

# 豬環狀病毒第二型 ORF1、ORF2、ORF3 基因重組蛋白的表現及純化

郭村勇<sup>1</sup> 陳裕森<sup>2</sup> 高志賢<sup>2</sup> 吳家霖<sup>2</sup> 蘇于婷<sup>2</sup> 賴秀穗<sup>3</sup>

1. 國立宜蘭技術學院畜產暨應用動物系助理教授

2. 國立宜蘭技術學院畜產暨應用動物系學生

3. 國立台灣大學獸醫學系教授

## 摘要

豬環狀病毒第二型( Porcine circovirus type2, PCV2 )是造成仔豬離乳後多系統耗弱症( Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS )之致病因子。該病毒可侵害離乳仔豬之呼吸系統、淋巴系統及腎、肝臟等器官並造成致害，近年來已在美加及歐洲地區造成養豬業的重大損害。本報告取 1998 年疑似受 PCV2 感染的台灣南部某豬場病材，進行核酸萃取後，以聚合 鏈鎖反應法( Polymerase chain reaction, PCR )進行該病毒三個基因的增幅。結果 ORF1 (與病毒複製有關的基因)、ORF2 (病毒的結構蛋白基因)、ORF3 (其功能則尚未證明)，都可順利被增幅。PCR 產物經過純化、連同載體一起切割後，再以連接 連接，送入原核表現載體 pET24a 中。在定序確認後，進行養菌及 IPTG 誘導，再以 SDS-PAGE 進行蛋白質電泳分析，結果發現 ORF1、ORF3 皆可以大量的表現重組蛋白，而 ORF2 的表現並不明顯。該三個重組蛋白皆可以西方墨漬法獲得確認。本報告所大量表現的基因重組蛋白，經過純化後，已具有開發成 PCV2 抗體檢驗試劑的雛型。

**關鍵詞：**豬環狀病毒第二型、仔豬離乳後多系統耗弱症

# Expression and Purification the Recombinant Proteins of Porcine Circovirus Type2 ORF1, ORF2 and ORF3

Tsun-Yung Kuo<sup>1</sup> Yu-San Chen<sup>2</sup> Zu-Shan Cau<sup>2</sup> Ga-Lin Wu<sup>2</sup> Yu-Ting Su<sup>2</sup>  
and Shioh-Suey Lai<sup>3</sup>

1. Assistant Professor, Department of Applied Animal Science, National Ilan Institute of Technology

2. College Student, Department of Applied Animal Science, National Ilan Institute of Technology

3. Professor, Department of Veterinary Medicine, National Taiwan University

## Abstract

Porcine circovirus type2 (PCV2), a pathogen that infects the pig's respiration system, lymphoid tissues, kidney and liver, was the cause of porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome. Recently, PCV2 caused the economic lose in America, Canada and Europe. Herein we extracted the nucleic acid of the suspect infected pigs from south of Taiwan in 1998 and the three genes (ORF1, viral replication related, ORF2, viral structure protein related and ORF3, function not clear) were all amplified by polymerase chain reaction. After the purification process, the PCR products were cloned into a *E. coli* expression vector, pET24a. After Sequences confirmation, the log phase cultures were induced by IPTG and the recombinant proteins were analyzed by SDS-PAGE. The results show that ORF1 and ORF3 genes could be highly expressed, besides ORF2. The recombinant proteins were confirmed by western blots. The purified recombination proteins should be the base for development of PCV2 antibody detection kit.

**Key words:** Porcine circovirus type2, post-weaning multisystemic wasting syndrome

## 一、 前言

豬環狀病毒屬於環狀病毒科 Circoviridae 的一員[1]，病毒核酸為環狀、單股 DNA，大小約為 1.76 Kb[2]。環狀病毒科在動物方面還有雞貧血病毒(CAV)和鸚鵡喙羽病病毒(PBV)等 [3,4]。豬環狀病毒目前有兩個血清型，第一型又稱為 PK-15 型。在 1974 年，於豬腎細胞中 (PK-15) 就已被發現且分離出該病毒[5]。目前研究指出，PCV PK-15 病毒株雖然已經在許多國家造成感染，對豬隻並不具有致病性[6]。

豬離乳後多系統耗弱症 (PMWS)，最早是在 1991 年由加拿大首度報告[7]；臨床症狀包括體重降低、呼吸症狀、黃疸，病理學特徵包括：間歇性肺炎肉牙腫、淋巴器官病變、肝炎、腎炎等。近年來，發現造成 PMWS 疾病的病原是類似 PCV PK-15 的 PCV type2 而 PCV type2 目前已經橫掃歐美各國[8,9,10,11]，PCV type2 和 PCV PK-15(又稱 PCV type1) 之間的病毒特性不同，核酸序列的相同性僅有 76%[12]。

目前本病尚無疫苗可用，其原因之一乃是本病毒(PCV2)不易大量增殖培養。由於本病毒是目前所發現最小的動物病毒，因此，基因結構相當簡單。由基因組成的分析，目前較能肯定其功能的，是和病毒進行複製相關的 ORF1 基因及病毒結構蛋白 ORF2 基因[2]。

以遺傳工程技術進行外來基因的表現已行之有年，就病毒而言，病毒基因表現後的產物將來極有可能開發成次單位疫苗和診斷試劑。本實驗之主要目的，是將豬環狀病毒的三個基因(ORF1、ORF2、ORF3)進行選殖、定序確認以及以原核系統進行表現，並分別將其表現之重組蛋白進行純化及分析，以評估將來製備為次單位疫苗或診斷試劑之可行性。

## 二、 材料與方法

### (一) 病毒核酸的萃取

核酸的萃取是參考 Chomczynski 和 Sacchi[13]所述的方法經修飾後進行之。抽取方法是將疑似病豬的肺臟組織加入兩倍磷酸緩衝液(PBS)後磨碎，以低速離心 1000xg 15 分鐘後，抽取均勻組織上清液 200  $\mu$ l，加入 500  $\mu$ l GTC Buffer ( Guanidium thiocyanate 150 g；二次蒸餾水(DDW) 293ml；0.75 M Sodium citrate 17.6 ml；10 % N-lauroysarcosine 26.4 ml 及  $\beta$ -Mercaptoethanol 2.5 ml)及 50  $\mu$ l pH 5.6 的 3M Sodium acetate 混合均勻後，置於冰上。再加入 500  $\mu$ l pH 8 的 phenol 及 150  $\mu$ l chloroform，經劇烈震盪 (Vortex) 1 分鐘後，置於冰上 20 分鐘。再以高速離心 10 分鐘 12000xg，抽取上清液置於新的離心管中，再加入等量的異丙醇 (isopropanol) 混合均勻，置於-20  $^{\circ}$ C 中 1 小時以上。取出後於 4  $^{\circ}$ C 離心 15 分鐘 12000 xg，倒掉上清液，再加入 750  $\mu$ l 的 70% 冰乙醇，清洗核酸沈澱物，再將酒精完全去除，最後將核酸溶於 TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)中備用。

### (二)PCR 增幅 ORF1、ORF2 及 ORF3 基因

將純化好之核酸以 PCR 法分別增幅三個基因。ORF1 引子為：前：5' CGG AAT TCA TGC CCA GCA AGA AGA AT'；後：5' CCG CTC GAG GTA ATT TAT TTC ATA TGG 3'。引子在 ORF1 基因前添加 EcoR 切位；反向引子在 ORF1 基因後添加 Xho 切位。ORF2 引子為：前 5' CCC AAG CTT GCA TGA CGT ATC CAA GGA GGC G 3'；後 5' CCG CTC GAG GGG TTT AAG TGG GGG GTC TTT A 3'。引子在 ORF2 基因前添加 Hind 切位；反向引子在 ORF1 基因後添加 Xho 切位。ORF3 引子為：5' CGG AAT TCA TGG TAA CCA TCC CA 3'；後 5' CCG CTC GAG ATT GAA TGT GGA GCT CCT 3'。引子在 ORF3 基因前添加 EcoR 切位；反向引子在 ORF3 基因後添加 Xho 切位。PCR 反應條件為 95  $^{\circ}$ C 3 分鐘一個循環、94  $^{\circ}$ C 1 分鐘、57  $^{\circ}$ C 2 分鐘、72  $^{\circ}$ C 2 分鐘重複 30 個循環，最後再進行 72  $^{\circ}$ C 7 分鐘一個循環。

### (三)ORF1、ORF2、ORF3 基因選殖

分別以 EcoR + Xho、Hind + Xho 及 EcoR + Xho 酵素各分別切割 1  $\mu$ g 的 ORF1、ORF2、ORF3 及載體 pET24a(EcoR + Xho 及 Hind + Xho) 於 37  $^{\circ}$ C 下切割 3 - 4 小時，再以 1% 洋菜膠電泳分析確認無誤後即可進行純化。純化是以 Qiagen 公司出品的核酸純化套組進行，方法則參照使用說明。分別取經純化的已切割 DNA 3  $\mu$ l 及 1  $\mu$ l 的连接酵素 (T4 ligase) 1.3  $\mu$ l T4 DNA ligase Buffer 及 4.7  $\mu$ l DDW 進行連接反應 (ligation)，在 14  $^{\circ}$ C 下過夜。轉型作用 (transformation) 時先製備勝任細胞 (competent cell)。製備方法是先取 100 分之 1 體積之過夜培養菌液 (大腸桿菌 BL21) 接種入新鮮的 LB (Luria Bertani) 培養液 (1% Tryptone, 1% NaCl, 0.5% Yeast extract, pH 7.5)，37  $^{\circ}$ C 震盪培養 3 小時後，以 2000xg 10 分鐘離下菌液後，以冰冷的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 處理 30 分鐘，重複上述步驟，最後將細菌溶於 25 分之 1 體積的冰冷 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 即可使用。取勝任細胞 200  $\mu$ l，加入重組質體 5  $\mu$ l，置於 4  $^{\circ}$ C 之冰上 30 分鐘，再立即放入 42

水浴槽中 1 分 30 秒，之後迅速放入 0 的冰水中，加入 0.8 ml LB 培養液於 37 培養 1 小時，取 200  $\mu$ l 菌液至含有 kanamycin (25  $\mu$ g/ml) 的 LB 培養基 (LB 培養液再含 1.5 % Bacto-agar) 上塗抹，37 培養過夜培養後，挑選可能有成功選殖入 pET24a 之重組質體進行確認。

#### (四) 重組質體之挑選確認

將挑出的菌落接種至 LB (含 kanamycin) 中培養過夜，之後以 Qiagen 公司出品的核酸純化套組將質體萃出之後，取質體 1  $\mu$ g 同時二個限制酵素進行雙切割(總體積 50  $\mu$ l) 3 小時，再以 1% 洋菜膠電泳分析進行確認有無基因嵌入質體。洋菜膠電泳分析是先分別將 DNA 樣品及標準分子樣品(Marker)置入電泳槽後，以 100 伏特進行電泳後，將膠片置入濃度 1  $\mu$ g/ml 的溴化乙錠 (Ethidium Bromide) 中染色 10 分鐘，再以清水沖洗膠體 10 分鐘進行退染後，於紫外光下觀察並以拍立得 667 底片照相。

#### (五) 序列分析及比對

核酸定序係以美國 LI-COR 公司 DNA 螢光自動定序儀 (Mode 4000L) 進行定序，其反應乃根據 Sanger 氏雙去氧鏈終止反應 (Sanger's dideoxynucleotide termination chain reaction) 的原理，以 SequiTherm Long-Read 套組 (EpiCentre Technologies) 進行之。定序的步驟依照定序套組所附的說明書進行，定序結果的分析則是以 DNASIS 軟體進行之。

#### (六) ORF1、ORF2 及 ORF3 基因之表現

挑取單一嵌有病毒基因片段的菌落，將之培養於含 25  $\mu$ g/ml kanamycin 的 LB 培養液中，於 37 培養 16 小時。然後，將此菌液以 1:100 的比例接種於含 25  $\mu$ g/ml kanamycin 的 LB 培養液中，震盪培養至菌液濃度到達 OD<sub>600</sub> 約為 0.6 左右時，加入 IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) 使其最終濃度為 1.0 mM 或 0.7 mM，繼續震盪培養，分階段收集 0~6 小時的菌液 0.5 ml，收集的菌液以 5000xg 離心 5 分鐘，將上清液去除，加入 Sample buffer (0.5 M Tris-HCl pH 8 1ml, 2-mercaptoethanol 0.4 ml, Glycerol 0.8 ml, 10 % SDS 1.6 ml, Bromophenol blue 0.04 g, DDW 4.2 ml) 將菌塊溶解後，煮沸 10 分鐘使蛋白質變性，在冰上冷卻，高速離心 (12000xg) 1 分鐘後取 10  $\mu$ l 進行 SDS-PAGE 分析。

#### (七) SDS-PAGE 分析

配製 15% (ORF3) 和 10% (ORF1、ORF2) 分析膠片 (separating gel) 及 5% 的滯聚電泳膠片 (stacking gel)，先將分析膠片傾入架好的兩片玻璃之間，以水壓平上層，待膠凝集後，將水倒出，再加入滯聚電泳膠及齒梳 (comb)，凝集後，取蛋白質抽取液 10  $\mu$ l 加入電泳膠片中，以 100 伏特電壓進行電泳分析。其後以染色液 (Coomassie blue 0.125 g, 440 ml DDW, methanol 25 ml, acetic acid 35 ml) 在室溫下染色 4 小時，再以脫色液 (methanol 30 %, acetic acid 10 %) 脫色 3 小時後置於清水中，待膠片回復原來大小，即以年糕紙進行封片及風乾。

#### (八) 西方轉印法 (Western blot)

將 SDS-PAGE 電泳分析後，去除滯聚電泳膠的部分後，將膠浸置於 TBE 中，同時裁下大小約 8 x 6 cm (視膠片大小決定) 的 PVDF 尼龍膜 (Nylon membrane) 及 6 張 3 MM paper，將尼龍膜先浸至甲醇中潤濕再浸漬於 TBE 中，3 MM paper 則直接浸至 TBE 中後備用。將半乾式轉印儀器裝好後，以陰極 (下層) - 3 張 3 MM paper - 尼龍膜 - 膠片 - 3 張 3 MM paper - 陽極 (上層)，各部分需貼合且不能產生氣泡。以 0.8 mA/cm<sup>2</sup> 的電流進行轉印一小時。轉印後將尼龍膜置於填塞液 (Blocking buffer: 5 % Skim milk, Difco, in TBS) 於 37 恆溫箱內作用 1 小時，以去除非特異性反應。然後，加第一道抗體 (老鼠抗組織胺酸之單株抗體)，並於 37 作用 1 小時，再以 TBST 液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.3% Tween 20) 洗滌 3 次，每次各 15 分鐘。然後加標幟鹼性磷酸 (AP) 酵素的第二道抗體 (Alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG, Leinco)，於 37 恆溫箱內作用 60 分鐘後，以 TBST 液洗滌 6 次，每次各 15 分鐘。洗滌後，加受質 (NBT 及 BCIP, Promega) 呈色約 10 分鐘後，以清水水洗終止呈色反應。

#### (九) 包涵體型基因重組蛋白之純化

將基因重組細菌養在 500 ml LB 中，將培養到對數期的菌液分別加入適當濃度的 IPTG 誘導 6 小時後，以磷酸鹽緩衝液 (PBS) 清洗數次後，加入 Lysozyme 分解細胞壁，並以超音波破碎法將菌體碎裂，直至溶液不再黏稠為止。以高速離心 (10000 xg) 10 分鐘後去上清液，不斷地以 IB wash buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5 10 mM EDTA, 1% Triton X-100) 清洗直至下層團塊變白為止。團塊變白後稱重並將之溶解在 IB solubilization buffer (50 mM CAPS, pH 11.0) / 0.3% N-laurolsarcosine 中，使包涵體最終濃度為 20 mg/ml，放置室溫 15 分鐘後，離心 10000xg 10 分鐘以上收集上清液。將收集的上清液置入透析膜中，並置於 5 公升的水槽中透析 (透析液為 20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1 mM DTT) 在 4 中

先透析三小時，之後重新換透析液並透析過夜，隔天再換液二次(配方如上,但不含 DTT)，最後收集透析膜中蛋白質並濃縮。濃縮分別以 3 kDa 和 10 kDa 的濃縮離心管以低速離心(3000 xg)取得濃縮的重組蛋白備用。

### 三、 結 果

#### (一) 以 PCR 法增幅 PCV ORF1、ORF2 及 ORF3 基因

將豬肺臟病材抽取核酸後，利用不同的引子分別進行 PCR，再將 ORF1，ORF2 和 ORF3 的 PCR 產物進行洋菜膠電泳分析，可分別看到大約 900 bps、700 bps 和 300 bps 大小的片段。這與我們所預期的大小相同(如圖 1)。

#### (二) ORF1、ORF2 和 ORF3 基因的選殖

ORF1 和 ORF3 的 PCR 產物及質體 pET24a 分別以 EcoRI 和 Xho I 兩個限制酵素進行切割並純化，而 ORF2 的 PCR 產物及質體 pET24a 則以 Hind III 和 Xho I 兩個限制酵素進行切割並純化後，再分別將基因和 pET24a 質體連接過夜並轉型送入勝任細胞大腸桿菌(BL21)，將挑選的菌落進行過夜培養，分別抽其質體，進行雙切確認。其中 ORF1 和 ORF3 以 EcoRI 和 Xho I 兩個酵素進行切割，而 ORF2 則以 Hind III 和 Xho I 兩種酵素進行切割，洋菜膠電泳分析，結果發現選殖之重組質體除了有載體部分(5.3 kb)的片段以外，另有一片段出現，此片段 ORF1 約為 900 bps，ORF2 約為 700 bps，而 ORF3 則大約為 300 bps。(如圖 2)。

#### (三) 基因序列分析

將嵌入 ORF1，ORF2 和 ORF3 基因的 clone 進行過夜養菌，抽取質體後依照自動定序分析儀器所述的方法進行基因序列分析。而本實驗為進行將來表現蛋白時之確認，於該基因末端添加選殖位 Xho1 以及 6 個 CAC codon (轉譯成組氨酸, Histidine)，以便於西方轉印能以商品化之抗 6x Histidine 之單株體進行辨認，其序列經分析後也確認無誤，結果如圖 3、4、5 所示。

#### (四) ORF1、ORF2 和 ORF3 基因之表現與確認

分別將培養達對數期的菌液加入最終濃度 0.7 mM (ORF1)和 1.0 mM (ORF2、ORF3)的 IPTG 誘導後，抽取細菌全蛋白，分別進行蛋白質電泳分析之後，可分別發現 ORF1 在 38 kDa (如圖 6)，ORF2 在 31 kDa (如圖 7)，而 ORF3 在 14.5 kDa (如圖 8)處有比對照組多出一條片段，我們可以發現其中 ORF1 和 ORF3 基因的表現量較佳，然而 ORF2 基因所表現的蛋白質不太明顯。

#### (五) ORF1 及 ORF3 基因重組蛋白之純化

ORF1 及 ORF3 的重組蛋白經確認是以包涵體(inclusion body)的形式存在(未附分析圖，以 Pierce 公司出品之分析套組獲得結果)，將基因重組過的細菌經大量培養及 IPTG 誘導 6 小時後，進行包涵體純化、溶解，再經由透析及濃縮等過程即可獲得重組蛋白。ORF1 和 ORF3 重組蛋白經大量純化後，以 SDS-PAGE 分析，可分別在相同的分子量處，獲得純化的重組蛋白。(如圖 9 及圖 10)。將此 3 種 clone 的蛋白質電泳膠經由轉漬到尼龍膜之後，經由初級抗體(鼠抗 6x Histidine 之單株抗體)以及二級抗體(山羊抗鼠抗體，已標示鹼性磷酸酵素，AP conjugated)結合及清洗後，進行呈色反應，結果可分別看出有誘導部分所表現的蛋白質上有呈色反應，而無插入病毒基因的載體 pET24a 則無呈色反應，因此證實 ORF1、ORF2、ORF3 基因確實有表現。(如圖 11、12 及 13)

### 四、 討 論

本篇報告證明，台灣在 1998 年之前確實已遭豬環狀病毒第二型的侵襲。同時本病毒的三種基因都可以用 PCR 法順利增幅，並可在大腸桿菌中表現重組蛋白。

在 ORF1 及 ORF3 方面，重組蛋白的表現量相當高，作者群將此二種重組蛋白加以純化後，可獲得純度極高的重組蛋白。同時，由於這兩個重組蛋白均經過重摺疊(refolding)的過程，理論上抗原性應獲得保存，因此，該二個重組蛋白將來可以嘗試做為開發診斷試劑的重要材料。至於 ORF2 方面，由於 ORF2 是病毒的結構蛋白基因，是開發疫苗和診斷試劑的重要抗原，可惜的是，在本實驗中，將 ORF2 嵌入 pET24a 載體置入 BL21 大腸桿菌中表現並不佳，pET24a 所使用的是 T7 啟動子(promoter)，作者群曾用過 T5 啟動子的 pQE30 和 tac 啟動子的 pGEX 兩種質體，並分別在 BL21、

M15 及 SG13009 三種菌中進行表現，表現結果都不甚滿意。將來勢必再嘗試各種條件和各種載體進行大量表現。

重組蛋白在細菌內表現通常有可溶態(soluble form)和包涵體態(inclusion body form)兩種，假若是可溶態，則蛋白質的純化較為簡單，只要打破細菌的菌體即可收集重組蛋白，不必經過變性及重摺疊等繁瑣過程進行純化，有抗原性被破壞或被改變之慮。至於包涵體態則必須先將菌體打破之後，純化出包涵體，再經過變性及重摺疊，才能純化出重組蛋白。

在本實驗中，西方轉印法所使用的初級抗體是小鼠抗 6X Histidine 頂位(epitope)的單株抗體，理論上該抗體的特異性應該很高才是，但很可惜的，是 ORF1 部分，在 26-27Kda 附近有多出一個未知的反應帶，ORF3 部分，在 37-38KDa 附近也多出一個未知的反應帶，就理論而言，連續六個氨基酸全都是 Histidine 的機率是二十分之一的六次方，也就是六千四百萬分之一，委實機率甚低！因此，到底為什麼會有這些非特異性的片段，仍需探討。

豬環狀病毒第二型(PCV2)與豬環狀病毒第一型不同，它會造成仔豬離乳後多系統耗弱症(PMWS)，全世界目前對此病毒束手無策，台灣目前也已遭受此病毒感染[14]，因此疫苗和檢驗試劑的開發是當務之急，本實驗結果成功的以原核系統大量表現出病毒基因的重組蛋白，為將來診斷試劑的開發向前邁進了一大步。

## 六、參考文獻

1. Lukert, P., G. F. D. Boer, J. L. Dale, P. Keese, M. S. McNulty, J. W. Randles and I. Tischer ( 1995 ), "The Circoviridae. In Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses", pp.166-168.
2. Meehan, B. M., J. L. Creelan, M. S. McNulty and D. Todd ( 1997 ), "Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circovirus", J. Gen. Virol., Vol. 78, pp.221-227.
3. Ritchie, B. W., F. D. Niagro, P. D. Lukert, W. L. Steffens and K. S. Latimer ( 1989 ), "Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease", Virology, Vol.171, pp.83-88.
4. Todd, D., J. L. Creelan, D. P. Mackie, F. Rixon and M. S. McNulty ( 1990 ), "Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent", J. Gen. Virol., Vol.71, pp.819-823.
5. Dulac, G.C. and A. Ahmad ( 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., Vol.53, pp.431-433.
6. Tischer, I., W. Miels, D. Wolff, M. Vagt and W. Greim ( 1986 ), "Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus", Arch. Virol., Vol.91, pp.271-276.
7. Clark, E. G ( 1997 ), "Post-weaning multisystemic wasting syndrome. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners", 28th Annual Meeting, Quebec City, Canada, pp. 499-501.
8. Hines, R. K. and P. D. Lukert ( 1995 ), "Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United States", Swine Health Prod, Vol.3, pp.71-73.
9. LeCann, P., E. Albina, F. Madec, R. Cariolet, and A. Jestin ( 1997 ), "Piglet wasting disease", Vet. Rec., Vol.141, pp.660.
10. Segales, J., M. Sitjar, M. Domongo, S. Dee, M. Del Pozo, R. Noval, C. Saeristan, A. De las Heras, A. Ferro and K. S. Latimer ( 1997 ), "First report of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain", Vet. Rec., Vol.141, pp.600-601.
11. Ellis, J., L. Hassard, E. Clark, J. Harding, G. Allan, P. Willson, J. Strokappe, K. Martin, F. McNeilly, B. Meehan, D. Todd and D. Haines ( 1998 ), "Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome", Can. Vet. J., Vol.39, pp.44-51.
12. Morozov, I., T. Sirinarumit, S. D. Sorden, P. G. Halbur, M. K. Morgan, K. J. Yoon and P. S. Paul (1998),"Detection of a Novel Strain of Porcine Circovirus in Pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome", J. Clin. Microbiol., Vol.36, pp.2535-2541.
13. Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987),"Single-step method for RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction", Ana. Biochem., Vol.162, pp.156-159.
14. 張甘楠、蘇柏栩、邱振豪、劉宏仁、蔡信雄 (2002), 「以聚合 鏈反應、DNA 序列及原位雜交方法確認台灣地區豬環狀病毒之感染」, 台灣獸醫學雜誌, 第二十八卷, 第三期, 第 186-194 頁。

91 年 09 月 14 日投稿

91 年 09 月 29 日接受

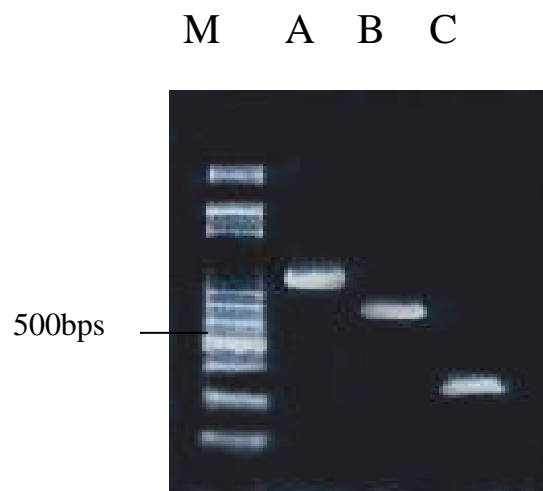


圖 1. 以 PCR 法增幅 PCV2 ORF1、2、3 基因。M : 100 bps marker A : ORF1 基因  
B : ORF2 基因 C : ORF3 基因。

Fig.1.The amplification of PCV2 genes by PCR. M:100 bps markers ; A: ORF1

B: ORF2 C: ORF3

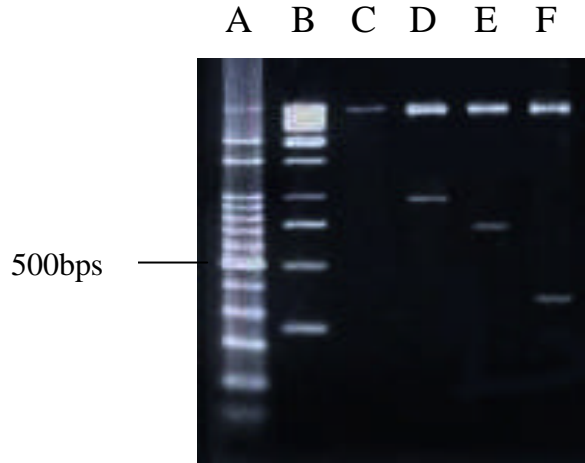


圖 2. PCV2 三種基因選殖診視圖。以酵素分別切割內含 PCV2 基因之菌株 DNA 並以電泳膠分析。

A : 100 bps Marker ; B : 1 kb Marker ; C : 載體 pET24a ; D : ORF1 ; E : ORF2 ; F : ORF3。

Fig2. Restriction digest of the pET24a-ORFs recombinant clones. The DNA were double digested with EcoR I/Xho (ORF1 and ORF3) or HindIII /Xho (ORF2). M: 100 bps ladders ; A: 1kb ladders ; B : pET24a only ; C : recombinant ORF1 clone ; D: recombinant ORF2 clone ; E: recombinant ORF3 clone.

GGG	CCC	9	GTC	GCA	18	TCC	CGG	27	CCA	TGG	36	CCG	CGG	45	TTC	GAT	54
G	P	D	V	A	C	S	R	F	P	W	R	F	R	E	F	D	S
GAA	TTC	63	CCC	AGC	72	AAG	AAT	81	AGA	AGC	90	CCC	CAA	99	CAT	AAA	108
K	F	M	F	S	K	K	N	G	R	S	G	P	Q	F	H	K	R
TGG	GTG	117	ACG	CTC	126	AAT	AAT	135	GAA	GAC	144	CGC	AAG	153	ATA	CSG	GAG
W	V	F	T	L	N	N	P	S	E	D	E	R	K	K	I	R	E
CTC	CCA	171	TCC	CTA	180	TTT	GAT	TAT	TTT	ATT	GTT	GGC	GAG	GAG	GGT	AAT	GAG
L	F	I	S	L	F	D	Y	F	I	V	G	E	E	G	N	E	E
GGC	CGA	225	ACC	CAC	234	CAG	GGG	243	GCT	AAT	252	GTG	AAG	261	CAA	ACT	TTT
G	R	T	F	H	L	Q	G	F	A	N	F	V	K	K	Q	T	F
AAT	AAA	279	AAG	TGG	288	TTT	GGT	297	CGC	TGC	306	ATC	GAG	315	GCG	AAA	324
N	K	V	K	W	Y	F	G	A	R	C	H	I	E	K	A	K	G
ACA	GAT	333	CAG	CAG	342	AAA	GAA	TAC	TGC	AGT	351	AAA	GAA	360	GGC	AAC	369
T	D	Q	Q	S	K	E	Y	C	S	K	E	G	N	L	L	I	E
TGT	GGA	387	GCT	CCT	396	TCT	CAA	GGA	405	CGC	AGT	GAC	CTG	TCT	ACT	GCT	GTG
C	G	A	F	R	S	Q	S	Q	R	S	D	L	S	T	A	V	S
ACC	TTG	441	GAG	AGC	450	GGG	AGT	CTG	GTG	ACC	GTT	GCA	GAG	CAG	CAC	CCT	GTA
T	L	L	E	S	G	S	L	V	T	V	A	E	Q	H	P	V	T
TTT	GTC	495	AGA	AAT	504	CGC	GGG	CTT	GCT	GAA	513	CTT	TTG	522	AAA	GTG	531
F	V	R	N	F	R	G	L	A	E	L	L	K	V	S	G	K	M
CAG	AAG	549	CGT	GAT	558	AAG	ACC	AAT	GTA	CAC	567	GTC	ATT	576	GTG	GGG	585
C	A	G	A	T	T	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A



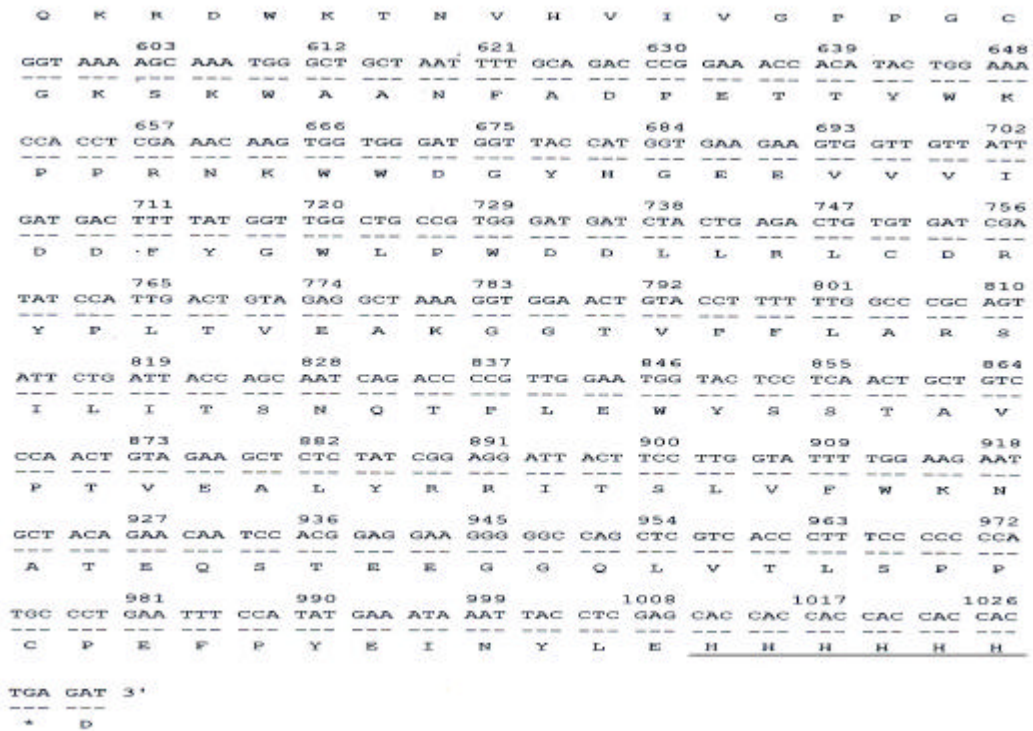


圖 3. PCV ORF1 基因序列分析圖。圖中\_\_\_\_\_部分分別是 ORF1 基因起點和終點的引子位置，以及顯示最後結束前有 6 個 CAC 的 codon。

Fig3. Sequences analysis of the ORF1 gene of PCV. The position of forward primer, reverse primer and the 6XHis codons were indicated by \_\_\_\_\_.

130	140	150	160	170	180
ACAAGCTTGC	<u>ATGACGTATC</u>	<u>CAAGGAGGCG</u>	TTTCCGCAGA	CGAAGACACC	GCCCCCGCAG
190	200	210	220	230	240
CCATCTTGGC	CAGATCCTCC	GCCGCCGCC	CTGGCTCGTC	CACCCCGCC	ACCGTTACCG
250	260	270	280	290	300
CTGGAGAAGG	AAAAATGGCA	TCTTCAACAC	CCGCCTCTCC	CGCACCTTCG	GATATACTGT
310	320	330	340	350	360
CAAGGCTAGC	ACAGTCAGAA	CGCCCTCCTG	GGCGGTGGAC	ATGATGAGAT	TTAATATTAA
370	380	390	400	410	420
CGACTTTGTT	CCCCCGGGAG	GGGGGACCAA	CAAAATCTCT	ATACCCTTTG	AATACTACAG
430	440	450	460	470	480
AATAAGAAAG	GTTAAGGTTG	AATTCTGGCC	CTGCTCCCCA	ATCACCCAGG	ATGACAGGGG
490	500	510	520	530	540
AGTGGGCTCC	ACTGCTGTTA	TTCTAGATGA	TAACTTTGTA	ACTAAGGCCA	CAGCCCTAAC
550	560	570	580	590	600
CTATGACCCC	TATGTAAACT	ACTCCTCCCG	CCATACAATC	CCCCAACCCCT	TCTCTACCAC
610	620	630	640	650	660
TCCCGGTACT	TTACCCCAA	ACCTGTCCTT	GATTCCACTA	TTGATTACTT	CCAACCAAAC
670	680	690	700	710	720
AGCAAAAGGA	ATCAGATTTG	GCTGAGGCTA	CAAACCTCGG	CAATGTGGA	CCACGTAGGC
730	740	750	760	770	780
CTCGGTACTG	CGTTCGAAA	CAGTAAATAC	GACCAGGACT	ACAATATCCG	TGTAACTATG
790	800	810	820	830	840
TATGTACAAT	TCAGAGAATT	<u>TAATCTTAAA</u>	<u>GACCCCCAC</u>	<u>TTAAACCCCT</u>	<u>CGAGCACCAC</u>
850	860	870	880	890	900
<u>CACCACCACC</u>	<u>ACTGAGATCC</u>	GGCTGCTAAC	AAAGCCCGAA	AGGAAGCTGA	GTTCACTGCT
910	920	930	940	950	960
GCA.....	.....	.....	.....	.....	.....

圖 4. PCV ORF2 基因序列分析圖。圖中 \_\_\_\_\_ 部分分別是 ORF2 基因起點和終點的引子位置，以及顯示最後結束前有 6 個 CAC 的 codon。

Fig4. Sequences analysis of the ORF2 gene of PCV. The position of forward primer, reverse primer and the 6XHis codons were indicated by \_\_\_\_\_.

10	20	30	40	50	60
GAGCGGATAA	CAATTCCCCT	CTAGAAATAA	TTTTGTTTAA	CTTTAAGAAG	GAGATATACA
70	80	90	100	110	120
TATGGCTAGC	ATGACTGGTG	GACAGCAAAT	GGGTCGCGGA	<u>TCCGAATTCA</u>	<u>TGGTAACCAT</u>
130	140	150	160	170	180
<u>CCCACCACTT</u>	GTTTCGAGGT	GGTTTCCAGT	ATGTGGTTTC	CGGGTCTGCA	AAATTAGCAG
190	200	210	220	230	240
CCCATTTGCT	TTTACCACAC	CCAGGTGGCC	CCACAATGAC	GTGTACATTG	GTCTTCCAAT
250	260	270	280	290	300
CACGCTTCTG	CATTTTCCCG	CTCACTTTCA	AAAGTTCAGC	AAGCCCGCGG	AAATTTCTGA
310	320	330	340	350	360
CAAACGTTAC	AGGGTGCTGC	TCTGCAACGG	TCACCAGACT	CCCGCTCTCC	ACAAGGTAC
370	380	390	400	410	420
TCACAGCAGT	AGACAGGTCA	CTGCGTTGTC	CTTGAGATCT	<u>AGGAGCTCCA</u>	<u>CATTCAATCT</u>
430	440	450	460	470	480
<u>CGAGCACCAC</u>	<u>CACCACCACC</u>	<u>ACTGAGATCC</u>	GGCTGCTAAC	AAAGCCCGAA	AGGAAGCTGA
490	500	510	520	530	540
GTTGGCTGCT	GCCACCGCTG	.....	.....	.....	.....

圖 5. PCV ORF3 基因序列分析圖。圖中 \_\_\_\_\_ 部分分別是 ORF3 基因起點和終點的引子位置，以及顯示最後結束前有 6 個 CAC 的 codon。

Fig5. Sequences analysis of the ORF3 gene of PCV. The position of forward primer, reverse primer and the 6XHis codons were indicated by \_\_\_\_\_.

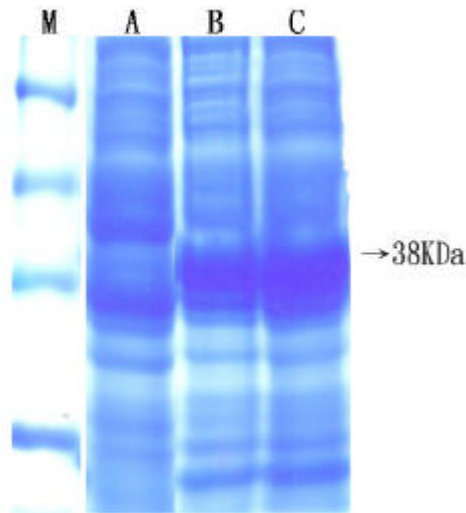


圖 6. 以 pET24a 表現 PCV2 ORF1 基因之 SDS-PAGE 電泳分析。M：標準分子量；A：僅含 pET24a 質體之菌株；B：pET24a-ORF1 以 0.7 mM IPTG 誘導 5 小時；C：pET24a-ORF1 以 0.7 mM IPTG 誘導 6 小時。

Fig6. The SDS-PAGE analysis of PCV2 ORF1 expression. M: molecular weight markers ; A: pET24a in BL21 (no insert) ; B: pET24a-ORF1 induced by 0.7 mM IPTG, 5hrs. ; C: pET24a-ORF1 induced by 0.7 mM IPTG, 6hrs.

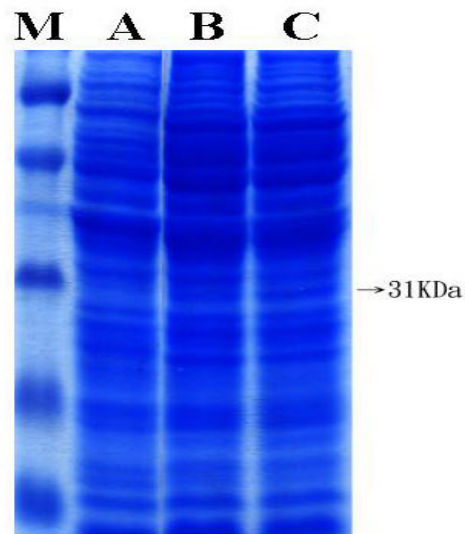


圖 7. 以 SDS-PAGE 電泳分析 pET24a 表現 PCV2 ORF2 基因。M：標準分子量 A：僅含 pET24a 質體之菌株；B：pET24a-ORF2 以 1 mM IPTG 誘導 5 小時；C：pET24a-ORF2 以 1 mM IPTG 誘導 6 小時。

Fig7. The SDS-PAGE analysis of PCV2 ORF2 expression in *E. coli*. M: molecular weight markers ; A: pET24a in BL21 (no insert) ; B: pET24a-ORF2 induced by 1 mM IPTG, 5hrs ; C: pET24a-ORF2 induced by 1 mM IPTG, 6hrs.



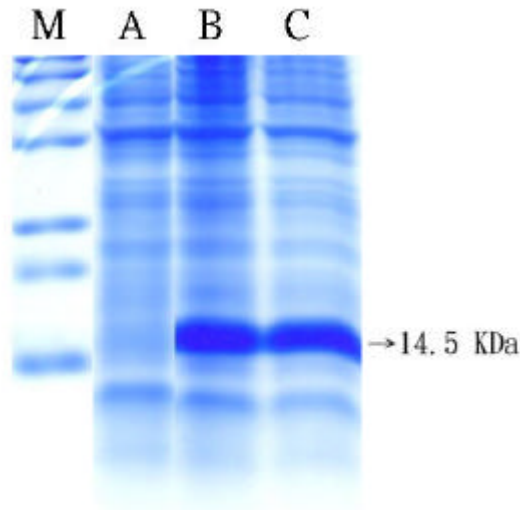


圖 8. 以 SDS-PAGE 電泳分析 pET24a 表現 PCV2 ORF3 基因。M：標準分子量 A：僅含 pET24a 質體之菌株；B：pET24a-ORF3 以 1 mM IPTG 誘導 5 小時；C：pET24a-ORF3 以 1 mM IPTG 誘導 6 小時。  
Fig8. The SDS-PAGE analysis of PCV2 ORF3 expression in *E. coli*. M: molecular weight markers ; A: pET24a in BL21 (no insert) ; B: pET24a-ORF3 induced by 1 mM IPTG, 5hrs ; C: pET24a-ORF3 induced by 1 mM IPTG, 6hrs.

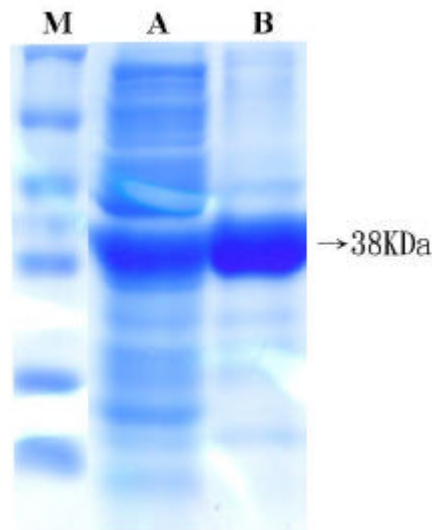


圖 9. 以 SDS-PAGE 電泳分析基因重組蛋白 PCV2 ORF1 的純化。M：標準分子量；A：未純化的全菌體蛋白質；B：經純化的重組蛋白質。  
Fig.9 The SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein PCV2 ORF1. M: molecular weight markers ; A: The total proteins of pET24a-ORF1 in BL21 ; B: The purified recombinant protein expressed by pET24a-ORF1 in BL21.

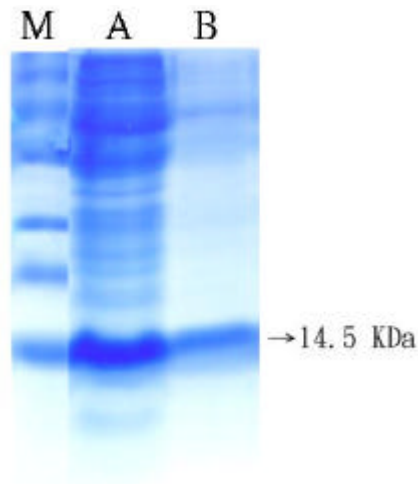


圖 10. 以 SDS-PAGE 電泳分析基因重組蛋白 PCV2 ORF3 的純化。M：標準分子量；A：未純化的全菌體蛋白質；B：經純化的重組蛋白質。

Fig.9 The SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein PCV2 ORF3. M: molecular weight markers; A: The total proteins of pET24a-ORF3 in BL21; B: The purified recombinant protein expressed by pET24a-ORF3 in BL21.

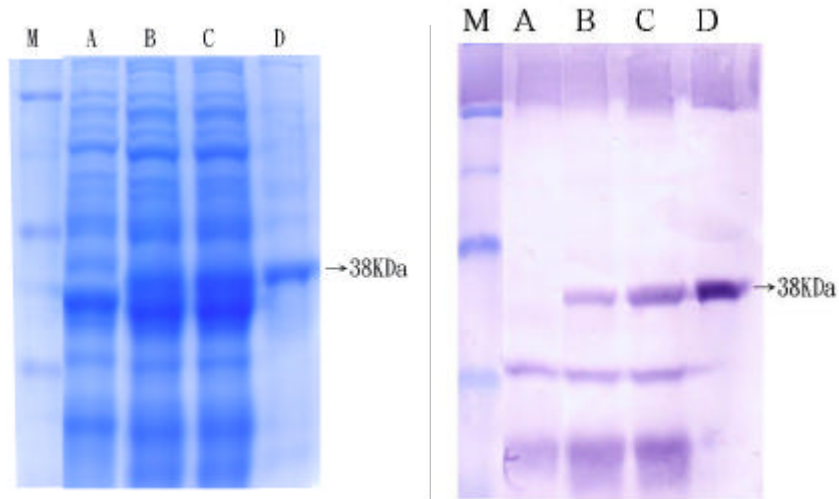


圖 11. 以西方轉印法確認 ORF1 重組蛋白。左：SDS-PAGE 電泳分析；右：西方轉印法分析；M：標準分子量；A：僅含 pET24a 質體之菌株；B：pET24a-ORF1 以 0.7 mM IPTG 誘導 5 小時；C：pET24a-ORF1 以 0.7 mM IPTG 誘導 6 小時；D：經純化及濃縮的 ORF1 重組蛋白。

Fig11. The identification of recombinant PCV2 ORF1 by western analysis. Left: SDS-PAGE analysis; Right: Western blotting; M: molecular weight markers; A: pET24a in BL21 (no insert); B: pET24a-ORF1 induced by 0.7 mM IPTG, 5hrs; C: pET24a-ORF1 induced by 0.7 mM IPTG, 6hrs.; D: The purified recombinant protein, PCV2 ORF1.

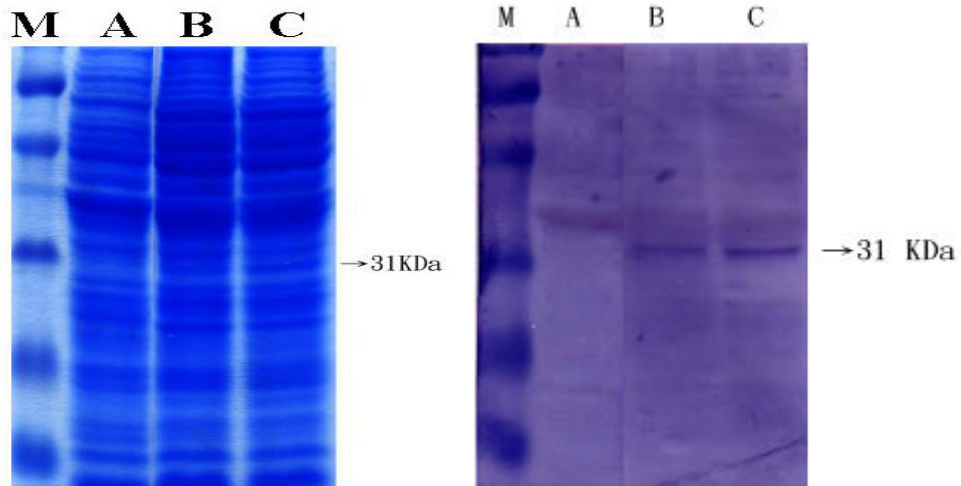


圖 12. 以西方轉印法確認 ORF1 重組蛋白。左：SDS-PAGE 電泳分析；右：西方轉印法分析；M：標準分子量；A：僅含 pET24a 質體之菌株；B：pET24a-ORF2, 1 mM IPTG 誘導 5 小時；C：pET24a-ORF2, 1 mM IPTG 誘導 6 小時。

Fig12. The identification of recombinant PCV2 ORF2 by western analysis. Left: SDS-PAGE analysis ; Right: Western blotting ; M: molecular weight markers ; A: pET24a in BL21 (no insert) ; B: pET24a-ORF2 induced by 1 mM IPTG, 5hrs ; C: pET24a-ORF2 induced by 1 mM IPTG, 6hrs.

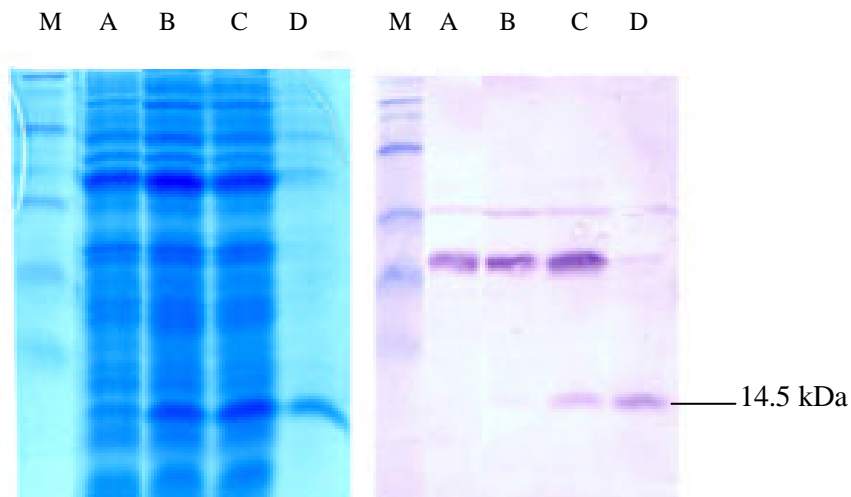


圖 13. 以西方轉印法確認 ORF3 重組蛋白。左：SDS-PAGE 電泳分析；右：西方轉印法分析；M：標準分子量；A：僅含 pET24a 質體之菌株；B：pET24a-ORF3, 1 mM IPTG 誘導 5 小時；C：pET24a-ORF3, 1 mM IPTG 誘導 6 小時；D：經純化及濃縮的 ORF3 重組蛋白。

Fig13. The identification of recombinant PCV2 ORF3 by western analysis. Left: SDS-PAGE analysis ; Right: Western blotting ; M: molecular weight markers ; A: pET24a in BL21 (no insert) ; B: pET24a-ORF3, 1 mM IPTG, 5hrs ; C: pET24a-ORF3, 1 mM IPTG, 6hrs ; D: The purified recombinant protein, PCV2 ORF3.