

# 使用纯化的CD138血浆细胞增强多发性骨髓瘤检测的灵敏度

在多发性骨髓瘤的骨髓样本中，通常非恶性和恶性细胞混合在一起。当对含有大量非恶性细胞的样本进行分析时，很难检测到其中少量的恶性骨髓瘤细胞。通过CD138正选纯化浆细胞，能增加分析样本中恶性骨髓瘤细胞的比例，从而增强对其中基因组异常的检测。该技术公告提出了一种分离浆细胞的方法，以增强下游分析的敏感性，例如荧光原位杂交（FISH）、基于微阵列的分析、基因组测序和用于多发性骨髓瘤检测的基因表达谱分析。

## 研究背景

### 多发性骨髓瘤

多发性骨髓瘤是由B细胞瘤引起的一种癌症，导致恶性浆细胞（表达CD138（Syndecan-1）并参与免疫应答过程中抗体产生的细胞）产生失调和克隆扩增<sup>1</sup>。该疾病的特征是骨髓中存在数量过多的异常浆细胞，及完整的单克隆免疫球蛋白以及游离的单克隆κ和λ免疫球蛋白轻链的过量生产。

### 多发性骨髓瘤样本的基因组畸变的分析

通常多发性骨髓瘤首选的实验室筛查方法是对骨髓中CD138<sup>+</sup>浆细胞进行检测和定量。该疾病可通过其特征性的染色体异常与其他B细胞瘤区分开。这些染色体异常包括免疫球蛋白重链区域上的染色体易位导致的癌基因激活、染色体缺失（尤其是13号染色体）和超倍性。这些信息可将多发性骨髓瘤分类为具有不同特征的亚型<sup>2,3</sup>。

分子细胞遗传学技术（例如FISH）是表征多发性骨髓瘤常用的工具。FISH使用核酸探针来检测和定位染色体上是否存在特定的DNA序列。FISH检测中核酸探针检测基因组异常的能力有限。因此，科学家们正在开发其它更高分辨率的技术（例如，基于微阵列的基因组谱分析，基因组测序和基因表达谱分析），与FISH结合用于多发性骨髓瘤的检测<sup>4,5,6</sup>。

### 通过CD138<sup>+</sup>浆细胞富集来增强灵敏度

多发性骨髓瘤骨髓样本通常包含非恶性和恶性细胞。在含有大量显示正常核型的健康B细胞和非恶性浆细胞的样本中检测少量恶性浆细胞并不容易。为了鉴定和分析一小部分异常克隆需要对大量的细胞进行分析。然而，CD138的抗原只存在于所有的浆细胞（包括非恶性和恶性细胞），而并不存在于成熟B细胞上。因此CD138抗原是富集所有浆细胞（包括恶性多发性骨髓瘤细胞）的合适的标志物。相比于对混合细胞群的样本进行分析，通过CD138分选富集血浆细胞增加了分析物中恶性骨髓瘤细胞的比例，并提高了检测基因组异常的灵敏度<sup>4,5,7</sup>。因此，通过CD138分选以富集浆细胞是下游分析之前的非常有用的一步，可增强其灵敏度并能更可靠地进行FISH、基于微阵列的基因组谱分析和多发性骨髓瘤的基因组测序。

国家综合癌症网络®（NCCN指南 版本 2.2020 多发性骨髓瘤）推荐在进行FISH检测多发性骨髓瘤时，使用从骨髓穿刺获得富集的浆细胞。

- NCCN指南® 版本 2.2020 多发性骨髓瘤；NCCN.org

### 轻松、无柱的浆细胞富集

可使用免疫磁珠细胞分选技术，如EasySep™（图1），从骨髓样本或外周血单个核细胞获得CD138<sup>+</sup>浆细胞。首先通过识别细胞表面CD138的抗体混合物来靶向目的细胞，并将其与磁珠连接。接着将样本置于EasySep™磁极中，通过磁场作用经标记的细胞被吸附于试管的侧面，未经标记的细胞则可通过简单的倾倒或使用移液管吸至一个新的试管中。

通过EasySep™富集CD138<sup>+</sup>细胞已被证明是获得用于下游多发性骨髓瘤检测的浆细胞的有效方法<sup>5,6,8</sup>。为了节省更多时间并最大程度地减少样本处理，可通过RoboSep™仪器自动操作EasySep™富集浆细胞<sup>5,8</sup>。一项评估RoboSep™用于CD138<sup>+</sup>浆细胞富集的研究发现，即使在浆细胞含量很低的情况下该仪器也能可靠地分离浆细胞<sup>8</sup>。

下面是从骨髓、全血和单个核细胞制备物中富集浆细胞的完整操作流程，以用于后续的下流多发性骨髓瘤检测。

## 操作流程

### 第一步: 不同来源的样本制备

#### 样本来源: 骨髓

使用EasySep™人全血和骨髓CD138正选试剂盒II (产品号 #17887) 制备样本

用D-PBS (不含钙和镁) 将样本稀释5至10倍, 然后上下吹打轻轻混合。通过预先润湿的70-100µm滤网过滤样本, 以除去骨碎片、细胞团块和细胞碎片。将骨髓单细胞悬液转移至试管中, 300 x g离心10分钟, 关闭离心机刹车。小心去除血浆, 不要接触到白膜层/红细胞沉淀, 接着用D-PBS重悬至起始样本体积。对于超过24小时的样本, 按100µg/mL添加DNase I以减少细胞结团。重悬前可将DNase I直接加入到沉淀的细胞中并轻轻混合。

将最多4.5 mL的单细胞悬液转移至14 mL圆底聚苯乙烯管中。以1: 1的比例添加1X EasySep™红细胞裂解液\*, 并充分混匀。制备好的样本可被用于手动 (第2A部分) 或自动 (第2B部分) 细胞分选。

使用EasySep™人CD138正选试剂盒II (产品号 #17877) 制备样本

通过将样本加至密度梯度离心液 (例如Lymphoprep™) 上进行离心, 从整个骨髓中制备单个核细胞 (MNC) 悬液。或者, 通过使用氯化铵溶液裂解来去除红细胞。单细胞悬液制备好后, 将细胞以 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL的浓度重悬于含有2%胎牛血清和1 mM EDTA的PBS中, 并将其 (最多8.5 mL) 转移至14 mL圆底聚苯乙烯管中。

#### 样本来源: 外周血

使用EasySep™人全血和骨髓CD138正选试剂盒II (产品号 #17887) 制备样本

将全血收集到装有抗凝剂的采血管中。将最多4.5 mL全血转移到14 mL圆底聚苯乙烯管中。以1: 1的比例添加1X EasySep™红细胞裂解液\*, 并充分混匀。制备好的样本可通过手动 (第2A部分) 或自动 (第2B部分) 细胞分选。

使用EasySep™人CD138正选试剂盒II (产品号 #17877) 制备样本

将全血收集到装有抗凝剂的采血管中。通过将全血加至密度梯度离心液 (例如Lymphoprep™) 上进行离心, 从全血中制备外周血单个核细胞 (PBMC) 悬液。

单细胞悬液制备好后, 将细胞以 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL的浓度重悬于含有2%胎牛血清和1 mM EDTA的PBS中, 并将其 (最多8.5 mL) 转移至14 mL圆底聚苯乙烯管中。制备好的样本可通过手动 (第2A部分) 或自动 (第2B部分) 细胞分选。

#### 样本来源: 冻存的骨髓或外周血单个核细胞

使用EasySep™人CD138正选试剂盒II (产品号 #17877) 制备样本

用浓度为100µg/mL的DNase I在室温下 (15 - 25°C) 孵育细胞至少15分钟。将悬浮液通过37µm滤网以获得最佳结果。单细胞悬液制备好后, 将细胞以 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL的浓度重悬于含有2%胎牛血清和1 mM EDTA的PBS中, 并将其 (最多8.5 mL) 转移至14 mL圆底聚苯乙烯管中。制备好的样本可通过手动 (第2A部分) 或自动 (第2B部分) 细胞分选。

\*注意: 试剂盒中的EasySep™红细胞裂解液为10倍浓缩液。在使用前至少1小时, 将1份10X裂解液加入9份蒸馏水或1型水中制备1X裂解液。使用前需温和且充分混匀。

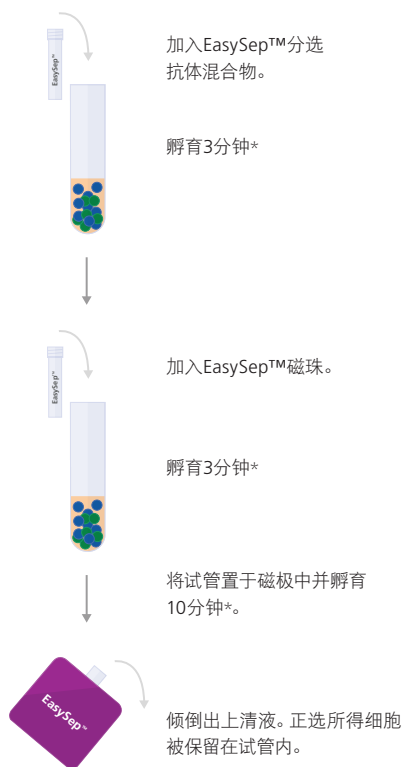
应在采集后的24小时内对样本进行处理, 以获得最佳的细胞分选结果。



## 第2A部分: 手动富集血浆细胞

根据相应产品说明书上的特定说明, 使用EasySep™分选混合物和RapidSpheres™ (图1) 对细胞进行标记。首先, 加入EasySep™分选混合物和RapidSpheres™, 通过分选混合物中的抗CD138<sup>+</sup> (Syndecan-1) 抗体混合物和RapidSpheres™磁珠来标记目的细胞。接着, 将装有样本的试管置于EasySep™磁极中孵育, 然后吸出或倾倒入上清液。靶向的CD138<sup>+</sup>细胞被保留在试管中, 而非目的细胞则被吸出或倾倒入。将含有目的细胞的试管从磁极中取出, 在合适的溶液中重悬细胞。分选所得的细胞表面附有EasySep™磁珠。然而, 这些磁珠并不会影响下游应用, 如流式细胞术、FISH和核酸提取。

欲了解更多信息, 请使用此产品说明书 (PIS) 查找工具按产品号下载您所需的PIS。



\*时间因使用试剂、分离方法和使用平台有所不同。

图1. 使用EasySep™正选试剂盒手动分离CD138<sup>+</sup>细胞的操作步骤

用抗体和磁珠标记CD138<sup>+</sup>细胞后, 使用EasySep™磁极进行分选。分选得到的细胞可立即用于下游应用, 如荧光原位杂交 (FISH)、流式细胞分析、细胞培养或DNA / RNA提取。

## 第2B部分: 自动富集血浆细胞

使用RoboSep™-S和RoboSep™-16可以完全自动化地富集浆细胞。通过仪器即可执行所有细胞标记和分选步骤。使用RoboSep™进行CD138<sup>+</sup>浆细胞富集时, 请选择优化的仪器操作流程 (详情请见相应的产品说明书), 接着加载样本和试剂, 并按照屏幕上的提示启动细胞分选程序。运行完成后, 取出装有分离所得的细胞的试管, 然后重悬于合适的溶液中。请确保从试管壁收集细胞。

## 第3部分: 细胞分选后测定细胞纯度

使用抗人CD138 (Syndecan-1) 抗体, 克隆号MI15, 通过流式细胞仪测定CD138<sup>+</sup>细胞的纯度。浆细胞表达κ (Kappa) 或λ (Lambda) 轻链, 也可以按照Ahmann及其团队的方法通过对细胞内κ和λ轻链染色来测定细胞纯度<sup>9</sup>。或者, 可以使用标志物如抗人CD38抗体, 克隆号HIT2和抗人CD45抗体, 克隆号HI30来检测CD38<sup>+</sup>CD45细胞<sup>10</sup>。

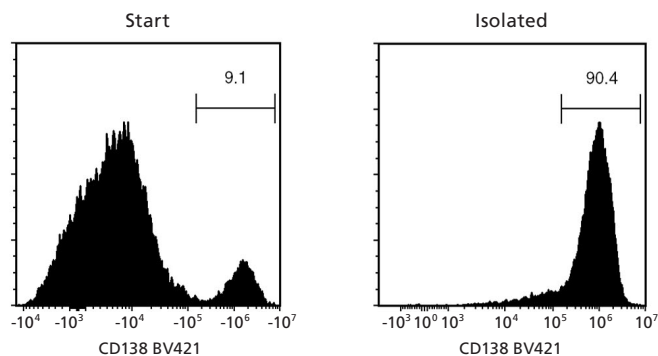


图2. EasySep™人全血和骨髓CD138正选试剂盒II (产品号 #17887)

起始样本为混入了多发性骨髓瘤细胞系U266的新鲜全血, 分选后细胞中CD138<sup>+</sup>细胞的内容通常为83.7%-98.3%。以上示例中, 起始样本和分选后的细胞的纯度分别为9.1%和90.4%。

\*注意: 流式分析前已通过裂解从起始样本中去除红细胞。对于CD138<sup>+</sup>起始含量小于10-15%的样本, 分选后的CD138<sup>+</sup>细胞的纯度有可能有所不同。

## 第4部分: 下游实验

富集后的浆细胞可立即用于下游实验和分析, 如FISH、基于微阵列的基因组谱分析和基因组测序。

# 产品列表

## 细胞分选产品

产品名称	产品描述	用于处理	产品号 #
EasySep™人CD138正选试剂盒II	通过免疫磁珠正选, 从新鲜或冻存的人骨髓或外周血单个核细胞(PBMCs) 富集CD138 <sup>+</sup> 细胞	2 x 10 <sup>9</sup> 个细胞	17877 17877RF
EasySep™人全血和骨髓CD138正选试剂盒II	通过免疫磁珠正选, 从新鲜骨髓或全血富集CD138 <sup>+</sup> 细胞	60 mL全血或骨髓	17887 17887RF
RosetteSep™人多发性骨髓瘤细胞富集抗体混合物	RosetteSep™人多发性骨髓瘤细胞富集抗体混合物	40 mL骨髓	15129
	5 x 15129	200 mL骨髓	15169

注意: RF试剂盒为包含RoboSep™缓冲液和过滤枪头的相应的EasySep™试剂盒。

## RoboSep™仪器

RoboSep™-S和RoboSep™-16能全自动地执行所有细胞标记和分选步骤, 最大化地减少样本处理的操作和技术人员的时间。操作很简单: 只需加载样本和试剂, 然后启动细胞分选程序即可。分离所得细胞可立即用于下游应用。欲了解详情, 请浏览[www.RoboSep.com](http://www.RoboSep.com)。



RoboSep™-S



RoboSep™-16

若想了解RoboSep™仪器是如何运行的, 请浏览[www.RoboSep.com](http://www.RoboSep.com)。

产品名称	产品号 #
RoboSep™-S	21000
RoboSep™-16	23000

## 用于流式细胞仪测定纯度的染色抗体

产品名称	产品号 #
抗人CD138 (Syndecan-1) 抗体, 克隆号MI15	60003
抗人CD38抗体, 克隆号HIT2	60014
抗人CD45抗体, 克隆号HI30	60018

## 参考文献

- Huff CA & Matsui W. (2008) Multiple myeloma cancer stem cells. *J Clin Oncol* 26(17): 2895–900.
- Zandeki M et al. (1996) Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol* 94(2): 217–27.
- Facon T et al. (2001) Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 97(6): 1566–71.
- Pugh TJ et al. (2018) Assessing genome-wide copy number aberrations and copy-neutral loss-of-heterozygosity as best practice: An evidence-based review from the Cancer Genomics Consortium working group for plasma cell disorders. *Cancer Genet* 228–229: 184–196.
- Kjeldsen E. (2016) Identification of Prognostically Relevant Chromosomal Abnormalities in Routine Diagnostics of Multiple Myeloma Using Genomic Profiling. *Cancer Genomics Proteomics* 13(2): 91–127.
- Berry NK et al. (2014) Genomic profiling of plasma cell disorders in a clinical setting: integration of microarray and FISH, after CD138 selection of bone marrow. *J Clin Pathol* 67(1): 66–9.
- Glaskova L et al. (2017) CD138 Enrichment Strategy and Results of Chromosome Genomic Array Testing (CGAT) for Multiple Myelomas. *Cancer Genet* 214: 43.
- Shetty S et al. (2012) Utility of a column-free cell sorting system for separation of plasma cells in multiple myeloma FISH testing in clinical laboratories. *Int J Hematol* 95(3): 274–81.
- Ahmann GJ et al. (1998) A novel three-color, clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet Cytogenet* 101(1): 7–11.
- Kumar S et al. (2010) Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 23(3): 433–51.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Multiple Myeloma [Online], Version 2.2020. [[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/recently\\_updated.aspx](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/recently_updated.aspx)] (accessed Oct 23, 2019)

版权所有© STEMCELL Technologies Inc. 2020. 保留一切权利, 包括图形和图像。STEMCELL Technologies及其设计及徽标, 以及Scientists Helping Scientists、EasySep、RoboSep和RosetteSep均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的注册商标。国家综合癌症网络、NCCN和NCCN指南是National Comprehensive Cancer Network, Inc.的注册商标。其他注册商标为各自持有人的产权。STEMCELL尽力确保STEMCELL及其供应商提供的信息正确无误, 对此类信息的准确性或完整性不作任何保证或声明。

STEMCELL TECHNOLOGIES INC. 的质量管理体系已经过ISO 13485医疗器械标准认证。产品仅供研究使用。除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。



微信ID: STEMCELLTech



STEMCELL Technologies China Co. Ltd.

电话: 400 885 9050 E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM 网站: WWW.STEMCELL.COM

文档号 #28731CN 版本 2.0.0 2020年04月