

同步接毒条件下鳊传染性脾肾坏死病毒在 CPB 细胞中的最适增殖条件

罗霞¹, 付小哲^{1,2}, 李宁求^{1,2*}, 林强^{1,2}, 张悠¹, 黄志斌¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部渔用药物创制重点实验室,
广东省水产动物免疫技术重点实验室,广东 广州 510380;
2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心,湖北 武汉 430070)

摘要:为了获知鳊传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)同步接毒最适增殖条件,通过检测不同血清浓度、病毒接种量、细胞状态等培养条件下的病毒拷贝数,确定鳊脑组织细胞(CPB)同步接种 ISKNV 的最适体外增殖条件。结果表明,上述各因素对 ISKNV 的增殖量均有明显影响。其中选取处于对数生长中期的 CPB 细胞,胰酶消化后按照病毒感染复数(MOI)为 0.2 同步接种 ISKNV,培养液中胎牛血清终浓度为 6% 时,28 ℃ 恒温培养 9 d 后收获,所得病毒拷贝数最多,为 2.54×10^8 拷贝/mL。将所测得病毒拷贝数折算成培养基成本进一步分析表明,按照上述相同条件进行接毒,每元人民币培养基所得病毒量也最高,为 4.24×10^{11} 拷贝。综上所述,本研究基于病毒增殖量及培养基成本对病毒增殖条件进行优化,可为低成本 ISKNV 疫苗的生产提供理论依据。

关键词:鳊; 传染性脾肾坏死病毒; 鳊脑细胞; 同步接毒; 荧光定量 PCR; 增殖条件

中图分类号: S 941

文献标志码: A

鳊(*Siniperca chuatsi*)是我国重要淡水特色养殖品种之一,近年来由传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)引起的鳊虹彩病毒病给鳊的养殖产业带来严重经济损失。吴淑勤等^[1]首先在患病鳊中发现一种球形病毒,并认为是鳊暴发性传染病的病原。何建国等^[2]通过回归感染及形态学研究发现所分离的病毒与吴淑勤等^[1]发现的均属同种病毒,并且具有较强的致病力,由于主要感染器官为肾脏和脾脏,因而命名为传染性脾肾坏死病毒,后来又通过主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因等序列分析将其确定为一种虹彩病毒^[3]。在过去 10 年中,肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)成员引发的疾病已被确认为严重影响水产养殖业健康发展的原因之一^[4]。根据国际病毒分类委员会(International Committee

on Taxonomy of Viruses, ICTV)第八次报告^[5], ISKNV 是虹彩病毒科(Iridoviridae)肿大细胞病毒属的代表种,其传染力强,发病率高达 30%,致死率高达 90% 以上,可以感染近 60 种淡水和海水鱼^[6],给鳊、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、乌鳢(*Channa argus*)、美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)和巨石斑鱼(*Epinephelus tauvina*)等海、淡水鱼类养殖业造成了巨大威胁。自 1994 年以来,ISKNV 给我国鳊养殖业造成的平均年经济损失高达 2 亿元^[7],是制约鳊养殖业健康发展的主要瓶颈。

免疫接种是预防传染病发生的主要手段,鉴于肿大细胞病毒属所引发的疾病,目前国内外已有学者研发出多种针对此类病毒的疫苗,具有一定的保护效果^[8-9]。本实验室建立了 ISKNV 敏感的鳊脑组织细胞系 CPB^[10],研制出细胞培养灭活疫苗。但如何以低成本生产获得高滴度病毒是

收稿日期:2015-04-10 修回日期:2015-06-16

资助项目:广东省教育部产学研结合专项(2012B091100164);国家科技支撑计划(2012BAD25B02);国家自然科学基金(31202032)

通信作者:李宁求, E-mail: liningq@126.com

疫苗制备的关键步骤。本研究针对以上问题,通过设置不同的血清浓度、病毒接种量以及接种病毒时细胞的生长状态及细胞浓度等因素,综合考虑培养基成本和时间成本,筛选出适合鲮传染性脾肾坏死病毒在体外培养 CPB 细胞中的最适增殖条件,旨在用最低的培养基成本和最少的时间成本获取最高的病毒量,为鲮传染性脾肾坏死病毒灭活疫苗的研制提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

CPB 由本实验室 Fu 等^[10]建立并保藏;鲮传染性脾肾坏死病毒 QY 株 (ISKNV-QY) 由本实验室分离保存。L15 培养基、胎牛血清、胰酶为 Gibco 公司产品;DNA 提取试剂盒为 OMEGA 公司产品;10 × Taq 反应缓冲液、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、Premix Ex TaqTM 购于 TaKaRa 公司。

1.2 接毒条件的研究

最适细胞状态 通过 Countstar 细胞计数仪测定传代至 65 代、28 °C 恒温培养 0、24、48、72 和 96 h 的 CPB 数量,制作细胞生长曲线,选取处于对数生长期早、中、晚 3 个时间点的细胞,胰酶消化后同步接种 ISKNV 病毒液。

最适接毒量 分别设置 0.1 ~ 0.6、1 ~ 6 和 10 ~ 60 共 18 个不同梯度的感染复数 (multiplicity of infection, MOI),同步接种处于对数生长期早、中、晚 3 个时间点的 CPB 细胞。

ISKNV 增殖最适血清浓度 同步接种病毒后培养液中胎牛血清终浓度设置 6%、8% 和 10% 3 个浓度梯度。

1.3 病毒培养及含量的测定

上述每个样品均作 3 个平行处理,接毒完毕后,28 °C 培养箱中培养,逐日观察细胞病变 (cytopathic effect, CPE)。待 CPE 达 80% 以上时收获细胞及病毒培养液, -20 °C 反复冻融 3 次后,置 -70 °C 保存。每个样品取 400 μL 病毒液,按照 OMEGA 公司的 DNA 提取试剂盒说明书提取病毒核酸后,溶于 80 μL 无菌水,在荧光定量 PCR 仪上 (ABI 7500) 检测病毒含量,根据付小哲等^[11]报道的公式计算病毒拷贝数:

$$C_T = -3.314 \lg x + 41.48$$

式中, x 代表病毒拷贝数, C_T 值为荧光定量 PCR 仪所测得数据,代表每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数。

1.4 数据的处理

分别以培养基成本和时间成本为参考因素,将所测得的病毒拷贝数进行不同方式处理,分别折算成培养基成本 (Y) 即每元人民币培养基所得病毒拷贝数 (拷贝/元) 和时间成本 (D) 即每日的病毒拷贝数 (拷贝/天),对培养增殖条件进行评价。ISKNV 增殖所用培养基成本主要包括 L15 培养基和胎牛血清,其中 L15 培养基的价钱为 65 元/L,胎牛血清为 10 000 元/L,以培养 1 L 体积病毒计算,胎牛血清浓度为 6%、8% 和 10% 的培养基价格分别为 665、865 和 1 065 元,则增殖病毒所产生的培养基成本 (Y) 计算公式如下:

$$Y = 10^6 x / 665, Y = 10^6 x / 865, Y = 10^6 x / 1065$$

增殖病毒所产生的时间成本 (D) 计算公式:

$$D = x / (\text{接毒前细胞培养天数} + \text{接毒后病毒培养天数})$$

式中, x 代表病毒拷贝数,并依据上述公式进行数据处理。

1.5 数据统计分析

实验所得数据均表示为平均数 ± 标准差 (mean ± SD),采用软件 OriginPro 8.0 进行数据处理,并利用 t 检验进行差异性分析,当 $P < 0.05$ 时差异显著, $P < 0.01$ 时差异极显著。

2 结果

2.1 细胞生长状态的研究

CPB 细胞传代后至 24 h 期间细胞数量稍有下降,为潜伏期;24 ~ 72 h 期间细胞生长速度呈直线上升趋势,为对数生长期;72 ~ 96 h 细胞生长平稳,开始进入平台生长期 (图 1)。

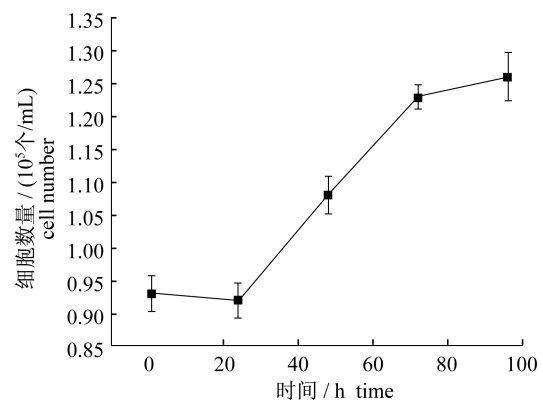


图 1 CPB 细胞生长曲线 (0 ~ 96 h)

Fig. 1 Growth kinetics of CPB cells from 0 hour to 96 hours

处于对数生长期的细胞分裂生长旺盛、细胞状态良好,病毒增殖快^[12],分别选取该时期早(24 h)、中(48 h)、晚(72 h)3个时间点的细胞作为接种对象,细胞浓度分别为 0.92×10^5 、 1.08×10^5 和 1.23×10^5 个/mL,进一步筛选出最适合 ISKNV 增殖的细胞数量和接种时间。

2.2 不同接毒条件下病毒增殖结果

其他条件均相同的情况下,处于对数生长中期的细胞接种 ISKNV,平均获得病毒拷贝数最多,为 1.60×10^8 拷贝/mL,与接种对数生长早期 (1.22×10^8 拷贝/mL) 和对数生长晚期 (1.30×10^8 拷贝/mL) 的 CPB 相比差异显著 ($P < 0.05$) (表 1);根据接种病毒时培养液中的血清浓度进行分组,对各组样品的病毒拷贝数计算平均值,结果表

明胎牛血清浓度为 6% 时最适合 ISKNV 的增殖,平均收获病毒拷贝数为 1.48×10^8 拷贝/mL,与 10% 血清组 (1.19×10^8 拷贝/mL) 相比差异显著 ($P < 0.05$),与 8% 血清组 (1.45×10^8 拷贝/mL) 差异不显著 ($P > 0.05$);根据接种病毒时的 MOI 进行分组比较,对各组样品的病毒拷贝数计算平均值,结果表明 MOI 为 0.2 时所收获的病毒拷贝数最多,为 1.75×10^8 拷贝/mL,与其他组相比差异均显著 ($P < 0.05$)。综上所述,MOI 为 0.2,同步接种培养 48 h 处于对数生长中期的 CPB 细胞、培养液中胎牛血清终浓度为 6% 时,所得病毒拷贝数最多,为 2.54×10^8 拷贝/mL,即此培养条件为 ISKNV 同步接毒 CPB 细胞的最适增殖条件。

表 1 不同接毒条件下的病毒拷贝数
Tab. 1 Viral copy numbers under different inoculation conditions $\times 10^8$ copies/mL

MOI	对数生长早期 CPB CPB at the early-log phase			对数生长中期 CPB CPB at the middle-log phase			对数生长晚期 CPB CPB at the late-log phase			平均 A average A
	血清浓度 serum concentration			血清浓度 serum concentration			血清浓度 serum concentration			
	6%	8%	10%	6%	8%	10%	6%	8%	10%	
	6%	8%	10%	6%	8%	10%	6%	8%	10%	
10	1.49 ± 0.078	1.41 ± 0.56	1.13 ± 0.07	1 ± 0.072	1.8 ± 0.008	1.53 ± 0.03	1.14 ± 0.09	1.17 ± 0.032	0.97 ± 0.04	1.29 ± 0.05
20	1.54 ± 0.03	1.64 ± 0.12	1.59 ± 0.07	1.17 ± 0.198	1.65 ± 0.256	1.63 ± 0.06	1.56 ± 0.012	1.21 ± 0.016	0.87 ± 0.4	1.43 ± 0.04
30	0.33 ± 0.018	0.62 ± 0.44	0.56 ± 0.11	1.11 ± 0.072	1.21 ± 0.296	1.37 ± 0.03	2.05 ± 0.048	1.32 ± 0.024	0.73 ± 0.03	1.03 ± 0.06
40	0.52 ± 0.036	0.51 ± 0.208	0.57 ± 0.06	0.98 ± 0.075	1.19 ± 0.008	0.95 ± 0.05	1.89 ± 0.018	2.01 ± 0.024	0.89 ± 0.08	1.06 ± 0.05
50	0.56 ± 0.006	0.84 ± 0.168	0.85 ± 0.72	1.83 ± 0.246	1.23 ± 0.416	1.37 ± 0.06	1.65 ± 0.024	1.78 ± 0.048	0.89 ± 0.29	1.22 ± 0.1
60	0.45 ± 0.024	0.75 ± 0.032	1.05 ± 0.08	1.58 ± 0.67	1.43 ± 0.36	1.33 ± 0.03	1.38 ± 0.042	1.41 ± 0.016	0.89 ± 0.42	1.14 ± 0.08
1	1.19 ± 0.066	1.65 ± 0.264	1.1 ± 0.09	1.26 ± 0.024	1.2 ± 0.424	0.84 ± 0.06	1.51 ± 0.036	1.2 ± 0.04	0.97 ± 0.1	1.21 ± 0.15
2	1.52 ± 0.048	1.09 ± 0.096	1.31 ± 0.03	1.83 ± 0.042	1.76 ± 0.024	1.35 ± 0.05	1.71 ± 0.024	1.11 ± 0.04	0.91 ± 0.14	1.4 ± 0.06
3	1.69 ± 0.012	1.57 ± 0.008	1.44 ± 0.28	1.47 ± 0.168	1.83 ± 0.008	1.09 ± 0.07	1.46 ± 0.036	1.22 ± 0.032	1.14 ± 0.56	1.43 ± 0.1
4	1.82 ± 0.024	2.02 ± 0.184	1.62 ± 0.08	2.15 ± 0.036	1.8 ± 0.088	0.97 ± 0.07	1.45 ± 0.03	1.32 ± 0.04	1.03 ± 0.39	1.58 ± 0.11
5	1.31 ± 0.036	1.41 ± 0.304	1.81 ± 0.28	2.11 ± 0.606	1.22 ± 0.088	1.26 ± 0.01	1.48 ± 0.054	1.46 ± 0.04	1.44 ± 0.16	1.5 ± 0.22
6	0.69 ± 0.036	1.3 ± 0.096	1.42 ± 0.13	1.69 ± 0.288	1.73 ± 0.040	0.99 ± 0.03	1.3 ± 0.036	1.29 ± 0.048	1.18 ± 0.25	1.29 ± 0.09
0.1	0.75 ± 0.018	1.24 ± 0.102	1.4 ± 0.13	1.81 ± 0.39	2.41 ± 0.016	1.33 ± 0.03	1.32 ± 0.09	1.24 ± 0.024	0.98 ± 0.09	1.39 ± 0.12
0.2	1.35 ± 0.042	1.35 ± 0.096	1.68 ± 0.22	2.54 ± 0.486^c	2.50 ± 0.08	1.91 ± 0.01	1.97 ± 0.03	1.32 ± 0.04	1.13 ± 0.11	1.75 ± 0.04^b
0.3	1.2 ± 0.006	1.39 ± 0.464	1.17 ± 0.08	2.24 ± 0.486	2.22 ± 0.024	1.88 ± 0.01	1.8 ± 0.054	1.2 ± 0.032	0.8 ± 0.04	1.54 ± 0.15
0.4	1.25 ± 0.024	1.41 ± 0.48	1.49 ± 0.05	2.09 ± 0.228	2.52 ± 0.024	1.32 ± 0.02	1.39 ± 0.012	1.22 ± 0.048	0.75 ± 0.22	1.49 ± 0.18
0.5	1.09 ± 0.09	1.54 ± 0.464	1.32 ± 0.26	2.12 ± 0.606	1.44 ± 0.048	1.57 ± 0.04	1.45 ± 0.03	1.35 ± 0.04	0.88 ± 0.51	1.41 ± 0.2
0.6	1.24 ± 0.336	1.35 ± 0.096	1.14 ± 0.21	2.39 ± 0.366	1.71 ± 0.048	1.61 ± 0.04	1.91 ± 0.03	1.46 ± 0.032	0.98 ± 0.14	1.53 ± 0.15
平均 B average B	1.11 ± 0.06	1.28 ± 0.22	1.26 ± 0.20	1.74 ± 0.38^c	1.72 ± 0.20	1.35 ± 0.04	1.58 ± 0.06	1.35 ± 0.05	0.97 ± 0.2	-
平均 C average C		1.22 ± 0.16		1.60 ± 0.21^d				1.30 ± 0.10		-

注:A 为相同 MOI 组的平均病毒拷贝数; B 为相同细胞状态和相同血清浓度组的平均病毒拷贝数; C 为相同细胞状态的病毒拷贝数; a 为所有实验组中的最高病毒拷贝数; b 为 A 列即相同 MOI 组的最高病毒拷贝数; c 为 B 行即相同细胞状态和相同血清浓度组的最高病毒拷贝数; d 为 C 行即相同细胞状态组的最高病毒拷贝数

Notes: A represents average viral copy numbers of groups with the same MOI; B represents average viral copy numbers of groups with the same cell state and serum concentration; C represents average viral copy numbers of groups with the same cell state; a represents the highest amount of virus of all experimental groups; b represents the highest amount of virus of groups with the same MOI (column A); c represents the highest amount of virus of groups with the same cell state and serum concentration (line B); d represents the highest amount of virus of groups with the same cell state (line C)

2.3 病毒增殖培养基成本的研究

其他条件均相同的情况下,处于对数生长中期的细胞接种 ISKNV,平均每元培养基所生产的病毒量最高,为 2.13×10^{11} 拷贝,与接种对数生长早期 (1.57×10^{11} 拷贝/元) 和对数生长晚期 (1.76×10^{11} 拷贝/元) 的 CPB 相比差异显著 ($P < 0.05$) (表 2); 该细胞浓度下 6% 血清组的平均病毒产量为 2.91×10^{11} 拷贝/元,显著高于 8% (2.15×10^{11} 拷贝/元) 和 10% (1.35×10^{11} 拷贝/元) 血清组的病

毒拷贝数; 其中又以 MOI 为 0.2 时的产量最高,平均每元病毒产量为 2.33×10^{11} 拷贝,与其他组相比差异均显著 ($P < 0.05$)。综上所述,MOI 为 0.2 时同步接种培养 48 h 处于对数生长中期 CPB 细胞、培养液中胎牛血清浓度为 6% 时,每元人民币所得病毒拷贝数最多,为 4.24×10^{11} 拷贝,即此培养条件可用最低的培养基成本获得最高的病毒产量。

表 2 平均每元培养基成本的病毒产量
Tab.2 The average cost of viral yield per yuan

MOI	对数生长早期 CPB CPB at the early-log phase									对数生长中期 CPB CPB at the middle-log phase			对数生长晚期 CPB CPB at the late-log phase			平均值 A average A
	血清浓度 serum concentration			血清浓度 serum concentration			血清浓度 serum concentration									
	6%	8%	10%	6%	8%	10%	6%	8%	10%							
	6%	8%	10%	6%	8%	10%	6%	8%	10%							
10	2.49 ± 0.013	1.76 ± 0.07	1.13 ± 0.07	1.66 ± 0.012	2.24 ± 0.001	1.53 ± 0.003	1.91 ± 0.015	1.46 ± 0.004	0.97 ± 0.004				1.68 ± 0.01			
20	2.56 ± 0.005	2.01 ± 0.015	1.59 ± 0.007	1.94 ± 0.033	2.06 ± 0.032	1.63 ± 0.006	2.6 ± 0.002	1.51 ± 0.002	0.87 ± 0.041				1.86 ± 0.01			
30	0.56 ± 0.003	0.77 ± 0.055	0.56 ± 0.011	1.86 ± 0.012	1.51 ± 0.037	1.36 ± 0.003	3.42 ± 0.008	1.65 ± 0.003	0.73 ± 0.003				1.38 ± 0.01			
40	0.87 ± 0.006	0.64 ± 0.026	0.57 ± 0.006	1.63 ± 0.126	1.48 ± 0.001	0.95 ± 0.005	3.15 ± 0.003	2.51 ± 0.003	0.89 ± 0.008				1.41 ± 0.02			
50	0.93 ± 0.001	1.05 ± 0.021	0.85 ± 0.072	3.06 ± 0.041	1.54 ± 0.052	1.37 ± 0.006	2.75 ± 0.004	2.22 ± 0.006	0.89 ± 0.029				1.63 ± 0.02			
60	0.74 ± 0.004	0.94 ± 0.004	1.05 ± 0.008	2.64 ± 0.111	1.79 ± 0.045	1.33 ± 0.003	2.3 ± 0.007	1.76 ± 0.002	0.89 ± 0.042				1.49 ± 0.03			
1	1.98 ± 0.011	2.07 ± 0.033	1.10 ± 0.009	2.09 ± 0.004	1.50 ± 0.053	0.84 ± 0.006	2.52 ± 0.006	1.5 ± 0.005	0.97 ± 0.010				1.62 ± 0.02			
2	2.53 ± 0.008	1.36 ± 0.012	1.31 ± 0.003	3.05 ± 0.007	2.20 ± 0.003	1.35 ± 0.005	2.85 ± 0.004	1.39 ± 0.005	0.92 ± 0.035				1.88 ± 0.01			
3	2.81 ± 0.002	1.96 ± 0.001	1.44 ± 0.028	2.45 ± 0.178	2.28 ± 0.001	1.09 ± 0.007	2.43 ± 0.006	1.52 ± 0.004	1.14 ± 0.056				1.90 ± 0.022			
4	3.03 ± 0.004	2.52 ± 0.023	1.62 ± 0.008	3.59 ± 0.006	2.24 ± 0.011	0.97 ± 0.007	2.42 ± 0.005	1.65 ± 0.005	1.03 ± 0.039				2.12 ± 0.013			
5	2.18 ± 0.006	1.77 ± 0.038	1.81 ± 0.028	3.52 ± 0.101	1.53 ± 0.011	1.26 ± 0.001	2.46 ± 0.009	1.82 ± 0.005	1.44 ± 0.016				1.98 ± 0.015			
6	1.16 ± 0.006	1.63 ± 0.012	1.42 ± 0.013	2.81 ± 0.048	2.16 ± 0.005	0.99 ± 0.003	2.17 ± 0.006	1.61 ± 0.006	1.18 ± 0.025				1.68 ± 0.008			
0.1	1.25 ± 0.003	1.55 ± 0.128	1.40 ± 0.013	3.02 ± 0.065	3.01 ± 0.002	1.33 ± 0.003	2.2 ± 0.015	1.55 ± 0.003	0.98 ± 0.009				1.81 ± 0.005			
0.2	2.25 ± 0.007	1.68 ± 0.012	1.68 ± 0.022	4.24 ± 0.081^a	3.2 ± 0.010	1.91 ± 0.001	3.28 ± 0.005	1.65 ± 0.005	1.12 ± 0.011				2.33 ± 0.01^b			
0.3	1.99 ± 0.001	1.73 ± 0.058	1.17 ± 0.008	3.74 ± 0.081	2.78 ± 0.003	1.88 ± 0.001	2.99 ± 0.009	1.5 ± 0.004	0.8 ± 0.004				2.06 ± 0.015			
0.4	2.08 ± 0.004	1.76 ± 0.06	1.49 ± 0.005	3.49 ± 0.038	3.15 ± 0.003	1.32 ± 0.002	2.32 ± 0.002	1.52 ± 0.006	0.75 ± 0.022				1.99 ± 0.01			
0.5	1.82 ± 0.015	1.92 ± 0.058	1.32 ± 0.026	3.54 ± 0.101	1.81 ± 0.006	1.57 ± 0.004	2.42 ± 0.005	1.69 ± 0.005	0.88 ± 0.051				1.89 ± 0.012			
0.6	2.06 ± 0.056	1.69 ± 0.012	1.14 ± 0.021	3.98 ± 0.061	2.14 ± 0.006	1.61 ± 0.004	3.18 ± 0.005	1.82 ± 0.004	0.98 ± 0.014				2.07 ± 0.02			
平均 B average B	1.85 ± 0.01	1.60 ± 0.04	1.26 ± 0.02	2.91 ± 0.06^c	2.15 ± 0.02	1.35 ± 0.00	2.63 ± 0.01	1.69 ± 0.00	0.97 ± 0.02				-			
平均 C average C		1.57 ± 0.02		2.13 ± 0.03^d				1.76 ± 0.01					-			

注:A 为相同 MOI 组的平均元培养基成本的病毒产量; B 为相同细胞状态和相同血清浓度组的平均元培养基成本的病毒产量; C 为相同细胞状态组的平均元培养基成本的病毒产量; a 为所有实验组中每元培养基成本的最高病毒产量; b 为 A 列即相同 MOI 组每元培养基成本的最高病毒产量; c 为 B 行即相同细胞状态和相同血清浓度组的每元培养基成本的最高病毒产量; d 为 C 行即相同细胞状态组每元培养基成本的最高病毒产量

Notes: A represents average cost of viral yield per yuan of groups with the same MOI; B represents average cost of viral yield per yuan of groups with the same cell state and serum concentration; C represents average cost of viral yield per yuan of groups with the same cell state; a represents the highest viral yield per yuan of all experimental groups; b represents the highest viral yield per yuan of groups with the same MOI (column A); c represents the highest viral yield per yuan of groups with the same cell state and serum concentration (line B); d represents the highest viral yield per yuan of groups with the same cell state (line C)

2.4 病毒增殖时间成本的研究

其他条件均相同的情况下,处于对数生长早期的细胞接种 ISKNV,平均病毒日产量最高,为 2.28×10^7 拷贝/天,与接种对数生长中期 (2.00×10^7 拷贝/天)和对数生长晚期 (1.48×10^7 拷贝/天)的 CPB 相比差异显著 ($P < 0.05$,表 3);该细胞状态下 10% 胎牛血清浓度更适合病毒的增殖,平均病毒日产量为 2.50×10^7 拷贝/天,显著高于 6% (2.00×10^7 拷贝/天)和 8%

(2.34×10^7 拷贝/天)血清浓度下的平均病毒日产量;其中又以 MOI 为 4 时的产量最高,平均病毒日产量为 2.39×10^7 拷贝/天,与其他各组相比差异均显著 ($P < 0.05$)。综上所述,MOI 为 4,同步接种培养 24 h 处于对数生长早期的 CPB 细胞、培养液中胎牛血清终浓度为 10% 时,每日所产病毒量最高,为 3.64×10^7 拷贝,即此培养条件可以最短的时间成本获得最高的病毒产量。

表 3 平均每日病毒产量
Tab.3 The average viral yield per day

MOI	对数生长早期 CPB CPB at the early-log phase									对数生长中期 CPB CPB at the middle-log phase			对数生长晚期 CPB CPB at the late-log phase			平均值 A average A
	血清浓度 serum concentration			血清浓度 serum concentration			血清浓度 serum concentration									
	6%	8%	10%	6%	8%	10%	6%	8%	10%							
	6%	8%	10%	6%	8%	10%	6%	8%	10%							
10	2.99 ± 0.02	2.82 ± 0.015	2.25 ± 0.175	1.43 ± 0.014	2.56 ± 0.001	2.18 ± 0.175	1.43 ± 0.018	1.22 ± 0.008	2.99 ± 0.02				2.11 ± 0.04			
20	3.07 ± 0.008	3.28 ± 0.03	3.18 ± 0.017	1.66 ± 0.04	2.35 ± 0.052	2.33 ± 0.018	1.95 ± 0.002	1.25 ± 0.010	3.07 ± 0.008				2.38 ± 0.02			
30	1.11 ± 0.009	2.05 ± 0.22	1.86 ± 0.055	1.86 ± 0.017	1.72 ± 0.06	1.94 ± 0.055	2.57 ± 0.010	1.05 ± 0.008	1.11 ± 0.009				1.77 ± 0.04			
40	1.73 ± 0.019	1.7 ± 0.105	1.89 ± 0.03	1.63 ± 0.19	1.98 ± 0.02	1.36 ± 0.03	2.36 ± 0.003	1.28 ± 0.020	1.73 ± 0.019				1.74 ± 0.07			
50	1.85 ± 0.003	2.79 ± 0.085	2.83 ± 0.36	3.06 ± 0.062	2.05 ± 0.105	2.29 ± 0.36	2.07 ± 0.005	1.27 ± 0.007	1.85 ± 0.003				2.28 ± 0.06			
60	1.49 ± 0.013	2.5 ± 0.16	3.5 ± 0.041	2.64 ± 0.167	2.39 ± 0.09	2.22 ± 0.04	1.73 ± 0.008	1.28 ± 0.011	1.49 ± 0.013				2.22 ± 0.05			
1	1.7 ± 0.015	2.36 ± 0.045	1.57 ± 0.015	1.57 ± 0.004	1.5 ± 0.071	1.21 ± 0.012	1.68 ± 0.006	1.08 ± 0.017	1.7 ± 0.015				1.58 ± 0.01			
2	2.17 ± 0.03	1.56 ± 0.017	1.87 ± 0.006	2.28 ± 0.007	2.2 ± 0.004	1.92 ± 0.009	1.9 ± 0.004	1.14 ± 0.007	2.17 ± 0.03				1.88 ± 0.09			
3	2.41 ± 0.22	2.24 ± 0.001	3.38 ± 0.003	1.84 ± 0.178	2.28 ± 0.002	1.56 ± 0.015	1.62 ± 0.006	1.42 ± 0.011	2.41 ± 0.22				2.09 ± 0.03			
4	2.6 ± 0.105	2.88 ± 0.031	3.64 ± 0.007^a	2.69 ± 0.006	2.56 ± 0.018	1.39 ± 0.015	1.61 ± 0.005	1.28 ± 0.008	2.6 ± 0.105				2.39 ± 0.03^b			
5	2.62 ± 0.085	2.83 ± 0.075	3.62 ± 0.001	2.64 ± 0.101	1.75 ± 0.018	1.79 ± 0.001	1.64 ± 0.008	1.81 ± 0.008	2.62 ± 0.085				2.33 ± 0.03			
6	1.39 ± 0.16	2.61 ± 0.025	2.84 ± 0.009	2.41 ± 0.058	2.47 ± 0.008	1.42 ± 0.005	1.45 ± 0.006	1.48 ± 0.010	1.39 ± 0.16				2.01 ± 0.02			
0.1	1.07 ± 0.003	1.77 ± 0.17	2 ± 0.022	1.65 ± 0.043	2.19 ± 0.002	1.21 ± 0.003	1.2 ± 0.011	0.89 ± 0.011	1.07 ± 0.003				1.5 ± 0.02			
0.2	1.92 ± 0.007	1.92 ± 0.016	2.4 ± 0.036	2.31 ± 0.054	2.33 ± 0.009	1.74 ± 0.001	1.79 ± 0.004	1.02 ± 0.014	1.92 ± 0.007				1.93 ± 0.01			
0.3	1.99 ± 0.003	1.98 ± 0.078	1.67 ± 0.013	2.04 ± 0.054	2.02 ± 0.026	2.09 ± 0.001	1.63 ± 0.006	0.8 ± 0.006	1.99 ± 0.003				1.78 ± 0.01			
0.4	2.08 ± 0.008	2.01 ± 0.08	2.48 ± 0.01	1.9 ± 0.026	2.29 ± 0.003	1.65 ± 0.003	1.39 ± 0.002	0.83 ± 0.004	2.08 ± 0.008				1.83 ± 0.01			
0.5	1.82 ± 0.003	2.56 ± 0.011	2.2 ± 0.052	1.93 ± 0.068	1.44 ± 0.006	1.96 ± 0.007	1.45 ± 0.004	0.97 ± 0.009	1.82 ± 0.003				1.84 ± 0.01			
0.6	2.06 ± 0.011	2.25 ± 0.025	1.89 ± 0.042	2.17 ± 0.041	1.9 ± 0.006	2.01 ± 0.068	1.91 ± 0.004	1.08 ± 0.003	2.06 ± 0.011				1.8 ± 0.01			
平均 B average B	2.00 ± 0.04	2.34 ± 0.07	2.50 ± 0.05^c	2.10 ± 0.06	2.11 ± 0.03	1.79 ± 0.05	1.74 ± 0.01	1.18 ± 0.01	2.00 ± 0.04				-			
平均 C average C	2.28 ± 0.05^d		2.00 ± 0.05			1.48 ± 0.01						-				

注:A 为相同 MOI 组的平均每日病毒产量; B 为相同细胞状态和相同血清浓度组的平均每日病毒产量; C 为相同细胞状态组的平均每日病毒产量; a 为所有实验组中每日最高病毒产量; b 为 A 列即相同 MOI 组的每日最高病毒产量; c 为 B 行即相同细胞状态和相同血清浓度组的每日最高病毒产量; d 为 C 行即相同细胞状态组的每日最高病毒产量

Notes: A represents average viral yield per day of groups with the same MOI; B represents average viral yield per day of groups with the same cell state and serum concentration; C represents average viral yield per day of groups with the same cell state; a represents the highest viral yield per day of all experimental groups; b represents the highest viral yield per day of groups with the same cell number and serum concentration (column A); c represents the highest viral yield per day of groups with the same cell state and serum concentration (line B); d represents the highest viral yield per day of groups with the same cell state (line C)

3 讨论

测定病毒滴度的方法有多种,如 CPE 法、荧光定量 PCR 法、空斑法、OD₂₆₀法等,其中尤以前 2 种较为常用。荧光定量 PCR 法通过测定病毒基因组拷贝数,较精确地反映细胞培养液中病毒的数量^[13],较 CPE 法更为快速、简便、准确。付小哲等^[11]建立荧光定量 PCR 法对 ISKNV 进行定量检测,并通过反复实验证明该方法重复性好、稳定、可靠,与 CPE 方法检测的病毒滴度具有较好的相关性。本实验利用荧光定量 PCR 法,对同步接毒条件下,从血清浓度、CPB 的生长状态及细胞量、接毒量等方面对 ISKNV 的体外最适增殖条件进行了研究。

相对于异步接毒法,同步接毒法可以减少工作量,提高工作效率,降低污染几率,节省成本。唐满华等^[14]对猪(*Sus domesticus*)细小病毒的研究中发现同步接毒收获病毒液的病毒含量高于单层接毒收获的病毒;赵守友等^[15]在鸡痘鹌鹑化弱毒细胞苗的生产中发现同步接毒法的致病变速度基本相同,收获的病毒含量不高于异步法,并且整个生产过程缩短 24 h。也有研究发现分步接毒的病毒含量高于同步接毒,增殖周期也缩短^[16]。本研究对象 ISKNV 的常规接种一般选用异步接毒法,即 CPB 细胞经传代后 28 °C 恒温培养 1~2 d,待长满单层后接种 ISKNV,28 °C 吸附 1~2 h 后倒掉病毒液,加入含 2% 胎牛血清的 L-15 培养液,28 °C 恒温培养 6~7 d 后收获病毒,所得病毒拷贝数约为 8.89×10^7 拷贝/mL^[10-11]。而本研究所选用的同步接毒法所得病毒量中显示 88% 的数据(表 1)均高于此值,其中以 MOI 为 0.2 同步接种培养 48 h 处于对数生长中期的 CPB 细胞,培养液中胎牛血清终浓度为 6% 时,28 °C 恒温培养 9 d 后收获,所得病毒拷贝数最多,为 2.54×10^8 拷贝/mL,约为异步接毒法的 2.85 倍。袁建琴等^[17]认为同步接毒法病毒含量高可能是由于细胞在分裂增殖的同时病毒感染,病毒不必再通过细胞间传递而侵染到全体细胞,数量增多。此外,ISKNV 在 CPB 细胞中病变相对较慢,留给细胞一定的生长时间,在细胞传代的同时进行接种更适合该病毒的增殖。

细胞培养时间和生长状态是影响病毒增殖的重要因素,当细胞分裂生长旺盛、细胞状态良好

时,病毒增殖越快、CPE 越明显,TCID₅₀ 越高^[18]。细胞增殖可分为延迟期、对数期、稳定期和衰亡期 4 个时期,对数生长期的细胞增殖旺盛、代谢强、活力佳,适用于实验研究。以往文献对病毒的接种仅见选取对数生长期的细胞^[19-20],本实验根据 CPB 的生长特性,绘制出细胞生长曲线,分别选取处于对数生长早、中、晚 3 个时期的细胞接种 ISKNV,结果发现其他条件均相同的情况下,从培养基成本考虑,处于对数生长中期的细胞更适宜该病毒的增殖,这可能是由于培养 24 h 的细胞处于对数生长早期,细胞量仍较少,不能满足病毒增殖的需要;而培养 72 h 的细胞处于对数生长晚期,即将进入稳定期,由于营养物质等的耗尽,细胞活力下降;处于对数生长中期的细胞无论在数量还是生长状态方面都更为适合 ISKNV 的增殖。但若从时间成本考虑,处于对数生长早期的细胞由于培养时间的缩短,有利于时间成本的降低。

血清对病毒增殖具有一定的抑制作用^[21-22],血清浓度高不仅增加成本,还会抑制和干扰病毒在宿主细胞内的增殖;血清浓度低时,由于宿主细胞的繁殖速度变慢,也会使病毒的增殖数量减少,降低毒液效价^[23]。为筛选出适宜 ISKNV 增殖的最适血清浓度,实验设置了 6%、8% 和 10% 3 个浓度梯度,结果发现,当细胞达到一定浓度时,培养液中胎牛血清的终浓度为 6% 时即可满足 ISKNV 的增殖并具有较高的病毒滴度,同时有利于培养基成本的降低;但从时间成本考虑,由于选择对数生长早期的细胞来接毒,此时细胞数量相对较少,对营养要求较高,需要添加 10% 的血清才能满足其生长需求。

适宜的病毒接种量是病毒体外增殖的关键要素。接种量过小,病毒在一定时间内于宿主细胞中增殖量少;接种量过大,会导致宿主细胞迅速裂解,病毒增殖时间变短,均不利于病毒增殖^[24]。本研究设置 0.1~0.6、1~6 以及 10~60 共 18 个不同梯度的 MOI 值同步感染 CPB 细胞,结果发现 MOI 为 0.2 进行接种时所得病毒量最高,但收毒时间为 9 d,无疑增加了时间成本,若单纯考虑病毒的滴度,该条件最为适宜 ISKNV 的增殖,换算成每元人民币所得病毒产量也最高,为 4.24×10^8 拷贝/元,即培养基成本最低;当 MOI 为 4,进行接种时缩短了病毒的增殖时间,所需时间成本最低,每日可得病毒产量为 3.64×10^8 拷贝。

综上所述,培养基的血清含量、宿主细胞浓度及接毒量对病毒的增殖均有一定的影响,并且三者之间相互制约,只有处于合适的配比,才能获得较高的病毒产量。本实验利用 CPB 细胞对 ISKNV 最适体外增殖条件的研究,为利用细胞大规模培养、增殖病毒,制备病毒疫苗创造了条件,可根据不同需要选择最适合的接毒方法,即在时间充裕的情况下选择用最低的培养基成本生产出最高的病毒拷贝数,当时间比较紧张时选择在最短的时间内生产出最高的病毒拷贝数。本研究为低成本疫苗的生产提供了理论依据,对于养殖鳜脾肾坏死病毒病的防治、提高鳜养殖业的经济效益等都将具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Wu S Q, Li X H, Pan H J, *et al.* Research on the pathogen of the outbreak infective disease of *Siniperca chuatsi* [J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21 (S1): 56 - 60. [吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳜暴发性传染病病原研究. 水产学报, 1997, 21 (S1): 56 - 60.]
- [2] He J G, Wong S P, Huang Z J, *et al.* Identification of outbreak and infectious diseases pathogen of *Siniperca chuatsi* [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni: Natural Science, 1998, 37 (5): 74 - 77. [何建国, 翁少萍, 黄志坚, 等. 鳜暴发性流行病病毒性病原研究. 中山大学学报: 自然科学版, 1998, 37 (5): 74 - 77.]
- [3] Deng M, He J G, Zuo T, *et al.* Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) from *Siniperca chuatsi*: development of a PCR detection method and the new evidence of iridovirus [J]. Chinese Journal of Virology, 2000, 16 (4): 365 - 369. [邓敏, 何建国, 左涛, 等. 鳜鱼传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV) PCR 检测方法的建立及虹彩病毒新证据. 病毒学报, 2000, 16 (4): 365 - 369.]
- [4] Kurita J, Nakajima K. Megalocytiviruses [J]. Viruses, 2012, 4 (4): 521 - 538.
- [5] Dong C, Xiong X, Luo Y, *et al.* Efficacy of a formalin-killed cell vaccine against infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) and immunoproteomic analysis of its major immunogenic proteins [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162 (2 - 4): 419 - 428.
- [6] Caipang C M, Hirono I, Aoki T. Immunogenicity, retention and protective effects of the protein derivatives of formalin-inactivated red seabream iridovirus (RSIV) vaccine in red seabream, *Pagrus major* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2006, 20 (4): 597 - 609.
- [7] Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, *et al.* Virus taxonomy: VIIIth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. New York: Academic Press, . 2005: 145 - 162.
- [8] Wang Y Q, Lü L, Weng S P, *et al.* Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus [J]. Archives of Virology, 2007, 152 (4): 763 - 773.
- [9] Wu S Q, Wang Y J, Pan H J *et al.* The new technology of prevention and curation against Chinese perch disease (I) [J]. Scientific Fish Farming, 2007, (8): 12 - 13. [吴淑勤, 王亚军, 潘厚军, 等. 鳜鱼病害防治新技术 (一). 科学养鱼, 2007, (8): 12 - 13.]
- [10] Fu X, Li N, Lai Y, *et al.* A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization [J]. Journal of Fish Biology, 2015, 86 (1): 32 - 45.
- [11] Fu X Z, Li N Q, Lin Q, *et al.* qPCR method for virus titer testing of infectious spleen and kidney necrosis virus [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38 (9): 1573 - 1578. [付小哲, 李宁求, 林强, 等. 基于荧光定量 PCR 的鳜传染性脾肾坏死病毒滴度检测方法. 水产学报, 2014, 38 (9): 1573 - 1578.]
- [12] Yu K, Wei Z D, Pang X, *et al.* Comparison of producing the live attenuated rotavirus vaccine with the primary and subcultured calf kidney cells [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2007, 35 (4): 1 - 5. [鱼轲, 魏至栋, 庞兴, 等. 不同代次牛肾原代细胞培养轮状病毒的比较研究. 微生物学免疫学进展, 2007, 35 (4): 1 - 5.]
- [13] Atkinson E M, Debelak D J, Hart L A, *et al.* A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors [J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26 (11): 2821 - 2823.
- [14] Tang M H, Chen R A, He L, *et al.* Optimization of ST cell culturing condition for the cultivation of porcine parvovirus M2 strain [J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, (10): 55 - 60. [唐满华, 陈瑞爱, 何玲, 等. 猪细小病毒 M2 株在 ST 细胞中培养条件优化. 现代畜牧兽医, 2013, (10): 55 - 60.]

- [15] Zhao S Y, Zhang W L, Niu Y H. Comparison between synchronous and asynchronous inoculation in the production of fowl pox cell vaccine [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2000, 34(2): 36 - 37. [赵守友, 张万林, 牛玉华. 同步与异步接毒法在鸡痘鹌鹑化弱毒细胞苗生产中的比较. 中国兽药杂志, 2000, 34(2): 36 - 37.]
- [16] Wu Y F, Zhu L, Xu Z W, et al. Proliferation characteristics of a PK-15 cell-adapted strain of porcine parvovirus [J]. Chinese Journal of Virology, 2013, 29(4): 357 - 363. [吴云飞, 朱玲, 徐志文, 等. 猪细小病毒 PK-15 细胞适应株的培育及增殖特性. 病毒学报, 2013, 29(4): 357 - 363.]
- [17] Yuan J Q, Gao B Z. Cell cultures of fowl POX vaccine and measurement of virus amount inside the cells [J]. Journal of Shanxi Agricultural University: Natural Science Edition, 2007, 27(3): 308 - 311. [袁建琴, 高斌战. 不同接毒方法培养鸡痘细胞苗维持液与细胞内病毒含量的测定. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2007, 27(3): 308 - 311.]
- [18] Zhu S H, Zhang S Z, Shan H, et al. Comparison of effects of porcine parvovirus strain X proliferated on different cells [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2012, 43(6): 6 - 10. [朱绍辉, 张述智, 单虎, 等. 猪细小病毒 X 株在不同细胞上增殖效果比较. 东北农业大学学报, 2012, 43(6): 6 - 10.]
- [19] Fan T J, Wang L Y, Geng X F, et al. Studies of the propagation of turbot reddish body iridovirus *in vitro* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2006, 36(5): 767 - 774. [樊廷俊, 王丽燕, 耿晓芬, 等. 大菱鲆红体病虹彩病毒体外增殖条件的研究. 中国海洋大学学报, 2006, 36(5): 767 - 774.]
- [20] Madan N, Nambi K S, Abdul M S, et al. *In vitro* propagation of hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) of shrimp in C6/36 (*Aedes albopictus*) cell line [J]. Journal of Invertebrate Athology, 2013, 112(3): 229 - 235.
- [21] Zhang Z G, Liu Q L, Wang H B, et al. Study on influenza virus cultivation in Vero cell [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2004, 32(3): 5 - 8. [张卓光, 刘启良, 王洪彬, 等. Vero 细胞培养流行性感冒病毒的研究. 微生物学免疫学进展, 2004, 32(3): 5 - 8.]
- [22] Li X, Fukuda H. *In vitro* culture of goldfish cell sensitive to goldfish herpes virus [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2003, 12(1): 12 - 18. [李霞, 福田颖穗. 金鱼疱疹病毒敏感细胞的体外培养. 上海水产大学学报, 2003, 12(1): 12 - 18.]
- [23] Fan W P, Li J Y, Wang H X, et al. Influence of culture medium with different concentration of serum for HIV production [J]. Military Medical Sciences, 2000, 24(1): 69 - 70. [樊卫平, 李敬云, 王红霞, 等. 不同血清浓度培养基对 HIV 产量的影响. 军事医学科学院院刊, 2000, 24(1): 69 - 70.]
- [24] Siegl G, de Chastonay J, Kronauer G. Propagation and assay of hepatitis a virus *in vitro* [J]. Journal Virol Methods, 1984, 9(1): 53 - 67.

Study on optimal proliferation conditions of infectious spleen and kidney necrosis virus of *Siniperca chuatsi* in CPB cells with synchronous inoculation

LUO Xia¹, FU Xiaozhe^{1,2}, LI Ningqiu^{1,2*}, LIN Qiang^{1,2}, ZHANG You¹, HUANG Zhibin¹

(1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture,

Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Pearl River Fishery Research Institute,

Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China)

Abstract: The optimal proliferation conditions of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in CPB cells with synchronous inoculation method were confirmed through detecting the viral copy numbers. The virus which proliferated with different FBS concentration, amount of inoculated virus, cell state, and viral harvest time was harvested and then DNA was extracted for qPCR detection. Results showed that all of the above factors had obvious influence on the ISKNV proliferation in vitro. It would obtain the highest amount of virus (2.54×10^8 copies/mL) under the conditions that the MOI was 0.2, the virus was inoculated to the CPB cells cultured for 48 h at the middle-log phase and cultured with L-15 medium containing 6% fetal bovine serum and harvested after culturing at 28 °C for 9 days. The average cost of viral yield per yuan and per day was further analyzed. The results indicated that if the culture medium cost was only considered, it would obtain the highest viral yield (4.24×10^{11} copies) per yuan as the above method; however, if it was as far as possible to shorten the time of cell culture and virus culture for saving time cost, it would obtain the highest viral yield per day (3.64×10^7 copies) under the conditions that the MOI was 4, virus was inoculated to the CPB cells cultured for 24 h at the early-log phase and cultured with L-15 medium containing 10% fetal bovine serum and harvested after culturing at 28 °C for 4 days. In conclusion, this paper will provide the theoretical basis for ISKNV vaccine production with low cost through the comprehensive viral yield analysis of the medium cost and culture time cost.

Key words: *Siniperca chuatsi*; infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV); CPB cells; synchronous inoculation; qPCR; proliferation condition

Corresponding author: LI Ningqiu. E-mail: liningq@126.com

Funding projects: Special Project on the Integration of Industry; Education and Research of Guangdong Province (2012B091100164); National Key Technology R&D Program (2012BAD25B02) as well as National Natural Science Fund (No. 31202032)