中国农业科学 2001,34(6):690－696
Scientia Agricultura Sinica

马传染性贫血病病毒L株前病毒全基因组核苷酸序列分析

刘红全，王 柳，杨志彪，孔宪刚，童光志

（中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室，哈尔滨 150001）

摘要：本实验所用的马传染性贫血病毒(EIAV) L株(EIAV-L)是我国研制成功的EIAV弱毒疫苗的原始强毒株。以EIAV-L感染马外周血液白细胞中DNA为模板，利用PCR技术，分4个片段扩增EIAV-L前病毒DNA，并分别克隆到载体质粒pBluescript SK中，得到4个重组质粒p2.8、p2.4、p3.1和p1.2，经酶切鉴定后测序。对测序结果分析、拼接，得到EIAV-L前病毒基因组全序列。EIAV-L前病毒基因组全长8235bp，其中G+C含量为38%。通过使用计算机软件DNASIS分析，EIAV-L与马传贫驴强毒和马传贫驴白细胞疫苗毒序列同源性分别为98.4%和96.9%。同源性如此接近反映了它们之间的亲缘关系，另外EIAV-L与驴强毒的同源性高于其与驴白细胞弱毒疫苗株的同源性，这符合驴白细胞弱毒疫苗株的衍生过程。基因组两端是长为316bp的LTR，其中U3为197bp，R为80bp，U5为39bp。前病毒基因组有3个较大的开放阅读框架(ORF)，分别编码gag、pol和env基因。gag基因位于713～1912位碱基之间，全长1200bp；pol基因位于1708～5109位碱基之间，全长3402bp；env基因内出现一个框内终止密码子，使其分为两个部分，env1位于5305～6003位碱基之间，长为699bp；env2位于6073～7899之间，长为1827bp。此外，前病毒还有3个小的ORF，S1位于5113～5265位碱基之间，长为153bp；S2位于5279～5482位碱基之间，长为204bp；S3位于7245～7646位碱基之间，长为402bp。

关键词：马传染性贫血病毒；L株；前病毒核苷酸；序列分析

中图分类号：S852.65+2　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0578-1752(2001)06-0690-07

Complete Sequence of Proviral DNA of Equine Infectious Anemia Virus L Strain

LIU Hong-quan, WANG Liu, YANG Zhi-biao, KONG Xian-gang, TONG Guang-zhi

(*National Key Lab of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, Harbin 150001*)

Abstract: Equine infectious anemia virus (EIAV) is the etiological agent of equine infectious anemia (EIA). Donkey leukocyte attenuated equine infectious anemia virus (DLA EIAV) vaccine was the only successful lentivirus vaccine prepared in China, which has been applied extensively in China against EIA for twenty years. The vaccine was developed by passaging EIAV Liaoning strain (EIAV-L) in donkeys and obtained donkey-adapted equine infectious anemia virus (D-A EIAV), then attenuated it in donkey leukocytes. In this study, peripheral blood lymphocytes (PBL) were collected from a horse infected with EIAV-L. The PBL DNAs were extracted. The EIAV-L proviral DNA was amplified in four parts, covering the whole proviral DNA sequence by polymerase chain reaction (PCR). Each of the four parts was cloned into the plasmid pBluescript SK, and obtained the four recombinant plasmid p2.8, p2.4, p3.1 and p1.2, respectively. Once the recombinants were comfirmed by restriction digestion. They were sequenced. The complete nucleotide sequence of EIAV-L provirus was determined by analyzing each of the four parts and connecting them as a whole. The genome of EIAV-L was 8235 bp in length, and G+C content was 38%. The analyzing results by the computer software DNASIS showed that the sequence of EIAV-L was 98.4% and

收稿日期：2000-07-24

作者简介：刘红全(1975-)，男，黑龙江肇东人，东北农业大学在读硕士。童光志为本文责任作者，杨志彪现在宁波大学工作。Tel：0451-2734181；Fax：0451-2734181；E-mail：gztong@public.hr.hl.cn

96.9% in homology with that of D-A EIAV and DLA EIAV, respectively. The high homology between these strains showed they were relationship. The homology between ELTV-L and D-A EIAV is higher than that between EIAV-L and DLA EIAV, this is consistent with the derivation process of DLA EIAV. Identical long terminal repeat (LTR) sequences which is 316bp in lengh were at both ends of EIAV-L provirus. The LTRs include U3, R, and U5 regions in turn, and the sizes of them were 197bp, 80bp and 39bp, respectively. The genome of EIAV-L provirus had three long open reading frames (ORF) encoding gag, pol, and env genes, respectively. Gag gene, which was 1200bp, located at 613-1912. Pol gene with 3402bp was at position 1708-5109. There was a termination codon in the env gene dividing it into two parts: env1 of 699bp (nucleotides 5305-6003) and env2 of 1827bp (nucleotides 6073-7899). The provirus had three small ORFs, ie. S1, S2 and S3, with sizes of 153bp (nucleotides 5113-5265), 204bp (nucleotides 5279-5482) and 402bp (nucleotides 7245-7646), respectively.

Key words: Equine infectious anemia virus; L strain; Proviral DNA; Sequence analysis

马传染性贫血病毒(EIAV)是马传染性贫血病(简称马传贫,EIA)的病原,属于反转录病毒科慢病毒属。EIAV 与同为慢病毒的人免疫缺陷病毒(HIV-1)在病毒形态、基因组结构、序列、遗传性、抗原性、细胞嗜性、变异性、传播途径及病毒复制调节途径等方面都极为相似[1~3]。EIAV 是遗传结构最简单的慢病毒,EIAV 感染的潜伏期只有几天至几周,而且在 EIAV 感染过程中新的抗原变异株的出现与疾病的复发相关,这使 EIAV 可作为研究 HIV-1 分子致病机理的动物模型[4]。

我国的马传贫弱毒疫苗是迄今为止世界上唯一投入应用的慢病毒疫苗,成功地控制了我国 EIA 的流行,在古巴应用也取得了良好的效果。该毒株是将 EIAV L 株(EIAV-L)通过驴体传代,使其毒力明显增强,然后在驴白细胞培养物上连续传代致弱获得的,接种马 6 个月后产生坚强免疫力,对同源及异源毒株均有较好的保护率,且接种马未发现水平及垂直传播病毒,免疫期至少为 3 年[5~8]。马传贫弱毒疫苗的成功应用,证明了慢病毒防制的现实可行性。研究发现 EIAV 驴白细胞弱毒株与 EIAV Wyoming 株之间存在很大的差异[9,10]。要揭示我国马传贫弱毒疫苗致弱的分子机制,为 HIV-1 及其他慢病毒疫苗的设计和研究提供有价值的理论依据,尚需对 EIAV 驴白细胞弱毒株及其亲本毒株进行比较分析。为此,我们对 EIAV-L 进行了全序列测定。

1　材料与方法

1.1　材料

病毒 EIAV-L 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供,载体质粒 pBluescript SK 由兽医生物技术国家重点实验室提供,限制性内切酶、修饰酶和 TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶等购自大连宝生物工程有限公司。Gel Extraction Kit (100)购自上海华舜生物工程有限公司。根据 EIAV 驴强毒株 RNA 基因组核苷酸序列[11],利用计算机软件 Oligo4.1 程序设计 4 对引物,引物序列位置见表。

表　PCR 扩增所用引物

Table　Primers for PCR

名　称 Name	位　置 Position	序　列 Sequence	预期扩增产物大小 Predicted length
HBD1S	88	5' TTGCCAGGCAACTGCAGTGTGATAACCTTT 3'	2.8kb
HBD1R	2865	5' CTGCAATTTATCCTCAGGCGTCTCAAAACC 3'	
HBD2S	2624	5' GCCATCCATTAATCATCAGGAACCAG 3'	2.4kb
HBD2R	5020	5' GACCACTACTGCTCCATCACCTTTCC 3'	
HBD3S	4074	5' GCTAAGCAAGGGTTATTAATCAATGG 3'	3.1kb
HBD3R	7168	5' TTTAATTATGGAAGCTCCTAATCCAG 3'	
HBD4S	6991	5' ATGATTCTACACAATGGGATGACTGG 3'	1.2kb
HBD4R	8125	5' CAGCAGAGAAGGAGCTCAGACCGCAGAATC 3'	

1.2 方法

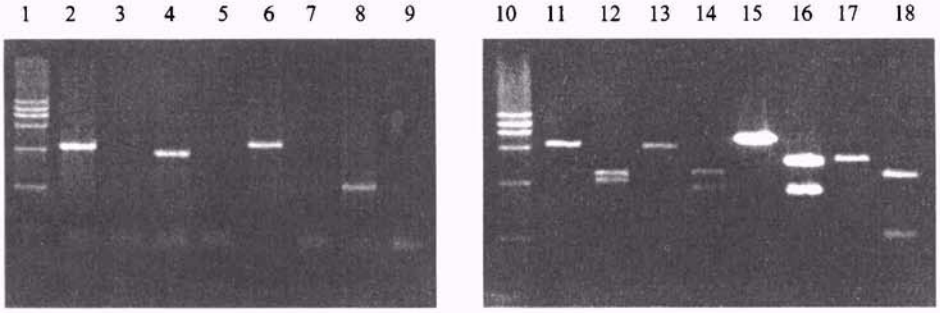
1.2.1 白细胞的分离及DNA的提取 用EIAV-L接种一匹健康马，于病毒血症期间采抗凝血。2000r/min离心15min，收集淡黄色白细胞层。按1∶5加入0.87%氯化铵，37℃水浴10min，1000r/min离心10min。沉淀物用含5mmol/L EDTA的PBS洗两次后，加入TE悬浮白细胞。分别加入终浓度为0.4%的SDS和140μg/ml的蛋白酶K，37℃水浴消化2h。分别用等体积的酚∶氯仿(1∶1)、氯仿抽提1次，加入2倍体积预冷的无水乙醇和1/10体积的3mol/L醋酸钠(pH5.2)以沉淀DNA，沉淀干燥后用TE溶解并加RNase消化后备用。

1.2.2 PCR 反应参数为：95℃5min预变性后，反应35个循环，每个循环包括94℃1min，53℃(HBD1R/HBD1S)/57℃(HBD2R/HBD2S)/53.2℃(HBD3R/HBD3S)/54.2℃(HBD4R/HBD4S)1min，72℃3～5min。最后72℃10min。

1.2.3 PCR产物的克隆和测序 将HBD1R/HBD1S、HBD2R/HBD2S、HBD3R/HBD3S和HBD4R/HBD4S的扩增产物分别克隆至pBluescript SK的Hind Ⅲ/Pst I位点、Apa I/Hind Ⅲ位点、Sma I位点和Sac I/Xba I位点(分别简称为p2.8、p2.4、p3.1和p1.2)。用限制性酶切分析筛选含有目的片段的重组质粒。将经过鉴定的重组质粒送交大连宝生物工程公司，用Thermal Cycling全自动序列分析仪测序。使用计算机软件DNASIS进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增及克隆质粒的鉴定 4对引物的扩增产物分别为2.8、2.4、3.1和1.2kb，其重组质粒的酶切分析与预期相符(见图1)。



1,10为DL-15000 Marker；2,4,6,8分别为PCR产物2.8kb,2.4kb,3.1kb和1.2kb；3,5,7,9为PCR水对照；11为p2.8/Hind Ⅲ；12为p2.8/Hind Ⅲ+Pst I；13为p2.4/Hind Ⅲ；14为P2.4/Hind Ⅲ+Apa I；15为p3.1/Nco I；16为p3.1/Nco I+Xba I；17为p1.2/Xba I；18为p1.2/Xba I+Sac I。

DL-15000 Marker(lanes 1 and 10); PCR products with sizes 2.8kb,2.4kb,3.1kb and1.2kb,respectively(lanes 2,4,6,and 8); Compared PCR products obtained with H_2O(lanes 3,5,7,and 9); Restriction digestion of recombinant plasmids,ie. p2.8/Hind Ⅲ,p2.8/Hind Ⅲ+Pst I,p2.4/Hind Ⅲ,p2.4/Hind Ⅲ+Apa I,p3.1/Nco I,p3.1/Nco I+Xba I,p1.2/Xba I and p1.2/Xba I+Sac I,respectively(lanes 11,12,13,14,15,16,17,and 18).

图1 EIAV-L前病毒各段PCR扩增及其重组质粒酶切鉴定结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis profiles of EIAV-L provirus PCR products and restriction digestion of their recombinant plasmids

2.2 EIAV L株前病毒核苷酸全序列 将各基因片段测序，再通过计算机软件拼接，得出EIAV L株前病毒基因组全序列(见图2)。

2.3 序列分析 EIAV-L前病毒基因组全长8235bp，其中G+C含量为38%。EIAV-L与马传贫驴强毒和马传贫驴白细胞弱毒疫苗株序列同源性分别为98.4%和96.9%。如此高的同源性反映出它们之间的亲缘关系，另外EIAV-L与驴强毒的同源性高于其与驴白细胞弱毒疫苗株的同源性，这符合驴白细胞弱毒疫苗株的衍生过程。

基因组两端是长为316bp的LTR，其中U3为197bp，R为80bp，U5为39bp。前病毒基因组有3个较长的开放阅读框架(ORF)，分别编码gag、pol和env基因。gag基因位于713～1912位碱基之间，全长1200bp；pol基因位于1708～5109位碱基之间，全长3402bp；env基因内出现一个框内终止密码

1 TGTGGGATTA ATACAAGATT CTTATAAGTG ATTATAAAAG TTGCTGATGC TCTCATAACC TTATGTAACC CAAAAGACTA

81 GCTCATGTTG CCAGGCAACT AAACTGTGAT AACCTTTTGT TCCTCATTAT AGTTCCGCTT TTGTGACGCG TTAAGTTCCT

U3　R

161 GTTTTTACAG TATATAAGTA CTTGTATTCT GACATTTGGA CACTCAGATT CTGCGGTCTG AGTCCCTTCT CTGCTGGGCT

R　U5　U5

241 AACTCTAGCC TTGGTAATAA ATATAATTCT CTGCTCAGTC CCTGTTCTTA GTCTGTCTTG TTTTCAAGGT CTAACAGTTG

321 GCGCCCGAAC AGGGACCAGA GGGCGCAGAC CCTGCCTGCT GAACCTGGCT GATCGTAGGA TCCCTAGGAC AGCAGAGGAG

401 AACTTACAGA CGTCTTCTGG AGGTGTTCCT GGCCACAACA CAGGAAGACA GGTAAGATGG GAGACTCTTT GACATGGAGC

481 AAAGCGCTCA AGAAGTTAGA GAAGGTGACG GTACAAGGGT CTCAAAAGCT AACTAATGGT AACTGTAATT GGGCGCTGAA

561 TTTGGTGAAC TTATTCCATG ACACCAATTT TTGTAAAGAA AAAGACTGGC AATTAAGGGA CGTCATTCCA TTGTTGGAGG

gag start

641 ACGTTTCCCA GACATTGTCA GGACAAGAGA GAGGCATTTG AAAAAACTTG GTGGGCAATA GCTGCCGTTA AG***ATG***GGCTT

721 ACAAATTAAT ACTGTGAATG ATGCAAAAGC AACATTTACT ATATTAAAAG CTAAGTTTGA AAGAAAGACT GCAAATACTA

801 CCAAAAAGCA GTCTGAGCCC ATGGAAGAAT ACCCAATAAT GATTGATGGG GCTGGAAACC GAAACTTTCG GCCATTAACA

881 CCCAGAGGAT ATACTACCTG GGTAAATACT ATACAGCAAA ACAATCTCTT AAATGAAGCT AGTGTGAATC TATTTGGTAT

961 TTTATCAGTA GACTGTACTT CTGAGGAAAT GAATGCATTT TTGGATGTAG TACCAGGACA AGCAGGACAA AAACAAGTAC

1041 TATTGGATAA TCTTGATAAG ATTGCAGAAG AATGGGATCG TAGGCACCCG ATGCCAAATC CTCCATTAGT GGCACCACCA

1121 CAAGGGCCTA TTCCCATGAC AGCAAGGTTC ATTAGGGGAT TGGGAGTTCC TAGAGAAAGA CAGATGGAAC CTGCTTTTGA

1201 TCAGTTTAGA CAAACTTATA GACAGTGGAT AATAGAAGCA ATGACAGAGG GGATAAAAAT AATGATTGGG AAACCCAAAG

1281 CGCAAAATAT TAGGCAAGGA CCCAAAGAAC CCTATCCAGA GTTTGTAGAC AGATTGCTGT CTCAGATAAA AAGTGAGGGA

1361 CATCCGGCTG ATATAACTAA ATTCCTGACA GACACCTTAA CTATTCAGAA TGCTAATGAT GAATGCAAAA GTGCTATGAG

1441 ACATTTGAGG CCAGAAGATA CATTAGAAGA AAAAATGTAT GCATGTAGAG ATATTGGCAC TATGAAACAA AAAATGGCAT

1521 TATTAGCCAA GGCACTTCAA ACAGGATTAG CTGGTCCTAT GAAGGGAGGA ATATTTAAAG GGGGACCCTT AGGGGCGAAG

1601 CAGACATGTT ATAATTGTGG AAAACCAGGA CATTTTTCTA GTCAATGTAA AGCACCTAAA GTATGTTTTA AGTGCAAACA

pol start

1681 GCCAGGACAT TTCTCAAAAC AATGTAGAAA TGCTCCAAAA AACGGGAAAC AAGGGGCTCA GGGGAGGCCC CAAAAACAAA

1761 CTTTCCCTGT GCAGAAGGAA TCAATGAACA AAACACAAAA GGAGGAAAAA CAGCAAGGGA CCTTATATCC AGATTTGAGT

gag end

1841 CAGATGAAAC AGGAGTACAA GATCAAGGAA GAGGAAAATC AAGAGGATCT CAATCTGGAC AGTTTGTGGG AG***TAA***CTTAT

1921 AATTTAGAAA AGAGACCAAC TACAATAGTT TTGATTAATG ACACACCCTT AAATGTATTA TTGGACACAG GAGCAGACAC

2001 GTCGGTACTA ACTATTGCAC ATTATAATAG GTTAAAGTAT AGAGGAAGGA AATATCAAGG TACAGGTATT GTTGGGGTTG

2081 GAGGTAATGT AGAAACATTC TCCACTCCTG TTACGGTAAA AAAGAAAGGA AAACAAATTA AAACTAGAAT GTTAGTAGCA

2161 GATATCCCAG TTACTATTTT GGGGCGAGAT ATCCTTCAAG AATTAGGCGC ACAATTAATA ATGGCTCAAC TTTCAAAAGA

2241 AATAACCCCA AGAGAAATTA AATTAAAAAC AGGCACAGTA GGGCCTAAGG TTCCCCAATG GCCACTTACT AAAGAGAAGT

2321 TATTAGGTGC TAAAGAAATA GTCAAAAAAT TGTTAGATGA AGGTAAAATA TCAGAAGCCA GTGATGATAA TCCTTATAAT

2401 TCTCCTATAT TTGTAATAAA AAAGAAATCT GGGAAGTGGA GACTATTGCA AGATTTAAGA GAATTAAATA AGGTGGTACA

2481 AGTAGGAACT GAAATATCCA GAGGGTTACC TCATCCAGGG GGATTAATTA AATGTAATCA TATGACAGTA TTAGATATTG

2561 GAGATGCCTA TTTCACTATA CCATTAGATC CAAAGTTTAG ACAATATACA GCATTTACTG TGCCATCCAT TAATCATCAG

2641 GAACCAGATA AAAGATATAT ATGGAATTGC TTGCCACAAG GTTTTGTGTT AAGTCCATAC ATATATCAAA AAACATTACA

2721 GAACATATTA CAAGCTTTTA GAGAAAGGCA TCCAGATGTA CAATTATATC AATATATGGA TGATTTATTC ATTGGGAGTA

2801 ATGGATCTAA AAGACAACAT AAGGAACTAG TAGAAGAATT AAGAGCTATT CTTTTAGAAA AGGGCTTTGA GACGCCTGAG

2881 GATAAATTGC AGGAAGAGGC ACCCTATAAT TGGCTGGGAT ATCAACTTAG TCCAGGCAAT TGGAAAGTAC AAAAGATGCA

2961 ATTAGAATTG GTAAAAGAAC CAACATTAAA TGATGTGCAA AAATTAATGG GAAATATAAC ATGGATGAGT TCAGGGGTTC

3041 CTGGATTAAC AGTGAAGCAA ATAGCTGCTA CCACTAAAGG ATGCCTAGAT TTAAATCAAA AGGTAGTATG GACGGAAGAA

3121 GCACAAAAAG AACTAGAGGA AAATAATAAA AAGATTCAGG AAGCTCAGGG ATTGCAATAT TATAACCCAG AAGAAGAAGT

3201 AATCTGTGAG ATTGAAATTA CTAAAAATTA TGAGGCTACT TATATAATAA AACAGTCCCA AGGAATATTG TGGGCAGGAA

3281 AGAAAATTAT GAGGGCTAAT AAAGGATGGT CCGCAGCAAA AAATCTAATG TTATTGTTAC AACATGTAGC CACAGAAAGT

3361 ATTGTTAGAA TTGGAACATG TCCAAAATTT AAAGTACCTT TTACTAAAGA ACAAGTCAAA TGGGAAATGG AAAAGGGATG

3441 GTATTATTCA TGGCTACCAG ATATGGTATA TTCACATCAA GTTGTTCATG ATGATTGGAA ACTGAAATTA GTAGAGCAAC

3521 CAACATCTGG TATAACAATT TACACTGATG GGGGTAAACA GAATGAAGAA GGAGTTGCAG CTTATGTGAC TAGTAATGGG

3601 AAAACTAAAC AAAAAAGGTT AGGACCTGTT ACTCATCAAA CTGCTGAGAG GATAGCAATA CAAATGGCAT TAGAAGATAC

3681 TGAAGAGACA CTGGTAAATA TAGTAACTGA TAGTTACTAC TGTTGGAAAA ATATTACAGA AGGATTAGGG TTAGAAGGAC

3761 CAGACAGCCC CTGGTGGCCA ATAATTCAAA ATATTAGGGC TAAAGAAATG GTTTATTTTG CTTGGGTACC AGGTCACAAG

3841 GGAATATATG GCAATCAATT GGCAGATGAG GCTACTAAAA TAACAGAGGA CATTATGTTA GCATATCAAG GCACACAGAT

3921 TAAGGAAAAA AGAGATGAAG ATGCAGGGTT TGACTTGTGT ATTCCTTATG ACATAATAAT ACCTGTCTCT GAGACAAAGG

4001 TTATACCCAC AGATGTAAAA ATACAGGTAC CTCATAAATG TTTTGGATGG GTAACTGGTA AGTCATCGAT GGCTAAGCAA

4081 GGGTTATTAA TCAATGGGGG AATAATTGAT GAAGGATACA CAGGTGAAAT ACAGGTAATT TGTACTAACA TTGGAAAGAG

4161 TAACATTAAA CTCAGGGAAG GACAAAAGTT TGCACAATTA ATCATATTAC AGCATCGATC AAATGATAAA CAAATCTGGG

4241 ATGAAAATAA AACATCTCAA AGGGGAGATA AAGGGTTTGG AAGCACAGGT GTATTTTGGG TAGAGAATAT CCAAGAGGCA

4321 CAAGATGAAC ATGAAAACTG GCATACATCT CCAAAGATAT TGGCAAAAAG ATATGGGTTA CCATTGACGG TAGCTAAACA

4401 GATAACTCAA GAATGCCCTC ATTGTACTAA GCAAGGACCT GGACCAGCAG GTTGTGTAAT GAGATCCCCT AATCATTGGC

4481 AGGCTGATTG TACACATTTA GAAAACAGGA TAATAATGAC ATTTGTAGAG TCTAATTCAG GATACATTCA TGCTACTCTA

4561 TTGTCCAAAG AAAATGCCTT GTGTACTTCA TTGGCTATTT TGGAATGGGT GAGGTTATTT TCTCCTAAAT CTTTACATAC

4641 AGACAATGGT ACTAATTTTG TAGCAGAGTC AGTAGCAAAT CTGTTGAAAT TCCTGAAGGT GACACATACT ACAGGAATAC

4721 CTTATCACCC AGAGAGCCAA GGCATTGTGG AAAGGGCAAA CAGGACATTA AAAGAAAAAA TTAAAAGTCA TAGAGAAAAT

4801 ACTCAGACAC TTGAAGCAGC ATTACAACTT GCTCTCATTA CTTGTAACAA AGGGAGGGAA AGTATGGGAG GACAAACTCC

4881 ATGGGAAGTA TTTATTACTA ATCAGGCTCA AACAATACAT GAAGAACTTT TATTACAACA AGCACAATCT TCTAAAAAAT

4961 TTTGTTTTTA TAAAATTCCT GGAGAGCATA ATTGGAAGGG GCCCACCAGA GTATTGTGGA AAGGTGATGG AGCAGTAGTG

pol end S1 start

5041 GTCAATGATG AGGAGAAAGG AATAATTGCT GTGCCTTTAA CCAGGACTAA ATTATTAATA AGACCAAATT GAGTGTTGTT

5121 TCAGGAATCA CCACCAGTCA GCTATCATTG TCAACTGTGT TTCCTGAGAT CATTGGGAAT TGACTACCTT GACAGCTCGC

S1 end

5201 TGAAGAAGAA GAACAAACAA AGACAGAAGG CCATCAAGGA GGGAAGACCA CCTCAGTATC TGTTATAAGG TTTGGTGCAT

S2 start env1 start

5281 GGGATTATTT GGTAAAGGGG TAACATGGTC AGCATTGCAT TCTATGGGGG TATCCCAGGG GGAATATCAA CCCCTATCAC

5361 CCAACAAACA AAATCAACAG ACACACAAAA AGGGGATCAC ATGGTATATC AACCCTATTG TTATAATGAC AGCCATAAAG

S2 end

5441 CAGAAATGGC AGAGGCAAGA GACACAAGAT ACCAAGAAGA AATGAACCGG AAAGAAGAGA AAGAAGATAA CAAAAGAAGA

5521 AATAACTGGT GGAAGATAGG TATGTTCCTA TTGTGTCTGT TGGGGACCAC TGGAGGATTC CTCTGGTGGT ATGAGGGGCA

5601 AAAGCATTCA CATTATATAG GATTGGTTAC AATAGGAGGT AGACTAAATG GTTCAGGAAT GACTAGTGCC ATAGAATGTT

5681 GGGGTTCATT TCCTGGGTGT AGGCCATTTA CTAACTATTT CAGTTATGAG ACTAATAGGA CTATTAGTAG AGATAATAAT

5761 ACTGCCACTC TGTTAGATGC TTATCAAAGA GAAGTAACAA ACATATACAG GACATCTTGT GTAGATAGTG ATCACTGTCA

5841 AGAGTATAAA TGTAAGCAAG TACAGTTGAG GGAGAACAGC AGTAACATTA TAATGAATAA TTGTAGTAAT AATAGTTGTG

5921 AAGAGTTTTG GGGGTTTAGC TGGTTAGAAT GTAATCAGAC AGAAAATGCA ATAACTATAT TGGTCCCAGA AGTAGAAATG

env1 end env2 start

6001 CAGTAAAGCG ATAATAACAC TTGGATTCCA AAAAGGTGTA ATGAAACTTG GCTAGGGTA AAACATTGTC CGATGGATTT

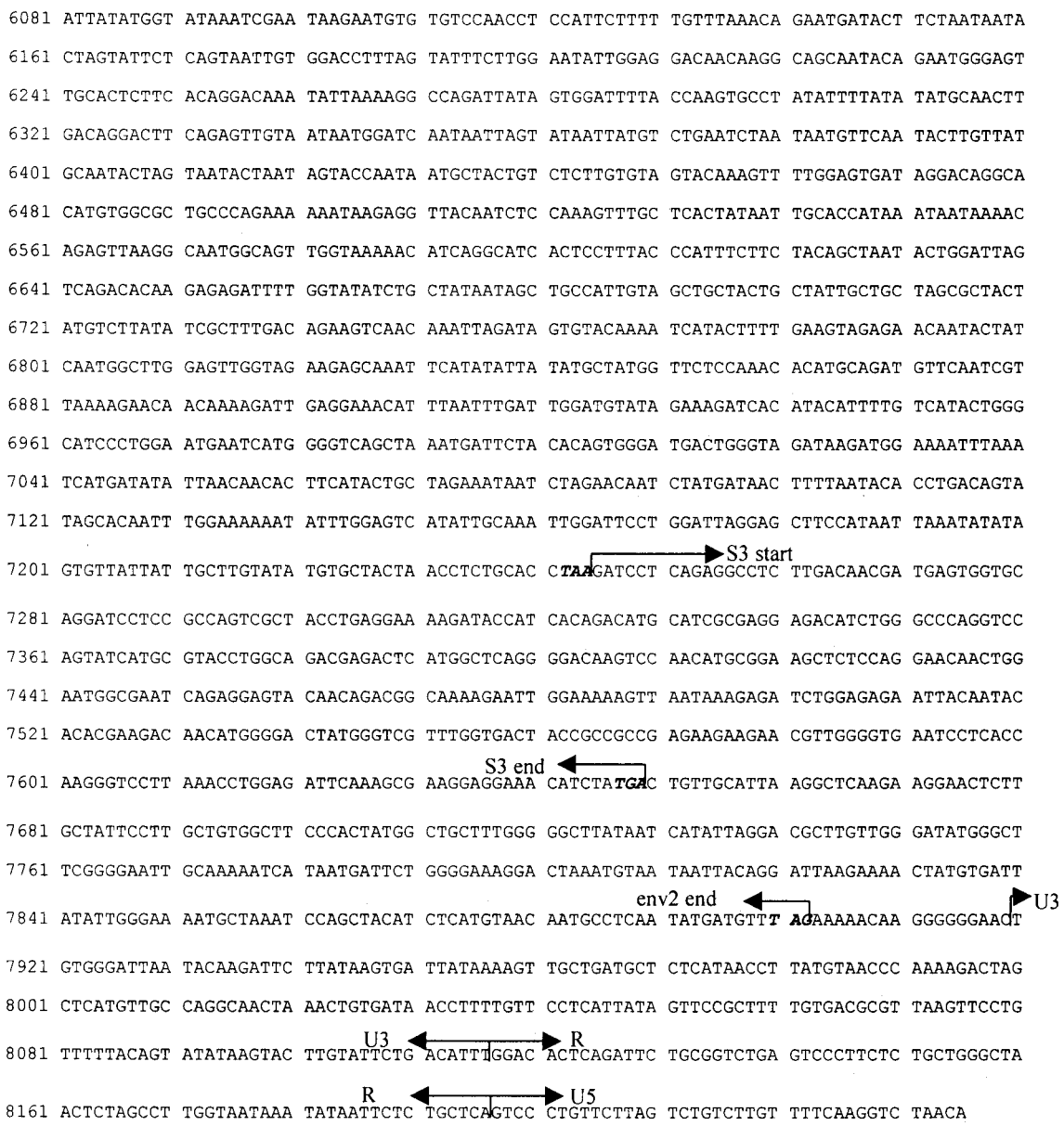


图 2　EIAV-L 前病毒 全基因组核苷酸序列

Fig. 2　Complete sequence of provirol DNA of equine infectious anemia virus L strain

子，使其分为两个部分，env1 位于 5305～6003 位碱基之间，长 699bp，env2 位于 6073～7899 位碱基之间，长 1827bp。此外，前病毒还有 3 个小的 ORF，S1 位于 5113～5265 位碱基之间，长 153bp，S2 位于 5279～5482 位碱基之间，长 204bp，S3 位于 7245～7646 位碱基之间，长 402bp。EIAV-L 与驴强毒及驴白细胞疫苗毒及国外相关毒株的序列比较将另文发表。EIAV-L 全序列测定为进一步确定 EIAV 的基因功能、揭示马传贫疫苗毒的致弱及免疫机理奠定了基础。

References：

[1] Kawakami T L, Sherman J, Dahlberg A, et al. Nucleotide sequence analysis of equine infectious anemia virus proviral DNA[J]. Virology, 1987, 158: 300－312.

[2] Rushlow K K, Olsen G, Stiegler S L, et al. Lentivirus genomic organization: the complete nucleotide sequence of the env gene region of equine infectious anemia virus[J]. Virology, 1986, 155: 309－321.

[3] Stephens R M, J W Casey, N R Rice. Equine infectious anemia virus gag and pol genes: relatedness to visna and to the

AIDS virus[J]. Science, 1986, 231: 589－594.

[4] Yu L, Zhang X F. Lentivirus and the Related Diseases[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technigue Press, 1996: 96.
于 力，张秀芳. 慢病毒和相关疾病[M]. 北京：中国农业科技出版社，1996：96.

[5] Shen R X, Xu Z D. Development and use of an quine infectious anemia donkey leucocuyte attenuated vaccine[A]. Proceedings of International Symposium on Immunity to Equine Infectious Anemia[C]. Harbin, 1983: 21－33. (in Chinese)
沈荣显，徐振东. 马传染性贫血病驴白细胞弱毒疫苗的研制与应用[A]. 国际马传染性贫血病免疫学术讨论会文集[C]. 哈尔滨，1983：21－33.

[6] Kong X G, Ning X D. Application of an differentiating ELISA based on monoclonal antibody for equine infectious anemia in Cuba[J]. Chinesee Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases, 1994, 16(1): 35－37. (in Chinese)
孔宪刚，宁希德. 马传贫强、弱毒血清抗体鉴别诊断法在古巴的应用[J]. 中国畜禽传染病，1994，16(1)：35－37.

[7] Zhu G F, Xiang W H, Yin X N, et al. Pathological and immuno-morphological observations of challenged horses previously vaccinated with EIAV attenuated vaccine[J]. Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases, 1993, 23(12): 6－9. (in Chinese)
褚桂芳，相文华，尹训南，等. 马传贫弱毒疫苗接种马攻强毒后病理及免疫形态学变化规律的研究[J]. 中国畜禽传染病，1993，23(12)：6－9.

[8] Dai Y K, Zhang B S. Specificity determination of sera from sicked horses showing negative by EIAV AGP test and positive by ELISA[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 1994, 24(5): 3－4. (in Chinese)
戴玉坤，张宝山. 现地马传贫琼扩阴性酶联免疫法阳性病马血清的特异性试验[J]. 中国兽医科技，1994，24(5)：3－4.

[9] Wang L, Yu L, Rong J G, et al. Integration dynamics of proviral DNA in fetal donkey dermal cell infected by attenuated strain of equine infectious anemia virus[J]. Chinese Journal of Virology, 1997, 13(3): 235－239. (in Chinese)
王 柳，于 力，荣骏弓，等. 马传染性贫血病毒弱毒株感染驴胎皮肤细胞(FDD)的前病毒 DNA 整合动态[J]. 病毒学报，1997，13(3)：235－239.

[10] Wang L, Yu L, Zhang S J, et al. Cloning and sequence analysis of Chinese attenuated euine infectious anemia virus (EIAV) long terminal repeat[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 1998, 18(1): 1－5. (in Chinese)
王 柳，于 力，张绍杰，等. 马传染性贫血病毒弱毒株 LTR 的克隆及序列分析[J]. 中国兽医学报，1998，18(1)：1－5.

[11] Zhang B S. Genomic sequence and molecular characterization of EIAV donkey leucocyte attenuated vaccine and its parental donkey-adapted virulent virus[D]. A Ph. D dissertation of Chinese Academy of Agricltural Sciences, 1999: 39－40. (in Chinese)
张宝山. 马传染性贫血驴白细胞弱毒疫苗及其亲本驴强毒全基因组核苷酸序列分析与分子特性的研究[D]. 中国农业科学院博士研究生学位论文，1999：39－40.

第二届国际可持续农业会议

征集论文通知

由联合国粮农组织、国际可持续农业和资源管理理事会和中国科学院植物研究所共同发起组织的第二届国际可持续农业会议将于 2002 年 9 月 8-13 日在北京举行。会议的主题为：发展可续续农业，为人类提供更多的食物、能源和工业原料。

此次会议的目的是为全世界从事可持续农业研究的科学家和一切为农业可持续发展而奋斗的工作者提供一个讲坛，交流 1997 年不伦瑞克会议以来在生物多样性、植物育种、基因工程及生物技术，农业、林业、畜牧业、有机农业、绿色食品、农产品的贮藏与加工，热带雨林土地的可持续利用，沙漠化的防止，土地、水、资源的管理与利用，可再生能源的开发与利用，在可持续增长情况下土壤、植物、微生物的相互作用，可持续发展的因素及资源的管理，温室效应的防止及环境保护等方面所取得的新成就，并展示我国在这些方面所取得的进展和成果。通过交流，使有关领域在科学技术上所取得的最新成就得以在国际上应用与推广，届时将发表“北京宣言”。

会议论文集将用英文于会前出版，因此敬请与会代表于 2002 年 5 月 31 日以前将论文的英文稿及中文稿用 Word 97 或 Word 2000 录入、编辑后用电子邮件一并发送给黎大爵教授，电子信箱为：lidajue@hotmail.com。论文参照杂志“Crop Sciences”式样撰写，长度包括图表、照片及参考文献限 7 页，照片一律用黑白照片。

联系地址及联系人：北京 100093，中国科学院植物研究所，范增兴

电话及传真：010-82593128；

电子信箱：ISAConfe@hotmail.com

国际域名：http://www.ISAConfe.org