

## 简便高效分离细胞新型免疫磁珠制备\*

刘辉荣<sup>1</sup>, 徐宏<sup>1</sup>, 古宏晨<sup>1</sup>, 卢瑛<sup>1</sup>, 王玲<sup>2</sup>, 侯盛<sup>2</sup>

**摘要:**目的 采用碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)方法在羧基磁珠表面偶联抗体, 制备可高效分离细胞的免疫磁珠。方法 用 EDC 和 NHS 活化磁珠表面羧基, 活化的羧基再与抗体上氨基进行反应, 从而将抗体偶联于磁珠表面, 获得免疫磁珠。使用高性能纳米粒度分析仪(HPPS)、二辛可酸(BCA)蛋白定量试剂盒、流式细胞仪、透射电镜(TEM)表征磁珠的粒径、磁珠表面连接的抗体量及其免疫活性。结果 HPPS 检测磁珠平均水力学粒径为 110 nm; 磁珠表面偶联 52.4 μg 抗 CD11a+ 抗体/mg 磁珠。经磁分离后细胞的流式分析结果表明, CD11a+ 免疫磁珠可以有效分离髓系白血病细胞系(KG-1a)细胞, 免疫磁珠均匀结合于细胞表面, 且不影响细胞的活性。结论 成功制备可用于细胞分离且不影响分离后细胞活性的新型免疫磁珠。

**关键词:** 免疫磁珠; 免疫活性; 分离细胞

**New immunomagnetic beads used for cell separation simply and high efficiently** LIU Hui-rong, XU Hong, GU Hong-chen, et al. Med-X Research Institute, Shanghai Jiaotong University(Shanghai 200030, China)

**Abstract:** **Objective** To prepare the immunomagnetic bead used for cell separation simply and high efficiently. **Methods** The immunomagnetic beads were prepared by the reaction between the amidos of the antibodies and the carboxyl on the surface of magnetic beads whose carboxyl groups were activated by EDC/NHS. The properties of magnetic beads were studied by dynamic light scattering size analyse, BCA protein quantification assay, flow cytometer and TEM. **Results** The diameter of the magnetic beads was 110 nm. There were 52.4 μg CD11a+ antibodies labeled on the per mg magnetic beads. FACS results indicated that KG-1a cell were separated efficiently by the immunomagnetic beads. TEM results indicated that the immunomagnetic beads were combined on the surface of the cell. The cultivation and microscopic observation indicated that the immunomagnetic beads didn't affect the activation of the cell. **Conclusion** The new kind immunomagnetic beads which could be used for cell separation without negative effect on cells activation is prepared successfully.

**Key words:** immunomagnetic beads; immunoactivity; cell separation

目前, 用于分离细胞的免疫磁珠(IMB)主要以德国 Miltenyi 公司 50nm 的免疫磁珠与挪威 Dynal 公司微米尺寸免疫磁珠为主<sup>[1]</sup>。其中 50nm 粒径磁珠分离细胞后无需将磁珠解离就可直接进行下步应用分析, 分离纯度高但操作时间长<sup>[2]</sup>; 微米粒径磁珠与细胞处于同一尺度量级<sup>[3]</sup>, 可在较短时间内完成整个细胞分离过程, 但进行下步应用分析时, 需将磁珠与细胞分开。本研究以平均粒径为 110 nm、高饱和磁化强度(40emu/g)的磁珠作为载体, 及其表面联接抗 CD11a+ 模式抗体, 获得了可在低梯度磁场下方便而高效分离细胞, 且不影响分离后细胞活性的免疫磁珠。现报告如下。

## 1 材料与与方法

1.1 免疫磁珠制备 (1)活化: 以 pH 6.0, 0.01 mol/L 的 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 吐温(0.05% Tween-20)溶液作为活化缓冲溶液, 取 2 mg 羧基磁珠于 2 ml 离心管中, 加入 500 μl 活化缓冲液, 在漩涡振荡器上混合均匀, 再将离心管放置于磁分离架上, 待磁珠完全被吸附, 用微型台式真空泵把上清液抽提掉; 加入 500 μl 活化缓冲液重新洗涤磁珠 2 遍后, 向磁珠中加入 485 μl 活化缓冲液, 再分别加入 2.5 mg 碳二亚胺(EDC, 原浓度 0.5 g/ml)与 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 原浓度 0.25 g/ml), 在漩涡振荡器上混合均匀, 室温活化 2 mg 磁珠表面的羧基 30 min。(2)偶联: 以 500 μl, pH 7.4, 0.01 mol/L 的磷酸盐吐温

(PBST, 0.05% Tween-20)溶液作偶联缓冲液, 加 500 μl 的活化缓冲液重新洗涤已经活化的磁珠 3 遍后, 再用 500 μl 的偶联缓冲液洗涤磁珠 2 遍; 加 475 μl 偶联缓冲液重悬洗涤后的磁珠, 再加入 25 μl 6 mg/ml 的抗 CD11a+ 抗体, 使得磁珠表面活化的羧基同抗 CD11a+ 抗体的氨基室温反应 3 h, 将抗体偶联于磁珠表面, 得到免疫磁珠。(3)封闭: 用 500 μl 的偶联缓冲液洗涤偶联后磁珠 2 遍, 加入 500 μl 含有 1% 牛血清白蛋白(BSA)的偶联缓冲液封闭磁珠 30 min。(4)保存: 用 500 μl 的偶联缓冲液洗涤封闭后的磁珠 2 遍, 用 500 μl 含 0.02% Na<sub>3</sub>N, 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)的 pH 7.4, 0.01 mol/L 磷酸盐吐温(0.05% Tween-20)溶液重悬磁珠, 保存于 4 °C 冰箱, 待用。

1.2 磁珠粒径分布检测 采用 HPPS5001 型高性能纳米粒度分析仪(英国 Malvern 公司)测量磁珠的粒度分布, 测量条件为: λ=632.8 nm, T=25 °C。

1.3 抗体偶联量的检测 采用(BCA)试剂盒(上海生物工程技术有限公司)结合酶标仪(美国 PerkinElmer 公司)检测偶联反应后上清液中抗体的含量。抗 CD11a+ 抗体溶液用 pH 7.4, 0.01 mol/L 磷酸盐吐温(0.05% Tween-20)溶液稀释为 0.5 mg/ml 的标准溶液, 分别取 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μl 标准液于酶反应条中, 每个标准溶液做 1 个平行重复, 每孔加 pH 7.4, 0.01 mol/L 磷酸盐吐温(0.05% Tween-20)溶液补足总体积为 20 μl; 将待检测上清液 12 000 r/min, 离心 10 min 后, 取 20 μl 于酶反应条中, 每个待检测上清液做 1 个平行重复; 向所有加了标准液或上清液的酶反应孔中加入 200 μl BCA 反应液, 60 °C 反应 30 min; 用酶标仪检测各孔的吸光度(A)值。根据标准液的浓度与吸光值做出标准曲

\*基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA032359); 上海市科委基金(0652nm012, 05DZ19312)

作者单位: 1. 上海交通大学 Med-X 研究院, 上海 200030; 2. 第二军医大学国际合作肿瘤研究所

作者简介: 刘辉荣(1982-), 男, 江西高安人, 硕士在读, 研究方向: 免疫磁性纳米颗粒在生物分离和检测上的应用。

通讯作者: 徐宏

线,再根据待检测上清液的吸光度值得到上清液中抗体的量,从而得出单位质量磁珠表面偶联的抗体含量。

1.4 细胞分离 将 Raji 细胞(阴性细胞,  $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ )与 KG-1a 细胞(阳性细胞,  $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ )各  $100 \mu\text{l}$  混合于  $2 \text{ ml}$  离心管; (1) 加入  $42 \mu\text{l}$  免疫磁珠(含抗体量为  $10 \mu\text{g}$ ), 补加  $158 \mu\text{l}$  含  $1\%$  BSA 的磷酸盐缓冲液(PBSS); (2) 另一离心管中不加磁珠, 只加 PBSS 为阳性对照, 最后各管反应体积为  $400 \mu\text{l}$ , 冰浴反应  $45 \text{ min}$ ; 分离磁珠, 分别收集阴性和阳性细胞, 并重悬于  $200 \mu\text{l}$  PBSS 中, 各取  $100 \mu\text{l}$  用 PBSS 洗 2 遍, 重悬于  $100 \mu\text{l}$  PBSS 中, 加入  $100 \mu\text{l}$  偶联抗 CD11a+ 抗体的 FITC(含抗体量为  $2 \mu\text{g}$ ) 进行标记, 冰浴  $45 \text{ min}$ , PBSS 洗 2 遍, 用流式细胞仪(美国 BD 公司, FACS Calibar) 检测各管细胞。

1.5 细胞与免疫磁珠结合观察 (1) 阳性细胞与免疫磁珠、空白磁珠结合状态观察: 用 TECNAI20S-TWIN 型透射电镜(英国飞利浦公司)观察分离后阳性细胞与磁珠的结合状态; 将空白磁珠(未活化, 未连接抗体的磁珠)与阳性细胞冰浴反应  $45 \text{ min}$ , 用透射电镜(TEM)观察细胞与空白磁珠的结合状态。(2) 细胞形态与活性比较: 分离后的阳性细胞继续培养在含有  $10\%$  小牛血清的 RPMI-1640 培养液(美国海克隆公司)中, 置于  $\text{CO}_2$  培养箱(美国热电公司)内培养并维持  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 。用光学显微镜在不同时段观察细胞形态与活性,  $48 \text{ h}$  后传代; 传代后  $48 \text{ h}$  继续观察细胞。

## 2 结果

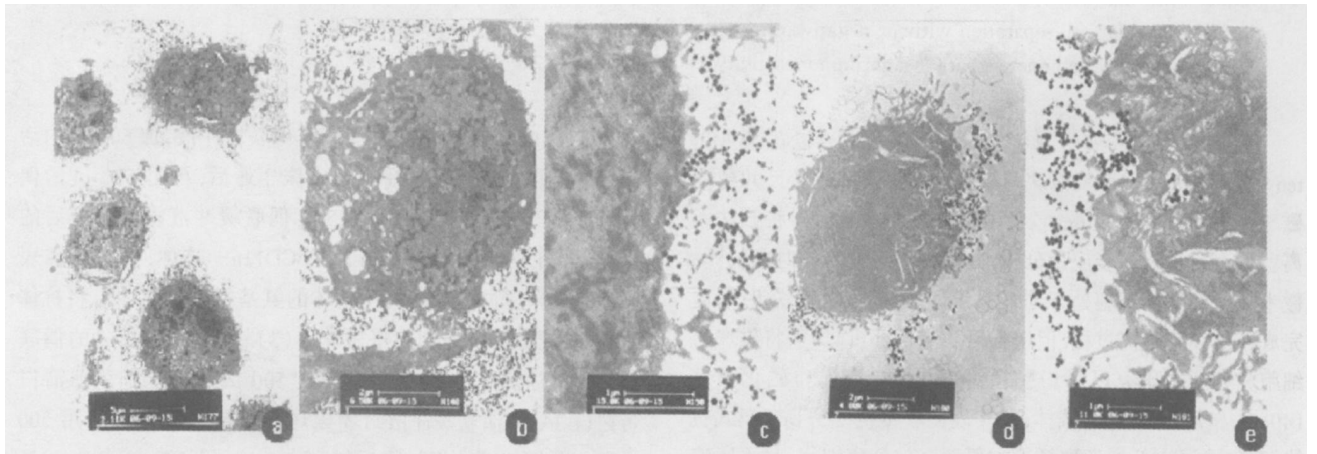
2.1 磁性微球粒径分布 高性能纳米粒度分析仪测量结果显示, 磁性微球的平均粒径分布较窄, 集中在  $90 \sim 160 \text{ nm}$ , 平均粒径为  $110 \text{ nm}$ , 多分散系数(PDI)为  $0.076$ , 粒子大小分布比较均匀。

2.2 磁珠表面抗体定量 采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测磁珠表面连接的抗 CD11a+ 抗体的量。得到浓度已知的蛋白标准溶液所对应的吸光度值。根据不同标准溶液所含蛋白量与其吸光度值, 做标准曲线, 得到标准曲线的公式为:  $y = 20.15x - 0.1985 (R^2 = 0.9981)$ 。将上清液样品吸光度值代入公式, 得出上清液样品中蛋白含量分别为  $41.8487 \mu\text{g}$ , 因加入反应抗体为  $150 \mu\text{g}$ , 即每  $2 \text{ mg}$  磁珠表面连接的抗体量为  $108.21013 \mu\text{g}$ ; 综合以上计算可得, 磁珠表面连接的抗 CD11a+ 抗体量平均为  $52.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ 。

2.3 细胞分离结果 流式分析结果显示, 分离前阳性细胞与阴性细胞的比例为  $47.72:52.33$ ; 经过磁分离后, 阳性细胞的纯度较高, 达到  $91.71\%$ ; 上清液中阴性细胞纯度为  $76.23\%$ , 阳性细胞的回收率为  $64.98\%$ 。

2.4 分离后阳性细胞与免疫磁珠、空白磁珠结合状态(图 1)

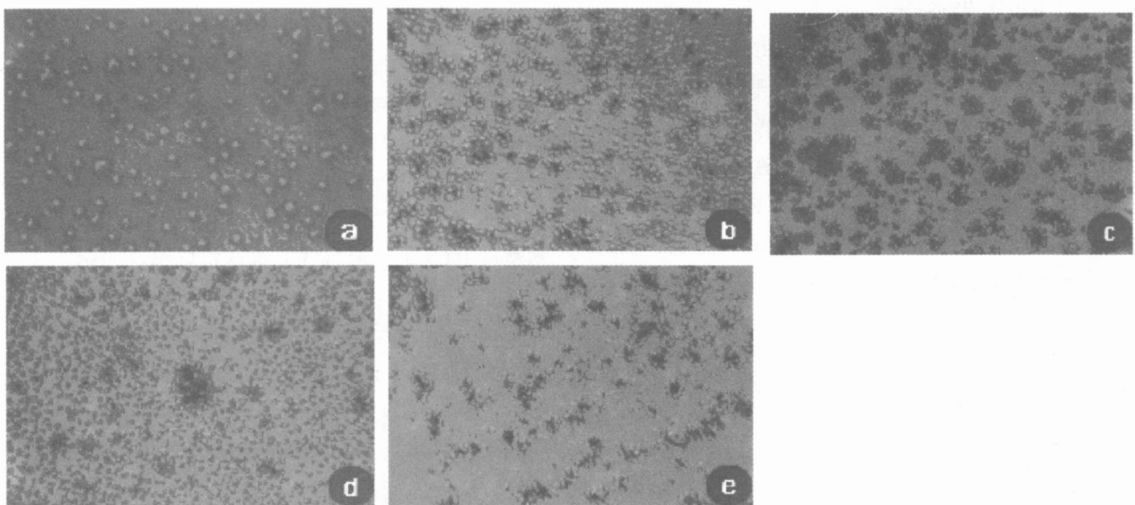
图 1 可见, 免疫磁珠均匀结合于细胞的表面, 并未进入细胞内(图 1a, b, c); 与免疫磁珠相比, 空白磁珠则较少在细胞的表面均匀粘附, 且有部分空白磁珠进入了细胞(图 1d, e)。



注: a: 标尺为  $5 \mu\text{m}$ ; b: 标尺为  $2 \mu\text{m}$ ; c: 标尺为  $1 \mu\text{m}$ ; d: 标尺为  $2 \mu\text{m}$ ; e: 标尺为  $1 \mu\text{m}$ 。

图 1 TEM 不同标尺观察免疫磁珠和空白磁珠与阳性细胞的结合状态

2.5 细胞的形态与活性(图 2) 图 2 可见, 分离后细胞的形态跟分离前相同, 呈圆形, 透亮状; 随着培养时间的增加, 细胞



注: a: 分离前; b: 分离后  $0 \text{ h}$ ; c: 分离后培养  $12 \text{ h}$ ; d: 分离后培养  $48 \text{ h}$ ; e: 传代后  $48 \text{ h}$ 。

图 2 光镜下磁分离后阳性细胞不同时段继续培养和传代结果

数量也在不断增多,且细胞状态一直保持良好的;对细胞进行传代后,细胞上的磁珠量减少,生长状态仍保持良好,表明免疫磁珠不影响分离细胞的生长活性。

### 3 讨论

免疫磁珠(IMB)分选细胞技术是近年来发展起来的一项新的细胞分离技术,具有简便易行、分离纯度高、保留细胞活性等优点<sup>[4]</sup>,可用于分离和检测各种骨髓及血细胞、肿瘤细胞、细菌及其他微生物等<sup>[5-12]</sup>。近几年,免疫磁珠逐步朝着亚微米尺寸方向发展,以使得磁珠能够在低梯度磁场下简便快速分离细胞,又在实施分离后无需将磁珠从细胞表面解离而直接进行后续分析与应用,且磁珠对分离后的细胞活性没有影响。本文结果表明,本实验室制备的磁珠平均水力学粒径为 110 nm 左右,可简单较高效地分离目标细胞,细胞分选优化试验正在研究中。

纳米磁珠与细胞的相互作用和磁珠表面的修饰有关<sup>[13]</sup>。为了研究本实验室制备的免疫磁珠是否影响分选后细胞的活性,将分选后的细胞继续培养。结果表明,本实验室制备的免疫磁珠并不影响细胞活性。这可能是因为免疫磁珠表面偶联的是抗 CD11a<sup>+</sup> 抗体,而 CD11a 是细胞膜上的粘附分子之一,若吞噬细胞缺乏此类分子,会影响其对异物表面的粘附,从而影响细胞吞噬功能的发挥。细胞分离过程中,免疫磁珠表面的抗体跟细胞表面的 CD11a 特异性结合,减少了细胞表面游离 CD11a 的数目,从而降低细胞的吞噬作用;而空白磁珠表面无抗 CD11a 的抗体,不影响细胞表面 CD11a 的状态,从而不会降低细胞对空白磁珠的吞噬。与目前用于细胞分离的主流磁珠相比,本实验室制备的粒度分布均匀的免疫磁珠具有以下优点:(1)磁珠粒度为亚微米尺度、磁响应性强,不需要专用高梯度磁分离设备<sup>[14]</sup>;(2)分离后不需要酶切等后续步骤将磁珠从目的细胞表面解离,同时免疫磁珠不影响细胞的活性<sup>[15]</sup>。因此,本实验室的免疫磁珠分别结合了纳米尺度磁珠和微米级别磁珠的优点,通过改变磁珠表面的抗体种类,所制备的免疫磁珠可用于各种细胞分离过程。

### 参考文献

- [1] Chalmers J J, Zborowski M, Moore L, et al. Theoretical analysis of cell separation based on cell surface marker density[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 59(1): 10-20.
- [2] Thiel A, Scheffold A, Radbruch A. Immunomagnetic cell sorting—pushing the limits[J]. *Immunotechnology*, 1998, 4: 89-96.

- [3] Partington K M, Jenkinson E J, Anderson G, et al. A novel method of cell separation based on dual parameter immunomagnetic cell selection[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1999, 223: 195-205.
- [4] Safarik I, Safariková M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells[J]. *Journal of Chromatography B Biomed Sci Appl*, 1999, 722: 33-53.
- [5] Yang H, Qu L, Wimbrow A N, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 118: 132-138.
- [6] Hibi K, Mitsubayashi K, Fukuda H, et al. Rapid direct determination using combined separation by prepared immunomagnetic and flow cytometry of *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22: 1916-1919.
- [7] Chen W, Shen H, Li X, et al. Synthesis of immunomagnetic nanoparticles and their application in the separation and purification of CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells[J]. *Applied Surface Science*, 2006, 253: 1762-1769.
- [8] Barker S D, Casado E, Gomez-Navarro J, et al. An immunomagnetic-based method for the purification of ovarian cancer cells from patient-derived ascites[J]. *Gynecologic Oncology*, 2001, 82: 57-63.
- [9] Øren A, Husebø C, Iversen A C, et al. A comparative study of immunomagnetic methods used for separation of human natural killer cells from peripheral blood[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2005, 303: 1-10.
- [10] Lara O, Tong X, Zborowski M, et al. Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation[J]. *Experimental Hematology*, 2004, 32: 891-904.
- [11] 张宏伟, 郑玉梅. 免疫磁珠性质及其应用[J]. *国外医学免疫学分册*, 2000, 23(1): 5-8.
- [12] 唐岩, 唐军民, 李银生, 等. 免疫磁珠技术在分离人外周血树突状细胞中的应用[J]. *解剖学杂志*, 2003, 26(3): 298-300.
- [13] 鄢祝兵, 马勇杰, 古宏晨, 等. 谷胱甘肽纳米 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 对人肺腺癌细胞 SPC-A1 影响[J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(12): 1445-1447.
- [14] Kekkarainen T, Mannelin S, Laine J, et al. Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells[J]. *BMC Cell Biology*, 2006, 7(1): 30.
- [15] Oberg H H, Wesch D, Lenke J, et al. An optimized method for the functional analysis of human regulatory T cells[J]. *Immunological Methods*, 2006, 64(3): 353-360.

收稿日期: 2008-04-05

(孔繁学编辑 张亚莲校对)

## 科技论文基本撰写规范

**缩略语** 论文中应尽量少用缩略语。必须使用时于首次出现处先写出其全称,其后用括号给出中文缩略语或英文全称及其缩略语。如该缩略语已公知,可不注出其英文全称。

**参考文献** (1)以作者本人阅读的近年主要文献为主,未公开发表的文章不作为参考文献。(2)一般论著类论文引用数量不超过 15 条,综述、述评类文章不超过 20 条。(3)引用的文献作者不超过 3 位时全部列出,超过 3 位时,只列出前 3 位作者,其后加“等”,或者西文加“et al”,日文加“他”。(4)每条参考文献均须列出引用的起止页。(5)在参考文献中的文题后要用方括号加注文献类型标识符:[M]专著、图书、教科书;[J]期刊;[C]论文集、会议记录;[N]报纸;[D]学位论文;[R]报告;[S]专利;[DB]数据库;[CP]计算机程序;[EB]电子公告;[MT]磁带;[DK]磁盘;[CD]光盘;[OL]联机网络。

**附录项** (1)致谢项:如有致谢项,应在正文末尾用括号写出。(2)为方便论文审改,作者可将稿件主要联系人的电话、传真、E-mail 地址写在文末空白处,以便随时联系。