DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.016

成纤维蛋白单体并交叉连接形成网，从而形成血凝块。凝血酶原时间测定的关键是血浆凝集反应起点和终点的正确判定。

压电石英传感器对反应体系液体粘度、密度以及晶体表面质量负载的变化有高度的敏感性，具有ng级的质量检测能力，其振荡频率与液体粘度、密度以及晶体表面质量负载成负相关关系。在凝血反应启动后，检测池中反应溶液的粘度随着血浆的凝集，纤维蛋白的形成而不断加大，晶体表面质量负载也由于纤维蛋白的附着逐渐增加，导致晶体的振荡频率呈阶梯状快速下降。因此，晶体频率的变化规律如实地反映了血浆凝集的全过程，与溶液粘度对晶体频率的影响结果符合[7]。随着血浆凝集反应的进行，达到血浆凝集过程的终点时，溶液粘度虽不再变化，但附着在晶体表面的纤维蛋白随血块收缩离开晶体表面，导致晶体表面质量负载瞬间减小，晶体振荡频率快速上升；随后血凝块又快速沉积、附着在晶体表面，晶体质量负载快速增加，晶体振荡频率下降并迅速达到相对平稳状态，从理论上也符合石英晶体频率变化对质量效应的响应规律[8]。因此，应用压电石英晶体传感器测定血浆凝血酶原时间具有可靠的理论依据和实验基础[9]。综上所述，在血浆凝集反应过程中，晶体频率变化的规律为频率快速下降又瞬时上升，再缓慢降低达到平稳。石英晶体振荡频率的这种变化过程为血浆凝集反应起点和终点的判断提供了客观依据，晶体频率阶梯状下降的起点为血浆凝集反应的起点，随后晶体频率的快速上升变为下降的转折点即是血浆凝集反应的终点，计算两点之间的时间即为血浆凝血酶原时间。

本研究建立的压电石英晶体传感器检测血浆凝血酶原时间的方法，与目前采用的*STAGO*凝血分析仪检测结果符合，两种方法的相关系数为0.97，且压电石英晶体传感器操作简单，仪器成本低廉，是一种检测血浆凝血酶原时间敏感、快速、简单、成本低廉的新方法。具有广阔的应用前景和推广使用价值。

参考文献：

[1] 丛玉隆，王叔娟. 今日临床检验学[M]. 北京：中国科学技术出版社，1997. 180-183.
[2] 丛玉隆. 关于卫生部出凝血时间操作规程《通知》的理解[J]. 中华检验医学杂志，2001，24(3)：183-185.
[3] Pavey K D, Ali Z, Olliff C J, *et al*. Application of the quartz crystal microbalance to the monitoring of Staphylococcus epidermidis antigen-antibody agglutination[J]. Pharm Biomed Anal, 1999 20(1-2): 241-245.
[4] Zhou A, He D, Nie L H, *et al*. Determination of the binding parameters of drug to protein by equilibrium dialysis/piezoelectric quartz crystal sensor [J]. Anal Biochem, 2000, 282(1): 10-15.
[5] Nomura T, Okuhara M. Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids[J]. Anal Chim Acta, 1982, 142(2): 281-284.
[6] Kanazawa K K, Gordon J G. The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with a liquid[J]. Anal Chim Acta, 1985, 175(9): 99-105.
[7] Shigeru K, Naoki K. Detection of antistreptolysin O antibody: application of an initial rate method of latex piezoelectric immunoassay[J]. Anal Chem, 1992, 64(21): 2 483-2 487.
[8] Park I S, Kim W Y, Kim N. Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting Salmonella spp[J]. Biosens Bioelectron, 2000, 15(3-4): 167-172.
[9] 周铁安，谢乃贤，聂利华，等. 血液凝固过程压电响应机理研究及临床应用[J]. 湖南大学学报，1998，25(5)：34-37.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)01-0034-02

细胞同步化能显著提高逆转录病毒载体的转染效率

Synchroization of cells significantly improves transduction efficiency of retroviral vector

杨金亮[1]，黄晋生[2]，房殿春[1]，张海荣[2]（[1]第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心，重庆 400038；[2]海军总医院中心实验科，北京 100037）

本研究采用低温处理细胞，使之同步化，可以明显提高逆转录病毒载体的转染效率，现报告如下。

1 材料和方法

1.1 细胞株及培养

人胃癌细胞株SGC-7 901、逆转录病毒包装细胞PA317和NIH3T3细胞由本室冻存保种，前者培养于含10%小牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI 1640培养液中，后二者培养于DMEM培养液中，培养条件为37 ℃、5% CO_2和饱和湿度，每隔3~4 d消化传代1次。

1.2 逆转录病毒包装、收获和滴度测定

包含人B7-1基因全长cDNA的逆转录病毒载体pLXSN-B7由上海生化研究所的王顺友博士构建并惠赠。pLXSN-B7转染PA317细胞采用电穿孔法[1]，转染后48 h，用含G418 1 000 μg/ml的培养液筛选，2周后挑取单克隆细胞进行扩大培养，适时冻存保种。病毒上清收集、保存和滴度测定按文献[2]进行。

1.3 细胞同步化法[3]

采用低温处理法使细胞同步化，收集分裂期细胞。

1.4 逆转录病毒感染SGC-7 901细胞

取培养于6孔板上的对数生长期细胞（约60%汇合）和已同步化的分裂期细胞，弃尽培养液，加pLXSN-B7病毒上清2 ml

（下转38页）

作者简介：杨金亮（1967-），男，山西省平顺县人，博士，主治医师，主要从事消化道肿瘤的免疫和基因治疗研究，发表论文10余篇。电话：(023)65180109

收稿日期：2001-01-05；修回日期：2001-09-25

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

量检测方面具有一定的优势。

综合以上实验结果不难发现，hCG 压电石英晶体免疫传感器克服了酶免法（ELISA）、放射免疫分析法（RIA）和荧光免疫分析法（EIA）等免疫检测方法费时、成本高、标记及操作繁琐的缺点[7]，具有灵敏度高、检测速度快和在线检测等优点。因此，其应用前景广阔，适合用于 hCG 的快速定量检测，具有临床推广价值。

参考文献：

[1] 姚守拙. 压电生物传感[J]. 生命科学研究, 1998, 2(1): 1－5.

[2] Sauerbrey G Z. Verwendung von schwingquartzen zur wagung dunner schichten und zur mikrowagung[J]. Z Phys, 1959, 155(2): 206－222.

[3] Su X, Chew F T, Li S F. Self-assembled monolayer-based piezoelectric crystal immunosensor for the quantification of total human immunoglobulin E [J]. Anal Biochem, 1999, 273(1): 66－72.

[4] Susmel S, O'Sullivan C K, Guilbault G G. Human cytomegalovirus detection by a quartz crystal microbalance immunosensor[J]. Enzyme Microb Technol, 2000, 27(9): 639－645.

[5] Mao Y, Wei W, Zhang J, *et al*. Real-time monitoring of formaldehyde-induced DNA-lysozyme cross-linking with piezoelectric quartz crystal impedance analysis[J]. Analyst, 2001, 126(9): 1 568－1 572.

[6] Lu, H C, Chen H M, Lin, YS, *et al*. A reusable and specific protein A-coated piezoelectric biosensor for flow injection immunoassay[J]. Biotechnol Prog, 2000, 16(1): 116－124.

[7] Park I S, Kim N. Thiolated Salmonella antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric crystal[J]. Biosens Bioelectron, 1998, 13(10): 1 091－1 097.

[8] 陶其敏. 免疫学和免疫学检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 71－73.

[9] 叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 第 2 版. 南京: 东南大学出版, 1997. 135－136.

[10] 裴仁军, 胡继明, 胡 毅, 等. 蛋白 A 定向固定抗体的纤维蛋白压电免疫传感器的研究[J]. 高等学校化学学报, 1998, 19(3): 363－367.

[11] Babacan S, Pivarnik P, Letcher S, *et al*. Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application[J]. Biosens Bioelectron, 2000, 15(11-12): 615－621.

（编辑 王 红）

（上接 34 页）

及 polybrene 8 μg/ml 置 37 ℃培养 6 h（其间摇动培养板数次），然后换新培养液继续培养 48 h，使目的基因得到充分的表达。

1.5 B7-1 表达与鉴定

转染 48 h 后，弃尽培养液，多聚甲醛固定细胞，用免疫组化 ABC 法鉴定转基因细胞 B7-1 的表达情况（鼠抗人 B7-1 单抗由美国 Bristol-Myers Squibb 药物研究所的 Linsley 教授惠赠），并计数 5 个高倍镜视野下 B7-1 阳性细胞的百分率，取其平均值表示逆转录病毒的转染效率。

2 结果

2.1 pLXSN-B7 逆转录病毒包装和滴度测定

用电穿孔法将 pLXSN-B7 转入 PA317 包装细胞，经 G418 筛选，共获 12 个抗性细胞克隆，用感染 NIH3T3 细胞测其病毒上清最高滴度为 4.5× 10^5 CFU/ml 和 5× 10^5 CFU/ml，收集二者的混合病毒上清作为感染 SGC-7901 细胞用。

2.2 pLXSN-B7 逆转录病毒感染 SGC-7901 细胞及其 B7-1 表达

pLXSN-B7 病毒上清感染 SGC-7 901 细胞 48 h 后，常规感染法 B7-1 阳性细胞约为 9%，而同步化感染法 B7-1 阳性细胞约为 95%，此说明细胞同步化能显著提高逆转录病毒载体的转染效率。

3 讨论

逆转录病毒载体是目前较常用的、转染效率较高的一种载体，尤其适用于 ex vivo 基因治疗，理论上它能转染几乎 100% 的靶细胞，且能整合到基因组中获得稳定而长期的表达，但实际的转染效率远低于此，一般为 5%～58%。究其原因：一是逆转录病毒只能转染正在分裂的细胞[4]；二是所获得的逆转录病毒滴度较低，一般仅为 10^5 ～ 10^6 CFU/ml；三是逆转录病毒半衰期短，37 ℃时只有 5～8 h，而且移动距离有限，在一个半衰期内距靶细胞 480～610 μm 以上的大多数病毒不能到达靶细胞，此也被看作是逆转录病毒转染效果不佳的主要原因[2]。为提高逆转录病毒载体的转染效率，通常采用的方法是：① 用 polybrene 处理细胞使之对逆转录病毒的敏感性增高；② 改进病毒上清收集方法以获得高滴度的病毒或浓缩病毒[2,5]；③ 重复或多次感染[6]，但结果并不令人满意。为此，Kotani 等[2] 采用离心和低温（32 ℃，可延缓逆转录病毒的半衰期）相结合的方法大大提高了逆转录病毒的转染效率。而 Chuck 等[7] 则采用流动转染法（Flow through transduction），使病毒上清以恒定速度流过一半透膜（细胞培养于膜上），将转染效率提高到 90%，并且对病毒滴度的要求大大降低，也不必再用 polybrene 来辅助转染。此二法虽能提高逆转录病毒的转染效率，但其主要缺点是需要一特殊装置，难以推广。我们则着眼于逆转录病毒只能转染分裂细胞的特性，采用简便的低温处理法使细胞同步化，然后收集分裂期细胞进行转染，获得了近乎 100% 的转染效率，为 ex vivo 基因治疗创建了一种简单而高效的逆转录病毒转染方法。

关键词：逆转录病毒载体；细胞同步化；基因治疗
中图法分类号：R394-33 文献标识码：B

参考文献：

[1] L.G. 戴维斯等著（张钰 等译）. 分子生物学实验基本方法[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1989. 280－283.

[2] Kotani H, Neoton P B, Zhang S Y, *et al*. Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy[J]. Human Gene Therapy, 1994, 5(1): 19－28.

[3] 鄂 征 主编. 组织培养的分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1995. 199－200.

[4] Muller D G, Adam M A, Mikker A D. Gene transfer by retrovirus vector occurs only in cells that are actively replication at the time of infection[J]. Mol Cell Biol, 1990, 10(8): 4 239－4 441.

[5] 李和伟, 王志杰. 一种提高重组逆转录病毒滴度的收集法[J]. 基础医学与临床, 1995, 15(3): 235.

[6] Aicher A, Westermann J, Cayeux S, *et al*. Successful retroviral mediated transduction of a reporter gene in human dendritic cells: Feasibility of therapy with gene-modified antigen presenting cells[J]. Experimental Hematology, 1997, 25(1): 39－44.

[7] Chuck A S, Palsson B D. Consistent and high rates of gene transfer can be obtained using flow through transduction over a wide range of retroviral titers [J]. Human Gene Ther, 1996, 7(6): 743－750.

（编辑 刘 鹏）

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