

伪狂犬病病毒鄂 A 株 gG⁻/LacZ⁺ 突变株 在不同细胞中增殖规律的研究

方六荣, 陈焕春, 肖少波, 何启盖, 吴美洲, 汪 超

(华中农业大学牧医学院动物病毒室, 武汉 430070)

关键词: 伪狂犬病病毒; 鄂 A 株 gG⁻/LacZ⁺ 突变株; 细胞; 增殖规律

中图分类号: S852.65⁺5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2002)04-0359-03

伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PrV)属疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科,能引起多种家畜及野生动物的伪狂犬病,尤其是猪的伪狂犬病,已成为危害当今养猪业的最严重的传染病之一。根据已成功根除伪狂犬病国家的经验以及伪狂犬病病毒分子生物学研究的新成果,种猪的免疫还是以灭活苗为主。但传统的灭活苗由于缺少检测标志,无法采用鉴别诊断方法区分疫苗免疫猪和野毒感染猪。而在目前广泛使用的三种基因缺失标志疫苗株(gG⁻、gE⁻、gC⁻)中,由于gG的缺失不影响免疫原性,因此,gG⁻灭活苗优于gE⁻、gC⁻灭活苗,更适合种猪的根除计划。鉴于此,本实验室以我国地方分离株鄂A株为亲本,成功地构建了鄂A株gG⁻/LacZ⁺疫苗株,临床试验效果相当理想。为了探讨该疫苗规模化生产的条件,本研究对该毒株的最适增殖细胞、最佳接毒剂量和收毒时间进行了研究。

1 材料和方法

1.1 毒株与细胞 PRV 鄂 A 株 gG⁻/LacZ⁺ 突变株由本室构建保存, BHK-21、PK-15、IBRS-2、MDBK 细胞由本室提供。

1.2 培养基 DMEM 培养基, GIBCO 公司产品。生长液加 10% 犊牛血清, 维持液加 5% 犊牛血清, 均含 100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素。

1.3 PRV 鄂 A 株 gG⁻/LacZ⁺ 突变株病毒的增殖与 TCID₅₀ 的测定 将冻干保存的毒种在 IBRS-2 细

胞上连传 3 代, 取第 3 代测其 TCID₅₀ 值。

1.4 空斑纯化 将测好 TCID₅₀ 值的病毒在 PK-15 细胞上空斑, 挑斑接种已长满单层 IBRS-2 细胞的 24 孔板, 待病变后分别测定各空斑的 TCID₅₀ 值, 然后选 TCID₅₀ 值最高的空斑进一步纯化, 如此纯化 4 次。

1.5 PRV 鄂 A 株 gG⁻/LacZ⁺ 突变株在不同细胞中引起病变的情况及增殖规律 取 4 次纯化后毒价最高的病毒以 0.01PFU/cell 的量分别接种 IBRS-2、PK-15、MDBK 和 BHK-21 细胞, 37℃ 吸附 1 h, 吸弃病毒液, 用 PBS 洗 2 次, 加入维持液, 摇匀后每种细胞各取出一瓶, 以后每隔 8h 各取一瓶, 一直到 96 h, 测定不同收取时间病毒的 TCID₅₀ 值。按上述步骤再重复实验 2 次。

1.6 PRV 鄂 A 株 gG⁻/LacZ⁺ 突变株不同接毒剂量对 IBRS-2 细胞感染试验 采用纯化后毒价最高的病毒分别以每细胞 100PFU、10PFU、1PFU、0.1PFU、0.01PFU、0.001PFU 6 个不同的剂量接种 IBRS-2 细胞, 37℃ 吸附 1 h, 吸弃病毒液, 用 PBS 洗 2 次, 加入维持液, 37℃ 温箱培养, 逐日观察细胞病变的情况, 待细胞完全病变后收毒测 TCID₅₀ 值。并重复实验 3 次。

2 结果

2.1 病毒的增殖与 TCID₅₀ 测定结果 将冻干的 PRV 鄂 A 株 gG⁻/LacZ⁺ 突变株在 IBRS-2 细胞上培养 3 代后, 测得 TCID₅₀ 值为 10^{-5.7}/0.1 ml。

2.2 病毒空斑纯化结果 取在 IBRS-2 细胞上传代 3 次的 PRV 鄂 A 株 gG⁻/LacZ⁺ 突变株病毒, 在 PK-15 细胞上进行空斑纯化 4 次, 每次选接种 24 孔板后病变典型的空斑 20 个进行 TCID₅₀ 滴定, 下一次纯化都是选上一次 TCID₅₀ 值最高的病毒进行。

收稿日期: 2001-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(39970559)和“九五”国家科技攻关计划生物技术项目(96-C01-04-03)

作者简介: 方六荣(1969-), 女, 汉族, 湖北咸宁人, 讲师, 主要从事病毒分子生物学的研究。

空斑纯化的结果见表 1。

表 1 PRV 鄂 A 株 $gG^- / LacZ^+$ 突变株空斑纯化的结果

Table 1 The results of plaque purification of the PRV Ea $gG^- / LacZ^+$

空斑纯化次数 Times of plaque purification	空斑数 Number of plaque	lg TCID ₅₀		
		最高值 Max	最低值 Mini	平均值 Mean
1	20	- 7.3	- 6.0	- 6.5
2	20	- 7.7	- 6.5	- 6.8
3	20	- 8.0	- 7.0	- 7.5
4	20	- 8.0	- 7.3	- 7.7

2.3 PRV 鄂 A 株 $gG^- / LacZ^+$ 突变株在不同细胞

中增殖规律结果 经空斑 4 次纯化的 PRV 鄂 A 株 $gG^- / LacZ^+$ 突变株病毒以 0.01PFU/cell 的量分别接种 BHK-21、IBRS-2、PK-15、MDBK 4 种不同的细胞, 结果 BHK-21、IBRS-2、PK-15、MDBK 4 种细胞分别在接种后 12 h、16 h、18 h、24 h 出现病变。待样品收集完毕后, 测定不同细胞不同时间收集病毒液的 TCID₅₀, 结果 IBRS-2、PK-15 均在接种后 40 h 滴度达到高峰, 高于 $10^{-7.5}/0.1 ml$, 并可维持 24 h; 病毒在 MDBK 上于接种后 56 h 达到增殖高峰, 但滴度较低, 在 $10^{-7.0}/0.1 ml$ 左右, 维持时间在 16 h 左右; 病毒在 BHK-21 细胞上达到增殖高峰的时间在接种后 40 h, 但滴度仅为 $10^{-6.5}/0.1 ml$, 维持时间也只有 16 h。根据 3 次实验的结果, 取平均值绘制病毒在 4 种细胞上的生长曲线见图。

2.4 PRV 鄂 A 株 $gG^- / LacZ^+$ 突变株不同剂量感

染 IBRS-2 细胞的试验结果 试验用每细胞 100PFU、10PFU、1PFU、0.1PFU、0.01PFU、0.001PFU 6 个滴度的病毒剂量接种 IBRS-2 单层细胞, 结果不同接种剂量开始出现病变的时间不一样, 但 3 次实验结果基本一致。待 90% 以上细胞出现 CPE 时收毒, 反复冻融 3 次, 测 TCID₅₀, 见表 2。

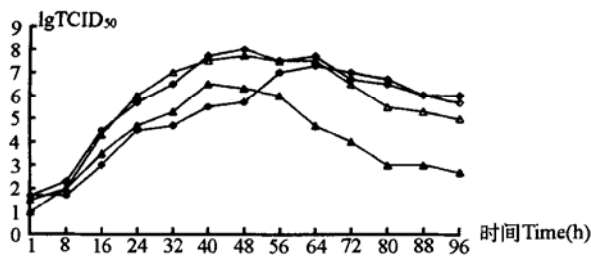


图 PRV 鄂 A 株 $gG^- / LacZ^+$ 突变株在不同细胞上的生长曲线

Fig. The growth curves of $gG^- / LacZ^+$ mutant in different cell lines

◆IBRS-2 △PK-15 ▲BHK-21 ◊MDBK

表 2 不同剂量的 PRV 鄂 A 株 $gG^- / LacZ^+$ 突变株感染 IBRS-2 细胞的结果

Table 2 The titer of IBRS-2 inoculated with different dose virus

接毒剂量 Doses (PFU/cell)	开始出现 病变时间 CPE(h)	收毒时间 Harvested(h)	lgTCID ₅₀ (Mean)
100	2.0 ± 0.5	8.0 ± 1.0	- 6.7
10	3.0 ± 1.0	10.0 ± 1.0	- 6.7
1	5.0 ± 1.0	18.0 ± 2.0	- 6.5
0.1	16.0 ± 2.0	30.0 ± 2.0	- 7.7
0.01	21.0 ± 2.5	48.0 ± 2.5	- 8.0
0.001	30.0 ± 3.0	72.0 ± 3.0	- 5.7

3 讨论

基因缺失标志疫苗在世界各国猪伪狂犬病的根除计划中发挥了巨大作用, 但最近的研究表明, 基因缺失标志活疫苗容易引起种母猪的卵巢炎, 对发情和妊娠早期的母猪尤其严重, 而且同样的情况在其他动物疱疹病毒疾病(如牛的传染性鼻气管炎)也被证实, 因此, 许多学者提出种猪的根除计划还是以基因缺失标志灭活苗为主, 这一方面是因为灭活苗安全, 不存在排毒或毒力返强的威胁; 另一方面, 有一些非必需糖蛋白(如 gG)的缺失已被证明不影响免疫原性, 在保证良好的免疫原性的基础上, 又可通过缺失的非必需糖蛋白对疫苗免疫猪和野毒感染猪进行鉴别诊断。事实上, 在一些国家如德国、法国, 规定只有基因缺失的灭活苗或亚单位疫苗才能用于种猪的免疫, 并取得了很大的成功。我国的猪伪狂犬病的根除计划尚未启动, 并且种猪伪狂犬病的根除是整个根除计划中非常重要的一环。我们应借鉴国外成功根除了该病的国家的经验, 也应从中吸取一些有益的教训。本研究室经过多年的积累, 以国内地方分离强毒株鄂 A 株为亲本, 成功地构建了 $gG^- / LacZ^+$ 、 $TK^- / gG^- / LacZ^+$ 、 $TK^- / gE^- / LacZ^+$ 等多株基因缺失标志疫苗株, 并将 $gG^- / LacZ^+$ 作为种猪的疫苗使用, 临床试验证明具有很高的保护力, 并可用于种猪伪狂犬病的根除计划。为了确定该疫苗株的最适增殖细胞、最佳接毒剂量和收毒时间, 以便为今后大规模化生产提供依据。

病毒在长期保存过程中, 不可避免地有死亡的现象, 所以在开展实验之前, 首先对病毒进行复壮, 滴度测定, 然后进行空斑纯化。空斑纯化是疫苗生产以及分离重组病毒中获得高滴度、均一的种毒液的一种行之有效的办法。在实验中我们发现, 第 1

次空斑纯化后, 滴度大幅度提高, 原来的 $10^{-5.7}/0.1$ ml 增高到 $10^{-7.3}/0.1$ ml, 第 2 次空斑纯化后也有较小的提高, 第 3-4 次空斑纯化后病毒滴度升高的幅度很小。这一方面说明病毒基本上已纯化好, 可用于下一步实验用; 另一方面也说明 3 次空斑纯化基本上能达到纯化的要求, 这对今后的疫苗生产有十分重要的指导意义。

PRV 具有泛嗜性, 能在多种组织培养细胞内增殖, 但表现的敏感度不同。为了确定鄂 A 株 $gG^- / LacZ^+$ 疫苗株的最适增殖细胞, 我们对该毒株在 BHK-21、IBRS-2、MDBK、PK-15 四种细胞的增殖情况进行了研究。根据测定的 $TCID_{50}$, 确定 IBRS-2、PK-15 比较适合该毒株的增殖。尽管有人报道用 MDBK 增殖 PRV 较好, 并且我们在以往的实验中也发现, 国内另一个地方分离株闽 A 株对 MDBK 确实较敏感。但从我们的实验结果, IBRS-2 更适合于鄂 A 株 $gG^- / LacZ^+$ 疫苗株的增殖, 这或许是由于 PRV 鄂 A 株是由发病猪中分离到的, 因此对猪源细

胞更为敏感。所以根据这一结果, 我们选择 IBRS-2 细胞用于病毒的培养, 并在接毒后 40~50 h 收毒。

接种剂量在大规模疫苗生产中十分关键。接种量过高, 细胞病变太快, 而且容易形成缺损干扰病毒颗粒 (DI); 接种量过低, 细胞不能被同时感染, 增殖时间太长, 导致滴度达不到, 若用作疫苗生产需要浓缩, 无疑会增加生产成本。为了确定病毒在 IBRS-2 细胞中的最适接种剂量, 以 6 个不同的剂量接种 IBRS-2 细胞, 结果高接种剂量组 (100PFU/cell、10PFU/cell、1PFU/cell) 均于接种后几小时就出现病变, $TCID_{50}$ 值均在 $10^{-7.0}/0.1$ ml 以下, 这可能是由于病毒接种剂量过大, 形成过多缺损干扰病毒颗粒的影响, 低接种剂量组 (0.001PFU/cell) 的病毒滴度也很低, $TCID_{50}$ 值只有 $10^{-5.7}/0.1$ ml; 另外两组 0.1PFU/cell、0.01PFU/cell 剂量组的滴度最高, $TCID_{50}$ 值均在 $10^{-7.5}/0.1$ ml 以上, 但考虑到接种剂量较大, 缺损干扰病毒颗粒形成的机会也较大, 所以确定 0.01PFU/cell 的量为最佳接种剂量。

Growth Pattern of the Mutants of Pseudorabies Virus Strain Ea with the Genotype $gG^- / LacZ^+$ in Different Cell Lines

FANG Liurong, CHEN Huan-chun, XIAO Shaobo, HE Qir-gai, WU Meir-zhou, WANG Chao
(*Lab of Animal Virology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*)

Abstract: In order to determine the most optimal host cell line, inoculation dose and the time of harvest, we studied the growth pattern and cytopathic effect (CPE) of the mutants of Pseudorabies virus (PRV) Ea strain, $gG^- / LacZ^+$, in different cell lines. A clone virus of $gG^- / LacZ^+$, the titer of which could be up to $10^{-8.0}/0.1$ ml, after purification four times by plaques, was obtained. The clone virus was inoculated into different cell lines, BHK-21, IBRS-2, MDBK and PK-15, respectively. Infected BHK-21 could be induced CPE at 12 hours p. i. . However, The CPE of MDBK appeared after 24 hours p. i. . In terms of the growth pattern, the titer of IBRS-2 could reach the peak level at 40 hours p. i. and the peak titer was up to $10^{-8.0}/0.1$ ml, which was maintained until 64 hours p. i. . In contrast, the peak of BHK-21 was only $10^{-6.5}/0.1$ ml during the 96 hours p. i. . We also studied the titer of IBRS-2 when it was inoculated with different dose virus from 0.001 PFU/cell to 100PFU/cell. It was discovered that the titer could reached over $10^{-7.5}/0.1$ ml when inoculated with 0.1PFU/cell, 0.01PFU/cell after 30, 48 hours p. i. , respectively. These data indicate that IBRS-2 is the most optimal cell and that the titer could reach the peak when inoculated with 0.01PFU/cell and harvested at 40-50 hours p. i. .

Key words: Pseudorabies virus; $gG^- / LacZ^+$; Cell; Growth pattern