

水体病毒浓缩方法的建立和优化研究

盘宝进 刘军义 韦梅良

(广西出入境检验检疫局技术中心 南宁 530021)

摘要: 采用氯化钙 (CaCl_2)、聚乙二醇 (PEG, pH7.0)、聚乙二醇 (PEG, pH11.5)、三氯化铝 (AlCl_3) 沉淀、Amicon Utera 超滤离心装置和硝酸纤维素吸附膜 6 种浓缩方法, 浓缩人工添加于水体的 1 型脊髓灰质炎疫苗病毒 (PV_1), 并对浓缩实验条件进行选择和优化。结果表明, CaCl_2 和聚乙二醇 (pH7.0) 沉淀法适用于浓缩大容量水体中的病毒, 而超滤离心管浓缩法适用于小容量水体, 这 3 种浓缩方法的病毒回收率均达到 100%。

关键词: 水体, 病毒, 浓缩方法, 条件优化

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0042-05

Studies on Establishing and Optimizing Conditions of Concentration Virus in Water Body

PAN Bao-Jin LIU Jun-Yi WEI Mei-Liang

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

Abstract: In this experiment six methods, calcium chloride (CaCl_2) precipitation, polyethylene glycol (PEG, pH7.0) precipitation, polyethylene glycol (PEG, pH11.5) precipitation, aluminum chloride (AlCl_3) precipitation, Amicon Utera centrifugal filter devices and cellulose nitrate membrane were used to concentrate the vaccine poliovirus type 1 (PV_1) added to water body; experimental conditions for concentration were selected and optimized. The results showed that two methods, CaCl_2 and PEG (pH 7.0) precipitation were suitable for concentrating virus in large volumes of water while amicon utera centrifugal filter devices for small ones. The virus recovery of the three methods reached a 100% rate.

Key words: Water body, Virus, Concentration methods, Optimizing experimental conditions

目前, 水体环境中由于人类、动物和植物病毒的污染, 给人体健康和农业生产带来危害^[1,2]。一般受污染水体中病毒含量较低, 常常达不到直接检测浓度, 需要经过浓缩才能被检测到, 因此病毒浓缩方法的准确性和有效性显得十分重要, 本研究采用人工播种脊髓灰质炎疫苗病毒方法, 应用细胞培养技术测定浓缩回收病毒的滴度, 建立和优化水体病毒浓缩方法, 筛选出简便快速、准确性高、低成本的病毒浓缩方法。

1 材料

1.1 实验材料

1.1.1 病毒株和细胞系: 1 型脊髓灰质炎疫苗病毒株 (Poliovirus, PV_1) 和人喉癌细胞系 (HEp-2), 由某防疫单位赠送, HEp-2 细胞用含 10% 胎牛血清, 1% L-谷氨酰胺, 1% Na_2HCO_3 和各 200 单位青、链霉素 MEM, 于 37℃、5% CO_2 培养, 长成单层后, 接

通讯作者 Tel: 0771-5330122, E-mail: pan2005@china.com.cn

收稿日期: 2005-01-24, 修回日期: 2005-03-02

种 PV₁, 待病变达 80% 以上时, 收获, 反复冻溶 3 次, 收获病毒液备用。

1.1.2 水样: 市售纯净饮用水。

1.1.3 细胞培养板: 96 孔微量细胞培养板, 加拿大 JET 生物化学公司生产。

1.2 浓缩材料

1.2.1 浓缩试剂: 10% CaCl₂, 10% A (由于是新方法, 暂不公开 CaCl₂ 沉淀法中的另一种浓缩成份, 用 A 表示); 0.005mol/L AlCl₃; 聚乙二醇。

1.2.2 吸附膜: 国产硝酸纤维素膜, 孔径 0.45μm。

1.2.3 浓缩装置: 美国产超滤离心装置 (Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices)。

1.3 洗脱材料

0.01mol/L EDTA-0.1mol/L 甘氨酸缓冲液 (含 15% 小牛血清, pH10.5); 5mol/L Tris-0.2% Tween20; 0.1mol/L Na₂HPO₄ (pH9.5); 1mol/L 盐酸。

2 实验方法

2.1 病毒滴度测定

2.1.1 病毒滴度 (TCID₅₀) 的测定: 将病毒样品用 MEM 营养液作 1:10 递增稀释, 每个稀释度接种 4 个培养孔, 接种量 0.1mL/孔, 加入 0.1mL HEp-2 细胞, 37℃、5% CO₂ 培养 1 周, 每天观察细胞病变情况, 记录细胞病变出现的孔数。

2.1.2 TCID₅₀ 病毒滴度计算: 按 Reed-Muench 病毒滴度计算方法进行^[3]。

2.2 CaCl₂ 和 AlCl₃ 双重沉淀浓缩法

取饮用水 2,000mL, 添加 PV₁ (抽取待检添毒水样, 编号为 a), 取 1,000mL 加入 CaCl₂ 和 A, 终浓度均为 0.1%, 室温作用 1h, 5,000r/min 离心 15min, 取 8mL EDTA-甘氨酸缓冲液洗脱, 1,500r/min 离心 10min (上清样品 b); 上清液再加 0.005mol/L AlCl₃, 用 1mol/L HCl 调 pH 至 3.5, 搅拌 15min 使病毒絮凝, 10,000r/min 离心 15min, 用 2mL 0.1mol/L Na₂HPO₄ (pH9.5) 悬浮沉淀物 (样品 c)。按 2.1 方法测定样品 a、b、c 的 TCID₅₀。

2.3 CaCl₂、PEG (pH7.0)、PEG (pH11.5)、AlCl₃ 和超滤离心浓缩法比较试验

添加 PV₁ 的 1,000mL 水样 (水样 d), 加入 CaCl₂ 和 A, 终浓度均为 0.1%, 室温搅拌 1h, 8,000r/min 离心 15min (上清液样品 e), 加 50mL 0.01mol/L EDTA-0.1mol/L 甘氨酸缓冲液洗脱沉淀, 8,000r/min 离心 10min (上清样品 f)。取洗脱液 3 份, 每份 10mL, 2 份分别用 pH7.0 和 pH11.5 的含 8% PEG、0.3mol/L NaCl 沉淀, 4℃ 过夜, 8,000r/min 离心 15min, 用 EDTA-甘氨酸缓冲液洗脱, pH7.0 PEG 法 (上清液样品为 g, 洗脱样品为 h), pH11.5 PEG 法 (上清液样品为 i, 洗脱液样品为 j); 另一份加 0.005mol/L AlCl₃ (pH3.5), 沉淀过夜, 8,000r/min 离心 15min (上清液样为 k, 用 EDTA-甘氨酸洗脱沉淀, 样品为 l); 取 4mL CaCl₂ 沉淀法洗脱液于病毒超滤浓缩离心管中, 7,500r/min 离心 15min, 超滤装置内管剩余样品 200μL (标记为 m), 测定样品 d、e、f、g、h、i、j、k、l、m 的 TCID₅₀。

2.4 EDTA-甘氨酸和 Tris-Tween20 洗脱液洗脱效果比较试验

取 1,000mL 饮用水添加 PV₁ (样品 n), 取稀释液 4 份, 每份 100mL, 两份加 CaCl₂ 和 A (终浓度均为 0.1%) 室温搅拌 30min, 8,000r/min 离心 15min, 一份用 EDTA-甘

氨酸洗脱液洗脱 (标记为 o), 另一份用 5mol/L Tris-0.2% Tween20 洗脱 (标记为 p); 另两份经硝酸纤维素膜过滤, 分别用 EDTA-甘氨酸和 Tris-Tween20 洗脱 (分别标记为 q、r), 测定样品 o、p、q、r 的 TCID₅₀。

2.5 盐酸溶解浓缩病毒沉淀物试验

1,000mL 添加 PV₁ 水样 (水样 s) 中加入含 0.1% CaCl₂ 和 0.1% A, 室温搅拌 1h, 8,000r/min 离心 15min, 用 5mL 1mol/L HCl 溶解沉淀物, 取 1mL 直接检测病毒滴度 (标记为 t), 4mL 经超滤离心后剩余 100μL, 测定其病毒滴度 (标记为 u)。

3 结果

3.1 CaCl₂ 和 AlCl₃ 双重浓缩沉淀法试验结果

第一步, CaCl₂ 沉淀法病毒回收率达到 100%, 而第二步 AlCl₃ 沉淀法病毒回收率为 0, 见表 1。

表 1 CaCl₂ 和 AlCl₃ 双重浓缩沉淀法病毒回收率

样品	编号	浓缩倍数	PV ₁ 滴度 (TCID ₅₀)	病毒回收率
添毒水样	a	0	10 ^{5.4}	0
CaCl ₂ 沉淀法	b	125	10 ^{7.5}	100%
AlCl ₃ 沉淀法	c	3.5	10 ^{7.0}	0
对照	con	0	0	0

3.2 CaCl₂、PEG、AlCl₃、超滤离心浓缩效果比较试验结果

CaCl₂、PEG (pH7.0) 和超滤离心管浓缩 3 种方法病毒的回收率均达到 100%, PEG (pH11.5) 絮凝沉淀法为 60%, AlCl₃ 沉淀法为 0。见表 2。

表 2 CaCl₂、PEG、AlCl₃、超滤离心管浓缩法结果

样品	编号	浓缩倍数	PV ₁ 滴度 (TCID ₅₀)	病毒回收率
添毒水样	d	0	10 ^{4.0}	0
CaCl ₂ 法上清	e	未测		
CaCl ₂ 法洗脱	f	20	10 ^{5.4}	100%
PEG (pH7.0) 上清	g		0	
PEG (pH7.0) 洗脱	h	10	10 ^{6.4}	100%
PEG (pH11.5) 上清	i		10 ^{1.5}	
PEG (pH11.5) 洗脱	j	10	10 ^{6.0}	60%
AlCl ₃ 法上清	k		10 ^{5.4}	
AlCl ₃ 法洗脱	l	10	10 ^{4.5}	0
超滤离心装置	m	10	10 ^{6.4}	100%
对照	con	0	0	0

3.3 EDTA-甘氨酸和 Tris-Tween20 洗脱效果试验结果

CaCl₂ 沉淀法和硝酸纤维素膜吸附法, 用 Tris-Tween20 洗脱, 病毒回收率分别为 100% 和 70%; 而用 EDTA-甘氨酸洗脱, 硝酸纤维素膜吸附法为 0, 见表 3。

表 3 EDTA-甘氨酸和 Tris-Tween20 洗脱液洗脱效果试验结果

样品	编号	浓缩倍数	PV ₁ 滴度 (TCID ₅₀)	病毒回收率
添毒水样	n	0	10 ^{4.0}	0
CaCl ₂ 法 EDTA-甘氨酸洗脱	o	10	10 ^{4.7}	70%
CaCl ₂ 法 Tris-Tween20 洗脱	p	10	10 ^{5.0}	100%
硝酸纤维素膜吸附法 EDTA-甘氨酸洗脱	q	10	10 ^{4.0}	0
硝酸纤维素膜吸附法 Tris-Tween20 洗脱	r	10	10 ^{4.7}	70%
对照	con	0	0	0

3.4 盐酸溶解浓缩病毒沉淀物试验结果

添毒水样经 CaCl₂沉淀法浓缩 200 倍，病毒回收率为 0，见表 4。

表 4 1mol/L HCl 溶解浓缩病毒沉淀物试验结果

样品	编号	浓缩倍数	PV ₁ 滴度 (TCID ₅₀)	病毒回收率
添毒水样	s	0	10 ^{2.5}	0
盐酸溶解的沉淀物	t	200	0	0
超滤离心装置	u	10,000	0	0
对照	con	0	0	0

4 讨论

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。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化学相互作用，如用多价阳离子盐、不溶性多聚电解质沉淀浓缩病毒^[4-6]；膜吸附—洗脱法是较好的水体病毒浓缩方法^[7,8]。本研究建立了浓缩水体病毒的新方法—CaCl₂沉淀法，并与 PEG (pH7.0)、PEG (pH7 11.5)、AlCl₃、超滤离心管浓缩和硝酸纤维素膜吸附 5 种浓缩方法进行比较。CaCl₂、PEG (pH7.0) 和超滤离心管浓缩 3 种浓缩方法的病毒回收率均达到 100%。CaCl₂和 PEG (pH7.0) 法适用于浓缩大容量水体中的病毒，而超滤离心浓缩法由于离心管容量小，仅适用于第二级或少量水质的浓缩。我们建立的 CaCl₂沉淀法还具有耗时短，操作过程简便，不需要复杂的仪器设备，成本低廉等优点。

CaCl₂、PEG (pH7.0)、PEG (pH711.5) 和硝酸纤维素膜吸附 4 种方法浓缩条件进行比较，实验证明，同一浓缩方法，采用不同的 pH 值，对病毒的浓缩效果有一定影响，PEG 沉淀法，选择 pH7.0 时，病毒回收率达 100%，而选择 pH11.5 时，仅有 60% 回收率。洗脱液的洗脱效力也十分重要，本试验选择 0.01mol/L EDTA-0.1mol/L 甘氨酸 (含 15% 的小牛血清，pH 值 10.5) 和 5mol/L Tris-0.2% Tween20 两种洗脱液。它们均适用于 CaCl₂沉淀法病毒的洗脱，洗脱效果达到 100%；EDTA-甘氨酸洗脱 PEG

(pH7.0) 沉淀法浓缩的病毒沉淀物以及用 Tris-Tween20 洗脱硝酸纤维素膜吸附的病毒, 同样取得了较好的洗脱效果。

本试验探索应用强酸 (1 mol/L HCl) 溶解浓缩病毒沉淀物, 目的是减少浓缩病毒沉淀物洗脱液的数量, 由于洗脱 1,000mL 水样所产生的沉淀物, 至少需要 10mL 常规洗脱液进行洗脱。我们用 CaCl_2 沉淀浓缩方法, 浓缩添加了 PV_1 的 1,000mL 饮用水样, 用 5mL 1mol/L HCl 即可溶解全部沉淀物, 取溶解液测定病毒滴度, 结果表明, 虽然浓缩了 200 倍, 但是, 病毒滴度为 0, 说明 HCl 对病毒有灭活作用, 在获取活病毒的浓缩过程中, 盐酸不适宜用于溶解浓缩沉淀物。

参 考 文 献

- [1] 郑耀通, 林奇英, 谢联辉. 中国病毒学, 2000, 15 (1): 1~7.
- [2] Binon G. Niley and Sons. New York: John, 1980.
- [3] 戴华生. 新实验病毒学. 北京: 中国学术出版社, 1983. 30~35.
- [4] Cookson J T. The chemistry of concentration by chemical methods. In: Development in industrial microbiology. Arlington: American Institute of Biological Science, 1974, 15: 160~173.
- [5] England B. International Virology, 1971, (17): 325~342.
- [6] England B. Appl Microbiol, 1972, 24: 510~512.
- [7] Wallis C, Homma A. Am Water Works Assoc, 1972, 64: 189~196.
- [8] Sobey M D. Can Microbiol, 1977, 23: 770~778.