

贺紫琴, 宁李纳, 范杰, 等. 猪圆环病毒 2 型感染性克隆的构建及拯救病毒的双抗体夹心 ELISA 鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (7): 95-101.
HE Z Q, NING-LI N, FAN J, et al. Construction of porcine circovirus type 2 infectious clones and identification of rescued viruses using double-antibody sandwich ELISA [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (7): 95-101.

猪圆环病毒 2 型感染性克隆的构建及拯救病毒的双抗体夹心 ELISA 鉴定

贺紫琴¹, 宁李纳¹, 范杰¹, 凌同², 刘甜甜¹, 李欣¹,
陈志雄¹, 黎满香¹, 葛猛^{1*}

(1. 湖南农业大学动物医学院, 湖南长沙 410128;
2. 湖南中岸生物药业有限公司工程技术中心, 湖南长沙 410300)

摘要: 旨在构建猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 感染性克隆, 并利用双抗体夹心 ELISA 对拯救病毒进行鉴定。通过 PCR 从阳性病料中扩增出 PCV2 两种基因型 2b 与 2d 的全基因组 DNA, 并分别克隆入 pMD-19T 载体, 获得 2 个重组质粒, 命名为 p19T-PCV2b 与 p19T-PCV2d。利用 *Sac* II 酶切获得 1 767 bp 的 PCV2 全基因组, 并在体外分别用 *T4* 连接酶连接而环化, 将环状基因组转染至 PK-15 细胞, 传至 P6 代, 利用间接免疫荧光试验 (IFA) 对拯救病毒进行鉴定, 结果表明 PCV2b 与 PCV2d 感染性克隆可拯救出病毒。利用 PCV2 单克隆抗体 (单抗) 作为捕获抗体, 用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 PCV2 多抗作为检测抗体, 建立检测 PCV2 病毒粒子的双抗体夹心 ELISA 方法, 用于 PCV2 拯救病毒的鉴定。将该检测方法与 IFA 和半数组织细胞感染量 (TCID₅₀) 结果进行对比分析, 结果显示, ELISA 检测值与 Image-J 所计算的 IFA 荧光强度及 TCID₅₀ 的相关系数分别达到 0.7 和 0.8 以上, 说明该方法与 IFA 及 TCID₅₀ 检测结果均具有较强的一致性, 可以用于 PCV2 拯救病毒快速鉴定。

关键词: PCV2; 感染性克隆; ELISA

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)07-0095-07

Construction of porcine circovirus type 2 infectious clones and identification of rescued viruses using double-antibody sandwich ELISA

HE Ziqin¹, NING-LI Na¹, FAN Jie¹, LING Tong², LIU Tiantian¹, LI Xin¹,
CHEN Zhixiong¹, LI Manxiang¹, GE Meng^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Engineering Technology Center, Hunan Sinoland Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410300, China)

Abstract: The whole genome DNA of two genotypes, 2b and 2d, of porcine circovirus type 2 (PCV2) was amplified from the positive samples by PCR, and cloned into the pMD-19T vector, respectively. Then, the resulting recombinant plasmids were named p19T-PCV2b and p19T-PCV2d, respectively, and the 1 767 bp whole genome of PCV2 was cut out by *Sac* II, and was cyclized by *T4* ligase *in vitro*. The circular genome was transfected into PK-15 cells and passaged to the P6, and the rescued virus was identified by indirect immunofluorescence assay (IFA). The results showed that PCV2b and PCV2d infectious clones were rescued to generate the viruses. A double-antibody sandwich ELISA method for the detection of PCV2 virions was established by using PCV2 monoclonal antibody as the capture antibody and horseradish peroxidase (HRP) -labeled PCV2 polyclonal antibody as the detection antibody for the identification of PCV2 rescued virus. The above results indicated that the correlation coefficients between the ELISA detection value and the IFA fluorescence intensity and TCID₅₀ value calculated by Image-J were above 0.7 and 0.8, respectively, suggesting that the ELISA method was in strong consistency with the IFA and TCID₅₀ results, and could be used for the rapid identification of PCV2 rescued virus.

Keywords: porcine circovirus type 2; infectious cloning; ELISA

收稿日期: 2024-01-23; 修回日期: 2024-05-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32072871); 湖南省重点研发计划项目 (2023NK2017); 湖南省普通高等学校科技创新团队支持计划项目

第一作者: 贺紫琴, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 葛猛, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要从事动物传染病诊断及防控研究, E-mail: gmg02@126.com。

猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 是圆环病毒科圆环病毒属成员, 是目前感染哺乳动物的最小病毒, 在电镜下观察, 病毒粒子呈球形, 无囊膜, 大小 15~20 nm, 由 60 个 Cap 蛋白亚基所构成的一个 20 面体对称结构^[1]。PCV2 基因组为单股环状 DNA, 大小约 1.7 kb, 包含 2 个主要的开放性阅读框 (ORF), 其中 ORF1 编码 Rep 蛋白, 全长 945 bp, 为 PCV2 最大的 ORF, 编码由 314 个氨基酸所组成的与病毒复制相关的 Rep 蛋白, 分子量约为 36 kDa。ORF2 编码方向与 Rep 蛋白相反, 基因全长 702 bp, 编码由 234 个氨基酸组成的 Cap 蛋白, 分子量约为 27.8 kDa^[2]。Cap 蛋白是 PCV2 唯一的结构蛋白及保护性抗原, 可以诱导机体产生特异性的免疫应答^[3]。PCV2 在我国最早报道于 2000 年^[4], 最新研究表明, PCV2 可分为 8 个基因型, 即 PCV2a~PCV2h, 其中 PCV2a、PCV2b 和 PCV2d 占据优势地位^[5-6]。2010 年发现 PCV2b 的变异毒株 PCV2d, 并且该毒株在美国与中国流行率逐渐上升^[7-8], 到目前为止 PCV2d 已成为了 PCV2 最优势基因型^[9-10]。

PCV2 能够在猪肾细胞 (PK15) 与小肠上皮细胞 (IPEC-J2) 增殖, 因此常用上述 2 种细胞系进行病毒分离与培养^[11]。但从猪体内分离的病毒可能是多种 PCV2 毒株的混合物, 不利于研究不同 PCV2 毒株入侵细胞、复制以及毒力等方面的差异。2000 年, Fenaux 等^[12]首次利用感染性克隆获得的 PCV2 拯救病毒感染猪, 猪出现典型的临床症状和病理变化。之后也有多个报道利用感染性克隆技术获得不同 PCV2 毒株, 并进行感染性差异等方面的研究^[13-15]。

对于 PCV2 感染性克隆拯救病毒的鉴定, 可以通过电镜直接观察病毒粒子, 该方法虽然直观但敏感性不高, 要求样本有较多的病毒粒子, 且仪器昂贵。鉴于病毒核酸检测的 PCR 与 qPCR 等方法并非直接针对病毒粒子检测, 且可能受到复制过程中的病毒核酸以及感染性克隆 DNA 残留的干扰。传统的抗原检测方法间接免疫荧光试验 (IFA), 步骤繁琐, 耗时较长, 并且还有一定的主观性。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 是基于抗原抗体特异性结合的一种免疫学分析方法, 其中双抗体夹心 ELISA 方法广泛应用于病原、细菌和食品成分等的检测。如果将检测 Cap 蛋白的双抗体夹心 ELISA 用于 PCV2 感染性克隆及拯救病毒的鉴定, 能排除核酸干扰的同时, 还具有操作简单、省时的优点, 将大幅提升鉴定的效率。

本研究旨在构建 PCV2b 和 PCV2d 感染性克隆, 并通过双抗体夹心 ELISA 方法对拯救病毒进行鉴定, 为后续多个不同 PCV2 感染性克隆构建及病毒拯救进行快速鉴定, 为不同 PCV2 毒株的感染和致病性差异

研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

琼脂糖、核酸染料、DNA Marker、100×双抗和牛血清白蛋白 (BSA) 均为北京索莱宝生物科技有限公司产品; Sac II 限制性内切酶、T4 连接酶为宝日生物技术有限公司产品; 2×Phanta Max Master Mix 为诺唯赞生物科技有限公司产品; 胶回收试剂盒、清洁试剂盒与小提质粒提取试剂盒购自 Bio-Tek 公司; Fugene HD 转染试剂为 Promega 公司产品; 胰酶、DMEM 和 Opti-MEM 均为 Gibco 公司产品; Alexa Fluor 488 标记山羊抗鼠荧光二抗为赛默飞世尔科技公司产品; 细胞培养瓶、细胞培养板和磁珠法病毒核酸提取试剂盒均为自杭州博日科技有限公司产品; 96 孔酶标板为 Costar 公司产品; PCV2 的病毒样颗粒 (VLPs)、单克隆抗体 (单抗) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 PCV2 多抗均为本实验室保存; 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 为美国 KPL 公司产品; 2 mol/L 硫酸终止液、PBS 均由本实验室配制。

1.2 PCV2 全长基因组的克隆

参照 GenBank 已发表的 PCV2 基因序列设计一对 PCV2 特异性全长引物, PF: 5'-CCGCGGGCTGGCT-GAACTTTTCAAAG-3', PR: 5'-CCGCGGGAAATTT-CTGACAAACGTTAC-3', 从 PCV2b 和 PCV2d 阳性病料中提取病毒核酸作为模板, 用含上述引物和高保真酶的反应液进行 PCR 扩增, 将目的片段切胶回收并与 pMD-19T 进行连接, 将连接产物转化至 DH5 α , 通过蓝白斑挑取阳性菌落, 用 M13 引物进行菌落鉴定。将阳性菌落接种至 LB 液体培养基中, 培养 12 h, 提取质粒后进行测序, 用 Sac II 限制酶切获得 PCV2 全长基因组序列, 对已验证的 PCV2 线性基因组回收产物进行环化, 16 °C 连接 12 h。

1.3 PCV2b 与 PCV2d 环状基因组转染 PK-15 细胞

当 PCV 阴性的 PK-15 细胞生长至 75% 的细胞汇合度时, 利用 Fugene HD 转染试剂将环状基因组转染至 PK-15 细胞中, 6 h 后弃去培养液, 每孔加入完全培养基后在 37 °C、5% CO₂ 温箱中继续培养 72 h, 随后回收 6 孔板中的第一代细胞培养物, 将其置于 -80 °C 冻融 3 次。

1.4 拯救病毒的 IFA 检测

将克隆样品连续盲传至第 6 代, 将其按 1:5 接种于生长状态良好、细胞汇合度为 75% 的 PK-15 细胞, 同时设置对照组。将病毒侵染细胞 1 h, 每 20 min 进行震荡混匀。1 h 后, 弃掉病毒液, 用 500 μ L PBS 进行洗涤, 最后用 2 mL 含 2% FBS 的细

胞维持液继续培养。72 h后, 弃掉培养液, PBS 洗涤 3 次, 加入 4% 组织固定液 37 °C 固定 20 min; 弃掉固定液, PBS 洗涤 3 次, 晾干。随后使用含 10% 的山羊血清的 PBS 于 37 °C 封闭 1 h, 接着每孔加入 500 μ L 鼠抗 PCV2-Cap 蛋白单抗 (1 : 1 000), 37 °C 孵育 1 h; 弃去一抗后, PBS 洗涤 4 次, 每次 5 min; 洗涤完成后每孔加入 500 μ L Alexa Fluor 488 标记山羊抗鼠荧光二抗 (1 : 1 000), 37 °C 避光孵育 45 min; 弃掉二抗, PBS 洗涤 4 次, 每次 3 min, 晾干。最后每个孔加入 500 μ L DAPI 染色液, 室温染色 10 min, PBS 洗涤 3 次, 于倒置荧光显微镜下观察。

1.5 PCV2b 与 PCV2d 拯救毒株的测序

将 PCV2b 与 PCV2d 拯救病毒传至 P6 代后取病毒液 200 μ L, 采用磁珠法提取病毒 DNA, 详细步骤见杭州博日磁珠法病毒核酸提取试剂盒说明书。以提取的 PCV2b、PCV2d DNA 为模板, 利用 PCV2 全长引物进行 PCR 扩增。随后将产物进行测序, 分析 PCV2b 与 PCV2d 感染性克隆是否稳定表达。

1.6 PCV2b 与 PCV2d 毒价的测定

将汇合度为 90% 的 PK-15 细胞进行胰酶消化, 以每孔 100 μ L 接种 96 孔板的前 10 排, 用 DMEM 倍比稀释的 P6 代 PCV2b 和 PCV2d 拯救病毒, 设置 10^{-1} ~ 10^{-10} 共 10 个稀释度, 每个稀释度设置 8 个重复孔, 第 11 排每孔加 2% 细胞培养液作为阴性对照, 在 37 °C、5% CO₂ 温箱培养。72 h 之后, 弃掉培养液, 采用上述免疫荧光步骤进行镜检, 按照 Reed-Muench 计算 P6 代 PCV2 拯救病毒的半数组织细胞感染量 (TCID₅₀)。

1.7 PCV2 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立

利用本实验室保存的鼠抗 PCV2 单抗作为捕获抗体, HRP 标记的兔抗 PCV2 多抗作为酶标抗体, 初步建立检测 PCV2 的双抗体夹心 ELISA 方法。将 PCV2 单抗以 0.5 μ g/mL 4 °C 包被 24 h, 37 °C 封闭 2 h, 烘干 1 h, 将原浓度 320 μ g/mL 的 Cap 蛋白组装的 VLPs 作为标准品进行一系列稀释, 标准样品在 37 °C 孵育 30 min, 用 HRP 标记的兔抗 PCV2 多抗 1 : 1 000 稀释, 37 °C 孵育 30 min; 根据标准品不同稀释度所检测得到的 OD_{450 nm} 值与标准品浓度建立标准曲线。

1.8 利用双抗体夹心 ELISA 鉴定 PCV2 拯救病毒

将拯救的 PCV2b 与 PCV2d 病毒样品 P2~P6 代病毒液进行 1 : 10 稀释, 采用上述 ELISA 方法进行检测, 计算 P2~P6 代病毒液中 PCV2 的病毒粒子数。

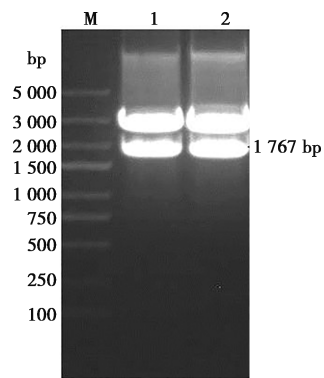
1.9 双抗体夹心 ELISA 与 IFA 或 TCID₅₀ 测定结果的对比分析

将拯救的 PCV2 不同代次样品按上述方法分别进行 ELISA 检测与 IFA 鉴定, IFA 结果成像图片用 Image-J 软件处理, 分析其荧光强度, 采用 Graphpad Prism 8.0 软件将上述结果与 ELISA 反应的 OD_{450 nm} 值进行相关性分析; 另外, 取 P6 代样品, 按上述 PCV2 病毒毒价测定的方案, 将其梯度稀释获得不同 TCID₅₀ 的病毒样品, 进行 ELISA 检测, 分析 OD_{450 nm} 与 TCID₅₀ 之间的相关性。

2 结果

2.1 PCV2b 与 PCV2d 全长基因组的克隆

利用 PCR 从病料中分别扩增出了预期大小为 1.8 kb 左右的 DNA 片段, 将目的片段进行切胶回收后与 pMD-19T 载体连接, 转化至 DH5 α 感受态细胞。挑选阳性菌落, 接种 LB 液体培养基培养过夜, 采用质粒提取试剂盒提取阳性质粒, 送至生工生物工程有限公司进行 PCV2 全长基因测序, 将测序正确的阳性重组子分别命名为 p19T-PCV2b 与 p19T-PCV2d。用质粒提取试剂盒提取含 PCV2 基因组的重组质粒 p19T-PCV2b 与 p19T-PCV2d, Sac II 酶切获得了 1 767 bp 的 PCV2 全长基因组片段 (图 1)。



M. DNA 分子质量标准 (DL5000); 1. p19T-PCV2b 重组质粒; 2. p19T-PCV2d 重组质粒。

图 1 p19T-PCV2b 与 p19T-PCV2d 重组质粒酶切

2.2 PCV2b 与 PCV2d 拯救病毒的 IFA 法检测

阳性细胞孔内可观察到细胞的胞核或者胞浆内有典型的特异性亮绿色荧光, 而阴性对照的细胞孔内无特异性的绿色荧光 (图 2), 说明 PCV2b 与 PCV2d 拯救成功。

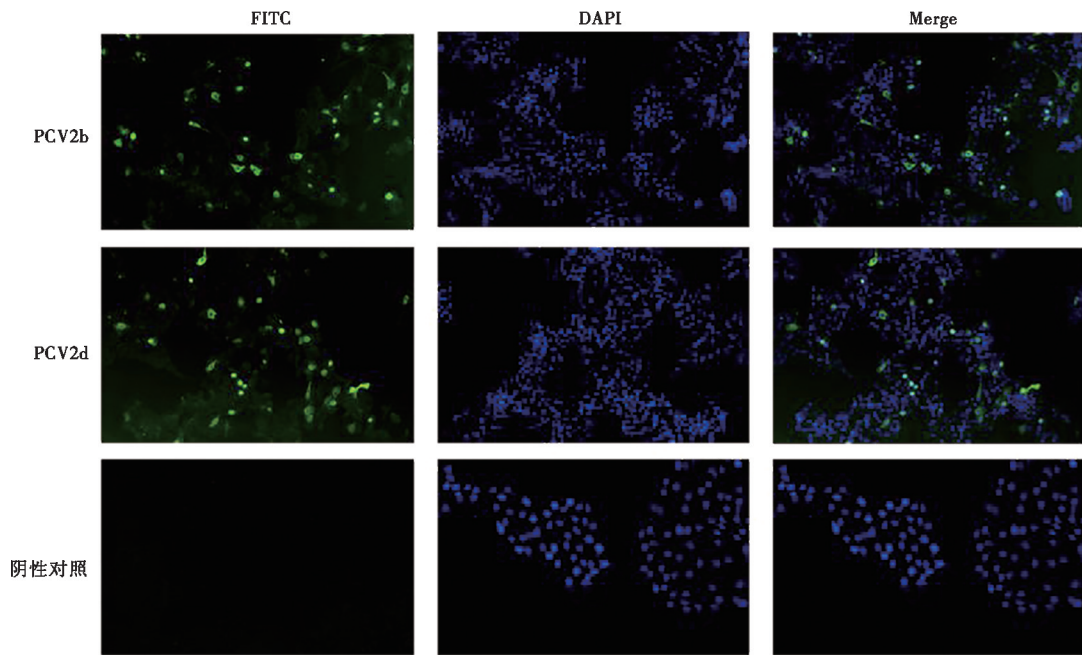


图2 PCV2 拯救病毒的 IFA 鉴定 (100×)

2.3 PCV2b 与 PCV2d 拯救病毒的测序

PCV2b 与 PCV2d 病毒液 PCR 产物的测序结果表明, PCV2b 与 PCV2d 的 P6 代的病毒序列与环状基因组序列一致, 因此 PCV2b 与 PCV2d 拯救病毒能在 PK-15 细胞稳定传代。

2.4 PCV2 病毒毒价的测定

根据 Reed-Muench 法, 距离比 = (高于 50% 的百分数 - 50%) / (高于 50% 的百分数 - 低于 50% 的百分数), $\lg \text{TCID}_{50} = \text{距离比例} \times \text{稀释度对数之间的差} + \text{高于 50% 病变率的稀释度的对数}$ 。计算可得 PCV2b 的 P6 代 TCID_{50} 约为 $10^{-2.33} / 0.1 \text{ mL}$ (表 1)。

表 1 PCV2 拯救病毒 TCID_{50} 测定 (Reed-Muench 法)

稀释度	荧光孔数	无荧光孔数	累计荧光孔数	累计无荧光孔数	荧光孔占比/%
10^{-1}	8	0	14	0	100
10^{-2}	6	2	6	2	75

2.5 PCV2 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立

对 PCV2 双抗体夹心 ELISA 方法进行条件摸索后, 最终确定捕获抗体的最佳包被浓度为 $0.5 \mu\text{g/mL}$, 最佳包被条件为 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 包被 24 h, 最佳封闭条件为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 封闭 2 h, HRP 标记的兔抗 PCV2 多抗最佳稀释度为 1:1000。采用 Cap 蛋白组装的 VLPs 按照不同的比例进行稀释, 建立 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值与样品浓度的标准曲线 (图 3)。

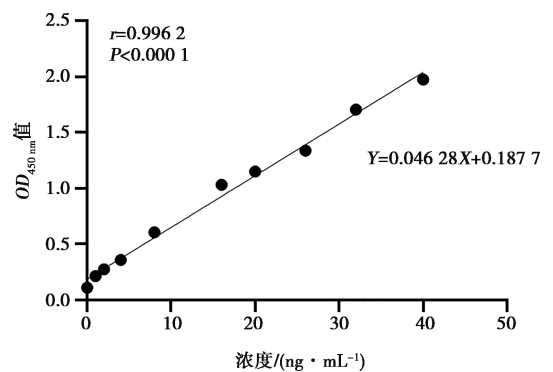


图3 PCV2 双抗体夹心 ELISA 标准曲线

2.6 利用双抗体夹心 ELISA 鉴定 PCV2 拯救病毒

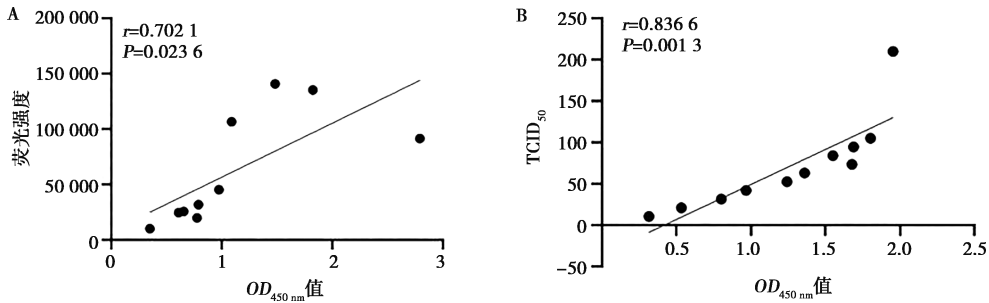
将 PCV2b 与 PCV2d P2~P6 代病毒液 1:10 稀释后进行 ELISA 检测, 根据各代次病毒液的 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值计算出 PCV2 的病毒颗粒数 (表 2)。计算方法: 根据 OD_{450} 值得到样品中 Cap 蛋白的浓度, 样品中 Cap 的质量 = 浓度 \times 样品体积, 物质的量 = 样品中 Cap 的质量 / 相对分子质量, 病毒颗粒数 (个/mL) = 物质的量 \times 阿伏加德罗常数。

2.7 双抗体夹心 ELISA 与 IFA 或 TCID_{50} 测定结果的对比分析

将 PCV2 不同代次样品进行 ELISA 检测与 IFA 鉴定, 上述 $OD_{450 \text{ nm}}$ 与 Image-J 所计算的荧光强度有较强的相关性, 相关系数 r 达到 0.7 (图 4A); 不同 TCID_{50} 病毒液进行 ELISA 检测, 其 $OD_{450 \text{ nm}}$ 与 TCID_{50} 相关系数 r 也高达 0.8 以上 (图 4B)。

表2 PCV2b与PCV2d各代感染性克隆的ELISA检测值与各代的病毒浓度

项目	代次				
	P2	P3	P4	P5	P6
PCV2b组 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	2.888	2.962	2.647	2.111	1.165
PCV2b 病毒颗粒数/ (个· mL^{-1})	2.1×10^{11}	2.2×10^{11}	1.9×10^{11}	1.5×10^{11}	7.6×10^{10}
PCV2d组 $OD_{450\text{ nm}}$ 值	0.738	0.647	0.492	0.932	0.217
PCV2d 病毒颗粒数/ (个· mL^{-1})	4.3×10^{10}	3.6×10^{10}	2.4×10^{10}	5.6×10^{10}	2.2×10^9

图4 PCV2病毒样品检测的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值与荧光强度(A)和 $TCID_{50}$ (B)的相关性

3 讨论

PCV2是一种变异速度很快的DNA病毒,可以达到 1.2×10^{-3} 置换/位点/年的核苷酸置换率,接近于单链RNA病毒的进化速度^[16]。尤其是在2007年PCV2疫苗广泛使用之后,有研究表明其变异速率进一步加快,且PCV2d的流行比例越来越高,这可能与疫苗免疫选择压力有关^[17]。通过分析PCV2a、PCV2b和PCV2d的氨基酸序列,发现了PCV2d Cap蛋白在多个氨基酸位点相对于PCV2a和PCV2b发生了突变,这些氨基酸替换势必引起其结构与功能发生一定的变化。为研究不同突变位点对病毒结构和功能的影响,可利用定点突变技术,对PCV2d Cap蛋白氨基酸差异位点进行突变,构建不同的PCV2感染性克隆。因此本文所搭建的PCV2感染性克隆平台将为PCV2多个基因型与各突变体感染性克隆的构建奠定基础。

感染性克隆的构建以及病毒拯救的效率与多种因素有关,而体外转染细胞的选择以及病毒在宿主细胞中的复制水平是其中的关键。PK-15细胞是PCV2在体外有效增殖的靶细胞,该细胞也是PCV2全病毒灭活疫苗生产的细胞来源,然而PCV2在体外细胞的增殖滴度相对较低^[18]。本试验将含PCV2全基因组的质粒转染PK-15细胞,所构建的感染性克隆及其拯救病毒传代至第6代后,也存在病毒滴度较低的问题。为了提高PCV2在PK-15细胞上的滴度,Fenaux等^[19]研究发现,PCV2的滴度随着传代次数的增多而

上升,从第1代的 $10^{1.75}$ $TCID_{50}/\text{mL}$,上升到第35代的 $10^{5.6}$ $TCID_{50}/\text{mL}$; Zhu等^[20]研究发现,通过有限稀释法从PK-15混合细胞中获得1株对PCV2复制高度敏感的细胞,用其培养PCV2,最高病毒滴度可以达到 $10^{7.0}$ $TCID_{50}/\text{mL}$ 。因此,本研究所构建的PCV2感染性克隆及其拯救病毒的滴度较低,可能是病毒传代次数较少,也有可能是PCV2对本试验PK-15的细胞适应性较差有关^[21]。

另外,有研究表明由于PCV2在PK-15中的复制周期时间长达36 h,病毒的复制过程需要细胞S期表达的复制相关蛋白,然而不同的细胞所处的分裂周期不同,因此较难达到细胞的完全感染,导致病毒的复制滴度较低^[18]。有研究表明D-氨基葡萄糖(D-G)一方面可以增强PK-15细胞S期蛋白的表达,另一方面可以促进病毒的DNA进入细胞核,从而增强病毒的复制。Tischer等^[22]最先用D-G来提高PCV2的增殖,之后Gilpin等^[23]发现用300 mmol/L D-G刺激处理PK-15细胞20 min能够显著增加病毒的增殖能力。本试验分别采用300 mmol/L D-G处理20 min和3 mmol/L D-G处理72 h,对比发现3 mmol/L D-G处理72 h,能够使PCV2的复制效率得到提高,而300 mmol/L D-G处理细胞造成部分细胞死亡,没有明显促进PCV2的复制。后续将对拯救病毒继续在添加3 mmol/L D-G的PK-15细胞上接毒并传代,尝试进一步提高其病毒滴度。

PCV2感染性克隆及所拯救病毒在前期传代过程中,往往存在病毒滴度低、不稳定等情况^[24],用传

统的 IFA 鉴定会出现信号弱, 对结果的判断存在主观性等问题, 尤其是对多个感染性克隆的构建以及不同代次样品的鉴定, 其检测周期较长、工作量大, 这不利于 PCV2 感染性克隆的早期和快速鉴定。感染性克隆只有在成功构建且 PCV2 获得拯救的情况下才能产生病毒粒子, 而 Cap 蛋白是 PCV2 的唯一结构蛋白, 因此可以通过对 Cap 蛋白的检测来鉴定 PCV2 感染性克隆及拯救的病毒。双抗体夹心 ELISA 方法是一种常用的检测病毒等抗原物质的血清学检测方法, 一般而言, 该方法比 IFA、免疫过氧化物酶单层细胞检测技术 (IPMA) 等有更好的敏感性与特异性^[25-26]。本研究通过建立检测 PCV2 Cap 蛋白的双抗体夹心 ELISA 方法, 且将模拟病毒粒子的 PCV2 VLPs 作为标准品进行梯度稀释, 证明该方法的检测结果与 PCV2 病毒粒子数量之间具有很好的线性关系。利用该方法检测 PCV2 拯救病毒的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值与 Image-J 所计算荧光强度和 $TCID_{50}$ 数值进行对比分析, 两者之间都有较强的相关性, 说明该双抗体夹心 ELISA 方法可以用于 PCV2 感染性克隆及拯救病毒的鉴定。

本研究成功获得了 PCV2b 与 PCV2d 的感染性克隆毒株, 并建立了检测 PCV2 的双抗体夹心 ELISA 方法, 为 PCV2 感染性克隆的构建及拯救病毒的检测分析提供了一种更加简单、高效的鉴定方法, 同时该方法也是一种潜在的检测疫苗或临床病料中 PCV2 Cap 抗原的方法。

参考文献:

- [1] WEI R, VAN RENNE N, NAUWYNCK H J. Strain-dependent porcine circovirus type 2 (PCV2) entry and replication in T-lymphoblasts [J]. *Viruses*, 2019, 11 (9): 813.
- [2] ZHANG Z, LUO Y, ZHANG Y, et al. Enhanced protective immune response to PCV2 adenovirus vaccine by fusion expression of Cap protein with InvC in pigs [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2019, 20 (4): e35.
- [3] LI N, LIU J, QI J, et al. Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 2 in China during 2000–2019 [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 788172.
- [4] 郎洪武, 张广川, 程君生, 等. 猪圆环病毒分离鉴定及猪断奶多系统衰弱综合征的诊断 [J]. *中国兽医科技*, 2001 (3): 4–6.
- [5] HUANG L, WANG Y, WEI Y, et al. Capsid proteins from PCV2a genotype confer greater protection against a PCV2b strain than those from PCV2b genotype in pigs: evidence for PCV2b strains becoming more predominant than PCV2a strains from 2000 to 2010s [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100 (13): 5933–5943.
- [6] YU C, CAO M, WEI Y, et al. Evaluation of cross-immunity among major porcine circovirus type 2 genotypes by infection with PCV2b and PCV2d circulating strains [J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 283: 109796.
- [7] CHAE C. An emerging porcine circovirus type 2b mutant (mPCV2b) originally known as PCV2d [J]. *Veterinary Journal*, 2015, 203 (1): 6–9.
- [8] JIANG C G, WANG G, TU Y B, et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 in China [J]. *Archives of Virology*, 2017, 162 (9): 2715–2726.
- [9] XIAO C T, HALBUR P G, OPRIESSNIG T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d [J]. *The Journal of General Virology*, 2015, 96 (Pt 7): 1830–1841.
- [10] 徐敏, 汪孟航. PCV2d 已成为猪圆环病毒 2 型的优势流行基因型 [J]. *畜禽业*, 2020, 31 (10): 4–5.
- [11] YAN M, ZHU L, YANG Q. Infection of porcine circovirus 2 (PCV2) in intestinal porcine epithelial cell line (IPEC-J2) and interaction between PCV2 and IPEC-J2 microfilaments [J]. *Virology Journal*, 2014, 11: 193.
- [12] FENAUX M, HALBUR P G, HAQSHENAS G, et al. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76 (2): 541–551.
- [13] FENAUX M, OPRIESSNIG T, HALBUR P G, et al. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77 (20): 11232–11243.
- [14] GUO L J, LU Y H, HUANG L P, et al. First construction of infectious clone for newly emerging mutation porcine circovirus type 2 (PCV2) followed by comparison with PCV2a and PCV2b genotypes in biological characteristics in vitro [J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 291.
- [15] 宋益, 朱丽娜, 高崧, 等. 嵌合型猪圆环病毒 1–2 型感染性 DNA 克隆的构建及其对小鼠的免疫原性 [J]. *微生物学报*, 2008 (9): 1234–1240.
- [16] FIRTH C, CHARLESTON M A, DUFFY S, et al. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2 [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83 (24): 12813–12821.
- [17] SUH J, OH T, CHAE C. Virulence comparison of 4 porcine circovirus type 2 (PCV-2) genotypes: 2a, 2b, 2d, and 2e with a single infection and co-infection with PCV-2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2023, 87 (1): 41–50.
- [18] 夏德利. 猪圆环病毒分子流行病学及复制调控与入侵转运机制的研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨兽医研究所, 2020.
- [19] FENAUX M, OPRIESSNIG T, HALBUR P G, et al. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication *in vitro* and attenuated the virus *in vivo* [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78 (24): 13440–13446.
- [20] ZHU Y, LAU A, LAU J, et al. Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line [J]. *Virology*, 2007, 369 (2): 423–430.

- [21] 刘长明, 张超范, 危艳武. 猪圆环病毒 2 型细胞培养适应毒株的培育和鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2006 (3): 248-252.
- [22] TISCHER I, PETERS D, RASCH R, et al. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence [J]. Archives of Virology, 1987, 96 (1/2): 39-57.
- [23] GILPIN D F, MCCULLOUGH K, MEEHAN B M, et al. *In vitro* studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2003, 94 (3/4): 149-161.
- [24] YANG X, CHEN F, CAO Y, et al. Comparative analysis of different methods to enhance porcine circovirus 2 replication [J]. Journal of Virological Methods, 2013, 187 (2): 368-371.
- [25] 许立华, 王玲, 陈溥言. 猪圆环病毒检测方法的研究进展 [J]. 宁夏农学院学报, 2004 (1): 73-76.
- [26] 卢奇. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白单克隆抗体的制备及双抗夹心 ELISA 检测方法的建立 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2023.

· 信息 ·

倡导健康养殖新理念 解读疫病防控新技术

欢迎订阅 2024 年《畜牧与兽医》

ISSN 0529-5130, CN 32-1192/S

《畜牧与兽医》月刊由教育部主管、南京农业大学主办。1935 年创刊, 由原中央大学畜牧兽医系编辑出版, 著名兽医学家罗清生教授任主编, 至今已有 89 年的办刊历史。始终遵循“为社会服务, 为畜牧生产服务”和“理论与实践相结合, 普及与提高并举”的办刊宗旨。本刊连续入选中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》, 先后荣获华东地区优秀期刊、江苏期刊方阵双效期刊、江苏省优秀科技期刊、全国高校优秀期刊、全国畜牧兽医类优秀期刊等。

读者对象: 畜牧、兽医科技工作者和大专院校师生等。

主要内容: 主要刊登畜牧、兽医两学科各领域的研究报告、文献综述等。主要栏目有遗传繁育、动物营养、环境卫生、基础兽医、预防兽医、临床兽医和专题综述等。

征订办法: 本刊为月刊, 大 16 开, 定价: 28.00 元, 全年 12 期共 336.00 元。邮发代号: 28-42, 全国各地邮局均可订阅。邮局漏订者可直接汇款至本刊杂志社补订。

地 址: 江苏省南京市卫岗 1 号南京农业大学内 邮 编: 210095

电话: 025-84395701 (编辑部) E-mail: muyizz@njau.edu.cn