

PCV2 Rep 基因启动子区 ν ISRE 突变株的生物学特性

顾金燕, 曹瑞兵*, 张羽, 陈溥言

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095)

摘要 【目的】为了初步揭示 PCV2 Rep 基因启动子区类干扰素刺激反应元件(ν ISRE)的生物学功能。【方法】应用感染性克隆技术构建了 2 株 ν ISRE 点突变的重组 PCV2, 对突变病毒在 PK15 细胞上的增殖特性、遗传稳定性及对干扰素刺激的反应特性进行了分析。【结果】Rep 基因启动子区 ν ISRE 点突变后 PCV2 仍可在 PK15 细胞中正常复制, 但病毒滴度比亲本毒株下降。PCV2 1740^{G-C} 在 PK15 细胞上 3 至 10 代之间遗传稳定, PCV2 1741^{A-T} 在 PK 细胞上第 3 代病毒保持突变基因的特征, 但传至第 7 代时 1743 和 1744 位的 AC 突变为 TT, 并一直保持到第 10 代。100 U/mL 的 PoIFN- α 处理感染病毒的 PK15 细胞后, 亲本毒株和 2 个突变毒株的阳性感染细胞数量均有增加, 但亲本毒株病毒粒子数的增加显著高于 2 个突变毒株。【结论】Rep 基因启动子区 ν ISRE 的突变影响 PCV2 在 PK15 上的增殖和对干扰素刺激的反应, 推测其可能在干扰素促进病毒增殖中发挥调控作用。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; Rep 基因启动子; 干扰素刺激反应元件; 基因突变

中图分类号: Q392 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)09-1217-06

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)是一种无囊膜的单股环状负链 DNA 病毒, 病毒粒子直径约为 17 nm ~ 20 nm, 属于圆环病毒科, PCV 根据基因组和抗原性的不同分为 PCV1 和 PCV2^[1]。PCV1 对猪没有致病性, PCV2 是断奶仔猪多系统衰竭综合征(post wean multi-system wasting syndrome, PWMS)的主要病原, 可以引起断奶仔猪发生衰竭、死亡, PCV2 的感染还可以造成猪的免疫抑制, 引起其他各种病原的继发感染^[2]。目前, PCV2 已经成为严重危害我国养猪业发展的主要病原之一^[3-4]。

PCV2 基因组为 1767 nt 或 1768 nt, 被鉴定具有明确功能的病毒蛋白有 3 种, ORF1 编码的复制酶 Rep 和 Rep', 两者形成复合体参与病毒基因组的复制; ORF2 编码的衣壳蛋白 Cap; PCV2 ORF3 编码的促细胞凋亡蛋白。PCV 不编码 DNA 聚合酶, 主要依赖细

胞有丝分裂 S 期表达的蛋白和酶类进行滚环方式复制^[5]。

由于 PCV2 编码病毒蛋白数量有限, 不能像一些复杂的病毒那样改变细胞的环境以便于自生的复制。然而像 PCV2 这样相对简单的病毒能够利用其它病原感染宿主造成的有利条件进行增殖, PRRSV 或 PPV 等病原的混合感染以及一些疫苗佐剂对猪的免疫刺激都可增强 PCV2 在猪体内的增殖, 并可导致疾病的发生, 但相关作用机制目前仍不清楚。

Meerts 等^[6]研究发现用一定剂量的猪干扰素(PoIFN)处理感染 PCV2 的 PK15 细胞, 可以增加感染 PCV2 阳性细胞的数量, 促进病毒的增殖。Mankertz 等^[7]发现在 PCV1 基因组的复制起点附近 742 ~ 735 存在一个干扰素刺激反应元件(interferon stimulated response element, ISRE)基序, 其序列为

基金项目: 国家青年自然科学基金项目(30600018); 国家行业专项子课题(200803020-4)

* 通信作者。Tel: +86-25-84396028; Fax: +86-25-84396335; E-mail: erb@njau.edu.cn

作者简介: 顾金燕(1984-), 女, 江苏吴江人, 博士研究生, 主要从事动物分子病毒学与免疫学研究。

收稿日期: 2009-05-08; 修回日期: 2009-07-05

TAAAAGTGAAAGGA。由于该区与 Rep 蛋白的启动子区重叠,推测细胞因子可能会利用 ISRE 对 PCV1 的复制和转录发挥调控作用。笔者分析 PCV2 基因组序列时发现 PCV2 复制起点附近存在一个与 PCV1 方向相反的 ν ISRE, 其序列为“CTGAAAACGAAAGA”。

近年来研究发现 Epstein-Barr virus (EBV)、人乙型肝炎病毒(Human Hepatitis Virus Type B, HBV)和人类爱滋病毒 I 型(Human Immunodeficiency Virus Type 1, HIV-1)的病毒基因组启动子区中也存在类似 ISRE 的基因序列,称为 ν ISRE,这些 ν ISRE 在病毒与宿主的免疫系统相互作用中发挥重要的作用^[8-10]。

PCV2 能否通过基因组中的 ν ISRE 与宿主抗病毒反应或免疫应答中产生的干扰素效应分子相互作用来促进其基因转录或复制,从而增强自身的增殖?本研究应用感染性克隆技术构建了两株 ν ISRE 发生点突变的重组 PCV2,分析其在易感细胞上对 IFN 处理的应答反应特征,初步确定 PCV2 基因组中 ν ISRE 的生物学功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞和菌株 猪圆环病毒灯塔株(PCV2 DT)^[11]和含该病毒全基因组的质粒载体 pUC18-PCV2^[12]、无 PCV 污染 PK15 细胞、DH5 α 感受态大肠杆菌、均为本实验室保存。酵母表达的猪 α 干扰素为本实验室研制,经 MDBK-VSV 系统的微量病变抑制法测定其抗病毒活性为 1.0×10^6 U/mL。

1.1.2 工具酶和生化试剂 :LA Taq 酶、SYBR Premix Ex TaqTM、pMD-18-T、T₄ DNA 连接酶和 EcoR I 等限制性内切酶以及 DNA 胶回收试剂盒购自 TaKaRa 生物工程(大连)公司;转染脂质体 TransfastTM 为 promega 公司产品;UNI-Q-10 柱式病毒 DNA 提取试剂盒购自上海生工生物公司;HRP 标记羊抗猪 IgG 为 KPL 公司产品;1640 培养液、胎牛血清为 invitrogen 公司产品;IPMA 试验中的 AEC 试剂为 Sigma 公司产品,其余试剂均为分析纯。

1.2 引物设计

根据 PCV2 灯塔株的基因组序列和 pUC18 载体的序列设计引物(表 1)。P1 与 P2 用于 PCV2 全基因组序列的扩增;P3、P4、P5 和 P6 用于将 PCV2 ν ISRE “CTGAAAACGAAAGA”突变为“CTCAAAAACGAAAGA”(*C* 为点突变碱基);P3、P6、P7 和 P8 用于将 PCV2 ν ISRE “CTGAAAACGAAAGA”突变为

“CTGTAAACGAAAGA”(T 为点突变碱基)。

表 1 PCV2 基因扩增和突变引物

Table 1 Primers for PCV2 genome amplification and mutation

Primer name	Primer sequence (5'→3')
P1	GCGAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTTC
P2	ATGAATTCTGGCCCTGCTGCC
P3	ACTGAGAGTGCACCATATGC
P4	TCTTTTCGTTT C AGGTATGAC
P5	CTTGATACGTCATACCT C AAA
P6	CACCCCAGGCTTTACACTT
P7	TTTCGTTT A CAGGTATGACGTA
P8	TTGATACGTCATACCTG T AAAC

The bold italics letter represents the designed mutant.

1.3 PCV2 基因突变重组病毒的构建

应用上述引物通过重组 PCR 方法获得点突变的病毒基因组,用 EcoR I 将突变的 PCV2 基因组从扩增片段上切下回收,用 T₄ DNA 连接酶将其环化,纯化后应用 TransfastTM 转染 PCV 阴性 PK15 细胞。盲传 3 代后应用 IPMA 检测病毒。扩增重组 PCV2 含 ν ISRE 的基因片段,双向测序,由 Invitrogen 公司完成。

1.4 病毒滴度的测定

用无血清 RMPI-1640 10 倍比稀释 PCV2 样品,分别接种于刚贴壁的 PK15 细胞,每个稀释度接种 8 个孔(100 μ L/孔),同时设立阴性对照,放入 5% CO₂ 温箱中 37 $^{\circ}$ C 继续培养 48 h。参照文献[13]应用 IPMA 检测 PCV2 阳性细胞,一抗为 50 倍稀释的猪源抗 PCV2 阳性血清,二抗为 1000 倍稀释的 HRP 标记羊抗猪 IgG。按 Reed-Muench 法计算病毒 TCID₅₀。试验重复 3 次。

1.5 定量 PCR 检测 PCV2

参照文献[14],合成检测引物:PCV2-QF2:5'-CTTGTTGGAGAGCGGGAGTC-3'; PCV2-QR2:5'-ATTAGTCTTCCAATCACGCTTCTG-3',应用 SYBR 染料相对法定量检测样品中 PCV2 的数量。反应条件为 95 $^{\circ}$ C、30 s;95 $^{\circ}$ C、5 s,55 $^{\circ}$ C、10 s,72 $^{\circ}$ C、31 s,40 个循环,加一个溶解曲线分析程序。

1.6 突变病毒的全基因组测序

应用 UNI-Q-10 柱式病毒 DNA 提取试剂盒提取第 3、7 和 10 代的突变病毒的基因组,用引物 P1 和 P2 扩增 PCV2 全基因,克隆到 pMD-18-T,送上海 Invitrogen 公司测序。

1.7 猪 α 干扰素(PoIFN- α)处理感染 PCV2 的 PK15 细胞

分别在 PCV2 DT(MOI=0.1)接种于 PK15 细胞后 1 h、6 h 和 12 h 用终浓度为 0、10、100 和 1000 U/mL

的 PoIFN- α 处理,每个处理 6 个重复。48 h 后,用 IPMA 方法鉴定,统计病毒阳性细胞数,分析 PoIFN- α 的最佳作用时间和浓度。

按常规方法将 PCV2 DT、PCV2 1740^{G-C} 和 PCV2 1741^{A-T} 用无血清 RPMI-1640 10 倍稀释后分别以 100 μ L/孔(96 孔细胞板)接种于长成 50% 丰度的 PCV 阴性 PK15 细胞,每个处理 6 个重复。置 5% CO₂ 温箱中培养 6 h 后用 100 U/mL 的 PoIFN- α 作用,继续培养 48 h。测定各重组 PCV2 感染的 PK15 细胞阳性细胞数和病毒基因拷贝数,分析 PCV2 ν ISRE 突

变前后对干扰素刺激应答的特性。试验重复 3 次。

2 结果

2.1 PCV2 ν ISRE 突变株的鉴定

体外环化的 PCV2 DT、PCV2 1740^{G-C} 和 PCV2 1741^{A-T} 基因组转染 PK15 细胞并盲传 3 代后,IPMA 检测发现均产生 PCV2 抗原阳性细胞(图 1)。PCR 扩增病毒基因的测序结果表明,3 株病毒分别均具有转染基因组的序列特征,获得重组病毒 PCV2 DT、PCV2 1740^{G-C} 和 PCV2 1741^{A-T}。

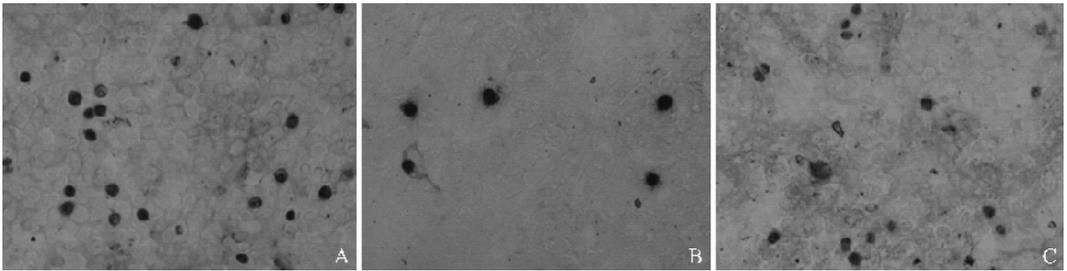


图 1 IPMA 鉴定 PCV2 ν ISRE 突变株

Fig.1 PCV2 ν ISRE mutant strains identified by IPMA. A: PCV2 DT; B: PCV2 DT 1740^{G-C}; C: PCV2 DT 1741^{A-T}.

2.2 重组 PCV2 在 PK15 细胞中的遗传稳定性

重组 PCV2 在 PK15 细胞上的第 3 代和第 10 代病毒基因组序列分析显示:PCV2 DT 和 PCV2 1740^{G-C} 在 PK 细胞上 3 至 10 代之间遗传稳定,PCV2 1741^{A-T} 在 PK 细胞上第 3 代病毒保持突变基因的特征,但传至第 7 代时 1743 和 1744 位的 AC 突变为 TT,并一直保持到第 10 代。

2.3 重组 PCV2 在 PK15 细胞的增殖特性

与亲本毒株 PCV2 DT 相比 2 个 PCV2 ν ISRE 突变株的在 PK15 细胞上的生长滴度均有下降(图 2)。PCV2

1740^{G-C} 和 PCV2 1741^{A-T} 在细胞上 7~10 代次的病毒滴度略有升高,但差异不显著。PCV2 DT 的滴度约为 10^{4.5} TCID₅₀/mL, PCV2 1740^{G-C} 的滴度约为 10³ TCID₅₀/mL, PCV2 1741^{A-T} 的滴度约为 10⁴ TCID₅₀/mL。

2.4 PoIFN- α 促进 PCV2 DT 在 PK15 细胞中增殖的合适作用时间与剂量

实验结果(图 3)显示:PoIFN- α 对 PCV2 在 PK15 细胞中增殖的影响具有剂量和时间效应关系;与空白对照相比,10、100 U/mL 的 PoIFN- α 处理接种 PCV2 的 PK15 细胞能促进 PCV2 的增殖,以 100 U/mL 的

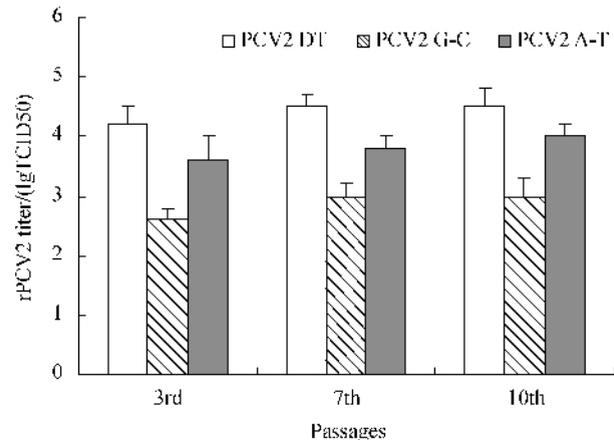


图 2 PCV2 DT 及 ν ISRE 突变株在 PK15 细胞中的生长滴度

Fig.2 Virus titers of PCV2 DT and ν ISRE mutant strains in PK15 cells.

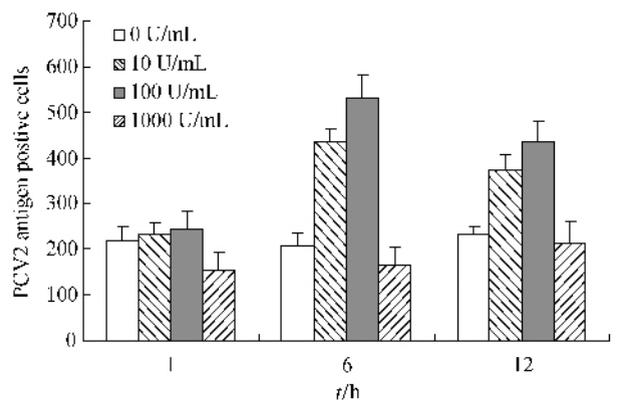


图 3 PoIFN- α 对 PCV2 DT 接种 PK15 细胞后增殖的影响

Fig.3 Effect of PoIFN- α treatment after virus inoculation on the replication of PCV2 DT in PK15 cells.

PoIFN- α 增强效果更为显著;而1000 U/mL的 PoIFN- α 对 PCV2 在 PK15 细胞中的增殖则具有抑制作用。从处理时间来看,PCV2 接种于 PK15 细胞后 6 h 加 100 U/mL 的 PoIFN- α 促进效果最佳。

2.5 PoIFN- α 对 PCV2 DT 及 vISRE 突变株在

PK15 细胞上增殖的影响

IPMA 检测结果(图 4)显示 接种第 10 代 PCV2 DT、PCV2 1741^{A-T} 和 PCV2 1740^{G-C} 的 PK15 细胞在用 100 U/mL 的 PoIFN- α 处理后均有 PCV2 抗原阳性细胞数量的增多 但 PCV2 DT 抗原阳性细胞增多最为显著。

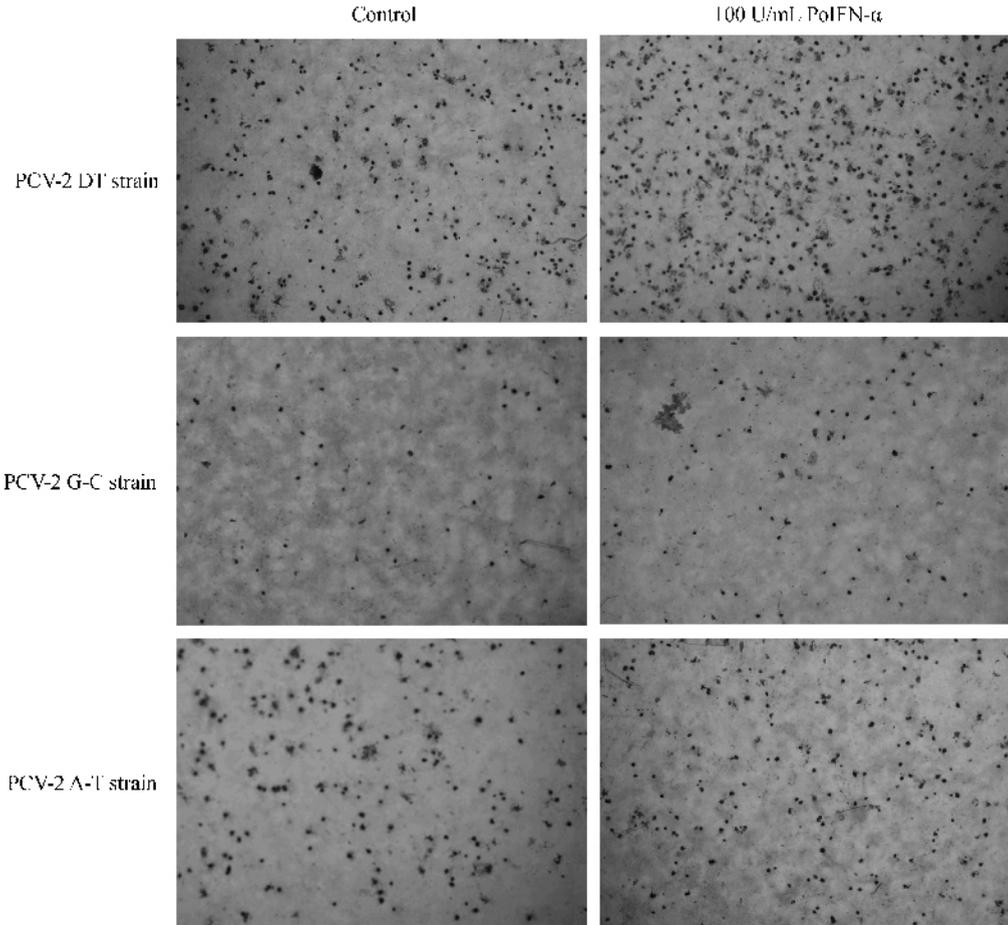


图 4 IPMA 检测 PoIFN- α 对重组 PCV2 在 PK15 细胞中增殖的影响

Fig. 4 Effects of PoIFN- α on the replication of rPCV2 in PK15 cells identified by IPMA.

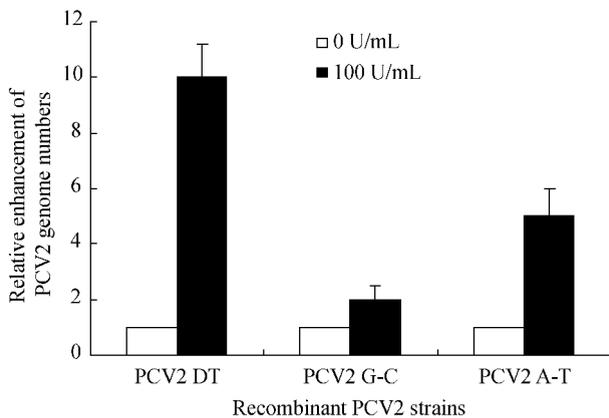


图 5 Real-time PCR 检测 PoIFN- α 对重组 PCV2 在 PK15 细胞中增殖的影响

Fig. 5 The effects of PoIFN- α on the replication of rPCV2 in PK15 cells detected by Real-time PCR.

定量 PCR 结果(图 5)显示:PCV2 DT、PCV2 1740^{G-C} 和 PCV2 1741^{A-T} 接种 PK15 细胞后 6 h 用 100 U/mL 的 PoIFN- α 处理,病毒增殖数量均有提高。PCV2 DT 的增幅最为显著,病毒基因数量约为未处理对照组的 10 倍,PCV2 1741^{A-T} 提高约 5 倍,PCV2 1740^{G-C} 提高约 2 倍。

3 讨论

PCV2 是近年来新发现的一种重要的猪病原,在我国的临床生产上猪群 PCV2 感染率普遍很高,但发病率相差较大。猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪细小病毒(PPV)等病原的混合感染以及疫苗免疫的刺激均可促进 PCV2 感染猪的发病。

PCV2 感染猪是否表现出临床症状或产生典型的病理变化与感染猪血液中 PCV2 病毒的滴度有密切的相关性。

Meerts 等^[6]研究发现猪 α 、 γ 干扰素可以促进感染 PCV2 的 PK15 细胞中的病毒产量,并证实 IFN- γ 处理细胞后通过改善病毒的内化作用可以提高 PCV2 感染细胞的能力,这是至今为止发现的干扰素促进病毒增殖的第一例。本研究发现 PoIFN- α 对 PCV2 在细胞中增殖的影响具有剂量依赖性和时效性,高浓度的 PoIFN- α (1000 U/mL)对 PCV2 在 PK15 细胞中的增殖具有明显的抑制作用,低剂量的 PoIFN- α (10 U/mL、100 U/mL)可显著增强感染 PCV2 的 PK15 细胞中病毒的增殖,而且在病毒接种细胞后 6h 再用干扰素刺激增强效果最为明显。

本研究还发现 100 U/mL PoIFN- α 处理 PCV2 感染细胞后抗原阳性细胞增多了 2 倍,但病毒基因拷贝数却增加了近 10 倍,可见 PoIFN- α 还能促进单个阳性细胞中 PCV2 增殖的数量。

PCV2 基因组主要依赖细胞有丝分裂 S 期表达的蛋白和酶类进行滚环方式复制。Rep 和 Rep' 蛋白与病毒基因组的复制子结合,启动病毒的复制,是复制过程中必不可少的。Steinfeldt 等^[15]进一步研究发现,Rep 和 Rep' 蛋白还参与了病毒基因组的剪切与病毒复制的终止过程。申会刚等^[16]对 PCV2-Rep 蛋白在 PK15 细胞中的表达特性进行研究,将 pCI-neo-Rep 重组载体转染细胞后 48 h 可检测 Rep 的转录与表达,在表达量低的细胞中,PCV2 Rep 蛋白主要位于 PK15 的细胞浆,在表达量高的细胞中,细胞浆和细胞核中均含有大量的 Rep 蛋白。可见 PCV2 Rep 蛋白在细胞中的分布与其表达量有一定联系,而 Rep 蛋白分布到细胞核是启动 PCV2 复制所必需的,因此推测细胞中 Rep 蛋白的表达量可能影响病毒的增殖效率。

本研究分析 PCV2 Rep 基因启动子发现 pRep 不存在典型真核启动子所具有 TATA 和 CAAT 元件,却密集分布了 3~5 个转录因子 SP1 的结合位点“GGCGGG”和一个类干扰素刺激反应元件(ν ISRE)“CTGAAAACGAAAGA”。本研究应用 PCV2 感染性克隆技术构建了 2 株 ν ISRE 区点突变的重组 PCV2。试验发现 PCV2 的 Rep 基因启动子区 ν ISRE 点突变后在 PK 细胞上的增殖滴度降低,PCV2 1740^{G-C} 降低 1.5 个滴度,而 PCV2 1741^{A-T} 降低了 0.5 个滴度,并且 PCV2 1741^{A-T} 的遗传稳定性差,在 PK15 细胞上传至第 7 代时 1743 和 1744 位的 AC 突变为 TT。可见

ν ISRE 并非 PCV2 存活所必需,但也显著影响了病毒在 PK 细胞上的增殖。为了进一步探索 PCV2 Rep 基因启动子存在 ν ISRE 基序是否具有 ISRE 的功能活性,本研究将 PCV2 DT、PCV2 1740^{G-C} 和 PCV2 1741^{A-T} 接种 PK15 细胞后 6 h 用 100 U/mL 的 PoIFN- α 处理,结果发现 PoIFN- α 对 ν ISRE 突变毒的增强效果明显低于亲本毒株,PCV2 1740^{G-C} 尤为明显。

分析上述实验结果表明:PCV2 Rep 基因启动子存在的顺式作用元件 ν ISRE 可能是宿主免疫分子调节病毒增殖的作用靶点。因此干扰素促进 PCV2 在细胞中的增殖可能存在多个机制:一方面促进病毒的内化;另一方面,PCV2 Rep 基因启动子区存在的 ν ISRE 可被干扰素诱导的信号分子作用,从而促进病毒增殖。这就解释了为什么感染 PCV2 的仔猪免疫激活后反而加速了疾病的发生。

参考文献

- [1] Allan GM, Ellis, et al. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2000, 12(1), 3-14.
- [2] Chae C. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *The Veterinary Journal*, 168, 41-49.
- [3] 王忠田, 郭鑫, 杨汉春, 等. 六株猪圆环病毒 2 型国内分离株的全基因组序列测定与分析. *农业生物技术学报 (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 2005, 13(1): 56-60.
- [4] 王先炜, 姜平, 韦显凯, 等. 免疫刺激商品断奶仔猪复制多系统衰竭综合征 (PMWS). *畜牧兽医学报 (Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica)*, 2008, 39(1): 66-7.
- [5] Mankertz A, Caliskan R, et al. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Veterinary Microbiology*, 98 (2004) 81-88.
- [6] Meerts P, Misinzo G, Hans J. Enhancement of Porcine Circovirus 2 Replication in Porcine Cell Lines by IFN- α Before and After Treatment and by IFN- α After Treatment. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2005, 25: 684-693.
- [7] Mankertz A, Hillenbrand, et al. Analyses of transcription of Porcine circovirus type 1. *Journal of General Virology*, 2003, 83: 2743-2751.
- [8] Flavio F. Alcantara, Hong Tang, Alan Melachlan. Functional characterization of the interferon regulatory element in the enhancer 1 region of the hepatitis B virus genome. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(9): 2068-2075.

- [9] Chen Liang , Xuguang Li , Yudong Qian , et al. Wainberg Sequence Elements Downstream of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Long Terminal Repeat are Required for Efficient Viral Gene Transcription. *Journal of Molecular Biology* , (1997) 272 , 167 – 177 .
- [10] Giulia Marsili , Alessandra Borsetti , Marco Sgarbanti , et al . On the Role of Interferon Regulatory Factors in HIV-1 Replication. *Annals New York Academy of Sciences* , 2003 , 1010 : 29 – 42 .
- [11] 芦银华 , 华修国 , 陈德胜 , 等 . 猪圆环病毒 2 型分离毒株全基因组的克隆及序列分析 . 病毒学报 (*Chinese Journal of Virology*) 2003 , 19(1) : 42 – 46 .
- [12] 芦银华 , 华修国 , 崔立 , 等 . 感染性猪圆环病毒 2 型基因组 DNA 的分子克隆 . 中国病毒学 (*Virologica Sinica*) , 2003 , 18(4) : 371 – 375 .
- [13] Meerts P , Misinzo G , McNeilly F , et al. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells , fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch. Virol* , 2005 , 150 : 427 – 441 .
- [14] 王小武 , 符芳 , 柴政 , 等 . PRRSV 和 PCV-2 以及 PRV 多重 SYBR Green- I 实时荧光 PCR 检测方法的建立 . 中国兽医科学 (*Veterinary Science in China*) 2008 , 38(06) : 494 – 499 .
- [15] Steinfeldt T , Finsterbuseh T , Mankertz A . Demonstration of nicking/joining activity at the origin of DNA replication associated with the rep and rep' Proteins of Porcine circovirus type 1. *The Journal of Virology* , 2006 , 80(13) : 6225 – 6234 .
- [16] 申会刚 , 周继勇 , 陈庆新 , 等 . 猪圆环病毒 II 型 Rep 基因在 PK15 细胞中的表达及特性 . 中国兽医学报 (*Chinese Journal of Veterinary Science*) 2005 , 25(5) : 244 – 246 .

Biological character of porcine circovirus type 2 with site mutation at interferon stimulation reaction element (ISRE) like region in Rep gene promoter

Jinyan Gu , Ruibing Cao* , Yu Zhang , Puyan Chen

(Key laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology , Ministry of Agriculture , Nanjing Agriculture University , Nanjing 210095 , China)

Abstract [Objective] To explore the biological function of the interferon stimulation reaction element (ISRE) like motif CTGAAAACGAAAGA within porcine circovirus type 2 (PCV2) Rep promoter. [Methods] Two recombinant PCV2 strains , namely PCV2 1740^{G-C} and PCV2 1741^{A-T} , were constructed by transfecting PK15 cells with site-mutated infectious clone of PCV2 strain Denta . Replication character , genetic stability and reactive character to porcine interferon alpha ($\text{poIFN-}\alpha$) were compared among parental PCV2 and the two mutant viruses. [Results] The ISRE like motif in Rep promoter was not necessary for the replication of PCV2 because two site-mutated viral genome clones both produced infectious virus . In contrast to parental PCV2 , the viral antigen positive PK15 cells of the two site-mutated PCV2 were decreased . PCV2 1740^{G-C} was genetically stable in the PK15 cell while PCV2 1741^{A-T} was found to have another two nucleotide mutated from 1744AC1745 to 1744TT1745 between 3th and 7th passage in the PK15 cell . After treated with 100 U/mL porcine interferon alpha , the viral antigen positive PK15 cells and virus genomes of parental PCV2 and two site-mutated viruses were both increased . But the enhancement rate of the two site-mutated PCV2 was significantly lower than parental PCV2. [Conclusion] Site-mutation of ISRE like motif in Rep promoter decreased the replication and $\text{poIFN-}\alpha$ induced enhancement of PCV2 in PK15 cells . According to these above results , it maybe speculated that ISRE like motif in PCV2 Rep gene promoter contain a functional element and it may contribute to the interferon inducible enhancement of virus replication in PK15 cells .

Keywords : PCV2 ; Rep gene promoter ; interferon stimulation reaction element ; gene mutation

(本文责编 : 张晓丽)

Supported by the Grants from National Natural Science Foundation (30600018) and National Public Agricultural industry-specific foundation (200803020-4) .

* Corresponding author . Tel : + 86-25-84396028 ; E-mail : crb@njau.edu.cn

Received : 8 May 2009 / Revised : 5 July 2009