

猪圆环病毒 型 Cap 蛋白重组腺病毒的构建与鉴定*

王先炜, 姜平**, 李玉峰, 蒋文明, 汤景元

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095)

Construction and Identification of Recombinant Adenoviruses Containing the Cap Protein of Porcine Circovirus 2

WANG Xian-wei, JIANG Ping, LI Yu-feng, JIANG Wen-ming, TANG Jing-yuan

(Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract : *Porcine circovirus 2* (PCV2) has been implicated as the etiological agent of a new disease, named postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). PCV2 contains two major open reading frames (ORFs): ORF1 and ORF2, encoding replication-associated (Rep) protein and capsid (Cap) protein, respectively. The cap protein is a candidate 2 for recombinant PCV vaccine, because it possesses several potential antigen epitopes. In the study, the cap gene was amplified by PCR, and cloned into the transfer vector pShuttle-CMV subsequently. The recombinant plasmid and bone vector pAdEasy-1 were cotransformed into BJ5183 to generate the recombinant plasmid rAd-ORF2 pAd-Cap. The recombinant adenovirus (rAd-Cap) was generated by transfection and plaque purification in in 293 cells. The transcription and expression of Cap protein in rAd-Cap infected 293 cells were confirmed by RT-PCR, indirect-ELISA, Western blot and IPMA. The study laid the foundation for development of the recombinant vaccine against PCV2.

Key word : PCV2; Cap protein; Recombinant; Adenovirus ; Construction

摘要 : 猪圆环病毒 型 (PCV2) 是近年来新发现的引起仔猪多系统衰弱综合症的必需病原, 含有两个主要的阅读框 ORF1 和 ORF2, 分别编码复制相关蛋白 (Rep) 和核衣壳蛋白 (Cap), 其中 Cap 含有病毒主要抗原表位, 是研究 PCV2 基因工程苗的主要候选目的基因。本研究利用 PCR 技术将 Cap 蛋白基因克隆入人 5 型腺病毒穿梭载体 (pShuttle-CMV), 与腺病毒骨架载体 (pAdEasy™) 共转化大肠杆菌 BJ5183 进行同源重组并转染 HEK-293A 细胞, 经多次亚克隆获得了重组腺病毒 rAd-Cap, 测定其 TCID₅₀ 为 10^{13.7}/mL。用 RT-PCR、间接 ELISA、Western blot 和 IPMA 等方法证明了 Cap 蛋白在腺病毒中获得表达。该研究为发展 PCV2 的重组腺病毒基因工程疫苗奠定了基础。

关键词 : 型猪圆环病毒; Cap 蛋白; 重组; 腺病毒; 构建

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0029-05

猪圆环病毒 (*Porcine circovirus*, PCV) 属于圆环病毒科圆环病毒属, 是迄今发现的一种最小的动物病毒, 直径仅为 17nm, 无囊膜, 其基因组为

一条长约 1.76kb 的单股 DNA^[1]。PCV 有 PCV-1 和 PCV-2 两个基因型。PCV-1 是最早由 Tischer^[2,3] 等从猪肾细胞 (PK-15) 中发现并分离获得。用 PCV-1

收稿日期: 2005-06-08, 修回日期: 2005-07-14

* 基金项目: 浙江省攻关项目 (021102529); 国家自然科学基金 (30270990); 江苏省高新技术项目 (BG2002317); 教育部博士点基金项目 (20030307012); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-04-0502)

作者简介: 王先炜 (1975-), 女, 博士研究生, 研究方向为动物传染病防治。

** 通讯作者: Corresponding author. Tel: 025-84395504, E-mail: jiangp@njau.edu.cn

感染猪后不出现临床症状,因此认为它无致病性^[4,5],在正常猪群中也可检测到 PCV1 的抗体^[5-7]。PCV2 具有致病性^[8,9],主要引起断奶仔猪多系统衰弱综合症 (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)^[10-12],还引起猪皮炎和肾病综合征、间质性肺炎和繁殖障碍^[13]等。PMWS 于 1991 年在加拿大首次爆发,随后世界上许多国家和地区都有报道^[14],主要感染断奶仔猪,以发热、渐进性消瘦、呼吸困难和黄疸等症状为特征,死亡率可达 5%~30%^[15],给养猪业造成严重的经济损失。

PCV1 与 PCV2 比较,核苷酸序列同源性小于 80%,它们都含有两个主要的开放式阅读框 (Open reading frames, ORF),其中最大的阅读框 ORF1 编码复制相关蛋白 Rep,同源性较高 (85%),具有与典型滚环复制相关的 3 个保守基序以及结合 dNTPs 的 P 环结构,这些结构对于维持 Rep 蛋白的功能至关重要^[16]。ORF2 编码核衣壳蛋白 Cap,是病毒的主要结构蛋白,分子量 28~36kDa^[17,18,19]。PCV2 不同分离株 Cap 蛋白基因变异性较大,同源性仅为 65%,这说明病毒的基因型是由 Cap 蛋白决定的^[20]。多肽扫描 (Pepscan) 显示^[21],PCV-1 与 PCV-2 的 Cap 蛋白上存在共同的抗原决定簇,但血清学却显示它们的 Cap 蛋白没有抗原交叉性。通过多肽扫描分析在 Cap 蛋白中已经鉴定出了几个型特异的表位^[21]。研究表明 Cap 蛋白具有较好的免疫原性,能诱导机体产生较强的抗体反应,因此, Cap 蛋白已成为研究基因工程疫苗的候选基因。本研究将 PCV2 的 Cap 蛋白重组入人腺病毒中,构建了 Cap 蛋白的重组腺病毒,为 PCV2 重组腺病毒基因工程疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒

HEK-293A 细胞 (本实验室保存); PCV2 分离株 SHHT1 (本实验室分离保存)。

1.2 Cap 蛋白基因的扩增

以 GeneBank 中 PCV2-TJ (序号 AY181946) 毒株基因序列为模板,用软件 Primer Premier 5.0 设计一对引物,分别加入 *Kpn* 和 *Hind* 酶切位点。引物 1: 5'-TTC ggTACCAgCTATgACgTATCCAAG-3'; 引物 2: 5'-gCCAAgCTTTCACTTCgTCCTggTTT3'。该引物扩增基因片段大小为 751bp。

将 PCV2-PK15 细胞培养物反复冻融三次后按常规方法提取 DNA。

PCR 反应体系: 引物各 1.0 μ L (50pmol/L),

MgCl₂ (25 mmol/L) 3.0 μ L; dNTP(2.5 mmol/L)4.0 μ L; 10 \times buffer 5.0 μ L; DNA 模板 6.0 μ L; Taq 酶 (5 μ / μ L) 0.3 μ L; 加灭菌双蒸水至 50 μ L。循环参数: 95 $^{\circ}$ C, 预变性 12min; 再以 95 $^{\circ}$ C, 40 s、58 $^{\circ}$ C, 40 s、72 $^{\circ}$ C, 1 min、35 次循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.3 重组质粒 rAd-ORF2 的构建与鉴定

按照 pAdEasyTM 载体系统操作说明,利用双酶切位点 (*Kpn* /*Hind*) 将外源片段克隆至转移载体 pShuttle-CMV 中; 用 PCR、*Kpn* /*Hind* 双酶切及测序分析进行鉴定,命名为 rShuttle-CMV-ORF2; 用 *Pme* 酶切该重组质粒,使其线性化,然后与 pAdEasyTM Vector 在 2.5kV、25 μ F 和 200 条件下电转化至大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞,使 rShuttle-CMV-ORF2 与 pAdEasyTM Vector 发生同源重组,转化至 DH5 宿主菌,挑选出阳性克隆,用 PCR 和 *Pac* 酶切鉴定重组是否正确,构建成重组质粒,命名为 rAd-ORF2。

1.4 转染

按照脂质体转染试剂操作方法,将预先用 *Pac* 线性化的重组质粒 rAd-ORF2 转染 HEK-293A 细胞,5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 静置培养 10d 以上,显微镜观察有无病变。

1.5 重组病毒的噬斑纯化

在长满单层的 HEK-293A 细胞的 24 孔细胞板上,每孔加入 200 μ L 稀释的重组病毒和 0.8mL 含 2% 血清的 DMEM 过夜; 弃去上清,用预热的无菌 PBS 洗涤两次; 每孔加入 1.0mL 含 2% 血清、1% 青链霉素和 1% 琼脂的 DMEM 营养液,使其覆盖整个细胞面,5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 静置培养; 挑取包含单个噬斑的琼脂糖块放入无菌离心管中,加入 200 μ L 的无菌 PBS,将琼脂块捣碎后反复冻融三次,12000r/min 离心 5min,收获的病毒接种于一新的 24 孔细胞板中,如此反复纯化三次。

1.6 重组病毒的 TCID₅₀ 的测定

用 DMEM 维持液将纯化后的第 5、10、15 和 20 代病毒作 10 倍梯度稀释,然后分别接种于长满 HEK293-A 细胞单层的 96 孔细胞培养板,每个稀释度重复 5 孔,每孔 100 μ L。同时设定对照孔。5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 静置培养 4 d,观察病变,按 Read-Muenels 法,计算病毒 TCID₅₀。

1.7 重组腺病毒 Cap 蛋白表达的鉴定

1.7.1 RT-PCR: 取接种重组腺病毒的 HEK-293A 和正常的 HEK-293A 细胞各一瓶,反复冻融三次后取适量,按 TRIZOL 试剂说明书提取总 RNA,然后按下列方法进行反转录: Oligo(dT)(500 μ g/mL) 0.5 μ L;

5×buffer 4.0μL; dNTP(10 mmol/L) 0.5μL; mRNA 14.5μL; 65 °C 水浴 10 min, 加入 0.5 μL M-MLV 反转录酶(200u/μL), 37 °C 水浴 1h。PCR 反应同 ORF2 片段的扩增。

1.7.2 间接 ELISA: 用 8% PEG-6000 浓缩重组腺病毒 HEK-293A 细胞培养物, 同时设定正常 HEK-293A 细胞培养物为对照, 用 pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释至 4 μg/μL, 每孔 100 μL, 37 °C 包被 3 h; PBST 洗涤后, 加入 2%明胶 37 °C 封闭过夜, 洗涤 3 次; 每孔加入 100 μL 1:100 稀释的 PCV2 抗血清, 37 °C 作用 2 h, 洗涤 3 次; 每孔加入 100 μL 1:10000 稀释的 SPA-HRP(武汉博士德公司), 37 °C 作用 1 h, 洗涤 5 次; 每孔加入 100 μL OPD 底物, 37 °C 20min; 加入 50μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测定 OD₄₉₀ 值, 并计算检测孔 OD₄₉₀/对照孔 OD₄₉₀。重复三次。

1.7.3 Western blot: 将上述浓缩蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转印到硝纤膜上后, 10%脱脂乳封闭过夜; 加入 1:100 PCV2 抗血清室温作用 2h; 洗涤 3 次, 加入 1:2000 稀释的 SPA-HRP, 室温作用 1.5h; 充分洗涤后, 加入化学发光法显色液, 并进行 x 光显影, 观察特异蛋白条带。

1.7.4 IPMA: 将重组腺病毒稀释后接种于长满单层的 HEK-293A 细胞, 4%CO₂、37 °C 培养, 约 24h, 弃去上清, 用 PBS 洗涤一次, 37 °C 干燥 45min, -20 °C 冷冻 45min, 再以冷的无水乙醇 4 °C 固定 45min, PBS 洗涤 3 次; 加入 50μL 用 0.5 mol/L NaCl 和 0.5% Tween80 1:20 稀释的 PCV2 抗血清, 37 °C 作用 1 h, 0.15 mol/L NaCl 和 0.5% Tween80 洗涤 3 次; 加入 1:100 SPA-HRP, 37 °C 作用 1 h, 洗涤 3 次; 加入 50 μL AEC 底物溶液, 室温作用 20-30 min; 弃去 AEC, 加入 50 μL 的 PH5.0 的 0.05 mol/L 醋酸钠; 显微镜观察。

2 结果

2.1 Cap 蛋白基因的扩增

PCR 产物 1%琼脂糖电泳, 可见扩增有大小约为 750bp 左右的条带(图 1), 并用 ORF2 中的 *EcoR* 酶切位点鉴定该片段为目的片段(图略)。

2.2 重组质粒 rShuttle-CMV-ORF2 的鉴定

将重组质粒 rShuttle-CMV-ORF2 1:100 稀释作 PCR 反应, 扩增出与 ORF2 片段大小一致的片段。*Kpn* /*Hind* 双酶切重组质粒, 可见切出有与 ORF2 片段大小一致的片段(图 1)。测序分析结果显示, 该片段确为 PCV2 的 ORF2 基因片段, 并符合原阅读框。

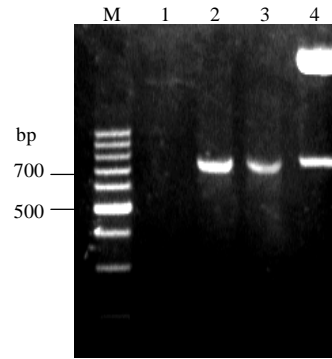


图 1 rShuttle-CMV-ORF2 的 PCR 及酶切鉴定

Fig.1 Analysis of rShuttle-CMV-ORF2

M, 100bp DNA ladder; 1, PCR products of the pShuttle-CMVcapsid; 2, PCR products of the rShuttle-CMV-ORF2; 3, PCR products of PCV2; 4, The digestion of rShuttle-CMV-ORF2 with *Kpn* and *Hind*.

将重组质粒 rAd-ORF2 1:100 稀释作 PCR 反应, 扩增出与 ORF2 片段大小一致的片段。*Pac* 酶切重组质粒, 1%琼脂糖电泳可见切出 35kb 和 4.5kb 的片段(图 2)。

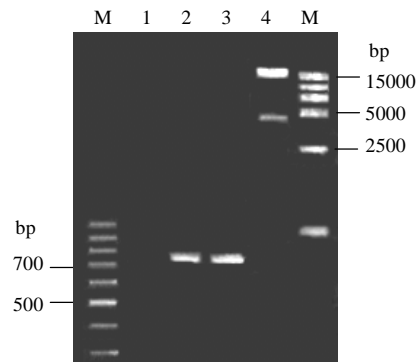


图 2 rAd-Cap 的 PCR 及酶切鉴定

Fig.2 Identification of ORF2 gene in the recombinant adenovirus rAd-Cap.

1, PCR products of the capsid pAdEasy-1; 2, PCR products of the recombinant capsid rAd-ORF2; 3, PCR products of PCV-2; 4, Digestion of rAd-Cap with *Pac*; M, DNA marker.

2.3 转染 HEK-293A 细胞

转染线性化 rAd-ORF2 质粒 DNA 细胞在第 14 天镜检可以观察到有部分细胞孔出现轻微的病変, 第 17 天细胞病変达 100%。

2.4 重组病毒的克隆及稳定性试验

经空斑试验, 连续克隆 3 次, 获得一株重组腺病毒, 命名为 rAd-Cap, 于 HEK-293A 细胞连续传代测定其 TCID₅₀, 第 5、10、15 和 20 代重组病毒 TCID₅₀ 分别为 10^{13.7}/mL、10^{10.7}/mL、10^{12.5}/mL 和 10^{12.5}/mL。

2.5 重组腺病毒 rAd-Cap 蛋白表达的鉴定

从接种重组腺病毒 rAd-Cap 的 HEK-293A 细

胞可以扩增出与 ORF2 片段大小一致的片段, 而从正常的 HEK293-A 细胞未扩增出该片段。说明该重组病毒在细胞中已开始转录。

三次间接 ELISA 的检测孔与对照孔平均 OD₄₉₀ 比值分别为 2.715、3.686、2.368。三次的比值均大于 2.1, 说明接种重组腺病毒的 HEK-293A 细胞中表达了 Cap 蛋白。浓缩的重组腺病毒经电泳转印显色后显示, 接种重组腺病毒的 HEK-293A 细胞在 30kDa 处有一条明显的条带, 而对照正常的 HEK-293A 细胞没有(图 3), 说明接种的 HEK-293A 细胞中表达了 Cap 蛋白。

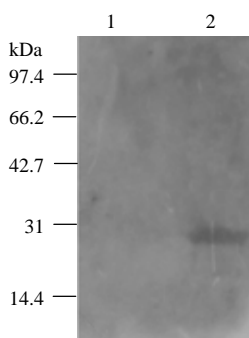


图 3 重组腺病毒的 Western-blot 鉴定

Fig.3 Western-blot analysis of recombinant adenovirus

1, normal HEK-293A cell; 2, HEK-293A cell infected with recombinant adenovirus.

IPMA 处理后镜检可见接种重组腺病毒的 HEK-293A 细胞大部分被染色成红褐色, 而正常 HEK-293A 细胞只在细胞间隙可见有较淡的染色(图 4)。说明 Cap 蛋白在细胞中获得表达。

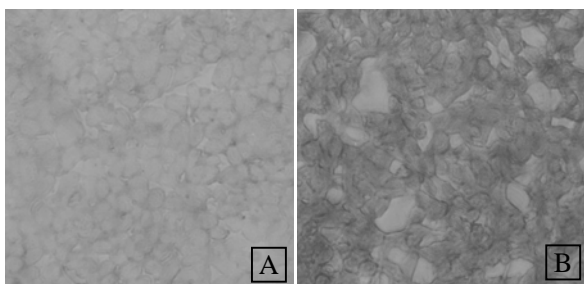


图 4 IPMA 的鉴定结果

Fig.4 Identification of recombinant adenovirus with IPMA

A: Normal HEK-293A cell; B: HEK-293A cell infected with the recombinant adenovirus.

3 讨论

近年来, PCV2 的致病作用逐渐被认识, 但尚无商品化疫苗可供使用。目前, 有关该病的疫苗研

究仅限于全病毒灭活疫苗、Cap 蛋白基因工程亚单位疫苗^[22]、DNA 疫苗^[23]及 PCV1-PCV2 重组疫苗^[24], 并取得重要研究进展。Blanchard 等(2003)^[22]研究了 PCV2 的 ORF1 和 ORF2 DNA 疫苗和亚单位疫苗对猪的免疫保护力, 证明了用杆状病毒表达的 Cap 蛋白可诱导产生好的免疫应答, 有较好的攻毒保护效果。Kamstrup 等(2004)^[23]也研究了 PCV2 Cap 蛋白对小鼠的免疫效果, 将表达 Cap 蛋白的质粒经基因枪注入小鼠体内, 三次免疫后, 鼠体内的抗体可达到 1:400 ~ 3200, 说明 Cap 蛋白可诱导小鼠产生一定水平的抗体。这些结果表明 Cap 蛋白具有主要的抗原中和表位, 可以诱导机体产生免疫反应, 对机体产生保护力, 因此成为基因工程苗的首选基因。

pAdEasy-1 表达系统, 缺失了人腺病毒血清 5 型(Ad5)的 E_1 和 E_3 基因, 具有无致病性、复制效率高、克隆空间大(可容纳 7.5kb 的外源片段)、同时表达多个基因等特点, 也可以用来基因治疗各种疾病。外源基因克隆入穿梭载体 pShuttle-CMV 后与骨架载体 pAdEasy-1 共同转化进大肠杆菌 BJ5183 中, BJ5183 中含有重组酶, 使穿梭载体与骨架载体发生同源重组。正确的重组有二种方式即左、右臂之间重组和复制起始点、右臂之间重组, 用 *Pac* 酶切可以切出 35kb 的大片段和 3.0Kb 或 4.5Kb 的小片段, 本实验切出 35Kb 和 4.5Kb 的条带, 为复制起始位点重组。 E_1 基因与腺病毒的复制有关, HEK-293A 细胞中表达 E_1 基因, 因此同源重组后的腺病毒可以在 HEK-293A 细胞中复制, 并可对外源基因进行正确的翻译和修饰, 使表达的蛋白具有与天然蛋白相同的生物活性。因此本研究选择 Cap 蛋白作为目的基因, 构建成功了能够表达 Cap 蛋白的重组腺病毒。

纯化筛选能稳定表达外源蛋白的重组腺病毒是研制重组腺病毒基因工程疫苗的关键。本研究通过空斑试验筛选纯化出一株重组腺病毒, 在 HEK-293A 细胞传代至第 20 代, 经 RT-PCR、ELISA、IPMA 和 Western-blot 等方法检测, 均证明该病毒可有效转录 Cap 蛋白的 mRNA 和表达 Cap 蛋白, 而且病毒滴度均保持 10^{10} TCID₅₀/mL 以上, 表明该病毒具有较好的稳定性。

References

- [1] Fenaux M, Halbur G. P, Haqshenas G, *et al.* 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]. *Virology*, 2002, 76 : 541-551
- [2] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, *et al.* A very small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. *Nature*, 1982, 295:64-66
- [3] Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines [J]. *Zentbl Bakteriol Htg A*, 1974, 226:153-167.
- [4] Allan G M, McNeilly F, Cassidy J P, *et al.* Pathogenesis of porcine circovirus: experimental infections of colostrums deprived piglets and examination of pig fetal material [J]. *Vet Microbiol*, 1995, 44: 49-64
- [5] Tischer I, Miels W, Wolff D, *et al.* Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus [J]. *Arch Virol*, 1986, 91: 271-276.
- [6] Dulac G C, Afshar A. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL- 33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs [J]. *J Can Vet Res*, 1989, 53:431-433.
- [7] Allan G M, Phenix K V, Todd D, *et al.* Some biological and physicochemical properties of porcine circovirus [J]. *J Vet Med*, 1994, B41:17-26.
- [8] Allan G M, Meehan B, Todd D, *et al.* Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndromes [J]. *Vet Rec*, 1998, 142:467-468.
- [9] Allan G M, McNeilly F, Kennedy S, *et al.* Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in USA and Europe [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1998, 10:3-10.
- [10] Allan G M, McNeilly F, Meehan B M, *et al.* Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland [J]. *Vet Microbiol*, 1999, 66(2):115-23.
- [11] Hamel A L, Lin L L, Sachvie C, *et al.* PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus [J]. *Can J Vet Res*, 2000, 64(1):44-52.
- [12] McNeilly F, McNair I I, Connor M O, *et al.* Evaluation of a porcine circovirus type 2-specific antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry and the polymerase chain reaction [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2002, 14(2):106-12.
- [13] Ouardani M, Wilson L, Jette R, *et al.* Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(12): 3917-3924.
- [14] Fenaux M, Halbur P G, Gill M, *et al.* Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2 [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(7): 2494-503.
- [15] Madec F, Eveno E, Morvan P, *et al.* Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) In Pigs In France: clinical observations from follow-up studies on affected farms [J]. *Livestock Prod Sci*, 2000, 63:223-233.
- [16] Mankertz A, Hillenbrand B. Analysis of transcription of porcine circovirus type 1 [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83:2743-2751.
- [17] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S, *et al.* Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81:2281-2287.
- [18] Pogranichny R M, Yoon K J, Harms P A, *et al.* Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. [J] *Viral Immunol*, 2000, 13:143-153.
- [19] Tisher I, Gelderbolom H, Vettermann W, *et al.* A very small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. *Nature*, 1982, 295:64-66.
- [20] Liu Q, Tikoo S K., Babiuk L A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine Circovirus Type2 [J]. *Virology*, 2001, 285: 91-99.
- [21] Mathe D, Blanchard P, Truong C, *et al.* Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1815-1824
- [22] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, *et al.* Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins [J]. *Vaccine*, 2003, 4039:1-11
- [23] Kamstrup S, Barfoed A M, Frimann T H, *et al.* Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 1358-1361.
- [24] Fenaux M, Opriessnig T, Halbur P G, *et al.* Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV 2) and nonpatho-genic PCV1 in weanling pigs [J]. *J Virol*, 2003, 77:11232-11243.