

免疫磁珠分离与实时定量 PCR 技术联合检测水中轮状病毒的研究

杨万, 何苗*, 李丹, 施汉昌, 刘丽

(清华大学环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要:建立了一种免疫磁珠分离技术联合实时定量 PCR 快速定量检测水中轮状病毒的方法. 通过制备能够分离水中轮状病毒的特异免疫磁珠, 优化分离条件, 建立了免疫磁珠分离前处理方法, 并与逆转录、实时定量 PCR 结合, 成功用于水中轮状病毒的检测. 研究发现, 在 1 mL 水样中加入 10 μ L 轮状病毒免疫磁珠、0.25 μ L Tween 20、孵育 2 h 可达到较好的分离效果; 免疫磁珠可用于 3% 牛肉浸膏等常用病毒洗脱液中的轮状病毒的分离, 表明该分离技术能与已有的病毒浓集方法良好地整合. 免疫磁珠分离技术与实时定量 PCR 联合用于检测水中轮状病毒, 全过程需时约 5 h, 检测限为 1×10^4 copies/mL (相当于 3~4 PFU/mL), 检测结果与细胞病变试验检测结果有良好的线性相关关系 ($R^2 = 0.9816$), 表明其能较好地表征水样的病毒感染风险. 对接种已知量的轮状病毒的污水处理厂二级出水、再生水、地表水、自来水等水样的实验表明, 该法可用于各种水样中轮状病毒的检测.

关键词: 免疫磁珠分离前处理; 实时定量 PCR; 轮状病毒; 环境水样

中图分类号: X832 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)05-1368-08

Rapid Detection of Rotavirus in Water Samples Using Immunomagnetic Separation Combined with Real Time PCR

YANG Wan, HE Miao, LI Dan, SHI Han-chang, LIU Li

(State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A quantitative and rapid detection method for rotavirus in water samples was developed, by using immunomagnetic separation combined with reverse transcription and real time polymerase chain reaction (IMS-RT-real time PCR). Magnetic beads coated with antibodies directed against group A rotavirus were used to capture and purify the virus in water samples. The experimental results showed that IMS was optimized when 1 mL samples were supplemented with 10 μ L of immunomagnetic beads, 2.5 μ L of Tween 20 and incubated for 2 h. The IMS method was employed in the detection of rotavirus in seeded virus eluant such as 3% beef extract successfully and thus manifested its compatibility with established virus concentration methods. The IMS-RT-real time PCR method could yield quantitative results within about 5 h with a detection limit at 1×10^4 copies/mL (equivalent to 3-4 PFU/mL). The method exhibited a high level correlation ($R^2 = 0.9816$) with cell culture assay, indicating that it could perform as well as cell culture assay does in infection tests. And the method functioned satisfactorily in seeded concentrate of secondary waste water treatment plant effluent, reclaimed water, surface water and tap water.

Key words: immunomagnetic separation; real time polymerase chain reaction; rotavirus; water samples

全球范围内由病毒污染水源引起疾病暴发事件不断发生^[1,2]. 据报道^[3], 排入环境水体中的病毒多于 140 种, 它们对消毒剂耐受力强^[4,5]、存活时间长、感染剂量低^[6,7], 易于穿透污水及/或供水处理屏障, 进入各种环境水体甚至饮用水系统^[8,9], 威胁人体健康和自然生态系统. 因此, 加强对水环境及饮用水中病毒的监测、预警及有效控制至关重要.

轮状病毒 (rotavirus, RV) 是婴幼儿重症胃肠炎的主要致病原, 全球每年有 74.9~208.5 万 5 岁以下婴幼儿受轮状病毒感染, 近 100 万患者因此死亡^[10]. 在我国, 上海、广州、深圳、兰州、长春、北京等地均有轮状病毒感染的报道. 轮状病毒随粪便排泄

进入各种水体, 目前国内外均有从环境水体中检测出轮状病毒的报道^[11~13].

传统的病毒检测, 采用细胞病变试验、蚀斑试验等方法, 能够直接反映水质的微生物学安全性, 但操作复杂、需时较长 (一般需数天至数周), 且不适于检测难培养或不可培养的病毒 (如甲肝病毒、诺罗病毒等). PCR 检测方法具有快速、灵敏、特异等特点, 能

收稿日期: 2008-06-10; 修订日期: 2008-08-14

基金项目: 国家重点实验室专项基金项目 (08Y01ESPCT)

作者简介: 杨万 (1983~), 女, 硕士, 主要研究方向为环境病原微生物的检测. E-mail: wanyang08@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: hemiao@mail.tsinghua.edu.cn

够在一定程度上弥补上述不足,但该法易受水样中生物或非生物杂质的干扰,出现假阴性或假阳性;另一方面,PCR 方法仅检测病毒核酸,不能反映病毒的感染性.免疫磁珠分离技术(immunomagnetic separation,IMS)是基于免疫学原理,利用待测目标病毒与其抗体的特异性结合特征,高效捕获分离完整的病毒粒子的新兴前处理方法.将免疫磁珠分离技术与 PCR 技术相结合,保证了 PCR 扩增的模板来自具备抗原性的病毒粒子,能够同时检测病毒的抗原性及核酸,因而检测可良好表征样品中病毒的感染风险;同时该联合检测技术能去除水样中的杂质对检测的干扰,减少了假阴性或假阳性结果;相对于传统检测方法,该技术可实现水样品中病毒的快速有效检测^[14,15].

鉴于此,本研究自主制备轮状病毒的免疫磁珠分离材料,开发基于免疫磁珠分离的前处理方法,结合本课题组已经开发的实时定量 PCR 法,建立水中轮状病毒的快速定量分析方法,以期为水环境中轮状病毒的监控提供技术支撑.

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

病毒:轮状病毒标准株 SA-11,由山东省医学科

学院基础研究所孟虹教授惠赠.
免疫磁珠分离试剂及仪器:磁珠(Dynabeads[®] Protein A, Dynabeads[®] M-280 Sheep anti-Mouse IgG)购自 Invitrogen 公司.轮状病毒抗体[Goat Antibody to Rotavirus NCDV (all antigens), Catalog: B65110G; Monoclonal Antibody to Rotavirus group-specific antigen, Catalog: C86310M]购自 Bidesign 公司.磁性分离架购自宁波新芝生物科技股份有限公司.

逆转录(reverse transcription, RT)和实时定量 PCR 试剂盒及仪器:逆转录试剂盒 Prime Script[™] RT Reagent Kit (Code: DRR037A)、荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Code: DRR041A)购自 Takara 公司.iCycler iQ 荧光定量 PCR 仪购于 Bio-Rad 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 水中病毒的检测流程

由于环境水样病毒个数较低且干扰杂质多,必须通过过滤-洗脱等方法浓缩水样,再经超滤、免疫磁珠分离等技术进一步浓集、纯化后进行细胞感染、PCR 等检测.本研究采用的轮状病毒检测方法全流程如图 1 所示,水样经浓缩、免疫磁珠分离前处理后,由热裂解提取病毒 RNA,再经逆转录(reverse transcription, RT)合成 cDNA,最后由实时定量 PCR 得出最终检测结果(IMS-RT-实时定量 PCR).

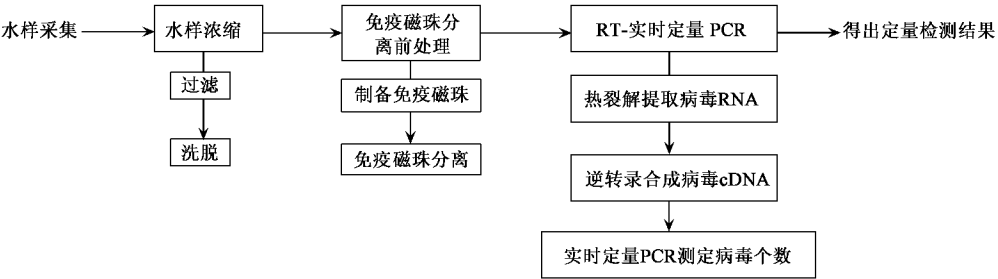


图 1 轮状病毒检测方法流程
Fig.1 Rotavirus detection method flow chart

1.2.2 免疫磁珠的制备

涡旋振荡混匀磁珠后,取出 100 μL 于 1.5 mL EP 管,用清洗液(0.1 mol/L Na₃PO₄, 0.01% ~ 0.1% Tween 20, pH 8.0)清洗 3 次后,去除上清,加入 50 μL PBS、50 μL 抗体,保持反应体系中磁珠浓度与商品原浓度相同,于涡旋振荡器振荡混匀后,室温孵育 30 min.去除上清,用清洗液清洗 3 次后,加入 100 μL PBS-0.1% BSA,存于 4℃备用.

1.2.3 免疫磁珠分离

在 1 mL 水样(置于 1.5 mL EP 管)中加入 10 μL

免疫磁珠,振荡混匀后,室温孵育 2 h,期间每隔 5 min 颠倒反应管 3 ~ 5 次以防止免疫磁珠沉淀.之后,将 EP 管置于掌形离心机,低速离心 10 s,再放入磁力架,静置约 1 min 使免疫磁珠完全吸附于管壁后,吸除水样,再加入清洗液,清洗 3 次.最后一次清洗尽量去除残留的清洗液.

1.2.4 病毒 RNA 的提取

加入 RNA 提取液 20 μL,反复吹吸重悬免疫磁珠后,将免疫磁珠悬液吸至 200 μL 的 PCR 管,95℃,孵育 5 min,迅速冰浴冷却,再 12 000 r/min、4℃、离心

2 min, 留上清, 立即逆转录或者保存于 - 80℃.

1.2.5 逆转录

按照 Prime Script™ RT Reagent Kit (Code: DRR037A) 说明书进行逆转录反应, 反应体系 (10 μL) 为: RNA 6.5 μL, 5 × Prime Script™ Buffer 2 μL, Prime Script™ RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Oligo dT Primer (50 μmol/L) 0.5 μL, Random 6 mers (100 μmol/L) 0.5 μL. 反应程序为: 37℃, 15 min; 85℃, 5 s. 逆转录得到的 cDNA 立即进行实时定量 PCR 反应或保存于 - 20℃.

1.2.6 实时定量 PCR

PCR 引物由本实验室设计^[16]. 引物序列如下, SA-11-Sense: 5'-CCTCACTTATACACTTTGCC-3'; SA-11-Antisense: 5'-TTCGCTTCGTCAGTTTGCT-3'. 依照 SYBR® Premix Ex Taq™ (Code: DRR041S) 说明书, 实时定量 PCR 的反应体系为 (20 μL): 2 × SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL, 上、下游引物各 0.2 μL (终浓度 0.2 μmol/L), cDNA (标准品^[16]或样品) 4 μL, 双蒸水 5.6 μL 补足体积至 20 μL. 实时定量 PCR 反应程序如下, 1 个循环: 95℃, 5 min; 40 个循环: 95℃, 5 s, 59℃, 20 s, 72℃, 15 s (收集荧光); 熔解曲线的过程为: 95℃, 1 min, 65℃ 1 min, 从 65℃ 开始每 30 s 温度升高 0.5℃, 进行 61 个循环, 结束温度为 95℃. 反应结束后 4℃ 保存.

2 结果与分析

2.1 轮状病毒免疫磁珠分离材料的制备

用轮状病毒多克隆抗体 (PAb) 包被 Dynabeads®

Protein A 磁珠, 用轮状病毒单克隆抗体 (McAb) 分别包被 Dynabeads® M-280 Sheep anti-Mouse IgG 磁珠及 Dynabeads® Protein A 磁珠, 制作了 3 种轮状病毒免疫磁珠, 依次记为 PAb-ProA、McAb-α Mouse IgG、McAb-ProA (如表 1 所示). 对同一种免疫磁珠, 考察使用不同浓度的抗体包被磁珠对其分离性能的影响, 并确定最优的抗体包被浓度. 将制备的免疫磁珠投加入含有相同量 SA-11 病毒粒子的水样中, 测试各种免疫磁珠捕获病毒粒子的效率. 每组实验设置 2 个平行样, 下同. 设定免疫磁珠 PAb-ProA (抗体浓度 1.12 mg/mL) 的平均捕获效率为 100%, 其他免疫磁珠的捕获效率与之比较, 结果列于表 1.

试验结果表明, 采用多抗制备的轮状病毒免疫磁珠 (PAb-ProA) 病毒捕获效率高于采用单抗制备的免疫磁珠 (McAb-α Mouse IgG 及 McAb-ProA), 其原因可能在于, 多抗是由轮状病毒全抗原制备所得, 因而含有各种抗原决定簇, 能够全面捕获水样中的轮状病毒粒子; 而单抗仅针对特定抗原决定簇, 可能因此漏捕水样中不具相应抗原决定簇的病毒粒子. 从表 1 还可以看出, 采用不同浓度抗体包被的磁珠, 其分离性能相差较大, 且高浓度的抗体制备的免疫磁珠分离性能并非最高. 对于 PAb-ProA, 当包被抗体的浓度为 1.12 mg/mL 时, 所制得的免疫磁珠捕获效率最高, 因此后续试验均采用此配方制作免疫磁珠.

将 5 μL PAb-ProA 免疫磁珠投加入不同病毒浓度的水样中, 测试免疫磁珠的病毒捕获容量. 实验表明, 1 μL PAb-ProA 免疫磁珠能够捕获病毒粒子约 4 × 10⁶ copies.

表 1 3 种轮状病毒免疫磁珠及其病毒捕获效率比较

免疫磁珠名称	材料		抗体浓度 /mg·mL ⁻¹	捕获效率 (平均值 ± 标准偏差)/%
	抗体	磁珠		
PAb-ProA	Goat Antibody to Rotavirus NCDV (all antigens)	Dynabeads® Protein A	2.25	96.68 ± 19.40
			1.12	100 ± 13.03
			0.56	29.79 ± 4.46
			0.28	31.12 ± 9.19
McAb-α Mouse IgG	Monoclonal Antibody to Rotavirus group-specific antigen (host: mouse)	Dynabeads® M-280 Sheep anti-Mouse IgG	3.6	3.25 ± 1.85
			1.8	8.63 ± 5.92
			0.9	2.20 ± 1.28
			3.6	8.82 ± 1.54
McAb-ProA	Monoclonal Antibody to Rotavirus group-specific antigen (host: mouse)	Dynabeads® Protein A	1.8	11.21 ± 3.21
			0.9	15.08 ± 2.13
			0.45	61.03 ± 8.25
			0.23	43.81 ± 4.57

2.2 免疫磁珠分离条件的优化

免疫磁珠分离是免疫磁珠与病毒粒子碰撞、吸

附、解吸的动态平衡过程. 根据扩散原理和抗原 (病毒粒子) 与抗体 (吸附于免疫磁珠) 的反应动力学, 反

应体系中病毒粒子与免疫磁珠的扩散速度、反应体系中病毒粒子及免疫磁珠的浓度、反应的时间,是影响免疫磁珠分离效率的主要因素.本实验分别测试了这些因素对免疫磁珠分离效率的影响,并根据实验结果优化了分离过程的反应条件.

为保证免疫磁珠与水样充分混合以增大免疫磁珠与目标病毒粒子碰撞的机率,在实验过程中每隔 5 min 颠倒反应管 3~5 次或涡旋振荡 1 次.

在 1 mL 水样中分别投加 5、10、20 μL PAb-ProA 免疫磁珠,测试使分离效率达到最高的免疫磁珠浓度.实验结果表明,免疫磁珠投加量为 10 μL 时病毒粒子捕获量(copies)最大,分别是投加 5 μL 、20 μL 时的 6 倍及 5.8 倍.因此确定 1 mL 水样的免疫磁珠投加量为 10 μL .

由于环境样品中病毒的浓度往往较低,报道中多采用 1~2 h 的孵育时间^[17,18],以使免疫磁珠与病毒粒子充分结合.本实验测试了孵育时间分别为 0.5、1、2、3、18 h 时的免疫磁珠分离效率(每个水样接种轮状病毒约 2×10^5 copies/mL),结果比较如图 2.从中可知,随孵育时间的延长,分离效率明显提高.2 h 及 3 h 的分离效率相当,低于 18 h 但明显高于 0.5 h、1 h 的分离效率.考虑分离效率及快速检测的要求,确定孵育时间为 2 h.

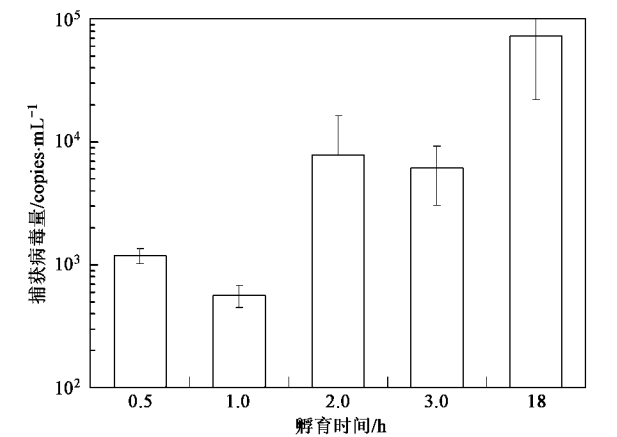


图 2 不同孵育时间免疫磁珠分离效率比较

Fig.2 Comparison of IMS efficiency with different incubation time

实验发现,当水样中有机物含量极低(如自来水、双蒸水配制的水样)且病毒浓度较低时,投加的免疫磁珠容易吸附于 EP 管管壁,影响分离效率.为消除免疫磁珠对管壁的吸附,在水样(双蒸水 1 mL,接种轮状病毒约 6×10^6 copies)中分别加入 0、0.1、0.5、1.0、2.5、5 μL 的 Tween 20,检测其对反应的影响.实验表明,加入 0.1~5 μL 的 Tween 20 都能在一

定程度上消除免疫磁珠对管壁的吸附,当加入量为 2.5 μL 时,检测出的病毒量最高(图 3).这可能是由于当 Tween 20 加入量不足时,仍有部分免疫磁珠吸附于壁管,改良效果不明显;当 Tween 20 加入量过多时,致使水样产生大量泡沫,影响分离效率,且高浓度的 Tween 20 可能对抗体产生不良作用,影响免疫磁珠的活性;而当加入量为 2.5 μL 时,Tween 20 能够较好地消除免疫磁珠对管壁的吸附且不影响抗体活性.

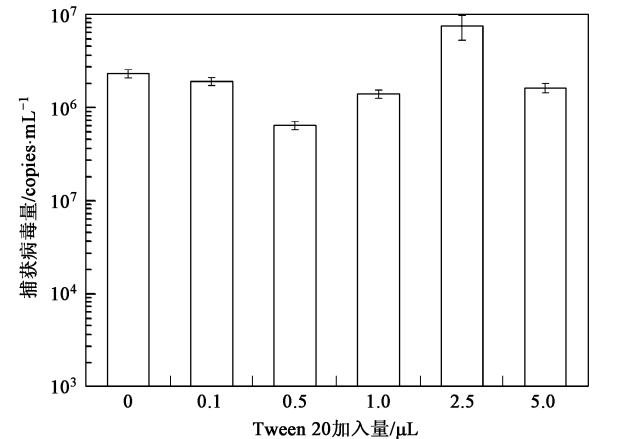


图 3 不同 Tween 20 加入量对免疫磁珠分离效率的影响

Fig.3 Effect of Tween 20 on IMS efficiency

2.3 RNA 提取液的比选

将 IMS 后捕获了病毒粒子的免疫磁珠等分,分别用双蒸水、EDTA 溶液(2 mmol/L EDTA,用 DEPC 水配制)、SDS-EDTA 溶液(4 mmol/L SDS, 2 mmol/L EDTA,用 DEPC 水配制)、0.1 $\times$ PCR buffer[10 $\times$ PCR buffer(不含 Mg^{2+}),TaKaRa 公司生产,用 DEPC 水稀释 100 倍]作为 RNA 提取液,比较 4 种溶液提取 RNA 的效果.实验结果表明,双蒸水及 EDTA 溶液的效果明显优于 SDS-EDTA 溶液及 0.1 $\times$ PCR buffer.这可能是由于 SDS-EDTA 溶液及 0.1 $\times$ PCR buffer 中含有干扰 RNA 逆转录或实时定量 PCR 的物质.进一步的实验表明,双蒸水及 EDTA 溶液无显著差别,因而在后续试验中选用双蒸水作为 RNA 提取液.

2.4 实时定量 PCR

经优化,本实验实时定量 PCR 检测的范围为 $3.6 \times 10^2 \sim 3.6 \times 10^{11}$ copies,其中 $3.6 \times 10^2 \sim 3.6 \times 10^7$ copies 范围内线性关系良好.以标准品稀释滴度的对数值为横坐标,以临界循环数(threshold cycle)为纵坐标建立实时定量 PCR 的标准曲线(图 4),其线性回归方程为 $y = -3.3914x + 43.104$,标准曲线斜率为 -3.391 , $R^2 = 0.996$,PCR 扩增效率 $E =$

96.0%,说明实时定量 PCR 扩增曲线线性关系良好,且扩增效率较高.经实时定量 PCR 熔解曲线分析表明扩增是特异性的,熔解曲线峰值温度在 $81^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,结果见图 5.

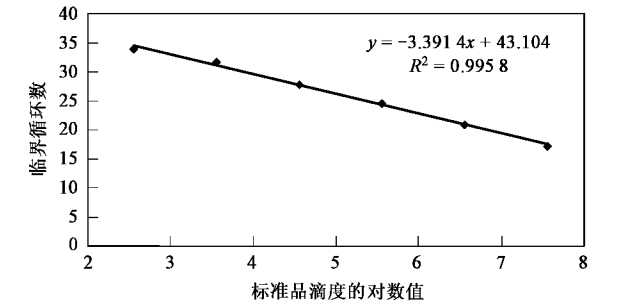


图 4 实时定量 PCR 的标准曲线
Fig.4 Standard curve of real time PCR

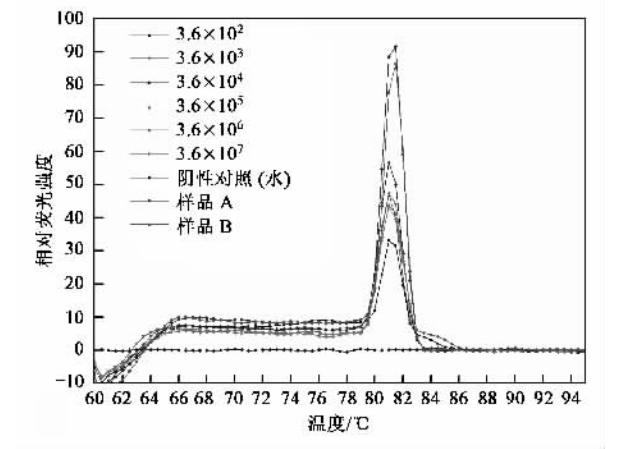


图 5 标准品及样品实时定量 PCR 产物熔解曲线
Fig.5 Melting curve of standard and sample real time PCR products

2.5 IMS-RT-实时定量 PCR 的检测限

以轮状病毒培养液 10 倍的倍比稀释接种双蒸水至滴度为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9$ copies/mL 后,做 IMS-RT-实时定量 PCR.实验结果如表 2 所示,当滴度为 1×10^4 copies/mL 时,IMS 捕获的病毒量仍足以被实时定量 PCR 检出,而当滴度为 1×10^3 copies/mL 时,IMS 捕获的病毒量低于实时定量 PCR 仪器检测限.因此,本研究 IMS-RT-实时定量 PCR 的检测限为 1×10^4 copies/mL.

2.6 病毒洗脱液对 IMS 的影响

如图 1 所示,免疫磁珠分离是介于水样浓集与细胞感染或 PCR 等检测的中间纯化步骤,因此必须不受浓集所得病毒洗脱液成分的干扰,且应去除洗脱液所含的各种可能干扰下游反应的杂质,才能与

上游的浓集步骤、下游的检测步骤良好地整合.目前常用的有机病毒洗脱液主要有 3% 牛肉浸膏 (beef extract, BE, pH 9.5)、BE-甘氨酸 (3% BE, 0.05 mol/L 甘氨酸, pH 9.5)^[19]、尿素-精氨酸-磷酸盐溶液 (urea arginine phosphate buffer, UAPB, 配方为 1.5 mol/L 尿素, 0.02 mol/L 精氨酸, 0.008 mol/L 磷酸盐, pH 9.0)^[20]等.由于这些病毒洗脱液含多种有机物质,溶液粘度较大,可能影响免疫磁珠的分离,且溶液中含有的有机物质可能溶于 RNA 提取液中,干扰逆转录.因此,为测试此类病毒洗脱液对 IMS 的影响,分别配制这 3 种溶液, 121°C , 30 min 高压灭菌处理后,加入等量轮状病毒 (约 3×10^6 copies/mL),以双蒸水为对照,做 IMS-RT-实时定量 PCR.实验表明,3 种病毒洗脱液的检测结果均不低于双蒸水对照,可见,病毒洗脱液中的有机物质不会干扰免疫磁珠分离过程,且经免疫磁珠分离后,有机物质被去除,消除了其对后续逆转录、实时定量 PCR 的干扰.实验结果如图 6.

表 2 IMS-RT-实时定量 PCR 的检测限		
Table 2 Detection limit of IMS- RT-real time PCR		
投加病毒量 /copies	捕获病毒量/copies	
	平均值	标准偏差 (变异系数 CV/%)
1×10^9	2.78×10^8	2.39×10^6 (0.86)
1×10^8	1.29×10^7	2.92×10^6 (22.97)
1×10^7	9.14×10^5	3.06×10^5 (33.47)
1×10^6	1.24×10^5	2.86×10^4 (23.00)
1×10^5	1.27×10^4	6.31×10^1 (0.50)
1×10^4	2.06×10^3	3.92×10^2 (19.00)
1×10^3	ND ¹⁾	ND

1) ND 表示低于仪器检测限

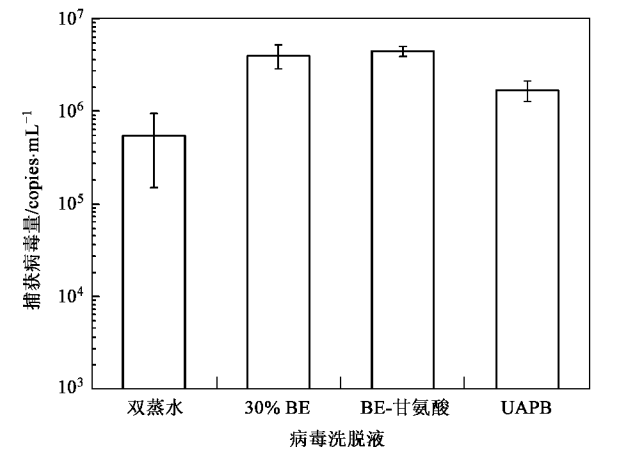


图 6 病毒洗脱液对 IMS 的影响
Fig.6 Effect of virus elution on IMS efficiency

2.7 IMS-RT-实时定量 PCR 与病毒感染检测结果的

对应关系

为评价本研究所建立的 IMS-RT-实时定量 PCR 检测水中轮状病毒方法与传统细胞感染试验的对应关系,以轮状病毒培养液 10 倍的倍比稀释接种双蒸水至滴度为 $3.16 \times 10^0 \sim 3.16 \times 10^5$ TCID₅₀/mL (50 percent tissue culture infection dose, TCID₅₀, 由本实验室细胞感染试验测定)后,分别做 IMS-RT-实时定量 PCR 与细胞感染实验,比较 2 种试验方法的检测结果.实验结果表明,IMS-RT-实时定量 PCR 检测结果与细胞感染试验的检测结果有良好的线性对应关系(如图 7).经线性拟合表明,两者的相关系数 $R^2 = 0.9816$.国外学者报道^[21]投加肠道病毒的水样经 IMS-实时定量 RT PCR 及蚀斑试验分别检测的结果相关性达 $R^2 = 0.9682$,本试验与国外学者的研究结果一致,表明水样经过 IMS 前处理后再进行 PCR 试验,检测结果与传统方法有良好的对应关系.这可能是由于 IMS 捕获的是抗原性完整的病毒粒子,即具有感染潜能的病毒粒子,而不具感染性的病毒粒子不被捕获因此不能成为后续 PCR 扩增反应的模板,从而能够消除 PCR 反应只检测病毒核酸而导致的与传统细胞感染试验的不一致性.因此,IMS 技术与 PCR 技术联合用于水样中病毒的检测,能够在一定程度上弥补单用 PCR 技术检测不能表征病毒感染性的不足.

2.8 实际水样浓缩液的 IMS-RT-实时定量 PCR 检测

于 2008 年 4 月下旬采集清河污水处理厂二沉池出水、膜过滤再生水、昆玉河(颐和园段)、昆玉河(紫竹院段)水、饮用水(清华大学实验室)各 10 L,参照文献[22]的方法过滤浓缩水样,按文献[23]的方

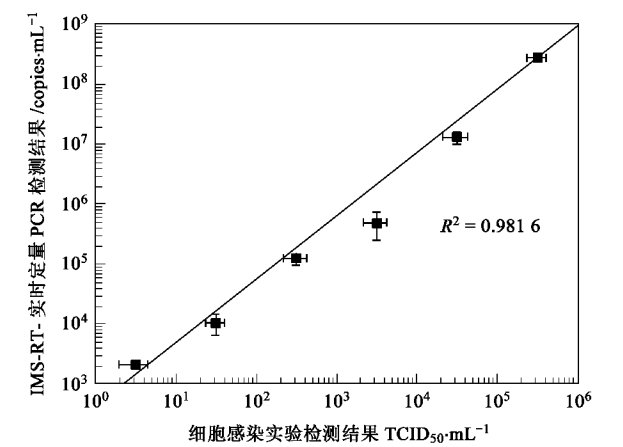


图 7 IMS-RT-实时定量 PCR 与病毒感染检测结果比较

Fig. 7 Comparison of IMS-RT-real time PCR and cell culture assay

法洗脱后得病毒浓缩液各约 50 mL, -80℃ 冻存.经细胞病变试验证实,水样不含轮状病毒.在各水样中分别接种等量轮状病毒(约 2×10^8 copies)、超滤浓缩至 1 mL 后做 IMS-RT-实时定量 PCR.实验结果列于表 3.实验表明,IMS-RT-实时定量 PCR 能够成功地检测出各种接种水样中的轮状病毒,且应用于地表水、自来水的检测效果较好.接种的污水厂处理水病毒检出量较地表水、自来水低 1~2 个数量级,这可能是由于水样从 10 L 浓缩至 1 mL,体积缩小为原来的 1/10 000,水样中杂质的浓度也提高了近 10 000 倍,虽然经免疫磁珠分离处理后干扰杂质大大减少,但仍可能影响后续的逆转录或/及 PCR 反应;而河水及自来水比较洁净,对 IMS-RT-实时定量 PCR 检测的干扰较小.

表 3 实际水样浓缩液接种后 IMS-RT-实时定量 PCR 检出病毒量

水样种类		水样来源	COD/mg·L ⁻¹	接种水中病毒检出量/copies	
				平均值	标准偏差(变异系数 CV/%)
污水厂处理水		清河厂二沉池	62.16	2.91×10^5	$\pm 3.19 \times 10^4$ (10.15)
		清河厂再生水	37.30	1.43×10^6	$\pm 3.23 \times 10^5$ (26.37)
地表水		昆玉河(颐和园段)	13.09	2.23×10^7	$\pm 6.94 \times 10^6$ (25.02)
		昆玉河(紫竹院段)	7.48	8.65×10^7	$\pm 4.31 \times 10^6$ (0.50)
自来水		清华大学实验室	—	2.57×10^7	$\pm 7.83 \times 10^6$ (11.85)

3 讨论

由于环境水体中可能存在的病毒个数低,因而必须通过浓缩数 L 至数千 L 的水样至数 mL,提高其中病毒的浓度后再加以检测^[24].但水样中的杂质也一同被浓集,并将干扰后续的细胞培养或 PCR 等试

验,如浓缩液中的有毒物质可毒害细胞使之死亡而无法感染病毒,其中的腐殖酸等有机物质可干扰 PCR 使模板无法扩增,因而使检测出现假阴性或假阳性结果.因此,采用有效的前处理方法,浓集病毒并去除干扰杂质是水中病毒检测的关键.免疫磁珠分离技术,不同于超滤、有机萃取等物理、化学分离

方法,是基于抗原-抗体的免疫结合反应,能够高效地分离与之结合的物质,从而去除水样中不与之结合的生物及非生物杂质。

免疫磁珠仅分离抗原性完整的病毒粒子,而极少吸附裸露的核酸^[25]。IMS 与 PCR 结合,能够同时检测病毒的抗原性及核酸。所以,用 IMS-PCR 方法检测病毒,用于病毒感染风险的评估,相比普通的 PCR 方法具有更高的可信度,也为目前尚无可行培养方法或难以培养的病毒,如诺罗病毒(norovirus)、甲型肝炎病毒(HAV)的感染风险评估提供了更加有效的工具。

实时定量 PCR 是对普通 PCR 的一大改进,不仅能定量样品中初始的核酸,且通过熔解曲线能够检测 PCR 扩增产物是否为目标片段,有助于剔除 PCR 假阳性的结果^[26]。

本研究制备了轮状病毒特异免疫磁珠,建立了免疫磁珠分离水中轮状病毒的方法,与逆转录、实时定量 PCR 结合,用于检测水中轮状病毒。所建立的 IMS-RT-实时定量 PCR 方法灵敏、快速,能够检测 1×10^4 copies/mL 浓度的轮状病毒,且仅需约 5 h 即可检测出水样浓缩液中的病毒个数,与细胞病变试验、蚀斑试验等传统方法相比,大大缩短了检测时间。试验表明,所建立的 IMS 方法不受常用的有机病毒洗脱液成分的干扰,因此,该法能够与已建立的病毒浓集方法整合,用于病毒洗脱液中病毒粒子的纯化及进一步浓集。本试验比较了 IMS-RT-实时定量 PCR 方法与传统细胞培养法检测结果的关系,结果表明两者有良好的对应关系,说明 IMS-RT-实时定量 PCR 方法能够较好地表征水样的病毒感染风险。此外,经过 IMS 处理后,免疫磁珠能够去除污水处理厂二级出水、再生水、河水等水样中的杂质,试验表明 IMS-RT-实时定量 PCR 可成功应用于污水处理厂出水、再生水、地表水、自来水等水样的检测。

4 结论

(1)本研究制备了分离纯化水样中轮状病毒的免疫磁珠材料,建立了免疫磁珠分离前处理方法;该法适用于常用病毒洗脱液(3% BE、BE-甘氨酸、UAPB 等)中病毒的分离纯化,能去除洗脱液中所含有机质,消除其对后续逆转录、实时定量 PCR 的干扰,说明该法可与常用的病毒浓集方法良好整合用于水中病毒的检测。

(2)将免疫磁珠分离前处理方法与逆转录、实时定量 PCR 结合,建立了检测水中轮状病毒的 IMS-

RT-实时定量 PCR 方法。该法检测限为 1×10^4 copies/mL(相当于 3~4 PFU/mL);检测结果与细胞病变试验检测结果有良好的线性相关关系($R^2 = 0.9816$),说明该法能较好地表征水样的病毒感染风险,而检测时间仅需约 5 h,远小于细胞病变试验等传统检测方法。

(3)所建立的 IMS-RT-实时定量 PCR 方法成功用于污水处理厂二级出水、再生水、地表水、自来水等水样浓缩液轮状病毒的检测。

致谢:感谢山东省医学科学院基础研究所孟虹教授赠予轮状病毒标准株。

参考文献:

- [1] Maunula L, Miettinen I T, Von Bonsdorff C. Norovirus outbreaks from drinking water[J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, **11**(11): 1716-1721.
- [2] Hoebe C, Vennema H, De Roda-Husman A M, *et al.* Norovirus outbreak among primary school children who had played in a recreational water fountain[J]. *J Infect Dis*, 2004, **189**(4): 699-705.
- [3] Gutiérrez M F, Alvarado M V, Martínez E, *et al.* Presence of viral proteins in drinkable water-sufficient condition to consider water a vector of viral transmission? [J]. *Water Res*, 2007, **41**(2): 373-378.
- [4] Ko G, Cromeans T L, Sobsey M D. UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR[J]. *Water Res*, 2005, **39**(15): 3643-3649.
- [5] 谷康定,唐非,谭铁强,等. 饮水消毒剂对水中指示菌和病毒的灭活及消毒副产物生成的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, **9**(3): 293-297.
- [6] Rzezutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2004, **28**(4): 441-453.
- [7] Espinosa A C, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, *et al.* Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water[J]. *Water Res*, 2008, **42**(10-11): 2618-2628.
- [8] Griffin D W, Donaldson K A, Paul J H, *et al.* Pathogenic human viruses in coastal waters[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2003, **16**(1): 129-143.
- [9] Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Bofill-Mas S, *et al.* Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant[J]. *Environ Sci Technol*, 2006, **40**(23): 7416-7422.
- [10] Stebbins S. Rotavirus: disease and vaccine update, 2007 [J]. *J Family Pract*, 2007, **56**(2): 6-11.
- [11] 程莉,何晓青,李伟,等. 北方某市城区水环境中轮状病毒的初步检测[J]. *生态毒理学报*, 2007, **2**(2): 202-207.
- [12] Kittigul L, Ekchaloemkieta S, Utrarachkij F, *et al.* An efficient virus concentration method and RT-nested PCR for detection of rotaviruses in environmental water samples[J]. *J Virol Methods*, 2005, **124**(1-2): 117-122.

- [13] Ballester N A, Fontaine J H, Margolin A B. Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the Massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR[J]. J Wat Health, 2005, **3**(1): 59-68.
- [14] Casas N, Suñén E. Detection of enteroviruses, hepatitis A virus and rotaviruses in sewage by means of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay[J]. Microbiol Res, 2002, **157**(3): 169-175.
- [15] Abd El Galil Khaled H, El Sokkary M A, Kheira S M, *et al.* Combined immunomagnetic separation-molecular beacon-reverse transcription-PCR assay for detection of hepatitis A virus from environmental samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, **70**(7): 4371-4374.
- [16] 胡秀华,何苗,刘丽,等. 水中轮状病毒实时定量 PCR 外标准品的构建[J]. 环境科学,2008,**29**(2):380-385.
- [17] Gilpatrick S G, Schwab K J, Estes M K, *et al.* Development of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay for the detection of Norwalk virus[J]. J Virol Methods, 2000, **90**(1): 69-78.
- [18] Abd El Galil K H, El Sokkary M A, Kheira S M, *et al.* Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of hepatitis A Virus[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, **71**(11): 7113-7116.
- [19] 张崇森,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.
- [20] Jothikumar N, Apama K, Kamatchiammal S, *et al.* Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, **59**(8): 2558-2562.
- [21] Hwang Y C, Leong O M, Chen W, *et al.* Comparison of a reporter assay and immunomagnetic separation real-time reverse transcription-PCR for the detection of enteroviruses in seeded environmental water samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, **73**(7): 2338-2340.
- [22] 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.
- [23] 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]. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**(3): 1033-1039.
- [24] Straub T M, Chandler D P. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens[J]. J Microbiol Methods, 2003, **53**(2): 185-197.
- [25] Schwab K J, De Leon R, Sobsey M D. Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, **62**(6): 2086-2094.
- [26] Min B S, Noh Y J, Shin J H, *et al.* Assessment of the quantitative real-time polymerase chain reaction using a cDNA standard for human group A rotavirus[J]. J Virol Methods, 2005, **137**(2): 280-286.