

一株类猪圆环病毒 2 型因子 P1 的全基因组序列测定与分析

温立斌¹, 何孔旺¹, 杨汉春²

(¹江苏省农业科学院兽医所, 南京 210014; ²中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要:【目的】确定猪体内存在与猪圆环病毒 2 型核苷酸序列高度同源的因子。【方法】首先利用 PCR 方法对来自临床表现为猪断奶后多系统衰竭综合征的猪血清所抽提的 DNA 进行扩增, 根据获得的序列再设计引物进行反向 PCR, 拼接得到类猪圆环病毒 2 型因子 P1 的全基因组序列, 最后根据 P1 全基因组序列设计引物扩增其全基因组加以验证。【结果】首次完成了类猪圆环病毒 2 型因子 P1 的全基因组序列测定。测序结果表明 P1 因子为环状 DNA 基因组, 全长 648 个核苷酸, 包括 3 个开放阅读框。除 5'端 16 个核苷酸外, P1 因子与国内猪圆环病毒 2 型 BF 毒株的核苷酸同源率为 98.42%。系统进化分析表明 P1 与猪圆环病毒有很近的亲缘关系。【结论】猪体内存在类猪圆环病毒 2 型因子 P1。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; P1; 全基因组; 序列测定与分析

Sequencing and Analysis of Complete Genome of a Porcine Circovirus Type 2-like Agent P1

WEN Li-bin¹, HE Kong-wang¹, YANG Han-chun²

(¹Institute of Veterinary, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014; ²College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract: 【Objective】 The aim of the experiment is to discover an agent containing high homologous sequences of porcine circovirus type 2 in swine. 【Method】 PCR was developed for detection of DNA extracted from porcine sera collected from pigs with clinical signs of postweaning multisystemic wasting syndrome, then a reverse PCR was carried out based on the acquired sequences in this study, the sequences of PCR fragments were assembled into consecutive sequence and then finally verified by amplifying the agent complete genome. 【Result】 Complete nucleotide sequence of genome of porcine circovirus type 2-like agent P1 was firstly reported in this paper. P1 contained circular genomic DNAs of 648 nucleotides and three open reading frames. Except 16 nucleotides in the 5' end of the genome, the genome of P1 showed 98.42% of nucleotide homology compared with porcine circovirus type 2 BF isolate. Phylogenetic analysis revealed that P1 was closely related to the porcine circovirus. 【Conclusion】 Results suggested that there existed porcine circovirus type 2-like agent P1 in swine.

Key words: porcine circovirus type 2; P1; genome; sequencing and analysis

0 引言

【研究意义】猪圆环病毒相关疾病 (porcine circovirus associated disease, PCVAD) 或猪圆环病毒病 (porcine circovirus diseases, PCVD) 是指由猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2, PCV2) 为主要原发病原所引起的猪的系列疾病, 如猪断奶后多系统衰

竭综合征 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)、猪皮炎与肾病综合征、后期流产、呼吸障碍、生殖障碍等^[1-4]。其中临床最常见的是 PMWS, PMWS 主要发生在 5—12 周龄的仔猪, 临床表现为渐进性消瘦或生长迟缓, 呼吸困难, 腹股沟淋巴结肿大、贫血等, 目前已成为危害养猪生产的重要免疫抑制性疫病之一^[5]。有关 PMWS 的研究成为猪病

收稿日期: 2008-04-16; 接受日期: 2009-11-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30972184)、国家“973”计划前期研究专项资助课题 (2007CB116308)

作者简介: 温立斌, 高级兽医师, 博士。E-mail: wlbwhxjp@163.com; Tel: 025-84390331。通信作者何孔旺, 研究员, 硕士。Tel: 025-84390748; E-mail: hekongwang@yahoo.com。通信作者杨汉春, 教授, 博士。Tel: 010-62731296; E-mail: yanghanchun1@cau.edu.cn

研究的热点和难点,其中之一就是直到现在,单纯的 PCV2 感染动物很难复制出与临床 PMWS 相似的典型症状^[6-8]。因此寻找与引起 PMWS 的 PCV2 相类似的因子已成为研究 PCV2 和 PMWS 的迫切需要。【前人研究进展】目前已确定慢病毒与 PMWS 无联系^[9],也确定共感染病原,如猪细小病毒 (porcine parvovirus, PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪肺炎支原体和免疫刺激等因素可协同 PCV2 使猪出现典型的 PMWS。Allan 等^[10]对禁食初乳猪 (colostrum-deprived pig, CD 猪) 经鼻接种 PCV2 或 PPV 及同时接种两种病毒进行比较,认为联合感染可使猪出现 PMWS 病变。其后,Ellis 等^[11]和 Krakowka 等^[12]的实验也证实了上述结果;Allan 等^[13]对单独试验感染 PCV2 或 PRRSV 与 PCV2 联合 PRRSV 进行试验感染 1—2 日龄 CD 猪进行比较,结果表明联合感染组中 PRRSV 可以促进 PCV2 在组织中的增殖和分布;Harms 等^[14]对 3 周龄剖腹产且禁食初乳猪以及 Rovira 等^[15]用 5 周龄普通猪分别进行的试验,结果也支持了 PRRSV 感染可以促进 PCV2 复制的结论;Opriessnig 等^[16]对 4 周龄普通猪进行的研究结论认为,猪肺炎支原体可以加重 PCV2 对淋巴组织和肺脏造成的损害,提高相应组织中病毒特异性抗原的数量及延长其存留的时间,并可促进 PMWS 的发生;Krakowka 等^[17]对注射含有钥孔戚血蓝蛋白和弗氏不完全佐剂的悉生猪感染 PCV2,结果认为免疫激活是与 PCV2 相关 PMWS 发病的重要诱因之一。除此之外,Opriessnig 等^[18]研究表明 PMWS 的出现与猪的品种有关,Dupont 等^[19]则认为 PCV2 的不同基因型可能与 PMWS 的出现有关。上述研究中涉及共感染的病原因子与 PCV2 既不同科,也不存在序列上的高度同源性,Wen 等^[20]在临床送检的疑似 PMWS 感染的病料中检出类 PCV2 因子 P2,该因子基因组也为环状 DNA,全长 993 个核苷酸,部分核苷酸与 PCV2 的高度同源。【本研究切入点】在实验室利用 PCR 对 PCV2 进行诊断中,笔者发现利用针对 PCV2 orf2 的特异性引物进行扩增得出的阳性结果远远高于利用针对其 orf1 特异性引物所扩增得出的结果,从而我们推测猪体内可能存在与 PCV2 orf2 序列相关的因子。在前期研究发现类 PCV2 因子 P2 后,本研究仍从 PCV2 orf2 着手,进行其它类 PCV2 因子的检测。【拟解决的关键问题】探讨新的类 PCV2 因子的存在,为 PCV2 的诊断研究以及重新认识 PMWS 进一步提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 样 品

278 份血清样品采集于 2002—2006 年江苏、北京、山东和河北等地区发生疑似 PMWS 的猪,样品于 -80℃ 保存。

1.2 主要分子生物学试剂

PCR 反应所需的 TaqDNA 聚合酶购自北京天为时代公司;Proteinase K 为 Merker 公司产品;克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 DH5 α 为江苏省农业科学院兽医研究所人兽共患病防控研究室保存;B 型小量 DNA 片段快速回收试剂盒为北京博大泰克生物基因技术有限责任公司产品。

1.3 PCR

1.3.1 引物设计 引物设计采用 Oligo 6.0 软件。根据中国 PCV2 BF 株序列 (GenBank 收录号为 AF381175),首先设计出下列 I 和 II 两对特异性引物;其次,对用 I 引物扩增为阳性而用 II 引物扩增为阴性的样品,用 III 引物进行反向扩增;最后根据用 I 和 III 引物扩增所拼接得到的序列,再用 IV 引物进行扩增加以验证。

I: 上游引物: 5'-ACGGATATTGTAGTCCTGGT-3', 对应于 PCV2 的 1 094—1 113 位;下游引物: 5'-CAAGGCTACCACAGTCAGAA-3', 对应于 PCV2 的 1 565—1 546。可扩增出 orf2 基因中的 472 nt 片段。

II: 上游引物: 5'-AGTGAGCGGGAAAATGCAGA-3', 对应于 PCV2 的 514—534 位;下游引物: 5'-TCCTCCGTGGATTGTTCTGT-3', 对应于 PCV2 的 931—912。可扩增出 orf1 基因中的 418 nt 片段。

III: 上游引物: 5'-TGTAGACCACGTAGGCCTCGG-3', 下游引物: 5'-GGTTTGTATCCTCAGCCAAG-3'。此对引物是根据用引物 I 扩增后所测得的序列所设计的反向引物。

IV: 上游引物: 5'-TTAAAGACCCCCACTTAAACCTAAATGA-3', 下游引物: 5'-AGTGGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCTCTG-3', 此对引物可扩增出 P1 全基因组的片段。

引物由上海英骏生物技术有限公司合成,用无核酸酶的灭菌水配成使用浓度。

1.3.2 PCR 反应 PCR 体系包括 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上、下游引物,0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTPs 和 2.5 U Taq DNA 聚合酶。在 94℃ 预变性 5 min 后进入以下循环: 94℃, 30 s; 57℃, 45 s; 72℃, 60 s。共进行 30 个循环,72℃

再延伸 10 min。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.3.3 PCR 产物的克隆与测序 从 1.2%琼脂糖凝胶回收 PCR 扩增片段, 与 pMD18-T 载体连接, 转化感受态 DH5 α , 涂布含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板, 37°C 培养过夜, 挑取白色菌落, 经 PCR 鉴定后, 选取阳性重组子, 由上海英骏生物技术有限公司进行测序。测序进行 3 次重复。

1.4 序列比较与系统进化分析

对测得的核苷酸及序列拼接和推导的氨基酸序列进行同源性的分析软件为 DNAMAN 5.2.2; 通过 Neighbor-Joining 方法建立系统进化树的分析软件为 MEGA2.1。

本研究用到的毒株及登录号为 PCV2 (CHN-2A, AF381175 (BF, 2001); CHN-2B, AF381176 (HR, 2001); CHN-2C, AF381177 (BX, 2001); CHN-2D, AY181948 (SZ, 2002); CHN-2F, AY181947 (SD, 2002); CHN-2G, AF538325 (BJ-HB, 2002)); PCV1, Y09921 和 P2, EF514717。其中所选的 PCV2 毒株为中国代表毒株^[21], 各登录号后括号中的内容是 PCV2

毒株的名称和发现年代。P2 为另一株类 PCV2 因子^[20]。

2 结果

2.1 中国类 PCV2 因子的流行情况

采用 PCR 对 2002—2006 年采集于中国北京、河北、山东和江苏等 4 个省(市) 278 份猪血清样品的 DNA 进行扩增, 结果用引物 I 扩增的阳性率约为 60%, 而用引物 II 扩增的阳性率约为 48%。用引物 III 对引物 I 扩增为阳性、引物 II 扩增为阴性的血清样品的 DNA 进行扩增, 然后对测得的核苷酸序列与引物 I 扩增得到的序列进行拼接, 最后用引物 IV 进行扩增全基因组加以验证。结果从河北和江苏两个猪场的 5 份血清样品中得到一个新的类 PCV2 因子, 暂定名为 P1。另外从北京和河北两个猪场的 3 份血清样品中检出类 PCV2 因子 P2。

2.2 类 PCV2 因子的基因组

根据反向 PCR 获得的 P1 基因组, 确定其为环状的 DNA, 大小为 648 个核苷酸(图 1), GenBank 登录号为 EF514716。

```

1   ggatccacta gtaacggcgg cccctggctc gttccacccc gccaccgcta ccgttggaga
61  aggaaaaatg gcattctcaa caccgcctc tcccgtacct tcggatatac tatcaagct
121 accacagtca gaacgcctc ctggcggtg gacatgatga gatttaatat tgacgacttt
181 gttccccggg aaggggggac caacaaaate tctataccct ttgaaacta cagaataaga
241 aaggttaagg ttgaattctg gccctgctcc cccatcacc agggatgatag gggagtgggc
301 accactgctg ttattctaga tgataacttt gtaccaaagg ccacggccca aacctatgac
361 ccatatgtaa ctactectcc cgccatacaa tcccccaacc ettctctac cactcccgtt
421 acttcacacc caaacctggt cttgactcca ctattgatta cttccaacca aatacaaaaa
481 ggaatcagct ttggctgagg atacaaacct ctagaaatgt agaccacgta ggcctcggca
541 ctgcgttga aaacagtata tacgaccagg actacaatat ccgtgtaacc atgtatgtac
601 aattcagaga atttaactct aaagaccccc cacttaaac ctaaatga

```

图 1 类 PCV2 因子 P1 全基因组序列

Fig. 1 Complete nucleotide sequence of porcine circovirus type 2-like agent P1

2.3 类 PCV2 因子的基因组特征

就全基因组而言, P1 与其它 PCV2 的核苷酸总同源率为 32.6%—35.5%, 与 PCV1 的为 22.9%, 与 P2 的为 63.3%。同时, 序列分析表明除 P1 5'端的前 16 个核苷酸外, 从第 17 个核苷酸起到第 648 个核苷酸止, 与 PCV2 (AF381175) 反向互补序列的 107—739 核苷酸同源率为 98.42%, 但在对应 PCV2 的第 461 位核苷酸 A 处, P1 缺省 1 个核苷酸。经 DNAMAN 5.2.2 分析, P1 有 3 个开放阅读框: ORF1, 12.5 kD (nt 154—496); ORF2, 3.0 kD (nt 68—155); ORF3, 3.9 kD (nt 153

—148)。其中 P1 最大的 ORF1 所编码的氨基酸与其它 PCV ORF2 所编码的氨基酸总同源率为 22.3%—33.5%。其 ORF1、ORF2 和 ORF3 与 PCV2 (AF381175) 相关的开放阅读框所编码的氨基酸同源性比较见图 2。

2.4 类 PCV2 因子的系统进化分析

依据因子与 PCV2 所推导的相对应的氨基酸序列进行的进化分析表明 P1 和 P2 与 PCV2 有很近的亲缘关系, 其中与中国最早登录 GenBank 的 PCV2 BF 株 (CHN-2A) 关系最近, 与 PCV1 关系稍远, 但也可共同形成一独立的进化树(图 3)。

P1_ORF1	1	MMRFNIDDFVPPEGGTNKISIPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGT
PCV2_ORF2	71	MMRFNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS

P1_ORF1	51	TAVILDDNFVKATAQTYDPYVTTTPPAIQSPNP-----SPTTPVTSH
PCV2_ORF2	121	TAVILDDNFVKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPFYSHSRYFTPKPVLVDS

P1_ORF1	93	PNLF-----LTPLLITS---NQITKGISFG
PCV2_ORF2	171	IDYFQPNNKGNQLWPRIQTSRNVHDVGLGTAFE-
		* * * * *
P1_ORF2	1	MASSTPASPVPDILSRLPQSERPPGRWT
PCV2_ORF6	1	MASSTPASPAPSDILSRLPQSERPPGRWTC

P1_ORF3	1	MSTAQEGVLTVVALIVYPKVRERRVLKMPFLLQR
PCV2_ORF10	18	MSTAQEGVLTVVALTVYPKVRERRVLKMPFLLQR

图中相同的氨基酸用星号表示；缺失的用破折号表示。蛋白序列末端的破折号表示未显示其后面的氨基酸
 Homologous nucleotides are indicated by asterisks and deleted amino acids by dashes. The dash shown at the ends of protein sequences indicate that these proteins continue further, and their remaining sequences are not shown

图 2 P1 因子 3 个开放阅读框与相应 PCV2 的所推导编码氨基酸序列的同源性比较
 Fig. 2 Alignments of predicted amino acid sequences of several ORFs in P1 and PCV2

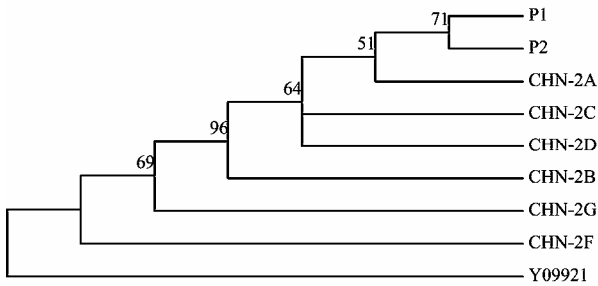


图 3 基于 P1 ORF1、 P2 ORF3 和 PCV ORF2 所推导氨基酸序列的系统进化分析
 Fig. 3 Phylogenetic analysis of deduced amino acid sequences based on the ORF1 of P1, ORF3 of P2 and ORF2 of PCV2

3 讨论

分别应用针对 PCV2 ORF1 和 ORF2 引物，对送检临床疑似 PMWS 病例进行 PCR 扩增，排除 PCR 技术本身存在的假阳性或假阴性外，笔者发现两者的样品扩增阳性率存在一定程度差异。本研究在 278 份送检血清中除了发现已经报道的类 PCV2 因子 P2 后，又发现了类 PCV2 因子 P1。当然有些样品虽扩增片段与 P1 和 P2 不同，但由于条带较弱，没有进行克隆，所以不排除还存在其它因子。

到目前为止，P1 是发现的具有最小基因组的 DNA

因子。根据 P1 环状 DNA 基因组的特征，且与 PCV2 有高度同源性的核苷酸序列，笔者推测 P1 可能为圆环病毒科的新成员，而且和 PCV2 有很密切的关系。也许，P1、P2、PCV1 和 PCV2 都起源于一共同祖先，为一个大的病毒性家族关系。可能与先前被列入圆环病毒科的另一成员——TTV 病毒类似，TTV 病毒起初也是从其核苷酸着手研究的，而且和以后发现的系列相关病毒共同组成了家族病毒^[22]。

根据多基因分析，有认为 PCV 可能是联系哺乳动物和植物病毒的桥梁^[23-24]；也有认为在双联体病毒和植物圆环病毒进化过程中动物圆环病毒起了纽带作用^[25]；Gibbs 等^[26]应用生物信息学研究发现 PCV 的 Rep 蛋白的 N 端与矮缩病毒属的相似，C 端与类小 RNA 病毒编码的 RNA 结合蛋白有关，因此认为 PCV 是植物矮缩病毒和动物类小 RNA 病毒重组的结果。P1 基因组 5'端的前 16 个核苷酸，经 BLAST 发现其与很多生物的序列高度同源，笔者推测其可能为猪内源性反转录病毒的囊膜蛋白基因部分序列，虽然其过于短小，但令人感兴趣的是，另外一个类 PCV2 因子 P2 5'端也具有这 16 个核苷酸，说明其可能不是随机形成的。此外，P1 因子与 PCV2 的 CHN-2A 亲缘关系最近，而 CHN-2A 在中国流行最早，近年来已不是中国的主要基因型^[20]，因此，有理由怀疑 P1 因子是由 PCV2 CHN-2A 衍化且与猪内源性反转录病毒重组形成而来的。当然，有关具体问题还需要进一步研究。

PCV 包括两个基因型, 无致病性的 PCV1 和有致病力的 PCV2。据分析, 它们都含有 11 个开放阅读框, 其中 ORF5、6、9、10 和 11 编码的氨基酸在两者之间缺乏同源性, 被认为与 PMWS 临床症状、损害等有关^[27]。P1 因子的 ORF2 和 ORF3 所编码的氨基酸分别与 PCV2 的 ORF6 和 ORF10 所编码的高度同源, 推测其对猪可能也具有致病性。事实上, 随后的研究表明, 所构建的 P1 因子的分子克隆具有感染性, 表现为在感染的细胞中形成包涵体, 以及可引起接种仔猪贫血^[28-29]。更深入的研究正在进行着。

4 结论

通过对同时扩增 PCV2 orf1 和 orf2 而发现阳性比例有很大不同这一现象着手研究, 利用常规 PCR 和反向 PCR, 从猪血清中检测到了类 PCV2 因子 P1, 其特征为环状 DNA 基因组, 除少量核苷酸外, 其它核苷酸序列与 PCV2 orf2 高度同源。其将对目前一般以 PCV2 orf2 为靶基因为诊断的现行方法提出了挑战, 同时为 PCV2 和 PMWS 提供新的研究点, 此外, P1 仅含有 648 个核苷酸, 它对研究 PCV2 乃至生命的起源也有深远影响。

References

- [1] Allan G, Meehan B, Todd D, Kennedy S, McNeilly F, Ellis J, Clark E G, Harding J, Espuna E, Botner A, Charreyre C. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndrome. *The Veterinary Record*, 1998, 142(17): 467-468.
- [2] Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian Veterinary Journal*, 1998, 39(1): 44-51.
- [3] Rosell C, Segalés J, Ramos-Vara J A, Folch J M, Rodríguez-Arrijoja G M, Duran C O, Balasch M, Plana-Durán J, Domingo M. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *The Veterinary Record*, 2000, 146(2): 40-43.
- [4] West K H, Bystrom J M, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan G M, Haines D M, Clark E G, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis J A. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1999, 11: 530-532.
- [5] 杨汉春. 猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策. *中国畜牧兽医*, 2004, 31(5): 41-43.
- Yang H C. Epidemiological characteristics and control measures of immunosuppressive swine diseases. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2004, 31(5): 41-43. (in Chinese)
- [6] Fenaux M, Halbur P G, Haqshenas G, Royer R, Thomas P, Nawagitgul P, Gill M, Toth T E, Meng X J. 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. *Journal of Virology*, 2002, 76(2): 541-551.
- [7] Muhling J, Raye W S, Buddle J R, Wilcox G E. Genetic characterisation of Australian strains of porcine circovirus types 1 and 2. *Australian Veterinary Journal*, 2006, 84(12): 421-425, 416.
- [8] Raye W, Muhling J, Warfe L, Buddle J R, Palmer C, Wilcox G E. The detection of porcine circovirus in the Australian pig herd. *Australian Veterinary Journal*, 2005, 83(5): 300-304.
- [9] Bratanich A, Lairmore M, Heneine W, Konoby C, Harding J, West K, Vasquez G, Allan G, Ellis J. Lack of evidence of conserved lentiviral sequences in pigs with post weaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1999, 63(3): 207-211.
- [10] Allan G M, Kennedy S, McNeilly F, Foster J C, Ellis J A, Krakowka S J, Meehan B M, Adair B M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 1999, 121(1): 1-11.
- [11] Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, Haines D, Bratanich A, Clark E, Allan G, Konoby C, Hassard L, Meehan B, Martin K, Harding J, Kennedy S, McNeilly F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1999, 11(1): 3-14.
- [12] Krakowka S, Ellis J A, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Pathology*, 2000, 37(3): 254-263.
- [13] Allan G M, McNeilly F, Ellis J, Krakowka S, Meehan B, McNair I, Walker I, Kennedy S. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Archives of Virology*, 2000, 145(11): 2421-2429.
- [14] Harms P A, Sorden S D, Halbur P G, Bolin S R, Lager K M, Morozov I, Paul P S. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology*,

- 2001, 38(5): 528-539.
- [15] Rovira A, Balasch M, Segalés J, García L, Plana-Durán J, Rosell C, Ellerbrok H, Mankertz A, Domingo M. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *Journal of Virology*, 2002, 76(7): 3232-3239.
- [16] Opriessnig T, Thacker E L, Yu S, Fenaux M, Meng X J, Halbur P G. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with mycoplasma hyopneumoniae and porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology*, 2004, 41(6): 624-640.
- [17] Krakowka S, Ellis J A, McNeilly F, Ringler S, Rings D M, Allan G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV2). *Veterinary Pathology*, 2001, 38(1): 31-42.
- [18] Opriessnig T, Fenaux M, Thomas P, Hoogland M J, Rothschild M F, Meng X J, Halbur P G. Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Veterinary Pathology*, 2006, 43(3): 281-293.
- [19] Dupont K, Nielsen E O, Baekbo P, Larsen L E. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary Microbiology*, 2008, 128: 56-64.
- [20] Wen L B, He K W, Yang H C, Ni Y X, Zhang X H, Guo R L, Pan Q X. Complete nucleotide sequence of a novel porcine circovirus-like agent and its infectivity in vitro. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2008, 51(5): 453-458.
- [21] Wen L B, Guo X, Yang H C. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Veterinary Microbiology*, 2005, 110: 141-146.
- [22] Tanaka Y, Primi D, Wang R Y, Umemura T, Yeo A E, Mizokami M, Alter H J, Shih J W. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN Virus) and its relationship to the TT virus family. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001, 183(3): 359-367.
- [23] Mankertz A, Persson F, Mankertz J, Blaess G, Buhk H J. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *Journal of Virology*, 1997, 71(3): 2562-2566.
- [24] Meehan B M, Creelan J L, McNulty M S, Todd D. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *The Journal of General Virology*, 1997, 78: 221-227.
- [25] Niagro F D, Forsthoefel A N, Lawther R P, Kamalanathan L, Ritchie B W, Latimer K S, Lukert P D. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circovirus. *Archives of Virology*, 1998, 143(9): 1723-1744.
- [26] Gibbs M J, Weiller G F. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 8022-8027.
- [27] Hamel A L, Lin L L, Nayar G P S. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*, 1998, 72: 5262-5267.
- [28] Wen L B, He K W, Yang H C. Infectivity analysis of cloned genomic DNA of P1 agent in vitro. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2009, 40(Suppl.): 43-46.
- [29] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 倪艳秀, 张雪寒, 俞正玉, 茅爱华. 类猪圆环病毒因子 P1 感染对猪红细胞的影响. *内蒙古农业科技*, 2009, 2: 46-48.
- Wen L B, He K W, Yang H C, Ni Y X, Zhang X H, Yu Z Y, Mao A H. Effect of porcine circovirus type 2-like agents P1 infection on porcine erythrocytes. *Inner Mongolia Agricultural Science and Technology*, 2009, 2: 46-48. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)