

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (2) :211 - 217; 4 February 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsx.2014.02.010

表达猪圆环病毒 II 型 ORF2 基因的重组猪伪狂犬病病毒的免疫原性

钞安军^{1,2}, 付朋飞¹, 郭晓庆¹, 高晓云¹, 崔保安¹, 陈红英^{1*}

¹河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州 450002

²河南正大畜禽有限公司, 河南 新乡 453003

摘要: 【目的】为研制预防猪圆环病毒 II 型 (PCV2) 感染的重组伪狂犬病病毒 (PRV) 活载体疫苗。【方法】将 PCV2 ORF2 基因插入到 PRV 通用载体 pG 中, 利用脂质体 Lipofectamine™ 2000 试剂盒将重组转移质粒 pGO 与猪 PRV 弱毒 HB98 株 DNA 共转染猪睾丸 (ST) 细胞, 通过 3 轮蚀斑纯化重组病毒。将重组病毒、商品化 PCV2 灭活苗及 DMEM 培养液分别免疫 6 周龄雌性昆明小鼠, 4 周后加强免疫 1 次, 首免后第 8 周用 PCV2 强毒 NY 株对小鼠进行攻毒。【结果】成功获得表达 ORF2 基因的重组病毒 PGO, 首免重组病毒后小鼠体内抗 PCV2 的 ELISA 抗体水平很低, 二免后小鼠 PCV2 特异的 ELISA 抗体水平明显升高, 并且重组病毒组能够激发 PCV2 特异的淋巴细胞增殖效应。攻毒试验表明重组病毒组和 PCV2 灭活疫苗组均能有效抵抗 PCV2 强毒攻击。【结论】表明表达 ORF2 基因的重组病毒 PGO 具有良好免疫原性。

关键词: 猪圆环病毒 II 型, ORF2 基因, 伪狂犬病病毒, 重组病毒, 免疫效力

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 02-0211-07

猪圆环病毒 II 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 属于圆环病毒科圆环病毒属^[1-2], 是猪圆环病毒相关疾病 (PCVAD) 的主要病原^[3], PCV2 感染呈全球分布。PCV2 除引起猪体发生原发感染甚至死亡之外, 还侵害猪的淋巴系统, 导致免疫抑制, 从而继发猪蓝耳病、猪瘟和猪伪狂犬病等病毒性传染病, 使疫情加重, 给养猪业造成了巨大经济损失。

PCV2 全病毒灭活油乳苗虽对 PCVAD 的控制发挥了重要作用, 但由于 PCV2 生长慢, 增殖滴度低, 测定效价需要借助间接免疫荧光试验和免疫过氧化物酶单层细胞试验, 并且需要多次接种, 因此灭活疫苗制备成本较高且应用繁琐, 基因工程亚单位

疫苗高成本以及嵌合病毒疫苗的低增殖滴度限制了这些疫苗的广泛应用, 而 DNA 疫苗免疫正处于研究之中^[4], 因此利用基因工程方法获得的病毒活载体疫苗成为了防治该病的一个重要方向。

伪狂犬病毒 (PRV) 基因组庞大 (150 kb)^[5], 含有 TK 基因、gI 基因、gG 基因、gL 基因等非必需基因, 可供多种外源基因插入及稳定表达, 并且 PRV 具有病毒稳定、无致癌性、免疫原性持久, 能够同时激发细胞免疫和体液免疫等优点, 因此伪狂犬病毒适合基因工程活载体疫苗的研究和开发。因此, 本试验将 PCV2 ORF2 基因插入到猪 PRV 弱毒 HB98 株中, 获得 1 株重组病毒 PGO, 接种小鼠进行免疫原

基金项目: 河南省重大科技专项 (111100110300)

* 通信作者。Tel: +86-371-63554361; Fax: +86-371-63558180; E-mail: chhy927@163.com

作者简介: 钞安军 (1988 -), 男, 河南新乡人, 硕士研究生, 主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。E-mail: caj8811@163.com

收稿日期: 2013-06-29; 修回日期: 2013-09-13

性试验,旨在为 PCV2 ORF2 基因重组猪伪狂犬病毒病的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞及毒株:含有伪狂犬病病毒自身晚期基因 gG 启动子及插入的 hCMV 基因、SV40 Poly (A) 基因和绿色荧光蛋白 (GFP) 基因的通用转移载体 pG 和 PCV2 强毒 NY 株 ORF2 基因的克隆质粒 pGEMT-ORF2 均由河南省动物性食品安全重点实验室构建并保存;猪睾丸 (ST) 细胞购自中国兽药监察所;猪 PRV 弱毒 HB98 株购自武汉科前生物制品公司。PCV2 强毒 NY 株由河南省动物性食品安全重点实验室分离并保存。

1.1.2 疫苗及试验动物:PCV2 灭活苗购自武汉科前生物制品公司。6 周龄雌性昆明小鼠购自河南省试验动物中心。

1.1.3 主要试剂:EX Taq DNA 聚合酶,限制性内切酶 BamH I 购自 TaKaRa 公司;碱性磷酸酶 (CIAP)、T₄ DNA 连接酶购自 Promega 公司;BIOMIGA 无内毒素质粒提取试剂盒购自郑州赛斯生物科技有限公司;Lipofectamine™ 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司;低熔点琼脂糖购自索莱宝公司;MTT 试剂和淋巴细胞分离液购自华美生物工程有限公司。HyClone DMEM 细胞培养液、四季青胎牛血清购自郑州赛斯生物科技有限公司;PCV2 抗体 ELISA 检测试剂盒购自武汉科前生物制品公司、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗鼠 IgG 抗体购于北京博奥森生物技术发展公司。

1.2 含 ORF2 基因的猪伪狂犬病毒转移质粒的构建

根据 pGEMT-ORF2 质粒的 ORF2 基因序列设计 1 对引物,上、下游引物的 5'端均引入限制性酶切位点 BamHI (见划线部分)。上游引物 (P1) 5'-GAGGATCCATGACGTATCCAAGG-3';下游引物 (P2) 5'-GCGGATCCCATTTCATTAAGGGTTA-3'。该引物扩增长度为 1740 bp,含 ORF2 基因全序列。反应条件为:预变性 94℃ 5 min;95℃ 1 min,58℃ 1 min,72℃ 1 min,30 个循环;最后 72℃ 再延伸 10 min。经 BamH I 酶切的 PCR 产物克隆到经同样处理并用 CIAP 去磷酸化的 pG 质粒中,完成重组转

移质粒 pGO 的构建。

1.3 转染

参照 BIOMIGA 无内毒素质粒小提试剂盒使用说明进行转移质粒的纯化。转染时,先用 DMEM 培养液洗涤已长至 80% - 90% 的 ST 细胞,然后按 Lipofectamine™ 2000 试剂盒转染说明书将质粒 pGO 与猪 PRV 弱毒 HB98 株基因组 DNA 进行共转染,在 37℃ 5% CO₂ 的条件下培养 5 h 后,吸弃孔内培养液,加入全培养液,在 37℃ 5% CO₂ 的条件下继续培养,待细胞病变达到 80% 时收获病毒,反复冻融 3 次后,用于重组病毒 PGO 的筛选与纯化。

1.4 蚀斑纯化与遗传稳定性

将收获的转染液按照 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释度接种到 ST 单层细胞的 6 孔板中,吸附 1.5 h 后每孔加入 2 mL 低熔点琼脂琼脂糖,置于细胞培养箱中培养 48 h,在荧光显微镜的蓝光 (波长 420 - 490 nm) 和白光下能观察到绿色和无色两种病毒蚀斑,在荧光显微镜下用巴氏吸管小心吸取绿色蚀斑,-20℃ 反复冻融 3 次后再次重复上述操作,结合 PCR 扩增 ORF2 基因,直至所有的蚀斑均发出绿色荧光。提取重组病毒感染的病变细胞总 RNA,RT-PCR 扩增 ORF2 基因,并采用 IPMA 方法检测 Cap 蛋白,鉴定 PCV2 ORF2 基因在 PRV 中的表达。

重组病毒在 ST 细胞上连续传 15 代,第 15 代时作蚀斑试验。挑取单个蚀斑用 PCR 扩增 ORF2 基因,鉴定 ORF2 插入的遗传稳定性。

1.5 动物分组免疫

将 30 只 6 周龄雌性小鼠随机分为 3 组,10 只/组,免疫途径均采用两后肢胫骨前肌多点注射,4 周后以同样剂量加强免疫一次。免疫方案见表 1。

1.6 淋巴细胞增殖试验

1.6.1 淋巴细胞的分离:首免后第 8 周,3 组均取 5 只小鼠,脱臼处死,用 75% 酒精消毒后迅速移至无菌操作台;用剪刀和镊子无菌取脾脏并在研钵中研磨,加入 2 mL PBS,用 120 目尼龙网过滤到小烧杯中;在离心管中加入 2 mL 淋巴细胞分离液,并在其上部沿管壁缓慢加入脾细胞悬液,用水平离心机 1000 × g 离心 10 min;将中间层的淋巴细胞转移到干净离心管中;再用 PBS 液洗 2 次,500 × g 离心 5 min,弃去上清即得浓缩的淋巴细胞。

表 1 试验分组及免疫情况
Table 1 Test grouping and Vaccination

groups	the first immunization		the second immunization	
	dose/mouse	vaccination route	dose/mouse	vaccination route
recombinant virus PGO	1×10^6 PFU	intramuscular injection	1×10^6 PFU	intramuscular injection
PCV2 inactivated vaccine	100 μ L	intramuscular injection	100 μ L	intramuscular injection
DMEM medium	100 μ L	intramuscular injection	100 μ L	intramuscular injection

1.6.2 淋巴细胞增殖反应的检测 (MTT 比色法):

取分离的淋巴细胞用 RPMI 1640 培养液配成每毫升 1×10^6 单细胞悬液, 然后于 96 孔板中每孔加入 200 μ L。用 PCV2 紫外灭活病毒进行刺激, 同时设只加培养液为阴性对照和不添加任何刺激物作为空白对照, 均做 3 个重复。置 5% CO₂ 37°C 培养箱 (Thermo, 371 型) 中培养 36 h 后进行测定。测定前 4 h 时每孔加入 MTT 20 μ L (5 mg/mL) 继续培养, 测定时每孔加入 200 μ L 的 DMSO, 充分震荡 10 min (动作要轻柔, 使结晶物溶解即可), 5 min 内用酶联免疫检测仪 (Thermo) 测定 OD₄₉₀ 值。结果用刺激指数 (Stimulation index, SI) 表示。SI = (刺激物 OD 值 - 空白 OD 值) / (细胞 OD 值 - 空白 OD 值)。检验比较各组间的统计学差异。

1.7 PCV2 抗体的检测

首免后第 3 周至攻毒后第 2 周, 每周对各组 5 只小鼠断尾采血并分离血清。小鼠血清作 1:40 稀释后, 用 PCV2 抗体 ELISA 检测试剂盒 (批号: 130503) 检测小鼠的抗体水平, 试剂盒中酶标二抗用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗替代, 其余的按照试剂盒进行操作。ELISA 反应反应结束后, 测定 630 nm 时 OD 值。

1.8 攻毒保护试验

首免后第 8 周各组试验小鼠取 5 只, 用 PCV2 强毒 NY 株通过腹腔注射途径进行攻击, 500 μ L/只, 攻毒后第 3 周处死所有小鼠, 采取肺脏、脾脏组织, PCR 扩增组织中 PCV2 全基因组。上游引物 (P1) 5'-TATCCGCGGGCTGGCTGAACCTTTTGAA-3'; 下游引物 (P2) 5'-GTGCCGCGGAAATTTCTGACAAA CGTT-3'。扩增程序为 95°C 5 min 之后, 94°C 40 s, 53°C 50 s, 72°C 45 s, 35 个循环后, 72°C 延伸 10 min。扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.9 数据处理

用 SPSS18.0 for Windows 及 Microsoft Excel 统计软件将所得数据进行统计学处理, 计算其平均值。

2 结果和分析

2.1 转移质粒 pGO 的构建及鉴定

BamH I 酶切的 ORF2 因克隆到经同样处理并用 CIAP 去磷酸化的质粒 pG 中, 构建重组转移质粒 pGO, 该质粒 pGO 含有可以与亲本株猪 PRV 基因组发生同源重组的同源臂、gG 启动子控制下的 ORF2 基因和 SV40 启动子控制下的 GFP 基因 (图 1)。

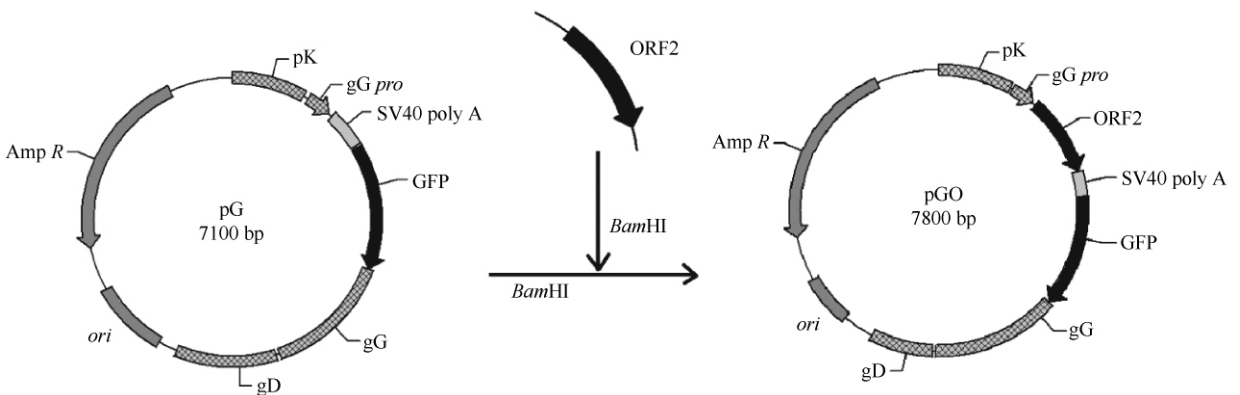


图 1. 重组质粒 pGO 构建流程图

Figure 1. Construction of recombinant plasmid pGO.

重组转移质粒 pGO 经 *Bam*H I 酶切酶切, 电泳出现约 0.7 kb (ORF2 基因) 和 7.1 kb (pG 载体) 的 2 条带。用 PCV2 ORF2 特异性引物对重组质粒 pGO 进行 PCR 扩增, 电泳检测结果显示在约 0.7 kb 处有清晰条带, 与预期的大小相符。酶切和 PCR 鉴定正确的重组转移质粒进行序列测定, 结果表明, 重组转移质粒 pGO 中含有 ORF2 基因的核苷酸序列及阅读框均完全正确。

2.2 重组病毒蚀斑筛选与纯化结果

将重组转移质粒 pGO 与猪 PRV 弱毒 HB98 株 DNA 共转染 ST 细胞, 质粒 pGO 与猪 PRV 发生同源重组, 重组病毒带有 GFP 基因, 表达绿色荧光蛋白。将重组病毒液进行蚀斑筛选。在荧光显微镜下能观察到绿色荧光 (图 2)。PCR 扩增为阳性的病毒蚀斑, 进一步进行蚀斑纯化, 通过连续 3 轮蚀斑筛选纯化后, 形成的蚀斑均发出绿色荧光。对重组病毒感染细胞总 RNA 进行 RT-PCR 扩增 ORF2 基因, 电泳显示 1 条约 700 bp 的带, 与预期扩增大小相一致; IPMA 检测结果表明, PCV2 阳性血清能够与重组病毒感染细胞发生反应并呈现棕红色, 而对照组健康

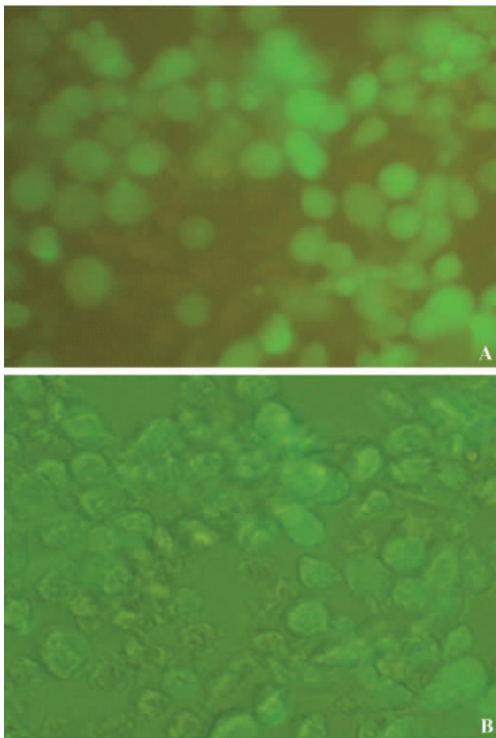


图 2. 空斑筛选后不同亮度下观察到的荧光照片

Figure 2. Illustration of green fluorescence after plaque assay with different brightness. A: The photo collected with brightness; B: the photo collected with white brightness.

细胞反应则不着色, 表明重组病毒表达了 PCV2 的 Cap 蛋白。

重组病毒经 15 次传代后仍然发出绿色荧光, 并用 PCR 鉴定每一个蚀斑, 均能扩增出 1 条约 702 bp (ORF2 基因) 的带, 证明 ORF2 稳定地插入到猪 PRV 弱毒 HB98 株中, 表明重组病毒遗传稳定好。

2.3 淋巴细胞增殖测定结果

二免后第 4 周每组取 5 只小鼠处死, 采集脾脏并分离淋巴细胞, 并将经紫外线照射灭活的 PCV2 作为特异性抗原, 用以检测小鼠体内淋巴细胞的特异性增殖情况。结果表明重组病毒免疫组能够诱导小鼠产生特异性淋巴细胞增殖反应, 与 PCV2 灭活疫苗组及阴性对照组相比, 差异显著 ($P < 0.05$) (图 3)。

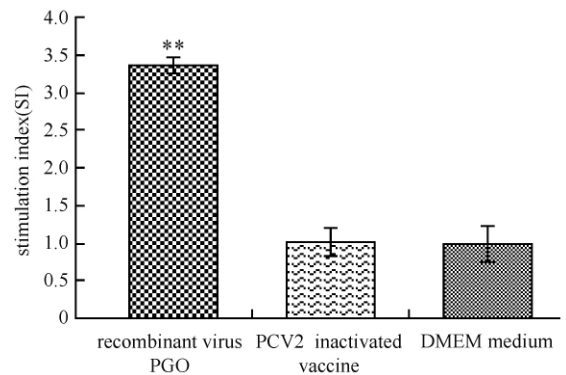


图 3. PCV2 特异性淋巴细胞增殖效应结果

Figure 3. Results of PCV2 specific lymphocyte proliferation assay. ** = significant ($P < 0.05$) differences when compared with PCV2 inactivated vaccine or DMEM medium.

2.4 ELISA 检测结果

当 OD 值大于 0.52 时判为阳性, 低于 0.48 时判为阴性。如图 4 所示, 一免疫后第 4 周时重组病毒组与灭活疫苗组 ELISA 抗体水平非常低, 几乎与 DMEM 培养液组一样, 第 5 周时灭活疫苗组抗体水平已经开始上升, 至第 6 周时重组病毒免疫组抗体水平也呈现明显的上升趋势, 至攻毒后第 2 周 (即第 9 周), 重组病毒组与灭活疫苗组抗体水平均升至最高, 而 DMEM 培养液对照组抗体一直处于低水平。在首免后第 6-9 周内, 重组病毒组诱生的 ELISA 抗体水平明显高于灭活疫苗组, 差异显著 ($P < 0.05$)。

2.5 攻毒保护试验结果

DMEM 组中的 5 只小鼠 PCR 结果均为阳性, 表明其体内存在 PCV2 病毒; PCV2 灭活疫苗免疫组和

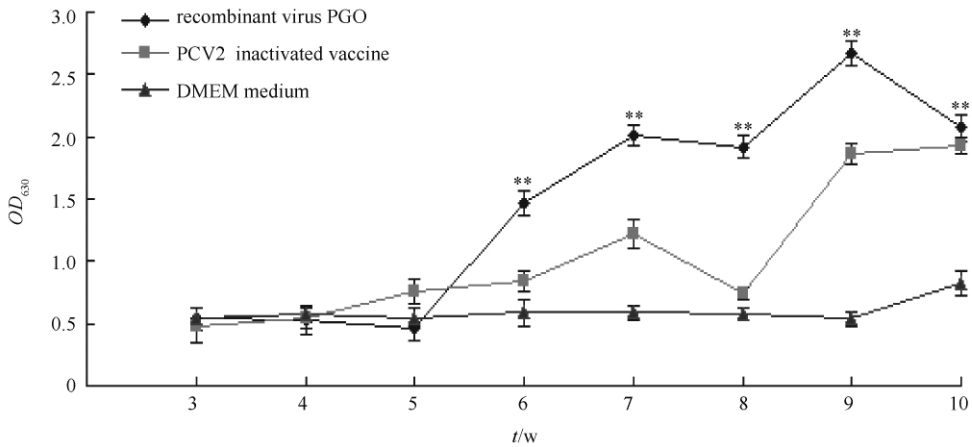


图 4. 免疫后血清中 ELISA 抗体动态 (OD 值)

Figure 4. The dynamic variation of ELISA antibody determined by ELISA after second immunization (OD value). ** = significant ($P < 0.05$) differences between recombinant virus PGO and PCV2 inactivated vaccine.

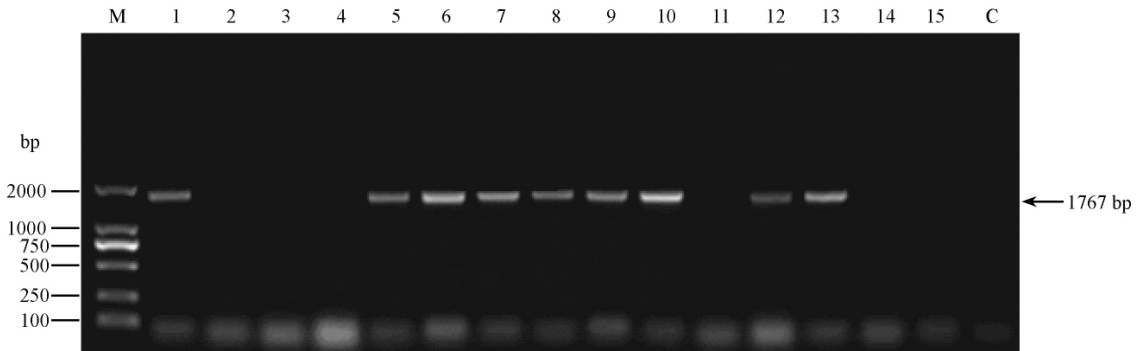


图 5. PCV2 NY 株攻毒后小鼠组织中 PCV2 全基因组的 PCR 检测结果

Figure 5. PCR results of PCV2 genome from tissues of mice after challenged by PCV2 NY isolate. M, Marker; lane 1 - 5, group of PGO recombinant virus; lane 6 - 10, group of DMEM culture solution; lane 11 - 15, group of inactivated vaccine of PCV2; C, Negative control.

重组病毒 PGO 免疫组中均有 2 只小鼠能扩增出 PCV2 全基因组 (1767 bp), 每组剩余的 3 只结果均阴性, 表明该重组病毒能够有效抵抗 PCV2 强毒的攻击。

3 结论和讨论

伪狂犬病病毒作为重组病毒疫苗载体, 已成功地用于多种病原保护性抗原的表达。近年来进行表达外源基因的重组伪狂犬病病毒的构建时, 主要是将重组 PRV 转移质粒与 PRV 弱毒疫苗株基因组共转染细胞, 进行同源重组, 从而获得重组伪狂犬病病毒, 如: 猪细小病毒的 VP2 基因^[6-7]、乙脑病毒的 NSI 基因^[8]、猪瘟病毒的 E2 基因^[9]、犬瘟热 H 基

因^[10]、弓形虫 SAG1 和 MIC3 基因^[11]、口蹄疫病毒 P12A 和 3C 基因^[12]等重组伪狂犬病病毒的研究, 都是以 PRV Bartha-k61 株等作为弱毒亲本株进行转染。本试验使用 PRV TK⁻/gG⁻/gE⁻三基因缺失疫苗 HB98 株作为重组伪狂犬病病毒的亲本毒, 目前该 PRV 基因缺失标志疫苗的推广应用已经非常成功且对 PRV 的根除计划具有重要作用。PRV HB98 株与国外弱毒疫苗 Bartha-k61 株相比, 该疫苗病毒分离于国内故其遗传背景更加清楚, 又因缺失了主要毒力基因 TK, 故减少了毒力返强的风险, 因此 PRV HB98 株更适合作为重组伪狂犬病病毒的亲本毒, 用于表达 PCV2 ORF2 基因以进行 PCV2 相关疾病的免疫预防。

在重组病毒 PGO 株、PCV2 灭活苗和 DMEM 培

养液免疫小鼠试验中,在首免后第 6-9 周内,重组病毒组诱生的 ELISA 抗体水平明显高于灭活疫苗组(图 4),差异显著($P < 0.05$),而且 PGO 株在诱导外周血 T 淋巴细胞亚群数量上要优于 PCV2 灭活疫苗组免疫组(如图 3),差异显著($P < 0.05$),表明重组病毒 PGO 株比 PCV2 灭活疫苗激发更强免疫反应,这是由于重组病毒同时激发细胞免疫和体液免疫,而 PCV2 灭活疫苗缺乏细胞免疫反应,也有可能 PCV2 灭活疫苗剂量不足造成的。另外,第 5 周时灭活疫苗组抗体水平已经开始上升,而第 6 周时重组病毒免疫组抗体水平才上升,表明重组病毒诱生 ELISA 抗体较慢,需要二次免疫才能达到较好的效果。

从攻毒试验,重组病毒和灭活疫苗的保护效果没有区别(3/5),表明重组病毒具有与 PCV2 灭活疫苗相当的效力,均有效抵抗了 PCV2 强毒的攻击。重组病毒在用于疫苗生产的 ST 细胞和 IBRS-2 上增殖滴度高达 1×10^{-7} TCID₅₀ 以上,从而易于生产,且成本低,易推广;可作到“一针防两病”的目的,简化了免疫程序。此外,尽管重组猪伪狂犬病毒能够发挥 PCV2 特异性的保护作用,但是并不能发挥 100% 的保护效力,这可能与免疫剂量及免疫时机有关,也可能与 PCV2 病毒特性有关,待进一步研究。

参考文献

- [1] Yu S, Carpenter S, Opriessnig T, Halbur PG, Thacker E. Development of a reverse transcription PCR assay to detect porcine circovirus type 2 transcription as a measure of replication. *Journal Virology Methods*, 2005, 123 (1) : 109-112.
- [2] Molnar T, Glavits R, Szeredi L, Dan A. Occurrence of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2002, 50 (1) : 5-16.
- [3] Grau-Roma L, Fraile L, Segales J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Veterinary Journal*, 2011, 187 (1) : 23-32.
- [4] Aravindaram K, Kuo TY, Lan CW, Yu HH, Wang PH, Chen YS, Chen GH, Yang NS. Protective immunity against porcine circovirus 2 in mice induced by a gene-based combination vaccination. *Journal of Gene Medicine*, 2009, 11 : 288-301.
- [5] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [6] Wang X, Li W, Wu F, Wei J, Geng H, Jin Y. Expression of green fluorescent protein gene deletion mutant of the pseudorabies virus construction. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2009, 36 (1) : 41-44. (in Chinese)
王鑫, 李文刚, 吴凤笋, 魏娟, 耿红娟, 靳永健. 表达绿色荧光蛋白的伪狂犬基因缺失病毒的构建. *中国畜牧兽医*, 2009, 36 (1) : 41-44.
- [7] Chen Y, Guo W, Xu Z, Yan Q, Luo Y, Shi Q, Chen D, Zhu L, Wang X. A novel recombinant pseudorabies virus expressing parvovirus VP2 gene: Immunogenicity and protective efficacy in swine. *Virology Journal*, 2011, 8 : 307.
- [8] Xu G, Xu X, Li Z, He Q, Wu B, Sun S, Chen H. Construction of recombinant pseudorabies virus expressing NS1 protein of Japanese encephalitis (SA14-14-2) virus and its safety and immunogenicity. *Vaccine*, 2004, 22 (15-16) : 1846-53.
- [9] Fan W, Zhang X, Wei R, Zhao H, Chen P. Construction of TK gene-deleted PRV Bartha-K₆₁ strain transfer vector containing EGFP and CSFV-E2. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2003, 39 (3) : 3-7. (in Chinese)
范伟兴, 张雪莲, 魏荣, 赵宏坤, 陈溥言. 含绿色荧光蛋白基因和猪瘟 E2 基因的伪狂犬病毒 Bartha-K61 株 TK 基因缺失转移载体的构建. *中国兽医杂志*, 2003, 39 (3) : 3-7.
- [10] Li Y, Sun C, Han N, Wang Y, Hu R. Construction of recombinant pseudorabies virus expressing canine distemper virus H gene and analysis on its biological characters. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2011, 39 (24) : 14899-14901. (in Chinese)
李业伟, 孙程龙, 韩乃君, 王颖, 扈荣良. 表达犬瘟热 H 基因重组伪狂犬病毒的构建及生物学特性研究. *安徽农业科学*, 2011, 39 (24) : 14899-14901.
- [11] Nie H, Fang R, Xiong BQ, Wang LX, Hu M, Zhou YQ, Zhao JL. Immunogenicity and protective efficacy of two recombinant pseudorabies viruses expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 and MIC3 proteins. *Veterinary Parasitology*, 2011, 181 (2-4) : 215-221.
- [12] Zhang K, Huang J, Wang Q, He Y, Xu Z, Xiang M, Wu B, Chen H. Recombinant pseudorabies virus expressing P12A and 3C of FMDV can partially protect piglets against FMDV challenge. *Research in Veterinary Science*, 2011, 91 (1) : 90-94.

Immune efficacy in mice by recombinant pseudorabies virus PGO expressing ORF2 gene of porcine circovirus type 2

Anjun Chao^{1,2}, Pengfei Fu¹, Xiaoqing Guo¹, Xiaoyun Gao¹, Baoan Cui¹,
Hongying Chen^{1*}

¹College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

²Henan Zhengda Livestock Co., Ltd., Xinxiang 453003, Henan Province, China

Abstract: [Objective] We developed a recombinant pseudorabies virus (PRV) vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2). [Methods] PCV2 ORF2 gene was inserted into vector pG to produce the recombinant PRV vector pGO; the genome of PRV attenuated vaccine and the transfer plasmid pGO were transfected by using Lipofectamine™ 2000 Reagent into swine testis cells for homologous recombination to obtain the recombinant PRV. Six-week-old female Kunming mice were immunized two intramuscular immunizations 4 weeks apart, and then challenged with the virulent PCV2 NY strain at 8 weeks after the first immunization. [Results] A recombinant PRV expressing PCV2 ORF2 was successfully constructed, and named PGO. There was a low ELISA antibody level of PCV2-specific humoral immune response elicited by recombinant virus PGO for the first immunization but high significantly for the second immunization. PCV2 antigen-specific T-cell proliferative responses can be elicited by immunization with recombinant virus. Challenge experiments show that the recombinant virus and PCV2 inactivated vaccine could both protect the mice against PCV2 challenge, suggesting that the recombinant virus can be an excellent potential vaccine. [Conclusion] The results show the recombinant PRV expressing PCV2 ORF2 had good immunogenicity.

Keywords: porcine circovirus type 2, ORF2 gene, pseudorabies virus, recombinant virus, immune efficacy

(本文责编: 张晓丽)