

洛阳汉族人群 A2 亚型遗传背景初探

贡中桥 杨 波 马红丽 兰炯采

摘 要 **目的** 探讨 ABO 血型系统 A2 亚型在洛阳汉族人群的基因遗传背景。**方法** 采用血清学方法对 A2 亚型进行初步鉴定;采用 PCR-SSP 法进行 ABO 常规基因定型;对 A2 型的 ABO 基因第 6、7 外显子进行 DNA 测序。**结果** ①通过对 150 个随机献血员进行 PCR-SSP 法基因定型,我们发现了 A201A202、A202A202、A20101、A202B 等 10 种基因型,但未发现 A101A101、A10102、A10202 等基因型;②通过对 17 例血清学鉴定为 A2 亚型的样本进行 PCR-SSP 法基因定型,发现其中 12 例为 A201O 或 A201B,5 例为 A202O 或 A202B。通过对上述样本进行基因测序,发现 A201 等位基因主要含有 467C>T 突变,A202 等位基因中主要含有 nt1054 C>T 突变。**结论** 洛阳汉族人群 A2 等位基因构成与其他人种存在显著差异。

关键词 ABO 血型 等位基因 PCR-SSP

Study on the Genetic Background of A2 Subgroup in Luoyang Han Population. Yun Zhongqiao, Yang Bo, Ma Hongli, Lan Jiongcai. The Blood Center of Luoyang, Henan 471000, China

Abstract Objective To study the genetic background of A2 subgroup in ABO blood group of Han population in LuoYang. **Methods** The A2 subgroup was preliminary identified by serological method. ABO genotype was analyzed by PCR-SSP. A2 subgroup was analyzed by sequencing to detect the exons 6 and 7. **Results** ①Of 150 samples from random donations, ten genotypes were detected, such as A201A202, A202A202, A20101, A202B, but the A101A101, A10102 and A10202 were not found by PCR-SSP. ②Among the 17 samples, 12 were A201O or A201B, 5 were A202O or A202B. A201 allele mainly had 467C>T mutation, and A202 allele mainly had nt1054 C>T mutation. **Conclusion** The A2 alleles in Han population of Luoyang were notably different from other peoples.

Key words ABO blood group; Allele; PCR-SSP

ABO 血型系统在输血和移植医学中具有非常重要的临床意义。A 和 B 基因同为共显基因,所以 ABO 血型可以分为 A、B、AB 和 O 型。A1 和 A2 是两种常见的 A 亚型,它们之间最主要的区别是,A1 中的转移酶活性比 A2 中的转移酶强 5~10 倍。自从 ABO 血型的 cDNA 被 Yamamoto^[1]等克隆以来,ABO 基因定型已广泛应用于区分 ABO 亚型和分析 ABO 稀有类型之间的差别。A 亚型的分子基础已被大量研究,然而在不同地域,这些亚型具有广泛的基因多态性。笔者使用血型血清学方法随机从献血员中筛选出 A2 或 A2B 亚型,并设计了相应引物,对血清学方法确定为 A2 或 A2B 亚型样本的 ABO 基因第 6、7 外显子进行 DNA 序列测定,以初步了解洛阳汉族人群 A2 亚型的遗传背景。

材料与方法

1. 样本来源:①从洛阳汉族无偿献血者中,随机选择无血缘关系的献血员 150 人,其中男性 105 人,女性 45 人;②从洛

阳本地 A 或 AB 型无偿献血者中,随机选出 2113 例,皆为汉族,用血型血清学方法鉴定出 17 例 A2 亚型。

2. ABO 血型鉴定:采用血清学方法进行 ABO 血型鉴定,正定型(抗 A、抗 B 单克隆抗体,长春博德;抗 A1 单克隆抗体,ImmuCor 公司)与反定型(A 细胞、B 细胞、O 细胞,上海血液中心)实验按试剂说明书进行。

3. 基因组 DNA 的提取:分别采集 A2 亚型献血员外周血 4ml,枸橼酸钠盐抗凝。采用商品试剂盒(北京庄盟)快速提取 DNA,用紫外分光光度计检测,A260/A280 约为 1.80~1.90,并将 DNA 终浓度调整为 150~200ng/μl。

4. PCR-SSP 法 ABO 基因定型:使用美国 G&T 公司的 PCR-SSP ABO 基因分型试剂盒(G&T Biotech, Rockville, MD),使用人类生长激素基因作为内对照,扩增产物长度为 207bp,反应条件:94℃ 4min;94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 90s,35 个循环;72℃ 10min。1% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物 30min,紫外灯下检测、记录结果。

5. ABO 基因第 6、7 外显子检测:(1)采用的引物:参照 Pubmed 上公布的 ABO 基因序列,自行设计两对引物,即 ABO-e6-F:5'-CGG CTG CCT CTG GAA GGG TG-3', ABO-e6-R:5'-TTA CCG ACC TGG CGA GCC CA-3', 产物长度为 252bp。ABO-e7-F:5'-GCT CTA AGC CTT CCA ATG GCC GC-3', ABO-e7-R:5'-ACA GGA CGG ACA AAG

GAA ACA GAG T-3′, 产物长度为 843 bp。上述引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。(2) ABO 基因扩增 PCR 反应体系: 500ng 基因组 DNA, 1 × PCR buffer, 1. 5mmol/L MgCl₂, 200μmol/L dNTPs, 5U Taq DNA 酶, 引物各 0. 2μmol/L, 终反应体系为 50μl。PCR 仪为 PE9700, 扩增参数: 94℃ 3min; 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 45s, 30 个循环; 72℃ 5min 后 4℃ 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定产物的特异性。用回收纯化试剂盒(北京庄盟公司)进行纯化后, 取 10μl 作为 DNA 测序模板。(3) 基因测序: 使用 Big Dye Terminator Cycle sequencing Kit (美国 ABI 公司) 直接测序, 测序仪为 ABI3130 (美国 ABI 公司)。方法为正向、反向同时测序, 其引物与扩增 ABO 基因的引物一致。使用标准反应体系, 即 DNA 1μl, BigDye (2. 5 ×) 8μl, 引物 1μl, 灭菌去离子水 10μl。扩增条件: 96℃ 1min; 96℃ 10s, 50℃ 5s, 60℃ 1min, 25 个循环, 4℃ 保温。测序产物经乙醇/EDTA/NaAc (pH5. 2) 法纯化, 95℃ 4min, 4℃ 4min 变性后, 立即上机检测, 数据经 Run 3130 Data Collection 软件收集后, 用 Sequencing analysis 5. 2 软件进行分析。

结 果

洛阳地区汉族人群 ABO 基因型初步调查结果,

见表 1。ABO 基因第 6、7 外显子扩增产物, 见图 1。A2 样本基因分型结果中 17 例血清学确定为“A2”型的样本, 经 PCR-SSP 法 ABO 基因定型, 其结果是 1 例为 A202A202, 4 例为 A201B, 7 例为 A201B1, A202O1 有 4 例, 而 A201O1 仅有 1 例, 但未发现 A203-209, 见表 2。A2 样本测序结果, A201O1 样本经 ABO 第 6、7 外显子直接测序, 结果是 467C/T、646A/T、188G/A、771C/T、829G/A、1061 位一单倍体缺失 C, 同时, 在这类样本的外显子 7 中还发现了 A2 特异性序列, 即 O^N-A2 杂交, 在外显子的 5nt220 之后和外显子 6 的 nt261 有 1 个交换点, 见图 2^[2]。PCR-SSP 基因定型为 A201B1 样本的测序结果为 467C/T、526G/C、657T/C、646A/G、795C/A、681G/A、1009A、1059 位有 C 缺失, 见图 3。PCR-SSP 基因定型结果为 A202B 和 A202O1 样本均为 1054C/T、646T、754G、771T、831G、1061 无 C 缺失。

表 1 洛阳汉族人群 ABO 基因型初步调查结果 (n = 150)

表型	样本数	基因型	观察值	分类基因型频率 (%)	总体基因型频率 (%)	期望值	χ ²
A	40	A201A102	3	7. 50	1. 98	4. 13	2. 4723
		A202A102	6	15. 00	3. 95	6. 16	0. 1242
		A202O1	1	2. 50	0. 66	1. 62	0. 0843
		A201O1	30	75. 00	19. 83	31. 51	0. 0725
B	46	BB	7	15. 22	5. 09	9. 24	0. 4887
		BO1	39	84. 78	28. 32	38. 37	0. 0734
O	44	O1O1	41	93. 13	27. 14	40. 30	0. 0122
		O1O2	3	6. 87	1. 89	1. 54	1. 3842
AB	20	A202B	8	40. 00	5. 34	1. 95	3. 7151
		A201B	12	60. 00	7. 98	14. 15	0. 0721

χ² = 9. 3120, df = 9, P > 0. 05

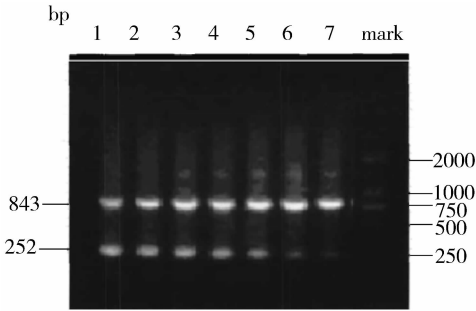


图 1 ABO 基因第 6、7 外显子扩增产物

表 2 17 例血清型为 A2 型样本的检测结果

样本数	PCR 分型	测序
1	A201O1	467C > T 1061 位 C 缺失
7	A201B1	467C > T 1059 位 C 缺失
4	A201B	467C > T 1009A/G
4	A202O1	1054C > T 1060 位 C 缺失
1	A202A202	1054C > T

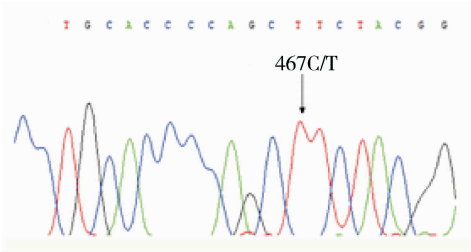


图 2 A201O1 样本的 467 位杂合

讨 论

ABO 基因包含 7 个外显子和编码糖基转移酶的 1 个 1062bp 序列, ABO 表型由 ABO 基因编码的许多不同的糖基转移酶产生, 且在 A 和 B 转移酶之间发现了 4 种氨基酸替换, 即 Arg176Gly, Gly235Ser, Leu226Met 和 Gly268Ala。其中 A1 等位基因产物将 1 个单糖(N-乙酰-α-D-半乳糖胺)连接到 1 个特

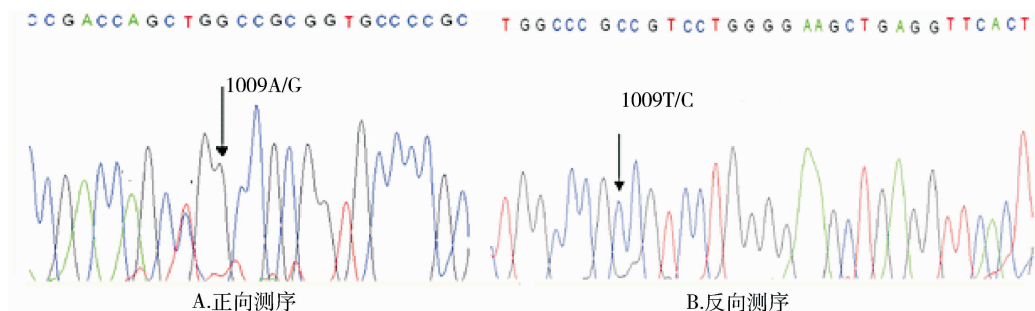


图3 A201B1 样本的 1009 位杂合

殊的糖结合物受体上^[3]。A2 等位基因的编码区与 A1 等位基因的不同之处,在于 1 个看上去无意义的 467C > T (Pro156Leu) 替换,以及引起框移突变的 1 个 1061delC 和扩大阅读框的 64 位核苷酸^[4,5]。目前已经发现 9 种 A2 等位基因,即 A201 (nt 467C > T; 1061del C), A202 (nt 1054C > T), A203 (1054C > G), A204 (297A > G; 526C > G; 657C > T; 703G > A; 771C > T; 829G > A), A205 (467C > T; 1009A > G), A206 (1061delC), A207 (539G > C), A208 (467C > T; 539G > C) 和 A209 (nt 467C > T; 527G > A; 1061delC)^[6,7]。通过对 ABO 血型基因座位上的等位基因进行详细的分析,可以说明翻译产物的不同区域的作用,以及红细胞 ABO 表型重要的临床意义。影响糖基转移酶活性(包括插入、缺失和替换)的潜在因素主要在于外显子 6 和外显子 7 上的杂种基因、及剪切位点突变、增强活性的改变、甲基化启动基因和突变启动基因。所以,我们设计了相应的引物,对 ABO 基因的第 6 和 7 外显子进行扩增。基于以上遗传学基础,我们设计了对应的引物,对 ABO 基因的第 6 和 7 外显子进行扩增。通过基因测序发现,467C/T 作为一种常见的 A2 等位基因,绝大多数的 A2 型样本中含有此基因。通过对 17 例洛阳汉族献血员血样的 ABO 基因分型,我们发现 A2B 等位基因在此类人群中较为常见(11/17),结果与非洲裔美国人和其他东方人种的结果相似^[8]。分型结果显示在洛阳汉族人群中 A 型以 A201 为主,占绝对优势。而在有关白种人的报道中,A2 样本中 A201 约占 20%^[9]。而在中国台湾人群的 A2B 型中,A205B 等位基因占有绝对优势,但日本人群中却以 A202、A203 为主,韩国人群以 A202、A204 为主^[10]。表明洛阳汉族人群 A2 等位基因构成与白种人存在较大差异,且与其他东方人之间也存在差异。

本研究结果表明,洛阳地区汉族人群的 A2 型遗传背景与文献报道有明显差异,但由于调查人数有限,在该类人群中 A2 基因频率的详细情况有待进一步大样本调查研究。我们将继续扩大样本含量作进一步的研究,全面了解和揭示洛阳地区汉族人群中 A2 亚型的遗传背景。

参考文献

- 1 Yamamoto F, Clausen H, White T, *et al.* Molecular genetic basis of the histo - blood group ABO system. *Nature*, 1990,345(6272):229 - 233
- 2 Hosseini - Maaf B, Hellberg A, Rodrigues MJ, *et al.* ABO exon and intron analysis in individuals with the A_{weak} B phenotype reveals a novel O^h - A² hybrid allele that causes four missense mutations in the A transferase. *BMC Genet*, 2003,4(17):17 - 28
- 3 Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, *et al.* Different alleles cause an imbalance in A2 and A2B phenotypes of the ABO blood group. *Vox Sang*, 1998,74(4):242 - 247
- 4 许先国,洪小珍,吴俊杰,等. 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. *中国实验血液学杂志*, 2006,14(4):808 - 811
- 5 喻琼,梁延连,邓志辉,等. 常见 ABO 抗原和稀有 A2 抗原同步基因分型的研究. *中国输血杂志*, 2006,19(5):361 - 364
- 6 Olsson ML, Chester MA. Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Transfus Med*, 2001,11(4):295 - 313
- 7 Chen DP, Tseng CP, Wang WT, Sun CF. Identification of a novel A2 allele derived from the A transferase gene through a nucleotide substitution G539C. *Vox Sang*, 2005,88(3):196 - 199
- 8 Chen YJ, Chen PS, Liu HM, *et al.* Novel polymorphisms in exons 6 and 7 of A/B Alleles detected by polymerase chain reaction—single strand conformation polymorphism. *Vox Sang*, 2006,90(2):119 - 127
- 9 Yip SP. Single - tube multiplex PCR - SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. *Blood*, 2000,95(4):1487 - 1492
- 10 Chang CS, Lin KT, Chang JG, *et al.* Molecular basis of the A2B in Taiwan. *Int J Hematol*, 2008,88(2):127 - 133

(收稿:2010 - 08 - 23)