

菜白蝶的一种新病毒

IV. 病毒的细胞培养

赵林 李天宪 李爱华 陈绳亮 孙富林

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

1978年3月,作者首先发现了菜白蝶的一种新病毒。其后对该病毒的分离、鉴定、病毒的生物物理性质、血清学性质以及病毒的核酸性质等进行了报道^[1-4]。以其主要特性证明,该病毒可能为细小病毒科、密核病毒属的一个新种。Kusetak曾报道细小病毒科的密核病毒属,其病毒易感染脊椎动物的多种细胞。菜白蝶的这种新病毒是否具有此特性,作者用地鼠肾细胞进行了感染试验,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 病毒增殖

取低温保藏的毒种,置于常温下进行温度平衡,然后将毒种悬液涂于新鲜洁净的甘蓝叶上,饲喂饥饿处理的菜青虫,感染5天左右,收集典型症状病死的幼虫,用无菌水研磨均匀,4000g×离心30分钟,除去虫体碎片,上清液再次扩大饲喂幼虫,如此反复至病死幼虫够量。

1.2 病毒提纯

取250—300只典型病死幼虫,按每只虫1ml 1 mol/L PBS缓冲液充分研磨,纱布过滤,再经4000g×离心30分钟,弃沉淀,取上清液,再经15 000g×离心60分钟,上清液再经过65 100g×离心180分钟,弃上清液,用适量缓冲液研磨均匀,低速离心除去不溶物。获得病毒液置4℃备用。

1.3 细胞制备

取2周龄金地鼠放血致死,鼠体浸没于新洁尔灭1:1000溶液内,如此反复3次,每次浸泡30分钟,第4次用1:500新洁尔灭溶液浸泡30分钟,彻底杀死鼠皮毛的菌类。在无菌条件下,将鼠固定于夹上,无菌解剖取肾。取无污染的地鼠肾,在Hank's液中用无菌剪子,剪碎如米粒大小,再以0.25%胰蛋白酶消化,4℃冰箱过夜,次日在无菌条件下用滴管轻轻吹打,使细胞分散,离心吸出胰酶消化液。再用Hank's液洗除去余酶,将细胞悬于Eagle's培养液内,加10%灭活小牛血清,用NaHCO₃调pH至7.5左右,将细胞分装于克氏瓶内,置37℃静止培养3—4天。待细胞形成单层时,每瓶接种病毒液0.5ml,35℃吸附2小时,倒掉瓶内含有病毒的培养液,用Hank's溶液洗2次,加入含5%小牛血清的Eagle's培养液,置37℃继续培养至70%细胞病变脱落。用吸管将所有细胞打下来分成两份,取一份感染病毒的细胞及悬液,置冰箱反复冻融3次,400r/min离心40分钟,除去细胞碎片,上清液经65100g×离心180分钟,沉淀用适量无菌水悬浮研磨,置4℃备用。另一份感染病毒的细胞经1000g×离心20分钟,沉淀细胞编号A。

1.4 细胞超薄切片

取沉淀细胞A,用2.5%戊二醛和1%锇酸双固定,然后用苯二甲酰二丙烯酯包埋,在60℃下聚合2天,编号B。取B号包埋固定的感病毒细胞,用LKB超薄切片机切片,切片厚薄约300 Å,切片经醋酸铀柠檬酸铅双重染色法染色。

1.5 细胞病毒的活性测定

取 A 号提纯的细胞培养病毒, 适量稀释均匀涂在洁净的白菜叶上, 对照以无菌水各饲养饥饿的 3 龄菜青虫幼虫各 5 只。

1.6 电子显微镜观察

取 A 号病毒悬液一滴, 滴在喷有碳膜的富尔膜电镀铜网上约 5 分钟, 用滤纸条除去余液, 再滴上 2% PTA 一滴, 5 分钟后除去。晾干, 取 A 号和 B 号制备的电镀铜网, 在 JEM-100C 电镜下观察拍片。

2 结果和讨论

金地鼠肾细胞培养成功均匀铺满克氏瓶壁(图版 I-1)。感病细胞超薄切片, 细胞核内有堆集大量小病毒粒子(图版 I-2)。感病细胞经冻融粗提纯物在电镜下可见有病毒粒子(图版 I-3)。粗提纯的感染病毒细胞培养液, 感染 5 只幼虫实验组 5 日全部萎缩死亡, 其余 5 头对照组, 均健康化蛹(图版 I-4)。

实验结果证实, 该病毒不仅在生物物理、生物、化学、核酸性质与密核病毒属类同, 并且在感染细胞范围上也有类似之处。何中元等人曾将该病毒感染 Vero 细胞成功, 作者感染金地鼠肾细胞也得到满意结果。但是该病毒是否能感染所有脊椎动物细胞, 仍需做大量研究工作。

参 考 文 献

- [1] 孙富林, 宋宝云, 赵林, 等. 自然杂志, 1979, 3(4): 320.
- [2] 孙富林, 陈明树, 毕坎华, 等. 微生物学报, 1981, 21(1): 41.
- [3] 毕坎华, 李小洁, 陈明树, 等. 微生物学报, 1983, 23(4): 309.
- [4] Sun Fulin, Chen Ming Shu. *J Invert Patho* 1985, 46: 121.
- [5] 孙富林, 陈明树, 孙松柏. 微生物学报, 1986, 26(2): 188.

A NEW INSECT VIRUS OF PIERIS RAPAE

IV. CELL CULTURE OF VIRUS

Zhao Lin Li Tianxian Li Aihua Chen Shenliang

Sun Fulin

(Wuhan Institute of Virology Academia Sinica, Wuhan 430071)

Abstract In 1978, the first observation a New densovirus from pieris rapae was made by F. L. Sun. The virus is very small and have very high virulence. After 1989, we report their every character, example; biology, biophysics serology morphology and nucleat acid specificity. Those special were reported, but, how is the cell culture character? So we study the infectivity that infect cell of vertebrate. The virus all character are similar densovirus of parvoridae. Consequently we suppose this viurs of pieris rapae is a New insect virus.

Key words Densovirus, Serology, Pieris rapae

图 版 说 明

1. 金地鼠肾细胞(250×); 2. 细胞核内堆集的大量病毒粒子(20 000×); 3. 感染病毒的虫尸粗提纯物中见有病毒粒子(120 000×); 4. 感染病毒的细胞培养物感染菜青虫幼虫死亡, 对照化蛹。