

唐波,张道华,张雪花,等.猪细小病毒在 ST 细胞中增殖规律的动态分析[J].江苏农业科学,2015,43(12):247-249.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.078

猪细小病毒在 ST 细胞中增殖规律的动态分析

唐波,张道华,张雪花,常晨,刘国阳,王永帅,唐应华,华涛,侯继波

(江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014)

摘要:将猪细小病毒接种于 ST 细胞,于不同时间点收获病毒测定其病毒滴度与病毒拷贝数,以此分析该病毒在 ST 细胞上的增殖规律。细胞于感染后 48 h 开始出现细胞病变,84 h 细胞出现脱落和崩解。TCID₅₀ 结果显示,病毒感染后 18 h 即能检出病毒滴度,随后逐渐升高至 72 h 达到峰值($10^{7.2}$ /mL),其后逐渐下降。通过 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法测定不同时间病毒体外感染细胞后的复制动态水平,病毒含量的增长于 108 h 达到峰值随后逐渐下降。通过对 PPV 在 ST 细胞中的体外复制动态分析结果表明感染后 96~108 h 为最佳收毒时间,这为利用细胞增殖病毒生产疫苗提供重要参考。

关键词:猪细小病毒;ST 细胞;SYBR Green I 实时定量 PCR;病毒复制

中图分类号: **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0247-02

猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)是引起母猪繁殖障碍的主要病原之一。属于细小病毒科细小病毒属,可引起母猪的繁殖障碍性疾病等。PPV 最早出现于欧洲,Cartwright 等在 1967 年对猪的不孕、流产、死胎等进行病原学研究时,从病料中分离出了猪细小病毒,从而首次证明了它的致病作用^[1]。目前猪细小病毒在世界上很多国家和地区流行,我国在 1983 年由潘雪珠等首次分离到 PPV^[2]。猪细小病毒病常见于初产母猪,该病分布广泛,30%~50% 的 PPV 抗体阳性猪是带毒者^[3]。猪细小病毒病在我国的流行呈上升趋势,已有许多地区分离出了猪细小病毒,血清学调查阳性率高达 80%,给养猪业造成了巨大的经济损失^[4]。

疫苗免疫仍是目前控制猪细小病毒病流行的最有效方法,国内市场 PPV 疫苗目前仍以灭活疫苗为主^[5-7]。常用来培养猪细小病毒的细胞主要是 PK-15 和 ST 细胞,在目前国内疫苗生产中,多使用 ST 细胞来增殖病毒^[8-10]。了解并掌握该病毒在 ST 细胞上体外增殖的方法和规律从而把握最佳收获时机获得高滴度 TCID₅₀ 在生产应用过程中尤为重要。本试验利用实时 PCR 方法在不同时间点准确测定病毒复制的拷贝数,从而了解病毒的体外复制动态,目的是通过对 PPV 在 ST 细胞上增殖的动态分析为猪细小病毒疫苗的生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 毒株和细胞

收稿日期:2014-11-29

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(11)2047];江苏省科技支撑计划(编号: BE2012370)。

作者简介:唐波(1982—),男,江苏海安人,硕士,助理研究员,主要从事动物分子病原学及免疫学研究。Tel: (025) 84392058; E-mail: 2005107058@163.com。

通信作者:张道华(1962—),男,湖南长沙人,硕士,研究员,主要从事动物分子病原学及免疫学研究。Tel: (025) 84392058; E-mail: zhangdh2005@163.com。

ST 细胞系(购买自 ATCC)及 PPV-NJ 株均由江苏省农业科学院保存。

1.2 主要试剂及仪器

本试验所用 DMEM 培养液、新生牛血清为美国 Gibco 公司产品, Taq 酶为 TaKaRa 公司产品, SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 购自宝生物工程(大连)有限公司, Light cycle 480 II 荧光定量 PCR 仪为 Roche 公司产品。

1.3 试验设计

用 DMEM 培养液加 10% 新生牛血清作为 ST 细胞的培养液(pH 值为 7.2),置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养;0.1% 胰酶消化细胞,传代 7 h 后,按 1% 比例接种 PPV 病毒并同时换含有 2% 小牛血清的 DMEM 培养液。分别于感染 18、24、30、36、42、48、60、72、84、96、108、120、120 h 取样,分别测定不同时间点收获液的 TCID₅₀ 并用建立的 Real-time PCR 检测相应的病毒核酸拷贝数,根据检测结果绘制 PPV 在 ST 细胞上的增殖动态曲线。

1.4 病毒毒价测定

将 ST 细胞稀释成 $10^5 \sim 10^6$ 个/mL 之后铺于 96 孔培养板中,0.1 mL/孔;将不同时间段的病毒液进行连续 10 倍稀释,每个稀释度分别接种于 10 孔,0.1 mL/孔,并用 DMEM 培养液做细胞对照,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每天观察细胞病变并记录,按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

1.5 PPV 在 ST 细胞中病毒核酸拷贝数的检测

1.5.1 阳性标准质粒的构建

1.5.1.1 引物的设计与合成 参照 GenBank 上登录的基因序列,设计扩增 PPV-NSI 的引物, P1: CGCGGATCCATG-GCAGCGGGAAACACTTACT; P2: CCCAAGCTTTTATTCAAG-GTTTGTTGTGGGTCC。

1.5.1.2 阳性重组质粒的构建及拷贝数浓度的计算 按照常规方法构建 PPV NSI 基因的荧光定量阳性标准质粒。使用核酸紫外分光光度计测定阳性重组质粒核酸浓度,计算出 1 μL 所含的 DNA 拷贝数。选取阳性质粒作为构建 Real-time PCR 方法的模板质粒。

1.5.2 Real-time PCR 标准曲线的建立

1.5.2.1 引物设计 应用软件 DNASTar 分析 PPV 全基因组序列, 设计 2 对特异性荧光引物。F1: CAACTACGCAG-CAACTCCAATCA; F2: ATCAAAGCAGGCTCTTATGTCG。

1.5.2.2 Real-time PCR 反应条件 根据宝生物 Premix Ex Taq 试剂盒说明书, 用所构建的阳性重组质粒对 PCR 反应的退火温度、引物浓度等进行初步优化; 确定反应体系; 根据重组质粒拷贝数浓度进行 10 倍比稀释, 选取合适浓度范围 ($10^1 \sim 10^8$ 拷贝/ μL), 每个浓度梯度设立 3 个重复样本进行 Real-time PCR 反应来建立标准曲线。反应体系 20 μL : SYBR Green I PreMix 聚合酶 10 μL , 上下游引物各 0.4 μL , 模板 2 μL , 补水至 20 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 s, 扩增 40 个循环。反应结束后, 分析溶解曲线, 根据各浓度组对应的重复样本循环阈值 C_T 值, 绘制标准曲线, 并计算扩增效率。

1.5.3 PPV 样品检测 收取感染后不同时间样品 (每个样品 3 个重复孔), 反复冻融 3 次后提取病毒 DNA 待检, DNA 提取方法按照试剂盒说明书提取。以提取的病毒 DNA 为模板进行 Real-time PCR, 以建立的 PPV 标准曲线计算病毒核酸拷贝数。

2 结果与分析

2.1 Real-time PCR 标准曲线的建立

按照正常条件, 将重组质粒进行 10 倍比稀释, 选取合适浓度范围 ($10^1 \sim 10^8$ 拷贝/ μL), 进行 Real-time PCR, 每个浓度做 3 个重复样品, 通过 LightCycler 480 software release 1.5.0 SP3 软件进行数据分析, 建立标准曲线。PPV 标准曲线的截距为 38.18, 斜率为 -3.297, 扩增效率为 98%, 呈现良好的线性关系从而得到拷贝数 x 与循环阈值 C_T 之间的线性关系曲线表达式: $C_T = -3.297x + 38.18$ 。结果显示标准曲线 r^2 为 0.999, 重复性好, 可用于计算待测样品的拷贝数。

2.2 TCID₅₀ 测定

接毒 5 d 观察, 待细胞出现明显的 CPE 后, 统计并按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。结果显示, 细胞于感染后 48 h 开始出现细胞病变, 84 h 细胞出现脱落和崩解。在 18~72 h, 病毒增殖呈指数型增长, 滴度逐渐升高, 在 72 h 时病毒滴度达到最高值。感染 84 h 后, 细胞开始逐渐融合、裂解和死亡, 病毒的 TCID₅₀ 开始下降直到 132 h (图 1)。

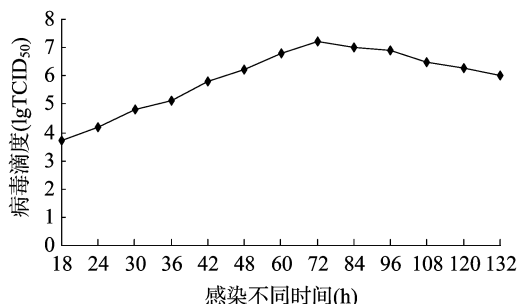


图1 PPV 在 ST 细胞中的生长曲线

2.3 PPV 在 ST 细胞上病毒拷贝数动态变化

本试验利用 Real-time PCR 方法检测 PPV 感染 ST 细胞后在 18、24、30、36、42、48、60、72、84、96、108、120、132 h 病毒

核酸拷贝数的变化。根据 PPV NSI 基因的标准曲线换算出模板的病毒拷贝数。图 2 的检测结果显示, PPV-NJ 株感染 ST 细胞后 24 h 之后内开始增长, 36 h 开始迅速增殖, 核酸拷贝数呈指数显著增长到 96 h 时病毒达到最高峰。随后病毒 DNA 核酸拷贝数增长变缓, 接毒 108 h 后病毒 DNA 核酸拷贝数下降, 此时细胞病变达 100% 以上, 大量细胞裂解死亡。

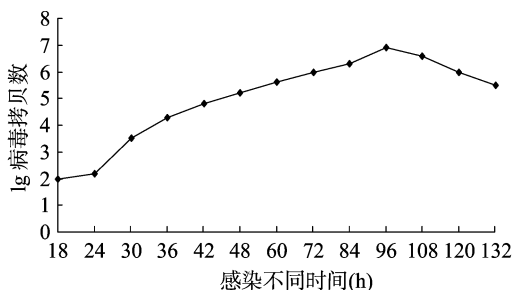


图2 PPV 在 ST 细胞上感染不同时间 PPV 病毒核酸拷贝数的变化

3 讨论

PPV 疫苗质量的优劣与其抗原含量有密切关系。病毒收获时间则是影响抗原含量至关重要的因素, 如不能掌握病毒在细胞上的增殖规律, 将难以准确把握收获时间从而生产出优质的疫苗。因此, 了解 PPV 的体外复制动态规律对于确定最佳接种方法、感染复数及接毒和收毒时间从而对制备疫苗提供高效价的病毒液具有重要意义。顾帅等在 PK-15 上研究表明, 接毒后 108 h 培养液中病毒含量达到峰值, 随即病毒含量开始快速下降。细胞内病毒粒子在接毒后 24 h 内为对数增长期, 然后为缓慢增长期, 至接种后 72 h 达到复制峰值, 并维持至 108 h^[11]。魏占勇等报道 PPV 感染 PK-15 细胞后 12 h 病毒开始快速增殖, 24 h 病毒开始快速释放, 60 h 细胞中病毒含量达到最高, 72 h 培养上清中病毒含量达到最高^[12]。马慧慧等在 IBRS-2 细胞上研究表明, PPV 接种到 IBRS-2 细胞后, 12 h 病毒量开始升高, 大约在 72 h 病毒量达到最高值, 之后明显下降, 因此生产上应在 72 h 左右及时收毒^[13]。

本研究通过测定 TCID₅₀ 绘制 PPV 在 ST 细胞上增殖的生长曲线可以看出, PPV 病毒在感染 18 h 时, 病毒滴度就开始增加, 72 h 时病毒滴度达最高, 随着细胞开始出现聚集、融合等细胞病变, 滴度开始下降, 在 84 h 时后病毒滴度下降明显。利用 SYBR Green 实时 PCR 方法检测病毒 DNA 的拷贝数发现接毒后 24 h 拷贝数开始缓慢上升, 接毒后 36 h 开始快速复制核酸拷贝数呈指数显著增长, 接毒后 96~108 h 仍然维持较高的拷贝数。然而, TCID₅₀ 检测结果表明 72 h 时的病毒滴度才是所有检测时间点的最高值, 显然通过观察 CPE 测定 TCID₅₀ 的含量来确定收获时间并不能准确反映出灭活疫苗当中抗原的有效含量。因此, 猪细小病毒在 ST 细胞上增殖后 96~108 h 应为最佳收毒时间。

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 1150-1155.

赵永前,孙华伟,何孔旺,等.后备母猪入群前的抗体筛查在某规模化猪场的应用[J].江苏农业科学,2015,43(12):249-250.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.079

后备母猪入群前的抗体筛查在某规模化猪场的应用

赵永前,孙华伟,何孔旺,茅爱华,蒋晨慧,张敬峰

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014)

摘要:为了探索后备母猪入群前进行猪瘟和猪伪狂犬病毒 gpI(野毒)抗体的筛查在猪场实际生产中对初产母猪生产成绩的影响,2014 年 5 月对安徽省和县某规模化猪场的 36 头后备母猪随机等分为 2 组,试验组在入群前进行上述 2 种抗体的检测,对猪瘟抗体不合格、猪伪狂犬 gpI 抗体阳性的后备猪不予入群,试验组不进行检测直接入群。待此批后备母猪妊娠结束,试验组和对照组的窝平活健仔数分别为 10.42、9.78 头;28 日龄平均断奶质量分别为 6.94、6.49 kg,差异显著;断奶育成率分别为 98.63%、96.02%,差异不显著。在后备母猪入群前进行猪瘟和猪伪狂犬 gpI 的抗体筛查能显著提高初产母猪的窝平活健仔数、平均断奶质量。

关键词:猪瘟抗体;伪狂犬病病毒;初产母猪

中图分类号: S858.285.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0249-02

猪瘟(CSF)是由猪瘟病毒(CSFV)引起的一种高度接触性传染病^[1]。由于我国一直重视猪瘟的防治,自 1956 年制定以免疫猪瘟兔化弱毒疫苗为主的猪瘟消灭计划以来,大规模的猪瘟暴发已经停止^[2]。近年来,随着养猪规模的不断扩大,饲养管理水平参差不齐,猪瘟在各地的发病率呈上升趋势。保持猪群处于较高的群体免疫水平,是规模化猪场有效防控猪瘟的重要手段。猪伪狂犬病(pseudorabies)是由伪狂犬病病毒引起的一种急性传染病。伪狂犬病病毒感染猪可以引起种猪的繁殖障碍,产弱仔,新生仔猪表现为共济失调、抽搐,甚至突然死亡等^[3]。通过抗体筛查,保证入群后备猪的猪伪狂犬野毒 gpI 抗体阴性是种猪群伪狂犬病净化的有效方法。目前很多猪场在后备猪选育上普遍存在误区,即仅仅注重后备猪的体质量、背膘厚,却忽视了入群前主要疫病抗体水平的筛查。后备母猪入群前的抗体筛查可为规模化猪场疫病防

控和种猪群净化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

猪瘟病毒抗体检测试剂盒(CSFV Ab)、猪伪狂犬病毒 gpI 抗体检测试剂盒(PRV gpI Ab)购自美国 IDEXX 公司,宝特 ExL 800 型酶标仪(美国宝特公司),Centrifuge 5424 R 型冷冻离心机,各种规格移液器(德国 Eppendorf 公司),恒温箱水浴锅等。

1.2 血清来源与检测时间

将安徽省和县某规模化猪场的 36 头后备母猪随机等分为 2 组,试验组在入群前应用猪瘟病毒抗体检测试剂盒、猪伪狂犬病毒 gpI 抗体检测试剂盒进行上述 2 种抗体检测,对猪瘟抗体不合格、猪伪狂犬野毒抗体阳性的后备猪不予入群,试验组不进行检测直接入群。该猪场后备母猪猪瘟的免疫程序为:配种前 3 周、配种前 7 周分别免疫 1 次某生物制品厂的猪瘟 ST 传代细胞苗,按 2 头份/头进行肌注免疫。猪伪狂犬病免疫程序为:配种前 4 周、配种前 8 周分别免疫 1 次某进口猪伪狂犬 gE 基因缺失苗,按 1 头份/头进行肌注免疫。于 2014 年 5 月在江苏省农业科学院兽医研究所动物疫病诊断检测中

收稿日期:2014-12-05

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(13)3075]。

作者简介:赵永前(1973—),男,江苏东台人,硕士,副研究员,主要从事动物疫病的诊断和检测研究及临床技术服务工作。E-mail:15996263206@163.com。

[2]潘雪珠,刘洪云,严仲烈,等.猪细小病毒 S-1 毒株的分离和鉴定[J].上海畜牧兽医通讯,1983(1):1-3.

[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]崔鹏超,何玉,刘捷,等.新型猪细小病毒感染的分子流行病学调查[J].畜牧与兽医,2014,46(4):1-8.

[5]张婉华,彭丽英,张春玲,等.猪细小病毒疫苗研究进展[J].上海畜牧兽医通讯,2014(3):22-23.

[6]王冠,代小芳,谢之景.猪细小病毒的研究进展[J].山东畜牧兽医,2012,33(1):78-80.

[7]焦茂兴,郭春和,黄毓茂.猪细小病毒结构蛋白 VP2 及其疫苗的研究进展[J].中国畜牧兽医,2011,38(10):231-234.

[8]唐满华,陈瑞爱,何玲,等.猪细小病毒 M2 株在 ST 细胞中培养

条件优化[J].现代畜牧兽医,2013(10):55-60.

[9]吴云飞,朱玲,徐志文,等.猪细小病毒 PK-15 细胞适应株的培育及增殖特性[J].病毒学报,2013,29(4):357-363.

[10]朱绍辉,张述智,单虎,等.猪细小病毒 X 株在不同细胞上增殖效果比较[J].东北农业大学学报,2012,43(6):6-10.

[11]顾帅,陈陆,常洪涛,等.SYBR Green I 实时 PCR 对猪细小病毒体外复制动态分析[J].中国兽医学报,2012,32(3):350-354.

[12]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.

[13]马慧慧,薛霜,陈其兵,等.利用荧光定量 PCR 检测猪细小病毒在 IBRS-2 细胞增殖动态研究[J].中国兽药杂志,2013,47(10):1-5.