

MNS 血型系统专刊——Miltenberger 发现史

2022 年 8 月

编者导读:

MNS 血型系统 (ISBT 编号 002) 在 1927 年由 Landsteiner 和 Levine 发现, 根据该系统前 3 个抗原命名。目前, ISBT 总共确认了 50 个抗原。Miltenberger 是与 MNS 系统有关的、在大多数人群中稀有的一系列表型, 相互间通过一些特异性重叠的低频同种抗原联系在一起。

Cleghorn 从 1966 年开始创建 Miltenberger 系列^[6], 目的是让不同抗体对低频抗原的复杂的反应格局条理化。这些抗体被分为四种类型的血清: ① Verweyst (Vw)^[1,5]; ② Miltenberger (Mi^a)^[2]; ③ Murrell (Mur); ④ Hill (Hil)。这四种血清确定了四类表型: I~IV^[3,4,6]。最初将这些表型和 MNS 系统联系在一起, 是因为观察到 Vw 是和 MNS 共同遗传的。Cleghorn 用和四类红细胞都反应的血清 Miltenberger 来命名这一系列血型。从那以后又有 6 种新的类型被加进来。

1970 年, 第五种类型被加入 Miltenberger 系列^[7]。Mi.V 细胞不和 Miltenberger 血清反应, 之所以把它加入 Miltenberger 系列, 是因为它和抗-Hil 反应, 和 Mi.III 细胞类似。

抗 Hop 和抗 Nob 被鉴定出来后, Miltenberger 系统又增加了 Mi.VI、Mi.VII、Mi.VIII 三种类型。抗 Hop 与 Mi.IV、Mi.VI 和 Mi.VIII 红细胞反应, 抗 Nob 与 Mi.VII 和 Mi.VIII 红细胞反应^[8-12]。这样的解释是过于简化的, Tippett 等对 Hop 和 Nob 特异性做了更详细的说明^[18]。

1991 年, Skov 等又引入了 Mi.IX^[13]。他们发现四位先证者的 Mur+ 细胞也和抗-DANE 反应, 抗-DANE 是一种针对 Mi.IX 的新抗体。尽管 Mi.IX 细胞是 Mur+, 但它是 MUT- 的。1992 年, 加入了 Mi.X^[15], 其代表红细胞是 Hil+、MUT+、Mur-、Hut-。两个先证者 JR 和 JL 的表型作为 Mi.XI 加入了 Miltenberger 系列, 两位先证者的红细胞和抗-TSEN 及抗-MINY 反应; 抗-TSEN 及抗-MINY 还与一些其他的 Miltenberger 类型红细胞反应^[16-17]。

一种 MNS 变异表型要归为 Miltenberger 系列, 而不仅仅是作为 MNS 变异型的一种, 其标准是纯血清学的, 而且不同种类间的这些血清学联系有时是非常微弱的。为接纳新表型而扩充 Miltenberger 系列, 或是将一些已存在的 MNS 变异表型 (比如 M^g, 它从血清学结果来看有可能成为候选对象) 加入其中都已经不适合了。1992 年 Tippett 等提出了新的命名方式, 既包容了传统的定义和分类, 又对相关抗原的生物化学研究成果系统归类, 同时也容易表述新发现的该类抗原^[18]。

2001 年, Chen 等证实 Mi^a 抗原存在^[19]。

本月期刊检索了 Miltenberger 发现史相关多篇经典文献, 就 Miltenberger 发现史进行归纳汇总, 以便阅读, 在此郑重感谢所有文章作者所做出的努力及贡献。编者仅为收录方便学习, 无观点诱导及评判, 亦无商业目的 (注: 期刊文献按发表时间和抗原抗体发现顺序从早到晚排序, 编者导读中参考文献编号即为期刊中文文献编号; [14] 号文献未出现在编者导读中, 是一篇综述, 推断发布时间介于 [13] 和 [15] 之间)。

目录

1 《A rare iso-haemagglutinin》	3
2 《A New Human Blood Factor of Rare Incidence in the General Population》	4
3 《Blood Group Antigens Mi ^a and Vw and their Relation to the MNSs System 》	6
4 《On the Relationship of the Blood Group Antigens Mia and Vw to the MNSs System》	7
5 《The duplication of the Gr (Graydon) blood group by Vw (Verweyst)》	14
6 《A Memorandum on the Miltenberger Blood Groups》	16
7 《A British family possessing two variants of the MNSs blood group system, M ^y and a new class within the Miltenberger complex》	19
8 《Three antibodies of the MNSs system and their association with the Miltenberger Complex of antigens. I. Anek serum》	22
9 《Three antibodies of the MNSs system and their association with the Miltenberger complex of antigens. II. Raddon and Lane sera》	24
10 《Three antibodies of the MNSs system and their association with the Miltenberger complex of antigens. III. Anek, Raddon and Lane antisera in relation to each other and the Miltenberger complex》	26
11 《A new Miltenberger class detected by a second example of Anek type serum》	28
12 《Serological activity of low frequency antigens of the MNSs system and reappraisal of the Miltenberger complex》	31
13 《Miltenberger class IX of the MNS blood group system》	37
14 《Miltenberger subsystem of the MNSs blood group system. Review and outlook》	44
15 《Gene conversion confined to a direct repeat of the acceptor splice site generates allelic diversity at human glycophorin (GYP) locus》	48
16 《TSEN: a novel MNS-related blood group antigen》	61
17 《MINY: a novel MNS-related blood group antigen》	68
18 《The Miltenberger subsystem: is it obsolescent?》	71
19 《Direct evidence for the existence of Miltenberger ^a antigen》	82

MNS 血型系统专刊——Miltenberger 发现史

(编辑: 艾丽萍, 张悦, 陈悦妍)

1 《A rare iso-haemagglutinin》

《一种罕见的同种血液凝集原》

作者: Graydon JJ

作者单位: 澳大利亚墨尔本联邦血清实验室

来源: Med J Aust. 1946 Jul 6;2:9.

偶尔有不寻常或不规则的同种血液凝集原的报告, 在某些受试者的血液中发现, 并独立于 A,B,O、M,N 和 Rh 血型发生。这些因子大多数是通过很少在 30℃ 以上有活性的“冷”凝集素检测到的。在某些情况下, 特异性凝集素是自然发生的, 在其他情况下, 凝集素是在注射相应抗原后产生的, 要么是通过有意免疫, 要么是在输血过程中无意产生的。在这些尚未被积极研究的凝集素-凝集原系统中, 最著名的是 P 因子, 1945 年 Wiener 等报道 P 因子存在于纽约市约 75% 的白人和 98% 的黑人中。

Wiener (1942) 描述了一种罕见的凝集素, 与任何先前已知的血液因子无关, 它是在选择献血者时偶然检测到的。患者和献血者均为 B 型血。通常的交叉配血试验发现, 献血者的血清凝集了患者的细胞, 但没有凝集 B 血型的其他受试者的细胞。此外, 患者的细胞也没有被 B 血型的其他人的血清凝集。该患者所生的三个孩子的细胞没有被这种罕见凝集素凝集。因此, 很难说该因子具有遗传性。

1945 年 Callender、Race 和 Paykoc 报告了一个有趣的过敏病例, 一名弥漫性红斑狼疮患者因持续贫血, 接受了 9 次输血。尽管仔细选择了合适的献血者, 但患者的血清中出现了 Hr' 凝集素(“St”特异性)和三种 37℃ 比低温更有活性的新抗体。

用这些新发现的凝集素检测到的抗原中, 第一种抗原“Lutheran”, 作为一种孟德尔显性性状遗传, 发生在 8%-9% 的英国人的血液中, 与 A,B,O、M,N、P 或 Rh 血型无关。

第二种抗原“Willis”, 也作为一种孟德尔显性性状遗传, 但它与 Rh 因子有关, 存在于约 7% 的 R⁰¹R⁰¹ 基因型的 Rh⁰¹ 血液标本中。它显然是由一个 Fisher C-c 基因座上有活性的等位基因决定的。

第三种抗原“Levay”, 在献血者及其父亲的血液中被发现, 但在几百份随机血液样本中没有发现。也许它也是一个“显性”性状, 尽管看上去非常罕见。

本文的目的是描述另一种罕见的凝集素-凝集原系统, 该系统是在 1943 年 7 月偶然发现的。

在制备用于血型分型的人源血清时, 从澳大利亚红十字会输血服务中心的维多利亚分部提供的献血者小组中选择具有异常高滴度血凝素的献血者。收集的每个血清标本与适当血型的实验室工作人员的红细胞进行滴定。其中一名工作人员(G)的红细胞血型是 O、MN、Rh⁰¹rh, 作为所有血清的“阴性”对照。一个 O 型献血者(L.J.)的血清, 在 37℃ 进行的试验中, 对 A1 型细胞滴度为 1/250, 对 A2 型细胞滴度为 1/120, 对 A2B 型细胞滴度为 1/500, 对 B 型细胞滴度为 1/120。然而, 该 O 型血清出乎意料地凝集了同样是 O 型的“G”细胞, 在 18℃ 时滴度为 1/32, 在 37℃ 时滴度为 1/4。

61 例其他实验室工作人员的 O 型细胞样本没有被该血清凝集。由于 Rh 阳性、Rh 阴性、P 阳性和 P 阴性细胞以及所有的 M,N 血型在本系列样本中都很典型, “新”抗原可能与 Rh、M,N 系统和 P 因子无关。

在对不同种族的血液进行分型调查时, 用 L.J. 血清检测 91 名巴布亚人和 39 名澳大利亚土著居民的 O 型细胞样本。这些细胞都没有被 L.J. 血清凝集。用 L.J. 血清中的这种“非典型”凝集素检测到的特异性抗原显然很罕见。然而, 当对 G 的亲属的血液样本进行检测时, 发现有 4 份与该血清(必要时适当吸收)有特异性反应。图 1 显示了该抗原在 G 家系中的发生情况。这种抗原被暂定命名为“Gr”以区别于 Schiff 的“G”因子, 连续三代出现, 但迄今为止还没有在不是 G 近亲的受试者中发现。因此, 它似乎作为一种孟德尔显性性状遗传, 与 A,B,O 和 M,N 血型无关。它在白人中的稀有程度表明, 它与 P 因子或“Lutheran”抗原无关。

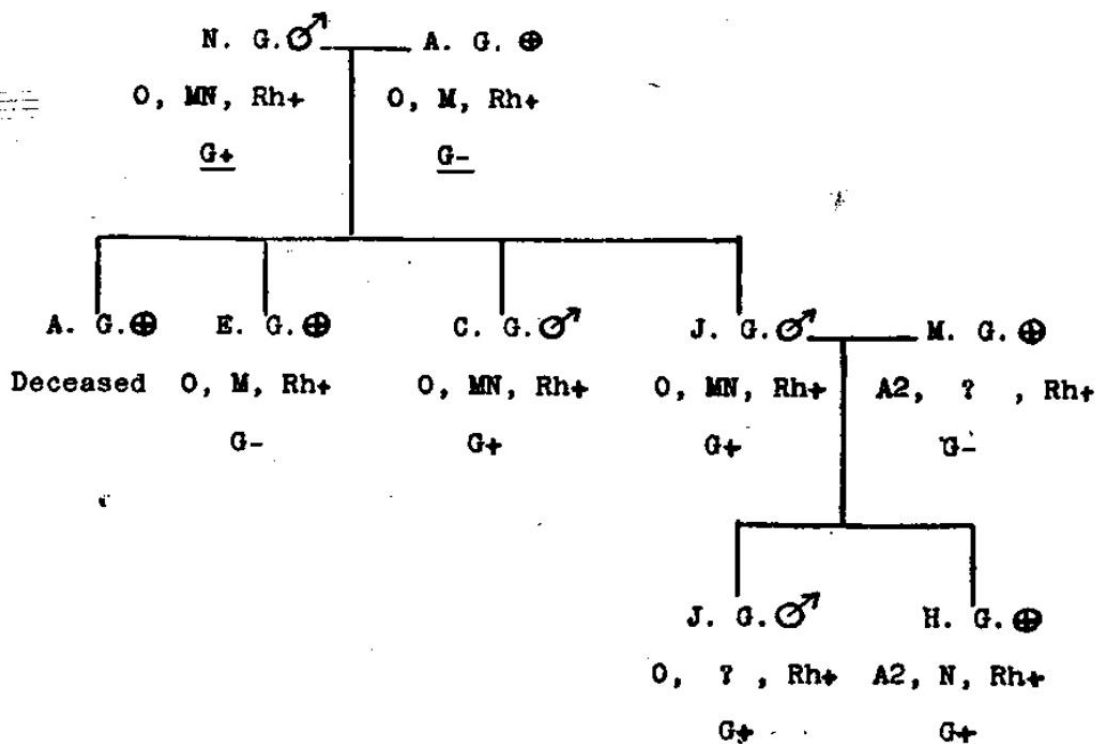


FIGURE I.

它可能与“Levay”抗原是相同的，但两者的稀有性使得这个可能性很小。此外，“Gr”凝集素在冷环境比 37°C 活性高，而“Lutheran”、“Willis”和“Levay”抗体在 37°C 比低温活性高。值得注意的是，“Gr”凝集素可以被 G 细胞吸收，留下正常的高滴度的 O 型血清。研究还发现，从原血清中吸收抗 A1、抗 A2 和抗 B 凝集素后，留下的液体可能用于检测任何血型细胞中的“Gr”抗原。

另一个有趣的地方是，献血者(L.J.)是一名未婚女孩，18 岁，无病史。她无输血史，找不到出现这种异常凝集素的原因。

据报道，已故的 Karl Landsteiner 博士已经坚定地相信血液的完全个性。通过对 Rh 血型的阐明，可识别的血型的数量大大增加，随着新因子的发现，如上面提到的那些，正在接近 Landsteiner 所设想的状态。

为了在这些方面取得进展，我们希望报告发现“非典型”抗原，即使它们可能没有临床意义，也可能没有明显的人类学意义。还应努力通过适当的方法来保存特定的凝集素，以供将来参考。在目前的情况下，这是通过冷冻干燥在安瓿（装针剂的小玻璃瓶）中的血清样品来完成的。

2 《A New Human Blood Factor of Rare Incidence in the General Population》

《一种在一般人群中罕见的新的人类血液因子》

作者：LEVINE P, STOCK AH, KUHMICHEL AB, BRONIKOVSKY N.

作者单位：美国新泽西州拉里坦 Ortho 研究基金会；宾夕法尼亚州匹兹堡儿童医院。

来源：Proc Soc Exp Biol Med. 1951 Jul;77(3):402-3.

摘要：

简要描述了一种新的血液因子， Mi^a ，因其同种免疫抗体导致新生儿溶血病而被发现。在一个特定家系三代 10 人中有 4 人存在 Mi^a ，而在 425 例随机血液样本中不存在 Mi^a ，这证明了 Mi^a 具有遗传性。

在研究一名 Rh 阳性母亲（R. M. 夫人，孕 4 产 4，分娩了一名患有严重溶血病的婴儿）的血清时，观察到一种抗体与其父亲、最年长的同胞和上述溶血病婴儿的血液有反应，但与其余 2 名同胞的血液没有反应。该因子存在于婴儿的祖母和外祖母的血液中，但不存在于其祖父和外祖父的血液中，也不存在于其父亲的 2 个同胞的血液中。因此，在该家系 3 代的 10 个成员中，有 4 个成员的血液中显示存在该凝集原。

这种新的血液因子在一般人群中的频率非常低，因为用该免疫母亲的血清，检测 425 名 O 型和 A 型的随机个体，没有观察到反应。

经患儿父母的许可，这种新的凝集原被指定为 Miltenberger 血液因子。该基因、因子和抗体的缩写形式可以分别表示为 Mi^a 、 Mi^a 和抗 Mi^a 。相应的等位因子无论何时只要可以被证明，就可以称为 Mi^b 。患儿的母亲有 3 个孩子，他们在出生时都很正常，现在都活得很好。第四个婴儿于 1951 年 1 月 27 日足月出生，非常苍白，还有点黄疸。由于在出生后 12 小时出现呼吸困难和更严重的黄疸，婴儿被转移到儿童医院，在那里进行了 Rh 阴性血液的换血。入院时的血细胞计数和血红蛋白值分别为 212 万和 8g，分别增加到 560 万和 15.2g。该婴儿在 5 周大时再次入院进行再次输血，目前已完全康复。

用标准抗体对患儿家系进行的血清学检测如下：

			Tests with anti-sera				
			D	C	E	c	Mi^a
Father	O	MN	0	0	0	+	+
Mother	A	M	+	+	0	+	0
1st child	A	M	+	+	0	+	+
2nd "	O	MN	+	+	0	+	0
3rd "	A	M	+	+	0	+	0
Affected infant	O	MN	+	+	0	+	+
Paternal grandfather*	B		+	+	0	+	0
" grandmother	O		+	+	0	+	+

*使用中和后的抗 Mi^a ，在该血液（患儿祖父和外祖父的血液）中，以及在患儿父亲的两个同胞的血液中，都没有检测到 Mi^a 因子。

父母双方的 Fy^a (Duffy)、S 均呈阳性，K (Kell) 和 Le^a (Lewis) 均呈阴性。配血时， Lu^a (Lutheran)、 Jk^a (Kidd) 和 N 因子不相容，但这些因子的抗体不能被证明。

然而，用父亲的红细胞检测母亲的血清，获得了显著的结果。生理盐水悬浮细胞在 37℃ 下的滴定值为 1:2-1:4，间接抗球蛋白试验的效果更明显，滴定值为 1:16-1:32。与抗 Fy^a 的情况一样，用胰蛋白酶处理后的细胞检测不能引起反应。在婴儿出生后第 5 天，对婴儿细胞进行直接 Coombs 试验，反应非常弱，但该试验是在用 O 型、Rh 阴性和很可能 Mi^a 阴性的血液换血后进行的。如果在分娩时进行直接 Coombs 试验，反应肯定要强得多。

该血清中存在的唯一的不规则抗体是抗 Mi^a ，这一事实促进了对该血清的进一步研究。在 18℃，使用众多血液（包含了所有抗原种类），进行了一系列试验，证实了上述事实。在这些条件下，只有使用已知含有 Mi^a 因子的血液才能获得弱反应。

用间接抗球蛋白技术对 Miltenberger 家系的四种阳性血液进行抗 Mi^a 滴定，结果均为 1: 16-1: 32。因此，表明纯合子个体的双剂量效应不能被证明，但这并不令人惊讶，因为所有四个个体都是明显的杂合子。

根据一般人群中频率如此之低的任何因子的基因频率可以预期，该因子纯合的血液肯定非常罕见，由于同样的原因，等位因子 **Mib** 应该存在于几乎所有检测的血液中。**Mi^a** 是否与异常高频的 **Tj^a** (**Jay**) 或 **k** (**Cellano**) 因子有遗传相关性，仍有待确定。

最近报道了三种低频血液因子，**Levay**、**Gr** 和 **Jobbins**，主要发生在特定家系成员中，但由于缺乏用于研究的抗体，它们彼此之间、它们和 **Mi^a** 之间的关系无法确定（根据 **Race**，抗 **Levay** 不同于抗 **Mi^a**，因为抗 **Mi^a** 不能与已知含有 **Levay** 因子的血液发生反应。仍有待用 **Jobbins** 和 **Gr** 因子阳性的血液检测抗 **Mi^a**）。

与上述 3 种因子的抗体相反，抗 **Mia** 被认为是导致溶血病的抗体，因此具有临床意义。抗 **Mi^a** 和抗 **Gr** 都是各自血清中唯一存在的不规则抗体，但它们彼此不同，因为抗 **Gr** 很可能是自然产生的抗体，已排除其来源于妊娠或输血的抗原刺激的可能性。

Mi^a 等因子的抗体的出现，使得有必要排除所有以往认为 **ABO** 不相容引起的溶血病病例的血清中这些抗体的存在。在这些病例中，如果用许多 **A** 型（或 **B** 型）血液吸收母亲的血清，消除了 **A** 型（或 **B** 型）父亲血液的所有活性，则可以排除仅对偶尔的血液产生反应的抗体。只有这样，我们才能考虑导致溶血病的同种免疫由抗 **A** 或抗 **B** 引起的可能性。

3 《Blood Group Antigens **Mi^a** and **Vw** and their Relation to the **MNSs** System 》

《血型抗原 **Mi^a** 和 **Vw** 及其与 **MNSs** 系统的关系》

作者：WALLACE J, MILNE GR, MOHN J, et al.

作者单位：英国格拉斯哥和苏格兰西部输血服务中心；美国布法罗大学医学院细菌学和免疫学系；英国李斯特研究所医学研究委员会血型研究单位

来源：Nature. 1957 Mar 2;179(4557):478.

血型抗原 **Mi^a** 是由 **Levine**、**Stock**、**Kuhmichel** 和 **Bronikovsky** 在 1951 年发现的。抗 **Mi^a** 是识别该抗原所必需的抗体，由一位母亲被其 **Mi(a+)** 胎儿免疫后产生，该 **Mi(a+)** 胎儿因此患有严重的溶血病。**Mi^a** 抗原被证明是一种显性遗传性状。该抗原显然很罕见，因为在 425 名随机人群的测试中没有发现。

血型抗原 **Vw** 是由 **van der Hart**、**Bosman** 和 **van Loghem** 在 1954 年发现的。抗 **Vw** 抗体由一位母亲被其胎儿免疫后产生。父亲有 **Vw** 抗原，其家系中的几个成员也有 **Vw** 抗原。在 740 份随机抽取的荷兰人的血液样本中没有发现该抗原。该抗原被证明是一种显性遗传性状。**Sanger** 在研究家系时，注意到 **Vw** 基因与 **MNSs** 基因座连锁，并与 **Ns** 共同遗传：有 12 个非交换（non-cross-overs），0 个交换（cross-overs）。

然后发现，该荷兰家系的 **Vw+** 成员也是 **Mi(a+)**，所以很自然地认为 **Vw** 与几年前发现的抗原 **Mi^a** 是相同的。

我们发现抗原 **Mi^a** 和 **Vw**，虽然相关，但并不相同：**Mi(a+)** 个体中，大约一半是 **Vw+**，一半是 **Vw-**。检测数千白人，没有发现 **Mi(a-) Vw +**。

虽然抗原 **Mi^a** 和 **Vw** 都是罕见的（白人中，这两种表型的组合频率约 1/1000），但抗 **Mi^a** 抗体相对常见，且令人惊讶的是，抗 **Mi^a** 可以出现在没有妊娠或输血导致的抗原暴露史的人的血清中。

从对家系的测试中可以清楚地看到，编码 **Mi(a+) Vw+** 和 **Mi(a+) Vw-** 这两种表型的一个或多个基因，与 **MNSs** 基因座连锁。这种连锁与在 **CDE** 基因之间以及在 **MNSs** 基因之间发现的连锁类似，都是极其紧密的连锁类型。这一观点先因家系中不存在交换而提出，后由以下观察结果证实：在迄今分析的所有染色体中，编码 **Mi(a+) Vw+** 表型的一个或多个基因伴随 **N** 和 **s** 存在，而编码 **Mi(a+) Vw-** 表型的一个或多个基因伴随 **M** 和 **S** 存在。

由于这两种表型的罕见性，可能需要一段时间才能确定它们确切的遗传背景。我们可以想到三种可能。第一种可能：编码的基因可能是等位基因，类似于 **Rh** 系统中的 **CC^w**。抗原 **Mi^a** 可能像 **C**，抗原 **Vw** 可能像

C^w；抗 Mi^a 抗体可能像抗 C 抗体，与 Cc 和 C^wc 发生反应，而抗 Vw 抗体可能像抗 C^w 抗体，只与 C^w 发生反应。第二种可能：这些基因可能代表相邻的基因座，类似于 Rh 系统中 D 和 C。抗原 Mi^a 可能像 D，抗原 Vw 可能像 C；抗 Mi^a 抗体可能像抗 D+C 抗体，抗 Vw 抗体可能像抗 C 抗体。迄今已知的遗传学和血清学细节符合这两种可能，但不太符合第三种可能：①一个基因单独编码；②Mi(a+) Vw+和 Mi(a+) Vw-之间的差异反映了 Ns 和 MS 基因各自的位置效应。

抗原 Mi^a 和 Vw，以及抗原 Hu 和 He，证明了编码 MNSs 血型的染色体区域的复杂性，现在看来至少有 4 个基因座参与其中。

在这项工作中使用的一些抗血清由 Philip Levine 博士、J. J. van Loghem, jun.博士和 A. E. Mourant 博士提供。调查的细节将提交给其他地方发表。

4 《On the Relationship of the Blood Group Antigens Mia and Vw to the MNSs System》

《血型抗原 Mia 和 Vw 与 MNSs 系统的关系》

作者：MOHN JF, LAMBERT RM, ROSAMILIA HG, et al.

作者单位：英国格拉斯哥和苏格兰西部输血服务中心；美国布法罗大学医学院细菌学和免疫学系；英国李斯特研究所医学研究委员会血型研究单位

来源：Am J Hum Genet. 1958 Sep;10(3):276-86.

1 引言

1927 年，MN 血型系统的发现是 Landsteiner 和 Levine 的辉煌成就。随后的工作完全证实了最初的发现；还表明，基因和抗原 M 和 N 只是一个复杂系统的一部分。我们现在所理解的对该系统的描述见 1958 年 Race 和 Sanger 出版的书籍《Blood Groups in Man（第 3 版）》。本文研究了两种抗原，称为 Mia 和 Vw，它们是 MNSs 系统的一部分，但它们在系统中的确切位置仍未确定。当它们的位置已知时，便是寻找更合适符号的时候了。

Mia 抗原是由 Levine、Stock、Kuhmichel 和 Bronikovsky 在 1951 年发现的。识别 Mia 抗原的抗 Mia 抗体，由一位母亲被其 Mi(a+)胎儿免疫产生，该 Mi(a+)胎儿因此患有严重的溶血病。该抗原被证明是一种显性遗传性状，而且它显然是罕见的，因为在 425 名随机人群的测试中没有发现。

血型抗原 Vw 是由 van der Hart、Bosman 和 van Loghem 在 1954 年发现的。抗 Vw 抗体由一位母亲被其胎儿免疫后产生。父亲有 Vw 抗原，其家系中的几个成员也有 Vw 抗原。在 740 份随机抽取的荷兰人的血液样本中没有发现该抗原。该抗原被证明是一种显性遗传性状。Sanger 在研究家系时，注意到 Vw 基因与 MNSs 基因座连锁，并与 Ns 共同遗传。因为有 12 个非交换，0 个交换，所以 Vw 可能是 MNSs 系统的一部分，且这种连锁是非常紧密的类型，这种紧密类型的连锁在 Rh 中首次识别。

然后发现（Levine et al., 1956），该荷兰家系的 Vw+成员也是 Mi(a+)，所以很自然地认为抗原 Mi^a 和 Vw 是相同的。但是，在一次初步的交流中，本文的作者（Wallace et al., 1957）指出，这两个抗原并不相同：Mi(a+)个体中，大约一半是 Vw+，一半是 Vw-。此外，在当时研究的分离清楚的所有家系中，编码 Mi(a+) Vw+表型的一个或多个基因在一条 Ns 染色体上遗传，而编码 Mi(a+) Vw-表型的一个或多个基因在一条 MS 染色体上遗传。

在本文中，我们给出了这些家系和其他最近测试的家系的细节，以及对随机白人的测试结果。

几乎同时在美国布法罗和英国格拉斯哥发现抗 Mia，此时开始本项研究。在布法罗发现的 1 例抗 Mia 是免疫抗体，而且是溶血性疾病的原因；Mohn、Lambert 和 Rosamili 在今年（1958 年）正在报告该病例的临床和血清学方面。在格拉斯哥发现 2 例抗 Mia，1 例在抗 E 血清中，1 例在抗 D+C+E 血清中，与一位 cde/cde 的工作人员的血液意外反应。2 例抗 Mia 似乎都是“自然发生”的，且都伴抗 Wra 存在。

2 频率

为了了解这两种表型， $Mi(a+)$ $Vw+$ 和 $Mi(a+)$ $Vw-$ ，在白人中的频率，用抗 Mia 检测英国格拉斯哥和伦敦近 4000 人的血液。伦敦的样本也都用抗 Vw 检测(抗 Vw 血清由 van Loghem 博士提供)。在格拉斯哥发现 $Mi(a+)$ 样本时，送往伦敦进一步用抗 Vw 检测。结果如表 1 所示。也在美国布法罗检测大量白人和黑人样本；这些数据还有待分析，并将成为另一篇论文的主题。

表 1 中 9 名 $Mi(a+)$ 个体彼此之间都没有已知的血缘关系。虽然 $Mi(a+)$ 个体很少，但似乎更经常是 $Vw-$ 而不是 $Vw+$ 。看来 $Mi(a+)$ 在白人中的频率约为 1/430。

没有发现 $Mi(a-)Vw+$ ；这种表型只在 2071 份伦敦样本中检测，这些样本无论是 $Mi(a+)$ 还是 $Mi(a-)$ ，都用抗 Vw 检测。

3 遗传

遗传研究的样本来自表 1 中 $Mi(a+)$ 个体的家系和在布法罗发现的 $Mi(a+)$ 个体的家系。绝大多数的家系样本是在布法罗和格拉斯哥收集的；送往伦敦进一步用抗 M 、抗 N 、抗 S 、抗 s 和抗 Vw 检测。

还对这些家系样本进行了 A1A2BO、P、Rh、Lutheran、Kell、Lewis 和 Duffy 血型的检测；其中大约一半的人也进行了 Kidd 血型的检测。发现了一位私生子。意料之中地，没有发现抗原 Mia 和 Vw 与这些血型有关联。

表 1 用抗 Mia 和抗 Vw 检测随机白人的结果

	$Mi(a+) Vw+$	$Mi(a+)Vw-$	$Mi(a-) Vw+$	$Mi(a-) Vw-$	Total
London	2	1	0	2068	2071
Glasgow	1	5		1767	1773
Total	3	6		3835	3844

3.1 $Mi(a+)Vw+$ 的遗传

图 1 中的家系均显示表型 $Mi(a+)Vw+$ 作为显性孟德尔性状遗传。

在 Verweyst 家系中，可以看到，编码 $Mi(a+) Vw+$ 表型的基因在一条 Ns 染色体上遗传，该染色体肯定是来自自己故的祖母 I-2。在第二代，两个 $Mi(a+)Vw+$ 孩子遗传了母亲的 Ns ，两个 $Mi(a-)Vw-$ 孩子遗传了母亲的 M ；在第三代，所有四个 $Mi(a+) Vw+$ 孩子都遗传了祖母的 Ns ，而所有四个 $Mi(a-) Vw-$ 孩子都遗传了祖父的 Ms 或 MS 。因此，有 12 个非交换，0 个交换。

在 Bro. 家系中，2 个 $Mi(a+)Vw+$ 孩子都遗传了父亲的 Ns ；所以该家系又提供了 2 个非交换。

在 Colb. 家系中，只有 II-1 和 II-2 的子代提供了直接的连锁证据；他们的 3 个 $Mi(a+) Vw+$ 孩子遗传了父亲的 Ns ，而 2 个 $Mi(a-) Vw-$ 孩子遗传了父亲的 MS 。因此，这个家系又提供了 5 个非交换，0 个交换。应用连锁知识，可以将 II-3、II-4 和 III-8 的基因型写成 MS/Ns 。

Mac. 家系由于 I-1 和 II-3 都是纯合子的 Ns/Ns ，所以没有提供关于连锁的信息。但现在连锁已经建立，这个家系再次显示，编码 $Mi(a+) Vw+$ 表型的基因位于一条 Ns 染色体上。表 1 中还有 1 例 $Mi(a+) Vw+$ 表型个体，是 Ns/Ns ，但未检测其家系。

因此，图 1 中的家系建立了编码 $Mi(a+) Vw+$ 表型的基因与 $MNSs$ 基因之间的连锁关系。这些家系共含有 19 个非交换和 0 个交换。在五个无血缘关系的白人中，新基因与 $MNSs$ 基因之间特别的连锁关系已经很清楚，每个人的新基因都在 Ns 染色体上。这种对 Ns 的偏好仅由偶然性导致的概率小于 1/100。这表明，这种连锁不是传统类型，或多或少频繁交换导致平衡；而是特殊类型，在 Rh 系统的 CDE 基因之间发现，也在 MN 和 Ss 基因之间发现，交换极其罕见。我们假定还存在其他的连锁类型有待发现。

Verweyst 家系（图 1）中，有 $Mi(a+) Vw+$ 表型的 III-9 在出生时死亡。由于她的细胞被她母亲的抗 Vw 致

敏，Vw 抗原肯定在出生前就已发育良好（Hart et al., 1954）。

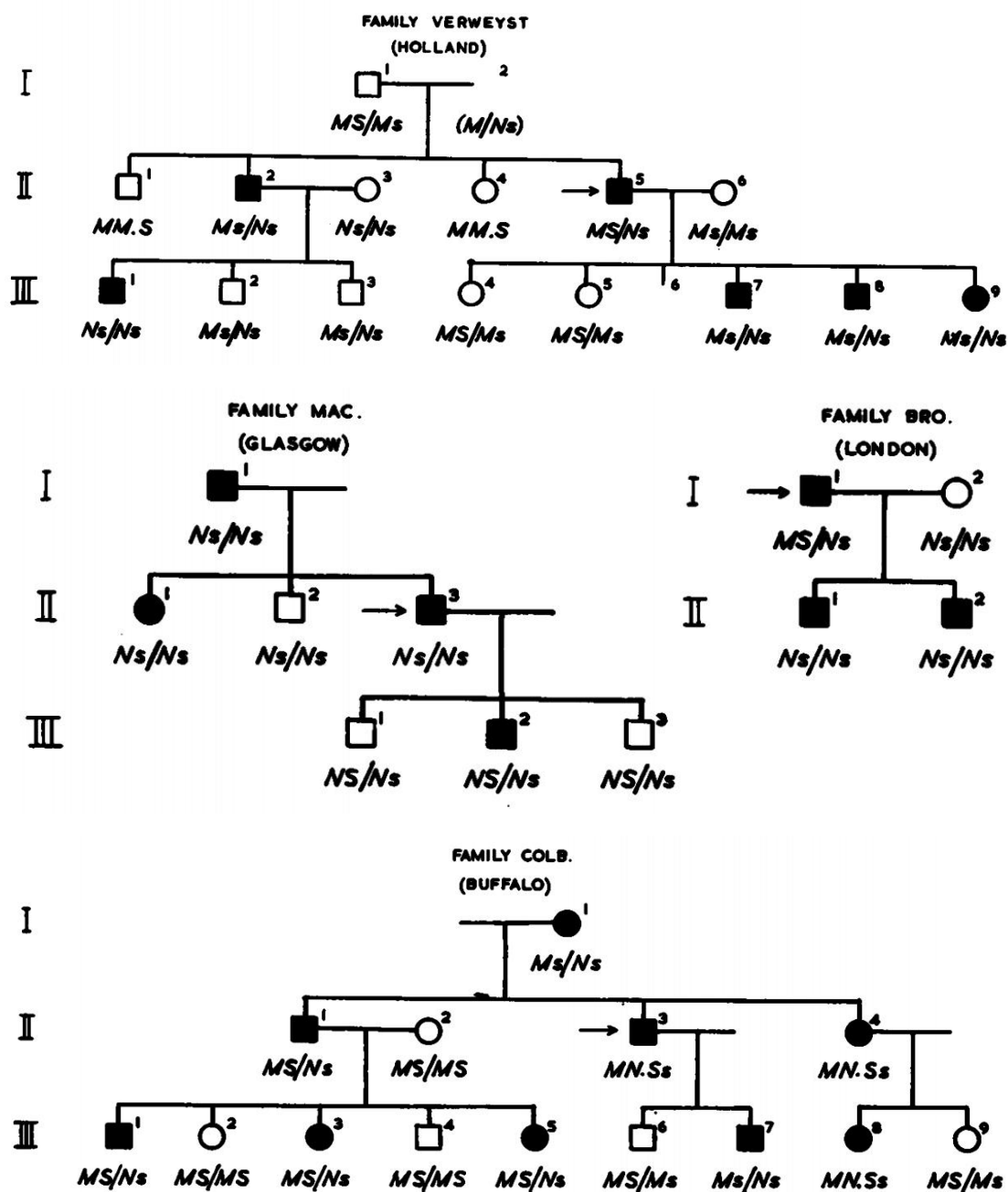


图 1 说明表型 Mi(a+)Vw+遗传的家系。黑色=Mi(a+)Vw+；白色=Mi(a-)Vw-。箭头=先证者。在四个家系中的三个家系（Verweyst、Bro.和 Colb.）中，编码 Mi(a+)Vw+表型的基因与 Ns 共同遗传。家系 Mac.未提供任何连锁信息。血清学结果明确的血型，或结合血清学结果和该家系其他成员血型可以明确的血型，都写成基因型。推断出的未检测人员的血型被列在括号中。使用的抗血清：抗 Mia、抗 Vw、抗 M、抗 N、抗 S、抗 s。最初 Vw 家系 Verweyst 的样本由 van Loghem 博士提供。在这个家系中，II-1 和 II-4 没有用抗 s 检测，III-9 没有用抗 Mia 或抗 s 检测。

3.2 Mi(a+)Vw-的遗传

图 2 中的家系显示，表型 Mi(a+)Vw-作为一个显性孟德尔性状遗传。

四个家系，Hut., Col., Pul.和 Erm., 证明了编码 Mi(a+) Vw-表型的基因与 MNSs 基因之间存在连锁关系。

在 Hut.家系中，所有的 Mi(a+) Vw-成员都拥有 I-2 的 MS 染色体。在这个家系中，有 10 个非交换，0 个交换。

对已经死亡的 I-2 的血型的重建，可以作为演绎方法的一个例子，在将 MNSs 表型转化为基因型时，经常不得不采用该演绎方法。

II-2 基因型是 MS/MS；因此，I-2 有一条 MS 染色体。III-12 和 III-13 的表型为 Ns；因此，它们的基因型为 Ns/Ns；因此，表型为 MNSs 的 II-6 基因型肯定是 MS/Ns；且 II-6 的 Ns 染色体一定来自 I-2，因此 I-2 的基因型是 MS/Ns。如果从 III-15 开始，也可以推导出 I-2 具有 Ns。这说明，检测家系中缺乏目的性状的分支，偶尔也是很重要的。

在 Col.家系中，Mi(a+)Vw-同样与 MS 连锁。我们认为有 5 个非交换和 0 个交换。

在 Pul.家系中，Mi(a+)Vw-同样与 MS 连锁，有 11 个非交换和 0 个交换。

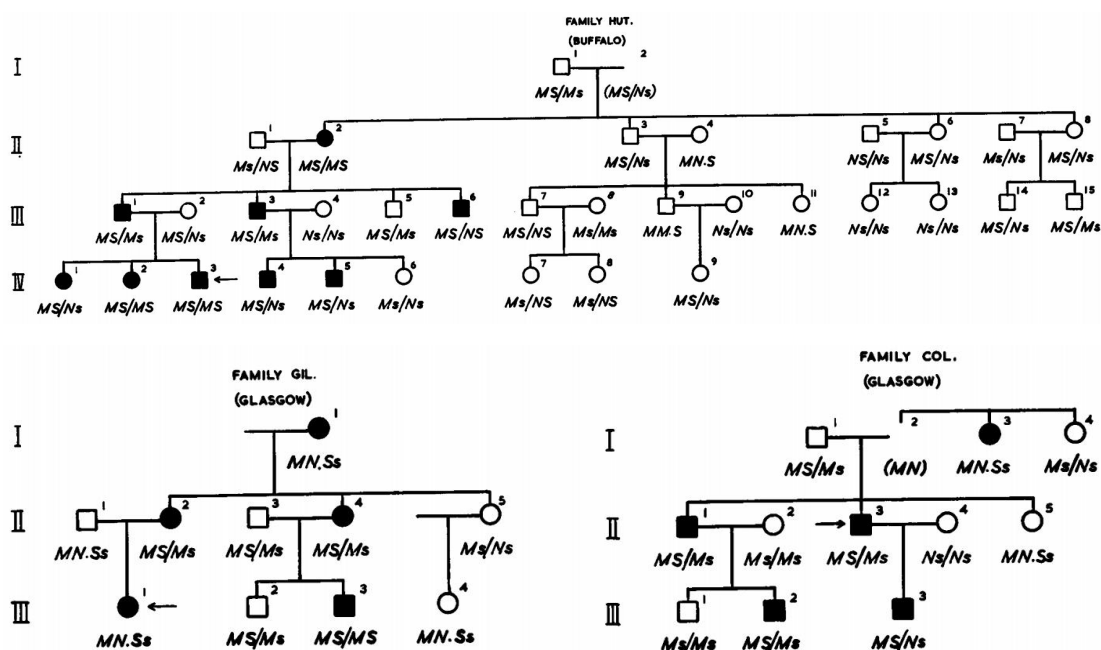
Gil., Mus.和 Ped.家系未提供直接的连锁信息，但已知连锁存在，很明显，在所有三个家系中，编码 Mi(a+) Vw-表型的基因再次与 MS 共同遗传。

在家系 Erm.中，有 2 个非交换（III-9 和 III-10）和 0 个交换。该家系特别有趣，因为它显示，编码 Mi(a+) Vw-表型的基因也可以与 Ns 共同遗传。

因此，图 2 中的家系建立了 Mi(a+) Vw-表型编码基因与 MNSs 基因之间的连锁关系。这些家系共含有 28 个非交换和 0 个交换。

Mi(a+) Vw-表型编码基因所在的 MNSs 染色体已经在 7 个无血缘关系的人中被确认；6 人是 MS，1 人是 Ns。

Mi(a+) Vw-表型在出生时就已发育良好（Mohn et al., 1958）。在图 2 中，Hut 家系的 IV-3 和 IV-5 检测的是脐带样本。据推测，Mia 抗原也在出生前很久就形成了，因为 IV-3 患有抗 Mia 导致的溶血病。在图 2 中，Erm.家系的 III-8 检测的也是脐带样本。



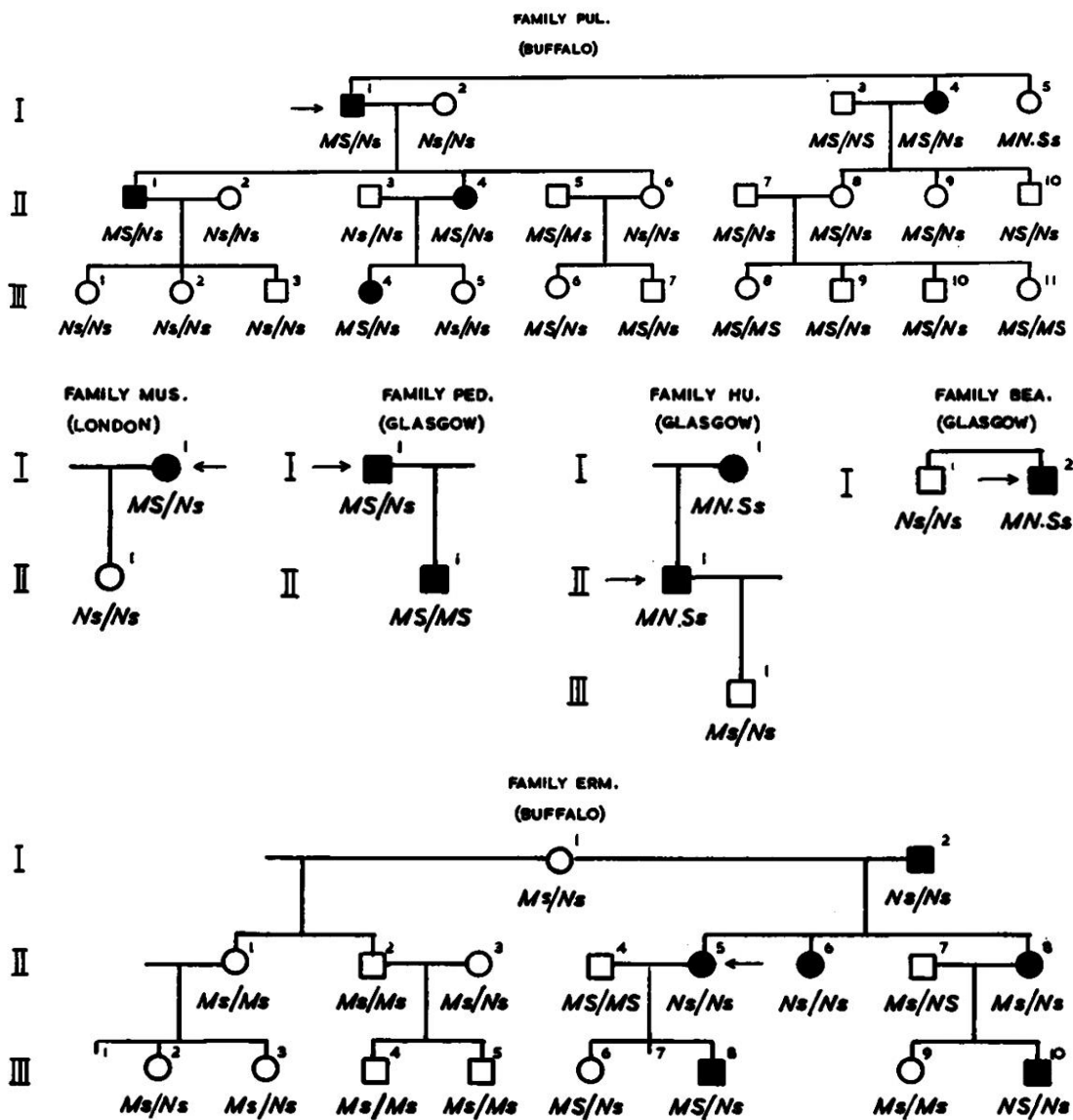


图 2 说明表型 $Mi(a+)Vw-$ 的遗传的家系。黑色= $Mi(a+)Vw-$ ；白色= $Mi(a-)Vw-$ 。箭头=先证者。在九个家系中的三个（Hut.、Col.和 Pul.），可见编码 $Mi(a+)Vw-$ 表型的基因与 MS 共同遗传。Erm.家系，另一方面，显示该基因与 Ns 共同遗传。有关其他注释，请参见图 1 中的图例。Hut.家系 II-3、II-4 及其子女没有用抗-s 检测。

3.3 新基因在 MNSs 染色体上的位置

这似乎是一个困难的问题，而且还远未得到解决。为方便讨论，我们将编码 $Mi(a+)Vw-$ 表型的基因称为 Mia，将编码 $Mi(a+)Vw+$ 表型的基因称为 Vw。

3.4 Mia 和 Vw 与 MNSs 基因的关系

至少看起来很清楚，Mia 和 Vw 都不是 M 或 N 的等位基因，也不是 S 或 s 的等位基因。已发现一些 $Mi(a+)Vw-$ 和 $Mi(a+)Vw+$ 个体的表型是 MNSs，且其 M、N、S 和 s 抗原与正常的 M、N、S 和 s 抗原相比，与相应抗血清的反应无差异。

由于 M^c (Dunsford et al., 1953) 和 M^E (Allen et al., 1958) 是 M 和 N 的等位基因，它们不可能与 Mia 和 Vw 有特别的关系。此外， $Mi(a+)Vw-$ 和 $Mi(a+)Vw+$ 表型的血液样本已用抗 M 和抗 N 血清检测 M^c ，结果为阴性；也已用抗 M^E 检测 M^E ，结果也为阴性。

由于 S^u 是 S 和 s 的等位基因，它也不可能与 Mia 和 Vw 有特别的关系。以下事实支持了这一观点：两名

S^uS^u 个体用抗 Mia 检测，三名 S^uS^u 个体用抗 Vw 检测，结果均为阴性。

“Mi(a+) Vw-和 Mi(a+) Vw+表型是 MNSs 基因之间相互作用的结果”这一理论上的可能性，似乎可以通过这些表型的罕见性以及“在 MS 和 Ns 染色体上都已发现 Mia”这一事实排除。

3.5 与 Hunter 和 Henshaw 基因的关系

抗原 Mia 和 Vw 与抗原 Hu 或 He 不相同。几个 Mi(a+) Vw+和 Mi(a+) Vw-表型的白人血液已用抗 Hu 和抗 He 检测，结果为阴性。Mia 或 Vw 基因可能是 Hu 或 He 的等位基因；能够提供信息的家系很罕见，尚未找到。

3.6 与 Vr 基因的关系

Mia 和 Vw 都不同于抗原 Vr (Hart et al., 1958)。Mi(a+) Vw+和 Mi(a+) Vw-样品经抗 Vr 检测，结果为阴性。反过来，抗 Mia 和抗 Vw 与 3 例无血缘关系的 Vr+样本也没有反应。Mia 或 Vw 可能是 Vr 的等位基因，但同样地，能够提供信息的家系很罕见，尚未找到。

3.7 Mia 和 Vw 之间的关系

看来，Mia 与 MN 基因的关系，就像 S 或 s 与 MN 基因的关系一样；Vw 亦然。

下面描述的血清学反应并不能帮助确定 Mia 和 Vw 是像 Rh 系统中 C 和 C^w 那样彼此互为等位基因，还是像 C 和 D 这样紧密连锁的基因座。在确定这一点之前，似乎需要第三种抗体——抗 Mib 或抗 vw，更重要的是，还需要进行家系研究，而这种家系极其罕见，恐怕只能通过实验交配生成。

3.8 血清学证据

抗 Mia 是否含有两种抗体——抗 Mia (狭义) 和抗 Vw？抗 Vw 是否只含有一种抗体？为了回答这些问题，用 Mi(a+) Vw+红细胞、Mi(a+) Vw-红细胞、Mi(a-) Vw-对照红细胞，吸收抗 Mia 血清和抗 Vw 血清。结果见表 2。吸收试验在 20℃ 下进行，随后的滴定试验也在 20℃ 下进行；用于这些测试的细胞悬浮在生理盐水中。

表 2 用 Mi(a+) Vw+、Mi(a+) Vw-、Mi(a-) Vw-红细胞吸收 2 例抗 Mia 血清和 1 例抗 Vw 血清的结果

Sera		Absorbed by ½ vol. of Packed Cells	Titration Scores		Interpretation
			Mi(a+) Vw+ cells	Mi(a+) Vw- cells	
anti-Mi ^a (Hut.)	×	Mi(a-) Vw-	60	43	anti-Mi ^a + Vw
anti-Mi ^a (Hut.)	×	Mi(a+) Vw+	0	15	anti-Mi ^a
anti-Mi ^a (Hut.)	×	Mi(a+) Vw+ twice	0	11	anti-Mi ^a
anti-Mi ^a (Hut.)	×	Mi(a+) Vw-	11	0	anti-Vw
anti-Mi ^a (Dal.)	×	Mi(a-) Vw-	13	20	anti-Mi ^a + Vw
anti-Mi ^a (Dal.)	×	Mi(a+) Vw+	0	13	anti-Mi ^a
anti-Mi ^a (Dal.)	×	Mi(a+) Vw-	0	0	
anti-Vw (Verw.)	×	Mi(a-) Vw-	27	0	anti-Vw
anti-Vw (Verw.)	×	Mi(a+) Vw+	2	0	
anti-Vw (Verw.)	×	Mi(a+) Vw-	27	0	anti-Vw
			Vw	Mi ^a	antigens

虽然似乎有大量的交叉吸收，但证据强烈表明，Hut.血清含有两种抗体，抗 Mia (狭义) 和抗 Vw。不同温度下的比较试验和使用不同红细胞悬浮介质的比较试验 (Mohn et al., 1958) 相互独立地提供了证据支持 Hut.血清中存在两种抗体。我们无法在 Dal.血清中分离出抗 Vw，我们认为，这是由于交叉反应，以及抗

体弱。

另一方面，抗 Vw 显然只含有一种抗体。

如果这种对抗体的解释是正确的，那么只需要两种抗原就可以符合这些反应格局——Mi(a+) Vw+表型红细胞有 Vw 抗原，Mi(a+) Vw-表型红细胞有 Mia 抗原。

表 3 给出了我们有机会检测的抗 Mia 和抗 Vw 血清献血者的详细情况。

表 3 某些抗 Mia 和抗 Vw 血清的来源

Antibody	Donors		Stimulus of Antibody	From
anti-Mi ^a (anti-Mi ^a + Vw)	Mrs. Miltenberger	M.S	pregnancy: husband Mi(a+)	Dr. P. Levine
	Mrs. Adan.	—	no details	Dr. P. Levine
	Mrs. Hut.	MS/Ns	pregnancy: husband Mi(a+) Vw—	Buffalo
	Mrs. Dal.	Ms/Ns	no known stimulus	Glasgow
	Mrs. Stev. Mrs. Garl.	MS/Ms Ms/Ms	no known stimulus no details	Glasgow Dr. M. M. Pickles
anti-Vw	Mrs. Verweyst	Ms/Ms	pregnancy: husband Mi(a+) Vw+	Dr. J. J. van Loghem
	Mr. Murr.	MN·Ss	no known stimulus	Dr. C. Cameron
	Mrs. Bur.	MN·S	pregnancy: husband Mi(a+) Vw+	Dr. D. Parkin and Dr. C. Gässer
	1 Donor	Ms/Ms	no known stimulus: antibodies found in testing the serum of 703 blood donors	Dr. R. A. Zeitlin
	2 Donors	MN·Ss		
	4 Donors 1 Donor	Ms/Ns Ns/Ns		

如果 Mi(a+) Vw+表型的人真的只有一种抗原 Vw，那么我们可以认为，这些人的血液刺激产生抗 Vw，而不产生抗 Mia。Verweyst 和 Bur.家系就是如此。

如果 Mi(a+) Vw-表型的人真的只有一种抗原 Mia，那么我们可以认为，这些人的血液刺激产生抗 Mia，而不产生抗 Vw；但是，尽管被 Mi(a+) Vw-胎儿免疫，Hut.夫人血清中含有抗 Mia+Vw（表 2）。虽然她血清中的抗 Vw 成分比抗 Mia 强；但是，由于样本是在产褥期采集的，胎儿可能吸收了不少抗 Mia，使得抗 Vw 看起来更强。两个月后采集的样品在 20℃ 下与悬浮在生理盐水中的 Mi(a+) Vw-和 Mi(a+) Vw+细胞反应强度相同。

很有可能是，Hut.夫人血清中的抗 Vw 最初是一种“自然发生的”抗体，可能在她被胎儿的 Mia 抗原免疫时接受了一些交叉反应刺激。抗 Vw 是一种相对常见的抗体：Darnborough（1957）检测 400 份正常血清，发现 7 例抗 Vw；我们筛查 703 名献血者的血清，发现 8 例抗 Vw（表 3）。我们是在 20℃ 进行的检测，并且忽略了弱反应；更严格的测试无疑会检出更多的弱抗 Vw。

值得一提的是，Darnborough 和我们在筛选测试中使用的红细胞表型为 Mi(a+) Vw+，不能检出表 2 最后一列狭义的抗 Mia。这种狭义的抗 Mia 血清会凝集 Mi(a+) Vw-红细胞，但不会凝集 Mi(a+) Vw+红细胞。

表 3 还显示了目前已知的抗血清的献血者的 MNSs 血型；均无显著差异。Darnborough（1957）发现 9 个抗 Vw 献血者都为 O 型。在表 3 中提到的 11 个抗 Vw 献血者中，6 个 A₁ 型，1 个 A₂ 型，1 个 AB 型，3 个 O 型。

在本研究过程中，以下“私有（private）”抗体被认为不是抗-Mia 或抗-Vw：抗-Di^a，-By，-Wr^a，-Rm，-Be^a。

Mia 和 Vw 抗原在目前所研究的人群中出现的频率较低，但通过对它们的研究，人们对 MNSs 染色体的复杂结构有了进一步的了解，因此，这两种抗原引起了人们的兴趣。

4 总结

红细胞表型 $Mi(a+)Vw+$ 和 $Mi(a+)Vw-$ 是显性孟德尔性状。有证据表明，每个表型依赖于单一抗原的存在， $Mi(a+)Vw+$ 反映抗原 Vw 的存在， $Mi(a+)Vw-$ 反映抗原 Mia 的存在。

基因 Vw 和 Mia 是 $MNSs$ 基因复合体的一部分。在白人种中， Vw 更倾向于在 Ns 染色体上遗传，而 Mia 则更倾向于在 MS 染色体上遗传。

Vw 和 Mia 基因不是 M 或 N 的等位基因，也不是 S 或 s 的等位基因；但它们是彼此互为等位基因，还是 Hu 、 He 或 Vr 的等位基因，仍然存疑，且可能长期存疑。

注：本研究中使用的抗血清来自私人赠予。

5 《The duplication of the Gr (Graydon) blood group by Vw (Verweyst)》

《Gr (Graydon) 血型与 Vw (Verweyst) 血型相同》

作者：SIMMONS RT, ALBREY JA, McCULLOCH WJ

作者单位：澳大利亚墨尔本联邦血清实验室；红十字会输血服务处（澳大利亚昆士兰分部）

来源：Vox Sang. 1959 Apr;4(2):132-7.

摘要：

1957 年在澳大利亚昆士兰州布里斯班的红十字会输血服务处发现的 4 例不规则抗体样本被证明是抗 Gr 。它们在 O 、 A 和 B 血型个体中被发现。之后的研究表明，1954 年报道的 Vw 血型与 1946 年报道的 Gr 血型重复，并且 Gr 与 Mia 的关系，也与之前报道的 Vw 与 Mia 的关系一致。在 1326 份随机血样中没有发现 Gr 抗原。 Gr 抗原与 $MNSs$ 血型的 Ns 相关，与之前报道的 Vw 与 Ns 相关一致。在维多利亚州和昆士兰州的 2 个不相关的家系中发现的 16 个 Gr 阳性个体中，都是 $Gr(Vw)$ 和 Ns 在同一染色体上遗传。

1 引言

1943 年，为选择 $A-B-O$ 血型分型血清，检测 O 型血清样本的不规则抗体时，发现 Gr (Graydon) 血型。 Gr 血型不规则抗体出现在一位 18 岁无输血史的单身女性的血清中。在 1 份 O 型对照血液样本中发现了相应的抗原，但在其他 61 份 O 型血样中没有发现。该抗体在较低的温度下比在 $37^{\circ}C$ 时反应更好。1946 年，Graydon 报道了一种“新”血型，并认为它是一种“家族”血型。

在接下来的十年中，描述了许多“家族”或“私有”血型系统，每个抗原或是与一个家族相关，或是在研究人群中罕见。在这些“新”血型中，就有 van der Hart、Bosman 和 van Loghem 在 1954 年描述的 Vw (Verweyst)。认为是妊娠导致抗 Vw 产生。 Vw 抗原被证明与稀有血型抗原 Ven , $Romunde$, E^w , $Batty$, $Henshaw$, C^x 和 $Wright$ 不同。通过间接 Coombs 测试，抗 Vw 与 740 份无血缘个体的血液样本没有反应。

Levine 和 Robinson 报告 Diego 血液因子相关研究时指出，他们在低频血液因子列表中证明了一个重复： Vw 与 1951 年 Levine, Stock, Kuhmichel 和 Bronikovsky 描述的 Mia (Miltnerberger) 相同。

下一个发展是在 1957 年由 Wallace, Milne, Mohn, Lambert, Rosamilia, Moores, Sanger 和 Race 报道的，当时研究表明抗原 Mia 和 Vw 虽然相关，但并不相同。 $Mi(a+)$ 个体中，大约一半是 $Vw+$ ，一半是 $Vw-$ 。Sanger 早年研究了 Verweyst 家系，观察到 Vw 基因与 $MNSs$ 基因座连锁，并与 Ns 共同遗传。还表明，尽管 Mia 和 Vw 抗原罕见（白人种两种表型的组合频率约为 $1/2000$ ），但抗 Mia 抗体相对常见，并在从未暴露于抗原刺激（妊娠或输血）的个体的血清中发现。家系研究表明，编码 $Mi(a+)Vw+$ 和 $Mi(a+)Vw-$ 表型的一个或多个基因与 $MNSs$ 基因座连锁，编码 $Mi(a+)Vw+$ 表型的基因与 N 和 s 共同遗传，编码 $Mi(a+)Vw-$ 表型的基因与 M 和 S 共同遗传。 Mia 、 Vw 、 Hu 和 He 抗原与 $MNSs$ 血型的关联表明了该血型系统的复杂性。

Darnborough 报告了对 Vw 血型的调查。最初的 2 例 O 型患者中的不规则抗体被证实为抗 Vw ，随后检

测 211 份 O 型血清、138 份 A 型血清、30 份 B 型血清和 13 份 AB 型血清，又发现 7 例抗 Vw。9 例抗 Vw 血清均为 O 型，至少 5 例是自然发生的，无明显抗原刺激的证据。在研究的家系中，Vw+的父亲和 2 个女儿也携带 Ns 基因。

在 Darnborough 的研究进行的同时，在澳大利亚布里斯班和墨尔本，也在独立地进行一项对 Gr 血型的研究，包括：确定献血者的血清中抗体的频率，澳大利亚人群中抗原的频率，2 个携带 Gr 抗原的家系的血型遗传方式，以建立 Gr 抗原与其他血型系统的可能关联。这项研究的结果显示，1954 年报道的 Vw (Verweyst) 血型与 1946 年报道的 Gr (Graydon) 血型是相同的，本文将简要报道。

2 材料和方法

在布里斯班的红十字会输血服务处遇到了一种不寻常的抗原-抗体系统，随后被证明与 Gr 血型相同。在我们的实验室检测不规则抗体，玻片法，24℃和 37℃，使用 1 滴未稀释的血清和 1 滴 15%未洗涤的细胞悬液（改良 Rous 和 Turner 葡萄糖-柠檬酸血液保存液）。玻片在保湿室中培养。因为已发现抗 S 和抗 s，因此本研究可以进行 MNSs 血型系统内的检测。

3 结果与讨论

3.1 澳大利亚人群中的抗 Gr

1957 年在 500 份血清样本中发现了 4 例抗 Gr。其中，1 例为 O 型，2 例为 A 型，1 例为 B 型，因此抗 Gr 并不只在 O 型内发现，与 Darnborough 对抗 Vw 的研究结果不同。

通过间接 Coombs 试验，在布里斯班发现的 4 例抗 Gr 血清均无阳性反应。所有抗 Gr 都是在较低温度下比在 37℃时反应更好。当使用新鲜血清作为稀释剂，且细胞悬浮在新鲜血清或 30%牛白蛋白中时，滴定值最高。

找到了 1943 年报道的抗 Gr 先证者，又进行了一次抽血。1958 年该供者血清的抗 Gr 活性几乎与 1943 年的记录相同，因此该抗体不是短暂存在的。

共有 1326 份澳大利亚白人随机血样进行了 Gr 抗原检测，结果为阴性。

3.2 Gr 与 Vw 和 Mia 的关系

最初的 Gr 家系和昆士兰 Gr 家系的代表样本分别用抗 Vw (由 van Loghem 博士提供) 和抗 Mia (由 Mohn 博士提供) 检测。这些样品检测结果都是 Gr+、Vw+和 Mi(a+)。将抗 Gr 样品寄到海外，分别用已知 Mi(a+)Vw+的细胞和已知 Mi(a+)Vw-的细胞检测，结果显示仅与 Mi(a+)Vw+细胞产生阳性反应。因此，1954 年报道的 Vw 与 1946 年报道的 Gr 重复，且与 Mia 的关系是一致的。

3.3 在澳大利亚 Gr 和 Ns 的关系

检测最初 Gr 家系成员 ABO、MNSs、Rh、P、Lea、Fya、K、Wra 和 Gr 血型，以确定 Gr 是否与其他血型系统有关。对同样拥有 Gr 抗原的昆士兰家系也进行了类似的检测，但不那么全面。唯一发现的关联与 Vw 和 Ns 的关联相同。然后在这些家系中研究了 Gr 与 Ns 的关联。在维多利亚家系中 (图 1)，可以看到编码 Gr 抗原的基因从 I-1 开始，到 II-3、II-5、III-3、III-6 和 III-7，都是与 Ns 染色体共同遗传。

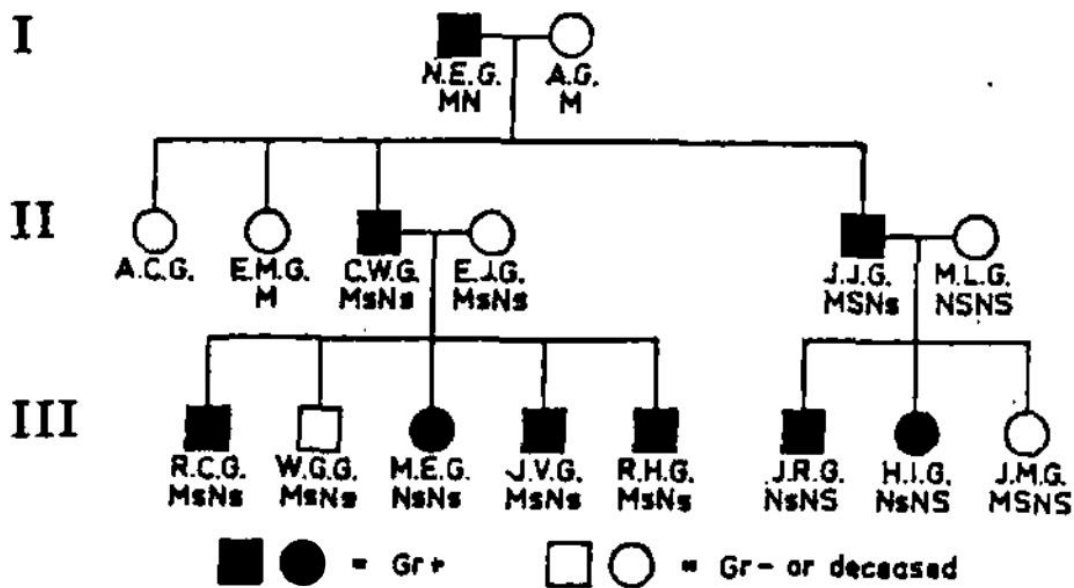


图 1 维多利亚的 Gr 家系

在昆士兰家系中（图 2），可以看到 Gr 基因从 I-1 到 II-1、II-3 和 II-5，都是与 Ns 染色体共同遗传。

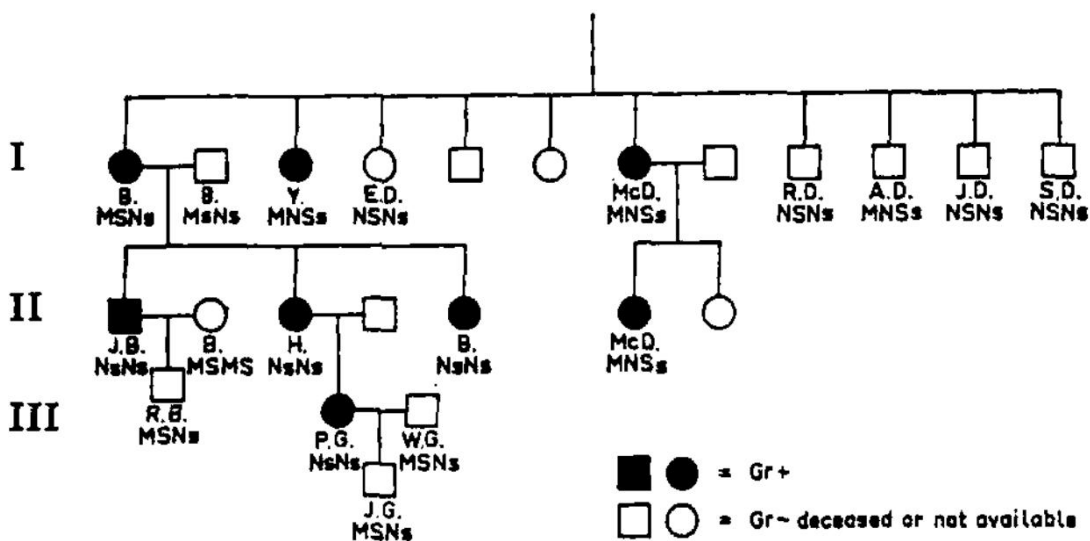


图 2 昆士兰的 Gr 家系

由于在调查的后期才获得检测血清，因此 Mia 的家系研究数据不足。维多利亚和昆士兰家系中各有 2 名成员接受了抗 Mia 检测，所有 4 名成员都是 Mi(a+)。

注：本研究使用的抗血清来自私人赠予。

6 《A Memorandum on the Miltenberger Blood Groups》

《关于 Miltenberger 血型的报告》

作者: Cleghorn TE

作者单位: 国家输血服务处, 埃奇韦尔 (伦敦北部地名)

来源: Vox Sang. 1966 Mar-Apr;11(2):219-22.

由于作者职务变更, 因此对 Miltenberger 血型的工作中断。在这里对主要发现进行总结。支持证据将尽快公布。

1. 在因怀有 Miltenberger 阳性胎儿而被免疫的妇女体内发现了四种不同的血清:

(i) Verweyst

(ii) Miltenberger

(iii) Murrell

(iv) Hill

2. 通过使用这些血清, 已经定义了四种红细胞表型:

Cell class	Reactions with type-sera				Examples (propositus first)
	Verweyst	Miltenberger	Murrell	Hill	
I	+	+	—	—	Graydon, Miltenberger, Verweyst
II	—	+	—	—	Hutchinson, Musson
III	—	+	+	+	Murrell, Wagstaffe
IV	—	+	+	—	Hopper

已经有记录, Vw (Verweyst) 型细胞与 Mia (Miltenberger) 和 Gr (Graydon) 型细胞重复。作者已经证实, 这三种细胞无法区分, 都属于 I 类细胞。

3. 到目前为止, 所有测试的 Verweyst 血清似乎都是单特异性和相同的。有一些是由于 I 类细胞多特异性妊娠而产生, 还有更多“自然发生”的。

4. 多特异性妊娠产生的 Miltenberger 血清有两种:

(a) 受 I 类细胞 (Miltenberger, Bell, Harris 等) 刺激产生。

(b) 受 II 类细胞 (Hutchinson) 刺激产生。

吸收实验表明:

(i)(a) 型血清与 I 类细胞有强反应性, 与 II、III 和 IV 类细胞具有不同程度的交叉反应性。所有四种细胞类型的放散液表现出与原血清相同的反应性。这些血清中有一些也含有针对 II 类和/或 III 类和 IV 类的弱抗体。

(ii)(b) 型血清可以通过适当的吸收, 分离出一种特异于 II、III 和 IV 类细胞的强反应组分 (尚未尝试进一步分离), 以及特异于 I 类细胞的较弱反应组分。

5. 仅有的两例测试过的 Murrell 血清似乎是单特异性和相同的。用所有已知的 III 类或 IV 类 Mu (+) 细胞吸收后, 去除了所有抗体。

6. 仅发现 1 例 Hill 血清, 它与所有 III 类细胞反应强, 但与 IV 类细胞完全没有反应。后者消除了 Murrell 血清的所有反应性, 因此无可争议地是 Mu (+)。

7. 有强有力的证据表明这些血型与 MNSs 密切相关，并且通过家系研究已经确定了以下连锁关系：

Cell class	Alignment (in decreasing order of frequency)
I	<i>Ns, NS, Ms, MS</i>
II	<i>MS, Ns, Ms</i>
III	<i>Ns, Ms</i>
IV	<i>NS</i>

8. 基因型 Ms/NS 的 IV 类细胞可以将 S-抗血清分为三种类型：

(i) 与所有“正常”S(+) 细胞反应，但与 Ms/NS IV 类细胞没有反应。

(ii) 与所有“正常”S(+) 细胞反应，也与 Ms/NS IV 类细胞反应。用 Ms/NS IV 类细胞吸收后，留下了对“正常”S(+) 细胞的反应性；用“正常”S(+) 细胞吸收后，消除了所有的反应性。两种放散液的反应都与天然血清一样。

(iii) 反应类似(ii)型 S-抗血清，但用“正常”S(+) 细胞吸收，或用 Ms/NS IV 类细胞吸收后，都消除了所有反应性。两种放散液的反应都与天然血清一样。

这些 S 反应与 Rh 中的 C 反应之间有一些相似之处：

Anti-S type	Specificity	Rh analogy
(i)	S	C
(ii)	S + SS ^w	C + CC ^w
(iii)	SS ^w	CC ^w

9. 一个中国家系 (Opp.) 具有 III 类表型，与变异 Ms 共同遗传。这种复合物产生导致 III 类表型的单个或多个抗原、M 抗原、比“正常”M 多得多的 N 抗原、变异 s 抗原 (Ms/NS 细胞上的变异 s 不能与 1/5 的强 s 抗血清发生反应或吸收)。

另一个中国家系 (Kuei) 具有 III 类表型，Ms/Ms 基因型，并表现出增强的 N 反应：未检测 s 的剂量。

10. 显然，早就该对命名法做一些修订了，不仅是基于优先级，而且更重要的是，以便在积累更多的资料之前可以停止解释性术语。本文提出了以下建议：

(a) Gr (Graydon) 的历史较早，并与 Vw (Verweyst) 和 Mia (Miltenberger) 重复。I 类细胞的抗原复合物应该被称为 Gr (Graydon)，而特异性抗体是抗 Gr。

(b) Mu 已经被用来表示 M (U 阴性)，因此 Mur (Murrell) 应该取代 Mu。相应的抗体，抗 Mur，识别 III 和 IV 类细胞中的抗原复合物。

(c) Hill 血清只能识别 Mur 复合物的一部分，因此使用术语 Hil (Hill) 和抗 Hil，是合适的。

(d) 第 1 例 II 类细胞是在 Hut 家系中发现的，因此 II 类细胞的抗原复合物应该被命名为 Hut(Hutchinson)，对应的特异性抗血清，命名为抗 Hut。

(e) Miltenberger 血清是多价的，识别所有四种细胞类型，因此这个名称应保留给这个子系统。

11. 综上所述，本文第 1 段所列的血清的反应性如下：

(i) Verweyst 血清：抗 Gr。

(ii) Miltenberger 血清：

(a) 抗 Gr + 与 Hut、Mur 和 Hil 发生交叉反应的抗 Gr。痕量的特异性抗 Hut、抗 Mur 和抗 Hil。

(b) 抗 Hut + 抗 Gr (可能部分交叉反应；尚未检测其他特异性抗体)。

(iii) Murrell 血清：抗 Mur。

(iv) Hill 血清：抗 Hil (anti-Mur less the -S^w component)。

其他复合物血清正在研究中，其中两种似乎具有特异性 Hut + Mur；进一步的分析正在进行中。尚未找到含有 II 类和 IV 类细胞特异性单一抗体的血清。

7 《A British family possessing two variants of the MNSs blood group system, M^v and a new class within the Miltenberger complex》

《一个英国家系拥有 MNSs 血型系统的两个变异体，M^v 和 Miltenberger 复合体中的一个新类型》

作者：Crossland JD, Pepper MD, Giles CM, Ikin EW

作者单位：英国利兹市输血实验室；伦敦 MRC 血型参比实验室

来源：Vox Sang. 1970 May;18(5):407-13.

摘要：

鉴定出了一种自然发生的抗 M^v。研究了 M^v 先证者的家系，并显示其含有 MNSs 血型系统的另一种变异体。弱 N 抗原与抗 Hil 反应有关，抗 Hil 是 Miltenberger 复合物的一部分。揭示一个新类型(V)，为 Vw(-) Mi(a-) Mur(-) Hil(+).

1 引言

1963 年，GERSHOWITZ 报告了“一种不寻常的抗 N 血清”。随后，GERSHOWITZ 和 FRIED 用该血清和其他 MNSs 抗血清平行进行了详细的血清学 and 家系研究，并将该抗体命名为抗 M^v。该血清与所有白种人 NN 和 MN 样品发生反应，但另外与 1/400 MM 样品发生反应；这意味着两种特异性，M^v 和 N，但它们是不可分割的。GERSHOWITZ 和 FRIED 能够通过反应强度的不同在 N 存在下检测到 M^v；M^vN 样品反应最强，其次是 NN 样品。当用人、兔和牛的血清和屈曲花凝集素进行检测时，M^vN 个体中的 M^v 产生了正常 M 抗原的反应。DUNSFORD 等对比了 M^v 和 M^c 的反应。1968 年 METAXAS 等发表的报告显示，通过比较抗原反应性，他们报道的新变异没有一个与 M^v 相同。抗 M^v 在一名 MM 妇女的血清中发现，她的丈夫和两个孩子是 M^vM，因此 GERSHOWITZ 和 FRIED 得出结论，该抗体是由妊娠引起的，但作为一种生理盐水凝集素不会引起溶血性疾病。

本报告叙述了另一例抗 M^v 的鉴定过程，它不同于之前的那例抗 M^v，因它不与 N 抗原反应，且它是自然发生的。R.夫人，该家系的 M^v 先证者，也被发现是 Vw(-) Mi(a-) Mur(-) Hil(+)，从而揭示了 Miltenberger 复合体中的一个新的红细胞类型。

2 血清学发现

用 AB 型血清 N.A. 检测 R. 夫人的红细胞，观察到凝集现象。以前认为 N.A. 血清没有不规则抗体。R. 夫人的细胞在 20°C 和 4°C 的生理盐水和白蛋白中反应。以 1000 r.p.m. 离心 2 分钟增强了其在生理盐水中的凝集作用。经无花果蛋白酶处理后，R. 夫人的细胞不再与 N.A. 血清发生反应。

用含有抗低频抗原抗体的血清检测 R. 夫人的细胞；唯一获得的阳性反应是与 Hill 血清，其中含有抗 Hil，相应的抗原是 Miltenberger 复合物的一部分。R. 夫人的细胞与 2 例抗 Vw、4 例抗 Mi^a 和 2 例抗 Mur 血清反应呈阴性，似乎表明在 Hill 血清中检测到第二种抗体，因为之前所有的 Hil(+) 样本都是 Vw(-) Mi(a+) Mur(+).

N.A. 血清不与具有低频抗原的细胞发生反应，包括 MNSs 系统的 Vw(+) Mi(a+) Mur(-) Hil(-), Vw(-) Mi(a+) Mur(+) Hil(+), M^c, M^g, M^k, M^r, M^z, St(a+), Cl(a+), Ny(a+), Vr(+), He(+), Tm(+), Sj(+), Hu(+). N.A. 血清与 Arm. 先生的 M^vM 细胞发生阳性反应。用 Arm. 先生的细胞吸收 N.A. 血清，会消除 N.A. 血清对 R. 夫人的细胞的反应性；用 R. 夫人的细胞吸收 N.A. 血清，会消除 N.A. 血清对 Arm. 先生的细胞的反应性。结果表明，N.A. 血清含有抗 M^v；R. 夫人是 M^v(+).

吸收实验表明，R. 夫人和一位已知 Vw(-) Mi(a+) Mur(+) Hil(+) 献血者的细胞都去除了 Hill 血清中的抗体活性，但只有 R. 夫人的细胞去除了 N.A. 血清中的抗体活性。

图 1 示用 N.A. 和 Hill 血清检测 R. 夫人家系细胞样本的结果。显然 R. 夫人拥有 MNSs 系统的两个变异体，分别来自父母，并分别遗传给她的孩子们。父亲 I-1、先证者 II-2 及其幼子 III-2 是 M^v(+)，其基因复合体是 M^vs。母亲 I-2、姨母 I-4、先证者及其长子 III-1 都是 Vw(-) Mi(a-) Mur(-) Hil(+), 与弱表达 N 抗原的 Ns 基因复合物共同遗传。Hil(+) 家系成员与兔抗 N 血清和禾本科野豌豆种子凝集素反应正常，而 I-4、II-2 和 III-1 与人源抗 N 血清反应较弱或阴性。对 I-2 细胞和人源抗 N 血清的剂量评分表明，N 的剂量超过单倍剂量，但少于两倍剂量。

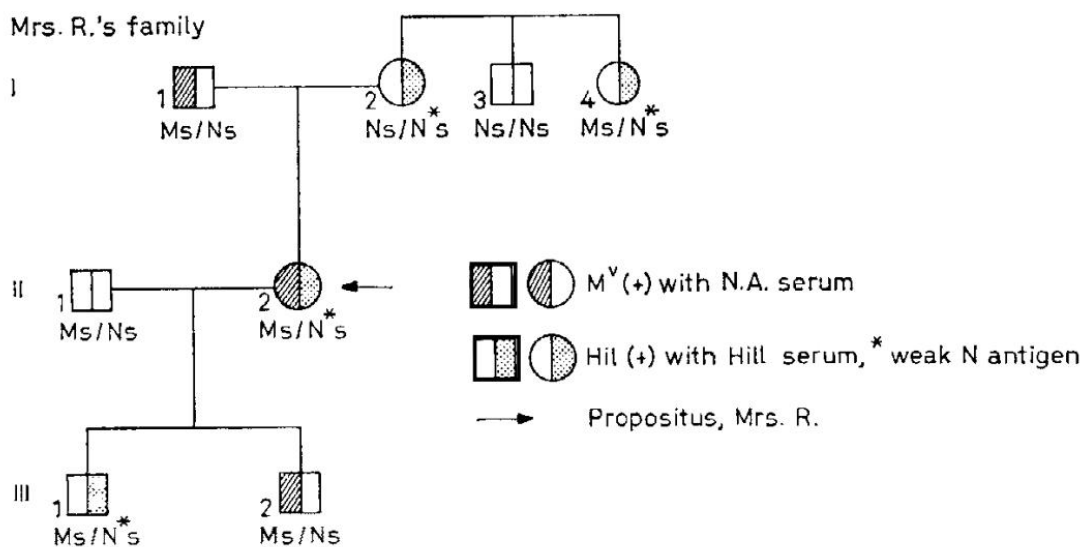


Fig. 1

3 用 N.A. 血清进行 M^v 研究

N.A. 血清在 M^vM 和 M^vN 人群中均检测到 M^v 抗原，因此 N.A. 血清与源自 Arm. 夫人的最初的抗 M^v 不同。

最初的抗 M^v 是一种对 M^v 和 N 抗原都发生交叉反应的不可分离的抗体，也许命名为抗 M^vN 更合适。用 Arm. 先生的 M^vM 细胞吸收最初的抗 M^v，会去除其与 MM N.A.(+) 细胞、MN 和 NN 细胞的反应性；用 MM N.A.(+) 细胞吸收最初的抗 M^v，会去除其与 Arm. 先生的 M^vM 细胞、MN 和 NN 细胞的反应性；用 MM 细胞吸收最初

的抗 M^v ，不会去除其与任何细胞的反应性。同样地，如前所述，用 Arm.先生的细胞吸收 N.A.血清，会去除其与任何细胞的反应性。

N.A.已献血多年；她 7 次捐献的血清，用 O 型细胞 4℃吸收去除非特异性凝集素后，用作惰性 AB 型血清。她的细胞为 A_2B 、Rh 表型 CcDee、MSs，与抗 M^vN 反应呈阴性。25 年前，N.A.有过一次妊娠，在分娩一个死胎后输过血。她丈夫的细胞是 MNS，与她的血清相容。从临床病史中，没有证据表明近期有刺激，且该抗体的反应模式是“冷盐水凝集素”，因此推测抗 M^v 是自然发生的。

在 N.A.血清中鉴定出抗 M^v 后，英国利兹市输血中心用该血清检测随机献血者样本。用生理盐水 1:2 稀释 N.A.血清，筛选 2024 个样本，检测到 2 个样本有阳性反应；人们认为，如此低的阳性率，是因为血清被稀释后活性不够。使用未稀释的血清筛选 2371 个样本，检测到 14 个样本有阳性反应。用每个阳性样本吸收 N.A.血清，都会去除其与 1 例 M^vM 样本的反应性。

16 个 M^v 阳性样本中 14 个 MNSs 表型为：4 个 Ms，4 个 MSs，5 个 MNSs，1 个 MNSs；另外 2 个为 MNS+ 和 MNS-，但没有用抗 s 分型。全部 16 个 M^v 阳性样本均为 M 阳性；没有一个是 s 阴性，因此不知道 M^vS 是否存在。最初用生理盐水抗 S 或抗 s 检测这些 Ss 杂合子没有观察到弱反应，但随后又用 6 个抗 s 检测，结果显示，这些 Ss 杂合子与一个白蛋白抗 s 和两个生理盐水抗 s 试剂的反应比正常对照弱。检测了 3 个先证者的家系（其中 2 个是 S+），结果显示，与 R.夫人的家系一样，基因复合体是 M^vs 。

可以用未稀释的 N.A.血清检测的第二个样本系列的数据来计算 M^v 的频率。在 2371 个随机样本中检测到 14 个 M^v 阳性个体，频率为 0.0059。没有检测这 2371 名献血者的 MN 血型，但使用 RACE 和 SANGER 报道的对 1419 份英国人样本进行检测得到的基因频率，计算得到这 2371 名献血者的 MM、MN 和 NN 预期人数分别为 667、1181 和 523。由于等位基因 M^v 很罕见，推测与 N.A.血清反应阳性的 MM 样本都不是 M^vM^v 。

因此，在 2515 ((667x2)+1181)个 M 基因中有 14 个为 M^v 。M 基因中 M^v 的比例为 0.0056。 M^v 基因频率为 $0.0056 \times 0.5303 = 0.0030$ 。用这个基因频率计算，2371 个样本中， M^v 阳性个体的预期人数为 14.23。

4 Miltenberger 抗原复合体中的一个新类型

CLEGHORN 总结了其关于检测 MNSs 系统罕见抗原的抗体的工作。四种抗体，分别称为 Verweyst (Vw)、Miltenberger (Mi^a)、Murrell (Mur)和 Hill (Hil)，检测四个细胞类型。所有的类型都是 Mi(a+)，它们可以表示如下：

I	Vw(+)	Mi(a +)	Mur(-)	Hil(-)
II	Vw(-)	Mi(a +)	Mur(-)	Hil(-)
III	Vw(-)	Mi(a +)	Mur(+)	Hil(+)
IV	Vw(-)	Mi(a +)	Mur(+)	Hil(-)

在 R.夫人细胞上检测到的新类型可以表示如下：

V	Vw(-)	Mi(a -)	Mur(-)	Hil(+)
---	--------	---------	---------	---------

用 III 类和 V 类细胞吸收 Hill 血清，可以去除 Hill 血清对这两类细胞的反应活性，因此得出结论，Hill 血清中的单一抗体导致这些反应。

V 类的表型在两个方面是不寻常的。一方面，它是这个系列中第一个 Mi(a-)。在该家系中发现其与 Ns 连锁，且弱表达 N 抗原。唯一一例已知的 IV 类细胞显示出不寻常的 S 活性，而两个 III 类家系显示出不寻常的 N 和 s 活性。I 类和 II 类细胞没有显示出异常的 MNSs 反应性。

发现 R.夫人后，METAXAS 又发现了几例 V 类表型个体（暂未发表，在准备中）。

5 讨论

由于先证者 R.夫人的细胞与 1 例“惰性”AB 血清发生反应，因此对 R.夫人的家系进行研究。认为这种反应由一种低频抗原和一种看上去是自然产生的抗体导致。许多有这样反应的样本被送检参考实验室，在那里通常用一组血清检测样本细胞，每个血清中含有一种或多种抗体。起初认为只有一种抗原参与其中，而 N.A.和 Hill 血清中存在同样的抗体。与 Hill 血清产生阳性反应的细胞(III 类)没有被 N.A.血清凝集，因此在 Hill 血清中可能存在第二种抗体。吸收试验表明，Hill 血清的反应仅由一种抗体导致，直到进行家系研究，才发现 R.夫人十分巧合地有两种罕见的 MNSs 系统抗原。

发现 1 例不与 N 抗原发生交叉反应的抗 M^v ，可以用它更准确地测定 M^v 的频率。发现的阳性反应比预期的要多；在 2371 个样品中发现了 7 个 M^vM 样品，计算 2371 个样品中有 667 个为 MM 样品，因此， MM 样品中 M^vM 频率约为 1/100。可能抗 M^v 特异性有轻微差异，但所有 M^vM 样本都用最初的抗 M^vN 进行了检测，结果都是预期的阳性反应。很难基于反应强度检测具有抗 M^vN 的 M^vN 样本，因为正常个体中 M 和 N 抗原的表达都可能不同。

目前还无法确定 N.A.血清是否能检测到与 S 共同遗传的 M^v 。 M^v 阳性人群中 Ms 基因： MS 基因比例高于一般人群，而且由于没有一个 N.A.反应阳性者是 s 阴性的，因此没有证据表明 S 与 M^v 连锁。使用某些抗 s 试剂检测所有 5 个 Ss 杂合子，结果均为弱反应，也许可以作为仅检测到 M^vs 的证据。然而，只有对这 5 人的家系进行研究，才能显示哪些基因复合物存在。已检测 2 个家系，都有 M^vs 基因。由于 GERSHOWITZ 和 FRIED 报告了两个 M^v 和 S 连锁遗传的家系，并且没有观察到 S 抗原弱表达，因此没有理由认为一些 S 抗原在本系列中未被检测到。

MNSs 系统的变异体与 Rh 系统的变异体相似。抗原弱表达的 Rh 基因复合物有时可以被特异性抗体检测到，如 ROSENFELD 等人报道的称为 $\bar{R}^v$ 的(C)D(e)弱表达复合物，它与 Troll 血清反应。瑞典的几例(C)D(e)都与 Troll 血清反应阴性，因此显示出细微的区别。R.家系表达受抑的 N 不同于其他形式弱表达的 N，因其是表达与 Hill 血清反应的抗原的基因复合物的一部分。其他形式的 N_2 ，被 METAXAS 等人称为一系列基因的“初步描述”，尚未被报道为 Hil(+). 作者已证明 M^r 、 M^z 、 M^c 、 M^s 和 M^k 样品为 Hil(-)，而 METAXAS 已证明 N_2 样品（直接抗球蛋白反应阴性）为 Hil(-)。用不同的血清进行比较研究，通过不同的反应模式来区分这种类型的 MNSs 和 Rh 变异。这在 METAXAS 等人的研究（用抗 M 和抗 N 血清）中得到了很好的说明。可以设想在每个系统中一系列的突变形式最终可能被特异性抗体检测到。当对具有低频抗原的细胞进行分型时，仔细检查它们与常规血清的反应是很重要的，因为它们可能会提示与特定血型系统的关联。

注：GERSHOWITZ 博士提供 M^v 细胞和 Arm.血清，并确认 N.A.血清中的抗 M^v ；CLEGHORN 博士确认 R.夫人家系 Miltenberger 抗原复合物的反应。

8 《Three antibodies of the MNSs system and their association with the Miltenberger Complex of antigens. I. Anek serum》

《MNSs 系统的三种抗体及其与 Miltenberger 系列抗原的关联——I. Anek 血清》

作者：Chandanayingyong D, Pejrachandra S, Poole J

作者单位：泰国曼谷 Siriraj 医院输血服务中心；英国伦敦 MRC 血型参考实验室

来源：Vox Sang. 1977;32(5):272-3.

摘要：

Anek 血清中的一种新抗体与 7%的泰国 Mi III 献血者样本发生反应。

在泰国人群中发现 Miltenberger 系列的 Mi III 表型 (Mi(a+) Vw(-) Mur(+) Hil(+)) 频率高 (9.72%)，因

此在泰国，可以很容易获得 Mi III 细胞样本，来筛选患者和献血者血清中的抗 Mia，已检出许多例抗 Mia。在这些研究中，发现在一名 25 岁的泰国男性献血者 Anek(AY)的血清中检测到一种新的抗体，该献血者的血型是 A、*Ms/Ms*、Mi III。Anek 先生无输血史，因此推测该抗体是自然发生的。该抗体与 Mi III 献血者 San. 的细胞反应，在 20℃ 的生理盐水和白蛋白中反应最佳。采用酶技术破坏了这种反应性。

用 AY 血清检测 2500 名泰国献血者，17 名反应阳性，都是 Mi III，因此整个人群中 AY 反应阳性者的频率约为 0.7%。AY 抗体仅对约 7% 的泰国 Mi III 样本发生反应，对所有缺乏 Miltenberger 系列抗原的泰国献血者均呈阴性。Anek 血清与 Mi I、Mi II 和 Mi V 细胞无反应，但与 1 例 Mi IV 细胞发生反应，与 FR、JL 反应者有弱反应。

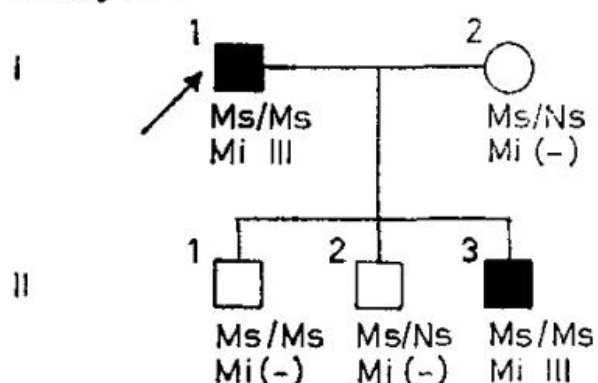
17 个 AY 反应者的 MNSs 血型见表 1。5 个先证者的家系显示，AY 抗原与 Mi III 共同遗传，而 Mi III 与 *Ms* 共同遗传。图 1 示其中 3 个家系。在 C.H.家系中，推测母亲是 Mi III 纯合子。在 MNSs 血型显示杂合性的 P.T.家系中，证实 AY 与 *Ms* 而不是 *MS* 或 *Ns* 相关。

AY 抗体与 Miltenberger 系列有很强的关联，并能够细分泰国的 Mi III。显然，AY 抗体不能结合所有 Mi III 样本，因为 Anek 先生本人就是 Mi III。AY 抗体对 Mi III 的细分不是基于与 MNSs 的连锁关系，而是类似 Hil 血清对 Mur(+)的细分。泰国人群中大多数 Mi III 与 *Ms* 共同遗传，Mi III AY(+)样本也是如此，因为 17 人中有 13 人是 *Ms/Ms* 基因型；在 1 例 MNss 个体（图 1，P.T.家系）中，Mi III AY(+)还是与 *Ms* 共同遗传。在这方面，AY 血清与 Hil 血清不同，但 Mi III 和 Mi IV 之间的密切关系仍然存在，因为 AY 血清也与 Mi IV 细胞发生反应。

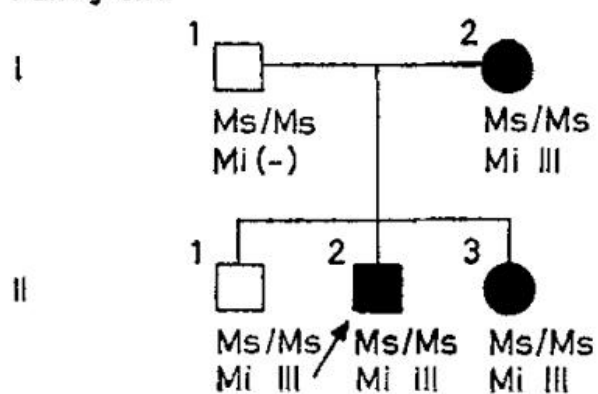
表 1 17 个 AY 反应者的 MNSs 血型

Number of samples	Rabbit		Human			Mi ^a	Vw	Mur	Hil
	M	N	N	S	s				
13 MMss	+	(+)	-	-	+	+	-	+	+
3 MNss	+	+	+	-	+	+	-	+	+
1 MMSs	+	(+)	-	+	+	+	-	+	+

Family S.P.



Family C.H.



→ propositus
 □ ○ AY (-)
 ■ ● AY (+)
 n.t. not tested

Family P.T.

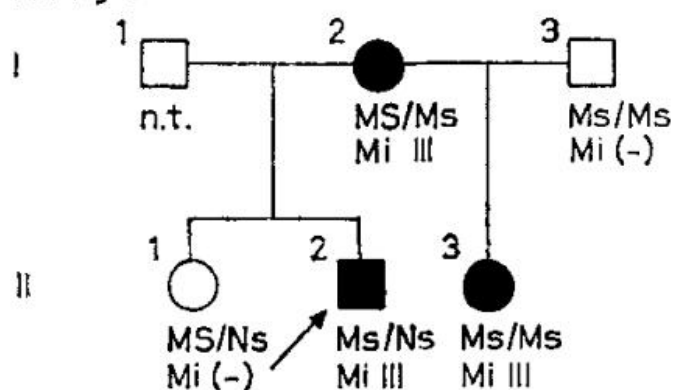


图1 有 AY 抗原的 3 个家系的研究

9 《Three antibodies of the MNSs system and their association with the Miltenberger complex of antigens. II. Raddon and Lane sera》

《MNSs 系统的三种抗体及其与 Miltenberger 系列抗原的关联——II. Raddon 和 Lane 血清》

作者: Webb AJ, Giles CM

作者单位: 英国布里斯托尔输血中心; 英国伦敦 MRC 血型参考实验室

来源: Vox Sang. 1977;32(5):274-6.

摘要: 两种抗血清可以在英国人群中检测到一种与 MNSs 相关的低频抗原。

1966 年, 一份 70 岁男性晚期癌症患者 F. Raddon (FR) 的血液样本被转送到布里斯托尔输血中心, 研究一种在生理盐水和白蛋白中有活性的抗体, 通过间接抗球蛋白技术检测到该抗体与一种低频抗原强反应。在 SephadexA-50 上分离后, 在 IgG 组分中发现了该抗体, 并与抗 IgG 反应。该抗体不凝集或致敏无花果蛋白酶或木瓜蛋白酶处理后的唯一不相容的供体 (Noble) 的红细胞。1953 年使用的 8 个供体都无法找到, 也没有其他样本与 Raddon 血清发生反应。

对 Noble 细胞上存在的低频抗原进行研究, 结果显示:

(a) Noble 细胞 (以及之后发现的 FR 反应阳性细胞) 上不存在以下抗原: C^w, C^x, Rh 30, Rh 32, Rh 33, Rh 35, Be^a, Z^d, Mⁱ, M^g, Mⁱ^a, V^w, M^u, Hⁱ, N^y^a, Cⁱ^a, T^m, S^j, Rⁱ^a, S^t^a, W^r^a, S^w^a, T^r^a, Jⁿ^a, P^t^a, O^r^a, B^p^a, M^o^a, S^k^a, Rⁱ^a, W^b, G^f, W^u, B^y, H^olⁱs^te^r, Mⁱd^de^l, Fⁱn^la^y, P^ea^co^ck, G^la^ddⁱn^g, M^ar^ri^ot^t, W^et^z.

(b) FR 血清与以下抗原无反应: C^w, C^x, Rh 30, Rh 32, Rh 33, V, V^S, Z^d, Mⁱ^I, Mⁱ^{II}, Mⁱ^V, T^m, S^j, Mⁱ, M^t^a, S^u^l, M^g, M^v, H^e, H^u, Rⁱ^a, V^r, F^ar, L^u 1, L^u 14, K, K^p^a, J^s^a, W^k^a, K^w, K^o(K^x), F^y^x, Y^t^b, Dⁱ^a, B^u^a, C^o^b, Iⁿ^a, B^g^a, B^g^b, W^r^a, S^w^a, R^d, S^k^a, Jⁿ^a, W^u, L^s^a, W^b, J^e^a, P^t^a, G^f, B^y, H^ei^be^l, G^oo^d, H^ey, B^an^ks, J^on^es, H^olⁱs^te^r, Mⁱd^de^l, R^ei^te^r, B^ow^ye^r, Bⁱo-5, T^ar^ge^tt, Lⁱv^es^ey, D^ou^gh^ty, P^arⁱs.

由于患者 FR 在本研究开始后不久就死亡了, 因此 FR 血清的供应有限。用 FR 血清对布里斯托尔输血中心的献血者进行筛选, 间接抗球蛋白法筛选后的上清液被保存下来, 汇集并重复使用, 直到滴度降低到 1: 16。抗血清的体积逐渐增加到 4: 1, 以补偿稀释; 对照 FR(+)细胞的反应一直是最大强度。在 4929 个随机 O 型献血者中, 又检测到 3 个 FR(+), 均与 Noble 细胞的放散液发生反应。2 名献血者没有近亲。图 1 中的两个家系研究显示, FR 抗原与 MNSs 系统有关, 在 No.家系中, FR 与 M^s 共同遗传, 在 Vi.家系中, FR 与 M^S 共同遗传。两个家系都没有交换。在 No.家系中, II-1 和 II-3 的 z₁ 计数为 2: 0。在 Vi.家系中, II-2、-3、-4 和 II-6、-8、-9 的 z₁ 计数均 3: 0, 且第 III 代有 3 个非重组 III-1, -4, -5。

当用 FR(+)细胞筛选布里斯托尔输血中心接收的产前样本时, 在 Lane (JL) 夫人的血清中发现了第二种抗体, 它与 4 个无血缘 FR(+)样本中的 3 个发生反应。JL 夫人无输血史, 且她丈夫的细胞与她的血清和 FR 血清相容, 因此认为 JL 抗体是自然产生的。JL 抗体在 20℃生理盐水和白蛋白中反应最佳, 并在 20℃致敏后与抗 IgG 产生最佳的抗球蛋白反应。JL 抗体与酶处理后的 FR(+)细胞没有反应。

FR 和 JL 抗体的区别在于: FR 抗体能与 Mⁱ III AY(+)和 Mⁱ IV 样品发生弱反应, 而无论通过直接凝集法还是通过间接吸收法, JL 血清都不能与 Mⁱ III AY(+)和 Mⁱ IV 样品发生反应。与 FR 和 JL 血清发生反应的英国献血者样本中, 没有一个与 Miltenberger 系列已创建的 5 种抗血清反应阳性, 但这种新的抗原显示与 MNSs 系统密切相关。

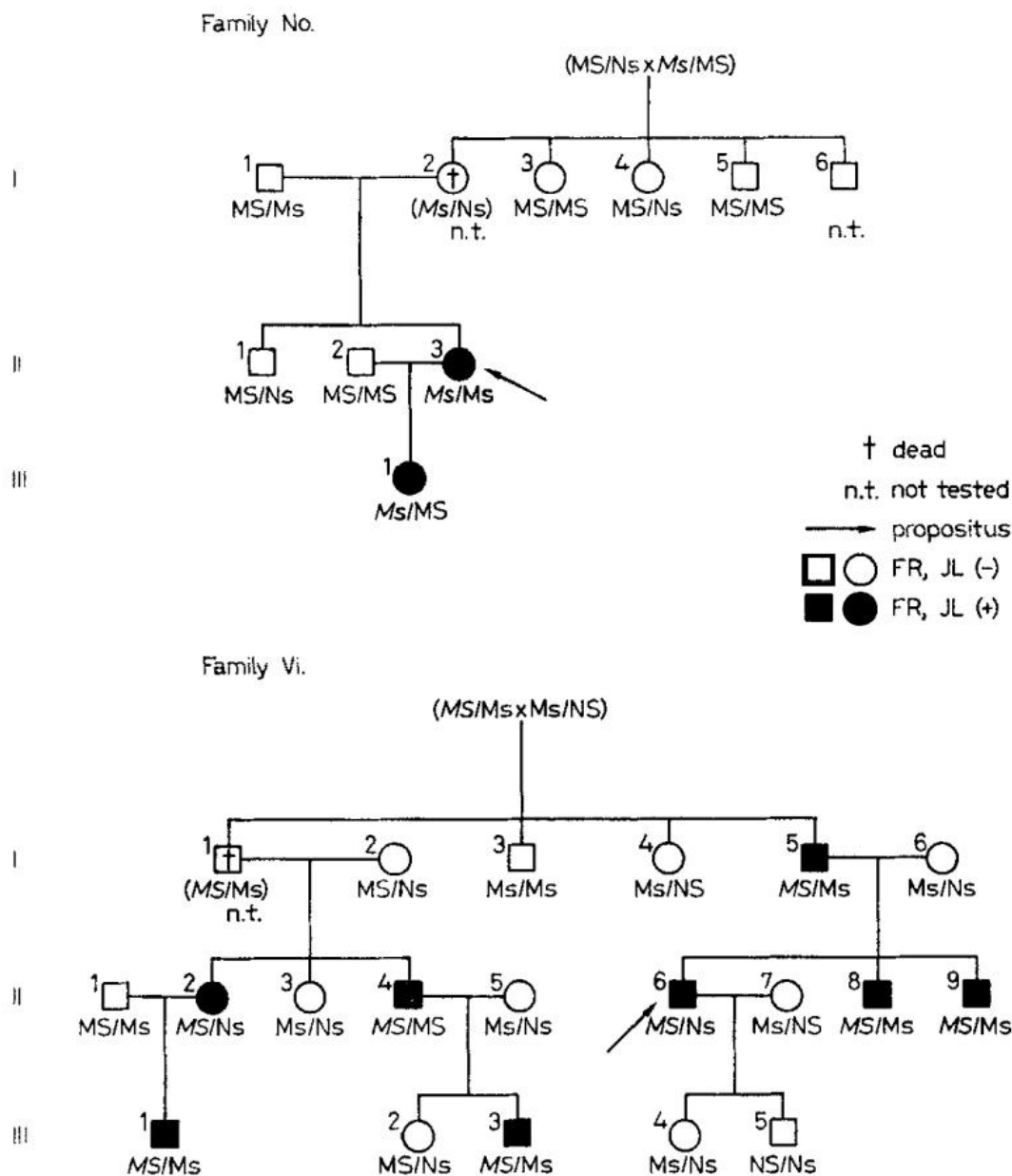


图 1 FR, JL(+)家系研究。Ms 和 MS 显示与 FR, JL 抗原共同遗传。

10 《Three antibodies of the MNSs system and their association with the Miltenberger complex of antigens. III. Anek, Raddon and Lane antisera in relation to each other and the Miltenberger complex》

《MNSs 系统的三种抗体及其与 Miltenberger 系列抗原的关联——III. Anek、Raddon 和 Lane 抗血清彼此之间及与 Miltenberger 系列的关系》

作者: Giles CM, Chandanayingong D, Webb AJ

作者单位: 英国伦敦 MRC 血型参考实验室; 泰国曼谷 Siriraj 医院输血服务中心; 英国布里斯托尔输血中心

来源: Vox Sang. 1977;32(5):277-9.

摘要: 讨论了 Anek、Raddon 和 Lane 抗血清与 Miltenberger 子系统的关系。

如 Chandanayingyong 等所述, Anek (AY) 血清有一种与泰国 7% 的 Mi III 样本发生反应的抗体。随后发现其他 2 种细胞类型与 AY 血清发生反应: Mi(-) FR, JL(+) 和 Mi IV (T. E. Cleghorn 博士惠赠)。Raddon (FR) 血清与 Mi III AY(+) 和 Mi IV 样品发生反应, Lane (JL) 血清不与 Mi III AY(+) 和 Mi IV 样品发生反应。细胞与血清的交叉反应性见表 I。Mi III AY(+) 样品比 Mi(-) FR, JL(+) 样品与 FR 血清的反应弱, 而 Mi(-) FR, JL(+) 样品比 Mi III AY(+) 样品与 AY 血清的反应弱。AY 和 FR 血清的吸收实验如表 II 所示。这两种抗血清似乎都是单特异性的, 因为每种情况下的吸收细胞都能够去除针对每种细胞类型的抗体。Mi III AY(+) 和 Mi(-) FR, JL(+) 细胞的放散液和 FR 血清均与两种细胞类型发生反应。Mi III AY(+) 细胞没有从 JL 血清中去除抗体, 据推测 (虽然未检测) Mi IV 细胞不会影响 JL 血清的反应性。

表 I Anek、Raddon 和 Lane 血清的交叉反应

	Anek, tested at 20°C		Raddon, tested at		Lane, tested at 20°C		
	spin saline	spin albumin	20°C spin albumin	37°C AGT	saline	albumin	AGT
Thai Mi III AY(+)	+++	++++	+++	+++ (4) ¹	-	-	-
Thai Mi III AY(-)	-	-	-	-	-	-	-
Thai Mi(-) AY(-)	-	-	-	-	-	-	-
British Mi IV	+++	+++	+++	++	-	-	-
British Mi(-) FR, JL(+)	(+)	+++	+++	++++ (32) ¹	+++	+++	+++

AGT = Antiglobulin test.

¹ (4) and (32) titres with Raddon serum.

表 II AY 和 FR 血清的吸收实验

	Anek, 20°C, albumin spin					Raddon diluted 1:4, 37°C, AGT				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Thai Mi III AY(+)	+++	+++	w	-	++	+	++	-	n.t.	-
Thai Mi III AY(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	-
British Mi IV	+++	+++	-	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
British Mi(-) FR, JL(+)	+++	+++	-	-	w	++++	++++	+	n.t.	-

AGT = Antiglobulin test; n.t. = not tested; w = weak reaction; 1 = unabsorbed; 2 = absorbed with Mi III AY(-); 3 = absorbed with Mi III AY(+); 4 = absorbed with Mi IV; 5 = absorbed with Mi(-) FR, JL(+).

很难对这些复杂的相互作用作出解释。Cleghorn 在他关于 Miltenberger 的论文中认为, 在他能够定义的 4 种特异性 (血清) (Venvyst, Miltenberger, Murrell 和 Hill) 中, 只有 Miltenberger (Mi^a) 血清是多特异性的。随后发表的和未发表的关于这些抗体的研究表明, 一些血清具有交叉反应性, 另一些血清具有可分离的特异性。Chandanayingyong 和 Pejrachandra 通过吸收试验成功从 2 种血清 (1 种具有抗 Mur+Hut, 1 种具有抗 Mi^a) 中产生单特异性抗 Hut, 但他们清楚地显示了大多数其他试剂的交叉反应性。因此, 在 Miltenberger 子系统中, 很难确定哪些抗血清是真正的单特异性的, 哪些是交叉反应的。可以推测, 观察到的 Anek 和 Raddon 血清之间反应重叠是由于交叉反应性, 因为它们与不同细胞类型显示不同强度反应, 在这种情况下只有 2 个新的特异性被发现, 即抗 Mi III AY(+), Mi IV 抗体和抗 Mi(-) FR, JL(+) 抗体。Lane 血清中的抗体本身已被证明属于 MNSs 系统, 但如果没有 Raddon 血清, 就不会将 Lane 血清与 Miltenberger 系列相关联。如

果首先发现 Hil 与 Mi V 的反应性，情况也是如此。虽然很容易创建新的 Miltenberger 系列的细胞类型，但作者觉得，向现有 5 种抗血清和细胞类型添加 3 种新抗体和 2 种新细胞类型，可能使体系太繁琐；然而，至少以这种方式安排，3 种抗体的相互关系更清楚（表 III）。

表 III Miltenberger 亚类型的可能扩展

Cell classes	Antisera							
	Verwyst	Miltenberger	Murrell	Hill	Hut ¹	Anek	Raddon	Lane
<i>Classes</i>								
I	+	+	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	+	-	-	-
III	-	+	+	+	-	-	-	-
IV	-	+	+	-	-	+	(+)	-
V	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Possible new classes</i>								
VI	-	+	+	+	-	+	(+)	-
VII	-	-	-	-	-	(+)	+	+

+ = Positive; (+) = weak positive, - = negative.

¹ An alternative interpretation of Cleghorn [3] and his definition of anti-Hut appears in Race and Sanger [5].

将 Miltenberger 系列这样扩展后，在可能的 2 种新的细胞类型 VI 和 VII 中，没有观察到 MNSs 抗原的意外反应；除了已经报道的 MM Mi III 样本中 N 表达增加也适用于 Mi VI。FR,JL(+)样本与常规 MNSs 血清反应正常。Anek 先生比较特殊，他既有一些 Miltenberger 抗原，又有一种与 Miltenberger 子系统密切相关的抗体。Mi III 和 Mi IV 表型之间的关系很难评估，因为迄今只有一个家系有 Mi IV 反应性，但似乎 Mi III 和 Mi IV 表型之间的关系非常紧密。

补遗

在接受本报告后，发现 Raddon 血清与 Mi IV（3 名家系成员）发生反应，因此对文本和表格进行了修改。未吸收的 Raddon 血清与 Mi IV 细胞无反应，但吸收去除抗 A 和抗 B 后，得到了阳性结果。这一结果表明，该反应可能依赖于 pH。

11《A new Miltenberger class detected by a second example of Anek type serum》

《用第 2 例 Anek 血清检测到一种新的 Miltenberger 类型》

作者: Dybkjaer E, Poole J, Giles CM
作者单位: 丹麦维兹奥勒医院; 丹麦哥本哈根大学; 英国伦敦血型参比实验室
来源: Vox Sang. 1981 Nov-Dec;41(5-6):302-5.

摘要: 在相容性检测中发现一种不完全 IgG 抗体，与 Miltenberger 系列的一种血清 Anek 特异性相同。该名献血者的细胞代表了一种新的 Mi 类型，VIII，同时有在 Mi.IV、VI 和 VII 细胞上发现的抗原决定簇。

Cleghorn 在 1966 年回顾了 Miltenberger 系列抗体和抗原的复杂性，并用四种分型抗血清定义了四种细胞类型。Crossland 等报道了第五种类型，仅与抗 Mi^a 阴性的 Hil 血清有反应。另外两个类型（Mi.VI 和 Mi.VII）由 Giles 等初步提出，并通过随后的测试正式建立。Mi.VI 和 Mi.VII 由三种血清定义，其中两种（Anek 和 Raddon）

表现出相反的交叉反应性。已报道另一例 Raddon 抗体引起输血反应，但没有报道新的 Anek 或 Lane 血清。本报告描述了第 2 例 Anek 特异性，由与 Miltenberger 系列血清具有新的反应模式的一例细胞样本检测到。

一位 B 血型患者 E.L.因慢性肺病入院，需输血，进行配血。她无输血史，有 2 次妊娠。使用 IgG 抗球蛋白技术，发现只有 B 型献血者 D.J.的细胞与患者 E.L.的血清不相容。患者 E.L.的血清在吸收去除抗 A 后，与其丈夫的 A 型细胞不反应。经无花果酶或木瓜蛋白酶处理后，献血者 D.J.的细胞与患者 E.L.的血清相容。这个问题被提交到伦敦，在那里发现 D.J.细胞与 Anek、Raddon 和 Lane 血清反应，将其归类为 Mi.VII，但其他 Mi.VII 细胞样本与 E.L.血清不反应。

E.L.血清的血清学检测见表 I。按 Judson 和 Anstee 描述的方法用胰蛋白酶处理细胞，已知可以消除所有红细胞 M 和 N 活性，而‘N’、S、s 和 U 不受影响。E.L.血清中含有抗 Vw 和与 Anek 血清特异性相同的抗体。D.J.细胞与 Miltenberger 血清的反应格局（表 II）与任何已知的 Mi 类型都不匹配（表 III）。献血者 D.J.的家系研究表明，她的细胞上的抗原决定簇是遗传的，并与 Ns 共同遗传（图 1）。MNSs 表型的 D.J.父亲的细胞上 N 和 s 抗原决定簇的表达看起来很正常。D.J.细胞与龙爪槐和野大豆凝集素不反应。

E.L.血清具有抗 Vw 和 Anek 特异性。Vw 抗原决定簇是胰蛋白酶敏感的，但由 Anek 和 Lane 血清检测到的抗原决定簇是胰蛋白酶不敏感的（表 I）。当抗原决定簇对胰蛋白酶不敏感时，胰蛋白酶处理会增强反应性。只有在胰蛋白酶处理后，E.L.血清对 Mi.VII 细胞的活性才明显可见，这表明 E.L.血清与 Anek 血清一样，对 Mi.IV 和 Mi.VI 的反应性强于对 Mi.VII 的反应性。然而，对于 Anek，在吸收实验中发现其活性是交叉反应的。D.J.细胞与 Mi.VII 细胞的不同之处在于，D.J.细胞与 Anek（和 E.L.）血清的反应性更强（表 I）；与 Mi.IV 和 Mi.VI 的不同之处在于，D.J.细胞与 Lane 反应（表 III）。因此，作者们建议将 D.J.及其 E.L.（Anek）阳性亲属的细胞归入一种新的 Mi 类型，VIII，与 Ns 共同遗传。Mi.VIII 细胞似乎具有 2 个抗原决定簇：第 1 个是 Mi.IV 和 Mi.VI 共有的抗原决定簇，可被 Anek（和 Raddon）血清检测到；第 2 个是 Mi.VII 有的抗原决定簇，可被 Lane 血清检测到，Lane 血清是单特异性的，没有交叉反应（Anek 和 Raddon 是多特异性的，有交叉反应）。Giles 等在其报告中评论说，这三种血清（Anek、Raddon 和 Lane）可能只检测到 2 个新的抗原决定簇，本报告表明这是一个正确的解释。

表 I Mi.I~VII 和 D.J.细胞在 LISS 离心 IgG 抗球蛋白试验中与 E.L.血清的反应结果，与在盐水离心试验中与 Anek 血清的反应结果对比

Sera	Cells							
	MiI	II	III	IV	V	VI	VII	D.J.
E.L.								
Untreated	+++	-	-	+++	-	+++	(+)	++++
Trypsin-treated	-	-	-	+++	-	+++	+++	++++
Anek								
Untreated	-	-	-	+++	-	+++	(+)	++++
Trypsin-treated	-	-	-	++++	-	++++	+++	++++

表 II 胰蛋白酶处理前后，D.J.细胞与 Miltenberger 血清反应结果

Cells	Antisera								
	Saline spin							AGT	
	Mi ^a	Vw	Hut	Mur	Hil	Anek	Lane	Raddon	Lane
Untreated									
D.J.	-	-	-	-	-	++++	-	+++	+++
+ control	+++	+++	++++	++++	+++	+++	-	++++	++++
- control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trypsin-treated									
D.J.	-	-	-	-	-	++++	++++	+++	+++
+ control	+++	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++
- control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AGT antiglobulin test.									

表 III Mi.I~VII 和 D.J.细胞 (Mi.VIII)

Cell classes	Type sera							
	Mi ^a	Vw	Hut	Mur	Hil	Anek	Raddon	Lane
Mi I	+	+	-	-	-	-	-	-
Mi II	+	-	+	-	-	-	-	-
Mi III	+	-	-	+	+	-	-	-
Mi IV	+	-	-	+	-	+	(-)	-
Mi V	-	-	-	-	+	-	-	-
Mi VI	+	-	-	+	+	+	(-)	-
Mi VII	-	-	-	-	-	(-)	+	+
Mi VIII (D.J.)	-	-	-	-	-	+	+	+
(-) = Weak positive reaction due to minor component of cross-reactivity.								

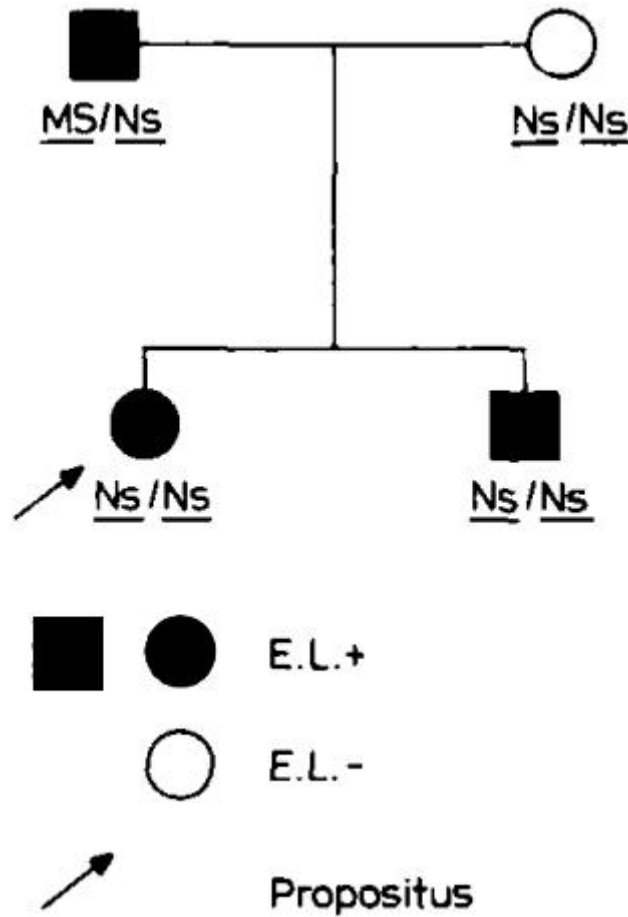


图 1 D.J.家系研究

12 《Serological activity of low frequency antigens of the MNSs system and reappraisal of the Miltenberger complex》

《MNSs 系统的低频抗原的血清学活性和 Miltenberger 复合物的重新评价》

作者: Giles CM

作者单位: 英国伦敦血型参比实验室

来源: Vox Sang. 1982;42(5):256-61.

摘要: 对 MNSs 系统的低频抗原进行了对胰蛋白酶处理的敏感性测试, 并将其分为两个不同的组。提出了一种基于抗原决定簇而不是血清的 Miltenberger 复合体的新解释。

1 引言

MNSs 血型系统有大量的低频抗原。这些低频抗原紧密相关, 可能是 MNSs 血型系统的一个基本组分。第一个被报道的是 Hu, 于 1934 年报道。目前发现的低频抗原有: He, Mi^a, Vw, M^g, Vr, M₁, Mur, Ri^a, St^a, Mt^a, Hil, Cl^a, Ny^a, M^v, Sul, Far/Kam, Anek, Raddon, Lane, 以及最近增加的 Mit。M 和 N、S 和 s 是等位基因对, 彼此紧密相关, 其所在基因座已定位到第 4 染色体 q28 到 q31 区域。红细胞膜的两种主要唾液糖蛋白, α-和δ-组分, 或称血型糖蛋白 A 和 B, 分别表达 MN 和 Ss 活性。α-组分对胰蛋白酶敏感, δ-组分对胰蛋白酶不敏感。据

报道， α -组分上的胰蛋白酶裂解位点在残基 31 和 39 的区域。因此似乎可以将低频抗原定位到 α -组分的 MN 胰蛋白酶敏感部分，或定位到 δ -组分的 Ss 'N' U 胰蛋白酶不敏感部分，注意部分 MN 糖蛋白对胰蛋白酶不敏感， β -和 γ -组分（目前未发现有红细胞决定簇）都对胰蛋白酶敏感。

本报告通过将罕见 MNSs 抗原在血清学上细分为胰蛋白酶敏感和胰蛋白酶不敏感的类型，来扩展对这些抗原的知识。以抗原决定簇而不是“血清”来表达 Miltenberger 复合体（现在有 8 个细胞类型），使之简化。

2 材料和方法

这些罕见的红细胞样本尽可能在新鲜时使用。否则，在-20℃下保存在 40%甘油中，使用前用等渗盐水透析。

所使用的罕见抗血清如下：

Hu	1 serum Sext (reported by <i>Wright</i> et al. [33] as first possible example of human anti-Hu)
M ^g	2 sera; Har and Hog
M ₁	1 serum; Mee, checked by absorption
Cl ^a	2 sera; 492 and 753, 1 checked by absorption (492)
Ny ^a	3 sera; 5266/81, Gud, Sey
Vw	5 sera; Bed, Mee, 623, E.L., Lim, the first 4 were checked by absorption
Hut	4 sera; Soros and Hut 8, specific anti-Hut; and Ruff, Hut/Mur, MWMBB Lot 23 Vw/Hut, 1 checked by absorption (Ruff)
He	1 serum; Gamma 41976
St ^a	2 Sera; Ath and Brid
Mt ^a	2 sera; Mart, Cor, 1 checked by absorption (Cor)
M ^v	2 sera; N. A. and Moon
Far/Kam	2 sera; Far and Szokol
Mit	2 sera; Mit and Bin, 1 checked by absorption (Bin)
Mur	3 sera; Lam, Nip, McG, 1 checked by absorption (McG)
Hil	1 serum; Hil
Anek (Hop)	3 sera; Anek, E.L., Bin, 1 checked by absorption (Anek)
Lane (Nob)	2 sera; Lane and Rad

根据 Judson 和 Anstee 描述的方法用胰蛋白酶处理细胞, 生化研究显示此法可以完全去除 M 和 N (而不是 'N') 抗原决定簇。胰蛋白酶裂解是否完成, 可以通过血清学方法确认: 用人源抗 M 检测 M 和 MN 细胞是否失去活性, 或用人源抗 M^g 检测 M^g 细胞是否失去活性。结晶牛胰蛋白酶 (Sigma) 2.5 mg/ml 溶解在 0.1M

磷酸钠缓冲盐水中，pH 为 8.0。将 1ml 胰蛋白酶溶液与 0.25ml 洗涤后的压积细胞混合，37℃ 水浴 30 min。处理后的细胞在使用前用生理盐水洗涤三次。

用等体积（未经处理或胰蛋白酶处理）的压积细胞吸收血清，并在最适反应活性温度（37 或 4℃）下孵育 1 h。由于所使用的红细胞样本稀少，不可能重复吸收。

抗血清的检测要么使用 18℃ 盐水法，孵育后 1000 rpm 离心 1 min，显微镜检；要么使用 IgG 抗球蛋白试验，玻片法或低离子强度溶液（LISS）试管离心法。

3 结果

使用每种抗血清的最佳技术直接检测许多 MNSSs 相关抗原的胰蛋白酶敏感性。在可能的情况下，每种抗体特异性使用多个抗体检测，并用胰蛋白酶处理后的反应细胞吸收来确认直接试验的结果。仅用人源抗血清评估胰蛋白酶的敏感性，结果总结在表 I 中。两例含有抗 Hut 特异性的抗血清显示，Mi.II 细胞上的抗原决定簇对胰蛋白酶敏感（表 II）。如果一个抗原决定簇对胰蛋白酶不敏感，胰蛋白酶处理有时会增强其血清学活性；表 III 用 Anek 血清说明了这一点。表 IV 示验证性吸收实验的典型结果。抗 Cl^a（492）与胰蛋白酶处理过的细胞产生非特异性反应，因此需要进行吸收试验，结果显示 Cl^a 抗原决定簇对胰蛋白酶处理敏感。抗 Mt^a（Cor）直接试验和吸收试验结果显示，Mt^a 抗原决定簇对胰蛋白酶不敏感。胰蛋白酶处理前后，不同 Mi 类型细胞与多特异性抗 Mi^a 和一些抗 Mur/Hut 的反应，往往由于交叉反应性很难解释，除非对一个抗原决定簇的反应性为主，否则无法得出结论。

表 I 用人源抗血清检测 MNSSs“卫星”抗原对胰蛋白酶的敏感性

Trypsin sensitive	(M, N), Hu, Mg, M ₁ , Cl ^a , Ny ^a Vw, Hut
Trypsin insensitive	(‘N’, S, s, U) He, St ^a , Mt ^a , M ^v , Far/Kam, Mit Mur, Hil, Anek (Hop), Lane (Nob)
Not tested: Ri ^a , Vr, Sul.	

表 II 用交叉反应性抗血清检测 Hut 对胰蛋白酶的敏感性

	Mi				
	I	II	III	IV	VI
<i>Ruff anti-Mur/Hut</i>					
Untreated	-	++++	+++	+++	+++
Trypsin-treated	-	-	+++	+++	+++
<i>MWMBB Lot 23 anti-Vw/Hut</i>					
Untreated	+++	+++	-	-	-
Trypsin-treated	-	-	-	-	-

Strength of positive reactions in decreasing order
 +++, ++, +, (+), w; -negative.

表 III 用 Anek 血清检测胰蛋白酶处理后细胞的活性增强，特别是 Mi.VII

	Mi					
Anek	III	IV	V	VI	VII	VIII
Untreated	-	+++	-	+++	(+)	+++
Trypsin-treated	-	++++	-	++++	++++	++++

表 IV 通过直接检测和吸收试验来评估胰蛋白酶的敏感性

492, anti-CI ^a	Unabsorbed		Absorbed with CI (a+) T		Absorbed with CI (a-) T	
	U	T	U	T	U	T
Caldwell CI (a+)	+++	+++	+++	-	+++	-
OR ₁ r CI (a-)	-	+++	-	-	-	-
Cor, anti-Mt ^a	Unabsorbed		Absorbed with Mt (a+) T			
	U	T	U	T		
Davis Mt (a+)	++++	++++	w	++		
Lov Mt (a-)	-	-	-	-		

U = untreated cells; T = trypsin-treated cells.

4 讨论

本报告的数据显示，MNSs 血型系统的低频抗原可根据其对胰蛋白酶处理的敏感性进行分类。M^g 和 Vw 的敏感性之前已有记录。M₁ 作为 M 的一种过表达形式，应该是胰蛋白酶敏感的，本研究结果显示的确如此。如果 Sext 血清具有抗 Hu 特异性，那么 Hu 抗原决定簇应该是胰蛋白酶敏感的，因为它已经在缺乏 δ -组分的 S-s-U-样本中检测到。分别具有抗原决定簇 Vw 和 Hut 的 Mi.I 和 Mi.II 细胞在 β -组分的区域中均有 PAS 染色异常。不出意料，我们发现红细胞上的这两个抗原决定簇都是对胰蛋白酶敏感的。这些抗原决定簇是否位于 α -或 β -组分上，有待于生化研究。

胰蛋白酶不敏感的抗原决定簇可能位于 Ss 唾液糖蛋白 (δ -组分) 上，但不能排除部分靠近红细胞膜的 α -组分。据目前的记录，S-s-U-样本上没有 He (Henshaw)，生化研究显示 He 抗原可能源自正常 'N' 序列中的一个氨基酸取代，因此它应该是胰蛋白酶不敏感的。St^g 抗原在一个抗 Lepore 型的杂交分子上发现，生化分析显示其对胰蛋白酶不敏感。据目前的记录，Mt (a+) 样品没有异常的 MNSs 反应性，而 M^v (+) 样品同时有缺失或异常的 'N' 和异常的 s。因此，现在认为 M^v 与 Ss 的关系比 MN 更密切。Far/Kam 是一种独特的 MNSs 相关抗原，对无花果蛋白酶和木瓜蛋白酶不敏感，所以认为它对胰蛋白酶不敏感。这种血清学反应性是否将 Far/Kam 抗原决定簇从 MNSs 系统排除还有待观察，但该抗原决定簇仍然与 MNSs 密切相关。Mit 在四个家系中与 MS 共同遗传，S 抗原决定簇在其中两个家系中弱表达。类似地，Mur、Hil 和 Anek 与一种异常的 δ -组分共同遗传，且对胰蛋白酶不敏感。Lane (或 Mi.VII) 与正常的 M、S 和 s 抗原共同遗传，但对胰蛋白酶不敏感。

现在看来，根据胰蛋白酶的敏感性，Miltenberger 复合物有两组抗原决定簇。Hut 是 Mi.II 上的抗原决定簇，而不是 Mi.II、III、IV 和 VI 所共有的。Mur 抗原决定簇由 Mi.III、IV 和 VI 共有，Hil 抗原决定簇由 Mi.III、V 和 VI 共有。Giles 等认为，Anek 和 Raddon 血清虽然都与 Mi.IV、VI 和 VII 的细胞发生反应，但可能只检测 Mi.IV 和 VI 共有的以及 Mi.VII 上的两个抗原决定簇。最近发现的另外 2 例 Anek 型血清 (1 例源自名为 E.L. 的个体，用该血清检测到一种新的 Mi.VIII 类型；1 例源自名为 Bin 的个体，与抗 Mit 共同存在) 证实了这一解释。如果 Miltenberger 复合体作为一个实体存在，那么 Mi^a 作为一个抗原决定簇可能就不存在了。没有生化数据表明，Mi.I、II、III、IV、VI 和可能的 V 类的 Mi (a+) 细胞共有异常 α -或 δ -组分。抗 Mi^a 血清被认为是多特异性的，具有可分离和交叉反应的抗体。我们的结果发现，一些抗原决定簇对胰蛋白酶敏感，一些对胰蛋白酶不敏感，这证实了 Mi^a 的异质性。通过考虑抗原决定簇而不是“血清”，Miltenberger 复合物被简化 (表 V)。一些抗原决定簇只属于一个类型 (如 Vw 和 Hut 分别只属于 Mi.I 和 II)，而其他抗原决定簇是共有的 (如 Mur 和 Hil)，与特异性抗血清的反应强度相同。三种“血清”Anek、Raddon 和 Lane 定义了两个抗原决定簇 Hop (来自 Hopper，第一例 Mi.IV 细胞) 和 Nob (来自 Noble，第一例 Mi.VII 细胞)。最新的 Mi.VIII 同时有 Hop 和 Nob 抗原决定簇。Raddon 和 Lane 定义了两个抗原决定簇 Hop (来自 Hopper，第一类 IV 细胞) 和 Nob (来自 Noble，第一类 VII 细胞)。最新的 Mi.VIII 类被认为同时有 Hop 和 Nob 抗原决定簇。

表 V 修正的 Miltenberger 复合物，由 6 个抗原决定簇衍生，产生 8 个类型

Cell classes	Determinants					
	Vw	Hut	Mur	Hil	Hop	Nob
Mi I	+	-	-	-	-	-
II	-	+	-	-	-	-
III	-	-	+	+	-	-
IV	-	-	+	-	+	-
V	-	-	-	+	-	-
VI	-	-	+	+	+	-
VII	-	-	-	-	-	+
VIII	-	-	-	-	+	+
	Trypsin sensitive			Trypsin insensitive		

很明显，对这些罕见的抗原决定簇的生化调查将补充血清学数据。如果提出的 Miltenberger 复合物的抗原决定簇概念是正确的，那么研究与 Mi.III、IV 和 VI 相关的异常 δ -组分是 Mur 抗原决定簇特有，还是也与 Hil 相关，将是有趣的。迄今为止，所调查的大多数抗原决定簇都具有不寻常的血清学和/或生化特征。抗原决定簇如 Cl^a、Ny^a、Mt^a、Far、Hop 和 Nob 伴随血清学正常的 MNSs 抗原决定簇出现，其中 Cl^a、Ny^a、Hop 和 Nob 进行了生化研究，发现它们伴随正常的 α -和 δ -组分出现。

本研究使用胰蛋白酶作为研究工具，得到了有趣的血清学数据。用仅去除唾液酸的唾液酸苷酶的类似研究显示，一些抗原决定簇对唾液酸苷酶敏感，而其他的则不敏感。M^b 不依赖唾液酸，M^v 依赖唾液酸。这种类型的评估，实现完全的去唾液酸化，将产生更多感兴趣的血清学数据。

13 《Miltenberger class IX of the MNS blood group system》

《MNS 血型系统 Miltenberger 第 IX 类》

作者: Skov F, Green C, Daniels G, Khalid G, Tippett P

作者单位: 1 丹麦尼克宾中央医院; 2 英国伦敦医学研究委员会血型单位

来源: Vox Sang. 1991;61(2):130-6.

摘要:

Mi.IX 是 MNS 血型系统 Miltenberger 系列中的一种新的表型，在丹麦的频率为 0.43%。Mi.IX 红细胞是 Mur⁺，但不表达任何其他已确定的 Miltenberger 抗原决定簇。Mi.IX 红细胞与一种新的抗体（抗 DANE）发

生反应。抗 DANE 定义了 Mi.IX 细胞而不是其他 Miltenberger 表型细胞上存在的一种抗原决定簇。已发现 4 例 Mi.IX 先证者。他们的家系表明，Mi^{IX} 基因与 MS 基因簇共同遗传 ($\theta=0.00$ 时 lod 评分 3.69)，Mi^{IX} 基因产生了胰蛋白酶不敏感的 M 抗原。DANE 已分配 ISBT 编号 002032 (MNS32)。用针对 GPA 各种抗原决定簇的人源抗体和单克隆抗体进行的血清学和免疫化学研究表明，Mi.IX 与异常 GPA 分子有关，该分子在氨基酸残基 39 处缺乏胰蛋白酶裂解位点，在残基 34 处保留了胰凝乳蛋白酶裂解位点，其相对分子质量比正常 GPA 少约 1000。据推测，这个 Mi.IX 分子在氨基酸残基 35-39 的区域有一个氨基酸改变，可能还有一个糖基化改变。

1 引言

MNS 是一个高度复杂的血型系统，包含大量的红细胞表面抗原。其中一些，包括 M、N 和 Ena，位于红细胞含量最丰富的富含唾液酸的糖蛋白——血型糖蛋白 A (GPA) 上；其他的，包括 'N'、S、s 和 U，位于一个相关的糖蛋白——血型糖蛋白 B (GPB) 上。GPB 和 GPA 的 N 端 26 个氨基酸残基是相同的，携带 N 或 'N' 抗原。产生 GPA 和 GPB 的基因已经被鉴定出来，它们独立存在，但紧密连锁。一些 MNS 系统抗原与杂交血型糖蛋白有关，这些杂交血型糖蛋白可能由 GPA 分子的 N 端和 GPB 分子的 C 端组成，也可能由 GPB 分子的 N 端和 GPA 分子的 C 端组成。在 MNS 系统中至少包含了 22 种低频抗原。其中 7 种抗原定义了 8 种相关的表型，被称为 Miltenberger 系列，以最初的先证者命名。

在对有红细胞抗原 Vw、Mia、Mur、Hil 和 Hut 存在的家系进行血清学调查后，Cleghorn 提出了 Miltenberger 系列的分类。Cleghorn 最初对具有 5 个抗原的 4 个表型的描述，在识别到与该系列相关的进一步特异性后，被扩展到 8 个表型。Giles 重新评价并改进了该系列的表型分类。Cleghorn 描述的抗 Hut 抗体被 Giles 认为是抗 Hut+Mur。表 1 显示了扩展的 Miltenberger 系列。抗 Mia 可能不作为单独的特异性存在，因此在表 1 中省略了。

表 1 Miltenberger 系列的血清学定义

Class	Vw	Hut ¹	Hut ²	Mur	Hil	Hop	Nob	DANE
I	+	-	-	-	-	-	-	-
II	-	+	+	-	-	-	-	-
III	-	+	-	+	+	-	-	-
IV	-	+	-	+	-	+	-	-
V	-	-	-	-	+	-	-	-
VI	-	+	-	+	+	+	-	-
VII	-	-	-	-	-	-	+	-
VIII	-	-	-	-	-	+	+	-
IX	-	-	-	+	-	-	-	+

1 最初称为 Hut；2 由 Giles 定义。

I-IV 类细胞与被称为抗 Mia 的血清反应阳性，该血清含有抗体混合物。

Miltenberger 表型与 GPA 或 GPB 的异常相关，或与包含这些血型糖蛋白的一部分的杂交分子相关。胰蛋白酶处理完整的红细胞，在氨基酸残基 39 和 40 之间裂解 GPA。部分胰蛋白酶的裂解也可能发生在残基 30 和 31 之间，以及残基 31 和 32 之间。Mi.I 和 Mi.II 表型的细胞分别与胰蛋白酶敏感抗原 Vw 和 Hut 相关，在 GPA 的第 28 位残基处有不同的氨基酸替换，导致一个糖基化改变。Mi.VIII 与胰蛋白酶不敏感抗原 Hop 和 Nob 相关，由残基 49 处的单一氨基酸取代形成；Mi.VII 与 Nob 抗原相关，由 GPA 的 49 和 52 残基处的

氨基酸取代形成。Mi.III、Mi.IV 和 Mi.VI 表型都与胰蛋白酶不敏感抗原 Mur 和相对分子质量增加的异常 GPB 分子有关。这种异常的 GPB 分子可能包含一个 GPA 插入片段。Mi.III 细胞也是 Hil+, Mi.IV 细胞 Hop+, Mi.VI 细胞 Hil+ 和 Hop+。Mi.V 已经被完全表征, 与一个杂交血型糖蛋白相关, 包括 GPAN 端的前 58 个氨基酸残基和 GPB C 端的残基 27-72。Mi.V 细胞为 Hil+, 不携带其他 Miltenberger 抗原 (表 1)。

本报告为本已复杂和繁琐的 Miltenberger 系列又增加了一类, 该先证者的红细胞与抗 Mur 反应。“新”类型 (Mi.IX) 的细胞在已知的 Miltenberger 抗体中, 仅与抗 Mur 反应, 但还与一种以前未鉴定的抗体 (抗 DANE) 反应。

2 材料和方法

2.1 材料

稀有表型的红细胞或由同事赠予, 或通过 UK 或 SCARF 交换计划获得。洗过的红细胞或从“新鲜”血液中制备, 或从 -30℃ 甘油储存液中提取。抗血清是多年来收集的, 有些是礼物, 有些是从以前涉及低频抗原的调查获得的。单克隆抗体 LICR R1.3、LICR R10、LICR R18、BRIC 116、BRIC 119、BRIC 127、BRIC 163, 以及部分抗 M 和抗 N, 由英国布里斯托尔 S.W. 区域输血中心 D. Anstee 博士提供; E4 (单抗 150, 第二届抗人类红细胞和相关抗原的单克隆抗体国际研讨会, 1990 年) 由美国杜克大学医学中心 M. Telen 博士提供; F84.3E8.E2 (单抗 148, 第二届单克隆研讨会, 1990 年) 由美国 Immucor 公司 D. L. Stone 博士提供; 抗 M 和抗 N 由英国弗雷泽、格拉斯哥和苏格兰西输血中心 R. Fraser 博士提供。

2.2 血清学方法

本研究使用标准试管法, 有时用酶处理红细胞。孵育 1 小时或加入白蛋白后, 1000 rpm 离心 1 min, 显微镜下观察凝集结果。抗球蛋白试验离心后肉眼读取试管中结果: 多特异性抗人球蛋白用于人源抗体, 抗小鼠 IgG 用于小鼠单克隆抗体。一些抗血清使用增强介质 LO-ION (美国 Gamma 公司)。用酸放散法 (Elu-Kit II, 美国 Gamma 公司) 制备放散液, 用于血清学检测。

2.3 酶处理

红细胞用木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、链霉蛋白酶或唾液酸酶进行预处理, 如前所述。进行唾液酸酶-胰凝乳蛋白酶修正, 即先用唾液酸酶处理红细胞, 洗涤, 再用胰凝乳蛋白酶处理红细胞。

2.4 免疫化学方法

免疫印迹法如前所述。简单地说, 在十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 2-巯基乙醇的存在下溶解红细胞影, 组分在 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上分离。然后将这些蛋白质电印迹到聚偏二氟乙烯滤膜上, 用牛奶封闭未结合的位点。然后将滤膜与单克隆抗体或人源抗体 (通过抗原阳性红细胞吸收放散制备) 孵育, 洗涤后, 使用辣根过氧化物酶偶联的抗人球蛋白或抗小鼠 IgG, 以 4-氯-1-萘酚为底物, 检测结合抗体。

2.5 连锁研究

为研究 DANE 抗原与 MNS 的关系, 利用 Attwood 和 Bryant 开发的 LYNSKYS v 4.11 软件, 通过 LIPED 分析家系数据。在计算中采用了一个丹麦人群的 MNS 频率。

3 结果和讨论

3.1 抗 DANE 和 Mi.IX 表型

一名患者 (K.G.R.) 无输血史, 因肝硬化和急性呕血入院。在他死前 3 个月的治疗中, 40 个单位的血液与他的血清进行了交叉匹配: 只有 1 个献血者 (Dane.) 的红细胞, 在 K.G.R. 患者第一次输血 6 周后进行测试时, 与 K.G.R. 血清发生反应。K.G.R. 血清中的抗体, 在室温下凝集 Dane 红细胞悬液, 但滴度只有 2。

Dane 红细胞血型为 A CDe/CDe。用抗低频抗原抗体研究 Dane 红细胞, 发现 Dane 红细胞表达 MNS 血

型系统的 Miltenberger 系列的抗原 Mur。含有针对 MNS 相关低频抗原 (He, Vw, M^s, V^r, Mt^a, St^a, Ri^a, Cl^a, Ny^a, Hut, Hil, M^v, Far, s^D, Mit, Dantu, Hop, Nob, Or) 抗体的抗血清, 与 Dane 细胞反应阴性。Dane 细胞与 3 例抗 Mur (含原始抗 Mur) 反应阳性。Dane 细胞还与几例含有 Miltenberger 抗体混合物的血清反应阳性: 这几例血清都含有抗 Mur。通过用 Dane 细胞和 Mi.III 细胞对抗 Mur 进行吸收放散, 证实 Dane 细胞为 Mur⁺。在每一种情况下, 放散液都与 Dane 细胞反应阳性, 也与 Mi.III, Mi.IV 和 Mi.VI 细胞反应阳性, 但与 Mi.II 细胞反应阴性。这种与 Miltenberger 抗血清的反应模式以前没有见过, 因此, Dane 细胞有一个新的 Miltenberger 表型, Mi.IX (表 1)。

Dane 细胞是 M+N+S+s-U⁺。M 抗原是异常的, 因为在胰蛋白酶处理的细胞上仍可以检测到。正常 M+N⁺ 细胞的 M 抗原, 以及 Mi.III, Mi.IV 和 Mi.VI 细胞 (也携带 Mur 抗原) 的 M 抗原, 很容易被胰蛋白酶破坏。Dane 细胞上的 Mur 抗原, 与其他 Mur⁺细胞上的 Mur 抗原一样, 对胰蛋白酶处理不敏感。令人惊讶的是, Dane 细胞上的这种新抗原 (被称为 DANE), 被胰蛋白酶处理破坏。与正常的 M+N⁺细胞一样, M+N⁺ Mi.IX 细胞的 M 抗原不被胰凝乳蛋白酶处理破坏。

发现 Dane 细胞 Mur⁺后, 用其他 Miltenberger 表型细胞检测 K.G.R.血清: 均反应阴性。因此, K.G.R.血清中含有一种新的 Miltenberger 抗体, 抗 DANE, 它可以检测 Mi.IX 表型 (表 1)。

3.2 其他 Mi.IX 先证者

第 2 个 Mi.IX 先证者被发现, 是因为在研究 K.G.R.抗体期间使用了他的 SC:1,2 细胞 (另 2 例 SC:1,2 细胞与 K.G.R.抗体反应阴性)。吸收放散试验表明, 与 K.G.R.血清的反应性是由于 Dane 红细胞上相同的抗原。和 Dane 一样, 第 2 个先证者的红细胞也是 Mur⁺, 并携带对胰蛋白酶不敏感的 M 抗原。

用胰蛋白酶处理丹麦尼克宾法尔斯特地区 467 名随机献血者的红细胞, 用单克隆抗 M (clone BS57, Biotest) 进行检测。2 个献血者的红细胞被凝集, 显示具有胰蛋白酶不敏感的 M 抗原。两人都是 DANE⁺ Mur⁺, 是 Mi.IX 表型。因此, Mi.IX 在丹麦并不少见, 其发生频率为 0.43%。

3.3 家系研究

对全部 4 个先证者的家系都进行了调查; 图 1 示抗-M、-N、-S、-s、-DANE 和-Mur 的检测结果。在每个家系中, 所有 DANE⁺个体的红细胞都与抗 Mur 发生反应, 并具有胰蛋白酶不敏感的 M 抗原。家系研究表明, DANE 为常染色体显性性状, 且与 MS 共同遗传。DANE 与 MNS 未发生重组。在重组分数为 0 时, DANE 和 MNS 的 lod 分数之和为 3.69; 因此, DANE 或是由 MNS 基因座上的基因产生, 或是由与 MNS 基因座密切连锁的基因产生。因此, DANE 是一种新的低频 MNS 抗原, 并分配 ISBT 号 002032 (MNS32)。

胰凝乳蛋白酶先后处理过的红细胞发生反应；BRIC 119 是唾液酸依赖的，其他的不是。R.L.（抗 En^aTS）是一种人源同种异体抗体，由 1 名 GPA 缺陷个体产生。R.L.血清和 BRIC 127 与胰蛋白酶处理或胰凝乳蛋白酶处理的对照细胞没有反应，推测只与氨基酸残基 33 上没有糖基化的 GPA 分子发生反应。所有这些针对胰蛋白酶敏感表位的抗体都与 Mi.IX 细胞发生反应；除 E4 外，都不与胰蛋白酶处理的 Mi.IX 细胞发生反应。BRIC 127 和 R.L.抗体都不与胰凝乳蛋白酶处理的 Mi.IX 细胞反应（表 3）。

R18 检测 GPA 上的一个胰蛋白酶不敏感表位，R1.3 检测 GPA 和 GPB 的 N 端 26 个氨基酸残基所共有的一个唾液酸依赖的表位。两种抗体都与 Mi.IX 细胞发生反应。胰蛋白酶不敏感抗原与 Mi.IX 表型的关联表明，氨基酸残基 39 处的胰蛋白酶裂解位点有变化。尽管 Mi.IX GPA 中的胰蛋白酶裂解位点看起来是丢失了，但大多数抗 En^aTS 抗体与胰蛋白酶处理的 Mi.IX 细胞没有反应，表明 Mi.IX GPA 缺乏的是这些抗体检测的表位。然而，E4 确实与胰蛋白酶处理过的 Mi.IX 细胞发生反应，因此 E4 表位看上去确实存在于 Mi.IX GPA 分子上。E4 不与胰凝乳蛋白酶处理的去唾液酸化的细胞发生反应（表 3），表明氨基酸残基 34 处的胰凝乳蛋白酶裂解位点是完整的。

表 3 针对 GPA 上抗原决定簇的单克隆抗体和人源同种抗体，与 M+N+ Mi.IX 和 M+N+对照细胞的反应

Enzyme treatment	Cells	anti-M	R.L.	R10	BRIC 116	BRIC 119	BRIC 127	E4	R18	R1.3
None	Mi.IX	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	M+N+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trypsin	Mi.IX	+	0	0	0	0	0	+	+	+
	M+N+	0	0	0	0	0	0	0	+	+
Chymotrypsin	Mi.IX	+	0	+	+	+	0	+	+	+
	M+N+	+	0	+	+	+	0	+	+	+
Sialidase	Mi.IX			+	+	0	+	+	+	0
	M+N+			+	+	0	+	+	+	0
Sialidase/ chymotrypsin	Mi.IX			0	0			0	+	
	M+N+			0	0			0	+	

3.5 免疫化学

M+N+ Mi.IX 细胞与单克隆抗 M 的免疫印迹（图 2）显示，存在代表 GPA、GPA 二聚体（GPA2）、GPA 与 GPB 的异源二聚体（GPAB）的条带。然而，与 M+N+对照细胞的 GPA 带相比，M+N+ Mi.IX 细胞的 GPA 带显示迁移率稍有增加，相当于相对分子质量减少了约 1260（来自 8 例单克隆抗 M 的 8 次测定）。家系研究表明，Mi.IX 基因与 MS 基因簇相关，因此抗 M 在 M+N+ Mi.IX 细胞免疫印迹上检测到的 GPA 分子，一定是由 MS^{Mi.IX} 基因产生的 GPA 分子。抗 N 免疫印迹显示 Mi.IX 细胞和 M+N+对照细胞的 GPA 相对分子质量无明显差异[结果未显示]。R18 单抗检测 GPA 胞外结构域的一个胰蛋白酶不敏感抗原决定簇（En^aKT），BRIC 163 单抗检测 GPA 胞质 C 端结构域的一个表位。R18 和 BRIC 163 与 Mi.IX 细胞的染色模式，类似于抗 M 与 Mi.IX 细胞的染色模式，表明 GPA 的相对分子质量减少（图 2，BRIC 163 的结果未显示）。R1.3 单抗检测 GPA 和 GPB N 端的一个共有表位。R1.3 与 Mi.IX 细胞的染色模式也显示 Mi.IX 细胞的 GPA 相对分子质量降低，但 GPB 看起来是正常（图 2）。因此，Mi.IX 似乎与相对分子质量轻微降低的 GPA 分子有关。在 Mi.IX 细胞与抗 GPA 抗体的一些免疫印迹（图 2 中的 X）上，可见相对分子质量 63500 的弱染色带（3 次检测）。这条带的意义尚不清楚，但它可能代表一种降解产物。

胰蛋白酶处理细胞后，与抗 M 进行免疫印迹，M+N+对照细胞没有染色条带，Mi.IX 细胞有 GPA、GPA2 和 GPAB（图 2）。R1.3 在胰蛋白酶处理的对照组细胞的免疫印迹上仅与 GPB 和 GPB2 结合[未显示]，在胰蛋白酶处理的 Mi.IX 细胞的免疫印迹上也染色 GPA、GPA2 和 GPAB。抗 M（和 R1.3）在胰蛋白酶处理的 Mi.IX 细胞的免疫印迹上还染色了另外两个条带，相对分子质量 61000 和 51200（来自 7 次测定）（图 2）。在所有四个家系 Mi.IX 成员红细胞免疫印迹上都可以看到这两个额外条带，而非 Mi.IX 成员红细胞免疫印迹上都没有这两个条带。胰蛋白酶处理细胞的实验结果证实了 Mi.IX 与 N 端不被胰蛋白酶裂解的 GPA 分子

相关。这两个额外条带（图 2 中的 T1 和 T2）的意义尚不清楚。其中一个可能代表 Mi.IX GPA 与胰蛋白酶裂解的正常 GPA 的二聚体，也可能代表 Mi.IX GPA 与一些 Mi.IX GPA 分子的片段（胰蛋白酶在氨基酸残基 39 处的主要裂解位点之外的其他位点进行裂解）的二聚体。

R10 单抗检测 GPA 上 26 和 39 氨基酸残基之间的一个胰蛋白酶敏感表位，也在 Mi.IX 细胞的免疫印迹上显示了 GPA、GPA2 和 GPAB。然而，用 R10 单抗染色时，GPA 相对分子质量下降不明显，且与对照组 M+N+细胞相比，Mi.IX 细胞的 GPA 染色强度降低（图 2）。R10 在胰蛋白酶处理的 Mi.IX 或对照细胞的免疫印迹上没有条带。这些结果进一步证明了 R10 与 Mi.IX GPA 不反应。

通过抗 N、R1.3、人源抗 S 或单克隆抗 GPB（F84.3E8.E2）的免疫印迹检测，Mi.IX 细胞的 GPB 表现正常。

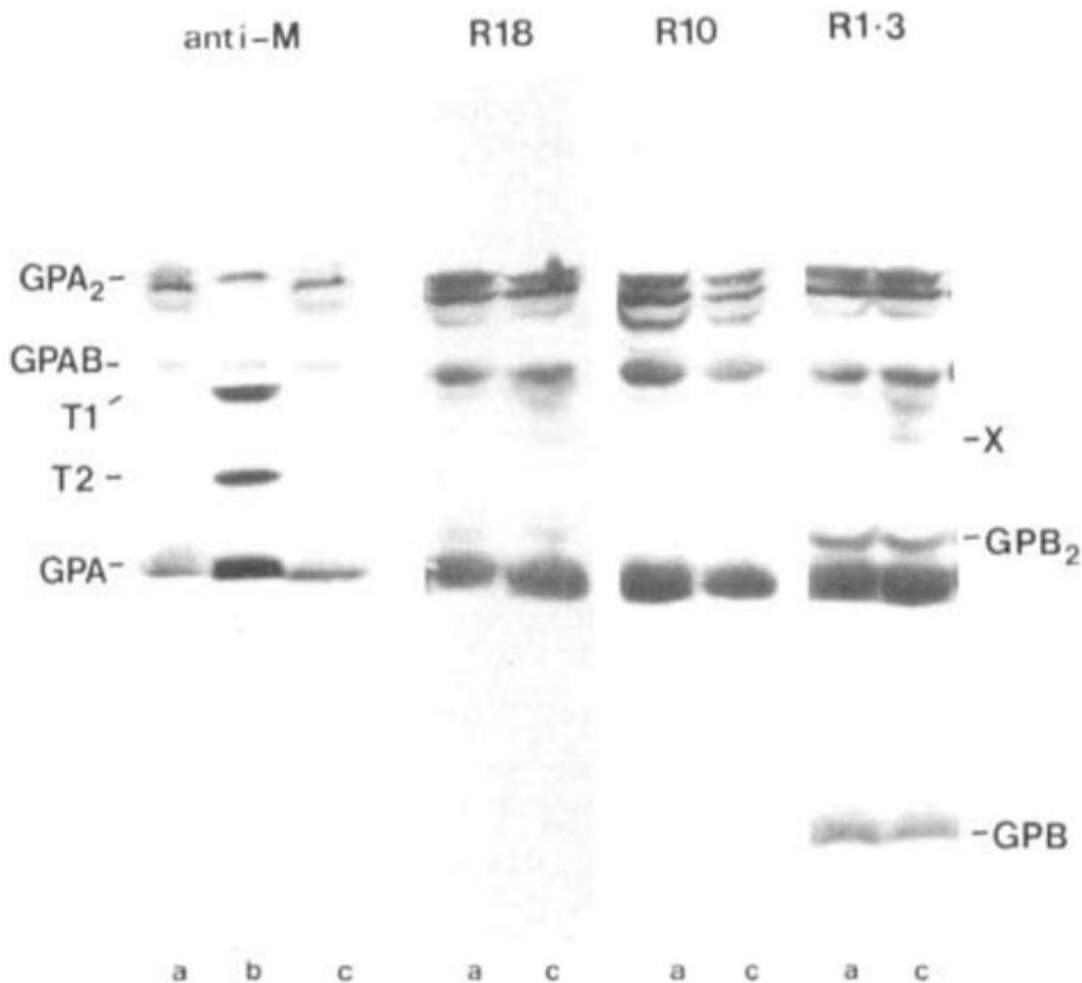


图 2 用检测 GPA 上的不同表位的单克隆抗体染色的免疫印迹。a M+N+对照细胞。b 胰蛋白酶处理 Mi.IX 细胞。c Mi.IX 细胞。T1 和 T2=胰蛋白酶处理 Mi.IX 细胞的额外条带。X=未处理的 Mi.IX 细胞的额外条带。

血清学和免疫化学检测结果表明，Mi.IX 与一个异常的 GPA 分子有关，该分子具有表现正常的 N 端和 C 端区域和正常的 EnaKT（一个位于氨基酸残基 49 附近的抗原决定簇）。它在残基 39 处缺乏胰蛋白酶切割位点，可能缺乏位于 26 和 39 残基之间的 EnaTS（R.L., R10, BRIC 119, BRIC 127 可检测, E4 不可检测），相对分子质量比正常 GPA 低约 1000。根据用单克隆抗体 E4 获得的数据，在残基 34 处的胰凝乳蛋白酶裂解位点似乎是完整的。第 33 位的糖基化苏氨酸似乎存在，因为正是这种糖基化阻止了胰凝乳蛋白酶对某些 GPA 分子的裂解（表 2）。Mi.IX 细胞中 GPA 的 30 和 31 残基之间的胰蛋白酶部分裂解位点可能保持完整，

因为只有一些 GPA 分子会在这个位点被裂解，因此胰蛋白酶处理不会破坏这些细胞中 M 抗原的表达。

生化和血清学数据与位于氨基酸残基 35-40 区域附近的 Mi.IX 相关的 GPA 的改变相一致。如果 Mi.IX GPA 分子量减少 1000 是由于一个 O-聚糖的丢失，那么这可能是来自第 37 位的苏氨酸。另外，分子量的减少可能是由于 GPA 分子在残基 39 处胰蛋白酶裂解位点附近的一些氨基酸残基的缺失。

Mur 抗原以前只在 Mi.III、Mi.IV 和 Mi.VI 表型中发现。在这些表型中，Mur 与异常 GPB 分子的存在有关，该分子可能包含一个 GPA 插入片段。抗 Mur 很可能检测的是 Mi.IX 中异常 GPA 分子上的某个抗原决定簇，该抗原决定簇也存在于 Mi.III、Mi.IV 和 Mi.VI 的异常 GPB 分子中的插入片段上。DANE 抗原在 Mi.IX 中的意义更难解释。DANE 是胰蛋白酶敏感的，表明它不位于 Mi.IX GPA 分子上。然而，由于抗 DANE 对 Mi.IX 细胞的滴度非常低，因此，少量 DANE 活性 GPA 分子在 39 位主要胰蛋白酶裂解位点外的其他次要裂解位点被胰蛋白酶裂解，可能会充分降低抗原位点密度，使得抗 DANE 凝集细胞受阻。不幸的是，唯一的抗 DANE 血清供应极少，抗体产生者已经死亡，所以在发现其他抗 DANE 血清之前，DANE 抗原的位置不太可能被澄清。在本研究过程中，发现有几个 M⁺细胞也是 DANE⁺。这将是今后报告的主题。

Mi.IX 表型细胞的血清学和免疫化学结果的一致性良好。Miltenerberger 表型 Mi.I、Mi.II、Mi.V、Mi.VII 和 Mi.VIII 的生化性质现已明确，而 Mur⁺表型 Mi.III、Mi.IV、Mi.VI 和 Mi.IX 的生化性质仍不清楚。这些很可能将会通过对产生异常 GPA 或 GPB 分子的基因的分子分析来确定。

14 《Miltenerberger subsystem of the MNSs blood group system. Review and outlook》

《MNSs 血型系统的 Miltenerberger 子系统——综述和展望》

作者：Dahr W

作者单位：德国贝尔吉施-格拉德巴赫科学咨询与翻译研究所

来源：Vox Sang. 1992;62(3):129-35.

摘要：Miltenerberger (Mi) 系列代表一组红细胞表型，这些红细胞携带与 MNSs 血型系统相关的低频抗原。已知 MNSs 血型系统抗原位于两种唾液酸糖蛋白——血型糖蛋白 A (GPA) 和 GPB 上。已阐述 7 种 Mi 变异体 (I、II、III、V、VI、VII、VIII) 和一种相关变异体 (J.L.) 的结构改变。基于这些数据和对 Mi 抗原的不完整的研究，可以预测 IV 和 IX 的大致结构改变。此外，通过了解 Mi 抗原的结构和部分特征，可以对定义 Mi 子系统的各种抗体所识别的表位提出详细的假说。在分子水平上对 Mi 子系统的理解为未来的研究铺平了道路，未来研究包括：更详细地阐明 Mi 相关抗体的表位，新的 Mi 变异体的特征，以及寻找假设的迄今未知的 Mi 相关抗体。

1 引言

MNSs 血型系统的抗原位于人红细胞膜中的两种唾液酸糖蛋白 (SGPs) 上，称为血型糖蛋白 A (GPA，又称 MN SGP 或 α) 和 GPB (又称 Ss SGP 或 δ)。GPA 和 GPB 分子的多肽链是由相邻的同源基因编码的。GPA 由 131 个氨基酸残基组成，携带 M 和 N 抗原，由第一和第五位的氨基酸多态性确定。GPB 由 72 个氨基酸残基组成，携带 S 和 s 抗原，由第 29 位 Met (M) /Thr (T) 氨基酸多态性确定。GPB 还携带另一种 N 抗原，称为 N'，因为它的 N 端 26 个残基与血型 N 特异性 GPA 完全相同。GPB 的胞外结构域 (残基 1-40) 比 GPA (残基 1-72) 要短得多，因为 GYPB 基因包含一个额外的外显子 (外显子 3)，编码残基 27-57。GYPB 基因包含一段与 GYPB 第 3 外显子相当的 DNA 序列 (以下称“GPB 假外显子”)，由于相邻的一段内含子 DNA 序列发生一个突变，其信息不表达。GPA 和 GPB 的部分结构，包括由“GPB 假外显子”编码的假设氨基酸序列，如图 1 所示。最近描述了第三种与 GPA 和 GPB 相关的次要组分 (GPE)。GPE 对 MNSs

系统的抗原变异体的意义仍有待阐明。

Miltenberger (Mi) 抗原代表了属于 MNSs 系统的一组低频抗原。Mi 子系统首先被 Cleghorn 定义为有四个类型 (Mi.I-IV) 的一个集合, 都与 Miltenberger 血清 ('抗 Mia') 反应, 并与其他血清显示特定的反应模式 (抗 Vw、-Hut、-Mur、-Hil; 表 1)。随后, 还发现了其他的 Mi 类型 (V-IX) 和血清。最近定义的一些 Mi 类型不符合 Mi 子系统的原始定义, 即它们与抗 Mia 没有反应。我不赞成 Giles CM 建议的忽略 Anek 型血清与 VII 类红细胞的反应。由于解释 Lane 血清的反应模式也有困难, 我更倾向于使用原来的名称 Anek、Raddon 和 Lane, 而不是 ISBT 定义的名称和编号 (Hop, MNSs 26; Nob, MNSs 27)。一些 Mi 类型表现出主要抗原 (M, N, S, s, 'N') 的改变: 增强的 'N' (III、VI; 推测还有 IV), 减弱的 M 或 N (V), 对胰蛋白酶不敏感的 M (IX), 性质改变的 s (III、V、VI), 性质改变的 S (IV)。

在过去的 12 年里, 关于各种 Mi 红细胞类型中 GPs 的结构变化积累了丰富的知识。因此, 有必要对 Mi 子系统的血清学、遗传学和生物化学进行详细综述。

**Hypothetic residues
encoded by the 'GP B-
pseudoxon':**

**Partial structure
of normal GP B:**

DKHKRDTYPA-HTANEVSEISVITVSPPEKKN
* * *
-ISSQTN-----GEMGQLVHR-
21 25 27 30 35

**Partial structure
of normal GP A:**

* * * O * * * * *
-ISSQTNDHKRDTYAATPRAHEVSEISVRTVYPPEEETGERVQLAHH-
21 25 30 35 40 45 50 55 60 65

**Partial structures
of GP A variants:**

Mi.I: * * * * *
-ISSQTNMHRDTYAA--AHEVSEISVITVSPPEEETGER- :Mi.VII
21 25 30 35 40 45 50 55 60

Mi.II: * * * * *
-ISSQTNDKHKRDTYAA--AHEVSEISVITVYPPEEETGER- :Mi.VIII
21 25 30 35 40 45 50 55 60

**Partial structures
of hybrid GPs:**

Mi.V (A-B): ? ?
-EISVRTVYPPEEETGETGQLVHR-
45 50 55 60 65

J.L. (A-B): * *
-EISVRTVYPPEEETGEMGQLVHR-
45 50 55 60 65

Mi.III (B-A-B): * ? * * * ? * *
-ISSQTNDKHKRDTYPA-HTANEVSEISVRTVYPPEEETGETGQLVHR-
21 25 30 35 40 45 50 55 60 65

Mi.VI (B-A-B): ? ? ? ? ? ? ?
-ISSQTNDKHKRDTYPA-HTANEVSEISVITVYPPEEETGETGQLVHR-
21 25 30 35 40 45 50 55 60 65

Mi.IV (B-A-B): ? ? ? ? ? ? ?
(hypothetic) -ISSQTNDKHKRDTYPA-HTANEVSEISVITVYPPEEETGEMGQLVHR-
21 25 30 35 40 45 50 55 60 65

Mi.IX (A-B-A): ? ? ? ? ? ? ?
(hypothetic) -ISSQTNDHKRDTYAA-HTANEVSEISVRTVYPPEEETGERVQLAHH-
21 25 30 35 40 45 50 55 60 65

图 1 GPA、GPB 和 GP 变异体的部分结构。与正常 GPA 不同的残基标注下划线。由“GPB 假外显子”编码的假设残基显示在 GPB 序列的上方。O=N-糖基化位点; * =O-糖基化位点; ? =糖基化尚未被研究或有歧义。

表 1 Mi 红细胞的分类

Cell class	Antigens/antisera								
	Mi ^a	Vw	Hut ¹	Mur	Hil	Anek	Raddon	Lane	DANE
I	+	+	-	-	-	-	-	-	-
II	+	-	+	-	-	-	-	-	-
III	+	-	-	+	+	-	-	-	-
IV	+	-	-	+	-	+	(+)	-	-
V	-	-	-	-	+	-	-	-	-
VI	+	-	-	+	+	+	(+)	-	-
VII	-	-	-	-	-	(+)	+	+	-
VIII	-	-	-	-	-	+	+	+	-
IX	-	-	-	+	-	-	-	-	+

(+) = Weakly positive reactions.

¹ The anti-Hut defined by Cleghorn [8] is now denoted as anti-Hut+Mur.

2 对 Mi 特异性 GP 的结构和抗原的生物化学和免疫化学研究

2.1 Mi.I 和 Mi.II

Mi.I 和 Mi.II 红细胞上 GPA 的相对分子质量降低（约 2000）。结构分析表明，正常 GPA 第 28 位的 Thr（T）残基分别被 Met（M）和 Lys（K）残基取代。这些变化阻止了正常 GPA 中发生的 Asn-（N-）26 的 N-糖基化，从而为 Mi.I-和 Mi.II-GPA 的相对分子质量降低提供了解释（图 1）。抑制实验表明，Mia 和 Vw 抗原位于 Mi.I-或 Mi.II-特异性改变的 GPA 区域。最近，通过免疫印迹法证实了 Vw 抗原在 Mi.I-GPA 上的定位。最近的一篇会议摘要描述了第一个 Mi.I 纯合子，它产生的抗体（抗 EnaEH）针对的是正常 GPA 上 Vw 抗原的高频对偶抗原。EnaEH 是否也在 Mi.II-GPA 上表达还有待阐明。

2.2 Mi.VII 和 Mi.VIII

一位 Mi.VII 纯合子个体产生了针对正常 GPA 的 45-55 残基（近似）的同种抗 EnaKT（MNSs 29），这一发现引发了对 Mi.VII-GPA 的结构分析。Mi.VII-GPA 分子在 49 或 52 位分别出现 Arg（R）→Thr（T）和 Tyr（Y）→Ser（S）替换。由于 Mi.VII 和 Mi.VIII 在血清学上密切相关，随后对 Mi.VIII-GPA 进行了研究，发现仅在 49 位出现 R→T 替换。Mi.VIII 杂合子红细胞被抗 EnaKT 血清弱凝集，表明 Mi.VIII-GPA 也缺乏 EnaKT 抗原。认为 Mi.VIII-GPA 代表了正常 GPA 和 Mi.VII-GPA 之间的进化联系，类似于 M^c 和 M 和 N。然而，由于“GPB 假外显子”编码了 Mi.VII 特征序列（TTVS），因此 Mi.VII-GPA 也可能通过基因转换而产生，一小部分“GPB 假外显子”作为供体，形成 GPA-B-A 杂交蛋白。通过抑制实验，发现 Anek 型血清识别的抗原位于 Mi.VII-GPA 和 Mi.VIII-GPA 发生结构改变的区域（残基 40-61）。最近，用对应于 Mi.VIII-GPA 残基 45-54 的合成肽进行抑制试验，证实了 Anek 型血清识别的抗原的这一位置。

2.3 Mi.V、J.R.和 J.L.

最初，Mi.V 杂合子细胞显示出一种“新的”组分，其相对分子质量介于 GPA 和 GPB 之间，且 GPA 和 GPB 的含量降低（约为正常水平的 50%）。随后对一位 Mi.V 纯合子个体的研究表明，Mi.V 基因复合物只产生具有 GPA 和 GPB 特性的异常组分，而不产生正常的 GPA 和 GPB。因此，认为 Mi.V 基因复合物产生的是一种 Lepore 型的 GPA-B 杂交蛋白，包括 GPA 残基 1-55（近似）和 GPB 残基 28-72（近似）。最近两组研究人员对基因组 DNA 的分析阐明了 Mi.V 杂交蛋白的确切结构（GPA 残基 1-58，GPB 残基 27-72）。Vignal 等研究表明，Mi.V 特异性分子是一种 GPB-A-B 杂交蛋白。然而，这并不影响成熟蛋白的结构，因此，为了简化，在图 1 中被省略了。

1981 年，Langley 等描述了一位纯合子个体（J.R.），其红细胞缺乏 GPA 和 GPB，但包含一个推测的 GPA-B 杂交蛋白，类似于 Mi.V 红细胞（但缺乏 Hil，含有 S 而不是 s）。最近对 J.R.变异体的遗传研究发现，S 抗原性质改变。Huang 和 Blumenfeld（1991）、Johe 等（1989）阐明了一种相似变异体（J.L.）的结构。J.L.与 Mi.V 的差异仅在于，J.L.在 61 位是 M 残基（S 特异性），Mi.V 是 T 残基（s 特异性）。1991 年 Johe

等用对应于 Mi.V 和 J.L. 杂交蛋白 54-67 残基的合成肽进行抑制试验, 结果显示, 抗 Hil 仅与 s 特异性 (Mi.V) 序列反应, 从而证明了 Anstee 和 Tanner 在 1978 年提出的一种假说: 抗 Hil 代表一类 Mi 特异性抗 s, 即识别 GPA 的 N 端附近序列 PPEET。

2.4 Mi.III、Mi.IV 和 Mi.VI

聚丙烯酰胺凝胶电泳显示, Mi.III、Mi.IV 和 Mi.VI 红细胞上 GPB 分子的相对分子质量增加 (约 5000)。GP 组分的抑制试验证明了抗 Mia 和 Anek 血清识别的抗原位于该异常组分上。由于 Mi.VII 和 Mi.VIII 红细胞上 Anek 血清识别的抗原已被证明位于 GPA 上, 因此有人提出 III、IV 和 VI 红细胞中的异常组分代表 GPB-A-B 杂交蛋白。然而, 用人抗血清抑制试验来证明在 Mi.III-GPB 上存在 EnaKT 抗原的尝试都失败了。King 等用有抗 EnaKT 特异性的小鼠单克隆抗体, 通过免疫印迹法, 能够在 Mi.III-GPB 上检测到该抗原, 但在 Mi.IV-或 Mi.VI-GPB 上检测不到。最近, Huang 和 Blumenfeld 阐明了 Mi.III 和 Mi.VI 变异体的结构, 并证明了它们由 GYPB-A-B 杂交基因编码。有趣的是, 这种杂交基因使得“GPB 假外显子”编码的部分信息在成熟蛋白中表达。因此, Mi.III 和 Mi.VI 变异体在 28 位都是 K 残基, 和 Mi.II-GPA 一样; 但它们的残基 35-40 与 Mi.II-GPA 不同 (Mi.III 和 Mi.VI 的残基 35-40 相同)。Mi.VI-GPB 在 48 位是 T 残基, 而 Mi.III-GPB 不是 (类似于 Mi.VIII-GPA 的 T-49 残基)。这两种 GP 变异体 (Mi.III 和 Mi.VI) 在 60 位残基 (T=s 特异性) 附近的序列与 Mi.V 相同。1991 年 Johe 等研究发现, 一种与 Mi.III 和 Mi.VI 变异体的 31-49 残基对应的合成肽可以抑制“抗 Vw+Hut+Mur”。1991 年 Herron 等报道“抗 Mur”与 Mi.III-GPB-A-B 结合。但我认为不能排除其他相关的抗体特异性 (anti-Mi^a, anti-Vw plus anti-Hut+Mur)。

2.5 Mi.IV 和 Mi.IX 变异体的假设结构

根据上述讨论的数据, 可以预测 Mi.VI 红细胞包含一个与 Mi.VI 红细胞基本相同 (除了 60 位残基为 M, 决定了 S 特异性) 的 GPB-A-B 杂交蛋白。

基于 Skov 等的的数据, 对最近发表的 Mi.IX 变异体的结构也可以进行初步预测。Mi.IX 红细胞表现出一种改变的 GPA, 该 GPA 携带对胰蛋白酶不敏感 (因为 R-39)、对胰凝乳蛋白酶敏感 (因为是 YA 序列, 不是 YP 序列) 的 M 抗原。该 GPA 缺乏某些 EnaTS 抗原 (位于正常 GPA 的大约 27-42 残基内)。从图 1 所示的数据和 Johe 等人最近的结果判断, Mi.IX 红细胞携带的 Mur 抗原的表位序列似乎是 YPAHTANE。因此, Mi.IX-GPA 似乎是一种 GPA-B-A 杂交蛋白, 它是由部分“GPB 假基因”作为供体的基因转换而导致的。从其对胰凝乳蛋白酶的敏感性判断, Mi.IX-GPA-B-A 可能表现出图 1 所示的序列或相当相似的结构。

2.6 Mi 系列的抗原和抗体

在讨论了 Mi 变异体的结构和旨在阐明 Mi 抗原的位置和特性的研究后, 对 Mi 抗原和 Mi 相关抗体进行初步总结 (表 2)。表 2 中所描述的一些抗体和抗原的结论是不言自明的, 不需要任何进一步的评论 (如 Vw、Mur、Hil)。然而, 其他一些抗体和抗原则需要更详细的讨论。Cleghorn 最初定义了一些交叉反应性抗体, 如抗 Mia 和抗 Hut (现在称为抗 Hut+Mur)。随后的血清学工作主要集中于寻找“更有特异性”的抗体。在寻找特定 Mi 类型所特有的抗原决定簇的过程中, 发现了不存在特异性抗体的 Hop 抗原 (MNSs 26)。一些研究人员认为, 抗 Mia 和 Mia 抗原并不存在。然而, 抗 Mia 的结构可以很容易地从图 1 中推断出来。很难理解为什么 Lane 血清与 Mi.VII 和 VIII 红细胞发生反应, 而与 VI (和 IV) 红细胞没有反应。可能是因为, 邻近蛋白 (如带 3 或 Rh 相关组分) 提供的特定环境, 或特殊的糖基化, 对抗原的表达有影响。也可能是因为, Lane 血清与 Mi.VI (和 IV) 红细胞的反应相当微弱, 未被检测到。我认为有必要重新调查。表 2 中所示的初步推断的表位, 可能通过未来使用合成肽的研究来阐明。

表 2 还列出了三种假设抗体 (抗-X, -XX, -XXX), 可能通过仔细搜索检测到。需要指出的是, Mi 系列的复杂性即将进一步增加。另外三种 Mi 变异体即将被调查 [Johe KK, 1991; Huang CH, 1991; Blumenfeld and Tippet, 私人交流]。此外, Skov 等人注意到抗 DANE 血清凝集 M^s 红细胞。如果这种目前难以解释的反应可以通过更详细的研究来证实, 那么 M^s 红细胞将成为新的 Mi 类型, 抗 M^s 将成为新的 Mi 相关抗体。

表 2 Mi 相关抗体识别的抗原表位的数据和假设（与抗体反应的 Mi 细胞类型见表 1；Mi 血型糖蛋白序列见图 1）

Designation of antibody	ISBT number	Possible sequence of antigen	Comments concerning specificity
Anti-Vw	9	QTNDMHKR	Specific for Met res. at pos. 28
Anti-Hut	19	QTNDKHKRDTYAATP	Specific for Lys res. at pos. 28, requiring res. C terminal of pos. 34
Anti-Vw+Hut	—	QTND ^M _K HKRDTYAATP	Like anti-Hut, but not distinguishing between Met or Lys res. at pos. 28
Anti-Mi ^a	7	QTND ^M _K HKRDTY	Like anti-Vw+Hut, but not requiring res. C terminal of position 34
Anti-Hut+Mur	—	QTNDKHKRDTY	Specific for Lys res. at pos. 28, not requiring res. C terminal of pos. 34
Anti-Mur	10	YPAHTANE	Assumed to react with the sequence shared by class III and VI RBC
Anti-DANE	32	TYAHTANE (hypothetic) _V	Possibly reacting with the hypothetical sequence shown in figure 1
Serum Anek	—	SEISVTTV ^V _S PP	Reacting better with the sequence exhibiting a Tyr res. at pos. 52
Serum Raddon	—	SEISVTTV ^V _S PP	Weaker reaction with IV and VI RBC due to lower abundance of molecules
Serum Lane	—	SEISVTTV ^V _S PP	The reason why serum Lane does not react with IV and VI RBC is not clear
Anti-Hil	20	EEETGETGQLV	Anti-s (Thr specific) that also requires the sequence derived from GP A
<i>Hypothetic antibodies</i>			
Anti-X	—	SEISVTTVSPP	Antibody specific for class VII cells requiring the Ser res.
Anti-XX	—	EEETGE ^M _T GQLV	Antibody reacting with class III, IV, V, VI and J. L. RBC
Anti-XXX	—	EEETGEMGQLV	Anti-S (Met specific) requiring the sequence derived form GP A, reacting with class IV and J. L. RBC

补遗（1992 年 1 月 13 日）

即将发表 [Huang et al., J Biol Chem, in press] 另一种 GPB-A-B 变异体，部分序列为 26-NDKHKRDTYAATPRAHEVSEISVRTVYPPEEETGETGQLVHRF-67。携带这种杂交分子的红细胞（称为 Mi.X）表现出一种新的 Mi 表型（Mi^a+, Vw-, Hut-, Mur-, Hut plus Mur+, Hil+, Hop-, Nob-）。目前还不清楚为什么这些细胞没有被抗 Hut 凝集。可以想象，抗 Hut 不能与 Mi.III、Mi.IV、Mi.VI 和 Mi.X 细胞发生反应，是因为它们的 GPB-A-B 杂交分子与 Rh 相关蛋白形成复合物，类似正常的 GPB。相反，可以假设 Mi.II-GPA（与抗 Hut 反应）与带 3 形成复合物，类似正常的 GPA。抗 Hut 与 Mi.II 细胞反应，不与其他 Mi 细胞反应，也可能是因为这些分子的糖基化的差异。

表 2 中列出的两种假设抗体（抗 XX，抗 XXX）已被发现，分别称为抗 MINY 和抗 TSEN [Reid et al., Transfusion 1991;31:46S, and Vox Sang, in press]。因此，J.R.（或 J.L.）型细胞可以被视为 Mi 系列中的一个新类型（XI）。

15 《Gene conversion confined to a direct repeat of the acceptor splice site generates allelic diversity at human glycophorin (GYP) locus》

《人类血型糖蛋白(GYP)基因座上一段剪接受体同向重复序列的基因转换产生等位基因多样性》

作者：Huang CH, Kikuchi M, McCreary J, Blumenfeld OO
 作者单位：美国爱因斯坦医学院；日本宫城红十字会血液中心；美国 Ortho 诊断系统公司
 来源：J Biol Chem. 1992 Feb 15;267(5):3336-42.

摘要:

4号染色体长臂上的血型糖蛋白基因座(GYP)编码MNSs血型系统的抗原,在人群中表现出相当多的等位基因变异。我们研究了一种变异的血型糖蛋白等位基因的基因组结构和组织,该等位基因编码了一种新的Miltenberger(Mi)相关表型,MiX。这种变异体可能是由一段剪接受体同向重复序列的基因转换事件引起的。Southern印迹分析表明,MiX基因的5'和3'部分来自血型糖蛋白B或 δ 基因,而内部来自血型糖蛋白A或 α 基因。通过单拷贝聚合酶链反应扩增出包含MiX基因重排区域的基因组序列。直接DNA测序显示,在MiX基因的形成过程中,一段 α 基因外显子III中含有剪接受体的短片段取代了一段 δ 基因中含有隐蔽剪接受体的沉默序列。上游 δ - α 断点的两侧是剪接受体的同向重复序列,而下游 α - δ 断点位于相邻的内含子中。这种片段转移产生了一个新的复合外显子,它的表达不仅反式激活了部分沉默序列,还创建了外显子内和外显子间的杂交连接,这表征了MiX血型糖蛋白的抗原特异性。MiX与MiIII和MiVI相似,都由 δ - α - δ 杂交基因编码,不同之处在于基因转换位点不同;这表明,表达的序列和不表达的序列通过特定基因组DNA基序进行混编,是在进化过程中塑造MNSs血型系统抗原多样性的重要机制。

1 引言

4号染色体长臂上的血型糖蛋白基因座(GYP)编码MNSs血型系统的抗原,在人群中表现出相当多的等位基因变异。最近已表征该基因座三个关键成员(HGpA、HGpB和HGpE)的基因组结构和组织。这些血型糖蛋白基因在单倍体基因组中以单拷贝的形式出现,并在红细胞系中特异性表达。它们具有广泛的序列同源性,并通过基因复制和多样化由一个共同祖先衍生形成一个家族。HGpA或 α 基因以两种等位基因形式存在, α M和 α N,分别编码M和N血型糖蛋白。HGpB或 δ 基因也以两种等位基因形式存在, δ S和 δ s,分别编码S和s血型糖蛋白。HGpB基因缺乏编码胞质结构域的外显子。HGpB基因中与HGpA基因第三个外显子相似的序列(称为 δ 假外显子)不表达。HGpE基因与HGpB密切相关,但保留了一段定义M而不是N血型抗原的序列。除了这些基因,血型糖蛋白基因家族还包括越来越多的变异等位基因,负责塑造人类MNSs血型系统的抗原多样性。

以往的分子遗传学研究已经阐明了几种变异血型糖蛋白等位基因的基因组结构,这些等位基因源自部分亲本基因以不同的构型排列杂交。HGpSt^a基因和Dantu基因均为 δ - α 杂交基因,其断点分别位于内含子3和4中。在HGpSt^a基因中,已发现三种亚型,其断点位于内含子3中的不同位点。相反,Miltenberger(Mi)系列的两个变异血型糖蛋白基因HGpMiV和MiJL均为 α - δ 杂交基因,在断点位置上也不同。这些杂交基因很可能是通过不等交换机制的同源重组产生。最近,人们发现Miltenberger系列的HGpMiIII和MiVI基因具有相似的 δ - α - δ 杂交结构,这源于基因转换事件。在这两个基因中,不同反向重复序列的DNA片段转移形成一个复合外显子,包含一部分通常不表达的序列。本研究描述了一种人类血型糖蛋白基因HGpMiX的结构和组织,该基因编码了一种新的Miltenberger相关表型。虽然也有 δ - α - δ 排列,但这种等位基因变异似乎源于剪接受体同向重复序列的基因转换事件。

2 材料和方法

2.1 血样及血清学分型

采集一名MiX杂合子日本献血者的新鲜外周血。这名献血者红细胞的MNSs表型为:M⁺、N⁺(非常弱)、S⁻、s⁺(异常强)。进一步的血清学检测表明,这名献血者具有一种变异表型,可能与MiIII、IV或VI相关,但不完全相同。用Miltenberger系列分型抗血清检测,结果如下:Vw⁻、Hut⁻、Mur⁻、[Hut/Mur]⁺(一种同时含有Hut和Mur抗体的抗血清)、Hil⁺、Hop⁻、Nob⁻。经胰蛋白酶处理后,这名献血者的红细胞对[Hut/Mur]抗血清呈阴性反应。这与胰蛋白酶处理的MiIII红细胞的反应(Hut⁻、Mur⁺、[Hut/Mur]⁺)不同。这种比较验证了抗血清的特异性,并提示出现了一种新的Miltenberger类型,命名为MiX。除上述反应外,MiX表型红细胞以下抗原均为阴性:He、Mg、Mt^a、Mit、Cl^a、s^D、Ri^a、Sw^a、Fr^a、Vg^a、Tr^a、Pt^a、Far、Ny^a和St^a。

2.2 核酸探针和放射性标记

核酸探针包括血型糖蛋白 cDNA、基因组 DNA 序列和合成的寡核苷酸。通过 PstI 裂解和低熔融温度琼脂糖凝胶电泳获得了 α M 血型糖蛋白的 cDNA 插入片段。通过 PCR 从 α N 血型糖蛋白克隆 λ HGp 4-2 中扩增出 2 个基因组 DNA 片段——IVS2 片段(0.7kb)和 IVS3 片段(0.9kb)，并用 5%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯化。在 ABI 380 A DNA 合成仪上合成寡核苷酸(24-27 mer)，15% PAGE (7.0 M 尿素)纯化，用作杂交探针或扩增引物。通过随机引物延伸法，用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 标记 cDNA 和基因组 DNA 探针。通过 T4 多核苷酸激酶，用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (>6000 Ci/mmol) 标记合成的寡核苷酸。

2.3 DNA 分离、Southern 印迹和直接凝胶杂交

通过在 50°C 下与 1% SDS 和蛋白酶 K (0.2 mg/ml) 孵育 8 小时后用苯酚和苯酚/氯仿 (v/v=1) 提取，分离出 MiX 和正常献血者白细胞核高分子量 DNA。提取出的基因组 DNA 用限制性内切酶在 37°C 下酶切 15h，然后在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳分离。分离的 DNA 酶切物或从琼脂糖凝胶转移到硝化纤维素滤膜用于 Southern 印迹，或固定在原位用于直接凝胶杂交。预杂交、与核酸探针杂交、清洗滤膜或凝胶的条件如以前的报道所述。

2.4 PCR 扩增基因组 DNA

采用 Taq DNA PCR 法扩增正常和变异血型糖蛋白基因的基因组序列。为了生成用于直接 DNA 测序的特异性模板，我们开发了一种称为单拷贝 PCR 的程序，以避免非特异性扩增。根据基因组定位数据(图 1)，通过电洗脱分别回收了 HGpMiX 基因特有的三个单拷贝片段，即 MiX1 (9.6kb)、MiX2 (3.9kb) 和 MiX4 (2.2kb)。两个 MspI 片段 MiX1 和 MiX2 跨越内含子 1 到内含子 5，而 HindIII/SacI 片段 MiX4 与 MiX1 和 MiX2 重叠(图 1，底部)。将这三个片段作为单拷贝 PCR 模板，生成 5 个重叠的基因组片段(A-E)，包含 HGpMiX 基因的外显子 II-IV：A 和 B 片段为 MiX1 的产物，D 和 E 片段为 MiX2 的产物，C 片段为 MiX4 的产物(图 2)。5 对扩增引物的核苷酸位置见图 2 注释。在单模块 PCR 仪(Ericomp)中进行 PCR，循环条件如之前的一篇论文所述。为了进行比较，我们从 MiX 杂合子中回收了 HGpB (δ) 8.0kb (SacI)、HGpA (α) 1.6kb (HindIII) 和 5.8kb (MspI) 片段(图 1)，并作为 PCR 模板生成相应的 DNA 片段。

每次 PCR 扩增的 DNA 产物等分 (3-5 μ l) 用 1.6%琼脂糖或 5%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析。进一步表征所有扩增的基因组 DNA 片段，或通过限制性内切酶分析，或用巢式外显子特异性探针进行等位基因特异性寡核苷酸杂交，之后进行印迹转移。滤膜杂交、洗涤和放射自显影如之前文献所述。

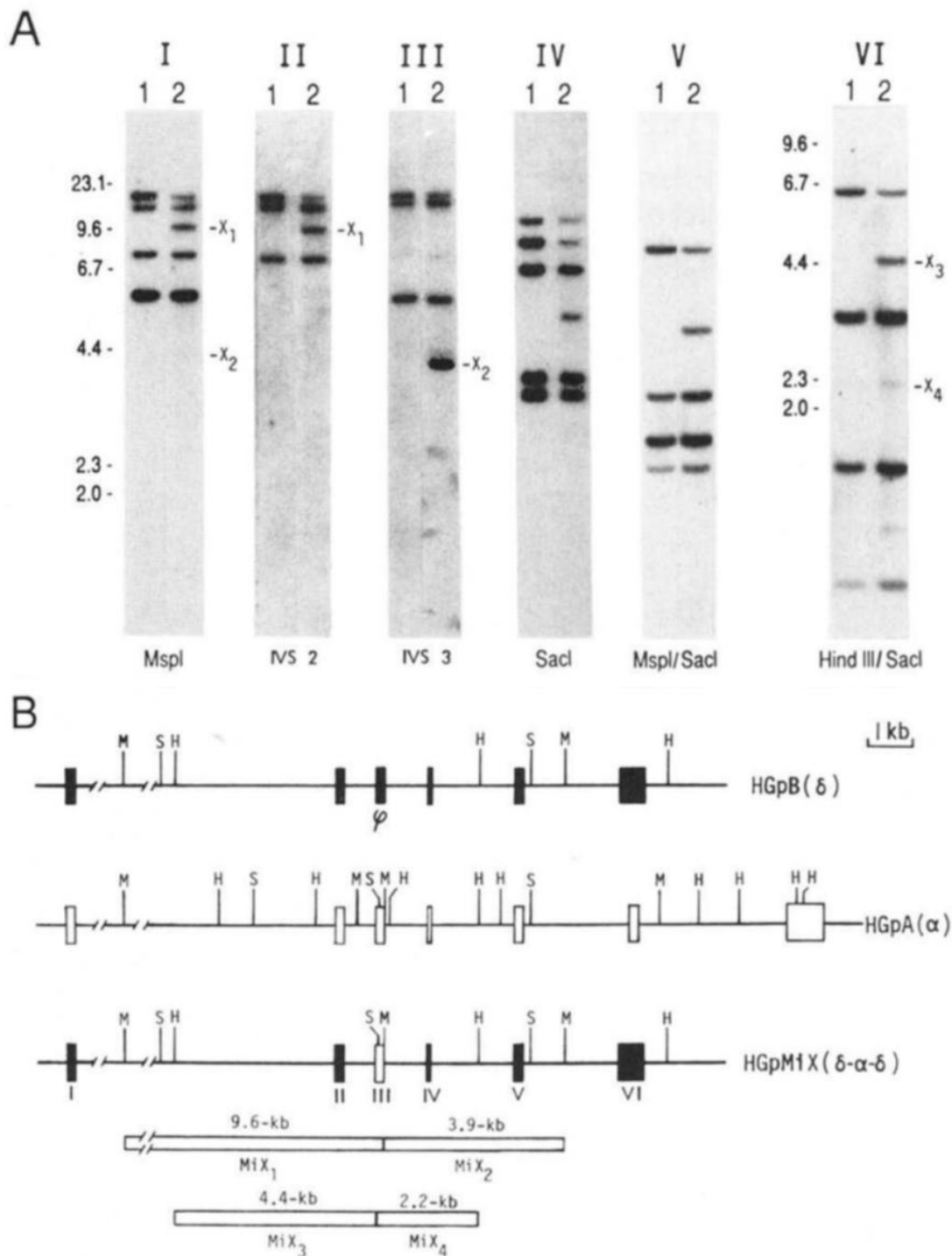


图1 HGpMiX 基因的结构组织。A，对来自 MiX 杂合子的基因组 DNA 进行 Southern 印迹；1，对照；2，MiX。胶图下示所用的限制性酶：MspI (M) (图 I-III)、SacI (S)、HindIII (H) 及其组合。将印迹与血型糖蛋白 cDNA (图 I、IV-VI) 和 IVS (图 II 和 III) 探针杂交。胶图左侧示大小标准 (以千碱基对为单位)。X₁ 和 X₂ 表示 HGpMiX 基因的 9.6kb 和 3.9kb 的 MspI 片段，X₃ 和 X₄ 表示 HGpMiX 基因的 4.4kb 和 2.2kb 的 HindIII/SacI 片段。B，HGpMiX 基因的结构和部分限制性酶切图谱。为了说明 HGpMiX 基因杂交片段 (MiX₁-MiX₄，底部) 的起源，平行显示了 HGpB (δ) 和 HGpA (α) 基因的结构和限制性酶切图谱。实心框和空心框表示外显子。HGpB (δ) 外显子 III 是不表达的假外显子 (φ)，缺乏功能性 5'剪接位点。-/-表示 SacI 和 HindIII 位点的分布不明确。

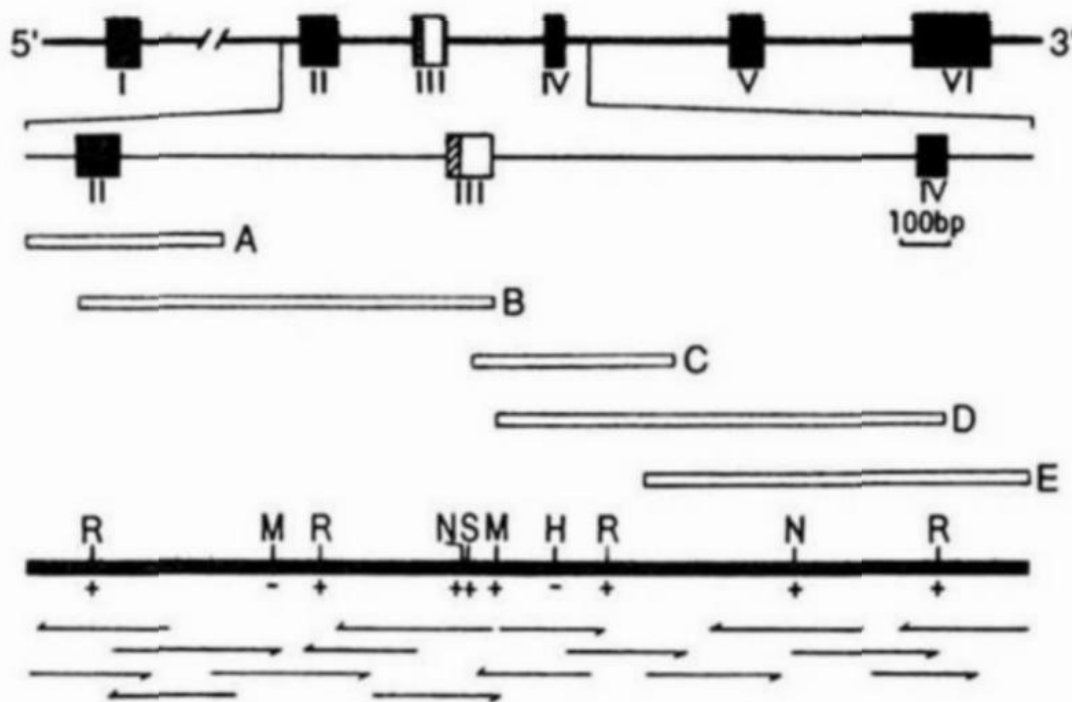


图2 从HGpMiX基因中扩增出的基因组序列的分析。显示了PCR扩增和直接DNA测序的策略。将包含HGpMiX基因外显子II到IV的基因组区域按比例放大。阴影和空心框表示复合外显子（外显子III）。空心条表示5个包含上述区域的扩增的DNA片段，A-E。这5个扩增DNA片段的5'和3'端由PCR引物的核苷酸位置（见图4A）定义：A，核苷酸-95~341；B，核苷酸58~938；C，核苷酸891~1321；D，核苷酸940~1910；E，核苷酸1242~2055。实心条显示了HGpMiX基因的区域图，这是通过分析扩增的DNA片段构建的：H，HindIII；M，MspI；N，NdeI；R，RsaI；S，SacI。实心条下的“+”或“-”表示是否存在裂解位点。图下面的箭头表示测序反应的方向和长度。

2.5 直接DNA测序

直接Sanger双链测序HGpMiX基因。在用T7 DNA聚合酶和 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 标记引物测序前，将PCR扩增的双链DNA片段用5% PAGE纯化，紫外光下切胶，TE洗脱（37℃ 8-10 h；TE配制：10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0），离心回收。将模板DNA的等分物（0.5-1 pmol）与反应缓冲液和5'末端标记 ^{32}P 引物（4-5 pmol）混合，总体积12.5 μl 。在Centricon 10浓缩器（Amicon）中，通过离心透析，将放射性引物从游离的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 中分离出来。测序反应和凝胶电泳详见之前的报道。对HGpMiX基因中的断点区域进行了两次测序。作为对照，平行测定了包含重排区域的HGpA（ α ）和HGpB（ δ ）序列。获得的序列用GCG程序进行分析。

2.6 红细胞血型糖蛋白的Western印迹

MiX和正常的红细胞裂解物用SDS-10% PAGE分离，并电转移到硝化纤维素滤膜上。用 α -血型糖蛋白抗血清、M和N血型特异性单克隆抗体进行Western印迹。为了分析N-糖基化模式，通过吡啶增溶、乙醇分离、SDS-三氯乙酸提取不溶于乙醇的沉淀物，从红细胞膜分离血型糖蛋白。在供应商（Genzyme）推荐的条件下，用N-聚糖酶处理血型糖蛋白，并进行SDS-10% PAGE和Western印迹。通过与 α -血型糖蛋白抗血清的免疫反应，来观察蛋白条带。

3 结果

3.1 MiX杂合子个体的基因组DNA的限制性酶切定位

图 1A 示与血型糖蛋白 cDNA 和 IVS 探针杂交的 MiX 基因组 DNA 印迹。虽然用 HindIII 酶没有检测到明显的变化（未显示），但 MspI 或 SacI 酶切显示 MiX 基因组 DNA 在酶切位点模式和条带强度上均有变化（图 1A, I-IV）。除了 HGpA (α)、HGpB (δ) 和 HGpE 三个基因的特征片段外，MiX DNA 还在 HGpB (δ) 基因中产生了两个 MspI 和一个 SacI 条带，并显示剂量减少。MiX 和正常 DNA 之间的这些差异还可以在双酶切的印迹中看到（图 1A, V 和 VI）。这些改变的片段肯定来源于 HGpMiX 变异基因，且是该基因所特有的。

根据广泛的限制性酶切分析、已知的内含子大小、包含 HGpA (α) 和 HGpB (δ) 胞外结构域的完整基因组序列，可以推断出 HGpMiX 基因的结构（图 1B）。显然，HGpMiX 基因的分子改变仅限于胞外结构域外显子 II-IV，且涉及 HGpB (δ) 假外显子被 HGpA (α) 片段替代。因此，MiX1 (9.6-kb) 和 MiX2 (3.9-kb) 或 MiX3 (4.4-kb) 和 MiX4 (2.2-kb) 片段肯定保留了近端 δ - α 和远端 α - δ 断点（图 1B）。

3.2 包含 HGpMiX 基因外显子 II~IV 的基因组 DNA 的扩增与分析

进一步的研究集中在包含 HGpMiX 基因外显子 II-IV 的基因组区域。图 2 示源自 HGpMiX 基因的 3 个限制性片段（MiX1、MiX2 和 MiX4）的 5 个重叠片段（A-E）的特异性扩增。片段 B 和 D 之间存在一个单核苷酸间隙，但被片段 C 所覆盖。在所有的情况下，在琼脂糖凝胶电泳中观察到一个预期大小的单一条带（凝胶未显示）。通过等位基因特异性寡核苷酸杂交（未显示）和限制性酶切（见下文）判断，这 5 个片段都是 HGpMiX 基因所特有的，且都不包含从正常血型糖蛋白基因共扩增的序列。

为了定位 HGpMiX 基因内假定的断点，用限制性内切酶分析扩增的基因组片段，酶切位点在 HGpA (α) 和 HGpB (δ) 基因之间显示不对称分布。该分析的结果如图 2 所示。在包含外显子 II-IV 的区域中，HGpB (δ) 的 MspI、NdeI、SacI 和 HindIII 位点分布与 HGpA (α) 不同。B 片段中，MspI 位点缺失、NdeI 和 SacI 位点存在，提示 HGpMiX 基因的近端 δ - α 断点位于 NdeI 位点的上游。C 片段中，MspI 位点存在、HindIII 位点缺失，提示远端 α - δ 断点位于相距 89bp 的这两个位点之间。通过比较变异基因和正常基因的限制性酶切模式，进一步证实了 HGpMiX 基因在 5'和 3'端类似于 HGpB (δ)，但在中间包含 HGpA (α) 基因的部分外显子 III。这种片段 DNA 重排，通过在编码区获得三个独特的酶位点得以证明，有可能在 HGpMiX 基因中创造一个新的复合外显子。

3.3 HGpMiX 基因的核苷酸序列

为了准确识别基因断点的位置，并确定是否形成了一个可表达的复合外显子，我们通过对扩增的 DNA 片段进行直接测序，获得了包含 HGpMiX 基因外显子 II-IV 的核苷酸序列。测序策略见 HGpMiX 基因区域图下方（图 2，底部）。片段 B、C 和 D 被全部测序，而片段 A 和 E 被部分测序。DNA 序列分析清楚地表明，HGpMiX 基因保留了一个 δ - α 杂交结构，并编码了血型糖蛋白家族的一个新成员。

图 3 显示了 HGpMiX 基因中近端 δ - α 断点周围的 DNA 序列 ladders。通过对 HGpMiX、HGpB (δ) 和 HGpA (α) 基因的序列进行比较，可以清楚地看到定义断点的 5' δ 和 3' α 边界的核苷酸。在 HGpMiX 中，HGpB (δ) 样序列终止于假定的复合外显子的 5'端附近（核苷酸 847），而 HGpA (α) 样序列开始于核苷酸 867，通过一个共享区域，进一步向下游延伸。通过对这个重排区域中的结构基序的搜索，发现了一个 8-bp 的同向重复序列（ATATGCAG N₁₉ ATATGCAG），该序列包含内含子 2/外显子 III 连接处，并构成剪接受体的一部分。该同向重复序列在 HGpA (α) 中是完美的，但在 HGpB (δ) 基因中的下游 half-site 的第 5 位，包含一个 G 到 C 的颠换（图 3，1 和 2）。值得注意的是，在 HGpMiX 基因中的近端断点的两侧，是同向重复序列的两个 half-sites，分别来自 HGpB (δ) 和 HGpA (α) 基因（图 3，3）。这些结果表明，除了序列同源性外，受体剪接信号作为串联重复序列出现，可能在确定基因重组过程中 δ 向 α 转变的位点中起着重要作用。

由于 HGpA (α) 基因的第三个内含子中 994 核苷酸处存在一个多态残基(G 或 A)，因此只能暂定 HGpMiX 基因的远端 α - δ 断点位于假定的复合外显子的下游（图 4A）。因此，HGpA (α) 样序列可能终止在核苷酸 964 或核苷酸 994 处，然后通过一段共享区域融合 HGpB (δ) 样序列，标志是核苷酸 994 或核苷酸 1028 处

的特征性残基(核苷酸 1028 处的替换,导致失去一个独特的 HindIII 位点,因此可以根据这个替换确定 HGpB 基因)。研究个体的 HGpA (α)、B (δ) 和 MiX 基因在 994 核苷酸处分别是 G、A 和 A; 如果 MiX 基因来源于 HGpA (α), 那么远端 α - δ 断点将由核苷酸 964 和 994 定义(图 4A)。根据该定义, HGpMiX 基因形成过程中, 从 HGpA (α) 转移到 HGpB (δ) 的最小序列长度为 98bp (核苷酸 867-964), 从外显子 III 延伸到相邻内含子。

通过比较 HGpA、B 和 MiX 基因的核苷酸序列(图 4A)发现, 这种片段替换创建了一个复合外显子, 没有改变开放阅读框, 也没有引入其他错配到编码区。这个新的外显子包含 HGpB (δ) 基因沉默假外显子 III 的部分, 以及 HGpA (α) 基因活性外显子 III 的 3'部分。因此, 在 HGpMiX 基因中, 复合外显子的两侧分别是来自 δ 内含子 2 的功能性剪接受体, 和来自 α 内含子 3 的功能性剪接供体。复合外显子的剪接供体由 α 内含子 3 与 α 外显子 III 序列的共转座(cotransposition)而形成。综上所述, 该复合外显子编码的序列可能在 MiX 蛋白中表达。

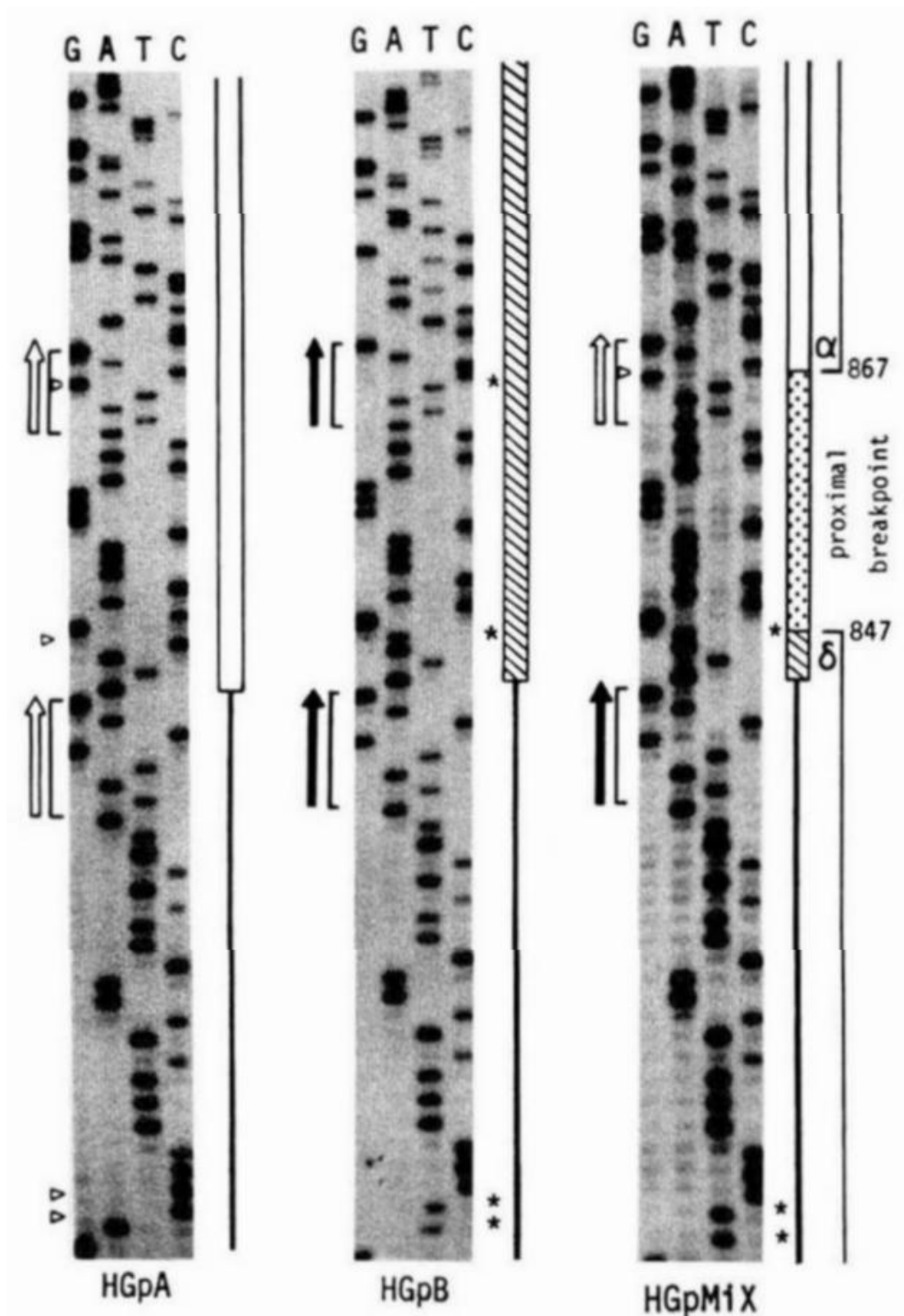


图3 HGpMiX 基因近端 δ - α 断点周围的 DNA 序列 ladders。显示了来自同一 MiX 个体的相应的 HGpA 和 HGpB 序列以进行比较。每个图右侧的垂直线和条形分别显示内含子 2 的 3' 部分及其相邻的外显子 III。带阴影线的条形显示 δ 假外显子的一部分。在每个图的左侧，半括号和空心或实心箭头显示同向重复序列的 8-bp half-sites。三角形和星形表示在内含子/外显子连接附近 HGpA 和 HGpB 基因的核苷酸差异。在 HGpMiX 基因中，从 HGpB (δ) 向 HGpA (α) 的核苷酸序列转变清晰可见。如图所示，重排的外显子是一个复合外显

子，保留了由核苷酸 847 和 867 定义的近端 δ - α 断点（点状条）。

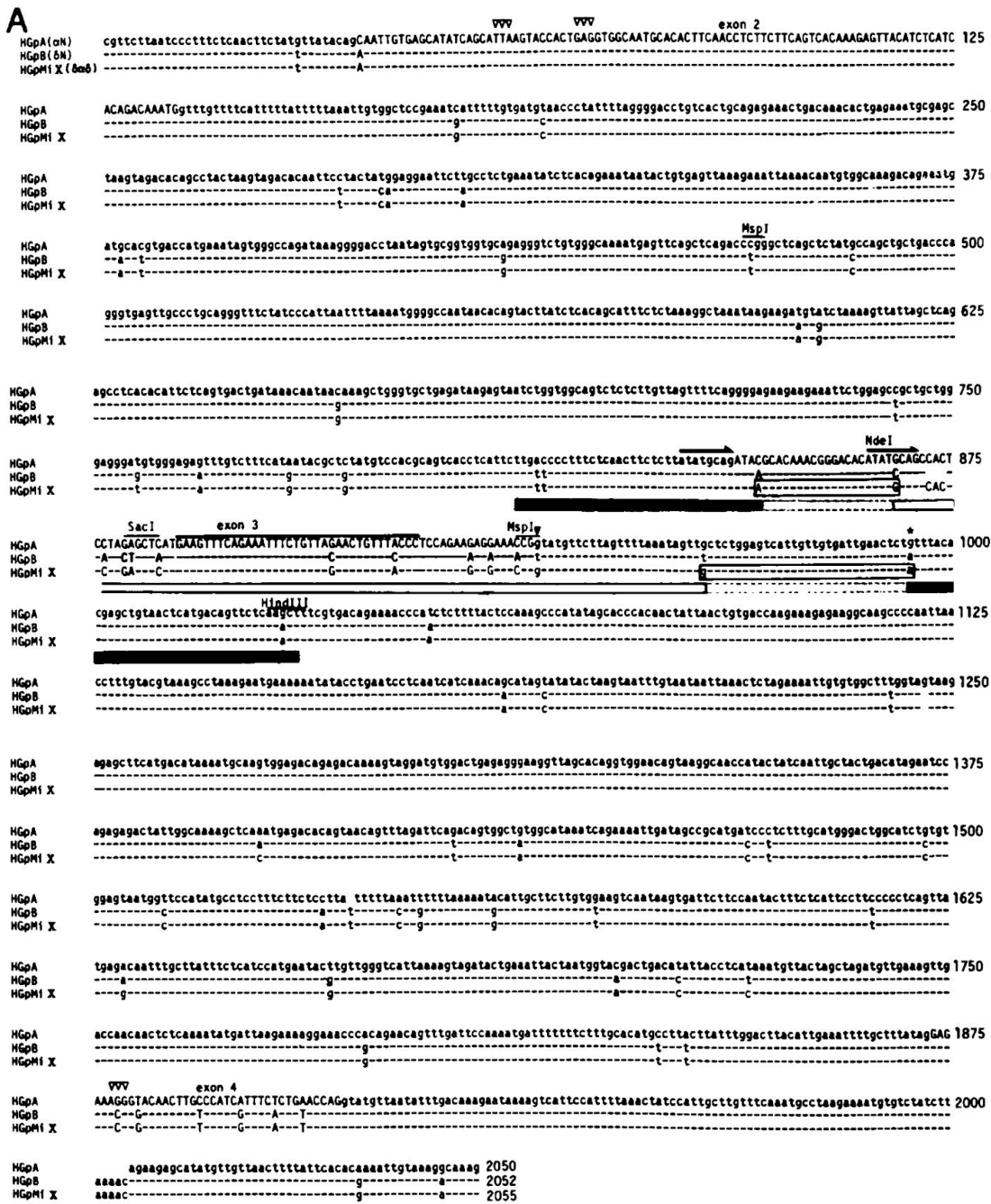


图 4 HGpMiX 胞外结构域的核苷酸和推断的氨基酸序列。A，HGpA (α) 和 HGpB (δ) 序列比对，其中核苷酸 750-1150 从 MiX 献血者测得。破折号表示与 HGpA 相同的核苷酸。注明差异核苷酸。空心三角形表示定义 N 和 s 血型抗原的密码子。箭头表示同向重复序列的 half-sites。上划线表示复杂的回文序列。实心三角形表示一个点突变（核苷酸 940，g $\rightarrow$ t），使 HGpB 外显子 III 的 5'剪接位点失活。星号表示不同个体间 HGpA 基因中的一个多态性残基（核苷酸 994，g 或 a）。HGpMiX 基因中近端 δ - α 和远端 α - δ 断点被框出。实

心条和空心条分别表示紧邻断点（阴影）的 HGpB 和 HGpA 来源的 DNA 片段。B，成熟 MiX 血型糖蛋白的整个胞外结构域的推断氨基酸序列。显示了其与各个外显子的关系。空心三角形，如上所述。圈出的第 27 和 59 位的 D（Asp）和 G（Gly），是由包含复合外显子的连接密码子（junctional intercodons）编码的。HGpMiX 基因下的空心条显示了参与 DNA 重排的区域。

3.4 MiX 血型糖蛋白的一级结构

所推断出的成熟的 MiX 血型糖蛋白的整个胞外结构域的氨基酸序列如图 4B 所示。MiX 蛋白的氨基端（残基 1-26）和羧基端（残基 59-71）对应 HGpB（ δ ）的残基 1-26 和 27-39，而 MiX 蛋白的残基 27-58 对应由复合外显子编码的 δ - α 融合多肽。该融合序列与 HGpA（ α ）残基 27-58 的不同之处仅在于第 28 位的一个氨基酸残基，即 HGpA（ α ）的苏氨酸（T）被 HGpB（ δ ）沉默序列中 AAG 密码子编码的赖氨酸（K）所取代。这种改变使得 MiX 血型糖蛋白不能 N-糖基化，因为所需的共有序列 Asn-Asp-Thr 已被改变为 Asn-Asp-Lys（在 26-28 位）（图 4B）。除了跨 28-35 氨基酸残基（KHKRDITYA）的外显子内连接，MiX 蛋白还包括杂交序列 25TNDKH29 和 57ETGETG62。在转录物加工过程中，复合外显子与其相邻外显子之间可能形成这些外显子间连接。正是这些连接序列的表达决定了 MiX 蛋白产物的抗原特异性。

3.5 MiX 红细胞血型糖蛋白的免疫印迹分析

从基因结构可以预测，MiX 血型糖蛋白应该在红细胞膜上表达，其分子大小介于 HGpA 和 HGpB 之间。推导出的氨基酸序列也表明，MiX 蛋白应该保持 N 和 s 血型的反应性，并可能缺乏天冬酰胺连接的糖基。图 5 示 MiX 杂合子红细胞血型糖蛋白的 Western 印迹。除了 HGpA（ α ）和 HGpB（ δ ）条带外，还可以看到一条预期的 HGpMiX 特征性变异条带（图 5A，1）。它与 N 特异性单克隆抗体反应，与 M 特异性单克隆抗体不反应（图 5A，2 和 3）。它与针对 HGpA（ α ）羧基末端区域（残基 82-131）的抗血清不反应（未显示）。MiX 血型糖蛋白的这些特征类似于 HGpB（ δ ）。当用 N-聚糖酶对分离出的血型糖蛋白进行处理时，MiX 带的迁移率保持不变，而来自对照和 MiX 献血者的 HGpA（ α ）的迁移率均增加（图 5B）。这表明 MiX 血型糖蛋白没有 N-糖基化。

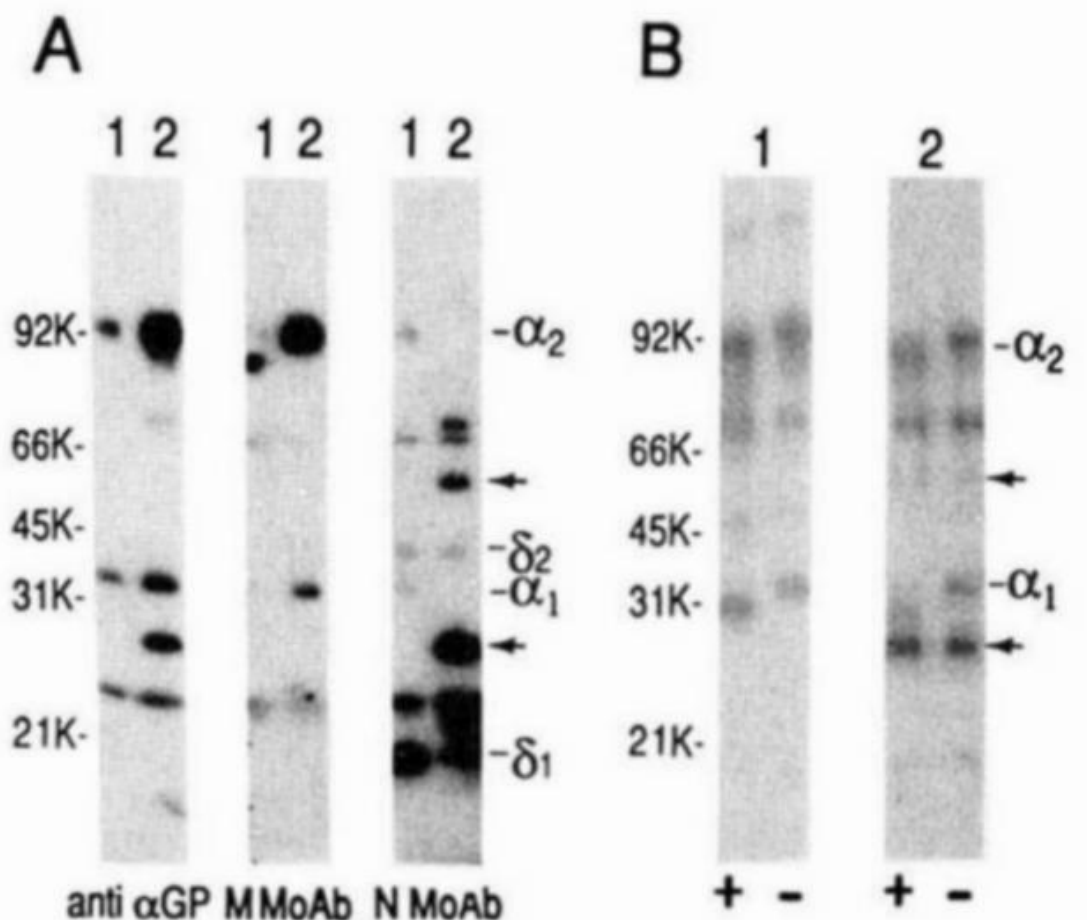


图 5 MiX 杂合子红细胞血型糖蛋白的 Western 印迹。1、对照；2、MiX。A，红细胞裂解物在 SDS-10% PAGE 上分离，用 α 血型糖蛋白抗血清（anti α GP，图 1）、M 血型特异性单克隆抗体（M MoAb，图 2）和 N 血型特异性单克隆抗体（N MoAb，图 3）进行检测。箭头表示 MiX 变异体的同型二聚体和单体条带。B，从红细胞膜中分离的血型糖蛋白用（+）或不用（-）N-聚糖酶处理，如上所述电泳，并用 α 血型糖蛋白抗血清进行检测。图 1，对照；图 2，MiX。分子量标记物显示在左侧。

4 讨论

在这份报告中，我们表征了一种编码 MiX 表型的人类血型糖蛋白变异的基因组结构。HGpMiX 是一种 δ - α - δ 杂交基因，通过替换相对较短的 DNA 片段而形成，而不是简单地将 HGpA (α) 序列插入 HGpB (δ) 基因。这些基因组重排导致了 HGpMiX 基因中一个新的复合外显子的产生，其表达不仅反式激活了部分沉默序列，而且还使得 MiX 血型糖蛋白中产生新的外显子内和外显子间杂交连接。MiX 红细胞膜血型糖蛋白的 Western 印迹提供了 MiX 蛋白表达的证据。

核苷酸序列比对（图 4）表明，HGpMiX 基因是通过在具有较大同源性区域的序列之间进行 DNA 重组而形成的。在同源重组的机制方面，基因转换反映了信息从一个双链体到另一个双链体的定向转移，而不对等交换导致信息的相互交换，产生交互性排列的两个重组体。在 HGpMiX 基因中发现的片段 DNA 替换可以很容易地通过基因间转换事件来解释，尽管不能正式排除因 2 次交换导致的不等重组。我们倾向于基因转换作为一个更简单的模型，因为通常认为 2 次不等交换事件是罕见的，特别是当重组涉及的遗传图谱距离短时。此外，发现了许多类似的杂交血型糖蛋白基因，其重排都聚集在短 DNA 片段中，削弱了 2 次交换是其主要机制的可能性。

除了广泛的序列同源性外，特殊的基因组 DNA 基序的相互作用似乎也参与了基因转换位点的选择。我

们检测了重排区域的重组基因特征，这可能对 HGpMiX 基因的形成很重要。在内含子 2/外显子 III 的连接区域，发现了一个 8-bp 的剪接受体的完美同向重复序列，其两个 half-sites 分别来自 HGpB (δ) 和 HGpA (α) 基因 (图 4A)。值得注意的是，从一个 half-site 到另一个 half-site 的转变定义了 HGpMiX 基因中 δ - α 的断裂和愈合；这有力地表明，同向重复序列参与了基因重排。我们提出了一种 HGpMiX 基因转换机制假说：由剪接受体的同向重复序列介导 (图 6)。这些重复序列可能参与了重组基因的配对和定位，并作为链解开、入侵和分支迁移的转换位点。

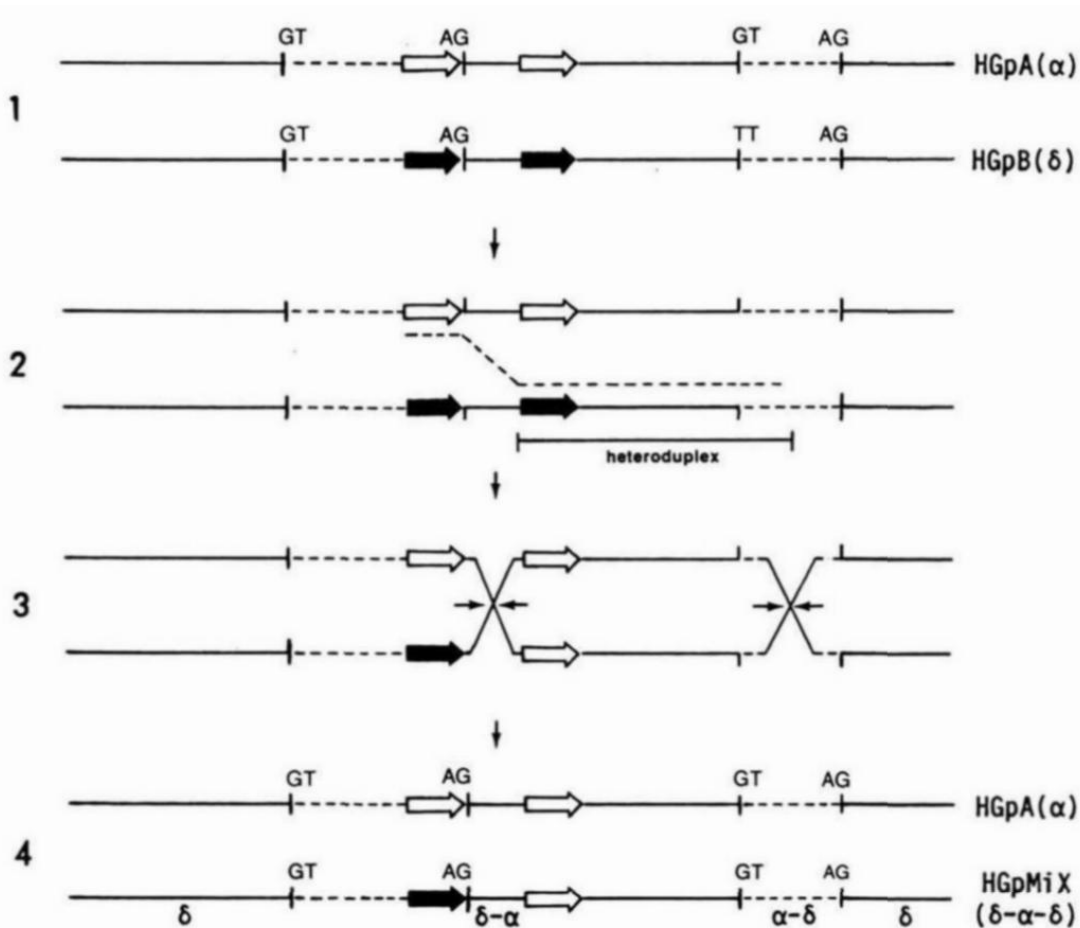


图 6 HGpMiX 基因可能起源于一个片段 DNA 转换事件。1、亲代 HGpA (α) 和 HGpB (δ) 基因同源配对后包含外显子 II-IV 的基因组区域的示意图。实线，外显子；虚线，内含子。外显子-内含子连接分别由供体和受体剪接信号 GT 和 AG 表示。在 HGpB (δ) 中，外显子 III 的剪接供体因 G $\rightarrow$ T 颠换失活。包含剪接受体的同向重复序列的位置由两对箭头表示。2、HGpA (α) 基因的链入侵和分支迁移 (用弯曲的虚线表示) 在同向重复序列的两个 half-sites 之间启动。这导致一条 HGpB (δ) 链被置换，形成异源双链体 (为了简化，被置换的链没有显示)。3 和 4，HGpB (δ) 受体中异源双链区域的错配修复采用 HGpA (α) 的入侵链作为模板，而 HGpA (α) 供体的重新合成采用其自身留下的链作为模板。两个霍利迪连接体 (用水平箭头表示；一个位于同向重复序列侧翼，另一个位于相邻的内含子中) 的消除，恢复了 HGpA (α) 供体，但将 HGpB (δ) 受体转化为 HGpMiX 基因。在 HGpMiX 中，显示了 δ - α 和 α - δ 断点的位置。

在内含子 2/外显子 III 连接处出现 2 拷贝相同的剪接受体作为一个串联重复序列，增加了 HGpMiX 基因初级转录物可变剪接的可能性。使用上游组成性剪接位点将形成 MiX 血型糖蛋白 (图 4B)，在天冬酰胺 26 处缺失 N-糖基化。然而，选择下游重复序列作为可变剪接位点，将产生一种血型糖蛋白异构体，缺乏 27-35 氨基酸残基，但保留 N-糖基化共有序列 Asn-Ala-Thr。MiX 血型糖蛋白中天冬酰胺连接的糖基缺失 (图 5)，

证明在 HGpMiX 转录物的加工过程中确实使用了上游组成性剪接位点。有两个因素可能导致该位点相对于其重复序列的优先使用。上游的剪接位点与剪接所需的结构元件相连，包括一个富含嘧啶的序列和一个共有分支点。此外，它的位置更靠近第二个内含子中的剪接供体。然而，在某些情况下，即使这些结构要求没有完全满足，也可能发生可变剪接。进一步研究 HGpMiX 转录物，将为碱基水平上可能发生的可变剪接事件提供线索。

我们认为，人类血型糖蛋白的大量等位基因多样性的原因可能是，在各种基因间重组事件中，胞外结构域外显子（包括沉默的假外显子）混编。到目前为止，所有的不等同源重组都发生在内含子内。虽然这种内含子-内含子交换可能形成新的外显子间连接，但它们对抗原变异的贡献相当有限。事实上，我们最近发现，不等同源重组，每一个都独立地发生在第三内含子中的一个不同位点，导致了 HGpSta 基因的三种亚型，编码相同的 Sta 蛋白。相反，越来越多的证据表明，基因转换可能在该家族的许多其他杂交蛋白的起源中发挥了更重要的作用。

将 HGpMiX 与 HGpMiIII 和 MiVI 进行比较（图 7），可以得出以下结论。（a）它们具有相似的组织结构，除外显子 III 外，所有的外显子都来自于 HGpB 基因的一个 δs 等位基因。（b）它们都是 HGpB (δ) 序列被替换、丢失；替换进来的 HGpA (α) 序列始于不同重复序列定义的不同位点，然后延伸一段较短的序列，该延伸序列的最小长度分别是：HGpMiX 基因中是 98 bp，HGpMiIII 是 55 bp，HGpMiVI 是 131 bp。（c）在所有情况下，片段转移都与剪接供体的共转换有关，也与融合到包含隐蔽剪接受体的沉默序列有关。因此，这三种杂交基因在复合外显子及其相邻外显子之间形成相同的外显子间连接，但外显子内连接的位置不同。因此，这些特征反映在各自的蛋白质结构中（图 7，上），并部分解释了其抗原特性。HGpMiX 作为迄今发现的另一种 δ - α - δ 杂交基因，与 MiIII 和 MiVI 基因转换位点不同，这有力地表明，通过特定基因组 DNA 基序混编表达和不表达的序列，是进化过程中塑造 MNSs 血型系统抗原多样性的一种重要的机制。

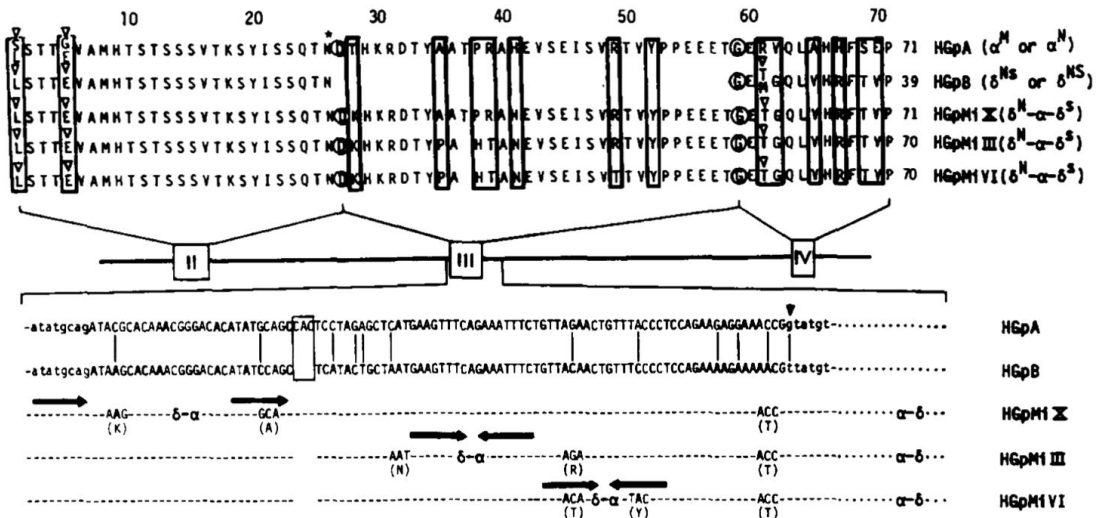


图 7 HGpMiX 与其他变异血型糖蛋白的一级结构比较。上图示亲代和变异血型糖蛋白的胞外结构域的氨基酸序列的比对结果。空心三角形和圆的意义同图 4B。星号表示 N-糖基化位点。氨基酸的变异被框出。中图与上图蛋白质结构对应的外显子 II-IV 的基因组结构。下图示包含 HGpA 的第三外显子、HGpB 的沉默假外显子以及 HGpMiX、MiIII 和 MiVI 变异基因的复合外显子的核苷酸序列的比对结果。竖条表示 HGpA 和 HGpB 之间的核苷酸差异。HGpB 中缺失的三核苷酸 (CAC) 被框出。实心三角形指向剪接供体的第一个核苷酸，该剪接供体在除 HGpB 外的所有基因中都有活性。箭头表示可能参与基因转换事件的同向重复序列或反向重复序列。在每个变异基因中，近端断点的位置是由亲代基因特征性的氨基酸密码子来定义的。值得注意的是，HGpMiX、MiIII 和 MiVI 的远端 α - δ 断点都终止于第三内含子。破折号表示与 HGpA 或 HGpB 相同的核苷酸。

已经在大量人类多基因家族中描述过基因转换机制的同源重组，包括球蛋白、结合珠蛋白、免疫球蛋白和主要组织相容性复合体（MHC）基因簇。在 HGP_{MiX}、Mi_{III} 和 Mi_{VI} 基因中观察到的基因重排的分子特征类似于发生在 MHC 或 HLA I 类和 II 类基因中的转换事件。（a）将相对较短的 DNA 片段从一个成员转移到另一个成员，通常局限于包含蛋白质胞外结构域的基因组区域。（b）可变部分中的沉默序列可以被反式激活，以多样化抗原特异性。（c）通常，特定的基因组序列，如回文序列，位于重组断点的两侧，并参与基因重排。然而，对这些序列的调查显示，它们与血型糖蛋白基因中发现的重复序列没有相似之处。虽然 MHC 系统中的等位基因多样性是功能上的必要条件，但血型糖蛋白基因家族中的等位基因多样性的意义仍有待了解。

16 《TSEN: a novel MNS-related blood group antigen》

《TSEN：一种新的 MNS 相关血型抗原》

作者：Reid ME, Moore BP, Poole J, Parker NJ, Asenbryl E, Vengelen-Tyler V, Lubenko A, Galligan B

作者单位：英国布里斯托尔输血中心国际血型参考实验室；加拿大红十字会血液服务国家参考实验室；加拿大红十字会血液服务多伦多中心；美国洛杉矶和奥兰治县红十字会血液服务中心；北伦敦输血中心；加拿大圣约瑟夫健康中心

来源：Vox Sang. 1992;63(2):122-8.

摘要：

我们报道了一种抗体（抗 TSEN），其识别的抗原（TSEN）位于 GPA⁵⁸ 与 GPB²⁷ 连接处的独特氨基酸序列上（GPB 携带 S 抗原）。几个无亲缘献血者的红细胞被抗 TSEN 凝集，这些红细胞都具有这种 GP(A-B) 杂交分子。由于该连接处氨基酸序列的合成肽（Pro-Glu-Glu-Glu-Thr-Gly-Glu-Met-Gly-Gln-Leu-Val-His-Arg）特异性抑制抗 TSEN，因此 TSEN 抗原肯定位于这个新的氨基酸序列中。ISBT 红细胞表面抗原术语工作组已为 TSEN 抗原暂时分配 MNS 血型系统抗原编号 002.033。

1 引言

血型糖蛋白 A（GPA；又称：唾液酸糖蛋白 α ，MN SGP）和血型糖蛋白 B（GPB；又称：唾液酸糖蛋白 δ ，Ss SGP）是存在于人类红细胞膜中的密切相关的唾液酸糖蛋白。当第一个氨基酸残基为丝氨酸，第五个氨基酸残基为甘氨酸时，GPA 表达 M 血型抗原，当第一个氨基酸残基为亮氨酸，第五个氨基酸残基为谷氨酸时，GPA 表达 N 血型抗原。GPB 在氨基酸残基 1 和 5 上分别有亮氨酸和谷氨酸，因此，它总是携带‘N’抗原。GPB 氨基酸残基 29 的多态性（蛋氨酸或苏氨酸）分别产生 S 和 s 抗原。GPA 和 GPB 对蛋白水解酶裂解的敏感性不同。在完整的红细胞上，胰蛋白酶很容易在氨基酸残基 39 处切割 GPA，而 α -胰凝乳蛋白酶的作用不大。相比之下，胰蛋白酶对 GPB 的影响很小，而 α -胰凝乳蛋白酶很容易在氨基酸残基 32 和 34 处切割 GPB。

其他 MNS 相关血型抗原有些位于 GPA 或 GPB 的变异体上，这些变异体源于氨基酸取代和/或糖基化改变。有些存在于杂交分子上 GPA 和 GPB 的连接处。例如，当氨基酸残基 1-26 来自 GPB，氨基酸残基 59-131 来自 GPA 时，GPB 到 GPA 的连接处存在 Sta 抗原。当氨基酸残基 1-39 来自 GPB，氨基酸残基 71-131 来自 GPA 时，GPB 到 GPA 的连接处存在 Dantu 抗原。Hil 抗原包含氨基酸序列 PEEETGETGQLVHR，存在于 Mi.V 红细胞上 GPA 到 GPB 的连接处，此时氨基酸残基 1-58 来自 GPA，氨基酸残基 54-104 来自 s 特异性 GPB 的氨基酸残基 27-72。

一些人的红细胞携带 GP(A-B) 杂交分子，但未证实存在新型血型抗原：En(a-) ^{UK} 分子由很小部分的 GPA 连接到 GPB，而 JR、AG 和 JL 红细胞中 GP(A-B) 杂交分子包含更大部分的 GPA。JL 红细胞含有的杂交分子 1-58 氨基酸残基来自 GPA，59-104 氨基酸残基来自 S 特异性 GPB 的 27-72 氨基酸残基。

本文报道了两位新的先证者（Rag 和 Oca），其红细胞含有相对分子质量为 40000 的 GP(A-B) 杂交

分子，以及凝集这些红细胞的一种新的抗体（抗 TSEN）。有证据表明，TSEN 抗原位于 GPA 到 GPB 连接处，包含氨基酸序列 PEEETGEMGQLVHR。

2 材料和方法

来自正常献血者和已知具有各种 Mi 表型的个体的红细胞、人类多克隆和小鼠单克隆抗体均由实验室自制。单抗 LICR.LON R1.3 (R1.3) 与 GPA 和 GPB 的 N 端部分上的一个表位发生反应。R10 与 GPA 的 36 和 39 氨基酸残基区域的一个表位发生反应。BRICs 116、117、119 和 127 结合在 GPA 的同一区域，但不是与相同的表位结合；它们的结合位点位于包含氨基酸残基 26-39 的序列上。R18 与 GPA 的 49-52 氨基酸残基区域中的一个表位发生反应。BRIC 157 (9W10) 是一种抗 N 抗体，BRIC 163 与 GPA 的 C 端结构域上的一个表位发生反应。单抗 148 检测 GPB 上的一个氨基酸序列为 TNGE 的表位，并优先与 S+红细胞反应。

2.1 血清学检测

全程使用标准血清学试管技术。红细胞用胰蛋白酶和 α -胰凝乳蛋白酶处理，如之前报道所述。将抗体吸收到抗原阳性的红细胞上，然后 56℃ 加热 10 min 进行放散，或对洋地黄皂苷溶解的红细胞基质进行酸放散。

2.2 免疫印迹

在还原条件下，红细胞膜在 3% (w/v) 丙烯酰胺的成层胶和 10% (w/v) 丙烯酰胺的分离胶上进行电泳分离。免疫印迹法基本与 Mallinson 等描述的相同，不同之处在于使用含 5% 牛奶粉的磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.3) 作为阻断剂。

2.3 血凝抑制

Hil 肽 (PEEETGETGQLVHR)、JL 肽 (PEEETGEMGQLVHR)、Mur 肽 (DTTPAHTANEVSE)、Hop 肽 (EISVTTVTPP) 之前已描述过。将它们与等量的未稀释的血清 (15 μ l) 混合，并在室温下孵育 15 min。然后加入 5% 红细胞生理盐水悬液 (30 μ l)，采用间接抗球蛋白试验检测。

3 结果

3.1 Tsen 夫人的案例研究

1984 年，一名 33 岁的女性 (Tsen 夫人) 接受 6 单位的压积红细胞输注，没有发生事故。1985 年，她入院接受肾移植。在输血前测试中，她的血清在间接抗球蛋白试验中对来自一个供者 (Rag) 的红细胞强凝集，对 St (a+) 红细胞弱凝集；没有发现其他强反应性的样本。这些发现表明，Tsen 夫人血清中存在一种针对 Rag 红细胞上一种低频血型抗原的抗体。移植前两天，Tsen 夫人接受了 4 单位的交叉配血相合的血液，没有发生事故。她接受了抗淋巴细胞球蛋白治疗，并产生了一种泛凝集性的抗 IgG 抗体。她丈夫的红细胞没有被她的血清凝集。

在 1990 年重新检查 Rag 红细胞时，从 Tsen 夫人那里获得了新鲜的血清。在间接抗球蛋白试验中，该血清与 Rag 红细胞强凝集，但不再凝集 St (a+) 红细胞，也不再含有泛凝集素。这种新鲜的血清供应使得可以进行更广泛的研究。

3.2 对 Tsen 夫人的红细胞和血清的血清学检测

Tsen 夫人的红细胞血型为 O、D+C+E+c+e+、M+N+S+s+、P1+、Lu (a-)、K-、Le (a-b+)、Fy (a-b+)、Jk (a+b+)。

Tsen 夫人的血清在几个实验室进行了检测，与具有以下 MNS 抗原的红细胞无反应：DANE、Dantu、Far、He、Hey、Hil、Hop、Hut、M₁、M^c、M_g、Mit、Mt^a、Mur、M^v、Nob、Ny^a、Or、Ri^a、Sj、Tm、Vw。该血清与含有以下抗原的红细胞也无反应：C^w、C^x、Evans、Go^a、Rh32、Rh33、Rh35、Rh40、V、Vs；Js^a、Kp^a、Kp^c、K10、K17；Lu^a、Lu9、Lu14；An^a、Bg^a、Bg^b、Bg^c、Bp^a、By、Chr^a、Co^b、Di^a、Duch、ELO、

Fr^a、Gf、Hov、In^a、Je^a、Jn^a、Kn^b、Li^a、Ls^a、LW^b、McC^b、Mo^a、P^k、NFLD、Pt^a、Rb^a、Rd、Reid、Sc2、Sk^a、Sw^a、Tc^b、Tc^c、To^a、Tr^a、Vg^a、Wb、Wd^a、Wr^a、Wu、Yt^b，以及大量携带未报告的低频抗原的红细胞样本。

3.3 对 Rag 红细胞的血清学检测

强不相容献血者 (Rag) 红细胞血型为 O、D+C+E-c+e+、M-N+S+s+、P1+、Lu (a-)、K-、Le (a-b+)、Fy (a+b+)、Jk (a+b+)。这些红细胞不具有以下与 MNS 相关的血型抗原：Cl^a、Dantu、Far、He、Hil、Hop、Hut、M₁、M^c、M_g、Mit、Mt^a、Mur、M^v、Nob、Ny^a、Or、Ri^a、s^D、Sj、St^a、Sul、Tm、Vr、Vw。Rag 红细胞具有 MINY 抗原，但不具有以下低频抗原：Be^a (Rh36)、C^w (Rh8)、C^x (Rh9)、Evans (Rh37)、E^w (Rh11)、Go^a (Rh30)、Har (Rh33)、JAL (Rh48)、Rh32 (Rh_n)、Rh33、V (Rh10)、VS (Rh20)、Rh35、Tar (RH40)、D^w (Rh23)；Lu9、Lu14、Co^b、Di^a、Kp^a、Kp^c、Js^a、K^w、Ul^a、Wk^a；P^k、An^a、Bg^a、Bg^b、Bg^c、Bi、BOW、Bp^a、Bu^a、Bx^a、By、Chr^a、Dh^a、ELO、Fr^a、Gf、Good、Hey、Hg^a、HJK、HOFM、Hov、Ht^a、In^a、Je^a、Jn^a、JONES、Kg、Kn^b、Li^a、Ls^a、LW^b、McC^b、Mo^a、NFLD、Ol^a、Os^a、Pe、POLL、Pt^a、Rb^a、Rd、Re^a、Rl^a、Sk^a、Sw^a、SWI、Tc^b、Tc^c、To^a、Tr^a、Vg^a、Wb、Wd^a、Wr^a、Wu、Yt^b、Zt^a，以及大量未发表的抗原。

值得注意的是，在最初的测试中，7 例抗 S 中有 4 例未凝集 Rag 红细胞。因此，用另外 18 例多特异性人源抗 S 检测 Rag 红细胞。其中 4 例血清也无反应，而其他血清的反应性从弱到强不等。单抗 148 未凝集 Rag 红细胞 (表 1)。用抗 U 抗体获得的滴度和评分与正常对照红细胞相当。

在吸收实验中进一步研究了 Rag 红细胞上 S 抗原的不同表达强度。用 S+s-红细胞吸收的抗 S 完全失去了对 S+和 Rag 红细胞的反应性，而用 S-s+红细胞吸收没有消除对 S+或 Rag 红细胞的反应性。Rag 红细胞完全去除了抗 S 对 Rag 红细胞的强反应性，减弱但不完全去除对 S+红细胞的反应性。这些结果表明，Rag 红细胞的 S 抗原表达有性质的改变，而不是活性抗 S 有污染的“抗 Rag”。酶处理红细胞检测结果 (表 1) 表明，Rag 红细胞上改变的 S 抗原与 TSEN 抗原有关，因此可能在杂交血型糖蛋白分子上，而 s 抗原在正常 GPB 分子上。

表 1 抗 S、抗 s 和抗 TSEN 与 Rag、Oca 红细胞的反应

RBC	Anti-S	Anti-s	MoAb 148	Anti-TSEN
S+s- untreated	3+	0	3+	0
S-s+ untreated	0	3+	±	0
Rag. untreated ¹	0 (8) ± (2) + (2) 3+ (13)	3+	0	3+
Rag.-papain ¹	0	0	NT	0
Rag.-α-chymotrypsin ¹	0	3+	NT	0
Rag.-trypsin ¹	3+	3+	NT	3+
Oca. ¹ untreated	0 (1) ± (1) + (2) 3+ (6)	0	0	3+

NT = not tested. Numbers in parentheses denote the number of anti-S giving that reaction.

¹ Tested with strongly reactive anti-S.

3.4 对 Oca 红细胞和血清的血清学检测

在产前检测中，发现 Oca 夫人的血清具有一种在抗球蛋白试验中与所有红细胞都反应的抗体。唯一相容的红细胞来自于一位已知具有 GP (A-B) 杂交分子的个体 (AG)。

Oca 红细胞血型为 O、D+C+E+c+e+、M+N-S+s-、P1+、K-k+、Fy (a+b-)、Jk (a-b+)，并有以下高频抗原：Kp^b、Js^b、Di^b、Co^a、At^a、Cr^a、Er^a、Jr^a、Ge2、Ge3、Lan、Ok^a、PP1P^k、Rh29、Sc:1、Vel、Gy、Hy。Oca 红细胞为 En^aFR-、En^aFS-，缺乏 Vw、Hut、Mur、Hil、Hop 和 Nob 抗原。

Oca 红细胞 M 抗原单剂量表达，S 抗原表达定性改变。3 例抗 M，在它们显示剂量效应（与 M+N-红细胞反应 2+~3+，与 M+N+红细胞反应阴性）的条件下与 Oca 红细胞反应，结果阴性。用 10 例强反应性人源抗 S 检测 Oca 红细胞，6 例反应强，2 例反应中等，1 例反应弱，1 例不反应。单抗 148 不凝集 Oca 红细胞，但抗 TSEN 凝集 Oca 红细胞（表 1）。Oca 红细胞 U 抗原表达正常，MINY 阳性。

3.5 免疫印迹

用 R1.3 对 Rag 红细胞膜进行免疫印迹显示，除了正常的 GPA 和 GPB 条带外，还有 2 个相对分子质量为 40000 和 80000 的条带（图 1）。R10、R18、BRIC 116、BRIC 117、BRIC 119 和 BRIC 127 识别的表位均出现在异常成分上，而 BRIC 163 识别的表位不出现在异常成分上。BRIC 157 也与异常成分发生反应，表明存在 N 抗原。尝试用反应性抗 S 制备的放散液和抗 TSEN 进行免疫印迹均不成功。R1.3、R10、BRIC 119 和 BRIC 127 在胰蛋白酶处理 Rag 红细胞膜的免疫印迹上无反应。在类似的实验中，R18 与一个相对分子质量为 14000 的成分反应，表明该表位存在于异常成分的胰蛋白酶不敏感部分。

总的来说，这些结果表明，Rag 红细胞具有一种异常成分，其单体形式的相对分子质量为 40000，至少

有一个胰蛋白酶裂解位点。存在 GPA 的氨基酸残基 26~52, 缺失 GPA 的 C 端。仅使用可获得的抗血清, 不可能确定 N 端结构域是 GPA 还是 GPB 来源。这些结果与 Mi.V 红细胞相关的 GP (A-B) 杂交分子获得的结果一致; 然而, Rag 红细胞是 Hil 阴性的。正常 GPA 和 GPB 的存在表明, Rag 是 GYP (A-B) 杂交基因杂合子。结果与 TSEN 抗原位于 GP (A-B) 杂交血型糖蛋白的胰蛋白酶不敏感、 α -胰凝乳蛋白酶敏感部分相一致。

在 Oca 红细胞制备的膜上用 R1.3 免疫印迹显示, 存在 2 个相对分子质量为 40000 和 80000 的条带, 而正常 GPA 和 GPB 对应的条带不存在。这与 Oca 是 GYP (A-B) 杂交基因的纯合子相一致。R10、R18 和 BRIC 127 识别的表位存在, 而 BRIC 163 识别的表位不存在。R1.3 在胰蛋白酶处理的 Oca 红细胞制备的膜的免疫印迹上无反应, 而 R18 与相对分子质量为 14000 的成分发生反应, 表明该表位存在于异常成分的胰蛋白酶不敏感部分。这些结果表明, Oca 红细胞具有 GP (A-B) 杂交分子, 其单体形式的相对分子质量为 40000, 至少有一个胰蛋白酶裂解位点。

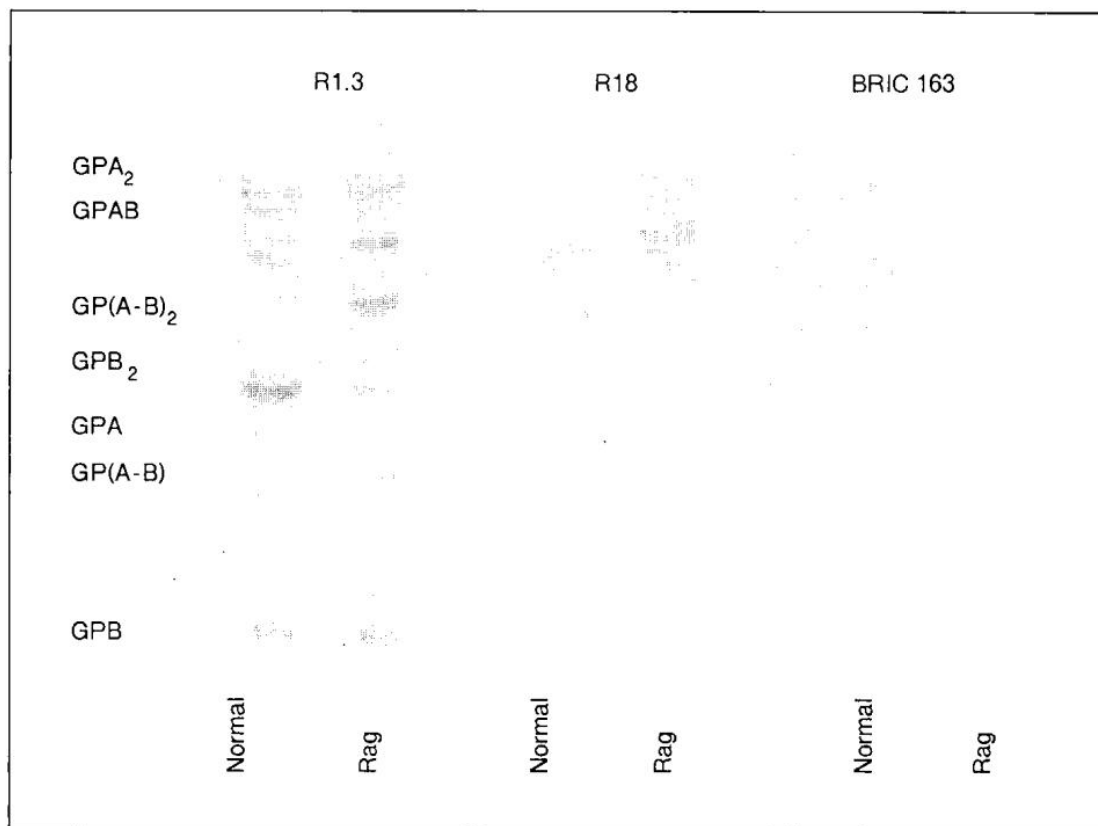


图 1 R1.3、R18 和 BRIC 163 的免疫印迹。对在还原条件下溶解的等量的红细胞膜进行电泳和免疫印迹。显示了正常和 Rag 红细胞膜与抗 GPA 单抗 R1.3, R18, BRIC 163 的免疫印迹。GPA₂、GPB₂ 和 GP (A-B)₂ 分别表示 GPA、GPB 和 GP (A-B) 的二聚体。GPAB 是指 GPA 和 GPB 的异源二聚体。

3.6 对其他具有 GP (A-B) 杂交分子的个体的红细胞进行检测

从其他已知有杂交 GP(A-B) 分子或改变的 GPA 分子的献血者那里获得了红细胞。结果见表 2, 抗 TSEN 仅凝集有相对分子质量为 40000 的 GP (A-B) 杂交分子的红细胞 (Rag、Oca、JL、JR、AG), 以及 Mi.IV 红细胞。采用免疫印迹法证实, AG、JR 和 JL 的红细胞膜中异常血型糖蛋白具有 R1.3、R10 和 R18 识别的表位, 而不具有 BRIC 163 识别的表位。具有其他 GP (A-B) 杂交分子 (Mi.V, En (a-) ^{UK})、GP (B-A-B) 杂交分子 (Mi.III, Mi.VI)、GP (B-A) 杂交分子 (St (a+), Dantu+)、改变的 GPA 分子 (Mi.I, Mi.II, Mi.VII, Mi.VIII) 的红细胞, 未被抗 TSEN 凝集。缺乏 GPA (En (a-) ^{FIN})、缺乏 GPB (U-)、同时缺乏 GPA 和 GPB (MkMk)、4 个新型先证者 (TK, Mi.IX, GP.Mor, GP.Kipp) 的红细胞, 也未被抗 TSEN 凝集。认为 TK

红细胞有一种 GP (A-B) 杂交分子, 但具有表型 S-s-, 而 Mi.IX、GP.Mor 和 GP.Kipp 的 GP 改变尚未见报道。

表 2 抗 TSEN 与各种红细胞的反应

RBC	AHG reaction
Rag.	3+
Oca.	3+
JL	3+
JR	3+
AG	3+
Mi. IV	3+
Mi. V; En(a-) ^{UK}	0
Mi. III; Mi. VI	0
St(a+); Dantu+	0
Mi. I; Mi. II; Mi. VII; Mi. VIII	0
En(a-) ^{FIN} ; U-; MkMk	0
TK; Mi. IX; GP. Mor; GP. Kipp	0

AHG: 间接抗球蛋白试验

3.7 家系研究

Rag 的母亲、姐姐/妹妹和丈夫的红细胞呈 TSEN 阴性: 她的父亲已故。她的 3 个孩子遗传了 TSEN 抗原和 GP (A-B) 杂交分子; 然而, 由于他们都从父亲那里遗传了一个正常的编码 S 的 GYPB 基因, 因此未检测他们 S 抗原的改变情况。

在 AG 家系中, TSEN 抗原与 MS 抗原共同遗传; 在 Rag 家系中, TSEN 抗原与 NS 抗原共同遗传。Mi.IV 个体的兄弟的红细胞, 也有 Mi.IV 表型、S 表达改变和 TSEN 阳性。其他 TSEN 阳性先证者 (JR、JL、Oca) 的家系成员的红细胞无法获得。

3.8 血凝抑制

TSEN 抗原位于 GPA⁵⁸ 与 GPB²⁷ 交界处的可能性, 通过使用合成肽的血凝抑制得到证实。以 Mi.IV 或 Rag 红细胞为指示细胞, 在终浓度低至 12.5μg/ml 时, 'JL'肽完全抑制抗 TSEN。在终浓度高达 500μg/ml 时, 'Hil'、'Mur'或'Hop'肽没有抑制抗 TSEN。'JL'和'Hil'肽由 14 个氨基酸残基组成, 只有 1 个残基不同: 残基 8 上是蛋氨酸或苏氨酸。当 GPB 携带 S 抗原时, 这些结果将 TSEN 抗原定位于 GPA⁵⁸到 GPB²⁷的交界处。

3.9 ISBT 红细胞表面抗原编号

ISBT 红细胞表面抗原术语工作组已为 TSEN 抗原暂时分配 MNS 血型系统抗原编号 002.033 (MNS33)。

4 讨论

我们描述了一种新的 MNS 相关血型抗原 TSEN, 并表明它位于新的氨基酸序列上, 该序列中正常 GPA 的氨基酸残基 58 与正常 S 特异性 GPB 的氨基酸残基 27 相连。我们将 Rag 红细胞上的这种新抗原命名为

“TSEN”，是因为该抗原决定簇由 Tsen 夫人的血清识别，且还存在于其他红细胞样本上。这与血型抗原命名的惯例不符。这样做不是因为抗 TSEN 识别一个家族抗原或它是一种自身抗体，而是为了避免与其他已知名称混淆（例如，Rg 表示 Rodgers；Rag 表示因子 VIII 相关抗原；Rags 表示类风湿凝集素）。

抗 TSEN 是因交叉配血不相合而发现的。不相合的红细胞（Rag）具有 GP（A-B）杂交分子。根据单抗对酶处理前后 Rag 红细胞的反应性，可以明显看出该 GP（A-B）杂交分子存在 GPA 氨基酸残基 26-52，C 端结构域源自 GPB。无法确定 N 端 26 个氨基酸残基是 GPA 还是 GPB 来源。用 Oca 红细胞得到了类似的结果，Oca 红细胞也是 TSEN 阳性。鉴于这些发现，我们测试了其他带有 GPA 和 GPB 杂交分子的红细胞。Mi.III、Mi.V、Mi.VI、St（a+）和 Dantu 阳性红细胞 TSEN 阴性，而 JL 红细胞 TSEN 阳性。已描述具有这些表型的个体的 cDNA 的核苷酸序列，并已推导出 GPA 和 GPB 的不同部分的氨基酸序列。JL 红细胞具有 GP（A-B）杂交分子，由 GPA 的氨基酸残基 1-58 和 S 特异性 GPB 的氨基酸残基 27-72 组成。该 GP（A-B）连接处具有氨基酸序列 PEEETGEMGQLVHR。具有该氨基酸序列的合成肽抑制了抗 TSEN，从而证实了其特异性，并将 TSEN 抗原定位到 GP（A-B）连接处。

基于这些发现，我们提出，其他 TSEN 阳性的红细胞（Rag、Oca、JR 和 AG）具有类似的 GP（A-B）杂交分子。我们还推测，任何具有 GPA⁵⁸ 与携带 S 的 GPB²⁷ 连接的杂交分子的红细胞都将具有 TSEN 抗原。这方面的一个例子是 Mi.IV 表型红细胞，它可能具有 GP（B-A-B）杂交分子。需要氨基酸或核苷酸测序来证明这一假设。

虽然 AG 红细胞具有 GP（A-B）杂交分子，且是 S 阳性和 TSEN 阳性，但它们也是 Hil 弱阳性。最近的研究表明，Hil 抗原出现在 GPA⁵⁸ 和 GPB²⁷ 的连接处，GPB 在氨基酸残基 29 上有苏氨酸，因此携带 s 抗原。因此，Hil 抗原需要氨基酸序列 PEEETGETGQLVHR，与 TSEN 抗原的差异只有一个氨基酸残基。根据与人源抗 S、单抗 148 和抗 TSEN 的反应，AG 红细胞可能具有 GP（A-B）杂交分子，包括 GPA 的氨基酸残基 1-58 和 S 特异性 GPB 的氨基酸残基 27-72。AG 红细胞上存在弱 Hil 抗原的原因可能是，连接处附近有一些其他的微小改变，也可能是抗 Hil 对 s 特异性序列不是完全特异性的，而是与 S 特异性序列发生交叉反应。

S 抗原在 TSEN 阳性红细胞上的部分表达表明，人源抗 S 至少识别两种抗原决定簇。Dahr 等报道，人源多克隆抗 S 抗体识别的 S 抗原需要 GPB 的 Met29，但也受到 Glu28、His34、Arg35 和 Thr25 上 O-糖苷键连接的低聚寡糖的影响。很明显，那些凝集 TSEN 阳性红细胞的人源多克隆抗 S 抗体不需要 Thr25 或其 O-聚糖，因为与 GPA 的连接消除了这个潜在的糖基化位点。因此，不同的抗 S 显然对最佳反应性有不同的要求，而构象和/或糖基化的改变也影响了它们的反应能力。

总之，TSEN 抗原是一种以前未被描述过的与 MNS 相关的低频血型抗原。它位于 GPA⁵⁸ 与 GPB²⁷ 的交界处，基因编码 Met29，因此位于新氨基酸序列 PEEETGEMGQLVHR 中。如果该氨基酸序列仅相差 1 个氨基酸（Thr 取代 Met），则红细胞为 TSEN 阴性，而具有低频的 Hil 血型抗原。TSEN 阳性和 Hil 阳性红细胞具有 MINY 抗原，存在于 GPA⁵⁸ 和 GPB²⁷ 的连接处，与 GPB 部分携带 S 还是 s 无关。

致谢

JR 红细胞由美国辛辛那提 Hoxworth 血液中心的 Wilkinson 提供；Mi.IV 细胞由南伦敦地区输血中心的 Bushrod 提供；Mi.IX、GP.Mor 和 TK 细胞由伦敦 MRC 血型单位的 Green 提供。感谢 Immucor 公司的 Sinor、Stone、Farlow 和 Rolih 提供单抗克隆 F84.3E8.E2 的上清液（ISBT Workshop 1990 MoAb No. 148）；纽约阿尔伯特·爱因斯坦医学院的 Blumenfeld 提供合成肽。感谢美国洛杉矶和奥兰治县地区红十字会的 Marfoe 检测 Oca 红细胞；加拿大红十字会的 Cornwall 和美国 Gamma 公司的 Moulds 检测 Rag 红细胞和 Tsen 血清。

17 《MINY: a novel MNS-related blood group antigen》

《MINY：一种新型的 MNS 相关血型抗原》

作者：Reid ME, Poole J, Green C, Neill G, Banks J

作者单位：英国布里斯托尔输血中心国际血型参考实验室；英国爱丁堡皇家医院

来源：Vox Sang. 1992;63(2):129-32.

摘要：

我们报告了一种抗体（抗-MINY），它可以识别一种新的低频 MNS 相关血型抗原。抗-MINY 凝集所有 Hil 阳性红细胞（Mi.III、Mi.V、Mi.VI、GP.Kipp、GP.Mor 和 AG）和 Hil 阴性 TSEN 阳性红细胞（Mi.IV、JR、JL、Oca 和 Rag）。所有 MINY 阳性的红细胞都具有血型糖蛋白 A-B 杂交分子。无论血型糖蛋白 B 基因在正常血型糖蛋白 B 的氨基酸残基 29 上编码蛋氨酸还是苏氨酸，MINY 抗原都发生在血型糖蛋白 A⁵⁸ 与血型糖蛋白 B²⁷ 连接产生的独特氨基酸序列上。ISBT 红细胞表面抗原术语工作组已为 MINY 抗原暂时分配 MNS 血型系统抗原编号 002.034。

1 引言

血型糖蛋白 A（GPA；又称：唾液酸糖蛋白 α ，MN SGP）和血型糖蛋白 B（GPB；又称：唾液酸糖蛋白 δ ，Ss SGP）是存在于人类红细胞膜中的密切相关的唾液酸糖蛋白。GPA 在其 N 端携带 M 和 N 血型抗原决定簇，GPB 在其 N 端携带 N 血型抗原，此外还携带 S 和 s 血型抗原（氨基酸残基 29 处，S 为蛋氨酸，s 为苏氨酸）。其他 MNS 相关血型抗原有些位于 GPA 或 GPB 的变异体上，这些变异体源于氨基酸取代加糖基化改变，或仅氨基酸取代。有些存在于 GPA 和 GPB 的连接处。例如，Sta 和 Dantu 抗原出现在血型糖蛋白 B 到血型糖蛋白 A（GP（B-A））杂交分子上。Hil 抗原存在于 Mi.V 红细胞中 GP（A-B）杂交分子（GPA 氨基酸残基 1-58 和血型 s 特异性 GPB 氨基酸残基 27-72）上的这两个血型糖蛋白的连接处，序列为 Glu-Thr-Gly-Glu-Thr-Gly。Glu-Thr 由 GYP A 基因编码，Gly-Glu-Thr-Gly 由来自血型 s 特异性 GYP B 基因的 DNA 片段编码。Hil 抗原也存在于 Mi.III 和 Mi.VI 红细胞中，这些红细胞具有由 GP（B-A-B）组成的血型糖蛋白杂交分子。GPA-GPB 连接处是 GPA⁵⁸-GPB²⁷，因此，该连接处的氨基酸序列与 Mi.V 红细胞相同。

来自以下个体的红细胞：JR、AG、JL、Rag 和 Oca 也携带 GP（A-B）杂交分子，具有改变的 S 抗原，s 阴性并具有 TSEN 抗原。JL 红细胞中的杂交分子由 GPA 的 1-58 氨基酸残基和血型 s 特异性 GPB 的 27-72 氨基酸残基组成。因此，JL 红细胞 GP（A-B）杂交分子的连接序列为 Glu-Thr-Gly-Glu-Met-Gly，其中 Glu-Thr 由 GPA 的 DNA 片段编码，Gly-Glu-Met-Gly 由血型 s 特异性 GYP B 基因的 DNA 片段编码。

在这篇论文中，我们报道了一种抗体（抗-MINY），它可以检测一种抗原（MINY），该抗原存在于具有 Hil 或 TSEN 低频抗原的红细胞上。我们提供的证据表明，抗-MINY 识别位于 GPA⁵⁸ 与 GPB²⁷ 交界处的氨基酸序列。

2 案例研究

McI 夫人是一名健康的献血者，曾有一次流产和两次足月妊娠。1959 年，她在流产后的一次手术中接受了 5 个单位的血液输注。1981 年，她一个单位血液的红细胞被发现直接抗球蛋白试验呈阳性，这导致了对她血清中抗体的调查。

3 材料和方法

我们收集的标本中有具有正常表型和 Mi 亚类表型的红细胞。JR 红细胞由美国 Hoxworth 血液中心的 Wilkinson 提供；JL、AG 和 Oca 红细胞由美国红十字会血液服务中心的 Vengelen-Tyler 提供；Rag 红细胞由加拿大红十字会的 Moore 提供；Mi.IV 细胞由南伦敦输血中心的 Bushrod 提供；Mi.IX 和 TK 红细胞由伦敦 MRC 血型单位的 Green 提供；来自一位 Mi.V 纯合子个体（FM）的红细胞由英国布里斯托尔输血中心的免

疫化学部门提供；En (a-) ^{UK} 红细胞由兰开斯特国家输血中心的 Hodson 提供。合成肽由纽约阿尔伯特·爱因斯坦医学院生物化学系的 Blumenfeld 惠赠。

全程使用标准血清学试管技术。红细胞用胰蛋白酶和 α -胰凝乳蛋白酶处理，如之前报道所述。通过将等体积的压积洗涤红细胞与血清在 18℃ 下孵育 60 min，来进行吸收试验。使用洋地黄皂苷/酸法或 EDTA/HCl 法从抗原阳性红细胞上放散抗体。

3.1 抑制研究

合成肽用磷酸盐缓冲盐水稀释到浓度 1 mg/ml。将等量的这些肽溶液和血清（稀释后使抗体产生 2+ 的血凝反应）混合，并在室温下孵育 20 min。加入红细胞（30 μ l 5% LISS 悬液），进行直接凝集试验（DAGT）。这些试管是由一个独立的调查人员进行编码和阅读的，而他不知道这些试管的内容。

3.2 免疫印迹法和免疫沉淀法

免疫印迹法基本与 Mallinson 等描述的相同，不同之处在于使用含 5% 牛奶粉的磷酸盐缓冲盐水（pH 7.3）作为阻断剂，以及使用过氧化物酶偶联抗人免疫球蛋白检测人源抗体的结合。免疫沉淀法基本与 Moore 等描述的相同，不同之处在于使用浓度为 2% 的 Triton X-100，以及使用 G 蛋白修饰琼脂糖珠代替 A 蛋白修饰琼脂糖珠。

4 结果

4.1 血清学检测

McI 夫人的红细胞血型为 O, C+c+D+E-e+, M-N+S-s+, P1+, Lu(a-), K-, Le(a-b+), Fy(a+b+), Jk(a+b+)。她的红细胞与抗 IgG 试剂的 DAGT 呈阳性，在几年的检测中强度不同。1982 年，DAGT 为中等强度，且她的血清中含有一种木瓜蛋白酶反应性自身抗体，其特异性在当时尚不确定。1988 年，DAGT 呈强阳性，用 EDTA/HCl 法从她的红细胞制备的放散液，除 En (a-) 和一位 M^k 纯合子个体的红细胞外，与所有木瓜蛋白酶处理的红细胞均呈强阳性。因此，该自身抗体可以识别 GPA 上的某个抗原决定簇。在 1991 年，DAGT 要弱得多，但木瓜蛋白酶自身抗体仍然存在于她的血清中，并且仍然可以从她的红细胞制备出反应性放散液。McI 夫人的血清中还含有抗-S 和弱抗-Vw（通过盐水法检出），以及抗-Wra, -Mit, -Sta 和 -Dantu（通过间接抗球蛋白试验检出）。除了这些可以通过适当红细胞吸收相互分离的抗体外，她的血清还含有一种强的生理盐水凝集素，识别以前未描述过的低频 MNSs 相关抗原，我们将其命名为 MINY。用 AB 型、S+、胰蛋白酶处理的红细胞吸收抗 A、抗 B 和抗 S，用吸收后的血清得到以下结果。

抗-MINY 强凝集以下红细胞：Mi.III、Mi.IV、Mi.V、Mi.VI、GP.Kipp、GP.Mor、AG、JR、JL、Rag 和 Oca。GP.Kipp 和 GP.Mor 是与 Miltenberger 子系统相关的未发表的变异体[J. Poole 和 P. Tippett, 私人交流]。所有这些红细胞，或者是 Hil 阳性（Mi.III、Mi.V、Mi.VI、GP.Kipp、GP.Mor 和 AG，AG 是 Hil^{wk}），或者是 TSEN 阳性（Mi.IV、AG、JR、JL、Rag 和 Oca），都具有由 GPA 和 GPB 组成的杂交分子。Hil 阳性和 TSEN 阳性红细胞的滴定评分（表 1）表明，无论 GPB 是 S 特异性还是 s 特异性，抗-MINY 与所有反应性红细胞反应强度相同。抗-MINY 不凝集携带以下低频 MNS 相关抗原的红细胞：DANE (Mi.IX)、Dantu、He、Hop (Mi.VIII)、Hu、Hut (Mi.II)、M₁、M^c、M^g、Mit、M^a、M^v、Nob (Mi.VII 和 Mi.VIII)、Or^a、Ri^a、St^a、Tm、Vr。抗-MINY 与一位 M^kM^k 个体的红细胞无反应，与其他已知具有 GP (A-B) 杂交分子的红细胞（即 En (a-) ^{UK} 和 TK）无反应。由于对 Hil 阳性和 TSEN 阳性的红细胞及其各自的抗体已进行了彻底的研究，因此没有进行广泛的检测。

用所有可获得的 MINY+红细胞进行吸收研究（表 2），结果表明抗-MINY 是一种单特异性抗体。MINY 抗原决定簇对木瓜蛋白酶和 α -胰凝乳蛋白酶敏感，对胰蛋白酶不敏感。

表 1 抗-MINY 的滴定分数

RBC		Titer	Score
Mi.III	Hil+ 1	32	54
	2	32	55
Mi.V	Hil+ 1	32	60
	2	32	59
Mi.IV	TSEN+ 1	32	59

表 2 用各种红细胞对抗-MINY 的吸收

Absorbed anti-MINY tested with	Anti-MINY ¹ absorbed with			
	Mi.III	Mi.IV	Mi.V	GP.Kipp
Mi.III	0	0	0	0
Mi.IV	0	0	0	0
Mi.V	0	0	0	0
Mi.VI	0	0	0	0
Rag	NT	0	0	NT
GP.Kipp	NT	NT	NT	0
GP.Mor	0	NT	0	NT
JL	NT	0	0	NT
AG	NT	0	0	NT
Oca	NT	0	0	NT

NT = Not tested.

¹ Before absorption, anti-MINY reacted 4+.

4.2 家系研究

对 AG、Rag 和 107 家系成员的红细胞检测结果显示, MINY 抗原与 MNSs 共同遗传。在 AG 家系中 MINY 伴 MS 遗传, Rag 家系中伴 NS 遗传, 107 家系中伴 Ms 遗传。

4.3 血凝抑制

考虑 MINY 抗原位于杂交分子上 GPA 与 GPB 连接处的可能性。使用 GPA⁵⁸ 与 GPB²⁷ 连接处氨基酸组成的合成肽抑制抗 -MINY。1:4 稀释的抗 -MINY, 被 Hil 肽 (PEEETGETGQLVHR) 和 JL 肽 (PEEETGEMGQLVHR) 完全抑制, 肽的终浓度低至 12.5 µg/ml, 使用 Mi.III、Mi.IV 或 Rag 红细胞作为指示细胞。抗-MINY 不被 Mur 肽 (DTTPAHTANEVSE) 或 Hop 肽 (EISVTTVTTP) 抑制, 肽的终浓度高至 500 µg/ml, 使用 Mi.III 和 Rag 红细胞作为指示细胞。

4.4 免疫化学

我们多次尝试通过免疫印迹法和免疫沉淀法证明 MINY 抗原位于异常血型糖蛋白上，但均未成功。

5 讨论

我们描述了一种抗体（抗-MINY），识别一种血型抗原（MINY），该抗原位于 GP（A-B）杂交分子的连接处，正常 GPA 的 Thr⁵⁸ 连接到正常 GPB 的 Gly²⁷。我们已经证明，无论 GPB 的第 29 个残基是蛋氨酸（S）还是苏氨酸（s），MINY 抗原都出现在这个连接处（图 1）。

分子生物学研究表明，献血者 FM 红细胞中 Mi.V 血型糖蛋白杂交分子由正常 GPA 的 1-58 氨基酸残基和正常 GPB 的 27-72 残基组成，GPB 的 29 残基是苏氨酸。类似的研究也表明，Mi.III 和 Mi.VI 红细胞 GP（B-A-B）杂交分子具有相同的连接，因此具有相同的氨基酸序列。这个氨基酸序列（Glu-Thr-Gly-Glu-Thr-Gly-Gln）使得 s 血型抗原可以表达（尽管 s 表达改变了），并产生 Hil 血型抗原。

具有 GP（A-B）杂交分子的红细胞，直到最近还没有已知的新的血型抗原，已经通过分子生物学技术进行了分析。JL 红细胞具有 GP（A-B）杂交分子，由正常 GPA 的 1-58 氨基酸残基和正常血型 s 特异性 GPB 的 27-72 残基组成。因此，该连接处的氨基酸序列为：Glu-Thr-Gly-Glu-Met-Gly-Gln。这个序列最近被证明产生 TSEN 血型抗原。

对已经在分子水平上进行了血液分析的几个个体的红细胞样本进行了抗-MINY 检测。抗-MINY 与所有 Hil 阳性或 TSEN 阳性的红细胞反应，因此，MINY 抗原位于 GPA⁵⁸ 和 GPB²⁷ 连接处，无论 GPB 是携带 S 还是 s 抗原。ISBT 红细胞表面抗原术语工作组已为 MINY 抗原暂时分配 MNS 血型系统抗原编号 002.034。

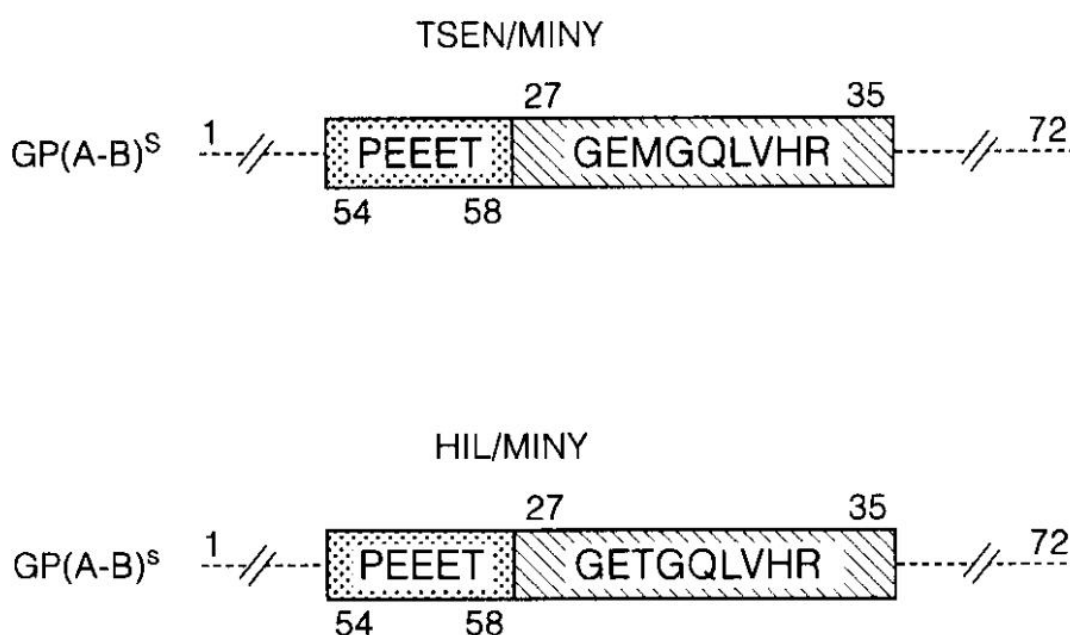


图 1 MINY 血型抗原在血型糖蛋白杂交分子上的位置示意图。▨ = GPA; ▩ = GPB。数字代表正常血型糖蛋白上的氨基酸残基。

18 《The Miltenberger subsystem: is it obsolescent?》

《Miltenberger 子系统：它已经过时了吗？》

作者：Tippett P, Reid ME, Poole J, Green CA, Daniels GL, Anstee DJ

作者单位：英国伦敦医学研究委员会血型单位；英国布里斯托尔国际血型参比实验室
来源：Transfus Med Rev. 1992 Jul;6(3):170-82.

1 引言

Cleghorn 于 1966 年首次提出将 MNS 血型系统的四种相关低频红细胞抗原归入一个子系统 Miltenberger (Mi.)。Cleghorn 对不同实验室的几种血清的研究进行了整理和扩展。根据与四种血清的反应，定义了四种细胞类型。四种血清是 Verweyst (Vw)、Miltenberger (Mi^a)、Murrell (Mur) 和 Hill (Hil)；四种细胞类型是 Mi.I、Mi.II、Mi.III 和 Mi.IV。这四种细胞都与 Miltenberger 夫人的血清呈阳性反应，因此把它们关联起来（表 1）。一个新的类型，Mi.V，被添加到 Miltenberger 子系统。Mi.V 红细胞样本与 Miltenberger 夫人血清反应阴性，但与抗 Hil 反应阳性。Mi.子系统进一步扩展到 8 种表型，并由 Giles 根据抗原决定簇重新定义，而不再根据与血清的反应定义。相关的低频抗原随后被国际输血协会红细胞抗原术语工作组编号。最近又增加了第九类。这些抗原总结见表 1。有一些细胞样本，用与 Mi.III 和 Mi.IV 细胞反应阳性的抗体检测时，呈阳性反应，但不符合已识别的表型，将在后面讨论。

表 1 Miltenberger 类型

MNS	Antigenic Determinants							
	Mi ^a 7	Vw 9	Mur 10	Hil 20	Hut 19	Hop 26	Nob 27	DANE 32
Mi.I	+	+	-	-	-	-	-	-
Mi.II	+	-	-	-	+	-	-	-
Mi.III	+	-	+	+	-	-	-	-
Mi.IV	+	-	+	-	-	+	-	-
Mi.V	-	-	-	+	-	-	-	-
Mi.VI	+	-	+	+	-	+	-	-
Mi.VII	-	-	-	-	-	-	+	-
Mi.VIII	-	-	-	-	-	+	+	-
Mi.IX	-	-	+	-	-	-	-	+

注意：数字是 ISBT 抗原编号。Mi^a 不是抗原决定簇，因历史原因被纳入；它是由一种血清定义的，最初是 Miltenberger 夫人的血清。缩写：+，阳性；-，阴性。

从一开始，人们就对抗 Mi^a 抗体的特异性提出了质疑，因为 Miltenberger 血清看起来是异质性的。人们发现抗 Mi^a 具有多特异性，具有可分离和交叉反应的抗体。Giles 推测，“如果 Miltenberger 复合体作为一个实体存在，那么 Mi^a 作为一个抗原决定簇可能就不存在了。”Anstee 也持这一观点。由于合适红细胞罕见、“单特异性”血清缺乏（大多数试剂都是具有交叉反应成分的多特异性试剂），Mi.抗原决定簇之间关系的澄清受到阻碍。最近使用 Mi.I、Mi.II 和 Mi.III 细胞进行的吸收/放散试验结果表明，Miltenberger 夫人（1972 年亡故）的血清中含有抗 Vw+抗 MUT：没有发现可分离的抗 Mi^a 的证据（Green，未发表的观察结果）。几乎没有证据表明 Mi^a 是一个独立的抗原决定簇。大多数血清，如 Miltenberger 夫人的血清，都有可分离的抗 Vw+抗 MUT 和/或抗 Mur 和/或抗 Hut（Poole，未发表的观察结果）。因此，不再将 Mia 作为抗原决定簇考虑。

MN 和 Ss 抗原由血型糖蛋白 A (GPA) 和血型糖蛋白 B (GPB) 携带。GPA 和 GPB 是红细胞上主要的

富含唾液酸的糖蛋白。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的红细胞膜成分与抗 GPA 和抗 GPB 的免疫印迹显示，单体 GPA 的表观相对摩尔质量 (M_r) 为 42000，单体 GPB 的 M_r 为 25000。已测定 GPA 和 GPB 的氨基酸序列：在残基 1 和 5 处， GPA^M 分别是丝氨酸和甘氨酸， GPA^N 分别是亮氨酸和谷氨酸。GPB 的氨基酸残基 1-26 与 GPA^N 相同；GPB 的 Ss 多态性取决于 29 残基上的单氨基酸取代：GPB^{NS} 是蛋氨酸，GPB^{Ns} 是苏氨酸。

编码 GPA 和 GPB 的基因紧密连锁，并已被定位到第 4 号染色体上。这些基因的克隆显示它们具有相当大的同源性，并证实了它们的紧密连锁和染色体定位。GPA 的基因有 7 个外显子，其中 5 个（外显子 A2 到 A6）编码蛋白。GPB 的基因有 5 个外显子，其中 3 个（外显子 B2 到 B4）编码蛋白。这两个基因有 4 个外显子是相同的（图 1）。这两个基因的外显子 1 都包含 5'非编码序列和部分信号序列。外显子 B2 和 B3（内含子 B2）之间的插入序列包含一段序列，被 Blumenfeld 和同事称为假外显子（图 1 中的 ψB ）。该假外显子与 A3 外显子相似，但不表达，这是由于单核苷酸取代导致 5'剪接信号序列失活。在对 GPA 和 GPB 的基因的研究中，发现了第三个相关基因（GYPE）。目前尚未明确发现与 GPE 对应的细胞表面蛋白，尽管已经发现了一个可能的候选蛋白。

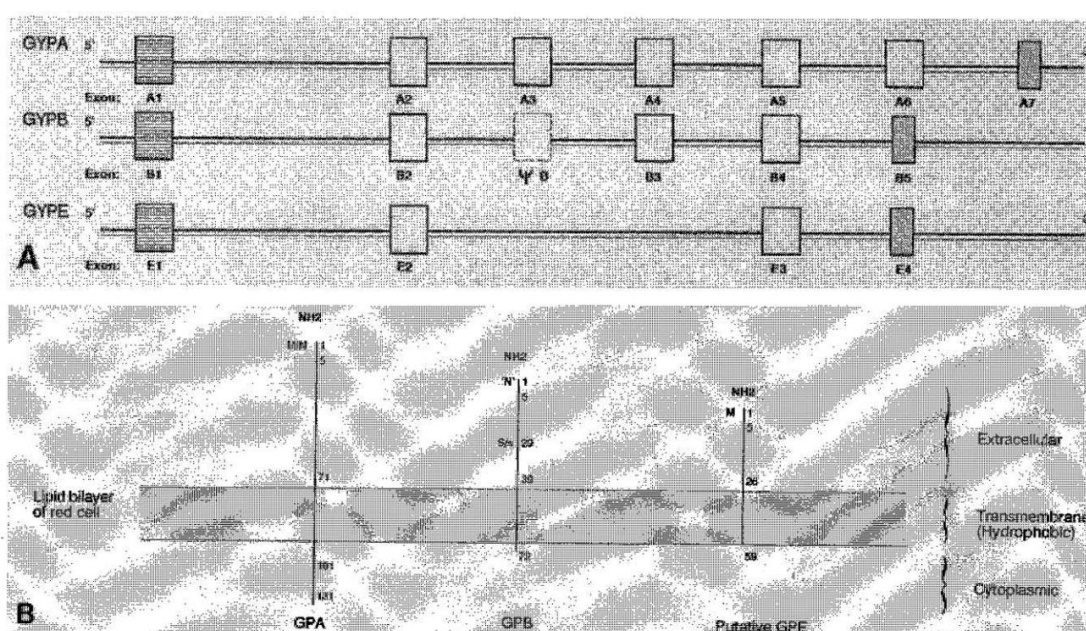


图 1 GYPA、GYPB 和 GYPE 的基因组结构 (A) 以及这些基因编码的血型糖蛋白 (B)：▨表示 5'非编码序列和部分信号序列；▩表示 3'非翻译外显子；□表示假 GYPB 序列 (ψB)；▬表示插入序列。

生化和分子研究表明，Mi.细胞类型与 GPA 分子的改变形式有关，或与由 GPA 和 GPB 序列组成的杂交分子有关。这些杂交分子源于减数分裂时的染色体错位和不等交换，或源于基因转换机制。在减数分裂时，一次不等交换后，一条染色体上只有杂交基因 *GYP (A-B)*，没有正常 *GYP A* 或 *GYP B* 基因；另一条染色体上有杂交基因 *GYP (B-A)*，还有正常 *GYP A* 和正常 *GYP B* 基因。两次不等交换或基因转换后，一条染色体上有 *GYP (B-A-B)* 杂交基因和正常 *GYP A* 基因，没有 *GYP B* 基因；另一条染色体上有 *GYP (A-B-A)* 基因和正常 *GYP B* 基因，没有 *GYP A* 基因。

这篇综述旨在总结目前 Mi.类型的血清学、遗传学、生化和分子知识，并考虑 Miltenberger 表型术语（为满足血清学标准而设计）是否已失去用途。我们的结论是，由于这些表型的生化基础和（有时）遗传基础已经建立，进一步扩展这种表型术语是不合适的。因此，我们将建议使用另一种简略的表型术语。

2 Mi.I 和 Mi.II 细胞类型

2.1 血清学和遗传

Mi.I 和 Mi.II 是 Cleghorn 发现的两种细胞类型[最初归类为 Mi (a+) Vw+ Mur-和 Mi (a+) Vw- Mur-], Giles 认为 Mi.I 细胞表达特征抗原 Vw, Mi.II 细胞表达特征抗原 Hut (表 1)。Hut 最初被 Race 和 Sanger 用作第五种血清的名称, Cleghorn 用 Mi.I 细胞吸收抗 Mia 分离得到: 这种血清 (现在大多认为含有抗 MUT) 与 Mi.II、Mi.III 和 Mi.IV 细胞反应。Giles 认为 Hut 型血清是抗 Hut 和抗 Mur 的混合物。

在几个白人群体中发现了 Mi.I 表型个体, 但在美国黑人、日本人或爱斯基摩人中没有发现: Mourant 等总结了几项研究。瑞士东南部 Mi.I 表型频率最高 (1.43%)。编码 Mi.I 的等位基因通常与 *N* 一起遗传。家系研究显示, 18 例 Mi.I 伴有 *Ns*, 3 例伴有 *NS*, 仅一个家系中伴有 *MS* (表 2)。在我们记录的 Mi.I 献血者 (未检测家系) 中, 有 45 例 M-N+, 44 例 M+N+和 1 例 M+N-; 有趣的是, 这种分布也提示 Vw 抗原与 *N* 表达有关。为了解北欧以外的人群中是否也是这种分布, 我们咨询了 3 家美国大型参考实验室 (位于罗克维尔市和洛杉矶市的美国红十字会实验室; Ortho 公司) 的 Mi.I 样本的 MN 表型。在列出的 68 个 Mi.I 样本 (可能有重复样本) 中, 只有 2 个是 M+N-, 其中 1 个来自泰国。

在白人和黑人群体中, 发现了 Mi (a+) Vw- 细胞; 这种表型包括 Mi.II 和 Mi.III 细胞类型。编码 Mi.II 的等位基因伴有 *M* 和 *N* 的几率相等; 它与 *MS* (4 个家系) 和 *Ns* (3 个家系) 一起遗传 (表 2)。在我们的 Mi.II 献血者中, 有 3 个 M-N+, 4 个 M+N+和 5 个 M+N-。

也有报道 Mi.I 或 Mi.II 细胞与抗 M、抗 N、抗 S 或抗 s 无异常反应。在胰蛋白酶处理的 Mi.I 细胞和 Mi.II 细胞上检测不到特征抗原 Vw 和 Hut。

表 2 Miltenberger 类型: 遗传和生化信息

Mi Class	Travels with	Known Alterations of GPA
Mi.I	Ns; NS; MS	Amino acid substitution on GPA (28 Thr → Met)
Mi.II	MS; Ns	Amino acid substitution on GPA (28 Thr → Lys)
Mi.III	M*s; Ns	GP(B-A-B ^{Thr29})
Mi.IV	NS	GP(B-A-B ^{Met29})
Mi.V	Ms; Ns	GP(A-B ^{Thr29})
Mi.VI	M*s	GP(B-A-B ^{Thr29})
Mi.VII	Ms; MS	Amino acid substitution on GPA (49 Arg → Thr and 52 Thr → Ser)
Mi.VIII	Ns	Amino acid substitution on GPA (49 Arg → Thr)
Mi.IX	MS	Aberrant GPA, molecular basis not determined

注意: B^{Met29} 和 B^{Thr29} 分别来自携带 S 和 s 抗原的 GPB。*推测的 M 抗原, 因为正常的 *GYP A* 基因与 *GYP (B-A-B)* 杂交基因相关。

2.2 免疫化学和分子生物学

电泳分离的 Mi.I 和 Mi.II 红细胞膜组分的过碘酸希夫 (PAS) 染色, 没有显示明显的异常模式, 但在 Mr 40000 区域显示条带染色增强, 随后显示是由 GPA 改变引起的。用 GPA 特异性单克隆抗体 (MoAb) 进行免疫沉淀和免疫印迹 (图 2), 证实了这一发现: 抗 N 染色 N^{Mi.I} 和 N^{Mi.II} 细胞中的异常单体, 抗 M 染色 M^{Mi.I} 和 M^{Mi.II} 细胞中的异常条带。抗 Vw 免疫印迹也发现了 Mi.I 膜中的特征性 40000 条带。

Dahr 等对携带 Vw 和 Hut 的 GPA 分子 (分别是 Mi.I 和 Mi.II 细胞的变异 GPA) 进行了测序。他们在两种 GPA 分子的 28 残基上都发现了一个氨基酸取代: 苏氨酸在 GPA Vw 中被蛋氨酸取代, 在 GPA Hut 中被赖氨酸取代。在这两种情况下, 这种替代都阻止了天门冬酰胺残基 26 的 N-糖基化, 为免疫印迹上观察到的 3000 的 Mr 变化提供了解释 (图 2)。这种变化不影响胰蛋白酶在残基 39 处的切割位点, 与血清学发现一致: Vw 和 Hut 是胰蛋白酶敏感的抗原; 它们的 M、N、S 和 s 抗原表达正常。这并不能解释 N 伴随 Vw 的发生率为何高于预期。

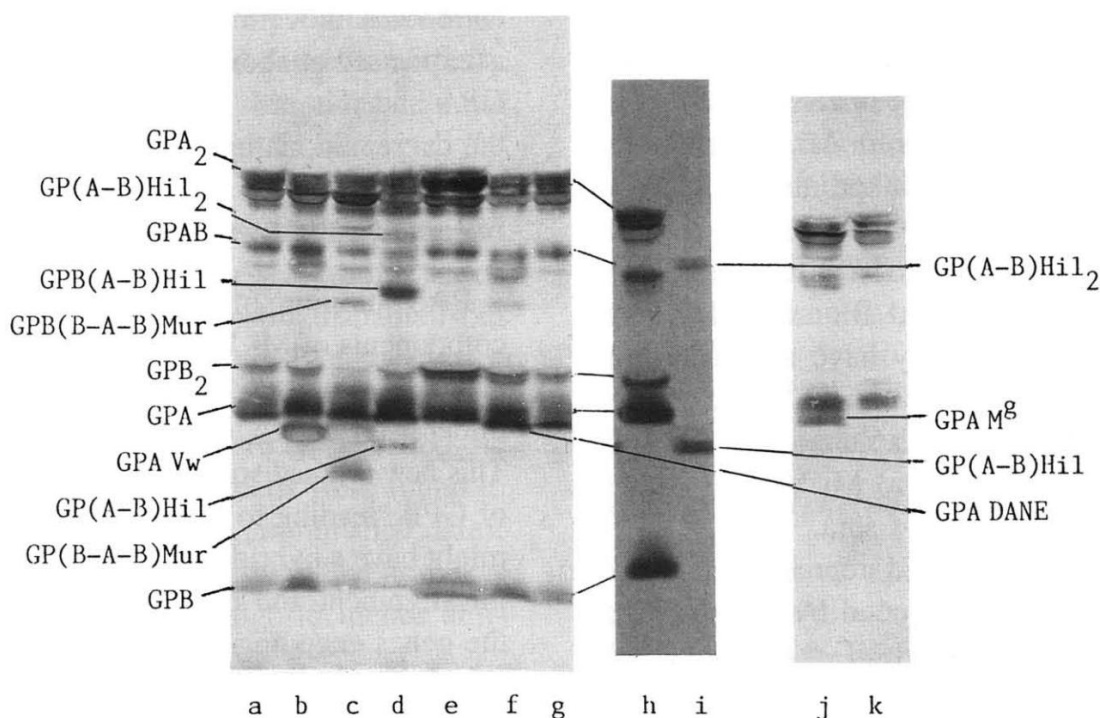


图 2 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后红细胞膜成分的免疫印迹。泳道 a~i: 用 R1.3 单抗进行免疫染色, R1.3 检测 GPA 和 GPB 的 N 端区域共有的抗原决定簇。泳道 j 和 k: 用选定的单克隆抗 M (19W4) 进行免疫染色。a, g, h, k = M+N+对照; b = GP.Vw, 与 GP.Hut 相同; c = GP.Mur, 与 GP.Hop、GP.Bun 和 GP.Kipp 相同; d = GP.Hil, 与 GP.JL、GP.JR 和 GP.AG 相同; e = GP.Nob, 与 GP.Joh 和常见 MNS 表型细胞相同; f = GP.Dane; i = Hil/M^k 个体的细胞; j = M^g, 显示抗 M 免疫染色, 因为 R1.3 不免疫染色 GPA M^g, 可能是因为糖基化减少。

3 Mi.III、Mi.IV 和 Mi.VI 细胞类型

3.1 血清学和遗传

Mi.III 和 Mi.IV 由 Cleghorn 发现: 与抗 Mur 反应阳性, 将这些 Mi (a+) Vw- Mur+细胞与 Mi.II 细胞区分开来 (表 1)。与抗 Hil 反应阳性, 将 Mi.III 细胞与 Mi.IV 细胞区分开来 (表 1)。11 年后, 血清 Anek 的反应从 Mi.III 中分出一个新的类型, Mi.VI。在泰国, 似乎是 Mi.III 的样本中, 约 7% 与 Anek 血清呈阳性, 因此是 Mi.VI; 在香港华人献血者中, Mi.VI 的频率要低得多。

Mi.III 和 Mi.VI 在白人中很少见, 但 Mi.III 在一些亚洲人群中频率在 5% 到 10% 之间。编码 Mi.III 的等

位基因总是与 s 抗原一起遗传，或是 *Ms*，或是 *Ns*；编码 Mi.VI 的等位基因在三个献血者家系中与 *Ms* 一起遗传（表 2）。只记录了一个 Mi.IV 白人家系；该家系中，编码 Mi.IV 的等位基因与 *NS* 一起遗传（表 2）。

由编码 Mi.III 的等位基因产生的 s 抗原是不寻常的，因为尽管血清学检测时增强其表达，但它还是只能被一些而不是所有的抗 s 检测到。*Ms^{Mi.III}* 和 *Ms^{Mi.VI}* 基因复合物比普通的 *Ms* 基因复合物表达更多的 N：一些 M+N- Mi.III 和 Mi.VI 细胞被错误地分型为 M+N+。Mi.IV 相关的 S 抗原是不寻常的；它只能被一些而不是所有的抗 S 检测到。Mi.IV 细胞没有被单克隆抗 GPB（MAb-148）凝集，该抗体最初被认为具有抗 S 特异性。

与低频抗原 Vw 和 Hut 不同，在 Mi.III、Mi.IV 和 Mi.VI 细胞上发现的抗原 Mur、Hil 和 Hop 对胰蛋白酶不敏感。

3.2 免疫化学和分子生物学

电泳分离的 Mi.III、Mi.IV 和 Mi.VI 红细胞膜组分的 PAS 染色显示，每个病例中都存在一种异常蛋白，导致了几条额外的条带。通过抗 GPA 和 GPB 单克隆抗体的免疫印迹证实了额外条带的存在；每种异常分子的单体形式的表观 *Mr* 都是 38000（图 2）。用选定的抗 GPA 和 GPB 单克隆抗体对不寻常 MN 基因型（*Mi.III/Mi.III*, *Mi.III/S^U*, *Mi.III/Dantu*）个体的红细胞膜进行免疫印迹，证实这些细胞缺乏正常 GPB，因为只有正常 GPA 带，GPB^{Mi.III} 的 38000 带，及其同源和异源复合物被染色。这些 Mi.类型的 GPB 来源与它们的低频抗原的胰蛋白酶抗性行为相一致。研究发现，Mi.III 细胞的唾液酸含量增加。

生化研究的结果提示，Mi.III、Mi.IV 和 Mi.VI 的异常成分是带有 GPA 插入片段的 GPB 分子（表 2）；Mi.III 和 Mi.VI 已通过核苷酸测序得到证实。编码 Mi.III 和 Mi.VI 的基因与 *GYPB* 基因的差异在于：*GYPB* 的一个内部片段被 *GYP A* 基因的同源部分取代，形成 *GYP (B-A-B)* 杂交基因，表达 *GYPB* 假外显子。编码 Mi.III 和 Mi.VI 的基因的差异在于：①替换的序列长度不同（Mi.III 为 55 bp，Mi.VI 为 131 bp）；②断点的精确位置不同（外显子 3 中 GPB-GPA 连接的位置不同；内含子 3 中 GPA-GPB 连接的位置不同）。Huang 和 Blumenfeld 认为，这些杂交基因可能是通过基因转换的机制产生的。该衍生序列为 Mi.III 和 Mi.VI(s+ Mur+ Hil+) 细胞与一些抗 s 血清的异常反应提供了一个可能的解释。

合成了 Mur 肽（Asp-Thr-Tyr-Pro-Ala-His-Thr-Ala-Asn-Glu-Val-Ser-Glu）和 Hop 肽（Glu-Ile-Ser-Val-Thr-Thr-Val-Tyr-Pro-Pro）。Mur 肽代表氨基酸残基 32~43，由 Mi.III 和 Mi.VI 的异常 *GYP* 基因编码。Hop 肽是 Mi.VI 和 Mi.VIII 的血型糖蛋白共有的一段氨基酸序列。Hop 肽特异性抑制抗 Hop。Mur 肽抑制了 Mi.III 和 Mi.VI 细胞与含有抗 Mur(+抗 Vw 和抗 Hut)的血清的反应，但不抑制该血清与 Mi.IV 细胞的反应。

4 Mi.V 细胞类型

4.1 血清学和遗传

这类细胞被包括在 Miltenberger 子系统中，是因为其与抗 Hil 反应阳性，尽管与抗 Mi^a 反应阴性（表 1）。Mi.V 细胞不表达与 Mi.类型相关的任何其他低频抗原。

在对 5 万名英国献血者的检测中，没有发现 Mi.V 表型；但在其他欧洲人群中发现了 Mi.V 表型——在一项对瑞士献血者的调查中，Mi.V 表型频率高达 1/2000。编码 Mi.V 的等位基因总是与 s 抗原相关，并与 *M* 或 *N* 一起遗传（表 2）。Mi.V 细胞的 M 或 N 抗原被抑制，但 s 抗原的表达被增强。异常蛋白上携带的 M 或 N 抗原是胰蛋白酶敏感的，而 Hil 抗原是胰蛋白酶抗性的。

一些植物凝集素能够凝集 Mi.V 细胞，这使得人们开始研究 Mi.V 细胞的唾液酸含量：发现 Mi.V 细胞的唾液酸含量显著下降。使用放射性碘化的单克隆抗体的定量研究表明，异常 GP 分子的表达水平约为正常 GPA 的 1/3，这为唾液酸含量降低提供了可能的解释。

4.2 免疫化学和分子生物学

电泳分离的 Mi.V 膜成分的 PAS 染色发现了一种特征模式，显示条带（单体、二聚体和异源二聚体）代

表一种新的 GP。这种新的 GP 具有 GPA 和 GPB 的一些特性，提示 Mi.V 细胞可能存在杂交 GP，这是编码 GPA 和 GPB 的基因之间的染色体错位和不等交换的结果。通过免疫沉淀和后来的免疫印迹（图 2），以及对罕见基因型 *Mi.V/Mi.V* 和 *Mi.V/M^k* 细胞的研究，证实了杂交血型糖蛋白 GP (A-B)^{Mi.V} 的存在。GP (A-B)^{Mi.V} 的单体形式的 Mr 为 40,000。

该变异 GP 的遗传基础已经被阐明。推断 GP (A-B)^{Mi.V} 是由 GPA 氨基酸残基 1~58 和 GPB 氨基酸残基 27~72 组成的杂交分子。该交换涉及 *GYP A* 的内含子 3。编码 Mi.V 的基因由 *GYP A* 的外显子 A1~A3 和 *GYP B* 的外显子 B3~B5 组成。

合成了 Hil 肽（Pro-Glu-Glu-Glu-Thr-Gly-Glu-Thr-Gly-Gln-Leu-Val-His-Arg），用于血凝抑制试验。Hil 肽代表 GPA 和 GPB 杂交连接序列，Mi.V 的氨基酸残基 54-67（Mi.III 的 53-67）。Hil 肽在与 Mi.III、Mi.V 和 Mi.VI 细胞的测试中特异性抑制抗 Hil。

5 Mi.VII 和 Mi.VIII 细胞类型

5.1 血清学和遗传

通过对三种血清（Anek、Raddon 和 Lane）区分 Mi.VI 细胞和 Mi.III 细胞的研究，还发现了一种新的 Mi.表型，Mi.VII（表 1）。Mi.VII 细胞对抗-Mi^a、-Vw、-Mur、-Hil 和-Hut 呈阴性，但对血清 Raddon 和 Lane 呈阳性，对血清 Anek 呈弱阳性。这种反应格局归因于血清 Raddon 和 Lane 中的抗 Nob，以及血清 Anek 中的抗 Hop。第二种抗体，EL，特异性类似于 Anek，含有抗 Hop，与 Mi.VII 细胞没有反应；用 EL 进行的测试揭示了 Mi.VIII 表型的存在。Mi.VIII 细胞携带 Hop 和 Nob 抗原，但没有其他 Mi.抗原（表 1）。难以区分纯合 Mi.VII (KT) 细胞与 Mi.VIII 细胞对 Mi.抗血清的反应格局，因为与血清 Anek 都是强阳性反应（未使用 EL 血清）；一项家系研究确定了真正的类型。随后，发现 KT 细胞对 EL 血清反应阴性（Poole，未发表的数据）。此外，Laird-Fryer 等发现纯合 Mi.VII 细胞缺乏高频抗原 En^aKT。

Mi.VII 表型仅在白人献血者中发现；在英国布里斯托尔的 4929 名随机 O 型献血者的测试中发现了 3 个 Radon 血清阳性反应者，频率为 0.06%，最近发现了第四个先证者（Poole 未发表的观察）。Mi.VII 与 *Ms*（一个家系）和 *MS*（两个家系）相关（表 2）。Mi.VIII 发生的频率未知。研究了两个已知先证者的家系；在这两个家系中，Mi.VIII 都与 *Ns* 共同遗传。

Mi.VII 和 Mi.VIII 细胞的 M、N、S 和 s 抗原的反应强度正常。

5.2 免疫化学和分子生物学

电泳分离的 Mi.VII 和 Mi.VIII 红细胞膜组分的 PAS 染色模式未见异常。对纯合 Mi.VII 个体 (KT) 细胞的研究，将 En^aKT 抗原与正常 GPA 的 46-56 氨基酸残基联系起来。Dahr 等通过对 Mi.VII 和 Mi.VIII 细胞的变异 GPA 分子中胰蛋白酶消化后的肽（残基 40-61）的序列分析，对 Mi.VII 和 Mi.VIII 细胞进行了生化分析。在 Mi.VII 细胞中，他们发现了两个氨基酸替换：残基 49 处精氨酸被苏氨酸取代，残基 52 处酪氨酸被丝氨酸取代。49 位的苏氨酸被糖基化。由 Anek 血清定义的 Mi.VII 细胞上的抗原决定簇被定位到 40~61（或 40~57）残基区域。该抗原决定簇依赖于该区域中 O-连接糖上的唾液酸。类似的研究表明，Mi.VIII 细胞也缺乏 En^aKT 抗原决定簇。与 GPA Mi.VII 类似，发现 GPA Mi.VIII 在 49 号残基处有一个氨基酸取代，精氨酸被苏氨酸取代，且该苏氨酸残基被糖基化。与 GPA Mi.VII 不同，第 52 位酪氨酸没有变化（表 2）。Dahr 等认为，Mi.VIII 的基因可能是 Mi.VII 的基因与正常 *GYP A* 基因之间的进化联系。

6 Mi.IX 细胞类型

6.1 血清学和遗传

对一种针对某低频抗原的抗体的研究导致发现 Mi.IX 类型。Mi.IX 细胞表达了 Mur 抗原和一种新的抗原 DANE，但不表达其他 Mi.抗原（表 1）。Mi.IX 细胞类型在丹麦的频率约为 0.43%。对四个丹麦先证者的家系研究表明，该新类型与 *MS* 共同遗传（表 2）。Mi.IX 细胞的 M 抗原对胰蛋白酶不敏感（不寻常），但 S 抗原看上去是正常的。

6.2 免疫化学和分子生物学

使用抗 GPA 和/或 GPB 抗体进行的免疫印迹研究表明, Mi.IX 与一种异常的 GPA 分子(表观 Mr 42,000, 图 2) 有关, 该分子在正常 GPA 的氨基酸残基 39 处缺乏胰蛋白酶裂解位点。

7 其他相关的表型和抗原决定簇

其他几种表型促使人们重新评估扩展当前术语的价值。考虑的标准是 (1) 红细胞, 其与 Mi.抗血清的反应模式不适合任何已发现的细胞类型; (2) 抗血清, 其反应模式与表 1 所示不同; (3) 类似于 GP (A-B) Mi.V 的 GP (A-B) 杂交分子的生化/遗传鉴定。所涉及的细胞和抗血清列于表 3 中, 这些新的抗原决定簇和表型的详细信息已经发表或即将发表。一些表型仅通过一种 Mi.类型的共有抗原相关联; 例如, M^s 细胞表达 DANE 抗原, 该抗原只在 Mi.IX 细胞上发现 (表 1 和 3)。Mi^a 作为抗原决定簇存在的证据不足; 如果 Mi^a 不存在, 则没有共有抗原将 Mi.I 与其他 Mi.类型或相关表型联系起来。因此, 通过增加 Mi.类型的编号来扩展 Mi.术语似乎不可取; 因此, 我们提出了一种新的术语, 将用于本文的其余部分。

表 3 Miltenberger 抗血清及相关特异性与异常 MN 表型细胞的反应

Cells	Anti-							Type Serum	
	Mur	Hil	Hop	Nob	DANE	M ^s	TSEN ⁶⁶	MINY ⁶⁶	MUT
GP.JL ^{23,55,62*}	-	-	-	-	NT	-	+	+	NT
GP.AG ^{63,65,66}	-	(+)	NT	NT	NT	-	+	+	NT
GP.JR ⁶⁴⁻⁶⁶	-	-	-	-	NT	-	+	+	NT
GP.Mor ⁶⁷	-	+	-	-	-	-	-	+	+
GP.Kipp ⁶⁸	+	+	±	±	-	-	-	+	+
M ^s ^{5,69}	-	-	-	-	+	+	-	-	-

注意: 所有样本都是 Vw- Hut-。缩写: +, 阳性; -, 阴性; (+), 弱阳性; ±: 与一些血清反应阴性, 与其他血清反应阳性; NT, 未测。*信息也来源于 Green 未发表的观察结果。

7.1 建议的术语

为简化表型名称, 我们建议将表型命名为 GP.第一个先证者的名字, 例如 GP.Vw (表 4)。红细胞表型来自血清学检测, 总是可以用其抗原谱来表示: GP.Vw 可以定义为 Vw+, GP.Hut 可以定义为 Hut+, 因为这些抗原是这些表型所特有的。其他类型的定义更为困难, 因为它们的抗原被不止一个 Mi.类型共有。我们建议列出区分不同表型的最小抗原数量。这些抗原可以被记为符号或 ISBT 编号数字。某些表型的区分, 需要同时注明缺失和存在的抗原; 例如, GP.Hil 是 Hil+, 但 Hil+与 GP.Hil 不同义, 因为还有其他表型是 Hil+ (表 1 和 3)。

表 4 Miltenberger 表型及其血清学抗原决定簇的建议术语

First Propositus	Shorthand Symbol		Serological Determinants											
	Current	Proposed	Vw 9	Hut 19	Mur 10	MUT	Hil 20	TSEN 33	MINY	Hop 26	Nob 27	*	DANE 32	M ^a 11
Vw	Mi.I	GP.Vw	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hut	Mi.II	GP.Hut	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mur	Mi.III	GP.Mur	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Hop	Mi.IV	GP.Hop	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Rog	Mi.V	GP.Hil†	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Bun	Mi.VI	GP.Bun	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Nob	Mi.VII	GP.Nob	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Joh	Mi.VIII	GP.Joh	-	-	-	-	-	NT	-	+	+	+	-	-
Dane	Mi.IX	GP.Dane	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Mor		GP.Mor	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Kipp		GP.Kipp	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Gil	M ^a	GP.Mg‡	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
JL		GP.JL§	-	-	-	NT	-	+	+	-	-	-	NT	-
JR		GP.JR§	-	-	-	NT	-	+	+	-	-	NT	NT	-
AG		GP.AG	-	-	-	-	(+)	+	+	NT	NT	NT	NT	-

缩写：+，抗原存在；-，抗原不存在；（+），抗原弱表达。*未命名的抗原决定簇，由血清 BD、Anek 和 Raddon 检出。见正文和表 5。†使用常用的抗原名，而不是先证者名字。‡使用常用的表型名，而不是先证者名字。§认为携带部分 S 抗原的 GP.JL 不同于 S 抗原表达增强的 GP.JR。

当变异 GP 的生化结构被确定后，这可以与第一个先证者的名字一起使用。因此，已证明有 GP (B-A-B) 分子的 GP.Bun 表型，可以表示为 GP (B-A-B) Bun。如果已测序 GP，则可以确定每个亲代 GP 的贡献。当遗传学确定后，一个扩展的推断表型可以总结可用的信息：GP (B-A-B) Bun 是 GP (B-pseudoB-A-B^{Thr29}) (A58,B27) Bun。Thr (或 Met) 写作上标，表示血型糖蛋白 B 的氨基酸残基 29，正常表达 s (或 S) 抗原。第二个括号中的信息表示参与两个血型糖蛋白连接 (确定或推断) 的氨基酸；该连接用逗号表示。对于 GP (B-A-B) Bun，只有第二个连接处的氨基酸是已知的；假 B 外显子的激活阻碍了 B-A 连接处氨基酸的识别。对于生化结构是变异 GPA 分子的，保留了目前的术语：GPA 空格名字，例如 GPA Vw。当结构尚未确定时，我们建议使用符号 GPA:B。

保留了目前关于单特异性抗体的术语。确定寡特异性 Mia 血清的特异性是困难的。要彻底检测所有抗血清以确定其成分的特异性，需要相当多的资源 (时间和罕见的细胞样本)。研究人员应该意识到可能存在的各种特异性组合。在生化测试中使用定义不明确的特异性可能会导致令人困惑的信息。针对 GPA:B 表型相关低频抗原的单克隆抗体在定义表型方面可能会非常有用。

ISBT 红细胞表面抗原术语工作组负责单倍型术语。可以遵循人类基因作图命名委员会对 MN 和 Ss 基因座的符号 *GYP A* 和 *GYP B* 的建议。杂交基因可以记为 *GYP (A-B)* 和 *GYP (B-A-B)*，如果精确组成未知，也可以记为 *GYP A:B*。我们建议命名单倍型 (根据血红蛋白变异的例子) 而不是杂交基因，并列导致该单倍型的各种基因。例如，单倍型 *Mur* 有一个正常的 *GYP A* 基因和一个 *GYP (B-A-B)* 杂交基因，但没有 *GYP B* 基因；单倍型 *Hil* 有一个 *GYP (A-B)* 杂交基因，但没有正常的 *GYP A* 或 *GYP B* 基因。需要注意的是，*GYP* 表示基因座，不同于常用的蛋白质缩写 GP。

7.2 抗原决定簇 MUT

Hut 最初被用作第五种 Miltenberger 血清的名称，通过用 GP.Vw 细胞吸收从抗 Mi^a 血清中分离出来。该试剂与 GP.Hut、GP.Mur 和 GP.Hop 细胞发生反应。Giles 使用不同的 Miltenberger 血清，认为 Hut 型血清是抗 Hut (仅与 GP.Hut 细胞呈阳性) 和抗 Mur 的混合物。然而，最近的吸收/放散试验证实，GP.Hut、GP.Mur、GP.Hop 和 GP.Bun 细胞共有一种抗原决定簇，该抗原决定簇在 GP.Vw、GP.Hil、GP.Nob、GP.Joh 或 GP.Dane 细胞上未发现 (Green, Poole, 未发表的观察结果)。建议将这个抗原决定簇命名为 MUT。大多数抗 Mur/Hut 血清没有可分离的抗 Hut 成分。我们收集的许多抗 Mur/Hut 含有抗 MUT，有时有可分离的抗 Mur，少数含有抗 Mur+抗 Hut，还有一例血清似乎只含有抗 MUT (Poole, 未发表的观察)。

7.3 GP.JL、GP.AG 和 GP.JR 表型

起初很难理解血清 MINY 的特异性：对 GP.Mur、GP.Hop、GP.Hil 和 GP.Bun 细胞反应阳性，对 GP.Vw、GP.Hut、GP.Nob、GP.Joh 或 GP.Dane 细胞反应阴性。对抗 TSEN 的研究，以及对不同阳性反应表型的异常 GP 的生化特性的研究，阐明了这一问题。抗 TSEN 与 GP.Hop、GP.AG、GP.JR 和 GP.JL 表型细胞反应；所有这些细胞都包含 GPA-GPB 的连接，其边界包括 GPA 氨基酸残基 58 和 GPB 氨基酸残基 27，杂交蛋白的 GPB 部分携带 Met²⁹ (S)。抗 Hil 与抗 TSEN 相反，与携带 GP (A-B) (A58,B27) Hil 杂交蛋白的细胞反应，该杂交蛋白的 GPB 部分携带 Thr²⁹ (s) (表 2)。与血清 MINY 反应阳性的细胞要么是 Hil⁺，要么是 TSEN⁺，这表明 MINY 抗原决定簇在具有 GPA58,GPB27 连接的 GP (A-B) 杂交蛋白中，无论其 Ss 状态如何。

最初并不认为 GP.AG 和 GP.JR 样品属于 Mi. 子系统，尽管 GP.AG 细胞与抗 Hil 有弱反应 (表 3)。GP.JL 和 GP.JR 样本有异常的 S 抗原：GP.JL 是 S 抗原部分表达，而 GP.JR 是 S 抗原表达增强。GP.JL 被称为 Mi.V^{JL} 或 Mi.V-like，尽管缺乏 Hil 抗原的表达。

目前已经确定了 GP (A-B) JL 分子的遗传基础。编码 GP.JL 表型的基因与编码 GP.Hil 的基因相似，都是 *GYP (A-B)* 杂交基因。GP.JL 杂交蛋白的 GPB 部分的第 29 位氨基酸残基是 Met，GP.Hil 是 Thr。编码 GP.JL 和 GP.Hil 表型的 *GYP (A-B)* 杂交基因源于不等交换，基因的交互构型，导致携带 Sta 抗原的 GP (B-A) 杂交蛋白。这三种杂交基因的产生涉及到不同的断点。1982 年 Anstee 等的结论中提到一种交互关系；1989 年 Johe 等通过比较 GP (A-B) JL 和 GP (B-A) St^a 的氨基酸序列推断出该交互关系。

一种合成肽，S^{JL} 肽 (Pro-Glu-Glu-Glu-Thr-Gly-Glu-Met-Gly-Gln-Leu-Val-His-Arg)，包含 GP (A-B) JL 分子的杂交连接处 (A58^{Thr}, B27^{Gly})，中和了抗 S 与 GP.JL 细胞的反应；没有中和其他抗 S 的反应，也没有中和抗 Hil 与 GP.Hil (Mi.V) 细胞的反应。该肽还能抑制抗 TSEN 和 MINY 血清与 GP.JL 和其他抗原阳性细胞的反应。Hil 肽与 S^{JL} 肽只有一个氨基酸残基不同 (Thr→Met)，没有抑制那些与 GP.JL 细胞产生阳性反应的抗 S，也没有抑制抗 TSEN，但抑制了抗 MINY。

7.4 GP.Mor 表型

对 1 例日本样本的初步检测显示：与抗 Mur/Hut 血清 (该血清与 GP.Hut, GP.Mur, GP.Hop 和 GP.Bun 细胞反应阳性) 和抗 Hil 呈阳性反应；与抗 Hut (该血清与 GP.Hut 细胞反应阳性) 和抗 Mur 血清 (该血清与 GP.Mur, GP.Hop, GP.Bun 和 GP.Dane 细胞反应阳性) 呈阴性反应。进一步的血清学检测显示，抗 Mur/Hut 血清中含有抗 MUT，GP.Mor 细胞具有之前未被识别的表型 Mur- Hil⁺ Hut- MUT⁺ TSEN⁻ MINY⁺ (表 3)。这些结果可能代表了一个不寻常的基因型，可能是一个杂合子，2 条等位基因编码不同 MNS 低频抗原；也可能是一种新的等位基因，编码 MNS 抗原的新组合。细胞免疫印迹表明，一个杂交分子，类似于 GP (A-B) Hil (Mi.V)，但缺乏正常 GPA 氨基酸残基 26 处的 N-聚糖，编码 GP.Mor。这可能与 Huang 等的 Mi.X 表型相同 (在本文撰写完成后，Huang 等简要提到一种表型，编号为 Mi.X)。

7.5 GP.Kipp 表型

最初认为 GP.Kipp 样本具有 GP.Bun 表型，因为认为血清 BD 与血清 Raddon 具有相同的特异性。然而，使用更多抗 Hop 和抗 Nob 平行检测 GP.Kipp 和 GP.Bun 细胞，发现它们的表型并不相同 (表 3 和 5)。GP.Kipp 细胞与 Anek 血清反应阳性，但与其他抗 Hop (EL, S165) 反应阴性，与 Raddon 型血清 (Raddon, BD) 反应阳性，但与其他抗 Nob 血清反应阴性 (表 5)；这些结果使得人们重新考虑这些特异性。GP.Kipp 细胞仅与以下类型的抗血清发生反应：该类抗血清与含有 Hop 和/或 Nob 抗原的细胞发生反应。GP.Kipp 细胞不能与纯抗 Hop 或纯抗 Nob 反应 (表 5)。这种反应模式表明，血清 Anek 的特异性可能比其他抗 Hop 更广泛，类似地，血清 Raddon 和 BD 的特异性可能比血清 Lane 更广泛。血清 Raddon 和 BD 的特异性不同，因为血清 BD 与 GP.Hop、GP.Bun 和 GP.Nob 细胞的反应同样强，而血清 Raddon 与 GP.Hop 和 GP.Bun 细胞的反应比与 GP.Nob 细胞的反应弱 (表 5)。

表 5 Miltenberger 类型与定义 Hop、Nob 和相关抗原的抗血清的反应模式

Mi Classes	Anti-		Type Sera		
	Hop*	Nob†	Anek‡	Raddon§	BD
Mi.I	—	—	—	—	—
Mi.II	—	—	—	—	—
Mi.III	—	—	—	—	—
Mi.IV	+	—	+	(+)	+
Mi.V	—	—	—	—	—
Mi.VI	+	—	+	(+)	+
Mi.VII	—	+	(+)	+	+
Mi.VIII	+	+	+	+	+
Mi.IX	—	—	—	—	—
GP.Mor	—	—	—	—	—
GP.Kipp	—	—	+	+	+

Abbreviations: +, positive; —, negative; (+), weak expression.

* EL⁵⁷; S165, AB—S.⁵⁸

† Lane.^{34,56}

‡ Anek.^{34,56}

§ Raddon.^{34,56}

|| BD.⁷⁴

7.6 M^s 表型

1958 年首次描述 M^s 表型，由一条 *M* 和 *N* 的等位基因编码。抗 M^s 是一种常见的抗体，可能是 MNS 系统中最常见的抗体。在研究 GP.Dane 表型之前，没有观察到或怀疑过 M^s 和 Mi 子系统之间存在联系。M^s+ 细胞为 DANE+（表 3）。抗 M^s 不能通过吸收/放散试验从含有抗 DANE 的血清中分离出来。这是令人惊讶的，因为 Mg 的生化结构不同于导致 GP.Dane 表型的异常 GPA。M^s 的表达与变异 GPA^N 有关，其中 4 位的苏氨酸被天冬酰胺取代，这阻止了残基 2 和 3 的糖基化。最初 Murrell 夫人的抗 Mur 提出了进一步的问题：它是唯一与 M^s+ 细胞产生阳性反应的抗 Mur；且吸收/放散试验表明，这种特异性不是由于可分离的抗 M^s。推定 GPA Dane 中 GPA 残基 41 处存在单氨基酸取代，即组氨酸→天冬酰胺，这可以解释 Mur 抗原的存在。推定 GPA Dane 与 GPA M^s、GP (B-A-B) Mur 和 GP (B-A-B) Bun 共有一个三氨基酸序列，这可能解释了 Murrell 夫人的血清与 M^s+ 细胞的阳性反应。

8 结论

通过血清学、生化和分子生物学技术对这些罕见的红细胞表型进行的研究表明，不同的遗传事件可能产生相同的氨基酸序列，从而产生相同的抗原。因此，不同的 GP 分子可能携带相同的抗原；例如，Hil 抗

原位于 GP.Mur 和 GP.Bun 的 GP (B-A-B) 分子上, 以及 GP.Hil 的 GP (A-B) 分子上 (表 1 和 2)。

对这些罕见表型个体的 DNA 分析证实, 由重组 (交换、二次交换和基因转换) 产生的杂交基因编码杂交 GPs。例如, 对于 GP (B-A-B) Mur 和 GP (B-A-B) Bun 表型个体, DNA 分析表明, 重组导致了 *GYPB* 假基因的表达。最近对血型糖蛋白的分子遗传学进行了综述。从目前报道的分析来看, *GYPE* 基因未参与这些杂交基因的形成。

我们知道, 所提出的新术语废除了子系统的概念。我们认为是时候这样做了, 因为来自生化和分子生物学研究的信息为大多数的血清学关系提供了解释。我们提出的术语的灵活性可能对描述其他表型同样有用。例如, Vr+可以是 GP.Vr, Dantu+可以是 GP.Dantu。

19 《Direct evidence for the existence of Miltenberger^a antigen》

《Miltenberger^a 抗原存在的直接证据》

作者: Chen V, Halverson G, Wasniowska K, Lisowska E, Chen J, Moulds M, Reid ME

作者单位: 1 美国贝勒医学院; 2 纽约血液中心; 3 波兰科学院 Ludwik Hirsfeld 免疫和实验治疗研究所; 4 美国 Immucor 公司和伽马生物制品公司

来源: Vox Sang. 2001 May;80(4):230-3.

摘要

Miltenberger (Mi) 子系统由最初确定的 4 个表型发展到现在已经有 11 个表型。Mi 子系统的抗原属于 MNS 血型系统。已报道在 Miltenberger 的 Mi.I, Mi.II, Mi.III, Mi.IV, Mi.VI 和 Mi.X 几个表型的红细胞上表达 Mi^a 抗原。然而, Mi^a 抗原是否作为一个独立的实体存在, 一直存在质疑, 很难用多克隆试剂证明。本文报道了首例单克隆抗-Mi^a (GAMA210, 抗原表位 TNDKHKRD 或 QTNDMHKR), 并用其确定了 Mi^a 抗原的存在。

1 引言

MNS 血型系统的抗原位于糖蛋白 A(GPA)、糖蛋白 B(GPB)或由部分 GPA 和部分 GPB 组成的分子上。MNS 系统中的几种抗原是低频抗原, 并已被归类为 Miltenberger (Mi)子系统。Mi 子系统最初是由 Cleghorn 定义的, 因为红细胞与来自 Miltenberger 夫人的血清('抗 Mia')发生反应。随着与定义抗体产生不同反应模式的红细胞被发现, 子系统扩展。该子系统现在有 11 种类型 (Mi.I~Mi.XI)。

Mi.I, Mi.II, Mi.III, Mi.IV, Mi.VI 和 Mi.X 表型的红细胞被含有'抗 Mia'的人源血清凝集。实际上, 这些血清中还含有针对 Miltenberger 子系统中其他低频抗原的抗体, 这些抗体不能通过吸收放散来分离, 这使得一些人认为抗 Mia 和 Mia 抗原并不作为一个实体独立存在。

已确定变异形式的 GPA 和 GPB 的分子基础, 大多是杂交分子。利用这些信息, 以及使用胰蛋白酶消化物或合成肽进行抑制试验, 已经有可能预测特定抗原的氨基酸序列。Mi.I 和 Mi.II 红细胞中的 GPA 显示 Thr28 分别被 Met 和 Lys 取代, 导致 Asn26 上缺乏 N-聚糖。Dahr 推测 Mia 抗原存在于 ²⁴QTNDMHKRDTY³⁴ 或 ²⁴QTNDKHKRDTY³⁴ 序列中, 因为这 2 个序列总有一个存在于 Mi.I 和 Mi.II 红细胞, 以及所有与抗 Mia 反应的红细胞样本中。

我们报道了一种小鼠单克隆抗 Mia 的生产和特性, 表明它作为单一特异性存在, 并证实了 Mia 抗原的存在。

2 材料和方法

2.1 单克隆抗体的生产

采用 BALB/cAnNHSD-NZB/OlaHsd 杂交小鼠。腹腔注射 (i.p.) 0.1ml 0.4% Mi.III 红细胞悬液, 以及静脉注射 (i.v.) 0.5μg 脂多糖(LPS), 用于初始免疫。随后是 0.15ml Mi.III 红细胞和 12.5μg LPS, 每周一次,

连续 8 周，最后连续 3 天 0.15ml Mi.III 红细胞和 12.5 μ g LPS。最后一次免疫后 1 天取出脾脏，使用标准杂交瘤技术将脾细胞与骨髓瘤细胞(细胞系 P3/NS1/I-Ag4)融合。用限制稀释法克隆杂交细胞 4 次，用血凝法筛选上清液的抗体活性。所得到的细胞系被命名为 GAMA210。

2.2 GAMA210 特性

2.2.1 血凝

在试管中进行 GAMA210 的血凝试验。多年来，对 Mi 表型红细胞进行了分类和收集；有些是同事赠送，有些是通过血清、细胞和稀有液体交换程序获得；储存在液氮中。

2.2.2 免疫球蛋白亚型测定

同种型分析采用标准 ELISA 技术，使用 HyClone®小鼠单克隆亚型-同种型分型试剂盒（美国 HyClone®实验室）。

2.2.3 免疫印迹

采用了标准的免疫印迹技术。简单地说，对红细胞影进行 SDS-PAGE。将蛋白质转移到硝化纤维素纸上，并与 GAMA-210 单克隆抗体上清液孵育。洗涤后，用过氧化氢酶和二氨基联苯胺(DAB)染色，检测结合抗体。

2.2.4 表位分析（肽扫描）

表位扫描试剂盒购自澳大利亚 Chiro Mimotopes。根据厂家说明，在化学衍生柱上进行肽合成，从 C 端逐步延伸到 N 端，并将末端氨基乙酰化。使用偶联碱性磷酸酶的山羊抗小鼠免疫球蛋白抗体和 Sigma 104 磷酸酶底物片进行 ELISA，检测单抗 GAMA210(用含有 0.05%吐温-20 的 tris 缓冲盐水稀释 100 倍)与固定化肽的结合。合成了包含 GPA 第 20-36 位氨基酸残基的 3 组相互重叠的八肽。1 组（对照）对应正常 GPA，在 28 位包含 Thr。另外 2 组包含 Met28 或 Lys28（推定 Mia 表位中存在 Met28 或 Lys28）。结果是至少两个 ELISA 测试的平均值，每个测试都重复进行。标准差在平均值的 10%的范围内。

3 结果

3.1 血清学特征

小鼠单抗 GAMA210 是 IgG1 κ ，可通过直接凝集反应。通过盐水试管法，该单抗特异性地凝集了至少 1 例 Mi.I, Mi.II, Mi.III, Mi.IV, Mi.VI 和 Mi.X 红细胞，但与 Mi.V, Mi.VII, Mi.VIII, Mi.IX 和 Mi.XI 红细胞没有反应（表 1）。与 M^s 阳性红细胞、A、B 或 O 红细胞均未观察到反应性。

表 1 GAMA210 的血清学检测

RBC phenotype	Antigen profile					Direct agglutination with GAMA210	
	Vw	Hut	Mur	MUT	Mi ^a	IS	30' RT
Mi.I	+	-	-	-	+	3+	3+
Mi.II	-	+	-	+	+	3+	3+
Mi.III	-	-	+	+	+	3+	3+
Mi.IV	-	-	+	+	+	2+ ^S	3+
Mi.V	-	-	-	-	-	0	0
Mi.VI	-	-	+	+	+	2+ ^S	3+
Mi.VII	-	-	-	-	-	0	0
Mi.VIII	-	-	-	-	-	0	0
Mi.IX	-	-	+	-	-	0	0
Mi.X	-	-	-	+	+	3+	3+
Mi.XI	-	-	-	-	-	0	0

IS, immediate spin; 30' RT, 30 min at room temperature; 2+^S, strong.

3.2 免疫印迹

通过免疫印迹, Mi.I 和 Mi.II 红细胞影的 GAMA210 染色条带位于相对分子质量约 40 000 处, Mi.III, Mi.IV 和 Mi.VI 红细胞影的 GAMA210 染色条带位于相对分子质量约 35 000 处 (数据未显示)。这些条带对应于与每个表型相关的杂交血型糖蛋白分子的单体形式。野生型 GPA 染色微弱。通过免疫印迹, GAMA210 没有与 Mi.V, Mi.VII, Mi.VIII 或 Mi.IX 红细胞的变异血型糖蛋白发生反应。不可获得用于免疫印迹的 Mi.X 和 Mi.XI 红细胞。

3.3 表位分析

单抗 GAMA210 与 3 个多肽的结合最强: ²⁴QTNDMHKR³¹, ²⁵TNDKHKRD³² 和 ²⁴QTNDKHKR³¹ (图 1)。这些数据表明, 该抗体识别了 TNDKHKRD 或 QTNDMHKR 序列中的一个表位; 还表明, 在这些合成肽中, 当 Met28 存在时, N 端存在 Gln24(²⁴Q)时实现最强结合。除八肽 QTNDTHKR 外, GAMA210 没有与含 Thr28 的肽 (对应正常 GPA 序列) 结合。然而, GAMA210 与 QTNDTHKR 的结合明显弱于与含 Lys28 或 Met28 的肽的结合。GAMA210 与正常红细胞缺乏凝集, 或与野生型 GPA 弱结合, 很可能不仅是由于 28 位苏氨酸的存在, 而且主要是由于 Asn26 的 N 糖基化。

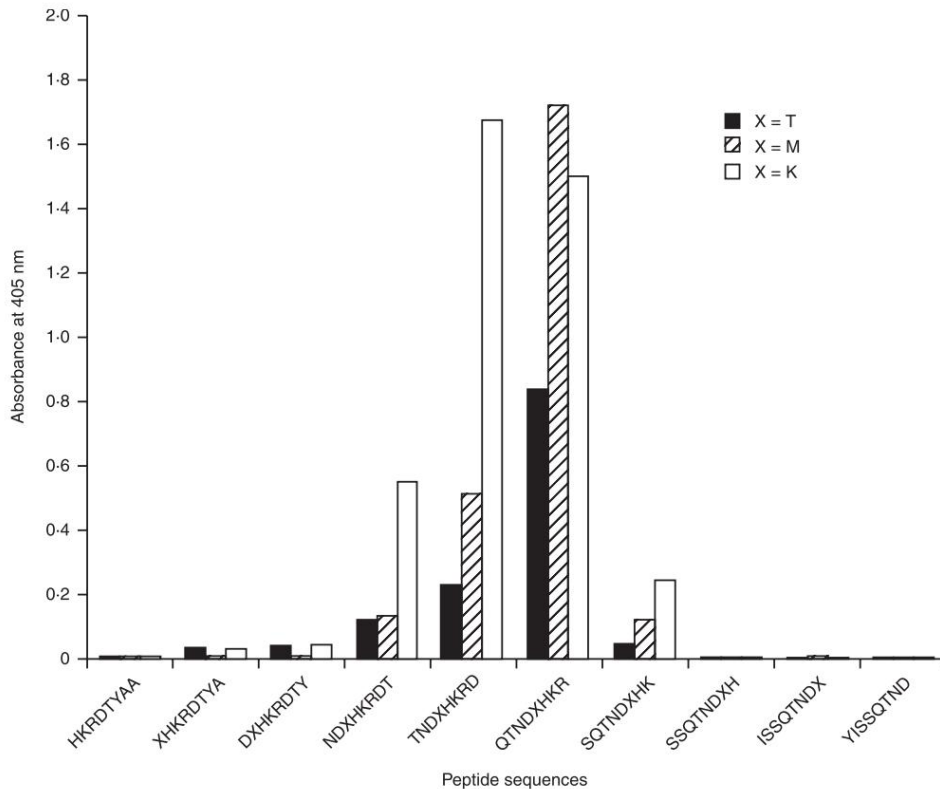


图 1 单抗 GAMA210 与包括 GPA 氨基酸序列 Tyr20~Ala36 的三组相互重叠的八肽序列的结合。一组肽对应于正常 GPA 序列(28 位 Thr)，另外两组肽在这个位置包含 Lys 或 Met。

4 结论

我们报道了一种单抗，GAMA210，它是针对 Mia 表位的，我们已经确定 Mia 表位在序列 TNDKHKRD 或 QTNDMHKR 内。因此，该单抗可以识别含有 GPA 序列第 28 位 Lys 或 Met 残基的变异血型糖蛋白中的线性肽非糖基化表位。该抗体证明，抗 Mia 是单一的特异性，且 Mia 表位是一个独特的实体。Cleghorn 最初将 Miltenberger 系列定义为 4 种类型或表型，它们都与 Miltenberger 血清(最初的抗 Mia)发生反应，且都是基于红细胞抗原 Vw、Mur、Hil 和 Hut 的存在或不存在。该系列后来被扩展到目前基于特定抗原的存在的 11 种表型的定义。人们推测，Mia 抗原并不作为单一的表位存在，因为相应的抗体以前在反应性血清样本中没有作为一个可分离的实体被发现过。Dahr 推测 Mia 抗原的结构序列在 QTNDMHKRDTY 或 QTNDKHKRDTY 序列内，其存在于与被认为含有抗 Mia 的血清反应的红细胞。QTNDMHKRDTY 序列存在于 Mi.I 红细胞，因为正常 GPA 的 Thr28 被 Met(M)取代。QTNDKHKRDTY 序列出现在 Mi.II, Mi.III, Mi.IV, Mi.VI 和 Mi.X 红细胞，在由 GPB 的假外显子编码的氨基酸序列内。Mi.IX (GP.DANE)红细胞缺乏序列 ²⁴QTNDM/KHKRDTY，存在含 Thr28 的序列 ²⁴QTNDTHKRDTY，未被 GAMA210 凝集，表明该表型不表达 Mia。同样的序列也存在于野生型 GPA 中，在正常情况下，它也不与抗 Mia 或 GAMA210 发生反应。然而，在我们的表位分析过程中，观察到与八肽 QTNDTHKR 的中度反应（图 1）。这个序列，当出现在野生型 GPA 或 GP.DANE 时，携带一个与 Asn26 连接的 N-聚糖，这种寡糖可能掩盖或改变了 GAMA210 检测的表位。

我们开发了一种针对 Mia 表位的单抗，从而证明了 Mia 确实作为单一的、可定义的表位存在。通过 pin 技术发现，GAMA210 可以识别表位 QTNDMHKR 或 TNDKHKRD。我们发现 GAMA210 与 Mi.I, Mi.II, Mi.III, Mi.IV, Mi.VI 和 Mi.X 表型的红细胞有反应性，与 Mi.V, Mi.VII, Mi.VIII, Mi.IX 和 Mi.XI 表型的红细胞没有反应性（表 1）。该抗体将有助于通过血凝法和免疫印迹法筛选 Mi(a+)红细胞。

下期主题: MNS 血型系统专刊——Miltenerberger 频率研究



为中国血型基因检测贡献力量!!!
为人民服务!!!



天津秀鹏生物微信公众平台
与您分享专业的体外诊断信息

更多内容请登录秀鹏生物网站
www.biosuper.com