

粘虫胚胎细胞系的建立及对 MsNPV 敏感性的测定*

于洪春¹, 郑桂玲¹, 王晓云¹, 李国勋², 赵奎军¹

(1. 东北农业大学农学院植保系, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 河北农业大学, 河北 保定 071001)

Establishment of a cell line from embryos of *Mythimna separata* and its susceptibility to MsNPVYU Hong-chun¹, ZHENG Gui-ling¹, WANG Xiao-yun¹, LI Guo-xun², ZHAO Kui-jun¹

(1. Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: A new cell line, designated NEAU-Ms-980312, was established from 24-hr-old *Mythimna separata* eggs and was passaged 201 times. The cells were heterogeneous in morphology with spherical and spindle-shaped cells. The population doubling time of the cell line was 47.82h in 120h at 28°C. The cell line was highly susceptible to *Mythimna separata nuclear polyhedrosis virus* (MsNPV). When the cells were inoculated at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 0.08TCID₅₀/cell with wild passage MsNPV, the infection rates and occlusion bodies (OB) yield reached a value of 62.10%, 33.59PIB/infected cell at 240h postinfection (pi), respectively.

Key words: *Mythimna separata*; Cell line; *Mythimna separata nuclear polyhedrosis virus* (MsNPV); Susceptibility

摘要: 用培养 24h 的粘虫受精卵成功地建立一株粘虫胚胎细胞系, 命名为 NEAU-Ms-980312, 目前已传代 201 代, 该细胞系主要含有圆形和纺锤形两种细胞, 在 28°C、120h 的细胞群体倍增时间为 47.82h。该细胞系对粘虫核型多角体病毒有较高的敏感性, 用原代病毒以感染复数 (m.o.i.) 为 0.08TCID₅₀/细胞感染细胞, 在接毒后 10d, 病毒感染率和每细胞产生的多角体数量分别为 62.10% 和 33.59PIB。

关键词: 粘虫; 细胞系; 粘虫核型多角体病毒 (MsNPV); 敏感性

中图分类号: S433 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2003)01-0031-04

粘虫核型多角体病毒 (*Mythimna separata nuclear polyhedrosis virus*, MsNPV) 同源寄主细胞系的建立, 为 MsNPV 离体复制培养提供了可能^[1]。为寻求和建立高效的 MsNPV-昆虫细胞离体复制系统, 提高离体培养 MsNPV 能力, 我们又成功地建立一株新的粘虫胚胎细胞系。本文对此细胞系的建立、细胞生长特征性及对 MsNPV 的敏感性进行了报道。

1 材料与方法

1.1 培养基

Tc-100 昆虫培养基 (美国 SIGMA 公司制造),

辅以 20% 小牛血清。在进行病毒感染性测定时血清浓度改为 10%。

1.2 细胞原代培养

收集室内人工饲养的粘虫成虫新产下的受精卵约 1 000 粒, 于 26°C 培养 24h, 经 2% 次氯酸钠和 70% 酒精分别消毒后, 用无菌水洗 3 次, 再将卵转移到浸于 10mL 培养基中孔径为 100μm 的无菌细筛中, 用胶皮淀帚磨碎卵粒, 将每 1mL 细胞悬液移入含有 4mL 培养基的培养瓶中, 于 28°C 培养箱中静止培养, 每 10d 更换一半培养基。

1.3 细胞传代培养

当细胞长满培养瓶壁后悬浮细胞, 等量分 2 瓶

收稿日期: 2002-04-08, 修回日期: 2002-06-03

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助 (C9827); 河北省自然科学基金资助 (399169)

作者简介: 于洪春 (1966-), 男, 黑龙江省人, 副教授, 硕士, 主要从事农业害虫防治与研究的的教学与科研工作。

并加等量培养基于 28℃ 进行分瓶培养, 约每 8d 分瓶传代培养 1 次, 待细胞生长稳定后, 每 5d 传代培养一次。

1.4 细胞生长曲线和细胞群体倍增时间的测定

将第 40 代处于对数生长期的细胞按 3.0×10^5 细胞/mL 密度接种于 21 个培养瓶中, 于 28℃ 培养箱中培养。每隔 24h 随机取 3 瓶细胞用血球计数板计数细胞密度, 取其平均值, 绘出细胞生长曲线。按 Hayflick 法^[2] 计算出细胞群体倍增时间。

1.5 MsNPV-NOV 毒源的制备

MsNPV 为本研究室分离获得。按 10^8 PIB/mL 的浓度接种人工饲料饲喂 3 龄初粘虫幼虫, 5d 后取感染未死粘虫进行体表消毒, 剪断腹足收集血淋巴于培养基中, 经离心后过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 滤液即为毒源。

1.6 毒源 50% 组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 测定

将毒源作系列稀释到 10^{-8} , 在 96 孔细胞培养板每孔加入 2×10^4 个细胞, 培养 24h 后加入各级病毒 0.1mL, 培养 7d 后以产生多角体为感染, 按照

Reed 和 Muench 方法^[3], 计算病毒液的 TCID₅₀。

1.7 病毒感染率及多角体产量的测定

将 2.5mL 含 7.5×10^5 个的对数期细胞移入培养瓶中, 培养 3h 后待细胞贴壁后, 弃去培养基, 接种 1mL 毒源, 在 28℃ 吸附后 3h 后弃去病毒液, 重新加入等量培养基培养。每天用相差显微镜观察细胞被感染情况。在接毒后 10d, 以细胞中出现多角体为感染, 用血球计数板计数细胞被感染率。将被病毒感染的细胞用超声波裂解器破碎细胞释放出多角体, 计算出每个感染细胞产生的多角体数量。

2 结果

2.1 建系及传代

来源于粘虫胚胎的细胞悬浮液, 在 14d 左右形成贴壁的细胞聚集团, 约 1 个月从增长的细胞聚集团周围长出纤维状组织, 约 5 个月后呈网络的纤维状组织布满瓶壁 (见图 1A)。后来, 在纤维状组织或其下方生出许多不同形状的细胞 (见图 1B)。



图 1 粘虫胚胎细胞培养物的形态

Fig. 1 Morphology of *Mythisma separata* embryos cells of the 48th passage

A, Multicellular fibers formed a net-like structure over the bottom of the flask; B, Many different morphological cells attached to and underneath the fibers; C, NEAU-Ms-9801312 cells of the 48th passage.

约 12 个月后, 呈网络的纤维状组织从瓶壁解离, 细胞长满瓶壁, 开始进行第一次传代培养。约连续传代 20 次, 细胞开始生长稳定, 将该细胞系命名为 NEAU-Ms-980312。此细胞系有圆形和纺锤形两种细胞, 以圆形细胞为主, 且贴壁生长 (见图 1C)。目前该细胞系已传代 200 余代

2.2 细胞生长曲线和群体倍增时间

在不同时间对细胞的生长进行测定, 根据结果平均值绘制出细胞生长曲线图 (见图 2), 按 Hayflick 法计算出该细胞系在 28℃、120h 的细胞群体倍增时

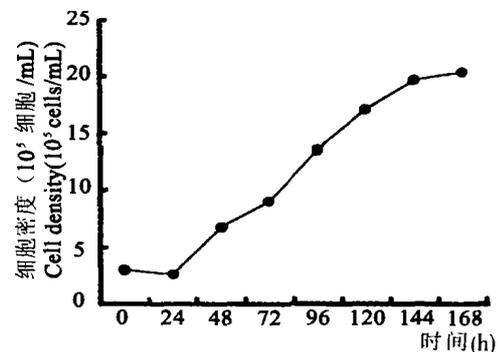


图 2 NEAU-Ms-980312 细胞生长曲线 Time (h)

Fig. 2 Growth curve of the NEAU-Ms-980312 cell line

间为 47.82h。从细胞生长曲线图可以看出,细胞生长明显表现为停滞期、对数生长期、平稳期三个阶段。

2.3 NEAU-Ms-980312 细胞对 MsPNV 的敏感性

NEAU-Ms-980312 细胞在接种 MsNPV 24h 后镜检发现,细胞生长缓慢,并有部分细胞聚集成堆。在接种病毒后 72h,部分细胞的细胞核已明显膨大(见图 3A),在接种病毒后 96h,细胞核内已经有较多折光性很强的多角体出现(见图 3B)。随着感染时间的延长,被感染的细胞数量增多,细胞

边缘也变得十分粗糙和模糊,失去贴壁习性,漂浮聚集成团,并有个别细胞破裂释放出多角体(见图 3C)。在细胞接种病毒后 10d,计数病毒感染率和细胞形成多角体的数量,结果表明病毒感染率为 62.10%,每感染细胞产生的多角体数量平均为 33.59PIB,实验结果见表 1。

采用病毒 10 倍稀释法和 96 孔细胞培养板法,经 3 次测定,按 Reed 和 Muench 计算方法计算出接种毒源的滴度值为 $2.37 \times 10^4 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。则原代病毒感染细胞的感染复数(m.o.i)为 0.08TCID₅₀/细胞。

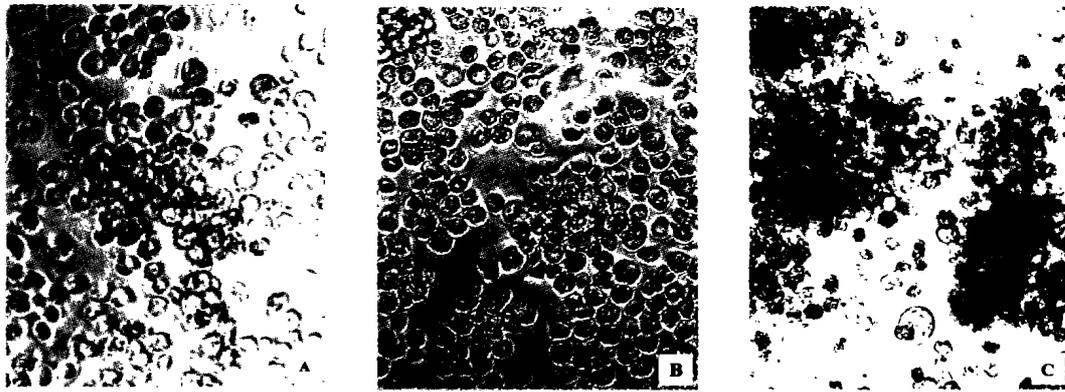


图 3 Ms NPV 感染后的 NeAu-Ms-980312 细胞形态

Fig. 3 NeAu-Ms-980312 cells infected with MsNPV

A, 72h postinfection; B, 96h postinfection; C, 9d postinfection.

表 1 NEAU-Ms-980312 细胞在接毒后 10d 病毒感染率及多角体产量

Table 1 Infection rates and OB yield in NEAU-Ms-980312 cells at 10d postinfection

Repeat	Density of cell (10^6 cells/mL)	Density of infected cell (10^6 cells/mL)	Infection rates (%)	Density of OB (10^6 PIB/mL)	OB yields (PIB/infected cell)
1	2.32	1.43	61.64	44.32	30.99
2	2.76	1.80	65.45	58.88	32.71
3	2.50	1.48	59.20	54.88	37.08
Average	2.52	1.57	62.10	52.69	33.59

OB: occlusion body

3 讨论

来源于粘虫胚胎的细胞从原代培养到建系成功用时约 18 个月,其中从细胞最初培养到细胞长满瓶壁进行第 1 次传代就耗时约 12 个月。在对该细胞进行传代培养的最初几代,细胞生长缓慢且极不稳定,有很多传代细胞在分瓶传代培养时死亡,此时是昆虫建系的危险时期。在此期进行昆虫传代培养时,接入的细胞数量要大,以一瓶等分为二代培养最为适宜,同时,应根据细胞生长情况决定是否进行分瓶培养,只有在细胞长满瓶壁时才能分瓶,一般以 7~8d 传代 1 次较为适宜。细胞在传代

培养约 20 代后,生长旺盛且稳定,此时改为以约 3×10^5 细胞/mL 的细胞密度进行传代培养,每 5d 传代 1 次,现已传代培养 200 余代。

NEAU-Ms-980312 在早期传代培养时,细胞形态和大小不一,但随着传代次数的增加,细胞形态和大小趋于稳定和一致,主要以圆形细胞为主,也有少量纺锤形细胞。细胞贴壁性强,在每次传代时必须用移液管多次吹打悬浮细胞,这对细胞有机械损伤作用,因此,在进行细胞传代培养的最初 24h,细胞数目几乎没有增加,此后细胞才明显快速增长。

在已建立起的几株粘虫细胞系对 MsNPV 敏感

性的比较中发现, 它们对 MsNPV 的敏感性有很大不同。粘虫血球细胞系不能被 MsNPV 感染, 已建立的胚胎细胞系 NEAU-Ms-941015 对 MsNPV 的敏感性很低, 只有极个别细胞能产生多角体, 用其滤液感染细胞, 没有发现细胞能被再感染。用 0.1TCID_{50} /细胞的感染复数感染 NEAU-Ms-947311 细胞, 原代病毒感染率为 39.51%, 多角体产量为 $16.48 \times 10^6 \text{PIB/mL}$, 平均每感染细胞产多角体数为 $26.14 \text{PIB}^{[4]}$, 而用 0.08TCID_{50} /细胞的感染复数感染 NEAU-Ms-980312 细胞, 原代病毒感染率为 62.10%, 是 NEAU-Ms-947311 细胞的 1.57 倍, 多角体产量为 $52.69 \times 10^6 \text{PIB/mL}$, 平均每感染细胞产多角体数为 33.59PIB , 多角体产量是 NEAU-Ms-947311 细胞的 3.20 倍, 说明此细胞系对 MsNPV 的敏感性明显大于前几株细胞。类似情况其他学者也有报道, 如来自于棉铃虫蛹的卵巢细胞系, 产生的 HzSNPV OB 和 NOV 可相差 100 倍以上^[5,6]。可见, 来自于同一种昆虫或同种昆虫组织的不同细胞系, 其对同一病毒的敏感性也会有很大的差异, 这对我

们在建立和寻找敏感的昆虫杆状病毒——昆虫细胞离体复制系统时提供了一些有益启示。

参考文献

- [1] Li G, Yu H, Shong J, *et al.* New cell line from embryos of *Mythimna separata* [J]. *Entomologia sinica*, 1998, 5(1): 89-94.
- [2] Hayflick L. Subculturing human diploid fibroblast cultures[A]. In "Tissue Culture: Methods and Applications" [M]. New York: Academic Press, 1973, 220-223.
- [3] Reed L J, Muench H A. A Simple method of estimating fifty percent end-points [J]. *Am J Hyg*, 1938, 27: 493-497.
- [4] 于洪春, 王晓云, 李国勋. 四株昆虫细胞系对粘虫核型多角体病毒敏感性的测定 [J]. *东北农业大学学报*, 2000, 31(4): 342-345.
- [5] McIntosh A H, Ignoffo C M. Replication and infectivity of the single-embedded nuclear polyhedrosis virus, *Baculovirus heliothis*, in homologous cell line [J]. *J Invert Pathol*, 1981, 37: 258.
- [6] Rice W C, McIntosh A H. Yield and activity of the *Heliothis zea* single nuclear polyhedrosis virus propagated in cloned and uncloned lines of *Heliothis zea* cell [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1989, 25: 201.