

细胞有较大的影响,速度太低载体小球悬浮得差,速度太高又不利于细胞贴球和生长,因而搅拌速度宜适中。培养液成分对细胞生长也有一定影响。关于影响微载体培养的因素近来已有较详细的报道^[4,5]。

十分明显,微载体培养增大了培养面积(每1克Cytodex 1的表面积是0.6平方米),随着培养面积的增大细胞产量也相应增加,而且培养液的消耗也相应减少。本试验采用500毫升广口试剂瓶和1毫克/毫升的载体浓度,当接种250毫升细胞悬液时,获得的细胞产量分别相当于37个容量100毫升小方瓶和4.6个容量1000毫升大扁瓶的细胞产量。如果把载

体浓度增加2,3和4倍则培养面积亦相应增加,精密地控制各参数可获得更高产量的细胞,从而生产出大量病毒和细胞产物。因而微载体培养法是一种发展中的有实用价值的方法。

参 考 文 献

- [1] Van Wezel, A. L., 1967, *Nature*, 216: 64.
- [2] Van Wezel, A. L., et al., 1978, *Develop. Biol. Standard*, 41:159.
- [3] Van Wezel, A. L., et al., 1980, *ibid.*, 46: 151.
- [4] Clark, et al., 1980, *ibid.*, 46:117.
- [5] Hirtenstein, M. et al., 1980, *ibid.*, 46: 109.

β -丙内酯用于病毒介导的细胞融合的研究*

郑瑞珍 王素敏 赵淑慧

(中国科学院动物研究所)

制备高效和安全的仙苔病毒细胞融合剂,事先必须灭活。当前灭活病毒一般都采用紫外线^[1,2]或 β -丙内酯(β -PL)^[3],但前者灭活病毒往往不完全,有细胞毒作用,对有些敏感细胞不适用,利用 β -PL灭活病毒较完全,但它是一种强诱变剂和有毒药物,故必须谨慎从事。但目前各国有关实验室所用 β -PL的剂量较高,对残留 β -PL**的细胞毒性和诱变性未见有报道。本文就不同浓度的 β -PL对仙苔病毒几种活性的影响及残留 β -PL的细胞毒性及诱变性进行分析,以期获得一更合理和更安全的灭活浓度。

材 料 和 方 法

- 一、仙苔病毒的制备和灭活 同以前所述^[4]
- 二、血凝效价(HAU),融合效力和感染力的测定 HAU的测定按Salk(1944)的方法,用1%鸡

红血球滴定;融合效力的测定方法同1980所述^[4],感染力的测定,用含病毒的尿囊液原液0.2毫升,接种于鸡胚尿囊腔。每组各接种四个鸡胚,在35℃孵育72小时,然后分别收获,分别细菌检查和HAU滴定,然后把无菌的尿囊液按组混合在一起,进行第二次感力测定。

三、残留 β -PL诱变性分析 用人外周淋巴细胞染色单体交换(SCE)技术来检测 β -PL的诱变性。 β -PL的制备模拟病毒的过程,但不加病毒。实验用0.01%和0.05% β -PL两种浓度进行分析,各分四组:(1)新鲜制备不经热处理;(2),(3)一周前制备各经37℃热处理30分和60分;(4)空白对照,不加 β -PL。每组2瓶,每瓶含MEM培液3.8—3.9毫升。

* 复旦大学遗传所邱信芳和李昌本同志,暨南大学沈锦南同志及中山医学院肿瘤所邓承宗同志参加了部分工作,特此谨致谢意。

** 指加到病毒悬液中的 β -PL经热处理没有完全降解部分。

具体操作如下：取肝素抗凝的健康人外周血 2 毫升，每瓶加 0.1 毫升，各加相应的 β -PL 0.1 毫升使最终浓度为 0.01% 或 0.05%，充分混合后在 37℃ 孵育 30 分钟，再在室温放置 30 分，然后用 Hank's 液洗两次，细胞用 4 毫升含 PHA 的 MEM (含 20% 小牛血清、双抗各 100 单位/毫升) 重新悬浮，再加 0.1 毫升 5-溴去氧尿嘧啶核苷，使最终浓度为 10 μ g/毫升，放在暗处于 37℃ 孵育 72 小时，收获前四小时加秋水仙素 0.2 微克/毫升，按常规制染色体片。一天后用 1 M Na₂HPO₄ (PH 8.0) 在 80℃ 处理 12 分钟，姬姆萨染色，在油镜下统计 SCE。每组观察 30 个染色体数完整，分化良好的分裂相，少数几组因分裂相数不足，只计数 12 和 17 个。

四、残留 β -PL 的细胞毒性分析 以对数生长期的 CHO 细胞的生长曲线的变化来分析残留 β -PL 的细胞毒性。 β -PL 采用 0.01% 和 0.05% 两种浓度，每组浓度的实验分三组：1. 实验组：加一周前制备经热处理 60 分钟的 β -PL；2. 阳性对照组：加新鲜制备不经热处理的 β -PL；3. 空白对照：不加 β -PL。每组 21 瓶，每瓶加 3 毫升 CHO 细胞悬液 (含 6 万个细胞/毫升)，在 37℃ 孵育，每三天换液一次，每天在固定时间从各组随机取三瓶计数，取其平均值，共计数 7 天，经统计制回归直线，用 t 值检验各组回归直线斜率的差异。

实验结果

一、 β -PL 对仙苔病毒几种活性的影响

在预备实验中，我们用 0.05% β -PL 处理八个病毒样品，每个样品分为四份，一为对照，其它分别热处理 30 分钟、60 分钟和 120 分钟。其融合效力的变化结果见表 1。

从表 1 可见用 0.05% β -PL 处理病毒，经 37℃ 热处理 120 分钟以上者融合效力不稳定。有些样品融合效力保持原状，有些不同程度地下降，有些消失了融合活性，而用 0.01% β -PL 处理者，融合活性保持良好。处理 60 分钟以内者仍保留一定程度的融合活性。故后边的实验只采用 30 分钟和 60 分钟两种处理。

我们用同一病毒样品分成三组：一为对照；二、三各与 β -PL 混合，使最终浓度分别为 0.01% 和 0.05%，然后各作三种处理：

表 1 经 0.05% β -PL 灭活和加热处理不同时间后仙苔病毒融合效力的变化

样品	融合效力	在 4℃ 振荡 10 分钟			
		对照	在 37℃ 热处理时间		
			30分	60分	120分
1	卅	卅	卅	卅	
2	卅	卅	卅	卅	
3	卅	卅	+	消失	
4	卅	卅	卅	消失	
5	卅	卅	卅	+	
6	卅	卅	卅	卅	
7	卅	卅	+	卅	
8	卅	卅	卅	卅	

(1) 只在 4℃ 振荡 10 分钟；(2)(3) 在 4℃ 振荡后再在 37℃ 热处理 30 分钟或 60 分钟。处理后的各组病毒的感染力、融合效力和 HAU 的检测结果列于表 2。

表 2 用不同浓度 β -PL 灭活并经热处理不同时间后仙苔病毒活性变化

组别	处理条件			血凝单位	融合效力	第一次感染	第二次感染
	β -PL 浓度 (%)	温度 (℃)	时间 (分)				
一对照	×	4		1600	卅	感染	感染
二	0.01	4		1600	卅	阴性	阴性
		37	30	1600	卅	阴性	阴性
		37	60	1600	卅	阴性	阴性
三	0.05	4		1600	卅	阴性	阴性
		37	30	1600	卅	阴性	阴性
		37	60	240	+	阴性	阴性

二、残留 β -PL 诱变性分析

新鲜制备不经热处理的 0.01% 和 0.05% 二组三个血样细胞数量都很少，前者部分淋巴细胞发生不同程度的转化，但分裂相极少，后者淋巴细胞不发生转化，也没有分裂相，因此

这两组的 SCE 缺如。现将三个血样其它六组的 SCE 统计数列于表 3。

表 3 残留 β -PL 对外周淋巴细胞 SCE 的影响

血样	β -PL 浓度(%)	37℃ 热处理		空白对照	变异数分析		F 测定 (F)
		30 分	60 分		组间均方	误差均方	
1	0.01	5.7	6.3	5.3	2.17	6.46	4.7
2		5.8	5.9	4.4			
3		5.1	4.6	4.0			
1	0.05	14.6	7.8	4.9	60.66	5.13	11.8
2		8.2	5.0	4.4			
3		17.1	10.1	4.6			

用变异数分析法分别对两种浓度的 β -PL 的各组 SCE 的变化进行分析。当 $n_1 = 2, n_2 = 4$ 时, $F_{0.05} = 6.94, F_{0.01} = 18$, 故 0.01% β -PL 各组间的差异不显著; 0.05% β -PL 各组间的差异显著。再进一步分析 0.05% β -PL 各组均数之间的差异, 表明热处理 30 分钟组与对照组差异显著, 其它各组差异不显著。

三、残留 β -PL 的细胞毒性分析

用 0.01% β -PL 处理 CHO 细胞不管 β -PL 是新鲜制备不加热处理, 还是一周前制备经热处理, 两者对 CHO 细胞的生长影响不明显, 细胞的生长比空白对照组的稍慢些。三条回归直线的斜率为: 阳性对照组 10.26, 实验组 10.23, 空白对照组 12.07(见图 1)。用 t 测定三者之间没有显著差异。新鲜制备不经热处理的 0.05% β -PL 对 CHO 细胞的影响较大, 第一天细胞数量显著减少, 到第五天细胞消失几尽, 而 0.05% β -PL 实验组的 CHO 细胞比 0.05% 空白对照组的细胞生长稍慢一些。经统计制成回归直线(见图 2)。三条回归直线的斜率: 实验组为 10.88, 空白对照组为 14.5, 阳性对照组 -0.1。用 t 测定, $t > t_{0.05}$, 对照组与实验组没有显著差异; 实验组与阳性对照组差异非常显著, $t < t_{0.01}$ 。

讨 论

Neff 和 Ender^[5] 和 Wainbery 等^[6] 都曾

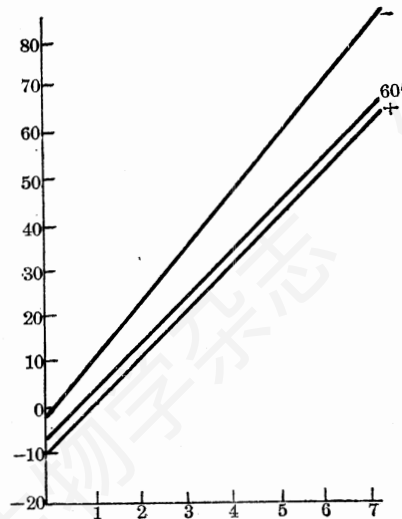


图 1 示 0.01% β -PL 对培养的 CHO 细胞生长的影响

“-” 空白对照组 “60” 实验组用一周前制备并经 37℃ 热处理 60 分的 0.01% β -PL 处理。
“+” 阳性对照组用新鲜制备不经热处理的 0.01% β -PL 处理

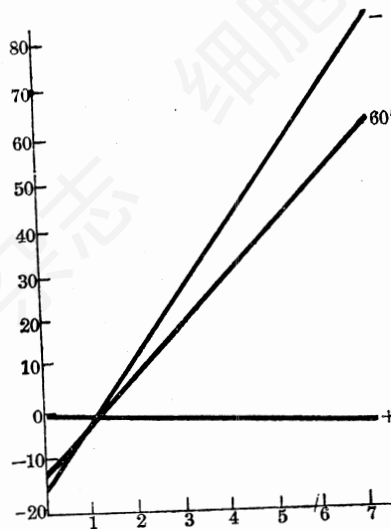


图 2 示 0.05% β -PL 对培养的 CHO 细胞生长的影响

“-” 空白对照 “60 分” 实验组用一周前制备并经 37℃ 热处理 60 分的 0.05% β -PL 处理
“+” 用新鲜制备不经热处理的 0.05% β -PL 处理

用不同浓度的 β -PL处理病毒,然后对病毒的几种生物学活性的反应进行分析,我们的结果与他们的有相似之处,结果都表明病毒的感染力灭活最快,其次是融合活性,血凝活性较稳定。但我们与他们又各有出入, Neff 等用0.03%、0.06%和0.13% β -PL处理病毒,融合活性仍保持完好;而 Wainbery 等用0.05% β -PL处理,病毒消失融合活性,用0.013%者保留融合活性;我们在预备实验中用0.05% β -PL处理病毒并在37°C处理120分钟,病毒的融合效力表现不稳定。有些样品融合效力保持原状,有些不同程度地下降,有些消失了融合活性;而用0.01% β -PL处理者,融合活性保持良好。这说明不同样品的病毒融合活性对较高浓度的 β -PL反应不稳定,而对较低浓度的 β -PL反应较稳定。Brusik^[1]曾就 β -PL对遗传物质作用的特征进行评论,认为“ β -PL是一种高度活跃的分子,它快速地与嗜核中心(nucleophilic centers)如蛋白之类物质起反应,特别与含硫氨基酸起反应,使核酸发生单股断裂,而不损害病毒的外壳”。这大概就是为什么病毒的感染力对 β -PL特别敏感,而融合活性和血凝活性较稳定的原因,因为后两种活性只与病毒的外壳有联系,必须提出的是 β -PL不损害病毒的外壳,只是对低浓度的 β -PL而言,而较高浓度的 β -PL对病毒外壳是有损害的。我们用0.01% β -PL处理的病毒其融合活性没有变化,并能较长时间保存,而用0.05% β -PL处理者融合活性降低,只能保存较短时间,这都说明病毒的外壳随着 β -PL的浓度的增加,受损害也加剧。

Dean^[8]曾用大白鼠的白血球进行实验,发现 $2.5 \times 10^{-4} M \beta$ -PL就有细胞毒作用,分

裂指数明显降低。Perry和Evans^[2]的工作说明 $3 \times 10^{-5} - 3 \times 10^{-4} M \beta$ -PL对CHO细胞有显著的诱发SCE的作用。虽然不同动物的细胞对 β -PL的反应会有不同,但从这些资料看来, β -PL的毒性和诱变性还是相当高的,国外各实验室一般都采用0.05% β -PL灭活病毒,浓度较高,为了使药物降解,制剂在37°C处理120分钟,而这样对病毒的融合效力影响较大,有些融合效力下降了,有些消失了融合活性。我们的实验证明,如果在37°C热处理时采用连续振荡法,可以加速药物的降解。0.05% β -PL热处理60分钟,残留 β -PL没有显著的诱变性和细胞毒性。实验还证明用0.01% β -PL就足以灭活病毒,在37°C处理30分钟到60分钟其残留 β -PL没有显著的细胞毒性和诱变性。但融合效力保持良好,并能较长时间保存。

参 考 文 献

- [1] Harris H. and Watking J. F., 1965., *Nature(London)*, 205:640—646.
- [2] Okada. Y. and J. Tadokoro, 1962, *Exp. Cell Res.*, 26:108—118.
- [3] Giles R. E. and F. H. Ruddle, 1973, *In vitro*, 4:103—107.
- [4] 郑瑞珍、王素敏、赵淑慧, 1981, 动物学集刊, 81(1): 181—184.
- [5] Neff J. M. and F. H. Ender, 1968, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 12:260—267.
- [6] Wainbery M. A., R. N. Hjorth and C. How, 1971, *Applied Microbiol.*, 22:618—621.
- [7] Brusik J. D., 1977, *Muta. Research*, 39: 241—256.
- [8] Dean B. J., 1969, *Lab. Animal.* 3:157—174.
- [9] Perry P. and H. J. Evans, 1975, *Nature (London)*, 258:121—125.

(上接第45页)

- [3] 中国医学科学院流行病防治研究所, 1978, 常见病毒病实验技术, 365页, 科学出版社.
- [4] Robert J. Kuchler., 1977, *Biochemical methods in cell culture and virology.*, p. 14.
- [5] Raymond C. Parker, ph. D., 1964, *Methods of tissue culture*, p. 131 Hoeber Medical Division Harper & Row, Publishers,