



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103314103 B

(45) 授权公告日 2015.06.24

(21) 申请号 201180061073.6

(22) 申请日 2011.12.20

(30) 优先权数据
61/426,087 2010.12.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2013.06.20

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2011/084277 2011.12.20

(87) PCT国际申请的公布数据
W02012/083837 ZH 2012.06.28

(83) 生物保藏信息
CCTCC No :V201117 2011.11.05

(73) 专利权人 施怀哲维克有限公司
地址 中国香港铜锣湾勿地臣街1号时代广场2座2201-2207室

(72) 发明人 郭村勇 陈旭中 吴忠晋 陈汉婷

(74) 专利代理机构 北京天平专利商标代理有限公司 11239
代理人 孙刚

C07K 16/08(2006.01)
A61K 39/12(2006.01)
A61P 31/20(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)
C12R 1/93(2006.01)

(56) 对比文件
CN 101549155 A, 2009.10.07, 全文.
CN 101343671 A, 2009.01.14, 全文.
CN 101980720 A, 2011.02.23, 全文.
Xin, X. et al.. 登录号 :AY291317.
《GenBank》. 2003,
Zhai, S. L., et al.. 登录号 :GQ359002.
《GenBank》. 2009,

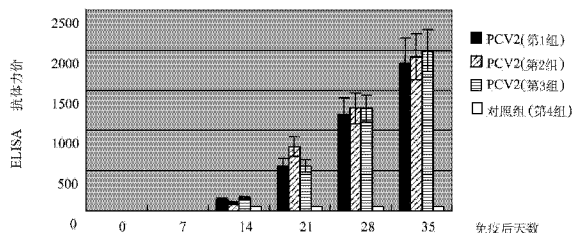
审查员 彭海航

(51) Int. Cl.
C12N 7/00(2006.01)
C12N 15/34(2006.01)
C07K 14/01(2006.01)

权利要求书1页 说明书15页
序列表5页 附图6页

(54) 发明名称
猪第二型环状病毒、含彼此的免疫组合物、检测套组及其应用

(57) 摘要
提供了一种猪第二型环状病毒株,其保藏号为 CCTCC No :V201117。还提供了含有该猪第二型环状病毒株的免疫组合物、检测该病毒株的试剂盒、以及该病毒株的用途。



1. 猪第二型环状病毒 (Porcine Circovirus Type 2, PCV2) H 株, 其基因组序列如 SEQ ID No:1 所示。
2. 一种含有如权利要求 1 所述的猪第二型环状病毒 H 株的免疫组合物。
3. 如权利要求 2 所述的免疫组合物, 其中该免疫组合物进一步包含药学上可接受的载体。
4. 如权利要求 3 所述的免疫组合物, 其中该载体为一佐剂。
5. 如权利要求 2 所述的免疫组合物, 其中该猪第二型环状病毒株 H 经过灭活处理。
6. 如权利要求 2 所述的免疫组合物, 其中该猪第二型环状病毒 H 株经过减毒处理、或为亚单位形式、或为 DNA 形式。
7. 如权利要求 2 所述的免疫组合物, 进一步包含至少一种病原抗原, 该病原抗原选自由下列群组所组成: 猪流感病毒 (SIV) 抗原、猪繁殖与呼吸症候群病毒 (PRRSV) 抗原、猪支原体 (Mycoplasma) 抗原、猪细小病毒 (Parvovirus, PPV) 抗原、猪丹毒 (Erysipelas) 抗原, 以及伪狂犬病 (Aujeszky's disease) 抗原。
8. 一种抗猪第二型环状病毒 H 株的抗体, 所述该抗体可与包含 SEQ ID No:4 的猪第二型环状病毒 (PCV2) 相结合; 所述猪第二型环状病毒 H 株的基因组序列如 SEQ ID No:1 所示。
9. 如权利要求 8 所述的抗体, 该抗体包含至少下列其中一种: 一单株抗体、一多株抗体, 以及一经基因重组的抗体。
10. 一种多核苷酸 (polynucleotide), 编码如权利要求 1 所述的猪第二型环状病毒 H 株的多肽) 序列, 该多肽的序列包含 SEQ ID No:5。
11. 如权利要求 10 所述的多核苷酸, 其中该序列包含 SEQ ID No:4。
12. 一种猪第二型环状病毒 H 株的检测套组, 包含一侦测单元, 该侦测单元选自于下列群组所组成中至少一者: 一如权利要求 1 所述的猪第二型环状病毒 H 株的病毒抗原、一可与包含 SEQ ID No:4 的猪第二型环状病毒 H 株相结合的抗体, 所述猪第二型环状病毒 H 株基因组序列如 SEQ ID No:1 所示、一如 SEQ ID No:4 所示的多核苷酸序列, 以及一侦测如 SEQ ID No:1 所示序列的核酸片段。
13. 如权利要求 12 所述的检测套组, 其中该病毒抗原置于一 96 孔微量平底培养盘上。
14. 如权利要求 13 所述的检测套组, 其中该病毒抗原经过灭活处理。
15. 如权利要求 12 所述的检测套组, 其中该抗体包含至少下列其中一种: 单株抗体、多株抗体、经基因重组的抗体。
16. 如权利要求 12 所述的检测套组, 其中该核酸片段的序列为至少下列其中一种: SEQ ID No:8、SEQ ID No:9、SEQ ID No:10, 以及 SEQ ID No:11。

猪第二型环状病毒、含彼的免疫组合物、检测套组及其应用

技术领域

[0001] 本发明关于动物保健领域,特别是关于一种新颖的猪第二型环状病毒(PCV2)、含有该病毒的免疫组合物、检验套组及应用。

背景技术

[0002] 猪环状病毒(porcine circovirus, PCV)最早是在猪肾细胞株(PK-15, ATCC CCL33)中被发现,虽然会持续感染该细胞,但是并不产生细胞病变效应(cytopathic effect, CPE);另外该病毒虽会感染猪只,但是并不造成猪只产生任何病变。该病毒为一环状单股、全长1759bp的正二十面体(icosahedron)病毒,在1995年被归类为环状病毒科(Circoviridae)的一员。

[0003] 而1991年首度于加拿大发现的仔猪离乳后多系统耗弱症(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome,以下简称PMWS),主要发病的对象为5到12周龄的保育后期及肥育前期仔猪,其临床症状包括渐进性的消瘦、呼吸急促、皮肤苍白及偶尔可见黄疸等,解剖分析可看到间质性肺炎肉芽肿、肝炎、肾炎及淋巴病变等。自从PMWS在加拿大爆发后,北美、欧洲及亚洲等世界各主要国家几乎都有报导PMWS的发生。近年,从罹患PMWS的病猪身上被分离出另一种新的环状病毒,该病毒与当初从PK-15细胞分离出的环状病毒外形非常相似,但是基因组序列的相似度只有68-76%,后来将无致病性的猪环状病毒称为猪第一型环状病毒(porcine circovirus type1, PCV1),而会造成PMWS的病毒则称为猪第二型环状病毒(porcine circovirus type2, PCV2)。

[0004] 猪第二型环状病毒(PCV2)属于环状病毒科(circoviridae),为不具套膜(envelope)的正二十面体(icosahedron)病毒,直径约17nm,病毒核酸为单股环状DNA,在DNA的环状基因组上有一茎-环状(stem-loop)的构造为复制走台点,此为环状病毒共通的特征。PCV2的基因组有1768或1767个核苷酸,是目前已知最小的动物病毒。PCV2基因组序列经软体分析后发现顺时针加上逆时针共有11个开放阅读框架(open reading frame, ORF),其中ORF1、ORF2是2个最主要的基因。ORF1可转录出Rep及Rep'蛋白,与该病毒的复制有关。而ORF2则是PCV2的外壳蛋白(capsid),是最有可能诱发出中和抗体的抗原。

[0005] PCV2在全世界都有很高的感染率。PCV2会造成猪只育成率及饲料换肉率的降低,而使得养猪业受到极大的冲击与经济损失,所以PCV2检测/诊断试剂及疫苗的开发,可说是刻不容缓且极为重要的事。

发明内容

[0006] 本发明于第一部份中提供一种新颖的猪第二型环状病毒株,该病毒株系自一受感染的猪只中分离及纯化。该病毒具有如SEQ ID No:1所示的正股基因组序列;经鉴定后,确认该病毒为一种新颖的猪第二型环状病毒株,命名为猪第二型环状病毒H株(PCV2H strain)。将该病毒株寄存于中国典型培养物保藏中心(China Center For Type Culture Collection, CCTCC),寄存日为2011年11月5日,寄存编号为CCTCCNo:V201117。

[0007] 本发明于第二部分中提供一种含有该新颖的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的免疫组合物。于一实施例中,该免疫组合物为一疫苗,系将上述猪第二型环状病毒 H 株不活化,或进行病毒株弱化,再与一药学上可接受的载剂 (pharmaceutically acceptable vehicle),制备成一适用本发明疫苗的剂型。然而,该疫苗的剂型包含但不限于:死毒(不活化)疫苗、活毒(减毒)疫苗、次单位疫苗、DNA 疫苗、或藉由该新颖猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 或其核苷酸序列、氨基酸序列所制备而得的疫苗。

[0008] 本发明所述的不活化处理(或去活化处理,inactivated treatment)包含但不限于:去活化剂处理、热处理等适用本发明的不活化方法。其中去活化剂包含但不限于:甲醛(formaldehyde)、多聚甲醛(paraformaldehyde)、 β -丙内酯(Beta-Propiolactone,BPL)、2-溴乙胺(binary ethyleneimine,BEI),或适用本发明的去活化剂等。

[0009] 其中该药学上可接受的载剂包含一或多种选自于下列的试剂:溶剂(solvent)、乳化剂(emulsifier)、悬浮剂(suspending agent)、分解剂(decomposer)、黏结剂(binding agent)、赋形剂(excipient)、安定剂(stabilizing agent)、螯合剂(chelating agent)、稀释剂(diluent)、胶凝剂(gelling agent)、防腐剂(preservative)、润滑剂(lubricant)、界面活性剂(surfactant)、佐剂(adjuvant),及其他类似或适用本发明的载剂。

[0010] 其中该佐剂包含但不限于:油质佐剂(如:矿物油、植物油、动物油、佛氏完全佐剂、佛氏不完全佐剂等)、水质佐剂(如:氢氧化铝)、双相油质佐剂(如:水包油包水剂型,w/o/w)、生物型佐剂(如:CpG 寡核苷酸、细菌类毒素 toxoid)等。其中该双相油质佐剂包含界面活性剂以及油相物质;该界面活性剂包括一或多种下列所选的群组:山梨醇(sorbitol)脂肪酸酯;山梨醇脂肪酸酯与环氧乙烷(ethylene oxide)或环氧丙烷(propylene oxide)浓缩物;甘露醇(mannitol)脂肪酸酯;甘露醇脂肪酸酯与环氧乙烷或环氧丙烷浓缩物;甘露醇脂肪酸酯与下列所选的亲水基:羧酸(carboxylic acid)、胺基(amine)、酰胺(amide)、醇类(alcohol)、聚酯多元醇(polyol)、醚类(ether)、氧基(oxide)的接合物;无水甘露醇(anhydromannitol)脂肪酸酯;无水甘露醇脂肪酸酯与下列所选的亲水基:羧酸、胺基、酰胺、醇类、聚酯多元醇、醚类、氧基的接合物;蔗糖(saccharose)脂肪酸酯;蔗糖脂肪酸酯与环氧乙烷或环氧丙烷浓缩物;甘油脂肪酸酯;甘油脂肪酸酯与环氧乙烷或环氧丙烷浓缩物;脂肪酸与环氧乙烷或环氧丙烷浓缩物;脂肪醇与环氧乙烷或环氧丙烷浓缩物;以及甘油磷脂(glycerophospholipid)。该油相物质包括或多种下列所选的群组:矿物油、植物油以及动物油。

[0011] 本发明所述的免疫组合物,可进一步包含一种或多种病原抗原,该病原抗原包含但不限于:猪流感病毒(SIV)抗原、猪繁殖与呼吸症候群病毒(PRRSV)抗原、猪霉浆菌(Mycoplasma)、猪小病毒(Parvovirus,PPV)、猪丹毒(Erysipelas)、伪狂犬病(Aueszky's disease),且该等病原抗原的形式包含但不限于:重组蛋白、次单位蛋白、基因缺损的病原、灭活的病原抗原等。

[0012] 本发明于第三部分中提供一种猪只对抗猪第二型环状病毒(PCV2)病毒的方法,包含使用有效量的上述免疫组合物以施予猪只,以增强该猪只对抗猪第二型环状病毒(PCV2)的免疫力,降低病毒血症的严重性,进而提升、改善其临床症状、存活率、及增重趋势。

[0013] 本发明于第四部分中提供一种抗猪第二型环状病毒 (PCV2) 的抗体,通过本发明的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 所制备或衍生而得;该抗体包括但不限于:单株抗体、多株抗体,以及经基因重组的抗体。于一实施例中,该抗体为经由将本发明的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 施打于动物体内而得到的多株抗体。于另一实施例中,该抗体为经由筛选单株化融合瘤所得到的单株抗体。

[0014] 本发明于第五部分中提供上述新颖的猪第二型环状病毒 (PCV2) 所含的 DNA 片段,其具有如 SEQ ID No :1,2,4,6 所示的序列。该 DNA 片段的应用包含,但不限于:制成 DNA 疫苗、次单位疫苗、或用于设计引子或探针以侦测猪第二型环状病毒 (PCV2)。于一实施例中,该 DNA 片段为猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的基因组全长,其具有如 SEQ ID No :1 所示的序列。于另一实施例中,该 DNA 片段为猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的开放阅读框架 (open reading frame, ORF),包含但不限于:

[0015] 第一开放阅读框架 (ORF1),其具有如 SEQ ID No :2 所示的序列,其编码如 SEQ ID No :3 所示的氨基酸序列;

[0016] 第二开放阅读框架 (ORF2),其具有如 SEQ ID No :4 所示的序列,其编码如 SEQ ID No :5 所示的氨基酸序列;以及

[0017] 第三开放阅读框架 (ORF3),其具有如 SEQ ID No :6 所示的序列,其编码如 SEQ ID No :7 所示的氨基酸序列。

[0018] 本发明于第六部分中提供一种猪第二型环状病毒 (PCV2) 的检测套组,该检测套组用以侦测检验样本是否含有猪第二型环状病毒 (PCV2) 或侦测检验样本内是否含有抗猪第二型环状病毒 (PCV2) 的抗体。该检测套组包含但不限于:(1) 一抗原,该抗原为该猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的病毒抗原,于一实施例中,该抗原置于一抗原盘上,并以去活化剂处理;(2) 一抗体,该抗体由该猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 所衍生、制备而得的单株抗体或多株抗体;(3) 一经基因重组的抗原或抗体,该基因重组的抗原或抗体利用该猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的全基因组序列(如 SEQ ID No :1 所示)、或其核苷酸片段(如 SEQ ID No :2,4,6 所示)所衍生、制备而得;以及(4) 一多核苷酸 (polynucleotide),该多核苷酸由该猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的全基因组序列(如 SEQ ID No :1 所示)、或其核苷酸片段(如 SEQ ID No :2,4,6 所示)所衍生、制备,如:引子或探针;于一实施例中,该多核苷酸可用于侦测出猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 序列的引子对,如 SEQ ID Nos :8 ~ 11 所示。

[0019] 该检测套组的形式包含但不限于:酵素连结免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 套组、微晶片检验套组 (Microchip kit)、免疫荧光分析法 (immunofluorescent assay, IFA) 检测套组、聚合酶连锁反应 (PCR) 检验套组、或其他藉由该猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 所制得的检测套组。于一实施例中,该检测套组至少包含一含有该猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的抗原盘,可用于检验样本中是否含有抗猪第二型环状病毒 (PCV2) 的抗体。

[0020] 本发明所述的新颖的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain),亦应包含其继代培养的后代,或突变株,但仍具有与本发明所述的病毒特性、基因体 (genomic)、或致病性相同。

[0021] 本发明所述的「DNA (核酸)」、「多核苷酸」、「氨基酸」、「胜肽」、「多胜肽」可为自然

存在、单离的、重组的,或人工合成的。

[0022] 术语“预防、保护、对抗”意谓,相较于未使用本发明免疫组合物的动物的免疫力,使用本发明免疫组合物,将可有效增强免疫动物对抗猪第二型环状病毒(PCV2)的能力,并可预防及保护该免疫动物免于感染猪第二型环状病毒(PCV2)及其衍生的相关疾病。

[0023] 本说明书中所述的所有技术及科学术语,除非另外有所定义,皆为该所属领域具有通常技艺者可共同了解的意义。

[0024] 本发明以下面的实施例子以示范阐明,但本发明不受下述实施例所限制。

附图说明

[0025] 图 1A 为未感染猪第二型环状病毒(PCV2)的 PK-15 细胞,培养 4 天后细胞生长的形态(100×);

[0026] 图 1B 为感染猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)的 PK-15 细胞,培养 4 天后细胞生长的形态(100×)。

[0027] 图 2 为猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)基因组序列的亲缘树分析图。

[0028] 图 3 为猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)的 ORF2 氨基酸序列与美国国家生物技术资讯中心(NCBI)基因资料库(GenBank)中氨基酸序列相似度最高的前三名序列进行比对(alignment)的结果。

[0029] 图 4 为猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)的 ORF2 氨基酸序列与猪第二型环状病毒(PCV2)2d 亚群的原型株(GenBank 编号:ZJ0955b)的 ORF2(GenBank 登录号:ADD25772)氨基酸序列比对(alignment)的结果。

[0030] 图 5 为小鼠经猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)不活化疫苗免疫后,不同时间采集的血液样本以猪第二型环状病毒(PCV2)ELISA 测定抗体力价的结果。

[0031] 图 6 为仔猪经猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)不活化疫苗免疫后,不同时间采集的血液样本以猪第二型环状病毒(PCV2)IFA 测定抗体力价的结果。

[0032] 图 7 为仔猪经猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)不活化疫苗免疫后,不同时间的称重结果所画成的增重趋势图。

具体实施方式

[0033] 实施例一猪第二型环状病毒(PCV2)的分离与鉴定

[0034] 1. 种病毒株来源:

[0035] 受感染的猪只肺脏及淋巴结检体自一养猪场(台湾,新竹)中采集而来。这些受采样的八周龄猪只皆具有仔猪离乳后多系统耗弱症(PMWS)的临床征状。肺脏及淋巴结检体采集后随即置于-70℃中保存。

[0036] 为了分离检体中的病毒,将已均质化的上述检体 0.2ml 接种于未受猪环状病毒(PCV)、猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、猪腺病毒(porcine adenoviruses)、猪小病毒(porcine parvovirus)、猪繁殖与呼吸综合症(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪伪狂犬病(pseudorabies virus, PRV)、猪水泡病病毒(swine vesicular disease virus, SVDV)、霉菌菌及其他细菌污染的猪肾细胞(PK-15)单层细胞或其衍生(derived)的细胞株进行培养,于 37℃、5% CO₂

作用 1 小时后,以灭菌 PBS 冲洗 3 次,置入含 2%胎牛血清的新 MEM 培养液培养 4 小时,将培养液倒弃,加入 300mM 的 D-glucosamine 作用 30 分钟,以 PBS 冲洗 3 次后,置入约含 8%胎牛血清的新 MEM 培养液中,于 37℃、5% CO₂培养箱内培养 72 小时,再以免疫荧光分析法 (IFA) 进行检测有无病毒存在。

[0037] 免疫荧光分析法 (IFA) 的步骤如下:样品来自上述接种后的细胞,首先将培养液去除,以 1 倍 PBS 洗三次,每次五分钟。加入 75 μl 的 80%丙酮(以蒸馏水配制),于 4℃固定三十分钟,将丙酮去除后,以 1 倍 PBS 洗三次,每次五分钟。接着将 PBS 去除,再加入 75 μl 以 PBS 稀释 1500 倍的猪环状病毒抗病毒多株抗血清 (porcine circovirus anti-viral polyclonal antiserum, VMRD[®]) (一级抗体),于 37℃培养箱中培养三十分钟后,再将一级抗体移除,以 1 倍 PBS 洗三次,每次五分钟。移除 PBS 后,加入 75 μl 以 PBS 稀释 1000 倍的 Rabbit anti-Pig IgG-FITC(whole molecule) (Sigama, F1638) (二级抗体),于 37℃培养箱中培养三十分钟后,将二级抗体去除后,以 1 倍 PBS 洗三次,每次五分钟。最后于 96 孔盘中加入 200 μl 的 1 倍 PBS,以荧光显微镜观察荧光。

[0038] 选出 IFA 结果最佳的细胞所感染的病毒为种毒株。并对该病毒株基因组序列进行定序,定序结果如 SEQ ID No :1 所示,经序列比对鉴定确认为新病毒株(病毒株鉴定方法与结果如下所述),将之命名为猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain)。

[0039] 2. 种病毒株继代:

[0040] 将上述选出的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 感染新鲜的 PK-15 细胞或其衍生的细胞株,得到的病毒称之为 P₁代。收集所培养细胞的上清液 (P₁代) 并将之稀释 (比例为 1 : 2) 后,再感染新鲜的 PK-15 细胞或其衍生的细胞株,培养 3 天后,收集培养细胞的上清液 (含 P₂代病毒株),再次稀释 (比例为 1 : 2) 并感染新鲜的 PK-15 细胞或其衍生的细胞株,培养 3 天后收集上清液得到 P₃代。重复上述步骤 3 次以上,以取得猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain)P₆代。

[0041] 以 PK-15 细胞或其衍生的细胞株培养猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的过程中,观察到该病毒株会造成宿主 PK-15 细胞或其衍生的细胞株产生细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 的现象,CPE 现象如图 1B 所示;其中图 1A 为未感染猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的 PK-15 细胞,培养 4 天后细胞生长的形态 (100×);图 1B 为感染猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的 PK-15 细胞,培养 4 天后细胞生长的形态 (100×)。其中 PK-15 衍生的细胞株的 CPE 现象亦可参阅图 1B 所示。

[0042] 3. 种病毒株鉴定:

[0043] 本发明所分离得到的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的基因组序列如 SEQ ID No :1 所示,将 SEQ ID No :1 所示序列与美国国家生物技术资讯中心 (NCBI) 基因资料库 (GenBank) 进行比对,结果如表一所示,猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的基因序列与猪第二型环状病毒 (PCV2) 相似,相似度可达 99%,但并无发现 GenBank 资料库中有与猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 基因序列完全一样 (相似度 100%) 的猪第二型环状病毒 (PCV2) 存在。因此,由比对结果可知,本发明所得到的病毒分离株属猪第二型环状病毒 (PCV2) 一员,目为一株新颖的病毒株。经亲缘关系树分析结果如图 2 所示,由分析结果可知,猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 属于 PCV22d 亚群 (subgroup) 的一员。

[0044] 表一 PCV2H 株基因组序列于 NCBI 比对的结果

[0045]

登录号 (Accession No.)	说明 (Description)	Max score	Total score	Max ident.
<u>HM038017.1</u>	Porcine circovirus 2 strain BDH	<u>3236</u>	3236	99%
<u>GU001710.1</u>	Porcine circovirus 2 isolate BJ0901b	<u>3236</u>	3236	99%
<u>EF675230.1</u>	Porcine circovirus 2 strain GXHZ-1	<u>3236</u>	3236	99%
<u>GU083583.1</u>	Porcine circovirus 2 isolate PCV2C53	<u>3230</u>	3230	99%
<u>GQ359002.1</u>	Porcine circovirus 2 strain GX0839	<u>3230</u>	3230	99%
<u>FJ644929.1</u>	Porcine circovirus 2 isolate GL08	<u>3230</u>	3230	99%
<u>FJ426398.1</u>	Porcine circovirus 2 strain GXWZ-1	<u>3230</u>	3230	99%
<u>HM038030.1</u>	Porcine circovirus 2 strain AH	<u>3229</u>	3229	99%
<u>HM161710.1</u>	Porcine circovirus 2 isolate BX-2	<u>3225</u>	3225	99%

[0046] 分析结果显示,本发明的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 具有第一开放阅读框架 (ORF1),其具有如 SEQ ID No :2 所示的序列,其编码如 SEQ ID No :3 所示的氨基酸序列 ;第二开放阅读框架 (ORF2),其具有如 SEQ ID No :4 所示的序列,其编码如 SEQ ID No :5 所示的氨基酸序列 ;以及第三开放阅读框架 (ORF3),其具有如 SEQ ID No :6 所示的序列,其编码如 SEQ ID No :7 所示的氨基酸序列。

[0047] 由于猪第二型环状病毒 (PCV2) 的 ORF2 基因序列编码的外壳蛋白 (capsid),是较有可能诱发出中和抗体的抗原,因此,本案发明人将猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的 ORF2DNA 序列 (如 SEQ ID No :4 所示) 及氨基酸序列 (如 SEQ ID No :5 所示) 与 NCBI 的资料库 (GenBank) 进行比对。结果显示,GenBank 资料库内并无与猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的 ORF2DNA 序列或氨基酸序列完全一样 (相似度 100%) 的序列存在,氨基酸序列相似度最高达 98%。将氨基酸序列相似度最高的前三名序列与猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的 ORF2 氨基酸序列进行比对,结果如图 3 所示,比对后发现 6 个氨基酸不同。而与猪第二型环状病毒 (PCV2) 2d 亚群的原型株 (prototype) (GenBank 编号 :ZJ0955b) 的 ORF2 (GenBank 登录号 :ADD25772) 氨基酸序列相比,结果如图 4 所示,猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 与该序列有 7 个氨基酸相异,相似度为 97%。

[0048] 此外,本案发明人亦将猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的 ORF1 以及 ORF3 的 DNA 序列 (如 SEQ ID No :2 及 6 所示) 及氨基酸序列 (如 SEQ ID No :3 及 7 所示) 序列分别与 NCBI 的 GenBank 资料库进行比对,结果发现 GenBank 资料库中亦无与本发明猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 的 ORF1 及 ORF3 的 DNA 序列及氨基酸序列完全相同者 (相似度 100%)。

[0049] 经上述结果证实,本发明所提供的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 为一新颖的猪第二型环状病毒株 (PCV2),该病毒株已于 2011 年 11 月 5 日寄存于中国典型培养物保藏中心 (China Center For Type Culture Collection, CCTCC),寄存编号为 CCTCC No : V201117。

[0050] 实施例二猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 疫苗的制备

[0051] 1. 病毒培养

[0052] 取未受猪环状病毒 (PCV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪腺病毒、猪小病毒、猪繁殖与呼吸综合症 (PRRSV)、猪伪狂犬病 (PRV)、猪水泡病病毒 (SVDV)、霉菌菌及其他细菌的污染的 PK-15 细胞, 在 37℃、5% CO₂ 之下培养于细胞生长培养基 (约含有 5% 胎牛血清的 MEM 培养基, pH7.2±0.2) 内。待该 PK-15 细胞铺平长满后, 以约 0.2% Trypsin-EDTA 完整消化细胞, 以细胞维持培养基 (约含有 2% 胎牛血清的 MEM 培养基, pH7.4±0.2) 冲散细胞后计算细胞数, 加入适量细胞生长培养基, 调整细胞数为 3.0×10⁵/ml, 分装至回转瓶, 于 37℃ 下回转培养 3~4 日之使形成单层细胞。以细胞维持培养基将猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 种毒液调整为 10^{4.0}TCID₅₀/ml。将已长成单层细胞的回转瓶内的培养基移除, 加入 PBS 洗净细胞面, 接种已配制好的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 种毒液, 将回转瓶置于 37℃ 下进行病毒增殖培养。病毒接种后 48~96 小时, 抽样以免疫荧光分析法 (IFA) 测定病毒含有量, 当病毒含有量达 10^{6.0}TCID₅₀/ml 以上时收集病毒液; 或当细胞病变 (CPE) 达 70~80% 时收集病毒液。

[0053] 2. 不活化处理 (inactivated process)

[0054] 将 37% 甲醛溶液 (formaldehyde) 加入步骤所收集的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 病毒液中, 并调整甲醛含量至终浓度为 0.2% (w/v), 并于 37℃ 下持续震荡至少 24 小时, 较佳可为 48 小时, 以进行不活化处理; 经过验证实验确定猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 病毒液已完全不活化后, 将含有甲醛的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 病毒液离心, 移除上清液以去除甲醛, 并将猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 病毒液悬浮于缓冲溶液 (如: 蒸馏水或磷酸缓冲盐溶液, phosphate buffered saline, PBS) 中, 即可制得含抗原的疫苗原液 (死毒抗原), 并保存于 4℃ 备用。

[0055] 3. 猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 不活化疫苗的调制

[0056] 取步骤二所制得的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 灭活抗原, 加入已灭菌的双相油质佐剂 (如: MONTANIDE™ ISA206 双相油质佐剂, 最终浓度 50%, v/v) 后, 置于乳化桶内混合均匀, 进行油质乳化反应, 反应完成后即获得猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 不活化油质佐剂疫苗。

[0057] 对于该领域具有通常技艺者亦可藉由习知技艺, 挑选其他适用的佐剂以制备本发明的猪第二型环状病毒 (PCV2) 不活化疫苗, 其中该双相油质佐剂 (如: 水包油包水剂型, w/o/w) 亦可更换但不限于油质佐剂 (如: 矿物油、植物油、动物油、佛氏完全佐剂、佛氏不完全佐剂等)、水质佐剂 (如: 氢氧化铝)、生物型佐剂 (如: CpG 寡核苷酸、细菌类毒素 toxoid) 等。

[0058] 实施例三猪第二型环状病毒 (PCV2) 检测套组的制备 -1

[0059] 于本实施例中, 猪第二型环状病毒 (PCV2) 检测套组为含有本发明猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 病毒抗原的抗原盘。首先将 PK-15 细胞 (或其单株化的细胞株) 进行继代培养, 将 PK-15 细胞调整细胞浓度至 2×10⁵ cells/ml, 并取 96 孔微量平底培养盘, 每孔加入 PK-15 细胞悬浮液 50 μl, 并于每一孔中加入 50 μl 猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 病毒液 (1×10³TCID₅₀), 再置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 72 小时后, 以灭菌 PBS 清洗 2 次, 以 80% 丙酮在室温下固定 15 分钟, 再以 PBS 液清洗 3 次去除固定液后, 倒置放进

37℃培养箱中风干后,保存于-20℃下备用。该抗原盘可用于检测猪血清样本中是否含有抗猪第二型环状病毒(PCV2)的抗体。(Tischer et al.,1995)

[0060] 实施例四猪第二型环状病毒(PCV2)检测套组的制备-2

[0061] 于本实施例中,猪第二型环状病毒(PCV2)检测套组为含有本发明猪第二型环状病毒H株(PCV2H strain)的重组外壳蛋白(capsid)(即ORF2基因片段编码的蛋白)的抗原盘。该重组外壳蛋白(capsid)具有如SEQ ID No:5(ORF2氨基酸序列)所示的序列,系作为抗原盘上的抗原。

[0062] 首先,以聚合酶连锁反应(PCR)增幅本发明猪第二型环状病毒H株(PCV2H strain)ORF2DNA片段。取本发明猪第二型环状病毒H株(PCV2H strain)DNA,将该病毒DNA溶于50 μl二次水作为DNA模板。使用GeneAmp PCR System2400反应器(购自Applied Biosystems)进行PCR。取8 μl的DNA模版、5 μl10倍PCR buffer(MDBio, Inc.)、8 μl1.25mM dNTP、50 μM正向及反向引子各1 μl、0.5 μl Pfu DNA polymerase(MDBio, Inc.),最后以二次水补至总体积为50 μl。PCR反应条件为:95℃反应5分钟后,进行95℃30秒、55℃30秒、72℃30秒,共25个循环,最后以72℃反应5分钟以进行延伸反应。将PCR产物以PCR-M纯化套组(Viogene)纯化之。其中该正向引子及反向引子为该领域具有通常技艺,可依本发明所提供的PCV2H株的DNA片段(如:ORF2 DNA片段)为模板以设计之。在本实施例中,该正向引子具有限制酶HindIII切位,而该反向引子具有限制酶XhoI切位。

[0063] 接着,将该纯化后的PCR产物构筑于pET24a表现载体。先将该PCR产物与pET24a表现载体(Novagen)分别以Hind III及Xho I两种限制酶(New England Biolabs),于37℃下,进行限制酶切割反应(Restriction Enzyme Cleavage Reaction)8小时。并以PCR-M纯化套组(Viogene)纯化该酶切后的PCR产物及pET24a表现载体。再将酶切后PCR产物与酶切后的pET24a载体进行接合反应(ligation),以取得pET24a-ORF2质体,并将该质体利用转殖作用(transformation)送入表现宿主大肠杆菌(E. coli)中,经选殖挑选出菌株中带有该PCR产物片段的质体后,进行定序确认增殖的PCR产物序列无误,以得到含有pET24a-ORF2质体的菌株。

[0064] 再将含有pET24a-ORF2质体的菌株以2ml的LB培养基,于37℃培养16~18小时,再将菌液以1:50的比例接种至含有25 μg/ml kanamycin的新鲜LB培养基中,置于37℃、200rpm的培养箱中培养,直到菌液浓度达0.6600nm为0.6时,加入β-D-thiogalactoside(IPTG)使其最终浓度为1mM,再于37℃、200rpm的培养箱中培养6小时,吸取1ml菌液,经10,000×g离心后,取离心后的菌块以B-PERTM细菌蛋白质萃取试剂(B-PERTM Bacterial Protein Extraction,Pierce Protein Research Produces)来确认重组蛋白为可溶性蛋白或是包涵体(indusion body)。确认方法为于菌块中加入40 μl的反应试剂,剧烈震荡(vortex)1分钟后,10,000×g离心,离心后重组蛋白在上层部份为可溶性蛋白,在下层部份则为包涵体。将可溶性蛋白溶于SDS-PAGE用的1x sample buffer,下层的菌块则加入2x的SDS-PAGE sample buffer。以干浴槽100℃煮沸20分钟后离心之,吸取上层液体部份,以15%的SDS-PAGE确认重组蛋白表现的情况;确认无误后,取所得的猪第二型环状病毒H株(PCV2H strain)的重组外壳蛋白(capsid)进行抗原盘的制备。

[0065] 以pH9.6PBS将所得的猪第二型环状病毒H株(PCV2H strain)的重组外壳蛋白

(capsid) 稀释至终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$, 包覆于 96 孔微量平底培养盘 ($100 \mu\text{L}/\text{孔}$), 于 37°C 下作用 2 小时后, 于 4°C 包覆过夜; 以 PBS 洗涤 3 次, 每次 3 ~ 5 分钟; 每孔加 $200 \mu\text{L}$ 的 0.15% BSA 阻隔液 (blocking solution) 阻隔 (block) 该 96 孔微量平底培养盘, 置于 37°C 作用 2 小时后以 PBS 洗涤, 并存放于 4°C 下作为猪第二型环状病毒 (PCV2) 检测套组备用。

[0066] 实施例五抗猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 抗体的制备

[0067] 1. 抗 PCV2H 株的多株抗体:

[0068] 培养 PCV2H 病毒株至适当的病毒力价后, 采收病毒液进行去活化。将去活化后的病毒液与适用的佐剂 (如: 弗氏完全佐剂) 混合后施与动物 (如: 鼠、猪、山羊、兔) 以进行初级免疫, 经适当时间间隔后 (如: 2 ~ 3 周), 视需要以不活化后的病毒液及适当的佐剂 (如: 弗氏不完全佐剂) 施与二级免疫。经适当时间间隔后 (如: 2 ~ 3 周), 采集免疫动物 (如: 鼠、猪、山羊、兔) 的血清, 即制得抗 PCV2H 株的多株抗体。

[0069] 其中该抗 PCV2H 株的多株抗体, 可视需要与显色剂或荧光结合。

[0070] 其中该动物经施予初级免疫及二级免疫后, 可视需要增加免疫次数, 以提高抗体力价。

[0071] 其中施与的动物包含, 但不限于: 鼠、兔、禽 (蛋)、猪、山羊、牛、水产动物。

[0072] 2. 抗 PCV2H 株的单株抗体:

[0073] 将 PCV2H 株浓缩的病毒, 或其特定 PCV2H 株的抗原片段 (如: ORF2) 的抗原蛋白施予动物 (如: 小鼠), 视需要可添加适当的佐剂 (如: 弗氏完全佐剂), 以进行初级免疫。经适当时间间隔后 (如: 2 ~ 3 周), 视需要以不活化的病毒 (或抗原蛋白) 及适当的佐剂 (如: 弗氏不完全佐剂) 施与二级免疫。经适当时间间隔后 (如: 2 ~ 3 周), 采集免疫动物 (如: 小鼠) 的血清, 用以评估适合用以采集脾脏细胞的小鼠。从该适用的小鼠采集脾脏细胞与骨髓瘤细胞 (如: FO 细胞株、NS 细胞株) 以 PEG (Polyethylene Glycol, 如 PEG1500) 进行细胞融合。从融合细胞中筛选出具分泌能力的融合瘤并单株化后, 可得一适合用以产制抗 PCV2H 株的单株抗体的融合细胞系。

[0074] 经上述制备所得的抗体, 可用于免疫检测试剂、治疗剂、或加入食品、饲料中使食用者具有免疫力。

[0075] 实施例六猪第二型环状病毒 (PCV2) 不活化疫苗的效力试验 -1

[0076] 1. 小鼠免疫试验

[0077] 用 5 ~ 6 周龄健康雌性清洁级 Balb/c 小鼠 60 只作为试验动物, 所有小鼠的猪第二型环状病毒 (PCV2) 酵素结合免疫吸附分析 (ELISA) 抗体皆呈阴性。将这 60 只小鼠随机分为 4 组, 每组 15 只, 第 1 ~ 3 组分别以肌肉注射 3 个批次的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 不活化疫苗, 注射剂量为 $0.2\text{ml}/\text{只}$, 两周后用相同免疫剂量加强免疫一次; 第 4 组为空白对照组, 隔离饲养观察, 首次免疫后第 2、3、4、5 周分别随机取出 5 只, 采血分离血清, 测定血清内猪第二型环状病毒 (PCV2) 的 ELISA 抗体力价。

[0078] 2. 血清抗体的判定 - 以酵素连结免疫分析 (ELISA) 测定猪第二型环状病毒 (PCV2) 抗体力价

[0079] 可采用实施例三或实施例四所制备的抗原盘作为检测套组。以含有 $500 \mu\text{L}/\text{L}$ Tween-20 的 $50\text{mmol}/\text{L}$ PBS (pH7.2) (即 PBST) 洗涤抗原盘 3 次, 每次 3 ~ 5 分钟; 再于抗原盘中加入 0.15% BSA 阻隔液 (blocking solution) ($200 \mu\text{L}/\text{孔}$), 以阻隔 (block) 抗原

盘,并于 37℃ 下作用 2 小时后,以 PBS 洗涤。将待检测的小鼠血清以 PBS 缓冲液以 1 : 50 倍数稀释,然后再做倍比稀释;每孔加 100 μ L 稀释的小鼠血清,于 37℃ 下作用 1 小时后,以 PBS 洗涤;然后加入酵素(辣根过氧化酵素(Horseradish peroxidase, HRP)标定的二级抗体(如:兔抗鼠的二级抗体),于 37℃ 下作用 1 小时后,以 PBS 洗涤;接着加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺二盐酸(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)溶液显色,最后用 2mM 的 H₂SO₄终止反应后判定结果。判定结果标准为:血清样本 OD₄₅₀值 / 阴性血清 OD₄₅₀值 (P/N 值) \geq 2.1 为阳性。以 P/N 值 \geq 2.1 的血清最大稀释度作为该血清样本的 ELISA 抗体力价。

[0080] 除了本实施例所用的辣根过氧化酵素(HRP)与 TMB 之外,亦可使用其他具有相同功能的显色试剂、或荧光标记,如:碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)、4-甲基伞形酮磷酸酯(4-Methylumbelliferyl Phosphate, 4-MUP)、荧光异硫氰酸盐(Fluorescein isothiocyanate, FITC)。

[0081] 3. 结果

[0082] 小鼠经不同批次的疫苗首次免疫后,于首次免疫后第二周起均可从小鼠血清中检测出抗猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)的抗体,再经加强免疫后,其 ELISA 抗体力价于首次免疫后 35 天可达 1800 ~ 2000(图 5);由此可知,本发明所提供的猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)不活化疫苗可有效诱发小鼠体内的免疫反应。

[0083] 实施例七猪第二型环状病毒(PCV2)不活化疫苗的效力试验-2

[0084] 1. 猪体免疫试验

[0085] 取约 5 ~ 6 周龄健康仔猪 2 头,以肌肉注射猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)不活化疫苗,注射剂量为 1ml/头,三周后用相同免疫剂量加强免疫次;于首次免疫前(约 5 ~ 6 周龄)、二次免疫前(约 8 ~ 9 周龄),以及二次免疫后 2 周(约 10 ~ 11 周龄)分别采集血清及称重,并以 ELISA 检测血清中的抗体力价。

[0086] 2. 血清抗体的判定-以酵素连结免疫分析(ELISA)测定猪第二型环状病毒(PCV2)抗体力价

[0087] 以实施例三或实施例四所制备的抗原盘作为检测套组。以含有 500 μ L Tween-20 的 50mmol/L PBS(pH7.2)(即 PBST)洗涤抗原盘 3 次,每次 3 ~ 5 分钟;再于抗原盘中加入 0.15% BSA 阻隔液(blocking solution)(200 μ L/孔),以阻隔(block)抗原盘,并于 37℃ 下作用 2 小时后,以 PBS 洗涤。将待检测的猪血清以 PBS 缓冲液以 1 : 50 倍数稀释,然后再做倍比稀释;每孔加 100 μ L 稀释的猪血清,于 37℃ 下作用 1 小时后,以 PBS 洗涤;然后加入二级抗体(如:山羊抗猪的二级抗体),于 37℃ 下作用 1 小时后,以 PBS 洗涤;接着加入 TMB 溶液显色,最后用 2mM 的 H₂SO₄终止反应后判定结果。判定结果标准为:血清样本 OD₄₅₀值 / 阴性血清 OD₄₅₀值 (P/N 值) \geq 2.1 为阳性。以 P/N 值 \geq 2.1 的血清最大稀释度作为该血清样本的 ELISA 抗体力价。

[0088] 3. 结果

[0089] 请参阅表二,仔猪以本发明猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)不活化疫苗免疫后,于首次免疫后三周内可从仔猪血清中检测出抗猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)的抗体,再经二次免疫后二周内,其 ELISA 抗体力价可达 11,000 以上;由此可知,本发明所提供的猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)不活化疫苗可有效诱发仔猪体内

的免疫反应。

[0090] 表二以 ELISA 判定仔猪血清样本中的抗体力价的结果

[0091]

采样时间	首次免疫前 (约 5~6 周龄)	二次免疫前 (约 8~9 周龄)	二次免疫后 2 周 (约 10~11 周龄)
仔猪 1	1	8,490	11,728
仔猪 2	1	10,263	13,065

[0092] 实施例八猪第二型环状病毒 (PCV2) 不活化疫苗的效力试验 -3

[0093] 1. 猪体免疫试验

[0094] 请参阅表三,取约 2 周龄健康仔猪 40 头,随机分为 4 组,每组 10 头。于 3 周龄时第 1~3 组分别以肌肉注射 3 个批次的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 不活化疫苗,注射剂量为 1ml/头,三周后用相同免疫剂量加强免疫一次;第 4 组为空白对照组,隔离饲养;首免前第 1 周(约 2 周龄)及首免疫后第 1(约 4 周龄)、2(约 5 周龄)、3(约 6 周龄)和第 5 周(8 周龄)分别采集血清及称重,并以 IFA 检测仔猪血清中抗体力价。

[0095] 表三猪只免疫计划及检测项目

[0096]

周龄	2	3	4	5	6	8
免疫计划	-	首次免疫	-	-	二次免疫	-
检测项目 1	采血、	-	采血、	采血、	采血、	采血、

[0097]

	测 IFA	测 IFA	测 IFA	测 IFA	测 IFA
检测项目 2	-	称重	称重	称重	称重

[0098] 2. 血清抗体的判定 - 免疫荧光分析法 (IFA) 法测定猪第二型环状病毒 (PCV2) 抗体力价

[0099] 将实施例三制得的猪第二型环状病毒 (PCV2) 抗原盘由 -20℃ 低温保存环境取出之后,倒置放进 37℃ 培养箱中风干。将收集的猪只血清样本先以 PBS buffer 进行 50 倍稀释,然后连续以 2 倍稀释的方式进行稀释,再将稀释的血清样品分注于猪第二型环状病毒 (PCV2) 抗原盘中,每孔分注 50 μl。再将抗原盘置于 37℃ 培养 30 分钟后以 PBS 清洗 3 次,以去除未作用的抗体,每孔再加入 50 μl rabbit-anti-pig IgG FITC conjugate(1 : 100, Sigma),避光培养 30 分钟后以 PBS 清洗 3 次,于荧光显微镜下观察,并进行猪第二型环状病毒 (PCV2) 抗体力价判定。(Rodriguez-Arriola et al., 2000)

[0100] 3. 结果

[0101] 3.1 抗体力价

[0102] 请参阅表四及图 6 所示,仔猪经不同批次的疫苗首次免疫后,于首次免疫后第二周(5 周龄)时,其抗体力价已升至约 600,而对照组则无变化。再经二次免疫(6 周龄)后,发现免疫组的抗体力价皆大幅度提升;于 8 周龄时,其抗体力价亦较 6 周龄时更为提升,而

对照组仍无变化。

[0103] 表四以 IFA 判定仔猪血清样本中的抗体力价的结果

[0104]

周龄	2	4	5	6	8
第 1 组	800	200	600	13,440	48,640
第 2 组	1,680	230	620	20,800	46,720
第 3 组	1,100	220	650	18,660	49,760
第 4 组 (对照组)	1,880	210	190	300	170

[0105] 3.2 增重趋势

[0106] 请参阅表五及图 7 所示,相较于对照组,仔猪经不同批次的疫苗免疫后,免疫组的体重增重趋势,明显高于对照组的增重趋势。至 8 周龄时,免疫组的仔猪体重明显高于对照组约 2 公斤。表五猪只的增重趋势(单位:公斤)

[0107]

周龄	3	4	5	6	8
第 1 组	8.4461	9.9512	12.4207	16.1756	20.5284
第 2 组	7.3781	9.064	11.7594	15.2267	20.3755
第 3 组	7.9564	9.5413	12.3461	15.8561	20.4345
第 4 组 (对照组)	7.5906	8.9899	11.724	12.9102	18.6059

[0108] 因此,经本发明的猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)不活化疫苗免疫后的猪只,其抗体力价可大幅度提升,改善猪只的免疫力,进而促使猪只的增重率上升。

[0109] 实施例九猪第二型环状病毒(PCV2)不活化疫苗的效力试验-4

[0110] 1. 猪体免疫试验

[0111] 取 14~16 日龄猪第二型环状病毒(PCV2)抗体呈阴性的健康仔猪 20 头,随机分为 4 组,每组 5 头。第 1~3 组分别以肌肉注射 3 个批次的猪第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)不活化疫苗,注射剂量为 1ml/头,两周后用相同免疫剂量加强免疫一次;第 4 组为空白对照组,隔离饲养;首次免疫后第 5 周以第二型环状病毒 H 株(PCV2H strain)(强毒株)($10^{6.0}$ TCID₅₀/ml)攻毒,每头猪滴鼻 1ml、肌肉注射 2ml,攻毒后第 7、11、19 和 25 天采集血清和鼻拭的样品,以 PCR 检测有无病毒。

[0112] 2. 以 PCR 侦测猪第二型环状病毒(PCV2)(病毒血症)

[0113] 以聚合酶连锁反应(PCR)检测猪只血液样本内猪第二型环状病毒(PCV2)。病毒 DNA 的萃取用 DNAzol® 试剂,基本步骤为:于 200 μ L 血清中加入 400 μ L DNAzol,以 12,000rpm/min 离心 15min 后取上清,并加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀,再以 12,000rpm/min 离心 15min 后弃掉上清液,以 75%乙醇洗涤 DNA,再以 12,000rpm/min 离心 5min 后弃掉

上清液,最后以 8mM NaOH 溶 DNA。

[0114] PCR 所用的引子序列如下:

[0115] PCV2-F1 :5' GTGAAGTGGTATTTTGGTGCC3' (SEQ ID No :8)

[0116] PCV2-Ri :5' GTCTTCCAATCACGCTTCTGC3' (SEQ ID No :9)

[0117] 预期扩增片段在 PCV2ORF1 区域,增幅的 PCR 产物大小为 284bp。PCR 反应总体积为 25 μ L,含正向引子 PCV2-F1 1 μ L、反向引子 PCV2-R1 1 μ L、25mM Mg^{2+} 1.5 μ L、2.5mM dNTPs2.0 μ L、10 \times Mg^{2+} free buffer2.5 μ L、Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L、二次蒸馏水 11.8 μ L,以及模板 DNA5 μ L。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟后,进行 94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒,共 38 个循环,再以 72 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟以进行延伸反应,最后则维持在 4 $^{\circ}$ C。PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。另,用以检测猪只血液样本内猪第二型环状病毒 (PCV2) 的引子序列亦可为:

[0118] PCV2-F2 :5' TGTTGGCGAGGAGGGTAATG' 3 (SEQ ID No :10)

[0119] PCV2-R2 :5' TGGGACAGCAGTTGAGGAGT' 3 (SEQ ID No :11)

[0120] 利用该引子对可增幅的 PCR 产物大小为 676bp。

[0121] 3. 病理解剖和病理组织学观察

[0122] 猪只于攻毒后第 25 天宰杀解剖,以观察脏器病理变化,并采集淋巴结和肺脏组织,以 4% 甲醛固定,制备石蜡切片,进行苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining),显微镜观察组织病变。

[0123] 4. 结果

[0124] 4.1 病毒血症

[0125] 从 PCR 检测病毒血症的结果可知,在攻毒后 25 天时,免疫组 (第 1~3 组) 的病毒血症发生率比未免疫的对照组 (第 4 组) 的病毒血症发生率低 40~60% (表六),表示本发明的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 不活化疫苗可诱发猪只产生免疫力、降低病毒血症的严重性、缩短病毒血症的感染时间,进而提供猪只足够的保护效果以抗猪第二型环状病毒 (PCV2) 的感染。

[0126] 表六、免疫猪只经猪第二型环状病毒 (PCV2) 攻毒后,病毒血症的检测结果

[0127]

组别	攻毒前	攻毒后天数			
		7	11	19	25
第 1 组	0/5 ^a	2/5	2/5	1/5	1/5
第 2 组	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5
第 3 组	0/5	3/5	2/5	1/5	1/5
第 4 组 (对照组)	0/5	4/5	3/5	4/5	3/5

[0128] ^a分母为检测猪总头数,分子为 PCR 结果呈阳性猪头数

[0129] 4.2 病理变化

[0130] 请参阅表七及表八,猪只攻毒后第 25 天宰杀解剖,进行病理学观察,结果显示:攻

毒对照组中 2 只仔猪的腹股沟淋巴结、肺门淋巴结和肠系膜淋巴结明显水肿、切面苍白,1 只仔猪的肺脏弹性变小、水肿,或肾脏变黄,有少量灰白色点;而免疫组仔猪则皆没有明显的病理变化。

[0131] 表七、猪攻毒后的肉眼病理变化观察统计结果

[0132]

组别	肉眼病理变化				
	淋巴结水肿	肺水肿	花斑肾	脾轻度肿大	其他病变 ^b
第 1 组	0/5 ^a	0/5	0/5	0/5	0/5
第 2 组	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
第 3 组	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
第 4 组 (对照组)	2/5	1/5	1/5	1/5	0/5

[0133] a. 分母为剖解猪总头数,分子为有病变猪头数;

[0134] b. 其它病变包括肝胆轻度肿大,肠道鼓气。

[0135] 表八为不同试验猪只经攻毒后,其病理变化及猪第二型环状病毒 (PCV2) 检测结果,结果显示:攻毒对照组中各猪只的病理变化明显,如:淋巴结内淋巴细胞缺失 (5/5)、巨噬细胞浸润 (4/5)、淋巴结中猪第二型环状病毒 (PCV2) PCR 检测结果均为阳性 (5/5);3 只仔猪的肺脏组织有炎性细胞浸润、肺组织中猪第二型环状病毒 (PCV2) PCR 检测结果有 2 只仔猪呈阳性;相较于未免疫的对照组仔猪,免疫组仔猪具有病理变化及病毒血症的情况明显减少,3 个免疫组中只有 1 只仔猪 (编号:A4) 的淋巴结出现组织病理变化,淋巴结和肺组织中猪第二型环状病毒 (PCV2) PCR 检测结果呈阳性。因此,该三批次的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2 H strain) 灭活疫苗对于猪只均有明显保护作用,其保护率约为 80%~100%。

[0136] 表八、不同试验猪只经攻毒后,其病理变化及 PCV2 检测结果

[0137]

组别	猪 编号	淋巴结			肺组织			发病 判定	保 护 率 (%)
		肉眼 病变	淋巴 细胞 缺失	巨噬 细胞 浸润	淋巴结 PCR	肉眼 病变	炎性 细胞 浸润		
第 1 组	A1	-	-	-	-	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-	-	-	-	-
	A3	-	-	-	-	-	-	-	-
	A4	-	+	+	+	-	-	-	+
	A5	-	-	-	-	-	-	-	-
	小计	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5*	0/5*	1/5
第 2 组	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
	B3	-	-	-	-	-	-	-	-
	B4	-	-	-	-	-	-	-	-
	B5	-	-	-	-	-	-	-	-
	小计	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
第 3 组	C1	-	-	-	-	-	-	-	-
	C2	-	-	-	-	-	-	-	-
	C3	-	-	-	-	-	-	-	-
	C4	-	-	-	-	-	-	-	-
	C5	-	-	-	-	-	-	-	-
	小计	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
第 4 组 (对照组)	D1	+	+	+	+	-	+	-	+
	D2	+	+	+	+	+	+	+	+
	D3	-	+	+	+	-	+	+	+
	D4	-	+	+	+	-	-	-	+
	D5	-	+	-	+	-	-	-	+
	小计	2/5	5/5	4/5	5/5	1/5	3/5	2/5	5/5

[0138] * 分母为检测猪总数, 分子为出现该病变或病毒的猪数。

[0139] 综上所述, 本发明所提供的猪第二型环状病毒 H 株 (PCV2H strain) 疫苗除可诱发猪只产生免疫力外, 亦可降低病毒血症的严重性、缩短病毒血症的感染时间、改善其临床症状, 进而对抗猪第二型环状病毒 (PCV2) 的感染, 提供猪只足够的保护效果, 促使猪只的生理状况更趋健康 (如: 增重趋势), 更提供畜猪业者一保护猪只对抗猪第二型环状病毒 (PCV2) 感染的方法, 藉此有效提升猪只饲养率。

[0001]

序列表

<110> 福又达生物科技股份有限公司

<120> 猪第二型环状病毒、含彼此的免疫组合物、检测套组及其应用

<160> 11

<210> 1

<211> 1767

<212> DNA

<213> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain)

<220>

<223> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain)的基因组DNA

<400> 1

```

accagcgcac ttggcagcgc gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca      60
agaagagtgg aagaagcggg ccccaaccac ataaaagggt ggtgttcacg ctgaataatc      120
cttccgaaga cgagcgcgaag aaaatacggg agctcccaat ctccetattt gattatttta      180
ttgttgccga ggaaggtaat gaggagggcc gaacaeccca ctacagggg ttcgctaatt      240
ttgtgaagaa gcaaactttt aataaagtga agtggtattt tgggtcccgc tgccacatcg      300
agaaaagcga aggaacagat cagcagaata aagaatattg cagtaaagaa ggcaacttae      360
tgatagaatg tggagctcct agatctcaag gacaacggag tgacctctct actgctgtga      420
gtacctgttt ggagagcggg agtctgggtg cegttgcaga gcagcacctt gtaacgtttg      480
tcagaaattt ccgcgggetg gctgaacttt tgaagtgtag cgggaaaatg cagaagcgtg      540
attggaagac gaatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggcaaa agcaaatggg      600
ctgctaattt tgcagaccog gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtgg      660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtt ttgatgactt ttatggctgg ctgccgtggg      720
atgatctact gagactctgt gatcgatata ctttgactgt tgagactaaa ggtggaaactg      780
tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccgttg gaatggtact      840
ectcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tctatcggag gattaettcc ttggtatttt      900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttegtcaec etttcccccc      960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt ttttatcaet tcgtaatggt      1020
ttttattatt cacttagggt taagtggggg gtctttaaga ttaaattctc tgaattgtac      1080
atacatgggt ataccgatat ttagtctctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc      1140
gagcctaca tgggtctacat ttccagtagt ttgtagtctc agccagagtt gatttctttt      1200
gttattgggt tggaaagtaat cgattgtctc atcaaggaca ggtttegggg taaagtaccg      1260
ggagtggtag gagaagggct gggttatggt atggcggggag gagtagttaa cataggggtc      1320
ataggttagg gcattggcct ttgttacaaa gttatcatct agaataacag cagtggagct      1380
cactcccctg tcaccctggg tgattgggga gcagggccag aattcaacct taaccttctc      1440
tattctgtag tattcaaaag gcacagttag ggggcttagg ccccctctg ggggaagaaa      1500
atcataaata ttaaafctca tcatgtccac attccaggag ggcgttctga ctgtggtttt      1560
cttgacagta taaccgatgg tgcgggagag gcgggtgttg aagatgcat ttttctctc      1620
ccagcggtaa cgggtggcggg ggtggactag ccaggggagg cggcggagga tctggccaag      1680
atggetgagg gggcgggtgc ttcgtctgag gtaacgcctc cttggatacg tcatcgtgta      1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtattt

```

<210> 2

<211> 945

<212> DNA

<213> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain)

<220>

<223> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain) ORF1 DNA序列

<400> 2

```

atgcccagca agaagagtgg aagaagcggg ccccaaccac ataaaagggt ggtgttcacg      60
ctgaataatc cttccgaaga cgagcgcgaag aaaatacggg agctcccaat ctccetattt      120
gattatttta ttgttgccga ggaaggtaat gaggagggcc gaacaeccca ctacagggg      180

```

[0002]

```

ttcgetaatt ttgtgaagaa gcaaactttt aataaagtga agtgggtatth ttgtgcecege      240
tgccacatcg agaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatattg cagtaaagaa      300
ggcaacttac tgatagaatg tggagctcct agatctcaag gacaacggag tgacctctct      360
actgctgtga gtaccttggt ggagageggg agtctgtgta ccgttgcaga gcagcacctt      420
gtaacgtttg tcagaaatth ccgcgggctg gctgaactth tgaaagtgag cgggaaaatg      480
cagaagcgtg attggaagac gaatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggcaaa      540
agcaaatggg ctgctaattt tgcagaaccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac      600
aagtgggtgg atggttacca tggatgaagaa gtggttgtha ttgatgactt ttatggctgg      660
etgcectggg atgatctact gagactctgt gatcgataac ctttgactgt tgagactaaa      720
ggtggaactg tacctthttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccgttg      780
gaatggtaet cctcaactgc tgtcccagct gtagaagetc tctatcggag gattacttec      840
ttggatthtt ggaagaatgc tacagaacaa tecacggagg aagggggcca gttcgtcacc      900
ctttcccccc catgcctcga atttccatat gaaataaatt actga      945
    
```

- <210> 3
- <211> 314
- <212> PRT
- <213> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain)
- <220>
- <223> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain) ORF1氨基酸序列

```

<400> 3
Met Pro Ser Lys Lys Ser Gly Arg Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg
1          5          10          15
Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro Ser Glu Asp Glu Arg Lys Lys Ile
          20          25          30
Arg Glu Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Phe Ile Val Gly Glu Glu
          35          40          45
Gly Asn Glu Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe
          50          55          60
Val Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly Ala Arg
65          70          75          80
Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
          85          90          95
Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Ser
          100         105         110
Gln Gly Gln Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu
          115         120         125
Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val
          130         135         140
Arg Asn Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met
145         150         155         160
Gln Lys Arg Asp Trp Lys Thr Asn Val His Val Ile Val Gly Pro Pro
          165         170         175
Gly Cys Gly Lys Ser Lys Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr
          180         185         190
Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly
          195         200         205
Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp
          210         215         220
Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys
225         230         235         240
Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn
          245         250         255
Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu
    
```

[0003]

260 265 270
 Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr
 275 280 285
 Glu Gln Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro
 290 295 300
 Cys Pro Glu Phe Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr
 305 310

<210> 4
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain)
 <220>
 <223> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain) ORF2 DNA序列

<400> 4
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga cgaagacacc geccccgcag ccatettggc 60
 cagatcctcc gccgcccgcc ctggctagtc cccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
 aaaaatggca tctcaaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc 180
 acagteagaa cgcctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttett 240
 cccccaggag ggggctcaag ccccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag 300
 gttaaggttg aattctggcc ctgctcccca atcaccaggg gtgacagggg agtgagctcc 360
 actgetgta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaact actctcccg ccataccata acccagcct tctctacca ctcccgtac 480
 ttacccega aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaaccaa taacaaaaga 540
 aatcaactet ggetgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg ccteggeact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataacat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatettaa agacccccca cttaacctta agtga 705

<210> 5
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain)
 <220>
 <223> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain) ORF2氨基酸序列

<400> 5
 Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45
 Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Arg Thr
 50 55 60
 Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Ser Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Ser Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr

[0004]

```

130                               135                               140
Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145                               150                               155                               160
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165                               170                               175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr Gly Asn
180                               185                               190
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
195                               200                               205
Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210                               215                               220
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys
225                               230

```

<210> 6

<211> 315

<212> DNA

<213> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain)

<220>

<223> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain) ORF3 DNA序列

<400> 6

```

atggtaacca tcccaccact tgtttctagg tggtttcag tatgtggtt cgggtctgc      60
aaaattagca gccatttgc ttttgccaca cccaggtggc cccacaatga cgtgtacatt      120
cgtcttccaa tcacgcttct gcattttccc gctcactttc aaaagttcag ccagcccgcg      180
gaaatttctg acaaacgtta cagggtgctg ctctgcaacg gtcaccagac tcccgetete      240
caacaaggta ctcacagcag tagagaggtc aetccgttgt ccttgagate taggagctec      300
acattctatc agtaa                                     315

```

<210> 7

<211> 104

<212> PRT

<213> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain)

<220>

<223> 猪第二型环状病毒H株(Porcine Circovirus Type 2 H strain) ORF3氨基酸序列

<400> 7

```

Met Val Thr Ile Pro Pro Leu Val Ser Arg Trp Phe Pro Val Cys Gly
1                               5                               10                               15
Phe Arg Val Cys Lys Ile Ser Ser Pro Phe Ala Phe Ala Thr Pro Arg
20                               25                               30
Trp Pro His Asn Asp Val Tyr Ile Arg Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
35                               40                               45
Phe Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser Asp
50                               55                               60
Lys Arg Tyr Arg Val Leu Leu Cys Asn Gly His Gln Thr Pro Ala Leu
65                               70                               75                               80
Gln Gln Gly Thr His Ser Ser Arg Glu Val Thr Pro Leu Ser Leu Arg
85                               90                               95
Ser Arg Ser Ser Thr Phe Tyr Gln
100

```

<210> 8

[0005]

<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 侦测猪第二型环状病毒(Porcine Circovirus Type 2)所用的引子/探针	
<400> 8	
GTGAAGTGGT ATTTTGGTGC C	21
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 侦测猪第二型环状病毒(Porcine Circovirus Type 2)所用的引子/探针	
<400> 9	
GTCTTCCAAT CACGCTTCTG C	21
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 侦测猪第二型环状病毒(Porcine Circovirus Type 2)所用的引子/探针	
<400> 10	
TGTTGGCGAG GAGGGTAATG	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 侦测猪第二型环状病毒(Porcine Circovirus Type 2)所用的引子/探针	
<400> 11	
TGGGACAGCA GTTGAGGAGT	20

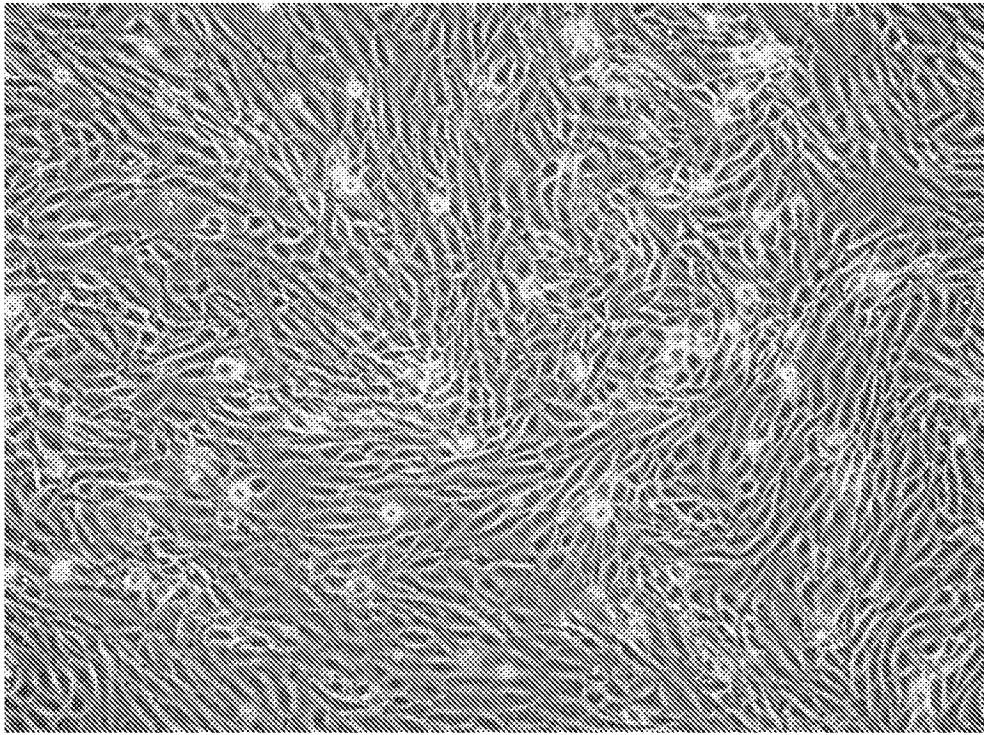


图 1A

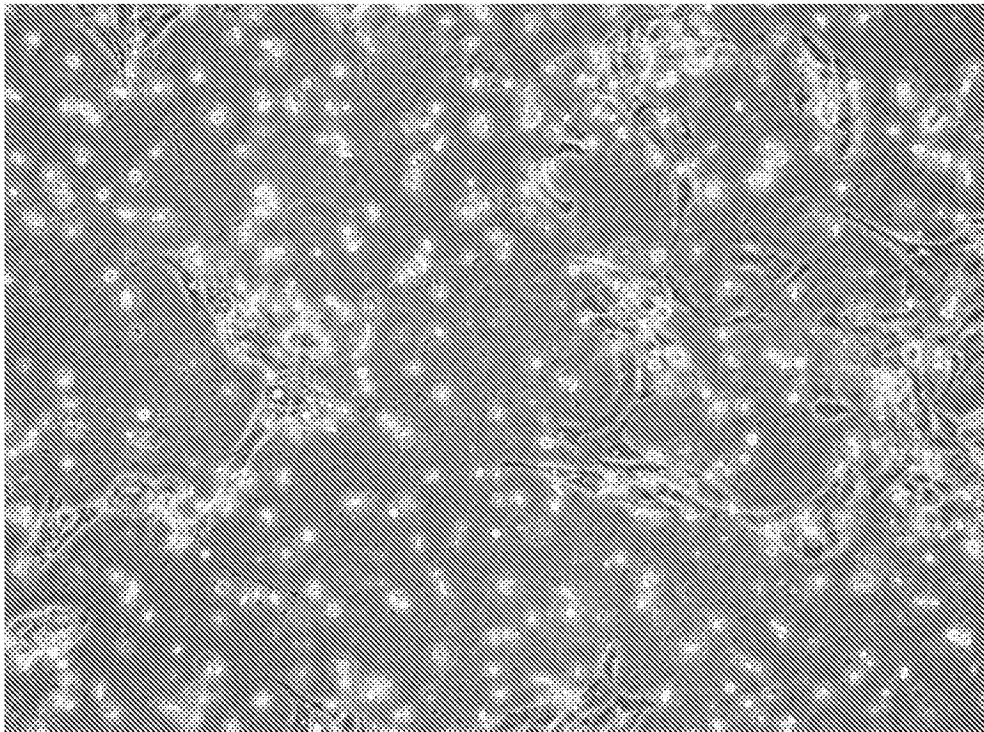


图 1B

H_strain_ORF2
 ABV21950
 ADK34046
 ADD25772

H_strain_ORF2
 ABV21950
 ADK34046
 ADD25772

H_strain_ORF2
 ABV21950
 ADK34046
 ADD25772

H_strain_ORF2
 ABV21950
 ADK34046
 ADD25772

MTYPRRRYRRRRRPRSHLGGQILRRRPWLVHPRRHYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVVKKT
 MTYPRRRFRRRRPRSHLGGQILRRRPWLVHPRRHYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVVKKT
 MTYPRRRFRRRRPRSHLGGQILRRRPWLVHPRRHYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVVKKT
 MTYPRRRFRRRRPRSHLGGQILRRRPWLVHPRRHYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVVKKT
 *****:*****

TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGSSPLTVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVSS
 TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGSNPLTVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS
 TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGSNPLTVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS
 TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGSNPLTMPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS
 *****:*****

TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYHSRHYFTPKPVLDRITIDYFQPNPKR
 TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYHSRHYFTPKPVLDRITIDYFQPN-KR
 TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYHSRHYFTPKPVLDRITIDYFQPNPKR
 TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYHSRHYFTPKPVLDRITIDYFQPNPKR
 *****:*****

NQLWLRLLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQVQREFFNLKDPPPLNPK
 NQLWLRLLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQVQREFFNLKDPPPLNPK
 NQLWLRLLQTTGNIDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQVQREFFNLKDPPPLNPK
 NQLWLRLLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQVQREFFNLKDPPPLNPK
 *****:*****

图 3

```

H_strain_ORF2
ADD25772_2d
MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRHRYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVKKT
MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRHRYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVKAT
*****
TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGSSPLTVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVSS
TVRTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGSNPLTVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS
*****
TAVILDDNFVKANALTYDPVNYSSRHTITQPF SYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKR
TAVILDDNFVKATALTYDPVNYSSRHTIPQPF SYHSRYFTPKPVLDRITIDYFQPNNKR
*****
NQLWLRQLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLPNK
NQLWLRQLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPLPNK
*****

```

图 4

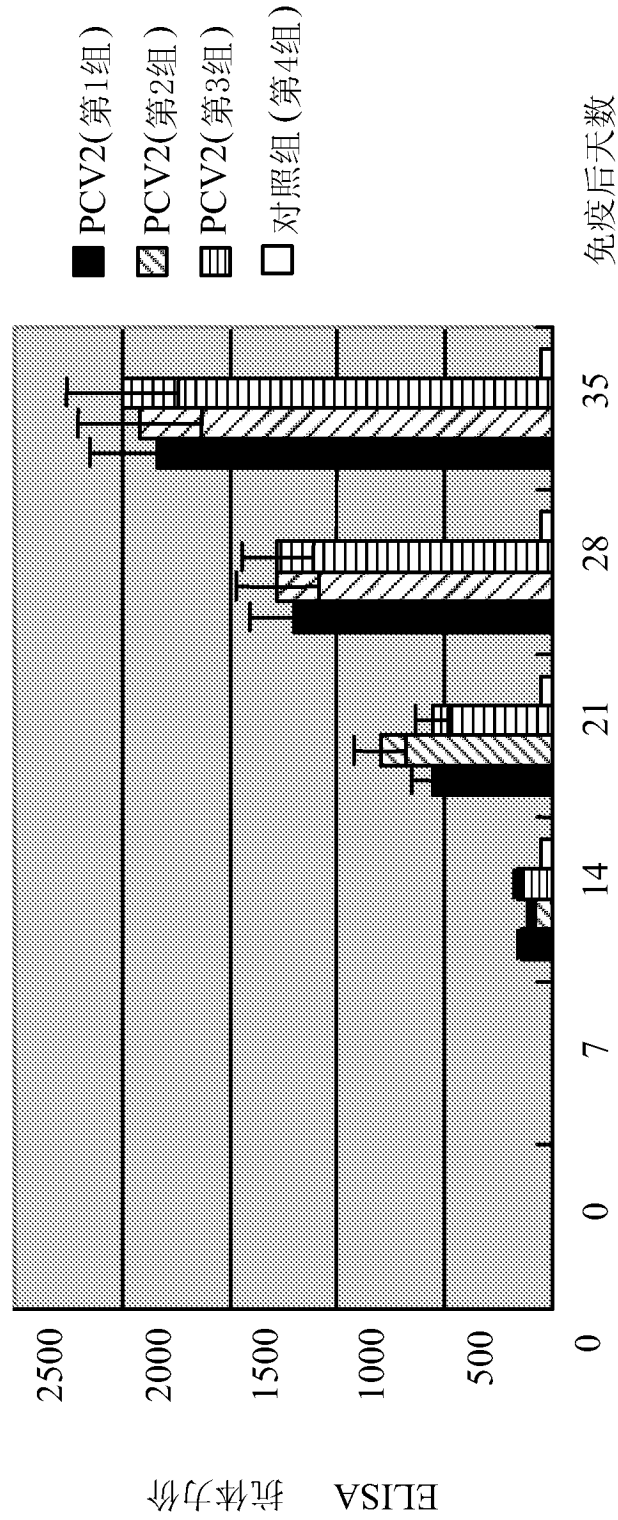


图 5

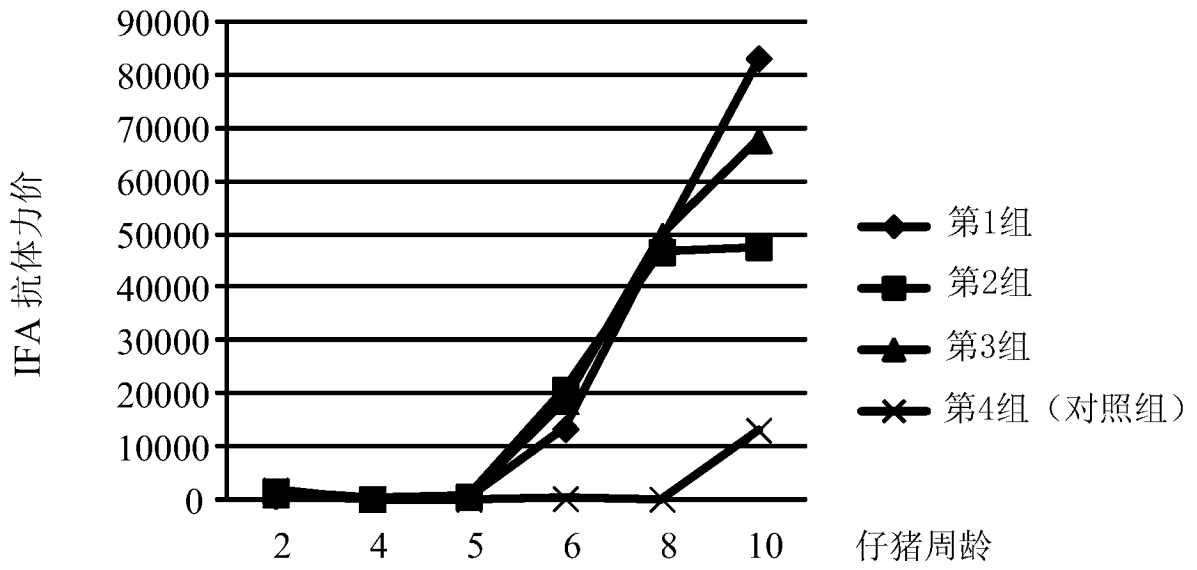


图 6

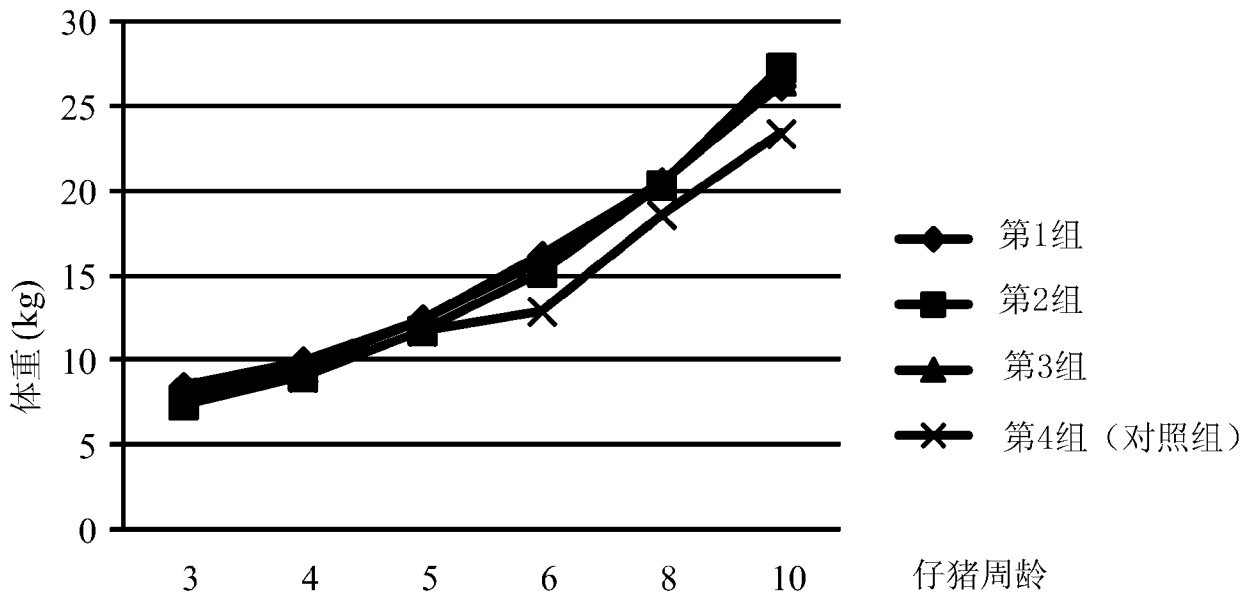


图 7

专利名称(译)	猪第二型环状病毒、含彼の免疫组合物、检测套组及其应用		
公开(公告)号	CN103314103B	公开(公告)日	2015-06-24
申请号	CN201180061073.6	申请日	2011-12-20
申请(专利权)人(译)	施怀哲维克有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	施怀哲维克有限公司		
[标]发明人	郭村勇 陈旭中 吴忠晋 陈汉婷		
发明人	郭村勇 陈旭中 吴忠晋 陈汉婷		
IPC分类号	C12N7/00 C12N15/34 C07K14/01 C07K16/08 A61K39/12 A61P31/20 G01N33/53 G01N33/569 C12R1/93		
CPC分类号	A61K39/12 A61K2039/5252 A61K2039/552 A61K2039/55566 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/20 A61P37/04 C07K14/005 C12N7/00 C12N2750/00063 C12N2750/10021 C12N2750/10034 G01N33/56983 G01N2333/01 A61K2039/5254 C07K16/081 C07K2317/34 C07K2317/76 C12N2750/10071 C12Q1/701 G01N2469/20		
代理人(译)	孙刚		
优先权	61/426087 2010-12-22 US		
其他公开文献	CN103314103A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了一种猪第二型环状病毒株，其保藏号为CCTCC No : V201117。还提供了含有该猪第二型环状病毒株的免疫组合物、检测该病毒株的试剂盒、以及该病毒株的用途。

