· 个例报告 ·

一种新型 *RHD* 变异 *IVS4+2delT* 导致 RhD 抗原阴性表型的功能研究

郝萧 李蕊蕊 张璐 杨永春
(济南市血液供保中心,山东 济南 250000)

摘要:目的 对 1 例血清学表型为 RhD 抗原阴性的新 *RHD* 基因型(*RHD** *01N. 01/RHD** *01. 01* 携带 IVS4+2delT 突变),进行体外实验探究其对 RhD 表型的影响。**方法** 血清学初筛采用盐水法,间接抗人球蛋白试验(IAT 法)进行确认,RhCE 分型卡确认 RhCE 表型,采用 PacBio 长读长测序技术对其 *RHD* 基因全长进行测序,生物信息学分析和基于 minigene 剪接变异体分析技术研究了剪接位点新变异的异常剪接机制。**结果** 血清学为 RhD 抗原阴性,基因型为 *RHD** *01N. 01/RHD** *01. 01*+new mutation,该新突变为内含子 4 的 5′端剪接位点(*IVS4+2delT*)。该突变破坏供体剪接位点,激活下游隐性剪接位点。Minigene 实验证实该突变导致异常剪接,产生两种 mRNA,一种为插入 10 bp 的 mRNA;另一种为插入 15 bp 的 mRNA。**结论** 发现 1 例 *RHD* 基因 *IVS4+2delT* 导致 RhD 阴性表型的新型等位基因,揭示了其通过异常剪接机制影响 RhD 抗原的表达。

关键词:*RHD* 新变异型;剪接;PacBio 测序;minigene 分析
中图分类号:R457. 1 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-549X(2026)6-0795-05
DOI:10. 13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2026. 06. 014

Functional study of a novel *RHD* variant IVS4+2delT leading to RhD-negative phenotype

HAO Xiao, *LI Ruirui*, *ZHANG Lu*, *YANG Yongchun.*
Jinan Blood Center, *Jinan*250000, *China.*
Corresponding author:*YANG Yongchun*, *Email*:920850089@ *qq. com*

Abstract:Objective To investigate the effect of a novel *RHD* genotype (*RHD** *01N. 01/RHD** *01. 01* with IVS4+2delT mutation) on the RhD phenotype through in vitro experiments in a case with a serologically RhD-negative phenotype. **Methods** Serological screening was performed using saline method, and confirmed by indirect antiglobulin test (IAT). RhCE phenotyping was determined by RhCE typing cards. The full-length *RHD* gene was sequenced using PacBio long-read sequencing technology. Bioinformatics analysis and Minigene splicing variant analysis technology were used to elucidate the abnormal splicing mechanism of novel splice site variations. **Results** The serological presentation was RhD negative. The PacBio sequencing revealed a compound heterozygote *RHD** *01N. 01* and a new *RHD** *01. 01* allele, which carried a new mutation at the 5′ splice site (IVS4+2delT) of intron 4. Bioinformatics predicted that the mutation disrupts the donor splice site and activates downstream recessive splice sites. The minigene experiment confirmed that this mutation leads to abnormal splicing, producing two types of mRNA:one with a 10 bp insertion and the other with a 15 bp insertion. **Conclusion** A novel allele of the *RHD* gene IVS4+2delT causing an RhD-negative phenotype was identified, revealing that it affects D expression through an abnormal splicing mechanism.

Key words:novel RHD variant; splicing; PacBio sequencing; minigene assay

Rh 血型系统是所有血型系统中最复杂的血型系统,其中 D 抗原是 Rh 抗原中免疫原性最强的抗原,也是最具有临床意义的抗原[1]。根据 D 抗原在红细胞膜上的表达情况,可分为 D 阳性、D 阴性和 D 变异型血型,D 变异型的产生涉及多种不同的突变机制,包括单核苷酸多态性、多核苷酸取代、短片段或长片段的插入或缺失和基因重组等。近年来,研究表明剪接异常也是导致 D 变异型的分子机制之一[2-4]。尤其是发生在剪接位点或其邻近位点的突变可能会引起外显子异常剪接、内含子的保留或潜在剪接位点激活,导致成熟 mRNA 发生数量或性质上的变化,从而影响蛋白表达[5-7]。我们发现了 1 例罕见 *RHD* 基因型(新突变 *RHD** *01N. 01/RHD** *01. 01* 携带 IVS4+2delT),表型为 D 阴性的个体,其中 IVS4+2delT 为 *RHD* 基因新突变,位于 *RHD* 基因内含子 4 的 5'-端剪接位点。通过功能实验验证其对剪接模式的影响,为了解 D 阴性表型的分子基础提供新视角。

基金项目:济南市医疗卫生行业高层次人才专项经费资助(202512)
第一作者简介:郝萧(1987-),女,副主任技师,Email:haoxiao7777@ 126. com;**通信作者:**杨永春,Email:920850089@ qq. com

1　对象与方法

1.1　研究对象

1 例 RhD 抗原初筛阴性的献血者血样送至本室进行抗原阴性确认试验。

1.2　仪器与试剂

Gamma-clone 单克隆抗-D（Immucor, Inc., IgM GAMA40; IgG F8D8, 批号:506325L）; 抗-D（加拿大宜美康, IgM D175-2; IgG D4151E4, 批号:517294,）; 抗-D(上海血液生物,IgG MS-2,批号:20250312),）; Rh 血型分型卡（达亚美, 批号:9894677115）;低离子抗人球蛋白卡(达美亚, 批号: 9951041824）; 抗体筛选细胞（达美亚, 批号: 06280721）;MagaBio plus 全血基因组 DNA 纯化试剂盒(杭州博日生物,批号:C732501002）;人类红细胞 RHD 基因分型试剂盒(SSP 荧光 PCR 染料法)(天津秀鹏生物,批号:K202504002）;PacBio 测序委托西安浩瑞基因技术有限公司进行检测;KOD-Plus-Neo(TOYOBO,批号:KOD-401）;2×Taq PCR Mix（北京海创科业,批号:HTR100495）;2×Seamless Cloning Mix(北京博迈德生物,批号:CL117-02）;限制性内切酶 XhoI(NEB, 批号:R0146V）;限制性内切酶 BamHI(NEB, R0136V）;HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit（+gDNA wiper)(南京诺唯赞,批号:R212-01）;Lipofectamine2000（赛默飞世尔科技,批号:11668019）;HEK-293T 细胞(北京海创科业）; pMini-CopGFP 质粒(北京海创科业, 批号: HTR-0093）; PCR 扩增仪（杭州博日科技, TC-96）; 孵育器（BIOBASE, BJPX-SK24）; 离心机（BIO-RAD, ID-centrifuge 12SII）。

1.3　方法

1.3.1　血清学方法

3 种抗-D 分别用盐水试管法和微柱凝胶卡法检测献血者红细胞 RhD 抗原; 此外采用抗人球蛋白卡进行直接抗人球蛋白试验以及意外抗体筛查;采用 Rh 血型分型卡对 RhCE 抗原进行检测,所有试验均按操作规程(血站部分)进行操作。吸收放散实验采用 IgG 单克隆抗-D 进行。

1.3.2　基因组 DNA 提取及 *RHD* 基因分型分析

取 200 μL 全血按照 DNA 提取试剂盒说明书方法提取基因组 DNA。将 DNA 稀释至浓度为 30 ng/μL,按 *RHD* 基因分型试剂盒操作说明书方法检测 *RHD** E1/E3/E4/E5/E6/E7/E9/E10/E6-845A/E9-1227A/hybrid Rhesus box。

1.3.3　PacBio 测序

提取基因组 DNA 后,采用长片段 PCR 扩增 *RHD* 基因全长(含上下游调控区,覆盖 1-10 外显子、内含子 1-9、5' UTR 及部分 3' UTR),构建 PacBio SMRTbell 文库并进行单分子实时测序(平均测序深度:4 538,CCS reads:52 860)。使用 pbmm2 将标本的 CCS 数据比对到 $GRCh_{38}$ 版本的参考基因组,获得基因的目标序列进行下游分析;再将目标 reads 比对到 ISBT 提供的参考基因(NG_006669.1);使用 deepvariant 软件检测变异位点;使用 whatshap 软件对变异位点进行分型;然后提取 CDS 区域的突变位点与 ISBT 分型数据库比对,获取对应分型。

1.3.4　体外功能分析

采用无缝克隆方式设计含 20 个同源序列的引物扩增 2 个目的基因片段 A 与 B(片段 A 为外显子 3 及部分内含子 3 上游区域,片段 B 为部分内含子 3 下游区域、外显子 4、内含子 4 及外显子 5),两片段重组并克隆到 pMini-CopGFP 载体的两个酶切位点(BamHI/XhoI)获得野生型质粒。以该野生型质粒为模板通过点突变(*IVS4+2delT*)构建突变型质粒。将野生型及突变型质粒分别转染到 HEK293 细胞,48 h 后 TRIzol 法提取 RNA 进行 RT-PCR 扩增及产物测序。

引物序列如下:

RHD-AF: AAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCTATTCGGCTGGCCACCATGAGTGCTTTG

RHD-AR: TCCCAAAGTGGGGCTCAAACAATCCTTCCAACTCACACC

RHD-BF: GTTTGAGCCCCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGTGGAT

RHD-BR: TAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCTTGCTGATCTTCCCTTGGGGGTGAGCC

PCR 反应体系(50μL)如下:10× KOD Buffer 5 μL, dNTP 5 μL, $MgSO_4$ 3 μL, KOD-Plus-Neo 1 μL, 基因组 DNA 2 μL, RHD-正向引物 1.5 μL, RHD-反向引物 1.5 μL, ddH_2O 31 μL。反应条件:94℃ 2 min, 98℃ 10 s, 62℃ 30 s, 68℃ 120 s, 35 个循环。

1.3.5　生物信息学分析

RDDC 在线工具预测 *IVS4+2delT* 突变对剪接位点的影响(https://rddc.tsinghua-gd.org/zh)。

2　结果

2.1　血清学结果

RhD 抗原阴性确认试验显示,该献血者红细胞与三种抗-D 试剂盐水法及微柱凝胶法凝集反应均为阴性,献血者红细胞吸收放散试验结果为阴性。RhCE 抗原分型为 Ccee,红细胞直抗及血浆抗体筛查均为阴性。

2.2　RHD 基因分型(SSP-荧光 PCR 染料法)

荧光 PCR 结果显示 1/3/4/5/6/7/9/10 外显子及 hybrid Rhesus box 检测均为阳性,box 孔为阳性,表明其一条染色体上缺失了全部的 *RHD* 基因;1/3/4/5/6/7/9/10 外显子孔均阳性表明另一条染色体有 *RHD* 基因。

2.3　PacBio 测序

PacBio 测序结果(图 1)显示,一条单倍体基因型为外显子 1-10 全缺失型的 *RHD** *01N.01*,另一条单倍体基因型为携带 IVS4+2delT 突变(位于内含子 4 的 5' 保守剪接位点)的新型 *RHD** 01.01 等位基因。该新突变已提交至 GenBank(PX363523)。

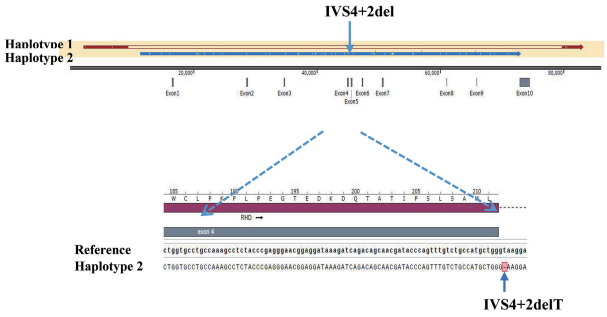


图 1　PacBio 测序结果

Figure 1　PacBio sequencing results of the *RHD* gene

2.4　生物信息学预测

生物信息学分析(图 2)显示,IVS4+2delT 突变导致供体剪接位点失活,并激活下游隐性剪接位点,预测产生插入 15 bp 的异常转录本(DanQ Score=0.986 3, SPTransformer=0.984 6)。



图 2　生物信息预测结果

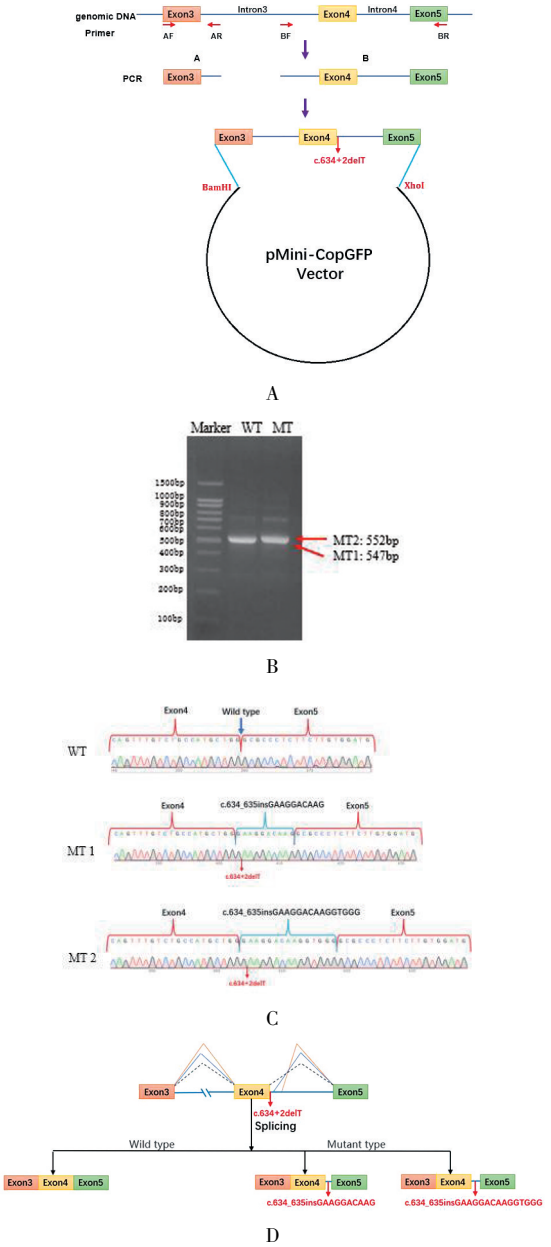
Figure 2　Bioinformatics prediction result

2.5　体外微基因剪接试验(minigene splicing assay)

分别构建 *RHD* 野生型 minigene 质粒和 *RHD* 突变型 minigene 质粒(如图 3A 所示)进行微基因分析。将 RT-PCR 产物(如图 3B 所示)经琼脂糖凝胶切胶回收后进行测序分析,野生型 mRNA 剪接产物长度为 537 bp(包含载体上的编码序列 71bp 及外显子 3、4、5 全部序列 466 bp);突变型首次测序中出现明显的双峰,提示可能存在多个转录本。因此进行后续的突变型克隆测序,从送检的 12 个克隆中,获得两个长度分别为 547 bp 和 552 bp 的转录本序列(如图 3C)。突变体 1 在外显子 4 与 5 之间插入 10 bp 的内含子序列,导致蛋白移码,形成截短蛋白,突变体 2 在外显子 4 与 5 之间插入 15 bp 的内含子 4 序列,导致形成插入 5 个氨基酸的其他蛋白(图 3D)。

3　讨论

本研究对 1 名 RhD 抗原初筛阴性的献血者进行 RhD 表型及初筛基因分型的试验,血清学结果显示该献血者 RhD 抗原阴性确认及吸收放散试验均为阴性。荧光 PCR 分型结果为 *RHD**01.01/*RHD**01N.01,与血清学 D 抗原阴性结果不一致。该 SSP 荧光 PCR 染料法检测 *RHD* 基因分型基于聚合酶链反应-序列特异性引物法(PCR-SSP)反应原理,利用包被在 96 孔 PCR 板中的多组等位基因特异性引物,通过 RT-PCR 仪器特异性扩增 *RHD* 等位基因。通过对特征性熔解曲线 Tm 值定性判断孔位阴阳性,依据结果分型表所示阳性孔位组合,定性判读基因分型结果。该方法只针对 *RHD* 基因的第 1/3/4/5/6/7/9/10 外显子是否存在,以及 845A、1227A 等 SNP 位点是否突变进行定性检测,只为上述基因区域影响的 RhD 血型抗原表达鉴定提供参考,无法检测引物结合区域以外的未知突变。该样本荧光 PCR 结果显示 1/3/4/5/6/7/9/10 外显子及 hybrid Rhesus box 检测均为阳性,hybrid Rhesus box 孔为阳性表明其一条染色体上缺失了全部的 *RHD* 基因;1/3/4/5/6/7/9/10 外显子孔均阳性表明另一条染色体有 *RHD* 基因。该结果与血清学 D 抗原阴性结果不一致。因此,需要 Sanger 测序或 PacBio 三代测序。考虑到 *RHD* 和 *RHCE* 基因同源性高达 97%且存在大片段重复结构,PacBio 可读取数千碱基的长片段,直接跨越整个基因甚至包含内含子区域,从而完整组装单倍体型并准确定位断裂点,故我们直接进行了 PacBio 三代测序。



注:A. 体外质粒的构建图;B. RT-PCR 产物琼脂糖电泳图;C. 克隆测序结果;D. c.634+2delT 导致异常剪接的拼接示意图。

图 3　微基因剪接试验

Figure 3　Microgene splicing experiment

PacBio 三代测序结果显示基因分型为 *RHD** *01N. 01/RHD** *01. 01*+new mutation，携带未被报道的 IVS4+2delT 新突变，该突变位点位于 *RHD* 基因内含子 4 的 5′剪接位点（5′SS）。真核生物的蛋白质编码基因常被非编码的内含子打断，这些内含子必须被精准删除才能生成可翻译的成熟 mRNA。承担这项“分子剪接”任务的是由多种蛋白质与小核 RNA（snRNA）组成的剪接体[8]。5′剪接位点（5′SS，一段位于外显子和内含子边界的 9 个核苷酸序列，用于标记外显子-内含子边界）的识别直接决定内含子能否被顺利剪除，是 RNA 剪接反应的关键识别信号[9-10]。

突变后剪接体（spliceosome）无法识别和结合这个位点[11]，可能造成第 4 外显子后的天然剪接供体位点失活，同时可能激活一个隐蔽的供体位点。生物信息学预测，该突变导致在外显子 4 与 5 之间插入 15 bp 长度的新剪接供体（DanQ Score = 0. 9863，SPTransformer = 0. 984 6），得分越接近 1 越说明异常剪接概率越高。

人工合成包含基因特定区域的小型基因片段（Minigene）剪接技术可帮助分析隐蔽剪接位点的形成以及其对 mRNA 表达的影响[12]。本研究采用 Minigene 剪接实验研究 c. 634+2delT 新突变的有害性，结果发现该突变导致产生两种异常剪接产物，分别在外显子 4 与 5 之间插入 10 bp 和 15 bp 两种产物，插入 10 bp 长度的产物（p. Ala213ArgfsTer108）导致蛋白移码形成截短蛋白，另一个 15 bp 的产物导致插入 5 个氨基酸（p. Gly212_Ala213insArgThrArgTrpGly）形成另一种蛋白。该氨基酸突变位于第 7 跨膜区，该跨膜螺旋异常折叠可能会导致 RhD 蛋白在内质网中滞留，并被蛋白酶降解；D 抗原的复杂性在于多个胞外环在空间上靠近形成一个折叠好的表位簇，该截短或错误折叠的跨膜区位于第 3 和第 4 胞外环之间，无法维持胞外环的高级结构，导致表位簇的构象改变，从而引起 RhD 抗原阴性。

在临床工作中，对于 C/E 表型的 RhD 阴性标本，在进行常规 *RHD* 基因初筛分型时，遇到血清学与基因分型不一致时，应结合长读长测序或覆盖内含子区域的测序方法及功能试验进一步确认，这不仅是精准血型诊断的内在要求，也是保障输血安全、预防同种免疫反应的临床实践核心。

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 Consent

本研究经济南市血液供保中心伦理委员会批准（伦理号：2025-01）。本研究纳入的患者，患者本人签署了知情同意书。

作者贡献/Authors′ Contribution

郝萧：研究方案设计、试验操作、论文撰写、文献整理与检索；李蕊蕊：文献整理与检索、数据分析；张璐：文献整理与检索；杨永春：试验实施指导、文章学术性校对。

[参考文献]

[1] 王可，马筱洁，李海林，等. 50 例 RhD 变异型的分型研究及输血和孕期管理建议[J]. 中国输血杂志，2025，38(12)：1707-1712.
WANG K，MA X J，LI H L，et al. Genotyping of 50 RhD variant samples：implication for transfusion ad pregnancy management [J]. Chin J Blood Transfusion，2025，38(12)：1707-1712.

[2] 贾双双，温机智，魏玲，等. RHD 新等位基因 c. 801+2T>G 的鉴定及对 RhD 表型影响的体外功能探究[J]. 中国输血杂志，2024，37(12)：1427-1431.
JIA S S，WEN J Z，WEI L，et al. Identification of the RHD novel allele c. 801+2T>G and study of its effect on RhD phenotype in vitro[J]. Chin J Blood Transfusion，2024，37(12)：1427-1431.

[3] RAUD L，KA C，GOURLAOUEN I，et al. Functional analysis of novel RHD variants：splicing disruption is likely to be a common mechanism of variant D phenotype [J]. Transfusion，2019，59(4)：1367-1375.

[4] YING Y，ZHANG J，HONG X，et al. The significance of RHD genotyping and characteristic analysis in Chinese RhD variant individuals[J]. Front Immunol，2021，12：755661.

[5] ANNA A，MONIKA G. Splicing mutations in human genetic disorders：examples，detection，and confirmation [J]. J Appl Genet，2018，59(3)：253-268.

[6] 贾双双，孙明明，温机智，等. 中国人群中 RHAG 变异对 mRNA 剪接影响的体外研究[J]. 中国输血杂志，2023，36(11)：986-990.
JIA S S，SUN M M，WEN J J，et al. Effect of RHAG variants identified in Chinese population on RHAG mRNA splicing in vitro [J]. Chin J Blood Transfusion，2023，36(11)：986-990.

[7] 罗亚林，魏玲，姬艳丽，等. 基于二代测序的 RhD 阳性个体 RHD 基因 mRNA 选择性剪接分析[J]. 中山大学学报（医学科学版），2021，42(1)：51-56.
LUO Y L，WEI L，JI Y L，et al. Alternative Splicing of RHD mRNA by the Next-generation Sequencing in RhD-positive Individuals[J]. J Sun Yat-Sen Univ(Med Sci)，2021，42(1)：51-56.

[8] KENNY C J，MCGURK M P，SANDRA SCHULER，et al. LUC^7 proteins define two major classes of 5’ splice sites in animals and plants[J]. Nature Communications，2025，16(1)：1574.

[9] KRÄMER A，KELLER W，APPEL B，LÜHRMANN R. The 5′terminus of the RNA moiety of U_1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors[J]. Cell，1984，38(1)：299-307.

（下转第 808 页）

[67] HELGESON E S, VEMPATI S, PALZER E F, et al. Development and validation of a hypertension risk calculator for living kidney donors [J]. Transplantation, 2023, 107(6):1373-1379.

[68] CROWDER L A, EDER A F, STEELE W R. Effectiveness of the post-donation instruction sheet in conveying information to repeat blood donors[J]. Vox sanguinis, 2021, 116(3):305-312.

[69] FRANCE C R, FRANCE J L, HIMAWAN L K, et al. Results from the blood donor competence, autonomy, and relatedness enhancement (blood donor CARE) randomized trial [J]. Transfusion, 2021, 61(9):2637-2649.

[70] FRANCE C R, FRANCE J L, KOWALSKY J M, et al. Education in donation coping strategies encourages individuals to give blood:further evaluation of a donor recruitment brochure[J]. Transfusion, 2010, 50(1):85-91.

[71] 杨锦, 孙莉, 毕岐勇, et al. 献血者初筛体检血压异常导致暂缓献血及返回献血影响因素分析[J]. 中国输血杂志, 2026, 39(1):56-61.
YANG J, SUN L,BI Q,et al. Analysis of factors influencing temporary deferral and return to donation due to abnormal blood pressure in pre-donation screening [J]. Chin J Blood Transfusion, 2026,39(1):56-61.

[72] DITTO B, ADLER P S, FRANCE C, et al. Family history of hypertension and vasovagal symptoms during blood donation[J]. Journal of behavioral medicine, 1995, 18(4):331-340.

[73] THIBEAULT C, LEWIN A, RABUSSEAU I, et al. Deferring blood donors with out-of-range blood pressure:Does it decrease the risk of adverse reactions? [J]. Transfusion, 2025, 65(6):1083-1091.

(2026-04-13 收稿,05-08 修回,06-17 接收)

本文编辑:李宜博

(上接第 798 页)

[10] SCHWARTZ S H, SILVA J, BURSTEIN D, et al. Large-scale comparative analysis of splicing signals and their corresponding splicing factors in eukaryotes[J]. Genome Res,2008, 18(1):88-103.

[11] WONG M S, KINNEY J B, KRAINER A R. Quantitative activity profile and context dependence of all human 5' splice sites[J]. Mol Cell, 2018, 71(6):1012-1026. e3.

[12] VALENZUELA-PALOMO A, SANOGUERA-MIRALLES L, BUENO-MARTÍNEZ E, et al. Splicing analysis of 16 $PALB_2$ ClinVar variants by minigene assays:identification of six likely pathogenic variants [J]. Cancers (Basel),2022, 14(18):4541.

(2026-05-08 收稿,05-19 修回,05-29 接收)

本文编辑:李宜蔓