

猪圆环病毒 2 型双拷贝感染性 DNA 的构建及体外拯救

李俊¹, 时建立¹, 于周^{1,2}, 徐绍建¹, 丁鹏^{1,2}, 程凯慧^{1,2}, 王金宝¹

1 山东省农业科学院畜牧兽医研究所 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 济南 250100

2 青岛农业大学, 青岛 266109

摘要: 感染性分子克隆是研究病毒复制和致病机制的有力工具。本研究应用 PCR 诱变技术解决了外源片段易于自连的难题, 成功将 2 个 PCV2 SD1 株全基因组(DQ346683)头尾相接插入到真核生物表达载体 pSK 的多克隆位点中, 构建重组质粒 pSK-2PCV2; 另外课题组成功构建含单个 PCV2 全基因组的 pSK-PCV2 和自身环化质粒 ds-PCV2。将所得 3 种质粒分别转染无 PCV 污染的 PK-15 细胞系, 经 10 次连续传代后, 间接免疫荧光试验检测显示三者均在细胞核中聚集大量的病毒抗原; 经 RT-PCR 检测都有 PCV2 特异性基因转录; 透射电镜下可观察到直径约为 17~20 nm 的典型 PCV2 病毒粒子; 经测序鉴定所拯救出的病毒与亲本病毒核苷酸同源性为 100%。拯救出的 PCV2 与亲本病毒具有相同的病毒学及分子生物学特性。本研究应用 PCR 诱变技术成功构建 PCV2 双拷贝感染性克隆, 并经体外拯救证实具有感染性, 为进行 PCV2 分子特性及致病机理研究打下了基础。

关键词: 猪圆环病毒 2 型, 单拷贝, 双拷贝, 自身环化, 感染性克隆, 体外拯救

Rescue of porcine circovirus type 2 from cloned DNA

Jun Li¹, Jianli Shi¹, Zhou Yu^{1,2}, Shaojian Xu¹, Peng Ding^{1,2}, Kaihui Cheng^{1,2}, and Jinbao Wang¹

1 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China

2 Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

Abstract: Infectious clone is a useful tool in exploring viral replication and pathogenesis. In order to prevent linear PCV2 cyclization, PCR mutagenesis was used to construct the first molecular clone (pSK-2PCV2) by ligating two copies of the complete PCV2 genome with the pBluescript SK (pSK) vector. In addition, pSK-PCV2 and ds-PCV2 were constructed. PK-15 cells were transfected with above three infectious clones. Indirect immunofluorescence assay (IFA) revealed that the virus antigen mainly localized in infected cell nucleolus and cytoplasm. PCV2 specific nucleotide fragment in cell culture was amplified by RT-PCR. Typical porcine circovirus particles with diameter about 17 nm were also observed by transmission electron microscope (TEM) in the infected cells. The rescued virus sequences from the cultures had 100% homology with the inserting PCV2 genome. The rescued virus shared similar properties with that of the parental virus. The study establishes a platform for further research on the virus molecular biology and pathogenicity.

Keywords: porcine circovirus type 2, single copy, double copy, cyclization, infectious clones, virus rescue

猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2) 是一种无囊膜的单股负链环状 DNA 病毒。猪圆环病

Received: July 4, 2009; **Accepted:** September 28, 2009

Supported by: Natural Science Foundation of Shandong Province (No. Y2006D23), Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program during the Eleventh Five-Year Plan Period (No. 2006BAD06A18).

Corresponding author: Jinbao Wang. Tel: +86-531-83179996; Fax: +86-531-88978476; E-mail: wangjb@saas.ac.cn

山东省自然科学基金(No. Y2006D23), “十一五” 国家科技支撑计划(No. 2006BAD06A18)资助。

毒是 1974 年由德国学者 Tischer 等^[1]首次从猪肾传代细胞(PK-15)中分离到的, 1982 年被命名为猪圆环病毒。猪圆环病毒分为 2 个血清型: PCV1 和 PCV2。其中 PCV2 具有致病性, 能引起断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS), 并能导致母猪繁殖障碍和引起免疫抑制, 给养猪业造成严重的经济损失。PCV 基因组有 6 个大于 200 bp 的开放阅读框架(ORF)^[2], 其中有 2 个 ORF, ORF1 基因产物与病毒复制酶相关 (*Rep*), ORF2 基因产物构成病毒核衣壳蛋白(*Cap*)^[3]。ORF3 编码蛋白诱导细胞凋亡作用而在病毒感染中扮演一定角色^[4]。PCV2 通过其复制中间体(双链复制型 DNA)以滚环复制方式进行复制^[5]。PCV2 复制起始于 *Rep* 蛋白结合与复制起始位点上游六核苷酸序列重复区的茎环结构。复制过程中, *Rep* 蛋白切开并结合与复制环的起始和结束位点, 同时细胞中的聚合酶负责病毒 DNA 的合成^[6]。

PCV2 的感染过程需酸化的环境^[7], 但基因组如何到达细胞核仍完全未知。在 PK-15 细胞系中 *Cap* 蛋白在接种后 6~12 h 即可在细胞质中得到表达。而 *Rep* 蛋白的表达要晚得多, 约在接种后 12~14 h 出现在细胞核中。有趣的是, 此时 *Cap* 也在细胞核内出现, 推测可能是 *Rep* 蛋白将其运送入细胞核内。一旦 *Cap-Rep* 复合体到达细胞核, 整个基因组便开始复制, 装配病毒粒子。然后细胞核伴随着整个细胞一起裂解, 与 Meerts 等^[8]的报道相一致。这种相关性与其致病机理的关系目前仍不明确, 需要进一步地深入研究。

本研究旨在通过构建单拷贝、双拷贝感染性克隆及自身环化产物并转染无 PCV 污染的 PK-15 细胞系, 拯救出 PCV2 病毒, 为进一步研究圆环病毒的致病机理打下基础。

1 材料和方法

1.1 毒株、细胞和试剂

PCV2 SD1 株为本实验室从临床患 PMWS 仔猪淋巴结中分离得到(DQ346683)^[9]。PK-15 细胞无 PCV 污染、含 PCV2 全基因组的 pMD18-T-PCV2 重组质粒及 pBluescript SK(简称为 pSK)载体由本实验室保

存。LipofectamineTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司, D-氨基葡萄糖购自美国 Sigma 公司, DMEM 购自美国 Gibco 公司, TRI Reagent[®]购自美国 Ambion 公司, 兔抗猪荧光二抗购自美国 Sigma 公司, E.Z.N.A[®] mRNA Enrichment Kit 购自美国 Omega 公司。

1.2 引物设计及病毒基因组扩增

根据 NCBI 上发表的 PCV2 全基因序列, 参照 Fenaux 等^[10]设计 3 对引物: PF、PR 用于扩增 PCV2 全基因序列, 引物中含有一个 *Sac* II 酶切位点, 此位点在 PCV2 全基因中是唯一的; 诱变引物 MF、PR, 用于将 PCV2 中 *Sac* II 酶切位点诱变为 *Hind* III 酶切位点; 引物 *CapF/CapR* 用于扩增 *Cap* 蛋白基因转录产物。

取 PCV2 SD1 株细胞培养裂解液, 反复冻融 3 次后, 5000 r/min 离心 15 min, 使用酚:氯仿法抽提 DNA, -20°C 保存备用。利用设计的 PCR 引物 PF、PR, 以上述 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增条件为: 95°C 预变性 9 min; 94°C 变性 1 min, 48°C 退火 1 min, 72°C 延伸 3 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物在 10 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳检测。诱变 PCR 采用 MF/PR 引物, 反应条件同上。

1.3 含单、双拷贝及自身环化 PCV2 基因组的重组质粒的构建

自身环化 PCV2 基因组构建见图 1C: 用限制性内切酶 *Sac* II 对 pMD18-T-PCV2 质粒进行酶切、电泳, 回收 PCV2 全长基因片段, 纯化, T4 DNA 连接酶连接。

含单拷贝 PCV2 基因组的重组质粒的构建见图 1D: 用限制性内切酶 *Sac* II 对 pMD18-T-PCV2 质粒及载体 pSK 进行酶切, 回收所得的 PCV2 全序列, 用 CIAP 对 pSK 载体的酶切产物进行去磷酸化处理。用 T4 DNA 连接酶将 PCV2 全序列与载体 pSK 连接, 重组质粒命名为 pSK-PCV2, 连接产物转化入大肠杆菌 DH5⁺ 感受态, 提取质粒, 进行酶切及 PCR 鉴定, 并将阳性菌液送上海生工测序^[11]。

含双拷贝 PCV2 基因组的重组质粒的构建如图 1E。以上述 PCV2 全序列为模板、用引物 MF、MR 诱变扩增, 回收所得 PCR 产物命名为 HS-PCV2, 经 *Sac* II 和 *Hind* III 酶切后按上述步骤插入 pSK 载体, 得到重组质粒 pSK-HS-PCV2, 酶切鉴定。经 *Sac* II

表 1 用于 PCR 扩增和突变的引物

Table 1 Primers for PCR amplification and mutation

Names	Sequences	Positions	Purposes
PF	TGTCCGCGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGTGA	488	PCR
PR	GCCCCGCGGAAATTTCTGACAAACGTTACA	469	PCR
MF	TGTAAAGCTTGCTGGCTGAACCTTTGAAAGTGA	498	Mutagenesis
CapF	GCGGATCCGTGACGTATCCAAG	1747	RT-PCR
CapR	CCACTAGTATAGGGGTAAAGTGGGG	1024	RT-PCR

F stands for forward primer, R stands for reversed primer.

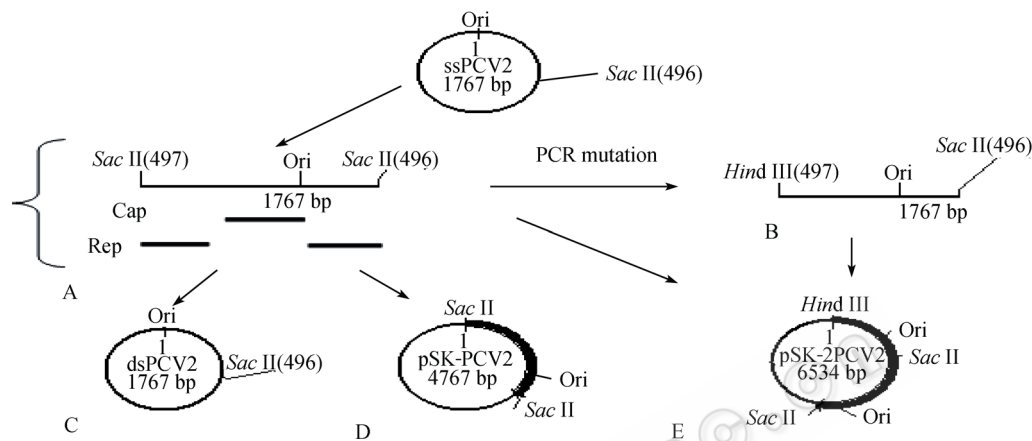


图 1 含单、双拷贝及自身环化 PCV2 基因组的重组质粒的构建策略

Fig. 1 Construction of single copy, double copy and self-circled PCV2 genome.

酶切后将未诱变的 PCV2 全长基因插入到 pSK-HS-PCV2 的 *Sac* II 酶切位点, 进行酶切及 PCR 鉴定, 阳性质粒送上海生工测序, 筛选出一前一后顺次插入 2 个 PCV2 的重组质粒, 重组质粒命名为 pSK-2PCV2。构建策略见图 1。

1.4 重组质粒转染及间接免疫荧光检测

将复苏成功并进入对数生长期的无 PCV 污染的 PK-15 细胞用胰酶/EDTA 常规消化, 以 10^8 细胞/mL 接种 6 孔板, 每孔 2 mL, 37°C 培养。待细胞铺满 90% 或以上时, 用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒将重组质粒 pSK-PCV2(5 μg)、pSK-2PCV2(5 μg) 和 ds-PCV2(5 μg) 分别转染入无 PCV 污染的 PK-15 细胞, 同时设平行转染空载体 pSK 作为阴性对照。12 h 后, 用 300 mmol/L D-氨基葡萄糖处理 30 min, 洗涤后添加新鲜的含 3% 小牛血清的 DMEM 培养液继续培养 48 h。弃去培养液, 用 PBS(pH 7.2)洗涤, 拍干; 用丙酮: 无水乙醇(6:4, *V/V*)固定 5~10 min, 弃去固定液, 自然晾干; 用 PBS 洗涤, 拍干; 加入 PCV2 阳性血清

(1:100 稀释), 37°C 作用 1 h, PBS 洗涤 5 次; 滴加 FITC 标记的兔抗猪荧光二抗(1:200 稀释), 37°C 作用 45 min, 同样洗涤后拍干, 荧光显微镜观察。

1.5 病毒体外转录鉴定

按 TRI Reagent®说明书提取细胞裂解液总 RNA, 按 E.Z.N.A®mRNA Enrichment Kit 说明提取 mRNA, 用引物 *CapF/CapR* 进行 RT-PCR 扩增编码 *Cap* 蛋白特异性序列。

1.6 电镜观察

将转染后的细胞病毒液反复冻融 3 次, 8000 r/min 离心 30 min, 弃沉淀; 将上清液 40 000 r/min 超速离心 3 h, 弃上清液, 用 0.01 mol/L (pH 8.0) 的 TE 缓冲液重悬沉淀并收集, 透射电镜观察是否存在病毒粒子。

1.7 亲本病毒与拯救病毒的生长曲线

将盲传 10 代的亲本病毒 PCV2、重组 pSK-2PCV2 及空载体对照组在接种后 18、24、36、48、72、96 h 分别做 IFA 检测其生长规律。

2 结果

2.1 重组质粒 pSK-PCV2 和 pSK-2PCV2 的鉴定

重组质粒 pSK-PCV2 和 pSK-2PCV2 经 *Sac* II 和 *Hind* III 酶切后电泳, 结果与预期目标相符。重组质粒 pSK-PCV2 经 *Sac* II 酶切后电泳出现两条特异性条带, 大小分别约为 3000 bp 的载体片段和 1800 bp 的 PCV2 全基因; 重组质粒 pSK-2PCV2 经 *Sac* II 酶切后电泳出现两条特异性条带, 大小分别约为 4800 bp 的线性重组质粒 pSK-HS-PCV2 和 1800 bp 的 PCV2 全基因; 重组质粒 pSK-2PCV2 经 *Hind* III 酶切后电泳出现大小为 6500 bp 左右条带, 与线性化的 pSK-2PCV2 大小相符(图 2)。DNA 测序证实重组质粒 pSK-PCV2 和 pSK-2PCV2 中接头连接与预期目标一致, 病毒全基因组正确。

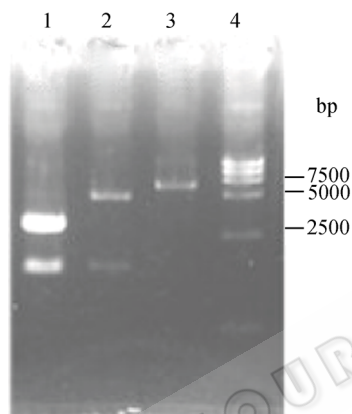


图 2 重组质粒 *Sac* II 和 *Hind* III 酶切图谱

Fig. 2 Recombinant plasmid digested with *Sac* II and *Hind* III. 1: pSK-PCV2 digested with *Sac* II; 2: pSK-2PCV2 digested with *Sac* II; 3: pSK-2PCV2 digested with *Hind* III; 4: DNA marker (DL 15000).

2.2 IFA 检测结果

盲传 10 代的转染重组质粒 pSK-PCV2、pSK-2PCV2、dsPCV2 和 PCV2 SD1 毒株的 PK-15 细胞在荧光显微镜下可观察到特异性荧光。IFA 检测细胞核部位有大量病毒抗原, 细胞质中亦存在少量抗原。但感染 PCV2 SD1 组的 PK-15 细胞的荧光强度和荧光数量要明显高于盲传 10 代的转染组, pSK-PCV2、pSK-2PCV2、dsPCV2 各转染组之间荧光强度和荧光数量相差不大。转染空载体的 PK-15 细胞未见特异性荧光(图 3)。

图 3 转染 PK-15 细胞 IFA 检测结果

Fig. 3 Transfected PK-15 cells detected by IFA. (A) PK-15 cells transfected with pSK-2PCV2. (B) pSK-PCV2. (C) dsPCV2. (D) PK-15 cells infected with PCV2 SD1. (E) pSK.

2.3 RT-PCR 扩增 *Cap* 蛋白基因 mRNA 鉴定目的基因转录

提取转染细胞裂解液总 RNA 后, 分离 mRNA, 经 RT-PCR 扩增后电泳所得条带与预期相同, 大小约 700 bp, 表明转染细胞中有 *Cap* 蛋白基因 mRNA 的表达(图 4)。

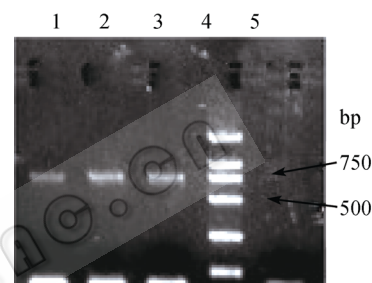


图 4 *Cap* 蛋白基因 mRNA RT-PCR 扩增结果

Fig. 4 RT-PCR amplification results of *Cap* protein gene mRNA. 1, 2, 3, 5: *Cap* of pSK-PCV2(1), pSK-2PCV2(2), dsPCV2(3) and pSK(5); 4: DNA marker (DL 2000).

2.4 透射电镜观察结果

透射电子显微镜下观察到病毒粒子呈圆形, 直径约 17 nm ~20 nm(图 5)。



图 5 电镜下观察到的 PCV2 粒子照片(140 000×), bar=50 nm

Fig. 5 Observed in Electron microscope photographs of PCV2 particles (140 000×), bar= 50 nm.

2.5 亲本病毒与拯救病毒的生长曲线结果

结果见图 6。

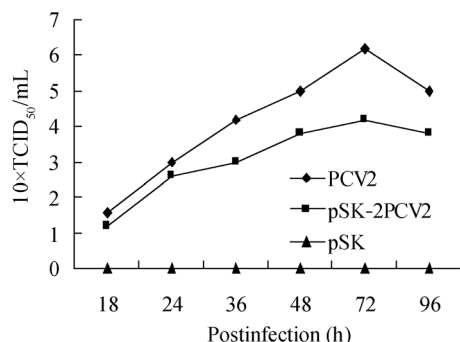


图 6 亲本病毒与拯救病毒的生长曲线

Fig. 6 Virus growth curve indicated postinfection.

3 讨论

PCV2 的基因组呈环形, 共含有 1767 bp, 结构相当紧凑, 存在基因重叠现象。两个主要编码区(*Rep* 和 *Cap*)分别位于复制起始位点(*Ori*)的两侧^[12]。*Ori* 包含一段保守的九核苷酸序列 AAGTATTAC, 序列两侧有一对回文序列, 形成了一个特殊的茎环结构^[13]。鉴于这些特点, 首先在基因组扩增时将含单一酶切位点 *Sac* II 的引物设计在第 496 位核苷酸处, 与 Fenaux 等^[10]和郝鑫等^[14]报道的一致, 由于 *Sac* II 位点在 PCV2 基因组上是唯一的, 且相当保守, 保证了 *Ori* 的完整性, 防止在酶切割、连接等操作时在此造成基因组损伤。经体外转染 PK-15 细胞, 发现构建的含 PCV2 单拷贝的重组质粒在未进行病毒基因组释放、环化等步骤的情况下, 仍能产生出有感染性的病毒粒子。在重组质粒 pSK-PCV2 中, *Ori* 虽未遭破坏但整个基因组已不连续, *Rep* 基因被切割开来, 由此推测可能是由于所用 PK-15 细胞系中具有 *Rep* 蛋白补偿功能, 本课题组正在进行这方面的深入研究。pSK-2PCV2 构建首先将插入的单拷贝进行了改造: 将其中的一个 *Sac* II 酶切位点 PCR 诱变为 *Hind* III 酶切位点, 然后再继续亚克隆, 成功克服了用于构建重组克隆的真核表达质粒载体的拷贝数较低, 使得外源片段相对含量较高, 易于自连的难题, 成功构建串联双拷贝感染性克隆, 此前国内学者由于外源片段易于自连而未构建成功^[14-15], 曹胜波等^[16]将 PCV2 的 ORF2 基因替换猪 I 型圆环病毒(PCV1)的 ORF2 基因, 构建了以 PCV1 基因组为骨架的嵌合病毒(PCV1-2)的分子克隆(pSK2PCV1-2), Liu 等^[17]将 2

个 PCV2 全长基因组一前一后插入载体成功构建 PCV2 感染性克隆, 该克隆包含一分子标记可以区分拯救病毒与亲本病毒。而国外也仅有 Fenaux 等构建成功串联双拷贝感染性克隆, 本研究利用 PCR 诱变成功解决了这一难题, 此法比体外连接双拷贝后再插入载体简单、明确、效率高, 且体外转染后可得到具有感染性的病毒粒子。另外成功构建全长基因组自身环化的产物, 以模拟病毒核酸的天然形式进行转染, 亦可检测到病毒粒子, 与郝鑫等^[14]、芦银华等^[18]报道的一致。

本研究所构建的两种重组质粒所用载体为 pBluescript SK 载体, 在大肠杆菌体内可高拷贝复制。重组质粒获取简单、易行、高效。实验表明利用含双拷贝 PCV2 全基因组重组质粒直接注射猪可以产生完整病毒和病毒血症^[10]。利用重组质粒可直接产生有感染性的病毒粒子, 省略了繁琐的细胞培养及病毒传代工作, 避免病毒在细胞上连续传代产生变异的问题。

本研究将等量的两种感染性分子克隆转染 PK-15 细胞, IFA 检测结果显示, 两者的转染效率相仿, 但感染 PCV2 SD1 组的 PK-15 细胞的荧光强度和荧光数量要明显高于盲传 10 代的转染组, 与曹胜波等^[16]报道的一致。PCV2 基因组小, 易于在核酸水平上进行体外修饰, 从发展疫苗的角度看, 由于 DNA 具有制备简单、稳定性高、易储存运输等优点, 此感染性分子克隆在挑选去除毒力基因后可直接作为 PCV2 基因工程致弱疫苗应用, 也可以此重组质粒为骨架进行进一步的整合改造构建嵌合病毒, 有着广阔的疫苗发展前景。

REFERENCES

- [1] Tischer I, Rasch R. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol(Orig A)*, 1974, **226**(2): 153-167.
- [2] Segales J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev*, 2005, **6**(2): 119-142.
- [3] Mankertz A, Caliskan R, Hattermann K, et al. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet Microbiol*, 2004, **98**(2): 81-88.
- [4] Liu J, Zhu Y, Chen I, et al. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase

- Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. *J Virol*, 2007, **81**(17): 9560–9567.
- [5] Cheung AK. Rolling-circle replication of an animal circovirus genome in a theta-replicating bacterial plasmid in *Escherichia coli*. *J Virol*, 2006, **80**(17): 86–94.
- [6] Steinfeldt T, Finsterbusch T, Mankertz A. Demonstration of nicking joining activity at the origin of DNA replication associated with the rep and rep' proteins of porcine circovirus type 1. *J Virol*, 2006, **80**(13): 6225–6234.
- [7] Misinzo G, Delputte P, Meerts DJ, *et al*. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J Virol*, 2006, **80**(7): 3487–3494.
- [8] Meerts P, Misinzo G, McNeilly F, *et al*. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch Virol*, 2005, **150**(3): 427–441.
- [9] Yu Z, Li J, Cheng KH, *et al*. Isolation and identification of PCV2. *Chin J Vet Med*, 2009, **45**(1): 19–20.
于周, 李俊, 程凯慧, 等. 猪圆环病毒 2 型毒株的分离鉴定. 中国兽医杂志, 2009, **45**(1): 19–20.
- [10] Fenaux M, Halbur PG, 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 Virol*, 2002, **76**(2): 541–551.
- [11] Xu SJ, Li J, Cao S. *et al*. Sequence analysis and construction DNA clone of PCV2. *Chin J Vet Med*, 2009, **45**(1): 21–23.
徐绍建, 李俊, 曹帅, 等. 猪圆环病毒 2 型全序列分析及感染性克隆的构建. 中国兽医杂志, 2009, **45**(1): 21–23.
- [12] Mankertz A, Persson F, Mankertz J, *et al*. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol*, 1997, **71**(3): 2562–2566.
- [13] Ilyina TV, Koonin EV. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**(13): 3279–3285.
- [14] Xi X, Chen HC, Chen HP, *et al*. Cloning of full length genome of porcine circovirus type 2 and identification of the infectivity. *Acta Microbiol Sin*, 2004, **44**(2): 172–176.
郝鑫, 陈焕春, 陈华平, 等. 猪 II 型圆环病毒全基因组的克隆及感染性鉴定. 微生物学报, 2004, **44**(2): 172–176.
- [15] Han LX, Liu JH, Chen Y, *et al*. *In vitro* and *in vivo* infection experiment of infectious PCV2 molecular clone. *Chin J Prev Vet Med*, 2006, **28**(3): 241–270.
韩凌霄, 刘建华, 陈艳, 等. PCV2 感染性分子克隆的制备及体内外感染性试验. 中国预防兽医学报, 2006, **28**(3): 241–270.
- [16] Cao SB, Sun MX, Liu XQ, *et al*. Construction of molecular clone of chimeric porcine circovirus (PCV1-2) and identification of its infectivity. *Acta Microbiol Sin*, 2006, **46**(1): 158–161.
曹胜波, 孙敏轩, 刘雪芹, 等. 嵌合猪圆环病毒 PCV1-2 的构建及其感染性初步鉴定. 微生物学报, 2006, **46**(1): 158–161.
- [17] Liu C, Wei Y, Zhang C, *et al*. Construction and characterization of porcine circovirus type 2 carrying a genetic marker strain. *Virus Res*, 2007, **127**(1): 95–99.
- [18] Lu YH, Hua XG, Cui L, *et al*. Molecular cloning of the infectious genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virol Sin*, 2003, **18**(4): 63–67.
芦银华, 华修国, 崔立, 等. 感染性猪圆环病毒 2 型基因组 DNA 的分子克隆. 中国病毒学, 2003, **18**(4): 63–67.