

# 新城鸡瘟病毒空斑滴定的简单方法

郭焯玉 嚴詠楷 白施恩

(中山医学院微生物学教研组, 广州)

动物病毒的空斑技术自 Dulbecco (1952)<sup>[1]</sup> 建立以来, 已被广泛应用于病毒学的研究。目前常用空斑方法的缺点是技术较复杂, 空斑的呈现又受各种因素的影响, 用中性红染色的细胞标本不能固定保存。为此, Holland 与 McLaren (1959)<sup>[2]</sup> 曾用减量琼脂的复盖液及结晶紫染色法改良了几种肠道病毒及牛痘苗病毒的空斑滴定。Hotchin 等(1960)<sup>[3]</sup> 利用小量琼脂复盖液及血球吸附法显示出一些粘液病毒的空斑。关于新城鸡瘟病毒(下称 NDV) 在鸡胚单层细胞上形成空斑及用作病毒滴定的指标有不少报告<sup>[4-9]</sup>。但都是采取常量琼脂复盖层做试验的。我们按 Holland 与 McLaren (1959) 及 Hotchin 等(1960) 方法, 用小量琼脂复盖液在鸡胚单层细胞小瓶作 NDV 的滴定, 并对本方法的准确性, 可重复性及敏感性作了一些研究。

## 材料与 方法

**病毒** 用 NDV 疫苗株, 系从本市兽医防疫站取得, 经本实验室用鸡胚尿囊途径作多次传代, 将感染鸡胚的尿液分装小管, 放普通冰箱冰盒内冻存, 作为实验用的病毒原材料。

**鸡胚单层细胞的制备** 取 10 天龄的鸡胚, 剪碎, 按常规方法过滤、离心。将沉淀的细胞加适量生长液(A液)稀释。用于小量琼脂空斑法的细胞浓度为每毫升  $4 \times 10^6$ 。按此量接种于底面积为  $1.5 \times 3.5$  平方厘米的抗菌素小瓶, 每瓶 1 毫升。观察常量琼脂复盖层下的空斑用侧面积为  $2 \times 6$  平方厘米的扁瓶, 每瓶接种细胞  $1.5 \times 10^7$ 。观察试管细胞病变或血球吸附现象用  $12 \times 150$  毫米的小管, 每管细胞  $1 \times 10^6$ 。抗菌素小瓶及扁瓶均平放, 试管斜放  $5^\circ$  角。静置于  $36^\circ\text{C}$  培养 48 小时, 长成密致的单层细胞, 供病毒感染之用。

### 培养基及病毒稀释液

1. 鸡胚单层细胞的生长液(A液) 是含有 5% 小牛血清、0.5% 乳蛋白水解物的 Hanks 液。每毫升含 0.7 毫克  $\text{NaHCO}_3$  及 100 单位青霉素和 100 微克链霉素。
2. 鸡胚单层细胞的维持液和病毒稀释液(B液) 成分与 A 液相似, 但小牛血清浓度减为 1%。
3. 小量琼脂覆盖液(C液) 的配制 先配含 1.5% 琼脂及 0.5% 乳蛋白水解物的 Earle 氏液作 D 液。将加热溶化并冷却至  $50^\circ\text{C}$  左右的 D 液 1 份加入 B 液 9 份, 混匀后放  $37^\circ\text{C}$  水浴待用。
4. 常量琼脂覆盖液(E液) 的配制 将加热溶化并冷却至  $50^\circ\text{C}$  左右的 D 液 100 毫升, 依次加入 1:200 中性红水溶液 1 毫升, 正常小牛血清 2 毫升, 抗菌素原液(每毫升含青霉素 1 万单位、链霉素 1 万微克) 1 毫升, 7.5%  $\text{NaHCO}_3$  3 毫升。充分摇匀, 俟琼脂温度下降到  $40^\circ\text{C}$  时应用。

### 病毒滴定

1. 小量琼脂覆盖液空斑滴定法 吸除长有鸡胚单层细胞抗菌素小瓶的生长液。用 B 液将 NDV 作 10 倍连续稀释。选择适当浓度(通常为  $10^{-6}$ ) 接种细胞, 每稀释度种 4—5 瓶, 每瓶 0.1 毫升。细胞在

36°C 吸附病毒 30 分钟后,每瓶加 C 液 1 毫升。放回 36°C 静置培养 36 小时。取出将覆盖液吸除后,按 Postlethwaite (1960)<sup>[11]</sup> 法滴加浓石炭酸复红数滴染色 10 余秒,用自来水冲洗细胞 1—2 次。根据单层细胞出现肉眼可见的空斑数,计算每毫升 NDV 的空斑形成单位 (PFU)<sup>[10]</sup>。

2. 常量琼脂覆盖层空斑滴定法 将鸡胚单层细胞扁瓶的生长液吸出,每瓶接种不同稀释度的 NDV 0.5 毫升,每稀释度种 5 瓶。在 36°C 吸附 60 分钟后吸除接种物,每瓶加入 E 液 5 毫升。俟琼脂凝固后将扁瓶倒置,放 36°C 培养。NDV 空斑于感染后 40 小时开始出现,至 50 小时即清晰可数。按感染后 72 小时的空斑数计算每毫升病毒的 PFU 滴度。

3. 50% 细胞培养的疾病感染量 (TCID<sub>50</sub>) 及 50% 细胞培养的血球吸附量 (HAD<sub>50</sub>) 的测定 以不同稀释度的 NDV 接种细胞管,每稀释度 4 管,每管 0.1 毫升。在 36°C 吸附细胞 30 分钟后加入 B 液 1 毫升,放 36°C 培养。72 小时后用低倍扩大显微镜 (100×) 观察细胞病变。记录结果后吸出维持液,于每管中滴加 0.5% 鸡血球盐水悬液 0.2 毫升。静置于室温 10—20 分钟后,用低倍镜检查血球吸附情况。按 Reed 与 Muench 二氏<sup>[12]</sup>法分别计算每毫升 NDV 的 TCID<sub>50</sub> 及 HAD<sub>50</sub> 单位。

4. 50% 鸡胚感染量 (EID<sub>50</sub>) 的测定 用不同稀释度的病毒接种 9—10 天鸡胚的尿囊腔,每稀释度 4 个鸡胚,每胚 0.1 毫升。置 36°C 孵育 72 小时,取出放 4°C 冷冻后分别收集其尿囊液作鸡血球凝集的定位试验。根据血凝反应结果,按 Reed 与 Muench 法计算 NDV 的 EID<sub>50</sub> 滴度。

## 試驗結果

(一) NDV 空斑形成的特点 应用小量琼脂覆盖液维持鸡胚细胞作 NDV 空斑试验时,一般在感染病毒 28—30 小时后鸡胚单层细胞出现肉眼可见的空斑,其时空斑数目较少,直径均小于 1 毫米。到 36 小时,空斑数目增多,呈圆形,直径达 1—2 毫米。镜下可见空斑处细胞大部分脱落,残余的病变细胞交织成网。空斑部位呈白色,与周围染成深红色的细胞片成一鲜明对比。到 48 小时,空斑数目无明显增多,其大小则继续增长,直径可达 2—4 毫米。但此时在原始空斑的四周可见有针孔样的继发性空斑出现。故以后实验选择孵育 36 小时后作细胞染色,计算空斑数目,作为小量琼脂覆盖液空斑滴定的标准观察时间。

### (二) 影响小量琼脂覆盖液病毒空斑滴定的若干因素

1. 覆盖液的琼脂浓度 最初实验发现 NDV 空斑形成的式样同覆盖液中小量琼脂的存在有很大关系。从图 1 可见,若用不含琼脂的 B 液作维持液,鸡胚单层细胞感染病毒 29 小时后用复红染色时,可见大小不一、形状不整齐的“彗星状”空斑出现<sup>[3]</sup>。若用含小量琼脂的 C 液维持细胞,“彗星状”空斑即由圆形孤立的空斑所代替(图 2)。

实验进一步观察不同的琼脂浓度与空斑滴度的关系。用三组细胞瓶,每瓶接种 0.1 毫升  $10^{-6}$  稀释的 NDV,分别加入含有 3 种浓度 (0.15%、0.20%、0.25%) 的琼脂培养基作覆盖液,孵育 36 小时后染色。从表 1 结果可见,所试验的 3 种琼脂浓度对 NDV 空斑出现的时间、大小及数目无显著影响。但当覆盖液中的琼脂浓度较大时,静置培养 30—36 小时后单层细胞上可见附着一琼脂薄层,滴加复红染色时需延长时间且着色不均。因之用浓度为 0.15% 的琼脂较为适合。

2. 吸附时间 实验共分两批。每瓶鸡胚细胞接种 0.1 毫升  $10^{-6}$  稀释的 NDV。同时放 36°C 使病毒与细胞接触 5、10、15、20、25、30、60、90、120 分钟,分别取出 5 瓶。于实验 1 的细胞瓶吸出接种物后用 Hanks 液冲洗细胞 5 次,每次 1—2 毫升,最后加入 C 液 1

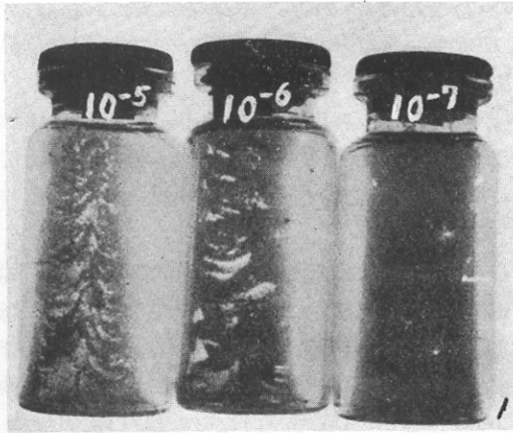


图1 鸡胚单层细胞感染  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  的 NDV, 培养 29 小时后, 用复红染色所呈现的空斑情况。

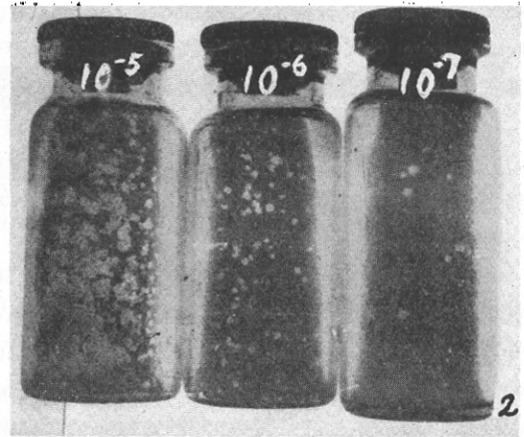


图2 鸡胚单层细胞感染  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  的 NDV, 用含有 0.15% 琼脂的维持液培养 36 小时后, 用复红染色所呈现的空斑。

表1 复盖液中不同琼脂浓度对 NDV 空斑形成的影响

培养时间 (小时)	在不同琼脂浓度的复盖液中每毫升 NDV 的空斑数		
	0.15%	0.20%	0.25%
30	$9 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$5 \times 10^8$
36	$1.75 \times 10^9$	$1.4 \times 10^9$	$1.75 \times 10^9$

毫升。于实验 2 的细胞瓶不吸出接种物即加入 C 液。培养 36 小时后染色, 分别算出各吸附时值组细胞瓶的空斑数。

表2 病毒吸附时间与空斑形成数目的关系

实验批号	吸附时间(分钟)	5	10	15	20	25	30	60	90	120
1*	平均空斑数†	9.8	9.8	13	22.6	25.4	23.2	46.6	49.6	53.4
	空斑数的相对%	18.4	18.4	24.4	42.4	47.6	43.5	87.3	92.9	100
2 <sup>△</sup>	平均空斑数†	43.8	45.4	43.5	50.6	56.0	57.4	71.6	82.0	81.2
	空斑数的相对%	53.4	55.4	53.1	61.7	68.3	70.0	87.4	100	99.1

\* 吸附后将细胞瓶用 Hanks 液洗 5 次;

<sup>△</sup> 吸附后将接种物吸出;

† 5 瓶细胞平均数。

表3 病毒吸附后将接种物吸出对 NDV 空斑数的影响

组别	吸附时间(分钟)	接种物处理	平均空斑数*	空斑数的相对%
1	30	不吸出	41.6	100
2		吸出	37.2	89.4
3	60	不吸出	53.4	100
4		吸出	48.0	89.9

\* 5 瓶细胞平均数。

从表 2 及图 3 可见，细胞吸附病毒的时间与空斑形成的数目有明显关系。吸附时间越长，空斑数越多。如以最长的吸附时间（90—120 分钟）所形成的空斑数为 100%，在实验 1，吸附 5 分钟所产生的空斑数仅为 18.4%，吸附 30 及 60 分钟的空斑数各为 43.5%，87.3%。在实验 2，吸附 5 分钟所形成的空斑数即达 53.4%，吸附 30 及 60 分钟的空斑数各为 70% 与 87.4%。

3. 病毒接种物的吸除 表 3 进一步同时比较吸附后是否吸出接种物对 NDV 空斑数目的影响。无论在 36°C 细胞吸附病毒 30 或 60 分钟后，吸除接种物一组细胞的空斑数，均少于不吸除接种物一组的空斑数，前者约为后者的 89—90%。

### (三) 小量琼脂覆盖液空斑滴定法的准确性、可重复性与敏感性

#### 1. 空斑数目与病毒浓度的关系

实验用  $10^{-6}$ 、 $\frac{1}{2} \times 10^{-6}$ 、 $\frac{1}{4} \times 10^{-6}$ 、 $\frac{1}{8} \times 10^{-6}$  四种不同稀释度的病毒感染细胞小瓶。观察空斑数目与病毒浓度的关系。由表 4 及图 4 可见，NDV 空斑数目随病毒浓度的升高而增加，二者基本上成一直线关系。当细胞瓶感染较大剂量的病毒时，空斑数的变异系数 (Coefficient of Variation) 小于感染较小量病毒时空斑的变异系数。表明每瓶细胞接种 40—60 PFU 的病毒量时，空斑的分布比较集中，变异参差的程度较小。

2. 空斑滴定的可重复性 实验用同一批冰冻保存的病毒，在不同批次的鸡胚单层细胞作空斑滴定。从表 5 结果可见，同一批病毒所产生的空斑数基本上是一致的，说明这种滴定法的稳定性。根据试验瓶数较多的第 4 批结果计算，空斑数的均数 (Mean) 为 49.65，变异数 (Variance) 为 52.46，标准差为 7.244。其变异数与均数相近，说明细胞瓶中的病毒

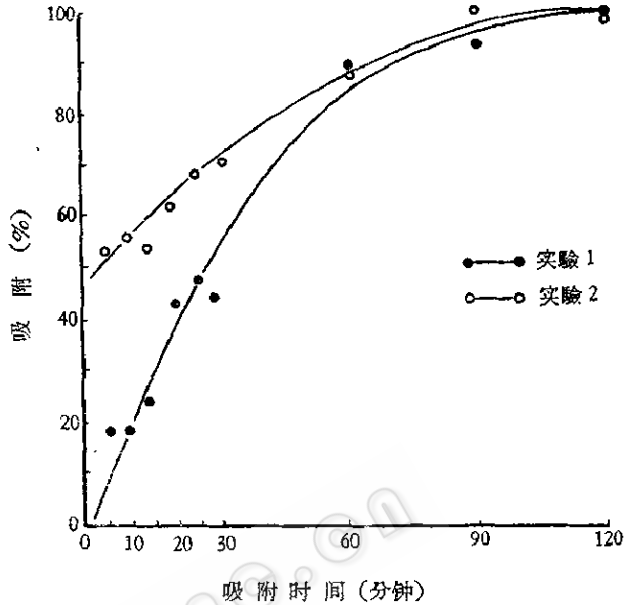


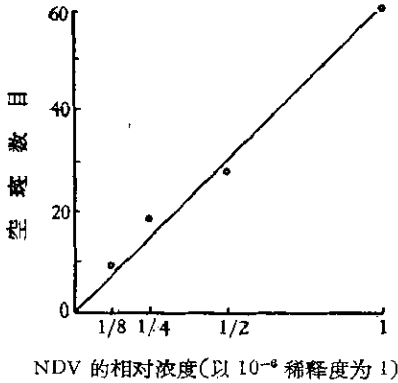
图 3 NDV 在鸡胚单层细胞的吸附率

实验 1 是定量病毒与鸡胚细胞接触一定时间后，将接种物吸出，再用 Hanks 液冲洗细胞层 5 次。  
实验 2 是吸附后不吸出接种物。

表 4 不同的病毒浓度与空斑形成数目的关系

病毒稀释度	每瓶空斑数	均数	标准差	变异系数
$10^{-6}$	68, 56, 66, 59, 49 66, 54, 58, 56, 63	59.5	6.11	10.27
$\frac{1}{2} \times 10^{-6}$	33, 22, 21, 27, 30 32, 20, 27, 39, 25	27.6	6.00	21.74
$\frac{1}{4} \times 10^{-6}$	19, 23, 21, 14, 12 21, 22, 16, 17, 21	18.6	3.68	19.78
$\frac{1}{8} \times 10^{-6}$	9, 11, 10, 13, 7 9, 8, 11, 11, 4	9.3	2.54	27.29

空斑分布属于 Poisson 分布<sup>[14]</sup>。



NDV 的相对浓度(以  $10^{-6}$  稀释度为 1)

图 4 病毒浓度与空斑数目的关系。

3. 空斑滴定的敏感性 实验用不同稀释度的 NDV 同时感染鸡胚单层细胞小瓶、扁瓶、细胞管及鸡胚尿囊腔, 借以比较几种方法滴定 NDV 的敏感性。从表 6 可见, 用空斑滴定所得的 PFU 滴度, 与接种鸡胚所得的 EID<sub>50</sub> 滴度基本一致, 似较富于用细胞管测定的 TCID<sub>50</sub> 或 HAD<sub>50</sub> 滴度。

4. 空斑滴定的特异性 实验用  $2 \times 10^{-5}$  和  $2 \times 10^{-6}$  稀释的 NDV 悬液, 加入等量的 NDV 免疫血清放 36°C 作用 1 小时, 然后将混合物接种鸡胚单层细胞作中和试验。结果发现: 1:10 稀释的免疫血清能完全抑制 220 个 PFU 病毒量的空斑形成, 说明这种空斑滴

定方法的特异性。

表 5 用同批 NDV 作空斑滴定结果的重复性

实验批号	病毒稀释度	接种瓶数	平均空斑数	PFU/毫升
1	$10^{-6}$	3	43.3	$4.3 \times 10^8$
2	$10^{-6}$	4	40.5	$4.1 \times 10^8$
3	$10^{-6}$	4	49.5	$5.0 \times 10^8$
4	$10^{-6}$	20	49.65	$5.0 \times 10^8$

表 6 用小量琼脂复盖液作 NDV 空斑滴定的敏感性

实验批号	小量琼脂复盖液 空斑法 (logPFU/毫升)	常量琼脂复盖液 空斑法 (logPFU/毫升)	试管细胞病变法 (logTCID <sub>50</sub> /毫升)	试管血球吸附法 (logHAD <sub>50</sub> /毫升)	鸡胚接种法 (logEID <sub>50</sub> /毫升)
1	8.35	8.49	8.17	8.17	8.67
2	8.82	8.81	≥ 8.33	≥ 8.50	8.67

## 讨 论

根据上述试验, 应用小量琼脂复盖液方法在鸡胚单层细胞小瓶作 NDV 空斑滴定是可靠的。用同批病毒几次试验的结果证明空斑滴度的可重复性很高。用此法测得的空斑滴度与常量琼脂复盖液所得的滴度或鸡胚接种法的滴度相近, 说明本法的敏感性颇高。根据病毒的空斑滴度与接种量成直线关系, 病毒空斑呈 Poisson 分布, 表明这些空斑是由单个感染性病毒微粒所引起的<sup>[10]</sup>。

实验发现, NDV 在鸡胚单层细胞吸附 30 分钟所产生的空斑数可达接种病毒量的 43.5—70%。这种情况同 Levine (1958)<sup>[7]</sup> 及 Baluda (1959)<sup>[9]</sup> 的结果相似。在吸附最初的 30 分钟内, 不吸出接种物的细胞瓶中的病毒空斑百分数, 比重复洗涤的细胞瓶为高。其原因可能是未被吸附的病毒微粒, 在小量琼脂复盖液中弥散, 最后感染单层细胞, 继续形成空斑之故<sup>[15]</sup>。

在本实验条件下,用小量琼脂覆盖法作 NDV 空斑滴定时,每瓶细胞接种的病毒量最好在 40—60 PFU 之間,过多或过少可能影响試驗的准确度。细胞瓶感染病毒后在 36°C 吸附 30—60 分钟,不吸出接种物即加入覆盖液,放 36°C 培养 36 小时进行细胞染色是适宜的。空斑显现后可以当时或留待日后计数。由于这种方法操作简便,NDV 空斑的出现又较常量琼脂覆盖法为早,而且可免除中性红对空斑形成的影响<sup>[13]</sup>,经过复红染色固定的细胞标本,不易褪色变形,故可长期保存供空斑形态学分析之用。因此,除用作 NDV 滴定之外,可考虑用于其他细胞致病作用明显的病毒的研究。

## 总 结

本实验按 Holland 与 McLaren 及 Hotchin 等法用小量琼脂覆盖液及按 Postlethwaite 用复红染色法在鸡胚单层细胞小瓶作新城鸡瘟病毒的空斑滴定。单层细胞于感染病毒后 36 小时出现肉眼可数的空斑。根据病毒空斑滴度与接种量成直线关系,空斑滴度的可重复性与敏感性,以及病毒空斑所呈的 Poisson 分布,表明本法适用于 NDV 的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Dulbecco, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **38**:747—752, 1952.
- [2] Holland, J. J. and McLaren, L. C.: *J. Bact.*, **78**:596—597, 1959.
- [3] Hotchin, J. E. et al.: *Virology*, **10**:275—280, 1960.
- [4] Bower, R. K.: *J. Bact.*, **75**:496—498, 1958.
- [5] Wright, B. S. and Sagik, B. P.: *Virology*, **5**:573—574, 1958.
- [6] Levine, S. and Sagik, B. P.: *Virology*, **2**:57—68, 1956.
- [7] Levine, S.: *Virology*, **5**:150—167, 1958.
- [8] Franklin, R. M. et al.: *Virology*, **3**:96—114, 1957.
- [9] Baluda, M. A.: *Virology*, **7**:315—327, 1959.
- [10] Dulbecco, R. and Vogt, R.: *J. Exp. Med.*, **99**:167—182, 1954.
- [11] Postlethwaite, R.: *Virology*, **10**:466—482, 1960.
- [12] Reed, L. J. and Muench, H.: *Am. J. Hyg.*, **27**:493—497, 1938.
- [13] Waterson, A. P.: *Arch. Virusforsch.*, **8**:113—122, 1958.
- [14] Saunders, L. and R. Fleming: *Mathematics and Statistics for Use in Pharmacy, Biology and Chemistry*, pp. 129—131, William Clowes and Sons, London, 1957.
- [15] Youngner, J. S.: *J. Immunol.*, **76**:288—292, 1956.

## A SIMPLE PLAQUE ASSAY FOR NEWCASTLE DISEASE VIRUS IN MONOLAYER CHICK EMBRYO CELLS

KUO HUI-YU, YEN YONG-KAI AND PAI SHIH-EN

*(Department of Microbiology, Chungshan Medical College, Canton)*

A simple plaque technique was developed for titration of Newcastle disease virus in monolayers of chick embryo cells under a liquid medium containing 0.15% of agar following the methods described by Holland and McLaren, Hotchin and his co-workers. Infected cultures were incubated at 36°C under stationary conditions for 36 hours. After the removal of the medium, the monolayers were stained with strong carbolfuchsin, washed with tap water, allowed to drain and dry as described by Postlethwaite. Macroscopic plaques appeared as clear unstained areas against a deep-red background. The validity of this plaque assay for NDV is demonstrated by its high reproducibility, the Poisson distribution of plaques and the linear relationship between amount of virus inoculum and resulting plaque counts. The plaque numbers were affected by the time of adsorption and removal of inoculum after virus adsorption. This plaque assay was shown to be as sensitive as the ordinary plaque assay using an overlay medium containing much more agar. The sensitivity of this method was slightly higher than that of the tube titration method and was no less than that of the infectivity titration in developing chick embryos.