

网状内皮组织增生症病毒中国分离株HA9901 全基因组核苷酸序列的测定与分析*

王 玉 崔治中** 姜世金

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要 以网状内皮组织增生症病毒(REV)中国分离株 HA9901 感染的鸡胚成纤维细胞(CEF)基因组 DNA 作为其前病毒基因组模板, 根据已发表序列设计合成 6 对引物, 经 PCR 扩增出 6 段连续的、相互部分重叠的 DNA 片段和闭环前病毒两末端 LTR 的连接区段, 并分别连入 T 载体进行克隆、测序. 用 DNASTAR 软件对测序结果进行剪辑和拼接, 完成了 REV 第一个中国分离株 HA9901 前病毒全基因组核苷酸序列. 在从截然不同的地区、不同年份、不同禽类分离到的毒株中, 将该序列与另两个毒株已完成的全基因组序列的比较表明, REV 的整个基因组相对保守, 各毒株间对应基因的同源性都在 92%以上. 其中, 从我国鸡体分离到的野毒株 HA9901 与美国鸡源分离株 FA 在整个基因组上的同源性均显著高于美国的鸭源 SNV 株.

关键词 网状内皮组织增生症病毒 全基因组核苷酸序列 同源性比较

网状内皮组织增生症病毒(REV)是一种禽反转录病毒, 可在鸡和多种鸟类引起肿瘤、免疫抑制或生长迟缓综合症, 严重时可表现明显的致瘤性和免疫抑制性^[1,2]. 诸多学者已经以经典分离株即鸭源SNV株、火鸡缺陷性致瘤T株及其增殖辅助病毒A株为样本, 从不同侧面对REV基因组核酸的结构与功能开展了许多研究. 1985 年Ridgway等人^[3]以 713 克隆株研究REV中的启动子功能时, 完成了其 5'LTR和 3'LTR的序列测定; 1980 年Shimotohno等人^[4]以SNV株的不同克隆研究一类似细菌转座成分时, 完成了

5'LTR的U3 末端连同gag 5'端部分序列的接口处序列, 此处于 1998 年被Gabus-Darlax等人^[5]在T株确定为启动全基因组RNA转录的RNA聚合酶结合位点; 1990 年Weaver等人^[6]在研究并确定SNV株gag基因编码的蛋白对病毒粒子包装及释放的必需功能时, 完成了gag和pol接口处的序列. 而早在 1984 年, Wilhelmsen等人^[7]研究T株的致癌基因时, 得到辅助病毒A株的同源序列, 即pol基因 3'端的部分序列、完整的env基因和ptt序列及 3'LTR的 5'端长 18 nt的序列. 同年, Panganiban等人^[8]研究T株生长史时, 发现了REV前

2004-12-06 收稿, 2005-04-05 收修改稿

*国家自然科学基金资助项目(批准号: 30270060)

**联系人, E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

病毒cDNA两末端LTR在整合前相互连接成环形, 并由此完成了 5'LTR和 3'LTR两末端序列的测定。另一方面, REV与其他致癌病毒混合感染的发现与研究, 尤其REV整合进禽痘病毒(FPV)和鸡马立克氏病病毒(MDV)现象的频繁发生, 使得对REV的精细研究愈显加快。而发生整合的片段多为REV的 5'LTR或 3'LTR, 从而使得对REV 5'LTR和 3'LTR的研究从核苷酸序列组成到功能日趋详尽, 但一直没有一完整的REV全基因组序列发表。直到2000年, Singh等人^[9]在研究FPV在免疫鸡群中的演化时, 得到一整合进FPV的REV前病毒株(FPV-associated, FA), 并完成了其cDNA全基因组序列。但该病毒不是独立存在的, 且其序列的 3'LTR区段不完整。直到2002年, 吉荣¹⁾以具有感染性的经典SNV株全基因组cDNA重组质粒克隆pPB101为样本, 首次完成了该病毒的全基因组序列。

近年来, REV与其他致免疫抑制病病毒混合感染^[10,11]日趋严重, 致使鸡群肿瘤病发病率逐年递增。尤其是REV以垂直传播、污染常规疫苗以及整合进禽痘病毒和疱疹病毒^[12]等, 从而加重REV源的危害, 这一境况在我国目前尤为突出。为了解国内REV流行株的来源及其与国外分离株的差异和今后的演变趋势, 本研究对REV中国分离株HA9901前病毒基因组cDNA进行分段PCR扩增、克隆和测序, 并对其进行了相关分析。

1 材料和方法

1.1 细胞和病毒

(1) 鸡胚成纤维细胞(CEF): 取10日龄的SPF鸡胚(SPAFAS, 济南)常规制作原代CEF(3.5×10^6 个/mL), 用含5% CS的M199于37℃ 5% CO₂培养。

(2) 病毒HA9901^[13]: 分离于1999年1月份江苏省海安某鸡场送检的肉用型父母代具有免疫抑制病症的病鸡。

(3) 病毒的复苏和增殖: 原代CEF长成单层后, 取数瓶接种-70℃冻存的HA9901病毒悬液, 37℃ 5% CO₂继续孵育5天, 到时取其中一瓶用0.25%胰酶消

化、重悬, 传代至加有飞片的35 mm平皿中。待再长成单层后, 用固定液(丙酮: 甲醇=6: 4)固定, 以抗REV特异性单克隆抗体(Monoclonal Antibody, MAb) MAb11B118和MAb11B154^[14]分别与FITC标记的羊抗鼠二抗(Sigma)联合做IFA染色, 然后在荧光显微镜下进行观察。同时用未感染REV的CEF作对照, 以此验证感染细胞中HA9901病毒的存在。

1.2 HA9901前病毒基因组cDNA的提取

将HA9901感染后经IFA检测为阳性的同一批CEF用0.25%胰酶消化, 1800 r/min离心、收集, 按常规方法提取其基因组DNA, 最后溶于TE缓冲液置-20℃保存, 以备用作PCR扩增HA9901前病毒线性cDNA的模板。

另REV感染宿主细胞后, 在其前病毒cDNA发生整合前有一闭合环形时期^[8], 这为扩增和克隆其基因组两末端序列提供了有利条件。因此, 为增加感染宿主细胞基因组DNA中HA9901前病毒环形cDNA的比例, 将大量病毒一次性接种多瓶新长成的原代CEF(每瓶接种 2.3×10^7 TCID₅₀/0.2 mL)。感染后8~12 h期间每隔1 h取样, 并如前操作分别提取其基因组DNA作为模板, 以备从中扩增HA9901闭合环形前病毒两末端LTR的连接区段。

1.3 PCR引物设计

参照文献[4~9]中已发表的REV多个片段的序列, 设计合成了在REV前病毒基因组cDNA上相互连续且部分重叠的5对引物。由于整合进宿主细胞基因组的REV前病毒cDNA其5'LTR和3'LTR完全相同^[2,3,8], 故参照5'LTR序列设计合成第6对引物3LTR-F和3LTR-R。引物序列见表1。

1.4 HA9901前病毒基因组cDNA的PCR扩增、克隆和测序

(1) HA9901前病毒线性基因组cDNA的扩增: 按标准rTaq PCR试剂盒(Takara, 大连)的方法说明, 用6对引物分别对HA9901前病毒线性基因组cDNA进行扩增。

1) 吉 荣. 禽网状内皮组织增生症病毒分子生物学特性的研究. 硕士学位论文, 扬州大学, 2002

表 1 扩增 HA9901 前病毒基因组 cDNA 的引物序列

编号	引物名称	引物序列	相对SNV的起止位点 ^{b)}	大小/bp
1	5LTR F ^[5]	5'-GCTATATAAGCCAGGTGC-3'	418~435/8263~8280	1520
	5g1R ^[4]	5'-ACTGGGCTTCTATTTCTCGCT-3'	1937~1917	
2	5g2F ^[4]	5'-TG TTCACGACGAGGAAAGGG-3'	1833~1853	2955
	5g2R ^[7]	5'-ACCCGTTTAGGTAGCCAGAC-3'	4787~4768	
3	p1F ^[7]	5'-TGATCTACAGAGAAAGGGG-3'	4685~4703	1102
	p1R ^[7]	5'-CTTAACGAAGACGAGGTCAC-3'	5786~5767	
4	p2F ^[7]	5'-AGCATAACCAACCAACCTG-3'	5760~5780	1111
	p2R ^[7]	5'-TTCGCCGGGATGGCTGCGGGG-3'	6870~6850	
5	envF ^[7]	5'-CTCCTGACAACCAAGAAG-3'	6037~6054	1825
	envR ^[7]	5'-AGCTCCCTCCCACATTC-3'	7861~7845	
6 ^{a)}	3LTR-F ^[7]	5'-TAGTCCCGCAGTACAAGCCACT-3'	7764~7785	711/1303
	3LTR-R ^[5]	5'-CAAATGTTGTACAGAAATTC-3'	8474~8466/594~575	

a) 该对引物也用以扩增 HA9901 闭合环形前病毒两末端 LTR 的连接区段。b) 吉荣, 禽网状内皮组织增生症病毒分子生物学特性的研究. 硕士学位论文, 扬州大学, 2002

(2) 从 HA9901 闭合环形 cDNA 扩增两侧 LTR 的末端序列: 用第 6 对引物(3LTR-F 和 3LTR-R), 以接种 HA9901 8~12 h 后提取的宿主细胞基因组 DNA 为模板, 扩增其闭合环形前病毒 cDNA 两末端 LTR 的连接区。

(3) 各段 PCR 产物分别连入载体 pMD 18-T, 经转化、筛选和鉴定后, 阳性克隆进行核苷酸序列测定。

2 结果

2.1 IFA 显示细胞 REV 感染状态

感染 HA9901 的 CEF 呈现特异性荧光染色。与阴性相比, 阳性(MAb11B154, MAb11B118 介导着染) CEF 狭长的细胞浆呈现强的黄绿色荧光, 而细胞核则为灰暗色, 无荧光显现(图 1)。根据 IFA 阳性细胞的比例, 可用来判断被 HA9901 感染的宿主细胞的量,

以确保其全基因组 DNA 中含有较高比例的 HA9901 前病毒基因组 cDNA。

2.2 PCR 扩增产物

利用 6 对引物对 HA9901 前病毒线性基因组 cDNA 进行的 PCR 反应, 扩增出了相应的 6 个 DNA 片段, 其大小都与预期相符(图 2)。其中用第 6 对引物, 以 HA9901 感染 8~12 h 后的宿主细胞基因组 DNA 为模板进行的 PCR 反应, 同时扩增出长约 628 和 1170 bp 的两个片段(图 3)。

2.3 HA9901 前病毒 cDNA 的全基因组核苷酸序列

利用 DNASTAR 软件对 7 个 PCR 片段克隆的测序结果进行剪辑和拼接, 完成了 REV 中国分离株 HA9901 前病毒 cDNA 全基因组的核苷酸序列, 该序列全长 8295nt(GenBank accession No. AY842951)。经

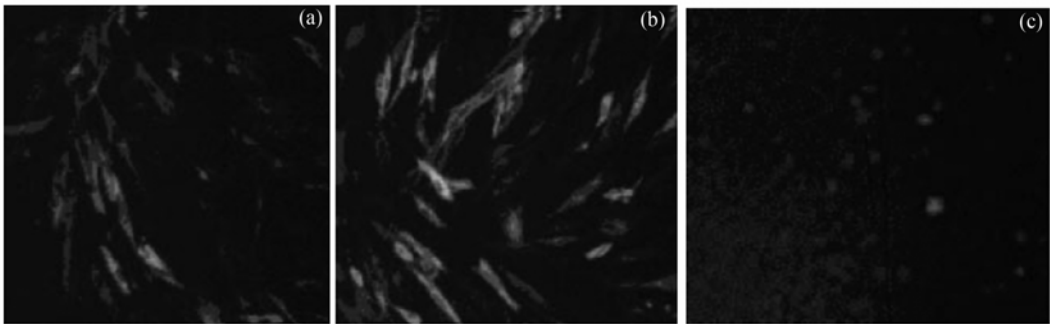


图 1 感染 HA9901 CEF 的 IFA 镜检结果

(a) 单抗MAb11B118 介导着染的结果; (b) 单抗MAb11B154 介导着染的结果; (c) MAb11B118 和MAb11B154 混合介导着染未感染REV的CEF



图2 利用6对引物对 HA9901 线性前病毒基因组 cDNA 进行 PCR 扩增结果

1 示 DL15000 分子量 Maker; 2 示 3LTR RT F-5g1R 长约 1520 bp 的产物; 3 示 5g2F-5g2R 长约 2955 bp 的产物; 4 示 p1F-p1R 长约 1102 bp 的产物; 5 示 p2F-p2R 长约 1111 bp 的产物; 6 示 envF-envR 长约 1825 bp 的产物; 7 示 3LTR F-3LTR R 长约 628 bp 的产物; 8 示 DL2000 分子量 Maker

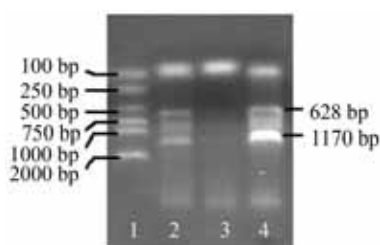


图3 以引物 3LTR F-3LTR R 扩增 HA9901 闭合环形前病毒两末端 LTR 连接区段的结果

1 示 DL2000 分子量 Makek; 2~4 示以 3LTR-3LTR R 扩增的 HA9901 闭合环形前病毒长约 628 和 1170 bp 的片段

与已发表 REV 相应序列中不同基因的比较, 其 3 个主要 ORF 编码的基因序列的核苷酸起止位点和长度分别为: *gag* 相当于碱基位 941~2443, 长 1503nt; *pol* 相当于碱基位 2567~6025, 长 3459nt; *env* 相当于碱基位 5967~7716, 长 1755nt。两端相同的 LTR 全长 550nt, 其中 U3 相当于碱基位 1~368 和 7746~8113, 长 368nt; R 相当于碱基位 369~448 和 8114~8193, 长 80nt; U5 相当于碱基位 449~550 和 8194~8295, 长 102nt。在 5'LTR 与 *gag* 接口处启动全基因组 RNA 转录的 RNA 聚合酶结合位点 PBS leader 序列在碱基位 551~940, 长 390nt。以上各结构片段的具体核苷酸序列见图 4。

2.4 HA9901 前病毒 cDNA 全基因组序列与已知 REV 毒株相应序列的同源性比较

以 DNASTar 软件中的 ClustalV 方法, 将 HA9901 前病毒 cDNA 全基因组序列与已知 REV 毒株即 A 株、

SNV 株和 FA 株 cDNA 的相应序列进行比较(表 2)。

(1) LTR区段的比较: 表 2 显示, HA9901 株与 A 株、SNV 株及 FA 株完整 LTR 核苷酸序列的同源性分别是 97.3%, 93.3%, 96.7%。不论是完整的 LTR 还是其中的 U3 区, 从鸡分离到的野毒株 HA9901 与鸡源的 A 株、FA 株均比较接近, 与鸭源 SNV 株相去较远, 而且在此区域与 SNV 株相比, 鸡源的 HA9901、A 和 FA 株有两处发生同步缺失, 并有一处在 U3 区启动子序列的前端^[15](图 5)。

(2) 3 个主要基因 *gag*, *pol* 和 *env* 的比较: 迄今为止, 只有鸡源的 FA 株和鸭源的 SNV 株完成了所有 3 个主要基因编码序列的测定。不论从核苷酸水平还是从氨基酸水平比较, HA9901 株的 3 个主要基因与鸡源 FA 株的同源性均高于鸭源的 SNV 株(表 2 和 3)。

2.5 3 个 REV 毒株前病毒全基因组 cDNA 的结构比较

将已经完成全基因组测序的 3 株病毒进行比较, 结果表明, 三者全基因组的碱基数并不相同, 但它们的 3 个主要基因编码的氨基酸数仅稍有差异, 在 *gag* 基因处 HA9901 是 500 个, FA 和 SNV 是 499 个; 在 *pol* 基因处三者都是 1152 个; 在 *env* 基因处 HA9901 是 584 个, FA 和 SNV 是 586 个(表 3)。图 6 显示了这 3 个毒株基本相似的基因组结构。

3 讨论

本文以 REV HA9901 株所感染 CEF 的基因组 DNA 为模板, 以能覆盖其前病毒基因组全序列的 6 对相互连续且部分重叠的引物进行 PCR 反应, 并将各扩增产物分别加以克隆、测序, 从而完成了 REV 第一个中国分离株 HA9901 前病毒 cDNA 全基因组核苷酸序列。该序列全长 8295nt, 且不含有限制性内切酶 *EcoR* 的识别位点, 与 Chen 等人^[16]报道的相似, 其 *pol* 基因与 *env* 基因在核苷酸序列上互相重叠 64nt, 但两者采用的是在此段上下游同向但又互不同步的两个 ORF。

与 HA9901 的全基因组相比较, 另外两个毒株的全基因组序列也已经完成, 它们分别是上个世纪 50 年代末从美国的病鸭中分离到的 SNV 株^[17]和上世纪

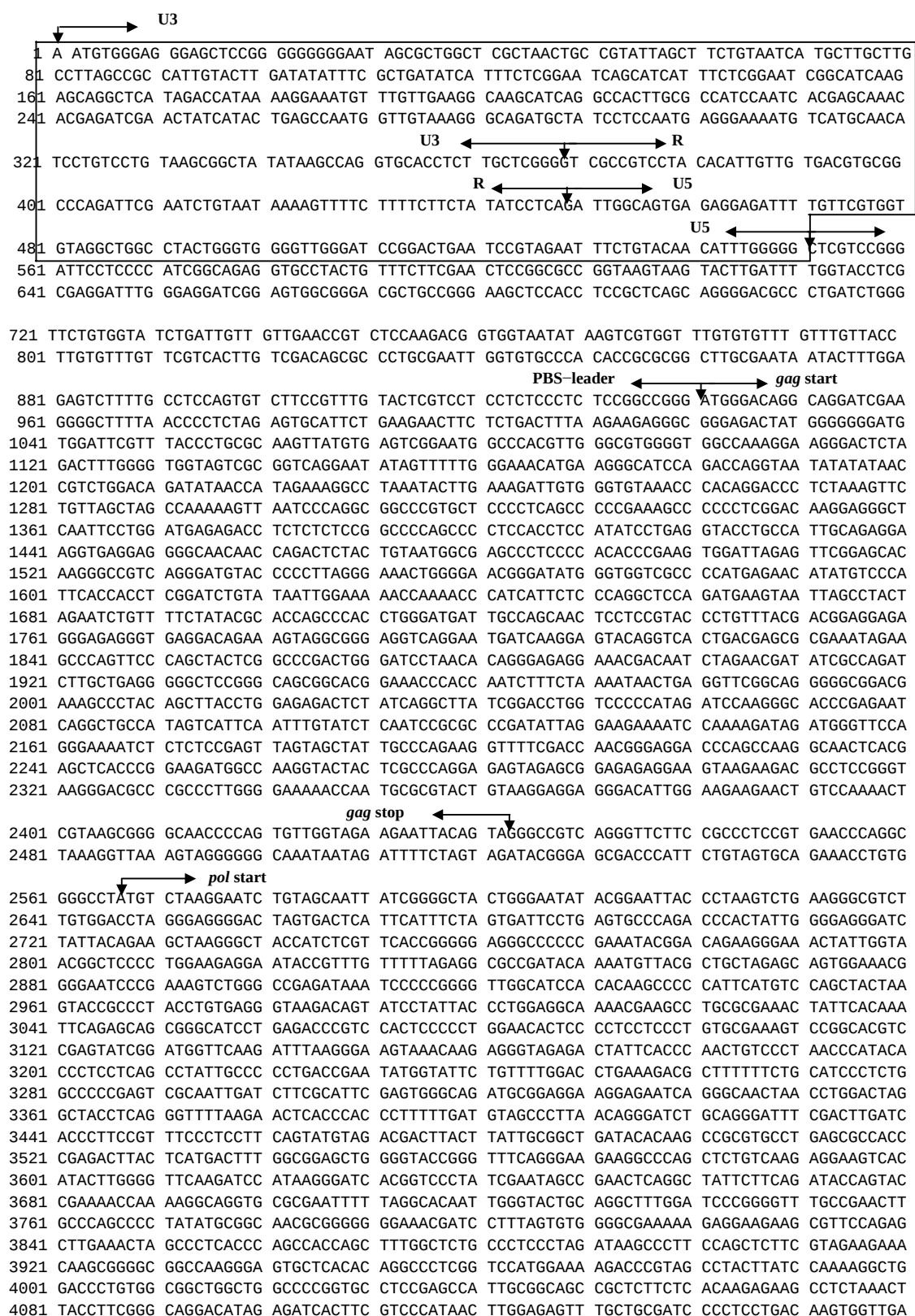




图 4 HA9901 前病毒全基因组 cDNA 的核苷酸序列

两端方框内的 550nt 示相同的 5'LTR 和 3'LTR 序列; 箭头标识各段序列的起止位点; ppt 是聚嘌呤通道及正链 DNA 合成的起始位点

表 2 HA9901 与已知 REV 各毒株主要基因或片段核苷酸序列的大小及同源百分比

基因或片段	已知的 REV 毒株		
	A ^[7]	SNV ^[4,6]	FA ^[9]
LTR	97.3(545nt)	93.3(633nt)	96.7(519nt)
U3	97.5(365nt)	92.7(449nt)	97.6(340nt)
5'PBS leader	— ^{b)}	94.6(400nt)	98.0(390nt)
<i>gag</i>	— ^{b)}	95.5(1500nt)	98.2(1500nt)
3' <i>pol</i> ^{a)}	97.6(1413nt)	94.7(1413nt)	97.9(1413nt)
<i>pol</i>	— ^{b)}	95.3(3459nt)	98.3(3459nt)
<i>env</i>	97.4(1749nt)	94.5(1761nt)	97.7(1761nt)

a) *pol* 基因 3'端部分(计 1413aa)核苷酸序列; b) 此项未作比较

表 3 HA9901 与已知 REV 各毒株主要基因氨基酸序列的大小及同源百分比

基因或片段	已知的 REV 毒株		
	A ^[7]	SNV ^[4,6]	FA ^[9]
<i>gag</i>	— ^{b)}	96.2(499aa)	98.0(499aa)
3' <i>pol</i> ^{a)}	89.0(471aa)	95.6(471aa)	98.1(471aa)
<i>pol</i>	— ^{b)}	96.6(1152aa)	98.4(1152aa)
<i>env</i>	80.2(583aa)	92.3(586aa)	95.9(586aa)

a) *pol* 基因 3'端部分(计 471aa)氨基酸序列; b) 此项未作比较

1	AATGTGGGAG	GGAGCTCCGG	GGG---GAAT	AGCGCTGGCT	CGCTAACTG-	-----	-----	-----	A U3
1	AATGTGG-AG	GGAGCTCCGG	GGG---GAAT	AGCGCTGGCT	CGCTAACTG-	-----	-----	-----	FA U3
1	AATGTGGGAG	GGAGCTCCGG	GGGGGGGAAT	AGCGCTGGCT	CGCTAACTG-	-----	-----	-----	HA9901 U3
1	AATGTGGGAG	GGAGCTCTGG	GGG---GAAT	AGTGGCTGGCT	CGCTAACTGC	TATATTAGCT	TCTGTACCCA	TGCTTGCTTG	SNV U3
47	-----	-----CCAT	ATTAGCTTCT	GTAATCATGC	TTGCTTGCCCT	TAGCCGCCAT	TGTACTTGAT	ATATTTTCGCT	A U3
46	-----	-----CCAT	ATTAGCTTCT	GTAATCATGC	TTGCTTGCCCT	TAGCCGCCAT	TGTACTTGAT	ATATTTTCGCT	FA U3
50	-----	-----CCGT	ATTAGCTTCT	GTAATCATGC	TTGCTTGCCCT	TAGCCGCCAT	TGTACTTGAT	ATATTTTCGCT	HA9901 U3
78	CCCTGGCCAC	TAACCGCCAT	ATTAGCTTCT	GTACACATGC	TTGCTTGCCCT	TAGCCGCCAT	TGTACTTGAT	AT-----	SNV U3
111	GATATCATTT	CTCGGAATCG	GCATCA----	---TTTCTCG	GAATCGGCAT	CAAG-----	-----	-----	A U3
110	GATATCATTT	CTCGGAATCG	GCATCA----	-----	-----	-----	-----	-----	FA U3
114	GATATCATTT	CTCGGAATCG	GCATCA----	---TTTCTCG	GAATCGGCAT	CAAG-----	-----	-----	HA9901 U3
150	---GCCATTT	CTCGGAATCG	GCATCAAGTC	TCGCTTCTCG	GAATCGGCAT	CAAGTTTCGC	TTCTCGAAAT	CGGCGTCATT	SNV U3
158	-----	---AGCAGGC	TCATAGACCA	TAAAAGGAAA	TGTTGCTTGG	AGGCGAGCAT	CAGACCACTT	GCGCCATCCA	A U3
137	-----	--GAGCAGGC	TCATAAACCA	TAAAAGGAAA	TGTTTGTGTA	AGGCAAGCAT	CAGACCACTT	GCACCATCCA	FA U3
161	-----	---AGCAGGC	TCATAGACCA	TAAAAGGAAA	TGTTTGTGTA	AGGCAAGCAT	CAGGCCACTT	GCGCCATCCA	HA9901 U3
227	TCTCGGCATC	GAGAGCAAGC	TCATAAACCA	TAAAAGGAAA	TGTGTATTGA	AGGCAAGCAT	CAGACCACTT	GCGCCATCCA	SNV U3
225	ATCACGAAGA	AACACGAGAT	CGAACTATCA	TACTGAGCCA	ATGGTTGTAA	AGGGCAGATG	CTATCCTCCA	ATGAGGGAAA	A U3
205	ATCACGAACA	AACACGAGAT	CGAACTATCA	TACTGAGCCA	ATGGTTGTAA	AGGGCAGATG	CTATCCTCCA	ATGAGGGAAA	FA U3.
228	ATCACGAGCA	AACACGAGAT	CGAACTATCA	TACTGAGCCA	ATGGTTGTAA	AGGGCAGATG	CTATCCTCCA	ATGAGGGAAA	HA9901 U3
307	ATCACGAACG	AACACGAGAT	CGGACTATCA	TACTGAGCCA	ATGGTTGTAA	AGGGCAGATG	CTACTCTCCA	ATAAGGGAAA	SNV U3
305	ATGTCATGCA	ACATCTGTCT	--CTGTAAGC	GGCTATATAA	GCCAGGTGCA	TCTCTTGCT	CGGG	A U3	
285	ATGTCATGCA	ACATCTGTGA	AG-----C	GGCTATATAA	GCCAGGTGCA	TCTCTTGCT	CGGG	FA U3	
308	ATGTCATGCA	ACATCTGTCT	--CTGTAAGC	GGCTATATAA	GCCAGGTGCA	CCTCTTGCT	CGGG	HA9901 U3	
387	ATGTCATGTA	ACACCTGTGA	AGCTGTAAGC	GGCTATATAA	GCCGGGTACA	TCTCTTGCT	CGGG	SNV U3	

图 5 各 REV 毒株完整 LTR U3 区核苷酸序列的比较
--示碱基缺失

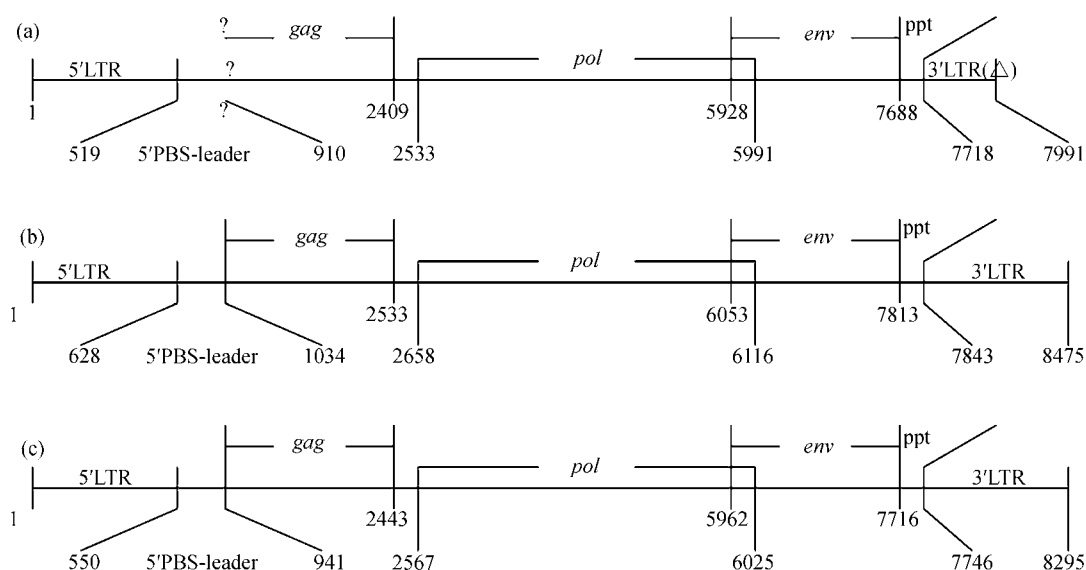


图 6 三株不同来源的 REV 全基因组结构简图

(a) FA^[9]; (b) SNV; (c) HA9901. “?”示文献中对此处没有确切定位; ppt是聚嘌呤通道及正链DNA合成的起始位点

90 年代从美国的鸡痘疫苗中检出的含有几乎完整基因组cDNA的前病毒株^[9], 本文中称之为痘病毒相关株(FPV-associated, FA). 该 3 个毒株的全基因组中各对应基因及片段的同源性比较结果表明, REV的基因组是相对保守的. 虽然 3 个毒株分离的禽类、年份、地域均相差很远, 各个基因及主要片段的同源性却都在 92%以上(表 2 和 3). 但最近从鸡体分离到的中国野毒株HA9901 显然更接近美国的鸡源FA株, 而与鸭源的SNV株相去较远(表 2 和 3, 图 4).

另外, 经比较发现, A株的env基因与其他毒株在核苷酸水平上的同源性在 97%左右, 但在氨基酸水平却只有 82%, 这不符合一般规律, 我们推测这可能是在A株 1984 年发表的序列^[18]中有部分错误, 导致一些位点发生误读或移码所致.

本文比较的结果还显示, 各毒株前病毒cDNA的 LTR尤其U3 区在核苷酸序列上差异很大. 相对于火鸡源A株、鸡源FA和HA9901 株, 鸭源的SNV株 在U3 区有两处都多出几十个碱基. 而同一禽种来源的病毒株其U3 区的同源性则很高, 相对比较保守, 这与赵文明等人^[19]的结果一致.

在这已知全基因组序列的 3 个毒株中, 中国鸡源株HA9901 和鸭源的国际参考株SNV都是能构成完整

感染性病毒颗粒的基因组全序列, 而FA株是不能直接产生感染性病毒颗粒的整合进禽痘疫苗毒基因组DNA中的REV前病毒株, 其 5'LTR是完整的, 与HA9901 和SNV株相似. 但是其 3'LTR缺失很长一段, 不仅不带有R和U5 区, 而且该U3 片段本身也只有 275nt, 相对于SNV和HA9901 的U3(分别为 449 和 368nt)区更是少了许多, 即使相对于其自身 5'LTR中的U3 区(340nt)也少了 65nt. 现在还不清楚, 这是否是这一整合进禽痘病毒中的FA株不具有感染性的原因. 但是, 如果将该天然重组禽痘疫苗毒接种易感鸡只或提取经其感染的宿主细胞的基因组DNA再去转染新的细胞, 却又能产生出具有感染性的REV颗粒^[9]. 而同是整合进鸡FPV中REV的核酸成分, 在Kost^[20], Hertig^[21], Isfort^[22], Maricarmen^[23]和Singh^[24]等人对不同年份FPV的不同疫苗株和野毒株中整合情况的调查研究, 除FA株的基因组cDNA序列较为完整外, 其他各株均为完整LTR或U3 或U5 区小片段的整合, 但发生整合的区段相对应的序列都是相同的.

迄今为止, 真正直接以具感染性病毒完成全基因组序列测定的REV还只有鸭源的SNV 株和本文报道的HA9901 株. 所以, 此网状内皮组织增生症病毒中国分离株HA9901 前病毒全基因组核苷酸序列的

完成, 为了解国内 REV 流行株的来源及其与国外分离株的差异和今后的传播、演变提供了参考, 更为研究 REV 的后续工作准备了素材。

参 考 文 献

- Walker M H, B J Rup, Rubin A S, et al. Specificity in the immunosuppression induced by avian reticuloendotheliosis virus. *Infect Immun*, 1983, 40: 225~235
- Witter R L, Fadly A M. In: Saif Y M. *Diseases of Poultry*. 11th ed. Ames: Iowa State Press, 2003. 517~536
- Ridgway A A, Swift R A, Kung H J, et al. *In vitro* transcription analysis of the viral promoter involved in c-myc activation in chicken lymphomas: detection and mapping for two RNA initiation sites with the reticuloendotheliosis virus long terminal repeat. *J. Virol*, 1985, 54: 161~170
- Shimotohno K, Mizutani S, Temin H M. Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements. *Nature*, 1980, 285: 550~554[DOI]
- Gabus-Darlax C, Darlix J. Novel internal ribosome entry site and vector containing same. *Genebank*, GI: 6732807
- Weaver T A, Talbot K J, Panganiban A T. Spleen necrosis virus gag polypeptide is necessary for partial assembly and release but not for proteolytic processing. *J. Virol*, 1990, 64: 2642~2652
- Wilhelmsen L C, Eggleton K, Temin H M. Nucleic acid sequences of the oncogene v-rel in reticuloendotheliosis virus strain T and its cellular homolog the proto-oncogene c-rel. *J. Virol*, 1984, 52: 172~182
- Panganiban A T, Temin H M. Circles with two tandem LTRs are precursors to integrated retrovirus DNA. *Cell*, 1984, 36(3): 673~679[DOI]
- Singh P, Kim T-J, Tripathy D N. Re-emerging fowpox: evaluation of isolates from vaccinated flocks. *Avian Pathol*, 2000, 29: 449~455[DOI]
- 张志, 崔治中, 姜世金, 等. 鸡肿瘤病料中马立克氏病毒和禽网状内皮组织增生症病毒共感染的研究. *中国预防兽医学报*, 2003, 04: 274~278
- 张志, 崔治中, 姜世金. 从 J 亚群禽白血病肿瘤中检测出禽网状内皮组织增生症病毒. *中国兽医学报*, 2004, 01: 10~13
- 张志, 崔治中. 整合进禽反转录病毒基因组片段的鸡马立克氏病病毒重组野毒株得发现. *中国科学, C 辑*, 2004, 34(4): 317~324[摘要][PDF]
- 崔治中, 杜岩, 赵文明, 等. 禽网状内皮增生病毒感染和鸡群的免疫抑制. *中国兽药杂志*, 2000, 34(4): 1~3
- Cui Z Z, Lee L F, Silva R F, et al. Monoclonal antibodies against avian reticuloendotheliosis virus; identification of strain-specific and strain-common epitopes. *J Immunol*, 1986, 136: 4237~4242
- Ridgway A A, Swift R A, Kung H J, et al. *In vitro* transcription analysis of the viral promoter involved in c-myc activation in chicken B lymphomas: detection and mapping of two RNA initiation sites within the reticuloendotheliosis virus long terminal repeat. *J Virol*, 1985, 54(1): 161~170
- Chen I S, Malk T W, O'Pear J J, et al. Characterization of reticuloendotheliosis virus strain T DNA and isolation of a novel variant of reticuloendotheliosis virus strain T by molecular cloning. *J Virol*, 1981, 40: 800~811
- Trager W. A new virus of ducks interfering with development of malaria parasite (*Plasmodium lophurae*). *Proc Soc Exp Biol Med*, 1959, 101: 578~582
- Wilhelmsen K C, Eggleton K, Temin H M. Nucleic acid sequences of the oncogene v-rel in reticuloendotheliosis virus strain T and its cellular homolog, the proto-oncogene c-rel. *J Virol*, 1984, 52(1): 172~182
- 赵文明, 丁家波, 崔治中. 网状内皮组织增殖病病毒(REV)不同分离株 LTR 的序列分析. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2001, 19(1): 13~19
- Kost R V, Jones D, Isfirt R J, et al. *Retrovirus* insertion into *Herpesvirus*: characterization of a Marek's disease virus harboring a solo LTR. *Virology*, 1992, 192: 161~169[DOI]
- Heritig C, Coupar B E, Gould A R, et al. Field and vaccine strains of fowlpox carry integrated sequences from the avian retrovirus, reticuloendotheliosis virus. *Virology*, 1997, 235: 367~376[DOI]
- Isfort R J, Jones D, Kost R G, et al. Retrovirus insertion into herpesvirus *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 991~995
- Maricarmen Gareia, Neelam Narang, Willie M Reed et al. Molecular characterization of reticuloendotheliosis virus insertions in the genomes of field and vaccine strains of fowlpox virus. *Avian Diseases*, 2003, 47: 343~354
- Singh P, Schitzlein W M, Tripathy D N. Reticuloendotheliosis virus sequences within the genomes of field strains of fowlpox virus display variability. *J Virol*, 2003, 77 10: 5855~5862