

3'-U3 区碱基突变不影响禽白血病病毒的体外复制能力

高雁妮, 高 奇, 李晓菲, 负炳岭, 祁小乐, 王永强, 刘长军, 崔红玉,
张艳萍, 高宏雷, 王笑梅, 高玉龙*

(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 禽免疫抑制病创新团队, 哈尔滨 150001)

摘要: 为探索近年蛋鸡分离株中出现规律性突变的 J 群禽白血病病毒 (ALV-J) 3'-U3 区对病毒体外复制能力的影响, 以 ALV-J 原型毒株 HPRS-103 为骨架, 利用融合 PCR 技术构建含蛋鸡分离株 SD09DP04 的 3'-U3 区的嵌合病毒的 cDNA 克隆。嵌合病毒的感染性克隆与原型毒株 HPRS-103 的感染性克隆分别在脂质体介导下转染 DF-1 细胞, 对收获的病毒分别用间接免疫荧光试验、禽白血病抗原和反转录酶试剂盒检测, 结果表明成功拯救到 2 株病毒。对拯救的 2 株病毒, 进行其 3'-U3 区启动子活性和增强子活性的检测, 以及复制动力学比较分析结果显示, 出现特异性规律性突变的 U3 区对于原毒株的体外复制能力无显著影响。所构建的 3'-U3 区的嵌合病毒的成功拯救对于进一步探索近年 ALV-J 流行毒株其 3'-U3 区出现的规律性突变的功能及意义奠定了基础。

关键词: U3 区; 嵌合病毒; J 亚群禽白血病病毒; 生物学特性

中图分类号: S852.659.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)04-0608-07

The Mutations of 3'-U3 Region Make No Difference to ALV's Replication Capacity *in vitro*

GAO Yan-ni, GAO Qi, LI Xiao-fei, YUN Bing-ling, QI Xiao-le, WANG Yong-qiang, LIU Chang-jun,
CUI Hong-yu, ZHANG Yan-ping, GAO Hong-lei, WANG Xiao-mei, GAO Yu-long*

(State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology/Division of Avian Immunosuppressive Diseases,
Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: In order to study the influence of the 3'-U3 region with regular mutations of epidemic J subgroup avian leukosis virus (ALV-J) strains isolated from egg-type flocks on its replication capacity *in vitro*, a full-length cDNA clone was constructed based on ALV-J prototype HPRS-103 strain infectious clone via replacing its 3'-U3 region by the corresponding part of egg-type isolate SD09DP04. Both the constructed chimeric infectious clone and the HPRS-103 infectious clone were transfected into DF1 cells by lipofectamine 2000, respectively. The two infectious clones were passaged to another generation. And the harvested viruses were respectively confirmed by indirect immunofluorescence (IFA), ALV-antigen test kit and reverse transcriptase activity test kit. Analyzing the 3'-U3 region's promoter activity or enhancer activity and TCID₅₀ growth curves showed that such U3 region with regular mutations had no evident effect on the virus's replication capacity *in vitro*. The successful rescue of the chimeric virus plays the basic role in further exploration of the functions and the significance of the regular mutations in the 3'-U3 region in the epidemic ALV-J strains in recent years.

Key words: U3 region; chimeric virus; ALV-J; biological characteristics

收稿日期: 2014-08-14

基金项目: 国家自然科学基金(31372437); 现代农业肉鸡产业技术体系(nycytx-42-G3-01)

作者简介: 高雁妮(1990-), 女, 山东淄博人, 硕士生, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: yngao03@sina.com

* 通信作者: 高玉龙, 研究员, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: ylg@hvri.ac.cn

禽白血病病毒属于反转录病毒科,禽 C 型反转录病毒属,俗称禽 C 型肿瘤病毒。根据病毒的宿主范围、囊膜特性、交叉中和试验及其他特性,可将禽白血病病毒分为 6 个亚群,即 A、B、C、D、E 和 J 亚群禽白血病病毒。同时,根据传播方式的不同,禽白血病病毒也可分为外源性白血病病毒(A、B、C、D 和 J 亚群)和内源性白血病病毒(E 亚群)。J 亚群禽白血病病毒(J subgroup avian leukosis virus, ALV-J)是在 1988 年由英国科学家 L. N. Payne 于肉用型鸡群中首次分离得到^[1],此后 ALV-J 在世界范围内流行,给世界养禽业带来了巨大的经济损失。中国于 1999 年首先在肉鸡中分离出 ALV-J,随后在 2004 年首次报道蛋鸡自然感染 ALV-J^[2-3]。

在 2004 年以前,中国的 ALV-J 感染主要在肉鸡中流行,但自 2004 年后,在蛋鸡以及多种地方品系鸡中也发现了 ALV-J 的自然感染病例并分离得到病毒^[4-5],特别是 2009 年后,该病在蛋鸡群中的影响进一步扩大。有报道称 ALV-J 感染蛋鸡群后可引起高达 60% 的发病率和最多超过 20% 的死亡率。同时,ALV-J 的感染还引起了多种肿瘤的发生,并在全国范围内引起商品化蛋鸡和地方种鸡的生产下降等问题^[2,6-7]。

ALV-J 具有典型慢转化复制完全型白血病病毒的整体结构,即 5'-LTR-*gag-pol-env*-3'LTR^[8]。其 LTR 区域是病毒复制过程的重要调节区域,在病毒的翻译和 RNA 的复制过程中起着重要的作用。LTR 由 U3-R-U5 三部分组成,其中 U3 的作用最为重要。U3 区含有多种顺势作用元件,如 CCAAT 增强子结合元件等,可与细胞内反式作用因子结合,进而调控病毒的复制,转录等重要生命过程。*gag*、*pol* 和 *env* 基因则分别编码 ALV-J 的衣壳蛋白、反转录酶及囊膜蛋白。

近几年,ALV-J 的流行毒株与其原型毒株 HPRS-103 的基因组序列比较显示,ALV-J 的流行毒株的基因组序列出现一些与其致病性密切相关的特征性突变。例如,其 rTM 缺失 205 个碱基,E 元件序列的缺失都是 ALV-J 在其进化过程中自然发生的序列突变,并且某些这类突变能够增强病毒本身的致病力^[10-11]。最近,本实验室经过分析 ALV-J 蛋鸡分离株的序列特点,在其 U3 区域发现了很多特异性且有规律的突变^[7,11]。为了验证这些特异性的突变是否能够对病毒的生物学特性造成影响,我们构建了 ALV-J 的原型毒株 HPRS-103 的感染性

克隆,同时构建了以 HPRS-103 原型毒株为骨架,替换上具有特征性突变的蛋鸡分离株 SD09DP04 的 U3 区嵌合病毒的感染性克隆,拯救出 2 株病毒,并对拯救出的嵌合病毒的生物学特性进行了分析。

1 材料与方法

1.1 病毒株、细胞、载体和菌种

ALV-J 病毒株 SD09DP04 由本实验室分离保存^[12];ALV-J 原型毒株 HPRS-103 基因组全长已经克隆到 pUC19 载体上,该质粒命名为 pUC19-HPRS-103,由英国 Pirbright 研究所病毒性肿瘤病实验室惠赠;DF-1 细胞由笔者所在实验室保存,用于病毒的拯救和增殖;pBlueScript II KS(+)载体和 DH5 α 菌种由笔者所在课题组保存。

1.2 主要试剂

各种限制性内切酶、PrimeSTARTM HS DNA Polymerase、DNA Marker、dNTP、T4DNA 连接酶、PUC19 空载体等购自大连宝生物工程有限公司;FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体、pGL3 Luciferase Reporter Vectors 检测试剂盒购自 Sigma 公司;脂质体(LipfectamineTM2000)购于 GibcoBRL 公司;质粒提取试剂盒、核酸凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;Plasmid Mini Kits 为 QIAGEN 公司产品;反转录酶活性检测试剂盒为 Roche 公司产品;ALV-J 的 p27 蛋白单克隆抗体为本实验室保存^[13]。

1.3 引物设计

根据 ALV-J 原型株 HPRS-103 在 GenBank 中的序列设计 3 对特异引物,用以扩增病毒的前病毒基因组。同时,根据构建 3'-U3 区嵌合病毒的需要设计融合 PCR 所需引物。引物序列见表 1。

1.4 融合 PCR

用 DNA 凝胶回收试剂盒回收以质粒 HPRS-103 为模板,R1-F、R1-R 这对引物扩增的特异片段 R1(2 333 bp),R2-F、R2-R 这对引物扩增的特异片段 R2(99 bp)。胶回收以质粒 SD09DP04 为模板,R3-F、R3-R 这对引物扩增的特异片段 R3(226 bp)。将 R1、R2、R3 做融合 PCR,得到 2 658 bp 的片段,命名为 A-DPU3 备用。

1.5 嵌合病毒 HPRS-103 Δ DPU3 株感染性克隆构建

以 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切凝胶回收的融合 PCR 产物 A-DPU3 及空载体 pUC19,经连接和转化后,挑取单克隆白色菌落进行鉴定,阳性重组质粒

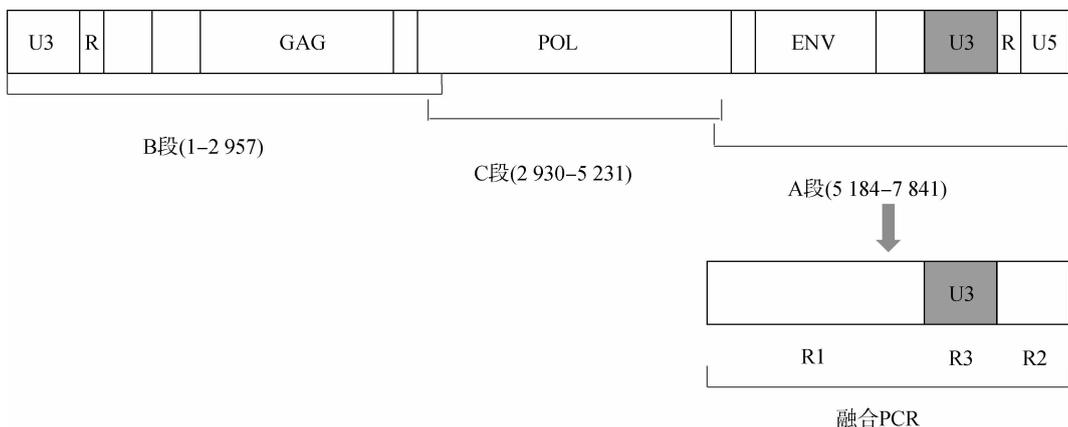
命名为 pUC19-A-DPU3;以 BF、BR 为引物,质粒 pUC19-HPRS-103 为模板 PCR 扩增 B 片段。以 *Hind*III 和 *Hpa*I 双酶切凝胶回收的 PCR 产物和 pUC19-A-DPU3,经连接转化后,挑取单克隆白色菌落进行鉴定,阳性重组质粒命名为 pUC19-A-DPU3-B。以 CF、CR 为引物,质粒 pUC19-HPRS-

103 为模板 PCR 扩增 C 片段,以 *Hpa*I 和 *Kpn*I 双酶切凝胶回收 PCR 产物及 pUC19-A-DPU3-B,经连接和转化后,挑取单克隆白色菌落进行鉴定,阳性重组质粒命名为 pUC19-A-DPU3-B-C,即嵌合病毒 HPRS-103 Δ DPU3 株感染性克隆。构建策略如图 1。

表 1 扩增 PBW-ALV-J 前病毒基因组的引物

Table 1 Primers used for amplification of PBW-ALV-J pri-DNA

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence	产物大小/bp Product size
BF	TAAAAGCTTTGTAGTGTATGCAATACTC	2 957
BR	TAGGTACCA CAAGCTTGGCGTTAACAG	
CF	TCGTTTATTGCATGACTTGCG	2 302
CR	CGAGAAGGTACCCAAATAACCTTAT	
AF	TAGGTTAACGCTGTGAAAAACAGGGACACT	2 658
AR	TGAAGCCATCCGCTTCATGCA	
R1-F	TAGGTTAACGCTGTGAAAAACAGGGACACT	2 333
R1-R	ATTGCATAAGACTACATTTCCCCCTCCCTATGCAAAGC	
R2-F	TAGCTTGATACAATAAACGCCATTTTACCTCCCAC	99
R2-R	GCAGAGCTCTGAAGCCATCCGCTTCATG	
R3-F	TTTGCATAGGGAGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACT	226
R3-R	GGTGGGAGGTAAAATGGCGTTATTGTATCAAGCTAGGC	



阴影部分为替换的 SD09DP04 的 U3 区

The shading indicate the U3 of SD09DP04

图 1 嵌合病毒重组质粒 pUC19-A-DPU3-B-C 构建策略

Fig. 1 The diagram of the construction strategy about the recombinant plasmid pUC19-A-DPU3-B-C

1.6 细胞转染及病毒拯救

用 QIAGEN 公司的产品 Plasmid Mini Kit 分别纯化 pUC19-HPRS-103 和 pUC19-A-DPU3-B-C,由 Lipfectamine™ 2000 分别介导转染约 80% 的单层 DF-1 细胞,同时以正常的 DF-1 为对照,转染后 6

h 弃细胞上清,用只加双抗的 DMEM 清洗两遍,每孔加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的加入双抗的 DMEM,在 37 °C 温箱中继续培养,转染 72 h 后收毒,冻存于 -80 °C 冰箱。反复冻融三次后连续在 DF-1 上传代,经鉴定后将拯救的病毒命名为 rH-

PRS-103 和 rHPRS-103 Δ DPU3。

1.7 病毒粒子的鉴定

1.7.1 间接免疫荧光试验 将拯救的 2 株病毒按照常规方法接种于约 70% 单层 DF-1 的 48 孔板中,7 d 后按常规方法进行间接免疫荧光检测,检测所用一抗为抗 ALV-J p27 蛋白的单克隆抗体,二抗为 FITC 标记的兔抗鼠 IgG 抗体,同时设不接毒的 DF-1 细胞作为对照。

1.7.2 群特异性禽白血病毒抗原检测 使用禽白血病毒抗原检测试剂盒^[13],参照其试剂盒说明书的具体步骤,对拯救的两株病毒进行检测。

1.7.3 反转录酶检验 用 reverse transcriptase assay 检测病毒的反转录酶的活性,首先用 PEG 法处理接毒的细胞液,按照试剂盒说明要求,对拯救的两株病毒进行反转录酶活性的检测。

1.8 rHPRS-103 和 rHPRS-103 Δ DPU3 的 U3 区启动子活性、增强子活性差异检测

将 ALV-J 实验室分离株 SD09DP04 和原型株 HPRS-103 的 U3 区分别克隆至 pGL-Enhancer Vector 或 pGL-Promoter Vector (引物序列如下, DPU3F:AGCGGTACCAATGTAGTCTTATGCA-ATACTCT;DPU3R:AGCAAGCTTGTATTG-TATCAAGCTAGG; 103U3F: GCGGTACCAAT-GTAGTGTATTGCAATACTCT; 103U3R: CGA-AAGCTTGTATTGTGTCGGGCTA)。转化 DH5 α 大肠杆菌感受态。挑取单克隆,用 Axygen 质粒提取试剂盒提取质粒后测序鉴定正确,将质粒命名为 E-DPU3、E-103U3 和 P-DPU3、P-103U3,分别用于检测比较 U3 区的启动子活性和增强子活性。用 QIAGEN 的 Plasmid Mini Kits 纯化构建好的 4 种质粒,用 LipfectamineTM 2000 分别介导转染约 80% 的单层 DF-1 细胞的 6 孔板中,同时转染 pGL-Enhancer Vector 或 pGL-Promoter Vector 作为阴性对照。转染后 48 h 按照 pGL Luciferase Reporter Vectors 试剂盒检测说明书进行荧光检测,统计并分析数据。

1.9 rHPRS-103 和 rHPRS-103 Δ DPU3 复制动力学的比较

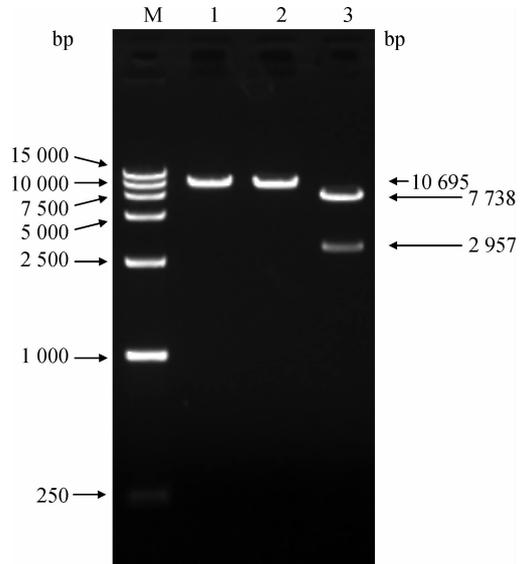
将两株拯救的病毒以 1×10^2 TCID₅₀ 的病毒量接种铺有单层的 DF-1 细胞的 6 孔板中(约 1×10^6 个细胞),感染后 1、2、3、4、5、6、7 d 分别取细胞上清,用禽白血病毒抗原检测试剂盒检测 p27,用于其复制动力学比较,重复测定 3 次,取其平均值,绘

制病毒的复制动力学曲线。

2 结果

2.1 ALV-J 嵌合病毒重组质粒的鉴定

用 *Kpn* I、*Sac* I 单酶切;*Hind* III 和 *Hpa* I 双酶切,鉴定重组质粒 pUC19-A-DPU3-B-C。酶切结果显示,重组质粒 pUC19-A-DPU3-B-C 经 *Kpn* I、*Sac* I 单酶切后,均为大小为 10 695 bp 的单一清晰条带,而经 *Hind* III 和 *Hpa* I 双酶切后,则得到大小分别为 2 957 和 7 738 bp 的 2 条条带(图 2)。同时将构建好的重组质粒全长测序,测序结果显示构建成功。



M. DL15000 DNA 相对分子质量标准;1. *Kpn* I 单酶切;2. *Sac* I 单酶切;3. *Hind* III 和 *Hpa* I 双酶切

M. DNA molecular weight marker DL15000;1. *Kpn* I ;2. *Sac* I ;3. *Hind* III and *Hpa* I

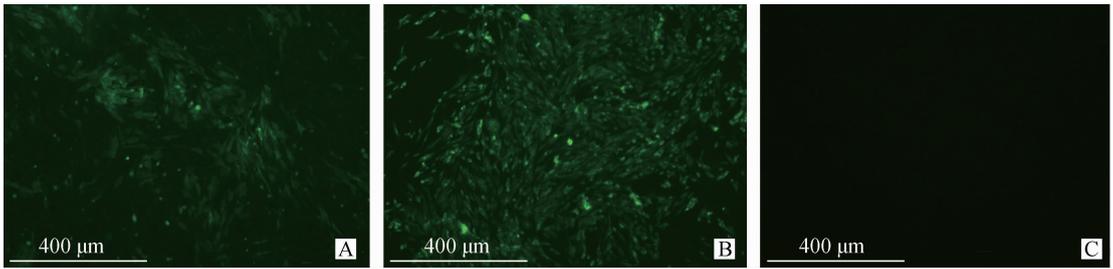
图 2 感染性克隆 pUC19-A-DPU3-B-C 的酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme identification of the infectious clone pUC19-A-DPU3-B-C

2.2 病毒粒子的鉴定

2.2.1 间接免疫荧光鉴定 rHPRS-103、rHPRS-103 Δ DPU3 的第 5 代病毒与抗 ALV-J 的 p27 蛋白的单克隆抗体均呈阳性反应。感染组 DF-1 细胞表面以及细胞质有明显的绿色荧光(图 3)。对照组 DF-1 细胞内没有绿色荧光。该结果表明,2 株病毒均得到成功拯救。

2.2.2 群特异性抗原检测 用禽白血病毒抗原检测试剂盒检测这 2 株拯救病毒的第 5 代病毒,绘制标准曲线。阳性对照孔在 OD_{650 nm} 吸光度平均



A. rHPRS-103 感染组; B. rHPRS-103 Δ DPU3 感染组; C. 阴性对照组
A. rHPRS-103; B. rHPRS-103 Δ DPU3; C. Negative control

图 3 rHPRS-103、rHPRS-103 Δ DPU3 株的间接免疫荧光鉴定结果
Fig. 3 Identification of rHPRS-103, rHPRS-103 Δ DPU3 by IFA

值为 0.368, 阴性对照孔在 OD_{650 nm} 吸光度平均值为 0.078。由公式得临界值 = $0.2 \times (\text{阳性对照平均值} - \text{阴性对照平均值})$, 计算得临界值为 0.136。rHPRS-103 株在 OD_{650 nm} 吸光度检测的平均值为 0.795, rHPRS-103 Δ DPU3 株在 OD_{650 nm} 吸光度检测的平均值为 0.967。抗原检测结果表明, 2 株病毒均得到成功拯救。

2.2.3 反转录酶检验 采用 Roche 的反转录酶检测试剂盒, 利用 HIV 反转录酶标准品绘制标准曲线, 再通过吸光度确定第 5 代拯救病毒的反转录酶活性, 通过 ELISA 检测, 取 3 次检测结果的平均数。2 株病毒 ELISA 在 OD_{450 nm} 处吸光值分别如下: rHPRS-103 为 3.128, rHPRS-103 Δ DPU3 为 2.985。所对应的反转录酶活性分别为 1.528 1 和 1.324。结果表明, 2 株病毒均得到成功拯救。

2.3 rHPRS-103、rHPRS-103 Δ DPU3 复制动力学的比较 绘制的病毒复制动力学曲线见图 4。结果表明, rHPRS-103、rHPRS-103 Δ DPU3 两株病毒体外

复制无明显差异。

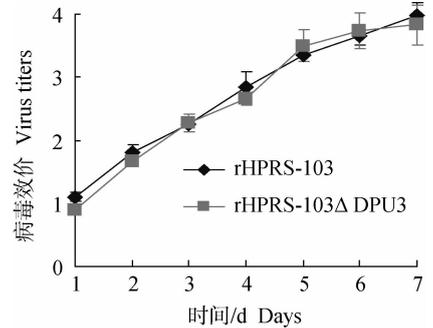


图 4 拯救病毒的复制动力学曲线
Fig. 4 Proliferation kinetics curve of the rescued viruses

2.4 U3 区启动子及增强子活性差异比较

按 pGL3 Luciferase Reporter Vectors 试剂盒检测说明书对转染后 48 h 的细胞进行荧光检测。结果如图 5。检测结果表明, rHPRS-103、rHPRS-103 Δ DPU3 的 U3 区启动子活性和增强子活性均无明显差异。

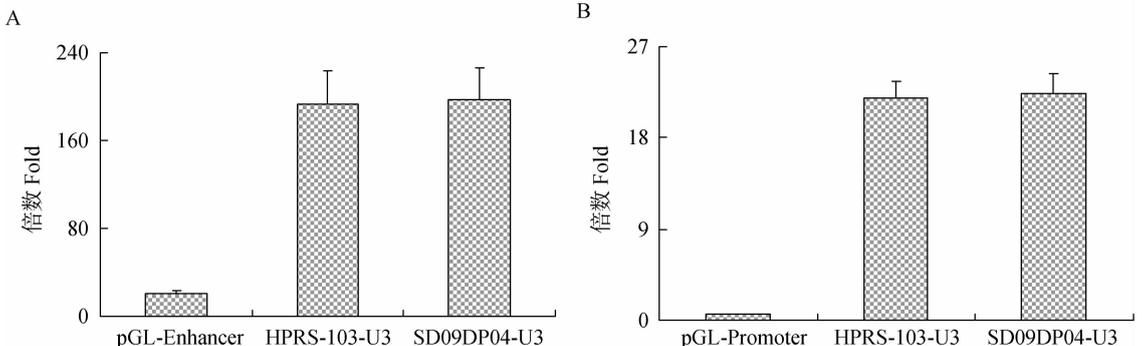


图 5 ALV-J 实验室分离株 SD09DP04 与原型株 HPRS-103 U3 区启动子活性(A)、增强子活性(B)结果
Fig. 5 The results of the promoter (A) /enhancer (B) activity between laboratories isolated virus SD09DP04 and classical virus HPRS-103

3 讨论

自 2008 年以来,ALV-J 的感染在中国出现大范围的流行^[7,12]。而与此同时,ALV-J 的流行毒株的基因组序列与原型毒株 HPRS-103 相比也出现了一些特异有规律的变化。通过笔者实验室所进行的流行病学调查以及对 ALV-J 流行毒株 U3 区的基因序列分析,发现 87.5%(14/16)的流行毒株具有 14 个碱基的规律性突变。而且,流行毒株的 U3 区与原型毒株及多株肉鸡分离株的 U3 区的进化树分析显示,此流行毒株的 U3 区处于一个新的分支上^[12]。由于 U3 区在病毒的复制增殖过程中有着重要的调控作用,含有多种与病毒复制密切相关的启动子和增强子元件^[14]。且最近的一些研究表明,ALV-J 倾向于出现有利于其迅速进化的突变^[10]。而上述流行毒株中出现的 U3 区的规律性突变正是 ALV-J 在其进化过程中自然发生的,这就表明其很有可能是 ALV-J 本身适应自然界,增强其增殖能力的一个有利进化。因此,对此具有特异性规律突变的 U3 区的功能及其对病毒复制的影响的研究,成为本研究的主题。本研究所拯救的 ALV-J 嵌合病毒中的 U3 区,即为近年来流行毒株 SD09DP04 的 U3 区序列,并且具有上述 U3 区的特异性规律特征。

本研究构建了 1 株 3'-U3 区嵌合禽白血病毒感染性克隆 (pUC19-A-DPU3-B-C),与 pUC-HPRS-103 分别转染 DF-1 细胞获得 2 株拯救病毒。ALV 属于反转录病毒,前病毒全基因组克隆被转染于 DF-1 后,即可利用宿主细胞的 RNA 聚合酶 II,启动转录、翻译过程,并最终完成病毒的包装和释放,所以在设计 ALV 感染性克隆时,不需要考虑启动子和核酶序列等修饰因子^[15]。

构建感染性克隆并拯救相应病毒,对于研究病毒基因组某一部分的作用,例如其对于整个病毒复制过程的影响,具有十分重要的意义。为了排除质粒瞬时转染蛋白质的可能性,本研究将转染后的病毒经过连续传代后,再进行一系列病毒活性的检测,并且同时采用多种检测方法,最终确定成功拯救出病毒,为后续的试验研究奠定了基础。

在本研究之中,对拯救的原型毒株 rHPRS-103 和嵌合病毒 rHPRS-103 Δ DPU3 的复制动力学曲线的测定结果表明这两株拯救病毒的体外复制能力无明显差异。为进一步探索 U3 区碱基的突变对于病

毒的复制能力无影响的机制,鉴于 U3 区含有多种顺式作用元件,起重要的增强子和启动子活性功能,我们对流行毒株的 U3 区与原型毒株 U3 区的启动子活性及增强子活性进行检测。检测结果表明,流行毒株的 U3 区其启动子活性和增强子活性均与原型毒株的 U3 区无明显差异。这些数据都表明,流行毒株的 U3 区的规律性突变,没有增强其 U3 区的增强子或启动子活性,进而对 ALV-J 的复制能力未造成影响。

但是,ALV-J 是反转录病毒,其在宿主体内复制过程中,首先要整合至宿主基因组内,而后再进行一系列复制过程。U3 区是决定 ALV-J 整合入宿主基因组的整合位点的重要区域。而且,在 2008 年以前,ALV-J 主要感染肉鸡群并引起骨髓瘤,但是在 2008 年后 ALV-J 的广泛流行过程中,出现了 ALV-J 感染蛋鸡的病例,同时还引起感染鸡发生血管瘤。由于 U3 区在 ALV-J 整合入宿主基因组过程中所起的重要作用,我们猜想流行毒株 U3 区的规律性突变可能与宿主的改变或者引起肿瘤类型的改变有关,但这还有待于进一步研究。

4 结论

利用融合 PCR 技术,以 ALV-J HPRS-103 株为骨架构建含 SD09DP04 株 3'-U3 区的嵌合病毒的 cDNA 克隆。嵌合病毒与 HPRS-103 的感染性克隆转染 DF-1 细胞,成功拯救到 2 株病毒,3'-U3 区启动子活性和增强子活性的检测以及复制动力学分析结果显示,出现特异性规律性突变的 U3 区对于原毒株的体外复制能力无显著影响。

参考文献 (References):

- [1] 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(4): 801-807.
- [2] 成子强, 张利, 刘思当, 等. 中国麻鸡中发现禽 J 亚群白血病毒[J]. *微生物学报*, 2005, 45(4): 584-587. CHENG Z Q, ZHANG L, LIU S D, et al. Emerging of *Avian leukosis virus* subgroup J in a flock of Chinese local breed [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(4): 584-587. (in Chinese)
- [3] 赵振华, 顾玉芳, 王凤龙, 等. 禽骨髓细胞瘤病的病理学研究(初报)[J]. *动物医学进展*, 1999, 20(3): 85-86. ZHAO Z H, GU Y F, WANG F L, et al. Pathological

- study on myelocytomatosis (preliminary study)[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 1999, 20(3): 85-86. (in Chinese)
- [4] 徐镛蕊, 董卫星, 余春明, 等. 用 ALV-J gp85 单克隆抗体证明蛋鸡存在 J 亚群禽白血病[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(3): 269-271.
- XU B R, DONG W X, YU C M, et al. Occurrence of ALV-J in egg type chickens certified by monoclonal antibody against ALV-J gp85[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(3): 269-271. (in Chinese)
- [5] 李 艳, 崔治中, 孙淑红. 黄羽肉鸡 J 亚群禽白血病病毒的分子生物学特性和致病性[J]. *病毒学报*, 2007, 23(3): 207-211.
- LI Y, CUI Z Z, SUN S H. Molecular biology and pathogenicity of Subgroup J avian leukosis virus isolated from yellow chickens[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2007, 23(3): 207-211. (in Chinese)
- [6] CHENG Z, LIU J, CUI Z, et al. Tumors associated with avian leukosis virus subgroup J in layer hens during 2007 to 2009 in China[J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72(8): 1027-1033.
- [7] GAO Y L, QIN L T, PAN W, et al. Avian leukosis virus subgroup J in layer chickens, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(10): 1637-1638.
- [8] BAI J, HOWES K, PAYNE L N, et al. Sequence of host-range determinants in the env gene of a full-length, infectious proviral clone of exogenous avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J)[J]. *J Gen Virol*, 1995, 76 (Pt 1): 181-187.
- [9] CHESTERS P M, SMITH L P, NAIR V. E(XSR) element contributes to the oncogenicity of Avian leukosis virus (subgroup J)[J]. *J Gen Virol*, 2006, 87 (Pt 9): 2685-2692.
- [10] WANG Q, GAO Y, WANG Y, et al. A 205-nucleotide deletion in the 3' untranslated region of avian leukosis virus subgroup J, currently emergent in China, contributes to its pathogenicity[J]. *J Virol*, 2012, 86 (23): 12849-12860.
- [11] GAO Y, YUN B, QIN L, et al. Molecular epidemiology of avian leukosis virus subgroup J in layer flocks in China[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(3): 953-960.
- [12] PAN W, GAO Y, SUN F, et al. Novel sequences of subgroup J avian leukosis viruses associated with hemangioma in Chinese layer hens [J/OL]. *Virology*, 2011, 8: 552. [2015-1-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3310751/>.
- [13] YUN B, LI D, ZHU H, et al. Development of an antigen-capture ELISA for the detection of avian leukosis virus p27 antigen[J]. *J Virol Methods*, 2013, 187(2): 278-283.
- [14] 张伟伟, 王 超, 杨宗伟, 等. J 亚群禽白血病病毒的 LTR 体外启动活性分析[J]. *中国兽医科学*, 2011, 41 (2): 121-125.
- ZHANG W W, WANG C, YANG Z W, et al. In vitro promoter activity analysis of long terminal repeat from avian leukosis virus subgroup J[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2011, 41(2): 121-125. (in Chinese)
- [15] 张纪元, 崔治中, 丁家波, 等. J 亚群白血病病毒 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, 45(3): 437-440.
- ZHANG J Y, CUI Z Z, DING J B, et al. Construction of infectious clone of subgroup J Avian leukosis virus strain NX0101 and its pathogenicity[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(3): 437-440. (in Chinese)

(编辑 白永平)