

## 用蚀斑法滴定痘苗病毒的准确性 及其精确数学模型的探讨

王继麟 朱家鸿

(卫生部武汉生物制品研究所, 武汉 430060)

**A** **摘要** 用蚀斑法滴定病毒是确定感染病毒颗粒存在数量的一种较准确方法。本实验表明, 痘苗病毒吸附 4 h 后仍有大量病毒粒子未能吸附到细胞单层, 进而测定出病毒接种量、维持液加量和所测病毒滴度间具有一种互为消长的非线性相关性。因而设计了几种检测方法, 其准确性均优于常规痘苗病毒蚀斑测定法。利用装配有 Mathematic 软件包的计算机在痘苗病毒接种量、维持液加量和所测病毒滴度间建立了曲线拟合模型和曲面拟合模型。通过曲线拟合模型推断病毒感染滴度为常规法测定值的近 5 倍。

**关键词** 蚀斑法, 痘苗病毒, 准确性, 数学模型

痘苗病毒天坛株曾作为疫苗株在我国用于消灭天花。近十年来, 随着基因工程技术的发展, 已用痘苗病毒天坛株作载体先后表达了乙肝病毒、狂犬病毒和艾滋病毒免疫蛋白在内的多种抗原。其中表达乙肝表面抗原的重组痘苗病毒灭活疫苗已用于人体免疫<sup>[1]</sup>。在美国, 经过遗传修饰的高减毒的痘苗病毒株已被降低安全等级, 用其作载体表达狂犬病毒糖蛋白的重组痘苗病毒活毒疫苗已用于人体免疫<sup>[2]</sup>。由于重组痘苗病毒作为疫苗, 其效力和所含病毒量正相关, 有必要对所含病毒量进行准确滴定。为此我们选择亲本株痘苗病毒天坛株为材料, 对其蚀斑滴定值的因素进行了探索, 以期建立更为准确和合理的痘苗病毒蚀斑滴定法。

### 材料和方法

#### 1 病毒株

痘苗病毒天坛株, 引自中国预防医学科学院病毒学研究所。

#### 2 细胞株

CV-1 细胞, 即非洲绿猴肾传代细胞。引自中国预防医学科学院病毒学研究所。

#### 3 病毒的蚀斑滴定法

3.1 常规法  $5 \times 10^5$ /孔·mL 的 CV-1 细胞悬液在 24 孔板 (Costar, USA) 上生长 2 d 成单层, 去营养液, 加入 4 个适宜 10 倍稀释的病毒稀释液, 每稀释度 3 孔, 每孔 0.1 mL, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内吸附 2 h, 补加含 5% 血清的 Eagles 维持液至 1 mL/孔, 静止培养 44 h。去维持液, 用 0.1% 结晶紫染色、数斑、计算病毒滴度。

3.2 微量吸附法 以小于 0.1 mL 的病毒液 (12.5、25、50  $\mu$ L/孔), 用微量移液器 (Gilson, France) 定量均匀地加在 CV-1 细胞单层上吸附 2 h, 分别补加维持液至 0.25、0.5、0.75 和 1 mL/孔。

3.3 微量不吸附法 方法同微量吸附法, 省去 2 h 吸附过程。

3.4 同时接种法 接种细胞悬液时同时接种不同量的病毒液, 46 h 判定结果。

3.5 2 d 吸附法 在 CV-1 细胞单层上加入不同稀释度的病毒液, 0.2 mL/孔, 46 h 判定结果。

#### 4 病毒吸附曲线的测定方法

0.1 mL/孔的病毒液经过 15、30 min 及 1、1.5、2、3、4 h 的不同吸附期, 按以下三种方式培养出斑并计算病毒滴度: (1) 补加维持液至 1 mL/孔; (2) 去吸附液, 每孔加维持液 1 mL; (3) 以上吸附了不同时间的病毒液重新在新的细胞单层上按常规法测定病毒滴度。

#### 5 病毒接种量、维持液加量与病毒滴度间拟合曲线和拟合曲面的计算机处理

5.1 曲线拟合法 将不同病毒接种量、维持液加量及获得的病毒滴度输入装配有 Mathematic 软件包的计算机。求病毒接种量和病毒滴度拟合曲线时采用  $Q(x) = a + b \exp(cx)$  式 [ $\exp(cx)$  是以  $e$  为底的指数函数], 用最小二乘曲线拟合法求逼近式。求不同维持液加量和  $f(a)$ 、 $f(b)$ 、 $f(c)$  的拟合曲线时, 采用  $P(x) = a_0 + a_1x + a_2x^2$  式, 用同法求逼近多项式。

5.2 曲面拟合法 求不同病毒接种量, 维持液加量和病毒滴度的拟合曲面时, 采用  $Z(x, y) = a + b \exp(cx) + d \exp(fy) + h \exp(ix + jxy + ky)$  式, 用最小二乘逼近法求拟合曲面方程及曲面。

## 结 果

### 1 不同时间痘苗病毒吸附量的动态观察

图 1a 为常规法测定的 4 h 内痘苗病毒的吸附曲线。从图可见, 2 h 内的病毒吸附量最大, 但 2~4 h 仍有部分病毒继续被吸附。病毒吸附不同时间后直接加维持液与去吸附液后, 加维持液所测的病毒滴度曲线为两平行曲线(图 1a, b), 后者滴度约为前者的 2/3, 病毒吸附 4 h 后的吸附液经常规法测定仍有大量病毒被测出(图 1c)。病毒吸附后去吸附液加维持液测定值(图 1b)与重吸附测定值(图 1c)之和高于不去吸附液的常规法测定值(图 1a)。

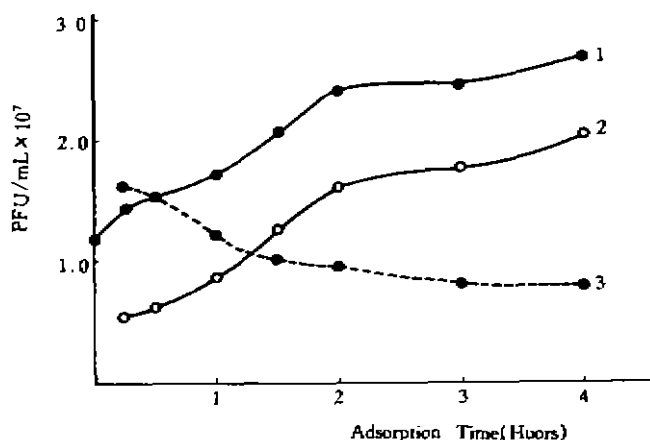


图 1 痘苗病毒的吸附曲线

1. 病毒接种吸附后, 不去未吸附残余病毒
2. 病毒接种吸附后, 去未吸附残余病毒
3. 未吸附残余病毒重测

Fig. 1 Adsorption curve of vaccinia virus

1. Inoculum was not moved after adsorption.
2. Inoculum was moved after adsorption.
3. Secondary titration of unadsorbed virus in inoculum.

### 2 病毒接种量和维持液加量对滴度的影响

在确定痘苗病毒最佳吸附时间为 2 h 基础上, 对不同的病毒接种量及吸附后的维持液加量进行了病毒滴度的比较测定, 结果列于表 1。从表 1 可见, 病毒的接种量越小, 测得的病毒滴度越高; 病毒吸附后补加的维持液量越少, 获得的病毒滴度也越高。以微量的病毒液吸附后加尽可能少的维持液至病毒在细胞上出斑, 可获得较为接近待测病毒真实感染滴度的滴定值。

### 3 不同蚀斑滴定方法的比较

如表1所示,改进的不同痘苗病毒蚀斑滴定法的准确性和简便性均不同程度地优于常规法。各种方法所获病毒滴度高低依次为:微量吸附法>微量同时接种法>微量不吸附法>2d吸附法>常规法。当微量法的接种量为25 μL/孔、维持液总量为0.25 mL/孔时,各种方法获得的病毒滴度之比依次为2.33:2.11:1.96:1.42:1。

表1 用不同蚀斑法检测痘苗病毒的比较

Table 1 Comparison of detection of vaccinia virus by different plaque methods

方法 Method	培养基体积 Volume of medium (mL/well)	接种体积 Volume of inoculum (μL/well)						
		12.5	25	50	100	200	300	400
吸附法 Adsorption (2 h)	0.25	4.55*	3.80	2.88	2.45	2.18		
	0.5	3.51	3.07	2.58	2.20	2.02		
	0.75	2.78	2.52	2.33	2.00	1.76		
	1.0	2.27	1.93	1.87	1.63**	1.41		
同时接种法 Inoculating viruses and cells suspension simultaneously	0.25		3.44	2.85	2.54			
	0.5		2.95	2.50	2.34			
	0.75		2.54	2.30	2.11			
	1.0		2.14	1.89	1.57			
不吸附法 No adsorption	0.25		3.20	2.63				
	0.5		2.40	2.23	2.13			
	0.75		1.95	1.90	1.65			
	1.0		1.45	1.35	1.30			
2 d 吸附法 Adsorption(2 d)						2.31	1.97	1.71

\* Titer of virus: PFU/mL × 10<sup>7</sup>

\*\* Titer obtained by routine method

### 4 病毒吸附量、维持液加量与病毒滴度间关系的数学模型的建立

#### 4.1 曲线拟合模型

##### 4.1.1 病毒吸附量与病毒滴度关系的逼近式

调用 Mathematic 软件包,根据数据求得不同维持液加量时病毒吸附量与病毒滴度关系的拟合曲线(图2)及其方程:

$$y_{\text{加液量}} = 0.25 \text{ mL} \quad Z_1 = 2.2748 + 3.5460 \exp(-0.035x)$$

$$y_{\text{加液量}} = 0.50 \text{ mL} \quad Z_2 = 2.0195 + 2.2014 \exp(-0.029x)$$

$$y_{\text{加液量}} = 0.75 \text{ mL} \quad Z_3 = 1.7462 + 1.2581 \exp(-0.017x)$$

$$y_{\text{加液量}} = 1.0 \text{ mL} \quad Z_4 = 1.3852 + 0.9759 \exp(-0.0142x)$$

式中 Z 为病毒滴度(PFU/mL), x 为病毒接种量(μL)。通过上述逼近式可求得不同加液量(0.25、0.5、0.75 和 1.0 mL)下, X 趋于零(X→0)时病毒滴度的模型估计值分别为:

$$\hat{Z}_{1x \rightarrow 0} = 5.8208 \times 10^7 \text{ PFU/mL} \quad \hat{Z}_{2x \rightarrow 0} = 4.2209 \times 10^7 \text{ PFU/mL}$$

$$\hat{Z}_{3x \rightarrow 0} = 3.0043 \times 10^7 \text{ PFU/mL} \quad \hat{Z}_{4x \rightarrow 0} = 2.3611 \times 10^7 \text{ PFU/mL}$$

##### 4.1.2 维持液加量与指数函数中参数关系的逼近式

上述指数函数的通式为  $Z(x) = a + b \exp(-cx)$ 。其中 a、b、c 为参数在维持液加量 y 固定

时为常数,由于 a、b、c 随 y 的变化而变化,固通式又可写为:  $Z(x, y) = f(y) + g(y)\exp[-h(y)x]$  其中 f(y)、g(y)和 h(y)为 y 的函数。将不同加液量下已获得的 f(y)、g(y)和 h(y)(上列四式中所显示数值)输入计算机求出 f(y)、g(y)、h(y)的逼近多项式分别为:

$$f(y) = 2.4973 - 0.81027y - 0.302893y^2$$

$$g(y) = 5.41918 - 8.58725y + 4.12949y^2$$

$$h(y) = 0.0464 - 0.04576y + 0.0128y^2$$

其拟合曲线见图 3a、图 3b 和图 3c。当 y<sub>加液量</sub> 趋于零 (y→0) 时, f(y)→2.4973, g(y)→5.41918, h(y)→0.0464。

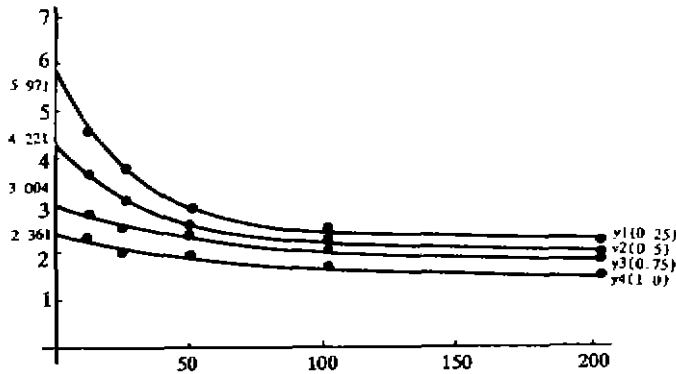


图 2 病毒滴度和病毒吸附量的拟合曲线  
Fig 2 Fitting curves of titer with volume of virus inoculum

y1: Volume of medium 0.25mL/well.  
y2: Volume of medium 0.5mL/well.  
y3: Volume of medium 0.75mL/well.  
y4: Volume of medium 1.0mL/well.

$$y1 = 2.27477968888313 + 3.515950468722485/\exp[0.035 * x]$$

$$y2 = 2.019508530871931 + 2.201434082322432/\exp[0.029 * x]$$

$$y3 = 1.746154201243469 + 1.258059029000941/\exp[0.017 * x]$$

$$y4 = 1.38515983392321 + 0.975915045097969/\exp[0.0142 * x]$$

#### 4.1.3 病毒真实感染滴度的推断

通式  $Z(x, y) = f(y) + g(y)\exp[-h(y)x]$ , 当  $x \rightarrow 0, y \rightarrow 0$  时,  $Z(x, y) \rightarrow f(y) + g(y) \rightarrow 2.4973 + 5.4198 = 7.9171\text{PFU/mL}$

#### 4.2 曲面拟合模型

根据输入数据,由 Mathematic 软件包进行曲面拟合得拟合曲面方程为:

$$Z(x, y) = -1.12038 - 373.02\exp(-1.2387x) + 380.068\exp(-0.4513x - 0.4328y) + 4.57292\exp(-0.4892y)$$

图 4 为拟合曲面在  $x[0, 100]$ 、 $y[0, 1.0]$ 、 $z[0, 6]$  区域内的图形。

## 讨 论

早先的研究表明,在痘苗病毒天坛株 TK 区插入狂犬病毒 G 基因或同时插入 N 和 G 基因,其毒力分别下降 2~4 和 4~6 个对数值<sup>[3]</sup>。重组痘苗病毒的增殖力、吸附力等特性与亲本株天坛株有平行关系;并通过比较证明痘苗病毒对 CV-1 细胞最敏感<sup>[4]</sup>。这些研究为本实验奠定了基础,并提供了依据。

一般病毒,如狂犬病毒、Junin 病毒属释放型病毒;而痘苗病毒和疱疹病毒等为非释放型病毒<sup>[5-8]</sup>。前一种病毒增殖的子代大量释放到培养上清而不出斑,且释放的子代病毒会重感染

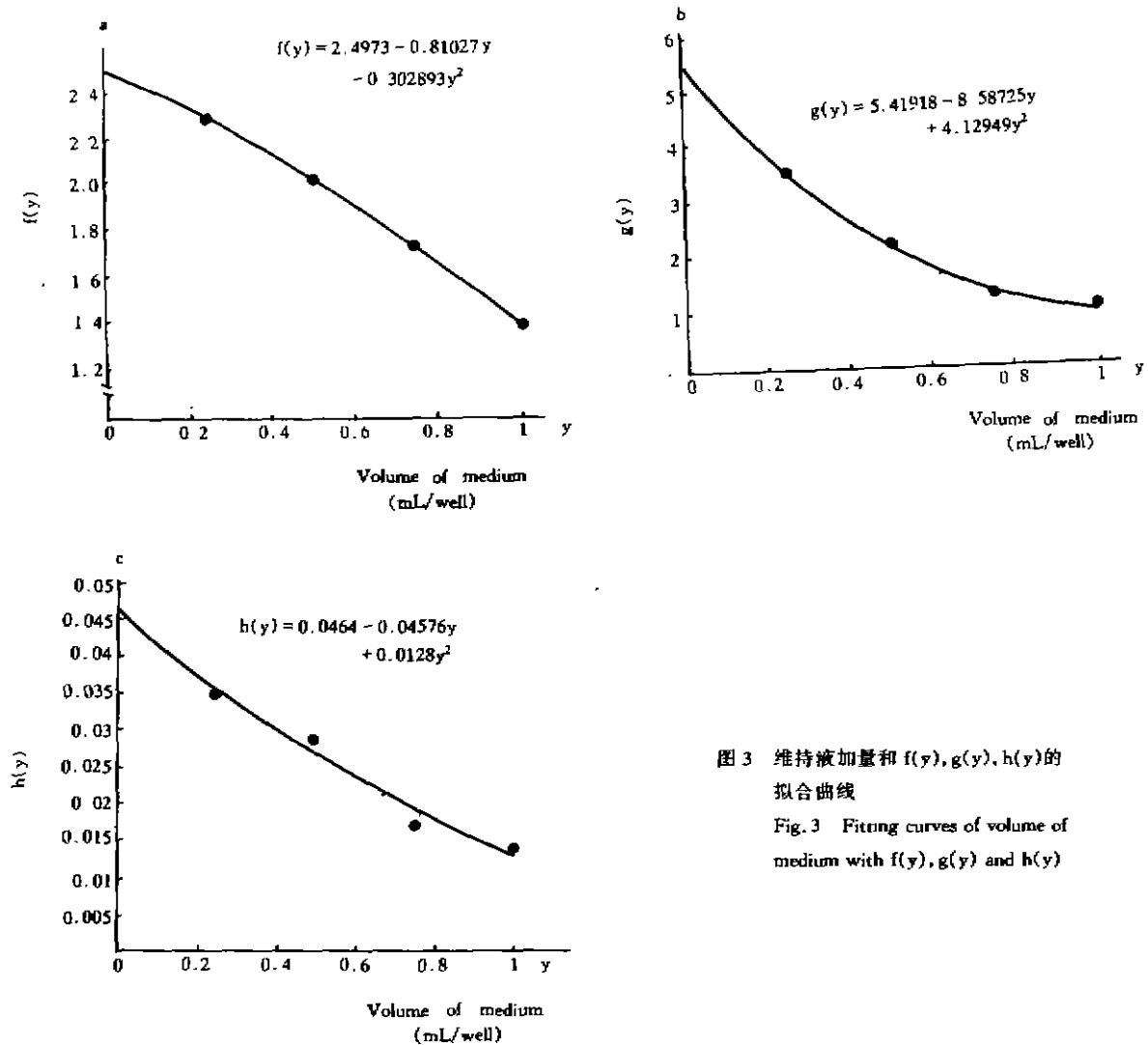


图3 维持液加量和  $f(y)$ ,  $g(y)$ ,  $h(y)$  的拟合曲线

Fig. 3 Fitting curves of volume of medium with  $f(y)$ ,  $g(y)$  and  $h(y)$

细胞,因而必须在感染细胞上加盖琼脂或甲基纤维素等覆盖物才能出斑;后一种病毒增殖的子代主要通过细胞间传播,不需加覆盖物便可在细胞上形成液体蚀斑。本实验通过在感染痘苗病毒的细胞上加盖甲基纤维素,病毒产生较大的蚀斑,且斑数和洗去未吸附病毒后产生的液体蚀斑数相当。当在培养上清中加入病毒抗血清后病毒产生较小的蚀斑(资料未显示),证实痘苗病毒主要通过细胞间传播,但也有少数病毒释放到细胞外,释放的子代病毒通过培养液传播成斑,对病毒滴度增值无显著影响。

理论上同一浓度病毒的不同接种量应与病毒蚀斑数有线性关系且获得的滴度值相同。但本实验所测结果不符合这种关系。当病毒接种量过大时,病毒粒子与细胞单层接触吸附的机率减小,故只有少量病毒吸附成斑。我们改用微量吸附法后,病毒和细胞接触吸附机率大大增

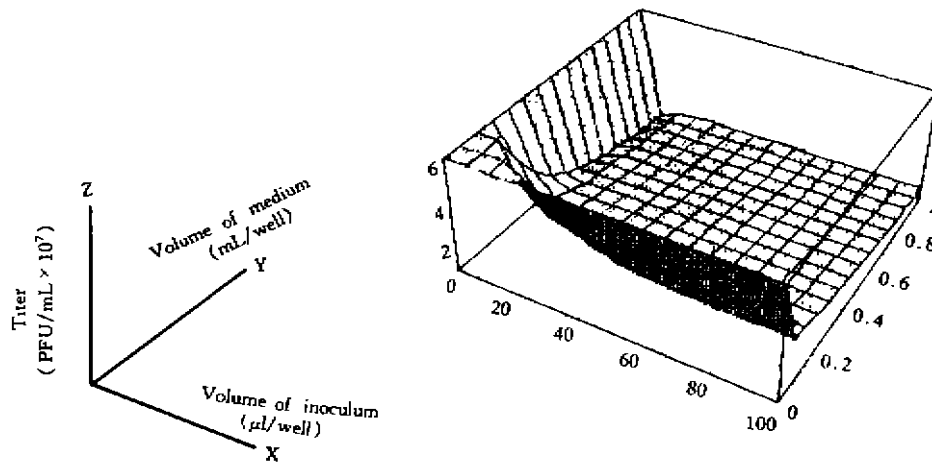


图 4 病毒滴度与病毒吸附量、维持液加量的拟合曲面

Fig 4 Fitting surface of titer with volume of virus inoculum and volume of medium

加,所获病毒滴度也大为提高。由于痘苗病毒吸附过程长达 10 h<sup>[8]</sup>,而微量接种吸附时间过长会使细胞干死,所以在微量病毒吸附 2 h 后加入尽可能少的维持液,病毒可以一新的、较低浓度继续吸附直至成斑,如此测出的病毒蚀斑滴度较为接近待测样品病毒粒子的真实感染滴度。

Bushar 等<sup>[6]</sup>在滴定 Junin 病毒时认为病毒滴度和病毒接种体积符合  $1/T = kV + h$  的线性关系;Slonim 等<sup>[9,10]</sup>则认为痘苗病毒所测滴度的对数和病毒接种体积的对数具有线性相关关系。本实验用装配有 Mathematic 软件包的计算机,推导病毒接种量和维持液加量这两因子与病毒滴度之间的关系,并证实一种以 e 为底的指数函数和一种多项式函数适合于表达这种关系,这与以往局限于线性关系的认识相比,较为直观、合理和准确。本研究同时尝试用一种曲面和曲面方程来直接表达这种关系。通过我们所建立的数学模型中的曲线拟合模型,推断样品的病毒感染滴度为 7.917PFU/ml,是常规滴定值的 4.86 倍。这个结果表明,有必要进一步改进出斑的条件和方法,使测定的病毒滴度能更准确的反映待测样品的真实病毒感染滴度。

**致谢** 本研究中有关曲线的计算机推导得到武汉汽车工业大学黄樟灿、王传法两位副教授的帮助;中国科学院武汉数理所熊规景研究员对本文的曲线拟合模型结构给予指导;美国器械和放射卫生中心 G. Bushar 博士提供部分资料和提出宝贵意见,特此致谢。

## 参 考 文 献

- 1 李岱, 兰晓青, 王素甫·那斯尔等. 重组痘苗乙型肝炎疫苗免疫中学生的一年保护效果. 中华预防医学杂志, 1993, 27: 74-76
- 2 Pincus S, Tartaglia J, Paoletti E. Poxvirus based vector as vaccine candidates. *Biologicals*, 1995, 23: 159-164
- 3 Zhu Jiahong, Wang Jilin, Cai Bing *et al.* Immunogenicity and relative attenuation of different vaccinia-rabies virus recombinants. *Archives of Virology*, 1996, 141: 1055-1065
- 4 王继麟, 朱家鸿, 龙行华. 狂犬病毒糖蛋白重组痘苗病毒生物学特性的研究. 中华实验和临床病毒学杂志, 1996, 10(3): 212-216
- 5 Cooper P D. 1967. The plaque assay of animal viruses. In: K. Maramorosch *et al.* eds, *Methods in Virology*, Vol. 3, Academic Press, New York and London, 244-312
- 6 Bushar G, Sagripanti J L. Method for improving accuracy of virus titration: standardization of plaque assay for Junin virus. *Journal of Virological Methods*, 1990, 30: 99-108
- 7 Nishimi M, Keller R. Observation on the mode of spread of vaccinia virus in HeLa cell monolayer cultures. *Virology*, 1962, 16: 91-92
- 8 Postlethwaite R. A plaque technique for the titration of vaccinia virus in chick embryo cells and some feature of vaccinia infection in this system. *Virology*, 1960, 10: 466-482
- 9 Slonim D, Hulenova M. Study of plaque titration of vaccinia virus in chick embryo cell cultures. I. Assay under an agar overlay. *Acta Virology*, 1969, 13: 209-215
- 10 Slonim D, Hulenova M. Study of plaque titration of vaccinia virus in chick embryo cell cultures. II. Assay by inoculation of a cell suspension and in liquid medium. *Acta Virology*, 1969, 13: 329-336

## Plaque Assay Method for Vaccinia Virus: Accuracy and Its Mathematical Model

Wang Jilin     Zhu Jiahong

(Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan 430060)

Titration of infective virus by plaque assay is one of the most accurate methods which could determine the numbers of infective virus. The result shows that a considerable number of vaccinia viruses in inoculum were still unadsorbed to cv-1 cell monolayer after a period of 4 hours adsorption time. A reciprocal and unlinear relationship between the titer of virus and the volume of inoculum, the volume of liquid medium was detected. According to this relationship, several new plaque assay methods, which had the advantage over routine method, were designed. By means of electronic computer equipped with mathematical software package, the curve fitting model and the surface fitting model of titer with the volume of virus inoculum and the volume of medium had been established. By curve fitting model, the extrapolated value of vaccinia virus titers was obtained fivefold higher than the titers by routine method.

**Key words** Plaque assay method, Vaccinia virus, Accuracy, Mathematical model