DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.052

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

思路。应用抗 VEGF McAb 针对瘤体内 VEGF 诱导的血管生成进行肿瘤免疫治疗, 国内外多有报道。但以放射性核素标记抗 VEGF McAb 作为显像剂进行肿瘤放射免疫显像诊断的相关研究尚未见报道。本实验应用核医学技术, 在体外合成^{131} I-抗-VEGF McAb (sc-7269)并鉴定其免疫学活性, 探讨将其应用于放射免疫显像(Radioimmunoimaging, RII)的可行性。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞　　T24 细胞为浸润性人膀胱癌细胞系, 胞浆内高水平表达 VEGF[1]。人脐静脉血管内皮细胞。

1.1.2　主要试剂　　鼠抗人、鼠 VEGF McAb(sc-7269): Santa Cruz 公司; Na^{131}I: 中国原子能研究院(无还原剂、无载体); Iodogen(四氯二苯基甘脲): 美国 Sigma 公司; Sephadex G-50: 瑞士 Pharmacia 公司。

1.1.3　主要仪器　　CO_2 培养箱: 美国 Shel-Lab 公司生产; FH463A 自动定标器: 北京核仪器厂; RM905 放射性活度计: 中国计量科学研究所。

1.2　方法

1.2.1　^{131}I-sc-7269 的制备

1.2.1.1　sc-7269 的^{131}I 标记　　采用 Iodogen 法标记sc-7269[2]: 将 100 μg Iodogen 溶解于 100 μl 氯仿溶液中制成 Iodogen 溶液; 取 15 μl Iodogen 溶液置于乙烯子弹头离心管中, 旋转蒸发后在试管底部内壁形成一层均匀的氯甘脲膜; 在涂有 Iodogen 15.0 μg 的试管中依次加入 0.5 mol/L、pH 7.6 的磷酸盐缓冲液 100 μl, sc-7269 35.0 μg, Na^{131}I 92.5 MBq, 充分混匀后在室温下反应 15 min, 其间温和地震荡数次, 加入 1% KI 50.0 μl 终止反应。反应液滴加于预先经 PBS(10 mmol/L、pH 7.4)平衡、2%牛血清白蛋白液淋洗饱和的 Sephadex G-50 层析柱上, 用 10 mmol/L、pH 7.4的 PBS 洗脱层析柱, 通过自动部分收集器收集洗脱液, 流速每管 1.0 ml/3 min, 共收集 60 管, 每管取 10.0 μl, 在 FH463A 自动定标器上分别进行放射性测量(cpm 值), 以试管编号为横坐标, 对应各管的 cpm 值为纵坐标, 绘制洗脱曲线。标记产物的标记率、放射浓度按下列公式计算:

$$\text{标记率}\% = \frac{\text{蛋白峰各管放射性计数的总和}}{\text{蛋白峰加游离峰放射性计数之和}} \times 100\%$$

$$\text{放射浓度} = \frac{\text{投入的}^{131}\text{I 总量} \times \text{标记率}}{\text{蛋白峰收集液总 ml 数}}$$

标记物的纸层析: 取分离纯化后标记产物(^{131}I-sc-7269) 5.0 μl, 在层析滤纸距一端 0.5 cm 处中央点样(新华 3 # 滤纸, 长 20 cm, 宽 3.0 cm), 点样时要求点样范围直径不能超过 0.5 cm, 用正丁醇∶醋酸∶水=4∶1∶5 的展开剂进行上行层析 15.0 cm 左右, 层析时间约为 3 h, 层析完毕后将层析滤纸于室温下晾干, 自原点起将层析滤纸剪成长各 0.5 cm 的 30 张纸片。将纸片按顺序分别置于 FH463A 自动定标器上测放射性计数, 绘制纸片编号-计数曲线。

1.2.1.2　标记物的理化性质鉴定　　标记产物^{131}I-sc-7269 放射化学纯度的测定: 三氯醋酸法从蛋白峰(标记产物^{131}I-sc-7269)收集液中, 取 10.0 μl 标记产物于试管内, 加入 100 μl 2%牛血清白蛋白液充分混匀, 加入 15%三氯醋酸液三滴混匀, 立即测总放射性(A), 离心 1 500 r/min×5 min 后弃上清液, 测沉淀放射性(B), 按下列公式计算标记产物的放射化学纯度及游离碘率:

放射化学纯度(%)=B/A×100%

游离碘率(%)=1-放射化学纯度

^{131}I-sc-7269 比活度的测定: 蛋白峰收集液应用 RM905 放射性活度计测量标记产物的活度, 根据投入的抗体的总化学量计算比活度或按下列公式计算:

$$\text{放射性比活度} = \frac{\text{投入}^{131}\text{I 总量} \times \text{标记率}}{\text{投入抗 VEGF McAb}}$$

蛋白峰收集液过滤除菌后用于下一步实验。

1.2.2　体外细胞结合实验鉴定^{131}I-sc-7269 免疫活性[3]　　以脐静脉血管内皮细胞作为对照进行^{131}I-sc-7269 的免疫活性鉴定。常规培养的 T24 细胞、脐静脉血管内皮细胞, 用 DMEM 完全培养液制备细胞悬液, 调至细胞浓度 1×10^6/ml, 两种细胞各分装入 6 孔培养板中的 3 孔(每孔 1×10^6/ml)。每组细胞中分别加入^{131}I-sc-7269(105 cpm), 摇匀后常规培养, 每 2 h 振荡一次, 12 h 后将每孔的上清液移入试管, 0.25%胰蛋白酶消化 T24 细胞与脐静脉血管内皮细胞, 将细胞移入装有相应上清液的试管, 在 FH463A 自动定标器上测定每管的总放射性。1 000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 沉淀用 PBS 洗涤 3 次, 最后测沉淀放射性。按下式计算^{131}I-sc-7269 与细胞结合率:

$$\text{结合率}(\%) = \frac{\text{沉淀部分放射性计数(cpm)}}{\text{总放射性计数(cpm)}} \times 100\%$$

2　结果

2.1　抗体标记的结果

Iodogen 法碘化标记 McAb(sc-7269), 经 Sephadex G-50 柱层析分离纯化, ^{131}I-sc-7269 蛋白峰出现在第 4 管, 游离碘峰出现在第 10~14 管。

^{131}I 分两次用 Iodogen 法标记总量为 35.0 μg 的 sc-7269。标记产物采用新华滤纸行纸层析, 根据公式计算其标记率为 27.46%, 比活度为 1.02 MBq/μg。三氯醋酸法测定平均放化纯度为 96.20%。两次标记的蛋白峰收集液共 2.0 ml, 其平均放射浓度为 18.30 MBq/ml。

2.2　标记抗体的免疫结合活性及稳定性

经体外结合分析, ^{131}I-sc-7269 与 T24 细胞结合率达 59.12%, 而与对照细胞人脐静脉血管内皮细胞结合率仅为 7.16%($P<0.001$)。标记物在 4 ℃保存 7 d 后与 T24 和人脐静脉血管内皮细胞体外结合率分别为 56.31%、7.42%, 与标记后即时比较二者差异无显著性($P>0.05$)。说明: ①本实验标记的^{131}I-sc-7269 保持有良好的免疫结合活性; ②^{131}I-sc-7269 于 4 ℃保存具有较好的稳定性; ③^{131}I-sc-7269 与 T24 细胞呈特异性结合。

3　讨论

蛋白质多肽的碘化标记可分为直接法和间接法, 在实际工作中多采用前者: 以 NaI 形式提供的 I^- 在氧化剂的作用下被氧化形成中间活性形式, 然后再标记到蛋白质多肽分子的酪氨酸残基的苯环上(酚羟基的部位)[2]。鼠抗人、鼠 VEGF McAb(sc-7269)系免疫球蛋

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

白IgG 2α，本实验采用1，3，4，6-四氯3α，6α-二苯苷脲即Iodogen法对其进行碘化标记。Iodogen氧化^{131}I使sc-7269分子发生碘化反应，碘化反应以后用SephadexG-50分离纯化，除去游离碘与其它放射性杂质，收集标记产物蛋白峰洗脱液。碘标记率为27.46%，G-50分离纯化后标记产物的放化纯度＞95%。标记产物的比活度为1.02 MBq/μg。我们的实验结果与文献[4]报道基本一致。

抗体的同位素标记技术中最重要的是要保持标记复合物的生物、免疫学活性，否则即使标记工作做得再好也无法将标记抗体应用于下一步的实验或临床领域。在蛋白质、多肽的几种碘化标记法中Iodogen法的标记反应比较温和。本实验结果表明抗-VEGF McAb(sc-7269)经碘化标记以后基本保持了原有的免疫学活性，^{131}I-sc-7269与人膀胱癌T24细胞结合率明显高于人脐静脉血管内皮细胞(59.12% *vs* 7.16%，$P<0.001$)。标记产物在4 ℃保存1周后其免疫学活性无明显改变，其与T24细胞结合率为56.31%，与标记后即时比较差异无显著性($P>0.05$)。

总之，McAb(sc-7269)在Iodogen法碘化标记后能较好地保留其免疫学活性。VEGF在新生血管的形成过程发挥着举足轻重的作用，膀胱癌的发生以及转移过程中都有VEGF诱导的新生血管的形成，针对VEGF阻断新生血管形成来抑制膀胱癌的生长及其转移将成为一种新的研究手段。我们的实验研究结果为将来应用抗-VEGF McAb进行膀胱癌RII的实验和临床研究奠定了基础。提示值得进一步探讨抗-VEGF McAb用于VEGF表达阳性的膀胱癌放射免疫显像(RII)的可行性。

关键词：VEGF；McAb；放射性核素；放射免疫显像
中图法分类号：R817　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 李忠俊，程绍钧. 人浸润性膀胱癌裸鼠移植瘤模型的建立及其VEGF的表达[J]. 第三军医大学学报，2000，22(11)：1062－1064.
[2] 程绍钧，余裕民. 检验核医学[M]. 重庆：重庆大学出版社，1999. 43－62.
[3] Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, *et al*. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess[J]. J Immunol Methods, 1984, 72(1): 77－89.
[4] Lin Y S, Nguyen C, Mendoza J L, *et al*. Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 288(1): 371－378.

（编辑　薛国文）

技术方法

文章编号：1000-5404(2001)07-0866-03

乙肝病毒DNA荧光定量PCR检测及其意义

Detection of HBV DNA with fluorescence quantitative PCR and its clinical significance

曹红卫，卫　国，冯文曦，龚小云，郑　江　（第三军医大学附属西南医院中心实验室，重庆 400038）

提　要：目的　探讨荧光定量PCR法检测的乙肝病毒DNA与乙肝病毒标志物之间的关系。方法　362例血清标本同时进行乙肝病毒标志物和HBV DNA的检测，按照不同的乙肝病毒标志阳性情况分组后，进行乙肝病毒DNA与乙肝病毒标志物的分析研究。结果　乙肝病毒标志物HBsAg HBeAg HBcAb阳性组HBV DNA阳性率97.7%，拷贝数在10^4～10^8之间；HBsAg HBeAb HBcAb阳性组阳性率56%，拷贝数在10^2～10^7之间；HBsAg HBcAb阳性组阳性率54%，拷贝数在10^2～10^7之间；HBsAg HBeAg组阳性率100%，拷贝数在10^7之间；HBeAb HBcAb组3例，有1例阳性，拷贝数10^2；HBsAb组阳性率14.3%，拷贝数在10^3～10^7之间；189例全阴性有2例阳性(1.06%)，拷贝数在10^4～10^5之间。结论　HBV DNA在各种模式的HBV标志阳性血清甚至全阴性的血清中均可检出，但检出率相差甚大，从1.06%～100%；HBV DNA乙肝病毒标志中HBeAg阳性者其HBV DNA阳性率及拷贝数较高；HBsAg及其抗体阳性者仍可检出HBV DNA，说明仅仅依靠乙肝病毒标志进行早期诊断以及判断病人是否具有传染性是不够的。

乙肝病毒血清标志物(HBV-M)检测是目前诊断乙型肝炎最常用的指标，主要反映人体对乙肝病毒(HBV)的免疫反应状态，由于不同血清标志模式反映不同的临床意义，非传染病专业的医师很难准确掌握。因此采用简单快捷的诊断指标对乙肝早期诊断、准确判断乙肝患者的带毒状态具有重要意义。许多研究证明，定量检测HBV DNA是衡量乙肝传染性的最精确的指标，是确定HBV感染不同复制状态的非常有价值的检测手段[1,2]。HBV DNA阳性即反映有完整的病毒颗粒复制即具有传染性[3]。荧光定量PCR(FQ-PCR)克服了常规PCR假阳性的缺点，其对HBV DNA的定量检测，可为乙型肝炎提供准确的病原学诊断，并能为乙型肝炎的抗病毒治疗提供可靠的疗效评估。我室对

作者简介：曹红卫(1970－)，女，湖南省长沙市人，主管技师。电话：(023)68754437
收稿日期：2001-04-18；修回日期：2001-06-04

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