

## 摘要

Rh 血型的發現到今天已經有六十年的時間，由於醫學的知識及技術不斷在進步，使得過去因 Rh 血型系統不合所引起的遲發性輸血反應，以及 Rh 陰性婦女因懷孕而引起的胎兒有核溶血球症得以獲得預防與治療。然而仍有不少病例因疏忽或其它原因一再發生，所以 Rh 血型的正確判定仍值得我們去重視。過去傳統的血清法，乃利用 anti-D 抗體與受測者血球反應，以 D 抗原的存在與否，來判讀 Rh 血型系統陽性或陰性。但目前已知有一些 D 抗原表現較弱或 D 變異型如 RhDel、partial D、及 weak D ( $D^U$ )，並無法利用傳統的血清法，加以正確的判讀，所以有可能對 RhD 血型作出錯誤的判讀。近年來由於分子生物技術的蓬勃發展，PCR 的技術被廣泛的使用，包括 ABO, MN 等血型系統都可利用 PCR 來作分析。近年來有人針對胎兒 DNA，利用 PCR 的方法作 RhD 血型的研究，可用來預防新生兒溶血症。但後來陸續有人利用這個技術方法針對 RhD 作分析，發現只利用一組 primer 來作 RhD 的分型，造成偽性結果偏高，必須至少使用 2 組以上 primers (複式 PCR)，才可以避免錯誤結果的發生。這種複式 PCR 的 DNA 分型法，所需的 DNA 量很少，且可應用在法醫學上以及父權的確定。在此研究中，我們利用複式 PCR 方法，擴增具 RhD 特異性的 exon 3、4、5、7 及 9，以瞭解臺灣 Rh 陰性捐血者的 RhD 基因構造。依照 PCR 結果(即 exon 表達的不同)，我們將 157 位 RhD 陰性捐血者分成 12 組(A~L)，並進一步將結果簡單歸為三型，第 I 型 RhDel 占 22.3%，第 II 型則表現部份 exon 占 9%，第 III 型為真正 RhD 陰性者占 68.7%。也就是說在臺灣 RhD 陰性捐血者，除了 2~3 成的 RhDel 以外，還有近一成左右有 RhD 特有基因的表現。另外，就 RhD 變異型來說，所分析的結果我們發現有 4 位是  $R_0^{Har}$ ，1 位  $D^{Va}$  和二位  $D^{IVb}$ 。再者，我們分析臺灣 RhD 陰性捐血者的 Rh 表現型，發現在真正 RhD 陰性及 RhDel 族群中，並未發現有任何 CcdEe 的表現型，這與日本人及香港的中國人有很大的差異。

## Abstract

Rh blood group system has been established for sixty years. Based on the improvement of medical knowledge and technology, Rh incompatible blood transfusion reaction and pregnancy induced hemolytic disease of newborn could be prevented and treated. However, cases still occur which makes it an important task to determine Rh blood type carefully and correctly. The determination of Rh positive or negative is based on whether the D antigen is present or not. In routine serum method, anti-D monoclonal antibodies are used to react with blood cells of tested subject. However, apparent low expression of D antigen or D variant such as RhDel, partial D, and weak D ( $D^U$ ), cannot be detected by routine serum method since the result are easily wrong. In recent year, biological technology has been improved greatly and PCR method has been used to detect ABO, MN or other blood groups. In 1993, this method has first time being applied for detection of RhD blood group and preventing hemolytic disease of newborn. After that, this method has been used widely to analyze RhD gene. It is soon being found out that the results tend to be false with only a pair of primers being used in RhD typing. It became necessary, therefore, to use more than one pair of primers for preventing false results. Furthermore, the samples used in this DNA typing method could be from blood, hair, body fluid and so on and the sample needed could be as small as 10 to 500 ng. Therefore, DNA typing method could be used in forensic expert-paternity testing. To understand the RhD genes profiles of Taiwan RhD negative donor, the multiplex PCR method was used to amplify RhD specific exons 3, 4, 5, 7 and 9. Based on the PCR results, the 157 RhD negative donors was divided to 12 groups (A~L) due to different expression patterns of RhD exons. They were further divided into three types; type I: RhDel (22.3%); type II: contain some exons of RhD (9%); type III: true RhD negative (68.7%). This result suggests that 20%~30% of Rh negative donors are RhDel and about 10% with some RhD exon gene. There are six defined RhD variants identified in this study. Among them, four are  $R_0^{Har}$ , one is  $D^{Va}$  and two is  $D^{Vb}$ . However, no true RhD negative or RhDel donor with the CcdEe phenotype was found in this analysis of Taiwan RhD negative donors, which is different from the studies of Japanese and Hong Kong Chinese.

# 以複式 PCR 法分析 台灣地區 Rh 陰性捐血者之 RhD 基因

## 壹. 緒言與文獻回顧：

### 第一節：Rh 血型系統

Rh 血型的發現起始於 1939 年 Levine 和 Stetson 二氏注意到一種奇異的現象，有一個產婦生了一個死胎，由於分娩時大量出血，給她輸了與她血型相同的丈夫血液(都是 O 型)。但輸血後卻發生嚴重的輸血反應，因此懷疑她的血液裡存在著一種與 ABO 血型不相關的特別抗體 (Levine et al., 1939)。在 1940 年 Landsteiner 和 Wiener 二氏使用恆河猴的紅血球打入天竺鼠和家兔，產生之血清抗體能夠凝集 85% 白種人的紅血球，其餘 15% 則不起反應，他們將有這種抗原的人就歸於 Rh 陽性，不起凝集反應則歸於 Rh 陰性 (Landsteiner et al., 1940)。同年 Wiener 和 Peters 的研究證明了該種抗體與 Levine 和 Stetson 所發現的是同一種抗體，而奠定研究複雜 Rh 系統的基礎 (Bryant, 1994)。

在輸血醫學上，Rh 血型系統是僅次於 ABO 系統最重要的血型，Rh 系統內有 47 種不同的抗原，其中以 D 抗原為最重要 (雍建輝 1993)。依據 D 抗原的有無，可以將紅血球分為 Rh 陽性及 Rh 陰性。而在不同的人種之間，二者之比率有很大的差異；在中國人裏 99.5% 的人為 Rh 陽性 (白種人有 85%)，而 0.5% 的人為 Rh 陰性 (白種人為 15%)。Rh 系統除了 D 抗原以外，另外比較重要的還有 C, c, E 及 e 抗原。Rh 系統在臨床上具有其重要性，因為 Rh 陰性個體經由輸血或懷孕接觸 D 抗原後，超過半數以上會產生抗-D 抗體，而引起許多臨床症狀，包括溶血性輸血反應，新生兒溶血性疾病，以及自體免疫溶血性貧血。

從二級結構推測，Rh 蛋白的組成胺基酸幾乎都在磷質酯雙層的內側 (圖 1)。Rh polypeptides 的 N 端和 C 端都位在細胞內端 (Avent et al., 1992; Hermand et al., 1993)。而且，它與目前已知的任何蛋白並無任何序列同質性存在。進一步分析這種 Rh 蛋白，發現它是紅血球系 (erythroid) 特有的。從先前的評估發現 D, c 和 E 抗原是被同質性但不相同的蛋白所攜帶，這二種 RhD 和 RhCE cDNAs 的轉錄產物皆是含 417 胺基酸的 polypeptides，但彼此間的胺基酸序列有 8.4% 的差異 (圖 2)，即有 35 個胺基酸不相同，二種大小均約 30-32KDa，在 RhCE polypeptides 有六個 cystein，而 RhD 只有五個，這是因為在 RhD polypeptide 第 311 位置的 cystein 被 tyrosine 所替換 (Cartron, 1994)。不過 Flegel 等人研究發現在 RhCE 和 RhD polypeptide 之間，有 37 個胺基酸不相同 (Flegel et al., 1998)

*Rh* 基因座位在第 1 對染色體的短臂 1p34.3~36.1 的位置 (Cartron, 1994)，由 *RhD* 和 *RhCE* 兩種基因組成，彼此的距離很接近，具有半套體 (haplotype) 的遺傳模式。*RhCE* 基因是由 10 個 exons 所組成，超過 75Kb。而 *RhD* 基因與 *RhCE* 基因構造十分類似，主要的差異在於 *RhD* 基因比較靠近 3' 端，它也是由 10 個 exons 所組成。另外，*RhD* intron 4 基因被刪除了 600bp，而 *RhCE* intron 4 並沒有被刪除。在較早之前，有許多有關 *Rh* 基因的模式理論被提出來。首先 Fisher 和 Race 提出三個基因座的理論，Fisher 等人分析每一個基因的頻率，假設 *RhC/c* 基因是位在 *RhD* 和 *RhE/e* 基因之間，即 D-C-E (Fisher & Race, 1946)。這個理論後來被證實不正確，應該是 C-E-D 才正確，但對於 Rh 血型系統的遺傳樣式的瞭解有很大的助益。Wiener (1943) 等人則提出了單一基因座的理論，也就是說 Rh 抗原的遺傳是由眾多對偶基因 (alleles) 中的單一基因所決定的。之後，Tippett (1986) 等人提出兩個基因座的理論。基於這個模式，*Rh* 基因是由二個結

構基因組成:一個演譯 RhD 抗原, 另一個演譯 RhC/c 和 RhE/e 抗原。後來確實有二個不同的 Rh-cDNA (RhD 和 RhCE cDNAs) 被選殖出來。利用南方點墨法分析 DNA, Colin (1991) 等人發現在 RhD 陽性的個體有兩種高度相似的基因, 而在 RhD 陰性者身上只發現 *RhCE*, 缺乏 *RhD* 基因。C/c 和 E/e 抗原是表現在相同的蛋白上, 這顯示 *RhCE* 是製造一種產物而已 (Smythe et al., 1996), 而推翻原先所認為的 C/c 和 E/e 抗原是由 RhCE 產物經不同切割而來的假設 (Le Van Kim et al., 1992)。

*RhD* 基因演譯 D 蛋白, *RhCE* 基因演譯 CcEe 蛋白, 這些結果與遺傳的二基因模式一致, 這二種緊密相連的 *RhD* 和 *RhCE* 基因通常是以 Rh 半套體方式一起被遺傳的。它們彼此的同質性很高, 很可能是從共同的祖先基因所複製而來。另外, 從許多種族的研究發現, RhD 陰性的表現型有可能是來自 *RhD* 基因全部或局部刪除所形成的多形性所造成的。例如在 *RhD* 的 exon 1 發生點突變而引起 D 陰性表現型的結果 (Avent et al., 1997)。又如在非洲的黑人族群和日本族群, 利用血清學試驗測試, 有很多被認定為是 D 陰性者 (Daniels et al., 1997), 都可偵測出 *RhD* 基因, 這些都是由於 *RhD* 基因全部或局部刪除所形成的。在許多 RhD 陰性而含有 *RhD* 基因之檢體, 都顯示出在二種基因 (*RhD* 及 *RhCE*) 的 promoter 區域都是完整的。在許多 RhD 陰性捐血者若不具 *RhD* 基因, 那麼其 RhD-cDNA 是整個缺乏而不存在。

缺乏所有 Rh 抗原的紅血球, 其表現型稱為 Rh null, 而它又可分為兩種型式: 'amorph type' 及較常見的 'regulator type'。而不管是那一類型的 Rh null 在血液學上有類似的的不正常表現, 包括: 不同嚴重程度的溶血性貧血, 口狀球形血球增多症 (stomato-spherocytosis), 滲透脆性的增加以及離子通透性的增加。另外, Rh null 的紅血球細胞膜仍然會出現一些生

物學上的不正常，其特徵包括細胞膜上高活性的 ATPases，及膜上膽固醇缺乏等 (Cartron, 1994)。

組成 Rh 血型抗原的 polypeptide 被認為是由一個或更多的共同分子參與而成，而參與的分子包括 Rh50 醣蛋白，LW 醣蛋白，glycophorin B，CD47 醣蛋白以及 Duffy 醣蛋白 (Matassi et al., 1998)。Rh50 醣蛋白是由 50KDa 和 45KDa 組成的一種醣化膜蛋白。Cherif-Zahar 等人在研究 5 個 Rh null 個體後認為 Rh50 醣蛋白是 RhD 和 RhCE 二種 polypeptide 組成分子都必須的成份 (Cherif-Zahar et al., 1996)，這種 Rh50 醣蛋白與 CD47，LW 和 glycophorin B 連接在一起，並與 Rh 蛋白 (D 和 CE) 聯結，進而與 Rh 抗原形成一個多元的複合物，用來攜帶 Rh 抗原到細胞膜上 (Matassi et al., 1998)。在這些 Rh null 個體，可以發現 Rh50 醣蛋白會出現基因讀序的轉變，核酸突變。另外 Rh50 與另一種 Rh30 蛋白相聯結，一般認為 Rh30 polypeptide 為一 30KDa 與 Rh 抗原相關，存在紅血球膜上的蛋白。

因為 D 抗原具有強的免疫性 (immunogenicity)，所以它是 Rh 系統多形態產物中最重要的一種抗原物質。Partial D 是指可利用單株抗-D 抗體測出 RhD 蛋白缺乏某些 epitopes 的變異型 D 抗原 (Flegel et al., 1998)。D 抗原的變異可分為定量上和定性(質)上的變異二類：定量上的變異包括在紅血球膜上 D 抗原表達增加的 D<sup>-+</sup>；或 D 抗原表達減少的 weak D (Rouillac et al., 1996)。而 D 定性上的變異機轉是由 *RhD* 與 *RhCE* 之間的基因發生轉變 (gene conversion)，以及 RhD 發生點突變而引起胺基酸的替換 (Jones et al., 1997)。

在所有被評估的 partial D，均顯示有異常的 RhD 序列，就是屬於定性上的變異型。以分子的角度來探討 partial D 形成原因有三：1) 在 *RhD*

和 *RhCE* 之間大基因片斷的交換，而形成 RhD/RhCE hybrid 蛋白；2) 在 *RhD* 和 *RhCE* 之間發生單一或數個核酸的交換

3) 誤意突變(missense mutation) - 發生於產物蛋白質分子的某個位置，因突變而誤加入一個不同的胺基酸 (Flegel et al., 1998)。由於 partial D 分子的改變，會影響到至少一個細胞膜外側端 (extrafacial) 胺基酸發生變化。

Partial D 抗原與 monoclonal anti-D, anti-epD1~epD9 (epitope) 反應後，一般可將其分成九個種類，分別為 II~VII 及 DFR, DBT 和  $R_0^{Har}$ ，II~VII 可再細分為  $D^{II}$ ,  $D^{IIIa}$ ,  $D^{IIIb}$ ,  $D^{IIIc}$ ,  $D^{IVa}$ ,  $D^{IVb}$ ,  $D^{Va}$ ,  $D^{VI}$ , 及  $D^{VII}$ 。所有 partial D 抗原，除了種類 (含  $D^{IIIa}$ ,  $D^{IIIb}$ ,  $D^{IIIc}$ ) 不缺任何 epitope 以外，其它類型的 partial D 都缺乏一個或多個 epitopes，所以可以從其 epitope 的表現，定義是屬於那一類的 partial D (Tippett et al., 1996)。例如  $D^{II}$  缺 epitopes 4, 5； $D^{IVa}$  缺 epitopes 1, 2, 3 及 9； $D^{IVb}$  缺 epitopes 1, 2, 3, 4 及 9； $D^{Va}$  缺 epitopes 1 及 5； $D^{VI}$  缺 epitopes 1, 2, 5, 6, 7, 及 8； $D^{VII}$  缺 epitope 8。由於 RhD exon 被相對的 RhCE 所置換的變異型，包括  $D^{IIIb}$ ,  $D^{IIIc}$ ,  $D^{IVb}$ ,  $D^{Va}$ ,  $D^{VI}$ ,  $D^{DFR}$  和  $D^{DBT}$ 。以  $D^{IIIc}$  為例，是由於 RhD exon 3 被 RhCE 置換所造成的。而在  $R_0^{Har}$  則是 RhCE exon 5 被 RhD exon 5 所替換；至於  $D^{II}$ ,  $D^{IVa}$ ,  $D^{VII}$ ,  $D^{HMi}$ ,  $D^{DNU}$  和  $D^{DHR}$  則屬於點突變 (Jones et al., 1997)。各種不同的 partial D 抗原在不同的種族分佈各不相同。Flegel 等人利用血清法測定白種人發現的 partial D 頻率分別是  $D^{VII}$  1/900,  $D^{VI}$  1/6,800,  $D^{IV}$  1/10,000,  $D^V$  1/30,000,  $D^{II}$ -like 抗原 1/30,000,  $D^{DFR}$  1/60,000 和  $R_0^{Har}$  <1/60,000 (Maaskant-Van Wijk et al., 1998)。另外  $D^{IIIc}$  和  $D^{VI}$  在白種人較多，而  $D^{IIIa}$  和  $D^{IIIb}$  在黑種人較多， $D^{Va}$  則在白種人和黑種人皆可見到。在日本儘管 Rh 表現型 dce 出現的頻率很低，但是在捐血者中仍不難見到  $D^{IVb}$  和  $D^{Va}$  (Tippett et al., 1996)。數種 partial D 抗原會引起 anti-D 抗體產生，

其中又以 D<sup>VI</sup>和 D<sup>VII</sup>表現型出現此狀況的比例較高 (Flegel et al., 1998), 而其它類型 partial D 可能較少或者不會引起 anti-D 抗體的產生。由於數種這類 partial D 的 *RhD* 基因具有異常 RhD 序列, 這種特徵在臨床上是重要的, 因為辨明受血者是否為 partial D, 可利用作 RhD 陰性的輸血治療, 防止 anti-D 的形成。

大多數 partial D 抗原其 *RhD* 基因序列有 417 個核 酸 , 這分子是相同的, 但 D<sup>VI</sup> type I 的 *RhD* 基因是例外, 它是由 266 個核 酸組成 (Mouro et al., 1994)。雖然 D<sup>VI</sup>二種 type 均是相同的 *RhD* exon 被改變, 但大小差異很大, 主要是由於 type I 是整段 exon 4, 5, 6 被刪除 (Tippett et al., 1996), 而 type 是 *RhD* exon 4, 5, 6 被 *RhCE* 所置換, 所以並不影響其序列的大小。D<sup>u</sup>或 weak D 代表 D 抗原量表現較少, 與 partial D 的差別為 D<sup>u</sup>是量上的變化, 而 partial D 是性質上的改變。這種 weak D 抗原的表現, 是由於胺基酸替換而形成的不正常 RhD 蛋白 (Flegel et al., 1998), 而且這些胺基酸替換的位置, 都落在血球的轉膜區 (transmembranous) 和細胞膜內側端 (intracellular) (Ikemoto et al., 1996)。  
RhDel 表現型是 weak D 之一種, 其 RhD 抗原性較弱, 利用傳統血清法無法檢測出來, 必須使用吸附沖出法 (adsorption/elution) 才能確知。可能是因 *RhD* 基因表達減少而造成缺乏一些 RhD epitopes, 也就是它所擁有的 RhD epitope 數目較少, 所以血清法檢查不出來。

## 第二節：RhD DNA 分型法

傳統上 RhD 血清分型法, 是利用單株或多株的 anti-D 抗體與受測者血球反應, 用以得知其血球上是否含有 D 抗原存在。但此法有其限制, 例如在大量輸血後, 由於混了異體紅血球, 所以利用血清分型法來測定受血



者的抗原時會產生干擾。又如 partial D 其抗原密度較低，受限於抗體敏感度的關係，在利用血清分型法時測定上有其困難，而 DNA 分型法的發展正可解決這些困擾。DNA 分型預測這類 RhD 表現型顯示要比血清分型要來的好，尤其在鑑定不同的 D<sup>VI</sup> (Wagner et al., 1998a)。RhD DNA 分型法則是利用設計好的 RhD 特異的 primer，對受測者 DNA 進行 polymerase chain reaction (PCR) 反應，在特定區域增幅出來後，判定其分型。但由於 *RhCE* 和 *RhD* 基因相似度極高 RhD DNA 分型有其干擾，所以對 Rh DNA 分型而言，建立一個可靠且可應用的方式是很重要的。再者，要區別 RhD homozygotes 和 RhD heterozygotes 也是不容易的，因為普遍存在的 RhD 陰性對偶基因尚無法特別被偵測出來。所以如果利用分子生物的技術來預測 RhD 表現型時，常使用 DNA 分型這個名稱，而較少使用基因分型這個名詞。

直到目前為止，幾乎所有血型系統的基因都已被選殖出來了，而且它們主要抗原的分子形態也被闡釋清楚。因此以 DNA 分型來分析 Rh 血型抗原是可行的 (Avent, 1997)。目前已有數種不同的血型系統可利用 PCR 技術來作分析，例如 ABO (Gassner et al., 1996)，Kell (Hessner et al., 1996)，Duffy (Mallinson et al., 1995)，Kidd (Olives et al., 1997)，MN 和 Ss (Eshleman et al., 1995)。在 1993 年利用 DNA 分型來預測 Rh 表現型第一次被發表 (Bennett et al., 1993)，但是其結果之偽陽性和偽陰性比率偏高，因此就有人建議同時使用兩組不同 primers 來作，可以降低錯誤結果的比例 (Bennett et al., 1994)。於是在 1994 年 Spence 等學者首次利用複式系統(結合了 intron 4 和 exon 10) 用來作 RhD DNA 分型 (Spence et al., 1995a)。RhD DNA 分型法，目前已經有很多人提出不同的方法，如 Simsek 等人利用 *RhD* 和 *RhCE* 在 3' 不轉譯區及 intron 4 和 exon 7 序列的差別，以 PCR

的方式來作 RhD 的分型，但是此法的可信度不高 (Simsek et al., 1995) 而為了臨床上的應用，利用至少 2 種以上 PCR 方法來分析不同 RhD 區域是需要的，這樣能很快區分出表現型和基因型之間的不同。在 1998 年 Maaskant-van wijk 等人發表了一項複式系統，在同一根試管中同時偵測 RhD exons 3, 4, 5, 6, 7 及 9，其特異性的產物大小從 57 到 157 bp 不等 (Maaskant Van Wijk et al., 1997b)。這個精巧的系統可以鑑定除了 D<sup>IIIb</sup> 以外的大部分已知的 RHD-CE-D hybrid 對偶基因，這項技術更可進一步應用來作為產前檢查和族群的分析。

Rh DNA 分型法首次應用在臨床方面是針對胎兒 RhD 狀況的產前檢查，胎兒 RhD 分型結果可用來幫助判斷，是否需要進一步去預防母親 anti-D 對胎兒血球之破壞，因為當母親為 RhD 陰性而胎兒為陽性時，預防的工作就很重要了。另外對懷孕婦女具 anti-D 的臨床處置也有幫助 (Bennett et al., 1993)。DNA 分型法所需的胎兒組織較少，而且可以使用胎兒的任何組織來操作，例如羊水 (amniocytes)，trophoblastic cell (chorionic villi) 或臍帶血 (胎兒血球細胞)，而且可以在胎兒其 Rh 蛋白尚未表達前就可檢驗，所以這種 DNA 分型法對胎兒而言，要比傳統血清分型法來得更安全。產前基因分型已被應用的血型蛋白尚有 RhCE, KELL, MN 和 Ss (Flegel et al., 1998)。作 Rh 表現型的產前預測時，定型錯誤多源自技術上的問題，因此，要作產前檢查，必須包括兩種或以上多形態分析。使用這種較具安全性的檢查法，將使流產比例降低，所以 RhD DNA 定型法儼然已成為當今胎兒 RhD 表現型預測的最佳選擇。另外，Rh DNA 分型也可應用在父權試驗及法醫學上 (Ikemoto et al., 1996)。父權決定的檢查是取母親，小孩和疑父的 DNA 來比對，就像其它基因試驗，Rh DNA 分型試驗檢體只要取自人類有核細胞都可以，例如血液、皮膚、毛髮等，

經由 Rh DNA 分型法可以幫助血緣關係的判斷，增加親子鑑定的正確率。

在複式系統，數個特異性 PCR 的反應在同一根試管內操作，這樣只需要作一次 PCR 反應，就能得知單一 DNA 檢體內是否有超過一種以上的多形態產物。此種利用二組以上的不同的 primers，在一根試管內同時作 PCR 即所謂的 multiplex PCR。到目前為止，多達 11 組甚至更多 primer 可同時在一根試管內進行。複式 PCR 對於不同性質的 DNA 檢體能使其發揮最大效用，將干擾減至最低，由於能減少 DNA 和試劑的量，因此可增加基因分型的效率。相較之下，只使用單一組 primer 的 PCR 設計，可信度不高，而且也不能拿來作為診斷之用。而發展複式系統其首要工作在找出適當的反應條件，使得不同的 PCR 反應，能夠在相同的條件下，具有相同的效率作出產物，而且在彼此的競爭下，不喪失各自的特異性。

從分型的結果來看，如果只分析 RhD 部份區域，其他沒有被分析到的區域若有異常就可能會被忽略，所以當受血者或懷孕婦女作出正常 D 的結果，仍存在一定的可能性，就是他們的 D 抗原是不完全的。換一個角度來探討這個問題，若只分析 RhD 部份區域來判斷捐血者和新生兒之分型，可能會有部分的 D 基因存在而被誤認為 D 陰性，這將誘導 D 陰性受血者產生 anti-D。在另一方面，若要以 Rh DNA 分型法替換常規的血清法來預測 Rh 表現型，99.9% 的正確率仍嫌不足。主要的困擾是 RhD 陰性表現型可能帶有 RhD 特異的 DNA 序列，這種困擾要比 partial D 來得還大。因此針對以上所提之盲點，改進之法可採用複式 RhD PCR 偵測，且此法亦可用於調查不同種族其 *RhD* 和 *RhCE* 的多型性。另外分析 *Rh* 對偶基因的多型性，對於種族生物性的了解是有幫助的，因為利用分子技術可以解釋在一個族群中的少數對偶基因。總而言之，利用分子生物的方法，來作血型表現型的預測是很好的方法，而且在其它方面的應用上，此法已

經超越傳統標準的血清分析法，根據此兩種方法在預測 Rh 表現型的差異來看，*Rh* 基因分型法可能最後會取代傳統血清法。

### 第三節：本論文研究主題

從日本的研究，Rh 陰性但帶有 *RhD* 基因之捐血者，都是 CC 或 Cc 的表現型，而沒有 cc 表現型，這個結果顯示在 RhD 陰性的人，*RhD* 基因和 RhC 表現型之間有一些的相關性，在這篇報告中我們分析 157 位捐血者的 Rh 表現型並與複式 RhD 定型分析法的結果作對照，試著來瞭解其中的關聯性。另外，我們也針對這些檢體作 RhDel 分析，並與複式 RhD 定型分析法結果作對照，來瞭解 RhDel 的 *RhD* 基因表現情形。D 抗原性質上的變異型大部份都已經知道 (圖 3)，而 RhD exons 1, 2, 8, 及 10 的轉譯區與相對的 RhCE exon 是相等的，因此對這些 exons 進行擴增對 RhD 而言並無特異性。所以在這篇研究中，我們利用複式 RhD 定型分析法，來擴增 RhD exons 3, 4, 5, 7 和 9。利用這個方法來分析 157 位 Rh 陰性捐血者，其 RhD exons 3, 4, 5, 7, 和 9 的表達情形，並依此來判定是屬於那一類型的 D 變異型，進一步分析臺灣 Rh 陰性捐血者 partial D 的比率及基因型式。

## 貳. 材料與方法：

### 一. 材料：

1. 檢體：本研究所用之檢體均來自中華血液基金會台中捐血中心，包括 157 支 Rh 陰性檢體及 30 支 Rh 陽性檢體。

2. DNA 萃取材料：

✧ 1× RBC lysis buffer

✧ GenoMaker

✧ Chloroform

✧ Isopropanol

✧ 70% alcohol

3. Rh phenotyping 材料：

✧ 0.85% 生理食鹽水

✧ Anti-C, Anti-c, Anti-D, Anti-E, Anti-e (DiaMed)

✧ 血庫專用離心機(KA-2200)

4. D elution 的材料：

✧ Polyclonal Anti-D (DiaMed)

✧ Chloroform

✧ Water bath

✧ Anti Human Globulin (AHG)(DiaMed)

5. Multiplex PCR 分析法的材料：

✧ dNTPs (MDBio 公司)

✧ Taq DNA polymerase (MDBio 公司)

✧ MgCl<sub>2</sub> (MDBio 公司)

✧ Primers: RDex3F, 4F, 5F, 7F, 9F, RDex3R, 4R, 5R, 7R, 9R 及

BACF, BACR (MDBio 公司)(其序列如表 1)

6. 12% polyacrylamide gel：

- ◇ 30% Acrylamide
- ◇ 5 × TBE
- ◇ 10% Ammonium persulfate
- ◇ TEMED

## 二. 方法：

### 1. DNA 的萃取

在 15 ml 離心管中放入 3 ml 的全血及 6-9 ml 1 × RBC lysis buffer 混合均勻後，放在冰上 15 分鐘並不時加以搖動，之後以 450 g 轉速於室溫離心 10 分鐘。將上清液移除後，加入 0.6 ml GenoMaker，將 pellet 混合均勻後，再轉移到 eppendorf 管內，放在室溫下 3~5 分鐘。再加入 500 μl 的 chloroform 或 phenol/chloroform (24:1) 後，混合均勻幾次 (上下倒轉 mix)。然後在 12,000 g 4℃，離心 5 分鐘。將上層轉移到新的 eppendorf，加入等量 (約 800 μl) 的 isopropanol，並上下倒轉混合均勻，直到出現絲狀纖維 DNA 沉澱物為止。接著將 DNA 沉澱物以 1700 g 離心 2 分鐘，然後去掉上清液。小心的利用 pipet 將殘留的上清液移除後，加 1 ml 70% 的酒精 rinse，然後於 4000 g 條件離心 20 分鐘，利用 pipet 小心移去殘餘之上清液，將所得之 DNA 溶解在 100 μl 無菌水中，儲存在 -20℃。

### 2. Rh phenotyping

將血液檢體以 0.85% 生理食鹽水洗血球 3 次後，最後將上清液小心去掉，留下血球，在試管中分別加入 Anti-C，Anti-c，Anti-D，Anti-E 和 Anti-e 抗血清，再各別滴入 1 滴已洗過的血球懸浮液，在 1000 g 轉速下離心 15 秒，再加以判讀 (有凝集為陽性)。

### 3. D elution

取 1 ml 紅血球利用生理食鹽水洗 4 次，再加入 1 ml 的 polyclonal Anti-D，混合均勻後，在 37 °C 下放置 1 小時，每 10~15 分鐘混合一次，使抗原-抗體作用完全，再予以離心，並去掉所有上清液。再利用生理食鹽水將血球清洗至少 8 次，並保留最後之上清液，用於測定游離的抗體，以確定最後所沖出之抗體非來自沒洗淨之抗體。將 1 體積濃縮洗過的紅血球，加入 1 體積的生理食鹽水，以及 2 倍體積的 chloroform，然後劇烈混合 10 秒鐘，接著上下均勻混合 1 分鐘。除去蓋子，置於 56 °C 5 分鐘，在此期間，每 1 分鐘均勻搖 1 次，之後馬上以 1000g 轉速離心 5 分鐘，將淡紅色的沖出液 (elution) 取出作抗體鑑定 (同時用最後一次的上清液作對照)。另外也可以利用一滴沖出液及一滴上清液 (對照組)，各加入 O 型血球 1 滴，置於 37 °C 30 分鐘，使用生理食鹽水沖洗三次，加入 2 滴 Anti Human Globulin (AHG)，然後離心觀察。

### 4. Multiplex PCR analysis

在最終體積為 50  $\mu$ l 的 PCR 反應中加入 0.6 mM dNTPs，2U Taq DNA polymerase，1.5 mM MgCl<sub>2</sub>，primers (包括 50 ng 的 RHD5F 及 5R，15 ng 的 4F 及 4R，20 ng 的 3F 及 3R，25 ng 的 7F 及 7R 和 100 ng 的 9F 及 9R。另外加入 15 ng 的 BACF 及 BACR(  $\beta$ -actin 之特異引子，其產物為 200bp ) 當作 internal control。此五組 RhD 特異 primers 的設計是用來針對 RhD exons 3，4，5，7，和 9 擴增用的，各 primer 的序列和位置如表 1。所擴幅之產物大小依序分別是 111，126，157，96 和 71 bp (圖 4)。複式 PCR 的反應條件為 95 °C 反應 5 分鐘，然後再以 95 °C 作用 1 分鐘，55 °C 作用 1 分鐘，

72 作用 45 秒的循環進行 32 回，最後再以 72 反應 5 分鐘。PCR 產物以 12% polyacrylamide gel 來跑電泳，然後使用 EB (ethidium bromide) 染色，最後使用 UV 觀察結果。

## 參. 結果：

### I. Rh 表現型的測定：

我們從捐血中心取得 157 位 RhD 陰性及 30 位 RhD 陽性捐血者的血液，利



用 polyclonal 和 monoclonal anti-RhD 抗血清再確認一次，並加作 antiglobulin test，用來屏除 weak D 及 D<sup>U</sup> 抗原。另外我們也作了 RhC/c 和 RhE/e 表現型的測定。而在所分析的 156 位 (NO.101 因檢體不足，沒有作 Rh 表現型) RhD 陰性表現型中 CCdee 有 14 位 (8.9%)，Ccdee 有 59 位 (38%)，ccdee 77 位 (49.3%)，ccdEe 5 位 (3.2%)，CcdEe 1 位 (0.6%) (表 2) 由之前的文獻中可知，在 RhD 陰性捐血者會出現 *RhD* 基因似乎與 RhC 表現型有絕對的關係，而與 Rhc, RhE 或 Rhe 沒有關係 (Simsek et al., 1995) 由以上我們的結果也推論出相似之結論，唯一例外的是檢體 NO.77 有不同的結果，雖然它的 RH 表現型是 ccdee，但 5 種 RhD exons 都有表現 (表 5)。

## II. RhDel 吸附沖出法：

因為在臨床上 RhDel 它不會引起受血者產生 Anti-D 的反應，所以被歸類為 RhD 陰性，而在之前的研究者分析台灣 RhD 陰性個體，其中 Del 佔了約 2~3 成左右。在此我們也針對 RhD 陰性捐血者作分析，其中 Del 佔了 35 位 (22.3%)，又其中八位只有 exons 3, 4, 5, 及 7 之表現，全部 exons 皆表現的有 27 位 (表 3)。

## III. 利用 multiplex PCR 測定 RhD 基因：

利用 PCR 的方法，來證實 *RhD* 基因的存在與否，我們總共使用了五組 primers，來擴增 RhD exon 3, 4, 5, 7, 9，此五組 primers 分別為 primer RDex3F/3R 針對 exon 3 (其產物大小為 111 bp)，RDex4F/4R 針對 exon 4 (其產物大小為 126 bp)，RDex5F/5R 針對 exon 5 (其產物大小為 157 bp)，RDex7F/7R 針對 exon 7 (其產物大小為 96 bp)，RDex9F/9R 針對 exon 9 (其產物大小為 71 bp)。另外有一組針對 *-actin* 基因的 BACF/BACR 則作為

internal control，其產物為 200 bp。所有 30 位 RhD 陽性捐血者之 PCR 產物以凝膠分析之結果皆有 5 個 band 產生，即 111，126，157，96，71 bp 產物 (圖 4)。另一方面我們將 157 位 RhD 陰性捐血者，依其 PCR 分析結果分成 12 組 (A~L，表 5)。A 組只出現 exon 3 (1 位; 0.6%)；B 組只表現 exon 5 (4 位; 2.5%，其中 2 位為 CCee，2 位 Ccee)；C 組出現 exons 3 及 5 (2 位; 1.2%)；D 組出現 exons 7 及 9 (1 位; 0.6%)；E 組出現 exons 3，4，5 (2 位; 1.2%)；F 組出現 exons 3，4，7 (1 位; 0.6%)；G 組出現 exons 4，5，7 (1 位; 0.6%)；H 組出現 exon 5，7，9 (1 位; 0.6%)；I 組出現 exon 3，4，5，7 (8 位; 5%)；J 組出現 exon 3，4，7，9 (1 位; 0.6%)；K 組則 5 個 exons 全部出現，有 27 位 (17.2%)；L 組所有 RhD exon 全不表現，有 108 位 (真正 RhD 陰性，68.7%)。

綜合 RhDel 吸附沖出法及複式 PCR 之結果，我們可將 157 位 RhD 陰性者簡單歸為三類：RhDel 占 22.3% (第 I 型)，部份表現 exon 的占 9% (第 II 型)，RhD 真正陰性占 68.7% (第 III 型)。也就是說在台灣 RhD 陰性捐血者，除了 2~3 成的 RhDel 以外，還有近 1 成有部份 RhD 基因的表現。

另外，就 RhD 變異型來說，在我們的結果，有 4 位是 Ro<sup>Har</sup> (NO.120，122，130，131)，1 位 D<sup>Va</sup> (NO.4)，2 位 D<sup>Ivb</sup> (NO.39，72)。其它部份表現 RhD exon 的結果如表 4。

#### 肆. 討論：

RhD 定型分析是在產前預測胎兒 RhD 陽性或陰性以及瞭解 D 變異型時很重要的依據，可作為臨床輸血時重要的參考。以往利用血清分型的

方法來判定胎兒 RhD 血型時，往往因檢體取得不易，造成檢驗時的困難，甚至造成胎兒畸型流產。而且 D 變異型甚至 RhDel 及 weak D 都無法使用傳統血清法得到正確的結果。因為使用傳統標準血清分型法，不管是使用單株或多株的抗血清都可能漏失掉一些 D 變異型，除非能製造出很合適的抗血清才能測出來。因此研發更新更好的臨床檢驗方法有其迫切性。現在由於分子生物技術的進步及對 *Rh* 基因的瞭解，我們知道 *RhD* 和 *RhCE* 基因的核酸序列之間雖然很相異，但 *RhD* 之基因定型分析是可行的。1993 年 Bennet 等人利用 2 組 primers 分別針對 exon 7 及 exon 10 作擴增，其中 RhD 陽性會擴增出 136 bp (exon 7) 及 186 bp (exon 10) 之片段，而 RhD 陰性只會擴增出 136 bp 大小產物 (exon 7)，也就是利用 RhD 和 RhCE 在 3' 不轉譯區序列的不同來區分兩者 (Bennett et al., 1993)；同年 Arce 等人設計一組包含 intron 4 的 primer，發現 RhD 陰性只會得到 1200 bp 的產物 (*RhCE* 基因產物)，而 RhD 陽性會得到二個產物 (1200 bp 及 600 bp；*RhD* 基因產物)，也就是利用二者之 intron 4 的大小不同，作為 RhD 定型分析的依據 (Arce et al., 1993)。但這種只單獨使用一組特異 primer 的設計來作 RhD 定型時，很容易造成偽陰性或偽陽性的結果 (Simsek et al., 1995)。如果只使用 3' 不轉譯區分析法，一些 RhD 陰性捐血者，可能被誤認為是 RhD 陽性。另外如 partial D，已知它的 D-Ce-D hybrid 基因的 Ce 序列涵蓋了 exon 2 到 exon 9 區域，所以如果只分析單一區域，就有可能產生錯誤的結果 (Hung, 1996)。一些 partial D 變異型如 D<sup>VI</sup> type 1 和 type 2，利用 intron 4 分析法，可能會被誤判定為 RhD 陰性，因為它的這個區域 RhD 已經被 RhCE 所替換掉了。因此利用至少 2 種 RhD 區域來作定型分析法，才能得到更可靠的結果 (Avent, 1997)。

1997 年 Avent 等人利用同時擴增 *RhD* 基因 intron 4 和 3' 不轉譯區發展

出一套複式 RhD 定型分析法，應用此法將可區分出 partial D，weakD 和 RhD 陰性表現型(dCe 和 dcE) (Avent, 1997)；這些方法都是將不轉譯區以 PCR 方法擴增，然後由所得產物之大小來加以區別。但 Maaskant-Van Wijk 等人認為如果要得到 partial D 變異型更可靠的 *RhD* 基因分型，應該是利用轉譯區序列的差別而不是不轉譯區才對，因為決定終產物 peptide 的 DNA 序列是在轉譯區而不是在不轉譯區 (Maaskant-Van Wijk et al., 1998)，所以在這篇報告中，我們參照 Maaskant-Van Wijk 等人的方法，並加以小幅度的修改，希望建立一個快速可信的複式 PCR 系統來分析 *RhD* 的基因型 (Maaskant-Van Wijk et al., 1998)。這個複式 PCR 的分析方法是應用多組 RhD 序列特有的 primers 來同時擴增 RhD 的 exons 3, 4, 5, 7 及 9，利用這種方法來檢測 partial D 變異型。這些 partial D 變異型是由於 RhD 的部份 exon 被 RhCE 上對應的 exon 所置換而引起的 RhD 性質上的變異，我們可從產物的結果知道其變異型是屬於那一型。

在這裡所使用的 multiplex PCR 方法可直接擴增 RhD 的 5 個區域，除了 exon 6 外，這幾乎涵蓋了在轉譯區所有具 RhD 特有序列的全部 exon。Exon 6 之所以沒有包括在這個 multiplex PCR reaction 內，是因為在共同的 PCR 條件下無法得到特異的 exon 6 產物，所以我們沒有將 exon 6 納入複式 PCR 內。但是，這個方法若與只使用單一區域的 *RhD* 基因分型法作比較，可以大大降低偽性(錯誤)結果，特別是偽陰性的結果。同時也可以偵測出現今大多數已知 RhD 性質上的變異型。但此法亦有其限制，當一個未知的突變是發生在設計的複式 PCR 分析範圍以外的區域時，將會被漏失掉。以 D<sup>IIIb</sup> 為例，它形成的原因是 *RhD* 基因的 exon 2 被 *RhCE* 基因的 ce 或 Ce 對偶基因的對等片段所取代，分別是 Ile60Leu, Ser68Asn 及 Ser103Pro。但因為 *RhD* exon 2 與 *RhCE* exon 2 核 酸 序 列 相 同，所以 *RhD* exon 2 無法

被特異性的擴增 (Maaskant-Van Wijk et al., 1998), 所以  $D^{IIIb}$  就無法使用這個方法來區別。另外因單點突變而發生性質上的 D 變異型包括  $D^{II}$ ,  $D^{VII}$ ,  $D^{DNU}$ ,  $D^{HMi}$  和  $D^{DHR}$  利用這個方法也會被認為是正常的 D 陽性, 所以也不適合使用這個方法。而  $D^{IVa}$  因為它是 RhD exons 3 和 7 部份被 RhCE 所替換, 但因為 exon 3 和 7 在 *RhD* 和 *RhCE* 核 酸 序 列 不 相 同 用此 multiplex PCR 方法測知。除了  $D^{IVa}$  以外, 還有  $D^{IIIc}$ ,  $D^{IVb}$ ,  $D^{Va}$ ,  $D^{VI}$ ,  $D^{Har}$ , DFR 等變異型也可以利用這個複式 PCR 的方法來測定, 而這些變異型是使用傳統血清分析法所無法查覺到的。因為這個複式 PCR 分析, 已經幾乎涵蓋了所有 RhD 特有序列的 exon (除了 exon 6), 所以不再需要使用多種的單株抗體組合來測定, 就可以發現新的 partial D 基因型。故利用複式 PCR 這種技術來分析受血者、懷孕婦女的 DNA 之 *RhD* 基因, 將可大幅降低一個 D 變異型被判定為正常 D 陽性的情形, 以避免輸血錯誤。而就一個 D 變異型的母親懷有正常 D 的胎兒, 就可採取預防措施以防止 anti-D 的產生。

從許多的研究報告中發現, 在非白種人的種族其 D 變異型的實際頻率要比利用血清分型法所測的來的高些。RhD 陰性表現型的頻率在不同種族差異很大, 如英國族群有 17%, 而日本族群和台灣地區只有 0.5% (雍建輝 1993)。在這篇實驗中, 首先我們利用血清法來分析 156 位 RhD 陰性捐血者的 Rh 表現型, 從實驗中可以知道臺灣地區, 依血清法判定為 RhD 陰性的捐血者, 其 Rh 表現型以 ccdee (占 49.3%) 及 Ccdee (38%) 所占的比例最大, 而 CcdEe 表現型所占比例最少, 只有 0.6%。

利用血清學的方法可以將 RhD 陰性分為真實的 RhD 陰性和 RhDel 表現型二種。按照文獻指出, RhDel 占了日本族群中 RhD 陰性者的 10% (Okubo et al., 1984), 在中國族群則是 20~30% (Mak et al., 1993)。1998 年

Sun 等人利用吸附沖出法及 PCR 來擴增 RhD exon 4, 5, 7 和 10, 指出在台灣 RhDel 表現型占所有陰性者的 32.6%, 而真正 RhD 陰性占 RhD 陰性個體之 67.4% (Sun et al., 1998)。我們分析包含吸附沖出法在內的實驗結果, 發現 RhDel 表現型占所分析 RhD 陰性的 22.3%, 真正 RhD 陰性占 RhD 陰性個體占 68.7%, 其它表現部份 *RhD* 基因的有 9%。在東方國家由於在 RhD 陰性個體有 1~3 成比例的 RhDel 存在, 因為它對 D 抗原的反應較弱, 所以可以用來幫助解釋, 為什麼在東方 RhD 陰性婦女因懷孕較少引起新生兒溶血性疾病的原因。RhDel 表現型有較弱的 RhD 抗原性, 可能是因 *RhD* 基因表達減少而造成缺乏一些 RhD epitopes, 也就是它所擁有的 RhD epitope 數目較少, 而其所擁有少數 RhD epitope 對 anti-D 的親和力自然會比較低。

高加索族群的 RhD 陰性者, 並沒有發現有任何 RhD 特有的基因存在。1997 年 Okuda 等人利用 intron 4 及 exon 10 分析日本 RhD 陰性捐血者, 發現其中有 27.7% 帶有正常 *RhD* 基因, 而非洲黑人 RhD 陰性也有 *RhD* 基因的表現 (Daniels et al., 1997; Okuda et al., 1997)。因此, 我們也對同一群 Rh 陰性捐血人作 *RhD* 基因分析, 並瞭解其變異型的種類及比例。我們利用 multiplex PCR 分析法, 分析臺灣 Rh 陰性捐血者 partial D 的變異型及比例, 在 157 位 Rh 陰性捐血者中, 有 68.7% (108 位) 是沒有表達任何 *RhD* 基因, 屬於真正 RhD 陰性。有 8.9% (14 位) 表達部份 *RhD* 基因, 其中有 4 位是  $R_0^{Har}$ , 一位  $D^{va}$ , 二位  $D^{IVb}$ , 由此推算這三種 RhD 變異型在全部族群中出現的頻率分別是 0.012% (1/7850), 0.0032% (1/31400), 0.0032% (1/31400)。在其它人種,  $D^{va}$  廣佈於白人、黑人及日本人,  $D^{IVb}$  可見於白人及日本人, 而  $R_0^{Har}$  大多出現在白種人 (Tippett et al., 1996), 但我們所分析的結果臺灣  $R_0^{Har}$  比白種人更高 (1/60,000) (Maaskant-Van Wijk et al.,

1998), 值得進一步探討。另外還有數位無法由現在已知的性質變異型中加以分類 (表 5)。按照以上所述及的數據, 在其它沒有被研究過的種族中, 其 RhD 陰性族群可能也可以偵測到許多 *RhD* 基因變異型的存在, 特別是那些具有 RhC 抗原表現型的種族。另外, 1997 年 Okuda 也發現在其所分析的陰性捐血者中帶有 *RhD* 基因的, 都是擁有 CC 或 Cc 的表現型, 而不具 cc 的表現型, 從這個結果中顯示在 RhD 陰性的人, *RhD* 基因的表達和 RhC 表現型之間有某些的相關性, 唯一的例外出現在 1994 年 Umenishi 等人的報告中, 他們發現有一個日本人有 *RhD* 基因, 但卻有 ccdee 的表現型 (Umenishi et al., 1994)。而在我們所分析的台灣 Rh 陰性捐血者中, 也發現有一例是相同的情況, 即具 *RhD* 基因 (No.77 屬 RhDel), 而 Rh 表現型是 ccdee 的例子, 此一個案值得更進一步去研究。

綜合以上血清學、吸附沖出法及 DNA 分型法, 我們可以將此群 Rh 陰性捐血者分成三個 types, 分別為 RhDel 具 *RhD* 基因的 exon 3, 4, 5, 7 或 exon 3, 4, 5, 7, 9 歸於第 I 型, 它在紅血球細胞上具有弱的 RhD 抗原的表現 (占 22.3%)。第 II 型為部份表現 RhD exon (占 9%), 第 III 型為真正 RhD 陰性, 其 *RhD* 基因全部被刪除 (占 68.7%)。同時我們也分析這些 RhD 陰性捐血者的表現型 (phenotype) 與 RhD exons 和 3, 4, 5, 7, 9 之間的關係。值得一提的是, 雖然之前有人利用 PCR-RFLP 分析 RhDel 的序列發現這些個體缺少含 exon 9 在內共 1013 bp 的片段 (Chang et al., 1998), 但是我們的實驗結果顯示, RhDel 可以是表達 exons 3, 4, 5, 7 或 exons 3, 4, 5, 7, 9 兩種情形。也就是說利用吸附沖出法作出 RhDel 陽性的結果, 而利用複式 PCR 方法去分析, 有部份的 RhDel 陽性會出現 RhD exon 3, 4, 5, 和 7, 而另外有一部份的 Del 陽性會出現 RhD exon 3, 4, 5, 7, 和 9。

最後我們分析真實 RhD 陰性，Del 和 D variant 三種族群，其 Rh 表現型的相對百分比。在真實 RhD 陰性中，以 ccdee 所占比例最高為 70.4% (76/108)，其次為 Ccdee 23.1% (25/108)。在 Del 中，以 Ccdee 所占比例最高為 79.4% (27/34)，其次為 CCdee 17.6% (6/34)，而在 D 變異型則以 Ccdee 50% (7/14) 和 CCdee 42.8% (6/14) 最高 (表 6)。另外我們也比較日本、香港和臺灣地區校正後 Del Rh 表現型的百分比，雖然在臺灣的 RhDel 以 Ccdee 和 CCdee 兩種表現型為主，這與日本和香港地區相差不大，但比較值得注意的是在我們所分析的 RhDel 並未發現有 CcdEe 的表現型，這與日本人和香港地區的差異很大 (Mak et al., 1993)，因為在這兩個地區，RhDel 的 Rh 表現型 CcdEe，其相對百分比都在 50%~60% 之間，這也許是我們所分析的 RhDel 群體數目不夠有關，值得將來進一步去探討 (表 7)。但就真正 RhD 陰性而言，CcdEe 表現型的相對百分比在香港占有 40.0% (Mak et al., 1993)，然而在我們所分析的 108 位真正 RhD 陰性個體中，也並未發現有任何 CcdEe 表現型，同樣值得進一步去研究。

綜合以上所言，這種 multiplex PCR 技術除了可以用來分析部分 RhD 性質上的變異型種類及比例外，也可以應用在臨床上作為一項產前檢查-羊水的檢測，它可以快速而正確的知道胎兒 RhD 的分型，避免可能產生的新生兒溶血性疾病，同時又因其所需的檢體量很少，所以對胎兒而言幾乎不會造成任何傷害，這項技術值得推廣並應用在臨床上。

## 伍. 參考文獻:

雍建輝 臨床輸血醫學, 藝軒出版社, p507-523, 1993

Arce MA, Thompson ES, Wagner S, Coyne KE, Ferdman BA & Lublin DM:

Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in

RhD-positive, but not RhD-negative individuals. *Blood* 82: 651-655, 1993



- Avent ND, Butcher SK, Liu W, Mawby WJ, Mallinson G, Parsons SF, Anstee DJ & Tanner MJA: Localization of the C termini of the Rh (Rhesus) polypeptides to the cytoplasmic face of the human erythrocyte membrane. *Journal of Biological Chemistry* 267: 15134-15139, 1992
- Avent ND, Martin PG, Armstrong-Fisher SS, Liu W & Kirstin M: Evidence of genetic diversity underlying RhD-, weak D (D<sup>U</sup>), and partial D phenotypes as determined by multiplex PCR analysis of the RHD gene. *Blood* 89: 2568-2577, 1997
- Avent ND: Human erythrocyte antigen expression: its molecular bases. *British Journal of Biomedical Science* 54: 16-37, 1997
- Bennett PR & Cartron JP: Prenatal determination of fetal RhD type. *New England Journal of Medicine* 330: 795-796, 1994
- Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y, Warwick RM, Path FRC, Cherif-Zahar B, Fisk NM & Cartron JP: Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *New England Journal of Medicine* 329:607-610, 1993
- Bryant NJ: The Rh/Hr Blood group system Chapter 5. In 'An Introduction to Immunohematology'. 3<sup>rd</sup> ed. Saunoers, 141-154, 1994
- Cartron JP: Defining the Rh blood group antigens. Biochemistry and Molecular Genetics. *Blood Reviews*: 199-212, 1994
- Chang JG, Peng CT & Tsai CH: Human RhDel is caused by a deletion of 1,013bp between intron 8 and 9 including exon 9 of RHD gene. *Blood* 92: 2602-2604, 1998
- Cherif-Zahar B, Raynal V, Gane P, Mattei MG, Bailly P, Gibbs G, Colin Y & Cartron JP: Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most

- case of Rh-deficiency. *Nature Genetics*: 12: 168-173, 1996
- Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V & Cartron JP: Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 78: 2747-2752, 1991
- Daniels G, Green C & Smart E: Differences between RHD-negative Africans & RhD-negative Europeans (Letter), *Lancet* 350: 862-863, 1997
- Eshleman JR, Shakin-Eshleman SH, Kant JA & Spitalnik SL: DNA typing of the human MN and Ss blood group antigens in amniotic fluid and following massive transfusion. *American Journal of Clinical Pathology* 103: 353-357, 1995
- Fisher RA & Race RR: Rh gene frequencies in Britain. *Nature* 157:48-49, 1946
- Flegel WA, Wagner FF, Muller TH & Gassner C: Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfusion Medicine* 8: 281-302, 1998
- Gassner C, Schmarada A, Nussbaumer W & Schonitzer D: ABO glycosyltransferase genotyping by PCR using sequence-specific primers. *Blood* 88: 1852-1856, 1996
- Hernand P, Mouro I, Huet M, Bloy C, Suyama K, Goldstein J, Cartron JP & Bailly P: Immunochemical characterization of Rhesus proteins with antibodies raised against synthetic peptides. *Blood* 82: 669-676, 1993
- Hessner MJ, Mcfarland JG & Endean DJ: Genotyping of KEL1 and KEL2 of the human Kell blood group system by the PCR with sequence-specific

- primers. *Transfusion* 36: 495-499, 1996
- Huang CH: Alteration of RH gene structure and expression in human dCCee and DCW- red blood cells; phenotypic homozygosity versus genotypic heterozygosity. *Blood* 88: 2326-2333, 1996
- Ikemoto S, Iwamoto S, Tsuchida S, Goto K, Oyamada T & Kajii E: Molecular genetic basis of red cell markers and its forensic application. *Forensic Science International* 80: 147-161, 1996
- Jones J, Finning K, Mattock R, Williams M, Voak D, Scott ML & Avent ND: The serological profile and molecular basis of a new partial D phenotype, DHR. *Vox Sanguinis* 73: 252-256, 1997
- Landsteiner K & Wiener AS: An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proceeding of Society for Experimental Biology and Medicine* 43:223, 1940
- Le Van Kim C, Cherif-Zahar B, Raynal V, Mouro I, Lopez M, Cartron JP & Colin Y: Multiple Rh messenger RNA isoforms are produced by alternative splicing. *Blood* 80: 1074-1078, 1992
- Levine P & Stetson RE: An unusual case of intragroup agglutination. *JAMA* 113:126-127, 1939
- Maaskant Van Wijk PA, Faas BHW, Ruijter JAM, Von Overbeeke MAM, von dem Borne AEGK & van Rhenen DJ: RHD genotyping by multiplex PCR analysis of all RHD specific exons. *Transfusion*, 37, 1S, 1997b
- Maaskant Van Wijk PA, Faas BHW, Ruijter JAM, Overbeeke MAM, Borne AEG, Rhenen DJ & Schoot CE: Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion*

- 38:1015-1021, 1998
- Mak KH, Yan KF, Cheng SS & Yuen MY: Rh phenotypes of Chinese blood donors in Hong Kong, with special reference to weak D antigens. *Transfusion* 33:348-351, 1993
- Mallinson G, Soo KS & Anstee DJ: The molecular basis of the Fy (a) and Fy (b) antigens (Abstract). *Transfusion Medicine* 5: 45
- Matassi G, Cherif-Zahar B, Raynal V, Rouger P & Cartron JP: Organization of the human RH50A gene (RHAG) and evolution of base composition of the RH gene family. *Genomics* 47: 286-293,1998
- McGuire M, Smith BL & Agre P: Distinct variants of erythrocyte protein 4.1 inherited in linkage with elliptocytosis and Rh type in three caucasian families. *Blood* 72: 287-293, 1988
- Mouro I, Le Van Kim C, Rouillac C, Rhenen DJ, Pennec PY, Bailly P, Cartron JP & Colin Y: Rearrangements of the blood group RhD gene associated with the D<sup>VI</sup> category phenotype. *Blood* 83: 1129-1135, 1994
- Okubo Y, Yamaguchi H, Tomita T & Nagao N: A D variant Del? *Transfusion* 24:542, 1984
- Okuda H, Kawano M, Iwamoto S, Tanaka M, Seno T, Okubo Y & Kajii E: The RHD gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. *Journal of Clinical Investigation* 100: 373-379, 1997
- Olives B, Merriman M, Bailly P, Bain S, Barnett A, Todd J, Cartron JP & Merriman T: The molecular basis of the Kidd blood group polymorphism and its lack of association with type 1 diabetes susceptibility. *Human Molecular Genetics* 6: 1017-1020, 1997

- Rouillac C, Gane P, Cartron J, Pennec PYL, Cartron JP & Colin Y: Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D ( $D^U$ ) and Rh C/e in  $R^N$  phenotypes. *Blood* 87: 4853-4861, 1996
- Simsek S, Faas BHW, Bleeker PMM, Overbeeke MAM, Cuijpers HTM, Schoot CE & Borne AEG: Rapid RhD genotyping by PCR-based amplification of DNA. *Blood* 85: 2975-2980, 1995
- Smythe JS, Avent ND, Judson PA, Parsons SF, Martin PG & Anstee DJ: Expression of RHD and RHCE gene products using retroviral transduction of K562 cells establishes the molecular basis of Rh blood group antigens. *Blood* 87: 2968-2973, 1996
- Spence WC, Maddalena A, Demers DB & Bick DP: Molecular analysis of the RhD genotype in fetuses at risk for RhD hemolytic disease. *Obstetrics and Gynecology* 85: 296-298, 1995a
- Sun CF, Chou CS, Lai NC & Wang WT: RHD gene polymorphisms among RhD-negative Chinese in Taiwan. *Vox Sanguinis* 75: 52-57, 1998
- Tippett PA: A speculative model for the Rh blood groups. *Annals of Human Genetics* 50: 241-247, 1986
- Tippett P, Lomas-Francis C & Wallace M: The Rh antigen D: Partial D antigens and associated low incidence antigen. *Vox Sanguinis* 70: 123-131, 1996
- Umenishi F, Kajii E & Ikemoto S: Molecular analysis of Rh polypeptides in a family with RhD-positive and RhD-negative phenotypes. *Biochemical Journal* 299:207-211, 1994
- Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F & Flegel WA:

Three molecular structures cause Rhesus D category VI phenotype with distinct immunohematologic features. *Blood* 91: 2157-2168, 1998a

Wiener AS: Genetic theory of the Rh blood types. *Proceeding of Society for Experimental Biology* 54: 316-319, 1943

表 1: Sequences and positions of primers for RhD exons

Primer	sequence	position	exon
RDex3F	5' -TCG GTG CTG ATC TCA GTG GA-3'	364-383	3
RDex3R	5' -ACT GAT GAC CAT CCT CAT GT-3'	455-474	3
RDex4F	5' -CAC ATG AAC ATG ATG CAC A-3'	496-514	4
RDex4R	5' -CAA ACT GGG TAT CGT TGC TG-3'	602-621	4
RDex5F	5' -G TGG ATG TTC TGG CCA AGT T-3'	648-667	5
RDex5R	5' -CAC CTT GCT GAT CTT ACC-3'	787-801	5
RDex7F	5' -AGC TCC ATC ATG GGC TAC AA-3'	973-992	7
RDex7R	5' -ATT GCC GGC TCC GAC GGT ATC-3'	1048-1068	7
RDex9F	5' -AAC AGG TTT GCT CCT AAA TAT T-3'	1154-1170	9
RDex9R	5' -A AAC TTG GTC ATC AAA ATA TTT AAC CT-3'	1193-1219	9
BACTF	5' -CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G-3'		
BACTR	5' -GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC-3'		

BACTF, BACTR 當作 internal control

表 2: RhD 陰性檢體的 phenotype ; 檢體號 4-42 ( + :positive ; - :negative)

No.	MAb	Anti-C	Anti-c	Anti-D	Anti-E	Anti-e	phenotype
4		+	-	-	-	+	CCdee
5		+	+	-	-	+	Ccdee
6		+	+	-	-	+	Ccdee
7		-	+	-	-	+	ccdee
8		-	+	-	-	+	ccdee
9		-	+	-	-	+	ccdee
10		-	+	-	-	+	ccdee
11		-	+	-	-	+	ccdee
12		+	+	-	-	+	Ccdee
13		+	+	-	-	+	Ccdee
14		+	+	-	-	+	Ccdee
15		-	+	-	-	+	ccdee
16		+	+	-	-	+	Ccdee
17		-	+	-	-	+	ccdee
18		-	+	-	-	+	ccdee
19		+	+	-	-	+	Ccdee
20		-	+	-	-	+	ccdee
21		-	+	-	-	+	ccdee
22		+	+	-	-	+	Ccdee
23		-	+	-	-	+	ccdee
24		+	-	-	-	+	CCdee
25		-	+	-	-	+	ccdee
26		+	+	-	-	+	Ccdee
27		+	+	-	-	+	Ccdee
28		-	+	-	-	+	ccdee
29		+	+	-	-	+	Ccdee
30		-	+	-	-	+	ccdee
31		-	+	-	-	+	ccdee
32		+	+	-	-	+	Ccdee
33		-	+	-	-	+	ccdee
34		+	+	-	-	+	Ccdee
35		-	+	-	-	+	ccdee
36		+	+	-	-	+	Ccdee
37		+	+	-	-	+	Ccdee
38		-	+	-	-	+	ccdee
39		+	-	-	-	+	CCdee
40		+	+	-	-	+	Ccdee
41		+	+	-	-	+	Ccdee
42		-	+	-	-	+	ccdee



表2 continued-1 RhD陰性檢體的phenotype；檢體號43-82 (+ :positive； - :negative)

No.	MAb	Anti-C	Anti-c	Anti-D	Anti-E	Anti-e	phenotype
43		-	+	-	-	+	ccdee
44		-	+	-	+	+	ccdEe
45		-	+	-	-	+	ccdee
46		-	+	-	-	+	ccdee
47		+	-	-	-	+	CCdee
48		+	+	-	-	+	Ccdee
49		-	+	-	-	+	ccdee
50		-	+	-	-	+	ccdee
51		-	+	-	-	+	ccdee
52		+	+	-	-	+	Ccdee
53		+	+	-	-	+	Ccdee
54		-	+	-	-	+	ccdee
55		-	+	-	-	+	ccdee
56		+	+	-	-	+	Ccdee
57		-	+	-	+	+	ccdEe
58		+	+	-	-	+	Ccdee
59		-	+	-	-	+	ccdee
60		-	+	-	-	+	ccdee
61		+	+	-	-	+	Ccdee
62		-	+	-	+	+	ccdEe
63		-	+	-	-	+	ccdee
64		+	+	-	-	+	Ccdee
65		+	+	-	-	+	Ccdee
66		-	+	-	-	+	ccdee
67		+	+	-	-	+	Ccdee
68		-	+	-	-	+	ccdee
69		-	+	-	-	+	ccdee
70		-	+	-	-	+	ccdee
71		+	+	-	-	+	Ccdee
72		+	+	-	-	+	Ccdee
73		+	-	-	-	+	CCdee
74		+	+	-	-	+	Ccdee
75		+	+	-	-	+	Ccdee
76		-	+	-	-	+	ccdee
77		-	+	-	-	+	ccdee
78		-	+	-	-	+	ccdee
79		+	+	-	-	+	Ccdee
80		+	+	-	-	+	Ccdee
81		-	+	-	-	+	ccdee
82		-	+	-	-	+	ccdee

表2 continued-2. RhD陰性檢體的phenotype；檢體號83-123

No.	MAB	Anti-C	Anti-c	Anti-D	Anti-E	Anti-e	phenotype
83		-	+	-	-	+	ccdee
84		-	+	-	+	+	ccdEe
85		+	-	-	-	+	CCdee
86		+	+	-	-	+	Ccdee
87		+	+	-	-	+	Ccdee
88		-	+	-	-	+	ccdee
89		-	+	-	-	+	ccdee
90		+	+	-	+	+	CcdEe
91		+	+	-	-	+	Ccdee
92		-	+	-	-	+	ccdee
93		-	+	-	-	+	ccdee
94		-	+	-	-	+	ccdee
95		+	+	-	-	+	Ccdee
96		-	+	-	-	+	ccdee
97		-	+	-	-	+	ccdee
98		-	+	-	-	+	ccdee
99		-	+	-	-	+	ccdee
100		-	+	-	-	+	ccdee
102		+	+	-	-	+	Ccdee
103		-	+	-	-	+	ccdee
104		-	+	-	-	+	ccdee
105		+	+	-	-	+	Ccdee
106		+	+	-	-	+	Ccdee
107		+	+	-	-	+	Ccdee
108		+	+	-	-	+	Ccdee
109		+	+	-	-	+	Ccdee
110		-	+	-	-	+	ccdee
111		+	+	-	-	+	Ccdee
112		+	+	-	-	+	Ccdee
113		-	+	-	+	+	ccdEe
114		-	+	-	-	+	ccdee
115		-	+	-	-	+	ccdee
116		+	+	-	-	+	Ccdee
117		+	+	-	-	+	Ccdee
118		-	+	-	-	+	ccdee
119		-	+	-	-	+	ccdee
120		+	+	-	-	+	Ccdee
121		+	-	-	-	+	CCdee
122		+	-	-	-	+	CCdee
123		+	+	-	-	+	Ccdee

表 2 continued-3: RhD 陰性檢體的 phenotype; 檢體號 124-160 (+ :positive; - :negative)

No.	MAB	Anti-C	Anti-c	Anti-D	Anti-E	Anti-e	phenotype
124		-	+	-	-	+	ccdee
125		+	+	-	-	+	Ccdee
126		-	+	-	-	+	ccdee
127		+	+	-	-	+	Ccdee
128		-	+	-	-	+	ccdee
129		+	+	-	-	+	Ccdee
130		+	-	-	-	+	CCdee
131		+	+	-	-	+	Ccdee
132		-	+	-	-	+	ccdee
133		-	+	-	-	+	ccdee
134		-	+	-	-	+	ccdee
135		-	+	-	-	+	ccdee
136		+	+	-	-	+	Ccdee
137		+	+	-	-	+	Ccdee
138		+	-	-	-	+	CCdee
139		-	+	-	-	+	ccdee
140		+	-	-	-	+	CCdee
141		+	-	-	-	+	CCdee
142		-	+	-	-	+	ccdee
143		-	+	-	-	+	ccdee
144		+	-	-	-	+	CCdee
145		-	+	-	-	+	ccdee
146		+	+	-	-	+	Ccdee
147		-	+	-	-	+	ccdee
148		+	+	-	-	+	Ccdee
149		-	+	-	-	+	ccdee
150		-	+	-	-	+	ccdee
151		-	+	-	-	+	ccdee
152		+	+	-	-	+	Ccdee
153		-	+	-	-	+	ccdee
154		+	+	-	-	+	Ccdee
155		-	+	-	-	+	ccdee
156		+	-	-	-	+	CCdee
157		+	+	-	-	+	Ccdee
158		-	+	-	-	+	ccdee
159		-	+	-	-	+	ccdee
160		-	+	-	-	+	ccdee

表 3: D elution 結果 (+ :positive ; - :negative)

NO.	D-elution	NO.	D-elution	NO.	D-elution	NO.	D-elution
4	-	44	-	84	-	124	-
5	-	45	-	85	-	125	-
6	-	46	-	86	-	126	-
7	-	47	+	87	+	127	-
8	-	48	+	88	-	128	-
9	-	49	-	89	-	129	-
10	-	50	-	90	-	130	-
11	-	51	-	91	-	131	-
12	+	52	-	92	-	132	-
13	+	53	-	93	-	133	-
14	-	54	-	94	-	134	-
15	-	55	-	95	-	135	-
16	+	56	-	96	-	136	+
17	-	57	-	97	-	137	-
18	-	58	+	98	-	138	-
19	-	59	-	99	-	139	-
20	-	60	-	100	-	140	+
21	-	61	+	101	+	141	-
22	+	62	-	102	+	142	-
23	-	63	-	103	-	143	-
24	+	64	-	104	-	144	+
25	-	65	+	105	-	145	-
26	+	66	-	106	-	146	+
27	+	67	+	107	-	147	-
28	-	68	-	108	-	148	+
29	+	69	-	109	+	149	-
30	-	70	-	110	-	150	-
31	-	71	-	111	-	151	-
32	-	72	-	112	-	152	-
33	-	73	+	113	-	153	-
34	+	74	+	114	-	154	-
35	-	75	+	115	-	155	-
36	+	76	-	116	-	156	+
37	+	77	+	117	-	157	+
38	-	78	-	118	-	158	-
39	-	79	+	119	-	159	-
40	+	80	+	120	-	160	-
41	-	81	-	121	-		-
42	-	82	-	122	-		-
43	-	83	-	123	-		-

表 4: Multiplex PCR 結果 ; 檢體號 4~42 (+ :positive ; - :negative)

NO.	exon 3	exon 4	exon 5	exon 7	exon 9
4	+	+	-	+	+
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	+	+
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+	+
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-
22	+	+	+	+	-
23	-	-	-	-	-
24	+	+	+	+	+
25	-	-	-	-	-
26	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+
28	-	-	-	-	-
29	+	+	+	+	-
30	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-
34	+	+	+	+	+
35	-	-	-	-	-
36	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+
38	-	-	-	-	-
39	+	+	+	-	-
40	+	+	+	+	+
41	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-

表4 continued-1: Multiplex PCR結果；檢體號43~82 (+ :positive ; - :negative)

NO.	exon 3	exon 4	exon 5	exon 7	exon 9
-----	--------	--------	--------	--------	--------

43	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-
47	+	+	+	+	+
48	+	+	+	+	+
49	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-
58	+	+	+	+	-
59	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-
61	+	+	+	+	-
62	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-
65	+	+	+	+	-
66	-	-	-	-	-
67	+	+	+	+	+
68	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-
72	+	+	+	-	-
73	+	+	+	+	+
74	+	+	+	+	+
75	+	+	+	+	+
76	-	-	-	-	-
77	+	+	+	+	+
78	-	-	-	-	-
79	+	+	+	+	+
80	+	+	+	+	+
81	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-

表4 continued-2: Multiplex PCR結果；檢體號83~122 (+ :positive ; - :negative)

NO.	exon 3	exon 4	exon 5	exon 7	exon 9
-----	--------	--------	--------	--------	--------

83	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-
85	+	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-
87	+	+	+	+	+
88	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-
90	+	-	+	-	-
91	+	-	+	-	-
92	-	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-
97	-	-	-	-	-
98	-	-	-	-	-
99	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-
101	+	+	+	+	-
102	+	+	+	+	+
103	-	-	-	-	-
104	-	-	-	-	-
105	-	-	-	-	-
106	-	-	-	-	-
107	-	-	-	-	-
108	-	-	+	+	+
109	+	+	+	+	-
110	-	-	-	-	-
111	-	-	-	-	-
112	-	-	-	-	-
113	-	-	-	-	-
114	-	-	-	-	-
115	-	-	-	-	-
116	-	-	-	-	-
117	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-
119	-	-	-	-	-
120	-	-	+	-	-
121	-	-	-	-	-
122	-	-	+	-	-

表4 continued-3: Multiplex PCR結果；檢體號123~160 (+:positive ; -:negative)

NO.	exon 3	exon 4	exon 5	exon 7	exon 9
-----	--------	--------	--------	--------	--------

123	-	-	-	-	-
124	-	-	-	-	-
125	-	-	-	-	-
126	-	-	-	-	-
127	-	+	+	+	-
128	-	-	-	-	-
129	-	-	-	-	-
130	-	-	+	-	-
131	-	-	+	-	-
132	-	-	-	-	-
133	-	-	-	-	-
134	-	-	-	-	-
135	-	-	-	-	-
136	+	+	+	+	+
137	-	-	-	-	-
138	-	-	-	-	-
139	-	-	-	-	-
140	+	+	+	+	+
141	+	+	-	+	-
142	-	-	-	-	-
143	-	-	-	-	-
144	+	+	+	+	+
145	-	-	-	-	-
146	+	+	+	+	+
147	-	-	-	-	-
148	+	+	+	+	-
149	-	-	-	-	-
150	-	-	-	-	-
151	-	-	-	-	-
152	-	-	-	-	-
153	-	-	-	-	-
154	-	-	-	-	-
155	-	-	-	-	-
156	+	+	+	+	+
157	+	+	+	+	+
158	-	-	-	-	-
159	-	-	-	-	-
160	-	-	-	-	-

表 5: 157 位台灣 RhD 陰性捐血者其複式 PCR 的結果與 phenotype 之關聯

	RhD gene	RhD(-)RhC(+)Rhc(+/-)	RhD(-)RhC(-)c(+)
--	----------	----------------------	------------------



種類	exon3	exon4	exon5	exon7	exon9	CCdee	Ccdee	CcdEe	Total	ccdee	ccdEe	Total
A	+	-	-	-	-	1	0	0	1	0	0	0
B	-	-	+	-	-	2	2	0	4	0	0	0
C	+	-	+	-	-	0	1	1	2	0	0	0
D	-	-	-	+	+	0	1	0	1	0	0	0
E	+	+	+	-	-	1	1	0	2	0	0	0
F	+	+	-	+	-	1	0	0	1	0	0	0
G	-	+	+	+	-	0	1	0	1	0	0	0
H	-	-	+	+	+	0	1	0	1	0	0	0
I	+	+	+	+	-	0	7(1)	0	7(8)	0	0	0
J	+	+	-	+	+	1	0	0	1	0	0	0
K	+	+	+	+	+	6	20	0	26	1	0	1
L	-	-	-	-	-	2	25	0	27	76	5	81
Total						14	59	1	74	77	5	82

( ): 種類 I 有一檢體沒有作 Rh phenotype

表 6: 在 RhD 陰性捐血者中真實 D 陰性, Del 和 D variant 的 Rh 表現型相對百分比

Rh 表現型	Total	真實 D 陰性		RhDel		D variant	
		表現的 數目	百分比	表現的 數目	百分比	表現的 數目	百分比
Ccdee	59	25	42.37	27	45.76	7	11.87
CCdee	14	2	14.30	6	42.85	6	42.85
CcdEe	1	0	0.00	0	0.00	1	100.0
ccdEe	5	5	100.0	0	0.00	0	0.00
ccdee	77	76	98.70	1	1.30	0	0.00
Total	156(157)	108		34(35)		14	

註: ( )RhDel 有一檢體沒有作 Rh phenotype

表 7:比較日本、香港地區和臺灣 RhDel個體各種 Rh 表現型的相對百分比(%)

Rh 表現型	日本人	香港地區	臺灣人
Ccdee	50.2	68.2	45.8
CCdee	64.7	81.3	42.9
CcdEe	56.1	60.0	0.0
ccdEe	0.4	0.0	0.0
ccdee	0.3	0.0	1.3
Total	10.3	29.3	22.3

圖 1:Rh polypeptide.( )代表 D 蛋白與 CE 蛋白 35 個胺基酸替換的位置  
(引錄自 Cartron JP., 1994)

圖 2: Rh CcEe polypeptide , RhD polypeptide 及 Rh glycoprotein。位在膜外側臨界點負責 RhC , c , E 和 e 抗原表達的胺基酸變異型位置以灰色圓圈表示。(引錄自 Avent et al., 1996)

圖 3: 利用複式 PCR 之結果來判定 partial D 基因型。黑色正方形代表 RhD 序列，白色代表 RhCE 序列。(引錄自 Maaskant Van Wijk et al., 1998)

圖 4: RhD 陽性利用複式 PCR 方法擴增 RhD exon 3, 4, 5, 7 和 9 所得之產物。  
IC:internal control ; - :negative control ; + :positive control ; M :marker

圖 5: 血清法呈 RhD 陰性者, 利用複式 PCR 方法測試其 RhD exons 的結果。  
圖中的數目為捐血者的編號, 其中 No.4 表現 exon 3, 4, 7, 9; No.6 表現 exon 7 及 9; No.12, 13, 16 為 RhDel 表現 RhD exon 3, 4, 5, 7, 9; 其餘 No.5, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18 沒有表達者, 為真正 RhD 陰性。( + :positive control; - : negative control)

## 目錄

## 頁次

中文摘要	1
英文摘要	2
壹. 緒言與文獻回顧	3
一. Rh 血型系統	3
二. RhD DNA 分型法	8
三. 本論文研究主題	12
貳. 材料與方法	13
一. 材料	13
二. 方法	14
1. DNA 的萃取	14
2. Rh phenotyping	14
3. D elution	15
4. Multiplex PCR analysis	15
參. 結果	17
肆. 討論	19
伍. 參考文獻	25
陸. 附表	31
柒. 附圖	43