家畜衛試所研報No.42：79~88(2007)

利用真核系統表現豬第二型環狀病毒 ORF 2 蛋白

王羣[*1,2]、邱芮瑜[1,2]、黃天祥[1]、鍾明華[1]、趙磐華[1]、郭應誠[2]
[1]行政院農業委員會家畜衛生試驗所
[2]國立台灣大學獸醫學研究所

摘要　首先萃取台灣豬第二型環狀病毒（porcine circovirus type 2; PCV2）分離株之病毒核酸，然後利用聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)增幅豬第二型環狀病毒之第二開毒窗（open reading frame 2; ORF2）基因全長片段。再將該基因片段植入表現載體中（pCI-neo），經篩選後，選擇嵌有該基因之重組質體，並將此重組質體轉染（transfect）至真核細胞（PK-15 cell line）內進行重組蛋白表現，並以間接免疫螢光法（indirect immunofluorescence assay, IFA）、聚丙烯醯胺膠片(SDS-PAGE)以及西方轉印法（western blotting）進行分析，可觀察到重組蛋白在真核細胞成功的表現出來。

關鍵詞：豬環狀病毒、間接免疫螢光法、聚丙烯醯胺膠片、西方轉印法

緒言

豬環狀病毒(porcine circovirus；PCV)最早於1974年由遭受污染且不產生細胞病變效應(cytopathic effect)之PK-15（ATCC CCL33）細胞中發現。該病毒基因體被進一步研究發現為一條環狀單股DNA，可在豬可發現抗該病毒之抗體存在，被歸類為第一型豬環狀病毒(porcine circovirus type 1, PCV1)，國外相關報告指出PCV1對豬隻不具有病原性（Tischer et al., 1986）。1991年於加拿大首先證實豬罹患離乳後多系統消耗性綜合症(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)，最主要特徵為患豬體重漸進性喪失，呼吸症狀等。肉眼及組織病變有肉芽腫性間質性肺炎(granulomatous interstitial pneumonia)，淋巴結病(lymphadenopathy)，及淋巴球性肉芽腫性肝炎及腎炎（Ellis et al., 1998）。而由PMWS豬隻所分離到之環狀病毒，被歸類為第二型豬環狀病毒(porcine circovirus type 2, PCV2)，目前被認為是為引起PMWS之主要病原（Mahe et al., 2000; Nawagitgul et al., 2000）。除此之外目前相關報告指出，PCV2與豬隻皮膚炎腎病症候群(porcine dermatitis nephropathy syndrome, PDNS)、先天性震顫（congenital tremors, CT）、豬呼吸道綜合症(porcine respiratory disease complex, PRDC)、增殖性及壞死性肺炎(proliferative and necrotising pneumonia, PNP)、豬隻流死產均有關（Chae, 2005），甚至是無明顯臨床症狀豬隻之組織亦可檢測到PCV2之存在。

PCV2含有11個開讀窗(open reading frames, ORFs)，其中ORF1主要可轉譯出一36 kDa的蛋白質，其胺基酸序列顯示其中包含有4個functional motifs（Mankertz et al., 2001; Mankertz et al., 1998），其中具有一個GKS box（位於585 nt至593 nt）(Mankertz et al., 1998)，與nucleotide binding site（dNTP-binding motif）有關，而另外3個motifs（FTLNN box，位於105 nt至119 nt；HLQGF box，位於219 nt至233 nt；YCSK box，位於336 nt至347 nt）則與PCV2之複製有關（replication motifs）(Mankertz et al., 1998)。ORF2主要依照病毒核酸序列以反向方式轉譯出一28 kDa的蛋白質(1735 nt至1034 nt)，為PCV2

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

最主要之結構蛋白（capsid protein），也是引發宿主產生專一病毒中和性抗體最主要部分（Mahe et al., 2000; Nawagitgul et al., 2000; Hamel et al., 1998）。近年來部份國外專家學者已利用原核或真核細胞進行 PCV2 之第二開讀窗(open reading frames 2, ORF2)基因表達，並藉此發展成為診斷試劑，以調查豬群各年齡層 PCV2 抗體的分佈情形，並了解 PCV2 可能的感染期作為擬定防預措施的參考（Nawagitgul et al., 2000）。

近幾年來，畜禽新浮現疾病如豬環狀病毒、鐵士古病、赤羽病、家禽流行性感冒等陸續侵入我國，若再有細菌或其他病毒二次性感染，恐有引發畜禽死亡、育成率低落，造成農友重大損失之慮。九十至九十二年度以間接免疫螢光法(IFA)進行不同年齡層豬隻之PCV2與PCV1抗體檢測，經檢測後發現PCV2與PCV1抗體陽性率相當高（Wang et al., 2004）。惟IFA檢測法成本過高，而且檢測過程及實驗結果之判讀相當困難，無法有效進行田間試驗及血清學調查；因此擬以真核及原核細胞進行 PCV2 基因之表現並開發為診斷試劑，以掌握該病毒之致病機轉及最佳之防疫適期。

材料及方法

病毒核酸萃取

由全省隨機選擇豬場，收集全國各地養豬場具有PMWS 臨床症狀衰弱仔豬之檢體，採集其扁桃腺、林巴結、肺臟組織製成乳劑並保存於-70 ℃中，作為萃取核酸之材料。將上述的仔豬檢體均質後，依據QIAGEN 公司發展之 DNA Mini Kit 取 100 μl 之乳劑加入 100 μl 之 Buffer ATL 及 20 μl 之 Proteinase K，置於 56 ℃感作至組織完全溶解，然後加入 200 μl 之 AL Buffer 置於 70 ℃感作 10 分鐘，再加入 200 μl 之無水酒精，震盪 15 秒；將樣品混合液置入 QIAGEN 公司提供之 QIAamp spin column 之內(含 2 ml 之收集管)，離心 6000 g 約 1 分鐘，將 QIAamp spin column 置入一新 2 ml 之收集管，並加入 500 ul 之 AW1 buffer，離心 6000 g 約 1 分鐘，再將 QIAamp spin column 置入一新 2 ml 之收集管，並加入 500 μl 之 AW2 buffer，超高速離心約 1 分鐘，將 QIAamp spin column 置入一新 1.5 ml 之離心管，加入 200 μl 之 AE buffer 感作 1 分鐘，離心 6000 g 約 1 分鐘，將所萃取之病毒 DNA 核酸保存於-20 ℃。

ORF2 重組蛋白表現質體之構築

將純化好之病毒核酸以 PCR 方法分別增幅 ORF2 基因，引子之序列分別如下：

ORF2-f：5′ GGG AGC TCA TGA CGT ATC CAA GGA GGC GTT 3’ (5′端含有 Sac Ⅰ限制酶切位)

ORF2-r：5′ CCC AAG CTT CGG GGT TTA AGT GGG GGG T 3’ (5′端含有 Hind Ⅲ限制酶切位)

二者可針對 ORF2 基因之序列增幅出 699 bp 之 PCR 產物。將前述抽好的病毒 DNA 樣品取 6 μl 至預先混合各種反應溶液的 0.65 ml 離心管中(primer 20 μM 0.5μl、1.25 μM dNTP 8μl、10X Taq buffer 5 μl、2.5 U Taq DNA polymerase)並加入 DDW 補至總體積 50 μl 後直接放入溫度控制器內進行 PCR 反應。反應條件如下：先以 95 ℃進行 1 分鐘，再以 95 ℃、1 分鐘，60 ℃、1 分鐘，72 ℃、1 分鐘，共進行 42 cycles；最後再以 72℃進行 10 min。取反應完畢後之產物 10 μl 於 2 % Agarose 進行電泳分析，電泳完畢後浸泡 ethidium bromide (EtBr)進行染色，並於紫外線下觀察後照像。

ORF2 基因選殖

將增幅完成之 ORF2 基因產物先行以 QIAGEN 公司發展之 PCR Products Purification Kit 加以純化。本次實驗所選用之質體為 Promega 公司出品之 pCI-neo 質體，該質體具有複製效率高及重組蛋白表現量大之優點。首先將 pCI-neo 質體（圖 1）及含 ORF2 基因之 PCR 產物以 Sac Ⅰ與 Hind Ⅲ等限制於 37℃下切割 3-6 小時。然後以 T4 ligase 及其 buffer 加以連接，於 18℃感作 16 小時。然後轉型至 Top 10 大腸桿菌（transformation），並塗抹於

含抗生素（Ampicillin）之 LB agar 上，於 37℃感作至隔天，然後挑選極有可能成功選殖入 pCI-neo 之重組質體接種於 5 ml LB 培養液（含 ampicillin），並在 37 ℃下振盪培養過夜，再以 QIAGEN 公司發展之 Plasmid Extraction Kit 抽取 pCI-neo 之重組質體。

重組質體之確認

取 10μl 可能含有 PCV2-ORF2 基因之 pCI-neo 重組質體以 Sac Ⅰ與 Hind Ⅲ等限制 於 37℃下切割 3-6 小時。並取 2 μl 之產物於 2 % Agarose 進行電泳分析，電泳完畢後浸泡 EtBr 進行染色，然後於紫外線下觀察後照像。

核酸定序及分析

利用 ABI PRISM 377 Automated Fluorenscent DNA sequencer 進行 DNA 之分析定序，其方法是以 Perkin Elmer 公司的 ABI PRISMTM Cycle sequencing kit，原理為利用 ddNTP 上帶有四種不同吸光波長的螢光劑以 dideoxynucleotide termination 的方式及 PCR 的方法進行試管內 DNA 合成，加入十分之一體積的 3M NaOAC 及 2.5 倍體積 98%酒精，於冰上作用 10 分鐘，離心倒掉上清液，加入 5 μl loading dye 後，經 6%polyacrylamide gel 分析後，以 sequencer detector 上雷射光束來激發螢光的訊號，黑色代表 guanine，綠色代表 adenosine，紅色代表 thymidine，藍色代表 cytidine。

PCV1-free 細胞之培養

選用 PCV1-free 的豬腎臟細胞株（PK-15），以含 5 %胎牛血清(GIBCO)以及 100 unit/l penicillin G (Sigma) 與 100 mg/l streptomycin (Sigma) 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) 培養於 5 % CO2 之 37℃培養箱。

質體轉染

轉染的前一天在 6 wells 細胞培養盤鋪 5×105 顆 PK-15 細胞。取 6 μg 含 ORF2 基因體全長之 pCI-neo 質體 DNA 加入無抗生素無血清的 DMEM 中，接著加入 9.6 μL plus reagent (Invitrogen)，混勻稱做混合液 A (總體積 100 μl)，於室溫作用 20 分鐘。另外配置混合液 B，內含 91 μl 之無抗生素無血清之 DMEM 與 9 μl lipofectamine reagent (Invitrogen)。將混合液 B 加入混合液 A 中，室溫作用 20 分鐘。等待的過程中，將已貼附的 PK-15 細胞以 PBS (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH2P04, 8.1 mM Na2HP04)清洗三次，並將培養液換成無抗生素及血清的 DMEM 2 ml。將作用完之混合液 A+B，緩緩均勻地滴在細胞上轉染，將細胞置於 5 %二氧化碳 37℃培養箱作用 4-7 小時後，加入含 10 %血清的 DMEM，使總血清量達到平常 PK-15 細胞適應的 5 %血清，隔天視 PK-15 細胞生長程度進行繼代。

間接免疫螢光法

將抗 PCV2-ORF2 之單株抗體以 PBS 稀釋 150 倍後每孔加入 250 μl，室溫作用一小時，以 PBS 清洗三次後加入以經由 PBS 作 150 倍稀釋的 goat anti-porcine IgG-FITC (Jackson ImmunoResearch lab)，於室溫中避光作用一小時。以 PBS 清洗三次後，每孔加入 250 μl 之 PBS，最後以倒立螢光顯微鏡觀察螢光訊號。

蛋白質之電泳分析

本實驗採用不連續膠體電泳方法來偵測目標蛋白質之位置。首先將經轉染之 PK-15 細胞經冰凍解凍 3 次之後，取蛋白質樣本溶液，加入同體積 sample buffer 及適量之追蹤染劑 bromophenol blue，混合均勻後在 100 ℃加熱 5 分鐘，冷卻後注入 10%聚丙烯醯胺膠片（SDS-PAGE）之焦集膠體樣本槽，同時也注入蛋白質標準溶液以為對照，再以 100~150V 進行電泳。待追蹤染料泳動到底邊，中止電泳，取出膠片以 CBR 試劑進行染色約 1 小時。（註：若要進行西方轉印法分析，則膠片不能染色）。以滅菌之蒸餾水沖洗已染色膠片，再倒入 20 ml 脫色液加以脫色，如此重複脫色數次約 3 小時。

家畜衛試所研報No.42：79~88(2007)

西方轉印法分析

本方法之主要原理為將蛋白質經電抗PCV2-ORF2之單株抗體泳膠片（SDS-PAGE）分析後，將電泳膠片浸入轉印緩衝液，並與硝化纖維紙（nitrocellulose membrane）重疊在一起，然後將蛋白質轉印到硝化纖維紙上，再利用抗體（antibody）進行免疫染色（immunostaining）。首先依前述方法將蛋白質經電泳分析後，切除焦集膠體部份，然後將膠片浸在轉印緩衝液中 15 分鐘。取硝化纖維紙切成與膠片大小相同，然後以少許甲醇浸濕數秒，再浸在轉印緩衝液中 15 分鐘。接著取出轉印夾打開平放，先墊一張方形海綿墊，鋪上一張 Whatman 3MM 濾紙，鋪上濕潤的硝化纖維紙，然後疊上已濕潤的膠片，再鋪一張濾紙及海綿。將轉印夾放入裝有轉印緩衝液的轉印槽中，硝化纖維紙面朝向正極，膠片面朝向負極，以 400 mA 轉印一小時。然後取出轉印夾並打開，將硝化纖維紙標示齒槽（well）位置右上角截角以為標幟，再以水浸泡 5 分鐘。然後將硝化纖維紙放入 1x TTBS（Tween 20, Tris-Buffer Saline）含 0.5% skim milk 搖盪 30 分鐘，以填塞沒有蛋白質轉印上去的空間。倒去填塞溶液，以 1 x TTBS 清洗數次並浸泡 5 分鐘。倒掉 1 x TTBS，加入（1：1000 稀釋），置於室溫搖擺 1~2 小時。倒去抗 PCV2-ORF2 之單株抗體，以 1 x TTBS 清洗數次並浸泡 5 分鐘。倒掉 1 x TTBS，加入山羊抗鼠抗體（Goat-anti-mouse AP antibody，1：3000 稀釋），置於室溫搖擺 1~2 小時。倒去二次抗體，硝化纖維紙以 1 x TBS 清洗數次並浸泡 5 分鐘，以去除 Tween-20。將 1 x TBS 倒掉，加入 AP 顯色劑，反應至呈色（約 20 分鐘以內）。倒掉顯色劑，將硝化纖維紙放入水中以終止反應。

蛋白質定量

使用 Invitrogen 公司發展之蛋白質濃度檢測套組，取 10μl 之 A 液溶混於 190μl 之 B 液中，然後取 190μl 之混合液（A+B）加入標準蛋白 1，並於室溫感作 15 分鐘後置入 OD 值檢測儀進行第一次校正。然後以相同方法加入標準蛋白 2，並於 OD 值檢測儀進行第二次校正，此時即完成 OD 值檢測儀之正確校正。另將待測重組蛋白取 10μl 溶於 190μl 之混合液，並將其混合均勻，並於室溫感作 15 分鐘，然後置於 OD 值檢測儀中進行檢測，再乘以稀釋倍數(20 倍)，即可計算出重組蛋白之正確濃度。

結果

重組質體之確認

先以聚合酶鏈反應將 PCV2-ORF2 片段基因增幅之後，再予以構築入 pCI-neo 表現用載體已表現 PCV2-ORF2 基因蛋白。然後取 2 μl 之產物於 2 % Agarose 進行電泳分析，電泳完畢後浸泡 EtBr，並於紫外線下觀察後照像。可觀察到約 699 bp 大小之片段，與預期之大小相同。(圖 2)。

利用眞核系統生產 PCV2-ORF2 重組蛋白

將 PCI-neo 質體轉染 PK-15 細胞，在轉染 48 小時後，以間接免疫螢光法觀 察，發現三至五成的細胞可呈現陽性反應，螢光訊號多集中在細胞核，但也可見到少數在細胞質或整顆細胞(圖 3)。經初步評估可有效開發為 PCV2 抗體檢測用試劑。

蛋白質之電泳分析

由圖 4 可觀察到重組質體在轉染 PK-15 細胞後，可以成功表達出約 28kDa 之 ORF2 基因重組蛋白產物。而無轉染豬重組質體之 PK-15 細胞者則無 ORF2 基因重組蛋白產物之表現，因此呈陰性反應。

西方轉印法分析

由圖 5 可觀察到在 28kDa 處呈現陽性反應，而無轉染含豬第二型環狀病毒基因之 pCI-neo 重組質體者則無特異之蛋白質產物的產生。因此證實 ORF2 基因之蛋白質產物已被表達出來。

蛋白質定量

經 OD 值檢測儀檢測 PCV2-ORF2 基因蛋白在 PK-15 細胞之表現量，該重組蛋白之產量為 2 mg/l。

討論

因為 PCV2 本身對豬隻之致病性不像 HC 及 PRV 來的強烈，往往是在混合感染時因為豬隻本身免疫系統受到抑制，間接提高 PCV2 對豬隻之致病性。由於本病為病毒性疾病，臨床上無有效治療藥物可供使用，且本病尚無疫苗開發，目前最有效之防治方法，應落實各項疾病之預防注射，例如 HC、PRV 及 PRRSV 等，將混合感染之機會降到最低，同時加強飼養管理與人員及車輛管制，並落實衛生消毒工作，將環境中 PCV2 病毒存在量降到最低，減少 PCV2 感染機率，方可提升豬隻的育成率。另外，由於對 PCV2 基因體的了解，也可提供進一步研發疫苗的參考。

基於過往經驗，利用原核系統進行 PCV2 ORF2 表現往往容易出現許多問題。例如無法有較且穩定的進行重組蛋白表現，以及表現量過少。推測其原因，可能是原核系統所產生之重組蛋白表現在極短時間內即迅速溶解，或是該重組蛋白本身具有毒性，所以在剛開始表現出來時會抑制宿主細胞繼續表現該蛋白。另外因為 PCV2 ORF2 之序列在 N”端位置具有一段 Nuclear Location 序列(約 165 nts)，也會影響到該重組蛋白在原核系統之表現。故在執行期中改採用真核系統來進行重組蛋白表現，並以 PK-15 細胞作為載台，希望能有效解決上述之問題。

本實驗所構築之 PCI-neo 質體在轉染 PK-15 細胞後可以有效表達出 PCV2-ORF2 基因蛋白產物，並且開發為豬隻血清診斷試劑。對於過去數年來無法有效表現出 ORF2 基因體全長產物總算獲得了初步之解決。因為 PK-15 細胞能有效進行哺乳動物細胞的蛋白質轉譯後修飾作用，對於重組蛋白之品質以及穩定性具有極大助益，在構型上亦較接近原始之抗原結構。在本次實驗中，重組蛋白之產量可達到 2 mg/L，量產上已達到前人之研究水準。未來亦將朝向量產大量化之方面進行更多相關研究。

主要參考文獻

1. Allan, G. M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I. and Kennedy, S. 2000. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. Arch. Virol. 145: 2421-2429.
2. Allan, G. M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E. G., Ellis, J. A., Haines, D. M., Meehan, B. M. and Adair, B. M. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. J. Vet. Diagn. Invest. 10: 3-10.
3. Allan, G. M., McNeilly, F., Cassidy, J. P., Reilly, G. A., Adair, B., Ellis, W. A. and McNulty, M. S. 1995. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. Vet. Microbiol. 44: 49-64.
4. Chae C. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. Vet. J. 169: 326-336.
5. Chen, S. P., Weng, Y. J., Tsai, C. P., Chang, W. F., Li, N. J., Tsai, C. E. and Chiou, M. T. 2001. Case report: Identification of pathogenic porcine circovirus in pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome in Taiwan. J. Chin. Soc. Vet. Sci. 27: 251-255.
6. Choi, J., Stevenson, G. W., Kiupel, M., Harrach, B., Anothayanontha, L., Kanitz, C. L. and Mittal, S. K. 2002. Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. Can. J. Vet. Res. 66: 217-224.
7. Dulac, G. C. and Afshar, A. 1989. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. Can. J. Vet. Res. 53: 431-433.

8. Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D. and Haines, D. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Can. Vet. J. 39: 44-51.
9. Gresham, A., Jackson, G., Giles, N., Allan, G., McNeilly, F. and Kennedy, S. 2000. PMWS and porcine dermatitis nephropathy syndrome in Great Britain. Vet. Rec. 146: 143.
10. Hamel, A. L., Lin, L. L. and Nayar, G. P. 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. J. Virol. 72: 5262-5267.
11. Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S. and Allan, G. M. 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. J. Comp. Pathol. 122: 9-24.
12. Kim, J., Chung, H. K., Jung, T., Cho, W. S., Choi, C. and Chae, C. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. J. Vet. Med. Sci. 64: 57-62.
13. Larochelle, R., Magar, R. and D'Allaire, S. 2002. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. Virus Res. 90: 101-112.
14. Magar, R., Muller, P. and Larochelle, R. 2000. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. Can. J. Vet. Res. 64: 184-186.
15. Mahe, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E. and Jestin, A. 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. J. Gen. Virol. 81: 1815-1824.
16. Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J. M., LeCann, P., Jestin, A., Segales, J., Chmielewicz, B., Plana-Duran, J. and Soike, D. 2000. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. Virus Res. 66: 65-77.
17. Mankertz, A., Mankertz, J., Wolf, K. and Buhk, H. J. 1998. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. J. Gen. Virol. 79: 381-384.
18. Meehan, B.M., McNeilly, F., McNair, I., Walker, I., Ellis, J. A., Krakowka, S. and Allan, G. M. 2001. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Arch. Virol. 146: 835-842.
19. Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M. A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K. and Hino, S. 1999. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. J. Virol. 73: 3582-3586.
20. Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Morgan, M. K., Yoon, K. J. and Paul, P. S. 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. J. Clin. Microbiol. 36: 2535-2541.
21. Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S. R., Harms, P. A., Sorden, S. D. and Paul, P. S. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. J. Gen. Virol. 81: 2281-2287.
22. Niagro, F. D., Forsthoefel, A. N., Lawther, R. P., Kamalanathan, L., Ritchie, B. W., Latimer, K. S. and Lukert, P. D. 1998. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates

between the geminiviruses and plant circoviruses. Arch. Virol. 143: 1723-1744.

23. Phenix, K.V., Weston, J. H., Ypelaar, I., Lavazza, A., Smyth, J. A., Todd, D., Wilcox, G. E. and Raidal, S. R. 2001. Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus Circovirus of the family Circoviridae. J. Gen. Virol. 82: 2805-2809.
24. Rodriguez-Arrioja, G. M., Segales, J., Balasch, M., Rosell, C., Quintant, J., Folch, J. M., Plana-Duran, J., Mankertz, A. and Domingo, M. 2000. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. Vet. Rec. 146: 762-764.
25. Rodriguez-Arrioja, G. M., Segales, J., Calsamiglia, M., Resendes, A. R., Balasch, M., Plana-Duran, J., Casal, J. and Domingo, M. 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Am. J. Vet. Res. 63: 354-357.
26. Rosell, C., Segales, J., Ramos-Vara, J. A., Folch, J. M., Rodriguez-Arrioja, G. M., Duran, C. O., Balasch, M., Plana-Duran, J. and Domingo, M. 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Vet. Rec. 146: 40-43.
27. Sato, K., Shibahara, T., Ishikawa, Y., Kondo, H., Kubo, M. and Kadota, K. 2000. Evidence of porcine circovirus infection in pigs with wasting disease syndrome from 1985 to 1999 in Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci. 62: 627-633.
28. Shibata, I., Okuda, Y., Yazawa, S., Ono, M., Sasaki, T., Itagaki, M., Nakajima, N., Okabe, Y. and Hidejima, I. 2003. PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. J. Vet. Med. Sci. 65: 405-408
29. Tischer, I., Bode, L., Peters, D., Pociuli, S., and Germann, B. 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. Arch. Virol. 140: 737-743.
30. Tischer, I., Mields, W., Wolff, D., Vagt, M. and Griem, W. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. Arch. Virol. 91: 271-276.
31. Todd, D., Weston, J. H., Soike, D. and Smyth, J. A. 2001. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. Virology 286: 354-362.
32. Wang, C., Huang, T. S., Huang, C. C., Tu, C., Jong, M. H., Lin, S. Y., Lai, S. S. 2004. Characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan. J. Vet. Med. Sci. 66: 469-475.

家畜衛試所研報No.42：79~88(2007)

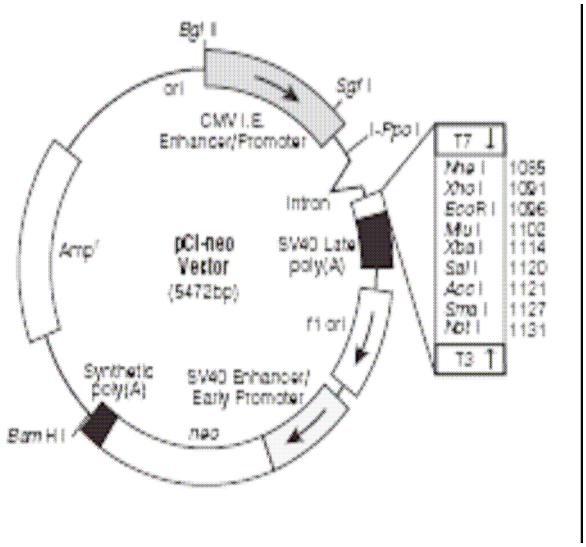


圖 1. pCI-neo 質體之圖譜

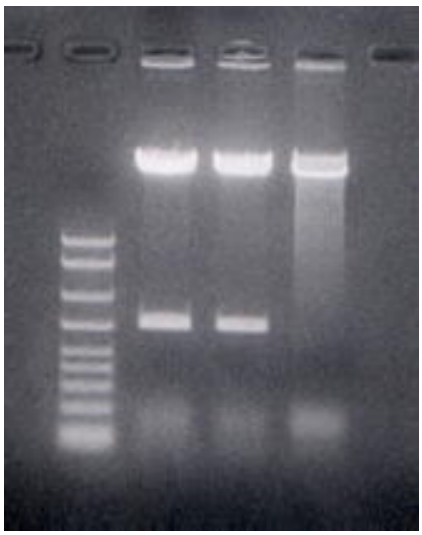


圖 2、豬第二型環狀病毒 ORF2 基因接合至 pCI-neo 質體

M: 100-bp DNA ladder markers

1: PCV2 ORF2 gene in pCI-neo plasmid

2: PCV2 ORF2 gene in pCI-neo plasmid

3: Only pCI-neo plasmid

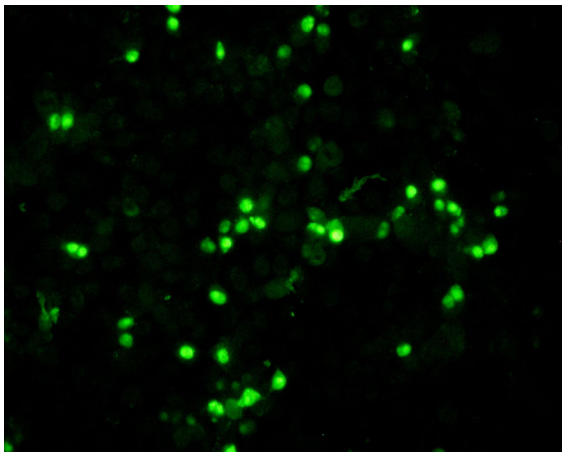


圖 3. PCV2-ORF2 基因之重組蛋白在 PK-15 細胞中成功表現出來，可在 PK-15 細胞之細胞核中觀察到特異性之螢光反應。

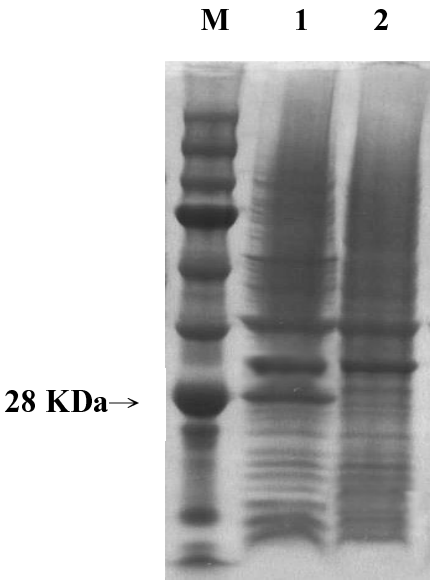


圖４、蛋白質電泳分析

M: Protein markers
1: PK-15 containing plasmids plasmids pCI-neo with PCV2-ORF2.
2: Only PK-15 was analysis.

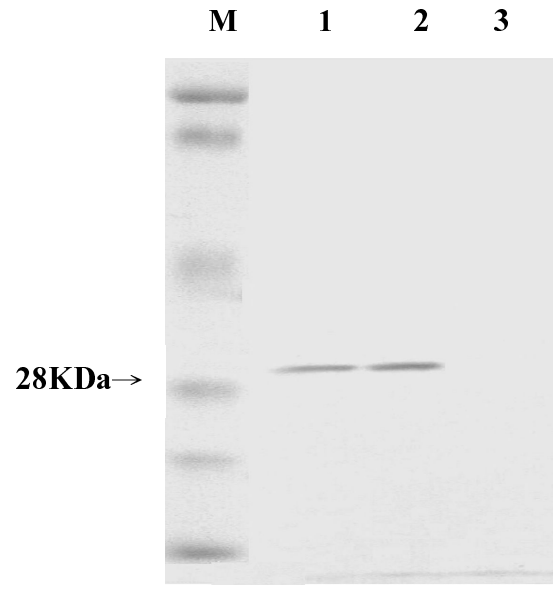


圖５、西方轉印法分析

M: Protein markers
1 and 2: PK-15 containing plasmids pCI-neo with PCV2-ORF2 was analysis by immunoblot with anti-PCV2 monoclonal antibody.
3: Only PK-15 was analysis by immunoblot with anti-PCV2 monoclonal antibody.

Exp.Rep AHRI.,No.42：79~88(2007)

Expression of the Recombinant ORF 2 Protein of Porcine Circovirus Type 2 in Eukaryotic System

Chun Wang*[1,2], Jui-Yu Chiu[1,2], Tien-Shine Huang[1], Ming-Hwa Jong[1], Parn-Hwa Zhao[1] and Ing -Cherng Guo[2]

[1]Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

[2]Graduate Institute of Veterinary Medicine, National Taiwan University

Abstract Porcine circovirus type 2 represents the causative agent of a new porcine disease which spread all over the world during the past several years. In this study, viral DNA of a Taiwanese PCV2 strain was extracted and its open reading frame 2 (ORF2) gene was amplified by PCR. The PCR product was purified and then cloned into the pCI-neo vectors. The recombinant vector was transfected into PK-15 cells. The recombinant protein was expressed successfully in PK-15 cells, which could be detected by using indirect immunofluorescence assay and Western blotting analysis.

Key words: *Porcine circovirus type 2; Indirect immunofluorescense assay; SDS-PAGE; Western blotting*

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute