

高锰酸钾对乙型肝炎病毒灭活的研究

河南省医学科学研究所肝炎研究室

赵世祯 朱金凤 焉晋绚 冠平原 王滨 李艳军 陈京 买凯

乙型肝炎病毒(HBV)的消毒问题,一直是人们十分关注的。在发达国家研究消毒剂对HBV作用,主要采用黑猩猩动物实验,这是比较理想的研究手段,但鉴于黑猩猩价昂难得,亦不能大批量实验。我们在缺乏这种易感的实验动物条件下,根据HBV具有形态、结构及酶活性特点,在消毒剂与HBV作用后用电镜观察形态的变化,用HBV-DNA探针检测DNA结构变化及测定DNA聚合酶活性三项指标来研究消毒剂对HBV杀灭效果,我们应用上述方法对高锰酸钾(potassium permanganate简称:P.P)杀灭HBV的作用进行实验,兹将研究初步结果报告于下:

材料与方 法

部分纯化HBV悬液:HBsAg阳性携带者血清,免疫对流电泳1:32,HBcAg阳性,DNA聚合酶阳性,血清层加于30%蔗糖(W/V)垫上,经156,000g 2小时超速离心,弃去全部上清液,沉淀用原体积1/20 0.01M PBS pH7.5缓冲液再混悬,分装小管, -20℃冻存储用。

HBV-DNA聚合酶活性测定:参照Kaplan方法^[1]进行。结果:HBV悬液5 μ l ³H-TTP掺入净cpm为17.5, 10 μ l为72, 20 μ l为104及30 μ l为313.5。为保证被作用HBV悬液具有充分的酶活性,特选定20 μ l量进行消毒剂试验。

消毒剂: 1:1,000高锰酸钾水溶液。

中和剂: 0.5%硫代硫酸钠水溶液。

1:1,000高锰酸钾灭活聚合酶试验: 日

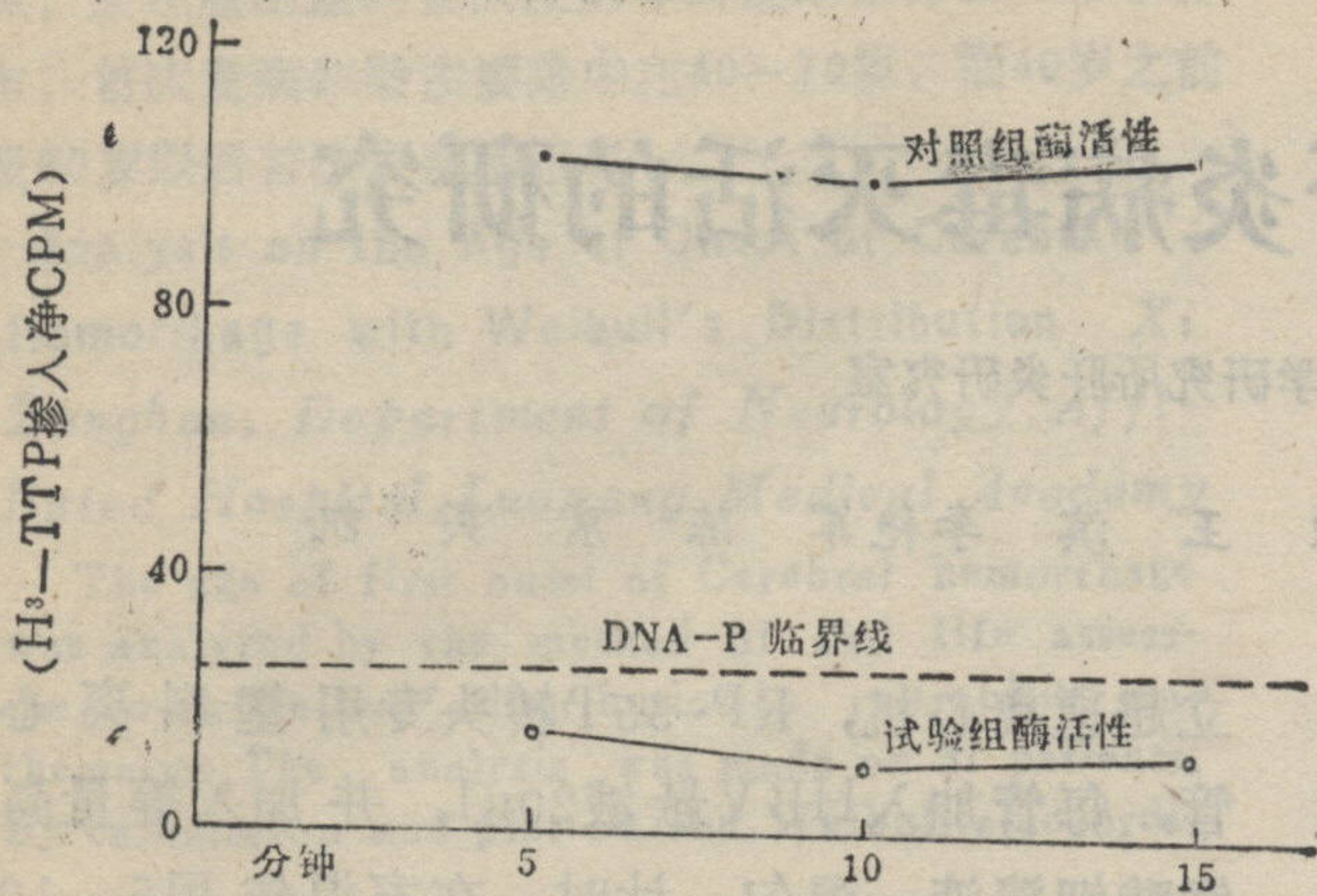
立超速离心机, RP-55T转头专用塑料离心管, 每管加入HBV悬液20 μ l, 并加入等量高锰酸钾溶液, 混匀、计时, 在室温作用5、10及15分钟立即加入10ml 0.01M Tris, pH7.5缓冲液稀释, 随即40,000rpm离心1小时, 弃去管内全部液体, 将管倒立于架上(垫以滤纸)空干, 并用滤纸条吸去管内壁上残留水珠, 再加入100 μ l 0.2M Tris, pH7.5缓冲液, 充分振荡使沉淀再混悬, 而后测定DNA聚合酶活性, 每次试验应设双份阳性对照(不含消毒剂)。

1:1,000高锰酸钾对HBV形态学影响: 将1:1000高锰酸钾溶液与HBV悬液等量混合, 在室温下作用5、10、15及30分钟, 加入中和剂停止反应, 分别以悬滴法, 每组作两个铜网, 2%磷钨酸负染, 在H-500电镜下观察拍片。

1:1,000高锰酸钾对HBV-DNA结构影响: 20 μ l HBV悬液与等量1:1,000高锰酸钾溶液混合, 作用1、2、3、4及5分钟, 立刻加入20 μ l 0.5%硫代硫酸钠中和, 试验设中和剂对照, 中和剂产物对照, 2%甲醛对照及5、10、15及20 μ l 4个不同量的HBV对照, 随后点膜, 用³²P标记HBV-DNA探针, 按斑点法, 作分子杂交^[2], 最后在X光胶片上自显影。

结 果

一、1:1,000高锰酸钾溶液与等量部分纯化HBV悬液, 经5、10及15分钟作用后, HBVDNA聚合酶被灭活情况, 见附图。



附图: 1:1000 P.P.灭活HBV-DNA聚合酶作用

二、1:1,000高锰酸钾溶液对HBV形态学影响: 对照组(不含消毒剂)电镜下可观察到许多HBV和HBsAg颗粒; 试验组: 经高锰酸钾5、10、15及30分钟作用后, HBV和HBsAg颗粒则荡然无存, 背景上只留下一些破碎的大小不一的无一定形状的微粒。

三、1:1,000高锰酸钾对HBV-DNA结构影响: 从自显影X光胶片上可见, HBV经1:1,000高锰酸钾作用1分钟结果为弱阳性; 2、3、4及5分钟均为阴性, 而中和剂、中和产物、2%甲醛及HBV对照组(5、10、15及20 μl) 4个不同量全为阳性。

讨 论

高锰酸钾为人们所熟悉并被广泛使用、价格低廉的消毒剂。它对HBV的杀灭作用, 文献上尚未报道。本研究证明: 1:1,000高锰酸钾水溶液, 能在2分钟破坏HBV-DNA; 5分钟灭活DNA聚合酶并使其形态发生不可逆降解。从而显示: 高锰酸钾为HBV良好的消毒剂。高锰酸钾杀灭HBV机制, 主要在于其具有强大氧化作用, 布鲁斯·N·埃姆斯(1984)指出^[3]: 氧基团能损伤DNA。日本国立癌症中心研究所有机反应研究室主任儿玉昌彦等(1985)报告^[5]: 香烟的烟雾溶于水时或食物中的脂质过氧化物所产生的“活性氧”同细胞的癌化有密切关系。彼等实验证明: 活性氧有

伤害位于人体细胞中的基因主体——DNA作用。为了从化学反应方面探索癌症发生的机制, 作者研究了象活性氧那样反应性高的各种自由基。他们把人的培养细胞放在20℃的香烟烟雾水溶液中浸泡1小时, 结果发现, 被浸泡细胞的DNA变成了碎片。如在香烟烟雾的溶液中施放分解活性氧化的过氧化氢酶或苯甲酸, 那么, DNA链就不能切断。从而证明溶液中活性氧有切断DNA链的作用。

蛋白质对HBV有保护作用, Schulster等(1982)报道^[4]: 次氯酸钠对HBV消毒作用时, 有效氯5600ppm 1分钟杀灭HBV, 若无蛋白保护时仅需500ppm, 因蛋白质可以起到中和氯的作用, 高锰酸钾遇有机物时便被还原成为无作用的二氧化锰, 所以, 该消毒剂最适用于皮肤粘膜、水果、蔬菜、饮食器皿等消毒。

在缺乏易感的实验动物条件下, 研究HBV消毒剂, 我们认为: 利用电镜观察HBV形态变化, 利用HBV分子杂交技术检测DNA结构破坏情况, 及测定HBV-DNA聚合酶灭活情况, 这三种手段所得结果应当是可靠的, 因为不论病毒赖以复制的酶遭到破坏, 拟或形态, 结构被毁灭, 它将永远失去传染性。任何对HBV有效的消毒剂, 三项指标应有一项显示有作用, 高锰酸钾对HBV三项指标全部显示有作用, 也可能是少见的。而公认对HBV有效的2%福尔马林, HBV-DNA探针检测为阳性, 提示: 任何一种方法都有一定的局限性, 福尔马林可以杀死HBV, 但不能破坏HBV的结构。在分子杂交技术中福尔马林为解链剂, 它仅破坏氢键使DNA双链分离, 同样碱变性亦属于此种情况。

摘 要

本文利用电子显微镜观察消毒剂对HBV形态学影响, HBV分子杂交技术检测DNA结构及HBV-DNA聚合酶活性三项指标对高锰酸钾杀灭HBV的效果进行了研究, 结果1:1000高锰酸钾2分钟可以破坏HBV-DNA结构, 5分钟破坏HBV形态, 并使HBV-

-DNA聚合酶灭活。提示：高锰酸钾为皮肤粘膜、水果、蔬菜及饮食器俱等HBV污染的良好消毒剂。

A study on the effect of inactivation of hepatitis B virus with potassium permanganate
Zhao Shi-zheng, et al., Hepatitis Division, Henan Institute of Medical Sciences

In this paper, we demonstrate the disinfectant effect of potassium permanganate by showing the morphological changes of hepatitis B virus (HBV) with electron microscope. The structure of HBV-DNA have been detected with molecular hybridization and HBV-DNA polymerase activity have been determined. The three indicators were used to evaluate the effects of inactivating HBV by potassium permanganate (P.P.). It was found that HBV-DNA structure could be destroyed in two minute, while HBV morphology and DNA polymerase were destroyed in five minute. It was suggested that

P.P. is an excellent disinfectant for the HBV contamination of the skin mucosa, fruits, vegetable, and diet vessels, etc.

参 考 文 献

1. Kaplan PM, et al. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *Journal of Virology* 1973; 12:995.
2. Weller VD, et al. The detection of HBV-DNA in serum by molecular hybridisation; A more sensitive method for complete HBV particles. *Journal of medical Virology* 1982; 9:273.
3. 布鲁斯.N.埃姆斯. 饮食中的致癌与防癌物质. 美国“科学”杂志 1984.
4. Schulster LM, et al. Immunological and biophysical alternation of hepatitis B virus antigen by sodium hypochlorite disinfection, *Appl. Environ. Microbiol* 1982; 42(5):762.
5. 儿玉昌彦等. 吸烟是如何诱发癌的? “日本经济新闻” 1985.

酶标SPA—ELISA法检测流脑A群抗体方法及应用

浙江省台州地区卫生防疫站 郑官增

本文参考文献进一步探讨了SPA-ELISA检测流脑A群抗体的方法及其应用, 现简报如下:

一、材料与方 法: 取10~20微克/毫升的冻干流脑A群多糖菌苗抗原包被反应板, 37°C 2小时后置4°C冰箱过夜, 洗涤4次; 加牛血清白蛋白4°C过夜, 同上洗涤; 每份标本加2孔, 测定孔加等量稀释液, 中和抑制对照孔加等量中和抗原, 37°C 1小时后置4°C过夜, 洗涤; 然后加酶标SPA 37°C 2小时洗涤; 最后加底物显色。测定孔显色, 中和抑制对照孔不显色为阳性结果。

二、结果与讨论:

1. 实验条件的选择: 抗原经酒精处理或在实验中加入牛血清白蛋白可使测定孔与中和抑制对照孔色差明显, 结果容易观察。中和抗原浓度为40微克/毫

升。

2. 特异性和重现性: 检测71份血清标本, 54份测定孔显色, 其中6份中和抑制对照孔亦显色, 经稀释后3份显阳性结果, 另3份对照孔仍显色。其特异阳性率为94.4%(51/54)。

在不同时间内对13份阳性血清及3份阴性血清检测二次, 结果其阳性率完全一致。10份抗体滴度未改变, 3份仅改变一个滴度, 说明结果重现性是良好的。

3. 应用: 用本法检测了免疫后儿童血清、病人血清和未免疫的对照人群血清共71份, 结果免疫后一个月儿童抗体阳性率为90.6%(29/32), GMT为14.92; 2份流脑病后一周的病人血清抗体滴度均为1:16, 对照人群抗体阳性率为62.2%(23/37), GMT为4.29。

本 刊 重 要 通 知

1. 本刊从1987年1月始, 对不录用稿件一律不退原稿, 请作者投稿时自留底稿。
2. 本刊从1986年始设全年卷终索引, 请今后投稿时提供关键词(中英文), 把原中文摘要改为提要放文前。详见374页。