

团 体 标 准

T/ZGYCXH XXX—XXXX

红细胞、血小板和中性粒细胞抗原基因检测 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for genetic testing of antigens of red blood cells, platelets and neutrophils

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国遗传学会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国遗传学会提出并归口。

本文件起草单位：XXXXXX。

本文件主要起草人：XXXXXX。

红细胞、血小板和中性粒细胞抗原基因检测 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法

1 范围

本文件规定了实验室利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱方法进行红细胞、血小板和中性粒细胞抗原基因检测的原理、样本、试剂耗材、设备、操作步骤、结果分析、质量控制、环境和人员等要求。

本文件适用的样本类型包括但不限于全血样本。

本文件适用于采供血机构、医疗机构和第三方检测机构开展人类红细胞血型抗原、血小板抗原和中性粒细胞抗原的核酸质谱基因分型工作，通过精准血型检测提高输血疗效，保障临床用血安全。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6041-2020 质谱分析方法通则

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

YY/T 1740.2-2021 医用质谱仪 第2部分：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

血型 blood group

在血液中所检测出的任何遗传多态性可称之为血型，但血型通常被限定为血细胞表面抗原的多态性，包括红细胞、血小板和中性粒细胞血型等。在非特指的情况下，血型一般是指红细胞血型。

3.2

红细胞血型抗原 red blood cell blood group antigen

红细胞血型抗原是红细胞膜表面的标记物，主要是蛋白质或碳水化合物，具有多态性，能够刺激缺少相应抗原的个体发生免疫应答，产生对应的抗体。

3.3

血小板抗原 platelet antigen

血小板抗原是血小板特异性的表面抗原标记物，由血小板表面糖蛋白携带。

3.4

中性粒细胞抗原 neutrophil antigen

中性粒细胞抗原由携带抗原的糖蛋白和被同种抗体识别的多态性命名，由中性粒细胞表面糖蛋白携带。

3.5

基因型 genotype

个体一个或多个基因座上等位基因的组成。

3.6

等位基因 allele

位于一对同源染色体的相同位置上控制同一性状的不同形式的基因。

3.7

多态性 polymorphism

由于一个基因中发生核苷酸的突变、插入、缺失，从而形成了2个或多个等位基因的现象。

3.8

基因分型 genotyping

通过对核酸碱基序列的分析确定等位基因和基因型。

4 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

PCR: 聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction)

SAP: 虾碱性磷酸酶 (Shrimp Alkaline Phosphatase)

dNTPs: 三磷酸脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleoside Triphosphate)

MALDI-TOF MS: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)

5 伦理要求

人源组织取材的研究必须遵守政府法律和所有相关机构的规定，在取材和试验前应获得患者的知情同意，并仅可在已通过项目伦理审查的医院和科研机构进行。

6 原理

待检测样本中提取纯化获得DNA模板，通过PCR扩增出含有待测位点的一段靶序列，经SAP消化去除扩增产物中多余的dNTP，加入序列特异性延伸引物（其3'末端碱基紧临待测位点）和延伸终止混合物，待测位点在延伸酶的作用下进行单碱基延伸。单碱基延伸依据ddNTP链终止原理，加入经过修饰的ddNTP，引物仅在突变位点处延伸一个碱基即终止。延伸产物经过脱盐纯化后，转移至带有基质的芯片上，使用MALDI-TOF MS对延伸产物进行检测，通过质荷比信号分析确定模板中各位点的基因分型结果。

7 样本

7.1 样本类型

样本一般使用抗凝全血，特殊情况可使用羊水、口腔拭子、毛发等其他类型标本。血液样本使用乙二胺四乙酸（EDTA）或枸橼酸（ACD）盐作为抗凝剂，不宜采用肝素抗凝。应充分考虑近期输血史、用药史、干细胞移植等对个体血型抗原基因分型的影响，遇到此情形必要时可采集口腔拭子、毛发等标本。

7.2 样本采集与标识

样本采集规程，明确采集前准备、待检者身份识别、采集消毒和穿刺、样本留取和保存等过程的要求以及对样本质量影响的因素。严格执行既定的采集规程，样本应具有唯一性标识，与待检者信息一一对应，具有可追溯性。

7.3 样本运输

样本包装规范，防损坏、渗漏和污染。样本、检测申请单一一对应，宜同步运输。样本的运输应符合生物安全要求。血液样本的运输应在适宜温度和时间范围内，建议4℃温度环境运输，防止发生样本溶血。

7.4 样本接收和验收

做好交接和验收记录，确保样本的完整性和准确性，包括样本来源、样本类型、运输方式、样本数量和质量等，并与检测申请单核对。验收不符合的，应通知重新送样或者补充完善信息资料，必要时可终止申请项目。

7.5 样本保存

样本应尽快提取核酸，避免长期保存及反复冻融原始样本。避免样本在检测前发生变质、遗失或损坏。

8 设备、耗材和试剂

8.1 主要设备

包含但不限于以下设备：

- 8.1.1 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）仪，检测范围 1,500 至 10,000 道尔顿，在 4,500 至 9,000 道尔顿区段内可区分因单个碱基差异（约 9-16 道尔顿）导致的质量变化。
- 8.1.2 核酸提取仪。
- 8.1.3 PCR 扩增仪。
- 8.1.4 台式微量离心机。
- 8.1.5 微孔板离心机。
- 8.1.6 涡旋震荡仪。
- 8.1.7 移液器，规格为 10 μL 、20 μL 、200 μL 和 1000 μL 。
- 8.1.8 紫外分光光度计。

8.2 主要耗材

- 8.2.1 移液器吸头，规格为 10 μL 、20 μL 、200 μL 和 1000 μL ，包括带滤芯和不带滤芯。
- 8.2.2 离心管，规格为 1.5 mL 和 2.0 mL。
- 8.2.3 PCR 反应板，规格为 96 孔或 384 孔，包括带裙边和不带裙边。
- 8.2.4 PCR 封板膜。
- 8.2.5 树脂。
- 8.2.6 质谱芯片。

8.3 主要试剂

除另有规定，所用试剂均为分析纯。也可根据自身实验需求，选择其他型号的同功能的耗材和试剂。

- 8.3.1 超纯水。
- 8.3.2 核酸提取试剂盒。
- 8.3.3 引物。
- 8.3.4 10 \times PCR 缓冲液。
- 8.3.5 25 mM 氯化镁溶液。
- 8.3.6 dNTP Mix。
- 8.3.7 DNA 聚合酶。
- 8.3.8 SAP 缓冲液。
- 8.3.9 SAP 酶。
- 8.3.10 延伸缓冲液。
- 8.3.11 延伸终止混合物。

8.3.12 延伸酶。

9 操作步骤

9.1 核酸提取

按照核酸提取试剂盒说明书操作要求进行样本 DNA 提取，提取的 DNA 建议 A260/A280 在 1.7~2.0 之间，A260/A230 大于 1.7。

9.2 PCR 反应

9.2.1 参考附录 A.1 PCR 反应体系配制 PCR 反应液。

9.2.2 配制完成后，将 PCR 反应液加入 PCR 反应板，封好封板膜，放入微孔板离心机，1000g 离心 15s。

9.2.3 将反应板放入 PCR 扩增仪中，参考附录 A.2 的 PCR 反应程序进行 PCR 反应。PCR 反应程序可根据检测的目的基因和位点进行修改或调整，确保扩增反应结果呈阳性。

9.3 SAP 消化反应

9.3.1 参考附录 B.1 配制 SAP 反应预混液。

9.3.2 从 PCR 扩增仪中取出 9.2 的扩增产物，放入微孔板离心机，1000g 离心 15s。

9.3.3 取 2 μ L SAP 预混液，加入上述步骤的单个 PCR 产物中，完成后封好封板膜，在涡旋震荡仪上充分混匀，放入微孔板离心机，1000g 离心 15s。

9.3.4 将反应板放入 PCR 扩增仪中，参考附录 B.2 的 SAP 程序进行 SAP 反应。

9.4 单碱基延伸反应

9.4.1 参考附录 C.1 配制单碱基延伸反应预混液。

9.4.2 从 PCR 扩增仪中取出 9.3 的 SAP 产物，放入微孔板离心机，1000g 离心 15s。

9.4.3 从 PCR 扩增仪中取出 9.3 的 SAP 产物，放入微孔板离心机，1000g 离心 15s。

9.4.4 将反应板放入 PCR 扩增仪中，参考附录 C.2 的延伸反应程序进行延伸反应。

9.5 上机检测

按照MALDI-TOF MS的操作说明将9.4的延伸产物进行脱盐纯化、点样和上机检测。

9.6 数据分析

使用配套分析软件对样本进行红细胞血型抗原、血小板抗原和中性粒细胞抗原的基因型数据自动分析。待测SNP位点通过单碱基延伸反应产生特定长度的延伸产物。因每种碱基（A、T、C、G）的分子量存在已知差异，软件根据延伸引物的分子量结合延伸碱基的分子量，预先计算出特定SNP位点所有可能等位基因对应的理论分子量峰值。如在理论分子量位置检测到信号峰，进行结果判读，得到对应位点的等位基因类型。

10 结果分析

10.1 结果分析应符合 GB/T 6041-2020 的要求。

10.2 在分析软件上查看分析每个样本对应位点质谱峰图的情况（峰高、峰面积和信噪比等信息）。分析阳性对照、阴性对照和空白对照的检出结果，对照孔的结果应和预期一致。

10.3 对每个样本的位点结果进行判断，分析每个位点的基因型结果。

10.4 结果表述

10.4.1 红细胞血型抗原基因分型

- a) 基因型和等位基因的描述应遵循国际输血协会（ISBT）红细胞免疫遗传和血型命名委员会的命名原则，参见 ISBT 网站红细胞免疫遗传和血型命名委员会更新的血型等位基因列表。
- b) 建议分型结果对检测的红细胞血型系统等位基因多态性信息进行描述，主要包括核苷酸在参考序列的位置和变化、突变种类，并注明其可能的曾用名。针对检出的变异，实验室应尽可能完整描述。

- c) 建议对分型结果进行适当注释或解读,包括红细胞抗原或表型预测、结论解释性描述、输血策略、临床应用的可能风险等。
- d) 如检测多个多态性位点的红细胞血型抗原,分型结果解读应综合全部位点的检测结果进行注释或解读。

10.4.2 血小板抗原基因分型

- a) 应按照由 ISBT 和国际血栓和止血协会 (ISTH) 联合成立的国际血小板命名委员会对血小板抗原的命名原则进行描述。
- b) 建议尽可能完整描述分型结果,包括核苷酸在参考序列的位置和变化、突变种类。
- c) 建议对分型结果进行适当注释和解读,包括血小板抗原预测、输注可能的临床风险等。

10.4.3 中性粒细胞抗原基因分型

- a) 应按照 ISBT 粒细胞抗原工作组对中性粒细胞抗原的命名原则进行描述。
- b) 建议尽可能完整描述分型结果,包括核苷酸在参考序列的位置和变化、突变种类。
- c) 建议对分型结果进行适当注释和解读,包括中性粒细胞抗原预测、与临床相关的风险等。

10.5 结果的存储与安全

应严格保护受检者隐私,严禁泄露受检者信息。结果根据需要进行安全备份,并与互联网有效隔离。实验室应规定结果的保存时间、文件目录和文件类型。

10.6 检测后的样本和资料保存

完成基因分型的DNA标本保存期限应不少于1年,信息和资料的保存期限应不少于3年。废弃的样本和检测产物应作为医疗废物进行处置。

11 质量控制

11.1 样本质量控制

采集的样本应进行详细的登记和标识,并在规定的时间内进行处理和检测,同时样品应存储在适当的条件下,防止样品变质或污染。提取的样本核酸应用紫外分光光度计测定浓度和纯度,浓度不低于 $5\text{ng}/\mu\text{l}$,DNA的 A_{260}/A_{280} 宜介于 $1.7\sim 2.0$, A_{260}/A_{230} 大于 1.7 。

11.2 设备质量控制

根据实验室要求和实验需求选择符合的设备。设备应定期校准和维护,并按照对应的使用方法开展。

11.3 软件质量控制

应严格规定随机软件的版本,软件应具有控制仪器各模块、校准仪器、采集数据、批处理数据、采集质谱信号和生成结果报告的功能。

11.4 过程质量控制

建议制定详细的操作规范。实验过程中应进行详细记录,包括实验时间、操作人员、实验条件、检测结果等。建议在检测过程中加入阳性对照、阴性对照和空白对照。

可以使用血型参考标准品或者已知突变的样本作为阳性对照品。阴性对照品可为无相关突变的同类标本。空白对照一般使用超纯水。

11.5 质控规则

实验室应建立适用的质控规则用来监控和分析失控原因。质控品检出结果应与预期相同,空白对照(模板为超纯水)检出也应符合预期(无非特异出峰),每次的质控结果做好质控记录。

11.6 记录质量控制

应对实验室的工作进行全面记录,包括实验记录、设备使用记录、人员培训记录等。记录应清晰、完整、易于查询。

11.7 阶段性质量控制

可根据需要,有计划地采用留样抽检复测、相同标本的不同人员和方法比对等方式进行阶段性质控。对每次阶段性质控数据进行汇总统计和室内质控评价。如采用分型后抽样方式,建议比例不低于2%,基因分型符合率应为100%。同类仪器和同类项目的测定建议每年至少进行1次比对试验,以保证分型结果的准确性和一致性。

12 环境和人员要求

12.1 实验室通用性要求

12.1.1 实验室设计应符合实验流程,便于操作和使用。

12.1.2 实验室应采用严格的分区设计,包括为四个独立区域:一区(试剂准备区)、二区(DNA提取)、三区(PCR扩增)、四区(核酸质谱检测区),其中四区需满足恒温 20-25℃,恒湿 30%-60%。人员流向应从一区→二区→三区→四区单向流通,空气压力应从一区到四区递减。

12.1.3 实验室设备应符合相关标准和规定,确保准确性和安全性。

12.1.4 实验室环境应具备适宜的温湿度控制和照明条件,应具备相应的防护设施,同时应设置相应的环保设施。

12.1.5 实验室安全应符合 GB19489-2008 的要求。设置安全出口和消防设施,配备相应的安全设备,同时制定安全管理制度,规范实验操作流程,确保实验室和人员的安全。

12.1.6 实验室废弃物应分类收集、分类处理,产生的有害废弃物应按照规定进行无害化处理,确保环境安全。

12.2 人员资质和培训

12.2.1 建立人员资质认证制度,对实验室工作人员进行考核和评价,定期对人员进行培训,并对培训效果进行评估和反馈。

12.2.2 临床基因扩增实验室人员应具备 PCR 上岗证方可从事临床基因扩增工作。其他岗位人员也应参加对应的专业培训并通过考核后方可上岗。

附录 A

(资料性附录)

PCR 反应体系及反应程序

表 A.1 PCR 反应体系

| 试剂名称 | 用量 (μL) |
|-------------|----------------------|
| 10×PCR 缓冲液 | 0.5 |
| 25 mM 氯化镁溶液 | 0.4 |
| dNTP Mix | 0.1 |
| DNA 聚合酶 | 0.2 |
| 引物 Mix | 1 |
| 超纯水 | 0.8 |
| DNA | 2.0 |
| 总量 | 5.0 |

表 A.2 PCR 反应程序

| 步骤 | 温度 ($^{\circ}\text{C}$) | 时间 | 循环数 |
|----|---------------------------|----------|-----|
| 1 | 95 | 2 min | 1 |
| 2 | 95 | 30 s | 45 |
| | 56 | 30 s | |
| | 72 | 1 min | |
| 3 | 72 | 5 min | 1 |
| 4 | 4 | ∞ | 1 |

注：若 PCR 反应产物暂时不进行下一步实验操作，可 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 24 小时，或者 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 2 周。

附录 B

(资料性附录)

SAP 反应预混液配方表及反应程序

表 B.1 SAP 反应预混液配方表

| 试剂名称 | 用量 (μL) |
|------------|----------------------|
| 10×SAP 缓冲液 | 0.17 |
| SAP 酶 | 0.3 |
| 超纯水 | 1.53 |
| 总量 | 2.0 |

表 B.2 SAP 反应程序

| 步骤 | 温度 ($^{\circ}\text{C}$) | 时间 | 循环数 |
|----|---------------------------|----------|-----|
| 1 | 37 | 40 min | 1 |
| 2 | 85 | 5 min | 1 |
| 3 | 4 | ∞ | 1 |

注：若 SAP 产物暂时不进行下一步实验操作，可 4°C 保存不超过 24 小时，或者 -20°C 保存不超过 2 周。

附录 C

(资料性附录)

单碱基延伸反应预混液配方表及反应程序

表 C.1 单碱基延伸反应预混液配方表

| 试剂名称 | 用量 (μL) |
|-------------------|----------------------|
| 10 \times 延伸缓冲液 | 0.2 |
| 延伸终止混合物 | 0.2 |
| 延伸引物 | 0.94 |
| 单碱基延伸酶 | 0.04 |
| 超纯水 | 0.62 |
| 总量 | 2.0 |

表 C.2 单碱基反应程序

| 步骤 | 温度 ($^{\circ}\text{C}$) | 时间 | 循环数 | |
|----|---------------------------|----------|-----|----|
| 1 | 95 | 30 s | 1 | |
| 2 | 95 | 5 s | 1 | 40 |
| | 52 | 5 s | 5 | |
| | 80 | 5 s | | |
| 3 | 72 | 3 min | 1 | |
| 4 | 4 | ∞ | 1 | |

注：若延伸产物暂时不进行下一步实验操作，可 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 24 小时，或者 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 2 周。

参考文献

- [1] 中国核酸质谱应用专家共识协作组. 中国核酸质谱应用专家共识[J]. 中华医学杂志,2018,98(12): 895-900.
 - [2] CNAS-GL039: 分子诊断检验程序性能验证指南
 - [3] YY/T 1740.2-2021 医用质谱仪 第2部分: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪
 - [4] GB/T 42751-2023 信息技术 生物特征识别 高通量测序基因分型系统规范
 - [5] T/CSBT 009-2021: 红细胞血型基因分型技术指南
 - [6] T/CSBT 010-2021: 血小板配合性输注的献血者资料库建设规范
 - [7] WS/T 203-2020: 输血医学术语
 - [8] ISBT Blood Group Database. <https://blooDATABASE.isbtweb.org/>
 - [9] Platelet and Granulocyte Immunobiology. <https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/platelet-granulocyte-immunobiology.html>
-