

嵌合型猪圆环病毒 1-2 型感染性 DNA 克隆的构建 及其对小鼠的免疫原性

宋益, 朱丽娜, 高崧*, 刘秀梵

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009)

摘要:【目的】本研究旨在构建嵌合型猪圆环病毒 1-2 型感染性 DNA 克隆。【方法】利用 PCR 技术扩增 PCV2 ORF2, 克隆入缺失 PCV1 ORF2 的 pSK-PCV1 Δ ORF2 中, 得到 pSK-sPCV1-2。该重组质粒中包含嵌合型 PCV1-2 全基因组, 通过不完全酶切的方法, 将嵌合型 PCV1-2 全基因组串联入 pSK 载体中, 得到含串联双拷贝的嵌合型 PCV1-2 感染性 DNA 克隆。【结果】经序列测定, 获得含串联双拷贝的嵌合型 PCV1-2 感染性 DNA 克隆。PCV1-2 嵌合病毒接种 BALB/c 小鼠, 用间接 ELISA 方法对接种后 7、14、21、28、35、42 d 的小鼠进行血清抗体检测。结果显示从接种后 14 d 开始, 即有部分小鼠产生了针对 PCV2 Cap 蛋白的特异性抗体; 至接种后 42 d, 几乎全部接种小鼠的血清均呈阳性。【结论】构建了 PCV1-2 型感染性 DNA 克隆, 该嵌合病毒能够激发机体产生体液免疫应答。

关键词: PCV1; PCV2; ORF2 基因; 嵌合型 DNA 克隆

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 09-1234-07

猪圆环病毒 1 型 (porcine circovirus type 1, PCV1) 无致病性, 广泛存在于猪群中^[1]; 猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2, PCV2) 是引起断奶仔猪多系统衰竭综合征 (post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 等相关疾病的重要病原^[2]。猪圆环病毒 ORF2 基因编码病毒的主要结构蛋白 Cap 蛋白, 该蛋白具有良好的免疫原性。PCV1 和 PCV2 ORF2 基因序列的核苷酸同源率为 67%。两种血清型 PCV 的 Cap 蛋白上存在共同的抗原决定簇, 但两者没有抗原交叉性, 因而是区分 PCV1 和 PCV2 的重要蛋白^[3]。

除 PMWS 外, 通过病例的回顾性和前瞻性调查, PCV2 还可能与下列疾病有关: 猪呼吸道复合症 (porcine respiratory disease complex, PRDC), 猪皮炎和肾病综合症 (porcine dermatopathy and neph-

ropathy syndrome, PDNS), 繁殖障碍, 肉芽肿性肠炎 (granulomatous enteritis), 渗出性表皮皮炎及肝炎^[4~7]。PCV2 可引起免疫抑制, 并常与其他病原体混合感染。如在 PRDC 病例中, PCV2、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 和猪肺炎支原体 (Mycoplasma hyopneumoniae) 最常被分离到^[8]。因此, PCV2 给养猪业带来了严重的经济损失。仅 PRDC 的发病率即可达 30%~70%, 死亡率可达 4%~6%^[9]。

1991 年, PMWS 首先发生于加拿大, 随后, 美国、欧洲和亚洲的许多国家纷纷报道了 PMWS 的发生和流行。在我国, 2000 年通过血清学调查证实了北京、河北、天津、江苏、上海等地的猪群中存在 PCV2 感染抗体, 2001 年与 PCV2 感染相关的 PMWS 开始在南方地区流行, 2002 年全国各地规模

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20041117005); 江苏省农业三项工程项目[SX(2007)080]

*通讯作者: Tel: +86-514-87991448; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

作者简介: 宋益(1979-), 女, 江苏省常熟人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病防治研究。E-mail: jszhulina@163.com

收稿日期: 2008-01-02; 修回日期: 2008-06-03

化猪场暴发 PMWS, 给我国养猪业造成了相当大的损失^[10]。

对 PCV2 感染的对策主要依靠加强饲养管理和控制混合感染^[11], 但这些措施并非在所有情况下都有效。因此, 有必要开展针对 PCV2 感染疫苗的研究。有些疫苗研究已在鼠或猪体进行了实验室试验, 如 PCV2 灭活苗^[12], ORF2 亚单位苗^[13], DNA 疫苗^[13], 表达 ORF1-ORF2 的伪狂犬病病毒载体疫苗^[14], 表达 ORF2 的腺病毒载体疫苗^[15], 以及活的或灭活的致弱 PCV2-1 嵌合体疫苗^[12, 16]。本文旨在以我国自行分离的 PCV1、PCV2 为材料, 构建 PCV1-2 嵌合体病毒, 并在小鼠体内测定其免疫原性, 为研制控制 PCV2 感染的基因工程疫苗奠定基础。通过序列比较, 本文中的 PCV2 ORF2 与 Fenaux 使用的 PCV2 ORF2 有着 52 个碱基的不同, 推导氨基酸有 15 个不同, PCV1 与 Fenaux 使用的 PCV1 有着 9 个碱基的不同, 推导氨基酸有 6 个不同^[16]。本文通过细胞感染试验证明, PCV1-2 嵌合体病毒对 Dulac 细胞和 PK-15 细胞均具感染性, 类似嵌合体病毒只在 PK-15 细胞上具有感染性的报道^[16], 其对 Dulac 细胞的感染性则未见报道。这一结果为无 PCV1 污染的 Dulac 细胞作为 PCV1-2 嵌合体疫苗的复制细胞提供了依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞和血清: PCV2 XSC 株由南京农业大学陈溥言教授馈赠; PCV1nanjing 株、Dulac 细胞和 PK-15 细胞由本实验室保存; 猪源 PCV2 阳性血清由浙江大学周继勇教授惠赠。

1.1.2 实验动物: BALB/c 小鼠, 规格为清洁级, 购自扬州大学比较医学中心。

1.1.3 主要试剂: 猪圆环病毒 2 型抗体酶联免疫检测试剂盒, 由浙江大学周继勇教授惠赠; 限制性内切酶 *Kpn* (Lot#252361)、IPTG、X-gal 购自美国 Promega 公司; 限制性内切酶 *Nar* (Lot:31)、*Psi* (Lot:12) 和 *Acl* (Lot:42) 购自 New England BioLabs 公司; 限制性内切酶 *Hpa* (Lot:20100341) 购自华美生物工程有限公司; 限制性内切酶 *Sac* (Lot CK1063A) 购自 TaKaRa 公司; 小牛肠碱性磷酸酶 (Lot#252741) 购自美国 Promega 公司; pBluescript SK 质粒载体由本实验室保存; 其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 嵌合型 PCV1-2 DNA 克隆的构建策略

嵌合型 PCV1-2 DNA 克隆的构建策略见图 1。

1.3 重组质粒 pSK-PCV1 的构建

根据 GeneBank 中 PCV1 (AY219836) 的基因序列, 设计一对含特异酶切位点 (*Kpn*) 的引物: P_1 : 5'-T-TTGGTACCCGAAGGCCGATT-3', P_2 : 5'-ATTGGTACCTCCGTGGATTGTTCT-3'。PCR 反应程序为 95 °C 10 min; 94 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 2 min, 25 个循环; 72 °C 7 min, 4 °C 保存。按常规方法对 PCR 产物进行 T 载体克隆、测序^[17], 含 PCV1 全基因组的 T 载体称为 T-PCV1, T-PCV1 重组质粒连接到 pSK 载体上, 经 *Kpn* 限制性内切酶酶切鉴定, 筛选出 pSK-PCV1 阳性重组质粒。

1.4 pCR2.1-pSK-PCV1 Δ ORF2 的构建

根据 pSK-PCV1 基因序列, 设计一对含特异酶切位点 (*Hpa*、*Nar*) 引物: P_3 : 5'-GAAGTTAACCT-AAATGAATAAAAATAAAAACCATACG-3', P_4 : 5'-GTGGCGCCTCCTTGGATACGTCATCCTATAAAAGTG-3'。PCR 反应程序为: 95 °C 9 min; 95 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 3.5 min, 25 个循环; 72 °C 10 min。PCR 回收产物连接到 pCR2.1 载体, 经 *Hpa*、*Nar* 限制性内切酶双酶切鉴定, 筛选出 pCR2.1-pSK-PCV1 Δ ORF2 阳性重组质粒。

1.5 重组质粒 pCR2.1-PCV2-ORF2 的构建

根据 GeneBank 中 PCV2 基因序列, 设计一对含特异酶切位点 (*Psi*、*Acl*) 的引物: P_5 : 5'-AGGT-TATAAGTGGTGGGGGTCTTTAAGATTAA-3', P_6 : 5'-GGAAACGTTACCGCAGAAGAAGACACC-3'。以提取的 PCV2 细胞毒 DNA 为模板, PCR 反应体系和程序同 1.3。PCR 回收产物连接到 pCR2.1 载体, 经 *Psi*、*Acl* 限制性内切酶双酶切鉴定后在上海联合基因公司测序。

1.6 pSK-sPCV1-2 重组质粒的构建

步骤 1.4 构建的 pCR2.1-pSK-PCV1 Δ ORF2 经 *Nar*、*Hpa* I 酶酶切后, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 回收纯化 pSK-PCV1 Δ ORF2 目的片段; 步骤 1.5 构建的 pCR2.1-PCV2-ORF2 经 *Psi*、*Acl* 酶酶切后, 回收纯化 PCV2 ORF2 目的片段; pSK-PCV1 Δ ORF2 与 PCV2 ORF2 连接后转化, 获得 pSK-sPCV1-2。

1.7 pSK-dPCV1-2 (即 PCV1-2) 重组质粒的构建

pSK-sPCV1-2 质粒经 *Kpn* 完全酶切, 回收其产物 1700 bp 的 PCV1 Δ ORF2-PCV2-ORF2 目的条带, 并去磷酸化; 将含有单拷贝 PCV1-2 (pSK-sPCV1-2) 重

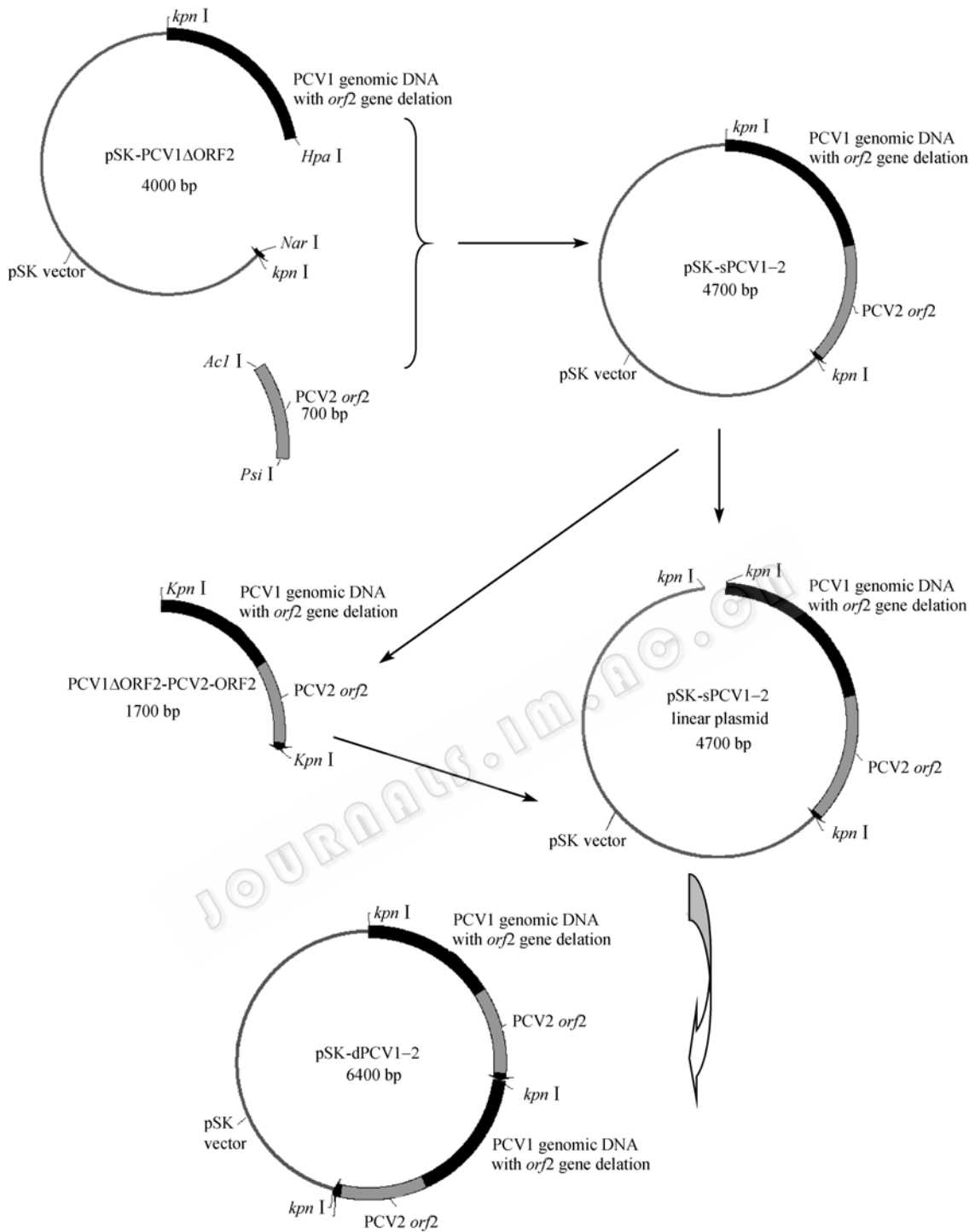


图 1 重组质粒 PCV1-2 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid.

组质粒用 *Kpn* 进行不完全酶切，酶切产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后，切下大小约为 4700 bp 的目的条带，回收纯化并去磷酸化；去磷酸化的 pSK-sPCV1-2 线性质粒与上述 PCV1ΔORF2-PCV2-ORF2 连接，得到 pSK-dPCV1-2 (即 PCV1-2) 重组质粒后测序鉴定。

1.8 嵌合型 PCV1-2 DNA 在 Dulac 细胞、PK-15 细胞中的转染

1.8.1 DNA 转染：用 QIAprep Spin Miniprep Kit 提取 pSK-dPCV1-2 重组质粒。将 $(2.5 \sim 10) \times 10^5$ 个 Dulac 细胞及 PK-15 细胞移于 Dish 中，待细胞长到 90~95% 时，进行 DNA 转染。按照转染试剂盒 (Lipofectamine

2000) 说明书进行转染。

1.8.2 PCR 检测 转染细胞进行传代, 经 5 次传代后, 参照步骤 1.5 采用 PCR 方法检测细胞中 PCV2 ORF2 基因。同时, 设正常 Dulac 细胞作为阴性对照。

1.8.3 间接免疫荧光试验: 参照文献[18]方法进行。

1.8.4 病毒 TCID₅₀ 的测定: 转染后的细胞连续盲传 5 代, 收获 1 mL 细胞悬液, 备用。Dulac 细胞分装到 96 孔板, 加入连续 10 倍稀释 (10^{-1} ~ 10^{-6} 稀释) 的病毒液 10 μ L (病毒的稀释度为 10^{-2} ~ 10^{-7}); 72 h 后弃去培养液, 以猪抗 PCV2 阳性血清及兔抗猪 IgG 荧光抗体作间接免疫荧光试验判定结果。按 Reed 与 Muench 氏法计算病毒的 TCID₅₀。

1.9 PCV1-2 嵌合病毒免疫试验

1.9.1 接种物的制备: 嵌合病毒的制备: Dulac 细胞经过脂质体转染 PCV1-2 嵌合质粒 DNA 后, 进行传代培养, 每代细胞培养 24 h 后用 300 mmol/L D-氨基葡萄糖处理 30 min, 用 10 mmol/L PBS 洗涤后换上新鲜培养液 (血清含量为 20 mL/L 的维持液) 继续培养。测定所收获病毒的 TCID₅₀。PCV1-2 灭活病毒为病毒活培养物经福尔马林灭活后, 加等体积的福氏佐剂混匀而成。PCV1、PCV2 病毒的制备: PCV1、PCV2 病毒接种 Dulac 细胞后, 同上述方法培养, 并测定病毒的 TCID₅₀。

1.9.2 动物免疫: BALB/c 小鼠分组及接种情况见表 1。

表 1 BALB/c 小鼠分组及接种情况
Table 1 The groups and immunization of BALB/c mice

Group	Number	Inoculations	Inoculation dose	Routes of inoculation
A	5	PCV1-2 virus	$10^{2.5}$ TCID ₅₀	abdominal cavity+nose
B	5	PCV1-2 inactivated virus (adjuvant)	$10^{2.5}$ TCID ₅₀	subcutaneously
C	5	PCV2 virus	$10^{2.5}$ TCID ₅₀	abdominal cavity+nose
D	5	PCV1 virus	$10^{2.5}$ TCID ₅₀	abdominal cavity+nose
E	5	/	/	/

1.9.3 血清中抗 PCV2 特异性抗体的检测: 分别于接种前和接种后 7、14、21、28、35 和 42 d 于小鼠眼眶采血, 分离血清。用 ELISA 试剂盒对血清中抗体进行检测。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物的鉴定

PCV1 全基因组和 PCV2 ORF2 基因的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 用设计的引物都成功地扩增出预期的目的条带, 其大小分别为 1760 bp 和 700 bp, 与预期的大小一致。

2.2 PCV1 全基因组的 PCR 产物克隆入 pGEM-T easy

PCV1 全基因组的 PCR 产物克隆入 pGEM-T easy 载体, 获得的重组质粒 T-PCV1 经 *Kpn* 酶切, 出现了约 3000 和 1760 bp 的条带, 说明 PCV1 已成功克隆入 pGEM-T easy 载体。测序结果证实 PCV1 基因组 DNA 克隆正确。

2.3 回收的 PCV1 全基因组克隆入 pBluescript SK 载体

重组质粒 T-PCV1 经 *Kpn* 酶切, 回收的 PCV1 DNA 片段克隆入 pBluescript SK 载体, 获得的重组质粒 pSK-PCV1 经 *Kpn* 酶切, 也出现了约 3000 和 1760 bp 的条带, 说明 PCV1 已成功克隆入 pBluescript SK 载体。

2.4 pCR2.1-pSK-PCV1 Δ ORF2 的鉴定

以质粒 pSK-PCV1 为模板, 用 PCR 方法扩增 pSK-PCV1 Δ ORF2, PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,

结果显示, 利用设计的引物成功地扩增出大小约为 4000 bp 的特异性目的条带。将该 PCR 产物克隆入 pCR2.1 载体, 重组质粒 pCR2.1-pSK-PCV1 Δ ORF2 经 *Nar*、*Hpa* 双酶切, 出现了约 900 bp、2700 bp 和 4000 bp 的条带, 说明 pSK-PCV1 Δ ORF2 已成功克隆入 pCR2.1 载体。其中大小约 4000 bp 的条带是线性 DNA 目的片段 pSK-PCV1 Δ ORF2。

2.5 pCR2.1-PCV2-ORF2 的鉴定

将 PCV2 ORF2 的 PCR 产物克隆入 pCR2.1 载体, 重组质粒 pCR2.1-PCV2-ORF2 经 *Psi*、*Acl* 双酶切, 出现了约 370 bp、620 bp、700 bp、1410 bp 和 1530 bp 的条带, 说明 PCV2-ORF2 已成功克隆入 pCR2.1 载体。其中大小约 700 bp 的条带就是目的 DNA 片段 PCV2-ORF2 片段。测序结果证实克隆正确。

2.6 pSK-sPCV1-2、pSK-dPCV1-2 重组质粒的鉴定

pSK-PCV1 Δ ORF2 与 PCV2-ORF2 连接, 构建成 pSK-sPCV1-2。将含单拷贝 PCV1 Δ ORF2-PCV2-ORF2 的重组质粒 pSK-sPCV1-2 不完全酶切、去磷酸化后与回收的 PCV1 Δ ORF2-PCV2-ORF2 按常规方法连接转化, 我们将获得的重组质粒命名为 pSK-PCV1-2 (即 pSK-dPCV1-2), 小规模提取质粒后, 电泳可见出现比 pSK-sPCV1-2 迁移速率明显慢的质粒。将 pSK-sPCV1-2 和 pSK-dPCV1-2 质粒用 *Kpn* 进行酶

切, 均出现大小约 1760 bp 和 3000 bp 的条带; 用 *Sac* 酶切, pSK-dPCV1-2 比 pSK-sPCV1-2 多出一条大小约 1760 bp 的条带。

2.7 pSK-sPCV1-2 重组质粒的序列分析结果

对重组质粒 pSK-sPCV1-2 进行序列测定, 测序结果正确。经序列比较, 本研究所用的 PCV2 ORF2 与国外类似构建所用 PCV2 ORF2 有 52 个碱基不同, 推导氨基酸 15 个不同, PCV1 有 9 个碱基不同, 推导氨基酸 6 个不同。

2.8 PCV1-2 感染性 DNA 克隆对 Dulac 细胞、PK-15 细胞感染性的检测

2.8.1 PCR 检测结果: 对转染细胞及正常对照细胞进行 PCR 检测的结果表明, 转染嵌合型 PCV1-2 DNA 的 Dulac 细胞中出现约 700 bp 的 PCV2 ORF2 特异性条带, 而正常 Dulac 细胞未扩增出任何条带。

2.8.2 间接免疫荧光检测结果: 在荧光显微镜下观察, 可见转染嵌合型 PCV1-2 DNA 的 Dulac 细胞、PK-15 细胞中均出现明显的荧光; 接种 PCV2 的阳性对照细胞也出现了特异荧光; 而正常 Dulac 细胞中未见荧光 (图 2)。可见转染嵌合型 PCV1-2 DNA 的细胞已成功表达 PCV2 Cap 蛋白。

2.8.3 病毒 TCID₅₀ 的测定结果: 所制备 PCV1-2 嵌合病毒的 TCID₅₀ 为 10^{-3.6}/0.1mL, PCV2 病毒的 TCID₅₀ 为 10^{-3.9}/0.1mL, 嵌合病毒 PCV1-2 在 Dulac 细胞或 PK-15 细胞传 5 代以上, 与 PCV2 相比, 嵌合病毒的 TCID₅₀ 未见明显下降, 表明嵌合病毒有着与 PCV2 相似的感染性和复制效率。

2.9 免疫小鼠血清中 PCV2 抗体的 ELISA 检测

免疫小鼠血清中 PCV2 抗体的检测结果和 ELISA 检测的具体 OD 数据见表 2、3。PCV2 抗体阳性的判定标准参照浙江大学研制的猪圆环病毒 2 型抗体酶联免疫检测试剂盒说明书。具体标准为: 被检样品 OD₄₅₀ 平均值 < 临界值下限, 为 PCV2 抗体阴性; 被检样品 OD₄₅₀ 平均值 ≥ 临界值上限, 为 PCV2 抗体阳性; 介

于二者之间, 判为可疑, 应复检, 复检 OD₄₅₀ 值 ≥ 临界值上限, 判为 PCV2 抗体阳性, 反之则判为阴性。其临界值的计算如下:

$$\text{临界值上限} = (\text{阳性对照孔 } OD_{450\text{nm}} \text{ 均值} - \text{阴性对照 } OD_{450\text{nm}} \text{ 均值}) \times 0.19 + \text{阴性对照 } OD_{450\text{nm}} \text{ 平均值}$$

$$\text{临界值下限} = (\text{阳性对照孔 } OD_{450\text{nm}} \text{ 均值} - \text{阴性对照 } OD_{450\text{nm}} \text{ 均值}) \times 0.15 + \text{阴性对照 } OD_{450\text{nm}} \text{ 平均值}$$

图 2 转染细胞的荧光染色结果

Fig. 2 Immunological fluorescence results of Dulac or PK-15 cells with PCV1-2 plasmid transfection or PCV2 infection. A: Dulac cells inoculated with PCV2; B: PK-15 cells inoculated with PCV2; C: Dulac cells transfected with plasmid PCV1-2; D: PK-15 cells transfected with plasmid PCV1-2; E: Dulac cells transfected with pBluescript SK; F: PK-15 cells transfected with pBluescript SK; G: IFA of normal Dulac cell; H: IFA of normal PK-15 cell.

表 2 BALB/c 小鼠接种后血清中产生针对 PCV2 抗体的检测结果

Table 2 Seroconversion to PCV2-specific antibodies in vaccinated or challenged BALB/c mice

Group	Innoculations	Serum-positive samples detected in BALB/c mice						
		-1 dpi*	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	35 dpi	42 dpi
A	PCV1-2virus	0/5	0/5	1/5	1/5	2/5	4/5	4/5
B	PCV1-2 inactivated virus (adjuvant)	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5
C	PCV2 virus	0/5	0/5	2/5	2/5	4/5	4/5	5/5
D	PCV1 virus	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5
E	/	0	0	0	0	0	0	0

*dpi: days post inoculation

表 3 BALB/c 小鼠接种后血清中产生针对 PCV2 抗体的 ELISA 检测结果
Table 3 OD_{450} Values of PCV2-specific antibodies in vaccinated or challenged BALB/c mice

Group	Innoculations	Serum-positive samples detected in BALB/c mice**						
		-1 dpi*	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	35 dpi	42 dpi
A	PCV1-2 virus	0.243	0.253	0.275	0.296	0.342	0.432	0.476
		0.256	0.364	0.442	0.469	0.565	0.586	0.612
		0.238	0.280	0.335	0.362	0.471	0.493	0.532
		0.265	0.292	0.310	0.343	0.362	0.438	0.505
		0.254	0.258	0.285	0.316	0.330	0.357	0.374
B	PCV1-2 inactivated virus (adjuvant)	0.225	0.342	0.418	0.409	0.496	0.521	0.532
		0.214	0.373	0.420	0.411	0.512	0.534	0.548
		0.232	0.245	0.365	0.382	0.434	0.462	0.483
		0.245	0.396	0.409	0.421	0.523	0.543	0.562
		0.242	0.280	0.321	0.345	0.436	0.452	0.487
C	PCV2 virus	0.210	0.224	0.242	0.275	0.310	0.376	0.425
		0.235	0.258	0.273	0.293	0.434	0.463	0.487
		0.227	0.365	0.452	0.476	0.485	0.514	0.532
		0.216	0.234	0.248	0.283	0.443	0.488	0.512
		0.234	0.356	0.458	0.473	0.483	0.510	0.548
D	PCV1 virus	0.212	0.234	0.283	0.429	0.385	0.401	0.321
		0.240	0.250	0.278	0.387	0.393	0.428	0.310
		0.232	0.238	0.320	0.373	0.321	0.358	0.338
		0.228	0.248	0.293	0.339	0.304	0.372	0.352
		0.231	0.240	0.314	0.319	0.315	0.363	0.300
E	/	0.087	0.088	0.077	0.052	0.093	0.053	0.092
		0.092	0.099	0.062	0.088	0.082	0.085	0.091
		0.082	0.069	0.058	0.059	0.085	0.066	0.083
		0.073	0.074	0.086	0.065	0.074	0.061	0.075
		0.058	0.063	0.073	0.078	0.099	0.071	0.069

*dpi : days post inoculation; **The positive samples were highlighted in bolds.

3 讨论

本文成功构建了含有双拷贝嵌合型 PCV1-2 全基因组重组质粒 pSK-dPCV1-2, 不仅为我们进一步研究不同血清型的猪圆环病毒基因组之间的结构和功能关系打下了基础, 而且为进一步研究该感染性 DNA 克隆对 Dulac 或类似细胞的感染性, 以及探讨其作为基因工程疫苗候选对象的可能性奠定了基础。

荧光抗体检测结果表明, 感染 PCV1 的 PK-15 细胞转染 PCV1-2 重组质粒后, 其荧光强度甚至比转染相同质粒的 Dulac 细胞 (无 PCV1 污染) 强 (图 2-C, D), 表明 PCV1 的存在似乎并不影响 PCV1-2 的复制。又因为 PCV1 无致病性, 且 PCV1-2 在 PK-15 细胞上的复制能力似乎强于在 Dulac 细胞上的复制能力, 提示将来可以应用 PK-15 细胞作为大量复制 PCV1-2 的宿主, 为 PCV1-2 的规模化生产提供可能。

近年来, 世界上许多国家和地区都有 PMWS 的发生, 该病的发生和流行对世界养猪业有重要的经济意义^[10]。目前, 国内尚无控制和消灭 PCV2 感染的有效措施, 也无商品化疫苗和药物来预防 PMWS 的发生。防制对策主要是实施严格的生物安全措施、加强良好的饲养管理、有效预防和控制其他感染性疾病等。因此, 迫切需要研制出有效疫苗以控制 PMWS

及其它 PCV2 相关性猪病的流行和传播。

1995 年, Tischer 等用 IFA 和 ELISA 两种方法在鼠类血清中检测出了针对 PCV2 的特异性抗体^[19]。Kiupel 等也曾用 PCV2 活病毒通过腹腔和鼻内两种途径接种 8 周龄的 BALB/c 小鼠, 在接种后 7、14、28 和 42 d 分次扑杀, 并对扑杀后的小鼠进行检测。通过 PCR 和原位杂交试验证实了 PCV2 在小鼠体内具有复制能力; 同时, 通过 IFA 检测小鼠血清中的特异性抗体, 发现在接种后 14 d 就有小鼠血清呈抗体阳性, 在接种后 42 d 时, 所有的小鼠血清都为抗体阳性^[20]。因此, 作者选定 BALB/c 小鼠作为实验动物来进行免疫应答的初步研究。

Fenaux 等用 PCV 嵌合病毒或重组质粒以 3 种方法免疫 9 周龄的 SPF 仔猪, 分别为重组质粒肌注、重组质粒浅表淋巴结注射及嵌合病毒肌注免疫, 研究发现, 肌注和浅表淋巴结注射两种免疫途径都非常有效; 而质粒和病毒两种免疫原效果也相当。仔猪在免疫后 42d 时进行攻毒试验, 发现尽管并非所有免疫仔猪血清中都产生特异性的抗体, 但是所有的免疫仔猪都经受住了 PCV2 病毒的攻击^[16]。这个现象说明嵌合型 PCV1-2 可能诱导机体产生了一定程度的细胞免疫应答。而两种免疫应答方式究竟孰轻孰重, 还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, *et al.* Pathogenesis of porcine circovirus: experimental infection of colostrums deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol*, 1995, 44: 49–64.
- [2] Allan GM, Meehan B, Todd D, *et al.* Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Record*, 1998, 142: 467–468.
- [3] Straw E, Allaire SD, Mengeling WL, *et al.* Diseases of swine, 8th edition. Iowa State University Press, 1999.
- [4] Rovira A, Balasch M, Segales J, *et al.* Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol*, 2002, 76: 3232–3239.
- [5] Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J*, 2005, 169: 326–336.
- [6] Ellis J, Clark E, Haines D, *et al.* Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet Microbiol*, 2004, 98: 131–135.
- [7] Harding JC. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol*, 2004, 98: 131–135.
- [8] Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J*, 2003, 44: 735–737.
- [9] Kim J, Chung HK, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J*, 2003, 166: 251–256.
- [10] 甘孟侯, 杨汉春主编. 中国猪病学. 第一版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [11] Batista L. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Quebec, is it an emerging disease? Proceedings of the 37th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners. 2006, pp.383–385.
- [12] Allan GM, McNeilly F. PMWS/PCVD: diagnosis, disease and control: what do we know? Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress. 2006, pp.1–10.
- [13] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, *et al.* Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine*, 2003, 21: 4565–4575.
- [14] Ju C, Fan H, Tan Y, *et al.* Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol*, 2005, 109: 179–190.
- [15] Wang X, Jiang W, Jiang P, Li Y, *et al.* Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. *Vaccine*, 2006, 24: 3374–3380.
- [16] Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, *et al.* A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J Virol*, 2004, 12: 6297–6303.
- [17] Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition). New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2002.
- [18] 芦银华, 谈国蓄, 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* (*Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*), 2002, 32: 19–20.
- [19] Tischer I, Bode L, Apodaca J, *et al.* Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice and cattle. *Arch Virol*, 1995, 140: 1427–1439.
- [20] Kiupel M, Stevenson GW, Choi J, *et al.* Viral replication and lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with porcine circovirus isolated from a pig with postweaning multisystemic wasting disease. *Vet Pathol*, 2001, 38: 74–82.

Construction of infectious DNA clone of chimeric porcine circovirus type 1-2 and its immunogenicity in mice

Yi Song, Lina Zhu, Song Gao^{*}, Xiufan Liu

(Key Laboratory of Animal Infectious Disease, Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: [Objective] To construct infectious DNA clone of chimeric porcine circovirus type 1-2. [Methods] Recombinant plasmid pSK-PCV1 Δ ORF2-PCV2-ORF2 (pSK-sPCV1-2) was constructed by replacing the PCV1 capsid gene with that of PCV2 in the backbone recombinant containing the complete genomic DNA of PCV1. The full-length chimeric fragment PCV1-2 was excised from pSK-sPCV1-2 and cloned into the same recombinant to form the dimerized tandem DNA clone pSK-dPCV1-2. [Results] The sequence of PCV1-2 infectious clone was confirmed by sequencing. PCV1-2 virus was observed to be infectious after transfecting into both PK-15 and Dulac cells. BALB/c mice were immunized with recombinant virus PCV1-2 and sera samples collected from all control and vaccinated animals at -1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 day post-inoculation (dpi) were assayed for anti-PCV2 capsid antibodies by ELISA. The results indicated that the chimeric PCV1-2 virus with the immunogenic ORF2 capsid gene of pathogenic PCV2 cloned into the nonpathogenic PCV1 genomic backbone induced specific antibodies against the pathogenic PCV2 capsid antigen in almost all mice at 42 dpi. [Conclusion] PCV1-2 infectious clone was constructed, and the recombinant virus strain of PCV1-2 was of some immunogenicity.

Keywords: PCV1; PCV2; ORF2 gene; chimeric infectious DNA

Supported by the Foundation for PhD Students Training Program of Ministry of Education(20041117005) and the Jiangsu Agricultural Three-area- focused Program [SX (2007) 080]

^{*}Corresponding author. Tel: +86-514-87991448; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

Received: 2 January 2008/ Revised: 3 June 2008