

油桐尺蠖卵巢细胞系 BS-484 克隆株特性的研究

梁布锋 梁 莉 邹帅洲

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

通过有限稀释法由 BS-484 细胞系中成功地分离出四个克隆株(Bs-484B, E, F, G)。克隆细胞株的生长特性不同于原细胞株 BS-484, 各克隆株之间的形态特征、细胞倍增时间、以及在维持油桐尺蠖核型多角体病毒的复制能力等方面均有差异。用三种同工酶(乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶和酯酶)比较了各克隆株与原细胞株之间的异同。

关键词: 昆虫细胞系 同工酶 克隆 油桐尺蠖核型多角体病毒

近年来, 大量昆虫细胞系的建立, 对于昆虫生理学、遗传学、生物化学和病毒学的研究工作起了重要作用^[1]。尤其是随着昆虫病毒作为一种生物防治的重要手段, 以及昆虫病毒作为外源基因载体在昆虫细胞中的重组和表达的深入研究^[2], 都促使人们需要更深入地研究昆虫病毒-寄主细胞的离体系统。

由于大多数昆虫的组织小而复杂, 在建立细胞系的初始阶段, 来源于昆虫组织的细胞, 通常是由不同类型的细胞成分组成的, 因而普通的细胞系是由不均一的混合细胞群形成的。细胞系中细胞的形态、大小、对病毒的敏感程度以及细胞的生长动力过程等等都有着不同程度的差异^[3]。为了便于对细胞进行研究, 就必须对细胞进行克隆化培养。

本文报道了使用有限稀释法在微孔塑料培养板中, 对油桐尺蠖卵巢细胞系 BS-484 进行克隆化培养, 获得了 BS-484B、E、F、G 等四株细胞克隆。比较了各个细胞株的形态特征、生长速度、及其接种油桐尺蠖核型多角体病毒后, 各细胞株复制病毒的能力。并且用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术分析了各个细胞株的同工酶图谱特征。

材料和方法

一、细胞: 系本所刘松华等建立的油桐尺蠖卵巢细胞系 BS-484^[4], 实验使用第 93 代细胞。

二、培养基: 用 TC-100 培养基, 小牛血清含量为 20%, pH6.2。传代培养油桐尺蠖卵巢细胞系 BS-484, 至第四天, 取细胞的上清液, 于 3500r/m 离心半小时, 再用孔径为 0.45 微米的微孔滤膜过滤培养液, 得到条件培养基。然后以 1:1 之比加入新鲜的 TC-100 培养基, 作为使用培养基。

本文于1988年12月10日收到
中国科学院青年科学基金资助的课题

三、克隆细胞株的获得: 选用对数生长期的 Bs-484 细胞, 经有限稀释方法使细胞浓度达 15 个细胞/毫升。用微量加样器吸取 100 微升 (约 1.5 个细胞/100 微升), 移入 96 孔微孔板中的每一孔中。静置 8 小时后, 在倒置显微镜下, 对有单细胞的孔穴检查后作好标记, 细胞置于 5% 二氧化碳培养箱, 26℃, 进行培养。以后每隔 6 天换培养液, 至单个细胞长出细胞团块后, 适时转入 24 孔塑料培养板中传代。

四、细胞生长曲线的测定: 选取生长良好的 Bs-484 细胞系的各克隆株以及原细胞株共 5 株细胞, 分别用血球计数板计数, 调整各细胞株的细胞密度为 1.5×10^5 细胞/毫升, 分装于 18cm² 的培养瓶中, 置于 26℃ 静止培养。每隔 2 天随机选取 3 瓶细胞计数, 共进行二次重复, 取其平均值, 连续计数 8 天, 绘制出细胞生长曲线图。

五、病毒感染性试验:

1. 病毒悬浮液的制备: 根据梁布樟等^[5]的报道进行。

2. 病毒 TCID₅₀ 的测定: 病毒悬浮液连续对 Bs-484 细胞感染传代四次, 收集被感染细胞的上清液, 经离心和过滤之后, 病毒按 10^{-1} 和 10^{-7} 不同浓度稀释, 按每孔 0.1 毫升量滴加于 96 孔塑料培养板 (每孔含 1×10^4 细胞), 置于 26℃、5% 二氧化碳培养箱, 于 7 天后观察, 统计受到感染的小孔数目, 按 Reed 和 Muench 法计算 TCID₅₀ 数值。

3. 病毒感染: 选取对数生长期的 5 个细胞株, 调整细胞浓度为 2×10^5 细胞/毫升, 每瓶为 2 毫升, 每株细胞为 5 瓶。对各细胞株的病毒感染倍数 (m.o.i) 都为 0.1, 在 26℃ 下培育, 8 天后, 于倒置显微镜下观察, 感染与否是以细胞核内见到病毒多角体来确定的。每株细胞随机观察 1000 个以上的细胞, 统计被感染的细胞及观察的细胞总数, 以此确定细胞感染的百分率。离心收集各细胞株中的细胞, 用 JB-3 型超声波机器处理, 经 2 分钟破碎细胞, 用血球计数器测定多角体数目。各细胞株的上清液被收集后, 按前面所述方法测定病毒 TCID₅₀ 数值。

六、同工酶分析: 分别选取各细胞株的细胞 2×10^6 个, 离心后, 弃去上清液, 收集细胞, 再用生理盐水洗涤 2 次。细胞于 -70℃ 冷冻, 再于 37℃ 解冻, 共进行 3 次, 细胞被破碎, 2500r/m 离心 15 分钟, 取上清液, 以此为电泳样品。酯酶、乳酸脱氢酶使用的电泳缓冲液为 TBE (81.2 mmol/L Tris, 20mmol/L 硼酸, 1.5mmol/L EDTA, pH8.9), 苹果酸脱氢酶使用的电泳缓冲液为 TC (19.4mmol Tris, 4.25mmol/L 柠檬酸, pH7.1)。电泳电压为 220 伏, 使用 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶, 染色方法按吴中兴等^[6]的报道。

结 果

一、细胞克隆

通过有限稀释方法, 得到四个细胞克隆株, 即 Bs-484B、Bs-484E、Bs-484F 和 Bs-484G。

四个细胞克隆株与原细胞株比较, 在形态上和生长特性等方面都有所差异。Bs-484B 大多数细胞为短梭形, 其细胞大小平均约 $17\mu\text{m} \sim 8\mu\text{m}$ 。Bs-484E 为小圆形细胞, 其细胞直径平均约 $11\mu\text{m}$ 。Bs-484F 为长梭形细胞, 其细胞大小平均约 $41\mu\text{m} \sim 9\mu\text{m}$ 。Bs-484G 为圆形细胞, 其细胞直径平均约 $15\mu\text{m}$ 。原细胞株 Bs-484 的细胞形态多样化, 细胞有圆形、椭圆形、梭形以及不规则的多边形等形态。细胞大小相差悬殊, 例如小圆形细胞的直径约 $9\mu\text{m}$, 而大圆形细胞的直径约 $45\mu\text{m}$ 。由图 1 可观察到每株克隆细胞尽管各个细胞形态并不绝对一致, 但是都有一种占绝对优势的细胞形态, 且细胞的大小也较为

一致。

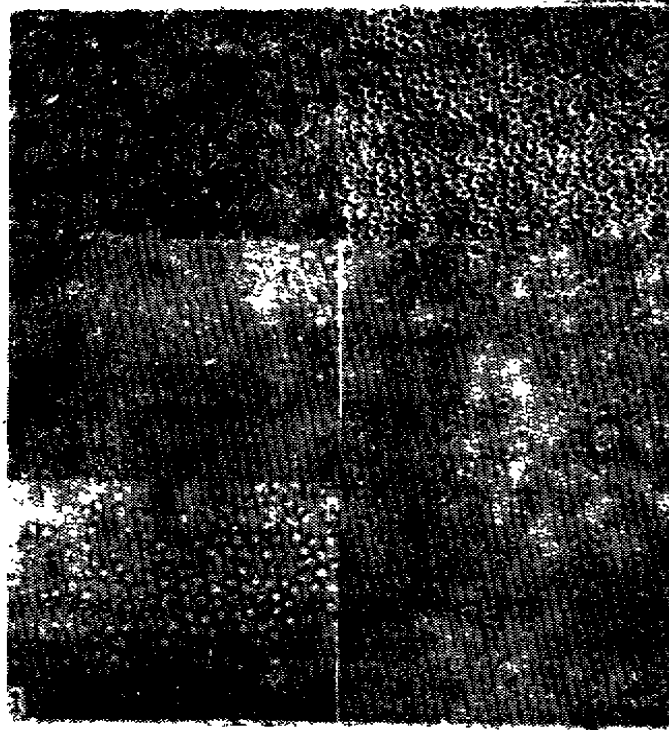


图 1 BS-484 细胞系和四个克隆株的形态 (×125)

Fig. 1 Morphology of the Bs-484 cell line and 4 clonal strains. (×125)

B (Bs-484B) E (Bs-484E) F (Bs-484F) G (Bs-484G) Bs (Bs-484)

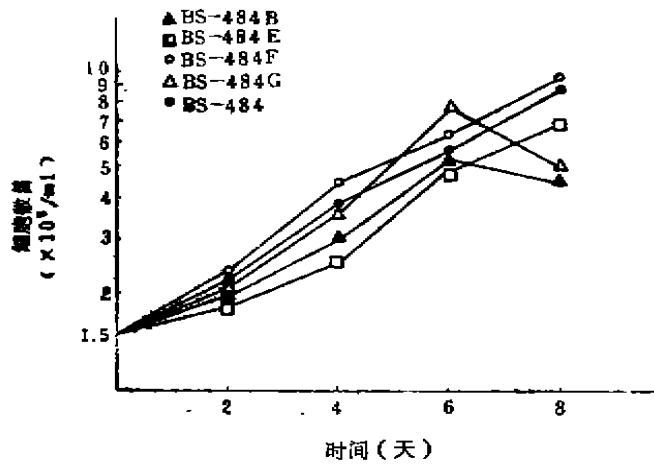


图 2 Bs-484 细胞克隆株和原细胞株的细胞生长曲线

Fig. 2 Cell growth curves of uncloned and cloned sublines of Bs-484 cells.

二、细胞生长曲线

由图 2 可观察到 Bs-484 和四个细胞克隆株的生长曲线。Bs-484、Bs-484E 和 Bs-

484F 在 8 天培养时间中, 细胞数目基本呈上升趋势。而 Bs-484B 和 Bs-484G 在第 6 至第 8 天时, 细胞数目呈下降趋势。经测算得到 Bs-484 细胞群体倍增时间约为 51 小时; Bs-484B 细胞群体倍增时间约 68 小时; Bs-484E 约 73 小时; Bs-484F 约 47 小时; Bs-484G 约 53 小时。

三、各细胞株的病毒产量及感染率

各细胞克隆株及原细胞株接种油桐尺蠖核型多角体病毒 (BsNPV) 之后, 都能够复制出病毒多角体。经 26 °C 培养 4 天之后, 在显微镜下可观察到细胞核明显地膨胀变大, 细胞核内有多角体形成。在感染后第 8 天, 经观察和统计得出每株细胞的感染百分率, 每毫升培养液中多角体的产量, 以及细胞上清液中未埋入型病毒 (NOV) 的 TCID₅₀ 数值 (表 1)。

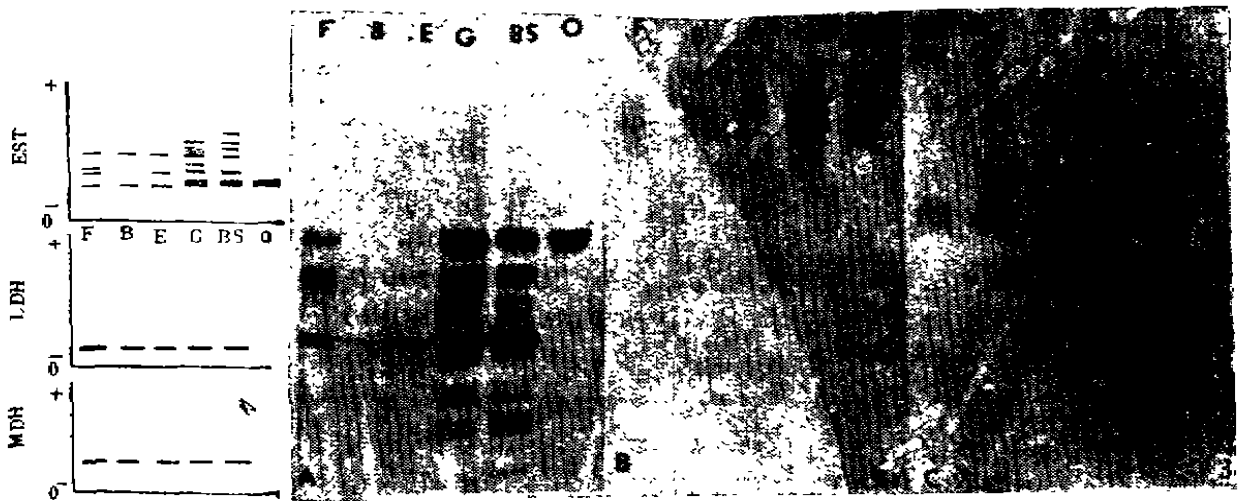


图 3 BS-484 克隆细胞株酯酶 (A) 乳酸脱氢酶 (B) 和苹果酸脱氢酶 (C) 同工酶的比较 O (卵巢)

Fig 3 Comparison of isozyme banding patterns between all BS-484 derived cell strains with isozymes EST (A), LDH (B) and MDH (C). O (ovary)

表 1 有关油桐尺蠖核型多角体病毒 (BsNPV) 的产率

Table 1 Estimate of relative viral productivity of BsNPV

细胞株 Strain	被感染细胞的平均百分率 Average Percent Infected Cell (%)	多角体的平均数目 Average Number ($\times 10^7$ PIBS/ml)	TCID ₅₀ ($\times 10^5$)
Bs-484B	22.9	1.4	8.31
Bs-484E	31.2	1.7	5.12
Bs-484F	27.8	1.2	0.70
Bs-484G	34.1	1.6	0.56
Bs-484	45.8	2.1	1.73

由表 1 可看到, 各细胞株的感染率在 22.9% 至 45.8% 之间; 病毒多角体的产量在每

毫升 1.2×10^7 多角体至 2.1×10^7 之间；未埋入型病毒(NOV)的滴度在 $0.56 \times 10^5 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 至 $8.31 \times 10^6 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 之间。表1所列各种数值，各细胞株均有不同，而且难以归纳成某种规律。例如，Bs-484B的感染率(22.9%)低于Bs-484E(31.2%)，其多角体产量(1.4×10^7)也低于Bs-484E(1.7×10^7)，有一定的相关性，但两者之间并不成比例。然而未埋入型病毒的滴度正好相反，Bs-484B(8.31×10^5)高于Bs-484E(5.12×10^5)。

四、各克隆细胞株与原细胞株同工酶的分析

为了确定和比较各克隆细胞株的来源，采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术，检测了五个细胞株的酯酶、乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶三种同工酶(图3)。由图可观察到酯酶同工酶的图谱，各细胞株都有多条带，其带型较为复杂。有一些带型是各细胞株都共有的，然而另一些带型却显示出不同的差异，没有任何两个细胞株的酯酶同工酶图谱是完全一致的。用作对照的油桐尺蠖成虫卵巢组织(即Bs-484建株来源的组织)，与各细胞株的图谱亦不相同。在乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶同工酶图谱中，各克隆细胞株和原细胞株无显著差异。基本上为一条带，且电泳相对迁移率较为一致。

讨 论

自从昆虫细胞在体外培养建系成功之后，人们就开展了昆虫细胞系克隆分离工作。早期的昆虫细胞系克隆分离工作，是使用新鲜培养基直接培养分离出的单个细胞^[7]。单细胞发育成细胞群体的时间长，细胞克隆形成率低。Nakajima^[8]使用条件培养基比较了黄猩猩果蝇细胞系的克隆形成率，证明条件培养基在促进单细胞的生长能力上优于新鲜培养基。近年来，昆虫细胞系克隆株的培养大多使用条件培养基^[9]。但其原理尚无满意的解答，Ui^[10]等人认为条件培养基起着类似于幼虫血淋巴的作用，我们认为条件培养基的作用尚待进一步研究。

四个细胞克隆株和原细胞株在复制油桐尺蠖核型多角体病毒的能力上存在着差异。无论是细胞感染的百分率，还是多角体及未埋入型病毒的产量都不相同，三者之间也不一定呈现相关性。细胞感染率高，每毫升多角体产量及未埋入型病毒的产量也不一定相应增高。例如Bs-484B和Bs-484F相比较，就出现相反的现象。这表明，不同克隆株细胞中，平均每个细胞所产多角体数目是不相同的。每毫升培养液多角体的产量不仅与细胞感染百分率有关，而且也与平均每个细胞所产多角体数目有关。Faulkner^[11]曾用苜蓿夜蛾核型多角体病毒感染TN-368细胞和它的克隆株细胞，统计了各个细胞株平均每个细胞所产生多角体的数目。作者认为每毫升培养液所含多角体的多少，比较直观地反映细胞总体复制病毒的能力，用这一单位可能更好一些。

各细胞株的同工酶经电泳分离后，用三种染色方法显示出酯酶、乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的同工酶图谱。其中各细胞株的乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶图谱较为一致，而各个细胞株的酯酶图谱却有所差异。这表明各克隆株细胞虽来源于Bs-484，但又不同于Bs-484，它们之间也不相同。酯酶同工酶图谱在确定不同的Bs-484克隆株时可能是一个有用的工具。

参 考 文 献

- [1] Grace, T.D.C., 1982, *Invertebrate Cell Culture Applications* 1-8
- [2] 许天恩, 1987, 病毒学报 3(2): 210
- [3] 三桥淳, 1980, 植物防疫 34(10): 18
- [4] 刘松华等, 1986, 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 53-71
- [5] 梁布锋等, 1986, 病毒学杂志 1(4): 73
- [6] 吴中兴等, 1987, 动物学杂志 22(5): 1
- [7] Suitor, E.C., et al., 1966, *Exptl. Cell Res.* 44: 572
- [8] Nakajima, S. et al., 1976, *Invertebrate tissue culture applications in medicine, biology and agriculture* 279-287
- [9] 胡有健等, 1984, 昆虫学研究集刊 第四集 163-168
- [10] Ui, K. et al, 1987, *In Vitro* 23: 307
- [11] Faulkner, P. et al., 1976, *Invertebrate tissue culture applications in medicine, biology and agriculture* 347-360

Characterization of Clonal Strains from the *Buzura suppressaria* Ovary Cell Line Bs-484

Liang Bu-feng Liang Li Zou Shuai-zhou
(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Four clones (Bs-484 B, E, F, G) were successfully isolated from the established cell line of Bs-484 by the method of finite dilution. The growth characteristics of the clonal strains were different from the parent line. The cloned cell strains were different in their predominant morphology, cell doubling times and the relative ability to support replication of the nuclear polyhedrosis virus of *Buzura suppressaria* (BsNPV). The origin of the cloned cell strains was confirmed by comparing their isozyme profiles with the parental Bs-484 cell line using lactate dehydrogenase (LDH), malic dehydrogenase (MDH) and esterase (EST).

Key words: Insect cell line Isozyme Clones BsNPV