



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103536911 B

(45)授权公告日 2019.09.13

(21)申请号 201210306454.2

专利权人 衣阿华州立大学研究基金公司

(22)申请日 2002.12.11

(72)发明人 孟祥金 M.费瑙克斯

(65)同一申请的已公布的文献号

P.G.哈尔布尔

申请公布号 CN 103536911 A

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(43)申请公布日 2014.01.29

代理人 梁谋

(30)优先权数据

(51)Int.Cl.

60/340775 2001.12.12 US

A61K 39/12(2006.01)

60/424840 2002.11.08 US

A61K 39/23(2006.01)

10/314512 2002.12.09 US

A61K 48/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61P 31/14(2006.01)

02828049.0 2002.12.11

A61P 31/20(2006.01)

(83)生物保藏信息

(56)对比文件

PTA-3912 2001.12.07

WO 00/77188 A2, 2000.12.21,

PTA-3913 2001.12.07

审查员 张丽华

PTA-3914 2001.12.07

(73)专利权人 弗吉尼亚科技知识产权有限公司

权利要求书2页 说明书40页

地址 美国弗吉尼亚州

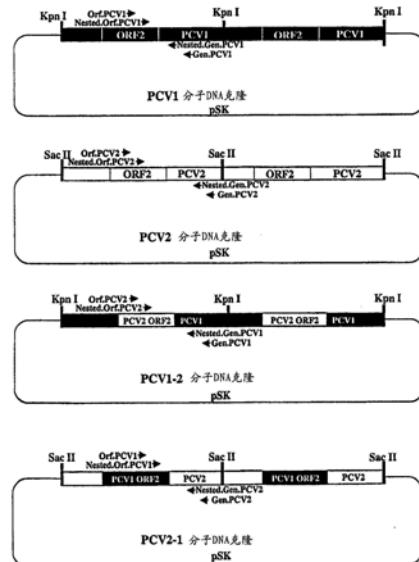
序列表6页 附图10页

(54)发明名称

嵌合传染性DNA克隆，嵌合猪环状病毒及其用途

(57)摘要

本发明涉及传染性DNA克隆，猪环状病毒(PCV)的传染性嵌合DNA克隆，保护猪免受PCV2引起的病毒感染或断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)的疫苗和方法。所述新型嵌合的传染性DNA克隆及其衍生的有毒力的嵌合病毒是用非致病性PCV1构建的，其中，致病性PCV2的免疫原性ORF基因取代了非致病性PCV1的基因，优选是在相同的位置上取代。所述嵌合病毒优选保留了PCV1的非致病性表型，但是，仍然能诱导对致病性PCV2的特异性免疫应答。本发明还包括所述免疫原性多肽表达产物。



1. 一种保护猪免受由PCV2导致的病毒感染或断奶后多系统衰竭综合征PMWS的病毒疫苗, 其包括无毒的生理学上可接受的载体、一种或多种佐剂和免疫原性量的选自以下的成分:

(a) 猪环状病毒的嵌合核酸分子PCV1-2, 其特征在于具有编码非致病性PCV 1的核酸分子, 它包括取代了所述PCV1核酸分子的ORF2基因的致病性PCV2的免疫原性ORF2基因;

(b) 嵌合核酸分子, 它具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列或其互补链;

(c) 质粒或病毒载体, 它包含(a)或(b)的嵌合核酸分子; 和

(d) 嵌合的猪环状病毒, 其由(a)或(b)的嵌合核酸分子制得, 其中PCV1的ORF2衣壳基因用PCV2的ORF2衣壳基因替换; 和

任选的免疫原性量的至少一种额外的猪抗原。

2. 权利要求1的病毒疫苗, 其中所述疫苗是遗传工程疫苗。

3. 权利要求1的病毒疫苗, 其中所述疫苗是DNA疫苗、活的疫苗、失活的疫苗或亚单位疫苗。

4. 权利要求1的病毒疫苗, 其中所述疫苗是修饰过的活的疫苗。

5. 权利要求1的病毒疫苗, 其中所述疫苗是减毒疫苗。

6. 权利要求1的病毒疫苗, 其中所述任选的额外的猪抗原是猪生殖性和呼吸综合征病毒PRRSV、猪细小病毒PPV或两者。

7. 权利要求1的病毒疫苗, 其中所述佐剂是氢氧化铝、免疫刺激复合物、非离子嵌段聚合物、细胞因子、皂昔、单磷酰脂质A、胞壁酰二肽、硫酸铝钾、从大肠杆菌中分离的热不稳定或热稳定性肠毒素、霍乱毒素或它的B亚基、白喉毒素、破伤风毒素、百日咳毒素、弗氏不完全或弗氏完全佐剂或它们的组合。

8. 权利要求7的病毒疫苗, 其中所述非离子嵌段聚合物是非离子嵌段共聚物。

9. 权利要求1-8中任一项的病毒疫苗在制备保护猪免受由PCV2导致的病毒感染或断奶后多系统衰竭综合征PMWS的疫苗制剂中的用途。

10. 权利要求9的用途, 用于制备以单一剂量施用的疫苗制剂。

11. 权利要求9的用途, 用于制备通过肠胃外、鼻内、真皮内或经皮途径施用的疫苗制剂。

12. 包含PCV2的ORF2衣壳基因或蛋白的疫苗在制备用于保护具有可检测水平的母体PCV2抗体的小猪崽免受PCV2或由PCV2导致的断奶后多系统衰竭综合征PMWS的疫苗制剂中的用途, 其中所述小猪崽因为所述疫苗的使用产生PCV2 ORF2特异性抗体而获得保护性免疫; 其中所述疫苗制剂包括选自以下的成分:

(a) 猪环状病毒的嵌合核酸分子PCV1-2, 其包含编码非致病性PCV 1的核酸分子, 它包括取代了所述PCV1核酸分子的ORF2基因的致病性PCV2的免疫原性ORF2基因;

(b) 嵌合核酸分子, 它具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列或其互补链;

(c) 包含(a)或(b)的嵌合核酸分子的质粒或病毒载体; 和

(d) 编码免疫原性PCV2 ORF2蛋白的无毒的嵌合猪环状病毒1型。

13. 权利要求12的用途, 用于制备含有编码免疫原性PCV2 ORF2蛋白的无毒的嵌合猪环状病毒1型的疫苗制剂。

14. 权利要求12的用途, 用于制备与佐剂组合施用的疫苗制剂。

15. 权利要求12的用途,用于制备以单一剂量施用的疫苗制剂。
16. 权利要求12的用途,用于制备通过肠胃外、鼻内、真皮内或经皮途径施用的疫苗制剂。
17. 权利要求12的制备疫苗制剂的用途,其中(c)的病毒载体是表达PCV2 ORF2蛋白的杆状病毒。
18. 权利要求12的制备疫苗制剂的用途,所述疫苗制剂进一步包括至少一种额外的猪抗原。
19. 权利要求18的制备疫苗制剂的用途,其中至少一种额外的猪抗原是传染性猪致病因子。
20. 权利要求18的制备疫苗制剂的用途,其中所述额外的猪抗原是猪生殖性和呼吸综合征病毒PRRSV、猪细小病毒PPV或两者。
21. 权利要求12的制备疫苗制剂的用途,所述疫苗制剂为遗传工程疫苗。
22. 权利要求12的制备疫苗制剂的用途,所述疫苗制剂是DNA疫苗、活的疫苗、失活的疫苗或亚单位疫苗。
23. 权利要求12的制备疫苗制剂的用途,所述疫苗制剂是修饰过的活的疫苗。
24. 权利要求12的制备疫苗制剂的用途,所述疫苗制剂是减毒疫苗。

## 嵌合传染性DNA克隆, 嵌合猪环状病毒及其用途

[0001] 本申请是专利申请号为02828049.0、国际申请日为2002年12月11日(国际申请号为PCT/US02/39646)、发明名称为“嵌合传染性DNA克隆, 嵌合猪环状病毒及其用途”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 对相关美国专利申请的交叉引用

[0003] 根据35U.S. §119(e)的规定, 本非临时申请要求申请日为2002年11月8日的美国临时申请号60/424,840的权益, 而后者根据35U.S. §119(e)的规定, 要求申请日为2001年12月12日的美国临时申请号60/340,775的权益。以上两份在先的专利申请, 被以它们的全文形式收作本文参考。

[0004] 有关联邦资助的研究或开发的声明

[0005] 无

[0006] 对“序列表”的引用

[0007] 在本申请中所提供的记录在包含序列表文件的一张CD上的材料被收作参考。建立日期为\_\_\_\_\_，2003，文件大小为大约\_\_\_\_\_。

[0008] 发明背景

### 技术领域

[0009] 本发明涉及可用作疫苗的传染性猪环状病毒1型(PCV1)和2型(PCV2)DNA克隆, 衍生自所述嵌合DNA克隆的嵌合PCV1-2传染性DNA克隆和活的嵌合病毒。

### 背景技术

[0010] 相关领域的说明

[0011] 在本说明书中所引用的所有专利和文献都被以它们的全文形式收作本文参考。

[0012] 猪环状病毒(PCV)最初是以猪肾细胞系PK-15的细胞培养物的污染物形式分离的(I.Tischer等, “具有环状单链DNA的非常小的猪病毒”Nature295:64-66(1982); I.Tischer等, “永久性猪肾细胞系中乳多空病毒和小RNA病毒-样颗粒的鉴定”, Zentralbl.Bakteriol.Org.A.226(2):153-167(1974))。PCV是小型二十面体无外被病毒, 它含有大约1.76kb的单链环状DNA基因组。PCV属于环状病毒科, 该科包括三种其他的动物环状病毒(鸡贫血病毒(CAV), 鹦鹉喙和羽毛病病毒(PBFDV), 和最近从鸽子体内发现的鸽子环状病毒(CoCV)), 以及三种植物环状病毒(香蕉簇顶病病毒, 椰子叶腐病病毒和地三叶草矮化病毒(M.R.Bassami等, “鹦鹉喙和羽毛病病毒核苷酸序列分析及其与猪环状病毒, 植物环状病毒和鸡贫血病毒的关系”, Virology 249:453-459(1998); J.Mankertz等, “猪环状病毒(PCV)的转录分析”, Virus Genes 16:267-276(1998); A.Mankertz等, “鸽子环状病毒(CoCV)-来自鸽子的新的环状病毒的克隆和测序”, Arch.Virol.145:2469-2479(2000); B.M.Meehan等, “猪环状病毒DNA的序列:与植物环状病毒的亲和力”, J.Gen.Viro1.78:221-227(1997); B.M.Meehan等, “与猪衰竭性综合征相关的新型环状病毒DNAs的鉴定”, J.Gen.Viro1.79:2171-2179(1998); D.Todd等, “三种动物病毒与环状单链DNA基因组的比较”,

Arch.Virol.117:129-135(1991))。以上三种以前鉴定的动物环状病毒(PCV, CAV和PBFDV)的成员,彼此之间不拥有核苷酸序列同源性或抗原决定簇(M.R.Bassami等,1998,同上;D.Todd等1991,同上)。新鉴定的CoCV的基因组与PCV的基因组拥有大约40%的核苷酸序列同一性(A.Mankertz等,“鸽子环状病毒(CoCV)——来自鸽子的新的环状病毒的克隆和测序”,Arch.Virol.145:2469-2479(2000))。最近,从与输血后肝炎相关的个体体内鉴定了一种被命名为输血传播的病毒或TT病毒(TTV)的具有环状基因组的新型人类环状病毒(H.Miyata等,“新的富含GC的113个核苷酸区的鉴定,以便完善第一种人类环状病毒TT病毒的环状单链DNA基因组”,J.Virol.73:3582-3586(1999);T.Nishizawa等,“与未知病因学的输血后肝炎的较高的转氨酶水平相关的新型DNA病毒(TTV)”,Biochem.Biophys.Res.Commun.241:92-97(1997))。另外,从正常血液供体体内鉴定了人类TTV-样小病毒(TLMV)(P.Biagini等,“TT病毒-样小病毒人类分离物的完整基因组和亚基因组序列的遗传学分析”,J.Gen.Viro.82:379-383(2001);K.Takahashi等,“直接与TT病毒和鸡贫血病毒相关的新的人DNA病毒(TTV-样小病毒,TLMV)的鉴定”,Arch.Virol.145:979-93(2000)),并且还从患有输血后肝炎的人体内发现了被称为SEN病毒(SENV)的第三种新型人类环状病毒(T.Umemura等,“SENV病毒感染及其与输血相关的肝炎的关系”,Hepatology33:1303-1311(2001))。两种人类TTV和TLMV的基因组组构与CAV的基因组组构类似(P.Biagini等,2001,同上;H.Miyata等,1999,同上;K.Takahashi等,2000,同上)。尽管PCV的抗体是在包括人类,小鼠,牛和猪的各种动物物种中发现的(G.M.Allan等,“猪环状病毒的单克隆抗体的生产,初步鉴定和应用”,Vet.Immunol.Immunopathol.43:357-371(1994);G.C.Dulac和A.Afshar,“PK-15细胞系(ATCC CCL-33)中的猪环状病毒抗原和加拿大猪体内的环状病毒抗体的证据”,Can.J.Vet.Res.53:431-433(1989);S.Edwards和J.J.Sands,“英国猪体内环状病毒感染的证据”,Vet.Rec.134:680-1(1994);J.C.Harding和E.G.Clark,“了解和诊断断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)”,Swine Health and Production5:201-203(1997);R.K.Hines和P.D.Lukert,“猪环状病毒:在美国对猪的血清学监督”,Swine Health and Production3:71-73(1995);G.P.Nayar等,“患有呼吸病和流产的牛胎儿的环状病毒证据”,Can.Vet.J.40:277-278(1999);I.Tischer等,“在不同的育种场的猪群体中猪环状病毒抗体的分布”,Arch.Virol.140:737-743(1995);I.Tischer等,“在人,小鼠和牛血清中与猪环状病毒抗体反应的存在”,Arch.Virol.140:1427-1439(1995)),对所述动物物种PCV的致病作用的了解很少。具有PK-15细胞衍生的PCV的猪的实验感染不能产生临床疾病,因此,这种病毒不被认为是对猪有致病性的(G.M.Allan等,“猪环状病毒的病理学:缺少初乳的小猪崽的实验感染以及猪胎材料的检查”,Vet.Microbiol.44:49-64(1995);I.Tischer等,“对猪环状病毒的流行病学和致病性的研究”,Arch.Virol.91:271-276(1986))。将来自污染的PK-15细胞系的非致病性PCV命名为1型猪环状病毒或PCV1。

[0013] 最早在1991年披露的断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)(J.C.Harding和E.G.Clark,1997,同上)是断奶猪患的复杂疾病,这种病正越来越广泛地传播。由于对养猪行业造成了潜在的严重经济学影响的威胁,已经迫切需要开发针对PMWS的主要致病剂PCV2的疫苗。PMWS主要影响5-18周龄的猪。PMWS的临床体征包括:进展性体重减轻,呼吸困难,呼吸急促,贫血,腹泻,和黄疸。死亡率可以在1%-2%之间波动,并且,在英国的某些复杂病例中,死亡率可以高达40%(M.Muirhead,“有关PMWS/PDNS的信息来源”,Vet.Rec.150:456

(2002)。PMWS的微观病变特征包括肉芽肿性间质性肺炎，淋巴腺病，肝炎，和肾炎(G.M.Allan和J.A.Ellis,“猪环状病毒:概述”,J.Vet.Diagn.Invest.12:3-14(2000);J.C.Harding和E.G.Clark,1997,同上)。PMWS现在业已在加拿大、美国的猪体内发现(G.M.Allan等,“来自患有衰竭性疾病综合征的猪体内的新型猪环状病毒”,Vet.Rec.142:467-468(1998);G.M.Allan等,“从美国和欧洲的患有衰竭性疾病的鸽子体内分离猪环状病毒-样病毒”,J.Vet.Diagn.Invest.10:3-10(1998);G.M.Allan and J.A.Ellis,2000,同上;J.Ellis等,“从患有断奶后多系统衰竭综合征的猪的损伤中分离环状病毒”,Can.Vet.J.39:44-51(1998);A.L.Hamel等,“与猪断奶后多系统衰竭综合征相关的猪环状病毒的核苷酸序列”,J.Virol.72:5262-5267(1998);M.Kiupel等,“与印度的断奶的猪的疾病相关的环状病毒-样病毒”,Vet.Pathol.35:303-307(1998);R.Larochelle等,“通过PCR确定的在魁北克常规养猪场中猪环状病毒发病率的鉴定”,Vet.Rec.145:140-142(1999);B.M.Meehan等,1998,同上;I.Morozov等,“在患有断奶后多系统衰竭综合征的猪体内检测猪环状病毒的新菌株”,J.Clin.Microbiol.36:2535-2541(1998)),在大部分欧洲国家(G.M.Allan等,“从美国和欧洲的患有衰竭性疾病的猪体内分离猪环状病毒样病毒”,J.Vet.Diagn.Invest.10:3-10(1998);G.M.Allan and J.A.Ellis,2000,同上;S.Edwards和J.J.Sands,1994,同上;S.Kennedy等,“北爱尔兰的猪环状病毒感染”,Vet.Rec.142:495-496(1998);A.Mankertz等,“来自西班牙,德国和法国的PCV-2分离物的鉴定”,Virus Res.66:65-77(2000);C.Rosell等,“在患有猪皮炎的肾病综合征的猪的组织中鉴定猪环状病毒”,Vet.Rec.146:40-43(2000);P.Spillane等,“爱尔兰共和国的猪环状病毒感染”,Vet.Rec.143:511-512(1998);G.J.Wellenberg等,“从荷兰的具有断奶后多系统衰竭综合征的猪体内分离并且鉴定2型猪环状病毒”,Vet.Quart.22:167-72(2000))以及在亚洲的某些国家(C.Choi等,“韩国猪的猪断奶后多系统衰竭综合征:通过免疫组织化学和聚合酶链式反应检测猪猪环状病毒感染”,J.Vet.Diagn.Invest.12:151-153(2000);A.Onuki等,“从日本的患有衰竭疾病的猪的损伤中检测猪环状病毒”,J.Vet.Med.Sci.61:1119-1123(1999))都识别到了PMWS。PMWS可能对世界范围内的养猪行业产生重大的经济影响。

[0014] PMWS的主要致病剂是被命名为2型猪环状病毒或PCV的PCV2致病菌株(G.M.Allan等,“来自患有衰竭性疾病综合征的新型猪环状病毒”,Vet.Rec.142:467-468(1998);G.M.Allan等,“从美国和欧洲的患有衰竭性疾病的猪体内分离猪环状病毒样病毒”,J.Vet.Diagn.Invest.10:3-10(1998);G.M.Allan等,“从西班牙,丹麦和北爱尔兰的患有消瘦综合征的猪体内分离并且鉴定环状病毒”,Vet.Microbiol.66:115-23(1999);G.M.Allan and J.A.Ellis,2000,同上;J.Ellis等,1998,同上;A.L.Hamel等,1998,同上;B.M.Meehan等,1998,同上;I.Morozov等,1998,同上)。业已确定了与PMWS相关的PCV2的完整的基因组序列(M.Fenaux等,“来自北美洲不同地区的患有断奶后多系统衰竭综合征的猪的2型猪环状病毒(PCV-2)的遗传学鉴定,并且开发了示差PCV限制片段长度多形性分析,以便检测并且区分PCV-1和PCV-2”,J.Clin.Microbiol.38:2494-503(2000);A.L.Hamel等,1998,同上;J.Mankertz等,1998,同上;B.M.Meehan等,1997,同上;B.M.Meehan等,1998,同上;I.Morozov等,1998,同上)。

[0015] PCV1在猪体内是普遍存在的,但是,对猪来说不是致病性的。相反,在遗传学上相关的PCV2是致病性的,并且会导致猪出现PMWS。序列分析发现,与PMWS-相关的PCV2,和非致

病性PCV1仅具有大约75%的核苷酸序列同一性。非致病性PCV1和致病性PCV2的ORF2基因编码主要免疫原性病毒衣壳蛋白(P.Nawagitgul等,“用于检测PCV抗体的修饰过的间接猪环状病毒(PCV)2型和重组衣壳蛋白(ORF2)型ELISA”,*Immunol.Clin.Diagn.Lab Immunol.*1:33-40(2002);P.Nawagitgul等,“编码主要衣壳蛋白的2型猪环状病毒的开放读框2”,*J.Gen.Virosl.*81:2281-2287(2000))。

[0016] 通过接种PCV2,在常规猪体内再现临床PMWS的最初的尝试是成功的(M.Balasch等,“用来自患有断奶后多系统衰竭综合征的猪体内的组织匀浆实验接种常规猪”,*J.Comp.Pathol.*121:139-148(1999);M.Fenaux等,“克隆的2型猪环状病毒(PCV-2)的基因组DNA在直接注射到SPF猪的肝脏和淋巴结中之后是传染性的:临床疾病,病毒分布和病理学损伤的鉴定”,*J.Virosl.*76:541-551(2002))。用来自患有天然存在的PMWS的组织匀浆和用细胞培养增殖的PCV2在限菌猪和常规猪体内进行的临床PMWS的实验性再现产生了混合的结果。在用PCV2和猪细小病毒(PPV)共同感染的限菌(SPF)猪和缺少初乳和剖腹产的猪体内再现了临床PMWS(G.M.Allan等,“通过用猪环状病毒和猪细小病毒共同感染猪实验性再现严重的衰竭性疾病”,*J.Comp.Pathol.*121:1-11(1999);S.Krakowka等,“猪的病毒性衰竭综合征:通过用2型猪环状病毒和猪细小病毒共同感染在限菌猪体内实验性再现断奶后多系统衰竭综合征”,*Vet.Pathol.*37:254-263(2000)),并且在用PCV2接种的限菌猪体内当通过用溶解在不完全弗氏佐剂中的匙孔喉血蓝蛋白激活它们的免疫系统时,也再现了临床PMWS(S.Krakowka等,“免疫系统的激活是在受猪环状病毒-2(PCV-2)感染的猪体内产生衰竭性疾病的关键事件”,*Vet.Pathol.*38:31-42(2001))。

[0017] 在仅接种PCV2的剖腹产/缺少初乳的猪(CD/CD)体内(P.A.Harms等,“在同时用2型猪环状病毒和猪生殖性和呼吸道综合征病毒感染的CD/CD猪体内实验性再现严重疾病。”*Vet.Pathol.*38:528-539(2001))以及在用PCV2和猪细小病毒(PPV)或猪生殖性和呼吸综合征病毒(PPRSV)共同感染的常规猪体内(A.Rivora等,“用猪生殖和呼吸综合征病毒和猪环状病毒2实验性接种常规猪”,*J.Virosl.*76:3232-3239(2002))也能再现PMWS。在PPRSV/PCV2共同感染的情况下,PMWS特有的病理学体征,如淋巴样衰竭,肉芽肿性炎症和坏死性肝炎是由PCV2诱导的,而不是由PPRSV诱导的(P.A.Harms等,2001,同上)。不过,在仅用PCV2感染的限菌猪体内不能再现临床PMWS(G.M.Allan等,“用猪环状病毒2(PCV2)和猪生殖和呼吸综合征病毒(PPRSV)实验性感染缺少初乳的猪能加强PCV2复制”,*Arch.Virosl.*145:2421-2429(2000);G.M.Allan等,“用猪环状病毒和猪细小病毒实验性感染猪的系列研究:低温冷冻切片的免疫染色和病毒分离”,*J.Vet.Med.*47:81-94(2000);G.M.Allan等,“通过用猪环状病毒和猪细小病毒共同感染猪实验性再现严重衰竭疾病”,*J.Comp.Pathol.*121:1-11(1999);M.Balasch等,1999,同上;J.Ellis等,“在限菌生物猪体内再现断奶后多系统衰竭综合征的损伤”,*J.Vet.Diagn.Inves t.*11:3-14(1999);S.Kennedy等,“通过仅用猪环状病毒2或与猪细小病毒组合感染常规猪再现断奶后多系统衰竭综合征的损伤”,*J.Comp.Pathol.*122:9-24(2000);S.Krakowka等,2001,同上;S.Krakowka等,2000,同上;R.M.Pogranichnyy等,“小猪对2型猪环状病毒感染的免疫应答的鉴定”,*Viral.Immunol.*13:143-153(2000))。在这些研究中所使用的病毒接种物是来自患有天然存在的PMWS的猪的组织匀浆,或是在PK-15细胞培养物中增殖的病毒(G.M.Allan等,“用猪环状病毒2(PCV2)和猪生殖和呼吸综合征病毒(PPRSV)实验性感染缺少初乳的猪能加强

PCV2复制”,Arch.Viro1.145:2421-2429(2000);G.M.Allan等,“用猪环状病毒和猪细小病毒实验性感染的系列研究:低温切片的免疫染色和病毒分离”,J.Vet.Med.47:81-94(2000);G.M.Allan等,“通过用猪环状病毒和猪细小病毒共同感染猪实验性再现严重衰竭疾病”,J.Comp.Pathol.121:1-11(1999);M.Balasch等,1999,同上;J.Ellis等,1999,同上;S.Kennedy等,2000,同上;S.Krakowka等,2001,同上;S.Krakowka等,2000,同上;R.M.Pogranichnyy等,2000,同上)。由于组织匀浆可能含有其他常见的猪的致病剂,如PPV和猪生殖和呼吸综合征病毒(PPRSV)(G.M.Allan等,“用猪环状病毒2(PCV2)和猪生殖和呼吸综合征病毒(PPRSV)实验性感染缺少初乳的猪崽能加强PCV2复制”,Arch.Viro1.145:2421-2429(2000);G.M.Allan等,“通过用猪环状病毒和猪细小病毒共同感染猪实验性再现严重衰竭疾病”,J.Comp.Pathol.121:1-11(1999);G.M.Allan和J.A.Ellis,2000,同上;J.A.Ellis等,“在患有自然获得的断奶后多系统衰竭综合征的猪中通过猪环状病毒和猪细小病毒进行共感染”J.Vet.Diagn.Invest.12:21-27(2000);C.Rose11等,2000,同上),并且由于采用PCV1持续感染用于PCV2增殖的ATCCPK-15细胞系(G.C.Dulac和A.Afshar,1989,同上),这些研究所再现的临床疾病和病理学病变可能不完全是由于PCV2感染(G.M.Allan等,“用猪环状病毒2(PCV2)和猪生殖和呼吸综合征病毒(PPRSV)实验性感染缺少初乳的猪崽,加强了PCV2复制”Arch.Viro1.145:2421-2429(2000);G.M.Allan等,“用猪环状病毒和猪细小病毒实验性感染猪的系列研究:冷冻切片和病毒分离物的免疫染色”J.Vet.Med.47:81-94(2000);G.M.Allan等,“用猪环状病毒和猪细小病毒共同感染猪而实验性再现严重衰竭疾病”J.Comp.Pathol.121:1-11(1999);G.M.Allan和J.A.Ellis,2000,同上;J.A.Ellis等,2000,同上)。

[0018] 在用猪肺炎支原体接种时,在PCV2接种过的CD/CD猪体内也能再现临床PMWS(G.M.Allan等,“免疫刺激,PCV-2和PMWS”,Vet.Rec.147:171-172(2000))。最近进行的两项野外研究(G.M.Allan等,“猪肺炎支原体的新生接种和断奶后多系统衰竭综合征:野外实验”,PigJ.48:34-41(2001),和C.Kyriakis等,“免疫调节对断奶后多系统衰竭综合征的临床和病理学表达的影响”,J.Comp.Pathol.126:38-46(2002))检测了通过猪肺炎支原体疫苗对地方性兽群PMWS发展的免疫调节作用,并且与接种过的动物相比,在未接种过的小鼠中出现了PMWS病例的显著减少。不过,使用常规SPF小猪崽在受控制的实验室条件下进行的另一项最新研究,不能再现所述作用,这表明了用猪肺炎支原体免疫有可能影响临床PMWS的发展,但是,对于PCV2感染来说,它显然是一种次要因素。基于上述和其他研究,PCV2尽管被认为是PMWS的主要致病剂,但不是唯一的致病剂。

[0019] 生物学纯形式的PCV2的传染性病毒原种的缺乏,业已妨碍了对PMWS中PCV2发病机理和PCV2的流行病学作用的了解。对PPV以及可能的PPRSV的免疫,没有一致性地表现出能抑制PCV2感染过的猪的PMWS的发作。因此,发现能特异性针对PMWS的安全的但仍然有效的疫苗一直是困难的。在兽医学领域确实认识到了需要生产能抗PCV2感染和PMWS的有效的、安全的疫苗。

[0020] 美国专利号6,287,856(Poet等)和W099/45956涉及来自鹦鹉喙和羽毛病毒(BFDV)的核酸,它是一种能感染禽类的环状病毒,和来自猪环状病毒(PCV)的核酸。以上专利提供了包括裸露的DNA或mRNA的疫苗组合物,并且披露了用于在真核细胞中瞬时表达PCV的核酸载体,这种载体包括源于人巨细胞病毒立即或早期基因增强子的顺式作用转录或翻译调控

序列或与序列的核酸功能性连接的启动子。不过,由于PCV DNA仅仅是源于PK-15细胞系,它有可能包括在将近30年以前由I.Tischer等(1974,同上)发现的非致病性PCV1,因此,它不大可能有效地诱导针对PCV2或由PCV2诱导的感染的免疫应答。在所述专利中还提示了用包括开放读框的载体制备的重组蛋白的亚单位疫苗,不过,来自PCV的开放读框,彼此之间不能很好地表征或区分。由于PCV DNA的来源是PK-15细胞,用包括PCV1的开放读框的载体制备的蛋白,不具备针对PCV2的可靠的免疫原性特性(如果有的话)。

[0021] 美国专利号6,217,883(Allan等)和法国专利号2,781,159B涉及从加拿大,加利弗尼亞和法国(Brittany)的感染了PMWS的猪体内采集的肺或神经结样品中分离五种PCV菌株,以及将它们与至少一种猪细小病毒抗原组合用于免疫原性组合物中的用途。由包括ORF1-ORF13的PCV2开放读框(ORF)编码的蛋白在专利文献中有广泛的披露,不过,没有任何一种具有免疫原性特性的特定蛋白的例子。所述专利还披露了包括DNA质粒,线性DNA分子,和重组病毒的载体,这些载体包括,并且能够在体内表达编码PCV抗原的核酸分子。若干其他的参考文献,例如,美国专利号6,391,314B1;美国专利号6,368,601B1;法国专利号2,769,321;法国专利号2,769,322;W001/96377A2;W000/01409;W099/18214;W000/77216A2;W001/16330A2;W099/29871等,也披露了施用PCV1或PCV多肽或编码各种菌株的多肽的核酸。

[0022] 不过,非致病性PCV1不能用于抗PCV2感染,而现有技术中所披露的致病性PCV2菌株即使是减毒的,也可能只具有有限的价值,因为活的病毒通常具有恢复它的有毒力状态的倾向。因此,本领域长期以来一直需要用于给猪接种的活的,传染性的,非致病性抗原,以便预防由PCV2导致的严重感染或PMWS,这种抗原是有效的,并且用在兽医疫苗中仍然是安全的。通过构建本文所披露的新型活的嵌合猪环状病毒实现了上述目的,这种病毒是以由I.Tischer等在大约30年前分离的非致病性PCV1的基因组主链为基础的。本发明的新型嵌合猪环状病毒能够满足所述长期的需要,包括独特并且有利于保留PCV1的非致病性表型,而又能诱导针对致病型PCV2的特异性免疫应答。

## 发明内容

[0023] 发明概述

[0024] 本发明涉及可用作疫苗的猪环状病毒(PCV)的传染性嵌合DNA克隆和源于DNA克隆的活的嵌合病毒。所述新的、活的嵌合的、遗传学上无毒的病毒,是用非致病性PCV1基因组结构制备的,其中,用致病性PCV2菌株的免疫原性基因取代了PCV1的基因,通常是在相同的相应位置上取代。本发明包括含有本文所披露的新的重组核酸分子的具有生物学功能的质粒,病毒载体等,用包括所述DNA的载体转染过的合适的宿主细胞以及免疫原性多肽表达产物。在本发明的范围内还包括保护猪免受由PCV2导致的病毒感染或断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)的新方法,该方法包括给需要所述保护的猪施用免疫有效量的疫苗,例如,所述疫苗包括质粒上的克隆的嵌合DNA,源于所述嵌合DNA的嵌合病毒,由本文所述DNA表达的多肽产物等。本发明还提供了新的传染性PCV2分子DNA,和PCV的交互(reciprocal)嵌合DNA克隆,可将它用作获得或鉴定新型减毒病毒疫苗的实验模型。

## 附图说明

- [0025] 下面将结合附图,对本发明的背景及其与现有技术的差别作进一步说明,其中:
- [0026] 图1表示传染性PCV2分子DNA克隆的构建。用于扩增完整的PCV2基因组的引物对的相对位置用箭头标出(反向引物PCVSAC2,正向引物PCVSAC2)。用SacII限制酶消化通过PCR扩增的PCV2基因组DNA,并且纯化,连接纯化的和SaCII消化过的基因组DNA,以便构成多联体。通过凝胶电泳分离连接的多联体,纯化SaCII的串联基因组二聚体,并且克隆到预先用SaCII酶消化过的pSK载体上,以便产生分子PCV2DNA克隆。
- [0027] 图2A和2B表示克隆的PCV2质粒DNA在体外感染PK-15细胞时是传染性的。图2A表示通过免疫荧光测定(IF),在用克隆的PCV2质粒DNA转染过的PK-15细胞中检测PCV2抗原。在转染细胞的细胞核中观察到了PCV2抗原的强的免疫标记,而在细胞质中观察到了较弱的免疫标记。图2B表示模拟转染的PK-15细胞。
- [0028] 图3A表示来自第21DPI的通过淋巴内途径用PCV2DNA接种过的猪的肺。所述肺是橡胶状的,不能收缩,并且呈斑点状棕红色。气管支气管淋巴结明显扩大,并且是棕色的(箭头)。图3B表示来自对照猪的正常肺的显微镜切片(25X)。图3C表示来自图3A中的猪的肺的显微镜切片。注意支气管周淋巴组织细胞炎症和中度坏死性支气管炎(25X)。图3D表示图3A中肺的免疫组织化学染色。注意巨噬细胞中的PCV2抗原(箭头)和呼吸道周围的成纤维细胞样细胞(箭头的头部)(64X)。
- [0029] 图4A表示来自对照猪的正常淋巴结。注意界限明确的淋巴样滤泡(箭头)(25X)。图4B表示图3A的21天前通过淋巴内途径用克隆的PCV2基因组DNA接种过的猪的气管支气管淋巴结的显微镜切片。淋巴样滤泡形成较差,存在轻度至中度淋巴衰竭,和轻度多病灶肉芽肿样炎症(25X)。图4C表示图4B中的淋巴结的显微切片的更大的放大倍数,聚焦在一个滤泡。注意用巨噬细胞和巨大细胞(箭头)代替滤泡淋巴细胞所产生的分界较差的滤泡(64X)。图4D表示与图4B相同的淋巴结中,在巨噬细胞(箭头)和巨大细胞(小箭头),和滤泡中树突样细胞(大箭头)中,PCV2抗原的免疫组织化学检测(64X)。
- [0030] 图5表示用携带致病性PCV2的免疫原性ORF2衣壳基因的非致病性PCV1基因组构建嵌合PCV1-2(PCV1/PCV2)DNA克隆。用二聚化的DNA克隆体外转染PK-15细胞,以便产生能表达PCV2的ORF2蛋白的活的嵌合病毒,并且通过体内动物实验证实它的活性。
- [0031] 图6表示传染性PCV1,PCV2,嵌合PCV1-2和交互的嵌合PCV2-1分子DNA克隆的构建和组构。PCV2DNA克隆是通过以前所披露的通用方法,将两个完整长度的线性PCV2基因组串联连接在pBluescriptSK载体(pSK)上而构建的(M.Fenaux等,2002,同上)。PCV1DNA克隆是通过将两个完整长度的PCV1基因组串联连接在pSK载体上而构建的。嵌合PCV1-2DNA克隆是通过用PCV2的ORF2衣壳基因取代pSK载体的非致病性PCV1基因组主链上的PCV1ORF2衣壳基因而构建的。交互的嵌合PCV2-1DNA克隆是通过用非致病性PCV1的ORF2衣壳基因取代pSK载体的致病性PCV2基因组上的致病性PCV2的ORF2衣壳基因而构建的。在pSK载体上,两种嵌合克隆都是二聚体。箭头表示PCR引物的相对位置,用于检测接种动物的PCV1,PCV2,PCV1-2和PCV2-1的病毒血症。
- [0032] 图7A-7J表示PCV1,PCV2,嵌合PCV1-2和交互的嵌合PCV2-1DNA克隆是传染性的,并且在体外转染到PK-15细胞时能表达相应的病毒抗原。左侧的照片(7A,7C,7E,7G和7I)是用抗PCV1ORF2的单克隆抗体染色的。右侧的照片(7B,7D,7F,7H和7J)是用抗PCV2的抗体染色

的。照片7A和7B是模拟转染的PK-15细胞。照片7C和7D是用PCV1DNA克隆转染过的PK-15细胞。照片7E和7F是用PCV2DNA克隆转染过的PK-15细胞。照片7G和7H是用嵌合PCV1-2DNA克隆转染过的PK-15细胞。照片7I和7J是用交互PCV2-1DNA克隆转染过的PK-15细胞。

[0033] 图8表示克隆的PCV2分子DNA的完整长度DNA序列(它相当于SEQ ID NO:1)。

[0034] 图9表示克隆的PCV1-2DNA的完整长度DNA序列(它相当于SEQ ID NO:2)。

[0035] 图10表示克隆的PCV1-2DNA的免疫原性ORF2衣壳基因的DNA序列(它相当于SEQ ID NO:3)。

[0036] 图11表示嵌合的PCV1-2DNA的免疫原性ORF2衣壳基因的推测的氨基酸翻译(它相当于SEQ ID NO:4)。

## 具体实施方式

[0037] 发明详述

[0038] 根据本发明,提供了猪环状病毒(PCV)的传染性分子和嵌合核酸分子,由所述嵌合核酸分子生产的活的嵌合病毒,以及用于保护猪免受病毒感染或由PCV2引起的断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)的影响的兽医疫苗。本发明还提供了可用作疫苗的免疫原性多肽表达产物。

[0039] PCV的新的、无毒的、传染性嵌合DNA分子(PCV1-2),包括编码传染性,非致病性PCV1的核酸分子,它包括取代了PCV1基因组中的ORF基因的致病性PCV2的免疫原性开放读框(ORF)基因。这种传染性嵌合PCV1-2DNA克隆优选包括克隆在传染性,非致病性PCV1DNA克隆的基因组主链上的PCV2DNA的免疫原性衣壳基因(ORF2)。一般来说,PCV2DNA的衣壳基因取代了非致病性PCV1基因组结构上的PCV1DNA的ORF2基因,但是,可以理解的是,能够通过遗传工程构建多种位置置换,以获得其它无毒或减毒的嵌合DNA克隆。PCV1和PCV2之间的交互的嵌合传染性PCV2-1DNA克隆作为对照分析本发明的嵌合PCV1-2克隆,并且是通过用PCV1的衣壳基因取代致病性PCV2传染性DNA克隆主链上的PCV2的衣壳基因而构建的。除了作为实验模型之外,所述交互嵌合PCV2-1DNA克隆可用于制备专门修饰过的疫苗。

[0040] 本文所披露的克隆的PCV2的基因组DNA,在转染到PK-15细胞中并且给猪使用时,表现出体外和体内传染性。传染性PCV2DNA克隆在猪体内产生了PMWS所特有的病理学损伤,使得能够更好地鉴定临床疾病,并且了解在所述组织细胞中的病毒分布。这种新的便于复制的致病剂,导致了它本身可以发展成用于防止猪出现PMWS的合适的接种过程。

[0041] 通过体外转染PK-15细胞和给猪体内施用,所述新的嵌合PCV1-2DNA克隆同样是传染性的。在转染过的PK-15细胞中,嵌合的PCV1-2DNA克隆,能表达PCV2衣壳抗原(PCV2的免疫原性衣壳蛋白),而所述交互嵌合PCV2-1DNA克隆能表达PCV1衣壳抗原。这一结果是通过用对PCV1或PCV2衣壳抗原特异的抗体通过免疫荧光测定(IF)证实的。在用传染性PCV2克隆以及嵌合PCV1-2克隆接种过的猪体内检测到了PCV2-特异性抗体的血清转变。PCV2-特异性抗体的血清转变的检测,确定了嵌合PCV1-2DNA克隆能在受感染的猪体内诱导PCV2-特异性抗体,并因此发挥保护接种过的猪免受PCV2感染的作用。

[0042] 下面的实施例更详细地披露了所述嵌合DNA克隆在接种过的猪体内免疫原性和致病性的评估。大体上讲,向抗PCV2ORF2抗原的抗体的血清转变,是在用PCV2DNA克隆(第3组)和嵌合PCV1-2DNA克隆(第4组)接种过的猪体内检测到的。用PCV1克隆和交互嵌合PCV2-

1DNA克隆接种过的所有的猪(分别为第2和第5组)都能血清转变成PCV1抗体。从每一个组中选择的猪体内回收的病毒进行了部分测序,并且证实是用于所述接种的真实的相应的传染性DNA克隆。与用PCV1,嵌合PCV1-2和交互嵌合PCV2-1DNA克隆接种过的猪相比,用PCV2DNA克隆接种过的动物的各种组织中的肉眼可见和显微镜下的病变明显更严重。

[0043] 令人吃惊的并且有利的是,具有克隆到非致病性PCV1基因组主链上的致病性PCV2的免疫原性衣壳基因(ORF2)的嵌合PCV1-2传染性DNA克隆,能诱导针对致病性PCV2衣壳抗原的特异性抗体应答,同时,它在猪体内独特地保留了PCV1的非致病性性质。用嵌合PCV1-2传染性DNA克隆接种过的动物,发生了类似于PCV1接种动物的轻度感染,同时,发生了抗致病性PCV2的ORF2衣壳蛋白的抗体的血清转变。在用PCV1和嵌合PCV1-2接种过的动物体内观察到的病毒血症的平均长度,分别比致病性PCV2接种过的动物短0.625周和1周,后者的平均长度为大约2.12周。在某些接种过的动物体内缺乏可检测的嵌合PCV1-2病毒血症,并不影响在PCV1-2接种过的猪(第4组)体内向抗PCV2ORF2衣壳蛋白的抗体的血清转变。以上结果表明,即使在某些接种过的动物体内嵌合PCV1-2病毒血症时间短或者是无法检测,但嵌合PCV1-2病毒仍然能够诱导针对PCV2ORF2衣壳蛋白的抗体应答。嵌合的PCV1-2传染性DNA克隆诱导特异于致病性PCV2免疫原性ORF2衣壳蛋白的免疫应答的特殊能力,对猪来说仍然是非致病性的,这使得这种嵌合PCV1-2克隆特别适合用作遗传学工程改造过的减毒活疫苗和其他类型的疫苗。

[0044] 本发明的新的,纯化的,和分离的核酸分子,包括在SEQ ID NO:2中和在图9中示出的克隆的嵌合PCV1-2DNA的完整长度DNA序列,并且以专利保藏号PTA-3912在美国典型培养物保藏中心保藏;它的互补链(即,反向和相对的碱基对)或与所述嵌合核苷酸序列具有至少95%的同源性的核苷酸序列(即完整基因的主要活性部分)。可以用本领域所熟知的常规方法,制备具有高度同源性的互补链或核苷酸序列,例如,通过本领域公知的标准或高严格性杂交技术制备。在SEQ ID NO:3和图10中同样示出了包括克隆的嵌合PCV1-2DNA的免疫原性衣壳基因的DNA序列的纯化的和分离的核酸分子。

[0045] 含有所述嵌合核酸分子的合适的细胞,能独特地产生生活的传染性嵌合猪环状病毒。正如本文所披露的,所述活的,传染性嵌合病毒是通过体外和体内转染PK-15细胞,由所述嵌合DNA克隆衍生的。克隆的嵌合PCV1-2DNA的优选例子,是在SEQ ID NO:2和图9中所示出的核苷酸序列。本发明还预计所述嵌合病毒源于所述嵌合核苷酸序列的互补链或与所述嵌合核苷酸序列具有至少95%同源性的高同源性的核苷酸序列。

[0046] 本发明的范围还包括含有本文所披露的新的重组核酸分子的具有生物学功能的质粒,和病毒载体等,用包括所述嵌合的和分子DNA克隆的载体转染过的合适的宿主细胞以及免疫原性多肽表达产物。特别优选的免疫原性蛋白具有在SEQ ID NO:4和图11中所示出的氨基酸序列。本发明还包括它的生物学活性变体。本领域普通技术人员无需过多的努力,就可以了解如何修饰,取代,缺失来自所述多肽序列的氨基酸,并且生产保留了与亲本序列相同或大体上相同的活性的生物学活性变体等。

[0047] 为了生产本发明的免疫原性多肽产物,所述方法可以包括以下步骤:以允许表达多肽产物的方式,在合适的营养条件下生长用本文所披露的新的重组核酸分子转染过的原核或真核宿主细胞,并且通过本领域已知的标准方法分离由所述核酸分子表达的需要的多肽产物。可以理解的是,所述免疫原性蛋白可以通过其他技术制备,例如,通过生物化学合

成等。

[0048] 嵌合病毒和分子DNA克隆的疫苗以及使用它们的方法同样包括在本发明范围内。接种过的猪能够免受严重病毒感染和由PCV2导致的PMWS。通过给猪施用免疫有效量的本发明的疫苗，所述新方法能够保护需要保护的猪免受病毒感染或PMWS，例如，包括免疫原性量的嵌合PCV1-2DNA的疫苗，克隆的嵌合病毒，含有PCV1-2的嵌合DNA的质粒或病毒载体，多肽表达产物，重组PCV2DNA等。可以将诸如PRRSV, PPV, 其他传染性猪致病剂和免疫刺激剂的其他抗原同时提供给猪，以便提供针对病毒感染的广谱性保护。

[0049] 例如，所述疫苗包括传染性嵌合PCV1-2DNA，存在于合适的质粒或载体上的克隆的PCV嵌合DNA基因组，例如，pSK载体，无毒的、活的嵌合病毒，失活的嵌合病毒等，它们与无毒性的生理学上可接受的载体组合，并且任选与一种或多种佐剂组合。所述疫苗还可以包括本文所披露的传染性PCV2分子DNA克隆。传染性嵌合PCV1-2DNA，含有传染性嵌合病毒基因组的质粒DNA以及活的嵌合病毒是优选的，而活的嵌合病毒是最优选的。本发明的无毒的，活的病毒疫苗与使用减毒的，活的传统病毒疫苗相比具有优点，后者存在恢复有毒力状态的危险，或者杀伤细胞培养物增殖的所有病毒，可能不能诱导用于预防病毒性疾病足够的抗体免疫应答。

[0050] 可以与本发明的疫苗组合使用的佐剂是能增强所述猪对所述疫苗的免疫应答的佐剂。所述佐剂可以在与所述疫苗相同的时间和相同的部位使用，或者在不同的时间施用，例如，作为加强剂使用。佐剂还可优选以与施用疫苗不同的方式和部位给所述猪施用。合适的佐剂包括，但不局限于氢氧化铝(明矾)，免疫刺激复合物(ISCOMS)，非离子嵌段聚合物或共聚物，细胞因子(如IL-1, IL-2, IL-7, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ 等)，皂苷，单磷酰脂质A(MLA)，和胞壁酰二肽(MDP)等。其他合适的佐剂包括，例如，硫酸铝钾，从大肠杆菌中分离的热不稳定性和热稳定性肠毒素，霍乱毒素或它的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。在使用之前，可以使诸如白喉毒素，破伤风毒素和百日咳毒素的基于毒素的佐剂失活，例如，通过用甲醛处理使它失活。

[0051] 所述疫苗还可以包括其他抗原，以便增强传染性嵌合PCV DNA克隆的免疫学活性，所述克隆如猪生殖和呼吸综合征病毒(PPRSV)，猪细小病毒(PPV)，其他传染性猪致病剂和免疫刺激剂。

[0052] 本发明的新的疫苗不局限于任何特定类型或制备方法。所述克隆的病毒疫苗包括，但不局限于传染性DNA疫苗(即利用质粒，载体或其他常规载体将DNA直接注射到猪体内)，活的疫苗，修饰过的活的疫苗，失活的疫苗，亚单位疫苗，减毒疫苗，遗传工程疫苗等。所述疫苗是通过本领域已知的标准方法制备的。

[0053] 所述活的病毒疫苗通常是最需要的疫苗，就是说，能在所述疫苗受体内激活所有可能的免疫应答，包括系统性，局部，体液和细胞介导的免疫应答。另一方面，灭活的疫苗只能诱导体液免疫应答。不过，虽然活的病毒疫苗是最理想的，但是它具有若干缺陷，例如，受活的意外病毒剂污染的潜在危险或所述病毒在野外恢复毒力的危险。值得注意的是，本发明的独特的PCV1-2嵌合DNA克服了所述缺陷。仅使用致病性PCV2的免疫原性基因，所述嵌合DNA构成了活的，复制的嵌合病毒，它是非致病性的，但仍然能诱导活的病毒疫苗针对致病性PCV2病毒的全面的，有利的免疫应答。基于所述嵌合病毒的活的病毒疫苗，基本上少有恢复成致病性表型的机会(如果有)。因此，基于非致病性的PCV1的结构的新的嵌合病毒，与重

组PCV2DNA病毒,任何活的,减毒的PCV2疫苗或任何其他类型的用于诱导针对PCV2感染的免疫的用于PCV2的疫苗相比,具有巨大的优点。

[0054] 尽管活的病毒疫苗是最优选的,可用于接种猪的其他类型的疫苗具有本文所披露的新嵌合病毒和其他抗原。为了制备失活的病毒疫苗,例如,来自传染性DNA克隆的病毒增殖,是通过本领域已知方法或本文所披露的方法进行的。然后,通过本领域普通技术人员所普遍公知的方法优化系列病毒灭活。

[0055] 失活的病毒疫苗可以通过用诸如福尔马林或疏水性溶剂,酸之类的灭活剂处理衍生自克隆的PCV DNA的嵌合病毒,通过用紫外线或X-射线辐射,通过加热等方法制备。灭活是通过本领域所了解的方法进行的。例如,在化学灭活中,用足够数量或浓度的灭活剂,在足够高(或低,这取决于所述灭活剂)的温度下或pH下,处理合适的病毒样品或含有所述病毒的血清样品足够的时间,以便使所述病毒失活。热灭活是在一定温度下进行足够长的时间以灭活病毒。辐射灭活是通过使用一定波长的光或其他能源进行足以使所述病毒失活的时间而进行的。如果所述病毒不能够感染易受感染的细胞的话,就认为所述病毒是失活的。

[0056] 亚单位疫苗的制备通常不同于修饰过的活疫苗或失活的疫苗的制备。在制备亚单位疫苗之前,必须确定所述疫苗的保护性或抗原性成分。所述保护性或抗原性成分包括病毒衣壳蛋白的某些氨基酸区段或片段,它们能在猪体内产生特别强的保护性或免疫应答;单个或多个病毒衣壳蛋白本身,它们的寡聚体,以及病毒衣壳蛋白的高级缔合物(这种缔合物形成了病毒的亚结构或所述亚结构的可识别的部分或单位);存在于病毒表面上或病毒表面附近,或存在于病毒亚结构中的寡糖苷,糖脂或糖蛋白,如与病毒结合的脂蛋白或脂基等。优选将衣壳蛋白,如由ORF2基因编码的蛋白用作所述亚单位疫苗的抗原性成分。还可以使用由所述传染性DNA克隆编码的其他蛋白。这些免疫原性成分可以通过本领域已知的方法方便地鉴定。一旦鉴定所述病毒的保护性或抗原性部分(即“亚基”)之后,就可以用本领域已知的方法纯化和/或克隆。所述亚单位疫苗与基于活病毒的其他疫苗相比具有优点,因为所述亚基,如病毒的高度纯化的亚基,与完整的病毒相比具有较弱的毒性。

[0057] 如果所述亚单位疫苗是通过重组遗传学技术生产的话,举例来说,通过诸如ORF2(衣壳)基因的克隆的亚单位的表达,可以通过本领域所公知的方法优化(例如,参见Maniatis等,"Molecular Cloning: A Laboratory Manual,"Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,MA.,1989)。如果所使用的亚单位体现了所述病毒的完整的结构特征,如作为完整的衣壳蛋白的话,从病毒中分离它的方法必须进行优化。在任何场合下,在对所述失活方法进行优化之后,在生产之前,可以对亚单位纯化方法进行优化。

[0058] 为了用致病性克隆制备减毒的疫苗,首先通过本领域已知的方法对适应组织培养物的,活的,致病性的PCV2进行减毒(使它变成非致病性的或无害的),通常是通过细胞培养而连续传代。致病性克隆的减毒,还可以通过基因缺失或病毒生产基因的突变而完成。然后,可以将减毒的PCV2用于构建其他嵌合的PCV1-2病毒,所述病毒保留了PCV1的非致病表型,不过,在免疫原性性状的强度方面可以改变,所述性状是通过重组技术从PCV2基因组中选择的。

[0059] 最优选的疫苗利用了活的嵌合病毒DNA克隆,特别是含有克隆在非致病性PCV1主链上的PCV2的免疫原性基因的克隆。有利的是,通过遗传工程构建的天然无毒的所述活的嵌合病毒,不需要花费时间的减毒过程。所述病毒能独特地用作活的,但是非致病性的复制

型病毒,它能在病毒复制期间产生针对PCV2的免疫原性蛋白,所述蛋白随后能诱导针对致病性PCV2的完整范围的免疫应答。

[0060] 作为另一个优点,本发明的优选的活的嵌合病毒提供了遗传学稳定的疫苗,所述疫苗比其他类型的减毒疫苗更便于制备,保存和送递。基于嵌合病毒的无毒和减毒疫苗,一般被认为是与传统的修饰的活的疫苗同样安全(如果不是更安全)(J.Arroyo等,“使黄热病毒/日本脑炎病毒嵌合疫苗(ChimeriVax-JE)的神经毒性减弱的分子基础”,*J.Virol.*75(2):934-942(2001);F.Guirakhoo等,“在非人灵长类中重组嵌合黄热-2型登革热病毒是免疫原性的和保护性的”,*J.Virol.*74(12):5477-5485(2000);S.Tang等,“针对脊髓灰质炎型猴免疫缺陷病毒疫苗:遗传稳定性和免疫原性之间的相关性”,*J.Virol.*71(10):7841-7850(1997))。例如,针对日本脑炎病毒(JEV)的ChimeriVax-JE疫苗,它是黄热病毒疫苗YFV17D的遗传工程衍生物,其中,编码YFV17D的结构蛋白prM和E的基因被减毒的JEV SA14-14-2株的相应的基因所取代,在体外和体内长期传代之后表现出遗传学稳定性(J.Arroyo等,2001,同上)。针对2型登革热的另一种嵌合病毒疫苗ChimeriVax-D2(它是减毒的嵌合黄热病(YF))2型登革热(登革热-2)病毒是遗传学稳定的;据报导,它的序列在Vero细胞中经过18次传代之后没有改变(F.Guirakhoo等,2000,同上)。

[0061] 本发明的另一种优选的疫苗,利用合适的质粒将非致病性嵌合DNA克隆送递到猪体内。与使用活的或灭活的细胞培养物增殖的完整病毒的传统疫苗相反,本发明提供了用含有传染性嵌合病毒基因组的质粒DNA直接接种猪的方法。

[0062] 本发明另一种需要的遗传工程疫苗是通过本领域已知技术生产的。所述技术包括,但不局限于进一步操作重组DNA,修饰或取代重组蛋白的氨基酸序列等。

[0063] 例如,基于重组DNA技术的遗传工程疫苗,是通过鉴定编码负责诱导猪体内的较强的免疫或保护反应的蛋白的病毒基因的替代部分制备的(例如,源于ORF3,ORF4等的蛋白)。可以将所述鉴定的基因或免疫显性片段克隆到诸如杆状病毒载体的标准蛋白表达载体上,并且用于感染合适的宿主细胞(例如,参见O'Reilly等,“杆状病毒表达载体:实验室手册”,Freeman & Co.,1992)。培养所述宿主细胞,以便表达所需要的疫苗蛋白,可以将所述疫苗蛋白纯化到需要的程度,并且配制成合适的疫苗产品。

[0064] 如果所述克隆保持了任何不希望的导致发病的天然能力的话,还可以标出病毒基因组中决定毒力的核苷酸序列的位置,并且,通过诸如定点诱变的方法,对通过遗传工程改造使所述病毒无毒。定点诱变能够添加,缺失或改变一个或多个核苷酸(例如,参见Zoller等,*DNA*3:479-488,1984)。合成含有所需突变的寡核苷酸,并且与单链病毒DNA的一部分退火。将通过这种方法得到的杂合分子用于转化细菌。然后将分离的含有合适突变的双链DNA用于通过与后者的限制片段连接,生产完整长度的DNA,然后将所得到的DNA转染到合适的细胞培养物中。将所述基因组连接到合适的载体上,以便可以通过本领域普通技术人员所公知的任何标准技术实现转移。将所述载体转染到宿主细胞中,以便生产病毒后代,这一目的可以使用任何常规方法实现,如磷酸钙或DEAE-葡聚糖介导的转染,电穿孔,原生质体融合和其他众所周知的技术(例如,Sambrook等,“*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,”Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)。这样,克隆的病毒具有需要的突变。另外,可以合成包括所述合适的突变的两种寡核苷酸。可以让以上两种寡核苷酸退火,以便形成能够插入所述病毒DNA的双链DNA,从而生产完整长度的DNA。

[0065] 例如,可用于疫苗中的遗传工程蛋白可以在昆虫细胞,酵母细胞或哺乳动物细胞中表达。可以通过常规方法纯化或分离的所述遗传工程蛋白,能够直接接种到猪体内,以便产生对由PCV2导致的病毒感染或断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)的预防作用。

[0066] 可以用含有从病毒中获得的或由病毒基因组拷贝的编码所述病毒的一种或多种免疫显性蛋白的核酸分子的转移载体转化昆虫细胞系(如HI-FIVE)。例如,所述转移载体包括线性化的杆状病毒DNA和含有所需多核苷酸的质粒。可以用线性化的杆状DNA和质粒共同转染所述宿主细胞系,以便制备所述重组杆状病毒。

[0067] 另外,可以将来自患有PMWS猪体内的,编码一种或多种衣壳蛋白的DNA,传染性PCV2分子DNA克隆或克隆的PCV嵌合DNA基因组,插入诸如痘病毒或腺病毒的活的载体内,并用作疫苗。

[0068] 给需要预防病毒感染或PMWS的猪施用免疫有效量的本发明的疫苗。用于接种所述猪的免疫有效量或免疫原性量,可以通过常规实验方便地确定或方便地滴定。有效量是这样一种量:其中,获得了对所述疫苗的足够的免疫应答,以便保护接触能导致PMWS的病毒的猪。优选在一定程度上对所述猪提供保护,其中,所述病毒性疾病的一种至所有的不良生理学症状或作用均被明显减弱,缓解或完全抑制。

[0069] 所述疫苗可以用单一剂量施用或用重复的剂量施用。例如,剂量可以为1-1000微克含有所述传染性嵌合DNA基因组的质粒DNA(取决于所述疫苗的免疫活性成分的浓度),不过,应当不包括足以导致病毒感染的不良反应或生理学症状的量的基于病毒的抗原。根据猪的体重,抗原的浓度和其他常见因素确定或滴定活性抗原性制剂的剂量的方法,为本领域所公知。优选将所述传染性嵌合病毒DNA克隆用作疫苗,或在体外制备活的传染性嵌合病毒,然后将所述活的嵌合病毒用作疫苗。在这种情况下,可以给猪提供100-200微克克隆的嵌合PCV DNA,或活的嵌合病毒的大约10000 50%组织培养感染剂量(TCID<sub>50</sub>)。

[0070] 所述疫苗优选给尚未接触PCV病毒的猪施用。含有所述嵌合PCV1-2传染性DNA克隆或其他抗原性形式的疫苗,可以方便地通过鼻内,经皮(即涂在皮肤表面上以便系统吸收),肠胃外等途径施用。肠胃外施用途径包括,但不局限于肌内,静脉内,腹膜内,真皮内(即注射或其他方式放置在皮肤下面)途径等。由于肌内和真皮内接种途径在使用病毒传染性DNA克隆的其他研究中业已获得成功(E.E.Sparger等,“通过注射猫免疫缺陷病毒分子克隆的DNA感染猫”,Virology 238:157-160(1997);L.Willems等,“将牛白血病原病毒转染到绵羊体内”,Virology 189:775-777(1992)),除了实际的鼻内施用途径之外,所述途径是最优选的。尽管不够方便,但也可以通过淋巴内接种途径将所述疫苗接种到猪体内。一种独特的,高度优选的施用方法,包括将含有PCV1-2嵌合体的质粒DNA通过肌内,真皮内,淋巴内途径等直接注射到猪体内。

[0071] 在以液体形式施用时,本发明的疫苗可以水溶液,糖浆,酏剂,和酌剂形式制备。所述制剂为本领域所公知,并且通常是通过将抗原和其他常见的添加剂溶解在合适的载体或溶剂系统中制备的。合适的载体或溶剂包括,但不局限于水,盐溶液,乙醇,乙二醇,甘油等。例如,典型的添加剂是得到认证的染料,芳香剂,甜味剂,和抗微生物防腐剂,如硫柳汞(乙基汞硫代水杨酸钠)。所述溶液可以是稳定化的,例如,通过添加部分水解的明胶,山梨醇或细胞培养基,并且可以通过常规方法,用本领域已知的试剂缓冲,如磷酸氢钠,磷酸二氢钠,磷酸氢钾,磷酸二氢钾,以及它们的混合物等。

[0072] 液体制剂可以包括含有与其他标准共同制备制剂组合的悬浮或乳化剂的悬浮液或乳液。以上类型的液体制剂可以通过常规方法制备。例如，悬浮液可以用胶体磨制备。例如，乳液可以用匀浆机制备。

[0073] 为了注射到体液系统中而设计的肠胃外制剂，需要合适的等渗性并且将pH缓冲到与猪体液相当的水平。根据需要，可以用氯化钠和其他盐适当调整等渗性。可以将诸如乙醇或丙二醇的合适溶剂用于提高所述成分在制剂中的溶解度和所述液体制剂的稳定性。可用于本发明疫苗中的其他添加剂包括，但不局限于葡萄糖，常规抗氧化剂和常规螯合剂，如乙二胺四乙酸(EDTA)。在使用之前，还必须对肠胃外剂型进行消毒。

[0074] 本发明的另一种实施方案包括制备PCV1-2的传染性，非致病性嵌合核酸分子的新方法，该方法包括除去编码传染性非致病性PCV1的核酸分子的开放读框(ORF)基因，用编码传染性致病性PCV 2的核酸分子的免疫原性ORF基因取代所述相同的位点，并且回收所述嵌合核酸分子。所述核酸分子通常是DNA。优选的方法是用本文所披露的PCV2的传染性致病性分子DNA的免疫原性ORF2衣壳基因取代非致病性PCV 1DNA的ORF2基因。可以理解的是，其他ORF位点或它的免疫原性片段，可以在PCV 1和PCV 2DNA之间交换，以便按照本文所披露的方法构建减毒的传染性嵌合DNA克隆。

[0075] 然后将所述重组核酸分子用于构建本发明的活的，传染性的，复制型嵌合病毒，所述病毒有利地保留了PCV 1的非致病性性质，并仍然能表达致病性PCV 2的免疫原性ORF2蛋白，并且诱导针对致病性PCV2的完整的免疫应答。所述PCV 1-2DNA克隆优选起着遗传工程改造的无毒的，活的疫苗的作用，可以在猪体内抗PCV 2感染和PMWS。

[0076] 按本文所述方法，构建了PCV 2的传染性DNA克隆，以便可以制备生物学纯的和均匀的传染性病毒原种，用于病理学研究和开发非致病性嵌合疫苗。与以往观察到的结果相比，通过使用这种分子DNA克隆和源于所述分子DNA克隆的生物学纯的和均匀的传染性PCV2病毒原种，可以更明显地表征与PCV2感染相关的临床疾病进程、病毒分布和病理学病变，这使得它本身可用于开发本发明需要的疫苗制品。

[0077] PCV2分子克隆是通过将两个拷贝的完整PCV2基因组串联在pSK载体上而制备的。与现有技术中所披露的单一拷贝基因组形成鲜明对照的是，通过本文所披露的方法制备的传染性DNA PCV2克隆包括以串联重复形式连接在一起的两个完整拷贝的PCV2基因组。将两个拷贝的基因组串联在一起，提供了模拟PCV2的常见环状基因组的类似的环状基因组。在传染性DNA PCV2克隆中具有两个串联的基因组拷贝的优点是，当所述传染性DNA克隆在体外和体内转染时，能够增强复制。因此，本发明的克隆能够比现有的单拷贝基因组更有效并且更经济地工作。

[0078] 为了研究病毒复制的遗传决定因素和在宿主体内的毒力，用所述分子病毒克隆感染动物是极为有效的。业已将2型猪环状病毒(PCV2)认定为断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)的致病剂。PMWS是猪的一种复杂的疾病综合征，并且在PMWS的临床表现方面涉及到多种因素。不过，由于其他常见的猪致病剂在患病猪的组织匀浆中的存在而导致的产生生物学纯形式的PCV2的难度，业已妨碍了仅仅由于PCV2感染所造成的临床疾病和病理学病变的明确表征。这是第一次构建了PCV2的传染性分子DNA克隆，并用于表征通过用所述分子克隆直接体内转染猪而导致的与PCV2感染相关的疾病和病理学损伤。

[0079] 在转染到PK-15细胞中时，证实了源于所述分子克隆的均匀的PCV2活的病毒原种

是传染性的。所述克隆的PCV2基因组DNA在直接注射到无特定病原体(SPF)猪的肝脏和表浅回肠淋巴结中时,也是传染性的。用所述克隆的PCV2质粒DNA注射过的动物,出现了类似于通过鼻内接种均匀的,传染性PCV2活的病毒原种所诱导的感染和疾病。在接种后第35天(DPI),来自接种过的组的大部分猪体内检测到向PCV2-特异性抗体的血清转变。

[0080] 在用嵌合PCV1-2DNA克隆接种过的猪体内的病毒血症的发作和持续,类似于用非致病性PCV1DNA克隆接种过的猪,而在用PCV2克隆接种过的猪病毒血症比后者出现的更早并且持续更长时间。在大部分PCV2接种的动物体内检测到病毒血症始于第14DPI,并且持续大约2-4周。类似地,在35DPI进行尸体剖检的大部分接种过的猪,都发生了向PCV2-抗体的血清转变。在接种过的猪的各种组织和器官中都检测到PCV2抗原。肉眼可见的病变局限于肺和淋巴结,并且以全身增大的棕色淋巴结,不能收缩的肺和轻度多病灶棕色实变灶为特征。影响非致病性PCV1和嵌合PCV1-2接种的猪体内的淋巴结的肉眼可见的病变是轻度的,并且仅局限于少数动物,而致病性PCV2接种过的猪都具有淋巴组织的中度至重度肿胀和脱色(参见下面的表9)。统计学分析发现,嵌合PCV1-2接种的动物体内的淋巴结的肉眼可见的病变的评分,类似于非致病性PCV1接种的猪的肉眼可见的病变的评分。在21DPI,PCV2接种过的猪的肉眼可见的病变在统计学上比PCV1和嵌合的PCV1-2接种的猪更严重。在接种过的(感染过的)猪的多种组织和包括大脑,肺,心脏,肾脏,扁桃腺,淋巴结,脾脏,回肠和肝脏的器官中检测到了组织病理学病变和PCV2-特异性抗原。用PCV2分子DNA克隆以及由所述分子DNA克隆体外制备的传染性病毒,在多种组织和器官中再现了类似于PMWS的组织病理学病变。在微观水平上,在21和49DPIs,嵌合PCV1-2接种过的动物,在统计学上比PCV2接种过的动物具有更小的显微镜下病变。在嵌合PCV1-2接种的猪的淋巴结中的显微镜下病变评分,类似于非致病性PCV1,交互的PCV2-1和未接种过的对照动物的评分。在致病性PCV2接种的动物的包括肺,肝脏,淋巴,脾脏,大脑,心脏,肾脏和扁桃腺组织的多种组织中,发现了中度至重度显微镜下病变。不过,在嵌合PCV1-2接种的动物体内,轻度至中度显微镜下病变仅局限于肝脏,淋巴结和肾脏组织(参见下面的表10)。

[0081] 在对照或任何接种过的猪体内没有显著的PMWS临床体征。尽管用克隆的PCV2质粒DNA(传染性PCV2DNA克隆)或用生物学纯的PCV2传染性病毒原种没有观察到PMWS的特有临床症状,PCV2明显负责在以下说明性实施例中再现的PMWS样组织病理学病变。得到普遍认可的是,PCV2是决定临床PMWS发作的主要的,但不是唯一的致病剂。

[0082] 本发明更明确地表征了仅仅由PCV2感染造成的临床进程和病理学病变。在下面的说明性实施例中所提供的数据表明,便于复制的克隆的PCV2基因组DNA,可用于取代传染性病毒,以便进行PCV2病理学和免疫研究。尽管证实了PCV2是PMWS发展所必需的,诸如PRRSV,PPV等的其他因素或致病剂,可能是诱导与先前出现的PMWS病例相关的全部临床体征和病变所需要的。不过,由于了解到PCV2是关键因素,本发明的新的传染性,复制性病毒克隆,可以通过免疫学和分子遗传学领域普通技术人员所公知的方法进行进一步修饰或进行遗传工程改造,以便获得所需要的最佳免疫原性效果。

[0083] 本文所披露的PCV2传染性DNA克隆的可利用性,使得它适合开发遗传工程减毒的疫苗,用于预防猪感染PCV2和PMWS。已知在天然感染期间,PCV2能在淋巴结,肺和肝脏中复制,并且主要病理学作用之一是通过降解淋巴样结构损伤免疫系统(S.Krakowka等,2001,同上;G.M.Allan和J.A.Ellis,2000,同上;S.Kennedy等,2000,同上;G.J.Wellenberg等,

2000,同上;G.M.Allan等,“通过用猪环状病毒和猪细小病毒共同感染猪实验性再现严重衰竭性疾病”,J.Comp.Pathol.121:1-11(1999);J.Ellis等,“在限菌小猪体内再现断奶后多系统衰竭综合征的损伤”,J.Vet.Diagn.Invest.11:3-14(1999);J.C.Harding和E.G.Clark,1997,同上)。通过使用这种新的传染性PCV2分子DNA克隆,能够更明确地表征仅由PCV2导致的临床疾病,病理学病变和病毒分布。

[0084] 由于本文所披露的PCV2,PCV1,嵌合PCV1-2,和交互嵌合PCV2-1传染性DNA克隆的可利用性,能够更好地理解PCV基因的结构和功能关系.Will等,“克隆的HBV DNA能在黑猩猩体内导致肝炎”,Nature299:740-742(1982)首次证实了利用克隆的乙型肝炎病毒DNA通过直接体内注射感染黑猩猩的可行性。这种方法一直被用于研究若干种其他病毒的病毒复制和病理学(T.W.Dubensky等,“将病毒和质粒DNA直接转染到小鼠的肝脏或脾脏中”,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:7529-7533(1984);R.Girones等,“能感染天然宿主的土拨鼠肝炎病毒的分子克隆的完整核苷酸序列”,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1846-1849(1989);N.L.Letvin等,“操作HIV的风险”,Nature 349:573(1991);C.Seeger等,“地松鼠肝炎病毒的克隆基因组在动物体内是传染性的”,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.81:5849-5852(1984);E.E.Sparger等,“通过注射猫免疫缺陷病毒分子克隆的DNA感染猫”,Virology 238:157-160(1997);R.Sprengel等,“在体内DNA转染之后嗜肝DNA病毒基因组之间的同源重组:用于研究病毒传染性”,Virology 159:454-456(1987);H.tWill等,1982,同上;L.Willems等,“将牛白血病原病毒活体转染到绵羊体内”,Virology 189:775-777(1992))。

[0085] 在本发明中,传染性PCV2分子DNA克隆的构建,以及将克隆的PCV2质粒DNA直接注射到猪的肝脏和淋巴结内所导致的感染的证实,有利于PCV2研究。这种体内转染系统将会增强对PCV2基因的结构和功能关系的研究,利用在体外构建的重组质粒检测PCV2的不同区域或基因在宿主细胞中病毒复制和致病作用方面的作用。PCV2的复制和致病作用可以在体内研究,而没有必要通过在细胞培养物中增殖PCV2生产传染性病毒原种。这一点是有利的,因为系列细胞培养物传代,可能会选择病毒变体。使用克隆的PCV2基因组DNA取代活的病毒进行动物研究的另一个优点是,比较容易对接种的剂量进行定量。通过分光光度计,可以方便地测定用于动物接种的克隆PCV2DNA的量,而活的PCV2病毒的剂量需要在细胞培养物中进行传染力滴定,并且通过IFA证实感染。用克隆的PCV2质粒DNA直接注射动物,消除了与在动物研究中存在于组织匀浆接种物中的其他固有的猪致病剂相关的问题。

[0086] 在本发明中,免疫原性ORF2衣壳基因在致病性PCV2和非致病性PCV1之间变换,以便产生嵌合的PCV1-2传染性DNA克隆的独特结构。令人吃惊并且有利的是,嵌合的PCV1-2传染性克隆能在体外和体内复制,表达所述免疫原性ORF2衣壳抗原,并且诱导针对PCV2ORF2的特异性抗体应答,但是保留了PCV1的非致病性质。嵌合的PCV1-2传染性DNA克隆具有诱导针对PCV2的强免疫应答的能力,同时仅诱导具有轻度病理学病变的有限感染,这种感染类似于非致病性PCV1的感染。对于疫苗开发来说,克隆DNA的比较便于保存和稳定性,以及重组PCV2质粒DNA和嵌合PCV1-2DNA克隆大规模生产的经济性,提供了将活的,传染性病毒DNA疫苗或遗传工程生产,减毒的病毒疫苗送递到猪体内的吸引人的手段,因此,在本发明中所披露的嵌合PCV1-2传染性DNA克隆,是抗PCV2感染和PMWS的有用的疫苗候选物。

[0087] 应当理解的是,本文所使用的所有科学和技术术语具有本领域普通技术人员所普遍了解的相同含义。对于本发明来说,术语“传染性的”表示病毒能在猪体内复制,而无论所

述病毒是否会导致任何疾病。“SFP”表示无特异性病原体的猪。“限菌”猪表示无菌猪。术语“PCV2质粒DNA”，“PCV2基因组DNA”和“PCV2分子DNA”可以相互交换使用，用来表示相同的克隆核苷酸序列。

[0088] 传染性PCV1/PCV2嵌合DNA克隆(菌株名称“PCV1-2嵌合体”),传染性PCV2分子DNA克隆(菌株名称“PCV2克隆”)和从患有严重PMWS的猪体内分离的并且确定为分离编号40895(菌株名称PCV2#40895”的源于PCV2的Iowa样品的生物学纯的和均匀的PCV2原种,是按照布达佩斯条约的规定,遵照37C.F.R. §1.808规定的条件,在美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A. 保藏的。本文所披露的DNA序列包含在克隆到pBluescript SK(+)载体(pSK) (Stratagene Inc., La Jolla, CA) 上的6,490bp的质粒内,并且转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞中。所述含有传染性嵌合PCV1-2DNA克隆(被确定为“嵌合猪环状病毒1型(PCV1)和2型(PCV2)传染性DNA克隆”)和传染性PCV2分子DNA克隆(确定为“2型猪环状病毒传染性DNA克隆(PCV2)”)的质粒业已于2001年12月7日交由ATCC保藏,并且分别授予了ATCC专利保藏号PTA-3912和PTA-3913。应当理解的是,可以利用定点诱变和本文所披露的技术方便地构建的其他质粒也包括在本发明范围内。分离物编号为40895的生物学纯的和均匀的PCV2样品(被确定为“2型猪环状病毒(PCV2)”),也于2001年12月7日交由ATCC保藏,并且确定的ATCC专利保藏号为PTA-3914。PCV2分离物编号40895的基因组(核苷酸)序列业已交由Genbank数据库保存,并且从2000年7月23日开始可以公开获得,编号为AF264042。

[0089] 下面的实施例说明了本发明的某些方面。不过,应当理解的是,这些实施例只是用于说明目的,而不是要全面限定本发明的条件和范围。应当理解的是,在提供典型的反应条件(例如温度,反应时间等)时,可以使用规定范围以上和以下的条件,只不过一般来说,使用起来不够方便而已。这些实施例是在室温(大约23°C-大约28°C)和大气压下进行的。本文所提到的所有份数和百分比,都是以重量为基础的,并且所有温度都是以°C形式表示的,除非另有规定。

[0090] 通过下面的非限定性实施例可以获得对本发明的进一步理解。

[0091] 实施例

[0092] 实施例1

[0093] 制备无PCV1污染的PK-15细胞系

[0094] PCV2分离物的来源,是来自患有天然存在的PMWS的猪的脾组织样品(PCV2系列鉴定号40895,被称为“分离物40895”) (M.Fenaux等,2000,同上)。用PCV2-特异性抗体进行的免疫组织化学染色(IHC),证实了PCV2抗原在所述组织中的存在。将所述脾组织放在-80°C下保存待用。

[0095] 从美国典型培养物保藏中心购买的PK-15细胞系(ATCC保藏号CCL-33),用PCV1进行持续感染(G.C.Dulac和A.Afshar,1989,同上)。由于只有PK-15细胞的一个亚群是持续感染的(id.),通过终点稀释制备了无PCV1污染的PK-15细胞系。方案是按以下方式进行的:在补充了10%胎牛血清(FBS)和1×抗生素(Life Technologies, Inc.)的含有Earle's盐和L-谷氨酰胺(Life Technologies, Inc., Grand Island, NY)的MEM中生长PK-15细胞。将铺满的细胞单层胰蛋白酶化,然后对细胞进行计数,并且进行系列稀释,使终点浓度为每0.2ml一个细胞。将所述终点稀释液铺平板到96孔平板上,并且让它从一个单细胞开始生长成单层。

利用能检测和分辨PCV1和PCV2的PCR-RFLP测定方法,检测来自每一个孔的细胞中PCV1DNA的存在(M.Fenaux等,2000,同上)。随后将通过PCR-RFLP测定检测成阴性的来自所述孔的PK-15细胞用于扩增。将无PCV1的PK-15的细胞系再继代培养5代,并且在每一个世代,通过PCR发现PCV1DNA是阴性的。

[0096] 通过对来自ATCC的持续感染的PK-15细胞进行终点稀释,生产PCV1污染为阴性的四种细胞系。在经过5次额外传代之后,通过PCR证实所述细胞系保持PCV1阴性。随后对所述细胞系之一进行扩增,并且证实在用PCV2分子DNA克隆转染(图2)和用PCV2病毒感染所述细胞时,能够支持PCV2复制。将所述克隆细胞进一步用于PCV2分子DNA克隆的体外转染,以便制备生物学纯的PCV2传染性病毒原种,用于动物接种实验。

[0097] 实施例2

[0098] PCV2传染性DNA克隆的构建

[0099] 为了构建PCV2分子DNA克隆,根据PCV2分离物40895的公开序列设计了一对PCR引物(M.Fenaux等,2000,同上):正向引物F-PCVSAC2(5'-GAACCGCGGCTGGCTGAACCTTGAAAGT-3'),如SEQ ID NO:5所示;和反向引物R-PCVSAC2(5'-GCACCGCGAAATTCTGACAAACGTTACA-3'),如SEQ ID NO:6所示。该引物对能扩增PCV2的完整基因组,它具有一个包括独特的SacII限制酶位点的重叠区(图1)。用QIAamp DNA微量制备试剂盒(Qiagen, Inc., Valencia, CA),从患有天然存在的PMWS的猪的脾组织样品(分离物40895)中提取DNA(M.Fenaux等,2000,同上)。用AmpliTaq Gold聚合酶(Perkin-Elmer, Norwalk, CT),通过PCR扩增提取的DNA。所述PCR反应包括在95°C下进行了9分钟的最初的酶激活步骤,随后进行35轮在94°C下变性1分钟,在48°C下退火1分钟,在72°C下延伸3分钟,并且在72°C下最终延伸7分钟。通过凝胶电泳分离具有预期大小的PCR产物,并且用Geneclean试剂盒(Bio 101, Inc., La Jolla, CA)通过glassmilk方法纯化。

[0100] 为了构建含有PCV2基因组的串联二聚体的分子DNA克隆,首先,将包括完整PCV2基因组的PCR产物连接到advanTAge质粒载体上(Clontech, Palo Alto, CA)。转化大肠杆菌DH5感受态细胞。通过限制酶消化证实重组质粒。通过用SacI I限制酶消化,将完整长度的PCV2基因组DNA从advanTAge载体上切除。在37°C下用T4DNA连接酶连接消化过的PCV2基因组DNA仅仅10分钟,这有利于串联二聚体的产生。随后将所述串联二聚体克隆到pBluescript SK (+)载体(pSK)上(Stratagene Inc., La Jolla, CA)(图1)。通过PCR,限制酶消化,和DNA测序,证实包括PCV2基因组的串联二聚体(本文称之为PCV2分子DNA克隆)的重组质粒。通过分光光度法测定重组质粒的DNA浓度。

[0101] 具体地讲,通过PCR扩增PCV2(分离物40895)的完整基因组,以便构建传染性PCV2分子DNA克隆。将两个拷贝的完整PCV2基因组以串联形式连接到pSK载体上,以便产生PCV2分子DNA克隆(图1)。通过PK-15细胞的体外转染,确定PCV2分子DNA克隆的传染力。用PCV2-特异性抗体进行的IFA证实了所述分子DNA克隆在体外是具有传染性的,并且,大约10-15%的PK-15细胞被转染过。通过IFA在转染过的细胞的细胞核中观察到了PCV2-特异性抗原,并且,在较低程度上在细胞质中观察到了所述抗原(图2)。用空的pSK载体模拟转染的细胞,保持PCV2抗原阴性。

[0102] 实施例3

[0103] 用PCV2分子DNA克隆进行体外转染,

[0104] 并且制备生物学纯的和均匀PCV2转染性病毒原种

[0105] 为了测试所述分子DNA克隆的体外传染性,让没有PCV1污染的PK-15细胞在8孔LabTek腔室载玻片上生长。当PK-15细胞达到大约85%的铺满度时,使用脂转染胺Plus试剂,按照生长商提供的方法(Life Technologies, Inc),用所述分子DNA克隆转染细胞。用空的pSK载体模拟转染的细胞作为对照。转染后3天,用含有80%丙酮和20%甲醇的溶液在4℃下固定细胞20分钟,进行使用PCV2-特异性兔多克隆抗血清的免疫荧光测定,以确定分子DNA克隆的体外感染力(见下文)。

[0106] 为了制备用于动物接种实验的生物学纯的和均匀的PCV2传染性病毒原种,在T-25培养烧瓶中培养无PCV1污染的PK-15细胞,并且用PCV2分子DNA克隆转染。在T-25烧瓶中,让PK-15细胞生长到大约85%的铺满度。在转染之前,用无菌PBS缓冲液洗涤所述细胞1次。对于在T-25烧瓶中进行的每一次转染反应来说,将12微克的PCV2质粒DNA与16微升的Plus试剂在0.35ml的MEM培养基中混合。将用空的pSK载体模拟转染细胞的烧瓶用作阴性对照。在室温下培养15分钟之后,将稀释在0.35ml MEM培养基中的50微升的脂转染胺试剂添加到该混合物中,并且在室温下再培养15分钟。然后将该转染混合物添加到含有2.5毫升新的MEM的PK-15细胞的T-25烧瓶中。在37℃下培养3小时之后,用含有2%FBS和1×抗生素的新的MEM培养基更换所述培养基。在转染3天之后收获转染过的细胞,并且在-80℃下保存待用。通过IFA测定所述病毒原种的传染效价(参见下文)。

[0107] 一般来说,通过用PCV2分子DNA克隆转染PK-15细胞制备生物学纯的和均匀的PCV2传染性病毒原种。通过体外转染生产的PCV2毒粒是传染性的,因为转染过的细胞裂解液能成功地用于感染PK-15细胞。因此,PCV2分子DNA克隆在用于体外转染时能够生产传染性PCV2毒粒。测定用转染细胞制备的均匀的PCV2病毒原种的传染效价为 $1 \times 10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml。将该病毒原种用于接种第二组猪。用空的pSK载体模拟转染的细胞裂解液不能感染PK-15细胞。

[0108] 实施例4

[0109] 通过免疫荧光分析(IFA)进行的病毒滴定

[0110] 为了测定均匀PCV2病毒原种的传染效价,将PK-15细胞放在8孔LabTek腔室载玻片上培养。用MEM将所述病毒原种系列稀释10倍,并且将每一种稀释液接种到生长在LabTek腔室载玻片上的PK-15细胞单层的10个孔上。将未接种过的细胞的孔作对照。在接种之后第3天,用含有80%丙酮和20%甲醇的溶液,在4℃下将感染过的细胞固定20分钟。在用PBS缓冲液洗涤所述细胞之后,用以1:1000倍稀释的PCV2-特异性兔单克隆抗体在37℃下培养感染过的细胞1小时(S.D. Sorden等,“用于检测福尔马林固定的,石蜡包埋的组织中2型猪环状病毒的多克隆抗体型免疫组织化学方法的开发”,J.Vet.Diagn.Invest.11:528-530(1999))。然后用PBS缓冲液洗涤所述细胞3次,并且用二级FITC-标记的山羊抗兔IgG在37℃下培养5分钟(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Gaithersburg, MD)。在用PBS缓冲液洗涤所述载玻片3次之后,用fluoromount-G封固所述载玻片,加盖盖玻片,并且在荧光显微镜下检查。计算每毫升50%组织培养物感染剂量(TCID<sub>50</sub>/ml)。首先,用包括单拷贝PCV2基因组的质粒构建体转染细胞,不过,来自单基因组构建体的传染性PCV2效价要比含有串联基因组的构建体的传染效价低的多。因此,将含有二聚体形式的PCV2基因组的质粒构建体用于体外和体内转染实验。

[0111] 实施例5

[0112] 用PCV2分子DNA克隆体外转染猪,以及用均匀的PCV2传染性病毒原种实验性接种猪。

[0113] 将4周龄的40头无特定病原体(SPF)猪随机安排到4个房间,每个房间10只。在接种之前,检测SPF猪的PCV,PRRSV,PPV的抗体,以及猪戊型肝炎病毒。第一组的猪不进行接种,并且被用作阴性对照。第二组的猪分别通过鼻内接种大约 $1.9 \times 10^5$ TCID<sub>50</sub>的衍生自PCV2分子DNA克隆的PCV2传染性病毒源种。第三组的猪在肝脏内直接注射PCV2分子克隆的重组质粒DNA。每一头猪一共注射200微克的重组质粒DNA(克隆的PCV2质粒DNA)。通过超声波导向技术,注射到肝脏的6个不同部位,第四组的猪分别用总共200微克重组PCV2质粒DNA直接注射到表浅回肠淋巴结中,并且每一个淋巴结接受2次独立的注射。每天监测所述动物的疾病的临床体征。在注射后(DPI)第0,7,14,21,28,35天,从每一只动物体内采集血清样品。在21DPI,从每一组中随机挑选5头猪,并且进行尸体剖检。每个小组的其余5只动物在35DPI进行尸体剖检。在尸体剖检期间收集各种组织和器官,并且处理以便进行组织学检查和免疫组织化学染色(参见下文)。

[0114] 结果如下面的表1所示。在第0DPI,来自第2,3和4组的所有接种过的猪都是PCV2抗体阴性的。在第0DPI,来自未接种过的对照第1组的两头猪具有可检测的PCV2母体抗体。这两头小猪崽体内的母体抗体到第7DPI消失。在10头未接种过的对照猪的任何一头体内都没有检测到向PCV2抗体的血清转变。在通过鼻内接种PCV2传染性病毒的第2组猪中,有一头小猪崽在第21DPI发生了向PCV2抗体的血清转变。到第35DPI,第2组猪中其余5头猪中的4头发生了血清转变。来自第3和第4组的转染动物的血清转变最早出现在第28DPI。到第35DPI,来自第3组的其余5头猪中的5头,以及来自第4组的其余5头猪中3头发生了向PCV2抗体的血清转变。

[0115] 在第3和21DPI检测到了所有猪的PPV抗体,并且在35DPI检测了其余猪的PPV抗体。在SPF小猪崽体内检测到针对普遍存在的猪致病剂PPV的母体抗体。在除了一头猪崽的所有猪崽体内的PPV HI抗体效价,从第3DPI(平均效价为1:2,665)-21DPI(平均效价为1:246)期间显著减弱,这表明了在这些猪崽体内检测到的抗体是被动衍生的。一头小猪崽的PPV HI效价从第3DPI的1:32略微提高到第21DPI的1:64,这可能是由于测试的变异造成的。用公开的PCR分析方法,对在第0,21和35DPI从所有猪体内采集的血清样品的PPVDNA作进一步的测定(J.M.Soucie等,“在患有血友病接受Hyate人群中进行的猪细小病毒研究:C猪因子VIII浓缩物”,Transfusion 40:708-711(2000))。在任何DPI,从任何猪体内都没有检测到PPV病毒感染,这进一步表明了所述猪不受PPV的感染。

[0116] 表1.在接种了PCV2活的病毒或直接注射克隆的PCV2质粒DNA的猪体内向PCV2特异性抗体的血清转变

[0117]

组别	接种物	途径	接种后天数						
			0	7	14	21	28	35	
1	无		2/10 <sup>a</sup>	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	
2	PCV2活病毒 <sup>b</sup>	鼻内		0/10	0/10	0/10	1/10	1/5	4/5
3	PCV2 DNA <sup>c</sup>	肝内		0/10	0/10	0/10	0/10	1/5	5/5
4	PCV2 DNA <sup>c</sup>	淋巴内		0/10	0/10	0/10	0/10	1/5	3/5

[0118] <sup>a</sup>PCV2抗体是通过ELISA测定的,阳性数量/测试数量。

[0119] <sup>b</sup>通过用PCV2分子DNA克隆转染PK-15细胞制备的生物学纯的和均匀的PCV2病毒原种。

[0120] <sup>c</sup>克隆在pSK质粒上的PCV2基因组DNA。

[0121] 实施例6

[0122] PCR-RFLP分析

[0123] 为了测定用PCV2分子DNA克隆转染的猪和用PCV2传染性病毒原种感染的猪体内的PCV2病毒血症,通过以前披露的PCR-RFLP分析的一般方法,检测了在不同的DPIs采集的血清样品中PCV2DNA的存在(M.Fenaux等,2000,同上)。使用**DNAzol®**试剂,按照生产商提供的方法(Molecular Research Center,Cincinnati,OH)从每一种血清样品的50微升样品中提取病毒DNA。将提取的DNA重新悬浮在不含DNase-,RNase-,和蛋白酶的水中,并且通过RCD-RFLP检测PCV2DNA(id.)。对来自选定动物的PCR产物进行测序,以便确定感染猪的病毒的起源。

[0124] 在第0,7,14,21,28,和35DPIs,从所有对照和接种过的动物体内采集血清样品,并且通过检测PCV2DNA分析PCV2病毒血症(id.)。结果如下面的表2所示。在任何DPI,在第1组未接种过的对照猪体内都没有检测到PCV2DNA。在第14DPI从来自第2组的10头猪的7头中检测到了病毒血症,并且在第35DPI,从10头猪的8头中检测到了病毒血症。病毒血症只持续了几周时间,因为在第28DPI和35DPI,在来自第2组的所有其余5头猪中都没有检测到PCV2DNA。在肝内注射PCV2分子DNA克隆的第3组猪中,在第14DPI,10头猪中有8头是具有病毒血症的,而到第35DPI,10头猪中有9头具有可检测的病毒血症。第4组的猪用PCV2分子DNA克隆注射到淋巴结中。在第14DPI,在第4组中的10头猪中有2头,以及在第21DPI,10头猪中有8头是具有病毒血症的。以上结果表明,当PCV2分子DNA克隆被直接注射到SPF猪的肝脏和表浅回肠淋巴结中之后,是有传染性的。对来自选定动物的扩增PCR产物进行测序。来自选

定动物的扩增的PCR产物的序列与所述PCV2分子DNA克隆的相应部位相同。

[0125] 表2.通过PCR检测接种过的和对照猪的血清的病毒血症(PCV2DNA)

[0126]

组别	接种物	途径	接种后天数						总计
			0	7	14	21	28	35	
1	无		0/10 <sup>a</sup>	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	0/10
2	PCV2活病毒 <sup>b</sup>	鼻内	0/10	0/10	7/10	5/10	0/5	0/5	8/10
3	PCV2 DNA <sup>c</sup>	肝内	0/10	0/10	8/10	6/10	3/5	3/5	9/10
4	PCV2 DNA <sup>c</sup>	淋巴内	0/10	0/10	2/10	8/10	2/5	0/5	8/10

[0127] <sup>a</sup>每组10头猪,阳性数量/测试数量。

[0128] <sup>b</sup>通过用PCV2分子DNA克隆转染PK-15细胞制备的生物学纯的和均匀的PCV2病毒原种。

[0129] <sup>c</sup>克隆在pSK质粒上的PCV2基因组DNA。

[0130] 实施例7

[0131] 临床评估

[0132] 在第0DPI和在尸体剖检时对猪进行称重。从第0到第35DPI,每隔1天记录直肠温度和从0到6的临床呼吸疾病评分(0=正常,6=严重)(P.G.Halbur等,“两种美国猪生殖和呼吸综合征病毒分离物与Lelystad病毒的致病性的比较,Vet.Pathol.32:648-660(1995)”。临床观察包括中枢神经系统疾病,肝脏肝脏疾病(黄疸),肌肉骨骼疾病的表现,并且还要每天记录身体状态的变化。

[0133] 为了评估总体病理学和组织病理学,在21和35DPI从每一组中随机挑选5头猪进行尸体剖检。在进行尸体剖检时,尸体剖检小组不了解这些猪的感染状态。对所有的猪进行全面尸体剖检。根据前面所披露的评分系统(id.),记录每一头猪的具有肉眼可见的肺炎的肺的估计百分比。该评分系统是以每一个肺叶占整个肺的大致体积为基础的:右前叶,右中叶,左前叶的前部,和左前叶的尾部各自占总肺体积的10%,附属叶占5%,而右侧和左侧尾叶各自占27.5%。诸如淋巴结肿大的其他病变是分别观察的。用于进行组织病理学检查的缺陷是从鼻甲,肺(七个切片)(id.),心脏,脑,淋巴结(气管支气管,回肠,肠系膜,舌下),扁桃腺,胸腺,肝脏,胆囊,脾脏,关节,小肠,结肠,乳腺和肾脏中采集的。所述组织以盲法形式检查的,并且为肺,淋巴结和肝脏病变的严重程度提供主观评分。肺的得分为0(正常)到3(严重淋巴组织细胞间质性肺炎)之间。肝脏得分为0(正常)到3(严重淋巴组织细胞性肝炎)之间。淋巴结得分是用于评估滤泡的淋巴衰竭量的,它为0(正常或无淋巴衰竭)为3(严重淋巴衰竭和滤泡的组织细胞置换)。

[0134] 血清学方法包括在达到11-12周龄时采集血液,以及在第0,7,14,21,28,和35DPIs,从所有的猪体内采集血液。用Herd Check PRRSVELISA分析PRSSV的血清抗体(IDEXX Laboratories, Westbrook, MA)。通过血凝抑制(HI)分析检测PPV的血清抗体(H.S. Joo等,“用于猪细小病毒抗体的标准化血凝抑制测试”,Aust. Vet. J. 52:422-424(1976))。通过以PCV2的重组ORF2蛋白为基础的改进的间接ELISA,检测PCV2的血清抗体(P.Nawagitgul等,“用于检测PCV抗体的基于改进的间接2型猪环状病毒(PCV)和基于重组衣壳蛋白(ORF2)的ELISA”,Immunol.Clin.Diagn.Lab Immunol.1:33-40(2002))。由含有PCV2的主要衣壳ORF2蛋白的重组杆状病毒感染过的Hi Five细胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)制备部分纯化的PCV2抗原(P.Nawagitgul等,“编码主要衣壳蛋白的2型猪环状病毒的开放读框2”,J.Gen.Viro.81:2281-2287(2000))。用类似方法制备用野生型杆状病毒感染过的HiFive细胞的细胞裂解物,并且用作阴性对照抗原。在4°C下,用最佳浓度的阳性抗原和阴性抗原对Immuno2HB聚苯乙烯微量滴定板(Dynex Technologies Inc, Chantilly, VA)进行包被36小时。将在5%乳稀释剂(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.)中以1:100的比例稀释的100微升每一种血清样品添加到每一个孔中。重复检测4次所述血清样品:两个孔用于阴性对照抗原,两个平行的孔用于PCV2抗原。在每一个平板上包括阳性对照和阴性对照血清。在37°C下培养所述血清30分钟,然后用含有0.1%Tween-20的0.1M的PBS缓冲液洗涤5次。在37°C下,培养用过氧化物酶标记过的二级抗猪IgG(Sigma Co, St. Louis, MO)30分钟。再次洗涤所述平板,并且在37°C下与2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc)一起温育15分钟,进行显色。在405nm的波长下读出光密度(OD)。通过从含有PCV2抗原的平行的孔的读数中扣除含有阴性抗原的孔的平均OD值,计算每一种测试和对照血清中的校正过的OD。通过用阳性对照血清的OD值(P)除测试血清样品的校正过的OD值(S),将数据标准化,并且以S/P的比例形式报导。S/P比例≤0.12,0.12-0.2,和>0.2的样品,分别被认为是阴性的,不确定的和阳性的。

[0135] 根据以上临床评估的结果,对照和接种过的猪无一表现出类似于临床PMWS的明显的疾病体征。四个小组中任意两个之间,都不存在体重增加或平均直肠温度的差别。在整个实验期间,第一组的对照猪一直保持正常。从第8到第14DPI,在PCV2DNA-转染过的和PCV2病毒-感染过的组中的大部分猪中,都观察到了轻度短时间的呼吸疾病。这种疾病以各个猪的持续1到2天轻度呼吸困难(临床呼吸评为1-2),和一组猪的持续5-6天的轻度呼吸困难为特征。

[0136] 在尸体剖检时,在对照猪体内没有发现肉眼可见的病变。三个接种过的组中的猪具有局限于肺和淋巴结的肉眼可见的病变(参见下面的表3)。所述病变在PCV2质粒DNA转染过的猪和PCV2病毒感染过的组中的猪之间是类似的。在第21DPI,占肺体积的0-2%(图3),在第35DPI,占肺体积的0-13%的肺不能回缩,并且具有随机的,多病灶的,棕色到紫色固化的中度界限明显的实变。在第21和35DPI,在来自所有三个PCV2接种组的大部分猪的淋巴结比正常体积系统性扩大了2-5倍,坚硬,并且呈棕色(图3)。

[0137] 显微镜检查在除了肝脏以外的对照猪的所有组织中,都没有发现病变。10头对照猪中有8头具有非常轻的多病灶淋巴浆细胞炎症,主要位于肝脏的门脉周围区域,与在正常猪中常见的情况一样,并且被认为是正常的背景(P.G.Halbur等,2001,同上)。

[0138] 来自两个PCV2质粒DNA-转染组(肝内和淋巴内),以及PCV2病毒-感染组(鼻内)的

猪,在脑,肺,心脏,肾脏,淋巴组织(扁桃腺,淋巴结,脾脏),回肠和肝脏中具有类似的病变(参见下面的表4)。在来自三个接种组的30头猪中的23头中观察到了脑病变,并且以具有血管外周成套和神经胶质增多症的轻度至中度多病灶淋巴浆细胞脑膜脑炎为特征。在30头PCV2接种过的猪中,有28头出现了肺病变,并且以轻度至中度支气管外周淋巴浆细胞和组织细胞支气管间质性肺炎为特征(图3C)。在第21DPI,对来自第2组的PCV2病毒感染的1头猪进行尸体剖检,并且在第35DPI,对分别来自两个PCV2质粒DNA转染组的1头猪进行尸体剖检,在支气管的固有层和支气管外周区具有溃疡性和增殖性支气管炎,伴有纤维增生和肉芽肿样炎症。在30头PCV2-接种过的猪中,有18头还出现了轻度多病灶淋巴浆细胞心肌炎。在30头PCV2接种过的猪中,有14头出现了轻度至中度多病灶淋巴浆细胞间质性肾炎。没有在胸腺中发现病变。在PCV2接种过的猪中,在扁桃腺中出现轻度至中度淋巴衰竭(图4B)和滤泡的组织细胞置换的比例为8/30,在脾脏中的比例为1/30,在淋巴结中的比例为26/30。在第21DPI,通过鼻内途径接种PCV2病毒的3头猪体内观察到了具有巨大细胞的中度肉芽肿样淋巴腺炎(图4C),并且在第35DPI,在每一个PCV2质粒DNA转染组中有1头猪出现了以上症状。在第35DPI,轻度淋巴浆细胞和组织细胞小肠结肠炎在PCV2病毒感染组中的出现比例为3/5,在PCV2质粒DNA肝内转染组中的出现比例为3/5,而在PCV2质粒DNA淋巴转染组的出现比例为1/5。在每一个PCV2质粒DNA转染组中,有1头猪伴随组织细胞置换的轻度淋巴衰竭,和在Peyer's斑中的少量巨大细胞。在3个PCV2接种猪组的30头猪中的29头中观察到了轻度至中度淋巴浆细胞肝炎。在第21DPI,在每一个PCV2质粒DNA转染的组中的1头猪体内,出现了由淋巴组织细胞炎症包围的少量广泛分布的独立的坏死肝细胞。在其他组织中的病变不明显。

[0139] 按照公开的评分系统,给肺,肝脏和淋巴结的显微镜下病变评分(参见下面的表4)(P.G.Halbur等,2001,同上;P.G.Halbur等,1995,同上)。没有用于其他组织和器官的可接受的评分系统。3个PCV2接种组的猪的肺和淋巴结的病变的平均得分,在统计学上不同于第一组对照猪的得分。3个PCV2接种组的肝脏病变的平均得分在统计学上与对照猪没有差别。

[0140] 表3.对照和PCV2接种猪体内的肺和淋巴结的肉眼可见病变

[0141]

组别	接种物	途径	接种		21 DPI		35 DPI	
			淋巴节	肺	淋巴节	肺	淋巴节	肺
1	无		0/5 <sup>a</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	PCV2 活病毒 <sup>b</sup>	鼻内	5/5	1/5(0-1) <sup>c</sup>	5/5	4/5(0-5)		
3	PCV2 DNA <sup>d</sup>	肝内	2/5	2/5(0-2)	5/5	2/5(0-13)		
4	PCV2 DNA <sup>d</sup>	淋巴内	4/5	5/5(0-1)	3/5	1/5(0-9)		

[0142] <sup>a</sup>在第21DPI, 对来自每一个组的5头猪进行尸体剖检, 并且在35DPI对其余5头猪进行尸体剖检。阳性数量/检测数量。

[0143] <sup>b</sup>通过用PCV2分子DNA克隆转染PK-15细胞制备的生物学纯的和均匀的PCV2病毒原种。

[0144] <sup>c</sup>具有病变的数量/检测数量(受肉眼可见的肺炎病变影响的肺的估算百分比范围, 0-100%)

[0145] <sup>d</sup>克隆在pSK质粒上的PCV2基因组DNA。

[0146]

表 4. 组织病理学病变在对照和 PCV2 接种猪体内的分布

组别	接种物	接种途径	接种							肾	扁桃腺
			DPI <sup>a</sup>	肺 <sup>b</sup>	肝 <sup>c</sup>	LN <sup>d</sup>	脾	胸腺	回肠		
1	无		21	0/5(0.0)	4/5(0.8)	0/5(0.0)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	PCV2 病毒	鼻内	35	0/5(0.0)	4/5(0.8)	0/5(0.0)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3	PCV2 DNA	肝内	21	5/5(1.0)	5/5(1.0)	3/5(1.2)	1/5	0/5	4/5	3/5	1/5
4	PCV2 DNA	淋巴内	35	5/5(1.0)	5/5(1.0)	4/5(0.8)	3/5	0/5	5/5	4/5	1/5
			21	5/5(1.2)	5/5(1.0)	5/5(1.0)	1/5	0/5	5/5	4/5	0/5
			35	5/5(1.0)	5/5(1.2)	4/5(1.0)	2/5	0/5	3/5	4/5	3/5

[0147] <sup>a</sup>接种后的天数(DPI): 在第21DPI, 对来自每一个组的5个动物进行尸体剖检, 并且在35DPI, 对来自每个组的其余5个动物进行尸体剖检。[0148] <sup>b</sup>阳性数量/检测数量(平均组织学肺得分: 0=正常, 1=轻度间质性肺炎, 2=中度, 3=

严重)

[0149] <sup>c</sup>阳性数量/检测数量(平均组织学肝脏得分:0=正常,1=轻度肝炎,2=中度,3=严重)

[0150] <sup>d</sup>阳性数量/检测数量(平均组织学淋巴(LN)衰竭得分:0=正常,1=轻度,2=中度,3=严重)

[0151] 实施例8

[0152] 免疫组织化学

[0153] 对在第21和35DPIs进行的尸体剖检期间采集的所有组织进行PCV2-特异性抗原的免疫组织化学(IHC)检测。将兔多克隆PCV2-特异性抗血清用于IHC,并且,总体方法以前业已公开(S.D.Soden等,1999,同上)。

[0154] 为了检测PCV2抗原的组织分布,对在第21和35DPI进行尸体剖检的所有猪的脑,肺,鼻甲,心脏,肾脏,前列腺,淋巴结,脾脏,胸腺,回肠,肝脏,胆囊和胰腺进行PCV2抗原的IHC染色。来自对照组的所有组织,都是PCV2抗原阴性的。PCV2抗原在三个PCV2接种组中的组织分布是类似的(参见下面的表5)。在脑中,发现PCV2抗原主要出现在脑膜和脉络丛的单核细胞,成纤维细胞样细胞和内皮细胞中,并且在大脑和小脑的内皮细胞和血管外周单核细胞中较为少见。在肺中,PCV2抗原是在呼吸道的固有层中的肺泡和隔膜巨噬细胞以及成纤维样细胞中检测到的(图3D)。在心脏中,PCV2抗原是在广泛分布的巨噬细胞和内皮细胞中检测到的。在肾脏中,PCV2抗原是在气管上皮细胞和间质中的单核细胞中检测到的。在淋巴样组织(淋巴结,脾,前列腺和Peyer's斑)中,PCV2抗原主要是在巨噬细胞和树突样细胞以及滤泡中的巨大细胞中检测到的(图4D)。还在小肠的固有层的巨噬细胞内检测到了PCV2抗原。在肝脏中,PCV2抗原是在单核细胞和Kupffer细胞中检测到的。在鼻甲,胸腺或胆囊中没有检测到PCV2抗原。

[0155]

表 5. 通过免疫组织化学在对照和 PCV2 接种过的猪中检测 PCV2-特异性抗原的分布

组别	接种物	接种途径	DPI <sup>a</sup>	接种									
				肺	肝	LN	脾	胸腺	回肠	脑	心脏	肾	扁桃腺
1	无		21	0/5 <sup>b</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	PCV2 病毒	鼻内	35	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3	PCV2 DNA	肝内	21	4/5	5/5	5/5	3/5	0/5	3/5	3/5	1/5	1/5	2/5
4	PCV2 DNA	淋巴内	35	1/5	2/5	3/5	2/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5
				35	4/5	4/5	3/5	4/5	0/5	3/5	4/5	2/5	3/5
				21	4/5	4/5	5/5	4/5	0/5	3/5	3/5	0/5	0/5
				35	3/5	4/5	5/5	4/5	0/5	2/5	3/5	1/5	0/5
												4/5	0/5

[0156] <sup>a</sup>接种后的天数(DPI) : 在第21DPI, 对来自每一个组的5个动物进行尸体剖检, 并且在35DPI, 对来自每个组的其余5个动物进行尸体剖检。

[0157] <sup>b</sup>阳性数量/检测数量。

[0158] 实施例9

[0159] 非致病性PCV1传染性DNA克隆的构建

[0160] 用于构建PCV1传染性DNA克隆的方法,基本上与本文所披露的用于构建PCV2的方法相同。根据公开的PCR1序列,设计一对PCR引物:如SEQ ID NO:7所示的KPNPCV1.U和SEQ ID NO:8所示的KPNPCV1.L(参见下面的表6)。该引物对能扩增具有包括独特的KpnI限制酶位点的重叠区的PCV1的完整基因组。PCV1病毒的DNA,是从污染过的ATCCPK-15细胞系中提取的,该细胞系是从美国典型培养物保藏中心获得的(ATCC保藏号CCL-33)。使用QIAamp DNA微量制备试剂盒(Qiagen, Inc., Valencia, CA.),从用PCV1持续感染的ATCC PK-15细胞中提取PCV1DNA。用AmpliciTaq Gold聚合酶(Perkin-Elmer, Norwalk, CT),通过PCR扩增提取的DNA。所述PCR循环包括95°C,10分钟的起始步骤,随后进行35轮循环在94°C下变性1分钟,在48°C下退火1分钟,在72°C下延伸2分钟,并且在72°C下最终延伸7分钟。通过凝胶电泳分离具有预期大小的PCR产物,并且用Geneclean试剂盒通过glassmilk方法纯化(Bio101, Inc., La Jolla, CA)。首先,将包括完整PCV1基因组的纯化的PCR产物连接到advanTAge质粒载体上(Clontech, Palo Alto, CA)。将大肠杆菌DH5α感受态细胞用于转化。通过限制酶消化证实重组质粒。通过用KpnI限制酶消化,将完整长度的PCV1基因组DNA从advanTAge载体上切除。在37°C下,用T4DNA连接酶将完整长度的PCV1基因组DNA连接到pBluescript SK (+) (pSK)载体上(Stratagene, La Jolla, CA),过夜。用Qiagen质粒微量制备试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)分离包括完整长度PCV1基因组的重组质粒,并且通过限制酶消化和DNA测序验证。通过KpnI消化,将完整长度的PCV1基因组DNA从pSK载体上切除,并且二聚化,以便按照在实施例2中制备PCV2传染性克隆的方法制备PCV1传染性DNA克隆。制备这样的串联二聚体,是因为二聚化的串联DNA克隆被证实有利于更有效地转染细胞和生产传染性毒粒。为了制备PCV1DNA的串联二聚体,在37°C下,用T4DNA连接酶连接消化过的PCV1基因组DNA仅10分钟时间,这有利于串联二聚体的产生。然后,将所述串联二聚体克隆到pBluescript SK (+) (pSK)载体上(Stratagene, La Jolla, CA)。通过PCR,限制酶消化,和DNA测序,证实含有PCV1基因组的串联二聚体(本文称之为“PCV1DNA克隆”)的重组质粒。通过分光光度法测定重组质粒的DNA浓度。

[0161]

表 6. 用于本发明的寡核苷酸引物

引物	方向	引物序列	应用
<b>构建引物:</b>			
KPNPCV1.U.	>	5'-TTGGTACCCGAAAGGCCATT-3' ( 相当于 SEQ ID NO:7)	PCV1 DNA 克隆构建
KPNPCV1.L.	<	5'-ATGGTACCTCCGGATTGTTCT-3' ( 相当于 SEQ ID NO:8)	PCV1 DNA 克隆构建
Hpa I-2	<	5'-GAAGTTAACCCCTAAATGAATAAAAACCATTACG-3'	PCV1-2 DNA 克隆构建
	( 相当于 SEQ ID NO:9)		
Nar I-3	>	5'-GGTGGCCTCCTGGATACGTACCTATAAAAGTG-3'	PCV1-2 DNA 克隆构建
Psi I-5	>	5'-AGGTATAAGTGGGGTCITTAAGATTAA-3'	PCV1-2 DNA 克隆构建
	( 相当于 SEQ ID NO:10)		
Acl I-6	<	5'-GAAACGTTACCGCAGAAGAACACCC-3'	PCV1-2 DNA 克隆构建
	( 相当于 SEQ ID NO:11)		
Bgl-II-ORF2	>	5'-ACTATAGATCTTAAATTCAATTAGGGGTCTTCAG-3'	PCV2-1 DNA 克隆构建
	( 相当于 SEQ ID NO:12)		
SpH-I-ORF2	<	5'-TACGGGCATGCATGACGTGGCCAAGGAGG-3'	PCV2-1 DNA 克隆构建
	( 相当于 SEQ ID NO:13)		
Bgl-II-PCV2	<	5'-AGACGAGATCTATGAATAATAAAACCATTACGAAAG-3'	PCV2-1 DNA 克隆构建
	( 相当于 SEQ ID NO:14)		
SpH-I-PCV2	>	5'-CGTAAGCATGCAGCTGAAACGAAAGTG-3'	PCV2-1 DNA 克隆构建
	( 相当于 SEQ ID NO:15)		
	( 相当于 SEQ ID NO:16)		
<b>检测引物:</b>			
MCV1	>	5'-GCTGAACCTTTGAAGTGAAGCGGG-3' ( 相当于 SEQ ID NO:17)	PCV1 和 PCV2 检测
MCV2	<	5'-TCACACAGTCTCAGTAGATCATCCCA-3' ( 相当于 SEQ ID NO:18)	PCV1 和 PCV2 检测
Orf.PCV1	<	5'-CCAACTTGTAACCCCCCTCCA-3' ( 相当于 SEQ ID NO:19)	PCV1 和 PCV2-1 检测
Gen.PCV1	>	5'-GTGGACCCACCTCTGTGCC-3' ( 相当于 SEQ ID NO:20)	PCV1 和 PCV1-2 检测
嵌套 OrfPCV1	<	5'-CCAGCTGGCTCCATTAA-3' ( 相当于 SEQ ID NO:21)	PCV1 和 PCV2-1 检测
嵌套 Gen.PCV1	>	5'-TTCCTATATAAAATTAATCTGAGTCCTT-3' ( 相当于 SEQ ID NO:22)	PCV1 和 PCV1-2 检测
Orf.PCV2	<	5'-CAGTCAGAACGCCCTCTCTG-3' ( 相当于 SEQ ID NO:23)	PCV2 和 PCV1-2 检测
Gen.PCV2	>	5'-CCTAGAAACAAGTGGGGATG-3' ( 相当于 SEQ ID NO:24)	PCV2 和 PCV2-1 检测
嵌套 Orf.PCV2	<	5'-TTGTAACAAAGGCCACAGC-3' ( 相当于 SEQ ID NO:25)	PCV2 和 PCV1-2 检测
嵌套 Gen.PCV2	>	5'-GTTGTGATCGATAATCCATTGACTG-3' ( 相当于 SEQ ID NO:26)	PCV2 和 PCV2-1 检测

a 引物方向

[0162] 实施例10

[0163] 在转染到没有病毒污染的PK-15细胞中之后

[0164] 评估PCV1DNA克隆的传染力

[0165] 通过体外转染PK-15细胞,测定PCV1分子DNA克隆的传染力。用PCV1特异性单克隆

抗体(由Gordon Allan博士馈赠,Belfast,U.K.)进行的IFA,证实了PCV1分子DNA克隆在PK-15细胞细胞中是传染性的。通过I FA在转染过的细胞的细胞核中观察到了PCV1-特异性抗原,并且在较低程度上在细胞质中观察到了所述抗原。用空的pSK载体模拟转染的细胞保持PCV1抗原阴性。

[0166] 实施例11

[0167] 嵌合PCV1-2病毒DNA克隆的构建

[0168] 通过使用PCV1和PCV2的传染性DNA,构建了非致病性PCV1和与PMWS相关的PCV2之间的嵌合病毒。为了构建嵌合PCV1-2DNA克隆,将非致病性PCV1的ORF2衣壳基因从PCV1传染性DNA克隆中除去,并且,将致病性PCV2的免疫原性ORF2衣壳基因置换到PCV1的基因组主链上(参见图5和6)。设计了两对PCR引物。第一对引物是用于PCV2ORF2的,将SEQ ID NO:11所示的PstI-5和SEQ ID NO:12所示的AclI-6设计成在所述引物的5'末端具有点突变,以便产生限制酶位点AclI和PstI,以便扩增PCV2的ORF2基因,并且通过点突变导入旁侧PstI和AclI限制酶位点。用于PCV2ORF2扩增的PCR反应,包括在95°C下进行9分钟的起始步骤,随后进行38轮在95°C下进行1分钟的变性,在48°C下退火1分钟,在72°C下延伸1分钟,并且在72°C下最终延伸7分钟。

[0169] 设计了用于扩增pSK+载体及其PCV1基因组插入片段的第二对PCR引物:SEQ ID NO:9所示的Hpa I-2和SEQ ID NO:10所示的Nar I-3。在所述PCR引物的5'末端导入点突变,以便产生旁侧限制酶位点NarI和HpaI。该引物对通过使用PCV1传染性DNA克隆作为PCR模板,扩增了pSK+载体以及它的缺少ORF2衣壳基因的插入PCV1的基因组DNA,即缺少PCV1ORF2的PCV1基因组(pSK-PCV1 Δ ORF2)。所述PCR反应包括在95°C下进行9分钟的起始步骤,然后进行38轮在95°C下变性1分钟,在50°C下退火1分钟,在72°C下延伸3.5分钟,和在72°C下最终延伸7分钟。用AclI和PstI消化PCV2ORF2PCR产物,以便消除所导入的点突变。用NarI和HpaI消化pSK-PCV1 Δ ORF2产物(缺少PCV1的ORF2基因的pSK载体-PCV1基因组PCR产物),以便除去PCR导入的点突变。后一种消化产生了互补于通过AclI和PstI限制酶消化产生的PCV2ORF2PCR产物的粘端和平端。用T4DNA连接酶连接消化过的PCV2ORF2产物和ORF2-缺失的pSK-PCV1产物,以便形成嵌合PCV1-2基因组DNA克隆,其中,PCV1的ORF2基因被PCV2的ORF2基因所取代。一旦消化并且重新连接了这两种PCR产物,在所得到的嵌合克隆中除去了所有通过PCR导入的用于促进克隆的点突变。转化大肠杆菌DH5α感受态细胞。分离含有嵌合DNA克隆的重组质粒,并且通过PCR,限制酶消化和部分DNA测序加以证实。通过KpnI消化将完整长度的嵌合PCV1-2基因组从pSK+载体(重组载体)上切除。然后,通过用T4DNA连接酶进行10分钟短时间的连接反应,将嵌合DNA基因组二聚化,这有利于线性二聚体的形成,以便生产PCV1-2嵌合传染性DNA克隆(图6)。通过PCR,限制酶消化和DNA测序,证实含有两个拷贝的所述嵌合病毒基因组的重组质粒。

[0170] 实施例12

[0171] PCV1-2嵌合DNA克隆的体外传染性的评估

[0172] 在PK-15细胞中检测嵌合PCV DNA克隆(具有PCV2的免疫原性衣壳基因的非致病性PCV1)的存活力。在用嵌合病毒DNA克隆转染PK-15细胞时,在转染之后大约2天,通过I FA检测到PCV2ORF2衣壳特异的病毒抗原。所述PCV1衣壳抗原在转染过的细胞中检测不到。该实验证实了在体外具有传染性的所述嵌合DNA克隆能在PK-15细胞中复制,并且产生PCV2的免

疫原性衣壳蛋白。

[0173] 实施例13

[0174] 交互嵌合PCV2-1DNA克隆的构建

[0175] 为了构建交互嵌合PCV2-1DNA克隆,致病性PCV2的基因组主链上的PCV2的ORF2衣壳基因被非致病性PCV1所取代(图6)。设计了两个PCR引物对:SEQ ID NO:13所示的Bg1-II-ORF2和SEQ ID NO:14所示的SpH-I-ORF2能扩增PCV1ORF2基因,并且通过点突变导入旁侧Bg1III和SpHI限制酶位点。第二个PCR引物对,SEQ ID NO:15所示的Bg1-II-PCV2和SEQ ID NO:16所示的SpH-I-PCV2能扩增pSK载体,和去掉了ORF2基因的PCV2基因组(pSK-PCV2 Δ ORF2),用PCV2传染性DNA克隆作为PCR的模板,并且通过点突变导入旁侧限制酶位点Bg1II和SpHI。用Bg 1II和SPAHI限制酶消化pSK-PCV2 Δ ORF2产物和PCV1ORF2PCR产物,以便产生连接在一起的互补的粘端和平端。在转化到大肠杆菌细胞中之后,通过酶消化和部分DNA测序,分离并且证实真实的重组质粒。通过SacII消化将完整长度的交互嵌合PCV2-1基因组从重组质粒上切除,并且按本文所述方法二聚化,以便生产交互嵌合PCV2-1传染性克隆。

[0176] 实施例14

[0177] 用PCV1,PCV2,PCV1-2和PCV2-1DNA克隆

[0178] 对PK-15细胞进行体外转染

[0179] 业已在上面的实施例3-5中证实了PCV2克隆的体外和体内传染性。为了检测PCV1和两种嵌合克隆的体外传染力,让通过实施例1所述方法制备的没有PCV1污染的PK-15细胞在8孔LabTek腔室载玻片(Nalge Nunc Int., Denmark)上生长。当PK-15细胞达到大约80%的铺满度时,分别用PCV1,PCV2,PCV1-2和PCV2-1DNA克隆转染所述细胞,按照生产商所提供的方法,使用脂转染胺Plus试剂进行转染(Life Technologies, Inc.)。将用空的pSK载体模拟转染的细胞用作对照。转染3天之后,在4℃下,用含有80%丙酮和20%甲醇的溶液固定所述细胞20分钟。通过间接免疫荧光测定(I FA),使用由G.M.Allan博士馈赠的抗PCV1ORF2衣壳基因的单克隆抗体,证实用PCV1和PCV2-1DNA克隆转染过的细胞中传染力和病毒复制的证据(G. M. Allan等,“猪环状病毒单克隆抗体的生产,初步表征和应用”,Vet. Immunol. Immunopathol. 43:357-371(1994))。用磷酸缓冲的盐溶液(PBS)洗涤固定的细胞,并且在37℃下与1:20稀释的PCV1单克隆抗体培养1小时。然后用PBS缓冲液洗涤所述细胞3次,并且在37℃下与荧光素异硫氰酸酯(FITC)标记过的山羊抗小鼠免疫球蛋白G(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.)一起温育45分钟。用PBS缓冲液洗涤3次,然后用fluoromount-G封固所述载玻片,并且在荧光显微镜下检查。按在前面的实施例4中所述方法,使用对PCV2特异的抗体,通过I FA证实用PCV2和嵌合PCV1-2DNA克隆转染过的细胞的传染力。

[0180] PCV1,嵌合PCV1-2DNA和交互嵌合PCV2-1DNA克隆的传染力,是通过体外转染PK-15细胞证实的。将两个相同拷贝的完整PCV1基因组以串联形式连接到pSK载体上,以便产生PCV1DNA克隆(图6)。嵌合PCV1-2DNA克隆中非致病性PCV1基因组主链上的PCV1的ORF2衣壳基因被致病性PCV2的ORF2衣壳基因所取代。交互嵌合PCV1-2DNA克隆中致病性PCV2基因组主链上的PCV2的ORF2衣壳基因被非致病性PCV1的ORF2衣壳基因所取代。如果在体外具有传染性,所述嵌合PCV2-1DNA克隆将能产生PCV2的ORF2衣壳抗原,而交互嵌合PCV1-2DNA克隆,能在转染过的PK-15细胞中表达PCV1ORF2衣壳抗原。以上结果表明,PCV1,嵌合PCV1-2DNA和

交互嵌合PCV2-1DNA克隆在转染到PK-15细胞中之后,都令人吃惊地表现出是传染性的,并且表达了相应的病毒衣壳抗原蛋白,这一结果是通过使用对PCV1或PCV2特异的抗体进行IFA证实的。使用抗PCV1 ORF2的单克隆抗体和抗PCV2抗体进行的IFA,证实了PCV1 DNA和PCV1-2DNA克隆是传染性的。用PCV1ORF2-特异性单克隆抗体进行的IFA,证实了PCV1-2嵌合DNA克隆也是传染性的。大约10-20%的转染过的PK-15细胞对于PCV1衣壳抗原和PCV2抗原来说是阳性的,并且在转染细胞的细胞核内表达了PCV10RF2抗原(图7)。

[0181] 实施例15

[0182] 用PCV1、PCV2、嵌合PCV1-2和交互嵌合PCV2-1DNA

[0183] 克隆实验性接种猪

[0184] 为了评估所述嵌合DNA克隆的免疫原性和致病性,将40头4-6周龄的无特异性抗原(SPF)的猪随机安排到5个房间中,每个房间8头猪。在接种之前,检测动物的PCV,PRRSV,PPV,和猪戊型肝炎病毒抗体。另外,通过PCR检测接种前血清样品的PCV1和PCV2核酸,以便证实所述猪没有受到上述任意一种病毒的天然感染。PCV1,PCV2,PCV1-2和PCV2-1DNA克隆,都是通过将克隆的质粒DNA直接注射到猪的表浅回肠淋巴结中接种的。第一组的猪接受磷酸缓冲的盐溶液(PBS缓冲液),并且用作阴性对照。第二组猪分别用200微克传染性PCV1DNA克隆注射到表浅回肠淋巴结中。第三组猪分别注射200微克传染性PCV2DNA克隆。第四组猪分别注射200微克传染性嵌合PCV1-2DNA克隆。第五组猪分别接受200微克传染性交互嵌合PCV2-1DNA克隆。每天监测所有动物的疾病的临床体征。在接种之后第-2,7,14,21,28,35,42和49天(DPI),从每一只动物体内采集血清样品。在第21DPI,对从每一小组中随机挑选的4只动物进行尸体剖检。在第49DPI,对每个小组的其余4只动物进行尸体剖检。按照在前面的实施例7中所披露的方法,在尸体剖检期间采集各种组织和器官,并且进行处理,以便进行组织学检查。

[0185] 检查所述猪体内的PCV1,PCV2和嵌合传染性DNA克隆的免疫原性。通过PCR检测克隆特异性DNA序列,分析在第-2(0),7,14,21,28,35,42和49DPIs从所有对照和接种过的动物体内采集的血清样品的PCV1,PCV2,PCV1-2和PCV2-1病毒血症,对于抗PCV1抗体来说,通过抗IFA进行分析,而对于抗-PCV2ORF2抗体来说,通过ELISA进行分析。在-2DPI的接种之前,通过PCR检测发现,来自所有5个组的动物都是PCV1和PCV2DNA阴性的。

[0186] 在本研究中,阴性对照动物的PCV1和PCV2病毒血症都是阴性的(参见下面的表7)。在第-2DPI,未接种过的对照组中的5头猪具有可检测的PCV3母体抗体,并且在第7DPI,有两头猪具有可检测的PCV1母体抗体(参见下面的表8)。在这些小猪患体内,PCV1和PCV2的母体抗体在第21DPI消失了。在本研究中,8头未接种过的对照猪中的任意一头,都没有检测向PCV1或PCV2的血清转变。

[0187] 在PCV1接种过的组中,病毒血症最初是在第7DPI在接种过的猪体内检测到的(参见下面的表7),并且持续到第35DPI都能检测到。用PCV1传染性DNA克隆接种过的8只动物,有5只是PCV1病毒血症阳性的。PCV1病毒血症的平均持续时间为0.625周。到第21DPI,PCV1接种组的所有动物都发生了向PCV1的血清转变,并且,直到第49DPI本研究结束时,仍然保持PCV1抗体阳性。

[0188] 在本文中证实了PCV2DNA克隆在猪体内是传染性的。在PCV2DNA克隆接种组中,最初在第7DPI检测到PCV2病毒血症(参见下面的表7)。到第21DPI,所有PCV2接种的第3组动物

都是PCV2病毒血症阳性的。PCV2病毒血症的平均长度为2.12周。在第7DPI, PCV2接种组内的两头猪具有可检测水平的母体PCV2抗体(参见下面的表8), 并且这些小猪体内的母体抗体在第14DPI消失。通过PCV2-特异性ELISA分析的向PCV2的血清转变, 最初是在第35DPI检测到的。到第42DPI, 用PCV2传染性DNA克隆接种过的所有猪都发生了向PCV2的血清转变。

[0189] 在用PCV1-2嵌合传染性DNA克隆接种的第4组猪体内, 对所述嵌合病毒特异的病毒血症, 最初是在第14DPI检测到的(参见下面的表7)。在第14DPI和42DPI之间, 7头接种过的动物中有4头出现病毒血症。嵌合PCV1-2病毒血症的平均时间为1周。1头猪在第7和14DPI具有可检测水平的母体PCV2抗体, 不过, 所述母体抗体到第21DPI消失(参见下面的表8)。向PCV20RF2-特异性抗体的血清转变最初出现在第28DPI。到第49DPI, 所有用嵌合PCV1-2DNA克隆接种过的猪都发生了向PCV20RF2-特异性抗体的血清转变。

[0190] 在用交互嵌合PCV2-1克隆接种过的猪中, 在血清样品中没有检测到对PCV2-1嵌合病毒特异的病毒DNA(参见下面的表7)。不过, 在第21DPI, 第5组中的所有动物都发生了向PCV1抗体的血清转变。对从每一组中选择的猪扩增的PCR产物进行测序, 并且证实是用于每一组接种的真实的相应的传染性克隆。

[0191] 表7. 通过嵌套PCR在接种过的和对照猪的血清中检测病毒血症

[0192]

组别	接种物	DPI								总计
		-2	7	14	21	28	35	42	49	
1	PBS <sup>a</sup>	0/8 <sup>b</sup>	0/8	0/8	0/8	0/4	0/4	0/4	0/4	0/8
2	PCV1 DNA <sup>c</sup>	0/8	1/8	1/8	2/8	0/4	2/4	0/4	0/4	5/8
3	PCV2 DNA <sup>c</sup>	0/8	3/8	6/8	7/8	1/4	2/4	2/4	0/4	8/8
4	PCV1-2 DNA <sup>c</sup>	0/7	0/7	1/7	2/7	2/4	2/4	2/4	0/4	4/7
5	PCV2-1 DNA <sup>c</sup>	0/8	0/8	0/8	0/8	0/4	0/4	0/4	0/4	0/8

[0193] <sup>a</sup> 用作阴性对照的磷酸缓冲的盐溶液(PBS)

[0194] <sup>b</sup> 每一个组中8头猪; 阳性数量/检测数量

[0195] <sup>c</sup> 克隆在pSK质粒上的基因组PCV或嵌合PCV DNA

**表 8. 在用 PCV2 或嵌合 PCV1-2 DNA 克隆接种的猪体内向抗 PCV2 抗体的血清转变以及在用 PCV1 或 PCV2-1 DNA 克隆接种的猪体内向抗 PCV1 抗体的血清转变**

组别	接种物 <sup>a</sup>	检测以下抗原的抗体 <sup>b</sup>	DPI <sup>c</sup>							
			-2	7	14	21	28	35	42	49
1	PBS	PCV1	NA	2/8	2/8	1/8	0/4	0/4	0/4	0/4
		PCV2	5/8	5/8	2/8	0/8	0/4	0/4	0/4	0/4
2	PCV1 DNA	PCV1 ORF2	NA	3/8	2/8	8/8	4/4	4/4	4/4	4/4
	PCV2 DNA	PCV2 完整病毒	3/8	2/8	0/8	0/8	0/4	3/4	4/4	4/4
3	PCV1-2 DNA	PCV2 完整病毒	2/8	1/8	1/8	0/8	1/4	1/4	3/4	4/4
	PCV2-1 DNA	PCV1 ORF2	NA	3/8	3/8	8/8	3/4	3/4	4/4	4/4

<sup>a</sup> 用作阴性对照的磷酸缓冲的盐溶液( PBS )。接种物是克隆在 pSK 质粒上的克隆的基因组 PCV 或 PCV 嵌合 DNA

<sup>b</sup> 通过对 PCV1 抗原特异的间接免疫荧光分析，测定 ORF2 的 PCV1 抗体。通过酶联免疫吸附分析测定 PCV2 抗体。

<sup>c</sup> 接种后天数，阳性数量/检测数量。

[0199] 在第0DPI和在尸体剖检时对猪进行称重。从第0到第49DPI,每隔1天记录直肠温度和在0到6范围内的临床呼吸得分(0=正常;6=严重)。(P.G.Halbur等,“两种美国猪生殖和呼吸综合征病毒分离物与Lelystad病毒的致病性的比较”Vet.Pathol.32:648-660(1995))。每天还要记录临床观察结果,包括中枢神经系统疾病,肝脏疾病(黄疸),肌肉骨骼疾病的表观和身体状况的改变。由包括二个人的小组进行所有的临床评估。

[0200] 对照或接种猪中没有1头表现出明显的完整范围的临床PMWS体征。在任意组之间都不存在体重增加或平均直肠温度方面的差别。来自PCV1-2接种的第3组的1头猪,在接种一天之后死亡。在尸体剖检和临床分析之后,没有检测到致病剂,并且死亡与接种方法或嵌合PCV1-2病毒无关。

[0201] 实施例17

[0202] 大体病理学和组织病理学

[0203] 分别在第21和49DPI对来自每个小组的4头猪进行尸体剖检。在尸体剖检时,尸体剖检小组不了解所述猪的感染状况。对所有的猪进行全面尸体剖检。根据以前所披露的评分系统记录每一头猪的患有肉眼可见的肺炎的肺的估算百分比(P.G.Halbur等,1995,同上)。单独发现了诸如淋巴结肿大的其他损伤。用于组织病理学检查的切片是从鼻甲,肺(七个切片)(id.),心脏,大脑,淋巴结(气管支气管,回肠,肠系膜,舌下),扁桃腺,胸腺,肝脏,胆囊,脾脏,关节,小肠,结肠,胰腺和脾脏中采集的。以盲法方式检查所述组织,并且按实施例7所述方法对肺,淋巴结和肝脏病变的严重程度进行主观评分。肺的得分为0(正常)至3(严重淋巴组织细胞间质性肺炎),肝脏得分为0(正常)至3(严重淋巴组织细胞肝炎),淋巴结得分对于估算量的滤泡淋巴衰竭的淋巴结得分为0(正常或无淋巴衰竭)至3(严重淋巴衰竭和滤泡的组织细胞置换)。

[0204] 为了确定PCV1,PCV2,嵌合PCV1-2和交互嵌合PCV2-1传染性DNA克隆在猪体内的致病性,首先检查肉眼可见病变。结果如下面的表9所示。在第21和第49DPIs,来自未接种的第一个对照组的动物的淋巴结是正常的。第4个接种组的猪具有局限于淋巴结的可变程度的肉眼可见病变。在PCV1接种过的第2组猪中,在第21DPI,淋巴结大体上是正常的,不过,在第49DPI,检测到了淋巴结的轻度至中度肿胀和脱色。第3组的所有PCV2接种的猪都具有比正常体积大2-5倍的淋巴结,到第21和第49DPIs,所述淋巴结是坚硬的和棕色的。在第21和第49DPIs,7头来自嵌合PCV1-2接种的动物中的5只的淋巴结是轻度至中度肿胀的,并且是脱色的。在用PCV2-1克隆接种的第5组猪中,8只动物中有1只在第21DPI具有淋巴结的轻度肿胀和脱色。在第21和第49DPIs,用嵌合PCV1-2克隆接种的猪的淋巴结的肉眼可见病变的平均得分,在统计学上与第1、2和5组的猪没有差别,不过,在统计学上与用致病性PCV2接种的第3组的猪有差别。在第49DPI,来自PCV1,PCV2,和PCV1-2接种动物的平均淋巴肉眼可见病变得分彼此之间在统计学上没有差别,不过,与第1和第5组的平均肉眼可见病变得分都存在统计学上的差别。

[0205] 然后,检查了显微镜下病变。结果如下面的表10所示。在任何DPI,在未接种过的第1组对照猪或PCV1接种的第2组猪中,都没有检测到显微镜下病变。在8头PCV2接种的猪中的1头观察到了以轻度气管外周淋巴浆细胞和组织细胞支气管间质性肺炎为特征的微观肺损伤。在PCV1-2和PCV2-1接种的动物中,没有在肺中观察到显微镜下病变。在任何接种猪的胸腺中都没有观察到损伤。在PCV2接种过的组中,在8头猪中有2头出现了轻度多病灶淋巴浆

细胞心肌炎。来自PCV1-2和PCV2-1接种动物的心脏组织没有显微镜下病变。在PCV2接种小组的8头猪中有4头,在PCV1-2接种的7头猪中有2头,以及在PCV2-1接种过的8头猪中有1头出现了轻度多病灶淋巴浆细胞间质性肾炎。在PCV2接种组中,出现轻度至中度淋巴衰竭和滤泡的组织细胞置换的比例,在扁桃腺中为5/8头猪,在脾脏中为3/8头猪,在淋巴结中为8/8头猪。在嵌合7PCV1-2接种过的动物中,在7头猪中,有2头的淋巴结出现了轻度淋巴衰竭和滤泡的组织细胞置换,不过,在脾脏或扁桃腺中都没有检测到。在交互嵌合PCV2-1接种的动物的淋巴结,脾脏或扁桃腺中都没有出现淋巴衰竭或滤泡的组织细胞置换。在PCV2接种的8头猪中,有7头出现了轻度至中度淋巴浆细胞肝炎。在嵌合PCV1-2接种的7头猪中,有2头出现了轻度淋巴浆细胞肝炎。在交互嵌合PCV2-1接种的猪中,没有出现淋巴浆细胞肝炎。在其他组织中的损伤不明显。

[0206] 按照公开的评估系统对肺、肝脏和淋巴结的显微镜下病变进行评分(P.G.Halbur等,1995,同上)。结果如下面的表10所示。在第21和49DPIs,来自第4组用嵌合PCV1-2接种的猪的淋巴结中病变的平均得分,与来自第1,2和5组的猪的类似,不过,在统计学上与来自用致病性PCV2接种的第3组猪的得分不同。在第21DPI,来自嵌合PCV1-2接种组的平均微观肝脏病变得分,在统计学上与来自PCV2接种的第3组动物的得分不同,不过,在第21DPI,与来自第1,2和5组的猪的得分类似。在第49DPI,来自第4组嵌合PCV1-2接种的猪的平均微观肝脏得分,在统计学上与来自1,2,3和5组的猪的得分没有差别。没有用于其他组织或器官的可以接受的评分系统。

[0207] 表9. 对照和接种猪的淋巴结的肉眼可见病变

组别	接种物 <sup>a</sup>	DPI <sup>b</sup>	
		21	49
[0208]	1 PBS	0/4(0.0)	0/4(0.0)
	2 PCV1 DNA	0/4(0.0)	4/4(1.5)
	3 PCV2 DNA	4/4(2.5)	4/4(2.25)
	4 PCV1-2 DNA	2/3(0.66)	3/4(1.25)
	5 PCV2-1 DNA	1/4(0.25)	0/4(0.0)

[0209] <sup>a</sup> 用作阴性对照的磷酸缓冲的盐溶液(PBS)。接种物是克隆在pSK质粒上的基因组PCV或PCV嵌合DNA

[0210] <sup>b</sup> 在第21DPI对来自每一个小组的4头猪进行尸体剖检,并且,在第49DPI,对其余的猪进行尸体剖检;阳性数量/检测数量。具有损伤的数量/检测数量(估计的严重淋巴结肿大的范围)

表 10. 组织病理学病变在来自对照和接种猪的不同组织 / 器官中的分布

组别	接种物 <sup>a</sup>	DPI <sup>b</sup>	肺 <sup>c</sup>	肝 <sup>d</sup>	淋巴节 <sup>e</sup>	脾 <sup>e</sup>	胸腺	回肠	脑	心脏	肾	扁桃腺
1	PBS	21	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
2	PCV1 DNA	21	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
3	PCV2 DNA	21	0/4(0.0)	4/4(1.5)	4/4(1.75)	3/4	0/4	0/4	1/4	1/4	2/4	3/4
		49	1/4(0.25)	3/4(0.75)	4/4(1.0)	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4	2/4	2/4
4	PCV1-2 DNA	21	0/3(0.0)	1/3(0.33)	1/3(0.33)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	1/4(0.25)	1/4(0.25)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
5	PCV2-1 DNA	21	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	0/4(0.0)	1/4(0.25)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

<sup>a</sup> 用作阴性对照的磷酸缓冲的盐溶液 (PBS)。接种物是克隆在 pSK 质粒上的基因组 PCV 或 PCV 嵌合 DNA。<sup>b</sup> 在第 21 DPI 对来自每一个小组的 4 头猪进行尸体剖检，并且在第 49 DPI 对其余的猪进行尸体剖检；<sup>c</sup> 阳性数量 / 检测数量 ( 平均组织学肺得分： 0, 正常； 1, 轻度间质性肺炎； 2, 中度； 3, 严重 )。<sup>d</sup> 阳性数量 / 检测数量 ( 平均组织学肝脏得分： 0, 正常； 1, 轻度肝炎； 2, 中度； 3, 严重 )。<sup>e</sup> 阳性数量 / 检测数量 ( 平均组织学淋巴 ( 淋巴结 ) 衰竭得分： 0, 正常； 1, 轻度； 2, 中度； 3, 严重 )。

[0212] 实施例18

[0213] 血清学

[0214] 在第-2, 7, 14, 21, 28, 35, 42 和 49DIPs, 从所有猪体内采集血液。使用Herd Check PRRSV ELISA (IDEXX Laboratories, Westbrook, MA) 分析PRRSV的血清抗体。通过血凝抑制 (HI) 分析检测PPV的血清抗体 (H.S.Joo等, “用于检测猪细小病毒抗体的标准化血凝抑制”, Aust.Vet.J.52:422-424 (1976)), 通过基于上文所述PCV2的重组ORF2衣壳蛋白的改进的间

接ELISA,检测PCV2的血清抗体(也可参见P.Nawagitgul等,“基于2型猪环状病毒(PCV2)改进的直接和基于重组衣壳蛋白(ORF2)的ELISA”,Immunol.Clin.Diagn.Lab Immunol.1:33-40(2002))。通过间接免疫荧光分析(IFA)检测PCV1的血清抗体。让用PCV1感染过的PK-15细胞在8孔LabTek腔室载玻片上生长。当感染过的PK-15细胞达到95-100%铺满度时,用含有80%丙酮和20%甲醇的溶液,在4℃下固定感染过的细胞20分钟。用PBS缓冲液洗涤所述固定过的细胞1次。将以1:10的比例稀释在PBS中的100μl猪血清添加到所述腔室中,并且在37℃下培养4小时。然后用PBS洗涤所述细胞3次,并且在45℃下与FITC-标记的山羊抗-猪二级抗体一起温育45分钟。然后用PBS洗涤所述载玻片3次,用Fluoromout-G封固,加盖玻片,并且在荧光显微镜下检查。对于阳性对照来说,将PCV1感染过的细胞,与稀释过的PCV1特异性单克隆抗体(由G.M.Allan博士馈赠)一起温育,然后,与FITC-标记过的山羊抗小鼠IgG(Kirkegaard&Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD.)一起温育。对于阴性对照来说,将PCV1感染过的细胞与以1:10的比例稀释的不含PCV1和PCV2抗体的猪血清一起温育,然后与FITC-标记的山羊抗猪IgG(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD.)一起温育。

[0215] 实施例19

[0216] PCR检测

[0217] 为了检测来自接种过的猪的血清中的PCV1,PCV2,嵌合PCV1-2和交互嵌合PCV2-1病毒血症,通过PCR检测在不同的DPIs采集的血清样品。按照生产商的方法,用DNAzol试剂(Molecular Research Center,Cincinnati, OH)从100微升每一种血清样品中提取病毒DNA。将提取的DNA重新悬浮在不含DNase, RNase和蛋白酶的水中。为了扩增PCV1,PCV2,嵌合PCV1-2和嵌合交互PCV2-1的克隆特异性基因组序列,设计了两套嵌套PCR引物对(参见上面的表6)。第一套嵌套引物是根据公开的PCV1序列设计的。如SEQ ID NO:20所示的引物Gen.PCV1和如SEQ ID NO:19所示的Orf.PCV1,在存在PCV1基因组的情况下扩增了400bp的片段。所述嵌套的引物,即如SEQ ID NO:22所示的nested.Gen.PCV1和如SEQ ID NO:21所示的nested.Orf.PCV1扩增了220bp的片段。

[0218] 为了检测PCV2病毒血症,如SEQ ID NO:24所示的Gen.PCV2和如SEQ ID NO:23所示的Orf.PCV2组成的PCV2引物对,在存在PCV2的条件下,在第一轮PCR中扩增了900bp的片段。如SEQ ID NO:26所示的引物nested.Gen.PCV2和SEQ ID NO:25所示的nested.Orf.PCV2在嵌套PCR中扩增了600bp的片段。

[0219] 为了检测嵌合PCV1-2病毒血症,第一轮PCR反应采用了如SEQ ID NO:20所示的PCV1-特异性引物Gen.PCV1和如SEQ ID NO:23所示的PCV20RF2-特异性引物Orf.PCV2,以便扩增580bp的嵌合片段。为了进行嵌套PCR,将如SEQ ID NO:22所示的PCV1-特异性引物nested.Gen.PCV1和如SEQ ID NO:25所示的PCV20RF2-特异性引物nested.Orf.PCV2用于扩增370bp的嵌合片段。

[0220] 为了检测交互嵌合PCV2-1病毒血症,第一轮PCR采用了如SEQ ID NO:24所示的PCV2-特异性引物Gen.PCV2和如SEQ ID NO:19所示的PCV10RF2-特异性引物Orf.PCV1,以便扩增700bp的嵌合片段。为了进行嵌套PCR,将如SEQ ID NO:26所示的PCV2-特异性引物nested.Gen.PCV2和如SEQ ID NO:21所示的PCV10RF2-特异性引物nested.Orf.PCV1用于扩增400bp的嵌合片段。所有PCR参数基本上相同,包括38轮在94℃下变性1分钟,在45℃下退

火1分钟，并且在72°C下延伸1.5分钟。通过PCR-RFLP诊断分析，检测来自阴性对照猪的血清样品，正如以前所披露的，该分析方法能检测并且区分PCV1和PCV2 (M.Fenaux等，“来自北美洲不同地区的患有断奶后多系统衰竭综合征的猪的2型猪环状病毒(PCV-2)的遗传学表征和用于检测和区分PCV-1和PCV-2感染的示差PCR-限制片段长度多形性分析”，J.Clin.Microbiol.38:2494-503(2000))。对来自每一个组的选择的动物的PCR产物进行测序，以便验证所述感染猪的病毒的来源。

[0221] 实施例20

[0222] 免疫组织化学(IHC)

[0223] 对在第21和49DPIs从所有尸体剖检的猪体内采集的淋巴结组织进行PCV2-特异性抗原的I HC检测。按照以前所披露的通用方法，将抗PCV2的兔多克隆抗血清用于IHC (S.D.Sorden等，“用于检测福尔马林固定的，石蜡包埋的组织中的2型猪环状病毒的多克隆抗体型免疫组织化学方法的开发”，J.Vet.Diagn.Invest.11:528-530(1999))。

[0224] 根据PCV2-特异性抗原的IHC染色，来自未接种的对照，PCV1和PCV2-1接种的猪的淋巴组织的PCV2抗原呈阴性。在PCV2接种组的8只动物中，有7只动物的淋巴组织中检测了PCV2抗原。在来自嵌合PCV1-2接种组的7头猪中，有1头猪的淋巴组织中也检测到了PCV2抗原。

[0225] 在以上说明中，业已出于说明目的，而不是限定目的对本发明的具体实施方案进行了详细说明。可以理解的是，在基于本说明书的基础上本领域技术人员显而易见的所有其他改进、分枝和等同方案，都被视为包括在如权利要求书所确定的本发明范围内。

## 序 列 表

<110> Meng, Xiang-Jin  
 Fenaux, Martijn  
 Halbur, Patrick G.

<120> 嵌合传染性 DNA 克隆，嵌合猪环状病毒及其用途

<130> AM100878 PCT

<140> PCT/US 02/39646  
 <141> 2002-12-11

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
 <211> 1768  
 <212> DNA  
 <213> 猪环状病毒 (Porcine circovirus)

<400> 1

aaatttctga	caaacgttac	agggtgctgc	tctgcaacgg	tcaccagact	cccgctctcc	60
aacaaggta	tcacagcagt	agacaggta	ctccgttgtc	ctttagatcg	aggagactca	120
cattcaataa	gtaagggcc	ttctttactg	caatattctt	tattctgctg	atcagttct	180
ttggcttct	cgatatggca	gccccccccc	aaataccact	tcactttatt	aaaagtttgc	240
tttttcacaa	aattagcgaa	ccccctggagg	tgaggttttc	gtcccttcctc	attaccctcc	300
tcgccaacaa	aaaaataatac	aatatgggg	attggggat	cccgatattt	cttgcgtcg	360
tcttcggaa	gattatttcg	cgtgaacacc	cacccccc	gtgggtgggg	tccgcttctt	420
ccattttct	tgctggcat	gttgcgtctg	agggtgtcc	gaggtgtgc	cgctgcccga	480
gtgcgttgt	aatacttaca	gcccacttct	ttcgttttca	gttatgact	atccaaggag	540
gcgttaccgc	agaagaagac	accggccccc	cagccatctt	ggccagatcc	tccggcccg	600
ccccctggctc	gtccacccccc	gccaccgcta	ccgttggaga	agaaaaatg	gcatcttcaa	660
cacccgcctc	tcccgcacct	tcggatatac	tgtcaaggct	accacagtca	gaacgcctc	720
ctggggcggt	gacatgatga	attttatata	tgacgactt	gttccccgg	gaggggggac	780
caacaaaatc	tctataccct	ttgaatacta	cagaataaga	aaggtaagg	ttgaattctg	840
gccctgcctc	cccatcaccc	agggtgatag	gggagtgggc	tccactgctg	ttattctaga	900
tgataacttt	gtaacaaagg	ccacagccct	aacctatgac	ccatatgtaa	actactcctc	960
ccgcatacata	atcccccaac	ccttctccct	ccactccctg	tacttccac	ccaaacctgt	1020
tcttgactcc	accattgatt	acttccaacc	aaataacaaa	aggaatcagc	tttgatgag	1080
gctacaaacc	tctagaaatg	tggaccacgt	aggcctcggc	actgcgttc	aaaacagtt	1140
atacgaccag	gactacaata	tccgtgtac	catgtatgt	caattcagag	aatttaatct	1200
taaagacccc	ccacttaaac	cctaaatgaa	taataaaaaac	cattacaag	tgataaaaaa	1260
gactcgttaa	tttatttcat	atggaaattc	agggcatggg	ggggaaaggg	tgacgactg	1320
gcccccttcc	ccggggatt	gttctgtac	attttccaa	aataccaaga	agtaatct	1380
ccgatagaga	gttctcacag	ctggggcagc	agttgaggag	taccatcca	acggggctg	1440
attgtgttta	atcagaatac	tgcggccaa	aaaaggtaca	gttccacctt	tagtcttac	1500
agtcaatgga	tatcgatcac	acagtctcag	tagatcatcc	cacggcagcc	agccataaaa	1560
gtcatcaata	acaaccactt	tttcacatgt	gttaccatcc	caccacttgt	ttcttaggtgg	1620
tttccagtt	gtgggttccg	ggtctgaaa	attagcagcc	catttgcctt	taccacaccc	1680
agggtggccc	acaatgacgt	gtacattgtt	tttccaaatca	cgcttctgca	ttttcccgct	1740
cactttcaaa	agttcagcc	gccccgggg				1768

<210> 2

<211> 1773  
<212> DNA  
<213> 猪环状病毒

<400> 2

ggtaacctcg tggatgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtgt aatctccga	60
tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggcctgattt	120
ctggtaatca aaatactgct ggccaaaaaa ggaacagtac ccccttagt ctctacagtc	180
aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcataccaa gtaaccagcc ataaaaatca	240
tccaaaacaa caacttcttc tccatgataat ccataccacc acttatttct actaggcttc	300
cagtaggtgt ccctaggctc agcaaaaatta cggggccact ggctcttccc acaaccggc	360
gggccacta tgacgtgtac agctgttttc caatcacgt gctgcattt cccgttact	420
ttccaaagtt cagccagccc gcgaaattt ctacatacg ttacaggaaa ctgcctggct	480
acagtccacca aagacccgt ctccaaaagg gtactcacag ctagacag gtcgtgcgc	540
ttccccctgtt tccggggc tccacactcg ataagtatgt ggccttctt actgcgttat	600
tcttatttct gctgtcggt tccttcgctt ttctcgatgt ggcagcggc accaaaatac	660
cacttcaccc tttttttttt ctccatcgta gaaggattat taagggtgaa caccaccc	720
ttatggggtt gcggccgct ttcttgctt ggcattttca ctgacgtgc cgagggtct	780
ccgctccgca agtgcgtgg taatactaca gcagcgcact tctttcactt ttataggat	840
acgtatccaa ggaggcgta ccgcagaaga agacaccgc cccgcagcca tcttggccag	900
atccctccgc ggcggccctg gctcgccac cccgcacc gctaccgtt gagaaggaaa	960
aatggcatct tcaacacccg cctctccgc accttcggat atactgtca ggctaccaca	1020
gtcagaacgc ctccttggc ggtggacatg atgagattt atattgacca ctttttccc	1080
ccgggggggg ggaccaacaa aatctctata ccctttgaat actacagaat aagaaaggaa	1140
aaggttgaat tctggccctg ctccccatc acccagggtt ataggggagt gggctccact	1200
gctgttatttcc tagatgataa cttttaaca aaggccacag ccatacccta tgaccat	1260
gtaaaactact ctcctccgca tacaatcccc caacccttctt cttaccactc ccgttacttc	1320
acacccaaac ctgttcttgc ctccaccatt gattacttcc aaccaaaataa caaaaggaat	1380
cagctttggta tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtggcct cggactgcg	1440
ttcggaaaaca gtatatacga ccaggactac aatatccgtt taaccatgtt tgtacaattc	1500
agagaatttta atcttaaaga ccccccactt aaaccctaaa tgaataaaaaa taaaaccat	1560
tacatgttgc taacaaaaaa gactcagttttaatggaaatgggatggcaccagggtt	1620
gggtccactg cttaaatcg gccttcgggt acc	1680
	1740
	1773

[0002]

<210> 3  
<211> 702  
<212> DNA  
<213> 猪环状病毒

<400> 3

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttgc	60
cagatccctcc gccgcggccc ctggctcgctt caccggcc accgctaccg ttggagaagg	120
aaaaatggca ttctcaacac ccgcctctcc cgcacccctt gatatactgt caaggctacc	180
acagtccggaa cgcctccgtt ggcgggtggac atgatgagat ttaatattgtt cgacttttt	240
cccccgggg gggggaccaa caaaaatcttctt ataccctttt aataactacag aataagaaaag	300
gttaagggtt aattctggcc ctgtttttttt atcacccagg gtgtatgggg agtggctcc	360
actgtgttta ttcttagatgtt aacaaaggcca cagccctaac ctaigaccca	420
tatgttaact actccctcccg ccataacaatc ccccaaccctt tctccatcca ctcccttac	480
ttcacacccca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaaccaa taacaaaagg	540
aatcagctttt ggtatgggatcc acaaaacttcc agaaatgtgg accacgttgg cctcgccact	600
gctgtcgaaa acagttatataa cggccaggac tacaatatcc ggtttttttttaatgtacaa	660
ttcagagaat ttaatctttaa agaccccccacccctttaaaatccaa aa	720

<210> 4

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 猪环状病毒

&lt;400&gt; 4

Met	Thr	Tyr	Pro	Arg	Arg	Arg	Tyr	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Pro	Arg
1																

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	Val	Lys	Ala	Thr	Thr	Val	Arg	Thr
50						55				60					

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

Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Ile	Ser	Ile	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	Thr	Ala	Val	Ile	Leu	Asp	Asp	Asn
115						120							125		

[0003]

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	Pro	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	Met	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	Arg	Asn
180						185							190		

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

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

Asn	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro	Leu	Lys	Pro	
225								230	

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 猪环状病毒

&lt;400&gt; 5

gaaccgcggg ctggctgaac ttttcaaagt	30
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 6	
gcaccgcgga aatttctgac aaacgttaca	30
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 7	
tttggtaccc gaaggccgat t	21
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 8	
atiggtacct ccgtggattt ttct	24
<210> 9	
[0004] <211> 39	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 9	
gaagtttaacc ctaaatgaat aaaaataaaaa accattacg	39
<210> 10	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 10	
ggtggcgccct ctttgatac gtcatttat aaaagtgt	37
<210> 11	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 11	
aggttataag tgggggtct ttaagattaa	30
<210> 12	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 12	

gaaaacgtta ccgcagaaga agacacc	27
<210> 13	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 13	
actatagatc ttattcatt tagaggtct ttcag	35
<210> 14	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 14	
tacgggcattt catgacgtgg ccaaggagg	29
<210> 15	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 15	
agacgagatc tatgaataat aaaaaccatt acgaag	36
<210> 16	
[0005] <211> 31	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 16	
cgttaaggcatg cagctgaaaa cgaaagaagt g	31
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 17	
gctgaacttt tgaaagttag cggtt	24
<210> 18	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 18	
tcacacagtc tcagtagatc atccca	26
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 19	

ccaaactttgt aacccctcc a	21
<210> 20	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 20	
gtggacccac cctgtgcc	18
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 21	
ccagctgtgg ctccatttaa	20
<210> 22	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 22	
ttcccatata aaataaatta ctgagtcctt	29
<210> 23	
[0006] <211> 19	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 23	
cagtcagaac gccctcctg	19
<210> 24	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 24	
cctagaaaca agtggtgga tg	22
<210> 25	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 25	
ttgtcacaaa ggccacagc	19
<210> 26	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 猪环状病毒	
<400> 26	
[0007] gtgtgatcga tatccattga ctg	23

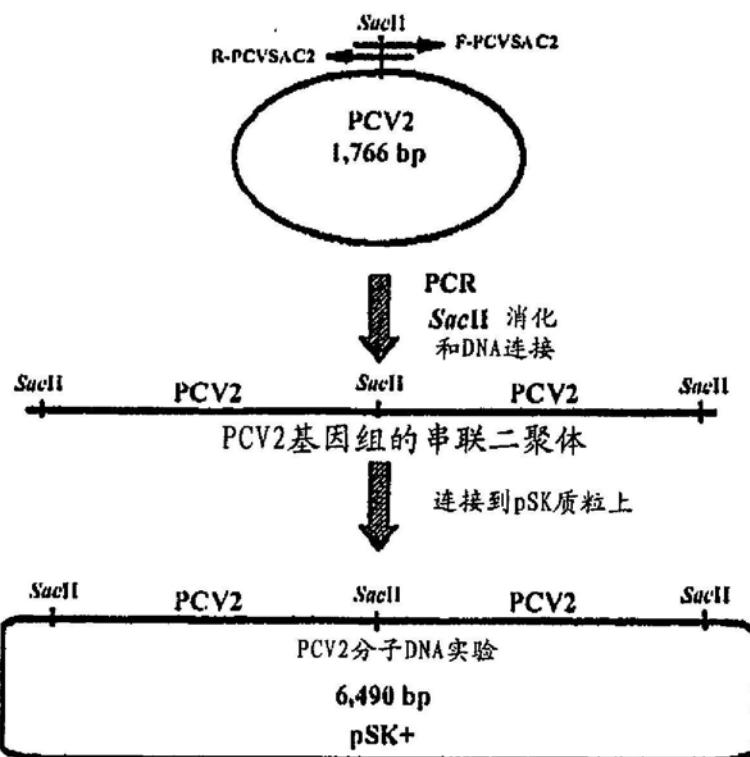


图1

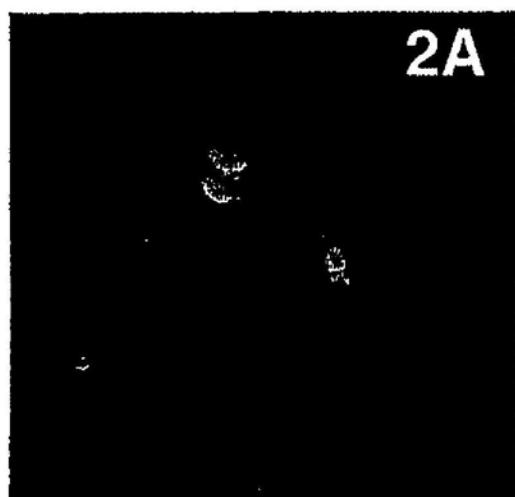


图2A

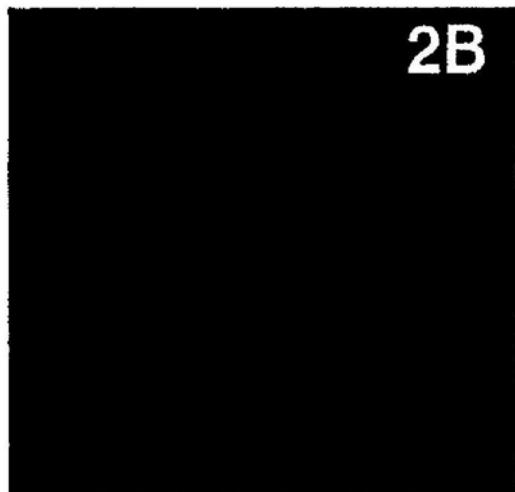
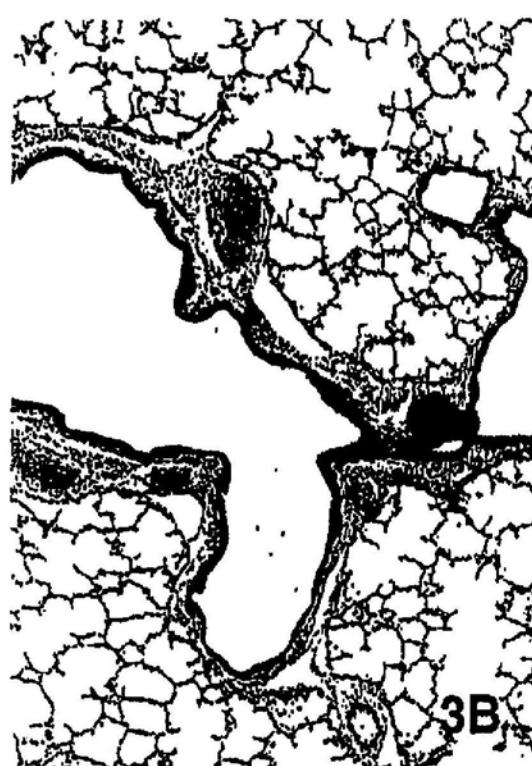


图2B



3A



3B



3C



3D

图3A-3D

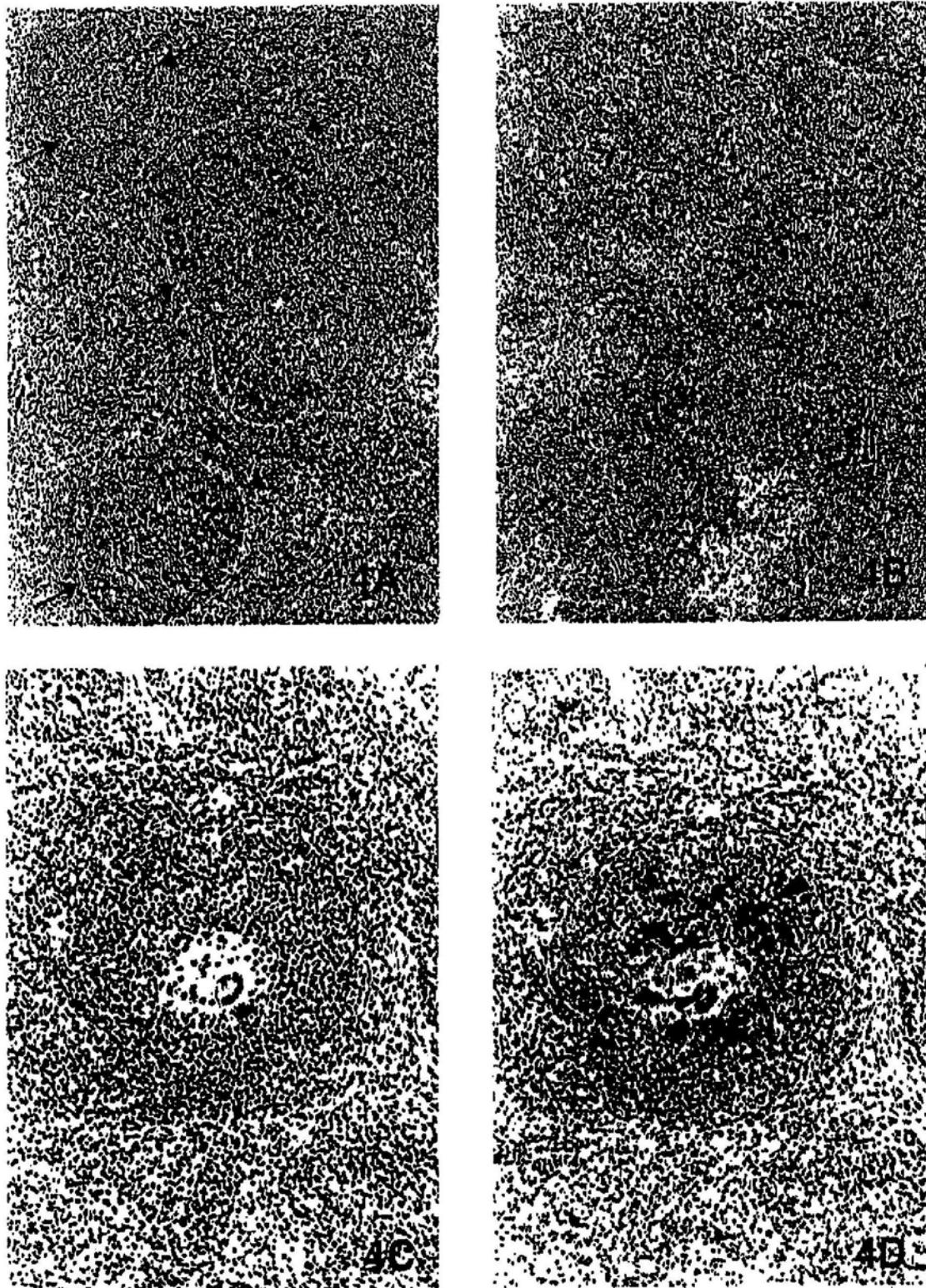


图4A-4D

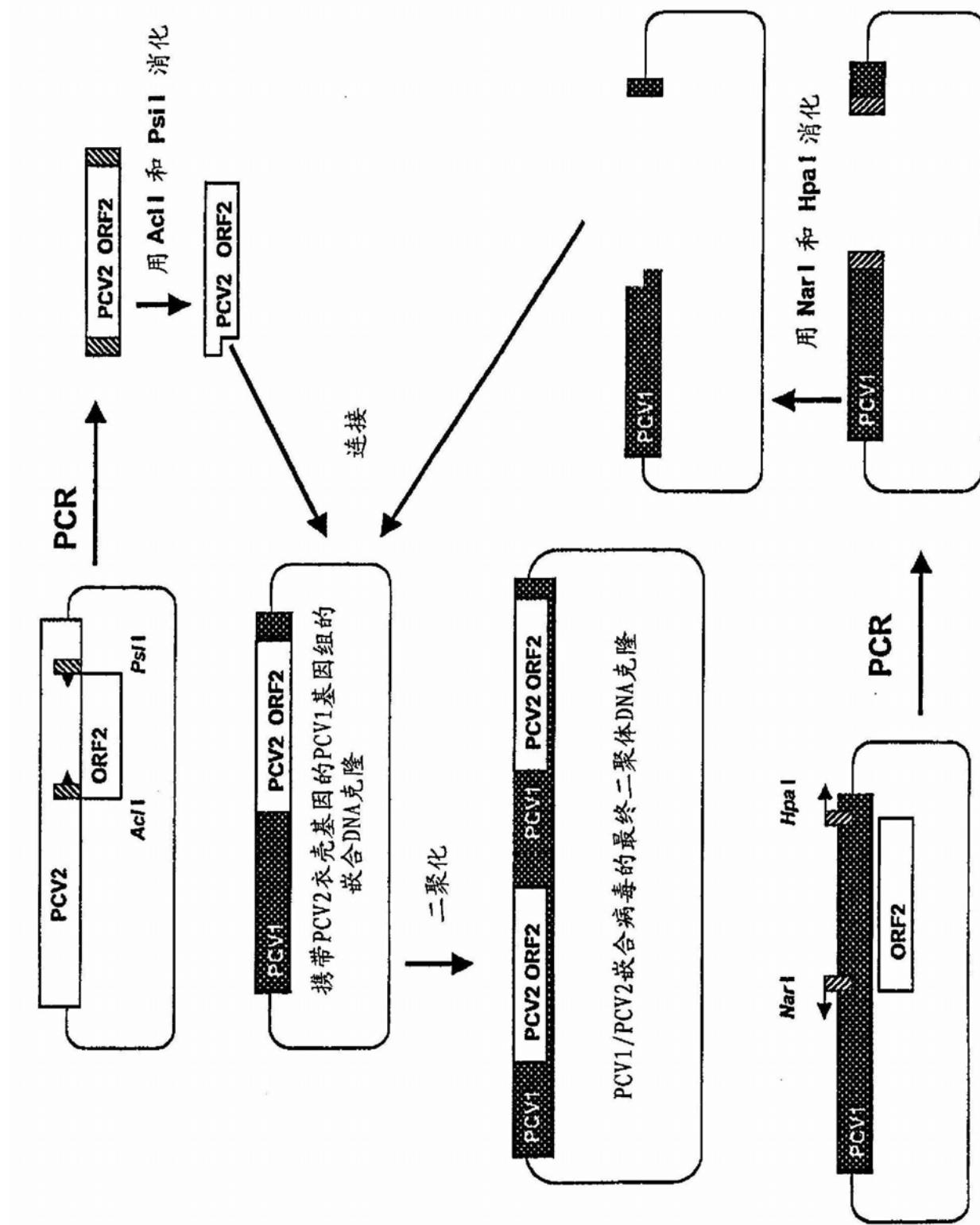


图5

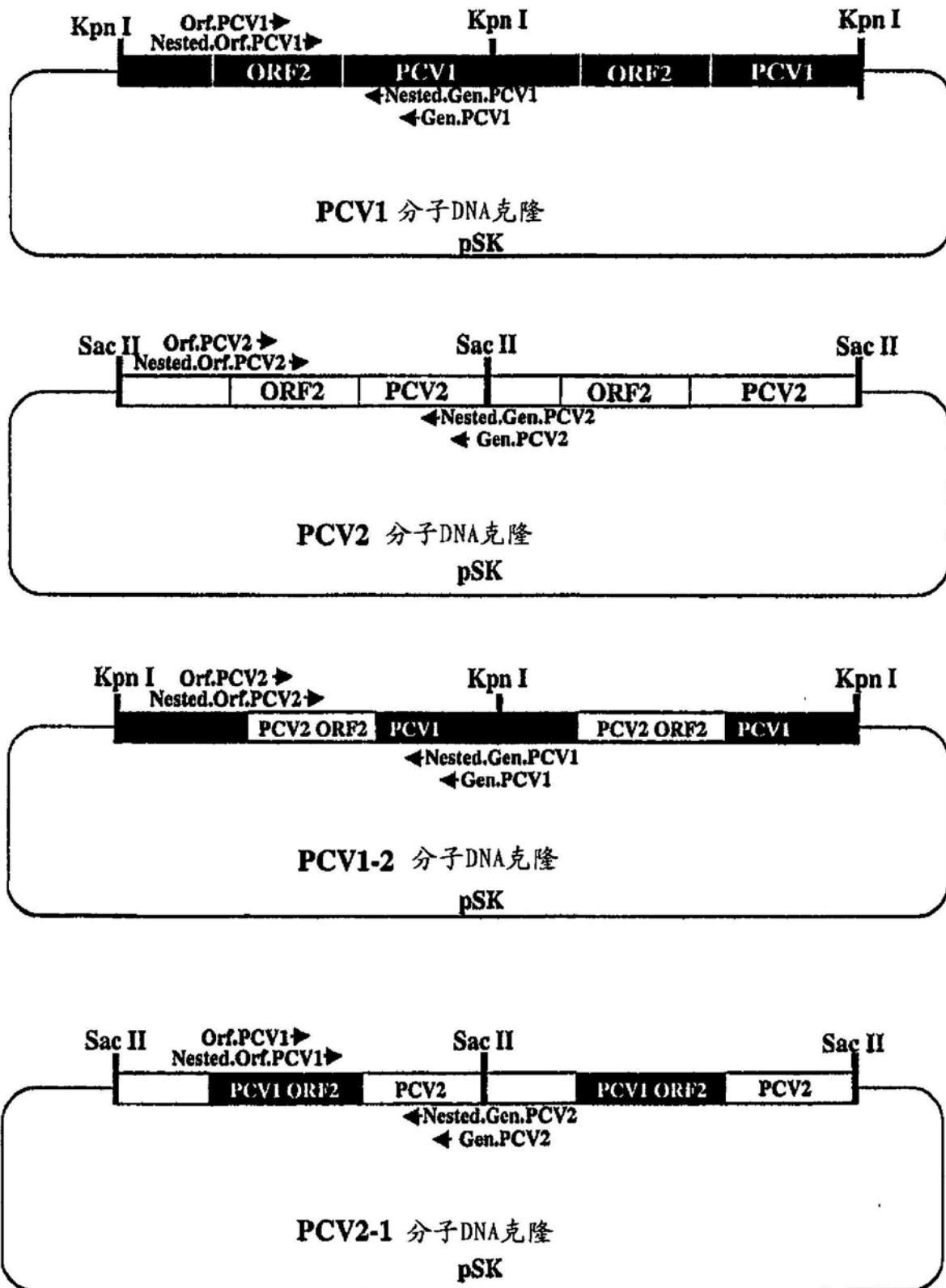


图6

具有抗-PCV1 ORF2的IFA

具有抗-PCV2的IFA

图 7A



A

图 7B



B

图 7C



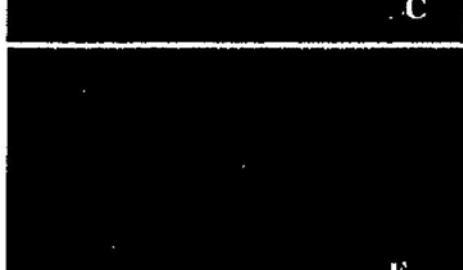
C

图 7D



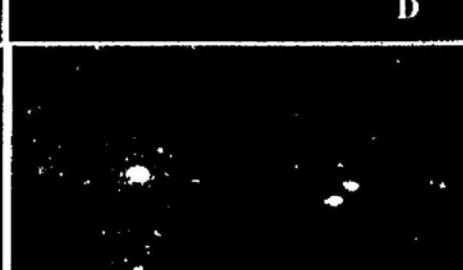
D

图 7E



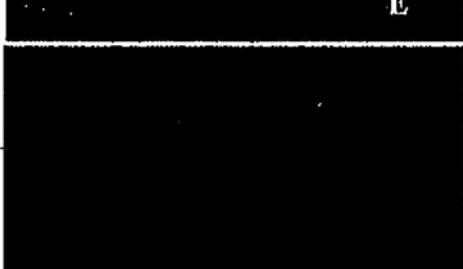
E

图 7F



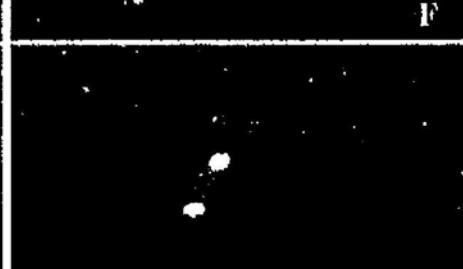
F

图 7G



G

图 7H



H

图 7I



I

图 7J



J

图7A-7J

AAATTCTGACAAACGTTACAGGGTGTGCTCTGCAACGGTCACCAGACTCCGCTCTCC  
 AACAAAGGTACTCACAGCAGTAGACAGGTCACTCCGTTGTCTTGAGATCGAGGAGCTCCA  
 CATTCAATAAGTAAGTTGCCCTCTTACTGCAATATTCTTATTCTGCTGATCAGTTCT  
 TTGGCTTCTCGATATGGCAGCGGGCACCCAAATACCACTTCACTTATTAAAAGTTGC  
 TTCTTCACAAAATTAGCGAACCCCTGGAGGTGAGGTGTTCGTCCTCCTCATTAACCTCC  
 TCGCCAACAATAAAATAATCAAATAGGGAGATTGGGAGCTCCGTATTTCTGCGCTCG  
 TCTTCGGAAGGATTATTCAAGCGTGAACACCCACCTTTATGTGGTTGGGTCCGCTTCTT  
 CCATTCTTCTTGCTGGCATGTTGCTGAGGTGCTGCCAGGGTGTGCCGCTGCCGAA  
 GTGCGCTGGTAACTTACAGCGACTTCTTCGTTTCAAGCTATGACGTATCCAAGGAG  
 GCGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTGGCCAGATCCTCCGCCGCG  
 CCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGGAAAATGGCATCTTCAA  
 CACCCGCCTCTCCCACCTCGGATATACTGTCAAGGCTACCAAGTCAGAACGCCCTC  
 CTGGCGGTGGACATGATGAGATTAAATTGACGACTTGTCCCCGGAGGGGGGAC  
 CAACAAAATCTCTATACCCCTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGTTGAATTCTG  
 GCCCTGCTCCCCATCACCCAGGGTGTAGGGGAGTGGCTCCACTGCTGTTATTCTAGA  
 TGATAACTTGTAAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCATATGAAACTACTCCTC  
 CCGCCATACAATCCCCAACCCCTCTCCTACCACTCCGTTACTTCACACCCAAACCTGT  
 TCTTGACTCCACCATTGATTACTTCAACCAAATAACAAAAGGAATCAGCTTGGATGAG  
 GCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCGACGTAGGCCCTGGCACTGCGTTCGAAAACAGTAT  
 ATACGACCAGGACTACAATATCCGTGTAAACCATGTATGTACAATTCAAGAGAATTAAATCT  
 TAAAGACCCCCACTTAAACCTAAATGAATAATAAAAACCATTACGAAGTGATAAAAAAA  
 GACTCAGTAATTATTTCATATGGAAATTCAAGGGCATGGGGGGAAAGGGTGACGAACGTG  
 GCCCCCTTCCCTCCGTGGATTGTTCTGTAGCATTCTCCAAAATACCAAGAAAGTAATCCT  
 CCGATAGAGAGCTCTACAGCTGGGACAGCAGTGAGGAGTACCTTCAACGGGGTCTG  
 ATTGCTGGTAATCAGAAATCTGCGGGCCAAAAAAGGTACAGTTCCACCTTAGTCTTAC  
 AGTCAATGGATATCGATCACACAGTCTCAGTAGATCATCCCACGGCAGCCAGCCATAAAA  
 GTCATCAATAACAACCACTTCTCACCATGGTAACCATCCCACCACTGTTCTAGGTGG  
 TTTCCAGTATGTGGTTCCGGGTCTGCAAAATTAGCAGCCCATTGCTTTACACACCC  
 AGGTGGCCCCACAATGACGTGTACATTGGTCTTCAATCACGCTTCTGCATTTCGGCT  
 CACTTCAAAAGTTCAGCCAGCCCGCGG

图8

GGTACCTCCGGATTGTTCTCCAGCAGTCTCCAAAATTGCAAAGTAGTAATCCTCCGA  
 TAGAGAGCTTCTACAGCTGGACAGCAGTGAGGAGTACCATTCCCTGGGGGCCTGATTG  
 CTGGTAATCAAATACTGCGGGCAAAAAAGGAACAGTACCCCCTTAGTCTCTACAGTC  
 AATGGATACCGGTACACAGTCTCAGTAGATCATCCAAGGTAAACCAGCCATAAAATCA  
 TCCAAAACAACAACCTCTTCTCCATGATATCCATCCCACCACTTATTCTACTAGGCTTC  
 CAGTAGGTGTCCTAGGCTCAGCAAAATTACGGGCCACTGGCTCTCCCACAACCGGGC  
 GGGCCCACTATGACGTACAGCTGTCCAAATCACGCTGCTGCATCTCCGCTCACT  
 TTCAAAAGTTCAGCCAGCCCCGGAAATTCTCACATACGTACAGGAAACTGCTCGGCT  
 ACAGTCACCAAAGACCCGTCTCCAAAAGGGTACTCACAGCAGTAGACAGGTGCGTGC  
 TTCCCCCTGGTTCCCGGGAGCTCCACACTCGATAAGTATGTGGCCTTCTTACTGCAGTAT  
 TCTTTATTCTGCTGGTGGTTCTCGTTCTCGATGTGGCAGCAGGGCACCAAAATAC  
 CACTTCACCTTGTAAAGTCTGCTTCTTAGCAAAATTGCAAACCCCTGGAGGTGAGGA  
 GTTCTACCCCTCTTCCAAACCTTCTGCCACAAACAAAATAATCAAAAAGGGAGATTGGA  
 AGCTCCCGTATTGTTCTCCCTCGGAAGGATTATTAAGGGTGAACACCCACCTC  
 TTATGGGTTGCGGGCCGCTTCTGCTGGCATTTACTGACGCTGCCAGGTGCTG  
 CCGCTGCCGAAGTGCCTGGTAATACTACAGCAGCGCACTTCTTCACTTTATAGGATG  
 ACGTATCCAAGGAGGCCTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGGCATCTGGCCAG  
 ATCCTCCGCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGGAAA  
 AATGGCATCTTCAACACCCGCCCTCCCGCACCTCGGATATACTGTCAGGCTACCA  
 GTCAGAACGCCCTCTGGCGGTGGACATGAGATTAAATTGACGACTTTGTTCCC  
 CGGGAGGGGGACCAACAAATCTCTACCCCTTGAAATACTACAGAATAAGAAAGGTT  
 AAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCATACCCAGGGTGAAGGGAGTGGCTCCACT  
 GCTGTTATTCTAGATGATAACTTGTAAACAAAGGCCACAGCCTAACCTATGACCCATAT  
 GTAAACTACTCCTCCGCCATACAATCCCCAACCTCTCCTACCACTCCGTTACTTC  
 ACACCCAAACCTGTTCTGACTCCACCATTGATTACTCCAACCAAATAACAAAAGGAAT  
 CAGCTTGGATGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCACGTAGGCCTCGGACTGCG  
 TTCGAAAACAGTATATACGACCAGGACTACAATATCCGTGAACCATTGTATGTACAATT  
 AGAGAATTAACTTAAAGACCCCCACTTAAACCTAAATGAATAAAAATAAAACCAT  
 TACGATGTGATAACAAAAAGACTCAGTAATTATTTATGGGAAAGGGCACAGGGT  
 GGGTCCACTGCTTCAAATCGGCCTCGGGTACC

图9

ATGACGTATCCAAGGAGGCCTAACGCAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTGGC  
 CAGATCCTCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGG  
 AAAATGGCATCTTCAACACCCGCCCTCTCCGCACCTCGGATATACTGTCAGGCTACC  
 ACAGTCAGAACGCCCTCTGGCGGTGGACATGAGATTAAATTGACGACTTTGTT  
 CCCCCGGAGGGGGACCAACAAATCTCTACCCCTTGAAACTACAGAATAAGAAAG  
 GTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCATCACCCAGGGTGAAGGGAGTGGGCTCC  
 ACTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTGTAAACAAAGGCCACAGCCTAACCTATGACCC  
 TATGTAACACTCCTCCGCCATACAATCCCCAACCTCTCCTACCACTCCGTTAC  
 TTCACACCCAAACCTGTTCTGACTCCACCATTGATTACTCCAACCAAATAACAAAAGG  
 AATCAGCTTGGATGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCACGTAGGCCTCGGACT  
 GCGTTCGAAAACAGTATATACGACCAGGACTACAATATCCGTGAACCATTGTATGTACAA  
 TTCAGAGAATTAACTTAAAGACCCCCACTTAAACCTAA

图10

MTYPRRRYRRRRHPRSHLGQILRRRPWLVRHRYRWRRKNGIFNTRLSRTFGYTVKAT  
TVRTPSWAVDMMRFNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYRIRKVKEFWPCSPITQGDRGVGS  
TAVILDNFVTKATALTYDPVNYSSRHTIPQPFSYHSRYFTPKPVLDSIDYFQPNNKR  
NQLWMRLQTSRNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPLK\*

\* 翻译终止密码子

图11