

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710307414.9

[51] Int. Cl.
C12M 1/12 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月1日

[11] 公开号 CN 101469310A

[22] 申请日 2007.12.28

[21] 申请号 200710307414.9

[71] 申请人 北京百奥科生物技术有限公司

地址 100070 北京市丰台区丰台科学城航丰
路8号302房间(园区)

[72] 发明人 赵海峰

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 赵晓梅

权利要求书1页 说明书7页

[54] 发明名称

从生物学样品富集靶细胞的方法及除去白细胞的方法

[57] 摘要

本发明涉及从生物学样品富集靶细胞的方法及除去白细胞的方法。具体地说,本发明提供一种从生物学样品富集靶细胞的方法,该方法包括:用基于摩尔渗透压浓度的方式除去红细胞和用免疫亲和层析法除去白细胞。该方法不仅成本低,而且高效地去除白细胞和红细胞,从而使靶细胞得以富集,并易于后续检测。本发明还提供一种从生物学样品除去白细胞的方法,该方法包括采用抗CD45抗体偶联的 Affi - Gel 10 除去白细胞。

- 1、一种从生物学样品富集靶细胞的方法，该方法包括：
用基于摩尔渗透压浓度的方式除去红细胞和用免疫亲和层析法除去白细胞。
- 2、如权利要求1所述的方法，其中所述的生物学样品是体液；优选所述的体液是血液、骨髓、脊髓或手术液。
- 3、如权利要求2所述的方法，其中所述的血液是取血当天的新鲜血液。
- 4、如权利要求1所述的方法，其中所述免疫亲和层析法中所使用的免疫颗粒的尺寸为 $1\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$ ，进一步优选为 $5\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m}$ ；更进一步优选所述的免疫颗粒具有可再生性。
- 5、如权利要求1所述的方法，其中所述基于摩尔渗透压浓度的方式包括沉淀和裂解红细胞。
- 6、如权利要求1所述的方法，其中所述免疫亲和层析法中所使用的抗体为识别在白细胞上表达的抗原的抗体；优选所述抗体为抗 CD45 抗体；更优选所述抗 CD45 抗体偶联到 Affi-Gel 10 基质上；进一步优选所述 CD45 抗体为抗 CD45 单抗。
- 7、如权利要求1所述的方法，该方法所获得的靶细胞适于后续分析、操作或应用，所述后续分析、操作或应用为以下之一：流式细胞术、聚合酶链式反应、免疫荧光、免疫细胞化学、图像分析、酶学测定、炎症研究、基因表达谱分析、治疗效力测验、细胞培养和细胞治疗。
- 8、如权利要求1所述的方法，其中所述的靶细胞包括干细胞、胎儿细胞、循环肿瘤细胞、免疫细胞中的至少一种。
- 9、如权利要求1所述的方法，该方法还包括除去血浆蛋白；优选回收所除去的白细胞和/或所除去血浆蛋白。
- 10、一种从生物学样品除去白细胞的方法，该方法包括采用抗 CD45 抗体偶联的 Affi-Gel 10 除去白细胞。

从生物学样品富集靶细胞的方法及除去白细胞的方法

技术领域

本发明涉及从生物学样品富集靶细胞的方法及除去白细胞的方法。

背景技术

包括干细胞、胎儿细胞、循环肿瘤细胞（CTC）、免疫细胞等在内的细胞在疾病的预防、检测、诊断和治疗方面有很大应用。

干细胞是指一类具有自我复制能力的多潜能细胞，包括胚胎干细胞、骨髓干细胞、成体干细胞、脐血干细胞、皮肤干细胞等。在一定条件下，干细胞可以分化成多种功能细胞，因此干细胞具有治疗许多疑难病症、提供器官移植，以及康复、保健，减轻老化、恢复青春活力等等广泛应用。

已经证明早在妊娠五周母血循环中就可监测出胎儿细胞。目前，获取胎儿细胞进行产前诊断的方法主要有羊膜腔穿刺、绒毛活检和脐血管穿刺。这些手段对胎儿有一定的风险，有可能造成流产。从母血中分离出胎儿细胞预示着只需通过简单的静脉穿刺途径即可获得胎儿细胞。胎儿细胞的临床应用将包括早期诊断胎儿染色体或基因异常。

大量报道提示甚至可在以成像分析方式检测到原发肿瘤之前，可在患者中发现循环肿瘤细胞（CTC）。除了在早期诊断和预测中的潜在作用外，CTC 还可在表征随肿瘤进程的遗传和免疫表型变化中发挥主要作用，从而有助于指导个体化治疗。

由于免疫系统或其他系统的疾病，或由于免疫接种或某些临床治疗措施及某些外界环境因素的影响，免疫细胞（例如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞，K 淋巴细胞或 NK 淋巴细胞）的数量或功能均可发生变化。因此，进行细胞免疫检测，对于某些疾病的诊断和发病机理研究、免疫治疗或预防接种的效果评估及环境因素对机体免疫功能的影响，都具有重要的意义。

但是所述干细胞、胎儿细胞、循环肿瘤细胞（CTC）、免疫细胞在生

生物学样品，例如血液、骨髓、脊髓或手术液等中存在量较少，属于稀有细胞，所以富集这些靶细胞成为首要问题。

尽管已将各种技术用于富集、分离和表征靶细胞，但是其中许多具有相似的原理，即基于抗体的正选择。由于细胞表面标记的异质性表达，这些用于靶细胞检测的策略显然受到以下因素的限制：抗不同靶细胞上的生物标记的抗体的可获得性、敏感性和特异性。其它策略包括红细胞（RBC）、白细胞（WBC）的负除去。目前主要基于大小过滤除去较小的 RBC 和 WBC，但因为某些靶细胞例如 CTC 可如 WBC 一样小，所述基于大小过滤的方法有丢失靶细胞的危险。

对于除去白细胞的方法，现有技术中虽存在使用抗 CD45 包被的 30 nm 磁珠（Miltenyi 产品，Germany）除去白细胞的方法，但该方法不仅昂贵（RMB 600-700/试验），费时（超过 4 小时/试验），而且 WBC 去除效率不高（WBC 去除率为约 2-3 logs）。

发明内容

为了克服现有技术的缺陷，本发明创造性地将基于摩尔渗透压浓度（osmolarity）的方式与免疫亲和层析法联合起来用于分别去除 RBC 和 WBC，从而达到富集靶细胞，尤其是稀有细胞的目的。该方法不仅成本低，而且高效地使靶细胞得以富集，并易于后续检测。所述靶细胞包括干细胞、胎儿细胞、循环肿瘤细胞（CTC）、免疫细胞等。

本发明还提供了一种除去白细胞的方法，该方法不仅成本低，省时，而且效率高。

具体实施方式

在本发明的一个具体实施方式中，本发明提供一种从生物学样品富集靶细胞的方法，该方法包括：

用基于摩尔渗透压浓度的方式除去红细胞和用免疫亲和层析法除去白细胞。

本发明创造性地联合应用基于摩尔渗透压浓度的方式除去红细胞和免

疫亲和层析法除去白细胞来富集靶细胞。利用摩尔渗透压浓度的方式除去红细胞和利用免疫亲和层析法除去白细胞这两个过程没有特别的顺序要求。例如可以先利用亲和层析法除去白细胞然后再利用基于摩尔渗透压浓度的方式除去红细胞；或者用基于摩尔渗透压浓度的方式除去红细胞然后再利用亲和层析法除去白细胞。为了更快地、更有效地使白细胞通过亲和层析柱，在本发明的一个优选实施方式中，用基于摩尔渗透压浓度的方式除去红细胞然后再利用亲和层析法除去白细胞。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的生物学样品是体液；优选所述的体液是血液、骨髓、脊髓或手术液（surgical fluid）。在本发明的一个实施方式中，以血液为例验证了本发明方法的有效性。同时由于血液、骨髓、脊髓或手术液的密度类似且靶细胞在其中的存在状态类似，所以本发明的方法可用于骨髓、脊髓或手术液中靶细胞的富集。

为了收集血液，将人或任何其它动物的血样收集在抗凝血收集管中或含有任何抗凝剂的管中，所述抗凝剂包括乙二胺四乙酸（EDTA）、枸橼酸葡萄糖（ACD）等。为了收集骨髓，可在供者的髂骨部位穿刺采集骨髓；也可以动员骨髓和其他部位的造血干细胞大量释放到外周血中去，然后从供者的手臂静脉中采集。脊髓可通过例如脊髓穿刺获得。手术液可以为利用手术方式获得的体液，例如腹腔或胸腔积液，其中包括本发明所述的一些靶细胞和蛋白。

在本发明的一个优选实施方式中，所用的血液是取血当天，优选取血起 20 小时之内，更优选取血起 10 小时之内，进一步优选取血起 5 小时之内或取血起 3 小时之内或取血起 1 小时之内，最优选取血起立即获得的新鲜血液。上述新鲜血液中的红细胞对 RBC 裂解缓冲液敏感，而靶细胞对 RBC 裂解缓冲液不敏感。

在本发明的一个具体实施方式中，其中所述免疫亲和层析法中所使用的免疫颗粒的尺寸为 $1\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$ ，更优选为 $2\ \mu\text{m}\sim 15\ \mu\text{m}$ ，进一步优选为 $5\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m}$ 。在本发明的一个具体实施方式中，进一步优选所述的免疫颗粒具有可再生性。可利用 Tris-Glycine 等缓冲液对免疫颗粒进行洗涤和重新使用，从而节约成本。

在本发明的一个具体实施方式中，用基于摩尔渗透压浓度的方式除去红细胞。在本发明的一个优选实施方式中，所述基于摩尔渗透压浓度的方式中包括沉淀和裂解红细胞。所述沉淀优选以 500~3000 rpm，更优选 100~2000 rpm 离心 1~6 分钟，优选 2~4 分钟以沉淀 RBC，优选同时除去血浆。在室温将所收集的 RBC 于 RBC 裂解缓冲液中轻柔旋转振荡 5~20 分钟。然后将所获得的溶液以 500~3000 rpm，更优选 100~2000 rpm，离心 1~10 分钟，更优选 3~6 分钟以沉淀未裂解的细胞，所述未裂解的细胞包括白细胞和稀有细胞。

在本发明的一个具体实施方式中，所述用于除去白细胞的免疫颗粒位于亲和层析柱中并结合有靶向白细胞的特异性结合物。优选所述的特异性结合物为识别在白细胞上表达的抗原的抗体。由于 CD45（又称“白细胞表面共同抗原”）是最认可和接受的白细胞表面抗原，所以更优选所述的抗体为抗 CD45 抗体。最优选将抗 CD45 mAb（CD45 单抗）偶联到 Affi-Gel 10 基质上。可采用本领域技术人员已知的亲和层析柱进行层析。在本发明的一个优选实施方式中，为了除去白细胞，将含有白细胞的溶液以约 0.5~8.5 ml/min 的流速，优选以约 0.75~3.5 ml/min 的流速，进一步优选以约 1~2.5 ml/min 的流速流过亲和层析柱。

利用本发明的方法所获得的靶细胞适于后续分析、操作或应用，当然也可在获得了本发明的靶细胞后，对靶细胞内的蛋白和/或基因进行后续分析、操作或应用。在本发明的一个具体实施方式中，所述后续分析、操作或应用为以下之一：流式细胞术、聚合酶链式反应（PCR）、免疫荧光、免疫细胞化学、图像分析、酶学测定、炎症研究、基因表达谱分析、治疗效力测验、细胞培养和细胞治疗、质谱和其它与细胞和/或蛋白相关的研究等。

在本发明的一个具体实施方式中，用本发明的方法富集的靶细胞包括干细胞、胎儿细胞、循环肿瘤细胞（CTC）、免疫细胞中的至少一种。在利用本发明的方法富集了上述靶细胞的基础上，可以利用进一步的分离纯化方法获得循环肿瘤细胞、干细胞（包括胚胎干细胞、骨髓干细胞、成体干细胞、脐血干细胞、皮肤干细胞等）、胎儿细胞、免疫细胞（包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞，K 淋巴细胞和 NK 淋巴细胞）等，并可进一步利用这

些纯化的循环肿瘤细胞、干细胞、胎儿细胞、免疫细胞进行预测、检测、诊断和治疗。

在本发明的一个具体实施方式中，本发明的方法还包括除去血浆蛋白。为了更有利于节省时间和减少操作步骤，除去血浆蛋白的步骤可与沉淀红细胞的步骤同时进行。例如在本发明的一个实施方式中，将全血以 1500 离心 3 分钟，以沉淀红细胞和去除包括血浆蛋白在内的血浆。

在本发明的一个具体实施方式中，优选回收本发明的方法所除去的白细胞和/或所除去血浆蛋白，并将其进一步用于后续分析、操作或应用，例如，流式细胞术、聚合酶链式反应（PCR）、免疫荧光、免疫细胞化学、图像分析、酶学测定、炎症研究、基因表达谱分析、治疗效力测验、细胞培养、细胞治疗、质谱和其它与细胞和/或蛋白相关的研究等。例如可利用进一步的分离纯化方法获得白细胞或血浆蛋白等，并可进一步利用这些纯化的白细胞或血浆蛋白进行预测、检测、诊断和治疗。

在本发明中，术语“富集”以其最广泛的含义使用，是使一物质比其原存在环境条件下更加浓缩，其包括“积累”、“浓缩”、“提取”、“分离”等含义在内。

本发明还提供了一种除去白细胞的方法，该方法包括采用抗 CD45 抗体偶联的 Affi-Gel 10 除去白细胞。可采用本领域技术人员已知的亲和层析柱进行层析。在本发明的一个优选实施方式中，为了除去白细胞，将含有白细胞的溶液以约 0.5~8.5 ml/min 的流速，优选以约 0.75~3.5 ml/min 的流速，进一步优选以约 1~2.5 ml/min 的流速流过亲和层析柱。可利用 Tris-Glycine 等缓冲液对免疫颗粒进行洗涤和重新使用，从而节约成本。该方法不仅成本低，省时，而且效率高。

以下以实施例的方式进一步说明本发明，所述实施例并不用于限定本发明的范围。

实施例

实施例 1、从生物学样品除去白细胞的方法

将人血稀释在含有 5 mM EDTA 的 PBS 中，加入 3 倍体积的 RBC 裂解

缓冲液（具体成分见下），于室温轻柔旋转振荡 12 分钟。将样品于 1500 rpm 旋转离心 5 分钟以收集细胞沉淀。弃去上清液中的裂解 RBC，并将细胞沉淀重悬浮在含有 5 mM EDTA 的 3 ml~5 ml 的 PBS 中，并使其通过抗 CD45 抗体偶联的 Affi-Gel 10（Pierce, IL, US）亲和层析柱以除去 WBC，其中将细胞以 2 ml/min 的流速于 PBS 中流过所述亲和层析柱，并收集流过液。与现有技术中利用 Miltenyi's 试剂盒去除白细胞相比，本发明去除白细胞的方法显著降低了成本（本发明分离方法的成本为 RMB 80-150/试验；而 Multiny's 试剂盒的成本为 RMB 600-700/试验）、缩短了时间（本发明分离方法每个试验需不到 40 分钟即可完成去除白细胞；而 Multiny's 试剂盒去除白细胞需超过 4 小时/试验）、而且效率高（本发明方法的 WBC 去除率可达约 3-4 logs；而 Multiny's 试剂盒的 WBC 去除率仅为约 2-3 logs）。

抗 CD45 抗体偶联的 Affi-Gel 10 的制备：由于购自 Pierce（IL, US）的 Affi-Gel 10 含有可供激活的化学基团，所以将抗 CD45 抗体与 Affi-Gel 10 混合约 15 分钟，即可完成抗 CD45 抗体与 Affi-Gel 10 的偶联。

RBC 裂解缓冲液（pH 7.2）：

NH ₄ Cl	82.9 g
KHCO ₃	10 g
EDTA 二钠	0.37 g
H ₂ O	1 L

实施例 2、从生物学样品富集靶细胞的方法

将 5 ml ~10 ml 的人血收集在含有 EDTA 的试管中，以 1500 rpm 旋转离心 3 分钟以沉淀 RBC 和除去包括血浆蛋白在内的血浆。在室温将所收集的 RBC 于 10 ml 基于 NH₄Cl 的 RBC 裂解缓冲液（具体成分如上）轻柔旋转振荡 15 分钟。然后将所获得的溶液以 1500 rpm 旋转离心 5 分钟以沉淀未裂解的细胞，所述未裂解的细胞包括 WBC 和稀有细胞。将所得未裂解细胞沉淀重悬浮在 5 ml PBS 中，并使其通过 0.5 ml 抗 CD45 抗体偶联的 Affi-Gel 10（Pierce, IL, US）亲和层析柱以除去 WBC，其中将细胞以 2 ml/min 的流速于 PBS 中流过所述亲和层析柱，并收集流过液。将所收集

的含有稀有细胞的流过液在 900 g 离心 5 分钟以上。将细胞沉淀重悬浮，以进行后续分析。富集后，可以用 10 ml Tris-Glycine (pH 2.5) 洗涤亲和柱以除去所有的结合分子，然后用 PBS (pH 7.4) 进行中和以备重新使用。

实施例 3、利用掺加研究验证本发明的富集方法的收率

用 4,6-二氨基-2-苯基吲哚 (DAPI) 预先标记靶细胞 (例如可从 ATCC 获得的 HeLa 细胞或 MCF-7 细胞) 然后掺入人血中，使用实施例 1 所述的方法富集掺加的细胞。平均回收率为约 70%~80%。与现有技术中利用 Miltenyi's 试剂盒去除白细胞的富集方法相比，本发明的富集方法显著降低了成本 (本发明富集方法的成本为 RMB 100-200/试验; 而利用 Multiny's 试剂盒的仅去除白细胞的成本就为 RMB 600-700/试验)、缩短了时间 (本发明的富集方法每个试验需不到 1 小时即可完成去除红细胞和白细胞; 而 Multiny's 试剂盒仅去除白细胞就需超过 4 小时/试验)、而且效率高 (本发明方法的 WBC 去除率可达约 3-4 logs; 而 Multiny's 试剂盒的 WBC 去除率仅为约 2-3 logs)。

专利名称(译)	从生物学样品富集靶细胞的方法及除去白细胞的方法		
公开(公告)号	CN101469310A	公开(公告)日	2009-07-01
申请号	CN200710307414.9	申请日	2007-12-28
[标]发明人	赵海峰		
发明人	赵海峰		
IPC分类号	C12M1/12 C12M1/00 G01N33/53		
代理人(译)	赵晓梅		
其他公开文献	CN101469310B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及从生物学样品富集靶细胞的方法及除去白细胞的方法。具体地说，本发明提供一种从生物学样品富集靶细胞的方法，该方法包括：用基于摩尔渗透压浓度的方式除去红细胞和用免疫亲和层析法除去白细胞。该方法不仅成本低，而且高效地去除白细胞和红细胞，从而使靶细胞得以富集，并易于后续检测。本发明还提供一种从生物学样品除去白细胞的方法，该方法包括采用抗CD45抗体偶联的Affi - Gel 10除去白细胞。