DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.017
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0035-04

论著

压电石英晶体微阵列免疫传感器检测hCG的实验研究

张 波[1],府伟灵[1],蒋天伦[1],陈 鸣[1],俞 凡[2],陈小兵[2] ([1]第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038;[2]信息产业部第26研究所,重庆 400060)

提 要:目的 构建一种新型压电石英晶体人绒毛膜促性腺激素(hCG)免疫微阵列传感器。方法 抗hCG-β单克隆抗体采用蛋白A(SPA)法固定在2×5的AT切向、基频10MHz的石英晶体微阵列金膜电极表面制成抗体敏感膜,构成压电石英晶体hCG免疫微阵列传感器。结果 构建的hCG压电石英晶体微阵列免疫传感器对hCG的响应特性良好,其检测线性范围为2.5~250 mIU/ml,TSH、FSH、LH对hCG的检测基本无干扰;60例临床标本检测结果与荧光免疫检测法符合($P>0.05$),两种方法的相关系数为0.92。结论 研制的压电石英晶体hCG免疫微阵列传感器具有灵敏度高、特异性好、成本低廉、省时、操作简单、不需标记、能在线实时检测等优点,对比实验表明其检测结果准确,能用于临床实验诊断检测。

关键词:压电;石英晶体;传感器,免疫;绒毛膜促性腺激素
中图法分类号:R446.6;TP212.3 文献标识码:A

Determination of human chorionic gonadotropin by piezoelectric quartz crystal micro-array immunosensor

ZHANG Bo, FU Wei-ling, JIANG Tian-lun, CHEN Ming, YU Fan, CHEN Xiao-bing (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a new type of piezoelectric quartz crystal micro-array immunosensor for the determination of human chorionic gonadotropin(hCG). Methods The crystal was 10 MHz AT-cut quartz with gold-coated electrodes. The immobilization of the monoclonal antibody of hCG-β onto the surfaces of the gold electrodes was accomplished *via* protein A. Results Experimental results showed that the piezoelectric immunosensor had good response to hCG, the frequency shifts were linearly dependent on the hCG concentration in the range of 2.5~250 mIU/ml, other hormones such as TSH, LH and FSH, did not interfere in the sensor's frequency. The analytical results from this approach were in satisfactory agreement with those of by fluorescent immunoassay ($P>0.05$) with correlation coefficiency of 0.92. Conclusion Piezoelectric micro array immunosensor for determination of hCG is of high sensitivity, good specificity, simple operation, rapid analysis, low cost and real-time detection *etc*. It is suitable for detecting hCG in serum and urine in clinical laboratory.

Key words: piezoelectricity; quartz crystal; immunosensor; human chorionic gonadotropin

当压电石英晶体谐振时,石英晶体对其表面质量负载的微小变化非常敏感,具有ng级的质量检测能力,也称为"石英晶体微天平"[1]。石英晶体振荡频率的变化与晶体表面质量负载呈负相关关系,Sauerbrey[2]根据单层无穷大薄板模型建立了质量效应型石英晶体传感器的频移-质量关系式(1):

$$\triangle f=-2.26\times10^{6}\triangle mf^{2}/A \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

$\triangle m$ 是质量负载的改变(以g为单位),$\triangle f$ 是 $\triangle m$ 改变所造成的频率变化,f 为石英晶体的工作频率(以Hz为单位),A是石英晶体电极的面积(以cm^2为单位),负号表示质量的增加导致频率的下降

基金项目:国家"九五"科技攻关项目(96-A23-04-04);国家自然科学基金资助面上项目(39870831);国家高技术计划生物技术领域青年基金资助项目("863"项目);全军"九五"医学科研计划资助面上项目(98MO94);全军"十五"医学科研计划资助面上项目(01MA180);全军"十五"医学科研计划指令性课题(01LO65);重庆市科委风险投资基金资助项目
作者简介:张 波(1969-),男,四川省安岳县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事医学实验诊断及相关新技术、新仪器方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68753687
通信作者:府伟灵(E-mail:weilingfu@yahoo.com)
收稿日期:2001-10-30;修回日期:2001-12-12

自20世纪80年代石英晶体在液相振荡获得成功以来,压电石英晶体传感器已广泛应用于生物医学领域,把压电石英晶体传感器对质量的高度敏感性与抗原抗体反应的特异性相结合,发展了一类新型免疫传感器,即压电石英晶体免疫传感器[3,4]。抗体或抗原作为大分子蛋白质固定在石英晶体电极表面,通过抗原抗体的特异性结合,其复合物容易导致晶体表面显著的质量变化,灵敏度高,采用单克隆抗体可进一步提高检测的特异性和灵敏度。因其具有灵敏度高、特异性好、不需标记、操作简单、在线实时检测等特点,而获得迅速的发展,成为免疫传感器研究的热点之一[5,6]。本研究利用蛋白A(SPA)作载体吸附于石英晶体金电极表面,用于抗人绒毛膜促性腺激素(hCG)β链的单克隆抗体的定向自组装,构建了一种新的质量效应型hCG免疫传感器微阵列,取得了满意的结果。

1 材料与方法

1.1 仪器与器材

石英晶体微阵列采用AT切向,双面镀金电极,基频10 MHz

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

的石英晶体，晶片直径 8.0 mm，电极直径 4.0 mm。采用树脂粘结剂把石英晶片粘结在 2×5 个孔并预埋电路的印刷电路板上，形成检测池的底部，晶体两面的金膜电极接点与预埋电路的接点连接，制成 2×5 型石英晶体微阵列，每个检测池的容积为 150 μl。频率检测仪采用自激式振荡电路，2×5 型多通道检测，频率信号为 TTL 电平输出，检测室具有恒温、屏蔽、防震动等装置。ACL-8454 多功能频率记数卡（ANDLINK 公司产品）内置于方正飞越奔 III型计算机（北大方正集团公司）。《PESA 分析软件 2.0》具有频率记数、差值显示、频率变化趋势图显示等功能。由我室与信息产业部第 26 研究所共同设计制作。

1.2 主要试剂

抗人绒毛膜促性腺激素（hCG）β 链单克隆抗体购自美国 Biodesign 公司（浓度为 4.02 mg/ml，PBS 溶液 pH 7.0）；金黄色葡萄球菌 A 蛋白（SPA）购自美国 Pierce 公司；绒毛膜促性腺激素（hCG）标准品，采用 hCG 荧光免疫检测试剂盒（Biodata 公司）的标准品，由西南医院妇产科王凤英博士惠赠。其它试剂均为 AR 级。

1.3 方法

1.3.1 石英晶体的预处理 按文献[7]报道方法进行。注意 NaOH 和 HCl 不能接触到晶体外连电极和线路。

1.3.2 SPA 在石英晶体金膜电极表面的吸附 气相检测石英晶体的振荡频率（f_0），取 2mg/ml 的 SPA 溶液（PBS 溶液，pH 7.0）5 μl 均匀涂布于经预处理的石英晶体金膜电极上，干燥后用 PBS 缓冲液和双蒸水冲洗，氮气吹干，检测 SPA 吸附后的晶体振荡频率（f_1）。

1.3.3 抗体分子的定向自组装 为了探讨 SPA 固定抗体的最适浓度，把 4.02 mg/ml 的抗体稀释成不同浓度的抗体溶液，观察抗体固定后石英晶体频率的变化。抗体溶液 3 μl 均匀铺于吸附有 SPA 的石英晶体金膜电极表面，30 ℃反应 2 h 后用 PBS 缓冲溶液和双蒸水冲洗，氮气吹干，检测抗体固定后石英晶体的振荡频率（f_2）。4 ℃保存备用。

1.3.4 标准曲线的制作 石英晶体微阵列的每个检测池加入 70 μl PBS 检测缓冲液，检测晶体的液相振荡频率（f_0）。以 1 号检测池作为参比检测池，频率稳定后，把 0、2.5、5、25、100、250、500 mIU/ml 的 hCG 标准溶液 10 μl 加入 2~7 号检测池中，混匀后 37 ℃继续检测晶体振荡频率 40 min（f_1）。每个浓度点重复 3 次。

1.3.5 血清和尿液中 hCG 的检测 方法同上。以 PBS 作为检测缓冲液。检测血清和尿液标本各 30 例，浓度高于 250 mIU/ml 的血清或尿液标本需稀释后检测，计算结果时乘上稀释倍数。

1.4 统计学分析

本方法检测结果与免疫荧光法检测结果采用 SPSS10.0 统计软件进行线性回归分析和配对资料 t 检验。

2 结果

2.1 蛋白 A 在石英晶体金膜电极表面的吸附

蛋白 A（SPA）分子与石英晶体金膜电极表面的金原子之间依靠分子间的作用力可以紧密地结合，SPA 是大分子蛋白质，结合在晶体电极表面会产生显著的质量负载效应，导致晶体频率下降。表 1 给出了 5 μl 的 2 mg/ml SPA 在晶体金膜电极表面的吸附量，吸附量用石英晶体振荡频率的减少 Δf_1（f_0-f_1；f_0 为 SPA 包被前的频率，f_1 为 SPA 包被后的频率）来表示。结果显示其吸附量为（180±67）Hz，变异系数为 35.51%，表明 SPA 成功地吸附在金膜表面，但不同晶体的吸附量差异较大。

2.2 抗 hCG-β 链单克隆抗体的固定

2.2.1 SPA 法固定抗体的量与抗体浓度之间的关系 抗体的 Fc 段与 SPA 分子的氨基连接而被固定在金膜电极表面，其固定量以抗体固定前后晶体频率的减少 Δf（f_1-f_2；f_1 为 SPA 包被后的频率，f_2 为抗体固定后的频率）表示。实验证明 SPA 固定抗体的量与抗体工作浓度密切相关，见图 1。从图中可以看出，当抗体浓度小于 4.02 mg/ml 时，抗体固定量随浓度的增加而增大，抗体浓度达到 4.02 mg/ml 时，抗体的固定量仍未达到饱和，表明 SPA 法固定抗 hCG-β 抗体，其固定抗体的饱和度大于 4.02 mg/ml。因购买的抗体溶液浓度最高为 4.02 mg/ml，无法观察更高浓度。因此对于 SPA 法固定抗 hCG-β 的抗体，其工作浓度选择 4.02 mg/ml，以下实验均采用这一浓度。

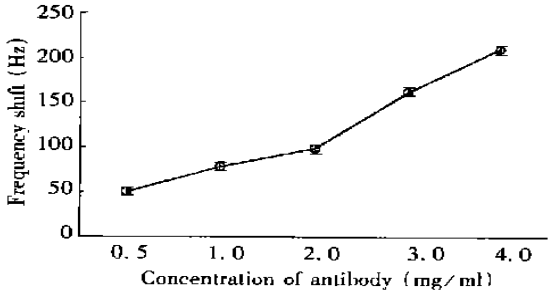


图 1 SPA 法固定抗体的量与抗体浓度的关系

Fig 1 Relationship between the concentration of the monoclonal antibody of hCG-β and frequency shifts

2.2.2 石英晶体电极表面固定抗体的量 采用 4.02 mg/ml 的抗体浓度，其固定量以抗体固定前后晶体频率的变化 Δf_2（f_1-f_2；f_1 为 SPA 包被后的频率，f_2 为抗体固定后的频率）表示。SPA 固定抗体的量见表 1。结果显示抗体固定量为（210±31）Hz，且不同晶体上抗体的固定量较一致，能较好满足 hCG 定量检测的要求。

表 1 SPA 法固定抗体的实验结果（$\Delta f_1=f_0-f_1$，$\Delta f_2=f_1-f_2$，Hz）

Tab 1 Results of immobilizing antibody via protein A ($\Delta f_1=f_0-f_1$, $\Delta f_2=f_1-f_2$, Hz)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}\pm s$	CV(%)
SPA (Δf_1, 2.0 mg/ml)	94	112	122	225	296	265	203	260	214	239	188±66.76	35.51
Antibody (Δf_2, 4.02 mg/ml)	184	176	170	173	237	201	232	241	258	231	210±31.31	14.91

Δf_1 represent frequency changes on SPA; Δf_2 represent frequency charges on antibody

2.3 压电石英晶体 hCG 免疫微阵列传感器的响应特性

2.3.1 温度对免疫传感器的影响 免疫反应对温度有一定的依赖性。实验发现，在 10~30 ℃之间，晶体频率变化随温度变化较小，表明免疫反应速度缓慢。随温度继续升高，频率变化迅速增大，在 37 ℃时，频率响应最大。当温度再升高时，频率响应却反而迅速减小。这可能与较高温度使抗原抗体反应的解离反应速率加快和抗体的失活有关，符合传统的免疫反应理论[8]。

2.3.2 抗原抗体反应时间对晶体振荡频率的影响 用制备好的石英晶体微阵列检测 hCG 标准品，在 37 ℃条件下观察抗原抗体不同反应时间对应晶体振荡频率的变化。结果显示，抗

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

原抗体反应在 40 min 后, 频率已不再降低。表明抗原抗体反应已达到平衡, 免疫反应基本完成, 再延长反应时间, 晶体表面质量负载也无明显变化, 频率达到稳定。因此, 实验选择 40 min 作为检测 hCG 样品的反应时间。

2.3.3　压电石英晶体免疫微阵列传感器检测方法的特异性

用 hCG 免疫传感器微阵列检测 TSH、FSH、LH 的标准溶液, 上述条件反应 40 min 后, 检测反应前后的频率变化值。这些物质引起的频率变化均在 10 Hz 左右, 对 hCG 的检测基本无干扰。可见, 该传感器的选择性较好, 特异性高, 能满足临床检测的要求。

2.4　压电石英晶体免疫微阵列传感器检测 hCG 的标准曲线制作

hCG 各浓度点的晶体频率变化值($\Delta f = f_0 - f_1$; f_0 为液相基频)用 3 次平行检测结果的平均值表示, 并用参考检测值进行校正。以 hCG 标准溶液的浓度为横坐标, 频率变化的绝对值(Δf)为纵坐标作图, 得到 hCG 石英晶体传感器的检测剂量反应曲线, 见图 2。从图中可以看出, hCG 的浓度在 2.5～250 mIU/ml 范围内, hCG 的浓度与晶体频率的变化之间呈良好的线性关系, 当 hCG 浓度大于 500 mIU/ml 时, 由于固定在晶体表面的抗体结合位点趋于饱和, 尽管反应液中存在 hCG 分子, 石英晶体表面质量负载已不再增加, 结果与抗原抗体的免疫反应规律符合。hCG 浓度低于 2.5 mIU/ml 时, 晶体频率的特异性响应信号被噪声信号淹没, 因此, 2.5 mIU/ml 是传感器的最低检测线。

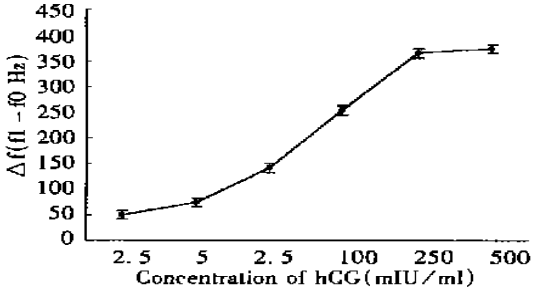


图 2　压电石英晶体免疫微阵列传感器检测 **hCG** 的标准曲线

Fig 2　Normalized response curve of piezoelectric quartz crystal microarray immunosensor to hCG concentration

2.5　临床标本的检测结果

利用构建的免疫微阵列传感器检测了血清和尿液中的 hCG, 对于超过检测线性范围的标本用检测缓冲液稀释后检测。结果经线性相关分析, 两种方法的相关系数为 0.92, 表明本法检测结果与荧光免疫检测法符合($P > 0.05$)。

3　讨论

绒毛膜促性腺激素(hCG)是胎盘绒毛膜滋养层细胞产生的一种促进性腺发育的蛋白质激素。由 α 和 β 两条链组成, 体内许多促性腺激素都含有与之相同的 α 肽链, 唯有 β 链具有特异性, 因此免疫分析法检测用抗体均是针对其 β 链的。hCG 的检测对于妊娠及妊娠相关疾病、肿瘤的诊断和鉴别诊断具有重要意义。目前, 应用较多的检测方法有酶联免疫法、放免法、乳胶凝集法以及胶体金试纸法等, 后者虽然操作简单, 但灵敏度低, 且只能进行定性或半定量检测, 酶联免疫法和放免法可进行定量检测, 灵敏度高, 但需标记, 操作繁琐, 费时, 放免标记的同位素对人体和环境有较大的危害和污染[9]。因此, 寻找一种简单、灵敏、快速且可精确定量的替代新方法在临床诊断中具有重要的实用价值。压电石英晶体免疫传感器是近年发展起来的一种新型免疫传感器件, 对表面质量负载的变化非常敏感, 具有 ng 级的质量检测能力。其操作简单, 不需标记, 能快速在线实时检测, 灵敏度高、特异性好, 有望成为未来临床大规模使用的检测手段。

实验构建检测 hCG 的压电石英晶体免疫微阵列传感器, 选用 SPA 分子作为双功能载体连接分子, 原因在于 SPA 与金形成非常稳定的 SPA-金复合物, 亲和常数达 10^8 L/mol, 结合力强。SPA 牢固地吸附在金膜电极表面形成一层均匀、致密的单分子膜层, 其活性氨基能与抗体的 Fc 段结合, 抗体的功能区 Fab 段面向晶体的外侧面, 有利于抗原分子与之结合, 这对压电石英晶体免疫传感器非常重要。另外, SPA 分子与抗体结合反应条件温和, 1 分子 SPA 能结合 2 分子抗体, 结合容量大, 理论上 SPA 法制备的抗体敏感膜的生物活性比其它方法高[10]。实验结果显示, SPA 在石英晶体金膜电极上的固定量尽管一致性不甚理想, 但 SPA 固定抗体量较为一致, 能获得空间取向一致的抗体敏感膜, 为传感器的定量检测奠定了基础。从 SPA 固定抗体的量与抗体浓度的关系中可以得出, 随着抗体浓度的增加, SPA 固定抗体的量也增加, 证明在实验所用 4.02 mg/ml 的抗体浓度时, SPA 分子结合抗体的位点仍未饱和, 其结合能力超过了 4.02 mg/ml, 保证了其固定抗体量的一致。因此, SPA 法是一种理想的抗体敏感膜固定方法[11]。

本实验建立的压电石英晶体免疫微阵列传感器检测 hCG 的标准曲线显示, hCG 浓度在 2.5～250 mIU/ml 的范围内, 石英晶体的振荡频率变化与 hCG 的浓度呈良好的线性关系, 传感器有良好的响应特性。当 hCG 浓度大于 250 mIU/ml 时, 标准曲线变平, 晶体频率与 hCG 浓度不再呈线性关系, 浓度低于 2.5 mIU/ml 时, 频率响应信号弱, 容易被噪声淹没。因此可以得出, 该方法检测的线性范围为 2.5～250 mIU/ml。如果标本浓度超过 250 mIU/ml 时, 标本需稀释后检测。同时用研制的 hCG 压电石英晶体免疫传感器检测了 TSH、FSH、LH 标准溶液, 传感器基本无响应, 表明其特异性高。60 例临床标本(血清和尿液各 30 例)检测结果与免疫荧光法比较, 相关系数为 0.92, 两种方法的检测结果无显著性差异。提示 hCG 压电石英晶体免疫传感器能用于 hCG 的定量检测。并且用 hCG 压电石英晶体免疫传感器检测, 操作过程简单, 加入标本后不需加入任何试剂, 检测时间短, 仅需 60 min 左右, 比荧光免疫法和放免法的时间大大缩短, 并且能进行实时检测, 又弥补了胶体金试纸法不能定量检测的不足。因此本法在临床 hCG 快速定

?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