

## 2 例罕见 RhD 变异型 *RHD* \* *DEL37* 的分子生物学分析

王 鹏<sup>\*△</sup>, 杨子瑶<sup>\*</sup>, 王 萌, 王 巍, 李爱芝

(北京大学第一医院输血科, 北京 100034)

**[摘 要]** Rh 血型系统是输血医学中重要的常规检测血型系统, 因 RhD 血型不合引起的溶血性输血反应及新生儿溶血病一直以来倍受临床重视。本研究报道了 2 例罕见的 *RHD* 基因变异型 *RHD* \* *DEL37* 个体的血清学和基因特征, 这 2 例个体的血液样本经血清学方法(试管法和微柱凝胶法)鉴定为 RhD 阴性。采用聚合酶链反应-序列特异性引物(polymerase chain reaction-sequence specific prime, PCR-SSP)对样本进行 *RHD* 基因分型和合子型分析, 基因分型结果为 *RHD* 基因阳性, 并排除了常见的几种 *RHD* 基因变异体的可能。*RHD* 基因合子型检测阳性, 证明其中一条 *RHD* 等位基因 1 ~ 10 外显子全部缺失。进一步对样本 *RHD* 基因 1 ~ 10 外显子基因进行 Sanger 法测序, 测序结果显示在另一条等位基因第 8 内含子上的第 1154-31 号碱基发生了 T > C 突变, 国际输血协会(International Society of Blood Transfusion, ISBT)将该突变等位基因命名为 *RHD* \* *DEL37*, 表型为 RhD 放散型(D-elute, D<sup>el</sup>)。本研究中, 2 例血清学初筛 RhD 阴性的样本通过分子生物学检测, 其基因型为 *RHD* \* *DEL37*/*RHD*-(*RHD* \* *O1N. O1*)。由于这 2 例个体无血缘关系, 提示我国可能存在携带该基因突变的人群。本研究提示分子生物学方法可辅助鉴别血清学初筛为阴性的 RhD 变异体样本, 联用分子生物学方法和血清学方法在准确鉴定血型、保障患者输血安全方面有重要意义。

**[关键词]** Rh-Hr 血型系统; 血清学; 基因分型技术; 等位基因

**[中图分类号]** R446.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2024)02-0352-05

**doi:**10.19723/j.issn.1671-167X.2024.02.024

### Molecular biology analysis of 2 rare RhD variant individuals with *RHD* \* *DEL37*

WANG Peng<sup>\*△</sup>, YANG Ziyao<sup>\*</sup>, WANG Meng, WANG Wei, LI Aizhi

(Department of Transfusion, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

**SUMMARY** The Rh blood grouping system is a critical standardized test in transfusion medicine, especially for the cases related to haemolytic transfusion reactions and neonatal haemolytic disease caused by clinical RhD blood group incompatibility. In the present case report, we presented two cases with the uncommon *RHD* gene variation *RHD* \* *DEL37*. The blood samples of the two subjects were mistakenly identified as RhD-negative through conventional serological testing. Firstly, both blood samples were tested negative for the RhD antigen using traditional tube test and gel microcolumn methods. The phenotyping of RhCE were identified as ccEe and ccee for each sample, respectively. Secondly, genetic analysis was performed using polymerase chain reaction-sequence specific prime (PCR-SSP) which revealed that neither sample belonging to the several common *RHD* gene variants which was found in Asia. Moreover, they turned out to be positive for the *RHD* haplotype, which indicated that exons 1 - 10 on one of the *RHD* alleles were entirely absent. In addition, a T > C mutation was observed at bases 1154-31 in intron 8 of the other allele, which was located at the intron 8 breakpoint. This result was obtained after further Sanger sequencing of exons 1 - 10 of the *RHD* gene. The mutant allele was designated as *RHD* \* *DEL37* by the International Society of Blood Transfusion (ISBT) and was identified as D-elute (D<sup>el</sup>) by phenotype analysis. Both samples were genotyped as *RHD* \* *DEL37* and showed positive results. In summary, the true genotype of the two blood samples, of which the screening results only using serological testing method was negative, were *RHD* \* *DEL37*/*RHD*-(*RHD* \* *O1N. O1*). Notably, this kind of genotype was reported for the first time in Chinese population. Moreover, the two individuals did not have ties of consanguinity, indicating that some of the Chinese individuals could be carriers of the genetic mutation. Therefore, it might be necessary to further confirm the frequency of this mutation in the Chinese population and the possibility of homozygosity for this mutation. This report identifies infrequent *RHD* gene mutation samples by coupling molecular biology and serological methods to prevent misclassification of blood groups. Combining serological and molecular biology test results to determine blood group is critical in protecting pa-

△ Corresponding author's e-mail, 04232@pkufh.com

\* These authors contributed equally to this work

网络出版时间:2024-01-15 13:18:11 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20240112.1437.014.html>

tients during clinical transfusion procedures.

**KEY WORDS** Rh-Hr blood-group system; Serology; Genotyping techniques; Alleles

Rh 血型系统是输血医学中重要的常规检测血型系统,由 RhD 血型不合引起的溶血性输血反应及新生儿溶血病一直以来倍受临床重视。运用血清学技术检测 RhD 血型,在预防新生儿溶血病和保障临床输血安全中起重要作用,然而,由于血清学技术受检测材料、实验温度、离心条件、抗血清试剂效价及特异性等诸多因素的限制,具有一定的局限性。分子生物学检测 RhD 血型基因能够在一定程度上克服上述局限性,可对血清学鉴定进行补充,逐渐成为鉴定稀有血型和疑难血型的重要辅助手段<sup>[1]</sup>。本文分析了北京大学第一医院 2 例 RhD 初筛阴性样本的血清学和基因检测结果,并报道了基因型 *RHD \* DEL37/RHD-(RHD \* 01N. 01)*。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

本研究纳入北京大学第一医院于 2020 年 11 月门诊接诊的 2 名患者,患者 1 为女性,25 岁,患桥本氏病(Hashimoto's disease, TD)(自身免疫性);患者 2 为男性,28 岁,主诉身体乏力。2 例患者常规入院前检查均进行了血型初检。

### 1.2 仪器与试剂

试剂包括微柱凝胶法血型鉴定试剂[ABO-Rh 血型检测卡(GRIFOLS 公司)]、试管法血型鉴定试剂[RhD(IgM)血型定型试剂(单克隆抗体,珠海贝索生物技术有限公司)]、核酸提取试剂(西安天隆科技有限公司)、人类红细胞 RhD 血型基因分型试剂盒[序列特异性引物(sequence specific prime, SSP)荧光 PCR 染料法]。

仪器包括核酸提取仪 NP968-C(西安天隆科技有限公司)、基因扩增仪 LifeECO(杭州博日科技有限公司)、通用型电泳仪 JY300C(北京君意东方电泳设备有限公司)、测序仪 ABI 3130xl(美国 ABI 公司)。

### 1.3 血型初筛及 RhD 血型的血清学鉴定

使用微柱凝胶法进行 ABO 血型、RhCE 血型、抗体筛查及自身对照检测,使用微柱凝胶法进行 RhD 血型初筛,使用盐水立即离心方法进行 RhD 抗原复核。

### 1.4 DNA 提取

按照核酸提取试剂说明书提取血液标本 DNA,调整 DNA 浓度为 30 ~ 50 mg/L、光密度  $D_{260\text{ nm}}$ /

$D_{280\text{ nm}}$  值为 1.6 ~ 2.0。

### 1.5 检测 *RHD* 基因和合子

采用聚合酶链反应-序列特异性引物(polymerase chain reaction-sequence specific prime, PCR-SSP)法进行 *RHD* 基因初筛和 *RHD* 基因合子型检测。严格按照试剂盒说明书操作,扩增条件如下,运行段:96 °C 2 min;96 °C 20 s,68 °C 60 s,5 组循环;96 °C 20 s,65 °C 50 s,72 °C 45 s,10 组循环;96 °C 20 s,62 °C 50 s,72 °C 45 s,15 组循环;72 °C 延伸 1 min。熔解段:95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s,台阶温度 1 °C,台阶恒温时间 20 s。

### 1.6 测序 *RHD* 基因

采用 Sanger 法对 2 例样本进行 *RHD* 基因第 1 ~ 10 外显子测序,确定突变位点以及突变位点所在基因位置。由天津市秀鹏生物技术开发有限公司根据 GenBank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)提供的 *RHD* 基因序列信息(NG\_007494.1)设计 *RHD* 基因第 1 ~ 10 外显子的扩增引物,测序引物与扩增引物一致。采用 Sanger 测序法将目的片段进行扩增后,用测序仪进行测序并读取结果。

按照以下反应体系对 *RHD* 基因第 1 ~ 10 外显子进行单独扩增:dNTP-Buffer 工作液 43.5 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.5 μL, 特异性引物对 1 μL, DNA 5 μL。

反应程序如下:96 °C 2 min,1 组循环;96 °C 20 s,68 °C 60 s,5 组循环;96 °C 20 s,64 °C 50 s,72 °C 90 s,10 组循环;96 °C 20 s,61 °C 50 s,72 °C 90 s,25 组循环;72 °C 5 min,1 组循环;4 °C 保存。

将扩增完成的产物用 2.5% (质量分数)琼脂糖凝胶进行鉴定,确定产物条带均一旦亮度足够后进行测序。使用 Chromaspro 软件以及 DNAMAN 8.0 软件将测序序列与 *RHD* 基因参考序列(NG\_007494.1)进行人工对比,根据国际输血协会(International Society of Blood Transfusion, ISBT)网站提供的 RH (ISBT 004)血型等位基因名录,以 *RHD \* 01* (NG\_007494)为参考序列。

## 2 结果

### 2.1 血型初筛及 RhD 血型的血清学鉴定

患者 1 和患者 2 的血液样本采用低离子抗人球蛋白卡(微柱凝胶法)及试管法检测,-D 检测结果均

为阴性, RhCE 分型分别为 ccEe 和 ccee, 不规则抗体 筛查均为阴性(表 1)。

表 1 2 例样本的血型血清学鉴定结果

Table 1 Results of serological tests of blood group of the two cases

Case	RhD blood type		Antibody screening test*			Self control*	ABO blood type	RhCE phenotype
	-D screen*	-D screen**	I	II	III			
Case 1	-	-	-	-	-	-	O	ccEe
Case 2	-	-	-	-	-	-	A	ccee

\*, detection through gel microcolumn assay; \*\*, detection through conventional tube test.

2.2 PCR-SSP 法检测 RHD 基因和合子

本研究采用的 RhD 血型基因分型试剂盒能够分辨 RHD 基因外显子全缺失, 以及包括中国人群常见的弱 D15 和“亚洲型” DEL1227A 在内的几种变异体。根据荧光 PCR 各孔位的阴性和阳性(表 2)以

及 RHD 基因结果分型图(图 1)判读本组 2 例患者的 RHD 基因分型结果, 显示 2 例患者为 RHD 基因阳性, 这与前文血清学鉴定中-D 均为阴性的结果相悖, 考虑 2 例患者可能为试剂盒检测范围之外的 RHD 基因变异体, 因此需进一步测序分析。

表 2 2 例样本的 RHD 基因和合子基因分型结果

Table 2 RHD gene and zygosity genotyping results of the two cases

Detection of mutation sites	Tm value/°C	Positive standard*/°C	Negative standard*/°C	Detection result
RhD exon 1	85.73	86.0	76.5	+
RhD exon 5	82.04	82.5	76.5	+
RhD exon 6	84.33	84.5	76.5	+
RhD exon 7	83.63	84.5	76.5	+
RhD exon 10	79.34	79.5	76.5	+
RhD 845A	71.57	84.0	71.0-73.0	-
RhD 1227A	72.26	82.0	71.0-73.0	-
RhD zygosity	83.13	84.0-86.0	76.5	+

\*, the standard is ±1.5 °C; +, the detection result was positive; -, the detection result was negative. Tm, melting temperature.

Detection of mutation sites

Genotype	Detection of mutation sites							
	RhD exon 1	RhD exon 5	RhD exon 6	RhD exon 7	RhD exon 10	RhD 845A	RhD 1227A	RhD zygosity
RhD positive	+	+	+	+	+	-	-	-
RhD whole deletion	-	-	-	-	-	-	-	+
RhD-CE(2-9)-D	+	-	-	-	+	-	-	+
Dva (Hus)	+	-	+	+	+	-	-	+
DVI III	+	-	-	+	+	-	-	+
Weak D15	+	+	+	+	+	+	-	+
RhD DEL1227A	+	+	+	+	+	-	+	+

+, the detection result of this mutation site was positive; -, the detection result of this mutation site was negative. PCR-SSP, polymerase chain reaction-specific primer.

图 1 基于 PCR-SSP 方法的 RHD 基因型分型结果

Figure 1 Results of several common RHD genotyping tests based on PCR-SSP method

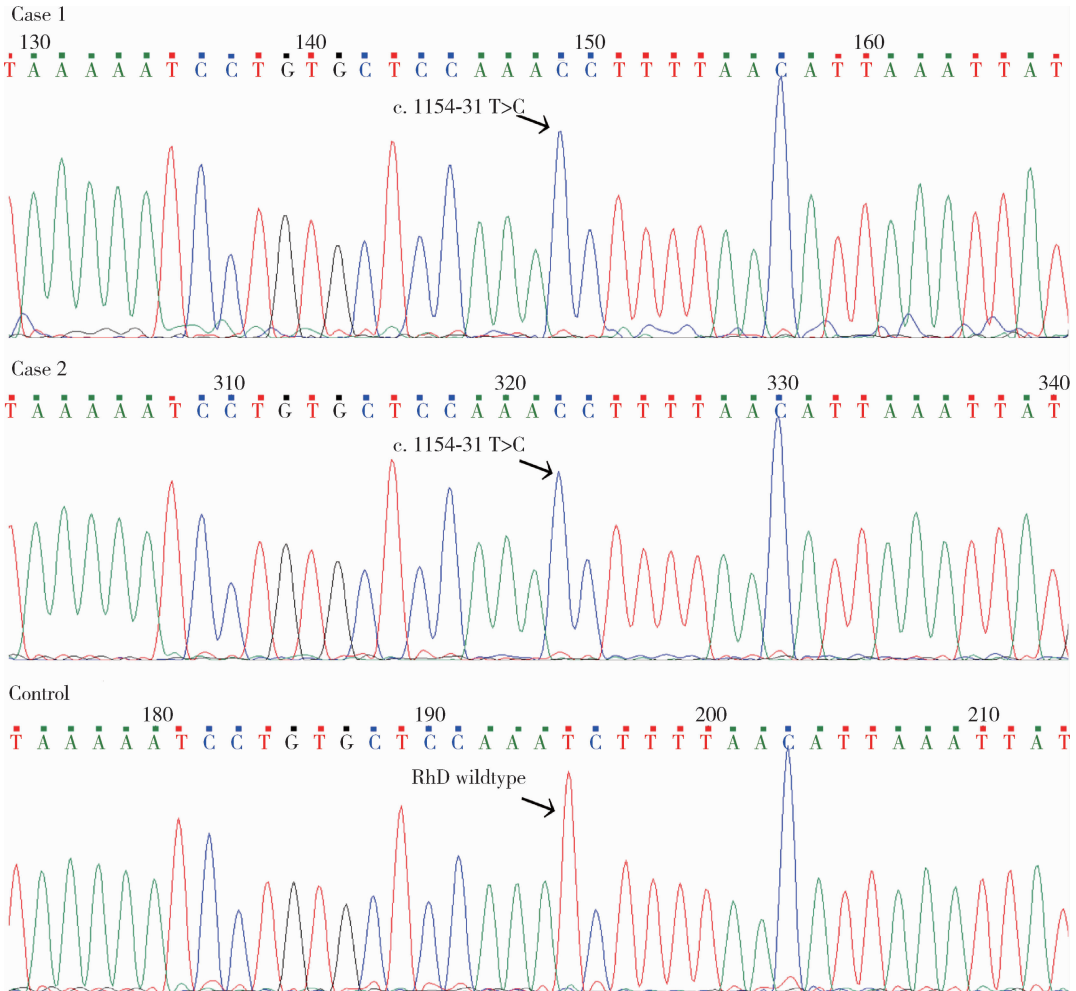
### 2.3 Sanger 法测序 *RHD* 基因

以 *RHD* \* *01* (*NG\_007494*) 为参考序列,测序结果为样本 *RHD* 基因第 8 内含子上靠近第 9 外显子 1154-31 位置的碱基发生了 T > C 突变,该突变位于剪切点位置,影响基因的表达(图 2)。

### 3 讨论

本研究中 2 例患者的血型血清学结果均为 RhD 初筛阴性。目前国内 RhD 阴性血型有的是从血清

学角度来判断,有的是通过血清学联合分子生物学手段来判断<sup>[2-5]</sup>,本研究倾向于后者进行结果判读。PCC-SSP 法 *RHD* 基因检测显示患者为 RhD 阳性型,但考虑到血型血清学检测结果为 D 抗原缺失,故怀疑是存在试剂盒检测范围以外的罕见 RhD 变异体型或者存在新的基因突变位点导致基因编码的氨基酸发生变化,从而使抗原缺失。于是我们对患者进行 *RHD* 基因第 1~10 外显子进行测序,结果为 *RHD* \* *DEL37*/*RHD*-(*RHD* \* *01N.01*) (图 2)。



The arrow in case 1 and case 2 indicated the mutation at position 1154-31 in exon 9 of the *RHD* gene.

图 2 2 例样本 *RHD* 基因第 9 外显子 1154-31 位置的碱基 T > C 突变测序结果

Figure 2 Sequencing results of the base T > C mutation at position 1154-31 in exon 9 of the *RHD* gene in the two cases

与正常型 *RHD* \* *01* (*NG\_007494*) 参考序列基因相比,患者基因序列第 9 外显子 1154-31 位置的碱基发生 T > C 突变,由于该突变点位于第 8 内含子剪切点位置,可能影响了 mRNA 的剪切,造成血清学抗原弱表达或缺失。该突变等位基因由 ISBT 命名为 *RHD* \* *DEL37*,表型为 RhD 放散型 (D-elute, D<sup>el</sup>),于 2012 年 Wagner 等<sup>[6]</sup>在德国人群中报道了 1 例,我们检测国内的相关数据库未见报道。需要更

加关注的是,本院 2020—2021 年共发现了 2 例该突变型,2 例患者不存在生物学亲缘关系,所以该突变型在中国人群中的频率尚需进一步的研究。为了解该突变基因的遗传稳定性,未来可进一步对其父母及其父母系三代进行家系调查。Fukumori 等<sup>[7]</sup>的研究认为, D<sup>el</sup> 表型的 RhCE 表型不会为 CCEe、CcEE、ccEE、ccEe 或 ccee,而本组 2 例样本的 RhCE 分型却分别为 ccEe (样本 1) 和 ccee (样本 2),这一

RhCE 表型在王敏等<sup>[8]</sup>对 74 例 D<sup>el</sup>表型的研究中也出现过 ccEe 表型 1 例,说明 D<sup>el</sup>表型的 RhCE 表型存在更多的多态性。

本组 2 例患者并未发现抗-D 产生,分析其原因,2 例患者均无妊娠、输血等产生抗体的诱导因素,也有可能是该 D<sup>el</sup>型跟“亚洲型”*DELI227A* 一样,无产生抗-D 的风险<sup>[9]</sup>,可以作为 RhD 阳性患者对待,这些都有待于在研究该突变型在中国人群中频率的基础上进行进一步研究,以指导该亚型患者的输血策略和孕期预防、治疗方案。

本研究结果提示,分子生物学检测技术对血型的准确鉴定具有重要作用。目前,血型分子生物学检测依据检测方法可分为 PCR-SSP、基因芯片、DNA 测序等,其中 PCR-SSP 是根据已知的突变设计对应引物特异性扩增基因片段。本研究的 2 例样本经 PCR-SSP 检测后发现不属于常见 RHD 全缺失和常见几种变异体,因此进一步进行了 Sanger 测序。Sanger 测序作为基因检测的金标准,能够提供准确的碱基序列信息,并检出未知的变异体。尽管分子生物学能够弥补血清学在对于白血病或造血系统恶性疾病导致的 ABO 抗原减弱、有移植史、近期有大量输血史、嵌合体、复杂稀有血型鉴定等方面的不足,但由于分子生物学的局限性使其无法替代血清学检测,如引物结合位点的突变导致等位基因缺失、突变导致编码抗原不表达的未知基因型的假阳性风险、忽略其他影响基因表达的表观遗传变化等都会造成血型的误判。此外,分子生物学技术存在检测环境要求高、检测成本高、检测用时长等局限性,因此该方法并不适合于患者的血型初筛或紧急输血的血型鉴定。为了提供准确的血型鉴定结果,最大程度保障患者的输血安全,应在考虑方法局限性的基

础上恰当地采用分子生物学技术辅助血型鉴定。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突。

**作者贡献声明** 王鹏、杨子瑶:提出研究思路,设计方案;王巍、李爱芝:收集样本,初步检测样本;王萌、杨子瑶:分析、整理数据,撰写论文;王鹏:总体把关和审定论文。

**参考文献**

- [ 1 ] Flegel WA, Chen Q, Castilho L, et al. Molecular immunohaematology round table discussions at the AABB Annual Meeting, Orlando 2016 [J]. *Blood Transfus*, 2018, 16(5): 447 - 456.
- [ 2 ] 杨光远,朱健,郑朝晖,等. 浙江台州地区血清型 RhD 初筛阴性的血型基因分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2022, 32(5): 555 - 558.
- [ 3 ] 邹彬彬,谢毓滨,阳智芬,等. 湖南省 RhD 阴性献血人群 11 种红细胞血型系统基因频率及多态性研究 [J]. *中国输血杂志*, 2022, 35(2): 144 - 148.
- [ 4 ] Zhang J, Zeng Y, Wang Y, et al. *RHD* genotypes in a Chinese cohort of pregnant women [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 752485.
- [ 5 ] Ding M, Li Q, Zhang H, et al. A novel *RHD* (c.509T>G, p. Met170Arg) allele shows weakened D expression [J]. *Transfusion*, 2022, 62(3): E17 - E18.
- [ 6 ] Wagner FF, Mardt I, Bittner R, et al. RhD PCR of blood donors in northern Germany: Use of adsorption/elution to determine D antigen status [J]. *Vox Sanguinis*, 2012, 103 (Suppl 1): 15.
- [ 7 ] Fukumori Y, Hori Y, Ohnoki S, et al. Further analysis of D<sup>el</sup> (Delute) using polymerase chain reaction (PCR) with *RHD* gene-specific primers [J]. *Transfus Med*, 1997, 7(3): 227 - 231.
- [ 8 ] 王敏,王保龙,蒋光明,等. D<sup>el</sup>红细胞膜表面 D 抗原表位及抗原强度分析 [J]. *中国输血杂志*, 2011, 24(1): 23 - 26.
- [ 9 ] 邵超鹏,徐华,徐群,等. 汉族 DEL 型孕妇可免去抗-D 产前检查 [J]. *中国输血杂志*, 2010, 23(9): 671 - 674.

(2023-09-25 收稿)

(本文编辑:任英慧)