· 论著 ·

NGS 联合 TGS 技术在红细胞血型库建设中的应用

丁梦圆　高鑫　王仪含　李少博　汤龙海　江妮娜
（苏州市中心血站，江苏 苏州 215006）

摘要：目的　采用二代测序（next-generation sequencing，NGS）对献血者 42 个血型系统进行大规模基因分型，评估其在献血者多系统血型鉴定及稀有血型库建设中的适用性；同时，针对 ABO 正反定型不符的疑难标本，探索三代测序（third-generation sequencing，TGS）在单倍体定相和深度不足区域变异捕获中的补充价值。**方法**　以某血站 562 名固定献血者为研究对象（中位献血 11 次），采用 NGS 对 42 个血型系统进行基因分型，重点分析 MNS、Lutheran、Kell、Duffy、Kidd、Diego、Yt、Colton、Gerbich、Ok、H、I 共 12 个建库必要系统的表型频率；对 12 例 ABO 正反定型不符标本进行 TGS 复核以解决单倍体定相（haplotype phasing，即确定不同突变位点是否位于同一条染色体上）问题；并对 MNS、Duffy、Kidd、Lewis 及 ABO 系统行血清学与基因分型比对。**结果**　NGS 分型显示，Duffy 系统 Fy（a−b+）占 0.87%（4/458），Diego 系统 Di（a+b+）占 10.62%（31/292）；Lutheran、Kell、Yt、Colton、H、Ok、I 及 Gerbich 系统呈近乎单一表型分布。12 例 ABO 疑难标本中，5 例 NGS 因无法定相给出多种基因型组合，TGS 通过长读长唯一确定基因型；1 例 NGS 因测序深度不足仅检出 2 个突变位点，TGS 完整检出 11 个位点并明确分型为 A1。血清学与基因分型一致率分别为：Duffy 96.55%（140/145）、ABO 96.43%（513/532）、Kidd 94.17%（97/103）、MNS 85.07%（57/67）、Lewis 68.18%（75/110）。MNS 系统 8 例血清学 M+N+而基因型为 M−N+的标本中，7 例携带 GYPB 变异；Lewis 系统不一致标本主要为基因型 Le（a−b+）而血清学呈其他表型。NGS 平台可在 2 周内完成 192 个标本测序。**结论**　NGS 联合 TGS 及血清学的分层分型策略可在大规模献血者中完成多系统血型鉴定，TGS 在 ABO 疑难标本定相和深度不足区域变异捕获上具有补充价值。本研究为本地稀有血型库扩容提供了技术框架和基础频率数据，但策略的标准化和成本效益需扩大标本验证，且对 Lewis 等分泌相关系统应保留血清学复核。

关键词：NGS；TGS；稀有血型；血型基因分型；献血者
中图分类号：R457.1　Q78　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1004-549X（2026）8-1110-07
DOI：10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2026.08.017

Application of combined NGS and TGS technologies in red blood cell blood group bank construction: a preliminary study

DING Mengyuan, GAO Xin, WANG Yihan, LI Shaobo, TANG Longhai, JIANG Nina.
Suzhou Blood Center, Suzhou 215006, *China.*
*Corresponding author: JIANG Nina, Email: htaojnn@*163.*com*

Abstract: Objective　This study employed next-generation sequencing (NGS) for large-scale genotyping of 42 blood group systems in blood donors to evaluate its applicability in multi-system blood group identification and rare blood type repository construction, while exploring the complementary value of third-generation sequencing (TGS) in haplotype phasing and variant capture in regions with insufficient sequencing depth for ABO ambiguous samples. **Methods**　A total of 562 regular blood donors (median donation frequency 11 times) from a blood center were enrolled. NGS was used for genotyping of 42 blood group systems, with a focused analysis on 12 systems essential for rare blood type repository construction: MNS, Lutheran, Kell, Duffy, Kidd, Diego, Yt, Colton, Gerbich, Ok, H, and I. TGS was employed to resolve haplotype phasing (i.e., determining whether different mutation sites are located on the same chromosome) in 12 ABO samples with discrepancies between forward and reverse typing. Serological and genotyping results were compared for MNS, Duffy, Kidd, Lewis, and ABO systems. **Results**　NGS-based genotyping revealed that Fy(a−b+) in the Duffy system accounted for 0.87% (4/458), and Di(a+b+) in the Diego system accounted for 10.62% (31/292). The Lutheran, Kell, Yt, Colton, H, Ok, I, and Gerbich systems exhibited near-uniform phenotype distributions. Among the 12 ABO ambiguous samples, NGS

基金项目：苏州市应用基础研究重点项目（SYW2025024、SYW2025025）、苏州市卫健委面上项目（MSXM2024040）、苏州市卫健委重点项目（ZDXM2025020）、苏州市预防医学会科技项目（SZSYFYXH-KJ-ZD2026-29）
第一作者简介：丁梦圆（1993-），女，主管技师，Email：mengyuan60_09@sina.com；**通信作者：**江妮娜，Email：htaojnn@163.com

yielded multiple possible genotype combinations in 5 cases due to inability to phase alleles, whereas TGS uniquely resolved the genotypes through long-read sequencing. In one case, NGS detected only 2 mutation sites due to insufficient sequencing depth, while TGS identified all 11 sites and assigned the A1 phenotype. Concordance rates between serology and genotyping were: Duffy 96.55% (140/145), ABO 96.43% (513/532), Kidd 94.17% (97/103), MNS 85.07% (57/67), and Lewis 68.18% (75/110). In the MNS system, 7 of 8 samples serologically typed as M+N+ but genotyped as M−N+ carried GYPB variants. Lewis discrepancies predominantly featured genotype Le(a−b+) with serological phenotypes of Le(a+b−), Le(a+b+), or Le(a−b−). The NGS platform completed sequencing of 192 samples within 2 weeks. **Conclusion** The tiered genotyping strategy combining NGS, TGS, and serology enables multi-system blood group identification in large-scale blood donor populations. TGS provides complementary value in phasing ambiguous ABO samples and detecting variants in regions with insufficient sequencing depth. This study provides a technical framework and baseline frequency data for the expansion of a local rare blood type repository. However, standardization and cost-effectiveness of this strategy require further validation with expanded sample sizes, and serological confirmation should be retained for secretion status-related systems such as Lewis.

Key words: next-generation sequencing; third-generation sequencing; rare blood types; blood group genotyping; blood donors

稀有血型通常指人群中分布频率低于 1/1 000 的红细胞表型,包括高频抗原阴性或特定抗原组合[1]。这类个体一旦因输血或妊娠产生针对稀有血型的同种抗体,寻找相合血液极为困难,严重时可危及生命[2]。国内报道显示,Rh、MNS、Kidd、Duffy、Diego 等系统的意外抗体均可导致溶血性输血反应或胎儿新生儿溶血病[3]。因此,建立包含多种血型抗原信息的稀有血型库,是推动输血模式从传统的 ABO/RhD 相容向精准输血转变的基础。

“十一·五”和“十二·五”期间,国内 13 个省级血液中心联合开展了 Duffy、Kell、Kidd、MNS、Diego 等系统的抗原筛查,初步建成了中国稀有血型库[4-5],近年来部分省份已实现省内稀有血型信息联网共享[6]。但多数血站的稀有血型库仍以 RhD 阴性为主,对其他系统的覆盖范围和库容有限,因此,探索高通量、低成本的大规模筛查方法十分必要。传统血清学筛查依赖进口单抗,价格昂贵且通量低;SSP-PCR 等方法虽提高了通量,但可检测的位点有限,难以发现新变异[7]。相比之下,丹麦学者采用 KASP 技术对 1 034 名献血者进行 35 个位点基因分型,准确率达 99.9%,错误率仅为血清学的三分之一[8],展示了高通量基因分型在献血者筛查中的优越性。

近年来,二代测序(next-generation sequencing, NGS)和三代测序(third-generation sequencing, TGS)技术的成熟为血型基因检测提供了新的工具。NGS 可一次性覆盖 ISBT 命名的全部血型系统相关基因;TGS 读长可达数十 kb,能跨越同源区域,实现单倍体水平上的精准分型[9]。国外已将靶向 NGS 用于大规模献血者分型,并整合入血液供应链管理,使得稀有血型患者的匹配效率显著提升[10-11]。但针对中国人群血型的 NGS 检测系统性研究尚缺乏报道。

为此,本研究使用 NGS 对献血者 42 个血型系统进行高通量血型基因分型,辅以 TGS 解决同源基因及单倍体定相难题,并用血清学进行比对验证,重点分析其中 12 个稀有血型建库必要系统(MNS、Lutheran、Kell、Duffy、Kidd、Diego、Yt、Colton、Gerbich、Ok、H、I),评估该检测模式在血型鉴定和稀有血型筛选中的适用性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

使用留样软件筛选本站 1 周内的献血者标本,满足以下条件:1)5 年内至少有 2 次献全血的记录;2)有 RhCE 分型记录。留取满足条件的献血者 EDTA 抗凝全血 0.5 mL,提取 DNA 并在一周内完成血清学检测。

1.2 仪器与试剂

抗-M、抗-N(上海血液生物),抗-Jk^a、抗-Jk^b、抗-Fy^a、抗-Fy^b(荷兰 Sanquin),抗-Le^a、抗-Le^b、抗-S、抗-s(德国 CE),氯化钠注射液 1 000 mL:9 g(山东威高),低离子抗人球蛋白卡(美国 BioRad),TGuide Smart 血液基因组 DNA 高效提取试剂盒(北京 TIANGEN),1×dsDNA HS Assay Kit(武汉 Yeasen),红细胞血型基因高通量二代测序分型试剂盒(江苏伟禾)、ABO 血型三代测序试剂盒(江苏

伟禾);96 孔 U 型微孔板(德国 greiner)。恒温混匀仪(BE3100),KA-2200 血清学离心机(日本 Kubota),S700FR 冷冻平板离心机(日本 Kubota),微柱凝胶孵育器(美国 BioRad),血型卡离心机(美国 BioRad),全自动核酸提取纯化仪(北京 TIANGEN),全自动高通量基因测序系统(深圳华大 DNBSEQ-AIO),双模块梯度 PCR 仪(杭州 BIOER),基因测序仪(深圳华大 DNBSEQ-G99、成都齐碳 QNome-3841),WRP 血细胞分型系统 v0. 1. 228(江苏伟禾)。

所有实验操作(包括血清学检测、核酸提取、NGS 文库构建与测序、TGS 文库构建与测序及生物信息学分析)均在苏州市中心血站实验室内完成,未委托外部检测公司。

1.3　红细胞抗原分型检测

1.3.1　红细胞抗原的选择

由于 NGS 可同时检测 42 个血型系统及 GATA1、KLF1 两个转录因子,因此本研究在既往稀有血型库筛选系统的基础上,增加了 H 和 I 血型系统,重点分析包含 MNS、Lutheran、Kell、Duffy、Kidd、Diego、Yt、Colton、Gerbich、Ok、H、I 在内的 12 个血型系统。由于 NGS 目前无法准确检测高度同源的 *RHD* 和 *RHCE* 基因,而本课题组已另文报道了本地区献血者 Rh 血型系统的表型分布及 Rh 血型库的建立情况,因此本文不再重复 RhD/RhCE 的检测与分析。本研究的检测方案见表 1。

表 1　血型检测方案

Table 1　Blood group testing strategy

	MNS	Duffy	Kidd	Lewis
U 型微孔板法	√			
手工试管法			√	√
抗人球蛋白卡法		√		
NGS	√	√	√	√

1.3.2　U 型微孔板法检测抗原

U 型板中加入抗-M/抗-N/抗-S/抗-s 试剂 20μL 及 3%的红细胞悬液 20 μL,吹打混匀后,平板离心机 1 000 g 离心 1 min,随后置于恒温混匀仪 600 rpm 上振荡 3 min,观察记录结果。无法确定的结果使用试管法复检。

1.4　手工试管法和抗人球蛋白卡法检测抗原

参照全国临床检验操作规程[12]和试剂说明书,手工试管法采用抗体试剂和 3%的红细胞悬液各 35 μL 的加样量,血清学离心机离心后观察结果。抗人球蛋白卡法采用抗体试剂和 3%的红细胞悬液各 15 μL 的加样量,孵育离心后观察结果。

1.5　NGS 法检测血型抗原

将制备好的 DNA 标本稀释至合适浓度后放入一体机中,装载红细胞血型基因高通量二代测序分型试剂盒及相应耗材,完成文库构建后取出杂交产物,手工制备环化文库,上 G99 测序仪测序。测序完成后,通过 WRP 血细胞分型系统 v0. 1. 228 进行质控、序列比对和分型分析。

1.6　TGS 法检测 ABO 血型

对于 NGS 检测中 ABO 定相困难或测序深度不足的疑难标本,采用 TGS 进行复核。TGS 检测流程参照试剂盒说明书中长片段扩增联合三代测序标准操作流程进行。主要步骤包括:针对 ABO 基因全长设计多对特异性引物进行长片段 PCR 扩增;扩增产物经纯化、末端修复、条形码连接和测序接头连接后构建测序文库;文库经质检定量后,于 QNome-3841 纳米孔测序仪上机测序;下机数据通过 WRP 血细胞分型系统 v0. 1. 228 进行序列比对和分型分析。

2　结果

2.1　研究对象基本特征

共纳入本站献血者 562 名,其中男性 358 名(63. 25%),女性 208 名(36. 75%)。年龄分布以 30~39 岁(170 名,30. 04%)和 40~49 岁(254 名,44. 88%)为主,29 岁及以下 21 名(3. 71%),50 岁及以上 121 名(21. 38%)。人均献血次数为 12. 78 次,中位献血次数 11 次,见图 1。

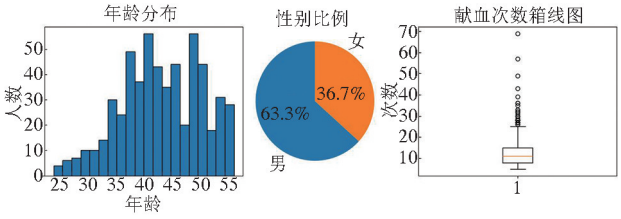


图 1　研究对象的年龄分布、性别比例和献血次数

Figure 1　Age distribution, sex ratio, and donation frequency of the study subjects

2.2　12 个血型系统表型频率分布

根据稀有血型建库必要系统(MNS、Lutheran、Kell、Duffy、Diego、Yt、Colton、Gerbich、Ok、H、I)的基因型推测表型,结果概述如下。Kidd 系统因 ISBT 数据库(https://blooddatabase. isbtweb. org/database)比对成功率偏低,其频率统计主要依据血清学结果。MNS、Duffy、Kidd、Diego 系统的表型分布见表 2~5(血清学与基因型不符的标本未纳入统计)。Lutheran 系统(n = 349)中 Lu(a-b+)占

99.71%,仅检出 1 例 Lu(a+);Kell 系统(n=473)均为 k+;Yt 系统(n=392)均为 Yt(a+b−)表型。Colton 系统(n=510)均为 Co(a+)。H 系统(n=530)均为 H+。Ok 系统(n=63)均为 Ok(a+)。I 系统(n=433)均为 I。Gerbich 系统(n=74)均为 GE:2,3,4。

表 2 MNS 血型系统表型分布

Table 2 Phenotype distribution of the MNS blood group system

	M+N+	M+N−	M−N+	S−s+
A 型	76	13	48	161
B 型	46	3	24	79
O 型	85	3	46	157
AB 型	44	3	29	94
合计(n,%)	251(59.76)	22(5.24)	147(35.00)	491(100)

表 3 Duffy 血型系统表型分布

Table 3 Phenotype distribution of the Duffy blood group system

	Fy(a+b+)	Fy(a+b−)	Fy(a−b+)
A 型	16	131	1
B 型	5	64	1
O 型	20	127	1
AB 型	12	79	1
合计(n,%)	53(11.57)	401(87.55)	4(0.87)

2.3 ABO 血型 NGS 与 TGS 结果比对

对 ABO 正反定型不符的 12 例标本进行 NGS 与 TGS 比对,结果见表 6。标本 5、6、7、10、12 中 NGS 给出多种可能的等位基因组合,无法唯一确定基因型;TGS 通过长读长有效区分处于不同单倍体上的等位基因,得出唯一基因型结果。标本 11 中 NGS 仅检出 c.106G>T 和 c.646T>A 两个突变位点,TGS 额外检出 c.188G>A、c.189C>T、c.220C>T、c.261delG、c.297A>G、c.467C>T、c.681G>A、c.771C>T、c.829G>A 共 9 个位点。分析原因为 NGS 对该标本的 ABO 血型测序深度低,未测完所有突变位点。其余标本 NGS 与 TGS 检测到的突变位点一致,由于篇幅限制未详细列出。其余 NGS 能明确分型的标本,其结果与 TGS 一致,与血清学也基本相符。

表 4 Kidd 血型系统表型分布

Table 4 Phenotype distribution of the Kidd blood group system

	Jk(a+b+)	Jk(a+b−)	Jk(a−b+)
A 型	65	36	37
B 型	30	28	16
O 型	75	37	36
AB 型	47	21	24
合计(n,%)	217(48.01)	122(26.99)	113(25.00)

表 5 Diego 血型系统表型分布

Table 5 Phenotype distribution of the Diego blood group system

	Di(a+b+)	Di(a−b+)
A 型	12	86
B 型	6	45
O 型	9	78
AB 型	4	52
合计(n,%)	31(10.62)	261(89.38)

表 6 ABO 血型的 NGS 和 TGS 比对表

Table 6 Comparison of NGS and TGS results for ABO blood group typing

序号	血清型	NGS		突变位点	推测表型	TGS		突变位点	推测表型
		Allel1	Allel2			Allel1	Allel2		
1	Bel	*ABO* BEL. 03*	*ABO* O. 01. 01*	略	Bel	*ABO* BEL. 03*	*ABO* O. 01. 01*	与 NGS 一致	Bel
2	O	*ABO* AW. 43*	*ABO* O. 01. 02*	略	Ax/Aweak	*ABO* AW. 43*	*ABO* O. 01. 02*	与 NGS 一致	Ax
3	ABel	*ABO* A1. 02*	*ABO* A1. 02*	略	A1	*ABO* A1. 02*	*ABO* A1. 02*	与 NGS 一致	A1
4	Aweak	*ABO* A1. 01*	*ABO* O. 01. 01*	略	A1	*ABO* O. 01. 01*	*ABO* A1. 01*	与 NGS 一致	A1
5	B3	*ABO* A1. 01*; *ABO* B. 01*	*ABO* O. 01. 41(O)*; *ABO* O. 01. 01(O)*	略	?	*ABO* O. 01. 01*	*ABO* B. 01*	与 NGS 一致	B
6	AB	*ABO* A1. 02*; *ABO* cisAB. 01*	*ABO* B. 01*; *ABO* cisAB. 05*; *ABO* BA. 06*	略	?	*ABO* B. 01*	*ABO* A1. 01*	与 NGS 一致	A1B
7	B3	*ABO* A1. 01*; *ABO* B. 01*	*ABO* O. 01. 41*; *ABO* O. 01. 01*	略	?	*ABO* B. 01*	*ABO* O. 01. 01*	与 NGS 一致	B
8	B3	*ABO* BW. 27*	*ABO* O. 01. 02*	略	Bweak	*ABO* O. 01. 02*	*ABO* BW. 27*	与 NGS 一致	Bweak
9	A3	*ABO* A1. 02*	*ABO* O. 01. 02*	略	A1	*ABO* A1. 02*	*ABO* O. 01. 02*	与 NGS 一致	A1
10	AB	*ABO* A1. 02*; *ABO* cisAB. 01*	*ABO* B. 01*; *ABO* cisAB. 05*; *ABO* BA. 06*	略	?	*ABO* A1. 02*	*ABO* B. 01*	与 NGS 一致	A1B
11	A	−	−	c.106G>T, c.646T>A	?	*ABO* O. 01. 02*	*ABO* A1. 02*	c.106G>T,c.188G>A,c.189C>T, c.220C>T,c.261delG,c.297A>G, c.467C>T,c.646T>A,c.681G>A, c.771C>T,c.829G>A	A1
12	B	*ABO* B. 01*; *ABO* B3. 02*	*ABO* O. 01. 02*; *ABO* O. 01. 35*	略	?	*ABO* B. 01*	*ABO* O. 01. 02*	与 NGS 一致	B

注:? 代表现有基因结果无法准确推断出表型。

2.4　血清学与基因分型一致性比较

对 MNS(M、N、S、s)、Duffy(Fy^a、Fy^b)、Kidd(Jk^a、Jk^b)和 Lewis(Le^a、Le^b)系统的部分抗原进行了血清学检测,同时导入了献血者的 ABO 血型信息,与基因分型结果比对,结果见表 7。其中 Duffy 系统一致性最高(96.55%),ABO 系统次之(96.43%),Lewis 系统最低(68.18%)。

ABO 系统 19 例不一致中,11 例为血清学 O 型而基因型检出 A 或 B 等位基因,提示可能存在微板法(献血者血型初筛时使用)无法检出的弱抗原。MN 系统 10 例不一致中,9 例血清学 M+N+而基因分型为 M-N+,其中 7 例携带 GYPB 变异(altered U)。Duffy 系统 5 例不一致中,4 例血清学 Fy(b+)而基因型为 Fy(a+b-)。Kidd 系统 6 例不一致中,3 例血清学 Jk(a-b-)而基因型为 Jk(a+b-)。Lewis 系统 35 例不一致中,多数血清学为 Le(a+b-)、Le(a+b+)或 Le(a-b-),而基因型均为 Le(a-b+)。

表 7　各血型系统血清学与基因分型一致性统计

Table 7　Concordance between serological phenotyping and genotyping across blood group systems

血型系统	同时有血清学和基因分型结果的例数(n)	血清学和基因分型结果一致的例数(n)	血清学和基因分型一致的比例(%)
ABO	532	513	96.43
MNS	67	57	85.07
Duffy	145	140	96.55
Kidd	103	97	94.17
Lewis	110	75	68.18

3　讨论

稀有血型频率在不同种族和地区间存在显著差异,既往国内研究多局限于血清学筛查或有限位点的 PCR 分型,标本量及系统覆盖范围不足,难以构建全面的区域血型数据库[13]。本研究采用 NGS 对 42 个血型系统进行大规模基因分型,同时针对 ABO 正反定型不符的疑难标本引入 TGS 进行单倍体定相,评估该分层策略在多系统血型鉴定及稀有血型库建设中的适用性。国际经验表明,区域特异性数据对稀有血型库建设至关重要[14]。本研究为本地稀有血型库扩容提供了基础数据。

Lutheran、Kell、Yt、Colton、H、Ok、I 及 Gerbich 系统在本研究中近乎单一表型分布,Duffy 系统 Fy(a-b+)仅占 0.87%,Diego 系统 Di(a+b+)占 10.62%。这一分布模式提示,本地稀有血型库的扩容应将重点放在 Duffy、MNS、Kidd 等多态性显著的系统上,而非对所有系统平均投入资源,这与 Westhoff 等[11]强调优先针对临床同种免疫负担最大系统的策略一致。需说明的是,文中部分表型频率仅为基于 NGS 可明确分型标本的估算值,因部分标本测序失败或 ISBT 数据库比对不成功而被排除,频率估算可能存在抽样误差,后续需扩大标本并辅以血清学或测序验证后确认。

MNS 系统 10 例血清学与基因分型不一致中,9 例血清学 M+N+而基因型推导为 M-N+,其中 7 例携带 GYPB 变异,提示该变异可能导致抗原表位改变或抗体交叉反应,造成血清学判读假阳性。这表明在高同源性的 GYPA 与 GYPB 基因区域,分子分型对血清学具有补充价值,与张兵等[7]的结论一致。另 1 例为血清学 M+N-而基因型推导为 M+N+,该标本测序深度低而可靠性不足,待后续复核确认。

ABO 系统 19 例不一致中,15 例为明确的血清型与基因型不符,另有 4 例测序深度低导致结果可靠性不足。血清 O 型而基因型检出 A 或 B 等位基因的现象,提示可能为微板法无法检出的弱 ABO 亚型(如 Aweak、Bel 等),这类弱抗原在常规凝集反应中因凝集强度低于判读阈值而被误判为 O 型。此外,NGS 测序深度不足可能导致等位基因漏检或低频嵌合体未被检出,需对测序深度低的标本以 Sanger 测序复核确认。

Duffy 系统 5 例不一致中,2 例测序深度低被排除后,3 例有效不一致表现为血清 Fy(b+)而基因型 Fy(a+b-)(2 例)或血清 Fy(a+b+)而基因型 Fy(a+b-)(1 例)。Fy(b)抗原表达量通常低于 Fy(a)抗原,且 Duffy 基因编码区外的调控区变异(如 GATA 盒突变)可影响红细胞表面抗原的表达水平[15],可能导致血清学弱阳性或假阴性结果;此外,不同厂家抗体试剂的效价差异亦可能导致判读偏差。上述推测需进一步验证。

Kidd 系统 6 例不一致主要包括 3 例血清 Jk(a+b+)而基因型 Jk(a+b-),1 例血清 Jk(a+b-)而基因型 Jk(a+b+),1 例血清 Jk(a+b-)而基因型 Jk(a-b+w),1 例血清 Jk(a-b+)而基因型 Jk(a+w b-),未见血清学 Jk(a-b-)表型。Kidd 基因(SLC14A1)编码区单核苷酸多态性相对有限,Jk(a+b+)与 Jk(a+b-)的反向差异提示 NGS 试剂盒对 Kidd 系统某些等位基因的捕获探针设计可能存在偏向性,或 WRP 分型系统在 ISBT 数据库比对时对特定等位基因的判定存在偏差。Vorholt 等[16]亦报道了 Kidd

系统 NGS 分型中部分等位基因存在预期之外的抗原表达特性,提示单纯依赖数据库比对可能遗漏中国人群特有的变异。对此需在后续研究中优化探针设计并扩大 Sanger 测序验证。

Lewis 系统血清学与基因型一致率仅 68.18%。35 例不一致结果中,多数标本基因型为 Le(a-b+)而血清学表现为 Le(a+b-)、Le(a+b+)或 Le(a-b-)。另有约半数标本测序深度低,提示 NGS 对 Lewis 系统相关基因(FUT2/FUT3)的捕获效率存在不足。Lewis 表型由 FUT2 和 FUT3 共同决定,且受分泌状态及生理病理因素影响,红细胞表面的 Lewis 抗原系血浆吸附而来[10, 15]。因此,Lewis 系统的低一致率是血清学与基因型生物学差异及 NGS 技术局限共同作用的结果,单纯以基因型推测 Lewis 表型并不可靠,应保留血清学复核。

12 例 ABO 疑难标本的 NGS 与 TGS 比对显示,NGS 在 cisAB 等可能涉及多种等位基因组合的标本中无法定相,TGS 凭借长读长可唯一确定基因型;1 例 NGS 因测序深度不足漏检 9 个位点,TGS 完整检出。上述结果表明,TGS 在本研究中的价值主要体现在 ABO 疑难标本的定相和深度不足区域的变异捕获上;对于 MNS 等其他系统的复杂结构变异,TGS 理论上同样具有优势,但因本研究 TGS 验证标本均为 ABO 正反定型不符者,暂未涉及其他系统。Fürst 等[10]亦指出,NGS 在 ABO 等高度多态性基因的定相上存在固有困难。以 NGS 初筛、疑难标本启用 TGS 复核的阶梯式策略兼顾了成本与精度,符合血站大规模筛查需求。

本研究也存在以下局限。首先,562 例标本量有限,且集中于多次献血者(中位献血 11 次),年龄和性别构成存在偏移,Gerbich、Ok 等系统因检测例数不足百例,其真实稀有表型频率可能存在偏差。其次,Kidd 系统基因分型成功率偏低,其原因在于部分标本检出的突变位点无法在 ISBT 数据库中比对到对应的等位基因信息,导致分型系统无法给出明确结论。这提示目前 ISBT 数据库对中国人群 Kidd 系统常见变异位点的覆盖尚不完整,后续需结合本地区人群测序数据补充和完善参考数据库[16]。第三,本研究尚未对血清学与基因分型不一致的标本进行 Sanger 测序及血清学回溯验证,上述不一致原因的分析仅为基于现有数据和文献的合理推测,确切成因有待后续实验证实。最后,Rh 系统因高度同源性未纳入本文分析,而 Rh 系统的复杂结构变异恰是精准配血的难点,今后应将其纳入统一的高通量检测体系。

基于上述结果与不足,后续工作将继续扩大标本,以提高频率估计的可靠性;针对 Kidd 等系统优化 NGS 捕获探针,完善数据库;对不一致标本逐一进行 Sanger 测序验证;同时将稀有血型个体的基因分型、抗原确认及同种抗体监测纳入信息化管理,形成从基因检测到临床供血的全链条闭环。

综上,NGS 联合 TGS 及血清学的分层分型策略可在大规模献血者中高效完成多系统血型鉴定,TGS 在 ABO 疑难标本中具有补充价值。本研究为本地稀有血型库的精准扩容提供了技术框架和频率数据,但该策略的标准化和成本效益仍需扩大验证后方可推广。

利益冲突说明/Conflict of Interests

所有作者均声明不存在利益冲突。

伦理批准及知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究通过苏州市中心血站伦理委员会批准[伦理号(2025)伦研批第(27)号],献血者均已签署《献血者知情同意及健康状况征询表》,同意血液中心按规定对血液标本进行科研相关检测及使用。

作者贡献/Authors' Contribution

丁梦圆:实验设计、数据统计分析、作图、文章撰写;高鑫、王仪含:实验操作、数据整理;李少博:软件代码编写、信息系统搭建;汤龙海、江妮娜:研究指导、论文审阅、经费支持。

[参考文献]

[1] 朱自严, 王晨, 叶璐夷, 等. 红细胞稀有血型筛选、建库与应用[C]//中国输血协会第六届输血大会论文集. 广州, 2012.
ZHU Z Y, WANG C, YE L Y, et al. Screening, database construction and application of rare red blood cell blood groups[C]//Proceedings of the 6th Annual Congress of Chinese Society of Blood Transfusion. Guangzhou, 2012.

[2] 杜飞嫦, 洪文旭, 吴凡. 稀有血型库和血小板供者资料库的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(2):276-278.
DU F C, HONG W X, WU F. Research progress on rare blood type database and platelet donor database[J]. Lab Med Clin, 2021, 18(2):276-278.

[3] CHEN C, TAN J, WANG L, et al. Unexpected red blood cell antibody distributions in Chinese people by a systematic literature review[J]. Transfusion, 2016, 56(4):975-979.

[4] 褚晓月, 张泳, 毛娟, 等. 陕西省 Kidd、Diego、Duffy

血型数据库的建立及临床应用研究[J]. 中国输血杂志, 2022, 35(11):1124-1127.
CHU X Y, ZHANG Y, MAO J, et al. Establishment and clinical application of Kidd, Diego and Duffy blood group database in Shaanxi Province[J]. Chin J Blood Transfusion, 2022, 35(11):1124-1127.

[5] 赵瑛, 圣孟华, 郝明葳, 等. 大数据背景下稀有血型数据库建设与管理的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2023, 36(19):3280-3282.
ZHAO Y, SHENG M H, HAO M W, et al. Research progress on construction and management of rare blood type databases in the context of big data[J]. Med Theory Pract, 2023, 36(19):3280-3282.

[6] 裘君娜, 孔长虹, 许先国,等. 基于数据建模的浙江省稀有血型信息共享系统构建与应用[J]. 中国输血杂志, 2024, 37(9):1068-1072.
QIU J N, KONG C H, XU X G, et al. Construction and application of rare blood type information sharing system in Zhejiang Province based on data modeling[J]. Chin J Blood Transfusion, 2024, 37(9):1068-1072.

[7] 张兵, 徐罡, 胡文健, 等. 建立基于 qPCR 技术的红细胞 Diego、MNS、Kell 血型基因分型方法及初步应用[J]. 中国实验血液学杂志, 2025, 33(5):1429-1434.
ZHANG B, XU G, HU W J, et al. Establishment and preliminary application of qPCR-based genotyping methods for red blood cell Diego, MNS and Kell blood group systems[J]. J Exp Hematol, 2025, 33(5):1429-1434.

[8] KROG G R, RIENECK K, CLAUSEN F B, et al. Blood group genotyping of blood donors: validation of a highly accurate routine method[J]. Transfusion, 2019, 59(10):3264-3274.

[9] PEYRARD T, PHAM B N, LE PENNEC P Y, et al. The rare blood groups: a public health challenge[J]. Transfus Clin Biol, 2008, 15(3):109-119.

[10] FÜRST D, TSAMADOU C, NEUCHEL C, et al. Next-generation sequencing technologies in blood group typing[J]. Transfus Med Hemother, 2020, 47(1):4-13.

[11] WESTHOFF C M, FLOCH A. Blood group genotype matching for transfusion[J]. Br J Haematol, 2025, 206(1):18-32.

[12] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 第 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2023.
SHANG H, WANG Y S, SHEN Z Y. National clinical laboratory operating procedures[M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2023.

[13] 丁佳栋, 王艺媛, 张晓萍. 甘肃省东乡族 12 个稀有血型系统基因多态性初探[J]. 中国实验血液学杂志, 2025, 33(2):552-556.
DING J D, WANG Y Y, ZHANG X P. Preliminary study on genetic polymorphisms of 12 rare blood group systems in Dongxiang ethnic group of Gansu Province[J]. J Exp Hematol, 2025, 33(2):552-556.

[14] LOMAS-FRANCIS C, THORNTON N, NANCE S T. The need for rare blood programs is real[J]. Transfusion, 2023, 63(4):659-664.

[15] MARTIN W, SYLVIA M, MAIKE B, et al. Regulation of the Lewis blood group antigen expression: a literature review supplemented with computational analysis[J]. Transfus Med Hemother, 2024, 51(4):225-236.

[16] VORHOLT S M, LENZ V, JUST B, et al. High-throughput next-generation sequencing of the Kidd blood group: unexpected antigen expression properties of four alleles and detection of novel variants[J]. Transfus Med Hemother, 2023, 50(1):51-65.

(2026-07-06 收稿,08-05 修回,08-14 接收)

本文编辑:李宜蔓