



# 生物通 2008 技术点评： 磁式细胞分选

在 20 世纪 70 年代末期到 80 年代初，许多分离细胞的技术不断涌现出来。1978 年，Guesdon 等用聚丙烯酰胺琼脂糖磁珠来简单快速地分离不同的血清蛋白。没过多久，这项技术就开始应用在分离完整的细胞上了。1982 年，Langenaur 和 Schachner 在磁珠上包被了少突胶质细胞表面抗原的单克隆抗体。通过这种磁珠，他们从混合的细胞群体（少突胶质细胞约占 1.5%）中富集目的细胞，结果纯度达到 91%。

由于磁式分选技术中，吸附和解离靶标的条件仅仅需要外加磁场和撤离磁场这种极为简单的物理方法来实现，无需添加任何其他试剂或者操作步骤，也不需要太多时间，磁场力对待分离样品的损伤小到可以忽略不计，因此，磁式分选技术很快得到了广泛应用，免疫磁珠也从抗体偶联磁珠发展到生物素磁珠，二抗磁珠，Oligo dT 磁珠等各类纯化介质偶联磁珠，常用于分离核酸、蛋白及细胞。这项技术的适应性及速度使它也成为高通量分析的理想选择。例如，日渐广泛的高通量核酸分离系统有相当多种试剂盒采用了磁式分选技术。

## 磁式细胞分选原理

磁式细胞分选的基本原理是借助偶联在磁性微粒上抗体高特异性识别并标记目标细胞表面抗原，再让混有磁珠的细胞悬液通过磁场，结合了磁珠的细胞被吸附在磁场侧壁上，而未结合的细胞被除去，得到纯化的目标细胞，从而实现高效的分选和富集。磁式分选高效快速，可在 2-30 分钟内实现  $10^5$  到  $10^{11}$  个细胞分选。由于其原理主要借助抗体抗原识别，通常又称为免疫磁珠法。

磁式细胞分选可手动完成，简单快速，不需要特别昂贵的设备，对实验和技术要求较低，实验流程对细胞损伤小，无菌和细胞状态

更有保证，分选得到的细胞可进行培养、血液回输或者流式分析。磁式细胞分选系统可以分离出非常纯的细胞群体，而且有极好的回收率和存活率。依据细胞频率和标记表达水平的不同，纯度可达 99%，回收率 >90%。但是磁式细胞分选仅能作为细胞分选之用，不能进行细胞分析，且分选过程中难以去除死细胞的干扰，难于同时进行多种标志物的分选。

磁式细胞分选已经成为分离造血干细胞、祖细胞、抗原特异性 T 或 B 细胞，分离残留的肿瘤细胞等的重要工具，还可以根据细胞的胞浆蛋白或活性细胞的分泌蛋白来进行细胞分离。磁式细胞分选还可以作为流式分选前样品处理步骤。

磁式细胞分选产品比较著名的品牌包括德国美天旎 (MACS)，Invitrogen 旗下 Dynal，BD 公司，StemCell 公司，R&D 公司等等，生物通在此为大家逐一介绍。

## 基础设备：磁珠

磁式分选的主要工具包括磁珠，磁力架，分离柱或者分离试管。

磁珠顾名思义，就是有磁性的微球。磁式分选的原则在于利用磁珠在磁场中的磁力作用，将磁珠标记的细胞和其他未标记细胞分离，因此磁珠标记的质量是磁式分选的关键。

由于专利等因素,每家公司提供的磁珠大小各异,设计侧重点也不同。

德国美天旎(MACS)磁珠由多聚糖和氧化铁组成的超顺磁化微粒,无毒性,微珠直径约有 50nm,比细胞小 200 多倍,体积为细胞的百万分之一,可与病毒的大小相比,光学显微镜下不可见,标记细胞上的MACS磁珠即使在扫描电镜照片上也几乎看不到。由于磁珠微粒极小,对细胞无机械性压力,不损伤细胞;可被细胞生物降解而无需解离磁珠,且不会激活细胞或影响细胞的功能和活力,细胞的生理功能也不变。因为极其微小,同样体积的磁珠密度更大,使得孵育时间短,标记反应只要几分钟; MACS磁珠在细胞表面的标记比例高,令标记的目标细胞在磁场中信号更强,这一点对于样品丰度极小的痕量细胞( $10^{-8}$ )分选尤为有利,使得极少数细胞也能达到很好的分离识别效果。磁性标记只占用 20—30%的结合位点,不影响细胞的荧光抗体标记,与流式细胞仪兼容,亚微观的MACS磁珠不会影响被标记细胞的光散射特性。经MACS分选的细胞可直接进行后续实验:如流式细胞仪分析或分选、分子生物学研究、细胞培养、回输给人或者动物,也可与荧光显微镜术,PCR或FISH兼容。

磁式分离技术的始祖是 Invitrogen 旗下 Dynal 公司的 Dynabeads 系统。Dynabeads 是由氧化铁磁性材料合成的均一、超顺磁微球。它的特点是在氧化铁外包被了一层多聚材料,使细胞不接触氧化铁或葡聚糖,不会引起细胞毒性或免疫原性。而且 Dynabeads 的大小、性状和表面积的均一性很好 ( $CV < 3\%$ ),提供了最佳反应动力学,促进了快速、高效的结合。大小有三种,直径分别为 4.5 $\mu$ m、2.8 $\mu$ m 和 1 $\mu$ m,适用于细胞分选和活化、生化实验及体外诊断。Dynabeads 的大小和细胞相近,

在阳性选择后如果要上流式或其他分析,就需要多一步反应:解离磁珠。也正是因为大小和细胞相似,可以作为人工抗原表达细胞来模仿体内细胞信号,从而活化人和小鼠 T 细胞。

BD 的 IMag 磁珠大小介于 MACS 磁珠和 Dynabeads 之间,直径约为 200nm。IMag 磁珠也是超顺磁颗粒,包被了 BD Pharmingen 生产的高质量单抗或链酶亲和素,适用于 BD IMagnet 磁力架和普通的试管。它对细胞温和,不影响细胞功能,分离后可继续培养或进行流式分析。StemCell 的磁珠则分为两种: EasySep 适用于管式分选系统,是流式兼容的; StemSep 则适用于柱式的磁性分选系统。R&D 公司则提供了链酶亲和素结合的磁珠,直径约为 150nm,有点像胶体颗粒。细胞先与生物素标记的一抗特异结合,磁珠再与生物素结合,从而实现分离。

### 分选柱

在德国美天旎 MACS 系统中,分离过程是在分选柱(column)中进行的。MACS 分选柱是一类填充有不同规格铁磁珠的塑料容器,其表面覆盖无损细胞的柔性亲水包被,因此不会损伤细胞。在磁场外 MACS 分选柱没有磁性,但是当置于 MACS 分选永磁铁的磁场中时,分选柱内的铁珠可以使分选器的磁场增强 1000 倍,足以滞留仅标记有极少量微珠的目的细胞;磁性标记细胞从分选柱中通过时受到均匀的磁力作用,可在磁场中悬浮,既不沉淀又不凝聚,未标记的细胞则在重力作用下自动流出柱子,直接加缓冲液即可清洗掉残留的未标记细胞,最后分选柱撤离磁场即可得到靶细胞,无需重复倒上清,操作方便。由于分选柱是一边流入一边流出,即使样品体积超过

柱容积也可以连续操作，无需分管分次进行，对于样品中低丰度细胞的分离非常有利。

**MACS** 分选柱特别设计减缓样本过柱的流速，缩小分选柱直径以延长过柱长度，吸附更彻底，清洗过程不需撤离磁场，直接加缓冲液冲洗即可，柱式设计可实现类似层析柱式的逐级分离的效果，清洗更彻底。有效提高分选纯度和回收率。大多数 **MACS** 分选柱都是无菌包装，一次性使用，可以满足细胞培养所需的无菌条件。

效果好的代价是成本高。特制的分选柱使得 **MACS** 使用成本一下提高很多。除去初次购买套装有赠送分选柱外，**MACS** 的分选柱相当不便宜，更有甚者，还分有很多种，比如有不同尺寸，不同大小还有分正选和负选专用的柱子等等。

其他厂家则不需要这种特定的柱子，使用试管分离（**tube-based**），普通的 **ependorf** 离心管或者 5ml 或 15ml 离心管即可，可以减少分离时外源免疫原性物质对结果的影响，是经济实惠之选，但是操作上需要稍微麻烦一点----将试管套入相应的磁力架上，磁珠标记细胞被吸附在管壁或者管底，然后倒掉或吸出上清。清洗需要重复这几个步骤。

### 磁力架/磁式分选器

简单的说，磁力架或者分选器就是为磁珠标记细胞提供分离磁场的一块永磁铁。但是当然不会是满大街磁铁笔盒似的廉价磁铁块，看起来总归是要高科技一些，虽然本质是一回事儿。

美天旒管他叫分选器（**separator**），分选器在使用时通常是吸附在特制铁架的垂直面上，可根据分离柱和下面回收管高度随意调整位置，为求磁场强度最大化而设计为 270

度紧贴包围度长的分离柱身，前方仅留平行出口便于平行取出分选柱；上端可承托分选柱的漏斗式大开口。分选器从小到大，从手动的 **µMACS**，**MiniMACS**（**OctoMACS**，就是 8 联 **MiniMACS**），**MidiMACS**（**QuadroMACS**，即 4 联 **MidiMACS**），**VarioMACS**，**SuperMACS**，到全自动 **AutoMASC**，临床的 **CliniMACS**，应有尽有，须得配合不同的分离柱使用。



使用常规离心管作为分选容器的产品，其分选磁力架则是配合离心管设计，兼容尖底和圆底离心管，样本量大时用于垂直位置，尖底离心管可用倾斜位置，适于处理少量样本。

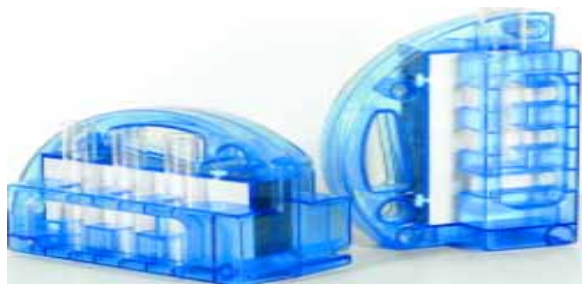
**Dynal** 用于细胞分离的磁力架有两种：**DynaMag-15** 和 **DynaMag-50**。**DynaMag-15**（如下图）的设计很巧妙，是二合一的磁力架。它既可以装 4 个标准的 15ml 管，也可以翻转 180 度后装 4 个用于流式的 5ml 管。**DynaMag-50** 可以装 2 个 5-50ml 管。



**BD Imagnet** 是钕铁硼永磁体，能装配 6 根 12x75 mm 的 **BD Falcon™** 检测试管（货号 352008）或者 2 根 17x100 mm 检测管（货号 352057）。分离细胞的回收率（>95%）和纯度（>95%）均与一次性分离柱相当，



但更为经济。



R&D 的磁力架 MagCelect Magnet 与 BD Imagnet 有些类似，也可以容纳 6 个 12×75 mm (5ml) 或 2 个 17×100 mm (15ml) 圆底管。这个磁力架适用于 100nm 或更大的磁珠，可以进行正选或负选。

StemCell 公司的 RoboSep 是一台全自动的磁式细胞分选系统。其原理是以不需分离柱的 EasySep 细胞正选和负选系统为基础，自动完成每次四种样品的细胞分选。仪器的操作在彩色的触屏上完成，每种细胞的最好分选程序可以事先被设定，使用时被调出即可。使用时只需要将样品和需要的分选试剂放入 RoboSep 分选系统中，RoboSep 即可在 1 小时内自动完成细胞分选的全过程。RoboSep 使用一次性枪头完成加样和加试剂的全过程，完全避免交叉污染，分选过程结束后，细胞即可被用于各种下游实验。RoboSep 可以被放在超净台或生物安全柜中操作，以保证整个过程在无菌状态下完成。正选时，可以同时分选四种不同的样品，每种样品的细胞数最多为  $2 \times 10^9$  细胞；负选时可同时分选两种不同的样品，每种样品的细胞数最多为  $1 \times 10^9$  细胞。正选和负选同时进行，对一种样品进行负选，对另外两种样品进行正选。



## 分离策略

磁式细胞分离基本策略有两种：阳性选择（正选）和阴性选择（负选）。如果简单的正选或者负选不能达到目的，还可以将这两种方法组合搭配进行复合选择。

阳性选择是指根据靶细胞表面特异抗原，用相应的抗体磁珠标记靶细胞，磁性分选去除其他细胞后，得到纯化的标记靶细胞。多数情况下，阳性选择都是首选，因为操作简单，速度快，特异性高，回收率高。

想要保留目标细胞特定抗原处于未结合的“untouched”状态时（未激活状态），就可以用阴性选择，也称之为去除法，即标记其他非目的细胞，令其滞留磁场，然后洗脱得到未标记的纯化靶细胞。例如用半抗原对血液中 CD4, CD11b, CD16, CD19, CD36, 和 CD56 进行修饰和半抗原抗体磁珠标记，通过负选可洗脱未被标记修饰的 CD8+ 细胞，得到未激活的 CD8+ 细胞，用于研究无细胞表面分子无交联而引起效应的功能研究，如 CD8+T 细胞激活的信号要求，诱导细胞毒性 T 细胞增值或者无能，表达调控等方面研究。

简单的正选，如果是 MACS 一类的超微磁珠，由于磁珠成分可被细胞生物降解，因而则可以直接进入下一步培养或者分析，如果是大磁珠则需要先解离磁珠才能得到靶细胞。

但是如果单纯的正选或者负选还不能达到目的时，则需要组合多次正选或者负选以达到目标。正如生物通前面提到过，磁式分选难于同时做多个标记物指标的分选，但巧妙使用复合选择法有时一样可以达到目标。

例如，造血干细胞/祖细胞分离中必然用到 CD34，可以用 CD34 抗体磁珠直接标记得到 CD34+ 的细胞，然后再选择其他标记物进

行进一步分选。这时两次分离之间无论磁珠大小都需要先解离磁珠后才能进行下一步磁式分离的工作。

例如，血液中髓细胞源树突细胞主要群体CD11c<sup>high</sup>CD123<sup>low</sup>树突细胞上特异表达CD1c(BDCA-1)抗原，但是血液中除髓细胞源树突细胞外，一种B细胞亚群也表达CD1c(BDCA-1)抗原，因此可以先通过cd19磁珠负选先除去B细胞，再用CD1c(BDCA-1)-Biotin和抗Biotin磁珠放大信号筛选出目标靶细胞。由于第一次负选时目标细胞并未标记，因而两次筛选过程之间无需进行磁珠解离步骤。

### 标记策略

用磁性分选细胞最重要的参数是有好的标记质量。对阳性细胞的标记要尽可能强，而对背景的标记要尽可能地弱，才能使阳性的组分与非标记的阴性组分得到最好的分离效果。标记策略也有两种：直接标记和间接标记。直接标记是磁性标记最快和最特异的方法。市场上有很多常见细胞的直接标记和分离试剂盒。

抗体品种千千万，当找不到合适的抗体磁珠时，也可以采用间接标记。首先用一抗(未标记一抗，或者生物素标记一抗，荧光素标记一抗均可)标记靶细胞，然后分别用二抗磁珠，或者抗生物素/链酶亲和素偶联磁珠、抗荧光素磁珠作为二抗来标记细胞。

几乎针对任何种系任何细胞的任何一种单抗或多抗，均可用于间接标记。间接标记主要在如下情况时选用：当没有直标磁珠时；需要用几种抗体的混合物同时分选或去除多种类型的细胞；因为间接标记有信号放大的作用，因此当目标细胞的特异抗原表达弱时，可以采用这种方法来最小化非特异结合。还可以

用于自备抗体或者配体的磁珠分选。

除了半抗原磁珠，许多公司也提供裸磁珠以便于研究需求。裸磁珠上带有活化基团可用于自己在实验室自行用磁珠标记抗体。

### 速度和规模

磁珠孵育所需时间很短，仅需 10-15 分钟。因而手动分选通常可在 30 分钟内完成全过程。手动每次处理可少至 10<sup>5</sup>个总细胞，最高处理量可达 10<sup>11</sup>个总细胞 (SuperMACS)！

需要频繁进行细胞分选且又多金的，还可以选择全自动磁式细胞分选器，当然这个就相当不便宜了。autoMACS分选器是一个全自动桌面型磁性细胞分选器，应用MACS技术，可以在 3-10 分钟内从总量 4×10<sup>9</sup>细胞样品中分选出 2×10<sup>8</sup>个细胞。autoMACS可以使用绝大多数直标和间标MACS细胞分选试剂，正选负选均可自动进行，双阳性筛选程序可以富集频率小于 10<sup>-6</sup>的细胞。适用于所有类型细胞的分选，需要安装两个autoMACS分选柱(可以重复使用 100 次)。更高级的CliniMACS细胞分选系统是临床级自动细胞分选设备，可在封闭的无菌系统内磁性富集大量目的细胞或去除非目的细胞，是世界上最早被批准应用于临床的造血干细胞分离、纯化系统，已在欧洲获得临床应用的CE认证，在美国也已通过IDE、IND认证。可用于任何细胞类型的分选，能从外周血单个核细胞中分离出纯度高达 95%的CD34+造血干细胞，去除约 3-4 个对数级的肿瘤细胞以及 4-5 个对数级的T淋巴细胞。完成一次分选仅需 3 小时左右。临床用 CliniMACS通道可以从 6-12×10<sup>10</sup>总细胞中分选出 6-12×10<sup>8</sup>个细胞。研究用阳性分选通道可以处理 1-2×10<sup>10</sup>总细胞，去除分选通道可以从 12×10<sup>10</sup>总细胞中去除 4×10<sup>10</sup>个细胞。

BD Imagnet磁分离系统分选的细胞数可达  $2 \times 10^9$  个，可用于阳性选择和阴性选择。阳性选择时细胞纯度高达 95%，阴性选择时非目的细胞 < 5%。分选后细胞可以直接用于流式细胞仪分析，是非常方便的预富集方法。

### 基于磁珠的细胞分离

每个公司都提供多种不同抗体包被的磁珠，用于分离人源、小鼠或大鼠的细胞，具体可去各公司网站查询。可分离的细胞组分包括 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核细胞、树突状细胞、干细胞、成纤维细胞、癌细胞等等。原始样本包括全血、骨髓细胞、脐带血、buffy coat、单个核细胞和组织消化等制备好的样本等。

### 磁珠的其他用途

美天旎的 MACS Cytokine Secretion Assays 是一种根据活细胞分泌的细胞因子来分析和富集活细胞的创新技术。首先，一种能与分泌的细胞因子结合的捕获试剂附着在细胞表面，以捕获细胞分泌的细胞因子，然后用第二抗体即检测抗体（荧光标记的细胞因子特异性抗体）通过细胞因子结合在细胞上，再用流式细胞仪分析这些细胞因子分泌细胞。此外，还可以通过 anti-PE 磁珠通过 MACS 技术富集此类细胞。它的另一个用途是分析和分离抗原特异性 T 细胞。对 T 细胞进行一个短暂的抗原特异性再刺激，可诱导其分泌细胞因子，继而进行检测和分离。这种方法简单易懂，几小时内即可完成，而且灵敏度高，可有效富集低至  $10^{-6}$  的抗原特异性 T 细胞。

Dynabeads 也可以作为人工抗原表达细胞来模仿体内细胞信号从而完全活化小鼠和人类 T 细胞。正是因为 Dynabeads 的大小（4.5um）与要刺激活化的细胞大小相似，所

以可以实现细胞活化。它通过利用两个活化信号 CD3 和 CD28 来模拟体内 T 细胞和抗原呈递细胞的相互作用。Dynabeads CD3/CD28 技术可以用于短期或长期的 T 细胞扩增，而且易于从培养体系中除去，因此可以用于流式分析。活化的 T 细胞不结合磁珠和抗体，且功能、细胞因子表达谱和 T 细胞的全部作用与体内活化的 T 细胞一样，因此不光能应用于实验研究，还可以应用于临床研究中。

Dynal 的微生物磁性分选类产品在临床检验、食品检验、水质 / 环境检验、兽药检验应用广泛，可利用磁性分选技术从环境、临床和食品预富集样品中富集细菌、诸虫，是高灵敏性、快速有效的富集分离方法。传统方法在分离微生物时的弊端，磁性分选技术都能有效避免，减少了背景的干扰，提高了精准性。

Dynabeads® 产品已经得到美国环保局和 AOAC 的认证，并成为 2008 北京奥运会食品安全指定检测试剂，用于检测 E. coli O157。

E. coli O157 是 VTEC 大肠杆菌群最常见的一类菌群。VTEC 是指产 vero 细胞毒素大肠杆菌 (Verocytotoxic Escherichia coli)。这种毒素是引起出血性尿毒症最主要的原因，也能引起儿童肾衰竭，死亡率达 10%。多年来，一直认为这种疾病感染的诱因是牛奶和牛肉的制品，但这种菌群的分离富集一直很难有理想的办法来解决。Dynabeads anti-E. coli O157 可以从各种食品样品中分离富集 E. coli O157，满足流行病学的研究要求和提高控制力度，富集细菌整个过程用时不超过 1 小时，分选结果的灵敏性大大提高，1 天可完成多个样品的检测。现在这种磁性分选的方法已经被英国公共健康服务实验室认定为标准的分离方法，在水质检测和牛奶制品的菌群检测方面也作为标准方法来采用。

## 附录：DynaI 磁珠产品技术要点

- ◇ IMS 分选试剂的储藏温度应该是 2-8℃。过低或过高的温度都会影响有效期，从而影响产品的使用效果。
- ◇ 所有的试剂和样本在使用之前都应该平衡到室温（15-25℃）。
- ◇ 全部操作都应该在试验台上，室温（15-25℃）下进行。
- ◇ 手动处理样本要求比较高的实验室操作技术和细心的操作。用 **BeadRetriever** 时，将样本转移至试管的操作应该在距离已经准备好的样本至少 1 米的区域进行。
- ◇ 磁珠使用前必须震荡混匀
- ◇ 在处理极其粘稠或是含脂量很高的样本时，可以用到稀释。推荐使用特定的洗涤缓冲液（PBS-Tween）来稀释样本。
- ◇ 使用 360° 旋转混合器来孵育磁珠。建议从头到底的旋转。
- ◇ 在室温下保持 10 分钟孵育时间。过多的孵育对靶细胞或靶分子的复原能力仅有

轻微的提升，但却增大了非特异性结合的可能性。

- ◇ 洗涤要彻底，而且要按照规定的次数进行。
- ◇ 轻微的混匀液体，而不是震荡摇匀。在加磁场之前，要确保磁珠适当的加到了溶液里。
- ◇ 当把磁珠集中在一个小球里的时候，用 90° 的 rock-n-roll 动作在特定的时间内对每个旋转进行 1/2 的操作。
- ◇ 小心的去处悬浮液。手工将液体吸出试管而不能空吸。从样本试管吸出磁珠后，因为这些液体要丢弃，所以会引起靶细胞或是靶分子的缺失。
- ◇ 额外的洗涤步骤可以减少背景干扰，但也会降低靶细胞的回收效率。
- ◇ 如果考虑到背景污染，可以在每次洗涤步骤后更换离心管。很多微生物都可以粘到管壁上，更换可以减少这种交叉污染。

（生物通 余亮 吴青）