

K 亚群禽白血病病毒 5'LTR 序列及启动活性分析

赵子君, 饶明章, 陈建, 张杰, 袁丽霞, 廖明, 曹伟胜*

(华南农业大学兽医学院, 农业部兽用疫苗创制重点实验室, 广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广州 510642)

摘要: 通过对 ALV-K 5'LTR 序列及其启动活性比较分析, 以探究 5'LTR 对 ALV-K 体外复制能力的影响。选取广东某黄羽祖代种鸡场健康鸡群中分离到的 ALV-K(GDFX0601) 毒株作为研究对象, 将其 5'LTR 核苷酸序列与国内外不同亚群 ALV 分离株比较分析, 并将该 ALV-K 接种 DF-1 细胞, 采用 ELISA 对细胞培养上清进行 ALV p27 抗原检测以分析其在 DF-1 细胞上的复制能力, 还分别将 ALV-K (GDFX0601)、ALV-J (CHN06)、ALV-E(ev-1) 和 ALV-K(JS11C1) 5'LTR 克隆进 pGL3-Basic 载体, 分别转染 DF-1、CEF 和 293T 细胞后测定荧光素酶活性来评估不同毒株 5'LTR 的启动活性。结果显示, ALV-K(GDFX0601) 与其他内源性 ALV LTR 相似性为 98.5%, 而与其他外源性 ALV 的相似性仅有 70% 左右, 且其 LTR U3 区转录调节元件与外源性病毒差异较大, 与内源性病毒相似。ALV-K(GDFX0601) 在 ALV 易感细胞 DF-1 上的复制速度与感染能力均弱于外源性病毒 ALV-A、ALV-B 和 ALV-J。5'LTR 的启动活性试验发现 ALV-K(GDFX0601) 毒株 LTR 的启动活性比 ALV-J 和 LTR 为外源性的 ALV-K(JS11C1) 毒株的启动活性弱 ($P < 0.05$)。ALV-K 比其他亚群 ALV 复制能力低可能与 5'LTR 启动活性有关。

关键词: ALV-K; 致病性; LTR; 启动活性

中图分类号: S852.659.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)04-0754-07

The Research of 5'LTR Promoter Activity of Avian Leukosis Virus Subgroup K

ZHAO Zi-jun, RAO Ming-zhang, CHEN Jian, ZHANG Jie,

YUAN Li-xia, LIAO Ming, CAO Wei-sheng*

(Key Laboratory of Veterinary Vaccine Innovation of the Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Zoonoses Control and Prevention of Guangdong, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, we investigated the proliferation of avian leukosis virus subgroup K (ALV-K) and the activity of LTR. An ALV-K strain was used to infect DF-1 cells and the LTR was cloned into pGL3-Basic vector. The replication ability of the virus on ALV susceptible cell DF-1 was evaluated by ALV p27 antigen ELISA, and the promoter activities of the LTR of ALV-K, ALV-E and ALV-J strains were measured using a Dual-Glo Luciferase Assay System. The results showed that promoter activity of ALV-K LTR was significantly lower than those of other exogenous ALV in DF-1, CEF and 293T cells. The relatively poorer replication ability of ALV-K may be related to its weak promoter activity of the LTR.

Key words: ALV-K; pathogenicity; LTR; promoter activity

收稿日期: 2017-09-22

基金项目: 国家自然科学基金 (31672552); 广东省自然科学基金 (2016A030313403); 广东省家禽产业技术体系疾病控制岗位专家 (2016LM1114); 国家肉鸡产业技术体系 (CARS-41-G16)

作者简介: 赵子君 (1991-), 女, 山西大同人, 硕士, 主要从事预防兽医学传染病方向研究, E-mail: Zzj910507@163.com; 饶明章 (1990-), 男, 江西上饶人, 硕士, 主要从事预防兽医学传染病方向研究, E-mail: raomingzh@163.com。二人对本文具有同等贡献, 并列第一作者

* 通信作者: 曹伟胜 (1975-), 男, 教授, 博士, E-mail: caoweish@scau.edu.cn, Tel: +86 20 85282536

禽白血病毒(avian leukosis virus, ALVs)属于反转录病毒科、 α 反转录病毒属,是一类能够引起禽类多种肿瘤性疾病的病毒群,对养禽生产危害巨大。根据宿主范围、囊膜蛋白抗原性和交叉中和反应等,将其分为 A~K 共 11 个亚群,其中 A~D、J 和 K 亚群为外源性 ALV,而 C、D 亚群在野外极为少见^[1];E~I 亚群为内源性 ALV,其中 E 亚群为整合在鸡染色体中一种前病毒 DNA,在鸡群中普遍存在,而 F~I 亚群主要感染野生禽类,包括雉、鹧鸪和鹌鹑等^[2]。

K 亚群禽白血病毒(ALV-K)是 2012 年王鑫等^[3-4]首次从我国地方品种芦花鸡中分离到的新亚群,随后,2014 年郝建勇等^[5]、2016 年 X. J. Li 等^[6]以及 2017 年 H. X. Shao 等^[7]在我国地方鸡群中也分离到 ALV-K。将这些新分离的 ALV-K LTR 部分与其余已知亚群 LTR 进行序列比对分析发现,除了王鑫等^[3-4]分离到的 ALV-K LTR 部分属于外源性 ALV 外,其余地方分离到的 ALV-K LTR 部分均属于内源性 ALV。值得注意的是,这种 LTR 为内源性的 ALV-K 毒株与我国台湾地区发生的神经胶质瘤突变株 TW3539^[8]高度相似,并且我国台湾地区的研究报道认为 LTR 为内源性的 ALV-K 在台湾地区很常见^[8]。目前,本课题组还分离到 14 株 LTR 为内源性的 ALV-K 毒株,推测 LTR 是内源性的 ALV-K 毒株可能一直存在于我国地方品种鸡中。

ALV 前病毒基因组结构中含两段长末端重复序列(5'LTR 和 3'LTR),包括 R 区、U5 区和 U3 区,负责控制病毒基因的转录,不编码蛋白质,其中 5'LTR 是 ALV 基因表达的调控中心,与病毒复制、翻译、致癌等密切相关。内源性和外源性 ALV 具有相同的结构特征,但 LTR 部分差异较大。张青婵^[9]研究发现带有内源性 LTR 的 ALV 在 DF-1 细胞上的复制显著低于带有外源性 LTR 的 ALV,病毒滴度可相差 100 倍,其推测 ALV 基因组中的 LTR 序列与 ALV 在细胞上的复制水平以及致病性有关,但未对 LTR 的启动活性作进一步探究。

本研究以源于广东某黄羽祖代种鸡场健康鸡群中分离到的 ALV-K 毒株(GDFX0601)作为研究对象,比较分析了其 5'LTR 核苷酸序列,并评估了 ALV-K(GDFX0601)在 DF-1 细胞上的复制能力,且分别在 DF-1、CEF 和 293T 细胞上评估了不同亚群 ALV 毒株 5'LTR 的启动活性差异。

1 材料与方 法

1.1 载体、细胞和质粒

pGL3-Basic、pGL3-Control 和 pRL-TK 海肾荧光素酶载体购自美国 Promega 公司。DF-1 细胞、CEF 细胞、293T 细胞和 ALV-K 毒株(GDFX0601)、ALV-A 毒株(GD13)、ALV-B 毒株(CD08)和 ALV-J 毒株(CHN06)均由农业部兽用疫苗创制重点实验室提供。

1.2 LTR 片段的扩增与序列分析

ALV-K 毒株(GDFX0601)和 ALV-J 毒株(CHN06)前病毒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳和回收后,分别克隆至 pMD18-T 载体中,阳性重组质粒送至上海 Invitrogen 公司进行测序。测序结果用生物学软件 DNASTar7.1 及在线软件 TFSEARCH 进行序列相似性分析和细胞转录因子结合位点分析。

1.3 ALV-K(GDFX0601)在 DF-1 细胞上的复制

将 ALV-K 毒株(GDFX0601)、ALV-A 毒株(GD13)、ALV-B 毒株(CD08)和 ALV-J 毒株(CHN06),以每孔接种 100 μ L 毒液($10^{3.5}$ TCID₅₀),分别接种 24 孔细胞培养板中,5% CO₂、10% FBS、37 °C 培养箱中培养。待接种毒液后第 2 天,细胞长满单层后,换为 1% FBS 的细胞维持液进行培养。连续培养 7 d,期间持续监测细胞的生长情况,收集 1~7 d 的细胞上清液用 IDEXX 公司的 Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit 进行检测,使用前试剂盒中所有试剂(包括包被板)应回温 2 h 以上,使其恢复至室温(18~25 °C),试剂及冻融样品在使用前应轻轻振摇彻底混匀。

1.4 重组质粒的构建

重组质粒 pGL3-Basic-GDFX0601-LTR、pGL3-Basic-CHN06-LTR、pGL3-Basic-ev-1-LTR、pGL3-Basic-JS11C1-LTR 的构建。将 ALV-K(GDFX0601)、ALV-J、ALV-E 和 LTR 为外源性的 ALV-K(JS11C1) LTR 的 PCR 产物和不含启动子的萤光素酶报告基因载体 pGL3-Basic 分别用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切后回收。将双酶切后的 LTR 回收产物分别与 pGL3-Basic 进行连接,重组质粒经初步鉴定正确后送广州艾基生物技术有限公司测序验证。

1.5 重组质粒的转染

用 OMEGA 去内毒素质粒提取试剂盒抽提

pGL3-Basic-GDFX0601-LTR、pGL3-Basic-CHN06-LTR、pGL3-Basic-ev-1-LTR、pGL3-Basic-JS11C1-LTR 质粒。消化前期准备的 DF-1 细胞、CEF 细胞和 293T 细胞,铺 24 孔细胞培养板,10% FBS,5% CO₂、37 °C 培养。24 h 内进行转染,Corning 公司 24 孔细胞培养板每孔转染体系为:1 μg 质粒(900 ng 重组质粒和 100 ng 海肾荧光素酶内参质粒)和 2.5 μL POLOdeliverer 3000 分别用 50 μL Opti-MEM[®] 稀释并孵育 5 min,然后再混合,共同孵育 15 min,将 100 μL 质粒-脂质体复合物加入到准备好的 24 孔细胞培养皿中。按照上海锐赛 POLOdeliverer 3000 转染试剂盒操作说明进行转染。

1.6 荧光素酶的检测

转染后的细胞,培养 48 h 后,按 Promega 双荧光检测试剂盒(Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System)说明书操作进行荧光素酶的检测。主要步骤有用细胞裂解缓冲液裂解细胞,检测萤火虫荧光信号和海肾荧光信号,二者比值即为重组质粒启动

活性。

2 结果

2.1 LTR 相似性及转录结合位点分析

利用 DNASTar 7.1 基因分析软件对 ALV-K(GDFX0601)毒株的 LTR 基因核苷酸序列与 GenBank 中已公开发表的国内外各参考毒株的 LTR 基因核苷酸序列进行相似性分析,发现外源性 ALV LTR 的大小在 325 bp 左右,内源性 ALV LTR 的大小在 274 bp 左右,ALV-J 国外参考株(HPRS103)的 LTR 长度为 325 bp,其中 U3 为 224 bp,R 为 21 bp,U5 为 80 bp。经典外源性 ALV-A、ALV-B 和 ALV-J 之间 LTR 的相似性在 80%左右,与内源性 ALV-E LTR 的相似性最高只有 70%左右。将本课题组分离到的 ALV-K(GDFX0601)毒株进行相似性分析,发现其 LTR 与 ALV-E 相似性高达 98.5%,与外源性 ALV 相似性只有 70%(图 1),与已报道的台湾株(TW3539)相似性达 99%(图 1)。

		Percent Identity														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Divergence	1	■	82.7	87.9	87.9	87.6	68.5	68.5	68.5	68.5	68.5	68.0	68.9	82.7	1	ALV-A MQNCSU-LTR.seq
	2	20.1	■	82.1	83.1	80.5	71.8	71.8	71.4	72.5	72.5	72.1	72.9	95.1	2	ALV-B SDAU09E3-LTR.seq
	3	13.4	20.8	■	92.0	96.6	68.1	68.1	67.4	68.5	68.5	68.0	68.5	80.4	3	ALV-J HPRS103-LTR.seq
	4	13.4	19.4	8.6	■	91.4	69.6	69.6	69.6	70.0	70.0	69.5	70.0	81.7	4	ALV-J SCAU-CHN06-LTR.seq
	5	13.8	23.2	3.5	9.3	■	68.5	68.5	67.8	68.9	68.9	68.4	68.9	80.1	5	ALV-J NX0101-LTR.seq
	6	41.5	35.8	41.8	39.3	41.2	■	99.6	98.5	98.2	98.2	97.8	98.5	71.8	6	ALV-E ev-1-LTR.seq
	7	41.5	35.8	41.8	39.3	41.2	0.4	■	98.2	98.5	98.5	98.2	98.9	71.8	7	ALV-E ev-3-LTR.seq
	8	41.5	36.5	43.2	39.3	42.6	1.5	1.8	■	96.7	96.7	96.3	97.1	71.1	8	ALV-E SDO501-LTR.seq
	9	41.4	34.5	41.1	38.6	40.5	1.9	1.5	3.4	■	100.0	99.6	99.6	72.5	9	ALV-K GDFX0601-LTR.seq
	10	41.4	34.5	41.1	38.6	40.5	1.9	1.5	3.4	0.0	■	99.6	99.6	72.5	10	ALV-K GDFX0602-LTR.seq
	11	42.4	35.3	42.0	39.4	41.4	2.2	1.9	3.8	0.4	0.4	■	99.3	72.1	11	ALV-K GDFX0603-LTR.seq
	12	40.8	33.9	41.2	38.6	40.6	1.5	1.1	3.0	0.4	0.4	0.7	■	72.9	12	TW-3593-LTR.seq
	13	20.2	5.1	23.2	21.3	23.8	36.0	36.0	37.1	34.6	34.6	35.4	34.1	■	13	ALV-K JS11C1-LTR.seq
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		

上三角表示相似性,下三角表示分歧度

Data in upper-triangle is percent identity, data in lower-triangle is divergence

图 1 ALV-K(GDFX0601)与不同亚群 ALV 参考株 LTR 基因核苷酸序列相似性分析

Fig. 1 The homology of nucleotide sequences of LTR of subgroup K ALV isolates and other reference strains

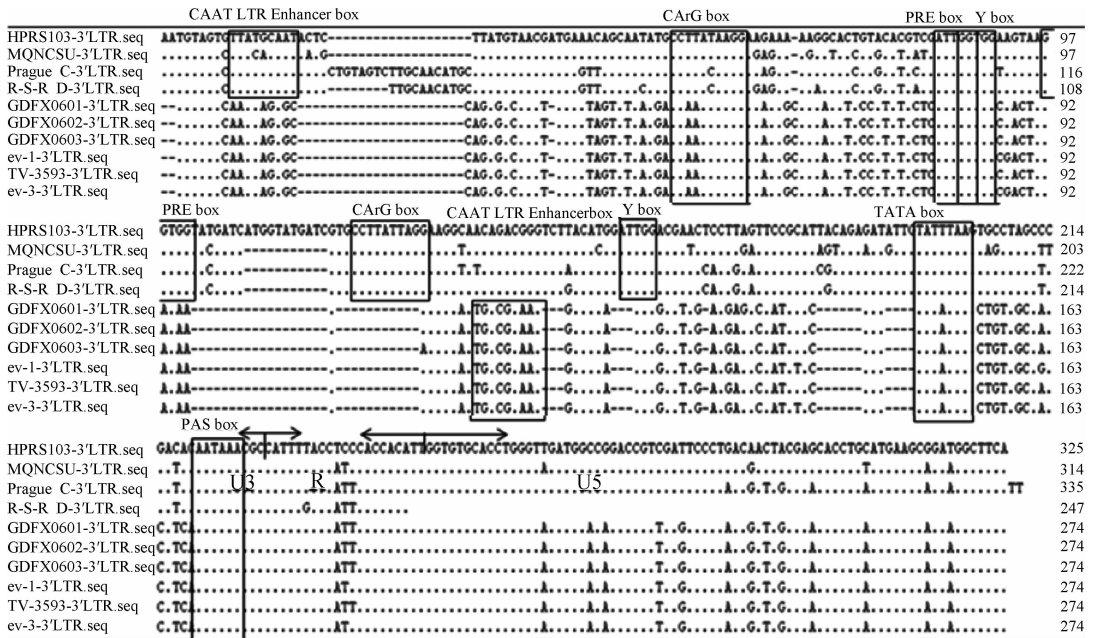
2.2 LTR 转录因子结合位点分析

ALV-K(GDFX0601) LTR 与其他参考毒株相比 R 区域与所有参考毒株相似性较高,U5 区域和外源性病毒有 83.3%~93.6%的相似性,相似性也较高,而包括 CArG box、Y box、PRE box、CAAT box 和 TATA box 等转录调节元件的 U3 区域与外源性病毒差异较大,其中 CAAT box、CArG box 和 TATA box 均有碱基突变(图 2)。ALV-K(GDFX0601) LTR U3 区域的转录调节元件和

ALV-E 一致,相对保守(图 2)。

2.3 ALV-K(GDFX0601)在 DF-1 细胞上的复制动力学

将 ALV-A、ALV-B、ALV-J 和 ALV-K(GDFX0601)接种 DF-1 细胞培养,连续 7 d 取细胞培养上清 ELISA 检测 p27 抗原,检测结果显示:ALV-K(GDFX0601)在 DF-1 细胞上的增殖能力显著低于 ALV-A、ALV-B 和 ALV-J ($P < 0.05$,图 3)。这表明 ALV-K(GDFX0601)在细胞上的复制速度与其感染能力弱于 ALV-A、ALV-B 和 ALV-J。



箭头表示 U3 区、R 区和 U5 区划分；· 代表碱基相同，而字母代表碱基突变；- 代表碱基缺失；方框代表不同的转录调节元件
The arrows indicate the division of the U3, R and U5 zones; Dots (·) indicate identical residues, while letters indicate base substitutions. Dashes (-) indicate gaps in the alignment. Locations of putative transcriptional regulatory elements are indicated in boxes and are marked

图 2 ALV LTR 各区域核苷酸序列及转录因子结合位点分析
Fig. 2 Nucleotide sequence alignments and motifs of the ALV LTR region

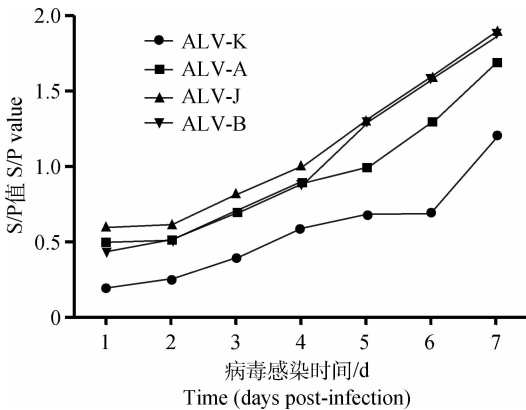


图 3 ALV-A、ALV-B、ALV-J 和 ALV-K 在 DF-1 细胞中复制
Fig. 3 Replication of the ALV-A, ALV-B, ALV-J, and ALV-K in DF-1 cells

2.4 在 DF-1 上各毒株 LTR 启动活性的比较

在 DF-1 细胞上转染 ALV-K (GDFX0601) LTR、ALV-J(HN06)LTR、ALV-E (ev-1) LTR 和 ALV-K(JS11C1)LTR 含荧光素酶报告基因重组质粒,结果显示 ALV-K(GDFX0601) LTR 重组质粒的荧光素酶的平均相对表达量均低于 ALV-J (CHN06)LTR 和王鑫等^[3]分离到的 LTR 为外源性的 ALV-K (JS11C1) LTR 重组质粒,但高于

ALV-E (ev-1) LTR(图 4)。

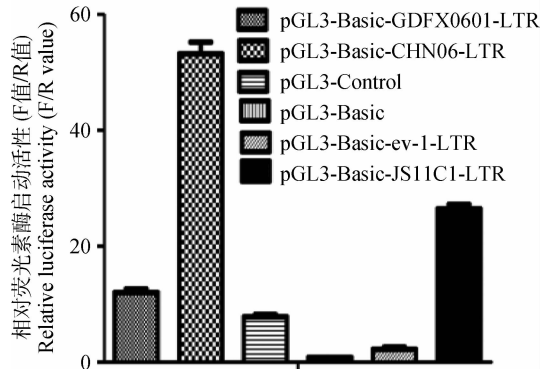


图 4 含不同 LTR 重组质粒在 DF-1 细胞的荧光素酶启动活性分析
Fig. 4 Luciferase activity analysis of DF-1 cells with different LTR recombinant plasmids

2.5 在 CEF 上各毒株 LTR 启动活性的比较

由于 ALV-K(GDFX0601)的 LTR 部分属于内源性 ALV,本研究又在可感染 ALV-E 的 CEF 细胞上进行试验,试验结果与在 DF-1 细胞上一致(图 5),说明 ALV-K(GDFX0601)毒株 LTR 的启动活性比 ALV-J 和 LTR 为外源性的 ALV-K(JS11C1)毒株 LTR 的启动活性弱。

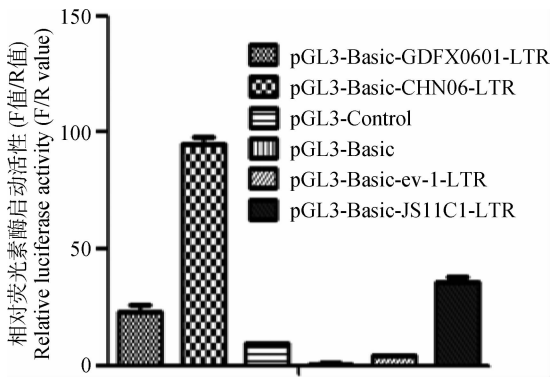


图 5 含不同 LTR 重组质粒在 CEF 细胞的荧光素酶启动活性分析

Fig. 5 Luciferase activity analysis of CEF cells with different LTR recombinant plasmids

2.6 在 293T 上各毒株 LTR 启动活性的比较

本研究同时在 293T 细胞上进行试验,结果发现转染含 ALV-K(GDFX0601)LTR 重组质粒的荧光素酶的平均相对表达量也均低于转染 ALV-J(CHN06) LTR 和 LTR 为外源性的 ALV-K(JS11C1)LTR 重组质粒,但高于转染内源性 ALV(ev-1)LTR(图 6)。结果再次说明 LTR 属于内源性毒株的 ALV-K(GDFX0601)的 LTR 的启动活性比外源性 ALV-J 毒株和 LTR 为外源性的 ALV-K(JS11C1)毒株的 LTR 的启动活性弱。

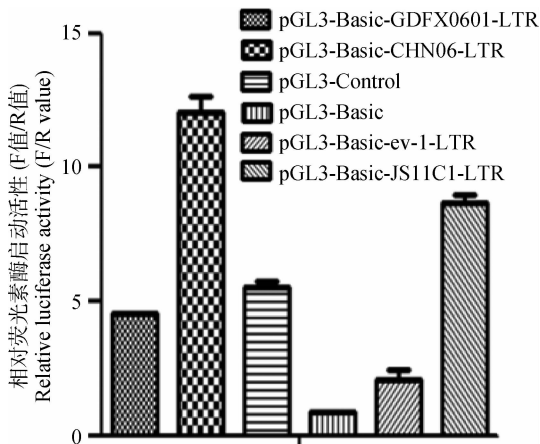


图 6 含不同 LTR 重组质粒在 293T 细胞的荧光素酶启动活性分析

Fig. 6 Luciferase activity analysis of 293T cells with different LTR recombinant plasmids

3 讨论

近几年来,ALV 在我国流行情况依然严重,不同亚群 ALV 感染我国地方品系鸡均有相关报道,

包括 ALV-A、B、E、J、K^[3,10-12]。中国作为养禽大国,养殖数量大、品种多、养殖场分散,使得 ALV 的净化和防控难以有效实施,加上禽白血病可通过垂直传播,严重影响雏鸡的质量,还可引起鸡群直接发病而死亡或使感染鸡群产生免疫抑制而继发其他疾病,从而降低疫苗免疫应答效果,影响鸡的生产性能^[13-15],给养殖业造成了巨大的损失。在外源性 ALV 中,以 ALV-A、ALV-B 和 ALV-J 为主,对养禽生产的危害较大^[13]。2012 年,王鑫等^[3-4]从我国芦花鸡中分离到 3 株毒株,鉴于其 *gp85* 基因不同于其他各已知亚群,故将其命名为 ALV-K;随后,2014 年郝建勇等^[5]和 2016 年 X. J. Li 等^[6]从广东地方品系鸡中、2017 年 H. X. Shao 等^[7]从江苏也分离到该亚群病毒,ALV-K 在我国地方种鸡中逐渐流行起来。2017 年从山东地区肉鸡中鉴定到一株 ALV-K 并完成其全基因组序列分析^[16]。值得注意的是,2014 年后分离到的 ALV-K 其 LTR 部分均属于内源性 ALV,大小与内源性病毒相近,而王鑫等^[3]分离到的 ALV-K 的 LTR 大小与外源性病毒相近。

ALV 基因组结构主要由 5'LTR-gag-pol-env-LTR3'组成,长末端重复序列 LTR 不编码蛋白质,分别由 3'独特区 U3、短重复区 R 及 5'独特区 U5 3 部分组成。ALV 的 LTR 与病毒复制、翻译、致瘤等密切相关^[17]。5'LTR 是反转录病毒基因表达的调控中心。ALV-K 作为新的亚群,近些年在我国很多地方品系鸡中被分离到^[3,5-7],但有关其生物学特性的研究报道相对较少,本研究以 LTR 为内源性的 ALV-K(GDFX0601)毒株为研究对象,感染 DF-1 细胞并将其 LTR 部分克隆进 pGL3-Basic 载体。对 LTR 基因核苷酸序列进行相似性分析,发现 ALV-K(GDFX0601) LTR 部分大小只有 274 bp,与内源性 ALV LTR 相似性大于 98.5%,而与外源性 ALV LTR 相似性小于 72.5%;LTR 区的 U3 是强转录调控单位,决定 LTR 启动活性强弱,序列分析结果显示 ALV-K(GDFX0601)U3 区的转录调节元件与其他外源性 ALV 差异较大,与内源性 ALV 相似性较高。本研究进一步将 ALV-K(GDFX0601)接种 DF-1 细胞,发现 LTR 为内源性的 ALV-K(GDFX0601)在细胞上的复制速度较 LTR 为外源性毒株慢,这与张青婵^[9]将 LTR 为内源性及外源性的 ALV-A 同时接种 DF-1 细胞的研究结果一致,LTR 为内源性的毒株在 DF-1 细胞上

复制更慢,病毒滴度更低。由于 LTR 为内源性的毒株复制速度慢,可致 p27 抗原表达水平低,易使 ELISA 方法漏检已感染这类外源性病毒的鸡,从而造成广泛传播,这应该引起足够的重视。根据研究结果推测 ALV-K(GDFX0601)的复制能力低可能与其 5'LTR 基因密切相关。

本课题组张贺楠等^[18]在体外细胞水平分析显示不同病变型 ALV-J 国内分离株 LTR 之间的启动活性差异不显著,之后本课题组冯少珍等^[19]研究发现 ALV-J LTR 启动活性高于 ALV-A 和 ALV-B,但其并未报道 ALV-E LTR 的启动活性。因此,本研究选择 ALV-J (CHN06)、ALV-E (ev-1)、ALV-K (GDFX0601) 和 LTR 为外源性的 ALV-K (JS11C1) 5'LTR 作为研究对象,分析 LTR 启动活性差异,为了避免重复,本研究没有选择 ALV-A 和 ALV-B LTR。pGL3-Basic 载体缺少启动子序列,但有荧光素酶报告系统,将 LTR 序列插入 pGL3-Basic 载体,可以通过检测荧光素酶活性,反映 LTR 启动活性的强弱;pGL3-Control 载体具有启动子序列,能启动荧光素酶的表达,作为对照;PRL 海肾荧光素酶载体为内参。5'LTR 的启动活性试验结果发现 ALV-K (GDFX0601) LTR 的启动活性比 ALV-J (HN06) 和 LTR 为外源性的 ALV-K (JS11C1) 的启动活性弱。由于 LTR 为内源性的 ALV-K 启动活性弱,而导致其复制能力低,使得 ELISA 检测血浆或者泄殖腔样本时漏检。目前我国地方品系鸡群中分离到的 LTR 为内源性的 ALV-K,究竟是王鑫等^[3]分离到的 ALV-K 毒株在净化演变过程中与内源性病毒发生了重组,还是内源性病毒与外源性病毒发生重组从而产生 LTR 属于外源性的 ALV-K 毒株,即 ALV-K 本身 LTR 是内源性还是外源性还有待进一步探究。

4 结 论

大部分反转录病毒 LTR 序列不仅具有真核生物启动活性,而且具有原核细胞启动活性,目前鲜有对 ALV-K 5'LTR 启动活性研究的报道。本研究验证了 LTR 属于内源性的 ALV-K(GDFX0601)的 5'LTR 启动活性低于 5'LTR 属于外源性的 ALV 毒株($P < 0.05$),这可能是 ALV-K(GDFX0601)复制能力和致病性弱的原因。同时试验结果显示转染 ALV-K (GDFX0601)毒株 LTR 启动活性高于转染 ALV-E(ev-1)毒株 LTR,究其 LTR 属于内源性毒

株的 ALV-K (GDFX0601) LTR 比内源性毒株 LTR 启动活性高的原因,推测与 LTR U3 区碱基的突变有关。本研究也为进一步研究内源性 ALV LTR 调控病毒复制的机制奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] 杨玉莹. J 亚群禽白血病毒研究进展[J]. 中国病毒学, 2003, 18(1): 93-97.
YANG Y Y. Advance in Avian leukosis virus subgroup J[J]. *Virologica Sinica*, 2003, 18(1): 93-97. (in Chinese)
- [2] PAYNE L N. Developments in avian[J]. *Leukemia*, 1999, 6(3): 150-152.
- [3] 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)
- [4] CUI N, SU S, CHEN Z M, 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.
- [5] 郝建勇, 秦建如, 邱倩倩, 等. 地方鸡种 K 亚群禽白血病毒病的分离及遗传鉴定[C]//中国畜牧兽医学. 中国畜牧兽医学 2014 年学术年会论文集. 广州: 中国畜牧兽医学, 2014.
HAO J Y, QIN J R, QIU Q Q, et al. Identification and evolution analysis of ALV-K isolated from local Chinese chicken[C]. Guangzhou: Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, 2014. (in Chinese)
- [6] LI X J, LIN W C, CHANG S, et al. Isolation, identification and evolution analysis of a novel subgroup of avian leukosis virus isolated from a local Chinese yellow broiler in South China[J]. *Arch Virol*, 2016, 161(10): 2717-2725.
- [7] SHAO H X, WANG L, SANG J J, et al. Novel avian leukosis viruses from domestic chicken breeds in mainland China[J]. *Arch Virol*, 2017, 162(7): 2073-2076.
- [8] CHANG S W, HSU M F, WANG C H. Gene detection, virus isolation, and sequence analysis of avian leukosis viruses in Taiwan country chickens[J]. *Avi-*

- an Dis*, 2013, 57(2): 172-177.
- [9] 张青婵. A 亚群禽白血病病毒不同分离株的基因组和生物学特性比较[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010. ZHANG Q C. Comparison of genome and biological characteristic of different subgroup A avian leukosis virus strains[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2010. (in Chinese)
- [10] 高玉龙, 邵华斌, 罗青平, 等. 2009 年我国部分地区禽白血病分子流行病学调查[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(1): 32-35, 43. GAO Y L, SHAO H B, LUO Q P, et al. Molecular epidemiology of avian leukosis virus isolates from some regions of China in 2009[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2010, 32(1): 32-35, 43. (in Chinese)
- [11] 王 帅. 地方品系鸡白血病流行病学调查与 ALV p27 基因的表达分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013. WANG S. Epidemiological investigation of avian leukosis in local strains chicken and expression analysis of ALV p27 gene[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [12] 冯 敏, 谭利强, 代曼曼, 等. 种禽场 A 亚群禽白血病病原学调查及分离株遗传进化分析[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(4): 11-15. FENG M, TAN L Q, DAI M M, et al. Etiology surveys and phylogenetic analyses of avian leukosis virus subgroup A isolated from breeder chickens farms[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2014, 35(4): 11-15. (in Chinese)
- [13] 郝建勇. 黄羽肉鸡配套系核心群 AL 净化方案的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2015. HAO J Y. Eradication protocol study of Avian Leukosis in Yellow broiler chickens [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [14] 秦立廷, 高玉龙, 潘 伟, 等. 我国部分地区蛋鸡群 ALV-J 及与 REV、MDV、CAV 混合感染检测[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(2): 90-93. QIN L T, GAO Y L, PAN W, et al. Investigation of co-infection of ALV-J with REV, MDV, CAV in layer chicken flocks in some regions of China[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2010, 32(2): 90-93. (in Chinese)
- [15] 张振杰, 刘绍琼, 王 波, 等. 地方品种皖南黄肉种鸡 ALV-J 与 REV 的共感染及其分子变异分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(11): 2379-2386. ZHANG Z J, LIU S Q, WANG B, et al. Identification of co-infection of ALV-J and REV and molecular characterization of the two viruses isolated from Wannan yellow feather broilers[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(11): 2379-2386. (in Chinese)
- [16] 李久庆, 刘 强, 郭 雷, 等. 一株新亚群禽白血病病毒全基因组序列分析[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(9): 1718-1723. LI J Q, LIU Q, GUO L, et al. Genomic sequence analysis of a new subgroup of avian leukosis virus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(9): 1718-1723. (in Chinese)
- [17] BROWN D W, ROBINSON H L. Influence of env and long terminal repeat sequences on the tissue tropism of avian leukosis viruses[J]. *J Virol*, 1988, 62(12): 4828-4831.
- [18] 张贺楠, 齐 岩, 史伟伟, 等. 不同病变型 J 亚群禽白血病病毒 LTR 启动子序列分析及活性比较[J]. 病毒学报, 2010, 26(5): 402-406. ZHANG H N, QI Y, SHI W W, et al. Sequence and promoter efficacy analysis of avian leukosis virus subgroup J strains of different pathotypes[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2010, 26(5): 402-406. (in Chinese)
- [19] 冯少珍, 李 娇, 吴晓婵, 等. 不同亚群禽白血病病毒 5'LTR 序列及启动子活性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(8): 125-131. FENG S Z, LI J, WU X C, et al. Sequence and promoter activity analysis of 5'LTR from different subgroups of avian leukosis viruses[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011, 38(8): 125-131. (in Chinese)

(编辑 白永平)