

适合猪圆环病毒 2 生长的 PK15 均质细胞株的构建

罗维, 赵墩, 蒋大良, 余兴龙*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要:为筛选出 PCV2 培养滴度最高的 PK15 细胞克隆株,采用稀释法从 PK15 混合细胞中分离单细胞克隆株,获得的细胞克隆用于接毒试验,即用同步接种法将猪圆环病毒 2(PCV2)病毒细胞混合液以 1:100 的比例接种单克隆细胞,接毒后经 PCR 与定量 PCR 检测得出 A10 细胞克隆培养 PCV2,获得的病毒含量最高。将 A10 细胞进行第 2 轮细胞克隆,之后用同步接种法和异步接种法将 PCV2 感染 A10 细胞,并检测 A10 细胞接毒后的 PCV2 DNA 含量,2 种接毒方法获得的最高 PCV2 基因组的拷贝数分别为 3.0×10^9 、 $6.2 \times 10^9/\text{mL}$,高于用 PK15 混合细胞培养 PCV2 所获得的最高 PCV2 基因组拷贝数($10^7/\text{mL}$)。综合以上结果,构建的 PK15 均质细胞克隆株比 PK15 混合细胞更适合 PCV2 的培养。

关 键 词:猪圆环病毒 2(PCV2); PK15 细胞; 细胞克隆; 定量 PCR; 同步接毒; 异步接毒

中图分类号: S852.65⁺9

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)04-0404-05

Construction of homogeneous PK15 cell line suitable for cultivation of porcine circovirus 2

LUO Wei, ZHAO Dun, JIANG Da-liang, YU Xing-long*

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: To screen single cell clone line for cultivation of PCV2 with the highest titer, dilution method was used to isolated single clone lines from PK15 heterogeneous cells. The obtained single cell clones were subjected to PCV2 infection through synchronized inoculation at a ratio of 1:100. PCR and quantitative PCR analysis showed the yield of PCV2 in cell clone A10 was the highest after PCV2 infection. Then second cell clone was conducted on A10 cell to ensure the homogeneous character of A10, followed by PCV2 inoculation test through synchronized and non-synchronized inoculations. The result of quantitative PCR indicated the maximum PCV2 genomic copy numbers obtained with synchronized and non-synchronized inoculations were $3.0 \times 10^9/\text{mL}$ and $6.2 \times 10^9/\text{mL}$, respectively, which were higher than the maximum PCV2 genomic copy numbers with PK15 heterogeneous cells. These results suggest the constructed homogeneous PK15 cell line is more suitable to cultivate PCV2 compared to PK15 heterogeneous cells.

Key words: porcine circovirus 2 (PCV2); PK15 cell; cell clone; quantitative PCR; synchronized inoculation; non-synchronized inoculation

猪圆环病毒 2(PCV2)能够引起机体的免疫抑制,是猪群多种临床疾病的主要致病因子,对猪群影响较大^[1-3]。PCV2 的临床重要性使得人们围绕它及 PCV1 作了大量的工作,其中包括猪圆环病毒(PCV)复制方面的研究^[4-5]。I. Tischer 等^[6]最先用 D-氨基

葡萄糖来提高 PCV 的复制效率,此后 D-氨基葡萄糖普遍用于 PCV 的接毒感染实验^[7-8];M.Fenaux 等^[9]则通过对带毒细胞连续传代对 PCV2 进行适应性培养来提高 PCV2 的复制效率;Y.Zhu 等^[7]将 PK15 混合细胞消化,稀释成 1 个细胞/孔,于 96 孔培养板

收稿日期: 2013-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(30571390)

作者简介: 罗维(1982—),女,湖南沅江人,博士研究生,主要从事动物疾病发病机理及防控研究,ms.luowei@163.com; *通信作者, xlyu999@126.com

中培养,获得PCV2复制高度允许性和低度允许性的克隆;彭伍平等^[8]也通过有限稀释法获得了一个对PCV2的复制高度允许的细胞。笔者参考Y.Zhu等^[7]的方法,从PK15混合细胞中获得单克隆细胞株,并构建定量PCR方法,测定PCV2在克隆细胞株中的复制滴度,以获得适合于PCV2培养的细胞株及用于PCV2定量检测的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、质粒、细胞

无PCV-1的PK-15细胞^[10]、P0质粒(含PCV2-1B基因组,GenBank登录号为EU095020)及PCV2病毒液(用PK15混合细胞培养的PCV2,用PCR检测信号最强的样品)^[10]由湖南农业大学分子与免疫学实验室保存与传代。

1.1.2 主要试剂及培养基

Taq 酶购自天为时代生物有限公司;超纯质粒提取试剂盒购自Invitrogen公司;DL2 000 DNA Marker、SYBR-Green 定量试剂盒购自TaKaRa公司;RPMI-1640培养基、10×胰酶、新生牛血清为Gibco公司产品;其他试剂均为国产,分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PK15细胞克隆

PK15单克隆的培养按文献^[7]的方法进行。将PK15细胞用胰酶消化,充分吹散、计数,然后用含20%新生牛血清的RPMI-1640培养基将细胞稀释至1个/(100 μL),铺96孔板,每孔100 μL。于5%CO₂培养箱静置培养,当单个细胞长满孔底后消化传代至24孔板,之后再传至6孔板。

1.2.2 PK15细胞克隆的接毒

消化细胞,用含6%新生牛血清的RPMI-1640培养基以1:5的比例传代,接种到24孔板,PCV2病毒液以1:100的比例与细胞悬液混合,于37℃,5%CO₂培养箱中培养,待细胞充分贴壁后(24 h之

内)换成2%新生牛血清的RPMI-1640培养基,继续培养48 h。

1.2.3 接毒细胞的PCR检测

用酚、氯仿-蛋白酶K消化法^[11]提取接毒细胞样品及PCV2病毒液的DNA,每个样品提取量均为300 μL,获得的DNA沉淀均用300 μL的水悬浮。PCR方法参照文献^[10]稍作修改,上游引物用FP1-24,序列为:5'-ACCAGCGCACTTCGGCAGC GGCAG-3';下游引物用RP774-97,序列为:5'-GC GGGCCAAAAAGGTACAGTTCC-3',退火温度为68℃。

1.2.4 接毒细胞的定量PCR检测

1) 定量PCR的构建。用超纯提质粒试剂盒提取P0质粒,检测质粒浓度后进行10倍系列稀释,以稀释的质粒为模板,用引物对1BFp148~167(5'-GGAGCTTCCAATCTCCCTT-3')/1BRp364~381(5'-TAGGAGCTCCACATTCG-3')^[8](引物退火温度为60℃),根据SYBR-Green定量试剂盒说明进行定量PCR,制定标准曲线,根据获得的循环阈值(C_t)对质粒浓度的对数方程计算待检样品的DNA拷贝数。

2) 接毒细胞的定量PCR检测。接毒细胞样品经PCR鉴定后,选取PCR信号较强的样品进行定量检测,对PCV2病毒液也进行定量PCR检测。

1.2.5 PK15细胞克隆的二次克隆及接毒试验

根据感染细胞检测结果,得出PCV2基因组含量最高的克隆细胞株,用其未接毒的细胞进行2次克隆,具体见1.2.1。细胞传到6孔板后继续传代扩大细胞并保存。

将扩大培养的细胞株,接种至75 cm²细胞培养瓶,并按2种方式接毒:同步接毒,即细胞以1:5消化传代到培养瓶的同时,以1:100的比例加入PCV2病毒液,于37℃,5%CO₂培养箱培养24 h后换液,继续培养至细胞长满(约3~4 d);异步接毒,即细胞以1:10消化传代到培养瓶,待细胞长到约50%汇合(一般24 h之内)时弃去培养基,用

RPMI-1640 培养基清洗细胞层,将 PCV2 病毒液用 RPMI-1640 培养基稀释 10 倍,再将病毒稀释液覆盖细胞层,于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h,弃去病毒液,用 RPMI-1640 培养基清洗细胞,再加入含 2% 血清的 RPMI-1640 培养基,细胞长满(约 3~4 d)。每种接毒试验均做 2 次,每次每种接毒方式做 3 个平行,感染细胞长满后收集,进行 PCR 及定量 PCR 检测。

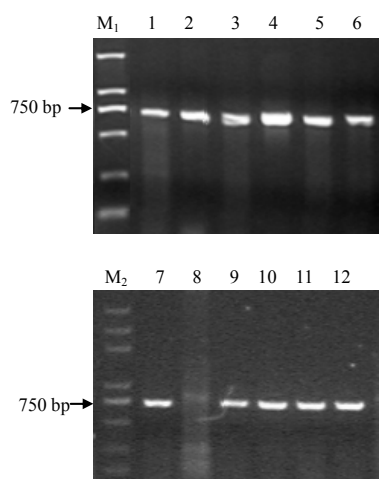
2 结果与分析

2.1 PK15 细胞克隆的获得

细胞接种 96 孔板后,培养 7 d,可以长成在显微镜下可见的单个克隆;培养 16 d,部分细胞克隆长满孔底,消化到 24 孔板,生长 5 d 后,将 24 孔板的部分细胞克隆消化到 6 孔板。

2.2 接毒后 PK15 细胞克隆的 PCR 检测结果

对获得的 PK15 细胞克隆进行接毒试验,并用一般 PCR 作检测,结果见图 1。接毒后,E1、A10 克隆细胞的 PCV2 DNA 的信号较强。PCV2 病毒液与接毒后的 F11、A7、G4、D3 克隆细胞的 PCV2 DNA 的信号较弱。



M₁ 为 DL 2 000 DNA marker; 1~6 泳道分别为 B12、C8、E1、A10、D6、E11 克隆细胞样品的检测结果; M₂ 为 DL 5 000 DNA marker; 7 泳道为 PCV2 病毒液样品的检测结果; 8~12 泳道分别为 F11、A7、G4、D3 克隆细胞样品的检测结果。

图 1 PK15 细胞克隆同步接毒 PCV2 的 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR tests for PK15 single cell clones infected with PCV2 through synchronized inoculation

2.3 接毒后 PK15 细胞克隆的定量 PCR 检测

2.3.1 PCV2-1B 定量 PCR 的标准曲线

将 P0 提质粒后,测定其浓度为 394 μg/mL,根据公式计算得出基因组拷贝数,稀释成 8×10^8 、 8×10^7 、 8×10^6 、 8×10^5 、 8×10^4 、 8×10^3 、 8×10^2 、 8×10^1 copies/μL,进行定量 PCR,获得的 C_t 值分别为 15.71、17.51、20.70、24.20、27.29、30.69、34.46、37,扩增曲线及溶解曲线均一致,根据 C_t 值及对应的质粒拷贝数的对数,绘制曲线(图 2),其 R² 为 0.996 1,线性较好,可以用于计算样品中的 PCV2 基因组拷贝数。

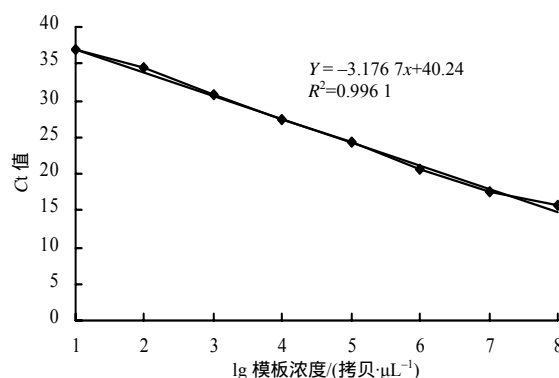


图 2 定量 PCR 的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of the quantitative PCR

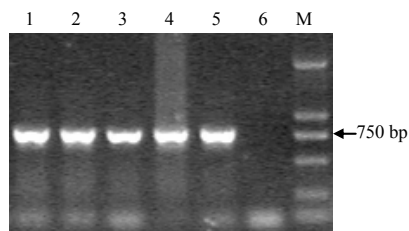
2.3.2 PCV2-1B 定量 PCR 筛选 PK15 细胞克隆

用建立的定量 PCR 对接毒后的 E1、A10 克隆细胞样品及 PCV2 病毒液的 DNA 样品进行检测。结果表明,E1、A10、PCV2 病毒液样品中病毒的基因组含量分别为 3×10^7 、 6.8×10^7 、 1×10^7 /mL。可见,A10 克隆细胞的接毒效果最好,此克隆细胞用第 2 轮细胞克隆。

2.4 A10 细胞培养 PCV2

将 A10 克隆细胞进行第 2 轮克隆,扩大的细胞用于接毒试验。同步接毒样品的 PCR 检测结果见图 3。2 批接毒样品中有 1 个是阴性,阳性样品信号都较强。异步接毒样品的 PCR 检测结果见图 4。2 批样品都为阳性,且信号都较强,说明异步接毒比同步接毒要稳定。定量 PCR 的结果显示,同步接毒第 1 批样品的病毒基因组含量分别为 1.6×10^8 、 1.6×10^8 、 8.1×10^7 /mL;第 2 批 2 个 PCV2 阳性样品的病毒基因组含量分别为 8.1×10^7 、

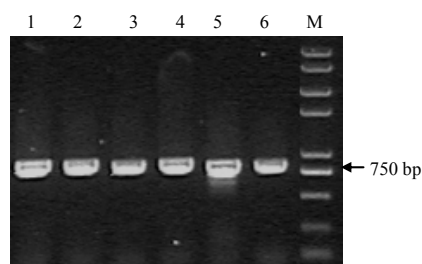
$3.0 \times 10^9/\text{mL}$; 异步接毒第1批样品的病毒基因组含量分别为 6.2×10^9 、 8×10^8 、 $7.9 \times 10^8/\text{mL}$; 第2批样品的病毒基因组含量分别为 7.9×10^8 、 2.0×10^9 、 $9.0 \times 10^7/\text{mL}$ 。说明同步接毒与异步接毒都能获得较高的病毒含量, 而异步接毒的重复性较好, 不会出现接不上毒的情况。



M 为 DL 2 000 DNA marker; 1~3 为第1批接毒的样品; 4~6 为第2批接毒的样品。

图3 A10细胞同步接毒PCV2病毒液后PCR检测结果

Fig. 3 PCR tests for A10 cells infected with PCV2 through synchronized inoculation



M 为 DL 8 000 DNA marker; 1~3 为第1批接毒的样品; 4~6 为第2批接毒的样品。

图4 A10细胞异步接毒PCV2病毒液后PCR检测结果

Fig. 4 PCR tests for A10 cells infected with PCV2 through non-synchronized inoculation

3 讨论

Y.Zhu等^[8]获得了对PCV2的复制高度允许和低度允许的细胞, 最高病毒含量分别达到 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL 和 $10^{2.0}$ TCID₅₀/mL, 对应的PCV2基因组拷贝数分别为 $10^{10}/\text{mL}$ 和 $10^4/\text{mL}$ 。Y.Zhu等^[8]也获得了对PCV2的复制高度允许的细胞, 获得的最高病毒含量为 $10^{7.0}$ TCID₅₀/mL。根据PCV2病毒液TCID₅₀/mL与基因组拷贝数的对应关系^[8], 推测其对应的PCV2基因组拷贝数分别为 $10^9/\text{mL}$ 。本试验接毒用的PCV2病毒液是通过将PCV2-1B感染性克隆病毒同步接种PK15混合细胞所得, 是经PCR鉴定为病毒含量最高的一个样品(PCV2基因组拷贝数为 $10^7/\text{mL}$), 此样品已成功用于小鼠及猪的动物

实验^[12]。用本试验获得的PK15单克隆A10细胞培养的PCV2病毒, 不管是用同步接毒还是用异步接毒, 其PCV2的含量(最高拷贝数约为 $10^9/\text{mL}$)都高于PCV2病毒液的样品(拷贝数为 $10^7/\text{mL}$), 即在培养PCV2时A10细胞优于其母代PK15混合细胞, 但是跟其他研究^[8-9]获得的PK15单克隆相比, A10并不是PCV2复制高度允许性细胞, 今后还有可能克隆到对PCV2复制允许度更高的细胞, 同时A10也不是PCV2复制的低允许性细胞; 因此, 用其培养病毒可以减少PCV2复制的低允许性细胞的干扰。

PCV2是很小的病毒, 基因组全长约为1.8 kb, 其复制依赖于细胞的分裂^[10], 因此许多研究^[9,12-15]用同步接种感染PCV2, 同时也有许多研究^[6,8,16-17]采用异步接种。本试验用2种方式接毒的结果表明, 异步接种的稳定性更好, 可能是同步接种时消化后的细胞中有部分死细胞或活力不好的细胞与病毒结合后, 病毒不能复制或复制受到阻碍, 而异步接种时, 死细胞及贴壁不好的细胞被弃去或被清洗掉, 与病毒结合的细胞活力都相对较好。

在体外复制过程中, PCV2的基因组含量与病毒粒子的含量呈对应一致的关系^[6,17], Y.Zhu等^[8]用检测TCID₅₀的方法来筛选PCV2复制高度允许性细胞克隆, 本研究用的方法为定量PCR, 以基因组的拷贝数来判断病毒复制的情况, 相对方便、快速。

参考文献:

- [1] Ge M, Luo W, Jiang D, et al. Development and application of a double-antigen sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine circovirus 2[J]. Clin Vaccine Immunol, 2012, 19(9): 1480-1486.
- [2] Darwich L, Mateu E. Immunology of porcine circovirus type 2(PCV2)[J]. Virus Research, 2012, 164(1/2): 61-67.
- [3] 蒋大良, 余兴龙. 猪圆环病毒2型致病机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(4): 94-98.
- [4] Opriessnig T, Meng X J, Halbur P G. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2007, 19(6): 591-615.
- [5] Firth C, Charleston M A, Duffy S, et al. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen:

- Porcine circovirus 2[J]. J Virol, 2009, 83(24): 12813–12821.
- [6] Tischer I, Peters D, Rasch R, et al. Replication of porcine circovirus: Induction by glucosamine and cell cycle dependence[J]. Archives of Virology, 1987, 96(1/2): 39–57.
- [7] Zhu Y, Lau A, Lau J, et al. Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line[J]. Virology, 2007, 369(2): 423–430.
- [8] 彭伍平, 王延辉, 胡东波, 等. 猪圆环病毒 2 型 PK15 细胞系高敏感性细胞的克隆[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(4): 37–39.
- [9] Fenaux M, Opriessnig T, Halbur P G, et al. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus(PCV2) enhanced PCV2 replication *in vitro* and attenuated the virus *in vivo*[J]. J Virol, 2004, 78(24): 13440–13446.
- [10] 李薇, 罗维, 余兴龙, 等. 三种亚群 PCV-2 感染性克隆的构建及体内感染性试验[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011, 37(1): 68–72.
- [11] 萨姆布鲁 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] Ren W, Luo W, Wu M, et al. Dietary L-glutamine supplementation improves pregnancy outcome in mice infected with type-2 porcine circovirus[J]. Amino Acids, 2011, DOI 10. 1007/s00726-011-1134-5.
- [13] O'Dea M A, Hughes A P, Davies L J, et al. Thermal stability of porcine circovirus type 2 in cell culture[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 147(1): 61–66.
- [14] 张鑫. 猪圆环病毒 2 型感染 PK-15 细胞差异蛋白质组研究[D]. 杭州: 浙江大学动物科学学院, 2009.
- [15] 刘长明, 张超范, 危艳武, 等. 猪圆环病毒 2 型细胞培养适应毒株的培育和鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(3): 248–251.
- [16] Hirai T, Nunoya T, Ihara T, et al. Infectivity of porcine circovirus 1 and circovirus 2 in primary porcine hepatocyte and kidney cell cultures[J]. J Vet Med Sci, 2006, 68(2): 179–182.
- [17] Beach N M, Juhan N M, Cordoba L. Replacement of the replication factors of porcine circovirus(PCV) type 2 with those of PCV type 1 greatly enhances viral replication *in vitro*[J]. Virol, 2010, 84(17): 8986–8989.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维