

# 白纹伊蚊细胞系 Aa-778 对 蓝舌病病毒的敏感性

潘李珍

樊玉珍

(首都医学院, 北京 100054)

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100031)

李 根

(云南省兽医研究所, 昆明 650024)

**摘 要** Aa-778 单层细胞接种 BTV-17 后, 于第三天出现细胞集聚, 进而融合, 脱落。细胞病变在第四天达高潮, 第六天后, 由于抗感染细胞繁殖逐渐覆盖单层空洞而恢复原样。用荧光抗体技术观察到 Aa-778 病变细胞中 BTV-17 包涵体和病毒抗原堆积物。TCID<sub>50</sub> 测定, 初步表明第一代细胞病毒不仅能在 Aa-778 细胞中繁殖传代, 而且它的毒力类似于在 BHK<sub>21</sub> 细胞中的毒力。

**关键词** 细胞系 蓝舌病病毒 敏感性 白纹伊蚊

蓝舌病病毒 Bluetongue virus (BTV) 是一群属双股 RNA 环形病毒 (Orbivirus)。已经证明 BTV 群至少有 20 多个不同的血清型 (Howell; Kumm, 1970; Verwoerd 等, 1979) [1,2], 它们能广泛感染牛、羊反刍动物发生蓝舌病——一种损失极大的重要虫媒病毒流行病。各种蓝舌病病毒均可以在牛、羊原代肾细胞培养物、BHK<sub>21</sub> 细胞系、Vero 细胞系以及库蠓唾液腺原代细胞培养物中繁殖。其中以 BHK<sub>21</sub> 细胞系为敏感的细胞系, 无论高度或低度感染, 在 BHK<sub>21</sub> 细胞培养物中均能产生高滴度 BTV。1982 年 Mcphee 等 [3] 证明, 各种蓝舌病病毒都能在 Singh 的白纹伊蚊细胞系中繁殖生长。1985 年 B. M. King [4] 等报告在 BTV 感染的白纹伊蚊细胞中观察到病毒堆积物及新繁殖的病毒后代, 其形态与 BTV 在哺乳类细胞培养物中的形态相同。我们测定白纹伊蚊细胞系培养物对 BTV-17 的敏感性, 目的是满足蓝舌病病源分离及免疫学研究的需要, 现将实验结果报告如下。

## 方法与结果

### 一、BTV-17 对 Aa-778 细胞的感染实验

1. 细胞系的来源与传代 Aa-778 细胞系来源于首都医学院实验中心细胞室。在使用前, 经过各种检验及电子显微镜观察, 证明无任何外来因子。细胞系用下述方法传代: 生长至对数期的单层细胞, 除去旧培养液, 用 Hanks 液洗涤两次, 加少许新培养液, 用弯头滴管

吹散单层细胞,按1:2分种率补加新培养液,分种于两个与原瓶体积相等的培养瓶中,置温箱中(28℃)闷瓶培养。每隔3~5天传一代,中间不换液。细胞生长液为含0.65%水解乳白蛋白的199培养液,其中含有20%小牛血清及100单位/ml的青霉素和80μg/ml的链霉素。

2. 病毒来源及接种前处理 实验使用NVSLUS DA蓝舌病病毒(BTV-17型)。将病毒接种于生长48小时BHK<sub>21</sub>细胞培养物(来源于农业部兽药监察所)。吸附1小时后,用Hanks液洗涤3次,加入维持液。BHK<sub>21</sub>细胞生长培养液是用Eagle氏液与0.5%水解乳白蛋白Hanks液等量混合液,其中含有10%小牛血清及100单位/ml的青霉素、80μg/ml的链霉素,调整培养基pH至7.2。维持液成分同生长培养液成分,但小牛血清浓度为5%。接种病毒后的BHK<sub>21</sub>细胞培养物,在37℃下维持培养3天,细胞病变面积达70%时收获病毒。收获方法是将培养物置于-20℃下,反复冻融三次,所得溶液为接种的病毒原液。

3. Aa-778单层细胞感染病变(CPE)的观察 试验使用Aa-778第22代细胞材料。细胞生长至对数期时,弃去旧培养液,接种上述病毒原液,每个小方瓶(7.5cm×3.5cm)内加入病毒原液1ml,然后在28℃温箱中维持培养,逐日观察细胞感染后出现的病变(CPE)。上述实验以未接种病毒的Aa-778单层细胞作对照,同时为排除接毒后洗涤不干净残留病毒的影响,在同代同批次的Aa-778单层细胞中,接种最后1次洗涤液作为另外一组的对照。

在维持培养的第三天,接种病毒的Aa-778第22代单层培养物出现细胞聚集病变(CPE),于第四天CPE达单层细胞面积70%。聚集的细胞融合成大圆形细胞,或葫芦状融合细胞。病变区中央细胞脱落成空斑。但至第五天后,细胞集聚病变范围及空斑逐渐缩小,为新生的细胞所覆盖,至第七天,单层细胞恢复如前。但未接种病毒及接种洗涤液的对照细胞自始至终均未发现上述细胞病变过程。

4. Aa-778接毒细胞的荧光抗体实验 为证明接种病毒的Aa-778单层细胞已感染BTV-17,我们使用荧光抗体技术检查接种病毒后出现病变的Aa-778单层细胞,观察细胞中是否存在病毒抗原或包涵体。实验方法是:取上述接毒四天的病变细胞培养物以及对照单层细胞培养物,分别弃去旧培养液,用Hanks液洗涤两次,加2ml Eagle氏液,再用弯头滴管吹散单层细胞,制成细胞悬浮液。细胞悬浮液以1000 rpm离心10分钟,沉淀物分别用P. B. S.液悬浮,振荡均匀,滴在载玻片上(载玻片一侧滴敏感细胞,另一侧滴对照细胞)。标本用丙酮固定,干燥后滴加预先测定效价的BTV-17荧光抗体稀释液(1:4),在37℃下作用45分钟,然后用pH7.2的P. B. S.液冲洗两次,滴加10%碳酸甘油缓冲液,加盖片。置载玻片标本于荧光镜下观察。结果在感染细胞中,观察到具有强烈荧光BTV-17包涵体,以及病毒抗原堆积物。而对照细胞则未见任何病毒荧光颗粒。

## 二、Aa-778第一代BTV-17细胞病毒毒价测定

在上述实验结果基础上,为了解Aa-778细胞病毒能否在Aa-778细胞中繁殖传代,其毒价如何,我们进行Aa-778第一代细胞病毒TCID<sub>50</sub>测定。实验中同时用BHK<sub>21</sub>细胞作对照比较。测定方法是:在相同条件下分别制备Aa-778单层细胞(25代次)及BHK<sub>21</sub>单层细胞(122代次)。每个小瓶的体积和接种量均相等。待细胞生长至48小时,分别接种Aa-778

第一代BTV-17细胞病毒材料(处理方法同前)。接毒后,维持培养至第四天,当病变面积达70%时收毒,培养物放在-20℃的冰箱中反复冻融三次,振荡培养瓶,所得的溶液为病毒原液。病毒材料稀释成 $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 等6个稀释度,每个稀释度各自接种5瓶单层细胞,实验的两个细胞系各设立5个未接种病毒的单层细胞作对照。接毒后的细胞在28℃下吸附1.5小时后,用Hanks液洗涤3次,最后加入维持液。接毒后的培养物,放在28℃温箱中维持培养,逐日观察两个细胞系单层细胞病变,统计病变瓶数,计算TCID<sub>50</sub>指数,结果如下表。

表 细胞感染率

细胞系	感染病毒	病变情况	细胞感染率*						TCID <sub>50</sub>
			10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	
Λa-778	Λa-778第一代细胞病毒	第3天出现	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4.5
BHK <sub>21</sub>	同上	第2天出现	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4.5
对照	未接种病毒	—	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	--

\* 分母为接种细胞瓶数,分子为病变瓶数

上述实验,Λa-778细胞于第三天、BHK<sub>21</sub>细胞于第二天出现细胞病变,细胞集聚,进而脱落,细胞感染情况几乎相同,对照的单层细胞未出现任何病变。

## 讨 论

1. D.A.Mcphée 等<sup>[3]</sup>曾经用Singh的ATC-15细胞系分离澳大利亚BTV三株病毒,他们发现这些BTV可以在ATC-15白纹伊蚊细胞上繁殖生长,但维持培养4天以上没有观察到细胞病变(CPE)。但在我们的实验中,Λa-778接种病毒三天便可观察到类似BHK<sub>21</sub>细胞上的病变。使用荧光抗体技术还观察到病变中BTV包涵体及病毒抗原堆积物。因此我们认为Λa-778细胞对BTV-17是有敏感性的。

2. Λa-778接毒后出现细胞病变空斑不是持续的,在培养第五天后细胞空斑逐渐为新生细胞所覆盖,从而使单层细胞恢复如前。我们认为可能是由于Λa-778由异体初孵幼虫组织建立的,本身存在多种细胞,对BTV-17敏感性不一样,敏感细胞产生病变脱落,非敏感的细胞或抗感染的细胞繁殖,以致覆盖单层细胞上的空斑。由此看来要提高细胞对BTV-17的敏感性,有必要对Λa-778细胞系克隆化,以挑选敏感性的细胞克隆株。

3. Λa-778第一代BTV-17细胞毒价的测定证明,它对Λa-778细胞是有强烈感染力的,所引起的细胞病变和毒价相当于BTV-17对BHK<sub>21</sub>细胞毒力的情况。因此我们认为Λa-778细胞对BTV-17不但敏感,而且可以传代繁殖。这一特性,可能有利于蓝舌病免疫学的研究。当然上述的TCID<sub>50</sub>测定只是初步的,应该设计更为精细的稀释度,以便得到更好的结果。

4. 实验所获在Λa-778繁殖的BTV-17细胞病毒株,应继续传代研究。我们认为这株昆虫宿主细胞病毒对蓝舌病的研究,无论在理论上或在实践上都有一定意义。经过传代,不管毒力逐渐减弱还是逐步增强,对蓝舌病免疫学的研究或制备蓝舌病疫苗都具有一定价值。

鸣谢 试验得到云南兽医所张念祖副研究员协助, 特此致谢。

### 参 考 文 献

- 1 殷震等. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1981, : 422~447
- 2 Huismans H, Erasmus B J. Identification of serotype-S specific and group-antigens of Bluetongue Virus. J Vet Res, 1981, 48: 51~58
- 3 Mcphee DA, Parsonson I M. Comparative studied on the growth of Australian bluetongue Virus serotype in continous cell line and embryonated chick egg. Vet Microbial, 1982, 7 (5): 401~410
- 4 King B M, Alders M A. Morphology of bluetongue virus-infected aedes albopictus (C6/36) cell culture. Virus Res, 1985 Jun.

## The Sensitivity of Aa-778 Cell to Bluetongue Virus (BTV)

Pan Lizhen

(Capital Medical College, Beijing)

Fan Yuzhen

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Research, Beijing  
Municipal Academy of Agriculture and forestry Sciences)

Li Gen

(Yunnan Provincial Veterinary Research Institute, Kunming)

**Abstract** Three days after inoculation by BTV -17, cell congregation, fusion and abscission were observed in the Aa-778 cells. On day 4, the highest value of the cytopathologic changes (CPE) was detected and the cell returned to normal after day 6. The presence of viroplasms and viral antigens in the infected cells was confirmed by the immunofluorescence techniques. Results of the TCID<sub>50</sub> measurements indicated possible reproduction of the first generation of the cytovirus in the Aa-778 cells and similar virulence in the Aa-778 cells to that in the BHK 21 cells.

**Key words:** Cell line; Blue Tongue virus; Sensitivity