

影响腺病毒凝集血球特性的某些因素

赵锦铭 白莹

(中国医学科学院儿科研究所, 北京)

本文报告采用人胚肾细胞制备的腺病毒血凝素, 就不同个体猴血球、不同血球浓度、不同培养温度、不同 pH 对腺病毒血凝滴度的影响进行的研究。结果表明, 3、7、11、14、21 型腺病毒血凝滴度不仅受不同个体猴血球影响, (其中以 3、7、14 型病毒显著), 同样也受不同血球浓度、培养温度、不同 pH 液体影响。进行腺病毒血凝反应的适宜条件为: 选用对腺病毒敏感的猴血球、1% 红细胞悬液、用 1/50 M pH 7.6—8.0 PBS 作稀释液、37℃ 培养 1 小时。

人胚肾细胞和 HeLa 细胞均可用于制备腺病毒血凝素, 在人胚肾细胞上制备腺病毒血凝素时采用 10^3 — 10^5 TCID₅₀ 病毒感染细胞, 受染细胞在染毒后 3—5 天出现完全病变, 产生的血凝素滴度高, 午型血凝素滴度高于 3 型。

腺病毒血凝素活力于 4℃ 下, 可保存数月不变, 7、11 型病毒血凝素 45℃ 加温处理 15 分钟, 血凝活力下降, 60℃ 加温处理 30 分钟, 3、7、11 型血凝活力完全丧失。紫外线照射、-40℃ 和 37℃ 反复冻融及超声波处理, 也可导致血凝滴度下降。

腺病毒具有凝集某种动物血球的能力, 按其凝集猴及大白鼠血球的能力将腺病毒分成四个组^[1,2]。国外曾有关于腺病毒凝集血球(简称血凝)特性及对其血凝素本质的研究^[3-13], 但国内尚未见这方面的报告。腺病毒是小儿急性呼吸道感染中的一组病原^[14,15], 我国婴幼儿腺病毒肺炎主要是由 3、7、11 型腺病毒引起的^[16-18], 目前治疗较困难, 有一定的病死率, 是研究儿科呼吸道感染的重要课题。3 个型的腺病毒均属于 Rosen 氏血凝 I 组病毒, 它们可凝集猴血球。为了解它们的血凝特性, 简化实验室诊断方法, 我们进行了有关影响腺病毒血凝特性的某些因素的研究, 现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 血凝素

3 型 (GP 株)、7 型 (Gomon 株)、11 型 (Slobitski 株)、14 型 (De wit 株)、21 型 (1645 株) 腺病毒感染原代人胚肾细胞, 37℃ 静置培养,

待受染细胞出现完全病变后, 收获的病毒悬液作为血凝素。

(二) 血球

恒河猴血球, 用前经稀释液洗 3 次, 1500 r. p. m. 离心, 时间分别为 5、5、10 分钟, 最终用稀释液将沉淀压实的血球配制成 4%、1% 血球悬液。

(三) 稀释液

1/50 M pH 7.6—8.0 磷酸盐缓冲液 (PBS)

(四) 试验方法

0.4 毫升不同稀释度的血凝素, 加 0.2 毫升 1% 猴血球悬液, 振荡均匀, 37℃ 静置 1 小时判定结果, 以凝集 50% 血球作为终点, 为 1 个血凝单位。

结 果

一、不同个体猴血球对腺病毒血凝滴度的影响

用标准 3、7、11、14、21 型腺病毒血

本文于 1979 年 4 月 2 日收到。

凝素,同一条件、同时滴定 5 批不同个体猴血球。从表 1 可见,3、7、14 型血凝素凝集猴血球的程度受不同个体血球影响较大,因此在进行腺病毒血凝试验前必须对不同个体猴血球进行挑选。

表 1 不同个体猴血球对腺病毒血凝滴度的影响

血凝素滴度 猴血球(批) 型别	血 凝 滴 度				
	I	II	III	IV	V
腺病毒 3 型	1:48	<1:8	<1:8	<1:8	<1:8
腺病毒 7 型		<1:8	1:14	1:40	
腺病毒 11 型	1:896	1:896	1:640	1:896	1:896
腺病毒 14 型	1:160	<1:8	1:32	1:8	<1:8
腺病毒 21 型	1:120	1:112	1:128	1:128	1:128

二、猴血球悬液浓度对血凝滴度的影响

用经稀释液洗涤过的猴血球精确地配制成 0.75%、1.00%、1.25%、1.50% 四种浓度的悬液(用 72 型分光光度计,440 毫微米波长测得上述血球悬液的透光度分别为 66、61、56、50.5),同时与标准 3、7 型及新分离 7 型腺病毒进行血凝反应,结果

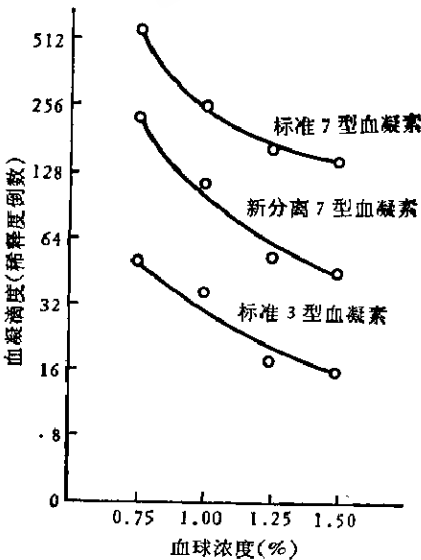


图 1 血球浓度对腺病毒血凝滴度的影响

(图 1)表明低浓度血球悬液的血凝滴度反而高。反应时间随血球浓度增高而缩短,当浓度为 1% 时,血球沉降完全的时间大约 1 小时,本工作均采用这一浓度。

三、稀释液的 pH 对腺病毒血凝滴度的影响

用 1/50M、pH 6.0、6.4、6.8、7.2、7.6、8.0、8.4 PBS 作稀释液,滴定 3、7、11 型腺病毒血凝素的结果见表 2。从表 2 可见,稀释液的 pH 对 3 型腺病毒血凝滴度有影响,随着 pH 由 6.0—7.6 的增高,血凝滴度也逐渐增高;对 7、11 型血凝滴度影响较小。

表 2 稀释液 pH 对腺病毒血凝滴度的影响

稀 释 液			血 凝 滴 度		
			3 型	7 型	11 型
PBS	pH	8.4	1:96	1:112	1:192
		8.0	1:96	1:96	1:192
		7.6	1:96	1:96	1:192
		7.2	1:64	1:112	1:128
		6.8	1:64	1:160	1:128
		6.4	1:48	1:160	1:128
		6.0	1:24	1:192	1:160
		5.0		1:192	1:128
NaCl	pH	5.0	1:24	1:192	1:96
		8.0	1:6	1:192	1:112

表 2 还表明,用 pH 5.0 的 PBS 和 0.85% NaCl 溶液 (pH 5.0—5.1) 作稀释液,同时滴定 3、7、11 型腺病毒的血凝滴度,结果近似;用 pH 5.0 和 pH 8.0 的 0.85% NaCl 溶液(后者用 5.6% NaHCO₃ 将 pH 调至 8.0, NaHCO₃ 最终浓度相当于 0.56%) 作稀释液,同时测定 3 个型腺病毒血凝滴度,结果发现用 pH 8.0 的 NaCl 溶液作稀释液时,对 3 型腺病毒血凝滴度影响较大,滴度低得较多,这可能与溶液中含较高浓度的 Na⁺ 离子有关,原因有待进一步研究。

从上述结果可见,用 1/50 M、pH 7.6—8.0 的 PBS 作稀释液,对 3、7、11 型腺病毒血凝滴度均适宜,因此本工作用它作稀释液。

四、不同温度对血凝滴度的影响

用 1/50 M、pH 7.6—8.0 的 PBS 作稀释液,同时在 37℃、22℃、4℃ 三种温度下,对 2 株 3 型、2 株 7 型腺病毒测血凝滴度。结果 3 型腺病毒血凝素只在 37℃ 时具有凝集猴血球的能力,7 型腺病毒血凝素在 37℃、22℃ 时具有凝集猴血球能力,但以 37℃ 时血凝滴度高,因此试验中测血凝滴度时均用 37℃。

五、腺病毒血凝素产生的某些条件

1. 细胞种类: 国外制备腺病毒血凝素多采用 HeLa 细胞等,国内研究腺病毒几乎全采用单层人胚肾细胞。用 3、7、11 型腺病毒(约 10^4 TCID₅₀)感染单层人胚肾、HeLa、KB、SL (上海传代淋巴细胞)细胞(面积约 2 平方厘米),待细胞完全病变后,收获病毒悬液,测定血凝滴度。另外在感染病毒当日,取 2—3 管细胞,经 Versene 液消化后计数,折算细胞数相同后的血凝滴度。从表 3 可见,人胚肾细胞制备 3、7、11 型腺病毒血凝素结果与 HeLa 细胞制备的近似。上述几种细胞染毒后,细胞出现病变的时间以人胚肾细胞最快,KB 细胞最慢。另外,细胞染毒后,继续繁殖的速度以传代细胞快。

2. 病毒量: 用 10^2 — 10^5 TCID₅₀ 稀释度的 3 型腺病毒感染同一批、细胞片大小近似的 4—5 管人胚肾细胞,37℃ 培养,待细胞完全病变后收获全部病毒悬液,滴定血

凝滴度。

表 3 不同细胞制备的腺病毒血凝素滴度

血 凝 素	细 胞			
	人胚肾	HeLa	KB	SL
3 型腺病毒	1:48	1:48	1:28	1:80
7 型腺病毒	1:56	1:96	1:14	NT*
11 型腺病毒	1:160	1:192	NT	1:48

* NT——未试验。

表 4 不同病毒量感染的细胞对其血凝滴度的影响

病 毒	剂 量 (TCID ₅₀)	细胞发生完 全病变时间 (天)	血凝滴度/0.4毫升
3 型腺病毒	10^{-5}	3	1:40
	10^{-4}	3	1:28
	10^{-3}	6	1:24
	10^{-2}	7	1:12

结果从表 4 可见,人胚肾细胞感染 10^3 — 10^5 TCID₅₀ 病毒,在受染后 3—6 天出现完全病变,产生的血凝滴度差别不大。随着感染细胞的病毒量的减少,受染细胞出现完全病变的天数逐渐延长。表明病毒繁殖在逐渐减少,相应细胞产生的血凝素也减少,因此血凝滴度逐渐下降。

3. 培养温度: 用标准和新分离的 3、7 型腺病毒 10^3 TCID₅₀ 感染同一批、细胞片大小相似的 3—5 管人胚肾细胞(面积约 2 平方厘米),分别在 33、37℃ 下经 4—5 天培养,受染细胞完全病变后收获病毒悬液,滴定血凝滴度。表 5 表明,不同培养温度对受染细胞产生血凝素影响不大。

表 5 不同培养温度对血凝滴度的影响

血 凝 素	培 养 温 度	
	33℃	37℃
标准 3 型腺病毒	1:160	1:160
新分离 3 型腺病毒	1:72	1:56
标准 7 型腺病毒	1:144	1:144
新分离 7 型腺病毒	1:88	1:160

4. 毒株型别：用婴幼儿病毒性肺炎患儿咽部原始标本 0.2 毫升，感染人胚肾细胞，并在其细胞上再传 1 代。测定每份标本中病毒产生的血凝滴度，共计 3 型腺病毒 160 株、7 型腺病毒 229 株。（图 2）

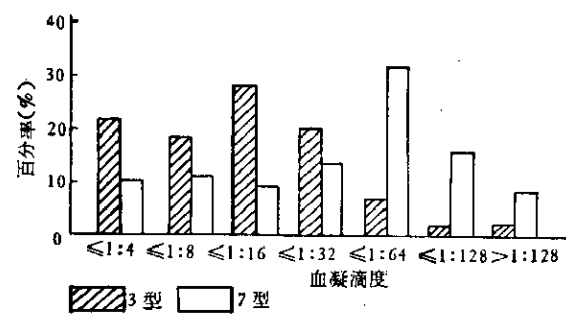


图 2 病毒性肺炎患儿咽部标本在人胚肾细胞上连续传 2 代后的血凝滴度

从图 2 可见，3 型腺病毒血凝滴度 $\leq 1:16$ 占 68.7%， $> 1:16 \sim \leq 1:64$ 占 26.9%， $> 1:64$ 占 4.4%；7 型腺病毒血凝滴度 $\leq 1:16$ 占 30.6%， $> 1:16 \sim \leq 1:64$ 占 45.4%， $> 1:64$ 占 24.0%。说明 7 型腺病毒产生的血凝滴度确实较 3 型高。

六、腺病毒血凝素的稳定性

1. 温度：用体积相等的标准 3、7 型腺病毒血凝素，同时置 37、45、60、80℃ 恒温水浴中，各加温处理 15、30、60 分钟，用同样条件同时测定其血凝滴度。结果如表 6 所示，3 型腺病毒血凝素对 37、45℃ 加温处理 60 分钟之内较稳定，7、11 型血凝素 45℃ 加温处理 15 分钟，血凝滴度下降。3 个型腺病毒血凝滴度均随着加温温度的增高和时间的延长而降低，60℃ 加温处理 30 分钟后，3 个型腺病毒血凝素活力全部丧失。

表 7 表示 3、7、21 型腺病毒血凝素在 4℃ 冰箱内保存的时间，3 型在保存 9 个月 后血凝滴度即明显下降。

2. 紫外线：用北京灯泡厂出品的 220

表 6 温度对腺病毒血凝素的影响

加温处理时间 (分)	血 凝 滴 度		
	3 型腺病毒	7 型腺病毒	11 型腺病毒
对 照	1:96	1:768	1:384
37℃	15	1:96	1:768
	30	1:64	1:512
	60	1:64	1:512
45℃	15	1:96	1:384
	30	1:96	1:192
	60	1:64	1:192
60℃	15	1:48	1:16
	30	<1:4	<1:4
	60	<1:4	<1:4
80℃	15	<1:4	<1:4

表 7 4℃ 保存对血凝滴度的影响

血 凝 素	保存前滴度	保存时间 (天)	保存后滴度
3 型腺病毒	1:40	266	1:16
7 型腺病毒	1:80	266	1:64
21 型腺病毒	1:128	345	1:112

伏、20 瓦、24 吋长的紫外灯光管，距离 50.0 厘米垂直照射 3、7 型腺病毒血凝素，照射时间 5、10、30、60、90 分钟，然后测定血凝滴度，结果从表 8 可见，3、7 型腺病毒血凝素经紫外线照射 5 分钟后，血凝滴度明显下降，若继续照射，血凝滴度变化不大。

表 8 紫外线照射对腺病毒血凝滴度的影响

照射时间 (分)	血 凝 滴 度	
	3 型腺病毒	7 型腺病毒
0	1:256	1:412
5	1:124	1:128
10	1:120	1:128
30	1:120	1:160
60	1:128	1:90
90	1:128	

结果表明，血凝素对紫外线的抵抗力可能分两部分，其中一部分对紫外线较敏

感,另一部分对紫外线照射有抵抗。

3. 冻融及超声波: 用标准和新分离的 3、7 型腺病毒血凝素,各分成体积相等的 3 份,其中 1 份做对照,1 份经 -40°C 和 37°C 水浴反复冻融 6 次,1 份用 CQX-80X 磁致伸缩性超声波发生器(最大输出功率 80 瓦、振动频率 16—24 千赫兹)处理 30 分钟,然后同时滴定其血凝滴度,结果见表 9。从表 9 可见,冻融及超声波处理对标准 3 型腺病毒血凝滴度无影响,其余 3 株腺病毒的血凝滴度均下降,说明血凝素经处理后有部分被破坏。

表 9 冻融、超声波处理对血凝滴度的影响

血 凝 素	未 处 理	处 理 后 滴 度	
		冻 融	超 声 波
标准 3 型	1:24	1:28	1:24
新分离 3 型	1:12	<1:8	1:8
标准 7 型	1:56	1:36	1:28
新分离 7 型	1:128	1:36	1:72

讨 论

3、7、11 型腺病毒凝集猴血球的能力受许多因素影响(尤其是 3、7 型)。我们的工作表明,首要的因素是在试验前必须对不同个体猴血球进行挑选,文献中也有类似报道^[2,5]。我们曾用胰蛋白酶处理对腺病毒不敏感的动物血球,企图用之代替对腺病毒敏感的猴血球,但还需继续进行试验。

制备高滴度的血凝素是实际应用中的重要关键,根据我们的工作,采用生长旺盛的人胚肾或 HeLa 细胞,用使受染细胞在染毒后 3—5 天内即可呈现完全病变的病毒量感染细胞,此外用病毒在人胚肾和 HeLa 细胞上交替传代等方法可获得高滴度的血

凝素。不论标准的或新分离的 3 型腺病毒产生的血凝素均较 7 型腺病毒血凝滴度低,原因有待进一步研究。工作中我们还发现用 Eagle 液维持受染细胞比 70 液(珠蛋白水解物液)维持细胞有利于细胞产生血凝素。若用传代人羊膜 (FL) 细胞制备血凝素时,用生长旺盛期的细胞染毒,比用生长缓慢期细胞染毒所产生的血凝滴度高,可能是前者较后者更有利于病毒复制,相应病毒繁殖量大,产生的血凝素也多,单位体积液体中血凝滴度高。

参 考 文 献

- [1] Rosen, L.: *Virology*, 5: 574, 1958.
- [2] Rosen, L.: *Am. J. Hyg.*, 71(1): 120, 1962.
- [3] Zuseck, F.: *P. S. E. B. M.*: 107(1): 27, 1961.
- [4] Bauer, H. and R. Wigand: *Arch. Ges. Virusforsch.*, 12: 148, 1962.
- [5] Simon, M.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 9(1): 45, 1962.
- [6] Wigand, R. and H. Baner: *Zbl. Bakt. (orig)*, 184: 60, 1962.
- [7] Lengyel, A. et al.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 10(3): 253, 1963.
- [8] Bauer, W. and R. Wigand: *Arch. Ges. Virusforsch.*, 21(1): 11, 1967.
- [9] Дрейзин, Р. С. и Э. Е. Золотарская *Вопр. Вирусол.*, 6: 689, 1966.
- [10] Дрейзин, Р. С. и Э. Е. Золотарская *Вопр. Вирусол.*, 5: 573, 1967.
- [11] Liem, I. T. F. W. et al.: *Arch. Ges. Virusforsch.*, 33: 177, 1971.
- [12] Norrby, E.: *J. Gen. Virol.*, 5: 221, 1969.
- [13] Hierholzer, J. C.: *J. Infect. Dis.*, 128(4): 541, 1973.
- [14] Stoff, E. J.: *Practitioner*, 205: 735, 1970.
- [15] W. H. O. Techn. Rep. Ser. No. 408, *Respiratory Viruses*, p. 49, Geneva, 1969.
- [16] 任贵方等: *中华医学杂志*, 48(2): 71, 1962.
- [17] 朱既明等: *微生物学报*, 9(1): 20, 1963.
- [18] 赵锦铭等: *中华儿科杂志*, 17(3): 142, 1979.

STUDIES ON SOME FACTORS INFLUENCING THE HEMAGGLUTINATING PROPERTIES OF ADENOVIRUS

Zhao Jin-ming Bai Ying

(Institute of Pediatrics, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

The activities of adenovirus hemagglutinin (HA) prepared in human embryonic kidney cell culture are described. The influencing factors such as erythrocytes from different individual monkeys, their concentrations, incubation temperatures and pH of the diluent are studied. Results obtained show that the hemagglutinating titers of types 3, 7, 11, 14 and 21 adenovirus are not only influenced by the different individual monkey red cells, especially those of types 3, 7 and 14, but also by the different concentrations of red cells, incubation temperatures and pH of the diluent. The optimal conditions for adenovirus HA test are as follows: using sensitive monkey red cells, 1% red cell suspension, 1/50 M pH 7.6—8.0 PBS, 1 hr incubation at 37°C.

Human embryonic kidney and HeLa cells can be used for the preparation of adenovirus HA. The human embryonic kidney cell cultures are infected with 10^3 — 10^5 TCID₅₀ of adenovirus. After CPE appears complete, the supernatants showing the highest HA titer are collected. The HA titer of type 7 adenovirus cultured in the human embryonic kidney cells is significantly higher than that of type 3 adenovirus.

The HA activity of adenovirus is stable for several months at 4°C, that of types 7 and 11 decreased at 45°C for 15 minutes and that of types 3, 7 and 11 lost completely at 60°C for 30 minutes. Ultra-violet treatment, repeated freezing and thawing and ultrasonic treatment could also result in decreasing of the HA titer.