

猪圆环病毒 2 型重组病毒 ZJ-R 感染性克隆的构建

温立斌¹ 张丹¹ 何孔旺¹ 解建平¹ 董美响²

1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/

国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014;

2. 河北省饲料工业协会, 石家庄 050021

摘要 利用无缝克隆方法构建 ZJ-R 全长基因组的单拷贝分子克隆以及双拷贝串联分子克隆; 通过生物信息技术预测 ZJ-R 病毒结构蛋白的 B 细胞抗原表位, 人工合成选定的表位肽, 然后偶联 KLH 免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体; 免疫组化试验证实该多抗与转染 PK15 细胞的 ZJ-R 双拷贝串联分子克隆具有反应性。结果表明构建的 ZJ-R 双拷贝串联分子克隆具有感染性。

关键词 猪圆环病毒 2 型重组病毒 ZJ-R; 无缝克隆; B 细胞表位; 肽抗体; 感染性克隆

中图分类号 S 852.65 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)02-0097-04

猪圆环病毒 2 型(PCV2)被认为是猪圆环病毒相关疾病(PCVAD)的必要病原^[1-2]。PCVAD 包括临床常见的猪断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)、猪皮炎与肾病综合征(PDNS), 也包括繁殖障碍、呼吸道疾病等。此外, PCV2 还可引起机体免疫抑制, 容易导致继发感染和免疫失败。目前, 单纯用 PCV2 感染动物很难复制出典型的临床症状, 许多学者认为还有其他未知因子与 PCV2 共同起作用。我们前期陆续发现了 2 株 PCV2 重组病毒—P1 和 P2, 它们可能是 PCV2 与其他病毒基因组重组形成的^[3-4]。最近, 我们报道了 PCV2 与宿主基因组重组形成的 ZJ-R 病毒(GenBank 登录号 KM259933), 同 P1 和 P2 一样, ZJ-R 病毒也具有闭合环状 DNA 基因组^[5]。本研究旨在构建 ZJ-R 病毒的感染性克隆, 为进一步研究 ZJ-R 病毒的生物学特性以及其在 PCV2 致病过程中扮演的角色奠定基础。

1 材料与方法

1.1 载体、细胞、试剂及试验动物

pBluescriptSK (pSK) 载体、ZJ-R 全基因组的 pMD18-T 载体以及无 PCV1 和 PCV2 污染的 PK15 细胞由江苏省农业科学院兽医研究所人兽共患病防

控研究室保存; GBclonart 无缝组装试剂盒为上海诺晶生物科技有限公司产品; DNA 片段胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒为 AxyGen 产品; 转染试剂 Lipofectamine™2000 为 Invitrogen 产品; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂为 Giffico 产品; 匙空血蓝蛋白 (KLH) 为 Sigma 产品; SABC-AP 免疫组化染色试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品; RPMI-1640 培养基及胎牛血清购自 GIBCO 公司。新西兰大白兔来自南京市江宁区青龙山动物繁殖场。

1.2 引物及多肽

所有试验用引物和多肽均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.3 ZJ-R 基因组单拷贝分子克隆和双拷贝串联分子克隆的构建

按照 GBclonart 无缝组装试剂盒说明, 进行 ZJ-R 病毒基因组分子克隆的构建。重组反应体系为 20 μ L, 包括 2 \times Gbclonart 无缝组装反应液、线性化的 pSK 载体 (*EcoRV* 酶切消化)、PCR 片段 1 或/和 PCR 片段 2、双蒸水; 经 45 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后, 进行转化, 涂 LB 平板, 挑取菌落 PCR 阳性克隆进行测序证实。其中用于构建 ZJ-R 单拷贝分子克隆的 PCR 片段 1 的 1 对扩增引物为:

F: 5'-GGTATCGATAAGCTTGATTCCCGGGGAACAAAGTCGTCAAT-3';

R: 5'-CCCGGGCTGCAGGAATTCGATGGGGGACCAACAAAATCTCTATA-3'。

构建 ZJ-R 双拷贝串联分子克隆的 PCR 片段 1 的扩增引物对为:

F:5'-GGTATCGATAAGCTTGGATTCCCGGGGGAACAAAGTCGCAAT-3';

R:5'-GGGGGACCAACAAAATCTCTATACCCTTTGAATACTACA-3'。

PCR 片段 2 由以下 1 对引物扩增得到:

F:5'-ATAGAGATTTTGTGGTCCCCCTCCCGGGGGAACAAAGT-3';

R:5'-CCCGGGCTGCAGGAATTCGATGGGGGACCAACAAAATCTCTATA-3'。

模板为克隆有 ZJ-R 全基因组的 pMD18-T 载体。

ZJ-R 单拷贝分子克隆和双拷贝串联分子克隆的构建过程见图 1。

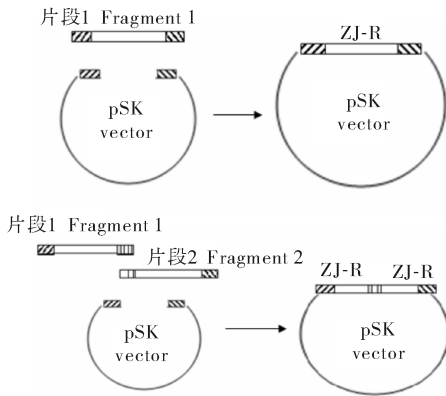


图 1 ZJ-R 分子克隆的构建示意图

Fig. 1 Construction of the ZJ-R molecular DNA clones

1.4 ZJ-R 抗原表位的分析

依据推导的 ZJ-R 病毒结构蛋白 VP2 氨基酸序列,对其进行亲水性、可塑性、可及性及抗原性等生物信息学分析,预测 ZJ-R 可能的抗原表位。具体分析过程参见文献[6]。

1.5 兔抗 ZJ-R 合成肽抗体的制备

通过固相合成法,合成选定的表位肽。采用戊二醛连接法,将选定的表位肽与载体蛋白 KLH 偶联,分 4 次免疫兔,具体免疫过程参见文献[7]。血清效用间接 ELISA 测定,包被抗原为合成肽,测定波长为 450 nm, S/N \geq 2.1 的血清最高稀释度作为血清的抗体效价。

1.6 PK15 细胞转染

按照转染试剂使用说明进行细胞转染,主要步骤如下:用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 生长液培养 PK15 细胞至旺盛生长状态,胰酶消化后,铺于 24 孔细胞培养板中,转染时要达到 90%~95% 的细胞融合;病毒 ZJ-R 单拷贝、双拷贝串联的分子克隆和对照 pSK 空载体各 0.8 μ g 分别用 50 μ L 的 OPTI-MEM I Reduced Serum Medium 稀释;同时用 OPTI-MEM I Reduced Serum Medium 将 2 μ L

LipofectamineTM 2000 脂质体稀释至 50 μ L,轻轻混匀后,置室温 5 min;然后在 30 min 内将稀释的 LipofectamineTM 2000 与稀释的 DNA 进行混合,置室温 20 min,以便 DNA-脂质体复合物形成;用无抗生素、无血清的培养液将 PK15 细胞清洗 3 次后,加入 500 μ L 无血清培养基,然后将复合物按每孔 100 μ L 加到 24 孔细胞板中,轻晃混匀,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 5 h,更换为 RPMI 1640 维持液(含 2% 胎牛血清),继续培养至 72 h。

1.7 免疫组化染色

按照试剂盒说明进行,基本步骤包括:4% 多聚甲醛固定细胞 60 min;用 1 份 30% H₂O₂ 和 50 份纯甲醇溶液浸泡 30 min,以灭活内源性过氧化物酶;5% BSA 封闭 20 min;滴加适当稀释的合成肽制备的多克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 60 min;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 20 min;滴加试剂 SABC-AP,37 $^{\circ}$ C 20 min;用 TBS 稀释的 BCIP/NBT 进行显色,显微镜下控制反应时间;用自来水冲洗后镜检。

2 结果与分析

2.1 ZJ-R 分子克隆的构建

通过 GBclonart 无缝组装手段,分别构建了 ZJ-R 单拷贝及双拷贝串联分子克隆,测序结果表明构建成功。ZJ-R 全基因组为 694 个核苷酸,GC 含量 57%,也存在 PCV2 ori 序列,大部分核苷酸序列与 PCV2 的高度同源,而另外 180 个核苷酸序列与宿主基因组的高度同源。

2.2 ZJ-R 结构蛋白的 B 细胞抗原表位分析

通过 DNAMAN 软件分析,ZJ-R 含有 2 个主要开放阅读框(ORF),其中 ORF1 编码蛋白的氨基酸序列与 PCV2 ORF1 的有一定同源性,推测为 ZJ-R 的复制酶;而 ORF2 编码蛋白的氨基酸序列与 PCV2 ORF2 的有一定同源性,推测其为 ZJ-R 的衣壳蛋白。ZJ-R VP2 有 220 个氨基酸,分子质量为 25.2 ku。多参数方案综合预测 ZJ-R VP2 有 8 个 B 细胞抗原表位优势区(图 2)。本研究选取 110~123 位的 14 个氨基酸,即:LDPGLSRPGELVDP,作为

1 MTYPRRRYRR RRHRPRSHLG QILRRRPWLV HPRHRYRWRR KNGIFNSRLS RTFGYTVKAT
61 TVTTPSWAVD MLRFNIDDFV PPGGGTNKIS IPFEYYRIRK VKVEFWPWHL DPGLSRPGEL
121 VDPVGLQTRA PVGQESWSTP LALNASASGP GQLVDHKGPL IHARVTWDGS SRIFLRSSE
181 GLFSVNTHLL CGWGPLLPFF LLGMLLLRCC RGAAAAEVRW

图 2 ZJ-R 病毒衣壳蛋白的 B 细胞表位(标下划线)的预测结果

Fig. 2 The prediction result of B cell epitope (marked underline) for the cap protein of ZJ-R virus

要合成的多肽序列。

2.3 免疫选取表位肽后兔体产生的抗体效价

从表 1 可知,用选取的表位肽,偶联 KLH 免疫兔,在第 4 次免疫后,2 只兔的表位肽抗体效价都达到了 1 : 512 000 以上(对照 $D_{450\text{ nm}}$ 为 0.052),说明选取的表位肽具有较高的免疫原性。

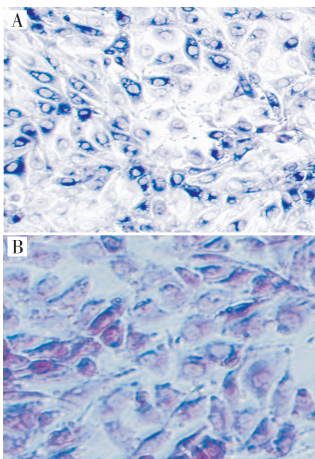
表 1 ELISA 检测第 4 次免疫表位肽后产生的抗体结果

Table 1 ELISA results for antiserum after the 4th immunization

血清稀释度 Dilution	第 4 次免疫后血清 Antiserum after the 4th immunization ($D_{450\text{ nm}}$)	
	兔 1 Rabbit 1	兔 2 Rabbit 2
1 : 1 000	3.047	3.168
1 : 2 000	2.953	3.137
1 : 4 000	2.870	2.930
1 : 8 000	2.775	2.463
1 : 16 000	2.395	2.092
1 : 32 000	1.970	1.572
1 : 64 000	1.463	1.052
1 : 128 000	1.028	0.668
1 : 256 000	0.626	0.399
1 : 512 000	0.398	0.255

2.4 免疫组化检测结果

从图 3 可知,用 ZJ-R 双拷贝串联分子克隆转染 PK 15 细胞后,可与用表位肽制备的多克隆抗体发



A. 转染 ZJ-R 双拷贝串联分子克隆 PK15 cells transfected with the molecular DNA clone containing a tandem dimer of ZJ-R genome; B. 阴性反应(转染 ZJ-R 单拷贝分子克隆或空载体对照) Mock-transfected PK15 cells.

图 3 应用制备的肽抗体进行免疫组化检测结果(200×)

Fig. 3 PK15 cells were immunochemically stained with peptide antibody against ZJ-R

生反应,多表现为在转染细胞的胞浆中出现蓝紫色阳性反应。而在转染 ZJ-R 单拷贝分子克隆或空载体细胞中并未出现特征性颜色反应。

3 讨论

猪圆环病毒 2 型(PCV2)在分类地位上属于圆环病毒科,该科包括一群能感染猪和禽的小的、无囊膜的、单股环状 DNA 病毒。Gibbs 等^[8]通过生物信息学分析,对圆环病毒的起源、进化进行了分析,他们发现矮缩病毒和圆环病毒 Rep 的 N 端氨基酸序列具有相似性,而 PCV Rep 的 C 端氨基酸序列则与脊椎动物杯状病毒的 RNA 结合蛋白 2C 有很近的亲缘关系,因此认为 PCV 来源于植物的矮缩病毒与脊椎动物杯状病毒的重组。Firth 等^[9]于 2009 年通过对 160 株 PCV2 全基因组核苷酸序列分析,计算出 PCV2 的突变率为 1.2×10^{-3} 置换/(位点·年),这对于 DNA 病毒来说,表明 PCV2 与许多 RNA 病毒相似,存在较高的突变率。近年来,我们相继发现了 3 株 PCV2 重组病毒,其中 PCV2 重组病毒 ZJ-R 基因组的分子特征为 PCV2 基因组与宿主基因组发生了重组,因此,有必要对其进行深入研究。由于目前对 ZJ-R 体外细胞培养特性未知,另外临床感染 ZJ-R 样品的纯净性也不确定,因此,构建 ZJ-R 感染性分子克隆,拯救病毒继而研究其生物学特性等无疑成为首选手段。

传统分子克隆构建方法是找到合适的内切酶,对病毒基因组的核苷酸序列而言,有时很难设计合适的酶切位点,而无缝克隆是近年快速流行于生命科学领域的新型基因克隆方法,它利用 DNA 重组的简单原理,将基因精准构建到任何载体,无需考虑酶切位点,效率高,成本低,操作容易,可取代传统的酶切方法。本研究通过该技术也成功构建了 ZJ-R 的单拷贝分子克隆和双拷贝串联分子克隆。

体外检验构建的分子克隆是否具有感染性,一般需要特定抗体。本研究通过生物信息学分析,获得了数个 ZJ-R 结构蛋白可能的 B 细胞表位。为了避免其他表位制备的抗体与 PCV2 可能存在交叉反

应性,本研究选取了含有宿主基因组的 B 细胞表位,用来制备表位肽抗体,进而将其应用于免疫组化试验中。结果表明 ZJ-R 双拷贝串联分子克隆具有感染性,这与构建的 PCV2、P1 和 P2 的分子克隆结果相似^[4,10-11]。

总之,PCV2 重组病毒 ZJ-R 感染性克隆的构建,不仅为深入研究 ZJ-R 的生物学特性提供了物质材料,对于 PCV2 的演化和致病性等研究也具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] ALLAN G M, ELLIS J A. Porcine circoviruses: a review [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2000, 12(1): 3-14.
- [2] SEGALES J, ALLAN G M, DOMINGO M. Porcine circovirus diseases [J]. *Anim Health Res Rev*, 2005, 6: 119-142.
- [3] WEN L B, HE K W, YU Z Y, et al. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus-like agent [J]. *J Virol*, 2012, 86(1): 639.
- [4] WEN L B, HE K W, YANG H C, et al. Complete nucleotide sequence of a novel porcine circovirus-like agent and its infectivity *in vitro* [J]. *Sci China C Life Sci*, 2008, 51(5): 453-458.

- [5] WEN L B, WANG F Z, HE K W, et al. Recombination in truncated genome sequences of porcine circovirus type 2 [J]. *Arch Virol*, 2015, 160: 371-374.
- [6] 温立斌,何孔旺,杨汉春,等.类猪圆环病毒因子 P1 VP2 蛋白二级结构与 B 细胞表位预测 [J]. *华北农学报*, 2009, 24(5): 45-49.
- [7] 温立斌,何孔旺,杨汉春,等.类圆环病毒因子 P1 结构蛋白表位肽抗体的制备及应用 [J]. *华北农学报*, 2011, 26(5): 83-86.
- [8] GIBBS M J, WEILLER G F. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (14): 8022-8027.
- [9] FIRTH C, CHARLESTON M A, DUFFY S, et al. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2 [J]. *J Virol*, 2009, 83(24): 12813-12821.
- [10] FENAUX M, HALBUR P G, HAQSHENAS G, et al. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions [J]. *J Virol*, 2002, 76(2): 541-551.
- [11] WEN L B, HE K W, XIAO Q, et al. A novel porcine circovirus-like agent P1 is associated with wasting syndromes in pigs [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e41565.

Construction of an infectious clone of porcine circovirus type 2 recombinant virus ZJ-R

WEN Libin¹ ZHANG Dan¹ HE Kongwang¹ XIE Jianping¹ DONG Meixiang²

1. *Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China;*
2. *Hebei Feed Industry Association, Shijiazhuang 050021, China*

Abstract The research was conducted to construct an infectious clone of porcine circovirus type 2 recombinant virus ZJ-R. One copy and two copies in tandem of the whole genomic sequence of ZJ-R were cloned into the pSK vector with restriction site of enzyme *EcoRV*. The B cell epitopes of the ZJ-R virus structural protein were predicted by using biotic soft-wares. The epitope peptides were chosen, synthesized and coupled to KLH. Then the New Zealand White Rabbits were immunized to elicit the polyclonal antibodies, which were used later in immunohistochemical techniques. The results showed that the ZJ-R virus could be detected by IHC after 72 h post transfection of pSK-2 ZJ-R. In conclusion, an infectious DNA clone of the porcine circovirus type 2 recombinant virus ZJ-R was constructed successfully.

Keywords porcine circovirus type 2 recombinant virus ZJ-R; seamless cloning; B cell epitope; peptide antibody; infectious clone