

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2020.12.008

从猪粪便中分离纯化毕氏肠微孢子虫的改良方法

莫碧莹^{1,2}, 焦寒伟³, 徐金智^{1,2}, 罗 碱^{1,2},
倪文佳^{1,2}, 李 田^{1,2}, 包佳玲^{1,2}, 周泽扬^{1,2,4}

1. 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715;
2. 西南大学 微孢子虫感染与防控重庆市重点实验室, 重庆 400715;
3. 西南大学 动物科学学院/兽医科学工程研究中心, 重庆 荣昌 402460; 4. 重庆师范大学, 重庆 401331

摘要: 为了从粪便样品中获得纯度更高的毕氏肠微孢子虫(*Enterocytozoon bieneusi*, *E. bieneusi*), 我们从患腹泻病症的猪粪便中, 通过改良网孔过滤、Percoll 等密度离心以及蔗糖梯度离心等步骤, 将粪便中的杂质去除, 获得纯度更高的毕氏肠微孢子虫。同时在纯化的必要环节进行 PCR 法辅以韦伯氏染色法对获得的样品进行鉴定, 从而进一步提高纯化的目的性和准确性。此方法大大提高了所获得毕氏肠微孢子虫的纯度, 最高能达到占样品总微生物的 15%。比现有报道的 9% 提高了近 1 倍。毕氏微孢子虫感染人类和牲畜, 严重威胁公共卫生健康。但由于其在体外纯化和繁殖困难, 关于它致病机理的研究非常有限。通过此改良方法获得更加纯化的毕氏肠微孢子虫, 为开展更深入的研究提供了坚实的基础。

关 键 词: 毕氏肠微孢子虫; 粪便样品; 纯化; PCR; 韦伯氏染色

中图分类号: Q93-331

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2020)12-0067-06

微孢子虫是一大类专性细胞内寄生的单细胞真核生物^[1]。微孢子虫具有广泛的宿主范围, 它们可以感染几乎所有种类的动物, 包括人类^[2]。微孢子虫感染已被认为是人类微孢子虫病的致病原因。这些感染大多数发生在免疫力低下的患者身上, 例如艾滋病患者、癌症患者以及移植受者中^[3]。人微孢子虫感染主要是由毕氏肠微孢子虫(*Enterocytozoon bieneusi*, *E. bieneusi*)、海伦脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon hellem*)、肠脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon intestinalis*)等。其中, 最常见的是毕氏肠微孢子虫(*Enterocytozoon bieneusi*)。艾滋病患者中高达 50% 原因不明的慢性腹泻症状很可能就是 *E. bieneusi* 造成的^[4-5]。这种微孢子虫在肠外的传播不那么普遍, 但越来越多的证据表明, 在眼睛、呼吸道和人体其他部位也可能存在该种微孢子虫^[6-7]。

毕氏肠微孢子虫是临床上感染人类最重要的微孢子虫, 同时也是能感染其他大型哺乳类动物的微孢子虫^[8]。其感染畜类如猪、牛、羊等, 并引起人畜共患微孢子虫病, 是对公共卫生健康的一大威胁^[9-11]。尽管控制毕氏肠微孢子虫感染对人类健康很重要, 但对该病原的感染机理研究非常有限, 目前的研究进展仍局限在流行病学调查和基因型鉴定方面。主要原因是 *E. bieneusi* 难以在体外纯化和繁殖^[12]。孢子与其他肠道微生物混在一起, 相对于其他微生物, 孢子的含量很低, 其识别过程复杂且耗时。到目前为止, 从粪便中纯化的 *E. bieneusi*, 其最佳纯度占其他肠道微生物还不到 10%^[13]。这样的纯度导致其纯化的孢子量几乎

收稿日期: 2019-11-09

基金项目: 重庆市留创计划基金项目(cx2018087); 国家自然科学基金项目(31802141)。

作者简介: 莫碧莹(1993-), 女, 硕士研究生, 主要从事微生物学的研究。

通信作者: 包佳玲, 博士, 副教授。

不能维持随后的体外培养. 缺乏 *E. bieneusi* 孢子的来源已经限制了该病原体的基础研究、诊断试剂以至新型治疗策略的运用.

在本研究中, 我们设计了一种从患腹泻病症的猪粪便中纯化 *E. bieneusi* 孢子的新方法. 该新方法在先前报道方法的基础上^[13-14], 经过了多个步骤的改良, 以提高 *E. bieneusi* 孢子的最终产量和纯度. 改良的内容包括: 更多次数的筛网过滤、Percoll 等密度离心以及蔗糖梯度离心, 辅以 PCR 和韦伯氏染色法进行分析. 通过此改良方法所获得的纯度更高的毕氏肠微孢子虫, 为后续开展针对其致病机理等更深入的研究提供了基础.

1 材料和方法

1.1 收集猪粪样本

猪粪便样品是从西南大学兽医科学工程研究中心的含水腹泻猪粪中收集的. 将粪便保存在一次性塑料容器中, 然后使用特异引物通过 PCR 筛选 *E. bieneusi* 孢子呈阳性的样品. 阳性水样粪便将进行进一步处理.

1.2 筛网过滤

猪粪样品中 *E. bieneusi* 阳性粪便样品经过连续筛网过滤, 即 45 目(325 mm)筛网过滤, 紧接着经过 80 目(180 mm)筛网过滤. 这样, 粪便中除微生物以外的大部分残渣都被过滤掉了, 样品杂质更少.

1.3 盐浮选

通过盐浮选步骤进一步富集孢子. 将 1 体积的粪便样品(10 mL)与 2 体积的饱和氯化钠溶液(20 mL)混合, 并将该混合物在室温下以 1 000 g 离心 15 min. 这个过程为我们提供了 3 个部分的样品: 顶带、沉淀和悬浮液. 然后, 我们通过 PCR 和韦伯氏染色验证 *E. bieneusi* 的存在. 将悬浮液离心收集沉淀, 并用蒸馏水洗涤 5 次, 重悬以进行进一步处理.

1.4 Percoll 和蔗糖离心

等密度 Percoll(80%)和连续蔗糖梯度(35%~60%)离心, 以进一步富集样品中的孢子. 将 1 体积的悬浮液与 9 体积的 80%Percoll 混合. 然后在室温下以 10 300 g 离心 20 min. 通过 PCR 和韦伯氏染色检测 *E. bieneusi* 的存在, 然后收集含有病原体的部分并重悬. 将重悬样品添加到蔗糖连续梯度中, 并在 4 ℃下以 78 600 g 离心 2 h. 通过 PCR 和韦伯氏染色验证 *E. bieneusi* 的存在.

1.5 PCR 和韦伯氏染色

使用 Qiagen DNA 提取试剂盒(Qiagen, Germany), 按照说明书从样品中提取总 DNA. 使用专门针对微孢子虫设计的引物, 对所获得的样品进行 PCR 扩增. 微孢子虫通用引物序列为 GForward: CACCAG-GTTGATTCTGCCTGAC; GReverse: CCTCTCCGGAACCAAACCCTG. *E. bieneusi* 特异引物序列为 SForward: TCGGCTCTGAATATCTATGG; SReverse: ATTCTTTTCGCGCTCGTC(表 1). PCR 双重阳性且测序结果正确的样品鉴定为含有 *E. bieneusi* 的样品.

表 1 实验中使用的引物

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段长度/bp
GForward	CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC	250
GReverse	CCTCTCCGGAACCAAACCCTG	
SForward	TCGGCTCTGAATATCTATGG	
SReverse	ATTCTTTTCGCGCTCGTC	410

韦伯氏染色方法: 将样品置于适量铬变素染色液中, 在室温下放置 90 min, 染色液必须完全覆盖样品. 在室温下, 置于醋酸酒精中洗 10 s 以上. 在 96%的酒精中固定脱水 5 min, 随后在 100%的纯酒精中固定脱水 10 min, 干燥后在二甲苯中固定、脱水、透明 10 min. 然后用甘油和指甲油密封, 以备光学显微镜观察. 经韦伯氏染色后的微孢子虫孢子将呈粉红色, 长度为 1~2 μm.

2 结果和分析

2.1 毕氏肠微孢子虫的富集和纯化

猪粪样品先经过 45 目(325 mm)筛网过滤, 紧接着经过 80 目(180 mm) 筛网过滤. 过滤步骤可有效去除大量食物颗粒和碎屑, 经此过程后样品杂质极大减少. 接下来, 盐浮选后我们得到 3 个部分的样品: 顶部带、沉淀和介于两者之间的悬浮液. 然后, 我们通过 PCR 和韦伯氏染色验证了 *E. bienersi* 的存在. 结果表明, 中间悬浮液富集了 *E. bienersi* 的孢子 (图 1).

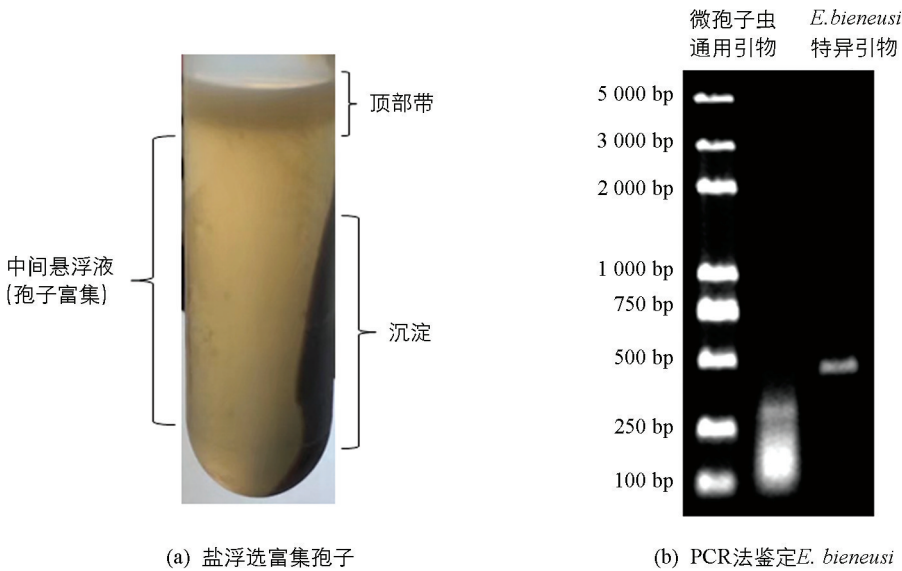
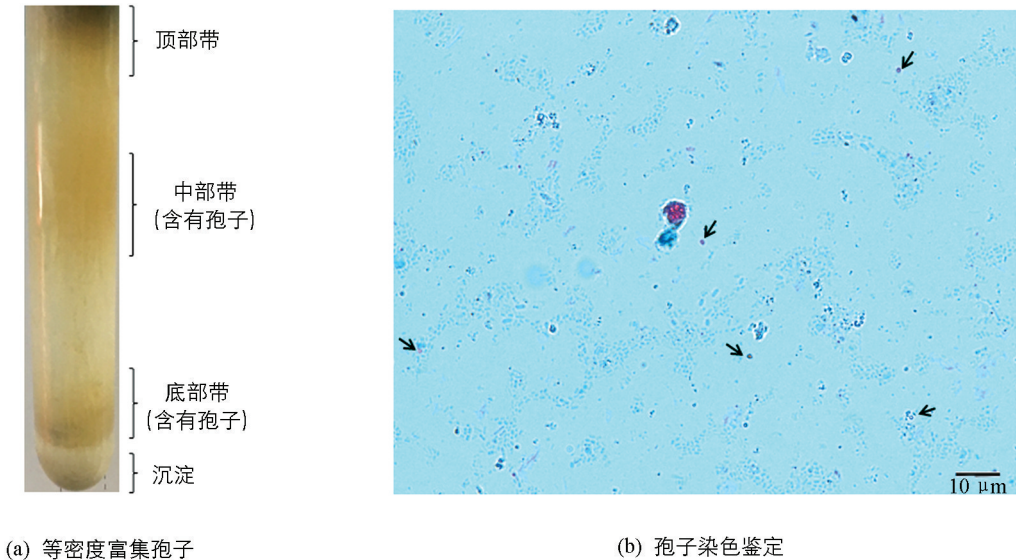


图 1 通过盐浮选富集 *E. bienersi* 孢子

然后将样品进行 80% 等密度 Percoll 纯化. 离心后, 样品分为 4 个部分 (图 2). 通过 PCR 和韦伯氏染色, 我们确认了沉淀上方两个带含有干净的孢子. 然后将这两部分合并在一起, 进行蔗糖连续梯度离心. 蔗糖连续梯度离心法得到 4 个部分的样品: 顶部带、中部带、底部带和沉淀. 通过 PCR 和韦伯氏染色, 我们鉴定出大部分 *E. bienersi* 孢子在底部带中 (图 3).



大小为 1~2 mm 的 *E. bienersi* 孢子呈粉红色, 中间淡染或苍白 (箭头)

图 2 Percoll 等密度离心富集 *E. bienersi* 孢子

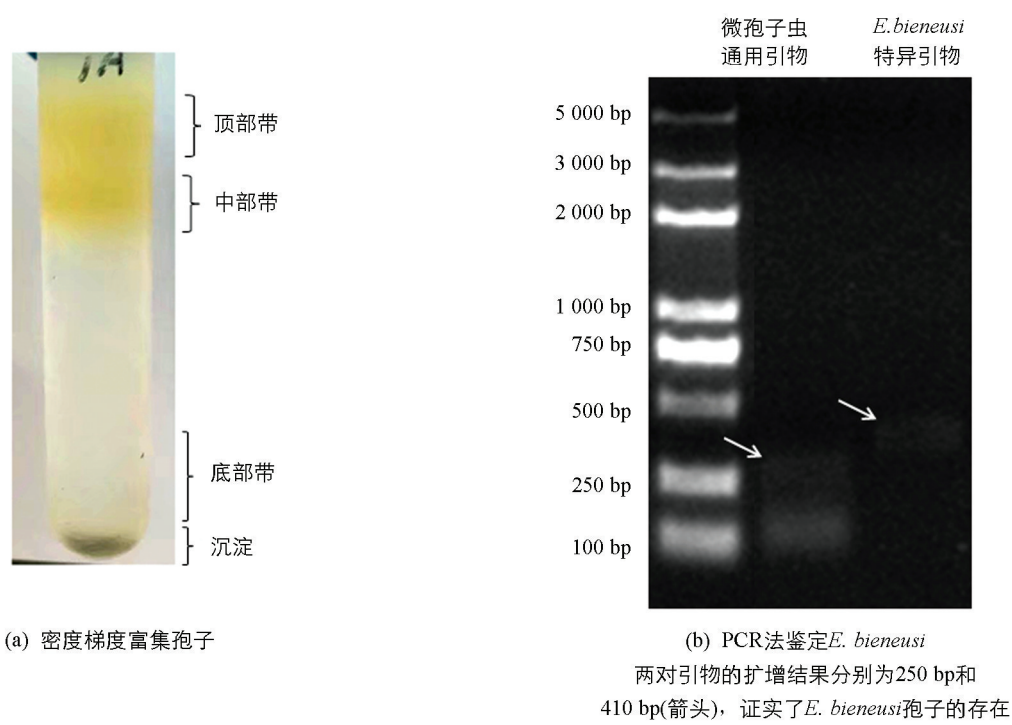


图 3 连续蔗糖密度梯度离心富集 *E. bieneusi* 孢子

2.2 纯化效率

使用当前改良的方法，在样品所有微生物中纯化的孢子产率高达 15 % (图 4)。与以前报道的孢子产生约为 9 % 的方法相比，我们的改良方法将 *E. bieneusi* 的孢子纯度提高了近 1 倍。这是从粪便中富集和纯化 *E. bieneusi* 孢子的极大改进，将大大促进该领域的研究。

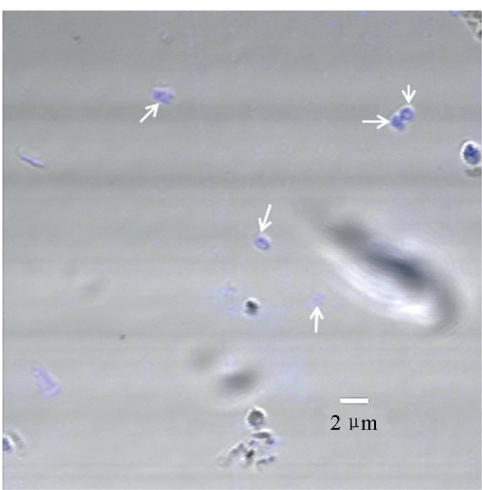
2.3 电子显微镜下的 *E. bieneusi* 孢子

使用扫描电子显微镜 (SEM) 以及透射电镜 (TEM) 进一步观察纯化的 *E. bieneusi* 孢子。在显微镜下，孢子大小为 1~2 μm，并且能观察到孢子内的微管结构 (图 5)。

3 讨论

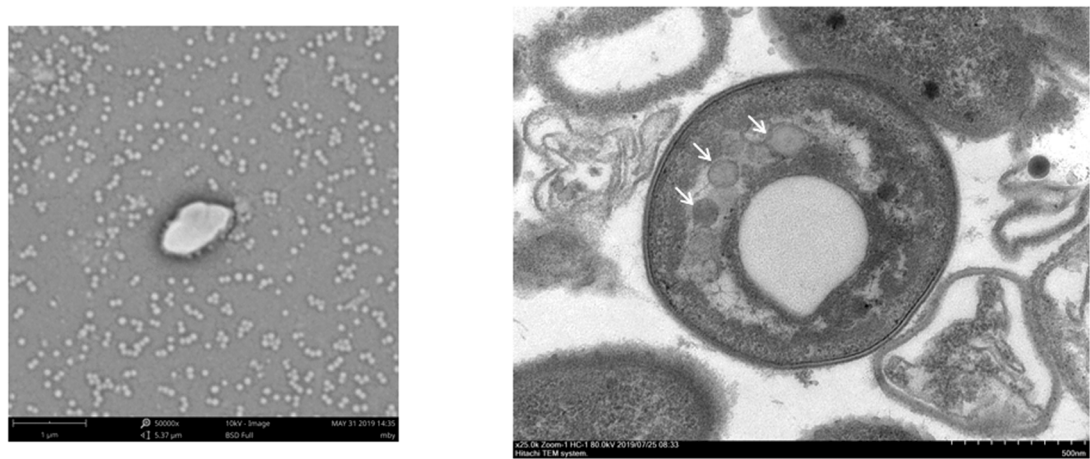
我们在这里设计了一种从猪粪便中分离纯化毕氏肠微孢子虫的改良方法，用于从猪的大量含水腹泻粪便中纯化 *E. bieneusi* 孢子。在此之前，所报道的方法多是直接使用等密度 percoll 离心和蔗糖密度梯度离心从 HIV 患者的粪便中纯化 *E. bieneusi* 孢子，但这些方法效果不佳。例如，其中一个步骤设计在 10 ℃ 下离心 24 h^[13]，这非常耗时并且纯化的孢子量低。更重要的是，最终产物中所含的 *E. bieneusi* 孢子纯度非常低。根据这些报道的方法，从粪便中提取 *E. bieneusi* 孢子的回收率为 1.7 %，最高也只可达 9.1 %。这种低纯度的病原体使得随后的体外培养非常困难^[15]，为了获得更多更干净的 *E. bieneusi* 孢子，迫切需要一种改进的方法。

在上述基础上，我们改良出了一种新颖的从粪便中分离纯化 *E. bieneusi* 孢子的方法。首先，使用连续的筛网去除粪便中的大颗粒和碎屑，此步骤能极大地提高样品的纯度，还能提高随后 percoll 和蔗糖密度梯度离心分离步骤的效率。我们做出的第 2 个改良是 percoll 等密度离心紧接着蔗糖密度梯度离心。通过适当的调整介质浓度和离心速度，我们可以大大减少离心时间，并且提高分层效率。通过这样的改良，可以为



富集的 *E. bieneusi* 孢子显示为蓝色。
且纯化的 *E. bieneusi* 孢子 (箭头) 非常干净。
图 4 荧光增白剂染色确认 *E. bieneusi* 孢子

我们节省 1 d 的处理时间, 总用时从 24 h 降低到 5 h. 最重要的是, 这种改良并没有牺牲产量, 还大大增加了最终样品的纯度, 原因可能是减少处理时间可以避免干扰并提高纯度.



(a) 扫描电子显微镜(SEM)观察纯化的
*E. bienersi*孢子(比例尺为1 μm)

(b) 透射电子显微镜(TEM)观察纯化的
*E. bienersi*孢子(极管如箭头所示, 比例尺为500 nm)

图 5 电子显微镜下的 *E. bienersi* 孢子

本方法所进行的另一项改进是, 在整个过程中都同时使用了 PCR 和韦伯氏染色进行检测, 以确保分离步骤的准确性和目的性, 因此大大提高了最终产物中 *E. bienersi* 孢子的纯度. 目前鉴定微生物的主要方法是基于 ITS 测序, 结合形态学观察^[16]. 因此, 我们同时使用了微孢子虫的通用引物和 *E. bienersi* 特异性引物, 以确保在每个步骤和每个分离样品部分中都存在 *E. bienersi* 孢子. 此外, 韦伯氏染色对于 *E. bienersi* 孢子的染色特异性非常高^[14]. 孢子显示为粉红色, 中间淡染或苍白, 这很容易与样品中的其他微生物区分开. 传统的染色方法如荧光增白剂染色法, 对微孢子虫特异性不强, 因为荧光增白剂标记的是几丁质, 而几丁质也存在于粪便里大量存在的酵母的细胞壁中. 因此, 将 PCR 和韦伯氏染色相结合可以避免假阳性, 从而显著提高 *E. bienersi* 孢子的最终纯度.

综上所述, 我们改良的方法新颖且省时, 同时极大地提高了粪便样品提纯最终产物中毕氏肠微孢子虫的纯度. 有了更多纯化的 *E. bienersi* 孢子, 研究人员将有更多机会在体外培养这种病原体, 并对其进行研究, 从而制定出更有效的预防和治疗策略以改善人类福祉.

参考文献:

[1] TROEMEL E R, FÉLIX M A, WHITEMAN N K, et al. Microsporidia are Natural Intracellular Parasites of the Nematode *Caenorhabditis Elegans* [J]. *PLoS Biology*, 2008, 6(12): 2736-2752.

[2] WEBER R, BRYAN R T, SCHWARTZ D A, et al. Human Microsporidial Infections [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1994, 7(4): 426-461.

[3] WEBER R, BRYAN R T. Microsporidial Infections in Immunodeficient and Immunocompetent Patients [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 1994, 19(3): 517-521.

[4] DIDIER E S, WEISS L M. Microsporidiosis; not Just in AIDS Patients [J]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2011, 24(5): 490-495.

[5] SAK B, BRADY D, PELIKANNOVA M, et al. Unapparent Microsporidial Infection among Immunocompetent Humans in the Czech Republic [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49: 1064-1070.

[6] KICIA M, SEDZIMIRSKA M, SAK B, et al. Respiratory Microsporidiosis Caused by *Enterocytozoon Bienersi* in an HIV-negative Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipient [J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2018, 77: 26-28.

[7] NAGPAL A, PRITT B S, LORENZ E C, et al. Disseminated Microsporidiosis in a Renal Transplant Recipient: Case Report and Review of the Literature [J]. *Transplant Infectious Disease*, 2013, 15: 526-32.

[8] SING A, TYBUS K, HEESEMANN J, et al. Molecular Diagnosis of an *Enterocytozoon Bienersi* Human Genotype C Infection in a Moderately Immunosuppressed Human Immunodeficiency Virus- Seronegative Liver-Transplant Recipient

- with Severe Chronic Diarrhea [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(6): 2371-2372.
- [9] PRASERTBUN R, MORI H, PINTONG A R, et al. Zoonotic Potential of Enterocytozoon Genotypes in Humans and Pigs in Thailand [J]. *Veterinary Parasitology*, 2017, 233: 73-79.
- [10] Li W, Feng Y Y, Santin M. Host Specificity of *Enterocytozoon bieneusi* and Public Health Implications [J]. *Trends Parasitol*, 2019, 35: 436-51.
- [11] QIU L Y, XIA W Y, LI W D, et al. The Prevalence of Microsporidia in China: a Systematic Review and Meta-analysis [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 3174.
- [12] VISVESVARA G S, LEITCH G J, PIENIAZEK N J, et al. Short-Term in Vitro Culture and Molecular Analysis of the Microsporidian, Enterocytozoon Bieneusi [J]. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1995, 42(5): 506-510.
- [13] SHEORAN A S, FENG X, KITAKA S, et al. Purification of Enterocytozoon Bieneusi from Stools and Production of Specific Antibodies [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(1): 387-392.
- [14] DEL AGUILA C, LOPEZ-VELEZ R, FENOY S, et al. Identification of Enterocytozoon Bieneusi Spores in Respiratory Samples from an AIDS Patient with a 2-year History of Intestinal Microsporidiosis [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(7): 1862-1866.
- [15] VISVESVARA G S. In Vitro Cultivation of Microsporidia of Clinical Importance [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15(3): 401-413.
- [16] 吴燕燕, 耿敬可, 徐 思, 等. 重庆地区草地贪夜蛾幼虫肠道真菌的分离鉴定 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(9): 1-8.

An Improved Method for Purifying *Enterocytozoon bieneusi* Spores Isolated from Stool Samples of Swine

MO Bi-ying^{1,2}, JIAO Han-wei³, XU Jin-zhi^{1,2}, LUO Jian^{1,2},
NI Wen-jia^{1,2}, LI Tian^{1,2}, BAO Jia-ling^{1,2}, ZHOU Ze-yang^{1,2,4}

1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Chongqing Key Laboratory of Microsporidia Infection and Control, Southwest University, Chongqing 400715, China;
3. Veterinary Science Engineering Research Center/College of Animal Science and Technology, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China;
4. Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

Abstract: In order to obtain better purified *Enterocytozoon bieneusi* spores. *E. bieneusi* spores from the stool samples of diarrhea swine were purified by a combination procedure of continuous mesh sieve filtration, isopycnic Percoll and sucrose gradient centrifugation. PCR and Weber's Chromotrope-based staining analysis were performed to assess the purified samples obtained so as to ensure the accuracy of purification. The results showed that this method greatly improved the purity of the pathogen. The yield of purified *E. bieneusi* spores was as high as 15%, nearly 1 folds as much as the reported 9%. In conclusion, *E. bieneusi* is the representative microsporidia which infects both human and livestock, and is a big threat to public health. However the studies about *E. bieneusi* are very limited, due to the difficulty of purification and propagation in vitro. This modified method dramatically improves the yield of *E. bieneusi* spores in stool samples, and with the better purified *E. bieneusi*, investigators would be able to launch more studies of this health-threatening pathogen.

Key words: *Enterocytozoon bieneusi*; stool sample; purification; PCR; Weber's Chromotrope-based staining