

• 生物技术与方法 •

# 一种基于胶体微晶纤维素的改良病毒蚀斑测定法的建立与评价

郎巧利, 黄楠, 李莉萍, 葛良鹏, 杨希

重庆市畜牧科学院, 重庆 402460

郎巧利, 黄楠, 李莉萍, 葛良鹏, 杨希. 一种基于胶体微晶纤维素的改良病毒蚀斑测定法的建立与评价. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1994-2002.

LANG QL, HUANG N, LI LP, GE LP, YANG X. Development of an improved virus plaque assay based on avicel. Chin J Biotech, 2022, 38(5): 1994-2002.

**摘要:** 胶体微晶纤维素 (avicel) 是一种由微晶纤维素 (microcrystalline cellulose, MCC) 和羧甲基纤维素 (carboxymethyl cellulose, CMC) 制成的混合物, 可用于病毒蚀斑测定。常用的 avicel 由 FMC 公司生产, 其 MCC 和 CMC 比例相对固定, 无法很好地适应所有类型病毒的蚀斑测定实验。本研究通过对比不同的 MCC 和 CMC 配制比例对 avicel 在病毒蚀斑测定作用的影响, 建立了一种操作简便、实用性好和稳定性好的改良 avicel 病毒蚀斑测定法。为了配制不同浓度 MCC 和 CMC 的混合物, 本研究制备出 12 种 2×avicel 覆盖层, 测定其总体黏度及底层黏度, 评估其与传统覆盖层相比, 使用时的操作难易程度。进一步将 12 种 2×avicel 覆盖层制备成 avicel-DMEM 营养覆盖层, 测定 96 孔板中猪流行性腹泻病毒滴度, 比较 12 种 avicel 覆盖层及传统覆盖层蚀斑大小、清晰度、稳定性及滴度准确性等的差异, 筛选出最佳测定方法。结果显示, 12 种 2×avicel 覆盖层中, 除 4.8% MCC+1.4% CMC 和 4.8% MCC+1.0% CMC 外, 其余 2×avicel 覆盖层在实际使用中均比 2×CMC 覆盖层更容易吸取和配制营养覆盖层。最后, 利用 avicel 病毒蚀斑测定法测定 96 孔板中猪流行性腹泻病毒滴度, 结果显示 CMC 浓度越高蚀斑越小, 其中终浓度为 0.6% MCC+0.7% CMC 的 avicel 覆盖层测定蚀斑染色最清晰, 准确度与传统覆盖层相似, 但操作较传统覆盖层更简便。综上所述, 本研究建立了一种操作简便、实用性好和稳定性好的改良 avicel 病毒蚀斑测定法, 为病毒的病原学、抗病毒药物及疫苗等相关研究的展开提供了良好的实验基础。

**关键词:** 改良病毒蚀斑测定; 胶体微晶纤维素; 猪流行性腹泻病毒; 微晶纤维素; 羧甲基纤维素

**Received:** August 18, 2021; **Accepted:** January 24, 2022

**Supported by:** Special Projects in Agricultural and Animal Husbandry High-Tech Industry Research and Development of Chongqing Rongchang, China (cstc2020ngzx0001); General Projects in Natural Science Foundation of Chongqing, China (cstc2021jcyj-msxmX0881); Special Fund in Chongqing of Performance Incentive Guide (cstc2021jxjl0017)

**Corresponding author:** YANG Xi. Tel: +86-23-46791131; E-mail: cqxky@cqaa.cn

**基金项目:** 重庆荣昌农牧高新技术产业研发专项 (cstc2020ngzx0001); 重庆市自然科学基金 (cstc2021jcyj-msxmX0881); 重庆市科研机构绩效激励引导专项 (cstc2021jxjl0017)

# Development of an improved virus plaque assay based on avicel

LANG Qiaoli, HUANG Nan, LI Liping, GE Liangpeng, YANG Xi

Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China

**Abstract:** Avicel is made of a mixture of microcrystalline cellulose (MCC) and carboxymethyl cellulose (CMC), and used for virus plaque assay. The avicel in common use is produced by FMC Biopolymer. Due to the relatively fixed proportion of MCC and CMC, avicel in common use is not suitable for plaque determination experiment of all types of viruses. In this study, we evaluated the effect of avicel made of different proportions of MCC and CMC on virus plaque assay, and developed an improved avicel virus plaque assay featured with simple and convenient operation, good practicability and high stability. To generate avicel overlays with different proportions of MCC and CMC, twelve different 2×avicel solutions were prepared. Their overall viscosity and bottom viscosity were measured to evaluate the ease of operation. The results showed that most of the 2×avicel solutions (except the 4.8% MCC+1.4% CMC and 4.8% MCC+1.0% CMC group) were easy to absorb and prepare nutrient overlap than 2×CMC solution. In order to find the best scheme to detect the titer of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), these avicel overlay solutions with different proportion of MCC and CMC were used as a replacement in the standard plaque assay. By comparing the size, clarity, stability and titer accuracy of virus plaque, we identified that 0.6% MCC and 0.7% CMC was the most preferable composition of avicel overlay for PEDV plaque assay. In conclusion, we developed an improved virus plaque assay based on avicel, which may facilitate the research of virus etiology, antiviral drugs and vaccines.

**Keywords:** improved virus plaque assay; avicel; porcine epidemic diarrhea virus; microcrystalline cellulose; carboxymethyl cellulose

1952年, Dulbecco等参照噬菌体蚀斑技术进行修改和改编,首次建立了病毒蚀斑技术并被广泛应用至今<sup>[1-4]</sup>。尽管近年来开发出很多病毒定量的替代方法,半数组织培养感染量测定(TCID<sub>50</sub>)、免疫荧光法、透射电子显微镜技术、病毒流式细胞术、可调电阻脉冲检测(tunable resistive pulse sensing, TRPS)、重组报告系统技术和实时荧光定量PCR(RT-qPCR)等,但由于病毒蚀斑技术可以直观展示和精确测定病毒的感染性和数量,是其他方法所不能替代的,被认为是病毒感染性和滴度检测的金标准<sup>[5-6]</sup>。

目前常用的病毒蚀斑技术是将病毒连续稀释至5-100个/孔病毒颗粒接种至融合的单层宿主细胞上,病毒吸附上细胞后,再加入固定病毒颗粒不扩散的营养覆盖层,待病毒大量复制导致细胞死亡后,去除覆盖层后,活细胞被染料染色,而死细胞处不能染色从而形成“蚀斑”。其中传统覆盖层主要包括固体琼脂糖(agarose)覆盖层、半固体甲基纤维素或羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)覆盖层等。但琼脂糖覆盖层由于其常温是固体状态,需加热后才能使用,操作困难,可能会出现温度掌握

不好导致细胞死亡及铺板不均匀等问题。而甲基纤维素和 CMC 覆盖层虽然是半固体状态使用较为方便,但由于黏度较高,在染色前去除覆盖层时也容易造成去除不干净,特别是 96 孔板中,去除困难,去除时容易伤害细胞,导致蚀斑计数结果不佳。

近年来,新型液体覆盖物胶体微晶纤维素 (avicel) 开始被应用于病毒蚀斑实验<sup>[7-10]</sup>,相较于传统覆盖层操作更简便,对病毒和细胞的伤害更小。目前蚀斑实验中主要使用的 avicel 是由美国 FMC BioPolymer 公司生产的 avicel<sup>®</sup>RC/CL RC-591,但其价格偏贵,且其中微晶纤维素 (microcrystalline cellulose, MCC) 和 CMC 含量固定,在实际应用中无法调整。因此,本研究利用以生工生物工程 (上海) 股份有限公司生产的 MCC 和 CMC 为原料,制备了 12 种 2×avicel 覆盖层,测定其黏度,分析比较其操作的便捷性。

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的一种以呕吐、腹泻和脱水为主要临床症状的猪肠道传染病,具有仔猪发病率和死亡率高的特征,给我国的养殖业造成了重大经济损失,危害极大<sup>[11-13]</sup>,因此 PEDV 是目前研究较多的动物病毒之一。对 PEDV 进行滴度测定是最常用的研究手段,且病毒滴度又是抗病毒药物和疫苗评价的主要指标之一,因此本研究选取了 PEDV 作为研究对象,采用新型改良的 avicel 材料作为蚀斑试验中的覆盖层,对 PEDV 的滴度进行测定,评价该改良蚀斑实验的可行性和准确性。

本研究利用制备的不同 MCC 和 CMC 比例的 avicel 测定 PEDV 的病毒滴度,比较其与传统覆盖层的黏度、蚀斑清晰度、稳定性、病毒滴度准确性及操作难易度等,找出最适合 96 孔

板 PEDV 病毒蚀斑测定的 avicel 浓度,建立了一种操作简便、经济实用的新型改良 avicel 病毒蚀斑方法,为今后病毒病原学、抗病毒药物及疫苗的研究提供更便利的条件。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞和病毒

PEDV SC-P 毒株由四川农业大学赠予<sup>[14]</sup>; Vero-E6 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

#### 1.1.2 主要试剂

胎牛血清购自 Biological Industries 公司; 胰酶 (2.5 g/L)、RPMI-1640 培养基和 DMEM 培养基均购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 微晶纤维素和羧甲基纤维素钠均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 甲醛溶液购自重庆川东化工有限公司; 琼脂糖和结晶紫均购自 Sigma 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养及病毒增殖

将 Vero-E6 细胞复苏至含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。待细胞汇合度达 70%–80%后,用 2.5 g/L 胰酶消化 5 min,1:4–1:6 传代培养,细胞生长状态良好后,传至 10 cm 培养皿用于病毒感染。24 h 后待细胞汇合度达 80%–90%,用 PBS 洗 2 次,取 PEDV (200 PFU/mL) 与 3 mL 含 7.5 μg/mL 胰酶的 DMEM 维持培养基混合,加入细胞中。37 °C 孵育 2 h 后,弃上清,加入 10 mL DMEM 维持培养基培养 4–5 d,待细胞病变 70%–80%,将细胞收至–80 °C 冰箱,反复冻融 3 次后,4 000 r/min 离心 30 min,取上清即病毒原液冻存至–80 °C 备用。

#### 1.2.2 2×覆盖层的配制

配制不同浓度的 2×avicel 覆盖层:称取

48 g MCC 至 1 L ddH<sub>2</sub>O 中, 用匀浆器混合搅拌至液体均质无颗粒, 即为 4.8% MCC, 接着将 4.8% MCC 稀释为 2.4% MCC 和 1.2% MCC, 并分别称取 1.4 g、1 g、0.6 g 和 0.2 g 的 CMC 至 100 mL 3 种不同浓度的 MCC 中, 搅拌均匀, 配置成 12 种不同浓度 MCC 和 CMC 的 avicel, 高压灭菌后室温密封保存备用。配制 2×CMC 和 2×agarose 覆盖层: 分别称取 2 g CMC 或 0.6 g agarose 溶于 100 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 配制成 2% CMC 和 0.6% agarose, 高压灭菌后室温密封保存备用。

### 1.2.3 2×覆盖层黏度测定

取配制好的 12 种不同浓度的 2×avicel 覆盖层, 用 NDJ-8S 数字黏度仪 (1#转子, 转速 30 r/min) 测定混悬液总体黏度, 取沉淀 24 h 后底层 (约占总体积 1/3) 混悬液测定黏度, 并设置 2% CMC 和 ddH<sub>2</sub>O 为对照分别测定总体黏度和底层黏度。

### 1.2.4 病毒的稀释及感染

将生长状态良好的 Vero-E6 细胞, 以 10<sup>6</sup> 个/mL 的浓度铺至 96 孔细胞培养板, 100 μL/孔, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 12 h 后使用。准备含 15 μg/mL 胰酶、200 U/mL 青霉素、200 μg/mL 链霉素和 4% 血清的 2×DMEM 维持培养基。将 PEDV 用 DMEM 维持培养基进行 10 倍梯度稀释, 稀释浓度依次为 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>。弃去 96 孔板培养基, 加入不同稀释浓度的 PEDV 100 μL/孔, 37 °C 孵育 2 h 后, 弃去病毒感染液, 加入 1:1 混合的 2×DMEM 维持培养基和所选的不同 2×覆盖层 (avicel、CMC 和 agarose) 100 μL/孔, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 5 d。其中 avicel 和 CMC 覆盖层与 2×DMEM 维持液混合后需 37 °C 平衡 30 min, 而 agarose 覆盖需要提前用微波炉加热至液体状, 冷却至 50–60 °C 左右, 1:1 加入 2×DMEM 维持培养基后置于 56 °C 水浴中平

衡 30 min 方可使用。

### 1.2.5 固定和染色细胞

固定细胞前, 不吸出 avicel 覆盖层, 加入 10% 甲醛溶液 100 μL/孔, 将细胞固定 30 min 至过夜<sup>[15]</sup>。对于琼脂糖或 CMC 覆盖层, 直接将甲醛溶液添加到覆盖层中 100 μL/孔, 固定 1 h 至过夜。在染色之前和固定之后, 弃去甲醛, 用水冲洗 avicel 斑块, 并用水或用刮铲除去 agarose 和 CMC 的半固体, 去除残留的覆盖物或固定剂。加入 1% 结晶紫溶液 50 μL/孔, 覆盖细胞约 15 min, 用水轻轻洗去结晶紫渍。干燥后, 保存于 4 °C, 以备分析。

### 1.2.6 确定病毒滴度

计数每个孔中的蚀斑数, 取相同稀释度重复样品的平均值计算病毒滴度, 具体计算方法如下: 蚀斑形成单位 (PFU/mL) = 平均蚀斑数 / (稀释倍数 × 病毒接种体积 (mL))。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒的培养及鉴定

将 PEDV 感染 Vero-E6 细胞, 并设置对照组。72 h 后显微镜下观察, 可见 PEDV 感染细胞出现明显圆缩、聚集及脱落 (图 1A), 对照组细胞贴壁良好, 无细胞病变 (图 1B)。

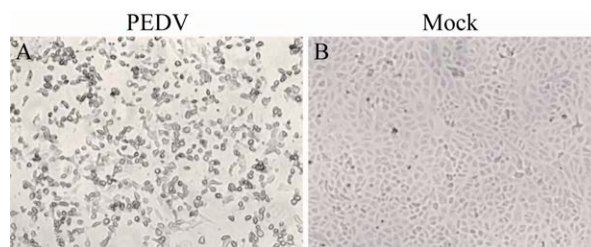


图 1 PEDV 感染 Vero-E6 细胞的病变效应 (EVOS XL Core, 20×)

Figure 1 Cytopathogenic effects (CPEs) observed in Vero-E6 cells infected with PEDV (EVOS XL Core, 20×). (A) Vero-E6 cells infected with PEDV. (B) Normal Vero-E6 cells.

## 2.2 2×覆盖层的黏度测定

测定不同浓度 2×avicel 覆盖层总体黏度和底层黏度 (约占总体积 1/3)。并设置常规使用覆盖层储存液和无黏度的 ddH<sub>2</sub>O 为对照。但由于琼脂糖常温状态下为固体状态, 因此, 本研究仅使用 2% CMC 和 ddH<sub>2</sub>O 为对照。

总体黏度测定结果显示, 随着 CMC 和 MCC 浓度升高, 2×avicel 覆盖层总体黏度越高, 其中 4.8% MCC+1.4% CMC 的总体黏度最接近 2% CMC, 而其他 2×avicel 覆盖层黏度均远低于 2% CMC ( $P<0.01$ ) (图 2A)。

底层黏度测定结果显示, 随着 CMC 和 MCC 浓度升高, 2×avicel 覆盖层底层黏度也越高, 其中 4.8% MCC+1.4% CMC 和 4.8% MCC+1.0% CMC 的底层黏度与 2% CMC 基本一致, 而其他 2×avicel 覆盖层黏度均远低于 2% CMC ( $P<0.01$ ) (图 2B)。

在实际使用中, 黏度越高, 吸取和操作越困难。结果证明, 除 4.8% MCC+1.4% CMC 和 4.8% MCC+1.0% CMC 外, 其他 avicel 覆盖层在实际使用中均应比 2% CMC 操作更容易和简

便 (图 2)。

## 2.3 不同覆盖层蚀斑染色效果比较

分别将 12 种不同浓度的 2×avicel 覆盖层与 2×DMEM 维持培养基 1:1 混匀后, 终浓度如图 3A-C 所示, 加入不同稀释度的 PEDV 感染 96 孔板 Vero-E6 细胞, 并设置传统覆盖层 1.0% CMC 和 0.3% 琼脂糖为对照, 1.0% CMC 覆盖层加入未感染病毒的 Vero-E6 细胞被设置为阴性对照。感染 5 d 后, 固定染色后保存至 4 °C, 并于 6 个月后拍照。结果显示, 不同浓度的 CMC 对细胞的结晶紫染色很均匀, 没有显著影响。在 CMC 和 MCC 混合试验中, 随着 CMC 浓度的升高, 蚀斑越来越清晰; 在 MCC+0.7% CMC 实验组中, 蚀斑可识别效果优于 1.0% CMC 阳性对照组, 显著优于 0.3% 琼脂糖阳性对照组。不同浓度的 MCC 对细胞的结晶紫染色有很大的影响, MCC 浓度越高, 细胞的结晶紫染色越浅, 越不容易识别蚀斑; 0.6% MCC+0.7% CMC 实验组中, 细胞背景染色好、蚀斑小且清晰, 其效果显著优于传统方法的阳性对照组 (1.0% CMC 组和 0.3% 琼脂糖组) (图 3)。

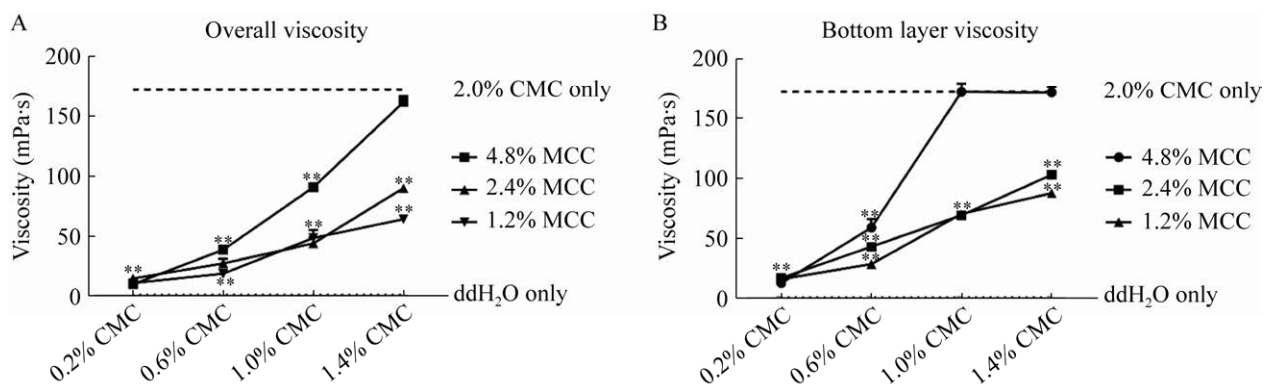


图 2 不同 2×覆盖层的黏度比较

Figure 2 Comparison of the viscosity of overlay storage solutions. To analyze ease of operation of overlay solutions, the overall viscosity (A) and bottom layer viscosity (B) of twelve different 2×avicel solutions with different proportions of MCC and CMC were detected. The traditional overlay storage solution (2×CMC) and double-distilled water (ddH<sub>2</sub>O) were used as positive and negative controls, respectively. MCC: microcrystalline cellulose; CMC: carboxymethyl cellulose; \*\*:  $P<0.01$ .

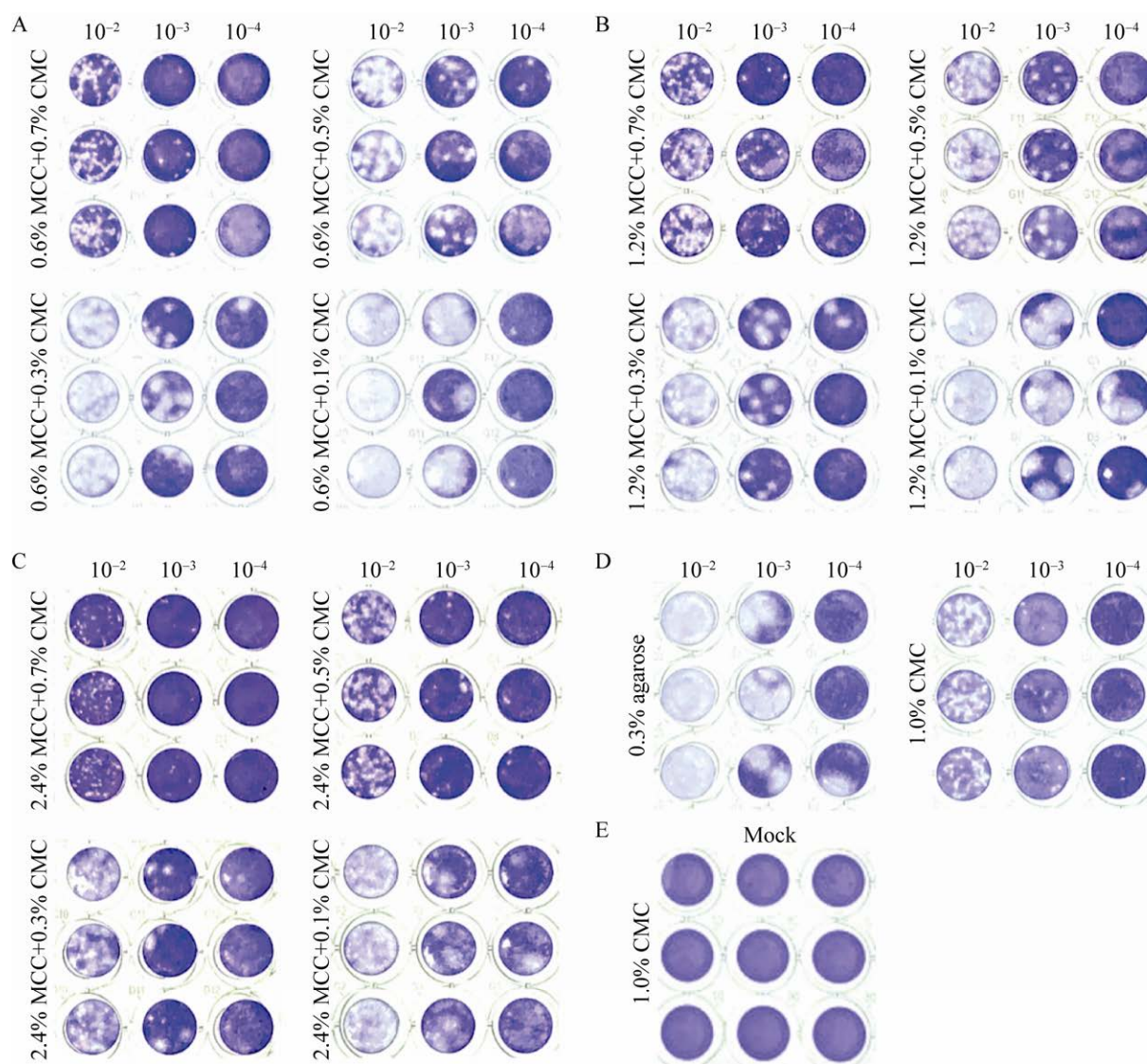


图3 不同覆盖层蚀斑染色比较

Figure 3 PEDV plaque overlay comparisons. Vero-E6 cells were plated in 96 well plates and infected with PEDV. After infection, overlay solutions of various concentrations of CMC with 0.6% MCC (A), 1.2% MCC (B), 2.4% MCC (C) and traditional overlay solutions (1.0% CMC and 0.3% agarose) (D) were applied in order to compare their effect on virus plaque staining. Uninfected Vero-E6 cells were also performed with 1.0% CMC in the same methods as a control (E). PEDV: porcine epidemic diarrhea virus; MCC: microcrystalline cellulose; CMC: carboxymethyl cellulose.

同时,本研究比较了该方法的稳定性,将96孔板染色后于4℃保存6个月仍能清楚地观察到蚀斑,证明其稳定性都很好。

#### 2.4 不同覆盖层的病毒滴度

选取适量病毒稀释后,用不同覆盖层进行

病毒滴度测定。结果显示,当MCC浓度为0.6%时,随着CMC浓度逐渐升高,可识别的蚀斑数越多,其中0.7% CMC可识别病毒滴度与传统方法的阳性对照组(1.0% CMC)接近,而显著优于0.3%琼脂糖阳性对照组( $P < 0.01$ ) (图4A);

当 MCC 浓度为 1.2% 时, 随着 CMC 浓度逐渐升高, 可识别的蚀斑数越多, 但均低于 1.0% CMC 阳性对照, 除 0.1% CMC, 均显著高于 0.3% 琼脂糖阳性对照组 ( $P < 0.01$ ) (图 4B); 当 MCC 浓度为 2.4% 时, 随着 CMC 浓度逐渐升高, 可识别的蚀斑数越多, 其中 0.7% CMC 可识别病毒滴度高于传统方法的阳性对照组 (1.0% CMC), 而显著优于 0.3% 琼脂糖阳性对照组 ( $P < 0.01$ ) (图 4C)。

### 3 讨论

病毒蚀斑测定技术是测定病毒感染性和数

量的金标准, 在病毒学、抗病毒药物及疫苗的研究工作中均需要该方法进行病毒滴度的测定。传统病毒蚀斑测定技术使用的覆盖层大多为琼脂糖和甲基纤维素<sup>[16-19]</sup>, 但这两种材料存在使用时需要加热和黏度较高的缺陷, 特别是在 96 孔板中实验时, 由于传统覆盖层的难去除, 往往导致实验难度大, 难以开展, 因此需要发展一种更优越的替代品。

Avicel 作为新型液体蚀斑覆盖层, 相较于传统覆盖层操作更简便, 对病毒和细胞的伤害更小。Avicel 是一种药用辅料, 由 MCC 和 CMC 混合制成, 主要用于乳剂型和混悬剂型药物。

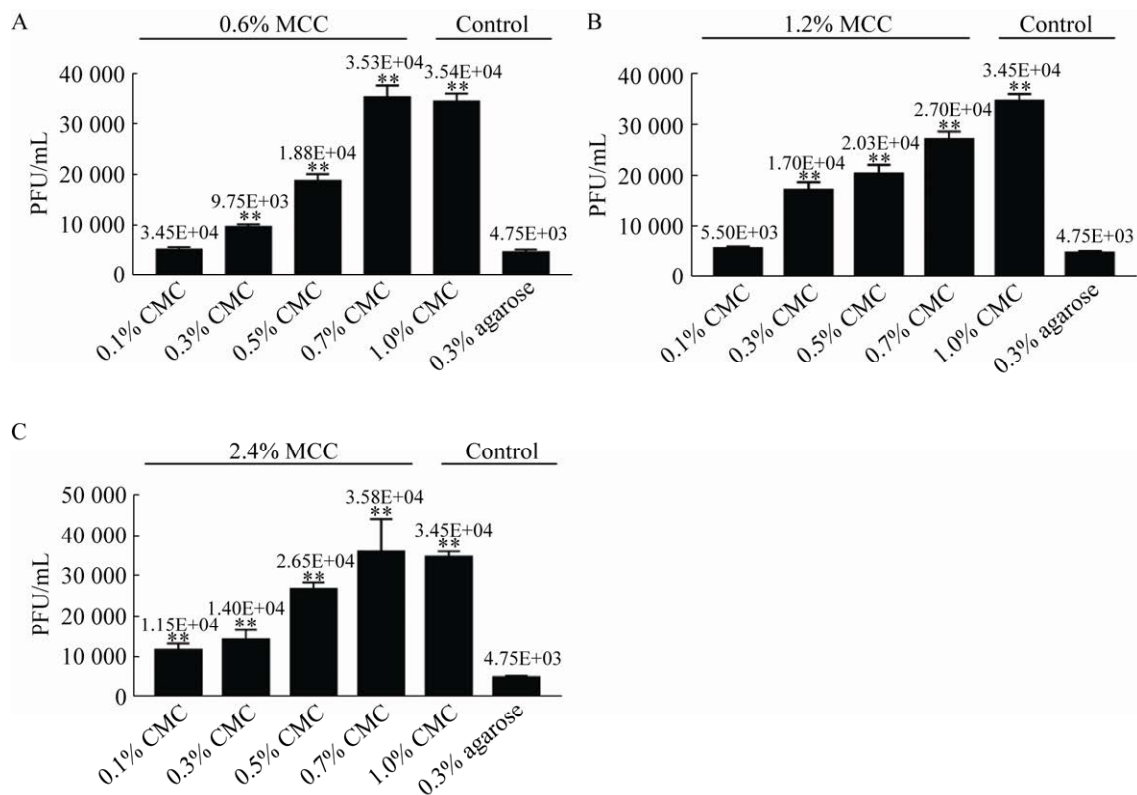


图 4 不同覆盖层病毒滴度测定比较

Figure 4 Determination of virus titer with different overlay solutions. Vero-E6 cells were infected with PEDV, and overlay solutions of various concentrations of CMC with 0.6% MCC (A), 1.2% MCC (B), 2.4% MCC (C) and traditional overlay solutions (1.0% CMC and 0.3% agarose) were applied. Following virus plaque formation and staining, plaques were counted to calculate virus titer and to compare the effect of different overlay solutions on virus titer. MCC: microcrystalline cellulose; CMC: carboxymethyl cellulose; \*\*:  $P < 0.01$ .

静置时, avicel 中 CMC 下沉, 使底部形成高黏度液体, 方便限制病毒移动, 能够在局部形成蚀斑; 摇动 avicel, 其中 MCC 和 CMC 混合形成混悬液, 黏度很低, 很容易从细胞孔中吸取出来, 操作简单, 不会伤及细胞层, 不会形成划痕干扰空斑计数。同时, avicel 可以在室温下应用, 不需要加热, 不耐热的病毒也更容易形成蚀斑。Matrosovich 等<sup>[10]</sup>首次利用 avicel 覆盖层进行了流感病毒的蚀斑实验, 并将其应用于 96 孔板实验中, 实验表明与琼脂和甲基纤维素覆盖层相比, 在含 avicel 覆盖层培养基下的蚀斑测定更容易、更快和更灵敏, 在 96 孔板中操作更轻松, 更适用于高通量病毒滴定、血清学研究和病毒药物敏感性实验。Yin 等<sup>[20]</sup>利用 avicel 覆盖层进行了肠道病毒 71 型的蚀斑实验, 发现不同浓度的 avicel 不影响蚀斑的形成, 原因是不同浓度的 avicel 沉淀后密度基本一致, 导致限制病毒液流动的能力基本一致。Baer 等<sup>[7]</sup>利用 avicel 覆盖层进行了裂谷热病毒的蚀斑实验, 发现 0.6% avicel 和 1.2% avicel 覆盖层在 96 孔板中测定病毒滴度没有明显差异。综上所述, avicel 作为蚀斑实验的覆盖层时, 不能通过稀释调整其底层 avicel 的浓度, 导致其不能通过稀释调整限制病毒液流动的能力。而目前使用的 FMC BioPolymer 公司生产的 avicel<sup>®</sup>RC/CL RC-591, 其中 MCC 和 CMC 含量固定, 在实际应用中无法调整, 且其价格偏贵, 因此需要开发出更经济且更易调整的病毒蚀斑覆盖层。

本研究基于此, 利用更加经济的 MCC 和 CMC 配制了 12 种不同浓度的 avicel, 测定其 2×覆盖层的黏度, 验证其在蚀斑试验中的操作难易度。进一步利用其进行 PEDV 蚀斑实验, 测定 PEDV 滴度, 比较 12 种 avicel 与传统覆盖层的蚀斑清晰度、稳定性及蚀斑测定准确度等。本研究发现, 除 4.8% MCC+1.4% CMC 和 4.8%

MCC+1.0% CMC 外, 其他 10 种 avicel 覆盖层在实际使用中均应比 2% CMC 操作更容易和简便。进一步通过比较 12 种 avicel 覆盖层及传统覆盖层蚀斑大小、清晰度、稳定性及滴度准确性等的差异, 筛选获得黏度更低, 操作更简便, 并在 PEDV 96 孔板蚀斑测定中蚀斑清晰度更好、准确度高且稳定性好的 avicel, 其浓度为 0.6% MCC+0.7% CMC, 可用于今后 PEDV 在 96 孔板中的蚀斑试验。而不同病毒特性不同, 所用的饲养细胞也有差异<sup>[7,10,21]</sup>, 甚至于所使用的不同孔板类型 (如 96 孔板、24 孔板、6 孔板等) 也会对 avicel 覆盖层有不同的要求。因此, 能够灵活调整的 avicel 覆盖层对病毒蚀斑测定非常重要。建议实际应用中, 不同的病毒可以直接先使用本研究的最佳条件进行病毒蚀斑测定, 对结果不理想或要求高清晰度的实验, 可以按照本文方法进行测试以确定最佳条件。

综上所述, 本研究成功建立了一种操作简便、实用性好、稳定性好的新型改良的 avicel 病毒蚀斑测定法, 为病毒的病原学、抗病毒药物及疫苗等相关研究的展开提供了良好的实验基础。

## REFERENCES

- [1] Cooper PD. The plaque assay of animal viruses. *Adv Virus Res*, 1961, 8: 319-378.
- [2] 黄桢祥. 医学病毒学基础及实验技术. 北京: 科学出版社, 1990.  
Huang ZX. *Medical Virology Basis, Fundamental Techniques & Methods*. Beijing: Science Press, 1990 (in Chinese).
- [3] Dulbecco R, Vogt M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1953, 18: 273-279.
- [4] Cohen SS. The biochemistry of viruses. *Annu Rev Biochem*, 1963, 32: 83-154.
- [5] Hartley JW, Rowe WP. Tissue culture cytopathic and plaque assays for mouse hepatitis viruses. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1963, 113: 403-406.



- [6] Juarez D, Long KC, Aguilar P, et al. Assessment of plaque assay methods for alphaviruses. *J Virol Methods*, 2013, 187(1): 185-189.
- [7] Baer A, Kehn-Hall K. Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. *J Vis Exp*, 2014(93): e52065.
- [8] 王文玲, 黄保英, 王慧娟, 等. 基于 avicel-结晶紫染色空斑的中东呼吸综合征冠状病毒感染滴定与中和抗体检测方法. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(1): 62-67.  
Wang WL, Huang BY, Wang HJ, et al. Development of a plaque assay based on avicel-crystal violet staining for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection and neutralizing antibody. *Chin J Microbiol Immunol*, 2017, 37(1): 62-67 (in Chinese).
- [9] Herzog P, Drosten C, Muller MA. Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. *Virol J*, 2008, 5(1): 138.
- [10] Matrosovich M, Matrosovich T, Garten W, et al. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virol J*, 2006, 3: 63.
- [11] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, 2012, 44(2): 167-175.
- [12] Li ZL, Zhu L, Ma JY, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in South China. *Virus Genes*, 2012, 45(1): 181-185.
- [13] Madson DM, Magstadt DR, Arruda PH, et al. Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs. *Vet Microbiol*, 2014, 174(1/2): 60-68.
- [14] 赵洲, 刘红亮, 顾凡, 等. 猪流行性腹泻病毒 SC-P 株部分特性研究. *中国兽医学报*, 2015, 35(9): 1397-1403.  
Zhao Z, Liu HL, Gu F, et al. Part characteristics of porcine epidemic diarrhea virus SC-P strain. *Chin J Vet Sci*, 2015, 35(9): 1397-1403 (in Chinese).
- [15] 黄楠, 郎巧利, 葛良鹏, 等. 不同固定液对 Vero E6 细胞形态和染色的影响及在病毒噬斑分析中的应用. *病毒学报*, 2021, 37(6): 1394-1399.  
Huang N, Lang QL, Ge LP, et al. Effects of different fixing agents on vero E6 cell staining and application in virus plaque assay. *Chin J Virol*, 2021, 37(6): 1394-1399 (in Chinese).
- [16] 叶跃天, 郇文彬, 陈欢, 等. 黄连素抑制猪流行性腹泻病毒复制和组装. *中国兽医学报*, 2019, 39(9): 1829-1835.  
Ye YT, Huan WB, Chen H, et al. Berberine inhibits porcine epidemic diarrhea virus replication and assembly. *Chin J Vet Sci*, 2019, 39(9): 1829-1835 (in Chinese).
- [17] 郭楠. 抗菌肽 Caerin1.1 抑制猪流行性腹泻病毒增殖的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.  
Guo N. Inhibition effect of antimicrobial peptide Caerin1.1 on the propagation of porcine epidemic diarrhea virus[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [18] Niu X, Kong F, Hou YJ, et al. Crucial mutation in the exoribonuclease domain of *nsp14* of PEDV leads to high genetic instability during viral replication. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 106.
- [19] Zhang FQ, Chen YX, Ke Y, et al. Single chain fragment variable (scFv) antibodies targeting the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus provide protection against viral infection in piglets. *Viruses*, 2019, 11(1): E58.
- [20] Yin Y, Xu Y, Ou Z, et al. A simple and highly repeatable viral plaque assay for enterovirus 71. *J Basic Microbiol*, 2015, 55(4): 538-541.
- [21] Escobar-Herrera J, Medina-Ramírez FJ, Gutiérrez-Escolano AL. A carboxymethyl-cellulose plaque assay for feline calicivirus. *J Virol Methods*, 2007, 146(1/2): 393-396.

(本文责编 郝丽芳)