型,主要有 B3、Bw、Bel、Bx 等共 9 种亚型^[4]。B 亚型的产生主要是由于半乳糖转移酶第 7 外显子某些碱基发生缺失或者替换,导致半乳糖转移酶活性降低或者改变,从而导致红细胞表面 B 抗原数量减少。B 亚型血清学的主要特征是:与抗 B

发生不凝集或弱凝集,而与抗 AB 凝集,红细胞能吸附和放散抗 B 抗体^[5]。在某些白血病患者中,B 抗原可暂时减弱为弱 B 形式,如同 B 亚型的表现。本例患者排除血液病,被检患者红细胞与标准 A 细胞反应强凝集,与抗 B 反应仅显示较弱的凝集,而与抗 A+B 出现明显凝集反应,表明患者血清中含有正常的抗 A 及较弱的抗 B;红细胞吸收能力弱于正常人的红细胞,放散能力强于正常红细胞,与抗 H

反应显示 O 型类似的强凝集,表明该样本为 B 亚型。

人类 ABO 基因定位于第 9 号染色体上,共有 7 个外显子,多数编码序列位于第 6、7 外显子。B 等位基因的点突变只是在 703、796、803 位高度保守。B 亚型等位基因除具有 703、796、803 位高度保守的点突变外,第 7 外显子还出现新的点突变,如 C502T、G539A、G871A、C873G、C1036G、A1037T、C1054T、G1055A 等^[6-7]。目前发现的 Bx 亚型有 9 种^[8],分别为 Bx01~09,其主要的突变点为 Bx01: 871 G>A; Bx02: 905 A>G; Bx03: 541 T>C; Bx04: 588 C>G; Bx05: 976 G>T; Bx06: 900 G>C; Bx07: 808 T>A; Bx08: 550 G>A; Bx09: 889 G>A。对第 6 和第 7 外显子进行扩增测序,测序结果显示:第 6 外显子出现 261G 缺失与 297 A>G 两个突变位点,表明该标本为 BO 基因杂合。第 7 外显子直接测序出现 526 C>G、646 T>A、657 C>T、681 G>A、703 G>A、771 C>T、796 C>A、803 G>C、905 A>G、930 A>G、1096 G>A,表明该标本为 Bx02 与 O02 的杂合。

Bx 亚型是 ABO 血型中 B 型红细胞上抗原量减少所致,往往容易被误定为 O 型。若 B 亚型患者输入 O 型血液,或者 O 型血液的患者输入了 B 亚型血液,都可能会出现严重的输血反应。由于 Bx 亚型血液中含有较强的抗 B 抗体,这类符合输血指征的患者应该考虑给予输注 AB 型血浆和 O 型洗涤红细胞^[9]。

血型鉴定作为现代输血前检测最关键的步骤之一,其准确的检测结果是确保输血安全的重要保证。当出现正反定型不符时,应该结合血清学及分子生物学方法,正确分析血型,以免漏检亚型,进而确保临床输血安全。

参考文献

- [1] LAZAR T. Human blood groups : chemical and biochemical basis of antigen specificity [J]. Transfusion, 2001, 41 (8):1077.
- [2] SCHENK-BRUNNER H. ABO (H) system [M]. 2nd ed, New York:Springer,2000:118-161.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 中国输血技术操作规程(血站部分) [M]. 天津:科学技术出版社,1997:62-64.
- [4] OLSSON M L, CHESTER M A. Polymorphisms at the ABO locus in subgroup A individuals [J]. Transfusion, 1996, 36 (4):309-313.
- [5] CHESTER M A, OLSSON M L. The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity [J]. Transfus Med Rev, 2001, 15(3):177-200.
- [6] 喻 琼, 吴国光, 梁延连, 等. 一个中国汉族 ABO 血型 B 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.
- [7] 涂源泉, 郭 萍, 罗 臻, 等. Bx 亚型 1 例临床分析 [J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(15):1174.
- [8] 刘 伟, 李代红, 刘 纯. Bx 亚型 1 例的分子生物学鉴定 [J]. 中南大学学报(医学版), 2011, 36(12):1213-1216.
- [9] SIMON T L, SNYDER E L, SOLHEIM B G, et al. Rossi's Principles of Transfusion Medicine [M]. 4th ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2009.

[本文编辑] 廖晓瑜, 贾泽军