

聚丙烯酰胺凝胶碎块吸收洗脱法浓缩 病毒的实验研究及应用

尚大庄 王永祥 王玉坤 顾葆良

(河北医学院微生物学教研室, 石家庄)

提 要

本文报告聚丙烯酰胺凝胶(PAG)碎块吸收洗脱法在浓缩新城鸡瘟病毒(NDV)和人轮状病毒(HRV)方面的实验研究及应用。我们通过一次和二次浓缩, 分别将NDV感染的鸡胚尿液稀释液浓缩了12.1倍和90.2倍, 血凝滴度相应增高, 总病毒回收率分别达到90.2%和84.9%。用二次浓缩后的含HRV粪便上清液进行RNA PAGE银染色检测, 获得了HRV RNA电泳型检测阳性稀释度提高32倍左右的结果。据此, 采用这一方法, 对临床RNA PAGE检测阴性的33例婴幼儿腹泻粪便进行PAG浓缩处理后再检测, 发现有12例转为阳性, 阳转率为36.4%。从而, 使HRV总检出率由67%增至79%。

关键词 聚丙烯酰胺凝胶, 病毒浓缩, 新城鸡瘟病毒, 人轮状病毒

1984年Cussler等⁽¹⁾建立了一种交联部分水解的聚丙烯酰胺凝胶(PAG)作为一种分子颗粒大小选择性提取物的方法, 使大分子溶液浓缩了20倍。PAG对于直径为1—3nm的溶质有选择性的吸收作用, 而>3nm的颗粒则被阻止而附着在凝胶的表面, 易被洗脱下来。1987年Donald等⁽²⁾用PAG碎块吸收洗脱法将鸭流感病毒感染鸡胚尿液浓缩了近12倍, 病毒回收率为84.2%。并认为该方法具有简便、经济、凝胶可重复使用、便于推广等优点。但其浓缩倍数较低, 仍不能满足实际应用的要求。为进一步提高浓缩倍数, 扩大其应用范围, 我们改进了方法, 对NDV感染的鸡胚尿液进行了浓缩试验, 取得了比Donald方法更高的浓缩倍数和病毒回收率。并在此基础上初步试用于临床婴幼儿腹泻粪便标本的RNA PAGE检测上, 提高了病毒检出率。现将结果报告如下。

材料与 方法

病毒 NDV(F株): 从北京生物制品检定所购买。按参考文献(3)方法扩增病毒, 将收获的鸡胚尿液混合后分装, 放-60℃冰箱保存。HRV: 从临床标本(婴幼儿腹泻病例, No.12/Shijiazhuang/1987)中分离, 经电镜负染法及RNA PAGE银染色法证实。

临床标本 自1987年10月21日至11月24日, 从河北省医院和石家庄三院儿科病房, 河北医学院附属第二、第四医院儿科门诊观察室收集的100例婴幼儿急性腹泻粪便标本。<4℃保存一周内。

凝胶制备 主要根据Donald等方法⁽²⁾, 并略加改进。取400mg N, N-亚甲双丙烯酰胺,

40g丙烯酰胺, 加三蒸水至 200ml, 滤纸过滤后, 作为贮备液, 放 4℃ 保存。取贮备液 50ml 加等量三蒸水混匀, 随后, 加入 0.2ml 10% 过硫酸铵, 0.2ml 4% 偏重亚硫酸钠, 摇匀后, 倒入一端封有胶皮的玻璃圆筒 (直径 45mm, 长 200mm) 中。然后, 将此圆筒放入大约 19℃ 水浴中, 立即向此混合物中通氮气 3 分钟, 以除去妨碍聚合作用的氧。3 小时后, 取出完全聚合的凝胶, 在其两端切去 3mm, 弃掉。然后, 再将胶剪成小块 (大约 $2 \times 2 \times 2 \text{mm}^3$), 经水冲洗后, 放 60℃ 烤箱 10—12 小时, 使其干燥。

浓缩过程 将待浓缩液若干毫升加入一端封有胶皮的玻璃圆筒 (长 200mm, 直径随液量变化) 中, 按凝胶重量 (g) 与待浓缩液量 (ml) 1:10 比例加入凝胶碎块, 随后, 放 4℃ 冰箱中。90 分钟后取出, 凝胶膨胀, 液体被吸干。取下玻璃圆筒上的胶皮, 换上 60 目铜网, 用 0.01mol/L PBS (pH7.2) 进行洗脱 (洗脱时用细金属棒轻轻搅拌), 收集洗脱液 (浓缩液), 记录液量。按以上方法再进行一次浓缩, 即为二次浓缩。使用过的凝胶碎块经 15 磅 15 分钟灭菌后, 用水冲洗干净, 放 60℃ 烤箱 10—12 小时, 使其干燥, 以备重新使用。

临床标本浓缩前的处理 取 RNA PAGE 银染色法检测阴性的标本 (蛋花样便或稀水便) 5—20ml, 加 2 倍量 0.01mol/L PBS (pH7.2), 在液体快速混匀器上振摇 10 分钟, 1000r/m 离心 5 分钟, 吸收上清液。沉淀物再用 PGS 洗两次, 共收集上清液 40—100ml, 进行二次浓缩。

血凝 (HA) 滴度 采用微量血凝法^[3]。为使测得的 HA 滴度更接近实际滴度, 每份标本先稀释为 1:2, 1:5, 1:7, 1:9 四个稀释度。然后, 再分别进行 2 倍系列稀释。

HRV RNA 提取及 RNA PAGE 银染色法 参照 Herring 等^[4] 方法, 略加改进。简言之, 将粪便悬液 2000r/m 离心 10 分钟, 取上清 0.4ml 加 10% SDS 50ul, 0.5ml 饱和酚/氯仿混合液, 快速液体混匀器上振摇 15 分钟, 10000r/m 离心 10 分钟, 取液相。以 2.5 倍体积无水乙醇沉淀 RNA, 最后以少量标本缓冲液溶解 RNA 后进行电泳。采用垂直板型、不连续系统 PAGE。分离胶浓度 7.5% (pH8.8), 浓缩胶浓度为 3% (pH6.8)。加样量为 30ul。电泳条件为, 室温下, 15mA, 12—15 小时。凝胶用 10% 乙醇、0.5% 醋酸溶液固定 1 小时后, 浸入 0.011mol/L 硝酸银液中染色 30 分钟, 用三蒸水洗 3 遍, 放入 0.75mol/L NaOH, 0.1mol/L 甲醛中显色, 用 5% 醋酸液终止反应 (约 10 分钟), 即可拍照观察结果。

结 果

一、PAG 浓缩法对感染的鸡胚尿液稀释液中 NDV 的浓缩效果观察: NDV 感染的鸡胚尿液 4—15ml 按试验要求用 0.01mol/L PBS (pH7.2) 稀释至 92ml, 取出 2ml, 放 4℃ 保存, 其余进行一次和二次浓缩, 收集洗脱液, 记录液量。测定浓缩前、后鸡胚尿液的 HA 滴度, 计算病毒回收率。结果见表 1 和表 2。

二、PAG 浓缩法对 RNA PAGE 检测 HRV 效果的影响:

取 HRV 粪便上清液 2ml 加入 200ml 0.01 mol/L PBS (pH7.2) 中, 混匀。取出 2ml, 作为浓缩前原液, 放 4℃ 保存。其余进行二次浓缩, 收集洗脱液约 2ml。分别取浓缩前、后的粪便上清液各 0.5ml, 用 0.01mol/L PBS (pH7.2) 进行 2 倍系列稀释。分别取各稀释度粪便上清液及浓缩前原液 0.4ml, 提取 HRV RNA。在同一块胶板上进行 RNA PAGE。经硝酸银染色后观察, 发现浓缩前标本原液和 1:2 稀释度阳性, 其余 (>1:2) 均为阴性。浓缩后标本 1:2 至 1:64 稀释度均阳性, 1:128 阴性 (图 1)。重复此

表 1 PAC浓缩法浓缩感染的鸡胚尿液中NDV的效果 (一次浓缩)

Tab 1 Effect of PAC concentration method on concentrating NDV from infected allantoic fluids (concentrated once)

实验次数	液 量		浓缩倍数	血凝滴度		提高倍数	病毒回* 收率(%)
	浓缩前 (ml)	浓缩后 (ml)		浓缩前 (μ)	浓缩后 (μ)		
1	90	7.50	12.00	20	224	11.20	93.00
2	90	7.00	12.90	20	224	11.20	87.00
3	90	7.50	12.00	40	448	11.20	93.30
4	90	8.50	10.60	40	384	9.60	90.70
5	90	7.00	12.90	80	896	11.20	87.10
平均			12.10			10.90	90.20

*病毒回收率 = $\frac{\text{浓缩后液量} \times \text{浓缩后HA滴度}}{\text{浓缩前液量} \times \text{浓缩前HA滴度}} \times 100\%$

Virus recovery rate = $\frac{\text{Concentrated volume} \times \text{Concentrated titer}}{\text{Initial volume} \times \text{Initial titer}} \times 100\%$

表 2 PAC浓缩法浓缩感染的鸡胚尿液中NDV的效果 (二次浓缩)

Tab 2 Effect of PAC concentration method on concentrating NDV from infected allantoic fluids (concentrated twice)

实 验 次 数	液 量*		浓缩倍数	血凝滴度		提高倍数	病毒回 收 率
	浓缩前 (ml)	浓缩后 (ml)		浓缩前 (μ)	浓缩后 (μ)		
1	90	1.00	90.00	80	6144	76.80	85.30
2	90	1.00	90.00	40	3072	76.80	85.30
3	90	0.85	105.88	40	3587	89.68	84.16
4	90	1.00	90.00	20	1520	76.00	84.40
5	90	1.20	75.00	20	1280	64.00	85.00
平 均			90.18			76.66	84.92

* 经一次浓缩后液量由90ml减少为10-15ml.

After concentrated once the volume of fluids was decreased from 90ml to 10-15ml.

试验5次, 结果基本一致。由此可见, 含HRV粪便上清液, 经二次PAG浓缩后, 用RNA PAGE银染色法检测, HRV RNA检出阳性稀释度提高了32倍左右。

表 3 RNA PAGE常规法和PAG浓缩法检测100例粪便标本中HRV的结果比较结果

Tab 3 Comparison of the results detecting HRV in 100 cases faecal samples with routine and PAG concentration method

	常规法	浓缩法	两法合并
	例 数(%)	例 数(%)	例 数 (%)
阳性	67 (67)	12 (36.4)	79 (79)
阴性	33 (33)	21 (63.6)	21 (21)
合计	100 (100)	33 (100)	100 (100)



图 1 PAC浓缩法对RNA PAGE检测粪便中HRV敏感性的影响
Fig 1 Effect to PAC concentration method on the sensitivity detecting HRV in faecal samples with RNA PAGE

•, 未浓缩液 A, 浓缩液
•, Unconcentrated A, Concentrated

三. PAG 浓缩法在RNA PAGE检测临床婴幼儿腹泻粪便标本中HRV中的应用: 用HRV PAGE银染色法予先检测了100例婴幼儿腹泻粪便标本。其中67例阳性, 33例阴性。阴性标本经予处理后, 分别进行二次PAG浓缩, 收集洗脱液1—1.5ml。取出0.4ml, 提取HRV RNA, 用RNA PAGE银染色法检测。结果33例阴性标本中, 有12例转为阳性, 阳转率为36.4%。从而, 使HRV总检出率从67%增至79%(表3)。

讨 论

本研究用改进的PAG碎块吸收洗脱法, 经二次浓缩, 使稀释的NDV感染的鸡胚尿液浓缩了90.2倍, 病毒回收率为84.9%。与一次浓缩相比, 浓缩倍数提高了7.5倍。改进后的方法简化了浓缩过程, 使凝胶的吸收、膨胀和洗脱在同一玻璃圆筒中进行。并在洗脱的同时用细金属棒轻轻搅拌, 使病毒洗脱得更彻底, 提高病毒回收率。实验证实, 与Donald等方法相比, 浓缩倍数及病毒回收率均有较明显提高。

Hlausky等⁽⁵⁾认为液体pH变化对凝胶的膨胀和吸收作用有一定的影响。但Donald等的研究证实, pH在6.5—7.5之间对浓缩过程无明显影响。本研究中, pH均使用在6.5—7.5之间。实践证明, 可得到较高的浓缩倍数和病毒回收率。

用PAG碎块吸收洗脱法浓缩粪便上清液中的HRV, 并将其用于临床标本的检测。我们用该法将稀释的含HRV的粪便上清液体积浓缩了100倍。但通过RNA PAGE银染色

法检测, HRV RNA检出阳性稀释度提高32倍左右。此结果低于预期值的原因, 可能是在HRV核酸提取过程中, 部分小凝胶碎片上的RNA在离心时丢失。用RNA PAGE 银染色法检测HRV是一种特异和敏感的方法⁽⁴⁾, 尤其是在HRV RNA分型及分子流行病学调查方面十分重要。根据资料⁽⁵⁾证明, 大量HRV存在于脱落的肠粘膜中, 粪便上清液中病毒含量相对较少。因此, 粪便中病毒浓度较低时, 常规RNA PAGE法常检测不到病毒RNA或电泳带很淡, 看不到完整的11条带, 分型很困难。欲提高该法的病毒检出率, 浓缩病毒实属必要。本研究中, 收集较大的婴幼儿腹泻粪便标本, 用PBS洗三次后浓缩, 使标本中的HRV浓度增加, 提高了RNA PAGE 银染色法的HRV检出率。表3表明, RNA PAGE常规法检测阴性的33例标本中的12例, 经浓缩处理后转为阳性, 使HRV总检出率由67%增至79%。

浓缩病毒, 在病毒学研究及临床标本的检测方面具有重要作用, 它为病毒的进一步纯化, 贮存以及病毒核酸分析创造了有利条件。特别是对于那些病毒含量小, 又容易大量收集的标本(粪便, 尿液等), 经适当浓缩处理后, 可提高病毒检出率。PAG碎块吸收洗脱法具有简便、经济、有效、凝胶可重复使用等优点。便于推广使用。它对于10—200ml的液体均适用。如要纯化病毒, 可根据需要配合使用其他方法。将此方法用于浓缩细胞培养液中的感染性病毒, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- (1) Cassler E. L. et al., 1984, *Am Inst Chem Eng J* 30: 578.
- (2) Donald C. et al., 1987, *J Virol Methods* 15: 25.
- (3) 杜平, 1985, 医用实验病毒学 P.111 人民军医出版社, 北京.
- (4) Herring A. J. et al., 1982, *J Clin Microbiol* 16(3): 473
- (5) Ilavsky M. et al., 1982, *Polym Bull* 7: 107.
- (6) 齐爱源等, 1981, 中国医学科学院学报3(1): 40.

Experimental Research and Application of Polyacrylamide Gel Debris Absorption and Elution Method for Virus Concentration

Shang Da-zhuang Wang Yong-xang Wang Yu-kun Gu Bao-liang

(Department of Microbiology, Hebei Medical College, Shijiazhuang)

This paper reports the results of experimental research and application of polyacrylamide gel(PAG) debris absorption and elution method for Newcastle

Disease Virus (NDV) and Human Rotavirus(HRV) concentration. By treating once and twice with PAG, the volume of diluted NDV infected allantoic fluids was concentrated about 12.1 and 90.2 folds respectively, and the HA titer of the virus was increased correspondingly. It was shown that the positive dilution titer of RNA electrophoretotype detected in HRV faecal extracts could be increased with 32 folds by using the method(PAG absorption and elution)in concentrating twice. Therefore, we applied this method to concentrate 33 samples which had been revealed negative in HRV RNA electrophoretotype by routine RNA PAGE detection, and detected the samples again with RNA PAGE. 12 of 33 samples were transformed into positive, i.e. positive transforming rate was 36.4%. Thus the HRV total positive detecting rate increased from 67% to 79%.

Key words, polyacrylamide gel, virus concentration, NDV,HRV