

稀有血型基因检测专刊

2019 年 1 月

编者导读:

稀有血型高频抗原对应的抗体的鉴定,面对谱细胞全阳性的格局,需要运用多样的血清学方法,对照高频抗原抗体的特点,推测可能的抗体类别。同时针对部分稀有抗原的抗体十分稀少,昂贵或者缺乏,因此对部分稀有表型不适合采用血清学方法进行大规模筛选。

通过分子生物学技术能更好地解决稀有血型抗体、抗原无法通过血清学方法进行鉴定的困境。稀有血型的分子基础,大多是因 1 个或多个错义低频突变导致编码氨基酸的改变,导致高频抗原的缺失,从而产生了血型的多态性,因此适合使用 PCR-SSP 方法进行检测,应首选基因分型试剂检测其红细胞多系统抗原基因,作为临床判定抗体特异性的参考依据和血液中心建立稀有血型库的工具。

目前国内筛查稀有血型系统统计如下:

稀有血型系统	低频抗原	稀有血型系统	低频抗原
Kell	k- Js b- Kpb-	Duffy	Fya-
Kidd	Jka-b-	OK	OKa-
H	H-	Digeo	Dib-
MNS	GPA- s-	Rh	Rhnull Rhmod D--
Gerbich	GPC-	VEL	Vel-
I	i+	Scianna	Scl-
Lutheran	Lub-	Indian	Inb-
Yt	Yta-	Colton	Coa-

目录

1 《Cost-efficient sequence-specific priming-polymerase chain reaction screening for blood donors with rare phenotypes》.....	4
2 《红细胞稀有血型筛选、建库与应用》.....	5
3 《建立多重 PCR 方法进行 Vel-, Sc1-, GIL -及 Inb -稀有血型检测》.....	7
4 《Multiplex polymerase chain reaction with DNA pooling: a cost-effective strategy of genotyping rare blood types》.....	8
5 《多重 PCR 筛选新疆少数民族 Fy(a-) 、s-稀有血型》.....	9
6 《A new strategy to identify rare blood donors: single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles》.....	11
7 《Molecular typing for the Indian blood group associated 252G>C single nucleotide polymorphism in a selected cohort of Australian blood donors》.....	14
8 《Performance of a microarray-based genotyping system for red cell and platelet antigens in China》.....	15
9 《定点诱变技术制备血型等位基因检测对照品》.....	17
10 《血型基因定型用于辅助鉴定高频抗原抗体的研究-附 1 例稀有血型 Di(a + b -) 产生疑似抗-Dib 鉴定报告》.....	17
11 《北京地区献血人群 Duffy 血型表型筛查及稀有血型库的建立》.....	19
12 《应用血清学和分子生物学方法筛选浙江汉族人群中部分稀有血型》.....	20
13 《国际基因库确认 1 例稀有血型类型-P 型》.....	21
14 《献血者稀有血型数据库的建立》.....	21
15 《中国南京地区十个红细胞血型系统稀有抗原的大规模调查》.....	22
16 《成都地区献血人群 Kell 等 9 个血型系统抗原基因分型研究》.....	23
17 《惠州地区无偿献血者 Mur 血型检索库的建立》.....	24
18 《Antibodies to high-frequency antigens may decrease the quality of transfusion support: an observational study》.....	25
19 《高频抗原抗体的鉴定方法和输血策略》.....	26

20 《Mononuclear cells from a rare blood donor, after freezing under good manufacturing practiceconditions,generate red blood cells that recapitulat e the rare blood phenotype》	27
21 《稀有血型及其在输血工作中的研究进展》	27

稀有血型基因检测专刊

(编辑: 艾丽萍)

1 《Cost-efficient sequence-specific priming-polymerase chain reaction screening for blood donors with rare phenotypes》

《稀有血型献血者低成本高效的 PCR-SSP 序列特异性引物聚合酶链反应筛选》

作者: Wagner FF, Bittner R, Petershofen EK

来源: Transfusion. 2008 Jun;48(6):1169-73

摘要:

背景:

由于缺乏适当的红细胞抗原阴性供血, 对存在高频率红细胞抗原对应不规则抗体患者的输血可能受到阻碍。通常, 这种缺乏是由于分型捐助者的数量很少。为此, 我们开发了一种简单的多重聚合酶链反应(PCR)方法来筛选血型罕见的献血者。

研究设计与方法:

基于一种可以省略 DNA 纯化步骤的商用系统(Extract-N-Amp, Sigma-Aldrich), 开发了一种序列特异性引物预测 Yt(a), Co(a), Lu(b)和 Kp(b)抗原的多重 PCR。PCR 扩增产物在 2%琼脂糖凝胶中按照条带大小进行分析。代表罕见表型的样本被鉴定为缺乏四种可见条带中的一种或多种。

结果:

除去反应混合物和凝胶的制备, 整个过程包括五个移液步骤。91 名捐赠者样本的手工操作时间为 102 分钟。优化后, 在没有复检的情况下 85%的样本得到了可解释的结果。在 3422 例供体中, 检测到 1 例 Kp(b-), 6 例 Co(a-), 10 例 Yt(a-), 5 例 Lu(b-)供体。

结论:

多重 PCR 是一种简单、通用和经济有效的方法，用于筛选可能通过基因型识别出罕见表型的供体。如果这种供体筛查被广泛采用，那么对抗 co (a)、抗 yt (a)或抗 lu (b)患者的输血支持将得到显著改善。

2 《红细胞稀有血型筛选、建库与应用》

作者：朱自严，王晨，叶璐夷等

来源：中国输血杂志 2012 年 10 月第 25 卷第 10 期

摘要：

目的：通过在献血者中筛选稀有血型，获得针对高频血型抗原组表达阴性的稀有表型，解决临床稀有血型血液供应困难的难题。

方法：在国家“十一·五”和“十二·五”计划项目中，通过国内 13 个省级血液中心的联合，利用血型血清学方法和分子生物学方法，我们开展了针对 Duffy, Kell, Kidd, MNS, Gerbieh, Diego, Yt, Lutheran, Colton, Ok 以及 ABO, Rh 血型系统中高频抗原的筛选。在血清学筛选试验中，采用了适应于高通量的微量板法和改良的抗球蛋白法。这些方法在简化经典的间接抗蛋白试验的同时，又适用于血型自动化检测的需求。在这些血型系统稀有血型筛选中，有 10 多种稀有血型是通过筛选稀有等位基因的方法来完成的。通过组建多个多重 PCR 体系，我们成功地完成了针对 k, s, Fy(a-), Co(a-), Yt(a-), Di(b-), Kp(c-), Kp(b-), Js(b-), Ok(a-)稀有等位基因的检测。由于单个实验室通常无法同时获各类稀有表型 DNA 作为分子诊断的实验对照，我们采用了定点诱变技术(SDM)，通过环状诱变 PCR 方法，制备了各种稀有表型等位基因突变点片段，以用于分子生物学方法筛选稀有血型的对照。

结果：在 2008 ~2010 年期间，参予项目的各单位共筛选献血者稀有血型 135 多万人次。其中北京、上海、广州、天津、武汉、浙江、江苏、成都血液中心筛选汉族献血者 130 万人次，新疆、内蒙、广西、昆明血液中心筛选少数民族献血者 5 万多人次。共获得各类稀有血型 1000 多例。其中包括极为罕见的 Ko、Rhnull、Wr(b-)等稀有表型。众多新的血型等位基因和存于中国人群中的特殊遗传模式被发现。同时，也首次在中国人群中发现 Yt(a-), Co(a-), Lu(a-b-)等稀有表型。2011 年 1 月，中国稀有血型专业网站开通，通过信息发布、在线查询和 BBS 论坛讨论，进一步有益于稀有血型的信息交流与技术的推广。在最近 2 年的临床稀有

血型输血应用中，共有>4000 ml 的稀有血液被用于临床抢救与治疗。

结论：开展稀有血型筛选并建立全国性的稀有血型信息网络对解决临床稀有血型输注困难是有效的途径。

扩大筛选的范围与增加筛选与验证的体系有助于中国稀有血型库的壮大。

讨论：中国稀有血型筛选与建库：在中国的稀有血型筛选项目中，我们首先关注的是能引起严重临床不良输血反应的稀有血型抗原或表型组合，这些稀有抗原或组合往往属于高频率血型抗原组和多个血型系统中，如 Vel、Lan、Jk(a-b-)、Lu(a-b-)、Rhnull、OH 等等，同时，我们也对中国人群中特有的能引起输血反应和新生儿溶血病的血型抗原进行筛选，如 Di(a+b-)、Fy(a-b+)等。希望通过筛选，初步建立中国人群稀有血型库。以解决临床上对稀有血型血液的迫切需求，减少输血不良反应的发生，提高输血疗效。

某些稀有血型的细胞本身带有一定的特殊性。利用这些特殊性而设计的筛选可使稀有血型的获得变的更为简单。比如 Jk(a-b-) 是 Kidd 血型系统中的 1 种稀有血型。这种表型的红细胞在 2M 尿素溶液中可使红细胞膜的完整性保持 6 h 以上，而带有 Jka 和 Jkb 抗原的红细胞在 2M 尿素溶液中 30 s 内便完全溶血。由于尿素试剂来源广泛而且十分廉价，整个筛选试验对技术和设备的要求都不高。因此可在所有的献血者中开展 Jk(a-b-) 的筛选。目前，国内通过 Jk(a-b-) 尿素筛选实验，已获得 50 多名 Jk(a-b-) 表型献血者。

在我们所筛选的这些血型系统稀有血型筛选中，有 10 种稀有血型是通过筛选稀有等位基因的方法来完成的。从筛选成本的性价比而言，利用基因诊断的方法对稀有血型进行筛选，优于从蛋白水平的筛选。目前，欧洲 7 国所组成的 1 个科研组、美国 1 家公司和荷兰的 1 家实验室均分别独立研制了血型检测的基因芯片，这些芯片可用于大规模筛选多种血型基因，其中包括一部分稀有血型。然而，目前这些芯片的设计思路主要是针对临床需长期多次输血的特殊患者(如 SLE、SCD、骨髓移植等)增加额外的抗原匹配之用，而不是针对稀有血型的筛选。因此，研发针对稀有血型筛选的检测芯片，将是下一步的目标。

多重 PCR 技术筛选红细胞稀有血型，即在同一反应体系中，加入多对针对不同血型抗原等位基因的序列特异性引物，根据扩增结果进行结果判读。但由于待检血型抗原的特殊性，大多数高频率抗原缺失型或低频率抗原的血样较难大量获得，而无法获得相应的血型等位基因对照品，从而限制了血型基因检测技术的应用。我们采用基于 PCR 的定点诱变技术，成功构建了 s 和 Oka 血型等位基因的含有突变 SNP 位点的标准质粒，制备了各种稀有表型等位基因突变点片段，以用于分子生物学方法筛选稀有血型的对照。进

一步，通过组建多个多重 PCR 体系，我们成功地完成了针对 k, s, Fy(a-), Co(a-), Yt(a-), Di(b-), Kp(c-), Kp(b-), Js(b-), Ok(a-) 稀有等位基因的检测。

综上所述，开展稀有血型筛选，并建立全国性的稀有血型信息网络，对解决临床稀有血型输注困难是有效的途径。扩大筛选的范围、增加筛选与验证的体系有助于中国稀有血型库的壮大。

3 《建立多重 PCR 方法进行 Vel-, Sc1-, GIL -及 Inb -稀有血型检测》

作者：王钰箐，龚淞颂，戴菁，陆晔玲，吴希，沈伟，陆琼，向东，蔡晓红

来源：中国输血杂志 2015 年 8 月第 28 卷第 8 期

摘要：

目的：建立稳定的多重 PCR-SSP 反应方法检测 Vel-, Sc1-, GIL-及 Inb-稀有血型，辅助鉴定稀有血型人士易产生的高频抗体。

方法：根据 Vel, Scianna, Gill 及 Indian 血型系统编码基因的单核苷酸多态性位点，设计特异性引物，对献血者 DNA 模板使用多重 PCR 方法进行检测，并使用 PCR 基因定点诱变技术和基因合成的方法制备出的 Sc1, GIL, Inb 及 Vel 阴性对照品作为对照，根据是否扩增出目标片段判断稀有血型基因的存在。直接测序验证此方法的准确性。

结果：建立了稳定的多重 PCR-SSP 反应体系，能够同时检测 Vel-, Sc1-, GIL-及 Inb-稀有血型，PCR-SSP 结果与直接测序结果相一致。

结论：该方法能在同一体系中同时扩增 4 个稀有血型，具有快捷、高效且成本低的优点，为稀有血型人士用血及抗体特异性鉴定提供保障。

稀有血型广义上即罕见血型，如 Rh 阴性血型，但还有更罕见的稀有血型存在于其他血型系统中，其稀有大多是由于高频抗原(在大多数群体中抗原频率 > 90%) 的缺失，这使得稀有血型患者难以获得相容血液，易与一般人血液产生输血反应，增加输血风险。例如抗-Vel 可引起严重的血管内输血反应、自身抗-Sc1 造成自身免疫性溶血性贫血、抗-GIL 引起溶血性输血反应、抗-Inb 引起急性溶血性输血反应等。

为了减少稀有血型人士的输血风险，使用相合的血液最为合理有效，但一般的血清学方法无法对这些高频抗原抗体予以鉴定，相应的抗血清也难以获得。因此，使用分子生物学方法比起传统方法更为简便高效，能更好鉴定抗体特异性，为稀有血型人士用血提供保障。

目前国内已有多篇使用多重 PCR 技术筛选稀有血型的文献，证明了多重 PCR 技术在国内进行稀有血型筛查的可行性与高效性，并且拥有降低检测成本的优势。我们建立了在同一体系中同时扩增这 4 个稀有血型的多重 PCR-SSP 方法，并采用直接测序法进行了验证。

随着医学技术的发展，通过分子生物学技术能更好地解决稀有血型抗体无法通过血清学方法进行鉴定的困境。其检测基因型准确、不易受标本保存期限的影响。且研究发现稀有血型的分子基础，大多是因 1 个或多个错义低频突变导致编码氨基酸的改变，导致高频抗原的缺失，从而产生了血型的多态性，因此适合使用 PCR-SSP 方法进行检测。

4 《Multiplex polymerase chain reaction with DNA pooling: a cost-effective strategy of genotyping rare blood types》

《DNA 混合池的多重 PCR：稀有血型经济有效的基因分型策略》

作者：He YL, Gao HH, Ye LY

来源：Transfus Med. 2013 Feb;23(1):42-7

摘要：

目的：

本研究旨在开发一种结合 DNA 池的多重 PCR 反应，用于对罕见稀有血型进行大规模筛查。

背景：

大多数血型抗原的差异与单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms, SNPs)有关, SNPs 用于在分子水平上检测血液抗原表达。然而, 所有现有的序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)只能检测单独 1 个样本的血型基因型的 1 个或多个 snp。DNA 池是一种减少所需基因分型数量的方法。

方法:

建立了一种敏感的多重 PCR-SSP 检测混合 DNA 的方法, 检测罕见的 Fy(b)和 S 等位基因。通过检测 898 个 DNA 文库, 共筛选 4490 个供体样本。阳性组的样本进一步单独检测。然后对 Fy(a-b+)/Fy(a+b+)和 S+ s -/S+ s+基因型阳性样本分别进行等位基因 Fy(a)和 S (s)的两种 PCR-SSP 检测。对罕见的 Fy(a-b+)和 S+ s -基因型进行血清学检测和测序分析验证。

结果:

254 例供者的 Fy(b)等位基因检测呈阳性, 101 例供者的 S 等位基因检测呈阳性。254 例(b+)供体中, 5 例(a-b+)供体, 249 例(a+b+)供体。101 个 S+供体中, 3 个为 S+ s -, 98 个为 S+ s+。罕见的 Fy(b)和 S 等位基因分别为 2.28 和 1.16%。PCR-SSP 检测通过测序分析和血清学检测证实。

结论:

将多重 PCR 检测与 DNA 池结合, 减少了所需的检测次数, 使大规模筛选成为可能。

5 《多重 PCR 筛选新疆少数民族 Fy(a-) 、 s-稀有血型》

作者: 乔艳辉, 张洪斌, 郭伟鹏

来源: 中国输血杂志 2016 年 10 月第 29 卷第 10 期

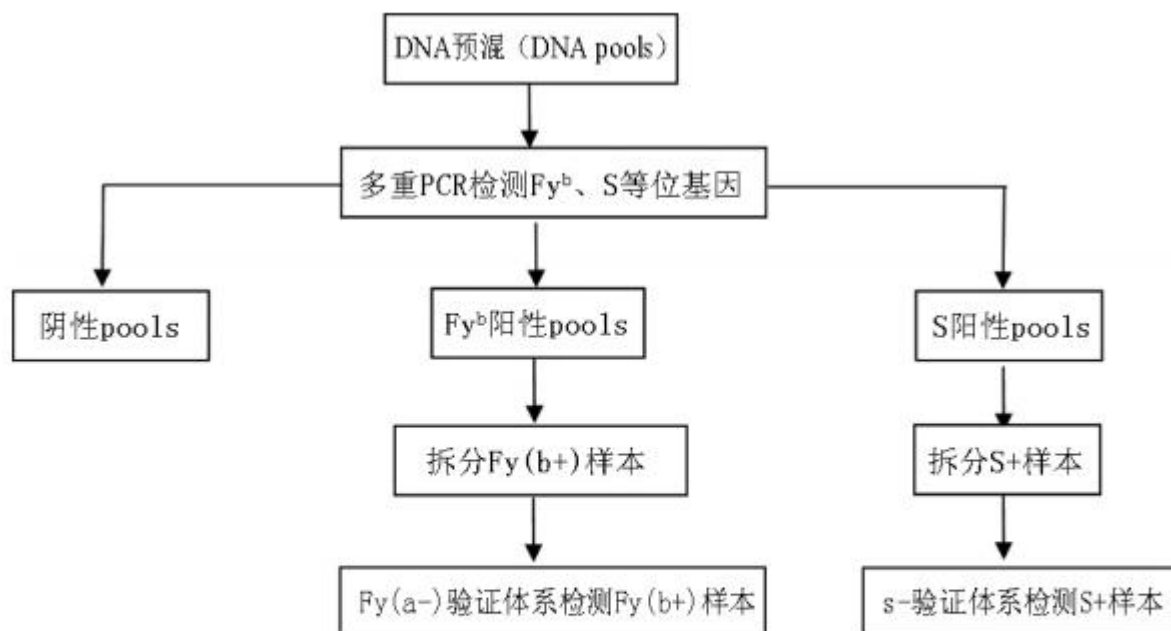
摘要:

目的: 通过分子生物学方法, 筛选新疆少数民族献血者样本中 Fy (a-)、s-表型, 了解这 2 种稀有血型抗原的分布情况, 以解决 Fy (a-)、s-稀有血型患者用血问题。

方法: 采用多重 PCR 体系, 以每 5 份标本混合检测方式, 对 1020 份无血缘关系健康少数民族献血者的血液 DNA 标本进行 Fyb 和 S 血型抗原基因分型。通过 PCR-SSP 验证方法, 分别检测多重 PCR 中含有 Fy (a—b+) / Fy (a+b+) 或 S+s- / S+s+阳性标本的高频等位基因 Fya 或 s, 从而获得稀有血型 Fy (a—b+) 或 S+s-。

结果：在 1020 例献血者中筛选出稀有血型 Fy (a-) 89 例，s-46 例。

结论：新疆少数民族献血人群中 Fyb 和 S 等位基因频率分别为 29.66% 和 21.32%，通过筛选获得的稀有血型数据，为临床输注配合性血液提供了参考资料，并进一步丰富了中国稀有血型库。



注：在检测过程中，对于阴性 pools 样本，忽略 Fy (a - b -)、S - s - 检出的可能性，因为该稀有表型在非洲人种以外的人群中非常罕见^[3]。

综上所述，本项研究主要采用多重 PCR 方法筛选了稀有血型 Fy(a -)、s -，通过筛选获得的新疆少数民族献血者 Duffy 和 MNS 血型系统血型抗原分布资料及稀有血型数据进一步提示了不同地域和民族人群稀有表型频率可能存在差异，因而有必要对不同地域人群开展稀有血型的筛查，用于初步建立稀有血型库，这对解决临床稀有血型患者的输血问题具有重要意义。

6 《A new strategy to identify rare blood donors: single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles》

《一种鉴定稀有血型献血者的新策略:聚合酶链反应、多重 SNaPshot 反应检测 16 个血型等位基因》

作者: Latini FR, Gazito D, Arnoni CP

来源: Blood Transfus. 2014 Jan;12 Suppl 1:s256-63

摘要:

背景:

作为表型检测的一种替代方法,基于 DNA 的大规模检测是可行的,可用于高通量供体红细胞分型,用于血型基因多态性的测定。然而,基于这些技术的高通量基因分型平台仍然昂贵,单核苷酸多态性的包含和等位基因的分析取决于试剂商的决定。为了克服这一限制,并为了开发一种能够筛选罕见稀有血型供体的分析方法,我们开发了一种 SNaPshot 分析方法,用于分析与抗原相关的 9 种单核苷酸多态性,这些多态性很难使用常规血清学进行评估。

材料与方法:

优化了聚合酶链反应的多重 SNaPshot 反应,确定了 9 个单核苷酸多态性,确定了 16 个等位基因: KEL*3/KEL*4、KEL*6/KEL*7、DI*1/DI*2、DI*3/DI*4、YT*1/YT*2、CO*1/CO*2、DO*1/DO*2、DO*4、DO*5。我们设计了包含血型单核苷酸多态性的引物的多重 PCR,并在片段分析后用能够识别等位基因的探针引物进行内部反应。利用之前通过 PCR 限制性片段长度多态性确定的 140 个已知等位基因对 SNaPshot 法进行验证。

结果:

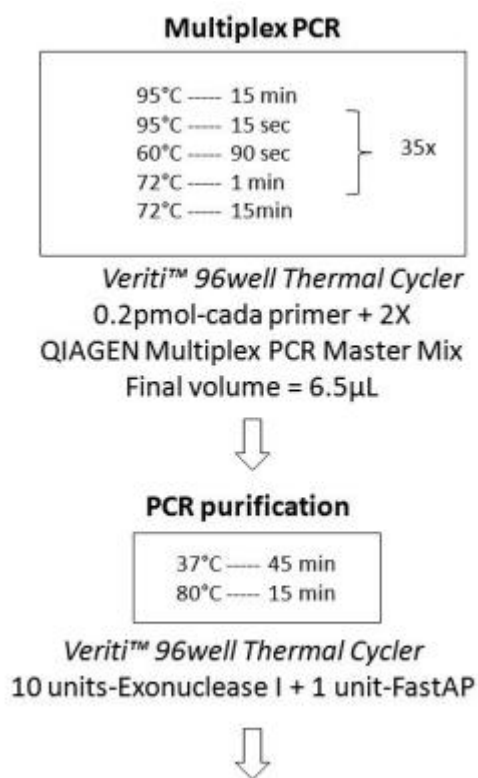
我们能够同时检测 9 个单核苷酸多态性,这些多态性定义了 16 个血型等位基因,其检测方法是基于多

重 PCR 和使用基因组 DNA 的单碱基扩展。

讨论:

本研究展示了一种稳健的基因分型策略来进行罕见供体筛选，该策略可应用于血液中心，可作为识别抗原阴性供体，从而提供罕见血液的重要工具。

具体流程如下：



SNaPshot reaction

96°C — 10 sec	} 25x
50°C — 5 sec	
60°C — 30 sec	

Veriti™ 96well Thermal Cycler

Probe primers:

0.2pmol-HY

0.4pmol-DI/CO/YT

0.5pmol-JS

0.6pmol-JO/DO/WR

0.7pmol-KP

+ 1.5µL-purified PCR product

+ 2.5µL-ABI Prism SNaPshot™

Multiplex Kit (Applied Biosystems)

+ purified water

Final volume 6µL (always perform on ice)



SNaPshot reaction purification

37°C — 45 min
80°C — 15 min

Veriti™ 96well Thermal Cycler

1 unit-FastAP



Denaturation

95°C — 5 min

Veriti™ 96well Thermal Cycler

1µL purified SNaPshot™ reaction

+ 9.75µL-formamide

+ 0.25µL-GeneScan LIZ120 (Applied Biosystems)



Fragment analysis

Time of injection (15 sec)

Pre run (3 min)

Run time (10 min)

Data delay (4 min)

POP-7™ Polymer (Applied Biosystems)

3500xL Genetic Analyzer

7 《Molecular typing for the Indian blood group associated 252G>C single nucleotide polymorphism in a selected cohort of Australian blood donors》

《澳大利亚献血者 Indian 血型系统分子分型 252G>C 单核苷酸多态性》

作者: Lopez GH, Mcbean RS, Wilson B

来源: Blood Transfus. 2015 Jan;13(1):78-85

摘要:

背景:

Indian 血型抗原(In(a)和 In(b))在输血医学中具有重要的临床意义。然而,这些抗原类型的抗血清很难获得。In(b)抗原是所有人人群中均存在的一种高频率抗原,而 In(a)抗原对立的频率在白种人中为 0.1%,在中东人群中为 11%。该抗原多态性由 CD44 中的单核苷酸多态性(SNP) 252G>C 编码。本研究的目的是建立和比较两种基因分型方法,以测量献血者队列中 IN*A 和 IN*B 等位基因的频率。

材料与方法:

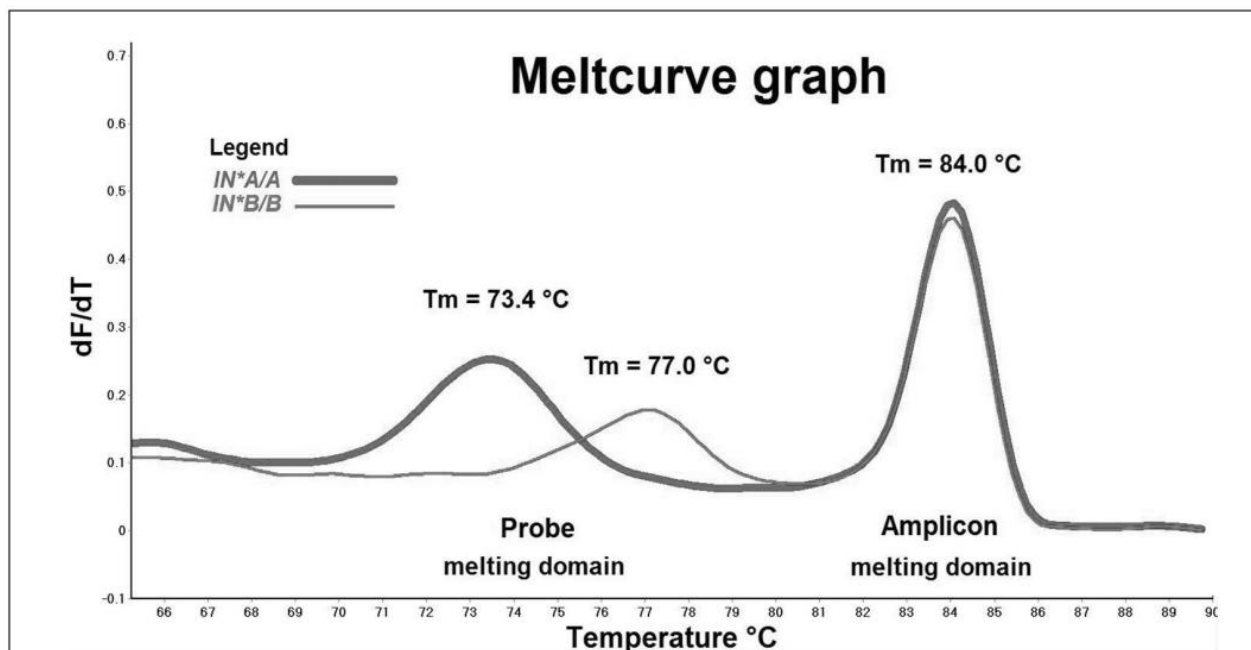
供体血液样本(n=151)采用新型实时聚合酶链反应(PCR)高分辨率熔解曲线 (HRM)分析和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 进行基因分型。利用核苷酸测序、红细胞凝集和流式细胞术对罕见的*A 等位基因样本进行了进一步研究。

结果:

本研究组共检测到 149 份纯合子*B 和 2 份杂合子*A/B, HRM 与 MALDI-TOF MS 方法 100%一致。在 PCR HRM 中,仅在*A 和*B 等位基因(3 类 SNP)中,扩增子熔解并无差异,但引入无标记探针(UP)提高了检测的分辨率。测序证实,两份非纯合子样品均为*A/B 杂合子,并通过红细胞凝集和流式细胞术进行表型鉴定,(A)和(B)抗原均符合预测。

讨论:

基因分型允许保存罕见的抗血清来预测血型抗原表型。在 PCR - hrm 中, In *A 和 In *B 等位基因根据其熔融特性进行了鉴别。在选定的供体人群中, In(a)频率为 1.3%。诸如此类的基因分型方法的应用有助于识别具有潜在临床意义的罕见血型表型的献血者。



8 《Performance of a microarray-based genotyping system for red cell and platelet antigens in China》

《基于微阵列的红细胞和血小板抗原基因分型系统在中国的应用研究》

作者: Ye L, Zhang J, Wang C, Yang Q, Han S, Zhu Z

来源: Blood Transfus. 2015 Oct;13(4):690-3

摘要:

输血前对抗原的鉴定检测的准确性对病人的安全至关重要的。血库和医院正在逐步采用基于基因分子方法来补充甚至取代免疫血液学技术。

本文验证 BLOODchip® Reference (Progenika, a Grifols company, Bilbao, Spain) 该芯片结果的正确性。

如下表：

Antigen system	Tested	Compared	Concordant results	Non-concordant results		
				Discrepancy		No call
				<i>in favour of BLOODchip®</i>	<i>in favour of ref. method</i>	
ABO	387	387	374	-	-	13 A
RhD	387	387	386	-	-	1 D+
RhCE	2,709	2,322 ^a	2,316	-	-	3 C, 3 c
Kell	3,096	2,709 ^b	2,709	-	-	-
Kidd	774	774	774	-	-	-
Duffy	774	774	774	-	-	-
MNS	2,322	1,548 ^c	1,539	5 N	-	2 M, 2 N
Diego	774	774	774	-	-	-
Dombrock	774	774	773	-	1 Do ^a	-
Colton	774	774	774	-	-	-
Lutheran	774	774	774	-	-	-
HPA	9,288	-	-	-	-	4 HPA6a / 4 HPA6bw
Total	22,833	12,005	11,967	5	1	32

Antigens not compared: (a) VS; (b) Kmod-1; (c) U, Mi².

ABO：芯片无信号原因：特殊基因型 A101A102

RHD、RHCD、MNS：芯片无信号原因：信号低

HPA6：芯片无信号原因：沉默基因多态性造成

MNS：芯片结果与测序一致，为 N-，血清学弱 N，怀疑单抗的假阳性造成。

Dombrock：芯片结果 Do(a-b+)，芯测序结果 Do(a+b+)，无义突变。

结论：总之，这是 BLOODchip®在中国第一个实现的结果，完成了基于微阵列的基因分型系统，基本保持一致。改良的软件分析的基因分型结果将会更加适应中国人群稀有血型的频率。

9 《定点诱变技术制备血型等位基因检测对照品》

作者：王攀，叶璐夷，郭忠慧，朱自严

来源：中国输血杂志 2010 年第 23 卷增刊

摘要：

目的：使用基于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的基因定点诱变技术 (site-directed mutagenesis, SDM)制备血型等位基因检测对照品，将此标准品用于稀有血型的多重 PCR 检测体系中，用以验证多重筛选体系敏感性和准确性。

方法：实验所用血液样本均来自上海市血液中心职工。首先使用 PCR 方法将血型等位基因的含有单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)位点的 1 段 DNA 克隆到质粒载体中，然后设计突变引物扩增此全长重组质粒，将扩增产物回收后进行 5' 端磷酸化，磷酸化产物进行自连后即制备了含有血型等位基因突变 SNP 的标准质粒。

结果：采用此种基于 PCR 的定点诱变技术，我们成功构建了 s、Oka、Yta、k、Jsb、Fya 血型等位基因的含有突变 SNP 位点的质粒标准品。

结论：基于 PCR 的基因定点诱变技术能够得到难以获得的血型等位基因检测对照品，用于稀有血型的多重 PCR 筛选中。

10 《血型基因定型用于辅助鉴定高频抗原抗体的研究

-附 1 例稀有血型 Di(a + b -) 产生疑似抗-Dib 鉴定报告》

作者：林裕翔，张烨，许志远，黄仁泰，苗天红

来源：中国输血杂志 2016 年 12 月第 29 卷第 12 期

摘要

目的：利用红细胞基因分型辅助鉴定对抗高频抗原的抗体(Antibody against high prevalence antigens)。

方法：对 1 例对抗高频抗原的抗体用血清学定型和基因定型(genotype) ，同时采用菠萝酶与巯基试剂(DTT) 处理红细胞进行抗体鉴定。

结果：抗筛细胞与谱细胞反应均阳性、反应强度一致且直抗和自身对照阴性，患者血清中存在对抗高频抗原的抗体。用试剂抗体血清学方法未检出稀有血型抗原，而基因分型检出患者为稀有血型 $Di(a + b -)$ ，其血清中存在的高频抗原抗体高度怀疑为抗-Dib。

结论：红细胞基因定型在辅助鉴定对抗高频抗原的抗体中有重要意义。

高频抗原抗体的特点是与筛选细胞和谱细胞反应均阳性且凝集强度一致，直抗和自身对照阴性，可与自身抗体区分。由于高频抗原阴性细胞取得困难，且表型检测缺乏相应的商用抗体试剂，因此检测上常使用已有的抗体试剂检测血型表型以期发现稀有血型，及使用不同的酶与化学试剂处理谱细胞观察反应的变化，但仍存在多种高频抗原抗体呈现相同反应格局的问题。

随着红细胞基因检测技术的发展与成熟，利用基因分型可以检出稀有血型并辅助检测高频抗原抗体。实验室遇到高频抗原抗体后的一般解决方法：用试剂抗体检测不同血型系统的抗原以期发现稀有血型；用不同的酶和巯基试剂 DTT 处理谱细胞看反应的变化等。但是这些血清学试验存在的问题是：商购试剂抗体的昂贵及缺乏，很多高频抗原抗体对处理谱细胞反应的一致性，这使得用血清学鉴定此类抗体十分困难。

目前红细胞血型抗原基因检测技术日益成熟，血型基因分型立基于序列特异性引物-聚合酶链式反应(PCR-SSP)针对高频抗原抗体检测过程中，若资金有限应首选基因分型试剂检测，其红细胞多系统抗原基因，作为判定抗体特异性的参考依据。

本例患者抗体鉴定发现其血浆中存在高频抗原抗体后，用血型室已有的试剂抗体分别检测了该患者的 12 个系统的抗原及 GPA 和 GPC，仍未检出患者缺乏哪个系统的高频抗原，同时用菠萝酶和 DTT 处理谱细胞，此抗体在菠萝酶和 DTT 对红细胞的处理中保持稳定反应格局，无法确定抗体的特异性。而通过血型抗原的基因检测，能有效检出患者为 Diego 系统的稀有血型 $Di(a + b -)$ ，其血清中存在的高频抗原抗体高度怀疑为抗-Dib。但仍需 $Di(a + b -)$ 细胞进行确认。

高频抗原抗体曾有严重输血反应的案例报导，正确鉴定高频抗原抗体除能提供患者用血安全外，血清中出现高频抗原抗体的患者同时也为稀有血型族群，可进行家族调查与登记建立稀有血型库，用以提供相同稀有血型族群的安全用血。

基因分型试剂：基因分型包含九个血型系统：MNS、Duffy、Kell、Dombrock、Diego、Kidd、Scianna、Colton、Lutheran(BioSuper 稀有红细胞基因分型试剂-9，批号：141222001) 由天津秀鹏提供。

11 《北京地区献血人群 Duffy 血型表型筛查及稀有血型库的建立》

作者：张燕华，车进，李美霖等

来源：中国输血杂志 2015 年 10 月第 28 卷第 10 期

摘要：

目的：调查 Duffy 血型表型在北京地区的分布频率，将筛选出的稀有血型红细胞甘油化冷冻保存，并建立稀有血型献血者档案资料，解决 Duffy 稀有血型患者输血难题。

方法：收集北京地区无血缘关系健康汉族献血者的血液标本 1752 份，少数民族献血者标本 274 份，外籍献血者标本 137 份，利用微柱凝胶法鉴定 Duffy 血型表型，PCR-SSP 检测 Duffy 血型基因，并随机选择 17 例做 Duffy 血型基因编码区域序列测定，以检测表现型与基因型符合性。

结果：1752 名汉族献血者，274 名少数民族献血者，137 名外籍献血者的 Du 血型各表型分布分别为：Fy (a+b-) 表型 1530 例 (87. 33%)、227 例 (82. 85%)、83 例 (60. 58%)，Fy (a+b+) 表型 213 例 (12. 16%)、42 例 (15. 33%)、32 例 (23. 36%)，Fy (a-b+) 表型 9 例 (0. 51%)、5 例 (1. 82%)、20 例 (14. 60%)，Fy (a-b-) 表型 0、0、2 例 (1. 46%)。FYA 基因频率分别为 93. 41、90. 51、72. 26，FYB 基因频率分别为 6. 59、9. 49、26. 28，FY 基因频率 0、0、1. 46。汉族与少数民族献血者，中国与外籍献血者表型频率比较，差异均具有统计学意义 ($P < 0. 05$)。17 例 FY 基因编码序列部分测序结果除 2 例 Fy (a-b-) 由于存在 FYB 基因外，其余标本与血清学、PCR-SSP 法均符合。FYA 与 FYB 基因的不同在于 FY 基因编码区域第 131 位核苷酸碱基为 A 或 G。

结论：北京地区汉族献血者 Fy^a 阴性表型频率与国内报道相似，而少数民族及外籍献血者较高，在北京地区建立 Fy^a 阴性稀有血型供者库，以便解决稀有血型患者紧急输血问题，对提高输血安全具有重要意义。

义。

Duffy 血型系统基因分型试剂盒(天津秀鹏, 批号: 140418001)

12 《应用血清学和分子生物学方法筛选浙江汉族人群中部分稀有血型》

作者: 祝宏, 刘瑛, 洪小珍, 许先国, 兰小飞, 马开荣, 何吉, 朱发明, 吕杭军

来源: 中国实验血液学杂志 2012; 20(3) : 749—752

摘要:

目的: 本研究探讨浙江汉族人群中部分红细胞血型系统稀有表型的分布情况。利用血清学技术或分子生物学。

方法: 分别筛选 H 系统 H-、MNS 系统 GPA-和 s-、Rh 系统 Rhnull、Rhmod、D--、CCDEE 和 CCdEE、Gerbich 系统 GPC-、I 系统 i+、Lutheran 系统 Lub-、Kell 系统 k-和 Jsb-、Duffy 系统 Fya-、Ok 系统 Oka-、Diego 系统 Dib-。利用尿素溶血试验筛选 Kidd 系统 Jk(a-b-)表型。

结果: 1 618 例献血者中检出 1 例 Di(a+b-), 1 007 例献血者检出 3 例 Fy(a-b+), 633 例 Rh 阴性献血者检出 1 例 CCdEE。大规模筛选中未发现 Jk(a-b-)、H-、GPA-、s-、GPC-、成人 i+、Lub-、k-、Jsb-、Lub-和 Oka-稀有血型。

结论: 在献血人群中发现 Di(a+b-)、Fy(a-b+)、CCdEE 稀有表型,提供了浙江汉族人群中部分红细胞稀有血型的分布数据。

稀有血型的筛选一般利用该血型抗原的特异性进行实验, 主要方法有血清学技术、抗原特异性实验和分子生物学方法。稀有血型的筛选理论上全部抗原均可以采用血清学技术, 但是由于针对部分稀有抗原的抗体十分稀少, 昂贵或者缺乏, 因此对部分稀有表型不适合采用血清学方法进行大规模筛选。

目前绝大部分稀有血型的分子机制已阐明, 因此可以利用其分子特性进行筛选, 常采用的方法有多重 PCR 技术或其它高通量分子诊断技术。

13 《国际基因库确认 1 例稀有血型类型-P 型》

来源：临床合理用药 2013 年 5 月第 6 卷第 5 期中

摘要：

近日，国际基因库确认并公布了 1 例序列号为 KC202808 的稀有血型类型，这个特殊的血型类型是由江苏省血液中心输血研究室主任刘衍春等发现的。1 例 62 岁的男性胃癌患者因术前备血，与库血中所有的 ABO、Rh 同型血相凝，最终确定该患者为 P 血型系统中的 p 血型，该血型在汉族人群中的出现比例低于 1/100 万。经家系调查，发现患者的一个弟弟与其血型完全相同。两人的血样经血型基因测序分析，发现第 343 碱基有 A > T 新的突变，使得终止密码子提前出现，相应血型抗原的糖基转移酶不能合成，结果，红细胞上 P 系统的抗原不能顺利形成，出现裸型即 p 血型。这是江苏省血液中心发现的第 2 例红细胞血型基因突变。

14 《献血者稀有血型数据库的建立》

作者：谢敬文，蓝文莉，莫锦政，马伟文，朱自严

来源：中国输血杂志 2011 年 08 月第 24 卷第 08 期

2.1 番禺地区献血者稀有血型筛选 见表 1。

表 1 番禺地区献血者稀有血型筛选结果

	稀有血型 表型	筛选 人数	阳性数	阴性数	频率(%)
抗-Mur	Mur +	2 500	179	2 321	7.2
抗-H	H -	18 000	17 997	3	0.017
抗-Lu ^b	Lu ^b -	5 000	4 998	2	0.040
抗-MN	M - N -	18 000	18 000	0	0
抗-Rh _{null}	Rh _{null}	18 000	18 000	0	0
抗-Kell	K ₀	18 000	18 000	0	0
2 mol/L 尿素	Jk (a - b -)	52 800	52 790	10	0.019

我们将本次筛选所获得的稀有血型资料，与 Rh 血型检索库和无偿献血者中同种不规则抗体阳性检索库起，建立本地区的稀有血型资源库。

15 《中国南京地区十个红细胞血型系统稀有抗原的大规模调查》

作者：马玲，刘衍春，薛敏，魏鹏，唐荣才

来源：中国实验血液学杂志 2011;19(1):231 -234

摘要：

本研究调查南京地区人群中稀有血型抗原的类型及分布情况，为稀有血型病人的临床用血和献血招募提供基础性资料。采用 4M 尿素对红细胞进行 Kidd 血型系统的 Jk (a-b-) 表型筛选；利用抗血清对 H 系统的 H-、MNS 系统的 GPA-、Gerbich 系统的 GPC-、li 系统的 i+、Lutheran 系统的 Lub-表型进行筛选；对 Kell 系统的 k-和 Js b-、Duffy 系统的 Fya-、Ok 系统的 Ok-、MNS 系统的 s-和 Digeo 系统的 Dib-表型采用多重 PCR 的方法进行筛选。

结果表明：在 40337 例标本中，筛选出 2 例 Jk (a-b-) 表型；在 1 782 例标本中，筛出 Fy (a-b+) 表型 3 例，尚未发现 Fy (a-b-) 的表型，也未发现 Ok-、s-和 Dib-表型。在 2 002、2 003、2 084、10 189 和 10 004 例标本中，未发现相应的 GPA-、GPC-、Lub-、H-和 i+稀有表型者。在 2017 例标本中，也未发现 k-和 Js b-的表型存在。

结论：南京地区人群中 Jk (a-b-) 表型频率为 0.0049%，Fy (a-b+) 表型频率为 0.168%，在现有筛

查人数中尚未发现所查其它血型系统稀有抗原的存在。

根据所查血型抗原的性质与抗体的稀缺性，综合性地采用了尿素溶解试验法、微量板改良抗人球法、multiplex PCR 法首次对南京地区稀有血型抗原进行了大规模的筛查，尤其是采用 PCR 法对多种血型抗原进行筛查，预示着分子时代的血型基因分型的到来。本次筛查所得到的结果，进一步提示不同的血型在不同地区和不同人群中既有共性又有区别。我国是一个多民族的国家，分析中国人特有的血型分布频率以及建立中国人的稀有血型库用于临床是十分有必要的。

16 《成都地区献血人群 Kell 等 9 个血型系统抗原基因分型研究》

作者：洪纛，巩天祥，周昌华，王乃红，杨群身，王欢

来源：中国输血杂志 2012 年 8 月第 25 卷第 8 期

摘要：

目的：了解成都地区献血人群 Kell 等血型系统抗原基因的多态性分布。

方法：采用 PCR-SSP 方法对 332 名成都地区汉族献血者的 Kell(KEL)、MNS(NMS)、Diego(DI)、Scianna(SC)、Dombrock(DO)、Colton(CO)、Duffy(FY)、Lutheran(LU)、Kidd(JK)等 9 个血型系统的 22 个抗原基因分型。

结果：成都地区汉族献血者 Kell、Kidd、Duffy 等血型系统抗原基因频率：KEL 为 $K=0.000\ 0$ 、 $k=1.000\ 0$ ；MNS 为 $m=0.575\ 2$ 、 $n=0.424\ 6$ 、 $S=0.0376$ 、 $s=0.962\ 2$ ，单体型 $MS=0.028\ 3$ 、 $Ms=0.546\ 9$ 、 $NS=0.009\ 3$ 、 $Ns=0.415\ 3$ ；DI 为 $Dia=0.040\ 7$ 、 $Dib=0.959\ 3$ ；SC 为 $Sc1=1.000\ 0$ 、 $Sc2=0.000\ 0$ ；DO 为 $Doa=0.066\ 3$ 、 $Dob=0.933\ 7$ ；CO 为 $Coa=1.000\ 0$ 、 $Cob=0.000\ 0$ ；FY 为 $Fya=0.951\ 8$ 、 $Fyb=0.048\ 2$ ；LU 为 $Lua=0.000\ 0$ 、 $Lub=1.000\ 0$ ， $Aua=0.893\ 1$ 、 $Aub=0.106\ 9$ ；JK 为 $Jka=0.442\ 8$ 、 $Jkb=0.557\ 2$ 。

结论：成都地区汉族献血人群中 MNS、DI、DO、FY、LU 和 JK 基因频率分布具有多态性，KEL、SC 和 CO 基因频率呈单态性分布。

人类 MNS、Duffy、Kell、Dombrock、Diego、Kidd、Scian na、Colton 和 Lutheran 等 9 个红细胞血型系统基因分型检测试剂盒(PCR-SSP) (天津秀鹏，批号 1010，1011)

17 《惠州地区无偿献血者 Mur 血型检索库的建立》

作者：严凤好，朱春燕，李雪群，钟展华，霍霞

来源：中国输血杂志 2016 年 2 月第 29 卷第 2 期

目的：通过对惠州地区无偿献血者抗-Mur 及 Mur 抗原进行检测,了解其在人群中的分布，建立本地区的 Mur 血型检索库。

方法：分别采用高通量微板法和微柱凝胶法对献血者进行抗-Mur 筛查和确认，并对其 Mur 抗原进行血清型检测。根据检测结果及献血者相关资料，建立 Mur 血型检索库，指导临床用血及献血者招募。

结果：总筛查人数 32 305 人，抗体阳性 104 人，阳性率 0.32%，其中 41 例具有临床意义，男女间的差异具有统计意义($P<0.05$)，女性高于男性;抗原阳性 1 862 人，阳性率为 5.76%。在近 1 年的临床输血应用中，共避免 41 袋含有抗-Mur 血液流入临床，并为 5 例抗-Mur 阳性患者找到相合血液。

结论：Mur 血型检索库的建立，能有效避免含有 Mur 抗体的血液制品流入临床，减少因此引起的疑难配血及输血不良反应，并快速找到相合血源，同时有利于稀有血型献血者的保留和电子配血的开展及推广。

18 《Antibodies to high-frequency antigens may decrease the quality of transfusion support: an observational study》

《高频率抗原的抗体可能会降低输血治疗效果:一项观察性研究》

作者: Seltsam A, Wagner FF, Salama A, Flegel WA

来源: Transfusion. 2003 Nov;43(11):1563-6

摘要:

背景:

关于对存在高频率红细胞抗原抗体患者输血治疗的研究报道较少。

研究设计与方法:

在与奥地利、德国和瑞士的参考实验室和输血服务机构的合作下，在 20 个月期间调研了存在高频抗原抗体的住院病人输血治疗的情况。

结果:

52 例高频抗原抗体患者在医院接受治疗。其中 22 人接受了 104 单位抗原阴性红细胞。在 23 例中，发生了偏离标准输血政策(例如，输入抗原不相容的单位)的情况。虽然不同国家使用冷冻或新鲜单位的情况各不相同，但在误差范围内不影响本研究统计量。本研究中大约 20% 的血样跨国供应。三分之二的患者具有四种抗体的特异性：抗 kpb、抗 vel、抗 lub 和抗 Yta。

结论:

本次调查显示，约三分之一的高频抗原抗体住院患者输血治疗不理想。维持仅四种罕见血液单位的快速供应及库存，将确保为这些患者中的大多数提供足够的输血治疗与支持。

19 《高频抗原抗体的鉴定方法和输血策略》

作者：黄娴，李彤彤，安仕萍，解金辉

来源：继续医学教育 2018 年 12 月 第 32 卷 第 12 期

摘要：

鉴定高频抗原抗体的主要目的之一是为患者找到匹配的血液。如果输入不相合的血液，若是 IgM 性质可能引起血管内溶血，急性溶血性输血反应甚至可能危及生命，若是 IgG 性质且效价不高则可能引起血管外溶血，迟发性溶血性输血反应导致发热和血红蛋白下降。

高频抗原抗体种类多、概率低、常呈现谱细胞全阳性且凝集强度一致，鉴定困难。文章归纳国内外报道的大多数高频抗原抗体所属的血型系统、高频抗原和对应的稀有血型，总结高频抗原抗体的鉴定方法，包括血清学试验和分子生物学技术，需根据抗原和抗体特点选择合适的鉴定方法。

血清学试验主要包括谱细胞鉴定和直抗试验、抗原鉴定、补体溶血和恢复试验、蛋白酶处理和 DTT 处理、效价和剂量效应、其它特性等。分子生物学技术主要包括基因分型、测序等。为解决含高频抗原抗体的患者的输血困难，可选择自体输血、亲属互助和稀有血型库匹配等输血策略，为稀有血型患者提供合适的血液。

血清学方法抗原鉴定受试剂缺乏、昂贵等因素制约，基因定型则更快捷、成本低，被大量应用于稀有血型的筛选。

血型基因分型基于序列特异性引物 - 聚合酶链式反应（PCR -SSP）的原理，根据不同血型抗原设计相应的引物。多重 PCR 基于 PCR-SSP 的反应原理，在反应体系内同时加入多种引物，扩增多种目的抗原片段，减少反应次数，增大通量，既可以提高检测效率，又能更大限度地使用个体极少见的稀有血型 DNA 样本。

测序通过检测相应血型的基因序列并进行比对，可直接证明患者是否为稀有血型。虽然耗时较长，但它可用于验证基因分型筛选的稀有血型。

据报道，2008—2010 年，国内 13 个省级血液中心联合筛选 135 万人次献血者，筛选出 1 000 多例稀有血型，并发现一系列在中国首次报道的稀有血型和新的稀有血型等位基因。2011 年，中国稀有血型网站开通（<http://www.chinarareblood.cn/>），通过信息共享，为高频抗原抗体患者解决输血难题已可进行

跨区域乃至国际合作。

总之，面对谱细胞全阳性的格局，需要运用多样的血清学方法，对照高频抗原抗体的特点，推测可能的抗体类别。运用分子生物学技术，通过基因分型鉴定稀有血型，必要时进行测序确认，可降低高频抗原抗体的鉴定难度。配血时，根据患者个体情况，选择自体输血、亲属互助献血或稀有血型库匹配，为含有高频抗原抗体的患者找到相合的血液提供了可能的途径。

20 《Mononuclear cells from a rare blood donor, after freezing under good manufacturing practice conditions, generate red blood cells that recapitulate the rare blood phenotype》

《来自稀有献血者的单核细胞，在良好的制造工艺条件下冷冻后，可产生再现稀有血型的红细胞》

作者：Masiello F, Tirelli V, Sanchez M

来源：Transfusion. 2014 Apr;54(4):1059-70

摘要：

背景：

从脐带血中培养的红细胞(cRBCs)可用于输血。从献血中丢弃的血沉棕黄层(成人血[AB])是否可以用来产生供输血用的红细胞还没有被研究。

结论：

常规供血者的血沉棕黄层在 cRBCs 的生成上并不逊色于脐带血。

21 《稀有血型及其在输血工作中的研究进展》

作者：曹庆盛，杨涛，王明慧

来源：中国实验血液学杂志 2017; 25(3) : 952 — 956

摘要:

通过人造血液解决稀有血型困境:

伴随干细胞研究的不断发展,将造血干细胞进行体外扩增,并诱导分化为成熟的红细胞,即人工制备红细胞用于输血已成为可能。目前多能造血干细胞的获取来源主要包括: 1) 直接通过脐带血分离; 2) 献血员献血后,收集滤白过程中抛弃的血液细胞,通过细胞重编程技术转换为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC) 进而获得多能造血干细胞; 3) 从胚胎干细胞中诱导分化。

通过血液分离中的废弃成分作为多能造血干细胞来源一直受到研究者的关注。最近, Masiello 等报道了在稀有血型献血员献血后,收集其滤白步骤后的废弃成分在体外诱导为成熟红细胞,扩增效率低于血清培养基中培养的脐带血干细胞,但与无血清培养基中脐带能干细胞的扩增效率比较无明显差别,为解决稀有血型输血者的输血困境带来希望。



为中国血型基因检测贡献力量!!!

为人民服务!!!