

文章编号: 1007-7847(2000)03-0197-05

# 传染性法氏囊病病毒弱毒株 对 Vero 细胞的适应性研究\*

顾 铭, 聂峰光, 戚艺华, 欧阳藩

(中国科学院 化工冶金研究所 生化工程国家重点实验室, 中国 北京 100080)

**摘 要:** 传染性法氏囊病病毒疫苗的传统生产工艺是利用鸡胚成纤维细胞增殖 IBDV, 但易被外源病原污染, 且生产成本很高。借鉴国内外流行性乙型脑炎疫苗生产的经验, 使用 Vero 细胞增殖 IBDV 弱毒株, 从病毒高峰出现时间、滴度峰值的高低、对细胞代谢的影响等方面研究了 IBDV 对 Vero 细胞的适应性、敏感性以及适应后的种毒的长期保存过程中发现病毒滴度有下降趋势, 试用了不同试剂对病毒进行保护。

**关键词:** 传染性法氏囊病病毒弱毒株; Vero 细胞; 适应性; 保护剂

中图分类号: Q939.4; Q2 文献标识码: A

## Proliferation of Infectious Bursal Disease Virus on Vero Cell

GU Ming, NIE Feng-guang, QI Yi-hua, OUYANG Fan

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy,  
Academia Sinica, Beijing 100080, China)

**Abstract:** The adaptation of infectious bursal disease virus (IBDV) B<sub>836F4</sub> to Vero cells was studied. Results were as follows: Vero cell was suitable to proliferate IBDV; IBDV titer of the medium reached a high level. Three different additives were tested to protect IBDV during cryopreservation.

**Key words:** infectious bursal disease virus (IBDV); Vero cells; adaptation; protective additives

传染性法氏囊病是危害养鸡业较严重的病毒性传染病之一, 该病尚无特效治疗手段, 以预防接种疫苗为主。传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 疫苗的生产目前主要采用原代鸡胚成纤维细胞增殖培养 IBDV 来实现。SPF 鸡胚取得及培养过程中易被外源病原污染, 使产品质量

\* 收稿日期: 2000-07-15

基金项目: 国家“九五”科技攻关资助项目 (96c-02-03-04);

作者简介: 顾铭 (1972-), 女, 江苏无锡人, 中国科学院化工冶金研究所助研, 硕士, Tel: 010-82627061, E-mail: rainbow\_gm@sina.com; 聂峰光 (1968-), 男 (蒙古族), 内蒙古人, 副教授, 硕士, 从事生物化工研究; 戚艺华 (1940-), 女, 吉林人, 研究员, 从事生物制品研究; 欧阳藩 (1940-), 男, 湖南人, 研究员, 从事生物化工研究。

不稳定;且 SPF 种蛋价格高,使疫苗成本很高。Vero 细胞是一种贴壁依赖性的传代细胞系,可大规模培养。Vero 细胞已被国外成功地用于生产脊髓灰质炎病毒和狂犬病毒等疫苗<sup>[1]</sup>。因 IBDV 有鸡(I型)和火鸡(II型)两个血清型,每种血清型又有多种亚型<sup>[2]</sup>。有文献认为用 Vero 细胞培养 IBDV 时,是否出现 CPE,病变高峰出现时间的长短与 IBDV 的类型、毒力强弱、对细胞的适应程度以及所用细胞的种类和代次长短有关<sup>[3]</sup>。本文研究了 IBDV B<sub>836</sub>F<sub>4</sub> 对 Vero 细胞的适应性,并针对适应后的种毒在长期保存过程中滴度有下降趋势的问题,考察了不同保护剂对病毒的保护效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

Vero 细胞:由卫生部北京生物制品研究所提供,第 146 代。

### 1.2 病毒

IBDV B<sub>836</sub>F<sub>4</sub> 由北京农林科学院提供,滴度 6.75(TCID<sub>50</sub>)。

### 1.3 培养基

细胞培养基: M199 培养基+ 8% 胎牛血清, pH 7.2。

病毒培养基: M199 培养基+ 2% 胎牛血清, pH 7.2。

### 1.4 保护剂

Antifoam C、DMSO 及 Pluronic F-68 购于 SIGMA CHEMICAL CO., 胎牛血清、牛血清白蛋白购于天津川页生化制品有限公司。

### 1.5 分析方法

病毒滴度测定: 蚀斑法, 用鸡胚成纤维细胞滴定, 见文献[4]。

葡萄糖、乳酸测定: 生化分析仪(YSI)。

### 1.6 病毒培养方法

细胞长成均匀的单层后, 弃去上清, 接种病毒, 使其在 37℃ 培养 1 h, 有利于病毒吸附于细胞, 最后补足培养基于 37℃ 培养。

## 2 结果和讨论

### 2.1 IBDV 在 Vero 细胞上传代 5 代时病毒增殖情况

图 1~3 说明: IBDV 在 Vero 细胞上繁殖一代即出现病变, 病变特征与在鸡胚成纤维细胞上培养时十分相似, 但病毒滴度较种毒略低。第 2 代, 病毒滴度就略高于种毒。至第 4 代病毒滴度已达到 8.0, 大大高出滴度为 6.75 种毒; 且病变高峰出现时间提前了 24 h。第 5 代病变高峰出现时间与第 4 代持平, 病毒滴度略有下降。

实验表明: IBDV 是可以适应在 Vero 细胞上增殖的。经过 4 代的适应, 病变高峰出现时间大大提前, 最重要的是, 病毒滴度比种毒有了较大的提高。因为病毒的滴定过程也是一个 IBDV 在鸡胚成纤维细胞上增殖的过程, 所以这一实验结果同时说明: 鸡胚成纤维细胞对于已适应于 Vero 细胞的 IBDV 仍十分敏感。所以, 用 Vero 细胞增殖 IBDV 不仅可行, 而且具有一定的优势。

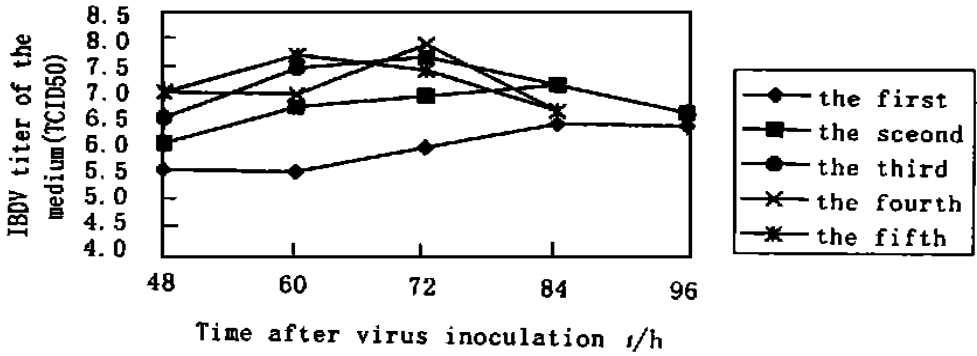


图1 IBDV 在 Vero 细胞上传代 5 次的病毒增殖曲线  
 Fig.1 Proliferation of IBDV on Vero cell for 5 generations

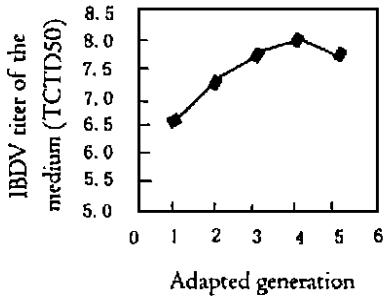


图2 病毒滴度峰值与适应代次的变化  
 Fig. 2 The relation between the maximum of IBDV titer and adapted generations

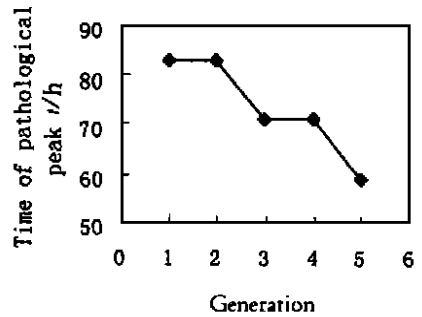


图3 病毒滴度高峰出现时间与适应代次的变化  
 Fig. 3 The relation between the appearance of maximum and adapted generations

### 2.2 IBDV 在 Vero 细胞上的代谢情况

图4说明: 接种病毒后的初期, 细胞代谢依然十分旺盛, 培养液中葡萄糖浓度直线下降. 这是由于接毒初期, 细胞自身的代谢活跃, 病毒进行核酸复制、蛋白质合成, 所以这个时期所表现出的代谢速率较高. 随着病毒增殖, 病毒对细胞生长的抑制作用不断增强, 细胞自身代谢减慢; 代谢速度明显低于未接种 IBDV 的细胞. 至培养后期, 细胞不断溶解, 以至于培养液中糖浓度略有上升.

IBDV 在 Vero 细胞上的代谢情况与 IBDV 在成纤维细胞上的代谢情况相吻合<sup>[5]</sup>, 说明 IBDV 是适应在 Vero 细胞上增殖的.

以上两组实验说明: IBDV 对 Vero 细胞的敏感性很好, 是适宜于在 Vero 细胞上培养的, 并可大幅度地提高病毒滴度. 当 IBDV 完全适应了 Vero 细胞上增殖, 病毒滴度在该培养条件下就不再提高, 此时的病毒十分适合作为 IBDV 在 Vero 细胞上增殖的种毒.

### 2.3 不同保护剂对 IBDV 长期保存的作用

在实验工作中发现, 适应于 Vero 细胞的 IBDV 在长期保存过程中病毒滴度有下降趋势, 且较鸡胚成纤维细胞增殖的种毒下降快. 所以根据细胞冷冻保存的经验, 选择了几种物质研究其对 IBDV 冷冻保存的作用.

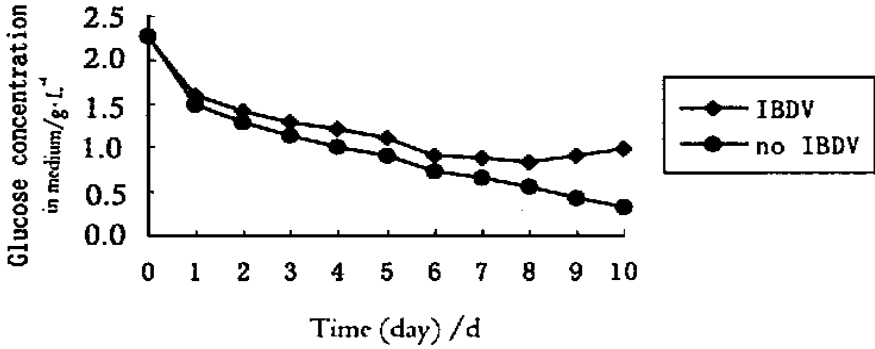


图4 接种与未接种 IBDV 的 Vero 细胞在葡萄糖代谢上的差别

Fig. 4 The metabolism of glucose of Vero cells with or without IBDV

在同批收取的滴度为 8.0(TCID<sub>50</sub>) 的 IBDV 病毒培养液中分别加入 Antifoam C (0.5%)、Pluronic F-68(0.75%)、DMSO(2.4%)、牛血清白蛋白(BSA)(1%)、胎牛血清(FBS)(10%)、甘油(Glycerin)(10%),在-30℃存放3个月后,取出测定病毒滴度。

由图5可见:在所选几种物质中,Antifoam C、Pluronic F-68、牛血清白蛋白对 IBDV 的保存有一定作用。我们对这三种保护剂进行了进一步的实验验证。

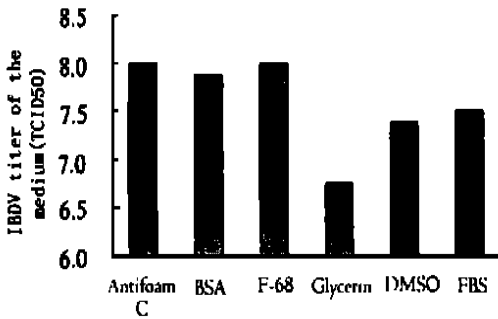


图5 不同保护剂对 IBDV 冷冻保存的影响

Fig. 5 The effect of different kinds of protective additives

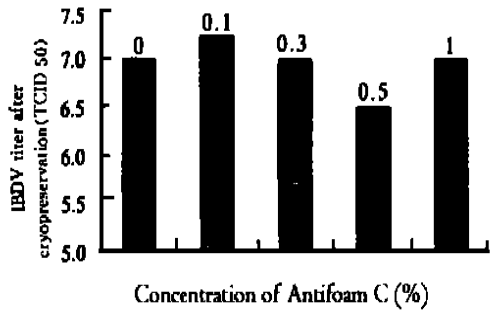


图6 不同浓度的破泡剂对 IBDV 保存的影响

Fig. 6 The effect of different concentration of Antifoam C

由图6可见: Antifoam C 浓度较低时(0.1%)对 IBDV 的保存有一定保护作用;而 Antifoam C 浓度较高时(0.3%, 0.5%, 1.0%),其保护作用不明显,过量的 Antifoam C 对病毒保存甚至还会有抑制作用。

由图7可见:低浓度的 Pluronic F-68(0.3%~1%)对病毒的保存有一定的保护作用,浓度为0.5%的效果最好,浓度过高时(2%)有一定的抑制作用。

由图8可见:适量的牛血清白蛋白(4%)对病毒的保存有一定的保护作用;浓度过高或过低时(如10%或1%),其保护作用不明显,甚至还会有抑制作用。

即:0.1%的 Antifoam C、0.5%的 Pluronic F-68、4%的牛血清白蛋白对 IBDV 的冷冻保存有一定保护作用。

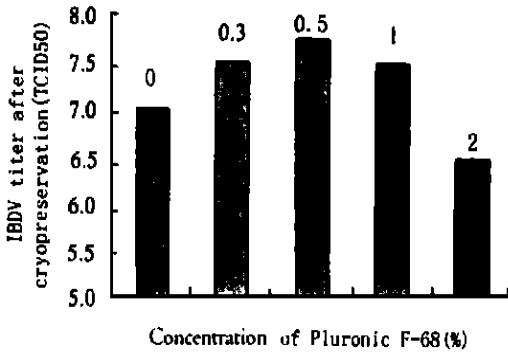


图7 不同浓度的 Pluronic F-68 对 IBDV 保存的影响

Fig. 7 The effect of different concentration of Pluronic F-68

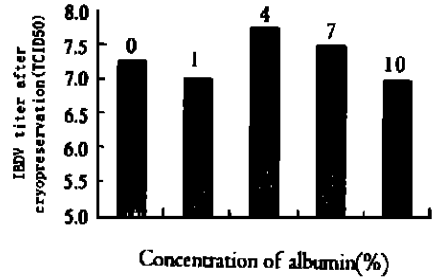


图8 不同浓度的牛血清白蛋白对 IBDV 保存的影响

Fig. 8 The effect of different concentration of BSA

### 参考文献:

- [1] 王玉树. 大规模微载体细胞培养技术研究- 微载体回收、细胞迁移、灌注培养及过程放大[D]. 北京: 中国科学院化工冶金所 (WANG Yu-shu. Large scale microcarrier cell culture technology-microcarrier recycling, cell transfer, perfusion culture and scale-up[D]. Beijing: Institute of Chemical Metallurgy, Chinese Academy of Sciences), 1998.
- [2] 徐为燕. 兽医病毒学[M]. 北京: 农业出版社(XU Wei-yan. Animal Virology[M]. Beijing: Agriculture Press), 1993. 83-84.
- [3] KIBENGE F S B, DHILLON A S, RUSSEL R G. Growth of serotypes and variant strains of infectious bursal disease virus in Vero cells[J]. Avian Diseases, 1988, 32(2): 298-303.
- [4] PURCHASE H G. 禽病分离鉴定实验室手册(第三册)[M]. 北京: 北京农业出版社(PURCHASE H G. Laboratory handbook of separation and purification of avian disease (Vol. 3)[M]. Beijing: Beijing Agriculture Press), 1993.
- [5] 李有根, 戚艺华, 聂峰光, 等. 传染性法氏囊病病毒在次代鸡胚成纤维细胞上的增殖[J]. 微生物学杂志 (LI You-gen, QI Yi-hua, NIE Feng-guang, et al. Proliferation of infectious bursal disease virus on second chicken embryo fibroblast cell [J]. Journal of Microbiology), 1998, 18(3): 10-14.