

## 嵌合猪圆环病毒 PCV1-2 的构建及其感染性初步鉴定

曹胜波<sup>1,2</sup>, 孙敏轩<sup>1,2</sup>, 刘学芹<sup>1,2</sup>, 刘新文<sup>1</sup>, 陈焕春<sup>1,2\*</sup>

(华中农业大学<sup>1</sup> 农业微生物学国家重点实验室<sup>2</sup> 湖北省预防兽医学重点实验室 武汉 430070)

**摘 要** 猪 II 型圆环病毒 (PCV2) 是当前严重危害养猪业的重要病原之一。目前, 世界上还没有有效疫苗用于该病毒的免疫预防。该研究利用 PCR 方法, 将 PCV2 的 ORF2 基因替换猪 I 型圆环病毒 (PCV1) 的 ORF2 基因, 构建了以 PCV1 基因组为骨架的嵌合病毒 (PCV1-2) 分子克隆 (pSK2PCV1-2)。将该分子克隆转染 PK-15 细胞并连续盲传 5 代, 用 RT-PCR 方法可以在转染后盲传的细胞中检测到 PCV1 的 ORF1 mRNA 和 PCV2 的 ORF2 mRNA, 但检测不到 PCV1 的 ORF2 mRNA 和 PCV2 的 ORF1 mRNA。间接免疫荧光检测显示在盲传第 5 代的细胞中有 PCV2 ORF2 蛋白的表达, 表达蛋白主要分布于细胞核。该研究初步证实构建的 PCV1-2 分子克隆转染细胞后可以形成具有感染性的嵌合病毒, 从而为更深入研究嵌合病毒生物学特性奠定了基础。

**关键词** 嵌合猪圆环病毒; 感染性; 鉴定

中图分类号: Q852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)01-0158-04

猪圆环病毒 (Porcine Circovirus, PCV) 是由 Tischer 等<sup>[1]</sup>于 1974 年在 PK-15 细胞中发现。该病毒粒子为 20 面体对称, 无囊膜, 以滚环方式进行复制, 可在 PK-15 细胞上生长但不引起细胞病变。其基因组是一种环状、单股副链 DNA, 与鸡贫血病毒 (Chicken Anemia Virus, CAV)、鸚鵡喙羽病毒 (Psittacine Beak and Feather Disease Circovirus, PBFDAV) 和人的 TT 病毒 (Transfusion Transmitted Virus, TTV) 同属圆环病毒科。该病毒有两种基因型即 PCV1 和 PCV2。前者广泛存在于猪源肾细胞中, 但并不引起感染猪发病; 后者首先由 Allan 等<sup>[2]</sup>从患断奶仔猪多系统衰弱综合征 (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS) 的猪群中分离到并被证明为 PMWS 的重要病原。

自 1996 年加拿大首次报道 PMWS 以来<sup>[3]</sup>, 该病已经成为了严重危害世界养猪业的重要传染病。患猪表现为渐进性消瘦、被毛粗乱、贫血、呼吸困难, 剖检可见淋巴结肿大、肝硬变、多灶性粘液脓性支气管炎、间质性肺炎; 发病率高, 死亡率可达 5%~40%, 康复猪成为僵猪。在我国, 朗洪武等<sup>[4]</sup>于 2001 年首次报道检测到 PCV2 抗体。随后, 其他研究者的血清学和病原学研究证实 PCV2 在我国猪群中广泛存在<sup>[5-8]</sup>。由于 PCV2 可破坏机体免疫系统, 导致免疫抑制, 从而造成其它疾病的混合感染。因此, 由感染 PCV2 而造成的直接、间接的经济损失巨大。但遗憾的是, 到目前为止, 世界上还没有一种有效的疫苗用于该病的防治。

分子生物学研究揭示 PCV1 和 PCV2 具有十分相似的基因组结构, 全基因组的同源性为 76% 左右, 且均含有两个主

要的读码框架即 ORF1、ORF2。二者的主要结构蛋白均由 ORF2 编码, 该蛋白在真核细胞中表达可以形成完整的病毒样颗粒, 是主要的免疫原性基因<sup>[9]</sup>, ORF1 则均编码病毒的复制蛋白<sup>[10]</sup>。

Mankertz<sup>[11]</sup>研究揭示 PCV1 和 PCV2 在复制过程中, 均首先产生双链的复制型中间体 (RF), 然后依赖于 PCV 基因组中的一段高度保守的茎环结构 (Stem-loop Structure) 启动滚环复制。同时, PCV1 和 PCV2 还具有相似的复制调控机制, 二者的复制相关基因也可以互换。本研究旨在以 PCV1 的全基因组为骨架, 用 PCV2 的 ORF2 基因替换 PCV1 的 ORF2 基因, 在此基础上构建以 PCV1 基因组为骨架嵌合圆环病毒的感染性分子克隆, 通过体外转染技术, 获得嵌合病毒, 为该嵌合病毒的生物学特性研究奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病毒:** PCV2 毒株为本文作者从河南某猪场一患 PMWS 的猪中分离得到 (AY035820)<sup>[12]</sup>。

**1.1.2 细胞、菌株和质粒:** 无 PCV 污染的 PK-15 细胞、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  和 pBluescript (+) 均由本室保存, 包含 PCV1 全基因组的质粒 (pSKPCV1-Hind III + *Kpn* I 和 pSKPCV1-*Kpn* I) 由本人构建<sup>△</sup>。

**1.1.3 酶和试剂:** 各种限制性内切酶、工具酶、分子量标准、蛋白酶、PCR 试剂盒均为大连 TaKaRa 公司产品, JUNIQ25 柱离心式 DNA 胶回收试剂盒购自上海 Sangon 公司, 荧光抗体

基金项目: 国家自然科学基金资助 (36170701)

\* 通讯作者。Tel: 86-27-87282608; Fax: 86-27-87281795; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

作者简介: 曹胜波 (1975-) 男, 湖北房县人, 讲师, 研究方向为动物分子病毒学。E-mail: sbcao@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2005-05-08; 接受日期: 2005-06-03; 修回日期: 2005-10-20

△曹胜波. 猪圆环病毒感染性分子克隆的构建及 siRNA 对 Rep 基因表达抑制研究. 华中农业大学博士学位论文, 2005. 6.

FITC-羊抗兔 IgG 购自晶美生物工程有限公司, 兔抗 PCV2 ORF2 蛋白多克隆抗体由本实验室琚春梅博士制备<sup>△</sup>, 脂质体转染试剂盒为 Invitrogen 公司产品。其它试剂为进口或国产分析纯试剂。

## 1.2 引物设计与合成

根据分离鉴定的 PCV1 和 PCV2 全基因组序列, 设计 6 对引物, 分别为 p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7, p8, p9, p10。引物序列见表 1。

表 1 构建嵌合病毒 PCV1-2 的引物序列

Table 1 Sequence of primers for construction of chimeric PCV1-2

Primers	Primers sequences(5'-3')	Restrictive enzyme sites	Target segments	Length
p1	CCCCTAGCTGAATAAAAAATAAAACCATACG	<i>Nhe</i> I	pSKPCV-1△ORF2 }	4.2kb
p2	CCTTCGCGACGTCATCCTATAAAAGTAAAG	<i>Nru</i> I		
p3	TATGCTAGCGTTAAGTGGGGGTCIT	<i>Nhe</i> I	ORF2-PCV2 }	702bp
p4	CCGTCGCGAAGGAGGCGTTCCGCAGAC	<i>Nru</i> I		
p5	GCTGCGCTAGCTTATTCATTTTGAGGGTTTTCAG	<i>Nhe</i> I	ORF2-PCV1 }	702bp
p6	TACGGGCATGCATGACGTGGCCAAGGAGG	<i>Sph</i> I		
p7	CITTAAGCTTATGCCAAGCAAGAAAAGC	<i>Hind</i> III	ORF1-PCV1 }	951bp
p8	CITGGATCCATTTATTTATATGCGAA	<i>Bam</i> H I		
p9	GGTAAAGCTTATGCTAGCAAGAAGAAT	<i>Hind</i> III	ORF1-PCV2 }	960bp
p10	GGTGGATCCGTAATTTATTCATATGG	<i>Bam</i> H I		
p11	ATTGGTACCTCCGTGATTGTTCT	<i>Kpn</i> I	PCV1 }	1759bp
p12	GGAAAGCTTCGAAGGCCGATTGCA	<i>Hind</i> III		

### 1.3 不包含 ORF2 基因的 pSKPCV1-Kpn I (pSKPCV-1△ORF2) 的 PCR 扩增

以 pSKPCV1-Kpn I 质粒为模板, 50μL PCR 反应体系中含灭菌水 39.5μL, 10× buffer 5μL, 2mmol/L dNTPs 2μL, 引物 p1 和 p2 引物各 1μL (25μmol/L), 模板 0.5μL, Taq DNA 聚合酶 1μL。反应参数 95℃ 5min 94℃ 30s 55℃ 30s 72℃ 2min, 共进行 35 个循环, 72℃ 10min。取 5μL 扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

### 1.4 PCV2 ORF2 基因扩增

从感染了 PCV2 的 PK-15 细胞中提取 PCV2 全基因组 DNA 为 PCR 反应模板, 于 PCR 反应体系(50μL)中分别加入: 灭菌水 40μL, 10× buffer 5μL, 2mmol/L dNTPs 1μL, 引物 p3 和 p4 各 1μL (25μmol/L), 模板 1μL, Taq 酶 1μL。反应条件: 95℃ 5min 94℃ 30s, 57℃ 30s, 72℃ 2min, 共进行 35 个循环, 72℃ 10min。取 5μL 扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

### 1.5 单拷贝嵌合病毒 PCV1-2 的分子克隆构建

将上述 PCR 产物回收后, 均用 *Nhe* I 和 *Nru* I 双酶切, 然后将二者于 16℃ 水浴连接过夜, 经转化大肠杆菌 DH5α, 提取质粒, 酶切鉴定, 筛选出阳性质粒, 命名为 pSKPCV1-2(Kpn I + Kpn I), 嵌合病毒基因组的两端均含有一个 *kpn* I 位点。

以 pSKPCV1-2(Kpn I + Kpn I) 为模板, 利用引物 p11 和 p12 扩增嵌合病毒全基因组, 将嵌合病毒基因组上游 *Kpn* I 酶切位点替换为 *Hind* III, 然后将 PCR 产物回收后用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切, 同时将空载体 pBluescript(+) 也用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切, 将上述酶切产物回收后加入 T4 DNA 连接酶于 16℃ 水浴连接过夜, 经转化大肠杆菌 DH5α, 提取质粒, 酶切鉴定, 筛选出阳性质粒, 命名为 pSKPCV1-2(*Hind* III +

*Kpn* I), 嵌合病毒基因组的两端分别含有一个 *Hind* III 和一个 *Kpn* I 位点。

### 1.6 双拷贝嵌合病毒 PCV1-2 的分子克隆构建

用 *Kpn* I 酶切 pSKPCV1-2(*Hind* III + *Kpn* I) 和 pSKPCV1-2(*Kpn* I + *Kpn* I) 质粒, 回收线性化的 pSKPCV1-2(*Hind* III + *Kpn* I) 质粒和约 1.8kb 的 PCV1-2 全基因组(两端均为 *Kpn* I 位点), 然后将二者于 16℃ 水浴连接过夜, 经转化大肠杆菌 DH5α, 提取质粒, 酶切鉴定, 筛选出阳性质粒, 筛选出双拷贝嵌合病毒 PCV1-2 的分子克隆阳性质粒, 命名为 pSK2PCV1-2。

### 1.7 体外转染

按照说明书转染没有污染 PCV 的 PK-15 细胞, 转染 48h 后, 收取转染细胞, 反复冻融 3 次, 再接种到新的 PK-15 细胞, 依次盲传 5 代后用间接免疫荧光检测。

### 1.8 间接免疫荧光检测嵌合病毒

参照芦银华<sup>[13]</sup>介绍的方法进行免疫荧光实验, 以兔抗 PCV2 ORF2 蛋白的多克隆抗体为一抗, 以羊抗兔 FITC 标记的 IgG 为二抗。

### 1.9 用 RT-PCR 检测 PCV1 ORF1、ORF2 和 PCV2 ORF1、ORF2 的 mRNA

从盲传第 5 代的 PK-15 中提取细胞总 RNA, 用 p3、p4 扩增 PCV2 ORF2 mRNA, 用 p5、p6 扩增 PCV1 ORF2 mRNA, 用 p7 和 p8 扩增 PCV1 ORF1 mRNA, 用 p9、p10 扩增 PCV2 ORF1 mRNA。反应条件均为: 50℃ 30min, 然后进行 35 个循环(循环条件同 1.4 节), 最后 72℃ 延伸 2 min; 扩增 PCV2 ORF2 mRNA、PCV1 ORF2 mRNA、PCV1 ORF1 mRNA、PCV2 ORF1 mRNA 的退火温度分别为 57℃、60℃、53℃、53℃。反应结束后, 将上述 RT-PCR 产物回收, 分别克隆至 pMD-18T 载体中,

<sup>△</sup>琚春梅. 猪 2 型圆环病毒 ELISA 诊断方法及猪 2 型圆环病毒-伪狂犬病病毒二价基因工程疫苗研究. 华中农业大学博士学位论文, 2005. 6.

然后进行测序分析。

## 2 结果

### 2.1 pSKPCV1- $\Delta$ ORF2 和 PCV2 ORF2 基因的 PCR 扩增

电泳结果显示,以 pSKPCV1-*Kpn* I 为模板,扩增得到了一条大小约为 4.2kb 的片段,以 PCV2 基因组 DNA 为模板,扩增得到了一条大小约 0.7kb 的片段,与预计结果相符。

### 2.2 单拷贝嵌合病毒 PCV1-2 的分子克隆构建

用 *Kpn* I 酶切 pSKPCV1- $\Delta$ (*Kpn* I + *Kpn* I),用 *Eco*R I 酶切 pSKPCV1- $\Delta$ (*Hind*III + *Kpn* I)质粒,电泳结果显示:前者被切为两条带,分别为 1.8kb 和 3.0kb,后者也被切为两条带,大小分别为 0.5kb 和 4.3kb,与预计大小相符,表明 PCV2 ORF2 基因已经成功插入到预定位置。在酶切鉴定后,将两个质粒分别测序,结果证实:PCV2 ORF2 基因已替换了 PCV1 的 ORF2 基因,并插入到正确位置,且 PCR 扩增没有导致核苷酸的突变。

### 2.3 双拷贝嵌合病毒 PCV1-2 的分子克隆构建

用 *Eco*R I 酶切 pSK2PCV1-2 质粒,电泳结果显示,该质粒被切为 3 条带,大小分别约为 0.6kb,1.8kb 和 4.2kb,而且通过酶切还可以判定所构建的 pSK2PCV1-2 是 PCV1-2 双拷贝正向串连体,表明 pSK2PCV1-2 构建正确。

### 2.4 间接免疫荧光检测嵌合病毒

间接免疫荧光显示:在转染后盲传第 5 代的 PK-15 中有特异性的荧光,而且荧光主要分布于细胞核,感染了 PCV2 的 PK-15 细胞中也有特异性荧光,荧光也主要分布于细胞核,而且其荧光强度及有荧光的细胞数量要明显高于转染后盲传的细胞,在没有感染 PCV 的 PK-15 细胞中则没有特异性荧光出现(图 1)。

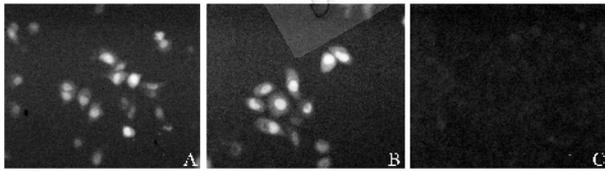


图 1 间接免疫荧光检测嵌合病毒(200 $\times$ )

Fig.1 Detection of PCV1-2 by IIF (200 $\times$ )

A: PK-15 cells infected with PCV2 as positive control; B: PK-15 cells infected with PCV1-2; C: PK-15 cells free of PCV as negative control.

### 2.5 PCV1 ORF1、ORF2 和 PCV2 ORF1、ORF2 的 mRNA 检测

从盲传第 5 代的 PK-15 细胞中提取细胞总 RNA,进行 RT-PCR,用 p3、p4 扩增出了 1 条大小约为 0.7kb 的片段,与 PCV2 ORF2 基因的大小相符;用 p5、p6 则没有扩增出特异性片段;用 p7 和 p8 扩增出了 1 条大小约为 0.9kb 的片段,引物 p9、p10 也扩增出了 1 条大小约为 0.9kb 的片段。测序结果显示:引物 p3、p4 扩增产物为 PCV2 ORF2 基因,引物 p7、p8 扩增产物为 PCV1 ORF1 基因,引物 p9、p10 扩增产物也为 PCV1 ORF1 基因。

## 3 讨论

PCV2 是当前严重危害世界养猪业的重要病原,也是继繁殖与呼吸综合征病毒之后的又一导致免疫抑制的病原。鉴于该病毒在细胞上增殖滴度低、侵害免疫系统等特点,常规的疫苗研究方法一时难以突破,因此,到目前为止,世界上还没有一种有效的疫苗问世。

为了验证嵌合病毒分子克隆在转染后是否可以形成具有感染性的病毒,本实验通过间接免疫荧光的方式,以检测嵌合病毒的结构蛋白为依据,来证实嵌合病毒在细胞上的增殖。间接免疫荧光结果显示,转染了嵌合病毒分子克隆的 PK-15 细胞在盲传 5 代后可以检测到特异性荧光,而且荧光主要分布于细胞核中,这与 ORF2 表达蛋白在细胞中的定位特点相吻合<sup>[4]</sup>。此外,我们还发现虽然在转染后盲传的 PK-15 细胞可以检测到荧光,但与感染 PCV2 的 PK-15 相比,发荧光的细胞数量较少,荧光强度也较弱。说明,细胞中有嵌合病毒的增殖和 PCV2 ORF2 基因的表达,但增殖滴度较低。

PCV 不引起细胞病变,因此,实验中 PK-15 细胞即使被 PCV 污染也很难察觉。为了排除这种因素的影响,本实验以盲传细胞总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 分别检测 PCV1 ORF1 和 ORF2 的 mRNA、PCV2 ORF1 和 ORF2 的 mRNA,结果显示:在盲传细胞中检测不到 PCV1 ORF2 mRNA 基因,但可以检测到 PCV2 ORF2 的 mRNA,说明盲传细胞并没有被 PCV1 污染。而在检测 ORF1 mRNA 基因时,发现两对引物都扩增出了大小相近的片段,后经测序证实,两对引物扩增的片段均为 PCV1 的 ORF1 mRNA 基因,说明,盲传过程中没有发生 PCV2 的污染。之所以会出现两对引物均可以扩增出 PCV1 的 ORF1 mRNA,是因为 PCV1 和 PCV2 的 ORF1 基因的同源性高达 83%,扩增所用引物的同源性也较高的缘故。

上述实验初步证实:本研究构建的嵌合病毒 PCV1-2 转染细胞后可以形成具有感染性的病毒,但病毒的增殖滴度较低。如何提高嵌合病毒的增殖滴度?该嵌合病毒的生物学特性究竟如何,是否可以作为预防 PCV2 感染的弱毒疫苗?将有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 1982, **295**: 64-66.
- [2] Allan GM, Mcneilly F, Cassidy JP, et al. Pathogenesis of porcine circovirus: Experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol*, 1995, **44**(1): 49-64.
- [3] Harding JCS, Clark EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod*, 1997, **5**: 201-203.
- [4] 朗洪武,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.
- [5] 曹胜波,陈焕春,肖少波,等. 猪环状病毒 2 型的 PCR 检测方法的建立与应用. *华中农业大学学报*, 2000, **20**(1): 53-56.

- [ 6 ] 王忠田, 杨汉春, 郭 鑫. 规模化猪场猪圆环病毒 2 型感染的流行病学调查. 中国兽医杂志, 2002, 38(10):3-5.
- [ 7 ] 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.
- [ 8 ] 琚春梅, 陈焕春, 曹胜波, 等. 应用在大肠杆菌中表达的猪 2 型圆环病毒 ORF2 蛋白建立一种 ELISA 诊断方法. 畜牧兽医学报, 2004, 35(6):689-693.
- [ 9 ] Pomtippa N, Lgor M, Steven R, *et al.* Open reading frame 2 porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol*, 2000, 81(9):2281-2287.
- [ 10 ] Cheung AK. Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses. *Virology*, 2003, 310(1):41-49.
- [ 11 ] Mankertz A, Mueller B, Steinfeldt T, *et al.* New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2. *J Virol*, 2003, 77(18):9885-9893.
- [ 12 ] 曹胜波, 陈焕春, 肖少波, 等. 猪 II 型圆环病毒豫 A 株全基因组克隆与序列分析. 病毒学报, 2002, 2(18):137-141.
- [ 13 ] 芦银华, 谈国蕾, 华修国, 等. 应用间接免疫荧光试验检测猪圆环病毒抗体. 中国兽医科技, 2002, 32(8):19-20.
- [ 14 ] Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*, 2001, 285(1):91-99.

## Construction of molecular clone of chimeric porcine circovirus( PCV1-2 ) and identification of its infectivity

CAO Sheng-bo<sup>1,2</sup>, SUN Min-xuan<sup>1,2</sup>, LIU Xue-qin<sup>1,2</sup>, LIU Xin-wen<sup>1</sup>, CHEN Huan-chun<sup>\*1,2</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory of Agricultural Microbiology ;<sup>2</sup> Hubei Province Key Laboratory of Preventive Veterinary ,  
Hua Zhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China )

**Abstract** : Porcine circovirus type 2 ( PCV2 ) recently emerged as an important infectious pathogen for pigs in the world. Unfortunately , there is no efficient method to deal with PCV2 infection until now. In this study , chimeric porcine circovirus molecular clone ( pSK2PCV1-2 ) was constructed by cloning capsid gene of PCV2 into the backbone of PCV1. PK-15 cells was transfected with pSK2PCV1-2 and then cultivated in plate for five passages. mRNA of PCV1 ORF1 and PCV2 ORF2 were detected in the fifth passage , but mRNA of PCV1 ORF2 and PCV2 ORF1 were not detected in the cells. On the other hand , capsid protein of PCV2 was also detected in the nucleolus of transfected cells by IIF. This study indicated that pSK2PCV1-2 could form infectious virus in transfected cells. It will provide base for further study on biological characteristic of chimeric porcine circovirus.

**Keywords** : Chimeric porcine circovirus ; Infectivity ; Identification

Foundation item : National Nature Science Foundation of China ( 36170701 )

\* Corresponding author. Tel : 86-27-87282608 ; Fax 86-27-87281795 ; E-mail : hzauvet@public.wh.hb.cn

Received 8 May 2005/Accepted 3 June 2005/Revised 20 October 2005