

不同温度对油桐尺蠖核型多 角体病毒在卵巢细胞 系中增殖的影响

王录明 张英莲 谢天恩

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

本试验用油桐尺蠖核型多角体病毒 (Buzura Suppressaria Nuclear Polyhedrosis Virus) 感染油桐尺蠖卵巢细胞系, 分别置于0°C、15°C、20°C、26°C、28°C、30°C、37°C下静止培养, 观察细胞病理变化, 测定细胞的感染百分率和多角体含量。试验结果表明, 不同温度对病毒的感染率及其在细胞中复制有明显的影晌。26°C是油桐尺蠖核型多角体病毒感染卵巢细胞并形成多角体的最适培养温度, 感染率最高, 多角体含量也最多。培养温度过低或过高, 多角体都不能在细胞内复制。

1984—1985年刘松华等从油桐尺蠖卵巢组织中建立了一个新的细胞系^[1]。本试验用油桐尺蠖核型多角体病毒感染该细胞系, 并在不同温度下培养, 观察其效应, 筛选出增殖病毒的最适温度, 为用体外培养细胞大量生产病毒提供毒源和研制杀虫剂的可能性。

材料与方 法

一、细胞 油桐尺蠖成虫卵巢细胞系 (BS-484细胞系), 由本所昆虫病毒研究室刘松华赠与。

- 二、培养液^[1]**
1. 在 Grace 基础液中除去 NaHCO₃,
 补加 HEPES (0.002克/毫升),
 甘露醇 (0.002克/毫升),
 tryptone (0.0026克/毫升),
 及谷氨酰胺 (0.00025克/毫升), 85%
 2. 小牛血清 10%
 3. 蓖麻蚕血淋巴 5%

每毫升培养液中含青霉素100单位, 链霉素100单位, pH = 6.4。

三、病毒 选择室内饲养的健康4龄油桐尺蠖幼虫, 用提纯的油桐尺蠖核型多角体

悬液, 浓度为 1×10^7 个/毫升, 进行添食感染, 第五天镜检幼虫血球细胞核中有多角体出现后, 无菌操作收集病虫血淋巴, 用含有饱和苯基硫脲的培养液, 将病血淋巴稀释到 10^{-1} , 3500rpm 离心30分钟, 取上清液, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 孔径的微量滤器过滤, 作为感染细胞的病毒源^[2]。

四、培养方法 选用油桐尺蠖成虫卵巢细胞系, 传49代的细胞, 26°C恒温静止培养三天后, 计算细胞数, 其细胞浓度为 4×10^5 个/毫升。按每毫升细胞悬液中含0.1毫升的病毒悬液、共配制42毫升, 轻轻摇动1—2分钟, 26°C下吸附1—3小时, 充分摇匀, 分装到20毫升容量的培养瓶中, 每瓶2毫升, 分别置于0°C、15°C、20°C、26°C、28°C、30°C、37°C下静止培养, 每种温度3瓶, 对照组不加病毒悬液, 每组2瓶。

结果与讨论

一、细胞病变观察

用倒置光学显微镜历时27天对比观察(其中前一周每天作连续对比观察), 不同温度培养的感染细胞有较明显差异。20°C、26°C、28°C、30°C培养的感染细胞都能形成多角体(图版I, 图1—4); 37°C培养的感染细胞趋于死亡; 0°C、15°C培养的感染细胞一直到45天不能形成多角体。其细胞病变过程大体相同, 首先细胞膨胀, 细胞核内出现多角体, 由少而多, 当多角体充满整个细胞后, 细胞破裂, 成熟的多角体释放到细胞外。对照组细胞不发生病变, 细胞核内始终不出现多角体(图版II, 图3)结果见表1。

表 1 细胞病变观察结果
Table 1 Observations of Cytopathological effect

温 度	细胞形态及生长情况	细胞膨胀时间 (天)	细胞核内出现多角 体时间(天)	细胞内多角体释放细 胞外时间(天)
0°C	圆形悬浮细胞	不膨胀	无	无
15°C	以圆形为主, 少数梭形附壁 细胞。	10	无	无
20°C	圆形及较多梭形附壁细胞	7	10	15
26°C	圆形为主, 少数梭形细胞	3	5	10
28°C	圆形为主, 少数梭形细胞	3	5	7
30°C	圆形及较多梭形细胞	3	4	5
37°C	细胞内成网状、中空。出现 聚集成团的小细胞, 最后细 胞死亡	无	无	无

二、细胞的感染百分率

接种病毒后, 培养27天, 随机观察1000个以上细胞, 统计内含多角体的细胞数, 计

算感染百分率。结果见表 2。

表 2 细胞的感染百分率
Table 2 Infection Percentage of Cells

温 度	细胞总数 (个)	含多角体的细胞数 (个)	感染率%
0°C	1000	无	无
15°C	1000	无	无
20°C	1095	493	45
26°C	1054	562	54
28°C	1088	268	25
30°C	1074	175	16
37°C	1000	无	无

在 26°C 培养的细胞，其感染率最高，而 0°C 和 15°C 培养的细胞核中未形成多角体。但有趣的是，当培养一个月后，将 0°C 培养的细胞转移 26°C 下培养，结果先在 0°C 培养的细胞移置 26°C 者，在培养一周左右，少数细胞核中形成多角体，而在 15°C 培养的细胞转移在 26°C 培养 3 天，细胞核中就出现多角体，一周左右有大部分细胞内充满多角体，并有些多角体释放到细胞外，测得细胞感染率为 49%，而在 0°C 和 15°C 继续培养 45 天的感染细胞始终未形成多角体（图版 II，图 1—2）。

三、多角体含量的测定

感染细胞在不同温度下培养 27 天后，分别收集细胞悬液，用 Jc-3 超声处理机，振幅是 9—10，经过 2—3 分钟破碎细胞后，用血球计数器计多角体数量：0°C、15°C、37°C 培养感染的细胞多角体含量为零；20°C 培养感染的细胞多角体数量为每毫升 1.6×10^8 ；26°C 培养感染的细胞多角体含量为每毫升 2.0×10^8 ；28°C 培养感染的细胞多角体含量为每毫升 1.5×10^8 ；30°C 培养感染的细胞多角体含量为每毫升 1.4×10^8 。（见图 1）。

图版 I Plate I

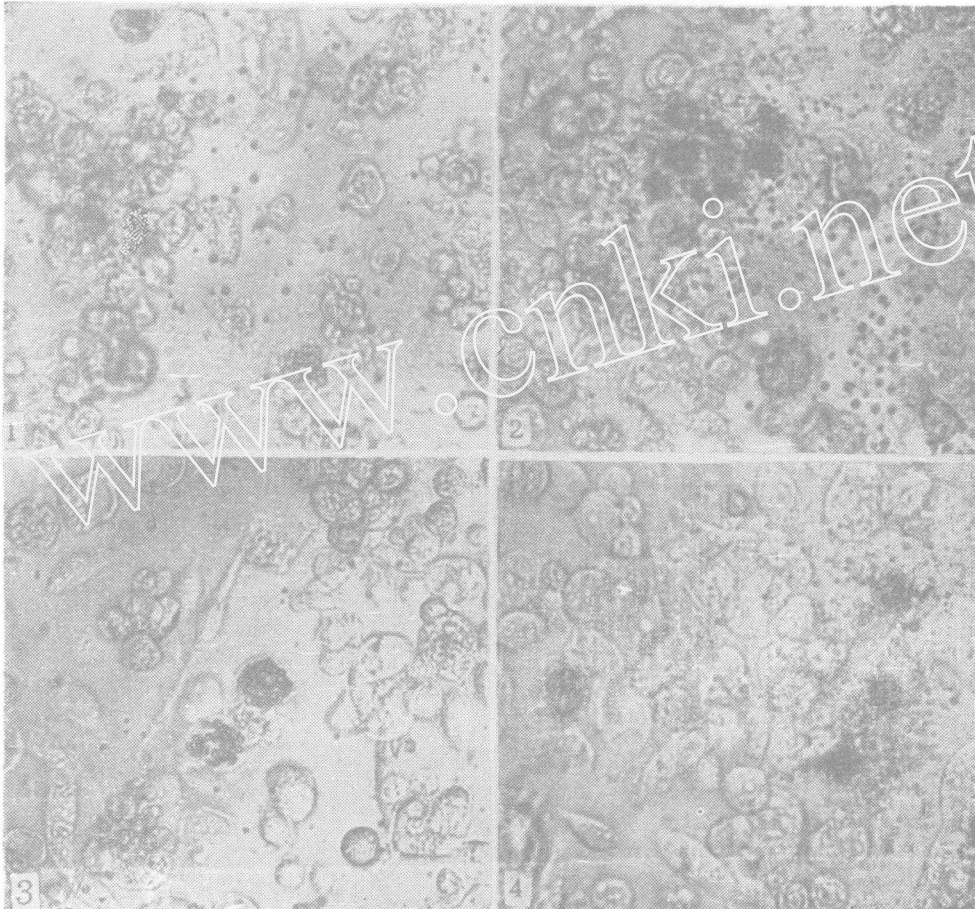


图1. 20°C 下培养27天的感染细胞 (×1000)

Fig1. Infected Cells Incubated for 27 Days at 20°C (×1000)

图2. 26°C 下培养27天的感染细胞 (×1000)

Fig2. Infected Cells Incubated for 27 Days at 26°C (×1000)

图3. 28°C 下培养27天的感染细胞 (×1000)

Fig3. Infected Cells Incubated for 27 Days at 30°C (×1000)

图4. 30°C 下培养27天的感染细胞 (×1000)

Fig4. Infected Cells Incubated for 27 Days at 30°C (×1000)

图版 II Plate II

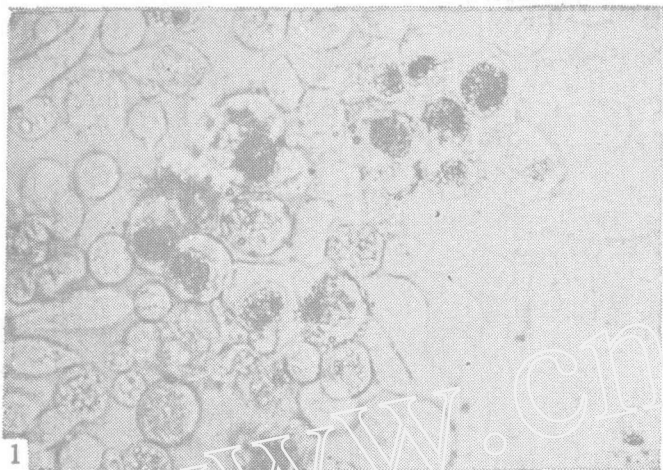


图 1. 15°C 转入 26°C 培养 7 天的感染细胞 (×1000)

Fig1. Infected Cells Incubated for 7 Days from 15°C to 26°C (×1000)

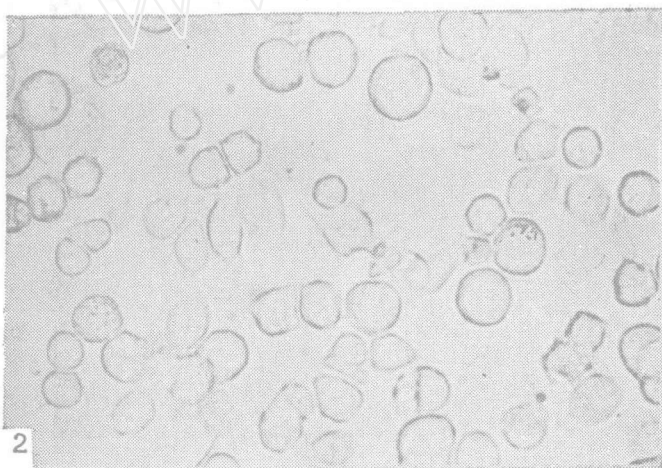


图 2. 15°C 培养 45 天感染细胞, 未形成多角体 (×1000)

Fig2. Infected Cells Incubated for 45 Days at 15°C no Polyhedrosis formed (×1000)

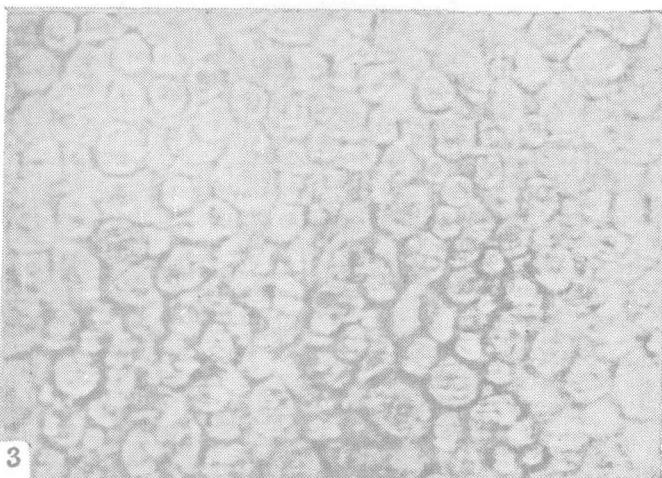


图 3. 油桐尺蠖卵巢细胞系, 对照细胞 (×1000)

Fig3. Ovary Cell line of Buzura Suppressaria, Control Cells (×1000)

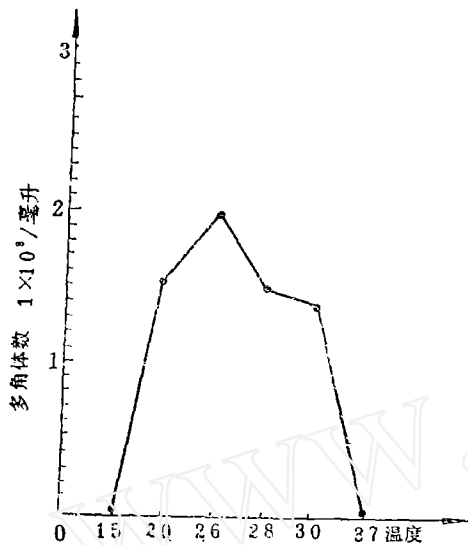


图 1 不同温度对多角体产量的影响
Fig1 Influence on the Polyhedrosis
Production at Different Temperatures

Hink 等^[3]用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒感染粉纹夜蛾细胞系后,分别置于 18°C、25°C、28°C、32°C 和 37°C 下培养,其细胞的感染率和多角体的产量有显著的差别,结果认为在 25°C 和 32°C 下培养的细胞,其多角体的产量最高。而我们的结果是 26°C 培养的感染细胞多角体产量最高,低于 26°C 或高于 26°C 培养的细胞,其多角体产量都低于 26°C 培养的感染细胞。

参 考 文 献

- [1] 刘松华、谢天恩, 1985, 油桐尺蠖核型多角体病毒杀虫剂的研制及应用成果鉴定资料 53—77。
- [2] 谢天恩、王录明、兰萍章 1984, 微生物通报, 11(1): 2—3
- [3] Hink, W. F., et al., 1976, In invertebrate Tissue Culture, Application in Medicine Biology and Agriculture Kurstak, E. E. and Maramorosch, K. Eds. pp. 369—374 Academic Press New York.

INFLUENCE OF DIFFERENT TEMPERATURES ON THE REPLICATION OF BUZURA SUPPRESSARIA NPV IN OVARY CELL LINE

Wang Lu-ming Zhang Yang-lian Xie Tian-en
(Wuhan Institute of Virology Academia Sinica, Wuhan)

This experiment is based on the infection of *Buzura Suppressaria* ovary cell line by *Buzura Suppressaria* NPV. After static incubation of the infected cell line at different temperatures: 0 °C, 15 °C, 20 °C, 26 °C, 28 °C, 30 °C, and 37 °C, the cytopathological effect have been observed by the determination of the percentage of the infected cells and the yield of polyhedra. The result has been shown that the infection rate of the virus during their replication in cells is obviously influence at different temperature. The optimum temperature is at 26 °C for the *Buzura Suppressaria* NPV infected the ovary cells and formed polyhedra, Because both the infection rate and the yield of polyhedra in cells are the highest at 26 °C polyhedra cannot replication in the cells at either lower or higher temperatures.

湖北省免疫学会成立暨首届学术交流会在武汉举行

THE FOUNDATION MEETING OF HUBIE IMMUNOLOGY SOCIETY IN WUHAN

湖北省免疫学会成立大会暨首届学术交流会于1986年11月1日在武汉召开。参加大会的有来自全省50多个单位的专家、教授和免疫学工作者105人,省科协、同济医科大学等单位的领导同志出席了成立大会,湖北省及武汉市十多个学术团体给大会发来了贺信。湖北省免疫学会是一个多学科的学术团体,会员包括医学免疫学、生物制品、畜牧兽医免疫学、水生生物免疫学和植物免疫学等领域的科技工作者,她的成立对于加强省内外免疫学工作者之间的合作与交流,促进我省免疫学研究工作的深入开展具有重要意义。

成立大会后,举行了为期三天的学术会议、交流了论文110多篇,并作了专题学术讲座。会后将举办为期七天的免疫学学习班。

李方和 陈龙邦