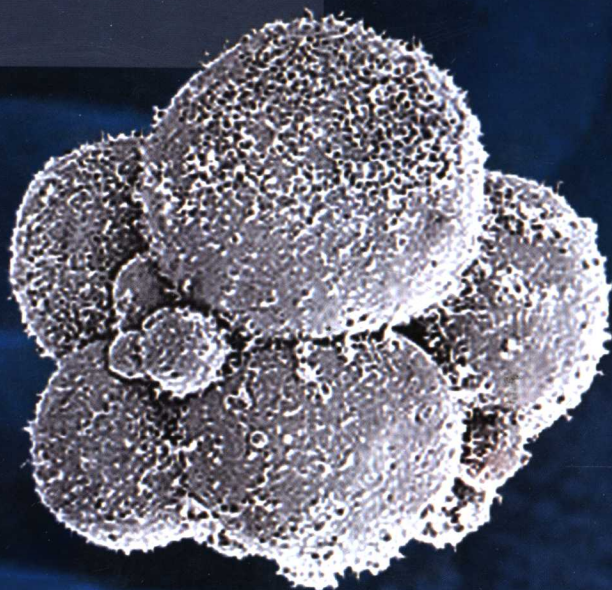


生命科学实验指南系列

干细胞 实验指南

裴雪涛 主编



科学出版社
www.sciencep.com

生命科学实验指南系列

干细胞实验指南

裴雪涛 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书以新颖、实用为基准,以可操作为目的,把干细胞领域的最新方法及技术加以凝练,按照实验操作指南的格式,对干细胞的分离纯化、鉴定、培养、扩增、诱导分化、核移植、细胞周期与调控、保存、复苏等技术进行系统描述。每一项技术均按基本原理、主要设备与试剂、操作步骤、结果判断、注意事项、参考文献等展开,希望达到系统、科学、全面地介绍干细胞研究的主要技术和实验方法的目的。

本书可用作干细胞研究、开发和应用的工具书,也可供细胞生物学、生物化学、分子生物学、基因组学、医学等相关领域的教学科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

干细胞实验指南/裴雪涛主编. —北京:科学出版社, 2006

(生命科学实验指南系列)

ISBN 7-03-016193-9

I. 干… II. 裴… III. 干细胞-实验-指南 IV. Q24-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 097047 号

责任编辑:莫结胜 彭克里 席 慧/责任校对:朱光光

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社编务公司排版制作

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2006年1月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2006年1月第一次印刷 印张:26 3/4 插页:1

印数:1—3 000 字数:615 000

定价:68.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换<双青>)

主 编：裴雪涛

编 者：(按姓氏汉语拼音排序)

高艳红	管利东	郭 永	韩 姝
韩 颖	李绍青	李艳华	梁 峰
刘大庆	南 雪	裴雪涛	彭红梅
齐 冬	秦立蓬	师 伟	苏 平
王冬梅	王 卉	王 俊	王韞芳
谢小燕	闫 舫	杨丽平	杨 晓
杨 怡	杨印祥	姚海雷	袁红丰
岳慧敏	张 鹏	张 锐	赵敬湘
赵云山			

参加编写单位：

军事医学科学院

中国人民解放军总医院

北京龙脉得生物技术有限公司

德国美天旒生物技术有限公司

美国 BD 生物技术有限公司

日本奥林巴斯生物技术有限公司

序

干细胞是具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞群体,即这些细胞可以通过细胞分裂来维持自身细胞群的大小,同时又可以进一步分化成为各种不同的组织细胞,从而构成机体中各种复杂的组织器官。随着干细胞技术的发展并根据干细胞本身所具有的特性,人类有可能在体外培养某些干细胞,定向诱导分化为我们所需要的各种组织细胞以供临床所需。以此为目的的干细胞工程学几乎涉及人体所有的重要组织和器官,也涉及人类面临的多数医学难题,如心血管疾病、自身免疫性疾病、糖尿病、骨质疏松、癌症、老年性痴呆、帕金森病、严重烧伤、脊髓损伤和遗传性缺陷等疾病的治疗。此外,干细胞研究还涉及克隆技术、组织工程学、功能基因组学和蛋白质组学、发育生物学、新药开发与药效、毒性评估等众多生命科学领域,并将在人类健康与疾病治疗方面产生极其重要而深远的影响。因此,干细胞的研究与应用在 *Science* 公布的 1999 年世界十大科技进展中名列榜首,并于 2000 年、2003 年、2004 年几度入选世界十大科技进展,已成为生命科学和生物医药领域最受关注的热点之一,并已成为衡量一个国家生命科学发展水平的重要指标,国际间的竞争也日趋激烈。

裴雪涛教授一直从事干细胞及其相关生命科学的基础与应用研究,年轻的编著者都是干细胞研究领域的实践者,他们掌握着这一领域最新的发展动态,有着扎实的理论功底和技术积累,有着严谨求实的工作作风和努力创新的开拓精神,并以自己的勤奋和努力不断探索和推动着这一学科的发展。在编写出版了《干细胞生物学》这一偏重理论知识的专著后,又一次把干细胞及其相关领域的技术原理、操作程序、结果判定等偏重于实际操作的方法归纳总结,使其更加标准化和规范化,更便于实验室间的交流与相互验证。该书是一部可操作性极强的工具书,再一次为我国的干细胞与再生医学事业做出了突出的贡献,并将进一步推动干细胞技术、克隆技术、组织工程技术以及其他相关生物技术和学科的发展。

中国科学院院士

吴祖泽

2005 年 6 月于北京

前 言

干细胞是具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞群体，干细胞的研究与应用几乎涉及了所有的生命科学和生物医学领域，除了在细胞替代治疗、组织器官再生修复与重建、基因治疗中的重要意义外，它还将在基因组与蛋白质组研究、系统生物学研究、发育生物学模型、新药开发与药效、毒性评估等领域产生极其重要的影响。同时，由于干细胞研究与应用中所涉及的干细胞来源、人与动物细胞核物质的互换、哺乳动物的无性繁殖、克隆人等而引发的社会问题、伦理学问题、生物安全问题等也备受社会各界人士的关注。

近年来，随着发育生物学、实验血液学、神经生物学、细胞生物学、分子生物学、免疫学等学科的发展，以及计算机技术、纳米技术、新材料技术等高新技术的突飞猛进，干细胞的分离纯化、建系、性能研究、培养扩增、诱导分化、组织重构等有了突破性进展，部分干细胞技术已开始进入临床应用。这一系列的成就使干细胞及再生医学的研究与应用成为 21 世纪最受关注的科学领域之一，也多次入选 *Science* 世界十大科技进展，且这一热点还在不断地持续升温。然而，我们都知道，科学与技术是相互依存、相互促进的。一个新学科、新领域、新医疗措施的出现和完善，其依托的技术方法至关重要，如果没有成熟的技术、没有规范的操作、没有标准的判定依据、没有重复性好的实验方法，就难以获得可靠的实验数据和结果，也就无法得出令人信服的结论，当然也就不可能准确地进行同行间的交流。核移植及克隆技术的突破引发了干细胞研究乃至生命科学和医学的革命，这就是技术推动科学进步的最好证明。

为此，本书以新颖、实用、可重复为基准，以可操作、规范化为目的，与先前出版的《干细胞生物学》形成互补，理论联系实际，尽最大可能地收集整理目前国际通行的、认可的技术方法，每一种主要的技术方法均以基本原理、主要仪器设备和试剂、操作方法与程序、结果判定、实验技巧及注意事项等为主要内容，以求成为一本从事本行业实际操作人员的工具书，同时也可供关注此领域的政治家、科学家、社会学家和伦理学家参考。

我们深知，干细胞与克隆技术正处在高速发展的阶段，新的理论和技术方法层出不穷，虽然此书出版的时候也许又有新的技术涌现。但我们深信，基础的是可以互通的，经典的是可以长久的。在此，我要向参与编写此书的年轻科学家、技术专家、博士后和博士生们表示由衷的感谢。是这些工作在第一线的同志们用高度负责的态度、创新的理念、求实的精神以及对新知识的敏锐和对新技术的掌握，把最新的信息、方法和技术加以凝练，为从事干细胞、克隆技术、组织工程及其相关领域研究、开发和应用的同行提供了一本可随身相伴的工具书。

最后，我要特别感谢我的导师吴祖泽院士又一次给了我信心和勇气，并亲自为本书作序。而为本书的组织、联络、编辑、校对等做出贡献的南雪、白慈贤、施双双和陈琳等同事也功不可没，我为他们无私奉献的精神、务实高效的工作感到骄傲。此外，本书

的出版还得到国家 863 计划“组织器官工程”重大专项、国家 973 计划、国家杰出青年科学基金等项目的大力支持，在此深表谢意。也向提供部分技术资料并参与部分章节编写的北京龙脉得生物技术有限公司、德国美天旎生物技术有限公司、美国 BD 生物技术有限公司、日本奥林巴斯生物技术有限公司等企业表示感谢。

裴雪涛

2005 年 6 月于北京

目 录

序

前言

第 1 章 干细胞的分离纯化	1
1.1 密度梯度离心法	1
1.2 单抗贴壁铺展法	3
1.3 免疫磁珠分选技术	4
1.4 流式细胞分选法	17
1.5 组织消化法	22
主要参考文献	23
第 2 章 干细胞的鉴定	24
2.1 光学显微镜	24
2.2 电子显微镜	32
2.3 共聚焦显微镜	43
2.4 流式细胞术鉴定特异基因的表达	47
主要参考文献	51
第 3 章 胚胎干细胞体外培养与定向诱导分化	53
3.1 胚胎干细胞分离培养	53
3.2 小鼠胚胎干细胞定向诱导分化	66
主要参考文献	69
第 4 章 成体干细胞分离培养扩增及体外分化	70
4.1 造血干/祖细胞	70
4.2 间充质干细胞	83
4.3 神经干细胞	101
4.4 血管内皮祖细胞	105
4.5 肌肉干细胞	108
4.6 肝脏干细胞	114
4.7 胰腺干细胞	122
4.8 皮肤干细胞的扩增及定向诱导分化	124
主要参考文献	128
第 5 章 干细胞体内增殖分化	131
5.1 干细胞向成体动物体内移植——NOD/SCID 小鼠造血干/祖细胞移植	131
5.2 干细胞向动物胚胎移植——胚胎干细胞囊胚植入构建嵌合体	135
5.3 体内可见光成像技术用于干细胞研究	144
主要参考文献	157

第 6 章 干细胞增殖、分化及其调控的分析检测	158
6.1 干细胞细胞周期检测技术	158
6.2 干细胞分化检测	164
6.3 干细胞增殖分化调控的研究策略	164
6.4 常规操作	168
6.5 增殖分化调控机制的研究	185
6.6 干细胞增殖分化调控研究范例 I——由生命现象到功能分子	225
6.7 干细胞增殖分化调控研究范例 II——由功能分子到生命现象的调控	233
主要参考文献	241
第 7 章 核移植技术	243
7.1 总论	243
7.2 核移植操作所需的主要设备与试剂	244
7.3 核移植技术的主要操作步骤	246
7.4 核移植技术的注意事项及影响因素	253
主要参考文献	255
第 8 章 基因打靶技术	256
8.1 打靶载体构建	256
8.2 中靶 ES 细胞的筛选	260
主要参考文献	266
第 9 章 干细胞与组织工程实验技术	267
9.1 干细胞与骨组织工程	267
9.2 干细胞与软骨组织工程	272
9.3 干细胞与皮肤组织工程	281
9.4 干细胞与肌腱组织工程	285
9.5 干细胞与心肌组织工程	290
9.6 干细胞与血管组织工程	298
9.7 干细胞与肝组织工程	302
主要参考文献	315
第 10 章 干细胞的保存与复苏	318
10.1 造血干细胞低温保存的生物学基础	318
10.2 冷冻保护液的选择	318
10.3 冷冻保存方法的选择	320
10.4 冷冻保存的设备	321
10.5 造血干细胞的低温保存方法	321
主要参考文献	325
第 11 章 干细胞治疗的临床前研究	326
11.1 有效性研究	326
11.2 安全性研究	335
11.3 干细胞的采集、分离、鉴定及体外操作的质量控制	340

主要参考文献	342
第 12 章 干细胞治疗的临床(试验)研究	343
12.1 临床研究的产生及筹划	343
12.2 临床研究的不同阶段	352
12.3 干细胞治疗的临床新技术申请	354
12.4 干细胞相关的临床试验研究示例	356
主要参考文献	361
第 13 章 干细胞与基因治疗	362
13.1 基因治疗概述	362
13.2 病毒介导的基因转导实验技术	370
13.3 干细胞的转染	387
13.4 以干细胞为基因导入靶细胞的基因治疗临床应用策略及前景	392
主要参考文献	396
附录 1 缩略语	398
附录 2 常用溶液配制方法	402
附录 3 主要共聚焦激光对应常用荧光染料表	405
附录 4 合适小鼠卵的培养基配方(g/L)	408
附录 5 Zimmermann 细胞融合培养基成分(pH7.0)	409
附录 6 补加锶的 M16 培养基	410
附录 7 FDA/NIH 关于基因治疗的相关文献	411

第 1 章 干细胞的分离纯化

1.1 密度梯度离心法

不同的细胞群的细胞密度不同(表 1.1), 比如血细胞成分中单个核细胞及血小板的密度为 1.075~1.090g/ml, 红细胞和粒细胞(包括中性粒细胞及嗜酸及嗜碱性粒细胞)的密度为 1.092g/ml 左右, 因此, 利用一种密度为 1.075~1.092g/ml 的等渗溶液进行密度梯度离心, 使不同密度的细胞按不同的密度梯度分布, 就可以将不同密度的细胞群分开, 从而使单个核细胞或者其他细胞从血细胞中分离出来。应用此种方法淋巴细胞的回收率约为 80%~90%, 淋巴细胞的纯度约为 90%。不同动物所用的细胞分离液密度有所不同, 例如, 人淋巴细胞分离液密度为 1.077g/ml, 大鼠淋巴细胞分离液密度为 1.083g/ml, 小鼠淋巴细胞分离液密度为 1.092g/ml。

表 1.1 人类各种血细胞的密度

细胞	密度/(g/ml)	细胞	密度/(g/ml)
红细胞	1.090~1.110	淋巴细胞	1.052~1.077
嗜酸性粒细胞	1.090~1.095	B 淋巴细胞	1.062~1.075
中性粒细胞	1.080~1.085	T 淋巴细胞	1.065~1.077
嗜碱性粒细胞	1.070~1.080	NK 细胞	1.050~1.070
单核细胞	1.050~1.066	血小板	1.030~1.060

最常用的聚蔗糖-泛影酸钠(ficoll-hypaque, F/H)密度梯度离心法(以下简称 F/H 法)分离外周血及骨髓中的单个核细胞就是利用各种细胞密度的差异将它们分散于自上而下的液体层次中, 单个核细胞及血小板的密度小于密度为 1.077g/ml 的 F/H 分离液, 离心后处于 F/H 液的顶端。红细胞及粒细胞的密度比 F/H 密度高, 离心后沉于 F/H 底端。血小板密度最小, 可用低速离心与单个核细胞分开, 或用胎牛血清梯度离心, 将血小板托起, 而单个核细胞沉于底部。

人骨髓或脐带血中单个核细胞(MNC)包括干细胞、淋巴细胞和单核细胞, 一般认为, 干细胞在形态上为淋巴样细胞, 其密度与淋巴及单个核细胞的密度基本相同, 因此通过密度梯度离心的方法, 就可以收集到我们需要的细胞, 而将不需要的细胞去除。利用密度为 1.077g/ml 左右的分层液做密度梯度离心, 使一定密度的细胞按相应密度梯度分布, 从而将各种血细胞加以分离。下面以外周血单个核细胞分离为例介绍此种分离方法。

1.1.1 试剂及配制

(1) 淋巴细胞分层液: 有成品供应, 密度为 (1.077 ± 0.001) g/ml。

(2) 台盼蓝染液：见附录 2。

1.1.2 操作方法

(1) 取血放入抗凝管，摇匀，用 pH7.2~7.6 的 Hank 缓冲液(或磷酸盐缓冲液)稀释血液 1~2 倍。

(2) 取淋巴细胞分层液 3~4ml，放入 15mm×150mm 的试管中。

(3) 用毛细吸管吸取稀释血液，在离分层液面上 1cm 处，沿试管壁徐徐加入，使稀释血液量叠于分层液上，稀释血液与分层液体积比例约为 2 : 1。

(4) 用水平离心机以 2000r/min 离心 30min，离心后其中的内容物分为三层，上层为血浆(内含血小板)，中间层为分层液，底层为红细胞和多核白细胞。在上、中层液体界面处可见到乳白色混浊的单个核细胞层。

(5) 用毛细吸管轻轻插入到白膜层，沿试管壁周缘吸取界面层的单个核细胞(图 1.1)，移入另一试管中。

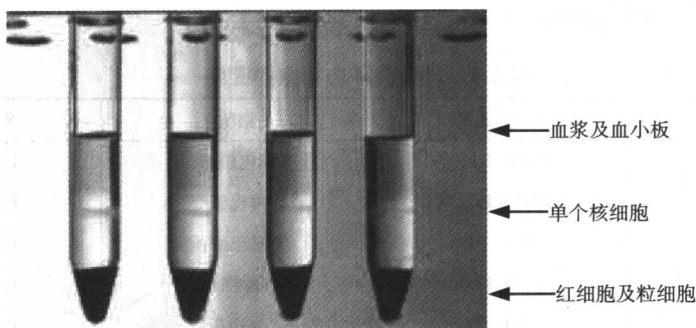


图 1.1 F/H 法分离淋巴细胞示意图

(6) 加 5 倍以上体积的不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 Hank 缓冲液，混匀，1500r/min 离心 10min，吸弃上清，重复洗涤 2 次。

(7) 末次离心后，吸尽上清，用含 10% 血清的培养基重新混悬细胞，取 1 滴细胞悬液计数。

(8) 细胞活力检测：取 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个细胞悬液加 1 滴 2% 台盼蓝染液混匀，加盖片，显微镜高倍镜检，活细胞不着色，折光强；死细胞被染成蓝色，体积略膨大。活细胞数应在 95% 以上。

1.1.3 注意事项

(1) 用稀释的全血可使单个核细胞获得率升高，将稀释的血液叠加于分层液上时，一定要细心，动作要轻，避免冲散分层液面或与分层液的混合而影响分离结果。

(2) 配制单个核细胞悬液所用的培养液要求等渗、具缓冲作用并对细胞无毒性。

(3) 吸取单个核细胞时，应避免吸出过多上清液或分层液而导致血小板污染。

(4) 配制好的单个核细胞可放室温或 0~4℃，后一条件较好，可减少细胞代谢活动。注意不要迅速改变其所处的温度，以免造成“温度”休克。

1.1.4 备注

大容量血液可先用甲基纤维素或羟乙基淀粉沉降后，再采用上述方法分离。

将稀释后的血液按 4 : 1 的比例与 0.5% 的甲基纤维素溶液混匀，室温沉降后，吸取上层细胞，离心后，可获得有核细胞，再以 PBS 稀释，重复上述步骤。

1.2 单抗贴壁铺展法

单抗贴壁铺展法又称洗淘法(panning)。此方法的基本原理是抗原-抗体的特异性结合反应，因此称为单抗贴壁铺展法。将聚苯乙烯培养瓶或培养板用抗体包被，然后将细胞与其共孵育，这样，那些表达所包被的抗体所对应的抗原的细胞就选择性地结合到培养瓶或培养板的表面而与其他未结合的细胞群分开。收集未黏附细胞群，即阴性选择；漂洗培养瓶或培养板后，收集黏附细胞群，即阳性选择。如利用 CD34 单克隆抗体(McAb)孵育骨髓单个核细胞悬液，然后将孵育过的细胞悬液加至已包被好羊抗鼠抗体的培养瓶或培养板中。这样通过抗鼠抗体-CD34⁺ McAb 的桥联结合反应使 CD34⁺ 细胞结合固定在细胞培养板底，而非固定的淋巴细胞(CD34⁻)可通过轻吸培养板孔或培养瓶内细胞悬液而获得。此种方法还适用于 T 细胞与 B 细胞、T 细胞亚群 CD4⁺ 或 CD8⁺ 细胞及 CD4⁻CD8⁻ 双阴性 T 细胞等细胞的分离。在此，以骨髓 CD34⁺ 细胞的分离纯化为例介绍此法。

1.2.1 实验材料、试剂及配制

- (1) 淋巴细胞分层液：有成品供应，密度为(1.077±0.001)g/ml。
- (2) 2% 台盼蓝染液，见附录 2。
- (3) 6 孔平底细胞培养板、毛细吸管等。
- (4) 抗人 CD34 单克隆抗体，羊抗鼠抗体。

1.2.2 操作方法

- (1) 密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞(方法见密度梯度离心法)。

(2) 制备洗淘板在 6 孔平底细胞培养板的每个孔中加 2.5ml 羊抗鼠(IgG 和 IgM)抗体[每孔加 10~20μg 抗体，以 F(ab')₂ 羊抗鼠 IgG 和 IgM 为准]。然后置室温 4~6h 或 4℃ 过夜。将上清液吸出，吸加含 1% FCS 的 PBS 液 2.5ml 于每孔，轻轻振摇，吸出所加液体，同上再吸取 2 次。然后将 2.5ml PBS(含 1% FCS)加入孔内，室温封闭 30min。用前用 PBS 洗涤 2 次，末次洗涤后，吸尽孔中液体。

(3) 将 2×10^7 个/ml 的骨髓单个核细胞悬液置于 15ml 离心管中，4℃、400g 离心 10min，弃上清，用含适合浓度的 CD34 抗体悬起细胞，冰浴中孵育 30min。

(4) 按每孔 1ml 细胞悬液的量加至已包被羊抗鼠抗体的 6 孔洗淘板中, 然后置 4℃ 孵育 30~45min, 轻吸孔内细胞悬液, 此悬液即为 CD34⁺ 细胞。

(5) 弃去每孔中的液体, PBS 洗涤一遍后, 机械剥离黏附在培养皿表面的细胞, 即用预冷的 PBS/0.2% BSA 用力冲洗平皿底部, 收集冲下的细胞即为 CD34⁺ 细胞。

1.2.3 注意事项

(1) 上述方法适用于这样的场合: 待选择分离的细胞不会自发地黏附于塑料上。

(2) 也可用 25cm² 或 28cm² 的细胞培养瓶进行抗体包被, 每瓶内加 2ml F(ab')₂ 羊抗鼠抗体(1mg/ml), 在 4℃ 冰箱内可长期存放。用前可将抗体液移出至另一培养瓶内继续包被。这种抗体液可重复使用 10~15 次。用 PBS 洗涤后的已包被好的培养瓶需在 2~3h 内立即使用。

(3) 有的实验室采用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液作为抗体的包被液, 其目的在于其能使抗体牢固地与包被板表面结合。

(4) panning 法可用于分离混杂悬液中的大、小细胞群。用多克隆抗体包被效果好, 但用 McAb 包被分离效果不满意。所以, 采用间接 panning 法为好。

(5) 间接 panning 法不仅可用于分离多种细胞(直接法只能分离抗体相应的细胞), 而且致敏细胞所用 McAb 无需纯化。间接法可用于同时黏附多种 McAb 混合致敏细胞, 以去除多种细胞。

(6) 间接 panning 法需用大量的高亲和层析纯抗体或高效价、特异性好的抗血清进行纯化。纯化的效果还取决于细胞黏附塑料平皿的强度和抗体结合塑料的能力。

(南 雪 裴雪涛)

1.3 免疫磁珠分选技术

随着对细胞功能的深入研究和细胞治疗的广泛开展, 分选技术已日益引起人们的关注。细胞分选方法有很多种, 主要可以归为两大类: FACS 分选和免疫磁珠分选。现以应用最为广泛的磁性细胞分选(magnetic activated cell sorting, MACS)技术为例, 介绍免疫磁珠分选技术。MACS 技术因为操作简便、分选纯度高、回收率高、分选后细胞活性好等优点, 已经成为细胞分选的标准方法。此技术应用领域极为广泛, 从实验室到临床, 从少量细胞分选到大量细胞分选, 从常见细胞到稀有细胞甚至到复杂的细胞亚群分选, 从人类细胞、小鼠细胞到其他种系的细胞分选, MACS 技术都得到了广泛的应用。在干细胞分选中, MACS 技术的作用更是不容忽视。

1.3.1 MACS 技术原理

MACS 技术是一种集免疫学、细胞生物学、磁力学等知识为一体的高度特异性细胞分选技术, 其主要组成部分有 MACS 微珠、MACS 分选柱和 MACS 分选器。MACS 技

术的高度特异性来自抗体对抗原的特异性识别。其基本原理是将磁性微珠直接或者间接耦联在抗体上,通过抗原抗体反应使磁珠耦联的抗体与表达相应抗原的细胞特异性结合,磁性标记的细胞在经过一个带有梯度的高强度磁场时会滞留在磁场中,而不表达相应抗原的细胞因为没有磁性标记,首先流出来,从而达到磁性分离的目的。离开磁场后,磁性标记细胞不再受磁场作用,就可以被洗脱下来(图 1.2)。

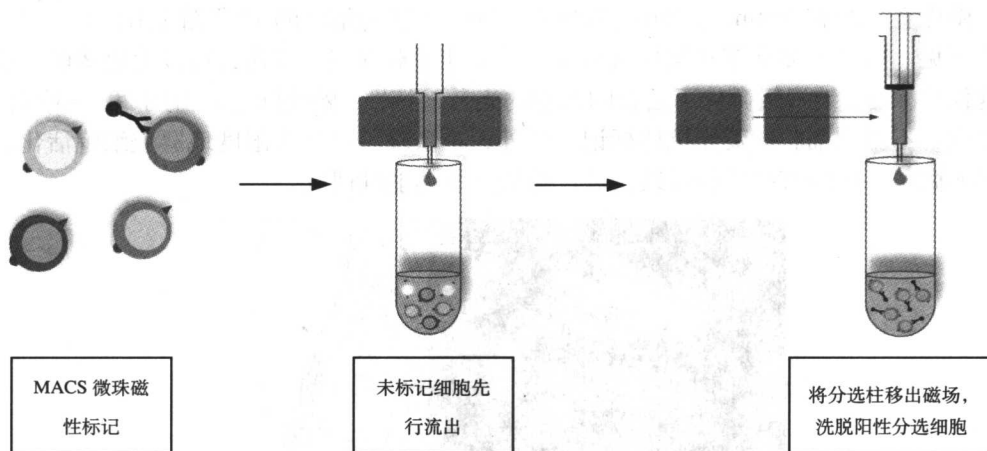


图 1.2 MACS 技术原理

MACS 技术的优点

1) 纯度高、回收率高,可重复性好

使用 MACS 技术,可获得高纯度、高回收率的分选细胞群,不仅可获得常见的细胞(如 T、B、NK 细胞和单核细胞),甚至可获得罕见的细胞(如干细胞、分泌细胞因子的 T 细胞亚群、树突细胞亚群),获得的纯度可高达 90%~99%。

2) 对细胞无损伤

MACS 微珠和 MACS 分选柱均无毒性,对细胞无损伤,可以纯化有活力和有功能活性的细胞。

3) 操作简便

MACS 技术设备小巧,操作简单,适用于在任一实验室分选各种细胞。磁珠孵育时间很短,仅需 15min。手动分选可在 30min 内完成,自动仪器分选可在 3~10min 之内完成。

4) 从实验室到临床

通过使用不同型号的分选柱和分选器,MACS 技术可以实现从 $10^5 \sim 10^{11}$ 个细胞的分选。如果使用频率高,可选用自动磁性细胞分选仪 autoMACS;若在密闭的系统内无菌分选细胞,可选用 CliniMACS。

5) 分选后细胞适用于后续实验

流式细胞术、显微镜分析和分子生物学研究显示 MACS 分选对细胞没有影响。分选后细胞适用于细胞培养和体内实验。此外,不论使用阳性分选还是去除分选,分选得到的标记细胞组分和未标记细胞组分均可回收利用。

1.3.1.1 MACS 微珠

MACS 微珠(microbead)是一种与高度特异性单克隆抗体相耦联的超顺磁化微粒，用于目的细胞或者去除细胞的磁性标记。

1) MACS 微珠的特性

微珠直径约有 50nm，是细胞直径的 1/200，体积为细胞的 10^{-6} (图 1.3)，光学显微镜下不可见。微珠由多聚糖和氧化铁组成，无毒性，对细胞无损伤，可以生物降解。流式细胞仪检测时，纳米级微珠不会影响细胞的光散射特性；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。此外，小微珠可以最大限度地避免细胞活化，无需解离微珠，可以直接进行后续实验，包括细胞功能性研究。

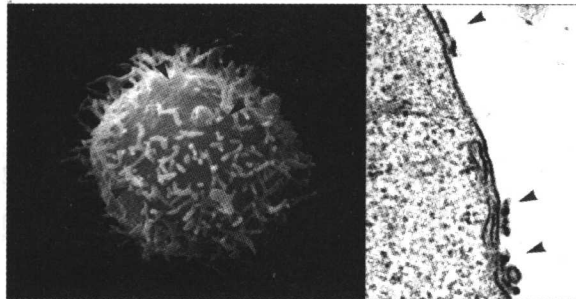


图 1.3 MACS 技术分选的细胞

箭头所示为磁性结合在细胞表面的微珠(图片由德国美天旎生物技术公司提供)

2) MACS 微珠的种类

MACS 微珠主要有三种：直标微珠(direct microbead)、间标微珠(indirect microbead)、多选微珠(multisort microbead)。

(1) 直标微珠：微珠直接与高度特异性的单克隆抗体相耦联，通过抗原抗体反应识别并对表达相应抗原的细胞磁性标记。用于人类干细胞分选的直标微珠主要有 CD34 微珠、CD133 微珠、CD117 微珠、CD105 微珠，用于小鼠干细胞分选的直标微珠主要有抗 Sca-1 微珠、CD117 微珠。

(2) 间标微珠：微珠不直接与特异性抗体相耦联，而是通过识别一类具有共同性质的一抗来对一抗结合的细胞磁性标记。一抗可以是未标记抗体、生物素化抗体或与荧光素结合的抗体，然后分别用结合有相应的抗一抗抗体的微珠(抗免疫球蛋白微珠、抗生物素微珠或链霉亲和素微珠、抗荧光素微珠)，对一抗结合的细胞进行磁性标记。

(3) 多选微珠：多选微珠是专门为分选细胞亚群研制的，微珠通过特殊的方式与抗体耦联，在第一次阳性分选完成后，与细胞结合的多选微珠可以被一种解离试剂剪切下来，阳性分选的细胞可以进行再次阳性分选或者去除分选。

1.3.1.2 MACS 分选柱

由于 MACS 微珠非常小，因此需要高强度梯度磁场来滞留标记细胞，MACS 分选柱(separation column)可以帮助产生强大的磁场，同时维持细胞的活性和功能。

1) MACS 分选柱特性

MACS 分选柱是一类填充有不同规格铁珠的塑料容器，铁珠表面有亲水包被，因此不会损伤细胞。MACS 分选柱本身不带有磁性，但是当置于一个永久性磁场——MACS 分选器中时，分选柱内的铁珠可以使分选器磁场增强 1000 倍，足以滞留仅标记有极少量微珠的目的细胞；铁珠的存在使磁性标记细胞从分选柱中通过时受到均匀的磁力作用，从而提高分选纯度和回收率。

2) MACS 分选柱的种类

根据分选柱的容量、用途、操作方式、使用范围，将分选柱分为以下 11 种：MS 分选柱、大细胞分选柱、LS 分选柱、XS 分选柱、LD 分选柱、CS 分选柱、D 分选柱、AutoMACS 分选柱、CliniMACS 分选柱及管道系统、 μ 分选柱、M 分选柱。

1.3.1.3 MACS 分选器

MACS 分选器(MACS separator)由永久性磁铁和支架构成，与分选柱一起形成高强度的梯度磁场。根据应用范围分为研究用和临床应用的 MACS 分选器，根据操作方式分为手动和自动分选器。不同的分选器需要使用相应的分选柱(表 1.2)。

表 1.2 MACS 技术所用的不同类型的分选器与分选柱

分选种类	分选柱	容量	适配分选器
手动阳性分选或者强标记细胞的去除分选	MS 分选柱	2×10^8 个总细胞 10^7 个标记细胞	MiniMACS、OctoMACS、VarioMACS、SuperMACS
	大细胞分选柱	2×10^8 个总细胞 10^7 个标记细胞	MiniMACS、OctoMACS、VarioMACS、SuperMACS
	LS 分选柱	2×10^9 个总细胞 10^8 个标记细胞	MidiMACS、QuadroMACS、VarioMACS、SuperMACS
	XS 分选柱	2×10^{10} 个总细胞 10^9 个标记细胞	SuperMACS
手动去除分选	LD 分选柱	5×10^8 个总细胞 10^8 个标记细胞	MidiMACS、QuadroMACS、VarioMACS、SuperMACS
	CS 分选柱	2×10^8 个标记细胞	VarioMACS、SuperMACS
	D 分选柱	10^9 个标记细胞	SuperMACS
	AutoMACS 分选柱	4×10^9 个总细胞 2×10^8 个标记细胞	自动磁性细胞分选仪 AutoMACS
自动分选	CliniMACS 分选柱及管道系统	$6 \times 10^{10} \sim 12 \times 10^{10}$ 个总细胞 $12 \times 10^8 \sim 6 \times 10^{10}$ 个标记细胞	临床级磁性细胞分选仪 CliniMACS
	μ 分选柱	10 μ g mRNA	μ MACS
分子生物学分选	M 分选柱	50 μ g mRNA	MiniMACS、OctoMACS、VarioMACS、SuperMACS

1.3.2 分选前标本制备

MACS 技术可以使用的细胞来源很广泛，包括人类的外周血、骨髓、脐带血、冷冻保存的外周血和骨髓、淋巴结、扁桃腺、肿瘤组织、体腔液，小鼠的脾脏、骨髓、胎肝、胸腺、淋巴结，其他动物以及其他种类的细胞(如培养细胞、大脑细胞、皮肤细胞等)。

由于细胞团块和死细胞的存在一方面会堵塞分选柱，降低分选效率，另一方面会与磁珠非特异性结合，造成分选后细胞纯度降低。因此分选前的标本制备是一个很重要的