

猪Ⅱ型圆环病毒 *ORF1*、*ORF2* 基因串联重组腺病毒的构建及其免疫效果

祝卫国^{1,2}, 王旭荣^{1,2}, 宋长绪², 杨增岐¹, 王建华¹, 张春红², 黄忠²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 广东省农业科学院 兽医研究所, 广东 广州 510640)

【摘要】【目的】构建含 *PCV2 ORF1* 和 *ORF2* 基因的串联重组腺病毒, 并对其免疫效果进行评价。【方法】扩增 *PCV2* 的 *ORF1* 和 *ORF2* 基因, 串联克隆入 pMD18-T 载体后亚克隆入腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中, 阳性穿梭质粒经 *Pme* I 酶线性化后与骨架载体 pAdeasy-1 在细菌 BJ5183 内完成重组, 获得重组腺病毒质粒。将重组腺病毒质粒用 *Pac* I 酶线性化后转染 293 细胞, 包装成重组腺病毒, 然后从致细胞病变、荧光检测及 PCR 检测等方面对该重组腺病毒进行了鉴定。以该重组腺病毒免疫小鼠, 对免疫鼠血清中 *PCV2* 的特异性抗体进行检测。【结果】得到了 *PCV2* 的 *ORF1* 和 *ORF2* 基因, pMD18-*ORF1-ORF2* 和 pAdCMV-*ORF1-ORF2* 载体构建成功, 获得了含有 *PCV2 ORF1* 和 *ORF2* 基因的重组腺病毒。该重组腺病毒免疫小鼠后, 在小鼠血清中可检测到 *PCV2* 的特异性抗体。【结论】成功构建了含 *PCV2 ORF1* 和 *ORF2* 基因的重组腺病毒, 此腺病毒可诱导机体产生针对 *PCV2* 的特异性抗体。

【关键词】 猪Ⅱ型圆环病毒; *ORF1*、*ORF2* 基因; 重组腺病毒; 免疫效果

【中图分类号】 S858.282.65⁺.9.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)03-0075-05

Construction of recombinant adenovirus carrying *ORF1*、*ORF2* gene of porcine circovirus₂ and immunological study

ZHU Wei-guo^{1,2}, WANG Xu-rong^{1,2}, SONG Chang-xu², YANG Zeng-qi¹, WANG Jian-hua¹, ZHANG Chun-hong², HUANG Zhong²

(1 Collage of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Veterinary Medicine Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, guangdong 510640, China)

Abstract:【Objective】The recombinant adenovirus carrying *ORF1* and *ORF2* gene of *PCV2* was constructed, then the immune result was evaluated.【Method】*ORF1*、*ORF2* gene of *PCV2* were amplified by PCR. The PCR products were cloned into pMD18-T vector one by one and recombinant plasmids were obtained. The interesting gene was subcloned into the shuttle plasmid of pAdTrack-CMV. The recombinant plasmid and adenovirus backbone DNA were cotransformed into *E. coli* BJ5183 and the recombinant adenovirus genomic DNA was obtained. After transfecting 293 cell lines with recombinant adenovirus the genomic DNA by the lipofectamine method, the recombinant adenovirus carrying *ORF1* and *ORF2* gene was screened under fluorescent microscopy and PCR analysis. The recombinant adenovirus have been immuned mice, detected sera antibody about *PCV2* of the mice by using ELISA.【Result】We obtained *ORF1* and *ORF2* gene of *PCV2*, constructed the pMD18-*ORF1-ORF2* and pAdCMV-*ORF1-ORF2* vector, and obtained the recombinant adenovirus carrying *ORF1* and *ORF2* gene. The specific antibody about *PCV2* has

* [收稿日期] 2007-03-22

[基金项目] 国家“863”计划项目(2003AA241110); 广东省农业攻关项目(2003B21404)

[作者简介] 祝卫国(1979-), 男, 陕西西安人, 在读博士, 主要从事动物疫病诊断与防控研究。

[通讯作者] 宋长绪(1965-), 男, 河南南阳人, 研究员, 主要从事动物传染病研究。E-mail: cxsong@yahoo.com

been found in serum of the immuned mice. 【Conclusion】 The recombinant adenovirus carrying *ORF1* and *ORF2* gene of PCV2 was obtained and it may induce the mice with specific antibody about PCV2.

Key words: PCV2; *ORF1*、*ORF2* gene; recombinant adenovirus; immunological result

猪Ⅱ型圆环病毒(porcine circovirus 2, PCV2)是仔猪断奶后多系统衰竭综合征(PWMS)的病原^[1],其不但可以引起断奶仔猪发生衰竭、死亡,还与仔猪 A2 型先天性震颤(CT)、成年猪皮炎肾炎综合征(PDNS)和呼吸道疾病综合征(PRDS)有关。更为严重的是,PCV2 的感染可以引起免疫抑制^[2],导致其他各种病原的继发感染,造成的间接损失难以估计。目前,PCV2 已经成为严重危害养猪业发展的主要病原之一^[3]。

PCV2 基因全长为 1 767 或 1 768 bp,包含 *ORF1* ~ *ORF11* 共 11 个阅读框,其中 *ORF1* 和 *ORF2* 是最主要的阅读框。PCV2 核苷酸序列同源性在 91.9%~100%,氨基酸序列同源性在 90.2%~100%,较为保守。

ORF1 为 945 bp,编码 315 个氨基酸(病毒的复制蛋白),与 PCV1 的 *ORF1* 编码的蛋白有相同的抗原性。*ORF2* 为 705 bp,编码 235 个氨基酸(PCV2 囊膜的主要结构成分),具有较好的免疫原性。*ORF1* 和 *ORF2* 基因是 PCV2 基因组中最大的两个开放性阅读框,也是目前 PCV2 PCR 检测及构建 PCV2 基因工程疫苗等方面较常选用的基因。

由于 PCV2 是目前所知哺乳动物病毒中个体最小的病毒之一^[4],其直径仅为 17 nm,另外在 PCV2 细胞培养时,病毒对细胞的感染率低,所以病毒的纯化和浓缩难度很大,故而目前还没有防止 PCV2 感染的灭活疫苗。国内外的学者在 PCV2 基因工程疫苗的研制方面已经进行了大量的研究工作,现已经证实,大肠杆菌表达的多肽免疫效果较差,而杆状病毒等真核表达系统表达的产物又难以纯化。为了应用真核表达而避免纯化的麻烦,本试验采用非复制型腺病毒为载体,构建含有 PCV2 的 *ORF1*、*ORF2* 基因串联重组腺病毒,并对其免疫效果进行了研究,以期 PCV2 重组腺病毒活载体基因工程疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、病毒及试剂 腺病毒骨架载体 pAdeasy-1 由 Howard Hughes Medical Institute 的 Bert Vogelstein 博士惠赠;穿梭质粒 pAdTrack-

CMV 和空重组腺病毒 Ad 由广东省兽医研究所曹汉威研究员惠赠;含有 PCV2 的 PK-15 细胞、大肠杆菌菌株 BJ5183、DH5 α 及 293 细胞株由广东省农业科学院兽医研究所猪病研究室保存;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;Lipofectamine TM2000 购自 Invitrogen 公司;PCR 试剂盒、DNA 片段回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、pMD18-T 载体、限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司(大连);*Pme* I、*Pac* I 为 New England Biolabs 公司产品;猪圆环病毒酶联免疫诊断试剂盒,购自华中农业大学动物病毒室;腺病毒滴度测定试剂盒 Adeno-XTM Rapid Titer Kit,购自美国 BD Biosciences Clontech 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG,购自北京鼎国生物技术发展中心。

1.1.2 试验动物 6~8 周龄 SPF 级 Balb/c 母鼠,体重约 25 g,购于中山大学试验动物中心。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中收录的 PCV2 全基因序列(登录号为 AY916791),设计 P1/P2 和 P3/P4 2 对 PCR 引物:

ORF1 上游引物 P1:5'-TTA GGT ACC ATG CCC AGC AAG AAG AAT G-3',

ORF1 下游引物 P2:5'-TTA ACT AGT TCA TTC ATA TGG AAA TTC AGG-3';

ORF2 上游引物 P3:5'-TTA ACT AGT ATG ACG TAT CCA AGG AG-3',

ORF2 下游引物 P4:5'-TTA GCGGCCGC TCA TTG ATA TGG AAA TTC AC-3'。

为了便于基因的克隆,在 P1 中加有 *Kpn*I 酶切位点,在 P2 中加有 *Spe*I 酶切位点,在 P3 中加有 *Spe* I 酶切位点,在 P4 中加有 *Not* I 酶切位点(即引物序列中用下划线标出的部分)。P1/P2 和 P3/P4 扩增片段分别为 *ORF1* 全基因(945 bp)和 *ORF2* 全基因(705 bp)。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.3 PCV2 *ORF1*、*ORF2* 基因的 PCR 扩增

从含 PCV2 的 PK-15 细胞培养物中提取 PCV2 DNA,用设计的引物进行 PCR 扩增。

1.3.1 *ORF1* 基因的 PCR 扩增 PCR 反应条件为 50 μ L:premix Tap 25.0 μ L,模板 DNA 2 μ L,P1、P2 各 1 μ L,ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C

2 min;94 °C 1 min,58 °C 1 min,72 °C 1.5 min,共进行 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。

1.3.2 ORF2 基因的 PCR 扩增 PCR 体系为 50 μ L;P3/P4 各 1 μ L,其余组分同上。PCR 的反应条件为:94 °C 2 min;94 °C 1 min,46 °C 1 min,72 °C 1 min,共进行 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。对两次 PCR 的扩增产物分别进行 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 pMD18-ORF1-ORF2 载体的构建与鉴定

用 DNA 片段回收试剂盒纯化 PCR 产物。将 ORF2 克隆入 pMD18-T 载体,经过 *Hind* III 酶切鉴定其为正向连接后,用 *Kpn* I/*Spe* I 对已克隆入 ORF2 基因的质粒和 ORF1 基因片段分别做双酶切处理,然后进行连接,阳性克隆进行 *Spe* I/*Hind* III 和 *Kpn* I/*Spe* I 双酶切鉴定,以证实 ORF1 和 ORF2 基因已按照 ORF1-ORF2 顺序克隆入 pMD18-T 载体。

1.5 pAdTrack-CMV-ORF1-ORF2 重组穿梭载体的构建与鉴定

利用 *Kpn* I 和 *Not* I 酶,将 ORF1-ORF2 基因片段从 pMD18-ORF1-ORF2 质粒中切下来,与经过相同酶切处理的 pAdTrack-CMV 载体进行连接,然后转化 DH5 α 感受态细胞,进行 Kan⁺ 抗性筛选。挑取有 Kan⁺ 抗性的单克隆,用 LB 培养基 37 °C 震荡培养 14 h 后抽提质粒,分别进行 *Kpn* I/*Spe* I、*Kpn* I/*Not* I 和 *Spe* I/*Not* I 双酶切鉴定以及 PCR 鉴定,将阳性重组穿梭载体命名为 pAdTrack-CMV-ORF1-ORF2。

1.6 含 ORF1-ORF2 基因重组腺病毒的构建

取 pAdTrack-CMV-ORF1-ORF2 重组穿梭载体进行 *Pme* I 酶切,获得完全线性化的 pAdTrack-CMV-ORF1-ORF2,然后将其转化 pAdeasy-1 感受态细胞,进行 Kan⁺ 抗性筛选。挑取 Kan⁺ 单克隆进行 *Pac* I 酶切鉴定,以证实获得的重组腺病毒质粒含有 ORF1-ORF2 基因。将重组的腺病毒 DNA 经 *Pac* I 线性化后做酒精沉淀^[5],然后参考文献^[6]及脂质体 Lipofectamine™2000 说明书提供的方法转染 293 细胞,连续培养细胞 10 d,期间每隔 2 天换液 1 次。待 293 细胞出现明显的病变后收集细胞,进行荧光显微镜观察,并以 P₁/P₄,P₁/P₂ 和 P₃/P₄ 为引物进行 PCR 检测,以验证是否获得携带 PCV2 ORF1-ORF2 基因的重组腺病毒^[7]。

1.7 重组腺病毒的免疫效果试验

1.7.1 重组腺病毒的制备及滴度测定 培养 293

细胞,待细胞培养铺满板底面积的 80%~90%时,分别接种重组腺病毒 Ad 和 Ad-ORF1-ORF2。2~3 d 后,当细胞病变达到 80%以上时,收获细胞,-20 °C 反复冻融 3 次,在 4 °C 以 4 000~5 000 r/min 离心 15 min,收集上清,用 Adeno-XTM Rapid Titer Kit 测定腺病毒的滴度。

1.7.2 小鼠免疫 将 20 只 SPF 级 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠随机分为 2 组,每组 10 只。断尾采血进行腺病毒和 PCV2 抗体检测,阴性小鼠用于接种。接种时,先用乙醚麻醉小鼠,然后将 100 μ L 1 \times 10⁷ 感染空斑单位(ifu)的重组腺病毒滴入小鼠鼻腔,对照组滴免疫空载体 Ad 腺病毒。15 d 后,断尾采血,获得一免血清;然后用与初次免疫同等剂量的病毒加强免疫 1 次,30 d 后断尾采血,获得二免血清。

1.7.3 小鼠血清中 PCV2 特异性 IgG 抗体的测定 用间接 ELISA 方法测定抗体效价,具体操作参照 ELISA 试剂盒说明书进行,但将试剂盒中的二抗换成辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 的单抗。

2 结果与分析

2.1 PCV2 ORF1、ORF2 基因的 PCR 扩增结果

结果显示,ORF1(945 bp)和 ORF2(705 bp)基因的特异片段扩增成功(图 1)。

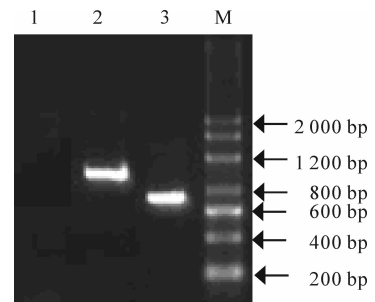


图 1 PCV2 ORF1 和 ORF2 基因 PCR 扩增产物的电泳结果
1. 水(阴性对照);2. ORF1 的 PCR 扩增产物;3. ORF2 的 PCR 扩增产物;M. DNA Marker(SD005)

Fig. 1 ORF1 and ORF2 gene amplified by PCR

1. PCR with H₂O as Negative template;2. Partial ORF1 amplified from PCV2;3. Partial ORF2 amplified from PCV2; M. DNA marker(SD005)

2.2 pMD18-ORF1-ORF2 质粒的酶切鉴定

pMD18-ORF1-ORF2 质粒经 *Spe* I/*Hind* III 双酶切,可切出约 700 bp ORF2 基因;经 *Kpn* I/*Spe* I 双酶切,可切出约 950 bp ORF1 基因(图 2)。

2.3 重组腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV-ORF1-ORF2 的鉴定

pAdTrack-CMV-ORF1-ORF2 经 *Kpn* I/*Spe* I、

Spe I / *Not* I 和 *Kpn* I / *Not* I 双酶切, 分别切出与 *ORF1* (约 950 bp)、*ORF2* (约 700 bp) 和 *ORF1-ORF2* (约 1 700 bp) 长度相符的片段(图 3)。PCR 鉴定结果显示, 可以扩增出与 *ORF1*、*ORF2*、*ORF1-ORF2* 长度相符的片段(图 4)。

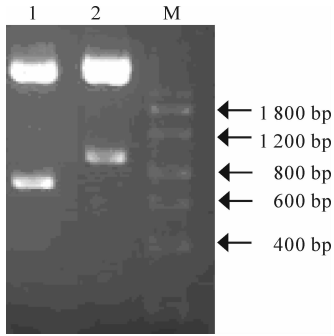


图 2 pMD18-ORF1-ORF2 阳性质粒的双酶切鉴定结果

1. *Spe* I / *Hind* III 双酶切结果;

2. *Kpn* I / *Spe* I 双酶切结果; M. DNA Marker(SD005)

Fig. 2 Identification of the recombination plasmid by digestion with double restriction enzymes

1. The result of pMD18-ORF1-ORF2 digested with *Spe* I / *Hind* III;

2. The result of pMD18-ORF1-ORF2 digested with *Kpn* II / *Spe* II;

M. DNA marker(SD005)

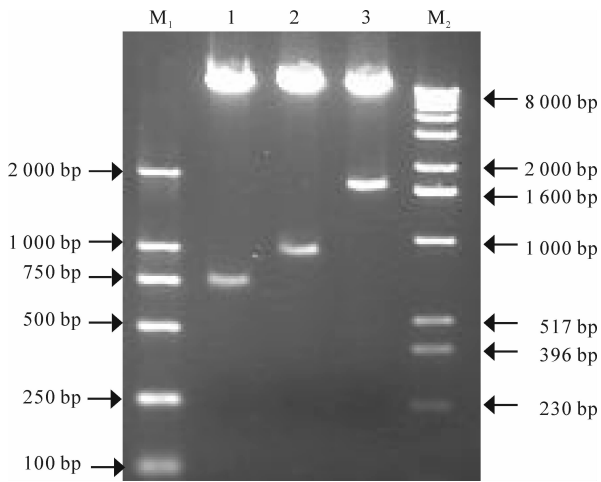


图 3 pAdTracK-CMV-ORF1-ORF2 的双酶切鉴定结果

M₁. DNA Marker(DL2000); 1. *Spe* I / *Not* I 双酶切结果;

2. *Kpn* I / *Spe* I 双酶切结果; 3. *Kpn* I / *Not* I 双酶切结果;

M₂. DNAMarker(D016-2)

Fig. 3 Identification of the recombination pAdTracK-CMV-ORF1-ORF2 by digestion with restriction enzymes

M₁. DNA marker(DL2000); 1. The recombination plasmid digested with *Spe* I and *Not* I;

2. The recombination plasmid digested with *Kpn* I and *Spe* I;

3. The recombination plasmid digested with *Kpn* I and *Not* I;

M₂. DNA marker(D016-2)

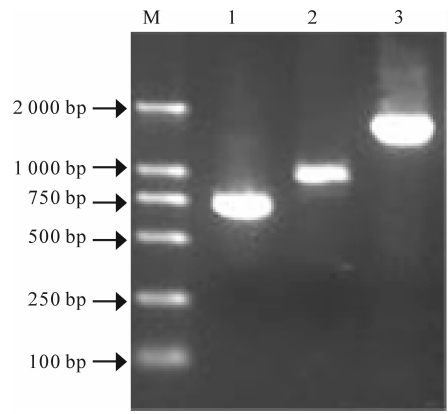


图 4 重组腺病毒穿梭载体 pAdTracK-CMV-ORF1-ORF2 的 PCR 鉴定结果

M. DNA Marker(DL2000); 1. 引物 P3/P4 扩增产物;

2. 引物 P1/P2 扩增产物; 3. 引物 P1/P4 扩增产物

Fig. 4 Identification of pAdTracK-CMV-ORF1-ORF2 by PCR

M. DNA marker(DL2000); 1. PCR amplified from the recombination plasmid with primer P3/P4;

2. PCR amplified from the recombination plasmid with primer P1/P2;

3. PCR amplified from the recombination plasmid with primer P1/P4

2.4 重组腺病毒质粒 pAdTracK-CMV-ORF1-ORF2 的酶切鉴定

理论上讲, 由于重组位点的差异, 重组腺病毒质粒 *Pac* I 酶切的结果有 2 种可能, 一种为 4.5 kb 和 30 kb, 另一种是 3.0 和 30 kb。本试验构建的同源重组腺病毒质粒 pAdCMV-ORF1-ORF2 经 *Pac* I 酶切后, 切出一条大小为 4.5 kb 的小片段和一条大小约 30 kb 的大片段(图 5)。

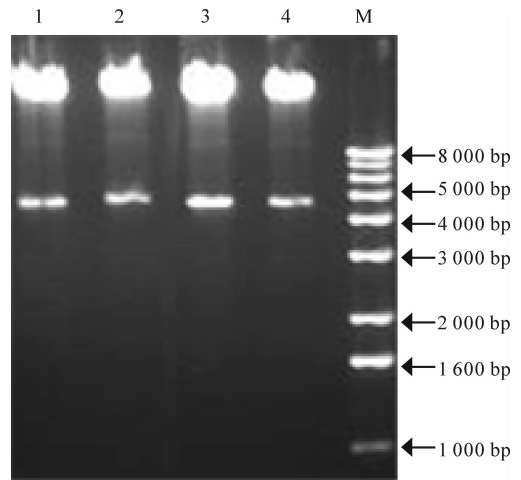


图 5 重组腺病毒质粒 pAdCMV-ORF1-ORF2 *Pac* I 酶切鉴定结果

1~4. *Pac* I 的酶切产物; M. DNA Marker(D016-2)

Fig. 5 Identification of the pAdCMV-ORF1-ORF2 with *Pac* I

1-4. pAdCMV-ORF1-ORF2 digested with *Pac* I;

M. DNA Marker(D016-2)

2.5 重组腺病毒的鉴定

脂质体 LipofectamineTM2000 介导重组腺病毒转染 293 细胞后,转染组细胞发生明显病变(图 6),病变的细胞在荧光显微镜下可观察到大量呈粗

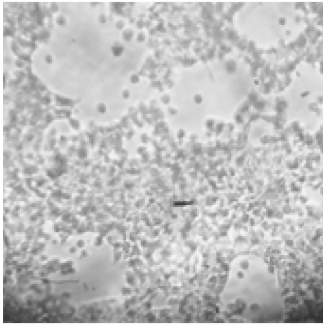


图 6 重组腺病毒转染的 293 细胞

Fig. 6 CPE of 293 cells

颗粒状或团块状的绿色荧光(图 7)。重组病毒液以 P1/P2、P3/P4 和 P1/P4 为引物进行 PCR 扩增,分别扩增出与 ORF1、ORF2、ORF1-ORF2 长度相符的片段(图 8)。

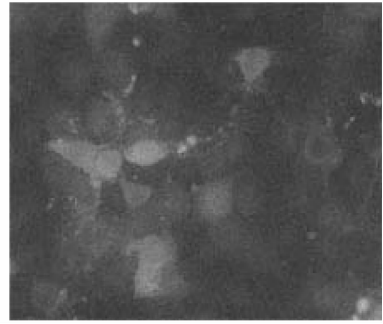


图 7 带有绿色荧光腺病毒的 293 细胞

Fig. 7 The adenovirus with green fluorescent

2.6 重组腺病毒免疫小鼠的抗体检测

结果(表 1)表明,重组腺病毒 AdCMV-ORF1-ORF2 可诱导小鼠产生针对 PCV2 的特异性抗体。

3 讨论

目前 PCV2 作为一种新发现病毒,已在全世界广泛存在^[8],已成为严重危害养猪业发展的重要病原之一。目前,对于 PCV2 的控制还没有更好的办法,所以检测方法的建立和高效疫苗的研制尤为迫切。由于 PCV2 不产生细胞病变,细胞培养后病毒的滴度较低,加之病毒粒子很小,纯化难度大,使得制备以高滴度抗原为基础的 PCV2 灭活苗存在诸多困难。考虑到 PCV2 为 DNA 病毒,比较保守,而且基因组小,所以比较适合做基因工程疫苗。ORF1 和 ORF2 基因是 PCV2 的主要基因,二者是构建重组疫苗和建立检测方法的首选基因^[9-10]。

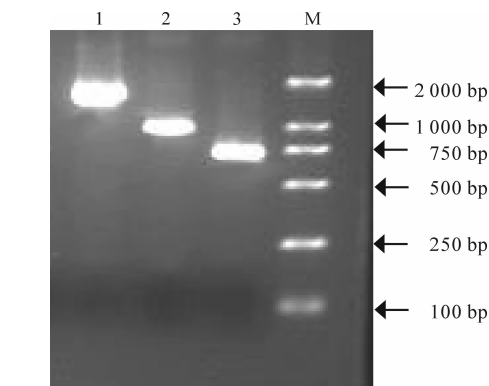


图 8 重组腺病毒 AdCMV-ORF1-ORF2 的 PCR 鉴定

1~3. 分别为引物 P1/P4、P1/P2 和 P3/P4 的 PCR 扩增产物;
M. DNA Marker(DL2000)

Fig. 8 Identification of AdCMV-ORF1-ORF2 by PCR

1-3. PCR amplified from AdCMV-ORF1-ORF2 with primer P1/P4, P1/P2 and P3/P4; M. DNA marker (DL2000)

表 1 重组腺病毒 AdCMV-ORF1-ORF2 免疫小鼠特异性抗体效价的 ELISA 测定结果

Table 1 Results of OD value of PCV2 antibody in immunized sera detected by ELISA

小鼠编号 The No. of mice	一免 The first immune		二免 The second immune	
	试验组 Experiment team	对照组 Negative team	试验组 Experiment team	对照组 Negative team
1	0.253	0.049	0.427	0.055
2	0.199	0.053	0.376	0.047
3	0.311	0.033	0.422	0.030
4	0.217	0.041	0.345	0.059
5	0.249	0.060	0.384	0.070
6	0.274	0.037	0.426	0.042
7	0.192	0.044	0.391	0.038
8	0.229	0.051	0.413	0.041
9	0.235	0.045	0.430	0.033
10	0.227	0.032	0.409	0.044