

# 鸡传染性法氏囊病病毒CJ—801株 细胞毒理化特性和形态学的研究

李汉秋 周 蛟 刘福致 陈丽永

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所)

(1983年12月8日收稿)

## 摘 要

用本所从北京地区分离的鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV) CJ—801 株鸡体传递16代毒, 经鸡胚法氏囊细胞, 鸡胚肾细胞和鸡胚成纤维细胞的适应和传代, 培育成一株适应于鸡胚成纤维细胞并致细胞产生明显病变的病毒株—CJ—801BKF, 其滴度基本稳定在 $10^5$ TCID<sub>50</sub>~ $10^6$ TCID<sub>50</sub>。

CJ—801毒株经研究鉴定证明: 病毒复制不受IUdR的影响, 属于RNA核酸型; 对乙醚、氯仿等有机溶剂不敏感, 具有无囊膜病毒的特点; 在56℃水浴中经90分钟灭活, 其感染滴度不下降, 有较强的耐热性; 能耐受10次以上反复冻融; 在pH3环境中放置3小时仍有感染性, 但滴度有所下降, 在pH12环境中放置3小时丧失感染能力, 说明病毒耐酸而对碱的耐受性差; 病毒能通过100nm的微孔滤膜, 而不能通过50nm的滤膜, 说明病毒粒子大于50nm而小于100nm。在电镜下观察, 病毒在细胞质中装配, 呈晶格状排列, 病毒粒子为六边形或卵圆形, 廿面体立体对称, 无囊膜, 直径约50~60nm,

关于鸡传染性法氏囊病病毒 (Infectious Bursal Disease Virus IBDV) 的理化特性和形态, 已有许多人做过不少细致的工作。在我国此项工作已经开展, 但是将鸡体囊毒适应到体外细胞培养物上, 从体外细胞培养物这个途径对IBDV进行研究还未见报道。这条途径难度较大, 存在一定的局限性。

我们将北京地区分离的CJ—801毒株经过体外细胞培养物繁殖后, 培育成一株适应鸡胚成纤维细胞的细胞毒株, 通过细胞培养物对其理化特性和形态进行了研究, 进一步从病毒的生物学特性上确定CJ—801毒株是IBD病毒。CJ—801细胞毒株的建立也为今后对IBDV的深入研究和新疫苗的研制奠定基础。IBDV的研究在国内报道的不多, 我们希望本实验结果能为国内研究该病毒提供一点有价值的材料。

## 材 料 和 方 法

### 一、病毒

CJ—801毒株是1980年本所在北京地区“CJ”鸡场从病鸡法氏囊分离的。此毒株经

参加本实验的还有李林、宫政辉、姚颖、王方等同志。

本文电镜照片由北京大学生物系翟中和副教授, 丁明孝老师拍摄制作, 特此致谢。

鸡体传16代, 鸡胚法氏囊细胞传9代, 鸡胚肾细胞传8代, 鸡胚成纤维细胞传3代后适应于鸡胚成纤维细胞。供本实验用的是在鸡胚成纤维细胞上传至第6~9代毒。简称 $B_9K_8F_6-B_9K_8F_9$  (B—Bursal法氏囊; K—Kidney肾; F—Fibre成纤维型)。病毒滴度基本稳定在 $10^6$ TCID<sub>50</sub>/0.1ml。

对照病毒: 在进行核酸定型与有无囊膜研究时, 选取两种已知病毒作为对照, 以检验操作技术的可靠性。

1. 传染性牛鼻气管炎病毒 (Infectious bovine rhinotracheitis virus IBRV) 是已知的DNA型病毒, 具有囊膜。本实验采用农牧渔业部动物检疫所供给的、经我们适应于牛鼻甲传代细胞。

2. 口蹄疫病毒 (Foot and Mouth Disease Virus FMDV) 是已知的RNA型病毒, 无囊膜。本实验用的是程绍迥教授实验室保存的毒株, 在猪肾原代细胞上适应后又在BHK—21细胞上传若干代毒。

## 二、细胞培养物

鸡胚法氏囊细胞, 用于CJ—801毒株适应细胞。取15日龄健康鸡胚的法氏囊制备, 96小时后细胞可形成单层。

鸡胚肾原代细胞, 用于CJ—801毒株适应体外细胞。取18日龄健康鸡胚肾制备, 48小时后培养的细胞可形成单层。

鸡胚原代成纤维细胞, 用于CJ—801毒株适应体外细胞和IBDV的滴定。取9~11日龄健康鸡胚制备, 细胞培养40小时后可形成单层。以上三种原代细胞的制备及培养液按常规法〔1〕。

牛鼻甲传代细胞系: 用于IBRV的培养及滴定。引自农牧渔业部兽医生物药品监察所。

BHK—21传代细胞系: 用于FMDV的培养及滴定。引自北京大学生物系。

## 三、IBDV在体外细胞的适应及病毒感染力测定

将CJ—801毒株在鸡体上传了16代的法氏囊病毒, 以1:4 (W/V) 加Hank's液研磨成匀浆, 经3000rpm离心15分钟后取上清液接种法氏囊细胞, 每瓶接种0.5ml, 间隔4~5天传1代, 连传9代, 将收获的第九代液体接种鸡胚肾细胞, 相隔2天传1代, 连传8代, 再将收获的第八代鸡胚肾细胞液体接种鸡胚成纤维细胞, 间隔2天传1代。将鸡胚成纤维细胞上繁殖的6~9代毒作实验用。

病毒感染力的滴定是用链霉素瓶培养供测定滴度的细胞, 每瓶分装1ml细胞悬液, 37℃静置培养, 形成单层后测病毒滴度。病毒稀释液为pH7.4的Hank's—水解乳蛋白液, 样品以10倍递增稀释, 每稀释度接种4瓶细胞, 每瓶接0.1ml, 37℃吸附1小时后加入0.9ml细胞维持液, 然后置37℃培养, 观察4~5天, 按Behrens—Karber法〔2〕计算病毒滴度TCID<sub>50</sub> (半数细胞感染量)。

## 四、病毒理化特性测定

1. 核酸型的鉴定: 用DNA合成抑制剂—5'-碘-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (简称IUdR) 测定病毒核酸型。IUdR能抑制DNA病毒在细胞培养物中的繁殖, 但不能抑制RNA病毒的繁殖, 这是鉴别病毒核酸型的简便方法之一〔3、4〕。此法分两步进行。第一步选取良

好的单层细胞按表1设计实验。待测的IBDV和已知的IBRV、FMDV同时测定。

表1 核酸型鉴定的第一步实验设计

组次	组别	维持液成分			备注
		病毒原液 (ml)	不含IUdR维持液 (ml)	含111 $\mu$ g/ml IUdR维持液(ml)	
1	正常细胞对照	—	1.0	—	
2	IUdR对照	—	0.1	0.9	IUdR终浓度为100 $\mu$ g/ml
3	病毒对照	0.1	0.9	—	
4	病毒+IUdR鉴定组	0.1	—	0.9	IUdR终浓度为100 $\mu$ g/ml

将上面4组置37℃处培养观察，待第三组细胞病变达80%时，同时收冻第四组，保存于-30℃冰箱待第二步的滴度测定。

2. 微孔滤膜过滤测定病毒大小：取CJ—801—B<sub>9</sub>K<sub>8</sub>F<sub>8</sub>代毒液10ml，留2ml做样品，其余的用负压分别通过孔径为100nm和50nm的微孔滤膜，取样测定滴度。

3. IBDV经乙醚和氯仿处理测定对有机溶剂的敏感性：氯仿处理：在5ml离心管中加氯仿0.1ml，再加CJ—801B<sub>9</sub>K<sub>8</sub>F<sub>7</sub>代毒液1.9ml（氯仿终浓度为5%），塞紧管口，用手猛烈摇成乳浊状，在室温静置10分钟后，经3000rpm离心10分钟，氯仿沉于管底，取上层水相测定滴度。同时测一份未经处理的病毒和IBRV、FMDV经氯仿处理做为对照。

乙醚处理：在5ml离心管中加乙醚0.4ml，再加CJ—801B<sub>9</sub>K<sub>8</sub>F<sub>7</sub>代毒液1.6ml（乙醚终浓度为20%），塞紧管口，充分摇匀，室温静置10分钟后经3000rpm离心10分钟，吸去浮在液面上的乙醚，用无菌纱布包好管口，置4℃冰箱过夜，使残余的乙醚充分挥发，然后测定滴度。同时测一份未经处理的存放于相同温度的病毒液和IBRV、FMDV经乙醚处理做为对照。

4. 反复冻融测定冻融对病毒的影响：将B<sub>9</sub>K<sub>8</sub>F<sub>8</sub>代毒液分装在3个小青霉素瓶中，每瓶3ml，放置-50℃低温冰箱中冻结，而后在室温中融化，如此分别重复处理3次、6次、11次，再测定各样品滴度。

5. 热稳定性的测定：将B<sub>9</sub>K<sub>8</sub>F<sub>8</sub>代毒液分别装2个青霉素小瓶，每瓶3ml，病毒液pH7.4。分别经56℃60分钟，56℃90分钟水浴处理后测定其滴度，同时测一份未经热处理的样品。

6. 对酸碱度耐受力的测定：取3只试管分别加入2ml毒液，第一管内的毒液用1NHCl调至pH3.0；第二管内的毒液用1NNaOH调至pH12；第三管内加入相当于调pH所用的HCl或NaOH量的Hank's—水解乳蛋白液，pH7.2，3管同时置室温3小时后，第一管用0.1NNaOH调pH为7.0；第二管用0.1NHCl调pH为7.0；第三管加入相当于调pH用的0.1NNaOH或0.1NHCl量的Hank's—水解乳蛋白液，pH7.2。3管分别测滴度。

## 五、电镜研究方法

1. 超薄切片法：用CJ—801B<sub>9</sub>K<sub>8</sub>F<sub>8</sub>代毒液接种67日龄健康鸡，并设接Hank's液的对照组。72小时后同时采两组鸡的法氏囊，按常规法进行固定、脱水、包埋、切片、染

色, 在JEM—H600电镜下观察。

2. 提纯病毒负染法: 被病毒CJ—801B<sub>9</sub>K<sub>8</sub>F<sub>7</sub>感染的鸡胚成纤维细胞培养物, 当其病变细胞达90%以上时收获, 冻融2次, 经10000rpm离心1小时取上清液经113000g低温超速离心1小时, 去掉上清液, 将沉淀物用极少量Hank's液悬浮, 滴于Formvar膜的铜网上, 用2%磷钨酸负染后进行观察。

## 实验结果

### 一、CJ—801毒株在细胞培养物上繁殖结果

CJ—801鸡体囊毒在法氏囊细胞上盲传9代, 鸡胚肾细胞上盲传8代都没出现细胞病变, 又继续在鸡胚成纤维细胞上盲传到第四代时, 出现了细胞病变。接毒后23小时细胞单层上出现均匀散在的折光性强的圆缩细胞见图1—a, 41小时观察, 单层细胞基本圆缩, 并有聚集现象, 单层细胞之间的空隙加大呈网状, 液体内悬浮大量脱落的圆缩细胞。对照瓶细胞未见到此现象见图1—b。在鸡胚成纤维细胞上又连续传5代, 细胞病变的特点是一致的, 但是细胞病变出现的时间和细胞单层的摧垮时间都提前了10个小时左右。测定病毒滴度基本稳定在 $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/0.1ml。

回鸡试验结果: 将CJ—801B<sub>9</sub>K<sub>8</sub>F<sub>7</sub>代毒液接种67日龄健康鸡, 同时设对照组。72小时后采囊观察, 按毒鸡法氏囊色黄, 粘膜面皱褶上布满点状淡黄色干酪样物, 质韧, 皱褶间有粘稠分泌物, 粘膜面有出血点。而对照鸡的法氏囊无上述特点, 囊呈浅粉色, 质地柔软。

采接毒鸡法氏囊做超薄切片, 电镜观察见图2—b、c, 在细胞质内有散在的或数个簇集的病毒粒子, 亦可观察到病毒晶格状排列, 排列的格式有所不同。病毒呈六边形或卵圆形, 为甘面体立体对称型, 直径约55~65nm, 无囊膜。细胞核内未观察到病毒粒子及未装配的衣壳体等结构。对照鸡的囊切片未见病毒。

### 二、病毒理化特性测定结果

#### 1. 核酸型的鉴定:

将CJ—801B<sub>9</sub>K<sub>8</sub>F<sub>7</sub>代毒和对照病毒IBRV、FMDV测核酸型结果见表2。

表2 IUdR对CJ—801毒株复制的影响

病毒	第一步		第二步	
	病毒对照(3组) 细胞病变%	病毒+IUdR(4组) 细胞病变%	病毒对照(3组) TCID <sub>50</sub> /0.1ml	病毒+IUdR(4组) TCID <sub>50</sub> /0.1ml
CJ—801 B <sub>9</sub> K <sub>8</sub> F <sub>7</sub> (待测)	80%	80%	10 <sup>6.00</sup>	10 <sup>6.25</sup>
IBRV (DNA型病毒)	80%	0	10 <sup>5.75</sup>	0
FMDV (RNA型病毒)	80%	80%	10 <sup>5.75</sup>	10 <sup>7.00</sup>

表2的实验结果说明CJ—801毒株与RNA型FMDV完全不受DNA合成抑制剂的作用, IUdR没有降低它们的滴度, 而DNA型的IBRV则被IUdR所抑制。证明CJ—801毒株病毒核酸是核糖核酸(RNA)。

#### 2. 病毒粒子大小的测定及形态观察:

测定结果, 病毒能通过100nm滤膜, 而不能通过50nm滤膜, 病毒大小应在50nm到

100nm之间。

经提纯浓缩的毒液悬滴负染后电镜观察,病毒粒子呈六边形或卵圆形,廿面体立体对称型。核壳体裸露、无囊膜包裹,核壳体上可看到排列的子粒,子粒数不清晰见图2—a。病毒粒子直径约50~60nm。

### 3. 对有机溶剂的敏感性试验结果:

有囊膜病毒(痘病毒除外)经有机溶剂处理后,囊膜被破坏,病毒感染力随即丧失。无囊膜病毒则能抵抗有机溶剂的作用。

表3 经50、100nm滤膜滤过后  
B<sub>9</sub>K<sub>8</sub>F<sub>7</sub> 代毒的滴度

滤膜孔径	滴度 (TCID <sub>50</sub> /0.1ml)
未过滤	10 <sup>4.25</sup>
100nm	10 <sup>3.25</sup>
50nm	0

表4 有机溶剂对CJ—801毒株的作用

病毒	滴度 耐乙醚 TCID <sub>50</sub> /0.1ml	滴度 耐氯仿 TCID <sub>50</sub> /0.1ml
CJ—801B <sub>9</sub> K <sub>8</sub> F <sub>7</sub>	10 <sup>3.75</sup>	10 <sup>5.50</sup>
对照(未处理)	10 <sup>5.00</sup>	10 <sup>5.00</sup>
FMD(无囊膜)	10 <sup>5.75</sup>	10 <sup>6.50</sup>
对照(未处理)	10 <sup>6.25</sup>	10 <sup>6.25</sup>
IBR(有囊膜)	0	0
对照(未处理)	10 <sup>4.50</sup>	10 <sup>4.50</sup>

表4结果说明有囊膜的IBR病毒经有机溶剂处理后,完全丧失感染力;而CJ—801毒株与无囊膜的FMD病毒经有机溶剂处理后不丧失其感染力,是无囊膜结构的病毒。

### 4. 反复冻融对病毒的影响:

表5结果说明,冻融次数对CJ—801毒株的毒力没影响。

### 5. 病毒对热的稳定性:

表7说明CJ—801毒株经56℃90分钟处理感染力不受影响。

### 6. CJ—801毒株对酸碱度的耐受力:

表5 冻融对病毒的影响

冻融次数	滴度 (TCID <sub>50</sub> /0.1ml)
3	10 <sup>5.25</sup>
6	≥10 <sup>6.25</sup>
11	10 <sup>6.00</sup>

表6 热稳定性测定

时间(分)	滴度(TCID <sub>50</sub> /0.1ml)
60	≥10 <sup>5.50</sup>
90	10 <sup>5.75</sup>
不经热处理	10 <sup>5.00</sup>

经测定CJ—801毒株在pH3的酸性环境中滴度有所下降,但仍保持一定的感染力,而在pH12的碱性环境中则完全丧失感染力。

## 讨 论

1. 本实验的目的是通过体外细胞培养的途径对CJ—801毒株进行理化特性的测定

表7 酸碱对病毒感染力的影响

pH	滴度 (TCID <sub>50</sub> /0.1ml)
3	10 <sup>3.5</sup>
7.2	10 <sup>5.25</sup>
12	0

及形态的观察,进一步确定从北京地区分离的本毒株是否属传染性鸡法氏囊病病毒。因此必须将囊毒适应体外细胞培养物。为此,先将囊毒在法氏囊细胞上传9代,又在鸡胚肾细胞上传了8代,最后适应于鸡胚成纤维细胞上,在鸡胚成纤维细胞上传4代观察到明显的细胞病变。这说明IBDV鸡体囊毒在体外细胞上培养有一个逐步适应的过程,是一个由靶器官细胞到异种细胞适应过程。最初要在法氏囊细胞上培养,再经鸡胚肾细胞培养,最后适应在鸡胚成纤维细胞并使细胞产生明显的病变。Lukert等人曾作过这方面的报道〔4〕。CJ—801毒株适应细胞培养物,这对于我们更深入地研究IBDV病毒,研制新的疫苗及对法氏囊病的诊断、预防提供了另一条途径。

2. 为了证实在鸡胚成纤维细胞上产生的细胞病变是由于传染性法氏囊病病毒所致,将B<sub>6</sub>K<sub>3</sub>F<sub>8</sub>代毒液接种敏感鸡,72小时后采囊,观察到有典型的法氏囊病毒感染的症状、囊色黄,皱褶间有粘稠的分泌物,皱褶的粘膜面上布满黄白色点状物。取样经电镜观察,可见到大量的散在的六边形及卵圆形病毒颗粒及呈晶格状排列的病毒颗粒,这与洪涛、李成等人经电镜观察所描述的本毒株的特征是一致的〔5、6〕。对照组法氏囊未观察到病毒。回鸡试验说明: B<sub>6</sub>K<sub>3</sub>F<sub>8</sub>代毒系由CJ—801F16代鸡体囊毒经细胞培养继代所繁殖的,适应体外细胞培养物后,能致使细胞产生明显的病变。而不是在传代过程中污染其它的病毒,或是由于鸡胚所带其它病毒等因素所造成的。回鸡试验还证明: CJ—801F16代囊毒经体外细胞继代25代后仍有相当的毒力,回鸡72小时后采囊,肉眼观察囊的病变与囊毒直接回鸡所造成的囊的病变特征一致〔7〕。

3. 对病毒的理化特性的测定,进一步证实了CJ—801毒株是IBD病毒。通过核酸定型试验,证明本株病毒核酸是核糖核酸(RNA型)与超薄切片的电镜观察结果相吻合。负染片观察病毒粒子是无囊膜的,核衣壳裸露。对有机溶剂敏感性试验也证明了这一点。病毒粒子大小在50~60nm之间,呈六边形或卵圆形,为廿面体立体对称型。CJ—801毒株耐酸、耐热、耐冻融、对碱的耐受性较差。

本实验与国内外利用电镜技术和生物学的实验报道的IBD病毒的形态特点和理化特性一致〔4~6、8~10〕。结合大量的血清学试验与临床症状检验〔7、11〕,可进一步确定本毒株为鸡传染性法氏囊病病毒。

### 参 考 文 献

- 〔1〕 中国医学科学院流行病防治研究所编(1978)。常见病毒病实验技术, 67~71, 科学出版社。
- 〔2〕 国立预防卫生研究所学友会编(1973)。ウイルス实验学总论, 改订二版, 东京丸善 480~484。
- 〔3〕 北京大学生物系细胞与病毒组(1979)。畜牧兽医学报, 10(1): 43~50。
- 〔4〕 Lukert, P. D. and Davis, R. B. (1974). Avian Diseases, 18(2): 243~249。
- 〔5〕 洪涛等(1982)。微生物学通报, 9(8): 128~129。
- 〔6〕 李成等(1983)。兽医科技杂志, 2: 2~4。
- 〔7〕 周蛟等(1982)。中国兽医杂志——禽病专刊, 8(7): 25~26。
- 〔8〕 Hofstad, M. S. et al. (1978). Diseases of Poultry. 7th ed., Iowa state Univ., Pr Ames Iowa 647~654。
- 〔9〕 Gordon, R. F. (1977). Poultry diseases. 1st ed., Bailliere Tindall London, 117~122。
- 〔10〕 平井克哉(1979)。鸡の传染性ファブリウス囊病—最近の研究と将来の展望—鸡病研报15(增刊号) 23~40。
- 〔11〕 周蛟等(1983)。北京农业科学, 1: 6~10。





图1a. CJ—801B<sub>9</sub>K<sub>9</sub>F<sub>3</sub>接种细胞23小时后, 细胞单层上出现均匀散在的折光性强的圆缩细胞。×75

b. 对照细胞单层。×75

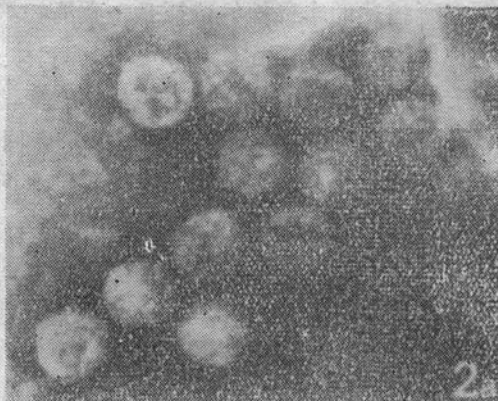
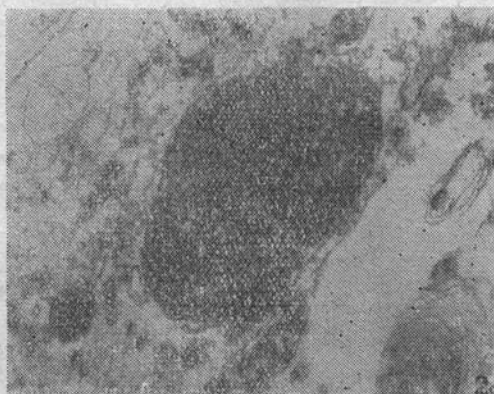


图2a. 从负染片观察病毒粒子呈六边形或卵圆形, 直径约50nm, 无囊膜, 表面由于子粒的排布而凸凹不平。×260000



b.c. 从超薄切片观察, 病毒粒子也是六边形或卵圆形, 粒子直径约55~65nm, 病毒粒子有中空状的和均质状的, 内部结构不均—(b), 晶格状的排列方式有所不同(c)。

b: ×8625

c: ×13000