论著

文章编号:1000-5404(2007)08-0708-03

N-乙酰半乳糖特异性植物凝素分离和富集胎儿有核红细胞

彭 佳,府伟灵,黄 庆,王 珏,陈 鸣,黄君富 (第三军医大学西南医院检验科,重庆 400038)

提 要: 目的 采用N-乙酰半乳糖(N-Acetyl-D-galactosamine; GalNAc)包被的玻片分离和富集胎儿有核红细胞(fetal nucleated red blood cells,FNRBCs)。**方法** 用密度梯度离心法收集胎儿脐血中的FNRBCs,然后将其与不同浓度的大豆凝聚素(SBA)混合,所形成的"FNRBCs-SBA"复合物用GalNAc包被的玻片来分离和富集,分析SBA工作浓度对FNRBCs分离和富集效率的影响。**结果** 当GalNAc包被玻片的浓度为100 μg/ml时,20 μg/ml的SBA浓度是分离和富集FNRBCs的最适浓度;此时WBC与有核红细胞的比值较低(27.7%),而FNRBCs与有核红细胞的比值最高(3.7%)。**结论** N-乙酰半乳糖特异性植物凝素可用于选择性地分离和富集FNRBCs,与传统方法相比较具有无需特殊仪器与设备,简便快速的优点。

关键词: N-乙酰半乳糖;大豆凝聚素;胎儿有核红细胞;无创产前诊断

中图法分类号: R331.141;R343.23;R446.113 **文献标识码**: A

Isolation and enrichment of fetal nucleated red blood cells by using N-acetylgalactosamine -specific lectin

PENG Jia, FU Wei-ling, HUANG Qing, WANG Jue, CHEN Ming, HUANG Jun-fu (Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To isolate and enrich fetal nucleated red blood cells (FNRBCs). **Methods** Fetal cells were collected by gradient centrifugation from umbilical cord blood collected during delivery, then mixed with soybean agglutinin (SBA) of a serial concentration (10, 20, 30, 40, 50 μg/ml) to isolate and enrich FNRBCs by using N-acetylgalactosamine (GalNAc)-coated chamber slides. **Results** The best working concentration of SBA was 20 μg/ml, which resulted in most effectively isolating and enriching FNRBCs in umbilical cord blood, when the coating concentration of GalNAc was 100 μg/ml. The ratio of white blood cells to nucleated cells were the lowest value (27.7%), and that of FNRBCs to nucleated cells were the highest value (3.7%). **Conclusion** GalNAc-specific agglutinin could be used to effectively isolate and enrich FNRBCs.

Key words: N-acetylgalactosamine; soybean agglutinin; fetal nucleated red blood cells; non-invasive prenatal diagnosis

目前,产前诊断已成为国内外临床产科学的重要组成部分,产前诊断技术根据取材方法不同,可分为创伤性产前诊断(invasive prenatal diagnosis)与无创产前诊断(non-invasive prenatal diagnosis),从母体外周血分离胎儿细胞进行产前诊断是近年来无创产前诊断的研究热点。胎儿有核红细胞(fetal nucleated red blood cells, FNRBCs)含有胎儿的全部遗传信息,生命周期较短,且具有独特的生物和理化特性,是理想的产前诊断的胎儿细胞。但是,由于妊娠母体外周血中的FNRBCs极少[有核细胞与胎儿细胞的比例为(10^5 ~ 10^9):1],因此,采用何种技术或方法对妊娠母体外周血中的FNRBCs进行高效和快速的分离与富集成为能否将其应用于无创产前诊断的关键所在[1-5]。本研究采用N-乙酰半乳糖(N-acetyle-D-galactosamine, GalNAc)包被玻片表面制备成可分离和富集FNRBCs的玻片,由于该玻片经包被后表面具有糖链,因此,通过大豆凝聚素(soybean agglutinin, SBA)对糖链的特异

基金项目:第三军医大学西南医院三优课题(SW2005005)
Supported by the Research Project Sponsored by Southwest Hospital of Third Military Medical University (SW2005005)

作者简介:彭 佳(1981-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事无创产前基因诊断系统方面的研究。电话:(023)68765447, E-mail: pengjia1209@163.com.cn

通讯作者:府伟灵,电话:(023)65460802, E-mail: weilingfu@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-10-20;修回日期:2007-01-18

识别使“FNRBCs-SBA”复合体可与玻片表面糖链的特异性结合，形成“FNRBCs-SBA-GalNAc”复合体，从而达到对 FNRBCs 的分离与富集。

1　材料与方法

1.1　标本

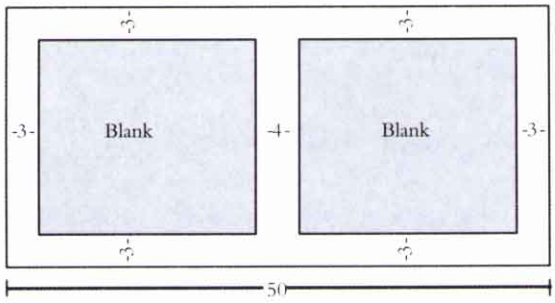
枸橼酸抗凝的胎儿脐血来自 8 例 38～40 孕周正常分娩的健康产妇（本院妇产科）。

1.2　密度梯度离心法收集胎儿脐血中的有核红细胞

将 Histopaque-1119（Sigma）与 Histopaque-1083（Sigma）以 7∶29 混匀，使分离介质密度为 1.090，加入 3 ml 分离介质到离心管中形成密度梯度。Buffer Ⅰ（PBS buffer，pH 7.2）等倍稀释脐血后，取 7 ml 稀释好的脐血缓慢加在 3 ml 分离介质上，保持二者液面清晰。将离心管放入水平离心机内 22 ℃ 1 500 r/min 离心 30 min，取出离心管，小心弃去白膜层上方的血浆层至白膜层上方 1 cm 处，收集白膜层及其上方 1 cm 的血浆 3～3.5 ml。Buffer Ⅱ（含 2 mmol/L EDTA，1 mg/ml BSA 的 PBS buffer，pH 7.2）洗涤细胞沉淀 2 次（22 ℃ 1 500 r/min 离心 5 min）后收集细胞沉淀。

1.3　GalNAc 包被玻片的制备

显微镜玻片等分为 2 个区域。按照图 1 所求平面结构制备 50 mm×24 mm×10 mm 玻片池，玻片池材料为聚苯乙烯疏水性塑料材质。玻片池制备完毕后，以粘胶方式黏贴于显微镜玻片上，依次于 75% 乙醇溶液和无菌去离子水中浸泡 4 h，室温干燥备用。1 ml 的 100 μg/ml GalNAc（Sigma）加至玻片池腔内的显微镜玻片表面，室温静置 8 h 包被玻片。



单位：mm

图 1　玻片池的平面视图

1.4　GalNAc 包被玻片分离和富集 FNRBCs

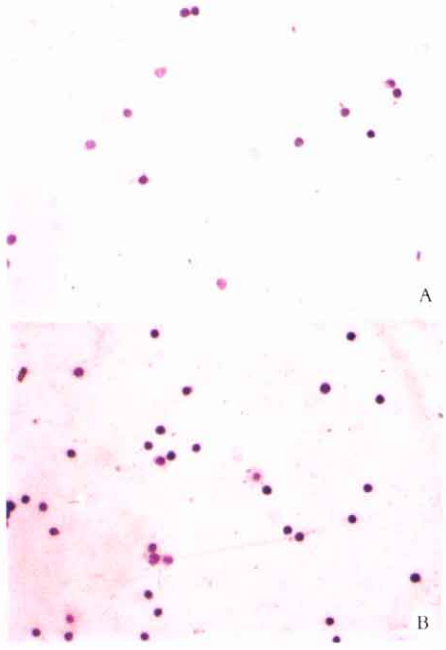
密度梯度离心法收集的 FNRBCs 沉积物与不同浓度（10、20、30、40、50 μg/ml）SBA（Sigma）等体积混匀后，1 ml 混合物缓慢加入 GalNAc 包被的玻片表面，20 ℃ 静置孵育 30 min，然后，将玻片池倒置于洁净纸巾上，弃去未结合的混合液，加入 1 ml Buffer Ⅰ洗涤玻片，室温干燥后，采用瑞氏染色法对分离的细胞进行染色分析。判断 FNRBCs 的形态学标准是：细胞核-细胞质比率低，细胞核密集且细小，色泽天然的，非颗粒状细胞质。

2　结果

为了检验本研究方法能否有效分离并富集 FNRBCs，选用胎儿脐带血作为研究对象。研究结果表明：白细胞（WBC）、FNRBCs 和红细胞（RBC）等均能结合到 GalNAc 包被的玻片上（表 1）。在反应中的 SBA 浓度变化范围为 10～50 μg/ml（表 1），黏附到 GalNAc 包被玻片的 WBC 的比率随 SBA 浓度的升高而减低。当 SBA 浓度为 10 μg/ml 时，WBC 与有核细胞的比率为（52.8%），FNRBCs 与有核细胞的比率为（0.8%）。当 SBA 浓度为 20 μg/ml 时，WBC 与有核细胞的比率较低（27.7%），FNRBCs 与有核细胞的比率最高（3.7%）。当 SBA 浓度低于 10 μg/ml 时 FNRBCs 很难发现，且当 SBA 浓度为 0 μg/ml 时没有发现有 FNRBCs 黏附到 GalNAc 包被的玻片上（图 2）。当 SBA 浓度高于 20 μg/ml 时，由于黏附到 GalNAc 包被的玻片表面上的 RBC 数量增多，FNRBCs 与有核细胞的比率减低。因此，20 μg/ml 的 SBA 浓度是分离和富集 FNRBCs 的最适浓度。

表 1　不同浓度 SBA 下黏附到 GalNAc 包被的玻片上的有核细胞（$n=10$，$x\pm s$）

SBA 浓度（μg/ml）	WBC（/100 个有核细胞）	FNRBCs（/100 个有核细胞）
10	52.8±21.5	0.8±1.4
20	27.7±11.8	3.7±1.8
30	12.3±0.8	1.4±1.3
40	10.9±2.2	1.3±1.8
50	10.5±5.6	1.2±1.5



A：SBA 10 μg/ml；B：SBA 20 μg/ml

图 2　不同浓度 SBA 下黏附到 GalNAc 包被的玻片上的 FNRBCs 观察结果　（LM×400）

3 讨论

目前研究表明,在妊娠母体外周血中游离 DNA 中,除了来自男性胎儿 Y 染色体的游离 DNA 外,其他游离 DNA 均难以与母体区分,因此,对妊娠母体外周血中的游离 DNA 的分析一般局限于 Y 染色体相关遗传病的诊断[1,2]。从母体外周血分离胎儿细胞进行产前诊断是近年来产前诊断的研究热点,胎儿细胞包括滋养层细胞、淋巴细胞、颗粒细胞和 FNRBCs。由于 FNRBCs 具备与母体细胞不同的生物和理化特异,如不存在于成人外周血中;数量较多,从妊娠初期至分娩均存在;包含了胎儿的全部遗传信息;分裂快,寿命短(90 d),不影响下次妊娠的产前诊断;细胞膜表面表达胎儿细胞特异性抗原,为各种分离和富集技术提供了靶点。因此,可利用这种差异从母体外周血中分离和富集到 FNRBCs[1,3,5]。目前,母体外周血中 FNRBCs 的分离和富集技术包括荧光激活细胞分类法(fluorescence activated cell sorting, FACS)、磁激活细胞分类法(magnet activated cell sorting, MACS)和电荷流式分离(flow cytosorting, CFS)等[1,3]。这些方法均需要特殊仪器或设备,费用昂贵,且分离和富集 FNRBCs 的效率均不太理想。

人体不同细胞的细胞膜表面有不同密度的半乳糖分子。SBA 是一类可特异性识别和结合半乳糖糖链的植物血凝素,且 SBA 与 GalNAc 的结合效价远远高于半乳糖。以 SBA 为代表的植物血凝素可特异性识别和结合血细胞膜表面糖链[6,7]。根据文献[8]报道,由于不同类型的血细胞表面的糖链数量和密度差异大,SBA 与不同类型的血细胞的亲和力差异也很大,FNRBCs 表面的半乳糖分子密度高于其他有核细胞,因此,FNRBCs-SBA 复合体可在较低 SBA 浓度条件下结合于 GalNAc 包被的玻片表面,从而达到对 FNRBCs 的分离和富集。本研究中通过密度梯度离心技术首先分离到富含 FNRBCs 的有核细胞,将其与一定浓度的 SBA 结合后制备成“FNRBCs-SBA”复合体,再与玻片上的 GalNAc 以“FNRBCs-SBA-GalNAc”复合体的形式选择性地分离和富集。国外有用 100 μg/ml 的半乳糖多聚体 PV-MeA [poly-(N-p-vinylbenzyl-O-α-D-galactopyranosyl-l,6-D-gluconamide)]包被玻片,通过“FNRBCs-SBA”复合体与 PV-MeA 包被的玻片选择性地吸附形成“FNRBCs-SBA-PV-MeA”复合体来分离富集 FNRBCs 的报道[9]。但由于商品化的 PV-MeA 已经停产,人工合成 PV-MeA 又十分困难,因此,本研究选择 GalNAc 来包被玻片。尽管 GalNAc 是半乳糖单体,但它与一定浓度的 SBA 有较高的结合效价。本研究结果显示,用 GalNAc 来包被玻片和 PV-MeA 包被玻片具有相似的分离和富集 FNRBCs 的效率。但是,在国外报道中 SBA 与 PV-MeA 结合时 SBA 的最佳浓度是 10 μg/ml,而在本研究中 SBA 与 GalNAc 结合时 SBA 的最佳浓度是 20 μg/ml。这种差异可能是由于 GalNAc 是单体,SBA 需要较高的浓度才能达到与 PV-MeA 分离富集 FNRBCs 相类似的效果。

总之,通过实验,我们建立了一种用 GalNAc 包被玻片有效地分离和富集 FNRBCs 的方法,该方法有望应用于无创产前诊断中 FNRBCs 的分离和富集。

参考文献:

[1] Sitar G, Brambati B, Baldi M, *et al*. The use of non-physiological conditions to isolate fetal cells from maternal blood[J]. Exp Cell Res, 2005, 302(2): 153-161.

[2] 易 萍,李 力,夏 季,等. 母体血浆中胎儿 DNA 分析在性连锁遗传病产前诊断中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 538-540.

[3] Shulman L P. Fetal cells in maternal blood[J]. Curr Womens Health Rep, 2003, 3(1): 47-54.

[4] Rijnders R, Christiaens G C, Bossers B, *et al*. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma[J]. Obstet Gynecol, 2004, 103(1): 157-164.

[5] 陆国辉, 陈天健, 黄尚志,等. 产前诊断及其在国内应用的分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2003, 11(1): 1-5.

[6] Ikeya M, Shinya M, Kitagawa M. Basic investigation of the lectin method for separation and recovery of nucleated red blood cells in maternal blood, and a study into the frequency of nucleated red blood cells in fetomaternal disorders[J]. Congenit Anom (Kyoto), 2005, 45(1): 26-31.

[7] Babochkina T, Mergenthaler S, Lapaire O, *et al*. Evaluation of a soybean lectin-based method for the enrichment of erythroblasts[J]. J Histochem Cytochem, 2005, 53(3): 329-330.

[8] Kitagawa M, Sugiura K, Omi H, *et al*. New technique using galactose-specific lectin for isolation of fetal cells from maternal blood[J]. Prenat Diagn, 2002, 22(1): 17-21.

[9] Wada S, Kitagawa M. Method of separation and concentration of fetal nucleated red blood cells in maternal blood and its application to fetal diagnosis[J]. Congenit Anom, 2004, 44(2): 72-78.

(编辑 郭建秀)