

猪 2 型圆环病毒 ORF2 基因在塞姆利基森林病毒 RNA 复制子 衍生的新型真核表达载体中的表达

罗玉子^{1,2} 仇华吉¹ 刘建华^{1,3} 韩凌霞¹ 李 娜^{1,3} 张守发² 童光志^{1*}

¹(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

²(延边大学农学院, 龙井 133400)

³(新疆农业大学动物医学院, 乌鲁木齐 830052)

摘 要 猪 2 型圆环病毒(porcine circovirus 2, PCV2)是断乳仔猪多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的原发性病原。PCV2 的 ORF2 编码病毒唯一的结构蛋白 Cap。根据 GenBank 中公布的 PCV2 JXL 株的序列设计一对引物,应用 PCR 方法从该毒株感染的 PK-15 细胞中扩增出完整的 ORF2 基因,将此基因克隆于本实验室此前构建的塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus, SFV)RNA 复制子衍生的新型真核表达载体 pSFV1CS 中的 *Bam*HI 位点,获得重组质粒 pSFV1CS-Cap。用 pSFV1CS-Cap 分别转染 BHK-21 细胞和 293T 细胞,经间接免疫荧光试验检测表明,PCV2 ORF2 基因在转染细胞中得到表达。小鼠接种试验表明,该重组质粒能诱导小鼠产生特异性抗体。

关键词 断乳仔猪多系统衰竭综合征, 猪 2 型圆环病毒, 塞姆利基森林病毒, RNA 复制子

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0948-05

1991 年, Harding 等报道^[1]在加拿大的猪群中发现一种称为断乳仔猪多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的疾病。目前,研究者普遍认为猪 2 型圆环病毒(porcine circovirus 2, PCV2)是该病的主要病原^[2-6]。目前 PMWS 广泛分布于全世界的大部分地区,给各国的养猪业造成了巨大的经济损失。郎洪武等^[7]用 ELISA 方法对来自北京等 7 省市的 22 个猪群的 559 份猪血清进行检测,结果显示,猪群 PMWS 抗体阳性率为 42.9%,证明 PCV2 已在我国广泛存在。迄今为止,对 PCV2 感染尚未找到有效的防治措施,有关疫苗的研制尚未见文献报道。

PCV2 为一单链环状 DNA 病毒,基因组 1.7kb,含有 2 个开放阅读框架即 ORF1 和 ORF2。ORF2 基因编码病毒的唯一结构蛋白即衣壳蛋白 Cap。Nawagitgul 等(2000)^[8]研究发现用杆状病毒表达的 Cap 蛋白可以自我装配成病毒样粒子, Liu 等^[9]认为 PCV2 的 Cap 蛋白具有良好的免疫原性,因此 Cap 可作为构建重组疫苗的靶抗原。

近些年来,塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus, SFV)与其它甲病毒如辛德比斯病毒(SIN)、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒(VEE)衍生的 DNA/RNA 载体被广泛用于外源基因的表达^[10-12]。此类表达载体对外源基因的表达机制不同于传统的真核表达载体。传统的真核表达载体中, RNA 聚合酶 II 直接介导外源基因 mRNA 的转录,而在此类载体中,启动子并

不直接指导外源基因的表达,而是控制具有自身复制能力的甲病毒 RNA 复制子的表达。甲病毒 RNA 的翻译产生病毒复制酶复合物,进而介导重组 RNA 在细胞浆内的大量复制,最终使得外源基因编码的 mRNA 获得高效表达^[10-11]。

pSFV1 是衍生于 SFV RNA 复制子的真核表达载体。快速的病毒传代、宽广的宿主谱、细胞质中有效的 RNA 复制和高效的表达水平,这些特征使该载体倍受青睐。pSFV1 真核表达载体已被用于表达人的铁转运蛋白受体(膜蛋白)等多种蛋白^[13]。

此前,我们以 pSFV1 为骨架,引入 II 型启动子和转录终止信号,构建了改进型真核表达载体 pSFV1CS,通过绿色荧光蛋白基因的克隆表达验证了该表达载体的实用性^[14]。经改造的载体保留了原载体的表达元件,克服了原载体需体外转录制备 RNA 的弊端,插入外源基因后可直接转染细胞表达外源蛋白,应用更为方便。

本研究将 PCV2 ORF2 基因克隆到上述改进型真核表达载体 pSFV1CS 中,通过细胞转染和小鼠接种试验探讨该载体用于构建 PCV2 RNA 疫苗的可行性。

1 材料与 方法

1.1 毒株和菌株

PCV2 JXL 株由本室保存,宿主菌 *E. coli* DH5 α 由本室保

收稿日期:2004-03-15,修回日期:2004-06-20。

基金项目:黑龙江省科技攻关项目(No. GA02B501)。

* 通讯作者。 Tel: 86-451-82725786 ext 259; Fax: 86-451-82734181; E-mail: gztong@public.hr.hl.cn

存。

1.2 细胞

BHK-21 细胞和 293T 细胞由本室提供,用含有 10% 犊牛血清和适量抗生素的 DMEM 培养基(Gibco BRL)置 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,培养 293T 细胞的 6 孔培养板用 0.1 mg/mL 的多聚赖氨酸预处理。

1.3 质粒

pSFV1CS 载体为根据 SFV RNA 复制子衍生的表达载体 pSFV1(Invitrogen 公司)改造的新型真核表达载体^[14],含有 SFV 非结构蛋白 nsP1-4 编码区、SP6 启动子、氨苄青霉素抗性基因(Amp^r)、原核细胞复制原点(ori)和多克隆位点(MCS),在此基础上插入了 CMV 立即早期启动子(P_{CMV})和 SV40 PolyA 信号(图 1)。

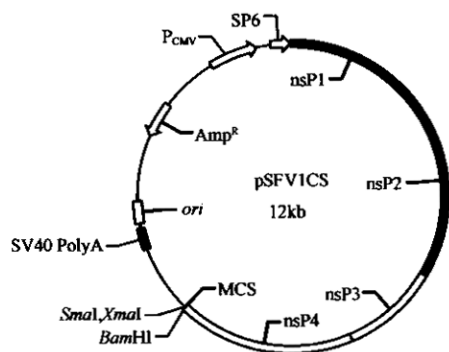


图 1 pSFV1CS 真核表达载体图谱

Fig.1 The map of pSFV1CS eukaryotic expression vector

1.4 PCR

将 PCV2 JXL 株种毒按 1:10 接种于长至 80% 的 PK-15 单层细胞。提取病毒感染细胞总 DNA,以此作为 PCR 的模板。根据 PCV2 JXL 株的序列(GenBank accession No. AY491310),利用 Oligo 5.0 生物学软件设计跨越 ORF2 基因的一对引物(上海博亚公司合成)pPCV1022(5'-CTC AGA TCT TAT GAC GTA TCC AAG-3')和 pPCV1717(5'-ATT AGA TCT GGG TTA AGT GGG-3'),引物 5'端引入了 Bgl II 位点,加下划线表示,预期扩增产物大小为 721bp。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5min;94℃ 变性 1min,50℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min,重复 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。

1.5 分子克隆

将扩增得到的 PCV2 ORF2 基因经 Bgl II 酶切后,用胶回收试剂盒回收目的片段,与用 BamH I 酶切并用碱性磷酸酶脱磷处理的载体 pSFV1CS 于 16℃ 连接过夜,转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,用 Xba I 和 Pvu II 酶切筛选重组克隆,并测序鉴定。

1.6 转染

用纯化试剂盒 Wizard[®] (PureFectin Plasmid DNA Purification System)(Promega 公司)按试剂盒说明书纯化质粒,用脂质体转染试剂盒 Lipofectamine[™] PLUS(Invitrogen 公司)将纯化的质粒转染至长成 70%~80% 的 BHK-21 和 293T 单层细胞,同时设转染 pSFV1CS-EGFP^[14] 的阳性对照和空质粒转染的

阴性对照。

1.7 间接免疫荧光试验

转染后 60h,首先将细胞用胰酶消化,用 PBS 洗涤 2 次,并用 PBS 将其稀释至适当浓度后,滴至载玻片上,吹干,用冷丙酮固定 10min,用去离子水冲洗后吹干。然后用 PCV2 抗血清(本室制备)进行间接免疫荧光试验(IFA)^[15] 检测。

1.8 小鼠接种试验

选取 12 只 4~5 周龄体重相近的 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠(由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供),对所有小鼠的免疫前血清进行 Cap 蛋白特异性抗体的 ELISA 检测和间接免疫荧光检测,检测结果均为阴性。将小鼠随机分为 3 组,每组 4 只。第 1 组和第 2 组为 pSFV1CS-Cap 免疫组,第 3 组为 pSFV1CS 免疫组。第 2 组 pSFV1CS-Cap 免疫组免疫剂量为 10μg,其余组的免疫剂量均为 100μg。在所有小鼠的双侧股四头肌平均注射稀释于生理盐水中的纯化的质粒 DNA,共免疫 3 次,间隔为 2 周,每次免疫前采血,三免后间隔 1 周采血,第 15d 进行眼球采血,分离血清,置 -20℃ 保存备检。应用间接 ELISA^[16] 检测免疫小鼠接种前后血清中的抗 Cap 蛋白的特异性抗体,以杆状病毒载体系统表达的纯化重组 Cap 蛋白(华中农业大学肖少波博士惠赠)作为抗原包被聚苯乙烯微量反应板。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

以病毒感染细胞的总 DNA 为模板,用 pPCV1022/pPCV1717 进行 PCR 扩增,PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,可见大小约为 0.7kb 的特异性条带,与预期片段大小相符(图 2)。

将扩增得到 PCV2 ORF2 基因经 Bgl II 酶切后克隆于 pSFV1CS 中的 BamH I 位点,通过 Pvu II 酶切鉴定,正向克隆命名为 pSFV1CS-Cap,经测序进一步验证了外源基因的插入方向和序列的正确性。

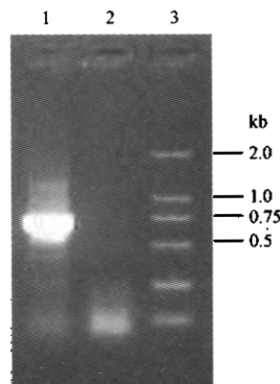


图 2 PCV2 ORF2 基因的扩增

Fig.2 Amplification of PCV2 ORF2 by PCR

1:products amplified from PCV2 genomic DNA; 2:negative control; 3:DL2 000 marker

2.2 PCV2 ORF2 基因在 pSFV1CS-Cap 转染细胞中得到表达

用含有 PCV2 ORF2 基因的重组质粒 pSFV1CS-Cap 分别

转染 BHK-21 和 293T 单层细胞。结果显示, pSFV1CS-EGFP 的转染孔在转染后 12h 在荧光显微镜下可见亮绿色荧光, 至 36h 发荧光细胞明显增多。转染后 60h 经 IFA 检测, 重组质粒 pSFV1CS-Cap 转染孔在倒置荧光显微镜下可见特异的亮绿色胞浆内荧光, 阴性对照则无特异性荧光, 表明 PCV2 ORF2 基因在转染细胞中得到了表达(图 3)。

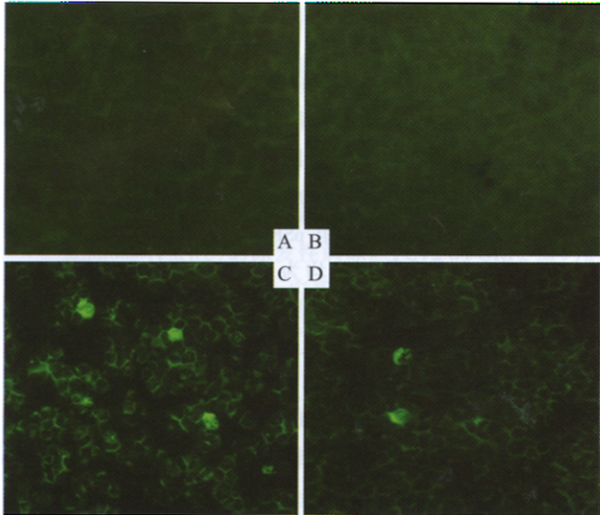


图 3 用 IFA 检测 PCV2 ORF2 基因在 pSFV1CS-Cap 转染细胞中的表达

Fig. 3 Detection of the expression of PCV2 ORF2 gene in pSFV1CS-Cap-transfected BHK-21 cells by IFA

A: untransfected BHK-21 cells control detected by IFA using anti-PCV2 sera; B: pSFV1CS-Cap-transfected BHK-21 cells detected by IFA using PCV2-negative sera; C and D: pSFV1CS-Cap-transfected BHK-21 cells detected by IFA using anti-PCV2 sera

2.3 pSFV1CS-Cap 诱导小鼠产生特异性抗体

用间接 ELISA 对免疫小鼠进行血清学检测, 免疫后血清 OD₄₉₂ 值/免疫前血清 OD₄₉₂ 值 ≥ 2 判为阳性。结果显示(表 1), 首次免疫后 2 周, 100μg pSFV1CS-Cap 免疫组有 2 只小鼠产生了 Cap 特异性抗体, 10μg pSFV1CS-Cap 组有 1 只小鼠抗体转阳; 第 2 次免疫后 2 周, 100μg pSFV1CS-Cap 免疫组又有 1 只小鼠抗体转阳, 10μg pSFV1CS-Cap 免疫组又有 2 只小鼠抗体转阳, 10μg 免疫组 1 只转阳小鼠抗体降至免疫前水平, 其余小鼠抗体水平与先前持平; 第 3 次免疫后 1 周, 小鼠抗体水平基本上无明显变化; 第 3 次免疫后 2 周, 除 100μg pSFV1CS-Cap 免疫组 2 只小鼠外, 其余小鼠抗体均呈下降趋势; 空载体 pSFV1CS 免疫组抗体检测结果始终为阴性。

3 讨 论

PMWS 是猪的一种多因子性疾病, PCV2 是其原发性病原^[2-6], 目前对 PCV2 感染尚无有效的防治方法。用杆状病毒表达的 ORF2 蛋白, 在电镜下观察到可自我装配成病毒样粒子^[8]。由此可推测, ORF2 表达产物可模拟全病毒抗原, 用于研制基因工程疫苗。

在真核表达系统中表达外源基因是研究并表达真核蛋白的有效途径。杆状病毒表达系统被广泛用于生产真核蛋白^[17], 但只能用昆虫细胞进行生产, 而且有些蛋白因为不正确的转录后修饰而不能在昆虫细胞中生产, 为构建重组病毒, 还需要进行同源重组。痘苗病毒系统是一种高效的哺乳动物细胞表达系统^[18], 但也需要制备重组病毒。酵母表达系统操作简便, 但对外源基因的序列组成要求比较严格^[19]。

表 1 免疫小鼠血清 Cap 蛋白特异性抗体的 ELISA 检测

Table 1 Detection of anti-Cap specific antibodies in immunized mice by ELISA

Groups	Dosage	No. of animals	OD ₄₉₂				
			0 week after first immunization	2 weeks after first immunization	2 weeks after second immunization	1 week after third immunization	2 weeks after third immunization
Group 1 pSFV1CS-Cap	100	1-1	0.134	0.336	0.334	0.316	0.272
		1-2	0.13	0.271	0.273	0.269	0.242
		1-3	0.124	0.215	0.248	0.156	0.19
		1-4	0.145	0.217	0.215	0.212	0.212
Group 2 pSFV1CS-Cap	10	2-1	0.141	0.181	0.295	0.197	0.147
		2-2	0.151	0.294	0.153	0.178	0.165
		2-3	0.162	0.198	0.169	0.179	0.153
		2-4	0.129	0.214	0.272	0.259	0.2
Group 3 pSFV1CS	100	3-1	0.154	0.208	0.201	0.189	0.187
		3-2	0.178	0.205	0.198	0.174	0.182
		3-3	0.141	0.171	0.133	0.147	0.121
		3-4	0.158	0.19	0.191	0.174	0.182

近年来, SFV 和 SIN 等甲病毒 RNA 复制子衍生的 DNA/ RNA 载体是一种新型真核表载体^[10-12]。这些甲病毒具有宿

主范围广、蛋白表达水平高、基因组小、容易操作等诸多优越性,所以被广泛用于表达外源基因及作为复制子疫苗和基因治疗的载体。传统的 DNA 疫苗对外源基因的表达水平低,而且存在可能整合于染色体上的隐患,这些局限促使研究者去寻找一种更为安全、表达水平更高、免疫效果更好的疫苗载体。SFV 或 SIN 衍生的 DNA/RNA 复制型载体作为新近开发的载体,具有安全、操作方便、表达效率高的特点,已被许多研究人员用于核酸疫苗和基因治疗研究。我们构建的改进型真核表达载体 pSFV1CS,省去了体外转录制备 RNA 的步骤,插入外源基因后可直接转染细胞。实验结果表明,该载体不仅可用于表达外源基因,而且还可作为 RNA 复制子载体用于抗病毒基因疫苗的研制。

我们在用重组质粒 pSFV1CS-Cap 转染细胞的同时,设转染 pSFV1CS-EGFP 作为阳性对照,pSFV1CS-EGFP 的转染孔在转染后 12h 在荧光显微镜下可见亮绿色荧光,至 36h 发荧光细胞明显增多(结果未显示),说明了载体可有效表达外源基因,并且转染程序是可行的。本试验利用 IFA 检测 Cap 蛋白的表达,该方法敏感而且特异。试验中因为缺乏针对 PCV2 ORF2 的单抗,故选用抗 PCV2 多抗血清进行检测,并无非特异性反应。

通过小鼠试验对构建的 PCV2 RNA 疫苗进行了免疫效力评价,用间接 ELISA 从 10 μ g 和 100 μ g pSFV1CS-Cap 接种小鼠的血清中检测到了 Cap 蛋白的特异性抗体。实验数据显示,高剂量(100 μ g)免疫组免疫应答高于低剂量(10 μ g)免疫组(表 1),表现为抗体应答时间相对较早,抗体滴度相对较高,抗体持续时间相对较长。值得注意的是,有些小鼠一次免疫后就检测到了抗体,有些小鼠在二次免疫后才有免疫应答,而个别小鼠即便免疫 3 次也始终无抗体应答。这些差别可能是实验动物的个体差异造成的。

从实验结果来看,加强免疫效果不太明显。据报道,以 RNA 复制子为基础的复制型 DNA 疫苗在免疫动物体内一过性表达外源基因后,随细胞凋亡而最终被机体清除^[20],因此 RNA 复制子疫苗诱导的免疫应答是短暂的,并且很难取得很高的免疫应答水平。接种次数过多,间隔时间过短,可能造成大量的细胞发生凋亡,而难以取得预期的免疫应答。因此需要多次实验以优化免疫程序。

Hariharan 等(1998)用 SIN 复制子衍生的 DNA 载体构建表达 LacZ 的复制型质粒,以低免疫剂量在小鼠体内诱导了有效的免疫应答。在单纯疱疹病毒糖蛋白 B 及肿瘤抗原模型中,SFV 复制型 DNA 载体可高水平表达外源基因,并以低于传统 DNA 疫苗 100~1000 倍的免疫剂量在 BALB/c 鼠中诱导出免疫反应^[21]。邓瑶等(2002)比较了 SFV 衍生的复制型 DNA 疫苗载体和常规非复制型 DNA 疫苗载体对小鼠的免疫效果,证实低剂量 SFV 衍生的复制型 DNA 疫苗载体可诱导与高剂量常规 DNA 疫苗载体相近的免疫效果^[22]。但在本研究中,10 μ g 复制子疫苗未能诱导理想的免疫反应,可能是由于不同研究所用的抗原存在差异,抑或是因为免疫程序不同所致,因此有待于进一步优化和改进。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Harding JC, Clark EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod*, 1997, 5:201-203
- [2] Allan G, Meehan B, Todd D *et al*. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec*, 1998, 142(17): 467-468
- [3] Ellis J, Hassard L, Clark E *et al*. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J*, 1998, 39:44-51
- [4] Hamel AL, Lin LL, Nayar GP. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol*, 1998, 72: 5262-5267
- [5] Meehan BM, McNeilly F, Todd D *et al*. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol*, 1998, 79:2171-2179
- [6] Morozov I, Sirinarumit T, Sorden SD *et al*. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: (9)2535-2541
- [7] Lang HW(郎洪武), Zhang GC(张广川), Wu FQ(吴发权) *et al*. Antibody detection of sera from postweaning multisystemic wasting syndrome. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology* (中国兽医科技), 2000, 30(3): 3-5
- [8] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR *et al*. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol*, 2000, 81(9):2281-2287
- [9] Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*, 2001, 285(1): 91-99
- [10] Hariharan MJ, Driver DA, Townsend K *et al*. DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a Sindbis virus based vector. *J Virol*, 1998, 72(2):950-958
- [11] Berglund P, Smerdou C, Fleeton MN *et al*. Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(6):562-565
- [12] Leitner WW, Ying H, Driver DA *et al*. Enhancement of tumor specific immune response with plasmid DNA replicon vectors. *Cancer Res*, 2000, 60(1):51-55
- [13] Liljestrom P, Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y)*, 1991, 9(12): 1356-1361
- [14] Qiu HJ(仇华吉), Luo YZ(罗玉子), Li N(李娜) *et al*. A modified eukaryotic expression vector derived from RNA replicon of Semliki Forest virus. *Journal of Chinese Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2004, 24(5):69-71
- [15] Lu YH(芦银华), Tan GL(谈国蕾), Hua XG(华修国) *et al*. Detection of antibodies against porcine circovirus by indirect immunofluorescent assay. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*(中国兽医科技), 2002, 32(8):19-20
- [16] Zhou ZF(周仲芳), Li LF(李力复), Luo CB(罗长保) *et al*. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant antigens for detection of antibodies against transmissible gastroenteritis. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology* (中国兽医科技), 2000, 26(10):12-14

- [17] Moss B, Elroy-Stein O, Mizukami T *et al.* Product review. New mammalian expression vectors. *Nature*, 1990, **348** (6296): 91 - 2
- [18] Miller LK. Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu Rev Microbiol*, 1988, **42**: 177 - 199
- [19] Wu D(吴丹), Qiu HJ(仇华吉), Tong GZ(童光志). Comparison of several expression systems. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), 2002, **2**: 30 - 34
- [20] Leitner WW, Ying H, Driver DA *et al.* Enhancement of tumor-specific immune response with plasmid DNA replicon vectors. *Cancer Res*, 2000, **60**(1): 51 - 5
- [21] Hariharan MJ, Driver DA, Townsend K *et al.* DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a Sindbis virus-based vector. *J Virol*, 1998, **72**(2): 950 - 958
- [22] Deng Y(邓瑶), Meng X(孟昕), Xu HL(许洪林) *et al.* A comparative study on SFV-based DNA vaccine and the conventional DNA vaccine. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 2002, **18** (4): 325 - 31

Expression of ORF2 Gene of Type 2 Porcine Circovirus in a Modified Eukaryotic Expression Vector Derived from RNA Replicon of Semliki Forest Virus

LUO Yu-Zi^{1, 2} QIU Hua-Ji¹ LIU Jian-Hua^{1, 3} HAN Ling-Xia¹ LI Na^{1, 3} ZHANG Shou-Fa² TONG Guang-Zhi^{1*}

¹(National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

²(Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, China)

³(College of Veterinary Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract The ORF2 gene of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-associated porcine circovirus 2 (PCV2) encodes the only structural protein, Cap. The ORF2 gene was amplified by PCR from the genomic DNA of PK-15 cell infected with PCV-2 JXL strain, then cloned into the unique *Bam*H I site of pSFV1CS, a eukaryotic expression vector derived from RNA replicon of Semliki Forest virus, creating a recombinant plasmid designated as pSFV1CS-Cap. The resultant plasmid was then transfected into BHK-21 and 293T cells. The results showed that the Cap gene was expressed efficiently in pSFV1CS-Cap-transfected cells, as demonstrated by indirect immunofluorescence assay (IFA). BALB/c mice inoculated with 10 or 100 μ g of pSFV1CS-Cap developed anti-Cap protein specific antibodies, as indicated by IFA as well as indirect ELISA based on baculovirus-produced recombinant Cap protein, indicating that pSFV1CS-Cap can induce specific immune response in mice. The recombinant plasmid expressing PCV2 ORF2 gene can be used as a potential RNA vaccine to prevent PCV2 infections.

Key words porcine circovirus 2, Semliki Forest virus RNA replicon, eukaryotic expression vector, indirect immunofluorescence assay

Received: 03-15-2004

This work was supported by Grant from Heilongjiang Science and Technology Projects Tackling Key Programs(No. GA02B501).

* Corresponding author. Tel: 86-451-82734181; Fax: 86-451-82734181; E-mail: gztong@public.br.hl.cn