

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101665781 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 23

(21) 申请号 200910181983. 2

审查员 史晶

(22) 申请日 2009. 08. 06

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C200936 2009. 05. 04

(73) 专利权人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗 1 号

(72) 发明人 姜平 王先炜 陈念劬

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 张素卿

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010. 01)

C12N 7/00 (2006. 01)

C12R 1/93 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

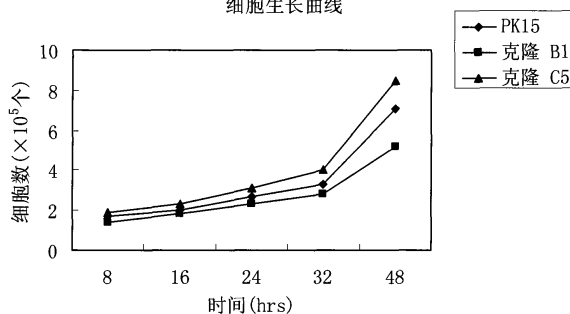
(54) 发明名称

高滴度猪圆环病毒 2 型培养细胞、制备方法及其用法

(57) 摘要

本发明高滴度猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 培养细胞、制备方法及其用法,属于生物技术领域。为获得能稳定产生高滴度 PCV2 的 PK15 细胞系,对 PK15 母细胞进行有限稀释后进行了连续的细胞克隆和亚克隆,利用 IFA 筛选,获得 1 株对 PCV2 具有高敏感性的 PK15-B1 细胞系。该细胞系生物学特性稳定,无外源微生物污染。该细胞接种 100TCID<sub>50</sub>/ml PCV2 后,37℃培养 3-4 天,病毒滴度达 10<sup>7.0</sup>TCID<sub>50</sub>/ml,比接种 PK15 母细胞的病毒滴度高 100 倍,表明 PK15-B1 细胞系对 PCV2 更为敏感,更利于 PCV2 的复制。本研究筛选的 PK15-B1 克隆细胞株及高滴度 PCV2 制备方法可用于 PCV2 疫苗和相关诊断试剂的研究与产品生产。

细胞生长曲线



1. 高滴度猪圆环病毒 2 型培养细胞, 该细胞克隆株 PK15-B1 为猪肾细胞传代细胞 PK15-B1, 已在中国典型培养物中心进行保藏, 保藏日期: 2009 年 5 月 4 日, 保藏号为 CCTCC NO :C200936。

2. 权利要求 1 所述高滴度猪圆环病毒 2 型培养细胞用于增殖高滴度猪圆环病毒 2 型的方法, 其特征在于:

将 PK15-B1 克隆细胞接种于细胞培养瓶内, 加入含体积比 8% -10% 犊牛血清的 MEM 营养液, 37°C 培养 48 小时可以形成细胞长满单层, 接种  $10^{4.0}$ /ml 以上的 PCV2, 加入含体积比 4% -5% 犊牛血清的 MEM 营养液, 于 37°C 培养 72-96h, 收获细胞培养物, 冻融 3 次, 用 IFA 方法测定, PCV2 滴度可达  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml。

## 高滴度猪圆环病毒 2 型培养细胞、制备方法及其用法

### 一、技术领域

[0001] 本发明涉及高滴度猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 培养细胞、制备方法及其用法,属于高生物技术领域,专用于高滴度猪圆环病毒 2 型培养细胞克隆株的建立、筛选和鉴定,筛选的 PK15-B1 克隆细胞及高滴度 PCV2 制备方法可用于 PCV2 疫苗和相关诊断试剂的研究与产品制备。

### 二、背景技术

[0002] 猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 现被认为是引起断奶仔猪多系统衰竭综合症 (PMWS) 的主要因素,同时还发现 PCV2 与其它疾病相关,这些疾病包括肾病皮炎综合症、繁殖障碍、出生前心肌炎和弥散坏死性肺炎。PCV2 是猪圆环病毒 (PCV) 两种基因型中的一种,为小颗粒、无包膜、环状单股 DNA 病毒,属环状病毒科,因能持续感染猪肾细胞 (PK15) 而被首次鉴定识别。

[0003] 使用 PCV2 抗原制成的疫苗在对 PMWS 的预防中初见成效。随着针对 PCV2 引起的 PMWS 及其它疾病的疫苗、诊断试剂和治疗方法的形成与发展,我们需要有效可靠的方法来获取足量的 PCV2 病毒。各实验室培养 PCV2 均在猪肾细胞系 PK15 上增殖。但是,病毒滴度低,病毒含量都低于  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml。免疫荧光试验显示,受 PCV2 感染的 PK15 细胞比例仅有 20% -30%。

### 三、发明内容

[0004] 技术问题 本发明的目的是筛选一株对 PCV2 高度易感且稳定的同源性 PK15 细胞系,并能持续产出高滴度的 PCV2,用于病毒增殖,培养的病毒可用于 PCV2 疫苗和相关诊断试剂的研究与产品制备。

[0005] PK15 细胞虽然适合 PCV2 增殖,但病毒滴度比较低,病毒的含量不能满足疫苗和诊断抗原的制备。本研究通过细胞克隆和筛选,成功获得一株能持续稳定增殖高滴度 PCV2 的 PK15 克隆细胞株 PK15-B1。

[0006] PK15-B1 克隆细胞株形态均一,细胞生长具有 S 型曲线,细胞连续传代至第 70 代,细胞形态和生长速度稳定,无支原体、PCV1、HCV、PPV、BVDV 和 PRV 等外源微生物污染。将 PK15-B1 细胞接种于细胞培养瓶内,加入含 8% -10% 犊牛血清的 MEM 营养液,37℃ 培养 48 小时可以形成细胞单层,接种 PCV2 ( $10^{4.0}$ /ml 以上),加入含 4% -5% 犊牛血清的 MEM 营养液,于 37℃ 培养 72-96h,可以出现细胞病变,PCV2TCID<sub>50</sub> 可达  $10^{7.0}$ /ml。

[0007] 技术方案 PK15-B1 细胞克隆株通过以下方法构建而成:

[0008] (1)PK15 细胞连续有限稀释进行细胞克隆 将保存的无猪圆环病毒 1 型 (PCV1) 污染的 PK15 细胞经胰蛋白酶消化为单个细胞后进行连续梯度稀释,然后分别培养于 96 孔细胞板,37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 10-14 天,挑选有单个细胞生长的细胞孔中细胞进行亚克隆培养,并连续亚克隆培养 3 次,获得亚克隆细胞株;

[0009] (2) 对猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 敏感的 PK15 克隆细胞株的筛选 将 PK15 细胞

不同克隆细胞株分别接种于 96 孔细胞培养板内,待细胞长满单层接种 PCV2 分离病毒,于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48h,观察细胞形态,弃去培养液,用 PBS 洗细胞 3 次,经无水乙醇固定后,分别加入 PCV2 抗血清(筛选自临床阳性血清),37℃ 作用 30min, PBS 洗涤 3 次后加入 FITC-SPA(Boster 公司),37℃ 作用 30min,洗涤后于荧光显微镜下观察特异性荧光细胞,并以未接毒的细胞作为阴性对照,挑选荧光数量最多(远多于正常 PK15 细胞荧光数量)的 PK15 细胞克隆株进行传代,获得 PK15-B1 克隆细胞株,并于 -196℃ 保存。

[0010] 用上述获得的 PK15-B1 细胞克隆株进行猪圆环病毒 2 型的增殖:

[0011] 将 PK15-B1 克隆细胞接种于细胞培养瓶内,加入含 8% -10% 犊牛血清的 MEM 营养液,37℃ 培养 48 小时可以形成细胞长满单层,接种 PCV2( $10^{4.0}$ /ml 以上),加入含 4% -5% 犊牛血清的 MEM 营养液,于 37℃ 培养 96-72h,可以出现细胞病变,PCV2 滴度达  $10^{7.0}$ /TCID<sub>50</sub>/ml。

[0012] 有益效果

[0013] PCV2 是引起 5-14 周龄仔猪患 PMWS 的主要因素,该病给养猪产业带来了巨大的经济损失。国外 PCV2 疫苗主要有基因工程疫苗和全病毒灭活疫苗,但因为 PCV2 滴度太低,难以获得足够的 PCV2 病毒,从而影响了 PCV2 研究及其诊断制品和疫苗的研究与开发。我国至今尚无商品化 PCV2 疫苗。为了获得关于疫苗、诊断试剂和治疗手段的更多信息,进行更为直接有效的研究,就需要获得一株持续对 PCV2 具有高感染性的细胞系。

[0014] 对 PCV2 敏感度高的 PK15-B1 细胞接毒后细胞状态会发生一定变化,表现为细胞聚集、拉网和脱落,疑为病变,该现象还未见报道。病毒滴度和病毒生长曲线测定表明,PK15-B1 克隆株较之 PK15 细胞更利于 PCV2 的复制与增殖,PCV2 滴度达  $10^{7.0}$ /TCID<sub>50</sub>/ml,并且这种敏感性在传代至第 50 代内也没有丢失。经检测,PK15-B1 细胞中未检测到常见的几种交叉感染病毒,无细菌和支原体感染。因此,PK15-B1 细胞克隆株及高滴度 PCV2 的增殖方法在 PCV2 研究与疾病防治方面具有广阔的应用前景。目前,我们已经利用 PK15-B1 细胞克隆株研制成功 PCV2 灭活疫苗(SH 株)。

#### 四、附图说明

[0015] 图 1 PK15-B1 细胞株细胞生长曲线

[0016] 图 2 PK15-B1 细胞外源病毒检测

[0017] M:标准分子且 2000bp DNA Ladder;Lane 1:DNA 病毒 PCV1 PCR 产物;Lane 2:PK15-B1 细胞外源 DNA PCR 产物,分子量大小 413bp;Lane 3:RNA 病毒 BVDV RT-PCR 产物,分子量大小 290bp;Lane 5:RNA 病毒 HCV RT-PCR 产物,分子量大小 378bp;Lane 7:RNA 病毒 EMCVRT-PCR 产物,分子量大小 186bp;Lane 4、6、8:PK15-B1 细胞外源 RNART-PCR 产物

[0018] 图 3 PCV2 在 PK15-B1 细胞的生长曲线(实时定量 PCR)

[0019] 生物材料保藏:细胞克隆株 PK15-B1 为猪肾细胞传代细胞 PK15-B1,已在中国典型培养物中心进行保藏,保藏日期:2009 年 5 月 4 日,保藏号为 CCTCC NO:C200936。

[0020] 五、具体实施方式

[0021] 1 对 PCV2 易感的 PK15 细胞系的克隆和筛选

[0022] (1)PK15 细胞连续有限稀释进行细胞克隆将保存的无猪圆环病毒 1 型(PCV1)污染的 PK15 细胞(中国典型培养物保藏中心)经胰蛋白酶消化为单个细胞后进行连续梯度稀

释,然后分别培养于 96 孔细胞板,37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 10-14 天,挑选有单个细胞生长的细胞孔中细胞进行亚克隆培养,并连续亚克隆培养 3 次,获得亚克隆细胞株;

[0023] (2) 对猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 敏感的 PK15 克隆细胞株的筛选将 PK15 细胞不同克隆细胞株分别接种于 96 孔细胞培养板内,待细胞长满单层接种 PCV2 分离病毒 PCV2-SH( 保藏号为 CGMCC NO. 2389, 专利申请号为 2008100244231, 公开号 :CN101240264, 公开日 :2008. 08. 13), 于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48h, 观察细胞形态, 弃去培养液, 用 PBS 洗细胞 3 次, 经无水乙醇固定后, 分别加入 PCV2 阳性血清 ( 筛选自临床 ), 37℃ 作用 30min, PBS 洗涤 3 次后加入 FITC-SPA (Boster 公司), 37℃ 作用 30min, 洗涤后于荧光显微镜下观察特异性荧光细胞, 并以未接毒的细胞作为阴性对照, 挑选荧光数量最多 ( 远多于正常 PK15 细胞荧光数量 ) 的 PK15 细胞克隆株进行传代, 并于 -196℃ 保存。

[0024] 2 高滴度猪圆环病毒 2 型的增殖方法

[0025] 经过细胞培养条件的筛选和优化, 确定如下培养方法, 可以获得高滴度 PCV2。即 : 将 PK15-B1 克隆细胞接种于细胞培养瓶内, 加入含 8% -10% 犊牛血清的 MEM 营养液, 37℃ 培养 48 小时可以形成细胞长满单层, 接种 PCV2, 加入含 4% -5% 犊牛血清的 MEM 营养液, 于 37℃ 培养 96-72h, 收获细胞培养物, 冻融 3 次, 用 IFA 方法测定病毒滴度, PCV2 滴度达 10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>/ml。

[0026] 3 PK15-B1 细胞系的特性研究

[0027] 3.1 细胞形态

[0028] 分别取等量的 PK15 母细胞、克隆株 PK15-B1 细胞接种于 6 孔板中, 加入含 8% -10% 犊牛血清的 MEM 营养液, 37℃ 培养 48 小时, 待细胞长满单层观察其形态差异。同 PK15 细胞相比, PK15-B1 细胞克隆株的形态并非典型的梭状, 细胞形态纵向变短, 而横向则变粗, 细胞边缘也平滑了许多。

[0029] 3.2 细胞生长速度

[0030] 取约 1×10<sup>5</sup> 个细胞接种于 6 孔板中培养, 加入含 8% -10% 犊牛血清的 MEM 营养液, 37℃ 培养, 分别于第 8, 16, 24, 32 和 48 小时取其中 1 孔细胞进行染色、计数, 每个孔做 3 个重复, 该实验重复 3 次。证明 PK15-B1 细胞的生长速度相对变缓。

[0031] 3.3 细胞生物学稳定性

[0032] 将克隆筛选后的 PK15 细胞传至第 50 代, 选取 5、10、20、50 代铺于 96 孔板, 待长满单层, 分别接种 PCV2, 37℃ 培养 96 小时, 观察细胞病变; 细胞病变出现时间没有变化, 证明细胞对病毒的敏感性没有发生改变。

[0033] 选取 5、10、20、50 代细胞铺于 96 孔板, 待长满单层, 分别接种 PCV2, 37℃ 培养 48h 后, 用 IFA 方法检测荧光数量, 观察不同代次间荧光数量的差异, 以判定克隆的 PK15-B1 细胞对 PCV2 易感的特性是否稳定。结果表明, 第 5、10、20 和 50 代 PK15-B1 接种病毒后进行荧光染色, 染色的结果没有区别, 可见该克隆细胞株对 PCV2 的易感性并未因代次的增高而发生改变。

[0034] 3.4 细胞外源病毒检测

[0035] 取第 5、10、20、50 代 PK15-B1 细胞, 按病毒提取的方法, 进行 DNA/RNA 提取, 用针对 PCV1、HCV、PPV、BVDV 和 PRV 的特异性 PCR 引物, 进行 PCR/RT-PCR, 同时设定已知病毒对照, 分别测定 PK15-B1 细胞是否存在该病毒。PCR 结果显示, 其它外源病毒检测都为阴性。

[0036] 3.5 细胞支原体检测

[0037] 同时,按《中国兽药典》附录的方法,取少量细胞上清按比例接种于支原体培养基中,于 37℃ 培养 5-7 天,并设立阴性对照,测定是否存在支原体。若培养基变为金黄色则证明有支原体污染,未变色则表明未被支原体污染。证明该克隆细胞株无支原体污染。

[0038] 4 PCV2 在克隆细胞株上的生长曲线

[0039] 取约  $1 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔细胞板中培养,待细胞长满单层在每个孔中接种等量 PCV2 ( $100\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ),加入等量维持液 1mL,并于接种后第 24、48、72 和 96 小时收获细胞上清,分别用 IFA 和实时定量 PCR 方法测定病毒  $\text{TCID}_{50}$  和分析病毒核酸,重复 3 次。结果表明,当接种病毒达到 72-96 小时时,病毒含量达到最高。

[0040] 4.1  $\text{TCID}_{50}$  测定

[0041] 将 PCV2 病毒液作  $10^{-1}$  到  $10^{-8}$  倍比稀释后分别接种于长满单层的 PK15 母细胞、克隆的 PK15-B1 细胞,每个稀释度 4 个孔,同时设立阴性对照,培养 48h 后,用 IFA 方法进行检测。

[0042] 4.2 实时定量 PCR

[0043] 取 PCV2 病毒液,用 zonDNA 试剂提取病毒 DNA。PCR 引物序列如下:F: 5' -CCAGGAGGGCGTTCTGACT-3', R: 5' -CGTTACCGCTGGAG AAGGAA-3',引物由 Invitrogen 生物公司合成。实时 PCR 反应体系  $20 \mu\text{L}$ :cDNA  $1 \mu\text{L}$ ,  $2 \times$ Power SYBRGreen PCR Master Mix (ABI 公司)  $10 \mu\text{L}$ ,引物 F/R 浓度均为  $400\text{nmol}/\text{L}$ 。反应在 ABI7300 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司) 上进行,反应条件为:  $50^\circ\text{C}$  2min; 预变性  $95^\circ\text{C}$  2min;  $95^\circ\text{C}$  15s,  $60^\circ\text{C}$  1min; 共进行 40 个循环。同时设定不加 DNA 的阴性对照。

[0044] 以含有 PCV2 全基因序列的质粒 pTSH(冯志新,姜平,王先炜,李玉峰,许家荣。猪圆环病毒 2 型 TaqMan 实时 PCR 检测方法的建立。中国病毒学,2006,21(4):371-374) 为标准样品。纯化后经紫外分光光 Real-time PCR 反应,根据各稀释度 Ct 值得出检测范围,并绘制标准曲线。

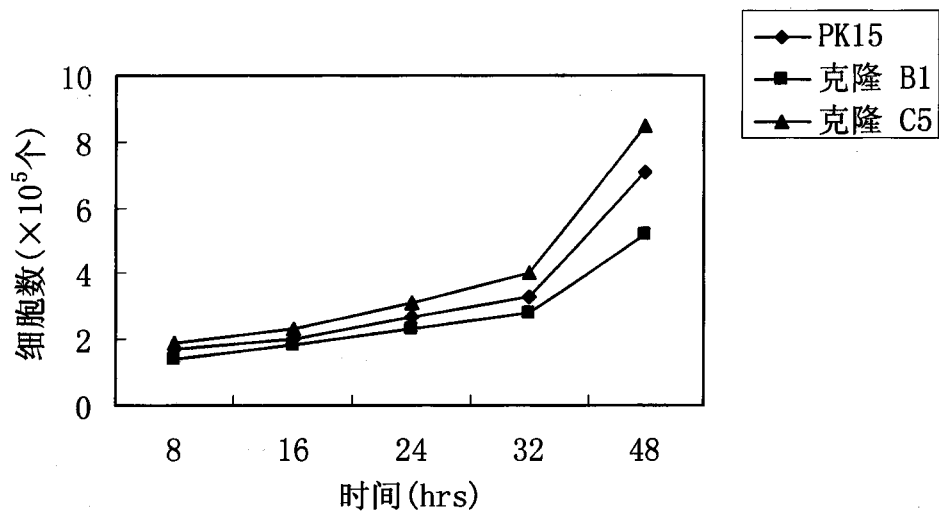


图 1

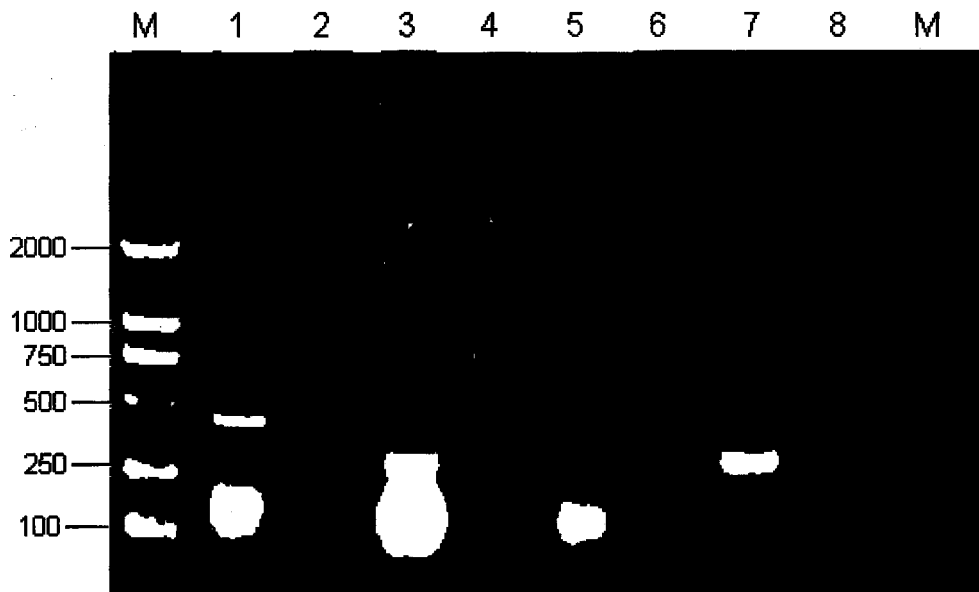
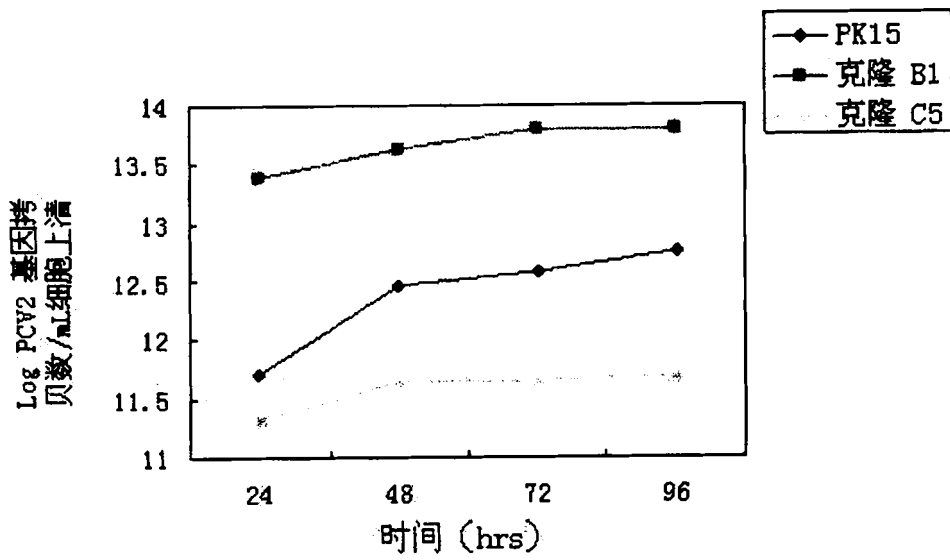


图 2



时间	24h	48h	72h	96h
PK15	11.71	12.47	12.58	12.75
PK15-B1	13.38	13.63	13.79	13.80

图 3