

猪瘟病毒 C 株兔脾毒在 SK6 细胞中的增殖培养及其鉴定*

张森涛^{1,2}, 冯霞¹, 刘湘涛^{1**}, 张彦明², 谢庆阁¹

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所畜禽疫病重点实验室, 甘肃兰州 730046; 2. 西北农林科技大学, 陕西杨凌, 710021)

The Culture Characteristics of Classical swine fever virus C-strain(Derived from Spleen) in SK6 Cell and Its Detection

(1. Lanzhou Veterinary Research Institute, Lanzhou 730046, China; 2. North-West Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yanling 710021, China)

Abstract: Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), direct florescent antibody staining, and RT-PCT were used to detect growth characteristics of *Classical swine fever virus C-strain* (Derived from Spleen) in SK6 cell. The results indicated than C-strain (Derived from Spleen) can grow in SK6 cell at a lower level. Direct florescent antibody staining method was not suitable for the detection of attenuated lapinized C-strain. The study provided a primary guide for the detection of attenuated classical swine fever virus. It also supplies an elementary foundation for the study of its growth characteristic in SK6.

Key words: *Classical swine fever virus*; C-strain; Multiplication culture; Detection.

关键词: 猪瘟病毒(CSFV); C 株; 增殖培养; 鉴定

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0404-03

猪瘟病毒 (*Classical swine fever virus*, CSFV) 是猪的最重要传染病之一, 给养猪业造成巨大经济损失。传统疫苗 C 株在猪瘟防治中曾发挥了巨大作用, 但由于猪瘟病毒逐渐产生变异, 同时使用传统疫苗无法区分自然感染动物和免疫动物, 从而使传统疫苗的应用受阻。因此十分必要研制新型猪瘟疫苗。用适宜的宿主细胞培养猪瘟传统弱毒疫苗 C 株, 通过灵敏可靠的方法检测病毒在宿主细胞中的感染, 是研究猪瘟病毒 C 株的一个重要基础环节。研究者多选用适应 SK6 细胞的 C 株细胞毒进行研究, 对 C 株兔脾组织毒在 SK6 细胞中的增殖培养未见报道。此外, 由于 CSFV 弱毒株在体外培养细胞中的增殖滴度较低, 且一般不引起细胞病变效应, 给体外培养细胞病毒感染的鉴定造成不便, 因此, 建立其可靠灵敏的检测方法十分重要。本研究以猪瘟病毒 C 株兔脾 (组织) 毒为对象, 通过对不同传毒代次细胞的病毒抗原和核酸的检测, 初步研究了 C 株兔脾组织毒在 SK6 细胞中的适应性和增殖特性, 以便为

后续的反向遗传操作系统的建立奠定可靠基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

CSFV C-株脾淋毒采用中国农科院兰州兽医研究所保存的种毒(中国兽药监察所的兔脾淋组织毒第 480 代)。宿主细胞采用兰州兽医研究所病毒室保存的 SK6 细胞系。细胞培养基采用 Hyclone 公司的 MEM。猪瘟荧光素标记抗体采用 FITC 标记抗体工作液(购自中国兽药监察所)。猪瘟病毒抗原检测采用 IDEXX 公司的 Classical Swine Fever Virus Antigen Test Kit。

1.2 病毒的提取

按照本实验室常规方法^[1]进行。

1.3 SK6 细胞的复苏和培养

取液氮冻存 SK6 细胞, 37℃ 迅速解冻, 用含有 5% 胎牛血清和双抗的 MEM 培养基, 37℃ 恒温常规培养。

收稿日期: 2004-01-05, 修回日期: 2004-02-24

* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划(G199901119)。

作者简介: 张森涛(1963-), 男, 陕西礼泉县籍, 在读博士生, 副教授, 主要从事动物生理学和病毒分子生物学研究。

** 通讯作者。Corresponding author; Tel: 0931-8342710; E-mail: Hnxiangtao@hotmail.com

1.4 细胞接毒和样品采集

设接毒组和对照组各 1 瓶细胞, 接毒组加入 0.5mL 病毒提取液和 9.5mL MEM 培养基, 对照组加入 10mL MEM 培养基, 37℃ 恒温培养。分瓶后留第 2 代、第 4 代和第 8 代细胞 4℃ 保存备用。另外在第 8 代的一瓶细胞中加入细胞飞片一张, 继续培养, 待细胞丰度达到约 80% 时进行荧光抗体染色。

1.5 病毒的检测

病毒抗原的直接荧光抗体检测: 参照文献^[1]方法进行荧光抗体染色, 镜检照相。

病毒抗原的夹心 ELISA 检测: 参照试剂盒操作说明, 反应终止后, 用 450nm 波长光测量待检样品和对照组的 OD 值。计算每个样品的 OD 校正值。

病毒 RNA 的 RT-PCR 检测: 对两组保存的第 2 代细胞进行检测, 反转录引物为 5'-GTAACACCT-GATTCTATCGCG3', PCR 扩增的上游引物为 5'-AT-CAGTTCAGTGGACCATGTC 3', 下游引物与反转录引物相同, 扩增区段位于猪瘟疫病毒 C 株基因组的 5330-6516 位, 长度 1187bp^[2]。电泳检测结果。

2 结果

2.1 直接荧光抗体染色结果

对两组细胞的各代细胞进行荧光染色和镜检, 下图为两组第 8 代细胞的直接荧光抗体染色照片: 从照片可见, 各组细胞均出现一定强度的染色, 用直接荧光抗体染色不能区分接毒组与对照组。

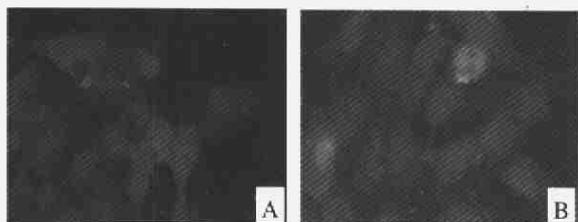


图 1 两组细胞的荧光抗体染色

Fig. 1 Fluorescence antibody staining of two groups

A: Fluorescence antibody staining of 8th passage of inoculated group. B: Fluorescence antibody staining of 8th passage of control group

2.2 病毒抗原的夹心 ELISA 检测结果

根据试剂盒说明, 标准阳性对照的 OD 值要求大于 0.500, 标准阴性对照的 OD 值不能大于标准阳性对照 OD 值的 20%, 试验结果符合要求。阳性判定的标准是 OD 校正值应大于 0.300, 可见, 接毒组的各代细胞都呈现阳性, 而对照组均为阴性。检测结果见表 1。

由结果可见, 试验组出现特异性扩增产物, 表现为阳性, 而对照组未出现相应产物, 表现为阴性。

表 1 接毒组和对照组各代细胞 ELISA 检测结果(450nm 的 OD 值)

Table 1 The results of ELISA test of inoculated group and control group

passage	OD or re- vised OD	Positive control	Negative control	Inoculated	Control
2 ed	OD	1.351	0.073	0.869	0.061
	revised OD	1.278	0.000	0.796	-0.012
4 ed	OD	1.348	0.071	0.868	0.077
	revised OD	1.277	0.000	0.797	0.006
8 ed	OD	1.359	0.073	0.872	0.065
	revised OD	1.286	0.000	0.799	-0.008

2.3 病毒 RNA 的 RT-PCR 检测结果

对 RT-PCR 产物进行电泳, 结果见图 3:

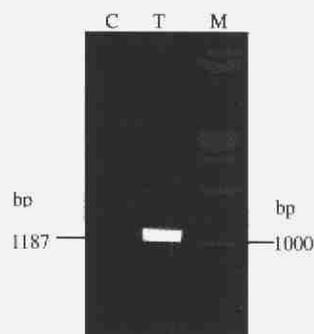


图 2 两组细胞 RT-PCR 检测结果

Fig. 2 The RT-PCR result of two groups

C. control, T. inoculated group, M. marker DL15000

2.4 讨论

猪瘟疫病毒 C 株是在世界范围内广泛应用的弱毒疫苗株, 国内外对 C 株细胞毒的研究报道较多, 但对于组织毒的研究报道较少。Mittelholzer 等(2000)对 CSFV 复制动力学进行了分析发现, 强毒株细胞结合病毒和分泌病毒的比例明显高于弱毒和中性毒株^[3]。在病毒检测上, 由于在体外培养细胞中的增殖滴度较低, 且不引起细胞病变效应, 因而无法从细胞形态的改变上判定病毒的感染和复制^[4]。本试验选用猪肾高代细胞系 SK6 作为 CSFV C 株兔脾组织毒的宿主, 通过接毒后的连续培养发现, 从第 2 代起, 夹心 ELISA 法检出的猪瘟疫病毒抗原表达稳定, 均呈现为阳性, 但其 OD 值明显低于阳性对照的 OD 值, 这一点与荷兰学者 Moormann 对 C 株细胞生长特性的研究报道一致^[5]。结果说明 C 株兔脾组织毒适宜在 SK6 细胞中生长培养, 但在 SK6 细胞中可能以较低速度生长。

研究者一般采用间接荧光抗体染色法检测猪瘟疫病毒。为了简化操作, 本试验采用了直接荧光抗体检测, 结果在接毒组和试验组中均出现染色, 但未发现两组的区别, 分析认为, 这些染色斑可能均

属于非特异染色, 未出现特异染色的原因可能在于弱毒株在细胞中病毒结合和分泌较少, 抗原表达量低下, 因而难以呈现明显的阳性反应, 提示猪瘟病毒直接荧光抗体染色法可能更适于强毒株或中性毒株的检测, 而用于检测弱毒疫苗株比较困难, 通过一定手段降低非特异荧光后^[1], 是否有助于阳性的检出有待进一步研究。

在 RT-PCR 检测中, 扩增病毒基因组 nt5330~nt6516, 该区段位于病毒基因组的中部, 具有一定代表性。通过扩增发现接毒组在第 2 代即出现特异性扩增产物, 对照组未出现, 该结果与 ELISA 的检测结果相同, 进一步证实了病毒的生长和复制。

猪瘟病毒 C 株具有特征性的兔体热反应, 可作为该病毒检测的一个重要手段^[6], 但必须对细胞毒进行提取、浓缩和纯化, 同时在接毒剂量上有待探索, 作者正在从事这方面的研究。

参考文献

- [1] 傅继华. 病毒学实用实验技术[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2001.
- [2] 胡建和, 刘湘涛, 张彦明. 中国猪瘟 C-株(脾淋毒)全长 cDNA 的分子克隆[J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(5), 490-493.
- [3] Mittelholzer C, Moser C, Tratschin J D, *et al.* Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains[J]. *Vet Microbiol*, 2000,74(4):293-308.
- [4] 王 镇, 陆 宇, 周鹏程, 等. 猪瘟病毒在 PK 细胞和 MPK 细胞中繁殖过程的研究[J]. 微生物学报, 1999, 39(3): 189-195.
- [5] Moormann R J M, Van Gennip H G P, Miedema G K W, *et al.* Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus[J]. *J Virol*, 1996, 70(2): 763-770.
- [6] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学(第 2 版)[M]. 北京, 科学出版社, 1997.