

浮游病毒的测定方法及其应用

程 凯 赵以军 夏燕华 张 婷

(华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

METHODS IN VIRIOPLANKTON AND THEIR APPLICATION

CHENG Kai, ZHAO Yi Jun, XIA Yan Hua and ZHANG Ting

(College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079)

关键词: 浮游病毒; 研究方法

Key words: Virioplankton; Research methods

中图分类号: Q179.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)05-0535-004

浮游病毒是较新的研究领域。浮游病毒包括噬藻体^[1] (Cyanophage, 即蓝藻病毒)、藻病毒^[2] (Phycovirus, 真核藻病毒)和噬菌体^[3] (Bacteriophage)等, 它们在水体生态具有重要的生态作用, 近 10 年的研究表明浮游病毒不仅在水体中大量存在^[4], 而且在控制水体的初级生产力和有机碳循环方面发挥着重要的作用^[5]。在这 10 年的发展过程中, 由于研究对象从纯培养的噬菌体-宿主系统 (Phage-Host System, PHS) 扩展到微宇宙系统和水生态系统^[3], 所以原有的传统方法已不能满足研究的需要, 不少新方法被应用到对浮游病毒的生态研究中。根据国内外最新的研究结果, 本文就应用于浮游病毒研究之中的具有代表性的方法作一综述。

1 浮游病毒的计数方法

1.1 浮游病毒的常规计数方法

1.1.1 空斑法 (Plaque Formation Units, PFU): PFU 法是病毒计数中最常规的方法, 常用于估测能裂解在固体培养基上生长的藻或菌的病毒的数量, 如天然水样中大肠杆菌病毒的丰度和分布就是通过 PFU 法获得的^[6]。PFU 法的原理是任一个具感染力的病毒单位都会在敏感宿主的细胞层上形成一个透明的裂解圈或生长抑制圈 (即空斑), 通过计数空斑即可测定病毒的数量。到目前为止, 由于 PFU 法的操作简单可行, 灵敏度高 (其检出限为每毫升 5 个空斑)^[7], 并可用于病毒的纯化, 所以, 它已被广泛地应用到对 PHS 的研究工作中。而该方法的局限性在于要求宿主必须能在固体培养基上培养, 且宿主细胞平板的形成可能会受到天然样品中细菌的干扰,

同时这种方法也不能有效地区分不同类型的病原体。

1.1.2 MPN 法 (Most Probable Number): MPN 法最早是用于对噬藻体 (蓝藻病毒) 进行计数的, 其方法是将病毒溶液进行梯度稀释, 用每个稀释度的多个平行样品 (通常是 10 个) 分别感染宿主细胞, 通过检测较长时间段 (如 14d) 内藻的生长情况来判断是否有病毒感染, 最后将出现感染的稀释度数和并行样品数与最可能数目表进行比较, 估测出病毒的数目^[7,8]。该法为计数不能在固体培养基上形成空斑的病毒提供了可能, 而且简单易行, 灵敏度高, 检出限可达到每毫升 1 个病毒。但这种方法的工作强度大, 准确性和精确度也不如 PFU 法。

总的来说, 由于 PFU 法和 MPN 法都依赖于对宿主的感染, 所以它们更多的是被应用在对特定的 PHS 的感染动力学的研究中, 而较少应用在对天然样品的总浮游病毒的定量研究中。

1.1.3 透射电镜法 (Transmission Electron Microscopy, TEM): 主要用来测定水样中病毒类颗粒 (Viral Like Particles, VLPs) 的浓度, 实际上, 人们通过 TEM 直接观察法, 发现浮游病毒在海水中是大量存在的, 从而推测浮游病毒的感染和裂解对浮游细菌及浮游藻类的生长与多样性有着巨大的影响。与 PFU 和 MPN 法相比, TEM 法的最大优势就在于可以直接计数自然水体中的病毒粒子的数量而无需对宿主进行感染, 因此它能够提供关于整个病毒群落的形态多样性和丰度方面的大量信息。而这种方法的主要缺点就在于测定下限高达 10^5 个/ml, 误差范围也高达 20%—25%^[9] (在测量低丰度样品时由于需要对样品进行浓缩, 因此误差更大), 无法确定

收稿日期: 2002-09-29; 修订日期: 2002-10-18

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 39600004 及 399700647) 资助

作者简介: 程 凯 (1977—), 男, 湖北省武汉市人, 现在华中师范大学工作

通讯作者: 赵以军, Email: pyzhao@263.net

病毒颗粒是否具有感染性及宿主的类型,而且设备昂贵,所需的分析时间长,对操作者的专业水平要求较高。

1.2 新发展的浮游病毒计数方法

荧光法 (Epifluorescence Microscopy, EFM) 与流式细胞计数法(Flow Cytometry, FCM)

EFM 法的基本思路是根据特定的荧光染料对不同的浮游生物的核酸染色的不同,从而在荧光显微镜下就可以进行区分和计数。通常,荧光法都需要浓缩、酶解游离核酸、染色、固定、镜检等一系列步骤,而常见的荧光染料有 DAPI, Yσ pro, SYBR 等。DAPI 是最早用于对浮游病毒进行研究的荧光染料,它能够对双链 DNA 进行特异性染色^[7]。Yσ pro 1 和 SYBR Green I 则是近年来才被应用于浮游病毒的计数

的^[10, 11]。这两种染料的优势在于具有较低的背景色及高于 DAPI 荧光的稳定性和亮度,因此它们已替代 DAPI 成为主流的荧光染料。以前人们在使用 Yσ pro 1 的时候,需要长达 2d 的时间才能使浮游病毒样品充分着色,但后来又有报道指出,通过用微波处理可将染色时间缩短至 4 min^[12],而且 Ca²⁺ 可以显著提高 Yσ pro 1 染色的检测效率¹³。与 Yσ pro 不同,SYBR Green I 仅染色水样中的病毒和细胞,尽管这种染料的褪色较快(可以通过加入抗褪色剂来减缓),但由于它的染色时间较短(小于 15min),亮度较高,而且不受乙醛固定剂的影响^[11],因此,SYBR Green I 被认为是目前用于荧光计数浮游病毒的最佳染料。DAPI, Yσ pro 1 和 SYBR Green I 三种染色法的区别见表 1。

表 1 DAPI, Yσ pro 1 和 SYBR Green I 三种染色法的比较
Tab. 1 Comparison between DAPI, Yσ pro 1 and SYBR Green I dyeing

	DAPI	Yσ pro 1	SYBR GREEN-I
染色时间	30min	48h—4min	< 15min
褪色时间	居中	褪色时间最晚	< 30s
样品固定	1% 的戊二醛或福尔马林	不需要固定	乙醛固定
荧光效果	较差	低背景色, 荧光更亮, 稳定性更高, 更准确	同 Yσ pro 1
样品预处理	样品不需预处理	无需预处理或用微波预处理	需加入特定的抗褪色物质

和 TEM 法相比,EFM 法的优势在于精度较高(其误差范围为 7—11%)^[13],所需的设备少,经济可行,且能够在实地进行。但用这种方法得不到关于病毒群种或被感染生物体组分的信息,小的细菌与大的病毒不易区分,单个病毒也不能从病毒聚合体中分辨出来,而且用不同的染料往往也会得到相去甚远的结果^[14]。如有人用 Yσ pro 1、DAPI 染色法和 TEM 法的检测了同一样品中的病毒粒子浓度,发现用 DAPI 染色得到的结果最低,大约只有 TEM 法的四分之一,而 Yσ pro 1 染色的结果最高,为 TEM 法的 10 倍左右^[15]。Yvan 等人也尝试过用各种荧光染料对不同营养背景的天然水样中的病毒进行计数,同样发现普通的 Yσ pro 1 染色法对各种水体中病毒计数的结果均是最高的,而用微波处理的方法虽然得数较低,但特别适用于对固定了的水样进行快速分析;此外,SYBR Green I 则由于褪色太快,所以不适合用于对病毒颗粒的浓度高于 10⁸ VLPs·mL⁻¹ 的样品进行计数^[14]。

FCM 法是由 EFM 法派生出来的,其运作的原理实质上与荧光法是相同的,因此其优缺点与 EFM 法也是基本相似的,但 FCM 由于实现了分析的自动化并且结合了高度灵敏的检测手段,所以它的结果比 EFM 法平均高 1.25 倍,其速度和精度也均高于 EFM 法,而且至少能够区分自然水样中的 2 到 3 个不同的病毒种群^[16, 17]。

目前应用于浮游病毒检测的 FCM 染料有两种: SYBR GREEN-I 和 SYBR Gold SYBR GREEN-I 染色时要求样品须经过深度冰冻或 80℃ 高温预处理,而且样品的褪色快(< 30s),病毒计数偏低^[16]。Chen 等人用 FCM 法计数用 SYBR Gold

染色的天然湖水样品时,至少可以分辨出 4 个不同的病毒颗粒类型,同时由于 SYBR Gold 的成本更低,染色更快而且不受固定剂的影响,荧光比 SYBR GREEN-I 更明亮,更稳定,持续时间更长达 2min^[16],因此它很有可能会替代 SYBR GREEN-I 目前的地位。

2 浮游病毒致死率的测定方法

病毒所引起的致死率是确定浮游病毒生态地位的重要指标,因此对它的准确测量显得十分重要,现在,研究者们主要通过以下方法来测量和计算病毒所造成的致死率。

2.1 切片观察法

通过对超薄切片的浮游生物进行电镜观察,人们能够对水生微生物群落中被病毒感染的细胞进行计数,并依此推算由病毒造成的致死率^[18]。尽管用切片法能够对被感染细胞进行直接计数,但由于它只能够识别已装配好了病毒颗粒,所以对处于感染的其他阶段的细胞无法计数。解决这一问题的方法是根据病毒的潜伏期和裂解期的长短来设计一个校正因子,将直接计数的得数来乘以这个校正因子来得到被病毒感染的细胞总数。现阶段常用的校正因子是 10¹^[18],但考虑到生态系统的复杂性,研究者正致力于设计出一系列校正因子来适应不同的 PHS 系统^[19]。迄今为止,利用切片观察法人们已经发现每天大约有 10%—20% 的浮游细菌被噬菌体所裂解,因此浮游病毒是控制浮游菌群的重要因子^[20]。

2.2 标记示踪法

根据标记物的不同,可以将标记示踪法分作两类:放射

性示踪法和荧光示踪法。放射性示踪法是 Steward 等人参照测量细菌生产力的方法而设计的,这个方法的基本原理是用 ^3H 或 ^{32}P 标记浮游病毒的核酸,然后计数宿主裂解后的放射性标记物的量,这个量所代表的就是病毒的生产量,最后用病毒的生产量除以病毒的平均释放量就能够推算出被感染的宿主数量^[21]。在将放射性标记量转化成病毒的生产量时,还需要一个转化系数。通常,这个系数是通过比较用其他方法测量的标准 PHS 中的病毒的数量变化和放射性标记物的数量变化来得到的^[21, 22]。但迄今为止,人们还没有在这个系数的选择上达成统一的意见,所以不同的研究者使用这种方法得到的病毒介导的致死率是有极大差异的。

由于放射性示踪法不适用于检测病毒生产力较低的样品,因此最近又有人将荧光染料用于对病毒生产力的示踪研究中^[23]。荧光示踪法的基本原理和放射性示踪法是相同的,但荧光染料对宿主正常生理活动的影响小,且无需推测转化系数,所以精度更高,此外它的操作性、安全性和灵敏度也优于放射性示踪法。而这种方法的缺点主要是由荧光染料的性质决定的,如由于 SYBR Green I 在光照下极易褪色,所以它只能用于对避光培养的 PHS 体系的研究^[23]。

总的来说,标记示踪法得到的结果低于用切片观察法所得到的结果^[24]。但标记示踪方法能够直接测定病毒的生产速率并推算它所造成的致死率,而且也可以用于直接记录病毒粒子的降解率,同时还为提供了有关物质从浮游菌群流向浮游病毒的直接证据^[7]。

2.3 基于数学原理的推算法

在对生态系统的研究过程中,很多关键性的数据是用现有的技术手段无法直接或精确测量的,因此通过数学原理来对它们进行合理的推断就变得十分必要,在研究浮游病毒的生态地位时,最常用的推断模型就是用病毒的失活率来推算其增殖率和对宿主的致死率^[25]。这个模型的基本前提是,由于天然水体中病毒的浓度几乎是季节性恒定的,所以病毒的生产速率就应该等于它的失活速率,而由病毒造成的细菌的日致死率在理论上就等于每日新增的病毒数量除以病毒的平均释放量。通常测定病毒失活率的方法是向海水培养体系中加入细胞毒素来阻止病毒增殖,这时只要对病毒进行计数就能够得到其失活率^[26]。另一个常用的模型是用病毒与宿主的浓度与个体大小来推算病毒所造成的细菌的致死率,其基本思路是通过病毒与宿主的浓度与个体大小来计算病毒与宿主细胞的接触率,再假设一个成功感染占总接触次数的百分比(通常是 100%),从而推算出病毒造成的细菌的致死率^[4, 27]。基于这一理论,Stuttle 等人计算得到了墨西哥湾海水中噬藻体对聚球藻的日致死率在 5%—7% 之间^[27],考虑到聚球藻对海洋初级生产力的巨大贡献,噬藻体对聚球藻的裂解作用可能会对整个海洋生态系统产生难以估量的影响。

尽管数学方法能够得到无法直接测量的数据,但它也存在一些问题,特别是方程中参数的取值对最后的计算结果有着极大的影响,如在上述使用失活率来推算致死率的模型中,选用较高的病毒释放量就会得到较低的致死率^[27]。因此

在应用这些方法时,对参数的取值进行精确的测量和合理的筛选就显得十分重要。

3 分子生物学方法

随着对浮游病毒的研究的深入,研究者不但需要得到浮游病毒的总量,而且更希望了解浮游病毒究竟是由哪些主要类群构成的,甚至还要知道这些类群的大小及它们与宿主之间的关系。分子生物学手段的采用和发展对这些研究提供了新途径。迄今为止,人们初步建立了以 PCR 为核心的定性检测方法^[28—31]。

在对噬藻体的研究过程中,人们发现由于 GP20 基因^[30]和 DNA 聚合酶基因^[28]具有相当强的保守性,所以他们可以当作研究噬藻体的分子进化关系的指示基因。现在,人们已经将 PCR 技术用于分析天然样品中的噬藻体种类,并根据上述基因的序列建立了部分噬藻体的分子进化图谱。这类 PCR 方法的过程是先用适当的方法浓缩水样中的噬藻体,然后对标志性的噬藻体 DNA 片段进行 PCR 扩增,最后再用 DNA 杂交^[30]、变性胶梯度电泳(DGGE)、毛细管电泳(CDCE)^[31]等高灵敏度的检测方法加以检测。此外,Wommack 等人还将用脉冲场电泳(PFGE)所分离出的不同大小的噬藻体基因组用于 PCR 检测:他将经过超滤浓缩和超离心纯化的天然水样固定于 1.5% 的 Agarose 中,随后用蛋白酶 K 处理使病毒脱衣壳,再经过脉冲场电泳之后选取不同分子量的噬藻体基因组进行 PCR 扩增,最终获得了海水中噬藻体种群结构随季节和地点变化的重要数据。应用上述分子生物学手段进行的研究主要有两大发现:一是证明了噬藻体与噬菌体之间是存在一定亲缘关系的,但不同类型的噬藻体之间的亲缘关系要大于噬藻体与噬菌体之间的亲缘关系^[29];二是表明了自然水体中噬藻体的种群结构是具有地域性和季节性特征的。

总之,相对于其他方法而言,PCR 方法无需对宿主和病毒进行纯化培养,且灵敏度和准确性更高,还能够检测溶原型的病毒,所以通过应用这个方法,人们已经获得了一些以前用常规方法所不能得到的关于病毒种群结构的数据,但目前 PCR 方法的应用还有一定局限。一个主要的问题就是由于人们对浮游病毒的序列的认识的不足,所以已知的 PCR 引物并不能扩增所有待识别的种类,但随着研究的深入和浮游病毒基因库的不断丰富,相信这一问题将会很快得到解决。此外,用 PCR 对浮游病毒进行定量研究现在也被提上了议事日程,虽然还没有直接报道,但基于其他水生微生物的定量 PCR 研究表明这一方法不但在原理上是可行的,而且在实际的操作中也能够达到所需的灵敏度和准确度。

浮游病毒作为一个新的研究领域^[32],其研究方法还不是十分完善,在某些情况下用不同的方法往往会得到相差甚远的结论,因此要建立一个标准来对各种方法加以衡量和比较。从现有的资料来看,浮游病毒的研究方法的发展将以分子生物学的原理和技术为基础,且存在从定性到定量的趋势。

参考文献:

- [1] Zhao Y J, Shi Z L, Huang G J, et al. Blue green algal viruses (Cyanophage) [J]. *Virologica Sinica*, 1999, **14**(2): 100—105. [赵以军, 石正丽, 黄国锦, 等. 蓝藻病毒(噬藻体)的研究进展[J]. 中国病毒学, 1999, **14**(2): 100—105]
- [2] Zhao Y J, Shi Z L. Viruses and virus like particles of eukaryotic algae [J]. *Virologica Sinica*, 1996, **11**(2): 93—100. [赵以军, 石正丽. 真核藻类的病毒和病毒类粒子(VLPs) [J]. 中国病毒学, 1996, **11**(2): 93—100]
- [3] Wommack K E, Colwell R R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, **64**(1): 1092—1172
- [4] Bergh O, Orsheim K Y, Bratbak B G, et al. High abundance of viruses found in aquatic environments[J]. *Nature*, 1989, **340**: 467—468
- [5] Suttle C A. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity[J]. *Nature* (London), 1990, **347**: 467—469
- [6] Paul J H., Rose J B, Jiang S C, et al. Coliphage and indigenous phage in Mamala Bay, Oahu, Hawaii [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**: 133—138
- [7] Suttle C A. Enumeration and isolation of viruses [A]. *Aquatic microbial ecology* [C]. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993, 121—134
- [8] Suttle C A. Community structure: viruses [A]. *Manual of environmental microbiology* [C]. Washington DC: ASM Press, 1997, 272—277
- [9] Weinbauer M C., Suttle C A. Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters[J]. *Aquat. Microb. Ecol.*, 1997, **13**: 225—232
- [10] Marie D, Brissard C P, Thyraug R, et al. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**: 45—52
- [11] Noble R T, Fuhrman J A. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria[J]. *Aquat. Microb. Ecol.*, 1998, **14**: 113—118
- [12] Xenopoulos M A, Bird D F. Virus alla sauce Yø-Pro: microwave enhanced staining for counting viruses by epifluorescence microscopy [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 1997, **42**: 1648—1650
- [13] Hennes K P, Suttle C A. Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 1995, **40**: 1050—1055
- [14] Bettarel Y, Sime Ngando T, Amblard C, et al. A Comparison of Methods for Counting Viruses in Aquatic Systems [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 2283—2289
- [15] Nuria G B, Kristine L, Carlos P A. Viral lysis and bacterivory during a phytoplankton bloom in a coastal water microcosm [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 1949—1958
- [16] Chen F, Lu J R, Brian J B, et al. Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR Gold [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 539—545
- [17] Li W K, Dickie P M. Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and viroplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry [J]. *Cytometry*, 2001, **44**(3): 236—246
- [18] Proctor L M, Fuhrman J A. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria [J]. *Nature* (London), 1990, **343**: 60—62
- [19] Proctor L M, Okubo A, Fuhrman J A. Calibrating estimates of phage induced mortality in marine bacteria: ultrastructural studies of marine bacteriophage development from one step growth experiments [J]. *Microb. Ecol.*, 1993, **25**: 161—182
- [20] Suttle C A. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities [J]. *Microb. Ecol.*, 1994, **28**: 237—243
- [21] Stewart G F, Wikner J, Cochlan W P, et al. Estimation of virus production in the sea. I. Method development. *Mar. Microb. Food Webs*, 1992, **6**: 57—78
- [22] Wikner J, Vallino J J, Stewart G F, et al. Nucleic acids from the host bacterium as a major source of nucleotides for three marine bacteriophages [J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1993, **12**: 237—248
- [23] Noble R T, Fuhrman J A. Rapid virus production and removal as measured with fluorescently labeled viruses as tracers [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(9): 3790—3797
- [24] Stewart G F, Smith D C, Azam F. Abundance and production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi seas [J]. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1996, **131**: 287—300
- [25] Bratbak G., Egge J K, Heldal M. Viral mortality of the marine alga *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms [J]. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1993, **93**: 39—48
- [26] Heldal M, Bratbak G.. Production and decay of viruses in aquatic environments [J]. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1991, **72**: 205—212
- [27] Suttle C A, Chan A M. Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus* spp [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**: 3167—3174
- [28] Chen F, Suttle C A, Short S M. Genetic diversity in marine algal virus communities as revealed by sequence analysis of DNA polymerase genes [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**(8): 2869—2874
- [29] Chen F, Suttle C A. Evolutionary relationships among large double stranded DNA viruses that infect microalgae and other organisms as inferred from DNA polymerase genes [J]. *Virology*, 1996, **219**(1): 170—178
- [30] Wommack K E, Ravel J, Hill R T, et al. Hybridization analysis of Chesapeake Bay viroplankton [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**(1): 241—250
- [31] Lin E L, Tomita A V, Thilly W G, et al. Combination of competitive quantitative PCR and constant denaturant capillary electrophoresis for high resolution detection and enumeration of microbial cells [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(9): 3897—3903
- [32] Zhang Q Y. Virioplankton [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(6): 691—696. [张奇亚. 浮游病毒水生生物学报, 2002, **26**(6): 691—696]