

马传染性贫血病毒基因非编码区 LTR 嵌合克隆的构建 *

魏丽丽^{1,2}, 王晓钧¹, 王 盈², 梁 华³, 沈 韬³, 李景鹏², 张晓燕³,
相文华^{1**}, 邵一鸣¹, 沈荣显¹

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江哈尔滨 150001; 2. 东北农业大学生命科学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 3. 中国疾病预防控制中心 性病艾滋病预防控制中心, 北京 100050)

Construction of a Chimeric Infectious Clone of Chinese Equine

Infectious Anemia Virus by Partial LTR Substitution

WEI Li-li^{1,2}, WANG Xiao-jun¹, WANG Ying², LIANG Hua³, SHEN Tao³, LI Jing-peng²,
Zhang Xiao-yan³, XIANG Wen-hua^{1**}, SHAO Yi-ming³, SHEN Rong-xian¹

(1. Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001, China; 2. Northeast Agricultural University, College of Life Sciences, Harbin 150030; 3. National Center for AIDS/STD Prevention and Control, China CDC, Beijing 100050)

Abstract : According to mutations occurred in the passages during the Equine infectious anemia virus (EIAV) vaccine attenuation, a full length chimeric gene clone, pL GFD9-12, was constructed successfully at a backbone of clone pL GFD3-8 by substitution with LTR U3 region of a virulent EIAV strain. The pL GFD9-12 was used to transfect fetal donkey dermal (FDD) cells and passaged in donkey leukocyte (DL) culture. The cell cultures were monitored by RT-PCR, reverse transcriptase activity assay and real-time RT-PCR. The results of RT activity and RT-PCR were positive in the supernatant of cell cultures and viruses particles were also clearly observed under electron microscope. The replication of pL GFD9-12 chimeric viruses and its parental virus pL GFD3-8 has no obvious differences. The level of replication of the pL GFD9-12 chimeric clone cultured in DL cells was higher than that in FDD cells. The characteristics on virulence and replication ability of pL GFD9-12 will be evaluated *in vivo*.

Key words : Equine infectious anemia virus; Gene substitution; Chimeric virus; LTR

摘要 : 在已有全长感染性克隆 pL GFD3-8 和 pD70344 的基础上, 根据马传贫弱毒疫苗致弱过程中不同代次毒株 LTR 序列的分析, 在 LTR U3 区选取特定的酶切位点对 EIAV 非编码区 LTR 基因进行了部分替换。将替换的全基因克隆转染驴胎皮肤细胞 (FDD) 并以驴白细胞 (DL) 传代, 用逆转录酶活性检测、RT-PCR 方法及 Real-time RT-PCR 验证其感染性。结果发现, 其衍生病毒感染上述两种细胞均出现明显的细胞病变; 细胞培养上清可检测到 RT 酶活性和 RT-PCR 阳性。电镜下可见大量典型的 EIAV 颗粒。pL GFD9-12 嵌合克隆衍生病毒与其父本克隆衍生病毒 pL GFD3-8 具有相似的复制水平, pL GFD9-12 嵌合克隆衍生病毒在 DL 细胞上复制水平略高于 FDD 细胞。此结果为进一步深入研究 LTR 对马传染性贫血病毒复制水平和毒力的影响奠定了基础。

关键词 : 马传染性贫血病毒; 基因替换; 嵌合病毒; LTR

中图分类号: S 852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)02-0149-06

马传染性贫血病毒 (Equine infectious anemia virus, EIAV) 引起马属动物以贫血、持续感染、反复发热为特征的急性烈性传染病, 与人免疫缺陷病毒 (HIV-1) 同属反转录病毒科慢病毒属的重要成员,

收稿日期: 2004-09-24, 修回日期: 2004-11-08

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助 (30200200); 科技部基础科研前期重大专项

作者简介: 魏丽丽 (1979-), 女, 汉族, 山东梁山籍, 博士研究生, 主要从事病毒学研究。

** 通讯作者: 相文华 (1953-), 博士, 研究员。Corresponding author. E-mail: hvriwang@yahoo.com.cn

二者在基因组结构、复制方式和蛋白种类及功能、传播方式和致病机理方面具有极高的相似性。病毒基因组包括三个结构基因 *gag*、*pol*、*env* 和几个小调节基因,在病毒基因组两端是长末端重复序列(Long terminal repeat, LTR)。EIAV 这种简单精确的基因组结构为研究人艾滋病提供了良好的动物模型。长末端重复序列是反转录病毒基因组中共有的非编码区,位于前病毒基因组的两端,是病毒基因组整合到宿主基因组的必要元件,与病毒的复制、繁殖动力学、组织嗜性、致病力等方面有密切关系。EIAV LTR 是基因组中高度变异区之一,EIAV LTR 的变异对于指导病毒的复制和病毒致病性具有重要的生物学意义^[1,2]。Payne 等提出 *env* 基因和 LTR 区与 EIAV 的致病性密切相关,LTR 区一些细胞转录因子调节基序如 CAAT 基序和 PEA2 位点的有无对 EIAV 的致病性有一定的影响^[3,4]。在上世纪 70 年代,我国自行研制成功了 EIAV 弱毒疫苗。该疫苗是通过经典细胞生物学的方法,将一株对马具有超强毒力的 EIAV 毒株在体外组织培养多次传代后培育成功^[5,6]。我们最近的分析结果显示,弱毒疫苗传代过程中 LTR 发生了一系列显著的变异,一是转录起始位点在 64 代之前均以 GGAC 为特征,64 代之后则表现为不规律的 GAAC, AAAC, AGAC 或 GGTC;二是 TAR 起始碱基在 59 代之前多数为 A,而 64 代之后均为 G;三是在 45 代之后(55 代除外),poly(A)附加位点一致表现为 AA,这种一致的核苷酸变化均发生在毒力明显降低的代次,提示这些突变引起的位点或结构变化很可能与病毒毒力减弱有直接关系。本文通过在亚基因组水平选取特定的限制性酶切位点,对强毒株与弱毒株 LTR 的部分序列进行替换获得全长基因的嵌合克隆,质粒转染驴胎皮肤细胞后获得了相应的衍生病毒,并在细胞水平上对其复制能力进行了检测,将为进一步在马体内进行动物实验奠定了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

EIAV 全基因克隆质粒 pL GFD3-8 是基于低拷贝载体 pL G338 的基础上构建的 EIAV 驴胎皮肤细胞疫苗株全基因感染性克隆^[7];EIAV 全基因克隆质粒 pD70344 来源于一株高致病力的感染性克隆^[8];pL G338 为源于 pL G338 限制性内切酶 *Mlu*I 缺失质粒;驴胎皮肤细胞 FDD、驴白细胞 DL、大肠杆菌 DH5 均由哈尔滨兽医研究所慢病毒研究组提供。

脂质体转染试剂和逆转录酶活性试剂盒均购至

Roche 公司;前病毒 DNA 及病毒 RNA 提取试剂盒均购至 Qiagen 公司,其余均为进口国产分析纯试剂。

1.2 引物

根据本室测定的 EIAV 弱毒疫苗株序列针对 LTR 区设计特异性引物,用于 LTR 替换的鉴定:5 LTR 外套扩增引物为 LTR-F5 (TGTGGGATTAATA TAA GA TTCT)/GR11(AACCTTGCTGCTA TGGGAA T),3 LTR 外套扩增引物为 LENF2 (GGTGTA GGCCA TTTACTAAC)/LTR-R5 (TGT TAGA TCTTGAAAACAAGA),内套引物均为 LTR-F5/LTR-R5;针对 *env* 区设计特异性引物用于 RT-PCR 鉴定:外套引物为 EV-F88 (GGT-TCA TTTCTGGGTGT)/EV-R62 (TGATTGCTG CTTTGTGTC),内套引物为 LENF2/EV-R61 (GAA TGGAGGTTGGACACACAT);针对 *gag* 区设计特异性引物和探针,用于病毒载量 Real-time RT-PCR 检测:RT1 (AGGAATTCTGGGAGACT CTTT GAC)/RT2 (ACTCGA GGTGCTT TACAT-TGACT);探针 probe (TCA GCCGGA TGCCCTCACT)。

1.3 强弱毒株 LTR 嵌合质粒的构建

*Eco*RI 酶切 pD70344,按 QIAEX Extraction Kit (QIAGEN)说明书推荐方法回收 8.2kb 酶切片段;*Eco*RI 酶切 pL G338,CIAP 处理后,回收其目的片段。将两片段连接转化到 DH5 中,得到阳性克隆 pL G-D13k。*Mlu*I 酶切 pL GFD3-8,回收 8.2kb 的酶切片段;*Mlu*I 酶切 pL G-D13k,CIAP 处理,回收 5kb 左右的片段。将两片段连接转化到 DH5,得到 LTR 嵌合的阳性克隆命名为 pL GFD9-12。

1.4 LTR 替换序列测定:

用套式 PCR 分别对替换的嵌合克隆 5 LTR 和 3 LTR 进行扩增,5 LTR 外套引物为 LTR-F5/GR11,3 LTR 外套引物为 LENF2/LTR-R5,内套引物均为 LTR-F5/LTR-R5。PCR 扩增产物直接送于上海生工生物公司进行序列测定,以确定其精确连接。

1.5 质粒转染

QIAprep Spin Miniprep Kit 纯化质粒 DNA (pL GFD9-12、pL GFD3-8)至 $OD_{260/280}$ 比值为 1.7~1.8,-20℃ 保存备用。按正常培养条件培养 FDD 细胞^[6],待细胞生长至 60%~80%,取 1.5μg 质粒 DNA 转染细胞,转染方法参照试剂盒 DOTAP Liposomal Transfection System (Roche)说明书进行,维持液用 3%的大牛血清,37℃ 培养,12d 后,反复冻融 2 次收获病毒,保存于 -70℃。

1.6 病毒传代

取 1mL 转染产物接种健康 FDD 细胞,37℃ 正常培养,按时观察,如无细胞病变,最长不超过 15d 收毒。连续在 FDD 细胞上盲传至第 4 代,反复冻融细胞接种物取 1mL 接种驴白细胞培养^[6],继续盲传至第 6 代。每代均在出现细胞病变 (cytopathic effect, CPE) 后立即收毒,保存于 -70℃,作为动物实验的种毒。

1.7 病毒 RNA 提取及 RT-PCR

在 FDD 细胞和 DL 细胞上接毒后,待各自发生细胞病变后收集培养物上清,按照 QIAamp Viral RNA Mini Kit 说明书提取病毒 RNA。用 EV-R62 为引物逆转录成 cDNA。RT-PCR 鉴定引物外侧为 EV-F88/ EV-R62;内侧为 LENF2/ EV-R61。

1.8 逆转录酶 RT 活性检测

接毒后培养细胞至出现明显 CPE 后,取 2mL 培养液 1 000g 4℃ 离心 15min 去除细胞碎片。取上清液 100 000g 4℃ 离心 1h 富集病毒颗粒,用 Non-Radioactive RT Assay Kit 测定培养物中的逆转录酶 RT 活性。

1.9 嵌合病毒 Real-time RT-PCR

取上述提取的 5μL 病毒 RNA 作为模板,加入特异性引物 RT1/ RT2 和探针,在 RT 酶的作用下,用 7700 型 Real-time PCR 仪监测整个 PCR 进程,通过已建立的标准曲线分析待测样本中游离 RNA 的拷贝数,观察病毒在细胞水平上的复制能力。

1.10 病毒颗粒电镜观察

在 FDD 细胞和 DL 细胞上接毒后,37℃ 培养至出现明显病变(细胞皱缩,变圆,形态改变)时,收取细胞制备电镜切片,用透射电镜观察其病毒颗粒的形成情况。

2 结果

2.1 强弱毒株 LTR 基因部分替换

根据马传贫弱毒疫苗致弱过程中不同代次毒株 LTR 序列的分析,选取了 LTR U3 区特定的酶切位点 *Mlu*I 对 EIAV 非编码区 LTR 基因进行了部分替换,得到全长的质粒命名为 pL GFD9-12,构建过程见图 1。

2.2 LTR 替换序列测定

采用套式 PCR 分别对替换的嵌合克隆 5' LTR 和 3' LTR 进行了扩增和序列测定,证实已经按着预期结果完成了替换,pL GFD9-12 含有的 EIAV 前病毒基因组长为 8.2 kb,包括基因组两端的 LTR 和 3 个较长的开放阅读框架(ORF)。该全长质粒

从 5' LTR U3 区 147 bp 至 3' LTR U3 区 146 bp 及其间的 *gag*、*pol*、*env* 基因完全来源于 EIAV 驴胎皮肤细胞疫苗株全基因感染性克隆 pL GFD3-8,而外侧部分 LTR 来源于高致病力的感染性克隆 pD70344。

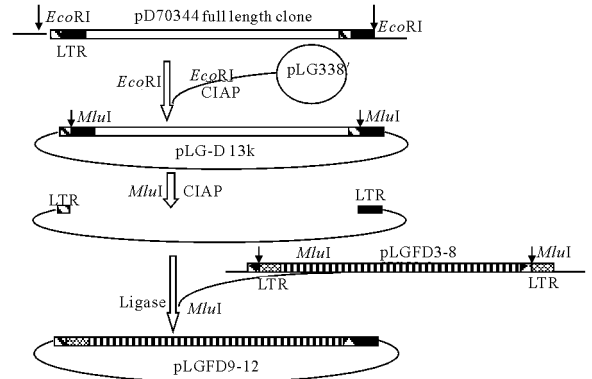


图 1 pL GFD9-12 嵌合克隆构建示意图

Fig. 1 The construction map of pL GFD9-12 chimeric clone

2.3 转染及感染性研究

2.3.1 转染以及细胞病变:将获得的全长嵌合克隆 pL GFD9-12 质粒以 1.5μg 转染六孔板培养 FDD 细胞,设立阴性对照和阳性对照(pL GFD3-8)。经过 FDD 细胞连续四代后转至 DL 细胞连续传至第六代。在 DL 细胞培养中细胞病变非常明显,细胞变暗、圆缩或变成线状,部分细胞脱落,见图 2。

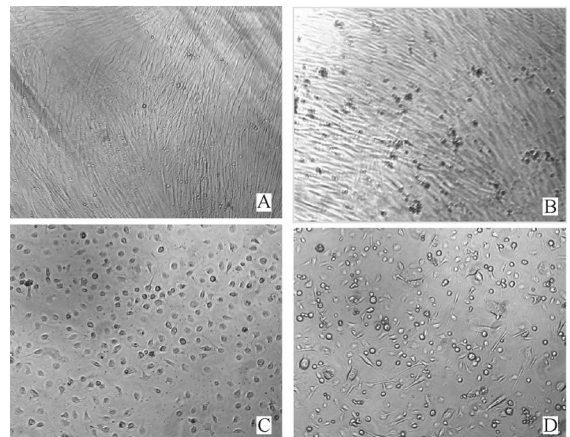


图 2 pL GFD9-12 衍生病毒在 FDD 细胞和 DL 细胞上 CPE 现象

Fig. 2 CPE phenomenon of pL GFD9-12-derived virus displayed on FDD and DL culture

A, FDD cell culture; B, FDD cell culture infected with pL GFD9-12-derived virus; C, DL cell culture; D, DL cell culture infected with pL GFD9-12-derived virus.

2.3.2 RT-PCR 鉴定:分别在转染后不同盲传细胞代次接种 5~8d 后取细胞上清进行 *env* 区 RT-PCR 检测,结果显示,在 pL GFD9-12 转染组的细胞中从第二代开始可以检测到特异性扩增现象,而在其它

对照转染组中未发现有扩增现象。这些结果表明已经获得了具有感染性的全长质粒,并通过细胞转染得到了相应的衍生病毒(图 3)。



图 3 细胞转染后传代细胞中 *env* 片段 RT-PCR 检测

Fig. 3 RT-PCR for *env* fragment in the supernatant

1/8, DL 2000 Marker; 2, PCR negative control; 3, Cell negative control; 4/5, pL GFD9-12 cultured in FDD and DL; 6/7, pL GFD3-8 cultured in FDD and DL.

2.3.3 逆转录酶活性分析:分别在 FDD 细胞和 DL 细胞上收集 pL GFD9-12 第四代衍生病毒培养上清进行 RT 酶活性检测。设立阴性对照和阳性对照(pL GFD3-8)。对比结果表明:pL GFD9-12 嵌合克隆在 DL 细胞培养中表达的逆转录酶活性要比相应的 FDD 细胞培养的略高,说明在 FDD 到 DL 继代培养的过程中,病毒得到了更好的复制,见表 1。

表 1 嵌合克隆 pL GFD9-12 第四代衍生病毒在细胞培养上清中逆转录酶活性检测

Table 1 Comparison of Reverse transcriptase activity of pL-GFD9-12 in the supernatant of the 4th passage of cells culture

Samples	Cell control (FDD)	Cell control (DL)	pL GFD 9-12 (FDD)	pL GFD 3-8 (FDD)	pL GFD 9-12 (DL)	pL GFD 3-8 (DL)
RT activity	-	-	+++	+++	++++	++++

2.3.4 pL GFD9-12 嵌合病毒 Real-time RT-PCR: 根据已建立的 Real-time RT-PCR EIAV 载量检测方法,将接种于 FDD 细胞和 DL 细胞上不同代次的衍生病毒进行了载量的测定。通过与标准曲线对比发现,接种驴白细胞的 pL GFD9-12 嵌合病毒与其父本感染性分子克隆 pL GFD3-8 病毒 RNA 载量为 7×10^7 个拷贝数左右,而接种驴胎皮肤细胞上的病毒 RNA 载量为 4×10^7 个拷贝数左右。从数据结果来看,pL GFD9-12 嵌合病毒在 DL 细胞上病毒 RNA 载量略高于 FDD 细胞,且 pL GFD9-12 嵌合病毒与其父本感染性分子克隆 pL GFD3-8 病毒 RNA 拷贝数没有明显差异,说明二者的复制能力相当。

2.4 衍生病毒在 FDD 细胞以及 DL 细胞上病毒颗粒观察

用质粒 pL GFD9-12 转染获得的衍生病毒接种

FDD 细胞和 DL 细胞,通过透射电镜在细胞浆以及胞浆间隙可观察到有大量呈球形的病毒粒子,直径约为 90~120nm,具有锥形的核心,为典型的马传染性贫血病毒粒子(见图 4),证实 pL GFD9-12 衍生病毒在体外对驴白细胞具有感染性,可以在驴白细胞体外培养中良好增殖。

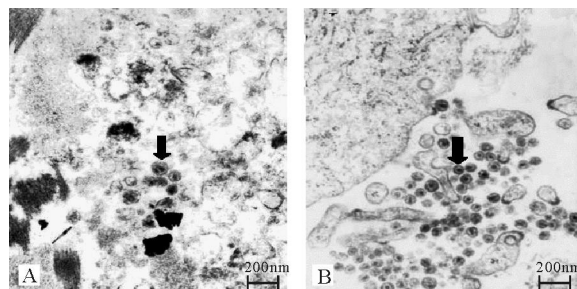


图 4 感染性克隆衍生病毒电镜观察结果

Fig. 4 Electron micrograph of EIAV infectious molecular clone pL GFD9-12

A, FDD cell culture infected with pL GFD9-12-derived virus; B, DL cell culture infected with pL GFD9-12-derived virus.

3 讨论

近年来,包括 HIV 在内的慢病毒疫苗的研究成为研究的热点,但由于慢病毒具有基因整合和高度变异的特性,所以慢病毒疫苗的研究一直是个难点。然而,在 70 年代末沈荣显等研制的中国马传染性贫血病毒弱毒疫苗在全国广泛应用,成功地控制了该病的流行。我国 EIAV 弱毒疫苗的成功,突破了学术界“慢病毒疫苗无效论”的论断,使得我国 EIAV 弱毒疫苗免疫保护与致弱机理的研究成为当今慢病毒免疫基础理论研究的热点之一。王柳^[9]等发现,中国 EIAV 弱毒株与 Wyoming 株之间的差异主要存在于 LTR 区,且差异高达 18.72%。Maury^[10]等发现,LTR 区变异主要发生在增强子区,其中 45%的核苷酸位点是变异的,而在 LTR 其余部分仅 5%的核苷酸位点是变异的,具体表现为碱基的缺失、增加和替代。最近我们通过分析 EIAV 致弱过程中不同代次毒株基因组非编码区 LTR 序列,发现 LTR U3 区基因变异较大,具体表现在增强子区(ENH)基因序列的缺失和特异性的细胞转录因子上的变化。本文基于代次毒株 LTR 序列分析结果,针对 EIAV 基因非编码区构建 LTR 强弱毒株嵌合的感染性分子克隆,为进一步进行动物试验,深入研究 LTR 部分改变对于病毒毒力减弱的影响机制奠定了基础。

EIAV 的 U3 区长度一般为 200bp 左右。EIAV 的 U3 区从 5 至 3,分布着负调节区(NRE)、增

强子区(ENH)、启动子 TATA 盒。ENH 是 LTR 的高变区,该区含有许多与病毒复制及致病力等相关的调节元件和调节基序。启动子 TATA 盒控制起始位置的精确性,是转录开始的解链位置。本文构建的嵌合克隆在 5'LTR 147 bp 位之前均由弱毒换成了强毒序列,形成的相对于原先弱毒感染性分子克隆的多处突变,最为明显的是 E-box 的丢失、GATA 基序的增加(如图 5)。E-box 基序是转录因子 bHLH 家族成员,bHLH 是个体发育过程中重要的转录因子^[11],也是与造血过程有关的转录因子。有报道指出,E-box 基序首次在马传贫驴白细

胞弱毒株中发现,而马传贫驴强毒株中不存在这一基序^[12]。本试验构建的嵌合克隆 E-box 基序的缺失可能导致病毒复制表达能力的改变,进而导致毒力的相应变化。GATA 转录因子可在动物体内调节血细胞的分化和发育^[13]。由于 CAAT 是大多数真核细胞启动子的共有成分且控制转录起始的频率,GATA 又可作用于血细胞发育的各个阶段,而 EIAV 的靶细胞又是单核/巨噬细胞,故 GATA 基序替代 CAAT 序列的这一变化对于 EIAV 的影响应该是巨大的,可能会导致在特定细胞中转录起始的频率显著下降,从而导致病毒基因表达水平的下降。



图 5 pL GFD9-12 与父本克隆在 U3 ENH 区基因序列对比

Fig. 5 Comparison of sequences on U3 ENH region of pL GFD9-12 and parental clones

通过逆转录酶活性试验及对病毒载量的测定,发现 pL GFD9-12 嵌合克隆与父本感染性分子克隆在一定时间内均可复制到较高水平,在复制能力上没有显著的差异,具有相似的复制水平。曾用此全长质粒直接转染体外培养的驴白细胞,但白细胞对转染试剂毒性比较敏感,细胞常常在转染试剂的刺激下生长状态不良,转染成功率不高。而采用在驴胎皮肤细胞上进行转染,将转染后的培养物再转移至驴白细胞上进行培养,发现病毒可在驴白细胞体外培养物中增殖复制,且能够获得高滴度的病毒。同时,从病毒 RNA 载量的结果来看,该嵌合克隆在白细胞上的拷贝数略高于驴胎皮肤细胞上的拷贝数,这些结果与 Payne^[14]等先前报道的现象相一致,推测不同来源的 LTR 决定了病毒在不同细胞的复制特性。

本文构建了一株 LTR 部分替换的 EIAV 嵌合克隆,并在细胞水平对此嵌合病毒复制及细胞嗜性进行了观察,确定其为一株典型的 EIAV 病毒。但以往的研究显示,病毒在体内和体外表现的特性往往有很大差别,因此目前我们正在进行此衍生病毒的马体动物感染实验,以期通过对接种动物后体内各项生物学指标的研究,揭示该嵌合克隆基因和病毒特性之间的关系。

致谢 本文受到自然科学基金青年基金项目“马传染性贫血病毒非编码区 LTR 变异与毒力的相关性”和科技部基础科研前期重大专项“以马传染性贫血病毒疫苗为基础的新型艾滋病疫苗发展策略”资

助。感谢赵立平老师、吕晓玲老师、李 栋、石长军对本文的大力支持。

参考文献

- [1] Carvalho M, Derse D. Mutational analysis of the equine infectious anemia virus Tat-responsive element [J]. *Virology*, 1991, 65(7):3468-3474.
- [2] Derse D, Carroll R, Carvalho M. Transcription regulation of equine infectious anemia virus [J]. *Seminars in Virology*, 1993, 4:61-68.
- [3] Payne S L, Rausch J, Rushlow K, et al. Characterization of infectious molecular clones of equine infectious anemia virus [J]. *J Gen Virol*, 1994, 57:425-429.
- [4] Perry S T, Faherty M T, Kelley M J, et al. The surface envelope protein gene region of equine infectious anemia virus is not an important determinant of tropism in vitro [J]. *Virology*, 1992, 66(7):4085-4097.
- [5] 沈荣显,徐振东,何云生,等. 马传染性贫血免疫的研究[J]. *中国农业科学*, 1979, 4: 1-15.
- [6] 沈荣显. EIA 驴白细胞弱毒疫苗的研制与应用[A]. 国际马传染性贫血免疫学术研讨会论文集[C]. 哈尔滨: 哈尔滨兽医研究所, 1983. 21-53.
- [7] 何 翔,邵一鸣,薛 飞,等. 感染性马传染性贫血病毒嵌合克隆的构建[J]. *病毒学报*, 2003, 19: 128-132.
- [8] 王晓钧. 中国马传染性贫血病毒强毒株致病性分子克隆的建立及其生物学特性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2003.
- [9] 王 柳,于 力,张绍杰,等. 马传染性贫血弱毒株 LTR 的克隆及序列分析[J]. *中国兽医学报*, 1998, 18:1-5.
- [10] Maury W, Perryman S, Oaks J L, et al. Localized sequence heterogeneity in the long terminal repeat of in vivo isolates equine infectious anemia virus [J]. *Virology*, 1997, 71(7):

- 4929-4937.
- [11] Penone P V, Omichinski J G, Nony C, *et al.* The N-terminal fingers of chicken GATA-2 and GATA-3 are independent sequence-specific DNA binding domains [J]. *EMBO J*, 1997, 16:2874-2882.
- [12] 张宝山. 马传染性贫血驴白细胞弱毒疫苗及其亲本驴强毒全基因组核苷酸序列分析与分子特性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 1999.
- [13] Atchley W R, Fitch W M. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 5172-5176.
- [14] Payne S L, La Celle K, Pei X F, *et al.* Long terminal repeat sequences of equine infectious anemia virus are a major determinant of cell tropism [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80 (Pt 3): 755-759.