· 个例报告 ·

一例 c. 899G>A 新突变导致 A 亚型的分子生物学研究

胥炳琳 朱建玲 台胜飞 程婷婷 马春娅 于洋
(中国人民解放军总医院第一医学中心 输血医学科,北京 100853)

摘要:目的 探讨 ABO 血型基因 *c. 899G>A* 导致 A 亚型发生的分子机制。**方法** 利用血清学方法对 ABO 血型进行鉴定,通过聚合酶链反应-序列特异性(PCR-SSP)试剂盒进行基因分型,一代测序技术完成 ABO 基因的 1~7 外显子测序分析,利用 PacBio 三代技术进行 ABO 基因全长单体型分析。应用 AlphaFold3 预测蛋白质结构,并结合 ChimeraX 软件分析碱基突变引起氨基酸改变后对蛋白结构的影响。**结果** 患者正定型为 O 型,反定型为 A 型,经吸收放散试验检出弱 A 抗原。分子生物学检测存在 *c. 261delG*,*c. 297A>G*,*c. 899G>A* 三个突变位点,三代测序分析待检者 ABO 基因一条单倍型为 *ABO* O. 01. 01*,另一条单倍型为 *ABO* B. 01-O. 01. 01* 的重组型,且 *c. 297A>G*、*c. 899G>A* 位于该重组单倍型上,蛋白结构预测 *c. 899G>A* 导致 ABO 血型基因终止密码子提前,翻译中断,致其 C 端缺失 55 个氨基酸。**结论** 患者 ABO 基因存在的 *c. 899G>A* 新位点突变导致患者 A 抗原表达减弱,血型表型为 A 亚型。

关键词:ABO 血型;*ABO* 基因;*c. 899G>A*;外显子;A 亚型
中图分类号:R457. 1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2026)9-1295-05
DOI:10. 13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2026. 09. 020

Molecularbiology study on a subtype caused by a novel *c.* 899*G>A* mutation

XU Binglin, *ZHU Jianling*, *TAI Shengfei*, *CHENG Tingting*, *MA Chunya*, *YU Yang*.
Department of Transfusion Medicine, *First Medical Center*, *PLA General Hospital*, *Beijing* 1000853, *China*.
Co-corresponding authors: *YU Yang*, *Email*: *yuyangpla*301@ 163. *com*; *MA Chunya*, *Email*: *mcydou*@ 163. *com*

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of ABO blood type gene *c. 899G>A* leading to the occurrence of subtype A. **Methods** Serological methods were used to identify ABO blood types. Genotyping was performed using polymerase chain reaction sequence specific (PCR-SSP) kits, and Sanger sequencing was used to analyze the ABO gene exons 1-7. PacBio third-generation sequencing was employed for ABO gene full-length haplotype analysis. AlphaFold3 was used to predict protein structure, and ChimeraX software was used to analyze the impact of amino acid changes caused by base mutations on protein structure. **Results** The patient exhibited group O of forward typing and group A of reverse typing. Weak A. antigen was detected by absorption-elution test. Molecular biology detection revealed three mutation sites, *c. 261delG*, *c. 297A>G*, and *c. 899G>A*. Third-generation sequencing showed that one haplotype was recombinant *ABO* O. 01. 01* and the other haplotype was recombinant *ABO* B. 01-O. 01. 01*, with *c. 297A>G* and *c. 899G>A* located on this recombinant haplotype. Protein structure prediction indicated that *c. 899G>A* resulted in premature termination codons and translation interruption of ABO blood group genes, leading to a 55 amino acid deletion at the C-terminus. **Conclusion** The *c. 899G>A* mutation in the ABO gene of the patient resulted in reduced A antigen expression and an A subtype phenotype.

Key words: ABO blood type; *ABO* gene; *c. 899G>A*; exon; subtype A

ABO 血型基因位于人类的第 9 号染色体上,核心编码序列长度约 19. 5kb,由 7 个外显子组成。自 1990 年 ABO 基因座 mRNA 对应的 cDNA 被克隆以来,ABO 系统的分子遗传基础已被人们所知[1-2]。在编码 ABO 血型基因的 7 个外显子中,第 6 和第 7 外显子,负责编码糖基转移酶的催化区域,占据了较为重要的位置[3-4]。ABO 血型基因的变异影响糖基转移酶的活性和特异性,从而导致 ABO 亚型的形成[5-6]。本中心发现 1 例 ABO 血型正反定型不符的标本,对其进行血型鉴定并探讨其分子机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

患者,男性,汉族,69 岁,诊断为膀胱炎,因排尿困难入院,患者无家族遗传史、无输血史,常规进行 ABO 血型鉴定

第一作者简介:胥炳琳(1999-),女,初级检验师,Email:1195561194@ qq. com;**共同通信作者:**于洋,Email:yuyangpla301@ 163. com;马春娅,Email:mcydou@ 163. com

时发现正反定型结果不一致。

1.2　试剂和仪器

单克隆抗-A、抗-B(上海血液生物医疗有限公司,批号:20220918),ABO 及 RHD 血型检测卡(美国奥森多,批号:ABR483F),抗-H(荷兰 Sanquin,批号:8000456682),ABO 血型反定试剂(美国 IMMUCOR,批号:115499C),抗-AB(德国 CE-ID,批号:OABM101-5),人源抗-A(实验室自制,IgM 抗体效价>64),红细胞 ABO-A 亚基因分型试剂盒(天津秀鹏生物技术有限公司,批号:K202216001),DNA 提取试剂盒(北京天根,批号 DP304);AUTOVUE 全自动血型分析仪(美国奥森多),PCR 扩增仪(杭州博日 FQD-96A)。

1.3　实验室检测

1.3.1　ABO 血型血清学鉴定

采用 AutoVue 全自动血型分析仪进行 ABO 血型初检,ABO 血型正反定型不一致时,用试管法进一步完成 ABO 血型鉴定,参照标准操作规程进行操作[7]。

1.3.2　吸收放散试验

对于疑似弱 A 抗原的患者红细胞进行吸收放散试验,具体检测流程参照输血技术操作规程[7]。

1.3.3　ABO 血型基因检测

使用 DNA 提取试剂盒提取患者外周血 DNA。使用双蒸水将 DNA 浓度调整至 30~50 ng/μL,采用聚合酶链反应-序列特异性(PCR-SSP)法,使用 ABO-A 亚型血型基因检测试剂盒完成 ABO 血型基因定性检测,试剂盒可检测相关基因包括 *ABO*A2.01*、*ABO*A2.05*、*ABO*A2.07/ABO*A2.08*、*ABO*A2.09*、*ABO*A2.13*、*ABO*AEL.01/ABO*AEL.08*、*ABO*AEL.04*、*ABO*AEL.05* 等。根据 GenBank 提供的 ABO 基因序列信息(NG-006669.2)设计 ABO 基因第 1~7 外显子的引物,委托天津秀鹏生物技术开发有限公司进行双向测序。采用 ChromasPro 软件阅读测序图谱,以 *ABO*A1.01* 为参考序列,利用 Clustal X(version 2.1)软件与标准序列进行比对,分析 ABO 血型基因突变位点。

1.3.4　PacBio 三代长读长技术测序

委托西安浩瑞基因技术有限公司,采用 PacBio SMRT 三代测序平台完成 ABO 基因全长测序分析。

1.3.5　蛋白结构模拟与分析

应用 AlphaFold3 预测 ABO 血型基因的 3D 蛋白质结构,结合 ChimeraX 软件分析碱基突变引起氨基酸改变后对蛋白结构的影响。

2　结果

2.1　ABO 血型血清学检测

柱凝集法和试管法 ABO 血型正定型为 O 型,反定型为 A 型,自身对照为阴性,抗-H 为阳性(4+)。该反应格局提示该患者红细胞表面可能存在弱 A 抗原,导致其 ABO 正反定型不一致,见表 1。

表 1　ABO 血型正反定型检测结果

Table 1　ABO blood group forward and reverse typing test results

	正定型				反定型			自身
	抗-A	抗-B	抗-AB	抗-H	A_1c	Bc	Oc	对照
柱凝集法	−	−				−	3+	
试管法	−	−	−	4+		−	3+	−

注:1 + ~ 4 +:凝集强度递增,−:无凝集。

2.2　吸收放散试验

患者红细胞分别与单克隆抗-A、人源抗-A 在 4℃吸收 2 h,经 56℃热放散后获得的放散液与 A_1、B、O 试剂红细胞反应,结果显示,与单克隆抗-A 吸收后红细胞制备的放散液与 A_1 细胞凝集强度 2+,与 B 细胞、O 细胞无凝集;人源抗-A 吸收后红细胞制备的放散液与 A_1、B 和 O 细胞均未发生凝集,表明患者红细胞表达弱 A 抗原,见表 2。

表 2　吸收放散试验结果

Table 2　Absorption and elution test results

	放散液检测结果(试管法)		
	A_1c	Bc	Oc
单克隆抗-A	2+	−	−
人源抗-A	−	−	−

注:1 + ~ 4 +:凝集强度递增,−:无凝集。

2.3　ABO 血型基因分型

PCR-SSP 法检测结果对照试剂盒对应分型判读表分析,无与之对应的反应格局,推测可能存在试剂盒外的突变位点。进一步对 ABO 血型基因第 1~7 外显子测序分析,发现 6 号外显子存在 *c.261delG* 和 *c.297A>G* 突变,7 号外显子存在 *c.899G>A* 突变,结果见图 1。结合血清学分析,推测该患者可能在 *ABO*A1.01/ABO*O.01.05* 的基础上,发生 *c.899G>A* 突变,该突变位点既往已有研究者在 GenBank 提交序列数据(登录号:PP421217.1、PV929811.1),但目前暂未被 ISBT 数据库正式命名。

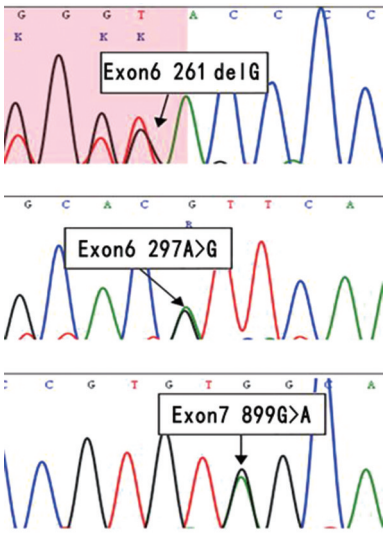


图 1　ABO 血型基因部分测序结果

Figure 1　Partial sequencing results of ABO blood group genes

2.4　PacBio 三代测序分析

三代测序结果显示,一条 ABO 基因单倍型为重组单倍

型,经 NCBI 数据库比对,重组拼接后推测为 *ABO* B. 01-O. 01. 01* 的重组型并伴有 *c. 899G>A* 突变,断点位于 *c. 375-103A>G* 与 *c. 526* 之间,跨越 6 号内含子与 7 号外显子,长度 255bp,见图 2;另一条 ABO 基因单倍型携带 *c. 261delG* 经典缺失突变,等位基因为 *ABO* O. 01. 01*,结果见图 3。

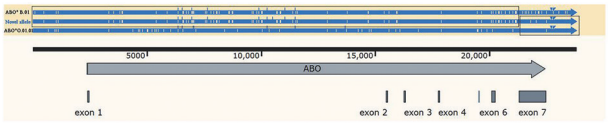


图 2 *ABO* B. 01-O. 01. 01* 重组基因结构示意图

Figure 2 *ABO* B. 01-O. 01. 01* recombinant gene

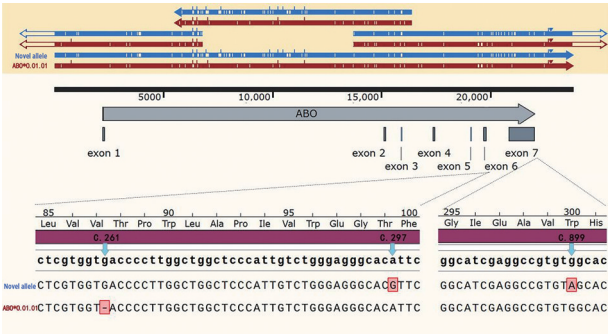
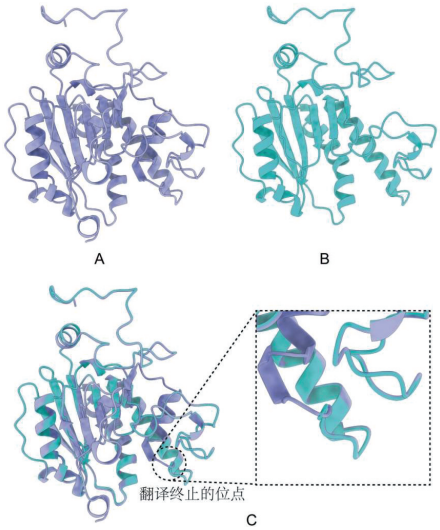


图 3 三代测序单倍体分析图谱

Figure 3 Haploid analysis map of third-generation sequencing

2.5 蛋白结构模拟与分析

根据 DNA 测序结果,将第 7 外显子中出现的 *c. 899G>A* 突变进行蛋白结构模拟,见图 4A、图 4B,以 *ABO* A1. 01* 为参考序列预测的野生型结构和突变型结构均接近球形,该蛋白在发生突变后,第 300~354 位氨基酸不再翻译,与野生型蛋白相比,C 端缺失了 55 个氨基酸,导致原本折叠在内部的氨基酸暴露,见图 4C。



注:A:野生型蛋白结构;B:突变型蛋白结构;C:野生型蛋白、突变型蛋白结构比对。

图 4 蛋白结构模拟图

Figure 4 Protein structure simulation diagram

3 讨论

在常规血型血清学检测中,ABO 血型亚型是导致正反定型不一致、血型误判的主要因素,若未被及时识别,极有可能在临床输血中诱发严重的急性溶血性输血反应[8],对输血安全构成严重威胁,因此在疑难 ABO 血型鉴定中,将血清学方法与分子基因检测技术相结合,能够有效提升结果的准确性与可靠性[9],对实现 ABO 血型结果的精准判定具有重要的临床应用价值。

PCR-SSP 技术操作简单、检测高效,已广泛应用于实验室红细胞血型分子诊断技术[10],但该技术对罕见等位基因与新突变点存在检测局限性,易漏检[11]。Sanger 测序能够精准读取单个片段的核苷酸序列,可有效识别未知突变,但无法确认单倍型[12-13]。PacBio 三代测序技术凭借读长长、极高准确性等优势,可精准分析基因单倍型[14],同时能够检测内含子、启动子等非外显子区突变,与一代测序互补,但受限于成本高昂,不利于临床实验室常规开展,目前多应用于条件完善的核心实验室[15]。

本例患者血清学结果显示正反定型不一致,正定型未检出 A、B 抗原,反定型 Ac 无凝集,Bc 阳性(3+),推测可能存在弱 A 抗原的表达。进一步吸收放散试验显示,单克隆抗-A 吸收后获取的放散液与 A 细胞反应阳性,人源抗-A 吸收后获取的放散液阴性,提示患者红细胞上存在弱 A 抗原。本案例单克隆试剂和人源试剂吸收后放散结果存在差异,分析原因为单克隆抗体具有特异性强、效价高、亲和力高等优点,但识别表位单一,若红细胞表面不表达与克隆株相匹配的抗原,检测结果则为阴性[16]。本例患者恰好表达相匹配的抗原,因此呈现阳性检测结果;而人源抗体虽覆盖较多的抗原表位,但其整体效价与亲和力偏低[17],虽被患者红细胞正常结合吸收,但放散液抗体含量低于检测阈值,故结果为阴性。综上血清学特征,可证实存在弱 A 抗原,其格局符合 Ael 亚型的表型特征。为探究其机制,我们进行了多种分子生物学的逐步分析,一代测序发现该样本存在 *c. 261delG*、*c. 297A>G*、*c. 899G>A* 突变,进而明确基因单倍型组成,进一步通过 PacBio 三代测序技术分析,结果显示新突变点 *c. 899G>A* 位于 *ABO* B. 01-O. 01. 01* 重组单倍型上,但与血清学 A 抗原的弱表达存在矛盾,具体原因分析如下。6 号外显子的 *c. 297A>G* 属于同义突变,编码的氨基酸序列并未改变,不影响抗原的表达,重组单倍型的断点位于 *c. 375-103A>G* 与 *c. 526* 之间,跨越 6 号内含子与 7 号外显子,7 号外显子并未保留 *ABO* B. 01* 的特征性突变位点,因此不具备表达 B 抗原的分子基础。已知 ABO 基因编码的 GTA 与 GTB 仅 4 处氨基酸残基存在差异:Gly/Arg 176, Gly/Ser 235, Leu/Met 266 与 Ala/Gly 268[18],该序列虽为 *ABO* B. 01-O. 01. 01* 重组型,但对照以上 4 种氨基酸残基,重组型仍与 GTA 一致,佐证了 A 抗原弱表达的分子基础,与血清学检测结果相互印证。通过进一步蛋白结构预测发现 *c. 899G>A*

突变导致蛋白质 C 端缺失了 55 个氨基酸,使原本折叠在内部的氨基酸暴露,我们推测这可能导致该蛋白质的稳定性下降,酶活性降低,从而影响 A 抗原的表达,最终呈现弱 A 抗原的表型。综合血清学结果分析,该突变是导致 A 抗原表达减弱的关键因素。在输血策略上,结合本例患者情况,临床上应优先选择 O 型洗涤红细胞、A 型血浆及血小板。

综上,本研究通过血清学试验、分子生物学技术及蛋白结构模拟的联合应用,发现并验证了 1 例 *c. 899G>A* 新突变位点导致的 A 亚型,证实了三代测序技术在疑难 ABO 血型鉴定的显著优势。然而,本研究局限性在于仅纳入单个病例,未开展家系分析,未来需扩大样本量以明确该突变的群体频率,并通过体外表达试验解析其分子机制,为 ABO 血型系统的遗传多样性补充新证据。

利益冲突说明/Conflict of Interests

所有作者均声明不存在利益冲突。

伦理批准及知情同意/Ethics Approval and Patient/Donor Consent

本研究通过了中国人民解放军总医院医学伦理委员会的审查(审批号:S2024-490-02);本研究患者本人及其家属均签署知情同意书。

作者贡献/Authors' Contribution

胥炳琳:试验实施、论文撰写;朱建玲:试验相关结果记录;台胜飞、程婷婷:数据分析与收集;马春娅:文章整体设计与修改;于洋:数据校对、论文审核。

[参考文献]

[1] YAMAMOTO F, CLAUSEN H, WHITE T, et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system[J]. Nature, 1990, 345(6272):229-233.

[2] STORRY J R, OLSSON M L. The ABO blood group system revisited:a review and update[J]. Immunohematology, 2009, 25(2):48-59.

[3] YAMAMOTO F. A historical overview of advances in molecular genetic/genomic studies of the ABO blood group system[J]. Glycoconj J, 2022, 39(2):207-218.

[4] YANG D, KIM B, SONG D Y, et al. Pitfalls of ABOgenotyping based on targeted single nucleotide variant analysis due to a nondeletional O allele lacking c. 261delG:first report of ABO* O. 09. 01 in Korea[J]. Ann Lab Med, 2019, 39(6):599-601.

[5] TORMEY C A, HENDRICKSON J E. Transfusion-related red blood cell alloantibodies: induction and consequences[J]. Blood, 2019, 133(17):1821-1830.

[6] KRaUCHI R, HENNY C, SCHIMANSKI B, et al. Identification of five novel ABO blood group alleles[J]. Transfusion, 2025, 65(5):858-862.

[7] 于洋,汪德清. 输血相容性检测实验室管理[M]. 北京:化学工业出版社, 2021:165.
YU Y, WANG D Q. Laboratory management of transfusion compatibility testing[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2021:165.

[8] 周璐,雷航,洪叶,等. 一个新的 ABO* A 等位基因导致的 AwB 亚型及其分子机制研究[J]. 诊断学理论与实践,2021,20(6):547-551.
ZHOU L, LEI H, HONG Y, et al. A_wB subtype caused by a novel ABO * A allele and its molecular mechanisms[J]. J Diagn Concepts Pract, 2021,20(6):547-551.

[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.
LEI H, WANG X F, CHENG X W, et al. Molecular mechanism of ABO bood group variation[J]. Chin J Blood Transfusion, 2024, 37(4):385-391.

[10] 梁伟,周建霖,杨亮,等. PCR-SSP 技术在红细胞 ABO 血型快速基因分型中的应用研究[J]. 中华全科医学,2015,13(8):1323-1327,1385.
LIANG W, ZHOU J L, YANG L, et al. Application of PCR-SSP technology in rapid genotyping of ABO blood group[J]. Chin Journal General Practice, 2015, 13(8):1323-1327, 1385.

[11] 李晓健,黄象艳. 红细胞血型分子诊断技术的研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志,2021,44(3):271-276.
LI X J, HUANG X Y. Research progress on molecular diagnosis of erythrocyte blood group[J]. Int J Blood Transfus Hematol, 2021,44(3):271-276.

[12] 高城燕,张慧,雷航,等. 结合一代与三代测序技术分析 ABO 正反定型不符血型标本的策略研究[J]. 中国输血杂志,2025,38(7):928-933.
GAO X Y, ZHANG H, LEI H, et al. Research on the molecular mechanisms of ABO subtypes based on first-generation and third-generation sequencing technologies[J]. Chin J Blood Transfusion, 2025,38(7):928-933.

[13] CROSSLEY B M, BAI J F, GLASER A, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring[J]. J Vet Diagn Invest, 2020,32(6):767-775.

[14] 丁教教,叶一冰,应伊丽,等. 1 例 B 亚型新等位基因 131delC 突变的血清学及基因分析[J]. 临床血液学杂志,2026,39(4):348-351.
DING J J, YE Y B, YING Y L, et al. Serological and genetic analysis of a novel 131delC allele mutation in a case of B subtype[J]. Clin Hematol (China), 2026, 39(4):348-351.

[15] 李蕊蕊,崔丛丛,郝萧. 利用 PacBio 三代测序技术鉴定 1 例 B/O 血型嵌合体[J]. 中国输血杂志,2025,38(3):421-425.

LI R R,CUI C C,HAO X. B/O blood group chimera identified by PacBio third-generation sequencing:a case report[J]. Chin J Blood Transfusion,2025,38(3):421-425.

[16] 吕红娟,朱海峰,等. 稀有血型筛选用小鼠单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国输血杂志,2010,23(6):429-433.
LÜ H J,ZHU H F,et al. Preparation and identification of murine monoclonal antibodies for the antigen screening of rare donors[J]. Chin J Blood Transfusion,2010,23(6):429-433.

[17] 左琴琴,张良子,吴大洲,等. ABO 血型鉴定中人源抗体的应用与评价[J]. 中国输血杂志,2023,36(10):928-931.
ZUO Q Q,ZHANG L Z,WU D Z,ET AL. Application and evaluation of human antibodies in ABO grouping[J]. Chin J Blood Transfusion,2023,36(10):928-931.

[18] PATENAUDE S I, SETO N O L, BORISOVA S N, et al. The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis[J]. Nat Struct Biol, 2002, 9(9):685-690.

(2026-04-17 收稿,07-22 修回,07-29 接收)

本文编辑:夏玲 李宜博

(上接第 1294 页)

[16] HELLSTERN P, SOLHEIM B G. The use of solvent/detergent treatment in pathogen reduction of plasma[J]. Transfus Med Hemother,2011,38(1):65-70.

[17] LEE L J, ROLAND K J, SREENIVASAN G M, et al. Solvent-detergent plasma for the treatment of thrombotic microangiopathies:A canadian tertiary care centre experience[J]. Transfus Apher Sci,2018,57(2):233-235.

(2026-01-19 收稿,03-12 修回,03-23 接收)

本文编辑:李宜蔓