

论著·临床研究

1 种 ABO 等位基因新突变组合鉴定及蛋白结构分析*

杨红梅,马思飞,邹 昕,钱 程,徐 立[△]

(常州市中心血站/常州市临床输血重点专科实验室,江苏 常州 213000)

[摘要] **目的** 分析 1 种 ABO 等位基因新突变组合标本的血清学和分子生物学特征,结合蛋白三维结构模型探究其遗传分子机制。**方法** 2023 年 10 月该实验室采用常规血清学方法对 1 例无偿献血的先证者及家系成员进行 ABO 血型鉴定,使用 Sanger 测序进行 ABO 基因分型,采用 PacBio 三代长读单分子实时测序分析 ABO 全基因包括侧翼调控区域,使用 DynaMut 构建野生型和突变型糖基转移酶(GTA)三维分子模型,通过 PROVEAN 和 PolyPhen2 预测突变对酶功能及蛋白稳定性的影响。**结果** 先证者和父亲血清学结果均为 AweakB,基因分型结果为 Ax24/B101;ABO 基因检测结果与 ABO * A1.01 序列对比:2 个样本均存在 297A>G、467C>T、526C>G、657C>T、703G>A、796C>A、803G>C、838C>T 和 903G>A 突变,在 ISBT 数据库中暂未检索到此种突变组合基因型;三代测序为 ABO * A3. new/ABO * B.01,导致多肽链 p. Leu280Phe (L280F)替换。GTA 三维分子建模提示 L280F 突变导致蛋白结构中氢键和水介导氢键数量减少,相应弱氢键、弱水介导氢键数量增加和原子间相互作用发生变化影响蛋白结构的稳定性。**结论** 在 ABO 第 7 外显子发现 1 种新的等位基因突变组合——467C>T、838C>T,该错义突变导致氨基酸替换影响酶活性改变,从而出现 A 抗原弱表达现象,且能稳定遗传。

[关键词] ABO 基因; 抗原弱表达; 基因测序; 3D 分子模型

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2025.08.007

中图法分类号:R457.1+1

文章编号:1009-5519(2025)08-1809-05

文献标识码:A

Identification of new ABO allele mutation combinations and analysis of protein structure*

YANG Hongmei, MA Sifei, ZOU Xin, QIAN Cheng, XU Li[△]

(Changzhou Blood Center/Changzhou Key Laboratory of Clinical Blood Transfusion, Changzhou, Jiangsu 213000, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the serological and molecular biological characteristics of a new ABO allele mutation combination specimen, and to explore its genetic molecular mechanism by combining a three-dimensional structure model of the protein. **Methods** The laboratory used conventional serological methods to determine the ABO blood type of a proband and family members who were voluntary blood donors in October 2023. ABO genotyping was performed using Sanger sequencing, and the entire ABO gene, including flanking regulatory regions, was analyzed using PacBio third-generation long-read single-molecule real-time sequencing. Wild-type and mutant glycosyltransferase (GTA) three-dimensional molecular models were constructed using DynaMut, and the effects of mutations on enzyme function and protein stability were predicted using PROVEAN and PolyPhen2. **Results** The serum test results for both the proband and her father were AweakB, with genotyping results of Ax24/B101. ABO gene testing results compared with the ABO * A1.01 sequence: Both samples exhibit the following mutations: 297A>G, 467C>T, 526C>G, 657C>T, 703G>A, 796C>A, 803G>C, 838C>T, and 903G>A. This mutation combination genotype had not yet been identified in the ISBT database; third-generation sequencing resulted in ABO * A3. new/ABO * B.01, leading to the amino acid substitution p. Leu280Phe (L280F). GTA three-dimensional molecular modeling suggested that the L280F mutation reduced the number of hydrogen bonds and water-mediated hydrogen bonds in the protein structure, corresponding increased in the number of weak hydrogen bonds and weak water-mediated hydrogen

* 基金项目:江苏省常州市科技局项目(CJ20245046;CJ20241124);江苏省常州市中心血站科研基金项目(XZ202403)。

作者简介:杨红梅(1982—),硕士研究生,副主任技师,主要从事血液免疫学研究。 [△] 通信作者, E-mail: xulion@126.com。

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250526.1134.012\(2025-05-26\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250526.1134.012(2025-05-26))

bonds, and changed in interatomic interactions that affect the stability of the protein structure. **Conclusion** A new allele mutation combination of 467C>T and 838C>T is found in exon 7 of ABO. This missense mutation causes amino acid substitution to affect the change of enzyme activity, resulting in weak expression of A antigen and stable inheritance.

[Key words] ABO allele; Weak expression of antigen; Gene sequencing; 3D molecular model

截至 2024 年 8 月 20 日共发现 47 个红细胞血型系统,而 ABO 血型系统是最重要和最有意义的血型系统之一,在安全输血、组织器官移植、产前诊断、法医鉴定等方面均具有重要意义。因此,鉴定准确血型是临床输血安全的重要保障^[1-2]。而在 ABO 血型血清学鉴定时常出现正反不一致现象,一般表现为抗原抗体异常出现、减弱、消失或混合视野等,探究其原因有基因变异,包括单核苷酸变异、多核苷酸变异、碱基插入或缺失、重组等^[3-9],从而产生 ABO 亚型。对疑似亚型样本可使用 ABO 基因分型方法辅助检测,以解决 ABO 血型的精准分型问题。到目前为止已发现几百种 ABO 等位基因,同一种血型血清学表型可由不同等位基因或基因座变异引起。本实验室在对 1 例疑似 ABO 亚型标本进行血型鉴定并辅以基因测序方法中进一步检测发现 ABO 等位基因新突变组合,最终确定为 ABO * A3. new/ABO * B. 01,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 样本来源 先证者,女,38 岁,2023 年 10 月无偿献血者,因 ABO 正反不符送本实验室进一步进行血型鉴定。受试者签署本研究书面知情同意书。本研究获本实验室医学伦理委员会审批通过(伦理批号:2024 年第 03 号)。

1.1.2 仪器与试剂 抗-A/B 单克隆抗体(上海血液生物)、IgM 型抗-D 单克隆抗体(北京金豪),抗-A1、抗-H、抗-AB 单克隆抗体(德国 CE),ABO 血型反定型红细胞购自上海血液生物,人源抗-A/B 单克隆抗体为本实验室自制,DNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司,琼脂糖购自北京沃比森,溴化乙锭(10 mg/mL)购自捷世康。仪器包括 9700 型聚合酶链反应(PCR)扩增仪、DNA 浓度测定仪、凝胶成像系统、贝克曼高速离心机、久保田 KA-2200 血清学专用离心机、37 ℃ 恒温水浴箱等。

1.2 方法

1.2.1 血清学检测 采用盐水试管法对 3 例样本(先证者、父亲、母亲)进行 ABO 血型血清学鉴定。取 B 型、O 型献血者及被检红细胞少许,用生理盐水洗涤 3 次并配制成 3% 左右红细胞悬液进行抗-H、抗-A1、抗-AB 实验,离心判读凝集强度;同时,对标本进行抗体筛查。所有实验均严格按文献^[10-11]方法及试剂盒操作说明书进行。

1.2.2 DNA 提取及 ABO 基因扩增、测序分析、比对 使用 DNA 提取试剂盒提取患者外周血基因组 DNA,调整 DNA 模板质量浓度为 30~35 ng/μL, A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 1.60~1.80,根据人类 ABO 血型基因检测试剂盒说明书设置参数进行 PCR 扩增;ABO 基因第 6、7 外显子扩增片段大小约 2 019 bp,扩增反应体系根据天津秀鹏试剂盒说明书进行,采用引物 5'-CCTGCCAGCTCCATGTGAC-3',下游引物:5'-CAGGACGGACAAAGGA-3'。扩增产物经纯化后测序第 1~7 外显子编码区,该实验部分委托天津秀鹏生物有限公司完成。第 6 外显子测序上游和下游引物分别为 5'-CATGTGGGTGGCACCCTGCC-3', 5'-ATGTCCACAGTCACTCGCCA-3';第 7 外显子上游和下游引物分别为 5'-GCTCCCCCAGC-CCCCGTCCG-3', 5'-GTTTACCCGTTCTGCTAA-3'。测序后于 NCBI 在线比对数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)确定其基因型。

1.2.3 PacBio 三代长读单分子实时测序 通过三代长读单分子实时测序获得先证者 ABO 基因全长单倍型序列。该实验部分由西安浩瑞基因技术有限公司完成。

1.2.4 蛋白结构分析 使用 DynaMut 构建野生型和突变型糖基转移酶(GTA)三维分子模型并预测稳定性变化(<https://biosig.lab.uq.edu.au/dynamut/>)。通过 PROVEAN 和 PolyPhen2 预测突变对酶功能的影响(<http://provean.jcvi.org/index.php>、<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>),根据 ΔG 突变型与 ΔG 野生型之间的 ΔΔG 自由能差异进一步分析突变型对蛋白质稳定性的影响。

2 结果

2.1 先证者及家族成员 ABO 血型血清学检测情况 先证者正定型(微柱凝集法)检出弱 A 抗原(2+⁺)和正常 B 抗原(4+),反定型检出抗-A 抗体(1+),呈现正反定型不符,经试管法复核血型结果与微柱凝集法基本一致。先证者及父母亲 ABO 血型血清学结果见表 1。先证者及父亲均表现为正反定型不符。

2.2 ABO 基因扩增、测序情况 对先证者及父亲血液标本提取 DNA 进行 ABO 基因测序并比对(以 ABO * A1.01 为参考序列)。一代测序在先证者及父亲的第 6、7 外显子中共发现 9 个碱基突变,分别为 297A>G、467C>T、526C>G、657C>T、703G>A、796C>A、803G>C、838C>T、903G>A 突变,且在

ISBT 数据库中暂未检索到此种突变组合基因型。根据 NCBI 网站提供的 The Blood Group Antigen Gene Mutation Database 综合推断测序结果为 A3. new/B101。见图 1。

2.3 ABO 基因编码区全长测序 先证者及父亲 ABO 基因编码区均在同一条单倍体中发现 c. 838C>T 错义突变,导致第 280 位氨基酸由亮氨酸(Leu)变

成苯丙氨酸(Phe)。根据 ISBT 单独的 c. 838C>T 突变,血型基因型为 ABO * A3. 03,预测表型为 A3;而第 7 外显子中的 c. 467C>T 突变位点为中国人常见的 A1 表型突变;推测同时存在 c. 467C>T、c. 838C>T 突变位点的单倍体表型为 A3. new,为新突变组合。见表 2。

表 1 先证者及父母亲 ABO 血型血清学检测情况

方法	正定型					反定型				抗筛	血清学结果
	抗-A	抗-B	抗-H	抗-A1	抗-AB	Ac	Bc	Oc	自 c		
柱集法											
先证者	2+ ^w	4+	—	—	—	1+	0	0	0	0	B(A)/AxB
父亲	2+ ^w	4+	—	—	—	1+	0	0	0	0	B(A)/AxB
母亲	0	4+	—	—	—	3+ ^s	0	0	0	0	B
试管法											
先证者	1+	4+	±/0	0	4+	1+	0	0	0	0	B(A)/AxB
父亲	1+ ^s	4+	±/0	0	4+	1+	0	0	0	0	B(A)/AxB
母亲	0	4+	1+ ^w /±	0	4+	3+	0	0	0	0	B

注:—表示无此项。

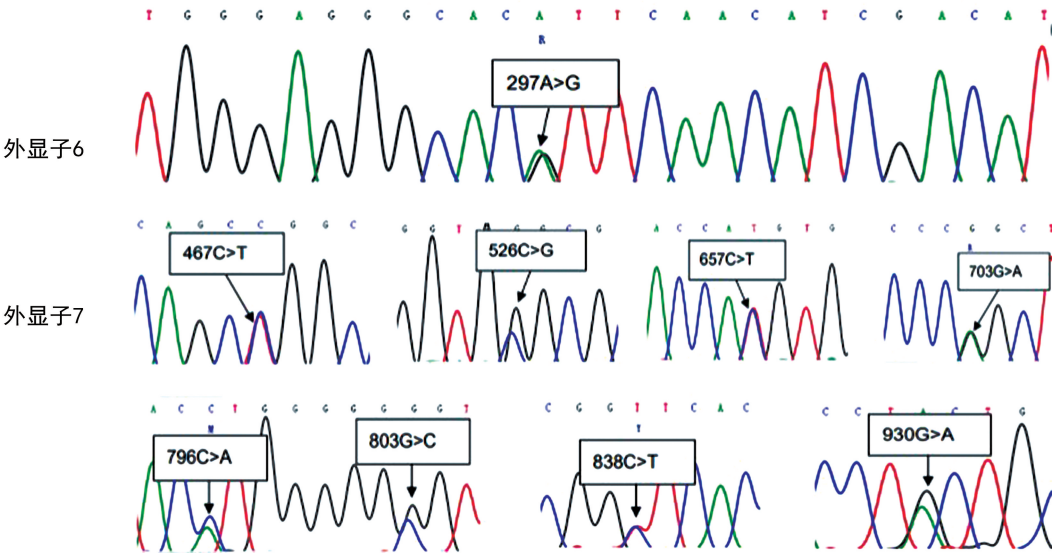


图 1 先证者及父亲 ABO 第 6、7 号外显子测序结果

表 2 先证者及父亲 2 条单倍型核苷酸突变位点和氨基酸改变结果

单倍体 1			单倍体 2			氨基酸变化
表型	等位基因	突变位点	表型	等位基因	突变位点	
A3	ABO * A3. new	c. 467C>T	B	ABO * B. 01	c. 297A>G	p. Pro156Leu
		c. 838C>T			c. 526C>G	p. Leu280Phe
					c. 657C>T	p. Arg176Gly;
					c. 703G>A	p. Gly235Ser;
					c. 796C>A	p. Leu266Met;
					c. 803G>C	p. Gly268Alap.
					c. 930G>A	

2.4 ABO 蛋白结构模拟 野生型和突变体氢键和离子相互作用等原子间相互作用的差异见图 2。三维结构显示第 280 位氨基酸由 Leu 变成 Phe 导致蛋白结构中氢键和水介导氢键数量减少,相应弱氢键、弱

水介导氢键数量增加和原子间相互作用发生变化,从而影响离子相互作用和疏水性,导致蛋白结构的稳定性变差。

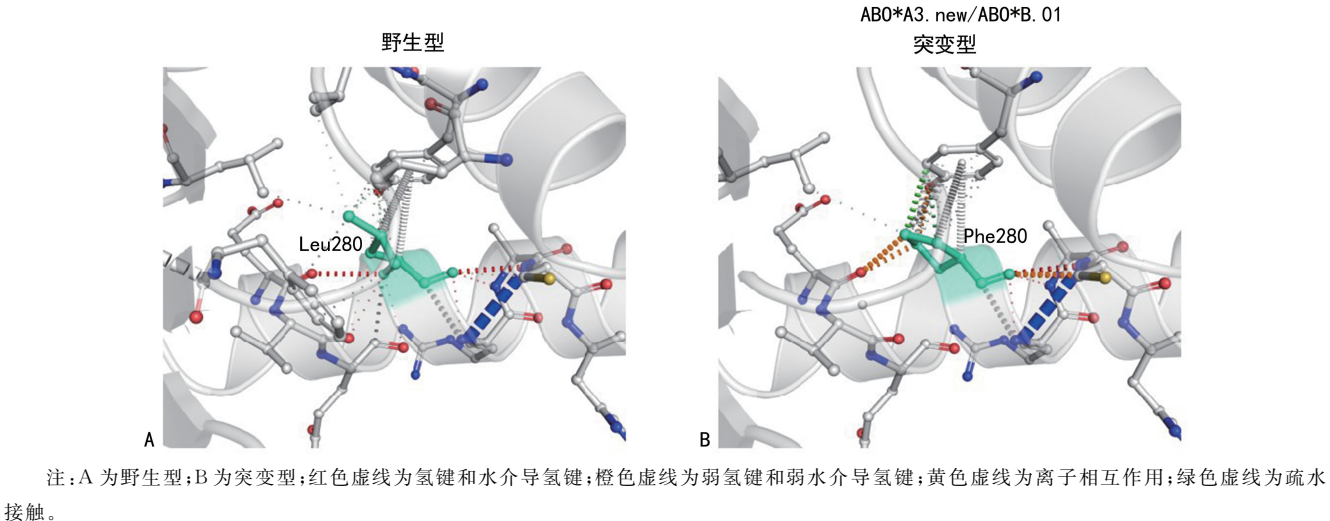


图 2 先证者及父亲野生型和突变型 GTA 晶体 3D 蛋白结构

3 讨 论

ABO 血型在输血和器官移植中具有至关重要的作用,其基因位于第 9 号染色体并编码不同的糖基转移酶^[12-15]。这些糖基转移酶将 N-乙酰半乳糖胺或 D-半乳糖结合到 H 抗原物质的末端从而进一步形成 A 或 B 抗原。GTA、GTB 非常相似且有重叠功能,GTA 可使用与 GTB 相同供体和受体底物合成 B 血型抗原。因此,GTA、GTB 之间变化仅为 Arg176Gly、Gly235Ser、Leu266Met 和 Gly268Ala,而第 266、268 位氨基酸在区分糖特异性方面尤为重要。本研究结果显示。先证者及父亲正定型检出弱 A 抗原(2+^w)和正常 B 抗原(4+),反定型检出抗-A 抗体(1+),血清学表型更接近 B(A)或 AxB;此时血清学判定血型具有一定局限性,于是采用 Sanger 测序使 ABO 血型结果更为准确。一代测序结果与 NCBI 数据库中 ABO 基因参考序列(NG_006669)比对,推断测序结果为 A3. new/B101,且在 ISBT 数据库暂未检索到此种突变组合基因型,于是采用 PacBio 三代长读单分子实时测序获得先证者及父亲的 ABO 基因全长单倍型序列,与相关研究结果一致^[16]。

ABO 抗原弱表达往往是因 ABO 基因核苷酸多态性及氨基酸变化影响糖基转移酶特性或活性^[17-19]。不同氨基酸可能在蛋白质结构中发挥不同的作用。本研究通过 3D 结构模型和蛋白稳定性改变预测了 A3. new/B101 等位基因(c. 838C>T, L280F)结构功能相关性。对 3D 分子建模和分析蛋白质结构中的变异变化,对于更深入地了解蛋白质变化的潜在机制至关重要。根据 DynaMut 预测 ΔG 突变型与 ΔG 野生

型之间的 $\Delta\Delta G$ 自由能差值为 -1.503 kcal/mol ($1\text{ kcal}=4.184\text{ kJ}$),与野生型相比该突变体使蛋白结构不稳定($\Delta\Delta G>0$ 表示突变蛋白结构稳定, $\Delta\Delta G<0$ 表示突变蛋白结构不稳定)。通过测定野生型与突变型之间的振动熵能量差异预测分子间作用力结果突变体与野生型之间的 $\Delta\Delta S_{vibENCm}$ 振动熵能差为 $0.697\text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{K})$,表明突变后分子间作用力发生改变导致分子间弹性增加。在 ABO 血型系统中因 c. 838C>T 错义突变引起 L280F,改变了 GTA 蛋白酶高度保守区和蛋白结构的稳定性,进一步影响了酶的活性和改变了红细胞表面 ABO 抗原的数量和表位,从而血清学呈现出 A 抗原弱表达。因此,采用现有的 PCR-SSP(序列特异性引物 PCR)、荧光定量 PCR 分型,以及一代测序等血型基因检测技术手段使血型检测更加精细、精准,有效保障了临床输血安全;但在面对更复杂的血型基因大片段插入、缺失、倒位等情况,以及单倍型分析方面显得力不从心,仍有一些标本存有疑问,没有明确答案,如新突变组合、某些样本 ABO 外显子 6、7 基因分型结果与血清学存在矛盾等,亟需进一步采用更优化的检测手段以解决血型基因领域检测技术瓶颈问题,从而提升血型分型准确性,保障临床输血安全和推动精准医学的发展。

参考文献

[1] BERTSCH T, LÜDECKE J, ANTL W, et al. Karl landsteiner: the discovery of the ABO blood group system and its value for teaching medical students [J]. Clin Lab, 2019, 65(6): 610-615.

[2] KIM T Y, YU H, SEO J Y, et al. Molecular basis of weak a subgroups in the Korean population: identification of three novel subgroup-causing variants in the ABO regulatory regions[J]. *Transfusion*, 2022, 62(2): 286-291.

[3] LEI H, WANG Z, WANG Y, et al. Two novel mutations p. L319V and p. L91P in ABO glycosyltransferases lead to Ael and Bel phenotypes[J]. *Blood Transfus*, 2020, 18(6): 471-477.

[4] 肖建宇, 冯晨晨, 刘太香, 等. ABO 基因第 7 外显子 c. 721C>T 变异导致 ABO 亚型的研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2021, 29(6): 1917-1922.

[5] 杨红梅, 邹昕, 虞茜, 等. 罕见类抗-A1 抗体引起 ABO 血型正反定型不符多因素分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2022, 43(20): 2557-2560.

[6] YAO M X, HAO X, XIA X X, et al. Retrospective analysis of molecular biology mechanism of ABO blood group typing discrepancy among blood donors in Jinan blood station[J]. *Transfus Clin Biol*, 2022, 29(1): 75-78.

[7] HONG X, YING Y, ZHANG J, et al. Six splice site variations, three of them novel, in the ABO gene occurring in nine individuals with ABO subtypes[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 470-473.

[8] 冯晨晨, 史丽莉, 李慧, 等. c. 955C>G 变异致 ABO 等位基因增强现象的研究及文献复习[J]. *临床输血与检验*, 2022, 24(2): 147-150.

[9] 雷航, 王学锋, 程晓文, 等. ABO 血型变异的分子基础研究[J]. *中国输血杂志*, 2024, 37(4): 385-391.

[10] FUNG M K, GROSSMAN B J, HILLYER C D, et al. AABB 技术手册[M]. 桂嵘, 陈秉宇, 黄远帅, 等, 译. 18 版. 长沙: 中南大学出版社, 2019: 98-102.

[11] 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: 118-137.

[12] 杨红梅, 陈敏洁, 邹昕, 等. 38 例 ABO 血型抗原表达异常的基因分析[J]. *检验医学与临床*, 2023, 20(13): 1878-1881.

[13] 徐明菊, 仇丰武, 沈钢, 等. B(A)04 等位基因的鉴定及相关分子机制[J]. *中国实验血液学杂志*, 2023, 31(5): 1492-1495.

[14] 周帆, 杨久扬, 赵恒丽. 罕见 Ael 亚型的鉴定及探讨[J]. *中国输血杂志*, 2024, 37(2): 219-222.

[15] 宿军, 王夕钢, 杨红霞, 等. ABO 亚型分子遗传学分析及罕见等位基因鉴定[J]. *中国输血杂志*, 2024, 37(2): 145-150.

[16] 崔文燕, 刘金华, 付威义. 利用三代测序技术鉴定 c. 586T>C 突变导致的 Bel 亚型[J]. *临床输血与检验*, 2024, 26(2): 262-266.

[17] 赵倩, 王振雷, 苏蔓, 等. 1 例类孟买血型的鉴定及分子机制研究[J]. *临床血液学杂志*, 2019, 32(2): 159-161.

[18] WANG C, TANG Y, ZHANG P, et al. Detection and phenotype analysis of a novel ael blood group allele[J]. *Vox Sang*, 2024, 119(1): 74-78.

[19] 刘昕, 王莲慧, 舒锦, 等. 新生儿 ABO * A2. 08 亚型等位基因的鉴定及蛋白结构分析[J]. *中国实验血液学杂志*, 2024, 32(1): 225-230.

(收稿日期: 2024-12-27 修回日期: 2025-03-28)

(上接第 1808 页)

[16] KONIJNENBERG L S F, DAMMAN P, DUNCKER D J, et al. Pathophysiology and diagnosis of coronary microvascular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(4): 787-805.

[17] 任琳, 王倩, 陈皓, 等. 老年急性 ST 段抬高型心肌梗死患者经皮冠状动脉介入治疗后延长应用替格瑞洛对临床转归的影响[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2024, 23(3): 202-206.

[18] 宋炳慧, 陈宏, 王书清, 等. 冠脉内注射尼可地尔对 STEMI 患者急诊 PCI 术的有效性及安全性分析[J]. *中国临床研究*, 2016, 29(1): 20-23.

[19] AKAI K, WANG Y, SATO K, et al. Vasodilatory effect of nicorandil on coronary arterial microvessels: its dependency on vessel size and the involvement of the ATP-sensitive potassium channels[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, 26(4): 541-547.

[20] 陈国雄, 王红娜, 房兆飞, 等. 选择性冠脉内应用替罗非班及异搏定对急诊冠脉介入治疗术中无复流现象的临床研究[J]. *中华急诊医学杂志*, 2018, 27(11): 1299-1302.

[21] 金旭李, 徐慧美, 曾慧. 替格瑞洛对 STEMI 患者 PCI 术后血小板参数、心功能状态及不良反应的影响[J]. *现代实用医学*, 2023, 35(2): 259-261.

[22] 董劲, 姜红. 不同抗血小板药物方案对行急诊经皮冠状动脉介入治疗的 STEMI 患者血小板反应性及对 MPVLR、NLR 的影响[J]. *岭南心血管病杂志*, 2023, 29(2): 119-123.

[23] 林晓明, 杨希立, 赖玉琼, 等. 碎裂 QRS 波对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者直接介入治疗后心肌灌注及预后的预测价值[J]. *广东医学*, 2017, 38(12): 1877-1879.

[24] 牛广鑫, 刘彦龙, 张冠茂. 尼可地尔联合替格瑞洛对 STEMI 患者 PCI 术后的效果[J]. *甘肃医药*, 2022, 41(3): 228-230.

[25] 何蕊, 苏英杰, 林航. 尼可地尔联合替格瑞洛对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者心功能和预后的影响[J]. *临床合理用药*, 2023, 16(6): 611-613.

[26] 李其勇, 苏莱, 陶剑虹. 替格瑞洛对急性心肌梗死患者冠脉血流和短期预后的影响[J]. *成都医学院学报*, 2019, 14(2): 187-192.

(收稿日期: 2024-09-30 修回日期: 2025-02-10)