

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610086918.8

[51] Int. Cl.

C12N 7/01 (2006.01)  
A61K 39/12 (2006.01)  
A61P 31/12 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)  
C12Q 1/70 (2006.01)  
C12R 1/93 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年5月20日

[11] 授权公告号 CN 100489092C

[22] 申请日 2006.6.16

[21] 申请号 200610086918.8

[73] 专利权人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所  
地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街427号

[72] 发明人 刘长明 危艳武 张超范 陆月华  
孔宪刚

[56] 参考文献

CN1579553A 2005.2.16  
US6660272B2 2003.12.9  
CN1769434A 2006.5.10  
US6497883B1 2002.12.24  
CN1693455A 2005.11.9

猪圆环病毒2型细胞培养适应毒株的培育和鉴定. 刘长明等. 中国预防兽医学报, 第28卷第3期. 2006

猪圆环病毒研究进展. 高骏等. 上海交通大学学报(农业科学版), 第23卷第1期. 2005

审查员 邢云龙

[74] 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司  
代理人 孙皓晨

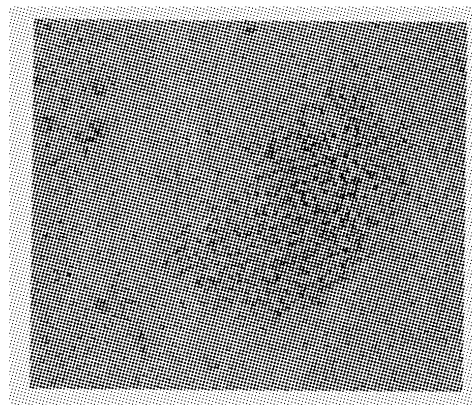
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

[54] 发明名称

一种猪圆环病毒2型遗传标记毒株及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种带有分子标记的猪圆环病毒2型(Porcine circovirus type 2)毒株 PCV2/PE, 保藏号是: CGMCC No. 1617, 还涉及该毒株的应用。本发明以临床分离的猪圆环病毒2型为材料, 利用PCR法扩增病毒基因组, 将2个基因组顺式连接插入到质粒载体中构建感染性分子克隆, 通过引物设计替换碱基, 在病毒基因组内插入SalI限制性内切酶位点作为遗传标记, 经重组质粒转染细胞获得带有遗传标记的新毒株。本发明毒株经过细胞传代培育, 病毒的繁殖能力显著提高, 具备疫苗种毒的基本要求。本发明毒株具有特有的遗传标记, 可与亲本野生型病毒相鉴别, 在建立动物感染模型, 探讨猪圆环病毒的致病机理、分子诊断及疫苗免疫效力的评价等方面均有重要的应用价值。



1.一种猪圆环病毒2型 (*Porcine circovirus type 2*) 毒株 PCV2/PE, 其保藏号是 CGMCC No.1617。

2.权利要求1的PCV2/PE毒株在建立断奶仔猪多系统衰竭综合症动物模型中的应用, 包括: 用所述的PCV2/PE毒株人工感染试验猪。

3.权利要求1的PCV2/PE毒株在制备预防猪圆环病毒2型疫苗中的应用。

4.一种检测猪圆环病毒2型抗体的诊断试剂盒, 其特征是含有权利要求1的PCV2/PE毒株的病毒培养物。

## 一种猪圆环病毒 2 型遗传标记毒株及其应用

### 技术领域

本发明涉及一种新毒株，尤其涉及一种猪圆环病毒2型遗传标记毒株及其应用，属于生物技术领域。

### 背景技术

猪圆环病毒 2 型 (*Porcine circovirus type 2*, PCV2) 主要引起断奶仔猪多系统衰竭综合症 (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)。本病于 1997 年在加拿大首次证实，相继欧、美、亚各洲许多国家均有本病发生的报道。我国猪群也普遍有本病流行，对养猪业构成巨大危害 (朗洪武，张广川，吴发权等. 断奶猪多系统衰竭综合征血清抗体检测. 中国兽医科技, 2000, 30 (3): 3-5.)，除 PMWS 外，猪皮炎与肾炎综合征、增生性坏死性肺炎、猪呼吸道综合征、繁殖障碍、先天性颤抖、胎儿心肌炎及肠炎等疾病也证实与 PCV2 感染有关。PCV2 是一种圆形小颗粒病毒，直径 17nm，呈二十面体对称，无囊膜，基因组由单股负链闭环 DNA 组成，含 1767 或 1768 碱基。基因组包括 2 个大的开放阅读框架 (ORFs)，ORF1 基因编码病毒复制酶 (Replicase)，ORF2 基因编码病毒衣壳蛋白 (Capsid)。病毒感染的致病性主要与机体免疫系统相互作用有关，可导致全身性淋巴细胞坏死，引起淋巴细胞耗损和巨噬细胞减少，引发机体免疫抑制，增加对各种病原体的易感性。

目前，PCV2感染引起的PMWS及相关疾病给全球养猪业造成巨大损失，病毒感染产生的免疫抑制能够导致现有疫苗免疫失败，造成多种病原混感，并使疫病流行更加严重。采用疫苗免疫已成为控制PCV2相关疾病的关键，是减少经济损失的有效方法。采用疫苗免疫已成为控制PCV2相关疾病的关键，是减少经济损失的有效方法。由于该病毒在体外培养毒价低，给疫苗的研制造成一定困难。

对于构建 PCV2 感染性分子克隆，目前主要采取两种策略：一是将病毒基因组克隆，再进行双基因组顺式连接，在重组质粒上形成一个完整的病毒基因组调控单元，经质粒转染细胞获得感染性病毒；另一种是将病毒单基因组克隆到质粒上，经酶切及凝胶电泳回收，进行自我环化形成模拟自然病毒基因组结构，转染细胞获取

病毒。研究表明，上述两种方法均能成功获得感染性病毒。比较而言，前者可操作性强，重复性好；后者因凝胶纯化与自我环化等环节不易控制，使感染性分子克隆转染率不高，可重复性不好。

最近，Fenaux 等 (fenaux M, Opriessing T, Halbur PG, *et al.* Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs[J]. *J Virol*, 2003,77(20): 11232-11243.Fenaux M, Opriessing T, Halbur PG, *et al.* A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs[J]. *J Virol*, 2004,78(12): 6297-6303; Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, *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]. *J Virol*. 2004, 78(24):13440-6)报道了利用 PCV1 与 PCV2 基因组 ORF2 编码衣壳蛋白区替换构建了嵌合型分子克隆，猪体接种试验证明其致病性减弱，并可诱导机体产生 PCV2 衣壳蛋白抗体，可产生免疫保护效果，但病毒在体外培养的情况尚未见后续报道。本发明人也曾进行过类似研究，然而构建的嵌合型病毒在体外培养传代未获成功，这可能与两种病毒基因编码区替换后改变病毒复制酶的功能有关。

## 发明内容

本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足，提供一种带有遗传标记的猪圆环病毒2型新毒株。

本发明所要解决的技术问题是通过以下技术途径来实现的：

一种带有遗传标记的猪圆环病毒2型 (*Porcine circovirus type 2*) 毒株，命名为：PCV2/PE；保藏号是：CGMCC No. 1617；保藏地点是：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心；保藏地址是：北京市海淀区中关村北一条13号，中国科学院微生物研究所；保藏日期是：2006年2月9日。

本发明以临床PMWS病猪分离的PCV2野生型毒株为材料，采用基因工程技术构建病毒基因组感染性分子克隆，通过引物设计替换碱基的方式，通过引物设计替换碱基，在病毒基因组内插入SalI限制性内切酶位点作为遗传标记，经重组质粒转染细胞获得带有遗传标记的新毒株。

本发明在构建病毒感染性分子克隆时,在基因组ORF1编码区末端替换2个碱基,形成一个SalI限制性内切酶切序列。试验设计中未改变基因编码阅读框架和氨基酸序列,从而保证了重组病毒复制酶的功能和对细胞的感染性。由于本发明新毒株基因组内插入一个SalI酶切位点,采用PCR与限制性片段长度多态性分析法可将本发明毒株与野生型病毒相区分。

本发明所构建的PCV2/PE毒株,细胞传代初期不产生CPE,基本与野生型病毒感染细胞结果相似。随着细胞培养传代次数的递增,病毒适应性增强,PCV2/PE株的繁殖能力显著提升。新毒株经细胞连续传60代,体外培养增殖性能稳定,毒价可达 $10^{6.6}$ TCID<sub>50</sub>/ml,具备疫苗种毒的基本要求。第60代病毒培养物以5%接种量感染细胞阳性率可达50%以上。当病毒繁殖达到一定水平时,感染细胞出现肥大、变圆、折光性改变等现象。通过病毒在体外细胞培养适应性传代,能够显著提高病毒繁殖能力,大量病毒在细胞内蓄积使宿主细胞发生相应的病变。

采用免疫过氧化物酶单层细胞试验、免疫电镜、核酸序列分析表明,在本发明病毒感染细胞中检出病毒特异抗原,其抗原性、病毒形态学及基因序列与亲本毒株一致。取本发明病毒培养物经静脉和滴鼻途径接种35日龄抗体阴性仔猪4头,接种后表现出体温升高、进行性消瘦、被毛粗糙及体表淋巴结肿胀症状,迫杀后多种脏器中均能检测到病毒抗原与核酸。

将本发明PCV2/PE株作毒种,经细胞培养工艺,获得病毒培养物,病毒培养物经过甲醛灭活,与佐剂乳化即得灭活疫苗,疫苗免疫效力试验结果表明,所制备的灭活疫苗具有较强的免疫保护效力。

此外,利用本发明PCV2/PE毒株的病毒培养物采用免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)法可以准确、方便的检测出样品血清中PCV2抗体,为猪圆环病毒2型流行病学调查和疫苗免疫效果的评价提供了一种有效技术手段。

总之,本发明新毒株为猪圆环病毒2型的致病性、致病机理、疫苗免疫及分子诊断等研究开辟了一条新途径。

## 附图说明

图1:重组克隆质粒酶切反应鉴定。

泳道1:单基因组+载体;泳道2:双基因组+载体;泳道3:空载体;M为DNA标样。

图 2: PCV2 感染性分子克隆转染细胞中病毒抗原的 IPMA 检测。

a: 病毒感染细胞; b: 未感染细胞对照。

图 3 :PCR 与限制性片段长度多态性分析鉴别重组型与野生型 PCV2。

泳道 1: 重组型病毒 PCR 产物 SalI 酶切产生 870bp 和 186bp 两条带; 泳道 2: 野生型病毒 PCR 产物 (1057bp) SalI 酶切呈阴性; M 为 DMA 标样。

图 4: PCV2/PE 毒株病毒粒子免疫复合物电镜观察。

图 5: 免疫组化法检测试验感染猪淋巴结中病毒抗原。

## 具体实施方式

以下通过实施例来进一步描述本发明, 应该理解的是, 这些实施例仅用于例证的目的, 决不限本发明的范围。

### [实施例 1] 本发明毒株的构建

#### 1 材料和方法

1.1 病毒、细胞、抗体、菌株及载体 PCV2 野生型毒株系从临床表现为 PMWS 病猪分离获得 (刘长明, 张超范, 危艳武等. 猪圆环病毒 2 型细胞培养适应毒株的培育和鉴定. 中国畜牧兽医学会畜牧兽医生物技术学会第六次学术研讨会论文集 (济南), 2005, p196-199.) PCV2 阳性猪血清 (IPMA 效价为 3200 倍), 用于病毒抗原检测; 基因克隆所用的大肠杆菌株 (Top10)、载体 (pUC19) 及限制性内切酶类购自日本宝生物工程公司 (Takara); 无猪圆环病毒 1 型 (PCV1) 污染的猪肾传代细胞系 (PK15) 由国外引进, 本室保存。

1.2 引物设计与 PCR 扩增 引物根据 GenBank(AF201311)序列设计。PCV2-F: 5'-GTCGACTGTTCTGTAGCATTCTTCCA-3', 对应序列为 920~946; PCV2-R: 5'-GTCGACGGAGGAAGGGGGCCAGTT-3', 对应序列为 925~901。下划线处斜体字母表示替换的碱基, 构成 SalI 酶切位点。病毒 DNA 提取按常规方法进行 (Liu CM, Ihara T, Nunoya T, *et al.* Development of an ELISA based on the baculovirus-expressed capsid protein of porcine circovirus type 2 as antigen [J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(3): 237-242.), TaKaRa Ex Taq PCR 试剂盒进行病毒基因组扩增, 具体程序为: 预变性 94°C2min, 35 个循环[94°C30s, 60°C30s, 72°C1.5min], 延伸反应 72°C7min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析鉴定。

1.3 病毒基因组克隆与测序 PCR 产物经 SalI 酶切处理及凝胶电泳纯化, 插

入到相同处理的质粒载体 pUC19 SalI 酶切位点,方法见文献(萨姆布鲁克 J, 拉塞尔著 D W (黄培堂等译).分子克隆实验指南[M]. 第3板, 科学出版社, 2002.)。373A 型 DNA 序列仪测序(Perkin-Elmer 试剂盒),DNAsis 软件分析。

试验结果: PCR 扩增产物为 1.7kb, 经 SalI 酶切处理, 克隆到 pUC19 载体。取 3 个阳性克隆进行序列测定, 结果一致, 未发现碱基错配和缺失。基因组全长 1768 个碱基组成, 含 ORF1 和 ORF2 编码区, 序列与 GenBank 登录的 AF166528、NC002173、AF264843、AF027217、AF118897、AF364094 和 AF201897 序列比较, ORF1 区同源率为 97.6%~99.8%, ORF2 区为 93.7%~98.6%, 全基因组为 96.2%~99.3%。

1.4 感染性分子克隆的构建 全长基因组重组质粒, 先行 ScaI 完全酶切 (pU19 载体上单酶切位点), 再进行 SalI 部分酶切 (插入基因组两侧酶切位点)。凝胶电泳回收含单基因组的长臂 (3506bp) 和另一含单基因组短臂 (2689bp), 凝胶纯化含病毒全长基因组与载体长臂和短臂的两条泳带, 用 T<sub>4</sub> 连接酶连接获得一个载体上顺式连接 2 个病毒基因组, 将两者连接后获得含双基因组顺式排列的重组质粒 (pUC/PCV2<sup>+</sup>), 酶切鉴定结果见图 1。

1.5 重组质粒细胞转染试验 用纯化的感染性分子克隆质粒转染 PK15 细胞, 转染试剂为 Lipofectamine2000(Invitrogen), 按厂家说明进行。转染后的细胞置 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养 72h 后收获病毒培养物, 按 10%接种量同步加入到新消化的细胞悬液中, 37℃静置培养 24h 形成单层, 按 Tischer 方法进行 D-氨基葡萄糖处理 (Tischer I, Peters D, Rasch R, *et al.* Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence [J]. Arch Virol, 1987, 96: 39-57.), 病毒培养, 经 3 次冻融后继代。

1.6 标记病毒的拯救 用含双基因组重组质粒(pUC/PCV2<sup>+</sup>)转染 PK15 细胞, IPMA 检测病毒抗原。病毒感染的阳性细胞被染成棕红色 (图 2a), 未感染病毒细胞对照呈阴性反应 (图 2b)。阳性细胞呈点式分布, 主要聚中在细胞核区及细胞质区。结果表明, 用重组质粒转染细胞成功获得新毒株 (命名 PCV2/PE), 它与野毒株具有相同的抗原性。

1.7 重组病毒的鉴定 采用免疫过氧化物酶单层细胞试验 (IPMA), 进行病毒感染细胞抗原和病毒含量测定, 免疫电镜法鉴定病毒形态学, 具体方法见文献 (刘长明, 张超范, 危艳武等. 猪圆环病毒 2 型细胞培养适应毒株的培育和鉴定. 中国畜牧兽医学学会畜牧兽医生物技术学会第六次学术研讨会论文集 (济南), 2005,

p196-199; 刘长明, 陆月华, 张超范等. 猪圆环病毒 2 型重组 Cap 蛋白在昆虫杆状病毒中的表达. 中国畜牧兽医学会畜牧兽医生物技术学会第六次学术研讨会论文集 (济南), 2005, p200-202.)。

1.8 遗传标记毒株与野生型病毒核酸鉴别试验采用引物 P1 和 P2 分别对本发明人工构建的毒株 (PCV2/PE) 和野生型毒株 (PCV2/LG) 基因组进行 PCR 扩增, 引物设计位于 SalI 酶切位点两侧, P1: 5'-CAGCAAGAAGAATGGAAGAAGCGGA-3; P2: 5'-CCAGGACTACAATATCCGTGTA ACT-3。扩增目的基因片段长为 1057bp, PCR 反应条件同 1.2。产物经 SalI 酶切可获得 870bp 和 189bp 两个片段; 野生型病毒基因组无 SalI 酶切位点, PCR 产物不变, 野生型病毒 PCR 扩增产物酶切反应呈阴性, PCR 产物不变 (图 3)。由此可见, 采用 PCR 方法可将本发明遗传标记毒株与野生型病毒相鉴别。

#### 实施例 2 用本发明毒株制备灭活疫苗

用 PCV2/PE 毒株作毒种, 经细胞培养工艺, 获得病毒培养物, 病毒含量达到  $1 \times 10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 以上。病毒培养物经过甲醛灭活, 与优质佐剂乳化制备成灭活疫苗。按兽药生物制品规程要求进行了半成品与成品疫苗的检验, 用检验合格制品进行下述临床试验。

#### 实施例 3 PCV2-IPMA 抗体诊断试剂盒的制备及其使用方法。

取新消化的 PK15 细胞悬液, 同步接种 2.5% PCV2/PE 病毒液, 接种于 96 孔细胞培养板的 1、3、5、7、9、11 奇数列 (100  $\mu$ L/孔), 偶数列 (2、4、6、8、10、12) 为不接种病毒的健康对照细胞孔, 培养板置 37 $^{\circ}$ C 50mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养 48h~72h 形成单层, 取出后用 PBS 浸洗细胞孔 1 次, 吹干后用 33% 丙酮-PBS 液固定 20min, 干燥后置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

PCV2-IPMA 诊断试剂盒操作程序: 取上述方法制备的检测反应板置室温预热, 用 PBS 浸洗 1 次, 用 0.1% 明胶-PBS 液按 1: 25、1: 50、1: 100 等 2 倍系列稀释待检猪血清, 以 PCV2 阳性和阴性血清作参照, 每份稀释的血清分别加入到 1 抗原孔和 1 个细胞对照孔内 (100 $\mu$ L/孔), 置 37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 1.5h; PBS 洗涤 3 次, 加入 1: 3000 倍稀释的 SPA-HRP 液 (Zymed 产品), 每孔 50 $\mu$ L, 置 37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 1h; PBS 洗涤 3 次, 加 50 $\mu$ L/孔底物反应液 [3-氨基-9-乙基咪唑 (AEC) 为 Sigma 产品], 置室温显色 30min, 甩除底物液后用蒸馏水洗涤 1 次, 干燥后用光学显微镜观察判定结果。PCV2 阳性血清与病毒感染细胞孔染色呈棕红色, 与健康

细胞对照孔应无着色反应者判为阳性反应；PCV2 阴性血清与病毒感染孔和细胞对照孔均无着色反应判为阴性，阳、阴性对照血清均成立时判定结果有效。

#### 试验例 1 本发明毒株感染细胞特性及病毒形态学鉴定

将本发明构建的 PCV2/PE 株感染 PK15 细胞（国外引进，哈尔滨兽医研究所保存），连续细胞继代 60 次。前 50 代基本未产生细胞病变（CPE），但随着病毒传代次数的提升，如 60 代病毒培养物接种细胞与对照组对比，可观察到轻微 CPE，表现为细胞肥大、变圆、折光性变化等。随代次增加，病毒滴度逐步升高。第 5、10、20、30、45 和 60 代病毒培养物毒价测分别为  $10^{2.5}$ 、 $10^{2.7}$ 、 $10^{3.5}$ 、 $10^{4.7}$ 、 $10^{5.5}$ 、 $10^{6.6}$ TCID<sub>50</sub>/ml。

取本发明病毒培养物进行免疫电镜鉴定，观察到形态均一的病毒样颗粒形成的复合物（图 4），呈圆形颗粒，直径约为 17nm，与野生型病毒形态基本一致，未发现外源病毒污染。

#### 试验例 2 本发明毒株感染动物试验

##### 一、试验方法

取第 60 代本发明病毒培养物（按照常规方法培养），经静脉和滴鼻途径各 1ml 接种 35 日龄抗体阴性断奶仔猪 4 头，同设未接种对照猪 2 头。隔离饲养，定期采血，测定体重、体温变化，观察临床反应情况。试验猪于接种病毒后 35d 迫杀，进行病理检查和 PCR 测定。

##### 二、试验结果

用 PCV2/PE 株培养物接种试验猪 4 头，有 2 头于接种后出现明显的临床反应，表现为被毛粗糙，体表淋巴结肿大，生长缓慢，皮肤丘疹等，一时体温达 41.3℃；其他试验猪反应略轻。接种后 35d 迫杀解剖所见，试验组猪多种淋巴组织表现不同程度的肿大和充血，间质性肺炎，肾点状灰白病灶，盲肠瓣滤胞肿胀。免疫组化检测表明，淋巴结滤胞区见有大量病毒抗原阳性细胞（见图 5）。PCR 检测多种脏器均呈阳性反应，以肠淋、鼠蹊淋、颌下淋、扁桃体和脾脏病毒含量较多，心、肝、肺、肾和睾丸次之。接种后第 1 周起 PCR 检出血清病毒血症，第 2 周起 IPMA 检出血清抗体。对照组猪试验期间未见异常，各种检测呈阴性。

#### 试验例 3 本发明灭活疫苗的安全性和免疫保护效力试验

安全性试验：用实施例 2 所制备的 PCV2/PE 灭活疫苗，按不同剂量（0.5ml/头、1ml/头、2ml /头、4ml/头）肌肉接种 25~30 日龄试验仔猪各 3 头，临床观察 28 天

未见无异常反应，证明疫苗制品对本动物是安全的。

疫苗免疫效力试验：用实施例 2 所制备的 PCV2/PE 灭活疫苗，采用 0.5ml/头、1ml/头、2ml/头三种剂量免疫 25~30 日龄日龄仔猪，每组 3 头，设未接种疫苗对照猪 3 头。所有疫苗免疫后 21 天抗体检测全部转阳，用强毒攻击后检测病毒血症，计算试验保护率结果为，0.5ml、1ml 和 2ml 免疫组均获得 100% 保护，对照组 100% 发病。

#### 试验例 4 PCV2 抗体诊断试剂盒检测血清样品 PCV2 抗体试验

将 PCV2/PE 病毒培养物稀释液接种于新消化的 PK15 细胞悬液中 ( $2 \times 10^4$ )，按 100  $\mu$ L/孔分注于 96 孔细胞培养板，同设病毒未接种对照孔，置 37°C 50mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养形成单层，用丙酮-PBS 液固定，干燥后置 -20°C 保存。

IPMA 操作程序：PBS 浸洗一次，用 0.1% 明胶-PBS 液将待检猪血清按 1:25 等 2 倍系列稀释，以 PCV2 阳性或阴性血清作对照，每份稀释的血清分别加入 1 个抗原孔和 1 个细胞对照孔 (100uL/孔)，置 37°C 湿盒孵育 1.5h，PBS 洗涤 3 次，加入稀释的 SPA-HRP 液 (50uL/孔)，置 37°C 湿盒孵育 1h，PBS 洗涤 3 次，加 50uL/孔底物反应液 (AEC)，置室温现色 30min，甩除底物液，用蒸馏水洗涤 1 次，用光学显微镜观察判定结果。

PCV2 阳性血清与病毒感染细胞孔染色呈棕红色，而与健康细胞对照孔无着色反应者判为阳性反应；PCV2 阴性血清与病毒感染孔和细胞对照孔均无着色反应判为阴性。

结果表明，用本发明 PCV2-IPMA 试剂盒检测人工感染猪血清第 1 周抗体检出率为 50%，第 2~5 周抗体检出率为 100%，同设对照组猪血清样品检测均为阴性。用试剂盒对黑龙江、吉林、辽宁、河北、上海等地 13 个猪场 520 份血清进行了 PCV2 抗体检测，8/13 猪场抗体阳性率大于 50%，抗体阳性率分布在 57.1%~100%。综上所述，本发明 PCV2-IPMA 试剂盒为流行病学调查和疫苗免疫效果的评价提供了一种新的技术手段。

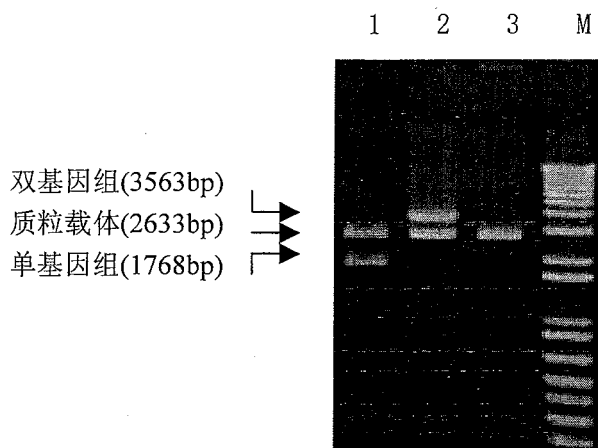


图 1

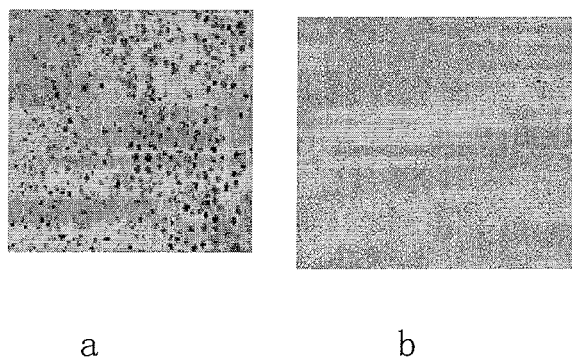


图 2

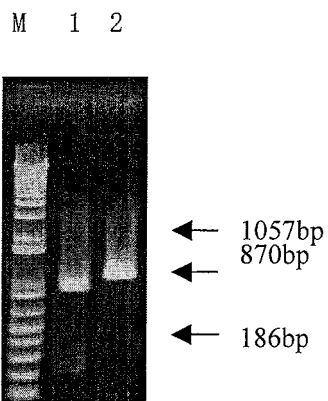


图 3

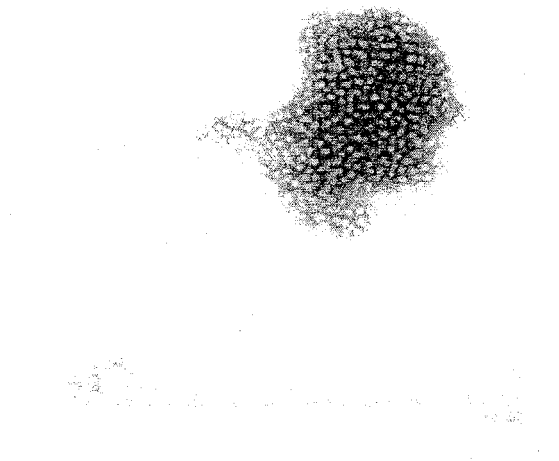


图 4

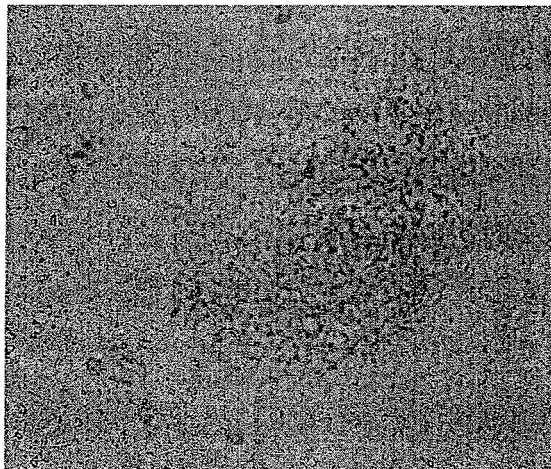


图 5

专利名称(译)	一种猪圆环病毒2型遗传标记毒株及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN100489092C</a>	公开(公告)日	2009-05-20
申请号	CN200610086918.8	申请日	2006-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	刘长明 危艳武 张超范 陆月华 孔宪刚		
发明人	刘长明 危艳武 张超范 陆月华 孔宪刚		
IPC分类号	C12N7/01 A61K39/12 A61P31/12 G01N33/53 C12Q1/70 C12R1/93		
代理人(译)	孙皓晨		
审查员(译)	邢云龙		
其他公开文献	CN101089177A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种带有分子标记的猪圆环病毒2型(Porcine circovirus type 2)毒株PCV2/PE, 保藏号是: CGMCC No.1617, 还涉及该毒株的应用。本发明以临床分离的猪圆环病毒2型为材料, 利用PCR法扩增病毒基因组, 将2个基因组顺式连接插入到质粒载体中构建感染性分子克隆, 通过引物设计替换碱基, 在病毒基因组内插入Sall限制性内切酶位点作为遗传标记, 经重组质粒转染细胞获得带有遗传标记的新毒株。本发明毒株经过细胞传代培育, 病毒的繁殖能力显著提高, 具备疫苗种毒的基本要求。本发明毒株具有特有的遗传标记, 可与亲本野生型病毒相鉴别, 在建立动物感染模型, 探讨猪圆环病毒的致病机理、分子诊断及疫苗免疫效力的评价等方面均有重要的应用价值。

