

ABO 血型基因无创产前专刊

2022 年 2 月

编者导读：

胎儿新生儿溶血病(hemolytic disease of the fetus and newborn, HDFN)是指因母婴血型不合，母体针对与其不同的胎儿红细胞血型抗原所产生的相应抗体经胎盘进入胎儿血液循环，导致胎儿或新生儿同种免疫性溶血引起的一系列临床症状。HDFN 常导致早期流产，轻者出现贫血、水肿、肝脾肿大，重者如果未经处理，可能导致胎儿重度贫血、严重的新生儿高胆红素血症与核黄疸甚至死亡。临床上以 ABO 血型不合引起的 HDFN 多见。中国输血协会免疫血液学专业委员会于 2021 年发布《胎儿新生儿溶血病实验室检测专家共识》，推荐进行胎儿非侵入性血型基因型检测(cff-DNA)，以确定胎儿血型，预测 HDFN 风险。在本月期刊中，我们讨论胎儿非侵入性 ABO 血型基因型检测。

本期期刊我们选取三篇文献，主要内容如下：

1.临床研究（发表在《Transfusion Medicine and Hemotherapy》影响因子 3.747）：

开创基于母体血浆细胞游离 DNA 和下一代测序(NGS)的胎儿 ABO 预测方法，检测 26 名 12-35 妊娠周孕妇血浆。19 例有产后血清学检查，与预测的胎儿 ABO 血型全部一致；7 例未分娩或未进行产后 ABO 测定，其中有 2 例无法预测，说明该方法由于杂交 ABO 基因或母体杂合性的局限性。此法估计可以在约 95%的 O 型孕妇中可靠地预测胎儿 ABO 血型。

2.临床研究（发表在《Electrophoresis》影响因子 3.535）：

提出采用高密度二氧化硅微珠(SiO₂ MBs)捕获母体外周血中胎儿有核红细胞(fnRBCs)的方法，用 fnRBCs PCR-SSP 检测 52 例 12-19 妊娠周的孕妇的胎儿 ABO 基因型。成功检测到所有 ABO 基因型，且新生儿和胎儿的基因型一致。一个样本的血清学结果不同于 PCR-SSP，认为 ABO 基因型检测比血清学检测更准确，血清学结果与新生儿血细胞的弱 ABO 抗原有关。此法对胎儿 Rh 血型和其他胎儿疾病的无创产前检测也有很大潜力。

3.临床研究（发表在《Clinical Chemistry and Laboratory Medicine》影响因子 3.694）：

开发实时 PCR 母体血浆胎儿 ABO 基因分型方案。检测 73 名妊娠 12-25 周 O 血型孕妇血浆。胎儿 ABO 基因分型诊断准确率为 93.2%。该方案适用于 HDFN 的常规产前诊断和法医分析。

*在此郑重感谢文章作者所做出的努力及贡献。编者仅为收录方便学习，无观点诱导及评判，亦无商业目的。

目录

1. 《母体血浆细胞游离 DNA 下一代测序预测胎儿 ABO 血型》3
Rieneck K, Egeberg Hother C, Clausen FB, Jakobsen MA, Bergholt T, Hellmuth E, Grønbeck L, Dziegiel MH. Next Generation Sequencing-Based Fetal ABO Blood Group Prediction by Analysis of Cell-Free DNA from Maternal Plasma. Transfus Med Hemother. 2020 Feb;47(1):45-53.
2. 《二氧化硅微珠捕获胎儿有核红细胞，用于胎儿 ABO 基因型的无创产前检测》 15
Cheng L, Wei X, Wang Z, Feng C, Gong Q, Fu Y, Zhao X, Zhang Y. Silica microbeads capture fetal nucleated red blood cells for noninvasive prenatal testing of fetal ABO genotype. Electrophoresis. 2020 Jun;41(10-11):966-972.
3. 《使用实时 PCR 对母体血浆进行非侵入性胎儿 ABO 基因分型》27
Song W, Zhou S, Shao L, Wang N, Pan L, Yu W. Non-invasive fetal ABO genotyping in maternal plasma using real-time PCR. Clin Chem Lab Med. 2015 Nov;53(12):1943-50.

无创产前专刊——ABO

(编辑：艾丽萍，张悦，陈悦妍)

1. 《母体血浆细胞游离 DNA 下一代测序预测胎儿 ABO 血型》

作者：Klaus Rieneck 1, Christoffer Egeberg Hother 1, Frederik Banch Clausen 1, Marianne Antonius Jakobsen 2, Thomas Bergholt 3, Ellinor Hellmuth 3, Lene Grønbeck 3, Morten Hanefeld Dziegiel 1.

作者单位：1 丹麦哥本哈根 Rigshospitalet Section 2034 临床免疫学系；2 丹麦欧登塞大学医院临床免疫学系；3 丹麦哥本哈根 Rigshospitalet 妇产科。

摘要

引言：作为胎儿或新生儿发病或死亡的原因，孕妇与其胎儿之间的 ABO 血型不相容仍然是一种重要的风险，尽管很少见。当孕妇具有高水平的抗 A 或抗 B IgG 抗体时，孩子可能有胎儿新生儿溶血病（HDFN）的风险。进行胎儿 ABO 血型的直接产前测定可以提供有价值的临床信息。

目的：在这里，我们报告了用于预测产前 ABO 血型的基于下一代测序（NGS）的方法。

材料和方法：共检测 26 例血浆样品，来自 26 名 12-35 妊娠周的孕妇。20 例是临床样品，6 例是测试样品。使用 2 组引物对提取的细胞游离 DNA 进行 PCR 扩增，然后进行 NGS。通过两种不同的方法（FASTQ 分析和 grep 搜索）分析了 NGS 数据，以确保获得可靠的结果。将预测的胎儿 ABO 血型与已知的血清学婴儿 ABO 血型（19 例样品可获得）进行比较。

结果：在可获得表型信息和通过两种方法进行分析的 19 个可预测样品中，有 19 个一致。对于免疫孕妇（n=20），预测 12 例胎儿有 HDFN 风险，7 例胎儿无风险，1 例不确定。克隆和测序揭示了一个新变异，该变异在 ABO*O.01.24 基础上具有额外的 c.220C>T 取代。在 6 个测试样品中发现了另一个不确定的结果，这是由母体杂合性引起的。这 2 个不确定的样品证明了该测定由于杂交 ABO 基因或母体杂合性的局限性。

结论：我们开创了基于母体血浆细胞游离 DNA 和 NGS 的胎儿 ABO 预测方法，并在少量样品中证明了其应用。基于计算的变异频率和 ABO*O.01/ABO*O.02 杂合子频率，估计可以在约 95% 的即将到来的 O 型孕妇临床样本中可靠地预测胎儿 ABO 血型。尽管 ABO 血型具有大量遗传变异，但许多变异很少见，产前 ABO 预测是可能的，且为预防 ABO HDFN 增加了有价值的早期信息。

1 引言

ABO 血型引起的胎儿新生儿溶血病 (HDFN) 非常频繁，但通常不严重[1-9]。ABO 血型系统是唯一一种在大约 4 个月时开始普遍存在针对相应抗原的天然 IgM 抗体的系统。针对 ABO 血型抗原的抗体可以显著增强——有时出于未知原因，有时是由于先前的妊娠免疫或使用益生菌。IgG 抗体将通过胎盘进入胎儿。

对于血型为 O 且抗 A 或抗 B 滴度高的孕妇，HDFN 尤其严重[3,6-8]。具有高抗 A 或抗 B 滴度[3,10]、曾怀有黄疸儿的孕妇，随后怀有严重 ABO HDFN 患儿的风险增加。

基于来自母体血浆的细胞游离 DNA (cfDNA) 分析预测胎儿 ABO 血型，同时测量胎儿大脑中动脉收缩期峰值流速，将提供有价值的早期信息，以确定 HDFN 的风险[11,12]。

血型基因分型已用于临床实践[13-16]。然而，ABO 基因分型是复杂的，尽管已成功开发了用于胎儿 RHD [17-19]、KEL 和其他非 RhD 抗原靶标[20-22]的基因分型测定，但尝试非侵入性胎儿 ABO 预测的工作较少[23]。由于 ABO 基因座遗传变异非常多[24,25]，很难开发出一种在不同种族人群中达到 100%准确度的简单检测方法。但是，通过我们在此介绍的方法，仅使用 2 个 PCR 引物组，然后进行下一代测序 (NGS)，就可以针对例如丹麦族裔人群中的常见临床情况实现高准确度。所描述的解决方案是实际可行性和广泛覆盖之间的折衷，针对预期的常见血型。无创胎儿 ABO 检测于 2017 年实施，在这里，我们报告了第一批常规分析的结果和检测的局限性。

2 材料和方法

2.1 样品

根据丹麦指南[26]，血清型 O 孕妇的抗 A 和/或抗 B 滴度高于 512，并且有 ABO HDFN 需要输血的既往婴儿史，需要进行产前 ABO 预测。将用于常规产前 ABO 分析的母体血浆样品（临床样品，n=20）收集在 10ml Cell-Free DNA BCT®采血管（美国 Streck）中。

纳入另外一组血浆样品（测试样品，n=6），是已知母体和胎儿 ABO 血清型的常规产前 RHD 测定样品的 1mL 残余血浆。根据出生后头 3 年内孩子的 ABO 测定来鉴定测试样品。选择母/胎 ABO 的各种组合，并且母体血浆样品是匿名的，仅保留母亲和孩子的血清学确定的 ABO 血型信息。这些测试样品收集在 EDTA 管中，并在室温下放置几天直至处理，并以血浆形式保存在 -20℃ 下直至分析。

2.2 DNA 提取

对于临床样品，通过在室温下以 2000g 离心 10 分钟来分离血浆。使用 QIAasymphony 全自动样本处理工作站（德国 Qiagen）从 4 mL 血浆中提取 DNA，并使用标准方案洗脱至 60μL。对于测试样品，使用 QIAasymphony 全自动样本处理工作站从 1mL 血浆中提取 DNA 并在 60 μ L 洗脱缓冲液中洗脱。在基于 NGS 的产前分析中分析血浆样品。

2.3 血清学

使用柱凝集技术[27]，根据 DANAK ISO 15189:2013 认可的血库的标准程序进行血清学 ABO 测定。

2.4 基于 NGS 的无创产前检测

2.4.1 测定原理

分析的原理很简单，基于 2 个附加的 PCR 引物组，这些引物组设计用于扩增没有等位基因特异性的单核苷酸变异（SNV）。对 PCR 产物进行测序后，计数等位基因，在大多数情况下可以推断出孕妇和胎儿的 ABO 血型。一个引物组扩增定义 O 型的 261delG 缺失（rs8176719），另一个引物组扩增必需的 B 特异性变异 796C>A 和 803G>C（rs8176746 和 rs8176747）以及 ABO*O.02 特异性 802G>A 取代（rs41302905）和 ABO*O.03 特异性 804dupG（rs782782485），如图 1 所示。

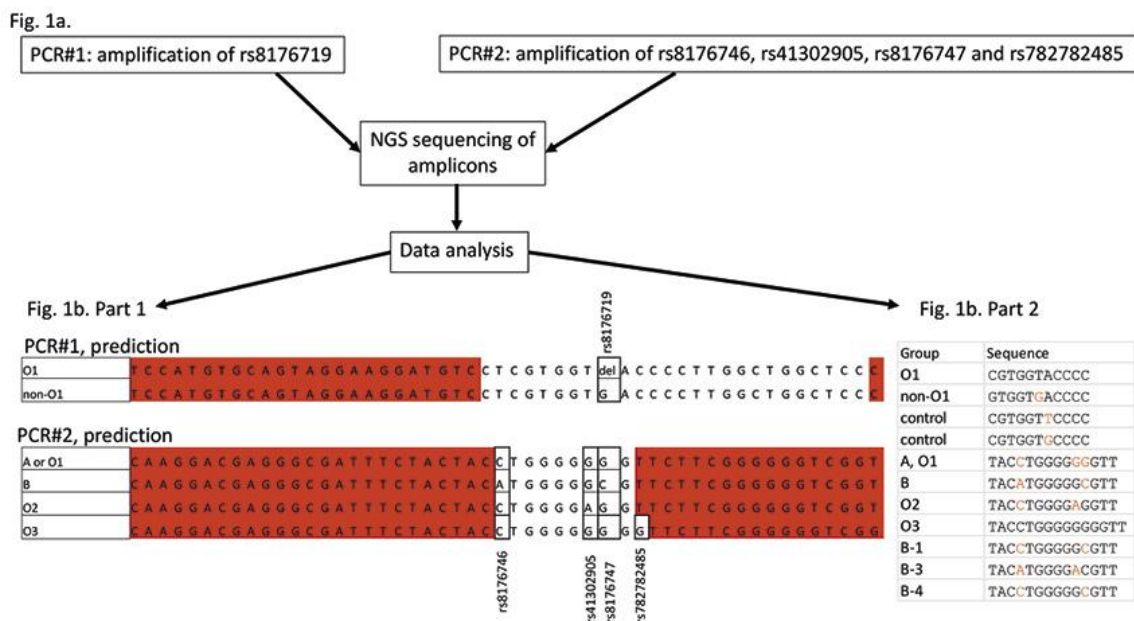


图 1 a 用 2 个独立的 PCR 引物组扩增从母体血浆样品纯化的母体和胎儿 cfDNA，扩增子长度对于 ABO*O.01 261delG 是 25 个碱基，对于 ABO*B 和 ABO*O.02 是 9 个碱基，对于 ABO*O.03 是 10 个

碱基。b Part 1 显示测序的碱基，红色标记的碱基是引物的一部分。Part 2 显示了 grep 搜索中用于搜索 MiSeq 仪器上生成的所有 FASTQ 序列的短字符串。

2.4.2 引物设计

引物是使用 Primer3 软件设计的[28]。我们评估了引物标准，包括 3'稳定性、自身互补性、错配、引物二聚体形成风险、正确的退火温度和平衡的 GC 含量。此外，优先选择在基因特异性引物靶向序列中具有尽可能少和稀有 SNV 的短 PCR 产物。进行候选设计的经验测试，检查 PCR 产物的量和纯度，并遵循下面在 QC 分析中描述的过程。决定的引物如表 1 所示，扩增的碱基如图 1b, part 1 所示。引物是从德国 Eurofins Genomics 订购的。O 引物组基因特异性扩增子的长度：对于不包含 261delG SNV 的 ABO*O 扩增子为 71 个碱基，对于包含 261delG 的 ABO*O 扩增子为 70 个碱基。B 引物组基因特异性扩增子的长度：对于 ABO*A、ABO*B 和 ABO*O 是 56 个碱基；对于 ABO*O.03，基因特异性扩增子是 57 个碱基。

表 1 基于 NGS 的胎儿 ABO 血型预测的引物序列

Primer name	Primer sequences
Oup2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TCCATGTGCAGTAGGAAGGATGTC
Olow2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC AATGTGCCCTCCCAGACAATG
Bup1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT CAAGGACGAGGGCGATTCTACTAC
Blow1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC TTTGCACCGACCCCCGAAGAA

引物的基因特异性部分以斜体显示，并附加了 MiSeq 测序所需的序列。Oup2 和 Olow2 引物组扩增定义 O 的 261delG 缺失 (rs8176719)，Bup1 和 Blow1 引物组扩增必需的 B 特异性变异 796C>A 和 803G>C (rs8176746 和 rs8176747) 以及 ABO*O.02 特异性 802G>A 取代 (rs41302905) 和 ABO*O.03 特异性 804dupG (rs782782485)。

2.4.3 PCR 扩增和 QC 前测序分析

使用 Phusion 热启动酶 (美国 New England Biolabs)，在 2 个独立的 PCR 反应 (PCR1 使用 Oup2 和 Olow2 引物，PCR2 使用 Bup1 和 Blow1 引物) (见表 1 和图 1) 中扩增提取的 cfDNA，退火温度为各个引物组计算得出，40 个扩增循环。PCR 产物在生物分析仪 (美国 Agilent) 上常规测试，纯化 PCR 产物浓度通过 Qubit 荧光定量分析 (美国 ThermoFischer) 测定。按照制造商的建议，在 AMPpure XP 珠 (美国 Beckman Coulter) 上纯化后，我们常规仅对浓度高于 5μg/mL 的 PCR 产物进行测序。使用匿名 cfDNA 测试引物，珠纯化的 PCR 产物的量通常在 20 和 40 μg/mL 之间。在生物分析仪上

估计假 PCR 产物的量。典型的生物分析仪运行结果如图 2 所示。由经验丰富的人员目视检查生物分析仪结果并评估 PCR 产物的纯度后，决定是否继续进行 DNA 测序。

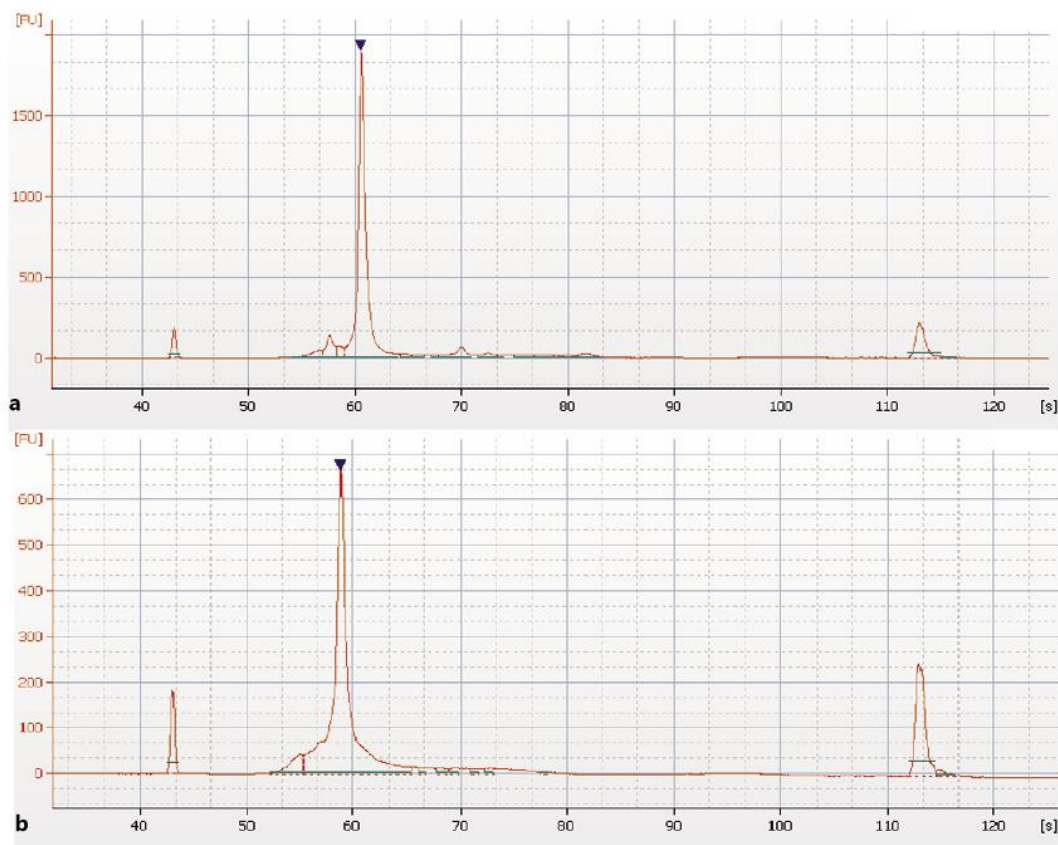


图 2 来自 O 引物组 (a) 和 B 引物组 (B) 的 PCR 产物的生物分析仪电泳图。PCR 产物用实心反三角形表示，大约 45 和 115 s 处的小峰是掺入的分子量标记物。PCR 产物在分子生物学级别的水中稀释，分别为 191/192 和 175bp。对于 O 和 B 引物组，都可以看到少量的假 PCR 产物。O 引物组扩增效果更好些。

2.4.4 NGS 测序

NGS 测序在美国 Illumina MiSeq 仪器上进行，使用 Illumina 的 50bp 试剂盒仅进行单向测序，严格遵守供应商的建议，仅稍作修改：PCR 产物在 HT1 缓冲液中稀释如下：30 μ L PhiX、320 μ L 浓度为 4 nM 的 PCR 产物和 250 μ L HT1 缓冲液，总计 600 μ L，加载到测序盒中。运行了 26 次，相当于每个样本运行一次。对于所有运行，Q30 都在 90%以上。

2.4.5 数据分析

FASTQ 数据以两种方式进行分析。第一，使用 FastQC 软件版本 0.11.5（英国 Babraham 研究所

的生物信息学小组；<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>分析频率>0.1%的 DNA 序列。对相同序列的 reads 构建 bin，并计算每个等位基因的 reads 数。第二，使用图 1b, part 2 中给出的搜索字符串进行基于 Unix 的 grep 搜索。对这些字符串进行精确搜索，计算每个字符串发生的次数，并将其与 reads 总数相关。样品 1-5 最初仅使用 FastQC 软件进行分析，将基于此单一软件分析的结果发送给临床医生。但是，当发现一个假阴性结果时，同时使用 FastQC 和 grep 搜索重新分析样品 1-5，并同时使用这两种方法分析所有后续样品。因此，本文报告的所有样品均同时通过 FastQC 和 grep 搜索进行了分析。grep 搜索用于避免假阴性结果。几个短字符串是质量控制(control1, control2, B-1, B-3 和 B-4)，结果数字未显示。预测取决于序列的相对数量；通常，在怀有 A、B、O2 或 O3 阳性胎儿的情况下，第一引物组仅发现少量非 ABO*O.01 序列，绝大多数 reads 显示 261delG，表明孕妇可能是 ABO*O.01 纯合子。第二引物组的结果表明是否存在 ABO*B、ABO*O.02 或 ABO*O.03 序列，从而预测胎儿 B、O2 或 O3 阳性；如果检测到的 ABO*B、ABO*O.02 或 ABO*O.03 序列的数量没有增加，则通过推理，预测胎儿 A 阳性。如果在来自第一引物组的 PCR 序列中仅发现 ABO*O.01 特异性序列并且如果第二 PCR 引物组未发现 ABO*B、ABO*O.02 或 ABO*O.03 特异性序列，则预测胎儿为 O。

2.5 新变异的克隆和测序

PCR 扩增样品 #19 的 ABO 基因所有外显子，然后使用 BigDye Terminator v3.1 进行测序，并在 ABI3500 Dx（丹麦 Life Technologies；引物序列见表 2）上进行分析。在 SeqScape 版本 3 中，将数据与参考序列 NG_006669.1（代表 ABO*A1.01）和 16 个不同 ABO 基因型的对照序列进行比较。为了分离携带新变异患者的 2 个等位基因，使用 TaKaRa Taq®RR02AG（日本 TaKaRa Bio Inc.）、外显子 3 的前向引物和外显子 7 的反向引物，进行了 5.6 kb 覆盖外显子 3-7 的长程 PCR。使用的 PCR 程序如下：在 94℃ 初始变性 1 分钟；94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 6 分钟，30 个循环；最后在 72℃ 下延长 5 分钟。将 PCR 产物克隆到 pCRTM 2.1-TOPO TA 载体（丹麦 Invitrogen）中。如上所述，用 ABO 特异性引物对克隆进行测序。对携带共同 ABO*O.01.01 等位基因的三个克隆和具有新变异的两个克隆进行测序。

表 2 用于克隆和测序 ABO 变异的引物

Exon	Forward	Reverse
1	5'-GTGTTTCGGCCTCGGGAAG-3'	5'-GAGGAGAGGCTGGAGACCG-3'
2	5'-AGGGTGTGATGCCTGAATTA-3'	5'-GCTGGACGCAGGCAATAAC-3'
3	5'-ATGCACTTTTGGAGGAAGG-3'	5'-TGGGCAGAGCATAGAGAGCG-3'
4	5'-GTTGTTCTGTGACTGTTTCT-3'	5'-TCAGAGCCACAGGAGGAAAG-3'
5	5'-CTTACCTGCATCCCACGCT-3'	5'-CCGCCCTCTAATACCTTCAG-3'
6	5'-GCAGAAGCTGAGTGGAGTTT-3'	5'-AACACAAGGAGAGACCTCAA-3'
7	5'-TCTGCTGCTCTAAGCCTTCC-3'	5'-ACCCGTTCTGCTAAAACCAA-3'

3 结果

表 3 列出了产前检查结果与产后血清学结果的比较。我们测试了来自 26 个不同个体的 26 个样本。临床样本来自妊娠中位数 16 周（范围 12-35），测试样本均来自妊娠 25 周。19 例有产后血清学检查；5 例妇女尚未分娩；2 例未进行产后 ABO 测定。为了预测胎儿 ABO 血型，19 例全部使用两软件分析与出生后血清学一致。#19 和 #23 这两个样本是不确定的，因此无法预测（下面将进一步详细讨论）。

#21 和 #25 这 2 个样品的结果仅依赖于 B 特异性引物组。对于 #21，无法预测胎儿是 AB 型还是 B 型，因为孕妇是 A 型；只能预测胎儿具有 B 抗原。对于 #25，无法预测胎儿是 O 型还是 AO 型，因为孕妇的基因型显然是 ABO*A/ABO*O；只能预测该胎儿不具有 B 抗原。在两种情况下，这都是 HDFN 潜在风险的相关临床信息。这说明了该测定的局限性。

在测试样品中，#23 的不确定结果是由 ABO*B/ABO*O.01 的杂合性引起的，这表明该测定法无法预测胎儿基因型的局限性。类似地，#19 的不确定结果清楚地表明，相对罕见的母体 ABO*O 变异可能会模糊胎儿表型的预测。#19 的 ABO 基因的克隆和测序显示 ABO*O 的一种新变异，类似于 ABO*O.01.24 等位基因，除了另外的 c.220C>T, Pro74Ser 取代。在该样品中，检测 O 261delG SNV 的引物组仍给出 220494 个 reads，明显高于背景，表明存在 A 阳性或 B 阳性胎儿。因此，一些母体基因型组合妨碍了胎儿表型预测（表 2S），但对 ABO*O.01 纯合孕妇无影响。此外，我们在样本中未发现 ABO*O.02 或 ABO*O.03 的母体或胎儿，见表 3。

该方法是敏感的，如 ABO*O.01 胎儿中的低背景 reads 数所示（例如 #4、#9 和 #10 以及 B 阴性胎儿中的特异性 B reads；见表 3）。对于临床样品，非 O reads 的临界值暂定为 0.025%，B 特异性 reads 的临界值暂定为 0.1%。

阳性临床样本的 reads 的胎儿分数估计：O 引物组平均 3.9%（n=13，范围 0.1-14.1%），B 引物组平均 7.5%（n=3，范围 6.9-8.6%）。

表 3 临床和测试样本概述

Case number*	Gestational age, whole weeks	Mother's serological ABO blood group	Infant's serological ABO group postnatally	Prenatal prediction	Result	O primers, total O reads rs8176719 (-/G)	Total B reads rs8176746 (C/A) rs8176747 (G/C)	O primers, non-O reads rs8176719 (G)	Specific B reads rs8176746 (A) rs8176747 (C)	Non-O reads, %	Specific B reads, %
1	13	O	A	A	Correct	6832784	5086191	392610	1	5.75	0.00
2	21	O	A	A	Correct	8008116	4948363	250852	8	3.13	0.00
3	22	O	A	A	Correct	7371630	5803623	102039	1	1.38	0.00
4	12	O	O	O	Correct	8060259	4756835	2	1	0.00	0.00
5	14	O	O/A*	A	Correct	5650568	4396888	4790	3	0.08	0.00
6	12	O	A	A	Correct	6336566	5187665	111061	1	1.75	0.00
7	34	O	No postnatal sample	A	N/A	5032888	4578020	709352	2	14.09	0.00
8	13	O	A	A	Correct	6718605	11620066	37029	5	0.55	0.00
9	15	O	O	O	Correct	8004851	4546100	0	1	0.00	0.00
10	19	O	O	O	Correct	6704503	4843488	1	3	0.00	0.00
11	27	O	B	B	Correct	3934914	3245762	243366	227327	6.18	7.00
12	32	O	B	B	Correct	7894289	5242408	465537	450910	5.90	8.60
13	16	O	No postnatal sample	A	N/A	4628526	3230323	157662	2312	3.41	0.07
14	15	O	Still pregnant	O	N/A	7336420	6118268	3	3	0.00	0.00
15	14	O	Still pregnant	A	N/A	6407459	5463652	130356	1	2.03	0.00
16	19	O	Still pregnant	O	N/A	5251880	4059343	647	17	0.01	0.00
17	14	O	Still pregnant	O	N/A	6779882	4988903	47	1	0.00	0.00
18	25	O	Still pregnant	B	N/A	5820353	5468214	197961	375307	3.40	6.86
19	19	O	B	Indeter [‡]	N/A	6289641	6170220	220494	3496912	3.51	56.67
20	28	O	O	O	Correct	6193016	5318222	1299	77	0.02	0.00
21	25	A	AB	B [§]	Correct	3845935	2959306	1793567	10665	46.64	0.36
22	25	O	A	A	Correct	8406658	5799271	2588	0	0.03	0.00
23	25	B	O	Indeter	N/A	5440367	4240078	2453856	2364791	45.10	55.77
24	25	A	B	B	Correct	5317095	19183	2832475	1780	53.27	9.28
25	25	A	O	not B [§]	Correct	3866705	3329210	1883678	1	48.72	0.00
26	25	O	A	A	Correct	3728609	3203736	8367	13	0.22	0.00

特异性 reads 的数量是给定测序运行中所有 FASTQ reads 中 grep 字符串搜索的结果。在任何样品中均未检测到 ABO*O.02 或 ABO*O.03。N/A，不适用；Indeter，不确定。*临床样品（样品编号 1 - 20），测试样品（样品编号 21 - 26）。#双胎妊娠；一个是 O，另一个是 A。最初，我们对样品 1-5 仅使用 FastQC 分析，结果样品 #5 假阴性。使用两种生物信息学分析方法，正确预测该样品为 A。□只能预测 A 或 B 血型。§ 这些样品中的预测仅基于 B 特异性引物组。对于 #21，不可能预测胎儿是 AB 还是 B，只能预测胎儿具有 B 抗原，这是相关信息。对于 #25，不可能预测胎儿是 AB 还是 AO，只能预测胎儿是否具有 B 抗原，这是确定 HDFN 风险的相关信息。

表 2S 母/胎基因型的理论组合

母血清型	母基因型	可能的胎儿基因型								
A1	A1A1	A1A1	A1A2	A1B	A1O1	A1O2				
A1	A1O1	A1A1	A1A2	A1B	A1O1	A1O2	O1A2	O1B	O1O1	O1O2
A1	A1O2	A1A1	A1A2	A1B	A1O1	A1O2	O2A2	O2B	O2O1	O2O2
A1, A2	A1A2	A1A1	A1A2	A1B	A1O1	A1O2	A2A2	A2B	A2O1	A2O2
A1, B	A1B	A1A1	A1A2	A1B	A1O1	A1O2	BB	BA2	BO1	BO2
A2	A2A2	A2A1	A2A2	A2B	A2O1	A2O2				
A2	A2O1	A2A1	A2A2	A2B	A2O1	A2O2	O1A1	O1B	O1O1	O1O2
A2	A2O2	A2A1	A2A2	A2B	A2O1	A2O2	O2A1	O2B	O2O1	O2O2
A2, B	A2B	A2A1	A2A2	A2B	A2O1	A2O2	BB	BA1	BO1	BO2
B	BB	BB	BA1	BA2	BO1	BO2				
B	BO1	BB	BA1	BA2	BO1	BO2	O1A1	O1A2	O1O1	O1O2
B	BO2	BB	BA1	BA2	BO1	BO2	O2A1	O2A2	O2O1	O2O2
O	O1O1	O1A1	O1A2	O1B	O1O1	O1O2				
O	O1O2	O1A1	O1A2	O1B	O1O1	O1O2	O2A1	O2A2	O2B	O2O2
O	O2O2	O2A1	O2A2	O2B	O2O1	O2O2				

假设添加特异性 A2 引物组到本试验中，可预测的相关胎儿抗原以粗体呈现。ABO 基因型的某些组合使得本试验无法预测胎儿 ABO 血型；在灰色背景上显示的组合中，不能识别或排除 A1。在与纯合 ABO*O.01 母亲最相关的临床情况下，如框架所示，本试验可以预测胎儿 ABO 血型。表仅适用于非卵子捐赠情况。

4 讨论

基于对母体血浆样本 cfDNA 的分析，我们介绍了基于 NGS 的无创胎儿 ABO 基因分型的首次临床经验的结果。对于可预测的样本，我们证明了胎儿 ABO 预测和婴儿 ABO 血型之间的完全一致性。该方法在概念上基于先前报道的用于胎儿 KEL 的无创预测的方法[20]，尽管这里具有更复杂的设置和更复杂的数据分析。仅 2 个引物组与母体 ABO 血清型的组合使得能够鉴定大多数临床相关的 O 和 B 等位基因，并且通过推断，可以鉴定 A 等位基因。A2 表型不是 ABO HDFN 的危险因素[29]；因此，纳入特异性扩增最常见的 A2 SNV 1061delC (rs56392308) 的一个额外引物组，以区分具有和不具有该缺失的 ABO*A 等位基因，可能是有利的。

在引物的设计中，最终选择反映了许多因素的折衷，这些因素都对设计造成了限制。最小化假扩增很重要。此外，由于细胞游离胎儿 DNA 的大小，保持扩增子短是一个优先事项，其平均大小为 143 bp [30]。由于 ABO*O 引物组的基因特异性靶区域中一个罕见遗传变异导致等位基因丢失的风险非常低（除了一个 T>C SNV，rs8176720，其距离上游引物 5'末端 3 个碱基，MAF 为 0.4），可能对扩增效率没有重大影响。对于 ABO*B 引物组，只有一些非常罕见的 SNV（除了一个 C>T SNV，rs8176745，位于下游引物的第一个 5'碱基，MAF 为 0.2962），可能没有显著影响扩增效率。

所有临床样品均来自 O 型孕妇。纳入了测试样品，以测试不同母/胎 ABO 血型组合；即使这些样品没有在稳定采血管中采集，并且仅 1 mL 用于 DNA 提取，也做出了可靠的预测。

在测试的 26 个样品中，2 个样品被归类为不可确定的，证明了预测胎儿 ABO 血型的局限性。有两个一般的限制来源：一个是由于母体基因型的干扰，模糊了相对较少的胎儿 reads，另一个是由于杂交 ABO*O/ABO*B 等位基因。样品 # 19 举例说明了一种类似于 ABO*O.01.24（具有额外的 c.220C>T 取代）的罕见母体变异的干扰，对该变异我们进行了克隆和测序。然而，这种情况是可以识别的，因为母体表型在分析之前总是已知的，因此可以防止其造成对胎儿 ABO 血型的错误预测。此外，某些 ABO*O 等位基因在此分析中无法检测到，因为它们缺少大多数 O 等位基因共有的 261delG 缺失；这些等位基因显示在表 1S 的下部。由于母体血清型总是已知的，因此在分析过程中也可以识别这些罕见情况。样本 # 23 举例说明了杂合子 ABO*B/ABO*O.01 孕妇的干扰（这种情况在 O 型孕妇中相当于 ABO*O.01/ABO*O.02 杂合子孕妇，对于 ABO*O.01/ABO*O.03 杂合子孕妇也是有效的），使得不可能预测胎儿血型。表 2S 描述了可能的母/胎基因型组合以及特定组合可能如何干扰使用当

前测定进行胎儿 ABO 基因分型。如果胎儿分数可靠且显著增加，则可以克服杂合子的局限性。

表 1S 干扰产前 ABO 检测解释的等位基因概述

携带 796C>A、803G>C（以粗体显示）的 O 等位基因。O 等位基因中 796C>A 和 803G>C 双替换使得用 B 引物检测血型 B 呈阳性：

ABO*O.01.24	106G>T; 188G>A; 189C>T; 261delG; 297A>G; 526C>G; 657 C>T; 703G>A; 796C>A; 803G>C ; 930G>A	Val36Phe; Arg63His; Thr88Profs*31
ABO*O.01.41	261delG; 297A>G; 526C>G; 657C>T; 703G>A; 796C>A; 803G>C ; 930G>A	Thr88Profs*31
ABO*O.11	297A>G; 505_507delCAG; 526C>G; 657C>T; 703G>A; 796C>A; 803G>C ; 930G>A	Gln169del; Arg176Gly; Gly235Ser; Leu266Met; Gly268Ala
ABO*O.12	297A>G; 526C>G; 563G>A; 657C>T; 703G>A; 796C>A; 803G>C ; 930G>A	Arg176Gly; Arg188His; Gly235Ser; Leu266Met; Gly268Ala

没有特征性 261delG 缺失的 O 等位基因，不包括 ABO*O.02 和 ABO*O.03 等位基因：

ABO*O.04.01	87_88insG	Val30Glyfs*27
ABO*O.05	322C>T	Gln108Ter
ABO*O.06	542G>A	Trp181Ter
ABO*O.07	467C>T; 893C>T	Pro156Leu; Ala298Val
ABO*O.08	927C>A	Tyr309Ter
ABO*O.09.01	646T>A; 681G>A; 771C>T; 829G>A	Phe216Ile; Val277Met
ABO*O.09.02	297A>G; 646T>A; 681G>A; 771C>T; 829G>A	Phe216Ile; Val277Met
ABO*O.10	66_67insG	Phe23Valfs*34
ABO*O.11	297A>G; 505_507delCAG; 526C>G; 657C>T; 703G>A; 796C>A; 803G>C; 930G>A	Gln169del; Arg176Gly; Gly235Ser; Leu266Met; Gly268Ala
ABO*O.12	297A>G; 526C>G; 563G>A; 657C>T; 703G>A; 796C>A; 803G>C; 930G>A	Arg176Gly; Arg188His; Gly235Ser; Leu266Met; Gly268Ala
ABO*O.13	452T>G	Val151Gly
ABO*O.14	635T>A	Val212Glu
ABO*O.15	793T>C	Tyr265His
ABO*O.16	106G>T; 188G>A; (203+1_204-1)_(490_?)del	?

数据来自 Erythrogene v0.8 (2017 年 11 月 27 日)，<http://www.erythrogene.com>[27]和 ABO (ISBT 001) 血型等位基因 v1.1 171023。ABO*O.01.24 的等位基因频率估计如下：千人基因组：0.82%；非洲：0.45%；美洲：1.44%；东亚：0%；欧洲：2.39%；南亚：0.1%。ABO*O.16 的等位基因频率估计如下：千人基因组：0.4%；非洲：1.29%；美洲：0.43%；东亚：0%；欧洲：0%；南亚：0%。

更详细地说，母体 ABO*O.01/ABO*O.02 的杂合性在高加索人群中具有约 3.4%的预期频率，ABO*O.01.24 等位基因（一种携带 261delG 变异并且具有 ABO*B 特异性 796C>A 和 803G>C 变异的杂交 O/B 基因）具有 2.39%的频率（表 1S）。总之，这些来源理论上是本测定无法从 O 型孕妇进

行非侵入性胎儿 ABO 预测的两个最常见原因，占约 5.8% 的病例。重要的是要注意，即使在杂交 ABO*O.01/ABO*B 基因的情况下不能确定胎儿 A 或 B 预测，也可能说明胎儿对 A 或 B 抗原呈阳性。基于这些计算，我们估计，在大约 95% 的 O 型孕妇中，我们可以确定可靠的胎儿 ABO 血型。但是，应该指出的是，在 1004 名基因分型的丹麦献血者中，未检测到 ABO*O.01.24 等位基因[16]。在大约 14000 名基因分型的丹麦献血者队列中，通过检测 261delG (rs8176719)、526G>C (rs7853989) 和 657C>T (rs8176741)，未发现与 ABO*O.01.24 或 ABO*O.01.41 相容的单倍型（数据未显示）。这可能表明 ABO*O.01.24 等位基因在丹麦献血者中很少见，因此，95% 的估计是非常保守的。但应该记住，献血人群并不能准确反映一般人群的变异。

此外，本试验未检测 FUT1（负责 H 物质的合成）变异，在胎儿 ABO 表型的预测中必须考虑到这一点，以免将误导结果提供给临床医生。

随着研究的进行，对 ABO 基因座遗传可变性的了解继续积累[20,22,25]。我们仅在 26 个样本中就发现了一个新变异，证明了这种可变性。但是，在白种人中不太可能发现新的常见 ABO 变异。

在所有 19 个可获得产后血型的样品中，胎儿 ABO 血型的预测与产后婴儿 ABO 血型一致。在本试验开发后的早期，当仅使用 FastQC 分析时，我们有一个假阴性结果。因此，我们补充了一种分析方法，将其应用于上述假阴性样本时，结果为阳性。需要使用更多样品进一步评估试验的可靠性和稳健性，例如，确定两个引物组的更低的 cutoff 值以提高预测的准确性。其他人也建立了用于预测胎儿 ABO 血型的产前检测，但该检测基于实时 PCR，73 例有 5 例假阴性结果[23]。

本试验的总体优势在于可靠、灵敏，并且可以检测胎儿 ABO 血型不确定的情况。此外，应该注意的是，本试验还提供了所研究 SNVs 的母体 ABO 基因型信息。总体弱点包括：局限于约 95% 的白种人孕妇，在技术上具有挑战性，并且解释需要一些经验。

总之，我们证明了无创胎儿 ABO 预测的临床应用。我们调查了一个小的临床队列，应该运行更多的样本来证实 cutoff 水平并进一步评估准确性。我们没有分析胎龄 10 周前的样本。我们估计可以在大约 95% 的临床样本中确定可靠的胎儿 ABO 血型。因此，可以预测临床 ABO HDFN 高风险妊娠并预先护理以预防严重发病。

参考文献

1. Doyle B, Quigley J, Lambert M, Crumlish J, Walsh C, McParland P, et al. A correlation between severe haemolytic disease of the fetus and newborn and maternal ABO blood group. *Transfus Med*. 2014 Aug;24(4):239–43.
2. Akanmu AS, Oyediji OA, Adeyemo TA, Ogbenna AA. Estimating the risk of ABO hemolytic disease of the newborn in Lagos. *J Blood Transfus*. 2015;2015:560738.
3. Li P, Pang LH, Liang HF, Chen HY, Fan XJ. Maternal IgG anti-A and anti-B titer levels screening in predicting ABO hemolytic disease of the newborn: a meta-analysis. *Fetal Pediatr Pathol*. 2015;34(6):341–50.

4. Matteocci A, De Rosa A, Buffone E, Pierelli L. Retrospective analysis of HDFN due to ABO incompatibility in a single institution over 6 years. *Transfus Med*. 2019 Jun;29(3):197–201.
5. Jain A, Malhotra S, Marwaha N, Kumar P, Sharma RR. Severe ABO hemolytic disease of fetus and newborn requiring blood exchange transfusion. *Asian J Transfus Sci*. 2018 Jul-Dec;12(2):176–9.
6. Kumar R, Saini N, Kaur P, Sood T, Kaur G, Bedi RK, et al. Severe ABO hemolytic disease of newborn with high maternal antibody titres in a direct antiglobulin test negative neonate. *Indian J Pediatr*. 2016 Jul;83(7):740–1.
7. Zonneveld R, van der Meer-Kapelle L, Sylva M, Brand A, Zijlstra M, Schonewille H. Severe fetal hemolysis and cholestasis due to high-titer maternal IgG anti-A antibodies. *Pediatrics*. 2019 Apr;143(4):e20182859.
8. Drabik-Clary K, Reddy VV, Benjamin WH, Bector FN. Severe hemolytic disease of the newborn in a group B African-American infant delivered by a group O mother. *Ann Clin Lab Sci*. 2006;36(2):205–7.
9. Goraya J, Basu S, Sodhi P, Mehta S. Unusually severe ABO hemolytic disease of newborn. *Indian J Pediatr*. 2001 Mar;68(3):285–6.
10. Bakkeheim E, Bergerud U, Schmidt-Melbye AC, Akkøk CA, Liestøl K, Fugelseth D, et al. Maternal IgG anti-A and anti-B titres predict outcome in ABO-incompatibility in the neonate. *Acta Paediatr*. 2009 Dec;98(12):1896–901.
11. Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ Jr, et al.; Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *N Engl J Med*. 2000 Jan;342(1):9–14.
12. Zimmerman R, Carpenter RJ Jr, Durig P, Mari G. Longitudinal measurement of peak systolic velocity in the fetal middle cerebral artery for monitoring pregnancies complicated by red cell alloimmunisation: a prospective multicentre trial with intention-to-treat. *BJOG*. 2002 Jul;109(7):746–52.
13. Westhoff CM. Blood group genotyping. *Blood*. 2019 Apr;133(17):1814–20.
14. Hyland CA, Roulis EV, Schoeman EM. Developments beyond blood group serology in the genomics era. *Br J Haematol*. 2019 Mar;184(6):897–911.
15. Lane WJ, Vege S, Mah HH, Lomas-Francis C, Aguad M, Smeland-Wagman R, et al.; MilSeq Project. Automated typing of red blood cell and platelet antigens from whole exome sequences. *Transfusion*. 2019 Oct;59(10):3253–63.
16. Krog GR, Rieneck K, Clausen FB, Steffensen R, Dziegiel MH. Blood group genotyping of blood donors: validation of a highly accurate routine method. *Transfusion*. 2019 Oct;59(10):3264–74.
17. van der Schoot CE, de Haas M, Clausen FB. Genotyping to prevent Rh disease: has the time come? *Curr Opin Hematol*. 2017 Nov;24(6):544–50.
18. Clausen FB. Lessons learned from the implementation of non-invasive fetal RHD screening. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018 May;18(5):423–31.
19. Yang H, Llewellyn A, Walker R, Harden M, Saramago P, Griffin S, et al. High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2019 Feb;17(1):37.
20. Rieneck K, Bak M, Jønson L, Clausen FB, Krog GR, Tommerup N, et al. Next-generation sequencing: proof of concept for antenatal prediction of the fetal Kell blood group phenotype from cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion*. 2013 Nov;53(11 Suppl 2):2892–8.
21. Wienzek-Lischka S, Krautwurst A, Fröhner V, Hackstein H, Gattenlöhner S, Bräuninger A, et al. Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a using targeted massively parallel sequencing. *Transfusion*. 2015 Jun;55(6 Pt 2):1538–44.
22. Orzińska A, Guz K, Mikula M, Kluska A, Balabas A, Ostrowski J, et al. Prediction of fetal blood group and platelet antigens from maternal plasma using next-generation sequencing. *Transfusion*. 2019 Mar;59(3):1102–7.
23. Song W, Zhou S, Shao L, Wang N, Pan L, Yu W. Non-invasive fetal ABO genotyping in maternal plasma using real-time PCR. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Nov;53(12):1943–50.

24. Möller M, Hellberg Å, Olsson ML. Thorough analysis of unorthodox ABO deletions called by the 1000 Genomes project. *Vox Sang*. 2018 Feb;113(2):185–97.
25. Möller M, Jöud M, Storry JR, Olsson ML. ErythroGene: a database for in-depth analysis of the extensive variation in 36 blood group systems in the 1000 Genomes Project. *Blood Adv*. 2016 Dec;1(3):240–9.
26. Danish Society for Fetal Medicine. Føtal anæmi og håndtering af gravide med alloimmunisering (Danish guidelines 2019). Available from: <http://www.dfms.dk/fagligt/guidelines/378-fotal-anaemi-2019.html>.
27. Ono T, Ohto H, Yasuda H, Hikichi R, Kawabata K, Minakawa K, et al. Comparative study of two automated pre-transfusion testing systems (microplate and gel column methods) with standard tube technique. *Int J Blood Transfus Immunohematol*. 2017;7:15–25.
28. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012 Aug;40(15):e115.
29. Klein HG, Anstee DJ. Mollison's blood transfusion in clinical medicine. 12th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2014.
30. Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*. 2010 Dec;2(61):61ra91.

2. 《二氧化硅微珠捕获胎儿有核红细胞，用于胎儿 ABO 基因型的无创产前检测》

作者：Lin Cheng 1 2, Xiaoyun Wei 3, Zixiang Wang 3, Chun Feng 1 2, Qing Gong 1, Yourong Fu 4, Xingzhong Zhao 3, Yuanzhen Zhang 1 2

作者单位：1 武汉大学中南医院妇产科，湖北武汉，中国。2 湖北省产前诊断与出生健康临床研究中心，湖北武汉，中国。3 武汉大学物理技术学院教育部人造微纳米结构重点实验室，湖北武汉，中国。4 武汉大学中南医院输血科，湖北武汉，中国。

摘要

新生儿 ABO 溶血病 (ABO-HDN) 可能引起新生儿黄疸和红细胞增多症，甚至死产或新生儿死亡，在中国很普遍。胎儿 ABO 血型的产前检查可以减少不必要的担忧或确保及时治疗。在这里，我们提出了一种采用高密度二氧化硅微珠 (SiO₂ MBs) 捕获母体外周血中胎儿有核红细胞 (fnRBCs) 的方法，并使用这些捕获的细胞检测了胎儿的 ABO 基因型。我们使用 SiO₂ MBs 评估了 52 名患者。在 26 例 O 型血孕妇中，8 例 (30.8%) 胎儿有 A 型血，5 例 (19.2%) 有 B 型血，13 例 (50%) 有 O 型血。在所有 27 名男性胎儿中检测到 SRY 基因。该研究代表了一种简单有效的胎儿 ABO 基因型无创产前检测方法。我们相信这种方法对于胎儿 Rh 血型和其他胎儿疾病的无创产前检测也有很大的潜力。

1 引言

新生儿溶血病（HDN）是由母胎血型特别是 Rh 和 ABO 血型不相容引起的。由于 Rh 阴性血型的女性在亚洲很少见，ABO 不相容（特别是 O 型母亲 A/B 型婴儿）引起的 HDN，称为新生儿 ABO 溶血病（ABO-HDN），是中国最常见的溶血病[1-3]。ABO-HDN 可导致新生儿黄疸和红细胞增多症，甚至死产或新生儿死亡。据报道，红细胞增多症可导致高达 15% 的死产，新生儿黄疸导致智力低下和脑瘫[4]。ABO-HDN 可通过新生儿期光疗、静脉注射免疫球蛋白或换血治疗[5,6]。然而，妊娠期母胎 ABO 不相容可能引起焦虑或因宫内和产时治疗给孕妇带来经济负担。因此，产前检测胎儿 ABO 血型具有重要意义。

侵入性产前诊断技术，例如羊膜穿刺术（AC）和绒毛膜绒毛取样（CVS）是获得胎儿细胞和测试胎儿 ABO 血型的常规方法。然而，由于感染和流产的风险，孕妇或其家属不容易接受这些手术[7,8]。产前检测母体血液中抗 A/B IgG 抗体的滴度广泛用于临床。然而，环境中 A/B 抗原的存在可能刺激母体细胞产生抗 A/B IgG 抗体，这使得该方法的可靠性仍存在争议[9,10]。母体外周血中的胎儿物质，如细胞游离胎儿 DNA（cffDNA）、细胞游离胎儿 RNA（cffRNA）、胎儿有核红细胞（fnRBCs）等，使得无创产前检测胎儿 ABO 血型成为可能。与广泛用于胎儿染色体非整倍体（如 21 三体、13 三体和 18 三体）无创产前检测的 cffDNA 相比[11,12]，fnRBCs 不受限制性胎盘嵌合（CPM）影响[12-14]。此外，fnRBCs 来源于胎儿，它们具有完整的胎儿遗传物质。因此，fnRBCs 被认为在非侵入性产前诊断的细胞中具有最大的潜力。这种类型的细胞已被用于产前非侵入性诊断胎儿的染色体非整倍性和微缺失综合征[15-18]。

由于母体血液中的 fnRBCs 数量有限，因此已经进行了许多尝试来捕获这些细胞。密度梯度离心（DGC）是从母体血细胞中分离 fnRBCs 的最早方法。然而，低纯度限制了 DGC 的临床应用。荧光激活细胞分选（FACS）和磁激活细胞分选（MACS）也已用于捕获母体血液中的 fnRBCs。然而，复杂的操作限制了广泛的研究。近年来，许多方法如微流控芯片已被用于捕获循环肿瘤细胞（CTCs）和 fnRBCs。Zhang 等使用具有双层人字形结构的三维微流控芯片来捕获和释放 CTCs [19]。Chen 等采用 DNA 片段辅助微流控芯片捕获和释放 CTCs [20]。Byeon 等将微流控芯片和免疫磁性纳米珠结合起来，反向富集 fnRBCs [21]。然而，由于血液中大量的 WBCs，使用免疫磁性纳米珠很难去除全部 WBCs，这也可能导致免疫磁性纳米珠和抗体的浪费。Huang 等开发了一种微流控芯片，用于从血液中捕获 fnRBCs，结合了 fnRBCs 的大小和磁性[22]。然而，这种方法仍然导致血液最终细胞产物的纯度低。Lee 等使用含有横流过滤装置的微流控芯片来分离 fnRBCs，其可以分离 74% 的胎儿细胞；但 53.5% 的母体红细胞仍然存在[23]。Mohamed 等使用由微柱组成的微流控芯片从血液分离

fnRBCs [24]。然而，仅使用基于尺寸的方法很难将 fnRBCs 与 WBCs 分离，并且芯片很容易堵塞。除此之外，用于单细胞分析的微流控装置还有几个缺点，一些会导致细胞损伤，一些难以实施生物测定[25]。Wei 等采用明胶纳米粒子涂层人字形微流控芯片捕获 fnRBCs [26]。然而，释放过程浪费了许多细胞，并且难以回收 fnRBCs 用于血型分析。同时，已经开发了许多纳米技术来捕获 fnRBCs。He 等开发了一种生物相容性羟基磷灰石/壳聚糖纳米结构来捕获 fnRBCs，但捕获的细胞不能从羟基磷灰石/壳聚糖纳米结构中释放出来[17]。Wei 等使用明胶包被的微球从全血中分离 fnRBCs，无需任何血液预处理[15]。然而，在没有血液预处理的情况下，仍然存在许多母体红细胞，并且全血的血脂可能引起微球和细胞的凝聚。

在此，我们开发了一种低成本、易于操作的基于二氧化硅微珠的技术，用于捕获母体外周血中的 fnRBCs。如图 1 所示，首先用链霉抗生物素蛋白完全修饰直径 $30\ \mu\text{m}$ 密度 $2.0\ \text{g/mL}$ 的二氧化硅微珠 ($\text{SiO}_2\text{-MBs}$) [27,28]，然后与生物素化的抗 CD147 抗体缀合[15-17,26]，从母体血液中特异性捕获 fnRBCs。细胞捕获后，使用 Percoll 分离溶液($1.13\ \text{g/mL}$)作为密度选择性沉降，从白细胞(WBCs, $1.07\text{-}1.09\ \text{g/mL}$)中纯化细胞附着的 MBs ($>1.13\ \text{g/mL}$)。结果显示免疫二氧化硅珠有效捕获细胞混合物中的 fnRBCs，并在 percoll 溶液中快速下沉，从而快速高通量分离 fnRBCs。此外，回收的 fnRBCs 成功应用于下游胎儿 ABO 血型检测。本方法可能具有基于细胞的非侵入性产前检测的显著潜力。

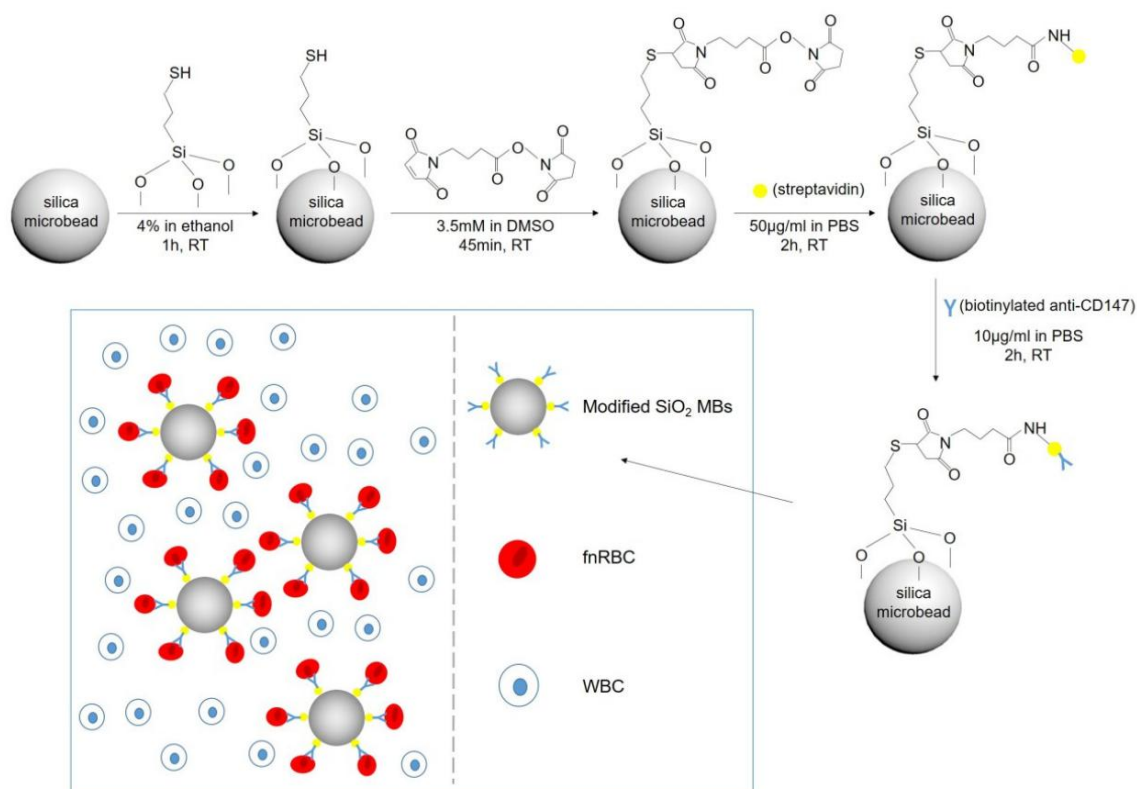


图 1 MB 合成和捕获过程示意图

2 材料和方法

2.1 材料

固体二氧化硅微珠购自苏州知益微球科技有限公司。无水乙醇和二甲基亚砷（DMSO）购自国药集团化学试剂公司。3-巯基丙基三甲氧基硅烷（MPTMS）、N-(4-马来酰亚胺氧化丁酰)-琥珀酰亚胺酯（GMBS）、多聚甲醛（PFA）、Triton X-100、牛血清白蛋白（BSA）、甲醛溶液、4,6-二脒基-2-苯基吡啶（DAPI）购自 Sigma-Aldrich。生物素化的抗 CD147 购自 R&D Systems。P-藻红蛋白（PE）标记的抗胎儿血红蛋白 ϵ （抗 ϵ -HbF）抗体、异硫氰酸荧光素（FITC）标记的抗 CD71 抗体和 FITC 标记的生物素购自 BD Biosciences。链霉抗生物素蛋白（SA）购自 Invitrogen。磷酸盐缓冲盐水（PBS）购自 HyClone。淋巴细胞分离培养基（LSM）购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。TIANamp 基因组 DNA 试剂盒、2 $\times$ Taq PCR MasterMix 和 50bp DNA ladder 购自天根生化科技有限公司。TAE（50 $\times$ ）和 Percoll 分离溶液购自 Biosharp。核酸染料购自上海赛百盛基因技术有限公司。单克隆抗 A 和抗 B 抗血清购自长春生物制品研究有限责任公司。

人红白血病细胞系（TF-1）购自 ATCC 公司。这些细胞在补充有 10%胎牛血清（FBS）的 Roswell Park Memorial Institute-1640（RPMI-1640）培养基中在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的潮湿培养箱中生长。单胎且胎龄在 12 至 19 周之间的孕妇被招募为我们的试验对象。对于每个个体，将 4mL 外周血储存在抗凝管（EDTA K2，2ml，武汉致远医疗科技有限公司）中。对这些孕妇进行随访直至分娩。对于每个新生儿，将 1mL 脐带血储存在同样的抗凝管中。所有血样均保存在 4 $^{\circ}$ C，24 小时内处理。

2.2 SiO₂ MBs 表面修饰

首先将二氧化硅微珠在室温（RT）下浸入 MPTMS（4%无水乙醇）中 1 小时。用乙醇洗涤 3 次以除去未结合的 MPTMS 后，加入 GMBS 溶液（在 DMSO 中 3.5mM）并反应 45 分钟。用 DMSO 和 PBS 洗涤以除去多余的 GMBS 后，将二氧化硅微珠在室温下浸入链霉抗生物素蛋白（SA，50 μ g/mL，在 PBS 中）2 小时，以使 SA 固定在 MBs 的表面上。FITC 标记的生物素用于模拟抗 CD147 抗体，以确认抗 CD147 抗体成功缀合到 MBs 上。将 MBs 用抗生物素-FITC（PBS 中 50 μ g/mL）染色 2 小时，然后用 PBS 洗涤 3 次以除去多余的生物素。随后，使用 IX81 倒置系统显微镜（日本 Olympus）观察荧光。

2.3 fnRBC 捕获程序

将 SA 修饰的 MB 用 PBS 洗涤 3 次以除去多余 SA。然后，将 MB 与生物素化的抗 CD147 抗体

(PBS 中 $10 \mu\text{g/mL}$) 室温摇床 (Crystal Silent Shake) 孵育 2 小时，以制备抗体修饰的微珠。孕妇外周血样品与 PBS 1:1 混合。然后，将混合血液加到淋巴细胞分离培养基 (LSM) 的表面。将试管在室温下以 1500rpm 离心 30 分钟，以将液体分成四层。fnRBCs 位于第二层，其中包括单核细胞，如 WBC。在室温下以 1500rpm 再离心 10 分钟后，将这些细胞加入 1mL PBS 中用于捕获过程。之前，用 PBS 洗涤抗体修饰的 MB，以除去未结合的抗 CD147 抗体。加入悬浮液，然后将试管室温摇床放置 1 小时，以将悬浮液与 MB 完全混合。接下来，用 percoll 分离溶液和 PBS 洗涤 SiO_2 MB，以除去非靶细胞。最后，使用扫描电子显微镜 (SEM, S-570, 日本) 观察细胞捕获的 MB 的表面形态。

2.4 扫描电子显微镜检

用 MBs 捕获的细胞在 4°C 下用 2.5% 戊二醛固定 1 小时。然后，用 PBS 洗涤细胞 3 次以除去过量的戊二醛溶液。之后，使用 1% 锇酸将细胞固定在微珠上 1 小时，然后用 PBS 洗涤细胞 3 次。洗涤后，使用 30%、50%、70%、80%、90% 和 100% 乙醇脱水 5 分钟，每次脱水后进行 CO_2 临界点干燥和真空喷雾。最后，将细胞置于扫描电子显微镜下观察和照相。

2.5 fnRBC 免疫荧光染色

捕获程序后，附着于 MB 的细胞在室温下用 PFA (PBS 中 4%) 固定 10 分钟。然后，用 PBS 洗涤细胞 3 次。之后，将 MB 上的细胞与 Triton X-100 (PBS 中 1%) 一起室温下温育 10 分钟以增强穿透性。在室温下用牛血清白蛋白 (BSA, PBS 中 3%) 封闭细胞 30 分钟。随后，加入抗 ϵ -HbF-PE ($10 \mu\text{g/mL}$) 和抗 CD71-FITC ($10 \mu\text{g/mL}$)，黑暗中室温孵育 2 小时，加入 DAPI ($0.1 \mu\text{g/mL}$)，黑暗中再孵育 10 分钟，以染色细胞核。最后，在 IX81 倒置系统显微镜下观察免疫荧光。

2.6 DNA 提取

使用 TIANamp 基因组 DNA 试剂盒从捕获的细胞和脐带血细胞中提取 DNA。根据说明书进行 DNA 提取。然后，用 NanoDrop 2000 分光光度计 (美国 Thermo Scientific) 定量 DNA。

2.7 检测 ABO 血型 and SRY 基因

用于 $\text{A}^{1/2}\text{B}^{1/2}$ 基因分型和对照-人生长激素 (C-hgh) 的引物和扩增产物长度如表 S1 所示[29]。此外，使用血清学方法检测新生儿 ABO 血型以确认 ABO 表型。对于男性胎儿，使用 PCR 测试 SRY 基因以确认 ABO 基因型来自胎儿。SRY 基因引物序列如下：F 5'-CAGTCCAGCTGTGCAAGAGA-3'

和 R 5'-GAGTACCGAAGCGGGATCTG-3'。PCR 扩增产物为 407bp。PCR 在 96 孔 Veriti 热循环仪 (Applied Biosystems) 中进行。PCR 条件包括 95℃ 预热 10 min, 95℃ 30 s, 61℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 30 s 扩增 40 个循环, 72℃ 最终延伸 7 分钟。PCR 扩增产物 4℃ 冷却, 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 分钟, 50bp ladder 作为对照。然后, 在凝胶成像系统 (Tanon 1600) 下观察结果。

表 S1 用于检测 A^{1,2}B O^{1,2} 基因型的引物

等位基因	引物名称	引物序列	产物(bp)
O¹	O ¹ -f	5'-TTAAGTGGAAGGATGTCCTCGTCGTA-3'	139
	nonO ¹ -f	5'-TAAGTGGAAGGATGTCCTCGTCGTG-3'	137
	all-r	5'-ATATATATGGCAAACACAGTTAACCCAATG-3'	
O²	O ² -f	5'-TCGACCCCCCGAAGAAGCT-3'	194
	nonO ² -f	5'-CGACCCCCCGAAGAAGCC-3'	193
	all-r	5'-AGTGGACGTGGACATGGAGTTCC-3'	
B	B-f	5'-ATCGACCCCCCGAAGAGCG-3'	195
	nonB-f	5'-CCGACCCCCCGAAGAGCC-3'	194
	all-r	5'-AGTGGACGTGGACATGGAGTTCC-3'	
A²	A ² -f	5'-GAGGCGGTCCGGAAGCG-3'	169
	nonA ² -f	5'-GAGGCGGTCCGGAACACG-3'	170
	all-r	5'-GGGTGTGATTGAGGTGGGGAC-3'	
	C-hgh-f	5'-TGCCCTCCCAACCATTCCTTA-3'	434
	C-hgh-r	5'-CCACTCACGGATTCTGTTGTTGTGTTTC-3'	

注意 “f” (=正向) 和 “r” (=反向)。每组的 “all” 是非特异性的, 与其他两个等位基因特异性引物之一一起用于两个独立的 PCR 反应中。C-hgh 引物用于每个 PCR 反应中的阳性扩增对照。

3 结果与讨论

3.1 修饰后 SiO₂ MBs 的表征和优化

为了确认抗 CD147 抗体与 SiO₂ MB 的缀合, 将 FITC 标记的抗生物素与 SA 修饰的 SiO₂ MB 混合。与 SA 未修饰的 SiO₂ MB 相比, SA 修饰的 SiO₂ MB 在 IX81 倒置系统荧光显微镜下显示绿色荧光, 表明抗 CD147 可成功粘附于 SA 修饰的 MB (图 2A 和 2B)。使用 Image-Pro Plus (IPP) 软件 (美国 Media Cybernetics) 定量有和无 SA 修饰的 MB 的荧光强度, 以确认抗体与微珠的缀合 (图 S1)。如图 S1 所示, SA 修饰的 MB 的荧光强度显著高于未修饰的 MB (P<0.05)。

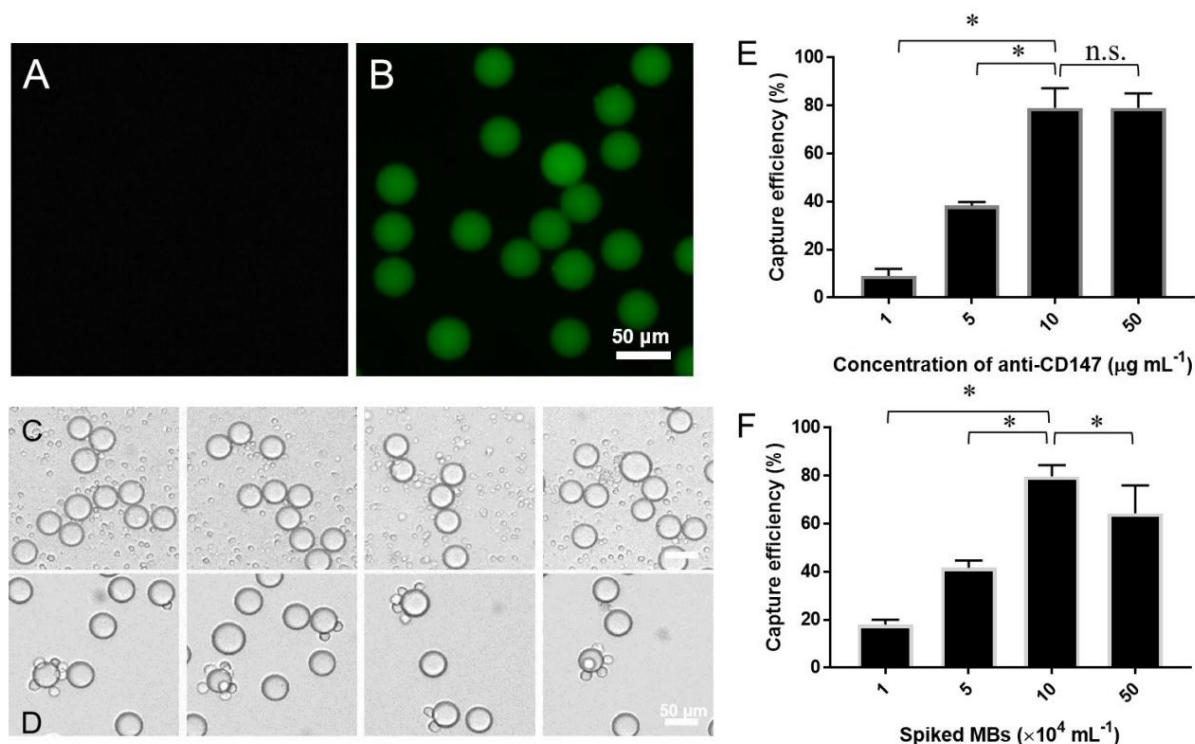


图 2 (A) 和 (B)：SA 未修饰的 MB 和 SA 修饰的 MB 的荧光图像。(C) 和 (D)：用 percoll 溶液洗涤以除去非靶细胞。(E) 和 (F)：基于细胞捕获效率优化 SiO_2 MB。(* $P < 0.05$, n.s. $P > 0.05$)

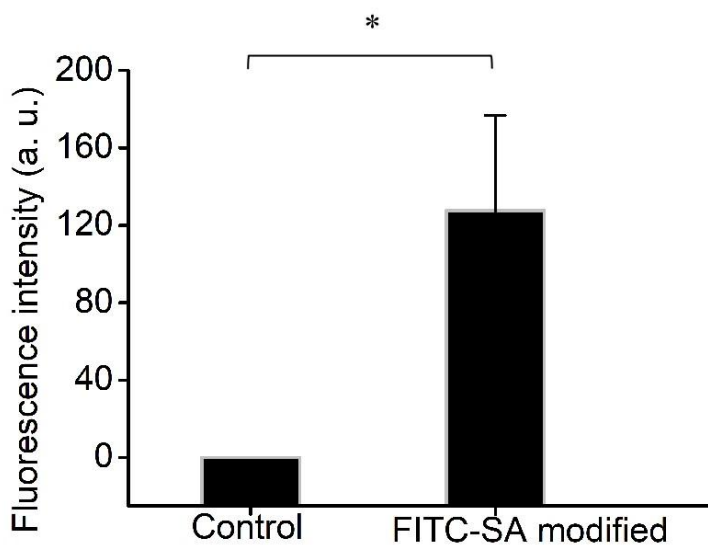


图 S1 有和无 SA 修饰的 MB 的荧光强度 (* $P < 0.05$)

3.2 基于 SiO_2 MBs 的细胞捕获

为了获得有效结合珠子的靶细胞，我们建立了密度选择性溶液，从未附着的细胞中纯化细胞附着的 MB ($> 1.13 \text{ g/mL}$)。使用直径 $30 \mu\text{m}$ 密度 2.0 g/mL 的 SiO_2 MB 来最大化密度变化。用 percoll

溶液洗涤后，除去非靶细胞（图 2C 和 2D）。

为了优化母体血液细胞捕获性能，我们使用 CD147 阳性细胞系（TF-1）来优化实验条件。首先，我们测试了抗 CD147 抗体的浓度，范围从 $1\mu\text{g/mL}$ 到 $50\mu\text{g/mL}$ 。如图 2E 所示，浓度为 $10\mu\text{g/mL}$ 时，捕获产率达到饱和。该优化浓度（ $10\mu\text{g/mL}$ ）具有更高的捕获效率。然后，我们测试了 SiO_2 MBs 的数量。采用不同数量的 MB 捕获 TF-1 细胞以确保 MB 数量最佳。如图 2F 所示，捕获产率随珠数量增加而增加，直到 MB 的量达到约 $10 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 。然后，随着 MB 数量的增加，捕获效率下降。原因可能是随着 MB 量的进一步增加，MB 的运动性降低，与细胞的接触面积减小；因此，捕获效率相应降低[30]。

3.3 fnRBCs 的识别和计数

使用优化的 MB，我们捕获了母体血液中的 fnRBCs。在 SEM 下观察 1 个细胞捕获的 MB 的表面形态（图 3A）。研究表明，CD71、 ϵ -HbF 和其他抗原存在于 fnRBCs 的表面和内部[31,32]。为了鉴定母体血液中捕获的细胞是 fnRBCs，我们使用抗 CD71、抗 ϵ -HbF 和 DAPI 抗体进行三色荧光染色，分别定位细胞膜、细胞质和细胞核。用 IX81 荧光显微镜进行细胞成像。图 3B 显示了在荧光显微镜下使用 SiO_2 MB 从母体外周血捕获的 fnRBCs。同时，在妊娠 12-20 周时从母体外周血中捕获 fnRBCs，并通过免疫荧光染色计数 fnRBCs。图 3C 显示了不同孕周的母体血液中 fnRBCs 的量。结果，母体血液中 fnRBCs 的量在每毫升 42 至 93 之间变化。从这些母体血液样品中捕获的 fnRBCs 的量均值为每毫升 53。细胞数量在妊娠 17-18 周达到峰值，这与之前的报道一致[15,16]。

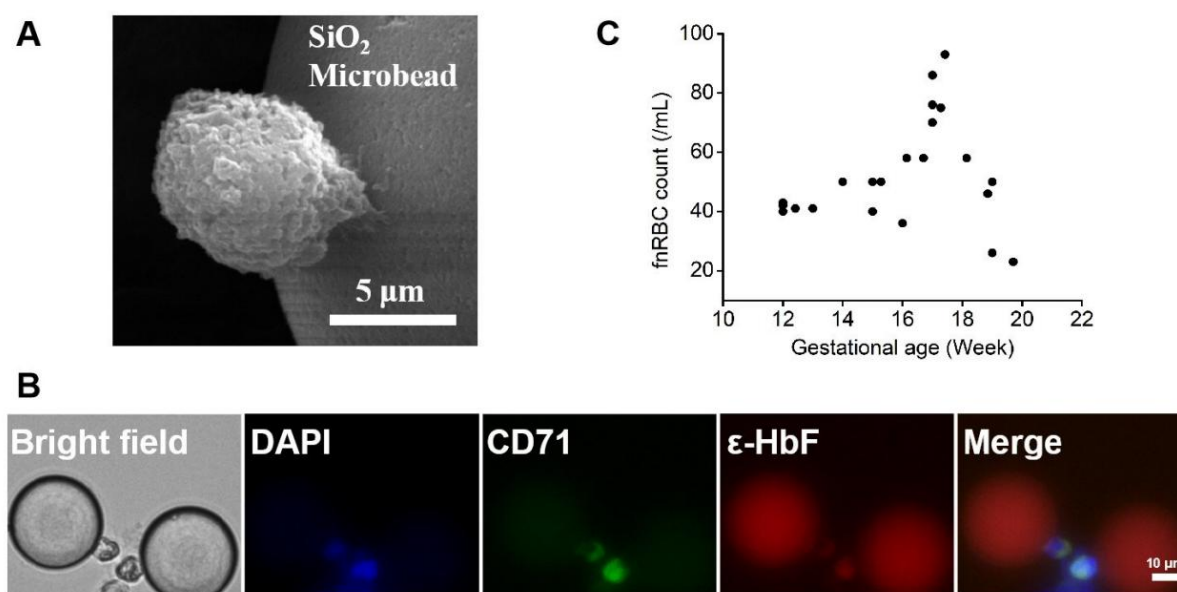


图 3 (A) 捕获一个靶细胞的 SiO_2 MB 的 SEM 图像。(B) 使用三色荧光染色鉴定从母体外周血分

离的 fnRBCs。(C) 不同孕周母体血液中 fnRBCs 的量。

3.4 ABO 基因型和表型的结果

一方面，可以在产前从 fnRBCs 提取 DNA 非侵入性地测试胎儿的 ABO 基因型。另一方面，可以进一步证实捕获的细胞来自胎儿。人类的 ABO 基因位于 9 号染色体的长臂上[33,34]。序列特异性引物聚合酶链反应 (PCR-SSP) 已被证明是区分 ABO 等位基因如 O¹、O²、A¹、A² 和 B 的快速有效方法[29]。我们使用 PCR-SSP 测试胎儿和新生儿的 ABO 基因型。PCR-SSP 的原理是从外显子或内含子具有特定碱基取代的 ABO 基因设计特异性引物，然后扩增 DNA 片段以检测 ABO 基因型及其亚型[29]。ABO 基因型的 PCR-SSP 结果显示在表 S2 中。图 4A 显示了胎儿和新生儿的 ABO 基因型 (O¹A¹、O¹B、O¹O¹ 和 A¹B 基因型)。图 4B 显示了男性胎儿的 SRY 基因。52 个样品的结果如表 S3 所示。在 26 例 O 型血孕妇中，8 例 (30.8%) 胎儿有 A 型血，5 例 (19.2%) 有 B 型血，13 例 (50.0%) 有 O 型血。PCR-SSP 成功检测到所有 ABO 基因型，且新生儿和胎儿的基因型一致。然而，有一个样本的血清学结果不同于 PCR-SSP (胎儿和新生儿的 ABO 基因型是 O¹A，而新生儿的 ABO 血型是 O 表型)。ABO 抗原可在 5-6 周内胎儿红细胞表面检测到；然而，它们的表达量仅有成人的 25%-50%，ABO 抗原直到出生后 18 个月才绝对表达。对于这个样本，我们认为与新生儿血细胞的弱 ABO 抗原有关[35]。总之，ABO 基因型检测比血清学检测更准确。在 27 名男性胎儿中，检测到所有 SRY 基因。

表 S2 PCR-SSP 检测 A^{1,2}B O^{1,2} 基因型

	O ¹	non O ¹	O ²	non O ²	B	non B	A ²	non A ²	基因型	表型
O ¹ (+)	+	-	-	+	-	+	-	+	O ¹ O ¹	O
	+	+	+	+	-	+	-	+	O ¹ O ²	O
	+	+	-	+	+	+	-	+	O ¹ B	B
	+	+	-	+	-	+	-	+	O ¹ A ¹	A
	+	+	-	+	-	+	+	+	O ¹ A ²	A
O ² (+)	-	+	+	-	-	+	-	+	O ² O ²	O
	-	+	+	+	+	-	-	+	O ² B	B
	-	+	+	+	-	+	-	+	O ² A ¹	A
	-	+	+	+	-	+	+	+	O ² A ²	A
B (+)	-	+	-	+	+	-	-	+	BB	B
	-	+	-	+	+	+	-	+	BA ¹	AB
	-	+	-	+	+	+	+	+	BA ²	AB
A ² (+)	-	+	-	+	-	+	+	+	A ² A ¹	A
	-	+	-	+	-	+	+	-	A ² A ²	A
All "non" (+)	-	+	-	+	-	+	-	+	A ¹ A ¹	A

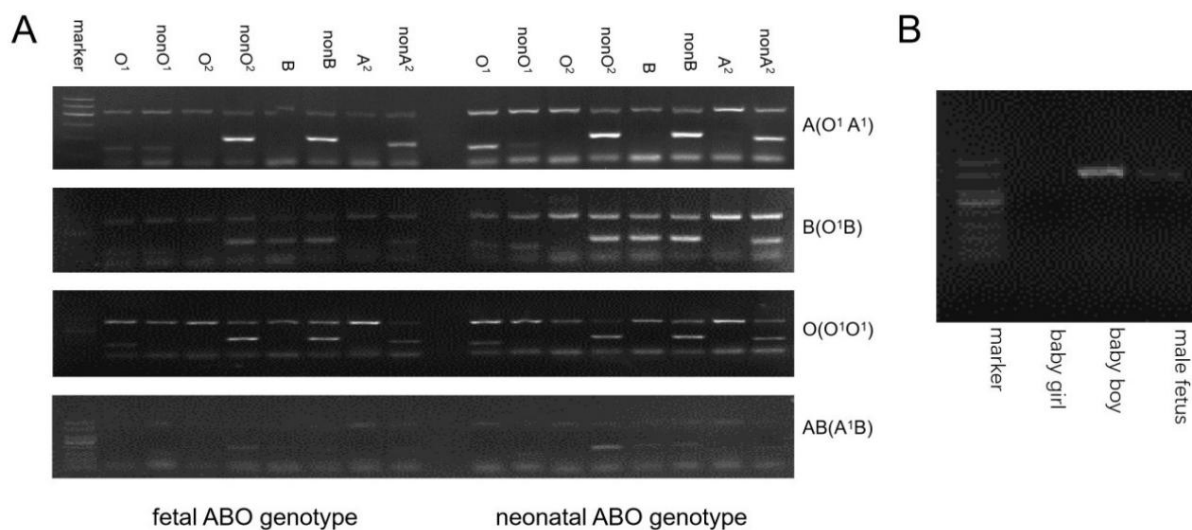


图 4 使用 PCR-SSP 检测 ABO 基因型和 SRY 基因。（A）胎儿和新生儿的 ABO 基因型。（B）1 例女性婴儿、1 例男性婴儿和 1 例男性胎儿的 SRY 基因。

表 S3 52 例样本结果

NO.	妊娠周	孕妇 ABO 血型	胎儿 ABO 基因型	新生儿 ABO 基因型	新生儿 ABO 血型	新生儿 性别
1	16+5	O	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	O	女
2	18+6	A	A ¹ B	A ¹ B	AB	男
3	18+2	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	女
4	16+1	A	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	女
5	17+4	O	O ¹ B	O ¹ B	B	男
6	18+5	O	O ¹ B	O ¹ B	B	女
7	18	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	男
8	17+5	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	女
9	16+1	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	女
10	16+5	O	O ¹ B	O ¹ B	B	女
11	13	A	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	女
12	16+3	A	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	女
13	17+4	O	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	男
14	18	A	O ¹ B	O ¹ B	B	女
15	16+6	AB	O ¹ B	O ¹ B	B	男
16	17+1	B	O ¹ B	O ¹ B	B	男
17	16+3	B	O ¹ B	O ¹ B	B	男
18	16	A	A ¹ B	A ¹ B	AB	女
19	17+1	A	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	男
20	17+3	O	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	男
21	16+6	O	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	女
22	17+3	A	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	女

23	16+2	O	O ¹ B	O ¹ B	B	男
24	12+4	A	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	女
25	12+3	A	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	男
26	16+3	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	女
27	16+1	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	女
28	16+3	A	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	男
29	16+1	B	O ¹ B	O ¹ B	B	女
30	12+4	B	O ¹ B	O ¹ B	B	女
31	17+4	AB	O ¹ B	O ¹ B	B	男
32	13+1	B	O ¹ B	O ¹ B	B	女
33	17	O	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	男
34	17+3	O	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	男
35	16	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	男
36	17	A	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	女
37	16+6	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	男
38	16+3	A	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	男
39	19	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	女
40	16+4	B	O ¹ B	O ¹ B	B	女
41	16+6	A	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	男
42	17+6	A	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	女
43	16+2	O	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	男
44	16+5	B	O ¹ B	O ¹ B	B	男
45	12+6	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	男
46	15+4	A	A ¹ B	A ¹ B	AB	女
47	15+5	A	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	男
48	18+1	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	女
49	12+4	O	O ¹ B	O ¹ B	B	男
50	15+6	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	男
51	17	O	O ¹ O ¹	O ¹ O ¹	O	男
52	16+4	O	O ¹ A ¹	O ¹ A ¹	A	男

4 结束语

在这项研究中，我们使用修饰的二氧化硅微珠捕获胎儿有核红细胞。之后，用非侵入性方法在产前测试胎儿 ABO 基因型。告知母亲其胎儿具有相同的 ABO 血型，可以减轻心理压力和经济压力。对于具有与母亲不同的 ABO 血型的胎儿，为了确保婴儿的安全，有必要确保密切随访和合格的分娩和产后期准备。我们相信这种捕获方法由于其低成本和易于操作而具有很大的潜力，也可用于胎儿 Rh 血型和其他胎儿异常的无创产前检测。

参考文献

1. Lin, Z. X., Dong, Q. S., Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2014, 22, 1432-1434.

2. Matteocci, A., De Rosa, A., Buffone, E., Pierelli, L., *Transfus. Med.* 2018, 29, 197-201.
3. Ma, X., Chen, F. Z., Hong, Q., *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2019, 27, 192-196.
4. Izetbegovic, S., *Mater. Sociomed.* 2013, 25, 255-258.
5. Bhat, Y. R., Kumar, C. G., *Paediatr. Int. Child Health* 2012, 32, 93-96.
6. Sharma, D. C., Rai, S., Mehra, A., Kaur, M. M., Sao, S., Gaur, A., Sapra, R., *Asian J. Transfus. Sci.* 2007, 1, 56-58.
7. Beta, J., Lesmes-Heredia, C., Bedetti, C., Akolekar, R., Minerva. *Ginecol.* 2018, 70, 215-219.
8. Malan, V., Bussière, L., Winer, N., Jais, J. P., Baptiste, A., Le Lorc'h, M., Elie, C., O'Gorman, N., Fries, N., Houfflin-Debarge, V., Sentilhes, L., Vekemans, M., Ville, Y., Salomon, L. J., *JAMA* 2018, 320, 557-565.
9. Li, P., Pang, L. H., Liang, H. F., Chen, H. Y., Fan, X. J., *Fetal Pediatr. Pathol.* 2015, 34, 341-350.
10. Zhu, W. Y., Li, H. X., Liang, Y., *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2014, 41, 28-31.
11. Benachi, A., Letourneau, A., Kleinfinger, P., Senat, M. V., Gautier, E., Favre, R., Bidat, L., Houfflin-Debarge, V., Querol, V., Bouyer, J., Costa, J. M., *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* 2016, 45, 633-640.
12. Du, E., Feng, C., Cao, Y., Yao, Y., Lu, J., Zhang, Y., *Twin Res. Hum. Genet.* 2017, 20, 242-249.
13. Grati, F. R., Bajaj, K., Zanatta, V., Malvestiti, F., Malvestiti, B., Marcato, L., Grimi, B., Maggi, F., Simoni, G., Gross, S. J., Ferreira, J., *Prenat. Diagn.* 2017, 37, 1017-1027.
14. Mardy, A., Wapner, R. J., *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 2016, 172, 118-122.
15. Wei, X., Ao, Z., Cheng, L., He, Z., Huang, Q., Cai, B., Rao, L., Meng, Q., Wang, Z., Sun, Y., Liu, W., Zhang, Y., Guo, S., Guo, F., Zhao, X. Z., *Nanotechnology* 2018, 29, 434001.
16. Feng, C., He, Z., Cai, B., Peng, J., Song, J., Yu, X., Sun, Y., Yuan, J., Zhao, X., Zhang, Y., *Theranostics* 2018, 8, 1301-1311.
17. He, Z., Guo, F., Feng, C., Cai, B., Lata, J. P., He, R., Huang, Q., Yu, X., Rao, L., Liu, H., Guo, S., Liu, W., Zhang, Y., Huang, T. J., Zhao, X., *J. Mater. Chem. B* 2017, 5, 226-235.
18. Huang, C. E., Ma, G. C., Jou, H. J., Lin, W. H., Lee, D. J., Lin, Y. S., Ginsberg, N. A., Chen, H. F., Chang, F. M., Chen, M., *Mol. Cytogenet.* 2017, 10, 44.
19. Zhang, L., Xu, Z., Kang, Y., Xue, P., *Electrophoresis* 2018, 39, 1452-1459.
20. Chen, D., Wen, J., Zeng, S., Ma, H., *Electrophoresis* 2019, 40, 2845-2852.
21. Byeon, Y., Ki, C. S., Han, K. H., *Biomed. Microdevices* 2015, 17, 118.
22. Huang, R., Barber, T. A., Schmidt, M. A., Tompkins, R. G., Toner, M., Bianchi, D. W., Kapur, R., Flejter, W. L., *Prenat. Diagn.* 2008, 28, 892-899.
23. Lee, D., Sukumar, P., Mahyuddin, A., Choolani, M., Xu, G., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 1862-1866.
24. Mohamed, H., Turner, J. N., Caggana, M., *J. Chromatogr. A* 2007, 1162, 187-192.
25. Sun, Y., Cai, B., Wei, X., Wang, Z., Rao, L., Meng, Q. F., Liao, Q., Liu, W., Guo, S., Zhao, X., *Electrophoresis* 2019, 40, 961-968.
26. Wei, X., Cai, B., Chen, K., Cheng, L., Zhu, Y., Wang, Z., Sun, Y., Liu, W., Guo, S. S., Zhang, Y., Zhao, X. Z., *Sens. Actuators B* 2019, 281, 131-138.
27. Yin, H., Wang, H., Jiang, W., Zhou, Y., Ai, S., *Biosens. Bioelectron.* 2017, 90, 494-500.
28. Gajos, K., Petrou, P., Budkowski, A., Awsiuk, K., Bernasik, A., Misiakos, K., Rysz, J., Raptis, I., Kakabakos, S., *Analyst* 2015, 140, 1127-1139.
29. Gassner, C., Schmarda, A., Nussbaumer, W., Schönlitz, D., *Blood* 1996, 88, 1852-1856.
30. Liu, H., Ao, Z., Cai, B., Shu, X., Chen, K., Rao, L., Luo, C., Wang, F. B., Liu, W., Bondesson, M., *Nano Futures* 2018, 2, 025004.
31. Pongsritasana, T., Wongratanacheewin, S., Prasertcharoensuk, V., Sermswan, R. W., *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2006, 24, 65-71.
32. Parano, E., Falcidia, E., Grillo, A., Pavone, P., Cutuli, N., Takabayashi, H., Trifiletti, R. R., Gilliam, C. T., *Am. J. Med.*

- Genet. 2001, 101, 262-267.
33. Bennett, E. P., Steffensen, R., Clausen, H., Weghuis, D. O., Van Lessel, A. G., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, 206, 318-325.
34. Su, Y., Kong, G. L., Su, Y. L., Zhou, Y., Lv, L. F., Wang, Q., Huang, B. P., Zheng, R. Z., Li, Q. Z., Yuan, H. J., Zhao, Z. G., Exp. Ther. Med. 2015, 9, 2325-2330.
35. Huang, Y., Lin, J., Zhu, S., Med. Sci. Monit. 2015, 21, 2781-2785.

3.《使用实时 PCR 对母体血浆进行非侵入性胎儿 ABO 基因分型》

作者：Wenqian Song, Shihang Zhou, Linnan Shao, Ni Wang, Lingzi Pan, Weijian Yu

作者单位：大连市血液中心

摘要

背景：胎-母 ABO 不相容是胎儿和新生儿溶血病（HDFN）的常见原因。母体 IgG 抗体水平的常规血清学测试用于预测 HDFN 显示低可靠性。非侵入性胎儿 ABO 基因分型可为妊娠早期预测 ABO-HDFN 提供新途径。本研究的目的是通过实时 PCR 研究母体血浆中胎儿 ABO 基因分型的可行性。

方法：从妊娠 12 至 25 周的总共 73 名 O 血型孕妇中收集血浆样品，然后从含有细胞游离胎儿 DNA（cffDNA）的母体血浆中提取 DNA。在甲基化敏感的限制酶后进行基于 TaqMan 的实时 PCR，以检测母体血浆中胎儿来源的高甲基化 RASSF1A 序列。使用等位基因特异性引物通过基于 SYBR 的实时 PCR 确定胎儿 ABO 基因型。通过新生儿的血型血清学结果评估胎儿 ABO 基因分型的性能。

结果：在所有 73 个血浆样品中均可检测到胎儿 RASSF1A 序列，这证实了 cffDNA 的成功提取。胎儿 ABO 基因分型的诊断准确率为 93.2%，其中胎儿基因型 OO, OA 和 OB 的准确率分别为 100%, 83.3%和 96.8%。

结论：我们开发了一种使用实时 PCR 快速可靠的母体血浆胎儿 ABO 基因分型方案。该方案适用于 HDFN 的常规产前诊断和法医分析。

1 引言

胎儿和新生儿溶血病（HDFN）是新生儿黄疸和贫血的常见原因。母体 IgG 抗体可穿过胎盘，附着于胎儿红细胞上的对应抗原，刺激免疫反应，引起红细胞破坏，导致出生后胎儿贫血和高胆红素血症[1]。ABO-HDFN 经常发生在怀有 A 或 B 血型胎儿的 O 血型孕妇。母体 IgG 抗 A 或 B 抗体可以靶向抗原 A 或 B 阳性胎儿红细胞，然后导致胎儿溶血。据报道，轻度 ABO-HDFN 发生率是 150

例新生儿中约有 1 例，轻度 ABO-HDFN 的新生儿通常通过光疗进行治疗。重度 ABO-HDFN 发生率是 3000 例新生儿中约有 1 例，重度 ABO-HDFN 的新生儿可能需要像重度 RhD-HDFN 的新生儿一样进行换血[2]。目前，孕妇通常采用血型 and 红细胞抗体的产前血清学检测来预测 HDFN。然而，血清学检测显示可靠性低，特别是对于胎-母 ABO 不相容。相比之下，怀孕期间的胎儿血型基因分型对于预防和治疗 HDFN 更可靠和有用。

常规胎儿基因分型需要侵入性收集胎儿细胞，如绒毛膜绒毛取样、羊膜穿刺术等。自从 Lo 等在 20 世纪 90 年代在母体血浆中发现循环胎儿 DNA 以来，已经发表了许多关于非侵入性产前诊断的研究[3]。母体血浆中的细胞游离胎儿 DNA (cffDNA) 来源于通过胎盘的滋养层细胞，经历细胞凋亡，将 DNA 释放到母体循环中[4]。已经了解到，早在妊娠 7 周时就可以在母体外周血中检测到 cffDNA。在妊娠早期，cffDNA 的比例接近总血浆 DNA 的 3.4%，在妊娠晚期上升至总血浆 DNA 的 6.2% [5]。母体血浆中 cffDNA 的分子大小约为 145-201 bp [6,7]。已经开发了多种 DNA 标记用于检测 cffDNA，例如胎儿来源的 Y 染色体[3,5]、多态性短串联重复基因座[8]和表观遗传特征[9,10]。作为表观遗传特征，高甲基化 RASSF1A 基因已被用作胎儿 RhD 基因分型的通用胎儿 DNA 标记[10]。然而，这种 DNA 标记从未用于胎儿 ABO 基因分型领域。

在这项研究中，我们开发了一种使用实时 PCR 进行胎儿 ABO 基因分型的新方案。在第一阶段，在甲基化敏感的限制酶消化后，使用基于 TaqMan 的实时 PCR，通过胎儿 RASSF1A 检测，在母体血浆中鉴定出足量用于实时 PCR 测试的 cffDNA。在第二阶段，使用等位基因特异性引物通过基于 SYBR 的实时 PCR 确定胎儿 ABO 基因型。

2 材料和方法

2.1 血浆收集和 DNA 提取

从 73 名 A/B/AB 血型丈夫的 O 型孕妇和 9 名非孕妇中采集血样。孕妇为 23-37 岁，胎龄为 12-35 周（妊娠早期 3 例，妊娠中期 62 例，妊娠晚期 8 例）。2013 年 12 月至 2014 年 6 月在大连市血液中心进行产前检查时采集血样。该研究经大连市血液中心伦理委员会批准。所有参与者在样本采集前签署了知情同意书。

采集孕妇 5ml 外周血入紫帽采血管（EDTA）中。全血立即离心 $1500 \times g$ 10 分钟。将血浆转移到新管中， $13000 \times g$ 再离心 10 分钟。然后收集上清液并保存在 -80°C 直至 DNA 提取。

根据制造商的说明，通过 QIAamp DSP 病毒试剂盒（德国 Qiagen）从 1.5 mL 血浆中提取 DNA，用 $60 \mu\text{L}$ AVE 缓冲液洗脱，然后在 -80°C 下保存直至进一步处理。

2.2 酶消化

按照制造商推荐的节省时间的方案，用甲基化敏感的限制酶 BstUI（美国 New England Biolabs）消化母体血浆 DNA。每个酶消化反应均在 20 μ L 反应体积中进行，包含 10 μ L 血浆 DNA、5U BstUI 和 NE 缓冲液（New England Biolabs）。非酶处理的对照包含 10 μ L 血浆 DNA 和 10 μ L NE 缓冲液。酶消化在 60℃ 下进行 2.5 小时。

2.3 基于 TaqMan 的实时 PCR 检测 RASSF1A 和 β -肌动蛋白序列

先前描述的 RASSF1A 和 β -肌动蛋白序列的引物和探针显示在表 1 中[10]。RASSF1A 和 β -肌动蛋白的探针均用 FAM 标记，在独立 PCR 管中平行检测。由于 RASSF1A 启动子的甲基化模式在成人和胎儿之间是不同的，低甲基化的母体序列可以通过甲基化敏感的限制酶消化去除，而高甲基化的胎儿序列可以保持完整。因此，在通过 BstU1 消化除去母体低甲基化的 RASSF1A 后，理论上可以通过基于 TaqMan 的实时 PCR 检测胎儿高甲基化的 RASSF1A。 β -肌动蛋白序列和 RASSF1A 序列具有相似的酶消化效率，因此使用 β -肌动蛋白作为对照来确定低甲基化序列完全酶消化[10]。通过 7300 实时 PCR 系统(美国 Applied Biosystems)以 25 μ L 终反应体积进行基于 TaqMan 的实时 PCR。每个反应体系由无 UNG 的 1 $\times$ TaqMan Universal Master Mix II（Applied Biosystems）、每个引物 900 nM、每个探针 200 nM、10 μ L 酶处理的 DNA 混合物（相当于 5 μ L 血浆 DNA）或 10 μ L 非酶处理的对照（相当于 5 μ L 血浆 DNA）。PCR 扩增反应程序如下：95℃ 10 分钟；95℃ 15 秒，60℃ 1 分钟，50 个循环。所有反应一式两份进行。通过 7300 System SDS 软件分析数据。

表 1 用于 RASSF1A 和 β -肌动蛋白检测的引物和探针序列

Primer	Sequence (5'-3')
<i>RASSF1A</i> -forward	AGCCTGAGCTCATTGAGCTG
<i>RASSF1A</i> -reverse	ACCAGCTGCCGTGTGG
<i>RASSF1A</i> -Probe	FAM-CCAACGCGCTGCGCAT-MGB
β - <i>Actin</i> -forward	GCGCCGTTCCGAAAGTT
β - <i>Actin</i> -reverse	CGGCGGATCGGCAA
β - <i>Actin</i> -Probe	FAM-ACCGCCGAGACCGCGTC-MGB

2.4 基于 SYBR 的实时 PCR 进行胎儿 ABO 基因分型

外显子 6 的核苷酸位置 (nt) 261 和外显子 7 的 nt 796 的引物序列基于先前描述[11]。为了提高反应的特异性，在我们的研究中将一个错配碱基引入每个正向引物中，如表 2 所示。图 1 显示了错配引物的分子机制。每个 25 μ L 反应体系包含 1 $\times$ SYBR Selected Master Mix (Applied Biosystems)，每个引物 200 nM 和 5 μ L 血浆 DNA (未富集 cfDNA)。扩增在 7300 实时 PCR 系统 (Applied Biosystems) 上进行，反应程序：50 $^{\circ}$ C 2 分钟；95 $^{\circ}$ C 10 分钟；95 $^{\circ}$ C 15 秒，60 $^{\circ}$ C 1 分钟，50 个循环。扩增后，熔解步骤在 60 $^{\circ}$ C 至 95 $^{\circ}$ C 范围内进行，熔解速率为 0.2 $^{\circ}$ C/s，以确认每个反应体系的特异性。平行扩增无模板对照。通过 7300 System SDS 软件分析数据。按照解释标准确定胎儿 ABO 基因型 (表 3)。筛查程序的流程图如图 2 所示。

表 2 用于胎儿 ABO 基因分型的等位基因特异性引物的序列

Primer	Sequence (5'-3')	Size of PCR product
A/B-forward	GGAAGGATGTCCTCGTGG <u>C</u> GA	79 bp
A/B-reverse	CTCGTTGAGGATGTCGATGTTG	
B-Forward	GACGAGGGCGATTCTACT <u>C</u> CA	107 bp
B-Reverse	TTGGCCTGGTCGACCATCATG	

错配的核苷酸用粗体和下划线标出。在 nt 261 处具有 G 的 A/B 正向和 A/B 反向引物对检测胎儿 A/B 等位基因。在 nt 796 处具有 A 的 B 正向和 B 反向引物对检测 B 等位基因。

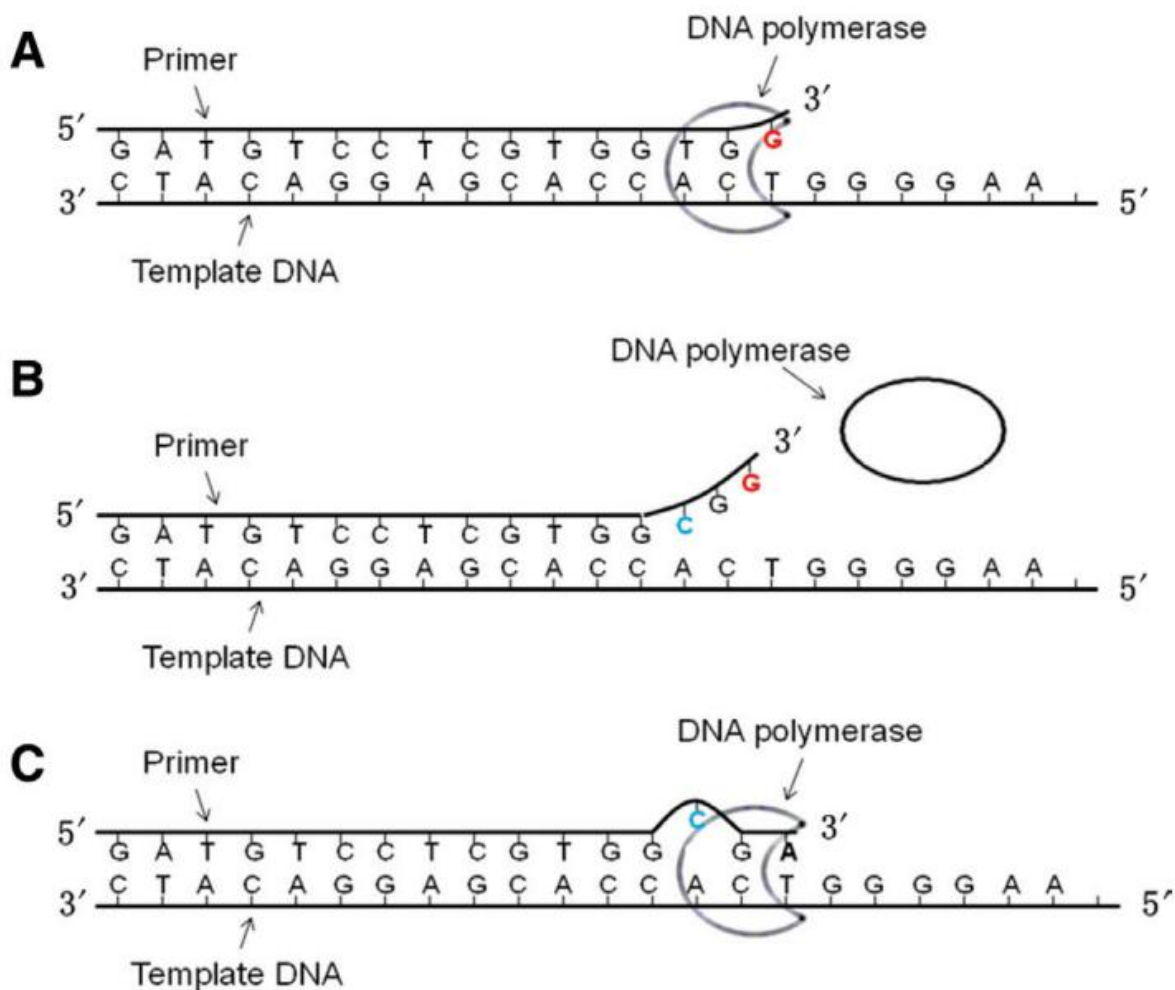


图 1 错配引物的分子机制。(A) 在引物末端错配的情况下，DNA 聚合酶可能不会完全停止与模板 DNA 的结合，可能发生意外引物延伸。(B) 错配的碱基导致引物-模板杂交体在 3'末端的第 3 个核苷酸处隆起。如果 3'末端碱基也错配，则在 3'末端的 3 个核苷酸上引物将从模板 DNA 解离，并且 DNA 聚合酶不能结合 3'末端区域。(C) 如果 3'末端碱基正确配对，则 3'末端三个碱基中的两个与模板 DNA 完全杂交，这使得 DNA 聚合酶能够结合，引物能够延伸。

表 3 胎儿 ABO 基因分型的解释标准

Fetal genotype	Nucleotide position	
	nt 261	nt 796
OO	del/del	C/C
OA	del/G	C/C
OB	del/G	C/A

del, O 等位基因 nt 261 处的单核苷酸缺失。

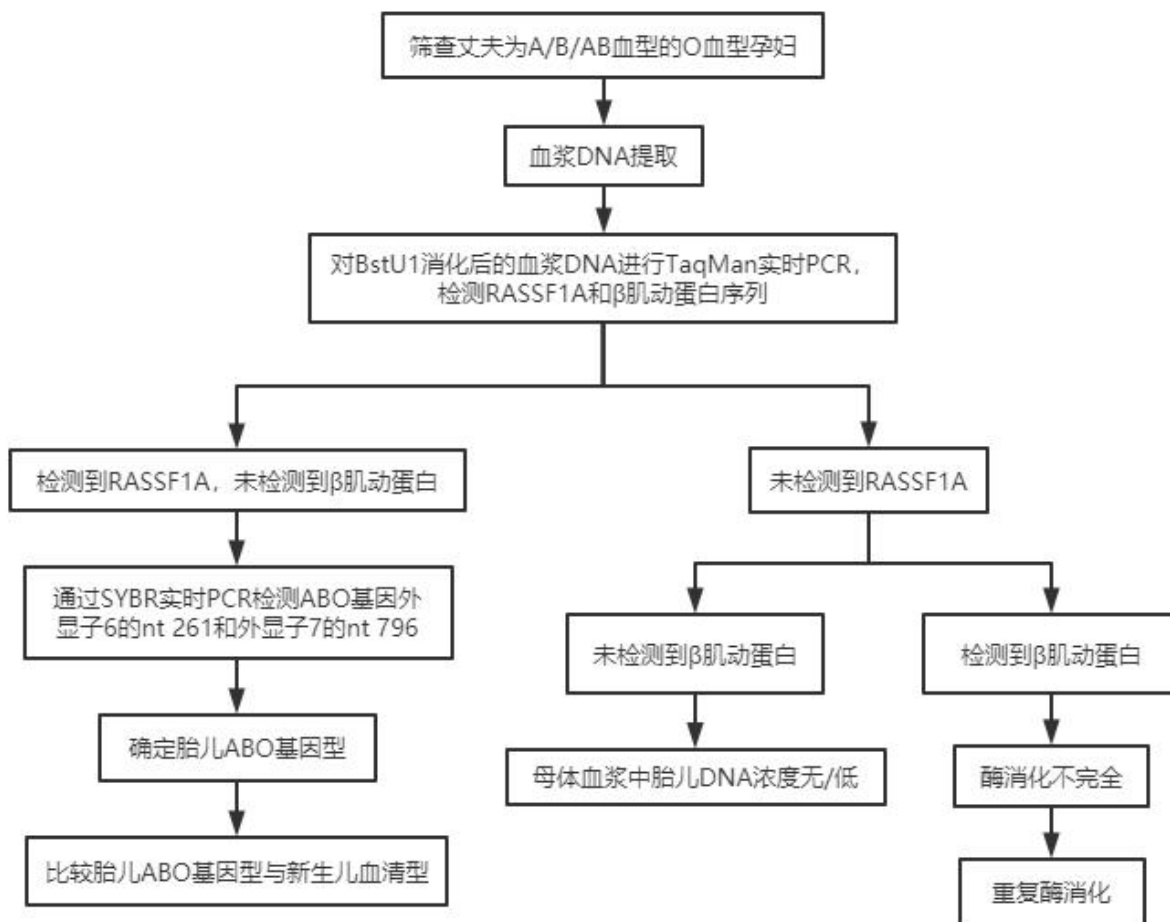


图 2 从母体血浆中检测胎儿 DNA 和 ABO 基因分型的程序

2.5 新生儿 ABO 血型的表型和测序分析

通过基于 SYBR 的实时 PCR 进行胎儿 ABO 基因分型后，通过血清学检测鉴定了 73 名孕妇分娩的新生儿的血型，并与胎儿基因分型结果进行了比较。在少数误诊病例中，对母亲和父亲的血液样本进行基因分型，并由上海桑尼生物科技有限公司对新生儿 DNA 的外显子 6 和外显子 7 的扩增子进行纯化和测序。

3 结果

对总共 73 个样品进行 BstUI 消化后基于 TaqMan 的实时 PCR，结果显示 RASSF1A 阳性扩增和 β -肌动蛋白阴性扩增，而 9 个未怀孕的对照在酶消化后未显示 RASSF1A 或 β -肌动蛋白的扩增。RASSF1A 阳性扩增的 Ct 值约为 37-43。阴性扩增的 Ct 值无法确定，因为 50 个扩增循环之前没有扩增曲线达到阈值线（图 3）。证明了在每个血浆样品中成功提取了胎儿 DNA。

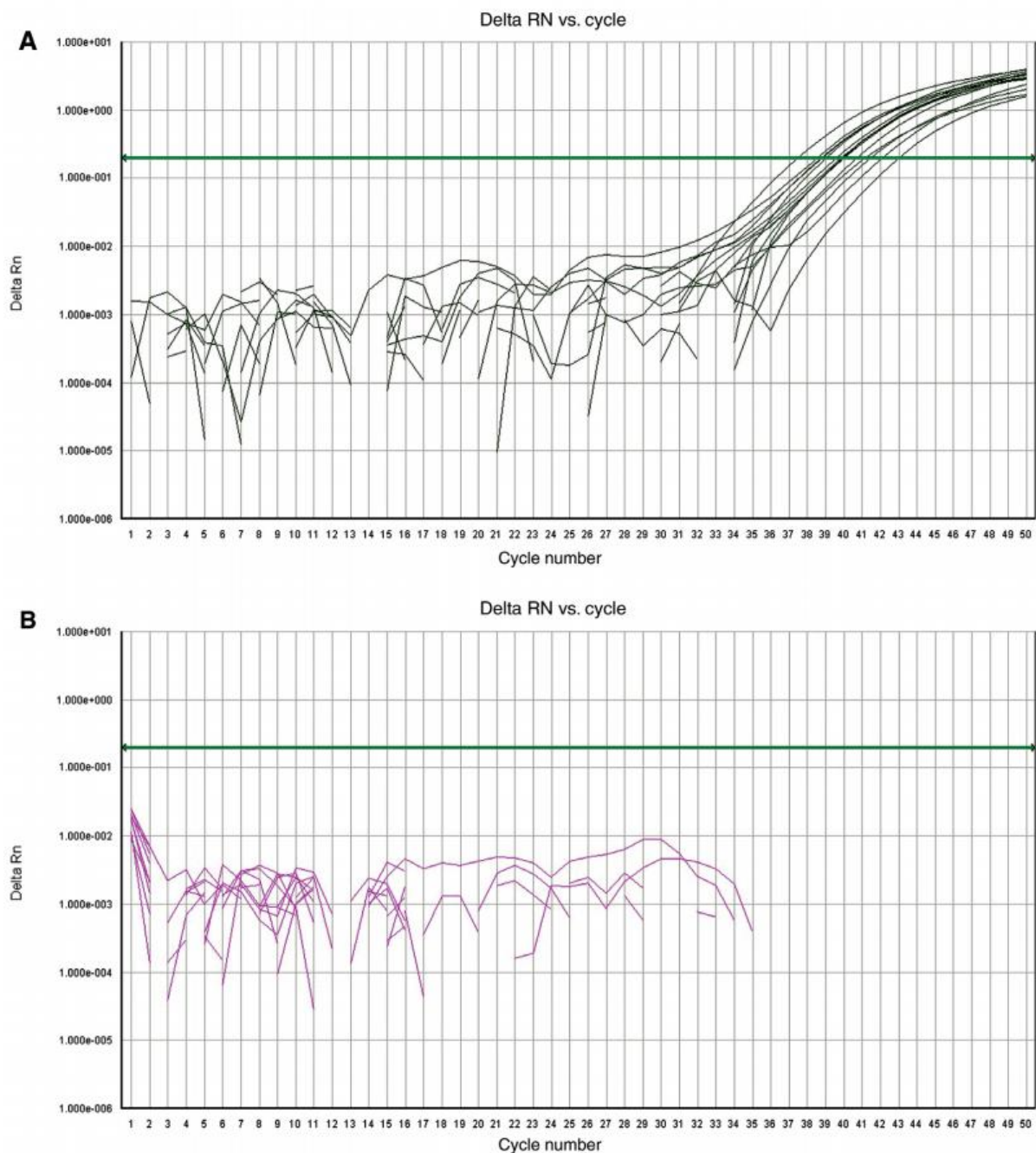


图 3 BstU1 消化后基于 TaqMan 实时扩增血浆 DNA 中 RASSF1A 和 β -肌动蛋白。(A) RASSF1A 和无模板对照的扩增。阳性扩增的 Ct 值为 37-43。(B) β -肌动蛋白和无模板对照的扩增。

对于通过基于 SYBR 的实时 PCR 进行的胎儿 ABO 基因分型（图 4），在 nt 261 反应中，阳性扩增的 Ct 值为 26 - 41，而在阴性结果中，50 个扩增循环之前没有扩增曲线达到阈值线。在 nt 796 反应中，阳性扩增的 Ct 值为 30 - 37，而在阴性结果中，50 个扩增循环之前没有扩增曲线达到阈值线。熔解曲线分析证实了两种反应体系的特异性。nt 261 和 nt 796 反应的熔解温度 (T_m) 分别为 82.3 - 83.5°C 和 87.3 - 88.1°C。如表 4 和表 5 所示，使用新生儿的血型血清学结果作为金标准，在 73 例

中的 68 例中正确预测了胎儿 ABO 基因型。对 5 例误诊重复 PCR 扩增，获得了相同的结果。然后通过新生儿 ABO 血型的测序分析以及父母 ABO 血型的基因分型分析验证了这 5 例误诊。基因型均与其血清学表型一致。因此，胎儿 ABO 基因分型的诊断准确性为 93.2%。

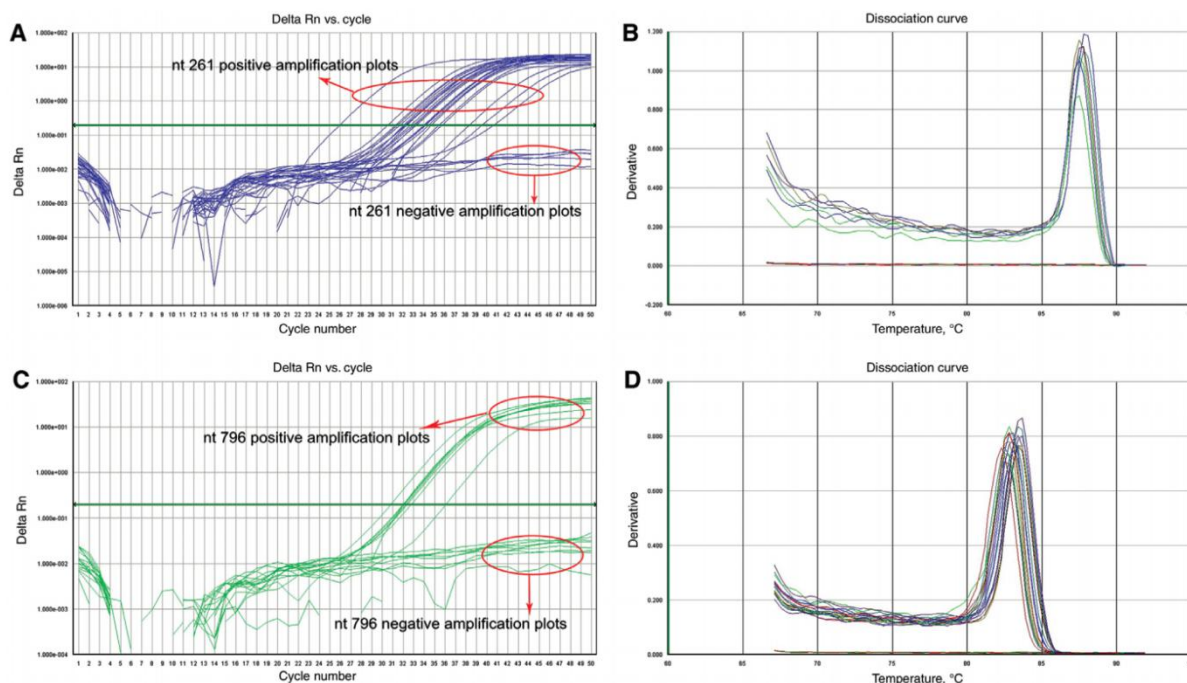


图 4 基于 SYBR 实时扩增胎儿 ABO 基因型。(A) nt 261 反应 cffDNA 扩增曲线。阳性扩增的 Ct 值为 26-41。(B) nt 261 反应熔解曲线。Tm 为 82.3-83.5℃。(C) nt 796 反应 cffDNA 扩增曲线。阳性扩增的 Ct 值为 30 - 37。(D) nt 796 反应熔解曲线。Tm 为 87.3-88.1℃。

表 4 检测 73 名血型 O 母亲胎儿的 ABO 基因型

Paternal ABO phenotypes	Samples (n=73)	Fetal ABO genotypes		
		OO	OA	OB
A	24	6	17 ^a	1 ^b
B	40	12	2 ^c	26
AB	9	0	5	4

a 17 名新生儿中有 2 名被确认为血型 O；b 新生儿被确认为血型 O；c 2 名新生儿中有 1 名被确认为血型 O，1 名被确认为血型 B。

表 5 胎儿 ABO 基因型产前诊断的准确性

Fetal ABO genotype	n	False diagnosis	Accuracy of diagnosis, %
OO	18	0	100
OA	24	4	83.3
OB	31	1	96.8

在 5 例误诊中，nt 261 反应中有 3 例假阳性，nt 796 反应中有 1 例假阳性和 1 例假阴性。在 nt 261 反应中，敏感性为 100%，特异性为 88%，阳性预测值为 94.4%，阴性预测值为 100%。在 nt 796 反应中，敏感性为 96.9%，特异性为 97.7%，阳性预测值为 96.9%，阴性预测值为 97.7%。

4 讨论

自 1997 年在母体血浆中检测到胎儿 DNA 以来，胎儿基因分型技术已广泛应用于胎儿 RhD，c，E，K 筛查，性别相关疾病和染色体非整倍性诊断[3,12]。此外，已经构建了 cfDNA 的全基因组遗传图谱以确定胎儿的突变状态，这为单基因突变引起的许多遗传疾病的非侵入性产前诊断铺平了道路[13]。据我们所知，尚未建立关于使用实时 PCR 对 ABO 基因型进行非侵入性产前诊断的方案。在这里，我们关注使用等位基因特异性引物通过基于 SYBR 的实时 PCR 进行胎儿 ABO 基因分型。

在这项研究中，我们使用实时 PCR 检测了 73 个母体血浆样本中的胎儿 ABO 基因型。我们的结果显示诊断准确率为 93.2%，高于先前使用序列特异性引物 PCR（PCR-SSP）的研究的准确性[14]。准确性的差异可能是由于特异性引物和检测方法。一方面，在我们的研究中等位基因特异性引物对中引入的错配碱基可以提高反应的特异性。特异性引物延伸取决于引物 3'端的正确碱基配对。然而，当引物与模板 DNA 非互补退火时，经常发生意外的引物延伸。从 3'端开始在第 3 个核苷酸上引入人为错配的碱基可以最大程度地减少假阳性信号[15]。换言之，只有当错配在 3'末端碱基处形成时，才能抑制 DNA 聚合酶与引物的结合[16,17]。由于背景减少并且需要宽松的 PCR 条件，错配引物特别适用于扩增较短的 DNA 产物，例如 cfDNA [18]。另一方面，实时 PCR 对 ABO 基因分型的敏感性高于 PCR-SSP [11,14]。已经证明 PCR-SSP 具有一些缺点，例如非特异性扩增和高背景[19]。

然而，共有 73 例发现 5 例假结果。误诊可能是由罕见的 ABO 等位基因的存在引起的。对于通过单核苷酸多态性（SNP）检测的 ABO 基因分型，A1 等位基因（*A101）和 B 等位基因（*B101）因单碱基取代在 nt 297, 526, 657, 703, 796, 803 和 930 处不同。O 等位基因与 A 等位基因在 nt 261 处不同，具有单碱基缺失[20]。尽管 nt 261 和 nt 796 区域的扩增可以区分常见的 ABO 等位基因，但需

要考虑罕见的等位基因，这可能导致 ABO 基因型和表型之间的差异，例如血型抗原基因突变数据库中描述的 *O03, *O08, *B115 [21]。然而，在 5 例误诊中，通过新生儿 ABO 血型的测序分析未发现罕见的等位基因。假阳性结果的另一个可能原因是血浆 DNA 提取过程中的污染，因为通过重复 PCR 扩增不能排除不希望的扩增。不幸的是，由于母体血浆用完，无法重复 DNA 提取。

值得注意的是，为了确保从母体血浆中分离出足量的 cfDNA 用于实时 PCR，我们选择高甲基化的 RASSF1A 基因启动子作为胎儿表观遗传标记。在所有 73 例中均观察到阳性胎儿 DNA 信号，这与 Chan 等[10]获得的结果一致。与之前的研究相比，使用胎儿 DNA 标记可以提高胎儿基因分型结果的可靠性[14]。

根据之前的研究，cfDNA 在母体血浆中的比例极低，仅占血浆总 DNA 的 3%-6%，与血浆中细胞游离母体 DNA 的比例呈正相关[5,13]。因此，重要的是使用对胎儿 ABO 基因分型具有高灵敏度的可靠检测方法。常用的 ABO 基因分型技术包括单链构象多态性 (SSCP) [22]，扩增产物长度多态性 (APLP) [23]，PCR 限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) [24]，PCR-SSP [25]，基于 TaqMan 和基于 SYBR 的实时 PCR [11,26]。其中，实时 PCR 是在低模板浓度下扩增短 DNA 序列的最佳选择。最近的报道显示，基于 TaqMan 的实时 PCR 对 ABO 基因分型的检测限达到每个反应 0.1 ng，而 SYBR 实时 PCR 检测限为每个反应 0.5 ng [11,26]。不幸的是，由于母体 O 基因的背景较大，使用等位基因特异性探针的基于 TaqMan 的实时 PCR 对于本研究中胎儿 ABO 基因分型是不可行的，这导致强母体 O 等位基因扩增信号掩盖了弱胎儿 A/B 等位基因信号。相反，基于 SYBR 的等位基因特异性引物实时 PCR 仅扩增 A/B 等位基因的靶序列，避免了母源 DNA 的干扰。与用基因组 DNA 实时测定 ABO 基因型不同[11]，由于母体血浆中 cfDNA 的显著凋亡降解，使用 cfDNA 进行 ABO 基因分型的检测限无法精确定义。作为 PCR 模板，片段化的 cfDNA <300 bp [6]，其中只有一小部分序列是有效的扩增模板。这表明，例如，1ng cfDNA 的扩增效率远低于 1ng 基因组 DNA 的扩增效率，且其可能随着不同的妊娠而变化很大。因此，本研究中胎儿 ABO 基因分型的检出限仍不清楚，这将在未来研究。

虽然胎-母 ABO 不相容在一些国家被认为很少引起严重的胎儿疾病[27]，但实际上在一小部分人群中已发生严重的 ABO-HDFN [2,28,29]。我们的方案可用于确定妊娠中期的胎儿 ABO 血型，这有助于预测和诊断 ABO-HDFN。此外，我们的方案是通过判断胎儿 ABO 状态来评估 RhD-HDFN 风险的有价值的工具。已证明胎-母 ABO 不相容降低了严重 RhD-HDFN 的发生率，因为在 RhD 阴性血型 O 的女性中发生 RhD 抗原的同种免疫之前，具有 RhD 抗原的胎儿 A/B 红细胞已被母体血浆中的抗 A/B 清除[30]。此外，在法医亲子鉴定中，胎儿 ABO 基因分型目前需要收集羊水，而我们的方

案可以提供一种非侵入性方法从母体血浆确定胎儿 ABO 基因型。我们研究的局限性在于未覆盖所有的妊娠阶段，大多数母体血液样本是在妊娠中期收集的。因此，不同妊娠阶段诊断准确性的差异无法反映，这将在后续研究中加以克服。

总之，我们已经建立了一种快速可靠的方案，用于妊娠中期的非侵入性胎儿 ABO 基因分型。该方案可用于抗 A 或抗 B 同种免疫的妊娠管理以及法医分析。

参考文献

1. Eder A. Update on HDFN: new information on long-standing controversies. *Immunohematology* 2006;22:188 - 95.
2. Stiller RJ, Herzlinger R, Siegel S, Whetham JC. Fetal ascites associated with ABO incompatibility: case report and review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1371 - 2.
3. Lo Y, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485 - 7.
4. Bianchi DW. Fetal DNA in maternal plasma: the plot thickens and the placental barrier thins. *Am J Hum Genet* 1998;62:763 - 4.
5. Lo Y, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768 - 75.
6. Chan KA, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004;50:88 - 92.
7. Lo YD, Chiu RW. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem* 2008;54:461 - 6.
8. Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet* 2000;106:45 - 9.
9. Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:14753 - 8.
10. Chan KA, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 2006;52:2211 - 8.
11. Muro T, Fujihara J, Imamura S, Nakamura H, Kimura-Kataoka K, Toga T, et al. Determination of ABO genotypes by real-time PCR using allele-specific primers. *Leg Med* 2012;14:47 - 50.
12. Lo YD. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications. *Clin Chem* 2000;46:1903 - 6.
13. Lo YD, Chan KA, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2010;2:61ra91.
14. Meng J-L, Wang X-T, Wang Y, Yue Y-F, Wang X, Chen Z-J. Use of maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis of fetal ABO genotypes. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:981 - 6.
15. Zhou G-H, Shirakura H, Kamahori M, Okano K, Nagai K, Kambara H. A gel-free SNP genotyping method: bioluminometric assay coupled with modified primer extension reactions (BAMPER) directly from double-stranded PCR products. *Hum Mutat* 2004;24:155 - 63.
16. Okano DK, Uematsu C, Matsunaga H, Kambara H. Characteristics of selective polymerase chain reaction (PCR) using two-base anchored primers and improvement of its specificity. *Electrophoresis* 1998;19:3071 - 8.
17. Yaku H, Yukimasa T, Nakano S, Sugimoto N, Oka H. Design of allele-specific primers and detection of the human ABO

genotyping to avoid the pseudopositive problem. *Electrophoresis* 2008;29:4130 – 40.

18. Okimoto R, Dodgson J. Improved PCR amplification of multiple specific alleles (PAMSA) using internally mismatched primers. *Biotechniques* 1996;21:20 – 2, 24, 26.

19. Ficko T, Galvani V, Ruprecht R, Dovc T, Rožman P. Real-time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR – SSP method. *Transfus Med* 2004;14:425 – 32.

20. Nakamura S, Matsushita H, Nagai T, Sugie H, Furukawa M, Kurihara K, editors. DNA analysis of ABO blood group system detected by single-base nucleotide substitutions in a paternity case. *International Congress Series*. Amsterdam: Elsevier, 2003.

21. Blumenfeld OO. Compilation of ABO alleles in BGMUT. March 2011.

22. Yip SP. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. *Blood* 2000;95:1487 – 92.

23. Watanabe G, Umetsu K, Yuasa I, Suzuki T. Amplified product length polymorphism (APLP): a novel strategy for genotyping the ABO blood group. *Hum Genet* 1996;99:34 – 7.

24. Stroncek D, Konz R, Clay M, Houchins J, McCullough J. Determination of ABO glycosyltransferase genotypes by use of polymerase chain reaction and restriction enzymes. *Transfusion* 1995;35:231 – 40.

25. Gassner C, SchmarDA A, Nussbaumer W, Schonitzer D. ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 1996;88:1852 – 6.

26. Maeda K, Nakamura S, Murakami C, Irie W, Watanabe T, Sasaki C, et al. ABO genotyping by TaqMan assay and allele frequencies in a Japanese population. *Leg Med* 2013;15:57 – 60.

27. de Silva M, Whittle M. Guidelines for blood grouping and red cell antibody testing during pregnancy. *Transfus Med* 1996;6:71 – 4.

28. Luo M, He J, Chen F. 54 cases of newborn multiple exchange transfusion resulting from severe ABO incompatibility. *Chongqing Med J* 2010;232 – 3 (in Chinese).

29. Sherer DM, Abramowicz JS, Ryan RM, Sheils LA, Blumberg N, Woods JR Jr. Severe fetal hydrops resulting from ABO incompatibility. *Obstet Gynecol* 1991;78:897 – 902.

30. Doyle B, Quigley J, Lambert M, Crumlish J, Walsh C, McParland P, et al. A correlation between severe haemolytic disease of the fetus and newborn and maternal ABO blood group. *Transfus Med* 2014;24:239 – 43.



天津秀鹏生物微信公众平台
与您分享专业的体外诊断信息

更多内容请登录秀鹏生物网站

www.biosuper.com