

蛋白酶对水环境中病毒的灭活作用

吕文洲^{1,2}, 杨清香¹, 张昱¹, 杨敏¹, 朱春芳³

(1. 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085; 2. 宁波大学建筑工程与环境学院, 浙江宁波 315211; 3. 中国地质大学水资源与环境工程学院, 北京 100083)

摘要:以大肠杆菌噬菌体 T₄ 作为模式病毒, 研究了蛋白酶对病毒的灭活作用. 试验结果表明:蛋白酶灭活病毒的效果明显. 适宜条件下, 67.5 u/mL 的蛋白酶 K 处理 1h 对纯水中病毒 (6.2 × 10⁵ PFU/L) 和生活污水中病毒 (7.2 × 10⁵ PFU/L) 灭活率分别达到了 99.4% 和 49.4%, 处理 3h 的灭活率分别是 >99.9% 和 81.1%; 工业蛋白酶 1398 在 75.0 u/mL 酶浓度下处理 1h 对纯水中病毒 (1.7 × 10⁵ PFU/L) 灭活率达到 74.4%. pH 和温度对病毒灭活效果的影响不明显.

关键词:蛋白酶; 病毒; 噬菌体 T₄; 灭活; 消毒

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)05-0093-04

Inactivation of T₄ Phage in Water Environment Using Proteinase

L Ü Wen-zhou^{1,2}, YANG Qing-xiang¹, ZHANG Yu¹, YANG Min¹, ZHU Chun-fang³

(1. SKLEAC, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. College of Architectural, Civil Engineering and Environment, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 3. College of Water Resources and Environmental Engineering, China University of Geoscience, Beijing 100083, China)

Abstract: The inactivation effectiveness of proteinase to viruses was investigated by using T₄ phage as a model virus. The results showed that the inactivation effectiveness of proteinase to T₄ phage was obvious. In the optimum conditions and 67.5 u/mL concentration, the inactivation rate of proteinase K to T₄ phage in sterilized water and in sewage achieved 99.4% and 49.4% respectively in an hour, and achieved >99.9% and 81.1% in three hours. The inactivation rate of the industrial proteinase 1398 to T₄ phage in sterilized water achieved 74.4% in an hour. The effects of pH and temperature on the inactivation effectiveness was not evident.

Key words: proteinase; virus; inactivation; T₄ phage; disinfection

2003 年春季爆发的 SARS 疫情引起了人们对医疗污水消毒的高度关注. 在消毒过程中主要使用液氯、次氯酸钠、二氧化氯以及过氧乙酸等消毒剂, 其中以次氯酸钠消毒居多. 现有技术中, 多数存在药剂贮运不便、设备故障率高及操作复杂等问题^[1~2], 而且过氧乙酸本身对人体有直接的危害作用, 而以氯为主的消毒方法有产生毒副产物的潜在危害^[3~5]. 因此, 新型消毒技术的开发研究已经成为当务之急.

病毒外层结构一般以衣壳蛋白为主. 衣壳蛋白保护病毒使其免受环境因素的影响, 决定病毒感染的特异性, 使病毒与宿主细胞表面的特定部位有特异亲和力, 比如 SARS 病毒的棘突蛋白 S^[6~8]、大肠杆菌噬菌体 T₄ 的尾丝蛋白^[9]等. 本研究以噬菌体 T₄ 作为模式病毒, 以蛋白酶对病毒衣壳蛋白进行破坏, 从而干扰病毒与宿主细胞的结合为出发点, 探讨了利用蛋白酶对污水中病毒进行灭活的可行性.

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌噬菌体 T₄ 及其宿主大肠杆菌 B (中科院武汉病毒研究所)、蛋白酶 K (BERCK)、中性工业蛋白酶 1398 (北京某酶制剂公司)、福林酚 (SIGMA) 等.

1.2 蛋白酶活性测定

采用福林法^[10~11], 显色温度: 30 ± 2 °C, pH 值 7.5. 蛋白酶 K 先用无菌水稀释成一定浓度的储备溶液. 分析得到 L-酪氨酸浓度 (c) 与吸光度 (A) 之间的线形关系: $c = 102.6A$, $R^2 = 0.9997$. 根据样品测得 A 值, 求得样品的酶活力单位. 1 个酶活力单位定义为: 1 g 固体酶粉 (或 1 mL 液体酶), 在 30 ± 2 °C 和 pH 7.5 条件下, 1 min 水解酪素产生 1 μg 酪氨酸, 以 u/g (或 u/mL) 表示. 本试验测得蛋白酶 K 储备溶液的酶活力为 9000 u/mL; 工业蛋白酶 1398 酶活力为 33200 u/g.

1.3 噬菌体 T₄ 浓缩液的制备与保存

收稿日期: 2003-10-31; 修订日期: 2003-12-23

基金项目: 国家自然科学基金主任基金项目 (20347001)

作者简介: 吕文洲 (1974~), 男, 陕西西安人, 博士生, 主要从事废水中病毒的灭活和酵母菌处理高浓度有机废水技术研究.

噬菌体 T₄ 浓缩液的制备程序:大肠杆菌 B 接入 LB 培养液 37 °C、150r/min 条件下培养过夜 接入噬菌体 T₄ 裂解透明液 加入幼龄大肠杆菌培养物 调节 pH 为中性 12000r/min 高速离心 0.22μm 微孔滤膜过滤. 滤过液即为噬菌体 T₄ 浓缩液. 浓缩液密封后置于 4 °C 冰箱保存备用.

1.4 病毒感染活性的测定^[12]

本研究选用的病毒是环境病毒学常使用的模式病毒^[13~14]——大肠杆菌噬菌体 T₄ (以下称为病毒). 感染活性采用双层琼脂平板法进行测定. 底层为 LB 培养基 20mL; 上层培养基中含有 1.5mL LB 培养基、1mL 待检测的病毒溶液和 0.5mL 的大肠杆菌培养物. 倾倒入, 平板置于 37 °C 的生化培养箱中培养, 4~6h 计数空斑单位 (PFU), 一个 PFU 计为一个具感染活性的病毒.

1.5 蛋白酶 K 对纯水中病毒的灭活试验

试验在空气浴恒温摇床上进行, 摇床转速固定在 200r/min 左右. 使用无菌水将病毒浓缩液进行适当稀释, 分装入 7mL 的离心管中, 每管 4mL. 根据试验设计的酶浓度, 加入一定体积的蛋白酶 K 储备溶液到离心管中(如无特殊说明, 以下试验同此). 37 °C 恒温摇床振荡, 每隔 1h 取样进行有感染活性病毒的测定, 以不加酶的病毒稀释液中有感染活性的病毒数为对照, 计算病毒灭活的百分率. 所有试验均设 3 个平行样, 结果取平均值, 以下同.

1.6 酶浓度、pH、温度对蛋白酶 K 灭活纯水中病毒的影响试验

采用单因素分析试验, 分别考察蛋白酶浓度 (1.35u/mL、13.5u/mL、67.5u/mL), pH(5.5、6.5、7.5、8.5)、温度 (20 °C、40 °C、55 °C) 对病毒灭活效果的影响. 除温度因素试验在 pH6.5 条件下进行外, 其他试验起初均选在 pH7.5 条件下进行. pH 和温度因素试验选用酶浓度为 13.5u/mL. 试验中每 10min 采样测试 1 次, 共 6 次.

1.7 蛋白酶 K 在适宜条件下对纯水和生活污水中病毒灭活效果的比较试验

生活污水取自当日北京市海淀区市政污水管网某处. 首先调节污水 pH 为 6.5, 然后使用 0.22μm 的微孔滤膜(预先灭菌)在无菌条件下过滤除菌, 添加 1mL 病毒稀释液. 在温度 40 °C、pH6.5 时, 考察了蛋白酶浓度 13.5u/mL、67.5u/mL 对纯水和生活污水中病毒的灭活效果.

1.8 工业蛋白酶 1398 在适宜条件下对纯水中病毒的灭活效果试验

将 0.225g 的工业蛋白酶 1398 捣碎并尽量溶解在 100mL pH 为 6.5 的纯水中(折合蛋白酶浓度 75.0u/mL), 经 4 层纱布过滤不溶残渣后, 转入 150mL 锥形瓶中, 添加 1mL 病毒稀释液, 同上法进行病毒灭活试验.

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶 K 对纯水中病毒的灭活作用

图 1 为蛋白酶 K 对水中病毒灭活效果图. 可以看出, 蛋白酶 K 对病毒的灭活作用明显, 即使在 1.35u/mL 的低浓度水平下, 也有比较明显的病毒灭活效果, 1h 内对浓度为 3.3×10^5 PFU/L 的病毒灭活率高于 74.3%. 随着酶浓度的增加, 灭活速度加快, 当酶浓度为 67.5u/mL 时, 1h 以内对同样浓度的病毒的灭活率为 98.8%. 实验中发现, 蛋白酶的灭活作用是一个比较缓慢的过程, 在低浓度下随着时间的延长, 灭活率会缓慢上升. 在 1.35 u/mL 的浓度水平下, 9h 的病毒灭活率达到了 97.3%.

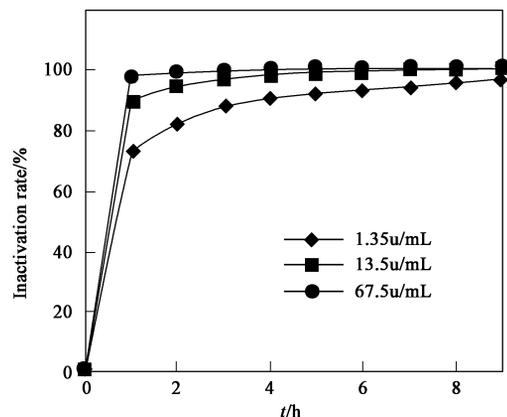


图 1 蛋白酶 K 对病毒的灭活效果

Fig. 1 Effects of proteinase K on phage inactivation effectiveness

2.2 影响蛋白酶 K 灭活水中病毒的因素

图 2 反映了酶浓度对病毒灭活率的影响, 是对图 1 在 1h 内病毒灭活效果的细化, 可以看出, 如果要求在 1h 内灭活几乎所有病毒, 那么 67.5u/mL 的酶浓度已经可以满足处理要求. 蛋白酶 K 灭活病毒的具体浓度选择可能与水中病毒的浓度、要求灭活的时间、效果来决定, 要考虑废水处理的成本因素. 低酶浓度虽然最终也可以达到几乎同样的处理效果, 但需要更长的处理时间, 因而会增加病毒灭活程序的运行成本.

图 3 和图 4 分别显示了 pH 和温度对蛋白酶灭活病毒效果的影响, 病毒浓度 3.3×10^5 PFU/L. 可

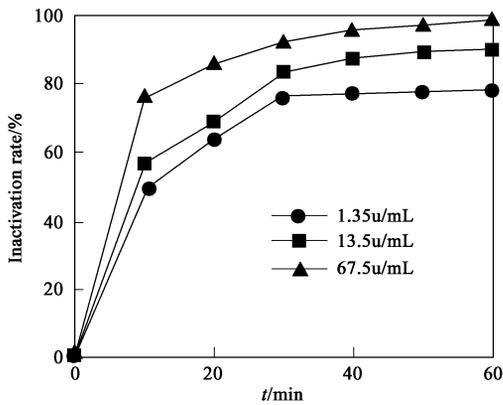


图2 蛋白酶 K 浓度对灭活效果的影响

Fig. 2 Effects of proteinase K concentration on inactivation rate

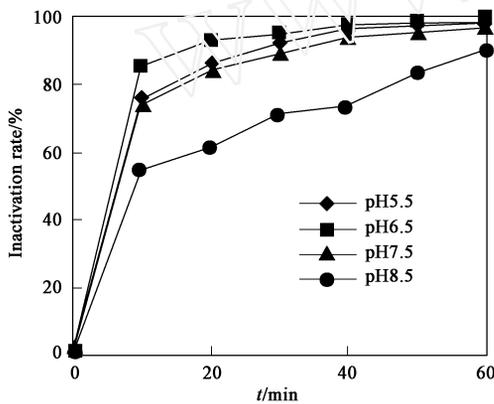


图3 pH对灭活效果的影响

Fig. 3 Effects of pH on inactivation rate

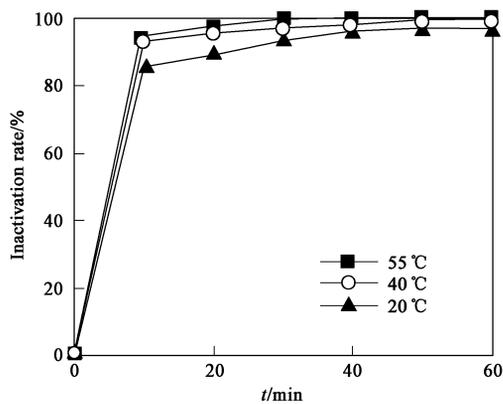


图4 温度对灭活效果的影响

Fig. 4 Effects of temperature on inactivation rate

可以看出, pH6.5 时的病毒灭活速度最大, 但 pH 在 7.5 以下时对灭活效果的影响不是十分明显, 只有当 pH 达到 8.5 时才会出现灭活效果的显著下降. 图 4 结果表明, 病毒灭活速度随着温度的升高有所

上升, 但总体来说, 温度的影响也不是很大. 由此可见, pH、气温的波动对病毒灭活效果的影响不是很显著, 这就为实际废水的处理提供了有利条件.

2.3 蛋白酶 K 在适宜条件下对纯水和生活污水中病毒的灭活效果

图 5 为蛋白酶 K 在 pH6.5、40 的条件下对纯水和生活污水中投加病毒的灭活效果, 病毒浓度分别为 6.2×10^5 PFU/L 和 7.2×10^5 PFU/L. 对于纯水中的病毒, 在 13.5u/mL 的酶浓度下作用 1h 可以取得 90% 左右的灭活效果, 4h 以后的灭活率达到 99.3% 的水平. 加大酶浓度至 67.5u/mL, 可以进一步加快灭活速度, 1h 就可以取得 99.4% 的灭活效果, 图 6 为处理前后噬菌斑对照. 相比之下, 酶对于污水中病毒的灭活效果要差很多, 提高酶浓度也可以加快灭活速度, 但是, 即使在 67.5u/mL 的浓度下 3h 的灭活率也仅为 81.1%. 实际污水中存在蛋白等容易与病毒产生竞争作用的物质, 造成了蛋白酶灭活效果的下降. 当污水先经过生物处理, 其中的污染物被分解以后, 蛋白酶对病毒的灭活应该可以得到改善, 有关这一点需要进一步探讨.

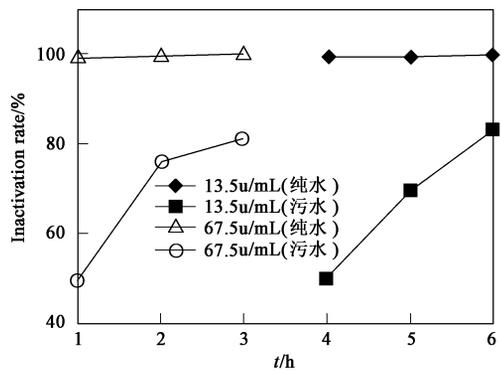


图5 蛋白酶 K 对纯水和生活污水中病毒灭活效果对比

Fig. 5 Comparison of inactivation rate of proteinase K to viruses in sterilized water and in sewage

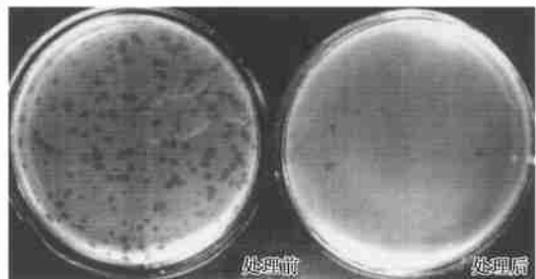


图6 处理前后的 PFU(蛋白酶浓度: 67.5u/mL, 1h)

Fig. 6 PFU before and after treatment (proteinase concentration: 67.5u/mL, 1h)

2.4 工业蛋白酶1398在适宜条件下对纯水中病毒的灭活

从实际应用的角度看,使用纯酶进行污水消毒的成本过高,只有使用价格低廉的工业蛋白酶才能有经济竞争力.图7是利用工业蛋白酶1398对纯水中T₄病毒进行灭活的结果.可以看出,中性工业蛋白酶1398有一定的灭活作用.在75.0u/mL的酶浓度下,对浓度为 1.7×10^5 PFU/L的病毒,1h内能够灭活74.4%左右,比蛋白酶K对病毒的灭活效果要低很多(蛋白酶K在67.5u/mL浓度水平1h病毒灭活率在99.4%).工业酶和纯酶在灭活效果方面存在显著差异,其原因需要进一步研究.

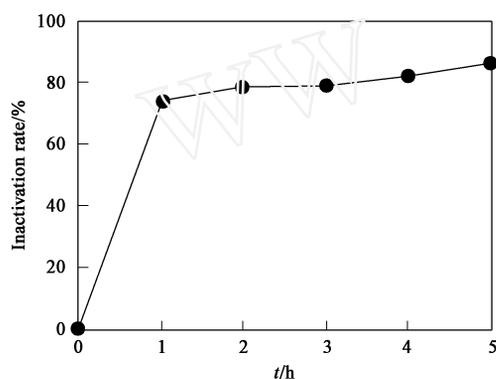


图7 工业蛋白酶对纯水中病毒的灭活效果

Fig. 7 Inactivation rate of industrial proteinase to viruses in sterilized water

2.5 讨论

实验结果表明,即使使用工业蛋白酶也可以实现一定的病毒灭活效果,用蛋白酶替代常规消毒剂具有一定的可行性.蛋白酶消毒法的主要作用机制是破坏病毒衣壳蛋白结构,对于病毒类具有广谱适用性.该方法的优点是消毒剂本身无害,而且不产生有害消毒产物.在灭活过程中,可以推测:蛋白酶或者作用于T₄的尾丝蛋白(其识别位点是大肠杆菌B脂多糖外膜中的二糖基残基),或者作用于整个衣壳蛋白,总之使其丧失了侵染活性.如果推测成立,那么此方法就有望应用于SARS病毒的方便、快速灭活.当然,本研究目前还仅是一个开始,在灭活机理和在处理核酸具有感染性的病毒以及运行工艺的选择等问题上还有许多需要探讨和完善的地方,有待进一步深入研究.

3 结论

(1) 适宜条件下,67.5u/mL浓度的蛋白酶K处理1h对纯水和生活污水中病毒灭活率分别达到了99.4%和49.4%,处理3h的灭活率分别是>99.9%和81.1%.

(2) 蛋白酶灭活病毒的效率在pH5.5~7.5的范围内变化不大;在20~55范围内温度对灭活效率的影响也不明显.

(3) 工业蛋白酶1398在75.0u/mL酶浓度下处理1h对纯水中病毒灭活率达到74.4%.

参考文献:

- [1] 余新民,彭裕连,谭勇,等.医院污水消毒设备调查分析[J].中国医师杂志,2002,4(7):767~768.
- [2] 胡国庆,等.浙江省医院污水处理情况调查分析[J].浙江预防医学,2000,12(1):20~24.
- [3] 孙建英,杜雪飞,贾力敏,等.不同消毒方法对自来水中有机浓集物致突变性影响[J].环境与健康杂志,2001,18(3):160~161.
- [4] Silvano Monarca, Donatella Feretti, Carlo Collivignarelli, et al. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater [J]. Wat. Res., 2000, 34(17): 4261~4269.
- [5] Mills CJ, Bull RJ, Cantor KP, et al. Workshop report. Health risks of drinking water chlorination by-products: report of an expert working group [J]. Chronic. Dis. Can., 1998, 19(3):91.
- [6] Peiris J, Lai S, Poon L, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome [J]. Lancet, 2003, 361(9366):1319~1325.
- [7] Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. N. Engl. J. Med., 2003, 348(20):1947~1958.
- [8] 王嘉丽,张佼磊,安静.SARS病毒的研究进展[J],第三军医大学学报,2003,25(9):828~830.
- [9] Montag D, Hashememolhosseini S, Henning U. Receptor-recognizing protein 37 of T-even type bacteriophages [J]. J. Mol. Biol., 1990, 216(2):327.
- [10] ZBX66030-87, 蛋白酶活力测定法[S].
- [11] QB/T 1803-93, 工业酶制剂通用试验法[S].
- [12] 白玉谦,万善康,高东,等.微生物实验技术[M].济南:山东大学出版社,1986.259~267,426~429.
- [13] 周群英,高廷耀.环境工程微生物学(第二版)[M].北京:高等教育出版社,2002.11~23.
- [14] IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology. Bacteriophage as model viruses in water quality control [J]. Wat. Res., 1991, 25(5):529~545.