

猪细小病毒 CG-05 株在 ST 细胞上的增殖规律研究

唐满华^{1,2}, 陈瑞爱^{1,2}, 何玲¹, 梁桂益¹

(1. 广东大华动物保健品股份有限公司, 广东新兴 527400; 2. 肇庆大华农生物药品有限公司 ·

广东省兽用生物制品生物技术研究与应用企业重点实验室, 广东肇庆 526238)

[收稿日期] 2012-09-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 01-0014-04 [中图分类号] S852.659.2

[摘要] 通过将猪细小病毒 CG-05 株同步接种于 ST 细胞, 测定不同时间收获的病毒液的 TCID₅₀ 和 HA, 研究了 CG-05 株病毒在 ST 细胞上的增殖规律。病毒接种后镜检观察接毒细胞, 在接种病毒后 24 h, 即可在细胞较少的区域看到非常轻微的病变。测定病毒 TCID₅₀, 检测到接毒后培养 17 h 病毒已经明显增殖; 当培养到 40 h 左右, 其 TCID₅₀ 即接近高峰, 达到 $10^{-7.2}/0.1$ mL 以上, 并进入平台期; 继续培养, TCID₅₀ 最高可达到 $10^{-8.5}/0.1$ mL, 且直到 122 h 也不见明显降低。病毒 HA 价也出现同样的平台期, 但比 TCID₅₀ 的平台期出现得晚, 到 50 h 才进入平台期。结果表明, 用 ST 细胞培养 CG-05 株病毒, 接种病毒培养 56 ~ 96 h 后, 如病变达到 80% 以上, 且细胞脱落已形成 20% 以上空斑, 此时收获病毒可获得高效价的病毒液。该研究可为制备高效价的 PPV 病毒抗原提供数据资料。

[关键词] 猪细小病毒; ST 细胞; 增殖规律

Replication Dynamics of Porcine Parvovirus CG-05 Strain in ST Cell Culture

TANG Man-hua^{1,2}, CHEN Rui-ai^{1,2}, HE Ling¹, LIANG Gui-yi¹

(1. Guangdong Dahuanong Animal Health Products Co. Ltd, Xinxing, Guangdong 527400, China; 2. Guangdong Enterprise Key Laboratory of

Biotechnology R&D of Veterinary Biological Products, Zhaoqing DaHuaNong Biological Medicine Co. Ltd, Zhaoqing High-tech

Development Zone, Zhaoqing, Guangdong 526238, China)

Abstract: The growth property of porcine parvovirus CG-05 strain in ST cells was studied by TCID₅₀ and HA test. The results indicated that slight CPE could be observed and the TCID₅₀ also rose obviously in 17 h after the virus be added into the cell culture. The TCID₅₀ was near to the peak and soon reached a plateau phase (above $10^{7.2}/0.1$ mL) after about 40 h of culture. The TCID₅₀ could reach $10^{8.5}/0.1$ mL by the most with no obvious dropping until 122 h. HA titer also rose with the culture time and soon reached a plateau phase in 50 h after the virus be added into the cell culture. According to the results, using ST cells to propagate porcine parvovirus CG-05 strain, high TCID₅₀ and HA titer virus could be gotten in 56 to 96 h after inoculation, when above 80% cells of the culture appeared CPE and 20% of which detached from the bottle wall and appeared plaque. The research could give data support for the preparation of high titer PPV antigen.

Key words: porcine parvovirus; ST cell; replication dynamics

猪细小病毒 (Porcine parvovirus, PPV) 引起的猪细小病毒病是母猪繁殖障碍病之一, 在我国的流

行已经非常普遍。PPV 的体外培养, 所用细胞主要有 PK15 细胞和 ST 细胞。因 PPV 的增殖条件比较

特别,需要正处于有丝分裂过程中的细胞的辅助,因此要获得病毒含量高的细胞培养物和使细胞出现比较明显的病变,需要在多数细胞处于旺盛的有丝分裂期或在此之前接种病毒^[1]。本实验主要是通过将 PPV 同步接种于 ST 细胞,然后在不同培养时间点分批收获细胞培养物的上清液,测定病毒 HA 和 TCID₅₀,以了解 PPV 培养物的病毒含量,从而了解病毒在 ST 细胞内同步接种培养的增殖规律,为科研和疫苗生产中制备高毒价的 PPV 病毒抗原提供数据资料。

1 材料

1.1 细胞和毒株 ST 细胞,购自中国兽医药品监察所;PPV(CG-05 株)种毒,TCID₅₀ 10^{-7.8}/0.1 mL,由广东大华农动物保健品股份有限公司保存。

1.2 主要试剂 胰蛋白酶、DMEM 培养基均为 Gibco 公司产品;胎牛血清,分别为 Gibco 公司和 Hyclone 公司产品。

1.3 ST 细胞培养液 含 10% 胎牛血清和 1% 庆大霉素(10 mg/mL)的 DMEM 营养液,用 NaOH 调 pH 为 7.2~7.6。

2 方法

2.1 细胞的培养及病毒接种 按常规细胞培养方法培养细胞^[2]。取传代后生长 48~54 h 的细胞,按 1:3 的比例连续传代培养。病毒接种时,在分散后的细胞悬液中按万分之一的剂量加入 PPV 病毒,混匀后接种 24 孔板,1 mL/孔。置 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养。分别用 Gibco 公司和 Hyclone 公司的胎牛血清进行病毒培养,以同时比较两种血清培养对 ST 细胞增殖 PPV(CG-05 株)的影响。第一次试验的接毒细胞为种细胞生长 54 h 传代的,第二次试验的接毒细胞为种细胞生长 48 h 传代的。

2.2 病毒收获 第一次试验是在病毒接种后 17、20、23、26、29、32、41、44、47、50、53、56、65、68、71、74、77、80 h 分别收获 3 孔接毒细胞的上清液。第二次试验是在病毒接种后 23、26、29、32、35、38、47、50、53、56、59、62、71、74、77、80、95、98、101、104、119、122 h 分别收获 3 孔接毒细胞的上清液,各时间点收集的病毒液混合后分装,-20℃ 保存备检。

2.3 HA 效价测定 在 96 孔微量板中每孔加入 25 μL 0.1 mol/L 的 PBS,再将 25 μL 待检样品加入到第一孔,然后作 2 倍比稀释到第 11 孔,第 11 孔混匀后弃掉 25 μL,第 12 孔作空白对照。最后每孔加

入 25 μL 0.5% 的豚鼠红细胞,室温放置 1 h 后判定结果,以完全凝集的最高稀释孔为该样品的凝集价。

2.4 病毒 TCID₅₀ 测定 将待检的病毒液用含 10% 胎牛血清和 1% 庆大霉素的 DMEM 作 10 倍系列稀释,取 10⁻⁶~10⁻⁹ 4 个稀释度接种已长成良好的 ST 细胞单层的 96 孔细胞板,每个稀释度分别接种 8 孔,0.1 mL/孔,同时设立健康细胞对照,置 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养,接种后第 3 天初判,第 6 天至第 7 天终判。按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

2.5 数据处理 将两次试验的样品测定结果分别做出折线图。同时,将两次所得的 TCID₅₀ 数据合并,同一时间点有多个数据的取其平均值,整理成接毒后培养 17、20、23、26、29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、95、98、101、104、119 和 122 h 等系列时间点对应的 TCID₅₀ 数据并制作折线图。

3 结果与分析

在接毒后 24 h 可在细胞较稀的区域看到非常轻微的病变,从病毒 TCID₅₀ 测定结果也可以看出,接毒后 17 h,病毒已经明显增殖(见图 1)。32 h 可在细胞较稀的区域看到比较明显的病变,40 h 可看到的明显病变达 30%~50%,48 h 病变达 70% 以上,并可以看到较稀的区域出现空斑(占细胞单层的 5% 左右),整个细胞单层细胞变单薄。到 53 h,病变可达 80% 以上,脱落出现的空斑在 10% 左右。

第一次试验的结果(图 1)表明:病毒培养到 41 h,病毒的 TCID₅₀ 就达到 10^{-7.2}/0.1 mL 以上,最高可达到 10^{-8.3}/0.1 mL 以上。经统计分析,在 41~80 h 内收毒,不管是用 Gibco 血清还是用 Hyclone 血清培养的,其变异系数都在 5% 以内。

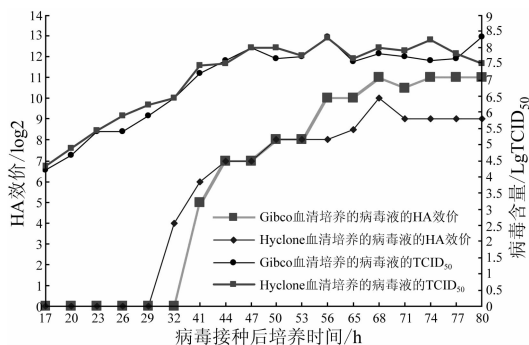


图 1 第一次试验两种培养基对病毒 TCID₅₀ 和 HA 效价的影响

第二次试验的结果(图2)表明:病毒培养到26 h,病毒的TCID₅₀就达到 $10^{-7.2}/0.1$ mL以上,最高可达到 $10^{-8.5}/0.1$ mL。经统计分析,在38~122 h内收毒,不管是用Gibco血清还是用Hyclone血清培养,其变异系数都在5%以内。

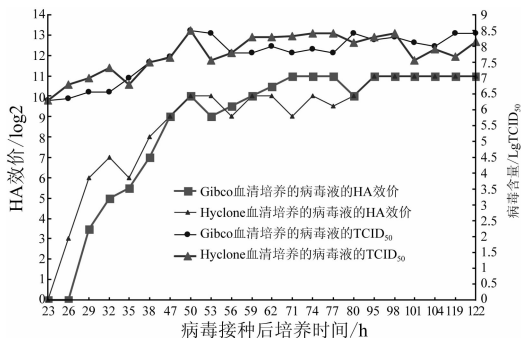


图2 第二次试验两种培养基对病毒TCID₅₀和HA效价的影响

单独分析每次试验结果,病毒滴度均有较明显的上升阶段和平台期。病毒滴度在进入平台期后,在122 h之内,并没有明显的下降趋势。从两次试验结果的综合分析看,病毒滴度也有明显的上升期和平台期,在122 h内也没有下降的趋势(见图3)。

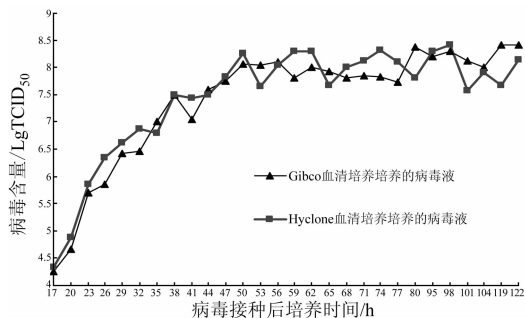


图3 两次试验数据合并处理后的TCID₅₀曲线图

HA效价测定结果则表明,在病毒接种后23 h内,HA效价为0;第一次试验结果表明,病毒接种后56 h,HA效价才到9log₂以上;第二次试验结果则表明,病毒接种后47 h,HA效价才到9log₂以上,培养到80 h以后,HA效价均达11log₂。

从两次试验结果的数据还可以看到,同一时间点收获的病毒液,第二次试验的病毒滴度和HA要比第一次试验的高,高峰值也要高(图1和图2)。病变过程观察看,第一次试验病变进程(开始出现细胞脱落,形成空斑的时间)要比第二次慢,主要原因可能是,第一次试验的细胞是种细胞生长54 h再传代的,而第二次试验的细胞是种细胞是生长

48 h传代的,所以第二次试验接种的细胞的密度比第一次要小,细胞接种量少。这也提示我们,病毒接种时接毒细胞的密度可能对病毒的滴度有影响。

4 讨论与结论

PPV可以用多种细胞培养,且能形成不同的细胞病变特性^[3-4]。倪娇等报道称生产中培养PPV多用PK15细胞^[5],但本项目组在用本实验室保存的PK15细胞培养PPV CG-05株时,却观察不到细胞病变,以致于难于判断病毒是否在细胞中得到增殖。而用ST细胞培养却病变明显,因此本项目选择用ST细胞培养PPV CG-05株。

根据感染后细胞的病变程度,可以作为病毒收获的依据。但如果不了解该毒株的病变特性和规律,或因设备限制等原因,病变难以观察,就会错过收毒最佳时机,甚至会丢失病毒。魏战勇等^[6]研究PPV南京毒株1(NJ-1)时,就发现PPV NJ-1病毒用PK15细胞在37℃培养,病毒半衰期为7 h。因此,在抗原制备中,通过分析病毒的增殖规律并结合病变程度进行收毒,比仅凭病变程度一个指标进行收毒,更具有可操作性和有效性。

本文对PPV(CG-05株)病毒按照0.01%的剂量同步接种ST细胞,测定不同时间所收获病毒的TCID₅₀和HA效价。因试验设计各次收毒时间间隔较短,而第一次收毒至最后一次收毒之间跨越的时间又较长,单次试验很难满足在晚上23:00至第二天上午8:00之间的时间点收毒,为避免通宵加班,又保持收毒时间的连续性,试验分两次进行,在两个不同的时间接毒,以错开收毒时间,保证在接毒后17~80 h内每3 h均有一次收毒。

试验结果表明,在接毒后40 h至80 h收获病毒,得到的病毒感染活性都很好,甚至延迟到122 h收毒,病毒滴度也不见明显降低。TCID₅₀测定结果显示,病毒接种后41 h~122 h,TCID₅₀均达到 $10^{-7.2}/0.1$ mL以上。但是HA效价测定结果显示,至少要培养47 h以上,甚至到56 h收获病毒,HA效价才达到9log₂以上的较高水平。收获时间太早,虽然TCID₅₀达到较高的水平,但HA效价却还没有达到较高水平。

PPV(CG-05株)用ST细胞培养,病毒TCID₅₀值平台期的出现要早于病毒HA效价平台期的出现。到一定时间,TCID₅₀值再没有明显的上升,但

(下转第22页)

产生及药物的残留,而且能全面提高机体的免疫力及疾病的治疗效果。因此,该免疫增强剂克服了抗生素及其他制剂的不足,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 张耀武,郑建武,李文辉,等.复方中草药制剂对黄颡鱼生长和非特异性免疫功能的影响[J].水产科学,2010,29(4):225-228.
- [2] 高吉青,刘升发,韩伟,等.胸腺素a原作为约氏疟原虫疫苗免疫佐剂的初步研究[J].中国免疫学杂志,2011,27:552-555.
- [3] 李树鹏,郝艳霜,欧阳五庆.黄芪多糖与紫锥菊提取物纳米乳的制备及免疫佐剂效应研究[J].西北农林科技大学学报,2011,39(10):10-16.
- [4] 郭玉娟,陈学年.A3a肽聚糖对受免彭泽鲫免疫应答影响的研究[J].中国预防兽医学报,2006,36(1):33-36.
- [5] 董晓庆,曲桂娟,程培英.苷肽注射液对猪免疫器官及血液指标的影响研究[J].中国兽药杂志,2010,44(1):35-37.
- [6] 曲桂娟,董晓庆,王延卓,等.苷肽注射液对犬外周血CD⁺₄、CD⁺₈比值的影响[J].中国兽药杂志,2011,45(10):10-11.
- [7] 曲桂娟,董晓庆,王延卓,等.苷肽注射液对犬淋巴细胞转化

试验[J].中国兽药杂志,2010,44(12):12-13.

- [8] 袁玉仲,袁正东,李晓华,等.芪黄素和转移因子对蛋鸡新城疫疫苗免疫效果的影响[J].中国家禽,2012,14(34):67-71.
- [9] 曲桂娟,程培英,董晓庆,等.苷肽注射液对猪生产性能的影响[J].安徽农业科学,2009,37(26):12575-12588.
- [10] 曹瑞兵,周国栋,陈溥言.猪 α 干扰素对猪圆环病毒2型亚单位疫苗免疫效果的影响[J].畜牧兽医学报,2009,40(6):867-872.
- [11] 王艳,王新卫,周欣,等.干扰素对新城疫灭活苗抗体滴度的影响[J].安徽农业科学,2008,36(31):13639-13640.
- [12] 李志中,凌红丽,高亚东,等.鸡 γ -干扰素联合新城疫活疫苗对肉鸡免疫效果的研究[J].中国动物检疫,2009,26(11):37-39.
- [13] 解希帝.猪 α 、 β 、 γ 干扰素在新城疫病毒La Sota株中的高效稳定表达及抗病毒活性研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.
- [14] 杨华.猪白细胞干扰素治疗小鹅瘟效果观察[J].中国兽医杂志,2000,26(2):54.
- [15] 侯云德.干扰素研究进展[J].医学分子生物学杂志,1979,(4):77-79.

(责任编辑:侯向辉)

(上接第16页)

HA效价仍然在上升。分析原因,可能是TCID₅₀的测定时病毒是10的倍数系列稀释,而HA效价的测定是病毒的2倍系列稀释,也抑或是病毒装配完全成熟的病毒粒子与装配具有感染力的病毒粒子的过程所需时间不一致,也就是说,可能病毒具有感染力时,其装配不一定是完整的,至少凝聚素可能还没有完全装配“齐全”或空间构象还没有展开。因此,为得到高质量的PPV(CG-05株)病毒抗原,单凭TCID₅₀测定或HA效价测定一个指标来评判可能存在不足,需综合考虑。

在用ST细胞同步接种PPV(CG-05株)病毒时,病毒接种后56~96h之间收毒,比较稳妥可行。在56~96h之间,如果病变达到80%以上,且细胞脱落已形成20%以上空斑,即可收获。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第2版.北京:科学出版社,1997:1145-1155.
- [2] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].第1版.西安:世界图书出版西安公司,2004:78-80.
- [3] 殷华平,郭万柱,徐志文,等.猪细小病毒(PPV)SC1株的分离鉴定[J].黑龙江畜牧兽医,2006,7:63-65.
- [4] 庄金秋.猪细小病毒在不同组织细胞上增殖特性的研究[J].现代畜牧兽医,2005,7:47-48.
- [5] 倪娇,赵建增,刘长辉,等.猪细小病毒在PK15细胞中增殖规律的研究[J].中国兽药杂志,2009,43(1):21-24.
- [6] 魏战勇,崔保安,黄克和,等.猪细小病毒在PK细胞中的增殖过程[J].中国兽医学报,2005,25(5):453-455.

(责任编辑:李文平)