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

编制说明

上海市血液中心

2026 年 5 月 6 日

目　　次

1. 标准制订的背景和目的.....1
2. 标准编制的基本原则.....1
3. 研究目标.....1
4. 伦理要求.....1
5. 检测条件的确定.....2
5.1 样本的确定.....2
5.2 仪器和耗材.....3
6. 红细胞、血小板和中性粒细胞抗原的核酸质谱检测.....3
6.1 操作步骤.....3
6.2 结果分析.....4
7. 质量控制.....5
7.1 样本质量控制.....5
7.2 设备质量控制.....5
7.3 软件质量控制.....5
7.4 过程质量控制.....5
7.5 质控规则.....5
7.6 记录质量控制.....5
7.7 阶段性质量控制.....5
7.8 实验室通用性要求.....6
7.9 人员资质和培训.....6
8. 采用国内外标准情况.....6
9. 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系.....6
10. 重大分歧意见的处理经过和依据.....6
11. 标准作为团体标准发布的意见.....6
12. 其他事项说明.....7

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

编制说明

1. 标准制订的背景和目的

输血是重要的医疗手段之一，广泛应用于临床。然而，血细胞表面的多态性（血型）可能导致溶血性输血反应、血小板无效输注等，严重危害患者的生命安全。此外，血型不配合还可导致新生儿溶血病、新生儿血小板减少性紫癜、移植失败等临床症状。因此，开展血型精准分型具有重要的临床意义和学术、应用价值，契合《中国精准医学 2035 发展战略》。

血清学技术是目前临床常规采用的血型检测方法，但是存在血清学试剂种类有限、某些血型抗原存在变异型、多次输血/某些药物导致患者定型困难等问题，无法开展红细胞血型抗原拓展分型或血小板抗原分型等。由于以上原因，基因分型成为了实现血型精准检测，提高输血疗效，解决血型相关临床问题的有效途径。由于血型抗原具有遗传多态性丰富，基因数量较多等特点，中高通量的检测技术，包括高通量测序等，更适合于血型抗原的全面分型。考虑检测效率和成本，基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱的核酸质谱检测方法，兼具高通量、高准确性、低成本、结果分析简易、快速稳定等优点，可检测 SNP、InDel 等主要的血型基因变异，因此适合应用于血型基因分型的常规检测（红细胞、血小板和中性粒细胞抗原），也是目前临床血型基因检测应用中有竞争力的商业化检测技术。

近年来，国内外已有多个实验室开发了基于核酸质谱的血型抗原实验室自建检测方法，在稀有血型库建库等应用方向开展了常规化应用。在商业领域，Agena 公司曾推出多个 Hemo ID 血型基因分型 panel，适用于红细胞等血细胞抗原的血型分型。随着血型基因分型技术的深入推广，预期核酸质谱检测技术将有更大的市场增长空间。

总体而言，核酸质谱技术在血型基因检测方向具有良好的应用前景，然而相关的技术标准仍缺失，限制了该技术的进一步应用。因此，亟需建立相应标准，规范核酸质谱技术在血型基因检测中的适用范围、实验方法和结果分析，推动血型基因核酸质谱检测的发展和临床应用。

2. 标准编制的基本原则

本标准的编制依据 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写》，并参照 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》和 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。本标准以血型抗原核酸质谱检测的规范化和标准化为出发点，以技术标准必须具有广泛性、可操作性和适用性为工作目标，参考了现有质谱和血型抗原基因分型相关的国内行业标准、指导文件和科研文献，总结出该标准的关键环节和参数依据，以满足标准制定的通用性、普适性和先进性要求。

3. 研究目标

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。

4. 伦理要求

涉及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。

5. 检测条件的确定

5.1 样本的确定

根据临床实践中主要的样本类型和核酸质谱检测对 DNA 样本的要求，确定了样本类型、采集与标识、运输、接收和保存等要求。

5.1.1 样本类型

样本一般使用抗凝全血。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。

5.1.2 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。

5.1.3 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。

5.1.4 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。

5.1.5 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。

5.2 仪器和耗材

使用核酸质谱检测所必需的设备和辅助设备。对使用的设备和试剂耗材的规格进行了确认。

5.2.1 主要和辅助设备

a）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；

b）核酸提取仪；

c）PCR 扩增仪；

d）台式微量离心机；

e）微孔板离心机；

f）涡旋震荡仪；

g）移液器，规格为 10 μL、20 μL、200 μL 和 1000 μL；

h）紫外分光光度计。

5.2.2 主要耗材

a）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；

b）离心管，规格为 1.5 mL 和 2.0 mL；

c）PCR 反应板，规格为 96 孔或 384 孔，包括带裙边和不带裙边；

d）PCR 封板膜；

e）树脂；

f）质谱芯片。

6. 红细胞、血小板和中性粒细胞抗原的核酸质谱检测

根据核酸质谱检测常规流程和血型抗原基因分型特点，我们将该工作分为实验操作和结果分析两个部分，实验操作包括：核酸提取、PCR 反应、SAP 消化反应、单碱基延伸反应、上机检测和数据分析；结果分析包括：分析要求、峰图查看、结果判断、结果表述、结果存储和样本资料保存。我们对各关键流程要求逐一细化，以达到标准化目的。

6.1 操作步骤

6.1.1 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。

6.1.2 PCR 反应

6.1.2.1 参考附录 A.1 PCR 反应体系配制 PCR 反应液。

6.1.2.2 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。

6.1.2.3　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。

6.1.3　SAP 消化反应

6.1.3.1　参考附录 B.1 配制 SAP 反应预混液。

6.1.3.2　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。

6.1.3.3　取 2 μL 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。

6.1.3.4　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。

6.1.4　单碱基延伸反应

6.1.4.1　参考附录 C.1 配制单碱基延伸反应预混液。

6.1.4.2　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。

6.1.4.3　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。

6.1.4.4　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。

6.1.5　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。

6.1.6　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。

6.2 结果分析

6.2.1　结果分析应符合 GB/T 6041-2020 的要求。

6.2.2　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。

6.2.3　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。

6.2.4　结果表述

6.2.4.1　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。

6.2.4.2　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。

6.2.4.3　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。

6.2.5　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。

6.2.6　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。

7.　质量控制

根据质量管理五要素“人机料环法”开展血型抗原核酸质谱检测的质量控制，主要包括：样本质量控制、设备质量控制、软件质量控制、过程质量控制、质控规则、记录质量控制、阶段性质量控制、实验室通用性要求、人员资质和培训。

7.1 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 5ng/μl，DNA 的 A260/280 宜介于 1.7～2.0，A260/A230 大于 1.7。

7.2 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。

7.3 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。

7.4 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。

7.5 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，空白对照检出也应符合预期，每次的质控结果做好质控记录。

7.6 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。

7.7 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。

7.8 实验室通用性要求

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 5ng/μl，DNA 的 A260/280 宜介于 1.7～2.0，A260/A230 大于 1.7。

7.8.1 实验室设计应符合实验流程，便于操作和使用。

7.8.2 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。

7.8.3 实验室设备应符合相关标准和规定，确保准确性和安全性。

7.8.4 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。

7.8.5 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。

7.8.6 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。

7.9 人员资质和培训

7.9.1 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。

7.9.2 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。

8. 采用国内外标准情况

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

9. 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准符合现行法律、法规和强制性标准的规定。

10. 重大分歧意见的处理经过和依据

无。

11. 标准作为团体标准发布的意见

目前，我国还没有血型抗原核酸质谱检测的国家、行业等标准方法，建议将本标准作为团体推荐性标准，并逐步向行业内推广使用。

12. 其他事项说明

无。