

Выделение клеток с использованием магнитных частиц (на модели выделения эритроцитов из цельной крови)

Алексей Жигулин, ООО Силекс, info@sileks.com

Введение

Выделение клеток с использованием различных технологий описывается в многочисленных статьях. Хорошо отработан и показал себя высокоэффективным метод специфической сепарации клеток предварительно меченых флуоресцентными метками. Похожий метод сепарации существует на основе магнитных частиц с иммобилизованными специфическими антителами. Единственный минус этих подходов заключается в необходимости использовать автоматическое устройство для сепарации. Применение такого сепаратора требует финансовых затрат и квалифицированного ухода. Существуют, конечно, классические методы выделения специфических клеток на поверхности планшетов. Однако, применение магнитных частиц для сепарации специфических клеток без использования дополнительной автоматизации позволяет сделать процедуру дешевой и простой.

Модельная система

Для наглядной демонстрации эффективности сепарации мы использовали модельную систему для удаления эритроцитов из цельной крови.

Материалы для модели

Антитела: IgG антитела к эпитопам D-антигена на поверхности резус-положительных эритроцитов.
Кровь: кровь с положительным резус-фактором.
Магн. частицы: SileksMag-Protein A, кат. номер K0181

Проведение эксперимента

Образец крови разводили в буфере PBS в соотношении 1 : 10 (объем крови : объем PBS) для улучшения визуализации эффекта сепарации. Далее по 100 мкл разведенного образца крови вносили в три отдельные пробирки: в первую пробирку (1) вносили 5 мкл антител, во вторую пробирку (2) – 5 мкл буфера PBS, третья пробирка служила контрольной (К).

Первую (1) и вторую (2) пробирку инкубировали в одинаковых условиях - +37° С, 1 час.

Контрольная (К) пробирка инкубировалась при комнатной температуре.

Затем содержащиеся в первой (1) и второй (2) пробирках эритроциты три раза отмывали буфером PBS для удаления не связавшихся антител в первой (1) пробирке. Эритроциты во второй (2) пробирке отмывали для синхронизации условий отмывки с первой пробиркой.

Условия отмывки: 500 мкл буфера PBS, микроцентрифуга 1500 об./мин., 1 минута. 3 отмывки.

После отмывки, содержимое первой (1) и второй (2) пробирок ресуспендировали в конечном объеме 100 мкл буфера PBS, равному изначально вносимому объему образца крови.

В первую (1) пробирку к эритроцитам с антителами вносили 20 мкл магнитных частиц SileksMag-Protein A (концентрация частиц 5 мг/мл), во вторую (2) пробирку к эритроцитам, где антитела не добавляли, также вносили 20 мкл магнитных частиц SileksMag-Protein A (концентрация частиц 5 мг/мл), в третью (К) пробирку вносили 20 мкл буфера PBS. Содержимое каждой пробирки аккуратно пипетировали и пробирки инкубировали с периодическим пипетированием в течение 10 минут при комнатной температуре.

Для сепарации резус-положительных эритроцитов пробирки помещали в магнитный штатив.

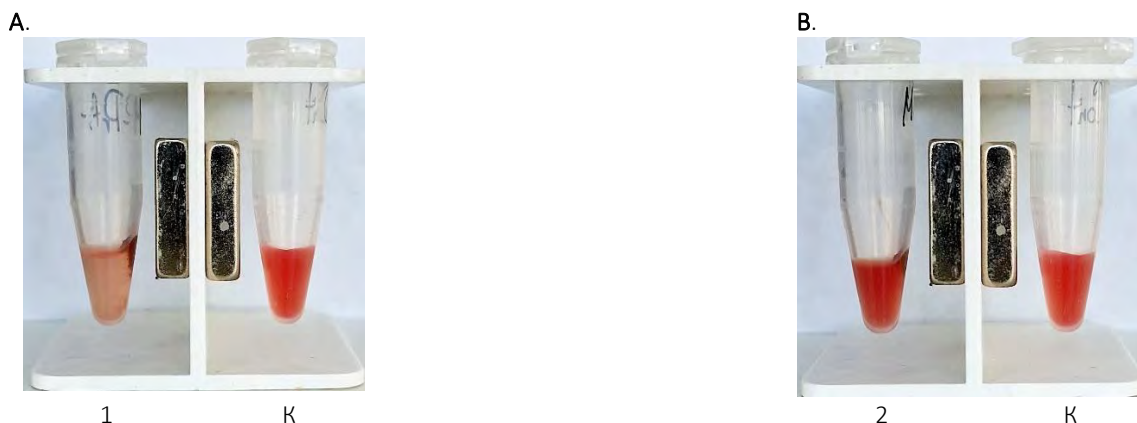


Фото 1. Сепарация эритроцитов магнитными частицами

А. Сепарация резус-положительных эритроцитов со связавшимися антителами магнитными частицами с белком А

1 – пробирка, где эритроциты предварительно обрабатывали антителами и после отмывки добавляли магнитные частицы с белком А, **К** – контрольная пробирка

В. Сепарация резус-положительных эритроцитов магнитными частицами с белком А

2 – пробирка, где эритроциты предварительно не были связаны с антителами и после отмывки добавляли магнитные частицы с белком А, **К** – контрольная пробирка

Результаты

Сепарация резус-положительных эритроцитов наглядно видна в варианте, при котором эритроциты вначале взаимодействовали с антителами, а потом к отмывым эритроцитам добавляли магнитные частицы с белком А (см. Фото 1, вариант А). В варианте, при котором эритроциты не имели на своей поверхности антител, сепарации эритроцитов не происходит (см. Фото 1, вариант В).

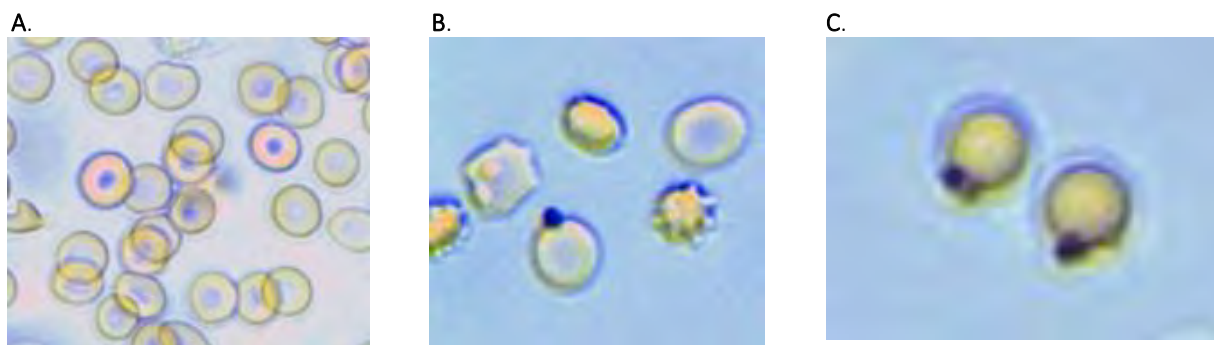


Фото 2. Клетки крови в оптическом микроскопе

А. Эритроциты в исходном образце крови

В. Эритроцит с магнитной частицей среди других клеток крови

С. Эритроциты с магнитными частицами после отмывки

На Фото 2 В видно, что не все эритроциты связываются с магнитными частицами. Возможно, это зависит от эффективности взаимодействия антител с поверхностью клетки, в также от возможности взаимодействия частицы с белком А со связанным с клеткой антителом. Также видно, что частицы не взаимодействуют с другими типами клеток.

Обсуждение

В приводимой модели мы использовали двухэтапный способ сепарации клеток с использованием магнитных частиц (связывание антител, выделение клеток). Вначале с клетками связывали антитела, затем не связавшиеся антитела удаляли в процессе отмывки и после этого захватывали клетки за связанные антитела частицами с белком А.

Мы использовали именно такой двухэтапный способ сепарации, поскольку прямой одноэтапный вариант сепарации с предварительной иммобилизацией антител на поверхности частиц (на частицах с тем же белком А или непосредственно на поверхность частиц) давал худшие результаты сепарации эритроцитов.

Такие отличия в подходе в способе сепарации могут объясняться тем, что эффективность взаимодействия клеток с антителами, не связанных на поверхности частиц, выше, чем взаимодействие клеток с антителами, иммобилизованными на частицах.

К сожалению, в описанной модельной системе не предполагается дальнейшее культивирование выделенных клеток.

В других экспериментах мы использовали одноэтапное взаимодействие частиц с предварительно иммобилизованными антителами со специфическими клетками и дальнейшим культивированием сепарированных клеток. Эксперимент проводили на лимфоцитарной линии клеток человека. IgG антитела иммобилизовали на частицах с белком А, частицы блокировали после иммобилизации антител неспецифическими человеческими белками и подготовленные таким образом частицы использовали для дальнейшей работы.

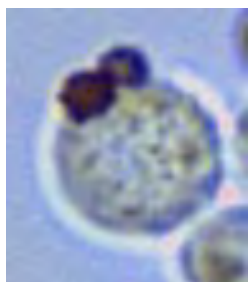


Фото 3. Лимфоцит человека со связавшимися на поверхности магнитными частицами

IgG антитела иммобилизовали на частицах с белком А.

Частицы блокировали после иммобилизации антител неспецифическими человеческими белками.

Частицы инкубировали с клетками в течение 30 минут при комнатной температуре.

Связавшиеся с клетками частицы собирали в магнитном штативе, отмывали стерильным PBS три раза пипетированием с повторным сбором частиц в магнитном штативе.

Магнитные частицы с клетками переносили в культуральный матрас с ростовой средой и культивировали в инкубаторе для размножения клеток.

После сепарации частицы культивировали в течение четырех суток, суспензию клеток переносили в стерильную пробирку, помещали в магнитный штатив и собирали в течение нескольких минут освободившиеся от клеток магнитные частицы и частицы, пока еще связанные с клетками. Клетки, свободные от магнитных частиц, помещали в свежую ростовую среду. Обычно, после нескольких пассажей можно получить клетки, в которых не будут присутствовать магнитные частицы.

При выборе частиц для сепарации клеток следует обратить внимание на размер частиц.

Частицы небольшого размера (до 1 микрона) более эффективны для связывания с клетками и их сепарации. Но при дальнейшем совместном культивировании клеток с частицами частицы часто захватывают магнитные частицы путем эндоцитоза, что может приводить к повреждению клеток.

Частицы более крупного размера (от 5 микрон и выше) имеют более низкую эффективность связывания клеток из-за своего размера и возникающих стерических препятствий, но зато не могут быть поглощены клетками.

Выводы

Эффективность использования магнитных частиц для выделения клеток наглядно продемонстрирована на модели выделения эритроцитов из цельной крови. Для более эффективной сепарации мы рекомендуем двухэтапный вариант сепарации, при котором на поверхности клеток связываются антитела, а затем клетки с антителами собираются магнитными частицами.

При аккуратном расчете количества берущихся антител к последующему количеству и емкости добавляемых магнитных частиц, стадия отмывки от не связавшихся антител может не потребоваться.

08 ноября 2023 г.