

禽传染性支气管炎病毒适应鸡胚 肾细胞致产生细胞病变的试验观察

刘 福 安

(牧医系)

提 要

本文报道为了进行一种微量血清中和试验,使禽传染性支气管炎病毒马萨诸塞41株,适应鸡胚肾细胞培养物的过程。

在利用Earle氏均衡盐液为基础成份的营养液并在二氧化碳培养箱的条件下,用培养皿培养,而不是培养瓶培养,是病毒得以继代的关键,第一次接毒尤其如此。作者认为是由于松宽的培养皿盖,使培养箱内的5%二氧化碳的空气较易进入皿盖之故。

病毒继代的早期代次于检测病毒活力的鸡胚气管器官培养方法亦作了详细的描述。

为了利用细胞培养物进行禽传染性支气管炎病毒(IBV)的微量血清中和试验,首先必须使IBV适应细胞培养物并产生细胞病变(CPE)。本文报道经多次试验而最终成功地使IBV马萨诸塞(Mass)41和康涅狄格(Conn)46毒株适应了鸡胚肾(CEK)细胞培养物的经过和经验。

材 料 与 方 法

一、细胞培养物

以无菌操作取出18~20日龄鸡胚的肾,用0.25%胰酶消化后,以每毫升 1.5×10^6 个细胞接种于含7%经灭能的胎牛血清的Eagle氏基础营养液(BME)或最低必需营养液(MEM)。48~72小时后,细胞多融合成单层,可以接种病毒。细胞培养容器是用Corning牌25平方厘米培养瓶或60×15毫米培养皿。在含5%二氧化碳空气和37°C温度的条件下进行培养。

二、病毒接种

在细胞培养物用不含血清的BME或MEM等冲洗一次后,将IBV Mass 41和Conn 46两个毒株的种毒分别以每份培养物接种0.1毫升量。病毒在37°C吸附于细胞1小时后,用无血清的199营养液代替原来的培养液。一般每48小时将病毒继代一次。不显示CPE的早期代次收获物,被接种于鸡胚气管器官培养物,以确定其是否含有病毒。

三、鸡胚气管器官培养

将20日龄鸡胚的头颈剪下来，并使气管保持最大长度。沿腹侧剪开颈皮肤而暴露气管，然后左右手各拿一把镊子将其周围脂肪组织剥离，将气管剪下并移到盛BME的平皿里。约5~6个胚可供48个适用的横断面标本。用一细径的玻璃滴管插入较宽的气管前端，然后冲洗数次，使其内层表皮的粘液、血块等尽量除净。用一具有细长末端的镊子挟住气管中部，并提吊空中以便观察。然后用锋利的剪刀把气管剪成若干横段，一般每一段将包括2~3个气管环。为使培养期间气管横段保持正确位置，两个断面应该是平行的。在剪切过程，气管断段往往贴附于刀刃上，只须浸没在BME即可使其脱落。用一经烧灼灭菌的、尖端稍带角度的金属线穿过气管内腔，将向上直立的那些断段转移到一块24孔的培养板。为了增加每孔有直立气管断段的可能性，每孔放两个标本。每一孔各加入BME1.5毫升，置于培养箱内一天。这时往往可见大量细胞贴附于粘膜。用滴管有力地冲洗气管断段，然后换上新的BME。一般选择位置直立的、纤毛运动最活跃（定为4+）的气管断段作接种病毒用，其他孔则为未接毒对照。每天在倒置显微镜下观察器官培养物并记录所见到的纤毛运动情况。接毒后五天再用滴管冲洗气管断段一次，并作一次纤毛运动的观察。最后一次观察作为判断的根据，纤毛运动完全停止被视为有IBV存在的确证。

细胞培养、病毒接种、器官培养等操作均在垂直层流式的超净无菌罩内进行。

结 果

试验进行十一次。一至五次是用Corning牌25平方厘米有颈培养瓶培养CEK细胞的。虽然采用不同日次收获病毒，用聚乙二醇（PEG）^[1]和乙二胺四乙酸（EDTA）试图改变细胞膜特性，增加接种的病毒浓度等办法，但均未能使IBV成功地感染细胞培养物。

试验六：据文献^[2]报道的方法是用Corning牌60×15毫米培养平皿，我们却一直在用有颈的培养瓶。因此，本次试验用培养平皿代替培养瓶；放弃烦琐的PEG、EDTA和PBS冲洗细胞法，恢复原来的BME冲洗法；收获病毒48小时一次；只收获液体而不用刮下细胞层；病毒继代时不预先作冻融处理。试验结果表明，用器官培养物测毒，发现第一代次所有平皿收获的物质均有明显的病毒活性。这次试验采用的培养条件下，用平皿培养细胞似乎是IBV继代的关键因素，这大概是由于和培养瓶比较，在平皿内外含5%CO₂空气能更快达到平衡有关。

试验七：为确定继代IBV用平皿培养细胞是否只有在第一代次才是关键性，从试验六的第一代次开始分线作了培养瓶和平皿两个系列的病毒继代。直到第13代次试验结束的时间为止，从培养瓶和平皿收获到的液体均表现病毒活性。由此可知第一次接种病毒于培养平皿是关键的一代次，而一旦较适应细胞培养物的少数病毒粒子能在体外繁殖，以后在培养瓶内继代病毒就变为容易了。

试验八：为了确定在病毒吸附后加1.5%α-甲基葡萄糖苷于199营养液中是否有利于IBV的繁殖，分别在平皿的营养液中加1.5%α-甲基葡萄糖苷和不加分别作了两个系列的

病毒继代。刚好那时BME营养液供应不上,改用MEM作为接毒前形成细胞单层的培养液。结果表明在199营养液内加1.5% α -甲基葡萄糖苷没有什么优越性,加与不加收获的培养液均继续表现病毒活性。BME和MEM所制备的培养液没有什么差别,两种培养液对细胞生长和病毒继代效果良好。

试验九:企图用空斑法挑选对细胞适应的病毒粒子,本试验在细胞培养物接种IBV Mass 41株之后,用含1%琼脂的MEM复盖细胞单层。复盖物中分别作了加胰酶^[4](10微克/毫升)和不加胰酶两种处理。结果两种方法均未能产生空斑。

试验十:为确定在细胞培养物出现明显CPE(合胞体形成)之后缩短病毒继代时间是否有利,从试验八的第24代开始分开两条线每隔48小时和24小时继代病毒。试验进行了24天。

试验24天后,隔48小时继代的病毒达35代而隔24小时的达42代。那时可以看到隔24小时继代的病毒所产生的CPE比隔48小时的多得多。隔48小时的到第35代即停止,而隔24小时的继续到45代便形成了适应于CEK细胞的IBV Mass 41株种毒。

试验十一:本次试验的目的是确定使IBV Mass41毒株适应CEK细胞的经验是否能同样见效于Conn 46株。方法是在鸡胚内将IBV Conn 46种毒继代四次,然后接种在培养CEK细胞的平皿上,待第三代次出现特征性的合胞体CPE后,改用每24小时继代病毒一次。即使没有采用气管器官培养物检测法,也可以很明显地观察到病毒在第10代已迅速适应了CEK细胞(图1、2)。使IBV Mass 41株成功地适应CEK细胞的操作方法,同样在Conn 46毒株也行之有效的。另外,IBV Conn 46毒株比Mass 41毒株更易适应CEK细胞。

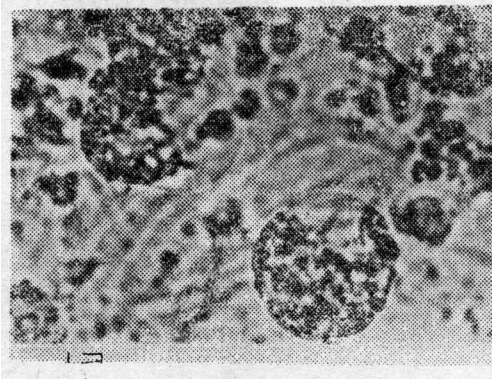


图1 IBV在CEK细胞培养物形成的合胞体

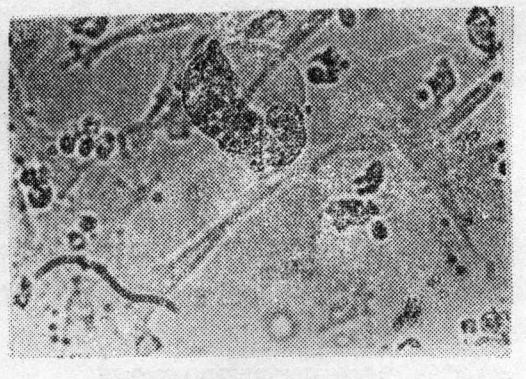


图2 合胞体的透明球状囊

讨 论

(一) 使IBV成功地在培养于平皿的CEK细胞中繁殖,似乎与5%二氧化碳空气在平皿内外迅速达到平衡的现象有关。鉴于所用的营养液的基础成份都是Earle氏均衡盐液(含 NaHCO_3 较多),以及在二氧化碳培养箱之外进行病毒接种细胞营养液会变硷性,故使用平皿有利于pH值降低到适合的范围。对于IBV来说,在37℃最适pH值为

7.4; 而pH8.0是有害的。

(二) 初期只有很少部分病毒群体^[5]是适合在CEK细胞繁殖的, 因此为第一次接种提供最适宜的条件是关键性的。假如将培养瓶盖放松一点, 可以促进瓶内外的气体交换, 但毕竟比不上平皿的快。估计两种培养容器不存在有细胞毒性。

(三) 在未出现明显CPE的早期继毒代次时, 应用鸡胚气管器官培养物检测IBV是很有价值的。可是, 由于其操作麻烦, 一般到试验后期就不使用它了。

(四) 在原代细胞培养物中IBV似乎仅作用于其中的类上皮型细胞。这些细胞收缩、变圆、核浓缩、出现合胞体; 成纤维细胞却继续正常生长。这可能解释为什么在试验九中IBV难于形成空斑, 而有些人宁愿用小鸡而不用鸡胚来供应肾细胞; 前者提供类上皮细胞的比例较大^[6]。如果进一步使IBV适应于一种类上皮型的传代细胞系, 例如VERO细胞^[7], 按道理应该可以获得更多CPE和空斑形成。

(五) 呈透明球状囊的合胞体是本研究过程观察到的IBV颇有特征性的现象, 在CEK细胞培养物和气管器官培养物均能见到; 弄清其性质有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Galfre, G., S. C. Howe et al (1976). Antibodies to Major Histocompatibility Antigens Produced by Hybrid Cell Lines. *Nature*, Vol. 266, 550—582.
- [2] Garcia, Z. and R. A. Bankowski (1981). Comparison of a Tissue-Culture Virus-Neutralization Test and the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For Measurement of Antibodies to Infectious Bronchitis. *Avian Diseases*, Vol. 25, 121—130.
- [3] Lukert, P. D. (1973). Avian Infectious Bronchitis—Characteristics of an Inhibitor Found in Serum. *Archiv Gesamete Virusforschung*, Vol. 40, 93—104.
- [4] Hans-dieter Klenk, Rudolf Rott, Michaela Orlich (1975). Activation of Influenza A Viruses by Trypsin Treatment. *Virology*, Vol. 68, 426—439.
- [5] Lukert, P. D. (1965). Comparative Sensitivities of Embryonating Chicken's Eggs and Primary Chicken Embryo Kidney and Liver Cell Cultures to Infectious Bronchitis. *Avian Diseases*, Vol. 9, 308—316.
- [6] Churchill, A. E. (1965). The Use of Chicken Kidney Tissue Culture in the Study of Avian Viruses of Newcastle Disease, Infectious Laryngotracheitis and Infectious Bronchitis. *Research in Veterinary Science*, Vol. 6, 162—169.
- [7] Cunningham, C. H., M. P. Spring, K. Nazerian (1972). Replication of Avian Infectious Bronchitis Virus in African Green Monkey Kidney Cell Line VERO. *Jour of General Virology*, Vol. 16, 423—427.

注: 本研究为作者于1980年10月~1981年10月在美国加州大学戴维斯校区兽医学院进修期间, 在R. A. 班考斯基教授指导下并在其所提供的实验室条件下进行的。

SOME OBSERVATIONS ON THE ADAPTATION OF THE AVIAN
INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS (IBV) TO PRODUCE CYTOPATHIC
EFFECT (CPE) IN CHICKEN EMBRYO KIDNEY (CEK) CELLS

Liu Fuan

(Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine)

ABSTRACT

This paper reports the course followed leading to the successful adaptation of IBV Massachusetts 41 strain to CEK cells as a prerequisite for the development of a micro serum neutralization test. It was found that, using nutrient media based on Earle's balanced salt solution and a 5% carbon dioxide incubator, the critical factor for success was the use of culture dishes as opposed to culture flasks, and especially so for the first virus passage. This was due presumably to the greater ease with which the loose cover allowed diffusion of the CO₂-charged air in the incubator into the dishes.

A detailed description is also given of the procedures for a chicken embryo tracheal organ culture which was found very useful in the detection of viral activity in early passages.