**纳米孔测序在疑难血型及输血的应用前景**

**孙岗 张瑚敏**

（**雅安市人民医院）**

**摘要：**输血是挽救病人生命的重要手段，但常常由于多次输血，ABO亚型，基因变异等血清学不能正确及时检测这些疑难血型，对病人及时安全输血造成隐患，纳米孔测序的诞生为疑难血型鉴定和安全输血提供了新的可能。

**关键词：**纳米孔测序 疑难血型 输血

输血是临床抢救与疾病治疗中迅速且有效的重要手段，目前尚无可完全替代血液功能的生物制品。无论是对危急重症的外伤患者，还是血液疾病、肾内、消化等慢性病人，输血仍是治疗疾病成功与否的关键因素之一。但是在血型鉴定及配血过程中，常常遇见不能正确鉴定出红细胞ABO血型或者RH血型，这对配血相合的成功是必须且十分重要的一步。在现阶段针对疑难血型的鉴定，主要依靠血清学的方法，耗时长，标本用血量大，以致不能及时有效的给病人配血，耽误救治工作。随着血型鉴定工作和研究的深入，血清学检测技术存在的不足之处愈发凸显［1］。因此急需新的检测方法指导血型鉴定及疑难输血。

从1953年沃森和克里克提出著名的[DNA双螺旋结构模型](https://baike.baidu.com/item/DNA%E5%8F%8C%E8%9E%BA%E6%97%8B%E7%BB%93%E6%9E%84%E6%A8%A1%E5%9E%8B/12637111?fromModule=lemma_inlink" \t "https://baike.baidu.com/item/DNA%E5%8F%8C%E8%9E%BA%E6%97%8B/_blank)，到2000年参加人类基因组[工程项目](https://baike.baidu.com/item/%E5%B7%A5%E7%A8%8B%E9%A1%B9%E7%9B%AE/2428362?fromModule=lemma_inlink" \t "https://baike.baidu.com/item/_blank)的美国、英国、法国、德国、日本和中国的6国科学家共同宣布，人类基因组草图的绘制工作已经完成[2]。发展至今人类基因检测经过四代检测技术的变化。

**一、四代测序技术的种类及特点**

1. 第一代测序： Sanger 双脱氧核糖核酸法 1978年Barnes部分核酸替代酶学法标志着第一代基因转化技术体系的建立。20世纪末期，第一代测序技术正式应用，在人类基因组测序等重大生物医学研究项目中发挥了关键作用。但由于第一代测序往往基于特定位点的PCR扩增，导致其检测通量较低。

2. 第二代测序：二代测序（NGS）具有以下几点特征：

（1）高通量测序：能够同时获得上百万条读段（read），结合生物编码技术（barcode）能够同时检测大量样本。（2）单次测序运行时间：目前只需24~48 h即可完成，结合快速的生物信息分析技术，相较于临床常规分离培养方法 可以更早得到病原结果。然而，二代测序也有相应的局限性：（a）不能对病原体 RNA 直接检测，需要逆转录、PCR扩增等一系列处理，这个过程中易产生碱基的错配或丢失，一定程度上降低了检测的正确性；（b）必须到测序结束才能分析数据，24 h 产出报告仍然不能满足临床面对重症感染时对病原诊断的迫切需求；（c）读长较短，目前应用于临床检测的二代测序仪读长一般为75~250 bp。

3. 第三代测序：单分子测序 测序平台有真正单分子测序技术(True single—molecule sequencing，tSMSTM)及单分子实时测序技术(Single．molecule real—time，SMRT)等。此技术在测序时可能会出现碱基的插入和缺失错误。

4.第四代测序：纳米孔测序技术 起源于Coulter计数器的发明以及单通道电流的记录技术[3] 。在2001年开启了固态纳米孔研究的新时代，经过十几年发展，纳米孔技术日益发展成熟。高通量、高读长的纳米孔技术(The single molecule nanopore DNA sequencing)。该技术不需要生物分子 修饰、标记或表面固定化技术，在化学、物理学、生物学等方面的应用倍受关注。

**二、纳米孔（Nanopore）测序原理**

Nanopore测序是基于纳米孔电信号测序技术，核心就是利用一个纳米孔，孔内共价结合有分子接头，将纳米孔蛋白固定在电阻膜上后，再利用动力蛋白牵引核酸穿过纳米孔。当单个碱基通过纳米尺度的通道时，会引起通道电学性质的变化。理论上，4种不同碱基（A、C、G、T）化学性质的差异会导致其穿过纳米孔时引起的电学参数变化不同，对这些变化进行检测可得到相应碱基的类型，进而实现测序。

纳米孔测序主要优势：1 超长读长，在纳米孔测序中，读长长度不受限于测序设备，用户可以通过所使用的文库制备实验方案来控制片段长度。目前报到处DNA片段长度最高记录为>2 Mb，直接RNA测序读长最长为26kb。2 直接测序，纳米孔技术基于电子学原理，允许直接测序原始DNA和RNA。不需要通过DNA拷贝、进行链合成或使用亚硝酸盐进行转化，这不仅节省了时间和成本，还意味着碱基修饰的信息会被完整的保留，并且包含在测序运行产生的原始信号信息中，随时进行分析。由于纳米孔技术支持无需PCR的直接测序，也就没有了扩增偏好性，并且文库制备工作流程也更简单。3 实时测序，纳米孔技术提供的是动态、实时的测序，支持在几分钟内就获得病原体鉴定等时间关键型应用的检测结果。测序时，DNA快速通过纳米孔。DNA片段通过纳米孔的速率已从推出时的每秒35个碱基提升到了现在每秒450个碱基。每一个在阵列上完成的读长，在数秒后就可以用来开始数据分析，用户可以在测序早期了解样本的质量和状态，也可以在获得足够的数据后停止测序。4 按需要测序，在纳米孔测序中，用户可以自行掌握测序时间、地点、以及需要使用的芯片数量。例如，可以单次使用的最小型的测序芯片Flongle适合快速质量检测、小型基因组实验和靶向测序。5 启动费用低传统的高通量测序价格昂贵，启动需要数十万至百万人民币。而纳米孔测序目前启动套装只需要十分之一甚至不到的钱。6 灵活、可扩展 所有Oxford Nanopore测序设备使用同样的核心技术，用户可以轻松根据应用测试实验以及扩大或缩小规模。

**三、 国内外纳米孔测序公司研发进展**

牛津公司Oxford Nanopore是2014年首次进入DNA/RNA测序领域，成功研发了世界上首例且唯一的纳米孔DNA/RNA测序仪。其中MinION［4］是一款便携式、实时、长读长、低成本设备。中国齐碳科技公司推出了一款名QNome-3841hex桌面式的纳米孔基因测序仪，该款测序仪能够实现最长读长2Mb 以上，测序速度350 ~ 450bp/s (DNA，不同试剂)，稳定输出 18Gb以上数据，准确率单次测序90%以上，一致性准确率99.9%以上。最大测序通道数2304个，获取序列时间（运行≥1min、实时）。适合用于微生物检测、扩增 子测序等应用场景，其使用的可分离式芯片进一步降低了单次测序成本。

**四 、 红细胞血型基因检测现状与局限**

尽管从上世纪 90 年代开始血型基因检测技术就开始逐步辅助血清学判定血型，已有多种检测红细胞血型的分子工具，包括第一代Sanger 测序和/或第二代NGS方法( 如 PCR-SSP、PCR-RFLP 等) ，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［5］。对于直接由血型特异性基因编码的抗原，从基因型预测表型相对容易。然而，对于某些血型系统，由于抗原不是基因的直接产物，所以基因型和表现型之间存在着间接的关系［6］。检测出某个基因或其 mRNA 并不能作为该基因所编码蛋白质表达的直接指标，这是基因分型和表型预测领域中众所周知的事实。分子生物学检测技术不能反映抗原抗体免疫学反应情况，因此有些情况下基因分型预测的血型表型需要使用血清学方法验证，以避免潜在的定型错误。例如ABO 亚型是由血型血清学方法所定义，ABO 基因突变会影响糖基转移酶的特异性和活性，但它并不是决定红细胞表面A、B 抗原数量的唯一因素［7］。

基因分型可以提高血清学无法鉴定红细胞表型情况下分型的准确性，例如在遗传变异而导致抗原表达减弱的个体中。此外，在某些情况下，基因分型是血型抗原唯一可用的分型方法，例如在罕见的表型中没有可用的商品化抗血清试剂 ，近期或多次输血的患者 ，用于测定母体血浆中胎儿游离 DNA 基因分型预测胎儿血型等。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。

时至今日在临床实际工作中，血型基因检测的应用进展还是十分缓慢，在基层医院和相关科室工作中，依旧局限于只使用常规的血清学检测方法。大致的原因主要有以下几个方面。首先，分子生物学方法与输血科实验室目前常规使用的方法有很大不同，故需要大量的培训和硬件支持才可以实施基因分型技术。因此，许多输血科通过与其他医院或其他科室的专业实验室合作进行红细胞基因型检测，或将样本送至血站专门的血型参比实验室检测。第二，输血科( 血库) 必须在极短的周转时间内为危重病人提供合适的血液制剂。即使采用最精简的方法，血型基因分型仍然需要一般至少半天的时间进行检测和分析。因此，实际应用中临床更倾向于对伴有疑难血型鉴定的非紧急用血患者开展血型基因分型检测。最后也是最基本的问题，即成本问题。分子生物学相关的成本投入，包括试剂和仪器等成本，是影响其在临床广泛开展的重要制约因素。前三代的测序技术，无论是时间还是成本，都是制约其应用临床输血的关键。测序时间几个小时，使其不能广泛用于临床常规血型检测，只是用于疑难血型的进一步验证。

**五 、纳米孔测序在疑难血型与输血应用展望**

随着纳米孔测序技术的出现和不断完善，作为血清学方法的替代或辅助手段，分子检测的使用频率也将逐步增加。采用纳米孔测序成本降为十分之一，也许将取代现有血清学的方法检测血型。用纳米孔直接测序，若检测时间降为半小时以内，无论是用于疑难血型的鉴定还是临床常规血型检测，都将对血型鉴定和输血是一种颠覆性革命。但是，如果从取代血清学成为金标准的角度而言，血型基因检测方法还需要进一步推进技术革新，而纳米孔测序为及时更好地解决临床应用中的实际问题提供可能。

从资源管理的角度来看，加入血型基因分型短期看似增加患者经济负担，但从长期看，尤其是对于反复多次输血的患者，是节约成本的。同时，对于血站而言，对供者人群的血型分型筛查中，人员支持、数据库管理、伦理及信息安全问题［8］ 也是不容忽视的成本问题。

血型基因分型有助于输血的管理，并可为血清学方法提供支持。纳米孔测序是精准医疗的重要组成部分，临床适用范围广，可以预测在实际输血治疗过程中可能引起干扰的等位基因竞争或突变，解决包括直接抗球蛋白试验阳性、多次输血或近期输血、多种抗体干扰等疑难情况。

**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］ Margulies, M.; Egholm, M.; Altman, W.E.; Attiya, S.; Bader, J.S.; Bemben, L.A.; Berka, J.; Braverman, M.S.; Chen, Y.J.; Chen, Z.;

et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **2005**, *437*, 376–380. [CrossRef]

［3］Sakmann B,Neher E.Single-channel Recording [M].NewYork:Springer-Verlag, 1995.

1. Sanderson N D, Street T L, Foster D, et al. Real-time analysis of nanopore-based metagenomic sequencing from infected orthopaedic devices[J]. BMC Genomics, 2018,19 (1):714.

［5］ Wheeler MM，Johnsen JM． The role of genomics in transfusion

medicine．Curr Opin Hematol，2018，25( 6) : 509-515．

［6］ Veldhuisen B，van der Schoot CE，de Haas M． Blood group geno-

typing: from patient to high-throughput donor screening． Vox San-guinis，2010，97( 3) : 198-206．

［7］ 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．

［8］ Tilley L，Grimsley S． Is next generation sequencing the future of blood group testing? Transfus Apher Sci，2014，50( 2) : 183-188．