

病毒快速自动检测法¹⁾

——一种新颖的核孔膜技术

何高魁 朱天成 王玉兰

(中国原子能科学研究院,北京 102413)

摘要 介绍了一种以核孔膜作为传感元件自动检测活体病毒大小和数量的方法及其在病毒学研究、医疗和卫生防疫等领域的应用意义,分析总结了该方法的特色和创新之处。

关键词 核微孔膜,病毒,微机,多道

Abstract This paper introduces a method for automatically and rapidly measuring the size and quantity of virus by means of nuclear pore membrane. It can be used in virology, medical treatment and sanitary engineering and epidemic prevention. The applications and the peculiarities of this method will be described in detail.

Key words nuclear pore membrane, virus, computer multichannel

人类由病毒所致的疾病占传染性疾病的75%—80%,而细菌感染仅占20%—25%^[1]。病毒性疾病种类很多,在人类中发生或流行的也不少,如流行性感、流行性乙型脑炎、传染性肝炎等,都是传染性强和发病率高的人类病毒性疾病。病毒病的流行,对人类的健康构成了严重威胁。

人类的病毒病有:天花、麻疹、水痘、脑炎、脊髓灰质炎、狂犬病、淋巴肉芽肿、流行性肝炎、流行性感、白血病、腮腺炎、传染性单核白细胞增多症、爱滋病、癌症等。

动物的病毒病有:口蹄疫、猪瘟、鸡瘟、牛瘟、假性狂犬病、马脑炎、马贫血病等,它们可使作为劳动力和供食用的动物致死,使国民经济遭受严重损失。

在植物方面,据统计,目前尚有200种以上的植物病毒病。

许多病毒病都有发病潜伏期,如流行性乙型脑炎,潜伏期为两周,死亡率高达5%—10%,且30%—50%都有后遗症,若能早期诊

断,早期治疗,则可大大降低死亡率和后遗症的发病率。因此,迅速诊断出病原在疾病的治疗和控制流行方面无疑具有重要意义。

快速检测病毒,可以确定某一地区病毒性疾病流行的类型及分布状况,及早发现或肯定病源,迅速采取措施防止蔓延,这在交通检疫工作中意义重大^[1]。

病毒是迄今为止人类认识的最小生命形态,其种类繁多,大小因种类而异。例如,脊髓灰质炎病毒直径仅有8—12nm,流行性乙型脑炎病毒大小为20—30nm,流行性感及Borna病毒是120—130nm^[2]。测量病毒的大小,可以判定病毒的种类,测量病毒的多少,可了解病毒在活体细胞中的繁殖能力,在疫苗制备中亦可提供浓度的准确数据。

防治病毒性疾病,首先要求作出正确的病原诊断。常用的检验方法有显微镜法、病毒分离和血清学试验。病毒极小,要在电子显微镜

1) 1994年8月11日收到。

下才能观测到, 电镜的操作需工作人员技术熟练, 操作繁琐而费时, 不易迅速作出诊断, 且电镜下观测的病毒已是死亡的“干”病毒。病毒分离和血清学试验检测病毒过程繁琐, 周期长, 不能迅速判断结果, 且动物、鸡胚或组织培养的细胞对病毒的敏感性有不同程度的个体差异, 必须选择几个必要稀释度的病毒和血清分别接种一定数目的动物、鸡胚或组织培养管, 综合观察不同稀释度的试验结果来进行判定。核微孔技术的出现, 为病毒检测提供了新的有力工具。本文介绍一种利用核孔膜快速、自动测量活体病毒大小及数量的方法。

1 核孔膜传感元件

核孔膜是一种新型材料, 在许多科学技术领域中得到了广泛应用。它是由重离子在绝缘物质薄膜上打内经化学蚀刻扩孔而成。当重离子在绝缘物质薄膜中的可蚀刻射程大于薄膜厚度时, 在每个垂直入射的重离子路径上产生的辐射损伤, 可用化学方法优先蚀刻, 形成穿透绝缘薄膜的笔直通道(微孔)。具有一个或多个这种穿透性微孔的绝缘薄膜称为核孔膜。

核孔膜的孔径由蚀刻时间决定, 精确控制蚀刻时间可获得预定孔径的核孔膜。重离子在绝缘物质中产生的辐射损伤区域具有一定穿透性, 直径为 3—5nm, 是核孔膜孔径的下限。控制蚀刻时间, 核孔膜的孔径可从这一下限扩大到几十个 μm , 跨越肉眼看不见的四个数量级的线度范围, 对这一线度范围微观客体的属性, 人们现在了解得甚少, 是当前科学技术的前沿领域之一。核孔膜将成为捕捉和分析这一范围微观客体的不可缺少的工具。目前, 核孔膜已在许多领域得到了广泛的应用, 如超流体研究、化学分离、同位素分离、净化技术、真空技术、制药工业、食品工业等。核孔膜最有实际意义的用途之一是用于病毒检测这一新的应用领域。

病毒的直径大小从 8—10 nm 到 250—300 nm 或更多, 正处在核孔膜孔径可达的线度范围内。据库尔特原理, 用具有圆柱形通道的微孔

可探测粒度为微孔孔径 2%—40% 的悬浮液中的固体颗粒。因此, 利用 800nm 的核孔膜, 配合核电子学能谱测量技术测量病毒大小, 可以得到病毒数目和大小的二维谱, 谱形中每个峰分别代表被测样品中不同大小病毒的数量。对谱进行适当的处理, 就可得到各种大小病毒的分布状况、数目和含量。

2 工作原理

如图 1 所示, 测量系统由探测器、负压系统、模数转换 (A/D)、微机多道及一系列相关

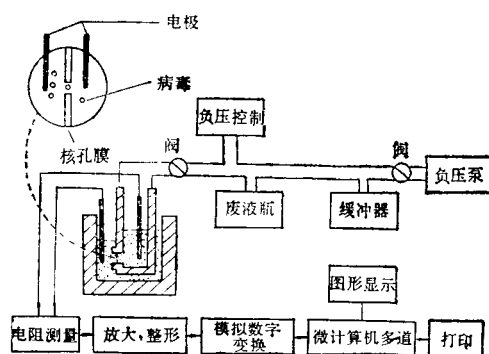


图 1 系统原理图

的电子学电路组成。待测病毒样品加入含电解质的稀释液中, 核孔膜固定在圆筒状绝缘探头侧面, 两探测电极被核孔膜分隔开, 电流只能通过核微孔构成回路。由于核微孔孔径很小, 其电阻比周围溶液的电阻大得多, 因此在孔周围形成电敏感区, 两电极之间的电阻主要取决于微孔通路的导通状况。电路中加入一恒定电流 I , 当探头内压强低于探头外时, 膜外侧的病毒随稀释液经过微孔流入探头内。当一个病毒进入微孔内, 瞬时改变了微孔的导通状态, 膜两边电阻值增大。由欧姆定律可知, 对球形粒子, 其增量为

$$\Delta R = K \frac{d^3}{D^4}, \quad (1)$$

其中 K 为常数, d 为病毒直径, D 为核孔膜孔径。

电极上产生的电压变化量为

$$\Delta U = I \times \Delta R = IK \frac{d^3}{D^4} \quad (2)$$

当病毒通过微孔时,两电极间的电压变化如图 2 所示。此电压脉冲信号与病毒大小的立方成正比,极为灵敏, d 的微小变化都将引起 ΔU 的变化。因此,精确测量 ΔU , 就能得到病毒的粒度值。

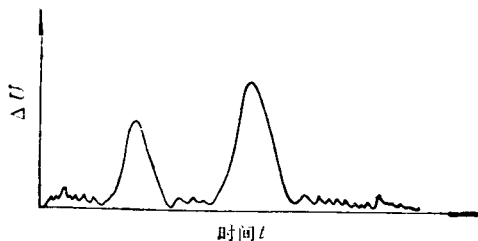


图 2

幅度代表病毒大小的电脉冲信号,经放大、整形送入模拟-数字变换(A/D)电路,将此模拟量变为数字量,以直接存储器存取(DMA)方式送入计算机多道,将该数据对应的道地址内计数加1。对于含多种病毒的样品,不同病毒的大小对应不同的道地址。统计测量大量病毒,分析、处理各道址内的数据,就可得到被测样品中病毒大小的分布及其含量的二维谱图,如图 3 所示。谱中每个峰代表一种病毒,峰值对应的横坐标为该种病毒的平均大小,峰面积为该种病毒的数目。谱分析和处理结果由打印机输出。

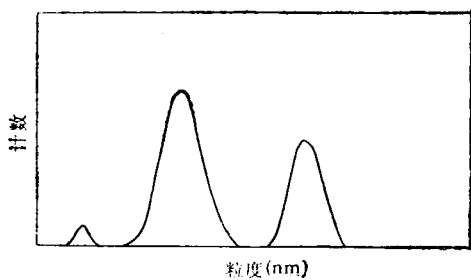


图 3

负压系统由负压泵、阀门、缓冲瓶和负压控制电路组成。在测量过程中产生负压,为病毒悬浮液流过微孔提供动力,选择适当的负压值,以获得较好的脉冲信号和适当的测量速度。

在信号采集过程中,由于信号较弱,必须选择恰当的电流值,以保证较好的信噪比,提高测量精度。

3 特色

病毒极小,除天花和牛痘等几种稍大的病毒可以用特殊方法染色后在普通显微镜油镜下检查原生小体外,绝大多数病毒只能用电子显微镜才能看见,但由于电镜的价格昂贵,目前一般实验室还没有条件购置。在电子显微镜下测量病毒大小,通常采用以下方法^[4]。一种是负染技术(negative staining):它是用重金属染液里的金属原子作为电子“颜料”,把密度较低的生物标本包围而形成明显的反差,电子光束能通过低电子密度的病毒颗粒,而不能通过金属背景,从而使病毒颗粒呈现明亮清晰的结构。另一种是超薄切片电镜术(thin section electron microscopy):一般的透射式电子显微镜电子束穿透能力较弱,大多数标本无法直接在电镜下观察,必须经过取材、固定、脱水、浸透与包埋,切成厚度为 10—100 μm 的薄片,才能观察。

以上方法在样品制备和处理中,难免存在人工损伤、污染及变形等^[5],使观察到的结果不能真实地反映病毒的大小,而且操作繁琐、费时,改变了病毒的生物特性,不能进行活体检测。

利用核微孔膜和核能谱测量技术测量病毒大小和数量的方法,设计新颖,构思巧妙,测量时只要求病毒悬浮液流过小孔即可,采用计算机处理。该方法具有以下特色和创新:

(1) 对病毒进行活体测量,不但得到真实的病毒尺寸,而且被测病毒还可进行进一步的其他方法分析。

(2) 能快速诊断有无病毒,利用免疫血清与病毒结合的特点可进行病毒的特异性诊断,在疾病防治中有很好的推广和应用前景。

(3) 测量自动化,计算机实时处理,快速、准确,大大减少人工劳动强度。

(4) 不但可以测定单个病毒,而且可统计

大量病毒,给出病毒数目随病毒大小的分布图,可对不同大小病毒含量进行分析。

4 结束语

在生物学历史上,所有领域的发展都在某种程度上依赖于科学技术的进步^[4]。在生理科学中,技术上的进步尤为重要。本文介绍的方法,其优点在于它具有非常高的鉴别和分析亚微观粒子的能力。从化学和生物学来讲,过滤性病毒处于生物和非生物之间的中间状态,虽然病毒不存在固有的新陈代谢活动,但具有遗传信息和在活体细胞内成倍繁衍的能力。生理学家们还发现,病毒具有转换细胞核性质的能力,其机制是人们研究的热点。据估计这可能是病毒的遗传物质、电荷侵入细胞后永久地改变细胞的遗传成分和性质所致。因此,在寻找

和研究动物和人类的致癌病毒方面,用适当的仪器表征不同病毒的特征,在已知的生理条件下测量这些病毒的增殖能力,是十分必要而有价值的工作。本文介绍的方法,具有自动、快速和电脑化等优点,结合免疫学方法有可能发展为一种新的病毒快速诊断方法,必将为寻找和研究过滤性病毒、动物和人类的致癌病毒的特性、新的未知病毒的鉴别、卫生防疫及医院临床诊断、海关检疫等领域提供一种新的病毒检测手段。

参 考 文 献

- [1] 上海卫生防疫站编著,卫生防疫检验,上海科学技术出版社,(1964),194.
- [2] 斯·尼古劳著,病毒学,科学出版社,(1956),19.
- [3] 杭振德、蔡文琴,电子显微镜术在临床医学的应用,重庆出版社,(1988),14.
- [4] G. E. 艾伦著,谭茵、田铭、王云松译,二十世纪的生命科学,北京师范大学出版社,(1984),251.

激 光 加 工 技 术 及 其 应 用¹⁾

邓 树 森

(中国大恒公司,北京 100080)

摘要 阐述了激光加工的基本原理及激光热加工与“冷加工”的概念,并将激光加工与传统加工方法作了对比,从中可看出激光加工的特点;其后介绍了激光热处理、焊接、切割的工艺参数及典型应用举例;最后介绍了国内外激光加工的市场及发展状况。

关键词 激光加工,激光加工原理,激光加工应用,激光加工市场

1 激光加工原理

激光是一种应用面很宽的高技术,有的是利用它的单色性,有的是利用相干性或方向性,有的则是利用其高功率密度。对于工业加工用的激光,人们关心的主要是功率、波长(单色性)、空间-时间特性以及偏振性。

将激光束照射到金属或非金属工件上,会瞬时使被辐照材料熔化甚至汽化,以完成各种加工,这种基于热效应的加工称为热加工。某一

类波长的激光束照射到聚合物一类的材料,则可产生光化学反应的刻蚀加工,这种加工称为“冷加工”。

激光加工有热加工和“冷加工”之分,决定因素是光子能量的大小,光子能量与光波频率成正比,与其波长成反比。表1给出了加工常用激光器的有关参数。

CO₂、CO 和 YAG 激光器均输出红外光。红外光的光波长而光子能量小。红外光子作用

1) 1994年6月8日收到。