论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0640-04

巴斯德毕赤酵母基因组外源基因整合数的高通量定量分析

吴丽娟[1],蒋建新[1],朱佩芳[1],康格非[2] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,全军交通医学研究所,全军交通医学实验室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042;[2]重庆医科大学医学检验系,重庆 400046)

提 要:目的 探索一种巴斯德毕赤酵母表达体系外源基因整合数的高通量定量分析方法。**方法** 采用基因工程技术构建pPIC9K-HG质粒作为定量标准品,建立毕赤酵母基因组外源基因整合的高通量定量PCR分析方法,用灵敏度、特异性等对方法进行评价,将之初步用于hA20基因毕赤酵母转化子外源基因整合数的分析。同时对3种酵母基因组制备方法进行了比较。**结果** 方法灵敏度达10^3拷贝,线性范围在$10^4 \sim 10^9$,平均变异系数6.62%,特异性100%。14株hA20基因毕赤酵母转化子外源基因整合数分析显示,成功收获外源基因整合数为单拷贝、3拷贝、10拷贝、13拷贝、17拷贝、50拷贝的阳性转化子。酵母基因组制备经典法、煮沸法和酶法阳性率分别为85.71%、28.57%和85.71%,经χ^2检验证实,酶法与经典法相比提取酵母基因组的效率一致($P>0.05$);煮沸法与经典法相比提取酵母基因组的效率存在显著性差异($P<0.05$)。**结论** 成功建立了巴斯德毕赤酵母基因组外源基因整合数高通量定量分析方法,方法学评价指标满意,可广泛用于不同外源基因整合之阳性菌株的大批量分析。酶法制备酵母基因组具有可靠、简单、迅速等优点,适合大规模提取酵母基因组。

关键词:基因表达;异种基因;多聚酶链反应;基因整合

中图法分类号:R394-33;R394.3 **文献标识码**:A

High-throughput quantitative analysis for integration number of exogenous gene in *Pichia pastoris* genome

WU Li-juan[1], JIANG Jian-xin[1], ZHU Pei-fang[1], KANG Ge-fei[2] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, [2]Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400046, China)

Abstract: Objective Here we establish a high-troughput quantitative method for identifying the integration number of exogenous gene in *Pichia pastoris* genome. **Methods** pPIC9K-HG was constructed by genetic engineering. After sequencing, pPIC9K-HG was taken as the standard for quantitative analysis. A high-throughput method was set up for detecting the integration number of exogenous gene in *Pichia pastoris* genome and evaluated with methodological indexes such as sensitivity, specificity, *etc.* Copies of hA20 in integrants were analyzed. The three methods for isolating the yeast genome were compared. **Results** The sensitivity was 10^3 and the specificity was 100%. The linearity was between 10^4 and 10^9. The average of CV achieved 6.62%. The positive rate of the three methods (classics, boiled and enzymatic) was 85.71%, 28.57% and 85.71% respectively. There was no significant difference between the classics and the enzymatic by χ^2 test, but there was significant difference between the classics and the boiled. We obtained single copy, 3 copies, 10 copies, 13 copies, 17 copies and 50 copies positive strain with hA20. **Conclusion** A high-throughput quantitative method was successfully established to determinate the copy number of heterologous gene inserted in yeast genome. Methodological indexes suggested that it meet the whole analysis request. The enzymatic method to prepare yeast genome is effective, simple and rapid, and can prepare yeast genome on large scale.

Key words: genetic expression; exogenous gene; polymerase chain reaction; gene integration

基因表达是分子生物学研究及生物制药领域的重要内容之一,酵母表达系统是表达功能性哺乳动物蛋白的首选方案,外源基因在酵母基因组中的整合数的多少与表达水平以及稳定表达直接相关,因此外源基因整合数的鉴定是经验性选择表达菌株的前提,同时积累大量准确数据,也是回顾性评价、修正"经验性选择"的必需。实验室一般采用Southern杂交的方法进

基金项目:国家科技部创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金资助项目(2003)
Supported by the Open Funds for the State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury by Ministry of Science and Technology (2003)

作者简介:吴丽娟(1965-),女,四川省成都市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事临床分子生物学及临床免疫学方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68757272, E-mail: wulijuan1638@126.com

通讯作者:蒋建新,电话:(023)68757460, E-mail: jiangjx@cta.cq.cn

收稿日期:2005-03-09;**修回日期**:2005-09-08

行分析,费时费力,酵母基因组用量大,提取过程烦琐,费时费力,且花费高。适时 PCR(real-time PCR)虽然定量准确,但是扩增外源基因的长度受到限制(一般小于 200 bp),因此必须针对整合的各种需要表达的外源基因设计专门的 PCR 引物对和荧光色素双标记探针,对于科研而言,花费大与用量少的矛盾突出。

我们利用 pPIC9K 多克隆位点两端的测序引物 P1 和 P2,以自行构建的 pPIC9K-HG 质粒为定量标准品,结合数学演绎,通过反复实验摸索,建立一种基于普通 PCR 的巴斯德毕赤酵母基因组外源基因整合数高通量定量分析方法,克服了上述不足,初步应用收到了良好的效果。

1　材料与方法

1.1　主要材料与试剂

TOPO-HG、pPIC9K-hA20 质粒由本实验室构建,pPIC9K 由北京中科院侯云德院士、张志清老师惠赠,毕赤酵母菌株 GS115、大肠杆菌 JM109 为本室保存菌种;*Eco*R Ⅰ、DNA 连接试剂盒、DNA 分子量标准品、PCR 试剂盒等购于 TaKaRa 公司;G418、氨苄青霉素(AP)、质粒提取试剂盒购于 Promega 公司;Lyticse 购于 Sigma 公司;酵母基因组提取试剂盒、引物合成、基因测序由上海申能博彩公司完成。

1.2　标准品的制备

1.2.1　pPIC9K-HG 质粒构建　　用 *Eco*R Ⅰ消化 TOPO-HG 和 pPIC9K 做琼脂糖凝胶电泳,酚氯仿抽提法回收目的 DNA。将酶消化后回收的 pPIC9K 和 HG 按 DNA 连接试剂盒说明书进行连接,以连接产物直接转化大肠杆菌 JM109 感受态,接种 LB(AP^+)平板,35 ℃培养 24 h,挑平板上长出来的克隆接种 LB(AP^+)液体培养基,35 ℃震荡培养过夜。取菌液按质粒提取试剂盒说明书提取质粒,测 $D(260)/D(280)$ 比值和 DNA 浓度。用 *Eco*R Ⅰ做酶切反应,行琼脂糖凝胶电泳,凝胶呈像扫描仪扫描进行初步鉴定。

1.2.2　测序分析　　取 JM109/pPIC9K-HG 菌液 1 ml 外送测序验证。

1.2.3　PCR 标准品制备　　准确吸取 5.0 μl pPIC9K-HG 质粒 DNA 加入到 95 μl 的 10 μg/ml 酵母基因组水溶液(为酵母基因组提取试剂盒制备的巴斯德毕赤酵母 GS115 基因组)中,测加入前后 $D(260)/D(280)$,计算 pPIC9K-HG 质粒 DNA 浓度。重复 10 次,取平均值作为标准品的原液浓度。计算依据:1 mol $\approx 6.25\times10^{23}$ 个分子,1D (260) = 50 μg/ml,DNA(pmol) = [2 ×(以 pg 计的 DNA 的量)]/[650 ×(以 bp 计的 DNA 的长度)]。用一定量的 10 μg/ml 酵母基因组水溶液将标准品原液梯度稀释至 1×10^1、1×10^2、1×10^3、1×10^4、1×10^5、1×10^6、1×10^7、1×10^8、1×10^9、1×10^{10}、1×10^{12} 个/μl,小份分装后 -20 ℃保存。上述标准品相当于酵母基因组中有单拷贝 HG 基因整合。

1.3　方法学的建立

1.3.1　PCR　　按 50 μl 总体积预混 PCR 反应体系:5 U/μl TaKaRa *Taq* 0.25 μl ,10 × PCR Buffer (Mg^{2+} Free) 5.0 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 3.0 μl,25 mmol/L dNTPs 4.0 μl,20 μmol/L 引物 P1(5′-tac tat tgc cag cat tgc tgc-3′,21 bp)1.0 μl,20 μmol/L 引物 P2(5′-gca aat ggc att ctg aca tcc-3′, 21 bp)1.0 μl,ddH_2O 30.75 μl。混匀,9 μl/支分装,在标准管和待分析管中分别加入标准品、阳性克隆的酵母基因组 DNA 各 1.0 μl。热启动 94 ℃ 2 min;进入变性 94 ℃ 1 min、退火 55 ℃ 1 min,延伸 72 ℃ 1 min 的热循环,共重复扩增 30 次;最后 72 ℃继续延伸 4 min。准确取 2.0 μl 反应液,适当稀释后测 $D(260)/D(280)$ 和 $D(260)$,重复 3 次。

1.3.2　循环次数的确定　　选择 1×10^4、1×10^8、1×10^{12} 3 个浓度点标准品,每个浓度点设计循环次数分别为 0、5、10、15、20、25、30、40 和 50 的扩增管,且每个循环次数重复 3 管进行 PCR 扩增。

1.3.3　灵敏度线性试验　　选择 0、1×10^1、1×10^2、1×10^3、1×10^4、1×10^6、1×10^8、1×10^{10}、1×10^{12}、1×10^{13} 个/ μl 的浓度,每个浓度点重复 3 次进行 PCR 扩增。

1.3.4　重复性(变异系数)　　选择 1×10^6、1×10^8、1×10^{10} 个/μl 的 3 个浓度点(高中低),每个浓度点重复 10 次进行 PCR 扩增。

1.3.5　特异性试验　　用毕赤酵母菌株 GS115 和 KM71、大肠杆菌 JM109、DH5α、人单核细胞株 THP1 进行扩增。

1.4　样品模板 DNA 的制备

1.4.1　经典法[1]　　挑适量的毕赤酵母 pPIC9K-hA20 质粒阳性转化子于 3 ml YPD 中,28 ~ 30 ℃ 250 r/min 培养 1 ~ 2 d,离心并将菌体悬液 $D(600)$ 调至 0.5,取 1.5 ml 菌液用试剂盒提取全基因组 DNA,溶于 50 μl ddH_2O 中。具体操作方法参见试剂盒说明书。

1.4.2　煮沸法　　取 $D(600)$ = 0.5 的毕赤酵母 pPIC9K- hA20 质粒阳性转化子菌液 30 μl,煮沸 30 min,12 000 r/min 离心 1 min,小心将全部上清液转移到 1 只洁净的 1.5 ml 管中,加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc pH 5.2,2.5 倍体积的无水乙醇,-20 ℃ 2 h,12 000 r/min 离心 1 min,基因组 DNA 沉淀重悬于 10 μl灭菌水。

1.4.3　酶法[2]　　取 $D(600)$ = 0.5 的毕赤酵母 pPIC9K-hA20 质粒阳性转化子菌液 30 μl,12 000 r/min 离心 1 min,弃上清,加入 10 μl 灭菌水和 25 U 的 Lyticase,30 ℃保温 20 min,-80 ℃放 15 min,在旋涡器上震荡 30 s,12 000 r/min 离心 1 min,上清液为含酵母菌基因组 DNA 溶液。

1.5　应用研究

从 YPD-G418(3.0 mg/ml)筛选平板上挑取单个毕赤酵母 pPIC9K-hA20 阳性转化子接种 3 ml YPD 液体培养基, 28 ~ 30 ℃ 250 r/min 培养 1 d,离心收集菌体并用灭菌水将 $D(600)$ 调至 0.5,取菌液 30 μl,采用酶法提取酵母全基因组 DNA 进行分析。实验同时以 1×10^4、1×10^5、1×10^6、1×10^7 和 1×10^8 标准品做工作曲线。

应用研究时,当外源基因的长度与 HG 基因的长度(2 350 bp)相当或接近时,实际整合拷贝数计算依据:对于酵母菌,0.1 $D(600)$ 相当于 4×10^6 个菌细胞/ml ,因此 30 μl 0.5 $D(600)$ 的酵母菌液含有 6.0×10^5 个酵母菌细胞,将提取的酵母基因组 DNA 溶于 10 μl 水中,PCR 摸板用量 1.0 μl,相当于在每个 PCR 反应管中加入了 6.0×10^4 个酵母菌细胞。因此,实际整合拷贝数 = PCR 模板拷贝数/6×10^4。

当外源基因的长度与 HG 基因的长度相差悬殊时,实际整合拷贝数计算时需扣除基因长度对结果的影响,根据基因的质

量一定时，该基因的摩尔数与其长度成反比的原理，实际整合拷贝数计算公式为：

$$\text{实际整合拷贝数}=\frac{\text{标准品 DNA 片段长度(bp)}}{\text{整合基因片段长度(bp)}}\times\frac{\text{PCR 模板拷贝数}}{\text{模板提取之酵母菌数}}$$

这里，标准品 DNA 片段长度为 2 350 bp，模板提取之酵母菌数为 6×10^4，公式可简化为：

实际整合拷贝数 =0.04(PCR 模板拷贝数 ÷ 整合基因片段长度)

1.6 统计学处理

用 Microsoft Excel 软件进行平均数、标准差分析，做折线图或条图；实验数据的两两比较采用 t 检验；3 种方法提取毕赤酵母基因组 PCR 阳性率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 标准品制备

我们将 HG 基因从 TOPO-HG 质粒上切割下来，装入毕赤酵母表达质粒 pPIC9K 中，从 LB(AP^+)筛选平板上挑阳性克隆接种 LB(AP^+)液体培养基，增菌后提取质粒。如果是 JM109/pPIC9K-HG 菌株，质粒用 *Eco*R I消化后电泳可以得到 HG 基因条带(2 350 bp)。同时 pPIC9K-HG 测序证实 HG 基因无突变发生。

2.2 方法学试验

2.2.1 循环次数 我们选择了 1×10^4(低拷贝组)、1×10^8(中拷贝组)和 1×10^{12}(高拷贝组)3 个浓度点进行调查，PCR 产物曲线提示：模板用量分别为 1×10^4、1×10^8、1×10^{12} 时，循环次数分别在 23～40、15～33、12～20 范围内时 PCR 产物量随循环次数的增加而增加，两者基本上保持线性关系。外源基因在酵母基因组中的整合数可以达到几十，甚至上百个拷贝，推测单 PCR 管中待分析靶基因的总拷贝数在 10^5～10^7。为此，为了确保最高灵敏度，PCR 定量分析靶基因在毕赤酵母基因组中的整合时，循环次数宜在 28～30 次。

2.2.2 灵敏度线性试验 在确定了 PCR 循环次数的基础上，我们对 PCR 的灵敏度和线性范围进行了调查。阴性对照、模板 DNA 用量为 1×10^1、1×10^2、1×10^3、1×10^4、1×10^6、1×10^8、1×10^{10}、1×10^{12}、1×10^{13} 拷贝的试验组，经过 30 次循环的 PCR 扩增后 DNA 浓度依次为(83±15)、(106±12)、(113±21)、(217±21)、(380±44)、(526±68)、(837±45)、(967±38)、(973±49)、(1 000±40) ng/μl。将试验组各组数据与对照组进行比较，发现 1×10^1 和 1×10^2 组与对照组比较无显著性差异($P>0.05$)；1×10^3 及以上组与对照组比较，说明具有极显著性差异($P<0.01$)。结果表明：模板中含有 1 000 个拷贝的外源基因时上述 PCR 扩增可以得到阳性信号，该灵敏度足以对毕赤酵母基因组中整合的单拷贝外源基因进行诊断。

实验组两两比较，t 检验发现 1×10^3～1×10^8 组之间差异显著($P<0.01$)，1×10^{10} 与 1×10^8 组比较有显著性差异($P<0.05$)，1×10^{12} 和 1×10^{13} 与 1×10^{10} 组比较无显著性差异($P>0.05$)。结果提示：该 PCR 方法可以对模板中 1×10^3～1×10^{10} 拷贝的外源基因进行定量分析，满足毕赤酵母基因组外源基因整合数分析的要求。

2.2.3 重复性试验 第 1 组为低拷贝组，模板 DNA 用量 1×10^6 拷贝，PCR 扩增产物达(423±37) ng/μl，变异系数 CV=8.67%；第 2 组为中拷贝组，模板 DNA 用量为 1×10^8 拷贝，PCR 扩增产物达(850±52) ng/μl，变异系数 CV=6.13%；第 3 组为高拷贝组，模板 DNA 用量 1×10^{10}，PCR 扩增产物达(972±49) ng/μl，变异系数 CV=5.06%。方法的平均变异系数 6.62%，重复性满足需要。

2.2.4 特异性试验 用毕赤酵母菌株 GS115 和 KM71、大肠杆菌 JM109、DH5α、细胞株 THP1 提取的 DNA 进行扩增，结果全部阴性，提示方法特异性 100%。

2.3 毕赤酵母基因组提取方法比较

我们用经典法、煮沸法和酶法对同一批筛选得到的 14 株可能整合有人锌指蛋白 A20(human zinc finger protein A20，hA20)基因的毕赤酵母 GS115 菌株进行了外源基因分析，结果经典法阳性 12 株(阳性率 85.71%)，阴性 2 株。经典法阳性的 12 株菌，煮沸法阳性 4 株(28.57%)，酶法全部阳性(阳性率 85.71%)；经典法阴性的 2 株菌，煮沸法和酶法全部阴性。煮沸法与经典法相比，毕赤酵母基因组的效率有显著性差异($\chi^2=4.67$，$P<0.05$)；酶法与经典法相比，毕赤酵母基因组的效率没有显著性差异($P>0.05$)。因此，我们推荐提取酵母基因组使用酶法，该法提取酵母基因组的效率与经典法一致，但方法简便、快速，特别适合大规模酵母基因组的提取。

2.4 初步应用研究

利用上述分析方法我们对 hA20 毕赤酵母表达菌株整合 hA20 基因的情况进行了分析。以 PCR 产物的浓度查工作曲线，菌株 1、2、3、6、7、11、12、13 的 PCR 模板数分别为 8×10^5、1×10^6、1×10^6、3×10^6、5×10^5、2×10^5、1×10^5 和 6×10^4，因此，根据公式计算，整合拷贝数分别为 13、17、17、50、10、3、3 和 1。

3 讨论

利用巴斯德毕赤酵母表达外源基因一般包括以下步骤[3,4]：①将外源基因插入毕赤酵母表达载体；②用内切酶处理线性化的重组质粒转化巴斯德毕赤酵母菌株；③将转化物接种 HIS^4 营养缺陷平板进行阳性重组子的首轮筛选；④用 G418 梯度平板进行阳性重组子的第 2 轮筛选；⑤进一步确定外源基因在酵母基因组中的整合情况；⑥小规模诱导培养鉴定外源基因的表达；⑦大规模诱导培养制备重组蛋白。其中外源基因在酵母基因组中整合情况的鉴定一直是上述工艺流程中的一个关键环节。对于外源基因在毕赤酵母基因组中的整合，人们追求的是高拷贝整合子，以期得到高水平的表达。但是，并不是整合的拷贝数越多越好，因为外源基因对于毕赤酵母本身而言毕竟是异源性质，过高拷贝数的阳性整合子往往不稳定，容易丢失外源基因。另外，外源基因表达水平越高对毕赤酵母自身的毒性也越大，表达水平反而下降，甚至在后续研究中发生菌株死亡。因此，存在筛选外源基因最佳整合数阳性整合子的问题，其标准是确保获得稳定高效表达菌株。不同的外源基因特点不同，他们在毕赤酵母基因组中的最佳整合数范围各不相同，对于每一种具体的目的基因而言，其最佳整合拷贝数必须从实践积累中获得。考虑到传统 PCR 法具有扩增效力宽、模板基因组用量少、快速、操作步骤简单等优点，我们在传统

PCR方法的基础上，研制了外源基因在毕赤酵母基因组中整合数的通用定量分析试剂，采用该套试剂可以一次试验同时对80余株不同外源基因整合进行扩增分析，简化了实验操作，节省了时间，并且达到了高通量和定量的目标，值得同行借鉴。

PCR定量分析的关键是制备扩增效力与待分析样品一致的PCR标准品，要求标准品与待分析样品的背景应尽可能一致。本研究中，我们以巴斯德毕赤酵母GS115菌株制备酵母基因组水溶液，以此做为标准品模板DNA(pPIC9K-HG质粒)的溶媒，保证了标准管与待测管基因背景的一致性，从而确保了它们拥有相同的扩增效力，使以此为依据的定量成为可能。

参考文献：

[1] BURDYCHOVA R, RUZICKA V, BARTOS M. PCR-based method for identification of integration events in the Pichia pastoris genome[J]. Biotechinques, 2002, 33(6): 1214-1218.
[2] 李克勤，李春海，颜春洪. 人组织型基质金属蛋白酶抑制剂-1在Pichia pastoris酵母中重组表达研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(2): 160-164.
[3] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris[J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(45): 45-66.
[4] 熊 盛，任向荣，唐永红，等. 人源抗HBsAg单链抗体在巴氏毕赤酵母中的表达[J]. 生物工程学报, 2003, 19(1): 19-23.

(编辑 王 红)

文章编号：1000-5404(2006)07-0643-01

个案与短篇

急慢性特发性血小板减少性紫癜TPO水平的调控及对抗核抗体的观察

罗晓菊，宪 莹，王莉佳 (重庆医科大学儿童医院免疫研究室，重庆 400014)

特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)是一种由于血小板破坏增多而引起的常见出血性疾病。临床特征主要是皮肤黏膜自发性出血，严重者出现颅内出血而危及生命。血小板生成素(thrombopoietin, TPO)是一种作用于巨核细胞，血小板系统的造血调控因子。儿童急慢性ITP时，TPO水平如何变化及调控？抗核抗体(anti-nuclear antiboby, ANA)阳性率如何？现分析如下。

1 材料与方法

1.1 对象

ITP组为2003年我院血液科收治的住院患儿，共有64例，其中急性54例，慢性10例。54例急性ITP中，男性37例，女性17例，平均年龄3岁10个月；10例慢性ITP中，男性7例，女性3例，平均年龄7岁1个月。正常对照组20例，来自健康儿童血清。

1.2 方法

1.2.1 试剂及方法 患儿住院后未经治疗立即抽血及骨髓穿刺。血小板计数采用全自动血细胞分析仪。血清TPO测定：采用ELISA一次性检测。抗核抗体(ANA)采用金标免疫斑点法进行定性检测。

1.2.2 ITP分型标准 急性ITP(AITP)：病程≤6个月，出血一般较重，PLT $<20\times10^9$/L；慢性ITP(CITP)：病程>6个月，出血一般较轻，PLT $(30\sim50)\times10^9$/L。治疗方案主要采用激素或激素+IVIG(静脉注射丙种球蛋白)。

1.3 统计学方法

数据以 $x\pm s$ 表示，采用SPSS10.5统计软件包进行 t 检验。

2 结果

2.1 急慢性ITP患儿PLT、巨核细胞及TPO检测结果

急慢性ITP患儿PLT较正常对照显著下降，巨核细胞较正常对照显著升高($P<0.05$)(表1)。

表1 急慢性ITP儿童PLT、巨核细胞、TPO水平比较($x\pm s$)

组别	例数	PLT(10^9/L)	巨核细胞(个/片)	TPO(pg/ml)
正常对照组	20	187.65±64.71	56.35±20.19	202.66±74.93
AITP	54	16.13±10.42[a]	271.33±225.36[a]	220.85±131.86
CITP	10	19.30±12.03[a]	255.80±238.77[a]	165.35±86.57

a: $P<0.05$，与对照组比较

2.2 急慢性ITP患儿ANA阳性率检测结果

正常对照组20例ANA均阴性，AITP组ANA阳性17例；CITP组ANA阳性4例。AITP、CITP组ANA阳性率与正常对照组比较差异显著($P<0.05$)。

2.3 33例急慢性ITP患儿治疗前后PLT、TPO水平

33例急慢性ITP患儿治疗后PLT较治疗前显著升高($P<0.05$)(表2)。

表2 急慢性ITP患儿治疗前后PLT、TPO水平比较($x\pm s$)

组别	例数	PLT(10^9/L)	TPO(pg/ml)
治疗前	33	13.82±8.64	209.68±132.37
治疗后	33	199.24±111.25[a]	164.70±134.17

a: $P<0.05$，与治疗前比较

作者简介：罗晓菊(1965-)，女，重庆市潼南县人，主管技师，主要从事小儿临床免疫学方面的研究，发表论文6篇。电话：(023)63632756-3415

收稿日期：2005-10-13；修回日期：2006-01-18

(下转647页)