环境水体中肠道病毒的膜吸附-洗脱浓缩方法研究

张崇淼[1], 刘永军[1], 王晓昌[1], 薛小平[2]
(1. 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安 710055; 2. 西北工业大学生命科学学院, 西安 710072)

摘要: 在膜吸附-洗脱和洗脱液浓缩相结合的基础上, 建立了一种简便实用的水中肠道病毒浓缩方法. 通过实时定量 RT-PCR 检测, 比较了不同材料和不同孔径的微孔滤膜对病毒的吸附效果; 对膜洗脱方式进行了改进; 研究了在洗脱液浓缩过程中, PEG 浓度对于病毒回收率的影响. 最后确定了最佳的浓缩方法. 选择效果好而且来源广泛的 0.22 μm 孔径的混合纤维素酯微孔滤膜, 采用磁力搅拌来洗脱滤膜上吸附的病毒; 洗脱液浓缩步骤中, PEG 最佳质量浓度为 130 g/L. 系统比较了不同病毒接种量下, 方法中各步骤的病毒回收率. 对接种已知量的肠道病毒的生活污水、二级处理出水和地表水等样品的试验结果表明, 该方法效果稳定, 适合不同水样中肠道病毒的浓缩分离.

关键词: 肠道病毒; 浓缩; 膜吸附-洗脱; 微孔滤膜; 实时定量 RT-PCR
中图分类号: X799.5; X832 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2007)07-1543-05

Study on Membrane Adsorption-Elution Method for Concentration of Enteroviruses from Environmental Waters

ZHANG Chong-miao[1], LIU Yong-jun[1], WANG Xiao-chang[1], XUE Xiao-ping[2]
(1. School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 2. Faculty of Life Sciences, Northwest Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract: A simple and efficient method for concentration of enteroviruses from water sample was established based on the membrane adsorption-elution method combined with eluant concentration. By means of real-time RT-PCR, microporous filters with various nominal pores and materials were compared; the membrane elution method was modified; the effect of PEG on virus recovery was studied; the optimal method was determined at last. In view of the virus recovery and cost, cellulose mixed-ester microporous filter with nominal pore size of 0.22 μm was superior to other filters. Magnetism agitation was used for membrane elution and the optimal final mass concentration of PEG was 130 g/L in eluant concentration step. The recovery of virus was studied in every step in various seeding viruses. The method was tested in surface water, secondary effluent and sewage seeded with viruses. The results showed that the modified method was reliable and suitable for separation and concentration of enteroviruses from various water samples.

Key words: enteroviruses; concentration; membrane adsorption-elution; microporous filter; real-time RT-PCR

近年来由于水污染的加剧, 在多种水体中都发现了肠道病毒, 水传播导致的肠道病毒感染的病例也时有发生, 已引起人们的普遍关注[1~3]. 脊髓灰质炎病毒是肠道病毒的典型代表, 在有关环境中肠道病毒的检测方法研究方面, 常被用作病毒模型[4]. 细胞培养是病毒检测的传统方法, 但存在操作繁琐、检测周期长等缺点, 随着分子生物学的发展, 新型的分子生物学技术——实时定量 RT-PCR 已经开始应用到环境领域中[3,5,6]. 通常情况下, 病毒在水中的含量很低, 为了提高检测效果, 高效的浓缩方法是必不可少的. 国内外已报道了很多病毒浓缩方法, 例如无机盐沉淀法[7]、正电荷介质吸附法[8]、烟煤吸附层法[9]、玻璃棉浓缩法[10]、差速离心法[11]、免疫磁珠捕获法[12]、有机絮凝法[13]等, 但这些方法大多数回收效率不高, 有的还需要昂贵的设备. 膜吸附-洗脱法具有效果稳定、操作简便、应用广泛的优点, 但在具体应用中还存在着很多亟待解决的问题, 例如滤膜的选用, 在洗脱液浓缩过程中影响病毒回收率的因素以及方法的适用性等. 本研究利用实时定量 RT-PCR 技术, 以病毒回收率为主要指标, 对膜吸附-洗脱法的流程进行研究和改进, 提高了病毒的浓缩效果, 并分析了各种影响病毒回收率的因素, 建立起一套切实可行的水样中病毒浓缩方法.

1 材料与方法

1.1 实验材料

水样: 地表水, 二级处理出水, 生活污水.

病毒株: 脊髓灰质炎病毒 I 型, 由中国人民解放军第四军医大学病毒中心实验室提供.

收稿日期: 2006-07-14; **修订日期**: 2006-10-29
基金项目: 国家自然科学基金项目(50478048); 国家自然科学基金重大国际合作项目(50621140001)
作者简介: 张崇淼(1978～), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物学及分子生物学, E-mail: zhangchongmiao@yahoo.com.cn

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

过滤装置:负压抽滤设备,微孔滤膜.

洗脱液:含有 0.05 mol/L 甘氨酸的 3 %牛肉膏溶液,用 NaOH 调节 pH = 9.5,高压灭菌后 4 ℃冷藏.

1.2 方法

1.2.1 浓缩流程

浓缩流程见图 1.

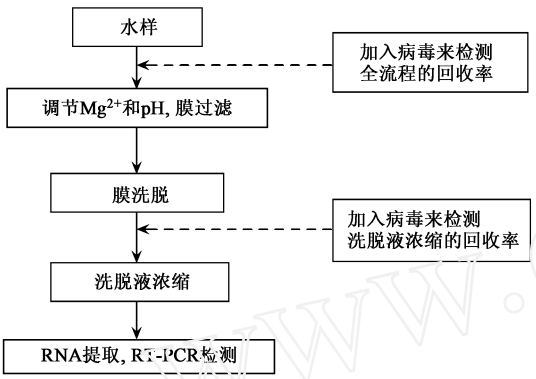

图 1 水样中病毒浓缩流程

Fig. 1 Flow chart of virus concentration from water sample

1.2.2 RNA 的提取

根据硅基质材料吸附 RNA 的原理,利用 Simply P 总 RNA 提取试剂盒(BIOER)对浓缩后的样品中的总 RNA 提取纯化.

1.2.3 逆转录

采用根据肠道病毒 RNA5 非编码区高度保守序列设计的通用引物,对所得到的 RNA 进行特异性的逆转录[14].

1.2.4 实时定量 PCR 检测

在 MJ Chromo 4™实时定量 PCR 仪(BIO-RAD)上对逆转录产物进行 PCR 扩增及结果分析. 反应条件为: ①95 ℃预变性 10 min; ②扩增循环 40 次:94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,在 82 ℃收集荧光信号; ③熔解曲线分析:降温至 65 ℃,以 0.2 ℃/s 的速率升温至 95 ℃,整个过程持续检测荧光信号. 检测结果使用 MJ Opticon Monitor™ (version 3.1) 软件进行分析.

2 结果与分析

2.1 微孔滤膜孔径对病毒浓缩的影响

选用 0.22、0.65、5.00 μm 孔径的混合纤维素酯微孔滤膜,分别对加入了 3.8×10^3 $CCID_{50}$ 病毒的水样进行浓缩,然后进行 RT-PCR 检测,不同孔径的滤膜对病毒回收率结果如图 2 所示. 选用 0.45、0.22 μm 孔径的混合纤维素酯微孔滤膜和截留相对分子质量为3 000的超滤膜对接种 3.8×10^3 $CCID_{50}$ 病毒的水样进行逐级连续过滤,经过 0.45 μm 和 0.22 μm 滤膜过滤后,所吸附的病毒约占所有回收病毒的 95 %(图 3).

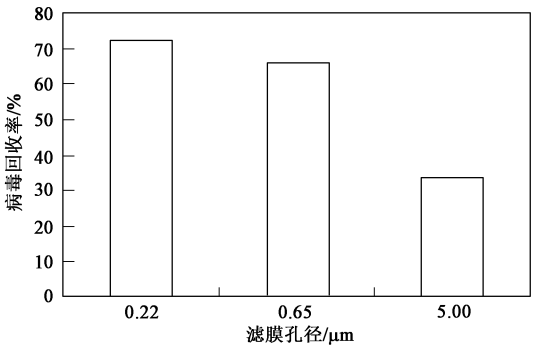

图 2 滤膜孔径对病毒回收效果的影响

Fig. 2 Effect of membrane nominal pore on virus recovery

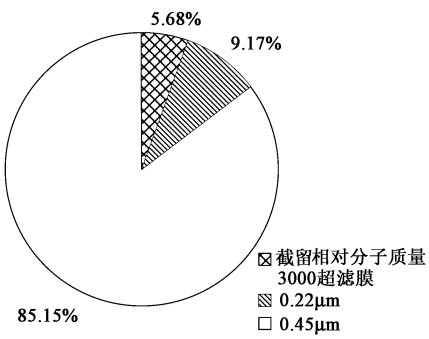

图 3 连续过滤中不同孔径滤膜对病毒的吸附情况

Fig. 3 Effect of various nominal pore membranes on virus concentration in continuous filtration

2.2 微孔滤膜材质对病毒浓缩的影响

选用 0.22 μm 孔径的不同材质的微孔滤膜(硝酸纤维素、尼龙和混合纤维素酯),对接种 3.8×10^3 $CCID_{50}$ 病毒的水样进行过滤(用尼龙膜过滤的水样不调节 Mg^{2+} 和 pH). 对滤速进行比较(表 1),尼龙滤膜过滤速度更快;浓缩样品经 RT-PCR 检测,几种滤膜的病毒回收率相差不大(图 4).

表 1 不同材质的滤膜过滤1 000 mL 含病毒水样所需的时间/s

Table 1 Time of filtration 1 000 mL water sample seeded viruses through filters with various materials/s

膜材质	硝酸纤维素	尼龙	混合纤维素酯
时间	433	238	406

2.3 洗脱液浓缩步骤中病毒的浓缩效果

聚乙二醇(PEG)是一种非离子水溶性的多聚体,它可以有效地沉淀蛋白质,并且能够保持蛋白质的活性,同样也可以利用这种原理来沉淀病毒. 相对

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

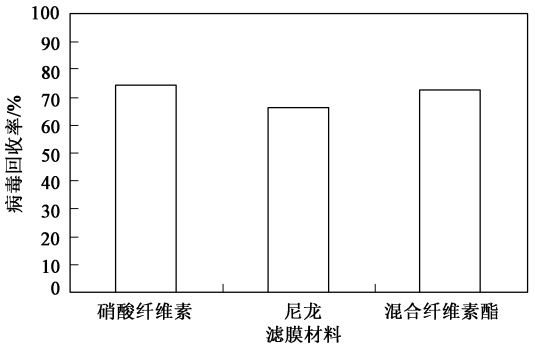

图 4　滤膜材料对病毒回收率的影响

Fig. 4　Effect of membrane material on virus recovery

于 PEG 来说,NaCl 对于病毒的浓缩效果影响不大,看起来更多的是辅助 PEG 进行病毒的沉淀浓缩.

在洗脱液中接种 3.8×10^3 $CCID_{50}$ 的病毒,调节洗脱液浓缩过程中 PEG 的浓度,考察它对于病毒回收率以及所形成的沉淀的影响. 结果表明,沉淀率(以加入 200 g/L PEG6000 所形成的沉淀质量为 100 %,其余沉淀质量与之相比而得)随着 PEG 质量浓度的增长而增加,并且与病毒回收率的变化趋势一致. 当 PEG 质量浓度在 50 g/L 以下时,病毒回收率随 PEG 浓度的变化率较大;当 PEG 质量浓度达 130 g/L 时,病毒回收率约 90 %,PEG 终浓度再继续增加,则病毒回收率变化很小(图 5).

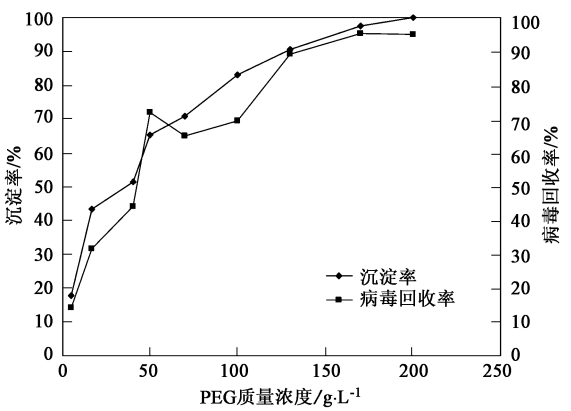

图 5　PEG 对病毒浓缩的影响

Fig. 5　Effect of PEG concentration on virus recovery

2.4　浓缩流程中各步骤的病毒回收率

根据以上研究结果,确定了改进的膜吸附-洗脱浓缩方法如下:

(1) 膜过滤　取水样 1 000 mL (悬浮颗粒物较多的水样,先用纱布进行预过滤),加入 $MgCl_2$ 溶液,使终浓度为 0.05 mol/L,再用 1 mol/L 的盐酸调节溶液的 pH = 3.5,在磁力搅拌器上搅拌混匀. 以负压抽滤通过 0.22 μm 孔径的混合纤维素酯微孔滤膜.

(2) 膜洗脱　将滤膜转移到干净的烧杯中,加入牛肉膏-甘氨酸洗脱液(pH = 9.5),充分浸润滤膜,然后在磁力搅拌洗脱 30 min,弃去滤膜.

(3) 洗脱液浓缩　在洗脱液中加入 PEG6000 和 5 mol/L NaCl,使终浓度分别达到 130 g/L 和 0.2 mol/L,搅拌混匀,4 ℃静置过夜. 在高速冷冻离心机中,10 000 r/min,4 ℃,离心 30 min,弃上清液,用灭菌的磷酸盐缓冲液(pH = 7.4)冲洗管壁,并收集定容.

按照图 1 所示的流程,加入不同量的病毒来考察浓缩流程中各步骤的病毒回收率. 从图 6 中可以看出,洗脱液的病毒回收率均高于相应全流程的病毒回收率,这说明病毒损失随着浓缩流程的增长而增加. 因此,应尽量选择流程较短的检测方法. 各接种量(38～3 800 $CCID_{50}$)的病毒回收率都在 70 %以上,说明该浓缩方法的效果良好.

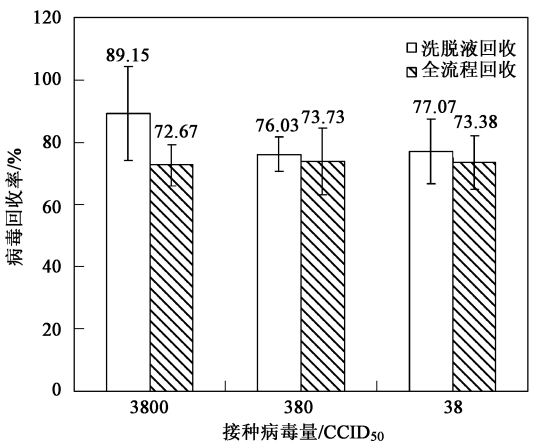

图 6　不同病毒接种量各步骤的回收率

Fig. 6　Virus recovery of every step in various seeding viruses

2.5　不同水样中的病毒浓缩

为了考察这种浓缩方法的适用性,选用不同的水样接种 3.8×10^3 $CCID_{50}$ 脊髓灰质炎病毒 Ⅰ型进行浓缩回收试验. 结果表明,在较清洁的水体中,病毒回收率较高;但在悬浮颗粒物和杂质较多的生活污水中,病毒回收率较低. 实时定量 RT-PCR 的检测极限接近单个病毒颗粒,因此即使较低的病毒回收量,同样也能够准确的检测出来.

表 2　不同水样中病毒总回收率/ %

Table 2　Virus recovery from various type water samples/ %

试验	地表水	二级处理出水	生活污水
1	75.03	57.44	36.71
2	76.72	75.69	40.73
3	61.01	64.65	22.31
平均值 ±标准偏差	70.92 ±8.62	65.93 ±9.19	33.25 ±9.69

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

在水体病毒的浓缩方法中,吸附洗脱法和絮凝沉淀法是最主要的 2 类. 絮凝沉淀法是利用了化学物质的絮凝作用,使水中的病毒沉淀下来,或者被吸附到预先形成的金属盐类的沉淀物上,从而达到浓缩病毒的作用. 然而,通常所产生的絮体都很微小,沉降性差,即便离心之后也难以获得密实的沉淀. 这可能是絮凝沉淀法的病毒回收率不高,并且可操作性不强的重要原因之一. 膜吸附-洗脱法是利用了病毒的胶体性质和蛋白质的特性来实现病毒浓缩的. 由于滤膜和含有病毒的水体相互独立,不需要在水相中产生新的固体相来浓缩病毒,因此这种方法的可操作性较强. 虽然国内的研究学者对膜吸附-洗脱法和絮凝沉淀法的浓缩效果评价不一[7,15~18],但在国外的研究中,大多数都是使用膜吸附-洗脱法作为水样中病毒的初步浓缩方法[19,20,22,24~26],这可能考虑到了可操作性因素. 在病毒回收率方面,Schwab 等[21]在利用 PEG 浓缩脊髓灰质炎病毒的实验中,回收率为(88 ±33) %;Lewis 等[22]报道了水样中脊髓灰质炎病毒回收率为(73 ±5) %,这都与本研究的结果相似. 此外,笔者将本研究建立的膜吸附-洗脱法与滑石粉-硅藻土絮凝沉淀法、化学絮凝沉淀法等具有代表性的几种浓缩方法进行了实验比较研究,结果也表明了膜吸附-洗脱法更适合于环境水体中肠道病毒的浓缩[23].

在膜吸附-洗脱法中,最关键的是滤膜的选择. 国外有报道利用 Plus 60S[24]、Zetapore[25]和 MK[26]等阳电荷微孔滤膜来浓缩病毒,这种方法不需调节水样的 pH 和离子浓度,具有操作简便、效果好的优点,在国外相关的研究工作中经常使用. 但是这种滤膜完全依赖进口,在国内很难购得,而且价格昂贵,不适合国内实际应用. 使用尼龙滤膜的浓缩步骤更为简便,效果也较好,可惜目前成本较高,但具有良好的发展前景. 本研究建立的膜吸附-洗脱法,所使用的是混合纤维素酯微孔滤膜. 早在 1978 年,我国就能够自主生产这种滤膜,且产品性能达到了美国同类产品的水平[27]. 因此,混合纤维素酯微孔滤膜目前在市场上的价格低廉,产品来源十分广泛,适合实际应用.

膜过滤浓缩水体病毒方法最大的缺陷是其过滤流速受到限制. 使用较大孔径的滤膜看起来似乎是改善的办法,但是通过实验发现,病毒在滤膜上的吸附效果也和膜的孔径有密切的关系. 虽然膜对病毒的吸附在很大程度上并不依靠机械截留,然而较大的滤膜依然难以捕捉到病毒;而使用孔径足够小的超滤膜,由于处理速度很慢,又易堵塞,所以也不合适. 对比使用最广泛的几种孔径的微孔滤膜,发现 0.22 μm 孔径滤膜更适合浓缩水体中的病毒颗粒.

传统的膜吸附-洗脱法在洗脱滤膜时,往往采用的是将洗脱液反复抽滤通过滤膜来洗脱被吸附的病毒. 但是这种方法存在以下 2 个缺点:洗脱液与滤膜接触的时间较短,不能充分洗脱;洗脱液的用量一般较大,给接下来的浓缩过程造成困难. 笔者对洗脱方法进行了改进,使操作更为简便.

4 结论

(1) 使用混合纤维素酯微孔滤膜对水体中的肠道病毒浓缩效果比硝酸纤维素和尼龙膜的效果好,而且成本低,更适合实际应用. 0.22 μm 孔径的滤膜比其他几种孔径的滤膜能更好地吸附病毒.

(2) 使用磁力搅拌方式进行膜洗脱比传统的反复抽滤洗脱方式更方便. 在洗脱液浓缩过程中,PEG 的浓度对病毒的回收率影响很大. 在 PEG 终浓度为 130 g/L 时,病毒的回收率基本达到最高.

(3) 这种改进后的膜吸附-洗脱法能够回收水体中不同量的病毒,且适用性强,对于地表水、二级处理出水中的肠道病毒均有较高的回收率. 笔者所建立的膜吸附-洗脱法适用性强、材料来源广泛、操作更加简便实用,为今后开展水体中肠道病毒的研究工作提供了一个有效的方法.

参考文献:

[1] Borchardt M A, Bertz P D, Spencer S K, *et al*. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(2): 1172～1180.

[2] Lee S H, Kim S J. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea [J]. Water Research, 2002, **36**(11): 248～256.

[3] Donaldson K A, Griffinb D W, Paula J H. Detection, quantitation and identification of enteroviruses from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR [J]. Water Research, 2002, **36**(10): 2505～2514.

[4] Jaykus L A. Epidemiology and detection as options for control of viral and parasitic food borne disease [J]. Emerging Infectious Diseases, 1997, **3**(4): 529～539.

[5] Fuhrman J A, Liang X L, Noble R T. Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(8): 4523～4530.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[6] Rose M A, Dhar A K, Brooksa H A, *et al*. Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR[J]. Water Research, 2006, **40**(12):2387～2396.

[7] 赵文彬. 二种浓缩水中病毒分离方法的实验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 1997, **7**(2):115～116.

[8] Li J W, Wang X W, Rui Q Y, *et al*. A new and simple method for concentration of enteric viruses from water [J]. Journal of Virological Methods, 1998, **74**(1):99～108.

[9] Lakhe S B, Paunikar W N. Elution and reconcentration of polioviruses adsorbed on coal from water samples [J]. Water Research, 2002, **36**(15):3919～3924.

[10] Vivier J C, Ehlers M M, Grabow W O K. Detection of enteroviruses in treated drinking water [J]. Water Research, 2004, **38**(11): 2699～2705.

[11] 张文清,马文煜,骆文静,等. PEG6000 沉淀结合差速离心方法浓缩水中脊髓灰质炎病毒[J]. 第四军医大学学报, 2000, **21**(1):38～40.

[12] Jothikumar N, Cliver D O, Marian T. Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64**(2):504～508.

[13] Huang P W, Laborde D, Land V R, *et al*. Concentration and detection of caliciviruses in water samples by reverse transcription-PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(10):4383～4388.

[14] 张崇淼,刘永军,王晓昌,等. 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术同时检测水中多种肠道病毒[J]. 环境科学研究, 2007, **20**(3):137～141.

[15] 张楚瑜. 两步浓缩法回收水中病毒的有效性[J]. 中国环境科学, 1989, **9**(6):463～465.

[16] 郭润霞,黄海云,冀玲,等. 三氯化铝-氯化钠絮凝法浓缩水中肠道病毒[J]. 环境与健康杂志, 1997, **14**(4):176.

[17] 郑耀通,林奇英,谢联辉. 水体病毒浓缩条件的优化[J]. 中国病毒学, 2004, **19**(1):62～66.

[18] 尤风兴,刘秉辉,张玲妹,等. 水标本中脊髓灰质炎病毒三种浓缩方法的比较及改进方法的建立[J]. 病毒学杂志, 1991, **6**(2):125～128.

[19] Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(3):133～139.

[20] Rutjes S, Italiaander R, van den Berg H J L, *et al*. Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the nuclisens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(7):3734～3740.

[21] Schwab KJ, Leon R D, Sobsey M D. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and norwalk virus by reverse transcription-PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, **61**(2):531～537.

[22] Lewis G D, Metcalf T G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, **54**(8): 1983～1988.

[23] 张崇淼,刘永军,王晓昌,等. 环境水体中肠道病毒浓缩方法的比较[J]. 中国给水排水, 2007, **23**(7):36～39.

[24] Brassard J, Seyer K, Houde A, *et al*. Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus in spring water samples by reverse transcription-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2005, **123**(2):163～169.

[25] Gilgen M, Germann D, Lühy J, *et al*. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples [J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, **37**(2～3): 189～199.

[26] Ma J F, Naranjo J, Gerba C P. Evaluation of MK filters for recovery of enteroviruses from tap water [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, **60**(6):1974～1977.

[27] 国家医药管理局科技教育司. 国家医药管理局科技成果汇编[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1989. 738.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net