

DNA。

制备性电泳纯化法设备简单,能得到单个质粒,但操作繁琐,特别是在用有机溶剂反复抽提时,每次都不可避免的要损失少许样品,得率很低,是其最大的弱点。

NaCl速度区带超离心法兼有上述二法的优点。其纯度、得率均较高,操作简便、试剂价廉。所以,在具有超速离心机的实验室,可选用此法。

本工作是在美国俄亥俄州立大学微生物系 Dr. Dean 的指导下作的。谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Jose, M. Gonzalez et al., *Plasmid* **5**, 351, 1981.
- [2] Thomas, M. Roberts et al.; *Gene*, **12**, 123, 1980.
- [3] Thomas, C. Curries et al.; *Analytical Biochemistry*, **76**, 431, 1976.
- [4] Phyllis, A. Martin. et al., *J. Bacteriology*, **145** (2), 980, 1981.

[本文于1983年12月5日收到]

醇醚水混溶剂制备脂质体方法

初连瑞 孔祥英 谢绵光

(军事医学科学院微生物流行病学研究所)

脂质体有明显的免疫佐剂作用,同时还对其它佐剂起载体作用^[1]。有关它的制备,目前多采用 A. D. Bangham 等^[2] 1965 年建立的多层脂质体制备方法(又称经典法),以及在此基础上经超声波处理制成单层脂质体的方法^[3]。这两种方法对脂质体的研究尤其是生物膜理论和药物载体的研究起了重要作用。70 年代出现了其它改进技术,但对大批量制备仍有不足之处。我们在前人工作的启发下,设计并建立了醇醚水混溶制备脂质体的方法(醇醚水法)。同时,对某些影响脂质体载荷率的因素、脂质体的免疫佐剂作用等进行了研究。现将结果介绍如下。

材 料 和 方 法

试剂 卵磷脂,自制。胆固醇为北京化工厂产。硬脂胺,瑞典产。牛血清白蛋白(BSA)。卵白蛋白(OVA),均为电泳纯。

动物 小白鼠:上海种,重18—20克/个,雌性。家兔:日本大耳白种,重3.5—4市斤/个。

脂质体的制备

乙醇和乙醚以1.5:1(V/V)混溶后,溶解三

种膜脂:卵磷脂,胆固醇和硬脂胺(微克分子比为7:2:1)。按水相和脂相10:1(V/V)将脂溶液加入水溶液中。经连续振荡(搅拌或吹吸)1分钟左右,室温放置1—2小时,再移至4—6℃冰箱2小时,即成多层脂质体。在放置冰箱前,经超声波处理1.5分钟制成更小的脂质体。对比所用经典法参照 Bangham 法^[2]进行。

载荷量测定 为测定脂质体对水相大分子的载荷量,在水溶液中掺入碘¹²⁵标记的微量同种大分子。测量前脂质体经17000rpm 4℃离心1小时,共洗三次。按以下公式计算载荷率:载荷率(%)

$$= \frac{\text{洗后脂质体脉冲数} - \text{本底}}{\text{洗前脂质体悬液总脉冲数} - \text{本底}} \times 100\%$$

动物免疫与抗体水平评价 各家兔背部皮下注射0.5mg BSA 制剂一次,从耳缘静脉采血。小鼠皮下注入0.3ml BSA 制剂,⁹12天后从眼窝静脉丛取血。用间接血凝技术测定每只动物血清抗体滴度。抗体效价为最高稀释倍数的倒数。组抗体水平以几何平均值表示。

脂质体形态观察 磷钨酸阴性染色,经电镜拍照,放大后,以纵横直径的平均数求其直

径。

结 果

(一) 脂质体的大小 醇醚水法脂质体在电镜下有与经典法脂质体相似的多层结构。其中较大脂质体为多个小脂质体的融合体。不经超声波处理的脂质体,其直径大小相差悬殊,但多数(72%)为0.3—1 μ 。经超声波处理1.5分钟后,小脂质体数量明显增加,<0.3 μ 者占72%。

(二) 影响脂质体载荷率的因素 为选择最佳制备条件,研究了水相离子强度、蛋白质浓度以及膜脂浓度等对脂质体载荷蛋白质效力的影响。结果表明:1.随水相离子强度(r/2)的降低,载荷率明显呈指数曲线增加(图1);2.随水相BSA浓度降低,载荷率呈对数曲线升高(图2);3.随加入水相脂浓度的增加,脂质体对BSA载荷率有规律地升高。呈生长曲线趋势(图3)。

在水相离子强度为0.16,膜脂浓度为600 μ mole/ml时醇醚水法脂质体对不同大分子物质

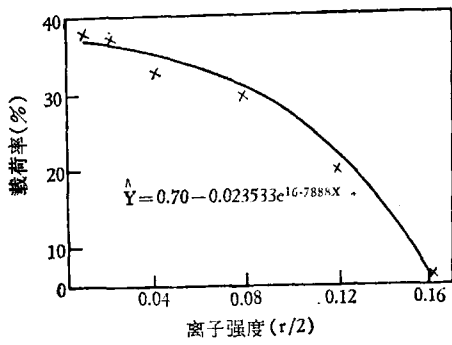


图1 离子强度对脂质体载荷率的影响

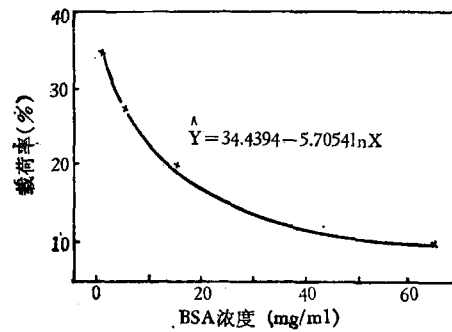


图2 蛋白质浓度对脂质体载荷率的影响

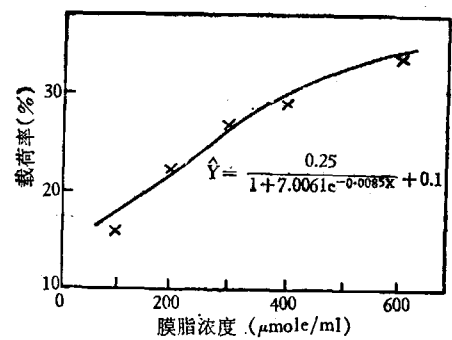


图3 膜脂浓度对脂质体载荷率的影响

表1 醇醚水法脂质体对某些大分子物质的载荷效力

大分子物质	溶液浓度(mg/ml)	载荷率(%)
BSA.....	1	36.3
炭疽保护性抗原...	12	25.0
人IgG.....	1	17.7
DNA.....	0.5	84.4
眼镜蛇毒.....	1.0	10.6

表2 醇醚使用量在体外对某些抗原活性的影响

抗原种类	最低检出浓度	
	对照组	实验组
菌体抗原	含量($\times 10^4$ 个菌/ml)	
鼠疫杆菌.....	12.5	12.5
霍乱弧菌.....	625.0	625.0
布氏杆菌.....	2500.0	2500.0
炭疽杆菌.....	1250.0	1250.0
土拉杆菌.....	625.0	312.0
类鼻疽杆菌.....	2500.0	2500.0
可溶性抗原	含量(μ g/ml)	
A型肉毒类毒素	1	1
葡萄球菌肠毒素A...	4	4
葡萄球菌肠毒素B...	8	8
BSA.....	800	800

的载荷效力见表1。

(三) 醇醚用量对某些抗原活性的影响 用间接血凝法评价对抗原的影响程度。由表2可见,经本法所用醇醚处理后,抗原对相应抗体的反应性无明显变化,各实验组和对照组最低检出浓度基本一致。

(四) 醇醚水法脂质体免疫佐剂作用 试验表明,与经典法脂质体组相比,其最早出现抗体时间,高峰抗体滴度及循环抗体维持期等均无明显差别(表3)。

表3 家兔对不同剂型BSA的抗体反应水平

组 别	动物数	血 凝 效 价							
		4	6	8	10	12	15	20	35(天)
单 抗 原	4	0	0	0	2.0	2.4	2.0	2.0	2.0
经典法脂质体	5	0	1.5	10.6	13.5	48.5	47.9	42.0	55.7
醇醚水法脂质体	5	0	1.7	24.2	97.0	97.0	64.0	76.1	90.5

以不同剂量的BSA免疫小鼠,结果显示,两种方法脂质体载荷相同量BSA组抗体水平相似(表4)。此外,还以OVA为抗原比较了两种方法脂质体的免疫佐剂活性,也未见差别(表5)。三次免疫后脂质体组抗体水平非常明显高出单抗原组。

表4 小鼠对不同剂型BSA的抗体反应水平

组 别	动物数	BSA量(mg)	血凝效价
单抗原.....	8	0.5	0.0
经典法脂质体:			
1	8	0.5	19.0
2	8	0.05	11.3
3	8	0.005	1.7
醇醚水法脂质体:			
1	8	0.5	24.7
2	8	0.05	10.4
3	8	0.005	2.2

表5 小鼠和豚鼠对不同OVA制剂的抗体反应水平

组 别	动物数	血 凝 效 价	
		二次免疫反应	三次免疫反应
豚鼠:			
单抗原.....	5	7	5
醇醚水法脂质体...	6	2048	7837
小鼠:			
单抗原.....	4	6	...
经典法脂质体	8	724	...
醇醚水法脂质体	8	724	...

讨 论

关于醇醚水法脂质体的载荷率,从表2可见,对不同物质(眼镜蛇毒、人IgG、BSA和DNA)的载荷率也有所不同(分别为10.6%、17.7%、36.3%和84%),这恰与该物质的等电点(分别为9.1、6—7.3、4.7和1—3)有明显的反比关系。这或许我们采用的是阳电荷脂质体,

由于电荷吸引缘故,即正电荷脂质体对等电点低的大分子(带负电荷较多)载荷率也较高。倘若这种推论是对的,那么带阴电荷脂质体可能对等电点高的硷性物质载荷率也高。

近十年来,脂质体的制备技术不断改进,如乙醇喷注法^[4]、醚蒸发技术^[5]、逆向蒸发技术等^[6-10]分别从不同方面获得了成功,但制备的脂质体或因载荷率过低或因有机溶剂过量致使蛋白质变性,均不够理想。我们设计建立的醇醚水混溶制备方法与经典法脂质体同样有明显的佐剂作用,而且对大分子物质的载荷率不低于经典法,并有节省器材、操作简便,可能便于批量生产等特点。

文中还介绍了水相离子强度等因素对脂质体载荷率的影响规律,可供选择抗原的最佳载荷条件时参考。

统计学处理得到薛仲三教授指导,电镜工作在余澄之同志帮助下进行,特致谢意。

参 考 文 献

- [1] Baldwin, H.: *Liposomes and Immunobiology*, 1980.
- [2] Bangham, A. D., et al.: *J. Mol. Biol.*, **13**: 238, 1965.
- [3] Papahadjopoulos, D., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **135**: 624, 1967.
- [4] Batzri, S., et al.: *J. Cell. Biol.*, **66**: 621, 1975.
- [5] Deamer, D., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **266**: 320, 1972.
- [6] Francis, S. Jr., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 4194, 1978.
- [7] Robinson, N.; *Faraday Soc.*, **56**: 1260, 1960.
- [8] Chowham, Z. T., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **266**: 320, 1972.
- [9] Malsumato, S., et al.: *J. Colloid Interface Sci.*, **62**: 149, 1977.

[本文于1983年11月12日收到]