

实验技术与方法

纯净水中病毒三种富集方法的比较

倪云龙¹, 乔昕¹, 王燕梅¹, 秦思^{1,2}, 田亭¹, 杨佳昭², 霍翔^{1,2,3,4}

(1. 江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009; 2. 南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 211166;
3. 江苏省卫生应急工程研究中心, 江苏 南京 210009; 4. 江苏省新发突发重大传染病病原微生物
重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 比较膜吸附法、膜吸附-PEG法和膜吸附-超滤法对纯净水中病毒的富集效果,并对优选的富集方法的实验条件进行比对,旨在寻找高效的方法,为其他水体中病毒富集检测提供技术借鉴。方法 本文以MS2噬菌体为目标病毒,制作高、低浓度水样,建立逆转录-荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)方法的标准曲线,进行定量检测。使用膜吸附法、膜吸附-PEG法和膜吸附-超滤法富集水样,并比较不同过滤膜、不同超滤管及两种核酸提取方法的回收率,选择最适方法。结果 膜吸附-超滤法、膜吸附-PEG法和膜吸附法回收率均值分别为 $19.80\% \pm 12.19\%$ 、 $12.71\% \pm 9.09\%$ 和 $9.05\% \pm 4.89\%$,各因素对回收率的影响顺序为:膜吸附-超滤法>膜吸附-PEG法>膜吸附法;高浓度>低浓度。混合纤维素酯膜的富集效果优于尼龙膜。100 K和50 K的超滤管富集效果无差异。硅胶离心柱法和磁珠法核酸提取效果无差异。结论 通过二次富集可提高富集效率,膜吸附-超滤法优于另两种方法,且其操作简单、耗时短、对设备依赖性低,易于推广。膜吸附-超滤法的实验条件仍可优化、完善,拓展其在不同水体和不同病毒富集中的应用。

关键词: 介水病毒; 富集; 膜吸附; 超滤

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)03-0353-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.03.006

Comparison of three methods for virus enrichment from purified waterNI Yunlong¹, QIAO Xin¹, WANG Yanmei¹, QIN Si^{1,2}, TIAN Ting¹, YANG Jiazhao², HUO Xiang^{1,2,3,4}

(1. Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Nanjing 210009, China;
2. Schoole of Public Health, Nanjing Medical University, Jiangsu Nanjing 211166, China;
3. Jiangsu Province Engineering Research Center of Health Emergency, Jiangsu Nanjing 210009, China;
4. Jiangsu Provincial Medical Key Laboratory of Pathogenic Microbiology in Emerging Major Infectious
Diseases, Jiangsu Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective To compare the effects and experimental conditions of membrane adsorption method, membrane adsorption-PEG method and membrane adsorption-ultrafiltration method on virus enrichment in purified water. **Methods** MS2 bacteriophage was used as target virus to prepare water samples with high and low concentrations, and the standard curve of reverse transcription-fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was established for quantitative detection. Water samples were enriched by membrane adsorption method, membrane adsorption-PEG method and membrane adsorption-ultrafiltration method. The recoveries of different filtration membranes, different ultrafiltration tubes and two nucleic acid extraction methods were compared. **Results** The average recoveries of membrane adsorption-ultrafiltration method, membrane adsorption-PEG method and membrane adsorption method were $19.80\% \pm 12.19\%$, $12.71\% \pm 9.09\%$ and $9.05\% \pm 4.89\%$. The order of influencing factors on the recoveries was: membrane adsorption-ultrafiltration method > membrane adsorption-PEG method > membrane adsorption method. High concentration > low concentration. The effect of virus enrichment of mixed cellulose ester membrane was better than nylon membrane. There was no difference in the enrichment effect of ultrafiltration tube at 100 and 50 K, and the nucleic acid extraction effect of

收稿日期: 2022-10-26

基金项目: 江苏省社会发展重大科技示范项目(BE2022837)

作者简介: 倪云龙 男 主管技师 研究方向为食品微生物检测与评估 E-mail: nylss2008@163.com

通信作者: 霍翔 男 主任医师 研究方向为传染病和食源性疾病流行病学 E-mail: huox@foxmail.com

silica gel centrifugation column method and magnetic bead method. **Conclusion** The enrichment efficiency can be improved by secondary enrichment. Membrane adsorption-ultrafiltration method is simple to operate, short time consuming, low dependence on equipment, and easy to be popularized. The experimental conditions of membrane adsorption-ultrafiltration can be optimized and improved to expand the application of different water bodies and different virus enrichment.

Key words: Waterborne virus; enrichment; membrane adsorption; ultrafiltration

环境水体是病毒存活、迁徙和灭亡的重要媒介^[1-2],在河流、湖泊、海洋、景观娱乐用水或是符合我国饮用水卫生标准的水体中都可以分离到肠道病毒^[3-10],病毒可通过多种途径污染水源,并可在含水层中迁移很远的距离^[11],莫斯科国立大学研究团队在地底 2 km 深处发现噬菌体病毒^[12]。有研究显示,生活污水中病毒的含量非常高,但目前的污水处理工艺无法完全去除污水中的病毒^[13-16]。世界卫生组织于 2022 年发布了《饮用水水质准则(第四版)》^[17],列出了腺病毒、星状病毒、诺如病毒、札如病毒、戊肝病毒、肠道病毒、副肠孤病毒、甲肝病毒和轮状病毒 9 种病毒可经水传播,鼓励各国选择某种病毒作为参考病原体,开展饮用水病毒污染的风险评估,制定针对水中病毒处理效果的性能目标,保证饮用水安全。

近年来,世界各地均有不同程度的水中病毒污染而导致的暴发事件发生。2020 年新型冠状病毒感染发生后,有研究发现生活污水、医疗废水等均能检出新型冠状病毒:2020 年 3~4 月在巴黎污水厂的污水中检测到浓度为 $5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ GU/L 的新型冠状病毒^[18];在伊斯坦布尔传染病医院附近的两个沙井水中分别检测到 4.49×10^4 和 9.33×10^4 copies/L 的新型冠状病毒^[19],检测到新型冠状病毒有经水传播的风险。最新修订的 GB 5749—2022《生活饮用水卫生标准》^[20]中没有饮用水中病毒的安全性要求和评价指标。病毒在水体中的传播具有高隐蔽性、复杂性和不确定性,且流动性大、病毒载量低等特点,国内尚无针对水体中进行病毒富集和检测国家标准。

目前对于水体中病毒的检测策略多为根据病毒的物理特性进行富集,提高单位体积内病毒载量。通过增加病毒核酸提取时使用的浓缩液体积,提高核酸提取液中病毒核酸浓度。使用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(Reverse transcription-fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)技术检测经过富集和核酸提取的水体样本中是否含有特定病毒。本研究使用世界卫生组织推荐的评价水源污染和饮用水处理过程中病毒杀灭效率的指示微生物 F 特异性噬菌体(MS2 噬菌体)^[17,21]作为目标病毒进行加标实验,比较 3 种国内

外广泛使用的水体中病毒富集方法(①膜吸附-洗脱法^[22-23];②膜吸附-PEG 法^[24-25];③膜吸附-超滤法^[26-29])的回收效果,旨在优选、优化水中病毒富集方法,建立适合在国内推广使用的水中病毒富集和检测的标准方法,为水中病毒污染的精准防控和风险评估做技术储备。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

MS2 噬菌体过程控制试剂盒(北京美正生物科技有限公司,货号:LR73141);Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit(德国 Qiagen 公司,货号:52906);MagaBio plus 病毒 DNA/RNA 纯化试剂盒Ⅲ(杭州博日科技科技股份有限公司,货号:BSC86M1E);混合纤维素酯滤膜(美国 Millipore 公司,货号:HAWP14250、HAWP04700);尼龙膜(美国 Millipore 公司,货号:GNWP04700);Amicon[®] Ultracore-15 浓缩离心管(美国 Millipore 公司,货号:UFC910096、UFC905096)。

THZ-C-1 全温振荡器(苏州培英实验设备有限公司);Multifuge X Pro 冷冻高速离心机(美国 Thermo Scientific 公司);QuantStudio 7 Pro 高通量实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司);GenePure 96 核酸提取仪(杭州博日科技科技股份有限公司);Vdose[®] Elite 蠕动棒及硅胶管(德国 WIGGENS 公司);142 mm 大型不锈钢固定器(日本 ADVANTEC 公司),6 联换膜过滤系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 样品制备

使用 MS2 噬菌体过程控制试剂盒,MS2 噬菌体原始浓度为 10^6 PFU/ μ L,1:10 倍比稀释至浓度为 10^4 PFU/ μ L 和 10^3 PFU/ μ L,分别取 50 μ L 噬菌体稀释液至 1 L 纯净水(怡宝)中,分别制成高浓度水样(0.5 PFU/ μ L)和低浓度水样(0.05 PFU/ μ L)每组实验准备 6 份样品,重复 6 次,用 1 L 无病毒纯净水做阴性对照。取未经浓缩的样品原液 300 μ L 和 300 μ L 纯净水(空白对照)进行核酸提取及 RT-qPCR 反应。

1.3 病毒富集

在样品中加入 2.5 mol/L $MgCl_2$ 溶液,使其终浓度为 0.05 mol/L,混匀样品;用 1 mol/L 盐酸调节样品 pH 至 3.0 ± 0.5 ;将混合纤维素酯膜(142 mm、

0.45 μm;47 mm,0.45 μm)、尼龙膜(47 mm,0.22 μm)分别置于过滤器上,样品以 2 mL/s 的流速在蠕动泵压力下,通过滤膜;取下滤膜,剪碎,收集于 50 mL 离心管中;加入 15 mL TGBE 洗脱液(12 g/L Tris-Base、3.8 g/L 甘氨酸、10 g/L 牛肉膏,1 L 无 RNase 水,pH 9.5,115 °C 20 min),室温下 300 rpm 振荡 30 min;吸取洗脱液,3 000 r/min 离心 10 min,离心后上清液为病毒富集液。

1.4 膜吸附法

方法同 1.3 中操作,取 1/4 的 142 mm 滤膜剪碎,用 1 mL TGBE 洗脱液洗脱后,取 300 μL 富集液提取核酸。

1.5 膜吸附-PEG 法

将 1.3 中富集液转入 50 mL 离心管中,加入 0.25 倍体积的 PEG/NaCl 溶液(500 g/L PEG8000,1.5 mol/L NaCl,无 RNase 水定容到 1 L,121 °C 15 min),混匀;4 °C 100 r/min 振荡 30 min;4 °C 12 000×g 离心 120 min,弃上清;4 °C 12 000×g 离心 5 min,弃上清;用 500 μL 无 RNase 水混匀重悬沉淀,4 °C 12 000×g 瞬时离心,使富集液聚集在管底;取 300 μL 富集液提取核酸。

1.6 膜吸附-超滤法

将 1.3 中富集液转入 Ultracore-15 浓缩离心管(100K、50K),4 000×g 离心 15 min;用 500 μL 无 RNase 水,吹打滤膜 20 次,将病毒富集液转移入 1.5 mL 离心管中;取 300 μL 富集液提取核酸。

1.7 标准曲线制备

取 20 μL MS2 噬菌体,95 °C 加热 5 min,冰上冷却至室温后,1:10 倍比稀释冷却后原液,稀释 5 个稀释度,形成原液,1:10、1:10²、1:10³、1:10⁴、1:10⁵ 标准系列。标准曲线中核酸 RT-qPCR 检测条件与样品核酸相同。

1.8 核酸提取和 RT-qPCR 检测

取 300 μL 富集液使用 Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒(硅胶离心柱法)或使用 GenePure 96 核酸提取仪(磁珠法)提取病毒 RNA。使用硅胶离心柱法时将 300 μL 富集液平均分配在 2 只硅胶离心柱中,提取方法参照试剂盒说明,用 60 μL Buffer AVE 收集 2 支硅胶离心柱中病毒核酸。使用磁珠法时候将 300 μL 富集液转移入裂解液中,提取方法参照 MagaBio plus 病毒 DNA/RNA 纯化试剂盒 III 说明。使用 MS2 噬菌体作提取过程阳性对照。使用 QuantStudio 7 Pro 高通量实时荧光 PCR 仪进行 RT-qPCR 检测,反应体系和反应条件参照 MS2 噬菌体过程控制试剂盒说明。使用 MS2 噬菌体作 RT-qPCR 阳性对照,用无 RNase 水作阴性对照。

1.9 实验回收率

根据 MS2 噬菌体的浓度与 RT-qPCR 反应循环数(Ct)之间的线性关系,以 Ct 值为 X 轴,以不同稀释度 MS2 噬菌体浓度的对数值为 Y 轴,建立标准曲线。将 RT-qPCR 检测结果带入标准曲线公式中,计算样品经过不同富集方法后,核酸提取液中病毒浓度。实验回收率公式为:Recovery = $CN_{virus} \times V_{template} \div V_{nucleic\ acid} \times V_{enrichment\ sample} \div N_{virus} \times 100\%$,式中:Recovery 为实验回收率,CN_{virus} 为核酸提取液中病毒浓度,V_{template} 为核酸提取液体积,V_{nucleic acid} 为用于提取核酸的病毒富集液体积,V_{enrichment sample} 为病毒富集液体积,N_{virus} 为样本中加入的 MS2 病毒数量。

1.10 统计学分析

采用 Excel 和 SPSS22.0 软件进行数据统计和分析。使用方差分析比较不同方法间回收率的差异,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质量控制

阴性对照和空白对照无扩增曲线,说明富集、提取、扩增过程无污染。阳性对照有典型扩增曲线,说明提取和扩增过程有效。对 14 次实验中 MS2 噬菌体标准曲线 6 个稀释度 RT-qPCR 反应 Ct 值分别进行 Bootstrap 抽样(1 000 次),取抽样均值,为 MS2 噬菌体标准曲线标准化 Ct 值,推算标准曲线公式为 $\lg(y) = -0.2793x + 10.837(r^2=0.9986)$ 。

2.2 3 种富集方法回收率的比较

膜吸附均使用混合纤维素酯膜(142 mm、0.45 μm),超滤使用 Ultracore-15(100 K)超滤管。高浓度和低浓度水样 MS2 噬菌体回收率分别为 17.84%±12.42% 和 11.79%±7.57%。膜吸附-超滤法、膜吸附法和膜吸附-PEG 法回收率均值分别为 19.80%±12.19%、9.05%±4.89% 和 12.71%±9.09%(表 1)。进行方差分析,主体间效应检验,F=6.120,P=0.001,模型有统计学意义,浓度(F=6.107,P=0.017)和方法(F=6.126,P=0.004)两个变量是影响回收率的因素,方法对回收率的影响高于浓度(表 2)。对 3 种富集方法进行两两比较,使用 Bonferroni 法,膜吸附-超滤法与膜吸附-PEG 法、膜吸附法的回收率差异有统计意义(P=0.037、P=0.007),膜吸附-PEG 法与膜吸附法的回收率差异无统计意义(P=0.838)。高浓度水样和低浓度水样回收率差异有统计学意义(P=0.017),平均值差值为 6.05,各因素对回收率的影响顺序为:膜吸附-超滤法>膜吸附-PEG 法>膜吸附法;高浓度>低浓度,见图 1。

表1 3种富集方法回收率比较

Table 1 Recovery rates of three enrichment methods

浓度	方法	Ct值	平均回收率/%	95% 置信区间(CI)	
				下限/%	上限/%
高浓度(0.5 PFU/ μ L)	膜吸附-超滤法	28.07 \pm 1.02	23.92 \pm 14.43	14.75	33.09
	膜吸附法	30.38 \pm 0.87	10.31 \pm 5.80	4.22	16.39
	膜吸附-PEG法	28.76 \pm 1.02	15.52 \pm 10.28	8.99	22.05
	总计	28.81 \pm 1.29	17.84 \pm 12.42	13.20	22.48
低浓度(0.05 PFU/ μ L)	膜吸附-超滤法	32.25 \pm 0.92	15.67 \pm 8.08	10.54	20.81
	膜吸附法	34.35 \pm 0.81	7.79 \pm 3.90	3.7	11.89
	膜吸附-PEG法	33.08 \pm 1.08	9.90 \pm 7.06	5.42	14.39
	总计	33.0 \pm 1.22	11.79 \pm 7.57	8.96	14.62
合计	膜吸附-超滤法	30.16 \pm 2.33	19.80 \pm 12.19	14.65	24.95
	膜吸附法	32.36 \pm 2.23	9.05 \pm 4.89	5.94	12.16
	膜吸附-PEG法	30.92 \pm 2.43	12.71 \pm 9.09	8.87	16.55
	总计	30.90 \pm 2.45	14.81 \pm 10.64	12.07	17.56

表2 富集方法主效应方差分析结果

Table 2 Main effects analysis variance of enrichment methods

源	因变量:回收率				
	III 类平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	1 649.904 ^a	3	549.968	6.120	0.001
截距	10 364.193	1	10 364.193	115.328	0.000
浓度	548.823	1	548.823	6.107	0.017
方法	1 101.081	2	550.540	6.126	0.004
误差	5 032.544	56	89.867		
总计	19 850.790	60			
修正后总计	6 682.449	59			

注:^a表示 $R^2=0.247$ (调整后 $R^2=0.207$)

2.3 3种滤膜回收率的比较

分别使用混合纤维素酯膜(142 mm、0.45 μ m; 47 mm、0.45 μ m)和尼龙膜(47 mm、0.22 μ m)吸附高浓度水样中病毒,使用 Ultrre-15(100K)超滤管二次浓缩,比较3种滤膜回收率差异。使用混合纤维素酯膜(142 mm、0.45 μ m)回收率均值为23.92% \pm 14.43%(95% CI 14.75%~33.09%),混合纤维素酯膜(47 mm、0.45 μ m)回收率均值为23.34% \pm 15.53%(95% CI 13.47%~33.21%),尼龙膜(47 mm、0.22 μ m)回收率均值为0.62% \pm 0.58%(95% CI 0.25%~

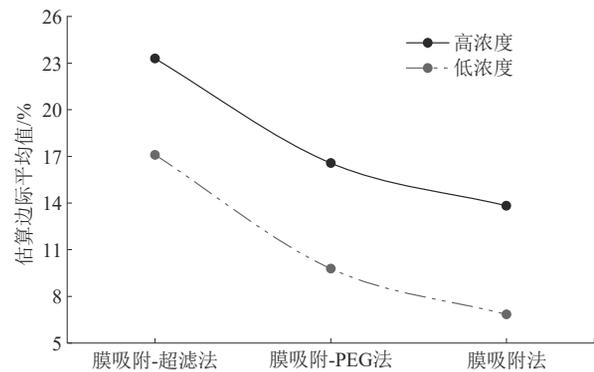


图1 三种富集方法回收率估算平均值图

Figure 1 Estimated marginal means of recovery for three enrichment methods

0.99%),见表3。单因素ANOVA分析, $F=14.13$, $P<0.001$,不同滤膜回收率的差异有统计学意义。对3种滤膜回收率进行两两比较,采用 Bonferroni 法,尼龙膜与两种混合纤维素酯膜回收率有差异($P<0.001$ 、 $P<0.001$),两种混合纤维素酯膜回收率无差异($P>0.05$),3种滤膜对回收率的影响顺序为混合纤维素酯膜(142 mm、0.45 μ m)=混合纤维素酯膜(47 mm、0.22 μ m)>尼龙膜(47 mm、0.22 μ m)。

表3 不同实验条件回收率比较

Table 3 Comparison of recovery rates under different experimental conditions

滤膜	超滤管	提取方法	平均回收率/%	95% 置信区间(CI)	
				下限/%	上限/%
混合纤维素酯膜(142 mm、0.45 μ m)	Ultrre-15(100 K)	硅胶离心柱法	23.92 \pm 14.43	14.75	33.09
混合纤维素酯膜(47 mm、0.45 μ m)	Ultrre-15(100 K)	硅胶离心柱法	23.34 \pm 15.53	13.47	33.21
尼龙膜(47 mm、0.22 μ m)	Ultrre-15(100 K)	硅胶离心柱法	0.62 \pm 0.58	0.25	0.99
混合纤维素酯膜(142 mm、0.45 μ m)	Ultrre-15(50 K)	硅胶离心柱法	26.05 \pm 19.59	13.60	38.90
混合纤维素酯膜(142 mm、0.45 μ m)	Ultrre-15(100 K)	磁珠法	21.47 \pm 14.45	12.29	30.64

2.4 两种超滤管回收率的比较

使用混合纤维素酯膜(142 mm、0.45 μ m)吸附高浓度水样中病毒,分别使用截留分子量为100 K和50 K的 Ultrre-15 超滤管二次浓缩,比较两种超滤管回收率差异。使用 Ultrre-15(50 K)超滤管回收率均值为26.05% \pm 19.59%(95% CI: 13.6%~38.9%),

见表3。进行 Levene 方差齐性检验, $F=1.32$, $P=0.263$,方差齐。独立样本 t 检验, $t=0.303$, $P=0.765$,两种超滤管回收率的差异无统计学意义。

2.5 两种核酸提取方法回收率的比较

使用混合纤维素酯膜(142 mm、0.45 μ m)吸附高浓度水样中病毒,使用 Ultrre-15(100 K)超滤管二

次浓缩,分别使用硅胶离心柱法和磁珠法提取核酸,比较两种核酸提取方法回收率的差异。磁珠法回收率均值为 $21.47\% \pm 14.45\%$ (95% CI: 12.29%~30.64%),见表3。进行 Levene 方差齐性检验, $F=1.22, P=0.281$, 方差齐。独立样本 t 检验, $t=0.417, P=0.681$, 两种核酸提取方法回收率的差异无统计学意义。

3 讨论

水体具有流动性、体积大的特点,单位体积内携带的病毒浓度低,RT-qPCR 技术虽然灵敏度高,但受限于模板浓度低,只能通过富集、浓缩水体的方法提高水体中病毒浓度。本研究中,高浓度病毒水样的回收率高于低浓度水样,差异有统计学意义。使用不同富集方法,高浓度样本回收率均高于低浓度样本,与冯微宏等^[29]的研究结果一致,水样中病毒浓度越高,病毒回收率也会升高,这可能与病毒的表面特性有关,浓度较高时病毒易聚集成颗粒而易被截留、捕获。富集方法是影响回收率的主要影响因素,通过文献查找,水中病毒的富集方法包括超速离心法、絮凝剂沉淀法、切向流超滤法、铝盐混凝沉淀法等,这些方法的原理主要是利用病毒及其衣壳蛋白的物理化学特性、电荷作用、亲(疏)水性,使用不同的滤膜(膜包)或化合物,对病毒进行机械筛分、吸附截留或聚集沉淀。膜吸附法是通过阴、阳离子膜截留、吸附携带相反电荷的病毒,本研究中使用的是混合纤维素酯膜(阴离子膜),首先通过大量的阳离子盐($MgCl_2$),使病毒与膜结合,再用洗脱液将膜上的病毒洗脱下来。膜吸附-PEG法和膜吸附-超滤法是在膜吸附法基础上,对膜吸附法的富集液进行二次浓缩。PEG沉淀是利用PEG的亲水性,在一定盐浓度下使病毒颗粒聚集,在离心力作用下沉淀。超滤是使用不同分子量截留滤膜,将大分子量颗粒物截留在滤膜上,反之在离心力作用下透过滤膜。本研究中膜吸附-超滤法的回收效果优于同样使用二次浓缩的膜吸附-PEG法和一次浓缩的膜吸附法,更适用于低浓度样本中病毒的富集,这与金萍等^[30]的研究结果一致。目前在水中病毒的富集检测方法常使用膜吸附法,此法操作简单,省时省力,不需要大型的离心设备,富集效果适中,适合大体积水样的富集,适合不同级别的实验室和现场调查中使用。而其他的富集方法往往受样本量的限制,很难开展500 mL以上水样的富集,当水样中病毒含量较低时造成灵敏度和准确度的降低,且受离心设备或其他特殊设备的制约,不适合多样本的同时检测,且耗时长。二次浓缩是对膜吸附法的优化,单独使用膜吸

附法时,因为检测方法的限制,只能使用1 mL或更少的洗脱液洗脱1/4滤膜上富集的病毒,当病毒在滤膜上分布不均或含量较低时结果准确度就会降低。而使用适量洗脱液洗脱整张滤膜,再进行二次浓缩可改善此问题并提高富集效率。PEG沉淀是最常见的富集方法,但其用时较长,对环境和离心设备有一定要求,操作过程存在困难。膜吸附-超滤法对离心设备的依赖性低,对电位、盐度、温度等环境没有要求,操作简单,且可很好的截留病毒,目前正在推广使用,但其也有成本较高,水体中杂质较多时容易堵塞滤孔等问题。

本研究中使用的模拟水样以纯净水为基础,与自然水体和生活污水有明显差异,后者可能含有大量杂质、藻类、细菌、病毒、有机物等,且pH、盐含量、阴阳离子浓度等都可能影响富集效率,且本研究以MS2病毒为目标病毒,MS2病毒虽为最小的病毒,但仍无法替代环境中病毒的多样性,不同病毒的电荷、分子量和直径也可能影响富集效率。目前常用预过滤、预离心的方法,去除杂质,人为调节pH和阴阳离子浓度到适宜范围,本研究中膜吸附-超滤法是否满足不同水体条件下针对不同病毒的富集和检测工作,相应的研究工作并未系统开展。应通过优化富集过程中不同实验条件,如滤膜的类型孔径、洗脱液的成分、超滤管的截留分子量、离心力等条件,掌握不同变量在富集过程中的效应关系。

本研究从滤膜类型和直径、超滤管的截留分子量、核酸提取方法等3个方面开展了一些评价工作。目前常见的滤膜有混合纤维素酯滤膜、聚酰胺滤膜、聚偏氟乙烯滤膜、聚醚砜滤膜、1MDS膜、NanoCeram膜等,膜的截留机制为根据膜孔径的物理截留和基于膜本身的化学性质与静电引力作用的吸附截留,本研究中不同直径,不通孔径的混合纤维素酯滤膜的富集效率无差异,但均优于尼龙膜。可能病毒的直径在纳米级别,0.22 μm 和0.45 μm 孔径的滤膜无法很好的截留病毒,但考虑到水体成分复杂,不能选用更小孔径的滤膜。影响富集效率的因素可能与滤膜的材质有关,滤膜的材质不同,其物理化学性能有差异,而对病毒的吸附和捕捉能力也会不同。水体中杂质的性质和大小,病毒表面性质和直径也是影响膜富集效率的因素。同一种病毒使用不同的滤膜富集或不同的病毒使用同一种滤膜富集,其富集效果均有可能存在差异。本研究中截留分子量为100和50 K的超滤管富集效果无差异,考虑MS2噬菌体是最小的RNA病毒,分子量在50 K以下。但使用截留分子量为100和50 K的超滤管仍然有较好的富集效果,可能MS2噬菌体

在水样中以聚集的形式存在,而非单独的个体,或超滤膜的截留方式并非简单的物理筛选,复杂的膜结构可捕获病毒。可使用截留分子量更小的超滤管以提高富集效率,但在实际运用中应综合考虑水体中杂质和目标病毒分子量,选用合适的超滤管。本研究中硅胶离心柱法和磁珠法两种核酸提取方法提取效果无差异,但本研究使用的是纯净水,无杂质,无法体现在复杂的自然水体和生活污水中的核酸提取效果。

4 结论

本研究比较了纯净水中病毒的富集方法和实验条件,初步摸索到一套适用的水中病毒富集方法。本研究发现不同的富集方法是影响水中病毒富集效率的主要因素,通过二次富集可提高富集效率。水体中病毒含量越高,富集效果越好。膜吸附-超滤法的富集效率优于另两种方法,膜吸附法效率弱于膜吸附-PEG法。鉴于水体成分复杂,在不使用更小孔径滤膜、更小截留分子量的滤膜或超滤膜时,富集效率与滤膜的直径和孔径无关,与超滤膜的截留分子量无关,与滤膜的材质有关。针对纯净水中病毒的核酸提取效果,硅胶离心柱法和磁珠法无差异。吸附-超滤法的实验条件仍需优化、完善,以期在不同水体中不同病毒富集检测提供技术借鉴。

参考文献

- [1] DIXIT U. Detection of water-borne pathogens: Culture plate to genomics[J]. Indian Journal of Science and Technology, 2009, 2(11): 59-71.
- [2] 赵炳梓,张辉,沈林林,等.病毒在不同环境介质中去向研究进展[J].土壤学报,2013,50(2):405-412.
- ZHAO B Z, ZHANG H, SHEN L L, et al. Fate of virus in different environmental media: A review[J]. Acta Pedologica Sinica, 2013, 50(2): 405-412.
- [3] 明红霞,樊景凤,朱琳.渤海湾肠道病毒的季节分布及其污染类型分析[J].海洋学报(中文版),2013,35(6):162-169.
- MING H X, FAN J F, ZHU L. Analysis on the seasonal distribution and pollution type of *Enterovirus* in Bohai Bay[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2013, 35(6): 162-169.
- [4] 蒋力云,曹毅敏,许杨,等.广州市水体中诺如病毒检测及分型[J].江苏预防医学,2012,23(3):25-27.
- JIANG L Y, CAO Y M, XU Y, et al. Detection and molecular epidemiology analysis of Norwalk-like viruses in water in Guangzhou[J]. Jiangsu Journal of Preventive Medicine, 2012, 23(3): 25-27.
- [5] 张楚瑜,李小锋,王祖卿,等.武汉东湖水体中病毒和指示细菌的研究[J].武汉大学学报(自然科学版),1991,37(1):99-108.

- ZHANG C Y, LI X F, WANG Z Q, et al. The survival level of viruses and indicator bacteria in the east lake and its effects on the function of this lake[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 1991, 37(1): 99-108.
- [6] 张崇森,王晓昌,彭党聪.西安市景观水体肠道病毒实时荧光定量RT-PCR检测与健康风险评估[J].安全与环境学报,2010,10(3):85-88.
- ZHANG C M, WANG X C, PENG D C. Real-time RT-PCR detection of the enteroviruses from the landscape waters in Xi'an and health risk assessment[J]. Journal of Safety and Environment, 2010, 10(3): 85-88.
- [7] EHLERS M M, GRABOW W O K, PAVLOV D N. Detection of enteroviruses in untreated and treated drinking water supplies in South Africa[J]. Water Research, 2005, 39(11): 2253-2258.
- [8] VIVIER J C, EHLERS M M, GRABOW W O K. Detection of enteroviruses in treated drinking water[J]. Water Research, 2004, 38(11): 2699-2705.
- [9] WIGGINTON K R, KOHN T. Virus disinfection mechanisms: The role of virus composition, structure, and function[J]. Current Opinion in Virology, 2012, 2(1): 84-89.
- [10] GALL A M, MARIÑAS B J, LU Y, et al. Waterborne viruses: A barrier to safe drinking water[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(6): e1004867.
- [11] STUMPP C, KELLERMANN C, GRIEBLER C. Transport von viren im grundwasser-experimentelle untersuchungen und mathematische modellierung[J]. Österreichische Wasser-Und Abfallwirtschaft, 2019, 71(9-10): 454-458.
- [12] KADNIKOV V V, MARDANOV A V, FRANK Y A, et al. Genomes of three bacteriophages from the deep subsurface aquifer[J]. Data in Brief, 2019, 22: 488-491.
- [13] SIMMONS F J, KUO D H W, XAGORARAKI I. Removal of human enteric viruses by a full-scale membrane bioreactor during municipal wastewater processing[J]. Water Research, 2011, 45(9): 2739-2750.
- [14] 谢显清,刘凤仁,谭惠玲,等.深圳市龙岗区环境水体中肠道病毒污染情况调查[J].河南预防医学杂志,2011,22(3):168-169,175.
- XIE X Q, LIU F R, TAN H L, et al. The investigation of *Enterovirus* in environmental water in Longgang district of Shenzhen[J]. Henan Journal of Preventive Medicine, 2011, 22(3): 168-169, 175.
- [15] 周进宏,王晓昌,张崇森,等.生活污水中肠道病毒分布特性的定量PCR研究[J].环境工程学报,2016,10(3):1023-1029.
- ZHOU J H, WANG X C, ZHANG C M, et al. Study on distribution characteristic of enteroviruses in domestic wastewater by quantitative real-time PCR method[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(3): 1023-1029.
- [16] CLOETE T E, DA SILVA E, NEL L H. Removal of waterborne human enteric viruses and coliphages with oxidized coal[J]. Current Microbiology, 1998, 37(1): 23-27.
- [17] World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality: incorporating the first and second addenda[M]. Geneva: World Health Organization, 2022.

- [18] WURTZER S, MARECHAL V, MOUCHEL J M, et al. Evaluation of lockdown effect on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in waste water, Greater Paris, France, 5 March to 23 April 2020 [J]. *Euro Surveill*, 2020, 25 (50): 2000776.
- [19] KOCAMEMI B A, KURT H, HACIOGLU S, et al. First dataset on SARS-CoV-2 detection for istanbul wastewaters in Turkey [J/OL]. (2020-05-06) [2022-07-04]. <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.05.03.20089417>.
- [20] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 中华人民共和国国家标准, 生活饮用水卫生标准: GB 5749-2022 [S]. 2022.
- State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. National Standards of the People's Republic of China. Standards for Drinking Water Quality: GB 5749-2022 [S]. 2022.
- [21] Roop D O. Indicator systems for assessing public health risk in waters [D]. Worcester: Worcester Polytechnic Institute, 2012.
- [22] LUKASIK J, SCOTT T M, ANDRYSHAK D, et al. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 2914-2920.
- [23] LEWIS G D, METCALF T G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human *Rotavirus*, from oyster, water, and sediment samples [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(8): 1983-1988.
- [24] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1033-1039.
- [25] 李慧莹. 不同样本中诺如病毒核酸检测方法的研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2019.
- LI H Y. Study on Norovirus nucleic acid detection methods in different samples [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2019.
- [26] AHMED W, ANGEL N, EDSON J, et al. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 728: 138764.
- [27] NEMUDRYI A, NEMUDRAIA A, WIEGAND T, et al. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater [J]. *Cell Reports Medicine*, 2020, 1 (6): 100098.
- [28] BALBOA S, MAURICIO-IGLESIAS M, RODRIGUEZ S, et al. The fate of SARS-COV-2 in WWTPS points out the sludge line as a suitable spot for detection of COVID-19 [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 772: 145268.
- [29] 冯微宏, 肖勇, 钱燕华, 等. 两种水源性诺如病毒富集方法的比较 [J]. *环境科学研究*, 2020, 33(6): 1549-1554.
- FENG W H, XIAO Y, QIAN Y H, et al. Comparison of two concentration methods for *Norovirus* in water [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2020, 33(6): 1549-1554.
- [30] 金萍, 石利民, 张韶华, 等. 水中诺如病毒的两种富集方法的效果比较 [J]. *医学动物防制*, 2021, 37(12): 1215-1219.
- JIN P, SHI L M, ZHANG S H, et al. Comparison on effects of two enrichment methods for *Norovirus* in water [J]. *Journal of Medical Pest Control*, 2021, 37(12): 1215-1219.