DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.051
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

文章编号:1000-5404(2001)07-0863-02

技术方法

噬菌体最佳保存方法探讨

An approach to optimal condition for preservation of bacteriophage

金晓琳,张克斌,胡福泉 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 寻找噬菌体有效而方便的保存方法。方法 将绿脓杆菌裂菌性噬菌体以不同方法保存在不同温度下,在不同时间取出,用终点稀释法动态检测其裂菌活性滴度。结果 冻干、室温、4 ℃和液氮保存对噬菌体活性滴度的影响无明显差异,6个月后仅有10^2数量级的降低;-20℃保存6月后滴度下降10^4数量级,效果最差。结论 日常工作中,至少6个月内,室温或4 ℃是噬菌体最简便而可靠的保存方法。

对于哺乳动物组织、细胞和细菌、真菌、放线菌以及一般病毒的保存条件都早有报道[1~6]。我们近来的工作需要对噬菌体进行保存,但对噬菌体以何种方法保存最佳,尚无明确答案。本研究试图找到一种最简便而有效的噬菌体保存方法。

1 材料与方法

1.1 噬菌体PaP1的宿主菌

所用宿主菌为新桥医院检验科从呼吸科病人分离到的绿脓杆菌,血清群为11群(卫生部成都生物制品所分群血清)。

1.2 噬菌体PaP1

该噬菌体为本室以上述细菌为宿主菌,从西南医院污水处理池取污水分离到的绿脓杆菌噬菌体。

1.3 保存剂和保存方法

将宿主菌接种到LB液体培养基中,振荡培养10余h(细菌数约10^8/ml),再接种噬菌体PaP1,继续培养至菌液彻底澄清,5 000× g 离心5 min,收集含噬菌体的上清,做如下保存:①加灭菌脱脂牛奶至10%终浓度,0.1 ml体积分装多管,冷冻真空干燥后保存于4 ℃;②在噬菌体悬液中加甘油至终浓度30%,分装多管,分别做室温、4 ℃、-20 ℃和液氮4种不同方法的保存。

1.4 噬菌体裂菌活性检测

采用终点稀释滴定法:冻干保存管以原体积(100 μl)LB液体基混悬,其它保存组亦各取噬菌体悬液100 μl,分别用LB液体基作10倍连续稀释,取各管稀释液100 μl,分别加入各900 μl宿主菌溶液(细菌浓度为10^7/ml),混匀,37 ℃过夜培养。然后观察各组各培养管的裂菌情况,记录能使菌液裂解至彻底澄清的稀释度,该管稀释度即为噬菌体裂菌活性的滴度。

2 结果

本研究探索了5种不同的保存方法。低温冻干后4 ℃保存,这是一种最经典的微生物保存方法。这种方法也应该是绿脓杆菌噬菌体的最佳保存方法,但这种方法需要特殊仪器,且低温冻干操作十分复杂,且费时费力。在这里我们将这种经典的方法作为靠得住的对照方法,与另外4种保存方法的保存效果进行比较,试图寻找更为简单、有效而又可靠的方法。现将实验结果归纳如表1。

表1 不同方法保存噬菌体的效果

	保存时间				
	0月	1月	2月	4月	6月
冻干	10^9	10^8	10^7	10^7	10^7
室温	10^9	10^8	10^7	10^7	10^7
4 ℃	10^9	10^8	10^8	10^7	10^7
-20 ℃	10^9	10^8	10^6	10^5	10^5
液氮	10^9	10^9	10^7	10^7	10^7

注:表内数值为噬菌体裂菌活性滴度

从表内结果可见,低温冻干后4 ℃保存仍然是最好的保存方法之一。室温、4 ℃、及液氮对噬菌体的保存与低温冻干后4 ℃冰箱保存的经典方法之间并无明显差别,在6个月之内,噬菌体的裂菌活性滴度降低为两个指数级。保存最差的是-20 ℃保存法,其裂菌活性在半年内降低了4个指数级。早期曾有文献提到,-20 ℃保存噬菌体活性时间不超过1个月,但这里我们保存了6个月,其活性保存尚有一半以上,虽然不及其它几法,但在实验室保存半年仍然是有可能的。

3 讨论

关于组织、细胞和细菌、真菌、放线菌以及一般病毒的保存条件,早已见诸报道[1~6],归纳起来,有一条规律,即不管保存这些生物活细胞的保存液是什么,但保存条件都需要低温保存。对于噬菌体的保存方法,通常沿用上述保存细菌、病毒的一般方法,即低温保存仍然是一般原则。但也有报道提到-20℃保存噬菌体其活性不超过一个月[7],那么"低温保存"的原则是否也适用于噬菌体保存?是否是必须遵循的原则?在我们的研究工作中需要对绿脓杆菌噬菌体进行保存,冷冻干燥法虽然保存效果好,但操作很不方便,-80 ℃液氮冻存操作虽然方便,但不可反复冻融,反复冻融后滴度下降很快。我们希望通过摸索,找到一种保存噬菌体效果最佳、操作最方便,且反复取样并不影响其活性

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070037);第三军医大学校管基金(997-2)
作者简介:金晓琳(1964-),女,江苏省建湖县人,高级实验师。电话:(023)68752239
收稿日期:2000-05-04;修回日期:2001-01-10

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

滴度的方法。

从实验结果看，－20 ℃尽管也是一种低温，但对噬菌体的保存效果是最差的。文献报道－20 ℃保存噬菌体活性时间不超过 1 个月，我们这里虽然保存达 6 个月之久，但其活性滴度下降了 10^4 个数量级，与其它几种方法比较仍然是最不可取的方法。－20 ℃保存具有原生质的生物细胞效果不好是可以理解的，因为在－20 ℃条件下容易使原生质内形成冰晶，损害原生质体。但噬菌体是非细胞形态的生物，并不具有原生质，为何这种低温对其保存是有害的，原因尚不清楚。

传统的低温冻干法仍然是噬菌体的最佳保存方法之一。但值得一提的是将噬菌体悬液加甘油至 30% 浓度后置室温或 4 ℃保存噬菌体有着非常好的保存效果，其活性滴度可与经典的低温冻干后 4 ℃保存或液氮保存相妣美。室温或 4 ℃保存显然违背了“低温保存生物细胞”的一般原则，即使是一般细菌，放置室温半年之后也常常难以复苏。对于这种现象的可能解释是：① 噬菌体是一种胞内寄生的非细胞型微生物，不能离开宿主细胞独立地进行新陈代谢，它们只要离开宿主细胞后，其代谢也就基本停止了，对它们的保存不象其它生物细胞，有赖于使用低温来降低新陈代谢；② 噬菌体只要具有完整的核酸分子存在即具有感染性；③噬菌体的核酸是包裹在蛋白质外壳内的。我们已有实验证明，在蛋白质衣壳完整情况下，即使向试管中加入核酸酶，酶也不能进入衣壳内破坏核酸分子。因此，只要噬菌体保存在一种蛋白质不被降解的条件下，就可能较长时间的保存。以上 3 点解释如果成立，那么室温或 4 ℃保存方法就不应该仅仅适用于噬菌体，也应该同样适用于保存所有非细胞型微生物，如病毒。

由于室温及 4 ℃保存两种方法都不需要特殊仪器，且条件最简单，操作最方便，是最值得采用的噬菌体保存方法。这两种方法到底能保持噬菌体活性多长时间，我们将继续观察下去。

关键词：噬菌体；保存；滴度
中图法分类号：Q93-335 文献标识码：B

参考文献：

[1] 贾建华. 液氮超低温冻结包藏酵母菌十年的检测报告[J]. 微生物学通报，1998，25(2)：65－68.
[2] 廖爱芳，林永珠. 液氮超低温保存放线菌条件研究[J]. 微生物学通报，1999，26(4)：272－274.
[3] Verghese S, Sudha P, Padmaja P, *et al*. Cryopreservation of cardiac homografts[J]. Indian Heart J, 1999, 51(3)：301－306.
[4] Komuro A, Hodge D O, Gores G J, *et al*. Cell death during corneal storage at 4 degrees[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(12)：2 827－2 832.
[5] Mohammad R M, Li Y, Mohamed A N, *et al*. Clonal preservation of human pancreatic cell line derived from primary pancreatic adenocarcinoma[J]. Pancreas, 1999, 19(4)：353－361.
[6] Hogman C F. Storage of blood components[J]. Curr Opin Hematol, 1999, 6(6)：427－431.
[7] 余 贺. 医学微生物学[M]. 北京：人民卫生出版社，1964. 89.

（编辑 潘式文）

技术方法

文章编号：1000-5404(2001)07-0864-03

^{131}I-抗 VEGF McAb 的制备及其体外免疫结合活性鉴定

Preparation of ^{131}I-anti-VEGF McAb (sc-7269) and identification of its immune activity *in vitro*

李忠俊[1]，程绍钧[2]，滕本秀[1]（第三军医大学：[1] 附属新桥医院输血科，重庆 400037；[2] 医学检验系核医学教研室，重庆 400038）

提 要：目的 制备^{131}I-抗-VEGF McAb(^{131}I-sc-7269)，并探讨其作为肿瘤放射免疫显像剂的可能性。方法 采用 Iodogen 法碘化标记制备^{131}I-sc-7269。SephadexG50 分离纯化标记产物，三氯醋酸法测定标记产物的放射化学纯度，体外细胞结合分析法鉴定^{131}I-sc-7269的免疫结合活性。结果 ①^{131}I 标记率为 27.46%，标记产物的放射性比活度为 1.02 MBq/μg，平均放射性化学纯度为 96.20%。平均放射性浓度为 18.30 MBq/ml。②体外结合分析显示，^{131}I-sc-7269 与人膀胱癌 T24 细胞结合率达 59.12%，而与人脐静脉血管内皮细胞结合率仅为 7.16%($P<0.001$)。^{131}I-sc-7269 4 ℃保存 7 d 后与 T24 细胞的结合率仍为 56.31%。结论 本实验制备的^{131}I-sc-7269，其放射性化学纯度＞95%，有良好的免疫活性和稳定性，具备作为放射性显像剂的条件。

肿瘤血管生成为肿瘤提供血、氧，是肿瘤生长、浸润、转移的重要一环。血管内皮生长因子/血管通透性因子（Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor，VEGF/VPF）是血管生成过程中的中心环节。VEGF 以旁分泌方式作用于血管内皮细胞，促进血管内皮细胞增殖、迁徙，诱导新生血管的形成。以抗血管生成进行实体瘤的诊断与治疗是一种肿瘤诊治新

作者简介：李忠俊(1974－)，男，湖南省隆回县人，硕士，医师，主要从事肿瘤血管生成相关研究，发表论文 5 篇。电话：(023)68755794

收稿日期：2000-12-05；修回日期：2001-01-27

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