

甲型流感病毒 WS 株在鸡胚肾与鸡胚肌皮混合 单层细胞上形成蚀斑的研究

张汉荆* 王植崙 应剑津

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

甲型流感病毒 WS 株在鸡胚肾与鸡胚肌皮混合单层细胞上的蚀斑形成单位比在鸡胚肌皮细胞上者高 100 倍。提高琼脂培养基中的葡萄糖含量大大有利于蚀斑的形成。使用不经任何处理的国产琼脂所得的蚀斑形成单位值比用英国琼脂者高, 而且蚀斑大而明显。关于病毒与细胞接触吸附的时间、琼脂的浓度等有关条件也进行了研究。在最适条件下, PFU 值约为 EID_{50} 值的 10%。本文可为流感病毒的遗传变异、药物筛选等方面工作提供一个简易可行、滴度较高的蚀斑方法。

自从 Dulbecco^[1] 首创病毒蚀斑法以来, 各国学者相继报告, 多种病毒能在各种不同细胞上形成蚀斑^[2], 为病毒学研究提供了新的方法。但目前有关流感病毒的蚀斑文献尚不多^[3-12], 且蚀斑形成效率不高, 各株病毒结果不一致, 而利用蚀斑法作进一步研究的报导更少。我们采用了鸡胚肾与鸡胚肌皮混合单层细胞培养, 获得了较高的蚀斑形成效率, 经过多次实验, 证明方法是稳定的。现将初步研究结果报告如下。

材料与方法

病毒株 原甲型流感病毒 WS 株, 在本实验室通过鸡胚 15 代 (简称为 WS E_{15}), 利用尿囊液病毒感染鸡胚肾与肌皮混合细胞, 然后挑取蚀斑接种鸡胚, 收获尿液 (简称为 WS $E_{15}P_1F_1$), 分管保存于 -25°C 备用。

细胞 鸡胚肌皮细胞是取 10—11 日龄的鸡胚, 按一般方法一次消化, 制成单层细胞^[13]。

鸡胚肾与鸡胚肌皮混合细胞 (简称为混合细胞) 是取 18—20 日龄的鸡胚肾, 用 0.125% 胰酶消化。根据实验要求按不同比例与鸡胚肌皮细胞混合, 使每 4 毫升含鸡胚细胞 1,600 万外另含

鸡胚肾细胞 100 至 400 万, 接种于方瓶的测面 (1.5×7.0 平方厘米)。生长液是由含 0.5% 乳蛋白水解物的 Hanks 液、5% 小牛血清、1.5% NaHCO_3 (5.6%) 和适量的抗菌素组成。在 37°C 培养 48 小时左右后即长成致密、匀厚的细胞层。

覆盖琼脂培养基 以含 1.0% 乳蛋白水解物的两倍浓缩但不含 NaHCO_3 和酚红的 Earle 氏液与 2% 琼脂等量相混, 按容量加入 1:1,000 的中性红 4%, 5.6% 的 NaHCO_3 4%, 和青霉素 100 单位/毫升, 链霉素 100 微克/毫升。除注明者外, 均采用广州医药采购供应站分装的国产琼脂 (以下简称“广州”), 使用前未经任何处理。

蚀斑试验 以 pH 7.5 的 Hanks 液将流感尿囊液病毒作 10 倍递增稀释, 选适当稀释度的病毒液按 0.5 毫升量接种细胞培养瓶, 在 37°C 接触吸附 4 小时, 倒去剩余液体后即覆盖琼脂培养基。蚀斑一般在第 2—3 天开始出现, 第 4 天增多, 第 5 天渐趋稳定。于第 3—6 天逐日观察记录蚀斑数, 根据最后一天的蚀斑总数计算每毫升病毒液的蚀斑形成单位 (简称 PFU)。

蚀斑抑制试验 已感染适宜量流感病毒的混合细胞, 待覆盖琼脂培养基冷凝后, 以消毒的、

* 现在上海生物制品研究所工作。

本文 1964 年 12 月 18 日收到。

直径约 6 毫米的滤纸片两张, 分别浸蘸同株的免疫鸡血清及正常鸡血清, 使之贴附在琼脂面上。若免疫血清与感染细胞的病毒同型则蚀斑被抑制, 浸蘸正常血清的滤纸片对蚀斑形成应无影响。

实验结果

(一) 细胞的种类 将消化成单个的鸡胚肌皮与鸡胚肾细胞分别按 1,600 万:100 万, 1,600 万:200 万, 1,600 万:400 万的比例配制成细胞悬液接种于细胞瓶, 待长成致密、匀厚的细胞层后, 在同一条件下滴定 WS 株的蚀斑形成单位, 结果依次为 3.4×10^7 、 5.0×10^7 、 5.2×10^7 。似可表明在混合细胞中鸡胚肾细胞的比例适当增加有助于 PFU 值的提高。WS 株在鸡胚肌皮细胞上也能形成蚀斑, 但其 PFU 值比在

混合细胞上的约低 2 个对数, 而且蚀斑较小, 不太清楚(表 1)。

(二) 病毒与细胞接触吸附的时间

细胞吸附病毒的时间长短与蚀斑形成数有密切关系, WS 株在 37℃ 吸附 2 小时所得的 PFU 值仅为吸附 4 小时的 46.5%。

(三) 病毒的浓度 蚀斑数与病毒的浓度成正比(表 2)。

表 2 流感病毒 WS 株的病毒浓度与 PFU (对数值) 的关系

实验 次数	病 毒 稀 释 度			
	10 ⁻⁶		10 ⁻⁷	
	蚀斑数	PFU/毫升	蚀斑数	PFU/毫升
1	67, 84	1.5×10^7	5, 9, 6	1.4×10^7
2	67, 77	1.4×10^7	7, 9, 5	1.4×10^7
3	86, 54	1.4×10^7	7, 16, 7	2.0×10^7
4	60, 77	1.4×10^7	8, 7, 3	1.2×10^7

表 1 流感病毒 WS 株在混合细胞*与鸡胚细胞中的 PFU (对数值)

实 验	细胞种类	PFU/毫升	蚀斑大小 (毫米)
1	混合细胞 鸡胚细胞	8.6×10^6 6.8×10^4	2—3 1—2
2	混合细胞 鸡胚细胞	1.4×10^7 9.0×10^4	2—3 1—2
3	混合细胞 鸡胚细胞	1.0×10^7 6.0×10^5	2—3 1—2
4	混合细胞 鸡胚细胞	4.0×10^6 6.0×10^4	2—3 1—2
5	混合细胞 鸡胚细胞	3.4×10^7 8.0×10^5	2—3 1—2
6	混合细胞 鸡胚细胞	1.2×10^7 1.0×10^5	2—3 1—2
7	混合细胞 鸡胚细胞	1.6×10^7 1.0×10^5	2—3 1—2
8	混合细胞 鸡胚细胞	2.0×10^7 5.6×10^4	2—3 1—2
9	混合细胞 鸡胚细胞	5.4×10^6 4.0×10^4	2—3 1—2

(四) 琼脂培养基的成分、琼脂的来源

及其浓度 琼脂培养基中的葡萄糖含量对流感病毒 WS 株蚀斑的形成、大小和清晰度有密切关系。当琼脂培养基中的葡萄糖含量比 Earle 氏液中所含者增加一倍时(即 0.2%), 其 PFU 值约可增加一倍(表 3), 蚀斑形态也较大和清楚(图 1)。在实验中比较了英国琼脂与国产“广州”琼脂对蚀斑形成的影响, 结果表明用英国琼脂所得的 PFU 值比用“广州”者约低 50%, 蚀斑也较小(表 4, 图 2)。琼脂的浓度越大, PFU 值越小, 蚀斑也越小。当琼脂浓度为 1.5% 时, 其 PFU 值比 0.5% 与 1.0% 琼脂浓度所得的结果低 50% 以上, 蚀斑直径约为 2 至 3 毫米(图 2)。以 0.5% 琼脂浓度所得的 PFU 值虽高, 蚀斑也大(约 4 至 5 毫米), 但其蚀斑边缘不太清楚, 影响正确计数。1.0% 琼脂浓度所得的 PFU 值与 0.5% 者基本一致而蚀斑清楚。

(五) 蚀斑的特异性 用同株免疫鸡

† 采用的流感病毒 WS 株, 在实验 1 与 2 中系 WS E₁₅, 余者为 WS E₁₅P₁E₁。

* 混合细胞中鸡胚肌皮与鸡胚肾细胞比例为 1,600 万:200 万(以下同)。

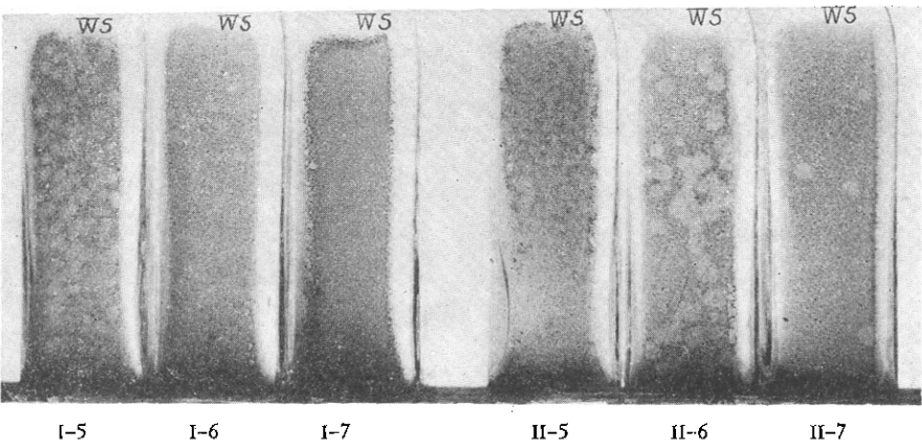


图1 琼脂培养基中葡萄糖含量不同对流感病毒 WS 株在混合细胞上形成蚀斑的影响。
图中有“I”者葡萄糖为 0.1 克%,“II”者为 0.2 克%。

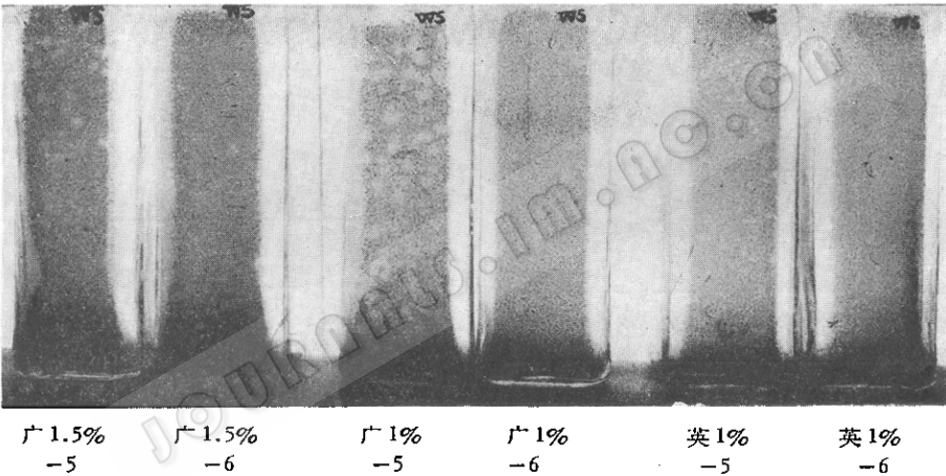


图2 浓度与来源不同的琼脂对流感病毒 WS 株在混合细胞上形成蚀斑的影响。
图中“广 1.5%”指用国产“广州”琼脂 1.5% 浓度;“广 1%”指用国产“广州”琼脂 1% 浓度;“英 1%”指用进口英国琼脂 1% 浓度。

表3 琼脂培养基中葡萄糖含量对流感病毒 WS 株的 PFU (对数值)的影响

实验次数	琼脂培养基中的葡萄糖含量 (%)	PFU/毫升	
		混合细胞	鸡胚细胞
1	0.1	1.0×10^7	6.0×10^5
	0.2	3.4×10^7	8.0×10^5
2	0.1	5.4×10^7	—*
	0.2	1.0×10^8	—
3	0.1	1.4×10^7	—
	0.2	3.4×10^7	—

* 未做试验。

表4 英国琼脂与国产“广州”琼脂对流感病毒 WS 株的 PFU(对数值)的比较

实验次数	琼脂名称	PFU/毫升	蚀斑大小 (毫米)
1	英国“广州”	7.7×10^6	1—2
		1.4×10^7	2—4
2	英国“广州”	5.0×10^6	1—2
		1.4×10^7	2—4

正常血清无影响。

(六) 蚀斑形成单位 (PFU) 与 EID_{50} 之比 在 1,600 万:200 万的鸡胚肌皮与鸡胚肾混合细胞上滴定 PFU 值,所用覆盖培养基内含 0.2% 葡萄糖,1% 琼脂。同时以

血清及正常鸡血清进行蚀斑抑制法的结果表明,蚀斑是特异的,为免疫血清所抑制而

同批稀释的病毒材料接种 9 至 11 日龄的鸡胚测其 EID_{50} 。两次实验的结果分别为 3.4×10^7 (PFU) 与 5×10^8 (EID_{50}); 6.5×10^6 (PFU) 与 5×10^7 (EID_{50}), PFU 值约比 EID_{50} 低一个对数左右。

讨 论

鸡胚肾细胞是来源比较方便而且对流感病毒比较敏感的细胞, 但鸡胚肾细胞数量毕竟较少, 尤感困难的是其形成的单层细胞较薄, 一旦长成致密层时细胞极易脱落, 在覆盖琼脂培养基后细胞又容易团缩, 细胞间的间隙加大, 影响蚀斑的形成与观察。我们采用了鸡胚肾与鸡胚肌皮混合细胞, 一方面既保留了鸡胚肾细胞对流感病毒较为敏感的特点, 同时也解决了细胞来源及其培养成致密的细胞单层问题, 这对于广泛的研究与应用都是有着实际意义的。

必须注意的是, 在制备混合细胞中, 鸡胚肌皮细胞与鸡胚肾细胞的比例要恰当, 若鸡胚肾细胞过少 (少于 1,600 万:100 万) 则形成的蚀斑数少, 不清楚; 过多 (多于 1,600 万:400 万) 则混合了的细胞易聚集, 覆盖琼脂培养基后细胞仍然会出现团缩现象。

根据特异性免疫血清能抑制流感病毒 WS 株的蚀斑形成以及病毒蚀斑数与病毒浓度相互平行的结果, 可以认为我们所观察到的蚀斑是特异的。我们没有观察到象 Granoff^[4] 报告的低稀释度病毒发生的蚀斑比高稀释度少的现象, 而是观察到在用较高的病毒浓度接种时 (例如 10^4 — 10^5 PFU), 蚀斑往往全部融合, 经常观察不到单个蚀斑的形态。但若仔细观察可看到蚀斑已融合的细胞其中性红着色比没有出现蚀斑的对照细胞浅。这可能容易被误认为不出现蚀斑或蚀斑形成不规律。

国产“广州”琼脂的纯净度虽比进口的英国琼脂差, 但对 WS 株病毒在混合细胞上形成的蚀斑却比进口琼脂大而数多。这对进一步采用国产琼脂进行流感病毒蚀斑试验提供了实验依据。至于来源不同的琼脂对流感病毒蚀斑数及大小影响的原因则还是值得进一步研究的。此外, 覆盖琼脂的浓度对蚀斑的数目及其清晰度有密切关系, 根据实验的结果, 我们认为采用 1% 的琼脂浓度是适宜的。

用不含小牛血清的琼脂培养基作为覆盖层时, 混合细胞仍然维持良好, 蚀斑数不受影响。同时考虑到动物血清中还可能含有非特异性抑制物, 故以不加为宜。

我们还对原甲型的 PR₈, 亚甲型的洛 57-4, 亚洲甲型不敏感相的贵 57-2, 兰生 60-2 以及乙型的 Lee 等毒株进行蚀斑试验, 证明这些毒株均能在混合细胞上形成蚀斑。

参 考 文 献

- [1] Dulbecco, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **38**: 747—752, 1952.
- [2] Cooper, P. D.: *Advances in Virus Research*, **8**:319—378, 1961.
- [3] Ledinko, N.: *Nature*, **175**:999—1000, 1955.
- [4] Granoff, A.: *Virology*, **1**:252, 1955.
- [5] Wright, B. S. and Sagik, B. P.: *Virology*, **5**:573—574, 1958.
- [6] Hirst, G. K.: *Virus Growth and Variation*, 82—99, 1959.
- [7] Zimmermann, T. and Schäfer, W.: *Z. Naturforsch.* **14b**:213—214, 1959.
- [8] Hotchin, J. E., Deibel, R. and Benson, L. M.: *Virology*, **10**:275—280, 1960.
- [9] Simpson, R. W. and Hirst, G. K.: *Virology*, **15**:436—451, 1961.
- [10] Choppin, P. W.: *Virology*, **18**:332—334, 1962.
- [11] Lehmann-Grube, F.: *Virology*, **21**:520—522, 1963.
- [12] Takemoto, K. K. and Fabisch, P.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **114**:811—814, 1963.
- [13] 张汉荆, 王逸民, 郑云凯: 微生物学报, **9**:253—260, 1963.

STUDIES ON PLAQUE FORMATION BY WS STRAIN IN MIXED MONOLAYER CULTURE OF CHICK EMBRYO KIDNEY AND SKIN-MUSCLE CELLS

CHANG HAN-JIN, WANG CHIH-LUN AND IN CHIEN-JIN

(Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

Conditions for plaque formation of type A influenza virus, WS strain in mixed monolayers of chick embryo kidney and skin-muscle cell were investigated. The experimental results demonstrate that the mixed cell monolayers were much more sensitive than chick embryo cell monolayers alone, and the plaque-forming units (PFU) per ml. were usually about 100 times greater. Furthermore, the plaques produced in mixed cells were larger and clearer. Under optimal conditions, PFU was 10% of EID₅₀ and the results were regular and reproducible.

The important conditions for optimal plaque formation are: time of adsorption, glucose concentration, the choice and concentration of agar in the overlay. The PFU of WS strain obtained after 2

hours adsorption was only about 46% of that obtained by 4 hours adsorption. When the concentration of glucose in the agar overlay was raised to 0.2% instead of the usual 0.1% in Earle's solution, the value of PFU was increased one fold, and the plaques formed were larger and sharper. The PFU obtained by using agar imported from England was only about 50% of that obtained with agar produced in Canton.

Plaque inhibition test, carried out with chick immune serum, showed that the plaques were specific.

Preliminary experiments showed that other influenza virus strains may form plaques under similar experimental conditions.