

鹿茸顶端组织 GHR 基因的 cDNA 克隆 及组织定位

李艳梅^{1a}, 贾康胜², 杨鸣琦^{1a}, 徐秀容^{1b}

(1 西北农林科技大学 a 动物医学院, b 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省珍稀野生动物抢救饲养中心, 陕西 西安 710402)

[摘要] **【目的】**检测鹿茸顶端组织 GHR 基因的表达,为鹿茸再生的分子机理研究提供理论依据。**【方法】**根据 GenBank 已发表的牛、山羊和绵羊生长激素受体(GHR)基因序列,用 CLUSTAL W 软件进行同源性分析,在保守序列设计克隆鹿 GHR 基因编码序列的引物。以 3~4 岁健康鹿生长 30 d 的鹿茸顶端组织提取的总 RNA 为模板,利用 RT-PCR 技术克隆 GHR 基因的 cDNA 序列;并用原位杂交技术对 GHR 基因在鹿茸顶端进行组织定位。**【结果】**成功克隆到了 1 967 bp 的序列(GenBank 登陆号为 EU381142),该序列包含 GHR 基因的全部编码序列。鹿 GHR 基因与牛、羊、人 GHR 核苷酸同源性分别为 97%, 97% 和 80%, GHR 蛋白氨基酸序列同源性分别为 97.9%, 97.6% 和 77.3%。杂交结果显示,在皮肤层、间叶细胞层、软骨膜层和软骨层的阳性组均有蓝色杂交信号。**【结论】**利用 RT-PCR 技术和原位杂交技术在鹿茸顶端皮肤层、间叶细胞层、软骨膜层和软骨层均检测到 GHR 的表达。

[关键词] 鹿茸; GHR; 基因克隆; 原位杂交

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2008)09-0005-06

cDNA cloning and tissue localization of GHR gene in antler tip

LI Yan-mei^{1a}, JIA Kang-sheng², YANG Ming-qi^{1a}, XU Xiu-rong^{1b}

(1a College of Veterinary Medicine, b College of Animal Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Rare Wild Animal Rescuing and Feeding Center of Shaanxi, Xi'an, Shaanxi 710402, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to detect expression of GHR in antler tip to provide theoretical basis for regeneration of antler molecular mechanism. **【Method】** A pair of primers were designed according to the homology region of GHR among other species. Total RNA was isolated from antler tip, the growing antlers from 3—4 years spotted deer were removed on the 30th day after the mineralized ones shed, and the cDNA sequence of GHR gene was cloned by RT-PCR technology. Then, in situ hybridization was performed to detect expression of GHR in the antler tip. **【Result】** Complete coding sequence of GHR gene was cloned (GenBank accepted number is EU381142), including 1 967 bp. Compared with others, the homology of GHR to bovine, ovine and human was 97%, 97% and 80% respectively, but the homology of protein was 97.9%, 97.6% and 77.3% respectively. Hybridization signals were obtained using in situ hybridization. **【Conclusion】** The results of RT-PCR and in situ hybridization showed that four regions had expression of GHR in deer antler tip.

Key words: deer antler; GHR; gene cloning; in situ hybridization

* [收稿日期] 2008-03-26
[基金项目] 西北农林科技大学博士科研启动费(01140501)
[作者简介] 李艳梅(1981—),女,河北唐山人,在读硕士,主要从事动物生理学研究。E-mail: 7311647@qq.com
[通讯作者] 徐秀容(1969—),女,湖北英山人,副教授,博士,主要从事生物技术与动物遗传育种研究。
E-mail: xiurong_xu@yahoo.com.cn

鹿为现存惟一可再生茸的动物,是目前继家畜后驯化程度最高的经济动物之一^[1-2]。鹿茸是一种特殊的骨组织,其上没有肌肉附着,而是由一层竖毛的表皮所覆盖,内含胶质等前成骨组织,富含血管和神经^[3]。鹿茸是哺乳动物惟一在失去后还能完全再生的器官,是研究哺乳动物器官再生及创伤修复的理想动物模型^[4]。

在鹿茸的生长期(约 90~120 d)骨轴的延伸很快,可达 1~2 cm/d,相应表皮层也生长很快,以便覆盖新增长的骨质,且每年鹿茸都进行周期性替换即鹿茸的再生,因此人们推测鹿茸中可能存在某种活性物质,控制并刺激鹿茸的生长。胰岛素样生长因子-1(IGF-1)最有可能是该种活性物质,其是骨吸收和骨形成的重要偶联因子。生长激素(GH)做为一种重要的内分泌因子,对骨骼的作用复杂,在骨细胞中 GH 与其特异性受体生长激素受体(GHR)结合,通过 JAK2-MAPK-STAT 途径促进 I 型胶原、碱性磷酸酶、骨钙素的表达和分泌。动物模型研究表明,注射 GH 可以加速骨重建,增加骨量和骨强度,促进骨折愈合^[5]。Suttie 等^[6]研究发现,赤鹿血液中的 GH 水平与鹿茸生长有一定相关性,但至今还未见证明 GH 直接参与鹿茸软骨细胞增殖和分化的相关研究报道。为此,本研究通过原位杂交技术检测了鹿茸顶端组织 GHR 的表达情况,以期为鹿茸再生的分子机理研究提供理论依据。

表 1 GHR 的引物序列
Table 1 Primers sequences of GHR

基因 Gene	引物序列 Primer	产物长度/bp Length of amplified fragment
GSP-GHR	5'-ATTCATGCCCCAGCCAAC-3'	
GHR-CDS	F:5'-GGTCCTACAGGTATGGATCTCTGG-3' R:5'-AGCCAACCCTGTGCCATTTC-3'	1 967
GHR1 GHR2	F:5'-CCTGTCCCAGATTATACCTCCA-3' R:5'-CCAACCCTGTGCCATTCAA-3'	196
GHR1-T	F:5'-TAATACGACTCACTATAGGG CCTGTCCCAGATTATACCTCCA-3'	
GHR2-T	R:5'-TAATACGACTCACTATAGGG CCAACCCTGTGCCATTCAA-3'	

1.3 鹿茸顶端组织 GHR 基因的克隆

1.3.1 总 RNA 的提取 用 Trizol 试剂盒提取鹿茸顶端组织的总 RNA,提取的总 RNA 用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.3.2 RT 反应 以基因特异性引物 GSP-GHR 为反转录引物,鹿茸顶端组织总 RNA 为模板反转录合成 cDNA 第一链。在反应体系中分别加入总 RNA 2.0 μL, 4 μmol/L GSP-GHR 0.5 μL, 10

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 取生长 30 d 3~4 岁鹿的鹿茸(陕西银户生态产业园):一部分放入液氮中带回实验室,保存于-80 ℃,用于 RNA 提取;另一部分立即切成约 1.5 cm×1.2 cm×0.2 cm 大小,放入 40 g/L 多聚甲醛中固定 3~4 h,转到 150 g/L 蔗糖溶液中过夜,然后倒掉蔗糖溶液保存于-80 ℃,用于原位杂交。

1.1.2 主要试剂 Trizol 试剂盒、反转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 和 dNTP Mixture 为 Invitrogen 公司产品,LA Taq DNA Polymerase 和 pMD-18T vector 为 TaKaRa 公司产品,DNA Marker 和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技有限公司,E. coli DH 5α、H. Q. &. Q 质粒微量提取试剂盒购自安徽优品生物工程有限公司,T7 RNA 聚合酶和地高辛标记及原位杂交试剂盒为 Roche 公司产品。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 发表的牛、羊 GHR 基因 cDNA 序列,在高度同源区设计引物。其中 GSP-GHR 为反转录引物,GHR-CDS 为以 cDNA 第一链为模版扩增鹿 GHR 基因编码序列的引物,引物序列见表 1。引物均由上海英俊生物工程服务有限公司(in-vitrogen)合成。

mmol/L dNTP Mixture 1.0 μL 和 DEPC 水 9.5 μL,于 65 ℃孵育 5 min,立即置冰上冷却后加入下列试剂:5×First-Strand Buffer 4.0 μL,0.1 mol/L DTT 1.0 μL,40 U/μL RNase inhibitor 1.0 μL,200 U/μL SuperScriptTM III RT 1.0 μL,反应总体积 20 μL。在 PCR 仪中,50 ℃反应 60 min,70 ℃孵育 15 min 后终止反应,冰上冷却。

1.3.3 PCR 反应 PCR 反应体系为 20 μL:4

$\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 $2.0\ \mu\text{L}$, $2.0\ \mu\text{L}\ 10\times\text{PCR}$ Buffer, $1.6\ \mu\text{L}\ 25\ \text{mmol/L}\ \text{MgCl}_2$, $2.0\ \mu\text{L}\ 2\ \text{mmol/L}$ dNTP Mixture, $8.8\ \mu\text{L}$ 灭菌的二蒸水, $0.2\ \mu\text{L}\ 5\ \text{U}/\mu\text{L}$ LA Taq DNA Polymerase, $1.4\ \mu\text{L}$ cDNA 模板。反应条件: $95\ ^\circ\text{C}\ 4\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}\ 30\ \text{s}$, $60\ ^\circ\text{C}\ 30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}\ 2\ \text{min}$, 38 个循环; $72\ ^\circ\text{C}\ 7\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。利用 MyCycler™ Thermal Cycler (BIO-RAD) PCR 仪进行扩增。PCR 产物用 $15\ \text{g/L}$ 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.3.4 扩增片段的分离和克隆 利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 从普通 $15\ \text{g/L}$ 琼脂糖凝胶上回收特异性条带, 回收产物连接于 pMD-18T 载体, 转化感受态 *E. coli* DH 5α , 涂布平板, 进行蓝白斑筛选, 然后分别接种于 $10\ \text{mL}$ LB 培养基中, $37\ ^\circ\text{C}$ 振荡过夜培养。

1.3.5 重组质粒的酶切鉴定 将抽提的质粒经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。经 PCR 和限制性内切酶酶切鉴定均为阳性的克隆, 交由上海生工生物工程有限公司测序。

1.4 原位杂交试验

将 1.1.1 中已固定好的组织修块, 用 APES 处理的载玻片贴片, 制备冰冻切片, 冰冻切片的厚度为 $10\ \mu\text{m}$ 。

1.4.1 探针制备 根据 GHR 基因编码序列测序结果, 设计引物 GHR1 和 GHR2 (详见表 1)。GHR1 和 GHR2 加上 T7 启动子接头后的引物为 GHR1-T 和 GHR2-T, 然后分别以 GHR1-T 和 GHR2, GHR1 和 GHR2-T 为引物克隆到长度为 $196\ \text{bp}$ 的序列。PCR 产物回收纯化后作为转录模板, 用 T7 RNA 聚合酶转录, 地高辛标记, 分别转录出与 mRNA 互补的 cRNA (阳性探针) 及与 mRNA 链序列相同的探针 RNA (作为阴性对照)。

1.4.2 预杂交 在 DEPC 处理的 PBS (pH 7.4) 中孵育切片 2 次, 每次 $5\ \text{min}$, 用不含 RNA 酶的 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K 在 $37\ ^\circ\text{C}$ 下通透切片 $30\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 下用 DEPC 处理的 PBS 溶液配制的 $40\ \text{g/L}$ 多聚甲醛后固定切片 $5\ \text{min}$, DEPC 处理的 PBS 冲洗切片 2 次, 每次 $5\ \text{min}$, $0.1\ \text{mol/L}$ 三乙醇胺 (TEA) pH 8.0 振荡漂洗 2 次, 每次 $5\ \text{min}$, 再用 DEPC 处理的 PBS 冲洗切片 $1\ \text{min}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 预杂交液中孵育切片 $60\ \text{min}$ 。

1.4.3 原位杂交 弃去预杂交液, 每张切片滴加 $30\sim 40\ \mu\text{L}$ 的杂交液 ($4\times\text{SSC}$, $100\ \text{g/L}$ dextran sulfate, $1\times\text{Denhardt's}$ solution, $2\ \text{mmol/L}$ EDTA, $500\ \text{mL/L}$ deionized formamide, $500\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 鲑鱼精

DNA, RNA 探针), 用原位杂交专用的杂交膜 (hydrophobic plastic coverslip) 覆盖切片, 置 $42\ ^\circ\text{C}$ 湿盒内孵育切片 $16\ \text{h}$ 。

1.4.4 杂交后处理 $37\ ^\circ\text{C}$ 将切片浸泡于 $2\times\text{SSC}$ 中 $5\sim 10\ \text{min}$, 去掉杂交膜, $37\ ^\circ\text{C}$ 用含 $600\ \text{mL/L}$ 甲酰胺的 $0.2\times\text{SSC}$ 冲浸泡冲洗切片 2 次, 每次 $15\ \text{min}$, $2\times\text{SSC}$ 洗切片 2 次, 每次 $5\sim 10\ \text{min}$ 。

1.4.5 杂交后显色 Buffer I (pH 7.5) 振荡漂洗切片 2 次, 每次 $10\ \text{min}$, 每张切片滴加 $40\ \mu\text{L}$ blocking reagent 孵育 $30\ \text{min}$, 用 blocking Buffer (含 $1:200$ 稀释的羊抗地高辛抗体 AKP 结合物) 孵育切片 $2\ \text{h}$, 在 Buffer I 中洗切片 2 次, 每次 $10\ \text{min}$, Buffer II (pH 9.5) 中孵育切片 $10\ \text{min}$, 每张切片滴加 $100\ \mu\text{L}$ 显色液, 在暗室下显色 $16\ \text{h}$ ($2\sim 24\ \text{h}$), 显色后用 Buffer III (pH 8.1) 终止显色反应, 双蒸水冲洗切片, 甘油封片, 晾干后拍照观察。

2 结果与分析

2.1 鹿茸顶端组织提取总 RNA 的检测

检测结果显示, 提取的鹿茸顶端组织总 RNA 5S, 18S 和 28S 3 条带清楚可见, 条带整齐 (图 1), 表明提取的总 RNA 没有降解, 完整性较好, 可用于后续试验。

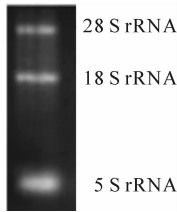


图 1 鹿茸顶端组织提取总 RNA 的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis profiles of total RNA from antler tip

2.2 鹿 GHR 基因编码序列的克隆

利用 RT-PCR 技术扩增鹿茸顶端组织 GHR 基因编码序列, PCR 产物用 $15\ \text{g/L}$ 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 得到一条约 $2\ 000\ \text{bp}$ 的特异性条带 (图 2), 与目的片段大小相符。

2.3 重组质粒的酶切鉴定

PCR 产物连接至克隆载体 pMD-18T 后转化感受态 *E. coli* DH 5α 细胞, 抽提质粒 DNA, 用 PCR 方法对阳性克隆进行初步筛选, 然后经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 可见 2 个 DNA 片段 (图 3), 大小分别与线性 pMD-18T 载体和鹿 GHR 基因相一致。

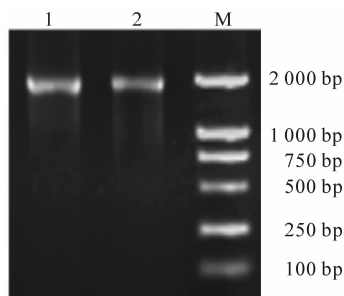


图 2 鹿茸顶端组织 GHR 基因 PCR 产物的电泳结果

M, Marker; 1, 2, GHR 基因

Fig. 2 Electrophoresis result of GHR PCR products

M, Marker; 1, 2, GHR gene

2.4 鹿 GHR 基因的同源性分析

测序结果表明,克隆的序列长度为 1 967 bp。比对分析表明,该序列为鹿 GHR 基因 cDNA 序列,从第 13 位到 1 917 位为 CDS 区。序列已经向 Gen-Bank 提交,登陆号为 EU381142。将编码区与 Gen-Bank 中已发表牛、羊和人的 GHR 基因序列进行比对,核苷酸同源性分别为 97%, 97% 和 80%, GHR 蛋白氨基酸序列同源性分别为 97.9%, 97.6% 和 77.3%。表明在鹿与牛、羊间 GHR 基因和 GHR 蛋白的同源性均较高。在鹿、羊和牛 GHR 基因的氨基酸序列中,1~18 氨基酸片段为信号肽序列,145~246 氨基酸片断为 FN3 结构域序列。在 GHR 肽链末端的细胞外配体结合区域的氨基酸序列中,鹿与羊、牛的同源性更高,鹿和羊该区域的氨基酸序列完全相同,而鹿与牛的仅有 1 个氨基酸残基不同,鹿的 GHR 位点为亮氨酸残基,牛的为甲硫氨酸残基。

2.5 原位杂交

用地高辛标记的 RNA 探针,BCIP/NBT 显色系统在鹿茸顶端组织的冰冻切片上进行原位杂交,图 4 中箭头所示蓝色颗粒为杂交阳性信号。杂交结果显示,在皮肤层、间叶细胞层、软骨膜层和软骨层的阳性组均有蓝色杂交信号,而阴性对照组均无杂交信号,说明以上各层均有 GHR 基因的表达。

3 讨 论

研究发现,GH 和 IGF-1 在骨代谢中起重要作用^[7-8],GH 的大部分生理功能是通过 IGF-1 实现的,GH 与其受体 GHR 结合后,直接或通过上调 IGF-1 的表达间接发挥对骨细胞的调节作用;GH 也可以通过 IGF-1 的介导作用于软骨细胞,促进其增殖和基质形成^[9]。研究证实,在鹿茸顶端可检测到 IGF-1 及其受体的表达^[10-12]。体外培养试验表明,IGF-1

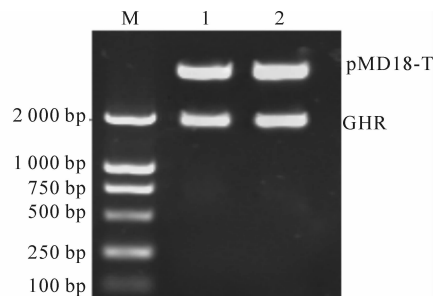


图 3 重组质粒的 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切鉴定

Fig. 3 *EcoR* I and *Hind* III restriction identification of recombinant plasmid

促进鹿茸软骨细胞的增殖和分化^[4]。而 Elliott^[13]通过放射自显影和 RRA 技术在鹿茸各部位中只检测到 IGF-1 受体,没有检测到 GHR 的分布。

原位杂交是在分子生物学领域应用极为广泛的试验技术之一,同时也是生物体发育研究过程中的一种极为重要的分子遗传学研究方法^[14-15]。由于地高辛标记法显示的颜色为紫蓝色(标记碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶显色系统),有较好的反差背景;RNA 探针是单链分子,所以它与靶序列的杂交反应极高,有报告认为其杂交率高于 DNA 探针的 8 倍,因此本试验采用地高辛标记的 RNA 探针进行原位杂交,以获得更好的杂交信号。本试验结果显示,在鹿茸顶端组织存在 GHR 基因的表达,并且从鹿茸顶端组织成功克隆出 GHR cDNA 编码区全长序列,其与牛和羊的 GHR 基因在核苷酸和氨基酸水平都具有较高的同源性。

本试验分析了牛、羊和鹿 GHR 基因的氨基酸序列同源性,结果显示,鹿的 GHR 与牛、羊 GHR 的氨基酸序列同源性分别达到 97.9% 和 97.6%,与 GHR 肽链末端的细胞外配体结合区域的氨基酸序列同源性更高,鹿和羊该结构域氨基酸序列完全相同,鹿和牛该结构域仅有 1 个氨基酸残基不同,鹿 GHR 该位点为亮氨酸残基,牛 GHR 为甲硫氨酸残基,这两个氨基酸都具有疏水基团。因此,Elliott^[13]利用牛和羊的 GH 为配体检测鹿茸顶部 GHR 的分布,检测结果为阴性的原因可能是种属特异性或方法敏感性的差异所致。

4 结 论

本试验利用原位杂交试验首次证实 GHR 在鹿茸顶端各部位都有表达,还成功克隆了 GHR cDNA 编码区全长序列,这为进一步研究 GH-IGF-1 轴对鹿茸生长的调控机理奠定了理论基础。

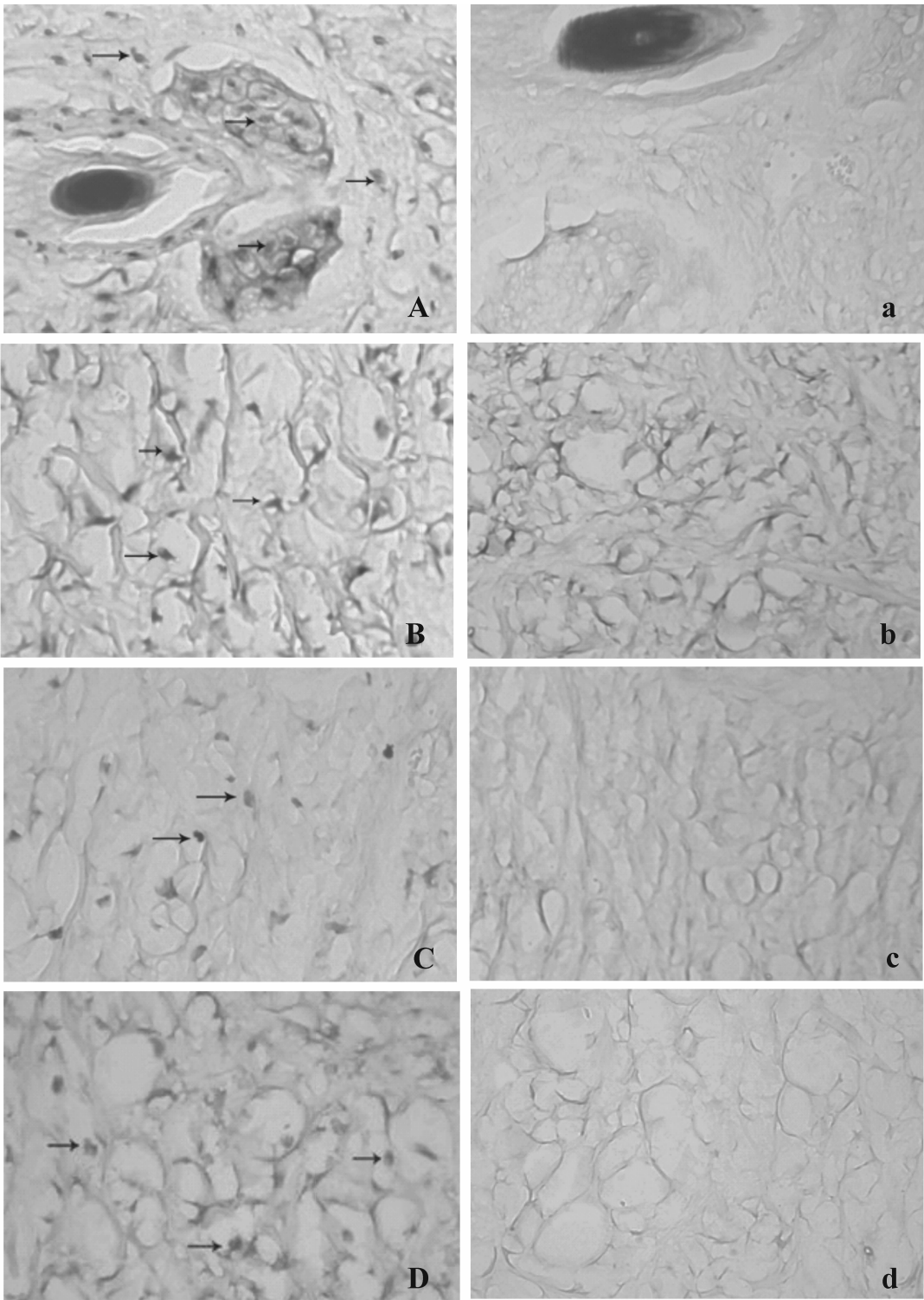


图 4 GHR mRNA 在鹿茸顶端的定位 (×200)

A. 皮肤层 GHR mRNA 原位杂交染色;B. 间叶细胞层 GHR mRNA 原位杂交染色;C. 软骨膜层 GHR mRNA 原位杂交染色;
D. 软骨层 GHR mRNA 原位杂交染色;a,b,c,d. 分别为 A,B,C,D 的阴性对照

Fig. 4 Tissue localization of GHR mRNA in antler tip (×200)

A. In situ hybridization staining of GHR mRNA in the velvet skin;B. In situ hybridization staining of GHR mRNA in mesenchymal cell;
C. In situ hybridization staining of GHR mRNA in perichondrium;D. In situ hybridization staining of GHR mRNA in cartilaginous zone;
a,b,c,d. Negative control

[参考文献]

[1]

Chapman D I. Antler-bones of contention [J]. Mammal Rew, 1975, 5: 121-172.

[2]

Goss R J. Developmental anatomy of antlers, in deer antlers, re-generation, function, and evolution [M]. New York: Academic Press, 1983: 133-171.

[3]

王秋玉, 王本祥. 论鹿茸生长因子[J]. 中医药学报, 2000, 6: 10.
Wang Q Y, Wang B X. Discussing deer antler growth factor [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmatology, 2000, 6: 10. (in Chinese)

[4]

Price J, Allen S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2004, 359(1445): 809-822.

[5]

Bail H J, Kolbeck S, Krummrey G, et al. Systemic application of growth hormone for enhancement of secondary and intramembranous fracture healing [J]. Horm Res, 2002, 58 (Suppl 3): 39-42.

[6]

Suttie J M, Fennessy P F, Corson I D, et al. Pulsatile growth hormone, insulin-like growth factors and antler development in red deer (*Cervus elaphus*) stags [J]. J Endocrinol, 1989, 121: 351-360.

[7]

DiGirolamo D J, Mukherjee A, Fulzele K, et al. Mode of growth hormone action in osteoblasts [J]. J Biol Chem, 2007, 282 (43): 31666-31674.

[8]

Boudignon B M, Bikle D D, Kurimoto P, et al. Insulin-like growth factor I stimulates recovery of bone lost after a period of skeletal unloading [J]. J Appl Physiol, 2007, 103 (1): 125-131.

[9]

Wislocki G. Studies on growth of deer antlers [M]. Berkeley, CA: University of California Press, 1943: 631-653.

[10]

Suttie J M. Insulin-like growth factor I (IGF-I) antler stimulating hormone [J]. J Endocrinol, 1985, 116 (2): 846-848.

[11]

Francis S M. Detection of growth factors and proto-oncogene mRNA in the growing tip of red deer (*Cervus elaphus*) antler using reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. J Exp Zool, 1998, 281 (1): 36-42.

[12]

Gu L, Mo E, Yang Z, et al. Expression and localization of insulin-like growth factor-I in four parts of the red deer antler [J]. Growth Factors, 2007, 25 (4): 264-279.

[13]

Elliott J L. Presence of insulin-like growth factor-1 receptors and absence of growth hormone receptors in the antler tip [J]. Endocrinology, 1992, 130 (5): 2513-2520.

[14]

Drks R W. RNA molecules lighting up under the microscope [J]. Histochem Cell Biol, 1996, 106 (2): 151-166.

[15]

Forozan F, Karhu R, Kononen J, et al. Genome screening by comparative genomic hybridization [J]. Trends Genet, 1997, 13 (10): 405-409.

(上接第 4 页)

[9]

李银聚, 吴庭才, 程相朝, 等. 鸡减蛋综合症病毒六邻体蛋白基因的克隆与序列分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33 (8): 31-34.
Li Y J, Wu T C, Cheng X C, et al. Cloning and sequence analysis of hexon-encoding gene of egg drop syndrome virus [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2005, 33 (8): 31-34. (in Chinese)

[10]

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[11]

Hess M, Blocker H, Brandt P, et al. The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: an intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses [J]. Virology, 1997, 238 (1): 145-156.

[12]

金 奇, 朱 雷, 章金钢, 等. 禽减蛋综合症病毒纤维蛋白基因的克隆与编码产物结构的分析 [J]. 科学通报, 1998, 43 (7): 741-744.
Jin Q, Zhu L, Zhang J G, et al. Cloning of fiber gene of the egg drop syndrome virus and structure analysis of its encoding product [J]. Science Bulletin, 1998, 43 (7): 741-744. (in Chinese)