

猪圆环病毒Ⅱ型河南地方株 ORF3 的克隆及原核表达

郑 鸣, 李华玮, 边传周, 王永芬, 王老七*

(河南牧业经济学院, 河南 郑州 450011)

摘要: 为获得猪圆环病毒Ⅱ型 ORF3 编码蛋白, 研究该蛋白的特性及功能, 根据 GenBank 数据库中 PCV Ⅱ的基因组序列设计引物, 利用 PCR 从病料基因组 DNA 中扩增 PCV Ⅱ河南地方株 ORF3, 将其克隆至表达载体 pET-32a 中进行诱导表达, SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白表达情况, 采用 Ni⁺ NTA 亲和纯化表达产物, 透析复性后免疫日本大白兔制备多抗血清, 并采用 ELISA 和 Western blot 方法检测多抗血清的效价和特异性。结果显示, PCR 扩增获得全长 315 bp 的 ORF3, 重组质粒经测序和双酶切证实构建正确; SDS-PAGE 结果显示, ORF3 能够在大肠杆菌中表达, 产物的分子量约为 30 ku, 以包涵体形式存在; 纯化的重组蛋白具有较好的抗原性, 制备的多抗血清抗体效价达 1 : 12 800 以上, 抗体特异性高, 能与表达的 ORF3 编码蛋白结合。成功克隆了 PCVⅡ河南地方株 ORF3 并实现原核表达, 获得纯化的重组 ORF3 编码蛋白。

关键词: 猪圆环病毒Ⅱ型; ORF3; 原核表达; 多抗血清

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)10-0123-05

Cloning and Prokaryotic Expression of ORF3 of Porcine Circovirus Type Ⅱ from Henan Strain

ZHENG Ming, LI Hua-wei, BIAN Chuan-zhou, WANG Yong-fen, WANG Lao-qi*

(Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450011, China)

Abstract: The research aimed to obtain the recombinant ORF3 protein of porcine circovirus type Ⅱ (PCV Ⅱ) to further research the characteristics and functions of ORF3 protein. According to the genomic sequence of PCV Ⅱ from GenBank, a pair of specific primers were designed. The ORF3 of Henan strain was amplified from pathological samples suspected PCV Ⅱ infection by PCR. Then the gene was cloned into prokaryotic expression vector pET-32a for expression in *E. coli* BL21(DE3). The expression product was purified by Ni⁺ NTA and refolded by dialysis. Japan white rabbits were immunized with the refolded recombinant ORF3 protein to generate polyclonal antiserum. The titer and specificity of the antiserum were detected respectively by ELISA and Western blot. The ORF3 of PCV Ⅱ, which was 315 bp in length, was amplified by PCR. Restriction enzyme digestion and sequencing proved that recombinant plasmid pET32a-ORF3 was constructed correctly. SDS-PAGE analysis showed that the ORF3 gene could express in *E. coli* BL21(DE3) and the expression product of ORF3 was about 30 ku, mainly in form of inclusion bodies. The purified recombinant ORF3 protein had good antigenicity. The specificity of polyclonal antiserum was high, and the titer could be above 1 : 12 800. The ORF3 of PCV Ⅱ from Henan strain was successfully cloned and prokaryotic expression, which laid foundation for further

收稿日期: 2014-05-20

基金项目: 河南省高等学校青年骨干教师资助计划项目(2011GGJS-192)

作者简介: 郑 鸣(1975-), 男, 河南固始人, 讲师, 硕士, 主要从事畜禽疾病防治及诊断技术的研究。

E-mail: floatingzm@163.com

* 通讯作者: 王老七(1973-), 河南中牟人, 副教授, 硕士, 主要从事猪病防控及猪场管理研究。E-mail: tianyigaoke@163.com

research on the characteristics and functions of ORF3 protein.

Key words: porcine circovirus type II; ORF3; prokaryotic expression; polyclonal antiserum

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)是一种无囊膜单链环状负链 DNA 病毒^[1],分为 2 个血清型:PCV I 和 PCV II,其中 PCV II 具有致病性,是一种重要的病原微生物,能够引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)、猪皮炎肾病综合征(PDNS)和增生性坏死性肺炎(PNP)等多种疾病^[2-5]。PCV II 在我国猪群普遍存在,且其持续感染会引起猪群免疫抑制,PCV II 同猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪细小病毒(PPV)、猪伪狂犬病毒(PRV)等病原体混合感染的现象严重^[6-9],给我国养猪业造成了巨大危害,影响了养猪业的健康发展,因此,对其致病机制的研究显得尤为重要。

研究表明,PCV II 基因组全长约 1.7 kb,存在 11 个开放阅读框(ORF1—ORF11)。其中,ORF1 编码参与病毒复制的 Rep 蛋白,在与 PRRSV 共感染中发挥重要作用^[10-11];ORF2 编码病毒的衣壳蛋白 Cap,是 PCV II 主要致病基因,可诱导免疫保护,也是基因工程疫苗研制的主要候选基因^[12-14];ORF3 编码一种非结构蛋白^[15-17];ORF4—ORF11 编码的蛋白功能尚不清楚。ORF3 位于 PCV II 基因组互补链上 ORF1 基因的内部,呈逆时针方向排列,全长由 315 个核苷酸构成,编码 104 个氨基酸^[18],而其编码蛋白的结构与功能目前尚不完全清楚。Liu 等^[19]研究发现,ORF3 编码蛋白在 PK-15 细胞培养中与病毒复制无关,但能够通过激活 Caspase-8 和 Caspase-3 途径诱导 PK-15 细胞凋亡;进一步研究发现,ORF3 编码蛋白能够影响动物细胞 p53(肿瘤抑制因子)基因的表达水平而诱导细胞凋亡^[15]。国内学者^[16]研究发现,ORF3 缺失株比野毒株对小鼠的淋巴器官致病力低,ORF3 编码蛋白虽然与病毒复制无关,但与病毒的致病性密切相关。

鉴于 ORF3 编码蛋白生物学功能的重要性,本研究将 ORF3 构建到原核表达载体中,转入大肠杆菌 BL21(DE3)中以实现 ORF3 的高效表达,为进一步研究 ORF3 编码蛋白的生物学功能和 PCV II 病毒致病的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源 猪病料组织由郑州牧业经济学

院大成动物生物技术研究提供,取自河南省卫辉、商丘等地 3 个猪场的疑似 PMWS 病死猪。

1.1.2 供试动物 日本大白兔由郑州牧业经济学院实验动物中心提供。

1.1.3 菌株、质粒和试剂 大肠杆菌 BL21(DE3)和原核表达载体 pET-32a 由四川大学生命科学学院微生物实验室徐辉博士惠赠;pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、DL2000 Marker、低分子量蛋白质 Marker 均购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、胶回收试剂盒及质粒 DNA 小提试剂盒购自北京天根公司;Ni²⁺ 金属螯合层析柱 HisTrap HP 购自 GE 公司;PVDF 膜购自 Roche 公司;其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 病料基因组 DNA 的制备 取疑似 PMWS 病料的淋巴结组织 0.1 g,用 PBS 冲洗 1~2 次,加入 600 μ L 组织匀浆缓冲液,研磨形成匀浆,8 000 r/min 离心 2 min,弃上清;向沉淀中加入 600 μ L 组织裂解液(含蛋白酶 K,终浓度 50 μ g/mL),55 $^{\circ}$ C 消化过夜;冷却至室温,用等体积的 Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 1 次,吸取上层水相;加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇,室温沉淀 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清;用 70%乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清;沉淀干燥后溶于 30 μ L TE 缓冲液中,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 引物设计及 ORF3 的克隆鉴定 参照 GenBank 数据库中 PCV II 中国株基因组序列(DQ195679.1),针对其编码框(315 bp)设计 1 对引物,上游引物为:5'-CCCTCGAGCTGATCGAATGTGGAGCTCC-3';下游引物为:5'-CGG-GATCCATGGTAACCATCCCACCACT-3',其中下划线部分为 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切位点序列,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以病料基因组 DNA 为模板扩增 ORF3,PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,52 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 扩增结束后,进行电泳检测,切胶回收纯化 PCR 产物,并连接到载体 pMD18-T 中,构建 pMD18-T-ORF3 重组质粒,转化 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆送生工生

物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定。

1.2.3 原核表达载体 pET-32a-ORF3 的构建及诱导表达 将 1.2.2 中经测序鉴定的重组质粒用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切,回收小片段,与经相同酶双酶切的表达载体 pET-32a 连接,构建表达载体 pET-32a-ORF3,转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,PCR 筛选阳性克隆进行诱导表达。表达条件:37 °C、180 r/min 将重组菌振荡培养至 $OD_{600}=0.8\sim 1.0$ 时,加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L,诱导 4 h,取少量菌液进行 SDS-PAGE 电泳分析,检测 ORF3 编码蛋白表达情况。

1.2.4 重组蛋白的纯化及复性 取诱导表达克隆菌液,离心收集菌体沉淀,用冰冷的 PBS 缓冲液洗涤菌体 1 次,按 1:10(m/V)的比例用裂解缓冲液(20 mmol/L PB、150 mmol/L NaCl, pH 值 7.4)重悬菌体,冰浴条件下超声波破碎,4 °C、8 000 r/min 离心 30 min,弃上清,沉淀即为融合蛋白包涵体;依次用 0.5% Triton X-100 和 1 mol/L 尿素洗涤包涵体;最后,用变性液(20 mmol/L PB、150 mmol/L NaCl、6 mol/L 尿素、20 mmol/L 咪唑, pH 值 7.4)溶解包涵体,4 °C、8 000×g 离心 30 min,收集上清即为纯化的包涵体溶液。采用 Ni²⁺ 金属螯合层析柱 HisTrap HP(GE healthcare)对包涵体溶液进行进一步纯化,收集 200 mmol/L 的洗脱峰,测定蛋白质含量,并进行 SDS-PAGE 检测。采用透析法进行包涵体复性,用变性液将包涵体溶液稀释至 0.5 mg/mL,装入透析袋中,进行梯度透析,条件如下:复性液+4 mol/L 尿素 4 °C 透析 4 h;复性液+2 mol/L 尿素 4 °C 透析 4 h;复性液 4 °C 透析 24 h(复性液主要成分为 50 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L EDTA、150 mmol/L NaCl、10% 甘油、1 mmol/L GSH、6 mmol/L GSSG, pH 值 8.5)。透析结束后,离心取上清,并用超滤管浓缩。

1.2.5 重组蛋白多抗血清的制备及效价测定 将复性后的重组蛋白(约 1 mg)与弗氏完全佐剂按 1:1 的体积比混匀,进行皮下多点注射日本大白兔。14 d 后以等量蛋白质和等体积弗氏不完全佐剂加强免疫,然后每半个月加强 1 次。第 4 次免疫后,抽取兔子心脏血液获得抗血清,-20 °C 保存备用。采用间接 ELISA 检测抗血清效价:以纯化蛋白质为抗原包被 96 孔板,用 PBST(PBS 溶液加入 1%的 Tween-20)对多抗血清分别进行 1:200、1:400、1:600、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800 倍稀释,各稀释度的血清取 100 μL 加入 96 孔板,同时设置阴性

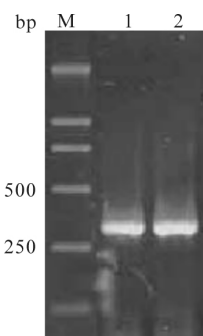
对照孔,37 °C 孵育 1 h 后洗涤,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗,37 °C 孵育 1 h 后洗涤,加入 TMB 显色剂,37 °C 避光显色 15 min,最后加入终止液终止反应,酶标仪测量 450 nm 波长处的吸光值。

1.2.6 重组蛋白的 Western blot 鉴定 将 SDS-PAGE 电泳分离后的蛋白质条带转移到 PVDF 膜上,用封闭液(含 1.5% BSA 的 TBST)封闭过夜, TBST 漂洗 5 次;加入兔抗 ORF3 蛋白多抗血清,37 °C 孵育 1 h,用 TBST 充分洗膜;再加入 HRP 标记的羊抗兔二抗,37 °C 孵育 1 h,用 TBST 充分洗膜;DAB 避光显色。

2 结果与分析

2.1 ORF3 的扩增及序列分析

以病料基因组 DNA 为模板,以 ORF3 特异性引物进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析,可见清晰的单一条带,且与 ORF3 315 bp 的长度相符合(图 1)。经克隆测序发现,扩增片段的序列与 PCV II 中国株序列(DQ195679.1)完全一致;通过 NCBI 中 BLAST 序列比对发现,该基因与 GenBank 中国内外参考毒株核苷酸同源性在 98%~100%。

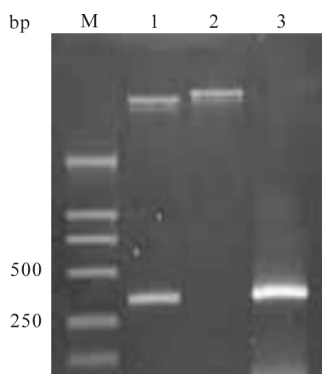


M. DL2000 Marker; 1—2. ORF3 的 PCR 扩增产物

图 1 ORF3 的 PCR 扩增结果

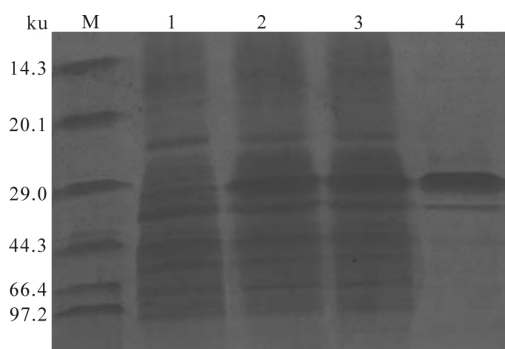
2.2 原核表达载体 pET-32a-ORF3 的构建及诱导表达

对重组质粒 pET-32a-ORF3 进行 PCR 扩增和酶切鉴定,结果显示,PCR 扩增产物与酶切产物大小完全一致(图 2),表明原核表达载体 pET-32a-ORF3 构建成功。测序结果表明,克隆至原核表达载体中的 ORF3 未发生突变,插入方向和位置与预期一致。筛选阳性克隆进行诱导表达,采用 SDS-PAGE 分析表达情况,结果显示,ORF3 在大肠杆菌中能高效表达,产物大小约 30 ku,与预期相符,而未诱导的对照则没有相应条带(图 3)。



M, DL2000 Marker; 1. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切;
2. 未酶切的重组质粒; 3. 重组质粒的 PCR 产物

图 2 重组质粒 pE-T32a-ORF3 的酶切及 PCR 鉴定



M, 低分子量蛋白 Marker; 1. 未诱导表达对照; 2—3. pET32a-ORF3 诱导表达; 4. 纯化后的 ORF3 编码蛋白

图 3 SDS-PAGE 检测 ORF3 编码蛋白表达及纯化结果

2.3 ORF3 重组蛋白的纯化及复性

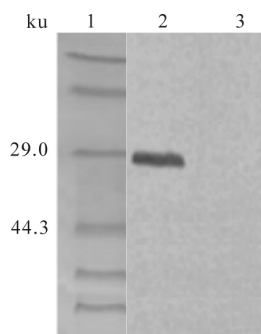
表达产物经超声波破碎、洗涤和变性溶解等纯化步骤后获得重组蛋白包涵体溶液,再经 Ni^{2+} 柱纯化,收集洗脱进行 SDS-PAGE 电泳检测,纯度达到 90% 以上(图 3),采用 Bradford 法测定蛋白质质量浓度为 1.816 mg/mL。将纯化的重组蛋白进行梯度透析复性,逐步去除包涵体溶液中的尿素,获得稳定的重组 ORF3 编码蛋白。

2.4 重组蛋白 ORF3 多抗血清的制备及效价测定

将制备的重组蛋白 ORF3 多抗血清用 PBST 稀释成不同浓度,采用间接 ELISA 方法检测多抗血清效价,结果显示,4 免后制备的多抗血清效价可达到 1:12 800 以上。

2.5 重组 ORF3 蛋白的 Western blot 鉴定

Western blot 分析结果显示,重组 ORF3 蛋白能与兔抗 ORF3 多抗血清发生特异性反应,形成一阳性条带,而对照 pET-32a 则在相应位置无条带(图 4)。表明原核表达的 ORF3 编码蛋白具有良好的免疫原性,而制备的多抗血清具有较好的特异性。



1. 低分子量蛋白 Marker; 2. ORF3 编码蛋白; 3. 阴性对照

图 4 重组 ORF3 蛋白的 Western blot 鉴定结果

3 讨论

基因克隆与表达是获得蛋白质并进行蛋白质结构与功能研究的前提。本研究根据 GenBank 中 PCV II 中国株基因组序列(DQ195679.1)设计 1 对特异性引物,成功从采自河南省周边县市的疑似 PMWS 病料中扩增出完整的 ORF3,序列测定结果显示,该基因序列与 PCV II 中国株基因组序列完全一致,与 GenBank 中国内外参考毒株核苷酸同源性在 98%~100%,表明 PCV II ORF3 序列高度保守。将 ORF3 构建到原核表达载体 pET-32a 后,该基因能够在大肠杆菌 BL21(DE3)细胞内表达,表达蛋白以包涵体形式存在,这主要是因为表达蛋白发生了错误折叠而引起的。为了获得具有活性的重组蛋白,将大量表达的 ORF3 编码蛋白经超声波破碎和离心后,获得包涵体沉淀,采用表面活性剂洗涤和低浓度尿素洗涤包涵体可以除去较多的杂蛋白质,于变性条件下进行 Ni^{2+} 柱纯化,可获得纯度达 90% 以上的重组蛋白。通过调整复性液中 GSH/GSSG 的浓度比例、添加适当浓度的甘油、梯度透析等手段优化复性条件,获得稳定的 ORF3 编码蛋白溶液。以复性后的蛋白溶液免疫日本大白兔,获得 ORF3 编码蛋白多抗血清,应用 ELISA 和 Western blot 检测结果表明,制备的多抗血清具有较高的效价和良好的特异性,为深入研究 ORF3 编码蛋白在 PCV II 病毒增殖、传播、病毒致病性和病毒与宿主相互作用中的功能,揭示 ORF3 编码蛋白与 PCV II 病毒致病的分子机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Hamel A L, Lin L L, Nayar G P, et al. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. J Virol, 1998, 72(6): 5262-5267. (下转第 140 页)

- [21] Kellogg R L, Lander C H, Moffitt D C, *et al.* Manure nutrients relative to the capacity of cropland and pastureland to assimilate nutrients: spatial and temporal trends for the United States[R]. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service and Economic Research Service, 2000; 48-52.
- [22] Saam H, Mark J M, Jackson-Smith D B, *et al.* Use of animal density to estimate manure nutrient recycling ability of Wisconsin dairy farms[J]. *Agricultural Systems*, 2005, 84(3): 343-357.
- [23] 张震, 司友斌, 谷勋刚, 等. 巢湖流域规模化养殖场畜禽粪便污染负荷研究——以居巢区为例[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(15): 7159-7161.
- [24] 王新谋. 家畜粪便学[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 1997.
- [25] 国家环境保护总局. GB 18596—2001 畜禽养殖业污染物排放标准[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [26] 袁彩凤, 张飞, 张粉如, 等. 河南省畜禽养殖污染对环境的影响研究[J]. *中国人口·资源与环境*, 2012(5): 44-48.
- [27] 王依贺, 单东方, 赵春江, 等. 北京市大兴区农业面源污染普查数据应用分析[J]. *农机化研究*, 2012(6): 189-193.
- [28] 张绪美, 董元华, 王辉, 等. 中国畜禽养殖结构及其粪便 N 污染负荷特征分析[J]. *环境科学*, 2007, 28(6): 1311-1318.
- [29] 高定, 陈同斌, 刘斌, 等. 我国畜禽养殖业粪便污染风险与控制策略[J]. *地理研究*, 2006, 25(2): 311-319.
- [30] 汪开英, 刘健, 陈小霞, 等. 浙江省畜禽业产排污测算与土地承载力分析[J]. *应用生态学报*, 2009, 20(12): 3043-3048.
- [31] 廖诗英, 赵书强. 河南省畜禽粪便污染状况评估[J]. *山东畜牧兽医*, 2013, 34(8): 1-3.
- [32] 李转寿, 杨逢贵, 吴文卫. 杞麓湖流域耕地畜禽养殖污染负荷及环境风险评价[J]. *江西农业学报*, 2013, 25(8): 127-129.
- [33] 王园欣, 左其亭. 沙颍河南段水质变化及成因分析[J]. *水资源与水工程学报*, 2012, 23(4): 47-50.

(上接第 126 页)

- [2] Borel N, Burgi E, Kiupel M, *et al.* Three cases of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) due to porcine circovirus type 2 (PCV2) in Switzerland[J]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 2001, 143(5): 249-255.
- [3] Choi C, Kim J, Kang L J, *et al.* Concurrent outbreak of PMWS and PDNS in a herd of pigs in Korea[J]. *Vet Rec*, 2002, 151(16): 484-485.
- [4] Dea S, Bilodeau R, Sauvageau R, *et al.* Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4(4): 380-392.
- [5] 林绵芳, 肖怡, 许文珍. 猪圆环病毒病的临床症状与防控对策[J]. *现代农业科技*, 2013(7): 299-300.
- [6] 王小敏, 何孔旺, 张文文, 等. 猪圆环病毒 2 型和猪繁殖与呼吸综合征病毒混合感染的流行病学调查[J]. *华北农学报*, 2012, 27(B12): 390-394.
- [7] 李彬, 马俊杰, 赵静静, 等. 断奶仔猪多系统衰竭综合征中多病原混合感染的流行病学调查[J]. *华北农学报*, 2012, 27(B12): 390-394.
- [8] 樊振华, 王娟萍, 孟帆, 等. 猪细小病毒和猪圆环病毒 2 型多重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. *山西农业科学*, 2012, 40(10): 1102-1106.
- [9] Gillespie J, Opriessnig T, Meng X J, *et al.* Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease [J]. *Vet Int Med*, 2009, 23(6): 1151-1163.
- [10] Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, *et al.* Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79(2): 381-384.
- [11] 郝鑫, 陈焕春, 李川, 等. 猪 II 型圆环病毒 ORF1 基因克隆及在 *E. coli* 中的表达[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(3): 413-417.
- [12] 郭龙军, 陆月华, 黄立平, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白核定位信号区抗原表位的鉴定[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(7): 1480-1486.
- [13] Gillespie J, Juhan N M, DiCristina J, *et al.* A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) is genetically stable *in vitro* and *in vivo*[J]. *Vaccine*, 2008, 26(33): 4231-4236.
- [14] Lekcharoensuk P, Morozov L, Paul P S, *et al.* Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 Porcine circovirus (PCV-2) by using chimeric PCV-1 and PCV-2[J]. *J Virol*, 2004, 78(15): 8135-8145.
- [15] Liu J, Chen I, Du Q, *et al.* The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis *in vivo*[J]. *J Virol*, 2006, 80(10): 5065-5073.
- [16] 杨晓农, 郭万柱, 徐志文, 等. 猪圆环病毒 II 型 ORF3 基因缺失突变毒株对仔猪的致病性及免疫原性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(8): 1094-1099.
- [17] 杨晓农, 郭万柱, 徐志文, 等. 基因缺失对猪圆环病毒 II 型感染复制能力的影响[J]. *中国兽医学报*, 2008, 28(9): 991-995.
- [18] 李增魁. 猪圆环病毒 2 型 ORF3 编码蛋白的体外表达[J]. *畜牧与兽医*, 2008, 40(9): 25-30.
- [19] Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type-2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis [J]. *J Virol*, 2005, 79(13): 8262-8274.