

# 有效期内抗体筛查细胞 M、Fya 和 P1 抗原 稳定性分析

卢燕君<sup>1</sup> 晁艳<sup>1</sup> 周厚全<sup>1</sup> 何耀宗<sup>1</sup> 高云龙<sup>1</sup> 王杰婷<sup>2</sup> 吴新忠<sup>1</sup> 梁铮<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:研究抗体筛查细胞在保存期内 M 抗原、Fya 抗原和 P1 抗原的稳定性变化。方法:应用 2 个不同厂家的抗体筛查细胞通过倍比稀释法进行单克隆抗体标准化(IgG-M/Fya/P1 抗体)。收集抗-M/Fya/P1 抗体阳性标本,制备人源抗体血清。自配 1% 试剂红细胞(10 例 O 型且 M/Fya/P1 抗原阳性志愿者)验证标准化单克隆抗体和人源抗体的稳定性。在有效期最后 30 d 内,采用微柱凝集法,使用标准化单克隆抗体和人源抗体对 2 厂家抗体筛查细胞(试剂 1 和 2) M/Fya/P1 抗原的抗原性进行监测。结果:试剂 1, M 和 P1 抗原在第 21 天及 Fya 抗原在第 28 天与第 0 天比较,凝聚强度结果差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); M 抗原于第 28 天及 P1 抗原于第 21 天出现无法检出现象。试剂 2, M 和 P1 抗原在第 21 天及 Fya 抗原在第 28 天出现凝聚强度差异( $P < 0.05$ ); M 和 P1 抗原第 28 天出现无法检出现象。结论:抗体筛查细胞血型抗原稳定性在有效期内逐渐降低,建议抗体筛查细胞保存期间进行质量监测。

**[关键词]** 抗体筛查细胞;稳定性;微柱凝集法;人源抗体;单克隆抗体

**DOI:**10.13201/j.issn.1004-2806.2022.12.001

**[中图分类号]** R457.1 **[文献标志码]** A

## Study on stability of M, Fya and P1 antigens in antibody screening cells within validity period

LU Yanjun<sup>1</sup> CHAO Yan<sup>1</sup> ZHOU Houquan<sup>1</sup> HE Yaozong<sup>1</sup> GAO Yunlong<sup>1</sup>  
WANG Jieting<sup>2</sup> WU Xinzhong<sup>1</sup> LIANG Zheng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou, 510120, China; <sup>2</sup>School of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine)

Corresponding author: LIANG Zheng, E-mail: 13924231981@139.com

**Abstract Objective:** To study the stability changes of M, Fya and P1 antigens in antibody screening cells during the storage period. **Methods:** Monoclonal antibody standardization (IgG-M/Fya/P1 antibody) was performed by doubling dilution using antibody screening cells from two different manufacturers. The positive specimens of anti-M/Fya/P1 antibody in our department were collected to prepare human antibody serum. Self-prepared 1% reagent red blood cells (10 volunteers with O type and positive for M/Fya/P1 antigen) were used to verify the stability of standardized monoclonal antibodies and human antibodies. During the last 30 days of validity, the M/Fya/P1 antigen antigenicity of the two manufacturers' antibody screening cells (Reagent 1 and Reagent 2) was monitored by microcolumn agglutination and using standardized monoclonal antibodies and human antibodies. **Results:** For reagent 1, compared with day 0, the results of aggregation strength of M and P1 antigens on day 21 and Fya antigen on day 28 were significantly different ( $P < 0.05$ ). The M antigen was undetectable on the 28th day and the P1 antigen on the 21st day. For reagent 2, the aggregation intensity of M and P1 antigens was different on the 21st day and the Fya antigen on the 28th day ( $P < 0.05$ ). The M and P1 antigens were undetectable on day 28. **Conclusion:** The stability of antibody screening cells blood group antigen gradually decreased during the validity period. It is recommended to monitor the quality of antibody screening cells during storage.

**Key words** antibody screening cells; stability; column agglutination; human antibody; monoclonal antibody

<sup>1</sup>广州中医药大学第二附属医院输血科(广州,510120)

<sup>2</sup>广州中医药大学基础医学院

通信作者:梁铮,E-mail:13924231981@139.com

截至 2021 年 6 月,国际输血协会(ISBT)公布的红细胞血型系统 43 个,共 345 种血型抗原<sup>[1]</sup>。血型抗原研究在器官移植<sup>[2]</sup>、新生儿溶血性疾病<sup>[3]</sup>和输血安全等方面具有重要意义。不规则抗体检测是《临床输血技术规范》要求输血前必须检测的项目,防止不规则抗体漏检是输血前检测的重要环节,是确保输血安全和有效输血的关键<sup>[4-5]</sup>。红细胞血型抗原物质是红细胞膜上的蛋白质及结合在胞膜上脂质和蛋白质上的糖分子,包括糖链、单次或多次穿膜的多肽<sup>[6]</sup>。抗体筛查细胞是离体游离红细胞,细胞膜表面存在多种血型抗原、用于检测供血者和受血者血浆中是否存在不规则抗体,其抗原性的稳定是筛查出不规则抗体的关键,如抗原性的结构改变或数量减少,可能导致不规则抗体漏检,影响红细胞输注的效果,甚至引起严重的输血不良反应<sup>[4-5]</sup>。不规则抗体漏检原因,大多数研究在方法学缺陷、不规则抗体效价低、抗体筛查细胞表面存缺少某种血型抗原或抗筛细胞某种血型抗原是杂合子以及细胞存在剂量效应等<sup>[5-7]</sup>。目前,国内大多数医院采用微柱凝集法作为输血前不规则抗体检测方法,笔者在检测工作中发现,受血者不规则抗体筛查的阳性检出率某一时段高,某一时段低,出现阶段性变化。探究其原因,是否因为保存期内抗筛细胞血型某种抗原的稳定性变化导致某一时间阶段受血者不规则抗体漏检。本文选择红细胞膜上的单次穿膜抗原(M 抗原)、多次穿膜抗原(Fya 抗原)和膜外糖链抗原(P1 抗原)为研究对象,采用微柱凝集法,用标化的单克隆抗体和人源抗体分别与 M、Fya 和 P1 抗原反应,分析保存期内抗筛细胞的 M、Fya 和 P1 抗原的稳定性随时间变

化情况,尝试为我实验室拟定监测保存期内抗体筛查细胞血型抗原的稳定性质量监控方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

抗筛细胞 1(试剂 1)(Bio-Rad,批号:45330751);抗筛细胞 2(试剂 2)(上海血液生物医药有限责任公司,批号:20217064);自配 1%的试剂红细胞(10 例 O 型且表达 M 抗原、P1 抗原、Fya 抗原的阳性的志愿者),用于标化单克隆抗体和人源抗体保存期间稳定性验证。

### 1.2 试剂

单克隆抗体 IgG-M(荷兰三昆试剂有限公司,批号:8000452675);单克隆抗体 IgG-P1(荷兰三昆试剂有限公司,批号:8000455970);单克隆抗体 IgG-Fya(荷兰三昆试剂有限公司,批号:8000260141);微柱凝胶卡(Bio-Rad,批号:505316817);样本稀释液 ID-Diluent2(Bio-Rad,批号:057610005)。

### 1.3 仪器

微柱凝胶卡专用离心机(Bio-Rad, ID-Centrifuge 12S II);恒温箱(Bio-Rad, ID-Incubator 37S I);-40℃冰箱(青岛海尔, DW-40L420F);台式离心机(日本久保田;KA-2200)。

### 1.4 单克隆抗体标化

应用 2 个不同厂家的抗体筛查细胞通过倍比稀释法进行单克隆抗体标化(IgG-M 抗体、IgG-P1 抗体和 IgG-Fya 抗体),要求稀释后柱凝集法检测结果的凝集强度分别 5~9 分(图 1),3 种用于监控 M 抗原、Fya 抗原和 P1 抗原抗标化稀释倍数见表 1。

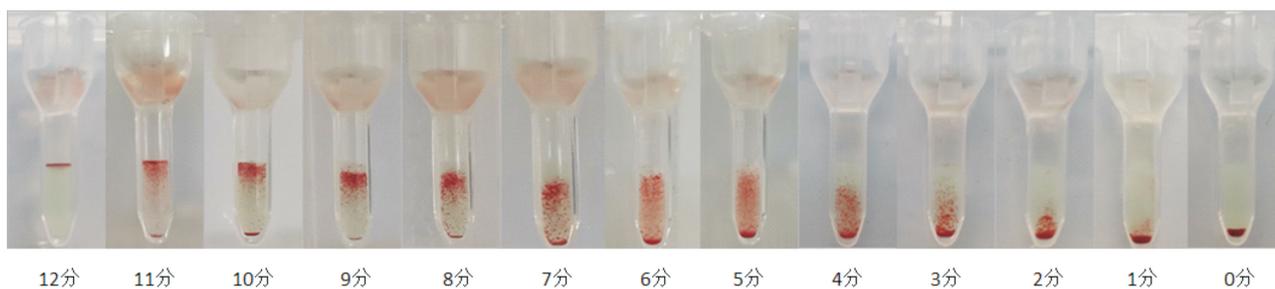


图 1 凝胶微柱凝集强度评分标准

表 1 3 种单克隆抗体在标化稀释倍数表

抗体名称	试剂 1	试剂 2
单克隆抗体 IgG-M	16	10
单克隆抗体 IgG-P1	4	2
单克隆抗体 IgG-Fya	10	5

### 1.5 人源抗体血清制备

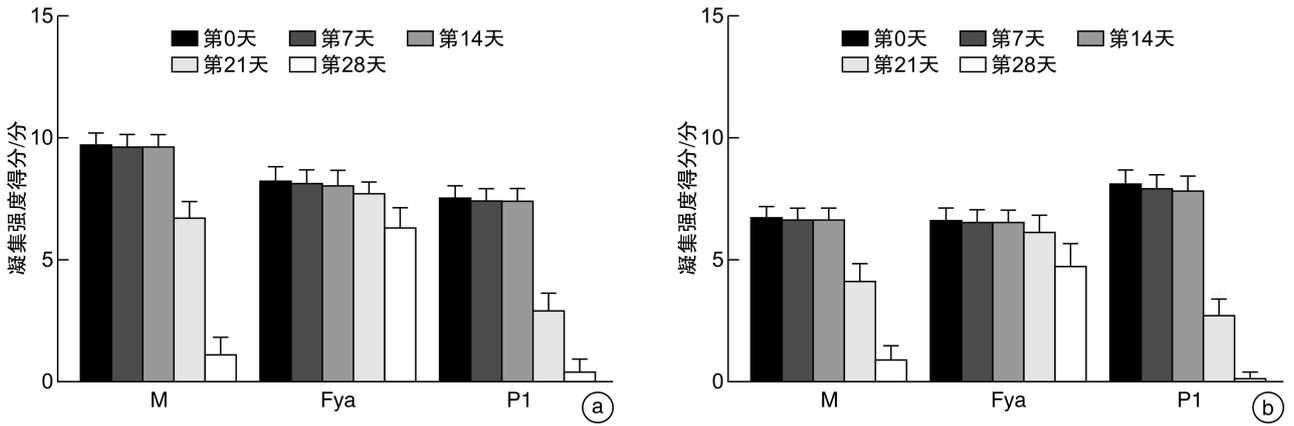
收集 2020 年 1 至 12 月我科不规则抗体阳性的标本,分别选择抗-M 抗体、抗-P1 抗体、抗-Fya

抗体的阳性标本,纳入本试验的自备人源抗体血清要求:抗-M 抗体阳性(微柱凝胶卡凝集强度分 5~11 分)、抗-P1 抗体阳性(微柱凝胶卡凝集强度分 4~10 分)、抗-Fya 抗体阳性(微柱凝胶卡凝集强度分 4~10 分),各收集血清后 20 mL,混匀后各置 EP 管分装(0.06 mL/管),-40℃保存。

### 1.6 抗体稳定性验证

自配 1%的试剂红细胞,在规定时间内(标化好第 0 天、第 30 天、第 60 天)采集血样,每例 2 mL





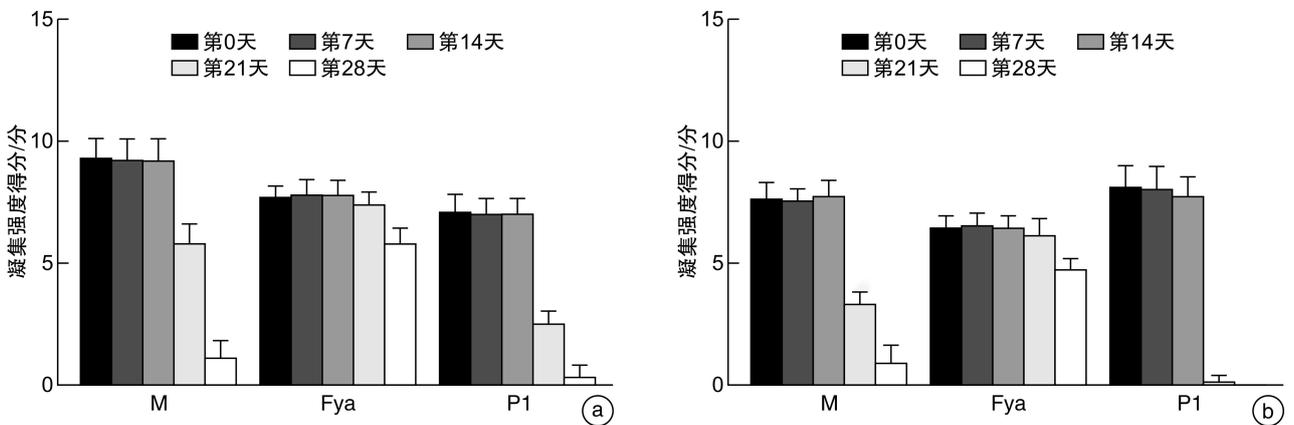
a: 已标化单克隆抗体检测结果; b: 人源抗体检测结果。

图 2 试剂 1 的 M、P1 和 Fya 抗原稳定性监测结果

表 4 试剂 2 的 M、P1 和 Fya 抗原稳定性监测表

$n = 10, \bar{X} \pm S$

时间	单克隆抗体			人源抗体		
	M 抗原	Fya 抗原	P1 抗原	M 抗原	Fya 抗原	P1 抗原
第 0 天	9.300±0.823	7.700±0.483	7.100±0.738	7.600±0.699	6.400±0.516	8.100±0.876
第 7 天	9.200±0.919	7.800±0.632	7.000±0.667	7.500±0.527	6.500±0.527	8.000±0.943
第 14 天	9.200±0.919	7.800±0.632	7.000±0.667	7.700±0.675	6.400±0.516	7.700±0.823
第 21 天	5.800±0.789	7.400±0.516	2.500±0.527	3.300±0.483	6.100±0.738	0.100±0.316
第 28 天	1.100±0.738	5.800±0.632	0.300±0.483	0.900±0.738	4.700±0.483	0
F	212.100	38.650	408.710	490.000	38.370	428.910
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001



a: 已标化单克隆抗体检测结果; b: 人源抗体检测结果。

图 3 试剂 2 的 M、P1 和 Fya 抗原稳定性监测结果

### 3 讨论

红细胞血型抗原的产生与红细胞膜的结构紧密相关。红细胞膜是由磷脂双分子层构成的液态镶嵌膜,镶嵌于双层磷脂骨架中的蛋白质被称为整合蛋白,其本身是蛋白质,奠定了红细胞血型形成的基础<sup>[6]</sup>。有些整合蛋白多次跨越细胞膜双层磷脂骨架结构,与双层磷脂结合较紧密,如 RhD 蛋白可穿膜 12 次,Duffy 血型蛋白可穿膜 7 次<sup>[8]</sup>。形成红细胞血型的另一种物质是结合到膜上的由多个单糖分子构成的糖链,属于这一类型的血型抗原

ABO 抗原、P1 抗原等。血型抗原还可以是糖蛋白,如 MNS 系统的 MN 抗原决定簇位于糖蛋白 A-1 种唾液酸糖蛋白结构上,是单次穿膜的糖蛋白<sup>[9]</sup>。赵俸涌等<sup>[9]</sup>进行红细胞膜蛋白抗原性研究,建议尽量使用新鲜谱细胞。本研究发现抗有效期内体筛查红细胞在实验室存放过程中,所监测的 3 种血型抗原的抗原性随时间延长减弱,第 21 天的 M 和 P1,第 28 天的 M、Fya 和 P1 抗原减弱变化的差异性,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );M 抗原于第 28 天出现无法检出现象,P1 抗原于第 21 天出

现无法检出现象,而 P1 抗原于在 28 全部样本无法检出现象,推断最早减弱的抗原是红细胞膜外糖链 P1 抗原,其次是单次穿膜的 M 抗原,最慢的是多次穿膜的 Fya 抗原,可能是血型抗原处在细胞膜位置有关。试验结论某种试剂抗原在接近失效期漏检对应抗体,与笔者工作中发现问题相似。有文献报道,CD44 分子是 1 种跨膜糖蛋白,作为红细胞表面受体在细胞相互、细胞黏附和迁移的作用<sup>[9-11]</sup>,CD44 分子与红细胞寿命方面有关,本试验研究在保存期抗原减弱是否与 CD44 分子的结构变化、数量变化有紧密性相关尚未明确。

本试验选用标化的单克隆抗体和人源抗体监测(试剂 1 和试剂 2)抗体筛查细胞抗筛红细胞表面 M、Fya 和 P1 抗原时,发现监测试剂 2 时,用人源抗体早于单克隆抗体出现 P1 抗原未检出现象,推测对于保存期内抗原性减弱明显的抗原,人源抗体的检测能力优于标化单克隆抗体,这可能与单克隆抗体效价高且特异性强有关,也可能是人源抗体针对抗原表位较多,而单克隆抗体仅针对单一表位,对于膜蛋白构象变化更为敏感<sup>[9-11]</sup>。因此相对于标化单克隆抗体,人源抗体更能及时反映出抗筛细胞部分血型抗原减弱现象。本研究选用标化的单克隆抗体是用试剂单克隆抗体估计稀释到一定浓度的自配抗体(半定量),而微柱凝集法作为一种半定量的免疫检测技术,是国内大多数医院作为输血前不规则抗体检测常规方法。我室实验室通过 ISO 15189 认可,根据认可准则以及相关要求和近几年精准输血概念的提出,对输血相容性检测提出了更高要求,除了 ABO、RhD 血型相容外,还提到对献血者和患者多血型系统匹配配合型血液输注方案的建议<sup>[12]</sup>,目的是保证所输的红细胞不与患者检出的不规则抗体反应(输血型抗原阴性红细胞),减少无效输血以及发生输血不良反应。目前临床上由不规则抗体引发输血不良反应和输血治疗无效屡见不鲜,在美国食品药品监督管理局所报道的因输血死亡的病例中,溶血性输血反应占 55.5%,而其中 14.0%是由不规则抗体漏检所引起的<sup>[13]</sup>,抗体抗筛细胞的血型相关抗原的完整性和稳定性非常重要,本研究提示输血检测工作人员在日常工作,要警惕不规则抗体漏检,特别抗-P1 抗体和抗-M 抗体,在 37℃,抗-P1 抗体可引起急性和迟发性溶血性输血反应的报道<sup>[14]</sup>。有报道抗-M 抗体通过胎盘屏障的 IgG 型抗体引发导致的新生儿溶血病<sup>[15]</sup>。红细胞血型系统较复杂,抗筛细胞血型抗原较多,目前,进口抗筛细胞试剂价格昂贵,进口试剂到达实验室有效期时间约 1 个月,国内尚无完善的质量控制方法,血型抗体国际标准品的价格昂贵,参考行业相关标准文献,探索适合本实验监测保存期内抗筛细胞血型抗原稳定性的可行性方案。

根据本研究结果,同时结合日常工作和现有条件,建议使用已标化单克隆抗体或者人源抗体于抗筛细胞保存期间进行质量监测,防止因不规则抗体漏检导致血液输注无效及输血不良反应的发生。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 杨东,陈青.红细胞血型系统研究新进展[J].临床输血与检验,2022,24(2):137-141,146.
- [2] 仲照东,陈智超,夏凌辉.急性髓系白血病造血干细胞移植后复发的预防及治疗[J].临床血液学杂志,2022,35(5):375-379.
- [3] 乔静,刘庆生,庞新丰,等.53 例 Rh 血型系统以外不规则抗体分布及新生儿溶血病发生关联分析[J].中国输血杂志,2021,34(8):874-877.
- [4] 杨婷婷.输血前不规则抗体筛查与输血安全的重要作用研究[J].中国继续医学教育,2021,13(33):134-137.
- [5] 李洪兵,王纯,文玲,等.不规则抗体检测对非 Rh 血型系统患者输血不良反应及溶血的影响[J].临床和实验医学杂志,2021,20(20):2215-2218.
- [6] 张黎雯,李树中,田丰,等.红细胞血型抗原的最新研究进展[J].临床血液学杂志,2021,34(2):135-144.
- [7] Ciana A, Achilli C, Gaur A, et al. Membrane Remodeling and Vesicle Formation During Ageing of Human Red Blood Cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(3):1127-1138.
- [8] Lee HS, Choi KM, Won EJ, et al. Protein stability changes of the novel p. Arg180Cys mutant A glycosyltransferase resulted in a weak A phenotype[J]. Vox Sang, 2016, 111(4):441-444.
- [9] 赵俸涌,李勤,郭忠慧,等.保存期间试剂红细胞血型相关膜蛋白抗原性研究[J].中国输血杂志,2018,31(9):957-959.
- [10] Remigante A, Morabito R, Marino A. Natural Antioxidants Beneficial Effects on Anion Exchange through Band 3 Protein in Human Erythrocytes[J]. Antioxidants(Basel), 2019, 9(1):25.
- [11] 方鹏,李玲,何芮,等.红细胞膜表面黏附分子与红细胞寿命的相关性研究[J].中国输血杂志,2021,34(1):19-22.
- [12] 柳斌,王伟,樊瑞军,等.血型不规则抗体筛查在精准输血管理中的应用[J].宁夏医学杂志,2021,43(2):139-141.
- [13] 赵震,孙长杰,王晓宁,等.抗人球蛋白 IgG 和 C<sub>3</sub>d 对不规则抗体筛查项目诊断价值分析[J].临床血液学杂志,2020,33(2):101-104.
- [14] 刘世佳,张勇萍,杨世明,等. IgM 抗 Le<sup>a</sup>-a、抗 P<sub>1</sub> 抗体联合 IgG 抗 E 抗体的血清学检测分析[J].细胞与分子免疫学杂志,2021,37(10):932-935.
- [15] 钱明明,郭霞,乔芳,等.母婴 ABO 血型不合合并 IgG 抗-M 抗体引起新生儿溶血病 1 例[J].安徽医药,2021,25(10):2102-2105.

(收稿日期:2022-08-29 修回日期:2022-09-28)