

巨细胞病毒冻干保存

赵素兰 蒋泓

(中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京)

巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 是疱疹病毒科的成员, 人类及其它一些哺乳动物易受该病毒感染, 于怀孕、多次输血及器官移植时可激活, 造成显性感染。孕妇感染对胎儿危害较大, 是人类先天性畸形的重要病原之一^[1-3]。近年来, 随着国内外医学界对该病毒的广泛研究, 要求提供毒种进行研究的单位日益增多, 但由于该病毒在培养过程中繁殖缓慢而且不易保存, 一般都沿用液氮为主要保存手段, 由于该保存法不能为各

地供应毒种提供方便, 有关冻干保存目前国内尚未见报道。鉴于以上情况, 作者探索了巨细胞病毒冻干保存的可行性, 经过一年多的反复试验及两年多的观察和应用, 巨细胞病毒冷冻干燥保存已在国内首次获得成功。

材料和方法

(一) 病毒

AD169 标准株由本室提供; David 标准株由

表 1 含 25% 脱脂奶、5% 明胶的 CMV 病毒冻干保存一年后在不同细胞系传代结果

病毒株	接种细胞	接种后病变观察时间 (d)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
AD ₁₆₉	Hep-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BHK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HEK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HEL	-	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
David	Hep-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BHK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HEK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HEL	-	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
CMV _{N-38}	Hep-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BHK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HEK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HEL	-	-	±	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++

首都儿科研究所病毒室提供; 奶标本 38 株系本室从正常乳标本中分离得到。

(二) 保护剂

1. 无菌脱脂奶。
2. 用生理盐水配成的 20% 明胶, 经高压灭菌后置 4℃ 备用。

(三) 细胞

HEL₂: 为水囊引产人胚肺制备的半传代细

胞, HEL₂—HEL₃₀ 为已知敏感细胞。HEK, Vero, BHK, Hep-2 为不敏感细胞。

(四) 具体方法

先将巨细胞病毒标准株和奶标本分离株分别接种在 HEL 细胞中 37℃ 平放培养, 当出现 +++ 典型病变时平放 4℃ 3—7d。合并病毒悬液分成

本文于 1989 年 3 月 23 日收到。

表2 含50%脱脂奶 CMV 病毒冻干保藏一年后在不同细胞系传代结果

病毒株	接种细胞	接种后病变观察时间 (d)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AD ₁₅₉	Hep-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BHK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HEK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HEL	-	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++	
David	Hep-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BHK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HEK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HEL	-	+	++	++	++	+++	+++	++++	++++	

表3 含50%脱脂奶 CMV 冻干保存效果

病毒株	条件	效果观察 (TCID ₅₀ /0.1ml)
AD ₁₅₉	冻干前	4.5 lg
	冻干后 -20℃ 保存 4 个月	2.0 lg
	冻干后 -20℃ 保存 12 个月	2.0 lg
	未加保护剂冻干后 1 个月	失传
CMV _{N-33}	冻干前	3.0 lg
	冻干后 -20℃ 保存 1 个月	1.5 lg
	冻干后 -20℃ 保存 12 个月	1.5 lg
	未加保护剂冻干后 1 个月	失传

3 个组, 两个组分别加不同保护剂, 另一个组不加保护剂。按组分别分装于无菌干燥管内^[3], 每管 0.4ml, 置 -60℃ 速冻装机, 机室温度必须在 -30℃ 以下。真空度保持在 13.3—1.33Pa, 抽真空 24h, 开机封管放 -20℃ 保存^[4]。

实验结果(表 1—3)表明, 采用 50% 脱脂奶或 5% 明胶加 25% 脱脂奶均能保护巨细胞病毒耐受冻干保存。经冻干保存一年, 4—10d 仍出现 + + + + + 典型病变, 而且经三代已用于制备 ELISA IgG 抗原, 为全国各地提供了大量试

剂盒。不加保护剂者失传, 冻干保存的最长存活时间有待继续观察。

参 考 文 献

- [1] Rand, K. H. et al.: *N. Engl. J. Med.*, 298: 951, 1987.
- [2] Preece, P. M. et al.: *Arch. Dis. Child.*, 59: 1120, 1984.
- [3] 王淑凤等: *病毒学报*, 4: 73, 1988.
- [4] 赵素兰等: *病毒学报*, 2: 14, 1986.

PRESERVATION OF CYTOMEGALOVIRUS BY LYOPHILIZATION

Zhao Sulan Jiang Hong

(*Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing*)

The preservation of cytomegalovirus (CMV) by lyophilization was first developed in China. In 4 to 10 days the typical CPE was up to ++++ in the HEL cell line which was inoculated only 0.2 ml suspension of lyophilized strain AD₁₈₉ or CMV isolated from milk breast. After preserved for 1 year the lyophilized cytomegalovirus strain still contained 1.5—2.0 lgTCID₅₀/0.1 ml in titer

of viral infection. The lyophilized strains have been used in the preparation of diagnostic antigen of cytomegalovirus in our department, also the strains were supplied to the whole country.

Key words

Cytomegalovirus; Lyophilization