

1 株髓细胞瘤型 J 亚群禽白血病病毒感染性克隆的构建与病毒拯救

林 艳¹, 夏 静¹, 邹年莉¹, 郭明萍¹, 王富妍¹, 赵 扬¹, 文心田^{1,2},
曹三杰^{1,2}, 黄 勇^{1,2*}

(1. 四川农业大学 动物医学院, 雅安 625014; 2. 四川农业大学 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014)

摘 要: 为构建髓细胞瘤型 J 亚群禽白血病病毒(avian leukosis virus, ALV-J)SCGS-1 株前病毒 cDNA 分子标记感染性克隆, 根据 SCGS-1 全基因组测序结果, 分 3 段进行全序列 PCR 扩增, 顺次连接至 pUC19, 构建 SCGS-1 株前病毒 cDNA 感染性克隆 pUC-SCGS; 通过重叠 PCR 方法对 SCGS-1 基因组进行沉默突变, 在 4 684 位点引入 *Sal* I 位点, 构建 SCGS-1 株分子标记感染性克隆 pUC- Δ SCGS; 以 pUC-SCGS 和 pUC- Δ SCGS 重组质粒转染 CEF 进行病毒拯救, 并通过 PCR、间接免疫荧光与双抗体夹心 ELISA 进行拯救病毒检测。结果显示, 成功构建 pUC-SCGS 与 pUC- Δ SCGS 重组质粒, 转染后盲传第 3 代、第 4 代细胞与上清中均检测到拯救病毒; 间接免疫荧光与抗原 ELISA 方法分别在 CEF 细胞和上清中检测到 ALV-J 抗原。成功拯救获得分子标记 ALV-J。

关键词: 髓细胞瘤型; J 亚群禽白血病病毒; 感染性克隆; 分子标记; 病毒拯救

中图分类号: S852.659.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)05-0754-06

Construction and Virus Rescue of Infectious Molecular Clones of Subgroup J Avian Myeloid Leukosis Virus

LIN Yan¹, XIA Jing¹, ZOU Nian-li¹, GUO Ming-ping¹, WANG Fu-yan¹, ZHAO Yang¹,
WEN Xin-tian^{1,2}, CAO San-jie^{1,2}, HUANG Yong^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The objective of this study was to construct the infectious molecular clone with molecular marker of subgroup J avian myeloid leukosis virus (ALV-J) strain SCGS-1. A full-length infectious clone of ALV-J (pUC-SCGS) was constructed by cloning and combining of three fragments using PCR method from SCGS-1. *Sal* I site was introduced on 4684nt of SCGS-1 by overlapping PCR to form another infectious clone and named pUC- Δ SCGS. The two plasmids, pUC-SCGS and pUC- Δ SCGS, were transfected into CEF, and the rescued viruses were detected by PCR, avian leukosis virus antigen test kit and indirect immunofluorescence assay (IFA). Digestion and sequence analysis revealed that the infectious clone pUC-SCGS and pUC- Δ SCGS were constructed correctly. PCR, ELISA test and IFA results showed that the 3rd and 4th generation of rescued virus were positive, while the controlled CEF were negative. Rescued virus and the virus with molecular marker of subgroup J avian myeloid leukosis virus were successfully construc-

收稿日期: 2012-11-21

基金项目: 教育部《长江学者和创新团队发展计划》创新团队项目(IRTO848)

作者简介: 林 艳(1986-), 女, 羌族, 四川绵阳人, 硕士研究生, 主要从事家禽传染病研究, E-mail: linyan102@126.com

* 通信作者: 黄 勇, E-mail: hyong601@163.com, Tel: 0835-2886117

ted, named rSCGS-1 and r Δ SCGS-1.

Key words: myeloid leukosis; subgroup J avian leukosis virus; infectious molecular clone; molecular marker; virus rescue

禽白血病病毒 (avian leukosis virus, ALV) 是在鸡群中普遍存在的一种反转录病毒^[1]。经典的鸡白血病主要由外源性 ALV 的 A、B 亚群引起, 少数病例由 C、D 亚群引起^[2], 而今, 经典的禽白血病已越来越少见, 主要为无致瘤性的内源性 E 亚群 ALV 感染。1991 年 L. N. Payne 等^[3] 从肉鸡群中分离到 1 株非 A-E 亚群的新型外源性禽白血病病毒, 将其命名为 J 亚群。ALV-J 主要引起肉种鸡的髓细胞瘤性白血病^[4], 给世界养禽业造成巨大损失。1999 年中国首次报道证实商品肉鸡中存在该病^[5]。

ALV 属于反转录病毒, 基因组是单链正义 RNA^[1]。由于反转录病毒的 RNA 聚合酶相对缺乏校对机制^[6-7], 同时在病毒复制过程中其基因组会与宿主基因组重组, 从而造成 ALV-J 在遗传上的多变性, 这对研究 ALV-J 的致病机理造成了巨大的困难。因此, 寻求单一起源的 ALV-J 对于研究病毒遗传特性、致病机理等非常重要。而反向遗传技术构建的感染性克隆所拯救出的病毒, 就是单一起源的病毒群体。同时, 通过构建病毒的感染性克隆, 可以实现 RNA 病毒基因修饰、敲除、替换等操作, 被广泛应用于多种病毒分子致病机制研究中^[8]。本研究通过构建髓细胞瘤型 ALV-J 四川株 SCGS-1 前病毒 cDNA 感染性克隆, 并通过点突变在病毒基因组中引入 *Sal* I 酶切位点进行分子标记, 并完成病毒拯救, 为 ALV-J 的分子致病机制研究等奠定基础。

表 1 SCGS-1 株前病毒 cDNA 扩增引物

Table 1 Primers used for amplification of SCGS-1

片段 Segment	名称 Primer	序列(5'-3') Sequence	酶切位点 Endonuclease	位置/bp Sites	片段大小/bp Fragment
A	AF	GC <u>GTCGACT</u> GTAGTGTTATGCAATACTC	<i>Sal</i> I	1—20	2 524
	AR	<u>GGTACC</u> AGGATACTCCCTCTAACCAT	<i>Kpn</i> I	2 505—2 525	
B	BF	GGACATCACTATTATTTTCGGAG	-	2 454—2 476	2 834
	BR	CTCGCCTCATCTTTCTTAGTC	-	5 267—5 289	
C	CF	CAATGTATGCCCTCAATCACTTT	-	5 017—5 040	2 825
	CR	GTA <u>GAATTCT</u> GAAAGCCATCCGCTTCATG	<i>EcoR</i> I	7 823—7 842	

以 SCGS-1 株病毒感染鸡胚成纤维细胞 (CEF), 以酚氯仿法提取 CEF 细胞总 DNA, 即为

1 材料与方法

1.1 毒株与细胞

髓细胞瘤型 ALV-J 四川分离株 SCGS-1 (GenBank 登录号为 JQ396302) 由本实验室从四川某种鸡场分离保存^[9]; 抗 ALV-J 血清、DH5 α 感受态细胞由本实验室制备并保存。

1.2 主要试剂

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; TRIzol 总 RNA 提取试剂, PrimeScript^{RT} Master Mix, Premix LA *Taq* 酶, pMD19-T Simple Vector, pUC19 质粒, 限制性内切酶等购自宝生物工程(大连)有限公司; E. Z. N. A. TM Plasmid Mini Kit 购自美国 OMEGA 公司; EntransterTM-D 转染试剂购自北京英格恩生物科技有限公司; Goat anti-chicken IgG(H+L), FITC conjugated 购自北京博奥森生物技术有限公司; 禽白血病病毒 ELISA 抗原检测试剂盒购自北京维德维康生物技术有限公司。

1.3 SCGS-1 株前病毒 cDNA 感染性克隆的构建

利用病毒基因组中 *EcoR* I (2 544)、*Kpn* I (5 262) 位点, 将全序列分 3 段重叠扩增, 设计 ALV-J SCGS-1 株前病毒 cDNA 扩增引物(表 1), 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

SCGS-1 株前病毒 DNA 模板。以 AF/AR、BF/BR、CF/CR 3 对引物分段进行 PCR 扩增, 分别将 A、B

片段克隆到 pMD19-T Simple Vector, 以 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切消化重组质粒, 回收 pMD19-T-A 与 B 片段; 将 B 片段连接至 pMD19-T-A 构建 pMD19-T-A-B; C 片段以 *Kpn* I、*EcoR* I 双酶切消化后, 连接至 pUC19 质粒构建 pUC19-C; 以 *Kpn* I、*Sal* I 双酶切消化 pMD19-T-A-B 与 pUC19-C, 回收 pUC19-C 与 A-B 片段, 将 A-B 连接至 pUC19-C 构建 pUC19-A-B-C (即 pUC-SCGS), 重组质粒送上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

1.4 SCGS-1 株前病毒 cDNA 分子标记感染性克隆的构建

基于 pUC-SCGS 序列测定结果, 设计定点突变

引物(表 2), 沉默突变 SCGS-1 株基因组 4 686(G→C)、4 689(T→C) 2 个位点, 引入 *Sal* I 位点, 氨基酸序列不变。

以 pUC-SCGS 为模板, 以 a/b、c/d 2 对引物分段进行 PCR 扩增, 回收 2 段 PCR 产物作为模板, 再以 a/d 引物进行 PCR 扩增, 回收点突变位的 ad 片段, 连接至 pMD19-T simple vector (命名为 pMD19-T-ad)。以 *Xba* I 与 *Kpn* I 双酶切消化 pUC-SCGS 和 pMD19-T-ad, 回收 ad 片段并连接至酶切消化后的 pUC-SCGS, 构建 SCGS-1 株前病毒 cDNA 分子标记(引入 *Sal* I 位点)质粒 pUC-△SCGS, 送上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

表 2 pUC-SCGS 点突变引物

Table 2 Primers used for mutation of pUC-SCGS

名称 Primer	序列(5'-3') Sequence	酶切位点 Endonuclease	位置/bp Sites	片段大小/bp Fragment
a	GCGAGGGAATGGAATCTA	—	3 589—3 606	1 106
b	GCGGT G TC G ACAGTAACAGCGAG	<i>Sal</i> I	4 694—4 672	
c	GTTACT GT C GA C ACCGCCTCATC	<i>Sal</i> I	4 678—4 700	609
d	CGCCTCATCTTTCTTAGTCA	—	5 286—5 267	

1.5 病毒拯救

以 E. Z. N. A.™ Plasmid Mini Kit 试剂盒提取并纯化 pUC-SCGS 与 pUC-△SCGS 质粒, 按照 Entranster™-D 转染试剂盒方法转染 CEF, 设立阴性对照; 转染后置 37 °C CO₂ 细胞培养箱中维持 8 d, 收集细胞上清盲传至第 4 代, 拯救病毒分别命名为 rSCGS-1 和 r△SCGS-1。

1.6 拯救病毒 PCR 检测

以 TRIzol 试剂盒方法分别提取 rSCGS-1 和 r△SCGS-1 第 3 代和第 4 代感染细胞上清总 RNA, 反转录制备 cDNA。以酚氯仿法提取 rSCGS-1 和 r△SCGS-1 第 3 代和第 4 代感染细胞总 DNA。以表 2 中 a/d 引物进行 PCR 扩增, 回收目的片段, 以 *Sal* I 进行单酶切分析, 阳性片段进行克隆测序。

1.7 拯救病毒间接免疫荧光检测

以 rSCGS-1 和 r△SCGS-1 第 3 代病毒感染 CEF, 感染后 7 d 弃培养液, 以 4% 甲醛 4 °C 固定过夜, PBS 洗涤 3 次, 加抗 ALV-J 血清 37 °C 孵育 1 h 后 PBS 洗涤 3 次, 再加 FITC 标记的羊抗鸡 IgG 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 以 90% 的甘油 PBS 封片; 利用荧光显微镜观察并记录结果, 设立不接毒

CEF 对照。

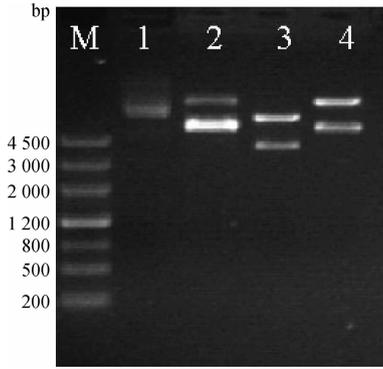
1.8 拯救病毒 P27 抗原 ELISA 检测

收集 rSCGS-1 和 r△SCGS-1 第 3 代和第 4 代细胞上清, 按照 Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit 检测试剂盒方法进行 ALV-J P27 抗原检测。

2 结果

2.1 SCGS-1 株前病毒 cDNA 感染性克隆的构建

pUC-SCGS 中 *Sal* I 与 *Kpn* I 为单酶切位点, *Cla* I 与 *EcoR* I 分别有 2 个酶切位点。以 *Sal* I 与 *Kpn* I 双酶重组质粒, 获得 5 262 和 4 947 bp 2 个片段, 与预期相符; 分别以 *EcoR* I 和 *Cla* I 单酶切分析重组质粒, 获得目的片段大小均与预期相符(图 1)。测序结果显示, pUC-SCGS 序列信息与预期相符, pUC19 连接处的序列分别与 SCGS-1 基因组的 5' 及 3' 端完全一致。SCGS-1 株全基因组序列与骨髓瘤型肉鸡分离株 HPRS-103 (Z463990)、NX0101 (DQ115805)、蛋鸡分离株 SD07LK1 (FJ216405)、血管瘤型四川分离株 SCDY1 (HQ425636) 序列相似性分别为 96.0%、95.3%、96.1%、98.1%。



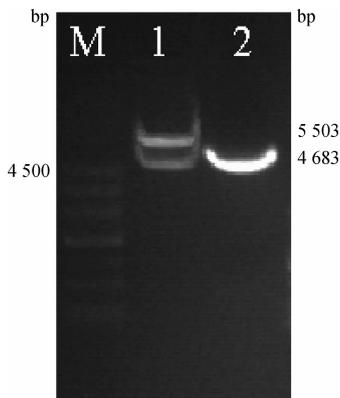
M. DNA Marker III 相对分子质量标准;1. 质粒 pUC-SCGS;2. pUC-SCGS *Sal* I、*Kpn* I 酶切;3. pUC-SCGS *Cla* I 酶切;4. pUC-SCGS *EcoR* I 酶切
M. DNA Marker III; 1. Plasmid of pUC-SCGS; 2. pUC-SCGS digested with *Sal* I and *Kpn* I; 3. pUC-SCGS digested with *Cla* I; 4. pUC-SCGS digested with *EcoR* I

图 1 pUC-SCGS 质粒酶切鉴定

Fig. 1 Identification of the pUC-SCGS by enzyme digestion

2.2 SCGS-1 前病毒 cDNA 分子标记感染性克隆的构建

在 SCGS-1 基因组 4 684 位点引入 *Sal* I 酶切位点后, pUC- Δ SCGS 含有 2 个 *Sal* I 位点。以 *Sal* I 单酶切消化 pUC- Δ SCGS, 得到 4 683 和 5 503 bp 2 条目的条带, 与预期相符(图 2)。pUC- Δ SCGS 质粒为环状 DNA, 电泳时比线性 DNA 迁移快, pUC- Δ SCGS 测序结果与预期相符, 引入突变位点正确。



M. DNA Marker III 相对分子质量标准;1. 质粒 pUC- Δ SCGS *Sal* I 酶切;2. pUC- Δ SCGS 质粒

M. DNA Marker III; 1. pUC- Δ SCGS digested with *Sal* I; 2. Plasmid of pUC- Δ SCGS

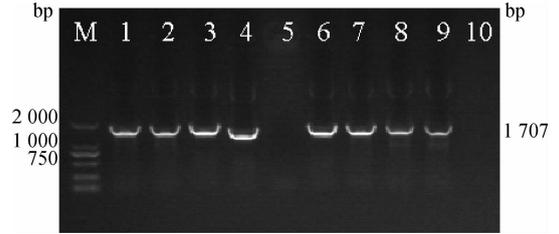
图 2 pUC- Δ SCGS 质粒 *Sal* I 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the pUC- Δ SCGS by digested with *Sal*I

2.3 拯救病毒 PCR 检测

以 pUC-SCGS 和 pUC- Δ SCGS 转染 CEF, 对

盲传第 3 代与第 4 代感染细胞和培养上清进行 PCR 检测。第 3、4 代 rSCGS-1 和 r Δ SCGS-1 感染细胞上清 ALV-J RNA 检测阳性, 感染细胞中 ALV-J 前病毒 DNA 检测阳性, 均扩增出 1 700 bp 左右目的片段, CEF 对照未见任何条带(图 3)。



M. DNA 相对分子质量标准 DL2000;1. 第 3 代 rSCGS-1 细胞上清 RNA;2. 第 3 代 r Δ SCGS-1 细胞上清 RNA;3. 第 3 代 rSCGS-1 细胞 DNA;4. 第 3 代 r Δ SCGS-1 细胞 DNA;5. 第 3 代空白细胞 DNA;6. 第 4 代 rSCGS-1 细胞上清 RNA;7. 第 4 代 r Δ SCGS-1 细胞上清 RNA;8. 第 4 代 rSCGS-1 细胞 DNA;9. 第 4 代 r Δ SCGS-1 细胞 DNA;10. 第 4 代空白细胞上清 RNA

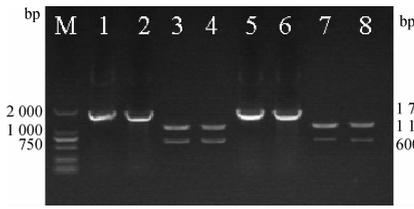
M. DNA Marker DL2000; 1. The 3rd generation rSCGS-1 RNA from supernatant; 2. The 3rd generation r Δ SCGS-1 RNA from supernatant; 3. The 3rd generation rSCGS-1 DNA from CEF; 4. The 3rd generation r Δ SCGS-1 DNA from CEF; 5. Negative control cell DNA of the 3rd generation CEF; 6. The 4th generation rSCGS-1 RNA from supernatant; 7. The 4th generation r Δ SCGS-1 RNA from supernatant; 8. The 4th generation rSCGS-1 DNA; 9. The 4th generation r Δ SCGS-1 DNA; 10. Negative control cell RNA of the 4th generation CEF

图 3 感染性克隆病毒 rSCGS-1 和 r Δ SCGS-1 PCR 检测
Fig. 3 Identification of the infection clones virus rSCGS-1 and r Δ SCGS-1 by PCR

回收目的片段进行 *Sal* I 酶切消化, r Δ SCGS-1 扩增出的片段被消化为 1 106 与 609 bp 2 个片段(图 4), rSCGS-1 不能被 *Sal* I 消化。测序结果显示引入突变位点稳定, 扩增序列为 1 707 bp, 与 SCGS-1 基因序列相似性为 99.9%。

2.4 拯救病毒间接免疫荧光检测

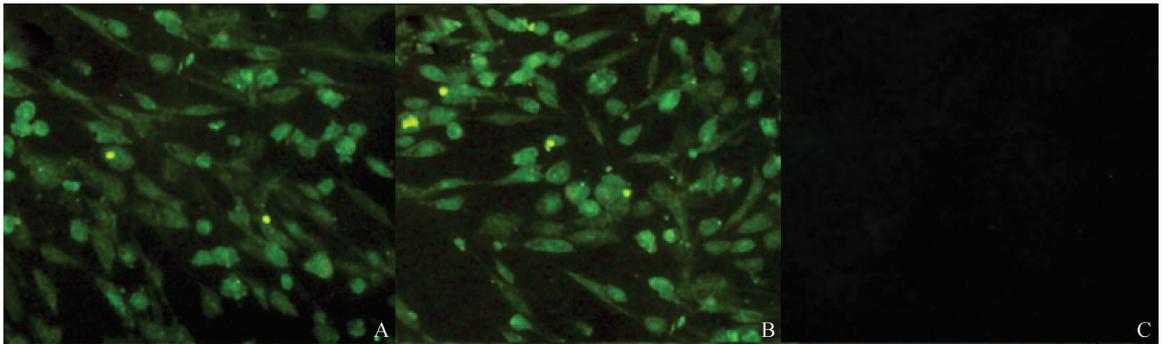
rSCGS-1 和 r Δ SCGS-1 第 3 代病毒感染 CEF 后, 进行间接免疫荧光检测。rSCGS-1 和 r Δ SCGS-1 均与抗 ALV-J 血清呈现阳性反应, rSCGS-1 和 r Δ SCGS-1 感染 CEF 细胞中检测到清晰的绿色荧光(图 5A 和图 5B), CEF 对照细胞中未检测到绿色荧光, 仅见少量背景荧光(图 5C), rSCGS-1 和 r Δ SCGS-1 感染 CEF 细胞中检测到 ALV-J 抗原。



M. DNA 相对分子质量标准 DL2000; 1. 第 3 代 rSCGS-1 细胞上清 RNA 扩增; 2. 第 3 代 rSCGS-1 细胞 DNA 扩增; 3. 第 3 代 r Δ SCGS 细胞上清 RNA 扩增; 4. 第 3 代 r Δ SCGS 细胞 DNA 扩增; 5. 第 4 代 rSCGS-1 细胞上清 RNA 扩增; 6. 第 4 代 rSCGS-1 细胞 DNA 扩增; 7. 第 4 代 r Δ SCGS 细胞上清 RNA 扩增; 8. 第 4 代 r Δ SCGS 细胞 DNA 扩增

M. DNA Marker DL2000; 1. The 3rd generation rSCGS-1 RNA from supernatant; 2. The 3rd generation rSCGS-1 DNA from CEF; 3. The 3rd generation r Δ SCGS-1 RNA from supernatant; 4. The 3rd generation r Δ SCGS-1 DNA from CEF; 5. The 4th generation rSCGS-1 RNA from supernatant; 6. The 4th generation rSCGS-1 DNA from CEF; 7. The 4th generation r Δ SCGS-1 RNA from supernatant; 8. The 4th generation r Δ SCGS-1 DNA from CEF

图 4 rSCGS-1 和 r Δ SCGS-1 PCR 扩增片段 *sal* I 酶切鉴定
Fig. 4 rSCGS-1 and r Δ SCGS-1 PCR products digested with *sal* I



A. rSCGS-1 感染 CEF; B. r Δ SCGS-1 感染 CEF; C. 未接毒 CEF

A. rSCGS-1; B. r Δ SCGS-1; C. Negative control

图 5 rSCGS-1 和 r Δ SCGS-1 间接免疫荧光检测

Fig. 5 Identification of rSCGS-1 and r Δ SCGS-1 by IFA

与 DNA 病毒相比, RNA 病毒的基因功能分析与基因改造难度较大, 反向遗传技术解决了这一难题, 为 RNA 病毒的基因功能和分子致病机制等研究提供了新思路。通过构建感染性分子克隆, 可以实现对 RNA 病毒基因组的分子修饰。借助感染性克隆载体携带的转录启动子, 在真核细胞内完成病毒合成与装配, 获得单一起源且遗传背景清楚的病毒。本试验成功构建骨髓瘤型 ALV-J SCGS-1 株前病毒 cDNA 感染性克隆 pUC-SCGS, 再通过点突变重叠 PCR 对病毒基因组 4 686 和 4 689 两位点进行突变, 在病毒基因组 4 684 位点引入 *Sal* I 酶切位点

2.5 拯救病毒 P27 抗原 ELISA 检测

以 Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit 进行 rSCGS-1 和 r Δ SCGS-1 第 3 代和第 4 代感染细胞上清 ALV-J P27 抗原 ELISA 检测, rSCGS-1 和 r Δ SCGS-1 第 3 代和第 4 代所有样品均为 ALV 抗原阳性, 未接毒 CEF 检测结果为阴性。

3 讨论

ALV-J 是危害养禽生产的主要疾病之一, 主要引起鸡骨髓瘤白血病 (ML) 和血管瘤型白血病^[10], 早年表型以肉鸡骨髓瘤型为主, 血管瘤型可能由骨髓瘤型基因组缺失突变而来, 导致病毒细胞嗜性改变。2010 年本实验室分别从四川地区分离到血管瘤型和骨髓瘤型 ALV-J, 毒株基因组序列分析发现, 四川株 ALV-J 与原型株 HPRS-103 的 *gp85* 基因和 6 995—7 242 位点均出现不同程度的碱基缺失^[9-11], 这些碱基的缺失在病毒致病性变化中可能具有潜在的意义^[12]。

进行分子标记, 不改变病毒蛋白的氨基酸序列, 不影响病毒生物学活性。该分子标记的主要作用是便于拯救病毒的鉴定, 原病毒 4 684 位点不能被 *Sal* I 酶切消化, 以此排除实验室环境污染对试验结果的影响, 为试验结果的可靠性提供了保证, 为病毒基因组修饰等后续研究奠定基础。

感染性克隆构建过程中, 病毒基因组的生物信息学分析与体外扩增的突变控制至关重要, 既要保证扩增序列的保真性, 还要考虑连接后质粒鉴定的可行性。病毒基因组中的每一个碱基突变都可能对病毒蛋白表达与蛋白结构产生影响, 从而影响拯救

病毒的活性,甚至导致拯救病毒丧失感染性。病毒拯救时,转染质粒必须保证高纯度和高浓度,以双蒸水溶解质粒可以更好地和转染试剂结合,同时还可减少对细胞的毒性。转染后,不同的病毒在细胞内转录复制的时间长短不一,需要在不同时间段对细胞上清中的病毒滴度进行检测,确定病毒拯救所需最短时间。本试验质粒转染以后,需维持 8 d 左右才可以实现病毒拯救。以拯救病毒感染细胞的上清进行连续盲传,可以排除转染质粒在 CEF 中瞬时表达产生的蛋白质与 ALV-J 特异性抗体发生免疫反应。本试验还通过 PCR 方法和 ELISA 抗原检测等手段对拯救病毒进行检测鉴定,保证结果的可靠性。

ALV-J 基因组较小,易于在核酸水平上进行体外修饰,目前除原型株 HPRS-103 感染性分子克隆成功构建外^[13],国内仅有少量相关报道 ALV-J 感染性克隆构建成功^[14-15]。本研究构建的 SCGS-1 株感染性克隆将为 ALV-J 地方毒株的基因功能研究奠定基础,为破译 ALV-J 病毒的复制、致病机制提供参考,为 ALV-J 弱毒疫苗构建提供新思路。

参考文献:

- [1] 塞弗 Y M. 禽病学[M]. 苏敬良,高 福,索 勋,译. 第 11 版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [2] PAYNE L N. Retrovirus-induced disease in poultry [J]. *Poult Sci*, 1998, 77: 1204-1212.
- [3] PAYNE L N, BROWN S R, BUMSTEAD N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens[J]. *J Gen Virol*, 1991, 72: 801-807.
- [4] SAIF Y M, FADLY A M, GLISSON J R, et al. Diseases of poultry[M]. John Wiley & Sons, 2011.
- [5] 杜 岩, 崔治中, 秦爱建. 从市场商品肉鸡中检出 J 亚群禽白血病病毒[J]. 中国家禽学报, 1999, 3(1): 1-4.
- [6] BOWERS W, RUDELL A. a1/EBP: a leucine zipper protein that binds CCAAT/enhancer elements in

- the avian leukosis virus long terminal repeat enhancer [J]. *J Virol*, 1992, 66(11): 6578-6586.
- [7] BOYCE-JACINO M, ODOGHOUE K, FARAS A. Multiple complex families of endogenous retroviruses are highly conserved in the genus Gallus[J]. *J Virol*, 1992, 66(8): 4919-4929.
 - [8] 吴海祥, 张楚瑜. 正连 RNA 病毒基因组感染性克隆研究进展[J]. 武汉大学学报(理学版), 2002, 48(4): 493-499.
 - [9] 石 敏, 田明星, 王远萍, 等. J 亚群禽白血病病毒四川株 SCMS1 的分离及囊莫基因序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(1): 62-65.
 - [10] CHENG Z, LIU J, CUI Z, et al. Tumors associated with avian leukosis virus subgroup J in layer hens of during 2007 to 2009 in China[J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72(8): 1027-1033.
 - [11] SHI M, TIAN M, LIU C, et al. Sequence analysis for the complete proviral genome of subgroup J Avian Leukosis virus associated with hemangioma: a special 11 bp deletion was observed in U3 region of 3'UTR [J]. *Virol J*, 2011, 8(1): 1-8.
 - [12] BAL B S, LOWE J A, E GIETLER A, et al. Heterotopic ossification after 2-incision total hip arthroplasty[J]. *J Arthroplasty*, 2010, 25(4): 538-540.
 - [13] BAI J, HOWES K, PAYNE L N, et al. Sequence of host-range determinants in the env gene of a full length, infections proviral clone of exogenous Avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup(designated J)[J]. *J Gen Virol*, 1995, 76:181-187.
 - [14] 张纪元, 崔治中, 丁家波, 等. J 亚群禽白血病病毒 NX0101 株感染性克隆化病毒的构建及其致病性[J]. 微生物学报, 2005, 3(45): 437-439.
 - [15] 王 琦, 王永强, 康忠慧, 等. 蛋鸡 J 亚群禽白血病病毒分离株 SD1009 感染性克隆的构建与病毒拯救[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(11): 1111-1116.

(编辑 白永平)