

## 毛蚶中肠道病毒检测方法的建立

马菊芳 蒋慧惠 胡善联 严惠琴 李洁

(上海医科大学公共卫生学院, 上海200032)

### 提 要

本文建立了检测毛蚶中肠道病毒的方法。病毒在 pH4.5 时吸附于毛蚶组织, 离心后用 pH9.5 甘氨酸盐水将病毒从毛蚶组织中洗脱出来, 并用 0.0005mol/L 三氯化铝代替 Johnson 法中的 Cat-Floc, 达到去除细胞毒性物质的目的。经过再一次离心, 利用牛肉浸膏在 pH3.5—4.0 时凝聚并吸附病毒的特性使洗脱液中的病毒得到浓缩。离心后沉淀溶解于 0.1mol/L 磷酸氢二钠溶液。用本法提取毛蚶中脊髓灰质炎病毒, 当病毒含量为每克组织  $3.5 \times 10^5$  至 35 PFU 时, 平均回收率为 71.2%。

**关键词:** 毛蚶 脊髓灰质炎病毒 回收率

贝类传播人类病毒性疾病的病原学研究, 离不开检测方法。国外对贝类中病毒检测方法的研究较多, 并朝着快速、简便的方向努力。本文建立了从毛蚶中分离提取肠道病毒的方法, 为进一步研究毛蚶传播人类肠道病毒的机制、建立合理的卫生学标准和评价食用方法等提供基础的手段。

### 材 料 与 方 法

**一、病毒** 本室保存的脊髓灰质炎病毒 I 型减毒株 (PI-LS<sub>0</sub>)。接种 0.1ml 于 Vero 细胞瓶, 37℃ 吸附 1 小时后, 加维持液 10ml, 37℃ 培养。待细胞病变 (CPE) 达 III 后收获, -20℃ 慢冻慢融三次, 离心 (5,000 转/分) 10 分钟, 去除细胞碎片。

**二、细胞培养** 本室保存的传代 Vero 细胞和 MRC<sub>5</sub> 细胞。用日本 Eagle's 液作培养液。生长液含 10% 小牛血清, 维持液含 2% 小牛血清。

**三、毛蚶中肠道病毒的提取** 1987 年 11 月从上海水产供销公司购得毛蚶, 置于无菌容器。去壳, 用组织捣碎器将毛蚶组织制成匀浆。以 Johnson 1981 年从蛤中分离提取肠道病毒方法为基础<sup>[1]</sup>, 建立从毛蚶中分离提取肠道病毒的方法。基本步骤包括酸性条件下吸附、碱性条件下洗脱、毒性去除及浓缩过程。

**四、空斑测定脊髓灰质炎病毒方法** 待测物用日本 Eagle's 液 (PH7.2) 连续 10 倍稀释后, 每稀释度接种 Vero 细胞小瓶 2 瓶, 每瓶 0.1ml。37℃ 吸附 1 小时后加琼脂复盖液 2ml/瓶。培养 5 至 7 天计空斑数, 计算待测物中每毫升所含病毒量。

本文于 1988 年 11 月 21 日收到。

## 结 果

## 一、吸附条件的确定

将 10 克毛蚶组织加入脊髓灰质炎病毒和 70ml 双蒸水后匀浆, 使每 10ml 匀浆含  $9.4 \times 10^5$  PFU 病毒。取 10ml 匀浆, 调 PH 至 4.5, 离心 (2,000 转/分) 20 分钟, 取上清空斑测定病毒含量。结果表明, 10ml 匀浆的上清中病毒含量小于  $8.5 \times 10^3$  PFU, 故病毒损失率小于 0.9%。因此选用 pH4.5 为吸附条件。

## 二、毒性去除条件的确定

取 10 克毛蚶组织加 50ml 双蒸水、加  $6.6 \times 10^5$  PFU 脊髓灰质炎病毒, 匀浆后调 pH4.5, 离心 (2,000 转/分) 20 分钟, 弃上清。沉淀悬于 50ml pH 9.5 的 0.05mol/L 甘氨酸盐水, 搅匀, 调 pH 9.5。取悬液分成 3 管, 分别加 0.005 mol/L、0.0005 mol/L  $AlCl_3$  及不加  $AlCl_3$ , 搅匀, 调 pH 9.5, 离心 (3,000 转/分) 20 分钟。分别收集上清, 加牛肉浸膏至最终浓度 1.5%, 调 PH3.5—4.0, 搅匀, 离心 (10,000 转/分) 15 分钟。分别将沉淀悬于 0.1mol/L  $Na_2HPO_4$  溶液, 调 pH7.2—7.4, 4°C 保存待测。

用 Vero 细胞空斑检测提取物中病毒, 计算最终回收率。最终回收率 = 提取物中病毒总量/加入病毒总量  $\times 100\%$ 。结果见表 1。

表 1  $AlCl_3$  浓度对洗脱效果和细胞毒性的影响Table 1 The effect of  $AlCl_3$  concentration on the efficiency of elution and cytotoxicity

$AlCl_3$ 浓度 (mol/L)	絮凝状况	上清性状	最终回收率
0.005	絮凝多	清	11.1%
0.0005	絮凝少	清	12.4%
无 $AlCl_3$	无絮凝	混浊	—*

\* 因提取物对细胞毒性大, 无法测定。

据表 1, 决定选用 0.0005mol/L  $AlCl_3$ 。 $AlCl_3$  能通过絮状物的形成而去除毛蚶组织, 使上清中对细胞有毒残留物更少, 达到去除毒性和减少提取物体积的目的。提取物接种 Vero 细胞, 基本无细胞毒性, 原液可直接进行空斑试验, 提取物原液接种 MRC<sub>2</sub> 细胞, 有细胞毒性, 经 1:2 稀释后, 基本上无细胞毒性, 细胞能维持 4 至 5 周。

## 三、洗脱时间与病毒回收率的关系

由于上述试验回收率较低, 因此增加洗脱次数, 延长洗脱时间以提高回收率。再次试验与前述过程相同, 洗脱时加 0.0005mol/L  $AlCl_3$ , 离心后沉淀再次用 0.05mol/L 甘氨酸盐水洗脱。合并两次洗脱液, 以后处理同前。表 2 说明了洗脱时间与最终回收率的关系, 可见洗脱两次, 每次洗脱时间不少于 15 分钟可得到较满意的回收率。

## 四、最终提取方法的确立及效果评价

基于上述实验, 并统一各步的离心速度, 确立从毛蚶中提取病毒的过程为: 1) 取毛蚶组织加双蒸水 ( $W/V = 1/5 \sim 1/7$ ), 匀浆后调 pH 4.5, 离心 5,000 转/分, 15 分

表 2 洗脱时间与最终回收率关系  
Table 2 The relation between the time of elution and recovering efficiency

样本号	洗脱时间 (min)	最终回收率 (%)
1	10	12.4
2	10×2*	37.5
3	15×2	42.9
4	15×2	62.9

\* 洗脱两次

钟, 弃上清。2) 沉淀悬于 pH9.5 的 0.05 mol/L 甘氨酸盐水洗脱, 加 0.0005 mol/L AlCl<sub>3</sub>, 调 pH9.5, 搅匀 15 分钟, 离心(5,000 转/分, 20 分钟), 收集上清。3) 沉淀再次悬于 pH9.5 的 0.05 mol/L 甘氨酸盐水洗脱, 调 pH 9.5, 搅匀 15 分钟, 离心 5,000 转/分, 20 分钟, 收集上清。4) 合并上清, 加 1.5% 牛肉浸膏, 调 pH 3.5—4.0, 离心 5,000 转/分, 15 分钟, 弃上清, 为浓缩过程。5) 沉淀悬于 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液, 调 pH7.2—7.4, 待测。

以上述方法提取毛蚶中脊髓灰质炎病毒, 当加入毛蚶匀浆的病毒量从每克组织  $3.5 \times 10^5$  PFU 至 35 PFU 时, 回收率为 42.9% 至 107%, 平均回收率为 71.2%。见表 3。

表 3 毛蚶中病毒提取效果的评价  
Table 3 The evaluation of efficiency of recovering viruses from clams

样本号	每克组织加入 病毒量 (PFU/g)	期望回收病* 毒总量 (PFU)	实际回收病 毒总量 (PFU)	回收率** (%)
1	$3.5 \times 10^5$	$1.75 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$	42.9
2	$3.5 \times 10^5$	$1.75 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	62.9
3	$3.5 \times 10^3$	$3.5 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	66.8
4	$3.5 \times 10^2$	$3.5 \times 10^2$	$2.67 \times 10^2$	76.2
5	35	35	37.5	107

\* 期望回收病毒总量即每样本加入病毒总量, 也即每样本组织重量 (g) 与每克组织加入病毒量 (PFU/g) 之积。

\*\* 回收率 = 实际回收病毒总量 / 期望回收病毒总量 × 100%

## 讨 论

从自然污染或实验室感染的贝类中提取肠道病毒的方法报道甚多。所有方法都首先将贝类组织制成匀浆。最初人们只简单地将匀浆离心后去除沉淀, 直接用上清进行细胞检测或经进一步处理 (如乙醚提取) 后进行细胞检测。但问题是上清体积太大, 难以检测少量病毒; 上清中含太多对动物细胞有毒性的物质, 致使病毒能计数以前细胞已破坏。以后超速离心技术、超滤技术的应用使上清得到浓缩。1970 年以来, 多聚电解质

Cat-Floc 和牛肉浸膏的应用,使上述两个问题得到进一步解决,是检测贝类中病毒方法学上一大突破<sup>[2]</sup>。

1975—1978年 Sobsey 等进一步发现控制 pH 和盐浓度能将肠道病毒从牡蛎中分离提取出来,并能有效地减少提取物体积<sup>[3,4]</sup>。Johnson 在此基础上又作了改进,建立了从蛤中分离提取肠道病毒的方法,较 Sobsey 法更为简便<sup>[1]</sup>。本文参考 Johnson 方法,结合国内条件和本实验室经验,建立了从毛蚶中提取肠道病毒的方法。

用本法提取毛蚶中病毒,提取物可直接接种 Vero 细胞,基本无毒性,可检测少量病毒(35PFU);但对 MRC<sub>6</sub> 细胞仍有一定毒性,需将提取物适当稀释后接种。

Sobsey 法检测牡蛎中脊髓灰质炎病毒、呼肠孤病毒和腺病毒,平均回收率 46%。Johnson 法检测蛤中脊髓灰质炎病毒,平均回收率 73%。本实验方法检测毛蚶中脊髓灰质炎病毒,平均回收率 71.2%。

### 参 考 文 献

- (1) Johnson, K.M, et al., 1981, *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 932—935.
- (2) Gerbe, C.P, et al., 1978, *J. Food Protect.* 41: 743—754.
- (3) Sobsey, M.D, et al., 1975, *Appl. Microbiol.* 29: 21—26.
- (4) Sobsey, M.D, et al., 1978, *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 121—128.

## Development of Method for the Detection of Enteroviruses from Clams

Ma Ju-fang Jiang Hui-hui Hu San-lian Li Jie

(School of Public Health, Shanghai Medical University,  
Shanghai 200032)

A procedure for concentrating and recovering enteroviruses from clams (*Arca (Anadara) subcrenata* Lischke) has been developed and evaluated. Viruses were efficiently adsorbed to homogenized clam tissue by adjusting the homogenate to pH 4.5. After low-speed centrifugation, the viruses were eluted from the sediment with pH 9.5 0.05mol/L glycine-saline. Instead of using Cat-Floc in Johnson's method, AlCl<sub>3</sub> was used to remove cytotoxicity from clam tissue homogenates. After low-speed centrifugation, viruses were concentrated by mixing the glycine supernatant with beef extract solution and by adjusting pH to 3.5—4.0. After another centrifugation, the pellet was resuspended in a small volume of phosphate buffer. This technique successfully recovered an average of 71.2% of the poliovirus added to clam homogenates at levels of 35 to  $3.5 \times 10^5$  PFU per 1 g.

**Key Words:** Clam (*Arca (Anadara) subcrenata* Lischke) Poliovirus recovery of virus