



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101932700 A

(43) 申请公布日 2010.12.29

(21) 申请号 200880125584.8

代理人 罗菊华

(22) 申请日 2008.12.18

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12N 7/00 (2006.01)

61/015,894 2007.12.21 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.07.26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/087361 2008.12.18

(87) PCT申请的公布数据

W02009/085912 EN 2009.07.09

(71) 申请人 惠氏有限责任公司

地址 美国新泽西

(72) 发明人 S·Q·吴

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

权利要求书 3 页 说明书 37 页 序列表 7 页
附图 9 页

(54) 发明名称

对猪进行抗猪圆环病毒免疫的方法和组合物

(57) 摘要

本发明涉及两种新型 2B 型猪圆环病毒株的分离和鉴定。这两种新型猪圆环病毒株可用于制备疫苗或免疫原性组合物以对猪进行抗断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 免疫。因此,本发明提供诱发针对病原性猪圆环病毒的保护性免疫应答的方法,通过对猪施用免疫原性有效量的 2B 型猪圆环病毒疫苗或免疫原性组合物,所述 2B 型猪圆环病毒疫苗或免疫原性组合物含有至少一种具有如 SEQ ID NO:1 或 2 中所示的核酸序列的猪圆环病毒,或至少一种来自如本文描述的这两种新型 2B 型猪圆环病毒株中的至少一种的蛋白质。本发明进一步涉及保护猪不产生任何一种或多种与 PMWS 相关的症状或后遗症。

PCV2B-FD07 基因组的全序列

关于 PCV2B-FD07 基因组的注释: 1767 bp ssDNA 病毒

复制 (复制酶) 基因: 碱基 51-985

衣壳基因: 碱基 1033-1734 C

```

15      25      35      45      55      65
AGGAGCAG TTGAGGAGAGG GAGAGAGAGG GAGAGAGAGG GAGAGAGAGG GAGAGAGAGG
75      85      95      105     115     125
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
135     145     155     165     175     185
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
195     205     215     225     235     245
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
255     265     275     285     295     305
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
315     325     335     345     355     365
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
375     385     395     405     415     425
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
435     445     455     465     475     485
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
495     505     515     525     535     545
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
555     565     575     585     595     605
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
615     625     635     645     655     665
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
675     685     695     705     715     725
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
735     745     755     765     775     785
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
795     805     815     825     835     845
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
855     865     875     885     895     905
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
915     925     935     945     955     965
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
975     985     995     1005    1015    1025
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1035    1045    1055    1065    1075    1085
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1095    1105    1115    1125    1135    1145
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1155    1165    1175    1185    1195    1205
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1215    1225    1235    1245    1255    1265
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1275    1285    1295    1305    1315    1325
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1335    1345    1355    1365    1375    1385
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1395    1405    1415    1425    1435    1445
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1455    1465    1475    1485    1495    1505
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1515    1525    1535    1545    1555    1565
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1575    1585    1595    1605    1615    1625
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1635    1645    1655    1665    1675    1685
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1695    1705    1715    1725    1735    1745
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1755    1765    1775    1785    1795    1805
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1815    1825    1835    1845    1855    1865
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1875    1885    1895    1905    1915    1925
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1935    1945    1955    1965    1975    1985
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
1995    2005    2015    2025    2035    2045
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2055    2065    2075    2085    2095    2105
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2115    2125    2135    2145    2155    2165
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2175    2185    2195    2205    2215    2225
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2235    2245    2255    2265    2275    2285
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2295    2305    2315    2325    2335    2345
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2355    2365    2375    2385    2395    2405
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2415    2425    2435    2445    2455    2465
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2475    2485    2495    2505    2515    2525
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2535    2545    2555    2565    2575    2585
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2595    2605    2615    2625    2635    2645
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2655    2665    2675    2685    2695    2705
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2715    2725    2735    2745    2755    2765
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2775    2785    2795    2805    2815    2825
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2835    2845    2855    2865    2875    2885
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2895    2905    2915    2925    2935    2945
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
2955    2965    2975    2985    2995    3005
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3015    3025    3035    3045    3055    3065
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3075    3085    3095    3105    3115    3125
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3135    3145    3155    3165    3175    3185
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3195    3205    3215    3225    3235    3245
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3255    3265    3275    3285    3295    3305
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3315    3325    3335    3345    3355    3365
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3375    3385    3395    3405    3415    3425
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3435    3445    3455    3465    3475    3485
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3495    3505    3515    3525    3535    3545
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3555    3565    3575    3585    3595    3605
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3615    3625    3635    3645    3655    3665
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3675    3685    3695    3705    3715    3725
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3735    3745    3755    3765    3775    3785
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3795    3805    3815    3825    3835    3845
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3855    3865    3875    3885    3895    3905
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3915    3925    3935    3945    3955    3965
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
3975    3985    3995    4005    4015    4025
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4035    4045    4055    4065    4075    4085
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4095    4105    4115    4125    4135    4145
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4155    4165    4175    4185    4195    4205
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4215    4225    4235    4245    4255    4265
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4275    4285    4295    4305    4315    4325
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4335    4345    4355    4365    4375    4385
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4395    4405    4415    4425    4435    4445
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4455    4465    4475    4485    4495    4505
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4515    4525    4535    4545    4555    4565
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4575    4585    4595    4605    4615    4625
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4635    4645    4655    4665    4675    4685
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4695    4705    4715    4725    4735    4745
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4755    4765    4775    4785    4795    4805
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4815    4825    4835    4845    4855    4865
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4875    4885    4895    4905    4915    4925
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4935    4945    4955    4965    4975    4985
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
4995    5005    5015    5025    5035    5045
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5055    5065    5075    5085    5095    5105
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5115    5125    5135    5145    5155    5165
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5175    5185    5195    5205    5215    5225
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5235    5245    5255    5265    5275    5285
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5295    5305    5315    5325    5335    5345
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5355    5365    5375    5385    5395    5405
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5415    5425    5435    5445    5455    5465
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5475    5485    5495    5505    5515    5525
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5535    5545    5555    5565    5575    5585
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5595    5605    5615    5625    5635    5645
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5655    5665    5675    5685    5695    5705
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5715    5725    5735    5745    5755    5765
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5775    5785    5795    5805    5815    5825
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5835    5845    5855    5865    5875    5885
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5895    5905    5915    5925    5935    5945
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
5955    5965    5975    5985    5995    6005
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6015    6025    6035    6045    6055    6065
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6075    6085    6095    6105    6115    6125
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6135    6145    6155    6165    6175    6185
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6195    6205    6215    6225    6235    6245
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6255    6265    6275    6285    6295    6305
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6315    6325    6335    6345    6355    6365
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6375    6385    6395    6405    6415    6425
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6435    6445    6455    6465    6475    6485
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6495    6505    6515    6525    6535    6545
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6555    6565    6575    6585    6595    6605
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6615    6625    6635    6645    6655    6665
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6675    6685    6695    6705    6715    6725
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6735    6745    6755    6765    6775    6785
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6795    6805    6815    6825    6835    6845
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6855    6865    6875    6885    6895    6905
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6915    6925    6935    6945    6955    6965
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
6975    6985    6995    7005    7015    7025
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7035    7045    7055    7065    7075    7085
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7095    7105    7115    7125    7135    7145
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7155    7165    7175    7185    7195    7205
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7215    7225    7235    7245    7255    7265
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7275    7285    7295    7305    7315    7325
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7335    7345    7355    7365    7375    7385
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7395    7405    7415    7425    7435    7445
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7455    7465    7475    7485    7495    7505
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7515    7525    7535    7545    7555    7565
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7575    7585    7595    7605    7615    7625
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7635    7645    7655    7665    7675    7685
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7695    7705    7715    7725    7735    7745
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7755    7765    7775    7785    7795    7805
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7815    7825    7835    7845    7855    7865
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7875    7885    7895    7905    7915    7925
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7935    7945    7955    7965    7975    7985
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
7995    8005    8015    8025    8035    8045
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8055    8065    8075    8085    8095    8105
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8115    8125    8135    8145    8155    8165
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8175    8185    8195    8205    8215    8225
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8235    8245    8255    8265    8275    8285
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8295    8305    8315    8325    8335    8345
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8355    8365    8375    8385    8395    8405
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8415    8425    8435    8445    8455    8465
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8475    8485    8495    8505    8515    8525
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8535    8545    8555    8565    8575    8585
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8595    8605    8615    8625    8635    8645
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8655    8665    8675    8685    8695    8705
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8715    8725    8735    8745    8755    8765
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8775    8785    8795    8805    8815    8825
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8835    8845    8855    8865    8875    8885
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8895    8905    8915    8925    8935    8945
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
8955    8965    8975    8985    8995    9005
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9015    9025    9035    9045    9055    9065
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9075    9085    9095    9105    9115    9125
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9135    9145    9155    9165    9175    9185
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9195    9205    9215    9225    9235    9245
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9255    9265    9275    9285    9295    9305
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9315    9325    9335    9345    9355    9365
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9375    9385    9395    9405    9415    9425
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9435    9445    9455    9465    9475    9485
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9495    9505    9515    9525    9535    9545
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9555    9565    9575    9585    9595    9605
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9615    9625    9635    9645    9655    9665
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9675    9685    9695    9705    9715    9725
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9735    9745    9755    9765    9775    9785
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9795    9805    9815    9825    9835    9845
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9855    9865    9875    9885    9895    9905
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9915    9925    9935    9945    9955    9965
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
9975    9985    9995    10005    10015    10025
AGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AG
```

1. 分离的猪圆环病毒,其基因组包含 SEQ ID NO:1 或 2 中任何一个的核酸分子,或其基因组包含与 SEQ ID NO:1 或 2 中任何一个具有至少 95%序列同源性的核酸分子。

2. 权利要求 1 的分离的猪圆环病毒,其基因组包含 SEQ ID NO:1 或 2 中任何一个的核酸分子。

3. 权利要求 1 或 2 的分离的猪圆环病毒,其为 2B 型猪圆环病毒。

4. 权利要求 3 的分离的猪圆环病毒,其具有与 SEQ ID NO:3 或 4 中任何一个具有至少 92%序列同一性的 ORF2 蛋白质。

5. 权利要求 2 的分离的猪圆环病毒,其中编码 ORF2 蛋白质的核酸包含 SEQ ID NO:5 或 6 的残基 1033-1734。

6. 分离的编码病原性 2B 型猪圆环病毒,或编码来自所述圆环病毒的至少一种蛋白质的核酸分子,其中核酸分子包含 SEQ ID NO:1、2、5 或 6 中任何一个的核苷酸序列或与 SEQ ID NO:1、2、5 或 6 中任何一个具有至少 95%序列同源性的核苷酸序列。

7. 权利要求 6 的分离的核酸分子,其包含 SEQ ID NO:1、2、5 或 6 中任何一个的核苷酸序列。

8. 权利要求 6 或 7 的分离的核酸分子,其中发现编码 ORF2 蛋白质的核酸在 SEQ ID NO:5 或 6 的残基 1033-1734 处。

9. 权利要求 8 的分离的核酸分子,其编码具有如 SEQ ID NO:3 或 4 中所示的氨基酸序列的 ORF2 蛋白质。

10. 免疫原性组合物,其包含权利要求 1-5 中任一项的分离的猪圆环病毒,以及药学可接受佐剂。

11. 权利要求 10 的免疫原性组合物,其中分离的猪圆环病毒为减毒或失活的。

12. 权利要求 11 的免疫原性组合物,其进一步包含至少一种其他的微生物体,或获自所述微生物体的需要针对其产生免疫应答的抗原。

13. 权利要求 12 的免疫原性组合物,其中其他微生物体选自:猪生殖和呼吸综合征病毒 (PRRS)、猪细小病毒 (PPV)、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、多杀巴斯德氏菌、链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、支气管炎博德特菌、猪霍乱沙门氏菌、猪红斑丹毒丝菌、钩端螺旋体细菌,猪流感病毒、大肠埃希氏菌抗原、猪呼吸冠状病毒、轮状病毒、引起伪狂犬病的病原体、引起猪传染性肠胃炎的病原体以及第二种不同的猪圆环病毒株。

14. 权利要求 13 的免疫原性组合物,其中第二种不同的猪圆环病毒株是 2A 型或 2B 型圆环病毒。

15. 免疫原性组合物,其包含权利要求 6-9 中任何一项的至少一种分离的核酸分子,以及药学可接受佐剂。

16. 权利要求 15 的免疫原性组合物,其进一步包含编码来自至少一种其他微生物体的需要针对其产生免疫应答的至少一种抗原的核酸分子。

17. 权利要求 16 的免疫原性组合物,其中其他微生物体选自:猪生殖和呼吸综合征病毒 (PRRS)、猪细小病毒 (PPV)、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、多杀巴斯德氏菌、链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、支气管炎博德特菌、猪霍乱沙门氏菌、猪红斑丹毒丝菌、钩端螺旋体细菌,猪流感病毒、大肠埃希氏菌抗原、猪呼吸冠状病毒、轮状病毒、引起伪狂犬病的病原体、引起猪传染性肠胃炎的病原体以及第二种不同的猪圆环病毒株。

18. 权利要求 17 的免疫原性组合物,其中第二种不同的猪圆环病毒株是 2A 型或 2B 型圆环病毒。

19. 权利要求 10 或 15 的组合物,其中组合物以单剂量或多剂量通过皮下、肌内、鼻内、透皮、肝内或通过淋巴内途径施用。

20. 对猪进行抵抗病毒感染或断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 的免疫,或用于预防由 PCV2 株引起的猪的断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 的方法,包括对猪施用免疫原性有效量的组合物,所述组合物包括以下的一种或多种:

- a) 免疫原性有效量的权利要求 1-5 中任何一项的 2 型猪圆环病毒;
- b) 编码 a) 的 2 型猪圆环病毒的核酸分子;
- c) 免疫有效量的分离自权利要求 1-5 中任何一项的 2 型猪圆环病毒的至少一种蛋白质;或
- d) 编码 c) 的至少一种蛋白质的核酸分子。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述方法进一步包括在施用 2 型猪圆环病毒免疫原性组合物之前、与之联合或之后施用免疫原性有效量的第二种不同的免疫原性组合物。

22. 权利要求 21 的方法,其中第二种不同的免疫原性组合物包含免疫原性有效量的对猪有病原性的至少一种其他微生物体,或获自所述微生物体的至少一种抗原或编码所述抗原的核酸分子,其中微生物体选自:猪生殖和呼吸综合征病毒 (PRRS)、猪细小病毒 (PPV)、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌,多杀巴斯德氏菌、链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、支气管炎博德特菌、猪霍乱沙门氏菌、猪红斑丹毒丝菌、钩端螺旋体细菌,猪流感病毒、大肠埃希氏菌抗原、猪呼吸冠状病毒、轮状病毒、引起伪狂犬病的病原体、引起猪传染性肠胃炎的病原体以及第二种不同的猪圆环病毒株。

23. 权利要求 22 的方法,其中第二种不同的猪圆环病毒株是 2A 型或 2B 型圆环病毒。

24. 包含编码 2A 型或 2B 型猪圆环病毒蛋白质的至少一种外源核酸分子的载体,其中猪圆环病毒蛋白质是 ORF2 蛋白质,并且其中编码所述蛋白质的外源核酸分子如 SEQ ID NO:5 或 6 的残基 1033-1734 所示。

25. 权利要求 24 的载体,其中载体是浣熊痘病毒载体。

26. 权利要求 24 或 25 的载体,其进一步包含编码来自对猪有病原性的微生物体的抗原的一种或多种外源核酸分子,其中微生物体选自:猪生殖和呼吸综合征病毒 (PRRS)、猪细小病毒 (PPV)、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、多杀巴斯德氏菌、链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、支气管炎博德特菌、猪霍乱沙门氏菌、猪红斑丹毒丝菌、钩端螺旋体细菌、猪流感病毒、大肠埃希氏菌抗原、猪呼吸冠状病毒、轮状病毒、引起伪狂犬病的病原体、引起猪传染性肠胃炎的病原体以及第二种不同的猪圆环病毒株。

27. 确定猪哺乳动物是否患有断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS),或处于发展断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 风险的方法,所述方法包括:

(I) 测量衍生自哺乳动物组织样品中 PCV2 核酸或由所述核酸编码的蛋白质的量,其中所述 PCV2 核酸或蛋白质是:

- a) 对应于 SEQ ID NO:1、2、5 或 6 中任何一个的核酸,或由其衍生的核酸;
- b) 包含 SEQ ID NO:3 或 4 中任何一个的蛋白质;
- c) 包含与 SEQ ID NO:1、2、5 或 6 中任何一个或其互补物在高度严格条件下可杂交的

序列的核酸,或包含由所述可杂交序列编码的序列的蛋白质;

d) 与 SEQ ID NO:1、2、5 或 6 中任何一个或其互补物具有用 NBLAST 算法确定的至少 95%同源性的核酸;或由其编码的蛋白质;以及

(II) 将来自怀疑患有 PMWS,或处于发展 PMWS 的风险的哺乳动物组织样品中所述核酸或蛋白质的量与来自正常哺乳动物组织样品中存在的核酸或蛋白质的量,或与对正常组织样品预先确定的标准进行比较,其中相比于正常组织样品中的量或对正常组织样品预先确定的标准,来自患有或怀疑患有 PMWS 的猪哺乳动物组织样品中所述核酸或蛋白质的升高的量表示哺乳动物患有 PMWS 或处于发展 PMWS 的风险。

28. 权利要求 27 的方法,其中组织样品选自腹股沟浅淋巴结、气管支气管淋巴结、颌下淋巴结、肺、扁桃体、脾、肝、肾、全血和血细胞。

对猪进行抗猪圆环病毒免疫的方法和组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及动物健康领域,并提供用于保护猪抵抗性病原性猪圆环病毒 2B 型株的方法和组合物。更具体而言,本发明涉及新近鉴定的病原性猪圆环病毒 2B 型株、编码这些 2B 型株的核酸序列及由这些核酸序列编码的蛋白质。本发明还涉及用于诱发对病原性猪圆环病毒的免疫应答的方法和组合物,其通过施用包含免疫原性有效量的这些 2B 型猪圆环病毒中的至少一种,或编码这些 2B 型猪圆环病毒中的至少一种的核酸或由这些核酸编码的蛋白质中的至少一种的组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 猪圆环病毒 (Porcine circovirus, PCV) 是一种小的二十面体无包膜病毒,含有大约 1.76kb 的单链环状 DNA 基因组。其最初是作为猪肾细胞系 PK-15 的细胞培养污染物而分离到的 (I. Tischer 等人, *Nature* 295:64-66(1982); I. Tischer 等人, *Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. Orig. A* 226(2):153-167(1974))。PCV 归类于圆环病毒科家族,该病毒科由三个其他的动物圆环病毒 (鸡贫血病毒 (CAV), 鸚鵡喙羽病病毒 (psittacine beak and feather disease virus, PBFDV) 以及最近发现的来自鸽子的鸽圆环病毒 (columbid circovirus, CoCV)) 以及三种植物圆环病毒 (香蕉束顶病毒, 椰子叶衰败病毒和地三叶草矮化病毒) 构成 (M. R. Bassami 等人, *Virology* 249:453-459(1998); J. Mankertz 等人, *Virus Genes* 16:267-276(1998); A. Mankertz 等人, *Arch. Virol.* 145:2469-2479(2000); B. M. Meehan 等人, *J. Gen. Virol.* 78:221-227(1997); B. M. Meehan 等人, *J. Gen. Virol.* 79:2171-2179(1998); D. Todd 等人, *Arch. Virol.* 117:129-135(1991))。三种之前识别的动物圆环病毒成员 (PCV、CAV、和 PBFDV) 相互不分享核苷酸序列同源性或抗原决定簇 (M. R. Bassami 等人, 1998, 见前文; D. Todd 等人, 1991, 见前文)。用 PK-15 细胞-衍生的 PCV 对猪进行实验性感染没有产生临床疾病,因此不认为此病毒对猪有病原性 (G. M. Allan 等人, *Vet. Microbiol.* 44:49-64(1995); I. Tischer 等人, *Arch. Virol.* 91:271-276(1986))。将这种衍生自污染的 PK-15 细胞系的非病原性 PCV 指定为 1 型猪圆环病毒或 PCV1。

[0004] 断奶后多系统衰竭综合征 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 首先描述于 1991 年 (J. C. Harding 和 E. G. Clark, *Swine Health and Production* 5:201-203(1997)), 是断奶仔猪的一种复杂疾病,其正变得越来越广泛。PMWS 主要影响 5-18 周龄的猪。临床 PMWS 表征包括进行性体重下降、呼吸困难、呼吸急促、贫血、腹泻以及黄疸。死亡率在 1%-2% 内变动,在英国的一些复杂病例中高达 40% (M. Muirhead, *Vet. Rec.* 150:456(2002))。PMWS 的镜检病理特征包括肉芽肿性间质性肺炎、淋巴结病、肝炎和肾炎 (G. M. Allan 和 J. A. Ellis, *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:3-14(2000); J. C. Harding 和 E. G. Clark, *Swine Health and Production* 5:201-203(1997))。

[0005] 虽然 PCV1 在猪中广泛存在,却对猪没有病原性。PMWS 主要的致病因子通常是标注为 2 型猪圆环病毒或 PCV2 的 PCV 的病原性株 (G. M. Allan 等人, *Vet. Rec.* 142:467-468(1998); G. M. Allan 等人, *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:3-10(1998); G. M. Allan 等人, *Vet. Microbiol.* 66:115-23(1999); G. M. Allan 和 J. A. Ellis, *J. Vet. Diagn.*

Invest. 12 :3-14(2000) ;J. Ellis 等 人 Can. Vet. J. 39 :44-51(1998) ;A. L. Hamel 等 人, J. Virol. 72 :5262-5267(1998) ;B. M. Meehan 等人, 1998, 见前文 ;I. Morozov 等人, J. Clin. Microbiol. 36 :2535-2541(1998))。已经确定了 PMWS- 相关 PCV2 的完整基因组序列 (M. Fenaux 等人, J. Clin. Microbiol. 38 :2494-503(2000) ;A. L. Hamel 等人, 1998, 见前文 ;J. Mankertz 等人, 1998, 见前文 ;B. M. Meehan 等人, 1997, 见前文 ;B. M. Meehan 等人, 1998, 见前文 ;I. Morozov 等人, 1998, 见前文)。

[0006] 序列分析显示 PMWS- 相关 PCV2 与非病原性 PCV1 只共有大约 75% 的核苷酸序列同一性。非病原性 PCV1 和病原性 PCV2 二者的 ORF2 基因都编码主要免疫原性病毒衣壳蛋白质 (P. Nawagitgul 等人, Immunol. Clin. Diagn. Lab Immunol. 1 :33-40(2002) ;P. Nawagitgul 等人, J. Gen. Virol. 81 :2281-2287(2000))。

[0007] 由于其对猪产业的潜在影响, 开发抗 PCV2 的疫苗变得至关重要。例如, 美国专利号 6, 287, 856 (Poet 等人) 和 WO 99/45956 描述了来自鸚鵡喙羽病病毒 (BFDV) (感染鸟类的圆环病毒) 以及来自猪圆环病毒 (PCV) 的核酸。该专利提出包含裸 DNA 或 mRNA 的疫苗组合物并公开了用于在真核细胞中 PCV 瞬时表达的核酸载体, 其包含衍生自人巨细胞病毒的顺式作用转录或翻译调控序列或者功能性连接于所述序列的核酸上的早期基因增强子或启动子。

[0008] 美国专利号 6, 217, 883 (Allan 等人) 以及法国专利号 2, 781, 159B 描述了从加拿大、加尼弗尼亚和法国 (布列塔尼) 的 PMWS 感染猪获得的肺或神经节样品中分离五种 PCV 株, 及其与至少一种猪细小病毒抗原组合用于疫苗 / 免疫原性组合物的用途。由 ORF1-ORF13 构成的 PCV2 开放阅读框 (ORF) 编码的蛋白质在专利中已有广泛描述, 但没有任何显示出免疫原性属性的特异性蛋白质的范例。该专利进一步描述了由 DNA 质粒、线性 DNA 分子以及含有并在体内表达编码 PCV 抗原的核酸分子的重组病毒构成的载体。

[0009] 若干其他参考文献, 例如, 美国专利号 6, 391, 314 B1 ;美国专利号 6, 368, 601 B1 ;法国专利号 2, 769, 321 ;法国专利号 2, 769, 322 ;WO01/96377 A2 ;WO 00/01409 ;WO 99/18214 ;WO 00/77216 A2 ;WO01/16330 A2 ;WO 99/29871 ;等等, 描述了施用作为疫苗组合物的 PCV1 或 PCV2 多肽或编码多种病毒株的多肽的核酸。

[0010] 本文任何参考的引用不应当被认为是承认这些参考作为先于本发明的现有技术。

[0011] 发明概述

[0012] 在其最广的方面, 本发明提供对两种新型 2 型猪圆环病毒 (PCV2) 株的分离和鉴定, 其中每种病毒株可单独使用或组合使用, 用来制备用于保护猪抵抗免受病原性 PCV2 感染或用于减轻至少一种与断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 相关的症状的疫苗或免疫原性组合物。

[0013] 因此, 本发明的第一个方面提供了分离的 2 型猪圆环病毒, 其基因组包含 SEQ ID NO :1 (标注为 FD07) 或 2 (标注为 FDJE) 中任何一个的核酸分子, 或其基因组包含与 SEQ ID NO :1 或 2 中任何一个有至少 95% 序列同源性的核酸分子。

[0014] 在一个实施方式中, 所述两种新近鉴定和分离的猪圆环病毒为 2B 型猪圆环病毒 (PCV2B)。

[0015] 在一个实施方式中, 分离的猪圆环病毒具有与 SEQ ID NO :3 (来自 FD 07) 或 4 (来自 FDJE) 中任何一个有至少 92% 序列同一性的 ORF2 蛋白质。

[0016] 在一个实施方式中,分离的猪圆环病毒具有包含 SEQ ID NO :3 或 4 中任何一个的氨基酸序列的 ORF2 蛋白质。

[0017] 本发明第二个方面提供了编码病原性 2B 型猪圆环病毒或编码至少一种来自所述圆环病毒的蛋白质的分离的核酸分子,其中核酸分子包含与 SEQ ID NO :1 或 2 中任何一个有至少 95% 序列同源性的核苷酸序列。

[0018] 在一个实施方式中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO :1 或 2 中任何一个的核苷酸序列。

[0019] 在一个实施方式中,编码 FD07 的 ORF1 复制酶蛋白质的分离的核酸分子包含 SEQ ID NO :5 的残基 51-995,以及编码 FD07 的 ORF2 衣壳蛋白质的分离的核酸分子包含 SEQ ID NO :5 的残基 1033-1734。

[0020] 在一个实施方式中,编码 FDJE 的 ORF 1 复制酶蛋白质的分离的核酸分子包含 SEQ ID NO :6 的残基 51-995,以及编码 FDJE 的 ORF2 衣壳蛋白质的分离的核酸分子包含 SEQ ID NO :6 的残基 1033-1734。

[0021] 在一个实施方式中,分离的核酸分子编码具有如 SEQ ID NO :3 或 4 中所示的氨基酸序列的 ORF2 蛋白质。

[0022] 本发明第三个方面提供了包含以下的至少一种的免疫原性或疫苗组合物:至少一种本文描述的分离的 2B 型猪圆环病毒,或其组合;编码至少一种本文描述的分离的 2B 型猪圆环病毒的至少一种核酸分子;编码来自至少一种本文描述的分离的 2B 型猪圆环病毒的至少一种蛋白质的至少一种核酸分子;或获自至少一种本文描述的分离的 2B 型猪圆环病毒的至少一种蛋白质以及药学可接受佐剂。

[0023] 在一个实施方式中,疫苗或免疫原性组合物可包含以下的一种或多种:

[0024] a) 活的/减毒或修饰的活 PCV2B,其基因组包含 SEQ ID NO :1 或 2 中任何一个的核酸分子;

[0025] b) 灭活/失活的 PCV2B,其基因组包含 SEQ ID NO :1 或 2 中任何一个的核酸分子;

[0026] c) PCV2B DNA 疫苗(例如,质粒载体,其表达基因组包含 SEQ ID NO :1 或 2 中任何一个核酸分子的 PCV2B 的 ORF2);或

[0027] d) 失活的病毒载体(例如棒状病毒、腺病毒、或痘病毒(如浣熊痘病毒)、或细菌(如大肠杆菌)),其表达基因组包含 SEQ ID NO :1 或 2 中任何一个核酸分子的 PCV2B 的 ORF2。

[0028] 在一个实施方式中,其中 ORF 2 基因获自 SEQ ID NO :1 或 2 的 2B 型猪圆环病毒的疫苗或免疫组合物可能交叉保护抵抗猪的 2A 型、2C 型或 2D 型株或任何其他变体。施用这种疫苗或免疫原性组合物导致保护猪抵抗低毒力/低死亡率的 2A 型株,也导致交叉保护抵抗病原性猪圆环病毒高毒力/高死亡率的 2B 型株。所使用的疫苗或免疫原性组合物可以单剂量或多剂量施用。施用导致保护猪免受断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)相关的任何一种或多种症状或后遗症。而且,施用包含任何上文提到的实施方式的疫苗或免疫原性组合物还降低了与猪圆环病毒高毒力/高死亡率的 2B 型株相关的高于平均的死亡率。

[0029] 在一个实施方式中,上文描述的免疫原性或疫苗组合物可用于诱发抗猪圆环病毒的免疫应答,或用于保护猪抵抗病原性 PCV2 感染,或用于减轻与此疾病相关的至少一种症状。

[0030] 在一个实施方式中,上文描述的免疫原性或疫苗组合物进一步包含至少一种其他的微生物体,或获自所述微生物体的需要针对其产生免疫应答的抗原。在一个实施方式中,上文描述的免疫原性或疫苗组合物进一步包含编码来自至少一种其他微生物体(需要对其产生免疫应答)的至少一种抗原的至少一种其他核酸分子。这些其他的微生物体可选自:猪生殖和呼吸综合征病毒(PRRS)、猪细小病毒(PPV)、猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*)、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*)、多杀巴斯德氏菌(*Pasteurella multocida*)、链球菌(*Streptococcus suis*)、胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、支气管炎博德特菌(*Bordetella bronchiseptica*)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、猪红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、钩端螺旋体细菌、猪流感病毒、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) 抗原、猪呼吸冠状病毒、轮状病毒、引起伪狂犬病(Aujeszky's Disease)的病原体、引起猪传染性肠胃炎的病原体、以及猪圆环病毒的第二种不同株。猪圆环病毒的第二种不同株可以为 2A 或 2B 型圆环病毒。

[0031] 在一个实施方式中,免疫原性或疫苗组合物与或不与佐剂一起施用。

[0032] 在一个实施方式中,免疫原性或疫苗组合物以单剂量或多剂量皮下、肌肉、鼻内、透皮、肝内、或通过淋巴内途径施用。

[0033] 本发明第四个方面提供了一种方法,即免疫猪抵抗病毒感染或断奶后多系统衰竭综合征(PMWS),或用于预防由 PCV2 株引起的猪体内的 PMWS,或用于减轻与 PMWS 相关的至少一种症状,包括对猪施用免疫原性有效量的包含以下一种或多种的组合物:

[0034] a) 免疫原性有效量的至少一种由 SEQ ID NO:1 或 2 中任何一个核酸分子编码的 2 型猪圆环病毒,如本文描述的;

[0035] b) 编码 a) 的至少一种 2 型猪圆环病毒的核酸分子;

[0036] c) 免疫原性有效量的分离自 a) 的至少一种 2 型猪圆环病毒的至少一种蛋白质;或

[0037] d) 免疫原性有效量的编码 c) 的至少一种蛋白质的至少一种核酸分子。

[0038] 在一个实施方式中,本发明提供用于免疫或保护猪抵抗猪圆环病毒的至少一种病原性株方法,通过施用疫苗或免疫原性组合物,其包含非毒性、生理可接受的载体以及免疫原性有效量灭活/失活的 2 型猪圆环病毒,或活的减毒 2 型猪圆环病毒,如本文所描述的,其基因组包含 SEQ ID NO:1 或 2 中任何一个的核酸分子。在一个实施方式中,本发明的方法提供了免疫或保护猪抵抗猪圆环病毒感染,通过施用疫苗或免疫原性组合物,如上文描述的,其进一步包含佐剂。

[0039] 在一个实施方式中,本发明提供用于免疫或保护猪抵抗猪圆环病毒的病原性 2B 型株的方法,通过施用疫苗或免疫原性组合物,其包含编码如 SEQ ID NO:1 或 2 所示的 2 型猪圆环病毒的感染性核酸,其中的施用导致一种或多种猪圆环病毒感染症状的减轻。

[0040] 在一个实施方式中,本发明提供用于免疫或保护猪抵抗猪圆环病毒的病原性 2B 型株的方法,通过施用免疫性有效量的疫苗或免疫原性组合物,其中所述组合物包含来自如本发明描述的 2 型猪圆环病毒的至少一种蛋白质,或编码来自本发明的 2 型猪圆环病毒的蛋白质的核酸。在一个实施方式中,来自本发明的 2B 型猪圆环病毒的蛋白质是 ORF2 蛋白质。在一个实施方式中,编码来自本发明 2B 型猪圆环病毒(标注为 FD07 和 FDJE)的 ORF2 蛋白质的 ORF-2 基因,分别包含如前述 SEQ ID NO:5 和 6 中核苷酸序列的残基 1033-1074,

并且由 FD07 和 FDJE 的 ORF-2 基因编码的蛋白质分别包含如前述 SEQ ID NO :3 和 4 中的氨基酸序列。

[0041] 在一个实施方式中,本发明提供用于免疫或保护猪抵抗猪圆环病毒的病原性 2B 型株的方法,包括施用疫苗或免疫原性组合物,其包含 2 型猪圆环病毒,或编码 2 型猪圆环病毒的核酸,其中猪圆环病毒由如前所述 SEQ ID NO :1 或 2 中的核苷酸序列、其互补链、或与 SEQ ID NO :1 或 2 中的核苷酸序列具有至少 95%同源性的核酸序列编码。

[0042] 在一个实施方式中,本发明提供用于免疫或保护猪抵抗猪圆环病毒的病原性 2B 型株的方法,通过施用疫苗或免疫原性组合物,其包含两种新型 2B 型猪圆环病毒中的至少一种或编码本发明的两种新型 2B 型猪圆环病毒中的至少一种的核酸,或来自本发明的两种 2B 型株中的至少一种的至少一种蛋白质,或编码这两种蛋白质中的至少一种的核酸,其中猪圆环病毒的病原性 2B 型株为猪圆环病毒的病毒株,其含有由 ORF 2 基因编码的衣壳蛋白质,其显示出与本发明描述的两种猪圆环病毒 2B 型株中的至少一种的 ORF2 基因编码的衣壳蛋白质不少于 92%的序列同一性。SEQ ID NO :3 和 4 显示了本发明描述的猪圆环病毒 2B 型株的衣壳蛋白质的氨基酸序列。

[0043] 在一个实施方式中,本发明的方法提供了免疫或保护猪抵抗 2B 型猪圆环病毒的病原性株的感染,包括对猪施用疫苗或免疫原性组合物,其包含 2B 型猪圆环病毒,或编码 2B 型猪圆环病毒或编码来自本发明所述的猪圆环病毒的至少一种蛋白质的核酸,其中所述的施用导致一种或多种以下临床症状的减轻:

[0044] 在暴露于 2B- 型猪圆环病毒的毒力形式时,猪的一种或多种淋巴或非 - 淋巴组织中镜检病灶的减少;

[0045] 与猪圆环病毒感染相关的病毒血症的减少;

[0046] 一种或多种组织中 2A- 型或 2B- 型核酸水平的减少。

[0047] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括在施用如本文描述的 2 型猪圆环病毒免疫原性组合物之前、与之联合或之后施用免疫原性有效量的第二种不同的免疫原性组合物。

[0048] 在一个实施方式中,第二种不同的免疫原性组合物包含免疫原性有效量的至少一种其他的对猪有病原性的微生物体,或获自所述的微生物体的至少一种抗原或编码所述抗原的核酸分子,其中微生物体选自:猪生殖和呼吸综合征病毒 (PRRS)、猪细小病毒 (PPV)、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、多杀巴斯德氏菌、链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、支气管炎博德特菌、猪霍乱沙门氏菌、猪红斑丹毒丝菌、钩端螺旋体细菌、猪流感病毒、大肠埃希氏菌抗原、猪呼吸冠状病毒、轮状病毒、引起伪狂犬病的病原体、引起猪传染性肠胃炎的病原体以及猪圆环病毒的第二种不同株。猪圆环病毒的第二种不同株可以为 2A 或 2B 型圆环病毒。

[0049] 本发明的第五个方面提供了载体,其包含编码 2A 型或 2B 型猪圆环病毒蛋白质的至少一种外源核酸分子,其中猪圆环病毒蛋白质是 ORF2 蛋白质,并且其中编码所述蛋白质的外源核酸分子如 SEQ ID NO :5 或 6 的残基 1033-1734 所示。

[0050] 在一个实施方式中,载体是浣熊痘病毒载体,其含有编码如本文所描述的 PCV2A 或 PCV2B 猪圆环病毒的至少一种或二种的核酸分子。

[0051] 在一个实施方式中,载体进一步包含编码来自对猪有病原性的微生物体的抗原的一种或多种外源核酸分子,其中微生物体选自:猪生殖和呼吸综合征病毒 (PRRS)、猪细小

病毒 (PPV)、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、多杀巴斯德氏菌、链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、支气管炎博德特菌、猪霍乱沙门氏菌、猪红斑丹毒丝菌、钩端螺旋体细菌、猪流感病毒、大肠埃希氏菌抗原、猪呼吸冠状病毒、轮状病毒、引起伪狂犬病的病原体、引起猪传染性肠胃炎的病原体以及猪圆环病毒的第二种不同株。

[0052] 本发明的第六个方面提供了确定猪哺乳动物是否患有断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 或是否处于发展断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 风险的方法,该方法包括:

[0053] (I) 测量衍生自哺乳动物组织样品中 PCV2 核酸或由所述核酸编码的蛋白质的量,其中所述的 PCV2 核酸或蛋白质为:

[0054] a) 包含 SEQ ID NO:1、2、5 或 6 中任何一个的核酸,或由其衍生的核酸;

[0055] b) 包含 SEQ ID NO:3 或 4 中任何一个的蛋白质;

[0056] c) 包含与 SEQ ID NO:1、2、5 或 6 中任何一个或其互补物在高度严格配对的条件下可杂交的序列的核酸,或包含由所述可杂交的序列编码的序列的蛋白质;

[0057] d) 与 SEQ ID NO:1、2、5 或 6 中任何一个或其互补物具有用 NBLAST 算法确定的至少 95%同源性的核酸;或由其编码的蛋白质;以及

[0058] (II) 将来自怀疑患有 PMWS 或处于发展 PMWS 的风险的哺乳动物组织样品中所述核酸或蛋白质的量与来自正常哺乳动物组织样品中存在的核酸或蛋白质的量,或与对正常组织样品预先确定的标准进行比较,其中相比于正常组织样品中的量或对正常组织样品预先确定的标准,来自患有或怀疑患有 PMWS 的猪哺乳动物组织样品中所述核酸或蛋白质的升高的量表示哺乳动物患有 PMWS 或处于发展 PMWS 的风险。

[0059] 在一个实施方式中,用于确定猪哺乳动物是否患有 PMWS 或处于发展 PMWS 的风险的方法提供了测量组织样品中本发明的 PCV 2B 的核酸或蛋白质的量,所述组织样品选自腹股沟浅淋巴结、气管支气管淋巴结、颌下淋巴结、肺、扁桃体、脾、肝、肾、全血和血细胞。

[0060] 附图简述

[0061] 图 1. 标注为 FD07 的 2B 型猪圆环病毒的完整基因组序列 (SEQ IDNO:1)。

[0062] 图 2. 标注为 FDJE 的 2B 型猪圆环病毒的完整基因组序列 (SEQ IDNO:2)。

[0063] 图 3. 标注为 FD07 的 PCV2B 的 ORF2 衣壳蛋白质的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)。

[0064] 图 4. 标注为 FDJE 的 PCV2B ORF2 衣壳蛋白质的氨基酸序列 (SEQID NO:4)。

[0065] 图 5. 编码 FD07 的 ORF1 和 ORF2 蛋白质的核酸序列 (SEQ IDNO:5)。

[0066] 图 6. 编码 FDJE 的 ORF1 和 ORF2 蛋白质的核酸序列 (SEQ ID NO:6)。

[0067] 发明详述

[0068] 在描述本方法和处理方法学之前,要理解的是本发明不限于所描述的具体的方法,以及实验条件,因为这些方法和条件可能变化。还要理解的是本文使用的术语学是仅仅为了描述具体实施方式的目的,不预期为限制性的。

[0069] 如本说明书和附加权利要求中使用的,单数形式的“一”、“一个”和“这个”包括复数指代,除非内容里清楚地指明另外的意思。因此,例如,提到“方法”包括一种或多种方法,和 / 或本文描述的和 / 或使本领域技术人员阅读本公开后变得清楚的类型的步骤等等。

[0070] 因此,在本申请中,可采用本领域之内的传统分子生物学,微生物学和重组 DNA 技术。这些技术在文献中有全面的解释。见例如,Sambrook,Fritsch & Maniatis,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Second Edition(1989)Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, New York (本文的 " Sambrook 等人, 1989 ") ; DNA Cloning : A Practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985) ; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984) ; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)) ; Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)) ; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1986)) ; Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)) ; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984) ; F. M. Ausubel 等人 (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)。

[0071] 尽管任何类似于或等价于本文所描述的那些的方法和材料可用于本发明的实践或测试, 现在描述的是优选的方法和材料。本文提到的所有出版物以其全文并入本文作为参考。

[0072] 定义

[0073] 本文使用的术语具有本领域技术人员认可和已知的意义, 然而, 为了方便和完整性, 在下文阐述具体术语及其意义。

[0074] 术语“佐剂”指的是增强对抗原的免疫应答的化合物或混合物。佐剂可起组织储库的作用, 缓慢释放抗原, 也可起淋巴系统激活物的作用, 非-特异性地增强免疫应答 (Hood 等人, Immunology, Second Ed., 1984, Benjamin/Cummings : Menlo Park, California, p. 384)。根据环境, 没有佐剂单独以抗原产生的主要攻击可能不能诱发体液或细胞的免疫应答。佐剂包括但不限于, 完全弗氏佐剂, 不完全弗氏佐剂, 皂苷, 矿物胶如氢氧化铝, 表面活性物质如溶血卵磷脂, 复合多元醇, 聚阴离子, 肽, 油或烃类乳剂, 钥孔血蓝蛋白, 二硝基苯酚, 以及潜在有用的人佐剂如 BCG (卡介苗) 和短小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。优选地, 佐剂为药学可接受的。

[0075] 通过“抗原”, 指的是根据本发明, 含有一种或多种能够在抗原存在时刺激宿主免疫系统产生细胞抗原-特异性免疫应答或体液抗体应答的表位的分子。正常地, 表位包括大约 3-15 之间, 通常大约 5-15 个氨基酸。给定蛋白质的表位可使用许多表位作图技术进行鉴定, 这些在本领域熟知。见, 例如, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N. J. 例如, 线性表位可通过例如, 同时在固相支持物上合成大量肽, 对应于蛋白质分子的部分的肽, 并将这些肽与抗体反应 (同时肽仍然连接于支持物) 而确定。这些技术在本领域已知并在例如, 美国专利号 4, 708, 871 ; Geysen 等人 (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 3998-4002 ; Geysen 等人 (1986) Molec. Immunol. 23 : 709-715 中有所描述, 其以全文并入本文作为参考。类似地, 构象的表位容易通过确定氨基酸空间构象而鉴定, 如通过例如, x- 光结晶学和 2- 维核磁共振。见, 例如 Epitope Mapping Protocols (见前文)。进一步地, 用于本发明的目的, “抗原”指的是包括对天然序列有修饰, 如缺失, 添加和取代 (通常本质上是保守性的, 但它们可能为非-保守性的) 的蛋白质, 只要此蛋白质保持了诱发免疫学应答的能力。这些修饰可能是有意的, 如通过定向点突变或通过特定的合成步骤, 或通过遗传工程手段, 或可能为意外的, 如通过产生这些抗体的宿主的突变。

[0076] 如本文使用的用于描述例如“减毒病毒”等等中的术语“减毒”, 指的是微生物体, 例如, 病毒, 其在体外或在体内生长或复制的能力受限。

[0077] 除非有另外有指出,如本文使用的术语“圆环病毒”,指的是归类于圆环病毒科家族的任何圆环病毒株。例如,在本发明中,圆环病毒为病原性猪圆环病毒。在具体实施方式中,病原性猪圆环病毒为低毒力/低死亡率的2A型猪圆环病毒株或高毒力/高死亡率的2B型猪圆环病毒株。

[0078] 在其认可的意义之内,“互补的”被理解为鉴定一条序列中的核苷酸与另一条序列中的核苷酸根据规则 A → T, U 和 C → G (反之亦然) 进行杂交(退火),并且因此在本定义之内“匹配”其伙伴。酶转录具有可测量的且已经熟知的错误率(根据具体所使用的酶),因此在使用了本文描述的模式转录精确度的限制之内,表现在技术工作者会理解酶的互补链合成的保真度不是绝对的,且扩增子不必在每个核苷酸上与靶标或模板 RNA 完全匹配。使用高度严格条件的步骤如下。对含有 DNA 的滤纸进行预杂交,在包含 6X SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% 聚蔗糖 (Ficoll)、0.02% BSA 和 500 μg/ml 变性鲑精 DNA 的缓冲液中在 65℃ 下进行 8h 至过夜。在 65℃ 下,将滤纸在含有 100 μg/ml 变性鲑精 DNA 和 5-20X10⁶cpm 的 ³²P- 标记探针的预杂交混合物中杂交 48h。在 37℃ 下,在含有 2X SSC、0.01% PVP、0.01% Ficoll 和 0.01% BSA 的溶液中对滤纸进行 1h 的洗涤。接着在放射自显影前在 0.1X SSC 中在 50℃ 下洗涤 45min。其他可使用的高度严格条件是本领域熟知的。(见,例如 Sambrook 等人,1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 另见, Ausubel 等人, eds., in the *Current Protocols in Molecular Biology* series of laboratory technique manuals, 1987-1997 *Current Protocols*, ©1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.)。

[0079] 要注意的是在本公开中,术语如“包括”,“所包括的”,“包括着”,“包含”,“含有”等等可具有美国专利法中归于其的意义;例如,它们的意思可以是“包括”,“包括在内”,“包括着”等等。术语如“基本上由……构成”与“基本上由……组成”具有美国专利法中归于其的意义,例如,它们允许包括不减损本发明新型或基本特征的其他成分或步骤,即,它们排除了减损本发明新型或基本特征的其他未提及成分或步骤,它们排除了在先技术的成分或步骤,如本文引用的或作为参考并入的文献,尤其是当定义可申请专利的实施方式为此文献的一个目标时,例如,对于在先技术是新型,不明显的,发明性的,例如对于本文引用的或作为参考并入的文献。并且,术语“由……构成”及“由……组成”具有美国专利法中归于其的意义;即,这些术语为封闭式的。

[0080] “所编码的”或“编码”指的是编码多肽序列的核酸序列,其中多肽序列含有至少 3-5 个氨基酸,更优选地至少 8-10 个氨基酸,甚至更优选地至少 15-20 个氨基酸的氨基酸序列,由所述核酸序列编码的多肽。还包括的是多肽序列,其可以由此序列编码的多肽免疫学地鉴定。因此,抗原“多肽”、“蛋白质”或“氨基酸”序列可具有与抗原的多肽或氨基酸序列至少 70% 的相似性,优选地至少大约 80% 的相似性,优选地至少大约 90-95% 的相似性,最优选地至少大约 99% 的相似性。

[0081] 如本发明上下文中使用的,“基因”为有相关联的遗传学功能的核酸分子(染色体,质粒,等等)中的核苷酸的序列。基因为例如生物体的一个遗传单位,包括一段多聚核苷酸序列(例如,哺乳动物的 DNA 序列),其在生物体的基因组之内占据特定的物理位置(“基因座”或“遗传座”)。基因可以编码表达的产物,如多肽或多聚核苷酸(例如, tRNA)。备选

地,基因可以限定对于具体事件 / 功能,如蛋白质和 / 或核酸结合的基因组位置(例如,噬菌体附着位点),其中基因不编码表达的产物。通常,基因包括编码序列,如多肽编码序列,和非-编码序列,如启动子序列、多-腺苷酸化序列、转录调节序列(例如增强子序列)。许多真核基因具有“外显子”(编码序列),其被“内含子”(非-编码序列)隔断。在特定情况下,一个基因与其他一个或多个基因(例如,重叠基因)共有序列。

[0082] 因此,“同源性”或“同一性”或“相似性”指的是两条肽或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可通过比较每个序列中的位置而确定,这些序列可经比对而用于比较的目的。当进行比较的序列中一个位置被相同碱基或氨基酸占据时,则该分子在那个位置处是相同的。核酸序列之间的同源性或相似性或同一性程度为这些核酸序列共有的位置上相同或匹配的核苷酸数量的函数。氨基酸序列的同一性程度为这些氨基酸序列共有的位置上相同的氨基酸数量的函数。氨基酸序列的同源性或相似性程度为氨基酸,即,在这些氨基酸序列共有的位置上结构相关的氨基酸数量的函数。“不相关”或“非-同源”序列与本发明序列之一共有低于 40% 的同一性,尽管优选地为低于 25% 的同一性。因此,猪圆环病毒的“同源物”或其片段应当与猪圆环病毒或其片段共有至少大约 75% 的同源性(优选地大约 80% 同源性,更优选地大约 90-95% 的同源性,最优选地大约 99% 的同源性)。

[0083] 对疫苗或免疫原性组合物的“免疫应答”在受试者中产生对抗原或感兴趣疫苗组合物中存在的分子的体液和 / 或细胞介导的免疫应答。对于本发明的目的,“体液免疫应答”为抗体-介导的免疫应答,涉及对本发明的抗原 / 疫苗具有亲和力的抗体的产生,而“细胞-介导的免疫应答”为由 T- 淋巴细胞和 / 或其他白细胞介导的应答。“细胞-介导的免疫应答”是通过与主要组织相容性复合物 (MHC) 的 I 类或 II 类分子相关的抗原性表位的呈递而诱发。这激活了抗原-特异性 CD4+T 辅助细胞或 CD8+ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (“CTL”)。CTL 具有对肽抗原的特异性,所述肽抗原与由主要组织相容性复合物 (MHC) 编码的蛋白质相关联呈递并在细胞表面表达。CTL 帮助诱导及促进在细胞内摧毁细胞内微生物,或裂解被这些微生物感染的细胞。细胞免疫的另一个方面涉及通过辅助 T- 细胞的抗原-特异性应答。辅助 T- 细胞的作用是帮助刺激非特异性效应子细胞针对那些在其表面显示有与 MHC 分子相关的肽抗原的细胞的功能,并集中了此活性。“细胞-介导的免疫应答”还指产生细胞因子,趋化因子和其他此类由激活的 T- 细胞和 / 或其他白细胞产生的分子,包括源于 CD4+ 和 CD8+T- 细胞的分子。有大量测定可确定具体的抗原或组合物刺激细胞-介导的免疫性应答的能力,如通过淋巴细胞增殖(淋巴细胞激活)测定,CTL 细胞毒性细胞测定,通过测定敏化受试者中特异于抗原的 T- 淋巴细胞,或通过测量对用抗原重刺激应答的 T 细胞的细胞因子的产生。这些测定在本领域熟知。见,例如,Erickson 等人, *J. Immunol.* (1993) 151 : 4189-4199 ;Doe 等人, *Eur. J. Immunol.* (1994) 24 :2369-2376。

[0084] 术语“免疫原性”指的是抗原或疫苗诱发免疫应答的能力,可以是体液或细胞介导的,或二者。如本文使用的,“免疫原性有效量”指的是足以诱发免疫应答,细胞(T细胞)或体液(B细胞或抗原)应答或二者的抗原或疫苗的量,这是通过本领域技术人员已知的标准测定所测量的。抗原作为免疫原的有效性可如下进行测量:通过增殖测定,通过细胞裂解测定,如铬释放测定以测量 T 细胞裂解其特异性靶标细胞的能力,或通过测量血清中特异于抗原的循环抗体水平以测量 B 细胞活性水平。进一步地,免疫应答的保护水平可通过用已经注射的抗原攻击经免疫的宿主而进行测量。例如,如果需要对其产生免疫应答的抗原

为病毒或肿瘤细胞,由“免疫原性有效量”的抗原诱导的保护水平是通过检测病毒或肿瘤细胞攻击动物之后的存活百分比或死亡百分比而测量的。在一个实施方式中,“免疫原性有效量”的疫苗或免疫原性组合物指的是通过 FAID₅₀ 方法 (King 等人, Journal of Comparative Medicine and Vet. Science, 29 :85-89(1965)) 以及美国专利号 4,824,785 中测量的病毒颗粒滴度的范围为大约 1-7Log₁₀ 病毒颗粒 /ml。在一个实施方式中,“免疫原性有效量”的疫苗或免疫原性组合物指的是通过 FAID₅₀ 方法 (King 等人, Journal of Comparative Medicine and Vet. Science, 29 :85-89(1965)) 以及美国专利号 4,824,785 中测量的病毒颗粒滴度的范围为大约 2-5Log₁₀ 病毒颗粒 /ml。在一个实施方式中,“免疫原性有效量”的感染性 DNA 疫苗或免疫原性组合物的范围可以为大约 50-5000 μg。在一个实施方式中,“免疫原性有效量”的感染性 DNA 疫苗或免疫原性组合物的范围可以为大约 50-1000 μg。在特定实施方式中,术语“大约”意思是在 20%之内,优选地在 10%之内,更优选地在 5%之内。

[0085] 术语“免疫原性组合物”指的是任何含有抗原,例如微生物体的药物组合物,所述组合物可用于在哺乳动物中诱发免疫应答。免疫应答可包括 T 细胞应答、B 细胞应答或 T 细胞和 B 细胞应答二者。组合物可起到敏化哺乳动物的作用,通过细胞表面呈递与 MHC 分子相关的抗原。此外,可产生抗原-特异性 T-淋巴细胞或抗体以允许对经免疫的宿主的未来保护。“免疫原性组合物”可含有活的、减毒的,或灭活/失活的疫苗,其包含完整微生物体或由其衍生的免疫原性部分,所述免疫原性部分诱导细胞-介导(T细胞)免疫应答或抗体-介导(B细胞)免疫应答或二者,并可保护动物不产生与微生物体相关的一种或多种症状,或可保护动物不会由于被微生物体感染而死亡。

[0086] “免疫原性 ORF”或“免疫原性 ORF”指的是诱发免疫应答的开放阅读框,例如,ORF2 编码一种免疫原性衣壳蛋白质。

[0087] 本发明的疫苗和免疫原性组合物能够进一步包含一种或多种其他的“免疫调制剂”,其为扰乱或改变免疫系统的试剂,从而观察到体液和/或细胞-介导的免疫的上调或下调。在一个具体的实施方式中,优选的是免疫系统的体液和/或细胞-介导的分支的上调。特定免疫调制剂的实例包括,例如,“药学可接受佐剂”或细胞因子,等等。可用于本发明疫苗的“药学可接受佐剂”的非限制性实例包括 RIBI 佐剂系统 (Ribi Inc., Hamilton, Mont.)、铝、矿物胶如氢氧化铝胶,水包油乳剂、油包水乳剂如弗氏完全和不完全佐剂、嵌段共聚物 (CytRx, Atlanta Ga.)、QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.)、SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.)、AMPHIGEN[®]佐剂、皂苷、Quil A 或其他皂苷部分、单磷酸酯 A、以及阿夫立定 (Avridine) 脂-胺佐剂。用于本发明疫苗的水包油乳剂的非限制性实例包括修饰的 SEAM62 和 SEAM 1/2 制剂。修饰的 SEAM62 是含有 5% (v/v) 鲨烯 (Sigma)、1% (v/v) SPAN[®]85 去垢剂 (ICI 表面活性剂)、0.7% (v/v) TWEEN[®]80 去垢剂 (ICI 表面活性剂)、2.5% (v/v) 乙醇、200 μg/ml Quil A、100 μg/ml 胆固醇和 0.5% (v/v) 卵磷脂的水包油乳剂。修饰的 SEAM 1/2 是含有 5% (v/v) 鲨烯 (Sigma)、1% (v/v) SPAN[®]85 去垢剂、0.7% (v/v) TWEEN[®]80 去垢剂、2.5% (v/v) 乙醇、100 μg/ml Quil A、50 μg/ml 胆固醇的水包油乳剂。其他可包括在疫苗中的“免疫调制剂”包括,例如,一种或多种白介素、干扰素或其他已知的细胞因子。在一个实施方式中,佐剂可以为环糊精衍生物或多聚阴离子多聚体,如分别在美国专利号 6,165,995 和 6,610,310 中描述的。

[0088] 术语“感染性的”指的是病毒在猪中复制或能够复制,不管此病毒是否引起任何疾

病。在本发明中，“感染性”DNA 的实例如 SEQ ID NO:1 或 2 的 PCV2DNA 所示。

[0089] 术语“分离的”或“纯化的”意思是材料从其初始环境（例如，如果其是天然发生的，为天然环境）移出。例如，“分离的”或“纯化的”肽或蛋白质基本上不含细胞材料或来自蛋白质所衍生自的细胞或组织源的其它污染性蛋白质，或当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物。语句“基本上不含细胞材料”包括这样的多肽 / 蛋白质的制备物，其中多肽 / 蛋白质与从中分离或重组产生其的细胞的细胞组分相分离。因此，基本上不含细胞材料的多肽 / 蛋白质包括这样的多肽 / 蛋白质的制备物，其具有少于大约 30%、20%、10%、5%、2.5% 或 1%（以干重计）的污染性蛋白质。当多肽 / 蛋白质为重组产生时，还优选地其基本上不含培养基，即，培养基占蛋白质制备物体积的少于大约 20%、10% 或 5%。当多肽 / 蛋白质是通过化学合成产生时，优选地其基本上不含化学前体或其它化学物，即，其与蛋白质合成中所涉及的化学前体或其它化学物相分离。因此，这些多肽 / 蛋白质制备物具有少于大约 30%、20%、10%、5%（以干重计）的目标多肽 / 蛋白质片段以外的化学前体或化学物。“分离的”或“纯化的”核酸分子为与其他存在于核酸分子天然来源的核酸分子相分离的分子。此外，“分离的”核酸分子，如 cDNA 分子或 RNA 分子，在由重组技术产生时可基本上不含其它细胞材料，或当通过重组技术产生时不含培养基，或当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物。

[0090] 术语“灭活的”或“失活的”在本文交换使用，指的是用于制备疫苗组合物的病毒的感染性的显著或完全减少。病毒的灭活或失活可根据任何本领域技术人员已知的步骤进行评估，例如，通过分子生物学方法（PCR）、用于对病毒滴度进行滴定的方法、荧光、免疫学方法（ELISA、RIA 等等）、可以检测一种或多种病毒多肽的免疫酶学方法（Western 等等）。已经使用的大量不同的失活试剂和方式包括福尔马林、叠氮化物、冻融、超声、热处理、压力骤降、去垢剂（尤其是非-离子去垢剂）、溶酶体、苯酚、蛋白水解酶以及 β -丙内酯。

[0091] 术语“淋巴组织”指的是任何富含淋巴细胞以及辅助细胞如巨噬细胞和网状细胞，并由结缔组织的网络支持的组织。淋巴组织包括骨髓、胸腺、淋巴结、脾、扁桃体、增殖腺、派伊尔集合淋巴结（Peyer's Patch）和粘膜表面上的淋巴细胞聚集物。“非-淋巴”组织指的是任何其他不富含如本文定义的淋巴细胞和辅助细胞的组织。

[0092] 如本文使用的，词语“核酸”或“核酸分子”指的是 DNA、RNA、以及任何已知的 DNA 和 RNA 的碱基类似物或由其形成的嵌合物。因此，“核酸”或“核酸分子”指的是核糖核苷（腺苷、鸟苷、尿苷或胸苷；“RNA 分子”）或脱氧核糖核苷（脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷或脱氧胞苷，“DNA 分子”）的磷酸酯多聚物形式，可以是单链形式或双链螺旋。双链的 DNA-DNA、DNA-RNA 和 RNA-RNA 螺旋都是可能的。术语核酸分子，具体而言 DNA 或 RNA 分子，仅仅指分子的一级或二级结构，不限于任何具体的三级结构。因此，此术语包括双链 DNA，尤其发现以线性或环状 DNA 分子（例如，限制酶片段）、质粒和染色体。在讨论特定双链 DNA 分子的结构时，序列可根据正常的惯例，只给出沿 DNA 非转录链（即，具有与 mRNA 同源序列的链）5N-3N 方向的序列而在本文中描述。“重组 DNA 分子”是已经经过分子生物学操作的 DNA 分子。

[0093] “核苷酸”指的是 DNA 或 RNA 的亚基，由一个含氮碱基（腺嘌呤，鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶）、一个磷酸分子和一个糖分子（DNA 中为脱氧核糖，RNA 中为核糖）构成。

[0094] 如本文使用的，术语“开放阅读框”或“ORF”，或“ORF”，指的是编码具体的圆环病

毒蛋白质或抗原所需要的不含介于中间的终止密码子的最少的核苷酸序列。

[0095] 术语“肠道外的”指的是物质以经过消化道以外的方式被摄入身体内或施用,例如,通过静脉内或肌肉内注射。

[0096] 术语“病原性”指的是任何感染试剂(例如细菌或病毒)引起疾病的能力。在本发明中,术语“病原性”指的是猪圆环病毒,具体而言为 2 型猪圆环病毒,引起猪的疾病(称为“断奶后多系统衰竭综合征”或“PMWS”)的能力。此疾病特征常常在于断奶的猪的衰竭性表现或表现不佳,并在于中度至重度的淋巴病理,伴随淋巴耗尽及淋巴组织中淋巴结的组织细胞取代。还已知患有 PMWS 的猪具有呼吸性疾病,例如,间质性肺炎、淋巴组织细胞肝炎及淋巴组织细胞间质性肾炎。与“病原性”2 型猪圆环病毒相关的其他病况包括分散性生殖障碍、肠炎和猪皮炎与肾病综合征(porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)。“非-病原性”微生物体指的是缺少上文对于猪圆环病毒“病原性”株提到的特征的微生物体。“非-病原性”猪圆环病毒通常指 1 型猪圆环病毒。猪圆环病毒的“病原性”株通常称为 2 型猪圆环病毒。“非-病原性”猪圆环病毒通常称为 1 型猪圆环病毒。

[0097] 因此,术语“一致性百分比”或“序列同一性百分比”指的是两条氨基酸序列之间或两条核苷酸序列之间的序列同一性。可使用多种比对算法和/或程序,包括 FASTA、BLAST 或 ENTREZ。FASTA 和 BLAST 可作为 GCG 序列分析软件包(University of Wisconsin, Madison, Wis.)的一部分而得到,且可用例如默认设置而使用。ENTREZ 可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information),美国国家医学图书馆(National Library of Medicine),美国国立卫生研究院(National Institutes of Health), (Bethesda, Md) 而获得。在一个实施方式中,两条序列的同一性百分比可通过 GCG 程序,用缺口加权为 1 而确定,例如,每个氨基酸缺口被当作两条序列单一的氨基酸或核苷酸错配而加权。

[0098] 术语“药学可接受载体”意思是联邦、州政府或其他管理机构许可的载体,或在美国药典或其他公认药典中列出的用于动物,包括人和非-人哺乳动物的载体。术语“载体”指的是药物组合物与之一同施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这些药物载体可为灭菌的液体,如水和油,包括石油、动物、蔬菜或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等的。当药物组合物静脉内施用时,水为优选的载体。盐水溶液和葡萄糖水溶液以及甘油溶液也可用作液体载体,具体是用于可注射的溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等等。如果有需要,组合物还可含有少量湿润或乳化试剂,或 pH 缓冲试剂。这些组合物可采用溶液、混悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉末、持续释放剂型等等形式。组合物可以栓剂配制,具有传统的结合物和载体,如三甘油酯。口服制剂可包含标准载体如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等等。合适的药物载体的实例在 E. W. Martin 的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中有所描述。制剂应当适合于施用的模式。

[0099] “多聚核苷酸”为核酸多聚体,其通常编码生物学活性(例如,免疫原性)蛋白质或多肽。根据多聚核苷酸编码的多肽的本质,多肽可包括少至如 10 个核苷酸,例如当多聚核苷酸编码抗原时。进一步地,“多肽”可包括双-和单-链序列,指的是来自病毒的 cDNA、原核或真核 mRNA、来自病毒(例如, RNA 和 DNA 病毒及逆转录病毒)的基因组 RNA 和 DNA 序列

或原核 DNA、还有合成的 DNA 序列,但不限于此。此术语还涉及包括 DNA 和 RNA 的任何已知碱基类似物的序列。此术语进一步包括对天然序列的修饰,如缺失、添加和取代(例如,甲基化或加帽),优选地这样以使核酸分子编码例如抗原性蛋白质。这些修饰可为有意的,如通过定点诱变,或通过具体合成步骤,或通过遗传工程手段,或可为意外的,如通过产生这些抗原的宿主的突变。术语“寡聚核苷酸”或“寡聚物”在本文交换使用。

[0100] 术语“猪的”和“猪”被交换使用,指的是任何猪科家族成员的动物,例如,猪。

[0101] 术语“保护”指的是通过诱导对具体病原体,例如圆环病毒的免疫应答来保护例如哺乳动物(具体而言为猪)抵抗感染或疾病。这种保护通常在用本文描述的疫苗组合物处理哺乳动物之后实现。

[0102] 术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”指的是氨基酸残基的多聚体,并且不限制其产物的最小长度。因此,肽、寡肽、二聚体、多聚体等等包括在所述定义之内。全长蛋白质和其片段二者都包括在所述定义之内。该术语还包括对天然序列的修饰,如缺失、添加和取代(通常本质上是保守性的,但其可以为非-保守性的),优选地这样以使此蛋白质维持诱发该蛋白质所施用的动物内免疫性应答的能力。还包括的为表达后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等等。

[0103] 如本文使用的,术语“序列同源性”其所有语法形式指的是具有共同进化起源的蛋白质之间的关系,包括来自不同物种的同源蛋白质。(Reeck 等人,1987,Cell 50:667)。

[0104] 当至少大约 75%(优选地至少大约 80%,更优选地至少大约 90 或 95%,最优选地大约 99%)的核苷酸在 DNA 序列的限定长度上匹配时,两条 DNA 序列为“基本上同源”或“基本上相似”。基本上同源的序列可通过使用序列数据库中可得的标准软件比较序列,或在例如如其具体系统规定的严格条件下的 Southern 杂交实验中而得到鉴定。规定恰当的杂交条件是在本领域技术之内的。见,例如,Maniatis 等人,见前文;DNA Cloning, Vols. I & II, 见前文;Nucleic Acid Hybridization, 见前文)。

[0105] 类似地,当大于 70%的氨基酸为相同的,或功能上相同,则两条氨基酸序列为“基本上同源的”或“基本上相似的”。优选地,相似或同源序列通过使用,例如, GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin) 堆积序列进行比对而鉴定。

[0106] 如本文使用的,“处理”(包括其变体,例如,“治疗”或“所处理的”)指的是以下的一种或多种:(i) 对感染或再感染的保护,如传统疫苗中的,(ii) 症状严重性的降低,或症状消除,以及(iii) 所考虑的病原体或障碍基本上或完全消除。因此,处理可预防性地(感染之前)或治疗性地(感染之后)实现。在本发明中,预防性处理是优选的模式。根据本发明一个具体的实施方式,提供了针对病毒感染处理(包括预防性地和/或治疗性地免疫)宿主动物的组合物和方法。本发明的方法用于赋予哺乳动物,优选地为猪,预防性和/或治疗性免疫性。本发明的方法还可在哺乳动物上实施以用于生物医学研究应用。

[0107] 交换使用的术语“疫苗”或“疫苗组合物”,指的是包含至少一种在动物体内诱导免疫应答的免疫原性组合物的药物组合物。疫苗或疫苗组合物可保护动物不受由于感染产生的疾病或可能的死亡,并且可包括或不包括增强活性组分免疫学活性的其他一种或多种组分。疫苗或疫苗组合物可另外包含进一步的药物组合物通常所有的组分。疫苗或疫苗组合物可另外包含进一步的疫苗或疫苗组合物通常所有的组分,包括,例如,佐剂或免疫调制

剂。疫苗的免疫原性活性组分可以包含以其原始形式的完整活生物体,或作为修饰的活疫苗中减毒生物体,或者灭活或失活疫苗中由恰当方法失活的生物体,或包含病毒的一种或多种免疫学组分的亚基疫苗,或通过本领域技术人员已知方法产生的遗传工程改造的、突变的或克隆的疫苗。疫苗可包含一种或同时包括超过一种上文描述的元件。在本发明中,疫苗组合物包括但不限于,活的、减毒的或灭活 / 失活形式的完整嵌合猪圆环病毒,编码此嵌合猪圆环病毒的感染性核酸,或包括质粒、载体,或其他载体以直接将 DNA 注射入猪的其它感染性 DNA 疫苗。

[0108] 总体描述

[0109] 由于其对猪产业潜在的影响,开发针对病原性形式的 2 型猪圆环病毒 (PCV2) 的疫苗是非常重要的。人们相信非病原性 PCV1 针对 PCV2 感染的用途有限。

[0110] 此外,已经出现了新型 PCV2 毒力株,其特征部分在于比平均死亡率高。这些 PCV2 地的高毒力高死亡率病原性株被标注为 PCV2B,而低毒力、低死亡率病原性株被标注为 PCV2A。最近提出的对这两株的备选命名将 PCV2A 株称为“基因型 II”或“RFLP 422”,而 PCV2B 株被称为“基因型 I”或“RFLP 321”。前文描述的特定疫苗组合物可证明对于较低死亡率、较少毒力的 PCV2A 病原性株有效,却没有一个被显示对高毒力病原性 PCV2B 株有效,所述高毒力病原性 PCV2B 株的特征部分在于其比平均水平高的死亡率。

[0111] 由于与猪圆环病毒的这些病原性 PCV2B 株相关的感染严重性以及高于平均水平的死亡率,鉴定、分离及利用这些株中的一种或多种用于制备病原性或疫苗组合物以免疫保护猪抵抗断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 是有利的。

[0112] 针对的是鉴定和分离本发明的这些 PCV2B 株。

[0113] 在一个实施方式中,新近鉴定和分离的猪圆环病毒为 2B 型株,其具有如 SEQ ID NO :1 或 2 中任何一个所示的核酸序列。在一个实施方式中,所分离的猪圆环病毒为 2B 型株,其具有与 SEQ ID NO :1 或 2 中任何一个的序列具有至少大约 95% 序列同源性的核酸序列。在一个实施方式中,新近鉴定和分离的 2B 型猪圆环病毒的 ORF2 蛋白质与 SEQ ID NO :3 或 4 中任何一个具有至少 92% 的序列同一性。

[0114] 在本发明的一个实施方式中,这些方法提供了对猪进行抗 2A 或 2B 型病原性猪圆环病毒 (PCV2) 的免疫,包括施用免疫学有效量的包含由本发明核酸编码的猪圆环病毒的免疫学组合物。

[0115] 具体而言,本发明的方法提供了疫苗或免疫学组合物的用途,所述疫苗或免疫学组合物包括以下的一种或多种:

[0116] a) 免疫学有效量的至少一种如本文描述的 2 型猪圆环病毒,为减毒或失活 / 灭活形式;

[0117] b) 编码 a) 的至少一种 2 型猪圆环病毒的核酸分子;

[0118] c) 免疫学有效量的分离自 a) 的至少一种 2 型猪圆环病毒的至少一种蛋白质;或

[0119] d) 免疫学有效量的编码 c) 的至少一种蛋白质的至少一种核酸分子。

[0120] 在一个实施方式中,疫苗或免疫原性组合物可包含 PCV2B DNA 疫苗(例如,表达 PCV2B ORF2 的质粒载体)。在一个实施方式中,疫苗或免疫学组合物可包含表达 PCV2B ORF2 的失活的病毒载体(例如,棒状病毒、腺病毒或痘病毒,如浣熊痘病毒;或细菌,如大肠杆菌)。

[0121] 还在考虑之内的是如本文描述的疫苗或免疫原性组合物对于预防与断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 相关的一种或多种症状有效。这些症状可包括,例如,以下的一种或多种:呼吸疾病、一种或多种组织或器官中的镜检病变、组织细胞炎症或淋巴结耗尽。

[0122] 此外,本文描述的疫苗或免疫原性组合物可与第二种或第三种疫苗或免疫原性组合物一同使用,所述第二种或第三种疫苗或免疫原性组合物保护猪抵抗一种或多种病原性猪病毒或细菌,包括:猪生殖与呼吸综合征 (PRRS) 病毒、猪细小病毒 (PPV)、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、多杀巴斯德菌、猪链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、支气管炎博德特菌、猪霍乱沙门氏菌、猪红斑丹毒丝菌、钩端螺旋体细菌、猪流感病毒、大肠埃希氏菌抗原、猪呼吸冠状病毒、轮状病毒、引起伪狂犬病的病原体、以及引起猪传染性肠胃炎的病原体。例如,在一个实施方式中,PCV 疫苗或免疫原性组合物可与猪生殖与呼吸综合征 (PRRS) 病毒疫苗或免疫原性组合物组合。在一个实施方式中,PCV 疫苗或免疫原性组合物可与猪肺炎支原体疫苗或免疫原性组合物组合。在一个实施方式中,PCV 疫苗或免疫原性组合物可与猪肺炎支原体疫苗或免疫原性组合物以及呼吸综合征 (PRRS) 病毒疫苗或免疫原性组合物组合。

[0123] PCV1-2 疫苗和免疫原性组合物的用途

[0124] 本发明提供了对两种新型病原性 PCV2B 猪圆环病毒的鉴定和分离。由于需要疫苗或免疫原性组合物施用于猪以预防由猪圆环病毒病原性株引起的 PMWS,或减轻与猪的此疾病相关的至少一种症状,人们预期这两种新型株中的至少一种,或编码这两种新型株的至少一种核酸,或获自这些株中的至少一种的至少一种蛋白质,可配制在疫苗或免疫原性组合物中用于传递至猪中以对猪进行抗该疾病的免疫,从而为猪提供抵抗病毒感染和断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 的保护。

[0125] 使用本文描述的方法制备所提出用作本研究的免疫原性或疫苗组合物的、包含至少一种新近鉴定和分离的 PCV2B 猪圆环病毒的疫苗或免疫原性组合物。

[0126] 本发明的核酸

[0127] 如本文描述的,编码全长 2B 型病原性猪圆环病毒的纯化并分离的核酸分子如 SEQ ID NO:1 和 2 所示。本领域熟知的常规方法可用于产生互补链或具有高同源性的核苷酸序列,例如,通过领域-认可的标准或高严格的杂交技术。包含 PCV2 DNA 免疫原性衣壳基因的 DNA 序列的纯化并分离的核酸分子如 SEQ ID NO 5 和 6 的残基 1033-1734 所示。

[0128] 因此,含有本文描述的 PCV2B 核酸分子的任何合适的动物细胞可产生活的、感染性猪圆环病毒。活的、感染性猪圆环病毒通过体外或体内转染例如 PK-15 细胞衍生自 DNA 克隆。如上文指出的,PCV2DNA 的一个实例如 SEQ ID NO:1 和 2 所示的核苷酸序列。本发明进一步设想病毒可衍生自互补链或与核苷酸序列具有高同源性,至少 80%,更优选地 95-99%的同源性的核苷酸序列。

[0129] 本发明范围内还包括的是生物学功能性质粒、病毒载体等等,其含有本文描述的核酸分子,含有 DNA 克隆和免疫原性多肽表达产物的载体转染的合适的宿主细胞。在一个实施方式中,免疫原性蛋白质为来自猪圆环病毒的病原性 2B 型株 ORF2 编码的衣壳蛋白质,如本文描述的。猪圆环病毒中的此衣壳蛋白质的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 和 4 所示。其生物学活性变体也进一步包括在本发明之内。本领域普通技术人员会知道如何对多肽序列中的氨基酸进行修饰、取代、缺失等等,并产生保留与亲本序列相同、或基本上相同活性的生物学活性变体,不需要过度的努力。

[0130] 为产生本发明免疫原性多肽产品,方法可包括以下步骤:在合适的营养条件下,以允许多肽产物表达的方式培养用本文描述的核酸分子转染的原核或真核宿主细胞,以及通过本领域已知的标准方法分离所需的多肽产物。免疫原性蛋白质可通过其他技术,如,生物化学合成等等而制备,这也是本发明考虑之内的。

[0131] 疫苗和免疫原性组合物

[0132] 对含有病原性 PCV2B 病毒的疫苗或免疫原性组合物的制备,如本文描述的,以及使用其保护猪抵抗病原性猪圆环病毒株感染及 PMWS 的侵害的方法,也包括在本发明范围之内。设想的是 PCV2B 的新分离株可用作灭活 / 失活制备物,或可以经减毒或遗传修饰以用来对猪进行抗病毒感染和 PMWS 的免疫。因此,本发明提出了方法,使用免疫原性有效量的疫苗或免疫原性组合物对猪进行抵抗病原性圆环病毒的感染或抵抗 PMWS 的免疫,所述疫苗或免疫原性组合物含有本文描述的两种新型病原性猪圆环病毒中的至少一种,或编码这两种圆环病毒中的至少一种的至少一种核酸分子,或获自这两种圆环病毒中的至少一种的至少一种蛋白质。此方法可在需要抵抗病毒感染或 PMWS 进行保护时保护猪,通过对猪施用免疫原性有效量的根据本发明的疫苗,例如,包含免疫原性量的 PCV2B DNA、克隆的病毒、含有 PCV2B DNA 的质粒或病毒载体、多肽表达产物等等的疫苗。本文描述的疫苗可与第二种或第三种疫苗或免疫原性组合物一同施用以抵抗其他猪病原体,包括例如 PRRSV、PPV 和其他猪感染性因子,其选自以下:猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、多杀巴斯德菌、猪链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、支气管炎博德特菌、猪霍乱沙门氏菌、猪红斑丹毒丝菌、钩端螺旋体细菌、猪流感病毒、大肠埃希氏菌抗原、猪呼吸冠状病毒、轮状病毒、引起伪狂犬病的病原体、以及引起猪传染性肠胃炎的病原体。具体的组合可包括 PCV 疫苗或免疫原性组合物与 PRRSV 疫苗或免疫原性组合物组合;PCV 疫苗或免疫原性组合物与猪肺炎支原体疫苗或免疫原性组合物组合;或 PSV 疫苗或免疫原性组合物与前述两种疫苗或免疫原性组合物的组合。免疫刺激剂可同时给予猪以提供抵抗其他病毒或细菌感染的广谱的保护。

[0133] 本发明的方法中使用的疫苗或免疫原性组合物不限制于任何具体类型或制备方法。这些疫苗或免疫原性组合物可包括,例如,编码一种或多种猪圆环病毒蛋白质的核酸、感染性 DNA 疫苗(即,使用质粒、载体或其他常规载体以直接将 DNA 注射入猪)、活的疫苗、修饰的活疫苗、失活的疫苗、亚基疫苗、减毒的疫苗、遗传工程改造的疫苗等等。在特定实施方式中,疫苗可包括感染性 PCV2B DNA,合适质粒或载体如 pSK 载体中克隆的 PCV DNA 基因组,无毒、活病毒,失活的病毒等等,或可使用病毒载体,例如但不限于,棒状病毒,腺病毒载体,或痘病毒载体如浣熊痘病毒,或细菌载体如大肠杆菌。上述的任何一种可用于与非毒性、生理学可接受载体以及,可选地,一种或多种佐剂组合使用。

[0134] 失活的病毒疫苗或免疫原性组合物可通过用失活试剂如福尔马林或疏水溶剂、酸等等,通过用紫外光或 X- 射线的辐射,或通过加热等等处理衍生自克隆的 PCV DNA 的病毒而制备。失活是以本领域中理解的方式施行。例如,在化学失活中,含有病毒的合适的病毒样品或血清样品用足够量或浓度的失活试剂在足够高(或低,根据失活试剂)温度或 pH 下处理足够长的时间以失活病毒。通过加热的失活是在足以失活病毒的温度和时间长度下进行。通过辐射的失活是使用足以失活病毒的光的波长或其他能源以及时间长度下进行。如果不能感染对感染易感的细胞,则此病毒被认为已经失活。

[0135] 亚基疫苗的制备通常与修饰的活疫苗或失活的疫苗的制备不同。在制备亚基疫苗

之前,疫苗的保护性或抗原性组分必须被鉴定。这些保护性或抗原性组分包括病毒衣壳蛋白质的特定氨基酸区段或片段,其引起猪体内特别强烈的保护性或免疫原性应答;单一的或多种病毒衣壳蛋白自身,其寡聚体,以及更高级别的病毒衣壳蛋白质相关物,其形成病毒亚结构或者这些亚结构可鉴定的部分或单位;病毒表面之上或附近或病毒亚结构之内存在的寡聚糖苷、糖脂或糖蛋白,如与病毒相关的脂蛋白或脂基,等等。优选地,衣壳蛋白质,如由 ORF2 基因编码的蛋白质被用作亚基疫苗的抗原性组分。由感染性 DNA 克隆编码的其他蛋白质也可使用。这些免疫原性组分很容易通过本领域已知的方法进行鉴定。一旦被鉴定,病毒的保护性或抗原性部分(即,“亚基”)接着通过本领域已知的步骤被纯化和/或克隆。亚基疫苗提供了相对其他基于活病毒的疫苗的优势,因为亚基,如高纯化的病毒亚基,比整个病毒毒性更小。

[0136] 如果亚基疫苗是通过重组遗传技术生产的,克隆的亚基如 ORF2(衣壳)基因的表达式,例如,可通过本领域技术人员已知的方法进行优化(见,例如 Maniatis 等人, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Mass., 1989)。如果所采用的亚基代表病毒的完整结构特征,如整个衣壳蛋白质,则必须优化将其从病毒中分离的步骤。在其他情况下,在优化失活操作流程之后,亚基纯化操作流程可在生产之前被优化。

[0137] 为从病原性克隆制备减毒的疫苗,适应组织培养的、活的、病原性 PCV2 首先通过本领域已知方法进行减毒(使其变成非病原性或无害),通常通过在细胞培养物的系列传代而进行。病原性克隆的减毒还可通过基因缺失或病毒-产生基因突变而产生。然后,减毒的 PCV2 病毒可用于构建保留了 PCV1 非病原性基因型的其他 PCV2 病毒,但其可通过重组技术在选自 PCV2 基因组的免疫原性特征的强度上有变化。

[0138] 在本发明中所需要的其他遗传改造的病毒是通过本领域已知技术产生的。这些技术涉及,但不限于,重组 DNA 的进一步操作,对重组蛋白质氨基酸序列的修饰或取代,等等。

[0139] 生产了基于重组 DNA 技术的遗传改造的疫苗,例如,通过鉴定编码负责在猪体内诱导更强免疫或保护性应答的蛋白质的病毒基因的备选部分(例如,衍生自 ORF3、ORF4 等等的蛋白质)。这些鉴定的基因或免疫-显性片段可被克隆入标准蛋白质表达载体,如棒状病毒载体,以及用于感染合适的宿主细胞(见,例如 O' Reilly 等人, "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual," Freeman & Co., 1992)。培养宿主细胞,从而表达所需要的疫苗蛋白质,对其进行纯化直至所需的程度并配制成合适疫苗产品。

[0140] 如果克隆保留了引起疾病的任何不需要的天然能力,还可能精确找到病毒基因组中负责毒力的核苷酸序列,并通过例如定点诱变将病毒遗传改造为无毒。定点诱变能够添加、删除或改变一个或多个核苷酸(见,例如 Zoller 等人, DNA 3:479-488, 1984)。合成含有所需突变的寡聚核苷酸并将其与单链病毒 DNA 的部分退火。用产生于此步骤的杂交分子转化细菌。用分离的含有恰当突变的双链 DNA 产生全长 DNA,这是通过连接到后者的限制性片段,接着将其转染入合适的细胞培养物。将基因组连接入用于转移的合适载体可通过任何本领域普通技术人员已知的标准技术完成。载体转染入用于生产病毒子代的宿主细胞可使用任何传统方法,如磷酸钙或 DEAE-葡聚糖介导的转染、电穿孔、原生质体融合及其他熟知的技术(例如, Sambrook 等人, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。克隆的病毒然后显示出所需的突变。备选地,

可合成含有恰当突变的两条寡聚核苷酸。其可退火形成可插入病毒 DNA 而产生全长 DNA 的双链 DNA。

[0141] 用于疫苗的遗传改造的蛋白质,例如可在昆虫细胞、酵母细胞或哺乳动物细胞中表达。可通过传统方法纯化或分离的遗传改造的蛋白质可直接接种于猪以赋予抵抗 PCV2 引起的病毒感染或断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 的保护。

[0142] 可以用含有获自病毒或拷贝自病毒基因组的编码一种或多种病毒的免疫-显性蛋白质的核酸分子的转移载体转化昆虫细胞系(像 HI-FIVE)。转移载体包括,例如,线性化棒状病毒 DNA 和含有所需多聚核苷酸的质粒。宿主细胞系可与线性化棒状病毒 DNA 和质粒共-转染以产生重组棒状病毒。

[0143] 备选地,来自患有 PMWS 的猪的、编码一种或多种衣壳蛋白质的 DNA,感染性 PCV2 分子 DNA 克隆或克隆的 PCV DNA 基因组可被插入活的载体,如痘病毒或腺病毒中,并用作疫苗。

[0144] 对需要抵抗病毒感染或 PMWS 的保护的猪施用免疫原性有效量的本发明组合物。接种猪的免疫原性有效量或免疫原性量可通过传统测试容易地确定或容易地滴定。有效量是其中保留了足够的针对疫苗的免疫原性应答以保护暴露于引起 PMWS 的病毒的猪的量。优选地,保护猪至一定程度,其中病毒疾病的一种至所有不利的生理学症状或影响显著减少、减轻或完全预防。

[0145] 疫苗或免疫原性组合物可以单剂量或重复剂量施用。剂量范围可以是例如,50-5,000 微克含有感染性 DNA 基因组的质粒 DNA(根据疫苗的免疫-活性组分的浓度),但不应当含有足以导致病毒感染的不利反应或生理学症状的量的基于病毒的抗原。用于确定或滴定活性抗原性试剂的合适剂量的方法在本领域已知,其基于猪的体重、抗原和其他典型因素的浓度。优选地,感染性病毒 DNA 克隆被用作疫苗,或可在体外产生活的感染性疫苗,然后活疫苗可减毒并然后用作疫苗。在那种情况下,可给予猪 100-200 微克的克隆 PCV DNA 或大约 10,000 的 50%组织培养物感染剂量 (TCID₅₀) 的活的减毒病毒。

[0146] 可取地,将疫苗或免疫原性组合物施用于还未暴露于 PCV 病毒的猪。含有 PCV2 感染性 DNA 克隆或其其他抗原性形式的疫苗可方便地鼻内、透皮地(即,在皮肤表面上或之内应用以系统性吸收)、肠道外地等等方式施用。肠道外施用途途径包括但不限于,肌肉内、静脉内、腹膜内、皮内(即,注射的或否则置于皮肤下方的)途径等等。由于肌肉内和皮内接种途径已经在使用病毒感染性 DNA 克隆的其他研究中获得成功(E. E. Sparger 等人, " Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone, " Virology 238:157-160(1997); L. Willems 等人, " Invivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep, " Virology 189:775-777(1992)),除了实践的鼻内施用途途径之外,这些途径是最优选的。尽管不够方便,通过淋巴结内接种途径将疫苗给予猪也是考虑之内的。独特的,高度优选的施用方法涉及将含有 PCV2 或 PCV2 病毒(减毒的或失活的)的质粒 DNA 以肌肉内、皮内、淋巴结内等等直接注射入猪。

[0147] 当以液体施用时,本疫苗可以以水溶液、糖浆、酏剂、酊剂等的形式制备。这些制剂在本领域已知,通常通过将抗原和其他一般的添加剂溶解于恰当的载体或溶剂系统中而制备。合适的“生理学可接受”载体或溶剂包括但不限于,水、盐水、乙醇、乙二醇、甘油等等。

一般的添加剂为,例如,合格的染料、风味剂、味剂和抗微生物防腐剂如硫柳汞(乙基汞硫代水杨酸钠)。这些溶液可通过例如添加部分水解明胶、山梨醇或细胞培养基而进行稳定,并且可通过常规方法使用本领域已知试剂而进行缓冲,所述试剂如磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、其混合物等等。

[0148] 液体制剂还可包括含有组合其他标准共-制剂物的悬浮试剂或乳化试剂的混悬液和乳剂。这些液体制剂类型可通过常规方法进行制备。混悬液可使用例如胶体磨进行制备。乳剂可使用匀浆器制备。

[0149] 为注射入体液系统而设计的肠道外制剂,需要合适的等渗性和 pH 缓冲以达到猪体液的相应水平。根据需要,等渗性可以用氯化钠和其他盐进行恰当地调整。合适的溶剂如乙醇或丙二醇可用来增加制剂中成分的溶解性以及液体制备物的稳定性。本发明的疫苗中可使用的进一步的添加剂包括但不限于右旋糖、常规抗氧化剂及常规螯合剂如乙二胺四乙酸(EDTA)。在使用之前肠道外剂型还必须经过灭菌。

[0150] 在一个实施方式中,衍生自至少一种本文描述的 2B 型圆环病毒的免疫原性 ORF2 衣壳基因可用于疫苗或免疫原性组合物中。

[0151] 佐剂

[0152] 本发明提供对由 SEQ ID NO:1 和 2 的核酸序列编码的两种新型 2B 型猪圆环病毒(PCV2B)的分离和鉴定。这些新型 PCV2B 型株分离自环境暴露的猪,并且这些猪因此可为制备疫苗和免疫原性组合物的理想候选者。本发明的一个目标是利用这些株的灭活/失活形式,或制备这两种株的减毒形式以制备疫苗或免疫原性组合物。本发明还有一个目标是将与或不与佐剂一起递送至猪群体以预防 PMWS 或减轻与此疾病相关的至少一种症状。

[0153] 因此,如本文所描述的,活的、减毒的 2B 型猪圆环病毒,或灭活的/失活的猪圆环病毒,或编码这些猪圆环病毒的核酸,或获自这些圆环病毒的至少一种蛋白质可与或不与佐剂一起传递。在一个实施方式中,疫苗为灭活/失活的 PCV2B 圆环病毒,其与佐剂一起施用。佐剂是增加猪对疫苗的免疫原性应答的物质。佐剂可在与疫苗相同的时间相同的位点施用,或在不同时间,例如,作为加强剂施用。佐剂还可有利地以一种方式或与疫苗施用的方式或位点不同的位点施用于猪。合适的佐剂包括但不限于,氢氧化铝(矾)、免疫刺激复合物(I SCOMS)、非-离子阻断多聚体或共多聚体、细胞因子(像 IL-1、IL-2、IL-7、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 等等)、皂苷、单磷酸脂 A(monophosphoryl lipid A, MLA)、胞壁酰二肽(MDP)等等。其他合适的佐剂包括,例如,硫酸钾铝、分离自大肠埃希氏菌热-不稳定或热-稳定的肠毒素、霍乱毒素或其 B 亚基、白喉毒素、破伤风毒素、百日咳毒素、弗氏不完全或完全佐剂等等。基于毒素的佐剂,如白喉毒素、破伤风毒素和白喉毒素可在使用之前进行失活,例如,通过用甲醛进行处理。

[0154] 用于测量免疫应答的测定

[0155] 对猪进行抵抗猪圆环病毒的免疫接种的功能结果可通过监测细胞或体液免疫性或 T 细胞活性的诱导的合适的测定来进行评估。这些测定对于本领域技术人员已知,但可包括细胞裂解 T 细胞活性的测量,使用例如铬释放测定。备选地, T 细胞增殖测定可用作免疫反应性或其缺少的指示。此外,可进行体内研究以评估使用本发明的方法针对病原体进行免疫接种的哺乳动物中的保护水平。通常的体内测定可涉及用抗原,如本文描述的嵌合猪圆环病毒对动物进行免疫接种。在等待了足以诱导抗体或 T 细胞应答发生的时间后(一

般是从注射后大约一到两周),用抗原(如任何一种病毒)对动物进行攻击,并监测与病毒感染相关的一种或多种症状的减轻,或动物的存活情况。针对猪圆环病毒的成功免疫接种方案会导致与非-免疫接种对照相比,与病毒感染相关的一种或多种症状的显著下降,或病毒血症的降低,或与病毒感染相关病变的数量或严重性下降或存活。还可收集血清以监测对免疫注射应答而产生的抗体水平,这是通过本领域技术人员已知的方法测量的。

[0156] 比较 2A 型和 2B 型猪圆环病毒分离株的方法

[0157] 新近鉴定的 2B 型猪圆环病毒可能起到疫苗或免疫原性组合物的作用,以提供抵抗 2A 型或 2B 型圆环病毒的感染的保护,这两种都在猪体内为病原性的。2A 型和 2B 型猪可通过使用限制片段长度多态性(RFLP)分析而区分。RFLP 使用酶消化病毒核酸(部分或全部),其产生可在胶上看见的特异性切割模式。如果在病毒的酶切位点之间有差异,则可观察到不同的模式。这种指纹技术已经常用于 DNA 病毒。Meng 等人(美国专利公开 2005/0147966)描述了 PCR-RFLP 测定的用途,其使用 NcoI 限制酶以区分非-病原性 1 型猪圆环病毒和病原性 2 型猪圆环病毒之间。2000 年描述的基于 ORF2 的 PCR-RFLP 测定使用了 HinfI、HinPII、KpnI、MseI 和 RsaI 酶,能够在 PCV2 分离株(PCV2A, B, C, D, and E)之间进行区分(Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP:PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. Can J Vet Res. 64:44-52, 2000)。

[0158] 最近描述两基于 ORF2 的 PCR-RFLP 测定使用了 Sau3AI、BanII、NspI、XbaI 和 CfrI 酶,并且能够区分 9 种不同 PCV2 基因型(Wen L, Guo X, Yang H:Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. Vet Microbiol. 110:141-146, 2005)。PCV2RFLP 分析显示从 RFLP 422 型至 321 型有显著的变化, 2005, Ontario, Canada(Delay J, McEwen B, Ca rman S, van Dreuel T, Fairies J: porcine circovirus type 2-associated disease is increasing. AHL Newsletter. 9: 22, 2005)。

[0159] 除了使用 RFLP 分析区别 2A 型和 2B 型猪圆环病毒,人们相信这两株可根据序列分析而进行区分。

[0160] 例如,使用序列分析可以表征遗传信息并对分离株进行相互比较(Choi J, Stevenson GW, Kiupel M, Harrach B, Anothayanontha L, Kanitz CL, Mittal SK: Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. Can J Vet Res. 66:217-224, 2002;De Boiss éson C, B éven V, Bigarr éL, Thi éry R, Rose N, Eveno E, Madec F, Jestin A:Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolates from post-Weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. J Gen Virol. 85:293-304, 2004;Fenaux M, Halbur PG, GillM, Toth TE, Meng XJ:Genetic characterization of type 2 porcine circovirus(PCV-2)from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. J Clin Microbiol. 38:2494-2503, 2000;Grierson SS, King DP, Sandvik T, Hicks D, Spencer

Y,Drew TW,Banks M:Detection and genetic typing of type 2 porcine circovirus in archived pig tissues from the UK.Arch Virol.149:1171-1183,2004;Kim JH,Lyoo YS:Genetic characterization of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs.J Vet Sci.3:31-39,2002;Mankertz A,Domingo M,Folch JM,LeCann P,Jestin A,Segalés J,Chmielewicz B,Plana-Durán J,Soike D:Characterisation of PCV-2 isolates from Spain,Germany and France.Virus Res.66:65-77,2000)。为进一步研究PCV2分离株之间的可能差异,有可能对整个PCV2基因组进行测序或只测序ORF2。

[0161] 这两株还在与疾病自身相关的病原性、临床症状以及死亡率方面有差异,其中2A型显示出较不重度的身体组织病变以及较低的死亡率,相比较的是与2B型株相关的更严重的病理和更高死亡率。这些临床参数可使用本领域已知的标准步骤进行测量,如本发明所显示的。

实施例

[0162] 以下实施例证明了本法的特定方面。然而,应当理解的是这些实施例只用于示例说明,不意味着完全规定了本发明的条件和范围。应当清楚的是当给出通常的反应条件(例如,温度、反应时间等等)时,在具体范围以上或以下的条件都可使用,尽快一般会不那么方便。除非另外有说明,本文参考的所有部分和百分比都基于重量,所有温度以摄氏度表示。

[0163] 实施例 1

[0164] 两种新型猪圆环病毒 2B 型株的分离和鉴定

[0165] 规划了一项研究以在猪中测试一种新型疫苗制剂以评估其抵抗猪圆环病毒和猪肺炎衣原体的效力。在研究过程中,观察到对照和免疫接种组中几只猪显示出PMWS症状。然后证实了这些猪在攻击之前暴露于环境的PCV2。对来自这些猪的血液和组织样品的分子分析显示他们具有与用于攻击的株不同的2B型株。此外,序列分析确立了标注为FD07的PCV2B株和另一种分离自农场的猪的新型PCV2B猪(标注为FDJE)与其他领域研究中鉴定的和来自其他人之前鉴定的其他2B型株不同。用于分离和鉴定这两种新型PCV2B株的材料和方法在下文描述。

[0166] 材料和方法

[0167] 测试动物

[0168] 混合培育的雄性和雌性常规猪用于此研究。有24只免疫接种猪和24只对照。猪在免疫接种时为3周龄。

[0169] 用于研究的猪购自商业农场并使用耳朵标签进行鉴定。猪获自单一源的兽群。在首次免疫接种时,猪通过ELISA(S/P比例 ≤ 0.5)确定为PCV2血清阴性。用于研究的靶群体为健康架子猪(feeder pig)。在其免疫功能方面,选择用于此研究的动物被视为代表了美国的架子猪。

[0170] 在FDAH, Fort Dodge, IA将猪圈养在分离设备中。在整个研究过程中于相似的环境中混合免疫接种猪和对照。将小猪按照每窝封闭于房间内。圈养间隔依照动物福利的适用规则。以标准商业饮食喂养猪,其自由采食可得的水和食物。

[0171] 需要医疗看护的猪如必要则在本研究研究者商议之后由植物兽医处理。

[0172] 血清样品的 PCV2-PCR 测试结果表明在实验攻击之前在一个房间中有意外的 / 环境的 PCV2 暴露于小猪。免疫接种后 28 天时首次在一只对照小猪的血清中检测到 PCV2, 并通过 DNA 测序鉴定为猪圆环病毒 2B 型株 (PCV2B)。此 PCV2B 感染其他的 6 只小猪。两只未免疫接种的对照猪产生了 PCV2- 相关临床表征, 并由于不良的健康状况在攻击后 18 天处以安乐死。临床表征包括但不限于, 食欲不振、嗜睡、抑郁、打喷嚏、咳嗽、流鼻涕、眼黏分泌物以及呼吸困难。在进行安乐死之前, 收集组织和血液样品用于圆环病毒分析和测序。

[0173] 样品收集和测试

[0174] 样品收集

[0175] 鼻腔拭子

[0176] 对 PCV2 分离株在免疫接种后天数 (DPV) 的第 0 天收集鼻腔拭子以确保测试动物在免疫接种之前没有 PCV2 感染。将鼻腔拭子样品置于分别的灭菌管, 其中含有 3mL 具有乳清蛋白水解物 (LAH) 以及庆大霉素 (60 μ g/mL)、青霉素 (100U/mL) 和链霉素 (100 μ g/mL) 的 MEM, 并于 -50°C 或以下温度储存直到测试。

[0177] 血清样品

[0178] 在 0、13、28DPV 给猪抽血得到血清样品 (不多于 10mL), 并在 -1、7、14、20DPC 用于 ELISA 测试, 在 0、13、28DPV, -1、3、7、10、14、17、20DPC 用于 PCR 测试。

[0179] 组织样品

[0180] 在 20/21DPC 对所有的动物进行尸检。收集来自三处淋巴结 (气管支气管、髂 (iliac)、腹股沟)、扁桃体和脾的切片并将其在福尔马林中固定用于组织病原学检查以及 PCV2 的免疫组化 (IHC) 测试。

[0181] 样品测试

[0182] 酶联免疫吸附测定 (ELISA)

[0183] 用间接 ELISA 检测血清样品中的抗 -PCV2 抗体, 气质使用重组 PCV2 衣壳蛋白质 (在棒状病毒中表达) 作为捕捉抗原。简言之, 用阳性捕捉抗原 (用表达 PCV2 衣壳蛋白质的重组棒状病毒感染的 Sf9 细胞) 包被 96- 孔聚苯乙烯平板。用阴性捕捉抗原 (Sf9 昆虫细胞) 包被每块平板的六个孔作为对照。在用封闭试剂处理平板之后, 将平板与测试和对照血清样品孵育。将测试血清的各样品添加至用阳性捕捉抗原包被的免疫平板的孔中 (每个测试样品 3 个孔)。将阳性对照血清样品添加至用阳性捕捉抗原 (阳性对照) 包被的免疫平板的六个孔以及用阴性捕捉抗原 (阴性对照) 包被的免疫平板的六个孔中。然后将 HRP 缀合的山羊抗 - 猪二抗添加入平板。最后, 加入 TMB (过氧化物酶底物) 并孵育一段恰当持续的时间。用 ELISA 平板读取仪定量所显的颜色。ELISA 平板中的每种试剂都以明确的方式孵育并在每次连续的步骤之前洗涤以去除多余试剂。测试样品和阳性对照的 OD 是通过测试样品和阳性对照的平均 OD 减去阴性对照的平均 OD 而计算的。血清滴度表示为 S/P (样品 / 阳性对照) 比率, 即, 测试样品的 OD 除以阳性对照样品的 OD。

[0184] PCR 测试

[0185] PCV2- 特异性 PCR 测试用于检测 PCV2 病毒基因组 DNA 在血清样品中的存在情况。使用 QIAGEN MatAttract Virus Mini Kit 和 QIAGEN BioRobot M48 Workstation 从血清中纯化病毒基因组 DNA。为检测 PCV2 特异性序列, 使用 ABI AmpliTaq Gold DNA 聚合酶和基因 - 特异性引物: F1PCV2, 5' -ATGCCAGCAAGAAGAATGG-3' (SEQ ID NO:7) 和 RPCV2,

5'-TGGTTTCCAGTATGT GGTTC-3' (SEQ ID NO :8) 扩增 592-bp 的片段。用纯化的病毒 DNA 作为模板,在 95℃ 下变性 10min。反应的 PCR 程序由 35 个循环的 94℃ 变性 30sec,59℃ 退火 1min,以及 72℃ 延伸 1min 构成。用 10 μ L 的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测 592bp 的 PCV2 DNA 片段。

[0186] 组织病理学

[0187] 在尸体解剖时从各动物中收集脾、扁桃体以及三种 (气管支气管、髂,腹股沟) 淋巴结的组织样品,于 10% 中性缓冲福尔马林中固定 2-4 天,并包埋于石蜡中。用苏木精和伊红对四微米的切片进行染色,在光学显微镜下检查进行组织病原学评估。

[0188] 对这些样品估计淋巴细胞耗尽 / 组织细胞置换的程度。简言之,所有组织都以盲法检查并对淋巴细胞耗尽和组织细胞置换的水平给出主观得分。淋巴耗尽的排名得分 0-3 是按如下指定的:0- 正常,1- 轻度淋巴耗尽并有整体细胞性丢失,2- 中度淋巴耗尽,3- 重度淋巴耗尽并有淋巴滤泡结构丢失。组织细胞置换的排名得分 0-3 以类似方式按如下指定的:0- 正常,1- 轻度组织细胞 - 至 - 肉芽肿炎症,2- 中度组织细胞 - 至 - 肉芽肿炎症,3- 重度组织细胞 - 至 - 肉芽肿炎症并有囊泡置换。

[0189] 组织病理学评估由注册病理学家在 Veterinary Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (Ames, IA) 进行。

[0190] 免疫组化 (IHC) 测试

[0191] 通过免疫组化测试检测淋巴结、扁桃体和脾组织中的 PCV2- 特异性抗原。简言之,将四微米的组织切片置于玻璃片上,并用二甲苯处理以去除石蜡。用溶于 PBS 的 3% H_2O_2 处理 20min 以淬灭清蜡的切片的内源过氧化物酶。在用蒸馏水冲洗之后,将切片与在 PBS 中 1 : 1,000 稀释的兔抗 PCV2 多克隆血清在室温孵育过夜。在用 PBS 洗涤之后,将切片与 biotinylated 山羊抗 - 兔 IgG 在室温下孵育 30min。然后将切片与链霉亲和素过氧化物酶缀合物孵育并用二氨基联苯胺四盐酸底物“显色”。基于 PCV2 抗原染色水平盲法估计 PCV2 抗原的量。排名得分按照如下指定:0- 无染色,1- 低水平染色,2- 中等水平染色,以及 3- 高水平染色。组织上的 IHC 是在 Veterinary Diagnostic Laboratory in the Iowa State University College of Veterinary Medicine (Ames, IA) 进行的。

[0192] 结果

[0193] 病毒分离

[0194] 在免疫接种后天数 (DPV) 的第 0 天收集鼻腔拭子用于 PCV2 分离,以确保测试动物在免疫接种之前没有 PCV2 感染。从各测试动物的鼻腔拭子中没有分离出病毒,表示这些猪在免疫接种时没有暴露于环境 PCV2 感染。

[0195] PCV2 攻击材料滴定

[0196] 毒力 PCV2 攻击材料 (株 40895) 的滴定结果显示于表 1。一试三份滴定得到的攻击病毒的平均滴度为 4.6Log₁₀ FAID₅₀/mL。

[0197] 血清学

[0198] PCV2- 特异性抗体 ELISA 的结果显示于表 2。

[0199] 在 0DPV1,对照 (C 组) 的 ELISA S/P 比率变化范围是从 -0.009 至 0.366,平均 S/P 比率是 0.135。免疫接种之后,在 13DPV 时,对照中 ELISA 抗体滴度下降到背景水平,并且所有小猪直到攻击之日都保持血清阴性。分别地,在 13DPV 的平均 S/P 比率为 0.049,在 28DPV

为 0.023, 在 35DPV (-1DPC) 为 0.004。在 PCV2 攻击后, 平均 S/P 比率从在 7DPC 的 0.125, 在 14DPC 的 0.612, 显著地增加到在 20DPC 的 0.922。

[0200] 在 0DPV1, 免疫接种猪 (组 V) 的 ELISA S/P 比率变化范围是从 -0.028 至 0.364, 平均 S/P 比率是 0.126。免疫接种之后, 平均 S/P 比率是在 13DPV 为 0.041, 在 28DPV 为 0.097, 在 35DPV (-1DPC) 为 0.167。在 PCV2 攻击之后, 在早至 7DPC 观察到该组小猪的 ELISA 滴度有显著增强, 平均 S/P 比率为在 7DPC 为 1.069, 在 14DPC 为 1.373, 在 20DPC 为 1.356。

[0201] PCV2 病毒血症

[0202] 通过 PCV2- 特异性 PCR 对防接种的猪和对照的血清中 PCV2 病毒血症的检测总结于表 3A。此 PCV2- 特异性 PCR 至少比常规细胞培养方法灵敏 1,000 倍。

[0203] 在攻击后 (DPC) -1 天, 意外地发现 24 只免疫接种猪当中有 3 只 (猪 #P102、P103 及 P104), 以及 24 只对照中有 6 只 (猪 #G197、G205、O162、P107、P108 和 P110) 被检测出血清样品的 PCV2 DNA 为阳性, 而所有其他的都维持为阴性。所有 9 只 PCV2 阳性猪被圈养在同一个房间 (#12)。不幸地有六只 PCV2- 感染的猪 (猪 #P102、P103、P104、P107、P108 和 P110) 以及两只非 - 感染猪被重新安置于 #13 房间, 与 8 只来自 #11 房间的在 -1DPC 非 - 感染猪由于空间需求而混合。因此, 所有 #12 和 13 房间的动物都潜在地暴露于环境 PCV2。

[0204] 为研究 PCV2 环境暴露的来源, 在 0、13 和 28DPV 收集血清样品, 通过 PCV2- 特异性 PCR 进行测试。所有猪都是 PCV2 阴性, 除了猪 #P108 (对照, #12 房间) 在 13DPV 有极强的阳性 PCR 带。此结果表示意外环境 PCV2 暴露源于猪 #P108, 然后传播到 #12 和 #13 房间的其他猪。然而, 此 PCV2 的确切来源并不清楚, 最可能来自猪 #P108 在参加研究之前以无法检测水平被感染的环境或农场。

[0205] 为确定来自环境暴露的 PCV2 的基因型, 克隆猪 #P108 的 PCR 产物用于测序。DNA 序列分析显示了来自猪 #P108 的 PCV2 为 2B 型株, 与株 -#40895 (2A) 不同。这两种 PCV2 株的基因组共有 95.98% 的 DNA 序列同一性。为进一步区分实验 PCV2 (株 #40895) 攻击与环境接触攻击 (来自猪 #P108 的 2B), 克隆来自所有 PCV2 病毒血症猪的 PCR 产物用于 DNA 测序。基因分型的结果显示于“PCV2 攻击”栏: “A”表示血清样品中没有检测到 PCV2B, 攻击只是由实验 PCV2-#40895 株产生的; “A+B”表示除了实验攻击之外, 还检测到 PCV2B, 并且由于相同的序列, 所有 PCV2B 都是来自猪 #P108; “A+(B)”表示除了实验攻击之外, 猪潜在地感染有 PCV2B, 因为这些猪与猪 #P108 在 #12/13 房间混合。然而, 所有这些猪都被保护不受 PCV2 攻击。

[0206] 为估计实验和环境接触攻击的影响, PCV2 病毒血症的 PCR 结果分成三类进行讨论: 总体比较 (表 3A), 实验攻击 (表 3B), 以及实验和环境接触攻击 (表 3C)。

[0207] 组之间总体比较显示 10/24 只 (41.7%) 免疫接种猪在血清中 PCV2DNA 的存在情况为阳性, 至少发生了单一的阳性和不确定的结果。如果单一的不确定发生不可计数, 5/24 只 (20.8%) 免疫接种猪为 PCV2DNA 阳性。相反, 24/24 只 (100%) 对照在血清中 PCV2DNA 存在情况为阳性且为多发的。对照中 PCV2 阳性带的频率和浓度比免疫接种猪显著更高更强 (见表 3A)。

[0208] 暴露于 PCV2 实验攻击组之间的比较 (表 3B) 显示 1/9 只 (11.1%) 免疫接种猪的 PCV2DNA 为阳性的, 只有单一的阳性发生。相反, 14/14 只 (100%) 对照在血清中 PCV2DNA 存在情况为阳性, 且为多发的。

[0209] 暴露于 PCV2 实验和环境接触攻击组之间的比较（表 3C）显示 4/15 只（26.7%）免疫接种猪 PCV2DNA 为阳性的，至少单一的阳性发生。相反，10/10 只（100%）对照在血清中 PCV2 DNA 存在情况为阳性，且为多发的。

[0210] 镜检病理 – 淋巴耗尽

[0211] 就淋巴耗尽，通过显微镜检查淋巴结、脾和扁桃体的组织。镜检的病变 – 淋巴耗尽的总结结果总结于表 4A（得分为 0-3 的动物数量）。

[0212] 组之间总体比较显示相比于 23/24 只（95.8%）对照猪，在 15/24 只（62.5%）免疫接种猪中观察到至少一种组织中的异常淋巴耗尽得分。相比于 14/24 只（58.3%）对照，在 4/24 只（16.7%）的免疫接种猪中观察到中度到重度淋巴耗尽病变。

[0213] 暴露于 PCV2 实验攻击组之间的比较（表 4B）显示相比于 13/14 只（92.9%）对照猪，在 6/9 只（66.7%）免疫接种猪中观察到至少一种组织中的异常淋巴耗尽得分。

[0214] 暴露于 PCV2 实验和环境接触攻击组之间的比较（表 4C）显示相比于 10/10 只（100%）对照猪，在 9/15 只（60%）免疫接种猪中观察到至少一种组织中的异常淋巴耗尽得分。

[0215] 镜检病理 – 组织细胞置换

[0216] 就伴随囊泡置换的组织细胞 – 至 – 肉芽肿炎症，通过显微镜检查淋巴结、脾和扁桃体的组织观察。镜检的病理 – 组织细胞置换的总结结果总结于表 5。

[0217] 总体比较显示相比于 22/24 只（91.7%）对照猪，在 15/24 只（62.5%）免疫接种猪中观察到至少一种淋巴组织中的异常组织细胞置换得分。

[0218] 免疫组化

[0219] 在淋巴结、脾和扁桃体中通过 IHC 染色检测 PCV2 抗原的量的结果总结于表 6（得分为 0-3 的动物数量）。

[0220] 总体比较显示相比于 23/24 只（95.8%）对照猪，7/24 只（29.2%）免疫接种猪在至少一种淋巴组织中为 PCV2 特异性 IHC 染色。

[0221] 攻击后临床观察

[0222] 就攻击后临床表征对个体猪进行每天观察的结果显示于表 7。除了 2 只对照猪（#P108 和 0162），在任何猪中都没有观察到临床表征。

[0223] 在 1DPC 观察到猪 #P108 的咳嗽，在 10DPC 有腹泻，在 17DPC 变得瘦弱、有腹泻且不活跃。该猪发展了衰竭的明显临床表征。由于不良状况，在 18DPC 对该小猪实施安乐死。尸体解剖显示了非常少的皮下脂肪，肺中中度颅骨 – 腹侧实变（cranioventral consolidation）、空的胃和小肠。该猪发展了 PCV- 相关疾病，这被以下发现所支持：PCV2 病毒血症（极强的 PCR 阳性）、重度淋巴耗尽、以及淋巴组织内的高 PCV2 抗原负载（通过 IHC 染色）。

[0224] 发现小猪 #0162 在 14DPC 变瘦，左后腿变跛。在 17DPC 发现该猪再次变瘦，不能移动，后腿的跗骨关节变肿。由于不良状况，在 18DPC 对小猪实施安乐死。尸体解剖显示有中度至重度的肺实变，伴随纤维性粘连。对肺组织进行镜检评估显示了重度的急性支气管炎和慢性病灶间质性纤维化。该猪发展了 PCV- 相关疾病，这被以下发现所支持：PCV2 病毒血症（极强的 PCR 阳性）、重度淋巴耗尽、以及淋巴组织内的高 PCV2 抗原负载（通过 IHC 染色）。

[0225] 表 1. PCV2(#40895) 攻击材料滴定

[0226]

重复实验	* 滴度
1	4.6
2	4.8
3	4.4
4	4.6
5	4.6
Ave ± SD	4.6 ± 0.14

[0227] *Log₁₀ FAID₅₀ 每 mL

[0228] Ave ± SD = 平均滴度 ± 标准偏差

[0229] 表 2. 由 PCV2 抗体 ELISA 测量的免疫接种猪和对照猪的血清中对 PCV2 的血清转换*

[0230]

猪 ID	组	0DPV	13DPV	28DPV	-1DPC	7DPC	14DPC	20DPC
G199	V	0.029	0.022	0.425	0.883	1.298	1.367	1.358
G203	V	0.010	-0.015	-0.007	0.004	0.591	1.373	1.458
G204	V	0.038	-0.002	0.057	0.034	1.399	1.524	1.524
G289	V	0.121	0.055	0.021	0.034	0.938	1.530	1.536
G290	V	0.162	0.035	0.041	0.027	1.007	1.438	1.451

[0231]

0112	V	0.222	0.062	0.059	0.017	0.520	1.145	1.127
0113	V	0.050	0.007	0.057	0.112	1.164	1.460	1.395
0117	V	-0.028	-0.010	0.381	0.608	1.264	1.334	1.282
0119	V	0.030	-0.007	0.001	-0.013	0.935	1.209	1.196
0156	V	0.058	0.008	0.158	0.272	1.434	1.438	1.416
0158	V	0.099	0.039	0.023	0.128	1.451	1.462	1.447
0159	V	0.082	0.034	0.184	0.234	1.194	1.433	1.415
P102	V	0.108	0.028	0.026	0.017	1.199	1.307	1.321
P103	V	0.206	0.096	0.177	0.238	1.322	1.457	1.371
P104	V	0.139	0.046	0.023	0.034	1.351	1.438	1.394
P109	V	0.179	0.048	0.041	0.630	1.396	1.492	1.409
P113	V	0.113	0.026	0.039	0.011	0.980	1.251	1.368
P115	V	0.141	0.077	0.055	0.077	1.266	1.436	1.353
P145	V	0.069	-0.003	0.120	0.219	1.215	1.521	1.500
P146	V	0.158	0.065	0.030	0.037	0.213	1.372	1.273
P150	V	0.124	0.049	0.009	0.108	0.619	1.265	1.306
P192	V	0.288	0.113	0.173	0.072	0.697	1.399	1.314
P213	V	0.364	0.121	0.116	0.085	0.909	0.847	0.967
P214	V	0.264	0.097	0.110	0.135	1.299	1.444	1.373
Ave (S/P 比率)		0.126	0.041	0.097	0.167	1.069	1.373	1.356
± SD		0.094	0.039	0.111	0.228	0.334	0.150	0.127

[0232]

G197	C	0.072	0.005	0.017	-0.005	1.011	1.135	1.240
G205	C	0.028	-0.010	-0.003	-0.016	0.389	1.072	1.042
G293	C	0.202	0.033	0.019	-0.011	-0.017	0.376	0.949
G296	C	0.266	0.052	0.032	-0.001	0.016	0.932	1.073
0109	C	0.014	-0.007	-0.012	-0.013	0.009	0.701	1.254
0110	C	0.001	-0.015	-0.017	-0.003	-0.032	0.355	0.704
0111	C	-0.002	-0.019	-0.021	-0.033	-0.034	0.448	0.858
0114	C	-0.009	-0.014	-0.019	-0.028	-0.041	0.159	0.216

0162	C	0.219	0.040	0.039	0.032	0.216	0.536	NA
0164	C	0.057	0.018	-0.005	-0.007	0.019	0.227	0.675
0166	C	0.072	0.003	-0.003	-0.009	0.041	0.914	1.146
P105	C	0.228	0.234	0.035	0.022	0.134	1.376	1.428
P107	C	0.142	0.043	0.037	0.001	0.549	1.102	1.195
P108	C	0.266	0.080	0.039	-0.029	-0.036	-0.029	NA
P110	C	0.204	0.047	0.027	0.024	0.574	0.704	0.772
P112	C	0.069	0.132	0.036	0.019	0.023	0.783	1.170
P116	C	0.080	0.023	0.006	0.012	-0.005	0.338	0.841
P147	C	0.149	0.024	0.029	-0.006	-0.005	0.199	0.597
P148	C	0.033	0.008	0.016	-0.016	0.006	0.642	0.966
P194	C	0.343	0.136	0.106	0.042	0.070	0.208	0.633
P195	C	0.169	0.100	0.046	0.021	0.028	0.816	1.093
P215	C	0.110	0.037	0.032	0.013	0.029	0.433	0.826
P216	C	0.171	0.071	0.044	0.035	0.036	0.600	0.906
P218	C	0.366	0.147	0.082	0.043	0.027	0.664	0.701
Ave (S/P Ratio)		0.135	0.049	0.023	0.004	0.125	0.612	0.922
± SD		0.109	0.063	0.031	0.022	0.256	0.358	0.277

[0233]

[0234] * 结果表示为样品 / 阳性对照 (S/P) 比率 ; Ave (S/P 比率) ± SD = 平均 S/P 比率 ± 标准偏差

[0235] NA = 未确定 ; V = 免疫接种组 ; C = 对照组

[0236] 表 3A. 通过在免疫接种和对照猪的血清的 PCV2- 特异性 PCR 检测 PCV2 病毒血症 : 总体比较

[0237]

猪 ID	组	房间	PCV2 攻击	0 DPV	13 DPV	28 DPV	-1 DPC	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	20 DPC	PCV2 病毒血症
G199	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G203	V	12	A + B	-	-	-	-	+	++	++++	+++	++	++	P
G204	V	12	A + B	-	-	-	-	++	++	++	++	+	+	P
G289	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	P*
G290	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	P*
O112	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O113	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O117	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O119	V	11-13	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	P
O156	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O158	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O159	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P102	V	12-13	A + B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	P
P103	V	12-13	A + B	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	P*
P104	V	12-13	A + B	-	-	-	++	++++	++	+++	+++	+	±	P
P109	V	12-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P113	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P115	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P145	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P146	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	P*
P150	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P192	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P213	V	12	A + (B)	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	P*
P214	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			阳性#	0/24	0/24	0/24	3/24	4/24	5/24	4/24	3/24	3/24	4/24	10/24 (5*/24)

[0238]

			%阳性	0%	0%	0%	12.5%	16.7%	20.8%	16.7%	12.5%	12.5%	16.7%	41.7 (20.8*)%
G197	C	12	A + B	-	-	-	++	+++	+++	++++	+++	++	++	P
G205	C	12	A + B	-	-	-	++	+++	+++	++++	+++	+	+	P
G293	C	11	A	-	-	-	-	-	++	+	±	±	-	P
G296	C	11	A	-	-	-	-	-	++	++++	+	+	+	P
O109	C	11-13	A	-	-	-	-	-	++	++++	+++	++	+++	P
O110	C	11-13	A	-	-	-	-	-	+	+++	+	+	+	P
O111	C	11-13	A	-	-	-	-	-	++	++	++	+	+	P
O114	C	11-13	A	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	P
O162	C	12	A + B	-	-	-	+	+++	++	++++	+++	++	NA	P
O164	C	12	A	-	-	-	-	±	+	+++	++	+	±	P
O166	C	12	A + B	-	-	-	-	++	++	+++	++	++	+	P
P105	C	12-13	A + B	-	-	-	-	++++	++	++++	++	++	+	P
P107	C	12-13	A + B	-	-	-	+	++++	++	+++	++	+	+	P
P108	C	12-13	A + B	-	-	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	NA	P
P110	C	12-13	A + B	-	-	-	++	+++	++	+++	+	+	+++	P
P112	C	11	A	-	-	-	-	-	++	++	+	-	+	P
P116	C	11	A	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+	P
P147	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	P*
P148	C	11	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+++	+	P
P194	C	11	A	-	-	-	-	-	±	+	+	±	+	P
P195	C	11	A	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+++	P
P215	C	12	A + B	-	-	-	-	+	+	++	+	+	+	P
P216	C	12	A	-	-	-	-	-	+	+	±	++	+	P
P218	C	12	A + B	-	-	-	-	+	+	+	+	±	-	P
			阳性#	0/24	0/24	1/24	6/24	11/24	23/24	22/24	24/24	21/24	18/22	24/24 (23*/24)
			%阳性	0%	0%	4.2%	25.0%	45.8%	95.8%	91.7%	100%	87.5%	81.8%	100 (95.8*)%

[0239] V = 免疫接种组 ; C = 对照组 ; NA = 未确定 ; 11 或 12 房间 : 小猪在整个研究过程中 (免疫接种和攻击期) 圈养 ; 11-13 和 12-13 房间 : 在免疫接种期将小猪圈养在 11 或 12 房间或在 ODPC (攻击期) 重新安置于 13 房间。

[0240] PCV2 攻击株 : A = 实验攻击 -PCV2 #40895 ; A+(B) = 除实验攻击 -PCV2 #40895 之外, 在免疫接种或攻击期过程中由于与猪 #108 混合的潜在环境接触攻击。然而, 这些猪受到保护抵抗 PCV2 攻击, 并且没有 PCR 产物可以测序到 PCV2B ; A+B = 实验攻击 -PCV2 #40895, 由于猪 #108 的环境接触攻击, 并且 PCR 产物进行测序并被鉴定为来自相同来源 (猪 #108) 的 PCV2B。

[0241] PCR 条带强度得分 : - 阴性 ; ± 非常微弱极少可见的 PCR 条带 ; + 阳性 ; ++ 强阳性 ; +++ 非常强的阳性 ; ++++ 极强阳性 ; PCV2 病毒血症 : - = 阴性 ; P = 阳性 ; P* = 不确定 (不确定 PCR 条带单次或两次发生)。

[0242] 表 3B. 免疫接种和对照猪的血清中通过 PCV2- 特异性 PCR 检测 PCV2 病毒血症 : 实验 PCV2 (#40895) 攻击

[0243]

猪 ID	组	房间	PCV2 攻击	0 DPV	13 DPV	28 DPV	-1 DPC	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	20 DPC	PCV2 病毒血症
G289	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	P*
G290	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	P*
0119	V	11-13	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	P
P113	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P115	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P145	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P146	V	11	A	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	P*
P150	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P192	V	11	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			阳性#	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	2/9	1/9	0/9	0/9	1/9	4/9 (1*/9)
			%阳性	0%	0%	0%	0%	0%	22.2%	11.1%	0%	0%	11.1%	44.4 (11.1*)%
G293	C	11	A	-	-	-	-	-	++	+	±	±	-	P
G296	C	11	A	-	-	-	-	-	++	++++	+	+	+	P
0109	C	11-13	A	-	-	-	-	-	++	++++	+++	++	+++	P
0110	C	11-13	A	-	-	-	-	-	+	+++	+	+	+	P
0111	C	11-13	A	-	-	-	-	-	++	++	++	+	+	P
0114	C	11-13	A	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	P
0164	C	12	A	-	-	-	-	±	+	+++	++	+	±	P
P112	C	11	A	-	-	-	-	-	++	++	+	-	+	P
P116	C	11	A	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+	P
P147	C	11	A	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	P*
P148	C	11	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+++	+	P
P194	C	11	A	-	-	-	-	-	±	+	+	±	+	P
P195	C	11	A	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+++	P
P216	C	12	A	-	-	-	-	-	+	+	±	++	+	P
			阳性#	0/14	0/14	0/14	0/14	1/14	13/14	12/14	14/14	11/14	11/14	14/14 (13*/14)
			%阳性	0%	0%	0%	0%	7.1%	92.9%	85.7%	100%	78.6%	78.6%	100 (92.9*)%

[0244] V = 免疫接种组 ; C = 对照组 ; NA = 未确定 ;

[0245] 11 或 12 房间 : 小猪在整个研究过程中 (免疫接种和攻击期) 圈养 ; 11-13 和 12-13 房间 : 在免疫接种期将小猪安置于 11 或 12 房间或在 0DPC (攻击期) 重新安置于 13 号房间。

[0246] PCV2 攻击株 : A = 实验攻击 -PCV2 #40895

[0247] PCR 条带强度得分 : - 阴性 ; ± 非常微弱极少可见的 PCR 条带 ; + 阳性 ; ++ 强阳性 ; +++ 非常强的阳性 ; ++++ 极强阳性 ;

[0248] PCV2 病毒血症 : - = 阴性 ; P = 阳性 ; P* = 不确定 (不确定 PCR 条带单次或两次发生)

[0249] 表 3C. 免疫接种和对照猪血清中进行 PCV2- 特异性 PCR 检测 PCV2 病毒血症 : 实验 PCV2 (#40895) 及环境接触攻击

[0250]

猪 ID	组	房间	PCV2 攻击	0 DPV	13 DPV	28 DPV	-1 DPC	3 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	20 DPC	PCV2 病毒血症
G199	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G203	V	12	A + B	-	-	-	-	+	++	++++	+++	++	++	P
G204	V	12	A + B	-	-	-	-	++	++	++	++	+	+	P
O112	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O113	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O117	V	11-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O156	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O158	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O159	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P102	V	12-13	A + B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	P
P103	V	12-13	A + B	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	P*
P104	V	12-13	A + B	-	-	-	++	++++	++	+++	+++	+	±	P
P109	V	12-13	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P213	V	12	A + (B)	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	P*
P214	V	12	A + (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			阳性#	0/15	0/15	0/15	3/15	4/15	3/15	3/15	3/15	3/15	3/15	6/15 (4*/15)
			% 阳性	0%	0%	0%	20%	26.7%	20%	20%	20%	20%	20%	40 (26.7*)%
G197	C	12	A + B	-	-	-	++	+++	+++	++++	+++	++	++	P
G205	C	12	A + B	-	-	-	++	+++	+++	++++	+++	+	+	P
O162	C	12	A + B	-	-	-	+	+++	++	++++	+++	++	NA	P
O166	C	12	A + B	-	-	-	-	++	++	+++	++	++	+	P
P105	C	12-13	A + B	-	-	-	-	++++	++	++++	++	++	+	P
P107	C	12-13	A + B	-	-	-	+	++++	++	+++	++	+	+	P
P108	C	12-13	A + B	-	-	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	NA	P
P110	C	12-13	A + B	-	-	-	++	+++	++	+++	+	+	+++	P
P215	C	12	A + B	-	-	-	-	+	+	++	+	+	+	P
P218	C	12	A + B	-	-	-	-	+	+	+	+	±	-	P
			阳性#	0/10	0/10	1/10	6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	7/8	10/10
			% 阳性	0%	0%	10%	60%	100%	100%	100%	100%	100%	87.50%	100%

[0251] V = 免疫接种组 ; C = 对照组 ; NA = 未确定 ;

[0252] 11 或 12 房间 : 小猪在整个研究过程中 (免疫接种和攻击期) 被安置其中 ; 11-13 和 12-13 房间 : 在免疫接种期将小猪圈养在 11 或 12 房间或在 0DPC (攻击期) 重新安置于 13 房间。

[0253] PCV2 攻击株 : A+(B) = 除实验攻击 -PCV2 #40895 之外, 在免疫接种或攻击期过程中由于与猪 #108 混合的潜在环境接触攻击。然而, 这些猪受到保护抵抗 PCV2 攻击, 并且没有 PCR 产物可以测序到 PCV2B ; A+B = 实验攻击 -PCV2 #40895, 由于猪 #108 的环境接触攻击, 并且 PCR 产物进行测序并被鉴定为来自相同来源 (猪 #108) 的 PCV2B。

[0254] PCR 条带强度得分 : - 阴性 ; ± 非常微弱极少可见的 PCR 条带 ; + 阳性 ; ++ 强阳性 ; +++ 非常强的阳性 ; ++++ 极强阳性 ;

[0255] PCV2 病毒血症 : - = 阴性 ; P = 阳性 ; P* = 不确定 (不确定 PCR 条带单次或两次发生)

[0256] 表 4A. 淋巴结、脾和扁桃体中的淋巴耗尽 : 总体比较 *

[0257]

组	得分的动物数量*			
	0	1	2	3
髂淋巴结 (IL LN)				
免疫接种猪	13	7	2	2
对照	4	9	3	8
腹股沟淋巴结 (IG LN)				
免疫接种猪	15	7	1	1
对照	5	10	6	3
气管支气管淋巴结 (TB LN)				
免疫接种猪	12	11	0	1
对照	2	9	9	4
脾				
免疫接种猪	15	9	0	0
对照	7	6	8	3
扁桃体				
免疫接种猪	19	4	1	0
对照	10	4	7	3

[0258] * 淋巴耗尽得分 : 0 = 正常, 1 = 轻度, 2 = 中度, 3 = 重度

[0259] 表 4B. 淋巴结、脾和扁桃体中的淋巴耗尽 ; 实验 PCV2 (#40895) 攻击

[0260]

组	得分的动物数量*			
	0	1	2	3
髂淋巴结 (IL LN)				
免疫接种猪	4	4	0	1
对照	3	7	2	2
腹股沟淋巴结 (IG LN)				
免疫接种猪	6	3	0	0
对照	5	7	2	0
气管支气管淋巴结 (TB LN)				
免疫接种猪	4	5	0	0
对照	2	8	3	1
脾				
免疫接种猪	6	3	0	0
对照	7	5	2	0
扁桃体				
免疫接种猪	9	0	0	0
对照	10	2	2	0

[0261] * 淋巴耗尽得分 : 0 = 正常, 1 = 轻度, 2 = 中度, 3 = 重度

[0262] 表 4C. 淋巴结、脾和扁桃体中的淋巴耗尽 ; 实验 PCV2 (#40895) 和环境接触攻击
[0263]

组	得分的动物数量*			
	0	1	2	3
髂淋巴结 (IL LN)				
免疫接种猪	9	3	2	1
对照	1	2	1	6
腹股沟淋巴结 (IG LN)				
免疫接种猪	9	4	1	1
对照	0	3	4	3
气管支气管淋巴结 (TB LN)				
免疫接种猪	8	6	0	1
对照	0	1	6	3
脾				
免疫接种猪	9	6	0	0
对照	0	1	6	3
扁桃体				
免疫接种猪	10	4	1	0
对照	0	2	5	3

[0264]

[0265] * 淋巴耗尽得分 : 0 = 正常, 1 = 轻度, 2 = 中度, 3 = 重度

[0266] 表 5. 淋巴结、脾和扁桃体中伴随囊泡置换的组织细胞 - 至 - 肉芽肿炎症 : 总体比较

[0267]

组	得分的动物数量*			
	0	1	2	3
髂淋巴结 (IL LN)				
免疫接种猪	14	2	7	1
对照	4	8	7	5
腹股沟淋巴结 (IG LN)				
免疫接种猪	18	3	3	0
对照	8	9	4	3
气管支气管淋巴结 (TB LN)				
免疫接种猪	14	7	3	0
对照	4	9	9	2
脾				
免疫接种猪	18	2	4	0
对照	9	4	8	3
扁桃体				
免疫接种猪	19	4	1	0
对照	11	5	4	4

[0268] *组织细胞置换得分:0 = 正常,1 = 轻度,2 = 中度,3 = 重度

[0269] 表 6. 淋巴结,脾和扁桃体中通过免疫组化 (IHC) 证实的 PCV2- 特异性抗原的量: 总体比较*

[0270]

组	得分的动物数量*			
	0	1	2	3
髂淋巴结 (IL LN)				
免疫接种猪	17	2	5	0
对照	4	6	7	7
腹股沟淋巴结 (IG LN)				
免疫接种猪	21	1	2	0
对照	10	9	4	1
气管支气管淋巴结 (TB LN)				
免疫接种猪	20	2	1	1
对照	7	12	3	2
脾				
免疫接种猪	20	2	2	0
对照	9	9	4	2
扁桃体				
免疫接种猪	21	1	2	0
对照	5	10	6	3

[0271]

[0272] *IHC 染色得分 :0 =无,1 =低水平,2 =中等水平,3 =高水平

[0273] 表 7. 攻击后临床观察 *

[0274]

猪 ID	GROUP	-2DPC	-1DPC	0 DPC	1 DPC	2 DPC	3 DPC	4 DPC	5 DPC	6 DPC	7 DPC	10 DPC	14 DPC	17 DPC	20 DPC
G199	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G203	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G204	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G289	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G290	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O112	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O113	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O117	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O119	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O156	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O158	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O159	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P102	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P103	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P104	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P109	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P113	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P115	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P145	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P146	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P150	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P192	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P213	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P214	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G197	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G205	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G293	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G296	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O109	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O110	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O111	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O114	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O162	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	I	I	.
O164	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O166	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P105	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P107	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P108	C	A	A	A	E	A	A	A	A	A	A	E, I	I	I	.
P110	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P112	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P116	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P147	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P148	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P194	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P195	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P215	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P216	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P218	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

[0275]

[0276] *A = 正常 ;E = 咳嗽 ;I = 其他 (见 6.8 节的解释)

[0277] V = 免疫接种组 ;C = 对照组

[0278] . = NA

[0001]

序列表

<110> Wyeth
 <120> 对猪进行抗猪圆环病毒免疫的方法和组合物
 <130> AM102973PCT
 <150> 61/015,894
 <151> 2007-12-21
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.4
 <210> 1
 <211> 1767
 <212> DNA
 <213> 猪圆环病毒
 <400> 1
 accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca 60
 agaagaatgg aagaagcgga cccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc 120
 ctccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatctt gattatttta 180
 ttgttgcgga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
 ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtggtatctt ggggtcccgc tgccacatcg 300
 agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggcaacttac 360
 tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
 gtacctgtgt ggagagcggg agtctgggtga ccgttcgaga gcagtaccct gtaacgtttg 480
 tcagaaattt ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagttag cgggaaaatg cagaagcgtg 540
 attggaagac taatgtacac gtcattgttg ggcaccttg gttgtgtaaa agcaaatggg 600
 ctgctaattt tgcagaccg gaaaccacat actggaacc acctagaaac aagtgggtgg 660
 atggttacca tggtaagaa gtggttgta ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
 atgatctact gagactgtgt gatcgatct cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
 tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaatgggtact 840
 cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc ttggtatctt 900
 ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc 960
 catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtcct ttttatcact tcgtaatggt 1020
 ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtccttaaga ttaaattctc tgaattgtac 1080
 atacatggtt acacggatat tglattcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc 1140
 gaggcctacg tggctctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt 1200
 gttgttttgt tggagtaat caatagtga atctaggaca ggtttggggg taaagtagcg 1260
 ggagtggtag gagaagggtt gggttatggt atggcgggag gagtagttta cataggggtc 1320
 ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct agaataacag cactggagcc 1380
 cactcccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440
 tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg ggggaagaaa 1500
 gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cggccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
 cttgatagta tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgcat tttccttct 1620
 ccagcggtaa cgggtggcgg ggtggacgag ccaggggcgg cggcggagga tctggccaag 1680

[0002]

```

atggctgcgg gggcgggtgc ttcttctccg gtaacgcctc cttggatacg tcatagctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

<210> 2
<211> 1767
<212> DNA
<213> 猪圆环病毒

<400> 2
accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca 60
agaagaatgg aagaagcgga cccaacccc ataaaagggt ggtgttcaact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct gattatttta 180
ttgttgcgga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtggatatt ggggtcccgc tgccacatcg 300
agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggtaacttac 360
tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttggt ggagagcggg agtctgtgta ccgttgca gaagtagcct gtaacgtttg 480
tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtga cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtgg 660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttgta ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggcccgagc attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaattgtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc ttatcggag gattacttcc ttggtatttt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttccccc 960
catgccctga attccatat gaaataaatt actgagtctt tttatcact tcgtaatggt 1020
ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtccttaaga ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatggtt acacggatat tgtattcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tggctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt 1200
gttgtttggt tggaaagta caatagtga atctaggaca ggtttggggg taaagtagcg 1260
ggagtgttag gagaagggtt gggttatggt atggcgggag gagtagttta cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttaca aa gttatcatct agaataacag cactggagcc 1380
cactccccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440
tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggttttag cccctctctg ggggaagaaa 1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cggccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
cttgatagtg tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgcat ttttcttct 1620
ccagcggtaa cgggtggcggg ggtggacgag ccaggggcgg cggcggagga tctggccaag 1680
atggctgcgg gggcgggtgc ttcttctccg gtaacgcctc cttggatacg tcatatctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

```

<210> 3
 <211> 233
 <212> PRT

[0003]

<213> 猪圆环病毒

<400> 3

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr
50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn
180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
195 200 205

Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
225 230

<210> 4

<211> 233

<212> PRT

<213> 猪圆环病毒

<400> 4

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro

[0004]

20	25	30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg 35 40 45		
Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr 50 55 60		
Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu 65 70 75 80		
Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr 85 90 95		
Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr 100 105 110		
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn 115 120 125		
Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr 130 135 140		
Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr 145 150 155 160		
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro 165 170 175		
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn 180 185 190		
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp 195 200 205		
Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe 210 215 220		
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro 225 230		
<210> 5 <211> 1767 <212> DNA <213> 猪圆环病毒		
<220> <221> 基因 <222> (51)..(995) <223> 复制酶基因(ORF1)		
<220> <221> 基因 <222> (1033)..(1734) <223> 由补体编码的衣壳基因(ORF2)		
<400> 5 accagcgcac ttgggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgccagca 60 agaagaatgg aagaagcgga ccccaacccc ataaaaggtg ggtgttctact ctgaataatc 120		

[0005]

```

cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatit gattatitita 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtatit ggggtccccgc tgccacatcg 300
agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggcaacttac 360
tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttggt ggagagcggg agtctggtag ccgttgca gaagtaccct gtaacgtttg 480
tcagaaatit ccgctggctg gctgaactit tgaaagtga cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgttg gccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagaccgc gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgttggg 660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttgta ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccggtt gaatggtaact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc ttatcggag gattacitcc ttggtatit 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttegtcacc cttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagctct ttttatcact tcgtaatggt 1020
ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtctttaaga ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatggtt acacggatat tgtattcctg gtcttatata ctgttttca acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tgggtctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt 1200
gttgtttggt tggaagtaat caatagtga atctaggaca ggtttggggg taaagtagcg 1260
ggagtggtag gagaagggtt ggggttatgt atggcgggag gagtagttta cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaa gttatcatct agaataacag cactggagcc 1380
cactccccgt tcacctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440
tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctctctg ggggaagaaa 1500
gtcataata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
cttgatagta tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgcat ttttcttct 1620
ccagcggtaa cgggtggcgg ggtggacgag ccaggggcgg cggcggagga tctggccaag 1680
atggtgcgg gggcgggtgc ttcttctccg gtaacgcctc ctggatagc tcatagctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

```

<210> 6
 <211> 1767
 <212> DNA
 <213> 猪圆环病毒

<220>
 <221> 基因
 <222> (51)..(995)
 <223> 复制酶基因(ORF1)

<220>
 <221> 基因
 <222> (1033)..(1734)
 <223> 由补体编码的衣壳基因(ORF2)

<400> 6
 accagcgac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgccagca 60

[0006]

```

agaagaatgg aagaagcgga ccccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctattt gattatttta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttgcctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtggtatit gggtgccgcg tgccacatcg 300
agaaagccaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggtaacttac 360
tgattgagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttggt ggagagcggg agtctgtgta ccgttcaga gcagtaccct gtaacgtttg 480
tcagaaattt ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtgag cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcatgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagaccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtgg 660
atggttacca tggtaagaa gtggttgta ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaatggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcgag gattacttcc ttggtatttt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc cttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt ttttatcact tcgtaatggt 1020
ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtctttaaga ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatggtt acacggatat tgtattcctg gtcgtatata ctgttttga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tggctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct gglttctttt 1200
gttgtttggt tggaagtaat caatagtga atctaggaca ggtttggggg taaagtagcg 1260
ggagtggtag gagaagggtt gggttatggt atggcgggag gagtagtita cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct agaataacag cactggagcc 1380
cactcccctg tcaccctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440
tattctgtag tattcaagg gcacagagcg ggggtttgag cccctcctg gggaagaaa 1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
cttgatagtg tatccgaagg tgcgggatag gcgggtgttg aagatgcat tttccttct 1620
ccagcggtaa cgttgccggg ggtggacgag ccagggcgcg cgccggagga tctggccaag 1680
atggetgcgg gggcggtgtc ttcttctccg gtaacgctc cttggatacg tcatatctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

```

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 7
 atgcccagca agaagaatgg 20

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0007]

<220>	
<223>	引物
<400>	8
tggtttccag tatgtggttt cc	22

PCV2B-FD07基因组的完整序列

关于PCV2B-FD07基因组的注释: 1767 bp ssDNA病毒

复制(复制酶)基因:

碱基51-995

衣壳基因:

碱基1033-1734 C

```

      10          20          30          40          50          60
AGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
                                     M P S

      70          80          90          100         110         120
AGAATGG AAGAAGCGGA CCCCACCCG ATAAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC
K N G R S G P Q P H K R W V F T L N N

      130         140         150         160         170         180
CCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
S E D E R K K I R D L P I S L F D Y F

      190         200         210         220         230         240
TTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
V G E E G N E E G R T P H L Q G F A N

      250         260         270         280         290         300
TGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCGC TGCCACATCG
V K K Q T F N K V K W Y L G A R C H I

                                     >PstI
                                     |
      310         320         330         340         350         360
AAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGCAACTTAC
K A K G T D Q Q N K E Y C S K E G N L

                                     >BglII
                                     |
                                     >SacI
                                     |
      370         380         390         400         410         420
TTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
I E C G A P R S Q G Q R S D L S T A V

      430         440         450         460         470         480
CCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCCT GTAACGTTTG
T L L E S G S L V T V A E Q Y P V T F

```

图 1 (SEQ ID NO :1)

```

      490      500      510      520      530      540
TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAAC TTT TGAAAGTGAG CCGGAAAATG CAGAAGCGTG
V R N F   R G L   A E L   L K V S   G K M   Q K R

      550      560      570      580      590      600
ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
D W K T   N V H   V I V   G P P G   C G K   S K W

      610      620      630      640      650      660
CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
A A N F   A D P   E T T   Y W K P   P R N   K W W

      >NcoI
      |
      670      680      690      700      710      720
ATG GTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
D G Y H   G E E   V V V   I D D F   Y G W   L P W

                                >EcoRV
                                |
                                >ClaI
                                |
      730      740      750      760      770      780
ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGTG
D D L L   R L C   D R Y   P L T V   E T K   G G T

      790      800      810      820      830      840
TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
V P F L   A R S   I L I   T S N Q   T P L   E W Y

      850      860      870      880      890      900
CCTCAACTGC TGTCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
S S T A   V P A   V E A   L Y R R   I T S   L V F

      910      920      930      940      950      960
GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCC
W K N A   T E Q   S T E   E G G Q   F V T   L S P

      >NdeI
      |
      970      980      990      1000      1010      1020
CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
P C P E   F P Y   E I N   Y

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
TTTTATTATT CATTAAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
          <* P N   L P P   D K L   N F E R   F Q V

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTCGA ACGCAGTGCC
<Y M T   V R I N   Y E Q   D Y I   S N E F   A T G

```

图 1 (SEQ ID NO:1) 续

```

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
GAGGCCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTCCTTTT
<L G V H D V N G A T Q L R L W L Q N R K

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
GTTGTTTGGT TGAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG TAAAGTAGCG
<N N P Q F Y D I T S D L V P K P T F Y R

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC
<S H Y S F P Q T I T H R S S Y N V Y P D

                                >XbaI
                                |
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
<Y T L A T A K T V F N D D L I V A S S G

                                >EcoRI
                                |
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT
<V G R D G Q T I P S C P W F E V K V K R

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCTCCTG GGGAAGAAA
<I R Y Y E F P V S R P N S G G G P P L F

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGCGTTCTGA CTGTGGTTCTG
<D N I N F R M M D V A W S P T R V T T R

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
CTTGATAGTA TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
<K I T Y G F T R S L R T N F I G N K R R

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
<W R Y R H R P H V L W P R R R L I Q G L

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATAGCTGA
<H S R P R H R R R R Y R R R P Y T M

      1750      1760
AAACGAAAGA AGTGCGCTGT AAGTATT

```

图 1 (SEQ ID NO :1) 续

PCV2B-FDJE基因组的完整序列

关于PCV2B-FDJE基因组的注释: 1767 bp ssDNA病毒

复制(复制酶)基因: 碱基51-995
衣壳基因: 碱基1033-1734 C

```

      10      20      30      40      50      60
ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCCAGCA
                                     M P S

      70      80      90     100     110     120
AGAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCCC ATAAAAGGTG GGTGTTCACT CTGAATAATC
K K N G R S G P Q P H K R W V F T L N N

     130     140     150     160     170     180
CTTCCGAAGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG ATCTTCCAAT ATCCCTATTT GATTATTTTA
P S E D E R K K I R D L P I S L F D Y F

     190     200     210     220     230     240
TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCTCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
I V G E E G N E E G R T P H L Q G F A N

     250     260     270     280     290     300
TTGTGAAGAA GCAGACTTTT AATAAAGTGA AGTGGTATTT GGGTGCCCCG TGCCACATCG
F V K K Q T F N K V K W Y L G A R C H I

                                     >PstI
                                     |
     310     320     330     340     350     360
AGAAAGCCAA AGGAACAGAT CAGCAGAATA AAGAATACTG CAGTAAAGAA GGTAACCTAC
E K A K G T D Q Q N K E Y C S K E G N L

                                     >BglII
                                     |
                                     >SacI
                                     |
     370     380     390     400     410     420
TGATTGAGTG TGGAGCTCCT AGATCTCAGG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
L I E C G A P R S Q G Q R S D L S T A V

     430     440     450     460     470     480
GTACCTTGTT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGTACCCT GTAACGTTTG
S T L L E S G S L V T V A E Q Y P V T F

```

图 2(SEQ ID NO:2)

```

      490          500          510          520          530          540
TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGAG CGGGAAAATG CAGAAGCGTG
V R N F R G L A E L L K V S G K M Q K R

      550          560          570          580          590          600
ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
D W K T N V H V I V G P P G C G K S K W

      610          620          630          640          650          660
CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAC AAGTGGTGGG
A A N F A D P E T T Y W K P P R N K W W

      >NcoI
      |
      670          680          690          700          710          720
ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
D G Y H G E E V V V I D D F Y G W L P W

      >EcoRV
      |
      >ClaI
      |
      730          740          750          760          770          780
ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAACCTG
D D L L R L C D R Y P L T V E T K G G T

      790          800          810          820          830          840
TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
V P F L A R S I L I T S N Q T P L E W Y

      850          860          870          880          890          900
CCTCAACTGC TGTCCCAGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
S S T A V P A V E A L Y R R I T S L V F

      910          920          930          940          950          960
GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTCACC CTTTCCCCC
W K N A T E Q S T E E G G Q F V T L S P

      >NdeI
      |
      970          980          990          1000          1010          1020
CATGCCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTATCACT TCGTAATGGT
P C P E F P Y E I N Y * >

      1030          1040          1050          1060          1070          1080
TTTTATTATT CATTAAGGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
< * P N L P P D K L N F E R F Q V

```

图 2 (SEQ ID NO :2) 续

```

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTCGA ACGCAGTGCC
Y M T V R I N Y E Q D Y I S N E F A T G

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
GAGGCCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GGTTTCTTTT
L G V H D V N G A T Q L R L W L Q N R K

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
GTTGTTTGGT TGGAAGTAAT CAATAGTGGA ATCTAGGACA GGTTTGGGGG TAAAGTAGCG
N N P Q F Y D I T S D L V P K P T F Y R

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTTA CATAGGGGTC
S H Y S F P Q T I T H R S S Y N V Y P D

                                >XbaI
                                |
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
Y T L A T A K T V F N D D L I V A S S G

                                >EcoRI
                                |
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT
V G R D G Q T I P S C P W F E V K V K R

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTTGAG CCCCTCCTG GGGGAAGAAA
I R Y Y E F P V S R P N S G G G P P L F

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGC GTTCTGA CTGTGGTTCTG
D N I N F R M M D V A W S P T R V T T R

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
CTTGATAGTG TATCCGAAGG TGCGGGATAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
K I T Y G F T R S L R T N F I G N K R R

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
W R Y R H R P H V L W P R R R L I Q G L

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATATCTGA
H S R P R H R R R R Y R R R P Y T M

      1750      1760
AAACGAAAGA AGTGCGCTGT AAGTATT

```

图 2(SEQ ID NO :2) 续

基因座 PCV2B-FD07 ORF2 234 AA 19-DEC-2007
来源 FDAH
特征 定位/限定
1..234
/note="PCV2b-FD07衣壳蛋白质 (ORF2) "
起始 -
1 MTYPRRRYRR RRHRPRSHLG QILRRRPWL V HPRHRYRWRR KNGIFNTRL S RTFGYTIKRT
61 TVRTPSWAVD MMRFNINDFL PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS
121 SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNYSSRHTI TQPFSYHSRY FTPKPVLDST IDYFQPNNKR
181 NQLWLRQLTA GNVDHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDPP LNP*

图 3 (SEQ ID NO :3)

基因座 PCV2B-FDJE 234 AA 19-DEC-2007
来源 FDAH
特征 定位/限定
1..234
/note="PCV2B-FDJE衣壳 (ORF2) 蛋白质"
起始 -
1 MTYPRRRYRR RRHRPRSHLG QILRRRPWL V HPRHRYRWRR KNGIFNTRL S RTFGYTIKRT
61 TVRTPSWAVD MMRFNINDFL PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS
121 SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNYSSRHTI TQPFSYHSRY FTPKPVLDST IDYFQPNNKR
181 NQLWLRQLTA GNVDHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDPP LNP*

图 4 (SEQ ID NO :4)

基因座	PCV2B-FD07	1767 BP	SS-DNA	环状	SYN	30-SEP-2006
来源	FDAH					
特征	定位/限定					
CDS	51..995					
	/note=“复制酶基因（ORF1）”					
CDS	互补(1033..1734)					
	/note=“衣壳基因（ORF2）”					
碱基计数	447 A	360 C	499 G	461 T	0 其它	
起始	-					
1	ACCAGCGCAC	TTCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCACCT	CAGCAGCAAC	ATGCCCAGCA
61	AGAAGAATGG	AAGAAGCGGA	CCCCAACCCC	ATAAAAGGTG	GGTGTTCACT	CTGAATAATC
121	CTTCCGAAGA	CGAGCGCAAG	AAAATACGGG	ATCTTCCAAT	ATCCCTATTT	GATTATTTTA
181	TTGTTGGCGA	GGAGGGTAAT	GAGGAAGGAC	GAACACCTCA	CCTCCAGGGG	TTCGCTAATT
241	TTGTGAAGAA	GCAGACTTTT	AATAAAGTGA	AGTGGTATTT	GGGTGCCCCG	TGCCACATCG
301	AGAAAGCCAA	AGGAACAGAT	CAGCAGAATA	AAGAATACTG	CAGTAAAGAA	GGCAACTTAC
361	TGATTGAGTG	TGGAGCTCCT	AGATCTCAGG	GACAACGGAG	TGACCTGTCT	ACTGCTGTGA
421	GTACCTTGTT	GGAGAGCGGG	AGTCTGGTGA	CCGTTGCAGA	GCAGTACCCT	GTAACGTTTG
481	TCAGAAATTT	CCGCGGGCTG	GCTGAACTTT	TGAAAGTGAG	CGGGAAAATG	CAGAAGCGTG
541	ATTGGAAGAC	TAATGTACAC	GTCATTGTGG	GGCCACCTGG	GTGTGGTAAA	AGCAAATGGG
601	CTGCTAATTT	TGCAGACCCG	GAAACCACAT	ACTGGAAACC	ACCTAGAAAC	AAGTGGTGGG
661	ATGGTTACCA	TGGTGAAGAA	GTGGTTGTTA	TTGATGACTT	TTATGGCTGG	CTGCCCTGGG
721	ATGATCTACT	GAGACTGTGT	GATCGATATC	CATTGACTGT	AGAGACTAAA	GGTGGAACTG
781	TACCTTTTTT	GGCCCGCAGT	ATTCTGATTA	CCAGCAATCA	GACCCCGTTG	GAATGGTACT
841	CCTCAACTGC	TGTCCCAGCT	GTAGAAGCTC	TTTATCGGAG	GATTACTTCC	TTGGTATTTT
901	GGAAGAATGC	TACAGAACAA	TCCACGGAGG	AAGGGGGCCA	GTTCGTCACC	CTTTCCCCCC
961	CATGCCCTGA	ATTTCCATAT	GAAATAAATT	ACTGAGTCTT	TTTTATCACT	TCGTAATGGT
1021	TTTTATTATT	CATTAAGGGT	TAAGTGGGGG	GTCTTTAAGA	TTAAATTCTC	TGAATTGTAC
1081	ATACATGGTT	ACACGGATAT	TGTATTCCCTG	GTCGTATATA	CTGTTTTTCGA	ACGCAGTGCC
1141	GAGGCCTACG	TGGTCTACAT	TTCCAGCAGT	TTGTAGTCTC	AGCCACAGCT	GGTTTTCTTTT
1201	GTTGTTTGGT	TGGAAGTAAT	CAATAGTGGA	ATCTAGGACA	GGTTTGGGGG	TAAAGTAGCG
1261	GGAGTGGTAG	GAGAAGGGCT	GGGTTATGGT	ATGGCGGGAG	GAGTAGTTTA	CATAGGGGTC
1321	ATAGGTGAGG	GCTGTGGCCT	TTGTTACAAA	GTTATCATCT	AGAATAACAG	CAC'TGGAGCC
1381	CACTCCCCTG	TCACCCTGGG	TGATCGGGGA	GCAGGGCCAG	AATTCAACCT	TAACCTTTCT
1441	TATTCTGTAG	TATTCAAAGG	GCACAGAGCG	GGGGTTTGAG	CCCCCTCCTG	GGGGAAGAAA
1501	GTCATTAATA	TTGAATCTCA	TCATGTCCAC	CGCCCAGGAG	GGCGTTCTGA	CTGTGGTTTCG
1561	CTTGATAGTA	TATCCGAAGG	TGCGGGATAG	GCGGGTGTG	AAGATGCCAT	TTTTCTTTCT
1621	CCAGCGGTAA	CGGTGGCGGG	GGTGGACGAG	CCAGGGGCGG	CGGCGGAGGA	TCTGGCCAAG
1681	ATGGCTGCGG	GGGCGGTGTC	TTCTTCTCCG	GTAACGCCTC	CTTGGATACG	TCATAGCTGA
1741	AAACGAAAGA	AGTGCGCTGT	AAGTATT			

图 5 (SEQ ID NO :5)

基因座	PCV2B-FDJE	1767 BP DS-DNA	SYN	05-NOV-2007		
来源	FDAH					
特征		定位/限定 51..995 /note=“复制酶基因 (Orf1)” 互补(1033..1734) /note=“衣壳基因 (Orf1)”				
CDS						
CDS						
碱基计数	446 A	359 C	499 G	463 T	0 其它	
起始	-					
1	ACCAGCGCAC	TTCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCACCT	CAGCAGCAAC	ATGCCCAGCA
61	AGAAGAATGG	AAGAAGCGGA	CCCCAACCCC	ATAAAAGGTG	GGTGTTCACT	CTGAATAATC
121	CTTCCGAAGA	CGAGCGCAAG	AAAATACGGG	ATCTTCCAAT	ATCCCTATTT	GATTATTTTA
181	TTGTTGGCGA	GGAGGGTAAT	GAGGAAGGAC	GAACACCTCA	CCTCCAGGGG	TTCGCTAATT
241	TTGTGAAGAA	GCAGACTTTT	AATAAAGTGA	AGTGGTATTT	GGGTGCCCCG	TGCCACATCG
301	AGAAAGCCAA	AGGAACAGAT	CAGCAGAATA	AAGAATACTG	CAGTAAAGAA	GGTAACTTAC
361	TGATTGAGTG	TGGAGCTCCT	AGATCTCAGG	GACAACGGAG	TGACCTGTCT	ACTGCTGTGA
421	GTACCTTGTT	GGAGAGCGGG	AGTCTGGTGA	CCGTTGCAGA	GCAGTACCCCT	GTAACGTTTG
481	TCAGAAATTT	CCGCGGGCTG	GCTGAACTTT	TGAAAGTGAG	CGGGAAAATG	CAGAAGCGTG
541	ATTGGAAGAC	TAATGTACAC	GTCATTGTGG	GGCCACCTGG	GTGTGGTAAA	AGCAAATGGG
601	CTGCTAATTT	TGCAGACCCG	GAAACCACAT	ACTGGA AACC	ACCTAGAAAC	AAGTGGTGGG
661	ATGGTTACCA	TGGTGAAGAA	GTGGTTGTTA	TTGATGACTT	TTATGGCTGG	CTGCCCTGGG
721	ATGATCTACT	GAGACTGTGT	GATCGATATC	CATTGACTGT	AGAGACTAAA	GGTGGAAGTG
781	TACCTTTTTT	GGCCCGCAGT	ATTCTGATTA	CCAGCAATCA	GACCCCGTTG	GAATGGTACT
841	CCTCAACTGC	TGTCCCAGCT	GTAGAAGCTC	TTTATCGGAG	GATTACTTCC	TTGGTATTTT
901	GGAAGAATGC	TACAGAAACAA	TCCACGGAGG	AAGGGGGCCA	GTTTCGTCACC	CTTTCCCCCC
961	CATGCCCTGA	ATTTCCATAT	GAAATAAATT	ACTGAGTCTT	TTTTATCACT	TCGTAATGGT
1021	TTTTATTATT	CATTAAGGGT	TAAGTGGGGG	GTCTTTAAGA	TTAAATTCTC	TGAATTGTAC
1081	ATACATGGTT	ACACGGATAT	TGTATTCCCTG	GTCGTATATA	CTGTTTTTCGA	ACGCAGTGCC
1141	GAGGCCTACG	TGGTCTACAT	TTCCAGCAGT	TTGTAGTCTC	AGCCACAGCT	GGTTTCTTTT
1201	GTTGTTTGGT	TGGAAGTAAT	CAATAGTGGA	ATCTAGGACA	GGTTTGGGGG	TAAAGTAGCG
1261	GGAGTGGTAG	GAGAAGGGCT	GGGTTATGGT	ATGGCGGGAG	GAGTAGTTTA	CATAGGGGTC
1321	ATAGGTGAGG	GCTGTGGCCT	TTGTTACAAA	GTTATCATCT	AGAATAACAG	CACTGGAGCC
1381	CACTCCCCTG	TCAACCCTGG	TGATCGGGGA	GCAGGGCCAG	AATTCAACCT	TAACCTTTCT
1441	TATTCTGTAG	TATTCAAAGG	GCACAGAGCG	GGGGTTTGAG	CCCCCTCCTG	GGGGAAGAAA
1501	GTCATTAATA	TTGAATCTCA	TCATGTCCAC	CGCCCAGGAG	GGCGTTCTGA	CTGTGGTTCT
1561	CTTGATAGTG	TATCCGAAGG	TGCGGGATAG	GCGGGTGTG	AAGATGCCAT	TTTTCTTTCT
1621	CCAGCGGTAA	CGGTGGCGGG	GGTGGACGAG	CCAGGGGCGG	CGGCGGAGGA	TCTGGCCAAG
1681	ATGGCTGCGG	GGGCGGTGTC	TTCTTCTCCG	GTAACGCCTC	CTTGGATACG	TCATATCTGA
1741	AAACGAAAGA	AGTGCCTGCT	AAGTATT			

图 6 (SEQ ID NO :6)