

## 重组表达猪圆环病毒 2 型衣壳蛋白的抗原特性分析

商绍彬<sup>1</sup> 周继勇<sup>1\*</sup> 吴建祥<sup>1</sup> 陈庆新<sup>1,2</sup> 龚 辉<sup>1</sup>

(浙江大学<sup>1</sup>动物预防医学研究所<sup>2</sup>生命科学学院 杭州 310029)

**摘 要** 将猪圆环病毒 2 型(PCV2) 核定位信号衣壳蛋白(Nuclear localization signal-defected capsid protein, dCap) 与谷胱甘肽-S-转移酶(GST) 融合, 在大肠杆菌中表达, 经纯化和凝血酶酶切分别获得纯化的 GST-dCap 融合蛋白和 dCap 蛋白, Western blot 结果表明二者都能与猪抗 PCV2 血清发生特异性反应。dCap 蛋白免疫小鼠制备的单克隆抗体, 不仅能特异地与 GST-dCap 融合蛋白、dCap 蛋白和纯化的 PCV2 粒子发生反应, 而且能特异地与 PK-15 细胞内的 PCV2 病毒颗粒发生反应, 其中抗 dCap 蛋白的单克隆抗体 4C4、3F6 和 2G7 具有阻止病毒感染细胞的能力。表明原核表达的 dCap 蛋白完全或部分正确模拟了 PCV2 天然衣壳蛋白的构象, PCV2 衣壳蛋白存在阻止 PCV2 病毒感染细胞的功能性表位。同时重组 PCV2 dCap 蛋白的获得为进一步研究 Cap 蛋白晶体结构和将重组的 dCap 蛋白作为抗原建立血清学诊断试剂及疫苗研究提供了基础。

**关键词** 猪圆环病毒 2 型, 去核定位信号衣壳蛋白, 单克隆抗体, 抗原表位

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2005)03-0377-05

断奶猪多系统衰竭综合征(Post-weaning multi-systemic wasting syndrome, PMWS) 是近年来新出现的一种猪病, 1997 年 Clark<sup>[1]</sup> 首先报道, 随后在北美、欧洲、亚洲许多国家相继报道, 患猪表现为生长缓慢、呼吸急促、消瘦、贫血、出现黄疸现象, 死亡率可达 50% 左右, 后经证实猪圆环病毒 2 型(PCV2) 是该病的主要病原<sup>[2]</sup>。在我国, PCV2 抗体已在 PMWS 发病猪群和健康猪群广泛存在<sup>[3-5]</sup>, 这对我国的养猪业带来了潜在的巨大威胁。

猪圆环病毒有两种基因型, 即 PCV1 和 PCV2。PCV1 由 Tischer 于 1974 在 PK15 细胞中发现, 不具有致病性, 但在正常猪血清中广泛存在<sup>[6,7]</sup>; PCV2 具有致病性, 常和 PRRS、PPV、PNDS 等混合感染, 引起猪免疫失败<sup>[8]</sup>。PCV1 基因全长为 1759bp, PCV2 基因全长为 1767 或 1768bp, 二者基因组结构相似, 包含两个主要的阅读框: ORF1 和 ORF2<sup>[5,9]</sup>。ORF1 编码病毒复制相关蛋白(Rep 蛋白), 是引起 PCV1 和 PCV2 抗原交叉反应的主要原因<sup>[10]</sup>; ORF2 编码病毒衣壳蛋白(Cap 蛋白), 与宿主免疫有关, 在两型 PCV 之间, 不存在抗原交叉反应。因此 Cap 蛋白可作为 PCV 试验猪及自然感染猪血清学检测的标志<sup>[11]</sup>。

PCV2 ORF2 基因编码一 30kD 的衣壳蛋白(Cap)<sup>[12]</sup>, 其 N 端包含一个由 41 个氨基酸残基组成

的核定位信号(Nuclear localization signal, NLS), 起核定位作用<sup>[13]</sup>。Mahe<sup>[10]</sup> 和 Liu 等<sup>[14]</sup> 分别在 sf9 真核细胞及大肠杆菌中进行了 PCV2 Cap 蛋白的表达, 但 Cap 蛋白的表达量较低。Allan 和 McNeilly 等<sup>[15,16]</sup> 分别利用全病毒制备了针对 PCV1 和 PCV2 的单克隆抗体。然而, 到目前为止, 尚无文献报道针对 PCV2 和 PCV1 病毒 Cap 蛋白的单克隆抗体。为了提高 Cap 蛋白的体外表达水平, 本试验研究了去除核定位信号的 PCV2 衣壳蛋白(dCap) 与谷胱甘肽-S-转移酶(GST) 融合后的表达与纯化, 在此基础上制备和鉴定了针对 PCV2 Cap 蛋白的单克隆抗体, 研究结果为进一步研究 PCV2 Cap 蛋白的三维晶体结构、PCV2 的感染机制和建立特异敏感的 PCV2 的检测方法奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

PCV2 分离株 HZ0201、PCV1 分离株 ATCC、PCV2 阳性血清、PCV2 阴性血清和无 PCV 污染的 PK-15 细胞由本室保存。4 周龄 SPF BALB/c 小鼠购自上海实验动物中心。

原核表达载体 pGEX-4T-1, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JBL21 由本室保存, 限制性内切酶、T4 DNA 连接

基金项目 浙江省重大科技攻关项目(2003C12012)

\* 通讯作者。Tel: 86-571-86971698 Fax: 86-571-86971821; E-mail: jyzhou@zju.edu.cn

作者简介 商绍彬(1978-) 男, 四川泸县人, 博士研究生, 主要从事分子病毒学研究。

收稿日期 2004-11-03, 修回日期 2005-03-08

酶为 TaKaRa 公司产品 ;*Taq* plus DNA 聚合酶为上海中科开瑞生物芯片科技有限公司产品 ;免源 GST 多抗和 HRP 标记羊抗兔 IgG 购自上海申能博彩生物有限公司 ;HRP 标记羊抗猪 IgG 和羊抗鼠 IgG、FITC 标记羊抗猪 IgG 均购自 KPL 公司 ;MEM 培养基购自 Gibco 公司 ;GSTrap FF 亲和纯化试剂盒购自 Amersham 公司 ;免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒购自 Southern Biotech 公司。

## 1.2 pGEX-PCV2-dCap 载体的构建

根据 PCV2 分离株 HZ0201 ( GenBank No. AY188355 )全基因序列<sup>[5]</sup> ,设计一对特异性引物。上游引物为 :5'-GC<sup>CGATCC</sup>AATGGCATCTTCAACAC-3' ;下游引物为 :5'-CCG<sup>CTCGAGT</sup>TAAAGGGTTAAGTGGG-3' 分别含 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点 ,以 PCV2 HZ0201 株病毒 DNA 为模板 ,扩增一段 579bp 的去核定位信号衣壳蛋白基因( *dCap* ) ,反应条件 :95℃ 5min 95℃ 30s 61℃ 30s 72℃ 45s ,进行 30 个循环 ;72℃ 10min。将扩增产物经双酶切纯化回收 ,插入原核表达载体 pGEX-4T-1 谷胱甘肽-S-转移酶( GST )基因下游 ,构建重组质粒 pGEX-PCV2-dCap ,转化大肠杆菌 BL21 ,作双酶切和测序鉴定。

## 1.3 rGST-dCap 融合蛋白的表达与鉴定

挑取含 pGEX-PCV2-dCap 质粒的重组菌单克隆扩繁 ,根据不同的 IPTG 浓度、诱导时间和诱导温度进行诱导表达 ,以筛选和优化诱导表达条件。同时设立含 pGEX-4T-1 空载体的表达菌为对照。诱导后每隔 1h 取样 ,作 SDS-PAGE 分析 ;用 GST 多抗和 PCV2 阳性血清作 Western Blot 鉴定 ,具体步骤按文献[17]的方法进行。

## 1.4 rGST-dCap 融合蛋白与重组 dCap 蛋白的纯化

根据优化的表达条件 ,作大量表达 ,收获菌体 ,超声波裂解。加入终浓度为 1% 的 Triton X-100 ,振荡混匀 30min ,4℃、12000r/min 离心 10min。按 GSTrap FF 亲和层析柱纯化试剂盒说明纯化 rGST-dCap 融合蛋白 ,收集样品。并用凝血酶( Thrombin )酶解 rGST-dCap 融合蛋白 ,纯化重组的 *dCap* 蛋白。分别取样进行 SDS-PAGE 分析 ,并用 Bradford 法测蛋白含量 ,计算表达量。

## 1.5 重组 dCap 蛋白单克隆抗体的制备

将 GST-dCap 融合蛋白免疫小鼠 ,其方法和程序按文献[18]进行。脾细胞与非分泌型骨髓瘤细胞 SP2/O 融合按文献[19]进行。获得的杂交瘤细胞于 RPMI 1640 培养基中维持培养 ,取培养上清用间接

ELISA( 以 GST-dCap 融合蛋白为抗原 )方法检测特异性的抗 rGST-dCap 融合蛋白的抗体。采用有限稀释法克隆能分泌抗 rGST-dCap 融合蛋白抗体的杂交瘤细胞 ,进而再分别以重组的 *dCap* 蛋白、重组的 PCV1 衣壳蛋白、纯化的 PCV2 和 PCV1 全病毒、含 pGEX-4T-1 空质粒的大肠杆菌裂解产物、PK15 细胞以及 RPMI 1640 培养基作为抗原作间接 ELISA 筛选能特异性分泌抗 PCV2 *dCap* 蛋白抗体的杂交瘤细胞。获得的杂交瘤细胞经扩繁 ,悬浮于无血清生长液 ,腹腔注射经降植烷致敏的小鼠 ,1 周后取腹水 ,获得抗重组 *dCap* 蛋白的单克隆抗体。

## 1.6 单克隆抗体的鉴定

以重组 *dCap* 蛋白为抗原 ,测定各株单克隆抗体的 ELISA 效价。用 Southern Biotech 公司的免疫球蛋白标准亚类试剂盒进行单克隆抗体亚型鉴定。Western blot 鉴定各株单克隆抗体与 GST-dCap 融合蛋白和纯化的 PCV2 病毒的反应性。

## 1.7 单克隆抗体的中和活性测定

参考文献[11]的方法 ,测得 PCV2 HZ0201 株的组织半数感染量( TCID<sub>50</sub>/mL )为  $1.0 \times 10^{5.75}$ /mL。采用微量固定病毒稀释单克隆抗体法测定制备的重组 *dCap* 单克隆抗体的病毒中和活性 ,方法同文献[20] ,将灭能的各株单克隆抗体作 10 倍梯度稀释 ,与等量的 50 个 TCID<sub>50</sub> 的 PCV2 HZ0201 混匀 ,37℃ 孵育 4h ,再将病毒单克隆抗体混合物与悬浮的 PK15 细胞(  $1.2 \times 10^6$  个/mL )按 1:5 混匀 ,加入到 96 孔细胞培养板 ,每个梯度 8 个重复 ,同时设立 PCV2 感染细胞为阳性对照 ,37℃ 培养 48h ,用 300mmol/L D-氨基葡萄糖处理 30min ,再培养 72h 后丙酮固定 ,作 IFA 检测各株单克隆抗体是否具有中和 PCV2 病毒的能力。

# 2 结果

## 2.1 pGEX-PCV2-dCap 原核表达载体的构建

PCR 扩增反应获得了 579bp( PCV2 基因组 1612

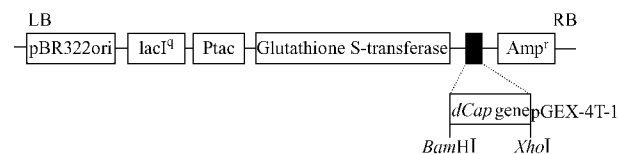


图1 pGEX-PCV2-dCap 重组质粒构建策略图

Fig.1 Schematic structure of the recombinant plasmids pGEX-PCV2-dCap  
The NLS-defected *Cap* gene sequence of 1612 to 1034nt of PCV2 was cloned into the *Bam*H I and *Xho* I site of pGEX-4T-1 vector.

至 1034 核苷酸位 ) 的去核定位信号的 *Cap* 蛋白基因片段 ,进而克隆到了原核表达载体 pGEX-4T-1 谷胱甘肽-*S*-转移酶基因下游 ,成功构建 pGEX-PCV2-*dCap* 重组质粒。测序结果表明 ,pGEX-PCV2-*dCap* 重组载体所插入的基因片段与 PCV2 HZ0201 株基因组中的 *Cap* 基因相应序列完全一致 (图 1)。

2.2 重组 dCap 蛋白的表达、纯化和鉴定

经优化实验 ,确定最佳诱导表达条件为终浓度 0.1mmol/L 的 IPTG 在 37℃ 诱导培养 5h。经过 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定 ,可见 pGEX-PCV2-*dCap* 重组质粒表达的 48kD 的 GST 融合蛋白和空质粒 pGEX-4T-1 表达的 29kD 的 GST 蛋白(图 2) ,与预期的大小相符 ;用 TotalLab 图像分析软件 ( <http://www.nonlinear.com> )分析表明 ,目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 14%。

纯化获得的 GST-*dCap* 融合蛋白 ,采用 Bradford 法定量表明 ,所得 GST-*dCap* 融合蛋白的表达量为 6.14mg/L 菌液 ,但存在少量降解。进一步用凝血酶切割 GST-*dCap* 融合蛋白后 ,获得与预期大小一致的分子量为 22kD 的纯化 *dCap* 蛋白(图 2-A)。

Western blot 鉴定表明 ,表达或纯化的重组 GST-*dCap* 融合蛋白以及重组 *dCap* 蛋白均能特异地被 PCV2 阳性血清识别。而作为对照的宿主菌、空载体和未经诱导的重组菌裂解产物均不与猪 PCV2 阳性血清反应。表明所获得的重组 GST-*dCap* 融合蛋白及 *dCap* 蛋白具有 PCV2 天然 *Cap* 蛋白的相似的结构(图 2-B)。

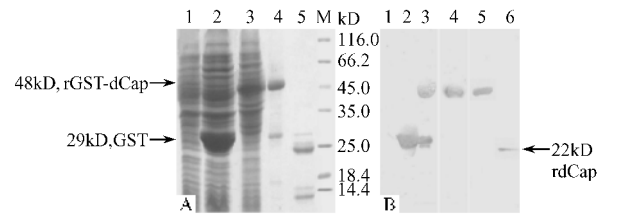


图2 重组 GST-*dCap* 融合蛋白表达、纯化、酶切产物 SDS-PAGE 分析 (A) 和 Western blot 鉴定 (B)

Fig.2 Analysis of expression , purification and cleavage of rGST-*dCap* protein

A SDS-PAGE. 1. *E. coli* BL21 ; 2. Bacterial lysates of pGEX-4T-1 induced with IPTG for 4h ; 3. Bacterial lysates of pGEX-PCV2-*dCap* induced with IPTG for 4h ; 4. Purified rGST-*dCap* protein ; 5. Purified rdCap protein ; M. Protein marker. B : Western blot. 1 ~ 3. *E. coli* BL21 , GST and rGST-*dCap* protein were recognised with anti-GST polyclonal antibody , respectively ; 4 ~ 6. rGST-*dCap* protein , purified rGST-*dCap* protein and purified rdCap protein were recognised with anti-PCV2 serum , respectively .

2.3 重组 dCap 单克隆抗体的制备和鉴定

经间接 ELISA 方法筛选 ,获得 5 株针对 PCV2 重组 *dCap* 蛋白的杂交瘤细胞系 ,即 1C7、2E5、2G7、3F6、4C4 ,其细胞分泌上清与 PCV2 *dCap* 重组蛋白有强烈的结合能力 ,而与 GST 蛋白、宿主菌 BL21 裂解产物、重组 PCV1 *Cap* 蛋白无任何反应性。对应的 5 株细胞株均能稳定分泌抗重组 *dCap* 蛋白的单克隆抗体 ,其 ELISA 效价分别为  $2.048 \times 10^6$ 、 $1.28 \times 10^5$ 、 $1.024 \times 10^6$ 、 $1.28 \times 10^5$ 、 $2.048 \times 10^6$ 。IgG 亚型鉴定表明 5 株单克隆抗体均属 IgG1 亚型 ,其轻链均为  $\kappa$  链。

Western blot 鉴定表明 ,获得的 5 株单克隆抗体 1:10000 倍稀释后均能特异性地识别 48kD 的重组 GST-*dCap* 融合蛋白和纯化的 PCV2 病毒 ,而不与重组 PCV1 *Cap* 蛋白、纯化的 PCV1 病毒、PK15 细胞裂解物及细胞培养上清等对照样品反应(图 3)。

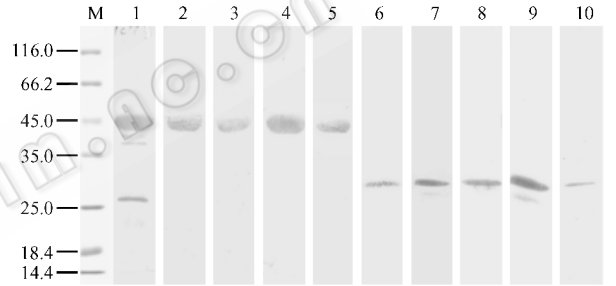


图3 重组 dCap 蛋白单克隆抗体与 GST-*dCap* 融合蛋白、纯化的 PCV2 病毒的免疫反应性

Fig.3 Immunoreactivity of mAbs to rdCap with rGST-*dCap* protein and purified PCV2 particles in Western blot

M. Protein marker ; 1 ~ 5. mAb 1C7 , 2E5 , 2G7 , 3F6 and 4C4 with the purified rGST-*dCap* protein ; 6 ~ 10. mAb 1C7 , 2E5 , 2G7 , 3F6 and 4C4 with the purified PCV2 particles .

2.4 单克隆抗体的中和活性测定

中和活性测定表明 ,针对 PCV2 rdCap 蛋白的单克隆抗体 1C7、2E5 不具有阻断 PCV2 病毒感染细胞的能力 ,2G7 具有较弱的中和能力 ,而单克隆抗体 4C4 和 3F6 具有较强的阻断 PCV2 病毒感染细胞的能力 ,其中和效价为  $10^{-5.33}$  和  $10^{-3.74}$ 。而针对 PCV2

表 1 PCV2 dCap 蛋白的单克隆抗体中和活性			
Table 1 Neutralizing activity( NA ) of Mabs to PCV2 rdCap			
Mabs	IFA titer	Neutralizing ability with PCV2	Neutralizing ability with PCV1
1C7	$10^{-5}$	0	0
4C4	$10^{-5}$	$10^{-5.33}$	0
2E5	$10^{-4}$	0	0
3F6	$10^{-5}$	$10^{-3.74}$	0
2G7	$10^{-4}$	$10^{-2.25}$	0

rdCap 蛋白的单克隆抗体均不能阻断 PCV1 病毒感染细胞的能力。

### 3 讨论

本试验成功地在原核表达载体 pGEX-4T-1 中表达了 PCV2 衣壳定位信号的衣壳蛋白基因(dCap), 进而纯化获得了 48kD 的重组 GST-dCap 融合蛋白, 其表达量可达 6.14mg/L 菌液, 高于 Liu 等<sup>[14]</sup>所表达的 72kD 的 MBP-His8-ORF2 融合蛋白(1mg/L 菌液)。重组 GST-dCap 融合蛋白进一步经凝血酶酶切后, 获得了分子量为 22kD 的纯化的 dCap 蛋白。结果表明我们所构建的 GST-dCap 融合表达系统优于 Liu 等用 pMAL-c2X 载体构建的 MBP-His8-ORF2 融合表达系统。

在表达试验中, 我们曾在 pBAD/His B 载体上构建了含 NLS 和不含 NLS 的 PCV2 ORF2 基因的重组表达载体, 但是, 即便优化了各种表达条件, 目的蛋白均未获得表达。后又在 pGEX-4T-3 载体上构建了相应的重组表达载体, 但目的蛋白仍未获得表达。表明 pBAD/HisB 和 pGEX-4T-3 原核表达载体不能够表达含或不含 NLS 的 PCV2 Cap 蛋白。基于此, 我们又在 pGEX-4T-1 上构建了含或不含 NLS 的 PCV2 ORF2 基因重组表达载体。最终, 我们在 pGEX-4T-1 载体上成功表达了不含 NLS 的 PCV2 ORF2 基因, 获得了 GST-dCap 融合蛋白, 而完整的 PCV2 衣壳蛋白仍然没有获得表达。这表明 ORF2 基因 5'端的核定位信号序列影响完整衣壳蛋白的表达。序列分析表明, 在 ORF2 基因核定位信号序列的 41 个密码子中含有 11 个大肠杆菌稀有密码子, 并伴有编码组氨酸的“AGGAGG”和“AGAAGAAGA”的稀有密码子串联体。文献表明, 外源基因的前 25 个密码子中的稀有密码子不利于外源基因在大肠杆菌的表达<sup>[21-22]</sup>, 说明 ORF2 基因 5'端的核定位信号序列是影响该基因在原核表达系统表达的主要原因, 故将去核定位信号的 PCV2 Cap 基因与 GST 融合表达不啻为一个成功的策略。重组表达的 GST-dCap 蛋白和 dCap 蛋白均能特异性地被 PCV2 多抗血清识别, 说明原核表达的 dCap 蛋白具有 PCV2 天然 Cap 蛋白相似的构象。据文献报道, PCV2 Cap 蛋白的抗原表位主要位于 65~87, 113~147, 157~183 和 193~207 位氨基酸残基<sup>[10]</sup>, 这也说明 NLS 的切除并不影响 dCap 蛋白的抗原性。

本试验利用重组表达的 GST-dCap 蛋白作为抗原成功制备了抗 PCV2 Cap 蛋白的单克隆抗体。

Western blot 结果表明, 重组 dCap 蛋白单克隆抗体能特异性识别 dCap 蛋白和纯化的 PCV2 病毒, 说明制备的单克隆抗体具有抗原反应性和拥有针对 PCV2 病毒天然 Cap 蛋白的结合表位。进一步的中和试验表明, 单克隆抗体 4C4、3F6 和 2G7 具有阻断 PCV2 病毒粒子感染 PK15 易感细胞的能力, 说明单克隆抗体 4C4、3F6 和 2G7 拥有 PCV2 Cap 蛋白的功能性中和表位, 表明 PCV2 Cap 蛋白在病毒感染细胞过程中发挥了关键作用。尽管 McNeilly 等<sup>[16]</sup>首次制备并筛选了 14 株针对 PCV2 的单克隆抗体, 但只获得 1 株(F190)具有中和性的单抗, 并且哪些单抗是针对 PCV2 Cap 蛋白的并不很清楚。本研究结果则进一步明确了 PCV2 的 Cap 蛋白上存在有 PCV2 的中和表位和非中和表位, 至于其具体表位则有待进一步研究。此外, 与用 PCV2 全病毒制备单克隆抗体相比较而言, 利用重组表达的 PCV2 Cap 蛋白制备单克隆抗体更易筛选得到针对 PCV2 Cap 蛋白这一目前已知的该病毒的主要结构蛋白的单克隆抗体, 避免了获得与 PCV1 抗原发生交叉反应的单克隆抗体的可能, 具有更强的特异性、针对性, 对 PCV2 诊断和 PMWS 的免疫治疗具有重要意义。同时, PCV2 重组 dCap 蛋白的获得为进一步研究 Cap 蛋白晶体结构和以重组 dCap 蛋白为抗原建立血清学诊断试剂及疫苗研究提供了基础。

### 参 考 文 献

- [1] Clark E G. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: Proceedings of the American Association of Swine Practitioners. Quebec City, Canada: American Association of Swine Practitioners, 1997, 499-501.
- [2] Allan G M, McNeilly F, Kennedy S, et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest*, 1998, **10**(1):3-10.
- [3] 郎洪武, 张广川, 吴发权, 等. 断奶猪多系统衰弱综合征血清抗体检测. *中国兽医科技*, 2000, **30**(3):3-5.
- [4] 周继勇, 陈庆新, 叶菊秀, 等. 猪圆环病毒 2 型感染的血清学分析. *中国兽医学报*, 2004, **24**(1):1-3.
- [5] 陈庆新, 商绍彬, 叶菊秀, 等. 杭州地区猪 II 型圆环病毒抗体的血清学调查. *中国兽医科技*, 2003, **33**(7):26-28.
- [6] Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus- and picomavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol*, 1974, **226**(2):153-167.
- [7] Tischer I, Miels W, Wolff D, et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol*, 1986, **91**(3-4):271-276.
- [8] Allan G M, Kennedy S, McNeilly F, et al. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol*, 1999, **121**(1):1-11.

- [ 9 ] Hamel A L , Lin L L , Nayar G P . Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs . *J Virol* , 1998 , **72** ( 6 ) : 5262 – 5267 .
- [ 10 ] Mahe D , Blanchard P , Truong C , *et al* . Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes . *J Gen Virol* , 2000 , **81** ( Pt 7 ) : 1815 – 1824 .
- [ 11 ] Truong C , Mahe D , Blanchard P , *et al* . Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection . *Arch Virol* , 2001 , **146** ( 6 ) : 1197 – 1211 .
- [ 12 ] Nawagitgul P , Morozov I , Bolin S R , *et al* . Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein . *J Gen Virol* , 2000 , **81** ( Pt 9 ) : 2281 – 2287 .
- [ 13 ] Liu Q , Tikoo S K , Babiuk L A . Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2 . *Virology* , 2001 , **285** ( 1 ) : 91 – 99 .
- [ 14 ] Liu Q , Willson P , Atttoh-Poku S , *et al* . Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein . *Protein Expr Purif* , 2001 , **21** ( 1 ) : 115 – 120 .
- [ 15 ] Allan G M , Mackie D P , McNair I , *et al* . Production , preliminary characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus . *Vet Immunol Immunopathol* , 1994 , **43** ( 4 ) : 357 – 371 .
- [ 16 ] McNeilly F , McNair I , Mackie D P , *et al* . Production , characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2 . *Arch Virol* , 2001 , **146** ( 5 ) : 909 – 922 .
- [ 17 ] Sambrook J , Russell D W . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* . 3<sup>rd</sup> ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2001 , A8.40 – A8.54 .
- [ 18 ] 龚 辉 , 吴建祥 , 王金勇 , 等 . 抗鸭 IL-2 单克隆抗体的制备与鉴定 . 浙江大学学报( 农业与生命科学版 ) , 2004 , **30** ( 2 ) : 169 – 172 .
- [ 19 ] Zhang Y D , Rameshwer S , Paul P S . Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus . *Vet Microbiol* , 1998 , **63** ( 2 – 4 ) : 125 – 136 .
- [ 20 ] Zhou J Y , Wu J X , Cheng L Q , *et al* . Expression of immunogenic S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus in transgenic potatoes . *J Virol* , 2003 , **77** ( 16 ) : 9090 – 9093 .
- [ 21 ] Chen G F , Inouye M . Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression : preferential usage of minor codons with in the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes . *Nucleic Acids Res* , 1990 , **18** ( 6 ) : 1465 – 1473 .
- [ 22 ] Zhang S P , Zubay G , Goldman E . Low-usage codons in *Escherichia coli* , yeast , fruit fly and primates . *Gene* , 1991 , **105** ( 1 ) : 61 – 72 .

## Antigenic analysis of the recombinant capsid protein of porcine circovirus type 2

SHANG Shao-bin<sup>1</sup> ZHOU Ji-yong<sup>1\*</sup> WU Jian-xiang<sup>1</sup> CHEN Qing-xin<sup>1,2</sup> GONG Hui<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Preventive Veterinary Medicine , <sup>2</sup> College of Life Sciences , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China )

**Abstract :** The nuclear localization signal ( NLS )-defected capsid protein gene ( dCap ) of porcine circovirus type 2 ( PCV2 ) was expressed firstly in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase ( rGST-dCap protein ). The purified rGST-dCap protein and NLS-defected Cap protein of PCV2 ( rdCap protein ) from the purified rGST-dCap protein reacted specifically with swine antiserum to PCV2 . Furthermore , the obtained monoclonal antibodies ( mAbs ) to rdCap protein were shown to bind to PCV2 particles replicated in PK15 cell . MAb to rdCap protein also revealed the neutralizing ability to PCV2 particles . These results demonstrate that rGST-dCap protein expressed in *E. coli* is folded correctly or at least partly , and all mAbs to rdCap protein possess the binding epitopes of PCV2 particle whereas mAbs 4C4 , 3F6 and 2G7 to rdCap protein keep the neutralization epitopes of PCV2 particle , showing a potential of rGST-dCap protein as a vaccine antigen or serodiagnostic reagent .

**Key words :** Porcine circovirus type 2 , NLS-defected capsid protein , Monoclonal antibody , Immunorelevant epitope

Foundation item : Key Project from Zhejiang Provincial Department of Science and Technology ( 2003C12012 )

\* Corresponding author . Tel : 86-571-86971698 ; Fax : 86-571-86971821 ; E-mail : jyzhou@zju.edu.cn

Received date : 11-03-2004