

猪 2 型圆环病毒核酸疫苗免疫效应研究

宋云峰, 肖少波, 金梅林, 张松林, 陈焕春*
(华中农业大学动物医学院动物病毒室, 武汉 430070)

摘要: PCR 扩增 PCV2 ORF2 和 BVP22 基因。将 ORF2 基因克隆入真核表达载体 pCDNA3.1(+), 构建了 pCORF2 作为核酸疫苗免疫小白鼠。同时将具有蛋白转导功能的 BVP22 基因分别克隆到 ORF2 基因的上游和下游, 使二者融合表达, 命名为 pCORF2BVP22 和 pCBVP22ORF2。分 4 组肌肉免疫 BALB/c 小白鼠, 分别注射 pCDNA3.1(+), pCORF2, pCORF2BVP22 和 pCBVP22ORF2, 共免疫 2 次, 间隔 2 周, 分别于首免后 2 周和二免后 4 周采血, ELISA 法检测体液抗体。同时为在体外验证 ORF2 和 BVP22 基因的真核表达, 将 ORF2 和 BVP22 基因分别克隆入 pEGFP-N1 载体, 构建了 pNORF2 和 pNBVP22, 转染 HeLa 细胞后在荧光显微镜下观察到了 ORF2 和 BVP22 在体外的瞬时高效表达。结果显示, 通过两次免疫后, 各疫苗组均产生了针对 ORF2 的体液抗体, 同时证明 BVP22 可增强核酸疫苗的免疫效果, 其中以 BVP22 在 ORF2 上游效果更好。本研究为防制猪 2 型圆环病毒感染提供了较为理想的候选疫苗。

关键词: 猪 2 型圆环病毒; ORF2; BVP22; 蛋白转导; 核酸疫苗

中图分类号: S858.285.3; S852⁺ 2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)10-1049-06

猪 2 型圆环病毒 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 属于环状病毒属, 该病毒无囊膜, 病毒粒子直径约为 15~17 nm, 基因组为单链环状 DNA, 大小约为 1.7 kb, 主要由两个大的开放阅读框架组成, ORF1 编码 Rep 蛋白^[1], 与病毒的复制有关。ORF2 编码核衣壳蛋白^[2], 是病毒的主要结构蛋白。PCV2 可引起断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)^[3], 主要症状为生长缓慢, 贫血, 呼吸困难, 黄疸等, 病理变化主要为间质性肺炎, 淋巴节炎, 肝炎, 肾病。PCV2 在淋巴系统增殖, 可导致机体免疫功能下降, 造成其它病毒、细菌性疾病的并发或继发。该病自 20 世纪 90 年代爆发以来, 在世界各地均有报道。关于该病疫苗的研究, 主要集中在基于 ORF2 基因的新型疫苗研究上。Blanchard 等用 ORF2 基因的杆状病毒表达产物免疫猪, 可使猪产生对 PCV2 的抵抗力^[4]。Kamstrup 等用 ORF2 基因的核酸疫苗免疫小白鼠, 在首免后 62 d 小白鼠体内可检测到高水平的体液抗体^[5]。在我国还未见关于防制该病疫苗的报道。本研究从笔者实验室分离的 PCV2 豫 A 株中扩

增得到 ORF2 基因, 并将其克隆至真核表达载体 pCDNA3.1(+) 中, 以期获得针对 PCV2 的核酸疫苗。

牛 1 型疱疹病毒 VP22 基因 (Bovine herpesvirus 1 VP22, BVP22) 由 258 个氨基酸组成。Harms 等通过瞬时表达 BVP22-EGFP 融合蛋白发现 BVP22 具有蛋白转导功能, 并且转导能力比 HSV-1 VP22 (HVP22) 更强^[6]。Derer 等证明 VP22 融合蛋白可在转染细胞与未转染细胞之间传递, 并可在高度分化的肌肉细胞中转导, 这一结果为通过蛋白转导来提高核酸疫苗的效果提供了理论依据^[7]。Oliverria 等构建了 BVP22-YFP 融合表达的 DNA 疫苗, 免疫小白鼠的结果显示特异性体液免疫和特异性细胞免疫都得到了增强^[8]。本研究在构建 PCV2 ORF2 核酸疫苗的同时, 构建了 BVP22 与 ORF2 融合表达的核酸疫苗, 并且使 BVP22 基因分别位于 ORF2 基因的上游和下游, 以期获得较好的免疫增强作用。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞

pMD18-T 载体购自宝生物 (大连) 公司; 真核表达载体 pCDNA3.1(+) 购自 Invitrogen 公司; 含有 CMV 启动子, 表达增强绿色荧光蛋白的质粒 pEGFP-N1, 购自 BD Biosciences Clontech 公司; 原核表达 PCV2 ORF2 融合蛋白的质粒 pGEXORF2 由笔者实验室构建并保存^[9]; 感受态细胞大肠杆菌

收稿日期: 2004-10-19

基金项目: “863” 项目 (2001AA213051)

作者简介: 宋云峰 (1978-), 男, 山东淄博人, 博士生, 从事病毒基因工程疫苗研究

* 通讯作者: 陈焕春, Tel: 027-87282608; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

(*Escherichia Coli*) DH5α ,BL21 ,Hela 细胞均由笔者实验室保存。

1.2 生化试剂

限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、碱性磷酸酶均购自宝生物(大连)公司; *Taq* DNA 聚合酶购自

BIOSTAR 公司; 转染用脂质体购自 Introvigen 公司; DNA 胶回收试剂盒购自上海生工公司。

1.3 PCR 引物

用于扩增 PCV2 ORF2 及 BVP22 基因的引物如表 1 所示。所有引物均由上海生工公司合成。

表 1 用于扩增 PCV2 ORF2 及 BVP22 基因的引物序列及酶切位点

Table 1 Primer sequence of the PCV2 ORF2 and BVP22

| 引物名称 Prime | 引物序列 Sequence | 酶切位点 Enzyme site |
|------------|------------------------------------|------------------|
| P1 | 5'-GAAAAGCTTGCCATGACGTATCCAAGGA-3' | <i>Hind</i> III |
| P2 | 5'-GAAAGATCTCTTAGGGTTAAGTGGGGG-3' | <i>Bgl</i> II |
| P3 | 5'-GAAAGATCTGCCATGACGTATCCAAGGA-3' | <i>Bgl</i> II |
| P4 | 5'-GAAGATATCTCACTTAGGGTTAAGTG-3' | <i>EcoR</i> V |
| P5 | 5'-GAAAGATCTGGCTTAGGGTTAAGTG-3' | <i>Bgl</i> II |
| Pb1 | 5'-TTTGGATCCGCCATGGCCCCGTTCCAC-3' | <i>Bam</i> H I |
| Pb2 | 5'-TAAGAATTCAAAGCCCTCCCGCTCG-3' | <i>EcoR</i> I |
| Pb3 | 5'-TTTAGATCTGCCATGGCCCCGTTCCACA-3' | <i>Bgl</i> II |
| Pb4 | 5'-TTTGGATCCCGGCCGGCCCGCTCG-3' | <i>Bam</i> H I |

1.4 ORF2 及 BVP22 基因的扩增

用 P1 和 P2, P3 和 P4, P1 和 P5 分别扩增 ORF2 基因, PCR 反应程序均为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。用 Pb1 和 Pb2, Pb3 和 Pb4 分别扩增 BVP22, PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应结束后进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 按 DNA 胶回收试剂盒的操作说明回收 PCR 产物, 并与 T 载体连接, 送宝生物(大连)公司测序。

1.5 核酸疫苗载体的构建

1.5.1 pCORF2 的构建 将 ORF2 基因用 *Bgl*II 和 *EcoR* V 从 T 载体上切下, 与经 *Bam*HI 和 *EcoR* V 酶切的 pCDNA3. 1(+) 载体连接, 用 *Hind* II 和 *EcoR* V 酶切鉴定, 挑取阳性重组子, 命名为 pCORF2(图 1)。

1.5.2 pCORF2BVP22 的构建 将 BVP22 基因用 *Bam*HI 和 *EcoR*I 从 T 载体上切下, 与 *Bam*HI 和 *EcoR*I 酶切的后的 pCDNA3. 1(+) 载体连接, 挑取阳性重组子, 命名为 pCBVPA。然后用 *Hind* III 和 *Bgl* II 将 ORF2 基因从 T 载体上切下, 与 *Hind* II 和 *Bam*HI 酶切的 pCBVPA 质粒连接, 用 *Hind* II 和 *EcoR* V 双酶切鉴定阳性重组子, 命名为 pCORF2BVP22(图 1)。

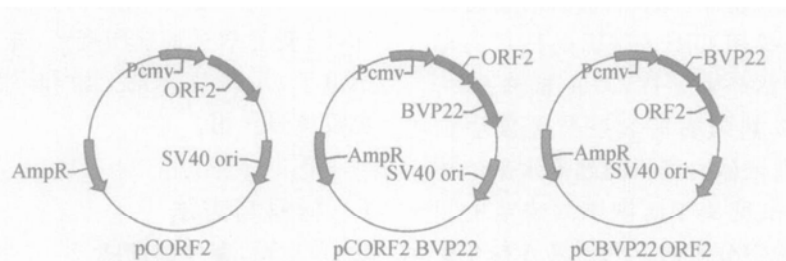


图 1 核酸疫苗载体质粒结构

Fig.1 Schematic of the nucleotide vaccines

1.5.3 pCBV22ORF2 的构建 将 BVP22 基因用 *Bgl* II 和 *Bam*H I 从 T 载体上切下, 与经 *Bam*H I 酶切的 pCDNA3. 1(+) 载体连接, 酶切鉴定正确后

命名为 pCBVPB。用 *Bgl* II 和 *EcoR* V 将 ORF2 基因从 T 载体上切下, 与经 *Bam*H I 和 *EcoR* V 酶切的 pCBVPB 质粒连接, 用 *Hind* III 和 *EcoR* V 双酶切

鉴定, 挑取阳性重组子命名为 pCBVP22ORF2 (图 1)。

3 种核酸疫苗载体连同空载体 pCDNA3. 1 (+), 用碱裂解法大量制备, PEG8000 纯化, 用 PBS 稀释至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 ORF2 基因和 BVP22 基因的体外表达

1.6.1 ORF2 及 BVP22 体外表达载体的构建 将 P1 和 P2 扩增的 ORF2 基因连入 T 载体, 然后用 *Hind* III 和 *Bgl* II 切下, 连入用 *Hind* III 和 *Bam*HI 酶切的 pEGFP-N1 载体, 用 *Hind* III 和 *Stu* I 双酶切鉴定, 挑取阳性克隆命名为 pNORF2。将 Pb3 和 Pb4 扩增的 BVP22 基因, 连入 T 载体, 然后用 *Bgl* II 和 *Bam*HI 切下, 与经过 *Bam*HI 酶切的 pEGFP-N1 载体连接, 用 *Bgl* II 和 *Bam*HI 双酶切鉴定, 挑取阳性重组子命名为 pNBVP22。

以上 2 个载体连同空载体 pEGFP-N1, 均按照碱裂解法大量制备, PEG8000 纯化, 用去离子水稀释至浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6.2 表达质粒的转染及表达检测 HeLa 细胞在细胞瓶中生长至单层时, 用胰酶消化, 用含 10% 犊牛血清的 DMEM 吹下, 转至 24 孔细胞培养板。待 24 孔板中细胞有 60% ~ 80% 融合时, 取 pEGFP-N1、pNORF2、pNBVP22 各 2 μg 按 Lipofectamine2000 转染试剂盒的说明进行转染。于转染后 18 h 将细胞置 OLYMPUS M081 倒置荧光显微镜下观察荧光。

1.7 动物试验

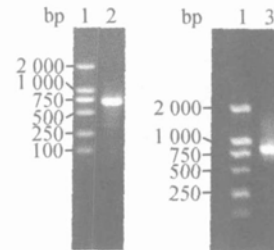
1.7.1 试验动物分组 6 周龄 SPF BALB/c 小白鼠 20 只, 购自湖北省预防医学科学院。随机分为 4 组, 每组 5 只, 分别肌肉注射 pCDNA3. 1 (+)、pCORF2、pCORF2BVP22、pCBVP22ORF2, 注射部位为双侧股四头肌, 每组免疫 2 次, 间隔 2 周, 免疫剂量为 100 $\mu\text{g}/\text{只}$ 。分别于首免后 2 周和二免后 4 周断尾采血, 分离血清。

1.7.2 血清抗体的 ELISA 检测 ORF2 的原核表达载体 pGEXORF2 转化 BL21, 经 IPTG 诱导后 3 h, 按《蛋白质纯化与鉴定技术》的方法制备包涵体, 复性后作为抗原包被酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS-T 洗板 3 次, 用含 0.1% BSA 的 PBS-T 封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min。PBS-T 洗涤 3 次后, 加入 1:40 倍稀释的血清, 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min。PBS-T 洗 3 次, 加 1:6000 稀释的羊抗鼠 IgG 的酶标二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min。PBS-T 洗涤 3 次后加入 TAB 底物缓冲液, 显色 15 min, HF 溶液中中止。用酶标仪测定 OD₆₃₀, 每组取 OD₆₃₀ 的平均值。

2 结果与分析

2.1 ORF2 和 BVP22 的扩增结果

取 PCR 产物各 8 μL , 进行 0.8% 琼脂糖电泳, ORF2 扩增的大小约为 705 bp, BVP22 扩增的大小约为 777 bp, 与预期大小相符(图 2)。



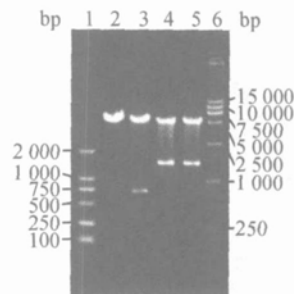
1. DL2000 marker; 2. PCR product of ORF2;
3. PCR product of BVP22

图 2 ORF2 和 BVP22 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR product of ORF2 and BVP22

2.2 核酸疫苗载体质粒的酶切鉴定

3 种质粒均用 *Hind* III 和 *Eco*R V 双酶切, 均可切下插入的外源片段, 分别在 705、1500、1500 bp 左右(图 3)。



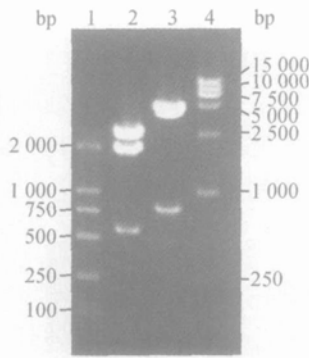
1. DL2000 marker; 2. pCDNA3. 1(+); 3. pCORF2;
4. pCORF2BVP22; 5. pCBVP22ORF2; 6. DL15000 marker

图 3 *Hind* III 和 *Eco*R V 双酶切
鉴定核酸疫苗载体质粒

Fig. 3 Identification of the nucleotide vaccine
vectors by *Hind* III and *Eco*R V

2.3 pNORF2 和 pNBVP22 质粒的酶切鉴定

用 *Hind* III 和 *Stu* I 双酶切鉴定质粒 pNORF2, 由于在 ORF2 第 588 位和载体 pEGFP-N1 第 2576 位处都有一 *Stu* I 位点, 而 ORF2 在第 620 位处插入, 所以可切出大约为 600、2100 和 2700 bp 的 3 条片段。用 *Bgl* II 和 *Bam*HI 双酶切质粒 pNBVP22, 可将 BVP22 基因切下, 可见有约 774 bp 和 4.7 kb 的带(图 4)。

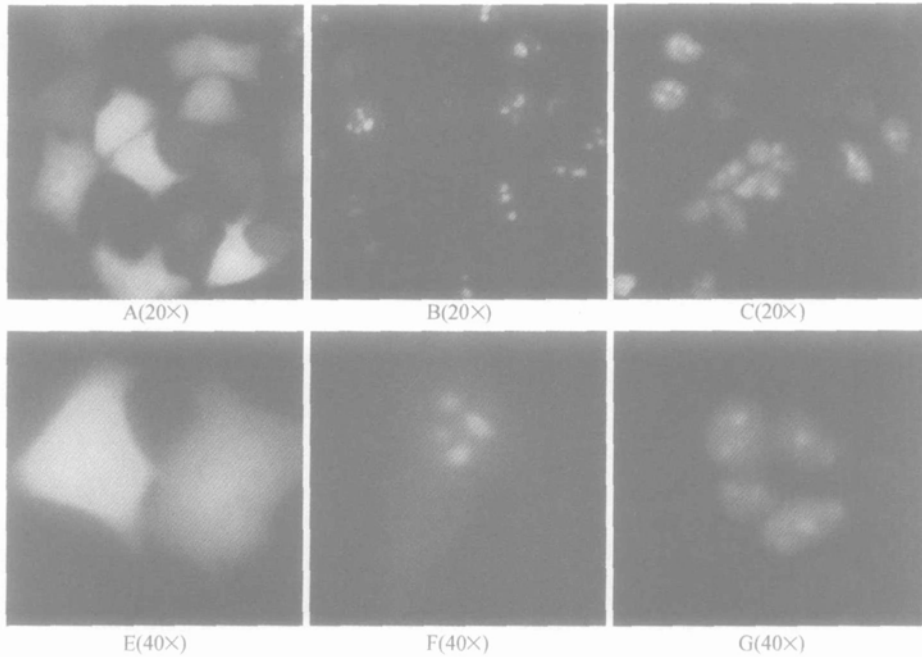


1. DL2000 marker; 2. pNORF2/*Hind* III+ *Stu* I ;
3. pNBVP22/*Bgl* II+ *Bam* H I ; 4. DL15000 marker

图4 pNORF2和pNBVP22的酶切鉴定结果
Fig. 4 Enzyme digestion identification
of pNORF2 and pNBVP22

2.4 ORF2和BVP22的体外表达

表达载体转染Hela细胞后18h在倒置显微镜下观察。转染pNORF2质粒的细胞可见绿色荧光表达,且荧光都固缩于细胞核周围,而在细胞质中却很少见荧光,对照质粒pEGFP-N1转染的细胞也发荧光,但不同的是整个细胞中都发出散在的荧光。这一结果证实笔者所克隆的ORF2基因在异源启动子CMV的作用下,在真核细胞中可以表达,而且是表达在核周。转染pNBVP22的细胞也有绿色荧光表达,而且也可见BVP22是核定位的,但与pNORF2转染的细胞不同之处是荧光在核周的光密度高,但在细胞质中也有荧光分布(图5)。



A and E. pEGFP-N1 transfection; B and F. pNORF2 transfection; C and G. pNBVP22 transfection

图5 ORF2和BVP22基因体外表达的检测

Fig. 5 Observation of ORF2 and BVP22 gene expression in vitro

2.5 ELISA方法检测抗体水平

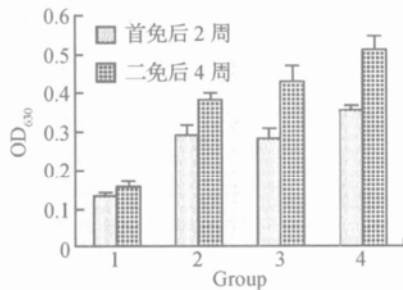
ELISA结果如图6所示。2次免疫后pCD-NA3.1(+)组的ORF2特异性抗体很低,而在首次免疫后2周,各试验组已有抗体产生,OD₆₃₀分别为0.291,0.282,0.354,抗体水平相近,抗体水平总体不高。而加强免疫后4周,各疫苗组的特异性抗体水平则明显升高,OD₆₃₀分别为0.383,0.430,0.512,加入蛋白转导的两组的抗体水平高于未加蛋白转导的试验组,而pCBVP22ORF2试验组则明显

高于pCORF2试验组($P < 0.01$)。

3 讨论

PCV2不但引起PMWS,还与猪皮炎和肾病综合征,母猪繁殖障碍,断奶和育肥猪的呼吸道疾病,猪先天性震颤等疾病有关。PCV2主要在宿主的淋巴系统增殖,可致使B淋巴细胞凋亡^[10],影响肺泡巨噬细胞的正常功能^[11],降低外周血中CD8⁺分子含量^[12],从而具有免疫抑制作用,因此有人将PCV2

病毒称为猪场中隐藏的定时炸弹。PMWS 主要发生于 9~12 周龄的断奶仔猪, 母源抗体可保护仔猪免受 PCV2 侵害, 而在断奶后母源抗体水平下降, 不能形成有效保护, 导致病毒感染。疫苗免疫是防制该病的有效手段, 但 PCV2 生物学特性比较特殊, 它在细胞上增殖滴度很低, 而且不引起细胞病变, 使用 D-氨基葡萄糖处理细胞后病毒滴度可以升高, 但 D-氨基葡萄糖对细胞有毒而使细胞很快死亡, 因此发展传统的灭活疫苗和弱毒疫苗的难度很大。核酸疫苗可激起机体特异性免疫应答, 免疫期长, 而且具有生产成本低, 易于大规模生产和易于保存的优点, 是具有应用前景的新一代疫苗。



1. pCDNA3.1(+); 2. pCORF2; 3. pCORF2BVP22;
4. pCBVP22ORF2

图 6 各试验组 ELISA 结果对比

Fig. 6 ELISA antibodies difference between the four groups

由于受抗原在体内表达量的影响, 核酸疫苗往往不能激发机体产生很强的免疫反应, 如果反复免疫则容易引起免疫耐受。因此许多学者都力图寻找理想的佐剂来增强核酸疫苗的免疫效果, 如白介素^[13]、CpG 岛^[14]和蛋白转导^[18]等。现发现蛋白转导家族有 HIV 的 *Tat* 基因、果蝇的 *Antp* 和 α 疱疹病毒亚科的 VP22 基因。VP22 基因在 α 疱疹病毒亚科各病毒之间具有很高的同源性, 都具有蛋白转导的活性, 其中以 BVP22 基因的蛋白转导活性最强。本试验在构建了 PCV2 ORF2 核酸疫苗的同时, 构建了 BVP22-ORF2 融合表达的核酸疫苗, 并使 BVP22 基因分别位于 ORF2 基因的上游和下游, 以此来研究蛋白转导对核酸疫苗的增强作用。通过 ELISA 检测可以看出, BVP22 不论位于 ORF2 基因的上游还是下游均可增强核酸疫苗的免疫效果, 而 BVP22 基因在 ORF2 基因上游具有更强的增强效果。Ren 等推测 BVP22 蛋白转导功能域可能位于 C-末端 118-258 位氨基酸^[15], 据此推测 pCBVP22ORF2 免疫效果好于 pCORF2BV22 免疫效果

的原因可能是 ORF2 基因更接近 BVP22 蛋白的转导功能域。

绿色荧光蛋白基因作为报告基因, 操作方便, 结果直观, 并且使在活体细胞内研究靶蛋白的功能成为可能, 近年来越来越多地用于研究基因的表达和外源蛋白在活细胞内的定位及功能^[16]。本试验用增强绿色荧光蛋白(EGFP)作为报告基因, 在 HeLa 细胞上成功表达了 ORF2 和 BVP22 基因, 并且可以清楚地看到 ORF2 和 BVP22 基因表达后在细胞中的定位。ORF2 在细胞中表达后全部固缩于核周, 在细胞质及细胞间隙很少有分布, 而 BVP22 表达后主要定位于核周, 但细胞质内也有大量的荧光。从 ELISA 结果可以看出, pCORF2 免疫后产生的抗体水平比较低, 这可能因为 ORF2 表达后定位在细胞核, 而与体液的接触概率低。BVP22 与 ORF2 基因融合表达后, BVP22 可将 ORF2 携带进入细胞质乃至另一细胞, 从而增加了 ORF2 与体液接触的概率, 因而可以引起较强的体液免疫反应。

本研究证明笔者所构建的 ORF2 核酸疫苗, 可以在小白鼠体内表达, 并刺激机体产生特异性体液抗体, 但要成为防制 PMWS 候选疫苗, 还需要进一步证明其可在猪体内表达并刺激产生抗体。

参考文献:

- [1] Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, et al. Identification of protein essential for replication of porcine circovirus [J]. *J Gen Virol*, 79: 381~384.
- [2] Pornthippa N, Logr M, Steven R B, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2 281~2 287.
- [3] Morozov I, Sirinarumitr T, Sorden S D, et al. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 2 535~2 541.
- [4] 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): 4 565~4 575.
- [5] Kamstrup S, Barfoed A M, Frimann T H, et al. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice [J]. *Vaccine*, 2004, 22(11-12): 1 358~1 361.
- [6] Harms J S, Ren X, Oliverra S C, et al. Distinctions

- between bovine herpesvirus 1 and herpes simplex virus type 1 VP22 tegument protein subcellular associations [J]. *J Virol*, 2000, 74: 3 301~ 3 312.
- [7] Derer W, Easwaran H P, Knopf C W, et al. Direct protein transfer to terminally differentiated muscle cells[J]. *J Mol Med*, 1999, 77: 609~ 613.
- [8] Oliveira S C, Harms J S, Afonso R R, et al. A genetic immunization adjuvant system based on BVP22-antigen fusion[J]. *Human Gene Therapy*, 2001, 12: 1 353~ 1 359.
- [9] 琚春梅, 陈焕春, 刘正飞, 等. 应用在大肠杆菌中表达的猪 2 型圆环病毒 ORF2 蛋白建立一种 ELISA 诊断方法[J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(6): 689~ 693.
- [10] Tomoyuki S, Kenshi S, Yoshiharu I, et al. Porcine circovirus induce B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome[J]. *J Vet Med Sci*, 2000, 62 (11): 1 125~ 1 131.
- [11] Meneilly F, Allan G M, Foster J C, et al. Effect of porcine circovirus infection of porcine alveolar macrophage function[J]. *J Vet Med Sci*, 1996, 49: 295~ 306.
- [12] Darwich L, Segales J, Domingo M, et al. Changes in CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺ CD8⁺, and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9: 236~ 242.
- [13] Anne C M, Wing-pui K, Bimal K, et al. Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice [J]. *J Virol*, 2002, 76 (1): 243~ 250.
- [14] Oxenius A, Martinic M M, Hengartner H, et al. CpG-Containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines [J]. *J Virol*, 1999, 73(5): 4 120~ 4 126.
- [15] Ren X, Harms J S, Splotter G A. Bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22 interacts with histones, and the carboxyl terminus of VP22 is required for nuclear localization[J]. *J Virol*, 2001, 75: 8 251~ 8 258.
- [16] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263: 802~ 805.

Study on the Nucleotide Vaccine Immune Effect of Porcine Circovirus Type 2 Virus

SONG Yun-feng, XIAO Shao-bo, JIN Mei-lin, ZHANG Song-lin, CHEN Huan-chun*

(Laboratory of Animal Virology, College of Veterinary Medicine,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The ORF2 of porcine circovirus type 2 and BVP22 of bovine herpesvirus were amplified by PCR. The cloned ORF2 gene was inserted into eukaryotic expression vector pCDNA3. 1(+) for constructing nucleotide vaccine vector pCORF2. Then nucleotide vaccine vectors which express BVP22-ORF2 fusion protein were constructed by inserting BVP22 gene, which has the function of protein transduction into pCORF2 at the upstream or downstream of the ORF2 gene respectively. All the above vaccines were intramuscular injected to BALB/c mice for twice at two weeks interval. 2 and 6 weeks after the first immune injection, serums were collected and the humoral antibodies were tested by ELISA. The result of ELISA showed that all the experimental groups produced anti-ORF2 antibodies, and high antibody level showed four weeks after the second immune injection. Results also showed that BVP22 could enhance the efficiency of ORF2 nucleotide vaccine. Our research provided a candidate vaccine for controlling PCV2 infection.

Key words: porcine circovirus type 2; ORF2; BVP22; protein transduction; nucleotide vaccine

* Corresponding author