

Оценка возможности использования центрифугирования для ускоренного проведения анализа с использованием иммунологических биочипов для исследования клеток крови

А.В. Шишкин¹, Н.Г. Овчинина¹, С.С. Бессмельцев²

¹ГОУ ВПО Ижевская государственная медицинская академия;

²ФГУ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург

Контакты: Александр Валентинович Шишкин Shishkin_lab@mail.ru

При исследовании клеток с помощью иммунологических биочипов (микроматриц) достаточно длительным является этап инкубации с клеточной суспензией. Он занимает от 20 до 60 мин, если осаждение клеток на поверхность биочипа происходит за счет силы тяжести. Возможно уменьшение длительности этого этапа с помощью центрифугирования. В данной работе рассматривается влияние центрифугирования на результаты анализа. Оцениваются изменения морфологических характеристик клеток при их осаждении с различным ускорением. Также показана перспективность использования центрифугирования в тех случаях, когда необходимо добиться высокой плотности связывания в тестовых участках биочипа клеток, присутствующих в исследуемом образце в малых концентрациях.

Ключевые слова: иммунологический биочип, определение поверхностных антигенов клеток, осаждение клеток

Assessment of centrifugation using for accelerated immunological microarray analysis for blood cells investigation

A.V. Shishkin¹, N.G. Ovchinina¹, S.S. Bessmeltsev²

¹Izhevsk State Medical Academy;

²Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg

Phase of incubation microarray with cell suspension is prolonged when cells are investigated. It takes from 20 to 60 min if cell sedimentation on the surface of microarray is the result of gravity. Decrease of this stage duration is possible due to centrifugation. In this article influence of centrifugation on results of analysis is considered. Changes of morphological description of cells are estimated when they are precipitated with different acceleration. Also availability of centrifugation using when it is necessary to obtain the high density of cell binding in test regions of microarray if cells concentration in sample is small is demonstrated.

Key words: immunological microarray, surface cell antigens detection, cell sedimentation

Перспективным направлением иммунодиагностики является исследование клеток с использованием иммунологических биочипов, содержащих иммобилизованные антитела, специфичные к поверхностным антигенам клеток [1–9]. Такой анализ позволяет одновременно определить множество антигенов на разных клетках при очень низком расходе антител. Иммунологический биочип данного класса, как правило, представляет собой твердую подложку, в строго определенных участках («пятнах») которой иммобилизованы молекулы антител [1–9]. Проведение анализа включает в себя инкубацию биочипа с суспензией исследуемых клеток. Клетки оседают на поверхность биочипа и прочно связываются в области тестовых участков при наличии у них соответствующих антигенов, а несвязавшиеся клетки устраняют при его последующей отмывке. Если осаждение клеток осуществлялось без перемешивания, плотность заполнения тестовых участков биочипа оказывается прямо пропорциональна содержанию клеток, имеющих соответствующие антигены [7, 8]. Это позволяет осуществлять его качественную, полуколичественную или количе-

ственную оценку. Кроме того, ранее была показана возможность выполнения окрашивания и морфологического исследования связанных клеток при использовании биочипов, изготовленных на прозрачных химически стойких подложках [7–9].

В процессе проведения анализа осаждение клеток на поверхность биочипа происходит под действием силы тяжести. Данный этап обычно занимает от 20 до 60 мин. Поэтому представляется актуальным сокращение времени проведения анализа за счет ускоренного осаждения клеток. Некоторые иммунологические субпопуляции клеток присутствуют в исследуемом образце в небольших концентрациях и заполняют соответствующие тестовые участки биочипа с низкой плотностью. Вместе с тем данные клетки могут представлять для исследователя значительный интерес. Поэтому в ряде случаев может потребоваться достижение более высокой плотности их связывания. В одной из предыдущих работ [7] была показана возможность подобного концентрирования. Его принцип заключался в том, что после осаждения клеток осуществляли смывание несвязавшихся клеток, а затем вновь осаждали клетки на поверх-

ность биочипа. При этом анализ выполняли с использованием инкубационно-отмывочной кюветы или в проточной камере. Недостатком данного подхода являлось значительное увеличение продолжительности анализа. Особенно длительными были этапы, связанные с осаждением клеток. В связи с этим представляется перспективной идея использования центрифугирования для их более быстрого выполнения.

Цель работы — оценка влияния на результаты анализа ускоренного осаждения клеток с использованием центрифугирования, а также оценка возможности его применения в процессе концентрирования клеток в области тестовых участков биочипа.

Материалы и методы

Устройство биочипов и их изготовление. Иммунологический биочип представлял собой прозрачную пластиковую подложку, на которой в строго определенных тестовых участках (пятнах) были иммобилизованы мышинные моноклональные антитела (IgG), специфичные к следующим поверхностным антигенам лейкоцитов человека: CD3, CD4, CD16, CD19, CD20, CD41, CD44, CD45, CD56. Такая панель антител позволяла определять в исследуемом образце содержание Т-, В-, NK-лимфоцитов, общее содержание лейкоцитов, относящихся к различным субпопуляциям, а также наличие тромбоцитов. Тестовые участки были отделены друг от друга фоновыми участками подложки, не содержащими иммобилизованных антител.

При изготовлении биочипов капли растворов антител объемом 0,25 мкл наносили на подложки в заранее отмеченные участки. Далее подложки помещали в камеру со 100 % влажностью и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего высушивали на воздухе и замораживали при -26°C в герметичных контейнерах. При таком хранении био-

чипы не теряли своих свойств по меньшей мере в течение 12 мес.

Приспособление для ускоренного осаждения клеток на поверхность биочипа. Приспособление (рис. 1а, б) имеет корпус, состоящий из разъемных секций, и дно (изготовленное из прозрачного материала), к которому герметично крепится биочип. Приспособление, которое в собранном виде представляет собой емкость, крепится на роторе центрифуги ОПН-3 вместо стакана, предназначенного для размещения пробирки (рис. 1в). При этом ротор центрифуги должен быть тщательно уравновешен. Расстояние от центра ротора центрифуги до поверхности биочипа составляет 121 мм. Таким образом, относительное центробежное ускорение при частоте вращения ротора 1000 об/мин составляло 135,28 g, при 1500 об/мин — 304,38 g, при 1000 об/мин — 1217,5 g.

Приготовление суспензии исследуемых клеток. Лейкоциты выделялись из периферической крови путем центрифугирования в градиенте плотности. Затем выделенные клетки от 1 до 4 раз отмывали 0,9% раствором NaCl для уменьшения содержания в исследуемом образце тромбоцитов и остатков разрушенных лейкоцитов. Для этого суспензию клеток переносили в пробирки, разводили изотоническим раствором до объема 10 мл и центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а осажденные клетки ресуспензировали в 10 мл изотонического раствора, после чего вновь выполняли центрифугирование. Осадок клеток, полученный после последнего центрифугирования, ресуспензировали в растворе, содержащем 0,1 % сухого молока, 20 % (по объему) инактивированной нагреванием человеческой сыворотки и 1,5 мМ ЭДТА в PBS. Концентрацию лейкоцитов и объем суспензии подбирали таким образом, чтобы осажденные клетки заполняли всю поверхность дна емкости одним слоем.

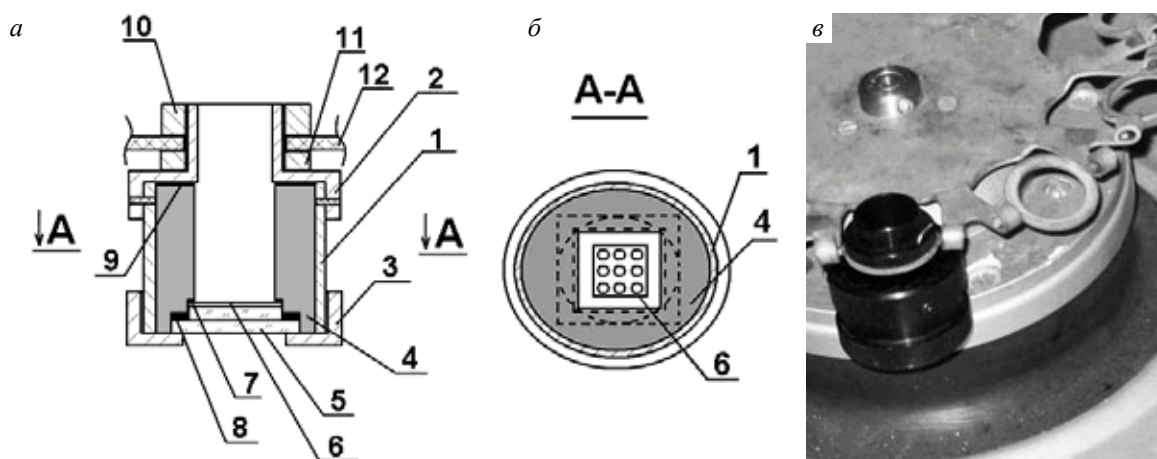


Рис. 1. Приспособление для осаждения клеток на поверхность биочипа путем центрифугирования: а — вид сбоку в разрезе; б — вид сверху в разрезе; в — приспособление, закрепленное на роторе центрифуги ОПН-3; 1 — центральная секция корпуса; 2 — верхняя секция корпуса; 3 — нижняя (прижимающая) съемная секция корпуса; 4 — съемная вставка; 5 — дно; 6 — биочип; 7, 8, 9 — герметизирующие эластичные прокладки; 10 — крепление; 11 — съемное кольцо; 12 — ротор центрифуги

В тех случаях, когда выполнялось концентрирование клеток в области пятен биочипа, использовалась суспензия клеток с концентрацией в 2 раза выше.

Подготовка биочипа к проведению анализа. После разморозки биочип закрепляли в инкубационно-отмывочной кювете или приспособлении для ускоренного осаждения клеток, ополаскивали 1 % раствором BSA в буфере PBS, затем проводили 3-кратную отмывку 0,05 % раствором детергента Tween-20 на шейкере. После этого биочип инкубировали с 1 % раствором BSA в PBS при комнатной температуре в течение 1 ч при перемешивании на шейкере. Затем вновь выполняли 3-кратную отмывку 0,05 % раствором детергента Tween-20 и ополаскивали биочип буфером для удаления следов детергента.

Инкубация биочипа с клеточной суспензией и его отмывка при проведении анализа без использования центрифугирования. В незакрепленное в центрифуге приспособление с находящимся в нем биочипом вносили клеточную суспензию и инкубировали в течение 60 мин без какого-либо перемешивания. После завершения инкубации биочип несколько раз ополаскивали PBS для устранения клеток, не связавшихся в участках с иммобилизованными антителами. Качество отмывки оценивали при помощи инвертированного микроскопа. Отмывка считалась выполненной качественно, если клетки отсутствовали в участках подложки, не содержащих иммобилизованных антител.

Инкубация биочипа с клеточной суспензией и его отмывка при проведении анализа с использованием центрифугирования. Приспособление для ускоренного осаждения клеток с биочипом закрепляли на роторе центрифуги ОПН-3 (рис. 1). В емкость приспособления вносили исследуемую клеточную суспензию. Осуществляли центрифугирование в течение 2 мин. Затем из приспособления сливали жидкость и выполняли отмывку биочипа от несвязавшихся клеток так же, как было описано выше.

Концентрирование клеток в области тестовых участков биочипа с использованием центрифугирования. В течение 1 мин осаждали клетки на поверхность биочипа, точно так же, как было описано выше. После этого центрифугу останавливали, встряхивали приспособление и вновь проводили осаждение клеток. Данные манипуляции выполняли несколько раз (см. далее). Затем осуществляли отмывку биочипа от несвязавшихся клеток.

Окрашивание связавшихся с биочипом клеток. Сразу же после завершения отмывки биочипа выполняли фиксацию клеток метанолом в течение 12 мин. Затем биочип высушивали на воздухе и окрашивали раствором азура и эозина. Далее биочип промывали проточной водой, ополаскивали дистиллированной водой и высушивали.

Приготовление из биочипа долговременного препарата для микроскопического исследования. Биочип извлекали из приспособления и заключали его между тща-

тельно обезжиренными предметным и покровным стеклами в композицию для приготовления долговременных микропрепаратов «Shandon-Mount» («Thermo-electron corporation», США). Микропрепарат помещали под пресс до затвердевания композиции.

Считывание и обработка результатов. В каждом пятне биочипа определяли плотность связывания клеток — отношение количества клеток, связанных в определенном участке, к площади поверхности данного участка. Для этого на микрофотографии каждого пятна выбирали 3–4 участка, соответствующих областям размерами 100 × 100 мкм, и определяли в каждом из них количество связанных клеток. Полученные значения усредняли. Далее полученные результаты выражали в процентах. За 100 % принимали среднюю плотность связывания клеток в области пятен с антителами, специфичными к антигену CD45 (присутствующему на лейкоцитах практически всех типов). Исходя из этого выполняли пересчет в проценты значений плотности связывания клеток в области других пятен. Ранее было показано [7, 8], что при проведении инкубации биочипа с клеточной суспензией без перемешивания, выраженные в процентах значения плотности связывания клеток в тестовых участках биочипа оказываются весьма близки значениям фактического процентного содержания в образце клеток, имеющих соответствующие антигены.

Для апробации предлагаемого метода использовалась кровь здорового человека.

Результаты

При проведении анализа без центрифугирования лейкоциты не разрушались и хорошо сохраняли свои морфологические признаки, что наглядно показано на рис. 2.

Для контроля использовался метод проточной цитофлуориметрии. Как видно из рис. 3, результаты оценки содержания клеток, имеющих определяемые антигены, хорошо соответствовали данным проточной цитофлуориметрии.

Для оценки загрязненности поверхности биочипа осевшими тромбоцитами использовалось пятно с антителами, специфичными к антигену CD41. В тех экспериментах, где центрифугирование не применялось, количество тромбоцитов, осевших на поверхность биочипа, было весьма невелико (рис. 2б) и не могло оказывать заметного влияния на результат анализа.

Если центрифугирование выполнялось при 3000 об/мин, происходило значительное повреждение или даже полное разрушение большинства лейкоцитов (рис. 4). Наиболее сильно повреждались CD16⁺-клетки (рис. 4б).

Между тем, если центрифугирование выполнялось при 1500 об/мин, то повреждалось меньшее число клеток, но полностью данная проблема не решалась. В тех случаях, когда выполнялось центрифугирование при 1000 об/мин, лимфоциты сколько-нибудь существен-

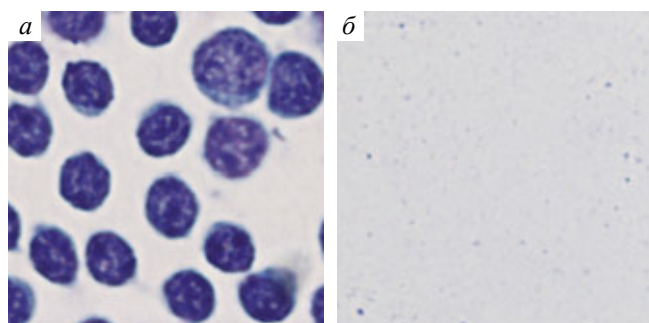


Рис. 2. Микрофотографии клеток, связавшихся в области тестовых участков биочипа: а — лейкоциты различных типов, связавшиеся в области пятна с антителами анти-CD45; б — небольшое количество тромбоцитов (экранирующих менее 1 % площади поверхности), связавшихся в области пятна с антителами анти-CD41. Осаждение клеток выполнялось без использования центрифугирования. Окраска по Романовскому—Гимзе. Увеличение в 1000 раз

ных морфологических изменений не имели (рис. 5). Миелоидные клетки (присутствующие в пятнах с антителами, специфичными к антигенам CD44 и CD45) также не разрушались. По морфологическим признакам их можно было четко отличить от лимфоцитов.

В большинстве экспериментов на этапе пробоподготовки выделение лейкоцитов из крови осуществлялось в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина (1077 г/л). В этих случаях на этапе осаждения клеток на поверхность биочипа пришлось столкнуться со следующей проблемой. При использовании центри-

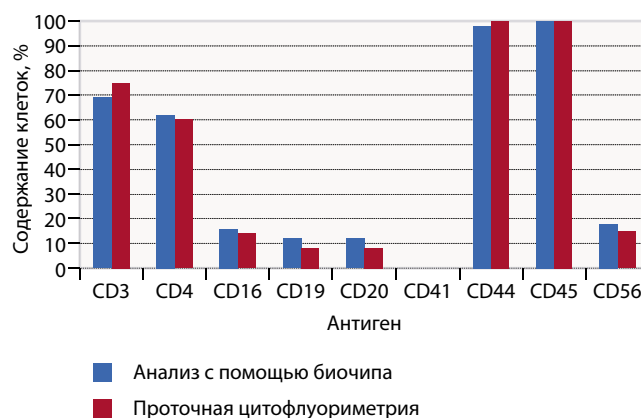


Рис. 3. Результат оценки содержания клеток, имеющих определяемые антигены, с использованием биочипа и методом проточной цитофлуориметрии

фугирования на поверхность биочипа в значительном количестве осаждались тромбоциты и фрагменты клеток, разрушившихся на предшествующих этапах анализа. Они были лишены цитоплазмы и ядра, но сохраняли антигены, позволяющие им связываться в области тех или иных участков биочипа с иммобилизованными антителами. На рис. 5 видно, что лейкоциты не разрушились в процессе центрифугирования при 1000 об/мин.

Количество осажденных тромбоцитов и фрагментов разрушенных клеток было особенно велико при цент-

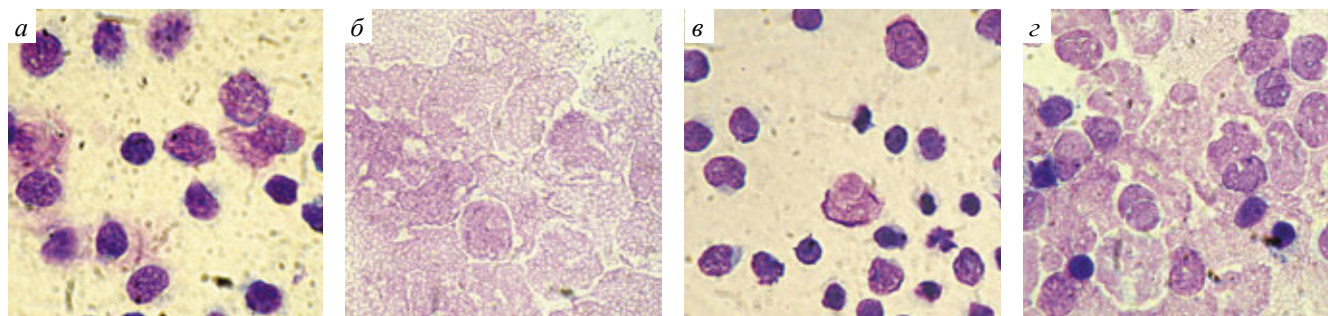


Рис. 4. Клетки, связавшиеся в тестовых участках биочипа с различными антителами: а — анти-CD3; б — анти-CD16; в — анти-CD19; г — анти-CD45. Осаждение клеток на биочип осуществлялось на центрифуге ОПН-3 при 3000 об/мин 2 мин. Окраска по Романовскому—Гимзе. Увеличение в 600 раз. Клетки деформированы либо полностью разрушены

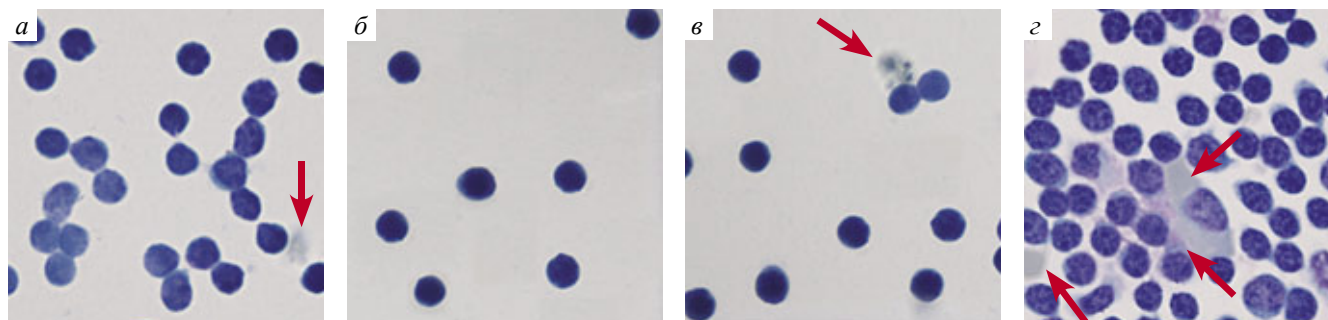


Рис. 5. Клетки, связавшиеся в тестовых участках биочипа с различными антителами: а — анти-CD3; б — анти-CD16; в — анти-CD19; г — анти-CD45. Осаждение клеток на биочип осуществлялось на центрифуге ОПН-3 при 1000 об/мин. Окраска по Романовскому—Гимзе. Увеличение в 600 раз. Клетки не разрушаются и сохраняют свои морфологические признаки. В области пятен связывается небольшое количество фрагментов клеток, которые подверглись разрушению, вероятно, еще на предшествующих этапах анализа (отмечены стрелками). С целью уменьшения данной примеси на этапе пробоподготовки выполнялась 4-кратная отмывка выделенных лейкоцитов

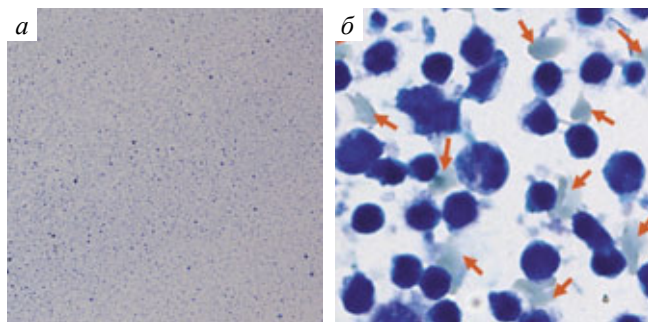


Рис. 6. Микрофотографии, демонстрирующие осаждение на поверхность биочипа большого количества тромбоцитов и клеток, разрушенных на этапе пробоподготовки, при недостаточной очистке исследуемой клеточной суспензии и центрифугировании при 3000 об/мин: а — тромбоциты, связавшиеся в области тестового участка (пятна) биочипа с антителами, специфичными к антигену CD41; б — клетки, связавшиеся в области тестового участка (пятна) биочипа с антителами, специфичными к антигену CD45. Фрагменты клеток, лишенные ядра, отмечены стрелками. Увеличение в 1000 раз. Окраска по Романовскому—Гимзе.

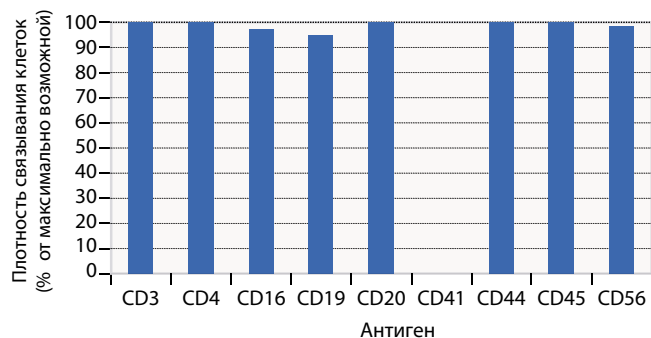


Рис. 7. Заполнение связанными клетками тестовых участков биочипа после выполнения концентрирования с использованием центрифугирования

рифугировании при 3000 об/мин и в тех случаях, когда после выделения тромбоцитов отмывка выполнялась всего 1–2 раза (рис. 6). Тромбоциты и фрагменты разрушенных клеток частично экранируют поверхность биочипа и не дают связаться с иммобилизованными антителами части исследуемых клеток. Поэтому плотность связывания лейкоцитов (рис. 6б) оказывалась меньше максимально возможной. Для того чтобы уменьшить содержание этих примесей в исследуемом образце, была использована 4-кратная отмывка выделенных клеток и уменьшение ускорения при центрифугировании. Количество осаждаемых на поверхность биочипа тромбоцитов и разрушенных лейкоцитов при этом существенно снижалось. Проведение многократной отмывки требует дополнительных затрат времени, а также уменьшает выход выделяемых лейкоцитов, что требует повышенного расхода клинического материала. Полностью решить указанные проблемы удалось только при использовании 2-ступенчатого градиента на этапе фракционирования клеток.

При проведении анализа с использованием центрифугирования получаемые результаты значительно

отличались от результатов эксперимента, в котором центрифугирование не использовалось. Отмечалось «завышение» плотности связывания клеток в области тех участков биочипа, где она должна была являться невысокой. Воспроизводимость результатов, особенно при центрифугировании при 3000 об/мин, была неудовлетворительной.

Ранее была показана возможность повышения плотности связывания в области тестовых участков биочипа клеток, присутствующих в исследуемом образце в малых количествах, путем многократного чередования осаждения клеток на поверхность биочипа и смывания несвязавшихся клеток [7]. Однако такой подход требовал больших затрат времени. Поэтому была предпринята попытка использования центрифугирования для ускорения данного процесса. В ходе проведения анализа этапы осаждения клеток центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1 мин чередовались со встряхиванием емкости (которое выполнялось после полной остановки ротора центрифуги). После выполнения 12 циклов осаждения и смывания удавалось добиться практически предельного заполнения клетками всех тестовых участков биочипа (рис. 7).

Обсуждение

Таким образом, использование ускоренного осаждения клеток крови позволило практически на 1 ч уменьшить время проведения анализа. В то же время точность результатов снизилась. Вероятно, одной из основных причин этого была вибрация центрифуги. Поэтому данный подход может быть использован только в тех случаях, когда необходимо быстро количественно или качественно определить наличие или отсутствие в образце той или иной субпопуляции клеток.

При центрифугировании происходит удар движущихся с ускорением клеток о твердую и недеформируемую поверхность биочипа. При большом ускорении может происходить разрушение клеток. Вопрос о различной устойчивости к такому воздействию у разных типов лимфоцитов требует дальнейшего изучения. Лимфоциты здорового человека не разрушались, если их осаждение на поверхность биочипа осуществлялось центрифугированием при 1000 об/мин (135,28 g). Однако нельзя исключать, что в случае исследования других типов клеток при данных условиях не будет происходить их разрушения. Поэтому может оказаться целесообразным проведение осаждения с меньшим относительным центростремительным ускорением. Это потребует внесения существенных изменений в конструкцию центрифуги или использования центрифуги другой модели.

При выполнении концентрирования клеток в области тестовых участков биочипа за счет использования центрифугирования продолжительность исследования сократилась на несколько часов по сравнению с исходной методикой, описанной в работе [7]. Тем не менее при этом требовалась многократная остановка

центрифуги для встряхивания емкости с биочипом, что приводило к дополнительным затратам времени.

Для того чтобы устранить данный недостаток, необходимо или встряхивать ротор в процессе вращения (вызывать вибрацию) или кратковременно снижать частоту его вращения (выполнять торможение). Данные процессы должны контролироваться, чтобы не происходило отрыва специфически связанных клеток. Это также требует внесения существенных изменений в конструкцию центрифуги.

Представляется перспективным использование описанного подхода для диагностики минимальной остаточной болезни при многих онкогематологических заболеваниях. Однако в связи с малым содержанием таких клеток (порядка 1 на 10^6 клеток и менее) потребуется выполнение множества циклов осаждения-смывания и использование суспензии со значительно большей общей концентрацией клеток. Кроме того, существенным изменениям придется подвергнуть конструкцию тест-системы. Вместо биочипа с множеством тестовых участков, имеющих малые размеры, в этом случае необходима тест-система, вся поверхность которой покрыта антителами, специфичными к одному антигену, или же тест-система, имеющая несколько тестовых участков очень больших размеров и практически полностью лишенная фоновых участков. Это необходимо для того, чтобы с антителами связалось как можно большее количество клеток, среди которых будет проводиться поиск минорных субпопуляций.

Клетки опухолевых заболеваний системы крови не содержат каких-то уникальных поверхностных анти-

генов. От нормальных клеток они отличаются комбинациями антигенов. Для того чтобы отличить опухолевую клетку от нормальных клеток, имеющих один и тот же определяемый антиген, потребуются определение коэкспрессии нескольких антигенов. Для этого после завершения концентрирования клеток и проведения отмывки может быть выполнена обработка поверхности тест-системы мечеными антителами.

Выводы

1. Использование центрифугирования для осаждения клеток на поверхность биочипа значительно ускоряет проведение анализа, но снижает воспроизводимость результатов и точность оценки содержания клеток, имеющих определяемые антигены. Такой подход не может быть использован в тех случаях, когда необходима точная количественная оценка данных показателей.

2. Разрушение лейкоцитов не отмечается при их осаждении на поверхность биочипа с относительным ускорением центрифугирования 135,28 g. При использовании центрифугирования для осаждения клеток на поверхность биочипа исследуемая суспензия должна быть тщательно очищена от примеси тромбоцитов и клеток, разрушенных на этапе пробоподготовки.

3. Ускоренное осаждение клеток центрифугированием может применяться при выполнении концентрирования клеток в области тестовых участков биочипа, требующего выполнения нескольких этапов осаждения/отмывки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belov L., de la VEGA O., dos Remedios C.G. et al. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer research* 2001; 61:4483–9.
2. Belov L., Huang P., Barber N. et al. Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray. *Proteomics* 2003;3:2147–54.
3. Belov L., Huang P., Chrisp J.S. et al. Screening microarrays of novel monoclonal antibodies for binding to T-, B- and myeloid leukaemia cells. *J Immunol Methods* 2005;305:10–9.

4. Ellmark P., Belov L., Huang P. et al. Multiplex detection of surface molecules on colorectal cancers. *Proteomics* 2006; 6:1791–802.
5. Woolfson A., Stebbing J., Tom B. et al. Conservation of unique cell-surface CD antigen mosaics in HIV-1-infected individuals. *Blood* 2005;106(3):1003–7.
6. Liu A.Y. Differential Expression of Cell Surface Molecules in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research* 2000;60:3429–34.
7. Шишкин А.В. Иммунологические биочипы для исследования клеток. Собственный опыт разработки.

Некоторые новые подходы к проведению анализа. LAP Lambert Academic Publishing & Co. KG, 2010. 158 с.

8. Шишкин А.В., Шмырев И.И., Кузнецова С.А. и др. Иммунологические биочипы для параллельного определения поверхностных антигенов и морфологического исследования клеток. *Биол мемб* 2008;4:277–84.
9. Шишкин А.В., Шмырев И.И., Кузнецова С.А. и др. Иммунологические биочипы для исследования эритроцитов человека. *Биол мемб* 2008; 4:267–76.