

猪圆环病毒 2 型核酸疫苗的构建及其免疫效果

王 新^{1a}, 郭万柱², 周 婷^{1b}, 徐志文², 王 印², 王小玉²

(1 西北农林科技大学 a 食品学院 b 动物医学院, 陕西 杨陵 712100;

2 四川农业大学 动物生物技术中心, 四川 雅安 625014)

【摘 要】 【目的】构建猪圆环病毒 2 型(PCV2)ORF2 基因疫苗,并对其免疫效果和安全性进行研究。【方法】将 PCV2 ORF2 基因从 pMD-ORF2^{*} 质粒(包含 PCV2 SCH A 株 ORF2 基因)酶切回收,插入到真核表达载体 pcDNA-3.1(+)中,构建真核表达质粒 pcDNA-ORF2,对该质粒进行酶切和 PCR 鉴定。将 pcDNA-ORF2 转染 IBRS-2 细胞,进行 Western blotting 检测。将构建好的 pcDNA-ORF2 制成核酸疫苗,按 100 μ g/只腿部肌肉注射免疫 Balb/c 小白鼠,同时设 pcDNA-3.1(+),PCV2 全毒和 PBS 为对照,共免疫 2 次,间隔 2 周。分别于首免后第 14 天和 56 天采血,用 ELISA 法检测抗体;于首免后第 56 天,采用淋巴细胞增殖试验(MTT 法)和流式细胞仪(FACS)对小鼠的细胞免疫进行检测。取首免后 56 d 小鼠的心肝、脾、肺、肾和脑等实质器官,采用 PCR 方法检测 pcDNA-ORF2 核酸疫苗的安全性。【结果】Western blotting 结果显示,pcDNA-ORF2 构建成功,并在哺乳动物细胞中获得表达。pcDNA-ORF2 核酸疫苗能诱导小鼠产生较强的细胞免疫和体液免疫应答。PCV2 ORF2 基因未整合到小鼠染色体上。【结论】pcDNA-ORF2 可诱导小鼠产生免疫反应,其对小鼠是安全的。

【关键词】 猪圆环病毒 2 型;ORF2 基因;核酸疫苗

【中图分类号】 S852.65

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)08-0041-05

Development of ORF2 gene vaccine against PCV2 and immunity test in mice

WANG Xin^{1a}, GUO Wan-zhu², ZHOU Ting^{1b}, XU Zhi-wen², WANG Yin², WANG Xiao-yu²

(1 a College of Food Science and Engineering, b College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Animal Biology Technology Center, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: 【Objective】The study is to develop a new generation vaccine of PCV2 furtherly. 【Method】The ORF2 gene of PCV2 was inserted into the eukaryotic expression vector pcDNA-3.1(+) to construct nucleotide vaccine plasmid pcDNA-ORF2. The nucleotide vaccine plasmid identified by PCR and digestion was transfected into IBRS-2 cells with lipofectamine for the analysis of western blotting. The constructed pcDNA-ORF2 was developed into nucleotide vaccine to intramuscular inject into BALB/c mice with 100ug at two weeks interval. On the 14th and the 56th day after the first vaccination, serums were collected to test by ELISA. And on the 56th day after the first vaccination, cell mediated immunity was detected by MTT method and Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS). To confirm the safety of pcDNA-ORF2 gene vaccines, the genomes of vaccinated mice were extracted for PCR amplification. 【Result】The result indicated that the nucleotide vaccine plasmid pcDNA-ORF2 was constructed successfully and the ORF2 gene was ex-

* [收稿日期] 2007-08-30

[基金项目] 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0555)

[作者简介] 王 新(1973—),男,四川邛崃人,讲师,博士,主要从事病原分子生物学及食品安全研究。

E-mail: xinwang7516@yahoo. com. cn

[通讯作者] 郭万柱(1938—),男,四川资阳人,教授,博士生导师,主要从事动物病原分子生物学研究。E-mail: wzguo@126. com

pressed in IBRS-2 cells, and pcDNA-ORF2 gene vaccines successfully induced humoral and cellular immune response in mice. The safety test of pcDNA-ORF2 gene vaccine showed that ORF2 genes could not be integrated into the mice chromosome and it was safe. 【Conclusion】 The pcDNA-ORF2 gene vaccine successfully induced immune response in mice and was confirmed to be safe.

Key words: porcine circovirus type2; ORF2 gene; nucleotide vaccine

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)是目前世界上发现的最小动物病毒之一,病毒粒子直径只有 17 nm,无囊膜,由衣壳蛋白和基因组组成^[1]。根据 PCV 在致病性、抗原性及核苷酸序列上的差异,可将其分为 PCV1 和 PCV2 2 种类型,没有致病性的为 PCV1,有致病性的为 PCV2^[2-3]。近年来,由 PCV2 引起的猪断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)、猪皮炎肾病综合征(PDNS)等疾病越来越普遍,给养猪业造成了巨大的经济损失。为了预防和控制 PCV2 引起的疾病,研发安全、高效的疫苗是关键^[4-7]。但是由于 PCV2 病毒在细胞上增殖效价低且侵害猪的免疫系统,研发常规的疫苗一时难以突破^[8]。

PCV2 ORF2 基因编码的 Cap 蛋白是病毒的衣壳蛋白,以之为目的基因构建重组疫苗是当前的研究热点^[9-11]。Blanchard 等^[12]对 PCV2 的 DNA 疫苗及亚单位疫苗进行了研究;Fenaux 等^[13]将 PCV2 的 ORF2 基因插入到 PCV1 基因组中,代替 PCV1 的 ORF2 基因,构建嵌合病毒 PCV1-2,用其接种猪,结果发现 PCV1-2 可以使猪体产生抗 PCV2 衣壳蛋白的特异性抗体,并且对猪的致病性大大减弱。因此,PCV 1-2 嵌合病毒有望发展成为一种基因工程弱毒活疫苗而用于 PCV2 感染的防治。近年来,国内许多学者也在 PCV2 基因工程疫苗方面进行了有益的探索,并且取得了一定的进展,但还处于实验室研究阶段,迄今为止还没有研制出有效的疫苗用于 PCV2 控制。本研究将猪圆环病毒 2 型四川分离株(PCV2 SCH 株)^[14]的 ORF2 基因,插入至真核表达载体 pCDNA-3.1(+)中,构建出表达 PCV2 ORF2 基因的真核表达质粒 pcDNA-ORF2,并对其免疫原性和安全性进行了研究,以期 PCV2 核酸疫苗的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pcDNA-3.1(+), pMD-ORF2* (包含猪圆环病毒 2 型 SCH A 株 ORF2 基因)、猪圆环病毒 2 型 SCH A 株^[14]、IBRS-2 细胞、PCV2 阳性血清、

PCV2 阴性血清、无 PCV 污染的 IBRS-2、大肠杆菌 DH5 α 均由四川农业大学动物生物技术中心保存。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 PCR 扩增酶为 TaKaRa 公司产品;HRP-SAP 购自博士德公司;MEM 培养基购自 Gibco 公司;刀豆蛋白 A(ConA) 购自华美生物工程公司。6~8 周龄雌性 Balb/c 小白鼠(均为 PCV2 血清学抗体阴性)购自四川大学实验动物中心。

1.2 引物的设计与合成

根据 PCV2 ORF2 基因序列,设计 1 对引物用于 PCR 扩增,上游引物:5'-CAC AAG CTT AGA TGA CGT ATC CAA GGA G-3';下游引物:5'-TAC GGT ACC TTA GGG GTT AAG TGG G-3'。上、下游引物中划线部分碱基分别为 HindⅢ 和 Kpn I 酶切位点。引物由 Invitrogen 公司合成,预期扩增片段长度约为 750 bp。

1.3 pcDNA-ORF2 载体的构建与鉴定

用 HindⅢ 和 Kpn I 将 ORF2 基因从 pMD-ORF2* 质粒上切下,与经同样酶切处理的载体 pcDNA-3.1(+)连接,构建 pcDNA-ORF2 载体,并通过 HindⅢ/Kpn I 双酶切和 PCR 鉴定,筛选阳性重组质粒。

1.4 pcDNA-ORF2 的转染及表达产物检测

培养 IBRS-2 细胞,待其长成单层时,用胰酶消化,用含体积分数 10% 犊牛血清的 DMEM 吹下,转接至 6 孔细胞培养板培养。待细胞长至约 80% 融合时,添加 pcDNA-ORF2(4 μ g/孔),同时设立 pcDNA-3.1(+)对照组,按 Lipofectamine2000TM 转染试剂盒说明进行转染,36 h 后收集细胞,进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。

1.5 PCV2 核酸疫苗 pcDNA-ORF2 的免疫效果检测

1.5.1 试验设计 将 20 只 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,随机分成 4 组,每组 5 只,分别腿部肌肉注射 pcDNA-3.1(+), pcDNA-ORF2、PCV2 全毒(1 $\times$ 10⁴ TCID₅₀)和 PBS 液, pcDNA-3.1(+)和 pcDNA-ORF2 的接种剂量为 100 μ g/只, PCV2 全毒和 PBS 液剂量为 100 μ L/只。首免后 14 d 再加强免疫一

次。于首免后第 14 天(二免疫前)和 56 天断尾采血,分离血清,用 ELISA 法检测抗体;于首免后第 56 天采集抗凝血,作 T 细胞亚群 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 细胞数量检测,并采集脾脏,进行脾 T 淋巴细胞增殖试验。

1.5.2 免疫小鼠血清抗体的 ELISA 检测 用间接 ELISA 方法测定小鼠血清中的抗体,同时用非免疫鼠血清作阴性对照。具体操作:将 PCV2 抗原包被在酶标板上(100 μ L/孔),于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后 4 $^{\circ}$ C 过夜;酶标板用洗涤液洗涤 3 次,每次 3 min,然后每孔加入 100 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min,再将标准血清按最佳稀释倍数稀释后加入酶标板(100 μ L/孔),于 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h;洗涤 3 次后,加 HRP-SPA(用 pH7.4 的 PBS 液稀释)100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 1 h;经洗涤后加入 OPD- H_2O_2 底物 100 μ L,室温反应 20 min,最后加入 100 μ L 终止液终止反应,用酶标仪测定 OD_{492} 值。

1.5.3 小鼠脾淋巴细胞的制备及脾细胞增殖试验

将小鼠断颈处死,无菌取脾脏放入盛有 PBS 的安瓶中,剥离白色结缔组织后,加入 4~6 mL Hanks 液,剪碎,过 0.05 mm 的铜网即得细胞悬液。取细胞悬液,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀加 4 mL 去红细胞裂解液(Tris $\cdot$ NH_4Cl 缓冲液,取 Tris 碱 1.03 g 和 NH_4Cl 3.735 g,加双蒸水至 500 mL,调 pH 值为 7.2~7.4),2 000 r/min 离心 10 min;弃上清,沉淀加入 5 mL Hanks 液洗涤,用含体积分数 10% 小牛血清的 MEM 培养液调整细胞浓度为 1×10^7 ml^{-1} 。将制备好的脾淋巴细胞加入 96 孔培养板中(100 μ L/孔),然后加入 ConA(5 μ g/mL),同时设空白对照组,置 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 96 h。于培养结束前 6 h 每孔加入 MTT(5 mg/mL)10 μ L,继续培养 6 h,每孔加入 100 g/L SDS 液 100 μ L,用酶标仪测定 OD_{570} ,计算刺激指数(SI): $SI=A/B$ 。式中:A 为刺激组 OD_{570} 值;B 为正常脾细胞组 OD_{570} 值。

1.5.4 小鼠 T 细胞亚群数量的检测 外周血淋巴细胞的预处理:取抗凝血 0.1 mL,加 8 mL 红细胞裂解液,室温作用 10 min,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加 5 mL PBS 液混悬,1 500 r/min 离心 10 min,重复 2 次。取 200 μ L 细胞(浓度为 2.5×10^3 μ L $^{-1}$)分别加入 20 μ L PE 标记的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 抗体,分装 2 管,4 $^{\circ}$ C 避光作用 30 min,荧光洗液(含体积分数 2% 小牛血清的 0.15 mol/L PBS,

pH 7.4)洗 2 遍,加入 300 μ L 荧光保存液(100 mL 0.15 mol/L PBS,pH 7.4,20 g/L 葡萄糖,体积分数 10% 甲醛)。次日用流式细胞仪测定 T 细胞亚群数量。

1.5.5 核酸疫苗的安全性检测 取首免后 56 d 小鼠的实质器官(心、肝、脾、肺、肾和脑等),按快速提纯试剂盒说明书提取 DNA,进行 PCR 扩增,检测核酸疫苗安全性。PCR 反应体系:10 $\times$ Buffer 5 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 3 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L,上、下游引物各 1 μ L, *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L,质粒 0.1 μ L, dd H_2O 35.4 μ L,总体系 50 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 变性 10 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,53 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,37 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。

2 结果与分析

2.1 pcDNA-ORF2 质粒的鉴定

结果显示,用 *Hind* III 与 *Bam* H I 双酶切得到长度约为 5.4 kb 和 750 bp 的 2 条带,与预期结果相符(图 1A);PCR 鉴定,扩增出约 750 bp 的目的片段(图 1B)。结果表明,ORF2 基因已定向连接插入到 pcDNA-3.1(+)载体中,真核表达质粒 pcDNA-ORF2 构建成功。

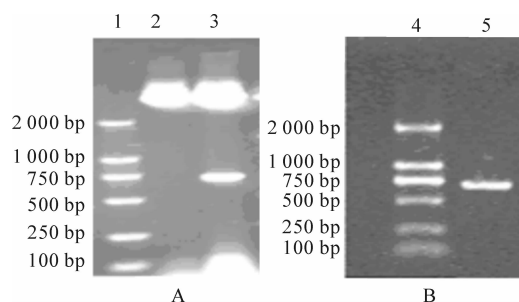


图 1 重组质粒 pcDNA-ORF2 的鉴定结果

A. 酶切鉴定; B. PCR 鉴定;

1, 4. DL-2000 Marker; 2. pcDNA-3.1(+)/*Hind* III + *Bam* H I;

3. pcDNA-ORF2/*Hind* III + *Kpn* I; 5. ORF2 基因

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pcDNA-ORF2

A. the result of digestion; B. the result of PCR;

1, 4. DL-2000 Marker; 2. pcDNA-3.1(+)/*Hind* III + *Bam* H I;

3. pcDNA-ORF2/*Hind* III + *Kpn* I; 5. ORF2 gene

2.2 PCV2 ORF2 基因在哺乳动物细胞中的表达

由图 2 可见, pcDNA-ORF2 质粒转染的 IBRS-2 细胞在约 29 ku 处出现特异性条带,而同步转染的 pcDNA-3.1(+)空白对照未出现特异性带,表明 ORF2 基因在哺乳动物细胞中获得了表达。

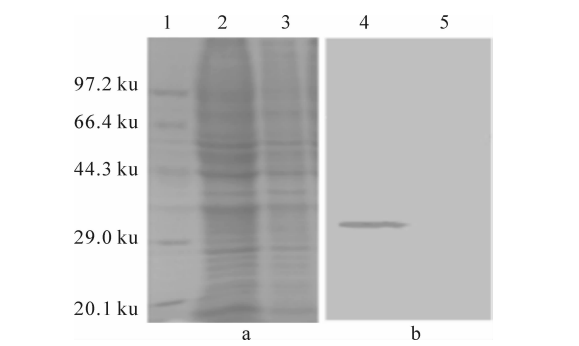


图 2 PCV2 ORF2 基因在 IBRS-2 细胞中的表达
a. SDS-PAG; b. Western blotting;
1. protein Marker; 2, 4. pcDNA-ORF2; 3, 5. pcDNA-3. 1(+)
Fig. 2 The expression of ORF2 gene of PCV2
in IBRS-2 cell line

2.3 免疫小鼠血清中 PCV2 特异性抗体的测定

从表 1 可以看出,重组核酸疫苗 pcDNA-ORF2 和 PCV2 全病毒均能诱导小鼠机体产生特异性抗 PCV2 抗体,且抗体水平高于 PBS 组和 pcDNA-3. 1(+)组,说明 pcDNA-ORF2 核酸疫苗可诱导小鼠产生明显的免疫反应。

表 1 pcDNA-ORF2 免疫小鼠血清中 PCV2 抗体的检测
Table 1 Detection of anti-PCV2 antibody
in immunized mice

组别 Group	OD ₄₉₂ 值 OD ₄₉₂ value	
	首免后 14 d the 14 th day after first immunization	首免后 56 d the 56 th day after first immunization
PBS	0. 099	0. 103
pcDNA-3. 1(+)	0. 101	0. 107
PCV2	0. 203	0. 503
pcDNA-ORF2	0. 156	0. 381

2.4 小鼠脾细胞的增殖

由表 2 可知,重组核酸疫苗 pcDNA-ORF2 和 PCV2 全病毒组的 OD₅₇₀ 值及 SI 值,均显著高于 PBS 对照和 pcDNA-3. 1(+)组($P<0. 05$),但 pcDNA-ORF2 组较活疫苗组略低,表明重组核酸疫苗 pcDNA-ORF2 能诱导脾淋巴细胞增殖。

表 2 pcDNA-ORF2 免疫小鼠脾细胞增殖试验结果
Table 2 Result of spleen lymphocyte proliferation
in immunized mice

组别 Group	OD ₅₇₀	SI
PBS(Control)	1. 729±0. 041 b	1. 0 b
pcDNA-3. 1(+)	1. 801±0. 076 b	1. 04 b
pcDNA-ORF2	2. 712±0. 101 a	1. 57 a
PCV2	2. 930±0. 105 a	1. 69 a

注:不同小写字母表示差异显著($P<0. 05$)。
Note: Different letters indicate difference ($P<0. 05$).

2.5 T 细胞亚类数量的检测

由表 3 可知,pcDNA-ORF2 免疫试验组小鼠的 T 淋巴细胞亚类 CD8⁺ 细胞数量显著高于空质粒 pcDNA-3. 1(+)对照组及 PBS 液对照组($P<0. 05$),但 CD4⁺ 细胞数量明显低于对照组,CD4⁺ /CD8⁺ 比例显著降低。

表 3 pcDNA-ORF2 免疫小鼠 T 淋巴细胞亚类的变化
Table 3 Numbers of T lymphocyte subgroups
in immunized mice($n=4$)

组别 Group	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
PBS	50. 04 a	16. 06 a	3. 12 A
pcDNA-3. 1(+)	46. 09 a	16. 86 a	2. 73 AB
pcDNA-ORF2	38. 16 b	29. 50 b	1. 29 B

注:不同小写字母表示差异显著($P<0. 05$);不同大写字母表示
差异极显著($P<0. 01$)。
Note: Different letters indicate difference ($P<0. 05$); Different
capital letters indicate significant difference ($P<0. 01$).

2.6 基因疫苗的安全性检测

PCR 扩增结果显示,从小鼠的心、肝、脾、肺、肾和脑等组织中均没有扩增出 ORF2 基因片段,提示 ORF2 基因未整合到小鼠染色体上,表明 pcDNA-ORF2 核酸疫苗是安全的。

3 讨论

真核表达载体 pcDNA-3. 1(+)带有巨细胞病毒早期启动子(hCMV),该启动子有一段迄今为止发现的最强的增强子序列,表达外源基因时几乎没有细胞特异性,适于大多数哺乳动物细胞^[15]。本试验选用具有良好免疫原性的 PCV2 衣壳蛋白 ORF2 基因和高效表达载体 pcDNA-3. 1(+)构建质粒,保证了基因的顺利表达。

本试验通过间接 ELISA 方法检测了 pcDNA-ORF2 免疫小鼠后的抗体变化,在免疫后第 2 周产生特异性抗体,但抗体水平较低,说明所构建的 pcDNA-ORF2 已成功转染小鼠体细胞并在细胞中表达,表达产物作为抗原刺激机体产生了免疫应答反应;二免后,试验组小鼠的抗体水平上升幅度很大,表明 pcDNA-ORF2 表达产物可诱导机体免疫系统中的 B 淋巴细胞产生免疫记忆效应,能够持续刺激小鼠机体产生特异性中和抗体,激发较强的体液免疫应答。淋巴细胞的增殖试验结果显示,pcDNA-ORF2 核酸疫苗能够诱导淋巴细胞的增殖,提示 pcDNA-ORF2 核酸疫苗也能够诱导小鼠产生较强的细胞免疫应答。真核表达质粒 pcDNA-ORF2 能够在小鼠体内表达外源基因编码的蛋白质,并能诱

导小鼠的免疫系统产生较强的体液免疫和细胞免疫。但是相对于 PCV2 全毒而言,pcDNA-ORF2 核酸疫苗的特异性免疫反应较弱,推测主要有 2 个可能的原因:①接种后载体转染率或在宿主细胞内的表达水平低;②尽管 pcDNA-ORF2 在宿主细胞内所表达的 Cap 蛋白含有较多的抗原位点,但与整个病毒粒子相比较,其抗原性仍然相对较弱^[16]。

核酸疫苗免疫动物的安全性,一直是人们关注的焦点^[17-18]。外源 DNA 整合到宿主染色体上的方式,有随机插入和同源重组,而随机插入导致的整合比同源整合概率高^[19]。本试验采用 PCR 法检测了 pcDNA-ORF2 核酸疫苗的安全性,结果显示小鼠的各组织基因组 DNA 均未扩增出 ORF2 基因片段,表明 pcDNA-ORF2 对小鼠具有较好的安全性。

综上所述,本研究所构建的 pcDNA-ORF2 核酸疫苗,可以在体外细胞中和小白鼠体内进行表达,并能刺激小鼠机体产生体液免疫和细胞免疫应答,但要应用于实际生产中,还需要进一步研究其在猪体内表达及其免疫应答情况。

[参考文献]

[1] Tischer I,Gelderblom H,Vettermann W,et al. A small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. Nature,1982,295:64-66.

[2] Allan G M,Meehan B,Todd D,et al. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes [J]. Vet Rec,1998,142:467-468.

[3] Meehan B M,McNeilly F,Todd D,et al. Characterization of novel circovirus with wasting syndromes in pigs [J]. J Gen Virol,1998,79: 2171-2179.

[4] Allan G M,McNeilly F,Ellis J, et al. PMWS: experimental model and co-infections[J]. Vet Microbiol,2004,9(2): 165-168.

[5] Mori M,Sato K,Akachi S. Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989 [J]. Vet Pathol,2000,37(6):667-669.

[6] Sato K,Shibahara T,Ishikawa Y. Evidence of porcine circovirus infection in pigs with wasting disease syndrome from 1985 to 1999 in Hokkaido,Japan [J]. J Vet Med Sci,2000,62(6): 627-33.

[7] Mankertz A,Persson F,Mankertz J,et al. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus [J]. J Virol,1997,71:2562-2566.

[8] Resendes A,Segales J,Balasch M,et al. Lack of an effect of a commercial vaccine adjuvant on the development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine cir-

covirus type 2 (PCV2) experimentally infected conventional pigs [J]. Vet Res,2004,35 (2):243-253.

[9] Mankertz A, Hillenbrand. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene [J]. Virol,2001,279(2):429-438.

[10] Nawagitgul P,Morozov I,Bolin S R,et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. J Gen Virol,2000,81:2282-2287.

[11] 杨汉春. 动物免疫学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社,1996.

Yang H C. Animal immunology [M]. Beijing:China Agriculture university Press,19996. (in Chinese)

[12] 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 [J]. Vaccine,2003,21(31):4565-4575.

[13] Fenaux M,Opriessnig T, Halbur P,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]. J Virol,2004,78(12): 6297-6303.

[14] 王 新,郭万柱,朱 玲,等. 猪Ⅱ型圆环病毒四川分离株鉴定及其 ORF2 基因序列分析 [J]. 中国病毒学,2005,20(4):438-440.

Wang X,Guo W Z,Zhu L,et al. Isolation and identification of porcine circovirus type 2 from sichuan province and sequence analysis of ORF2 gene [J]. Virologica Sinica,2005,20(4): 438-440. (in Chinese)

[16] 陈广南,梁希若,吴淑华. 含巨细胞病毒早期启动子的 EPO 逆转录病毒载体的构建 [J]. 广州医学院学报,1997,25(2):1-4.

Chen G L,Liang X R,Wu S H. Cloning of human genome with CMV early promoter in a retroviral vector [J]. Academic Journal of Guangzhou Medical College,1997,25(2):1-4. (in Chinese)

[17] Parker S E,Borellini F,Wenk M L,et al. Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits [J]. Hum Gene Ther,1999,10(5):741-758.

[18] 周凤娟,胡振林,戴建新,等. 乙肝表面抗原核酸疫苗的构建及其与宿主染色体整合的可能性分析 [J]. 第二军医大学学报,2002,23(8):816-818.

Zhou F J,Hu Z L,Dai J X,et al. Construction of hepatitis B S antigen DNA vaccine and its potential integration into host cell genome [J]. Academic Journal of Second Military Medical University,2002,23(8):816-818. (in Chinese)

[19] Parker S E,Borellini F,Wenk M L,et al. Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits [J]. Hum Gene Ther,1999,10(5):741-758.