

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.03.02

3 株鸡传染性贫血病毒的全基因组序列分析

邓显文, 张民秀, 谢芝勋*, 张艳芳, 谢丽基, 谢志勤, 刘加波, 罗思思, 曾婷婷

(广西壮族自治区兽医研究所, 广西兽医生物技术重点实验室, 南宁 530001)

[收稿日期] 2019-11-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 03-0007-08 [中图分类号] S852.65

[摘要] 通过对 3 株鸡传染性贫血病毒(CIAV)的全基因组序列比较分析,部分表明广西南宁鸡群 CIAV 毒株的遗传变异特征。将阳性 CIAV 的组织样品进行 DNA 抽提后,运用 PCR 方法分段扩增 CIAV 的全基因组,将获得的 PCR 产物进行基因克隆并进行阳性克隆菌鉴定后送测序。将所获得的基因序列进行拼接成 CIAV 基因组全长后,应用 LaserGene7.1 和 MEGA4.1 软件对 CIAV 全基因、Viral protein 3(VP3)、Viral protein 1(VP1)和 Viral protein 2(VP2)基因序列进行核苷酸、氨基酸同源性分析和遗传进化分析;并对 VP1、VP2 和 VP3 蛋白上与毒力、蛋白磷酸酶活性和细胞凋亡相关的氨基酸位点进行分析。结果获得 3 株 CIAV 的全基因序列,分别命名为 GX1801、GX1804 和 GX1810;CIAV 全基因遗传进化分析表明 GX1801、GX1804 和 GX1810 均同属于 Group A 群,与国内强毒株 GD-103 和 GD-104 毒株的亲缘关系较近;基于 VP1 基因构建的遗传进化树与全基因构建的进化树最相似;GX1801、GX1804 和 GX1810 VP1 蛋白上与毒力相关位点的第 75、89、125、141、144、394 位氨基酸位点与日本强毒株 C368 株、国内强毒株 GD-103 和 GD-104 株在同一位点保持一致;GX1801、GX1804 和 GX1810 VP2 蛋白上与磷酸酶活性相关的基序(I⁹⁴CNCGQFRKH¹⁰³)均未发生变异;GX1801、GX1804 和 GX1810 VP3 蛋白与诱导细胞凋亡相关的重要区域(VP3 蛋白 N 端结构域的第 1~69 位氨基酸)均高度保守。本研究对 3 株 CIAV 全基因组进行测定并进行基因分析,获得了其基因组特征,为进一步研究广西 CIAV 的分子流行和致病性提供参考。

[关键词] 鸡传染性贫血病毒;全基因;遗传进化

Complete Genomic Sequences Analysis of Three Chicken Infection Anemia Viruses

DENG Xian-wen, ZHANG Min-xiu, XIE Zhi-xun*, ZHANG Yan-fang, XIE Li-ji,

XIE Zhi-qin, LIU Jia-bo, LUO Si-si, ZENG Ting-ting

(Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China)

基金项目: 广西科技项目(桂科 AD17195083、桂科 AA17204057);“广西八桂学者”专项(2019.79);国家“万人计划”领军人才专项(W02060083)

作者简介: 邓显文,研究员,学士,从事动物分子生物学研究;张民秀,助理研究员,从事动物传染病病原和分子免疫学研究。张民秀与邓显文为并列第一作者。

通讯作者: 谢芝勋, E-mail: xiezhixun@126.com

Abstract: By comparing and analyzing the whole genome sequences of three chicken infectious anemia viruses (CIAV), the genetic variation characteristics of CIAV in chicken flock from Nanning of Guangxi province were partly revealed. The CIAV complete genomes from the positive samples were amplified by PCR after DNA extraction from liver samples of commercial broilers. LaserGene7.1 and MEGA4.1 softwares were used to analyze the nucleotide / amino acid homology and genetic evolution of CIAV complete genomes, Viral protein 3 (VP3), Viral protein 1 (VP1) and Viral protein 2 (VP2); and the amino acid sites related to viral virulence, protein phosphatase activity and apoptosis of VP1, VP2 and VP3 were analyzed. The results showed that three CIAV complete genome sequences were successfully obtained, named GX1801, GX1804 and GX1810, respectively; Genetic evolution analysis showed that GX1801, GX1804 and GX1810 belonged to the Group A and were closely related to the domestic virulent strain GD - 103 and GD - 104; The phylogenetic trees results showed that the phylogenetic tree based on VP1 gene was the most similar to that based on the complete genome; the amino acid sites at 75aa, 89aa, 125aa, 141aa, 144aa and 394aa of VP1 protein of GX1801, GX1804 and GX1810 were the same as those of C368, GD - 103 and GD - 104 strain; There was no variation of the phosphatase activity related motifs ($I^{94}CNCGQFRKH^{103}$) on VP2 protein in GX1801, GX1804 and GX1810, and the important regions (the amino acid sites at 1 to 69 of N - terminal domain) related to apoptosis induction of VP3 protein in GX1801, GX1804 and GX1810 VP3 were highly conserved. In this study, the genomes of three strains of CIAV were sequenced and analyzed, and the genomic characteristics were obtained, which can provide reference for further study of molecular epidemiology and pathogenicity of CIAV in Guangxi.

Key words: chicken infection anemia virus; complete gene; genetic evolution

鸡传染性贫血病 (Chicken infection anemia, CIA) 是由鸡传染性贫血病毒 (Chicken infection anemia virus, CIAV) 引起的鸡免疫抑制病, 易感雏鸡感染该病毒主要表现为再生性贫血障碍、骨髓萎缩和胸腺淋巴组织萎缩等症状^[1]。我国于 1992 年首次在鸡群中分离鉴定 CIAV^[2], 随后在黑龙江省、安徽省、广西省等地的鸡群均检测到 CIAV 的存在^[3-5]。CIAV 基因组全长约为 2.3 kb, 为单股负链 DNA, 含有 3 个开放阅读框 (Open reading frames, ORFs), 分别是 ORF1, ORF2 和 ORF3, 依次编码 Viral protein 3 (VP3)、Viral protein 1 (VP1) 和 Viral protein 2 (VP2)^[6]。VP1 蛋白是 CIAV 的核衣壳蛋白, 并且是 CIAV 的唯一结构蛋白和主要免疫原蛋白, 可刺激机体产生较高的中和抗体。VP2 蛋白是 CIAV 的支架蛋白, 并且是 VP1 蛋白的辅助蛋白, 帮助 VP1 蛋白形成正确的构像, 从而使 VP1 蛋白暴露出中和表位^[7]。VP3 蛋白是 CIAV 的非结构蛋白, 又称为凋亡素, 具有诱导鸡胸腺淋巴母细胞

和原始造血细胞凋亡的作用, 从而导致雏鸡出现再生性贫血障碍症^[8]。

根据 CIAV 全基因组的遗传进化规律, 将 CIAV 主要分为 4 个基因群, 分别是 Group A、Group B、Group C 和 Group D^[9-10]。目前研究显示 Group A 在世界范围内广泛流行, 是优势的基因群^[11-13]。我国主要流行的基因群为 Group A, 鸡群中散发存在 Group B 和 Group D 基因群^[9]。解慧梅^[14]在 2012 - 2104 年间对江苏省鸡群 CIA 进行了血清学调查, 发现血清抗体阳性率平均达到 31.9%。储鸿蒙^[15]对安徽省 CIA 血清学调查显示, 血清阳性率达 63.6%。这些数据再一次证实了我国 CIAV 感染鸡群的广泛性。本研究分别于 2018 年 1 月、4 月和 8 月在广西南宁市规模化鸡场采集到 3 份病鸡肝脏组织样品, 运用 CIAV 的检测引物鉴定为 CIAV 阳性后, 分段扩增 CIAV 的基因组, 并进行测序后将分段扩增的目的片段进行拼接, 获得 3 株 CIAV 的全基因组, 对这 3 株 CIAV 的基因组进行序列分析,

以期获得广西南宁市 CIAV 流行毒株的分子变异趋势,为进一步丰富 CIAV 的分子流行病学提供依据。

1 材料与方法

1.1 病料来源及 CIAV PCR 鉴定 2018 年 1 月、4 月和 8 月份于广西南宁市规模化鸡场商品代肉鸡采集到 3 份肝脏组织。样品处理:磷酸缓冲溶液(PBS)按照(肝脏:PBS)1:5 稀释混成匀浆,将匀浆吸入到 EP 管中,反复冻融 3 次,3000 r/min 离心 20 min,取上清液并 -70 ℃ 保存备用;运用参考文献^[16]中的引物鉴定这 3 份病料均为 CIAV 阳性。

1.2 主要试剂 分子克隆所需试剂盒 EasyPure Genomic DNA kit、DH5α 感受态细胞和胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;pMD18-T、TaKaRa Ex Taq 和 DL2000 Maker 购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

1.3 CIAV 全基因扩增引物 扩增 CIAV 全基因引物如表 1,引物由华大基因生物科技(深圳)有限公司合成。

表 1 引物序列信息

Tab 1 The information of primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') The sequences of the primers (5'→3')	大小 Sizes
CIAV41	CCGCGCAGGGCAAGTA	872bp
CIAV42	TCGCGGAGGGCAYGTTATTATCTA	
CIAV43	GCCCCATCGCCGCTGAGTTGA	907bp
CIAV44	TGCCGGTTACCCAGTTGCCAVAC	
CIAV55a	ATGAGACCCGACGAGCAAC	1254bp
CIAV32C	CCACACAGCGATAGAGTGATTG	

1.4 病料 DNA 的提取 3 份阳性 CIAV 组织样品的 DNA 按照 EasyPure Genomic DNA kit 的操作说明书提取,提取好的 DNA 于 -70 ℃ 保存备用。

1.5 CIAV 全基因的扩增及序列分析 将提取好的 DNA 参照 TaKaRa Ex Taq 操作说明进行 CIAV 全基因的扩增。PCR 产物进行电泳纯化后按照常规操作进行基因克隆,挑取阳性克隆菌液送华大基因生物科技(深圳)有限公司测序。应用 LaserGene7.1 对获得的序列进行拼接、拼接完成后运用

LaserGene7.1 和 MEGA 4.0 软件对 CIAV 全基因序列的核苷酸、VP1、VP2 和 VP3 蛋白氨基酸序列进行分析,并构建 CIAV 全基因、VP1、VP2 和 VP3 基因的遗传进化树。从 GenBank 上获得 28 条 CIAV 全基因序列,其中包括 13 条国外参考毒株的全基因序列,15 条国内参考毒株的全基因序列。

2 结果

2.1 CIAV 全基因扩增和序列测定结果 应用 CIAV 分段扩增引物对 3 份阳性 CIAV 的全基因进行分段扩增,扩增产物大小分别约为 872、907 和 1254 bp,见图 1。3 株 CIAV 基因组经过基因测序鉴定后,运用 LaserGene7.1 对 3 段基因进行拼接后,3 条全基因序列大小均为 2298 bp,将 3 株 CIAV 进行命名,分别是 GX1801、GX1804 和 GX1810,将序列上传至 GenBank 基因库,得到的相应序列号,分别是 MK484614、MK484615 和 MK484616。

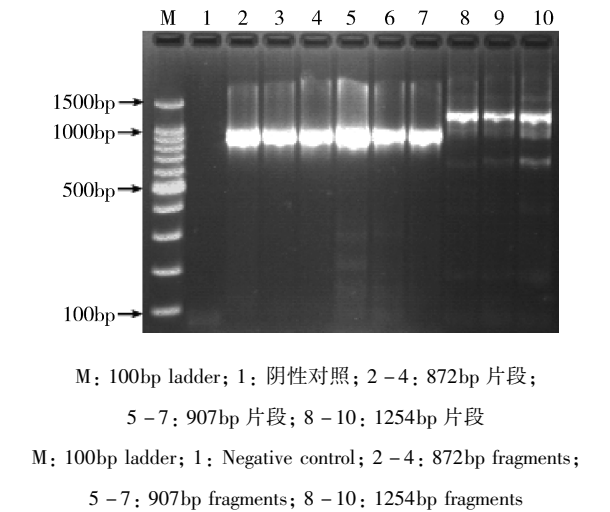


图 1 CIAV 基因组片段的扩增

Fig 1 The fragments amplification of the genome of CIAV

2.2 3 株 CIAV 全基因序列同源性分析及遗传进化分析 GX1801、GX1804 和 GX1810 全基因核苷酸序列之间的同源性为 99.3% ~ 99.7%,与 28 株参考毒株的核苷酸同源性为 95.6% ~ 99.8%; GX1801、GX1804 和 GX1810 全基因序列与参考毒株的遗传进化分析表明(图 2),CIAV 遗传进化树可分为 4 个基因群,分别是 Group A、Group B、Group C 和 Group D,所参考的中国毒株分别分布在

Group A、Group B 和 Group D 群; 本研究的 3 株 CIAV 与 12 株中国参考毒株同属于 Group A, 并与 GD-104 和 GD-103 的亲缘关系最近, 同源性在 99.3%~99.9%; 该结果说明了国内的 CIAV 流行毒株主要以 Group A 基因群为主(图 2)。根据遗传进化树的基因分群, 将本研究 3 株 CIAV 全基因序列分别与属于 Group A、Group B、Group C 和 Group

D 的参考毒株进行核苷酸进行同源性分析, 结果显示与 Group A 的参考序列间的核苷酸同源性为 96.5%~99.8%; 与 Group B 的参考序列间的核苷酸同源性为 97.7%~98.2%; 与 Group C 的参考序列间的核苷酸同源性为 96.2%~96.9%; 与 Group D 的参考序列间的核苷酸同源性为 95.6%~96.5%。

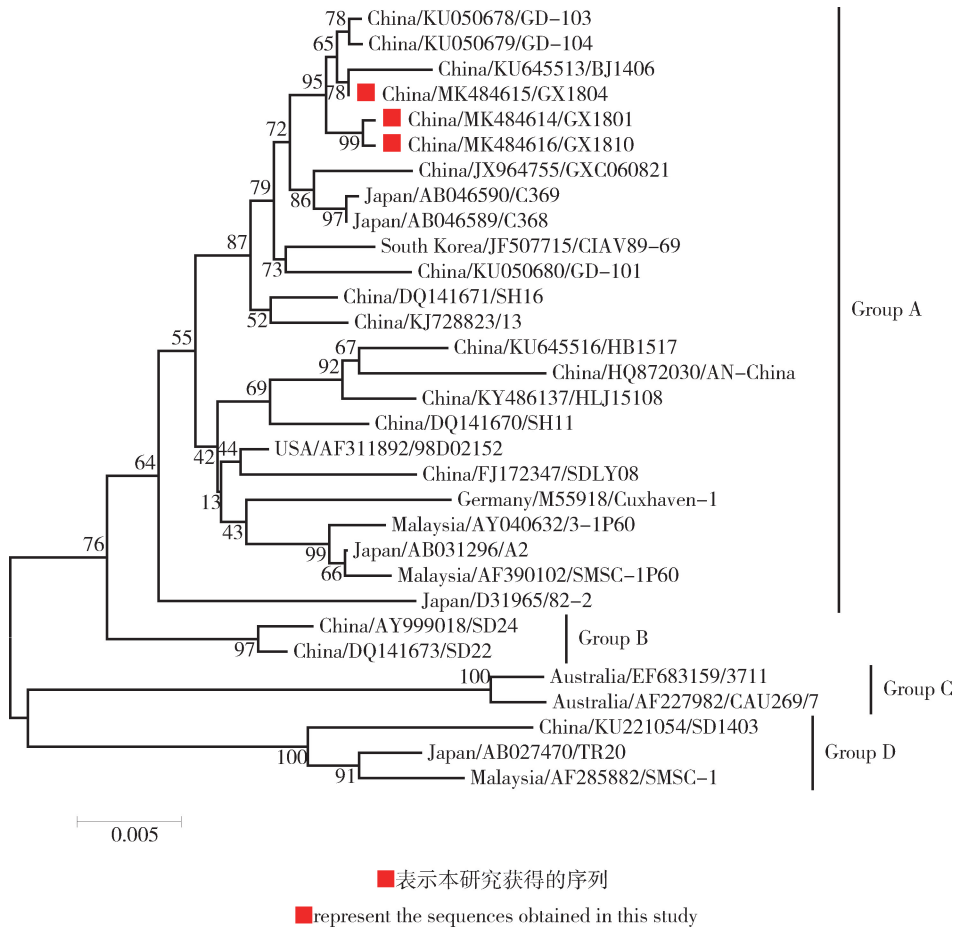


图 2 CIAV 全基因遗传进化树

Fig 2 The phylogenetic tree of CIAV complete genome

2.3 运用 VP1 基因、VP2 基因和 VP3 基因构建进化树的结果比较 比较基于 VP1、VP2 和 VP3 基因构建的遗传进化树, 发现基于 VP1 构建的遗传进化树可分为 Group A、Group B、Group C 和 Group D 4 个基因群, 并且与基于 CIAV 的全基因进化树分群相一致, 而 VP2 和 VP3 的遗传进化树仅能分为 Group A、Group B、Group C 或 Group A、Group D、

Group C(图 3); 以上数据说明 CIAV 的分群可依据 VP1 基因进行区分。

2.4 GX1801、GX1804 和 GX1810 VP1、VP2 和 VP3 氨基酸序列分析 将本研究获得毒株和 28 株参考毒株的 VP1 蛋白的氨基酸序列进行比对, 发现 VP1 蛋白的变异主要集中在第 75、97、125、139、144、287、370、376、413 和 447 位氨基酸位点;

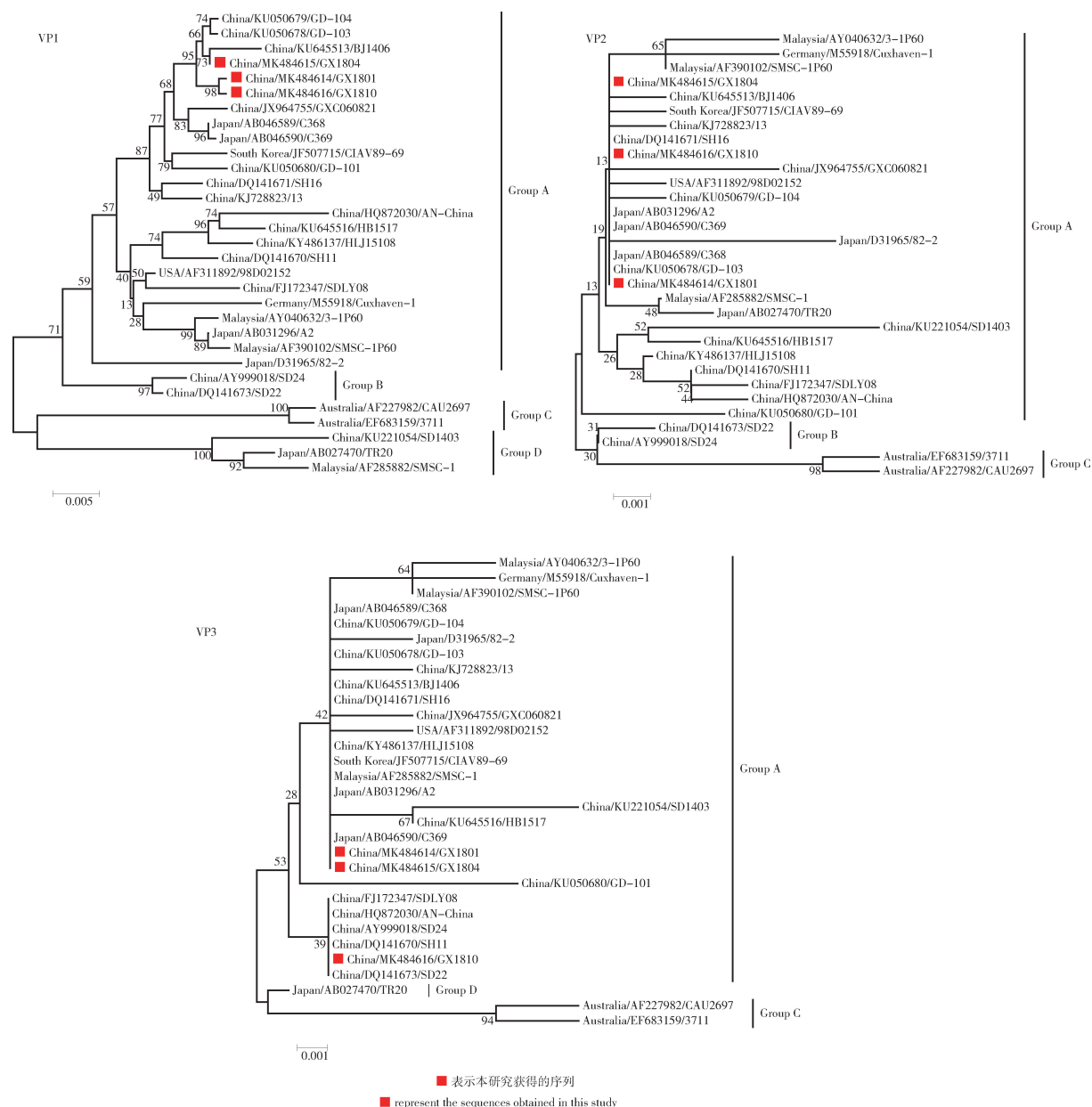


图 3 基于 VP1、VP2 和 VP3 基因构建的遗传进化树

Fig 3 The phylogenetic tree of CIIV base on the VP1、VP2 和 VP3 genes

GX1801、GX1804 和 GX1810 VP1 蛋白与 28 株参考毒株的氨基酸同源率为 96.8% ~ 100%，其中与 GD-103 和 GD-104 的氨基酸同源率为 99.8% ~ 100%；分析 GX1801、GX1804 和 GX1810 VP1 蛋白高变区 (139aa ~ 151aa) 发现，3 个毒株在该区域没有出现氨基酸位点的增加和缺失，并且具有高度保守的特性；分析 VP1 蛋白上与毒力相关的氨基酸位点 (第 75、89、125、141、144、394 位氨基酸位点)，发

现 GX1801、GX1804 和 GX1810 与国外强毒株 Cuxhaven-1 在第 75、89、141、394 位氨基酸位点上保持一致，与弱毒株 C369 仅在第 394 位氨基酸存在差异；与日本强毒株 C368、国内强毒株 GD-103 和 GD-104 株在第 75、89、125、141、144、394 位氨基酸位点全部一致，推测 GX1801、GX1804 和 GX1810 与日本强毒株 C368、国内强毒株 GD-103 和 GD-104 株可能具有相似的致病性 (表 2)。

本研究中 VP2 蛋白氨基酸序列比对结果显示 VP2 蛋白上氨基酸位点的变异较少,说明 VP2 蛋白氨基酸序列高度保守,GX1801、GX1804 和 GX1810 VP2 蛋白与 28 株参考毒株的氨基酸同源性为 98.6% ~ 100%;其中与 GD - 103 和 GD - 104 的氨基酸同源性为 99.5% ~ 100%;GX1801、GX1804 和 GX1810 VP2 蛋白上与磷酸酶活性相关的基序(I⁹⁴CNCGQFRKH¹⁰³)均未发生变异。比较所有 VP3 蛋白的氨基酸序列,结果发现 VP3 蛋白的氨基酸序列高度保守,未见有明显的变异;GX1801、GX1804 和 GX1810 VP3 蛋白与 28 株参考毒株的氨基酸同源性为 96.7% ~ 100%;其中与 GD - 103 和 GD - 104 的氨基酸同源性均为 100%;分析 GX1801、GX1804 和 GX1810 VP3 蛋白与诱导细胞凋亡相关的重要区域(VP3 蛋白 N 端结构域的第 1 - 69 位氨基酸),发现这个区域高度保守。

表 2 GX1801、GX1804、GX1810 和 Cuxhaven - 1、C368、C369、GD - 103、GD - 104 间的氨基酸位点变化

Tab 2 Amino acid changes during GX1801, GX1804, GX1810, Cuxhaven - 1, C368, C369, GD - 103 and GD - 104

毒株 Strain	VP1 蛋白氨基酸位点位置 Amino acid position in VP1 protein						
	75	89	125	139	141	144	394
Cuxhaven - 1	V	T	I	K	Q	D	Q
C368	V	T	L	K	Q	E	Q
C369	V	T	L	K	Q	E	H
GD - 103	V	T	L	K	Q	E	Q
GD - 104	V	T	L	K	Q	E	Q
GX1801	V	T	L	K	Q	E	Q
GX1804	V	T	L	K	Q	E	Q
GX1810	V	T	L	K	Q	E	Q

3 讨 论

蒋玲艳^[5]于 2002 - 2004 年间对广西鸡群的 CIAV 的感染情况进行了流行病学调查,并证明 CIAV 在广西鸡群中普遍存在。邓显文等^[17]于 2006 年对一株广西 CIAV 分离株进行遗传进化分析,发现该分离株与天津株 TJBD40 亲缘关系较近。

近年来,未见有关于广西 CIAV 的流行情况的报道,本试验从临床组织样品中扩增并获得 3 株广西南宁 CIAV 的全基因序列,为广西 CIAV 的分子流行病学调查提供了重要材料。

本研究参考 Eltahir 等^[9]对 CIAV 的分群,将 CIAV 遗传进化树分为 4 个基因群(Group A、Group B、Group C 和 Group D),国内所参考的 15 株中国毒株分别分布在 Group A、Group B 和 Group D 群,与 Eltahir Y M 的研究相一致,本研究的 GX1801、GX1804 和 GX1810 毒株与 12 株中国参考毒株同属于 Group A,再次证实了国内流行毒株主要以 Group A 群为主,并且 GX1801、GX1804 和 GX1810 毒株与国内毒株 GD - 103、GD - 104 的亲缘关系较近,其与 GD - 103、GD - 104 具有较高的氨基酸同源性,因此,推测 GX1801、GX1804 和 GX1810 毒株可能与 GD - 103、GD - 104 来源于同一毒株。本研究比较了基于 CIAV 全基因、VP1 基因、VP2 基因和 VP3 基因构建的进化树,发现 CIAV 全基因和 VP1 基因所构建的进化树相一致,而基于 VP2 基因和 VP3 基因构建的进化树不能够更细致的分群,因此基于 VP1 基因对 CIAV 进行分群给 CIAV 在基因群上的划分上带来一定的指导意义。

CIAV 的致病性和在细胞上的增殖、复制与 VP1 蛋白的氨基酸位点关系密切。Renshaw 等^[18]发现 VP1 上第 139 和第 144 位氨基酸位点均突变为谷氨酰胺(Q)时,会降低病毒在 MACC - MSB1 细胞上的增殖和传播效率。GX1801、GX1804 和 GX1810 VP1 蛋白上第 139 和 144 的氨基酸位点分别为赖氨酸(K)和谷氨酸(E),而与之比较的 C368 和 C369 株均能在 MACC - MSB1 细胞上增殖并具有较高的病毒效价^[19],因此,推测 GX1801、GX1804 和 GX1810 可能在 MACC - MSB1 细胞上具有很好的适应性。Todd 等^[20]对 Cuxhaven - 1 株 VP1 蛋白位点第 75、89、125、141、144 都进行了突变,但仍然保留 394 位氨基酸为谷氨酰胺(Q),发现该 Cuxhaven - 1 突变株毒力减弱,并且不能引起贫血、骨髓和胸腺萎缩。本研究中参考的 C368 和 C369 株已经经过 Yamaguchi 等^[19]的鉴定,分别是具有高

致病性强毒株和低致病性的弱毒株,而国内毒株 GD-103 和 GD-104 毒株也已经经过蔺文成等^[21]鉴定为强毒株,GX1801、GX1804 和 GX1810 VP1 蛋白在毒力相关位点(第 75、89、125、141、144 和 394 位)上均与 C368、GD-103 和 GD-104 在同位点上保持一致,因此,推测本研究中的 GX1801、GX1804 和 GX1810 株可能具有高致病性,但需要进一步的人工感染试验才能确定。

CIAV 的 VP2 蛋白具有双重特异性磷酸酶活性,与磷酸酶活性相关的基序是位于 VP2 蛋白上第 94~103 位氨基酸($I^{94}CNCGQFRKH^{103}$),基序内的第 95 位和第 97 位氨基酸的突变会减弱病毒在 MDCC-MSB1 细胞上的复制能力和减少细胞病变^[22]。本研究中 GX1801、GX1804 和 GX1810 VP2 蛋白上的 $I^{94}CNCGQFRKH^{103}$ 高度保守,这是否会导致 MDCC-MSB1 细胞上产生明显的细胞病变还需要进一步研究。Astrid 等^[23]研究发现,VP3 蛋白与诱导肿瘤细胞凋亡相关的重要区域是位于 N 端结构域的第 1~69 位的氨基酸位点,该区域的缺失不能诱导肿瘤细胞的凋亡。本研究中 GX1801、GX1804 和 GX1810 VP3 蛋白 N 端结构域的第 1~69 位氨基酸均高度保守,结合 VP1 毒力相关位点的分析,推测 GX1801、GX1804 和 GX1810 在感染鸡体后可能能够引起鸡类淋巴细胞和骨髓细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] Saif Y M. 禽病学 11 版[M]. 北京:中国农业出版社,2005: 150-151.
Saif Y M. Diseases of poultry 11th edition [M]. Beijing: China agricultural Press, 2005: 150-151.
- [2] 崔现兰,辜桂香. 鸡传染性贫血病毒病的鉴定[J]. 中国畜禽传染病,1992,(6):3-5.
Cui X L, Gu G X. Identification of chicken infection anemia virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 1992, (6):3-5.
- [3] 杨林,杜宗沛,熊永忠,等. 黑龙江省鸡传染性贫血病的流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医,2000,(3):26.
Yang L, Du Z P, Xiong Y Z, *et al.* Epidemiological investigation of chicken infective anemia in Heilongjiang Province[J]. 2000, (3):26.
- [4] 杨克礼,韦平,潘玲,等. 安徽省鸡传染性贫血病的流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医,2005,(4):44-45.
Yang K L, Wei P, Pan L, *et al.* An Epidemiological surveillance on chicken infectious anemia in Anhui Province, Epidemiological investigation of chicken infective anemia in Heilongjiang Province [J]. 2005, (4):44-45.
- [5] 蒋玲艳. 鸡传染性贫血 PCR 诊断方法的建立及其广西流行病学研究[D]. 广西:广西大学,2004.
Jiang Y L. The development of PCR diagnostic technique and epidemiologic investigation of chicken infectious anemia in Guangxi [D]. Guangxi: Guangxi University, 2004.
- [6] Gelderblom H, Kling S, Lurz R, *et al.* Morphological characterization of chicken anemia agent (CAA) [J]. Arch Virol, 1989, 109: 115-120.
- [7] Douglas A J, Phenix K, Mawhinney K A, *et al.* Identification of a 24 kDa protein expressed by chicken anemia virus [J]. J Gen Virol, 1995, 76(7): 1557-1562.
- [8] Notebom M H M, Todd D, Verschueren C A J, *et al.* A single chicken anemia virus protein induces apoptosis [J]. J Virol, 1994, 68(1):346-351.
- [9] Eltahir Y M, Qian K, Jin W, *et al.* Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China[J]. Virol J, 2011, 8(1): 145.
- [10] Erfan A M, Selim A A, Naguib M M. Characterization of full genome sequences of chicken anemia viruses circulating in Egypt reveals distinct genetic diversity and evidence of recombination [J]. Virus Res, 2018, 251:78-85.
- [11] Kye, Soo-Jeong, Kim, *et al.* Phylogenetic analysis and genetic characterization of chicken anemia virus isolates from Cambodia [J]. Poultry Sci, 2013, 92(10): 2681-2686.
- [12] Kim H R, Kwon Y K, Bae Y C, *et al.* Molecular characterization of chicken infectious anemia viruses detected from breeder and broiler chickens in South Korea [J]. Poultry Sci, 2010, 89(11): 2426-2431.
- [13] Gowthaman V, Singh S D, Dhama K, *et al.* Molecular characterization of chicken infectious anemia virus isolated from commercial poultry with respiratory disease complex in India [J]. AAVS, 2014, 2(3): 171-176.
- [14] 解慧梅. 江苏省鸡传染性贫血病血清流行病学调查及病原分离与鉴定[D]. 江苏:扬州大学,2018.
Xie H M. A sero-epidemiological survey of chicken infectious anemia from Jiangsu Province and pathogen isolation with identifi-

- cation[D]. Jiangsu: Yangzhou University, 2018.
- [15] 储鸿蒙. 安徽部分地区病鸡中 CAV 的血清学调查及病毒分离鉴定[D]. 安徽:安徽农业大学, 2016.
- Chu H M. Serological investigation, isolation and identification of CAV in diseased chickens in some areas of Anhui Province[D]. Anhui: Anhui Agricultural University, 2016.
- [16] 邓显文, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸡传染性贫血病 PCR 试剂盒技术的研究及应用[J]. 广西农业科学, 2009(2):203–206.
- Deng X W, Xie Z X, Xie L J, *et al.* Development and application of PCR kit for chicken infections anemia detection [J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2009(2):203–206.
- [17] 邓显文, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸡传染性贫血病毒广西株全基因组的克隆与序列分析[J]. 动物医学进展, 2011,(4):23–26.
- Deng X W, Xie Z X, Xie L J, *et al.* Cloning and nucleotide sequence analysis of complete genome of chicken Infectious anemia virus isolates in Guangxi[J]. Progress in veterinary medicine, 2011,(4):23–26.
- [18] Renshaw R W, C Soiné, Weinkle T, *et al.* A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture[J]. J Virol, 1996, 70(12): 8872–8878.
- [19] Yamaguchi S, Imada T, Kaji N, *et al.* Identification of genetic determinant of pathogenicity in chicken anemia virus[J]. J J Gen Virol, 2001, 82(Pt 5): 1233–1238.
- [20] Todd D, Scott A N J, Ball N W, *et al.* Molecular Basis of the Attenuation Exhibited by Molecularly Cloned Highly Passaged Chicken Anemia Virus Isolates[J]. J Virol, 2002, 76(16): 8472–8474.
- [21] 蔺文成, 张新珩, 李昕建, 等. 4 株鸡传染性贫血病毒的分离鉴定及其遗传进化分析[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(9): 695–699.
- Lin w c, Zhang X H, Li X J, *et al.* Isolation, identification and phylogenetic analysis of 4 chicken anemia virus isolates [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2016, 38(9):695–699.
- [22] Peters M A, Jackson D C, Crabb B S, *et al.* Mutation of chicken anemia virus VP2 differentially affects serine/threonine and tyrosine protein phosphatase activities[J]. J Gen Virol, 2005, 86(3): 623–630.
- [23] Astrid A A M. Danen V O, Zhang Y H, *et al.* Importance of nuclear localization of apoptin for tumor – specific induction of Apoptosis[J]. J Biol Chem, 2003, 27(30): 27729–27736.

(编辑:侯向辉)