

# 口蹄疫 A 型病毒 AF/72 株标准细胞毒株的研制

杜进鑫<sup>1,2</sup>, 王永录<sup>1</sup>, 张永光<sup>1</sup>, 方玉珍<sup>1</sup>, 蒋守田<sup>1</sup>, 吕建亮<sup>1</sup>, 潘 丽<sup>1</sup>, 刘力宽<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院 兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 甘肃 兰州 730046; 2. 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**用口蹄疫 A 型病毒 AF/72 株的第 3 代乳鼠组织毒, 通过乳鼠继续适应 3 代后, 转适 BHK-21 细胞, 获得该毒株的细胞毒 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>, 经测定其 TCID<sub>50</sub> 为  $10^{-8.0}$ /mL; 经 RT-PCR 获得其 VP1 基因序列, 并与 GenBank 中的其他 6 株口蹄疫 A 型病毒株比对, 同源性均大于 85%; 经无菌检验和外源病毒检验, 纯净性达到兽用生物制品标准要求; 经间接夹心 ELISA 测定, OD 值均大于 0.2, 且该毒仅能被口蹄疫 A 型标准血清中和, 具有型特异性; 经紫外分光光度法测定其 146S 含量, 均值为 189 ng/mL, 远大于 22 ng/mL 的国际标准。综合纯净性检验结果、特异性检验结果和 146S 含量, 确定 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub> 为口蹄疫 A 型病毒株 AF/72 的标准细胞毒。

**关键词:**口蹄疫 A 型病毒; FMD; 毒株

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)03-0074-04

## Study of Reference Cellular Strain of AF/72 of FMD Type A Virus

DU Jin-xin<sup>1,2</sup>, WANG Yong-lu<sup>1</sup>, ZHANG Yong-guang<sup>1</sup>, FANG Yu-zhen<sup>1</sup>,  
JIANG Shou-tian<sup>1</sup>, LU Jian-liang<sup>1</sup>, PAN Li<sup>1</sup>, LIU Li-kuan<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Virology of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou 730046, China; 2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Gansu 730070, China)

**Abstract:** Get the foot-and-mouth virus AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub> by rat rejuvenation and BHK-21 cells adaption using FMD virus AF/72/MF<sub>3</sub> the use of Karber method to measure AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub> TCID<sub>50</sub>, its value was 8.0; the main antigen VP1 gene sequence was got by RT-PCR with 6 type A strains of FMDV in GenBank, homology was higher than 85%. By the sterile examination, other exogenous virus test, its purity of AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub> conform to Biological Products Standards for Animal Use; Indirect Sandwich ELISA OD Values greater than 0.2, This virus was only neutralized by the reference serum of FMD type A in line with the specific; 146S antigen content was measured by ultraviolet spectrophotometer, The average value was much higher than 22 ng/mL of international standards. AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub> was identified as reference cellular strain of AF/72 of FMD type A virus integrating many parameters.

**Key words:** FMD type A virus; FMD; Strain

兽用生物制品在生产、供应、储存、使用等环节中受各种因素的影响, 可通过制定质量标准保证兽用生物制品的安全有效。兽用生物制品的质量状况可通过某些指标参数对其理化性质、结构、药效、毒性等作出判断, 但只凭这些参数去评定是远远不够的, 因为在兽用生物制品的定性、定量及其生产、供应、储存、使用过程中所发生的变化往往难以单纯用

参数加以确认和控制, 而需要实物对照, 这个实物就是兽用标准物质<sup>[1]</sup>。

口蹄疫(FMD)是由口蹄疫病毒(FMDV)引起的世界性重大动物疫病, FMDV 完整病毒粒子的沉降系数为 146S, 完整病毒在十二烷基硫酸钠、酸(pH 5.0)或高温(56℃)处理后, 衣壳裂解为 12S 亚单位<sup>[2,3]</sup>, RNA 几乎完全降解。146S 完整病毒粒子是

收稿日期: 2009-03-01

基金项目: 国家支撑计划项目(2006BAD06A06)

作者简介: 杜进鑫(1982-), 男, 甘肃靖远人, 在读硕士, 主要从事动物病毒分子免疫学研究。

通讯作者: 王永录(1964-), 男, 甘肃临洮人, 研究员, 博士, 主要从事动物分子免疫学和分子生物学研究。

FMDV 主要的保护性免疫组分。除了病毒完整粒子以外,还存在有免疫原性的空衣壳 75S 抗原<sup>[4]</sup>,但其诱导中和抗体应答水平及抗强毒攻击的保护性远不如 146S 粒子<sup>[5-7]</sup>。146S 完整病毒粒子是 FMDV 最主要的免疫原成分,其含量与 FMD 灭活疫苗的免疫效力直接相关<sup>[8-10]</sup>,Bartelin 和 Melen 等<sup>[11]</sup>曾用紫外分光光度法(SDG)定量 FMDV 146S 含量,取得了可靠结果。SDG<sup>[12-14]</sup>以其精确、敏感、快速而成为国际公认的技术标准,普遍用于 FMDV 146S 完整病毒粒子的定量。

鉴于与我国接壤的周边国家 A 型 FMD 流行非常严重,为了应对可能出现的我国 A 型 FMD 突发事件,为此,本研究对 A 型 FMDV AF/72 株细胞毒的各个参数进行了测定,研制出了标准毒实物,不仅可为筛选对实际防疫更具针对性的 A 型 FMD 疫苗毒种,研发安全高效优质的 A 型 FMD 疫苗提供技术支撑,也为科学、实时地监测我国 A 型 FMD 的流行和防疫动态提供综合信息数据库和决策平台。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 毒株、动物及细胞 FMDV A 型 AF/72 株第 3 代乳鼠组织毒即 AF/72/MF<sub>3</sub> 由国家口蹄疫参考实验室提供;试验动物由中国农业科学院兰州兽医研究所动物场提供;BHK-21 传代细胞系由本实验室提供。

1.1.2 试剂及引物 RNeasy Mini Kit 购自博大公司、AMV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自 Promega 公司,参考 GenBank 中 VP1 基因序列用 Oligo 软件设计了一对引物,引物序列为:1D1(+)5-CACAAATGTACAGGGATGGGT-3,1D5(+)5-GACATGTCTCTCTGCATCT-3,由大连 TaKaRa 公司合成。

表 1 病毒的稀释步骤

Tab.1 Diluting process of each virus								
稀释倍数 Diluting times	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
病毒液/μL Liquid virus	25	25	25	25	25	25	25	25
稀释液/μL Diluent	225	225	225	225	225	225	225	225

1.2.2 VP1 基因序列的测定及比对

1.2.2.1 病毒 RNA 的提取 按 RNeasy Mini Kit 试剂盒说明书提取细胞毒 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>的 RNA。

1.2.2.2 VP1 基因的 RT-PCR 扩增 以 1D5 为引物,对所提取的 RNA 进行反转录合成 cDNA。再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应程序:95 变性 3 min,54 退火 1 min,72 延伸 1 min,94 变性 1 min,共进行 29 个循环,最后 72 延伸 10 min。以

1.2 方法

1.2.1 毒种含量测定

1.2.1.1 病毒复壮 将 AF/72/MF<sub>3</sub>通过乳鼠复壮至 6 代,取各代次乳鼠胴体置入 50 % 甘油 PBS (pH7.6)中,-20 下保存备用。

1.2.1.2 处理乳鼠毒 用 DMEM(pH7.6)液按 1:4 的比例研磨 -20 保存的乳鼠胴体,4 浸毒过夜,3 000 r/min 离心 5 min,取上清,再加入 1/2 体积的 CHCl<sub>3</sub>,室温下振摇 1 h,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液置于带棉塞的试管中,4 挥发 24 h,保存备用。

1.2.1.3 适应 BHK-21 细胞 制备细胞:用 0.02 % EDTA 和 1 % 胰酶按 20:1 的比例配成消化液并消化 BHK-21 细胞,将已消化的细胞从瓶壁上洗下,移入配制好的细胞营养液中,混匀,分装成 6 瓶,置 37 下培养。

细胞毒传代:选形态正常的单层细胞 4~6 瓶,1 瓶作空白对照,倾去旧营养液,接种处理过的乳鼠组织毒 1 mL/瓶,置 37 吸附 1 h,弃掉病毒液,添加维持液 10 mL,置 37 培养,每隔 12 h 或 24 h 用倒置显微镜镜检一次,观察 CPE 情况,当 75 % 的细胞出现 CPE 时,取出置 -20 冻结 24 h,融化后经无菌检验,确认无菌,可作为继续传代的病毒材料。按如上方法连续传代至第 12 代即为 A 型 FMDV AF/72 株的细胞毒 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>。

1.2.1.4 病毒含量测定<sup>[15]</sup> 细胞悬液的制备:取形态良好的 BHK-21 细胞 1 瓶,用细胞消化液消化,加 pH 7.6 的 DMEM 25 mL,5 mL 犊牛血清,摇匀制成细胞悬液。病毒液的稀释:将细胞毒 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>3 000 r/min 离心 6 min,取上清液用 pH 7.6 的 DMEM 稀释。具体步骤见表 1。TCID<sub>50</sub>的测定:操作参考文献[1]附录 3,用 Kaber 法计算 TCID<sub>50</sub>。

DNA Marker 作为分子质量参照物,用 1 % 琼脂凝胶电泳检查所扩产物的分子大小。

1.2.2.3 目的基因的测序 鉴定结果为阳性的 PCR 产物送往大连 Takara 公司进行测序。

1.2.2.4 核苷酸序列的比较 使用 DNASTAR 中的 EditSeq 对所测的序列进行整理,然后用 MegAlign 比对程序的 Clustal 方法对 VP1 基因的核苷酸序列进行比对,并根据 VP1 序列绘制系统发生树。

1.2.3 纯净性检验

1.2.3.1 无菌检验 将细胞毒 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub> 分别接种于琼脂糖斜面、厌气肝汤、葡萄糖蛋白胨汤培养基,每种培养基各 1 mL,置 37 °C 温箱连续观察 7 d。

1.2.3.2 外源病毒检验 红细胞吸附试验 取已培养长好的 BHK-21 细胞,加细胞毒 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub> 1 mL 置 37 °C 1 h 后,弃去培养液,以 PBS 洗涤细胞面 3 次,加入 0.1 % (V/V) 鸡红细胞悬液覆盖细胞面,置 2~8 °C 60 min 以后,用 PBS 轻轻洗涤细胞 1 次,在显微镜下观察红细胞吸附情况。

病毒中和试验 将细胞毒 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>, 稀释至 10<sup>-3</sup>, A 型 FMD 标准血清 1:5 稀释,将两者混合,接种于已长好的 BHK-21 细胞,每一稀释度接种 1 mL,37 °C 孵育 1 h,加细胞维持液 9 mL,置 37 °C 温箱连续观察 7 d。

1.2.4 特异性检验 间接夹心 ELISA:操作参考文献[1],微量细胞中和试验操作参考文献[1]。

1.2.5 146S 抗原含量测定 将细胞毒 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub> 3 000 r/min 离心 6 min,经紫外分光光度计测 146S 峰值,重复 3 次,按如下公式:  $Y = 3.0067 \times (\text{mAU}/\text{mL})$  (mAU/mL 为峰面积) 计算 146S 峰值完整病毒粒子量。

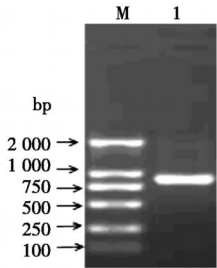
2 结果与分析

2.1 TCID<sub>50</sub>测定结果

经 Kaber 法计算细胞毒 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub> 的 TCID<sub>50</sub>为 10<sup>-8.0</sup>/mL。

2.2 RT-PCR结果

扩增目的片段与预想片段大小一致,约为 850 bp 左右。见图 1。



M. DL-2000 Marker; 1. 毒株 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>的 VP1 基因。  
M. DL-2000 Marker; Lane 1. Products of VP1 genes of strains of AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>.

图 1 VP1 基因的 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of VP1 gene

2.3 与参考毒株的同源性比较及系统发生树

从 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>与 GenBank 中其他 6 株 A 型

FMD 毒株比对的结果来看,AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>与 A/GS/LX/62、A/XJ/KT/58 和 A/NM/XZ/65 的同源性分别为 93.2 %、96.3 %、93.2 %,与 A/IND/2/68、A/GUA/24/91 和 A/IND/17/77 的同源性分别为 85.9 %、85.5 %、85.2 %,均大于 85 %,为同一基因型。见图 2 和图 3。

	1	2	3	4	5	6	7	
1		92.3	97.9	93.2	85.9	85.4	84.5	1 A/GS/LX/62
2	10.1		93.0	96.3	86.9	84.4	84.6	2 A/XJ/KT/58
3	2.1	8.8		93.2	86.2	85.4	84.7	3 A/NM/XZ/65
4	8.5	4.6	7.2		85.9	85.4	85.1	4 AF/72/MF6/BF12
5	17.6	15.5	15.4	16.2		88.3	92.6	5 A/IND/2/68
6	17.9	18.6	16.4	16.5	13.7		87.9	6 A/GUA/24/91
7	19.0	18.5	17.5	17.1	7.8	13.9		7 A/IND/17/77

图 2 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>与参考毒株 VP1 基因的同源性比较结果

Fig. 2 Homology comparison of VP1 gene of strains of AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>and reference strains

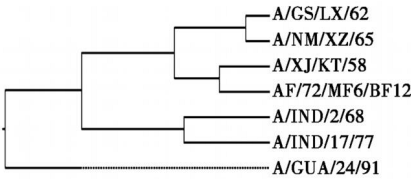
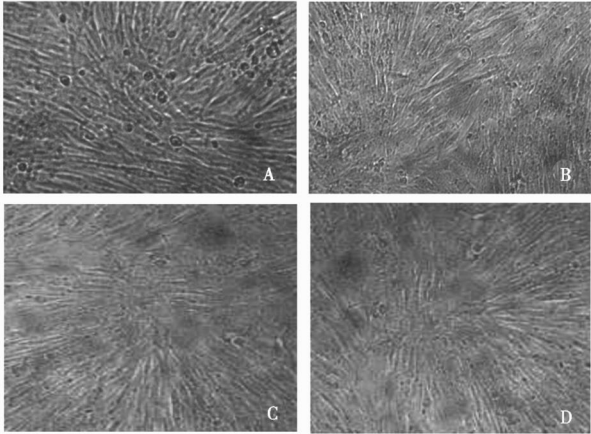


图 3 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>与参考毒株 VP1 基因的系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree of VP1 gene of strains of AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub> and reference strains

2.4 无菌检验、外源病毒检验

各培养基上均未观察到微生物生长,红细胞吸附试验未观察到红细胞吸附,血清中和试验 BHK-21 细胞生长良好。见图 4。



A. 红细胞吸附后的 BHK 细胞; B, D. 正常的 BHK 细胞;  
C. 中和试验中的 BHK 细胞。  
A. BHK cell of red blood cell adsorption test; B, D. Normal BHK cells;  
C. BHK cells of VNT.

图 4 外源病毒细胞检验结果

Fig. 4 Examination of exogenous virus by cells

2.5 特异性检验

细胞毒 AF/72/MF<sub>6</sub>/BF<sub>12</sub>经细胞微量中和试验检测,其仅能被 A 型标准血清中和。同时经间接夹

心 ELISA 检测,读取的四孔 OD 值均远大于 0.2,与 FMDV。见表 2 和表 3。  
参考文献 [1] 附录对比可知该细胞毒株为 A 型

表 2 间接夹心 ELISA 的 OD 值

间接夹心 ELISA indirect sandwich ELISA		OD 值 OD value			
阳性对照	Positive control	2.088	1.925	1.934	2.116
阴性对照	Negative control	0.102	0.124	0.158	0.192
AF/72/MF6/BF12		1.517	1.484	1.371	1.196

表 3 微量细胞中和试验

各型血清 Each type serum		血清稀释度 Dilution times of serum					
		1 8	1 16	1 32	1 64	1 128	1 256
口蹄疫 A 型标准血清	Serum of FMD type A	++	++	++	++	--	ND
口蹄疫 C 型标准血清	Serum of FMD type C	--	--	--	--	--	--
口蹄疫 Asia-1 型标准血清	Serum of FMD type Asia-	--	--	--	--	--	--
阳性血清对照	Positive control			++	++		
阴性血清对照	Negative control			--	--		
正常细胞对照	Normal cell control			++	++		

注：- . 有 CPE 产生；+ . 无 CPE 产生。 Note：- . CPE；+ . No CPE.

经计算重复 3 次测得的 AF/72/MF6/BF12 细胞毒 146S 含量分别为：206,253,107.9 ng/mL,均值为 189 ng/mL,远大于 22 ng/mL<sup>[16]</sup>,符合有效的病毒抗原含量,符合标准的要求。

3 讨论

FMD 标准毒的研制取决于各种参数的准确界定,尤其是 FMDV 最主要的免疫原成分 146S 完整病毒粒子的测定。国外对标准毒的研究主要也使用上述的一些方法。

本试验通过对 FMD A 型病毒 AF/72 株经乳鼠复壮,4~6 代发病死时间缩短在 24 h 之内,且发病规律,死亡整齐,转适 BHK-21 细胞,第 9~12 代收获病毒的时间缩短在 13 h 之内,经测定其 TCID<sub>50</sub> > 10<sup>-7.33</sup>/mL。经 VP1 序列测定和比对,该毒株与其他 A 型 FMDV 株同源性大于 85%,为 A 型口蹄疫病毒,并经 ELISA 和血清中和试验再次验证了其型特异性。纯净性检验符合要求。146S 含量高于国际标准 22 ng/mL。综合对比国际标准品,确定 FMD 病毒 AF/72 株的标准细胞毒为 AF/72/MF6/BF12。

本研究在前人试验的基础上,参照国家兽用生物制品标准和国际标准的一些要求,就标准毒株的特异性、有效成分、敏感性等进行定性或定量。

参考文献：

[1] 王在时. 国内外标准物质研制现状及发展趋势[C]// 国家兽用标准物质研讨会会议资料,2007:1-12.  
[2] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社,1997.  
[3] Cartwright B,Chapman W G,Brown F. Serological and immu-

munological relationships between the 146S and 12S particles of Foot-and-mouth disease virus [J]. J Gen Virol,1980,50: 369-375.  
[5] Cowan KM. Antibody response to viral antigens [J]. Adv Immunol,1973,17:195-255.  
[6] 李忠润,刘湘涛,胡弘博,等. 口蹄疫病毒 12S 亚单位抗原免疫学性质的研究[C]// 中国畜牧兽医学会儿口蹄疫学分会第七次全国口蹄疫学术研讨会论文集. 兰州:中国农业科学院兰州兽医研究所,1997:186-189.  
[7] Crowther J R,Reckziegel P O,Prado J A. Quantification of whole virus particles (146S) of Foot-and-mouth disease Virus in the presence of virus subunits (12S), using monoclonal antibodies in a sandwich ELISA [J]. Vaccine,1995,13:1064-1075.  
[8] Doel T R,Chong W K T. Comparative immunogenicity of 146S,75S and 12S particles of Foot-and-mouth disease Virus [J]. Archives of Virology,1982,73:185-191.  
[9] Black L,Nicholls M J,Rweyemamu M M, et al. Foot-and-mouth disease vaccination:a multifactorial study of the influence of antigen dose and potentially competitive immunogens on the response of cattle of different ages [J]. Res Vet Sci,1986,40(3):303-7.  
[10] Pay T W,Hingley P J. Foot and mouth disease vaccine potency tests in cattle: the interrelationship of antigen dose, serum neutralizing antibody response and protection from challenge[J]. Vaccine,1993,11(3):392.  
[11] 肖昭彭,杨福荣. 用紫外分光光度计检测口蹄疫病毒的研究[J]. 中国兽医科技,1997,27(7):23-24.  
[12] Bachrach H L. The determination of the sedimentation constant of a homogeneous component having the characteristics of the foot-and-mouth disease virus [J]. Amer J Vet Res,1952,13:13-16.  
[13] Duchesne M,Guerche J,Leqrand B, et al. The use of highly concentrated purified (by a large scale method) and long term liquid nitrogen stored foot-and-mouth disease viruses for the preparation of vaccines: physico-chemical quality controls and potency tests after storage [J]. Dev Biol Stand,1981,50:249-259.  
[14] Doel T R,Collen T. Qualitative assessment of 146S particles of foot-and-mouth disease virus in preparations destined for vaccines [J]. J Biol Standard,1982,10:69-81.  
[15] Reed L J,Muench H. A simple method of estimating fifty percentend points [J]. Am J Hyg,1938,27:493-497.  
[16] Pay T W F,Hingley P L. Correlation of 140S antigen dose with the serum neutralizing antibody response and the level of protection induced in cattle by foot-and-mouth disease vaccines [J]. Vaccine,1987,5:60-64.