

# 100nm 葡聚糖磁性微球用于 CD34<sup>+</sup>细胞分选的初步研究

杨芸 张海洋 巫鼎娥 曹飞婷

常州伯仪生物科技有限公司, 江苏常州, 213149;

**摘要:** 目前市场主流分选 CD34<sup>+</sup>细胞产品的是以美天旎为代表的纳米级路线 (10~50nm) 和以 StemCell 为代表的微米级路线, 但前者存在磁场响应弱、需要配套专用分选柱耗材的局限, 后者因磁珠粒径较大, 易引起细胞损伤及非特异性吸附的风险。为突破现有技术的局限性, 本研究首先制备粒径 100nm~150nm 的葡聚糖磁性微球, 拥有良好的磁场响应性与胶体稳定性, 通过磁珠界面修饰化学功能层, 共价偶联上抗人 CD34 单克隆抗体, 获得了 CD34<sup>+</sup>细胞分选磁珠, 分选效果与市售产品接近。综上所述, 本研究开发的 100 nm 纳米级 CD34 细胞分选磁珠, 既具有良好的磁场响应性, 可通过常规磁力架实现高效分选, 又因粒径适中, 对细胞的生理功能干扰以及表位占据影响较低, 实现了分选效率和细胞活性的高效平衡。该研究为 CD34<sup>+</sup>细胞的高效率分选提供了新型功能材料, 也为免疫磁珠的理性设计提供了新思路。

**关键词:** 细胞分选; 磁性微球; 免疫磁珠; CD34 细胞

**DOI:** 10.69979/3029-2808.26.02.063

## 引言

CD34<sup>+</sup>造血干/祖细胞具备高度自我更新和多向分化潜能, 在造血干细胞移植、再生医学及血液系统疾病治疗中具有重要应用价值。高效、高特异性分离 CD34<sup>+</sup>细胞是后续临床应用与机制研究的基础, 其核心挑战在于同时保障分选纯度、回收率及细胞活性, 并最大限度降低非特异性吸附对细胞功能的影响。传统的细胞流式分选虽然纯度高, 但分选速度和效率较低, 仅适用于基础科研, 难以满足规模化的临床分选需求。免疫磁珠分选技术凭借操作简便、分选快速、特异性强且对细胞损伤小等优势, 已成为 CD34<sup>+</sup>细胞分选的主流方法之一。目前市售分选磁珠主要分为两类: 50 nm 左右的小粒径纳米磁珠与微米级以上磁珠。前者虽占据细胞表位极少, 不激活细胞, 生物相容性较高, 但磁场响应性较弱, 必须依赖专用的分选设备或者耗材 (如分选柱), 增加了操作复杂程度和成本; 后者虽磁响应迅速、抗体负载量高, 但存在细胞机械损伤与非特异性高的风险<sup>[1-4]</sup>。因此, 开发一款生物相容性好、操作简单且可以实现规模化分选的 CD34 分选磁珠具有重要的科研和临床价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与原料

乙二醇; 二水合柠檬酸钠; 无水乙酸钠; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; 葡聚糖 (MW40000); 高碘酸钠; MES; PBS; 氢氧化

钠; 环氧氯丙烷; 碳酸氢钠; PAA5K; EDC(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺); NHS(N-羟基琥珀酰亚胺); 硼氢化钠; 乙醇胺; 甘氨酸; 牛血清白蛋白 (BSA), Tween-20, 以上试剂均为分析纯。Anti-Human CD34 mAb 和 FITC 标记 Anti-Human CD34 mAb 由常州鸿蒙生物有限公司提供。淋巴细胞分离液采购于碧云天生物科技有限公司。K562-CD34<sup>+</sup>细胞由本公司保存, 人血液样本由健康志愿者提供。

### 1.2 葡聚糖磁性纳米颗粒的合成

称取 0.5g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、1.5g 乙酸钠、1g 二水合柠檬酸钠, 量取 20mL 乙二醇, 均加入水热反应釜中, 于 200℃ 反应 10h。反应结束后磁吸去除上清, 并用 95% 乙醇清洗, 冷冻干燥, 即可得到粒径为 100~150nm 的磁性纳米颗粒。称取 1g 葡聚糖和 100mg 磁性纳米颗粒加入 100 mL 去离子水, 低温搅拌过夜 (N<sub>2</sub>)。反应结束后磁性去除上清, 并用去离子水清洗。向磁珠中加入 100mL 0.1M 氢氧化钠溶液和 100 μL 环氧氯丙烷, 室温反应 6h。反应结束后磁性去除上清, 并用去离子水清洗和重悬磁性纳米颗粒, 得到葡聚糖磁性纳米颗粒溶液。

### 1.3 醛基界面的 CD34 细胞分选磁珠合成

用 0.1M MES 缓冲液 (pH5.5) 清洗葡聚糖磁性纳米颗粒溶液后, 加入 0.1M MES 溶液 (pH5.5) 和 NaIO<sub>4</sub> (1 mg/mL) 分散磁性微球, 于 25℃, 100 rpm 转速反应 1h。加入 50 μL 乙二醇, 继续反应 15min。磁吸去上清后,

去离子水和0.1M PBS缓冲液洗涤，最终用0.1M PBS缓冲液复溶，得到醛基界面的磁珠。取10mg醛基界面的磁珠，用0.1M碳酸氢钠缓冲液(pH 8.0)清洗并分散。加入200μg Anti-Human CD34 mAb混匀于4℃、80 rpm转速避光孵育2h。加入2mg硼氢化钠混匀反应30min，再加入100μL 1M甘氨酸溶液和1mL 10mg/mL BSA溶液，室温孵育1h。反应结束后，磁吸去除上清，依次用5mL 0.1M PBST、2mL 0.1M PBS(pH 7.4)清洗，最后用1mL 0.1M PBS(pH 7.4)分散磁珠，得到醛基界面的CD34细胞分选磁珠(浓度10mg/mL)。

#### 1.4 羧基界面的CD34细胞分选磁珠合成

取葡聚糖磁性纳米颗粒水溶液，加入等体积氨水，置于25℃、100 rpm转速反应3h后，磁吸去除上清，去离子水清洗后，0.1M MES缓冲液洗涤并复溶，加入PAA5K、EDC和NHS，置于37℃、80 rpm转速孵育3h后。加入50μL乙醇胺，继续反应15min。磁吸去上清后，去离子水清洗后，0.1M PBS缓冲液洗涤并复溶，得到羧基界面的磁珠。取10mg羧基化磁珠，磁吸弃上清，加入1mg EDC和NHS活化剂(用0.1M MES缓冲液配制)，置于25℃、100 rpm转速反应0.5h后，磁吸去除上清，0.1M MES缓冲液清洗并重悬磁珠，加入200μg Anti-Human CD34 mAb，置于37℃、100 rpm转速反应1h后，磁吸去除上清，用0.1M PBS缓冲液(pH 7.4)洗涤后加入1M Tris溶液，室温孵育2h。磁吸弃上清，向磁珠中加入1mL 0.1M PBS缓冲液(pH 7.4)清洗并分散磁珠，得到羧基界面的CD34细胞分选磁珠(10mg/mL)。

#### 1.5 表征方法

采用扫描电镜(SEM)测试样品的形貌；傅里叶红外光谱仪(FT-IR)分析表面官能团；振动样品磁强计(VSM)测量磁性能，上述检测均委托科学指南针进行测试。

#### 1.6 CD34<sup>+</sup>细胞分选效果的测试

按照淋巴细胞分离液产品说明书提取PBMC细胞。将K562-CD34阳性细胞和PBMC混合，使得K562-CD34细胞的占比不超过2%，作为待分选细胞样本。取0.5mg醛基界面或羧基界面的CD34<sup>+</sup>分选磁珠与待分选细胞样本于2~8℃孵育30min。反应结束后，放置于磁力架进行分选：收集磁吸上清后，用PBS清洗磁珠，收集洗杂液，合并磁吸上清和洗杂液作为流穿组分；再将磁珠撤离磁铁，加入PBS重悬，作为洗脱组分。分别将流穿组

分和洗脱组分加入FITC标记Anti-Human CD34 mAb，同时设置待分选细胞样本、K562-CD34细胞、PBMC对照组，室温避光孵育30min，用PBS清洗后，重悬细胞，于流式分析仪(品牌：安捷伦；型号：Novocyte 2060)上检测CD34<sup>+</sup>细胞纯度和活率。

## 2 结果

### 2.1 SEM与VSM表征结果分析

磁性微球呈现微球状，粒径在100~150nm(图1)，饱和磁场强度为50emu/g，远高于20nm纳米磁性微球(10emu/g)，且矫顽力趋向于0(图2)，表明该方法合成的磁性微球具有超顺磁性，且工艺稳定，为高效磁分离提供良好的磁学性能。

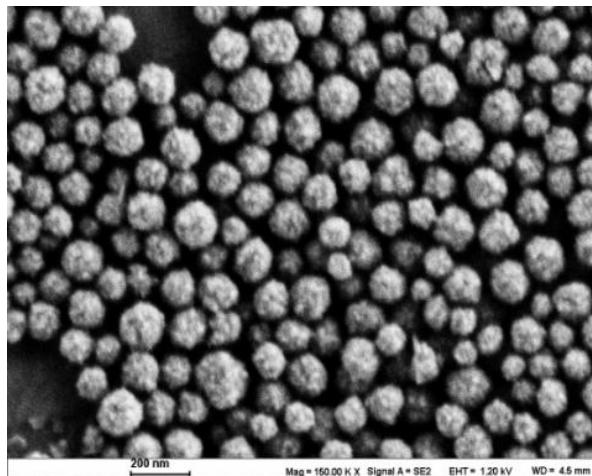


图1：磁性微球的扫描电镜表征

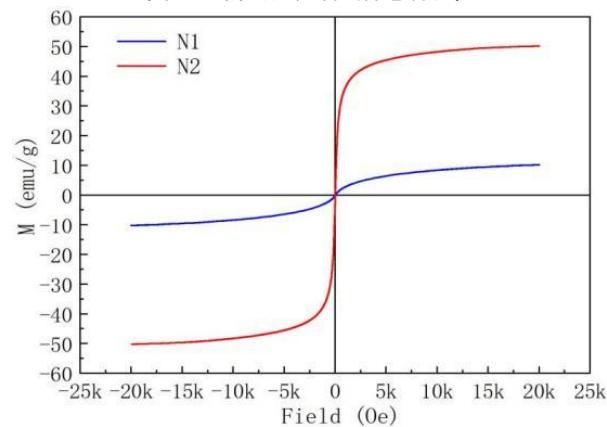


图2：20nm(N1)和100nm(N2)磁性微球的VSM表征

### 2.2 红外光谱(FT-IR)结果分析

根据图3(a)可知，葡聚糖磁性纳米颗粒在3400cm<sup>-1</sup>有羟基(-OH)的伸缩振动峰，2925cm<sup>-1</sup>饱和C-H键的伸缩振动峰，1027cm<sup>-1</sup>醚键(C-O-C)与醇羟基(C-O)的伸缩振动峰，在400~700cm<sup>-1</sup>有Fe-O的伸缩振

动峰，表明葡聚糖成功包覆到磁性微球表面；图3 (b) 显示醛基界面的磁珠在  $1635\text{cm}^{-1}$  有明显吸收峰，证明醛基和葡聚糖的羟基存在氢键作用力，表面醛基已成功修饰到葡聚糖磁性微球表面；图3 (c) 显示在  $1635\text{cm}^{-1}$  吸收峰更明显，证明羧基与葡聚糖的羟基也存在氢键作用力，且作用力更强。此外在  $3418\text{cm}^{-1}$  的吸收峰更显著，表明了磁珠表面修饰的羧基后，也增加羟基的总量。

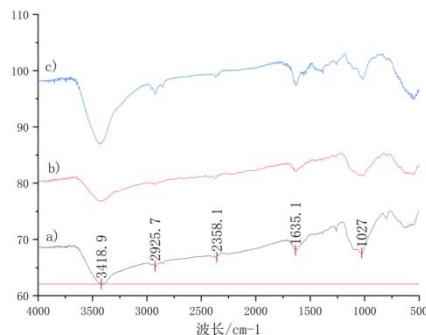
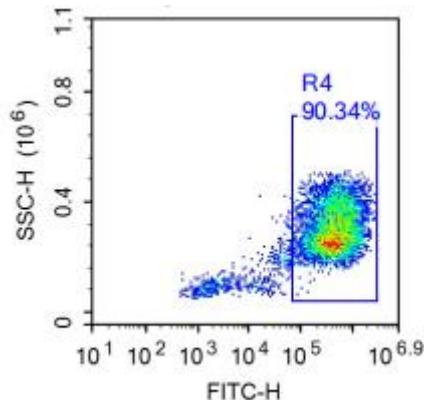


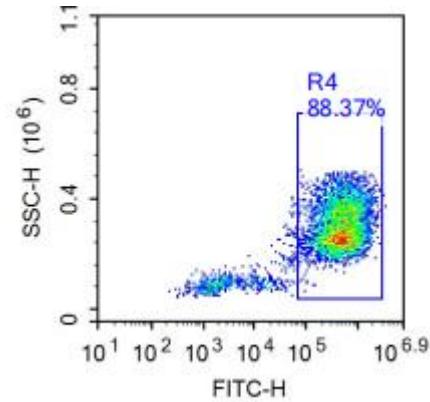
图3 红外光谱图结果：(a) 葡聚糖磁性纳米颗粒，(b) 醛基界面的磁珠，(c) 羧基界面的磁珠

### 2.3 不同化学修饰功能层对 CD34 细胞分选效果的影响

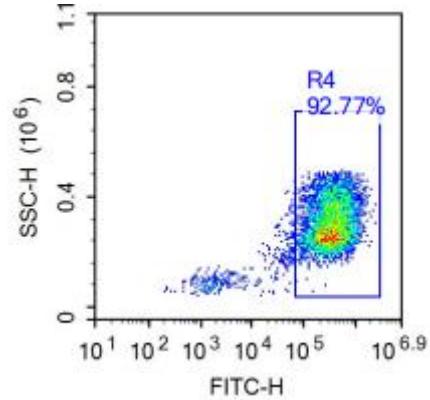
采用 PBMC 作为阴性细胞样本，向其中添加 2% K562-CD34 细胞进行分选实验，流式检测结果显示醛基界面的 CD34 细胞分选磁珠、羧基界面的 CD34 细胞分选磁珠以及市售同类产品均可以有效分选出 K562-CD34 细胞，纯度从起始的 2.06% 提高至 90.34% 和 88.37%，细胞活率均超过 95%，与市售进口同类产品分选效果一致，表明 Anti-Human CD34 mAb 成功偶联至磁珠表面，且抗体功能未受明显影响，可以特异性识别 K562-CD34 细胞表面的 CD34 胞外区域，同时对 PBMC 的非特异性吸附很低，满足应用需求。



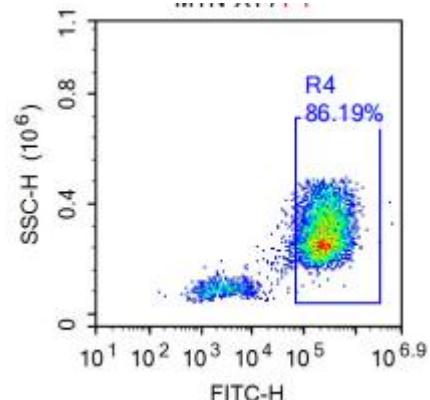
(a) 醛基界面的 CD34 分选磁珠



(b) 羧基界面的 CD34 分选磁珠



(c) 进口同类产品 (M)



(d) 国产同类产品 (G)

图 (4) 细胞分选结果

### 3 讨论

本研究聚焦于粒径调控与界面功能化修饰，将磁珠粒径调控在  $100\text{~}150\text{nm}$ ，旨在实现以下目标：保证磁珠具有磁场响应性与胶体稳定性，通过普通磁力架完成磁珠富集；同时相对于微米级别的磁珠，显著降低细胞表位占有率，降低对下游细胞实验的干扰影响。在此基础上，进一步探讨不同化学功能层修饰对细胞分选效果的影响，为高性能磁珠的开发提供技术支撑。2 种化学基团修饰的 CD34<sup>+</sup> 分选磁珠均能有效分选出靶细胞，纯度

均较高，接近市售同类产品水平。醛基功能化修饰的CD34<sup>+</sup>分选磁珠的分选纯度高于羧基界面修饰的CD34<sup>+</sup>分选磁珠，该差异主要由于两者的化学偶联机制、表面电荷特性以及反应条件差异相关。针对该体系仍存在一定程度的非特异性吸附等问题，后期可以通过针对性的工艺优化（如PEG修饰，表面电荷控制等）进一步改善。

综上所述，本研究通过粒径优化与官能团差异化设计，成功制备出100nm级葡聚糖分选磁珠。该磁珠在理化性能上实现了磁响应性、生物相容性与偶联稳定性的协同提升，在应用中展现出高纯度、高活性的潜力，为CD34<sup>+</sup>阳性细胞的高效分选提供了多元化解决方案，也为免疫磁珠的结构设计和性能优化提供了性能的技术思路。

### 参考文献

[1]Zoran Ivanovic. Hematopoietic stem cells in research and clinical applications: The “CD34 issue” [J]. World Journal of Stem Cells, 2010, 2 (2): 18-23.

- [2]Kimura T, Minamiguchi H, Wang J, et al. Impaired stem cell function of CD34<sup>+</sup> cells selected by two different immunomagnetic beads systems [J]. Leukemia, 2004, 18(3): 566-574.
- [3]Ueda, H., Agatsuma, K., Kajikawa, K., Furuse, M., et al. Design and Test of Filter of High Gradient Magnetic Separation System for Trapping Immunoglobulin in Serum [J]. IEEE Transactions on Applied Superconductivity, 2009, 19(3): 2157-2161.
- [4]Sutermaster BA, Darling EM. Considerations for high-yield, high-throughput cell enrichment: fluorescence versus magnetic sorting [J]. Sci Rep, 2019, 9: 227.

作者简介：杨芸；1988.09；女；汉；江苏；硕士；中级；微球开发。

课题：基于细胞与基因治疗的纳米级细胞分选磁珠开发，编号：CJ20241052