

鸚鵡幼稚病病毒PCR诊断方法的建立与应用

朱小甫, 吴旭锦, 张文娟, 熊忙利, 邢蕾

(咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 动物疫病分子生物学诊断实验室, 陕西 西咸新区 712046)

摘要: 建立一种鸚鵡幼稚病病毒(BFDV) PCR诊断方法, 为临床快速确诊鸚鵡幼稚病病毒感染提供技术手段。参考GenBank中公开的BFDV基因组序列, 设计了2对用于阳性质粒构建引物和1对检测引物, 采用套式PCR从临床疑似病例病料中扩增BFDV VP1基因, 构建VP1基因阳性质粒, 以阳性质粒为模板, 优化检测引物扩增体系与条件, 进行灵敏度试验、特异性检测和临床样品检测, 挑选3份不同地区阳性样品测序验证。实验结果表明, 成功构建了BFDV VP1基因阳性质粒pGEM-T-VP1, 建立的PCR检测方法检测的极限为105.8拷贝/ μL 。特异性试验仅能从pGEM-T-VP1中扩增出目的条带, 5种常见禽病毒检测均为阴性。应用建立的方法对75份疑似病例病料进行检测, 结果19份为阳性, 阳性率为25.3%。测定了3株不同地区BFDV流行毒株VP1基因片段序列, 比对分析发现核苷酸同源率为99.4%~100%, 在基因进化树上这3株病毒处在一个独立的分支上, 显示出一定的地域特征。成功建立了一种灵敏度高、特异性好的BFDV PCR诊断方法, 应用于临床诊断显示出良好效果。

关键词: 鸚鵡幼稚病; PCR诊断; 多瘤病毒; 序列分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2019)03-046-05

随着我国经济的快速发展, 养鸟产业蓬勃兴起, 其中鸚鵡作为观赏鸟类受到人们的喜爱。但随着鸟群的扩大, 传染病的发生频率越来越高^[1], 其中鸚鵡幼稚病病毒(Budgerigar fledgling disease virus, BFDV)感染严重危害鸚鵡健康^[2,3]。该病在1981年美国和加拿大首次报道, 临床上主要表现为虎皮鸚鵡雏鸟厌食、精神沉郁、下痢、皮下出血等, 死亡率高, 该病病原很快被确定为鸟类多瘤病毒^[4]。随后该病蔓延传播至德国、匈牙利、意大利和日本等国家^[5,6]。1994年, 该病首次出现在我国湖北和青岛, 给我国养鸟业造成重大经济损失^[7]。目前为止, 鸟类多瘤病毒在金刚鸚鵡、锥尾鸚鵡、月轮、凯克、爱情鸟、吸蜜鸚鵡、亚马逊鸚鵡、灰鸚、鹰头、及巴丹等品种中发现, 成为鸚鵡的一种重要病原。

BFDV为多瘤病毒科(Polyomaviridae)、多瘤病毒属(Polyomavirus)成员, 20面体对称, 环状双股DNA^[8]。BFDV基因组全长约为4981bp, 分为早期区、晚期区及调控区, 早期区主要编码大T抗原和

小t抗原, 早期基因产物的主要作用是参与病毒DNA复制和激活晚期转录以及早期启动子反馈调节与病毒的有效装配。晚期区主要编码病毒衣壳蛋白即VP1、VP2和VP3。调控区含有病毒DNA复制起点以及早、晚期基因启动子、增强子和多个大T抗原结合位点^[9]。BFDV主要分布于患病鸚鵡的血液、羽屑、粪便、嗦囊分泌物中, 其中羽屑为最重要的散布来源^[10,11]。由于本病对鸚鵡危害极大, 幼鸟死亡率高, 成鸟羽毛发育不良严重影响鸚鵡的观赏性, 因此是鸚鵡需要着重预防和检疫的传染病。但对BFDV检测技术研究报道的资料缺乏, 蒋文明等^[9]利用PCR技术对青岛即墨地区4只濒死鸚鵡进行BFDV的检测, 结果核酸扩增为阳性, 并对扩增的VP1基因序列进行了测序与分析, 确诊为鸚鵡幼稚病。张学等^[12]对2014-2018年中国大陆部分地区鸚鵡禽多瘤病毒感染情况进行了调查, 在1820个检测样品当中共发14个禽多瘤病毒阳性样品。以上研究均未详细介绍检测方法的建立过程、灵敏度和特异性如何。因此, 本研究拟建立一种BFDV快速诊断

收稿日期: 2019-06-19

基金项目: 咸阳市科学技术研究计划项目(2018k02-56)

作者简介: 朱小甫(197—), 男, 陕西眉县人, 硕士, 副教授, 执业兽医师, 主要从事动物疫病分子病原学与免疫学研究工作。

PCR方法, 并通过临床检测与BFDV基因序列分析进行验证, 为诊断和防控鸚鵡BFDV感染提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源 组织病料或羽髓样本, 由动物疫病分子生物学诊断实验室采集自陕西省咸阳市、西安市、宝鸡市共7个鸚鵡繁育场疑似BFDV感染鸚鵡, 共收集75份样品, 其中肝脏、心脏、肠道组织共43份, 羽髓32份。

1.1.2 参考病毒 传染性法氏囊炎病毒 (IBDV)、新城疫病毒 (NDV)、传染性喉气管炎病毒 (ILT V)、鸡痘病毒 (FPV) 均为市售商品疫苗毒株, I 群禽腺病毒4型SX17株由动物疫病分子生物学诊断实验室分离保存。

1.1.3 试剂与仪器 DNAiso Reagent、RNAiso plus、rTaq酶、dNTP等为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; pGEM-Teasy载体克隆试剂盒, Promega公司产

品; UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒, 生工生物工程 (上海) 有限公司产品; DH5 α 大肠埃希菌由动物疫病分子生物学诊断实验室保存。PCR仪, 美国ABI ProFlex; 高速冷冻离心机, 德国艾本德5424R; 超微量紫外-可见光分光光度计, 美国Thermo NanoDrop one。

1.2 方法

1.2.1 临床观察与病料处理 BFDV感染疑似病例临床表现为, 鸚鵡孵化出壳10d左右突然死亡, 腹部明显膨大, 剖检腹腔有大量透亮积液, 肝脏肿胀。将采集组织或羽髓研磨处理, 反复冻融3次, 13000 g离心10 min, 收集上清液-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 引物设计与合成 依据GenBank上公开的BFDV基因组序列 AF241168、AY672646, 针对VP1蛋白基因设计了3对引物, 由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 引物信息见表1。VP1-1F/VP1-1R、VP1-2F/VP1-2R组合进行套式PCR, 用于构建VP1基因阳性质粒, VP1-JF/VP1-JR为检测引物, 建立BFDV检测方法。

表1 引物名称、序列、位置及长度
Table1 The name, Sequence, position and length of the primers

引物名称 Primer name	核苷酸序列 (5' \rightarrow 3') Nucleotide sequence (5' \rightarrow 3')	相对 AF241168 位置 Relative AF241168 position	长度 Length
VP1-1F	GCCCACGACCTCAGCAGGTA	1924-1943	1007bp
VP1-1R	TTAGCGGGGAGCTTTGGGG	2912-2930	
VP1-2F	CATACCTTCAACCGCGGC	2020-2037	772 bp
VP1-2R	GAGTTTAGCAAACGAGATA	2773-2791	
VP1-JF	CCGCGCATTTAACGGATACG	2261-2280	465 bp
VP1-JR	TAGCGTGCTAGGCCTCGCC	2707-2725	

1.2.3 组织病料中DNA的提取 取1.5mL无菌无酶离心管, 吸取处理好的陕西省咸阳市鸚鵡繁育场组织病料上清液100 μL , 加700 μL DNAiso Reagent, 混匀后静置裂解10 min, 再加入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的无水乙醇600 μL , 混匀后沉淀DNA 10min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13000g离心10min, 弃去上清, 用1 mL -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的70%乙醇洗涤2次, 弃去乙醇, 倒置离心管在无菌滤纸上, 自然干燥至管壁无残留液体, 用40 μL 超纯水充分溶解DNA。

1.2.4 VP1基因的克隆 采用套式PCR方法克隆BFDV VP1基因。第1次扩增体系, DNA溶液 2.0 μL ,

10 \times Buffer 2.5 μL , dNTP 1.0 μL , VP1-1F、VP1-1R各0.5 μL , rTaq DNA聚合酶0.5 μL , 用超纯水补足25.0 μL 。反应条件, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 进入循环94 $^{\circ}\text{C}$ 变性40 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共35个循环, 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。第2次扩增体系, 第1次扩增产物2.0 μL , 引物更换为VP1-2F、VP1-2R, 其他成分与第1次扩增相同。反应条件, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 共35个循环, 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。反应完毕进行琼脂糖凝胶电泳观察。

1.2.5 VP1基因的正性质粒的构建 PCR产物电泳后

在紫外分析仪中切下目的条带,将胶块放入1.5 mL EP管中,每管加入Binding Buffer 700 μ L, 55 $^{\circ}$ C水浴10 min至胶块充分融化,将融化的胶溶液转移到吸附柱中,室温放置2 min, 8 000g离心1 min,弃去收集管中废液,在吸附柱中加入 500 μ L 洗液, 8 000g离心30 s,弃去废液,重复洗涤一次,弃去废液后将吸附柱10 000g离心15 s,在吸附柱膜中央加入20 μ L 55 $^{\circ}$ C水浴预热的Elution Buffer,将吸附柱放入洁净1.5 mL EP管中,室温放置2 min, 10 000g离心2 min,离心管中液体即为回收的VP1基因DNA片段。将回收的DNA片段与pGEM-T Easy载体连接, 4 $^{\circ}$ C水浴过夜,转化DH5 α 感受态细胞,经苜蓿阳性LB培养基筛选,挑取单个菌落, 37 $^{\circ}$ C、200r/min摇动培养至饱和,菌液PCR鉴定为阳性,碱裂解法提取质粒, EcoR I 酶切鉴定,阳性质粒由生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.2.6 BFDV PCR检测方法的建立 在微量紫外-可见分光光度计测定pGEM-T-VP1质粒浓度,以阳性质粒做为模板,改变扩增体系和反应条件,确定最佳PCR方案。PCR反应体系,质粒 1.0 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTP 1.0 μ L, VP1-JF、VP1-JR各0.5 μ L, 梯度增加rTaq DNA聚合酶用量(0.25~1.0 μ L), 总体积25.0 μ L剩余量用超纯水补足。反应条件, 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火温度由52 $^{\circ}$ C~58 $^{\circ}$ C按1 $^{\circ}$ C递增,时间40 s, 72 $^{\circ}$ C延伸40 s,共进行35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min,反应完成后琼脂糖凝胶电泳观察。摸索最佳反应体系和反应条件。

1.2.7 BFDV PCR检测方法灵敏性试验 按10倍梯度稀释pGEM-T-VP1质粒溶液,用建立的方法进行PCR反应,反应完毕后电泳观察。

1.2.8 BFDV PCR检测方法特异性试验 按照RNAiso plus操作说明提取NDV、IBDV核酸并反转录获得cDNA;提取ILT V、FA dV、FPV等DNA病毒DNA模板,用建立的PCR方法检测,PCR产物琼脂糖凝胶电泳,成像系统中观察照相。

1.2.9 BFDV PCR检测方法临床应用 用建立的检测方法对收集的75份疑似病例病料进行检测,阳性样品PCR产物直接进行测序分析。

2 结果与分析

2.1 VP1基因克隆试验结果

通过套式PCR方法,从陕西省咸阳市鸚鵡繁育场组织病料上清液提取的DNA中成功扩增出了预期772bp条带(图1)。

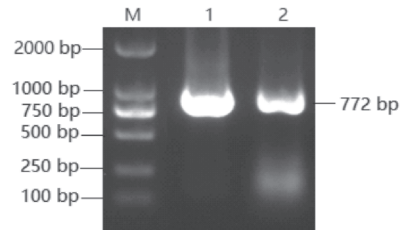


图1病料中VP1基因套式PCR扩增结果

M. DNA标准DL 2 000; 1~2.病料中VP1基因扩增

Fig.1 The result of clone VP1 gene from tissue by nPCR

M. DNA Marker DL 2 000; 1~2.Clone VP1 gene from tissue

2.2 VP1基因重组阳性质粒的构建结果

回收PCR产物连接pGEM-T Easy载体,转化DH5 α 感受态细胞,培养后挑取单个菌落,菌液PCR为阳性后提取质粒, EcoR I 酶切鉴定为阳性(图2),经过序列测定比对,与参考序列AF241168同源率为99%,提示VP1基因重组阳性质粒构建成功,将构建好的阳性质粒命名为pGEM-T-VP1。

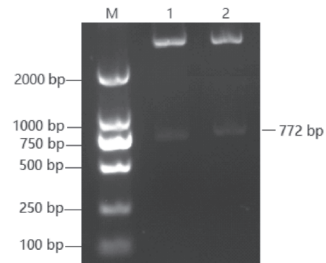


图2 重组阳性质粒酶切结果

M. DNA标准DL 2 000; 1~2.重组VP1 阳性质粒酶切

Fig.2 The electrophoresis result of enzyme digest recombinant plasmids of VP1 gene

M. DNA Marker DL 2 000; 1~2. Enzyme digest recombinant plasmids of VP1 gene

2.3 BFDV PCR检测方法的建立

以pGEM-T-VP1质粒做为模板,通过扩增体系和反应条件的探索,确定最佳PCR方案为,PCR反应体系中,超纯水19.25 μ L,质粒 1.0 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTP 1.0 μ L, VP1-JF、VP1-JR各0.5 μ L, rTaq DNA聚合酶0.25 μ L;反应条件, 95 $^{\circ}$ C预变性5 min,进入循环94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C退火40s, 72 $^{\circ}$ C延伸40 s,共进行35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

2.4 BFDV PCR检测方法灵敏性试验

用微量紫外-可见分光光度计测定pGEM-T-

VP1质粒浓度为439.5ng/μL, A260/A280为2.08, 提示质粒具有很高的纯度。用质粒拷贝数计算公式换算, pGEM-T-VP1质粒拷贝数为1.058 × 10¹¹拷贝/μL。梯度稀释质粒, 以1.058 × 10⁷~1.058 × 10¹⁰拷贝/μL共8个浓度梯度为模板进行PCR扩增, 电泳结果见图3。从图3可知, 建立的PCR方法检测的极限为105.8拷贝/μL, 提示建立的方法有很高的灵敏度。

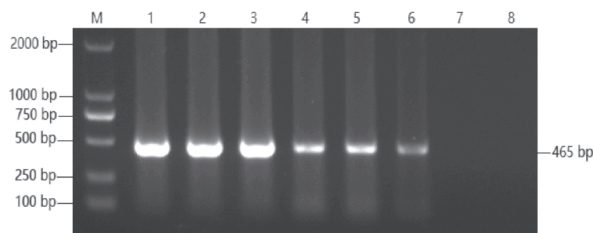


图3 PCR检测方法灵敏度试验结果

M. DNA标准DL 2000; 1~8.质粒浓度依次为1.058 × 10⁷~1.058 × 10¹⁰拷贝/μL

Fig.3 The result of sensitivity test for BFDV by PCR

M. DNA Marker DL 2000; 1~8. 1.058 × 10⁷~1.058 × 10¹⁰copies/μL of pGEM-T-VP1

2.5 BFDV PCR检测方法特异性试验

以NDV、IBDV反转录获得的cDNA作为模板, 以及ILTV、FAvD、FPV病毒DNA作为模板, 用pGEM-T-VP1作为参照, 用建立的PCR方法扩增。结果仅有pGEM-T-VP1扩增出了465 bp的目的条带, 其它5种禽常见病毒均为阴性, 提示所建立的方法特异性良好(图4)。

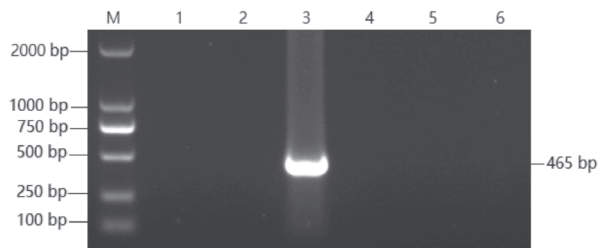


图4 PCR检测方法特异性试验结果

M. DNA标准DL 2000; 1.NDV; 2.IBDV;

3.pGEM-T-VP1; 4.ILTV; 5.FAdV; 6.FPV

Fig.4 The result of specialization test for BFDV by PCR

M. DNA Marker DL 2000; 1.NDV; 2.IBDV; 3

pGEM-T-VP1; 4.ILTV; 5.FAdV; 6.FPV

2.6 BFDV PCR检测方法临床检测与序列分析

用建立的BFDV PCR检测方法对75份疑似病例病料进行检测, 发现有19份为阳性, 阳性率为25.3%(图5)。

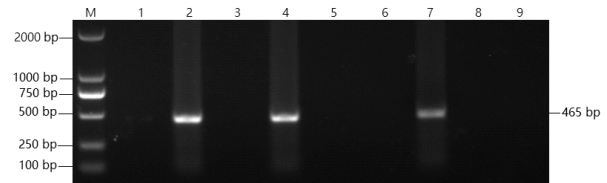


图5 部分临床样品检测结果M. DNA标准DL 2000;

2/4/7为阳性结果; 1/3/5/6/8/9为阴性结果

Fig.5 Partial clinical sample test resultsM. DNA Marker DL 2000; 2/4/7 are positive samples; 1/3/5/6/8/9 are negative samples

对其中3份不同地区来源的阳性样品进行测序, 获得的序列命名为XY2016-BFDV、XA2017-BFDV、BJ2017-BFDV, 利用DNASTAR软件, 将GenBank中公开的中国、日本、德国、波兰和葡萄牙BFDV参考毒株序列进行比对, 同源性结果见表2。从表2可知, 所有参比序列核苷酸同源性在99.4%~100%之间, XY2016-BFDV、XA2017-BFDV与BJ2017-BFDV这3株同源性为99.4%~99.8%, 结果表明不同国家和地区BFDV高度同源。

表2 BFDV测定序列与参考毒株核苷酸同源性

Table 2. BFDV assay sequence and reference strain nucleotide homology

		Percent Identity																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Divergence	1	100	99.5	99.7	99.5	99.7	99.5	99.6	99.7	99.4	99.5	99.6	99.1	99.4	99.5	1	AF241170 Germany	
	2	0.5	100	99.5	99.5	99.5	99.4	99.6	99.7	100.0	99.5	99.8	100.0	2	2	APV-P MK061528 China		
	3	0.3	0.5	100	99.5	99.7	99.6	99.6	99.6	99.4	99.6	99.4	99.6	99.8	3	3	APV3 AB453161 Japan	
	4	0.5	0.4	0.5	100	99.5	99.4	99.5	99.5	99.5	99.7	99.4	99.6	99.8	4	4	APV7 AB453165 Japan	
	5	0.3	0.4	0.3	0.5	100	99.6	99.7	99.5	99.6	99.6	99.4	99.6	99.8	5	5	AY672646 China	
	6	0.4	0.5	0.4	0.6	0.4	100	99.6	99.4	99.5	99.5	99.1	99.4	99.6	6	6	FJ385773 China	
	7	0.4	0.5	0.4	0.6	0.4	0.5	100	99.6	99.4	99.5	99.5	99.1	99.4	99.6	7	7	GF1-1 AB453166 Japan
	8	0.3	0.4	0.4	0.5	0.3	0.4	0.4	100	99.5	99.6	99.6	99.6	99.8	100.0	8	8	PL1067X KT203766 Poland
	9	0.6	0.3	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6	0.5	100	99.7	99.6	99.6	99.8	100.0	9	9	PT919 KX008969 Portugal
	10	0.4	0.3	0.4	0.2	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	100	99.7	99.4	99.6	99.8	10	10	PL1233X KT203769 Poland
	11	0.4	0.0	0.5	0.3	0.4	0.5	0.5	0.4	0.3	0.3	100	99.6	99.8	100.0	11	11	SD18 MH643735 China
	12	0.9	0.4	0.6	0.6	0.6	0.9	0.9	0.4	0.4	0.6	0.4	100	99.4	99.8	12	12	BJ2017-BFDV
	13	0.6	0.2	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6	0.2	0.2	0.4	0.2	0.5	100	99.8	13	13	XA2017-BFDV
	14	0.4	0.0	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.0	0.0	0.2	0.0	0.4	0.2	100	14	14	XY2016-BFDV

基因进化树显示(图6), 研究获得的XY2016-BFDV、XA2017-BFDV与BJ2017-BFDV这3株病毒和波兰、日本、葡萄牙、德国和中国其他地区参考毒株分布在不同的进化分支上, 显示出一定的地域特征。

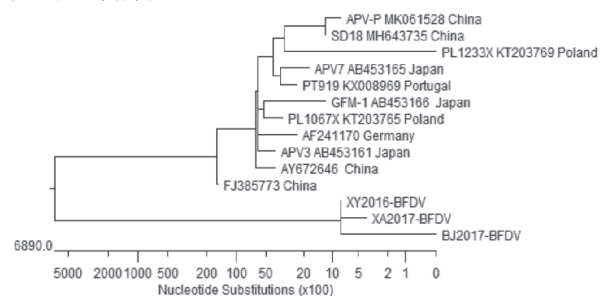


图6 BFDV基因进化树

Fig.6 BFDV gene evolution tree

3 讨论

由于鸚鵡幼稚病病毒对鸚鵡养殖危害巨大,为及早诊断控制鸚鵡幼稚病病毒感染,急需开发相应的确诊技术手段。但是,国内对该病的研究极为有限,分离获得病毒的研究仅有李天宪等^[13]报道过。蒋文明等、寇铮等、庄青叶等对国内流行的BFDV毒株进行了全基因或VP1基因序列克隆分析,但在进行流行病学调查时未明确检测方法是如何建立的,所用方法的灵敏性亦未说明。JINGJIAO MA等^[14]建立了TaqMan实时荧光定量PCR方法,其灵敏度可达30拷贝/ μL 。为了解决阳性参照缺乏的问题,本研究针对VP1基因设计了2对引物,以套式PCR方法从疑似病例病料中扩增目的片段,将PCR产物克隆入pGEM-T easy载体中,通过转化DH5 α 感受态细胞、筛选阳性菌落、质粒酶切鉴定和测序分析,确定获得了BFDV VP1基因的阳性质粒,为建立PCR诊断方法提供了阳性参照。以阳性质粒为参照,测定出本研究建立的普通PCR检测方法的极限为105.8拷贝/ μL ,并能特异地扩增BFDV VP1基因片段,提示所建立的方法灵敏性、特异性良好,可作为临床快速检测方法。与JINGJIAO MA等^[14]建立的TaqMan实时荧光定量PCR方法相比,虽然本方法灵敏性稍低,但常规PCR方法成本更低、普通分子实验设备即可完成,更适合基层实验室大范围进行流行病学调查。应用该方法检测临床75份疑似病料,19份为阳性,阳性率25.3%,提示陕西省内鸚鵡养殖场BFDV临床感染率较高。基因测序有助于分析病毒感染的来源、明确基因变异与疾病的关系^[15],因此本研究选取咸阳市、西安市和宝鸡市3个地区3份PCR阳性产物进行测序分析,结果表明,这3个流行毒株同源性为99.4%~99.8%,与参考毒株同源性为99.4%~100%,提示不同国家和地区的BFDV同源性很高,可能具有同一起源。基因进化树显示,本研究测定的XY2016-BFDV、XA2017-BFDV与BJ2017-BFDV这3株病毒构成了一个独立的进化分支,和参考毒株分布明显不同,地域特征较为显著,这一结果与我国部分地区BFDV VP1基因序列研究结论基本一致。总之,本研究建立的PCR方法为临床快速诊断BFDV提供了技术手段,检测出的阳性病料和VP1基因序列分

析结果为后续病原生物特征研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 翁善钢. 鸚鵡常见DNA病毒性疾病研究综述[J]. 广东畜牧兽医科技, 2012, 37(2): 1-4.
- [2] DAVIS R B, BOWMAN L H, GAUDRY D, et al. A viral disease of fledgling budgerigars[J]. Avian Dis, 1981, 25(1): 179-183.
- [3] 龚少宇, 李天宪, 盛希群. 鸟多瘤病的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(6): 479-480.
- [4] BOWMAN L H, DAVIS R B, GAUDRY D, et al. Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigar[J]. Avian Dis, 1981, 25(4): 972-980.
- [5] 吴延功, 刘燕征, 杜元钊, 等. 澳洲长尾小鸚鵡幼稚病[J]. 中国动物检疫, 1997, 14(5): 36-37.
- [6] JOHNE R, MULLER H. Avian polyomavirus in wild birds: genome analysis of isolates from Falconiformes and Psittaciformes[J]. Arch Viro, 1998, 143(8): 1501-1512.
- [7] 吴延功, 张子春, 王玉东, 等. 中国发现澳洲长尾小鸚鵡幼稚病[J]. 中国兽医学报, 1996, 16(2): 218-220.
- [8] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科技出版社, 1997.
- [9] 蒋文明, 庄青叶, 马青霞, 等. 青岛即墨鸚鵡幼稚病的诊断及病毒VP1基因序列分析[J]. 中国动物检疫, 2008, 25(12): 47-48.
- [10] 庄青叶, 蒋文明, 侯广宇, 等. 山东一株鸚鵡幼稚病病毒全序列测定与分析[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(10): 1885-1887.
- [11] 夏苇, 冯峰, 王旭, 等. 我国一株鸚鵡新病毒的生化性质及鉴定[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2000, 34(2): 216-219.
- [12] 张学, 纪钟书, 王宏钧, 等. 2014-2018年中国大陆部分地区鸚鵡禽多瘤病毒感染情况调查[C]//中国畜牧兽医学会2018年学术年会禽病学分会第十九次学术研讨会论文集. 广西南宁: 中国畜牧兽医学会禽病学分会, 2018: 247.
- [13] 李天宪, 冯峰, 夏苇, 等. 我国1株鸚鵡幼稚病毒的细胞培养特性[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(2): 138-140.
- [14] JINGJIAO MA, YE TIAN, MIN ZHANG, et al. Establishment of rapid detection method and surveillance of budgerigar fledgling disease virus using a TaqMan Real-Time PCR[J]. Molecular and Cellular Probes, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2018.11.002>.
- [15] REBECCA E. D., RODGERS, RICHARD A. Consigli. Characterization of a calcium binding domain in the VP1 protein of the avian polyomavirus, budgerigar fledgling disease virus[J]. Virus Research, 1996, 44: 123-135.

[责任编辑 王军利]