环境水体中肠道病毒浓缩方法的比较

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

摘 要: 向水样中接种已知量的脊髓灰质炎病毒，然后利用微孔滤膜吸附—洗脱法、滑石粉—硅藻土吸附层吸附—洗脱法、化学絮凝沉淀法和滑石粉—硅藻土絮凝沉淀法等 4种不同的浓缩方法对水样中的病毒进行浓缩，并采用实时定量 RT-PCR技术对各方法浓缩后样品中的病毒进行扩增和检测。综合考虑病毒回收率和浓缩方法的可靠性与简便性等因素，确定微孔滤膜吸附—洗脱法为最优的浓缩方案。此外，还比较了三种洗脱液和两种二次浓缩方法的效果，并对各步骤的回收率进行了分析。

关键词: 肠道病毒; 脊髓灰质炎病毒; 浓缩方法; 微孔滤膜吸附—洗脱法; 实时定量 RT-PCR

中图分类号: X703.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-4602(2007)07-0036-04

Comparison of Concentration Methods for Enteroviruses from Environmental Waters

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

Abstract: The four concentration methods including microporous filter adsorption-elution method, talcum powder-diatomaceous earth layer adsorption-elution method, chemical flocculation precipitation method and talcum powder-diatomaceous earth flocculation precipitation method were compared by seeding known concentrations of polioviruses into water samples. The viruses from concentrated samples were detected by real-time RT-PCR. In view of the virus recovery, the reliability and simpleness of the methods, the microporous filter adsorption-elution method was chosen as the optimal concentration method. In addition, the effect of three kinds of eluants, and organic flocculation and PEG-NaCl methods in secondary concentration was compared. The recovery of virus in every step was analyzed.

Key words: enterovirus; poliovirus; concentration method; microporous filter adsorption-elution method; real-time RT-PCR

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (50478048); 国家自然科学基金资助重大国际合作项目 (50621140001)

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

近年来,由于水污染的加剧,水传播导致的肠道病毒感染的病例时有发生,已引起人们的广泛关注[1]。脊髓灰质炎病毒是肠道病毒属的典型病毒,也是最早被证明能够通过受污染的水体传播的病毒,因而在有关环境中肠道病毒的检测方法研究方面,常将其作为病毒模型[2]。

病毒在水中的含量很低,必须浓缩大量水样之后才能检测。国内外已报道了很多病毒浓缩方法[3],但都未标准化,对病毒的回收效率受操作者的熟练程度以及试剂、仪器和外界环境干扰因素的影响较大。基于此,笔者选择了具有代表性的几种浓缩方法进行试验,并利用先进的实时定量 RT-PCR技术分析各方法对病毒的回收率,以期找到环境水体中肠道病毒的适宜浓缩方法。

1 材料与方法

1.1 病毒株和水样

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,水样为二级处理出水(接种病毒前采用高温灭菌处理,肠道病毒的 RT-PCR检测呈阴性)。

1.2 初步浓缩方法

① 滑石粉—硅藻土絮凝沉淀法

向 1 L水样中加入 $AlCl_3$,使其终浓度为 0.001 mol/L。按 0.08% (*m*/*V*)的比例向水样中加入滑石粉—硅藻土(3∶1),摇匀后于 4 ℃下静置过夜。于 5 000 r/min下离心 15 min,弃上清液,沉渣用 0.01 mol/L的 EDTA+0.1 mol/L甘氨酸缓冲液洗脱 5 min。将洗脱液在 4 ℃、1 500 r/min下离心 10 min,收集上清液用 PEG-NaCl法进行二次浓缩。

② 化学絮凝沉淀法

用 1 mol/L的盐酸调节水样的 pH值至 3.5;加入 NaCl和 $AlCl_3$,使其终浓度分别为 1% (*m*/*V*)和 0.001 mol/L,4 ℃下静置过夜;于 4 ℃、5 000 r/min下离心 15 min,弃上清液,沉渣用 0.01 mol/L的 EDTA+0.1 mol/L甘氨酸缓冲液(pH=10.5)洗脱 5 min;使洗脱液在 4 ℃、1 500 r/min下离心 10 min,收集上清液用 PEG-NaCl法进行二次浓缩。

③ 滑石粉—硅藻土吸附层吸附—洗脱法

将一张滤纸平铺于真空抽滤器的网板上,用无菌水浸湿后加入滑石粉—硅藻土混悬液(滑石粉:2.7 g,硅藻土:0.9 g,加入 100 mL无菌纯水混匀),抽滤使之形成均匀而平整的薄层,然后盖上两张直径相同的滤纸。按 1%(体积分数)的比例将 Earle's平衡液(A液:将 6.8 g NaCl、0.4 g KCl、0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.125 g NaH_2PO_4、1 g葡萄糖和 1 g $NaHCO_3$溶于 800 mL超纯水中制得;B液:将 0.2 g $CaCl_2$溶于 150 mL超纯水中制得。使用时将 B液加到 A液中搅拌混匀)加入到水样中并充分混匀。用 1 mol/L的盐酸调节 pH值至 4.5。采用真空抽滤使水样通过滑石粉—硅藻土吸附层,用 3%的牛肉膏(pH=10)洗脱吸附层上的病毒,收集洗脱液用 PEG-NaCl法进行二次浓缩。

④ 微孔滤膜吸附—洗脱法

向水样中加入 2.5 mol/L的 $MgCl_2$,使其终浓度达到 0.05 mol/L;用 1 mol/L的盐酸调节水样的 pH=3.0并混匀;采用真空抽滤使之通过 0.22 μm混合纤维素酯微孔滤膜,然后用 3%牛肉膏+0.05 mol/L甘氨酸洗脱液(pH=9.5)洗脱滤膜(20～30 min),收集洗脱液用 PEG-NaCl法进行二次浓缩。

1.3 二次浓缩方法

PEG-NaCl法:向含有病毒的洗脱液中加入 3.9 g的 PEG6000和 1.2 mL的 NaCl溶液(5 mol/L),磁力搅拌 10～15 min后,于 4 ℃下静置过夜;在 4 ℃、10 000 r/min下离心 30 min后弃上清液,保留沉淀待检。

有机絮凝法:用盐酸调节洗脱液的 pH=3.5,搅拌混匀后于 4 ℃下静置过夜;在 4 ℃、10 000 r/min下离心 30 min后弃上清液,保留沉淀待检。

1.4 实时定量 RT-PCR检测

对浓缩后的样品提取 RNA并进行反转录,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,在 MJ Chromo™ 4荧光实时定量 PCR仪上进行扩增及结果分析。反应条件为:①95 ℃预变性 10 min;②扩增循环 40次(94 ℃,30 s;55 ℃,30 s;72 ℃,30 s);③在 82 ℃下收集荧光信号。检测结果用 MJ Opticon Monitor™ (version 3.1)软件进行分析。

2 试验结果

2.1 初步浓缩方法的浓缩效果比较

在水样中接种 3.78×10^3 $CCID_{50}$的脊髓灰质炎病毒(Ⅰ型),采用上述 4种浓缩方法回收病毒,经实时定量 RT-PCR检测后,比较病毒回收率。结果表明,除化学絮凝沉淀法外,其他方法对病毒的回

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

收率都在 50%以上,其中微孔滤膜吸附—洗脱法的回收率最高(见图 1)。

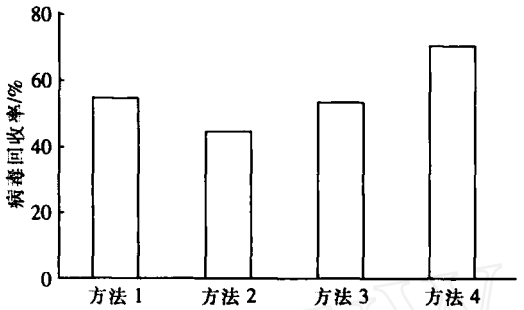

图 1 4种浓缩方法的病毒回收率

Fig 1 Recovery of virus by four concentration methods

2.2 洗脱液的洗脱效果比较

为考察微孔滤膜吸附—洗脱法中不同洗脱液的洗脱效果,进行了如下试验:在水样中接种 3.78×10^3 CCID$_{50}$的脊髓灰质炎病毒(Ⅰ型),并加入 2.5 mol/L的 $MgCl_2$,使其终浓度达到 0.05 mol/L;用 1 mol/L的盐酸调节水样的 pH=3.0后混匀,采用真空抽滤使之通过 0.22 μm混合纤维素酯微孔滤膜,然后分别采用 3%牛肉膏+0.05 mol/L甘氨酸洗脱液(pH=9.5)、3%的牛肉膏(pH=10)及 0.01 mol/L的 EDTA+0.1 mol/L甘氨酸缓冲液洗脱滤膜,最后通过 PEG-NaCl二次浓缩法回收病毒,比较病毒回收率。结果如图 2所示。

由图 2可知,使用 3%的牛肉膏洗脱时对病毒的回收率最高,但在进行 PCR扩增过程中有非特异性产物出现,而使用 3%牛肉膏+0.05 mol/L甘氨酸洗脱液时则 PCR产物的特异性很好,且对病毒的回收率也较高。因此,在这三种洗脱液中,3%牛肉膏+0.05 mol/L甘氨酸洗脱液的洗脱效果最好。

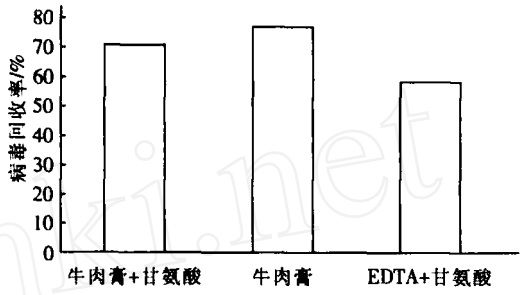

图 2 各种洗脱液的洗脱效果比较

Fig 2 Comparison of various eluants effect

2.3 二次浓缩方法的比较

在 3%牛肉膏+0.05 mol/L甘氨酸洗脱液(pH=9.5)中接种 3.78×10^3 CCID$_{50}$脊髓灰质炎病毒(Ⅰ型),分别采用有机絮凝法和 PEG-NaCl法进行二次浓缩,结果表明有机絮凝法对病毒的回收率较低(见表 1),且操作过程中产生的沉淀量较少且松散,不利于后续的操作。

表 1 两种二次浓缩方法的病毒回收率比较

Tab.1 Comparison of two reconcentration methods for virus recovery %

项目	有机絮凝法	PEG-NaCl法
病毒回收率	46.9	87.04

2.4 微孔滤膜吸附—洗脱法各步骤分析

通过试验确定了微孔滤膜吸附—洗脱法结合 PEG-NaCl二次浓缩对水体中肠道病毒的浓缩效果最好,在此基础上对该方法的病毒回收率做了进一步的分析,结果见表 2。

表 2 微孔滤膜吸附—洗脱法各步骤回收率分析

Tab.2 Analysis of virus recovery in every step of microporous filter adsorption-elution method

病毒接种量/CCID$_{50}$	初步浓缩病毒回收率/%				二次浓缩病毒回收率/%			
	1#	2#	3#	均值	1#	2#	3#	均值
3.78×10^3	81.94	77.86	81.56	80.45	93.83	88.57	89.10	90.50
3.78×10^2	92.19	95.88	78.93	89.00	76.18	76.90	84.21	79.10
3.78×10	80.11	95.22	96.94	90.76	80.61	77.06	75.49	77.72

由表 2可知,对于不同的病毒接种量,各步骤的回收率都在 70%以上,说明该方法对病毒的浓缩效果十分稳定。由于每个步骤都存在一定量的病毒损失,因此浓缩方法的流程越长则病毒总回收率就越低。

3 讨论

水体中病毒的浓缩方法是近年来环境微生物学研究的热点问题,然而大多数研究都是定性的,缺乏具体数量上的标准,而且所得结论差别较大。这可能和水样的非均一性有关,同时所用细胞培养法的检测限较高,也会对结果造成一定的影响。

化学絮凝沉淀法是通过调节 pH值和加入某些金属盐类($AlCl_3$是应用最广泛的金属盐之一),使病毒沉淀下来,或者吸附到多价金属盐类的沉淀物

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

上,其最大的问题在于如何保证通过第一次离心就把水体中的病毒充分地浓缩到沉淀中。由于水样的初始体积往往较大,这就限制了离心机的转速,而较低的转速并不能把水体中的病毒颗粒离心下来,这限制了该方法在实际中的应用。虽然有报道在 1 500*g*下也能有效浓缩病毒[4],但笔者的试验结果却与此相反:在化学絮凝法和滑石粉—硅藻土絮凝沉淀法中,提高离心机转速至 5 500*g*(5 000 r/min)后,仅获得了较为松散的沉淀物,且对病毒的回收率不高。

与化学絮凝沉淀法相比,使用矿物质的方法显得更为有效,其中滑石粉和硅藻土是用于病毒浓缩的最常见矿物质。通过试验发现,滑石粉—硅藻土吸附层吸附—洗脱法与滑石粉—硅藻土絮凝沉淀法对病毒的回收率基本相同。不过,使用滑石粉—硅藻土絮凝沉淀法也存在与化学絮凝沉淀法类似的问题,而滑石粉—硅藻土吸附层一旦发生堵塞,便无法更换吸附层。

微孔滤膜吸附—洗脱法是浓缩水体中病毒的最有效方法。自 1961年 Metcalf首次提出应用微孔滤器浓缩悬浮液中的病毒后,基于微孔滤膜吸附—洗脱的方法不断涌现,在滤膜、过滤设备等方面都有了很大的发展。膜吸附—洗脱法主要是利用病毒的胶体性质和蛋白质的特性来实现病毒浓缩的,尽管病毒在滤膜上的吸附机理很复杂(与疏水键、氢键和静电力都有关系),但可以明确的是选择合适的滤膜、降低水样的 pH值、加入一定量的多价阳离子,都有利于病毒的脱稳和吸附[5]。

滤膜上病毒的洗脱是该种浓缩方法中重要的一环。牛肉膏中含有大量的蛋白类物质,会与病毒竞争滤膜上的吸附位点,同时有机物之间疏水基团的相互作用在病毒洗脱中也起关键作用[6];甘氨酸能够改变病毒的吸附特性,较高的 pH值则能促使病毒从滤膜上解吸。在二次浓缩过程中,PEG有沉淀蛋白质的作用,在一定的无机盐和 PEG浓度下可使病毒沉淀,从而与其他成分分离。

不过微孔滤膜吸附—洗脱法也有自身的缺陷,例如:对于浊度较高的水体,膜污染和堵塞的情况比较严重;由于存在一定的过滤阻力,过滤操作时间通常较长;滤膜的成本较高。鉴于这些情况,笔者在实际操作中进行了一定的改进:当水体浊度较高时,先采用纱布或筛网等进行预过滤;在过滤过程中使流速稳定在某一范围内,从而保证一定的过滤阻力;当出现严重的膜堵塞时,及时更换滤膜;通过试验比较,选用了混合纤维素酯微孔滤膜,降低了成本。

4 结论

① 微孔滤膜吸附—洗脱法比滑石粉—硅藻土吸附层吸附—洗脱法、化学絮凝沉淀法和滑石粉—硅藻土絮凝沉淀法更适合于对水体中的肠道病毒进行浓缩。

② 综合考虑病毒回收率和 PCR产物的特异性,3%牛肉膏 +0.05 mol/L甘氨酸适于作为微孔滤膜吸附—洗脱法的洗脱液。

③ PEG-NaCl沉淀法对病毒的回收率比有机絮凝法高,而且操作简便易行,适于作为病毒的二次浓缩方法。

④ 微孔滤膜吸附—洗脱法结合 PEG-NaCl二次浓缩法的浓缩效果比较稳定,对于不同接种量的病毒,其初步回收率和二次回收率都在 70%以上。

参考文献:

[1] WHO. Guidelines for Drinking-water Quality (3rd ed) [M]. Geneva: World Health Organization, 2004.

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

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

[4] Belguith K, Hassen A, Aouni M. Comparative study of four extraction methods for enterovirus recovery from wastewater and sewage sludge [J]. Bioresour Technol, 2006, 97(3): 414-419.

[5] Bittion G. 环境病毒学导论 [M]. 王小平等译. 北京: 中国环境科学出版社, 1986.

[6] Stetler R E, Waltrip S C, Hurst C J. Virus removal and recovery in the drinking water treatment train [J]. Water Res, 1992, 26(6): 727-731.

作者简介:张崇淼(1978-),男,河南郑州人,博士研究生,主要研究方向为环境微生物学和分子生物学。

电话: 13572995750

E-mail: zhangchongmiao@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-12-15

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