3 讨论

Western-blotting技术是检测细胞内蛋白质表达的专用分析技术,但由于其检测系统通常采用酶促底物显色法,因其灵敏度较低、且显色缓慢而使其应用受到一定限制。本研究使用的Luminol-H_2O_2-HRP系统建立的Western印迹-增强化学发光法(ECL),它将Western-blotting的特异性和增强化学发光法的灵敏度结合起来,提高了Western-blotting技术的灵敏度,且发光信号可稳定在20 min无影响[3]。

电泳条件的选择是Western-blotting技术的关键环节之一。国外绝大多数学者均采用10%PAGE-SDS单一浓度胶检测细胞周期蛋白的表达[4],本实验证实采用10%PAGE-SDS和6%PAGE-SDS的堆积胶(Stack gel)[5],80 V,2.5 h,可以将分子量大小不同的蛋白质在很短的时间内,调节在同一起点上,分离效果优于单一浓度胶。

封闭可能结合非相关蛋白的位点也直接影响Western印迹法的检测效果[6]。因此在实验中我们对封闭条件作了改进,选择的封闭液中含有0.05% Tween-20,4 ℃,4 h,这样既不影响抗体与靶抗原的特异性结合,又可有效降低非特异性结合背景。

Western印迹膜同时采用酶促底物显色和ECL试剂检测,结果显示前者呈色浅,且非常缓慢,日光照射4 h后即褪去;而ECL试剂可以快速(反应1 min)、清晰地显示出所测靶蛋白的表达,大大提高了检测反应的灵敏度,且所发的光可以持续稳定较长的时间(20 min)。结果显示,在未经作用的K562细胞中,CyclinE和Cdk2的表达增强;而在苦参碱作用后分化的K562细胞中,CyclinD1和cdk5的表达增强。提示Cyclin和Cdk的表达与细胞增殖和分化密切相关。

目前,国外有关Western-blotting检测细胞周期蛋白表达的报道很多。大多数学者采用的蛋白质用量为50~100 μg,选择10%PAGE-SDS单一浓度胶,封闭条件为25 ℃,30 min,而本实验采用NP-40裂解法制备细胞核、Stack胶分离蛋白质、增强化学发光法检测,蛋白质用量降低为30 μg,从而使该方法能更广泛地应用于难得标本的分析,扩大了Western印迹技术的应用范围。

(致谢:本课题在香港大学医学院生物化学系完成,得到该系各位导师的指导和支持,特此致谢!)

关键词:Western印迹;增强化学发光;细胞周期调控
中图法分类号:R329-33 文献标识码:B

参考文献:

[1] Marzluff W F, Murphg E C, Huang R C C. Transcription of ribouncleic acid in isolated mouse myeloma nuclei[J]. Biochemistry, 1973, 12(6): 3 440-3 446.
[2] 陈文勇.化学发光在核酸探针诊断中的应用及其进展[J].国外医学:临床生物化学与检验学分册,1993,14(2):51-53.
[3] 张莉萍,蒋纪恺,Joe Tam,等.苦参碱诱导K562细胞分化的作用机制研究[J].中华血液学杂志,1999,20(6):315-316.
[4] Whicehead T P, Thorpe G H G, Carter T J N. Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay[J]. Nature, 1983, 305(3): 158.
[5] Zhan R L, Hromchak R, Bloch A. Differential expression of proteins regulating cell cycle progression in growth vs differentiation[J]. Biochimica Biophysica Acta, 1997, 1356(3): 149-159.
[6] J.萨姆布鲁克,E.F.弗里奇,T.曼尼蒂斯.分子克隆实验指南[M]:第2版.北京:科学出版社,1996.888-902.

(编辑 潘式文)

文章编号:1000-5404(2001)10-1243-02

技术方法

超氧化离子水的体外杀菌试验

Experimental study of antimicrobial effect of super-oxidizad water

陈 萍,刘 丁,张志诚,邓光贵 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所感染监控中心,重庆 400042)

提 要:目的 研究超氧化离子水对细菌、病毒的杀灭效果。方法 通过定量杀菌试验、乙型肝炎表面抗原破坏试验、金属腐蚀性试验进行比较杀菌性能。结果 在无有机物存在的条件下15 s可杀灭细菌繁殖体,作用30 s可破坏乙型肝炎表面抗原,作用10 s可杀灭枯草杆菌的芽孢,对金属腐蚀性小。结论 超氧化离子水对微生物有较强杀灭作用,可作为医院消毒使用。

超氧化离子水(Super-oxidized water)是将加入少量氯化钠的自来水,通过离子隔膜电解,在阳极产生具有1 100 mV以上的氧化还原电位(Oxidation reduction potential,ORP)和pH 2.7以下的特殊离子水。由于该水的强氧化能力和低的pH值,对细菌微生物具有一定的抗菌活性[1],为了进一步评价超氧化离子水的消毒效果,我们对其进行了有关实验的研究,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 消毒剂的制备

超氧化离子水是在自来水中加入氯化钠,配制成氯化钠浓度为10%的水溶液,将氯化钠充分溶解后,通过连续式电解水

作者简介:陈 萍(1962-),四川省宜宾市人,副主任技师,主要从事医院感染与消毒方面的研究,发表论文17篇,电话:(023)68757992

收稿日期:2000-12-29;修回日期:2001-05-23

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

生成器(日本三之水电器有限公司生产),在阳极产生氧化还原电位(ORP)高于1 100 mV、pH 值低于2.7的超氧化离子水。

1.2 菌悬液的制备

试验菌株为金黄色葡萄球菌(ATCC6538);大肠埃希菌(ATCC25922);枯草杆菌变种芽孢(ATCC25922),用生理盐水制备成含菌量均各为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml 的悬液。

1.3 中和剂选择

①用含0.1%硫代硫酸钠、0.07%卵磷脂的复方中和剂[1],0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液,pH 7.2~7.4(用于定量杀菌试验)。②0.5% 硫代硫酸钠,20% 小牛血清,0.02 mol/L 的磷酸缓冲液,pH 7.2~7.4(用于 HBsAg 破坏试验)。

1.4 定量杀菌试验

取菌悬液0.5 ml 加入到含4.5 ml 超氧化离子水中混匀振摇1 min 后,取0.5 ml 菌悬混合加入4.5 ml 中和剂A 中,混匀,作用10 min 后,取其原液及稀释液0.5 ml 分别接种平皿,倾注普通营养琼脂培养基并混匀。于37 ℃孵箱培养48 h,计数菌落,并计算出平均杀灭率,此试验均重复3次。

1.5 HBsAg 破坏试验

取1 mg/ml 含5.0%小牛血清的HBsAg 溶液6 μl,加入到含1.50 ml 超氧化离子水的试管内,混匀,作用至规定时间后,分别取0.30 ml 加入到含0.30 ml 中和剂的试管中,混匀,作用10 min 后,取0.10 ml 进行 ELISA(北京万泰生物有限公司产)检验,每个样品平行做两孔,取其平均 D_{450} 值,以 S/N< 2.1 作为 HBsAg 转阴的标准,试验重复3次。

1.6 金属腐蚀性定量试验

试验采用称重法。试验用铜、铝、不锈钢三种金属片外径24 mm 小孔,试验前,将样片作清洗,去油后干燥处理、精确称重(精确度为0.1 mg)。将每种样片分别放入超氧化离子水中浸泡,浸泡量为20 ml/cm^2,浸泡时间为72 h,每24 h 更换1次消毒剂,浸泡完毕后,将样片洗净刷去锈迹干燥、精确称重,计算腐蚀速率。

2 结果

2.1 杀菌效果

在(20±2) ℃水浴条件下,ORP 值为1 100 mV,pH 值为2.42的超氧化离子水原液对金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌作用30 s,杀灭率可达到99.91%;作用5 min 后可达100%。枯草杆菌变种芽孢作用10 min 后,杀灭率可达97%,作用30 min 后,可达100%,见表1。

表1 超氧化离子水对细菌的杀灭效果

试验菌	细菌的平均菌落数(cfu/ml)	作用不同时间的杀灭率(%)			
		0.5 min	2 min	5 min	10 min
金黄色葡萄球菌	7.20×10^5	99.99	100.00	100.00	100.00
大肠埃希菌	4.92×10	99.99	99.99	100.00	100.00
枯草芽胞杆菌	8.40×10^5	0.00	20.70	60.71	97.00

2.2 对 HBsAg 的破坏效果

在(20±2) ℃水浴条件下,ORP 值为1 100 mV,pH 值为2.42时的超氧化离子水作用30 s 可破坏 HBsAg 抗原性,结果见表2。

2.3 对金属腐蚀性试验

结果见表3所示,以72 h 连续浸泡之后,铝、铜及不锈钢片基本无腐蚀。

表2 超氧化离子水作用不同时间对 HBsAg 的破坏作用

	作用时间(min)				阴性对照	阳性对照
	0.5	1	2	5		
D_{450}	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	1.176
S/N	1.32	1.0	1.0	1.0		387.500

表3 超氧化离子水对不同金属腐蚀作用

试验样片	金属侵入前质量(g)	金属侵入后质量(g)	腐蚀速率(mm/h)
不锈钢	3.4672	3.4672	0.0000
铝	1.1940	1.1938	0.0092
铜	3.6217	3.6216	0.0015

2.4 环境影响因素

超氧化离子水还受消毒作用时间的影响,作用时间越长,杀灭率越高,同时有机物将严重降低超氧化离子水的作用。

3 讨论

超氧化离子水是国际上新开发出的一种高效、无毒、价廉、环保的全新消毒灭菌液,具有高氧化还原电位、低 pH 值[1,2]。本实验表明,能在较短时间内(30 s)杀灭金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌,对枯草芽孢杆菌也具有一定的杀灭效果。同时,对乙肝病毒的 HBsAg 也有破坏作用。其杀菌原理,一是由于它具有很高氧化还原电位(1 100 mV 以上),大大高于细菌及病毒等微生物生存所依赖的细菌、病毒等微生氧化还原电位400~900 mV 的电环境,二是由于其强酸性的 pH 值(2.7)失去了细菌及病毒等其它微生物的生存环境要求 pH 值在4.0~9.0条件。三是由于在其电离过程中,出现了大量的 HClO 及活性氧(H_2O_2 及 O_3)。通过多种作用,迅速抑制、破坏细菌生长所必需的酶,进而杀灭微生物。作为一种新型广谱消毒剂,在医疗卫生、卫生防疫、饮食服务、食品加业、家庭卫生等各领域具有良好的应用前景。另外,结果显示超氧化离子水的杀灭作用随着作用时间延长而加强,但有机物也可影响杀菌力,同时,该水极不稳定[2],因此在使用时,必须树立严格工作态度,把好质量关尽量做到现用现配[3],生产的超氧化离子水尽量在1周内用完,缩短贮存时间,贮水最好避光、密封,并注明制水日期、电位、pH 值等技术指标。应定期监测强氧化离子水的 pH 值及氧化还原电位,确保其消毒效果。

关键词:超氧化离子水;氧化还原电位;杀菌
中图法分类号:R187.1 文献标识码:B

参考文献:

[1] Selkon J B, Babb J R, Morris R. Evaluation of the antimicrobial activity of a new super-oxidixed water, Sterilox, for the disinfection of end oscopes [J]. J Hosp Infect, 1999, 41(3): 59-61.
[2] 李新武,孙守宏,李 涛 等.酸化电位水对微生物的杀灭效果及其作用机理的初步研究[J].中华流行病学杂志,1996,17(12):95-96.
[3] 王国卿,刘丽华,冯晓玲 等.强氧化离子水治疗严重创面感染的作用[J].中华医院感染杂志,1999,9(3):156-157.

(编辑 谢义霞)

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