

豬第二型環狀病毒感染性質體之建立

王 羣*、邱芮瑜、黃天祥、李 璠、鍾明華、張惟茗

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 豬第二型環狀病毒 (porcine circovirus type 2, PCV2)，為引起豬離乳後多系統消耗性綜合症 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 之主要病原。PCV2 常與其它病原混合感染，增加單獨分離此病毒的困難度，再者分離的 PCV2 病毒在細胞培養時其力價不高。本次論文主要目的是構築具感染性 PCV2 質體，利用細胞培養建立 PCV2 量產模式，作為穩定單純的病毒來源。將感染性 PCV2 質體轉染細胞後產生之病毒加以收集，並測試其力價，最高可為 105.5 TCID₅₀/mL。另一方面，轉染質體 DNA 之劑量的不同並不造成新生病毒力價的顯著差異。

關鍵詞：豬環狀病毒、感染性質體、轉染

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, CPE) 之 PK-15 (ATCC CCL33) 細胞中發現 (Tischer et al., 1987)。該病毒基因體被進一步研究發現為一條環狀單股 DNA，並可在豬發現抗該病毒之抗體存在 (Tischer et al., 1987)，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., 1987)。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，而由出現 PMWS 臨床症狀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)，目前認為是引起 PMWS 之主要病原 (Blanchard et al., 2002; Fenaux et al., 2002)。除此之外，一些相關報告指出，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、甚至由無明顯臨床症狀豬隻之組織亦可檢測到 PCV2 之存在 (Wang et al., 2004)。

PCV2 外型為正二十面體，直徑約 17 nm，無封套，含有約 1.76 kb 單股環狀之小型 DNA 病毒。PCV1 基因有 1,759 nucleotides (nt)，PCV2 基因有 1,768

*抽印本索取作者

nt。PCV1與PCV2皆被推測有11個open reading frame (ORF)。ORF1可轉譯出約36 kDa的Rep protein (replication associated protein) 以及中間序列選擇性轉譯約19 kDa的Rep' protein。Rep protein與Rep' protein推測與病毒複製有關 (Mankertz and Hillenbrand, 2001)。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，為PCV2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。

在PK-15細胞中培養環狀病毒時，許多研究都採用D-glucosamine的處理提高病毒力價，其原理是刺激PK-15細胞進入S期，以利病毒的複製 (Tischer et al., 1987)。Liu等人 (2001a) 則將PCV2改在含有同樣能刺激細胞進入S期的五號人類腺病毒 (human adenovirus 5) E1基因的VIDO-R1細胞 (胎豬視網膜細胞株) 培養，因此可發現環狀病毒在一般細胞培養中很難維持高力價。1990年代環狀病毒RF DNA (replication form DNA) 被構築成質體保存，並大量複製用以分析病毒基因序列 (Meehan et al., 1997; Meehan et al., 1998; Todd et al., 1991)。同時將所構築的質體中全長環狀病毒序列以限制酶切割釋放出來後，再轉染入PK-15細胞內可觀察到病毒抗原產生 (Mahe et al., 2000; McNeilly et al., 2001)。2002年Fenaux等人將2個PCV2全長基因串連後構築入pBluescript SK (pSK) vector中，以此質體轉染入PK-15細胞或直接注射SPF(Specific pathogen free) 豬隻肝臟和淋巴結之後，都能產生具感染性的病毒 (Fenaux et al., 2002)。之後便將此技術廣泛應用在PCV1與PCV2嵌合體病毒 (chimera) 的構築，藉以研究PCV2 ORF2的抗原決定位 (Lekcharoensuk et al., 2004) 以及開發減毒疫苗 (Fenaux et al., 2003; 2004)。

感染性PCV2質體可以提供穩定單純的病毒來源，所以本篇論文之研究目的，主要是參考Fenaux等人的研究，將PCV2台灣株構築成感染性PCV2質體，並觀察其於PK-15細胞中複製PCV2的能力。同時觀察病毒在PK-15細胞中增殖時，幾種主要病毒蛋白的表現情況，以及他們對病毒複製能力的影響。

材料與方法

細胞培養

將無PCV1污染的豬腎臟細胞株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%二氧化碳37°C培養箱。

PCV2 感染性質體 (infectious PCV2 clone) 之構築

以 PCV2 台灣株 (GenBANK accession No: AF364094) 作為模版，以含有 *Sac* II 限制酶切位之專一性引子對，利用PCR增幅出全長PCV2病毒DNA。再將增幅出之PCR片段以TA接合方式構築入 pGEM-T® easy vector載體，經定序確認為PCV2 monomer clone。接著以相同的PCV2病毒株為模版，以含有 *Bgl* II 及 *Spe* I 限制酶切位的引子對增幅PCV2核酸序列381-1112 nt之DNA片段，以 *Bgl* II 及 *Spe* I 二切位構築入PCV2 monomer clone，經定序確認後得到PCV2 1.5-mer clone(圖1) 同時以含 *Xba* I 限制酶切位的引子對增幅PCV2核酸序列全長，之後利用 *Xba* I切位構築入PCV2 monomer clone，經定序確認後得到PCV2 dimer clone (圖1)。然後以 maxi-prep kit (Invitrogen) 抽取高品質的質體DNA並保存於-20°C備用。

感染性質體之轉染 (transfection)

轉染的前一天在25T flask加入 5×10^5 個PK-15細胞(PCV1-free) 取6 μ g PCV2 dimer clone質體DNA加入無抗生素無血清的DMEM中，接著加入9.6 μ L plus reagent (Invitrogen)，混勻稱做混合液A (總體積100 μ L)，於室溫作用20分鐘。另外配置混合液B，內含91 μ L之無抗生素無血清之DMEM與9 μ L 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 KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄)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°C培養箱作用4-7小時後，加入含10%胎牛血清的DMEM，使培養液之血清含量達到平常PK-15細胞適應的5%。然後視細胞生長程度進行繼代。

病毒液之收集

轉染後的PK-15細胞經過繼代累積病毒量後，將每代細胞利用-80°C冰箱冷凍解凍三次，細胞破裂使病毒釋放出來，以250 g 4°C離心5分鐘，取上層之培養液，以微量試管分裝後，貯存於-80°C冰箱備用。

病毒力價測定

以每孔8000個PK-15細胞加入在96孔細胞培養皿中培養過夜。隔日將培養液吸起，病毒stock以DMEM十倍序列稀釋後每孔以100 μ L進行四重複感染，置於5%二氧化碳37°C培養箱感染2天，細胞以PBS清洗三次，並以-20°C 50% methanol + 50% acetone於室溫固定10分鐘。風乾後加入100 μ L PBS於4°C冰箱保存或以間接免疫螢光法 (indirect immunofluorescent antibody assay, IFA) 測定病毒力價。先將抗PCV2豬血清 (Anti-PCV2 polyclonal antibody, VMRD Inc) 以PBS稀釋150倍後每孔加入50 μ L，室溫作用一小時，以PBS清洗三次後加入以PBS 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100 μ L PBS，並以倒立螢光顯微鏡觀察螢光訊號。並計算其50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)。

質體轉染劑量與病毒力價之差異

將實驗分為2組，其中一組之PCV2 dimer clone 質體轉染劑量為6 μ g DNA (T2組)，另一組為質體轉染劑量為3 μ g DNA PCV2 dimer clone (T3組)，質體轉染至PK-15細胞株的方式如前述。在細胞與病毒液共同培養12小時後 (12 HPI)，開始收集新產生的病毒，之後每隔24小時收集一次，直到細胞經過繼代至6-7代時，PK-15細胞出現CPE而不再分裂為止。

結果

感染性質體之構築

本實驗所構築出的1.5-mer clone及dimer clone感染性質體(圖1)轉染PK-15細胞後,細胞繼代第三代時,將細胞固定,以間接免疫螢光法觀察PCV2複製的情況。發現dimer clone感染性質體所產生的PCV2病毒顆粒比1.5-mer clone多(圖2),所以之後的實驗都選用dimer clone感染性質體來進行。

利用感染性質體生產 PCV2 病毒

本實驗所構築出的dimer clone感染性質體轉染PK-15細胞,在經過48小時後,以間接免疫螢光法觀察,發現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)。

PCV2 病毒力價測定

將上述所收集病毒液繼續感染PK-15細胞,並進行繼代約6-7次,同時每隔24小時收集病毒液,將不同代數細胞產生之病毒做序列稀釋,測試其病毒力價,經計算後估計所收集的PCV2病毒液力價最高可為 $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL(圖4)。在不同轉染劑量影響之評估方面,T2組使用6 μg質體的轉染,T3組為3 μg質體的轉染。實驗結果顯示轉染不同劑量的質體DNA,並未造成新生病毒之間明顯的力價差異,而細胞經過繼代數次後,可逐漸累積病毒力價,最高達可到 $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL(圖5)。惟PK-15細胞接種PCV2病毒,並經繼代6-7次後,細胞數目往往不再增多甚至會大量死亡,無法持續繼代至第八代。

討論

有關豬環狀病毒感染性質體製備的方式如下，(1): 以限制酶將monomer clone 質體中病毒基因釋放出後，重新接合成環狀病毒DNA再做轉染(Mahe et al., 2000) (2): 構築1.5-mer clone (Roca et al., 2004) (3): 構築dimer clone (Fenaux et al., 2004; Grasland et al., 2005)。本實驗所構築之dimer clone 具較高生產病毒的能力，此結果與 Fenaux 等人 (2004) 研究中提到dimer clone有較佳生產病毒能力是類似的。Roca 等人 (2004) 認為病毒的產生是在質體進入細胞內多出一倍基因體的部分進行同源重組因而產生病毒基因，因為dimer clone可供進行同源重組的序列較多，或許是造成較多病毒產生的原因。此外也有可能是因為dimer clone具一個完整的ORF1且具二個完整的ORF2所致。

PCV2常伴隨其他病原存在動物體中，增加單獨分離此病毒的困難度，而且分離的PCV2病毒在細胞培養中並不易增殖純化(Fenaux et al., 2002)。本論文所製備的感染性質體確實能在PK-15細胞中產生穩定、均質的病毒，每次轉染後細胞若繼代到第6-7代，可產生約 $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL的病毒液。且質體的保存比病毒容易，大量製備也非常的方便，對 PCV2的研究是非常便利的工具。

PCV2在細胞培養時很難見到CPE，因此病毒力價的判定多是以間接免疫螢光法(IFA)或是免疫過氧化酶單層細胞分析法(IPMA)測試，且感染後多久的時間進行固定細胞的程序也不一致。本實驗選用感染 48 小時後固定細胞，是因為在96孔細胞培養皿中，經 48小時的細胞培養後，剛好可以長成全滿的單一細胞層，且在PK-15細胞對PCV2感染不同時間點蛋白表現之輪廓的實驗中發現，感染後48小時的細胞內主要的病毒蛋白都已達到飽和量(Fenaux et al., 2002)，此時以間接免疫螢光法觀察細胞內抗原應該是適當的時機。

感染性質體DNA量不同並不明顯影響各繼代的病毒力價，而且細胞經過數次繼代可逐漸累積病毒力價，但是本次實驗發現，繼代至第六或第七代時普遍發生細胞之外觀圓型化、數目不再增多甚至死亡的情

形，導致無法持續繼代的結果，與Liu等人 (2005) 觀察到的CPE現象非常類似。他們實驗結果指出此一情形乃是細胞凋亡所造成的現象。Liu等人以1 MOI的病毒量感染PK-15細胞，在感染後48與72小時以對PCV2有專一性豬血清進行間接免疫螢光觀察，同時進行DAPI (2,4-diamidino-2-phenylindole) 染色，發現DAPI所染上的不規則細胞核或碎片，正好是PCV2抗原的所在。

將感染性質體DNA轉染PK-15細胞後，生產的PCV2病毒經計算，其病毒力價可達 $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL。若能有效將病毒力價提高至 $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL，將可將發展為不活化疫苗，並應用於養豬場防疫(Zhu et al., 2007)。有關提高豬環狀病毒力價的方式如下，(1): 選殖對PCV2病毒具有高感受性之PK-15細胞，可以有效提高病毒之複製效率以及力價(Zhu et al., 2007)。(2): 將接種PCV2病毒之PK-15細胞以D-glucosamine處理提高病毒力價(如前述)，惟此方法會造成PK-15細胞大量死亡，且效果有時不甚理想。因此後續之研究方向，將朝向選殖對PCV2病毒具有高感受性之PK-15細胞，希望能有效提高PCV2之病毒力價，為疫苗之發展立下良好之基礎。

本次實驗建立了PCV2感染性質體之構築技術以及在宿主細胞的增殖模式，利用這些工具我們觀察PCV2主要病毒蛋白表現時機，藉此進一步瞭解PCV2在宿主細胞複製方式，而所得結果有助於我們對PCV2的瞭解，提供未來PCV2防疫上的新思考方向。

參考文獻

- Blanchard, P., Mahe, D., Cariolet, R., Keranflec'h, A., Baudouard, M.A., Cordioli, P., Albina, E. and Jestin, A. 2003. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 21: 4565-4575.
- Chae, C. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet. J.* 168: 41-49.
- Cheung, A.K. 2003. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology* 305: 168-180.
- Cheung, A.K. and Bolin, S.R. 2002. Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. *Arch. Virol.* 147: 43-58.
- Darwich, L., Segales, J. and Mateu, E. 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch. Virol.* 149: 857-874.
- 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.
- Fan, H.Y., Chen, H.C., Tong, T.Z., Ju, C.M., Lu, J.Q. and Huang, H.L. 2005. The expression of porcine circovirus type 2 ORF2 gene in insect cells and its character. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 21: 975-978.
- Fenaux, M., Halbur, P.G., Haqshenas, G., Royer, R., Thomas, P., Nawagitgul, P., Gill, M., Toth, T.E. and Meng, X.J. 2002. 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. Virol.* 76: 541-551.
- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F. and Meng, X.J. 2004. 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. Virol.* 78: 6297-6303.
- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G. and Meng, X.J. 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J. Virol.* 77: 11232-11243.
- Grasland, B., Loizel, C., Blanchard, P., Oger, A., Nignol, A.C., Bigarre, L., Morvan, H., Cariolet, R. and Jestin, A. 2005. Reproduction of PMWS in immunostimulated SPF piglets transfected with infectious cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus. *Vet. Res.* 36: 685-697.
- Ju, C., Fan, H., Tan, Y., Liu, Z., Xi, X., Cao, S., Wu, B. and Chen, H. 2005. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. *Vet. Microbiol.* 109: 179-190.
- Kamstrup, S., Barfoed, A.M., Frimann, T.H., Ladekjaer-Mikkelsen, A.S. and Botner, A. 2004. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine* 22: 1358-1361.
- Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P.S., Thangthumnyom, N., Wajjawalku, W. and Meng, X.J. 2004. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J. Virol.* 78:

- 8135-8145.
15. Liu, C., Ihara, T., Nunoya, T. and Ueda, S. 2004. Development of an ELISA based on the baculovirus-expressed capsid protein of porcine circovirus type 2 as antigen. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 237-242.
 16. Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H. and Kwang, J. 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 80: 5065-5073.
 17. Liu, J., Chen, I. and Kwang, J. 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 79: 8262-8274.
 18. Liu, Q., Tikoo, S.K. and Babiuk, L.A. 2001a. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 285: 91-99.
 19. Liu, Q., Willson, P., Attoh-Poku, S. and Babiuk, L.A. 2001b. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Expr. Purif.* 21: 115-120.
 20. 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.
 21. Mankertz, A., Caliskan, R., Hattermann, K., Hillenbrand, B., Kurzendoerfer, P., Mueller, B., Schmitt, C., Steinfeldt, T. and Finsterbusch, T. 2004. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet. Microbiol.* 98: 81-88.
 22. Mankertz, A. and Hillenbrand, B. 2001. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology* 279: 429-438.
 23. Mankertz, A. and Hillenbrand, B. 2002. Analysis of transcription of Porcine circovirus type 1. *J. Gen. Virol.* 83: 2743-2751.
 24. Meehan, B.M., Creelan, J.L., McNulty, M.S. and Todd, D. 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* 78: 221-227.
 25. Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M. and Allan, G.M. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79: 2171-2179.
 26. Misinzo, G., Delputte, P.L., Meerts, P., Lefebvre, D.J. and Nauwynck, H.J. 2006. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J. Virol.* 80: 3487-3494.
 27. Misinzo, G., Meerts, P., Bublot, M., Mast, J., Weingartl, H.M. and Nauwynck, H.J. 2005. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J. Gen. Virol.* 86: 2057-2068.
 28. 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.
 29. Roca, M., Balasch, M., Segales, J., Calsamiglia, M., Viaplana, E., Urniza, A., Hattermann, K., Mankertz, A., Plana-Duran, J. and Domingo, M. 2004. In vitro and in vivo characterization of an infectious clone of a European strain of porcine

- circovirus type 2. *J. Gen. Virol.* 85: 1259-1266.
30. Steinfeldt, T., Finsterbusch, T. and Mankertz, A. 2001. Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology* 291: 152-160.
 31. Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M. and Griem, W. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91: 271-276.
 32. Tischer, I., Peters, D., Rasch, R. and Pociuli, S. 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.* 96: 39-57.
 33. Wang, C., Huang, T.S., Huang, C.C., Tu, C., Jong, M.H., Lin, S.Y. and Lai, S.S. 2004. Characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 469-475.
 34. Wang, X., Jiang, W., Jiang, P., Li, Y., Feng, Z. and Xu, J. 2006. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. *Vaccine* 24: 3374-3380.
 35. Zhou, J.Y., Shang, S.B., Gong, H., Chen, Q.X., Wu, J.X., Shen, H.G., Chen, T.F. and Guo, J.Q. 2005. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *J. Biotechnol.* 118: 201-211.
 36. Zhu Y., Lau A., Lau J., Jia Q., Karuppanan A.K., Kwang J. 2007. Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line. *Virology* 369: 423-430.

豬第二型環狀病毒感染性質體之建立

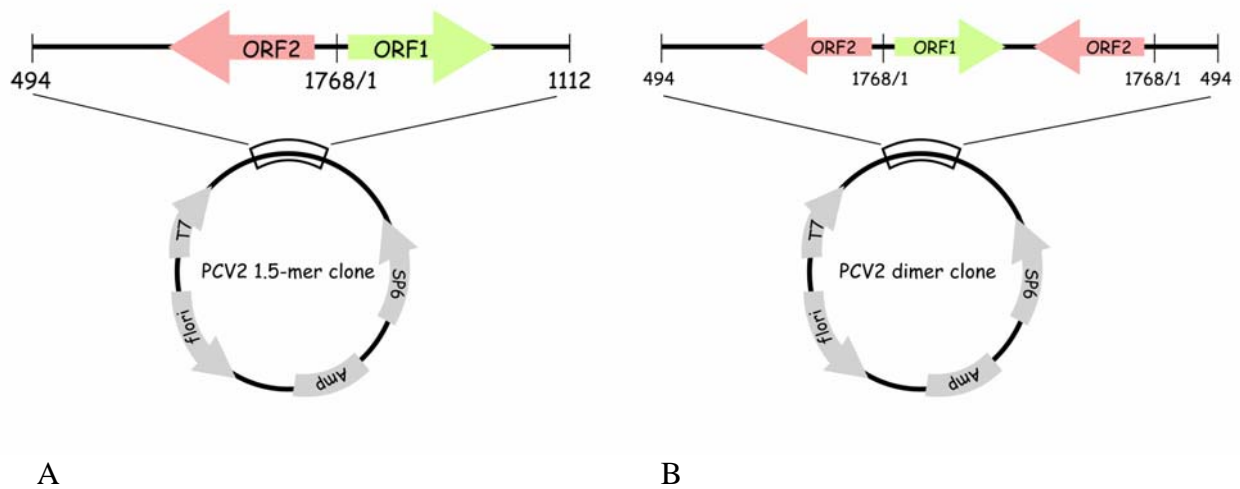


圖 1：第二型豬環狀病毒感染性質體之構築。以含有 Sac II 限制酶切位之專一性引子對，利用 PCR 增幅出全長 PCV2 病毒 DNA 後以 TA 接合方式構築入 pGEM-T® easy vector 載體產生 PCV2 monomer clone。以含有 Bgl II 及 Spe I 限制酶切位的引子對增幅 PCV2 核酸序列 381-1112 DNA 片段後，利用 Bgl II 及 Spe I 二切位構築入 PCV2 monomer clone 中，產生 PCV2 1.5-mer clone (A)。以含 Xba I 限制酶切位的引子對增幅 PCV2 核酸序列全長後，利用 Xba I 切位構築入 PCV2 monomer clone，得到 PCV2 dimer clone (B)。

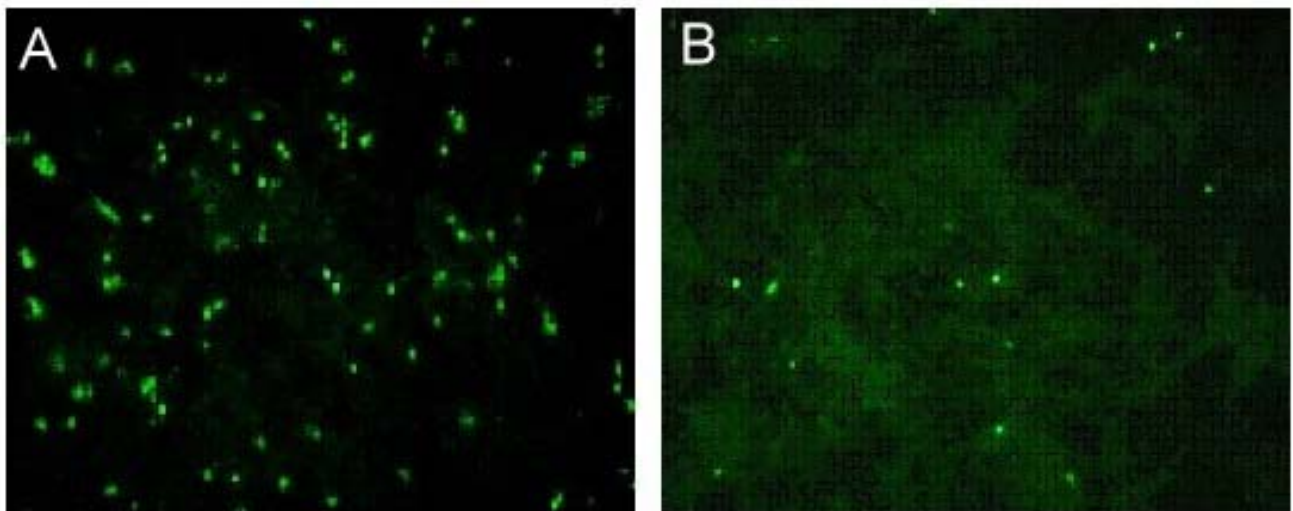


圖 2：PCV2 1.5-mer 與 dimer 感染性質體生產病毒能力之比較，PCV2 1.5-mer clone 或 PCV2 dimer clone 質體轉染至 PK-15 細胞後繼代第三代時，將細胞固定，以對 PCV2 有專一性的豬血清 (Anti-PCV2 polyclonal antibody, VMRD Inc) 進行 IFA 檢測。(A) dimer clone 之 100X 放大倍率；(B) 1.5-mer clone 之 100X 放大倍率。其結果顯示 dimer clone 比 1.5-mer clone 有較強的複製能力。

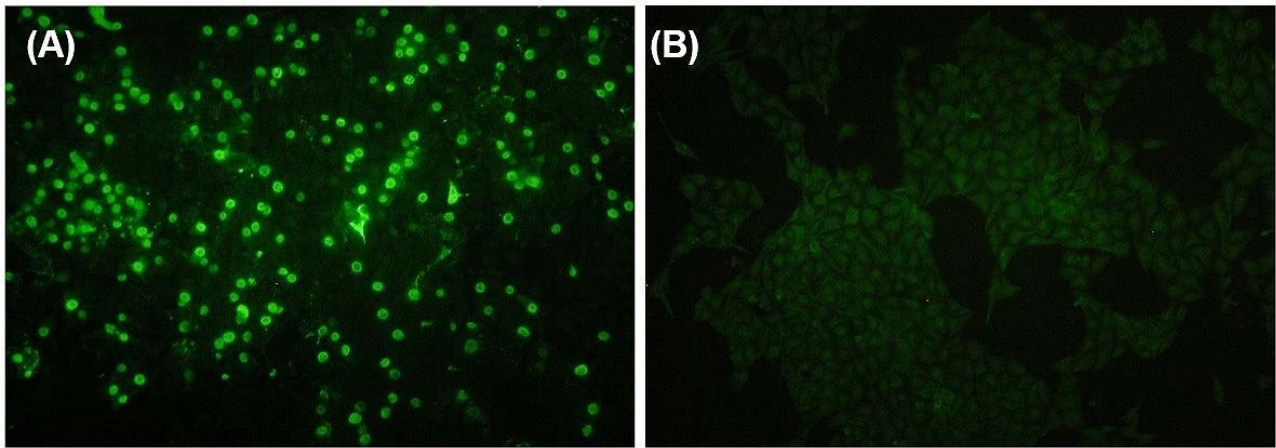


圖 3： (A) 以 PCV2 dimer clone 質體轉染 PK-15 細胞後，將第一代所收取的病毒液感染 PK-15 細胞，經 48 小時之後將 PK-15 細胞固定，以對 PCV2 有專一性的豬血清 (Anti-PCV2 polyclonal antibody, VMRD Inc) 進行 IFA 檢測。(B) 未感染的陰性對照。

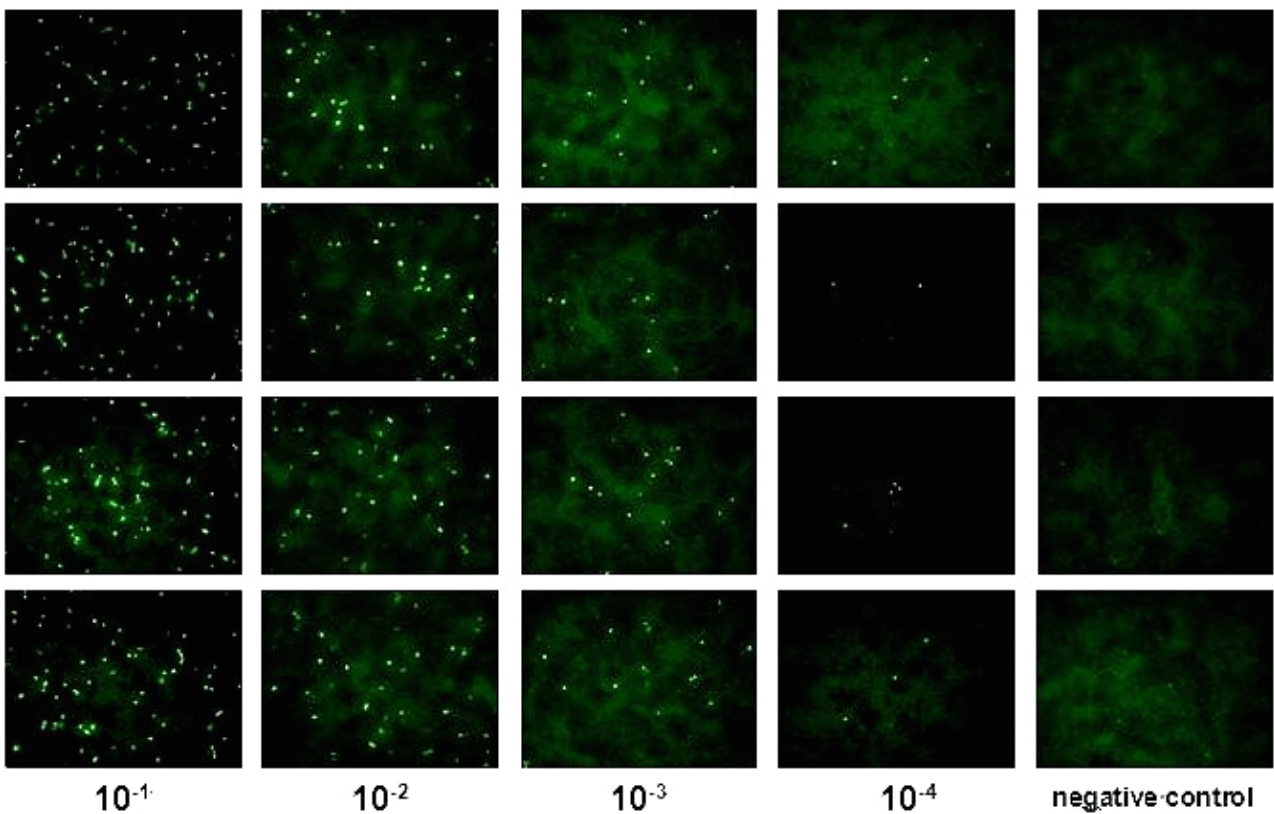


圖 4： 感染性質體所產生的病毒液之病毒力價測定。將 PCV2 dimer clone 質體轉染 PK-15 細胞，經 48 小時後，將收集的 PCV2 病毒液以 DMEM 十倍序列稀釋，並進行四重複感染 PK-15 細胞，再經過 48 小時，將細胞固定，並以對 PCV2 有專一性的豬血清 (Anti-PCV2 polyclonal antibody, VMRD Inc) 進行 IFA 檢測，計算後可知病毒力價為 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml。

豬第二型環狀病毒感染性質體之建立

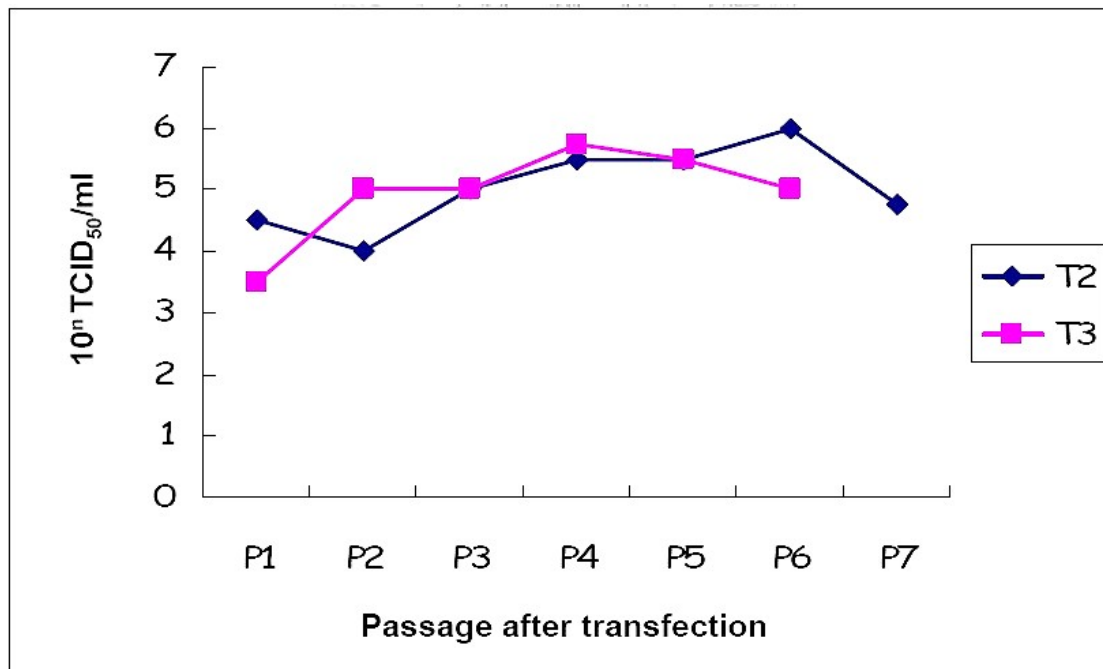


圖 5：轉染後細胞不同繼代代數病毒力價的比較。T2 組為 6 μg PCV2 感染性質體的轉染，T3 組為 3 μg 的轉染。轉染質體數量的不同並無造成病毒力價的顯著差異，細胞經過繼代代數後，可逐漸累積病毒力價，直到第 6-7 代，細胞出現 CPE 而不再分裂為止。

Establishment of Infectious Clone of Porcine Circovirus Type 2

C. Wang*, J. Y. Chiu, T. S. Huang, F. Lee, M. H. Jong, W. M. Chang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Porcine circovirus type 2 (PCV2) is associated with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). PCV2 is an important infectious disease in swine and occasionally co-infects hosts with other pathogens. PCV2 is difficult to isolate from field samples, and is maintained at low titers *in vitro*. In this study, we have constructed the infectious clone of PCV2 to generate stable virus. The infectious clones were transfected into PK-15 cell line to generate new viral particles. The highest titer of newly generated viral particles was $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL after a sixfold passage. In addition, there was no statistically significant differences between virus titer and infectious clones of various transfect dosages.

Keywords: *porcine circovirus, infectious clone, transfect*