

## 催化材料对病毒吸附及灭活作用特性的研究

赵春霞<sup>1</sup>, 明平文<sup>1</sup>, 杨 凌<sup>1</sup>, 刘中民<sup>1</sup>, 张卓然<sup>2</sup>, 马 磊<sup>1</sup>, 许 磊<sup>1</sup>, 齐 越<sup>1</sup>,  
孙承林<sup>1</sup>, 韩秀文<sup>1</sup>, 陈 严<sup>1</sup>, 曲振平<sup>1</sup>, 缪少军<sup>1</sup>, 郑丛龙<sup>2</sup>, 赵欣捷<sup>1</sup>,  
杜逊甫<sup>1</sup>, 刘 波<sup>1</sup>, 孔宏伟<sup>1</sup>, 王 畅<sup>1</sup>, 叶 芬<sup>1</sup>, 刘守新<sup>1</sup>, 胡 刚<sup>1</sup>,  
刘 页<sup>1</sup>, 张 涛<sup>1</sup>, 黄向阳<sup>1</sup>, 包信和<sup>1</sup>, 许国旺<sup>1</sup>

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; 2. 大连医科大学, 辽宁 大连 116023)

**摘要:**以核酸分子及普通病毒作为探针和模拟对象,进行了催化材料吸附、灭活副流感病毒的研究,旨在筛选出对病毒有过滤、吸附及灭活作用的高效非特异性催化材料,以应用于病毒的各种防护设施以及有效控制非典型性肺炎的传播。共评价了 93 种新合成的催化剂,发现两种催化材料对病毒具有杀灭作用。

**关键词:**毛细管电泳;副流感病毒;核酸;催化材料;非典型性肺炎

**中图分类号:** O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8713(2003)03-0222-04

## Characteristics of Adsorption and Inactivation of Viruses by Catalyst Materials

ZHAO Chunxia<sup>1</sup>, MING Pingwen<sup>1</sup>, YANG Ling<sup>1</sup>, LIU Zhongmin<sup>1</sup>, ZHANG Zhuoran<sup>2</sup>, MA Lei<sup>1</sup>, XU Lei<sup>1</sup>,  
QI Yue<sup>1</sup>, SUN Chenglin<sup>1</sup>, HAN Xiuwen<sup>1</sup>, CHEN Yan<sup>1</sup>, QU Zhenping<sup>1</sup>, MIAO Shaojun<sup>1</sup>,  
ZHENG Conglong<sup>2</sup>, ZHAO Xinjie<sup>1</sup>, DU Xunfu<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>1</sup>, KONG Hongwei<sup>1</sup>,  
WANG Chang<sup>1</sup>, YE Fen<sup>1</sup>, LIU Shouxin<sup>1</sup>, HU Gang<sup>1</sup>, LIU Ye<sup>1</sup>, ZHANG Tao<sup>1</sup>,  
HUANG Xiangyang<sup>1</sup>, BAO Xinhe<sup>1</sup>, XU Guowang<sup>1</sup>

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011, China;

2. Dalian Medical University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** SARS (severe acute respiratory syndrome) is a severe problem for people all over the world, and it is extremely urgent to control the spread of SARS. The purpose of this work is to evaluate and find effective catalyst(s), which can adsorb, decompose and inactivate viruses. In this study, nucleic acid and the parainfluenza virus, which is very similar to SARS, were selected as the probe and model object. Among the 93 newly synthesized catalysts evaluated using capillary electrophoretic and biochemical methods, two of them were found to be highly effective for killing the virus and will be useful for protection against the SARS infection.

**Key words:** capillary electrophoresis; parainfluenza virus; nucleic acid; catalyst materials; severe acute respiratory syndrome (SARS)

非典型性肺炎(atypical pneumonia)又名严重急性呼吸系统综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)<sup>[1~7]</sup>。当前,SARS的流行是人类社会面临的又一重大灾难。为了预防SARS,保障人类的安全与健康,我们开展了“用于呼吸道病毒阻隔、吸附和灭活的催化材料及相关作用机制”的研究,利用特制的催化材料,研究其对核酸分子、副流感病毒的吸附及灭活作用,以期将该催化材料进一步应用于SARS病毒的各种防护设施以及有效地控制SARS的传播。

SARS病毒主要是由近3万个碱基组成的核糖核酸(RNA)和3个糖蛋白组成的蛋白外壳构成<sup>[1~7]</sup>。由于直接使用病毒评价催化材料的过滤、吸附及灭活性能的周期较长,因此首先要建立可对催化剂进行快速筛选的方法。由于拟发展的催化材料是广谱性的吸附、氧化材料,初步可考虑选用构成SARS病毒的RNA及与SARS病毒中3个糖蛋白相近的糖蛋白作为催化材料快速筛选的评价对象。但由于糖蛋白的分析、检测方法的建立以及RNA的合成均需要较长的时间,也存在一定难度,而且我

收稿日期:2003-05-24

作者简介:赵春霞,女,1974年生,博士研究生。

通讯联系人:许国旺,男,博士生导师,研究员, Tel:(0411)3693403, E-mail:dicp402@mail.dlptt.ln.cn.

们的最终目的是筛选非特异性的高效催化材料,因此本实验选用较 RNA 更稳定的脱氧核糖核酸(DNA)分子作探针,对新合成催化剂<sup>[8]</sup>的吸附、抗水性能进行研究,筛选出不怕水且有较好吸附性能的催化剂进行下一轮的细胞毒性和病毒杀灭实验。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

ABI 310 型 DNA 全自动遗传分析仪、2700 型 DNA 扩增仪,购自美国应用生物系统(ABI)公司;超速低温离心机,购自美国科峻仪器公司;47 cm × 50 μm i. d. 石英毛细管柱,河北永年光导纤维厂产品。5A 分子筛、60~80 目玻璃微球,购自天津化学试剂二厂;商品化分离胶、分析缓冲液(3-羟甲基氨基甲烷-硼酸-乙二胺四乙酸钠, TBE), 购自 ABI 公司;聚合酶链反应(PCR)缓冲液、Taq DNA 聚合酶、脱氧核苷酸(dNTP)混合物、荧光标记 PCR 引物,购自大连宝生物(工程)有限公司;副流感病毒液(按 1:1280(体积比)的比例稀释病毒原液获得)、鸡胚(9~11 日龄)、0.5%鸡红细胞,由大连医科大学提供。93 种催化材料样品(ASC1~ASC60, DSA1~DSA4, AB-1~AB-5, AB-1-1, AB-2-1, AB-7, AB-8, AB-5-2, HR1~HR3, MA1~MA5, QA1~QA5, LPI, LY, KZJ09-1A, KZ09-1, Ag/SiO<sub>2</sub>, 活性炭)由中国科学院大连化学物理研究所催化实验室提供。

### 1.2 聚合酶链反应

本实验所用的 DNA 分子为 K-ras 基因<sup>[9]</sup>第一外显子中一段长为 211 bp 的 DNA 片段,由荧光(6-FAM)标记的引物经 PCR 扩增而成。PCR 反应体积为 50 μL,包括 1 μL 模板 DNA(100 ng)、5 μL PCR 缓冲液、4 μL dNTP 混合物、1.5 U Taq DNA 聚合酶、PCR 引物各 25 pmol 及适量去离子水。PCR 反应条件为 96 ℃ 下预变性 5 min,然后在 94 ℃ 下变性 1 min,50 ℃ 下退火 1 min,72 ℃ 下延伸 1 min;如此循环 35 个周期后,在 72 ℃ 下再延伸 7 min,在 4 ℃ 条件下放置。

### 1.3 催化材料的 DNA 分子吸附实验

将上述的 PCR 产物用去离子水稀释 30 倍后作为 DNA 分子原液。称取 0.2~0.3 g 催化材料,并将其均匀铺在表面皿上。取 50 μL 的 DNA 分子原液喷洒到催化材料表面并调匀,分别在 10,20 min 后用水超声洗脱,离心过滤,取上清液进行分析。

在 310 型 DNA 全自动遗传分析仪上进行电泳分析,采用激光诱导荧光检测器检测。筛分介质为短链线性聚丙烯酰胺凝胶<sup>[10]</sup>,涂层毛细管柱<sup>[11]</sup>(47 cm × 50 μm i. d.),进样时间和进样电压分别为 5~

50 s 和 15 kV,分离温度为 50 ℃,分离电压为 15 kV。

### 1.4 催化材料对细胞毒性的实验

本实验所用的细胞株为白血病耐药细胞株(K562/A)和白血病敏感细胞株(K562/S)。分别将 K562/A 和 K562/S 制成  $2 \times 10^5$  个/mL 和  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液。每种催化材料均制成 3 个浓度梯度的溶液:原液(1000 mg/L),1/10 原液(100 mg/L),1/100 原液(10 mg/L)。取各催化材料样品 100 μL 和细胞悬液 100 μL 加至 96 孔细胞培养板中,以催化材料的 3 个剂量(绝对量)100,10,1 μg 来确定其对细胞毒性的范围。将该细胞培养板放入 CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 24 h,显微镜下观察细胞的形态。

### 1.5 催化材料的抗病毒检验

称取催化材料 1 g 于无菌瓶中,加病毒液(1:1280)0.1 mL 于室温下混合作用 30 min,每 10 min 振荡 2 min,共操作 3 次;然后加入 2 mL 无菌生理盐水,立即混匀振荡 2 min,以 1000 r/min 的速率离心 5 min。吸取洗脱病毒液进行血凝试验,同时吸取 0.1 mL 稀释 100 倍后,取该稀释液 0.1 mL 接种(尿囊腔接种)9~11 日龄鸡胚,置于 37 ℃ 孵箱中孵育 72 h 后收集尿液测病毒血凝效价,并与培养前的血凝效价进行比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 分子吸附实验结果

考虑到研制出的催化材料的使用环境,我们认为:一个有前途的新催化材料,应该能吸附、杀灭病毒,且不怕水。为此,要对新研制的催化材料在含水环境中的吸附性能进行研究。首先用 60~80 目玻璃微球作为对照。结果表明,未经纯化处理的玻璃微球对 DNA 分子有少量吸附,经过乙醇和水清洗的玻璃微球对 DNA 分子无吸附(图 1),这也说明所建立的方法可以用于催化材料的 DNA 吸附能力评价。

与为常见的一般吸附剂进行比较,我们也对 5A 分子筛的吸附性能进行了研究,发现其对 DNA 分子有一定的吸附,但作用较弱。同时比较了水洗脱及甲醇-水(体积比为 1:1)溶液洗脱的效果,发现两种洗脱方法的效果相近(见图 2),因此对所有催化材料的 DNA 吸附能力评价均选用水洗脱。

对催化材料的吸附时间实验结果表明,大部分吸附性能强的催化材料在 10 min 内即可将 DNA 完全吸附(见图 3),少部分需要近 20 min 才能完全吸附(见图 4);对 DNA 分子吸附性能较差的催化材料在 20 min 后,其洗脱液中仍然含有大量 DNA 分子。

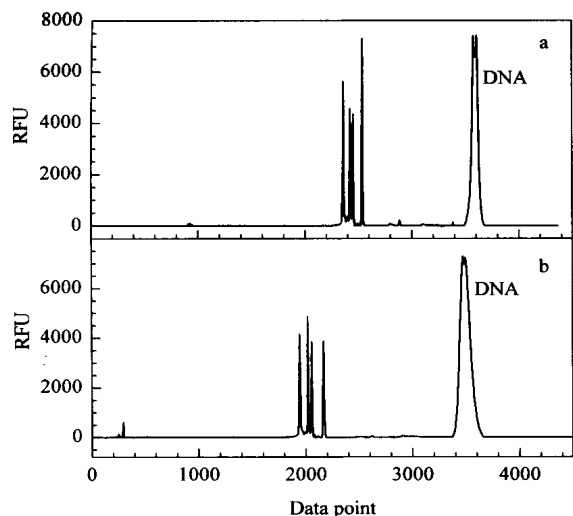


图 1 玻璃微球的 DNA 洗脱液的毛细管电泳图

Fig.1 Electropherograms of DNA molecules on glass micro-beads  
a. DNA molecular solution ; b. DNA eluate (eluting after adsorption for 20 min) .

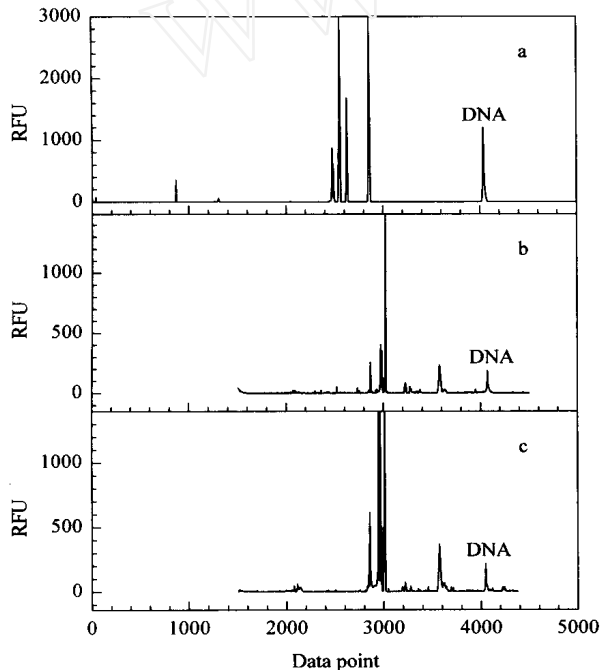


图 2 普通分子筛的 DNA 洗脱液的毛细管电泳图

Fig.2 Electropherograms of DNA eluate on general 5A molecular sieve

a. DNA molecular solution ; b. DNA eluate (eluting with water after adsorption for 10 min) ; c. DNA eluate (eluting with methanol-water (1 : 1, v/v) after adsorption for 10 min) .

在所评价的 93 种催化材料中,有 35 种对 DNA 分子的吸附能力较强,另有 35 种对 DNA 分子的吸附能力居中,分别占所评价催化材料的 37.6%。剩余 23 种催化材料(24.7%)对 DNA 分子的吸附能力相对较弱。

### 2.2 催化材料对细胞毒性的检测结果

本研究的目的是筛选具有灭活病毒作用的催化材料。该材料除可用于大型防护设施外,也希望能

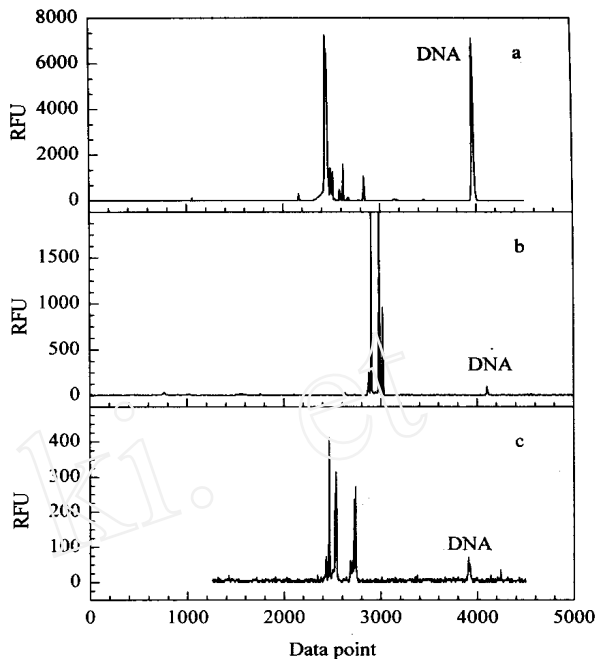


图 3 吸附性能较强的催化材料(ASC-16)的 DNA 洗脱液的毛细管电泳图

Fig.3 Electropherograms of DNA eluate on a newly synthesized catalyst material (ASC-16) with better adsorptive capability

a. DNA molecular solution ; b. DNA eluate (eluting after adsorption for 10 min) ; c. DNA eluate (eluting after adsorption for 20 min) .

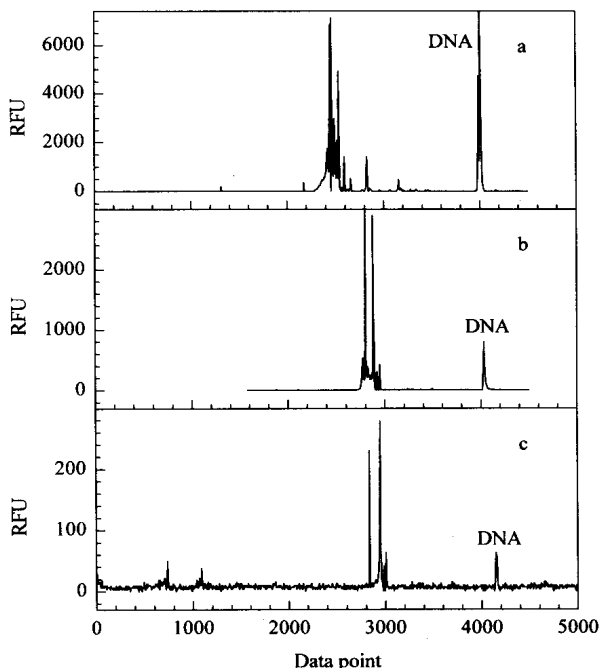


图 4 慢吸附催化材料(ASC-13)的 DNA 洗脱液的毛细管电泳图

Fig.4 Electropherograms of DNA eluate on a newly synthesized catalyst material (ASC-13) with a slowly adsorptive function

a. DNA molecular solution ; b. DNA eluate (eluting after adsorption for 10 min) ; c. DNA eluate (eluting after adsorption for 20 min) .

用于与人体接触的防护材料(如口罩、防护服等),因此需要确定催化材料对细胞的毒性。本阶段对93种催化材料进行了细胞毒性实验。根据细胞毒性实验结果可以将催化材料对细胞的毒性大小归纳为以下3组:对细胞的毒性最弱组(100  $\mu\text{g}$  剂量下,催化材料对细胞的致死率 10%);对细胞的毒性较强组(100  $\mu\text{g}$  剂量下,催化材料对细胞的致死率为 10%~50%);对细胞的毒性最强组(100  $\mu\text{g}$  剂量下,催化材料对细胞的致死率为 100%)。结合 DNA 分子吸附实验的结果可知,在所给出的吸附性能最强的35种催化材料中,ASC-23 对细胞的毒性最强,对 K562/A 细胞而言,2  $\times 10^4$  个细胞的安全剂量 10  $\mu\text{g}$ ,对 K562/S 细胞而言,1.5  $\times 10^4$  个细胞的安全剂量 10  $\mu\text{g}$ ;ASC-14,ASC-19,ASC-20,ASC-24,DSA-1,DSA-2,ASC-40,ASC-41,DSA-4 对细胞的毒性最弱,它们对 K562/A 细胞而言,2  $\times 10^4$  个细胞的安全剂量 100  $\mu\text{g}$ ,对 K562/S 细胞而言,1.5  $\times 10^4$  个细胞的安全剂量 100  $\mu\text{g}$ ,在口罩、防护服中使用的无毒高效催化材料应从其中选出或以此为先导。

### 2.3 催化材料的抗病毒检验结果

对催化材料吸附病毒后的洗脱液进行血凝试验,以血凝效价对催化材料的吸附能力进行筛选并将其按吸附力的强弱分为强、中、弱3级,结果如下:强吸附力催化材料(洗脱液血凝效价 < 1/20,吸附率 > 98%)有19种,占有催化材料的21.3%;中等吸附力催化材料(血凝效价为 1/20~1/160,相当于吸附率为 87.5%~98.0%)有39种,占有催化材料的43.8%;弱吸附力催化材料(血凝效价为 1/320~1/1280,相当于吸附率为 0~75%)有31种,占有催化材料的34.8%。催化材料对副流感病毒的吸附-洗脱-接种鸡胚再增殖试验的结果表明,ASC-28 和 AB-2-1 两种催化材料具有吸附与灭活副流感病毒的作用。其中 ASC-28 吸附病毒后的洗脱液能查出少量病毒(1/20),但接种鸡胚后无病毒增殖,证明病毒已被灭活。AB-2-1 的洗脱液接种鸡胚前后均为阴性,证明病毒完全被吸附并已被灭活。实验中也发现有的催化材料的洗脱液中有少量病毒存在,但保持活性,经接种鸡胚增殖后血凝效价呈升高

趋势,如 ASC-32 和 DSA-4 接种前血凝效价分别为 1/60 和 1/40,接种鸡胚后增殖,血凝效价均上升为 1/1280,说明这种吸附并不能灭活病毒。

### 3 小结

本实验选用 DNA 分子及副流感病毒作为模拟对象,进行了催化材料吸附、灭活病毒的实验研究。结果表明,选用 DNA 分子作为探针,可对研制的催化材料的吸附能力进行快速地筛选及评价,可为进一步的病毒模拟实验提供依据。副流感病毒实验的结果表明,我们所研制的催化新材料对病毒有不同的吸附及灭活作用,从中可筛选高效非选择性的催化材料,进行进一步的 SARS 病毒实验,以期应用于 SARS 病毒的多种防护设施以及控制 SARS 病毒的传播,造福人类。

### 参考文献:

- [1] Poutanen S M, Low D E, Henry B, Finkelstein S, Rose D, Green K, Tellier R, Draker R, Adachi D, Ayers M, *et al.* N Engl J Med, 2003, 348: 1995
- [2] Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt G M, Ahuja A, Yung M Y, Leung C B, To K F, *et al.* N Engl J Med, 2003, 348: 1986
- [3] Tsang K W, Ho P L, Ooi G C, Yee W K, Wang T, Chan Yeung M, Lam W K, Seto W H, Yam L Y, Cheung T M, *et al.* N Engl J Med, 2003, 348: 1977
- [4] Martin E, Gretchen V. Science, 2003, 300: 224
- [5] Dennis N. Science, 2003, 300: 714
- [6] Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H R, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier R A, *et al.* N Engl J Med, 2003, 348: 1967
- [7] Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, Zaki S R, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer J A, Lim W, *et al.* N Engl J Med, 2003, 348: 1953
- [8] Liu Zhongmin, Zhang Zhuoran, Xu Guowang, Yang Ling, Ma Lei, Sun Chenglin, Xu Lei, Qi Yue, Zhao Chunxia, Ming Pingwen, *et al.* Chinese Journal of Catalysis, 2003, 24(5): 323  
刘中民,张卓然,许国旺,杨凌,马磊,孙承林,许磊,齐越,赵春霞,明平文,等.催化学报,2003,24(5): 323
- [9] Leone-Kabler S, Wessner L L, McEntee M F, D'Agostino R B Jr, Miller M S. Carcinogenesis, 1997, 18: 1163
- [10] Ren J, Ulvik A, Ueland P M, Refsum H. Anal Biochem, 1997, 245: 79
- [11] Hjerten S. J Chromatogr, 1985, 347: 191