

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.09.007

α -1,3-N-乙酰半乳糖胺转移酶 p. Trp181Cys 突变导致 Aw 亚型*

俞霞¹, 吴茂锋^{2△}, 马淑群¹, 施明秀¹

1. 福建医科大学附属福清市医院输血科, 福建福清 350300; 2. 广州医科大学附属第六医院/广东省清远市人民医院药物 I 期临床研究室, 广东清远 511518

摘要:目的 探讨 Aw 亚型的血清学特征和分子生物学机制。方法 采用标准血型血清学方法检测先证者及其家系(父亲、母亲、女儿、儿子)ABO 血型, 利用聚合酶链反应(PCR)特异性序列引物对先证者及其父亲进行 ABO 基因初步分型, 再使用 PCR 方法扩增 ABO 基因 7 个外显子的全部编码序列并进行测序。结果 该家系成员中有 2 例为 Aw 亚型, 其红细胞含有弱 A 抗原, 血清中含有抗 A 和抗 B, 基因型为 Aw. new/O01; 2 例为 B 亚型; 1 例为 O 亚型。ABO 血型基因直接测序分析显示先证者及其父亲存在 c. 467C>T、c. 543G>C 杂合变异和 c. 261delG 缺失。第 7 外显子发生 543 位碱基 G>C 突变, 导致第 181 位氨基酸由色氨酸被半胱氨酸替换, 该突变极其罕见。结论 α -1,3-N-乙酰半乳糖胺转移酶基因第 543 位 G>C 突变可能引起酶活性下降, 从而导致 A 抗原表达减弱, 该研究进一步证实该突变具备遗传基础, 在家系中能够稳定遗传。

关键词: ABO 血型; A 亚型; 等位基因

中图分类号: R457.1+1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)09-1210-04

Aw subtype formation by α -1,3-N-acetylgalactosamine transferase p. Trp181Cys mutation*

YU Xia¹, WU Maofeng^{2△}, MA Shuqun¹, SHI Mingxiu¹

1. Department of Blood Transfusion, Fuqing City Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuqing, Fujian 350300, China; 2. Phase I Clinical Unit, the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University/Guangdong Qingyuan People's Hospital, Qingyuan, Guangdong 511518, China

Abstract: Objective To explore serological characteristics and molecular mechanism of Aw subtype.

Methods The ABO antigen and serum antibody of the proband and her family members (her father, mother, son and daughter) were detected by standard serological method. The ABO gene of the proband and her father were detected by polymerase chain reaction (PCR) method using sequence specific primers. Exons 1 to 7 of the ABO gene was amplified and sequenced with PCR method. **Results** Among the family members, 2 cases were Aw subtype, weakened A antigen was detected on red blood cells of them, both anti-A and anti-B were detected in the serum, and their genotypes were Aw. new/O01; 2 cases were B type; 1 case was O type. Direct sequencing analysis of ABO blood type gene showed that the proband and her father were heterozygous for c. 467C>T, c. 543G>C, in addition with a c. 261G deletion. The mutation c. 543G>C in exon 7, which caused amino acid from tryptophan to cysteine at position 181. The mutation is extremely rare. **Conclusion** The mutation c. 543G>C of α -1,3-N-acetylgalactosamine transferase gene may reduce enzyme activity and the expression of A antigen, and the study further confirms that the mutation can be stably inherited in the family.

Key words: ABO blood group; A subtype; allele

ABO 血型系统是人类最重要的红细胞血型系统, 在临床输血、器官移植等方面发挥着重要作用。A101 和 B101 是 ABO 基因的 2 个等位基因, 其中 A101 编码 α -1,3-N-乙酰半乳糖胺转移酶(GTA), GTA 能转移一个 N-乙酰氨基半乳糖(GalNAc)到 H 前体糖蛋白, 从而形成 A 抗原; B101 编码 α -1,3-D-半乳糖基转移酶(GTB), GTB 能转移一个 D-半乳糖到 H 前体糖蛋白, 从而形成 B 抗原^[1]。临床上有时会遇到

到血型正反定型不一致的情况, 而 ABO 亚型是导致血型鉴定困难的重要原因之一。ABO 亚型分类通常依据其血清学特征, 其中 A 亚型可分为 A2、A3、Ax、Am、Ael、Aend 等, A 亚型是 A 抗原减弱的亚型或变异型, 主要是由于 ABO 基因突变导致糖基转移酶活性降低, 从而导致 A 抗原合成减少^[2]。本研究对一个 Aw 亚型家系进行血清学和分子生物学研究, 现报道如下。

* 基金项目: 广东省清远市人民医院医学科研项目(20190208)。

作者简介: 俞霞, 女, 主管技师, 主要从事临床输血与血液免疫学研究。△ 通信作者, E-mail: wmf695@163.com。

1 资料与方法

1.1 一般资料 先证者,女,42 岁,无输血史,无血液系统疾病等病史,因患子宫肌瘤在福清市医院(以下简称本院)进行手术,术前进行血型检测和手术备血时,发现其血型正反定型不一致(A 抗原减弱),怀疑是 A 亚型,患者自述曾检测过血型为 O 型。本研究经患者及其家属知情同意后,采集先证者及其父亲、母亲、女儿、儿子共 5 人的血液标本进行检测分析。本研究获得医院医学伦理委员会批准[K(2022)38 号]。

1.2 仪器与试剂 离心机(江苏贝索生物工程有限公司,型号:BaSO2020-2);卡式离心机(长春博研科学仪器有限责任公司,型号:TD-A);聚合酶链反应(PCR)仪(杭州博日科技有限公司,型号:LifeECO);电泳仪(北京君意东方,型号:JY300C)。单克隆抗-A、抗-B、抗-H、抗-A1(上海血液生物医药责任有限公司,批号:20210303、20210917、20220221);抗-AB(DIAGAST,批号:840000);抗体筛选红细胞试剂(上海血液生物医药责任有限公司,批号:20227041);ABO 红细胞(本院实验室自制);ABO、Rh 血型定型微柱凝胶卡(长春博迅生物有限公司,批号:20220207);DNA 提取试剂盒、人类红细胞 ABO 血型基因分型(天津秀鹏生物技术有限公司)。所有试剂均在有效期内使用。

1.3 方法

1.3.1 血型血清学鉴定 ABO 正反定型、吸收放散试验、抗体筛查试验、抗 H 试验、直接抗人球蛋白试验和唾液 ABH 物质检测均严格按照《全国临床检验操作规程》^[3] 操作和相应试剂使用说明书进行。(1) ABO 正反定型试验(试管法):正定型为 3% 患者红细胞悬液和抗 A、抗 B、抗 A1、抗 AB 试剂反应检测抗原;反定型为患者血清和 ABO 反定型红细胞反应检测抗体,并做自身对照;(2)吸收放散试验:单克隆抗 A 试剂与患者红细胞混合 4℃ 吸收 1 h,56℃ 热放散 10 min,放散液与 ABO 反定型红细胞反应检测抗原;

(3)抗体筛查试验:在抗人球蛋白卡中分别加入 50 μL 患者血清与 50 μL 0.5%~0.8% 标准 O 型红细胞悬液,孵育 15 min 后离心观察结果;(4)抗 H 试验:在试管中加入 50 μL 患者 3% 红细胞悬液和 50 μL 抗 H 试剂,离心观察凝集情况,并做健康成人 B 细胞、O 细胞和 A 细胞对照;(5)直接抗人球蛋白试验(微柱法):在抗人球蛋白卡中加入 50 μL 患者 0.5%~0.8% 红细胞悬液,离心后观察结果;(6)唾液试验:患者唾液分别与标准化的抗 A、抗 B、抗 H 在常温下中和 8~10 min,再加入对应的 ABO 反定型红细胞,混匀后室温放置 30~60 min,离心后观察结果,并做盐水对照。

1.3.2 DNA 提取 严格按照基因组 DNA 试剂盒说明书进行血液 DNA 的提取。

1.3.3 ABO 基因扩增和测序 PCR 扩增的反应条件为:95℃ 预变性 120 s,95℃ 变性 20 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物使用含有 GelRed 的 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,150 V 电泳 20 min,紫外透射仪下观察目的片段的扩增和大小,并对酶切纯化后的 PCR 产物进行 ABO 基因第 1~7 外显子测序和分析。

1.3.4 序列比对和分析 应用 Chromas Pro 软件和 ISBT 网站公布的序列进行比对和分析测序结果,确定基因突变位置和类型。

1.3.5 突变基因功能预测 应用 Polyphen2 软件(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)对突变引起的蛋白质功能和结构改变进行预测分析。

2 结果

2.1 ABO 血清学检测结果

2.1.1 ABO 正反定型、吸收放散和唾液试验结果 先证者及其父亲红细胞表面存在 A 抗原减弱,血清中存在不规则抗 A 抗体,放散试验均检出 A 抗原,先证者及其父亲血清学血型表现为 Aw 型,先证者母亲血清学血型表现为 O 型,先证者女儿和儿子血清学血型表现为 B 型。见表 1。

表 1 ABO 血型血清学检测结果

受检者	抗 A	抗 B	抗 A1	抗 A+B	Ac	Bc	Oc	自身 c	吸收放散	唾液 ABH 物质检测	表型
先证者	w	0	0	w	1+	4+	0	0	A	H	Aw 型
先证者父亲	w	0	0	w	1+	3+	0	0	A	/	Aw 型
先证者母亲	0	0	/	/	3+	3+	0	0	/	/	O 型
先证者女儿	0	4+	/	/	4+	0	0	0	/	/	B 型
先证者儿子	0	4+	/	/	4+	0	0	0	/	/	B 型

注:1+~4+表示凝集强度;0 表示无凝集;w 表示弱凝集;/表示未检测。

2.1.2 与抗-H 血清试剂的反应 以健康成人 O 细胞、B 细胞、A 细胞为对照,结果显示该患者及其父亲红细胞与抗 H 反应凝集强度(4+)与 O 细胞凝集强度(4+)相当,明显强于 B 细胞(3+)和 A 细胞(1+),

证实先证者及其父亲血液标本中含有大量的 H 抗原。**2.1.3 不规则抗体筛查和直接抗人球蛋白试验** 先证者及其父亲抗体筛查结果均为阴性,直接抗人球蛋白试验阴性,自身试验阴性,未发现 ABO 以外的

抗体。

2.2 DNA 测序分析 测序结果显示先证者及其父亲 ABO 基因均存在 c. 467C>T、c. 543G>C 杂合变异和 c. 261delG 缺失,先证者及其父亲的 ABO 基因在 A102/O01 的基础上,第 7 外显子上的 543 号碱基发生了 G>C 的杂合突变,导致第 181 位氨基酸由色氨酸变成半胱氨酸。该突变在先证者及其父亲两代人中均检测到,说明该突变可以在家系中稳定遗传。目

前在 ISBT 数据库尚未查到该突变,基因型可描述为 Aw. new/O01。见图 1、2。

2.3 Polyphen2 软件预测结果 Polyphen2 软件对 c. 543G>C 碱基突变, p. Trp181Cys 替换引起所编码的蛋白质功能变化的预测结果为“很可能有害”。Polyphen2 软件预测该突变分值为 0.999,灵敏度为 0.09,特异度为 0.99。见图 3。

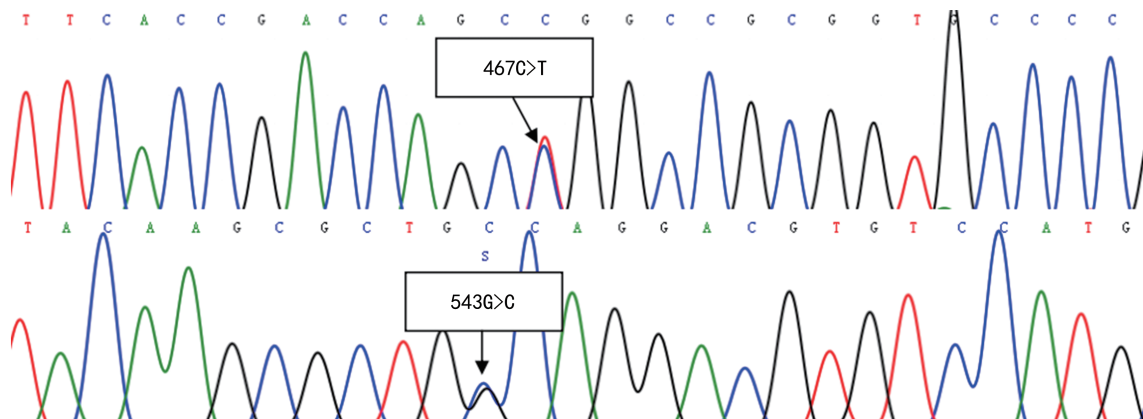


图 1 先证者 ABO 基因第 7 外显子测序结果

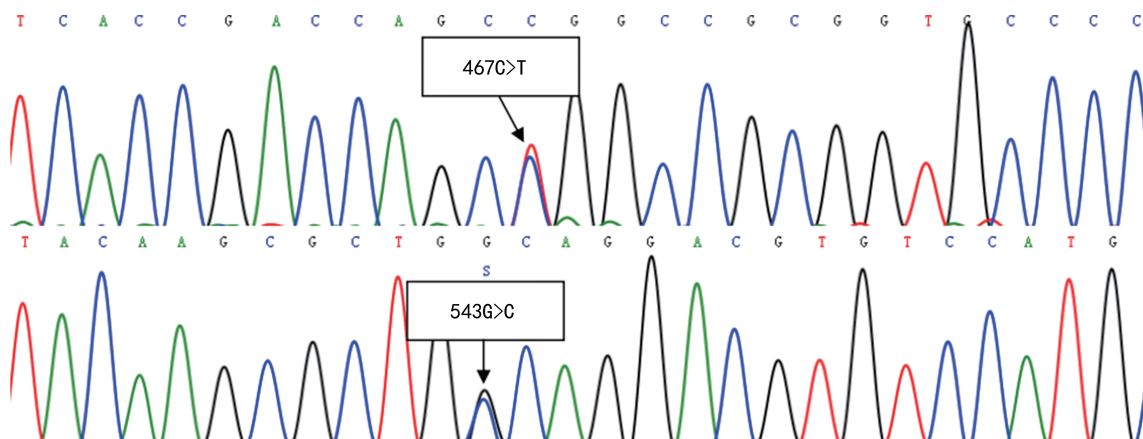


图 2 先证者父亲 ABO 基因第 7 外显子测序结果

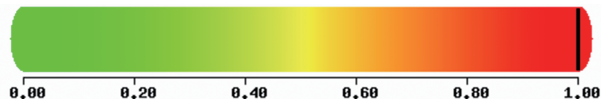


图 3 p. Trp181Cys 替换引起蛋白功能变化的预测结果

3 讨 论

ABO 基因位于第 9 条染色体(9q34.1~34.2),全长近 19.5 kb,编码 354 个氨基酸,基因的核苷酸序列变异可能导致抗原的氨基酸序列发生改变,同时也改变了抗原性^[4],产生不同的 ABO 亚型。ABO 基因编码区有 7 个外显子,外显子编码长度为 28~688 bp,其中第 6 和第 7 外显子占全部编码序列的 77%,共编码 91%的 ABO 糖基转移酶催化活性区域,既往报道的 ABO 亚型相关等位基因的突变大多发生在该区域^[5-6]。目前大部分 ABO 亚型的分子机制已经被阐明,主要包括碱基变异、缺失、插入、基因重组或交

换、启动子区域 CpG 甲基化等^[7-9]。

目前,大部分 ABO 亚型可用现有的分类法分类,但也会遇到和现有 ABO 亚型血清学特点不完全相符的情况,此时可用“Aw”和“Bw”来表示不符合已知亚型标准的其他 ABO 亚型^[10]。本例先证者标本检测出弱 A 抗原,同时血清中也存在较弱的抗 A 抗体,其 H 抗原强度明显增强,抗体筛查实验阴性,可确定反定型中与 A 细胞反应较弱的抗体不是同种抗体,而是不规则抗 A 抗体,其血清学特征与现有 ABO 亚型血清学特点不完全相符,因此血清学表现可判定为 Aw 型。笔者对先证者及其父亲标本进一步做基因测序分析,测序结果表明先证者及其父亲 ABO 基因第 7 外显子均存在 c. 543G>C 变异,说明该基因突变可稳定遗传,而非自然突变。结合该家系其他成员血清学结果,可推测该突变位于 A 等位基因上。467C> T

突变在中国人群中很常见,主要见于 A1.02 等位基因,该突变不影响酶的活性^[11],所以导致该例 A 抗原减弱的根本原因仅与 c.543G>C 突变有关,该突变导致多肽链第 181 位色氨酸(Trp)被半胱氨酸(Cys)替换。此外,543 位核苷酸密码子位于第 3 位,由于密码子的摆动性和简并性,第 3 位碱基的变异通常不会造成错义突变,而 Trp 只有一个密码子,所以 c.543G>C 突变最终导致氨基酸的改变。Trp 为芳香族杂环,非极性疏水氨基酸,而半胱氨酸是一个极性含巯基的氨基酸,氨基酸改变可能打破电荷平衡,破坏 GTA 的局部构象,进而影响该酶活性,从而导致 A 抗原表达减弱。

值得注意的是,c.543G>C 突变十分罕见,由 YANG 等^[12]首次进行报道,目前国内外鲜有报道^[12-13],且均来自中国人群,既往报道均未进行家系调查,无法证实该突变是否具备遗传基础。向东等^[10]报道显示,亚型必须具有明确的血清学特征和遗传基础,因年龄、妊娠、疾病等不可遗传的因素造成的血型改变不能定义为亚型;同样虽然具有基因改变但不影响血清学特征的血型也不能称为亚型。本研究通过家系调查,进一步证实该基因突变能在家系中稳定遗传,而非体细胞突变、疾病等原因造成。本例先证者及其父亲血型的血清学特征和基因改变符合亚型定义。此外,本研究中先证者与抗 A 和抗 AB 呈现较弱的凝集反应,与孔永奎等^[13]报道相一致,而与 YANG 等^[12]报道的先证者与抗 A 和抗 AB 呈现 2+mf 结果不一致,其中抗 AB 实验结果差异可能由于所使用的抗 AB 试剂抗体效价及所针对的抗原表位不同所致,血清学实验结果差异说明了同一基因型可存在不同的血清学表现,同时也反映了血型血清学方法无法精准鉴定血型,该罕见 Aw 亚型的血清学特点将在以后更多的病例被发现时逐步阐明。通过 Polyphen2 软件预测 p.Trp181Cys 替换能够引起蛋白质结构和功能的改变。既往报道的 ABO * BW.28 和 ABO * AW.33 也与 181 位氨基酸的改变有关^[14-15],不同的是 ABO * BW.28 等位基因存在 c.541T>C(p.Trp181Arg),ABO * AW.33 等位基因存在 c.543G>T((p.Trp181Cys)。此外 Trp181 位于氨基酸的无序环内(残基 179~194)^[16],可见 181 位点对 GTA 和 GTB 转移酶活性影响的重要性。

综上所述,联合血型血清学检测和分子生物学检测,有利于 ABO 亚型准确鉴定,条件允许情况下应开展家系调查,为临床输血安全提供有力保障。

参考文献

[1] 谷兰,刘凤霞.罕见 B_(el)01 亚型的血清学和基因分析

[J].中国免疫学杂志,2022,38(04):453-456.

- [2] 杰夫·丹尼尔,朱自严.人类血型[M].2版.北京:科学出版社,2007:36-41.
- [3] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].4版.北京:人民卫生出版社,2015:118-139.
- [4] 杨成民,刘进,赵桐茂.免疫血液学基础[M].北京:人民卫生出版社,2017:50-72.
- [5] 赵桐茂.基因分型预测 ABO 亚型的局限性[J].临床输血与检验,2018,20(2):113-116.
- [6] JIAO L X, YU J H, YU X L, et al. Gene analysis of two cases with CisAB/B blood subgroup[J]. Transfus Apher Sci, 2017, 56(2): 223-225.
- [7] PATNAIK S K, HELMBERG W, BLUMENFELD OO, BGMUT; NCBI dbRBC database of allelic variations of genes encoding antigens of blood group systems[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40: 1023-1029.
- [8] NAKAJIMA T, SANO R, TAKAHASHI Y, et al. Mutation of the GATA site in the erythroid cell-specific regulatory element of the ABO gene in a Bm subgroup individual[J]. Transfusion, 2013, 53(11 Suppl 2): 2917-2927.
- [9] SANO R, NAKAJIMA T, TAKAHASHI K, et al. Expression of ABO blood-group genes is dependent upon an erythroid cell-specific regulatory element that is deleted in persons with the B(m) phenotype[J]. Blood, 2012, 119(22): 5301-5310.
- [10] 向东. ABO 亚型的检测[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(8): 577-580.
- [11] OGASAWARA K, YABE R, UCHIKAWA M, et al. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system[J]. Blood, 1996, 88(7): 2732-2737.
- [12] YANG X, MA S, XIE H, et al. c.543G>C mutation in ABO * A. 1.02 allele responsible for a weak A phenotype [J]. Transfusion, 2019, 59(8): 2756-2757.
- [13] 孔永奎,蔡晓红,王莉,等.一例 ABO 血型 Aw33 亚型新等位基因的分子生物学鉴定[J].中华医学遗传学杂志, 2020, 37(5): 570-572.
- [14] CAI X H, JIN S, LIU X, et al. Molecular genetic analysis for the Bx subgroup revealing two novel alleles in the ABO gene[J]. Transfusion, 2008, 48(11): 2442-2447.
- [15] DENG Z H, YU Q, WU G G, et al. Molecular genetic analysis for Ax phenotype of the ABO blood group system in Chinese[J]. Vox Sang, 2005, 89(4): 251-256.
- [16] SELTSAM A, HALLENSLEBEN M, KOLLMANN A, et al. The nature of diversity and diversification at the ABO locus[J]. Blood, 2003, 102(8): 3035-3042.

(收稿日期:2022-09-26 修回日期:2023-01-03)