

油桐尺蠖核型多角体病毒的空斑测定

胡志红 谢天恩

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

提 要

在油桐尺蠖卵巢细胞系上对油桐尺蠖核型多角体病毒 (BsNPV) 进行了空斑测定。用此方法测定了BsNPV的感染力, 并将所得的结果与其TCID₅₀进行比较, 结果显示这两种方法在测定病毒感染力时敏感性相似。

关键词: 油桐尺蠖核型多角体病毒 空斑测定 半数组织培养感染剂量

油桐尺蠖核型多角体病毒 (*Buzura suppressaria* nuclear polyhedrosis virus, BsNPV) 是七十年代末在我国发现的。它对于茶园和森林的主要害虫之一油桐尺蠖具有较高的感染力和致死作用, 所以被作为病毒杀虫剂而受到重视, 对它的一般生物学性质和生物化学性质进行了广泛的研究。本文报道在油桐尺蠖卵巢细胞系上对BsNPV进行的空斑测定。

材 料 和 方 法

一、细胞 油桐尺蠖卵巢细胞系Bs-484^[1], 培养液为TC-100加10%小牛血清。

二、病毒 二种来源: 1. 直接采取BsNPV感染的油桐尺蠖幼虫的血淋巴, 经2500r/m离心25分钟, 取上清部分过滤除菌后置于4℃保存待用。2. BsNPV感染的组织培养物, 经2500r/m离心25分钟, 取其上清保存于4℃待用。

三、TCID₅₀测定 在直径为0.6cm的96孔组织培养塑料板 (Costar) 上, 每孔加入0.1ml细胞, 细胞浓度为 5×10^4 个/ml。在24小时内, 将培养液吸出, 每孔加入0.05ml待测病毒悬液。病毒悬液是用无血清TC-100对病毒原液作 $10^{0.5}$ 倍连续稀释而得, 共12个稀释度, 每个稀释度作8孔。于26℃吸附3小时后, 每孔加入含10%小牛血清的TC-100 0.1ml, 重放入26℃培养。以细胞核内出现多角体为病变特征。所得结果用Reed-Muench方法计算^[2], 病毒的感染力以TCID₅₀/ml表示。

四、空斑测定

1. 1%琼脂糖营养覆盖层的制备: 用无血清的TC-100培养液将低凝点琼脂糖 (Sigma Chemical Company产品) 配成2%的溶液, 8磅15分钟高压灭菌, 待冷却至40℃时, 与预先在40℃预热的含10%小牛血清的TC-100培养液等量混合均匀, 即为1%琼脂糖营养覆盖层。

本文于1991年3月16日收到, 1991年4月4日修回。

2. 空斑检测: 在24孔组织培养塑料板(16mm, Costar)中, 每孔加入0.5ml细胞, 细胞浓度为 $1\sim 2 \times 10^5$ 个/ml。于26℃培养至细胞贴壁后(24小时内), 去掉培养液, 加入0.25ml病毒悬液, 置26℃, 吸附3小时, 其间轻摇几次, 再去掉病毒悬液, 每孔加入0.75ml 1%琼脂糖营养覆盖层。待琼脂糖凝固后, 加入0.75ml含10%小牛血清的TC-100, 26℃培养。病毒感染细胞后第七天, 在显微镜下观察并计数空斑。病毒的感染力以每毫升病毒原液含多少个空斑形成单位(plaque forming unit, PFU)来表示, 计算PFU/ml。

结 果

一、病毒的接种浓度与所形成的空斑数之间的关系

将病毒悬液用无血源的TC-100作2倍连续稀释后, 作空斑滴定, 每个稀释度作4孔, 第七天计数空斑, 结果见图1。

从图1中可以看出, 病毒的接种量与所形成的空斑数之间呈明显的直线关系。

二、空斑法的灵敏度

空斑法的灵敏度可以通过计算在相同条件下的空斑形成单位(PFU)与半数组织培养感染剂量的比值而得, 根据泊松分布理论, 该比值应为 $0.69^{[9]}$ 。

我们将某病毒样品用TCID₅₀法测得其1ml原液的感染力为508200TCID₅₀。将同一样品作不同倍数稀释后作空斑测定, 计算PFU/TCID₅₀, 结果见表1。

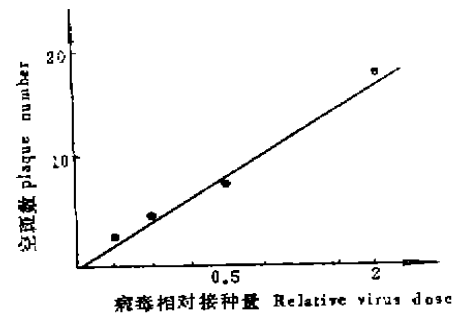


图1 病毒接种量与所形成的空斑数之间的关系

Fig.1 Relation between virus dose and plaque number

表1 空斑形成单位/半数组织培养感染剂量

Table 1 PFU/TCID₅₀

| 病毒稀释倍数 Dilution of virus | 空斑数 No. of plaques | 滴度 Titer | | x = PFU/TCID ₅₀ | |
|-----------------------------|-----------------------|----------|------------------------|----------------------------|-----------|
| | | PFU/ml | TCID ₅₀ /ml | x | \bar{x} |
| 6.25×10^{-4} | 230 | 368000 | 508200 | 0.72 | |
| 6.25×10^{-4} | 194 | 310400 | 508200 | 0.61 | |
| 6.25×10^{-4} | 192 | 307200 | 508200 | 0.60 | 0.63 |
| 3.125×10^{-4} | 87 | 278400 | 508200 | 0.55 | |
| 3.125×10^{-4} | 106 | 339200 | 508200 | 0.66 | |

实验结果PFU/TCID₅₀ = 0.63与理论值0.69经统计检验无显著性差异, 说明本实验的空斑测定与TCID₅₀测定反映的病毒感染力的敏感性相似。

三、空斑的特性

1. 空斑的形成过程

通常在感染后第三天开始观察到单层的局部区域出现二、三个核心中出现多角体的

相连细胞，构成了空斑形成中心。在以后的几天里，中心周围的细胞不断被感染，越来越多的细胞核内出现多角体，空斑不断扩大，直至与周围的空斑混杂。也有些空斑扩大到一定程度便不再扩增。

2. 空斑的大小

随着空斑在不断扩大，一般在第七天观察空斑的大小。发现即使同一病毒样品，在完全相同的条件下所得的空斑大小也可能不同。感染后的第七天，有的斑只由几十个、但有的斑却含有几百个感染后出现多角体的细胞，空斑的直径为0.05mm~0.3mm不等。

3. 空斑的形态

空斑的形态与单层上细胞的排列分布有较大的关系。当细胞分布疏密均匀时，产生的空斑一般为圆形；当细胞排列疏密不均时，空斑的形态也随之变得不规则（见图2，a、b）。

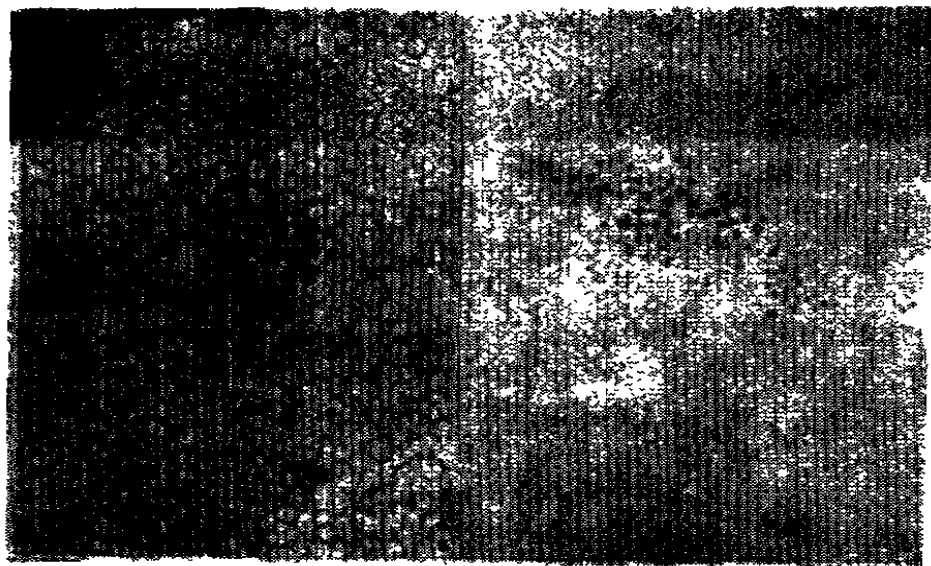


图2 空斑的形态

a. 细胞排列均匀，空斑呈圆形 b. 细胞排列疏密不均，空斑呈不规则状

Fig.2 Shapes of plaques

a, A round plaque; b, An irregular plaque

讨 论

本实验利用Bs-484细胞系对油桐尺蠖核型多角体病毒进行了空斑测定。用该方法测得的空斑数目与用来感染的病毒浓度呈直线相关，说明单个病毒粒子可以通过感染形成一个空斑。另外，同一病毒样品的PFU/TCID₅₀，经统计学检验，符合理论值0.69^[8]，说明此空斑法与TCID₅₀法在测定病毒感染力的敏感性相近，可以作为常规的测定病毒感染力的方法。

参 考 文 献

- (1) 刘松华, 谢天恩, 1983, 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), 第54-57页。
- (2) 戴华生等, 1983, 新实验病毒学, 第32页, 中国学朮出版社。
- (3) Davis, B.R., et al., 1977, Microbiology, 2nd ed., Harper and Row Publishers, Hagerstown, Md., pp.1042-1044.

Plaque Assay of *Buzura suppressaria* Nuclear Polyhedrosis Virus

Hu Zhi-hong Xie Tian-en

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

The plaque assay was carried out for *Buzura suppressaria* nuclear polyhedrosis virus (BsNPV) using cell line Bs-484. Results showed that the sensitivity of this plaque assay method was similar to that of TCID₅₀ method.

Key words: *Buzura suppressaria* nuclear polyhedrosis virus (BsNPV)
Plaque assay TCID₅₀