

• 临床研究 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.01.019

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240829.1538.034\(2024-08-30\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240829.1538.034(2024-08-30))

MALDI-TOF MS 检测 HPA-29-35w 技术的建立及应用*

陈洁润,周 燕,李丽兰,钟周琳,蒋丽红,马婷婷,李恒聪,莫秋红[△]

(南宁中心血站/南宁输血医学研究所,南宁 530003)

[摘要] **目的** 建立基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)基因分型检测技术,并应用于探索血小板抗原(HPA)-29-35w 低频基因在广西地区献血人群中的多态性。**方法** 确定 7 个目的基因突变位点在单核苷酸多态性数据库(dbSNP)中的 rs 号,利用 MassARRAY 平台在线引物设计工具 Assay Design Suite(ADS)设计 21 条引物,构建 7 个插入 HPA-29bb-35bb 突变型序列的过表达载体。在广西地区献血者中随机选择 29 名献血者的标本和载体进行 iPLEX Pro 多重基因分型分析与质谱检测;同时,对上述标本进行测序,将测序结果与质谱检测结果进行对比验证,建立 MALDI-TOF MS 基因分型检测技术。随后采用该技术对 588 名广西地区献血者的标本进行 HPA-29-35w 基因分型检测和多态性分析。**结果** MALDI-TOF MS 对 HPA-29-35w 基因分型检测结果与测序结果一致。HPA-29-35w 基因分型结果显示,588 名广西地区献血者的 HPA-29-35bw 基因型均为 aa 纯合子。**结论** 成功建立 MALDI-TOF MS 对 HPA-29-35w 基因分型检测技术,并应用于广西地区献血人群的 HPA-29-35w 基因筛查。

[关键词] 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;人血小板抗原;基因分型;基因多态性**[中图法分类号]** R440**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2025)01-0101-07**Establishment and application of MALDI-TOF MS technique for detecting HPA-29-35w***

CHEN Jierun, ZHOU Yan, LI Lilan, ZHONG Zhoulin, JIANG Lihong,

MA Tingting, LI Hengcong, MO Qihong[△]

(Nanning Blood Center / Nanning Institute of Blood Transfusion Medicine, Nanning, Guangxi 530003, China)

[Abstract] **Objective** To establish the genetic typing detection technique of matrix-assisted laser desorption ionization-time or flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and to apply it to investigate the polymorphism of the human platelet antigen (HPA)-29-35w low-frequency gene in blood donor population from Guangxi area. **Methods** The RS number of 7 target gene mutation sites in dbSNP and 21 primers were designed by using Assay Design Suite (ADS) of MassARRAY platform online primer design tool. Seven over-expression vectors inserting into HPA-29-35bb mutant sequence were constructed. Twenty-nine blood donors were randomly selected among the blood donors team in Guangxi area. The samples and vectors conducted the iPLEX Pro multiple genotyping analysis and mass spectrometric detection. Meanwhile, the above samples were sequenced and the sequencing results conducted the comparison validation with the mass spectrometric detection results, then the MALDI-TOF MS genotyping detection technology was established. Then adopting this technology conducted the platelet antigen HPA-29-35W genotyping detection and polymorphism analysis in the samples from 588 blood donors in Guangxi area. **Results** The MALDI-TOF MS HPA genotyping detection results were consistent with the sequencing results. The HPA-29-35w genotyping results showed that the HPA-29-35w genotype of 588 blood donors in Guangxi area was aa homozygote. **Conclusion** The genotype detection method of MALDI-TOF MS for HPA-29-35w is successfully established and applied to the screening of HPA-29-35w gene among the blood donor population in Guangxi area.

[Key words] matrix-assisted laser desorption ionization-time or flight mass spectrometry; human platelet antigen; genotyping; gene polymorphism

* 基金项目: 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20210821, Z20201430); 广西自然科学基金面上项目(2023GXNSFAA026300); 中国输血协会威高科研基金项目(CSBT-WG-2023-06)。 [△] 通信作者, E-mail: qihong_mo@126.com。

人类血小板抗原(human platelet antigen, HPA)主要位于 GP II b、GP III a、GP I b、GP IX、GP I a、CD109 等血小板膜糖蛋白上。血小板抗原 HPA-29a/29bw、HPA-32a/32bw-35a/35bw 与 HPA-1a/1b 均由 ITGB3 基因编码,位于血小板糖蛋白 GP III a 上;HPA-30a/30b 与 HPA-3a/3b 均由 ITGA2B 基因编码,位于血小板糖蛋白 GP II b 上;HPA-31a/31bw 由 GP9 基因编码,位于糖蛋白 GP IX。根据中国人群 HPA 多态性频率分布和同种异型抗原杂合度推测,HPA-3、5、15 由于同种免疫而产生相应 HPA 特异性抗体的可能性较大,由抗 HPA-3a、抗 HPA-5b 所致血小板免疫异常性疾病在国内已有报道^[1-2]。然而关于 HPA-29-35w 基因频率多态性鲜有报道。随着成分输血的发展,血小板输注已经成为血小板减少或功能缺陷患者支持治疗的重要手段^[3]。随着输注次数的增多,血小板输注无效也成为困扰国内外输血治疗的一大难题,其中 HPA 抗原引起的同种异体免疫发生率为 2%~8%^[4]。血小板交叉配合试验可以降低输血不良反应的发生率,对于需要长期输注血小板的患者,预防性选择抗原匹配的血小板供者或抗体对应血小板抗原阴性的献血者,可降低免疫刺激风险,提高输血的疗效和安全性。解决无效输注的有效途径是建立血小板供者基因数据。目前,南宁、杭州、广州等地采供血机构先后采用 PCR-序列特异性引物(sequence specific primer, SSP)、PCR-直接测序法(sequence-based typing, SBT)、PCR-顺序特异寡核苷酸法(sequence specific oligonucleotide, SSO)等技术方法建立了相应的血小板供者基因数据库。而建立基于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)平台的 HPA 基因分型技术鲜有报道,本研究拟建立 MALDI-TOF MS 对 HPA-29-35w 基因分型检测技术,应用于广西地区 HPA-29-35w 基因多态性研究,为血小板供者基因数据库的建设提供优质的 HPA 基因分型方法。

1 材料与方法

1.1 一般资料

对广西地区 588 名无血缘关系的随机献血者采集外周静脉全血 5 mL,以乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,于-80℃冻存待检。从 588 份标本中随机抽取 29 份作为技术验证标本,编号为 S1~S29。本研究经本单位医学伦理委员会审核(审批号:审 202105 号),研究对象知情同意并签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器

全自动核酸提取仪(Libex 96,中国西安天隆科技有限公司),PCR 扩增仪(Veriti DX,美国 ABI 公司),MALDI-TOF 质谱仪(美国 Agena 公司),离心机(Eppendorf Centrifuge 5424,德国 Eppendorf 公司),涡旋混匀仪(Vortex-genie2,美国 Scientific Industries

公司),不带裙边的 96 孔板(美国 Axygen 公司),透明的 PCR 封板膜(德国 Thermo 公司),移液器(Eppendorf Research plus,德国 Eppendorf 公司),10 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL 带滤芯吸头(美国 Axygen 公司);核酸提取或纯化试剂盒(Ex-DNA 全血基因组,西安天隆科技有限公司),基因分型试剂 iPLEX[®] Pro、PCR Reagents & SpectroCHIP[®] Kit-CPM(10×96)、MassARRAY[®] 清洁树脂、28 g 脱盐树脂(美国 Agena 公司);限制性核酸内切酶:FastDigest EcoR I、FastDigest Pvu II、FastDigest HindIII(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 制备

采用核酸提取或纯化试剂盒在全自动核酸提取仪上进行基因组 DNA 提取,稀释 DNA 终浓度为 50 ng/μL,吸光度为 1.75~1.85。

1.3.2 HPA-29-35w 突变型参考质粒的构建

根据突变型单核苷酸多态性(SNP)位点信息,见表 1,参考质粒包括 HPA-29bb-35bb 突变型及其两端碱基序列[HPA-29bb 位于 ITGB3 第 2 外显子(Exon2),HPA-34bb 位于 Eonx3,HPA-32bb 位于 Exon4,HPA-33bb 和 HPA-35bb 位于 Exon10;HPA-30bb 位于 ITGA2B Exon25;HPA-31bb 位于 GP9 Exon3],合成后克隆至 PUC57 载体,转化 E. coli DH5,提取质粒、酶切鉴定并测序。

1.3.3 MALDI-TOF MS 对 HPA-29-35w 基因分型检测方法的建立

包含检测 HPA-29-35aa 野生型(29 份技术验证标本)和对应突变参考质粒(HPA-29-35bb 共 7 个)的质谱检测方法。利用美国 Agena 公司 ADS 在线引物设计软件进行 SNP 位点引物设计,引物信息见表 1。多重 PCR 反应:5 μL 体系[高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)级水,10×PCR 缓冲液,25 mmol/L MgCl₂,25 mmol/L dNTP 混合物,0.5 μmol/L 引物混合物,5 U/μL PCR 酶,5 ng/μL DNA],PCR 循环参数:95℃ 2 min,45 个循环(95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min),72℃ 5 min,4℃ 保持。碱性磷酸酶处理:7 μL 体系[HPLC 级水,虾碱性磷酸酶(shrimp alkaline phosphatase, SAP)缓冲液,SAP 酶]。配制后 2 μL 加入到多重 PCR 反应产物中,PCR 循环参数:1 个循环(37℃ 40 min,85℃ 5 min,4℃ 保持)。单碱基延伸反应:9 μL 体系(HPLC 级水,iPLEX 缓冲液,iPLEX 终止混合物,延伸引物混合物,iPLEX Pro 酶配制后 2 μL 加入到碱性磷酸酶处理后的产物中,PCR 循环参数:95℃ 30 s,40 个循环(外部循环)95℃ 5 s,5 个循环(内部循环)52℃ 5 s,80℃ 5 s,72℃ 3 min,4℃ 保持。质谱仪分析:延伸反应结束后,加入 41 μL 去离子水,构成总体积 50 μL,反应产物经过树脂脱盐后点样在

SpectroCHIP 芯片上,用 MALDI-TOF 质谱仪进行检测。通过质谱仪的聚类分析模块,快速准确地区分 HPA-29-35bw 等位基因的基因型。

1.3.4 技术验证

利用建立的方法检测 29 份技术验证标本,同时设计引物进行 Sanger 测序,测序引物见表 2。将 MALDI-TOF MS 检测结果与测序结果进行比对。

表 1 人 HPA-29-35w 抗原系统的多态性及扩增单碱基延伸引物序列

HPA 分型	编码基因	糖蛋白	参考序列	dbSNP	核苷酸变化	PCR-SSP 引物	延伸引物 UEP	参考文献
HPA-29a/29b	ITGB3	GPⅢa	NM_000212	rs544276300	98C>T	F: ACG TTG GAT GTT TGT CTG TCT GTT GCA GGG R: ACG TTG GAT GTC CTT ACC TCA TCA GAG CAC	F:GGC CCA ACA TCT GTA CCA	[5]
HPA-30a/30b	ITGA2B	GPⅡb	NM_000419	rs377753373	2511C>G	F: ACG TTG GAT GTG GGA CTG TGA ATG GTC TTC R: ACG TTG GAT GGC TGT ATA TCC AGG ATG TAG	F:ATC CAC CTT CCG GGA CA	[6]
HPA-31a/31b	GP9	GPⅨ	NM_000174	rs202229101	368C>T	F: ACG TTG GAT GTG ACT GCA GCC TCA CCT ATC R: ACG TTG GAT GAG CTG GTA GCC TGT CAG CC	R: CCT GTC AGC CGG CCC AGC	[7]
HPA-32a/32b	ITGB3	GPⅢa	NM_000212	rs879083862	521A>G	F: ACG TTG GAT GTC TGT GGA GCA TCC AGA ACC R: ACG TTG GAT GAC AGG CTT GTC CAC AAA TGC	R:AAA TGC CCC GAA GCC AAT CCG CAG G	[8]
HPA-33a/33b	ITGB3	GPⅢa	NM_000212	rs1555572829	1373A>G	F: ACG TTG GAT GCT TCA AGG ACA GCC TGA TCG R: ACG TTG GAT GTT GCA GCG ATG GCT ATT AGG	R: TGG CAG GCA CAG TCA CAA	[9]
HPA-34a/34b	ITGB3	GPⅢa	NM_000212	rs777748046	349C>T	F: ACG TTG GAT GCC AGG TCA CTC AAG TCA GTC R: ACG TTG GAT GTC CAC CTT GTG CTC TAT GCC	F:GTC CCC AGA GGA TTG CAC TC	[10]
HPA-35a/35b	ITGB3	GPⅢa	NM_000212	rs779974422	1514G>A	F: ACG TTG GAT GAT CCC AGT GTG AGT GCT CAG R: ACG TTG GAT GAT TGA CCA CAG AGG CAC TCG	F:GCT CAG AGG AGG ACT ATC	[11]

dbSNP 为单核苷酸多态性数据库。

表 2 测序引物序列

HPA 分型	测序基因	目的片段	引物序列(5'-3')	扩增产物长度(bp)	NCBI 参考序列
HPA-29bw	ITGB3	Exon2	F:GGA TGA GGC AGG CAA GTA R:GCA GCA GTG GTT ACA GAG	416	NG_008332.2

续表 2 测序引物序列

HPA 分型	测序基因	目的片段	引物序列(5'-3')	扩增产物长度(bp)	NCBI 参考序列
HPA-30bw	ITGA2B	Exon25	F:CAG CAG AAG AAG GTG AGA G R:CCA GGA TGT AGA GCA GGT	264	NG_008331.1
HPA-31bw	GP9	Exon3	F:TGA CTG CAG CCT CAC CTA TC R:AGC TGG TAG CCT GTC AGC C	129	NG_008715.1
HPA-32bw	ITGB3	Exon4	F:TGC CTT CCA GAT GAT TCG R:AGA CAG CCA ACA AAG TGA T	363	NG_008332.2
HPA-33bw/HPA-35bw	ITGB3	Exon10	F:CCA GGA GAA GGA GAA GTC R:ACA GGA GAA GTC GTC ACA	364	NG_008332.2
HPA-34bw	ITGB3	Exon3	F:TGA TTG CTG GAC TTC TCT T R:ACT TCC TCC TCA GAC CTC	311	NG_008332.2

1.3.5 广西地区献血人群 HPA-29-35w 基因多态性研究

应用建立的 MALDI-TOF MS 方法对广西地区 588 名献血者进行血小板抗原 HPA-29-35w 基因分型检测和人群多态性分析。

2 结 果

2.1 成功构建 HPA-29-35w 突变型参考质粒

2.1.1 酶切验证构建的 7 个 HPA-29bb-35bb 突变型参考质粒

HPA-29bb 参考质粒 PvuⅡ 酶切,PUC57 载体 2 364 bp,插入片段 590 bp;HPA-30bb 参考质粒 PvuⅡ 酶切,PUC57 载体 2 364 bp,插入片段 562 bp;HPA-31bb 参考质粒 EcoRⅠ,HindⅢ 酶切,PUC57

载体 2 635 bp,插入片段 609 bp;HPA-32bb 参考质粒 PvuⅡ 酶切,PUC57 载体 2 364 bp,插入片段 599 bp;HPA-33bb 参考质粒 PvuⅡ 酶切,PUC57 载体 2 364 bp,插入片段 658 bp;HPA-34bb 参考质粒 PvuⅡ 酶切,PUC57 载体 2 364 bp,插入片段 714 bp;HPA-35bb 参考质粒 PvuⅡ 酶切,PUC57 载体 2 364 bp,插入片段 741 bp。经酶切验证成功。

2.1.2 测序验证 HPA-29bb-35bb 突变型参考质粒的插入序列

将突变型 b/b 所在的序列与美国国家生物技术中心(NCBI)参考序列进行比对,与表 1 中列出的对应核苷酸突变一致,见图 1。

HPA-29aa	GTTCAGGGC CCAACATCTG TACCAcGGCA GGTGTGAGCT	HPA-30aa	CCAOCCTTCGG GGACAcTCOC AGCCCTCCGA OCTGCTCTAC
HPA-29bb	GTTCAGGGC CCAACATCTG TACCAcGGCA GGTGTGAGCT	HPA-30bb	CCAOCCTTCGG GGACAcTCOC AGCCCTCCGA OCTGCTCTAC
Consensus	GTTCAGGGC CCAACATCTG TACCAcGGCA GGTGTGAGCT	Consensus	CCAOCCTTCGG GGACAcTCOC AGCCCTCCGA OCTGCTCTAC
HPA-31aa	TGCCATGGC CcGCTGGGCC GGCTGACAGG CTACCACTG	HPA-32aa	CTCACCAGTA AcCTGGGGAT TGCTTCGGG GCATTITGTG
HPA-31bb	TGCCATGGC CTGCTGGGCC GGCTGACAGG CTACCACTG	HPA-32bb	CTCACCAGTA GcCTGGGGAT TGCTTCGGG GCATTITGTG
Consensus	TGCCATGGC CcGCTGGGCC GGCTGACAGG CTACCACTG	Consensus	CTCACCAGTA aCTGGGGAT TGCTTCGGG GCATTITGTG
HPA-33aa	CCTGATCGTC CAGGTACCTT TTcATTGTGA CTGTGCTGC	HPA-34aa	GGTCACTCAA GTCAGTCCCC AGAGGATTGC ACTCcGGCTC
HPA-33bb	CCTGATCGTC CAGGTACCTT TTcATTGTGA CTGTGCTGC	HPA-34bb	GGTCACTCAA GTCAGTCCCC AGAGGATTGC ACTCTGGCTC
Consensus	CCTGATCGTC CAGGTACCTT TTcATTGTGA CTGTGCTGC	Consensus	GGTCACTCAA GTCAGTCCCC AGAGGATTGC ACTCcGGCTC
HPA-35aa	GTGTGAGTGC TCAGAGGAGG ACTATCcCC TTCCAGCAG		
HPA-35bb	GTGTGAGTGC TCAGAGGAGG ACTATCaCC TTCCAGCAG		
Consensus	GTGTGAGTGC TCAGAGGAGG ACTATCaCC TTCCAGCAG		

图 1 HPA-29bb-35bb 突变型参考质粒克隆测序序列比对结果图

2.2 MALDI-TOF MS 对 HPA-29-35w 基因分型检测结果

2.2.1 突变型参考质粒的基因分型结果

以插入 HPA-29bb 突变型序列参考质粒基因分型结果为例,图中只出现 T 峰,与表 1 中提到 HPA-29 的突变型一致,提示参考质粒 HPA-29 的基因型为 b/b,见图 2。

2.2.2 29 例技术验证标本的基因分型结果

以标本 S1 的 HPA-29-35w 基因分型结果为例,HPA-29 只出现 C 峰,与表 1 中的 HPA-29 的核苷酸

突变位点野生型一致,提示该例标本的基因型为 a/a。利用同样的方式判读出标本 S1 的 HPA-30-35w 基因型均为 a/a,见图 3。

2.3 技术验证结果

对 29 例技术验证标本进行 HPA-29-35w Sanger 测序,并与 2.2.2 中的 MALDI-TOF MS 结果进行比对,结果与 GenBank 数据库中公布的序列完全一致。

2.4 588 名广西地区献血人群的多态性分析

基因分型结果显示 588 名广西地区献血人群的 HPA-29-35bw 基因型均为 a/a 纯合子,见表 3。

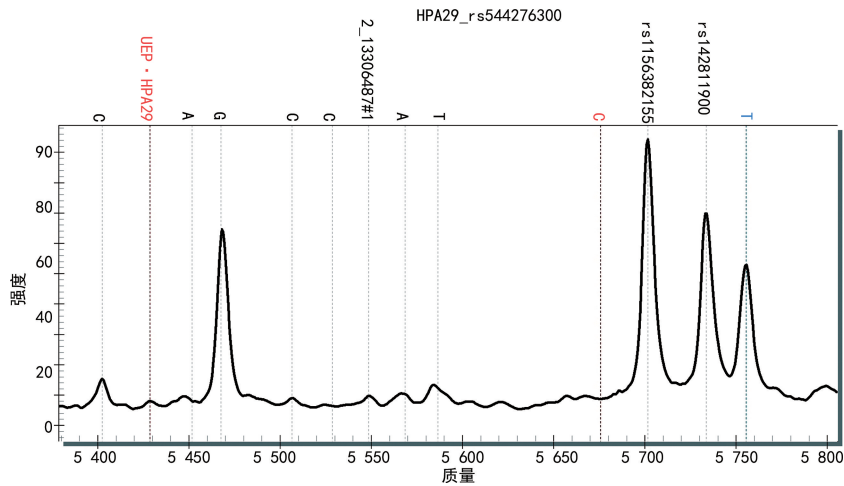


图 2 HPA-29bb 质粒标准品质谱检测峰图

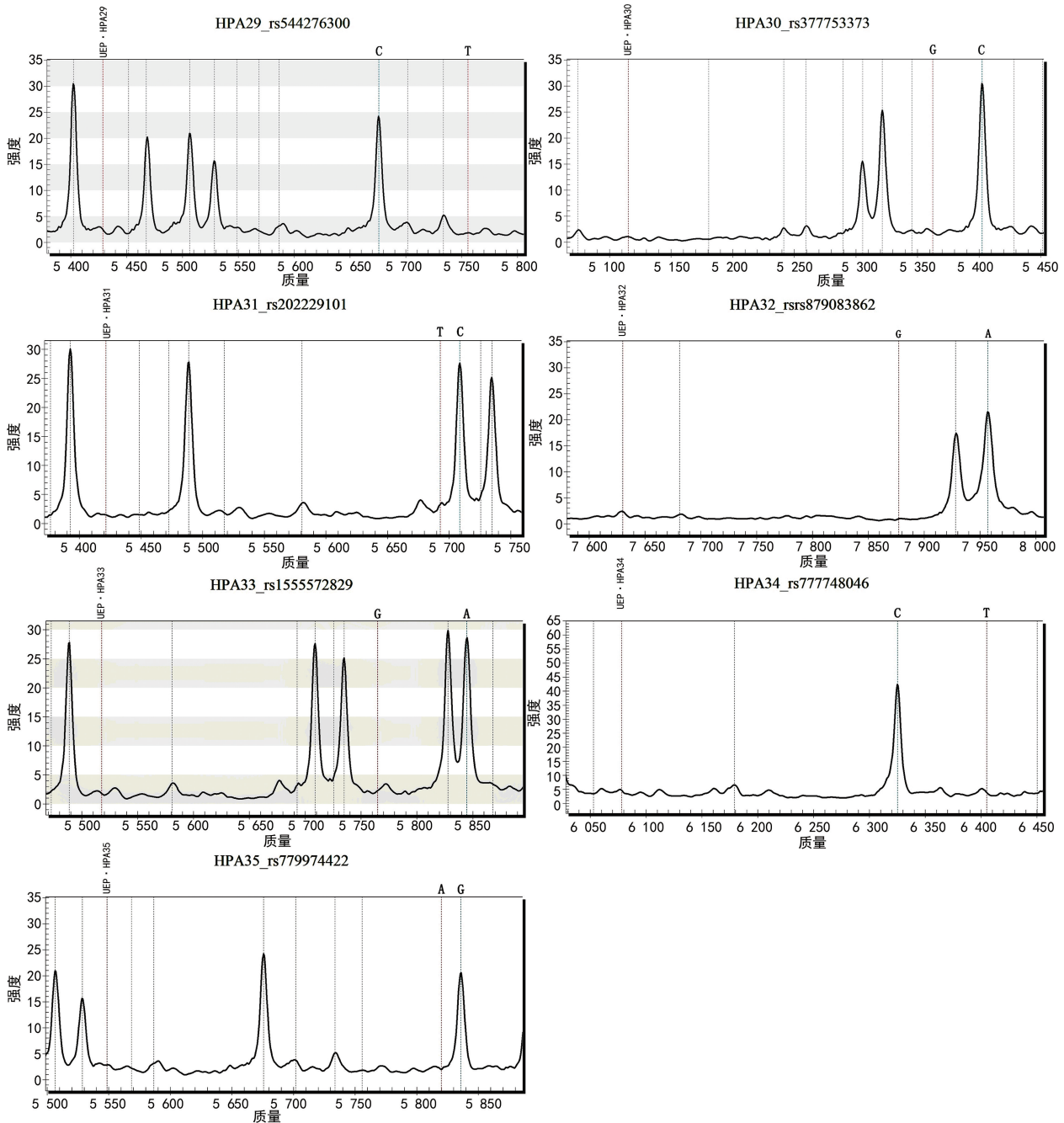


图 3 技术验证标本 S1 中 MALDI-TOF MS 对 HPA-29-35w 质谱检测峰图

表 3 588 名广西地区献血人群 HPA-29-35bw 基因分频率分布和质谱检出情况

HPA 分型	总例数(<i>n</i>) *	检出例数(<i>n</i>)	观察频率(%)	预期频率(%)	等位基因频率(%)
HPA-29a/29a	585	585	1.000 0	1.000 0	1.000 0
HPA-29a/29bw	585	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-29bw/29bw	585	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-30a/30a	584	584	1.000 0	1.000 0	1.000 0
HPA-30a/30bw	584	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-30bw/30bw	584	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-31a/31a	581	581	1.000 0	1.000 0	1.000 0
HPA-31a/31bw	581	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-31bw/31bw	581	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-32a/32a	585	585	1.000 0	1.000 0	1.000 0
HPA-32a/32bw	585	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-32bw/32bw	585	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-33a/33a	583	583	1.000 0	1.000 0	1.000 0
HPA-33a/33bw	583	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-33bw/33bw	583	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-34a/34a	583	583	1.000 0	1.000 0	1.000 0
HPA-34a/34bw	583	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-34bw/34bw	583	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-35a/35a	584	584	1.000 0	1.000 0	1.000 0
HPA-35a/35bw	584	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HPA-35bw/35bw	584	0	0.000 0	0.000 0	0.000 0

* : 由于标本采集原因,HPA-29-35bw 检测例数各不相同。

3 讨 论

MALDI-TOF MS 系统检测基因分型的核心原理是多重 PCR+单碱基延伸+质谱飞行检测,由于不同碱基的分子质量差,导致其在质谱飞行的过程中相对分子质量大的飞行速度慢,最后根据出峰的位置判断碱基类型。该技术具有以下优势:PCR 的灵敏便捷性、芯片技术的高通量性、1 个反应孔中可进行高达 40 重反应^[12]、质谱技术的高精准性。MALDI-TOF MS 技术可以在 PCR 反应、SAP 反应、延伸反应后的任何步骤灵活中断,方便试验者合理安排试验时间。检测结果可利用软件进行聚类分析,大大节省数据分析的时间。本研究利用 MALDI-TOF MS 平台,成功建立了 HPA 基因分型质谱检测技术,其检测结果与一代测序结果对比完全吻合,验证了核酸质谱方法的准确性。在 MALDI-TOF MS 检测 HPA-29-35w 技术中以 96 孔板反应计算,每个反应成本约 50 元,人工操作部分的时间不到 1 h。MALDI-TOF MS 技术中检测位点选择灵活,具备较高的特异度和准确度,使得多位点基因分型具有成本效益,已成功运用于临床致病微生物诊断^[13]、遗传病(耳聋基因检测)^[14]、疑难血型标本鉴定^[15]及血小板供者 HPA 资料库的建设^[16]等诸多方向。

随着检测技术的迭代更新,HPA 低频抗原不断被检出,由低频抗体介导的血小板免疫异常性疾病逐步受到输血界的关注,如在广西瑶族人群中发现 2 例罕见的 HPA-6bb 纯合子,发现了 1 例中国汉族人群中罕见的 HPA-4ab 基因型个体^[17],上海、山东地区报道了 1 例 HPA-10a/10bw 杂合子个体^[18-19],南京地区检出 1 例 HPA-11a/11bw 杂合子^[20],广东、石家庄地区都报道了检出的 HPA-21a/21bw 杂合子^[21-22];在一例母亲有多次妊娠史的家系中,父亲为低频 HPA-28bw,导致 3 名婴儿中的 2 名出现同种免疫血小板减少症^[23],提示低频抗原由于同种免疫一样能导致严重的血小板免疫异常性疾病发生。目前能检测低频抗原的技术主要有 PCR-SBT、PCR-SSP、实时荧光定量 PCR、二代测序技术等。Sanger 法是金标准,但受到检测通量较低、速度慢、无法自动化等因素的制约,更适合于对发现的新突变进行验证。实时荧光定量 PCR 检测技术特异度强、灵敏度高,但要提高通量,会引入多种荧光的串扰。高通量测序具有高昂的前期投入、数据管理和存储、生物信息学人员需要经过系统培训等特点,持续运行成本相对较高^[24]。不同种族、群体及地区间人群的血小板抗原和基因多态性分布各不相同,广西是壮族、瑶族、仫佬族、京族等少数

民族聚集区,且目前对广西地区人群低频抗原 HPA-29-35w 的多态性尚未有报道,故本研究采用成功建立的 MALDI-TOF MS 技术对广西地区献血者进行 HPA-29-35bw 基因分型,结果显示 588 名广西地区献血者的 HPA-29-35w 基因型均为 aa 纯合子,填补了广西地区人群中 HPA 分型的空白。

理论上来说,每个 HPA 系统的抗原都可能介导血小板输注无效、输血后紫癜等血小板免疫异常性疾病的发生,而解决此类疾病的方法之一就是建立血小板供者基因数据库。根据中国输血协会团体标准《血小板配合性输注供者资料库建设规范: T/CSBT 010—2021》,MALDI-TOF MS 作为 HPA 基因分型建库的推荐方法之一,通过核酸质谱平台,可将常见的 HPA-1-35w 基因分型同时检测,低成本实现对献血者、受血者进行精准 HPA 分型。各地区可根据本地区人群血小板抗原和基因多态性分布特征,从卫生经济学的角度出发,建立符合本地区使用的血小板供者基因数据库,提高血小板输注的匹配精准性,降低血小板输注无效等情况发生。

综上所述,本研究成功建立了 MALDI-TOF MS 对 HPA-29-35w 基因检测技术,并探明了广西地区献血人群血小板抗原 HPA-29-35bw 的基因型,为临床检测提供了参考依据,为血小板供者资料库的建设及研发更高通量的 HPA 基因分型检测技术奠定了实践基础。

参考文献

[1] 周燕,申卫东,吴国光,等.第 2 胎抗 HPA-3a 抗体可使新生儿同种免疫血小板减少症患者病情加重[J].临床检验杂志,2014,32(10):753-755.

[2] 周燕,钟周琳,吴国光,等.国内首例抗 HPA-5b 引发的新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜的检测、诊断及分析[J].中国实验血液学杂志,2014,22(2):399-402.

[3] 周燕,钟周琳,吴国光,等.ITP 患者血小板抗体特征分析暨 1 例含血小板自身和同种抗体的 ITP 患者输血疗效观察[J].重庆医学,2020,49(1):29-32,38.

[4] 中国输血协会人类组织抗原专业委员会,中国输血协会免疫血液学专业委员会.免疫性血小板输注无效的判定及临床实践专家共识[J].临床输血与检验,2022,24(3):273-278.

[5] SULLIVAN M J,PETERSON J,MCFARLAND J G,et al. A new low-frequency alloantigen (Kha(b)) located on platelet glycoprotein III a as a cause of maternal sensitization leading to

neonatal alloimmune thrombocytopenia[J]. Transfusion,2015,55(6 Pt 2):1584-1585.

[6] WIHADMADYATAMI H,HEIDINGER K,RÖDER L,et al. Alloantibody against new platelet alloantigen (Lap(a)) on glycoprotein II b is responsible for a case of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia[J]. Transfusion,2015,55(12):2920-2929.

[7] JALLU V,BERANGER T,BIANCHI F,et al. Cab4b,the first human platelet antigen carried by glycoprotein IX discovered in a context of severe neonatal thrombocytopenia [J]. J Thromb Haemost,2017,15(8):1646-1654.

[8] SULLIVAN M J,KUHLMANN R,PETERSON J A,et al. Severe neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by maternal sensitization against a new low-frequency alloantigen (Domb) located on platelet glycoprotein III a [J]. Transfusion,2017,57(7):1847-1848.

[9] POLES A,LUCAS G,GREEN F,et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to a new alloantigen Bl(a) defined by an Asp458Gly substitution in GP III a[J]. Transfusion,2019,59(1):396-404.

[10] BERTRAND G,DANGER Y,LAURICHESSE M,et al. A case of neonatal thrombocytopenia caused by maternal alloimmunization against a new platelet antigen (Bzha, HPA-34bw) located on GP III a[J]. Transfusion,2019,59(4):1402-1403.

[11] BERTRAND G,DANGER Y,CROISILLE L,et al. A new platelet alloantigen (Efsa, HPA-35bw) on glycoprotein III a leading to neonatal alloimmune thrombocytopenia [J]. Transfusion,2019,59(7):2463-2464.

[12] OETH P,DEL MISTRO G,MARNELLOS G,et al. Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY) [J]. Methods Mol Biol,2009,578:307-343.

[13] TSUCHIDA S,UMEMURA H,NAKAYAMA T. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology [J]. Molecules,2020,25(20):4775.

(下转第 113 页)