

ABO 亚型案例报道专刊——A 亚 2019 年 10 月

编者导读:

ABO 血型系统作为人类血型系统中最重要的一個紅細胞血型系統，在精準治療的今天，有必要針對編碼 ABO 血型的基因以及抗原進一步了解及認知，進一步指導臨床應用。針對 A 亞型，中國人群中最常見的為 A2 亞型，當然還有 A3、Ax 及 Ael 等，這些亞型產生抗 A 抗體多有不同特徵，也許在未來精準輸血、新生兒溶血病診斷、免疫力低下紊亂患者血型鑑定等诸多臨床應用方面發揮舉足輕重的作用。

本月期刊檢索了國內公開報導的 A 亞型多篇優秀文獻，就中國人群存在的 A 亞型種類，產生抗體情況及對應輸血策略進行歸納汇总，以便閱讀，在此鄭重感謝所有文章作者所做出的努力及貢獻。編者僅為收錄方便學習，無觀點誘導及評判，意無商業目的。

共計 31 篇文獻，主要內容如下：

- 1、ABO 亞型 71 例，25 種，分別為 A104、A204、A205、A207、A208、A213、A221、A307、A311、Ael01、Ael02、Ael04、Ael05、Ael08、Ax03、Ax13、Ax14、Ax26、Ax28、CisAB01-CisAB06（CisAB 存在 A 亞型特徵，本次汇总將該類型納入 A 亞）
- 2、明確產生抗體的亞型樣本 41 例，產生抗體亞型主要有 A205、A208、A213、A221、A311、Ael01、Ael04、Ael05、Ael08、Ax03、Ax14、Ax26、Ax28、CisAB01、CisAB02、cisAB03、CisAB05、cisAB06
- 3、提出對應輸血策略 14 篇

目录

1 《A205B 亚型伴抗-A1 抗体致配血不合 1 例》	3
2 《 α -1,3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶等位基因 467C>T 和 539G>C 变异导致 A2 亚型》	4
3 《A2 亚型的血清学和分子生物学的对比分析》	5
4 《 α -1,3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶基因 742C>T 突变导致 A2 亚型》	7
5 《ABO 血型系统中 1 种新 A2 等位基因的发现及在中国福建地区汉族人群中 A2 亚型调查》	8
6 《罕见的 2 例 A307 亚型的分子生物学研究》	10
7 《A307 亚型的鉴定及家系调查——附 1 例报告》	11
8 《A307 亚型家系的分子遗传分析》	13
9 《 α -1,3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶基因 EXON7 突变形成 A311 血型基因亚型》	14
10 《1 例少见 Ax B 亚型的鉴定分析》	16
11 《献血者 Ael 亚型 1 例及其家系调查》	17
12 《罕见患者 Ael04 亚型 1 例及其家系调查》	19
13 《罕见 Ael05/B101 亚型鉴定及输血探讨》	21
14 《ABO 血型新等位基因 Ael08 的分子生物学研究》	23
15 《一例罕见 Ael08 的血清学鉴定及基因测序》	25
16 《Ael 亚型的分子生物学研究》	27
17 《Ax 亚型的血清学和基因型研究》	30
18 《中国人群 ABO 亚型中一个新的 Ax 等位基因的鉴定》	31
19 《Ax 基因致血清型与基因型不符的家系遗传研究——附 1 例报告》	33
20 《一例 ABO 亚型 Ax28 新等位基因的鉴定》	36
21 《一例稀有 CisAB 血型血清学及遗传机理分析》	37
22 《ABO*cisAB.03.1.1/ABO*O.02.01.1 基因型患者的血型检测及分析》	40
23 《一例 ABO 血型 cisAB06 亚型的基因序列分析》	43
24 《CisAB 与 B(A)血型的鉴定分析——附报告 5 例》	45
25 《中国北方汉族人群 A204 等位基因的发现及家系调查》	48
26 《双胎输血综合征患儿 A2 血型 2 例及其家系基因调查》	49
27 《A 转换酶基因核苷置换 G539C 形成一新的 A2 等位基因》	50
28 《无锡市首例 Ael 标本的亚型血清学及基因型分析》	51
29 《罕见的 AEL.05 亚型等位基因的鉴定及家系分析》	52
30 《CisAB04 型血清学鉴定和基因型分析——附 1 例报告》	56
31 《南京地区汉族人群 A 血型亚型的分子机制调查与分析》	59

ABO 亚型案例报道专刊——A 亚

(编辑: 艾丽萍, 刘玉莲, 张悦)

1 《A205B 亚型伴抗-A1 抗体致配血不合 1 例》

作者: 董磊, 李双玉, 李立新, 安仕萍

来源: 检验医学与临床2015年1月第12卷第1期

标本来源: 患者, 女, 62 岁, 2014 年 1 月因子宫癌入住本市某医院, 患者血红蛋白 (Hb) 42g/L, 申请输血。医院发现交叉配血不合, 主侧出现弱凝集, 送至本实验室进行检测。经询问医院及患者家属得知, 该患者在 40d 前曾输注 AB 型悬浮红细胞 4U。

血清学结果:

表 1 患者血型鉴定结果

温度	正定型				抗-H	反定型			自身对照
	抗-A	抗-A ₁	抗-B	抗-AB		A ₁ C	BC	OC	
4℃	+++	—	++++	++++	+	++	—	—	—
室温	++	—	++++	++++	+	+	—	—	—
37℃	+	—	++++	++++	+	+	—	—	—

注: +表示阳性, —表示阴性

(1) 抗体筛查试验: 患者血清与 (I 号、II 号和 III 号) 抗筛细胞在盐水介质和卡式凝胶中均不反应, 未检出不规则抗体。

(2) 吸收放散试验及效价测定: 样本红细胞吸收放散试验结果显示患者红细胞 A 抗原吸收力弱, 放散力强, 符合 ABO 亚型的基本特征, 样本血清吸收放散其放散液与 A₁ 细胞呈弱阳性 (+) 反应, 证明患者血液中含有抗-A₁ 抗体。

PCR-SSP 检测结果: 使用 **人类 A B O 血型基因检测试剂盒 (购自天津秀鹏生物技术开发有限公司, 批号为 201318001)**, 结果为 A205B 亚型; 使用 **人类 A B O 血型-A 亚型基因分型检测试剂盒 (购自天津秀鹏生物技术开发有限公司, 批号为 201312007)**, 结果为 A205。

输血策略: 在该例患者血型研究中, 血清学试验提示患者血清中含有抗-A₁ 抗体, 该抗体在 37℃ 具有生物活性, 可以造成红细胞血型正反定型不符以及交叉配血不合。经吸收放散试验及 DNA 基因分型试验确定该

患者血型为 A205B 亚型，建议临床为其输注 O 型 RhD 阳性的洗涤红细胞，患者输血后无不良反应发生。

因此对于 ABO 亚型患者的输血治疗方案，输注红细胞时应尽量选择 O 型洗涤红细胞；输注血浆或冷沉淀应选择 AB 型或亚型对应的正常血型；输注血小板应选择亚型对应的正常血型。增加输血前常见 ABO 亚型的筛选，可以避免不规则 ABO 抗体的漏检，降低输血反应发生的风险，提高临床输血治疗效果。

2《 α -1,3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶等位基因 467C>T 和 539G>C 变异导致 A2 亚型》

作者：许先国， 洪小珍， 吴俊杰， 马开荣， 傅启华， 严力行

来源：中国实验血液学杂志 2006；14(4)： 808- 811

摘要：为了研究中国汉族人群 ABO 血型系统中 A2 亚型的分子遗传背景，发现并鉴定新的 ABO 等位基因，采用血型血清学方法鉴定 5 例 ABO 血型疑难样本，PCR 扩增 ABO 基因转录调控序列和全编码序列，PCR 产物经割胶纯化后直接测序，并对含有变异位点的扩增片段进行单倍体序列分析。结果表明：5 例疑难样本分别鉴定为 A2 或 A2B 亚型；进一步研究发现，1 例 A2B 和 1 例 A2 样本分别含有 A201 和 A205 等位基因，另 3 例 A2B 样本中发现一个新的 A2 等位基因。该等位基因与 A101 相比，差异在外显子 7 的 467C>T 和 539G>C 变异，导致多肽链 P156L 和 R180P 的替换。结论：首次发现 467C>T 和 539G>C 组合的 A2 等位基因，中国汉族人群中 A2 亚型具有遗传多态性。

标本来源：5 例血清学 A2 亚型样本(3 例男性，2 例女性，汉族，均无血缘关系)，无偿献血时发现 ABO 血型正反定型不符而深入研究。

血清学结果：

Table 1 Results of blood group serological detection

Sample	Reactions of cells with					Antibody in serum			Phenotype
	anti A	anti A1	anti B	anti A、B	anti H	A c	Bc	Oc	
1	4+	0	4+	4+	+	4+	0	0	A ₂ B
2	3+	0	0	3+	3+	4+	4+	0	A ₂
3	4+	0	4+	4+	+	4+	0	0	A ₂ B
4	4+	0	4+	4+	+	4+	0	0	A ₂ B
5	4+	0	4+	4+	+	4+	0	0	A ₂ B

ABO 血型基因 DNA 测序结果：以本实验室建立的方法，以 BigDye terminator V3.0 kit (ABI 公司产品，美

国)试剂进行序列分析。5 例 A2B 或 A2 亚型的增强子、启动子以及外显子 1-5 与 A101 序列完全一致; 内含子 5 到 3'UTR 序列见表 2: 其中样本 1 除外显子 7 的 467C/T 和 1061del/C 杂合外, 其余位点符合 A101B101 杂合特征; 样本 2 除外显子 7 的 467C/T 和 1009A/G 杂合外, 其余位点符合 A101O01 特征; 样本 3、4 和 5 除外显子 7 的 467C/T 和 539G/C 杂合外, 其余位点符合 A101B101 特征。各样本的变异位点均经过多次 PCR 扩增和测序证实, 排除因 PCR 扩增引入的假变异。

序列分析: 样本 3、4 和 5 其中一单倍体为 B101, 另一单倍体除 467C>T 和 539G>C 变异外, 其余序列与 A101 一致。经检索, 未发现此变异组合的 ABO 等位基因, 目前该等位基因已被血型抗原基因突变数据库 (BGMUT) 确认并命名为 A208 等位基因。

讨论: 实验还发现了另一个 A2 等位基因(467C>T, 539G>C)。检索显示, 467C>T 变异在各类 ABO 亚型中频率相对较高, 根据 BGMUT 数据, 截止到 2005 年 7 月, 在 139 个 ABO 等位基因中, 至少有 21 个等位基因含有 467C>T 变异, 而 539G>C 仅发现于最新报道的 A207 等位基因, 并经人群频率研究证实为 ABO 基因新突变位点。但未发现同时包含 467C>T 和 539G>C 的等位基因, 表明该等位基因是一个新的 ABO 等位基因组合, 是迄今发现的第 8 个 A2 等位基因。467C>T 和 539G>C 分别导致多肽链 Pro156Leu 和 Arg180Pro 的替换, 考虑到单独的 539G>C 突变(即 A207 等位基因)即能引起 A2 亚型, 推测 Arg180Pro 而非 Pro156Leu 是引起 α -1,3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶活性改变进而形成 A2 亚型的主要原因, 这类似于 A201(467C>T, 1061delC)和 A206(1061delC)的关系。A208 等位基因的发现从另一侧面证实了 A207 等位基因存在的真实性, 虽然后者迄今仅发现 2 个先证者。

3 《A2 亚型的血清学和分子生物学的对比分析》

作者: 黄颖, 林甲进, 朱碎永, 裘晓乐

来源: 中国卫生检验杂志 2017 年 2 月第 27 卷第 4 期

摘要:

目的: 探讨红细胞 A2 亚型在血型血清学和分子生物学的异同点。

方法: 用单克隆抗-A、抗-B、抗-A1 血型试剂进行血清学检测, 对血清学检测为 A2 亚型的标本再进行 ABO 基因第 6 内含子和第 7 外显子测序分析。

结果：血清学检测共筛得 40 例 A2 亚型标本，基因检测得 10 例 A2 亚型，27 例 A1 型，3 例 B(A)亚型；A2 亚型以 A205 居多，非 A2 型以 A102/B101 居多。

结论：中国人群红细胞 A2 亚型的血清学与基因型表现比较复杂，血清学表现为 A2 亚型，但基因型具有多样性，而且红细胞上 A 抗原的凝集强度与基因型之间不存在相关性。

标本来源：收集 2013 年 10 月—2015 年 1 月温州医科大学附属第二医院、温州医科大学附属第一医院及周边医院疑难血型标本，用常规血清学方法筛选出 A2 亚型标本 40 例。所有患者均为汉族，其中男性 24 例，女性 16 例，年龄为 6 岁~72 岁。

血清学结果和 ABO 血型基因 DNA 测序结果：

表 1 40 例 A2 亚型血清学结果(例)

基因型	血清型	例数 (例)	抗 A 凝集度(例)				抗 A 平均 凝集强度	抗 A1 凝集度 (例)	抗 H 凝集度(例)			抗 H 平均凝集 强度	血清抗 A1 (例)
			1+	2+	3+	4+			2+	3+	4+		
1 A201/O01	A2	1			1		3+	1			1	4+	0
2 A205/B101	A2B	5		1	1	3	3.4+	5		1	4	3.8+	0
3 A205/O02	A2	2			2		3+	2			2	4+	0
4 A208/B101	A2B	1		1			2+	1			1	4+	1
5 A209/O02	A2	1				1	4+	1			1	4+	0
6 B(A)04	A2B	3		3			2+	3			3	4+	3
7 A102/B101	A2B	21			5	16	3.76+	21	10	6	5	2.76+	0
8 A102/O02	A2	2			1	1	3.5+	2			1	4+	0
9 A101/B101	A2B	2				2	4+	2			2	4+	0
10 A102/O02	A2	2				2	4+	2			2	4+	0

讨论：

目前国内外学者研究发现 A2B 和 A2 的发生率存在明显的不均衡性，而且 A2B 的发生率远高于 A2 的发生率。Ogasawara 等人对日本东京 83504 名献血员进行血清学分型，发现 A2B 是 A2 的 16 倍。本文研究结果与上述结果比较相似，A2B(32 例)是 A2(8 例)的 4 倍。有学者认为 A2B 可能是同时存在强势的 B 抗原，影响了 A 抗原的表达，从而造成这种不平衡现象。

40 例标本中，基因型以 A102/B101 最常见，这种现象在一些文献中也有报道，其机制有待于进一步研究。本期刊编者认为正是因为强势的 B 抗原，影响了 A 抗原的表达，呈现出 A2 亚型表型，这 21 例并非真正的 A2 亚型。正是因为这种原因，限制了血清学对 A2 正确判断，检测出的 A2 并非真正的 A2，所以导致临床认为 A2 只要没有产生抗-A 抗体就跟 A1 同等对待，忽略了真正基因型 A2 亚型在临床中的应用，比如思考真正 A2 受血者输注 A1 后的反应。

本研究除了检测到 A2 和 A1 型外，还发现了 3 例 B(A)亚型，这 3 例亚型标本的血清学反应格局与 A2 亚型很相近，仅通过血清学检测难以判断，通过基因检测发现这 3 例标本在 640 位碱基发生了 A>G 的突变，符合 B(A)04 的特点，所以认为基因检测是判断 B(A)亚型和 A2 亚型的有效方法。

4 《 α -1,3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶基因 742C>T 突变导致 A2 亚型》

作者：洪小珍 应燕玲 许先国 马开荣 蓝小飞 刘瑛 朱发明 吕杭军 严力行

来源：《中国实验血液学杂志》2011年03期

摘要：本研究探讨 2 例 ABO 亚型 A2B 的分子机制。利用单克隆抗体检测先证者红细胞 ABO 血型抗原，用标准 A、B、O 细胞检测先证者血清中的 ABO 抗体，采用聚合酶链反应(PCR)技术扩增先证者 ABO 基因的第 5 至 7 外显子序列，其 PCR 产物经酶切后直接测序分析。同时，PCR 产物经 TOPOTA 克隆到质粒载体中获得单链，对所得克隆进行 ABO 基因第 6、7 外显子双向测序分析。结果表明，先证者红细胞有 A、B 抗原，同时其血清中存在抗 A1 抗体。直接测序分析发现，第 261 位无缺失，第 297 位 A/G、467C/T、526C/G、657C/T、703G/A、742C/T、796C/A、803G/C、930G/A 杂合。克隆测序得到 B101 和 1 个新的 A 等位基因。与 A102 相比，新 A 等位基因仅在第 742 位 C→T 突变，导致第 248 位精氨酸变成色氨酸，新等位基因已被正式命名为 A213。结论： α -1,3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶基因第 742 位 C→T 突变导致产生 A2 表型，表型个体血清中可含有抗 A1 抗体。

标本来源：2 例本中心自愿无偿的献血者，体检征询显示 2 例献血者无血缘关系，而且均无输血史，其标本因常规 ABO 血型正反定型中发现结果不一致而进一步检查分析。

血清学结果：

Table 2 ABO serological results of the probands

Probands	Cell typing			Serum typing		
	Anti-A	Anti-A ₁	Anti-B	A cell	B cell	O cell
Donor 1	++++	0	+++	++	0	0
Donor 2	++++	0	++++	++	0	0

A 和 B 转移酶的活性采用本方法检测 2 例 A2B 表型血浆中的 A、B 转移酶活性，结果 A 转移酶活性未能检测出，B 转移酶活性分别为 1：64 和 1：128。而对照标本 AB 表型中 A 转移酶活性为 1：128，B 转移酶活性为 1：64。

ABO 血型基因 DNA 测序结果：用 3730 DNA 测序仪(美国 ABI 公司产品)，以 BigDye terminator V3.0 kit(ABI 公司产品，美国)试剂进行序列分析。对先证者标本 TOPO 克隆测序发现，1 条单体型为常见的 B101 等位基因，另外 1 条单体型为新的 A 等位基因。与 A102 相比，新的 A 等位基因仅在第 742 位 C 突变为 T，这导致第 248 位精氨酸变成色氨酸。新等位基因的序列已提交 GenBank，序列登记号为 FJ998023。同时新等位基因相关信息上传红细胞血型抗原基因突变数据库，并被正式命名为 A213。

讨论：但是本实验的 2 例 A2B 表型未能检测出 A 转移酶活性，只检测出其 B 转移酶活性。由于实验对照 AB 型可有效检测 A、B 转移酶活性，因此可以排除检测方法的偏差，推测其可能原因是 A 基因发生突变后酶不能有效识别检测方法中的底物、酶促反应的最适条件发生改变或者方法检测敏感性不足等，这需要进一步系统研究，以明确 A2B 表型中 A 转移酶的整体酶促反应过程。

5 《ABO 血型系统中 1 种新 A2 等位基因的发现及在中国福建地区汉族人群中 A2 亚型调查》

作者：张爱，池泉，任本春

来源：中国实验血液学杂志 2012； 20(5)： 1243—1245

摘要：本研究探讨 ABO 血型系统中 A2 亚型在中国福建地区汉族人群中的分布频率及其分子机制。采用血清学方法鉴定 1 例 A2 亚型标本，PCR 扩增 ABO 基因第 6、7 外显子及第 6 内含子，PCR 产物经割胶纯化后直接测序，并对含有突变位点的扩增片段进行单倍体序列分析；用抗-A1 单克隆血清筛查福建地区 3176 例 A 或 AB 型汉族无偿献血者。结果表明，该例 A2 亚型的基因型鉴定为 A/Olv，与 A101 相比，其第 7 外显子存在 467C>T 和 607G>A 突变，分别导致多肽链 P156L 和 E203K 替换；经标准血清学方法检测，3176 例随机 A 或 AB 型献血者(同时期健康献血者约 16527 人)未检出 A2 亚型。结论：首次发现 467C>T 和 607G>A 组合的 A2 等位基因，A2 亚型在福建地区汉族人群中罕见。

标本来源：A2 亚型 1 例：ABO 血型为 A2 亚型的健康献血者，无偿献血时因 ABO 正反定型不符而进行深

入研究。A2 亚型筛查随机选择福建地区 3176 例 A 或 AB 型汉族无偿献血者。对照品以 50 例无血缘关系随机样本为对照(包括 30 例血清学鉴定为正常 A 型和 20 例鉴定为 B 型抗 A 减弱样本)。

血清学结果：本研究中 1 例因 ABO 正反定型不符而深入研究样品符合 A2 亚型血清学特征，为典型的 A2 亚型，结果见附表。用抗-A1 单克隆血清对 3176 例 A 或 AB 型随机献血者筛查，未检出 A2 亚型。

Table. Results of blood group detection for the A2 phenotype

Anti A	Anti B	Anti A1	Anti A,B	Anti H	Ac	Bc	Oc	A2 cell	Pheno- type	Geno- type
4 +	N	N	4 +	4 +	W	4 +	N	N	A2	A/Olv

N: negative; +: positive; W: weak positive. Anti-H reacted with B cells and O cells under the same conditon when it reacted with the A2 phenotype.

ABO 血型基因 DNA 测序结果：该例 A2 亚型的第 7 外显子存在 467C/T 和 607G/A 杂合突变(附图)。克隆后测序显示，该献血者的 ABO 基因型为 A/Olv，607G>A 位于 A 基因上。A 基因还存在 1 个 467C>T 多态性，为 A102 型等位基因。本研究报道的 A2 等位基因已提交 GenBank 和 BGMUT，序列号 JN223445，等位基因命名为 A221。第 607 位核苷酸 G 被 A 替换，导致新的氨基酸置换 E203K。这一新的点突变在 50 例对照品中未检出。

讨论：在本研究中发现 1 种新的 A2 等位基因，与 A101 相比，差异在外显子 7 的 467C>T 和 607G>A，分别导致多肽链 P156L 和 E203K 的替换。467C>T 对酶活性无明显影响，因此我们推测，Glu203Lys 是引起 A 酶活性改变进而形成 A2 亚型的主要原因。谷氨酸(E)为酸性氨基酸，赖氨酸(K)为碱性氨基酸，二者等电点差别大，E203K 替换可能通过破坏 A 酶局部构象而削弱酶的活性。值得注意的是，另 3 个 A 等位基因 Ax12、Aw20 和 Aw21 在 607G 位点也发现核苷酸变异，不同的是 Ax12 少了 467C>T，而 Aw20 和 Aw21 还同时存在 1061delC。不同等位基因在同一位点均发生相互独立的核苷酸突变，并导致 A 亚型形成，提示该位点氨基酸对糖基转移酶活性有着至关重要的作用，这个氨基酸可能处于酶活性区域中。推测在 A2 等位基因 mRNA 翻译成转移酶后，由于 203 位氨基酸由谷氨酸转变为赖氨酸后，蛋白构象发生了很大改变，大大降低了它把 A 抗原转移到 H 物质上的功能。综上，本研究首次报道 467C>T 和 607G>A 组合的 A2 等位基因，该等位基因 E203K 可能改变了 A 酶局部构象而削弱酶的活性，导致 A2 表现型。

6 《罕见的 2 例 A307 亚型的分子生物学研究》

作者：韩斌，冯智慧，郭庆明，王明民

来源：中国实验血液学杂志 2016； 24(3)： 918—920

摘要：

目的：对 2 例血清学定型困难的血液标本进行 ABO 基因检测，探讨其分子遗传学基础。

方法：应用 PCR-SSP 方法对此 2 例血清学定型困难的标本进行 ABO 基因分型，并对其 ABO 基因第 6、7 外显子扩增后进行直接测序和克隆测序，从而确定其基因型。

结果：2 例标本血清学表现为红细胞与抗-A1+凝集，与抗-A1 不凝集，在血清中存在抗-A1；PCR-SSP 基因分型显示为 A/O1；直接测序和克隆测序显示，此 2 例标本 A 等位基因在第 7 外显子存在 nt467C>T 及 nt745C>T 突变，导致第 156 位密码子编码的氨基酸由脯氨酸(Pro)变为亮氨酸(Leu)，第 249 位密码子编码的氨基酸由精氨酸(Arg)变为色氨酸(Trp)。

结论：血清学和基因测序结果表明，此 2 例标本为罕见的 A307 亚型。

标本来源：样本均为 2014 年无偿献血者，男性，汉族。

血清学结果：血清学(试管法)结果显示，此 2 例样本红细胞与试剂抗-A 及人源抗-A 均发生弱凝集，与抗-A1 不凝集，同时血清中检出弱的抗-A1 抗体(表 1)。

Table 1. Results of blood group serological detection

Sample	Forward typing (reagent)					Forward typing (human - derived)		Reverse typing			
	anti - A	anti - B	anti - A ₁	anti - AB	anti - H	anti - A	anti - B	A ₁ c	A ₂ c	Bc	Oc
1	1 +	0	0	1 +	4 +	1 +	0	±	0	4 +	0
2	1 +	0	0	1 +	4 +	±	0	±	0	3 +	0

PCR-SSP 检测结果：采用 ABO 基因分型试剂盒(Readygene ABO-SSP 试剂盒，德国)进行 ABO 基因分型。1—8 孔引物分别为 O1、非 O1、O2、非 O2、B、非 B、A2 和非 A2。此 2 例样本均为 A/O1 杂合基因型。

直接测序分析：采用 Olsson ML 等设计的测序引物对 Exon6、7 进行扩增，使用 3100 Avant Genetic Analyzer 测序仪进行测序。通过对此 2 例样本 Exon6、7 直接测序，均显示在 Exon6 表现为 261G/del 杂合，在 Exon7 表现为 467C/T、745C/T 杂合。

ABO 第 6、7 外显子克隆测序结果：在此 2 例样本其中一条单倍型序列均为 O101，另外 1 条单倍型序列与

A101 比对,发现其在第 467 位及 745 位碱基均存在 C>T 的突变。经检索基因突变数据库,此 2 例样本单倍型被确定为罕见的 A307 型。

讨论:在本研究中,通过血清学试验发现 ABO 正、反定型不符后,遂进行 DNA 提取、PCR-SSP 分型及测序检测。PCR-SSP 结果提示此 2 例样本均为 A/O1 杂合;直接测序结果显示,ABO 基因在 467C/T、745C/T 出现杂合;克隆测序结果进一步证实此 2 例样本分别在 nt467 位和 nt745 位发生了 C>T 的单碱基突变,进而证实此 2 例样本均为罕见的 A307 亚型。

输血策略:ABO 亚型在献血者血型筛查及临床输血配血过程中均应特别引起注意。此次发现的 2 例样本,由于红细胞表面表达弱的 A 抗原,同时在血清中含有抗-A1 抗体,在需要红细胞输注时应选择 O 型洗涤红细胞,同样此 2 例献血者的血液也不能输注给普通的 A 型受血者,以免发生输血反应。因此,在进行血型鉴定过程中,遇到 ABO 正、反定型不符的情形,应采用分子生物学的方法进一步确认,通过血清学与分子生物学相结合的方法进行最终定型,从而保证临床输血安全。

7 《A307 亚型的鉴定及家系调查——附 1 例报告》

作者:庄文华 张永善 冯智慧 范晓娟 姜美婷

来源:《中国输血杂志》2019 年 9 月第 32 卷第 9 期

摘要:

目的:对正反定型不符的先证者标本进行血清学疑难血型鉴定、基因测序分析和家系研究。

方法:应用常规血型血清学方法进行血型鉴定;对 ABO 基因的 Exon6 和 Exon7 扩增后进行直接测序,确定其基因突变位点。

结果:该亚型标本血清学表现为 A 抗原减弱,红细胞与抗-A 弱凝集,与抗-A1 不凝集,且血清中存在较弱抗-A;直接测序显示,该亚型标本的 α -1, 3-N-乙酰半乳糖胺转移酶基因在 Exon7 存在 467C>T 和 745C>T 的碱基突变,导致第 156 位密码子编码的脯氨酸(Pro)变为亮氨酸(Leu),第 249 位密码子编码的精氨酸(Arg)变为色氨酸(Trp)。

结论: α -1, 3-N-乙酰半乳糖胺转移酶基因 467C>T 和 745C>T 的碱基突变导致产生 A307 亚型,且在家系成员中能够稳定遗传。

标本来源：1 例先证者(来自无偿献血者，男性)及其家系成员。本站检验科对该例献血者标本进行血型检测时，发现其 A 抗原减弱，正反定不符，于是送到本实验室进行血型确认。后来因先证者父亲住院，本市中心医院因血型鉴定困难，送标本至本实验室进行血型鉴定，遂对其家系成员开展了血型调查研究。

血清学结果：对先证者以及先证者父亲、妻子、儿子、女儿、妹妹、妹夫、外甥和外甥女进行 ABO 血型血清学检测，发现先证者父亲、先证者姐姐以及先证者外甥女存在 A 抗原减弱，且存在不规则抗-A 情况，结果见表 1。

表 1 先证者及其家庭成员血型血清学检测结果

	正定型					反定型				ABO 血型
	抗-A	抗-B	抗-AB	抗-A ₁	抗-H	A ₁ c	Bc	Oc	自身 c	
先证者	1+	4+	4+	0	3+	±	0	0	0	A _正 B
父亲	2+	4+	4+	0	2+	1+	0	0	0	A _正 B
妻子	0	4+	/	/	/	3+	0	0	0	B
女儿	0	4+	/	/	/	3+	0	0	0	B
儿子	0	4+	/	/	/	3+	0	0	0	B
姐姐	2+	4+	4+	0	2+	1+	0	0	0	A _正 B
姐夫	0	0	0	0	3+	4+	4+	0	0	O
外甥	0	4+	4+	0	3+	3+	0	0	0	B
外甥女	1+	0	1+	0	2+	1+	3+	0	0	A _正

ABO 血型基因 DNA 测序结果：第 6 和第 7 外显子直接测序引物与 Ex-Taq 试剂盒由 TaKaRa 公司提供，使用全自动 DNA 序列分析仪(3100-Avant，ABI 公司)测序。与 A101/B101 标准序列比对，发现先证者 α -1，3-N-乙酰半乳糖胺转移酶基因在 Exon7 第 467 位和 745 位的核苷酸均发生 C>T 的碱基突变，导致第 156 位密码子编码的脯氨酸(Pro)变为亮氨酸(Leu)，第 249 位密码子编码的精氨酸(Arg)变为色氨酸(Trp)。对血型血清学检测中出现 A 抗原减弱的先证者父亲、先证者妹妹、先证者外甥女的标本进行 ABO 基因第 6、7 外显子直接测序分析，它们的基因型分别为 A307/B101、A307/B101 和 A307/O02(表 2)。A307 基因在和先证者父亲、先证者以及先证者外甥女三代人中均有检测到，说明该突变基因能够稳定遗传（图 2）。

表 2 先证者及先证者父亲、先证者妹妹、先证者外甥女 ABO 基因第 6、7 外显子直接测序分析结果

	Exon6 突变位点	Exon7 突变位点	ABO 基因型
先证者	297A>G	467C>T, 526C>G, 657C>T, 703G>A, 745C>T, 796C>A, 803G>C, 930G>A	A307/B101
先证者父亲	297A>G	467C>T, 526C>G, 657C>T, 703G>A, 745C>T, 796C>A, 803G>C, 930G>A	A307/B101
先证者姐姐	297A>G	467C>T, 526C>G, 657C>T, 703G>A, 745C>T, 796C>A, 803G>C, 930G>A	A307/B101
先证者外甥女	261del, 297A>G	467C>T, 646T>A, 681G>A, 745C>T, 771C>T, 829G>A	A307/O02

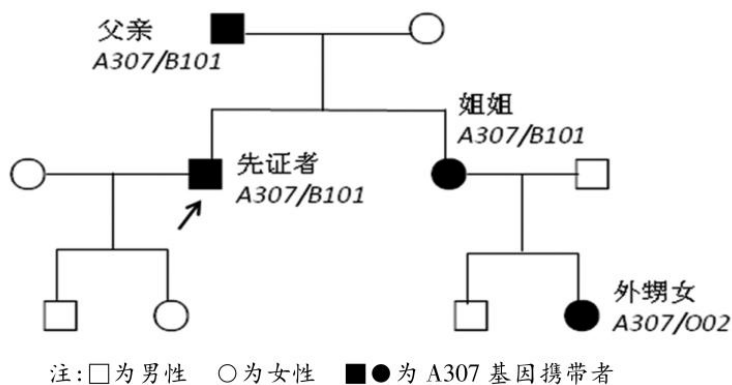


图 2 先证者 ABO 血型家系图

讨论: 本例先证者标本其血清学特征是红细胞与单克隆抗-A 弱反应、抗-A1 血清试剂不发生反应, 同时血清中存在弱的抗-A1; 其 H 抗原含量与 O 型红细胞接近, 明显高于常见的 A 型红细胞; 与单克隆抗-B 出现 4+ 强反应。因此血清学上表现判定为 A 亚 B 型。我们对先证者及其家系成员标本 ABO 基因的 Exon6 和 Exon7 进行了直接基因测序分析, 与 A101 标准序列比对, 发现 α -1, 3-N-乙酰半乳糖胺转移酶基因在 Exon7 第 467 位和 745 位的核苷酸均发生 C>T 的碱基突变, 导致第 156 位密码子编码的脯氨酸(Pro)变为亮氨酸(Leu), 第 249 位密码子编码的精氨酸(Arg)变为色氨酸(Trp), 引起 A 抗原的减弱。分析 NCBI 血型抗原基因突变数据库, 467C>T 合并 745C>T 突变只有 A307 等位基因。目前日照地区共检出 6 例含 A307 基因的标本, 除了本文提到的 4 例外, 另有 2 例标本来自另 1 个家系。

8 《A307 亚型家系的分子遗传分析》

作者: 章旭 李剑平

来源: 中国输血杂志 2016 年第 29 卷增刊第 1 期 (中国输血协会第八届输血大会)

摘要:

目的: 通过对 1 例罕见 A3 亚型家系的分子遗传分析, 探讨 α -1, 3-N-乙酰半乳糖胺转移酶基因突变对于 A 抗原表达的影响。

方法: 采用血型血清学方法对先证者及家系标本进行 ABO 血型鉴定, 采用 ABO 基因第 6、7 外显子 PCR 产物直接测序和基因克隆方法, 进行 ABO 亚型基因序列分析及单体型序列分析。

结果: 先证者红细胞含有弱 A 抗原, 同时血清中含有抗-A 和抗-B。直接测序分析发现第 6 外显子 261del G、

第 7 外显子 467C>T 和 745C>T 2 个杂合位点。基因克隆序列分析得到 2 个等位基因 A307 和 O01。A307 基因序列与 A101 基因比对在第 467 位碱基为 C>T 突变和第 745 位碱基为 C>T，导致多肽链 P156L 和 R249W 替换。

结论： α -1, 3 半乳糖基转移酶基因 467C>T 和 745C>T 突变产生 A307 基因型，导致 A 抗原表达减弱。

9 《 α -1,3-N-乙酰半乳糖胺转移酶基因 EXON7 突变形成 A311 血型基因亚型》

作者：刘衍春，刘毅，赵卫军等

来源：中国实验血液学杂志 2014； 22(3)：821 - 824

摘要：本研究对 1 例产生抗 A 抗体的血清学正反定型不符的 A 血型标本进行血型血清学分析及基因分析，以了解其分子基础。采用试管法进行血型血清学的检测，采用 PCR-SSP 对 A 基因进行扩增分析，采用 Sanger 测序法对 A 血型糖基转移酶基因进行测序分析。结果表明：血清学正反定型不符，初定为 A 亚型；PCR-SSP 扩增检测结果有 O、A 血型基因的存在；对 ABO 基因第 6 外显子测序发现存在 c.261delG，显示有 O 基因；对 A、O 基因第 7 外显子进行特异性扩增测序分析显示，在 A 单倍型基因第 7 外显子出现 c.467C>T、c.626G>A 的突变，在 O 单倍型基因第 7 外显子出现 c.646T>A、681G>A、771C>T、829G>A 等突变。结论：该献血者在 A 基因第 7 外显子的 c.626G>A 是新的等位基因突变，c.467C>T 是 SNP；新突变的 GenBank 序列号是 KC690281，被 BGMUT 命名为 1 个新的 A 等位基因亚型 A311。

标本来源：无偿献血者，女性，19 岁

血清学结果：标本正定型-A、-A1、-B、-AB、-H 结果分别为 1-2+/mf、-、-、1+/mf、4+，反定型 A1c、A2c、Bc、Oc、自身 c 凝集情况分别为 4+、1+、4+、-、-。该标本正定型结果出现 1-2+/混合外观(mf)及抗 H 为 4+，此为 A 亚型现象。反定型 A1c、A2c 均出现凝集，且 A1c 为 4+的特征，检测结果初步考虑为 A3 亚型。

PCR-SSP 检测结果：人类 ABO 血型-A 亚型基因分型检测试剂盒(PCR-SSP 法，天津秀鹏)，结果：A/O。



Figure 1. Band 42, 45 were positive. These results show the existence of A and O gene.

ABO 血型基因 DNA 测序结果: BigDye terminator V3.1 sequencing Kit 购自美国 ABI 公司; 测序采用 ABI3730 测序仪。第 6 外显子测序出现 c.261delG 的杂峰, 说明有 1 条链缺失 G, 此为 O 基因的特征。第 7 外显子 A、O 基因单链 DNA 测序: 根据血清学及 PCR-SSP 的结果进行 A、O 基因的单链测序。A 基因单链 DNA 测序结果出现 c.467C>T、c.626G>A 的突变, O 基因单链 DNA 测序结果出现 c.646T>A、681G>A、771C>T、829G>A 突变。

序列比对: 以上突变结果分别与 GenBank 参考序列 ABO*A101 (GenBank: AJ536122)、ABO*O01 (GenBank: AF134415) 进行比对分析, O 基因第 7 外显子上的突变均为已有的变化, A 基因第 7 外显子 c.626G>A 为新的等位基因突变, c.467C>T 为 SNP, 可以确定该标本的基因型为: Anew/O

讨论: 该标本有与 A3 正定型接近的反应格局, 但与 A2、A3 型应出现的反定型格局不同(正常的 A2、A3 型反定型 A1c、A2c、Bc 应为 0/1+或(+)、0、4+)。标本经 56℃ 热放散后, 红细胞上的 A 抗原明显减弱, 但仍有弱凝集。该献血者有减弱的 A 抗原、正反定型与已有的各种 A 亚型反应格局均不完全一致, 接近于 A3、Afinn、Ael。考虑目前的血清学试剂及操作原因, 该标本血清学结果初定为 A3。随即采用 ABO 分型 PCR-SSP 检测试剂盒检测, 检测结果存在 O、A 基因的可能。该标本 A 基因 c.467C>T、626G>A 的突变组合应为新的 A 血型等位基因亚型, 该基因突变组合提交 GenBank 获得确认, 序列号为 KC690281, 同时提交 BGMUT 被命名为 A311。血型的血清学检测是血型的重要分型基础, 但由于抗体的克隆株不同, 操作人员的操作及主观性, 在血型的亚型判别上存在差异。随着基因检测技术的发展, 给疑难稀有血型的鉴别带来了很大的便利。同时, 新等位基因地发现不断地丰富了人们对 ABO 血型基因的认识。由于 ABO 血型是临床输血中最主要的血型系统, 正确分析血型的亚型及分子基础从而确保临床输血安全有着十分重要的临床意义。

10 《1 例少见 AxB 亚型的鉴定分析》

作者：丁伟

来源：临床输血与检验 2015年4月第17卷第2期

摘要：

目的：鉴定并分析 1 例 AxB 亚型的血型血清学特性，为临床安全输血提供保障。

方法：应用血清学方法结合分子生物学（PCR-SSP）与测序技术。

结果：该标本血清学反应格局符合 AxB 亚型，PCR-SSP 检测为 AB 型，进一步对 ABO 基因 Exon6, 7 测序，发现 ABO 基因 Exon7 存在 626G/A 突变。

结论：血清学方法结合分子生物学是正确鉴定血型亚型，保证临床安全输血的重要方法。

标本来源：患者，女，24 岁，妊娠 3 个月，因引产入住本院产科，无输血史，术前常规检查血型。

血清学结果：样本直接抗人球蛋白试验阴性；唾液 ABH 血型物质检测，阴性对照、盐水对照凝集，阳性对照未凝，A、B、O 细胞均未凝集，说明唾液中含有 A、B 及 H 物质；将样本红细胞、A₂B 分别与单克隆抗-H 反应，做平行检测，结果样本红细胞与抗-H 反应强度>A₂B 与抗-H 反应强度，说明样本 H 物质增强强于 A₂B；吸收放散试验，因样本 B 抗原明显，只对 A 抗原进行吸收放散，56℃水浴 10min，放散液与 A 细胞凝集，最末洗涤液不凝，说明样本红细胞上含有 A 抗原。

表 1 样本 ABO 血型鉴定结果(卡式法)

室温	正定型				反定型			
	抗-A	抗-B	抗-D	chl	A ₁ c	Bc	Oc	自身 c
样本	1+	4+	4+	0	2+	0	0	0
A ₂ B	4+	4+	4+	0	/	/	/	/

注：0 代表阴性，/代表未测，chl 代表阴性对照

表 2 样本 ABO 血型鉴定结果(试管法)

室温	单克隆抗体					人源抗体			试剂红细胞			
	抗-A	抗-B	抗-D	抗-A ₁	抗-H	抗-A	抗-B	抗-AB	A ₁ c	Bc	Oc	自身 c
样本	1+	4+	4+	0	1+	0	4+W	4+W	2+	0	0	0
A ₂ B	4+	4+	4+	0	±	3+	4+W	4+W	/	/	/	/

注：±代表弱凝集，W 代表稍弱，0 代表阴性，/代表未测

PCR-SSP 检测结果：采用天津秀鹏生物技术有限公司人红细胞 ABO 血型基因检测试剂盒检测，样本 ABO 血型基因分型结果为 AB 型。

ABO 血型基因 DNA 测序结果：严格按 ABO 血型基因测序说明书操作（天津秀鹏生物技术有限公司）。通

过与 GENBANK 涉及的 dbRBC 网站公布的序列进行比对, 确定分型结果。ABO 基因 Exon6, 7 测序结果: 测序结果与 NCBI 网站提供的 ABO 基因 A101 参考序列进行比对, 发现在 ABO 基因 Exon7 存在的 626G/A 突变。

讨论: Ax 抗原是一种弱 A 抗原, Ax 表现型具有高度的遗传异质性, 主要血清学特征为 Ax 表现型红细胞与多数来源于 B 型血清的抗-A 不反应, 但可被大多数来源于 O 型个体的抗-AB 凝集且呈混合视野表现, 血清中通常含有抗-A1。

输血策略: 鉴于 AxB 亚型中可能产生的抗-A1 抗体, AxB 亚型作为受血者时应该接受 O 型洗涤红和 AB 型血浆, 本例 AxB 亚型患者因体质较好术中未输血; 而作为献血者, 文献报道了 4 名正常 AB 型女性患者输注了 AxB 亚型血浆(低温下检出不规则抗-A)后均无输血反应发生, 但研究者认为评价正常 AB 型患者输注 AxB 亚型红细胞的疗效还需要更多的数据。

11 《献血者 Ael 亚型 1 例及其家系调查》

作者: 郑朝晖 冯月清 杨光远

来源: 《中国输血杂志》2014年8月第27卷第8期

摘要:

目的: 通过1例ABO亚型及其家系血型的鉴定, 探讨ABO亚型的正确鉴定及对ABO亚型的输血原则。

方法: 应用ABO血型鉴定、吸收放散试验、血型物质测定等血清学技术及ABO基因直接测序分析来进行鉴定。

结果: 本例献血者父子血型血清学均符合Ael亚型特征, 先证者ABO基因第5~7外显子序列分析确定其ABO基因型为Ael01/O01。

结论: 在当前国内对ABO亚型的输血原则尚无明确的规定情况下, 临床用血应该严格遵循同型输注/相容性输注原则。

标本来源: 无偿献血者, 男, 汉族, 29岁, 无输血史, 已婚未育, 多次献血, 本次献血实验室检测该血样正定型为O型, 反定型也为O型, 但反定型时实验人员发现其血清与A细胞凝集强度较弱, 为+, 引起实验人员的关注, 为确保血型鉴定的正确, 送本站血型参比室作进一步鉴定, 其血型血清学符合Ael亚型特

征，经家系调查，该献血者父亲血型血清学亦为 Ael 亚型，送浙江省血液中心作 ABO 基因分析确定。

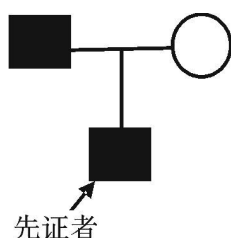
血清学结果：献血者(先证者)家 3 人 ABO 血型检测 ABO 血型正反定型结果提示献血者(先证者)父子红细胞反应格局为 O 型特性，但抗-A 明显减弱，进一步作抗-H、吸收放散及血型物质检测，显示两者红细胞均表达强的 H 抗原，通过吸收放散试验证实有极弱的 A 抗原，及唾液血型物质只有 H 血型物质，根据以上血清学结果，判定献血者(先证者)父子均为 Ael 亚型，而母亲为正常 B 型(表 1)。

表 1 献血者(先证者)家 3 人 ABO 血型血清学检查结果

	红细胞与抗血清		放散液与 A 细胞		血型物质		献血者血清与标准红细胞				
	单抗-A	单抗-B	人源抗-A	人源抗-B	抗 A,B	抗-H	AC	BC	OC		
献血者	0	0	0	0	0	2+	1+	4+	0	1+	H
父亲	0	0	0	0	0	2+	1+	4+	0	1+	H
母亲	0	4+	0	4+	未检	未检	4+	0	0	未检	未检

ABO 血型基因 DNA 测序结果：献血者(先证者)ABO 基因第 6 外显子 261 位缺失杂合，第 7 外显子 804insG 杂合，804 位插入 G 杂合导致 804 位后碱基出现连续杂合峰；其父 ABO 基因第 6 外显子 261 位缺失杂合和 297A/G，第 7 外显子为 646T/A、681G/A、771C/T、804insG 杂合。参照红细胞血型抗原基因突变数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmmt/about>)有关序列信息，确定先证者 ABO 基因型为 Ael01/O01，其父为 Ael01/O02，其母为 B101/O01。

献血者(先证者)家 3 人家系图：



讨论：Ael 型是 1 种较为罕见的 ABO 亚型，由等位基因产生，通常条件下，Ael 细胞与单克隆抗-A、单克隆抗-AB、人源抗-A、人源抗-AB 不发生凝集，但可以结合这些抗体，并通过吸收放散试验证明红细胞上有 A 抗原存在，分泌型唾液中可检测到 H 物质，但无 A 物质，其血清中常含有抗-A1，本例献血者父子血型血清学均符合 Ael 亚型，分子基因测序分析则进一步确定献血员 ABO 基因型为 Ael01/O01。Ael 亚型是 ABO 血型系统中非常罕见的亚型，有研究显示在 15 万名法国献血者中未发现 Ael 亚型个体，而在台湾地区 40 万名献血者中发现 5 例，提示 Ael 亚型在人群中频率很低且存在差异，所以完整的家系调查及分子生物学检测则能准确地鉴定此血型。ABO 系统的抗原除 A、B、O 以外，还有许多抗原性较弱的亚型或变异型，如 B3、Bx、Bm、Bel、A2、A3、Ax、Am、Ael 等，由于糖基转移酶基因第 6 和第 7 外显子的点突变或碱

基缺失等原因，减低或改变了酶的活性，导致 B 或 A 抗原的弱表达，从而给血型鉴定带来困难。本例献血者由于含有较弱的抗-A1，极易在实际工作中被误定为 O 型，因此血型工作者在遇到较弱的抗原抗体反应时，需引起高度重视，应送血型参比室做进一步检测，以免误定，必要时采用分子生物学技术加以辅助鉴定，以明确献血者血型。

输血策略：目前国内对 ABO 亚型的输血原则尚无明确的规定，基本上遵循同型输注或相容性输注原则。对于 Ael 型的献血者，由于其红细胞上 A 抗原强度极低，但其作为免疫原的作用尚不清楚，因此不宜当成 O 型输注，其红细胞洗涤后可输给 A 型患者，血浆宜作为 O 型使用。对于 Ael 亚型的受血者，由于其血清中常含有抗-A1，应选择 O 型洗涤红细胞输注，不宜选择 A 型红细胞悬液，血浆则首选 A 型血浆输注。本例献血者为第 4 次献血，前 3 次悬浮红细胞均作为 O 型输给患者，分送至 3 家不同的医院，经临床追溯，均未有输血反应发生，第 4 次悬浮红细胞经洗涤后作为 A 型供临床使用。

12 《罕见患者 Ael04 亚型 1 例及其家系调查》

作者：何卫社 梁俊杰 刘建岭 刘乐霞 王德平 冯丽娜 张燕 曹立敏

来源：《临床输血与检验》2017年4月第19卷第2期

标本来源：患者，女，26 岁，足月待产，无输血史、妊娠史，常规查血型为正定 O、反定 A，经家系调查，其母亲正定 O、反定 A，进一步做血型血清学鉴定，并送上海血液中心血型参比室做分子生物学鉴定。

血清学结果：该患者及其母亲的红细胞与抗-A、抗-B、抗-AB 在室温、4℃时均不凝集，与抗-H 出现强凝集。2 人的血清中除有正常抗-B 外，在 4℃与 A2c、自身 c、Oc 均不反应，与 Ac 有弱凝集，证明血清中有抗-A1；吸收放散试验效价为 64 的人源抗-A 经被检者红细胞和对照 A 型红细胞吸收后，被检者抗-A 的效价降为 16，对照 A 型红细胞抗-A 效价降为 0，被检者放散抗-A 的效价为 32，对照 A 型红细胞放散抗-A 效价为 0，阴性对照 O 型红细胞放散液为阴性，证明被检者的 A 抗原比正常 A 型的 A 抗原吸收能力弱，放散能力强，红细胞上有弱的 A 抗原；血型物质测定显示患者为分泌型，分泌 H 型物质，不分泌 A 型、B 型物质。见表 1。

表1 血型血清学、分子生物学检测结果

		正定型						反定型						吸收 放散	血型物质	
		长春试剂			人源试剂		抗-H		抗-A ₁	Ac	A ₂ c	Bc	Oc			自身c
		抗-A	抗-B	抗-AB	抗-A	抗-B	Pc	Bc								
患者	室温	0	0	0	0	0	4+	1+ ^W	0	0	0	3+ ^s	0	0	A	均为分泌型，分泌H型物质，不分泌A型、B型物质
	4℃	0	0	0	0	0				±	0	4+	0	0		
母亲	室温	0	0	0	0	0	4+	1+ ^W		0	0	4+	0	0	A	
	4℃	0	0	0	0	0				±	0	4+	0	0		

家系调查结果：家系3代中有2人为Ael亚型。见图1。

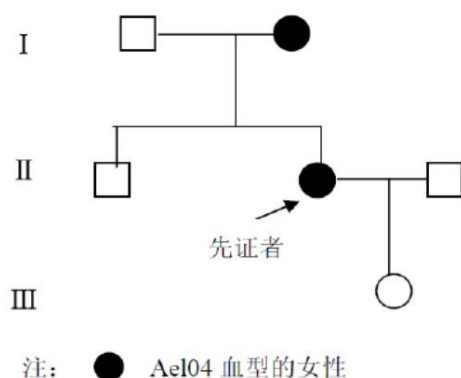


图1 Ael04家系血型遗传图

PCR-SSP 检测结果：患者及其母亲标本送上海市血液中心国家血型参比室进行分子生物学鉴定。

患者及其母亲基因型分别为 Ael04/O201、Ael04/O101。见表1。

讨论：本研究血型血清学试验结果显示患者及其母亲均为A细胞不被抗-A、抗-AB凝集，但经吸收放散试验可证实红细胞上有极弱的A抗原，唾液中含H物质，不含A物质，符合Ael血型血清学特点。本例患者及其母亲血清中均有抗-A₁，肯定了某些Ael个体血清中含抗-A₁。Ael与Ax、Am的区别主要在于Ax血清中常有抗-A₁抗体，而Am唾液血型物质有A、H物质。采用分子生物学方法进行基因定型，本例患者及其母亲均为Intron65G>A突变，对照血型抗原基因突变数据库，其等位基因均为Ael04。家系调查及分子生物学鉴定发现此患者Ael04血型从母亲遗传所得，其家族目前已遗传了2代，本例证实了Ael的遗传性。由此可见，血清学方法无法对亚型正确定型，通过分子生物学技术，结合家系调查揭示血型遗传方式，可得到准确的血型结果，因此，分子生物学技术及家系调查是血型血清学方法的重要辅助手段。Ael亚型红细胞上的A抗原极弱，一般情况下不易检出，患者及其母亲血清中不但含有抗-B，还有抗-A₁，易将其误定为“O”型。

输血策略：该Ael亚型患者由于其血清中有抗-A₁，不能接受A型红细胞，而应输注O型红细胞，作为献

血者，血浆不应输给 A 型患者。

13 《罕见 Ael05/B101 亚型鉴定及输血探讨》

作者：冯强，肖建宇，吴敏慧，张月香，夏勇，穆鑫，陈青

来源：《中国实验血液学杂志》2017； 25(5) ： 1528—1531

摘要：

目的：应用分子生物学方法鉴定 ABO 正反定型不一致的患者，并探讨合理的输血策略。

方法：在常规血型血清学鉴定的基础上，应用吸收放散法鉴定弱血型抗原；PCR 方法扩增 ABO 基因的 7 个外显子及侧翼内含子；对扩增产物进行直接测序及克隆测序分析。

结果：患者 ABO 血型正反定型不一致，患者正定型为 B 型，反定型为 AB 型；吸收放散试验证明患者红细胞上存在弱 A 抗原，ABO 基因测序发现第 7 外显子 767 位碱基 T>C 突变，导致 256 位异亮氨酸被苏氨酸替换，血型基因型为 ABO*Ael05/B101。

结论：α-1, 3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶基因的 767 位 T>C 突变是导致 Ael05 亚型 A 抗原表达减弱的分子机制。

标本来源：女，40 岁，汉族，孕 3 产 2 孕 19 周+6d，低置胎盘，中期引产入院。有剖宫产史，无输血史，术前常规检查血型提示 ABO 血型正反定型不符。

血清学结果：该标本经伽利略全自动血型仪(微孔板法)检测正定型为 B 型，反定型与 A1c 及 Bc 均未见凝集，提示 ABO 血型正反不符；手工试管法复检正定型抗-B 凝集强度 4+，反定型 A1c 侧可观察到 w+凝集(表 1)。该患者自身对照及直接抗人球蛋白试验阴性，排除自身抗体存在，不规则抗体筛查阴性，红细胞吸收放散试验结果证实患者红细胞上存在弱 A 抗原，血清中存在不规则抗-A，红细胞与抗-H 反应强度较弱(w+)，推测血型可能为 AelB 亚型。

Table 1. Results of ABO forward and reverse typing of the proband

Experimental conditions	Reactions of RBCs					Reactions of serum			
	Anti-A	Anti-B	Anti-A, B	Anti-A1	Anti-H	A1 cells	B cells	O cells	Self cells
Microplate testing	0	4 +	NA	0	NA	0	0	0	0
Tube testing	0	4 +	4 +	0	w +	w +	0	0	0

1 + to 4 +, agglutination of increasing strength; 0, no agglutination; w +, weak positive; NA, not applicable.

ABO 血型基因 DNA 测序结果: 委托上海生工生物技术有限公司进行测序。直接测序分析发现, 该患者 ABO 基因的第 1—5 外显子及第 6 内含子未发现任何突变, 第 6、7 外显子上存在 297A/G、467C/T、526C/G、657C/T、703A/G、767T/C、796C/A、803G/C、930A/G 杂合。经直接测序可证实该患者的基因型为 ABO*A102/B101, 但不能确定 767 位突变点位于 A 还是 B 基因。

单倍型序列分析: 对患者标本进行 TA 克隆后测序发现, 有 1 条单倍型为常见的 B101, 而另 1 条单倍型与 A101 相比, 第 7 外显子的 467 位碱基发生 C>T 突变, 767 位碱基发生 T>C 突变, 此两个突变分别引起多肽链 156 位氨基酸发生脯氨酸(Pro)被亮氨酸(Leu)替换, 256 位氨基酸发生异亮氨酸(Ile)被苏氨酸(Thr)替换, 检索血型抗原基因突变数据库 BG-MUT, ABO 血型基因型为 ABO*Ael05/B101。

讨论: 临床上较常见的 A 亚型按红细胞上 A 抗原决定簇数量下降依次分为 A1, A2, A3, Ax, Aend, Am 及 Ael, 其中 Ael 亚型红细胞上 A 抗原量最少, 约为 A1 亚型的 1/1000, 通常情况下不被抗-A 及抗 A, B 凝集, 经吸收放散试验方可证实红细胞与抗-A 试剂的反应性, 其血清与 A 型红细胞不凝集或弱凝集, 即 A 放散型(Ael)。大多数 Ael 等位基因的先证人群为亚洲人, 且 Ael 在人群中频率较低且存在差异, 报道显示韩国约 0.001%、日本约 0.0049%。Ael 血型亚型在我国人群表达概率约为八万分之一, 约为 Rh 阴性血型的千分之一。本例患者经吸收放散试验证实, 红细胞上存在较弱的 A 抗原以及正常的 B 抗原; 血清中存在针对弱 A 抗原产生的不规则抗-A, 可凝集 A1c(w+), 符合 AB 亚型个体血清学表现, 但不能精准判定其分型, 所以对患者 ABO 基因进行测序分析。结果发现, 767 位碱基存在 T>C 突变, 通过比对确定该患者基因型为 ABO*Ael05/B101。该突变导致 256 位异亮氨酸被苏氨酸替换, 可能导致 α -1, 3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶活性降低, 从而使 A 抗原表达减弱, 血清中产生抗-A 抗体, 形成 Ael 亚型。检索血型抗原基因突变数据库, 767 位碱基突变只有 Ael05 等位基因, 其他等位基因未发现在 767 位发生突变。另外, 与 A101 相比, 发现第 7 外显子的 467 位碱基发生 C>T 突变, 这一差别对于表现型无明显影响。Ael05 等位基因最早由吴国光等在 2008 年报道, 到目前为止, 共发现 12 种形成 Ael 亚型的等位基因。Ael 形成的分子机制有点突变, 插入, 缺失, 拼接位点突变, 重组位点位于外显子 7 的 A1v—O1v 杂交基因等。由于不同单克隆抗 A、B 血清对亚型抗原检出能力有差别, 会出现弱抗原漏检现象, 为临床输血造成安全隐患。ABO 亚型表型的判断, 通常是与标准血清抗体的反应强度、H 抗原表达强度、吸收放散相应血型抗体的能力以及分泌型唾液中 ABO 血型物质等血清学反应格局来综合分析, 同时还要排除白血病及某些恶性肿瘤造成的抗原减弱、免疫抑制导致的抗体分泌量减弱等干扰因素。随着分子生物学技术的发展, 基因分型在血清学

方法难以区分的疑难血型案例中发挥重要作用，从而进一步明确患者血型，为临床实现个体化血液管理，保障医疗用血安全。为保证患者用血安全，在临床工作中，应重视血型亚型的鉴定，对有疑问的血型应与临床医师及患者家属沟通，及时进行吸收放散等血型血清学检测，有必要时应进行分子生物学检查明确基因分型，并对有意愿患者开展家系调查，为稀有血型患者提供输血安全保障。

输血策略：本例患者因 ABO 血型检测正反定型出现凝集强度差异而引起重视，该类患者在紧急输血情况下可考虑输注 O 型或 B 型洗涤红细胞及 AB 型血浆和单采血小板。因其红细胞上 A 抗原与正常 A 抗原不同，且血清中含有抗 A 抗体，一般不宜输入 AB 型红细胞制剂，但亦有学者认为可选择经卡氏抗人球蛋白交叉配血试验相合的 AB 型红细胞制剂输注。同时应积极寻找血源进行同型输注或开展自身输血，但不应拘泥于完全同型输注而延误治疗时机。目前针对 AelB 血型输血策略的认识还需进一步以循证医学为基础的输血实践证实。对于 AelB 血型供血者易出现血型鉴定结果不一致和交叉配血困难，给异体同种输血带来风险，一般在血型确定后应取消其献血资格或报废血液，或将其红细胞冻存为相同亚型患者提供宝贵资源。

14 《ABO 血型新等位基因 Ael08 的分子生物学研究》

作者：吕杭军 洪小珍 应燕玲 许先国 朱发明 严力行

来源：《中国输血杂志》2011 年 08 月第 24 卷第 08 期

摘要：

目的：研究 ABO 新等位基因 Ael08 的分子机制。

方法：利用单克隆抗体检测先证者标本红细胞 ABO 血型抗原，标准 A、B、O 红细胞检测血清中的 ABO 抗体，吸收放散试验检测红细胞上微量抗原；采用 PCR 技术扩增先证者 ABO 基因的第 5~7 外显子序列，PCR 产物经双酶切后直接测序分析 6 和 7 外显子；扩增产物经 TOPOTA 克隆到质粒载体中获得单链，对所得克隆作 ABO 基因第 6、7 外显子双向测序分析；家系调查采集先证者父亲和哥哥的标本作血型血清学试验和 ABO 基因第 6 和 7 外显子直接测序分析。

结果：先证者红细胞上表达很弱的 A 抗原，只有通过吸收放散才能有效检出，同时其血浆中存在较强的抗-B 和较弱的抗-A；直接测序分析发现：6 号外显子第 261 位缺失杂合，7 号外显子第 297 位 A/G、467C/T、646T/A、681G/A、771C/T、829G/A、804insG/G 杂合；克隆测序发现 1 个为常见的 O02 等位基因，另 1 个

为 1 种新的等位基因(已被 dRBCNCBI 命名为 Ael08), 与 A102 比较, Ael08 在第 804 位碱基处插入 G, 这导致氨基酸第 268 位后阅读框架发生改变, 编码产物比正常 A1 转移酶多 37 个氨基酸。家系调查显示: 先证者 Ael08 等位基因从父亲遗传所得。

结论: 发现 1 个 ABO 新等位基因 Ael08, α -1, 3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶基因(A 基因)第 804 位碱基处插入 G 突变导致产生 Ael 表型。

标本来源: 献血者, 男, 汉族, 37 岁, 无输血史; 2010 年 9 月来本中心参加无偿献血, 因血液检验时 ABO 血型正反定型中发现结果不一致而进一步检查分析; 家系调查: 采集其父亲、哥哥的外周抗凝血标本各 5ml, 作 ABO 血型血清学检查和分子生物学实验分析。突变点频率调查标本为 2009 年 1 月在本中心的随机无偿献血者的 407 份标本, 每份标本为抗凝全血 5ml, -20°C 以下冰冻备用。

血清学结果: 献血者为 RhD 阳性; ABO 血型正定型: 红细胞与抗-A、-B 及-AB 的凝集强度均为 0, 与抗-H 凝集强度为 4+; 反定型: 血清与标准 A1、B 型细胞凝集强度为 2+、4+, 与 O 型细胞不凝集。提示献血者红细胞反应格局疑为 O 型特性, 但其血清中抗-A 强度明显表现较弱。进一步作吸收放散试验: 红细胞吸收放散上清液, 与 A 细胞反应凝集强度为 2+, 与酶处理 A 细胞反应凝集强度为 3+。综合血清学检测反应特性提示: 献血者中红细胞上表达很弱的 A 抗原, 只有通过吸收放散才能有效检出, 同时其血清中存在较强的抗-B 和较弱的抗-A。先证者父亲、哥哥标本正定型红细胞与抗-A、-B 凝集强度均为 0, 反定型其血清与标准 A1、B 型细胞凝集强度分别为 2+、4+; 吸收放散试验显示二者红细胞上表达很弱的 A 抗原。

ABO 血型基因 DNA 测序结果: BigDye terminator V3.1 Sequencing kit(美国 ABI 公司), DNA 测序仪(3730 型)(美国 ABI 公司)。先证者 ABO 基因第 6、7 外显子直接测序分析: 第 6 外显子 261 位缺失杂合和 297A/G, 第 7 外显子为 467C/T、646T/A、681G/A、771C/T、829G/A、804insG 杂合, 804 位插入 G 杂合表现为 804 位后碱基连续杂合峰的存在。参照红细胞血型抗原基因突变数据库 BGMUT 有关序列信息, 根据标本多态性位点情况, 不能指定其 ABO 基因型。与其最接近的基因型为 Ael01O02, 但存在 467C>T 突变或者是 A102O02, 在 804 位插入 G 突变。

ABO 基因克隆测序分析: 对先证者标本 TOPO 克隆测序: 1 条单体型为常见的 O02 等位基因, 另外 1 条单体型为 1 个新等位基因, 并已被 dRBCNCBI 命名为 Ael08, 新等位基因的序列已提交 GenBank, 序列登记号为 HQ843789。与 A102 相比, Ael08 在第 804 位碱基处插入 G, 这导致氨基酸第 268 位后阅读框架发生改变, 终止密码位置后移, 导致第 268 位后氨基酸发生改变; 另外 Ael08 等位基因编码 391 个氨基酸, 比

正常 A1 转移酶多 37 个氨基酸。家系调查：父亲标本 AB 基因第 6、7 外显子测序结果为 Ael08O01，显示先证者 Ael08 从父亲遗传获取，先证者哥哥的基因型为 Ael08O02。

804 位插入 G 突变点频率分析：随机的 417 名献血者，通过 ABO 基因第 6、7 外显子测序分析，所有标本未发现 804 位插入 G 的情况；这提示人群中 804 位插入 G 的频率至少 $<0.12\%$ 。

讨论：本例中的这名献血者因正反定型结果中抗-A1 凝集强度降低而经进一步分析并最终确认为 A 亚型，故在常规检测工作中应注意献血者 ABO 血型正反定型不一致或抗体凝集强度降低的现象，必要时采用分子生物学技术加以辅助鉴定，同时结合血清学试验的特性，以明确献血者血型。在本例中我们通过扩增先证者标本外显子第 5~7 序列，检测了第 6、7 外显子多态性；但应注意到人群中部分标本其他外显子上可能存在突变，特别是在第 6 和 7 外显子中未能发现突变点与血清学特性符合的情形下，需要考虑分析其他外显子的情况。Ael 是 1 种 ABO 血型亚型，其红细胞上 A 抗原表达量极弱，常与单克隆抗-A、-AB 显示不凝集或极微弱的凝集，往往只能通过吸收放散才能检出。现已被 NCBI 血型抗原基因突变数据库确认的 Ael 等位基因有 8 个，大多数 AEL 等位基因的先证者为亚洲人群，其分子机制包括为点突变、插入、缺失、内含子拼接位点突变等。据报道 Ael 个体血清中常含有抗-A1，本例中先证者标本血清中也存在较弱的抗-A1，由于 Ael 表型红细胞与抗-A 试剂反应基本上无凝集，而在其血浆中可存在较弱凝集的抗-A1，与 A 型细胞呈现凝集强度为 $\pm \sim 2+$ ，因此在实际工作中可能误判为 O 型。

输血策略：本例中的先证者已献血 2 次，其中第 1 次献血误指定为 O 型，并被临床当成 O 型使用，临床交叉配血和输注均未发现异常，第 2 次献血才被正确判定为 Ael 表型。目前国内对 ABO 亚型个体的输血原则尚缺乏明确的标准，但基本上遵循同型或相容性输注原则。从现有的血清学特性和分子机制来看，对于 Ael 表型的献血者而言，其所献血液宜作为 A 型洗涤红细胞供临床使用，尽管其红细胞上 A 抗原强度极低，但其作为免疫原的作用尚不清楚，因此不宜当成 O 型使用；而 Ael 表型的受血者应遵循相容性的原则，由于其血清中常含有抗-A1，其红细胞上 A 抗原与正常 A 抗原存在明显不同，应选择 O 型洗涤红细胞输注，通常不宜选择 A 型红细胞。

15 《一例罕见 Ael08 的血清学鉴定及基因测序》

作者：丁琴丽 凌止发 赖蜜 邹丽萍 邱芳

摘要：

目的：通过对本实验室 1 例正反定型不符的骨科患者标本进行血型鉴定，探讨 ABO 亚型鉴定的重要意义。

方法：应用常规试验以及吸收放散试验等血清学方法和 ABO 基因直接测序进行鉴定。

结果：患者红细胞上含有弱 A 抗原，血清中检出了不规则抗-A1，ABO 血型为 Ael 亚型，其基因型为 Ael08/O02。

结论：A 亚型最主要的血清学特征是红细胞抗原数量的减少，红细胞与试剂血清表现为弱凝集或者不凝集，易误定为 O 型，给患者输血带来风险。在日常工作中重视 ABO 亚型的存在，能够减少临床输血反应，保证临床输血安全。

标本来源：胡某，男，58 岁，汉族，临床诊断：左股骨颈骨折，肝硬化，脾肿大，低血小板血症。无输血史，无用药史。ABO 正反定型不符。

血清学结果：

（1）血型初检：正定型所用试剂为单克隆抗-A、抗-B 时和人源抗-A、抗-B 时，患者正定型均为 O 型，反定型经多次离心后血清与 A1 细胞有弱凝集(表 1)。

表 1 患者正反定型结果

	ABO 正定型					ABO 反定型			
	单-A	单-B	人-A	人-B	-A ₁	A ₁ c	Bc	Oc	自身
立即离心	0	0	0	0	0	0	3+	0	0
二次离心	0	0	0	0	0	0	3+	0	0
多次离心	0	0	0	0	0	1+ ^W	3+ ^S	0	0
4℃ 10min	0	0	0	0		1+	3+ ^S	0	0

（2）患者抗-H 结果：选取与患者标本同等新鲜程度的正常 O 细胞和 B 细胞做对照，检测患者红细胞上的 H 抗原，发现患者 H 抗原增强。

（3）患者吸收放散结果：选取与患者标本同等新鲜程度的正常 O 细胞做阴性对照，用人源抗-A 对患者标本及对照管在 4℃ 进行吸收，在 56℃ 进行热放散得到放散液，加入 A1 细胞，放散液中检出不规则抗体，红细胞表面上存在弱 A 抗原(表 2)。

表 2 患者吸收放散结果

放散液	Pc	Oc
立即离心	1+	0
二次离心	1+ ^S	0
4℃ 10min	2+	0

(4) 患者血清与 A2 细胞反应结果：室温中不凝集，4℃增强后仍不凝集，说明血清中的不规则抗体为不规则抗-A1。

ABO 血型基因 DNA 测序结果：基因直接测序送至上海生物工程有限公司完成。对该标本 ABO 基因第 6、7 外显子直接测序，得到以下结果：第 6 外显子 261delG 杂合、297A/G；第 7 外显子 467C/T，646T/A，681G/A，771C/T，804insG，829G/A。根据红细胞血型抗原基因突变数据库，确定该患者的 ABO 血型基因型为 Ael08/O02。

讨论：A 亚型的主要特征是红细胞上的 A 抗原数量减少，与抗-H 反应相对增强。在本实验中，患者红细胞上存在弱 A 抗原，同时 H 抗原反应增强，其血型的反应格局符合 Ael 亚型。同时对该标本进行 ABO 基因直接测序，测序结果说明其基因型为 Ael08/O02，因此可以确定该患者为 Ael 亚型。Ael 亚型是 1 种比较少见的 ABO 亚型，其红细胞上 A 抗原表达量极弱，只能通过吸收放散才能检出。Ael 亚型是由等位基因产生的，有报道 Ael 是可以通过遗传获取的。通常情况下，由于 Ael 亚型的红细胞不与抗-A 标准血清凝集，而其血清中大多数带有不规则抗体，因此很容易被误定为 O 型。亚型鉴定所需试剂品种较少，操作方法简单，影响因素少，因此我们应该在日常工作中重视 ABO 亚型的存在，必要时使用血清学结合分子生物学对标本进行正确的血型鉴定，这样能够减少临床输血反应，保证临床输血安全。

输血策略：在临床输血时，当弱亚型患者血液错误地定型为 O 型而输注 O 型血液时，预期应无严重后果；但是，若具有弱 A 抗原的供血者血液被定型错误而输给 O 型患者时，则能引起严重的输血反应。

16 《Ael 亚型的分子生物学研究》

作者：许先国 何吉 洪小珍 傅启华 吴俊杰 朱发明 严力行

来源：《中国输血杂志》2003 年 4 月第 16 卷第 2 期

摘要：

目的：研究汉族 ABO 血型系统 Ael 亚型分子基因基础。

方法：在标准血清学鉴定的基础上，对 2 例汉族 Ael 亚型进行 PCR-SSP 基因分型。并根据第 6、7 外显子及两侧内含子的保守序列设计引物进行扩增，PCR 产物经割胶纯化后直接序列分析。

结果：PCR-SSP 基因分型排除了其中一个等位基因为 A2、B、O1 和 O2 基因的可能。DNA 序列分析表明，该 Ael 亚型基因与 A1 基因相比，有(798~804)G 插入和 C(I-5/532)T 两处突变，推测的蛋白质除羧基端 86 个氨基酸残基与 A1 糖基转移酶不同外，还比 A1 转移酶多 37 个残基。

结论：(798~804)G 插入和 C(I-5/532)T 两处突变揭示了 Ael 亚型的分子基础。

标本来源：健康女性献血者，初检正定型 O，反定型 A，故进行深入研究和家系调查。

血清学结果：献血者一家血型及唾液血型物质检测结果见表 3。根据血清学结果，判定献血者为 Ael 亚型，父亲血型为正常 O 型，母亲虽未做唾液血型物质检测，但根据遗传规则可推测也为 Ael 亚型。

表 3 一家3人血型血清学检查结果

	正定型					反定型			吸收 唾液血		
	单抗-A	人源抗 A	抗 A ₁	抗-B	抗-A,B	抗-H	Ac	Bc	Oc	放散	型物质
献血者	0	0	0	0	0	4+	0	4+	0	A	H
母亲	0	0	0	0	0	4+	0~2+ *	4+	0	A	未检
父亲	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	0	未检	未检

* 母亲血清与普通 Ac 在 22℃时为 1+，37℃时为 0，与木瓜酶处理 Ac 为 2+

PCR-SSP 检测结果：按照本实验室建立的 A1、A2、B、O1、O2 基因分型方法，对献血者家庭 3 人进行 PCR-SSP 基因分型。一家 3 人及正常 A1/A1、A1/O1 血型 PCR-SSP 检测结果见表 4。根据 O1/非 O1 结果，献血者与母亲其中一条染色体上有 O1 基因(261G 缺失)，另一条染色体上有非 O1 基因(261G 不缺失)；根据其他结果，该非 O1 基因可以排除 O2、B 及 A2 基因。按常规的 ABO 三复等位基因理论判断，该非 O1 基因应为 A1 基因，即献血者和母亲皆为 A1/+O1 杂合(与正常 A1/O1 血型一样)。但该判断与血清学结果(Ael 亚型)不符，故需对其进行进一步作 DNA 序列分析。

表 4 一家3人及正常 A₁/ A₁、A₁/ O₁ 血型 PCR-SSP 检测结果

	O ₁	非 O ₁	O ₂	非 O ₂	B	非 B	A ₂	非 A ₂	判断
献血者	+	+	—	+	—	+	—	+	A ₁ / O ₁
母亲	+	+	—	+	—	+	—	+	A ₁ / O ₁
父亲	+	—	—	+	—	+	—	+	O ₁ / O ₁
A ₁ / A ₁	—	+	—	+	—	+	—	+	A ₁ / A ₁
A ₁ / O ₁	+	+	—	+	—	+	—	+	A ₁ / O ₁

ABO 血型基因 DNA 测序结果: BigDye™ Sequencing kit (ABI 公司), ABI PRISM™ 377 测序仪。以正常 A₁/A₁、O₁/O₁ 样本为对照, 对一家 3 人的 ABO 基因第 6、7 外显子及部分内含子序列分析, 献血者及母亲序列发现两处变异: 一处为第 798~805 位(第 7 外显子内)连续 8G, 而 A₁ 基因为 798~804 位 7G, 即该 Ael 分子在第 798~804 插入单核苷酸 G; 另一处为第 5 内含子 532 位(I-5/532, 即第 6 外显子 5'端上游-23 位)T 突变, 而 A₁ 基因为 C, 即 C(I-5/532)T。父亲为正常 O₁/O₁ 基因, 其 798~804 位、I-5/532 位与 A₁ 基因相同, 可知献血者(798~804)G 插入和 C(I-5/532)T 均由母亲遗传所得, 为该 Ael 分子特有。

讨论: 本实验对一个汉族家庭的 2 例 Ael 个体进行 DNA 扩增和序列分析。国外已报道的 Ael 亚型分为两种类型: 其中 Ael01 与 A₁ 相比为(798~804)G 插入, 其余序列相同; Ael02 与 A₁ 基因相比有 C467T、T646A、G681A 三处突变。本例中国汉族 Ael 亚型与 Olsson 等报道的白种人 Ael01 在(798~804)G 插入相同, 但 C(I-5/532)T 突变未见报道。由于(798~804)G 插入, 导致 Ael 基因 804 位后产生移码突变, 延长了 A 基因阅读框架。推测的表达产物与 A₁ 转移酶比较, 不仅随后的羧基端 86 个氨基酸残基改变, 而且比 A₁ 转移酶多 37 个残基, 比 A₂ 转移酶多 16 个残基。可能由于这些改变, 降低了 Ael 产物的糖基转移酶活性。对于 C(I-5/532)T 突变是否最终引起产物酶活性改变很难预测, 可能与 Ael 基因转录调控有关。

输血策略: Ael 红细胞不与抗 A 及抗-A, B 凝集, 但其吸收放散试验中表现有 A 特异性, 唾液中含有 H 物质而不含 A 物质, 献血者测定结果与之相符。而 Ael 亚型的血清中是否含有抗-A₁ 尚不肯定, 本献血者血清中无抗-A₁, 而母亲血清中有抗-A₁, 肯定了在某些 Ael 个体血清中含抗-A₁, 也说明该抗-A₁ 为日常 A 物质或类似 A 物质接触后逐渐形成。对母亲这种 Ael 亚型极易被误定为 O 型, 当其为受血者时, 输入 O 型血一般无输血反应; 当其为供血者时, Ael 血输入 O 型患者体内, 可能会引起严重输血反应, 对此类标本应严格检测。

17 《Ax 亚型的血清学和基因型研究》

作者：蔡雪娇，周湘静，谢作听

来源：《中国卫生检验杂志》2018 年 10 月第 28 卷第 20 期

摘要：

目的：研究分析 Ax 亚型伴抗 A1 抗体产生的血清学和分子生物学特点。

方法：收集 1 例 A 抗原减弱的样本，应用微柱凝胶法、试管凝集法和吸收放散实验等血清学方法鉴定该样本 ABO 血型表型，序列特异性引物—聚合酶链反应扩增 ABO 基因第 6、7 外显子，PCR 产物经割胶纯化后直接测序。

结果：患者红细胞上存在 A 抗原，血清中有含抗 A1 抗体。直接测序检测到该样本 646T>A；681G>A；771C>T；829G>A 突变。

结论：该样本 646T>A；681G>A；771C>T；829G>A 突变导致 A 抗原减弱，其基因型为 Ax03。

标本来源：因肠梗阻而入院的患者，女性，汉族，40 岁，有妊娠史，无输血史。

血清学结果：该患者样本正定型红细胞悬液与抗 A 抗体+，与抗 A1 抗体不凝集，反定型与标准 A 型细胞反应有+，与标准 B 型细胞反应有+++，吸收放散试验放散出 A 抗原，该患者红细胞上存在 A 抗原，血清中含有抗 A1 抗体。

ABO 血型基因 DNA 测序结果：ABO 基因位点的扩增和扩增引物测序分析参照相关文献。测序仪是美国 ABI 公司制造。ABO 基因的第 6、7 外显子和第 5 内含子的测序结果分析，检测到 646T>A；681G>A；771C>T；829G>A 突变，在血型抗原突变数据库(BGMUT)中进行检索，确定该患者基因型为 Ax03/O02。

讨论：Ax 亚型是 ABO 亚型中比较常见的一种表现型之一，它的血清学特点为 Ax 细胞与来源于 B 型个体的抗 A 反应呈现弱凝集，而与 O 型个体的抗 AB 凝集则反应增强，血清中往往含有抗 A1，分泌型个体的唾液中缺少 A 物质，只含有 H 物质。本研究中该样本正定型红细胞悬液与抗 A 抗体反应很弱+，与抗 A1 抗体反应不凝集，反定型血浆与标准 A 型细胞反应有+，与标准 B 型细胞反应有+++，根据血清学反应格局疑为 Ax，且含有抗 A1 抗体。采用分子生物学分析，检测到 646T>A；681G>A；771C>T；829G>A 突变。在血型抗原突变数据库(BGMUT)中进行检索，确定该患者的基因型为 Ax03/O02。进一步对其进行家系调查，其父亲是正常的 O 型，其母亲由于早逝，无法确定其血型，所以无法确定该突变是遗传来自其母亲还是该

基因在患者身上是首次突变。对于 Ax 亚型的标本，由于凝集很弱，如果结果观察不仔细，很容易被误定为 O 型。

输血策略：误定为 O 型的 A 亚型患者，若输注了 O 型的血液，输入的 O 型献血者血浆中的抗 A 抗体会与患者红细胞上的 A 抗原反应，可能会出现输血反应。所以血型鉴定一定要进行正反定型，同时结合吸收放散实验，血型鉴定有疑问时，利用基因测序，能进一步确保血型鉴定的准确性。此 Ax 亚型患者输血宜选择同 Ax 亚型或者 O 型洗涤红细胞，以防溶血性输血反应的发生。该患者入院时血红蛋白(Hb)为 70g/L，入院后分别给患者输注了 4 个单位 O 型洗涤红细胞，无输血不良反应，Hb 升至 100/L，好转而出院。

18 《中国人群 ABO 亚型中一个新的 Ax 等位基因的鉴定》

作者：蔡晓红 金沙 刘曦 王健莲 陆琼 沈伟 范亮峰 刘达庄 向东

来源：《临床血液学杂志》2009 年 6 月第 22 卷第 6 期

摘要：

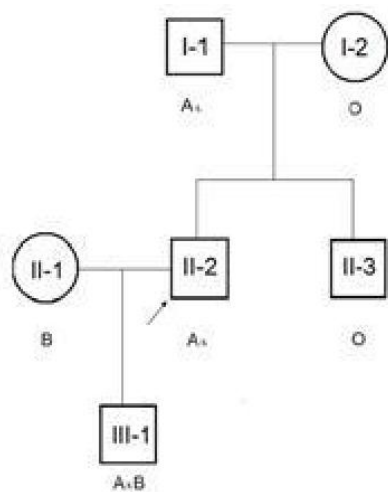
目的：Ax 是一种罕见的 ABO 亚型，其分子机理尚未完全阐明。本文以一个 Ax 亚型家系和一个无关的 Ax 亚型献血者个体为对象，研究中国人群 Ax 亚型的分子基础。

方法：ABO 血清学定型、血浆 N-乙酰-D-半乳糖胺基转移酶(A 酶)活性测定、ABO 基因 7 个外显子及其侧翼序列的 PCR 扩增、基因克隆和测序分析。

结果：DNA 克隆和测序分析显示，家系先证者和无关献血者个体的 ABO 基因分别为 A/O01 和 A/O02 基因型，在第 7 外显子均存在 426G>C 杂合突变，导致 N-乙酰-D-半乳糖胺基转移酶的氨基酸发生 M142I 改变。在 120 个正常样本中未检出此突变。

结论：ABO 基因 426G>C 突变导致的 N-乙酰-D-半乳糖胺基转移酶第 142 位氨基酸置换改变了酶的保守区域，从而降低了酶的催化活性，导致 Ax 表现型。本突变为国际首次报道。

标本来源：一个 ABO 血型为 Ax 的中国籍汉族家系，先证者为健康献血者，3 代共 6 名家系成员(见图 1)，无 6 个月内的新生儿；以及另一名无血缘关系的 Ax 亚型献血者(QC78)。所有研究对象均已知情同意。随机选择 120 名 ABO 血型正常的献血者作为对照。



箭头代表先证者
图 1 A_x 亚型家系图

血清学结果: 本研究中涉及的亚型个体的血清学结果及相应基因型见表 1。家系中先证者(II-2)及其父亲(I-1)为 A_x 血型, 先证者儿子(III-1)表现为 A_xB。先证者母亲(I-2)、妻子(II-1)和兄弟(II-3)ABO 由于血型正常, 分别为 O 型、B 型和 O 型(见图 1), 未进一步进行基因检测。无关献血者个体(QC78)的表现型也为 A_x 血型。A_x 和 A_xB 个体的血浆中, 未能检测到 A 酶的活性。

表 1 A_x 亚型家系成员和献血者的血清学鉴定结果

	抗-A	抗-B	抗-A1	抗-A, B	抗-H *	A 细胞	B 细胞	O 细胞	血浆 A 酶活性 (滴度) [†]	表型	基因型
I-1	1+ / 1+ ^w	N / N	N	2+ / 1+ ^s	2+	1+ ^w	3+ ^w	N	0	A _x	A _x 14 / O01
II-2	1+ / 1+	N / N	N	2+ / 1+ ^s	2+	1+ ^w	3+	N	0	A _x	A _x 14 / O01
III-1	2+ / 2+	4+ / 4+	N	4+ / 3+	1+	1+ ^w	N	N	0	A _x B	A _x 14 / B101
QC78	1+ / 1+	N / N	N	2+ / 1+ ^s	2+	1+	3+	N	0	A _x	A _x 14 / O02

注: 正定型斜线左侧和右侧分别为单克隆和多克隆抗血清检测的结果。和 A 细胞反应的抗-A 和抗-A, B 经标准化, 使得和正常 A 细胞有相同的反应度。N 表示阴性, s 表示强, w 表示弱。* 抗 H 和正常 A 和 O 细胞在相同的反应条件下进行, 凝集强度分别为 1+ 和 3+。[†] 滴度以导致凝集的抗-A 的最高稀释度表示。试验对照 O 和 B 血浆的检测结果为 0, 对照 AB 血浆的检测结果为 1 : 64。

ABO 血型基因 DNA 测序结果: 使用 ABI 377 测序仪(美国 Applied Biosystems 公司)进行测序分析。家系中血清学表现为 A_x 或 A_xB 血型的成员, 以及单个献血者个体, 进行 ABO 基因 7 个外显子及其侧翼序列和第 6 内含子直接测序。120 名献血者仅进行第 7 外显子的测序。家系中的先证者(II-2)ABO 基因第 7 外显子存在 426G>C 杂合突变。克隆后的 PCR 产物测序结果显示, 先证者的 ABO 基因型为 A/O01, 426G>C 突变位于先证者的 A 基因上, A 基因还存在一个 467C>T 多态性, 为 A102 型等位基因。等位基因命名遵循 BGAGMD(血型抗原基因突变数据库)里的术语。本文报道的 A_x 等位基因已提交 GenBank 和 BGAGMD, 序列号 EU551754, 等位基因命名 A_x14。家系中先证者的父亲(I-1)和儿子(III-1)以及无关献血者个体均存在

426G>C 杂合突变，基因型分别为 Ax14/O01、Ax14/B101 和 Ax14/O02。第 426 位核苷酸 G 被 C 替换，导致新的氨基酸置换 M142I。这一新的点突变未在 120 名随机献血者中检出。

讨论：Ax 亚型的血清学特点是红细胞与抗-A 弱凝集或不凝集，与抗-A, B 的反应增强；血清中常含有弱的抗-A。Ax 亚型红细胞上的 H 抗原较正常 A 型红细胞有明显增强，而 AxB 血型由于正常 B 基因的存在，其红细胞上的 H 抗原可不增强。在 Ax 血浆中通常检测不到 A 转移酶活性。本研究中发现的 ABO 亚型个体符合以上特征，为典型的 Ax 以及 AxB 血型。在所有 Ax 及 AxB 个体中的 A 基因检测出 426G>C 错义突变，而在 120 名随机选择的正常 ABO 血型的献血者中未发现此突变，从而排除了该点为多态性的可能。426G>C 突变导致新的 Ax 等位基因(Ax14)，突变造成 A 酶氨基酸替换 M142I。除外 467C>T 这一多态性位点(在 A102 等位基因中最先发现的多态性位点，对酶活性无明显影响)，426G>C 突变是本研究中 4 例 Ax 表型相关 ABO 基因编码区唯一的突变。因此，虽然甲硫氨酸(M)和异亮氨酸(I)同为非极性疏水脂肪族氨基酸，M142I 替换仍然可能通过破坏 A 酶局部构象而削弱酶的活性。少数 ABO 亚型中的基因突变可导致酶特异性的改变，如 CisAB 和 B(A)亚型；根据本研究的血清学结果，M142I 替换后的 A 酶转化红细胞上 H 抗原为 A 抗原的能力减弱，但却未将其转化为 B 抗原，表明这一突变和 ABO 亚型的多数突变类似，主要改变酶的活性而非特异性。人类血型 A 酶和 B 酶与 a3GalT 相关基因家族有很高的同源性。142 位的甲硫氨酸在 a3GalT 族同源蛋白中高度保守。一个有趣的现象是，另外两个在中国人群中首报的 ABO 亚型等位基因也与 142 位氨基酸的改变有关(Ael06 和 B305 等位基因中的 M142T)。由于苏氨酸(T)是极性亲水性氨基酸，不同于前述的甲硫氨酸和异亮氨酸，因此 M142T 导致的酶活性的下降可能较 M142I 更为明显，从而导致红细胞上 A 抗原数量较 Ax 亚型更少的 Ael 亚型的出现。简言之，142 位甲硫氨酸的重要性同时通过 A 酶和 B 酶自然突变的方式得到了论证，该位点氨基酸的改变将影响酶的活性。综上所述，本文首次报道 ABO 基因 426G>C 突变是 Ax 亚型的分子基础。该突变导致的 142 位氨基酸置换 M142I 改变了 N-乙酰-D-半乳糖胺基转移酶催化区的保守区域，从而降低了酶的活性，导致 Ax 表现型。

19 《Ax 基因致血清型与基因型不符的家系遗传研究——附 1 例报告》

作者：于卫建 戚凝 段莹 张力 周世航 梁晓华

摘要：

目的：对一家系 ABO 血型不符合遗传规律的原因进行分析研究，为今后临床类似问题提供参考依据。

方法：采用血清学方法分析 ABO 表型，采用 DNA 直接测序方法检测 ABO 基因的第 6、7 外显子序列，分析家系 ABO 血型不符合遗传规律的原因。

结果：血清学鉴定为父亲 B 型，母亲 O 型，孩子 AB 型。DNA 直接测序结果：父亲 Bw14(B110)/O01，母亲 Ax26/O02，孩子 Bw14(B110)/Ax26。表明母亲的 Ax26 基因没有表达 A 抗原。

结论：Ax 等位基因在不同杂合状态的个体中会呈现出不同血清表型。

标本来源：一家三口自述父亲 34 周岁 B 型、母亲 32 周岁 O 型、男孩 4 周岁 AB 型，身体健康。因血型疑似违反遗传学原理来本中心鉴定血型。检测对象各取静脉血 5mL，EDTA 抗凝。

血清学结果：父亲 B 型，母亲 O 型，孩子 AB 型，正反定型相符。因无法解释孩子 A 抗原的遗传学来源，因此增加血清学实验，结果见表 1。增加吸收放散试验，检测父、母红细胞是否含有微量的 A、B 抗原。用标准血清和人源血清分别对父亲、母亲红细胞做吸收放散液试验，并放散液中检测是否含有抗-A，抗-B。结果见表 2。试验证实母亲红细胞上没有检测到微量的 A、B 抗原，父亲红细胞上没有检测到微量的 A 抗原。血清学表现为：父亲 B 型，母亲 O 型，孩子 AB 型。

表 1 血清学反应格局

	抗-A	抗-B	A1 细胞	B 细胞	O 细胞	抗-A1	抗-AB	人源抗-A	人源抗-B	抗-H	自身
父	-	4+	4+	-	-	-	4+	-	4+	+	-
母	-	-	4+	4+	-	-	-	-	-	4+	-
孩子	4+	4+	-	-	-	4+	4+	4+	4+	+	-

表 2 吸收放散试验

	抗-A	抗-B	人源抗-A	人源抗-B
父	-	-	-	-
母	-	-	-	-
阳性对照	4+	4+	4+	4+

亲子鉴定：通过 21 个 STR 基因座位的检测，孩子所有等位基因均在父母双亲的等位基因中找到，没有违反遗传规律。鉴定意见为支持被检父母是孩子的生物学父母。

ABO 血型基因 DNA 测序结果：BigDye terminator v3.1 测序试剂盒(美国 AB 公司，批号 1601238)，3730 型基因分析仪(美国 AB 公司)。对父亲、母亲、孩子 DNA 的第 6、7 外显子和内含子 6 基因直接测序发现，共检测出 4 种等位基因，分别为 O01，O02，Ax26，Bw14(B110)。父亲、母亲、孩子的等位基因突变见表 3。

根据检测结果以及家系的遗传关系判断得出：父亲 Bw14(B110)/O01，母亲 Ax26/O02，孩子 Bw14(B110)/Ax26。家系调查结果见图 1。

表 3 等位基因突变点	
等位基因	碱基替换
父亲 Bw14(B110)	297 A>G; 523 G>A; 526 C>G; 657 C>T; 703 G>A; 796 C>A; 803 G>C; 930 G>A
O01	261 delG
母亲 Ax26	287 G>T; 467 C>T
O02	261 delG; 297 A>G; 646 T>A; 681 G>A; 771 C>T; 829 G>A
孩子 Ax26	287 G>T; 467 C>T
Bw14(B110)	297 A>G; 523 G>A; 526 C>G; 657 C>T; 703 G>A; 796 C>A; 803 G>C; 930 G>A

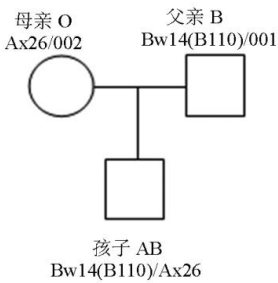


图 1 家系调查结果

讨论：本例中父母子的 ABO 血型分别为 B、O、AB 型，明显不符合血型遗传规律。经亲子鉴定证实父母子具有生物学亲子关系。基因检测发现母亲为 Ax26/O，表现为 O 型，经吸收放散试验未检出 A 抗原，无法证实 Ax26 基因有产物表达；经检测 H 抗原为阳性，排除孟买血型导致的 A 抗原缺失。根据文献 Ax26 是 2015 年 10 月首次在中国人群中发现，血清学表现为弱 A 型，本例观察到的母亲(0, Ax26/O)的血清型为 O 型与报道并不一致。父亲基因检测为 Bw14/O01，血清学表现为正常的 B 型，孩子(AB, Ax26/Bw14)血清学表现为正常的 AB 型。以上分析发现，Ax26 在 Ax26/Bw14 杂合子中，能够表达正常的 A 抗原，在 Ax26/O 杂合子中，不能表达 A 抗原，表明 Ax26 基因的表达可能受到对位等位基因的影响。这种等位基因在不同杂合状态中呈现出不同表型的现象被称作“等位基因增强效应”(allelic enhancement)，最先由 Salmonand Cartron 在 1976 年提出。ABO 等位基因增强效应在国际上有多篇文章中报道过，例如在 1 个法国家系中，A 基因在 A/O 型的个体表现为 Ax 表型，在 A/B 型的个体中表现为 A2B 表型。在 1 瑞士家系中，A2 基因在 A2B 基因型的母亲中表现为 A2B 表型，在 A/O1v 基因型的孩子中表现为 Ax。韩国有 2 个家庭调查发现，Avar 基因在 Avar/O02 基因个体中表现为 O 型，在 Avar/B101 基因个体中表现为 AwB 型。在我国台湾个体中发现 A(x)基因在 A(x)/B101 个体中表现为 A3B 型，在 A(x)/O01 个体中表现为 Ax 型。目前人类对 ABO 血型的基因调控和糖基转移酶活性的变化还缺乏必要的了解，引起等位基因增强效应的分子机理还有待探索。现已证实 ABO 抗原的表达量和特异性不仅受控于 ABO 基因，同时也受到基因调控的影响。有资料发现糖基转移酶的催化核心区域外的无义突变会导致弱 A、弱 B 的抗原表型，另外启动子的甲基化，增强子特性和抑制因子的作用等也会导致抗原的数量和血清学特性的改变。在临床输血实践中如何处理因等位基

因增强效应导致的 ABO 血清型与基因型不符的问题,可能还需要回归到依据血型的免疫学属性中进行思考,审慎对待基因检测结果。

20 《一例 ABO 亚型 Ax28 新等位基因的鉴定》

作者: 周天瑜 邓刚 贺云蕾 许德义 俞露 郭雯玉

来源: 《中华医学遗传学杂志》2018 年 6 期

摘要:

目的 研究 ABO 血型新等位基因 Ax28 的分子机制。

方法 应用单克隆抗体检测样本的红细胞 ABO 血型抗原,标准 A、B、O 红细胞检测血清中 ABO 抗体。PCR 技术扩增 ABO 基因 7 个外显子及其邻近内含子序列后测序,对第 5~7 外显子扩增产物进行克隆后测序。

结果 先证者红细胞有弱 A 抗原,同时血清中存在抗 A 和抗 B 抗体。直接测序分析发现第 6 外显子第 261 位杂合缺失,第 7 外显子在 467C>T、830T>C 杂合突变。克隆测序得到两个等位基因 O01 和 Ax28。与 A102 序列相比,Ax28 第 830 位 T>C 突变,导致第 277 位缬氨酸变成丙氨酸。

结论 N 乙酰氨基半乳糖基转移酶基因第 830 位 T>C 突变可能引起酶活性减弱,进而导致产生 Ax28 变异型。

标本来源: 女性,8 岁,ABO 血型鉴定时发现正反定型不符,怀疑为 Ax。经监护人签署知情同意后,应用 EDTA 抗凝管采集患者静脉血 5mL,进行红细胞血型血清学检测,并抽提全血基因组 DNA,进行分子生物学检测。本研究获得了宁波市中心血站输血研究所生物医学伦理委员会审批。

血清学结果: 直接抗球蛋白试验结果为阴性,ABO 正反定型血清学检测结果见表 1,其中抗-A、抗-B 分别使用单克隆抗体血型定型试剂和人源多克隆血清检测,两者结果一致。

表 1 1 例 Ax 亚型血型鉴定结果

	抗-A	抗-B	抗-A1	抗-H	A 细胞	B 细胞	O 细胞	表型
患者	1+	N	N	4+	1+	4+	N	Ax

注:N 表示阴性

ABO 血型基因 DNA 测序结果: 送上海祥音生物科技有限公司测序。外显子直接测序结果显示,受检者 ABO 基因存在 261del/G、467C>T、830T>C 杂合突变。克隆后测序发现其基因型为 A/O01,A 等位基因在 A102 的基础上发生 830T>C 错义突变,导致 α 1, 3-D-半乳糖转移酶第 277 位氨基酸被置换(Val277Ala)。该 Ax

新等位基因被提交至美国国立生物技术信息中心(NCBI)GenBank,序列号为 KT276008,并被 dbRBC of NCBI 命名为 Ax28,因此受检者基因型可写作 Ax28/O01。错义突变 830T>C 未在 120 份随机样本中检出。

α 3GalT 家族同源性蛋白比对结果:通过同源性对比,第 277 位氨基酸为保守氨基酸,提示其在酶活性中具有重要的作用。

讨论:本例 Ax 标本检出弱的 A 抗原同时血清中也存在抗-A 抗体,由于正反定型结果不一致,故进一步采用分子生物学技术加以辅助鉴定其血型。1993 年, Yamanoto 等报道了第一个 Ax 等位基因,迄今在不同地区和人群中发现了 28 个 Ax 等位基因(包括本文报道的案例),分别命名为 Ax01~Ax28,均为 A101 基础上的单碱基或多碱基错义突变。我们通过测定 1 例中国人 Ax 变异型 ABO 基因全编码序列,发现除第 7 外显子的 467C>T 和 830T>C 变异外,其他序列与 A101 等位基因完全一致。467C>T 多态性位点最早在 A102 等位基因中发现,对酶活性无明显影响。因此,我们推测,830T>C 碱基突变导致的 277 位氨基酸改变为破坏酶活性的关键。在 120 份随机样本中,也未检测到该变异,表明 830T>C 是一种突变而非多态性。经检索,在目前发现的数百个 ABO 等位基因中,未发现包含 830T>C 突变的其他等位基因,也未在 830 位点发现其他变异类型,表明该等位基因是一种新的 ABO 等位基因,故上报 dbRBC of NCBI 确认并被命名为 Ax28 等位基因。通过查询 dbRBC of NCBI 数据库发现,具有 277 位氨基酸替换的 ABO 亚型还有 A220(Pro156Leu、Val277Met)、Ael07(Pro156Leu、Val277Met)及 Bx10(Arg176Gly、Gly235Ser、Leu266Met、G268Ala、Val277Leu),三者均为 277 位氨基酸突变造成 A/B 抗原的弱表达,可推测该位点对 A/B 抗原正常表达的重要性。同时同源性比对中 277 位氨基酸在α3GalT 族同源蛋白中高度保守,提示 277 位 Val 对糖基转移酶活性具有重要的作用。由于未能采集到先证者家系血样,因此无法进一步做家系遗传分析。但根据上述分析,Ax28 等位基因 830T>C 突变导致 277 位氨基酸置换造成的重要影响,在 A220、Ael07 和 Bx10 等位基因以及在物种保守性比对分析中都得到了验证,提示该突变与 Ax 表型的强相关性。

21 《一例稀有 CisAB 血型血清学及遗传机理分析》

作者:何子毅,刘赴平,胡应明,邹文涛

来源:《中国生物制品学杂志》2012 年 11 月第 25 卷第 11 期

摘要:

目的：对 1 例献血者血型血清学鉴定为 A2B 血样进行基因型分析。

方法：应用常规血型血清学方法进行血型鉴定；采用 PCR-SSP 法进行 ABO 初步基因分型的检测，并对 ABO 基因第 6 和第 7 外显子的核苷酸序列进行扩增、测序和分析。

结果：血型血清学鉴定为 A2B 亚型，基因分型为 BB 型，初步判定为 B(A)型；基因测序发现两条等位基因第 6 外显子均不存在 261delG 及 297G / G，判定该献血者血型为 B 与 B 基因的组合，经与 A101 核苷酸序列比对，对第 7 外显子的核苷酸序列分析发现，有一条核苷酸链上有 526C>G、657C>T、703G>A 及 803G>C 点突变，另一条核苷酸链上有 297A>G、526C>G、657C>T、703G>A、796C>A、803G>C 及 930G>A 点突变，确定该献血者血型基因型为 CisAB02 / B101。

结论：血型血清学对 CisAB 和 B(A)判定有一定的局限性，通过核苷酸序列及分析能够明确本例献血者基因型为 CisAB02 / B101。

标本来源：由本站提供的无偿献血者血液样本，该献血者：男性，25 岁，符合《献血者健康检查要求》，无输血史，未接受过大型手术，也未患过重大疾病，近期无肠道感染疾患。

血清学结果：在室温、4℃及 37℃反应条件下，该献血者正定型为 AB 型，但与抗-A 反应凝集强度较弱，为“++”，而与抗-B 反应凝集强度达到“++++”，选择人源性抗-A 用 1.5mol/L 的 HCl 酸化至 pH6.0，与该献血者红细胞不产生凝集，排除类似于获得性抗原的可能性。用抗-H 分别与正常 AB 型、O 型献血者及该献血者红细胞反应，发现该献血者红细胞表面的 H 抗原比正常 AB 型明显增强，与正常 O 型红细胞相同。反定型与试剂 A 型红细胞发生反应，在 4℃条件下反应凝集强度较高，表现为盐水介质反应性不规则抗-A，自身对照阴性，红细胞不规则抗体筛选试验阴性，该献血者血型血清学特点符合 A2B 型。见表 1。

表 1 血型血清学反应结果

Tab 1. Results of blood group serological reaction

反应条件	红细胞反应					血清反应			
	抗-A	抗-A ₁	抗-B	抗-AB	抗-H	Ac	Bc	Oc	自身
室温	++	-	+++	+++	+++	++	-	-	-
4℃	++ ^s	-	+++	+++	+++	+++ ^w	-	-	-
37℃	++	-	+++	+++	+++	++	-	-	-

注:S 表示略强;W 表示较弱。

PCR-SSP 检测结果：ABO 基因分型试剂盒为美国 G&T 公司产品。经凝胶电泳分析，均可见 207bp 的内对照产物，仅在 4 泳道可见 90bp 的条带，为 B 基因产物条带，该献血者基因型 BB 型，初步判定 B(A)型。

ABO 血型基因 DNA 测序结果：*基因克隆测序及比对分析由天津秀鹏生物技术有限公司完成*。两条等位基因第 6 外显子均不存在 261delG 及 297G / G，判断该献血者遗传基础为 B 与 B 基因的组合；与 A101 核苷酸序列比对，对第 7 外显子的核苷酸序列分析发现，有一条核苷酸链上有 526C>G、657C>T、703G>A 及 803G>C 点突变，另一条核苷酸链有 297A>G、526C>G、657C>T、703G>A、796C>A、803G>C 及 930G>A 点突变，确定该献血者血型基因型为 CisAB02 / B101。

讨论：有研究者认为，CisAB 血型血清学常常表现为 A2B3 或 A2Bx，即这种表现型以 A 抗原为主，B 抗原较弱，而 B(A)红细胞上则含有少量 A 抗原活性和接近正常的 B 抗原特异性，H 抗原含量接近 O 型细胞，明显高于正常 B 型细胞，这个特点又与 CisAB 红细胞相似。与通常 AxB 亚型血清中的不规则抗-A1 及 B(A)血清中含有的抗-A 可凝集 A 细胞和部分 A2 细胞，因此从血型血清学表现上看，CisAB 和 B(A)表现型的抗原含量各有偏重。因此血清学除了表现 B 抗原特异性，还表现少量 A 抗原特异性。本实验发现的这例献血者，从血型血清学反应的格局，很容易判读为 A2B 型，采用 PCR-SSP 基因分型鉴定为 BB 型，两者结果不一致，我们分析该献血者可能不是 A2B 型，有可能是 B(A)型，而且血型血清学反应的特点也与 B(A)相似，进一步确定需要进行基因测序。基因测序结果显示，两条等位基因第 6 外显子均不存在 261delG，297G / G，判断该献血者血型为 B 与 B 基因的组合，证实了 PCR-SSP 分型的结果；第 6、7 外显子的核苷酸序列分析中发现有一条核苷酸序列中有 526C>G、657C>T、703G>A 及 803G>C 位点突变，符合 CisAB02；另一条核苷酸链有 297A>G、526C>G、657C>T、703G>A、796C>A、803G>C 及 930G>A 位点的突变，符合 B101，确定该献血者血型基因型为 CisAB02 / B101。很早前认为 CisAB 是编码 A 型糖基转移酶和 B 型糖基转移酶的基因在同一条单核苷酸链上，可以同时遗传，现在发现 CisAB 和 B(A)血型的形成机理一样，可能是 B 等位基因在正常 B 基因序列的基础上发生单碱基突变，变异的 B 基因可能具有编码双功能活性酶的能力，由于 A101 和 B101 两个等位基因高度同源，两者在氨基酸编码区有 7 个核苷酸的差异，中 297A>G、657C>T 和 930G>A 不引起氨基酸的改变，仅有 526C>G、703G>A、796C>A 和 803G>C 引起 4 个氨基酸（R176G、G235S、L266M 和 G268A）的替换。有学者将（526C+703G+796C+803G）4 个核苷酸组合的单倍型称为 AAAA 型，将（526G+703A+796A+803C）核苷酸组合的单倍型称为 BBBB 型。由于 AAAA 型和 BBBB 型分别在不同的单倍体上遗传和表达，自然界中很少存在其他组合的单倍体类型。而 B(A)和 CisAB 就是这类独特的很少见的单倍体类型，表现为同一等位基因的编码产物兼具 A 和 B 特异的糖基转移酶活性。已经报道的 B(A)有 6 种，CisAB 等位基因有 4 种，其主要表现糖基转移酶在这 4 个关键位置的核苷酸突变，同时

还有 297、467、640、641、695 和 700 核苷酸位点的突变情况，才能准确区分这两种特殊亚型的基因型。

CisAB 型发生频率约为 1 / (170000~580000) 之间。Yamamoto 等在 1993 年报道 CisAB 表型不是 A 和 B 两个等位基因的简单串联，而是在 A101 等位基因的基础上，通过 467C>T 和 803G>C 的变异组合(即 AAAB 单倍型组合)，导致该等位基因编码的糖基转移酶的特异性下降，能同时识别和催化 UDP-GalNAc 和 UDP-Gal 两种供给底物，并最终同时形成 A 和 B 抗原。2003 年我国才首次报道了中国人 CisAB 表型及其分子机制，最近的报道发现中国人 CisAB01 等位基因，但国内迄今未发现新的 CisAB02 / B101 等位基因，尽管在国外对该血型已有报道，所以本例为国内首次发现。本例的血清学表型与 A2B 符合，也符合 B(A)的血型血清学特点，B 抗原与正常的 B 抗原强度一样，A 抗原较弱，H 抗原增强，血清有不规则抗-A；但是基因测序分型结果确为 CisAB，而该血型在血清学常表现为 A 和 B 都有弱表现型，与该献血者的血清学反应并不一致，因此血型血清学反应特点有时并不准确。由于血清学方法的局限性，许多变异型在血清学分型中可能被误判，所以我们需要不断地分析和发现血清学分型与基因分型的原理和关系。对于特殊血型，首先选用 PCR-SSP 法进行初步 ABO 基因分型，但要明确该种基因分型的方法只能针对 ABO 基因中几个关键位置进行分析，而不能检测出除此之外位点突变，因此当血清学结果与基因分型结果发生矛盾时，需通过克隆测序才能最终证实有无新位点突变发生，才能真正的区分 CisAB 或者 B(A)型。从血型血清学和分子生物学两个方面总结其共性和不同，帮助我们早期发现和区分这两种特殊血型。

输血策略：对于 CisAB 受血者，由于其血清中偶有抗-A 或抗-B，故以输 O 型红细胞和 AB 型血浆为佳；若是献血者，建议其捐献的血液尽量不用于临床，也可制备洗涤红细胞，输给 AB 型受血者。

22 《ABO*cisAB.03.1.1/ABO*O.02.01.1 基因型患者的血型检测及分析》

作者：任思嫫 和予馨 王林林 马怡然 刀尧

来源：《中国输血杂志》 2012 年 4 月第 25 卷第 4 期

摘要：

目的：明确 ABO 血型血清学实验发现的患者正反定型不符情况的血型基因型。

方法：因贫血申请输注红细胞悬液的糖尿病患者，ABO 血型检测发现其正反定型不符，应用血型血清学实

验 A1 和 A2 亚型的分型、T 抗原检测以及血清不规则抗体检测方法判定其血清学表型，ABO 基因分型及测序技术判定其血型基因型。

结果：患者红细胞与花生血凝素不发生凝集反应，血清不规则抗体筛查阴性；患者红细胞与抗-A 凝集，与抗-A1 不凝集，患者血清与 A1 标准红细胞呈现较强凝集反应，与 A2 标准红细胞不发生凝集；EXON61 条等位基因存在 261G 的缺失，EXON7 序列非 O 等位基因出现 700T/C，EXON7 测序结果显示突变点为 526C/G，646A/T，657C/T，700C/T，703G/A，771C/T，796A/C，829G/A，803G/C，930G/A。

结论：我们发现该患者血清学方法表现为 A2B 血型，基因分型为少见的 ABO*cisAB.03.1.1/ABO*O.02.01.1。

标本来源：患者，女，78 岁，糖尿病多年。几天前因酮症酸中毒急诊入院。住院期间血常规检测 Hb：53g/L，遂申请输注红细胞悬液。输血科常规进行血型鉴定，发现正反定型不符。遂进一步进行血型鉴定。在询问家属血型时得知患者丈夫血型为 O 型，1 个儿子为 O 型，这种情况与血型的常规遗传方式不相符，遂进行其血型家系调查。

血清学结果：

（1）血型及 T 抗原检查结果：患者血型检测结果如表 1。患者红细胞与花生血凝素不发生凝集反应，其血清不规则抗体筛查阴性，表明患者红细胞与血型抗体的凝集为特异性凝集。患者红细胞与抗-A 凝集，与抗-A1 不凝集，具有 A2 抗原的表现；患者红细胞与抗-B 表现强凝集，说明红细胞上具有正常 B 抗原；患者血清与 A1 标准红细胞呈现较强凝集反应，与 A2 标准红细胞不发生凝集，说明患者血清中存在抗-A1，上述血型血清学表现符合 A2B 血型特点；患者红细胞与抗-H 反应强度比正常对照的 AB 细胞强得多，这也符合 A2B 血型的特点。

表 1 患者夫妇及其子女的血型血清学检测结果

	正定型					反定型				血型判断
	抗-A	抗-B	抗-H	抗-A ₁	抗-A,B	A ₁ c	A ₂ c	Bc	Oc	
患者	2+	4+	3+	-	4+	3+	-	-	-	A ₂ B
丈夫	-	-	4+	-	-	4+	-	4+	-	O
儿子 1	-	-	4+	-	-	4+	-	4+	-	O
儿子 2	-	-	4+	-	-	4+	-	4+	-	O
女儿	2+	4+	3+	-	4+	3+	-	-	-	A ₂ B

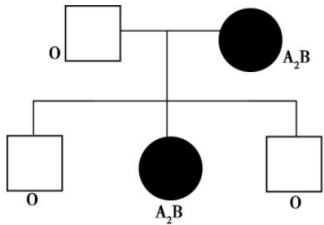


图 1 先证者血型家系调查

（2）患者丈夫及子女的血型检测结果：见表 1。从表 1 中可以看到患者丈夫、2 个儿子的血型都为 O 型，女儿的血型血清学反应格局与患者本人相同，也符合 A2B 型特点。结合 2.1 及 2.2 的结果，总结先证者血型

家系调查结果如图 1。

ABO 血型基因 DNA 测序结果：BigDye terminator 3.1 Sequencing kit 试剂盒（ABI 公司，美国），ABI 3130 测序仪。由生工生物工程(上海)有限公司完成。

（1）EXON6、EXON7：EXON6 测序结果显示 1 条等位基因存在 261G 的缺失，说明存在 O 的等位基因，而另 1 个为非 O 等位基因。EXON7 测序结果显示非 O 等位基因出现 700T/C，符合 ABO*cisAB03 的特点。

（2）EXON7、Intron6、3'NCR：EXON7 测序结果显示突变点为 526C/G，646A/T，657C/T，700C/T，703G/A，771C/T，796A/C，829G/A，803G/C，930G/A，表明是 ABO*cisAB.03.1.1/ABO*O.02.01.1 杂合基因。

讨论：cisAB 是 1964 年发现的较为罕见的 ABO 血型，表现在同一等位基因的编码产物兼具 A 和 B 特异的糖基转移酶活性，在遗传上表现为 cisAB 血型与 O 型婚配生出 AB 型和 O 型子女。cisAB 在血清学常表现为弱 A 抗原或弱 B 抗原，同时，血清中常存在针对弱抗原的抗体，血清学正定型检测结果经常为 AB 血型。通过血清学方法难以区分本患者是 cisAB 还是 transAB，于是进行了家系调查。家系调查中发现，患者的子女中出现同样血清学表现的 A2B 个体，间接证明患者为 cisAB 个体。为了进一步确认患者的基因分型，我们通过对 ABO 基因不同碱基的替换或缺失设计特异性引物，包括针对 O1 基因 261 碱基 G 缺失与内含子的碱基替换，O2 基因 646T>A 和 829G>A，B 基因 803G/C，A2 基因 467 位 C/T 和 1061 位的 C 缺失等，对患者的 DNA 进行测序。测序结果表明我们患者 1 条染色体上的等位基因存在 261G 的缺失，说明该患者基因型为杂合子，1 条染色体上的等位基因为 O，而另 1 个为非 O 等位基因。EXON7 测序结果显示显示 2 条等位基因存在 700T/C，其中 1 条为 700C 的等位基因突变点为 646A/T，771C/T，829G/A，930G/A，结果符合 ABO*O.02.01.1 的特点。关于遗传机制，目前 cisAB 有 2 种学说：1)染色体不等交换；2)糖基转移酶基因的错义突变，从文献报道看后者更为多见。目前国际上报道 6 种 cisAB 等位基因：CisAB*01-06，分别为 cisAB01(467C>T 和 803G>C)、cisAB02(526C>G657C>T，703G>A 和 803G>C)、cisAB03(297A>，526C>G，657C>T，700C>T，703G>A，796C>A，803G>C 和 930G>A)，cisAB04(467C>T，796C>A)等。根据上述基因型特点，本患者 1 条为 700T 的等位基因突变点为：700C/T，657C/T，526C/G，703G/A，796A/C，803G/C，符合 ABO*cis-AB.03.1.1 的特点，结合前述另 1 条等位基因的分型：ABO*O.02.01.1，确认患者 ABO 基因分型为 ABO*cisAB.03.1.1/ABO*O.02.01.1【根据 GENBANK 的美国国家生物信息中心 (NCBI)的“血型抗原基因变异资料库”(BGMUT)所公布的 ABO 基因的参考序列】。

输血策略：由于本患者血清中存在凝集强度较高的抗-A，且与同型异体血发生凝集，我们利用 Coombs 实验，

给予患者配血相合的 O 型红细胞输注。

23 《一例 ABO 血型 cisAB06 亚型的基因序列分析》

作者：戚新 章旭 刘显智 李剑平

来源：《中华医学遗传学杂志》2013 年 4 月第 30 卷第 2 期

摘要：

目的：探讨 1 例 ABO 亚型 cisAB06 的血清学和分子遗传特征。

方法：应用单克隆抗体检测 1 例 ABO 正反定型不符的患者红细胞 ABO 抗原，标准 A、B、O 红细胞检测血清中 ABO 抗体。用序列特异性引物-聚合酶链反应进行 ABO 基因分型。用 PCR 技术特异性扩增 A、B 基因第 6~7 外显子，PCR 产物纯化后直接测序分析。

结果：患者红细胞有 A、B 抗原，同时血清中存在抗 A 抗体。聚合酶链反应-序列特异性引物基因分型结果为 B/O02 型，直接测序结果为 cisAB06 型，与 B101 基因序列比对仅在第 526 位发生 G>C 的突变(c. 526G>C)，该位点的突变导致 176 位甘氨酸变成精氨酸(p. R176G)。

结论：B 等位基因 c. 526G>C 突变形成 cisAB06 等位基因，其血清学表现为 AB 型。

标本来源：患者，女性，35 岁，无输血史，有妊娠史，为临床幽门梗阻术前备血患者。常规 ABO 血型正反定型中发现结果不一致而送检。

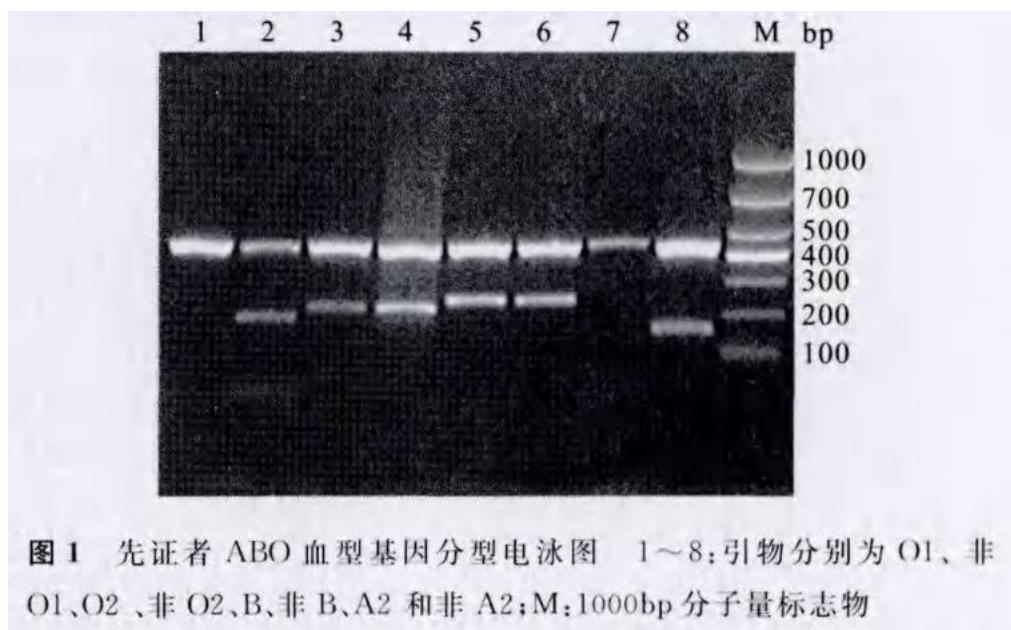
血清学结果：患者正定型中抗-A 凝集非常弱，抗-B 凝集强，反定型血清中抗-A 抗体凝集非常强，很容易误定位 B 型，ABO 正反定型结果见表 1。血浆型物质检测含有 B 和 H 物质，无 A 物质。

表 1 先证者血清学检测结果

试剂	ABO 正定型					ABO 反定型				血型物质
	抗 A	抗 A ₁	抗 B	抗 A+B	抗 H	A 细胞	B 细胞	O 细胞	自身细胞	
试剂 1	+	0	4+	4+	2+	4+	0	0	0	B、H
试剂 2	+	0	4+	4+	2+	4+	0	0	0	

PCR-SSP 检测结果：

应用天津秀鹏公司人红细胞 ABO 血型基因检测试剂盒检测，患者 ABO 基因型为 B/O02 型，见图 1。



ABO 血型基因 DNA 测序结果: BigDye terminator 3.1 Sequencing kit 试剂盒 (美国 ABI), ABI PRISM 3730xl 测序仪 (美国 ABI)。对患者 A、B 基因第 6~7 外显子基因测序分析结果, 与 A101 基因序列比对存在 6 个碱基突变, 分别是 297A>G、657C>T、703G>A、796C>A、803G>C 和 930G>A 突变。与 B101 基因序列比对仅在 526 位发生 G>C 的突变(c.526G>C), 经检索血型抗原基因突变数据库, 发现此序列与 cisAB06 基因的序列完全一致。该位点的突变导致 176 位亮氨酸变成脯氨酸(p.R176G), 该位点氨基酸与 A 基因相同。

讨论: cisAB 和 B(A)型基因就是在常见的 A 或 B 等位基因中发生 1 个或者 2 个碱基突变, 使得 A 抗原有了一些 B 抗原的性质, B 抗原有了一些 A 抗原的性质。cisAB 表现型是一种独特的 ABO 表型, 表现在同等位基因的编码产物兼具 A 和 B 特异的糖基转移酶活性。cisAB 血清学特征随着个体的不同、家系的不同而有所不同。cisAB06 等位基因是在 B101 等位基因的基础上保留了 A101 等位基因的 526 位 C 位点, 相应的氨基酸组合为(176R、235S、266M 和 268A), 即为 AB BB 单倍型组合的等位基因, 与所发现的其他 6 种 cisAB 基因单倍型不同。Seto 等通过构建基因突变体和原核细胞体外表达的方式, 分别研究了 AAAA、BAAA、BBAA、BBBA 和 BBBB 5 种单倍型组合的糖基转移酶特异性和酶动力学, 发现 BAAA、BBAA 和 BBBA 单倍型组合均同时拥有 A 型酶供体和 B 型酶供体催化功能。我们推测 AB BB 单倍型组合能够同时催化 A 型酶供体和 B 型酶供体, 血清学表达 AB 抗原。由于样本有限, 我们没能对该样本 A 和 B 转移酶活性进行检测。通过血清学试验我们推测 AB BB 型重组酶催化 A 型酶活性比正常 A 型酶低很多, 血清学 A 抗原表达非常弱。该样本的基因型是 cisAB06/O02。cisAB06 等位基因是 2009 年 Zhu 等首先报道, 我们在临床 ABO 基因测序样本中发现, 推测 CISAB06 等位基因应该在中国人群中较罕见。目前发现的 cisAB 等位基因有 7

种，分别为在欧美发现的 cisAB01、cisAB02 和 cisAB03 等位基因，在中国台湾发现的 cisAB04 等位基因和在中国内地发现的 cisAB01var、cisAB05 和 cisAB06 等位基因。cisAB01 等位基因在亚洲人种较为常见，韩国人中 0.0350%，日本人中 0.0012%。我们在 82 例 ABO 血型正反不符的样本基因测序中发现 cisAB01 等位基因 5 例，cisAB02 等位基因 2 例，cisAB03 等位基因和 cisAB06 等位基因各 1 例，还发现 1 例 B101 基因序列比对 797T>C 突变的 cisAB 新等位基因。cisAB 和 B(A)血型经常在 ABO 正反定型不一致或者凝集强度改变的情况下发现，在临床输血中引起定型和配血困难，严重影响输血的安全性和有效性。在临床上应引起重视，当 ABO 血型正反定型不一致或者血清学检测结果不符合孟德尔遗传规律，应用分子生物学技术辅助诊断，同时结合血清学实验的特性，明确样本血型，保证临床输血安全。

24 《CisAB 与 B(A)血型的鉴定分析——附报告 5 例》

作者：焦立新 于晓丽 林乾飞 杨帆 于江虹 陈琳

来源：《中国输血杂志》2015 年 12 月第 28 卷第 12 期

摘要：

目的：了解吉林地区人群中 CisAB 和 B(A)血型的特点及其表型与基因型的关联性。

方法：采用微孔板法对本血液中心无偿献血者共 71200 名进行 ABO 血型筛查鉴定，对凝集强度减弱和正反定型结果不一致样本采用试管法进行血型血清学分析和亚型鉴定，对血清学检测为 ABO 亚型的样本再采用 PCR-SBT 方法对 6、7 外显子和部分内含子进行基因序列分析。

结果：经 ABO 基因测序确定 CisAB3 例、B(A)2 例，等位基因有 CisAB01、CisAB05、B(A)02、B(A)04，其中发现 1 例 B(A)04/B(A)04 纯合基因型，它们对应的血清学表型有 A2B、A2Bx 和 AxB。

结论：CisAB 和 B(A)血型通过血清学表型通常难以区分，经基因测序可以明确血清学特征形成的分子基础。

标本来源：2010 年 10 月—2014 年 10 月本中心献血者共计 71200 人，进行 ABO 血型筛查鉴定，这些样本之间无任何血缘关系。发现 ABO 正反不符血液样本，采用试管法进行血型血清学分析和亚型鉴定，再提取 DNA 后进行核苷酸序列测定和序列比对。

血清学结果：经血型血清学实验 5 个样本有类似的特征，它们同时存在 A 抗原和 B 抗原，但表现强弱不一，血清中都存在针对 A 抗原的意外抗体，强弱也不一致(表 1)。

表 1 血型血清学检测结果

	-A	-B	-AB	-H	-A1	A _C	BC	OC	A2C	血清学 表型
样本 1	4+	1+	4+	4+	0	W+	3+	0	0	A ₂ B _X
样本 2	1+	3+	4+	2+	0	1+	0	0	1+	A _X B
样本 3	3+	4+	4+	1+	0	W+	0	0	0	A ₂ B
样本 4	1+	4+	4+	3+	0	4+	0	0	3+	A _X B
样本 5	3+	4+	4+	2+	0	3+	0	0	1+	A ₂ B

ABO 血型基因 DNA 测序结果：BigDye terminator 3.1 Sequencing kit 试剂盒（美国 ABI），3130xl 测序仪(美国 ABI)。与 A101 参考序列相比较，根据 5 个样本的外显子 6 和 7、内含子 6 及部分内含子 5 和 3'-UTR 的直接测序结果可分出各自的基因型，1-5 号样本分别为 CisAB01/O04、CisAB01/B101、CisAB05/B101、B(A)02/O01、B(A)04/B(A)04。测序结果显示这 5 个样本虽然血清学表型相似，但是基因学基础却不相同，1、2、3 号样本都存在 CisAB 等位基因，4、5 号样本存在 B(A)等位基因，由于突变位点不同，它们又分属于的不同基因类型；2、3 号样本由于同时存在 B 等位基因，5 号样本 2 个等位基因均为 B(A)04，导致血清学表型较为复杂(表 1)。

5 例样本的具体血清学结果和测序结果：

1 号样本正定-A 4+，但与之对应的 AC 反应弱阳性；正定-B 仅 1+，反定 BC 反应较强 3+，提示 A、B 抗原都存在亚型可能性，血清型初步判为 A2BX；根据基因测序结果分析 1 个等位基因为 CisAB01，与 A101 相比外显子 7 有 2 个核苷酸不同(467C>T 和 803G>C)；另 1 个等位基因为 O04，基因型确定为 CisAB01/O04。

2 号样本血清型检测正定-A 为 1+，反定 AC 为 1+；正定型-B 为 4+，血清型初步判定为 A_XB；基因测序结果显示在 nt297、nt526、nt657、nt703、nt796、nt930、nt1096 均表现为 A101/B101 的杂合特点，但在 A101 基础上检测到 nt467(C>T)、nt803(G>C)的点突变，经分析基因型为 CisAB01/B101；血清学 B 抗原表现正常，主要是被正常 B 基因所掩盖。

3 号样本血型检测时表现正反不符，A 抗原较强且存在弱-A 意外抗体，B 抗原表现正常，考虑血清型为 A2B。测序结果显示 1 个等位基因在 B101 基础上保留了 A101 的 803G 特点，只是在第 268 位氨基酸表现为 A 抗原特点(A 型为甘氨酸，B 型为丙氨酸)，经检索该等位基因已经被国际血型抗原基因突变数据库命名为 CisAB05 等位基因；另 1 个等位基因为 B101 序列，因此该样本基因型为 CisAB05/B101。因为有正常 B 基因，导致 B 抗原变异被掩盖。

4号样本正定型-A 1+, 反定型 Ac 反应较强, 在 3+到 4+之间; B 抗原表现正常, 血清型初步判为 AxB, 但血清与 A2 细胞反应为 3+, 与普通的 Ax 又有所不同。测序结果显示该样本 4 个关键位置(nt526、nt703、nt796、nt803)均表现 B 等位基因特点, 仅 nt700 处含有 1 个错义突变 700C>G, 经检索该等位基因为 B(A)02 即 B(A)700, 另 1 个等位基因为 O01。nt700 核苷酸突变导致 234 位氨基酸的置换(脯氨酸突变为丙氨酸), 由于与 A 和 B 酶差异的第 2 个关键氨基酸 235 位紧密相连, 这个位置对酶的催化活性影响非常重要, 使血清正定型表现出很弱的 A 型特征, 但还是以 B 型为主, 因此反定型 A 细胞和 A2 细胞均有强凝集。

5号样本血清型表现为 A2B, 测序结果该样本为纯合基因型, 主要表现为 B 基因特点, 但在 B101 基础上发生 nt640A>G 突变, 导致相应的第 214 位甲硫氨酸(Met)被缬氨酸(Val)置换, 经数据库检索为 B(A)04/B(A)04 基因型, 以往报道多为 B(A)/O 基因型, 我们此次发现这种 B(A)纯合基因型非常罕见。B(A)/O 型血清型多表现为 AwB 或 AxB, 该样本的血清型表现则较为特殊, 正定型-A 反应较强, 反定型不规则抗 A 也达到 3+, 可见 B(A)血型涵盖的血清学表型较为复杂。

讨论: CisAB 和 B(A)型是 2 种罕见的 ABO 亚型, 在人群中发生的频率大约为 1/20000, 国内外报道较少, 吉林省以往报道过 CisAB 型, 但 B(A)没有报道。由于技术限制, 没有采用分子生物学手段进一步检测, 此类样本容易被当作普通的 ABO 亚型处理。本实验 5 例样本经血清学分析初步判定为 ABO 亚型, 它们的共同特点是: 同时存在 A 抗原和 B 抗原, 血清中都存在针对 A 抗原的意外抗体; 与抗 H 反应均阳性; 不同点是: A/B/H 抗原强弱不一, 血清中抗体强度也不一致, 经基因分析最终确定真实血型。B(A)血型的形成机理可能是 B 等位基因在正常 B 基因序列基础上发生单碱基突变, 变异的 B 基因具有编码双功能活性酶的能力, 因此血清学除了表现 B 抗原特异性, 还表现少量 A 抗原特异性, 因此 B(A)检测需要应用一些高效和敏感的单克隆抗-A 试剂, 才能检出 B(A)型上的 A 抗原; CisAB 的分子基础有染色体的不等交换和糖基转移酶的错义突变, 且多数情况为后者。因此, 两者都同时具有 A 和 B 基因的特点, 只是强弱不一。从以上 5 个样本的实验结果分析发现, B(A)与 CisAB 血清学上虽有一定相似性, 但可有多种不同表现(A2BX、AXB、A2B 等), 经测序发现 2、3 号样本因同时存在 B 基因, 使血清学表现更复杂化, 单纯依靠血清学结果无法正确鉴定 CisAB 和 B(A)亚型, 容易造成误报, 基因定型方法用于疑难血型确认非常必要。

25 《中国北方汉族人群 A204 等位基因的发现及家系调查》

作者：杜振军 牟曦光 魏莉等

来源：中国输血杂志 2013 年 3 月第 26 卷第 3 期

摘要：

目的：了解中国北方汉族人群 ABO 血型系统 A2 亚型的基因型分布特点及 A204 的家系遗传规律。

方法：应用血清学试验筛选出 A 亚型标本，采用 PCR-SSP 法对 ABO 血型 A2 亚型作基因分型检测，随后直接 DNA 测序；对 A204 先证者作家系调查。

结果：从 3395 名献血者中筛选出 23 例 A 亚型：13 例为 A205、8 例为 A201、1 例为 A204、1 例不能确定；A205、A201、A204 基因测序结果均与 genebank 的参考序列相同，1 例基因分型不能确定者，基因测序结果与 genebank 的参考序列比对，确定其基因型为 A102；A204 先证者的 A204 是由其母亲遗传而来。

结论：A2 等位基因在所调查的人群(中国北方汉族)中以 A205 为主，其次为 A201，存在 A204，且 A204 可以在家系内遗传。

标本来源：从本站 2011 年 1 月~2012 年 4 月的 7924 名汉族 A 型献血者，随机选出山东籍 3395 人，年龄 18~55(33.2±10.4)岁，其中男性 1832 名、女性 1563 名，献血时留取外周静脉血样 5mL/人(份)(EDTA-K2 抗凝)，备用。

血清学结果：ABO 正反定型在全自动血型分析仪上进行，所有判定 A 型的血样与抗-A1 在 U 型板上反应，不凝集者，再以试管法确认 A 亚型后，保留血样。3395 名 A 型无偿献血者中，血清学检测出 23 例 A 亚型。

PCR-SSP 检测结果：采用 **人类 ABO 血型 A2 亚型基因分型检测试剂盒(PCR-SSP 法)(批号 20101201、20120102，天津秀鹏生物技术开发有限公司产品)**。基因分型结果：13 例 A205 等位基因、8 例 A201 等位基因、1 例 A204 等位基因及 1 例不能确定。

ABO 血型基因 DNA 测序结果：使用 DNA 测序仪(ABI3730 型，美国 ABI 公司)。所确定的 3 种 A2 等位基因序列分别与 A205O101、A201O101 及 A204O101 完全一致，1 例不能确定者与 A102O101 基因型序列相一致。

讨论：检测出先证者母亲和姐姐存在 A 基因，基因分型：母亲有 A204 等位基因，姐姐无；母亲 ABO 血型

基因直接测序为：297A>G、467C>T、526C>G、657C>T、703G>A、771C>T、829G>A，与 A204A102 等位基因型序列相一致；姐姐直接测序为：261delG、297A、467C>T，与 A102O101 等位基因序列相一致。

26 《双胎输血综合征患儿 A2 血型 2 例及其家系基因调查》

作者：陈海婧 张敏 鲁学良

来源：临床血液学杂志 2018 年 31 卷 10 期

摘要：

目的：分析 2 例 ABO 亚型 A2 及其家系成员的血型基因。

方法：同时应用血清学实验、序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)方法检测患者及其家系成员 ABO 基因，并进行测序。

结果：2 例患者血清学结果均为 A 亚型，PCR-SSP 分型结果为 A205/O02，其母亲血清学结果为 O 型，PCR-SSP 分型结果为 O01/O02，其父亲血清学结果为 A 亚型，PCR-SSP 分型结果为 A205/A205，所有家庭成员的 PCR-SSP 结果与测序结果相符。

结论：ABO 血型亚型具有遗传基础，可以结合分子生物学方法、血清学方法和家系调查等方法进行最终确认。

标本来源：患儿们为早产儿（33W+），均无输血史，单合子单绒毛膜双胎。

血清学结果：患儿们血型鉴定：正定均为 A 抗原减弱，凝集出现双群，反定无凝集。

PCR-SSP 检测结果：使用 **人类红细胞 A B O 血型基因分型试剂盒（天津市秀鹏生物技术开发有限公司）** 对患儿们及其家系进行 ABO 血型基因分型检测（以 A101 为参考序列），根据 PCR 扩增产物电泳分析的结果分型表，大儿子基因分型为 A205/O02，小儿子基因分型为 A205/O02，其母亲基因分型为 O01/O02，其父亲基因分型为 A205/A205。

ABO 血型基因 DNA 测序结果：应用 ABI 3730XL 测序仪对 4 个家庭成员样本进行测序。序列比对和分析使用软件 FinchTV 阅读测序图谱，软件 DNAMAN 比对和分析测序结果，与 GenBank：NG_006669 序列进行比对，确定样本基因型。

表 2 家系 7 个外显子结果

被检测者	等位基因	碱基替换	氨基酸替换	表现型
父亲	A ₂₀₅	467C>T;1009A>G	P156L;R337G	A ₂
	A ₂₀₅	467C>T;1009A>G	P156L;R337G	
母亲	O ₀₁	261delG	88fs + truncation	O
	O ₀₂	106G>T;188G>A;189C>T;220C>T; 261delG;297A>G;	V36F;R63H;P74S;88fs + truncation	
大儿子	A ₂₀₅	467C>T;1009A>G	P156L;R337G	A ₂
	O ₀₂	106G>T;188G>A;189C>T;220C>T; 261delG;297A>G;	V36F;R63H;P74S;88fs + truncation	
小儿子	A ₂₀₅	467C>T;1009A>G	P156L;R337G	A ₂
	O ₀₂	106G>T;188G>A;189C>T;220C>T; 261delG;297A>G;	V36F;R63H;P74S;88fs + truncation	

讨论: 不同红细胞抗原亚型、抗体在某些疾病基础时可能会发生凝集强度的变化, 从而影响我们对 ABO 血型的判断。ABO 亚型在日常工作中血清学方法很容易漏检, 这给血型鉴定和临床输血带来了极大的安全隐患。在日常工作中, 对于婴幼儿血型的鉴定, 出于抗原发育成熟度方面的考虑, 通常不注重亚型的鉴定。从而不能做出正确的结论, 影响患儿的输血安全。本研究中的患儿仅 1d, 发生亚型漏检的可能性非常大。对于双胞胎输血综合征 (TTTS) 中受血者的换血治疗而言, 意义尤为重要。

27 《A 转换酶基因核苷置换 G539C 形成一新的 A2 等位基因》

作者: 叶兵摘译【原文: Chen DP et al. Vox Sang, 2005, 88(3), 196】

来源: 《国外医学输血及血液学分册》2005 年第 28 卷第 6 期

摘要:

背景和目标: 在东方人群中, ABO 血型系统出现 A2 表现相当少见。这一表型为一种特殊的 ABO 等位基因编码一种能够合成 A2 抗原的糖转移酶, 该 A2 抗原比典型的 A 抗原弱。在本研究中, 作者报道 2 例没有亲缘关系的新的 A2 等位基因个体。

材料与方法: 标准 ABO 血清学试验确定这 2 例为 A2 显型。为分析 A2 等位基因, 进行了 ABO 基因的直接测序和基因克隆。

结果: 这 2 例 A2 个体的 ABO 基因由 O1 和 A2 等位基因组成, 这种新的 A2 等位基因有一个 539G>C 置换, 导致 Arg180Pro 氨基酸改变。这种突变一般在 A 型人群中检测不到。

结论: 作者第一次报道 539G>C 突变, 该突变代表了 A2 血型的一种新的分子基础。这种从精氨酸到脯氨

酸的置换可能影响 A 抗原的表达。

28 《无锡市首例 Ael 标本的亚型血清学及基因型分析》

作者：徐钰茜，蒋钰瑶

来源：《现代医学》2019， Apr； 47(4): 451-453

摘要：

目的：通过血清学和分子生物学方法对 1 例正反定型不符的献血者标本作进一步分析鉴定。

方法：在常规血清学检测基础上，采用 PCR-SSP 技术对该例标本进行 ABO 基因初步分型，并设计引物进行 PCR 扩增后直接测序。

结果：血清学检测显示该标本正定型为 O，反定型为 A，表达较强的 H 抗原，放散液与 A 细胞凝集；PCR-SSP 结果得出该标本基因型为 AO2 型；直接测序发现，标本第 6 外显子 261 位杂合性缺失；第 7 外显子 467C/T，646A/T，681A/G 杂合，显示基因型为 Ael02/O2 型。

结论：A 等位基因的变异是造成 Ael02/O2 型中 A 抗原表达减弱的主要原因，血清学和分子生物学方法相结合能准确鉴定疑难血型标本，了解其基因型特点，为临床安全用血提供保障。

标本来源：献血者，男，汉族，36 岁，无输血史。2003 年初次献血，最近一次献血于 2016 年 12 月 29 日。初检时血型为 O，复检时由于正反定型不符，送至我站血型研究室作进一步鉴定分析。

血清学结果：见表 1，在室温条件下，正定型是 O 型，反定型是 A 型；4℃ 时与室温下结果一致；放散液与 A 细胞凝集表明 A 抗原在红细胞表面有很弱的表达。该献血者细胞与抗-H 试剂的凝集强度为 3+，凝集强度 Oc=献血者 c>Bc，可以证实该标本红细胞表面表达较强的 H 抗原，符合亚型红细胞特点。

表 1 该献血者血标本血型血清学实验结果

温度	正定型						反定型			吸收放散实验	
	抗-A	抗-B	抗-AB	抗-A1	人源抗-A	人源抗-B	Ac	Bc	Oc	自身 c	A 抗原吸收放散
4℃	-	-	-	-	-	-	-	2+	-	-	/
室温	-	-	-	-	-	-	-	2+	-	-	1+

PCR-SSP 检测结果： 使用 **人类红细胞 ABO 基因分型试剂盒(天津秀鹏生物技术开发有限公司，批号 201708025)**，琼脂糖凝胶电泳结果如图 1，参照人类 ABO 血型基因分型试剂盒 PCR-SSP 法结果分型表，该

献血者的基因型为 AO2 型，证明有 A 基因和 O 基因存在。

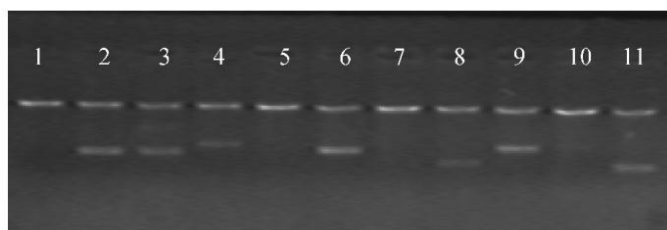


图 1 PCR-SSP 基因分型结果 第 1~11 孔依次为 O1、O2 B A A2、O2、O1 B A A2、B、A A2 O1 O2、A2、A B O1 O2、O、A201、非 A201；A 指除 A205、A201 之外的其他 A 基因；B 指 B 基因，CisAB, B(A) 等基因型；O1 指 O01 基因型；O2 指 O02 基因型

ABO 血型基因 DNA 测序结果：送上海生工生物工程有限公司进行测序。第 6、7 外显子直接测序结果：第 6 外显子 261 位杂合性缺失；第 7 外显子 467C/T，646A/T，681A/G 杂合。根据 NCBI 红细胞血型抗原基因突变数据库确认的 Ael 等位基因相关序列信息和分型试剂盒结果，将其基因型定为 Ael02/O2 型。

讨论：该献血者的红细胞与抗-A、抗-B 均不反应，与抗-H 有强凝集，其血清与 A 细胞不反应，与 B 细胞反应较强，通过吸收放散方法检测出该献血者红细胞上有 A 抗原，符合 Ael 型的血清学特征。该献血者 ABO 基因初步分型为 AO2 型，证明有 A 基因存在。目前有 8 种 Ael 基因型被 NCBI 红细胞血型抗原基因突变数据库确认，本例献血者为 Ael02 型，与 A101 比较 467C>T，646A>T 这 2 个地方碱基突变，导致了氨基酸发生如下改变：Pro156Leu、Phe216Ile。这些改变可能影响蛋白质的构象和活性，从而影响抗原的表达。准确地检测献血者 ABO 血型对于血液安全使用有着极其重要的意义。目前采供血机构采用的血清学技术正反定型，在多数情形下能准确鉴定献血者血型。但是 ABO 系统中存在一些亚型，血清学上主要表现为与对应抗体凝集强度减弱、正反定型不符。在鉴定这些异常表达的个体时或作遗传分析时，血清学技术存在局限性，需采用分子生物学方法加以辅助，以准确鉴定血型，为临床安全用血提供保障。

输血策略：Ael 表型献血者易被误判为 O 型，该血液用于临床上很有可能造成输血反应；该献血者作为受血者时，因其红细胞上的 A 抗原与正常 A 抗原存在不同，应输注 O 型洗涤红细胞。

29 《罕见的 AEL.05 亚型等位基因的鉴定及家系分析》

作者：高晶 李芳 王勤 王钰箐 雷航 王学锋 蔡晓红

摘要：

目的：Ael 是中国人群中 1 种较为常见的 ABO 亚型，其分子机理尚未完全阐明。本文对 1 例 Ael 亚型家系进行分子机制研究。

方法：在常规血型血清学鉴定的基础上，应用吸收放散法鉴定弱血型抗原；PCR-SSP 方法进行 ABO 基因初步分型；PCR 方法扩增 ABO 基因的 7 个外显子；对扩增产物进行直接测序和克隆后测序分析。构建 3D 分子模型，并就突变对 α -1, 3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶稳定性改变($\Delta \Delta G$)的影响进行预测。

结果：吸收放散试验证明患者红细胞上存在弱 A 抗原，血清学定型为典型的 Ael 表型；ABO 基因初步分型为 A1/O 型，测序发现第 7 外显子 767 位碱基 T>C 突变，导致 A 糖基转移酶第 256 位异亮氨酸被苏氨酸替换，血型基因型为 ABO*AEL.05/O.01.01。分子模建与分析提示突变导致蛋白局部氢键作用力改变不显著，但突变导致 $\Delta \Delta G$ 值的升高，表明蛋白稳定性降低。

结论： α -1, 3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶 p.I256T 突变可能通过降低了酶的稳定性导致 Ael 表现型。

标本来源：先证者女性，36 岁，汉族，重庆籍，因“蛋白尿 3 年余”入院，有明确父系家族肾脏病病史，既往体健，有孕产史，无输血史，入院常规检查血型提示 ABO 血型正反定型不符。知情同意后在家系采血及基因检测，家系成员包括其丈夫及 10 岁的儿子(图 1)。

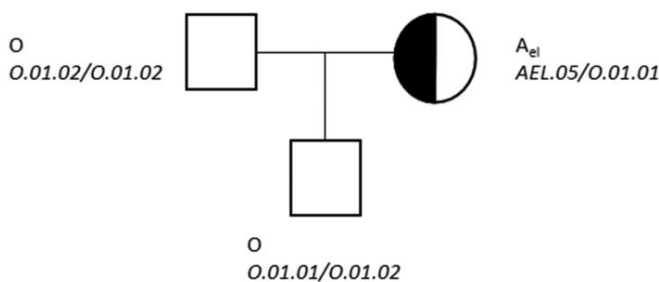


图 1 A_{el} 亚型家系图

血清学结果：

(1) ABO 血型鉴定和不规则抗体筛查：试管法中，患者红细胞与自身血清，单克隆抗-A、抗-B、抗-A1 试剂反应均呈阴性，和单克隆抗-H 试剂反应呈强阳性(4+)，患者(先证者)血浆与试剂 A 细胞和 B 细胞反应，结果分别为阴性和弱阳性(2+)。血清学表现为正反不符，疑似 A 亚型。不规则抗体筛查未见异常，见表 1。

表 1 血型血清学检测结果

	正定型				反定型			自身对照
	抗-A	抗-A ₁	抗-B	抗-H	A ₁ c	Bc	Oc	
先证者	0	0	0	4+	0	2+	0	0
丈夫	0	0	0	4+	3+	4+	0	0
儿子	0	0	0	4+	3+	3+	0	0

(2) 吸收放散试验: 先证者红细胞吸收了人源抗-A 后热放散得到的放散液与 A1 试剂红细胞反应结果为阳性(+), O 型对照红细胞放散液与 A1 试剂红细胞反应结果为阴性, 证实先证者红细胞上存在弱 A 抗原, 从而鉴定先证者为 A 亚型。

PCR-SSP 检测结果: 采用 **天津秀鹏的人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒(PCR-SSP 法)**, 根据电泳结果 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 号阳性和试剂盒对照表, 可判定先证者 ABO 基因初步分型结果为 A1/O, 证实存在 A1 背景下的等位基因, 见图 2。

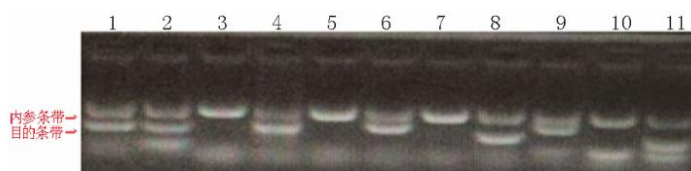
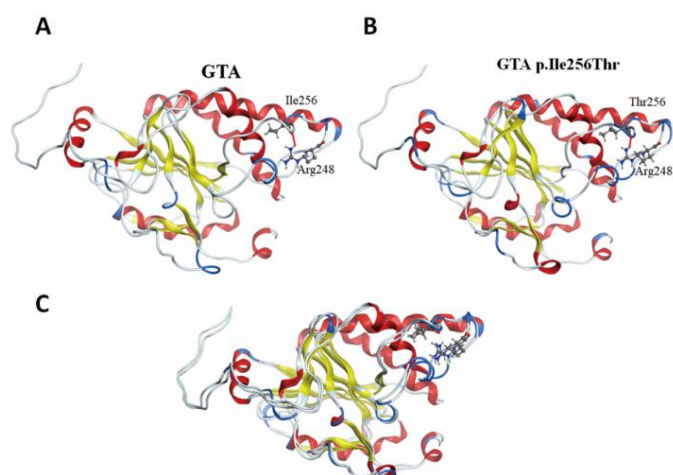


图 2 先证者 PCR-SSP 电泳结果

ABO 血型基因 DNA 测序结果: 测序仪(ABI377, 美国 Applied Biosystems)。为进一步确定先证者 A1 背景的等位基因是否存在突变及在家系中的遗传规律, 对 3 人的 ABO 基因 7 个外显子进行了测序分析。结果显示, 患者 ABO 基因第 7 外显子存在 467 位碱基 C>T 杂合突变, 767 位碱基 T>C 杂合突变(图 3), 此 2 个突变分别引起多肽链 156 位氨基酸发生脯氨酸(Pro)被亮氨酸(Leu)替换, 256 位氨基酸发生异亮氨酸(Ile)被苏氨酸(Thr)替换。经克隆分析, 此 2 个突变位于同 1 个等位基因, 检索 ISBT 血型抗原等位基因数据库显示存在 c.467C>T, c.767C>T (p.Pro156Leu, p.Ile256Thr)突变的等位基因为 AEL.05。另 1 等位基因除了第 6 外显子 c.261delG 外, 第 7 外显子未出现额外突变, 判为 O.01.01.所以此标本基因型 ABO*AEL.05/O.01.01.。家系其他成员的测序后基因分型结果显示在图 1 中, 先证者儿子并未遗传这一罕见的 AEL 等位基因。

对 GTA 空间模型的分析：从 3D 结构模型分析，在 wtGTA 和 GTA-p.I256T 这 2 个蛋白结构中都是 256 位氨基酸的主链氧和 Arg248 位的侧链氢之间形成氢键(图 4A，图 4B)；突变前后 2 个结构叠合对比结果，突变部位局部结构变化的差异很小(图 4C)。因此，从静态结构上分析，p.I256T 通过改变 GTA 局部氨基酸间形成的氢键数量而影响蛋白二级结构形成的可能性不大。为阐明 256Thr 突变对蛋白结构稳定性的影响，我们对 GTA-p.I256T 蛋白的热力学稳定性改变($\Delta \Delta G$)进行校正分析。其 $\Delta \Delta G$ 值是 2.83kcal/mol，预测结

论为 p.I256T 突变导致 GTA 酶的稳定性下降。



A. 野生型 GTA 蛋白整体结构图, 红色、黄色、蓝色、白色分别代表典型 α -螺旋、 β -片层、无规卷曲和 loop 区; B. 突变型 GTA 蛋白整体结构图; C. 突变与野生蛋白的叠加图, 局部氢键以红线表示

图 4 野生型 GTA 与 p. I256T 突变 GTA 的分子模型

讨论: 在通常条件下, Ael 细胞与抗-A 及抗-AB 不发生凝集, 虽然它们可以结合这些抗体, 结合的抗体可以通过吸收放散试验可证实红细胞与抗-A 试剂的反应性。其血清与 A 型红细胞不凝集或弱凝集, 即 A 放散型(Ael)。临床上常见的 A 亚型按红细胞上 A 抗原决定簇数量由多到少为 A1, A2, A3, Ax, Aend, Am 及 Ael, 其中 Ael 亚型 A 抗原量在红细胞上最少, 约为 A1 亚型的 1/1000, 大多数 AEL 等位基因的先证人群为亚洲人, 且 Ael 在人群中频率较低且存在差异。本例患者经吸收放散试验证实, 红细胞上存在较弱的 A 抗原, 符合 Ael 个体血清学表现, 但由于血清学表型容易受到疾病因素的干扰, 所以我们通过对患者 ABO 基因进行测序分析来辅助鉴定患者的血型。结果发现, 患者 767 位碱基存在 T>C 突变, 该突变导致 256 位异亮氨酸(Ile)被苏氨酸(Thr)替换, Ile 为脂肪族中性疏水性氨基酸, 突变为 Thr 后形成极性亲水氨基酸, 虽然分子结构预测 256 位氨基酸附近的氢键网络并未因为突变而受到明显影响, 但是该突变导致 α -1, 3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶稳定性降低, 从而使 A 抗原表达减弱形成 Ael 亚型。很可能这种稳定性的下降与酶在发挥催化过程中的分子局部环结构的摆动有关系, 而在静态的分子模拟中看不到这种作用。检索血型抗原基因突变数据库, 767 位碱基突变只有 AEL.05 等位基因, 其他等位基因未发现在 767 位发生突变。这一差别对于表现型无明显影响。通过比对确定该患者基因型为 ABO*AEL.05/O.01.01。2008 年吴国光等最早报道 AEL.05 等位基因, 之后相继有报道检测到 Ael05 亚型, 到目前为止, 共发现 13 种形成 Ael 亚型的等位基因。Ael 形成的分子机制有点突变, 插入, 缺失, 剪接位点突变等。对于 c.767T>C 导致的 p.Ile256Thr 如何进

一步导致酶活性减弱的机制还需要体外试验的证实。

30 《CisAB04 型血清学鉴定和基因型分析——附 1 例报告》

作者：沈志辉 周小芹 张乃淙 梁声强

来源：《中国输血杂志》2019 年 1 月第 32 卷第 1 期

摘要：

目的：对一家系(母亲、父亲、女儿)3 例 ABO 血型不符合遗传规律血液标本进行血清学及基因检测研究，探究其原因，为临床类似案例分析提供参考依据。

方法：采用血清学试验检测 ABO 血型，研究其血清型表现特点。采用 DNA 直接测序法对 ABO 基因的第 6、7 外显子测定序列，探究其不符合遗传规律的原因。

结果：血清学试验结果显示：母亲血型为 O 型，有高凝集强度 H 抗原；父亲血型为 AB 型；女儿正定型为 AB 型。测序结果显示：母亲符合等位基因 O02/O02；父亲为存在 467C>T 纯合突变和 796C>A 杂合突变，符合等位基因 CisAB04/A102；女儿存在 467C>T 杂合突变和 796C>A 杂合突变，符合等位基因 CisAB04/O02。父亲和女儿携带罕见 CisAB04 基因，符合等位基因遗传规律。

结论：CisAB 基因与另一不同等位基因(A 或 B 或 O 基因)杂合，在血清学表现上存在差异。家系调查对 CisAB 血型的发现有重要意义。

标本来源：2018 年 2 月 6 日本院妇产科 1 名新生儿及其父母 3 人血液标本。

血清学结果：

(1) 3 份标本正反定结果及抗-AB、抗-H、抗-A₁ 检测结果：母亲检测结果正定 O 型，反定 O 型，结果 O 型；父亲检测结果正定 AB 型，反定 AB 型，结果 AB 型；女儿为新生儿，不做反定，正定型检测结果 AB 型，抗-A₁ 检测结果阴性，类似于 A2B 血型的正定型表现，见表 1。

表 1 血清学检测结果(试管法)

	抗-A	抗-B	Ac	Bc	Oc	自身	抗-H	抗-AB	抗-A ₁
母亲	0	0	4+	4+	0	0	4+	0	0
父亲	4+	4+	0	0	0	0	2+	4+	4+
女儿	3+	3+	/	/	/	/	1+	4+	0

(2) 父亲唾液血型物质检测：含有 A 物质、B 物质和 H 物质，其中 B 物质相对于 A 物质及 H 物质较少。

(3) 人源血清检测结果：CisAB 型与 B(A)型在使用高效价单克隆抗体试剂检测时表现类似，B(A)型红细胞正定型与单克隆抗-A1 不凝集、与一些单克隆抗-A 及人源性抗-A 发生弱凝集。人源血清检测结果：母亲 O 型，父亲 AB 型，女儿 AB 型，见表 2。

表 2 人源血清检测结果

	抗-A	抗-B
母亲	0	0
父亲	4+	3+
女儿	2+	2+

(4) 交叉配血试验：为了 CisAB 的输血安全，做交叉配血试验(抗球蛋白凝胶卡配血)。父亲血液与 AB 型血液交叉配血，结果主次侧相合；与 O 红细胞做主侧配血，无凝集现象。

ABO6.7 外显子测序结果：由江苏中济万泰生物医药有限公司提供技术支持。测序试剂：ABO 6、7 外显子(科研) 测序试剂盒，江苏中济万泰生物医药有限公司。母亲测序结果为 O02/O02，该样本未见变异；父亲测序结果与参比序列(A1.01.1)对比仅存在 467C>T 纯合突变，796C>A 杂合突变；女儿测序结果与参比序列(A1.01.1)对比存在 O02 杂合变异(一条等位基因为 O02，另一等位基因为 A 或 B)，与 796C>A 与 467C>T 杂合突变。查询国际血型抗原基因突变数据库此突变型被命名为 CisAB04 型，父亲等位基因 CisAB04/A102，女儿等位基因 CisAB04/O02。

讨论：

CisAB 型是 ABO 血型中一种罕见的变异，它是一种独特的 ABO 表型，在遗传上表现为 AB 型与 O 型婚配生出 AB 型和 O 型的子女,而根据 ABO 三复等位基因学说以及孟德尔遗传定律,则 AB 型与 O 型婚配，其子女只有 A 型或者 B 型。我们在对临床标本进行血型鉴定中发现 1 名新生儿血型正定型结果为 AB 型，而其母亲血型为 O 型，随后检查其父亲血型为 AB 型，明显不符合遗传学规律，于是采集该新生儿及其父母血液进行血基因检测分析，发现父亲和女儿携带罕见 CisAB04 型基因。

CisAB 型是 1964 年在一波兰家庭母亲是 A2B 型，父亲是 O 型，2 个子女均为 A2B 型而首次被发现。1993 年 Yamamoto 等发现其原因是在 A101 等位基因的基础上，通过 467C>T 和 803G>C 的变异组合，导致该等位基因编码的糖基转移酶的特异性下降，能同时识别和催化 UDP-GalNAc 和 UDP-Gal2 种供给底物，

并最终同时形成 A 和 B 抗原,解释了 CisAB 型特点,证实 CisAB 型仍然符合遗传规律。中国人群则于 2003 年由许先国等首先报道存在 CisAB01 等位基因,随后逐渐有 CisAB 血型被报道。

本例是在母女常规检测血型时发现母亲血型 O 型,其孩子血型为 AB 型,随后检测父亲血型为 AB 型。分析原因可能有: 1)母亲是类孟买型,父亲是 AB 型。2)母亲是 O 型,父亲是 B(A)型。3)母亲是 O 型,父亲是 CisAB 型。在上述试验中看出,母亲抗-H 检测结果阳性,而类孟买的特点之一是 H 抗原阴性,所以排除第 1 种情况的可能性。B(A)型的特点之一是与部分高效价单克隆抗体有凝集,与人源血清弱凝集。而从表 2 结果看,父亲、女儿均与人源血清有明显凝集,所以就血清学检测结果推测父亲、女儿为 CisAB 型。CisAB 型的发现一般有 2 种情况,一是由于正反定型结果不符,另一个是由家系调查时发现。但就本例中父亲的血清学检测结果,一般不会怀疑其为 CisAB 型,而当成正常 AB 型,因此在血型检测时,注意查看受检者的父母或子女血型也显得尤为重要,有助于像 CisAB 型这样特殊血型的发现。

CisAB04 型非常罕见,检索文献仅 2005 年 Tzeng 等报道过 1 例 796C>A 与 467C>T 杂合突变型的 CisAB 血型。ABO 血型基因中, A 型和 B 型基因仅有 7 处核苷酸的碱基不同,但只有 G526C, A703G, A796C 和 C803G4 处碱基突变可以引起氨基酸的变异。Seto 等将(526C+703G+796C+803G)4 个核苷酸组合的单倍型称为 AAAA 型,将(526G+703A+796A+803C)核苷酸组合的单倍型称为 BBBB 型。本案例中 467C>T 为 A102 静默突变(不影响氨基酸表达), 796C>A 为 B 型突变点(其他 6 个点型突变点未见变异),即转变为 AABA 型,在表达时 266 处的亮氨酸残基氨基酸变化为蛋氨酸,使糖基转移酶在结构和性质上发生变化,可同时将 A 物质与 B 物质接合到前驱物质上,从而同时表达 A、B 抗原。CisAB 基因存在于一条染色体上,可以与含有 A、B、O、AB 之一基因的另外任意一条染色体杂合。父亲等位基因为 A102/CisAB04,血清学检查正定型和反定型表现为 A1B 型,均表现出强凝集强度,在用人源血清检测时也表现为仅有 1 个凝集强度差, A 抗原表达多于 B 抗原。女儿等位基因为 CisAB04/O02,血清学正定型表现为类似于 A2B,凝集强度较弱,但无混合凝集现象。于是我们对于此类 CisAB 血清学结果推测如下:

(1) 父亲等位基因为 A102/CisAB04,有 A102 基因,表达的糖基转移酶正常合成 A 抗原(A 和 A1 抗原),与 CisAB04 竞争表达 A 型, CisAB04 糖基转移酶由于竞争原因转移 A 物质较少,而更多的转移 B 型物质, B 抗原因此表达增强, A102 基因的存在掩盖了 CisAB 基因表现类似 A2B 的特点。

(2) 女儿等位基因为 CisAB04/O02, CisAB04 糖基转移酶转移同时 A 物质与 B 物质,但对比正常 A 型与 B 型糖基转移酶的酶动力学较低,导致 A 与 B 抗原量较少,与试剂反应呈现弱凝集。实际情况有待进

一步证实。

输血策略：CisAB04 型作为受血者时，就该父亲而言，尚未发现存在不规则抗-A 和抗-B，但已有文献报道 CisAB 血型的人有发现血清中有抗-A 或抗-B，是否 CisAB04/A 型和 CisAB04/O 型的血清中也会产生抗-A 或者抗-B 尚待考究。用父亲与正常 AB 型配血主次侧都相合，但从输血安全角度考虑，为避免其输血后产生抗-A 或抗-B，以输注 O 型洗涤红细胞和 AB 型血浆为佳。

31 《南京地区汉族人群 A 血型亚型的分子机制调查与分析》

作者：陈妍

来源：东南大学 2015 年硕士学位论文

摘要：

研究目的：血型是人类血液的主要特征之一，表达了产生抗原-抗体系统的遗传特征。与临床相关的主要是 ABO、Rh、Kell、Kidd、MNSs 等十余个血型系统，其中以 ABO、Rh 血型系统最为重要。ABO 血型与部分疾病的发生具有关联性，不仅与输血有密切的关系，也与器官移植、溶血性疾病、法医鉴定和人类学有关。ABO 血型系统有 A、B、H 抗原，出现的表型有 A、B、O、AB 血型，该系统最常见亚型出现在含 A 抗原的人群中，B 亚型不多见。A 型个体大多数属于 A1 型，少数属于 A2 型，及更少频率的 A3、Ax 及 Am 等亚型。在这些稀少的 A 亚型中不仅具有很强的抗 B 抗体，还会产生抗原性不同的抗 A 抗体，这就给临床血型的鉴定和配血带来困难，从而影响临床输血的安全。目前国内对 A 亚型的概率分布报道的不多，且南京地区未见关于该方面的报道。本研究拟通过较大样本量对南京地区汉族人群 A 血型亚型的基因分析，获取本地区人群 A 血型基因多态性的分布资料，为中国汉族人群 A 血型亚型多样性提供数据，丰富人类血型学内容，为进化、迁徙的研究提供依据；为血清学检测存在疑问的标本提供其基因分子的佐证；根据亚型调查的结果，考虑建立 ABO 亚型资料库的可行性，确保临床输血安全。

实验方法：随机选择 2013 年 10 月-2014 年 6 月来江苏省血液中心符合《献血者健康检查要求》的无偿献血者 ABO 血型定型为 A 型和 AB 型的 EDTA.K.2 抗凝全血标本，其中 A 型标本 7839 人份、AB 型标本 2173 人份，共计 10012 人份。采用微板法进行 A 亚型的血清学筛查。收集弱凝集和不凝集标本的白细胞膜层，置-20℃冰箱低温保存。采用原平皓(天津)生物技术有限公司商用试剂盒按照说明书提取样本基因组

DNA, 对 ABO 血型基因的第 6-7 外显子进行测序, 采用 SeqScapeV2.5 软件进行数据分析, 将 A101 序列作为标准序列, 测定序列与标准序列比对后, 获取 ABO 基因 6-7 外显子多态性, 将多态性情况与 ABO 血型突变数据库序列比较, 从而确定 ABO 血型序列及基因型。

结果:

- 1、南京地区 A 血型亚型在 A 型人群中的比例约为 0.31%, 其基因以 A201 亚型为主, 而在 AB 型人群中的比例约为 1.80%, 其基因型以 A205 亚型为主;
- 2、在 2169 名 AB 型人群中检出 1 例 CisAB06 和 1 例 B(A)02, 各占 AB 型的 0.046%(1/2169), 据此推算出 CisAB 亚型和 B(A)在南京地区汉族人群的比例分别为 4.6/10 万(0.0046%), 合计为 9.2/10 万(0.0092%), 明显高于原先血清学报道的 1/17-58 万的比例;
- 3、发现 1 例 A205/O01 基因型出现 nt806 位杂合新突变的样本, 经克隆测序证实突变位于 0 单倍型基因上, 该新等位基因第 7 外显子序列已经提交 Genbank, 序列号为 KP341759;
- 4、A 亚型在 A 型人群中血清学表型结果与分子生物学结果无显著差异, 而在 AB 型人群中血清学表型结果与分子生物学结果有显著差异($p < 0.05$)。判断 A2 亚型, 必须将血清学试验与分子生物学技术相结合。

结论: 本研究首次系统获取了南京地区汉族人群 ABO 血型基因多态性的分布资料, 丰富了人类血型学的内容; 建立的 ABO 血型系统基因测序方法将进一步完善本实验室的血型诊断技术; 初步建立的南京地区 A 亚型血型基因库, 可以为南京地区的临床疑难配血以及疑难血型鉴定提供服务, 并可以接收各地送检的疑难标本, 为临床提供疑难稀有血型配合性技术服务, 提高配合成功率, 保证临床输血安全。

标本来源: 随机选择 2013 年 10 月-2014 年 6 月来江苏省血液中心符合《献血者健康检查要求》的无偿献血者 ABO 血型定型为 A 型和 AB 型的 EDTA.K.2 抗凝全血标本, 其中 A 型标本 7839 人份、AB 型标本 2173 人份, 共计 10012 人份。

血清学结果: 7839 人份 A 型标本与抗 A1 血清反应不凝集 18 份, 弱凝集 14 份, 共检出可疑标本 32 份, 总计占 0.41%; 2173 人份 AB 型标本与抗 A1 血清反应不凝集 42 份, 弱凝集 17 份, 共检出可疑标本 59 份, 总计占 2.72%。将两者进行 χ^2 检验, $\chi^2 = 100$, $p < 0.005$, 两者有显著差异。

ABO 血型基因 DNA 测序结果: ABI 3500DX 测序仪 (美国 ABI), BigDye terminator 3.1 Sequencing kit 试剂盒 (美国 ABI)

表 2 南京地区汉族人群 A 等位基因的分型结果

血清学表 型样本数	有效测序 样本数	基因型	基因型 样本数	占所属血型测序样本 的基因型频率 (%)
A 型 7839	30	A101/O01	1	3.33
		A102/O01	4	13.33
		A102/O02	1	3.33
		A205/O02	3	10.00
		A205/O01	5	16.67
		A201/O02	4	13.33
		A201/O01	10	33.33
		A209/O02	1	3.33
		A205/O01 背景+806 位杂合突变	1	3.33
AB 2173	55	A102B101	15	27.27
		A104/B101	1	1.82
		A205/B101	34	61.82
		A201/B101	2	3.64
		Ax13/B101	1	1.82
		cisAB06/A102	1	1.82
		BA02/O01	1	1.82

讨论:

本研究采用血清学方法筛查了大样本量的 A 型和 AB 型样本, 并对血清学疑为 A 亚型的样本进行了基因测序, 结果表明, 血清学与基因测序结果在血型鉴定方面存在一定差异, A 亚型在 A 型人群中血清学结果与分子生物学结果无显著差异, 而在 AB 型人群中血清学结果与分子生物学结果有显著差异 ($P<0.05$), 故仅仅通过血清学来鉴定 A 亚型是不可取的。

CisAB 与 B(A)型人群中的发生频率非常低, 大约在 170000 到 580000 之间, 在日本人群中采用血清学方法检出大约为 0.0014%, 方法是血清学, 而现在是基因分型, 前者需要家系调查, 后者直接测序即可了解, 大大提高了在人群中的检出率, CisAB 占 AB 血型人群的 0.018%。本研究在 2169 名 AB 型人群中检出 1 例 CisAB 和 1 例 B(A)型, 分别占 AB 型的 0.046% (1/2169), 推算出 CisAB 亚型和 B(A)在南京地区汉族

人群的比例分别为 4.6/10 万 (0.0046%)，合计为 9.2/10 万 (0.0092%)，明显高于原先血清学报道的 1/17-58 万的比例，也高于近年来用基因测序法检测 CisAB 亚型和 B(A)的检出率 (4.1/10 万)。

CisAB 与 B(A)型两者的遗传方式相似，但血清学表现略有差异。CisAB 正定型表现为 AB 型，A 抗原一般比 A2 强但弱于 A1，B 抗原几乎总是弱表达，血清中一般含有弱的抗 B 抗体；而 B(A)红细胞是遗传学上的 B 型，其红细胞仅有少量 A 抗原和几乎正常含量的 B 抗原，但血清中包含抗 A。本研究中有 1 例血清学定为普通 AB 型的标本后经基因测序证实是 CisAB，还有 1 例血清学定为 A2B 型的标本后经基因测序证实是 B(A)型，其血清学检测红细胞含有比正常弱的 A 抗原，血清中含有较强的抗 A，且红细胞与 H 反应增强，属于典型的亚型标本特征。

以前认为 CisAB 是编码 A 型糖基转移酶和 B 型糖基转移酶的基因在同一条单核苷酸链上，可以同时遗传，现在发现 CisAB 和 B(A)血型的形成机理一样，可能是由于 B 等位基因在正常 B 基因序列的基础上发生单碱基突变，变异的 B 基因能产生既有 A 又有 B 活性的酶，是处于 A 和 B 等位基因之间的 1 种基因，其主要依据糖基转移酶在 526、703、796 和 803 这 4 个关键位置的核苷酸突变，以及 297，467，640，641，695 和 700 核苷酸位点的突变情况，来准确区分这两种特殊亚型的基因型。目前国际上发现并命名的 CisAB 型有 8 型 9 种，分别为 CisAB01 至 CisAB08、CisAB01V。CisAB05-08 均为国内所发现。CisAB 以 CisAB01 和 CisAB02 居多，CisAB06 在中国人群中非常罕见。

到目前为止，已经报道的 B(A)等位基因有 6 种分别为 B(A)01 至 B(A)06。与 B101 相比，这些 B(A)等位基因只有 1-2 个碱基的突变。近年来的研究表明，B(A)表现型呈弱的 A 抗原活性与其第 2 和第 3 外显子有关。B(A)血型以黑种人为主，在中国人群中非常罕见。迄今为止，我国已报道 B(A)02、B(A)04、B(A)05、B(A)06，且以 B(A)02、B(A)04 为主。本次研究中我们得到了一份非常典型的标本，其血清学检测定为 A2B，但测序结果显示，其除了具有正常的 O 基因外，其另一 B 基因在正常的 B 等位基因的基础上发生了突变，是 B(A)02 型等位基因，该标本的第 6 外显子存在 261delG 突变；第 7 外显子在 B101 序列的基础上，出现了 B(A)02 型 700C>G 的典型突变。该位点改变使得 234 位脯氨酸被丙氨酸置换，使得 B 糖基转移酶功能发生改变，使之带有弱的 A 型糖基转移酶的活性。

Ax 红细胞与多数 B 型人血清中的抗-A 不发生凝集或只有弱凝集，但与多数 O 型个体的抗-A，B 发生凝集。一些单克隆抗-A 能与 Ax 红细胞发生反应，因此被用于 Ax 表现型的鉴定。在 2169 名 AB 型人群中检出 Ax13/B 亚型 1 例。Ax 是一种罕见的 ABO 亚型，由于发现的 Ax 个体数很少，Ax 基因中共同的突变

点仍未确定下来，其分子机制还没有完全阐明。Ax 个体的红细胞或血清中检测不出 A 转移酶或只能检测出很弱的 A 转移酶。Ax 基因与 A1 等位基因相比，核苷酸 646T>A 导致了 216 位的苯丙氨酸被异亮氨酸替代。

本次调查还发现 1 例样本的测序结果为在第 6 外显子出现 261delC，297AA；第 7 外显子出现 467C>T，806T>C，1009A>G，判定该样本为 A205 与 O01 杂合型基因，且有 806 位新突变。由于该样本的基因型是 A/O 杂合，双链测序难判断 806 位的新突变究竟是位于 A 基因还是 O 基因上，因此采用 TA 克隆测序的方法对含第 7 外显子在内的序列进行克隆后再测序。结果显示：806T>C 新突变位于 O 基因上。该样本第 7 外显子核酸序列数据已经提交 GeneBank，序列号为 KP341759。

输血策略：CisAB 与 B(A)亚型的献血者如漏检 A 或 B 抗原、CisAB 与 B(A)亚型的受血者如漏检不规则抗-A 或抗-B，均将导致急性溶血性输血反应，危及生命。因此，因血清中存在不规则抗-A、抗-B 抗体，应输注 O 型洗涤红细胞或实现家属同型互助献血，条件许可应采用自体输血。

下期主题：**ABO 亚型案例报道专刊——B 亚**



为中国血型基因检测贡献力量！！！！

为人民服务！！！！