

## 普通大气条件下的蚀斑试验

方 勤 柯丽华

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉430071)

### 提 要

草鱼出血病病毒湖南邵阳株 (GCHV-873), 常规培养条件下能在鱼肾 (CIK) 细胞上形成直径约2mm的蚀斑。当采用三种缓冲系统 (MEM-NaHCO<sub>3</sub>、MEM-Tris、MEM-HEPES) 的培养液在普通大气条件下分别培养CIK细胞时, 三天内培养液的pH略有变化, 其变化范围在0.2—0.4左右, 但细胞生长仍然良好, 三者无明显差别。在上述系统, 以双相法 (培养液-凝胶) 进行蚀斑试验时, 观察到无机缓冲系统培养液的pH变化较大, 有机缓冲系统则较稳定, 且蚀斑形成的数量显著不同, 后者效价比前者要高出4个数量级。因此, 在培养液中加入适量的有机缓冲液代之以CO<sub>2</sub>的调节是完全有可能的。

**关键词:** 草鱼出血病病毒 CIK细胞 蚀斑测定 缓冲液

蚀斑法是滴定活性病毒效价常用的比较精确的方法, 通常采用NaHCO<sub>3</sub>缓冲系统调整培养液的pH并由部分CO<sub>2</sub>维持平皿内pH的稳定, 使病毒蚀斑在良好的环境下形成。用密闭容器培养的方法<sup>[1]</sup>虽可保持培养液pH的相对稳定, 但实验操作及结果观察均不理想。因此, 不用CO<sub>2</sub>培养箱进行蚀斑试验, 简化培养条件, 这在实际应用中将弥补仪器、设备的不足, 对广大基层卫生、科研单位的研究工作是一个促进。1971年Wolfken等人报道了在培养液中加入有机缓冲液, 以增强缓冲能力, 代之以CO<sub>2</sub>补充调节的研究<sup>[2]</sup>。我们在草鱼出血病病毒常规蚀斑测定<sup>[3]</sup>基础上, 进行了普通大气条件下的蚀斑测定, 比较了三种缓冲液对细胞生长和蚀斑数量的影响, 本文报告这一试验的结果。

### 材 料 和 方 法

一、病毒: 本实验室传代培养的GCHV-873<sup>[4]</sup>。

二、细胞: 鱼肾 (CIK) 细胞株<sup>[5]</sup>。

三、培养液:

1. MEM-NaHCO<sub>3</sub>: 即Eagle MEM。为本实验之基础培养基。含10%小牛血清的MEM (MEM-10) 为细胞生长液, 接毒后的细胞维持液改用MEM-2。

2. MEM-HEPES: 即MEM-NaHCO<sub>3</sub>中加入10mmol/L HEPES

3. MEM-Tris: 即MEM-NaHCO<sub>3</sub>中加入10mmol/L Tris

四、蚀斑测定:

按照本实验室已报道的方法<sup>[3]</sup>进行。

本文于1980年8月14日收到

### 五、三种缓冲液对细胞生长和蚀斑率的影响:

将三种不同缓冲液的MEM-10各自分成二组分别培养细胞, 一组置5%CO<sub>2</sub>培养箱, 另一组置普通培养箱培养, 接毒48小时后, 计算蚀斑数目。

## 结果与讨论

### 一、蚀斑形成:

GCHV-873病毒悬液能在CIK细胞上形成蚀斑, 28℃双相系统中培养24小时出现直径约为1mm左右的蚀斑, 以后蚀斑边缘逐渐扩大, 直径增至2mm左右, 形状为圆形或不规则, 该平皿经结晶紫染色后, 肉眼下蚀斑无色透明, 背景为紫色(见图1a), 光学显微镜下能分辨出内含残存物的蚀斑, 正常对照呈现均匀的紫色(图1b)。

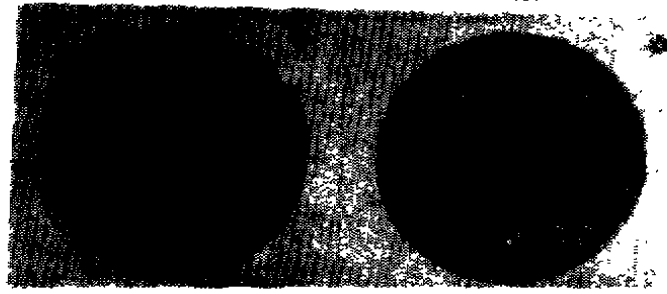


图1 GCHV-873在CIK细胞上形成的蚀斑及对照  
Fig 1 plaque production of GCHV-873 on CIK cells and Control  
a为染色后肉眼下的蚀斑, b为正常对照  
a. plaque stained with crystal violet, b. Control CIK Cells

### 二、蚀斑数与病毒悬液稀释度的关系

用10倍连续稀释的病毒悬液感染细胞, 在常规条件下培养48小时后计算的蚀斑数随病毒悬液稀释度增加而减少, 并与接种量之间呈线性关系(图2), 说明在CIK单层细胞中, 空斑数目的分布符合波松分布规律, 且病毒悬液稀释度之间的变化系数接近根据蚀斑总数预算出来的数值。未感染的细胞无蚀斑形成, 故用此方法滴定病毒效价比较准确、可靠。

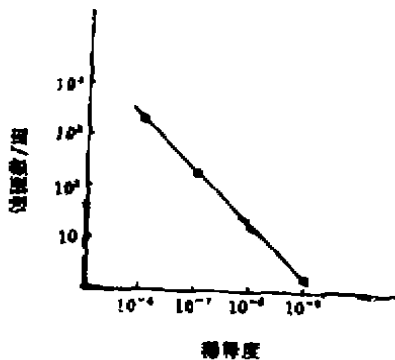


图2 蚀斑数与病毒稀释度的关系  
Fig 2 Relationship between plaque numbers and the virus dilutions

### 三、5%CO<sub>2</sub>和普通培养条件下三种缓冲液对细胞生长的影响:

从表1可看出: 细胞在含有HEPES或Tris的培养液中, 置5%CO<sub>2</sub>及普通大气条件下培养三天, 其pH上升了0.2, 细胞生长良好。培养于含NaHCO<sub>3</sub>培养液的细胞, 在上述条件下培养后pH上升0.4, 而细胞的生长状况与前者无异, 且数量相近。由此可见, 虽然无机系统的缓冲性能较差, 而细胞自身的生长、代谢释放出的CO<sub>2</sub>补偿了这一作用, 使培

养液的 pH 变化不大, 对细胞生长未造成不良影响。这些结果也可能以各类细胞特性而异。各种细胞生长除需要一定的营养条件外, 还要求与其相适应的温度和 pH 等。而且对这些条件要求的严格程度也不尽相同。此外, 我们还发现, 仅用有机试剂 Tris 调整培养液的 pH, 其结果是细胞生长速度缓慢、内含物增多, 按常规接种量传代的细胞, 4—5 天平皿中的细胞数仅为在含有 NaHCO<sub>3</sub> 培养液中生长三天细胞的 60%, 说明 NaHCO<sub>3</sub> 可能是 CIK 细胞生长的物质基础。

表 1 5%CO<sub>2</sub>和普通大气条件下三种缓冲液对细胞生长的影响  
Table 1 Effect of MEM with three buffers on CIK Cell growth at 5%CO<sub>2</sub> or normal atmosphere

缓冲系统	培养时间	温度(°C)	5%CO <sub>2</sub>		Normal Atmosphere	
Buffer System	Incubation time	Temperature	Cell No/ml	terminal pH	cell No/ml	terminal pH
	(day)					
NaHCO <sub>3</sub>	3	28	7.5 × 10 <sup>5</sup>	7.0	7.0 × 10 <sup>5</sup>	7.4
HEPES	3	28	7.2 × 10 <sup>5</sup>	7.0	7.0 × 10 <sup>5</sup>	7.2
Tris	3	28	6.5 × 10 <sup>5</sup>	7.0	7.5 × 10 <sup>5</sup>	7.2

#### 四、5%CO<sub>2</sub>和普通大气条件下三种缓冲液对产斑率的影响;

用双相法测定三种缓冲液在不同通气条件下所形成的蚀斑数, 其结果见表 2;

表 2 5%CO<sub>2</sub>和普通大气条件下三种缓冲液对产斑率的影响  
Table 2 Effect of three buffers on plaquing efficiency at 5%CO<sub>2</sub> or normal atmosphere

缓冲系统	培养时间(天)	温度(°C)	5%CO <sub>2</sub>		Normal Atmosphere	
Buffer System	Incubation time	Temperature	PFU/ml	终点pH	PFU/ml	终点pH
	(day)			terminal pH		terminal pH
NaHCO <sub>3</sub>	2	28	2.37 × 10 <sup>8</sup>	7.0	1.26 × 10 <sup>6</sup>	8.4
HEPES	2	28	5.82 × 10 <sup>8</sup>	7.0	4.9 × 10 <sup>8</sup>	7.2
Tris	2	28	4.39 × 10 <sup>8</sup>	7.0	6.1 × 10 <sup>8</sup>	7.0

从表 2 看出: 在普通大气条件下, 含 NaHCO<sub>3</sub> 的上层维持液的 pH 在接毒后明显升高, 由原来的 7.0 上升至 8.4, 其原因与病毒的复制使细胞裂解相关, 没有一定数量的细胞代谢, 无法补偿环境中的 CO<sub>2</sub>。所以这一碱性环境又有碍于 CIK 细胞的生长和病毒增殖, 导致所形成的蚀斑单位只有 1.26 × 10<sup>6</sup> PFU/ml, 仅为 5%CO<sub>2</sub> 调节条件下形成蚀斑数的万分之一左右。然而, 当加入有机缓冲系统 HEPES 或 Tris 时, 即使不再补充 CO<sub>2</sub>, 其 pH 也能保持相对稳定, 所形成的蚀斑单位也较接近。这一实验结果与 Wolf ken 的报道<sup>[8]</sup> 基本一致。因此, 在普通大气条件下, 用 MEM-NaHCO<sub>3</sub> 系统进行蚀斑测定, 不能真实、准确地反映活性病毒的滴价。采用 MEM-NaHCO<sub>3</sub> 系统进行蚀斑测定必须在有 CO<sub>2</sub> 补充情况下才能进行, 或加入适量有机缓冲液, 以增强溶液的缓冲能力, 方能获得满意的结果。

## 参 考 文 献

- [1] McCain, B.B. et al., 1971, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 1042-1046.  
[2] Wolf, K., and R.W. Darlington., 1971, *J. Virol.* 8: 525-533  
[3] 柯丽华等, 1990 水生生物学报, 14(2): 153-159  
[4] 方勤等, 1989, 病毒学杂志, No: (3): 315  
[5] 左文功等, 1984, 淡水渔业, 第三期, 38页  
[6] Wolf, Ken and M.C. Quimby., 1973, *Applied Microbiology*, Apr. P659-664.

## A Plaque Assay under Normal Atmosphere

Fang Qin Ke Li-hau

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

A method for plaquing Grass Carp Hemorrhage Virus-873 has been studied. We tested inorganic ( $\text{NaHCO}_3$ ) and organic (Tris, HEPES) buffer systems in open dish culture and found the combination of organic buffers with bicarbonate to be very promising for both cell growth and viral replication. The CIK cells grewed well in three media (MEM- $\text{NaHCO}_3$ , MEM-Tris and MEM-HEPES) under normal atmosphere or 5%  $\text{CO}_2$  pressure, but the organic buffer alone provided a little good cell growth response. Two-phase (gel-liquid) media incorporating three buffer systems allowed plaquing either in 5%  $\text{CO}_2$  pressure or in normal atmosphere, but greater efficiency and sensitivity were obtained with the combination of organic buffers and bicarbonate than bicarbonate only, and the former is higher 4 orders of magnitude than the latter in plaque numbers. Therefore, it is possible for plaque assay with organic buffer with bicarbonate instead of  $\text{CO}_2$  incubator in open dish culture.

**Key Words:** Grass carp Hemorrhage Virus CIK cell Plaque assay  
Buffer system