

密度梯度离心和免疫磁珠分选相结合分离脐血中胎儿有核红细胞

罗欣¹ 杜颖颖¹ 张进¹ 马端^{1,2*}

(1. 复旦大学上海医学院 分子医学教育部重点实验室, 上海 200032; 2. 复旦大学生物医学研究院 出生缺陷研究中心, 上海 200032)

【摘要】 **目的** 研究密度梯度离心和免疫磁珠分选相结合方法富集脐血中胎儿有核红细胞。**方法** 对5例脐血首先用密度梯度离心和免疫磁珠分选依次进行胎儿有核红细胞分离,用流式细胞检测和细胞染色对分选前后细胞进行分选纯度分析。**结果** 1. 通过流式细胞仪检测发现 CD71 单克隆抗体磁珠用于脐血中胎儿有核红细胞分选(CD71⁺, CD45⁻),分选后的纯度可以达到 81%,而分选前 CD71 阳性细胞只占 23.2%。2. 分选前脐血涂片可见大量的成熟红细胞,含少量有核红细胞;密度梯度离心后可见绝大多数细胞为单个核细胞(淋巴细胞、单核细胞和有核红细胞),含少量红细胞;CD71 单克隆抗体磁珠分选后阳性细胞多为胞浆丰富嗜碱性的有核红细胞。**结论** 密度梯度离心和免疫磁珠分选相结合可以有效提高脐血中胎儿有核红细胞的分选纯度。

【关键词】 胎儿有核红细胞;密度梯度离心;免疫磁珠分选

Density Gradient Centrifugation and Magnetic Activated Cell Sorting Combined Separation of Fetal Nucleated Red Blood Cells from Cord Blood

Luo Xin¹, Du Ying-ying¹, Zhang Jin¹, Ma Duan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Medical College, Fudan University, 200032, China; 2. Birth Defects Research Center, Institutes of Biomedical Science, Fudan University, 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate Density Gradient Centrifugation and Magnetic Activated Cell Sorting combined separation of fetal nucleated red blood cells(FNRBCs) from cord blood. **Methods** 5 cases of cord blood FNRBCs separated by Density Gradient Centrifugation and Magnetic Activated Cell Sorting in turn. Using Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) technique and cell staining to conducted purity analysis. **Results** 1. FACS detects the purity of CD71⁺ FNRBCs from cord blood separated by CD71 monoclonal antibody beads can reach to 81% while only 23.2% before the election. 2. Pre-sorting of cord blood smear shows a large number of mature red blood cells and contains little FNRBCs. After Density gradient centrifugation, most cells were mononuclear cells included lymphocytes, monocytes and FNRBCs and little red cells. CD71⁺ cells separated by CD71 monoclonal antibody beads are most FNRBCs which have basophilic cytoplasm. **Conclusion** Density Gradient Centrifugation and Magnetic Activated Cell Sorting combined separation can increase the sorting purity of FNRBCs from cord blood.

【Key words】 Fetal nucleated red blood cells; Density gradient centrifugation; Magnetic activated cell sorting

* 通讯作者:马端. E-mail:duanma@yahoo.cn

产前诊断是对胚胎或胎儿在出生前是否患有某些遗传病或先天畸形做出准确的诊断。目前采用的诊断方法多属于有创性检查,对妊娠妇女和胎儿都有一定的风险^[1]。从妊娠妇女外周血中分离胎儿有核红细胞(fetal nucleated red blood cells, FNRBCs)进行基因分析已成为国内外无创性产前诊断的研究热点。但是母体循环中的FNRBCs数量稀少,难以达到临床检测的要求,高效富集FNRBCs方法已成为产前诊断中筛查染色体异常和基因异常的必要手段。本研究通过结合密度梯度离心和免疫磁珠分选的方法提高分选后FNRBCs的纯度。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2007年5月至2008年3月在复旦大学附属妇产科医院足月分娩的健康胎儿脐血5例,每例6ml,EDTA抗凝。

1.2 实验方法

1.2.1 密度梯度离心 用Ficoll(美国Sigma公司)制备密度1.119/1.107/1.077的三重梯度,每个梯度2ml,依次加入15ml离心管中。将血标本:0.1MPBS=2:3(V/V)进行稀释,稀释后的血标本缓置于6ml密度梯度液上,室温22℃,400g×40min。在1.077和1.107密度界面上,可见呈白膜状的细胞层面。此层面即为富含单个核细胞,用枪头轻轻插到此层,将细胞转移入50ml管中,加入30ml PBS/1% BSA,300g×10min,弃上清,细胞沉淀再用相同的方法洗2次以去除残留的密度梯度液,最后细胞沉淀重悬于300ul PBS/0.1% BSA中,吹匀。

1.2.2 细胞计数 取2ul重悬液加入198ul PBS中(即稀释100倍),光镜下计数4大格细胞数,重复1遍。 $8 \text{大格细胞数} \times 100 \text{(稀释倍数)} \times 10^4 = \text{细胞数/ml}$ 。取 10^6 个细胞,用PBS/0.1% BSA补足80ul。

1.2.3 免疫磁珠分选 加入20ul CD71抗体磁珠(德国美天旎公司)4℃放置15min。300g×10min,弃上清,加入1ml PBS/0.1% BSA,重悬沉淀后,300g×10min,弃上清,沉淀重悬于500ul PBS/

0.1% BSA。组装美天旎磁珠分选系统。以500ul PBS/0.1% BSA润洗美天旎分选柱,待流空后,将分选的细胞上柱,收集流出液,标记为阴性细胞。取500ul PBS/0.1% BSA润洗管子,待流空后再重复2次,最后。取500ul PBS/EDTA/BSA加入分选柱,待流空后再重复一次。最后取1ml PBS/0.1% BSA加入分选柱,拿离磁场,冲洗入15ml管内,标记为阳性细胞。

1.2.4 免疫荧光染色 分选前细胞、分选后的阴性细胞、阳性细胞按 1×10^5 个细胞加入PE标记的CD45单克隆抗体(德国美天旎公司)和FITC标记的CD71单克隆抗体(德国美天旎公司)20 μ l,室温避光孵育30min,PBS洗3遍,1%多聚甲醛固定。流式细胞仪检测。

1.2.5 涂片 Wright's-Giemsa染色 同时取分选前细胞、密度梯度离心后细胞和分选后阳性细胞进行细胞涂片,涂片后先用瑞氏染液将涂膜面充分覆盖。稍等片刻待染液干后加吉姆萨染液1~2滴,用枪头引导染色覆盖涂膜面。等1~2min,再将PBS(PH6.4)一滴一滴地加到涂片膜上,直至膜面上染色液形成把表面张力而终止染色液进入(PBS的用量为瑞氏吉姆萨染液之和的两倍)。染色10min,分色,用自来水冲洗至颜色明显变淡(3min),镜下观察。

2 结果

2.1 CD71分选结果 通过流式细胞仪检测发现CD71单克隆抗体磁珠用于脐血中胎儿有核红细胞分选(CD71⁺, CD45⁻),分选后的纯度可以达到81%,而分选前CD71阳性细胞只占23.2%(图1)。

BLANK001:无标记的细胞,QIAN002:分选前细胞CD71和CD45双标记,HOU+004:分选后阳性细胞CD71和CD45双标记,HOU-003:分选后阴性细胞CD71和CD45双标记。

2.2 形态学观察

2.2.1 分选前脐血涂片可见大量的成熟红细胞,有核细胞以淋巴细胞、粒细胞和单核细胞为主,含少量有核红细胞(图2)。

2.2.2 三重密度梯度离心后取单个核细胞层,可见

绝大多数细胞为单个核细胞(淋巴细胞、单核细胞和有核红细胞),含少量红细胞(图3)

2.2.3 CD71 单克隆抗体磁珠分选后阳性细胞多为胞浆丰富略嗜碱性的有核红细胞(图4、图5)。

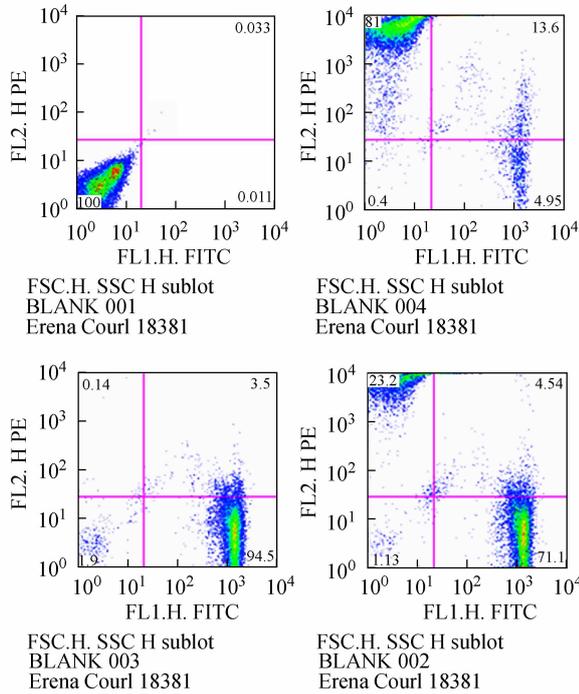


图1 CD71 磁珠分选的结果

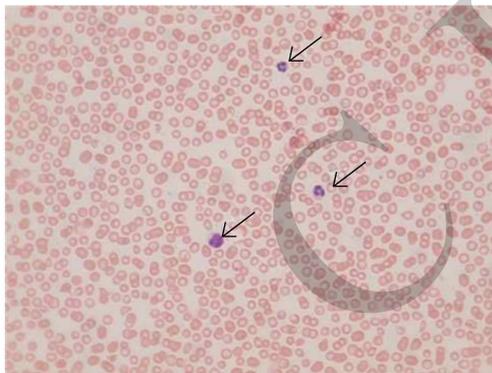


图2 分选前的脐血涂片瑞式吉姆萨染色(×400)

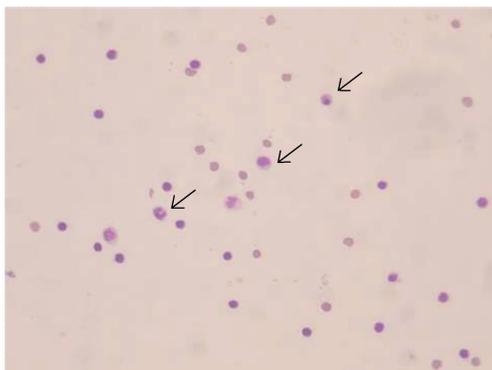


图3 三重密度梯度离心后细胞涂片瑞式吉姆萨染色(×400)

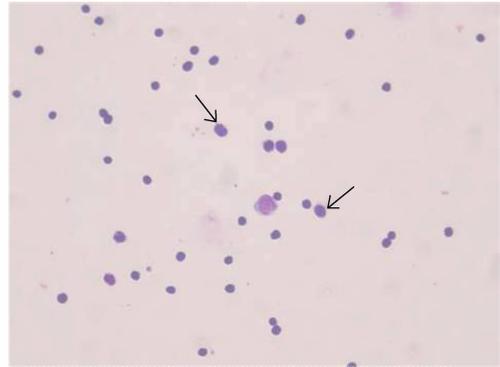


图4 分选后阳性细胞瑞式吉姆萨染色(×400)

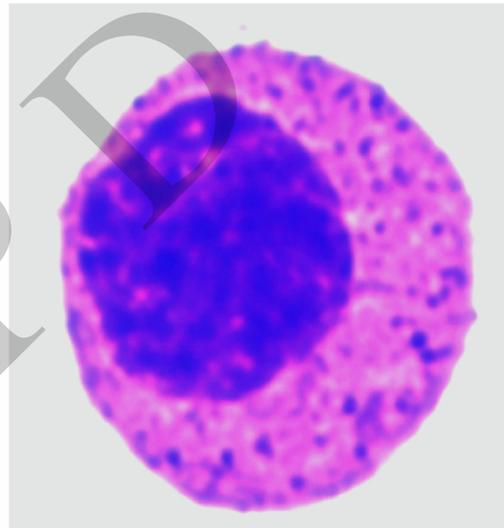


图5 分选后阳性细胞瑞式吉姆萨染色(×1000)

3 讨论

早在1893年 Schmorl^[2] 首先提出孕妇外周血中存在胎儿细胞,该观点今年已经被一些研究证实^[3]。这就为非侵入性产前诊断提供了很好的理论依据。Lo等^[4] 研究表明母血中胎儿细胞数量随孕周的增加而增加,且存在于整个孕期,使其成为很好的诊断材料。但是应用孕妇外周血胎儿细胞进行产前诊断已发展近20年,仍然因为技术和价格的局限性不能广泛在临床中使用,因此高效富集母血中的FNRBCs已经成为开展无创性产前诊断的关键。FNRBC是单核细胞,含有胎儿全部的遗传物质。它在孕妇外周血中的生存期比较短^[5],并且有区别

于其他细胞的多种筛选标记,如转铁蛋白受体(CD71)、血栓敏感素受体(CD36)等。目前用于分选 FNRBCs 的方法主要有:密度梯度离心(DGC)、流式细胞计数分选法(FACS)、显微操作法、免疫磁珠分离法、选择性红细胞裂解、凝集素富集法等。但是这些方法存在成本高或特异性不强等因素。虽然 Bianchi 等^[6]研究表明 FACS 是迄今为止最佳分选富集胎儿细胞的方法,但 FACS 的缺点是设备昂贵、操作步骤较复杂、可影响细胞的形态。本试验采用密度梯度离心和免疫磁珠分选相结合的方法,既可以排除密度梯度离心法获得细胞数量少,纯度不高且容易造成丢失的缺点^[7],又可以减少因为 CD71 在母体淋巴细胞、成熟红细胞、网织红细胞、血小板表面也有一定程度表达造成的污染^[8]。经过对分选前后细胞进行流式细胞分析技术和染色,此方法可以对脐血中 FNRBCs 进行很好的分选,并达到比较理想的分选纯度(81%)。优化后的实验方法可以运用于分选孕妇外周血中的 FNRBCs。

参 考 文 献

[1] Firth HV, Boyd PA, Chamberlain PF, et al. Analysis of

limb reduction defects in babies exposed to chorionic villus sampling[J]. Lancet, 1994, 344:1069-1071.

[2] Schmorl G. Uber das Schicksal embolisch verschleppter Placentarzellen Zentrabl Gynakol, 1950, 29:129.

[3] Simpson J L, Elias S. Isolating fetal cells from maternal blood: advances in prenatal diagnosis through molecular technology[J]. JAMA, 1994, 271:2357-2361.

[4] Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 63:768-775.

[5] Gussin, Helene A, Elischal, et al. Culture of fetal cells from maternal blood for prenatal diagnosis[J]. Oxford University Press, 2002, 6:523-527.

[6] Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, et al. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocyte in maternal blood[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:3279-3283.

[7] Zhong XY, Hahn S, Steinborn A, et al. Quantitative analysis of intact fetal cells in maternal plasma by real-time PCR[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2006, 124:20-24.

[8] 陈汉平, 贺桂芳. 孕妇外周血中胎儿细胞及胎儿 DNA 的检测[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2002, 16:596-598.

编辑:邢清和

(收稿日期:2010-07-05)

读 者 · 作 者 · 编 者

本刊对于稿件规范用语的要求(一)

1. 摘要:论著性文章需附中、英文摘要,均为 500 字(词)以上。摘要必须包括目的、方法、结果(列出主要数据)、结论 4 部分,各部分冠以相应的标题。英文摘要应包括文题、文中所有作者姓名(汉语拼音)、单位名称、所在城市及邮政编码,其后加列国名。

2. 关键词:论著需分别在中、英文摘要后标引 2~5 个中、英文关键词。请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版《Index Medicus》中医学主题词表(MeSH)内所列的词。若无相应的词,可按下列方法处理:① 可选用直接相关的几个主题词进行组配;② 可根据树状结构表选用最直接的上位主题词;③ 必要时,可采用习用的自由词并列于最后。关键词中的缩写词应按 MeSH 表还原为全称,如“HbsAg”应标引为“乙型肝炎表面抗原”。关键词之间用“;”分隔,每个英文关键词首字母大写。

3. 医学名词和药物名称:医学名词以 1989 年及其以后由全国自然科学名词审定委员会审定并公布、科学出版社出版的《医学名词》和相关学科的名词为准,尚未公布者以人民卫生出版社所编《英汉医学词汇》为准。中文药物名称应使用化学工业出版社 1995 年出版的《中华人民共和国药典》或卫生部药典委员会编写的《中国药品通用名称》中的名称,英文药物名称则采用国际非专利药名,不用商品名。