

水体病毒钙离子絮凝浓缩新方法研究*

刘军义^{1 2 3 4 * *} 吴清平² 盘宝进⁴ 寇晓霞^{1 2 3} 韦梅良⁴

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071) (广东微生物研究所 广州 510070)

(中国科学院研究生院 北京 100049) (广西出入境检验检疫局 南宁 530021)

摘要 研究建立了一种从水体中浓缩病毒的新方法,即钙离子絮凝-柠檬酸缓冲液洗溶法,该方法的要点是先用一定量的钙离子溶液和钙离子絮凝剂絮凝水体中的病毒,再用 pH 5.0 的 0.3 mol/L 的柠檬酸缓冲液洗溶,然后再进一步超滤浓缩。此法可方便地将水体中的病毒浓缩 10000 倍以上。应用该法分别对人工接种于饮用水中的 ϕ_2 噬菌体和脊髓灰质炎疫苗病毒(PV₁)进行了浓缩,结果发现 ϕ_2 噬菌体的平均回收率达 96%,而 PV₁ 的回收率为 100%,均显著高于阳电膜过滤法($P < 0.05$)。该方法快速、简便、有效。

关键词 水,病毒,浓缩,钙离子絮凝

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1202-03

Studies on Calcium Ion Flocculation of Viruses from Water Samples*

LIU Jun-Yi^{1 2 3 4 * *} WU Qing-Ping² PAN Bao-Jin⁴ KOU Xiao-Xia^{1 2 3} WEI Mei-Liang⁴

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071) (Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

(Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049)

(Guangxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanning 530021)

Abstract A new procedure for virus concentration from water samples has been developed. This method called calcium flocculation-citrate buffer method involves virus flocculation formed by 1 mol/L Ca^{2+} solution and its flocculating agent, virus release with sodium citrate dissolution (0.3 mol/L, pH 5.0), and virus reconcentration by ultrafiltration. It can concentrate the viruses 10000 times easily. Seeding experiments showed that it could recover ϕ_2 phage in an average rate of 96%, and 100% for the vaccine poliovirus type 1 (PV₁), which was significant higher than the current positive charged filter method ($P < 0.05$). The established approach is rapid, simple and effective.

Key words Drinking water, Noroviruses, Concentration, Calcium ion flocculation

近年来,水源性病毒引起的人类疾病时有发生,且危害严重^[1],科学家甚至在瓶装饮用水中检测到了诺瓦克样病毒的核酸^[2],目前,国际上对饮用水的病毒污染的监测已提到了议事日程^[3]。对水病毒进行快速准确的检测是控制水源性病毒污染的一项重要措施,但是由于水体特别是饮用水中病毒含量很低,因此病毒的浓缩就成为检测水病毒成败的关键因素。曾有不同的方法用于浓缩水体病毒,这些方法大多是利用了病毒的理化特性如物理吸附、沉淀、相分离、膜过滤及其在电场下的迁移等原理。较早的方法主要涉及到病毒外壳蛋白与吸附剂表面的电学相互作用,如用多价阳离子盐、不溶性多聚电

质沉淀浓缩病毒;也有用病毒对矿物质的吸附特性如用膨润土、滑石粉吸附水体中的病毒;还有像电泳、电渗透、冷冻等方法也曾用于浓缩水体中的病毒。目前水病毒的浓缩主要采用吸附洗脱法,如阳电膜过滤法^[4],氯化铝沉淀法^[5]。这些方法的回收率都不太高,前者在 60% 左右,后者 < 50%。此外,两种方法在洗脱时均需要耗费较长的时间,而且阳电膜需要进口,材料不易获得。

本文以 ϕ_2 噬菌体和脊髓灰质炎疫苗病毒(PV₁)为模型,研究了一种新型的病毒浓缩方法,即钙离子絮凝法。此法可以方便地从水体中浓缩病毒,较目前常用的吸附洗脱法如阳电膜过滤法和氯化铝沉淀

* 国家质量监督检验检疫总局资助项目(B116-2003)

** 通讯作者 Tel: 0771-5314098, E-mail: mark771@163.com

收稿日期:2007-03-14,修回日期:2007-06-01

法快速、简便、高效。

1 材料与方法

1.1 试验材料

f_2 噬菌体和 *Escherichia coli* 285 购自军事医学科学院卫生学环境医学研究所。 f_2 噬菌体原液的效价约为 10^9 pfu/mL。脊髓灰质炎病毒疫苗株 (Poliovirus, PV₁) 和 Hep-2 细胞由某疾控中心赠送, Hep-2 细胞用含 10% 胎牛血清, 1% L-谷氨酰胺, 1% Na₂HCO₃ 和各 200 单位青、链霉素 MEM, 于 37℃、5% CO₂ 培养, 长成单层后, 接种 PV₁, 待病变达 80% 以上时, 收获, 反复冻溶 3 次, 离心收集病毒液作为实验用病毒样品。

1.2 方法

1.2.1 病毒浓缩新方法即钙离子絮凝法: 取噬菌体原液按 1:10 梯度稀释至 10^{-4} , 取 1 mL 稀释液添加到 1000 mL 灭菌的纯净水中, 取样测定噬斑数, 作为浓缩前的样品噬斑数, 往水样中添加 2 mL 钙离子溶液 (1 mol/L), 再加入 2 mL 钙离子絮凝剂 (1 mol/L), 充分搅拌均匀, 负压过滤, 过普通混合纤维素滤膜 (孔径 0.45 μ m, 直径 47 mm) 取下滤膜, 用 4 mL 0.3 mol/L pH 5.0 的柠檬酸缓冲液洗溶 3 min, 最后用 4 mL 超滤管在 7500 \times g 下离心 10 min, 再用无菌蒸馏水定容至 100 μ L, 即得浓缩 10000 倍的病毒浓缩液。将此浓缩液用无菌蒸馏水复原至 1000 mL, 测定噬斑数, 是为浓缩后样品回复的噬斑数。

脊髓灰质炎病毒的浓缩方法按照上述噬菌体的浓缩方法进行。取浓缩前后的样品, 10 倍递增稀释, 加 Hep-2 细胞培养, 每天观察细胞病毒情况, 计算病毒滴度。

每次试验均以目前通用的阳电膜过滤法作对照。

1.2.2 阳电膜过滤法: 参照 Gilgen 等的方法^[4]。取 1000 mL 水样通过一阳电滤膜 (Zetapore, 孔径 0.45 μ m, 直径 47 mm), 然后用 4 mL 含有 1% 小牛血清的甘氨酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 9.5) 洗脱 30 min, 再用 20 μ L 的 HCl 调节 pH 至 8.0, 最后超滤浓缩至 100 μ L。

1.2.3 f_2 噬菌体效价测定方法: 把融化的营养琼脂 (琼脂含量 1.5%) 12 mL ~ 15 mL 倾入无菌平皿内作为底层, 待凝固后加入被检样品 1 mL, 再加入

0.4 mL 培养至对数生长期的大肠杆菌 *Escherichia coli* 285, 然后覆盖一层半固体营养琼脂 (琼脂含量 0.8%, 约 5 mL ~ 8 mL), 轻度平面摇匀, 37℃ 培养 18 h ~ 24 h, 计数蚀斑数量。

1.2.4 病毒滴度 (TCID₅₀) 的滴定: 将病毒悬液用 MEM 营养液作 1:10 梯度稀释, 每个稀释度接种 4 个培养孔, 接种量 0.1 mL, 然后加入 0.1 mL Hep-2 细胞, 37℃、5% CO₂ 培养 7 d, 每天细胞病变情况, 记录细胞病变出现的孔数。按 Reed-Muench^[6] 病毒滴度计算方法计算病毒的滴度。回收率按下式计算:

$$\text{病毒回收率} = \left(\frac{\text{浓缩水样的病毒滴度} \times \text{体积}}{\text{加入病毒的滴度} \times \text{体积}} \right) \times 100\%$$

2 结果

2.1 钙离子絮凝法对 f_2 噬菌体浓缩效果的观察

f_2 噬菌体的添加回收试验进行了 9 次, 添加回收试验的结果如表 1 所示。

表 1 钙离子絮凝法浓缩水中 f_2 噬菌体效果观察

实验序号	浓缩前噬斑数 (pfu/mL)	浓缩后噬斑数 (pfu/mL)	回收率 (%)
1	85	102	120
2	120	110	92
3	78	90	115
4	90	82	91
5	85	90	106
6	115	95	83
7	105	100	87
8	92	78	85
9	88	80	91
平均	95.33	91.89	96

从表中可以看出, 钙离子絮凝法试验得出的 f_2 的回收率在 83% 至 120% 之间, 平均回收率为 96%。

2.2 钙离子絮凝法对脊髓灰质炎病毒浓缩效果的观察

采用同一批病毒液做添加回收试验, 试验共进行了 9 次, 浓缩前的病毒滴度 (TCID₅₀) 稳定为 $10^{5.0}$, 浓缩后的病毒滴度 (TCID₅₀) 也全为 $10^{5.0}$, 脊髓灰质炎病毒的回收率为 100%。

2.3 钙离子絮凝法与阳电膜过滤法的病毒回收率的比较

试验过程中, 同时采用了阳电膜过滤法作对照, 阳电膜过滤法对 f_2 噬菌体和 PV₁ 的浓缩试验结果如表 2 所示。

从表中可以看出, 采用阳电膜过滤法浓缩后, f_2

的平均噬斑数为 29,平均回收率为 30%, PV_1 的平均滴度为 $10^{4.76}$,平均回收率为 57%。

钙离子絮凝法与阳电膜过滤法两种方法的试验结果的比较如表 3 所示。

表 2 阳电膜过滤法浓缩水中 f_2 噬菌体和 PV_1 试验结果^a

实验 序号	f_2 噬菌体		PV_1	
	浓缩后噬斑数 (pfu/mL)	回收率 (%)	浓缩后 滴度	回收率 (%)
1	28	33	$10^{4.7}$	50
2	41	34	$10^{4.7}$	50
3	22	28	$10^{4.8}$	63
4	28	31	$10^{4.7}$	50
5	19	22	$10^{4.8}$	63
6	38	33	$10^{4.8}$	63
7	38	36	$10^{4.8}$	63
8	20	22	$10^{4.7}$	50
9	27	31	$10^{4.8}$	63
平均	29	30	$10^{4.76}$	57

a 表中 f_2 噬菌体浓缩前的噬斑数与表 1 中的相同。 PV_1 浓缩前的病毒滴度(TCID₅₀)均为 10^5 。

表 3 钙离子絮凝法与阳电膜过滤法的病毒回收率比较^b

试验方法	f_2 噬菌体回收率		PV_1 回收率(%)	
	平均值(\bar{x})	标准差(s)	平均值(\bar{x})	标准差(s)
钙离子絮凝法	0.96	0.14	1.00	0.00
阳电膜过滤法	0.30	0.05	0.57	0.07

b 检测结果为 9 次试验测得的平均值。

从表中可以看出,钙离子絮凝法的回收率明显高于阳电膜过滤法,二者具有显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论

水体中病毒的种类和型别很多,目前研究最多的是脊髓灰质炎病毒(PV_1),一般将它作为水中肠道病毒的代表。近来发现 f_2 噬菌体在许多物理、化学特性方面与 PV_1 相似,二者核酸都是单链线性 RNA,具有 20 面体结构,在 pH3~10 时稳定,在水环境中不能复制。因此本试验选用了 PV_1 和 f_2 噬菌体作为水中病毒的指示微生物。

水体病毒污染监测包括代表性水样采集、水样浓缩、病毒检测及鉴定等过程,其中水样的浓缩是关键。目前国际上公认膜吸附-洗脱法是比较好的水体病毒浓缩方法,但是该方法的病毒回收率并不很高,Lamothe 等人^[7]认为这是因为病毒颗粒很小,很容易通过微孔,同时操作过程中不能保证将病毒全部洗脱下来,因此滤膜法会产生较严重的病毒丢失现象。

本试验建立的钙离子絮凝-柠檬酸缓冲液洗溶浓缩病毒的方法,能有效地浓缩 f_2 噬菌体和脊髓灰质炎疫苗病毒(PV_1),平均回收率分别达到 96% 和

100%,而用阳电膜过滤法的回收率分别只有 30% 和 57%,新研究的方法显著高于通常所用的阳电膜过滤法,也高于目前国内外的报道^[8,9]。与其它方法相比,新方法除了高效的特点外,还有如下优点:一是快速。絮凝快,洗脱也快。水中添加钙离子和钙离子絮凝剂后,能迅速形成带正电荷的胶体颗粒和絮凝物,通过吸附和包埋作用将病毒结合起来,只需搅拌均匀即可马上过滤,过滤后采用柠檬酸缓冲液进行洗脱,实际是起到了边洗脱边溶解絮凝沉淀的作用,因此非常快,只需 3 min 即可。而采用膜滤法和氯化铝沉淀法均需要用大体积洗脱液进行洗脱,洗脱时间较长,一般需要 0.5 h 以上,若要要进行二次浓缩,则可能需要过夜处理。二是比较简便。目前阳电滤膜全部依靠进口,材料不易获得,应用本法,使用任何一种普通的微孔滤膜均可。三是可用于现场快速浓集病毒。在现场采样时,不需要采取大量水样回到实验室进行检测,只需待水样絮凝静止沉降后,即可获得小体积的初步浓缩样品。

本试验中,噬菌体的回收率有时会超过 100%,这可能与噬菌体的多聚团解聚有关。播种所用的噬菌体为三倍肉汤悬浮物,由于肉汤中成份复杂,噬菌体很可能与其中的阳电荷成份或胶体颗粒起作用,通过静电或吸附作用形成病毒胶团,这些病毒胶团在浓缩后的洗脱溶解过程中可能得到解聚,从而“回收”出更多的病毒。

由于采用了絮凝法来浓缩病毒,由于凝胶颗粒对微孔有一定的阻塞作用,因此,本方法还不能直接用来处理大容量的水样(10L 以上)。要处理大容量的水样,可采用直径相对较大的滤膜。

参考文献

- [1] Koopmans M., Carl-Henrik von Bonsdorff, Jan Vinjé, et al. FEMS Microbiol Reviews, 2002, 26: 187~205.
- [2] Beuret, C., D. Kohler, and T. Luthi. J Food Prot, 2000, 63(11): 1576~1582.
- [3] Schaub, S.A., Oshiro, R.K. J Infect Dis, 2000, 181(Suppl. 2): 374~380.
- [4] Gilgen, M., D. Germann, J. Luthy, et al. Int J Food Microbiol, 1997, 37: 189~199.
- [5] 尤凤兴,刘秉辉,张玲妹,等. 病毒学杂志, 1991, 6(2): 125~128.
- [6] 戴华生. 新实验病毒学. 北京: 科学出版社, 1983, pp. 30~35.
- [7] Lamothe G. T., T. Putallaz, H. Joosten, et al. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 6541~6549.
- [8] 李君文,王新为,宋农,等. 中国公共卫生, 1996, 12(1): 26~27.
- [9] Beuret C. J Virol Methods, 2003, 107: 1~8.