

通过基因组定量研究猪瘟病毒在细胞中的增殖特性

徐兴然 郭焕成 史子学 夏咸柱 涂长春*

(军事医学科学院军事兽医研究所 长春 130062)

摘 要 应用间接免疫荧光、Real-time PCR 和病毒感染滴度(TCID₅₀)测定技术,分别从病毒抗原、病毒基因组 RNA 复制水平和病毒感染滴度变化 3 个方面,研究了猪瘟病毒(CSFV)在 PK-15 细胞中增殖的特点,用猪瘟病毒石门株感染 96 孔板培养的细胞,1 × 10² 个 TCID₅₀/孔,间接免疫荧光检测结果显示感染后 8h 能检测到被荧光抗体染色的感染细胞,随感染时间的延长,出现荧光的细胞数量逐渐增多,在感染后 72h,几乎所有细胞均能出现荧光。Real-time PCR 结果显示在细胞感染初期的 8 ~ 24h,病毒的基因组 RNA 复制呈加速趋势,其拷贝数在感染后 72h 达到高峰。此外,在感染后 8h 能检测到病毒基因组负链 RNA 转录,不过负链 RNA 在病毒增殖过程中维持在较低的水平。TCID₅₀ 测定结果表明 CSFV 的感染滴度增加趋势与基因组类似,在病毒感染 8 h 后能检测到具有感染性的子代病毒,感染滴度在 8 ~ 20h 之间逐渐增长,24 ~ 48h 之间增长速度稍减慢,在感染后 48 ~ 52h 达到高峰,能在 72h 之内维持较高的感染滴度。

关键词: 猪瘟病毒;细胞增殖;PK-15 细胞

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0800-05

最新的第八次国际病毒分类委员会报告^[1]指出猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、牛病毒性腹泻病病毒-1(bovine viral diarrhoea virus-1, BVDV-1)、牛病毒性腹泻病病毒-2(BVDV-2)、羊边界病病毒(border disease virus, BDV)和长颈鹿瘟病毒组成了黄病毒科瘟病毒属 5 个确定的成员。CSFV 和 BVDV-1 是属内的代表成员。由猪瘟病毒感染引起的猪瘟(classical Swine fever, CSF)是猪的一种严重的接触性的传染病,在世界范围内广泛流行,其发病率和死亡率均高,对养猪业危害严重。

猪瘟病毒在猪体内感染并破坏多种细胞,使猪迅速发病、死亡^[2,3];而在体外培养细胞中,CSFV 一般不使培养细胞产生病理变化(cytopathic effect, CPE)。在培养细胞中 CSFV 以低水平增殖,产生的子代病毒滴度较低^[4],细胞可带毒传代,并在细胞分裂时将病毒传至子代细胞中。为了探讨 CSFV 在细胞上的增殖特点,我们用石门株感染 PK-15 细胞,在培养的不同时间,分别应用间接免疫荧光染色检测病毒抗原、Real-time PCR 检测病毒基因组 RNA 的增殖水平及病毒感染 TCID₅₀ 测定技术研究了 CSFV 在细胞上的增殖特点,所获得的结果为该病毒的培养、鉴定及其他基础性研究工作奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞、病毒株与血清

PK-15 猪肾传代细胞系(80 代)猪瘟病毒石门株购自中国兽药药品监察所。猪抗猪瘟病毒阳性血清和猪瘟病毒阴性猪血清由本实验室制备、鉴定并保存^[5]。FITC 标记的兔抗猪 IgG 为 Sigma 公司产品。

1.2 病毒培养

传代 PK-15 细胞于培养板,培养于含有 10% 小牛血清、0.3% 谷氨酰胺、青霉素(50 μg/mL)、链霉素(100 μg/mL)的 MEM 细胞培养基中,置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中,培养 24h 后,细胞单层生长满度达到 80% ~ 90%,用无血清无抗生素的 MEM 细胞营养液洗涤 3 次,接种猪瘟病毒,不同孔数细胞培养板使用的病毒感染剂量不同。37℃ 吸附 1h,其间每 20min 轻摇培养板,使病毒液均匀分散于细胞单层表面,吸附结束后用无血清无抗生素的 MEM 细胞营养液洗涤 3 次,加入含 2% 小牛血清的 MEM 37℃ 培养备用。

1.3 培养的猪瘟病毒基因组 RNA 拷贝数测定

1.3.1 引物和探针设计:根据猪瘟病毒石门(Shimen)株全基因组序列(GenBank accession number: AF092448)中的 NS5B 基因序列,应用软件 Vector NTI 3.0 辅助设计用于扩增完整 NS5B 基因的引物:

基金项目 国家自然科学基金(30371071)、国家 973 项目(2005CB523200)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-431-87960009;E-mail: xchangchun-tu@hotmail.com

作者简介 徐兴然(1967-),男,重庆人,副教授,主要从事动物病毒学的研究。

其他作者 肖 昌,查云峰

收稿日期 2007-04-19,接受日期 2007-04-27,修回日期 2007-06-25

NS5BFP(5'-GACAGATCTAGTAATTGGGTGATGCAAGAAG-3')和 NS5BRP(5'-GAAGTCGACTACCCCTCTCCCTATCAGGGTCATC-3')。用 Primer express 2.0 软件设计用于 Real-time PCR 检测 CSFV 基因组 RNA 的引物 rFP(5'-GG GATGATGCTCTCTGATCAC-3') rRP(5'-CATCAAATTGGTAGGCCACTTTC-3')和 TaqMan 探针 Probe5B(5'-FAM-CCTTGCTCGCGAATTTCTCACCGA-TAMRA-3')。引物和 TaqMan 探针由上海生工生物工程技术服务公司合成。

1.3.2 RNA 提取及含量测定:在 12 孔细胞培养板上进行 PK-15 细胞的传代,37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 24h 后,用猪瘟病毒石门株感染细胞,1 × 10³ 个 TCID₅₀/孔。于病毒感染后每隔 4h 取样,用 TRIzol Reagent 提取感染细胞总 RNA, -80℃ 保存备用。

1.3.3 猪瘟病毒 NS5B 基因标准参照重组质粒制备:取总 RNA,用引物 NS5BRP 按 ThermoScript™ RT-PCR System 说明书所述方法进行逆转录,反应结束后取逆转录产物用引物 NS5BFP/NS5BRP 立即进行 PCR 扩增,反应条件为:94℃ 2min 后,94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 120s,35 个循环,72℃ 7min。扩增结束后,用 Agarose Gel DNA Extraction Kit 回收 PCR 产物,将其克隆到 pGEM-T 载体中,转化大肠杆菌,小提质粒,筛选阳性质粒并测序。用 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System(Promega)提取测序正确的重组质粒,命名为 pT-NS5B。用 GeneQuant 核酸浓度测定仪测定核酸浓度,并根据重组质粒的分子量,计算其单位体积的质粒分子数,小份分装, -80℃ 保存备用。

1.3.4 Real-time PCR 检测猪瘟病毒基因组 RNA 拷贝数:分别取培养病毒总 RNA 100ng,在两个独立的反应体系中,分别用下游引物 rRP 和上游引物 rFP 于 20μL 体系进行逆转录,取逆转录产物 1μL,根据 QuantiTect™ Prob PCR Kit(QIAGEN)使用说明书配制 Real-time PCR 反应体系,每个样品设置 3 个重复;用 pT-NS5B 为标准参照质粒,作系列稀释使其每微升分别含有质粒分子数为 600、1200、2400、4800、9600,作为制备标准曲线的模板。然后将各个样品用 ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System 进行 Real-time PCR 反应,条件为:95℃ 15min,94℃ 30s,60℃ 30s,40 个循环。反应结束后,用 ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System Software(Version 1.0)分析 Real-time PCR 结果,3 个重复测定结果的算术平均值为测定样品中所含猪瘟病毒基因组分子数。同时,对 Real-time PCR 扩增片段进行序列测定,确证 Real-time PCR 扩增的特异性。

1.4 病毒培养不同时间的间接免疫荧光检测

于 96 孔细胞培养板进行 PK-15 细胞传代,每孔 1.0 × 10⁴ 个细胞,37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 24h,接种猪瘟病毒石门株,1 × 10² 个 TCID₅₀/孔,培养病毒,每间隔 4h 取样,用 80% 的冷丙酮于 -20℃ 固定 30min,用 PBS(NaCl 140mmol/L, KCl 2.5mmol/L, Na₂HPO₄ · 12 H₂O 6.6mmol/L, KH₂PO₄ 1.5mmol/L, pH 7.4)缓冲液洗涤单层细胞 3 次,每次 3~5min。加入 1:100 稀释的猪抗 CSFV 阳性血清 100μL,37℃ 湿盒放置 1h,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 3~5min,然后加入 1:60 稀释的 FITC 标记的兔抗猪 IgG 50μL,37℃ 湿盒放置 1h,弃去荧光抗体,用 PBS(pH 7.4)缓冲液洗涤 3 次,每次 3~5min,吸干洗涤液后滴加少量 50% 甘油,用 ZEISS Axioskop 40 荧光显微镜观察荧光抗体染色结果,检测病毒表达的抗原蛋白。

1.5 病毒培养不同时间的感染滴度测定

将 PK-15 细胞于 12 孔板传代,每孔 1 × 10⁵ 个细胞,37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 24h。然后用猪瘟病毒石门株感染细胞,1 × 10³ 个 TCID₅₀/孔,每间隔 4h 收集病毒培养物。将病毒培养物冻融 3 次后于 10000r/min,4℃ 离心 10min,取上清液作 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 和 10⁻⁶ 稀释,取病毒稀释的 0.1mL 接种于洗涤好的 96 孔板单层细胞,每个病毒稀释度接种 4 孔,培养 72h 后,用间接免疫荧光方法检测病毒感染细胞,以 KÄRBER 公式计算单位体积病毒悬液中病毒的半数细胞感染量(TCID₅₀)。以 3 次重复实验结果的算术平均值为培养病毒的感染滴度。在实验中同时设立猪瘟病毒阴性血清对照。

2 结果

2.1 病毒培养不同时间的基因组 RNA 检测结果

用 1 × 10³ 个 TCID₅₀ 的石门株病毒感染 12 孔板培养的 PK-15 细胞,于病毒感染后每 4h 取样,提取细胞总 RNA,测定含量后取 100μg 总 RNA 进行逆转录,取逆转录产物 1.0μL 进行 Real-time PCR 反应,反应结束后,用 ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System Software(Version 1.0)分析 Real-time PCR 结果显示,反应体系中的模板分子数与出现典型扩增的 Ct 值相关,模板分子数越多,Ct 越小,标准曲线分析结果显示其 R² 值达到 0.98(图 1-A),表明检测数据具有很高的相关性,分析所得的样品中猪瘟病毒 cDNA 分子数具有较高的可信度。

猪瘟病毒感染 PK-15 细胞后不同时间的细胞总 RNA 逆转录所得 cDNA 样品的扩增实时监测结果(图 1-B),分析扩增动态显示,不同样品出现典型扩增所需的循环数不同,表明各个样品中的猪瘟病毒

基因拷贝数不同,最早出现典型扩增的 Ct 值为 21.23,其对应的是细胞感染猪瘟病毒后 72h 的总 RNA 的 cDNA,最晚出现的典型扩增的 Ct 值为 36.15 对应的是病毒感染后 4h 细胞总 RNA 的 cDNA,而病毒感染 4h 后的细胞总 RNA 的 cDNA 在扩增 40 循环时没有出现典型扩增。用上游引物 rFP 进行逆转录检测病毒的复制中间体负链 RNA 的 Real-time PCR 扩增出现典型扩增的是病毒感染 8h 后的样品,扩增结果显示负链 RNA 的 cDNA 的扩增曲线出现典型扩增时的 Ct 值均高于与其对应时间的基因组 RNA 的 cDNA 的 Ct 值,表明样品中负链 RNA 的 cDNA 分子数少于基因组 RNA 的 cDNA 分子数。

分析各个样品中的猪瘟病毒 NS5B 基因分子数,结果显示,猪瘟病毒感染 PK-15 细胞后,病毒基因组数量在一段时间内与感染时间正相关,基因组数量随感染时间延长而增加,病毒基因组 RNA 在感染后 72h 达到高峰,随后逐渐下降(图 2);检测结果显示,猪瘟病毒感染后不同时间的细胞总 RNA 中猪瘟病毒的基因组 RNA 拷贝数含量有明显的差别,病毒基因组 RNA 在感染后在一定时间内快速复制。而病毒的复制中间体负链 RNA 则在感染 8h 后能检测到,其拷贝数比基因组 RNA 拷贝数少的多(图 2),这与病毒复制酶 NS5B 的特性相符。序列测定结果表明 Real-time PCR 产物为猪瘟病毒石门株 NS5B 基因片段,说明检测结果具有高度的特异性和准确性。

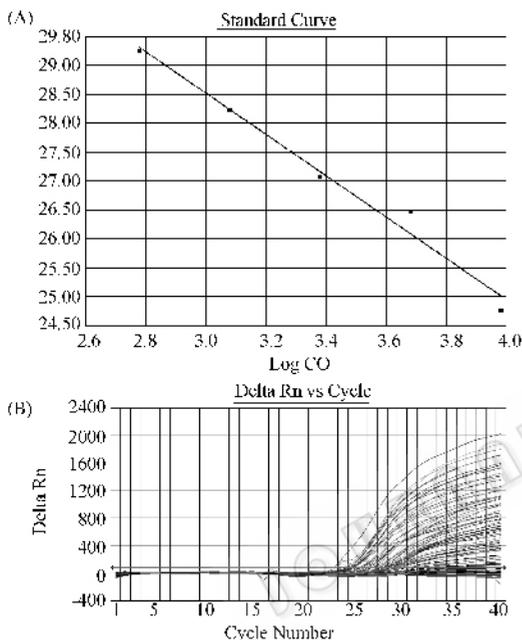


图 1 Real-time PCR 结果

Fig. 1 Results of Real-time PCR of CSFV. A: Standard curve; B: Amplification curve.

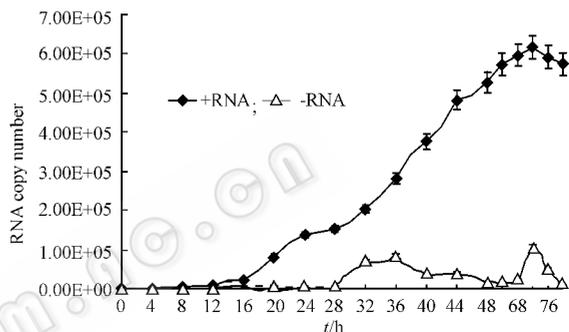


图 2 猪瘟病毒感染后不同时间基因组 RNA 的拷贝数

Fig. 2 Quantities of CSFV genomic RNA at different time post-infection.

2.2 病毒培养不同时间的间接免疫荧光测定结果

传代 PK-15 细胞于 96 孔细胞培养板,培养 24h 后用猪瘟病毒石门株感染细胞, 1×10^2 个 TCID₅₀/孔, 4 个重复孔,于感染后每间隔 4h 取样进行间接免疫荧光检测。结果显示,在所检测的 4 个重复孔中,病毒感染后 4h 均不能检测到被荧光抗体着色的细胞,病毒感染后 8h,则在 4 孔中均能检测到被荧

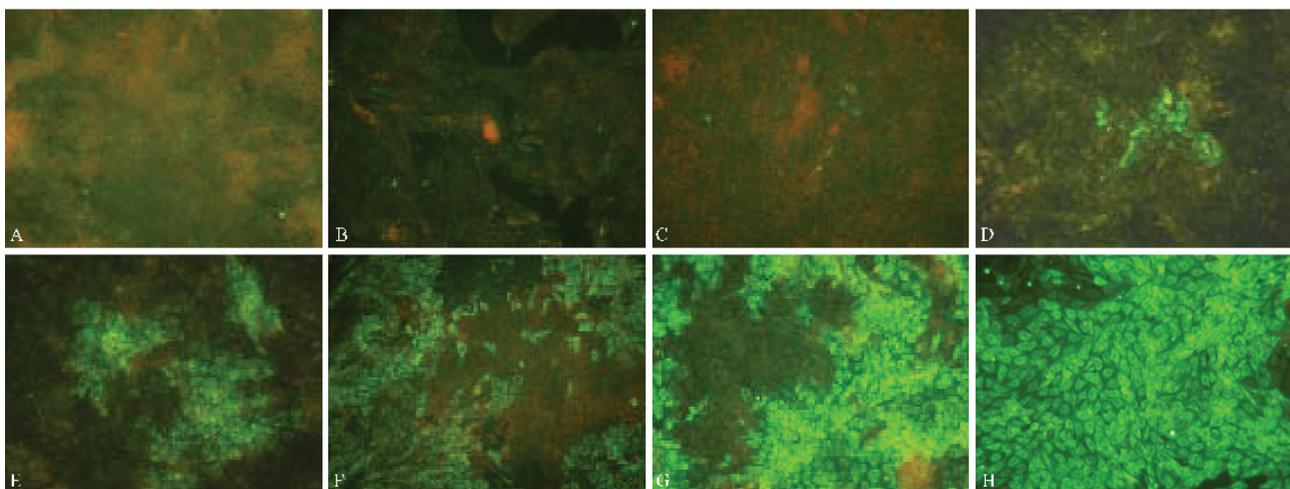


图 3 PK-15 细胞感染 CSFV 后不同时间间接免疫荧光检测结果

Fig. 3 IFA results of PK-15 cells at different time post-infection of CSFV. A: Negative serum (72h); B: 8h; C: 12h; D: 24h; E: 36h; F: 48h; G: 60h; H: 72h.

光抗体染色的感染细胞,但荧光较弱,随感染时间延长,被荧光染色的细胞数量增加,且荧光亮度明显增强。观察结果显示,在病毒感染后的8~36h这一段时间内,荧光斑的增加速度较慢,感染36h被荧光抗体染色的细胞数不到整个培养孔中所有细胞的20%,而在感染48h,约有30%的细胞能被着色,感染72h后,所有的细胞均能被染色,这表明在感染48h后,病毒蛋白的合成速度加快。图3显示病毒感染后8、12、24、36、48、60和72h的荧光检测结果。

2.3 病毒培养不同时间的感染滴度测定结果

用猪瘟病毒石门株感染12孔板上的PK-15细胞, 1×10^3 个 TCID₅₀/孔,于病毒感染后每间隔4h收集培养病毒,用间接免疫荧光方法测定猪瘟病毒的感染滴度。结果表明:猪瘟病毒感染PK-15细胞后8h能检测到病毒培养物中有感染能力的子代病毒,其 TCID₅₀ 为 $1 \times 10^{0.42}$ /0.1mL,随后其感染滴度迅速升高,呈现出快速增长的趋势,在感染后20h, TCID₅₀ 达到 $1 \times 10^{3.58}$ /0.1mL,在感染24h后,感染滴度的增加减慢,病毒的感染滴度较为平稳增加,感染后48~52h达到高峰,TCID₅₀ 为 $1 \times 10^{4.67}$ /0.1mL,随后病毒的感染滴度开始逐渐下降,但病毒的感染滴度能在较长时间内维持在较高的水平(36~72h),在感染后72h的 TCID₅₀ 为 $1 \times 10^{4.33}$ /0.1mL,96h为 $1 \times 10^{3.92}$ /0.1mL,120h为 $1 \times 10^{3.42}$ /0.1mL,而44h后,病毒的 TCID₅₀ 仅为 $1 \times 10^{3.17}$ /0.1mL(图4)。

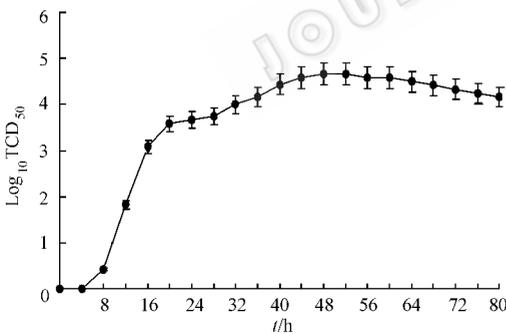


图4 猪瘟病毒感染后不同时间的半数细胞感染量测定

Fig.4 TCID₅₀ of CSFV-infected PK-15 cells at different time post-infection.

3 讨论

动物病毒的增殖过程大致可以分为:吸附于侵入、脱壳、病毒成分的合成及组装与释放的主要阶段。在这几个阶段中,病毒成分的合成是病毒增殖过程的关键,包括病毒基因转录、病毒蛋白的生物合成、病毒核酸的复制等过程。猪瘟病毒是单股的正链RNA病毒,母代RNA可以直接呈现mRNA的作用,同时又是合成负链RNA的模板,负链RNA反过来复制子代RNA。NS5B是瘟病毒基因组复制的主

具有RNA依赖的RNA酶活性,NS5B的C端含有Gly-Asp-Asp(GDD)基序,这一序列在其他种属生物的RNA依赖的RNA聚合酶中高度保守。病毒NS5B蛋白与正链基因组的3'-UTR形成一个复合物,NS5B蛋白也能结合负链3'-UTR,且猪瘟病毒编码的RNA依赖的RNA聚合酶对这两种RNA的亲合力不同,以至病毒复制过程中的负链RNA的拷贝数比基因组RNA拷贝数低。因此分析病毒的mRNA转录、病毒基因表达、病毒基因组复制水平及病毒感染后不同时期的病毒滴度,是研究病毒感染增殖过程的常用策略。

CSFV在猪的不同组织的细胞中增殖力不同,对淋巴系统细胞有嗜性^[6]。在体外培养细胞中,CSFV一般不使培养细胞产生CPE。在细胞中CSFV以低水平增殖,产生的子代病毒滴度较低,一般在 $10^6 \sim 10^8$ TCID₅₀/0.1mL^[3]。在PK-15中培养猪瘟病毒检测结果感染滴度最高时病毒的TCID₅₀为 $10^{4.67}$ /0.1mL,与文献报导相符^[4]。用猪淋巴细胞38A1D系培养CSFV比用PK-15细胞系培养滴度高^[7]。Shimizu用猪骨髓基质细胞(Porcine bonem arrow stroma cell, BMSC)增殖CSFV,发现CSFV不仅可以使BMSC产生CPE,且还抑制了骨髓基质细胞的分化^[8]。

病毒感染感染细胞的过程中,吸附于细胞表面的病毒粒子很快进入细胞,并迅速裂解,病毒粒子消失。从病毒粒子消失开始,到新的子代病毒粒子出现为止,这一段时间称为“隐蔽期”。“隐蔽期”是病毒增殖过程的主要阶段。我们的研究结果显示,猪瘟病毒石门株感染PK-15细胞后,8h能检测到病毒抗原的表达、病毒基因组复制中间体负链RNA,并能检测到具有感染性的病毒,这表明猪瘟病毒增殖过程的“隐蔽期”大约为8h,病毒RNA的定量分析结果表明,猪瘟病毒感染细胞后,其基因组RNA迅速合成,同时病毒的感染滴度也快速增长,这表明猪瘟病毒的基因组复制和病毒蛋白的生物合成及病毒粒子的组装成熟过程可能是同时发生的,我们的分析结果显示,病毒的感染滴度高峰出现在感染后48h,且随后开始逐渐下降,而病毒的基因组分子数在感染后72h达到高峰。在进行复制中间体负链RNA的检测中,我们检测到负链RNA的时间是在病毒感染后8h,但这并不是在病毒感染后8h以前没有负链RNA的存在,而是我们检测所用的cDNA只相当与5ng总RNA的逆转录产物。

王镇等^[9]曾对猪瘟弱毒疫苗Thiverval株(T株)在PK-15细胞中增殖特性进行研究,病毒感染后12h即有感染性病毒粒子释放到细胞外,说明CSFV T株病毒在PK-15细胞中的增殖至少可在12h内完成。

至感染后 60h 培养液中病毒的滴度达到最高峰, 随后病毒滴度下降, 至感染后 96h 病毒滴度趋于平稳, 并且整个感染过程中细胞不出现明显的 CPE。本文从病毒感染滴度和病毒基因组增殖两方面对猪瘟病毒石门株在细胞中增殖特性进行了研究, 间接免疫荧光结果表明随感染时间的延长, 能被荧光染色的细胞增加, 几乎所有细胞完全出现荧光需要 72h。病毒基因组的数量在感染后 72h 达到高峰, 而病毒的感染滴度在 48 ~ 52h 达到高峰后, 虽然能维持较长时间的高感染滴度水平, 但呈现出缓慢下降的趋势。检测结果显示: 感染 48h 后, 病毒基因组 RNA 拷贝数的增加、病毒蛋白的积累和感染细胞的增多并没有引起病毒感染滴度的增加, 出现病毒滴度的缓慢降低与基因组复制和病毒基因表达之间在量上的不一致性。我们在病毒感染细胞后 8h 可检测到感染能力的子代病毒, 病毒感染滴度得到高峰时间在 48 ~ 52h, 分别比王镇等^[9]确定的时间范围提前, 这可能与研究使用的猪瘟病毒毒株不同有关。

病毒复制中间体拷贝数检测结果显示, 在病毒基因组增殖迅速时期, 其复制中间体的拷贝数随之增加, 但其数量远小于基因组 RNA 拷贝数, 这与病毒复制酶 NS5B 与病毒 RNA 结合的特性相符^[10], 同时, 我们的检测结果表明, 作为病毒复制中间体形式存在的负链 RNA 拷贝数呈现出一定的波动, 这表明复制中间体 RNA 在宿主细胞不稳定, 在完成基因组

RNA 复制后可能很快被降解。

参 考 文 献

- [1] Heinz FX, Collett MS, Purcekk RH, *et al.* Family Flaviridae. In: Fauquet CM, Mayo M, Maniloff J, *et al.* Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. San Diego: Academic Press, 2004.
- [2] Pan IC, Huang TS, Pan CH, *et al.* The skin, tongue, and brain as favorable organs for hog cholera diagnosis by immunofluorescence. *Arch Virol*, 1993, **131**(3-4): 475-481.
- [3] Susa M, Konig M, Saalmuller A, *et al.* Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J Virol*, 1992, **66**(2): 1171-1175.
- [4] Moormann RJ, van Gennip HG, Miedema GK, *et al.* Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J Virol*, 1996, **70**(2): 763-770.
- [5] Yu X, Tu C, Li H, *et al.* DNA-mediated protection against classical swine fever virus. *Vaccine* 2001, **19**(11-12): 1520-1525.
- [6] Moenning V. Pestiviruses: a review. *Vet Microbiol*, 1990, **23**(1-4): 35-54.
- [7] Strandstrom H, Veijalainen P, Moenning V, *et al.* C-type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. I. Origin and properties of the host cells and some evidence for the occurrence of C-type-like particles. *Virology*, 1974, **57**(1): 175-178.
- [8] Shimizu M, Yamada S, Nishimori T. Cytocidal infection of hog cholera virus in porcine bone marrow stroma cell cultures. *Vet Microbiol*, 1995, **47**(3-4): 395-400.
- [9] 王镇, 陆宇, 周鹏程, 等. 猪瘟病毒在 PK 细胞和 MPK 细胞中繁殖过程的研究. *微生物学报*, 1999, **39**(3): 189-195.
- [10] Xiao M, Gao J, Wang W, *et al.* Specific interaction between the classical swine fever virus NS5B protein and the viral genome. *Eur J Biochem* 2004, **271**(19): 3888-3896.

Replicative kinetics of classical swine fever virus in PK-15 cells

XU Xing-ran, GUO Huan-cheng, SHI Zi-xue, XIA Xian-zhu, TU Chang-chun*

(Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Science Changchun 130062, China)

Abstract: In order to understand the replication kinetics of classical swine fever virus (CSFV) in in vitro cells PK-15 cells were seeded in 96-well tissues culture plates. After overnight incubation at 37°C in 5% CO₂ environment when growing to 80% confluence, the cells were infected with CSFV strain Shimen at 100 TCID₅₀ per well. At various time post infection (p. i.) the replication of the virus in the cells were analyzed respectively by detection of viral antigen using indirect immunofluorescent assay (IFA), RNA replication using reverse transcription real-time PCR and viral production using titration of TCID₅₀. In the results of the IFA the viral antigen could be detected as early as 8hrs p. i. and at 72h hrs p. i. almost all cells showed positive staining. the real-time PCR showed that the synthesis of viral genomic RNA was gradually increased between 8-24 hrs p. i. and reached its peak at 72 hrs p. i.. However, the synthesis of negative strand RNA was maintained at a low level for a whole period of culture although it could be detected at 8hrs p. i.. Titration of TCID₅₀ demonstrated that the production of live virions increased at 8h and peaked between 48 - 72 hrs p. i. without significant loss of titer.

Keywords: classical swine fever virus; replication kinetics; PK-15 cells

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30371071); Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523200)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-431-87960009; E-mail: changchun_tu@hotmail.com

Other authors: XIAO Chang, ZHA Yun-feng

Received: 19 April 2007/Accepted: 27 April 2007/Revised: 25 June 2007