

猪圆环病毒 2 型基因 1 群 B 亚簇的体外培养特征

罗维, 赵墩, 吴海超, 蒋大良, 余兴龙*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要:为探寻猪圆环病毒 2 型(PCV2)在 PK15 细胞中的复制特征,将 PCV2 基因 1 群 B 亚簇(PCV2-1B)病毒感染 PK15 均质细胞 A10,待感染细胞层长满,对其进行连续传代;对第 5、6 代细胞进行维持培养,即在细胞长满后隔天更换培养基,以维持细胞良好的生长;用第 10 代带毒细胞的培养液接种 A10 细胞,并进行换液维持培养。PCR 与定量 PCR 检测结果表明,PCV2-1B 病毒感染 A10 细胞后,其病毒基因组的含量在感染细胞长满之前(约 96 h)随着细胞的增多而上升,同时也随着传代次数的增多而上升;换液维持培养的细胞,在维持 10 d 后 PCV2-1B 病毒基因组的含量能维持在 $10^7\sim 10^8$ 拷贝/mL,而第 10 代带毒细胞的培养液接毒 A10 之后,病毒基因组含量随细胞增多而上升,在达到约 10^8 拷贝/mL 后,病毒基因组含量维持在 $10^7\sim 10^8$ 拷贝/mL。

关 键 词:猪圆环病毒 2 型;复制动态;PK15 细胞;毒株

中图分类号:S852.65⁺9 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2013)05-0534-05

In vitro replication characteristics of porcine circovirus 2(PCV2) belonging to B subcluster of genogroup1

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

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

Abstract: To observe the replication dynamics of PCV2 in PK15 cell, PCV2-1B infectious clone virus was inoculated to the homogenous PK15(A10) cells. After grew to 100% confluence, the cell was serially passaged. And part of the 5th and 6th-generation cells were maintained by altering cell culture medium at one day interval to maintain the cells. The culture medium of the 10th generation cells was inoculated to fresh A10 cells which was also maintained by culture medium alteration. The results of PCR and quantitative PCR showed that after infection, the PCV2 genome copies increased with the growth of the cells until the cell reached 100% confluence. And the PCV2 genome copies maintained at a level of $10^7\sim 10^8$ copies/mL in cells after maintained by culture medium alteration for 10 days. Infection of A10 cell with culture medium of the 10th generation cells also showed the virus genome content increased with the growth of the cell, and when reached 10^8 copies/mL, the genome copies maintained at $10^7\sim 10^8$ copies/mL.

Key words: porcine circovirus 2(PCV2); replication dynamics; PK15 cell; strain

猪群中流行的猪圆环病毒主要为 PCV2^[1]。PCV2a 灭活疫苗、PCV2 嵌合疫苗在降低猪的死亡率及提高生产性能方面有较好的效果^[2-3]。提高 PCV2 的体外复制效率有助于开发新的 PCV2 疫苗,降低

疫苗成本。获得大量 PCV2 病毒是研究 PCV2 病毒特性的基础。在 PCV2 病毒复制特征的研究过程中,Beach 等^[4]的研究结果表明,PCV2 感染细胞 60~84 h,病毒量逐渐上升;在 84~96 h,病毒量保持平稳。Hirai

收稿日期:2013-09-02

基金项目:国家自然科学基金项目(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

等^[5]将 PCV2 感染猪原代细胞,并将感染的细胞通过隔 2 d 换液维持 10 d,发现 PCV2 阳性的细胞数在第 10 天达到最高。笔者将 PCV2-1B 感染 PK15 克隆细胞 A10,并对其进行带毒传代及维持传代,以探寻 PCV2-1B 在带毒传代细胞及带毒维持细胞中的复制特征,旨在获得大量的病毒。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

PK15 克隆细胞 A10^[6]、PCV2-1B 病毒液^[7]由湖南农业大学分子与免疫学实验室维持与保存。

1.1.2 主要试剂

Taq 酶购自天为时代生物有限公司; *Trans* 2KTM Plus DNA Marker、*Trans* 2KTM Plus DNA Marker 购自北京全式金生物科技有限公司; SYBRGreen 定量试剂盒购自 TaKaRa 公司,病毒 DNA 提取试剂盒购自天泽恩公司;其他试剂均为国产,分析纯。RPMI 1640 培养基、10×胰酶、新生牛血清购自 GIBCO 公司。

1.1.3 引物

引物对^[6]FP1-24(5'-ACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAG-3')、RP774-97(5'-GCGGGCCAAAAA GGTACAGTTCC-3')用于 PCR 扩增 PCV2 部分 DNA 片段;引物对 1 BFp148~167(5'-GGAGCTTCCAATC TCCCTT-3')、1BRp364~381(5'-TAGGAGCTCCACA TTCG-3')^[6]用于 PCV2 的定量检测,引物对^[7]Fp1(5'-CCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAAG-3')、Rp1 (5'-CCGCGGAAATTTCTGACAAACGTTAC-3') 用于 PCV2 全长 DNA 检测。

1.2 方法

1.2.1 PCV2-1B 感染 PK15 细胞(A10)

将长成单层的 A10 细胞从细胞瓶上用胰酶消化下来,以 1:10 的比例传代,铺到直径为 35 mm 的细胞培养皿,24 h 后用 RPMI 1640 培养基清洗细胞层,将 PCV2-1B 病毒用无血清的 RPMI 1640 稀释 10 倍,并铺于细胞单层上,以完全覆盖细胞层为准,

于 5%CO₂ 细胞培养箱 37 ℃ 孵育 1 h,将病毒上清液弃去,并添加新鲜的含 2%血清的 RPMI 1640 培养基。感染细胞长满后(接毒后 96 h),对细胞进行连续传代。第 1 次传代之前,每天收集细胞培养液。从第 2 次传代开始,收集传代时去掉的细胞培养液,用于 PCV2-1B 检测,第 4、5 次传代的细胞均分出部分以 1:10 的比例接种到底面积为 75 cm² 的细胞培养瓶中,长满后进行隔天换液维持培养,收集换取的培养液。用第 10 代带毒传代细胞的培养液为接种液,接毒细胞培养皿中的 A10 细胞,待其长满,进行换液维持培养,收集换取的培养液。

1.2.2 感染后 PK15 细胞(A10)的检测

取 200 μL 收集的病毒细胞培养液样品,用 DNA 提取试剂盒提取 DNA,每个 DNA 样品均用 200 μL 水溶解。第 1 次传代之前收集的样品用引物 FP1-24 和 PR774-97 进行 PCV2-1B 部分片段的 PCR 检测。PCR 反应体系: H₂O 35.5 μL, 10×PCR Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, Fp(25 μmol/L) 1 μL, Rp(25 μmol/L) 1 μL, *Taq* 酶 (5 U/μL) 0.5 μL, DNA 1 μL, PCR 反应条件 95 ℃ 预变性 5 min→(94 ℃ 变性 30 s, 68 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s), 30 个循环, 72 ℃ 总延伸 7 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

对第 2~11 次传代时收集的部分培养液的 DNA 样品、换液维持细胞的 DNA 样品进行全长 PCV2-1B 病毒基因组的 PCR 检测,所用引物为 Fp1 和 Rp1。反应体系和反应程序同上。用定量 PCR^[7]检测第 2~11 次传代时收集的部分培养液的 DNA 样品、换液维持细胞的 DNA 样品中的 PCV2 基因组的含量,做定量 PCR 的每个样品均用 3 个重复。

1.2.3 细胞形态观察

在倒置显微镜下观察维持培养细胞的形态特征。

2 结果与分析

2.1 PCV2-1B 在带毒传代细胞的复制

A10 细胞接毒 PCV2-1B 后培养 24、48、72、96 h 的培养液的 DNA 样品,用 FP1-24、RP774-97 引物进行 PCR,结果见图 1。病毒复制在 48 h 之前较慢,48 h 之后病毒的 DNA 含量迅速上升。

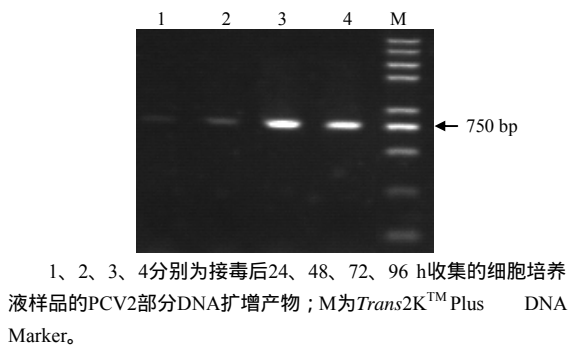


图1 PCV2接毒后96 h内收集样品的PCR检测结果

Fig. 1 PCR tests for PCV2 infected cell samples within 96 h after inoculation

对 A10 感染细胞进行连续传代,用扩增 PCV2 全长的引物 Fp1、Rp1 对部分代次的样品的 PCR 检测结果见图 2。被检样品均能检测出约 1 767 bp 的 PCV2-1B 全长基因组。传代次数及部分代次细胞的培养液的定量 PCR 结果见表 1。PCV2 的 DNA 拷贝数随着传代次数的增多而上升,达到最高后趋于平稳。

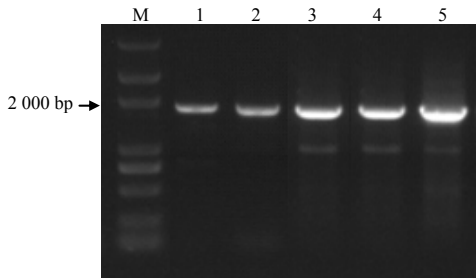


图2 带毒传代细胞部分样品PCR的检测结果

Fig. 2 PCR tests for PCV2 infected passed cell samples(partial samples)

Table 1 Quantitative PCR results for passaged infected cells				
传代次数	细胞代次	样品号	C _t	DNA 含量/ (拷贝·mL ⁻¹)
1	2	304	31.364	5.0×10 ⁶
2	3	307	31.015	6.4×10 ⁶
7	8	408	27.738	6.9×10 ⁷
8	9	428	23.392	1.6×10 ⁹
9	10	437	24.640	6.5×10 ⁸
10	11	444	24.821	5.7×10 ⁸
11	12	455	24.081	9.8×10 ⁸

2.2 PCV2-1B 在带毒维持细胞的复制

图 3 显示用 PCV2 全长引物对第 5、6 代维持细胞部分样品的 PCR 检测结果。被检测样品均能扩出约 1 767 bp 的 PCV2-1B 全长基因组。由表 2、表 3 可知,通过换液,不同代次的细胞都能维持较长

的时间。在维持细胞中,PCV2-1B DNA 的含量在维持 10 d 后稳定在 10⁷~10⁸ 拷贝/mL。

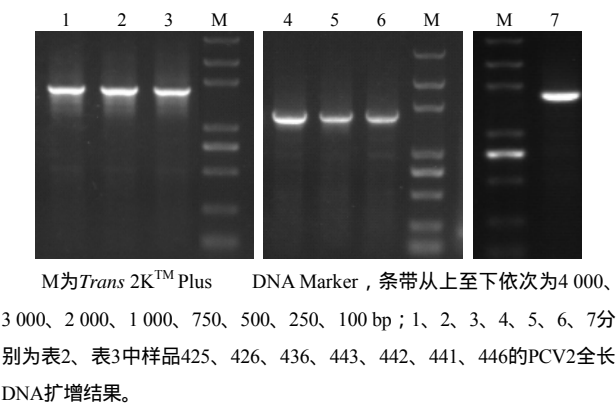


图3 带毒维持细胞部分样品的PCR检测结果

Fig. 3 PCR tests for infected cells maintained through culture medium exchange

表2 第5代带毒维持细胞的定量PCR检测结果

Table 2 Qauntitative PCR for the maintained PCV2 infected PK15 cells after passaged 4 times

换液次数	维持时间/d	样品号	C _t	DNA 含量/ (拷贝·mL ⁻¹)
1	2	326	29.190	2.4×10 ⁷
3	6	339	28.667	3.5×10 ⁷
4	8	363	32.292	2.5×10 ⁶
5	10	402	30.668	8.2×10 ⁶
6	12	412	29.985	1.3×10 ⁷
7	14	420	29.549	1.9×10 ⁷
9	18	425	27.433	8.6×10 ⁷
11	22	433	26.672	1.5×10 ⁸
12	24	441	28.779	3.2×10 ⁷
13	26	446	28.601	3.7×10 ⁷

表3 第6代带毒维持细胞的定量PCR检测结果

Table 3 Qauntitative PCR for the maintained PCV2 infected PK15 cells after passaged 5 times

换液次数	维持时间/d	样品号	C _t	DNA 含量/ (拷贝·mL ⁻¹)
1	2	338	29.547	1.9×10 ⁷
2	4	365	30.611	8.6×10 ⁶
5	10	411	30.391	1.0×10 ⁷
6	12	421	29.373	2.1×10 ⁷
8	16	426	26.805	1.4×10 ⁸
10	20	436	26.881	1.3×10 ⁸
11	22	442	26.984	1.2×10 ⁸

2.3 PCV2 感染细胞培养液中的病毒在新的 A10 细胞的复制

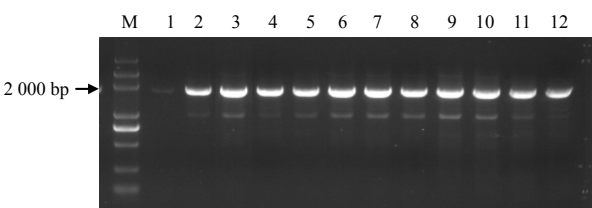
由表 4 可知,第 10 代带毒传代细胞的培养液与原接毒物 PCV2 病毒液的病毒的复制特征相似,PCV2 病毒含量随着细胞的增多而上升,到接毒后第

4 天达到较高水平，之后维持在 $10^7\sim 10^8$ 拷贝/mL。用 PCV2 全长引物做 PCR 检测的结果见图 4。从细胞培养液样品中均能检测到约 1 767 bp 的 PCV2-1B 全长基因组。

表 4 维持培养的病毒感染细胞样品的定量PCR检测结果

Table 4 Quantitative PCR for infected cells maintained through culture medium exchange

换液次数	维持时间/d	样品号	C_t	DNA 含量/ (拷贝·mL ⁻¹)
0	1.2	1	34.988	3.6×10^5
0	2.3	2	30.411	9.9×10^6
1	4.0	3	26.746	1.4×10^8
2	6.0	4	28.918	2.9×10^7
3	8.0	5	29.348	2.1×10^7
4	10.0	6	26.800	1.4×10^8
5	12.0	7	24.769	5.9×10^8
6	14.0	8	26.663	1.5×10^8
7	16.0	9	26.042	2.4×10^8
8	18.0	10	26.712	1.5×10^8
9	20.0	11	28.444	4.1×10^7
10	22.0	12	29.600	2.6×10^7



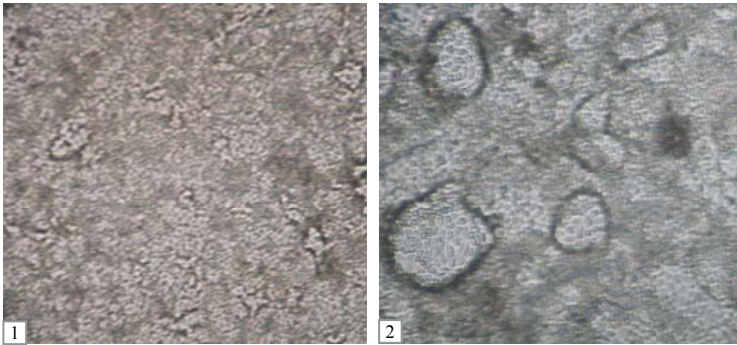
1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12分别为接毒后1.2、2.3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 d的细胞培养液样品的PCR结果；M为Trans2K™ plus DNA Marker。

图4 维持培养的病毒感染细胞的PCR结果

Fig. 4 PCR tests for infected cells maintained through culture medium exchange

2.4 PCV2 感染维持细胞的形态

PCV2 感染的细胞在换液维持过程中出现了细胞重叠生长(图 5)。随着时间的延长,细胞不断增多,到了后期原有的隔天换液方式已不能满足细胞的生长需要。可以加大新添加培养基的量,或降低培养基中血清的浓度(数据未显示)。



1 低倍显微镜下的细胞；2 高倍显微镜下的细胞。

图5 PCV2感染细胞换液维持过程中的形态

Fig. 5 Morphology of infected PK15(A10) cells continuously maintained

3 讨 论

在带毒细胞的传代过程中，各代次细胞的 PCV2 的病毒含量先呈上升趋势，之后趋于平稳，这与其他研究^[8]报道的情况相似，即病毒滴度随着病毒在细胞的传代而升高，最后滴度稳定在约 $10^{5.6}$ TCID₅₀/mL。Fenaux 等^[9]将 PCV2 在 PK15 细胞上传了 120 代，包括带毒传代和冻融传代，结果第 120 代的病毒比第 1 代的病毒高出 1 个数量级，认为病毒滴度的提高归因于第 30 代和第 120 代分别出现的 1 个碱基突变。而本研究 PCV2 在 PK15 细胞传 10 代获得的病毒基因组没有发生碱基的突变(数据未显示)，而病毒的复制同样提高了很多，说明细胞的传代能促

进 PCV2 的增殖。

在不受污染的情况下，PCV2 感染的细胞可以不断维持，且保持 PCV2 的量。通过维持培养、收集感染细胞培养液的方式，获得了大量的病毒。这些培养液中的死亡细胞含有大量 PCV2 DNA(结果未列出)，与 Zhu 等^[10]的研究结果相似。感染细胞培养液中的病毒同样能感染新的 A10 细胞，并在维持细胞中稳定复制，进一步证明了 PCV2 的复制特征。李志娟等^[11]研究了 PCV2 在 PK15 细胞的复制动力学，用荧光定量 PCR 检测，发现 PCV2 在接毒后 96 h 病毒的复制达到最高，随后复制下降。本研究的结果与其不一致，这应该是 96 h 之后培养基中营养耗尽，细胞生长不良所致。

普遍认为 PCV2 不引起 PK15 细胞产生病变^[6]。从 PK15 细胞中可克隆出在感染 PCV2 后产生病毒的细胞^[12]。本研究中,PK15 细胞能够在感染 PCV2 后带毒连续传代及带毒不断维持,应归因于 PK15(A10)在感染 PCV2 后不产生细胞病变,能够与 PCV2 共存。

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] Beach N M, Meng X J. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2)[J]. Virus Research, 2012, 164(1/2): 33-42.
- [3] Segalés J, Urnizac A, Alegrea A, et al. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2(PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms[J]. Vaccine, 2009, 27(52): 7313-7321.
- [4] 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]. Virology, 2010, 84(17): 8986-8989.
- [5] 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.
- [6] 罗维, 赵墩, 蒋大良, 等. 适合猪圆环病毒 2 生长的 PK15 均质细胞株的构建[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2013, 39(4): 404-408.
- [7] 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外感染性试验[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011, 37(1): 68-72.
- [8] 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.
- [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] 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.
- [11] 李志娟, 王永生, 陈陆, 等. 荧光定量 PCR 检测猪圆环病毒 2 型方法的研究与应用[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2011, 32(1): 49-54.
- [12] Gabriel Chen H C, Kuob T Y, Yang Y C, et al. Highly permissive subclone of the porcine kidney cell line for porcine circovirus type 2 production[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 187(2): 380-383.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维