

流感病毒在 MDCK 细胞中培养的条件优化*

余钧池, 陈柳军

(广西柳州市疾病预防控制中心 545007)

摘要:目的 探讨流感病毒在 MDCK 细胞中的最佳培养条件。方法 将流感病毒以吸附法和直接接种法接种在 MDCK 细胞上,比较接种效果;选择最佳病毒接种方案,分别通过调整细胞培养时间、培养温度、病毒生长液胎牛血清浓度、胰酶浓度、病毒接种量和染毒传代次数来优化选择最佳培养条件。结果 直接接种法的培养效率较高;流感病毒在 MDCK 细胞中培养的最佳收获时间为 96 h;最佳培养温度为 35.5 ℃;胎牛血清对病毒的增殖有明显的抑制作用;病毒生长液含有终浓度为 2.5 μg/mL 的胰酶可提高病毒血凝效价;用于流感病毒培养的 MDCK 细胞的传代次数不宜超过 4 代。结论 流感病毒在 MDCK 细胞中最佳培养条件是:在病毒生长液环境下直接接种流感病毒,放置 35.5 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 96 h 后收获。其中病毒生长液中无胎牛血清、胰酶终浓度为 2.5 μg/mL。

关键词:流感病毒; 细胞,培养的; 实验室技术和方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.038

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2014)01-0092-03

流感是全世界最严重的呼吸道传染病之一,其发病率和病死率极高^[1]。流感病毒的分离与鉴定是当今诊断和研究流感的主要手段^[2]。利用 MDCK 细胞培养、增殖和分离流感病毒的方法已广泛地应用于流感病毒研究、监测及疫苗生产等工作,使用 MDCK 细胞分离得到的流感病毒,抗原性和基因特性比鸡胚分离得到的病毒更接近于原始采集标本^[3]。因此,运用 MDCK 细胞分离流感病毒是我国流感监测网络实验室检测流感病毒的主要手段之一。本文通过比较不同培养条件下,使用 MDCK 细胞培养流感病毒的效果,以摸索出流感病毒在本实验室 MDCK 细胞上的最佳分离培养条件。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒 MDCK 细胞由广西壮族自治区疾病预防控制中心病毒所惠赠,为第 12 代;A1 代表季节性流感 H1N1;A2 代表季节性流感 H3N2;A3 代表甲型 H1N1;B 代表 B 型(Victoria)。实验过程中使用的病毒株,均为本实验室分离鉴定得到,经国家流感中心或广西壮族自治区疾病预防控制中心病毒所鉴定确认。

1.2 主要试剂 DMEM 基础培养基购自 HYCLONE 公司,D-Hank's 溶液购自 GENERAY 公司,Trypsin-EDTA、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司,1.5% 人"O"型血来自本实验室。

1.3 流感病毒在 MDCK 细胞上接种方法的比较

1.3.1 吸附法 将在 48 孔细胞培养板中生长成致密单层(75%~90%)的 MDCK 细胞用 D-Hank's 溶液洗涤 3 次后,接种 100 mL 流感病毒液,温和摇动数次,37 ℃、5% CO₂ 培养箱中吸附 1 h,取走接种物,用 D-Hank's 溶液洗涤 3 次后加入 1 mL 病毒生长液,放置 35.5 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3.2 直接接种法 将生长成好的 MDCK 细胞用 D-Hank's 溶液洗涤 3 次后,每个培养孔中加入 1 mL 病毒生长液,再接种 100 mL 流感病毒液,放置 35.5 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。以下实验均采用直接接种法。

1.4 流感病毒在 MDCK 细胞上最佳收获时间的选择 将接种了流感病毒的 MCDK 细胞,放置于 35.5 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。每日观察细胞病变情况,分别于不同的时间进行收

获,收获之前将细胞放于-80 ℃冰箱,冻融 1~2 次,按《国家流感中心标准操作规程(修订版)》进行流感病毒的血凝(HA)滴度检测。

1.5 流感病毒在 MDCK 细胞上最佳培养时间的选择 将接种了流感病毒的 MCDK 细胞,分别放置于 34.0、34.5、35.0、35.5、36.0、36.5、37.0 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 96 h,收获后测定病毒的 HA 滴度。

1.6 胎牛血清对 MDCK 细胞培养流感病毒的影响 将培养好的 MCDK 细胞涂 3 次后,接种流感病毒。病毒生长液中分别含有为:0.0%、1.25%、2.5%、5.0%、10.0%、20.0% 的胎牛血清和终浓度为 2.5 μg/mL 的胰酶,放置于 35.5 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 96 h,收获后测定病毒的 HA 滴度。

1.7 胰酶对 MDCK 细胞培养流感病毒的影响 将培养好的 MCDK 细胞涂 3 次后,接种流感病毒。病毒生长液中胰酶终浓度分别为:0.0、1.25、2.5、5.0、10.0、20.0 μg/mL,放置于 35.5 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 96 h,收获后测定病毒的 HA 滴度。

1.8 流感病毒最佳接种量的选择 将各型流感病毒分别接种 10、25、50、75、100、125、150、175、200 μL 于培养好的 MDCK 细胞上,放置于 35.5 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 96 h,收获后测定病毒的 HA 滴度。

1.9 流感病毒连续传代情况 将生长成致密单层的 MCDK 细胞用 D-Hank's 溶液洗涤 3 次后,接种流感病毒 50 μL,放置于 35.5 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 96 h,收获的病毒液连续盲传 10 代,测定各代病毒的 HA 滴度。

2 结果

2.1 两种接种方法的比较 根据实验结果发现,直接接种法收获的病毒,其 HA 滴度高于吸附法,结果如表 1。同时,通过实验操作步骤的比较,发现吸附法步骤比较繁琐,有增加潜在污染的危险。

2.2 MDCK 细胞培养流感病毒的最佳收获时间 测定不同时间收获的流感病毒液的 HA 滴度,绘制病毒增殖曲线图。由图 1 可知,流感病毒经过 96 h 增殖所得的 HA 滴度最高,见

* 基金项目:广西卫生厅自筹经费课题资助项目(Z2011265)。

图 1。

2.3 流感病毒在 MDCK 细胞上最佳培养温度 流感病毒在 35.5℃ 培养时,得到的 HA 滴度最高,如表 2。

表 1 流感病毒两种接种方法 HA 滴度比较

方法	流感病毒两种接种方法 HA 滴度比较			
	A1	A2	A3	B
吸附法	16	8	16	4
直接接种法	32	32	64	16

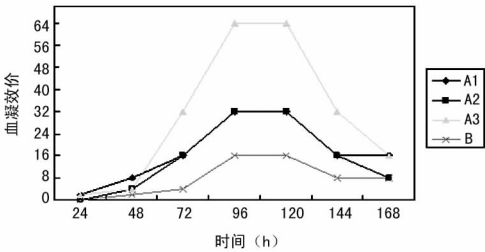


图 1 不同时间收获流感病毒的血凝效价

表 2 流感病毒在 MDCK 细胞上最佳培养温度

培养温度 (℃)	温度对 MDCK 细胞培养流感病毒的滴度			
	A1	A2	A3	B
34.0	4	—	2	—
34.5	8	4	16	4
35.0	16	8	32	4
35.5	32	32	64	16
36.0	16	16	32	8
36.5	32	32	32	8
37.0	16	16	16	4

—:无数据。

2.4 胎牛血清对 MDCK 细胞培养流感病毒的影响 随着病毒生长液中胎牛血清浓度的升高,流感病毒的血凝效价明显下降,见表 3。

表 3 血清对流感病毒在 MCDK 细胞上增殖的影响

血清浓度 (%)	血清对 MDCK 细胞培养流感病毒的滴度			
	A1	A2	A3	B
0.00	32	32	64	16
1.25	8	16	16	8
2.5	4	8	—	2
5.0	—	4	—	—
10.0	—	—	—	—
20.0	—	—	—	—

2.5 胰酶对 MDCK 细胞培养流感病毒的影响 病毒生长液中含有终浓度为 2.5~5.0 μg/mL 的胰酶时,可以较明显的提高流感病毒血凝效价,提高 MDCK 细胞病变程度;当胰酶终浓度为 10.0 μg/mL 时,血凝效价明显下降,见表 4。

2.6 流感病毒最佳接种量 流感病毒接种量为 50 μL 时,得到的 HA 滴度最高,见表 5。

2.7 流感病毒连续传代情况 流感病毒在 MDCK 细胞上经过连续传代,在第 3、4 代达到最高 HA 滴度,此后再传滴度出现下降,到第 7、8 代滴度开始出现阴性,见表 6。

表 4 胰酶对流感病毒在 MDCK 细胞上增殖的影响

胰酶浓度 (μg/mL)	胰酶对 MDCK 细胞培养流感病毒的滴度			
	A1	A2	A3	B
0	8	16	16	8
1.25	16	32	32	16
2.5	32	32	64	16
5.0	32	32	64	16
10.0	16	16	8	4
20.0	4	4	4	2

表 5 接种量对流感病毒在 MDCK 细胞上增殖的影响

接种量 (μL)	接种量对 MDCK 细胞培养流感病毒的滴度			
	A1	A2	A3	B
10	16	16	8	8
25	16	16	16	8
50	32	32	64	16
75	16	32	32	16
100	16	16	16	8

表 6 传代对流感病毒在 MDCK 细胞上增殖的影响

代数	MDCK 细胞培养流感病毒的滴度			
	A1	A2	A3	B
第 1 代	8	16	8	8
第 2 代	16	16	32	8
第 3 代	32	32	64	16
第 4 代	32	32	64	16
第 5 代	16	16	32	8
第 6 代	8	16	16	4
第 7 代	4	8	4	—
第 8 代	—	2	—	—

—:无数据。

3 讨 论

使用 MDCK 细胞分离流感病毒的实验方法,是常规流感检测及病毒研究的关键技术^[4],由于不同的 MDCK 细胞株均有各自的生长特点,流感病毒对其侵袭力及在该细胞上的繁殖条件均有所差异。因此,对本实验室使用的 MCDK 细胞针对培养流感病毒开展最适培养条件优化研究,既能提高流感病毒的分离率,又能节省人力、物力,提高工作效率。

流感病毒在 MDCK 细胞上培养,先吸附后加病毒生长液的吸附接种法既费时又费力,同时会增加污染的可能性,而将病毒液直接接种到病毒生长液的直接接种法,即减少实验操作步骤又可降低潜在污染。同时,通过实验的比较,发现直接接种法的培养效率比吸附法高,较适合本实验室流感病毒的分离培养。

流感病毒在 MDCK 细胞上连续培养,前 3~4 代流感病毒的 HA 滴度逐渐提高,之后随着传代次数的增加,流感病毒 HA 滴度逐渐下降并最终消失。其原因可能是流感病毒经过多次传代后,细胞的产物积累在生长液中,不利于细胞生长,从而减少子代病毒的含量^[5]。因此,在病毒培养过程中应尽量减少细胞的传代次数。同时,病毒接种量也要适中,接种量太少,流感病毒对 MDCK 细胞的侵袭力不够,得不到滴度高的病毒;接种量太高,会产生大量不具有感染性的不完全病毒颗粒^[6]。

使用 MDCK 细胞培养流感病毒过程中,加入一定量的胰酶可将没有感染性的非裂解型血凝素变成有感染性的血凝素^[7],少量的胰酶有助于流感病毒的增殖^[8]。同时郭元吉等^[6]也指出,胰蛋白酶类物质能提高细胞病变程度,增加空斑数,加大空斑的直径和提高清晰度,提高病毒收获量。然而,在 MDCK 细胞中不存在该酶类,因此在病毒繁殖时,加入适量的胰酶,能补充该细胞蛋白酶的不足,提高病毒 HA 的裂解。实验表明,胰酶浓度过高,细胞过早脱落,浓度过低又无相应作用,病毒生长液中胰酶终浓度为 2.5~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,可以明显提高流感病毒的 HA 滴度,提高细胞病变程度。在不影响流感病毒的分离培养又能节约成本的原则下,建议本实验室使用 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的胰酶。

因胎牛血清中含有某些抗胰酶物质,可减弱甚至丧失胰酶分解蛋白的作用,此外血清中还含有一些物质,能覆盖在细胞膜的病毒受体上,降低或影响病毒对细胞的感染^[9]。本实验表明,随着病毒生长液中胎牛血清浓度的增大,细胞病变速度减慢,病毒的 HA 滴度下降明显。因此,在病毒的生长液中不能含有胎牛血清,在接种病毒前细胞也应充分冲洗干净,尽量去除细胞中残留的胎牛血清。

总之,通过以上实验分析,发现流感病毒在 MDCK 细胞中

最佳培养条件是直接接种流感病毒于病毒生长液,放置 35.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 96 h。其中病毒生长液中无胎牛血清、胰酶终浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。含有流感病毒的细胞传代次数应控制在 4 代以内。收获流感病毒前,将细胞反复冻融 1~2 次,可提高病毒的 HA 滴度,收获的病毒应放置于一 80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

参考文献

- [1] Palese P. Influenza: old and new threats[J]. Nat Med, 2004, 10 (12): 82-87.
- [2] 刘鹏, 李佳林, 马超, 等. 流感病毒在 Vero 细胞系与 MDCK 细胞系增殖条件的比较[J]. 微生物学免疫学进展, 2012, 40(1): 24-27.
- [3] Schotaser M, De Filette M, Fiers W, et al. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments[J]. Expert Rev Vaccines, 2009, 8(4): 499-508.
- [4] 中国疾病预防控制中心, 病毒病预防控制所. 国家流感中心标准操作规程(修订版)[S]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2007: 37-39.
- [5] Youil R, Su Q, Toner TJ, et al. Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines[J]. J Virol Methods, 2004, 120(1): 23-31.
- [6] 郭元吉, 程小雯. 流行性感病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 100-106.
- [7] Boot HJCL, Ogrady J, Neuberger J. Clinical guideline on the management of hepatitis C[J]. Gul, 2001, 49(1): 19-21.
- [8] 陈敬贤. 诊断病毒学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 116.
- [9] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 215.

(收稿日期: 2013-07-05)

• 经验交流 •

血清超氧化物歧化酶检测方法评价及其在临床诊断中的应用价值探讨*

施一帆, 齐发梅[△], 韩平治, 司玉春, 贾彦娟, 王爱霞, 袁秀梅

(甘肃省人民医院 兰州 730000)

摘要:目的 对比色法测定超氧化物歧化酶(SOD)的方法学进行评价,探讨血清 SOD 活性在消化系统疾病、肾脏疾病、呼吸系统疾病、烧伤整形、脑血管疾病、心血管疾病、2 型糖尿病患者的血清水平变化及其临床应用价值。方法 用 Olympus 5400 全自动生化分析仪,对比色法测定血清 SOD 活性试剂盒从精密度、准确度、线性、参考范围等方面进行评价。选择 2012 年 1~8 月期间来该院就诊的已确诊住院患者 238 例作为病例组,健康体检人群 80 例作为健康对照组,测定血清 SOD 活性,数据用 SPSS 统计软件进行分析。结果 测试数据表明,比色法测定血清超氧化物歧化酶活性的精密度、准确性、线性、回收率等主要性能指标良好。消化系统疾病、肾脏疾病、呼吸系统疾病、烧伤整形、脑血管疾病、心血管疾病患者的血清 SOD 活性水平低于健康对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$),2 型糖尿病患者血清 SOD 活性水平与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 比色法测定超氧化物歧化酶试剂精密度、准确性、线性、回收率等结果符合要求,说明试剂盒测定结果稳定,实测浓度和预测浓度一致,具有良好线性关系,完全满足临床需求,血清 SOD 活性在心、脑血管疾病、肾病、肝脏疾病检测中具有良好辅助诊断价值。

关键词: SOD; 方法学; 评价; 临床意义

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.039

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2014)01-0094-04

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是以铜、锌、锰或镍为辅因子,催化超氧化物通过歧化反应转化为氧气和过氧化氢的一种酶,一种重要的抗氧化剂,与体内自由基含量成

负相关^[1]。许多物理、化学、生物因素都可诱发产生大量的自由基,自由基以各种方式造成组织急性或慢性损伤^[2]。所以,了解自由基的平衡状态,对于预防疾病,治疗疾病都有非常重

* 基金项目: 甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWST2012-18)。 [△] 通讯作者, E-mail: qfm3836@sina.com。