

人源抗 M 试剂血清的制备和应用*

张璐¹ 伍钢¹ 杜海林¹

[摘要] 目的:利用南京红十字血液中心废弃抗 M 抗体阳性血浆制备人源抗 M 试剂血清,达到报废血液再利用的目的。方法:将抗 M 抗体阳性的血浆通过中和稀释,冻融浓缩,海藻糖-PEG 浓缩等一系列方法,制备成人源化的抗 M 试剂血清。结果:制备的血清抗 M 效价可提高 4 倍,与市售试剂血清相比凝集强度有提高,1~2 个月制备的抗体效价基本不变。结论:利用废弃抗 M 抗体阳性血浆制备的人源抗 M 试剂血清亲和力在一定程度上高于市售血清,可适当用于日常标本检测,达到废血再利用的目的。

[关键词] 人源抗 M 试剂血清;冻融浓缩;海藻糖-PEG

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.12.012

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Preparation and application of human anti-M antibody reagent serum

ZHANG Lu WU Gang DU Hailin

(Nanjing Red Cross Blood Center, Nanjing, 210003, China)

Corresponding author: DU Hailin, E-mail: lulu198746@163.com

Abstract Objective: To prepare human anti-M antibody reagent serum using the discarded anti M antibody positive plasma in the center, so as to achieve the purpose of discarding blood for reuse. **Method:** Human anti-M antibody reagent serum was prepared by neutralization dilution, freeze thawing concentration, trehalose-PEG concentration and so on. **Result:** The serum titer of anti-M could be increased by 4 times, and the agglutination intensity was higher than that of commercially available reagent serum. The titer of antibody prepared was basically unchanged after 1-2 months. **Conclusion:** The serum affinity of human anti-M reagent prepared by the anti M antibody positive plasma was higher to some extent than that of the marketed sera, and it can be used to test the daily specimens properly to achieve the purpose of reusing the waste blood.

Key words human anti-M antibody reagent serum; freeze thaw concentration; trehalose-PEG

临床上除特别重要的 ABO, Rh 血型之外,还存在许多数量的红细胞同种抗原和血型系统。MNS 是第 2 个被发现的血型系统,抗原 40 多个。在人类血清中,抗 M 抗体很常见,室温鉴定发现盐水凝集。在临床上往往会造成血型鉴定困难以及交叉配血不合,给临床输血造成困难与风险^[1]。这种抗 M 抗体的产生大多无红细胞刺激,是天然产生的,抗 M 血清通常以 IgM 形式存在,也有 IgG 的抗 M, IgG 类的抗 M 抗体有时会造成新生儿溶血病。

目前,市面上抗 M 标准血清大多来自于单克隆抗体,据本中心检测,效价约为 1:8,甚至 1:4。在日常工作中我们发现,有些献血员 M 抗原极弱,用市售抗 M 试剂检测献血员 M 抗原,凝集强度仅为 1+~2+,甚至低于 1+,这为血型鉴定及配血造成一定困难。人源化的抗 M 试剂血清基本来自于献血者或没有输过血的患者,抗体性质为 IgM 天然抗体,经吸收抗 A、抗 B 后制备而成。目前有报道用中和稀释法及冻融浓缩法制备 M 抗体试剂

血清,其抗 M 效价可达 1:8,而且保存 1~2 个月后可以依然使用^[2],多态性优于单克隆抗体。PEG 是一种多聚体,可增强红细胞抗原与抗体反应的敏感性,低浓度 PEG 则可用于红细胞抗体提纯^[3-4]。有研究表明海藻糖可维持包括单克隆抗体在内的多种生物活性物质的活性^[5]。用海藻糖-PEG 血型抗体浓缩技术可使 IgG 型血性抗体效价升高 2~4 倍, IgM 型血型抗体效价升高 2~6 倍。

据统计,每年本中心献血者中检出抗 M 抗体阳性者几十例,占不规则抗体阳性标本 40%~50%。根据本中心相关规定,这些抗 M 抗体阳性的血液红细胞和血浆以及相关血液制品都必须全部报废,这样不仅产生了大量医疗废弃物以及报废所需的必须开支(运输、销毁等费用),而且在一定程度上造成了资源的浪费。将这些报废的抗 M 抗体阳性的血浆再利用,通过中和稀释,冻融浓缩等一系列方法,制备成人源化的抗 M 试剂血清。不仅可以废血再利用,减少浪费,节省购买试剂的成本,带来效益,而且制备的试剂血清可应用在日常工作中,提高与弱抗原反应的敏感性,在一定程度上避免漏检弱抗原。现将结果报告如下。

* 基金项目:南京市医学科技发展一般性课题(No: ykk15186)

¹ 南京红十字血液中心研究室(南京, 210003)

通信作者:杜海林, E-mail: lulu198746@163.com

1 材料与方法

1.1 标本留取

用市售抗筛细胞及谱细胞筛选本中心报废血浆中抗 M 抗体阳性者。选取 A 型、B 型、抗 M 抗体阳性血浆标本各 2 例,AB 型抗 M 抗体阳性血浆标本 2 例(分别标记为 A₁,A₂,B₁,B₂,AB₁,AB₂)。

1.2 试剂红细胞制备

用抗 M、抗 N 试剂血清筛选如下几种试剂红细胞:①M、N 型 A、B、O、AB 型红细胞各 5 人份,制成 2% 红细胞悬液;②N 型 A、B 型红细胞制成压积红细胞。

1.3 抗体效价测定

A 型血浆与 B 型血浆分别测抗 B、抗 A 效价,以及抗 M 效价。AB 型血浆直接测抗 M 效价。

1.4 中和稀释 A 型、B 型血浆

将 A 型、B 型血浆效价相同者 1:1 比例混合,室温中和,并测定抗 A、抗 B 效价。

1.5 冻融法浓缩抗 M 抗体

将已中和的血浆以及 AB 型血浆在 -30℃ 冰箱冰冻 48 h 后取出,在 4℃ 解冻,当冰块变白时,停止融化,测抗 M 效价。

1.6 抗 A、抗 B 抗体吸收

用 N 型 A、B 型混合压积红细胞吸收冻融后的 A 型、B 型混合血浆,分别在 37℃ 30 min 和 4℃ 30 min 吸收不完全和完全的抗 A、抗 B。

1.7 抗体特异性鉴定

用 N 型 A、B、AB、O 型红细胞及谱细胞证明抗 A、抗 B 已吸收完全,且不含非特异性抗体。用 M 型 A、B、AB、O 型红细胞各 5 例检测抗 M 抗体效价,评价吸收效果。

1.8 海藻糖-PEG 血型抗体浓缩技术提高抗 M 抗体效价

将血清与海藻糖-PEG 浓缩液(海藻糖浓度为 0.200 mol/L、PEG 400 浓度为 0.075 mol/L)按 1:1 混合,室温孵育 30 min 的同时混匀,3 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,加 pH 7.2 磷酸盐缓冲液至 0.1 ml 即为浓缩后血清。

1.9 效果测定

①制备的人源抗 M 抗体试剂血清与凝集强度不同的 M 抗原反应,与市售试剂对比反应敏感性;②血清效果 1~2 个月后再测定。

2 结果

2.1 中和前标本抗 A、抗 B 及抗 M 效价测定

中和前标本抗 A、抗 B 及抗 M 效价测定,见表 1。

2.2 中和稀释 A 型、B 型浆后效价测定

将抗 M 抗体效价相同的 A 型、B 型浆 1:1 混合后(A1 与 B1 混合,A2 与 B2 混合),血浆中抗 B

及抗 A 效价均降为 1:2。

表 1 中和前标本抗 A、抗 B 及抗 M 效价测定

效价	A1	A2	B1	B2	AB1	AB2
抗 A 效价	/	/	1:64	1:64	/	/
抗 B 效价	1:64	1:64	/	/	/	/
抗 M 效价	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4

注:A1 为 A 型 1 号标本,A2 为 A 型 2 号标本,以此类推。

2.3 中和后的血浆及 AB 型浆冻融后抗 M 效价

中和后的血浆及 AB 型浆冻融后检测抗 M 效价,见表 2。

表 2 中和后的血浆及 AB 型浆冻融后抗 M 效价

类型	抗 M 效价	
	冻融前	冻融后
混合 1	1:2	1:4
混合 2	1:4	1:8
AB1	1:2	1:4
AB2	1:4	1:8

注:混合 1 为抗 M 效价 1:2 的 A 型、B 型浆二者混合;混合 2 为抗 M 效价 1:4 的 A 型、B 型浆二者混合。

2.4 混合血浆吸收抗 A 及抗 B 抗体后测其效价

经测定,2 例混合样本经吸收后,抗 A 及抗 B 效价均为 0,吸收完全。抗 M 效价与吸收前无差异,且不含有其他非特异性抗体。

2.5 海藻糖-PEG 浓缩抗 M 抗体

海藻糖-PEG 浓缩抗 M 抗体,见表 3。

表 3 海藻糖-PEG 浓缩抗 M 抗体

类型	抗 M 效价	
	浓缩前	浓缩后
混合 1	1:4	1:8
混合 2	1:8	1:16
AB1	1:4	1:8
AB2	1:8	1:16

2.6 效果测定

①用市售抗 M 试剂血清选取 M 抗原阳性的红细胞,凝集强度 4+、3+、2+、1+ 各 5 例,用制备的抗 M 血清检测凝集强度结果为:4+、3+^S、2+^S、2+(S 为加强)。②1~2 个月后再测定市售血清凝集强度,基本保持不变。

3 讨论

在人类血清中,抗 M 抗体很常见,室温鉴定发现盐水凝集。在临床上往往会造成血型鉴定困难以及交叉配血不合,给临床输血造成困难与风险。

这种抗 M 抗体的产生大多无红细胞刺激,是天然产生的,抗 M 血清通常以 IgM 形式存在。据统计,每年我中心献血者中检出抗 M 抗体阳性者几十例,占不规则抗体阳性标本 40%~50%。根据本中心相关规定,这些抗 M 抗体阳性的血液红细胞和血浆以及相关血液制品都必须全部报废,这样不仅产生了大量医疗废弃物以及报废所需的必须开支(运输、销毁等费用),而且在一定程度上造成了资源的浪费。

本实验是将这些报废的抗 M 抗体阳性的血浆再利用,通过中和稀释,冻融浓缩等一系列方法,制备成人源化的抗 M 试剂血清。我们选取了抗 M 抗体阳性的 A 型、B 型血浆标本各 2 例,AB 型血浆标本 2 例。抗 M 抗体的 A 型 B 型血浆中由于有抗 B、抗 A 抗体,所以用中和稀释法可显著降低抗 B、抗 A 效价。中和前后抗 B、抗 A 效价从 1:64 降至 1:2,而抗 M 效价基本未变。混合后的血浆用 AB 型 M 阴性红细胞分别在 4℃、37℃ 吸收,以去除抗 A、抗 B 抗体,吸收后的血浆基本不含抗 A 抗 B。然后用冻融法可以浓缩抗 M 抗体,效价可提高 2 倍。有报道称用海藻糖-PEG 浓缩抗体,可将 IgM 类抗体提高 2~6 倍,IgG 类抗体提高 2~4 倍。本实验中混合血浆和 AB 型血浆经浓缩后可

将抗 M 抗体效价提高 2 倍。效果测定显示自制抗 M 血清与 M 阳性红细胞凝集强度与市售试剂血清相比效果有提高。可能人源的抗体亲和力较强缘故。本实验将废弃的抗 M 抗体阳性的血清,制备成抗 M 试剂血清在一定程度上达到了废血再利用的目的,开源节流避免浪费,可适当用于日常标本的检测。但广泛应用于日常,还需要进一步的纯化和实验。

参考文献

- [1] 张璐,袁红,伍钢. 抗 M 抗体、抗 lea 抗体以及自身冷抗体引起的输血交叉配血不合 1 例[J]. 临床血液学杂志,2017,30(4):325-326.
- [2] 肖瑞卿,林武存,许聘,等. 用中和浓缩吸收法制备抗 M 血清试剂的研究[J]. 重庆医学,2006,35(2):1064-1065.
- [3] 孙爱农. 低浓度聚乙二醇法检测红细胞 Rh 血型[J]. 皖南医学院学报,1993,12(1):70-71.
- [4] 余朝晖,孙爱农. 低浓度红细胞同种抗体的浓缩提纯[J]. 中国生物制品学杂志,2009,22(7):719-721.
- [5] 陈黎忠,李梅,边广珠,等. 海藻糖对干燥后单克隆抗体血型试剂的保活作用[J]. 临床检验杂志,2002,20(16):363-364.

(收稿日期:2018-07-24)

(上接第 932 页)

- [4] Guo X,Zhang Y,Li J,et al. Strong influence of human leukocyte antigen(HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the Han Chinese population[J]. Hepatology,2011,53:422-428.
- [5] Shaw BE,Marsh SG,Mayor NP,et al. HLA-DPB1 matching status has significant implications for recipients of unrelated donor stem cell transplants[J]. Blood,2006,107:1220-1226.
- [6] Kawase T,Morishima Y,Matsuo K,et al. Japan Marrow Donor Program. High-risk HLA allele mismatch

combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism[J]. Blood,2007,110:2235-2241.

- [7] 刘爱民,禰国维,陈达灿,等. HLA-DQ/DP 等位基因与粤籍汉族斑秃及中医证型的相关性研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志,2010,9(5):289-292.
- [8] 张力,刘淑芸,陈强,等. 成都地区妊娠肝内胆汁淤积症家庭 HLA-DPA1 基因多态性研究[J]. 四川大学学报,2003,34(3):530-532.

(收稿日期:2018-09-16)