

一种新的病毒空斑技术

孟继鸿 张建峰

(南京铁道医学院微生物学教研室)

摘要 本文报道了一种不同于 Dulbecco 细胞单层法和 Cooper 琼脂细胞悬浮法的病毒空斑技术——速成单层法病毒空斑试验。用 24 孔细胞培养板,不经预先制备细胞单层,将 Vero 细胞和水泡性口炎病毒 Indiana 株同时加入培养孔内,使细胞在贴壁的同时被病毒吸附,继后在营养凝胶下,细胞形成单层的同时病毒产生空斑。结果表明,此法简单快速,稳定可靠,经济节约,方便易行。用于单纯疱疹病毒分型的鸡胚细胞空斑形成试验,亦获得满意结果。

关键词 速成单层法病毒空斑技术; Vero 细胞;水泡性口炎病毒 (VSV) Indiana 株

病毒空斑技术在病毒学研究中应用十分广泛,然而其方法三十多年来只有 Dulbecco 细胞单层法和 Cooper 琼脂细胞悬浮法两种^[1],前者需在较多的培养器皿中预制良好的致密细胞单层,费时费力,后者所需细胞浓度高,用量大,且又不适用于大病毒。我们于实验中观察到刚贴壁的细胞即能在营养凝胶下生长、繁殖,并可在短小时内迅速形成致密细胞单层,从而设计了一种速成单层法病毒空斑技术,采用半微量细胞培养法,不经预制细胞单层,对水泡性口炎病毒 (VSV) Indiana 株的空斑滴定作了初步研究,并将此技术用于单纯疱疹病毒 (HSV) 分型的鸡胚细胞空斑形成试验^[2],获得满意结果。

材料和方法

(一) 细胞和病毒

Vero 细胞*以 15% 小牛血清 RPMI 1640 营养液传代培养。原代鸡胚细胞 (PCE) 以 10% 小牛血清 0.5% 水解乳蛋白 Hanks 液 (简称 LH 液) 为营养液按常规方法制备。VSV Indiana 株** (简称 VSV) 用 PCE 增殖, HSV-1 (SM44 株*、05 株*) 和 HSV-2 (Sav 株*、333 株***) 用原代乳兔肾细胞增殖,待 CPE 达“+++”时收获,冻融、离心后,取上清液分装, -40℃ 保存备用。

(二) 营养凝胶覆盖物的配制

取 30% 小牛血清双倍浓度 RPMI 1640 营养液和 20% 小牛血清双倍浓度 LH 液若干毫升, 45℃ 水浴预热后,各混以等量溶化的 1.4% 琼脂糖 (45℃), 制得凝胶浓度为 0.7% 的 RPMI 1640 和 LH 营养覆盖物, 分别用于 Vero 细胞和 PCE。

(三) 速成单层法 VSV 空斑滴定

取无菌 24 孔平底有盖细胞培养板, 分别加入不同稀释度的 VSV 悬液 0.1ml/孔, 继之加入 Vero 细胞 (55—60 万/ml) 0.5ml/孔, 摇匀, 置入 3% CO₂ 培养箱 37℃ 孵育 1 小时, 使病毒吸附、细胞贴壁, 取出后吸去上层液体, 加入 RPMI 1640 营养凝胶 0.5ml/孔, 凝胶凝固后反置于 3% CO₂ 培养箱, 37℃ 孵育 48 小时, 最后加入 10% 福尔马林·1% 结晶紫固定染色液 0.2 ml/孔, 37℃ 4—5 小时 (或过夜) 后用水冲去凝胶覆盖层, 肉眼计数空斑。

(四) 速成单层法 HSV 鸡胚细胞空斑分型

基本步骤如 (三), 不同的是加入 PCE (50 × 10⁶/ml) 0.4ml/孔, 待病毒吸附、细胞贴壁 2 小时后, 再加入 LH 营养凝胶 0.3ml/孔, 37℃ 孵育 72 小时, 最后加入 1:1000 中性红水溶液 0.2

* 武汉大学病毒学系惠赠

** 上海第二军医大学微生物学教研室惠赠

*** 湖北医学院肿瘤科惠赠

ml/孔, 37℃2—4 小时后肉眼或镜下观察 HSV 空斑, 根据两型 HSV 在 PCE 上所形成的空斑的大小不同进行分型^[2]。

结 果

(一) 速成单层法单层形成和病毒出斑情况

以 Vero 细胞对 VSV 进行速成单层法滴定时, Vero 细胞在 0.7% RPMI 1640 营养凝胶下, 一般 6—8 小时细胞单层就基本形成, 10—12 小时即可形成致密细胞单层(图版 I-1)。孵育 16—24 小时, 镜下可见 VSV 空斑出现, 尽管数量较少, 范围也只有几个细胞, 但细胞已结构模糊, 病变明显, 24 小时后空斑数目不断增加, 直至 40 小时后才趋减缓, 通常 48 小时后空斑数目不再增加或增加很少, 此时空斑区部分细胞已裂解, 圆形空斑边缘清楚, 直径大多在 0.8—1.0mm 左右, 经福尔马林·结晶紫固定染色后, 肉眼清晰易数(图版 I-2)。以病毒稀释度为 10^{-5} 的 4 个孔计数空斑后计算空斑形成单位 (PFU), 其滴定效价为 2.0×10^7 PFU/ml。

(二) 速成单层法空斑数目与细胞浓度的关系

制备细胞浓度分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 和 7×10^6 /ml 的 Vero 细胞悬液, 再取定量 VSV, 按速成单层法, 每个细胞浓度各接种 12 孔进行空斑滴定, 结果空斑数目随细胞浓度增高而增加; 在细胞浓度较低时, 空斑数目增加较快, 当细胞浓度增高到一定程度时空斑数目增加减缓, 并可出现波动(如图 1)。

(三) 速成单层法空斑数目与病毒浓度的关系

取定量 VSV, 再制成 25%、50%、75% 和 100% 四个不同相对浓度的悬液, 按速成单层法各接种 12 孔进行空斑滴定, 结果空斑数目随病毒浓度的增高而增加, 二者基本呈线性关系(如图 2)。

(四) 速成单层法的可重复性

1. 同份 VSV 10^1 倍稀释后, 同时在 3 批

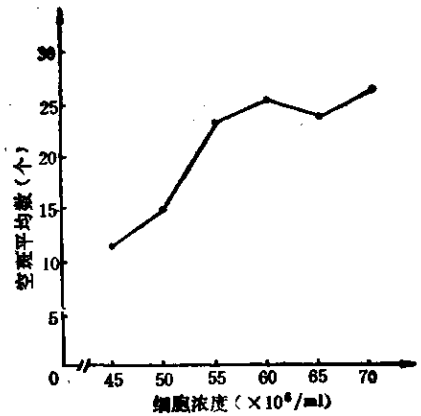


图 1 速成单层法空斑数目与细胞浓度的关系

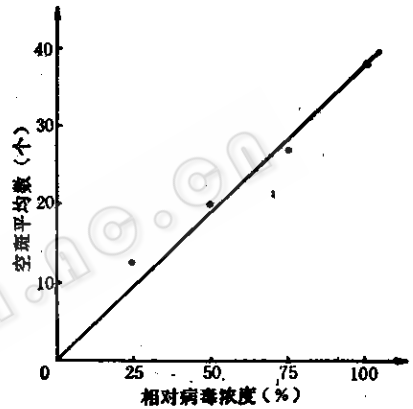


图 2 速成单层法空斑数目与病毒浓度的关系

Vero 细胞上按速成单层法进行空斑滴定, 每个稀释度接种 4 孔, 结果同份病毒在不同批细胞上所得的空斑数目相近(见表 1)。应用方差分

表 1 同份病毒不同批细胞速成单层法的可重复性

细胞批号	病毒稀释度	每孔空斑数目	空斑平均数
1	10^{-5}	17, 17, 16, 14	16.00
2	10^{-5}	12, 23, 14, 14	15.75
3	10^{-5}	12, 20, 19, 19	17.50

析统计处理, $F = 0.2784 < F_{0.05(2,9)} = 4.26$, $P > 0.05$, 差异无显著性。

2. 另一同份 VSV 10^1 倍稀释后分装 3 份, 保存于 -40°C , 每隔 2—3 天取出 1 份按速成单层法进行空斑滴定, 每个稀释度接种 4 孔, 结果同份病毒在不同时间所得的空斑数目也相近(见表 2)。应用方差分析统计处理, $R =$

3.2820 < $F_{0.05(2,9)} = 4.26$, $P > 0.05$, 无显著性差异。

表2 两份病毒不同时间速成单层法的可重复性

实验批号	病毒稀释度	每孔空斑数目	空斑平均数
1	10 ⁻³	23,21,25,19	22.00
2	10 ⁻³	25,28,23,30	26.50
3	10 ⁻³	21,23,25,24	23.25

(五) 速成单层法 HSV 鸡胚细胞空斑分型

以4株已知型别的 HSV, 应用速成单层法进行原代鸡胚细胞空斑形成试验, 所得空斑呈圆形, 边缘清晰, HSV-1 空斑较小, 直径大多在 0.3—0.4mm 之间, HSV-2 空斑较大, 多为 0.9—1.0mm。虽然 HSV-1 也可见少量较大空斑, HSV-2 有少量较小空斑, 但 HSV-1 空斑的最大直径仍明显小于 HSV-2 的最小直径。按空斑大小进行 HSV 分型, 实验结果与已知型别完全相符(见表3)。

表3 四株 HSV 空斑大小的比较

型	株	空斑直径 (mm)			分型结果
		最大	最小	平均*	
HSV-1	SM44	0.55	0.25	0.38	HSV-1
HSV-1	05	0.40	0.25	0.31	HSV-1
HSV-2	333	1.30	0.75	1.08	HSV-2
HSV-2	Sav	1.25	0.75	0.94	HSV-2

* 为随机测量 10 个空斑直径而得的平均数。

讨 论

刚贴壁于硬质支架的细胞能在营养凝胶下生长繁殖, 并能迅速形成致密细胞单层, 这一新的实验现象的发现, 为我们建立速成单层法病毒空斑技术提供了实验依据。因此, 速成单层法与 Dulbecco 细胞单层法^[3]和 Cooper 琼脂细胞悬浮法不同, 可将细胞和病毒一起加入培养孔内, 使细胞在贴壁的同时被病毒吸附, 然后在营养凝胶下, 细胞形成单层的同时病毒产生空斑, 从而避免了 Dulbecco 法必须预制细胞单层

和 Cooper 法细胞用量大、不适用于大病毒的不足, 简化了操作步骤, 缩短了空斑试验的周期。若以 Dulbecco 法进行 Vero-VSV 空斑滴定, 则要化 2—3 天来预制细胞单层, 4—5 天后才能获得滴定结果, 而速成单层法, 仅预制单层的时间就足以完成整个试验, 提高效率 1 倍以上; 假如以 Cooper 法进行 PCE-HSV 空斑试验, 则可能需用 10⁸/ml 数量级的 PCE^[4], 而速成单层法只需 10⁶/ml, 两者相差 100 倍左右, 并且象 HSV 这样的大病毒, Cooper 法是不适用的。

速成单层法空斑数目随细胞浓度的增高而增加。这是因为培养孔内细胞增多时, 可被病毒感染细胞也相应增多, 使病毒感染成功的机率增高, 以致出斑率也随之提高; 但当细胞增至一定量时, 对定量病毒而言可能已达到相对饱和状态, 此时再增加细胞量, 空斑数目就不再增加或增加很少; 如果细胞过多, 部分已吸附病毒的细胞因无贴壁之处而随上层液体被弃去, 以致空斑数目可能反而减少。

速成单层法空斑数目随病毒浓度的增高而增加, 二者呈线性关系, 这与 Dulbecco 法的结果^[3,5]相似。至于空斑数目的分布, 按 Dulbecco 和 Vogt 的推算^[5], 应呈波松分布, 从波松分布的方差等于其均数的特性, 本试验得到了两者相差甚微的结果, 故在统计处理时, 对数据进行了平方根变换。

Dulbecco 法预制的细胞单层, 其致密程度往往缺乏精确的客观指标。我们发现致密程度不同的单层对空斑滴定的结果有所影响, 致密程度高, 滴定效价也高, 这恰好与速成单层法空斑数目随细胞浓度而增加的关系是类同的。因此采用不同致密程度的单层, 必然会影响空斑滴定的可重复性, 而速成单层法, 通过细胞计数, 很易控制细胞数量, 加入定量细胞, 即能消除由于细胞量的多少对重复滴定的影响, 从而得到稳定一致的结果。

由上可见, 速成单层法病毒空斑技术, 不仅简单快速、经济节约, 而且稳定可靠、方便易行。我们认为, 只要细胞选用得当, 使单层形成的时间不长于病毒出斑所需的时间, 速成单层法必

能得到广泛应用,值得深入研究。

参 考 文 献

[1] 顾方舟主编: 脊髓灰质炎, 509 页, 上海科学技术出版社, 1984。

[2] Lowry, S. P., et al.: *J. Gen. Virol.* 10: 1—9, 1971.

[3] Dulbecco, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38: 747—752, 1952.

[4] Cooper, P. D.: *Virology.* 1: 397—401, 1955.

[5] Dulbecco, R. and Vogt, M.: *J. Exp. Med.* 99: 167—182, 1954.