

以試管內細胞培養病毒建立抗病毒 中藥篩檢研究

國立陽明醫學院·醫事技術學系

台北榮民總醫院·檢驗部病毒室

詹前朕·劉武哲

摘要

本計劃選用 A 型流行感冒病毒培養於人類前單核細胞株 (HL-CZ) 8 天，每天收集細胞做免疫螢光抗體 (IFA) 染色，使用 A 型流行感冒病毒的兩種單株抗體：抗病毒核殼蛋白 (anti-NP) 及抗病毒血球凝集素 (anti-HA)，可做為判定細胞受病毒感染的指標，接種後次日起即呈現強陽性反應並可維持到第 3 天，在中藥材方面選用大蒜精溶液及金線蓮萃取液，在測知兩藥液的最低細胞毒殺濃度分的最低細胞毒殺濃度分別為：大蒜液 10 倍稀釋與金線蓮液 4.0mg/ml 之後，以稍低於此濃度的藥液與病毒懸浮液一起加入細胞培養中，在接種後的 1,3,5,7,9,12,24,48, 小時分別收集細胞做成抹片並給予螢光抗體染色，初步的結果顯示：只接種病毒的陽性對照組，其平均感染率（螢光細胞率）為 59.7%，而加了大蒜液，金線蓮液及西藥 amantadine（陰性對照組）的平均感染率為 19.4%，33.6%，及 30.6%，初步推測這些藥液在 48 小時內可抑制病毒抗原在細胞內外的表現，至於病毒在細胞的感染是否完全受到了藥液的抑制（病毒 RNA 的複製情形），可由隨後的核酸聚合酶連鎖反應 (PCR) 偵測病毒 cDNA 之結果而得知，目前已知該病毒在 HL-CZ 細胞內複製，其 HA gene 在感染後 12 小時即可被測知，我們的研究模式可做為未來發展抗病毒篩檢研究之參考。

前言

自古相傳的一些食用植物或草藥是否具有預防及治療傳染病（特別是因病毒感染而引起的疾病）的效果，頗受國人及中醫藥界的關心，而事實上能

抗病毒 (anti-virus) 的西藥並不多見。中國民間相傳的大蒜 (garlic) 可用於感冒的預防與治療，本世紀來，西方的學者曾對大蒜中的兩種重要化學成分：蒜素 (allicin) 與蒜苷 (alliin)，作過許多詳盡的研究，不少古代與現代的醫者指出大蒜具有某些療效 (Block, 1985)。蘭科植物中的金線蓮 (*Anoectochilus formosanus hay*)，在台灣俗稱「藥虎」，中藥界指出它具有很強的藥理作用，服食後可消除或減輕一些病症。因此，本實驗擬以這兩種植物的抽取物，建立以試管內細胞培養病毒篩檢抗病毒中藥的模式。

流行性感冒病毒通常是造成人畜急性上呼吸道感染病症的主兇，台北榮總目前有分離出的五百多株病毒，故選用此病毒來進行實驗。我們的實驗在 1985 年起，已成功地建立一個細胞株，這是從一位白血病患者所分離出來的前單核球 (promonocyte) 細胞株，名為 HL-CZ。1990 年我們將此細胞株單株化 (Cloned)，其中一個單細胞株曾用於繁殖登革熱病毒 (dengue virus)，並發表於美國期刊上 (Liu 等人，1991)。本實驗所使用的另一單細胞株 (CCC-3)，經過實驗證實亦對流行性感冒病毒 A 型 Taiwan/86 (H₁N₁) 株具有感受性 (susceptibility)。故我們擬用 HL-CZ 細胞來培養流行性感冒 A 病毒 (influenza A virus)，試驗並評估自大蒜精商品及 50% 甲醇所萃取的大蒜抽取液與金線蓮抽取液，對病毒是否有抗病毒作用，並與文獻中指出能抗流行性感冒病毒的西藥—Amantadine 作比較 (Hay 等人，1985；Sugrue 等人，1990)。

在目前，一般的實驗室尚未有真正實用且方便的方法來做抗病毒的分析研究，以常用的病毒斑化成分分析 (plaque reduction assay) 為例，它雖可用但卻費時費事。在抑制劑 (inhibitory agents) 的存在下來定量病毒複製 (viral replication) 的方法有：核酸互交法 (nucleic acid hybridization) (Gadler 等人，1984；Swieskosz 等人，1987)，免疫螢光染色法 (immunofluorescence staining) (Telenti 與 Smith, 1989)、免疫過氧化酶染色法 (immunoperoxidase staining) (Howell 與 Miller, 1984)，酵素免疫分析法 (enzyme immunoassay) (Rabalais 等人，1987) 及其他方法 (vr McLaren 等人，1983；Prichard 等人，1990 之文獻) 等，這些抗病毒作用的分析方法仍有待標準化。本實驗乃是使用對流行性感冒病毒具有特異性的單株抗體 (monoclonal antibodies)，行免疫螢光抗體 (immunofluorescence antibody, IFA) 染色，作為中藥抗病毒作用分析的基本方法。

材料與方法

一、病毒與細胞培養

本實驗所使用的流行性感冒 A 型與 B 型病毒株分別是 A/Taiwan/86(H₁N₁) 與 B/Yamagata (山形)，從三天培養的初代猴腎細胞 (PMK)、犬腎細胞 (MDCK) 或雞胚胎 (embryonic egg) 中，收集到這些病毒 (Lathey 等人，1986)。HL-CZ 的單細胞株 CCC-3 培養於塑膠的培養瓶內 (Corning culture flask)，以含有 10% 胎牛血清、100units/ml 青黴素和 100mg/ml 鏈黴素之 RPMI-1640 培養基來培養。培養瓶置於 37 °C、5% CO₂ 的孵育箱 (incubator) 中。

二、藥材抽取物的製備與細胞毒殺作用試驗

金線蓮購買自南投埔里某人工養殖實驗室，整株人工養殖的金線蓮 (包含根、莖、葉) 經過清洗與稱重後，以 50% 的甲醇水溶液 (methanol-water) 萃取 24 小時三次，萃取液再經蒸餾以去除甲醇，裝瓶稱重後進行冷凍乾燥 16 小時。每一小瓶最後得到 0.123 ~ 0.125g 的金線蓮抽取物，加入 12.3 ~ 12.5ml 的 RPMI-1640 培養液而成為濃度 10mg/ml 的濃貯液 (stock solution)。

取商聖公司 (台中、台灣) 所出品的「大蒜精」(garlic essence) 溶到熱水中，調整濃度為 1:5 倍稀釋 (1:5 dilution) 或 25W/V，經過 10,000 轉離心 10 分鐘而製成濃貯液。

取西藥 amantadine (PK-Merz, Germany) 膠囊中的粉末 1.379g (含有 100mg 的 amantadine-Sulfate)，溶到 40ml 的 RPMI-1640 培養液中，濃貯液的濃度為 53mM。上述的所有溶液必須通過 0.45 μ M 的濾菌膜 (Millipore) 使成為無菌狀態才能進行實驗。

大蒜與金線蓮的萃取液加到細胞培養中培養一週，以 0.5% 的 trypan blue 染上死亡細胞後，用計數盤 (counting chamber) 計算細胞總數 (包括活細胞數)，如此這些萃取液對細胞的最低毒殺細胞濃度 (MCC, minimum concentration of cytotoxicity)，可被評估與訂定出來。

三、HL-CZ 細胞對流行性感冒病毒的感受性

為了瞭解 HL-CZ 細胞對病毒的感受性如何，1ml 的細胞培養液 (culture fluid) 與 1ml 的病毒懸浮液在離心管中混合。接種病毒的濃度以血球凝集試驗單位 (hemagglutination unit, HAU) 表示，A 型病毒的 HAU 為 64，B 型病毒的 HAU 為 32。病毒接種後須經過 90 分鐘的吸附作用 (adsorption)，然後將溶液換到培養瓶 (25cm² flask) 中並加入新鮮的 RPMI-1640 培養基，培養於 37 °C 下 8 天，每隔 3 天加 1.5ml RPMI-1640 培養基。

在病毒接種後的第 1,2,4,6,8, 天，以血球凝集微量試驗來檢測病毒在培養液中的存在情形。病毒 HAU 的測定方法是取 50 μ l 的培養上清液與等量的 0.5 % 天竺鼠紅血球懸浮液，混合於微量平盤內，搖晃幾下，在室溫下靜置 1 小時後觀察血球凝集的結果 (Liu 等人，1986b)。收集培養液時，取上清液做上述的血球凝集試驗，留下的細胞用磷酸鹽緩衝生理食鹽水清洗三次，最後調整細胞的數目為 5×10^6 個 /ml，滴 15 μ l 細胞懸浮液於多孔玻片的孔內，待風乾後以 -20°C 的冰內酮固定 10 分鐘。固定後的細胞玻片先以抗 A 型與 B 型病毒核殼蛋白 (nucleoprotein, NP)，以及抗 A 型病毒血球凝集素 (Hemagglutinin, HA) 之單株抗體 (monoclonal antibodies, Clonatec, Biosoft, Paris) 處理後，再染上帶有螢光的抗老鼠免疫球蛋白抗體 (anti-mouse Ig antibodies) (Brown 等人，1983；Walls 等人，1986)。最後以共焦距雷射掃描顯微鏡 (confocal laser scan microscope) (Zeiss, Germany) 來觀察細胞的螢光結果並攝影。

四、中藥萃取液的抗病毒分析

四瓶培養瓶各含有 1ml 的細胞培養液 (約有 $6 \sim 8 \times 10^6$ 個細胞)，加入 1ml 的 A 型病毒懸浮液 (HAU=64) 後再依各種不同藥液添加培養基而成為不同的藥液濃度 (見表 2)，例如只加 2ml 培養基者為對照組，加入 1.6ml 金線蓮濃貯液與 0.4ml 培養基而使得培養瓶中的金線蓮萃取液濃度為 4mg/ml (MCC)，最後所有培養瓶的溶液總量均為 4ml。在培養後的第 1,3,5,7,9,12,24 與 48 小時，收集細胞製成抹片，以 IFA 試驗檢測病毒抗原之表現。至於病毒 RNA 的複製 (replication) 是否受到了抑制，則以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction) 來偵測。上述的每一組實驗至少執行三次。

五、病毒 RNA 的抽取

前述做完 IFA 試驗所餘之細胞懸浮液 1ml，經三次重覆的冷解凍後，以低速離心去除細胞碎片。取 1ml 的上清液加入含有 3.0M NaCl 的 75 % polyethylene glycol 6,000 (PEG) 0.5ml，充份混合後置於冰浴中 45 分鐘。接著 12,000rpm 高速離心 20 分鐘，去除上清液，以 PH8.0 的 TNE 緩衝液 (含有 0.01M Tris-HCl, 0.1M NaCl 以及 0.001M EDTA) (Maniatis 等人，1983) 50 μ l 來溶解沈澱物。加入等量 (50 μ l) 的已去離子水飽和的酚 (ion-free distilled water saturated phenol)，激烈振盪混合 1 分鐘後以高速離心 (12,000rpm) 5 分鐘分層。

取上層液至另一小管，原下層液再加入 50 μ l 的 TE 緩衝液，再重覆震盪。重覆三次收集 150 μ l 的上層液再經兩次等體積的酚／氯仿 (Chloroform)(1:1) 溶液上下搖晃混勻，取上層液，加入 1/10 體積的 3M 醋酸鈉 (sodium acetate, pH5.3) 和 2 倍體積之絕對酒精，混合均勻後置於 - 20 $^{\circ}$ C 中沈澱 3 至 4 小時，以高速離心 15 分鐘，傾去上清液，再以 70 % 酒精清洗並離心 5 分鐘，最後以 Speed Vac (Model SC-100, Savant Instrument Inc., USA) 離心真空抽乾。

六、以 PCR 增幅 HA1 基因

PCR 增幅之區域涵蓋了 HA 基因中之 HA1 的大部份 (Rajakumar 等人，1990；Saiki 等人，1988)，除了 WL-16 引子 (primer)(Clontech, USA) 外，再加入相對於 HA1 基因了端之定次序 (sequence) 的引子 P4 (Oligos etc, USA)。在總共 50 μ l 的反應液中，包括純化後的 RNA 溶於 20 μ l 0.5 % 的 diethylpyrocarbonate water (DEPC, Sigma, USA)，各 1 μ l (50 p. mole) 的引子 WL-16 與引子 P₄、0.5 μ l (14 units) 的 AMV 超級反轉錄酶 (AMV Super reverse transcriptase)(Molecular Genetic Resources, USA)、0.5 μ l (2.5 units) 的耐熱菌 *Thermus aquaticus* (Taq) DNA 聚合酶與 10 μ l 10 \times 的 Taq 緩衝液 (Promega, USA)，5 μ l 的 dNTP (2.5 mM, pH 7.0) 以及 12 μ l 的 DEPC 水。反應液最後覆蓋一層 150 μ l 的礦物油 (mineral oil)。病毒 RNA 的增幅過程，首先是反轉錄作用 (42 $^{\circ}$ C 45 分鐘與 94 $^{\circ}$ C 5 分鐘之反應) 合成 cDNA 後進入 PCR 程式，包含了 94 $^{\circ}$ C 變性作用 (denaturation) 1 分鐘、37 $^{\circ}$ C 煉合 (reannealing) 2 分鐘及 72 $^{\circ}$ C 引子延伸 (extension) 2 分鐘的加熱週期 30 次，使用的機器為 DNA Thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, USA)。反應終止後，去除礦物油。吸取 5 μ l 的 PCR 產物在 2 % 洋菜膠 (agarose gel) 上進行電泳分析 (mini-gel electrophoresis)(Maniatis 等人，1982)，使用的裝置為 Mupid-2 (Cosmo Bio. Co. LTD, Japan) 與 Tris/borate/EDTA buffer system。

結果

首先我們要知道 HL-CZ 細胞對流行性感 A 型與 B 型病毒的感受性如何。由表 1 可看出，細胞內的兩種病毒抗原 (NP 與 HA) 在感染後的 1 到 4 天均呈現

出陽性的 IFA 結果，初步認為 HL-CZ 細胞對 A 型病毒有感受性，而對 B 型病毒則少有感受性，因此選擇 A 型病毒來做實驗。

大蒜與金線蓮萃取液對細胞毒性的測定結果列於表 2。活細胞與細胞總數之計數與觀察，可以繪製出細胞的生長曲線圖 (growth curve) (圖 1 與圖 2)，由此資料可評估藥液對細胞的毒殺作用程度。100 倍稀釋 (1:100 dilution) 的大蒜液在 5 天之內對細胞均無毒性，但濃度提高 10 倍 (1:10 dilution) 時，明顯可看出培養 2 天後之活細胞百分率只有 63.8%，到了第 3 天則降至 19.7%。同樣的情形也見於金線蓮萃取液，濃度為 4mg/ml，培養 2 天之活細胞有 89.7%，到了第 3 天則降為 25%。沒有加藥的對照組細胞在 5 天的培養內，活細胞一直維持在 95% 以上。我們訂定在培養第 3 天時，使活細胞下降至 50% 以下之藥液濃度為 MCC，由此可知，大蒜液與金線蓮液的 MCCs 分別是 1:10 稀釋與 4mg/ml。

表 3 列出了以 IFA 試驗測定加了中藥之細胞螢光百分率結果，病毒的 NP 與 HA 抗原，在接種病毒與（或無）大蒜液、金線蓮液及 amantadine 之後的 1 到 48 小時可用 IFA 來偵測。在只接種病毒的陽性對照組中，於 7 小時及 12 小時 P.i.，約有 33.3% 的 NP 抗原與 75% 的 HA 抗原可被偵測出來，但加了藥液的實驗組，無論是大蒜液、金線蓮液或 amantadine 均顯示有某種程度的抑制作用，加了大蒜液的實驗組，在 24 小時 P.i. 內所測得之 NP 與 HA 抗原平均螢光細胞率為 18.4% 與 13%；加金線蓮液者為 NP 平均 30.8%、HA 平均 26.1%；加 amantadine 者為 NP 32.6% 與 HA 32.8%。同樣的 IFA 結果可維持到感染後 48 小時。圖 3 舉出兩張其有代表性的細胞免疫螢光相片，左圖為只接種病毒的對照組；右圖為加了大蒜液的實驗組。

為了明白藥液的作用是否改變了細胞內病毒基因，我們將應用一種新的技術—PCR 以測定高濃度 (MCC) 藥液（大蒜與金線蓮）對細胞與病毒之作用後，病毒 HA 基因是否受到了抑制。初步的 PCR 結果列於圖 4，從圖 4 中可看出直接取病毒懸浮液 (Lane 5,6) 做 RT/PCR（一管式反轉錄酶/PCR）可在 1.07B 鹼基對 (base pair, bp) 處看到產物 (DNA band)。Lane 2 與 Lane 4 為 blank 與沒種病毒的細胞溶解物，均無產物出現。Lane 1 是接種病毒 12 小時後之細胞溶解物，如圖中結果可看出除了特定的 1.078 處有產物外，多餘且非特定的產物亦出現在 281/271 鹼基對處。因此，尚待進一步的實驗來測陽

性與陰性 RT/PCR 的結果，以證實病毒的基因受藥液抑制之情形。

討論

IFA 試驗在本研究可為一種測定流行性感冒病毒在 HL-CZ 細胞內生長情形的簡便方法。雖然實驗的結果證明流行性感冒 A/Taiwan/86 (H1N1) 病毒在 HL-CZ 細胞內，可被偵測出來，但根據最新的文獻指出 (Ochiai 等人, 1992)，以抗血球凝集素單株抗體 (anti- hemagglutinin McAb) 測定 A 型病毒經由 Fc receptor 感染鼠類巨噬細胞樣細胞株 (murine macrophage-like cell line) P388D1 時，發現病毒的複製可能會「流產掉」，無法自細胞釋出病毒顆粒。本實驗也有類似的情形（以 HA 測定細胞外的病毒顆粒之結果均為陰性反應），不過，病毒抗原在 HL-CZ 細胞之表現仍可被測得。至於 HL-CZ 細胞對兩種不同病毒之感受性差異如何，以及病毒顆粒是否真正無法自細胞釋出，有待使用更多的 A 型與 B 型病毒株做進一步的感受性試驗。目前所得之結論是 HA 試驗不適合用於分析流行性感冒病毒在 HL-CZ 細胞內之生長情形，而以特定、準確之單株抗體商品來做 IFA 試驗則可適用。

最低細胞毒殺濃度 (MCC) 之決定是主觀性的，每一種實驗若使用不同的病毒，細胞株及藥液，則有不同的決定標準，此可進一步研究而加以標準化。本實驗的決定方法是以在培養 3 天內使活細胞降至 50 % 以下之濃度為 MCC，HL-CZ 細胞對大蒜及金線蓮藥液的耐受性極強，即使使用如 MCC 之高濃度處理，除去死亡的細胞後再給予活細胞次培養仍可活下來。至於細胞形態的變化在本實驗沒有被討論。

由於在病毒的複製過程中，核殼蛋白的表現較早出現於細胞核內，使用共焦距雷射掃描顯微鏡可觀察病毒抗原的分佈與從核內移轉至胞質內的情形，結果指出可明確地看到病毒抗原分佈在核外緣區 (perinuclear zone)，這是使用傳統螢光顯微鏡所無法清楚看到的。

對於建立一個體外細胞培養病毒系統來做中藥抗病毒研究模式來說，大蒜抽取液可能適合用來做實驗。大蒜液來自大蒜精商品，據廠商指出是以低溫萃煉法來保存蒜苷與蒜素的活性，這兩種化學成分的藥理作用機轉將待進一步的研究。至於金線蓮方面，本實驗使用組織培養的植物來製備抽取液，

進一步的實驗將比較野生金線蓮抽取液的效果，並研究其抗感冒的成分。

誌謝

首先感謝中國醫藥學院醫技系鍾楚紅主任熱心提供我們大蒜精，以及台北榮總病毒室醫檢師蔡正賢在實驗上的協助。最後感謝衛生署之經費支持(DOH-CD34)才得完成本實驗。

表1 HL-C2细胞对流行性感冒病毒的感受性。

antigen detection		days post-infection				
HA or IFA*	virus strain	1	2	4	6	8
extra-cellular (HA)	influenza A	±	-	-	-	-
	influenza B	-	-	-	-	-
	control	-	-	-	-	-
intra-cellular (IFA)	influenza A	+++	++	++	±	+
	influenza B	±	-	-	-	-
	control	-	-	-	-	-

*HA - hemaqglutination with 0.5% guinea pig/RBC at R.T.

IFA- immunofluorescence antibody test with specific influenza A and B virus NP monoclonal antibodies (indirect methods).

表2 以不同濃度之中藥萃取液處理之HL-CZ細胞者細胞計數。

concentration of Chinese herb extracts		day(s) of cultivation					
		0*	1	2	3	4	5
Garlic stock: (1:5 dilution)	1:100	95.4 ⁺	98.0	96.4	97.8	96.7	93.6
	1: 50	95.7	93.8	94.9	87.5	82.1	80.7
	1: 20	96.4	95.6	95.8	91.2	91.9	79.2
	1: 10	96.8	87.1	63.8	19.7	8.3	9.8
	1: 8	93.9	81.3	39.7	16.1	15.5	15.7
<i>A. formosanus</i> stock: (10mg/ml)	0.1	98.3	98.6	100	98.4	99.3	98.6
	1.0	96.8	95.5	98.2	99.1	97.2	96.9
	2.0	98.1	97.5	97.0	96.8	93.5	80.7
	3.0	94.6	95.5	82.6	59	48.6	16.8
	4.0	87.5	88.5	89.7	25	12.5	10.9
	5.0	96.7	93.0	64.1	22.8	14.4	6.8
HL-CZ (ccc-3)		98.5	98.4	95.7	98.1	98.2	98.8

*The cells were counted before treatment of extracts at the beginning of experiment.

+viability of the cells (%)

表3 HLC2细胞培养病毒系统加入不同萃取液之免疫
荧光细胞阳性百分率。

time pi	virus control		Garlic*		<i>A. formosanus</i> *		Amantadine	
	NP	HA	NP	HA	NP	HA	NP	HA
1 hr	10.5	37.5	7.1	14.7	5.1	21.8	8.2	22.9
3 hrs	10.1	20.7	7.5	23.2	10.2	12.6	7.1	16.1
5 hrs	19.5	30.4	11.6	10.3	10.7	14.1	9.4	8.1
7 hrs	33.3	59.7	17.3	19.8	19.5	33.1	17.1	10.4
9 hrs	57.7	66.8	22.2	14.5	32.5	25.3	27.7	39.6
12 hrs	48.1	75	19.6	22.8	35.8	36	29.4	51.8
24 hrs	57.1	59.2	18.4	13	30.8	26.1	32.6	32.8
48 hrs	65.3	75.2	21.7	25	61.7	35.5	26.5	38.1

*The used concentrations (MCCs) of garlic, *A. formosanus* and Amantadine were 1:10 dilution, 4mg/ml and 0.53 mM, respectively.

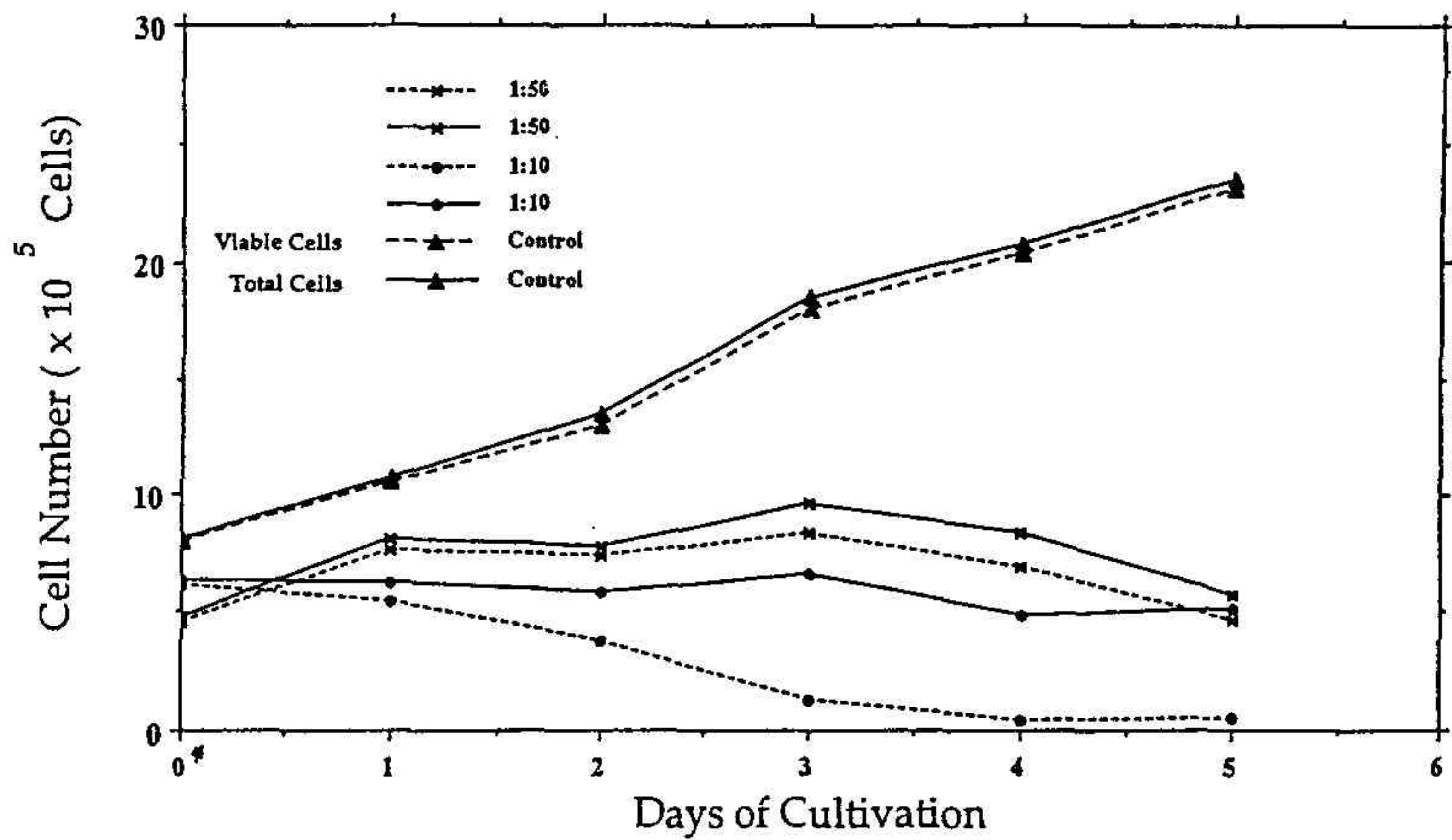


圖1 大蒜抽取液对HL-C2细胞生长曲线的影响。
 * 抽取液 (1:10 与 1:50 稀释) 在实验开始首日细胞计数后即加入。

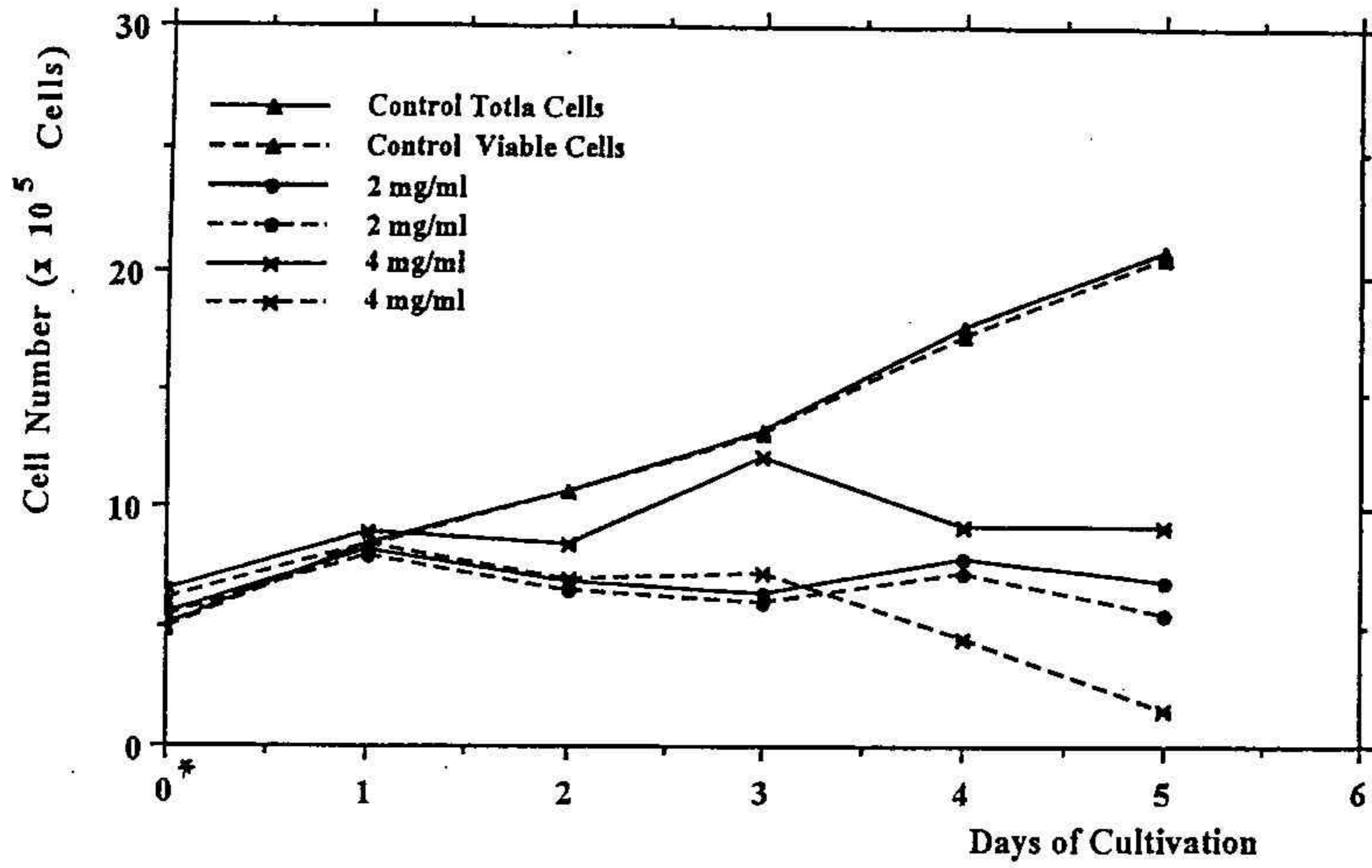


圖2 金線蓮抽取液对HL-C2细胞生長曲線的影响。
 * 抽取液(4 mg/ml 与 2 mg/ml)在实验開始的首日细胞計量後即加入

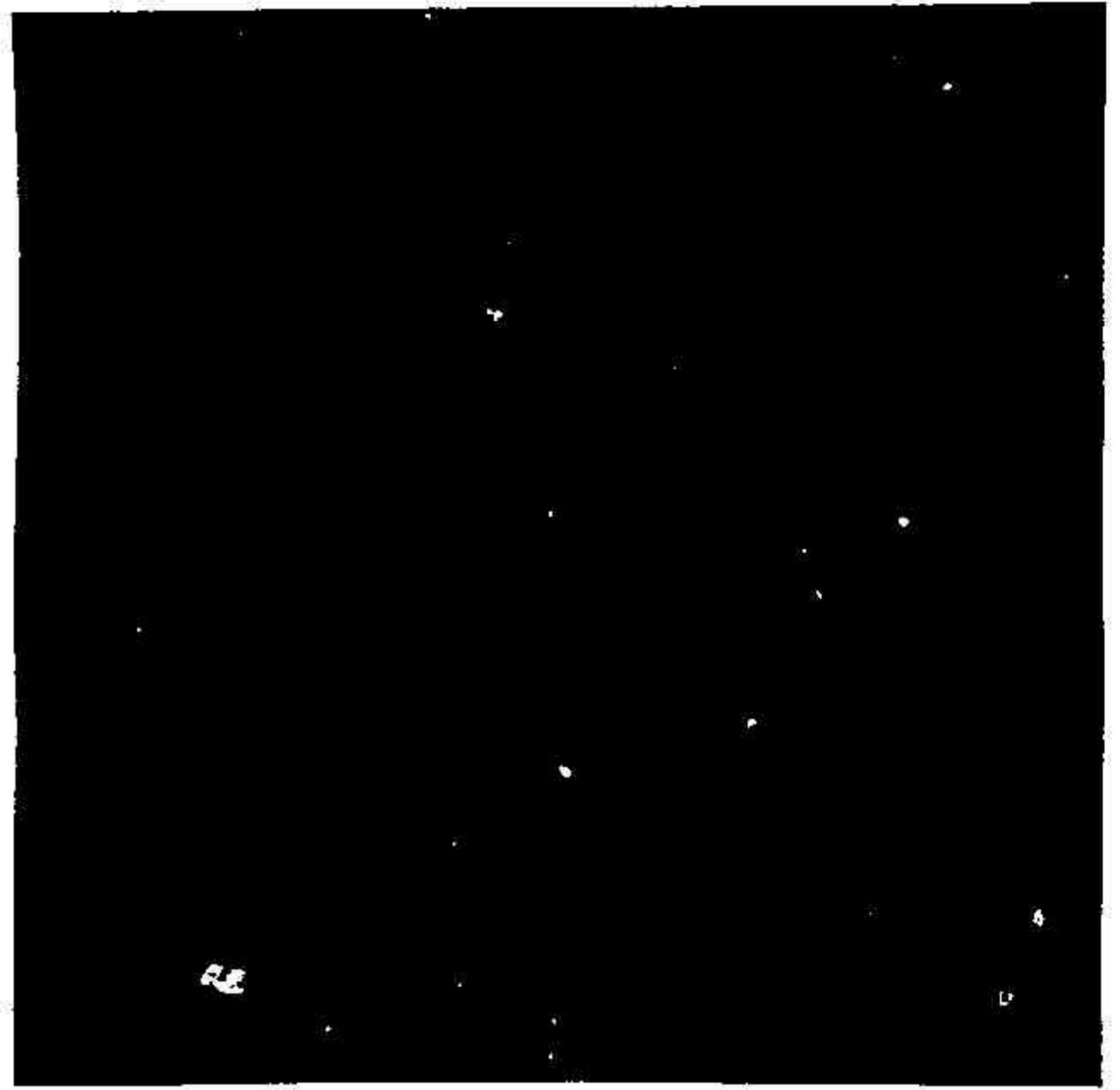
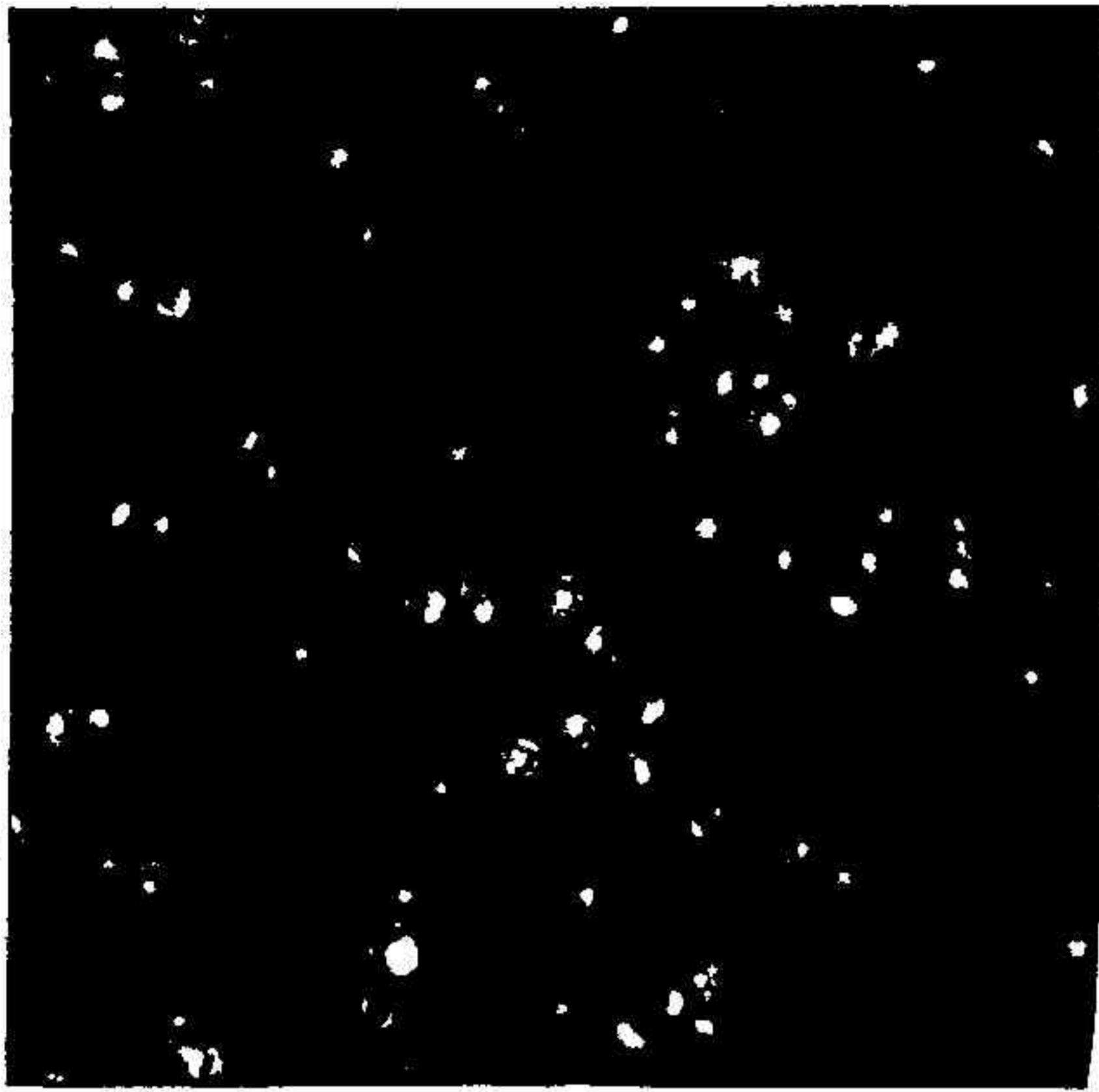


圖3 HL-C2細胞接種病毒(對照組,左圖)后再加入大蒜液(右圖),
9小時後之IFA(抗病毒HA之單株抗體)試驗結果相片。

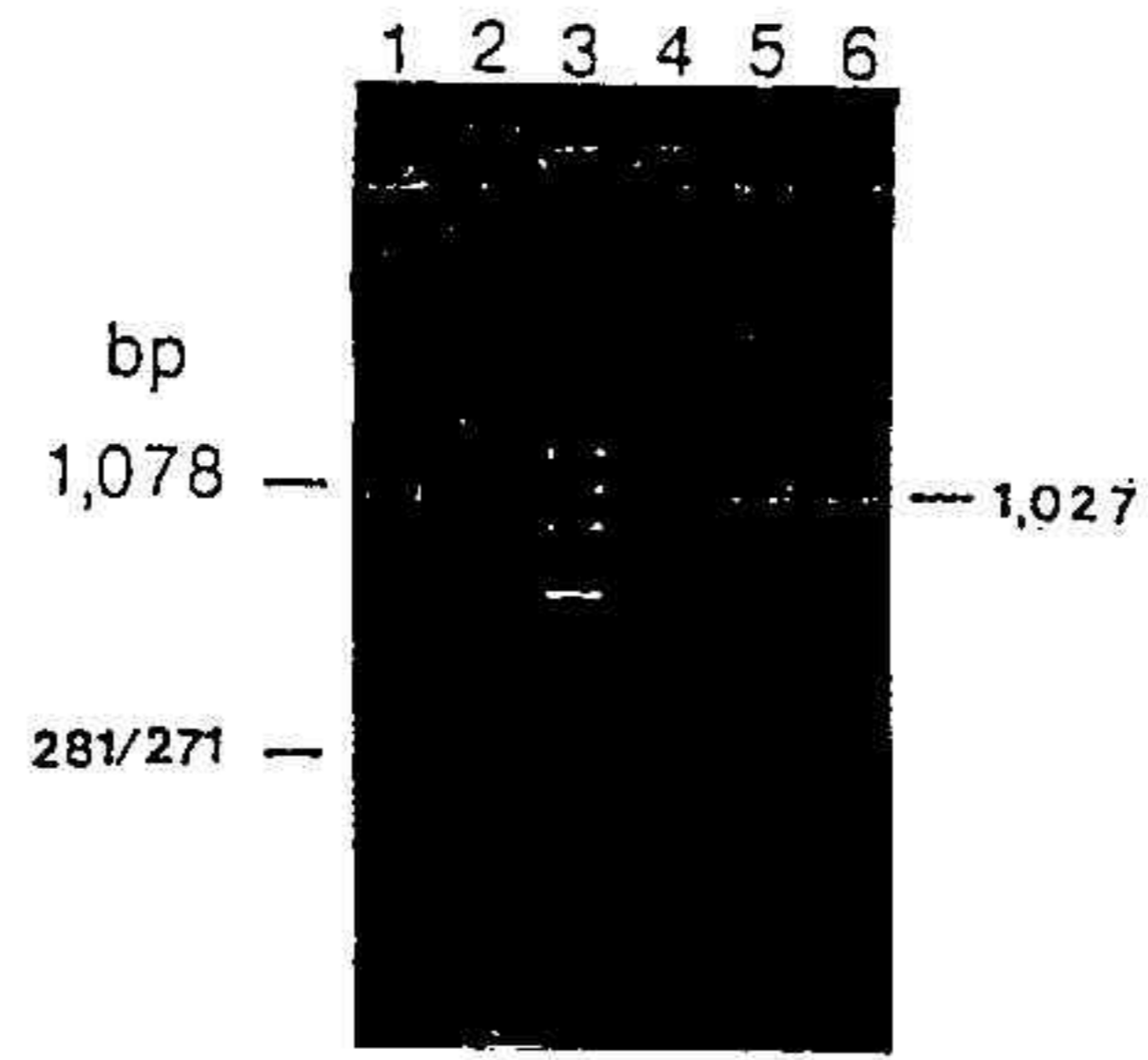


圖4 115 PCR 增幅 HAI1 基因後經由洋菜膠电泳分析之產物。

REFERENCES

- Block, E. (1985) The chemistry of garlic and onions. *Scientific American* 232(3), 94-99.
- Brown, L.E., Hinshaw, V.S. and Webster, R.G. (1983) Antigenic variation in the influenza A virus non-structure protein, NS1. *Virology* 130, 134-143.
- Cox, N.J., Black, R.A. and Kendal, A.P. (1989) Pathway of influenza A (H1N1) viruses from 1977 to 1986 as determined by oligonucleotide mapping and sequencing studies. *J. Gen. Virol.* 70, 299-313.
- Gadler, H., Larsson, A. and Solver, E. (1984) Nucleic acid hybridization, a method to determine effects of antiviral compounds on herpes simplex virus type 1 DNA synthesis. *Antiviral Res.* 4, 63-70.
- Hay, A.J., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J. and Smith, M.H. (1985) The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* 4, 3021-3024.
- Howell, C.L. and Miller, M.J. (1984) Rapid method for determining the susceptibility of herpes simplex virus to acyclovir. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2, 77-84.
- Lathey, J.L., Van Voris, L.P. and Belshe, R.B. (1986) Superiority of tissue-culture-grown antigens over egg-grown antigens for serologic diagnosis of influenza B virus infections. *J. Med. Virol.* 19, 155-159.
- Liu, W.T., Chen, S.C., Lee, N., Tan, S.K., Liu, S.F., Dunn, P. and Chang, K.S.S. (1989) Establishment and characterization of a cell line of

- monocytic origin, HL-CZ, from human leukemia. *J. Biomed. Lab. Sci.* 4, 284-292.
- Liu, W.T., Wei, H.Y., Peng Y.C. and Wang, H.C. (1989) Influenza virus isolates in Taiwan, 1977-1988. *J. Infect. Dis. Soci. ROC.* 2, 1-8.
- Liu, W.T., Chen, C.L., Lee, S.S.J., Chan, C.C., Lo, F.L. and Ko, Y.C. (1991) Isolation of dengue virus with a human promonocyte cell line. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44(5), 494-499.
- Lyon, J.A. and Hinshaw, V.S. (1991) Replication of influenza A viruses in an avian macrophage cell line. *J. Gen. Virol.* 72, 2011-2013.
- Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrooke, J. (1982) *Molecular Cloning*, 1st edit. Cold Spring Harbor laboratory, CSH, New York, p.187-193.
- McLaren, C., Ellis, M.N. and Hunter, G.A. (1983) A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to anti-viral agents. *Antiviral Res.* 3, 223-234.
- Mukaigawa, J., Hatada, E., Fukuda, R. and Shimizu, K. (1991) Involvement of the influenza A virus PB2 protein in the regulation of viral gene expression. *J. Gen. Virol.* 72, 2661-2670.
- Ochiai, H., Kurokawa, M., Matsui, S., Yamamoto, T., Kuroki, Y., Kishimoto, C. and Shiraki, K. (1992) Infection enhancement of influenza A NWS virus in primary murine macrophages by anti-hemagglutinin monoclonal antibody. *J. Med. Virol.* 36, 217-221.
- Prichard, M.N., Turk, S.R., Coleman, L.A., Engelhardt, S.L., Shipman, C. and Drach, J.C. (1990) A microtiter virus yield reduction assay for the

- evaluation of antiviral compounds against human cytomegalovirus and herpes simplex virus. *J. Virol. Methods* 28, 101-106.
- Rabalais, G.P., Levin, M.J. and Berkowitz, F.E. (1987) Rapid herpes simplex virus susceptibility testing using an enzyme-linked immunosorbent assay performed in situ on fixed virus-infected monolayers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 946-948.
- Rajakumar, A., Swierkosz, E.M. and Schulze, T. (1990) Sequence of an influenza virus hemagglutinin determined directly from a clinical sample. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA.* 87, 4154-4158.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988) Enzymatic amplification of gamma-globin genomic sequence and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sugrue, R.J., Bahadur, G., Zambon, M.C., Hall-Smith, M., Douglas, A.R. and Hay, A.J. (1990) Specific structural alteration of the influenza hemagglutinin by amantadine. *EMBO J.* 9, 3469-3476.
- Swierkosz, E.M., Scholl, D.R., Brown, J.L., Jollick, J.D. and Gleaves, C.A. (1987) Improved DNA hybridization method for detection of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1465-1469.
- Telenti, A. and Smith, T.F. (1989) Screening with a shell vial assay for antiviral activity against cytomegalovirus. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12, 5-8.
- Walls, H.H., Harmon, M.W., Slagle, J.J., Stocksadale, C. and Kendal, A.P.

(1986) Characterization and evaluation of monoclonal antibodies developed for typing influenza A and B viruses. *J. Clin. Microbiol.* 23, 240-245.