

## 马传染性贫血病毒非编码区 LTR 嵌合克隆的生物学特性\*

魏丽丽<sup>1,2</sup>, 王晓钧<sup>1\*\*</sup>, 耿庆华<sup>1</sup>, 童 骁<sup>3</sup>, 梁 华<sup>3</sup>,

沈 韬<sup>3</sup>, 张晓燕<sup>3</sup>, 相文华<sup>1</sup>, 邵一鸣<sup>3</sup>, 沈荣显<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 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)

### Characterization of a LTR Chimeric Infectious Clone of Chinese Equine Infectious Anemia Virus

WEI Li-li<sup>1,2</sup>, WANG Xiao-jun<sup>1\*\*</sup>, GENG Qing-hua<sup>1</sup>, TONG Xiao<sup>3</sup>, LIANG Hua<sup>3</sup>, SHEN Tao<sup>3</sup>,

ZHANG Xiao-yan<sup>3</sup>, XIANG Wen-hua<sup>1</sup>, SHAO Yi-ming<sup>3</sup>, SHEN Rong-xian<sup>1\*\*</sup>

(1. Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 150081; 3. National Center for AIDS/STD Prevention and Control, China CDC, Beijing 100050)

**Abstract:** Equine infectious anemia virus full-length-gene chimeric clone derived virus, vLGFD9-12, was inoculated into healthy horses. Over an observation period of 150 days, all inoculated groups showed no overt abnormal symptoms. The results from routine blood assays showed that the counts of WBC and HGB had no obvious changes between vLGFD9-12 group and its parental virus pLGFD3-8. Low levels of viral RNA in the plasma of vLGFD9-12- and pLGFD3-8-infected horses was detected. The results from cytolytic T lymphocyte (CTL) and lymphocyte proliferation assay (LPA) showed that all inoculated animals had similar changes on virus-specific CTL responses and virus-specific lymphocyte proliferation activity. These results provide an important foundation for further study on mechanism of attenuation of the EIAV and the protective immunity against EIAV.

**Keywords:** Equine infectious anemia virus; Derived virus; Long terminal repeat

**摘要:** 将已构建的马传染性贫血病毒 LTR 强弱毒嵌合克隆衍生病毒 vLGFD9-12 体内接种健康试验马, 在 150d 观察期内, 各组试验动物体症均未见异常。血液学分析发现, vLGFD9-12 嵌合克隆衍生病毒与亲本弱毒疫苗株的白细胞与血红蛋白含量总体上没有明显的规律性的变化。在动物外周血中均检测到一定的病毒 RNA 拷贝数, 但拷贝数较低。二者在诱导 EIAV 特异性淋巴细胞增殖功能和特异性细胞毒性杀伤反应中, 亦具有相似的变化趋势和效应。本项研究为进一步确定我国马传贫弱毒疫苗株毒力致弱及免疫保护的分子机制奠定了重要的分子生物学基础。

**关键词:** 马传染性贫血病毒; 衍生病毒; LTR

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0244-05

马传染性贫血病毒 (*Equine infectious anemia virus*, EIAV) 引起马属动物的一种急性烈性传染病, 以贫血、持续感染、反复发热为特征。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, 二者病毒基因组包括三个结构基因 *gag*、

*pol*、*env*, 此外还有几个小开放阅读框架, 及基因组两端的长末端重复序列 (Long terminal repeat, LTR)。LTR 含有两类调节序列, 一类是与细胞转录因子相互作用的上游序列, 一类是被病毒自身编码的反式激活蛋白 *tat* 所识别的下游序列 (TAR)。Pay-

收稿日期: 2005-11-09, 修回日期: 2006-02-24

\* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助 (30200200)

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

\*\* 通讯作者: 王晓钧 (1974-), 博士, 助理研究员。Corresponding author. E-mail: hvriwang@yahoo.com.cn

ne<sup>[1-3]</sup>等在亚基因组水平对低毒力毒株的部分序列进行替换发现*env*基因和LTR区对于EIAV的致病性至关重要,明确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意义。

我国于上世纪70年代在世界上首次培育成功了马传贫病毒弱毒疫苗<sup>[4,5]</sup>,该疫苗是将一株人工驯化的具有致死毒力的强毒株DV经过体外驴白细胞连续传代致弱的。为此,我们对该弱毒疫苗传代过程中不同代次毒株LTR进行了序列测定和分析<sup>[6]</sup>,针对序列分析结果,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,证明获得了LTR强弱毒嵌合克隆衍生病毒vLGFD9-12<sup>[7]</sup>。该嵌合克隆全长质粒从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pLGFD3-8<sup>[8]</sup>,而外侧部分LTR来源于高致病力的感染性克隆pD70344<sup>[9]</sup>。出现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。本文将此嵌合克隆衍生病毒vLGFD9-12接种试验动物,通过体内动物试验对该嵌合克隆生物学特性进行了研究,获得一些有效数据,为EIAV的免疫保护机制的研究提供了一定的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

EIAV LTR 强弱毒嵌合克隆衍生病毒 vLGFD9-12<sup>[7]</sup>; EIAV 驴胎皮肤细胞弱毒疫苗株 pLGFD3-8<sup>[8]</sup>; EIAV 驴强毒株 D<sup>[9]</sup>; 驴胎皮肤细胞 FDD、驴白细胞 DL 均由哈尔滨兽医研究所慢病毒研究组提供。

试验用马购自黑龙江省非马传贫疫区,经两次琼脂扩散试验(AGIP)检测 EIAV 抗体为阴性,并无疱疹病毒污染。

### 1.2 引物

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 (AGGAATTCTGGGAGACTCTTTGAC)/RT2(ACTCGAGGTGCTT TACATTGACT); 探针 probe (TCAGCCGGATGTC CCTCACT)。

### 1.3 试验动物分组及样品采集

5匹健康试验马根据接种毒株不同,将其分成3组,第1组为健康对照组(2#马);第2组为阳性对照组,为接种弱毒疫苗株pLGFD3-8组(15#和17#马);第3组为接种LTR嵌合克隆衍生病毒vLGFD9-12组(20#和30#马)。接种途径均为皮下,接种剂量均为5mL×10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>。接种后前3个月每隔15d静脉无菌采集动物全血、血清样品,3个月后每隔30d采集,共持续5个月。

### 1.4 临床症状的观察

试验期,试验马每日2次测温,并进行临床症状观察,正常体温为38℃左右,体温超过39℃认为EIAV引起的发热。

### 1.5 琼脂扩散试验

采集试验动物全血,分离血清,按照国际标准方法进行抗体琼脂扩散试验检查<sup>[10]</sup>。

### 1.6 外周血血液学分析

定期颈静脉无菌采集试验马肝素抗凝全血,采用日本光电株式会社MEK-6318K血液分析仪测定外周血白细胞数,红细胞数,血红蛋白、血小板数。

### 1.7 外周血 T 淋巴细胞数的测定

取100μL全血,加入鼠抗羊CD4/CD8 IgG1单克隆抗体,终浓度为20μg/mL,混匀,室温放置15min,用含5%胎牛血清的PBS洗涤3次,加入羊抗鼠IgG1-FITC多克隆抗体,终浓度为8μg/mL,混匀,室温放置15min,弃上清,加500μL固定液,染色细胞用流式细胞计数器进行分类计数。

### 1.8 血浆病毒载量测定

按照QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)说明书提取血浆病毒RNA,以其作为模板,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,观察病毒在外周血中的复制情况。

### 1.9 外周血单个核细胞的分离

采集肝素抗凝全血,用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC),用1640完全培养液悬浮细胞,37℃培养。

### 1.10 EIAV 特异性淋巴细胞增殖反应

用0.1%BSA/PBS悬浮PBMC,离心弃上清;加入250μL 0.3% BSA/PBS悬浮细胞;加250μL CFSE溶液至上述细胞悬液,放置染色10min;加血清终止染色后洗涤细胞3次;用完全培养液RPMI悬浮细胞,分装于24空板。每批细胞设四个复管,一个为阴性对照管,三个为测定管。病毒刺激组是采用DLV126疫苗毒作为刺激源,阳性对照采用浓度为

250 $\mu$ g/mL非特异刺激物植物凝集素PHA, 阴性对照为马血清, 于37 $^{\circ}$ C培养5d后收获细胞, 0.1%BSA/PBS洗涤细胞两遍, 细胞沉淀用200 $\mu$ L 0.1%BSA/PBS缓冲液和200 $\mu$ L 1%多聚甲醛溶液悬浮, 流式细胞仪分析。

### 1.11 EIAV 特异性杀伤性淋巴细胞功能检测

分离PBMC, 效应细胞、靶细胞分瓶培养。于效应细胞培养瓶中加入EIAV活病毒来刺激活化T细胞, 活化5-7d; 靶细胞培养的第5d, 将培养物1分为2, 一瓶加入蛋白, 一瓶不加做对照细胞, 蛋白的用量是20 $\mu$ g/mL, 于37 $^{\circ}$ C孵育4-5h; 用CFSE对靶细胞和对照细胞进行染色; 加入血清终止染色, 加入400 $\mu$ L 1640培养液, 离心收集细胞; 染色细胞和效应细胞沉淀分别用0.5mL的全培养液悬浮, 计数; 按照20: 1的效靶比配制CTL反应体系, 反应在37 $^{\circ}$ C进行5-6h, 每个反应分别做靶细胞杀伤反应和对照杀伤反应, 每个反应做复管。上流式细胞仪检测靶细胞的减少比例, 评估CTL杀伤的能力。

## 2 结果和分析

### 2.1 接种动物的临床反应

马传染性贫血的主要特征是持续感染、反复发热和贫血。试验动物接种后观察6个月, 在实验中, 各组实验马临床表现均未见异常, 均没有体温升高现象。

### 2.2 琼脂扩散试验

在接种后第3个月, 在各组试验动物中均有抗原抗体特异性结合现象产生, 与标准阳性反应对比, 各试验动物接种组抗原抗体反应呈弱阳性。

### 2.3 外周血血液学分析

在观察期内, 对血液样品进行分析显示, 各组试验动物白细胞与血红蛋白含量总体上没有明显的规律性的变化。弱毒疫苗克隆衍生毒的接种并没有造成白细胞数和血红蛋白含量的明显降低或上升。LTR嵌合克隆衍生毒接种马在接种后一个月内白细胞总数有明显的降低, 一个月后两指标的变化未见非常明显的变化, 均在正常范围之内, 白细胞总数为5.0-11.0 $\times 10^9$ /L、血红蛋白量为80-140g/L。在整个观察期内, 各接种组血小板计数均大于100 $\times 10^9$ /L, 数值基本维持在正常范围100-150 $\times 10^9$ /L之间。血小板和体温的变化曲线见图1。

### 2.4 外周血T淋巴细胞数的测定

按照1.7所述方法处理不同时间采集的外周血样品, 通过流式细胞计数仪检测外周血T淋巴细胞亚群数, 绘制出时间-CD4 $^+$ /CD8 $^+$ T细胞曲线如图2。

由图2-2 CD4 $^+$ /CD8 $^+$ T细胞变化曲线来看, LTR嵌合克隆接种组在接种后CD4 $^+$ T细胞水平高于健康对照组, 弱毒疫苗克隆衍生毒组在接种后CD4 $^+$ T细胞水平基本与健康对照组一致; 而二者CD8 $^+$ T细胞水平都明显低于健康对照组。CD8 $^+$ T细胞水平的高低与免疫水平呈正相关, 即CD8 $^+$ T细胞水平越高, 诱发电体产生的免疫保护反应能力越强, 我们推测LTR嵌合克隆衍生毒接种组同弱毒疫苗克隆衍生毒一样, 亦能诱导机体产生特异性的免疫保护反应。

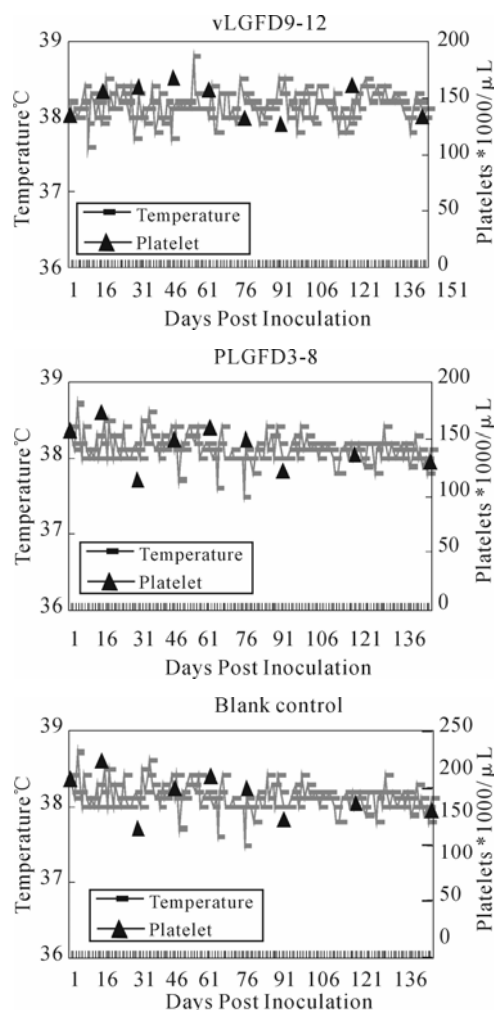


图1 试验动物外周血血小板和体温变化曲线  
Fig.1 Curve of platelets counts and body temperature of inoculated-animals

### 2.5 外周血病毒RNA载量的测定

测定外周血EIAV载量结果显示, 阴性对照组2#马载量为阴性; 弱毒疫苗克隆衍生毒接种组15#马呈阶段性低水平的复制, 大部分时间很难检出, 最高水平也仅达到10 $^2$ 拷贝/mL。17#马在病毒接种的最初阶段病毒载量接近10 $^3$ 拷贝/mL, 二周之后基本维持在0-10 $^2$ 拷贝/mL之间; LTR嵌合克隆衍生毒接种组在接种后2个月内均未检测到病毒载量,

在接种后第 60 天, 测得两匹马病毒 RNA 拷贝数分别为 224、210 拷贝/mL, 其后病毒 RNA 拷贝数基本保持在  $0-10^2$  拷贝/mL 之间。从病毒载量来看, 弱毒疫苗克隆株保持了弱毒株的毒力特点, 且复制水平比较低, LTR 嵌合克隆衍生毒同弱毒疫苗克隆毒复制水平相似, 在马体内的复制水平也很低。

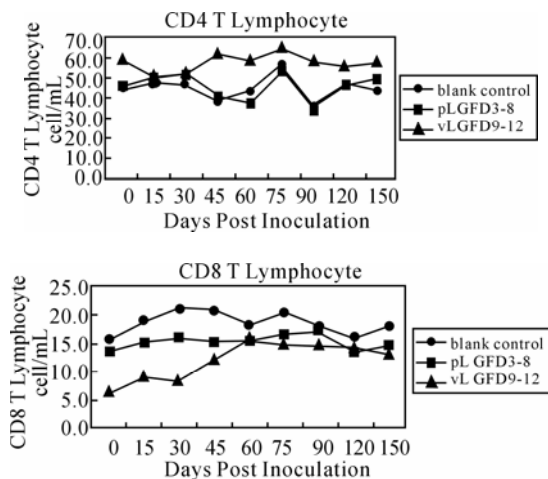


图2 接种试验动物 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞数  
Fig.2 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> subsets of T lymphocytes of inoculated-animals

## 2.6 EIAV 特异性淋巴细胞增殖实验

在接种 2 个月以后, 各组淋巴细胞增殖能力均迅速加强。弱毒疫苗克隆衍生毒接种组在第 4 个月达到一个相对高点, 达 30% 以上, 其后略有下降。LTR 嵌合克隆衍生毒接种组在观察期内淋巴细胞增殖能力一直呈上升趋势。通过数据显示, 二者都能诱导马体产生一定水平的细胞免疫反应, 且具有类似的变化趋势和时间特点。在各组之间观察到一定的反应水平的差异, 即疫苗克隆衍生毒接种组增殖水平高于 LTR 嵌合克隆衍生毒接种组, 我们推测疫苗克隆衍生毒能更好地诱导机体的淋巴细胞增殖, 达到更高一些的免疫保护水平。各组增殖变化趋势见图 3。

## 2.7 EIAV 特异性杀伤性淋巴细胞功能检测

各试验马接种病毒后, 马体在一个月后均开始产生病毒特异性的 CTL 反应, 且一直呈上升趋势, 在接种后 2-3 个月时候, 达到一个比较高的杀伤效应, 高达 30% 以上, 其后略有下降, 杀伤效率一般维持在 20%~30% 之间。弱毒疫苗克隆衍生毒接种组与 LTR 嵌合克隆衍生毒接种组试验马 CTL 变化趋势比较相近。在接种后相同时间内, 弱毒疫苗克隆衍生毒组的 CTL 杀伤效应略高于 LTR 嵌合克隆衍生毒组, 但差异不显著, 二者在 CTL 杀伤能力上具有相似的功能。各组杀伤变化趋势见图 4。

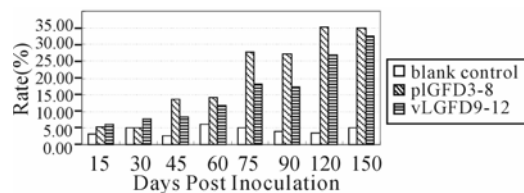


图3 接种试验动物淋巴细胞增殖功能分析  
Fig.3 Analysis of lymphocyte proliferation activity of inoculated-animals

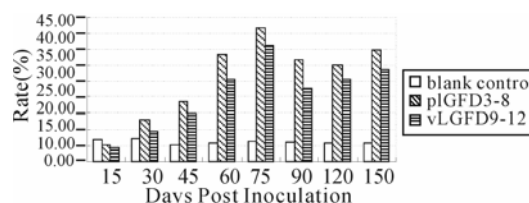


图4 接种试验动物淋巴细胞 CTL 杀伤功能分析  
Fig.4 Analysis of CTL responses of inoculated-animals

## 3 讨论

自 1983 年人类发现 HIV-1 以后, 世界范围内广泛开展了对 EIAV 分子生物学的研究并取得了许多成果, 尤其是反向遗传技术的发展为慢病毒的研究提供了新的思路。到目前为止, 已经构建了多个 EIAV 感染性克隆用于病毒各基因功能及其与病程之间关系的研究<sup>[11~13]</sup>。我国具有独立知识产权的 EIAV 弱毒疫苗致弱系统, 这一疫苗培育系统中不同于其他 EIAV 毒株和衍生毒, 它们包含了毒力由强到弱, 免疫原性逐步提高的关键信息, 但对其致病机理及其免疫机制尚不十分清楚。本实验室已经成功构建了弱毒疫苗感染性分子克隆 pLGFD3-8<sup>[7]</sup>、强毒株感染性分子克隆 pD70344<sup>[8]</sup>, 这就为马传贫乃至慢病毒免疫机理研究提供了绝佳的研究系统。本研究构建的 LTR 强弱毒嵌合克隆 pLGFD9-12 以上述强、弱毒感染性分子克隆为亲本, 在 LTR U3 区特定位置引入强毒株 pD70344 LTR 部分基因, 来考察 LTR 部分基序的改变对病毒的复制及毒力的影响, 为进一步在分子水平上阐明我国 EIAV 疫苗株的复制机制、减毒机理提供一定的理论依据。

本研究将 LTR 嵌合克隆 vLGFD9-12 衍生毒体外皮下接种试验马, 在观察期内并没有引起试验马发病, 临床体温及体征均正常; 通过血液学分析, 并没有引起试验马贫血症状, 红细胞、白细胞及血小板数也在正常范围内波动; 测得接种后试验动物外周血中病毒载量较低, 结果同弱毒疫苗克隆株相似。说明 LTR 嵌合病毒保持了亲本弱毒疫苗克隆株

的特性,对马不能引起急性发病,仅 LTR 某个基序的改变不能导致病毒毒力的变化,这与 Payne 等的研究结果一致,Payne 等研究发现,LTR 不是唯一的致病因素,*env* 基因的变异对 EIAV 的致病也起着重要的作用<sup>[12,14]</sup>。因反转录病毒 LTR 是在病毒的调节蛋白和细胞转录因子的共同作用下发挥其对病毒转录的调控作用,即病毒的致病力是在一个特定背景下多个因素共同作用的结果,我们仅改变了个别转录调节因子基序不能引起病毒复制、毒力上的改变,应在此嵌合克隆的基础上进一步构建某些与病毒复制、致病力相关基序改变的感染性分子克隆,深入研究明确与病毒致病力相关的基因。

本研究建立了流式细胞术结合荧光标记方法检测马淋巴细胞增殖功能和马的细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤作用的测定方法。CFSE(succinimidyl ester of carboxyfluorescein diacetate) 荧光标记物可自发地与细胞表面或细胞内蛋白成份中的赖氨酸侧链以及其他氨基酸的侧链氨基形成稳定的不可逆的结合。细胞分裂时,标记的 CFSE 可以非常平均地分配到子代细胞之间,在流式细胞仪检测时,可以以荧光强度的半数衰减的次数来判定细胞群体在增殖过程中连续分裂的代次数。可检测的细胞分裂次数主要受限于两方面因素:即未标记细胞的自发荧光强度以及标记细胞群体的体积大小的均一性程度。目前对 EIAV CTL 反应的检测都是通过采用 <sup>51</sup>Cr 释放的办法来上清中 <sup>51</sup>Cr 的放射量<sup>[15]</sup>。我们采用荧光标记结合流式细胞术达到取代 <sup>51</sup>Cr 的目的是完全可行的,在生物安全性方面具有很大的意义。

本试验主要注重考察 LTR 嵌合克隆衍生病毒 vLGFD9-12 毒力的问题,发现体内生物学特性与亲本弱毒疫苗感染性克隆有很大的相似性。评价该嵌合克隆衍生毒或疫苗弱毒感染性克隆的免疫原性需进行攻毒试验,用标准 EIA 攻毒方案进行动物实验,以明确 LTR 嵌合病毒在免疫特性上与亲本弱毒疫苗感染性克隆的关系,但因时间有限,并没有进行攻毒试验,我们后续将进一步进行深入研究。

**致谢:** 本文还受到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、李桢栋、石长军对本文的大力支持。

## References

[1] Carvalho M, Dorse D. Mutational analysis of the equine infectious

- anemia virus Tat-responsive element [J]. *Virology*, 1991, 65(7): 3468-3474.
- [2] Payne S L, Rausch J, Rushlow K, *et al.* Characterization of infectious molecular clones of equine infectious anemia virus [J]. *Gen. Virol.*, 1994, 57: 425-429.
- [3] 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.
- [4] Shen R X, Xu Z D, He Y S, (沈荣显, 徐振东, 何云生) *et al.* Immune study of equine infectious anemia virus [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 1979, 4: 1-15.
- [5] Shen R X. (沈荣显). Development and application of Chinese equine infectious anemia donkey leukocyte attenuated vaccine. The International Congress of Immunology on Equine Infectious Anemia (国际马传染性贫血免疫学术研讨会论文集) [C]. Harbin, China. 1983. 21-53.
- [6] Wang X J, Wei L L, Fan X J, (王晓钧, 魏丽丽, 范秀娟) *et al.*, Mutations occurring during the process of development of Chinese equine infectious anemia virus live attenuated vaccine. *Chin J Prevent Veter Med* (中国预防兽医学报) [J], 2005, 27 (3): 179-183.
- [7] He X, Shao Y M, Xue F, (何翔, 邵一鸣, 薛飞) *et al.* Construction of infectious equine infectious anemia virus (EIAV) chimeric clones [J]. *Chin J Virol* (病毒学报), 2003, 19: 128-132.
- [8] Wang X J (王晓钧). Development and characterization of a pathogenic molecular clone of Chinese Equine Infectious Anemia Virus donkey adapted strain [D]. Beijing: Chinese academy of Agricultural Sciences (中国农业科学院研究生院), 2003.
- [9] Wei L L, Wang X J, Wang Y, (魏丽丽, 王晓钧, 王盈) *et al.* Construction of a chimeric infectious clone of Chinese equine infectious anemia virus by partial LTR substitution [J]. *Virologica Sinica*, (中国病毒学), 2005, 20 (2): 149-154.
- [10] Coggins L, Norcross N L, Nusbaum S R. Diagnosis of equine infectious anemia virus by immunodiffusion test [J]. *Am. J Vet Res*, 1972, 33: 11-18.
- [11] Payne S L, Qi X M, Shao H, *et al.* Disease induction by virus derived from molecular clones of equine infectious anemia virus [J]. *J Virol*, 1998, 72 (1): 483-487.
- [12] Cook R F, Leroux C, Cook S J, *et al.* Development and characterization of an in vivo pathogenic molecular clone of equine infectious anemia virus [J]. *J Virology*, 1998, 72 (2): 1383-1393.
- [13] Leroux C, Craig J K, Issel C J, *et al.* Equine infectious anemia virus: genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies [J]. *J Virol*, 2001, 75 (10): 4570-4583.
- [14] Payne S L, Pei X F, Jia B, *et al.* Influence of long terminal repeat and *env* on the virulence phenotype of equine infectious anemia virus [J]. *J Virol*, 2004, 78 (5): 2478-2485.
- [15] McGuire T C, Leib S R, Lonning S M, *et al.* Equine infectious anaemia virus proteins with epitopes most frequently recognized by cytotoxic T lymphocytes from infected horses [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81, 2735-2739.