DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.019
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
1416 2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)12-1416-04

应用AFLP法检测小鼠高、低转移性肝癌细胞株基因组的遗传差异

梁智勇[1],史景泉[1],魏 泓[2],吴丰春[2],张树辉[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院病理学研究所;[2]实验动物中心,重庆 400038)

提 要:目的 应用AFLP技术检测小鼠高、低转移性肝癌细胞株基因组的遗传改变,以期发现与肿瘤转移相关的DNA片段或基因。方法 肿瘤组织基因组DNA经限制性内切酶酶切,连接特异性接头,采用25对与接头相识别的引物进行扩增,扩增产物经含溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外透视仪分析、照相,回收差异片段,克隆测序。结果 25对引物均扩增出清晰条带,21对引物扩增结果显示高低转移性肝癌无差异,4对引物扩增结果显示二者之间有差异,表现为扩增带的有无,4条回收片段中的1条片段克隆成功并测序。结论 AFLP技术适用于肿瘤易感基因的筛选,小鼠肝癌的转移可能与基因组不稳定性有关,所得差异片段是否与转移相关有待进一步鉴定。

关键词:肝癌;AFLP;基因组
中图法分类号:R394-33;R394.2;R735.7 文献标识码:A

Application of amplified fragment length polymorphism on detecting genomic alteration of high and low metastatic murine hepatocarcinoma

LIANG Zhi-yong, SHI Jing-quan, WEI Hong, WU Feng-chun, ZHANG Shu-hui (Department of Pathology, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract: **Objective** To detect the genetic genomic variant in high and low metastatic murine hepatocarcinoma cell lines for finding special DNA or gene fragment. **Method** Genomic DNAs from tumor tissue were digested by restriction endonuclease, ligated with specific adapter, and amplified by using 25 pairs of primers, PCR products were electrophoretically separated in agarose gel and banding profiles were visualized by ethidium bromide staining, differential bands collected were cloned into pUCm-T vector and squenced. **Results** 21 of the 25 pairs of primers produced amplification products were monomorphic and the remaining revealed changes when compared AFLP profiles of two cell lines. 4 differential DNA bands were collected and 1 band were successfully cloned and squenced. **Conclusion** AFLP method may be a better technique for finding difference in tumor genome, metastatic ability of murine hepatocarcinoma may be associated with genetic genomic instability, the value of the differential band deserved for further studying.

Key words: hepatocarcinoma; AFLP; genome

肿瘤正日益严重地威胁着人类的健康,尤其是恶性肿瘤对人类健康的威胁极大,尽管已对其进行了大量的研究,但其发病机制至今尚未完全阐明。近年来,分子生物学技术的发展极大地推动了肿瘤的研究,特别是人类基因组草图的提前完成,使研究者们把重点转向与疾病相关基因的研究,肿瘤易感基因的研究更成为热点方向。小鼠肿瘤基因组与人类基因组大小相同,二者有许多可比性,在小鼠中找到肿瘤相关基因后,可以通过搜寻基因库在人类基因组中找到与其同源的基因或表达序列标签(Expressed sequence tag, EST)。扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术是1993年由荷兰Keygene公司的科学家Zabeau Mare和Vos Pieter[1]发明创建的一种DNA分子标记技术,将RFLP的可靠性与PCR技术的快捷方便结合起来,重复性好,结果可靠,不需要了解样本基因组序列即可对其进行检测,是较为理想的一种检测基因组差异的方法,在动植物育种、遗传多样性的研究、品系分析、构建遗传图谱等方面应用广泛,但目前在肿瘤研究中的应用还很少。本研究旨在应用AFLP技术检测小鼠高、低转移性肝癌细胞株基因组的遗传改变,以期发现与肿瘤转移相关的DNA片段或基因。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠高、低转移性肝癌细胞株Hca/16A3-F、Hca/A2-P为大连医科大学病理学教研室凌茂英教授惠赠,BALB/c-nu-nu裸鼠,SPF级,6周龄,体重16~20 kg,由第三军医大学实验动物中心提供。

PCR扩增产物回收试剂盒、质粒小量制备试剂盒、pUCm-T质粒载体、X-gal、IPTG为上海生物工程公司产品。T4 DNA连接酶、TaqI内切酶、PstI内切酶为Promega公司产品。

接头与引物均由上海植物生理研究所BECKMAN生物技术示范实验室合成。PstI接头序列为5′-GACGTGACGGCCGT-CATGCA-3′, 3′-GCACTGCCGGCAGT-5′;TaqI接头序列为5′-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600079, 39900173);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(96M083);重庆市攻关项目
作者简介:梁智勇(1966—),男,四川省岳池县人,博士,主治医师,讲师,主要从事肿瘤病理学方面的研究。电话:(023)68754494
收稿日期:2001-07-17;修回日期:2001-11-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

GACGATGAGTCCTGAG-3′, 3′-TACTCAGGACTCGC-5′。根据接头序列设计 AFLP 引物, 一对预扩增引物 3′端有一个延伸碱基, 选择性扩增引物表现为 3′端 3 个碱基的差异, 本研究共使用 25 对选择性引物, 见表 1。

表 1　引物序列

Tab 1　The sequence of primers

Primers	Sequence
Preamplification primers	
P0	GACGGCCGTCATGCAGa
T0	GATGAGTCCTGAGCGAa
Selected amplification primers	
P1	GACGGCCGTCATGCAGagc
P2	GACGGCCGTCATGCAGatg
P3	GACGGCCGTCATGCAGact
P4	GACGGCCGTCATGCAGaac
P5	GACGGCCGTCATGCAGatt
T1	GATGAGTCCTGAGCGAacg
T2	GATGAGTCCTGAGCGAatg
T3	GATGAGTCCTGAGCGAaga
T4	GATGAGTCCTGAGCGAagc
T5	GATGAGTCCTGAGCGAatc

P: PstI, T: TaqI

1.2　方法

1.2.1　细胞培养及接种　　高、低转移性肝癌细胞株分别培养于 1640 培养基(含 10%小牛血清), 置于含 5% CO_2 的 37℃孵箱内, 稳定传代 3~4 代, 于对数生长期取约 5×10^7 瘤细胞分别接种于 4 只 BALB/c-nu, nu 裸鼠皮下, 2 只小鼠作为空白对照, 小鼠饲养 1 周。

1.2.2　模板制备　　①取新鲜肿瘤组织 500 mg, 应用 Tripure 法[1,2]提取 RNA。②应用 RT-PCR 法合成 cDNA: 取 RNA 18 μl、寡聚核苷酸引物(Oligo-DT) 2 μl, 65 ℃, 10 min。加 DEPC 处理水 5.5 μl, 5× buffer 8 μl, RNA 酶抑制剂(Rnasin) 0.5 μl, 2 mmol/L dNTP 4 μl, 逆转录酶(AMV) 2 μl, 42 ℃, 60 min。99 ℃, 5 min。取出反应管, 冰上冷却即得到 cDNA。③酶切: 合成的 cDNA 经 *Pst*I 及 *Taq*I 两种限制性内切酶消化。反应体系为 20 μl, 包括 10× buffer 2 μl, cDNA 约 200 ng, *Taq*I 内切酶 5 单位, 加去离子水至 20 μl, 65 ℃反应 2 h, 加 *Pst*I 内切酶 5 单位, 37 ℃反应 2 h, 70 ℃ 10 min, 4 ℃保存。④连接: 酶切产物与接头在 T4 DNA 连接酶作用下连接。反应体系为 20 μl, 包括 10× buffer 2 μl, 酶切产物 5 μl, T4 DNA 连接酶 5 单位, *Taq*I 接头 5 pmol, *Pst*I 接头 2 pmol, 加去离子水 20 μl, 22℃反应 2 h, 70℃10 min, 4℃保存。

1.2.3　预扩增　　25 μl 反应体系中含 10× buffer 2.5 μl, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, *Pst*I 预扩增引物 5 pmol, *Taq*I 预扩增引物 5 pmol, 连接产物 1 μl, *Taq*DNA 聚合酶酶 1 单位, dNTP 200 μmol/L, 反应条件为 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min 30 s, 20 个循环后 72 ℃ 10 min。预扩增产物稀释 100 倍, 4 ℃保存备用。

1.2.4　选择性扩增　　25 μl 反应体系中含 10× buffer 2.5 μl, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, *Pst*I 引物 5 pmol, *Taq*I 引物 5 pmol, 预扩增稀释产物 1 μl, *Taq*DNA 聚合酶 1 单位, dNTP 200 μmol/L, 反应条件为 94 ℃ 30 s, 65 ℃ 30 s(每循环递减 0.7 ℃), 72 ℃ 1 min, 13 个循环后接 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 23 个循环。72 ℃ 10 min, 4 ℃保存备用。

1.2.5　电泳分析　　扩增产物经含溴乙锭的 1.5%的琼脂糖凝胶电泳证实是否有产物。应用凝胶测序系统(50 cm× 38 cm 玻板)进行 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 照相。

1.2.6　从聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA 片段　　本实验采用银染法显示凝胶电泳结果, 由于 Ag^+ 离子与 DNA 结合后对 DNA 结构造成很大程度的破坏, 因此不宜直接从银染凝胶中回收 DNA 片段。我们参照文献[2]略作改进。

经证实有差异的样本重新点样, 分两部分点样。其中一半凝胶点样为其它样本, 凝胶靠中间位置点样为有差异的两个样本, 然后连续点样均为存在差异片段的那个样本(5~10 个点样孔)。电泳结束后用银染法染色, 只染一半凝胶, 连续点样的部分不染色。这样可以在同一块凝胶上, 根据存在差异的两个样本确定差异片段的位置, 仔细定位未染色部分, 用手术刀片切下含差异片段的凝胶条, 切碎后放入 1.5 ml 离心管中。连续点样可以确保有一部分样本不被染色, 并且通过多个样本回收, 回收量较多。

1.2.7　回收片段的再扩增　　回收的片段经琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳证实为目的片段后, 再用原来的相应引物扩增, 扩增条件不变。再扩增产物均可以通过琼脂糖凝胶电泳验证。应用 PCR 产物回收试剂盒纯化后进行克隆。以回收片段做探针与基因组 DNA 进行 Southem Blot 杂交。

1.2.8　回收片段的克隆与鉴定　　我们采用 pUCm-T 载体, 根据载体的 T 末端与 PCR 扩增片段 A 尾互补原则进行连接, 即 A-T 突出末端克隆技术[3]。连接反应按载体说明书进行, 10 μl 反应体系中包括载体 1 μl, 外源 DNA 片段 3 μl(约 200 ng), 10× 连接 buffer 1 μl, T4 DNA 连接酶(3U/μl) 1 μl, 加去离子水至 10 μl, 16 ℃ 16~22 h。参照文献[2]进行大肠杆菌感受态细胞的制备和转化。

1.2.9　克隆片段测序分析　　将含目的片段的重组质粒用全自动测序仪测序, 所得序列经 BLAST 在 Genebank 数据库中查找同源序列。

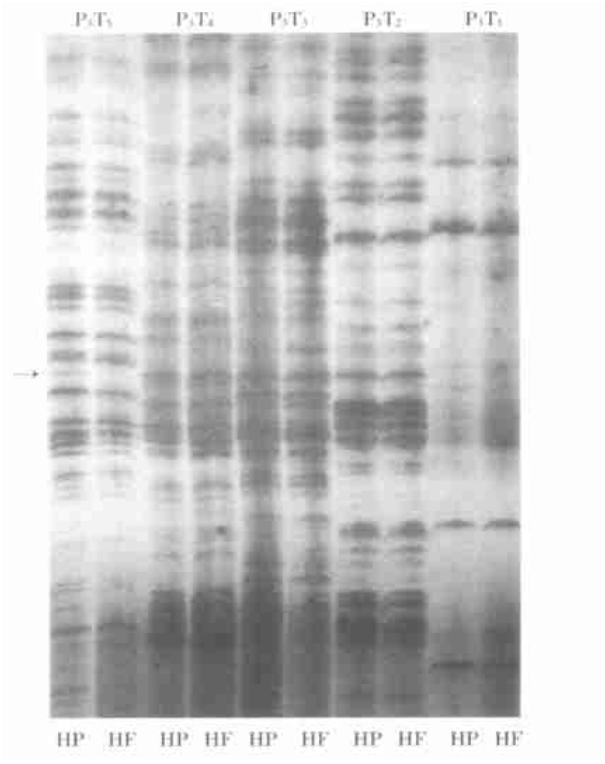
2　结果

25 对引物经扩增后电泳均可见清晰条带, 高低转移性肝癌经 21 对引物扩增无差异, 4 对引物扩增结果有差异, 表现为带的有无, 见图 1, 差异片段经回收纯化后再扩增得到目的片段, 回收差异片段作为探针与基因组 DNA 杂交, 结果显示差异片段来自基因组内。一条差异片段回收后克隆成功并通过测序得到序列(序列如下)。经 BLAST 同源性分析未找到同源序列。

CGAAGGCCAGTGCCAAGCTTGCTGCCTGCAGGTCGTTTACCTTACGG
AATCGGTACGGATACCGCGAAAGAGCAGATTTATAACCGCTTCACAC
TGACGCCGGAAGGGGATGAACCGCTTCCCGGTGCCGTTCACTTCCCG
AATAACCCGGATATTTTTGATCTGACCGAAGCGCAGCAGCTGACTGC
TGAAGAGCAGGTCGAAAAATGGGTGGATGGCAGGAAAAAAATACTGT
GGGACAGCAAAAAGCGACGCAATGAGGCACTCGACTGCTTCGTTTAT
GCGCTGGCGGCGCTGCGCATCAGTATTTCCCGCTGGCAGCTGGATCT
CAGTGCGCTGCTGGACTCTAGAGGATCGCTGCCAGCGAGCGCTGGAG
CTCGAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGGAAATGTTT

经重复实验, 结果完全一致, 表明 AFLP 重复性好, 结果可靠。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



HF: Hca/16A3— F; HP: Hca/A2— P; P3T1、P3T1、P3T2、P3T3、P3T4 and P3T5 repkesentating primer pairs composed of selective amplified primers P3 and T1、T2、T3、T4、T5 respectively

图 1 双酶切引物 **P3T5** 扩增结果显示 **Hca/16A3-F** 比 **Hca/A2-P** 少一条带(→)

Fig 1 Result of double enzyme primer P3T5 amplification shows the bands of Hca/16A3-F one band less than those of Hca/A2- p(→)

3 讨论

肿瘤易感基因的实质是一段特异的 DNA 片段,由于大多数肿瘤是多种基因改变累积所致,尤其是恶性肿瘤从发生到浸润转移经历多个阶段,每个阶段可能都有相关基因的改变,因此其易感基因可能不止一段 DNA 片段。随着分子生物学技术的不断发展,已建立了多种差异基因的检测和分离方法[4,5],如 cDNA(mRNA)差异显示技术,快速消减杂交技术等,但目前尚没有一种完全理想的方法。差异显示技术常得到一些非编码序列,影响检测结果的准确性,消减杂交技术只显示相比较的两个基因组中一个基因组内的差异表达或缺失,获得的信息不够完全[4,5]。也有研究者应用 RAPD 技术在多种肿瘤中筛选差异 DNA 片段,并进一步克隆鉴定,找到一些与肿瘤发生相关的 DNA 片段或基因[6],但由于 RAPD 引物碱基数少、退火温度低的影响,容易形成误配,使获得差异片段的可靠性相对差一些。而 AFLP 技术具有准确性高、重复性好的特点,是检测差异 DNA 片段或基因的一种新的比较可靠方法。AFLP 技术自从创建以来,经过不断改进,已逐渐完善,其模板制备可以用双酶切法或单酶切法,也有用 3 种酶切的报道;结果标记有同位素、银染及荧光标记;结果分析可以经琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳及荧光自动测序仪分析[7~9]。AFLP 引物的 GC 含量丰富(60%以上),其退火温度高,这样极大地降低了碱基的误配率,保证了扩增结果的稳定可靠。AFLP 技术酶切产生的大量片段是随机的,这些随机片段是与特定的接头连接后制备成模板,引物是根据与接头互补的原则设计的,通过引物 3′端碱基变化获取多态性信息,不受被检样本基因组限制,并且 AFLP 技术结合了以往技术的优点,快捷方便,重复性及稳定性好,不受环境影响,因此 AFLP 技术适合于所有生物基因组的检测[1,7]。应用 AFLP 技术可以对肿瘤整个基因组进行扫描检测,通过引物 3′端 1~3 个碱基变换扩增出大量 DNA 片段,形成复杂的 DNA 指纹,易于检出基因组细微的差异,故 AFLP 技术适合于肿瘤易感基因的筛选。

经典的 AFLP 技术主要是对基因组 DNA 进行检测,扩增片段中可能包括一些非编码序列,本实验采用的 cDNA-AFLP 技术针对 cDNA 进行检测[1,7],得到的是编码序列,对于某些目的基因的筛选可以节省大量时间。以往对 cDNA 的检测常采用差异显示法(Differential display),由于引物和 PCR 条件的限制,常常将 3′端非编码区扩增出来,很难确定序列的准确信息,cDNA-AFLP 法尽管复杂一些,但其严格的扩增条件可以保障获得编码区序列的准确信息,因此更为可靠[9,10]。对于来源于同一细胞株、遗传背景相似的两个亚克隆细胞株,双酶切 AFLP 法通过对整个基因组扫描能检测到其细微的差异,因此双酶切 cDNA-AFLP 技术可作为筛选肿瘤转移相关基因的有力工具。cDNA-AFLP 法在动植物研究领域应用广泛,在肿瘤研究中也有报道,表明 cDNA-AFLP 技术在肿瘤研究中的可行性。

肿瘤的浸润和转移是个多步骤的复杂过程,这期间发生了一系列变化,包括瘤细胞脱离原发灶、与细胞外基质相互作用、进入血管、淋巴管以及在靶器官内种植生长、形成转移瘤等步骤,以往研究表明,多种基因改变参与肿瘤的转移过程[10,11],如细胞间缝隙连接蛋白基因、细胞粘附分子以及一些转移抑制基因,虽然有关研究很多,但至今仍未找到肿瘤转移的特异性生物学标志,寻找肿瘤转移的相关基因一直是研究者们关注的重点。

张树辉等[12]对小鼠高、低转移性肝癌 Hca/16A3-F、Hca/A2-P 的微卫星不稳定性进行了检测,其结果表明二者存在差异,认为微卫星不稳定性与肝癌转移有关。我们应用 AFLP 法对 Hca/16A3-F、Hca/A2-P 进行检测,4 对双酶切 cDNA-AFLP 引物扩增结果显示二者存在差异,共检测到 4 条差异片段。当然,引物数量及内切酶的不同也可能对检测结果造成影响。Fukuda 等[13]应用 cDNA-AFLP 法对克隆出与大鼠骨肉瘤转移相关的 4 种基因,Majima 等[14]应用 cDNA-AFLP 技术克隆出与大鼠肾癌发生相关的一种新基因——Niban 基因。本实验对应用双酶切 AFLP 检测到的 4 条片段进

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

一步克隆分析。

差异片段的成功回收是对其进行分析鉴定的关键, 从聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA 片段是一项比较困难的工作, 常用的方法主要是对经过溴乙锭染色或放射性标记显影后的凝胶进行回收, 因为银离子对 DNA 结构的破坏严重, 一般不从银染凝胶中回收 DNA 片段[2]。我们通过实践建立了一种简便的半玻板凝胶染色法, 使银染凝胶 DNA 片段的回收成为可能。半玻板凝胶染色使待回收片段不受银离子破坏, 并且连续点样使对回收片段的定位准确, 应用这一方法我们成功地回收了 4 条片段。由于从聚丙烯酰胺凝胶回收的产物量常很低, 需要进行 PCR 再扩增才能进一步应用, 我们将回收的 4 条片段再扩增, 均得到与目的片段大小一致的产物。

本实验对回收的 4 条片段进行克隆, 经筛选、鉴定证实有 1 条回收片段克隆成功, 我们对其进行了测序。通过 GenBank 用 BLAST 搜寻均未见同源性信息, 我们目前还不能明确这条片段的价值, 有可能是新的基因序列, 但还需要进一步验证才能明确。

参考文献:

[1] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al*. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4 407—4 414.

[2] 金冬雁, 黎孟枫 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 45—60, 325—333.

[3] 肖翠英, 张思仲. PCR 产物的克隆方法[J]. 中华医学遗传学杂志, 1997, 14(3): 161—165.

[4] 况少青, 张宇舟, 陈　竺. 基因组扫描-遗传病相关基因定位的有利工具[J]. 中华医学遗传学杂志, 1997, 14(2): 99—103.

[5] 赵　勇, 丁金凤. 寻找差异基因[J]. 国外医学: 遗传学分册, 2000, 23(2): 76—80.

[6] De Juan C, Iniesta P, Cruces J, *et al*. DNA amplification on chromosome 6p12 in non small cell lung cancer detected by arbitarily primed polymerase chain reaction[J]. Int J Cancer, 1999, 84(4): 344—349.

[7] Savelkoul P H M, Aarts H J M, Hass J D, *et al*. Amplifedi fragment length polymorphism analysis: the State of an Art[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(10): 3 083—3 091.

[8] Lindstedta B, Heira E, Vardunda T, *et al*. A variation of the amplified-fragment length polymorphism(AFLP) technique using three restriction endonucleases and assessment of the enzyme combination BglII-MfeI for AFLP analysis of *Salmonella enterica subsp. Enterica isolates*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 189(1): 19—24.

[9] 万春玲, 朱玉芳, 谭远德. AFLP 标记在研究家蚕遗传多态性方面的应用[J]. 生物技术, 1999, 9(5): 4—9.

[10] Allan B, Curtis C H. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(3): 371—377.

[11] Yamasaki H, Omori Y, Zaidan-Dagli M L, *et al*. Genetic and epigenetic changes of intercellular communication genes during multistage[J]. Cancer Detect Prev, 1999, 23(4): 273—279.

[12] 张树辉, 史景泉, 魏　泓. 小鼠高低转移性肝癌微卫星不稳定性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 64—67.

[13] Fukuda T, Kido A, Kajino K, *et al*. Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas by a modified cDNA-AFLP method[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 261(1): 35—40.

[14] Majima S, Kajino K, Fukuda T, *et al*. A novel gene rising dbl quote, left (low) Niban" upregulated in renal carcinogenesis: cloning by the cDNA-amplified fragment length polymorphism approach[J]. Jpn J Cancer Res, 2000, 91(9): 869—874.

(编辑　薛国文)

(上接 1415 页)

3　讨论

PELA 具有无毒, 可降解的优点, 通过控制合成条件, PELA 微球可以制成不同粒径的微球, 从而在机体组织内具有不同的靶向性, 利用 PELA 包裹抗原物质可制备口服疫苗, 这种高分子具有抗酸作用, 微球口服后, 包裹物不受胃肠道消化酶及酸性的影响, 因此能够有效的运送抗原至粘膜部位, 由于 PELA 能够生物降解, 可以在粘膜局部保持抗原的缓慢释放, 保证抗原的长效全程刺激免疫系统, 而且实验还发现 PELA 抗原载体系统具有粘膜免疫佐剂效应。因此微球载体在疫苗免疫接种中呈现出广泛的应用前景。

本实验证明粒径在 6 μm 左右的 PELA 包裹物, 口服一周后, PELA 可在胃及肠道粘膜沉积下来, 具有良好的胃肠道靶向性。能够在 CT 下, 观察到明显的影像学改变, 说明局部肠道对微球具有较好的捕获作用。在国内外的类似的研究中, 多采用小型哺乳动物, 而本实验采用的小型猪, 其免疫系统和消化器官在解剖、组织、生理代谢等方面与人类极为相似的。通过对大型哺乳动物的研究, 尤其是粒径在 6 μm 左右的微粒胃肠道的靶向数据, 对聚合物的进一步人体实验具有一定的参考价值。在类似的研究中, 聚合物的示踪方法多采用荧光放射性标记法[4,5], 这种方法适用于局部、微观检测, 具有较高检出率等特点, 但是这种方法需要分批处死动物, 不利于动态观察结果。而本实验首创的造影剂示踪法, 能够从大体上动态观测聚合物的靶向作用, 并具有一定的灵敏度, 尤其它可活体观察的特点, 使该方法可能在 PELA 的缓释实验中, 对连续动态观察具有应用价值。

关键词: PELA; 靶向实验
中图法分类号: R914　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Eldridge J H, Stass J A, Meulbroek J A, *et al*. Biodegradable microspheres ad vaccine delivery system[J]. Mol Immunol, 1991, 28(3): 287.

[2] Lim D W, Park T G. Stereocomplex formation between enantiomeeric PLA-PEG-PLA triblock copolymers: characterization and use as protein-delivery mecroparticulate cariers[J]. J Polym Sci, 2000, 75(2): 1 615—1 623.

[3] Hans K, Kricheldorf H R, Boettcer D, *et al*. Ploylactones: 2 3 polymerization of racemic and meso D, L-lactide with various catalysts stereo-chemical aspects[J]. Ploymer, 1992, 33(3): 2 817—2 824.

[4] Eyles J E, Williamson E D, Alpar H O, *et al*. Immunological responses to nasal delivery of free and encapsulated tetanus toxoid: studies on the effect of vehicle volume[J]. Int J Pharm, 1999, 189(1): 75—9.

[5] 张文彬, 贾文祥, 刘　聪, 等. 口服霍乱微球疫苗的制备极其靶向分布[J]. 华西医科大学学报, 1999, 30(1): 31—33.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net