

利用空斑技术进行流行性乙型脑炎病毒 滴定和中和试验的初步报告

陈伯权 许兆祥 柳元元 范瑞莲

(中国医学科学院病毒学系)

空斑技术自 1952 年由 Dulbecco^[1] 建立以来, 已被广泛地应用于病毒的滴定、空斑抑制试验等血清学工作; 此外还成功地利用病毒的空斑特征进行了病毒的选种^[2,3], 为病毒变异的研究及寻找弱病毒株等工作提供了有效的方法。

Porterfield^[4]、郭辉玉^[5]和 Kanda^[6] 等报告, 流行性乙型脑炎病毒(简称乙型脑炎病毒)在鸡胚纤维母细胞上可以形成空斑。但 Henderson^[7] 等报告乙型脑炎病毒在鸡胚纤维母细胞上不能形成空斑, 而在鸭胚肾上才能形成空斑。在乙型脑炎病毒的空斑抑制试验方面, 也有些作者进行了研究, 但是对利用空斑技术进行该病毒的滴定和中和试验等研究尚少。本文对后述这些方面进行了初步研究。

一、材料与方 法

(一) 病毒 采用京卫研₁株(即 A₂株), 其历史详见文献[8]。本实验采用的材料系在鼠脑传代至 39 代的鼠脑病毒。用含有 5% 小牛血清(中和抗体阴性)的 Hanks 溶液, 将受染鼠脑制成 10% 悬液, 经 3,000 转/分离心沉淀 30 分钟后, 取出上清液, 作为实验用的病毒材料。

(二) 病毒的 LD₅₀ 滴定 用本院动物房繁殖的正常三周龄小白鼠, 经脑内接种 10 倍稀释的病毒悬液, 每一稀释度接种小白鼠 4 只, 每只接种 0.03 毫升。接种后对动物观察 2 周。按 Reed 和 Muench 法^[9]计算其 LD₅₀ 滴度。

(三) 空斑实验技术

1. 鸡胚纤维母细胞的制备: 取 10—11 日龄鸡胚的肌皮组织, 按 Dulbecco^[1] 的方法进行消化。培养细胞时所用的生长液为含有 0.5% 乳蛋白水解物的 Hanks 溶液、5% 小牛血清、4% NaHCO₃ (3.4%)、青霉素 1 百单位/毫升和链霉素 100 微克/毫升。在底面积为 2×7 平方厘米的培养瓶中接种 3 毫升细胞悬液, 每毫升含 4×10⁶ 个细胞。在 37°C 培养 20—24 小时, 生成厚而致密的细胞层, 供病毒空斑滴定用。

2. 营养性琼脂的配制: 先配成琼脂-乳蛋白混合液, 其成分为:

Earle 氏液 (10 倍浓缩, 不含 NaHCO₃) 18.00 毫升。

混合液成份	乳蛋白水解物	0.9 克
	琼脂(丙酮蒸馏水处理) ^[10]	1.98 克
	无离子水(导电度 < 5)	139.52 毫升

将各成分混合均匀, 加热溶解, 然后分装小瓶, 经 8 磅高压消毒后贮存备用。用前将琼脂-乳蛋白混合液加热溶解, 待温度降至 43°C 时, 按下列比例配成营养性琼脂:

琼脂-乳蛋白混合液	159.4 毫升
小牛血清	9.0 毫升
中性紅 (1:1000)	5.0 毫升
NaHCO ₃ (7.5%)	5.4 毫升
青霉素和鏈霉素混合液(每毫升中含青霉素 1 万单位和鏈霉素 1 万微克)	1.2 毫升

配好后,放在 40°C—43°C 水杯中輕輕搖动,待水的溫度降至 39°C 时即可使用。

3. 病毒接种及空斑滴度的計算: 将长成致密而厚的細胞层用 pH7.6 的 Hanks 溶液洗 1 次, 每瓶接种稀釋好的病毒悬液 0.5 毫升, 在 37°C 吸附 90 分钟, 傾出剩余的病毒悬液, 加入溫度已降至 39°C 左右的营养性琼脂 3 毫升, 待琼脂凝固后将瓶子倒置, 放在不曝光的鉄盒內, 置 37°C 恆温箱內培养。

空斑滴度的計算是根据 Dulbecco^[1] 的方法以每毫升病毒悬液实际所形成的空斑数目的对数来表示, 即:

$$\text{病毒的空斑滴度} = \frac{\text{最高稀釋度所形成的空斑数目} \times 1}{\text{病毒悬液的接种量} \times \text{引起空斑的病毒悬液的最高稀釋度}}$$

二、試驗与結果

(一) 观察空斑最适宜的时间

乙型腦炎病毒在鸡胚纖維母細胞培养时, 一般在感染后 72—96 小时开始出現肉眼可見的空斑。此后空斑数目随着培养時間而增加。到第 6 天已基本穩定, 延长培养時間空斑数目基本上不增加, 至第 8、9 天以后細胞开始衰老。如以第 6 天出現的空斑数目为 100 計算, 則第 4 天只出現 73% 的空斑, 第 5 天达到 92%, 第 7、8 天基本上不再增加(此时有些細胞由于衰老死亡或者有些空斑相互融合, 影响空斑計数的精确性)。因此, 在第 6 天观察結果最为适宜。

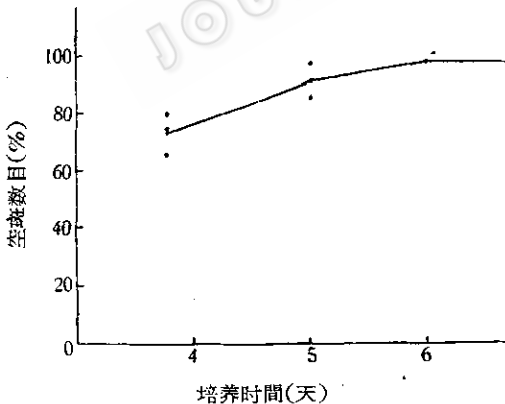


图 1 空斑数目与培养时间的关系

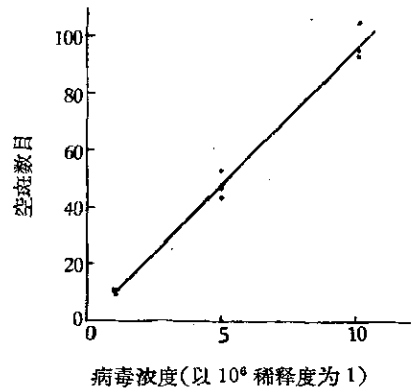


图 2 病毒浓度与空斑数目的关系

(二) 病毒的空斑滴定

1. 空斑数目与病毒浓度的关系: 实验用 10⁻⁵、2×10⁻⁶、10⁻⁶ 三种不同稀釋度的病毒悬液接种細胞层、观察空斑数目与病毒浓度的关系。由图 2 可以看到空斑数目随病毒浓度增加而增加。病毒浓度和空斑数目的关系, 基本上呈一直綫关系。

2. 空斑滴度的稳定性: 实验用同一份病毒悬液在几組試驗瓶中进行滴定, 在第 6 天观察空斑数目。表 1 所列示 4 次实验所得的結果。

表 1 同一份病毒悬液其空斑滴度的稳定性

组别	毒种	病毒稀释度	空斑数目	空斑滴度 (log PFU/毫升)	标准误差 (log)
1	A ₂	10 ⁻⁶	32	7.81	± 0.081
			43	7.94	
			24	7.68	
			27	7.73	
			26	7.72	
2	A ₂	10 ⁻⁶	86	8.24	± 0.022
			87	8.24	
			96	8.28	
3	A ₂	10 ⁻⁶	135	8.43	± 0.008
			131	8.41	
			136	8.43	
4	A ₂	10 ⁻⁶	44	7.95	± 0.035
			33	7.88	

可以看到,同一份病毒悬液所出现的空斑数目基本上是一致的,各组的标准误差范围是在 ±0.081 对数以内。由此可见空斑实验的可重复性与稳定性是相当高的。

3. 细胞层密度和中性红染色时间对空斑滴度的影响: 实验用不同数量的细胞接种培养瓶, 孵育一定时间, 使形成不同密集程度的细胞层后, 在每个培养瓶中接种了同量的病毒, 比较各瓶中病毒的空斑滴度, 如表 2 所示。细胞接种量为 400 万/毫升培养 24 小时及接种量为 200 万/毫升培养 48 小时的细胞层, 接种病毒后其空斑滴度较高——相应为 7.60 和 7.20 对数; 而细胞接种量为 300 万/毫升培养 24 小时及 100 万/毫升培养 48 小时的细胞形成的空斑滴度较低——相应为 6.60 和 6.81 对数; 细胞接种量为 200 万/毫升培养 24 小时的细胞层, 接种病毒后未见有空斑形成。

表 2 细胞层的密度与空斑滴度的关系

组别	细胞接种量	培养时间 (小时)	空斑滴度 (log PFU/毫升)
I	100 万/毫升 × 3	48	6.81
	200 万/毫升 × 3	48	7.20
	300 万/毫升 × 3	24	6.60
	400 万/毫升 × 3	24	7.60
II	200 万/毫升 × 3	24	0
	400 万/毫升 × 3	24	8.30

Tames^[11] 报告, 中性红染色时间对脊髓灰白质炎病毒在 HeLa 细胞上、西方马脑炎病毒在鸡胚纤维母细胞上的空斑滴度有显著的影响, 中性红与琼脂同时加入病毒培养瓶中, 比在琼脂面下培养病毒 72 小时后再染中性红, 其空斑数目要减少 50%。为了观察对脑炎病毒的类似影响, 进行了中性红染色时间与空斑滴度的关系实验。其结果如表 3 所示, 中性红与琼脂同时加入及在琼脂下培养病毒 72 小时后再加中性红, 其空斑滴度相应

为 7.60 和 7.78, 说明在本实验范围内, 中性红染色时间对空斑滴度影响不大。

表 3 中性红染色时间对空斑滴度的影响

染色时间	病毒稀释度	空斑数目	空斑滴度 (log PFU/毫升)
中性红与琼脂同时加入	10^{-5}	融 合	7.60
	10^{-6}	26	
	10^{-7}	2	
	10^{-8}	0	
感染病毒 72 小时后再 加入中性红	10^{-5}	融 合	7.78
	10^{-6}	30	
	10^{-7}	3	
	10^{-8}	0	

4. 空斑滴度与鼠脑 LD_{50} 滴度比较: 实验将同一份病毒悬液分成二份, 一份在鸡胚纤维母细胞层滴定其空斑滴度, 另一份在小白鼠脑内滴定其 LD_{50} 滴度。结果如表 4 所示。空斑滴度与鼠脑滴度基本上成一定的比例关系, LD_{50} 滴度平均比空斑滴度高 1.41 对数。

表 4 同一份病毒悬液其空斑滴度和鼠脑滴度的比较

组 别	毒 种	空 斑 滴 度 (log PFU/毫升)	鼠 脑 滴 度 (log LD_{50} /毫升)	LD_{50} /PFU (log)
1	A_2	7.90	9.00	1.10
2	A_2	8.30	9.50	1.20
3	A_2	8.30	9.50	1.20
4	A_2	7.82	9.30	1.48
5	A_2	7.88	9.30	1.39
6	A_2	8.30	10.02	1.72
7	A_2	8.00	9.80	1.80
平 均 数				1.41

(三) 病毒的空斑中和试验

用以下方法研究病毒的空斑中和试验及其可靠性。

用 Hanks 溶液稀释好的 2×10^{-1} 病毒悬液作 10 倍递增稀释, 将每个稀释度的病毒悬液各分成 2 份, 1 份加入等量人血清 (取自输血者) 作为试验组, 另一份加入等量中和反应阴性 (根据小白鼠脑内滴定) 的小牛血清作对照组。2 份材料皆在 37°C 放置 60 分钟, 然后从每个稀释度取出 0.3 毫升, 接种于长好的鸡胚纤维母细胞中, 在 37°C 吸附 90 分钟。不倾出剩下的液体即加入营养性琼脂, 轻轻摇匀使营养性琼脂和剩下的液体混合, 静置片刻, 待琼脂凝固后, 按上述方法倒置, 于 37°C 下培养。经 72—96 小时后, 观察结果。

同时将以上对照组及试验组的同一份材料在 3 周龄小白鼠脑内作中和试验, 以比较其可靠性。

其结果如表 5 所示。空斑中和试验与小白鼠中和试验的中和指数基本上呈平行关系, 空斑中和指数比鼠脑中和指数高 2—6 倍。在鼠脑中和试验为阴性的血清, 在空斑中和试验中同时表现为阴性的结果。因此, 利用空斑进行病毒的中和试验是可靠的。

表 5 乙型脑炎病毒空斑中和试验和鼠脑中和试验的比较

血清号	空斑中和试验			鼠脑中和试验			空斑中和指数 鼠脑中和指数
	对照组 (log PFU/ 毫升)	试验组 (log PFU/ 毫升)	中和指数	对照组 (log LD ₅₀ / 毫升)	试验组 (log LD ₅₀ / 毫升)	中和指数	
I	7.82	3.52	19950	9.02	5.52	3162	6.3
II	8.00	4.59	2455	9.75	7.18	1024	2.4
III	7.82	4.82	1000	10.02	7.85	148	6.6
IV	7.52	7.52	0	9.85	10.52	0	0

三、讨 论

利用空斑技术进行病毒的定量滴定已广泛地应用于病毒学研究^[1,12]。本实验证明,乙型脑炎病毒空斑滴度与病毒接种量成直线关系。在实验条件下,于病毒接种后第 6 天产生的空斑数量基本上不再增加,因此,在此时进行空斑计数是比较合适的。实验证明,空斑滴度虽然比鼠脑 LD₅₀ 滴度较低,但二者的比值是比较稳定的,并且同一病毒多次实验结果证明,空斑滴度可重复性很高。因此,用空斑技术作乙型脑炎病毒的滴定是可靠的。

关于中性红染色时间对空斑滴度的影响,本实验结果表明,中性红加入的时间不同,对空斑数目虽然稍有影响,但对空斑滴度影响不大。此结果与 Tames^[11] 报告稍有差别,这可能与病毒种类不同及实验方法不同有关,但其主要原因尚待进一步阐明。由于中性红可以与琼脂同时加到病毒培养瓶中,这给实验操作带来了不少方便。

本实验观察到细胞层的密度和厚度对空斑的形成有一定的影响。当细胞接种量少而尚未形成密集细胞层时(如 200 万细胞/毫升培养 24 小时)不易形成空斑。在本实验范围内,细胞接种虽然有不同,但是经过一定时间的培养,使瓶中的细胞繁殖成为密集细胞层后再接种病毒,结果病毒的空斑滴度差别不大。本实验表明,当细胞量较大时(例如 400 万细胞/毫升),培养 24 小时即可作空斑试验,细胞接种量较小时(如 200 万细胞/毫升),培养 48 小时也可以应用。此结果说明具有适当密集程度的细胞层是形成空斑的必要条件,否则不易形成空斑;同时指出,可以用上述不同细胞量接种培养瓶,分别于 24、48 小时在细胞比较密集时接种病毒进行空斑试验。采取这种操作方法,可使同一批消化的细胞供作两批实验用,这样可以节省材料和时间。

郭辉玉^[5]曾观察到乙型脑炎病毒免疫血清能抑制该病毒的空斑形成,但未应用于血清中和抗体的滴定。本实验表明空斑中和试验不但可以应用于该病毒的中和抗体测定,而且表明阳性血清的空斑中和指数比小白鼠的中和指数高 2—6 倍。空斑中和试验所测得的中和指数为什么比鼠脑中和指数较高呢?根据试验结果看来,没有抗体存在时,病毒的空斑滴度比鼠脑滴度约低 1 个对数左右,但在有中和抗体存在的情况下,空斑滴度比鼠脑滴度低 2 个对数左右。这可能由于在中和抗体存在情况下,较少量的病毒更不易侵入组织培养细胞进行繁殖。因此空斑中和反应比鼠脑中和反应更为明显。所以空斑中和试验可能比鼠脑中和试验更为敏感。对空斑中和试验的阳性标准尚待研究后才能确定。

四、摘 要

1. 根据本实验的结果观察,乙型脑炎病毒的空斑滴度虽然比鼠脑滴度略低,但是空斑

滴度与鼠脑滴度的比值是較恆定的,同时空斑的数目与病毒的接种量成直綫关系。空斑滴度的可重复性和稳定性也相当高。因此,可利用空斑技术作乙型脑炎病毒的定量滴定。

2. 实验表明空斑中和试验不仅可以代替鼠脑中和试验,而且表明对阳性血清表现較高的中和指数。本文并对空斑中和指数較高的原因进行了讨论。

3. 本文对空斑试验中细胞层的密度、中性红染色时间与空斑滴度的关系进行了观察,并对其实用意义进行了讨论。

参 考 文 献

- [1] Dulbecco, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **38**:747, 1952.
- [2] Sabin, A. B.: *Bull. N. Y., Acad. Med.*, **33**:17, 1957.
- [3] Hearn, H. J., Jr. and Soper, W. T.: *Bact. Proc.*, **61**:150, 1961.
- [4] Porterfield, J. S.: *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **22**:373, 1960.
- [5] 郭鐸玉: *微生物学报*, **8**:1, 1960.
- [6] Inoue, Y. K. & Iwasaki, D.: *J. Immunology*, **87**:337, 1961.
- [7] Henderson, J. R. & Taylor, R. M.: *J. Immunology*, **84**:590, 1960.
- [8] 黄祯祥、周明先: *微生物学报*, **6**:32 1958.
- [9] Reed, L. J. & Muench, H.: *Amer. J. Hyg.*, **27**:493—497, 1938.
- [10] Dulbecco, R. & Vogt, M.: *J. Exp. Med.*, **99**:167, 1954.
- [11] James, E. D.; Roycek, Z. L. & Thomas, K. S.: *Virology*, **6**:567, 1958.
- [12] Porterfield, J. S.: *Nature*, **187**:1069, 1959.

PRELIMINARY STUDIES ON THE TITRATION AND NEUTRALIGATION AND NEUTRALIZATION TEST OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS WITH PLAQUE ASSAY MEHTOD

CHÉN BO-CHÜAN, HSU CHAO-HSIANG, LIU YUAN-YUAN AND FAN RUI-LIAN
(*Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences*)

This study showed that the infectivity titres of Japanese B encephalitis virus obtained with the plaque assay method were approximately lower by 1 Log than those obtained through intracerebral inoculation of mice. However, the ratio between these two sets of titre was relatively constant and the number of plaques formed was proportional to the quantity of virus inoculated. Therefore, it is suggested that the plaque assay method may be used for routine quantitative titrations of the infectivity of Japanese B encephalitis virus.

By comparing the results obtained in the neutralization tests performed with the plaque assay method and the mouse brain inoculation method, it was found that the neutralization index of a given serum obtained with the former method was 2—6 times higher than that obtained with the latter. The possible explanations for this phenomenon were given in the discussion.

Certain factors which were considered to be essential for the titration and neutralization test of Japanese B encephalitis virus with the plaque assay method were also studied and discussed.