病毒学杂志 3，1987
Virologica Sinica

单纯疱疹病毒空斑形成影响因素的研究*

郑民实 施仲贤

（江西医学院微生物学教研室，南昌）

何善武

（江西省吉安地区卫生防疫站检验科，吉安）

提 要

使用pH 7.0的2%小牛血清Hanks氏液稀释Ⅰ型单纯疱疹病毒（冰盒存放6天内），接种原代人胚肌皮单层细胞瓶0.5ml，37°C静止吸附120分钟，弃去液体，不经洗涤或换塞。再加入2%小牛血清、0.5%水解乳蛋白与1个单位抗血清的维持液，培养4--6天后，分别取1%石碳酸复红与龙胆紫-甲醇进行二次染色，形成的空斑用肉眼清晰可见。同型抗血清可抑制空斑产生，表明本法具有特异性。本工作已用于抗病毒药物的筛选。

自从Dulbecco[1]创立病毒空斑技术以来，该法已广泛用于病毒学领域。国内学者曾做过流行性乙型脑炎、脊髓灰质炎、流行性感冒、腺病毒与新城鸡瘟病毒的空斑[2-5]。本工作对单纯疱疹病毒空斑形成的影响因素进行研究，现报告如下：

材料和方法

一、原代人胚肌皮单层细胞的来源与制备 人胚组织来自江西省妇女保健院。将健康孕妇的人工流产术后胎儿肌肉和皮肤，用Hanks氏液尽量洗除血球，剪成小块，按1：4—5倍加入0.25%胰蛋白酶（Difco，1：250）消化37℃30分钟或4℃过夜，经洗涤3次，再取适量生长液（含10%小牛血清、Difco 199培养液和抗生素，pH7.2—7.4）轻轻吹打，六层纱布过滤，100万/ml分装于细胞培养玻璃瓶内，每瓶3ml，37℃孵育，隔日换液，选择生长致密的单层细胞备用。

二、病毒株的来源与传种 Ⅰ型单纯疱疹病毒（HSV-Ⅰ）从卫生部药品生物制品检定所[6]获得。取上述细胞传种和抗血清鉴定无误后待用。

三、抗血清的制备 将感染HSV-Ⅰ的人胚肾细胞病变管反复融冻，经离心沉淀后，吸取上清液5ml，注射于家兔耳静脉内，每周一次，连续免疫3次再放血，待抗血清分

*本文摘要已选入首届全国病毒学学术会议论文集106—107页（1986年7月于天津）

本文1986年7月3日收到

出冷存。实验前用中和试验测定效价为1：640，用维持液(含2%小牛血清、Difeco 199培养液与抗生素，pH7.4—7.6)配成2个单位/ml。

四、空斑试验 取1ml同型标准吸管，将病毒用pH7.0的维持液作对数稀释(每个稀释度吹打3次后更换吸管)至10^{-4}或/和10^{-5}，每瓶单层细胞滴加1ml，34℃吸附2小时(每隔15分钟轻轻摇动10秒钟)，启开瓶塞，取Hanks氏液清洗3次(每次2—3ml)，再加入2个单位/ml抗血清-维持液3ml，另换新塞，34℃孵育5天，弃除液体，经洗涤3次，每瓶分别滴入1%石碳酸复红-甲醇液与1%结晶紫-甲醇液染色5—10秒钟，待乾燥后直接用肉眼计算空斑数目。本法用于实验对照组。

在上述对比条件下，按表1—10(包括病毒稀释液、吸附、维持液和抗血清以及病毒保存天数)进行影响因素的研究。

五、空斑抑制试验 先将HSV-Ⅰ(100 TCID50/ml)与同型抗血清等量混和，34℃作用2小时后，再加入单层细胞瓶内，按上法孵育和计数。若病毒对照组产生空斑，试验组不出现者，表示已被抗血清所中和。

结 果

一、病毒稀释液的影响：

(一)成份：两种稀释液成份(2%小牛血清-Hanks氏液与2%小牛血清-199培养液)出现的空斑数目相似(表1)。

表1 病毒稀释液的成份对空斑数的影响

Table 1. Effect of varieties of viral diluted solutions on numbers of plaques formed

病毒稀释液的成份	HSV-Ⅰ 10^{-5}稀释度				
	每瓶个数				平均个数
2%小牛血清-Hanks氏液	16	17	18	18	17.3
2%小牛血清-199培养液	15	17	19	22	18.3

(二)剂量：四种剂量(0.5、1.0、2.0和4.0ml)，稀释液产生空斑数量呈反比关系(表2)。若以0.5ml比较时，1.0、2.0与4.0却分别减少21.2、64.4和72.6%。

(三)pH：三种pH(5.0、7.0和9.0)稀释液所形成的空斑数，以7.0最多，5.0与9.0则分别减少50.3和68.0%(表3)。

表1—3的结果说明：病毒稀释时，每瓶使用pH7.0的2%小牛血清-Hanks氏液0.5ml为宜。

表2 病毒稀释液的剂量对空斑数的影响

Table 2. Effect of dosage of viral diluted solutions on numbers of plaques formed

病毒稀释液的剂量	HSV-I 10^{-4}稀释度			
	每瓶个数			平均个数
0.5ml	182	199	217	199.3
1.0ml	151	158	162	157.0
2.0ml	61	74	78	71.0
4.0ml	47	53	64	54.7

表3 病毒稀释液的pH对空斑数的影响

Table 3. Effect of pH of viral diluted solutions on numbers of plaques formed

病毒稀释液的pH	HSV-I 10^{-5}稀释度			
	每瓶个数			平均个数
5.0	6	7	9	7.3
7.0	12	14	18	14.7
9.0	4	4	6	4.7

二、病毒吸附的影响：

(一)温度：四种吸附温度(20°、34°、37°和40℃)的检测，以37℃产生空斑数量最多(表4)。若以37℃比较时，40°、34°与20℃分别减少23.0、33.0和63.0%。

(二)时间：四种吸附时间(15、30、60和120分钟)出现空斑的数目与时间长短呈正比例(表5)。吸附30、60和120分钟分别较15分钟增高3.5、7.9与11.3倍。

表4 病毒吸附的温度对空斑数的影响

Table 4. Effect of temperature of viral adherence on numbers of plaques formed

病毒吸附的温度	HSV-I 10^{-5}稀释度			
	每瓶个数			平均个数
20°C	3	4	4	3.7
34°C	6	7	7	6.7
37°C	8	10	12	10.0
40°C	7	7	9	7.7

表5 病毒吸附的时间对空斑数的影响

Table 5. Effect of duration of viral adherence on numbers of plaques formed

病毒吸附的时间	HSV-I 10^{-4}稀释度			
	每瓶个数			平均个数
15分钟	8	10	12	10.0
30分钟	39	45	52	45.3
60分钟	84	87	95	88.7
120分钟	99	117	123	113.0

(三)状态和处理：吸附过程的摇动或静止状态以及吸附后洗涤与换塞或不洗涤和不换塞的处理所见空斑数目大致相似(表6、7)。

表6 病毒吸附的状态对空斑数的影响

Table 6. Effect of shaken and still conditions on numbers of plaques formed

病毒吸附的状态	HSV-I 10^{-5}稀释度			
	每瓶个数			平均个数
摇动	14	15	18	15.7
静止	15	15	16	15.3

表7 病毒吸附后的处理对空斑数的影响

Table 7. Effect of management after viral adherence (washed, unwashed, stopper-changed and stopper-unchanged) on numbers of plaques formed

病毒吸附后的处理	HSV-I 10^{-5}稀释度			
	每瓶个数			平均数个
洗涤、换塞	16	18	18	17.3
不洗涤、不换塞	13	16	16	15.0

从上述表4—7结果可见，病毒吸附过程不必摇动，静置37℃ 2小时后，勿需洗涤与换塞处理。

三、病毒维持液和抗血清的影响：

三种病毒维持液(2%小牛血清-0.5%水解乳蛋白、2%小牛血清-Eagle氏液与2%小牛血清-199培养液)以及三种抗血清配制单位(1、2和4个单位)产生空斑数量均无明显差异(表8、9)。

表8 病毒维持液的成份对空斑数的影响

Table 8. Effect of varieties of viral maintenance media on numbers of plaques formed

病毒维持液的成份	HSV-I 10^{-5}稀释度			
	每瓶个数			平均个数
2%小牛血清-0.5%水解乳蛋白	10	12	15	12.3
2%小牛血清-Eagle氏液	10	13	15	12.7
2%小牛血清-199培养液	9	12	14	11.7

表9 抗血清的配制单位对空斑数的影响

Table 9. Effect of prepared units of antiserum on numbers of plaques formed

抗血清的配制单位	HSV-I 10^{-5}稀释液			
	每瓶个数			平均个数
1个单位	10	11	13	11.3
2个单位	11	11	13	11.7
4个单位	8	10	12	10.0

四、病毒保存天数的影响：

同批病毒在冰盒(－5—－8℃)内保存不同天数(1、6、9、11、15、18和24天)时，出现的空斑个数有反比例关系(表10)。用保存1、6天的10^{-4}与10^{-5}稀释度病毒比较时，第9、11、15、18和24天分别减少在36.0—38.2、60.9—62.4、73.4—75.8、86.6—90.4与99.2—100%范围，故冰盒内保存6天的同批病毒滴度不变。

表10 病毒的保存时间对空斑数的影响

Table 10. Effect of duration of viral storage on numbers of plaques formed

病毒的保存时间	HSV-I 10^{-4}稀释度					HSV-I 10^{-5}稀释度				
	每瓶数目				平均数目	每瓶数目				平均数目
1 天	130	170	179	185	166.0	15	17	19	22	18.3
6 天	166	172	196		178.0	16	18	18		17.3
9 天	103	113	114		110.0	9	12	12		11.0
11 天	61	67	74		67.3	6	7	7		6.7
15 天	43	45	49		45.7	4	4	5		4.3
18 天	20	22	27		23.0	0	2	3		1.7
24 天	1	1	2		1.3	0	0	0		0

五、空斑的稳定性和特异性：

培养第2—3天的同批病毒空斑大小约有1mm，滴度为$2.0—4.0\times10^5$PFU/ml，4—6天后稳定在$1.3—1.6\times10^7$PFU/ml范围，2mm左右空斑最为清楚，第8天开始融合，单层细胞在第10天大部分脱落。因此，空斑计数宜在第4—6天进行。

空斑抑制试验表明：Ⅰ型单纯疱疹病毒(100 TCID50/ml)能被同型抗血清所中和，

病毒对照则出现空斑，繁殖后其滴度为2.3×10^5PFU/ml。可见，本法形成的空斑具有特异性。

讨 论

选择对本病毒有高度敏感的细胞可提高空斑产生的能力，我们发展人胚肌皮细胞（对脊髓灰质炎病毒曾做过研究[7]）与人胚肾、兔肾细胞接种病毒后滴度相似。胰蛋白酶消化下来的组织，通过六层纱布过滤除去碎块，混悬细胞静止孵育，隔日换液1—2次，产生均厚、致密的单层是形成清晰空斑的必要条件，此时应及时使用，对生长不良或衰老细胞层，虽经多次换液或添加新的细胞混悬液，接种病毒后产生的空斑仍模糊不清。

我们的研究工作表明：使用pH7.0的2%小牛血清-Hanks氏液稀释病毒，在冰盒存放6天以内，接种原代人胚肌皮单层细胞瓶0.5ml，37℃静止吸附120分钟，弃去液体，不经洗涤或换塞，再加入2%小牛血清、0.5%水解乳蛋白、1个单位抗血清的维持液，培养4—6天后，分别取1%石碳酸复红和龙胆紫-甲醇进行二次染色，形成的空斑用肉眼清晰可见。

本法操作简便，培养时使用带橡皮塞的玻璃瓶，远较需配备二氧化碳温箱的平皿法[8]容易，亦比Cooper氏的琼脂-细胞混悬法节省细胞2.5倍，既可省去处理琼脂与铺层的麻烦，又能避免内含抑制物造成的空斑抑制[9,10]。选择上述两种染料复染，背景呈深紫红色，空斑不显色，易于用肉眼观察和计数，而且标本可长期保存，这是中性红染色法所不及的。合理使用标准定量吸管与细心操作，可使空斑的稳定性和可重复性得到保证。病毒稀释液与维持液可分别用含小牛血清的Hanks氏液或水解乳蛋白代替价昂的199或Eagle氏培养液，从而有利于推广。对这种空斑技术，我们已成功用于抗病毒药物的筛选工作[11]。

参 考 文 献

〔1〕 Dulbecco, R., 1952, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38: 747.
〔2〕 郑民实，1966，生物科学动态（3）：1.
〔3〕 张吕先等，1981，中华微生物学和免疫学杂志，1：356.
〔4〕 姜述德等，1982，中华微生物学和免疫学杂志，2：40.
〔5〕 唐清泉等，1983，中华微生物学和免疫学杂志，3：42.
〔6〕 郑民实等，1981，药学通报，16：388.
〔7〕 郑民实等，1964，中华医学杂志，50：278.
〔8〕 Smith, K. O. et al., 1980, *Antimicrob. Agents Chemother.* 17：144.
〔9〕 Cooper, P. D., 1955. *Virol.* 1：397.
〔10〕 Kaufman, H. E. et al., 1978. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14：842.
〔11〕 郑民实等，1986. 首届全国病毒学学术会议论文集（中国微生物学会病毒学专业委员会主编），第146页。

STUDY OF THE FACTORS AFFECTING PLAQUE FORMATION BY HERPES SIMPLEX VIRUS

Zheng Min-shi Shi Zhong-xian

(*Department of Microbiology, Jiangxi Medical College, Nanchang*)

He Shan-wu

(Jian Health Station, Jangxi, Jian)

In the present study we have first identified the factors regulating the formation of plaques by herpes simplex virus (type 1) infecting the primary muscle and skin monolayer cells of human embryo. The numbers of plaques formed in the two varieties of viral diluted solutions (e.g., Hanks' solution containing 2% fetal bovine serum and/or 199 solution) are parellel to each other. In the diluted solution 0.5ml/bottle with a pH 7.0 appear more plaques, whereas plaques are most abundant in the case of adhered virus at 37℃. The duration of adherence is directly proportional to the number of plaques. It does not make any clear difference whether the bottles of cells are in shaken or in still conditions, or whether they are washed and the stoppers are changed or not after adherence. There is no marked distinction irrespective as to whether the maintenance media with various constituents comprise lactolabumin hydrolysate containing fetal bovine serum, Eagle solution, or 199 soluiton and whether the antiserum with an amount of 1—4 units. The titers of the same batch of virus stored in the icebox for 6 days are not decreased. We suggest that studies in the plaque count should be carried out on the 4-6th day. The plaque inhibition test has demonstrated that the plaques formed by employing this technique are highly specific.