

◇ 预防医学研究 ◇

安徽省汉族人群 Miltenberger 血型调查分析

周娟¹, 吕蓉², 朱帮强³, 韩婷婷¹, 刘忠^{1,4}

摘要 目的 调查安徽省 Miltenberger 血型的分布情况,为建立红细胞库奠定基础。方法 随机采集安徽省血液中心 2 660 例非血缘关系汉族无偿献血者外周血样乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血标本,并提取 DNA。采用序列特异性引物 PCR(PCR-SSP)方法对 Miltenberger 血型系统进行检测,并通过血清学及测序方法验证。结果 2 660 例献血者中有 24 例 PCR-SSP 阳性,经血清学及测序确认均为 GP. Mur 表型。结论 在安徽省汉族人群中,GP. Mur 表型的频率为 0.9%。目前还未发现 Miltenberger 血型系统的其他表型。

关键词 血型; Miltenberger 血型; Mur 抗原

中图分类号 R 457.1+1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)03-0313-03

MNS 血型系统是第 2 个被发现的血型系统,其复杂程度仅次于 Rh 血型系统^[1]。MNS 系统包括一些变异的低频率抗原,这些抗原联系在一起组成 Miltenberger 血型系统,其中 Mur 抗原是该血型系统中最常见的一种抗原,在中国人中具有相对较高的频率。Miltenberger 血型系统在输血医学中具有重要意义。有报道^[2-3]表明,抗 Mur 抗体能引起严重的溶血性输血反应及新生儿溶血病,因此,对中国人 Miltenberger 血型分布进行调查,评估因 Miltenberger 血型不配合引起输血反应的风险,有一定的临床意义。该研究采用序列特异性引物 PCR(PCR-SSP)法对安徽省 2 660 例汉族人群 Miltenberger 血型进行了检测,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 样本 随机选取安徽省血液中心 2 660 例非血缘关系的汉族无偿献血者,经外周静脉采血

5 ml 并用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝。标准标本和血清:Mur 抗原阳性标本 6 份、阴性标本 2 份以及抗-Mur 标准血清 1 份,均由中山市红十字中心血站提供。

1.2 主要试剂与仪器 ① PCR 试剂:血液基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技北京有限公司,批号: M1218); dNTPs (批号: CBH801A)、DL2000 Marker(批号: B7001A)(大连 TaKaRa 公司); SYBR Green I 核苷酸胶体染料(美国 Invitrogen 公司,批号: 416154); MgCl₂、10 × PCR Buffer、AmpliTaq 金牌酶(美国 ABI 公司,批号: R01012、R02959、R04816); 测序反应及纯化试剂: ExoSAP-4T 虾碱磷酸酶(美国 Promega 公司); BigDye V3.1 测序试剂盒(美国 ABI 公司); ② 主要仪器: Biophotometer 型 DNA 浓度测定仪(德国 Eppendorf 公司); PCT-200 PCR 扩增仪(美国 MJ Research 公司); PRISM 3730 测序仪(美国 ABI 公司)。

1.3 引物 按照文献^[4]设计并委托上海英俊生物技术公司合成包括 GYP. Mur 基因在内的序列特异性引物,测序引物同扩增引物。可以检测到 Miltenberger 血型系统的表型有 GP. Mur、GP. Hop、GP. Bun、GP. Hut、GP. HF,人类生长激素(HGH)基因引物作为对照,引物序列见表 1。

表 1 引物序列及扩增长度

引物名称	序列(5'-3')	长度
Mi	F: CCCTTTCTCAACTTCTCT	148 bp(GP. Mur、GP. Hop、GP. Bun)
	TATATGCAGATAA	
	R: GAGCAACTATTTAAAAC	151 bp(GP. Hut、GP. HF)
HGH	TAAGAACATACCGG	
	F: TGCCTTCCCAACCATTC	434 bp(HGH)
	CCTTA	
	R: CCACTCACGGATTTCTGT	
	TGTGTTTC	

1.4 基因组 DNA 提取 采用离心柱法,使用天根血液基因组提取试剂盒从 EDTA 抗凝血中提取基因组 DNA,并通过 DNA 浓度测定仪对其浓度、纯度进行测定。

1.5 PCR-SSP 法检测 Miltenberger 血型系统 ①

2013-08-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81370669)

作者单位: ¹安徽医科大学公共卫生学院,合肥 230032

²安徽省血液中心输血研究室,合肥 230031

³安徽医科大学第一附属医院输血科,合肥 230022

⁴中国医学科学院输血研究所,成都 610052

作者简介: 周娟,女,硕士研究生;

刘忠,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

108340879@qq.com

PCR 扩增体系: 反应总体积为 50 μ l, 其中含 2 μ l 模板 DNA, 5 μ l 10 \times PCR Buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L dNTPs, 10 μ mol/L 引物各 1 μ l, Ampli-Taq 金牌酶 0.75 U。② PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。③ 产物分析: 取扩增产物 10 μ l 与已加 SYBR Green 染料的 6 \times Loading Buffer 2 μ l 混合, 直接点样至 2% 琼脂糖凝胶(不含 EB), 95 V 电泳 30 min, 用凝胶成像仪观察结果并作出判断。

1.6 Mur 血型血清学鉴定 采用盐水法, 抗-Mur 标准血清 2 滴, 加 3% ~ 5% PCR-SSP 阳性标本的红细胞 1 滴, 混匀, 3 000 r/min 离心 18 s。若盐水法无凝集, 再做凝聚胺法进一步加强, 并观察结果。

1.7 测序验证 ① PCR 扩增产物的纯化: 在每 5 μ l PCR 产物中加入 2 μ l ExoSAP-IT 虾碱磷酸酶, 消化条件为 37 $^{\circ}$ C 30 min, 80 $^{\circ}$ C 15 min, 然后冷却至 4 $^{\circ}$ C。② PCR 纯化产物的直接测序: PCR 纯化产物为测序反应模板, 使用 BigDye V3.1 测序试剂盒进行双向测序, 测序引物即扩增引物; 采用醋酸钠/乙醇法纯化测序 PCR 产物, 取纯化产物上测序仪进行电泳测序, Sequencing Analysis 软件进行序列分析。

2 结果

2.1 PCR-SSP 检测 Miltenberger 血型系统 采用 PCR-SSP 法对 2 660 份献血者样本进行筛查, 有 24 份阳性(0.9%)。扩增结果见图 1。

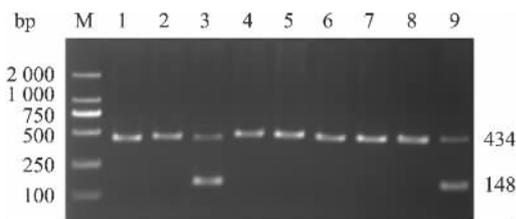


图 1 PCR-SSP 产物电泳结果

M: Marker; 1、2、4、5、6、7: 阴性检测样本; 3: 阳性检测样本; 8: 阴性对照样本; 9: 阳性对照样本

2.2 血清学试验验证 盐水法检测 PCR-SSP 阳性标本的红细胞均与抗-Mur 标准血清发生凝集反应, 表明存在 Mur 抗原。

2.3 基因测序结果分析 应用特异性引物对 24 例阳性标本进行 PCR 扩增, 扩增后产物进行测序, 测序结果与 GenBank 中 Miltenberger 血型系统基因参照序列比较, 结果与 GenBank 的 JN201202 序列(即

GP. Mur 序列) 一致(图 2), 表明这 24 例标本均为 GP. Mur 表型。

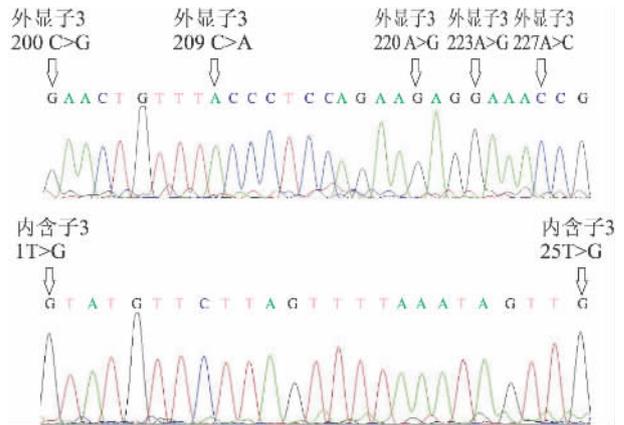


图 2 阳性标本的测序情况

箭头所指表示突变的碱基; GP. Mur 外显子 3 200C > G; 209C > A; 220A > G; 223A > G; 227A > C; 内含子 3 1T > G; 25T > G

3 讨论

Miltenberger 血型系统中 Mur 抗原的临床意义最大, 而其在不同种族中的分布差异较大, 在人类学研究中也是一个有用的工具。本组实验结果显示安徽省汉族人群 GP. Mur 表型频率为 0.9%。GP. Mur 表型在东南亚人群中具有较高的频率, 泰国人为 9.7%, 台湾一般人群平均频率为 7.3%^[5]。Mur 抗原在我国不同地区的汉族人群中的频率分布有差异, 在广州番禺地区的频率为 7.16%^[6], 上海市的频率为 0.67%^[7]。Mur 抗原在我国一些少数民族地区的分布频率更高, 调查发现在云南怒族的频率高达 22.65%^[8], 广西侗族、壮族分别占 15.4%^[9] 和 11.29%^[10]。

Miltenberger 血型系统存在 11 个低频抗原, 即 Mi^a、Vw、Hut、Mur、MUT、Hil、TSEN、MINY、Hop、Nob 和 DANE, 这些抗原交叉组成 11 种不同表型, 即 GP. Vw、GP. Hut、GP. Mur、GP. Hop、GP. Hil、GP. Bun、GP. Nob、GP. Joh、GP. Dane、GP. HF 以及 GP. JL。Miltenberger 血型系统产生的机制为血型糖蛋白 A (GPA) 和血型糖蛋白 B (GPB) 的基因发生重组, 即 GYP(A-B)、GYP(A-B-A)、GYP(B-A-B) 杂交基因所致, 其编码基因 GYP A、GYP B 位于染色体 4q28-31^[11]。GYP(A-B) 杂交基因编码 GP. Hil 和 GP. JL^[12]。对于 GYP. Hil、GYP A 与 GYP B 的交换位点位于 GYP A 内含子 3 的 5'端, 而 GYP. JL 交换位点位于内含子 3 的 3'端, 并包括 GYP B 外显子 4

的 7 个核苷酸。GP. Vw、GP. Hut、GP. Nob、GP. Joh 以及 GP. Dane 都是由 *GYP(A-B-A)* 杂交基因所编码^[12]。在这些杂交基因中, *GYPB* 假外显子不同大小(1~16 bp) 的插入片段替换了相同数目 *GYP A* 外显子 3 的核苷酸。*GYP(B-A-B)* 杂交基因所编码 GP. Mur、GP. Hop、GP. Bun 以及 GP. HF^[12]。在这些杂交基因中, 通常沉默的 *GYPB* 假外显子 3 表达。在亚洲人群中, Mur 抗原是最常见的一种抗原。该抗原是由于 *GYPB* 的假外显子 3 的部分片段被同源 *GYP A* 的外显子 3 替代, 从而形成 *GYP(B-A-B)* 结构, 导致外显子 3 的剪切位点被激活而表达 Mur 抗原, 其特异的氨基酸序列为 (34TPAHANE41)^[13]。

由于 Mur 抗原在脐带血中有很好的表达, 易引起新生儿溶血病, 也可引起严重的输血反应。因此, 在输血反应原因分析时应考虑 Mur 抗原抗体反应。Miltenberger 血型的分布和献血者资料是建立当地红细胞库的前提。此外, Mur 抗原在安徽省的频率较高, 输入这种血型的血液是否产生抗体, 需要后续的研究来证实。

参考文献

- [1] Daniels G. Human blood groups [M]. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 2002: 125-40.
- [2] 莫秋红, 刘金莲, 周先果, 等. 引起溶血性输血反应 3 例低频率抗-Mur 抗体特征探析 [J]. 内科, 2009, 4(4): 572-3.
- [3] Wu K H, Chang J G, Lin M, et al. Hydrops foetalis caused by anti-Mur in first pregnancy—a case report [J]. *Transfus Med*, 2002, 12(5): 325-7.
- [4] Palacajomsuk P, Nathalang O, Tantimavanich S, et al. Detection of MNS hybrid molecules in the Thai population using PCR-SSP technique [J]. *Transfus Med* 2007, 17(3): 169-74.
- [5] Shih M C, Yang L H, Wang N M, et al. Genomic typing of human red cell miltenberger glycoporphins in a Taiwanese population [J]. *Transfusion*, 2000, 40(1): 54-61.
- [6] 严康峰, 邓诗桢, 谢敬文. 番禺地区 Mur 抗原与抗-Mur 频率调查 [J]. 中国输血杂志, 2010, 23(3): 218.
- [7] 朱自严, 沈伟, 陈和平, 等. 上海地区部分人群 Jk(a-b-)、Dib-Wrb-K0、Ena-Tja-Ge-稀有血型筛选 [J]. 中国输血杂志, 2002, 15(4): 232-3.
- [8] 黄秀琼, 陈丽琼, 朱自严, 等. 云南怒族稀有血型 MNSs 系统-(Mur) 抗原抽样调查分析 [J]. 大理学院学报, 2004, 3(1): 39-40.
- [9] 焦伟, 黎海澜, 朱自严, 等. 广西侗族人群稀有血型 Mur 抗原的调查研究 [J]. 广西医科大学学报, 2010, 27(6): 962.
- [10] 焦伟, 黎海澜, 朱自严, 等. 广西壮族人群稀有血型筛选 [J]. 现代免疫学, 2011, 31(5): 401-4.
- [11] Reid M E, Lamont R E, Zelinski T, et al. Human blood group genes 2004: chromosomal locations and cloning strategies [J]. *Transf Med Rev*, 2005, 19(1): 45-57.
- [12] Palacajomsuk P. Review: molecular basis of MNS blood group variants [J]. *Immunohematology*, 2006, 22(4): 171-82.
- [13] Storry J R, Poole J, Condon J, et al. Identification of a novel hybrid glycoprotein gene encoding GP. Hop [J]. *Transfusion*, 2000, 40(5): 560-5.

The investigation and analysis of Miltenberger blood group in Anhui Han population

Zhou Juan¹, Lv Rong², Zhu Bangqiang³, et al

(¹Dept of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Blood Transfusion Institute, Anhui Blood Center, Hefei 230031; ³Dept of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract *Objective* To study the distribution of Miltenberger blood group in Anhui province to establish the red cell bank. *Methods* Peripheral blood samples anticoagulated with ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA) from 2 660 unrelated volunteer Han blood donors were randomly collected, and genomic DNA were extracted. PCR-Sequence specific primers(PCR-SSP) was used to screen for Miltenberger blood group, and serological and DNA sequencing method was used for validation. *Results* 24 donors were positive by PCR-SSP, and they were GP. Mur phenotype by serological and DNA sequencing method. *Conclusion* The frequency of GP. Mur phenotype is 0.9% in Anhui Han population. Other phenotypes in Miltenberger blood group system have not yet been found in Anhui Han population.

Key words blood group; Miltenberger blood group; Mur antigen