

论著·临床研究

羊水 ABH 血型物质测定与 ABO 血型基因分型*

陈江, 逯心敏, 郭渝, 胡伟

(四川省宜宾市第二人民医院检验科, 四川宜宾 644000)

摘要:目的 通过检测羊水 ABH 血型物质和序列特异性引物-聚合酶链反应(PCR-SSP)基因技术检测胎儿羊水细胞 ABO 血型基因型, 鉴定胎儿 ABO 血型。方法 选取妊娠 16~25 周的孕妇 53 例, 抽取羊水, 利用间接凝集实验测定羊水 ABH 血型物质; 将羊水细胞进行分离, 提取羊水细胞 DNA, 运用 PCR-SSP 技术分析其 ABO 血型基因型。结果 16 例羊水标本为非分泌型, 占 30.2%, 37 例羊水标本为分泌型, 占 69.8%; 48 例羊水标本通过 PCR-SSP 方法检测出了 ABO 血型的基因型。经基因鉴定的胎儿羊水细胞 ABO 血型与羊水分泌型 ABH 血型物质检测结果一致。结论 PCR-SSP 技术可以准确地检测胎儿羊水细胞的 ABO 血型。

关键词: ABO 血型系统; 羊水; 细胞; 序列特异性引物-聚合酶链反应; ABH 血型物质

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.11.008

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)11-1302-02

Detection of amniotic fluid ABH blood group substances and ABO blood type gene classification*

Chen Jiang, Lu Xinmin, Guo Yu, Hu Wei

(Department of Laboratory, Yibin Municipal Second People's Hospital, Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract: Objective To detect amniotic fluid ABH blood group substances and ABO blood group genotype by the polymerase chain reaction with sequence-specific primers(PCR-SSP) to increase the prenatal diagnosis of fetal ABO blood group. **Methods** 53 pregnant women with gestational age 16-25 weeks were selected. Amniotic fluid was extracted for detecting ABH blood group substances by the serological indirect agglutinating reaction; the amniotic fluid cells were separated for extracting DNA. Then the PCR-SSP technique was adopted to analyze the ABO blood group genotypes. **Results** 16 specimens of amniotic fluid were non-secreting type phenotype(30.2%) and 37 specimens of amniotic fluid were secreting type phenotype(69.8%); 48 specimens of amniotic fluid were detected out the ABO blood group genotype by the PCR-SSP method. ABO blood group of fetal amniotic fluid cells by the gene identification was consistent to the detection results of amniotic fluid secreting type ABH blood group substances. **Conclusion** The PCR-SSP technique can accurately detect the fetal amniotic fluid cells ABO blood group.

Key words: ABO blood-group system; amniotic fluid; cell; polymerase chain reaction with sequence specific primers; ABH blood group substances

母婴血型不合, 可引起胎儿或新生儿时期的免疫性溶血病。母体产生的免疫抗体, 通过胎盘进入胎儿体内, 可使胎儿红细胞凝集, 发生溶血, 引起死胎、死产、出生缺陷及新生儿溶血病^[1-2]。为了有效预防新生儿溶血病的发生, 产前确定胎儿血型十分必要, 为此本文抽取了 53 例孕妇羊水, 通过测定胎儿羊水 ABH 血型物质和序列特异性引物-聚合酶链反应(polymerase chain reaction with sequence specific primers, PCR-SSP)基因分型检测胎儿羊水细胞 ABO 血型, 来判断胎儿血型。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 3~10 月在本院孕 16~25 周、年龄 21~38 岁的孕妇 53 例, 采集羊水(双方签署知情同意书), 每人 2 份, 取样注意避免母血污染。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与材料 抗血清: 抗 A 效价 1:64, 抗 B 效价 1:128, 抗 H 效价 1:32, 购自长春博德; PCR-SSP ABO 血型试剂, 购自天津秀鹏生物技术开发有限公司; DNA 提取试剂, 购自杭州博日科技有限公司。

1.2.2 标准抗血清制备 (1) 标记试管: 3 排 18 支, 分别抗 A、抗 B 及抗 H。每排再标 2、4、8、16……。(2) 稀释: 每管加生

理盐水 50 μ L。每排第 1 管对应加抗 A、抗 B 及抗 H 血清 50 μ L, 倍量稀释成 2、4、8、16……稀释液。(3) 加 2% 悬红: 每排各管对应加悬红 50 μ L, 振摇混匀, 1 400 r/min, 离心 15 s。(4) 结果: 以 3+ 为标化血清的最适稀释度。

1.2.3 羊水 ABH 血型物质测定 (1) 无菌抽取羊水 5~10 mL, 经 1 400 r/min 离心 5 min 后留取上清液备用。(2) 排列试管 3 支, 分别标明 A、B、H, 3 管各加羊水 1 滴, 每管加相应标准抗血清 1 滴。混匀, 置室温, 中和 10 min。(3) 每管加相应 2% 标准红细胞悬液 1 滴, 混匀, 1 400 r/min 离心 15 s, 观察结果。

1.2.4 羊水细胞培养 取羊水专用培养基^[3], 加入新鲜小牛血清(56 $^{\circ}$ C, 30 min 灭活补体), 使终浓度达到 10%。将 5~10 mL 羊水接种于上述培养基中, 置 5% CO₂ 孵箱中, 37 $^{\circ}$ C 饱和湿度下培养, 每隔 48 h 换培养基。培养 3~5 d 后, 在倒置显微镜下观察, 如细胞贴壁生长良好。大部分或全部爬壁生长良好后, 即可终止传代生长。

1.2.5 引物设计 引物验证经 Primer 5.0 软件设计, 通过 NCBI-BLAST 数据库, 输入相应引物进行验证确认。O1 基因型: 上游引物 5'-TTA AGG GGA AGG ATG TCC TCG TCG

* 基金项目: 四川省卫生计生厅资助项目(20100583); 宜宾市科技局资助项目(2010SF011)。作者简介: 陈江(1974-), 副主任技师, 硕士研究生, 主要从事分子生物学与流式细胞学研究。

TA-3', Non O1 基因型: 下游引物 5'-TAA GTG GAG GAGTG AGT TGT G-3', 共同引物 5'-ATA TAT ATG GCA AAC ACA GIA ACC AAT G-3'; O2 基因型: 上游引物 5'-GAC CCC CGG AAG AAG CTA TTG GA-3', Non-O2 基因型: 下游引物 5'-CGA CCC CCG CAA GAA GGC C-3', 共同引物 5'-AGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC-3'; B 基因型: 上游引物 5'-ATC GAC CCC AGG GGA AGA CAG G-3', Non-B 基因型: 下游引物 5'-CCG ACC CCC CGA AGA GCC-3'; A2 基因型: 上游引物 5'-GAG GCG GTC CGG AAG CG-3', Non-A2 基因型: 下游引物 5'-GAG GCG GTC CGG AAC ACG-3', 共同引物 5'-GGG TGT GAT TTG AGG TGG GGA C-3'。

1.2.6 羊水细胞的 DNA 提取 将收集的羊水细胞于 2 500 r/min 离心 10 min, 弃去上清液; 再加入生理盐水 5~10 mL, 2 500 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。采用博日 DNA 提取试剂盒快速提取羊水细胞 DNA, 通过 2% 琼脂电泳鉴定提取的质量。

1.2.7 PCR 扩增 PCR 反应体系为 20.0 μ L 含模板 2.0 μ L (约 50 ng), 引物 1.5 μ L, dNTP 1.6 μ L (0.4 mmol), 10 \times Buffer 缓冲液 2.0 μ L, Taq 酶 1.0 U, 加双蒸水至 20.0 μ L; PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4.0 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1.5 min, 52 $^{\circ}$ C 退火 2.0 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2.0 min, 共 30 个循环。

1.2.8 PCR 扩增产物的检测 取 PCR 扩增产物 2.0 μ L, 2.5% 琼脂糖凝胶电泳 (T=6.0%, C=3.3%, 凝胶规格为 82 mm \times 64 mm \times 0.75 mm)。电极缓冲液为 1 \times TBE。将加有 1/5 体积上样缓冲液的酶切产物电泳, 电压 220 V, 电泳 20~30 min。紫外线下成像。结果判断见相应说明书。

2 结 果

2.1 羊水 ABH 血型物质检测结果及分布 53 例羊水 ABH 血型物质结果中非分泌型 16 例 (30.2%), A 型分泌型 13 例 (24.5%), B 型分泌型 6 例 (11.3%), O 型分泌型 15 例 (28.3%), AB 型分泌型 3 例 (5.7%)。

2.2 PCR-SSP 法检测结果 53 例羊水细胞 DNA 除 5 例未能正确检出, 其余均测出 ABO 血型。表现型为 A 型有 18 例, 基因型 O1A1:7 例, A1A1:2 例, A1O2:9 例; B 型有 8 例, 其基因型为 O1B:4 例, O2B:4 例; 表现型为 O 型有 19 例, 其基因型为 O1O1:3 例, O1O2:11 例, O2O2:5 例, 表现型为 AB 型有 3 例, 基因型均为 A1B。

2.3 结果比对 除非分泌型的结果和无效检测结果外, 孕妇羊水血型物质分泌型检测结果与基因分型结果均一致, 说明两种方法能达到临床检测的要求。

3 讨 论

血型是以血液抗原形式表现出来的一种遗传性状, 已经发现并成为国际输血协会承认的血型系统有 30 多种^[4], ABO 血型是最早发现的一个血型系统, 也是应用最广、与临床输血最密切、最重要、研究和认识较深入的一个血型系统。ABH 血型抗原在 5~6 周胎儿 RBC 已可测出^[5], 出生时抗原性只达成人的 25%~50%, 在出生后 18 个月时才能充分表现出抗原性^[6]。

所有 ABO 血型的抗原都由 H 物质合成而来, Se/se 基因和 H/h 基因都可以控制合成 H 物质。Se/se 基因的表达决定液体中是否出现 ABH 抗原, 决定 ABH 抗原为分泌型或非分泌型, 人类的这种分泌状态受控于分泌座位 (FUT2) 的一对等位基因, 即 Se 和 se, Se 基因编码有活性的为 α 2-L 岩藻糖基转移酶; se 是无效基因。大部分群体的 20% 为非分泌型, 是 se

基因的纯合子。H/h 基因的表达决定 RBC 上是否出现 ABH 抗原。再依 ABO 基因表达的不同, 合成出不同抗原形成不同的 ABO 血型^[7]。

母婴 ABO 血型不相容是临床新生儿溶血症的常见原因, 新生儿溶血病起源于胎儿从父亲方面继承了一些母亲没有的 RBC 抗原, 使得母婴血型不合, 母体存在与胎儿 RBC 血型抗原相应的免疫性抗体, 此免疫性抗体可以通过胎盘进入胎儿体内, 并包被在胎儿 RBC 上, 在分娩前、后加速胎儿 RBC 破坏发生溶血, 造成胎儿发生以溶血为主要损害的一种被动免疫性疾病^[8], 常常导致胎儿宫内感染, 早产、胎儿智力低下, 严重的造成胎儿死亡。国内常见的血型不合引起的新生儿溶血为 ABO 及 Rh 血型不合, 其中以 ABO 不合者居多, Rh 不合者次之^[9]。因此, 及早分析胎儿的血型, 对于预防和治疗具有重要的临床意义, 胎儿的血型鉴定以前主要是通过胎儿父母的血型, 按照孟德尔遗传规律推算出的子代血型, 具有一定的盲从性和主观性, 通过宫内穿刺采集胎儿血液进行胎儿血清学的 ABO 鉴定, 有较大的风险性, 容易造成胎儿损伤, 甚至导致胎儿死亡, 且胎儿 ABO 血型抗原发育不成熟, RBC 的凝聚力只有成人的 20%, 常常导致血型鉴定困难容易造成错判或误判^[10]。

人类 ABO 基因定位于第 9 对染色体长臂末端, ABO 血型系统的 3 个基因, 由 7 个外显子组成^[11]。ABO 血型系统不同的表型是由其基因水平上的几个核苷酸的不同所决定^[12]。PCR-SSP 技术检测 ABO 血型基因型是利用 ABO 基因发生突变位点的不同核苷酸, 分别设计一系列序列特异性引物, 直接扩增 ABO 血型基因型物质片段从而测得 ABO 血型及其亚型^[13-14]。

本次实验共收集到 53 例羊水标本, 均来自为 16~25 周的健康孕妇, 通过间接凝集抑制试验测得的 ABO 分泌型 37 例 (69.8%), 非分泌型 16 例 (30.2%), 稍高于文献报道^[15], 可能为胎儿尚未成熟, 羊水中分泌较少。同时对 53 例羊水标本进行了细胞培养, 通过 PCR-SSP 技术进行了基因分型, 除 5 例标本可能因提取 DNA 相对不够加之天气炎热, DNA 可能降解, 未能成功检测外, 其余均能正常检测, PCR-SSP 技术鉴定胎儿羊水细胞血型实验显示, 结果清晰可靠, 方法可行, 与分泌型的检测比对结果均为一致。

本研究表明, 采用 PCR-SSP 法检测胎儿羊水细胞 ABO 血型基因型来确定胎儿血型是准确可靠的。可有效克服常规血清学检测技术的不足和新生儿血型免疫系统不完善, 以及血型结果影响因素较多的问题。能较早快速准确地鉴定胎儿血型, 可直接用于临床检测, 有助于临床新生儿溶血症的预防和治疗。

参考文献:

- [1] Towns D, Hannon J, Hendry J, et al. Hemolytic disease of the fetus and newborn caused by an antibody to a low-prevalence antigen, anti-SARA[J]. *Transfusion*, 2011, 51 (9): 1977-1979.
- [2] Sammar M, Nisemblat S, Fleischfarb Z, et al. Placenta-bound and body fluid PP13 and its mRNA in normal pregnancy compared to preeclampsia, HELLP and preterm delivery[J]. *Placenta*, 2011, 32 Suppl: S30-36.
- [3] Roubelakis MG, Bitsika V, Zagoura D, et al. In vitro and in vivo properties of distinct populations of amniotic fluid mesenchymal progenitor cells[J]. *J Cell* (下转第 1307 页)

- Pulm Med, 2012, 18(2): 97-103.
- [2] Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(4): 347-365.
- [3] Orr R, Smith LJ, Cuttica MJ. Pulmonary hypertension in advanced chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2012, 18(2): 138-143.
- [4] Stone AC, Machan JT, Mazer J, et al. Echocardiographic evidence of pulmonary hypertension is associated with increased 1-year mortality in patients admitted with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Lung*, 2011, 189(3): 207-212.
- [5] Sims MW, Margolis DJ, Localio AR, et al. Impact of pulmonary artery pressure on exercise function in severe COPD [J]. *Chest*, 2009, 136(2): 412-419.
- [6] Tillie-Leblond I, Marquette CH, Perez T, et al. Pulmonary embolism in patients with unexplained exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: prevalence and risk factors [J]. *Ann Intern Med*, 2006, 144(6): 390-396.
- [7] 关伟. 慢性阻塞性肺疾病合并肺血栓栓塞症的研究进展 [J]. *心肺血管病杂志*, 2012, 31(3): 342-344.
- [8] Escribano SP, Barbera MJ, Suberviola V. Current diagnostic and prognostic assessment of pulmonary Hypertension [J]. *Rev Esp Cardiol*, 2010, 63(5): 583-596.
- [9] ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(1): 111-117.
- [10] Wedzicha JA, Bestall JC, Garrod R, et al. Randomized controlled trial of pulmonary rehabilitation in severe chronic obstructive pulmonary disease patients, stratified with the MRC dyspnoea scale [J]. *Eur Respir J*, 1998, 12(2): 363-369.
- [11] Ringbaek T, Martinez G, Lange P. A comparison of the assessment of quality of life with CAT, CCQ, and SGRQ in COPD patients participating in pulmonary rehabilitation [J]. *COPD*, 2012, 9(1): 12-15.
- [12] 武伟华. 6 分钟步行试验(6MWT)、BMI 及 MMRC 对评价 COPD 病情严重程度的意义 [D]. 泰安: 泰山医学院, 2010.
- [13] Kim S, Oh J, Kim YI, et al. Differences in classification of COPD group using COPD assessment test(CAT) or modified Medical Research Council(mMRC) dyspnea scores: a cross-sectional analyses [J]. *BMC Pulm Med*, 2013, 3(6): 13-35.
- [14] Gruffydd-Jones K, Marsden HC, Holmes S, et al. Utility of COPD Assessment Test(CAT) in primary care consultations: a randomised controlled trial [J]. *Prim Care Respir J*, 2013, 22(1): 37-43.
- [15] Nishimura K, Izumi T, Tsukino M, et al. Dyspnea is a better predictor of 5-year survival than airway obstruction in patients with COPD [J]. *Chest*, 2002, 121(5): 1434-1440.
- [16] Langhammer A, Jones R. Usefulness of the COPD assessment test(CAT) in primary care [J]. *Prim Care Respir J*, 2013, 22(1): 8-9.

(收稿日期: 2013-09-30 修回日期: 2014-01-27)

(上接第 1303 页)

- Mol Med, 2011, 15(9): 1896-1913.
- [4] Franchini M, Favaloro EJ, Targher G, et al. ABO blood group, hypercoagulability, and cardiovascular and cancer risk [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2012, 49(4): 137-149.
- [5] Moussa H, Tsochandaridis M, Jemni-Yacoub S, et al. Fetal RhD genotyping by real time quantitative PCR in maternal plasma of RhD-negative pregnant women from the Sahel of Tunisia [J]. *Ann Biol Clin(Paris)*, 2012, 70(6): 683-688.
- [6] Gloria-Bottini F, Cozzoli E, Neri A, et al. Effect of smoking and ABO blood groups on maternal age at child bearing and on birth weight [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011, 159(1): 83-86.
- [7] Emeribe AO, Igweagu CA, Osim EE. ABH secretor status in saliva of Calabar Municipality residents [J]. *East Afr Med J*, 1992, 69(1): 27-30.
- [8] Stasi R. Rozrolimupab, symphobodies against rhesus D, for the potential prevention of hemolytic disease of the newborn and the treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2010, 12(6): 734-740.
- [9] Zuppa AA, Cardiello V, Lai M, et al. ABO hemolytic disease of the fetus and newborn: an iatrogenic complication of heterologous assisted reproductive technology-induced pregnancy [J]. *Transfusion*, 2010, 50(10): 2102-2104.
- [10] Klarmann D, Eggert C, Geisen C, et al. Association of ABO (H) and I blood group system development with von Willebrand factor and Factor VIII plasma levels in children and adolescents [J]. *Transfusion*, 2010, 50(7): 1571-1580.
- [11] Klimant E, Glurich I, Mukesh B, et al. Blood type, hormone receptor status, HER2/neu status, and survival in breast cancer: a retrospective study exploring relationships in a phenotypically well-defined cohort [J]. *Clin Med Res*, 2011, 9(3/4): 111-118.
- [12] Jukic I, Bingulac-Popovic J, Dogic V, et al. Evaluation of ABO blood groups as a risk factor for myocardial infarction [J]. *Blood Transfus*, 2012, 11(3): 464-465.
- [13] Prager M. Molecular genetic blood group typing by the use of PCR-SSP technique [J]. *Transfusion*, 2007, 47(1 Suppl): S54-59.
- [14] 陈志忠, 廖扬勋, 陈尚良, 等. PCR-SSP 基因分型技术在 ABO 疑难血型定型中的应用 [J]. *现代检验医学杂志*, 2011, 26(4): 53-55.
- [15] 张萍. 羊水血型物质测定与临床应用 [J]. *医学创新研究*, 2008, 5(12): 159-160.

(收稿日期: 2013-09-28 修回日期: 2013-12-22)