

李荷然, 肖琦, 温立斌, 等. 猪圆环病毒 2 型 ORF1 部分位点突变对病毒复制能力的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (1): 71-76.

LI H R, XIAO Q, WEN L B, et al. Effect of partial site mutations of porcine circovirus type 2 ORF1 on its replication ability [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (1): 71-76.

猪圆环病毒 2 型 ORF1 部分位点突变对病毒复制能力的影响

李荷然^{1,2}, 肖琦², 温立斌², 朱雪蛟², 芮荣^{1*}, 何孔旺^{2*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室/

江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 可引起断奶仔猪多系统衰竭综合征, 导致仔猪逐渐消瘦。PCV2 ORF1 表达的 Rep 蛋白及其剪切体 Rep' 是 PCV2 复制所需的重要蛋白。为了研究 PCV2 ORF1 部分位点对 PCV2 复制能力的影响, 本试验通过构建 PCV2 ORF1 区域点突变双拷贝感染性克隆质粒, 在无 PCV2 污染的 PK-15 细胞中进行病毒拯救, 使用荧光定量 PCR 检测不同位点突变病毒培养不同代次上清液的 Ct 值。结果: 将 PCV2 Rep 的 17 aa、19 aa、20 aa 和 21 aa 突变为丙氨酸后病毒无法成功拯救, 2 aa 突变后严重影响病毒的复制能力, 3 aa、5 aa 和 18 aa 突变后病毒的复制能力增强且细胞病毒载量高于 PCV2 原毒株, 推测 17 aa、19 aa、20 aa 和 21 aa 是影响 PCV2 复制的关键作用位点。本研究结果为未来 PCV2 复制相关研究提供了试验依据。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; Rep 蛋白; 病毒复制

中图分类号: S851.3

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)01-0071-06

Effect of partial site mutations of porcine circovirus type 2 ORF1 on its replication ability

LI Heran^{1,2}, XIAO Qi², WEN Libin², ZHU Xuejiao², RUI Rong^{1*}, HE Kongwang^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Jiangsu Co-Innovation Center for the Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonosis, Nanjing 210014, China)

Abstract: Porcine circovirus type 2 (PCV2) can cause post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), resulting in gradual weight loss in weaned piglets. The Rep protein expressed by PCV2 ORF1 and its splice Rep' is important for PCV2 replication. In order to determine the effect of the partial sites of PCV2 ORF1 on the replication ability of PCV2, we constructed a point mutation double copy infectious clone plasmid in the PCV 2 ORF1 region and saved it in PK-15 cells without PCV2 contamination. The Ct values of the supernatant of different generations were detected by quantitative PCR after different site mutant viruses were transferred into cells. The results showed that the virus could not be successfully saved after PCV2 Rep 17 aa, 19 aa, 20 aa and 21 aa sites were mutated into alanine. However, the 2 aa site mutation seriously affected the replication ability of the virus. In addition, the replication ability of the virus was enhanced and the cell loading was higher than that of the original PCV2 strain after the mutation at 3 aa, 5 aa and 18 aa sites, respectively. It was speculated that 17 aa, 19 aa, 20 aa and 21 aa might be the key sites affecting PCV2 replication. This study provided experimental basis for future research on PCV2 replication.

Keywords: porcine circovirus type 2; Rep protein; virus replication

猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 是一种无囊膜的单股

负链环状 DNA 病毒, 可通过口鼻黏膜直接或间接通过接触粪、尿或病猪等发生水平传播, 也可以通过胎盘垂直传播^[1], 是临床上引起断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS) 的主要病因^[2-5], 给养猪业造成巨大的经济损失^[6-7]。PCV2 有 2 个主要的开放阅读框 (ORF): 编码衣壳蛋白 (Cap) 的 ORF2 和编码复制相关蛋白的 ORF1。PCV2 ORF1 所表达的 Rep 蛋白及

收稿日期: 2023-03-29; 修回日期: 2023-10-31

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31972679)

第一作者: 李荷然, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 芮荣, 教授, 主要从事动物生殖调控与产科疾病方

面的研究, E-mail: rui@njau.edu.cn; 何孔旺, 研究员, 主要从事

动物疫病防控方面的研究, E-mail: kwh2003@263.net。

经过剪切的 Rep' 蛋白对病毒 DNA 的复制至关重要^[8-10]。本实验室前期在探索 PCV2 Rep 在体外对 PK-15 细胞影响的过程中, 构建 2~6 aa 和 17~21 aa 点突变的双拷贝感染性克隆质粒时发现, 将 PCV2 Rep 某些位点上的氨基酸单个或多个突变为丙氨酸后 PCV2 点突变病毒拯救失败。为了找到突变后不影响病毒拯救的位点, 本研究通过构建 PCV2 ORF1 不同位点突变的双拷贝感染性克隆质粒并进行病毒拯救, 使用荧光定量 PCR (qPCR) 检测 PCV2 点突变株的复制能力, 为探究 Rep 蛋白影响 PCV2 复制的关键作用位点提供一定的试验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒和主要试剂

PK-15 细胞、PCV2d 毒株、pBluescript II SK (+) 载体由江苏省农业科学院兽医研究所提供。

胎牛血清 (FBS)、高糖 DMEM、胰酶, 购自中国 Gibco 公司; Green Taq Mix、2×Phanta Max Master Mix, 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Trans 5α 感受态细胞, 购自北京全式金生物技术股份有限公司; Uniclone One Step Seamless Cloning Kit, 购自北京金沙生物科技有限公司; Lipofectamine 3000 转染试剂盒, 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.2 引物设计

根据 PCV2d 的基因序列及无缝克隆试剂盒说明书设计 PCV2 Rep 不同位点氨基酸点突变为丙氨酸所需的引物。构建 PCV2 及 PCV2 点突变株双拷贝所需的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

名称	引物序列 (5'→3')
2-Uni-F1	GAATTCTGCAGCCCGGGGATCCAATAACAGCAGTG-GAGCCC
2-Uni-R1	CTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCAA
2-Uni-F2	TACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCAGTGAGCCC
2-Uni-R2	CACCCGGTGGCGCCGCTCTAGATGATAACTTTGTA-ACAAAGGCCAA
M13-F	GTAACACGACGGCCAGT
M13-R	GGAAACAGCTATGACCAT
630-F	GTTAGACGGATATTGTAGTCC
630-R	CGTTCCGCAGAAGAAGACAC
2-6aa-F	ATGGCTGCTGCTGCTGCTGGAAGAAGCGGACCCCAA
2-6aa-R	TCCAGCAGCAGCAGCAGCCATGTTGCTGCTGAGGTGC-TGC
2-4aa-F	ATGGCTGCTGCTAAGAGTGAAGAAGCGGAC

续表 1

名称	引物序列 (5'→3')
2-4aa-R	TCCACTCTTAGCAGCAGCCATGTTGCTGCTGAGGTGCT-GC
4-6aa-F	ATGCCAGCGCTGCTGCTGGAAGAAGCGGACCCCAA
4-6aa-R	TCCAGCAGCAGCGCTGGGCATGTTGCTGCTG
3aa-F	ATGCCCGCTAAGAAGAGTGAAGAAGCGGACCCCAA
3aa-R	TCCACTCTTCTTAGCGGCATGTTGCTGCTGAGGTG
5aa-F	CCCAGCAAGGCTAGTGAAGAAGCGGACCCCAAACCA
5aa-R	TCTTCCACTAGCCTTCTGCTGGGCATGTTGCTGCTGAG
3-6aa-F	AACATGCCCGCTGCTGCTGCTGGAAGAAGCGGACCC-CA
3-6aa-R	TCTTCCAGCAGCAGCAGCGGCATGTTGCTGCTGAG
17-21aa-F	ACATAAAAGGGTGCAGCTGCTGCTAATAATCCTTCCG-AAGACGAGCGCA
17-21aa-R	AAGGATTATTAGCTGCAGCTGCAGCCCTTTTATGTGGTT-GGGTCCGCTT
17-19aa-F	AAGGGCTGCAGCTACGCTGAATAATCCTTCCGAAGA
17-19aa-R	AGCGTAGCTGCAGCCCTTTTATGTGGTTGGGTCCG
17-18aa-F	AAGGGCTGCATTACGCTGAATAATCCTTCCGA
17-18aa-R	AGCGTGAATGCAGCCCTTTTATGTGGTTGGGTCCG
18-19aa-F	AAGGTGGCAGCTACGCTGAATAATCCTTCCGAAG
18-19aa-R	AGCGTAGCTGCCACCTTTTATGTGGTTGGGT
17aa-F	AAGGGCTGTGTTACGCTGAATAATCCTTCCG
17aa-R	AGCGTGAACACAGCCCTTTTATGTGGTTGGGTCC
18aa-F	TAAAAGGTGGGCATTCAGCTGAATAATCCTTCCGA-AG
18aa-R	GTGAATGCCACCTTTTATGTGGTTGGGTCCG
19aa-F	AAGGTGGGTGGCTACGCTGAATAATCCTTCCG
19aa-R	TCAGCGTAGCCACCCACCTTTTATGTGGTTGGG
20aa-F	GTGGGTGTCGCTCTGAATAATCCTTCCGAAGACGA-GC
20aa-R	GATTATTCAGTGCAGAACACCCACCTTTTATGTGGTTGG
21aa-F	AAGGTGGGTGTTACGCTGAATAATCCTTCCGAAG
21aa-R	CGGAAGGATTATTAGCCGTTGAACACCCACCTT
ORF2-F	TAAATCTCATCATGTCCACATTCCA
ORF2-R	CGTTACCGCTGGAGAAGGAA

1.3 构建 PCV2 点突变单拷贝感染性克隆质粒

以 pSK 载体为模板, *Xba* I 和 *Bam*H I 为酶切位点进行双酶切, 双酶切后进行胶回收。以 PCV2 环状病毒为模板, 使用 *Xba* I 酶对其预线性化。使用含有上游载体重叠区域、酶切位点与 PCV2 正向特异性扩增序列的引物 2-Uni-F1, 与包含目的碱基突变的下游引物进行 PCR 扩增, 获得插入片段 1; 使用包含目的碱基突变的上游引物, 与含有下游载体重叠区域、酶切位点与反向特异性扩增序列的引物 2-Uni-R2 进行 PCR 扩增, 获得插入片段 2。按照无缝克隆试剂盒说明书配置体系, 将载体、插入片段 1 和插入片段 2 进行重组反应, 转入 Trans5α 感受态, 挑菌摇菌后使用

载体通用引物 (M13-F 和 M13-R) 进行 PCR 检测, 选择重组成功的菌株送测序, 测序正确的菌株摇菌扩增, 提取质粒, 测量浓度后保存备用。

1.4 构建 PCV2 及 PCV2 点突变双拷贝感染性克隆质粒

以 pSK 载体为模板, *Xba* I 和 *Bam*H I 为酶切位点进行双酶切, 双酶切后进行胶回收。以 PCV2 环状病毒或 PCV2 点突变单拷贝质粒为模板, 使用 *Xba* I 酶对其预线性化。使用 2-Uni-F1 和 2-Uni-R1 引物进行 PCR 扩增, 插入片段 3; 使用在 5'端插入了与片段 3 的 3'端序列重复的 2-Uni-F2, 和 2-Uni-R2 一起进行 PCR 扩增, 获得插入片段 4。按照无缝克隆试剂盒说明书配置体系, 将载体、插入片段 3 和插入片段 4 进行重组反应, 转入 Trans5α, 挑菌摇菌后使用 630-F 和 630-R 引物进行 PCR 检测, 将在 630 bp 处有特异性条带的 PCR 产物送测序, 若测序结果正确则说明 PCV2 双拷贝感染性克隆质粒或 PCV2 点突变双拷贝感染性克隆质粒构建成功。将构建成功的 PCV2 双拷贝感染性克隆质粒命名为 pSK-PCV2, 根据不同的突变位点将 PCV2 点突变双拷贝感染性克隆质粒分别命名为 pSK-3aa、pSK-5aa、pSK-2-4aa、pSK-4-6aa、pSK-3-6aa、pSK-2-6aa、pSK-17aa、pSK-18aa、pSK-19aa、pSK-20aa、pSK-21aa、pSK-17-19aa 和 pSK-17-21aa。

1.5 感染性克隆质粒的转染

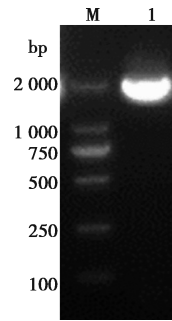
将无 PCV2 污染的 PK-15 细胞铺于 T25 细胞瓶中, 37 °C 培养至细胞铺满单层。按照 Lipofectamine 3000 转染试剂盒说明书分别将 pSK-PCV2、pSK-

3aa、pSK-5aa、pSK-2-4aa、pSK-4-6aa、pSK-3-6aa、pSK-2-6aa、pSK-17aa、pSK-18aa、pSK-19aa、pSK-20aa、pSK-21aa、pSK-17-19aa、pSK-17-21aa 以及空载体 pSK 转染 PK-15 细胞并记录为第 0 代, 连续带毒传代, 收取上清液使用荧光定量 PCR 的方法检测 Ct 值。若 Ct 值无明显变化, 则吸取 1 mL 收取的上清液接毒无 PCV2 污染的 PK-15 细胞盲传 6 代后再进行检测; 若 Ct 值持续升高则停止传代。

2 结果与分析

2.1 PCV2 点突变单拷贝感染性克隆质粒构建

构建的所有 PCV2 点突变单拷贝感染性克隆质粒无缝克隆后, 挑菌使用 M13 通用引物进行菌液 PCR, 阳性菌均应得到大小为 1 964 bp 的扩增产物 (图 1)。菌液进行测序, 测序结果显示相关位点突变成功, 说明点突变单拷贝感染性克隆质粒构建成功 (图 2)。



M. DL2000 Marker; I. PCV2 点突变单拷贝感染性克隆质粒。

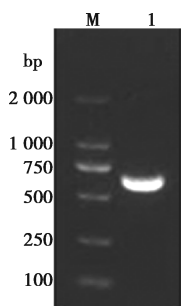
图 1 M13 通用引物检测 PCV2 点突变单拷贝感染性克隆质粒



图 2 PCV2 ORF1 部分位点突变

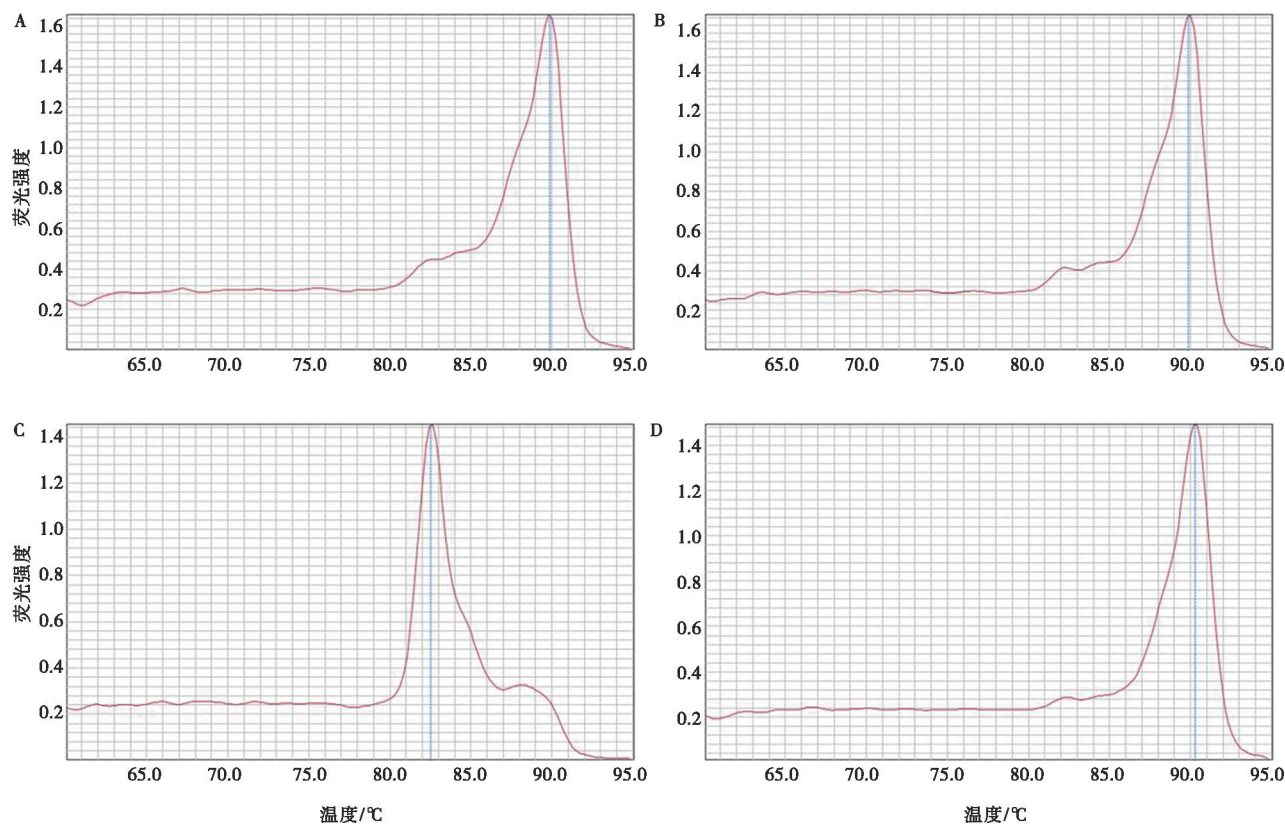
2.2 PCV2 及 PCV2 点突变双拷贝感染性克隆质粒构建

以 PCV2 双拷贝感染性克隆质粒的构建为例。pSK 载体、包含 pSK 载体上游重叠区域的 PCV2 全长或点突变 PCV2 全长的片段 3, 及包含 pSK 载体下游重叠区域的 PCV2 全长或点突变 PCV2 全长的片段 4 进行无缝克隆后挑菌; 使用引物 630-F 和 630-R 进行菌液 PCR, 若在 630 bp 处有明显的条带, 判定为阳性 (图 3), 测序结果正确, 说明双拷贝正确连接, PCV2 双拷贝感染性克隆质粒构建成功。



M. DL2000 Marker; 1. PCV2 双拷贝感染性克隆质粒。

图 3 630 引物检测 PCV2 双拷贝感染性克隆质粒



A. 3 aa 点突变株; B. 5 aa 点突变株; C. 18 aa 点突变株; D. 原毒株。

图 4 PCV2 ORF2 检测引物检测 PCV2 双拷贝感染性克隆质粒溶解曲线

2.3 3 aa、5 aa 和 18 aa 点突变后 PCV2 复制能力

pSK-PCV2、pSK-3aa、pSK-5aa 和 pSK-18aa 转染后传至第 3 代, 用收获的上清液接毒无 PCV2 污染的 PK-15 细胞并盲传 6 代, 吸出 200 μ L 收获的上清液用于病毒 DNA 提取, 并使用 PCV2 ORF2 检测引物进行荧光定量 PCR, 检测 Ct 值。若模板浓度太高, 将 DNA 稀释后再进行检测。结果显示, 3 aa 点突变株、5 aa 点突变株和 18 aa 点突变株 Ct 值与 PCV2 原毒株相比均有降低, 说明点突变后 PCV2 复制能力增强 (表 2)。溶解曲线显示 PCV2 ORF2 检测引物能有效检测 PCV2 点突变株和原毒株 (图 4)。

表 2 3 aa、5 aa 和 18 aa 点突变株与 PCV2 原毒株上清液 Ct 值

毒株	DNA 稀释倍数	Ct 值
3 aa 点突变株	4	4.649
5 aa 点突变株	4	4.303
18 aa 点突变株	4	4.166
PCV2 原毒株	2	4.208

2.4 4~6 aa 和 3~6 aa 点突变后 PCV2 复制能力

pSK-4-6aa 和 pSK-3-6aa 转染后连续传至 3 代, 收获上清液接毒无 PCV2 污染的 PK-15 细胞并盲传 6 代, 各吸出 200 μ L 提取 DNA 并使用 PCV2 ORF2 检测引物进行荧光定量 PCR 检测 Ct 值, 若模板浓度太高, 将 DNA 稀释再进行检测。结果显示 4~6 aa 点突变株和 3~6 aa 突变株复制能力减弱 (表 3)。

2.5 2~4 aa、2~6 aa、17~19 aa 点突变后 PCV2 复制能力变化

pSK-2-4aa、pSK-4-6aa 和 pSK-17-19aa 转染后连续传代, 最多传至第 6 代, 每代提取 DNA 进行

荧光定量 PCR 检测 Ct 值, 结果显示 Ct 值持续上升, 说明病毒复制能力明显减弱 (表 4)。

表 3 4~6 aa 和 3~6 aa 点突变株与 PCV2 原毒株上清液 Ct 值

毒株	DNA 稀释倍数	Ct 值
4~6 aa 点突变株	1	9.655
3~6 aa 点突变株	1	5.800
PCV2 原毒株	2	4.208

表 4 2~4 aa、17~19 aa 和 2~6 aa 点突变株与 PCV2 原毒株上清液 Ct 值

毒株	第 1 代	第 2 代	第 3 代	第 4 代	第 5 代	第 6 代
2~4 aa 点突变株	10.253	11.910	13.002	15.128	15.673	18.016
17~19 aa 点突变株	16.091	22.271	26.562	—	—	—
2~6 aa 点突变株	11.423	15.197	19.331	22.905	—	—
PCV2 原毒株	9.058	7.127	6.994	6.480	5.951	4.843

注: “—” 表示未进行检测。下同。

2.6 17 aa、19 aa、20 aa、21 aa 和 17~21 aa 点突变后 PCV2 拯救情况

pSK-17aa、pSK-19aa、pSK-20aa、pSK-21aa 和 pSK-17-21aa 转染后连续传代, 最多传至第 6 代, 每

代提取 DNA 进行荧光定量 PCR 检测 Ct 值, 结果显示 Ct 值持续上升至 30 以上, 说明 17 aa、19 aa、20 aa 和 21 aa 点突变后严重抑制了病毒的复制能力, 这 4 个位点对 PCV2 的复制起到关键作用 (表 5)。

表 5 17 aa、19 aa、20 aa、21 aa 和 17~21 aa 点突变株与 PCV2 原毒株上清液 Ct 值

毒株	第 1 代	第 2 代	第 3 代	第 4 代	第 5 代	第 6 代
17 aa 点突变株	17.831	23.879	27.698	33.795	34.606	35.894
19 aa 点突变株	17.108	22.708	28.071	31.598	33.992	36.920
20 aa 点突变株	14.824	19.340	19.078	23.532	27.798	31.763
21 aa 点突变株	12.465	15.959	20.940	26.921	32.425	—
17~21 aa 点突变株	15.442	21.886	26.752	31.678	—	—
PCV2 原毒株	9.058	7.127	6.994	6.480	5.951	4.843

3 讨论

PCV 有 4 种血清型: PCV1、PCV2、PCV3 和 PCV4。PCV1 和 PCV2 广泛存在, 目前普遍认为 PCV1 无致病性^[11-12], 而 PCV2 是导致 PMWS 的主要因素。PCV1 病毒的复制起点位于 2 个主要的开放阅读框 ORF1 和 ORF2 之间的颈环结构上, 由 Rep 和剪切后的 Rep' 在结构保守九聚体的第 7、8 碱基之间进行切割与连接^[13], PCV2 与 PCV1 的基因组具有高度同源性, 二者与病毒复制相关的起点及 Rep 基因都是保守的^[14]。与 PCV1 类似, PCV2 中同样存在 2 个以上剪切后的 Rep', 全长 Rep 和 Rep' 是 PCV2 复制所

必需的^[15]。本研究通过无缝克隆, 在不影响 Rep 全长的情况下将个别氨基酸突变为丙氨酸, 转染 PK-15 细胞后, 通过 qPCR 检测 PCV2 及 PCV2 突变株的复制情况。

本研究首先对 PCV2 Rep 的 2~6 aa 和 17~21 aa 进行了突变, 转染细胞后传至第 4 代, 发现病毒载量随细胞传代而不断降低, 且 17~21 aa 点突变株的 Ct 值上升至 31.678, 一般在 Ct 值为 35 时可以认为检测结果为阴性, 因此认为 17~21 aa 突变后 PCV2 无法复制。为进一步探究影响 PCV2 复制的具体位点, 构建一系列不同位点突变的 PCV2 点突变株, 结果显

示：3 aa、5 aa 和 18 aa 分别突变后 PCV2 的复制能力增强，在细胞中的载量明显高于 PCV2 原毒株；2~4 aa 和 17~19 aa 突变后病毒载量随细胞传代持续降低；4~6 aa 和 3~6 aa 突变后病毒能被成功拯救但复制能力与 PCV2 原毒株相比减弱；而 17 aa、19 aa、20 aa 和 21 aa 突变后病毒均无法成功拯救。以上结果显示，PCV2 Rep 17 aa、19 aa、20 aa 和 21 aa 是 PCV2 复制的关键位点，对其中任意一个位点进行突变，PCV2 都无法通过感染性克隆进行拯救，其复制能力受到严重的影响。PCV2 Rep 2 aa 也可能是 PCV2 复制的关键位点，与不包含 2 aa 突变的 3~6 aa 突变相比，包含 2 aa 突变的 2~4 aa 突变和 2~6 aa 突变在进行病毒拯救的过程中呈现 Ct 值缓慢上升的状态且 Ct 值明显高于 3~6 aa 突变，显示出 2 aa 突变对 PCV2 的复制产生影响。3 aa 和 5 aa 突变后 PCV2 复制能力增强，已有研究证明 6 aa 突变后可使 PCV2 的复制能力增强^[16]，但 3~6 aa 突变后 PCV2 虽然能拯救但病毒复制能力下降，说明 4 aa 突变后降低了 PCV2 的复制能力。

已有研究结果表明，ssDNA 可通过与 Rep 特定蛋白质直接接触，或通过有 U 型构象的凹槽与 Rep 对接从而进行间接接触，Rep 蛋白的 17 aa 至 21 aa 位于该结构的同一个 β 折叠上^[17]。因此，PCV2 Rep 的 17 aa、19 aa、20 aa 和 21 aa 可能正是 Rep 与 ssDNA 相互作用或帮助 Rep 形成相关空间结构的关键位点，改变相关氨基酸可抑制或减弱 Rep 与 ssDNA 的相互作用，从而对 PCV2 的复制产生了不利的影

响。总之，本文探究了 Rep 蛋白影响 PCV2 复制的关键位点，为后续开展 PCV2 复制相关研究奠定了基础。

参考文献：

- [1] 任慧波, 李双寅, 王慧, 等. 猪圆环病毒诊断方法研究进展 [J]. 湖南畜牧兽医, 2022 (6): 44-46.
- [2] 姜子昕. 山东省猪圆环病毒 2 型和 3 型流行病学调查及双重荧光 PCR 方法的建立 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- [3] 马玉静. 2017—2021 年河南省猪圆环病毒 2 型分子流行病学和血清学分析 [D]. 南阳: 南阳师范学院, 2022.
- [4] ELLIS J, HASSARD L, CLARK E, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. Can Vet J, 1998, 39 (1): 44-51.
- [5] GHEBREMARIAM M K, GRUYS E. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs with particular emphasis on the causative agent, the mode of transmission, the diagnostic tools and the control measures. A review [J]. Vet Q, 2005, 27 (3): 105-116.
- [6] 张振廷. 猪圆环病毒 2 型的临床症状、诊断和预防 [J]. 猪业观察, 2020 (4): 41-43.
- [7] 柴少征, 闫若潜, 王东方, 等. 猪圆环病毒研究进展 [J]. 畜禽业, 2009 (7): 34-36.
- [8] CHEUNG A K. Porcine circovirus: transcription and DNA replication [J]. Virus Res, 2012, 164 (1/2): 46-53.
- [9] MEEHAN B M, CREELAN J L, MCNULTY M S, et al. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses [J]. J Gen Virol, 1997, 78 (Pt 1): 221-227.
- [10] MANKERTZ A, HILLENBRAND B. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene [J]. Virology, 2001, 279 (2): 429-438.
- [11] 杨雁婷, 徐雷, 黄瑶, 等. 猪圆环病毒与其他病原共感染的研究进展 [J]. 病毒学报, 2022, 38: 1016-1024.
- [12] SEGALÉS J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis [J]. Virus Res, 2012, 164 (1/2): 10-19.
- [13] 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]. J Virol, 2006, 80 (13): 6225-6234.
- [14] MANKERTZ A, CALISKAN R, HATTERMANN K, et al. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication [J]. Vet Microbiol, 2004, 98 (2): 81-88.
- [15] CHEUNG A K. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2 [J]. Virology, 2003, 313 (2): 452-459.
- [16] WU X, WANG S, XIN C, et al. Mutation of the sixth amino acid of the Rep protein has no effect on porcine circovirus 2b but enhances porcine circovirus 2d replication *in vitro* [J]. Arch Virol, 2021, 166 (11): 3189-3192.
- [17] TOMPKINS K J, HOUTTI M, LITZAU L A, et al. Molecular underpinnings of ssDNA specificity by Rep HUH-endonucleases and implications for HUH-tag multiplexing and engineering [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49 (2): 1046-1064.