

海兰鸡内源性白血病病毒位点序列鉴定与分析

陈孜孟^{1,2#}, 董宣^{1#}, 苏帅¹, 崔宁¹, 李卓^{2*}, 崔治中^{1*}

(1. 山东农业大学动物医学院, 泰安 271018; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005)

摘要: 鉴定和比较海兰鸡基因组中内源性禽白血病病毒(ALV)位点。使用嗜热古菌 *Thermococcus* sp. 4557 来源重组表达的 Pol B DNA 聚合酶, 通过一次 PCR 反应从海兰鸡的基因组 DNA 中扩增到了包括 *gag*、*pol*、*env* 基因部分片段及 3'-LTR 的内源性 ALV 位点, 将其命名为 HL-E1。序列比较表明, 其 *env* 基因与 E 亚群内源性 ALV 高度同源; 与完整的 ALV 基因组相比, 其 *gag*、*pol*、*env* 三个主要功能基因分别缺失了 93、1 960 和 805 个碱基。海兰鸡基因组中存在 4 663 bp 的缺陷型 ALV 基因组片段, 其 *env* 基因和 LTR 都与鸡基因组上经典的 *ev1* 位点的相应基因有 96.8% 和 97.4% 的相似性, 表明这是整合进海兰鸡染色体基因组中的一个内源性 E 亚群 ALV 片段构成的 *ev* 位点, 这是又一个 *ev* 位点的全序列报道。

关键词: 海兰鸡; 内源性禽白血病病毒; PCR; 基因缺失; 染色体; 位点

中图分类号: S852.659.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)11-2050-06

Identification and Sequence Analysis of Endogenous Avian Leukosis Virus Element in Genome of Hy-Line Brown Layers

CHEN Zi-meng^{1,2#}, DONG Xuan^{1#}, SU Shuai¹, CUI Ning¹, LI Zhuo^{2*}, CUI Zhi-zhong^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;

2. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: To study the integration site of endogenous avian leukosis virus(ALV) elements in the genome of Hy-Line Variety Brown, a non-joined PCR amplicon(named HL-E1) was obtained using a B family DNA polymerase from hypothermophilic archaea *Thermococcus* sp. 4557(TXW-PolB). HL-E1 contains three essential genes including *gag*, *pol*, and *env* and the 3'-LTRs. And it lacks 93, 1 960 and 805 base pairs in the *gag*, *pol* and *env* genes, respectively. A 4 663 bp functional mutant of ALV integrated in the Hy-Line Variety Brown genome. The conserved *env*(highly similar with endogenous avian leucosis virus) and LTR genes have identities of 96.8% and 97.4% to *ev1* site. This indicates a newly identified endogenous ALV sequence integrated in an unknown site in the chicken genome.

Key words: Hy-Line Variety Brown; ALV-E; PCR; gene deletion; chromosome; loci

禽白血病病毒(avian leucosis virus, ALV)是反转录病毒科 α -反转录病毒属的成员之一。根据病毒在不同种禽类的宿主范围, 病毒间的干扰作用及病毒中和反应相关的囊膜蛋白抗原特性, 禽白血病

病毒分为 A~J 10 个亚群, A、B、C、D、E 和 J 等 6 个亚群可感染鸡^[1]。近年来王鑫等^[2]也分离到了新的 K 亚群 ALV。其中 E 亚群为内源性 ALV, 通常致病性很低或无致病性, 其余均为对鸡有致病性的外

收稿日期: 2015-03-27

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203055)

作者简介: 陈孜孟(1987-), 男, 山东寿光人, 硕士生, 主要从事动物分子病毒学方面研究, E-mail: 769623544@qq.com; 董宣(1988-), 男, 山东胶南人, 博士生, 主要从事动物分子病毒学方面研究, E-mail: dongxuan311@163.com。二人共为第一作者

* 通信作者: 崔治中, 博士生导师, E-mail: zzcui@sdau.edu.cn; 李卓

源性 ALV。内源性 ALV 是指整合进宿主细胞染色体基因组的可通过染色体垂直传播的 ALV 前病毒 DNA 及其可能产生的 ALV 病毒粒子。它可能只是病毒基因组的不完整片段,不会产生传染性病毒;但也可能是全基因组因而能产生有传染性的病毒粒子,不过这类病毒通常致病性很弱或没有致病性^[3]。内源性的 ALV-E 虽然没有致病性,但它可干扰对外源性 ALV 感染的检测,给诊断和净化 ALV 带来很大的困难^[4-5]。

在内源性 ALV 这个大概概念中,既包括在三十多年前就在鸡基因组上发现和报道的内源性白血病毒(endogenous viruses, ev)位点^[6],还有近二十多年中发现的中度重复性序列 EAV(endogenous avian virus)^[7]、ART-CH(avian retrotransposon from chicken genome)^[8]及高度重复性序列 CR1(chicken repeat 1)^[9]。鸡的内源性反转录病毒只是在真核生物中存在的许多反转录序列的突出例子。

鸡的 ev 位点的遗传序列与 E 亚群 ALV 相关,几乎所有正常鸡都带有完整的或缺陷性的 ALV-E 基因组^[10]。这些 ev 位点分布在鸡的体细胞和生殖细胞的不同的染色体上,并以孟德尔遗传法则遗传给它们的不同性别的后代^[11-12]。迄今为止,已至少识别和鉴定出 50 个不同的 ev 位点,其中在白来航鸡中确认的有 22 个^[13]。这些位点分别是在 20 世纪 70、80 年代通过 RELP 和分子杂交的方法从不同品种鸡鉴定和识别出来^[6,14]。其中只有 ev21 这个位点是从海兰鸡发现的^[12]。有些位点的染色体定位已经确定,有的尚待鉴定^[15-18]。随着鸡基因组序列测定的完成^[19],其他 ev 位点的定位也会逐渐完成。但是,迄今为止,大多数 ev 位点只是完成了染色体定位,尚未完成克隆和测序。要强调说明的是,这些特定位点是稳定地整合进鸡细胞基因组,因此能够按孟德尔法则遗传。

目前国内外对 ALV 鉴定报道,都是扩增其中的 env 片段或分段扩增三个基因片段后进行拼接得到的 ALV 序列^[20-24]。在 2011 年 X. Wang(王兴娜)等^[25]从深海分离到一株超嗜热古菌,并重组表达了其 Pol B DNA 聚合酶并具有扩增长片段的能力(相关文章尚未发表)。本研究利用超嗜热古菌 *Thermococcus* sp. 4557 来源重组表达的 Pol B DNA 聚合酶,通过一次 PCR 反应从海兰鸡中染色体基因组 DNA 扩增到 4 663 bp 的包含 gag、pol、env 部分基因片段和 3'-LTR 的内源性 ALV-E 位点,本文对其

做了全面的比较分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验室人工造病,感染 ALV-J 的海兰鸡颈部肿瘤组织和正常海兰鸡颈部组织提取的基因组 DNA;DNA 聚合酶由国家海洋局第三海洋研究所重组表达的从超嗜热古菌 *Thermococcus* sp. 4557 来源的重组表达的 Pol B DNA 聚合酶;Top10 感受态细胞由本实验室保存;质粒小提试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;通用型 DNA 纯化回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;rTaq DNA 聚合酶和 pMD18-T 购于 TaKaRa 公司。

1.2 长距离 PCR

参照 GenBank 上发表的 ALV 毒株(NX0101^[23], 登录号为 DQ115805;ev-1^[26], 登录号为 AY013303; JS11C1^[24], 登录号为 KF746200;SDAU09C2, 登录号为 HM446005)序列,设计 5' LTR 右侧外的 5'UTR 区段设计上游引物,在 3'LTR 右端区段设计下游引物。设计简并引物如下,Primer F:5'-TTT-GGTGACCCCGACGTGATAGTTAGGGAATA-GTGGTCG-3', Primer R:5'-TGAAGCCTTCCG-CTTCATGCAGGTGTTTCG-3'。使用从超嗜热古菌 *Thermococcus* sp. 4557 来源的重组表达的 Pol B DNA 聚合酶,配制 PCR 扩增反应体系 50 μ L: Tris (pH8.8)20 mmol \cdot L⁻¹, MgSO₄ 2 mmol \cdot L⁻¹, KCl 10 mmol \cdot L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 10 mmol \cdot L⁻¹, TritonX-100 0.5%, Trehalose 100 mmol \cdot L⁻¹, dNTP 0.2 mmol \cdot L⁻¹, BSA 20 mg \cdot L⁻¹, F 50 μ mol \cdot L⁻¹, R 50 μ mol \cdot L⁻¹, Template DNA 100 ng, Pol B DNA polymerase 1 μ L。反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min;变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,梯度退火 72~52 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min,35 个循环;后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。感染 ALV-J 的海兰鸡颈部肿瘤组织提取的基因组 DNA 为试验组,正常海兰鸡颈部组织提取的基因组 DNA 为对照组。

1.3 重组载体的构建

将 PCR 产物电泳切胶回收,使用 rTaq DNA 聚合酶按照产品说明配制反应体系,将模板 DNA 改为切胶纯化的 PCR 产物,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 min,使用天根通用型 DNA 纯化回收试剂盒对反应产物进行纯化,产物克隆至 pMD18-T,转化 Top10 感受态细胞,挑取单菌落,摇菌提取质粒,经 Sal I 单酶切后

进行琼脂糖凝胶电泳得到约 7 000 bp 大小条带的质粒,送上海美吉生物进行核苷酸序列测定。

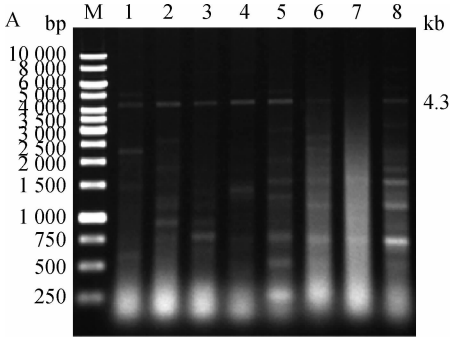
1.4 基因组序列的比较分析

使用 Genetyx 和 Chromas2 软件测序结果进行剪辑和拼接,使用 MegAlaine 软件对测序拼接结果与国内外已发表的不同亚群 ALV 基因组序列进行比较分析。

2 结果

2.1 ALV 基因组的扩增

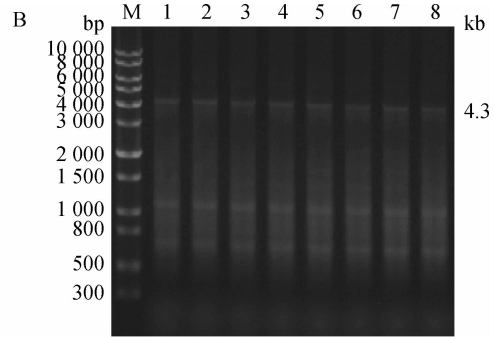
提取的组织基因组经过 NanoDrop2000 超微量分光光度计检测后,将基因组样品稀释到 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 作为模板使用。感染 ALV-J 海兰鸡颈部肿瘤组织基因组扩增到约 4.3 kb 大小的 DNA 片段



(图 1A)。为了确定它与外源性白血病病毒 cDNA 的关系,又使用正常海兰鸡颈部组织提取基因组做模板进行扩增,也扩增到同样约 4.3 kb 大小的 DNA 片段(图 1B)。

2.2 重组载体的构建

将不同模板扩增的 4.3 kb 大小的 DNA 片段进行切胶回收,使用 NanoDrop2000 超微量分光光度计检测后,将扩增的 DNA 末端使用 rTaq 进行 3'端加 A 后,进行纯化,连接 pMD18-T,转化 Top10 感受态细胞,挑取单克隆,摇菌提取质粒后,使用 *Sal* I 单酶切,选择得到约 7 000 bp 大小 DNA 条带的克隆,送上海美吉生物测序,确定含有 4 300 bp 的内源性 ALV 部分基因组序列,定名为 UL-E1。



A. 使用感染 ALV-J 海兰鸡颈部肿瘤组织基因组做模板扩增结果;B. 使用正常海兰鸡颈部组织基因组做模板扩增结果;M. DNA 相对分子质量标准;1~8. 72~52 °C 不同梯度退火温度 PCR 结果

PCR amplification with gradient annealing temperature, using Hy-Line Variety Brown neck tumor tissue DNA as template(A) or using Hy-Line Variety Brown neck tissue DNA as template(B). M. 1 kb plus DNA marker (purchased from Transgen Biotech);1-8. PCR amplicon of 72-52 °C annealing temperature

图 1 ALV-E 基因组扩增

Fig. 1 PCR amplification of ALV-E

2.3 对测序序列的分析

使用 Genetyx 和 Chromas2 对测序结果进行拼接和校正,得到完整的序列。对以 ALV 感染海兰鸡颈部肿瘤组织基因组和无外源性 ALV 感染的正常海兰鸡颈部组织基因组为模板分别扩增的序列做了比较分析,二者大小都为 4 663 bp,相似性为 100%,表明该片段来自正常鸡细胞基因组的内源性 ALV,而与感染的外源性 ALV 无关。

将测序拼接得到的基因组序列与 NCBI 网站上的同源序列进行 BLAST,发现与许多白血病病毒的基因组序列相似性最高达 99%,在该内源性 ALV 片段中,LTR 全长 274 bp,3 个主要结构基因 *gag*、*pol* 和 *env* 片段的大小分别为 2 013、728 和 1 046 bp,与完整的 ALV 基因组的相应基因相比都

有严重缺失(图 2)。其中与在原鸡 4 号染色体上的 *ev* 位点内源性 ALVE-B10^[27] (GenBank 登录号: KC610516)同源性最高,但是相比 ALVE-B10 基因组序列缺失严重,分别在 *gag*、*pol*、*env* 三个主要功能基因中位置缺失了 93、1 960 和 805 个碱基。

2.4 与原鸡的基因组其他序列的比较

在 GenBank 上找到原鸡的基因组序列,HL-E1 序列直接与原鸡基因组序列进行比对,在 1 号染色体(GenBank 登录号: NC006088)第 32 561 736—32 568 956(测序 *gap*)碱基位置之间找到了同源序列,相似性 99.2%。把这段序列拷贝下来,使用 Genetyx 进行比对发现,相比原鸡 1 号染色体序列在 32 563 954—32 563 686、32 564 811—32 566 771 和 32 567 340—32 568 147 碱基位置分别缺失了

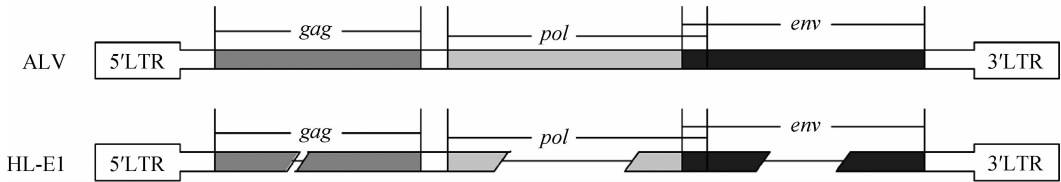


图 2 HL-E1 结构示意图

Fig. 2 Schematic illustration of HL-E1

93, 1 960 和 808 个碱基。

2.5 与其他亚群白血病毒全基因组序列比较分析

HL-E1 全基因组核苷酸序列与 ALV-A (SDAU09C1, 登录号为 HM452339)、ALV-B (SDAU09C2, 登录号为 HM446005)、ALV-E(*ev-1*^[26], 登录号为 AY013303)、ALV-J(NX0101^[23], 登录号为 DQ115805) 和 ALV-K^[2] (JS11C1^[24], 登录号为 KF746200) 的代表毒株进行序列比较, 结果显示: 该

内源性 ALV 片段与几个不同亚群的代表株的完整病毒粒子中的基因组相比, 其 *gag*、*pol*、*env* 都发生了严重缺失(表 1), 其 *env* 基因片段与 E 亚群 *ev-1* 的 *env* 基因相似性最高, 达 96.8%, HL-E1 的 LTR 与 *ev-1* 和 TW-3593 的 LTR 长度相同, 比较之下 HL-E1 的基因组大小明显小于其他 ALV 亚群(表 1)。此外, 通过对比 HL-E1 存在的三个缺失基因序列对应其他亚群的同源序列, 统计了 HL-E1 与其他亚群三个主要功能基因和 LTR 的相似性(表 2)。

表 1 HL-E1 与各亚群外源性 ALV 毒株基因组和鸡基因组内源性 ALV 成分的大小比较

Table 1 Comparison of HL-E1 strains with other subgroups ALV genes and genome size

bp

ALV 各亚群参考毒株 Reference of subgroup	基因和基因组 Gene and genome				
	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>	LTR	Genome
SDAU09C1(A 亚群) SDAU09C1(Subgroup A)	2 106	2 691	1 842	234	7 469
SDAU09C2(B 亚群) SDAU09C2(Subgroup B)	2 106	2 688	1 845	246	7 413
<i>ev-1</i> (E 亚群) <i>ev-1</i> (Subgroup E)	2 106	2 487	1 851	274	7 525
ALVE-B10(E 亚群) ALVE-B10(Subgroup E)	2 106	2 727	1 851	274	7 250
原鸡 1 号染色体 ALV 序列 ALV sequence of <i>gallus</i> chromosome 1	2 106	2 706	1 851	274	>7 221
NX0101(J 亚群) NX0101(Subgroup J)	2 106	2 622	1 710	325	7 688
JS11C1(K 亚群) JS11C1(Subgroup K)	2 106	2 688	1 806	327	7 707
HL-E1	2 013	728	1 046	274	4 663
HL-E1 缺失碱基数 HL-E1 missing nucleotide number	93	1 759—1 999	664—805	0	2 558—3 025

表 2 HL-E1 与各亚群外源性 ALV 毒株基因组和鸡基因组内源性 ALV 成分序列相似性比较

Table 2 Comparison of HL-E1 strains with other subgroups ALV three genes and LTR homologous

%

ALV 其他亚群参考毒株 Reference other subgroup	HL-E1			
	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>	LTR
SDAU09C1(A 亚群) SDAU09C1(Subgroup A)	95.3	92.2	91.2	25.2
SDAU09C2(B 亚群) SDAU09C2(Subgroup B)	96.3	93.3	90.0	30.1
<i>ev-1</i> (E 亚群) <i>ev-1</i> (Subgroup E)	98.7	96.0	96.8	97.4
ALVE-B10(E 亚群) ALVE-B10(Subgroup E)	99.3	98.1	99.1	98.5
原鸡 1 号染色体 ALV 序列 ALV sequence of <i>gallus</i> chromosome 1	99.3	98.2	98.8	98.5
NX0101(J 亚群) NX0101(Subgroup J)	98.9	91.3	50.5	49.3
JS11C1(K 亚群) JS11C1(Subgroup K)	96.8	95.1	94.7	50.0

3 讨论

利用自行研制的嗜热古菌 *Thermococcus* sp. 4557 来源重组表达的 *Pol* B DNA 聚合酶能扩增长片段 DNA 的特点(待发表),本研究最初试图通过一次 PCR 从鸡的急性肉瘤病料基因组 DNA 中扩增缺陷型急性致肿瘤 ALV 的全基因组,并得到了一个 4 663 bp 的片段。但在对照试验中,用相同的酶和引物,从未感染 ALV 的健康海兰鸡的细胞基因组 DNA 也扩增到序列完全相同的片段 HL-E1,这表明该片段实际上只是正常鸡基因组的一个组成部分。序列分析表明,对该片段全长 4 663 bp,分别包含 *gag*、*pol*、*env* 三个基因的部分序列及其 3'-LTR(表 1)。在 HL-E1 序列中 LTR 全长 274 bp;三个主要 ORF 编码的基因 *gag*、*pol*、*env* 的长度分别为 2 013、728 和 1 046 bp,与不同亚群的完整的 ALV 基因组上这三个基因相比都发生了很大的缺失。该片段 *env* 基因和 LTR 都与鸡基因组上经典的 *ev1* 位点的相应基因有 96.8% 和 97.4% 的相似性,而其他亚群的外源性 ALV 的相似性较低(表 2)。这表明这是整合进海兰鸡染色体基因组中的一个内源性 E 亚群 ALV 片段构成的 *ev* 位点。虽然到目前为止已分别从不同品系的正常鸡基因组识别和鉴定出 50 个不同的 *ev* 位点^[13],但这些位点分别是在 20 世纪 70、80 年代通过 RELP 和分子杂交的方法从不同品种鸡鉴定和识别出来^[14,15]。这些 *ev* 位点既有 E 亚群 ALV 完整的序列,如 ALVE-B10 等^[18],还有很多都是缺陷型的不完整基因组,其中只有少数几个有序列报道,如 *ev1*。到目前为止,从海兰鸡基因组还只有发现和报道了 *ev21* 这个位点^[12],这是与鸡的快慢羽性状相关基因紧密连锁的一个 *ev* 位点,它包括了完整的 E 亚群 ALV 全基因组。本研究克隆鉴定的 HL-E1 这个基因位点是不完整片段,显然这是不同于 *ev21* 的海兰鸡基因组上的又一个 *ev* 位点。

将 HL-E1 的序列与原鸡的基因组草图序列比对时,只在原鸡的 1 号染色体的第 32 561 736—32 568 956(此端为测序 *gap*) 碱基之间找到了同源序列,相似性 99.2%,HL-E 与原鸡的此段同源序列相比也在 1 859—1 951、3 076—5 036 和 5 605—6 412 位置缺失了 93、1 960 和 808 个碱基,其他位点没有找到同源序列。但该序列与从原鸡 4 号染色体扩增到的 ALVE-B10(内源性 E 亚群位点)的同源

性更高(表 1 和表 2),根据我们现有的研究结果还很难推断本研究扩增得到的 HL-E1 的位点是在海兰鸡的哪一条染色体上。这一内源性 ALV-E 位点是否会影响相应品系鸡的某种遗传性状也有待进一步研究。

4 结论

使用嗜热古菌 *Thermococcus* sp. 4557 来源重组表达的 *Pol* B DNA 聚合酶通过一次 PCR 反应成功扩增到了位于海兰鸡染色体基因组的一个新的 *ev* 位点 HL-E1。其 LTR 全长 274 bp,3 个主要结构基因 *gag*、*pol* 和 *env* 片段的大小分别为 2 013、728 和 1 046 bp,与完整的 ALV 基因组的相应基因相比都有严重缺失。

参考文献(References):

- [1] COFFIN J M. Structure and Classification of Retroviruses[M]. New York: Plenum Press, 1992, 1: 19-49.
- [2] 王鑫, 赵鹏, 崔治中. 我国地方品种鸡分离到的一个禽白血病毒新亚群的鉴定[J]. 病毒学报, 2012, 28(6): 609-614.
WANG X, ZHAO P, CUI Z Z. Identification of a new subgroup of avian leukosis virus isolated from Chinese indigenous chicken breeds[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2012, 28(6): 609-614. (in Chinese)
- [3] SAIF Y M, BARNES H J, GLISSON J R, et al. Disease of poultry[M]. Iowa State University Press, 2003: 64-78.
- [4] SPENCER J L, GILKA F, GAVORA J S, et al. Distribution of lymphoid leukosis virus and p27 group-specific antigen in tissues from laying hens[J]. *Avian Dis*, 1984, 28(2): 358-373.
- [5] CRITTENDEN L B, SMITH E J. A comparison of test materials for differentiating avian leukosis virus group-specific antigens of exogenous and endogenous origin[J]. *Avian Dis*, 1984, 28(4): 1057-1070.
- [6] ASTRIN S M. Endogenous viral genes of the White Leghorn chicken: common site of residence and sites associated with specific phenotypes of viral gene expression[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978, 75(12): 5941-5945.
- [7] DUNWIDDIE C T, RESNICK R, BOYCE-JACINO M, et al. Molecular cloning and characterization of *gag*-, *pol*-, and *env*-related gene sequences in the ev-chicken[J]. *J Virol*, 1986, 59(3): 669-675.

- [8] SACCO M A, FLANNERY D M, HOWES K, et al. Avian endogenous retrovirus EAV-HP shares regions of identity with avian leukosis virus subgroup J and the avian retrotransposon ART-CH [J]. *J Virol*, 2000, 74(3): 1296-1306.
- [9] STUMPH W E, HODGSON C P, TSAI M J, et al. Genomic structure and possible retroviral origin of the chicken CR1 repetitive DNA sequence family[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81(21): 6667-6671.
- [10] HUDA A, POLAVARAPU N, JORDAN I K, et al. Endogenous retroviruses of the chicken genome[J]. *Biol Direct*, 2008, 3:9.
- [11] BACON L D, FADLY A M, CRITTENDEN L B. Absence of influence on immune competence by the sex-linked gene(K) determining slow feathering in White Leghorn chickens[J]. *Avian Dis*, 1986, 30(4): 751-760.
- [12] BACON L D, SMITH E, CRITTENDEN L B, et al. Association of the slow feathering(K) and an endogenous viral(*ev21*) gene on the Z chromosome of chickens[J]. *Poult Sci*, 1988, 67(2): 191-197.
- [13] CRITTENDEN L B. Retroviral elements in the genome of the chicken: implications for poultry genetics and breeding[J]. *Crit Rev Poult Biol*, 1991, 3(2): 73-109.
- [14] SMITH E J, CRITTENDEN L B. Endogenous viral genes in a slow-feathering line of white leghorn chickens[J]. *Avian Pathol*, 1986, 15(3): 395-406.
- [15] BENKEL B F. Locus-specific diagnostic tests for endogenous avian leukosis-type viral loci in chickens [J]. *Poult Sci*, 1998, 77(7): 1027-1035.
- [16] SMITH A, BENKEL B F. Novel avian leukosis virus-related endogenous proviruses from layer chickens; Characterization and development of locus-specific assays[J]. *Poult Sci*, 2009, 88(8): 1580-1585.
- [17] YANG J, YU Y, YAO J, et al. Molecular identification of avian leukosis virus subgroup E loci and tumor virus B locus in Chinese indigenous chickens [J]. *Poult Sci*, 2011, 90(4): 759-765.
- [18] RUTHERFORD K, BENKEL B F. Characterization of insertion sites and development of locus-specific assays for three broiler-derived subgroup E avian leukosis virus proviruses[J]. *Avian Pathol*, 2013, 42(4): 373-378.
- [19] International Chicken Genome Sequencing Consortium. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution[J]. *Nature*, 2004, 432(7018): 695-716.
- [20] 徐海鹏, 孟凡峰, 董宣, 等. 种蛋中内源性禽白血病毒病的检测和鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(8): 1317-1323.
- XU H P, MENG F F, DONG X, et al. Detection and identification of an endogenous subgroup E avian leukosis virus in a chicken breeder embryo[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(8): 1317-1323. (in Chinese)
- [21] 刘超男, 高玉龙, 高宏雷, 等. J亚群与E亚群禽白血病毒自然重组病毒的全基因组序列分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(12): 978-981.
- LIU C N, GAO Y L, GAO H L, et al. Molecular characterization of a natural recombinant subgroup J avian leukosis virus with subgroup E partial *env* gene[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 31(12): 978-981. (in Chinese)
- [22] 孔义波, 张兴晓, 姜世金, 等. SPF鸡胚中内源性白血病毒全基因组序列鉴定与分析[J]. *病毒学报*, 2008, 24(1): 53-58.
- KONG Y B, ZHANG X X, JIANG S J, et al. Sequence analysis for the complete proviral genome of endogenous avian leukosis virus strain SD0501 [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2008, 24(1): 53-58. (in Chinese)
- [23] CUI Z, SUN S, WANG J. Reduced serologic response to Newcastle disease virus in broiler chickens exposed to a Chinese field strain of subgroup J avian leukosis virus[J]. *Avian Dis*, 2006, 50(2): 191-195.
- [24] CUI N, SU S, CHEN Z, et al. Genomic sequence analysis and biological characteristics of a rescued clone of avian leukosis virus strain JS11C1, isolated from indigenous chickens[J]. *J Gen Virol*, 2014, 95(Pt 11): 2512-2522.
- [25] WANG X, GAO Z, XU X, et al. Complete genome sequence of *Thermococcus* sp. strain 4557, a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent area[J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(19): 5544-5545.
- [26] JOHNSON J A, HENEINE W. Characterization of endogenous avian leukosis viruses in chicken embryonic fibroblast substrates used in production of measles and mumps vaccines[J]. *J Virol*, 2001, 75(8): 3605-3612.