

不同细胞进行牛血清中牛源病毒检测的比较试验

袁良玉¹, 黄敏¹, 卢美玲¹, 吕冰凌¹, 潘海龙¹, 孟丽^{2*}

(1. 成都生物制品研究所有限责任公司, 成都 610023; 2. 中国生物技术股份有限公司, 北京 100029)

[收稿日期] 2014-10-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2014)12-0038-05 [中图分类号] S852.653

[摘要] 对不同细胞进行牛血清中牛源病毒检测的比较实验, 选出用于牛血清中病毒检测的最适合外源病毒增殖的细胞, 从而提高血清中病毒的检出率, 以确保用于疫苗生产的牛血清安全可靠。将牛腹泻病毒、牛腺病毒、牛细小病毒、牛副流感病毒、呼肠孤病毒和狂犬病毒接种到培养好的 MDBK 细胞、VERO 细胞、BT 细胞中, 逐日观察细胞的病变情况, 待观察到 10% 细胞出现病变或者培养 7 d 后, 进行免疫荧光染色, 选出适合用于六种病毒增殖的细胞系。结果显示, BT 细胞对所有病毒敏感, VERO 细胞对 BAV、BVDV 病毒不敏感, MDBK 对 REO、BVDV、RV 三种病毒不敏感。综合比较后, 选择 BT 细胞为 BPIV、BPV、BAV、BVDV 的增殖及实验用细胞, VERO 细胞为 REO、RV 的增殖及实验用细胞。

[关键词] 细胞; 病毒; 增殖

作者简介: 袁良玉, 硕士, 医学生物学工程师, 从事生物制品的质量控制工作。

通讯作者: 孟丽。E-mail: jade_yuan@163.com

器, 经峰纯度检测能确认 2 种药物出峰处无杂质干扰, 经光谱相似度检查锁定非法添加物, 通过保留时间与对照品进行比对的方法确定非法添加物, 具有较好的准确度和精密度, 重复性良好, 可以用于兽药中非法添加氨茶碱和二羟丙茶碱的检测。

参考文献:

- [1] 中国兽药药典委员会. 兽药使用指南(化学药品卷)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [2] 中华人民共和国农业部公告第 2508 号. 氟苯尼考制剂中非法添加烟酰胺、氨茶碱检查方法[S].
- [3] 张幸国, 饶跃峰, 赵青威. 高效液相色谱法测定人血浆中丙羟茶碱的含量[A]. 2006 年浙江省药品法规与临床药理学学术研讨会论文集汇编[C]. 2006 年.
- [4] 翁水旺. HPLC 测定双塞通片中二羟丙基茶碱的含量[J]. 华西药学杂志, 2004, 19(4): 288-289.
- [5] 董玲玲, 范强, 杨星, 等. 氟苯尼考粉中非法添加烟酰胺和氨茶碱的 HPLC-PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(5): 47-50.
- [6] 郝利华, 于晓辉, 董玲玲, 等. HPLC-PDA 法同时测定黄芪多糖注射液中非法添加的四种解热镇痛类药物[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(8): 28-31.
- [7] 郑琰, 李荣华. 高效液相色谱法测定茶碱麻黄碱片中茶碱与盐酸麻黄碱含量[J]. 中国药业, 2008, 17(21): 27.
- [8] 高向波, 王玉梅. HPLC 法同时测定复方氨茶碱口服液中的氨茶碱和盐酸麻黄碱的含量[J]. 儿科药学杂志, 2007, 13(3): 24-25.
- [9] 陈新善, 耿铮, 刘春光, 等. HPLC 法测定高原康胶囊中氨茶碱的含量[J]. 解放军药学学报, 2012, 28(6): 529-530.
- [10] 陈邦元, 郭贵宾, 丁妍. HPLC 法测定止咳平喘片中氨茶碱的含量[J]. 东南国防医药, 2007, 9(4): 267-269.
- [11] 王建, 吴珺. HPLC 法测定氨茶碱注射液的含量[J]. 西北药学杂志, 2010, 25(4): 252-253.
- [12] Yin C, Tang C, Wu X. HPLC determination of aminophylline, methoxyphenamine hydrochloride, noscapine and chlorphenamine maleate in compound dosage forms with an aqueous-organic mobile phase[J]. Pharm Biomed Anal, 2003, 33(1): 39-43.
- [13] 于河先. 高效液相色谱法测定二羟丙茶碱的含量[J]. 2012, 25(2): 215-216.
- [14] Iturriaga H, Coello J, Maspocho S, et al. Kinetic-spectrophotometric determination of theophylline, dyphylline, and Proxiphylline by use of partial least-squares regression[J]. Anal Bioanal Chem, 2002, 374(1): 33-38.
- [15] 王铁松, 仝禹, 郑洁, 等. 薄层色谱法快速筛查降脂、降压、止咳平喘类中药制剂的 29 种添加化学药物[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(11): 857-861.
- [16] 华玉琴, 祝波, 梁成章. 高效液相色谱法检测止咳平喘类中药制剂中违法添加的茶碱[J]. 中国药业, 2007, 16(24): 34-35.
- [17] 宋祥珍, 李莉, 张自强. 非法添加止咳平喘类中药制剂的 HPLC-MS/MS 检测系统研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(10): 1822-1828.

(编辑: 侯向辉)

Comparison Experiment of Detecting Bovine Virus in Bovine Serum by Different Cells

YUAN Liang-yu¹, HUANG Min¹, HU Mei-ling¹, LV Bing-ling¹, PAN Hai-long¹, MENG Li^{2*}

(1.Chengdu Institutes of Biological Products Co Ltd, Chengdu 610023, China; 2.China National Biotech Group Company Limited, Beijing 100029, China)

Abstract: Choose the most suitable cell that was used in testing for exogenous virus in bovine serum, then as sensitive cells for detecting the virus in bovine serum in order to improve the detection rate of virus in the serum, it ensured that the bovine serum which was used in production of vaccine was safe. Be ready to cultivate appropriate cells including MDBK, VERO, BT. At the same time, six kinds of virus referred to the BPV, BVDV, BAV, BPIV, REO, RV, Six kinds of virus was inoculated on these three cells. Observing the cells which was inoculated virus every day. After 10% cell was appeared lesion or the cell was cultivated for 7 days, take out the cell, and these cells were dyeing by immunofluorescence, then according to the staining results to determine which cell was suitable for detecting these virus. The results showed that BT cell was sensitive to all cells, Vero cell was not sensitive to BAV, BVDV, MDBK was not sensitive to REO, BVDV, RV. The results of this study showed that BT cells can be used in proliferation and testing for BPV, BPIV, BAV, BVDV, and Vero cell can be used for REO, RV. In order to improve the detection rate of virus in the serum, we can choose a variety of cells at the same time.

Key words: cell; virus; proliferation

生物制品的出现对人类的健康和生活质量的提高有非常特殊的意义。生物制品的生产,尤其是病毒性疫苗的生产,大多数都需要经过细胞的培养^[1]。牛血清是疫苗生产的重要原材料,在培养体系中加入一定量牛血清可以补充细胞生长所需的生长因子、激素、细胞黏附因子等^[2],但是,各种外源因子很容易污染牛血清^[3-4],所以牛血清的质量与疫苗的质量息息相关。目前,已知有多种病毒可通过胎盘进入胎牛血清,而且血清中还可能存在着某些人畜共患疾病的病毒,如狂犬病毒^[5],因此对牛血清中病毒的检测尤为重要。2010版《中华人民共和国药典》规定^[6],细胞培养用的牛血清至少要检测牛腹泻病毒(BVDV)、牛细小病毒(BPV)、牛副流感病毒(BPIV)、呼肠孤病毒(REO)、牛腺病毒(BAV)和狂犬病毒(RV)六种病毒。在进行病毒检测时,选择合适的敏感细胞,可以提高对病毒的检出率,因此,本研究选用MDBK细胞、VERO细胞、BT细胞分别对六种病毒进行了检测,选出用于牛血清中病毒检测的最适合外源病毒增殖的细胞,从而提高牛血清中病毒的检出率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 BT细胞、VERO细胞和MDBK细胞由成都生物制品研究所有限责任公司提供。

1.1.2 荧光抗体 抗BVDV(批号:P111222-002)、BPIV(批号:P111222-003)、BPV(批号:P100430-001)、BAV(P080421-001)、REO(批号:P100118-001)的荧光抗体,均购自美国的VMRD;抗RV的荧光抗体(批号:308372)购自日本FUJIR。

1.1.3 病毒 BVDV、BPIV、BPV、BAV、REO病毒从ATCC购买,接种VERO细胞或BT细胞进行增殖,待细胞出现CPE时收获,于-70℃条件下保存备用。RV病毒由成都生物制品研究所病毒性疫苗研究室提供。

1.1.4 高糖DMEM 批号:NZG1168,购自ATCC。

1.1.5 牛血清 批号:DXJ0440,购自Hyclong。

1.1.6 牛血清白蛋白(BSA) 批号:262,购自SeaSkyBio。

1.2 方法

1.2.1 细胞浓度和血清浓度的确定 取长满单层的细胞,制备成 $0.5 \times 10^5/\text{mL}$ 、 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 、 $2.0 \times 10^5/\text{mL}$ 3

个不同浓度的细胞悬液,分别使用5%和10%的血清浓度配制细胞生长液来传代,挑选出合适的细胞浓度和血清使细胞生长7 d后,能够长满,但不出现脱落情况。

1.2.2 细胞板制备及病毒接种 将制备好的BT细胞、VERO细胞和MDBK细胞悬液加入到96孔细胞板中,每种细胞至少制备14孔。待细胞完全贴壁后,弃去细胞培养液。将六种病毒的病毒悬液加入到铺制了细胞的96孔板中,50 μL /孔,每种细胞接种2孔,剩余的2孔细胞加入50 μL 的DMEM,作为阴性对照,放置于37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中吸附,吸附1.5 h后,抽去各孔的液体,补加入相应的5%血清浓度的细胞培养液。置于37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养,逐日观察。

1.2.3 结果判定 待观察到10%细胞出现病变或

者培养7 d后,进行免疫荧光染色,取出培养好的96孔板,用甲醇对细胞进行固定,-20 $^{\circ}\text{C}$,固定20 min,用PBS清洗3次,加3%的BSA在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中封闭30 min,加适宜浓度的荧光抗体,避光放入4 $^{\circ}\text{C}$ 染色,次日取出,先用PBS清洗三次,然后于荧光显微镜下用蓝光观察结果。显示特异性的黄绿色荧光,可判定为阳性,即感染了病毒;没有显示特异性的黄绿色荧光,可判定为阴性。

2 结果

2.1 最佳细胞浓度和血清浓度 实验结果显示,选用5%的血清浓度,VERO细胞选择 0.5×10^5 的浓度,BT细胞选择 1.0×10^5 的浓度,MDBK细胞选择 0.5×10^5 的浓度为最佳方案(表1)。

2.2 病变结果 六种病毒分别接种三种细胞后的结果如表2、图1所示。

表1 不同细胞浓度和血清浓度培养的细胞生长情况结果表

细胞	细胞浓度	培养条件	5 d	6 d	7 d
VERO	0.5×10^5	5%血清浓度	80%~90%	长满	未脱落
		10%血清浓度	长满	很满	未脱落
	1.0×10^5	5%血清浓度	长满	很满	未脱落
		10%血清浓度	长满	很满	脱落
	2.0×10^5	5%血清浓度	长满	脱落	脱落
		10%血清浓度	长满	脱落	脱落
BT	0.5×10^5	5%血清浓度	50%~60%	70%~80%	90%~100%
		10%血清浓度	50%~60%	70%~80%	90%~100%
	1.0×10^5	5%血清浓度	70%~80%	90%~100%	长满、未脱落
		10%血清浓度	70%~80%	90%~100%	长满、未脱落
	2.0×10^5	5%血清浓度	80%~90%	长满	未脱落
		10%血清浓度	80%~90%	长满	未脱落
MDBK	0.5×10^5	5%血清浓度	50%~60%	80%~90%	长满、未脱落
		10%血清浓度	60%~70%	80%~90%	长满、未脱落
	1.0×10^5	5%血清浓度	长满	很满	未脱落
		10%血清浓度	长满	很满	脱落
	2.0×10^5	5%血清浓度	长满	脱落	脱落
		10%血清浓度	长满	脱落	脱落

BPIV接种BT细胞3~4 d,感染细胞呈拉网状,BPV细胞感染BT细胞在2~3 d,细胞圆缩,BAV接种BT细胞在3~4 d,感染细胞病变典型,呈圆缩、葡萄串状等,BVDV感染BT的病毒感染细胞

明显,感染细胞呈拉网状,REO感染BT细胞在6~7 d,感染细胞开始脱落,RV接种细胞,细胞未出现明显病变,且经荧光染色后可见荧光。

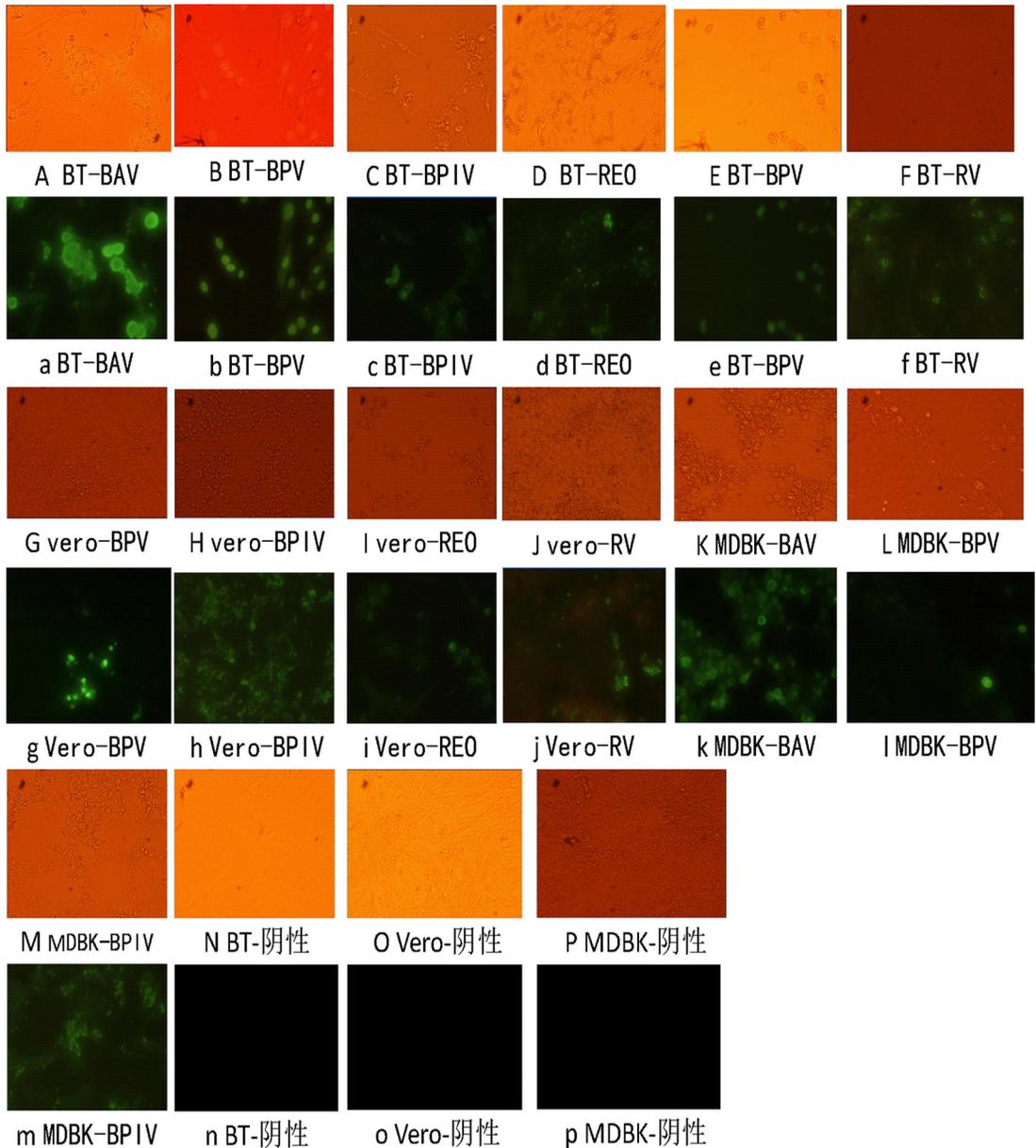
BAV、BVDV接种VERO细胞7 d,均未见细胞

病变,经荧光染色后也未出现荧光,BPV、REO、RV接种 VERO 细胞,培养 7 d,未见细胞出现病变,且经荧光染色后可见荧光。BPIV 接种细胞 4 d 后,经感染细胞呈细胞圆缩,染色后可见明显荧光。

BPIV 病毒接种 MDBK 细胞,培养 4~5 d,感染细胞呈拉网状,BAV 接种 MDBK 细胞后,培养 3~4 d 细胞出现明显病变,圆缩,感染细胞聚集呈葡萄串状,圆缩,BPV 感染 MDBK 细胞在 6~7 d,感染细胞圆缩,BVDV、REO、RV 均在 MDBK 细胞上培养 7 d,未见细胞病变,经荧光染色后也未出现荧光。

表 2 六种病毒感染细胞病变结果表

	BT		VERO		MDBK	
	CPE	IF	CPE	IF	CPE	IF
BPIV	+	+	+	+	+	+
BPV	+	+	-	+	+	+
BAV	+	+	-	-	+	+
BVDV	+	+	-	-	-	-
REO	+	+	-	+	-	-
RV	-	+	-	+	-	-



A~P: 明视场观察结果; a~p: 蓝色荧光观察结果

图 1 六种病毒接种三种细胞后的检测结果($\times 200$)

3 讨论与小结

现阶段,我国在很大程度上提高了牛血清的检测项目和检测指标,推动整个检测标准向欧美的药典及其他的国外先进标准靠拢,为整体提高我国牛血清的质量和整个疫苗产业质量迈出了关键一步。但是,《中华人民共和国药典》的要求和检测方法在我国推行的时间还较为有限,在以上六种病毒中除牛腹泻病毒是以往的常规检测病毒,已经有了很多检验方法学方面的研究,其余病毒的方法学检测均处于发展较慢的阶段。2010版《中华人民共和国药典》实施后,很多生物制品企业在开展牛病毒免疫荧光法检测方面做了很多工作,也在逐步开始做这方面的检测。对于病毒检测来说,选择合适的细胞,提高血清中病毒的检出率是牛血清检测的关键。

细胞培养液中的血清含量是细胞生长的一个关键条件,如果血清含量比较少,细胞生长较为缓慢;如果血清含量较高,细胞生长的速度也会比较快,但是,对病毒增殖来说差别不是很明显^[7],而且血清含量高,用的血清就多,经济费用也会高一些,所以,选择合适的接种条件才能保证血清病毒的正常检出。另外,细胞浓度的大小是细胞能否在瓶内表面贴壁生长的先决条件,接种病毒后,细胞密度太大或太小都会影响病毒的检出,所以在制备细胞板时选择合适的细胞浓度才能保证阴性对照细胞生长7 d不会脱落。

由于病毒对温度比较敏感,长时间在室温下能使病毒失去活性,例如牛副流感病毒极不稳定,对环境抵抗力也极弱,在没有蛋白质的溶液中,室温放置2~4 h,它的活力可降至10%,甚至没有活力^[8],所以在进行实验时要避免病毒的反复冻融和长时间在室温下操作。

从六种病毒接种三种不同细胞的结果可以看出,六种病毒在三种细胞上的感染情况各异。BT细胞对所有细胞都敏感,但是在接种REO病毒时,易出现脱落,而RV在接种BT细胞时,效果没有接种VERO细胞明显,VERO细胞对BAV、BVDV病毒不敏感,MDBK对REO、BVDV、RV三种病毒不敏感,但是,有文献报道,可以用牛肾细胞进行BVDV、REO的检测,ATCC的病毒资料指出可以使用原代牛肾细胞进行BVDV的增殖,因为本实验室使用的是传代牛肾细胞,代次过高会影响病毒检测

的敏感性^[9]。BT细胞作为敏感细胞用于实验,在免疫荧光染色时,易出现细胞脱落,所以会造成染色效果不佳的问题,有报道^[10]称细胞固定液和固定温度的不同会影响荧光染色的效果,在实验中选择合适的固定液进行固定^[11],可以避免这些情况。但是,整体来说BT细胞进行试验的敏感性要好些,也利于病毒的检出。

综合比较后,在实践中可以选择BT细胞为BPiV、BPV、BAV、BVDV的增殖及实验用细胞,VERO细胞作为REO、RV的增殖及实验用细胞。为了提高血清中病毒的检出率,实际操作中可以选择多种细胞同时进行实验。

参考文献:

- [1] Makoschey B, Patel J R, Van Gelder PTJA. Serum-free produced bovine Herpesvirus type 1 and bovine parainfluenza type 3 virus vaccine are efficacious and safe[J]. *Cytotechnology*, 2002, 39(3): 139-145.
- [2] 宋立荣, 李思经. 谈新生牛血清的质量控制[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2008, (10): 92-94.
- [3] Radwan G S, Brock K V, Hogan J H, *et al.* Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus[J]. *Vet Microbiol*, 1995, 44(1): 77-92.
- [4] Synge B A, Clark A M, Moar J A, *et al.* The control of bovine virus diarrhoea virus in Shetland[J]. *Vet Microbiol*, 1999, 64(2/3): 223-229.
- [5] 蔡翼虎, 王玉芳, 严雪仙. 狂犬病病毒检测方法的研究进展[J]. *浙江畜牧兽医*, 2009, (2): 12-13.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2010年版第三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [7] 张磊, 陈磊, 丁静静, 等. 猪细小病毒在F81细胞和PK15细胞增殖的研究[J]. *畜牧与兽医*, 2012, (44): 59-61.
- [8] Greenberg David P, Walker Robert E, Lee Min-Shi, *et al.* A bovine parainfluenza virus type 3 vaccine is safe and immunogenic in early infancy[J]. *The Journal of infectious diseases*, 2005, 191(7): 1116-1122.
- [9] 马岩松. 新生牛血清病毒检测[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011: 1-50.
- [10] 张维, 蹇爱荣, 高翔, 等. 细胞骨架染色中不同固定方法的探讨[J]. *中国细胞生物学报*, 2010, 32(1): 149-153.
- [11] Lieleg O, Sehmoller K M, Claessens M M, *et al.* Cytoskeletal Polymer networks; viscoelastic Properties are determined by the microscopic interaction Potential of cross-links[J]. *BioPhys J*, 2009, 96(11): 4725-4732.

(编辑:侯向辉)