

流行性出血热 (EHF) 病毒半 微量甲基纤维素空斑法的建立

聂子林 俞永新 姚智慧

(中国药品生物制品检定所, 北京100050)

提 要

本文报道 EHF 病毒一种新的空斑形成技术, 即半微量甲基纤维素空斑法的建立及其应用。6 株来源不同的毒株均可在 V_{ero}-E₆ 细胞或 V_{ero} 细胞上形成清晰的空斑, 形成的空斑能被特异抗 EHF 病毒血清所中和。其敏感性与用琼脂糖作覆盖物的空斑法一致。该方法具有操作简便、快速等优点, 适用于 EHF 的病原学和血清学研究。

关键词: 流行性出血热病毒 甲基纤维素 半微量空斑法 Vero-E₆ 细胞 Vero 细胞 中和试验

流行性出血热病毒空斑形成技术国内外已建立和应用^[1-5]。但这种技术具有难度大、操作繁琐和时间长等缺点, 影响它的普及与推广。用甲基纤维素培养基进行空斑试验具有操作简便、快速、省材料和能长期保存空斑等优点, 国外在研究登革热病毒时早已应用了这一方法^[6,7], 国内张国铭等以此法检测乙型脑炎病毒血清抗体^[8], 但用于 EHF 病毒则国内外尚无报道, 本文成功地建立了这一方法, 现报道如下。

材 料 与 方 法

一、细胞和甲基纤维素: V_{ero} 细胞从 ATCC 引进, V_{ero}-E₆ 细胞克隆 8 株由美国泛里特军事医学研究所 Eckels 博士惠赠, 本室用含 10% 小牛血清的 MEM 培养基传代培养。甲基纤维素为 Sigma 公司产品, 配制方法参考文献^[9]。

二、毒株和免疫血清: EHF 病毒 76-118 株、A₅₃₇ 株 (野鼠型) 和 U_r 株 (家鼠型) 由安徽医科所提供, Z₁₀ 株 (野鼠型) 和 沟₃ 株 (家鼠型) 由浙江卫生防疫站提供, L₉₉ 株 (家鼠型) 为卫生部长春生物制品检定所提供。免抗 EHF 病毒 R₃ 株免疫血清由浙江卫生防疫站提供。

三、半微量甲基纤维素空斑法及空斑减数中和试验 (PRNT):

1. 半微量甲基纤维素空斑法: 将 V_{ero}-E₆ 细胞和 V_{ero} 细胞经常规消化分散成 $1-5 \times 10^5$ 个细胞/ml 后, 按 0.9ml/孔 将细胞悬液加入到 16/24 孔塑料培养板中, 并立即加入不同稀释度的 EHF 病毒液 0.1ml/孔, 随后置 5% CO₂、37℃ 的培养箱内培养。6 小时后吸去细胞培养液, 每孔加 1ml 细胞覆盖物, 覆盖物的配方为: 2% 甲基纤维素 40%, 2 倍 MEM 培养液 40% 灭活小牛血清 10%, 7.5% NaHCO₃ 4%, 3% 谷氨酰胺 3%, 10mmol/L HEPES, , 1000000u/ml 青、链霉素

1%, 非必需氨基酸1%。继续培养7—10天后吸去覆盖物, 每孔加1%结晶紫液(配方按文献^[1])后置室温染色15—20分钟, 自来水漂洗, 凉干后即可肉眼计算空斑数。

2. 空斑减数中和试验(PRNT): 采用病毒稀释、血清固定法。病毒5倍稀释后再10倍连续稀释, 各稀释度病毒液分别与10—20倍稀释的免疫血清等量混和, 37℃中和1小时(每隔15—20分钟摇动一次), 各取0.1ml种入培养板上的细胞悬液中, 再按上述空斑法进行空斑形成减数试验。

四、EHF病毒半微量空斑法: 按文献^[1]进行。

结 果

一、Vero-E₉细胞上的半微量甲基纤维素空斑法对几株EHF病毒的PFU测定

我们在Vero E₉细胞上对6株EHF病毒进行PFU测定, 结果6株病毒均有清晰的空斑形成。在空斑形成的过程中, 感染细胞在覆盖物下都能见到融合病灶, 但出现的时间各毒株之间有所不同。有些毒株(如Z₁₀株)在接种后5—6天就有清晰的融合病灶产生, 而且随着培养时间的延长, 病灶直径逐渐扩大, 直到病灶中心的细胞坏死脱落。有些毒株(如UR株, L₉₉株等)则要在接种后9—10天才能见到细胞融合病灶。我们选择在融合病灶出现后2—3天对细胞单层进行染色, 结果均可见明显的空斑, 空斑数与病毒稀释度之间有明显的关系(见图1)。与此同时, 我们还进行了半微量甲基纤维素空斑法与原半微量空斑法测定病毒PFU的敏感性比较, 结果两者的敏感性一致(见表1)。

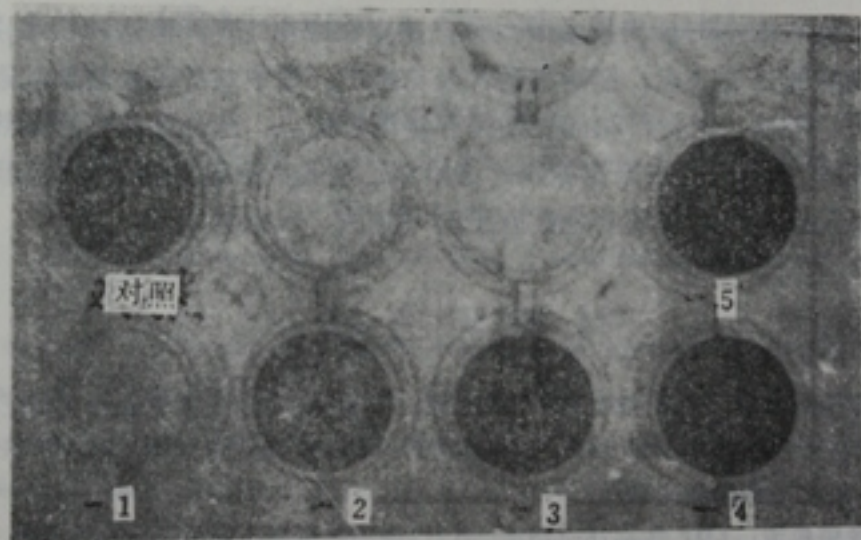


图1. Z₁₀株在E₉细胞上第9天的空斑形态

Fig 1. The plaque morphology of Z₁₀ strain on E₉ cells on day 9

二、Vero细胞上的半微量甲基纤维素空斑法对EHF病毒的PFU测定

我们还选择了3株EHF病毒(76-118株, Gou₃株和L₉₉株)在Vero-E₉细胞的母系细胞Vero细胞上进行半微量甲基纤维素空斑法进行EHF病毒PFU测定, 结果也有清晰的空斑形成(见照片2)。空斑形成前感染EHF病毒的Vero细胞在甲基纤维素培养基覆盖层下也均有典型的细胞病变产生。此外, 用Vero细胞进行的半微量甲基纤维素空斑法测定病毒PFU的敏感性也与原半微量空斑法基本一致(见表1)。

表1. 半微量甲基纤维素空斑法和半微量琼脂糖空斑法测定病毒感染滴度的比较

Table 1. Comparison of EHF virus titers between semi-micro methylcellulose plaque assay (MCPA) and semi-micro agarose plaque assay (APA)

| 空斑用细胞 Cell line for plaque assay | 病毒株 Virus strains | 病毒感染滴度(PFU/0.1ml) Virus infective titers(PFU/0.1ml) | |
|---|----------------------|--|-----------------------|
| | | 半微量甲基纤维素空斑法 MCPA | 半微量琼脂糖空斑法 APA |
| Vero-E ₂ cells | 76-118 | 2.0 × 10 ⁶ | 1.6 × 10 ⁷ |
| | Z ₁₀ | 2.5 × 10 ⁶ | 2.0 × 10 ⁶ |
| | UR | 9.0 × 10 ⁵ | 8.5 × 10 ⁵ |
| | A ₅₃₇ | 2.0 × 10 ⁴ | 7.0 × 10 ⁴ |
| | Gou ₂ | 4.5 × 10 ⁵ | 9.0 × 10 ⁴ |
| | L ₉₉ | 2.5 × 10 ⁴ | N D* |
| Vero cells | 76-118 | 2.8 × 10 ⁶ | 1.6 × 10 ⁷ |
| | Gou ₂ | 4.0 × 10 ⁵ | 1.0 × 10 ⁵ |
| | L ₉₉ | 4.0 × 10 ⁵ | 3.6 × 10 ⁵ |

*ND, 未做实验
ND, Not done

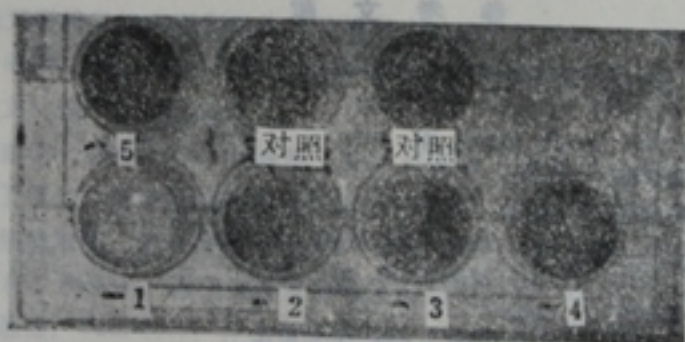


图2. 沟₂株在 Vero 细胞上第 8 天的空斑形态
Fig 2. The plaque morphology of Gou₂ strain on Vero cells on day 8

三、半微量甲基纤维素空斑减数中和试验

Z₁₀ 株、76-118 株、A₅₃₇ 株和 L₉₉ 株在 E₀ 细胞上形成的空斑以及 76-118 株在 Vero

表2. 兔抗 EHF 病毒血清对 EHF 病毒的空斑减数中和试验
Table 2. The plaque reduction neutralization test (PRNT) of rabbit anti-EHF virus serum to EHF viruses

| 病毒株 Virus strain | 中和组病毒感染滴度 Virus infective titers (PFU/0.1) in neutrali- zation group | 对照组病毒感染滴度 Virus infective titers (PFU/0.1) in control group | 中和指数 Neutralizing indices |
|---------------------|---|--|---------------------------------|
| 76-118* | 1.8 × 10 ⁷ | 6.2 × 10 ⁶ | |
| Z ₁₀ ** | 1.5 × 10 ⁷ | 2.4 × 10 ⁶ | 5300 |
| A ₅₃₇ ** | 1.0 × 10 ⁷ | 1.5 × 10 ⁴ | 1585 |
| L ₉₉ ** | 2.5 × 10 ⁷ | 2.5 × 10 ⁴ | 180 |

* Vero 细胞上的空斑减少中和的试验
* PRNT on Vero cells with MCPA

** E₀ 细胞上的空斑减少中和试验
** PRNT on Vero-E₀ cells with MCPA

细胞上形成的空斑都能被免抗 EHF 病毒 R₃ 株免疫血清所抑制, 免疫血清对各株的中和指数见表 2。

讨 论

我们曾根据国外资料首次在区内建立了 EHF 病毒全量和半微量空斑技术^(4,5), 但该技术条件要求高, 操作繁杂, 难度较大, 所需时间亦较长。因此, 我们根据过去作乙脑病毒空斑技术的经验⁽⁸⁾对该法进行改良, 在细胞覆盖物中用甲基纤维素代替琼脂糖, 结果 6 株 EHF 病毒在 Vero-E₆ 细胞上均可形成清晰的空斑, 其中 3 株病毒在 Vero-E₆ 的母系细胞上亦得到了同样的结果。用甲基纤维素代替琼脂糖后只需加一次覆盖物, 空斑形成只需 7—10 天, 较琼脂糖法缩短了 3—4 天时间, 并具有可长期保存空斑、操作简便等优点, 为病毒滴定和特异中和抗体检测等提供了有效的手段。

EHF 病毒感染细胞后子代病毒的完整颗粒大约需 7—9 小时才能形成, 而从细胞内释放游离出来所需的时间则长达 18 小时以上⁽⁹⁾。因此, 我们选定在病毒接种后 6—12 小时加细胞覆盖物, 其实验结果的敏感性与琼脂糖空斑法基本一致。

参 考 文 献

- (1) Mc Cormick J B et al., 1982, *Lancet*, 8275, 765.
- (2) Schmaljohn C S et al., 1985, *Science*, 227, 1014.
- (3) Takenaka A et al., 1985, *Arch Virol*, 84, 197.
- (4) 俞永新等, 1988, *病毒学报*, 4, 162.
- (5) 姚小剑等, 1988, *病毒学报*, 4, 347.
- (6) Fujita N et al., 1975, *Proc Soc Exp Biol Med*, 148, 472.
- (7) Morens D M et al., 1985, *J Clin Microbiol*, 22, 250.
- (8) 张国铭等, 1987, *病毒学报*, 3, 385.
- (9) 鄂征等, 1988, *组织培养技术*, 321—322 页, 人民卫生出版社。
- (10) 李德新译, 1988, *病毒性出血热* (世界卫生组织技术报告丛书 721), 人民卫生出版社。

Development of EHF Virus Semi-micro Methylcellulose Plaque Assay

Nie Zi-lin Yu Yong-xin Yao Zhi-hui

(National Institute for the Control of Pharmaceutical
and Biological Products, Beijing 100050)

A new semi-micro plaque assay has been established for epidemic hemorrhagic fever (EHF) virus, using methylcellulose as overlay tested on Vero-E₆ and Vero cell cultures. All EHF virus strains, including six tested on Vero-E₆ cells and three tested on Vero cells, could form clear plaques that could be neutralized by rabbit anti-EHF virus immune serum. The results also show that the sensitivity of this method is consistent with the method of semi-micro agarose

Plaque assay previously reported. However, this new method is easier, faster and more economical than the latter, and it can be read at any time and stored indefinitely for later interpretation or comparison.

Key words: Epidemic hemorrhagic fever (EHF) virus
Methylcellulose Semi-micro plaque assay Vero-E₆ cells Vero cells
Neutralization test

第五届国际无脊椎动物病理学及 微生物防治学术大会简介

Brief Review for Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control

第五届国际无脊椎动物病理和微生物防治学术讨论会于1990. 8. 20~24日在澳大利亚阿德赖德市举行。大会收到论文243篇, 其中昆虫病毒43篇, 会议代表266人, 来自世界27个国家和地区。我国提供论文14篇, 出席代表4人。

大会由阿德赖德大学的 Pinnock 教授主持。开幕式上由著名的昆虫病毒学者、加州大学的 Federici 教授作了题为“无脊椎动物病理学的光明前景”的大会报告。会议分为28个专题, 与昆虫病毒有关的有细胞培养, 流行病和生态学, GV, NPV, 分子生物学和基因工程等五个专题。Miller 作了分子杆状病毒学、激素调控及病毒杀虫剂的改进; Maeda: 利用杆状病毒载体在昆虫细胞中表达外源基因; Summers: 杆状病毒表达载体和外源基因的表达; Granados: 杆状病毒增强蛋白及其应用等。对杆状病毒基因工程及新型杀虫剂的进一步研究起着重大的作用。

在这次大会上, 我们有“一个新的昆虫病毒转移载体的构建”和“用昆虫病毒转移载体克隆表达 Bt 的 cry 基因”两篇论文。被大会评为优秀论文。在证书中写道, 你们的论文“获得高度赞扬, 是科学工作的典范, 达到了国际水平”。大会开得紧张、热烈; 并在团结友谊的掌声中结束。

(武汉大学病毒系 齐义鹏)