

巨细胞病毒中性红斑定量试验与高滴度病毒的制备

任向东 葛治华 余传霖 胡新美 张惠星 高利¹ 周红²

(上海医科大学微生物学教研室, 上海)

关键词: 人巨细胞病毒, 空斑定量, 病毒制备, 高滴度病毒

在巨细胞病毒(CMV)的研究中常需对病毒定量。CMV需低滴度传代, 否则会产生没有感染性的缺损病毒颗粒^[1]; CMV的抗原性受其感染量的影响^[2]; 检测CMV中和抗体或纯化病毒都需具备病毒空斑定量基础。另外, 制备高感染滴度的无细胞病毒(游离病毒)是对CMV进行分子生物学研究的前提。本文建立了CMV微量板法中性红斑定量技术并比较了几种制备无细胞CMV的方法。

材料与方 法

一、细胞和病毒株 人胚肺纤维母细胞(HF)自建, 在容量为250ml的圆瓶中旋转培养(速度可调式旋转培养装置由江苏省南通县无线电仪器厂生产), 5~15代使用。人巨细胞病毒为AD₁₆₀株。

二、中性红斑定量试验 参照Schmidt方法^[3], 有所改良。HF细胞经胰酶消化后加生长液调节细胞浓度至 1.5×10^5 /ml, 传入24孔(直径16mm)塑料板(Nunc, Denmark), 每孔1ml, 密封后置普通温箱培养, 次日长成单层细胞即可使用。用Hanks液洗后, 加入用Hanks液10倍比稀释的无细胞病毒每孔1ml, 37℃吸附90分钟, 加入营养琼脂每孔1ml, 37℃密封培养7天, 再加入含7%1:1000中性红的营养琼脂, 暗处培养24小时后于显微镜下计数CMV红斑。营养琼脂的成分: Eagle MEM(日本)内含0.6%琼脂糖(Serva)、0.2%牛血清白蛋白(中国科学院上海生物化学研究所)及抗菌素等, 用8.8%NaHCO₃调pH至7.2。

三、制备无细胞CMV (1)冻融高速离心法: 单层HF细胞接种CMV 0.01PFU/细胞, 加入50ml维持液旋转培养(6~7分钟/转), 每3天更换维持液, 至80~90%细胞病变(CPE)时, 用力振荡使细胞悬浮, 反复冻融3次, 离心(1000×g)15分钟去除细胞碎片, 再于45,000×g离心120分钟沉淀病毒, 使之悬浮于2~3ml上清中, 即为无细胞CMV No.1。(2)旋转培养上清法: 单层HF细胞同前感染CMV, 100% CPE时换入25ml维持液, 快速旋转培养(1~2分钟/转), 24小时后(即100% CPE后第2天)收集培养液, 经离心去沉淀物后所得即为无细胞CMV No.2; 按上法于100% CPE第3天、第4天重复所得的培养上清, 分别为无细胞CMV No.3、No.4。在100% CPE第1天换入50ml维持液常速连续培养三天的上清为无细胞CMV No.5。

本文于1988年1月26日收到

1. 云南省昭通地区防疫站在本室进修。

2. 上海职工医学院微生物教研室来本室进修。

结 果

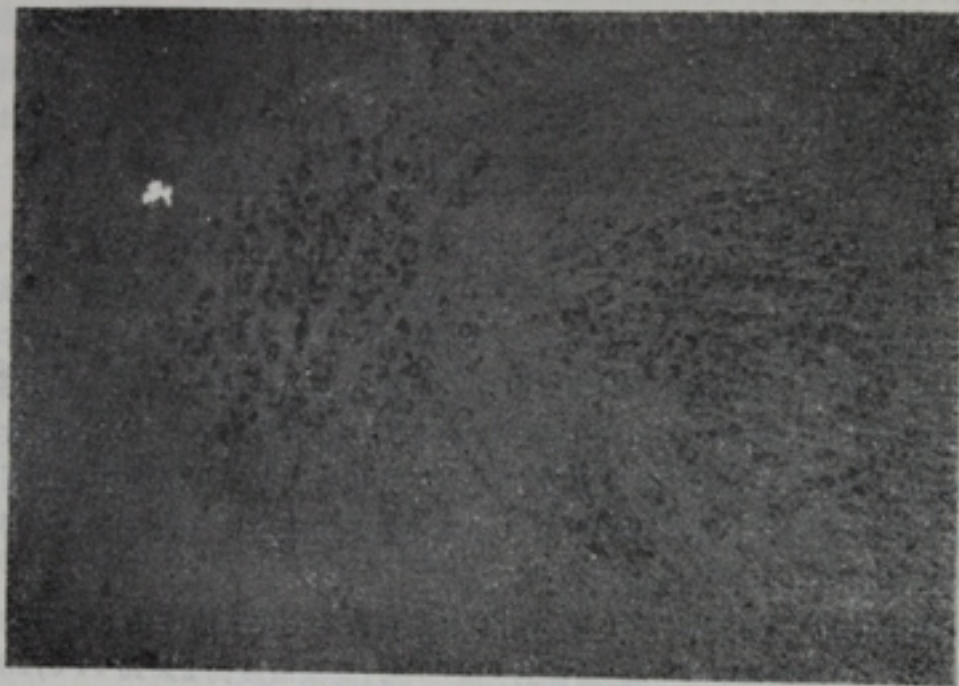


图1. 巨细胞病毒中性红斑

Fig.1. Foci of CMV-infected cells stained with neutral red 8 days after infection($\times 63$)

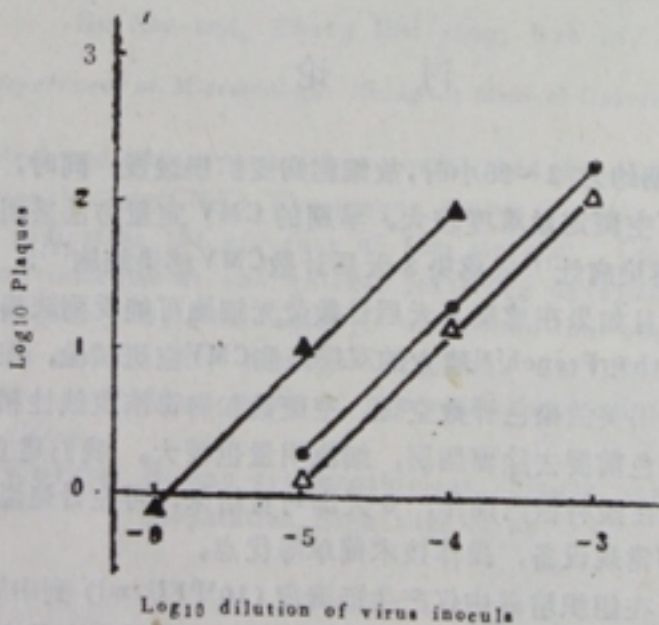


图2. CMV 中性红斑数与病毒浓度的关系

Fig.2. Relationship between CMV neutral red plaque counts and virus concentration.

表1. 测定不同方法制备的无细胞 CMV

Table 1. Infectivity of cell-free CMVs prepared with different methods

No. of virus	Infectivity (PFU/ml)
1	2.0×10^4
2	1.5×10^5
3	8.7×10^5
4	1.8×10^7
5	2.4×10^5

一、CMV中性红斑：由于CMV感染细胞对中性红染料摄入量比正常细胞多，同时CMV破坏细胞的能力弱，所以感染8天后CMV病灶被染成红色，在低倍镜下呈红斑(图1)。CMV红斑呈圆形或椭圆形，大小不一，小的仅由5~6个细胞组成，大的包含数十甚至上百个细胞。有时较大的红斑中心部位因感染细胞变性坏死摄入染料而呈“红空斑”。

二、红斑计数与病毒稀释度：图2所示为不同浓度CMV与其产生的红斑数量之间的关系。图中每个点为3个孔中红斑数的平均值。红斑的数量和病毒稀释度之间线性相关，说明每个红斑是由单个病毒感染形成，红斑计数能反映感染性病毒的量。同一毒种三次实验的结果相同，说明该法较为稳定。

三、无细胞CMV的滴定：用上述中性红斑定量试验测定了不同方法制备的无细胞CMV的感染滴度。经冻融高速离心法制备的CMV No.1感染滴度为 2×10^4 PFU/ml。旋转培养上清法制备的病毒在100% CPE后第2、3、4天分别为 1.5×10^5 、 8.7×10^5 和 1.8×10^7 PFU/ml；100% CPE后连续培养3天的上清(CMV No.5)感染滴度为 2.4×10^5 PFU/ml(表1)。

讨 论

CMV复制缓慢，周期约为72~96小时，故细胞病变扩展缓慢；同时，感染细胞的溶解至少要7天，所以CMV空斑定量难度较大。早期的CMV定量方法采用免疫荧光技术在感染7天后计数CMV感染病灶^[4]或感染3天后计数CMV感染细胞^[5]，这种方法需要可靠的CMV抗血清，而且如果在感染3天后计数荧光细胞可能受到缺损病毒颗粒的影响而造成误差。Wentworth和French^[6]建立的双层琼脂CMV空斑试验，在平皿内操作，培养14天后除去琼脂层再用美兰染色计数空斑，空斑数和病毒浓度线性相关，定量准确。但此法培养时间长，染色前要去除琼脂层，细胞用量也较大。我们建立的CMV定量试验不仅相当准确，而且在塑料板内操作，8天即可看结果，可在普通温箱内培养，具有快速、节省细胞、只需常规设备，操作技术简单等优点。

CMV复制效率低，在组织培养中仅产生低滴度(10^4 PFU/ml)到中等滴度(10^7 PFU/ml)的感染性病毒。以往制备无细胞CMV多采用破碎细胞释放病毒的方法^[3,7]，感染滴度在 $10^6 \sim 10^7$ PFU/ml，近年来有报道采用感染细胞的旋转培养上清^[2]，感染滴度可达 4×10^7 PFU/ml。我们的实验表明，旋转培养上清中的病毒滴度可达 1.8×10^7 PFU/ml，比破碎细胞释放的病毒感染量高，可能因为病毒颗粒的包膜在破碎细胞膜时也遭到破坏

从而影响了感染性。CMV对热敏感,同时细胞内病毒的复制对pH有一定要求,培养液pH低于6.2时病毒不能复制或不能释放感染性病毒⁽⁸⁾。所以100% CPE后连续培养3天时,部分病毒可能失活,同时由于培养液pH降低,病毒释放减少或停止释放,故上清中感染滴度不高。而100% CPE后每天换液可维持一定酸碱度和营养,使感染细胞持续大量释放病毒。另外,在速度可调式旋转培养装置上可进行少量液体快速旋转培养以浓缩上清中的病毒。所以,旋转培养上清法制备无细胞CMV不仅简单易行,而且病毒滴度高,供作研究病毒核酸时可避免缺损病毒的影响^(1,9)。

参 考 文 献

- (1) Stinski, M.F. et al., 1979, *J. Virol.*, 31: 231.
- (2) Middeldorp, J.M. et al., 1984, *J. Clin. Microbiol.*, 20: 763.
- (3) Schmidt, N.J. et al., 1976, *J. Clin. Microbiol.*, 4: 61.
- (4) Rapp, F. et al., 1983, *J. Immunol.*, 91: 709.
- (5) Waner, J.L. and Budnick, J.E., 1973, *Appl. Microbiol.*, 25: 37.
- (6) Wentworth, B.B. and French, L., 1970, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 135: 253.
- (7) Plummer, G. and Benyesh-Melnick, M.A., 1964, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 117: 145.
- (8) Zerbini, M. et al., 1982, *Arch. Virol.*, 72: 127.
- (9) Ramirez, M.L. et al., 1979, *Virology*, 96: 311.

Cytomegalovirus Neutral Red Plaque Assay And High Titer Virus Preparation

Ren Xiang-dong, Ge Zhi-hua, Yu Chuan-lin,
Hu Xin-mei, Zhang Hui-xing, Gao Li, Zhou Hong

(Department of Microbiology, Shanghai Medical University, Shanghai)

A neutral red plaque assay was established for the quantitation of infectious cytomegalovirus (CMV). The plaque counts linearly correlated to the virus dilutions, indicating the accuracy of this method. Using of the conventional reagents and instruments and quicker results (3 days) may facilitate the application of the assay. With this assay, it was found that rotating culture of CMV-infected cells could easily produce infectious CMV titer as high as 1.8×10^7 PFU/ml, when the culture medium supernatant was collected 4 days after 100% cytopathic effect.

Key words: Human cytomegalovirus, Plaque quantitation, Virus preparation, High titer virus