

四株猪轮状病毒蚀斑特性试验

丁再棣 何家惠 徐之昌 刘冬霞

(江苏农科院畜牧兽医研究所, 南京)

提 要

从江苏省自然腹泻病猪粪便中分离获得的四株猪轮状病毒, 都能在 MA104 单层细胞上形成蚀斑, 其中三株形成大小不同的蚀斑, 另一株仅形成小蚀斑。蚀斑试验培养瓶, 在 37℃ 中培养五天, 大蚀斑直径达 3—6 毫米, 小蚀斑达 1—2 毫米。在灯光下, 可见蚀斑呈云块状; 在低倍显微镜下, 蚀斑呈深色的细胞团块; 用 10% 福尔马林结晶紫液固定染色, 活细胞层染成深紫色而病毒感染的细胞脱落而成蚀斑。

关键词: 轮状病毒, 蚀斑形成, MA104 细胞

轮状病毒的蚀斑试验, 首先由 Smith 等(1979)^[1]用猴轮状病毒 SA11 毒株做试验成功, 接着 Estes 等(1980)^[2]参照 Smith 等的方法, 用蚀斑试验来鉴别猴(SA11)、猪(OSU)和牛轮状病毒毒株, 以后又有许多报告^[3-5]用减斑试验进行轮状病毒的血清型分型。在我国无论人和兽轮状病毒还未见有蚀斑试验的报告, 作者用四株猪轮状病毒, 做了这方面的实验, 现报告如下:

材 料 和 方 法

1. MA104 单层细胞制备 参照丁再棣等报告^[6]。

2. 病毒 我们在江苏省不同地区分离并适应于 MA104 细胞生长繁殖的四株猪轮状病毒—南 86 号、宁 71 号、江 150 号和漂 99 号毒株的细胞培养毒。病毒的分离和鉴定见以前的报告^[6]。

3. 试剂 琼脂粉(日本进口, 上海化学试剂分装厂分装)。MEM 培养基(日本, 日水制药株式会社产)、胰蛋白酶(Difco)、DEAE-Dextran(瑞典, Pharmacia 公司产品)。

4. 琼脂覆盖培养基 以不含犊牛血清的 MEM 细胞培养液为基础, 加 1% 琼脂并使每毫升含 1 微克胰蛋白酶, 100 微克 DEAE-Dextran, 0.292 毫克谷胺酰胺和青霉素 100 单位, 链霉素 100 微克。用碳酸氢钠调 pH 至 7.2。

5. 空斑试验 在细胞培养瓶内进行。基本参照 Estes 等^[2]方法加以改进。先将各毒株的细胞毒冻融三次, 2000r/m 离心 10 分钟, 取上清毒液, 每毫升加胰蛋白酶 20 微克, 于 37℃ 恒温作用一小时, 然后, 用不含犊牛血清的 MEM 细胞培养液(pH7.2)作对数稀释至 10⁻⁶ 或 10⁻⁷ (根据病毒含量, 确定稀释度)。确定的实验稀释度毒液, 每毫升加 5 微克胰蛋白酶, 混匀, 加入长成单层的细胞瓶。(接种前细胞要用 Hanks 液洗 2 次)。在 37℃, 吸附一小时后, 弃除种入的病毒液, 不

本文于 1988 年 4 月 12 日收到

本项目由科学基金会资助

经洗涤, 加入覆盖琼脂培养基, 凝固后, 置 37°C 恒温箱培养 5—7 天。

6. 固定染色 用 10% 福尔马林液中含 1% 的结晶紫溶液, 加入覆盖琼脂上; 在 37°C 下, 经 4—6 小时即可冲去琼脂观察。

结果和讨论

1. 四株猪轮状病毒在 MA104 细胞上形成的蚀斑参看照片。从照片上可清楚地看到宁 71 号、南 86 号和江 150 号三个毒株均能同时形成大小明显不同的蚀斑, 而漂 99 号毒株, 用其第 5 代和第 7 代细胞毒, 经多次重复实验, 仅形成大小比较一致的小蚀斑。于 37°C 培养 5 天, 大蚀斑直径可达 3—6 毫米, 小蚀斑直径达 1—2 毫米左右。



图 1 四株猪轮状病毒在 MA-104 细胞上形成蚀斑图象

A—南 86(Na86)毒株; B—漂 99(Li-99)毒株;
C—宁 71(Ning 71)毒株; D—江 150(Jiang)毒株;
E—对照 (Control).

Fig.1 The plaque formation pictures of four porcine rotavirus strains

2. 我们在实验中, 不加中性红琼脂, 直接观察蚀斑。培养瓶在灯光下, 蚀斑呈大小不等的乳白色云块状, 当用蜡笔圈出后即可挑取单个蚀斑, 进行病毒克隆。在低倍显微镜下观察, 蚀斑是一块颜色较深, 细胞变形的死细胞团, 与相邻的正常细胞有明显区别。

3. 当要测量蚀斑大小及计数时, 可加上所述的固定染色液进行固定和染色。其结果括细胞, 即未受病毒侵袭的细胞, 全部固定在瓶壁并染成深紫色, 而受病毒侵害的死细胞全部脱落而呈现出空白斑即蚀斑或称空斑。

4. 四株猪轮状病毒形成的蚀斑, 不管大小, 均为圆形, 不规则形态的出现, 乃是二个蚀斑的重叠或连接所致。

5. 用减斑试验来鉴定轮状病毒的血清型, 在国外有较多报告^[3,4,5], 但对轮状病毒所形成的大蚀斑和小蚀斑是否有病毒形态, 结构和毒力等方面的差异未见报道, 值得进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Smith EM, et al, 1979, *J.Gen.Virol.* 43: 515-521
[2] Estes, M.K.; et al., 1980, *American Journal of Veterinary Research* 41(1), P.151-152
[3] Richardg, Wyatt, et al., 1982, *Infection and Immunity* 37(1): 110-115
[4] Hoshino, et al., 1982, *Arch.Virol.* 72: 113-125
[5] Yasutaka Hoshino, et al, 1984, *The Journal of Infectious Diseases* Vol.149, No.5
[6] 丁再禄等, 1984, 《畜牧与兽医》第5期 1-3

Characteristics of the Plaque Formation in MA104 Cells of Four Strains of Porcine Rotavirus Isolated in Jiangsu Province

Ding Zai-di Ho Jia-hui Xu Zhi-chang and Liu Dong-xia

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, Nanjing)

Four strains of porcine rotavirus isolated from the feces of diarrheal piglets in Jiangsu Province were cultivated successfully and formed distinguishable plaques in the continuous Rhesus monkey cell line(MA104). Three of the four strains(Na86, Ning71, Jiang150) usually yielded both large and small plaques, whereas the other one (Li-99) induced only small plaques. After incubated at 37°C for 5 days the large plaques measured 3-6mm and small ones 1-2mm in diameter. The plaques look like cloudy clot under light and appear dark cell lumps under low power microscope. After the treatment of formalin and crystal violet, the living cells stained deepviolet and the cells infected with virus detached from the glass wall and the plaques were formed.

Key Words, Rotavirus, Plaque Formation, MA104 Cell