

基于体外自连接的猪圆环病毒 2 型感染性克隆构建方法

孙仁杰¹, 杨永乐², 王雅婷¹, 谢荣辉¹, 张传亮¹, 方维焕³, 李肖梁^{3*}, 赵灵燕^{1*}

1 浙江省动物疫病预防控制中心, 浙江 杭州 311199

2 湘湖实验室, 浙江 杭州 311231

3 浙江大学 动物科学学院 浙江省动物预防医学重点实验室, 浙江 杭州 310058

孙仁杰, 杨永乐, 王雅婷, 谢荣辉, 张传亮, 方维焕, 李肖梁, 赵灵燕. 基于体外自连接的猪圆环病毒 2 型感染性克隆构建方法[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2333-2345.

SUN Renjie, YANG Yongle, WANG Yating, XIE Ronghui, ZHANG Chuanliang, FANG Weihuan, LI Xiaoliang, ZHAO Lingyan. An *in vitro* self-ligation-based method for constructing infectious DNA clone of porcine circovirus type 2[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2333-2345.

摘要: 本研究旨在建立一种快速构建猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)感染性克隆的方法。以临床分离的 PCV2 LX 株为模板, 利用 DNA 无缝克隆技术成功构建了 PCV2 环状感染性克隆。同时, 在基因组体外自连接的构建过程以及拯救病毒的生长特性上, 将本方法与常规酶切连接方法进行了比较。本方法无须分析和引入限制性内切酶位点, 避免了传统酶切连接的繁琐, 能更高效地进行 PCV2 基因组的编辑。构建的感染性克隆经脂质体转染细胞, 成功拯救获得可以稳定传代的重组病毒, 并且重组病毒在 PK-15 细胞和 3D4/31 细胞(猪肺泡巨噬细胞系)上具有更强的增殖能力。综上所述, 本研究构建了一种基于体外自连接的 PCV2 反向遗传操作系统, 为 PCV2 基因工程疫苗的研发提供新策略, 为其他新发圆环病毒(PCV3 和 PCV4)感染性克隆的构建提供借鉴。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; 感染性克隆; 体外自连接; 病毒拯救

资助项目: 浙江省自然科学基金(LQ23C180001); 国家自然科学基金(32172819); 浙江省动物预防医学重点实验室开放基金(ZPKLPVM2022KFKT001); 浙江省“三农九方”科技协作项目(2022SNJF060, 2023SNJF059)

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LQ23C180001), the National Natural Science Foundation of China (32172819), the Zhejiang Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine Foundation (ZPKLPVM2022KFKT001), and the Zhejiang Province Science and Technology Cooperation Project of “Three Rural and Nine Parties” (2022SNJF060, 2023SNJF059).

*Corresponding authors. E-mail: ZHAO Lingyan, zhaoly96@163.com; LI Xiaoliang, xlli@zju.edu.cn

Received: 2023-09-14; Accepted: 2023-12-29; Published online: 2024-01-02

An *in vitro* self-ligation-based method for constructing infectious DNA clone of porcine circovirus type 2

SUN Renjie¹, YANG Yongle², WANG Yating¹, XIE Ronghui¹, ZHANG Chuanliang¹, FANG Weihuan³, LI Xiaoliang^{3*}, ZHAO Lingyan^{1*}

1 Zhejiang Provincial Center for Animal Disease Control and Prevention, Hangzhou 311199, Zhejiang, China

2 Xianghu Laboratory, Hangzhou 311231, Zhejiang, China

3 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract: The aim of this study was to establish a rapid method for constructing infectious clones of porcine circovirus type 2 (PCV2). In this study, we constructed circular infectious clones of PCV2 by seamless cloning technology, using the clinically isolated strain PCV2-LX as a template. Meanwhile, this method was compared with the conventional restriction-ligation approach, focusing on the *in vitro* circularization (self-ligation) process of the genome and the growth characteristics of rescued viruses. The results showed that this method eliminates the need to analyze and introduce restriction endonuclease sites, thus avoiding the complexities associated with traditional restriction enzyme-based cloning steps. It offers a simple and rapid operation, enabling more efficient editing of the PCV2 genome. The infectious clones constructed using this method could be successfully rescued through liposome transfection, resulting in the production of recombinant viruses that could be stably passaged. Moreover, the recombinant viruses rescued by this method exhibited enhanced proliferative capacity in PK-15 cells and 3D4/31 cells (immortalized porcine alveolar macrophages). In conclusion, this study has established a novel reverse genetics system for PCV2, providing a new strategy for the development of PCV2 genetic engineering vaccines. Additionally, it serves as a reference for the construction of infectious clones for other emerging circoviruses such as PCV3 and PCV4.

Keywords: porcine circovirus 2; infectious clone; *in vitro* self-ligation; virus rescue

猪圆环病毒(porcine circoviruses)属于圆环病毒科(*Circoviridae*)圆环病毒属(*Circovirus*), 目前成员包括: 猪圆环病毒 1 型(porcine circovirus type 1, PCV1)、2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)、3 型(porcine circovirus type 3, PCV3)和 4 型(porcine circovirus type 4, PCV4)^[1-8]。PCV2 是引起猪圆环病毒相关疾病(porcine circovirus-associated disease, PCVAD)的重要病原, 与猪的多种疾病综合征密切相关, 给全球养猪业造成重大经济损失。但 PCV2 单独感染

的致病力不强, 混合感染或继发感染或环境应激, 可以触发 PCVAD^[3,9-11]。自 20 世纪 90 年代末 PCV2 被发现以来, 已研发出多种商品化和实验性疫苗, 包括灭活疫苗、减毒嵌合疫苗、多价疫苗、亚单位疫苗、核酸疫苗和病毒载体疫苗。部分疫苗已被证实在生猪健康养殖和优化防疫免疫程序方面应用效果较好^[12]。然而, 随着 PCV2 基因型的增加, PCV2 疫苗的研制速度滞后于 PCV2 的进化速度, 因此研发有效、生产速度快、成本低以及能够应对基因组变异

的疫苗至关重要。

病毒反向遗传学是按照病毒基因组的组成顺序,通过基因工程技术构建含必需元件的全长 cDNA 克隆(过程中可对病毒基因组进行定点加工和修饰),借助细胞转染在宿主细胞内产生并获得重组病毒(具有复制能力)的技术方法。应用该技术能够深入探索研究病毒生物学和免疫学相关的重要问题,包括病毒基因的功能、病毒复制周期以及病毒的致病性等,并可用于疫苗开发和抗病毒药物的筛选^[13-14]。2002 年 Fenaux 等^[15]首次成功构建 PCV2 感染性克隆并拯救获得重组病毒,目前反向遗传学技术已被广泛应用于 PCV2 的研究。研究人员通过构建感染性克隆并拯救获得了流行毒株的重组病毒、带分子标记的重组病毒、*ORF3*、*ORF4*、*ORF5* 和 *ORF6* 基因缺失的重组病毒以及 PCV1-2 嵌合病毒等^[15-23]。

本研究利用 DNA 无缝克隆技术构建了基于体外自连接的 PCV2 环状感染性克隆,建立了一种简单、快速且高效的 PCV2 重组病毒拯救系统;以临床病料分离的 PCV2 LX 株为模板,比较了常规酶切连接法与新方法构建的环状感染性克隆所拯救重组病毒的生长特性;为深入研究 PCV (包括 PCV2、PCV3 以及 PCV4) 的基因组功能、病毒-宿主互作和致病机制提供技术平台,同时也为应对 PCV2 遗传变异多样性,研发核酸疫苗提供新策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒及相关材料

pEasy-Blount Zero Cloning 试剂盒购自北京全式金生物技术股份有限公司。高保真 PCR 聚合酶 2×Phanta Max Master Mix 和无缝克隆试剂盒 ClonExpress II One Step Cloning Kit 购自

南京诺唯赞生物科技股份有限公司;限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;质粒提取、PCR 产物纯化和凝胶回收纯化试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司;引物合成和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.1.2 病毒和细胞系

PCV2 LX 株(GenBank 登录号:MG870195)于 2016 年从浙江省某猪场临床发病猪中分离并经测序鉴定,其基因型为 PCV2d。

PCV 阴性的猪肾上皮细胞系(PK-15)和猪肺泡巨噬细胞细胞系(3D4/31)由浙江大学动物科学学院分子微生物学与食品安全实验室馈赠,本实验室传代保存。用含有 5%胎牛血清以及 1% antibiotic-antimycotic 抗菌-抗真菌剂的 DMEM 完全培养基,在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.1.3 细胞培养相关试剂材料

DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、抗菌-抗真菌剂(antibiotic-antimycotic)、0.25%胰酶溶液(含 EDTA)和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自 Thermo Fisher Scientific 公司;细胞冻存管、细胞培养瓶、培养板及培养皿均购自 Corning 公司。

1.1.4 间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)相关试剂材料

IFA 用 4%多聚甲醛和 Triton X-100 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;即用型正常山羊血清购自博士德生物工程有限公司;小鼠抗 Cap 单克隆抗体(D11-1)由浙江大学动物科学学院分子微生物学与食品安全实验室馈赠;FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 荧光二抗购自 KPL 公司。

1.1.5 其他试剂和耗材

Hanks 平衡盐溶液购自上海碧云天生物技术有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自 Sigma-Aldrich 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific

公司; Ezup 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 含 PCV2 基因组的重组质粒的构建

接种分离病毒的细胞(含培养基)反复冻融 3 次, 5 000 r/min 离心 10 min, 使用 Ezup 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒, 参照说明书提取 PCV2 基因组 DNA, -20 °C 保存备用。使用 Primer Premier version 5.0 软件设计扩增 PCV2 线性基因组的 PCR 引物(表 1)。PCR 模板为提取的 PCV2 基因组 DNA, 按照高保真 PCR 聚合酶说明书配制反应体系。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 15 s, 56 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。取 5 μL 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并使用 PCR 产物纯化试剂盒, 按照说明书进行纯化。

使用 pEasy-Blount Zero Cloning 试剂盒将纯化的 PCV2 线性基因组与载体 pEasy-Blount 连接, 重组质粒命名为 pEasy-Blount-LX, 连接产物转化入大肠杆菌 DH5α 感受态。筛选阳性克隆后参照质粒抽提试剂盒说明书提取质粒, 获得含 PCV2 LX 株全基因组的质粒, 由生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。

1.3 PCV2 环状感染性克隆的构建

本方法原理见图 1A。以 pEasy-Blount-LX

为模板, PCR 反应体系和条件与扩增线性基因组一致。扩增下游引物(circular PCV2-R)添加线性基因组 5'端反向互补的 15 bp 同源序列(表 1)。PCR 扩增含有 15 bp 同源序列的 PCV2 线性基因组。扩增产物使用胶回收试剂盒进行纯化, 获得纯化的 PCV2 线性基因组。使用无缝克隆试剂盒中的 Exnase II 酶(无缝克隆重组酶)对含有 15 bp 同源序列的 PCV2 线性基因组进行体外自连接反应, 反应体系参照说明书。反应条件: 37 °C, 15–30 min; 4 °C, 5 min (PCR 仪控温)。获得的环状双链基因组 DNA 通过 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化, 储存于 -20 °C 备用。1 次反应 DNA 总量为 400 ng, 根据转染需求, 可扩大反应体系。

常规酶切连接法原理见图 1B。以 pEasy-Blount-LX 为模板, PCR 反应体系和条件与上文一致。扩增上下游引物(T4 PCV2-F/R)见表 1。PCR 扩增两端都含有 *EcoR* I 酶切位点的 PCV2 线性基因组。使用胶回收试剂盒获得纯化的 PCV2 线性基因组。产物经 *EcoR* I 37 °C 酶切过夜, 再次进行胶回收纯化。纯化产物经 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 最终使用 PCR 产物纯化试剂盒获得纯化的环状双链基因组 DNA, 储存于 -20 °C 备用。

表 1 PCV2 环状感染性克隆构建和鉴定的引物序列

Table 1 Sequences of primers for PCV2 circular infectious clone construction and identification

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
Linear PCV2-F	GAATTCAACCTTAACCTTTCTTAT	1 767
Linear PCV2-R	TGGCCCTGCTCCCCGAT	
Circular PCV2-F	GAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTCTGT	1 782
Circular PCV2-R	GTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCGAT	
T4 PCV2-F	GAATTCAACCTTAACCTTTCTTAT	1 775
T4 PCV2-R	CGGAATTC TGGCCCTGCTCCCCGAT	
Verify-F	GAGAAGGGCTGGGTTATGGTATGG	447
Verify-R	GCGTTTCCGCAGACGAAGACA	

The box is the restriction site carried by each primer. GAATTC: *EcoR* I.

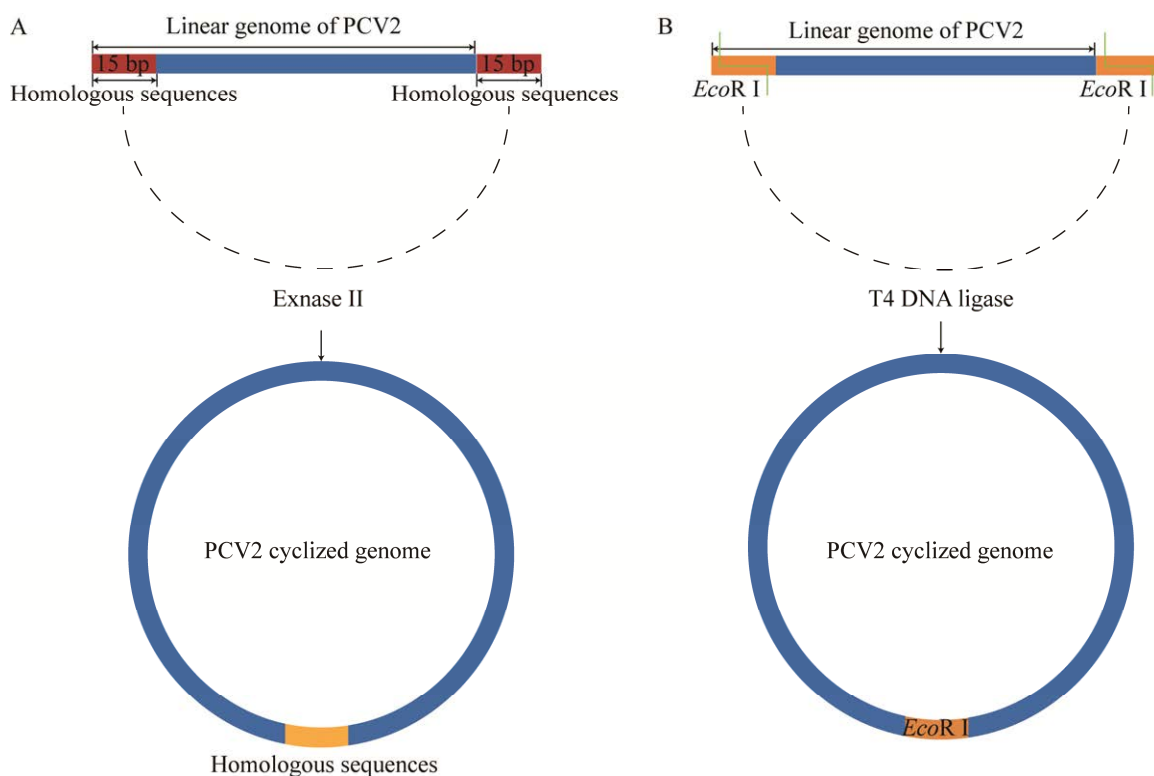


图 1 PCV2 环状感染性克隆的构建策略

Figure 1 Construction strategy of PCV2 circular infectious clone. A: Schematic illustration of constructing PCV2 circular infectious clone by seamless cloning technology. B: Schematic illustration of constructing PCV2 circular infectious clone by conventional restriction-ligation approach.

1.4 PCV2 环状感染性克隆的鉴定

采用 2 种方案验证 PCV2 基因组 DNA 是否能够自连接环化。酶切方案：使用限制性内切酶 *Nco* I 对构建的 PCV2 环状感染性克隆进行酶切，酶切产物进行核酸电泳(图 2A)。若体外自连接成功，电泳可见 1 个片段条带；若失败，电泳可见 2 个片段条带。PCR 方案：在 PCV2 线性基因组的两端设计特异性引物 verify-F/R (表 1) 进行扩增并进行核酸电泳，产物大小 447 bp。若体外自连接成功，电泳可见扩增条带；若失败，电泳无条带(图 2B)。

1.5 病毒体外拯救及鉴定

体外自连接的 PCV2 环状感染性克隆转染 PK-15 细胞。使用 Opti-MEM 培养基分别稀释 PCV2 环状感染性克隆和脂质体 Lipofectamine

2000，同步转染 24 孔板(0.8 μg)和 6 孔板(4 μg)，转染 6 h 后换成普通培养基。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下继续培养至转染后 72 h，在 24 孔板内细胞进行 IFA 检测。用 4% 多聚甲醛室温固定 25–30 min，加入 0.1% Triton X-100，室温孵育 15 min 进行细胞通透。使用小鼠抗 Cap 单抗(1:1 000 稀释)作为一抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60–90 min。FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 为二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60–90 min。使用 Olympus 公司 IX81 荧光倒置显微镜，进行拍照分析。鉴定结果阳性后，将 6 孔板内细胞消化至细胞培养瓶，继续培养。并进行连续传代，逐代进行 IFA 检测。

1.6 重组病毒滴度测定

用 IFA 检测重组病毒 TCID_{50} 。PK-15 细胞铺 96 孔板，待融合度至 70%–80% 备用。使用

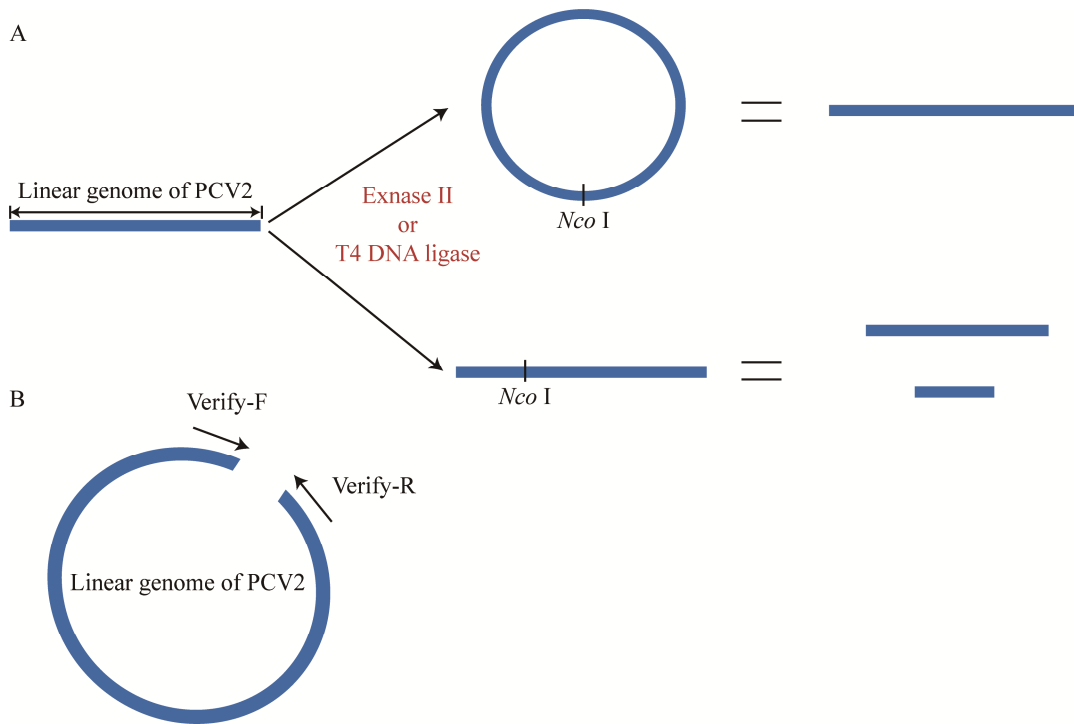


图 2 PCV2 环状感染性克隆的鉴定方案

Figure 2 Identification strategy of PCV2 circular infectious clone. A: Schematic illustration of identification of PCV2 circular infectious clone by restriction endonuclease *Nco* I. B: Schematic illustration of identification of PCV2 circular infectious clone by PCR amplification.

倍比稀释法在无菌 1.5 mL 离心管中稀释预定时间点收集的拯救病毒原液，使用无血清的 DMEM 培养基从 10^{-1} 连续 10 倍稀释至 10^{-12} 。使用稀释后的毒液感染 96 孔板中的细胞，每个稀释度含 8 个重复孔，感染后 72 h 进行 IFA 检测。荧光显微镜观察并记录每个稀释度的荧光阳性孔数，根据 Reed-Muench 法分析计算病毒的 $TCID_{50}$ 。

1.7 重组病毒生长特性的研究

将亲本病毒、本方法或酶切连接法拯救的重组病毒以 $MOI=0.05$ 分别接种 PK-15 细胞和 3D4/31 细胞(可传代猪肺泡巨噬细胞)，每个病毒设置 3 个重复孔。分别于感染后 12、24、36、48、60、72 h 收集总培养物(上清和细胞)，测定 $TCID_{50}$ 。以不同时间点为横坐标绘制病毒的生长曲线，并进行比较。

2 结果与分析

2.1 PCV2-LX 株环状感染性克隆的构建

使用 Ezup 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒提取 PCV2-LX 株基因组 DNA，利用引物线性 PCV2-F/R 经 PCR 扩增获得线性全基因组。将纯化的片段连接到 pEasy-Blount 载体，构建含 PCV2-LX 株病毒全长基因组的质粒。测序比对结果表明，所获 PCV2-LX 线性基因组序列与 GenBank Accession No. MG870195 一致，将该重组质粒命名为 pEasy-Blount-LX。

本方法以重组质粒 pEasy-Blount-LX 为模板，利用引物环状 PCV2-F/R 经 PCR 扩增获得含有 15 bp 同源序列的 PCV2 线性基因组，片段大小与预期结果一致(图 3 泳道 1)。之后使用 Exnase II 重组酶进行体外自连接，经纯化后获

得 PCV2-LX 株的环状感染性克隆。常规酶切连接法以相同重组质粒为模板, 使用引物 T4 PCV2-F/R 经 PCR 扩增获得含有 2 个 *EcoR* I 酶切位点的 PCV2 线性基因组, 片段大小与预期

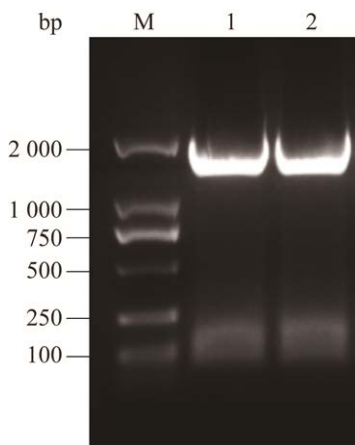


图 3 PCV2 环状感染性克隆线性模板的构建
Figure 3 Construction of linear template of PCV2 circular infectious clone. 1: Amplification result of linear template using circular PCV2-F/R primer; 2: Amplification result of linear template using T4 PCV2-F/R; M: Trans 2K DNA Marker.

结果一致(图 3 泳道 2)。之后使用 *EcoR* I 酶切并使用 T4 DNA 连接酶进行体外自连接, 纯化后获得环状感染性克隆。

2.2 环状感染性克隆的鉴定

PCV2 环状感染性克隆和构建前的线性基因组片段用限制性内切酶 *Nco* I 进行酶切鉴定。2 种方法构建的 PCV2 环状感染性克隆均可见 1 个片段条带, 体外自连接前的线性基因组可见 2 个片段条带(图 4A)。使用 verify-F/R 引物对 2 种方法构建的环状感染性克隆进行扩增及电泳, 片段大小与预期结果一致(图 4B)。以上结果表明, 2 种方法均成功构建 PCV2 环状感染性克隆。

2.3 重组病毒的体外拯救及鉴定

将 2 种方法构建的 PCV2 环状感染性克隆同步转染 PK-15 细胞进行重组病毒拯救。72 h 后进行 IFA 检测, 结果均可见 PCV2 感染的荧光阳性细胞(图 5A)。将本方法构建环状感染性克隆进而获得的重组病毒命名为 CZ-LX, 常规酶

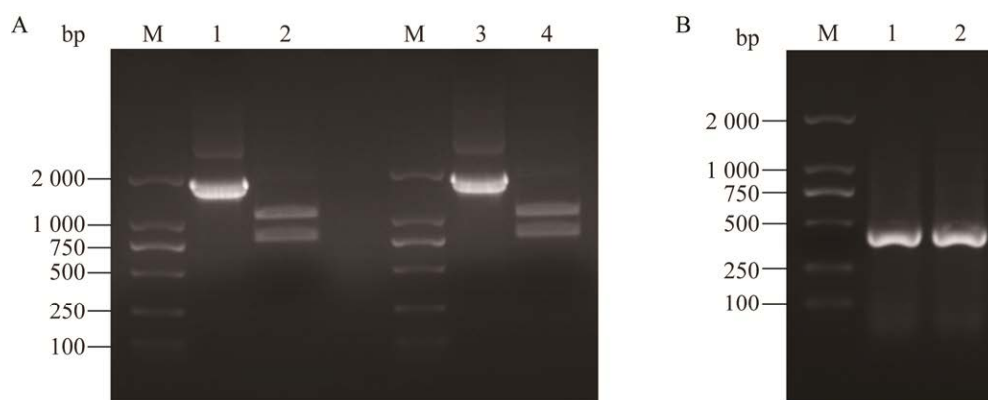


图 4 PCV2 环状感染性克隆的鉴定

Figure 4 Identification of PCV2 circular infectious clone. A: PCV2 circular infectious clone digestion with *Nco* I. 1: Circular infectious clone self-ligated by Exnase II were digested with *Nco* I; 2: Linear template before self-ligation with Exnase II were digested with *Nco* I; 3: Circular infectious clone self-ligated by T4 DNA ligase were digested with *Nco* I; 4: Linear template before self-ligation with T4 DNA ligase were digested with *Nco* I; M: Trans 2K DNA marker. B: Identification of PCV2 circular infectious clone with specific primer verify-F/R. 1: Amplification result of circular infectious clone self-ligated by Exnase II; 2: Amplification result of circular infectious clone self-ligated by T4 DNA ligase; M: Trans 2K DNA Marker.

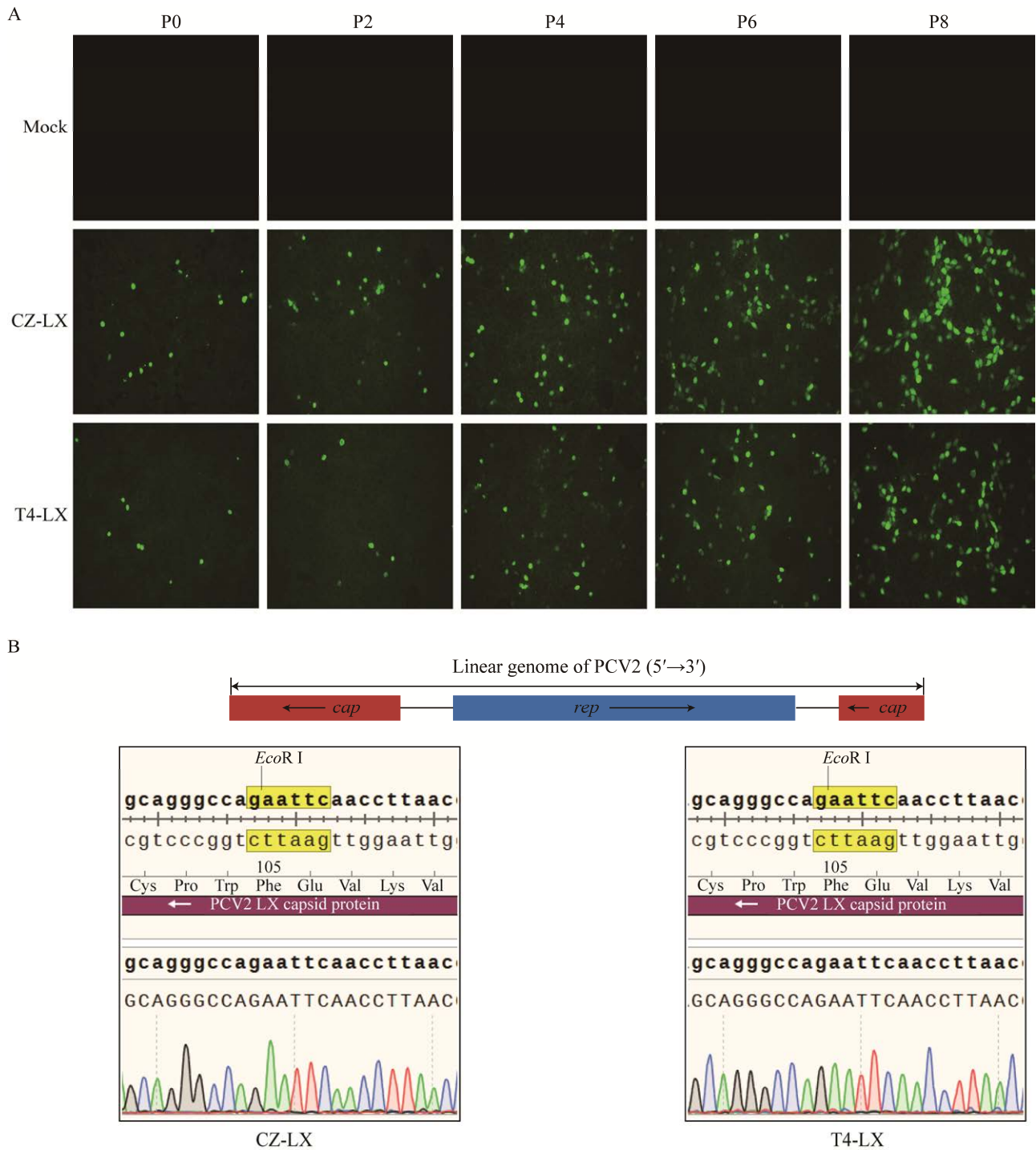


图 5 重组病毒 CZ-LX 和 T4-LX 的鉴定

Figure 5 Identification of recombinant virus CZ-LX and T4-LX. A: Proliferation of CZ-LX and T4-LX in PK-15 cells examined by IFA. PCV2-infected cells immunostained with anti-Cap (green) monoclonal antibody. Representative fluorescence images are shown. B: Sequencing chromatogram of rescued CZ-LX and T4 LX at self-ligation sites.

切连接法获得的重组病毒命名为 T4-LX。重组病毒均继续传 8 代, 逐代进行 IFA 检测, 观察 PCV2 感染细胞数的变化。CZ-LX 和 T4-LX P0 代至 P8 代的感染细胞数逐渐增多, 表明通过环状感染性克隆能拯救获得可以稳定传代的病毒。并且 CZ-LX 感染组随着传代次数增加, 其有荧光的细胞数量要高于 T4-LX 感染组(图 5A)。提取收获的 P8 代 CZ-LX 和 T4-LX 病毒 DNA 并进行 PCR 扩增, 扩增产物经纯化后测序, 结果显示二者线性基因组两端连接处序列(图 5B)以及全序列与亲本病毒一致。进一步对 P8 代的 CZ-LX 和 T4-LX 进行病毒滴度测定, CZ-LX 为 $10^{5.67}$ TCID₅₀/mL, T4-LX 为 $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL。

2.4 重组病毒 CZ-LX 和 T4-LX 的体外生长特性

亲本病毒 WT-LX、重组病毒 CZ-LX 和 T4-LX 在 PK-15 细胞中的生长曲线结果显示, 三者的增殖趋势相似。PCV2 感染初期(12-24 hpi), 病毒处于对细胞适应的阶段, 亲本病毒和 2 株重组病毒之间差异不显著, 重组病毒 T4-LX 的

TCID₅₀ 略低。重组病毒 CZ-LX 增殖水平在 36 hpi 上升较快, 其 TCID₅₀ 自此时间点之后均显著高于 T4-LX。3 株 PCV2 的病毒滴度均在感染后约 72 h 后接近高峰(图 6A)。在 3D4/31 细胞中, 2 株重组病毒的生长曲线趋势也均与亲本病毒 WT-LX 相似。亲本病毒和 2 株重组病毒在 36-48 hpi 快速增殖, 感染后 60 h 达到平台期。重组病毒 CZ-LX 在感染 24 h 后, 各个时间点测定的 TCID₅₀ 均高于 T4-LX, 特别是 36 hpi 和 60 hpi, 存在显著性差异(图 6B)。以上结果表明, 与重组病毒 T4-LX 相比, CZ-LX 在 PK-15 细胞和 3D4/31 细胞中的子代病毒增殖能力更强。

3 讨论

临床 PCVAD 多为 PCV2 和其他病原的混合感染, 常规方法分离 PCV2 较为复杂, 难以获得纯净的病毒, 应用病毒反向遗传学技术能解决这一难题。PCV2 感染性克隆的构建策略主要有单拷贝基因组重组质粒、双拷贝基因组重组质粒和体外自连接形成环状基因组 3 种^[15-24]。

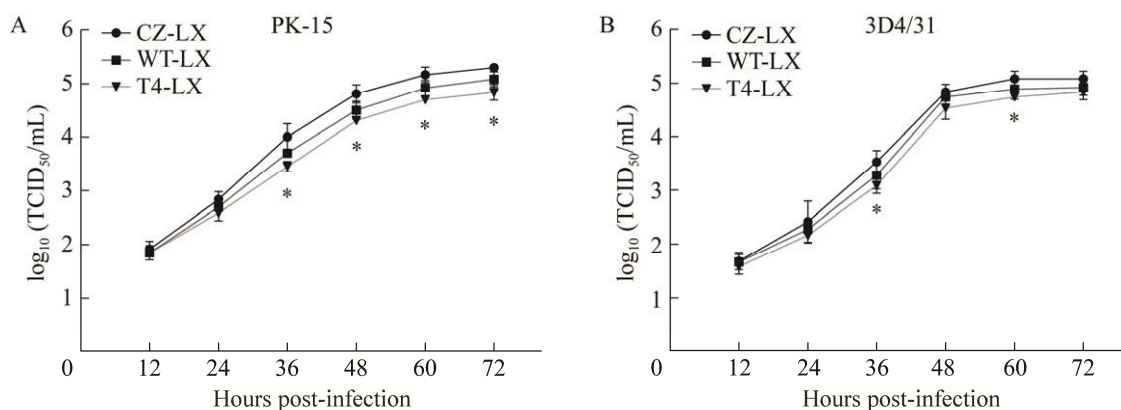


图 6 亲本病毒(WT-LX)和重组病毒(CZ-LX 和 T4-LX)的体外生长特性

Figure 6 Growth characteristics of wild-type and recombinant virus *in vitro*. The PK-15 cells or 3D4/31 cells were individually infected with the viruses at the indicated times for titration of virus growth shown as TCID₅₀. A: One-step growth curves of the wild-type PCV2 (WT-LX) and recombinant virus (CZ-LX and T4-LX) in PK-15 cells. B: One-step growth curves of the WT-LX, CZ-LX and T4-LX in 3D4/31 cells. Charts of panel A and B are mean±SD of three independent experiments. In panels A and B, the *P* value above the horizontal lines resulted from comparison between CZ-LX and T4-LX. *: *P*<0.05.

其中第 3 种较为特殊,在大多数 DNA 和 RNA 病毒感染性克隆的构建策略中不多见。这是由于单链 DNA 转化为双链 DNA 中间体的过程对合成 PCV2 基因组滚环复制的模板 DNA 尤为重要^[25]。鉴于 PCV2 基因组与质粒相同的闭合环状特性,本研究利用 DNA 无缝克隆技术建立了一种基于体外自连接的 PCV2 感染性克隆的构建方法。

构建含 PCV2 单拷贝基因组和串联双拷贝基因组的重组质粒步骤较多,所需时间较长。Fenaux 等^[15,24,26-28]通过传统酶切连接的方法(限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶),在体外自连接形成双链环状 DNA,并发现其对 PCV2 的天然宿主细胞具有感染性。此方法虽然耗时相对缩短,但需要分析病毒基因组所含酶切位点并通过引物引入。而本研究建立的新方法不受酶切位点限制,无须分析和引入 PCV2 基因组所含酶切位点,可以在除复制起始区外(含有茎环结构)的任意位置对基因组进行线性化,相比之下简化了操作过程。本研究以 PCV2 LX 株为模板,在环状感染性克隆的构建过程中,将本方法与常规的酶切连接法进行比较。为避免不同的自连接位置对 2 种方法的比较造成影响,选取基因组中唯一的 *EcoR* I 酶切位点进行引物设计,通过 PCR 扩增对序列进行重排,从而保持线性化基因组一致。同时设计了方案对构建的 PCV2 环状感染性克隆进行了验证。结果表明,本方法更为简便快捷,只需 1 轮 PCR 扩增和 15-30 min 的自连接反应即可获得 PCV2 感染性克隆。

在本研究中,PCV2 LX 株的环状基因组进行线性重排时,编码 Cap 蛋白的 ORF2 阅读框被截断,分布于线性基因组的两端。只有重组病毒拯救成功, Cap 蛋白完整表达, IFA 才能检测到病毒粒子。本研究对拯救重组病毒和亲本

病毒的体外生物学特性进行了比较。本方法拯救所获的重组病毒 CZ-LX 连续传至 8 代, Cap 蛋白都能获得稳定表达,序列分析显示其基因组截断处连接正常,整体与亲本病毒相比无任何点突变,证明本方法拯救的重组病毒具有良好的遗传稳定性。PK-15 细胞常用于 PCV2 的分离培养和相关特性研究,肺泡巨噬细胞被认为是 PCV2 感染机体的主要靶细胞之一。目前大多数研究仅在 PK-15 细胞上进行 PCV2 生长曲线的测定,为了更好地研究重组病毒的生长特性,本研究分别在 PK-15 和 3D4/31 细胞(猪肺泡巨噬细胞)上进行了亲本病毒 WT-LX 和两种重组病毒(CZ-LX 和 T4-LX)的生长曲线测定。CZ-LX 在 PK-15 和 3D4/31 细胞上的一步生长曲线趋势和各时间点的 TCID₅₀ 均与 WT-LX 相比没有显著差异,表明本方法构建衍生的重组病毒具有与亲本病毒一致的体外生长特性。在拯救的重组病毒之间, CZ-LX 的感染细胞数和病毒滴度要明显高于 T4-LX,这表明通过本方法构建的感染性克隆所拯救的重组病毒在体外细胞上的增殖能力更强。陈婷飞等^[27]研究发现体外自连接的环状基因组的转染效率要明显高于其他形式的感染性克隆。由此推测,形成环状双链 DNA 中间体能提高 PCV2 重组病毒的拯救效率。而本方法所使用的无缝克隆技术在连接效率上又高于传统的酶切连接方法^[29-30],这可能是 CZ-LX 在体外细胞上增殖能力强的原因。由于 PCV2 感染体外细胞不引起病变,其在体外的致病性是否改变需要后续试验进一步验证。

本研究建立的新方法与 PCV2 感染性克隆的常规构建方法相比具有一定优势,在圆环病毒的研究中具备应用潜力。虽然本文选取 PCV2d 株为模板进行研究,但已在不同基因型的毒株中都应用了本方法进行 PCV2 的基础和

应用研究, 包括成功拯救了 PCV2 流行毒株(基因型为 PCV2a、PCV2b 和 PCV2d)、PCV2b 基因型的 ORF3 缺失株^[31]、PCV2d 基因型携带 Rep 和 Cap 半胱氨酸残基单突变和三突变的重组病毒^[10]以及含有 His 标签的重组病毒。由此证明, 本方法适用于 PCV2 不同基因型毒株的拯救。除了拯救 PCV2 不同基因型的毒株, 还可应用于 PCV2 和 PCV3 的嵌合重组病毒(PCV2b-3 和 PCV2d-3)基因组的快速构建。PCV2 流行毒株的基因型自发现以来经历了 2 次重要变化, 分别为 PCV2a 转变为 PCV2b 和 2010 年后 PCV2d 的大范围流行^[1,12]。流行毒株基因型的频繁转变对商品化疫苗的免疫保护效果构成了威胁和挑战。为了应对这一挑战, 目前的实验性疫苗策略包含核酸疫苗和减毒嵌合疫苗^[12]。Sylla 等^[32]在 2014 年对制备的 PCV2 核酸疫苗进行了小鼠攻毒保护试验评价, 检测到 PCV2 抗体水平的增加。目前报道的实验性减毒活疫苗均为基因工程技术改造的 PCV 嵌合病毒(如 PCV1-2a 和 PCV1-2b 等), 将不同基因型的毒株片段整合在一个载体上, 接种小鼠和猪后能产生一定的免疫保护^[12]。本方法在设计含同源碱基的引物时即可引入突变位点或加入分子标记, 在上述核酸疫苗和减毒嵌合疫苗的研发过程中能更加方便和高效地进行 PCV2 基因组的编辑, 从而有助于防控 PCV2 的流行。此外, 有关新发圆环病毒 PCV3 和 PCV4 感染性克隆构建的方法研究较少, 本方法将有助于 PCV3 和 PCV4 流行毒株在体外的拯救, 为进一步研究 PCV3 和 PCV4 的致病机制提供技术支持。

4 结论

本研究成功建立了一种基于体外自连接的构建猪圆环病毒 2 型环状感染性克隆的新方

法, 具有操作简便、快速、高效等特点。通过该反向遗传平台拯救获得的重组病毒可以稳定传代, 并且在 PK-15 细胞和可传代猪肺泡巨噬细胞上都具有较强的增殖特性。

REFERENCES

- [1] OPRIESSNIG T, KARUPPANNAN AK, CASTRO AMMG, XIAO CT. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges[J]. *Virus Research*, 2020, 286: 198044.
- [2] SHULMAN LM, DAVIDSON I. Viruses with circular single-stranded DNA genomes are everywhere![J]. *Annual Review of Virology*, 2017, 4(1): 159-180.
- [3] MENG XJ. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2013, 1: 43-64.
- [4] PALINSKI R, PIÑEYRO P, SHANG PC, YUAN FF, GUO R, FANG Y, BYERS E, HAUSE BM. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure[J]. *Journal of Virology*, 2016, 91(1): e01879-16.
- [5] ZHANG HH, HU WQ, LI JY, LIU TN, ZHOU JY, OPRIESSNIG T, XIAO CT. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as porcine circovirus 4, Hunan Province, China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(3): 1057-1061.
- [6] KROEGER M, TEMEYASEN G, PIÑEYRO PE. Five years of porcine circovirus 3: what have we learned about the clinical disease, immune pathogenesis, and diagnosis[J]. *Virus Research*, 2022, 314: 198764.
- [7] WANG DL, MAI JH, YANG Y, XIAO CT, WANG ND. Current knowledge on epidemiology and evolution of novel porcine circovirus 4[J]. *Veterinary Research*, 2022, 53(1): 38.
- [8] 孙仁杰, 单颖, 安慧婷, 王雅婷, 谢荣辉, 张传亮, 赵灵燕, 方维焕, 李肖梁. 猪圆环病毒 3 型与宿主相互作用机制研究进展[J]. *浙江农业学报*, 2023, 35(7): 1755-1762.
- SUN RJ, SHAN Y, AN HT, WANG YT, XIE RH, ZHANG CL, ZHAO LY, FANG WH, LI XL. Virus-host interaction: an overview on recent advances in porcine circovirus type 3[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2023, 35(7): 1755-1762 (in Chinese).

- [9] OUYANG T, ZHANG XW, LIU XH, REN LZ. Co-infection of swine with porcine circovirus type 2 and other swine viruses[J]. *Viruses*, 2019, 11(2): 185.
- [10] SUN RJ, DENG ZF, HAN X, ZHANG YK, ZHOU YS, SHAN Y, FANG WH, LI XL. Porcine circovirus 2 manipulates the PERK-ERO1 α axis of the endoplasmic reticulum to favor its replication by derepressing viral DNA from HMGB1 sequestration within nuclei[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(19): e01009-21.
- [11] NIU GY, CHEN S, LI X, ZHANG LY, REN LZ. Advances in crosstalk between porcine circoviruses and host[J]. *Viruses*, 2022, 14(7): 1419.
- [12] GUO JS, HOU L, ZHOU JW, WANG DD, CUI YQ, FENG XF, LIU J. Porcine circovirus type 2 vaccines: commercial application and research advances[J]. *Viruses*, 2022, 14(9): 2005.
- [13] MARTINEZ-SOBRIDO L, NOGALES A. Editorial overview: virus reverse genetics approaches for the development of preventive and therapeutic vaccines[J]. *Current Opinion in Virology*, 2020, 44: iii-iv.
- [14] STOBART CC, MOORE ML. RNA virus reverse genetics and vaccine design[J]. *Viruses*, 2014, 6(7): 2531-2550.
- [15] FENAUX M, HALBUR PG, HAQSHENAS G, ROYER R, THOMAS P, NAWAGITGUL P, GILL M, TOTTH TE, MENG XJ. 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.
- [16] FENAUX M, OPRIESSNIG T, HALBUR PG, ELVINGER F, MENG XJ. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(12): 6297-6303.
- [17] JUHAN NM, LEROITH T, OPRIESSNIG T, MENG XJ. The open reading frame 3 (ORF3) of porcine circovirus type 2 (PCV2) is dispensable for virus infection but evidence of reduced pathogenicity is limited in pigs infected by an ORF3-null PCV2 mutant[J]. *Virus Research*, 2010, 147(1): 60-66.
- [18] HUANG LP, LU YH, WEI YW, GUO LJ, WU HL, ZHANG FY, FU YJ, LIU CM. Construction and biological characterisation of recombinant porcine circovirus type 2 expressing the V5 epitope tag[J]. *Virus Research*, 2011, 161(2): 115-123.
- [19] GAO ZZ, DONG QF, JIANG YH, OPRIESSNIG T, WANG JX, QUAN YP, YANG ZQ. ORF4-protein deficient PCV2 mutants enhance virus-induced apoptosis and show differential expression of mRNAs *in vitro*[J]. *Virus Research*, 2014, 183: 56-62.
- [20] WANG WC, ZENG ZY, TANG DY, LIANG HY, LIU Z, DAI ZJ. Construction of a novel porcine circovirus type 2 infectious clone as a basis for the development of a PCV2 iDNA vaccine[J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, 220: 21-26.
- [21] MATZINGER SR, OPRIESSNIG T, XIAO CT, NICHOLAS C, BEACH NM, SLADE DE, NITZEL GP, MENG XJ. A chimeric virus created by DNA shuffling of the capsid genes of different subtypes of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against the predominant PCV2b and the emerging PCV2d in pigs[J]. *Virology*, 2016, 498: 82-93.
- [22] LI DG, WANG J, XU SG, CAI SX, AO CJ, FANG LR, XIAO SB, CHEN HC, JIANG YB. Identification and functional analysis of the novel ORF6 protein of porcine circovirus type 2 *in vitro*[J]. *Veterinary Research Communications*, 2018, 42(1): 1-10.
- [23] LV JM, JIANG YF, FENG QW, FAN ZX, SUN Y, XU PP, HOU YF, ZHANG XP, FAN YX, XU XG, ZHANG YM, GUO KK. Porcine circovirus type 2 ORF5 protein induces autophagy to promote viral replication *via* the PERK-eIF2 α -ATF4 and mTOR-ERK1/2-AMPK signaling pathways in PK-15 cells[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 320.
- [24] 李俊, 时建立, 于周, 徐绍建, 丁鹏, 程凯慧, 王金宝. 猪圆环病毒 2 型双拷贝感染性 DNA 的构建及体外拯救[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(11): 1633-1638.
- LI J, SHI JL, YU Z, XU SJ, DING P, CHENG KH, WANG JB. Rescue of porcine circovirus type 2 from cloned DNA[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(11): 1633-1638 (in Chinese).
- [25] CHEUNG AK. Porcine circovirus: transcription and DNA replication[J]. *Virus Research*, 2012, 164(1/2): 46-53.
- [26] 郭龙军, 陆月华, 黄立平, 危艳武, 刘长明. 猪圆环病毒 2 型不同基因型毒株感染性克隆的构建及拯救毒株的体外生物学特性[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(23): 4918-4925.
- GUO LJ, LU YH, HUANG LP, WEI YW, LIU CM. Construction of infectious clone for different genotype strains of porcine circovirus type 2 and characterization of the rescued viruses *in vitro*[J].

- Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(23): 4918-4925 (in Chinese).
- [27] 陈婷飞, 周继勇, 陈庆新, 商绍彬. 猪圆环病毒 2 型 HZ0201 株分子克隆的感染性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(2): 86-91.
- CHEN TF, ZHOU JY, CHEN QX, SHANG SB. Analysis of infectious clones of porcine circovirus type 2 HZ0201 strain[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29(2): 86-91 (in Chinese).
- [28] 李梦莹. 猪圆环病毒 2 型感染性克隆构建及抗体检测 ELISA 方法的建立[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2016.
- LI MY. Construction of infectious clone of porcine circovirus type 2 and development of an indirect ELISA for antibody detection[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [29] LI XG, JIN JC, GUO ZY, LIU LW. Evolution of plasmid-construction[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 209: 1319-1326.
- [30] BENOIT RM, OSTERMEIER C, GEISER M, LI JSZ, WIDMER H, AUER M. Seamless insert-plasmid assembly at high efficiency and low cost[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153158.
- [31] ZHANG YK, SUN RJ, GENG SC, SHAN Y, LI XL, FANG WH. Porcine circovirus type 2 induces ORF3-independent mitochondrial apoptosis *via* PERK activation and elevation of cytosolic calcium[J]. Journal of Virology, 2019, 93(7): e01784-18.
- [32] SYLLA S, CONG YL, SUN YX, YANG GL, DING XM, YANG ZQ, ZHOU YL, YANG MN, WANG CF, DING Z. Protective immunity conferred by porcine circovirus 2 ORF2-based DNA vaccine in mice[J]. Microbiology and Immunology, 2014, 58(7): 398-408.

(本文责编 郝丽芳)