

基因检测在采集血液血型鉴定中的应用及进展

刘国栋

(济宁市中心血站 山东 济宁 272000)

摘要”基因组学近年来获得了非常快速的发展进步,对医学各领域产生了深刻的影响。在输血医学领域中,基因分型技术为以血清学方法为基础的血型检测提供了强有力的支持,成为精准鉴定血型的重要手段。随着基因型预测血型能力不断提升,对具有临床意义的血型抗原进行高分辨率的分型工作也会随之变得更加普及。本文分析了基因检测技术在红细胞血型鉴定中的应用及进展情况,希冀能为实践提供一定参考。

关键词:红细胞;血型鉴定;基因检测技术

血站正确鉴定红细胞血型能够为医院安全有效输血提供保障,当前实践中,通常是应用血清学技术鉴定血型,但这种方法对于某些疑难血型的鉴定存在一定不足。在分子生物学技术不断发展进步的情况下,其日渐成为正确判定血型不可缺少的手段。作为一种先进的检测技术,血型基因检测技术在鉴定疑难血型案例中起到了不可替代的作用,其能有效避免疾病和输血等外部因素的干扰,还能从分子水平上对血型抗原变化的原因进行准确分析,从而提高血型鉴定的准确性。

一、血型与血型鉴定

目前,红细胞血型系统已增加至大约 39 个,367 个抗原。研究发现,在基因水平变化的影响下,人类红细胞血型属同种异型抗原,抗原具有多样性。单核苷酸变异(single nucleotide variations, SNVs),失活突变如缺失和剪接位点突变也会导致新的表位或红细胞表面蛋白缺失是最常见的遗传变化^[1]。传统的血型测定方法是血清学试验,血型抗原的存在或缺失都能借助此种方法实现。随着血型鉴定工作和研究的深入,血清学检测技术的不足也逐渐凸显。此时,基因组学发展进步为红细胞抗原基因分型带来了新机遇,SNVs 基因分型为表型预测和基因分型方法的应用提供了依据。从实际情况看,基因分型能显著提升血清学无法鉴定红细胞表型情况下分型的准确性,某些情况下,基因分型也是血型抗原唯一可用的分型方法。

二、基因检测应用进展

血型基因分型在 20 世纪 90 年代就开始有研究,研究人员采用基于 PCR 的方法,来分析单个或少量 SNVs。大部分血型基因分型方法是建立在 PCR 扩增基础上的,各类技术存在载体类型、检测过程、选择的 SNPs 等方面的差异。依据血型基因检测技术,可分为高通量、中通量和高通量等几种技术。

(一) 低通量分析技术

低通量分析技术包括 PCR-RFLP、PCR-ASP、PCR-SSO、PCR-SSCP、PCR-SSP 等几种,其只能检测出已知的 SNPs,因而有可能漏检未知的基因变异。例如,PCR-SSP 技术对于 ABO 血型弱抗原及亚型的检测具有一定的帮助,但是只能针对 ABO 基因中几个关键位点做出设计和分析,无法对全基因位点的变异进行监测^[2]。同时,通常情况下描述一个特定的 ABO 等位基因需要识别许多 SNPs,且考虑到 ABO 和其他血型系统中发现新等位基因的速度,因此开发或利用某一种低通量技术检测应对所有等位基因的检测方法困难且不实际。

(二) 中通量分析技术

中通量分析技术包括 Real-time PCR、Sanger DNA 测序和焦磷酸测序(Pyrosequencing)等。Real-time PCR 是在常规 PCR 基础上加入荧光标记探针或相应的荧光染料来实现其定量功能。除了常规 ABO、Rh 血型检测,已有研究应用 real-time PCR 技术对 Diego 和 Duffy 等血型系统进行基因分型检测。Sanger DNA 测序是由 Sanger 等开发的传统基础测序方法,通过读取基因序列来识别单核苷酸多态性^[3]。中通量技术如 Real-time SNP 分析和 DNA 测序等属于相对耗时、需专业实验人员手工操作、需借助专业仪器才能开展的技术。此外,在 DNA 测序中,会产生大量需要存储和分析的数据,需要借助专门的生物信息学工具读取和分析结果,需要几天到几周的时间,这对于常规开展工作 and 应用是非常大的限制因素,难以用于大范围的血型系统检测。

(三) 高通量分析技术

目前中高通量分型技术涉及微阵列技术的应用。微阵列技术可以同时从基因组 DNA 中识别出大量的 SNPs,且可识别出不同血型系统的大多数等位基因。使用芯片检测允许同时识别不同血型系统的各种等位基因 SNPs,有助于确定多种血型系统的基因型。该技术可大量检测和分析 DNA 变异及多态性,自动化程度高,可快速分析差异表达基因等,但其缺点是重复多次使用后芯片或微阵列的敏感性会降低,且样品的制备和标记较复杂等。新的等位基因必须纳入检测平台,否则无法被检测到。同时,高通量分型技术在方法学、抗原选择、产量和成本等方面存在较大差异。

(四) 其他高通量分析技术

1、微测序或快照分析(Mini sequencing or the Snapshot assay)。该技术主要包括:一是利用 SNPs 技术进行准确的碱基检测;二是利用计算机辅助技术显示特定的基因改变和多态性。使用荧光标记的双脱氧核苷酸与多重 PCR 产物作为模板。在杂交和延伸步骤之后,测量来自阵列的荧光信号,并通过聚类分析确定基因型。这项技术已经成功的用于检测 ABO 血型系统中最常见的等位基因分型。

2、基质辅助激光脱附/电离飞行时间质谱分析(MAL-DI-TOF-MS)。该技术能区分在单个核苷酸中的 2 个不同 DNA 片段,主要包括:一是激光诱导基质分子的解吸、电离;二是依据基质分子的固有物理性质对其进行分离和分析。该方法被来自瑞士的两个研究团队使用,识别瑞士献血者中的 Kell, Kidd 和 Duffy 血型系统的等位基因。

(五) 下一代测序(Next-Generation Sequencing, NGS)

随着对血型基因多样性理解的深入,大规模并行测序或下一代测序(NGS)可能有助于准确预测变异的等位基因。NGS 是一种新的 DNA 测序方法,可以同时测定多个基因的序列,并可检测已知的或未知的 DNA 变异,且从单核苷酸变化到较大结构或不同类型的遗传变异都可以检测。NGS 技术更加经济高效,不仅能促进献血者的大规模基因分型,为稀有血型和/或产生多重抗体的患者提供精准安全的血液,还能提高检测的灵活性。新发现的等位基因越来越多,输血就能精确适应越来越多的受体,从而减少大量慢性输血患者的同种异体免疫。NGS 技术的这种优势在具有多种特异性等位基因的血型系统中尤为突出,比如 ABO 和 Rh 血型系统。

三、结语

血型基因分型研究有助于输血的管理,并可为血清学方法提供支持。红细胞抗原基因组学的应用是精准医疗的重要组成部分,目前,已有多种预测红细胞抗原遗传的分子工具,每种方法都有一定的临床应用价值,但它们也有其固有的局限性,如无法进行大规模测序(如 Sanger),或对不太常见的复杂变异、新的 DNA 变异(如 SNP 阵列)不敏感等。对于血站而言,对供者人群的血型分型筛查中,应结合实际情况加以灵活应用。

参考文献:

- [1] 谭茜茜,何涛,邹海曼,等.血型血清学和 PCR-SSP 方法在 ABO 疑难血型鉴定中的互补性应用.中国输血杂志.2017,11(30):1248-1250.
- [2] 雷建强,张民霞,唐元华.基于全外显子组数据的 ABO 血型的基因判定.生物信息学.2018(3):184-189.
- [3] 赵桐茂.基因分型预测 ABO 亚型的局限性.临床输血与检验.2018,20(2):113-116.