• 基础研究 •

基于特异性凝集筛选与分子建模的抗M血型抗体制备及效能评价

侯羽春[1,2]，凌亚亭[3]，张　钰[3]，常新霞[2]，徐静蕾[2]，何成涛[3]，傅　强[3]，王布强[4]，陈芳芳[4]，张　茜[2*]，王晓明[1,2*]

[1]南京医科大学基础医学院免疫学系，[2]国家卫健委抗体技术重点实验室，江苏　南京　211166；[3]南京红十字血液中心输血医学重点实验室，江苏　南京　210003；[4]江苏力博医药生物技术股份有限公司，江苏　江阴　214437

［摘　要］ **目的：**建立红细胞特异性凝集筛选结合分子建模的策略，高效制备抗M血型抗体，并验证其临床检验效能。**方法：**采用以完整红细胞为靶标的凝集筛选策略，结合流式分选获得抗M特异性B细胞并进行B细胞受体（B cell receptor，BCR）测序；对抗体可变区序列进行生物进化分析，联合分子建模预测抗原-抗体结合能力，筛选候选序列后构建表达质粒，经真核系统表达重组抗体；采用红细胞凝集试验、效价测定及流式细胞术验证抗体结合特异性，以不同MN表型红细胞样本评价其血型鉴定效能。**结果：**抗M抗体效价为1∶512的血液样本经特异性凝集筛选获得96个抗M特异性B细胞，经BCR测序得到28对重轻链可变区序列；根据生物进化分析与分子建模筛选6株候选抗体进行表达验证，其中2G9、2F11、2H5可特异性凝集M抗原阳性红细胞，以2G9凝集效价最高（1∶256）；流式细胞术证实2G9可特异性识别M抗原，该抗体对不同MN表型红细胞的M血型检出率为100%，假阳性率为0%。**结论：**本研究制备的抗M血型抗体2G9具有优异的临床检验效能，可用于临床M血型鉴定。红细胞特异性凝集筛选结合分子建模策略为血型抗体制备提供了新方法。

［关键词］ M血型抗原；血型抗体；特异性凝集筛选；分子建模；血型鉴定
［中图分类号］ R446.6　　［文献标志码］ A　　［文章编号］ 1007-4368（2026）11-1649-10
doi：10.7655/NYDXBNSN260416

Preparation and efficacy evaluation of anti-M blood group antibodies based on specific agglutination screening and molecular modeling

Hou Yuchun[1,2], Ling Yating[3], Zhang Yu[3], Chang Xinxia[2], Xu Jinglei[2], He Chengtao[3], Fu Qiang[3], Wang Buqiang[4], Chen Fangfang[4], Zhang Qian[2*], Wang Xiaoming[1,2*]

[1]Department of Immunology, [2]National Health Commission Key Laboratory of Antibody Techniques, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; [3]Key Laboratory of Transfusion Medicine, Nanjing Red Cross Blood Center, Nanjing 210003; [4]Jiangsu Libo Medicine Biotechnology Co., Ltd., Jiangyin 214437, China

［**Abstract**］ **Objective:** To establish a strategy combining specific erythrocyte agglutination screening with molecular modeling for the efficient preparation of anti-M blood group antibodies, and to verify their clinical detection efficacy. **Methods:** An agglutination screening strategy targeting intact erythrocytes was adopted, combined with flow cytometry sorting to obtain anti-M specific B cells for B cell receptor (BCR) sequencing. Evolutionary biological analysis was performed on the antibody variable region sequences, and molecular modeling was integrated to predict antigen-antibody binding affinity. Candidate sequences were screened to construct expression plasmids, and recombinant antibodies were expressed in a eukaryotic system. Erythrocyte agglutination test, titer determination and flow cytometry were used to verify antibody binding specificity, and erythrocyte samples with different MN phenotypes were employed to evaluate its blood group identification efficacy. **Results:** From the blood sample with an anti-M antibody titer of 1∶512, 96 anti-M specific B cells were obtained *via* specific agglutination screening, and 28 pairs of heavy and light chain variable region sequences were acquired through BCR sequencing. Six candidate antibodies were screened for expression and verification based on evolutionary biological analysis and molecular modeling, among which 2G9, 2F11, and 2H5 could specifically agglutinate M antigen-positive erythrocytes, with 2G9 showing the highest agglutination titer (1∶256). Flow cytometry confirmed that

［基金项目］ 国家自然科学基金（31970828，82573312）；南京红十字血液中心输血医学重点实验室2024开放课题（2024018）
*通信作者（Corresponding author），E-mail：zhangqian01@njmu.edu.cn（ORCID：0000-0002-6889-7112）；xmwang@njmu.edu.cn（ORCID：0000-0003-0679-9768）

2G9 could specifically recognize the M antigen, and this antibody achieved a 100% detection rate and 0% false positive rate for M blood group in erythrocytes with different MN phenotypes. **Conclusion:** The anti-M blood group antibody 2G9 prepared in this study has excellent clinical testing efficacy and can be used for clinical M blood group identification. The specific agglutination screening of red blood cells combined with molecular modeling strategies provides a new method for the preparation of blood group antibodies.

[**Key words**] M blood group antigen; blood group antibody; specific agglutination screening; molecular modeling; blood grouping

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(11): 1649-1658]

M抗原是MNS血型系统的核心抗原，抗原蛋白为血型糖蛋白A（glycophorin A，GPA），其抗原性依赖GPA细胞外域特定氨基酸序列及唾液酸糖基化天然构象[1-2]。M抗原与相应抗体的同种异体免疫反应，是引发溶血性输血反应及胎儿新生儿溶血性疾病（hemolytic disease of the fetus and newborn，HDFN）的重要原因[3-5]。近年来，我国由抗M抗体所致的HDFN病例呈明显上升趋势，且临床症状较ABO、RhD血型导致的HDFN更为严重[6-7]，凸显了完善临床M血型鉴定的必要性与紧迫性。

目前，我国MNS血型检测试剂多依赖进口。国内抗M血型抗体的制备以杂交瘤技术为主，然而，红细胞膜抗原成分复杂，易导致所获抗体的抗原针对性不足、筛选成功率低。噬菌体展示技术存在重轻链非天然配对问题[8-9]，EB病毒永生化B细胞则存在转化不稳定、抗体分泌能力易丢失等缺陷[10-11]。单B细胞受体（B cell receptor，BCR）测序技术可直接获取体内成熟B细胞的天然配对抗体序列，具有流程简便、周期短等优势，是制备高亲和力血型抗体的优选技术[12-15]。然而，抗原特异性B细胞的高效筛选仍是制约该技术应用的关键瓶颈。

针对上述问题，本研究拟建立基于红细胞特异性凝集的双向筛选策略，实现抗M特异性B细胞的定向富集，同时整合分子建模与生物进化分析，构建候选抗体的筛选体系，实现从海量测序序列到少量候选抗体的高效筛选，制备具有高临床检验效能的抗M血型单克隆抗体，为临床M血型鉴定和溶血性疾病的防治研究提供高效价的全人源单克隆抗体。

1　材料和方法

1.1　材料

血液样本均来自南京红十字血液中心无偿献血者，收集5例高滴度血清抗M抗体阳性样本（2024年9月—2025年1月），200例M抗原阳性红细胞（M^+RBC）样本及80例M抗原阴性红细胞（M^-RBC）样本（2025年11月—2026年3月），相关研究经南京红十字血液中心伦理委员会批准，所有受试者均签署知情同意书。

HEK293Freestyle细胞，抗体IgG表达质粒pFUSE-CHIg-hH、pFUSE-CLIg-hκ、pFUSE-CLIg-hλ（Invitrogen公司，美国）；抗A、抗B、抗M、抗N血型定型试剂，A1型及B型试剂红细胞（上海血液生物公司）；人免疫球蛋白血型定型凝胶检测卡（长春博讯公司）；16价红细胞抗体鉴定谱细胞（Sanquin公司，荷兰）；人B细胞富集试剂盒（EasySep公司，美国）；人淋巴细胞分离液（深圳达科为公司）；抗体Anti-Human CD19-A750、Anti-Human IgG Fc-PE（eBioscience™公司，美国）；蛋白纯化柱Hitrap Protein A HP（Cytiva公司，美国）。

血型血清学离心机（长春博研公司）；Cyto FLEX流式细胞仪（Beckman公司，美国）；CO_2细胞摇床培养箱（Thermo Scientific公司，美国）；PURE AKTA蛋白纯化仪（Cytiva公司，美国）；Discovery Studio 2021分子建模软件（BIOVIA公司，美国）。

1.2　方法

1.2.1　基于红细胞特异性凝集的双向筛选

从5例血清抗M抗体阳性样本中选择凝集效价最高者作为候选样本。使用人淋巴细胞分离液（参照说明书）分离候选样本外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）。使用人B细胞富集试剂盒（参照说明书）富集B细胞。负向筛选：根据候选样本ABO血型，选用表达相应ABO抗原的M^-RBC（如A型样本选用B型M^-RBC），调整红细胞悬液至2%，红细胞数∶B细胞数为10∶1，混匀，37 ℃孵育1 h，密度梯度离心去除与上述红细胞结合的B细胞。正向筛选：取O型M^+RBC，与未结合B细胞按上述相同条件反应并离心，收集红细胞凝集团，裂解红细胞后加入Anti-Human CD19-A750及Anti-Human IgG Fc-PE，流式分选CD19与IgG双阳性单B细胞。

1.2.2　单B细胞BCR测序与序列分析

采用Smart-seq3xpress技术，按照标准流程进行

细胞裂解、逆转录、cDNA预扩增、转座酶建库及高通量测序，获抗体重、轻链可变区序列；与IMGT数据库比对确定V（D）J基因、互补决定区3（complementarity-determining region 3，CDR3）序列及氨基酸组成，经Clustal Omega聚类分析、ChiPlot构建进化树，解析克隆谱系关系。

1.2.3　同源建模与分子对接

采用Discovery Studio 2021对单链抗体可变区（single-chain variable fragment，scFv）进行同源建模，选择与目标序列一致性≥90%的蛋白质数据库（Protein Data Bank，PDB）结构为模板，Ramachandran图验证模型可靠性。调取M抗原GPA晶体结构（PDB ID：2Kpf），与scFv模型行ZDOCK对接、RDOCK优化，以结合自由能为核心评价指标（数值越低表示结合潜能越高）。

1.2.4　候选抗体筛选

将分子对接结合自由能、CDR3长度及酸碱性氨基酸组成整合于抗体序列进化树。以结合自由能最低、重链互补决定区3（heavy chain complementarity-determining region 3，HCDR3）长度较长、酸性氨基酸数量不低于碱性氨基酸数量为筛选标准，自各克隆家族中选取代表性抗体，选取在上述3项指标中呈相反特征者，作为对照抗体。

1.2.5　抗体的表达、纯化及鉴定

将候选抗体重链及轻链可变区分别克隆至人IgG1恒定区载体，构建完整抗体表达质粒，由南京金斯瑞科技有限公司合成。活性≥90%的HEK293Freestyle细胞，计数3×10^8个，以轻链质粒60 μg、重链质粒40 μg与400 μL PEI共转染，于125 r/min、37 ℃、8% CO_2条件下培养120 h。培养后收集上清液，按照PURE AKTA蛋白纯化仪标准流程，采用Protein A亲和层析纯化。对转染前后细胞上清液、纯化流穿液及洗脱液进行SDS-PAGE及考马斯亮蓝染色鉴定，洗脱液经超滤浓缩后调整浓度至0.1 mg/mL备用。

1.2.6　抗体的功能验证

红细胞凝集试验：25 μL 2% M^+RBC、M^-RBC悬液分别加入抗体50 μL，混匀后转至抗人球蛋白凝胶卡，37 ℃孵育30 min后900 r/min离心10 min，凝集强度≥1^+为阳性。凝集强度判定标准：4^+（红细胞全部凝集于柱顶）、3^+（大部分凝集于上部）、2^+（凝集于中部）、1^+（凝集于下部）、±（极弱凝集）、0（无凝集，红细胞沉于柱底）。

凝集效价测定：抗体原液倍比稀释，50 μL稀释液与25 μL M^+RBC悬液孵育后转至凝胶卡，同上述条件离心，以凝集强度1^+的最高稀释度的倒数为效价。

特异性鉴定：100 μL 2% M^+RBC、M^-RBC悬液分别加入5 μg抗体，37 ℃孵育30 min，PBS洗涤后加入Anti-Human IgG-Fc PE染色，流式细胞术检测抗体结合阳性率。

1.2.7　抗体的M血型临床检验效能评价

以市售抗M血型定型试剂为对照，检测所制备抗体对280例临床红细胞样本M血型的检出率、漏检率及假阳性率，同时比较该抗体与市售试剂对M^+RBC的凝集效价。

1.3　统计学方法

采用SPSS 27.0.1进行数据分析。抗体与红细胞的结合率以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用两独立样本t检验；抗体与市售试剂对红细胞的凝集效价以中位数（四分位数）[$M(P_{25},P_{75})$]表示，组间比较采用Wilcoxon配对符号秩检验。双侧检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　高效价抗M血型抗体样本收集

抗M血型抗体阳性样本凝集效价检测提示5号样本效价最高，为1∶512，确认为候选样本（图1）。该样本ABO及MN表型为B型，M^-N^+。

2.2　基于红细胞特异性凝集的双向筛选

候选样本为B型，血清中存在抗A抗体。筛选策略为：以A型M^-RBC进行负向筛选，以O型M^+RBC进行正向筛选。自5 mL外周血分离PBMC 4.3×10^6个。经B细胞富集（图2A），淋巴细胞中$CD19^+$细胞比例由富集前的4.40%升至85.10%，获得B细胞1.0×10^5个。最后，经双向筛选，细胞数降至1.9×10^3个。经流式分选（图2B），$CD19^+/IgG^+$双阳性抗M特异性单B细胞比例为4.59%，数量为96个，实现了对特异性B细胞的高效筛选。

2.3　单B细胞BCR测序及序列分析

96个单B细胞中，58个测得抗体序列，其中重链55条、轻链53条（κ链34条、λ链19条）。经聚类分析，共获得28对天然配对的抗体可变区序列。重链中，21条为IGHV4亚型，7条为IGHV3亚型；轻链中，κ链18条为IGκV3亚型，λ链10条为IGλV3亚型。重轻链亚型分布及CDR3长度占比见图3。

2.4　分子建模及抗体序列筛选

28对scFv同源建模结构经Ramachandran图验证，位于允许区的残基占比均≥95%，模型可靠性良

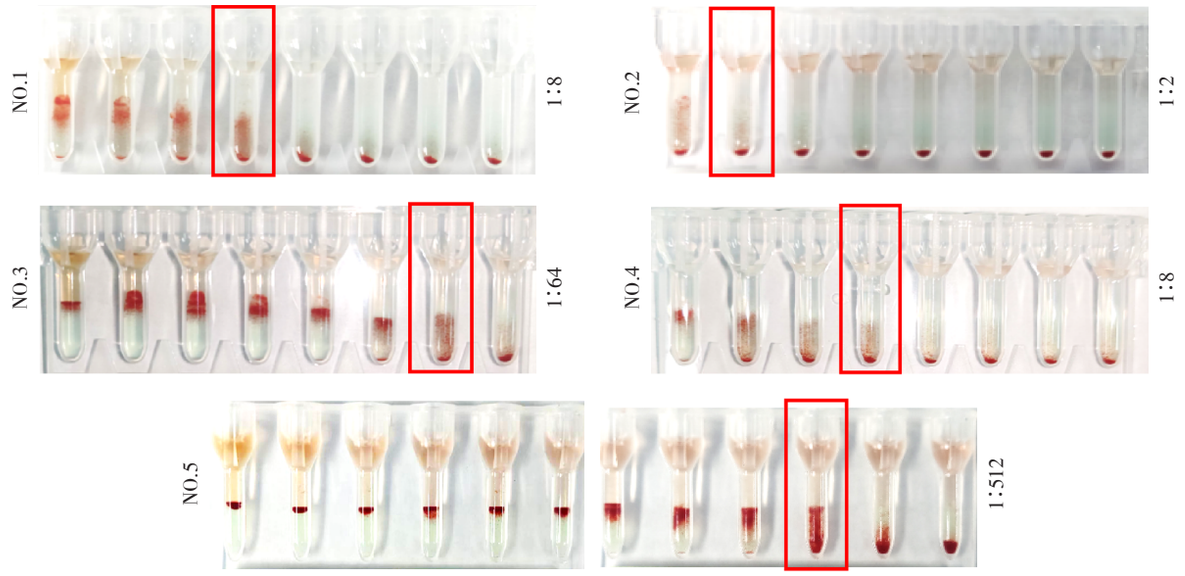
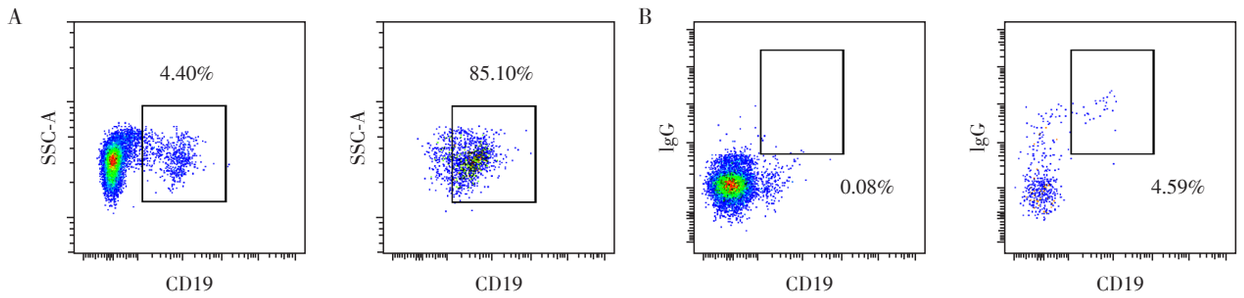


图1　抗M抗体阳性样本凝集效价检测

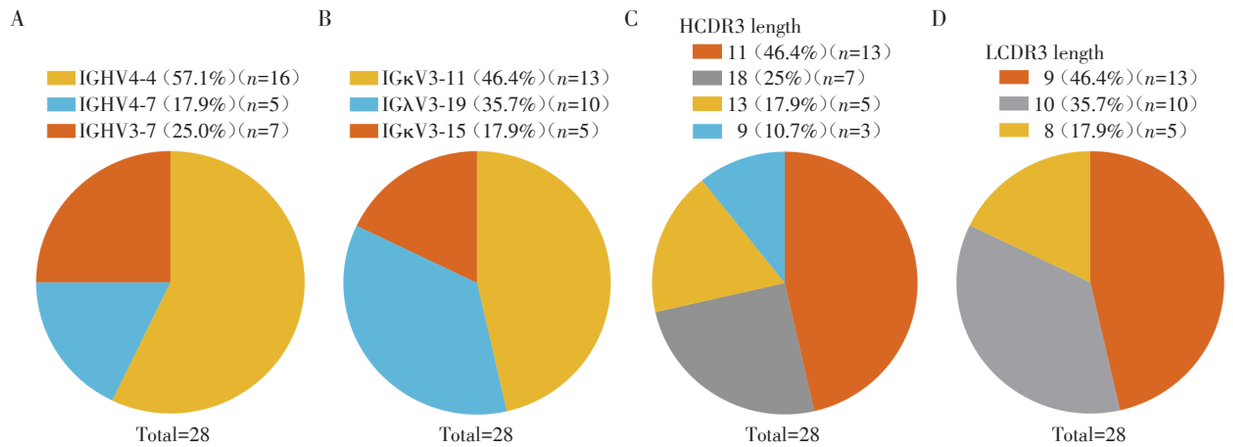
Figure 1　Agglutination titer detection of positive anti-M antibody samples



A: Flow cytometry analysis of B cells before (left) and after (right) enrichment. B: Flow cytometry analysis of anti-M-specific B cells before (left) and after (right) bidirectional screening.

图2　抗M特异性B细胞筛选

Figure 2　Screening of anti-M-specific B cells



A: Distribution of heavy chain variable region gene subtypes (n=28). B: Distribution of light chain variable region gene subtypes (n=28, including 18 κ chains and 10 λ chains). C: Distribution of heavy chain CDR3 (HCDR3) length (n=28). D: Distribution of light chain CDR3 (LCDR3) length (n=28).

图3　抗体序列分析

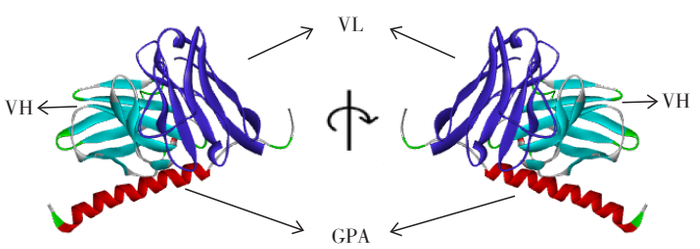
Figure 3　Antibody sequence analysis

好。scFv与M血型抗原蛋白GPA的分子对接模型见图4A。将scFv的重链及轻链亚型、酸碱性氨基酸个数、CDR3长度及分子对接结合能整合于抗体序列进化树（图4B）。从3个克隆家族中分别选取2H5、2G10、2G9（结合能分别为-24.777 4、-32.941 7、-29.944 4 kcal/mol，HCDR3长度分别为18、11、18，酸性氨基酸数量均不低于碱性氨基酸）作为代表性抗体，2F3、2F11、2H8作为对照抗体进行表达与功能鉴定。

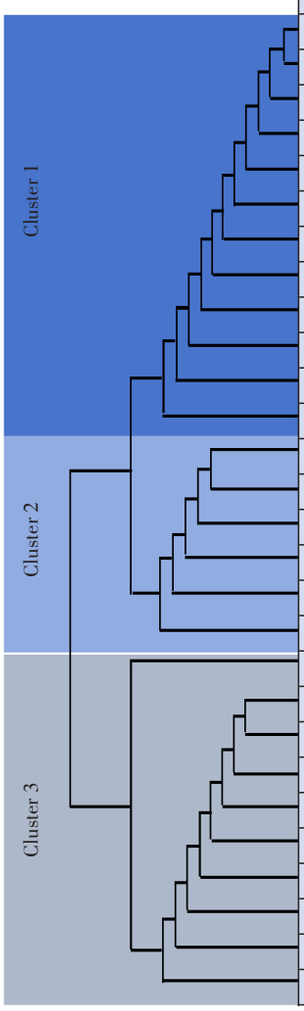
2.5　抗体的表达、纯化及鉴定

将候选抗体可变区克隆至人IgG1恒定区的表

A



B



Clone ID	Binding energy（kcal/mol）	HCDR3 length	LCDR3 length	Acidic amino acids in HCDR	Basic amino acids in HCDR	Acidic amino acids in LCDR	Basic amino acids in LCDR
2H2	-12.500 1	11	9	5	6	4	5
2F3	-20.474 5	13	10	4	6	4	6
2G11	-12.500 1	9	9	6	5	4	5
2G12	-18.474 5	13	10	5	6	4	4
2H5	-24.777 4	18	10	5	4	5	5
2G3	-18.474 5	11	9	5	5	4	5
2H9	-18.474 5	11	9	4	6	4	5
2G6	-18.474 5	13	10	5	6	4	4
2H10	-11.401 8	11	8	4	5	5	4
2H7	-12.197 2	11	8	5	6	4	5
3H12	-18.474 5	13	9	5	5	5	5
3H11	-18.474 5	11	9	5	6	4	4
2H3	-14.592 5	11	8	4	4	3	4
2H1	-14.529 1	11	9	5	4	4	3
2F12	-24.411 1	9	9	4	5	4	4
2F11	-27.944 4	18	9	5	5	4	4
2G7	-27.944 4	18	10	4	5	4	5
2G10	-32.941 7	11	10	5	5	4	3
2F5	-18.382 8	11	9	4	5	3	4
2G2	-21.842 6	11	8	5	6	5	6
2H12	-14.529 1	11	9	5	6	4	6
2G9	-29.944 4	18	10	6	5	4	4
2H4	-21.842 6	18	10	5	6	4	3
2G5	-18.708 8	9	9	5	6	3	3
2H11	-18.708 8	13	9	6	4	4	5
2H8	-12.513 3	18	10	5	4	5	3
2F10	-21.842 6	18	8	5	6	4	6
2H6	-21.842 6	11	10	3	4	5	3

A：Schematic diagram of the molecular docking model between scFv and M blood group antigen GPA（VH：heavy chain variable region；VL：light chain variable region）. B：Phylogenetic tree of antibody sequences and screening indicators（Cluster：clonal family；HCDR：heavy chain complementarity determining region；LCDR：light chain complementarity determining region；red：representative antibody；blue：control antibody）.

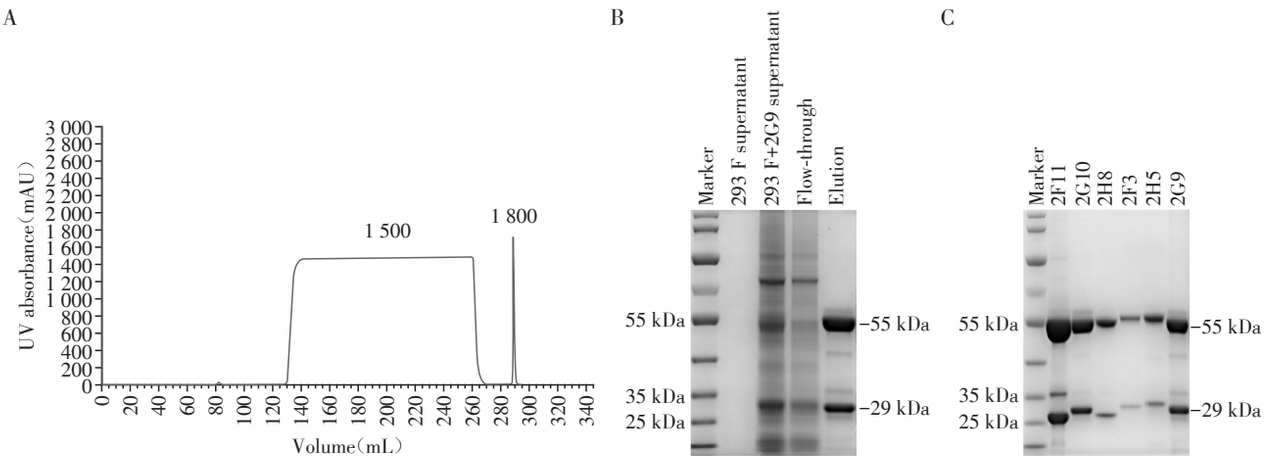
图4　分子建模及抗体序列筛选

Figure 4　Molecular modeling and antibody sequence screening

达载体，转染HEK293Freestyle细胞进行表达。表达产物经亲和层析纯化（图5A），紫外吸收曲线平台期为上样阶段，尖锐峰为目的蛋白洗脱峰。通过SDS-PAGE及考马斯亮蓝染色对转染前后细胞培养上清液、纯化流穿液及洗脱液进行检测（图5B），结果显示转染后上清及流穿液中存在多条杂带，洗脱液仅在约55 kDa及29 kDa附近出现清晰条带，对应抗体重链与轻链，证实纯化产物为抗体。图5C结果显示6个候选抗体均表达成功。

2.6　抗体结合抗原功能验证

红细胞凝集试验结果显示（图6A），2G9、2F11、2H5可凝集M^+RBC，对M^-RBC无凝集；2F3、2G10、2H8对两种红细胞均无凝集。凝集效价测定结果（图6B）显示，2G9效价最高（1∶256），确定为后续研究的目标抗体。流式细胞术结果（图6C、D）表明，2G9对M^+RBC的结合率为（97.92±1.34）%，对M^-RBC的结合率为（0.86±0.69）%，结合率差异有统计学意义（$P<0.01$），证实2G9特异性识别并结合M血型抗原。



A: Affinity chromatography profile. B: SDS-PAGE and Coomassie blue staining analysis of supernatant before and after transfection, purified flow-through, and eluate, showing heavy and light chain bands in the eluate. C: SDS-PAGE and Coomassie blue staining analysis of six candidate antibodies.

图5　抗体蛋白纯化及鉴定

Figure 5　Purification and characterization of antibody proteins

2.7　抗体的临床检验效能评价

2G9抗体对临床样本的M血型检测结果见表1，200例M^+RBC样本（表型为MM、MN）均呈阳性，检出率100.0%、漏检率0%；80例M^-RBC样本（表型为NN）均呈阴性，假阳性率为0%，与市售抗M试剂的检测符合率为100.0%。凝集效价比较结果见表2，2G9抗体与市售抗M试剂差异无统计学意义（$P>0.05$），表明2G9抗体具有良好的临床检测效能。

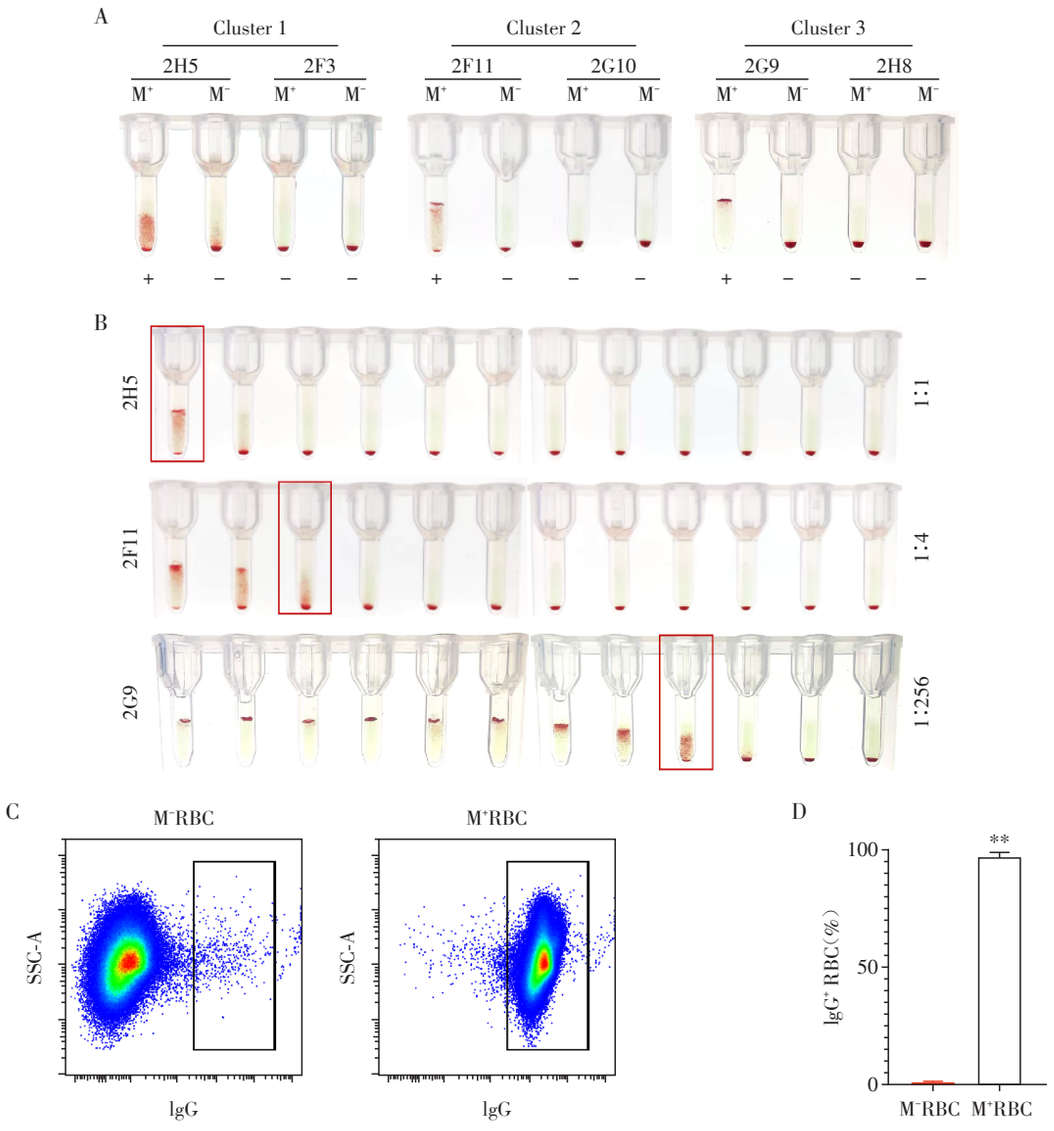
2.8　抗体特异性谱细胞鉴定

除了临床样本，本研究进一步采用16种谱细胞进行抗体鉴定。结果显示（图7），2G9抗体与所有M抗原阳性谱细胞（含MM型及MN型）均呈4^+强阳性凝集反应，与M型抗原阴性谱细胞无交叉反应，综合反应格局对比表达谱（表3）确认2G9为特异性抗M抗体。

3　讨　论

截至2025年9月，国际输血协会（International Society of Blood Transfusion，ISBT）确认人类红细胞血型包括48个系统、3个集合、2个系列，共397个抗原。血型抗原与相应抗体的同种免疫可导致溶血性输血反应、HDFN等，严重威胁输血安全与母婴健康。MNS血型系统因相关抗体致病风险高而具有重要临床意义，该系统已发现50个抗原，其中M抗原为核心抗原。当前，M抗原相关不良反应发生率呈上升趋势，具有重要研究价值。

红细胞血型精准鉴定是预防血型相关不良反应的核心[16-17]。我国MNS等血型检测抗体的研究制备严重滞后，高度依赖进口，属于输血领域“卡脖子”技术。本研究针对血型抗体制备过程中的关键瓶颈，建立了红细胞特异性凝集双向筛选策略，实现了抗M特异性B细胞的定向富集，同时整合分子建模与生物进化分析，构建了候选抗体的筛选体系，成功制备了具有高临床检验效能的抗M血型单克隆抗体2G9。研究结果表明，该抗体用于M血型鉴定的灵敏度、特异度均为100.0%，无假阳性及假阴性结果。本研究不仅为临床M血型鉴定和溶血



A: Agglutination reaction of candidate antibodies with M$^+$RBC and M$^-$RBC. B: Agglutination titer of antibodies capable of agglutinating M$^+$RBC. C, D: Flow cytometry (C) and quantitative analysis (D) of 2G9 binding to M$^+$RBC and M$^-$RBC (n=3, $^{**}P < 0.01$).

图6　抗体识别结合抗原功能验证

Figure 6　Functional verification of antibody recognition and engagement with the antigens

表1　2G9与市售抗M试剂检测M血型结果比较

Table 1　Comparison of M blood group detection between 2G9 and commercial anti-M reagent

Phenotype	No. of samples (n)	Commercial anti-M reagent		2G9		Concordance rate (%)
		Positive (n)	Negative (n)	Positive (n)	Negative (n)	
MN	131	131	0	131	0	100.0
MM	69	69	0	69	0	100.0
NN	80	0	80	0	80	100.0
Total	280	200	80	200	80	100.0

性疾病的防治研究提供了高效价的全人源单克隆抗体[18-19]，也为我国血型抗体制备提供了新策略、新路径，具有较大的临床应用价值。

在技术路径的探索中，本研究主要面临两个难点并分别提出了解决策略。其一，如何高效富集针对糖基化依赖型抗原（如M抗原）的特异性B细胞。前期预实验尝试采用合成GPA胞外区线性多肽（aa1~20）进行磁珠分选，但筛选所得B细胞经BCR

表2　2G9与市售抗M试剂的凝集效价比较

Table 2　Comparison of agglutination titers between 2G9 and commercial anti-M reagent

Phenotype	No. of samples (n)	Commercial anti-M reagent(1∶x) [$M(P_{25},P_{75})$]	2G9(1∶x) [$M(P_{25},P_{75})$]	P
MN	9	256(256,256)	256(256,512)	>0.05
MM	9	256(256,512)	256(256,256)	>0.05

In 1∶x, x is the dilution factor(the denominator of the titer); values in the table are x.

测序后表达的抗体均无法凝集天然M^+RBC，提示线性多肽无法模拟GPA蛋白的天然糖基化构象。基于此，本研究放弃多肽筛选法[20]，建立了红细胞特异性凝集双向筛选策略，以ABO抗原阳性M^-RBC负向剔除非特异性B细胞，以O型M^+RBC正向富集抗M特异性B细胞。该方法完整保留了红细胞膜上GPA的天然糖基化修饰与空间构象，最终成功获得功能性克隆。其二，单B细胞BCR测序产生的大量抗体序列若全量验证，成本高、工作量大。为此，本

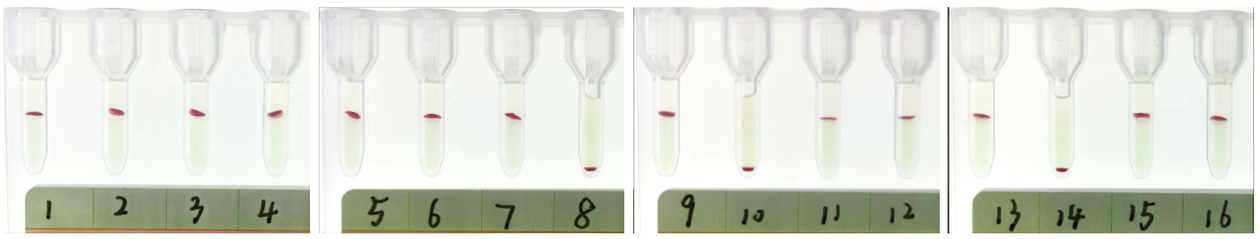


图7　16种谱细胞鉴定

Figure 7　Identification of antibody specificity *via* 16-cell panel testing

表3　用于抗体鉴定的16种谱细胞抗原谱

Table 3　Antigen profile of the 16-cell panel for antibody identification

Cell number	Rh-Hr									Kell					Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS			Luther Xg		
	C	D	E	c	e	C^w	f	*V	K	k	Kp^a	Kp^b	Js^a	Js^b	Fy^a	Fy^b	Jk^a	Jk^b	Le^a	Le^b	P_1	M	N	S	s	Lu^a	Lu^b	*Xg^a
1	+	+	0	0	+	+	/	/	0	+	0	+	/	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0
2	+	+	0	0	+	0	/	/	+	+	0	+	/	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	/
3	0	+	+	+	0	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+
4	0	+	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	/
5	+	0	0	0	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+
6	0	0	+	+	0	0	/	/	0	+	0	+	/	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+
7	0	0	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0
8	0	0	0	+	+	0	/	/	+	0	0	+	/	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0
9	0	0	0	+	+	0	/	/	+	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0
10	0	0	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+
11	+	+	+	0	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+
12	w	+	+	+	0	0	/	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	/
13	+	0	0	+	+	+	/	/	0	+	0	+	/	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0
14	0	+	+	+	0	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+
15	+	+	0	0	+	0	/	/	0	+	+	+	/	/	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	/
16	0	0	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+

The first column lists cell numbers(1–16); the first row indicates blood group systems; the second row indicates antigens within each system. In the table, "+" denotes positive antigen expression, "0" denotes negative, "w" denotes weak positive, "/" denotes not tested, and "*" indicates that the antigen status was determined using a single source of specific antibody. Antibody specificity is determined by comparing the reaction pattern(positive/negative/weak positive) of the test antibody with the antigen expression profile presented in the table.

研究构建了序列聚类、系统发育分析与分子建模结合的多指标综合筛选策略，通过聚类划分克隆家族、解析谱系关系[21]，分子对接结合自由能预测抗原及抗体结合能力[22-23]，同时结合HCDR3长度及CDR区电荷分布关键指标，即较长的HCDR3更利于突破空间位阻实现特异性结合[24]，CDR区酸性氨基酸数量等于或略多于碱性氨基酸、呈轻微负电或电中性时，可避免非特异性静电吸附与氢键网络干扰[25-26]。基于上述指标，从28对序列中高效筛选6株候选抗体，大幅减少实验工作量。功能验证显示，对照抗体中，2H8结合能较高，2F3酸性氨基酸少于碱性氨基酸，二者均无凝集活性。代表性抗体2G10虽结合能最低但因HCDR3过短丧失功能，而2G9、2F11、2H5兼具结合能低、HCDR3长及电荷分布适中，特异性凝集活性高，证实该筛选策略的可行性与有效性。

在临床效能评价方面，本研究制备的2G9抗体为IgG型，临床血型鉴定中常用的试管法包括盐水法和间接抗球蛋白试验（indirect antiglobulin test，IAT），盐水法仅适用于IgM型抗体，而IgG型抗体需通过抗球蛋白介质才能产生可见凝集。本研究在前期尝试了经典试管IAT，但由于2G9为纯科研级抗体，未添加任何增强剂、稳定剂或保护剂，也未进行浓度及孵育条件的优化，在试管IAT中的凝集效应较弱。因此，采用灵敏度更高的抗人球蛋白微柱凝胶卡法进行功能验证与效价测定。凝集效价检测中，纯合子与杂合子红细胞的凝集效价未见显著差异，这与“纯合子凝集强度应强于杂合子”的经典预期不完全一致。分析可能原因包括：抗体亲和力较高，使倍比稀释终点在杂合子中仍能维持较高水平；凝胶卡法作为定性终点检测，对弱剂量效应的敏感性有限；以及样本量较少，缺乏代表性等。为此，进一步完善了抗体鉴定谱细胞实验。结果显示，2G9与所有M抗原阳性谱细胞（无论MM纯合子还是MN杂合子）均呈4^+强阳性凝集，与M抗原阴性谱细胞无反应，综合以上结果确认为特异性抗M抗体。

本研究尚存在一定局限性。首先，分子建模未纳入M抗原的糖基化修饰。GPA胞外区含有1个N-连接糖基化位点和16个O-连接糖基化位点，其中后者直接邻近M抗原核心表位（第1~5位氨基酸），可能通过空间位阻或唾液酸残基影响表位可及性，从而干扰建模对真实抗体与抗原相互作用的预测。后续将完善抗原糖蛋白三维建模与分子对接技术，引入模拟膜环境提升计算筛选精准度。其次，血液样本来源集中，样本量较少，且样本均是M抗原高表达。此外，2G9抗体为纯科研级，未经临床转化所需的配方优化及多中心验证，其在经典试管IAT中的弱凝集表现有待后续通过系统优化加以提升。未来，将重点开展抗体配方优化、条件筛选及多中心临床验证，更加全面地评估2G9抗体对M血型的临床检验效能。

利益冲突声明：

作者单位与期刊出版部均属于南京医科大学，无利益冲突。本研究包含企业单位相关作者，但该企业未参与本研究的实验设计、数据采集分析、论文撰写及投稿发表等全部工作环节，作者间不存在任何潜在或显性的利益冲突。

Conflict of Interests:

The authors' institution and the journal's editorial office both belong to Nanjing Medical University, but there is no conflict of interest. This study includes authors affiliated with corporate entities; however, the aforementioned corporate entity was not involved in all aspects of this research, including experimental design, data collection and analysis, manuscript drafting, and submission. The authors declare that there are no potential or explicit conflicts of interest.

作者贡献声明：

侯羽春负责主体实验、数据分析、论文撰写；凌亚亭、张钰、徐静蕾负责部分实验；常新霞、王布强、陈芳芳负责实验指导、数据分析；何成涛、傅强负责研究设计、样本收集；张茜、王晓明负责研究设计、实验指导、论文修改。

Author's Contributions:

Hou Yuchun performed the main experiments, data analysis, and manuscript writing; Ling Yating, Zhang Yu, and Xu Jinglei performed part of the experiments; Chang Xinxia, Wang Buqiang and Chen Fangfang were responsible for experimental guidance and data analysis; He Chengtao and Fu Qiang contributed to study design and sample collection; Zhang Qian and Wang Xiaoming participated in study design, experimental guidance, and manuscript revision.

[参考文献]

[1] Castilho L. An update on the MNS blood group system[J]. Immunohematology, 2019, 35(2): 61-62

[2] Xu Z H, Fang Z H, Lu R, et al. Distribution and genetic characterization of the MNS blood group in multi-ethnic populations of East China[J]. J Blood Med, 2025, 16: 551-558

[3] Liang Y L, Shi Y, Su Y Q, et al. Maternal cold-reacting immunoglobulin G anti-M of MNS blood group system causing hemolytic disease of the fetus[J]. Iran J Immunol, 2023, 20(1): 129-134

[4] Chen X S, Zhang S L, Bi J Y, et al. The impact of anti-M antibodies on patient blood typing and transfusion safety: a retrospective study[J]. Lab Med, 2025, 56(6): 652-656

[5] 高　雪,武　文. 孕产妇意外抗体导致胎儿及新生儿溶血病血清学特征[J]. 中国实验血液学杂志,2026,34(1):219-224
Gao X, Wu W. Serological characteristics of fetal and neonatal hemolytic disease caused by maternal unexpected antibodies [J]. Journal of Experimental Hematology, 2026, 34(1): 219-224

[6] He Y J, Gao W, Li Y, et al. A single-center, retrospective analysis of 17 cases of hemolytic disease of the fetus and newborn caused by anti-M antibodies[J]. Transfusion, 2023, 63(3): 494-506

[7] Routray S S, Sahoo N, Bhuyan B, et al. Anti-M antibody in blood transfusion: an underestimated factor in service delays and expenditures [J]. Cureus, 2025, 17(5): e85004

[8] Nagano K, Tsutsumi Y. Phage display technology as a powerful platform for antibody drug discovery[J]. Viruses, 2021, 13(2): 178

[9] Ikujuni A P, Banos C, Daley S, et al. Phage display-based discovery of HPV capsomere-specific antibodies for HPV process characterization[J]. Biotechnol J, 2026, 21(3): e70205

[10] Xu H T, Xiang X X, Ding W Z, et al. The research progress on immortalization of human B cells[J]. Microorganisms, 2023, 11(12): 2936

[11] Theobald S J, Fiestas E, Schneider A, et al. Fully human herpesvirus-specific neutralizing IgG antibodies generated by EBV immortalization of splenocytes-derived from immunized humanized mice[J]. Cells, 2023, 13(1): 20

[12] Mathew N R, Jayanthan J K, Smirnov I V, et al. Single-cell BCR and transcriptome analysis after influenza infection reveals spatiotemporal dynamics of antigen-specific B cells[J]. Cell Rep, 2022, 41(9): 111764

[13] 李　冰,杨婷婷,唐　奇,等. HEV保护性基因工程抗体的制备及功能研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2020,40(3):342-347
Li B, Yang T T, Tang Q, et al. Preparation and function study of the protective HEV genetically engineered antibody[J]. Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences), 2020, 40(3): 342-347

[14] Zhu L W, Peng Q, Wu Y J, et al. scBCR-seq revealed a special and novel IG H&L V(D)J allelic inclusion rearrangement and the high proportion dual BCR expressing B cells[J]. Cell Mol Life Sci, 2023, 80(11): 319

[15] Gu J Q, Wang G Y. Research and progress in the preparation of monoclonal Rh blood group antibodies[J]. Blood Genom, 2025, 9(1): 16-22

[16] Shi E X, Chen J Y, Liu J Y. Application progress on construction of quality management system for blood group genotyping[J]. Blood Genom, 2025, 9(2): 90-98

[17] Brown C, Brown M. Blood and blood products transfusion errors: What can we do to improve patient safety?[J]. Br J Nurs, 2023, 32(7): 326-332

[18] Koike G, Bondt A, Schulte D, et al. Fucosylation limits ADCC in clinically used anti-RhD monoclonal antibodies [J/OL]. Transfusion, 2025. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/trf.18449. DOI: 10.1111/trf.18449

[19] Moise K J, Markham K B, Spinella P C, et al. A clinical practice guideline for the management of pregnancy alloimmunized to red blood cell antigens[J]. JAMA Netw Open, 2025, 8(11): e2544649

[20] Wang Z Y, Tang Q, Liu B D, et al. A SARS-CoV-2 neutralizing antibody discovery by single cell sequencing and molecular modeling[J]. J Biomed Res, 2022, 37(3): 166-178

[21] Weber L L, Reiman D, Roddur M S, et al. Isotype-aware inference of B cell clonal lineage trees from single-cell sequencing data[J]. Cell Genom, 2024, 4(9): 100637

[22] Marshall W F, Fung J C. Modeling homologous chromosome recognition *via* nonspecific interactions[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024, 121(20): e2317373121

[23] Qiu H H, Ma D L, Dong B, et al. Identification of hTAS2R38 bitter taste receptor antagonists *via* homology modeling and molecular docking[J]. Curr Res Food Sci, 2026, 12: 101340

[24] Zhang L, Yang T Y, Zhang Y, et al. Comparative analysis of CDR3 length-dependent patterns in VHHs[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1647230

[25] Yamamoto K, Nagatoishi S, Matsunaga R, et al. Affinity-stability trade-off mechanism of residue 35 in framework region 2 of V_HH antibodies with β-hairpin CDR3[J]. Protein Sci, 2025, 34(4): e70095

[26] Gavade A, Nagraj A K, Patel R, et al. Understanding the specific implications of amino acids in the antibody development[J]. Protein J, 2024, 43(3): 405-424

(收稿:2026-04-03;修回:2026-05-20;录用:2026-05-30)
(本文编辑:陈汐敏)