

中国南方汉族人群特殊O型个体的血清学特征和分子背景

骆宏, 张润青, 魏玲, 廖志坚, 莫春妍, 王贞, 罗广平
(广州血液中心临床输血研究所, 广东广州 510095)

摘要:【目的】探讨特殊O型个体的血清学特征和分子背景。【方法】收集ABO正反定型结果不一致的O型标本12例,采用试管法进行正反定型、H抗原物质检测、吸收放散等实验;PCR扩增ABO基因编码区外显子1-7,并进行直接测序;对于新发现的突变位点进行克隆测序;利用PDBviewer软件构建GTB酶蛋白突变体的3D模型,并对突变引发的GTB酶结构和功能变化进行分析。【结果】12例标本正反定型均为O型,反定型抗-A减弱的2例、完全消失的3例,抗-B减弱的5例、完全消失的2例;红细胞与抗-H的凝集强度均 $\geq 3+$;所有标本均不能吸收放散抗-A和抗-B;等位基因ABO*O01、ABO*O02、ABO*O06、ABO*O13在该类人群中出现频率较高;发现2例Ael02/O02基因型的个体;1条等位基因所含c.563G > A(p.R188H)为新的突变位点,3D模型表明该突变位于GTB酶的底物结合区,突变引起R188的氢键数目减少。【结论】特殊O型的血清学特征以血浆中的单个抗体减弱或消失为主;ABO*O01、ABO*O02、ABO*O06、ABO*O13是这类血型个体的主要等位基因;新的等位基因ABO*O77可通过影响GTB酶的活性导致B抗原的生成缺失。

关键词: 血型;血清学实验;分子背景;3D模型;糖基转移酶

中图分类号:R341 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2018)04-0521-05

Serological Feature and Molecular Background of Special O Blood Group of Han People in Southern Chinese

LUO Hong, ZHANG Run-qing, WEI Ling, LIAO Zhi-jian, MO Chun-yan, WANG Zhen, LUO Guang-ping
(Clinical Institute of Transfusion, Guangzhou Blood Center, Guangzhou 510095, China)

Abstract: 【Objective】 To study the serological feature and molecular background of special O blood group. 【Methods】 12 blood samples with sero-typing discrepancy in ABO blood group were collected. The forward and reverse grouping test, H antigen determination and adsorption/elution test were performed with tubes method. Exons 1 to 7 of ABO gene were amplified with PCR, then direct sequencing was carried out. Cloning sequencing would be performed if novel mutation had been found. Three-dimensional (3D) mutant glycosyltransferase B (GTB) structure was constructed and analyzed with PDBviewer software. 【Results】 All samples were typed as O group via forward group typing test, however, discrepancies exist between forward and reverse group typing test. H antigen could be detected and the agglutination strength was great than or equal to 3+. Negative reactions were observed in adsorption/elution test in all samples. Sequencing results indicated that ABO*O01, ABO*O02, ABO*O06, ABO*O13 were the main alleles in these individuals and special genotype Ael02/O02 was found in two people, novel mutation c.563G > A (p.R188H) in exon 7 was found in one allele. 3D models analysis of GTB showed that the novel mutation located in the combination area for substrate and could decrease the hydrogen bonds of R188. 【Conclusion】 Anti-A or anti-B in the plasma becomes to be weak or lacking is the serological feature of the special O group; ABO*O01, ABO*O02, ABO*O06, ABO*O13 are the main alleles of this special group; Mutation in ABO*O77 may decrease the activity of GTB, leading to the lack of B antigen.

Key words: blood group; serological test; molecular background; three-dimensional model; glycosyltransferase

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(4): 521-525]

收稿日期: 2017-12-28

基金项目: 广东省医学科研基金项目(A2017568); 广州市医学重点实验室项目

作者简介: 骆宏, 副主任技师, 研究方向: 临床输血与血型的分子遗传机制, E-mail: tigerluo88@126.com

在临床输血实践工作中,ABO血型正、反定型不一致容易造成实际工作的困惑,从而增加输血风险。因此,正确的血型鉴定对于保障输血安全有着重要意义。掌握正、反定型不一致标本的血清学特点和分子背景,是疑难血型得以正确鉴定的基础。近期,我们对临床实践中抗体减弱/消失导致正、反定型不一致的12例O型个体进行了初步研究,并发现1例新的ABO等位基因,现将这类特殊O型的血清学特点和分子生物学背景报告如下。

1 材料与方 法

1.1 研究资料

2016年3月至2017年4月总计收集单侧抗体减弱/消失导致正反定型不一致的O型个体标本12例,含男性7例,女性5例,年龄15~72岁。患者5例,健康献血自愿者7例。

1.2 标本采集

入选者手臂肘正中静脉区皮肤消毒后,采血针各抽取3 mL血液至2支EDTA抗凝管中,分别用于常规血清学实验和分子生物学实验。

1.3 仪器和方法

1.3.1 试剂和仪器 单克隆抗-A、抗-B血型试剂(上海血液生物医药公司),抗-H试剂(上海血液生物医药公司),人源抗-A和抗-B血清(本实验

室自制),不规则抗体筛选细胞(本实验室自制),人ABO血型反定型试剂红细胞(上海血液生物医药公司);微柱凝胶检测卡(西班牙Griffol公司),DNA抽提试剂盒(KURABO, Japan),Premix PrimeSTAR HS(大连宝生物公司),BigDye Terminator v3.1循环测序试剂盒(美国Applied Biosystems公司);pMD[®]18-T Vector;KA-2200血清学专用离心机(日本久保田公司),ABI9700型PCR仪(美国Applied Biosystems公司),ABI3130xl自动基因测序分析仪(美国Applied Biosystems公司)。

1.3.2 常规血清学实验 受检者的ABO血型正反定型、H抗原物质检测均采用试管法进行;不规则抗体筛选实验采用微柱凝胶卡法进行;采用人源血清进行吸收实验、热放散方法对吸收实验后的红细胞进行放散。相关操作按美国血库协会操作手册进行^[1]。

1.3.3 标本DNA提取 DNA提取试剂盒抽提入选者的基因组DNA,按照试剂盒说明书进行。

1.3.4 ABO基因第1-7外显子扩增和直接测序 扩增引物和测序引物见表1,外显子1、外显子2-7扩增反应体系和条件参照相关文献进行^[2-4];其中外显子2-5的扩增体系稍作优化:总体积为50 μ L,含有2 \times Premix 25 μ L,DNA 30~150 ng,各引物的终浓度为0.5 μ mol/L,退火温度为64 $^{\circ}$ C。PCR产物纯化后进行测序PCR,ABI PRISM 3130xl测序仪进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用DNA Star

表1 ABO基因外显子1-7扩增及测序引物

Table 1 Information of primer pairs used for amplification and sequencing exons 1 to 7 of ABO gene

Primer	Sequence(5'→3')	Objective region	Fragment size/bp
MO-12F	GGCGCCGTCCTTCCTAG	promoter/exon1 ^[2]	267
MO-12R	CCTGCGGTAGCGGCTCCT		
ABO-E2-3-F	GCAGGTGAGAGAAGGAGGGTGAGTGATGTG	exon2-3 ^[3]	941
ABO-E2-3-R	CAGCATGGATGCTCCACCTGCTCTTCCTG		
ABO-E4-5-F	TCCTGCTCCTAGACTAAACTTCATCTCCTGTG	exon4-5 ^[3]	1 880
ABO-E4-5-R	GAACAGCCCCTTGAGCTGCGTTCAGTTTCA		
ABO-E6-7-F	GGGTTTGTTCCTATCTCTTTGC	exon6-7 ^[4]	2 227
ABO-E6-7-R	ACAACAGGACGGACAAAGGAAACAG		
ABO-E6-SeqF	TCGCATTTGCCTCTGGTTGG	exon6 ^[1]	430
ABO-E6-SeqR	CTACCCTCTGGGAGGACAAG		
ABO-E7-SeqF	CTGCTCTAAGCCTTCCAATG	exon7 ^[2]	890
ABO-E7-SeqR	AAGGAAACAGAGTTTACCCG		

1), 2) primers for direct sequencing.

软件进行序列拼接和比对。

1.3.5 ABO 基因外显子突变位点的克隆测序分析 直接测序中新发现的等位基因,用扩增引物对突变位点所在外显子进行扩增,产物导入 pMD[®] 18-T Vector 进行 TA 克隆,挑取 10 个阳性菌落至 Luria-Bertani 培养基中培养后,提取质粒 DNA,对 ABO 基因的单倍型进行测序分析。

1.3.6 糖基转移酶 B (GTB) 蛋白位点突变后的 3D 模型构建和分析 以 PDB 库中的人类 GTB 酶 (PDB ID: 2RJ8) 的 3D 分子结构为模型基础 (即野生型),对新发现的突变位点 c.563G > A (p. R188H) 所导致的 GTB 酶蛋白突变体采用 Swiss PDBViewer 软件系统 (Version 4.0) 进行 3D 模型的构建和相关分析。

2 结果

2.1 血清学和基因分型实验结果

12 例血液标本的 ABO 正、反定型均不一致:所有标本正定型均为 O 型,反定型结果中,抗-A 减弱的 2 例,完全消失的 3 例;抗-B 减弱的 5 例,完全消失的 2 例。12 例受检标本的红细胞均能检出 H 物质,不能吸收放散抗-A 和抗-B,不规则抗体筛选实验阴性。基因型检测中,O01/O01 型 3 例、Ael02/O02 型 2 例、O02/O06、O01/O06、O01/O73、O01/O02、O01/O13、O04/O13、O68/O77 (novel) 各 1 例 (表 2)。

2.2 新等位基因直接测序和克隆测序结果

ABO 基因外显子 1-7 直接测序结果发现 1 条新的等位基因突变位点:297A>G、526C>G、563G>A、657C>T、703G>A、796C>A、803G>C、930G>A,其中外显子 7 的 c.563G>A 为新的突变位点,推断该例受检者基因型为 O68/Onovel 型,克隆测序结果证实了上述基因型 (图 1)。

2.3 新等位基因所致 GTB 蛋白突变体的 3D 蛋白模型分析

GTB 野生型 188 位氨基酸为 Arg (R),发生 563 G > A 突变后,188 位的氨基酸则突变为 His (H)。野生型 R188 的氨基酸侧链结构可与 S185、M191、I192、D211、D302 位的氨基酸形成氢键,突变型的 H188 位氨基酸只与 M191、I192 形成氢键,不能与上述其他 3 个位置的氨基酸形成氢键 (图 2)。

表 2 12 例 ABO 血型正反定型不符标本的血清学定型和基因分型

Table 2 Serotyping and genotyping results of 12 samples with discrepancy in forward and reverse typing for ABO blood group

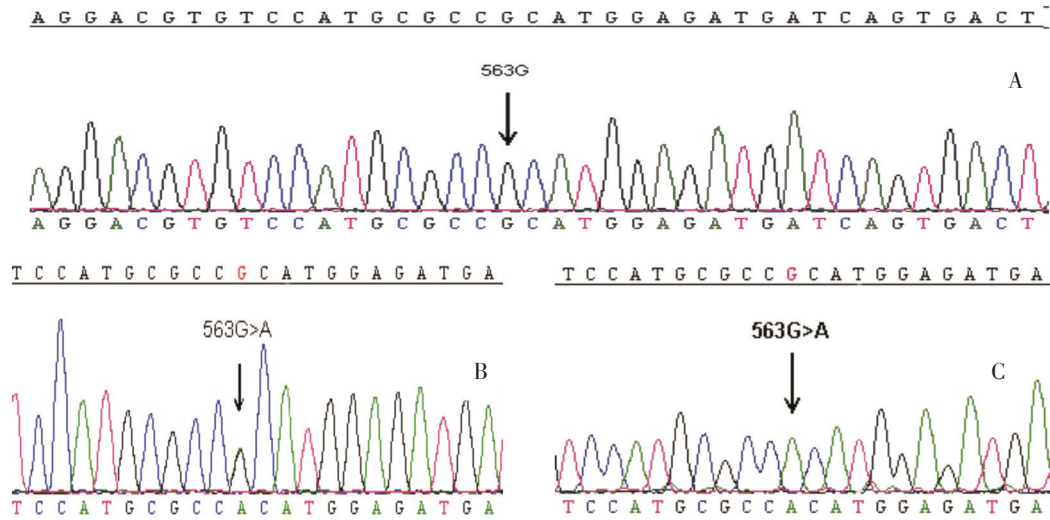
Sample	Forward typing		AB-H	Reverse typing			Genotype
	AB-A	AB-B		Alc	Bc	Oc	
1	0	0	4+	1+	4+	0	Ael02/O02
2	0	0	3+	4+	1+	0	O02/O06
3	0	0	4+	0	4+	0	O01/O06
4	0	0	3+	0	3+	0	O01/O73
5	0	0	3+	4+	1+	0	O68/O77 (novel)
6	0	0	2+	4+	0	0	O01/O02
7	0	0	3+	3+	1+	0	O01/O01
8	0	0	3+	2+	4+	0	Ael02/O02
9	0	0	4+	0	4+	0	O04/O13
10	0	0	3+	3+	w+	0	O01/O01
11	0	0	4+	3+	0	0	O01/O13
12	0	0	3+	3+	1+	0	O01/O01

AB: antibody

3 讨论

日常的临床输血实践中,特殊的 O 型血主要表现在正、反定型不一致。因此,掌握该类特殊 O 型的血清学特点是正确鉴定血型的基础。这类特殊 O 型表现为:正定型 O 型,反定型则可以因为血清中抗体减弱或消失的情况而表现为 A 型、B 型或 AB 型;红细胞不具备吸收放散抗-A 和抗-B 的能力;含有较多的 H 物质;反定型实验的结果在 4 °C 增强无效或不明显。用于这类 O 型检测的血清学方法主要有:常规正反定型实验、红细胞 H 抗原检测实验、吸收放散实验、降温增强实验等。其中,红细胞 H 抗原的检测和吸收放散实验较为重要:H 抗原物质的检测可以避免将类孟买和孟买型误判为特殊 O 型;吸收放散实验可以避免将亚型误判为特殊 O 型。本研究中的 12 例标本,均体现了上述血清学特点:ABO 血型正反定型不符、与抗-H 的凝集强度均 ≥ 3+、不能吸收放散抗-A 和抗-B;血浆中抗-A 减弱的 2 例,完全消失的 3 例;抗-B 减弱的 5 例,完全消失的 2 例。依据这些特点和上述提及的血清学方法,所有入选标本均得到正确鉴定。

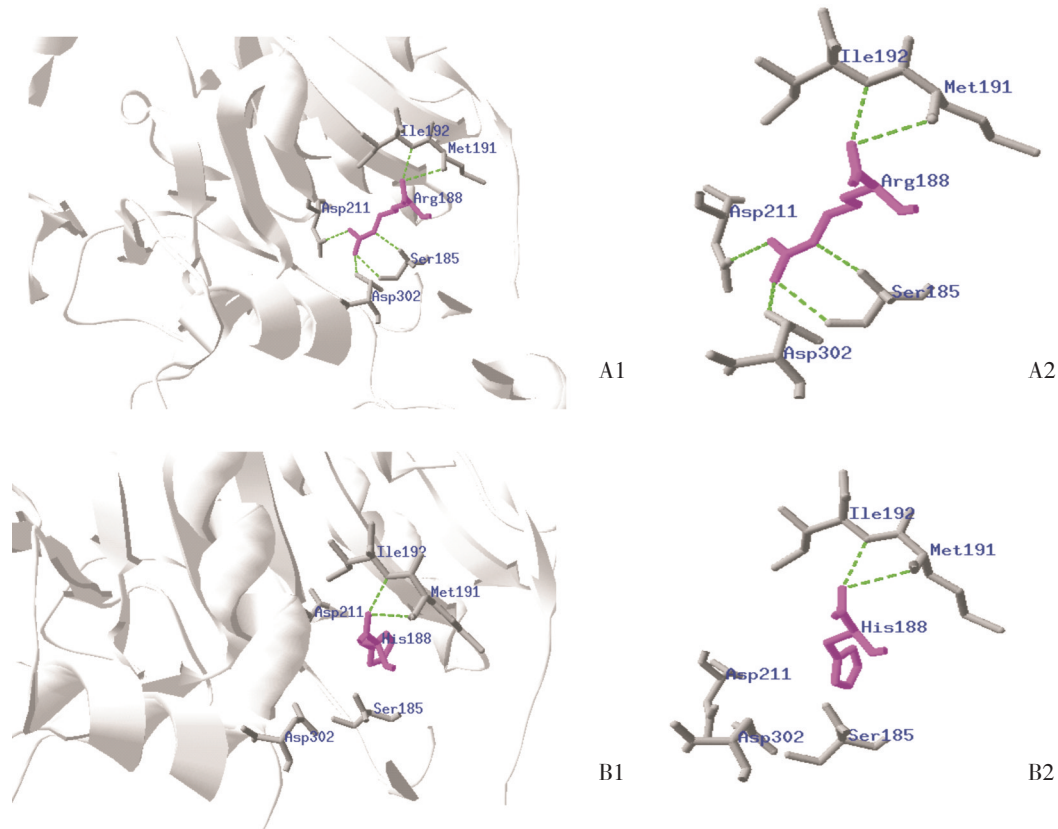
ABO 血型基因的编码区包含 7 个外显子,其



A: c.563G in ABO*B101 allele; B: direct sequencing result of the novel allele indicating the heterozygous mutation at c.563G > A; C: cloning sequencing result of c.563G > A of the novel allele.

图1 新等位基因突变位点(c.563G > A)测序图

Fig.1 Sequencing results of mutation point (c.563G > A) of the novel allele



A1: Structure of the wild type GTB(PDB ID, 2RJ8) and hydrogen bonds of the residue R188. A2: Part enlarge structure for showing hydrogen bonds, the side chain of R188 can form six hydrogen bonds with five surrounding residues (S185, M191, I192, D211, D302) indicated by the green dotted lines. B1: Structure of the R188H mutant type GTB and hydrogen bonds of H188. A2: Part enlarge structure for showing hydrogen bonds, the side chain of residue H188 can form only one hydrogen bond (indicated by the green dotted lines with residue M191 and I192 respectively).

图2 GTB酶野生型(PDB ID:2RJ8)和突变体的3D模型

Fig.2 Three-dimensional models of the wild type GTB (PDB ID, 2RJ8) and the mutant type GTB

中外显子6和7编码了糖基转移酶大多数的氨基酸序列^[5]。通过扩增ABO基因的外显子1-7,并将测序后突变位点入库比对,可以得出受检标本的基因型,也可以鉴定新的等位基因。本研究中,12例受检标本的基因型分布如下:O01/O01型3例、Ael02/O02型2例、O02/O06、O01/O06、O01/O73、O01/O02、O01/O13、O04/O13、O68/O77(novel)型各1例。从中可以看出,等位基因O01、O02、O06、O13在该类人群中出现概率较高。检出1例新的等位基因,该等位基因在ABO*B101的基础上,发生c.563G>A。结合克隆测序结果,该个体的基因型为O68/O novel。新的等位基因资料已递交至GenBank(序列号:KM892859),并被Blood Group Antigen Gene Mutation Database命名为ABO*O77。了解这类特殊O型个体的分子背景资料,有利于用分子生物学方法对其正确鉴定,避免误定型的发生。

构建蛋白结构的3D模型,有利于我们理解氨基酸突变对酶功能的影响^[6-7]。本研究中鉴定的新等位基因ABO*O77与ABO*B101仅有1个位点的差异,即c.563G>A(p.R188H)的变异,受检者基因型为ABO*O68/O77。因此,我们以糖基转移酶B(GTB酶)的3D分子结构(PDB ID: 2RJ8)作为

野生型模型,在此基础上,利用PDBviewer软件构建了ABO*O77编码蛋白的3D模型(突变型)。从图2可以看出,野生型R188的侧链结构可与S185、M191、I192、D211、D302分别形成氢键,而突变为H188后,只与191、192位的氨基酸形成氢键,氢键数量由6个减为2个,极大的减弱了H188与周围这些氨基酸的相互作用。R188H位于该GTB酶的底物结合区域,突变引起的氢键减少和离子键破坏,导致突变型蛋白的稳定性降低、GTB酶的催化活性下降、底物与酶的结合受到影响,从而导致相应血型抗原无法生成,故该个体最终表现为O型。

值得注意的是,在本研究中还发现了2例基因型为Ael02/O02的O表型个体。理论上分析,Ael02应当表达A抗原,表型为Ael。但事实上,这2例标本均不能吸收放散抗-A,表型为O型。国外曾有类似报道^[7-8]:Ax05/O01基因型的个体理论上其表现型应为Ax,但实际上却是O型。研究者推断,等位基因之间的片段杂交,可以导致A抗原的弱表达或不表达,呈现为何种表型有赖于O等位基因与另一等位基因杂交的“反式”位置。本研究中的2例是否也是这种原因所致,则有待于后续收集更多类似标本并进行深入研究探讨。

参考文献

- [1] Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, et al. Technical manual [M]. 18th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks (AABB), 2014: 319-324.
- [2] 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(19): 1585-1593.
- [3] Sun CF, Chen DP, Tseng CP, et al. Identification of a novel A1v-O1v hybrid allele with G829A mutation in a chimeric individual of Ael~Bel phenotype [J]. Transfusion, 2006, 46(5): 780-789.
- [4] 骆宏,林健伟,林树德,等.类孟买血型两例的分子遗传机制研究[J].中华检验医学杂志, 2012, 35(9): 815-819.
Luo H, Lin JW, Lin SD, et al. Study on molecular genetic mechanism of para-bombay phenotype in two individuals [J]. Chin J Lab Med, 2012, 35(9): 815-819.
- [5] Daniels G. Human blood groups [M]. 3rd ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2013:21.
- [6] Lee SY, Ihm C, Shin DJ, et al. The p.R168Q mutation is associated with the Bw phenotype and a predicted decrease in the stability of the resulting ABO glycosyltransferase [J]. Transfusion, 2014, 54(5): 1298-1304.
- [7] Yazer MH, Hosseini-Maa B, Olsson ML. Blood grouping discrepancies between ABO genotype and phenotype caused by O alleles [J]. Curr Opin Hematol, 2008, 15(6): 618-624.
- [8] Olsson ML, Michalewska B, Hellberg A, et al. A clue to the basis of allelic enhancement: Occurrence of the Ax subgroup in the offspring of blood group O parents [J]. Transfusion Med, 2005, 15(5): 435-442.

(编辑 王晓鹰)