

猪 2 型圆环病毒 ORF1 与 ORF2 基因和伪狂犬病毒基因的重组与表达的研究

Recombination and Expression of ORF1 and ORF2 Gene of Porcine Circovirus Type 2 and Gene of Pseudorabies Virus

琚春梅, 陈焕春*, 樊惠英, 刘正飞, 曹胜波

JU Chun-Mei, CHEN Huan-Chun*, FAN Hui-Ying, LIU Zheng-Fei and CAO Sheng-Bo

华中农业大学动物医学院病毒室, 武汉 430070

College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

摘 要 根据 GenBank 发布的猪 2 型圆环病毒(PCV2)序列(A Y035820), 设计两对特异性引物, 采用 PCR 方法, 分别扩增了猪 2 型圆环病毒 ORF1 和 ORF2 基因。将 ORF1 和 ORF2 基因的 PCR 产物回收并酶切后, 依次插入到伪狂犬病毒 gE/gI 双缺失通用转移载体 pIECMV 中, 构建了猪 2 型圆环病毒-伪狂犬病毒重组中间转移质粒 pIEORF1-ORF2。采用脂质体介导法, 将重组中间转移质粒 pIEORF1-ORF2 与伪狂犬病毒 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 基因组共转染 IBRS-2 细胞, 待发生细胞病变后收集病毒液进行空斑纯化, 利用检测 PCV2 ORF1 基因和 ORF2 基因的 PCR 方法筛选重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺, 用 Southern blotting 鉴定重组病毒, 并用 Western blotting 检测 ORF1-ORF2 融合蛋白的表达情况, 在此基础上也测定了重组病毒在不同细胞上的增殖滴度。结果表明, 外源基因 ORF1 和 ORF2 已成功插入到 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 亲本株的基因组中, 并获得了表达, 表达的蛋白可与 PCV2 阳性血清发生反应。同时发现 ORF1 和 ORF2 基因的插入不影响重组病毒的增殖特性, 其毒力与亲本株相当。

关键词 猪 2 型圆环病毒, ORF1 基因, ORF2 基因, 伪狂犬病毒, TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0370-05

Abstract ORF1 and ORF2 gene of porcine circovirus type 2 were cloned by PCR with the specific primers designed according to genome of PCV2 (AY035820). Following extraction and digestion, PCR products were subsequently inserted into universal transfer vector pIECMV (deleted partial gE and gI of pseudorabies virus) to generate recombinant transfer plasmid pIEORF1-ORF2. The genomic DNA of PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ strain and pIEORF1-ORF2 were co-transfected into IBRS-2 cells with lipofectin, and recombinant virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ was selected by PCR with ORF1 gene and ORF2 gene primers respectively. The recombinant virus was analyzed with Southern blotting and Western blotting. The results indicated that ORF1 and ORF2 gene of PCV2 had been inserted into the genome of TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ strain and the expressed ORF1-ORF2 fusion protein could react with PCV2 positive sera. Result of virus titers detection showed the insertion of ORF1 and ORF2 gene did not influence propagation of recombinant virus.

Key words porcine circovirus type 2, ORF1 gene, ORF2 gene, pseudorabies virus, TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺

Received: December 6, 2004; Accepted: March 17, 2005.

This work was supported by grant from the National High Technology Research and Development Program (No. 2001AA213051).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87282608; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn or juchunmei7625@163.com

国家高技术研究发展计划基金资助项目(No. 2001AA213051).

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)是近年来兽医界广泛关注的发现的新病毒之一。该病毒基因组为环状单链 DNA,大小约为 1.7kb,病毒粒子无囊膜,呈二十面体对称,直径约为 17nm^[1]。1995 年,国际病毒分类委员会第六次病毒分类报告将其与鸡传染性贫血病毒(CAV)和鸚鵡喙羽病毒(BFDV)共同归属于圆环病毒科。目前认为 PCV 有两种血清型:PCV1 和 PCV2,其中 PCV1 是 Tisher 等于 1974 年在 PK-15 细胞(ATCC CCL31)中发现,它不引起可见的细胞病变(cytopathogenic effect, CPE),感染猪后也不出现临床症状,而 PCV2 与猪的多种疾病综合征有关,特别是断奶仔猪多系统衰竭综合征(post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)。PMWS 是由 Clark 于 1991 年在加拿大的猪群中发现^[2],其后在美国、法国、西班牙、北爱尔兰、日本均有报道,该病严重影响猪的生长发育,给养猪业造成巨大的经济损失。目前,尚无商品化疫苗可用于该病的防制。

伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)属疱疹病毒科、 α 疱疹病毒亚科,是引起猪繁殖障碍的主要病原之一。该病毒基因组庞大,含有多个可缺失的病毒增殖非必需的基因,可供外源基因插入,插入外源基因的重组病毒在增殖的同时可稳定表达外源基因,从而提供对伪狂犬病毒和其它相应传染病的抵抗力。目前该病毒已成为多价基因工程疫苗的理想活病毒载体。迄今为止,已有多种标记基因和致病微生物的中和抗原基因在该病毒中获得稳定表达,最引人注目的是表达猪瘟病毒主要保护性抗原 E2 基因的重组伪狂犬病毒,目前,该疫苗株的遗传稳定性、外源基因对病毒增殖的影响以及生物安全性均已得到论证,有望投入生产实践^[3,4]。

猪 2 型圆环病毒含有两个最大的开放阅读框:ORF1 和 ORF2,其中 ORF1 编码与病毒复制有关的 Rep(35kD)和 Rep'蛋白(19kD),Pogranichnyy 研究表明 35kD 蛋白可能与 PCV2 中和抗体的产生有关;ORF2 基因是其主要结构蛋白基因,编码病毒的衣壳蛋白。Nawagitgul^[5]应用杆状病毒表达系统表达出了完整的 ORF2 蛋白,并观察到此蛋白可自我装配成病毒样粒子。Blanchard 等^[6]对 PCV2 ORF1 和 ORF2 基因 DNA 疫苗和亚单位疫苗研究发现,无论是 DNA 疫苗还是亚单位疫苗都可抵抗 PCV2 强毒的攻击,具有很好的免疫保护效果,且亚单位疫苗可诱导中和抗体的产生。本研究旨在克隆猪 2 型圆环病毒的 ORF1 和 ORF2 基因,并以此二基因替代伪狂犬病毒 Ea 株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 突变株中的 LacZ 基因,构建猪

2 型圆环病毒-伪狂犬病毒重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺,为猪 2 型圆环病毒-伪狂犬病毒二价基因工程疫苗的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

E. coli DH5 α 由本研究室保存,伪狂犬病毒 gE/gI 双缺失通用转移载体 pIECMV 由本室方六荣博士构建,伪狂犬病毒 Ea 株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 突变株由本研究室构建并保存。IBRS-2 细胞、Marc-145 细胞由本研究室保存,鸡胚成纤维细胞由本研究室制备。限制性内切酶,T4 DNA 连接酶,Taq DNA 聚合酶均购自大连宝生物工程有限公司,DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程公司,脂质体转染试剂盒为 GIBCO 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及 PCR 扩增:根据 GenBank 发布的 PCV2 序列(AY035820)设计两对引物分别扩增 PCV2 ORF1 和 ORF2 基因,其中 P1(5'-tct ggatccatgccagcaagaagaatgga-3')、P2(5'-ttgaattcgtaatttattcatatgg-3')为 ORF1 基因引物,P3(5'-tttcaattgaatggcatcttcaacacc-3')、P4(5'-tttactagtcacttagggtaagtgg-3')为 ORF2 基因引物。扩增 ORF1 基因的模板为含有 PCV2 ORF1 基因的重组质粒 pETORF1,扩增 ORF2 基因的模板为本室构建的包含猪 2 型圆环病毒豫 A 株全基因组的重组质粒 pT-PCV^[7],PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 猪 2 型圆环病毒-伪狂犬病毒重组中间转移质粒的构建:用 DNA 胶回收试剂盒回收 ORF1 和 ORF2 基因的 PCR 产物。ORF1 基因经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后插入到 gE/gI 双缺失通用转移载体 pIECMV 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点之间,构建重组质粒 pIEORF1。然后将 ORF2 基因用 *Mun*I 和 *Spe*I 酶切后插入到 pIEORF1 质粒 ORF1 基因下游的 *Eco*R I 和 *Xba*I 位点之间,从而构建重组中间转移质粒 pIEORF1-ORF2。

1.2.3 猪 2 型圆环病毒-伪狂犬病毒重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 的构建:提取 PRV Ea 株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 突变株基因组,用 *Eco*R I 酶切后,采用脂质体介导法将其与 pIEORF1-ORF2 共转染 IBRS-2 细胞,待细胞病变后,进行空斑纯化,用 PCV2 ORF1 和 ORF2 引物分别对挑取的空斑进行 PCR 扩增,以筛选重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ (图 1)。当重组病毒阳性率为 100% 时,再用该病毒进行

一次空斑纯化,随机挑取 50 个空斑,用 PCV2 ORF1 基因、ORF2 基因引物及 LacZ 基因引物分别对挑取的空斑进行 PCR 扩增,以鉴定重组病毒的纯度。

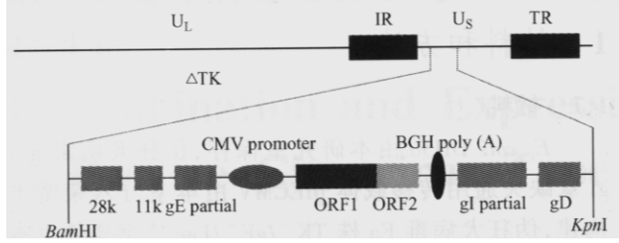


图 1 重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 的基因组结构示意图

Fig. 1 Genomic map of recombinant pseudorabies virus

TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺

PRV genomic DNA is approximately 150kb including a unique long region (U_L), a unique short region (U_S), internal repeat (IR) and terminal repeat (TR). ΔTK represents the deleted thymidine kinase gene. Recombinant pseudorabies virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ was constructed by homologous recombination between the attenuated PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ and pIEORF1-ORF2. 28K, 11K, gE, gI and gD gene are the homologous arm for recombination.

1.2.4 重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 的 Southern blotting 分析:按参考文献 [8] 提取亲本株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 及重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 基因组。在进行 Southern blotting 分析时,若以 ORF1 基因作探针,则分别用 BamHI 和 KpnI 单酶切亲本株及重组病毒基因组,若以 ORF2 基因作探针,则分别用 SphI 和 KpnI 单酶切亲本株及重组病毒基因组,并用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳、转膜。分别利用 PCV2 ORF1 和 ORF2 基因制备地高辛标记的 DNA 探针,按照地高辛标记试剂盒说明书进行杂交、检测。

1.2.5 重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 中 ORF1-ORF2 融合蛋白的表达分析:重组病毒 TK⁻/

gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 中 ORF1-ORF2 融合蛋白的表达通过 Western blotting 进行检测。具体步骤为:将亲本株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 及重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 分别接种长满单层的 IBRS-2 细胞,待细胞完全病变后收集病变细胞,加入适当体积的 PBS(pH7.4) 悬浮,再加入等体积的 2 × SDS 样品缓冲液,于 100℃ 煮沸 10min 后,通过 12% SDS-PAGE 电泳、转膜,然后将硝酸纤维素膜用含 1% BSA 的 TBST 封闭,经 TBST 洗涤后,加入猪抗 PCV2 阳性血清,于 37℃ 作用 30min,同上用 TBST 洗膜 3 次后,再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG, 37℃ 作用 30min,最后用 TBST 洗膜 3 次后,再用 TBS 洗膜 2 次,将膜转入显色液中显色。

1.2.6 重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 及亲本株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 在不同细胞上的增殖滴度测定:分别用 IBRS-2 细胞、Marc-145 细胞及鸡胚成纤维细胞 (CEF) 测定重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 及亲本株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 的半数组织细胞感染量 (TCID₅₀), 比较不同细胞对两种病毒的敏感性及其两种病毒的 TCID₅₀ 结果有无差异。

2 结果

2.1 重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 的构建

采用脂质体介导法将 PRV Ea 株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 突变株基因组与 pIEORF1-ORF2 共转染 IBRS-2 细胞,发生细胞病变后收集病毒液,进行空斑纯化。当重组病毒阳性率为 100% 时,再进行一次空斑纯化,随机挑取 50 个空斑,利用 PCR 方法从重组病毒中只能扩增到 PCV2 ORF1 和 ORF2 基因,而不能扩增到 LacZ 基因,表明已成功构建了重组病毒

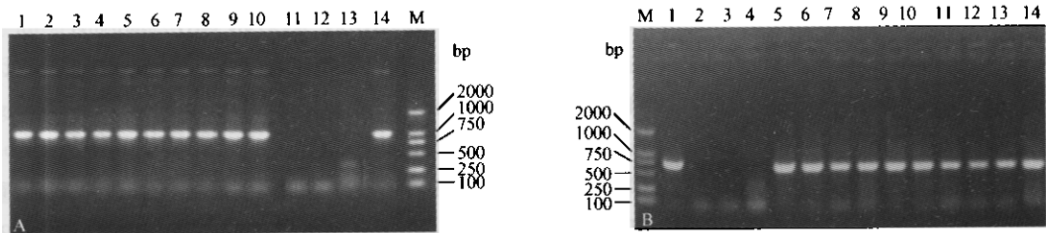


图 2 重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 中 ORF1 和 ORF2 基因的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of ORF1 and ORF2 gene from recombinant virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ by PCR

A: Identification of the ORF1 gene from recombinant virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ by PCR

1 ~ 10: recombinant virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺; 11: patent virus TK⁻/gE⁻/LacZ⁺; 12: IBRS-2 cells control; 13: water control; 14: positive control; M: DL2000 DNA marker.

B: Identification of the ORF2 gene from recombinant virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ by PCR

1: positive control; 2: water control; 3: IBRS-2 cells control; 4: patent virus TK⁻/gE⁻/LacZ⁺; 5 ~ 14: recombinant virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺; M: DL2000 DNA marker.

TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺, 且重组病毒中无亲本株污染(图 2)。

2.2 重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1 - ORF2⁺ 的 Southern blotting 分析

用 ORF1 基因作探针进行 Southern blotting 检测时,重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1 - ORF2⁺ 无论是用 *Kpn* I 酶切,还是用 *Bam*H I 酶切,都可见明显的杂交带,大小分别为 6.5kbp 和 7.3kbp,而亲本株用

Kpn I 和 *Bam*H I 分别酶切都无特异性杂交带出现。用 ORF2 基因作探针进行分析时,重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 用 *Kpn* I 和 *Sph* I 分别酶切,都可见明显的杂交带,大小分别为 6.5kbp 和 7.5kbp,与预期大小相符,而亲本株用 *Kpn* I 和 *Sph* I 分别酶切都无特异性杂交带出现。表明 PCV2 ORF1 和 ORF2 基因已插入到伪狂犬病毒基因组中去(图 3)。

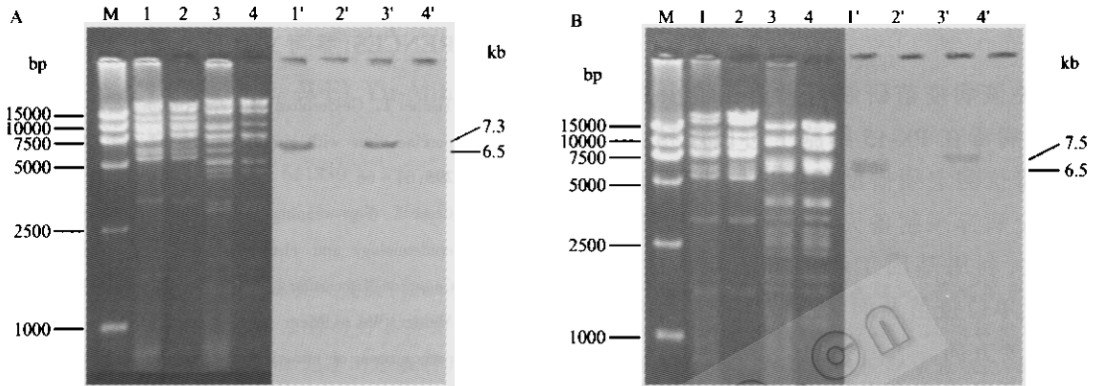


图 3 重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 的 Southern blotting 分析

Fig.3 Analysis of recombinant virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ by Southern blotting

A: analysis of recombinant virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ using ORF1 gene as a probe
 M: DL15000 DNA marker;
 1: TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ + *Kpn* I ;
 2: TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ + *Kpn* I ;
 3: TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ + *Bam*H I ;
 4: TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ + *Bam*H I .
 1', 2', 3', 4' was the result of southern blotting of 1, 2, 3, 4.

B: analysis of recombinant virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ using ORF2 gene as a probe
 M: DL15000 DNA marker;
 1: TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ + *Kpn* I ;
 2: TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ + *Kpn* I ;
 3: TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ + *Sph* I ;
 4: TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ + *Sph* I .
 1', 2', 3', 4' was the result of southern blotting of 1, 2, 3, 4.

2.3 重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 中 ORF1-ORF2 融合蛋白的表达分析

将亲本株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 及重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 分别接种长满单层的 IBRS-2 细胞,待细胞完全病变后收集病变细胞进行 Western blotting 分析,结果重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 在 58kD 处出现一条特异性带,大小与预期结果相符,而亲本株无此特异性带出现,表明 ORF1-ORF2 融合蛋白在重组病毒中得到了表达(图 4)。

2.4 重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 及亲本株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 在不同细胞上的增殖滴度测定

用 IBRS-2 细胞、Marc-145 细胞及鸡胚成纤维细胞分别测定同一批次的重组病毒及亲本株的 TCID₅₀,结果见表 1。由表 1 可以看出不同细胞对重组病毒及亲本株的敏感程度由强到弱依次为 IBRS-2 细胞、Marc-145 细胞、鸡胚成纤维细胞(CEF),并且重组病毒及亲本株在同一细胞上的增殖滴度基本相当,表明 PCV2 ORF1 和 ORF2 基因的插入不影响伪

狂犬病毒的增殖。

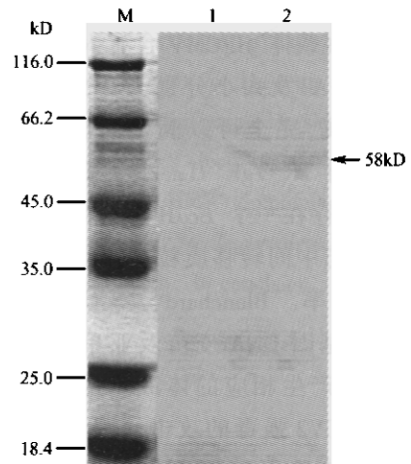


图 4 Western blotting 检测重组病毒中 ORF1-ORF2 融合蛋白的表达

Fig.4 Identification of ORF1-ORF2 fusion protein expression of recombinant virus by Western blotting

M: standard molecular marker; 1: patent virus TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ ;
 2: recombinant virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ .

表 1 重组病毒 TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ 及亲本株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 在不同细胞上的增殖滴度
Table 1 The propagated titer of recombinant virus TK⁻/gE⁻/gI⁻/ORF1-ORF2⁺ and parent virus TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ in different cells

Virus strain	IBRS-2	Marc-145	CEF
TK ⁻ /gE ⁻ /gI ⁻ /ORF1-ORF2 ⁺	10 ^{-7.86} /mL	10 ^{-7.02} /mL	10 ^{-6.45} /mL
TK ⁻ /gE ⁻ /LacZ ⁺	10 ^{-7.93} /mL	10 ^{-7.10} /mL	10 ^{-6.38} /mL

3 讨论

目前,有关该病疫苗研制的报道还很少。猪 2 型圆环病毒全病毒在 PK-15 细胞上可以增殖,但增殖滴度不高,毒价测定须借助免疫过氧化物酶单层试验,因此用全病毒来制备灭活疫苗,操作繁琐,成本高。基于此,利用基因工程的方法获得的疫苗(DNA 疫苗、亚单位疫苗及病毒活载体疫苗)将成为防治该病的重要方向。

伪狂犬病毒属疱疹病毒科、 α 疱疹病毒亚科,宿主范围广,且不感染人,在宿主细胞内的增殖能力较强,病毒基因组中含有多个病毒增殖所非必需的可缺失的基因,可供外源基因的插入。由于伪狂犬病毒基因组长达 150kb,因此外源基因不能采用常规的重组技术直接在体外插入到病毒基因组中,同源重组已被证实是将外源基因导入的一种十分有效的方法^[9]。同源重组的前提是构建转移质粒,一个好的转移质粒必须具有较强的启动子、有效的 poly(A) 以及足够长的两端同源侧翼。本研究所用的 gE/gI 双缺失通用转移载体 pIECMV 含有人巨细胞启动子 CMV、BGH poly(A) 及大小分别为 2.5kb 和 0.8kb 的上下游同源侧翼,完全可以满足同源重组的需要。同时伪狂犬病毒 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 突变株基因组中仅在 LacZ 基因中存在一个 EcoR I 位点,用 EcoR I 酶切该基因组后与中间转移质粒共转染时可大大提高同源重组的效率。Blanchard^[6] 等研究表明 PCV2 ORF1 和 ORF2 基因 DNA 疫苗及亚单位疫苗免疫猪后,都可使猪体产生相应的体液免疫及细胞免疫应答,且可抵抗 PCV2 强毒的攻击。因此,本研究利用 PCR 方法成功克隆了猪 2 型圆环病毒的 ORF1 和 ORF2 基因,并以此构建了猪 2 型圆环病毒-伪狂犬

病毒重组病毒, Southern blotting 分析表明 PCV2 ORF1 和 ORF2 基因已插入到伪狂犬病毒基因组中, Western blotting 表明 PCV2 ORF1/ORF2 融合蛋白得到了表达,且表达蛋白具有免疫学活性,可与 PCV2 阳性血清反应。在进一步研究中,我们将对重组病毒对猪的安全性及保护力进行研究,以期研制出一种有效的基因工程疫苗用于猪伪狂犬病及猪 2 型圆环病毒感染的防制,以达到一针防两病的目的。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W A *et al.* A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 1982, **295**:64 - 66
- [2] Clark E. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. *Proceeding of the Western Canadian Association of Swine Practitioners*, 1996, pp. 22 - 25
- [3] Mulder WA, Priem J, Glazenburg KL *et al.* Virulence and pathogenesis of non-virulent and virulent strains of pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *Journal of General Virology*, 1994, **75**:117 - 124
- [4] Iddekinge HV, Wind ND, Wensvoort G. Comparison of the protective efficacy of recombinant pseudorabies viruses against pseudorabies and classical swine fever in pigs; influence of different promoters on gene expression and on protection. *Vaccine*, 1996, **14** (1): 1 - 12
- [5] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR *et al.* Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology*, 2000, **81**:2281-2287
- [6] 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. *Vaccine*, 2003, **21**:4565 - 4575
- [7] Cao SB(曹胜波), Chen HC(陈焕春), Xiao SB(肖少波). Cloning and sequencing of the complete genome of porcine circovirus type 2 Yu A strain. *Chinese Journal of Virology (病毒学报)*, 2000, **18**(2):137 - 141
- [8] Chen HC(陈焕春), Zhou FC(周复春), Fang LR(方六荣) *et al.* Construction of pseudorabies virus Ea strain with the genotype TK-/gG-/LacZ+. *Chinese Journal of Virology (病毒学报)*, 2001, **17**:69 - 74
- [9] Fuchs W, Bauer B, Mettenleiter TC. A novel intergenic site for intergeneration and expression of foreign genes in the genome pseudorabies virus. *Journal of Virology*, 1994, **46**(1): 95 - 105