维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷1期 中国病毒学 16(1):68-73
2001年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 2001

禽白血病病毒J亚群 *env* 基因的克隆和序列分析*

秦爱建[1], 崔治中[1], Lucy Lee[2], Aly Fadly[2]

(1 扬州大学兽医系,江苏扬州 225009;
2 Avian disease and oncology laboratory, USDA, East Lansing, MI 48823)

Cloning and Sequencing of Envelope Gene of Subgroup J Avian Leukosis Virus

QIN Ai-jian[1], CUI Zhi-zhong[1], Lucy Lee[2], Aly Fadly[2]

(1. *Dept of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou* 225009, *China*;
2. *Avian disease and oncology laboratory, USDA, East Lansing, MI* 48823, *USA*)

Abstract: The envelope gene of ADOL-4817 strain of avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into TA vector. The sequence analysis results showed that the envelope gene is composed of 1 746 bp, 1 554 bp of which could be translated into 517 amino acids for gp85 and gp37. The molecular weight of envelope protein is 57.7kD. There are 15 potential glycosylation sites in the envelope protein, 13 of which is located in gp85. Analysis of sequences of envelope gene indicate that ADOL-4817 showed high degree of sequence identity to other ALV-J strains, and most closely related to the like-envelope gene of endogenous virus EAV-HP but divergent from these of other ALV subgroup A-E. These data support the hypothesis that envelope gene of avian leukosis virus subgroup J maybe acquired by recombination with expressed sequences.

Key words: Avian Leukosis Virus; Envelope Gene; Cloning; Sequence

摘要:应用多聚酶链反应(PCR)的方法扩增出ADOL-4817毒株的囊膜蛋白 *env* 基因,并克隆进大肠杆菌。经核酸序列分析证明,*env* 基因的大小为1 746 bp,其中gp85和gp37由1 554 bp组成,可翻译成517个氨基酸,分子量为57.7 kD。根据糖基化位点N-X-S/T的特点,发现ADOL-4817的 *env* 蛋白有15个潜在的糖基化位点。同源性分析证明,ADOL-4817的 *env* 基因与其它ALV-J的 *env* 基因序列同源性为88.8%~92.4%,而与外源性ALVs的相应序列的同源性仅为40.5%~51.4%,然而,与内源性的EAV-HP毒株的类 *env* 基因的同源性高达91.2%;另外,ADOL-4817毒株的gp37在C末端多了13个氨基酸。这些结果提示,ALV-J的 *env* 基因存在广泛的变异性,*env* 基因可能来源于内源性和外源性ALVs的重组。

关键词:禽白血病病毒;囊膜蛋白基因;克隆;定序
中图分类号:Q785,S858.31 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2001)01-0068-06

禽白血病病毒(ALV)是鸡多种肿瘤包括淋巴瘤和骨髓瘤的病因,它们属于C型反转录病毒。根据宿主范围,病毒囊膜干扰性和交叉中和反应型,可将鸡ALV分为A-E等五个亚群,90年代又鉴定出J

收稿日期:1999-12-30,修回日期:2000-04-28
* 基金项目:教育部基金和江苏省教育厅重点资助项目(OOKJB230002)
作者简介:秦爱建(1961-),男,江苏通州籍,教授,博士。主要研究方向是动物分子病毒学和免疫学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

亚群(ALV-J)[1~4]。ALV-J的HPRS103[2]、ADOL-4817和ADOL-Hc1[3]毒株是近年来发现的禽病毒白血病/肉瘤群(ALSV)的成员,与其它ALV亚群比较,其它亚群感染需要有亚群特定受体的鸡系,J亚群毒株则有着更广泛的宿主范围,病毒对骨髓源性的细胞有亲嗜性,而不是对淋巴细胞系[4~5]。J亚群主要诱导骨髓细胞性骨髓瘤白血病(ML)。

在反转录病毒中,亚群特异性是由 *env* 基因编码的表面囊膜蛋白gp85决定的,并通过另一个 *env* 基因编码的穿膜蛋白gp37,使gp85定位细胞膜上[6]。ALV-J的野毒株HPRS103与另外的ALV-J分离物的基因序列比较分析揭示了J亚群特异性蛋白gp85与A-E亚群的gp85基因只有40%的同源性,相反A-E亚群间有85%的一致性,差异性主要在高变区和可变区,而正是高变区和可变区确定亚群特异性和病毒中和反应型[7~9]。有学者用PCR的方法扩增 *env* 基因进行ALV-J的鉴定,然而,在鉴定ADOL-4817时,我们发现用HPRS103相应的 *env* 基因序列不能扩增出ADOL-4817*env* 基因[1],这说明了ALV-J的不同毒株在 *env* 基因上的变异相当大。因此,确定ALV-J病毒的 *env* 基因的特点,研究不同变异株病毒与之改变了表型相关的分子变化,将有助于进一步了解这一蛋白质的相关生物学特性。为此,我们对这一病毒的囊膜蛋白 *env* 基因进行了克隆和定序分析。

1　材料与方法

1.1　病毒和细胞

ADOL-4817分离于美国鸡场发生ML的鸡,并已鉴定为ALV-J亚群的成员[3]。用于病毒的传代和扩增的细胞为对E亚群有抵抗力的0系鸡胚成纤维细胞(CEF)。培养基为Leibowitz-McCoy's培养基(GIBCO Laboratories, Grand Island, NY),含有5%犊牛血清(CFS)作为细胞生长培养基,或1% CFS作为维持细胞生长培养基。

1.2　ADOL-4817株前病毒DNA的抽提

细胞中病毒前DNA的抽提按分子克隆实验手册的方法[10]进行,主要过程如下:将10^3个病毒感染单位接种于100 mm二重皿CEF或DF1单层细胞上,培养7 d。用0.25%胰蛋白酶消化细胞,经磷酸缓冲液(PBS pH7.3)洗涤一次,将其悬浮于500 μL消化液中(100 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 0.5 % SDS, 0.1 mg/mL proteinase K)在37℃消化4 h。消化结束后,用等量的TE饱和的苯酚/氯仿混和,充分振荡,离心抽提2次,并再经氯仿抽提1次。抽提完后用2倍体积的100%乙醇-20℃沉淀过夜,次日以12 000 r/min离心10 min。将沉淀以70%乙醇洗涤一次,空气中自然干燥后悬浮于50 μL H_2O中,并定量,作为粗提前病毒DNA,-20℃存放。

1.3　PCR扩增病毒 *env* 基因

根据英国已发表的ALV-J HPRS103的 *env* 基因序列[8]和Silva博士提供的基因序列设计引物,用多聚酶链反应(PCR)将ADOL-Hc1和ADOL-4817的 *env* 基因扩增出来。引物-1为5′-GGG ATC CAT GGA ACG GTC ATA AAG GCA TTT CTG ACT GGG-3′(正向引物),位于 *env* 基因的信号引导序列,并连接 *env* 基因的阅读框架起始密码序列,包含一个 *Bam* H I 酶切位点。用于ADOL-Hc1的引物-2为5′-GGG GTC GAC CTA CAG CTG CTC CCT AAT-3′(反向引物),位于 *env* 基因的终止密码子前的基因序列,包含一个 *Sal* I 酶切位点,用于4817株的引物-2为5′-GGG GTC GAC GAT TCC GCA AGT TTC ATA CCC CT-3′(反向引物),并且含有一个 *Sal* I 酶切位点,它位于 *env* 基因中止密码子的下游。PCR反应的组成是,5 μL 10 × PCR缓冲液,2 μL 25 mmol/L dNTP, 10 μL 25 mmol/L MgCl, 2 μL(4U) Taq DNA聚合酶, 6 μL 5 pmol/L引物,1 μL模板DNA(0.1 ng),加H_2O到50 μL,将这些成分加入PCR反应管中后,滴加一滴矿物油以防止反应过程中水分蒸发。PCR反应的条件为,95℃变性5 min,然后再经(94℃变性1 min, 55℃退火2 min, 72℃延长3 min)30个循环,最后经72℃延长5 min。PCR结束后,将其存放于4℃或-20℃待电泳分析。PCR仪为Mini Cycler (MJ Research Inc., Watertown MA)。

1.4　DNA电泳和DNA片段的纯化

电泳方法按分子克隆实验手册进行[10],DNA片段的纯化采用Qiagen试剂盒进行纯化,从琼脂糖凝胶中抽提的具体步骤按产品说明书进行。

1.5　PCR产物与载体质粒DNA连接反应

DNA连接反应的组成是,1 μL TA载体(Invitrogen corporation Carshad, CA), 1.5 μL 10 × 缓冲液,2 μL ligase, 5 μL PCR DNA或纯化的DNA fragment, 5.5 μL H_2O,连接反应在15℃条件下,反应17 h,存放于-20℃。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.6 细菌转化

采用电穿孔转化的方法进行细菌的转化试验，具体步骤按文献报道的方法进行[11]。

1.7 重组质粒 DNA 制备

挑取抗氨苄青霉素的菌落接种于 2 mL 的含有相应抗菌素的 2 · TY 培养基中 37℃ 培养 10～12 h，取出离心弃去培养基，将细菌悬浮于 100 μL GTE 缓冲液（50 mmol/L glucose, 25 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 10 mmol/L EDTA, 高压灭菌，4℃ 保存）中，加 200 μL NaOH/SDS (0.2N NaOH, 1% SDS) 变性裂解液，轻轻混匀裂解细菌，再加入 150 μL 的 5mol/L 醋酸钾 pH4.8 的缓冲液（29.5 mL 冰醋酸，用 KOH 调至 pH4.8，加 H_2O 至 100 mL）中和，经混匀后 12 000 r/min 离心，将上清移置另一干净的 1.5 mL 小离心管中，并加 800 μL 100% 乙醇混合并静止 1 min，12 000 r/min 离心 3 min，弃上清并用 500 μL 70% 乙醇洗涤 1 次，空气中自然干燥 5～10 min，悬浮于 50 μL TE 缓冲液，进行酶切筛选，鉴定正确插入 DNA 片段的克隆。

1.8 DNA 酶切分析

采用双酶切或单酶切的方法对小样 DNA 进行消化鉴定，消化液组成：2.0 μL 10 倍消化缓冲液，10 μL DNA，*Eco*R I 和/或 *Bam*H I（或 *Bam*H I 和 *Sal* I）5U，为了排除 RNA 的干扰可加入 0.25 μL RNase，再加 H_2O 到 20 μL，消化条件为 37℃ 1 h，然后加相应量的 6 倍样本缓冲液，于 1% 的琼脂糖凝胶中 70V 电泳 1～2 h 观察鉴定，记录试验结果。

1.9 DNA 的序列测定

用 Qiagen 试剂盒（Qiagen Chatsworth, CA）将正确插入 DNA 片段的质粒进行小样抽提纯化 DNA，操作过程按产品说明书进行，然后选用相应的 T7 引物经自动核酸序列分析仪进行测序。

1.10 计算机分析

计算机分析采用的软件为 DNAStar 软件（DNASTAR Inc. Madison, WI），用于 DNA 序列数据输入，多种序列比较分析以及进化树分析。GCK 软件（Text Co Inc., Western Lebanon, New Hamposhire）用于寻找 DNA 数据库中的 ORF，翻译 ORF 成为多肽，产生蛋白质结构的分析，Blast 程序用于比较同源性基因以及从基因库中调取基因。

2 结果

2.1 PCR 效果

在对感染 ALV-J 毒株 ADOL-4817 的 CEF 细胞进行基因组 DNA 抽提后，用上述引物对 J 亚群的 *env* 基因进行了 PCR 扩增。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分析表明，所获得的 PCR 产物的分子量约为 1.7 kb。该 DNA 条带大小与理论设计的核酸片段大小相符，并具有特异性，对照的无 ALV-J 感染的 CEF 细胞 DNA 不能扩增出相应的条带，说明此 PCR 扩增效果良好（见图 1）。然而如果用 ADOL-Hc1 的正向和反向引物对 ADOL-4817 前病毒 DNA 进行扩增，则不能扩增出相应的条带，这说明了这两株病毒在核酸组成上存在差异性，核酸序列测定也进一步证明了它们的差异性。

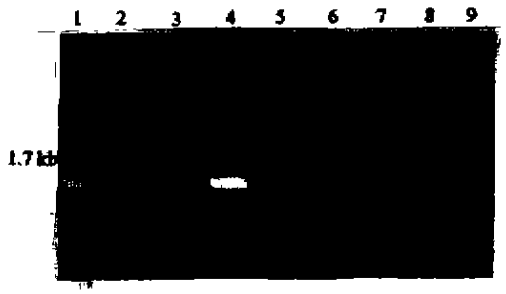

图 1 ALV-J ADOL-4817 和 ADOL-HC1 囊膜蛋白 *env* 基因的 PCR 结果

1 和 2 泳道，ADOL-Hc1 CEF 细胞 DNA；3 和 4，ADOL-4817 CEF 细胞 DNA；5 和 6，ADOL-4817 CEF 细胞 DNA，引物为 Hc1 引物；7 和 8，正常 CEF 细胞 DNA 对照；9，DNA Marker.

Fig. 1 PCR results of *env* gene of ADOL-4817 and ADOL-HC1 strains of ALV-J

Lane 1 and 2, DNA from CEF cells infected with ADOL-Hc1; lane 3 and 4, DNA from CEF cells infected with ADOL-4817; lane 5 and 6, DNA from CEF cells infected with ADOL-4817 but using Hc1 primers; lane 7 and 8, normal CEF cells DNA for control; lane 9, DNA marker.

2.2 PCR 产物克隆的鉴定

将 PCR 产物在 1% 琼脂凝胶中电泳后，用 Qiagen 试剂盒对切割下的 DNA 条带进行纯化，使纯化好的 DNA 片段溶于 50 μL TE 缓冲液，取其 5 μL 纯化的 DNA 片段按 5:1 的比率与 TA vector DNA 进行混合，并用 T4 DNA 连接酶连接，最后用电穿孔的方法将连接混合物转化 TG1 细菌。经过小样质粒 DNA 制备和酶切分析，结果获得了数个阳性克隆（图 2），将 DNA 插入正确的质粒 DNA 命名为 TA-4817*env*，并存放于 −20℃ 保存备用。

2.3 ADOL-4817*env* 基因分析

将上述的 TA-4817*env* 质粒 DNA 进行纯化，然后用自动核酸测序仪进行序列测定，结果表明，

维普资讯 http://www.cqvip.com

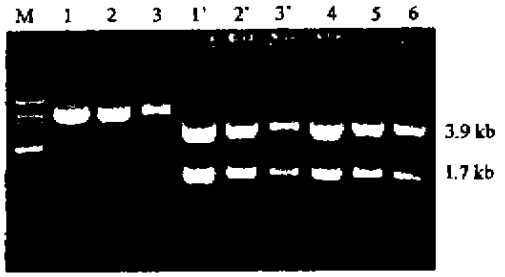

图2　限制性酶切分析4817TA质粒DNA

1-3泳道，不同4817-TA克隆质粒DNA经*Bam*HI单酶切消化；1-3'为1-3道相应DNA的*Bam*HI和*Sal*I双酶切消化；4-6道，不同4817-TA克隆质粒DNA经*Bam*HI和*Sal*I双酶切消化。M，DNA Marker。

Fig.2　Restriction enzymes (RE) analysis of 4817 TA plasmid DNA

Lane 1-3, different 4817-TA clones plasmid DNA digested with *Bam*H I; lane 1'-3', samples same to lane 1～3 but digested with *Bam*H I and *Sal* I; lane 4-6, different 4817-TA clones plasmid DNA digested with *Bam*H I and *Sal* I; Lane M, DNA marker.

ADOL-4817株 *env* 基因与其它ALV-J已发表的序列有很高的同源性，但也有一定的差异，对克隆的 *env* 基因进行定序分析，证明ALV-J ADOL-4817株 *env* 基因的大小为1 746 bp，经计算机分析可翻译成581个氨基酸蛋白质，分子量为64.64 kD。根据反转录病毒囊膜蛋白 *env* 的加工规律，前64个氨基酸，是高亲水性的，为蛋白引导序列，在囊膜蛋白加工合成的过程中被剪辑掉，从而形成囊膜蛋白前体Pro-env，它由517个氨基酸组成，分子量为57.68 kD。根据糖基化位点N-X-S/T的特点，可以发现ADOL-4817 env有15个位点可以糖基化，分别位于第81、120、142、162、180、193、221、247、273、287、311、353、363、424和472氨基酸位点。成熟的囊膜糖蛋白被加工成gp85和gp37。gp85蛋白氨基酸组成为307个氨基酸(65～372)，分子量为34.1 kD，gp37由209个氨基酸组成，分子量为23.6kD。gp37位于感染细胞的细胞膜内，gp85位于感染细胞的细胞膜外表，gp85和gp37之间以二硫键相连接，可以看出糖基化位点主要位于细胞外的gp85上(详见gp85和gp37基因序列和氨基酸翻译)。从ADOL-4817株 *env* 基因分析发现，在该基因的第526、645、754、1 617和1 742位点有TATA，是否他们有某种作用还有待进一步的研究。

2.4　ADOL-4817 *env* 基因与其他ALV-J毒株的比较分析

将ADOL-4817株的 *env* 基因序列与已发表的其它ALV-J的 *env* 基因序列进行比较，结果表明，ADOL-4817的 *env* 核酸序列与其它已发表的ALV-J HPRS103和ADOL-Hc1及R5-4毒株的 *env* 核酸序列密切相关(见表1)，gp85与其它ALV-J毒株的同源性在88.3%～95.1%，gp37与其它毒株的同源性为88.8%～92.4%(表略)，变异的碱基分散在整个 *env* 基因中，但主要集中在高变区hr1(105～161)、hr2(182～204)、vr3(236～248)以及gp85的

表1　不同ALV-J毒株gp85氨基酸同源性分析

Table 1　Pair distance of gp85 of different ALV-J strians

Percent similarity in up triangle

	103	4817	HC1	R5-4	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
103	***	95.1	91.2	90.8	93.5	92.5	92.2	90.6	91.2	91.5	92.2	90.6	95.4	90.6	90.2	91.2
4817	5.0	***	88.6	90.1	92.5	92.9	90.6	88.6	89.3	90.6	89.6	89.6	93.5	88.3	89.6	88.6
Hc1	6.8	9.7	***	87.8	89.0	88.6	88.6	87.3	88.3	87.6	88.9	88.3	87.9	86.3	87.3	86.6
R5-4	9.8	10.6	10.6	***	92.8	93.4	96.1	93.4	90.1	91.4	90.5	95.1	88.5	94.4	92.8	90.8
X1	6.8	7.9	9.4	7.6	***	91.9	92.9	91.5	92.8	92.8	91.9	91.9	93.8	91.2	92.2	91.9
X2	7.9	7.5	9.7	6.9	8.6	***	95.5	91.2	91.9	91.5	91.2	93.2	90.6	92.5	90.6	91.9
X3	8.2	10.1	9.7	4.1	7.5	4.7	***	93.8	90.2	93.2	92.5	96.4	90.2	95.8	94.1	92.2
X4	9.0	11.3	10.2	5.5	7.9	8.3	5.4	***	91.2	91.2	92.2	92.5	90.6	93.5	91.5	93.5
X5	8.3	10.5	9.0	9.1	6.5	7.5	9.4	9.4	***	91.9	91.5	89.3	91.5	90.9	89.9	92.2
X6	7.9	9.0	9.8	7.7	6.5	7.9	6.1	9.4	8.6	***	92.5	93.2	92.2	93.5	92.5	92.5
X7	7.2	10.1	8.3	8.8	7.5	8.3	6.8	8.3	9.0	7.9	***	91.9	92.8	92.8	92.2	92.5
X8	10.1	11.2	10.1	5.1	8.6	7.2	3.7	6.8	10.5	6.1	7.5	***	89.3	94.1	93.2	91.2
X9	3.7	5.8	9.4	11.0	5.4	9.0	9.4	10.1	9.0	8.3	7.5	10.5	***	90.6	91.5	91.9
X10	9.0	11.6	11.3	4.4	8.3	6.8	3.3	6.8	9.7	6.8	7.5	5.1	10.1	***	95.8	93.8
X11	9.4	10.1	10.2	6.2	7.2	9.0	5.1	9.0	10.9	7.9	8.3	6.1	9.0	4.4	***	92.2
X12	8.3	11.3	11.3	8.4	7.5	7.5	7.2	6.8	8.3	7.9	7.9	8.3	8.6	6.5	8.3	***

Percent divergence in lower triangle

维普资讯 http://www.cqvip.com

61～75 和 209～221 区域，最大变异为 11.7%。氨基酸序列分析进一步表明，虽然在整个 *env* 基因上有一些氨基酸的改变，但整个 *env* 基因表达的囊膜糖蛋白的结构特性如多肽引导序列，表面结构域，穿膜结构域等在所有的毒株都比较保守。由于 ADOL-Hc1 毒株有 6 个密码子缺失，并又有 6 个密码子重复，因此，该毒株具有较大的变异，与其它毒株的差异性较大。值得注意的是，ADOL-4817 的 *env* 终止码附近的序列完全不同于其它已报道的序列，它比其它毒株多了 13 个氨基酸残基，生物进化树分析结果表明，ADOL-4817 与 HPRS103 和 X-9 的 *env* 更加近源(图 3)。

2.5 ADOL-4817*env* 基因与其他 ALV 毒株的比较分析

ADOL-4817 *env* 基因与其他 ALV 毒株的比较分析结果表明，ADOL-4817 *env* 与 EAV-HP 的同源性为 91.2%，与 EAV-E51 *env* 的同源性为60.8%，而与 ALV 的 A-E 亚群的同源性仅 24.6%～51.4%(表 2)，进化树分析表明 ADOL-4817 与 EAV-HP 的基因更加近源(图 4)。

2.6 计算机模拟分析 ADOL-4817*env* 基因产物

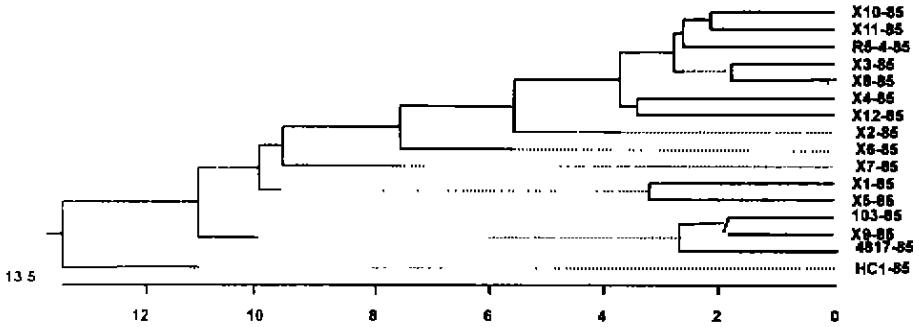

图 3 ADOL-4817 gp85 生物进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree of ADOL-4817 gp85

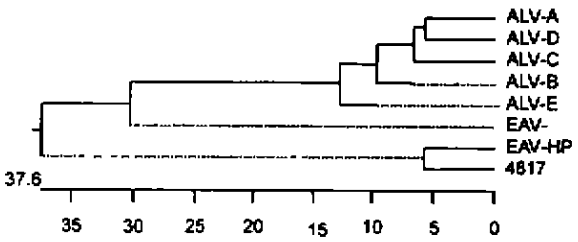

图 4 ALVs 生物进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of avian leukosis viruses

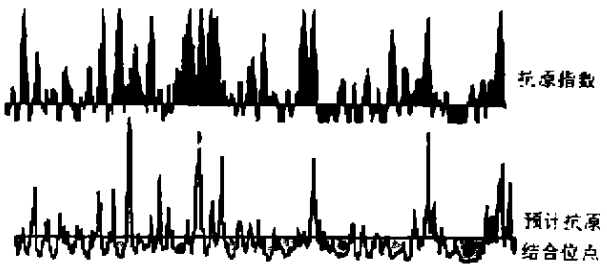

图 5 ADOL-4817*env* 基因产物抗原性分析

Fig. 5 Schematic map of ALV-J antigenic profile

表 2 ADOL4817-*env* 基因与其他 ALVs 的同源性分析

Table 2 Pair distance of ADOL-4817 *env* gene and other ALVs

Percent similarity in upper triangle

	ALV-A	ALV-B	ALV-C	ALV-D	ALV-E	EAV-HP	EAV-E51	4817
ALV-A	***	87.7	83.6	85.8	75.7	35.8	52.6	40.5
ALV-B	13.5	***	88.4	87.7	11.0	50.7	52.1	51.4
ALV-C	14.3	12.0	***	85.3	80.9	38.1	52.1	40.7
ALV-D	11.6	13.5	12.5	***	82.6	36.3	52.6	41.3
ALV-E	17.7	0.0	14.6	15.7	***	15.4	13.4	24.6
EAV-HP	89.8	70.7	89.2	90.7	123.6	***	58.8	91.2
EAV-E51	70.5	69.1	69.8	70.5	0.0	58.1	***	60.8
4817	74.5	68.6	77.4	76.9	98.7	9.1	56.4	***

Percent divergence in lower triangle

维普资讯 http://www.cqvip.com

计算机分析结果见图5,从图中可以发现 *env* 基因产物有较强的抗原性,尤其在gp85部分抗原性比gp37强。从表面可能的结构域分析可以看出,它们主要分布于env蛋白gp85,即在gp85的vr2,hr1,hr2和vr3各有一个主要的结构域,gp37部分仅有1个结构域。

3 讨论

本研究用PCR的方法对ADOL-4817株的 *env* 全基因进行了扩增,并成功地克隆进大肠杆菌。经核酸序列测定分析,证明了该毒株的 *env* 基因大小为1 746 bp。计算机分析 *env* 基因序列证明,ADOL-4817株的 *env* 基因与其它ALV-J毒株的 *env* 基因有很高的同源性,它们在某些序列上是保守的,它们的 *env* 基因序列最高同源性高达95.1%,最低为88.3%。ADOL-4817株的 *env* 基因3′端的核酸序列与其它的ALV-J毒株表现出较大的差异,它比其它毒株多出了13个氨基酸残基。

核酸序列分析发现ALV-J ADOL-4817的gp85表面蛋白不仅在可变区和高变区发生变异,而且在SU的整个组成上也有不同程度的变异,gp37的3′端改变了原有的保守状态,而完全不同于其它ALV-J毒株,比其它毒株多了13个氨基酸。这一结果提示,ALV-J在遗传上的多变性和不稳定性。核酸序列分析表明ADOL-4817株的 *env* 基因含有15个潜在的糖基化位点,这一结果与Tunicamycin处理的结果相一致[1],说明了表达的 *env* 基因产物在细胞中可被糖基化加工修饰。计算机分析发现 *env* 基因产物有较强的抗原性,表面可能的结构域主要分布于gp85,然而,病毒的中和位点位于哪一区域还需进一步研究。

RNA病毒特别是反转录病毒的一个显著特点,是他们的遗传不稳定性和多变性,这样就可能造成病毒编码的序列发生高错率,和高重组率[12~13],在免疫压力存在或缺失的情况下,两个高度异源性的病毒可能发生重组,并自然筛选出新的病毒。经不同亚群ALV的 *env* 基因序列比较发现,ADOL-4817的 *env* 基因与内源性EAV-HP的同源性高达91.2%,而与A-E亚群的同源性为24.6~51.4%,相反,A-D亚群的 *env* 基因的同源性为83.6~88.4,这一结果提示,ADOL-4817的 *env* 基因可能来源于外源性和内源性ALV的重组和进化,因为在分析ALV-J毒株的其它基因时发现,他们与外源性ALV相应基因具有高度同源性,这与Ruis等[9]和Benson等[14]报道的结果相吻合。有关ALV-J的起源和 *env* 等基因的特性还有待深入研究。

参考文献

[1] 秦爱建.禽白血病病毒J亚群囊膜糖蛋白 *env* 基因的生物学和生物化学特性[D].扬州:扬州大学,1999.

[2] Payne LN, Brown SR, Bumstead N, *et al*, A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens [J]. J Gen Virol, 1991, 72:801-807.

[3] Fadly AM, Smith EJ. Isolation and some characteristics of a subgroup J-like avianleukosis virus associated with myeloid leukosis in meat-type chickens in the United States [J]. Avian Dis, 1999, 43(3):391-400.

[4] Payne LN Developments in avian leukosis research[J]. Leukemia, 1992, 6 Suppl 3:150-152.

[5] Arshad SS, Howes K, Barron GS, *et al*. Tissue tropism of the HPRS-103 strain of J subgroup avian leukosis virus and of a derivative acutely transforming virus [J]. Vet Pathol, 1997, 34(2):127-137.

[6] Bova-Hill C, Olsen JC, Swanstrom R. Genetic analysis of the Rous sarcoma virus subgroup D *env* gene: mammol/Lal tropism correlates with temperaturesensitivity of gp85 [J]. J Virol, 1991, 65(4):2073-2080.

[7] Smith LM, Toye AA, Howes KB, *et al*. Novel endogenous retroviral sequences in the chicken genome. closely related to HPRS-103 (subgroup J) avian leukosis virus [J]. J Gen Virol, 1999, 80:261-268.

[8] Bai J, Howes K, Payne LN, *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, 76:181-187.

[9] Ruis BL, Benson SJ, Conklin KF Genome structure and expression of the ev/J family of avian endogenous viruses [J]. J Virol, 1999, 73(7):5345-5350.

[10] Sambrook J E, Fritsch F, Maniatis T. Molecular Cloning [M] A laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

[11] Calvin NM, Hanawalt PC. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation[J]. J Bacteriol 1988, 170(6):2796-2801.

[12] Andersson ML, Lindeskog M, Medstrand P, *et al*. Diversity of human endogenous retrovirus class II-like sequences [J]. J Gen Virol, 1999, 80:255-260.

[13] Nichol S. RNA viruses. Life on the edge of catastrophe [J] Nature, 1996, 384(6606):218-219.

[14] Benson SJ, Ruis BL, Fadly AM, *et al*. The unique envelope gene of the subgroup J avian leukosis virus derives from ev/J proviruses, a novel family of avian endogenous viruses [J]. J Virol, 1998, 72(12):10157-10164.