**分类号： S852** **授予学位单位代码：10434**

**U D C：**

**密 级：** 研 究 **生 学 号：2013010094**

**ft东农业大学**

**博 士 学 位 论 文**

**两株携带 v-*fps* 和 v-*src* 肿瘤基因的复制缺陷型急性致瘤病毒的鉴定及其感染性克隆的致肿瘤作用**

**Identification of two replication-defective acutely transforming viruses carrying v-*fps* and v-*src* oncogenes and**

**tumorigenicity analysis of infectious clones**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **研 究 Th** | **：** | **王一新** |
| **学科专业** | **：** | **预防兽医学** |
| **研究方向** | **：** | **分子病毒学** |
| **学** 院 | **：** | **动物科技学院** |
| **指导教师** | **：** | **崔治中 教授** |

2016 年 6 月 11 日

论 文 提 交 日 期：2016.04.28

论 文 答 辩 日 期：2016.06.11

学 位 授 予 日 期： 2016.06

学 科 门 类： 农 学

答 辩 委 员会主席： 秦爱建

**Shandong Agricultural University**

**Ph.D. DISSERTATION**

**Identification of two replication-defective acutely transforming viruses carrying v-*fps* and v-*src* oncogenes and tumorigenicity analysis of infectious clones**

Department: College of Animal Science and Veterinary Medicine Major: Preventive Veterinary Medicine

Ph.D.Candidate: Yixin Wang Supervisor: Zhizhong Cui

June, 2016

关于学位论文原创性和使用授权的声明

本人所呈交的学位论文，是在导师指导下，独立进行科学研究所取得的成果。对在论文研究期间给予指导、帮助和做出重要贡献的个人或集体，均在文中明确说明。本声明的法律责任由本人承担。

本人完全了解ft东农业大学有关保留和使用学位论文的规定，同意学校保留和按要求向国家有关部门或机构送交论文纸质本和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权ft东农业大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

保密论文在解密后应遵守此规定。

论文作者签名：

导 师 签 名：

日 期：

**本研究由国家自然科学基金项目（#31172330，#31402226）资助This study was a grant from National Natural Science Foundation of China (#31172330, #31402226).**

符号说明

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文名称 |
| ALV | Avian leukosis virus | 禽白血病病毒 |
| ALV-J | Avian leukosis virus subgroup J | J 亚群禽白血病病毒 |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| cDNA | Complementary DNA | 互补 DNA |
| CEF | Chicken embryo fibroblast | 鸡胚成纤维细胞 |
| c-onc | Cellular oncogene | 细胞原癌基因 |
| d | Day | 天 |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate | 焦碳酸二乙酯 |
| ELISA | Enzyme-linked immuno sorbent assay | 酶联免疫吸附测定 |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate | 异硫氰酸荧光素 |
| GP85 | Glycoprotein 85 | 囊膜糖蛋白 |
| h | Hour | 小时 |
| HAART | Highly active antiretrovirus therapy | 高效抗逆转录病毒治疗 |
| HIV | Human immumodeficiency virus | 人类免疫缺陷病毒 |
| IFA | Indirect fluorescence antibody assay | 间接免疫荧光分析 |
| IPTG | Isopropyl-β-d-thiogalactoside | 异丙基-β-d-硫代半乳糖苷 |
| kb | kilobase | 一千个碱基 |
| kDa | kilodalton | 一千个道尔顿 |
| LAM | lamivudine | 拉米夫定 |
| LTR | Long terminal repeat sequence | 长末端重复序列 |
| mAb | Monoclonal antibody | 单克隆抗体 |
| MDV | Marek's disease virus | 马立克氏病毒 |
| min | Minute | 分钟 |
| miRNA | microRNA | 微小 RNA |
| Nr ptk | Non-receptor protein tyrosine kinase | 非受体蛋白激酶 |
| ORF | Open reading frame | 开放阅读框 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| p27 | Protein 27 | 群特异性抗原 |
| PBS | Phosphate buffer solution | 磷酸盐缓冲液 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |
| PE | P-phycoerythrin | 藻红蛋白 |
| PTK | Protein tyrosine kinase | 蛋白酪氨酸激酶 |
| R ptk | Receptor protein tyrosine kinase | 受体蛋白激酶 |
| REV | Avian reticulo endotheliosis virus | 禽网状内皮组织增生症病毒 |
| RSV | Rous sarcoma virus | 罗斯肉瘤病毒 |
| RT | Reverse transcriptase | 反转录酶 |
| SPF | Specific pathogen free | 无特定病原 |
| TCID50 | 50% Tissue culture infective dose | 半数组织感染剂量 |
| Tf | Transcription factor | 转录因子 |
| UTR | Unique terminal repeat sequence | 独特末端序列 |
| v-onc | Viral oncogene | 病毒肿瘤基因 |
| W | Week | 周 |
| μg | microgram | 微克 |
| μl | microliter | 微升 |

目 录

[符号说明](#_Toc686896061) 3

[中文摘要](#_Toc686896062) 10

[Abstract](#_Toc686896063) 11

**[1](#_Toc686896064)** [前 言](#_Toc686896064) 12

[1.1 禽白血病病毒（ALV）的研究进展](#_Toc686896065) 12

[1.1.1 ALV的形态大小和抵抗力](#_Toc686896066) 12

[1.1.2 ALV的抗原分型](#_Toc686896067) 12

[1.1.3 ALV的Th长特征](#_Toc686896068) 13

[1.1.4 ALV的病毒基因组和蛋白](#_Toc686896069) 13

[1.1.5 ALV的遗传变异和重组](#_Toc686896070) 17

[1.1.6 ALV的复制和Th活史](#_Toc686896071) 17

[1.1.7 ALV的致病性](#_Toc686896072) 17

[1.1.8 ALV的致病和致瘤机制](#_Toc686896073) 17

[1.1.9 ALV的流行病学和流行特点](#_Toc686896074) 18

[1.1.10 ALV的检测和诊断](#_Toc686896075) 18

[1.1.11 ALV的防控措施](#_Toc686896076) 19

[1.2 反向遗传学在病毒学研究中的应用](#_Toc686896077) 19

[1.2.1 反向遗传学的原理](#_Toc686896078) 19

[1.2.2 ALV的反向遗传学](#_Toc686896079) 19

[1.3 基因芯片技术在动物病毒学研究中的应用](#_Toc686896080) 20

[1.4 核苷类药物在抗HIV治疗中的应用](#_Toc686896081) 20

[1.4.1 核苷类药物的应用概况](#_Toc686896082) 20

[1.4.2 HIV耐药性的产Th及其检测](#_Toc686896083) 21

[1.5 本研究的目的和意义](#_Toc686896084) 22

**[2](#_Toc686896085)** [材料和方法](#_Toc686896085) 22

[2.1 材料](#_Toc686896086) 22

[2.1.1 病料来源](#_Toc686896087) 22

[2.1.2 试验动物](#_Toc686896088) 22

[2.1.3 主要分子Th物学试剂](#_Toc686896089) 22

[2.1.4 主要配制试剂](#_Toc686896090) 23

[2.1.5 抗体](#_Toc686896091) 24

[2.1.6 菌种和载体](#_Toc686896092) 24

[2.1.7 主要仪器](#_Toc686896093) 24

[2.2 常规试验操作方法](#_Toc686896094) 25

[2.2.1 鸡胚成纤维细胞（CEF）的制备](#_Toc686896095) 25

[2.2.2 ELISA检测ALV抗原](#_Toc686896096) 25

[2.2.3 间接免疫荧光（IFA）](#_Toc686896097) 25

[2.2.4 组织/细胞DNA的提取](#_Toc686896098) 25

[2.2.5 细胞上清/血清中病毒RNA的提取](#_Toc686896099) 25

[2.2.6 常规PCR扩增](#_Toc686896100) 26

[2.2.7 RT-PCR扩增](#_Toc686896101) 26

[2.2.8 扩增产物的回收](#_Toc686896102) 27

[2.2.9 回收产物的连接](#_Toc686896103) 28

[2.2.10 感受态细胞制备](#_Toc686896104) 28

[2.2.11 连接产物的转化](#_Toc686896105) 28

[2.2.12 质粒的提取](#_Toc686896106) 28

[2.2.13 重组质粒的酶切鉴定](#_Toc686896107) 29

[2.2.14 SDS-PAGE蛋白质电泳](#_Toc686896108) 29

[2.2.15 免疫印迹（Western blot）](#_Toc686896109) 29

[2.2.16 免疫组织化学染色](#_Toc686896110) 30

[2.3 Fu-J (SDAU1005)株急性致瘤性ALV的分离鉴定](#_Toc686896111) 30

[2.3.1 Fu-J (SDAU1005)病毒悬液的传代和扩增](#_Toc686896112) 30

[2.3.2 肉瘤组织DNA和病毒RNA的提取](#_Toc686896113) 30

[2.3.3 PCR/RT-PCR扩增和克隆测序](#_Toc686896114) 30

[2.3.4 Fps蛋白和p19gag蛋白的原核表达](#_Toc686896115) 32

[2.3.5 鼠抗Fps和p19gag蛋白单因子血清的制备](#_Toc686896116) 33

[2.3.6 IFA检测感染Fu-J (SDAU1005)的CEF](#_Toc686896117) 33

[2.3.7 Western blot检测感染Fu-J (SDAU1005) 的CEF蛋白](#_Toc686896118) 33

[2.4 复制缺陷型Fu-Js感染性克隆的构建和病毒拯救](#_Toc686896119) 33

[2.4.1 SDAU1005感染性克隆质粒的构建](#_Toc686896120) 33

[2.4.2 SDAU1005感染性克隆质粒的转染和病毒拯救](#_Toc686896121) 35

[2.4.3 Fu-Js感染性克隆质粒的构建](#_Toc686896122) 35

[2.4.4 Fu-Js质粒的转染和病毒拯救](#_Toc686896123) 37

[2.4.5 动物实验研究拯救毒rFu-Js的致瘤性](#_Toc686896124) 38

[2.4.6 免疫组化和IFA检测拯救毒rFu-J诱发的肿瘤](#_Toc686896125) 39

[2.5 SJ (SDAU1102)株急性致瘤性ALV的分离鉴定](#_Toc686896126) 39

[2.5.1 SJ (SDAU1102)病毒悬液的传代和扩增](#_Toc686896127) 39

[2.5.2 肉瘤组织DNA提取和病毒RNA提取](#_Toc686896128) 39

[2.5.3 PCR/RT-PCR扩增和克隆测序](#_Toc686896129) 39

[2.5.4 p60v-src蛋白的原核表达](#_Toc686896130) 41

[2.5.5 鼠抗p60v-src蛋白单因子血清的制备](#_Toc686896131) 41

[2.5.6 Western blot检测感染SJ (SDAU1102)的CEF蛋白](#_Toc686896132) 41

[2.5.7 免疫组化检测原代肉瘤中的](#_Toc686896133)**[p60v-src](#_Toc686896133)**[蛋白](#_Toc686896133) 41

[2.5.8 复制缺陷型SJs感染性克隆的构建](#_Toc686896134) 41

[2.5.8 复制缺陷型SJs感染性克隆的转染和检测](#_Toc686896135) 43

[2. 6 Fu-J(SDAU1005)病毒Th物学特性和致病性的研究](#_Toc686896136) 44

[2.6.1 辅助病毒和缺陷型病毒荧光定量PCR方法的建立](#_Toc686896137) 44

[2.6.2 不同代次Fu-J (SDAU1005)细胞传代毒Fu-J含量的研究](#_Toc686896138) 45

[2.6.3 不同方式接种Fu-J (SDAU1005)毒株对SPF鸡的致病性](#_Toc686896139) 45

[2.6.4 不同方式接种Fu-J (SDAU1005)毒株的抗原分布](#_Toc686896140) 46

[2.6.5 免疫Fps蛋白对鸡体肿瘤的抑制作用](#_Toc686896141) 46

[2.7 Fu-J (SDAU1005)感染CEF的转录组学分析](#_Toc686896142) 47

[2.7.1 样品制备、RNA抽提和纯化](#_Toc686896143) 47

[2.7.2 样品RNA的放大和标记](#_Toc686896144) 47

[2.7.3 芯片杂交和扫描](#_Toc686896145) 47

[2.7.4 芯片数据分析](#_Toc686896146) 47

[2.7.5 荧光定量RT-PCR](#_Toc686896147) 47

[2.7.6 差异表达基因编码蛋白的互作分析](#_Toc686896148) 49

[2.8 拉米夫定抑制Fu-J (SDAU1005)复制和肿瘤Th长的研究](#_Toc686896149) 49

[2.8.1 拉米夫定在培养细胞上对Fu-J (SDAU1005)复制的抑制](#_Toc686896150) 49

[2.8.2 拉米夫定影响反转录酶活性的研究](#_Toc686896151) 50

[2.8.3 拉米夫定对CEF ALV-J受体表达影响的研究](#_Toc686896152) 53

[2.8.4 拉米夫定对病毒入侵和释放影响的研究](#_Toc686896153) 53

[2.8.5 拉米夫定对鸡体Fu-J (SDAU1005)复制和肿瘤Th长的抑制](#_Toc686896154) 53

[2.8.6 给药组鸡肿瘤中病毒耐药性的检测](#_Toc686896155) 53

**[3](#_Toc686896156)** [结果与分析](#_Toc686896156) 55

[3.1 Fu-J前病毒全基因组序列的扩增和分析](#_Toc686896157) 55

[3.1.1 病毒悬液的传代和辅助病毒的纯化](#_Toc686896158) 55

[3.1.2 Fu-J前病毒全基因组结构和序列的分析](#_Toc686896159) 55

[3.1.3 Fu-J编码蛋白质的分析](#_Toc686896160) 58

[3.1.4 Fu-J基因组结构与Fu-J1~5及FSV、PRCII基因组结构的比较](#_Toc686896161) 58

[3.1.5 Fps蛋白和p19gag蛋白的原核表达](#_Toc686896162) 62

[3.1.6 鼠抗Fps和鼠抗p19gag单因子血清的获得](#_Toc686896163) 64

[3.1.7 IFA检测感染Fu-J (SDAU1005)的CEF](#_Toc686896164) 64

[3.1.8 Western blot检测感染Fu-J (SDAU1005) 的CEF蛋白](#_Toc686896165) 64

[3.2 Fu-J(SDAU1005)感染性克隆的构建和缺陷型病毒的病毒拯救](#_Toc686896166) 64

[3.2.1 SDAU1005感染性克隆的构建和病毒拯救](#_Toc686896167) 64

[3.2.2 Fu-Js感染性克隆的构建](#_Toc686896168) 66

[3.2.3 Fu-Js缺陷型病毒的拯救](#_Toc686896169) 68

[3.2.4 拯救病毒的致瘤性研究](#_Toc686896170) 68

[3.3 SJ (SDAU1102)的分离鉴定和基因组分析](#_Toc686896171) 71

[3.3.1 SDAU1102的纯化和病毒的定量](#_Toc686896172) 71

[3.3.2 SDAU1102前病毒全基因组核苷酸序列的扩增和分析](#_Toc686896173) 71

[3.3.3 SJ前病毒全基因组核苷酸序列的扩增和分析](#_Toc686896174) 72

[3.3.4 p60v-src蛋白的原核表达](#_Toc686896175) 79

[3.3.5 鼠抗p60v-src单因子血清的获得](#_Toc686896176) 80

[3.3.6 Western blot检测感染SJ (SDAU1102)的CEF蛋白](#_Toc686896177) 80

[3.3.7 免疫组化检测SJ (SDAU1102)诱发的急性肿瘤组织](#_Toc686896178) 80

[3.3.8 SJ-1~5在不同代次肿瘤组织中的数量相对变化](#_Toc686896179) 81

[3.3.9 SJs感染性克隆的构建](#_Toc686896180) 82

[3.3.10 SJs感染性克隆瞬时转染的检测](#_Toc686896181) 83

[3.4 Fu-J (SDAU1005)病毒Th物学特性和致病性的研究](#_Toc686896182) 84

[3.4.1 辅助病毒和缺陷型病毒荧光定量PCR方法的建立](#_Toc686896183) 84

[3.4.2 不同代次Fu-J (SDAU1005)细胞传代毒Fu-J含量的比较](#_Toc686896184) 88

[3.4.3 不同方式接种Fu-J (SDAU1005)毒株对SPF鸡的致病性](#_Toc686896185) 88

[3.4.4 急性肿瘤传播方式的模拟实验](#_Toc686896186) 96

[3.4.5 免疫Fps蛋白对鸡体肿瘤的抑制作用](#_Toc686896187) 97

[3.5 Fu-J(SDAU1005)感染CEF的转录组学分析](#_Toc686896188) 98

[3.5.1 样品制备](#_Toc686896189) 98

[3.5.2 差异基因分析](#_Toc686896190) 99

[3.5.3 GO分析结果](#_Toc686896191) 104

[3.5.4 KEGG通路注释](#_Toc686896192) 106

[3.5.5 差异表达基因在染色体中的分布](#_Toc686896193) 106

[3.5.6 荧光定量RT-PCR验证芯片数据](#_Toc686896194) 106

[3.5.7 差异表达基因编码蛋白的互作分析](#_Toc686896195) 108

[3.6 拉米夫定抑制Fu-J (SDAU1005)复制和肿瘤发Th的研究](#_Toc686896196) 108

[3.6.1 拉米夫定对体外培养CEF的影响](#_Toc686896197) 108

[3.6.2 拉米夫定对Fu-J (SDAU1005)在CEF上复制的影响](#_Toc686896198) 108

[3.6.3 拉米夫定对AMV反转录酶的活性的影响](#_Toc686896199) 108

[3.6.4 拉米夫定对CEF病毒受体表达和病毒入侵及释放的影响](#_Toc686896200) 109

[3.6.5 拉米夫定对Fu-J (SDAU1005)在鸡体的复制和肿瘤Th长的影响](#_Toc686896201) 111

[3.6.6 给药组鸡肿瘤中病毒分离株耐药性的检测](#_Toc686896202) 113

**[4](#_Toc686896203)** [讨 论](#_Toc686896203) 114

[4.1 Fu-J(SDAU1005)的分离鉴定和基因组序列分析](#_Toc686896204) 114

[4.2 rFu-Js感染性克隆的构建、病毒拯救和致瘤性分析](#_Toc686896205) 114

[4.3 SJ(SDAU1102)的分离鉴定和基因组序列分析](#_Toc686896206) 114

[4.4 Fu-J(SDAU1005)的病毒复制及其致瘤性的研究](#_Toc686896207) 115

[4.4.1 Fu-J(SDAU1005)病毒复制特性的研究](#_Toc686896208) 115

**[4.4.2](#_Toc686896209)****[Fu-J(SDAU1005)](#_Toc686896209)** [对](#_Toc686896209)**[SPF](#_Toc686896209)**[鸡的致病性、致瘤性的研究](#_Toc686896209) 115

**[4.4.3](#_Toc686896210)****[Fps](#_Toc686896210)**[抗体对](#_Toc686896210)**[Fu-J (SDAU1005)](#_Toc686896210)**[诱发肿瘤抑制作用的研究](#_Toc686896210) 115

[4.5 感染Fu-J (SDAU1005)的CEF转录组分析](#_Toc686896211) 115

**[4.5.1](#_Toc686896212)** [细胞凋亡相关基因](#_Toc686896212) 115

**[4.5.2](#_Toc686896213)** [细胞增殖相关基因](#_Toc686896213) 115

**[4.5.3](#_Toc686896214)** [血管形成相关的基因](#_Toc686896214) 116

**[4.5.4](#_Toc686896215)** [肿瘤细胞迁移相关的基因](#_Toc686896215) 116

[4.6 拉米夫定抑制Fu-J (SDAU1005)复制的研究](#_Toc686896216) 116

**[5](#_Toc686896217)** [结 论](#_Toc686896217) 116

**[6](#_Toc686896218)** [参考文献](#_Toc686896218) 117

**[7](#_Toc686896219)** [致 谢](#_Toc686896219) 125

**[8](#_Toc686896220)** [攻读学位期间发表论文情况](#_Toc686896220) 125

# 中文摘要

近几年来，我国鸡群中J亚群禽白血病病毒（Subgroup J avian leukosis virus, ALV-J）诱发的髓样细胞瘤/血管瘤广泛流行的同时，在一些蛋鸡鸡群及“817”肉杂鸡鸡群中，出现了一定比例的体表纤维肉瘤。人工造病试验表明，接种了肉瘤研磨液的鸡在10-14d可发生相同类型的肉瘤，证明这些肉瘤为急性肿瘤（王鑫等, 2012；刘绍琼等, 2012；李传龙等, 2012； 李德庆等，2013）。本实验室前期工作中，以“817”肉杂鸡肉瘤组织DNA为模板，扩增到五种携带不完整v-*fps*肿瘤基因的缺陷型病毒基因组（Chen *et al*., 2012）。在此基础上，本研究将“817”肉杂鸡颈部皮下肉瘤和海兰褐蛋鸡肠系膜纤维肉瘤的研磨液接种鸡胚成纤维细胞（chicken embryo fibroblast, CEF），鉴定了两株急性致瘤性

ALV所携带的v-*fps*和v-*src*肿瘤基因；构建了辅助ALV和分别带有v-*fps*和v-*src*肿瘤基因的缺陷型病毒感染性克隆质粒，通过动物实验分析拯救病毒的致瘤性；将“817”肉杂鸡肉瘤研磨液接种SPF鸡，研究了该病毒的致病性和致瘤性；通过鸡急性肿瘤的动物模型，研究了核苷类抗HIV药物拉米夫定对ALV-J复制的抑制作用。本研究利用反向遗传学技术首次证明了携带完整v-*fps*肿瘤基因的缺陷性ALV可在ALV-J辅助病毒存在的条件下在鸡体内复制并诱发急性纤维肉瘤。同时，该研究也是急性纤维肉瘤天然病例中，携带v-*src*肿瘤基因的ALV-J相关复制缺陷型病毒的首次分离报道。

1. “817”肉杂鸡急性肉瘤中急性致瘤性病毒的分离及其v-*fps*肿瘤基因的鉴定

将“817”肉杂鸡肉瘤研磨液接种1日龄SPF鸡，在鸡体上传代。以第五代肿瘤组织DNA和感染了肿瘤研磨液的CEF DNA为模板，通过PCR扩增，拼接获得了缺陷型病毒Fu-J株的前病毒基因组序列。序列分析表明，Fu-J是一株携带完整v-*fps*肿瘤基因的复制缺陷型病毒，它以复制型ALV-J SDAU1005为辅助病毒完成自我复制，故将该病毒悬液命名为Fu-J (SDAU1005). Fu-J编码137 kDa的P137gag-fps融合蛋白。使用大肠杆菌表达系统获得Fps原核蛋白和p19gag原核蛋白，以其制备鼠抗Fps单因子血清和鼠抗

p19gag单因子血清。对感染了Fu-J (SDAU1005)病毒悬液的CEF做IFA和Western blot检测，结果表明，感染了Fu-J (SDAU1005)病毒悬液的CEF可以同时对ALV-J单克隆抗体、鸡抗ALV-J单因子血清和鼠抗Fps单因子血清呈现阳性反应。本研究完成了Fu-J株病毒的全基因组序列测定，为研究该病毒致瘤的分子机制奠定了基础。

I

2. rFu-Js感染性克隆的构建、病毒拯救和拯救病毒的致瘤性分析

通过PCR扩增、酶切连接等方法，构建了辅助ALV感染性克隆质粒PMD-SDAU1005和六种携带不同长度v-*fps*肿瘤基因的缺陷型病毒感染性克隆质粒PMD-Fu-J，PMD-Fu-J1, PMD-Fu-J2，PMD-Fu-J3, PMD-Fu-J4和PMD-Fu-J5. 将PMD-SDAU1005

和六种PMD-Fu-Js质粒分别按一定比例共转染CEF，获得拯救病毒rFu-J (rSDAU1005)、rFu-J1 (rSDAU1005)、rFu-J2 (rSDAU1005)、rFu-J3 (rSDAU1005)、rFu-J4 (rSDAU1005)

和rFu-J5 (rSDAU1005). 将6种拯救病毒分别翅下接种1日龄SPF鸡，发现仅接种rFu-J

（rSDAU1005） 的鸡出现了肿瘤（2/10）。将2只鸡的肿瘤在1日龄SPF鸡上持续传代。在传代过程中，肿瘤的生长速度逐渐加快。当传至第4代时，肿瘤生长速度与野毒诱发肿瘤生长速度基本一致。IFA和免疫组织化学方法证实该肿瘤组织对ALV-J及Fps抗体呈阳性反应。该研究表明，携带完整v-*fps*肿瘤基因的缺陷型ALV确实可诱发急性肿瘤。

3. 海兰褐蛋鸡腹腔急性肉瘤中急性致瘤性病毒的分离及其v-*src*肿瘤基因的鉴定

以海兰褐蛋鸡原代肿瘤组织DNA和感染了肿瘤研磨液的CEF DNA为模板，PCR扩增获得了复制缺陷型病毒SJ-1、SJ-2、SJ-3、SJ-4、SJ-5及辅助病毒SDAU1102的前病毒全基因组序列。该毒株被命名为SJ-1 (SDAU1102)、SJ-2 (SDAU1102)、SJ-3

（SDAU1102）、SJ-4 (SDAU1102)和SJ-5 (SDAU1102). 序列分析表明，辅助病毒SDAU1102

为J亚群ALV，其*gp85*基因与中国蛋鸡分离株JS09GY6同源性最高。SJ-1~5均携带v-*src*肿瘤基因，它们具有相同的3’端*src*-*env*衔接位点，但5’端衔接位点差异很大。使用大肠杆菌表达系统获得p60v-src原核蛋白，以其制备鼠抗p60v-src单因子血清。以该血清为一抗，Western blot和免疫组化实验显示，感染了病毒悬液的CEF及肿瘤组织中，均存在p60v-src蛋白过表达。构建了五种缺陷型病毒的感染性克隆质粒。将其转染CEF，发现仅SJ-1和SJ-2感染性克隆质粒可表达p60v-src蛋白。SJ-1~5 (SDAU1005)的分离及鉴定为为进一步研究ALV与原癌基因重组和v-*src*基因致瘤机制奠定了基础。

4. Fu-J (SDAU1005)病毒悬液对SPF鸡的致病性和致瘤性研究

本研究首先建立了分别针对ALV-J *gp85*基因和v-*fps*基因的SYBR Green I实时荧光定量PCR方法，两个方法特异性好、灵敏度高，为研究Fu-J (SDAU1005)的复制动态及其致病性提供了可靠的检测方法。分别采用颈部皮下、腹腔和静脉注射三种方式，将Fu-J (SDAU1005)病毒悬液接种1日龄SPF鸡，观察病毒的致病性和致瘤性。结果表明，

II

三种接种方式均可诱发鸡的急性肿瘤，且所有肿瘤均为纤维肉瘤；颈部皮下接种组的鸡体内没有肿瘤生长，表明该急性肿瘤的转移性不强；所有接触传播组的鸡均未发现肿瘤生长，表明该急性致瘤性ALV不容易通过横向接触方式传播。从上述结果，可以推测疫苗免疫时重复使用污染的针头，可能是某些鸡场内病毒从一只患病鸡传给其他个体并发生急性肿瘤的原因。病毒的抗原定位实验表明：在发病鸡体内肿瘤组织中辅助病毒和缺陷型病毒拷贝数最高；缺陷型病毒的拷贝数与辅助病毒拷贝数存在相关关系。

5. 感染了Fu-J (SDAU1005)病毒悬液的CEF转录组研究

为探讨Fu-J株病毒诱发细胞转化的机制，本研究采用基因芯片技术对感染了Fu-J

（SDAU1005）病毒悬液的CEF转录组进行了分析。与单独感染SDAU1005的CEF相比，感染Fu-J (SDAU1005)病毒悬液的CEF中有1253个转录子发生了4倍及以上的差异表达。这些差异基因主要涉及细胞过程、代谢加工、生物学调节、定位和发育过程等反应。细胞信号通路分析法发现，这些差异基因主要参与了神经活性因子-受体相互作用、紧密连接、代谢信号通路、GnRH信号通路、VEGF信号通路、Wnt信号通路等。本研究获得的差异转录组数据为深入研究v-*fps*肿瘤基因的急性致瘤机制奠定了基础。

6. 拉米夫定抑制ALV-J复制和肿瘤Th长的研究

为研究核苷类抗HIV 药物拉米夫定对ALV-J 复制的抑制作用，首先将Fu-J

（SDAU1005）病毒悬液接种体外培养的CEF，研究其对ALV-J复制的影响。结果表明，在1-4μg/ml的浓度范围内，拉米夫定可有效抑制辅助ALV和缺陷型病毒的复制。荧光定量PCR结果表明，拉米夫定可以抑制ALV反转录酶的活性。通过鸡颈部皮下肿瘤和腹腔肿瘤两种动物模型，研究了拉米夫定在鸡体内对ALV-J复制的抑制作用。结果表明，拉米夫定可以抑制辅助ALV和缺陷型病毒在鸡体内的复制、降低病毒载量，从而减缓鸡颈部皮下肿瘤的生长，延长腹腔攻毒鸡的生存时间并降低其死亡率。本研究为ALV的防控提供了新思路，但拉米夫定能否在鸡群中推广使用尚需进一步研究和论证。

**关键词：复制缺陷型病毒； 急性致瘤性； ALV； v-*fps* 肿瘤基因； v-*src* 肿瘤基因； 感染性克隆； 致病性和致瘤性； 转录组； 拉米夫定**

III

**Identification of replication-defective acutely transforming viruses carrying v-*fps* and v-*src* oncogenes and tumorigenicity analysis of infectious clones**

Abstract

In recent years, myeloblastomas and hemangiomas induced by Subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) was widespread in chickens in China. Meanwhile, a proportion of fibrosarcomas were appeared in some layer and" 817“hybrid broiler flocks. Animal experiment showed that similar sarcomas could be developed in chickens injected with tumor suspensions after 10-14 days post-inoculation, indicating those fibrosarcomas were induced by acutely transforming ALV. In our previous study, five replication-defective viral genomes namely Fu-J1, Fu-J2, Fu-J3, Fu-J4 and Fu-J5 carrying incomplete v-*fps* oncogenes were amplified by RT-PCR from RNA extracted from fibrosarcomas. In this study, suspensions prepared from fibrosarcomas of" 817” hybrid broilers and 240-day-old Hy-Line Brown chickens were inoculated into chicken embryo fibroblasts (CEFs) respectively, and complete v-*fps* and v-*src* oncogenes were identified from two acutely transforming ALV strains. Then, infectious clone plasmids of helper ALV and replication-defective viruses carrying v-*fps* and v-*src* oncogenes were constructed respectively, and animal experiments were performed to measure the tumorigenicity of those rescued viruses. Subsequently, 1-day-old SPF chickens were inoculated with tumor suspensions prepared from" 817“hybrid broilers to study the pathogenicity and tumorigenicity of Fu-J (SDAU1005) viral stocks. Finally, the inhibitory effect of lamivudine (LAM), an anti-HIV nucleoside analogues drug, on the replication of ALV-J was evaluated using an acute fibrosarcoma animal model. This is the first time to confirm that replication-defective ALV carrying complete v-*fps* oncogene could induce fibrosarcomas when co-exsited with helper virus using reverse genetic technique. In addition, it's the fisrt report of replication-defective ALV carrying complete v-*src* oncogene from natural fibrosarcoma cases.

**1. Isolation of acutely transforming ALV in fibrosarcomas from" 817“hybrid broilers and identification of v-*fps* oncogene in the virus.**

IV

Suspensions prepared from fibrosarcomas of" 817“hybrid broilers were inoculated into 1-day-old SPF chickens to passage from generation to generation. DNA of the fifth-generation fibrosarcomas and viral stock infected CEFs were used as template for PCR amplification, and complete proviral genome sequence was assembled. Sequence analysis showed that Fu-J was a replication-defective ALV carrying complete v-*fps* oncogene, which was depended on ALV-J SDAU1005 as its" helper virus". Therefore, it could be named as

“Fu-J (SDAU1005)" according to the international conventions. Fu-J encoded a 137 kDa P137gag-fps fusion protein. Fps and p19gag prokaryotic recombinant proteins were inducible expressed by Escherichia coli (E. coli.) expression system, and mouse anti-Fps and mouse anti-p19gag mono-specific serum were prepared. IFA and Western blot detection were performed on the Fu-J (SDAU1005) viral stock infected CEF. It showed that CEF infected with Fu-J (SDAU1005) viral stock could be detected simultaneously with chicken anti-ALV-J mono-specific serum, ALV-J mAb JE9, and mouse anti-fps mono-specific serum. Determination of Fu-J proviral sequence paved the way for further research on the molecular mechanism of acutely tumorigenesis.

**2. Construction of rFu-Js infectious clone plasmids, virus rescue and analysis of tumorigenicity.**

Infectious clone plasmids of helper virus PMD-SDAU1005 and other six replication-defective viruses carrying different lengths of v-*fps* oncogenes, PMD-Fu-J, PMD-Fu-J1, PMD-Fu-J2, PMD-Fu-J3, PMD-Fu-J4, PMD-Fu-J5 and PMD-Fu-J6, were

Constructed by PCR amplification, restriction enzyme digestion and ligation. Viral stocks of rFu-J (rSDAU1005), rFu-J1 (rSDAU1005), rFu-J2 (rSDAU1005), rFu-J3 (rSDAU1005),

RFu-J4 (rSDAU1005) and rFu-J5 (rSDAU1005) were rescued by co-transfeciton of CEF monolayer with a mixture of PMD-SDAU1005 and PMD-Fu-Js plasmids. Those rescued viral stocks mentioned above were inoculated into 1-day-old SPF chickens under their wings to evaluate their ability of tumorigenesis. It was found that, tumors were only developed in chickens inoculated with rFu-J (rSDAU1005) which carrying complete v-*fps* oncogene (2/10). Tumors were collected and passaged in 1-day-old SPF chickens. Tumors grown faster and

V

Faster during passage, and it had a similar growth rate with tumors induced by wild-type virus when passaged to the 4th-generation. IFA and Immunohistochemistry assay were performed to confirm that the tumors were positive to anti-ALV-J antibody and anti-Fps antibody. The study indicated that, only replication-defective virus carrying complete v-*fps* oncogene could induce tumors in chickens.

**3. Isolation of acutely transforming ALV in sarcomas from Hy-Line Brown chickens and identification of v-*src* oncogene in the virus.**

Original sarcoma tissues DNA and tumor suspension infected CEF DNA were used as template for PCR amplification, and proviral genome sequences of" helper virus" ALV-J SDAU1102 and a series of replication-defective viruses SJ-1, SJ-2, SJ-3, SJ-4 and SJ-5 were assembled. Sequence analysis demonstrated that SDAU1102 was an ALV-J strain with a *gp85* gene which had the highest homology with JS09GY6 isolated from layer chickens in China. Therefore, the acutely transforming ALV could be named as" SJ-1 (SDAU1102),"“SJ-2 (SDAU1102),"”SJ-3 (SDAU1102),"“SJ-4 (SDAU1102)" and" SJ-5 (SDAU1102)" according

To the international conventions. SJ-1~5 were replication-defective viruses carrying different lengths of v-*src* oncogenes which had the same 3' *src*-*env* junction site but a heterogenous 5' junction sites. p60v-src prokaryotic recombinant proteins were inducible expressed by Escherichia coli (E. coli.) expression system, and mouse anti-p60v-src mono-specific serum were prepared. Over-expression of p60v-src protein could be detected in viral stocks infected CEF and original tumor tissues by western blot analysis and immunohistochemistry assay using mouse anti-p60v-src mono-specific serum as first antibody. Five different infectious clone plasmids were constructed and transfected with CEF. However, it was found that only PMD-SJ-1 and PMD-SJ-2 could encode p60v-src protein. Isolation of viral stocks of SJ-1~5 (SDAU1005) and identification of v-*src* oncogene paved the way for further research of molecular mechanism of genetic recombination between ALV and cellular genes and acutely tumorigenesis of v-*src* oncogene.

**4. Pathogenicity and tumorigenicity study of Fu-J (SDAU1005) viral stock on SPF chickens.**

VI

Real time fluorescent quantitative PCR methods for ALV-J *gp85* gene and v-*fps* gene quantitation were established. Both two methods were sensitive and specific which established foundation for the research of replication dynamics and pathogenicity and tumorigenicity of Fu-J (SDAU1005) viral stock. Viral stock of Fu-J (SDAU1005) was inoculated into chickens subcutaneously, intraperitoneally and intravenously respectively to observe the pathogenicity and tumorigenicity of the viral stock. The results showed that injection with viral stock could induce acute tumors whatever the inoculation method, and all the tumors were fibrosarcomas. Tumors did not developed intraperitoneally in chickens inoculated with the viral stock subcutaneously, indicating a low metastasis rate of the sarcoma cell. Tumors also did not developed in chickens feeding together with infected chickens, indicating the replication-defective virus could not spread by contact transmission. It could be speculated that vaccination without replacing needles might contribute to the fibrosarcoma prevalence in some flocks. Real time fluorescent quantitative PCR was performed to detect the localization of ALV-J and Fps antigen. The results showed that both helper virus and Fu-J virus were found in largest amounts in tumor tissues, and there was a direct correlation between copy number of helper virus and copy number of Fu-J virus.

**5. Transcriptional profile analysis of the response of CEF to Fu-J (SDAU1005) infection.**

To further explore the molecular mechanism of transformation and tumorigenesis of Fu-J, transcriptional expression profiling response to Fu-J (SDAU1005) infection was investigated in this study. A total of 1253 genes differential expressed post-infection were identified comparing with CEFs infected with purified SDAU1005 (Fold change> 4). Bioinformatics analysis showed that the differentially expressed genes were mainly associated with some functions like cellular process, metabolic process, biological regulation, and localize and developmental process. In addition, those genes were involved in important signaling pathway like neuroactive ligand-receptor interaction, tight junction, metabolic pathways, GnRH signaling pathway, VEGF signaling pathway and Wnt signaling pathway. Transcriptional profile analysis of the response of CEF to Fu-J (SDAU1005) infection

VII

Provided us with a further understanding of molecular mechanism of transformation induced by Fu-J (SDAU1005) carrying complete v-*fps* oncogene.

**6. Research on the inhibitory effect of lamivudine on replication of ALV-J and tumor growth *in vitro* and *in vivo*.**

To study the antiviral effects of lamivudine on ALV-J and its inhibitory effect on the growth of fibrosarcomas caused by acute transforming ALV, a series of experiments were performed in chicken embryo fibroblast cultures and 1-day-old chickens inoculated with an acutely transforming viral stock Fu-J (SDAU1005). The results from 3 different assays, ELISA, Western blot and real-time PCR, in cell cultures demonstrated a significant inhibitory effect of lamivudine on the replication of both SDAU1005 and Fu-J viruses. Furthermore, the effect was dose dependent in the concentration range of 1–4μg/ml. Afterwards, real-time PCR assay was performed to demonstrate that lamivudine could inhibit replication of ALV-J by inhibiting ALV reverse transcriptase activity. In chicken experiments, lamivudine could decrease the viral loads of SDAU1005 and Fu-J in the plasma of inoculated chickens, delay the appearance of acute sarcomas, and decrease chicken mortality in the early stage. In addition, no drug-resistant mutants could be detected in acute subcutaneous sarcomas of chickens administered with a high dose of lamivudine. This study provided a new idea for the prevention and control of ALV in chickens. However, more research and argumentation are needed before its administration in practice.

**Key Words: repl*: replication-defectivevirus; Acutelytransformingalv; V-fps* oncogene; V-*src* oncogene; Infectious clones; Pathogenicity and tumorigenicity; Transcriptional profile; Lamivudine**

VIII

# **1** 前 言

## 1.1 禽白血病病毒（ALV）的研究进展

禽白血病病毒（Avian leukosis virus, ALV）是一种可以感染多种禽类的反转录病毒。家禽感染ALV后可引起多种肿瘤性疾病，如淋巴细胞白血病、成红细胞白血病、成髓细胞白血病、骨髓细胞瘤、纤维瘤和纤维肉瘤、骨细胞瘤、肾母细胞瘤、血管瘤、骨石症等（Payne *et al*., 2012）。此外，被感染鸡群可出现生产性能显著下降、对疫苗的免疫应答水平降低等诸多亚临床症状。虽然全世界大多数养鸡业发达的国家都已经基本消灭和控制了ALV在鸡群中的流行，但是在我国鸡群中，特别是特有地方品系鸡中ALV的感染仍然非常普遍（Cheng *et al*., 2010; Gao *et al*., 2010; Shi *et al*., 2011; Gao *et al*., 2012; Cai *et al*., 2013; Li *et al*., 2013; 2013; Zeng *et al*., 2014; Dong *et al*., 2015），禽白血病已成为危害我国养禽业发展的一种重要疾病。

### 1.1.1 ALV的形态大小和抵抗力

ALV属于反转录病毒科、α反转录病毒属。该群病毒的成员有相似的物理和分子特性，并有共同的群特异性抗原。ALV为二十面体对称、近球形的有囊膜RNA病毒。病毒的化学组成包括60%~65%的蛋白质、30%~35%的脂类、2.2%的RNA以及来源于细胞的少量DNA. ALV对热抵抗力较弱，对外界抵抗力较强，对脂溶剂和去污剂敏感。

### 1.1.2 ALV的抗原分型

根据病毒的宿主范围、病毒间的干扰作用及囊膜蛋白抗原特性，ALV可被分为A~J十个亚群（Hanafusa, 1973; Hanafusa *et al*., 1976; Frisby *et al*., 1979; Troesch *et al*.,1985; Bai *et al*., 1995）。其中，J亚群ALV（Subgroup J ALV, ALV-J）是所有亚群中致病性最强的病毒，它是20世纪90年代从英国的肉用型鸡中分离到的一种新的ALV亚群（Bai *et al*., 1995; Benson *et al*., 1998). 董宣等（2015）对近几年从中国地方品种鸡分离到的几十株

ALV囊膜糖蛋白*gp85*基因序列的同源性比较分析，发现有相当数量的分离株*gp85*基因与A~J亚群同源性在77.7%-82.4%之间，不属于任何已知亚群。这些毒株间*gp85*的同源性在95%以上，而且它们与从日本和台湾地区地方品种鸡分离的一些毒株的同源性也高达95%以上（王鑫等, 2012; Cui *et al*., 2014; Dong X *et al*., 2015）。因此，有理由推测这是东亚地区的地方品种鸡群中长期存在的一个ALV亚群。根据国际命名规则，将其命

1

名为“K亚群ALV”。

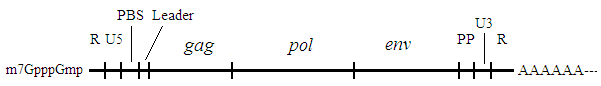
### 1.1.3 ALV的Th长特征

本群中的急性致瘤性ALV在接种11日龄鸡胚绒毛尿囊膜8d后可产生痘斑；接种5-8日龄鸡胚卵黄囊可产生肿瘤（Wang *et al*., 1988）。ALV能够在多种禽类细胞中复制，如鸡胚或者其他禽胚成纤维细胞。急性致瘤性ALV在CEF上生长可形成转化灶，而在细胞上进行培养时，只有ALV-B、D亚群可引起轻度的细胞病变，其他亚群不会引起细胞病变（Morgan *et al*.,1973; Sandelin *et al*.,1974）。

### 1.1.4 ALV的病毒基因组和蛋白

#### 1.1.4.1 慢性转化型ALV的基因组结构

根据病毒致瘤的快慢，该病毒可分为慢性转化型ALV和急性转化型ALV（Rubin, 2011; Vogt, 2012）。经典的ALV为不含致瘤基因的复制型病毒（图1-1）。病毒RNA基因组结构基因5’端至3’端为*gag-pol-env*，分别编码群特异性（gs）的抗原、含反转录酶和整合酶的DNA聚合酶以及囊膜糖蛋白，急性转化型ALV还含有与致瘤转化相关的基因。结构基因两侧为完全一致的LTR序列，该序列包含有与病毒的致瘤、复制和转译等紧密关联的序列。



**图1-1** **反转录病毒的基因组基本结构**

**Fig.** **1-1** **Genome structure of retrovirus**

#### 1.1.4.2 急性转化型ALV的基因组结构

急性致瘤性ALV在感染宿主后可以很快诱发急性肿瘤，这是由于这些病毒携带了某些肿瘤基因（图1-2）。迄今为止，已发现多种肿瘤基因整合进ALV基因组，比如*src*、

*fps*、*yes*、*ros*、*eyk*、*jun*、*qin*、*maf*、*crk*、*erbA*、*erbB*、*sea*、*myb*、*myc*、*ets*、*mil*等（Dalgleish *et al*., 1989），这些肿瘤基因多来自细胞染色体基因组，发挥着与生长调控相关的功能

（Wang *et al*., 1988; Martin, 2011; Martin, 2004; Vogt, 2012; 陈浩等, 2012）。为区分原癌基因和ALV携带的肿瘤基因，分别在病毒性的和细胞性的肿瘤基因前冠以v-和c-前缀来加以区分，如v-*src*和c-*src* （Schwartz *et al*., 1983）。表1-1列出了目前在ALV中发现的肿瘤基因及其编码产物、主要诱发的肿瘤类型和转化细胞的种类。需要指出的是，这

2

些急性致瘤性ALV在获得肿瘤基因的同时，往往会丢失自身复制所必须的基因，因此大部分急性致瘤性ALV为复制缺陷型病毒，它们必须在有复制完整型ALV共同存在的情况下方可复制、感染宿主细胞（Dutta *et al*., 1989）。我们将共同存在的复制完整型ALV称为“辅助病毒”。

**表1-1** **携带不同肿瘤基因的急性致肿瘤ALV及其诱发的肿瘤类型**

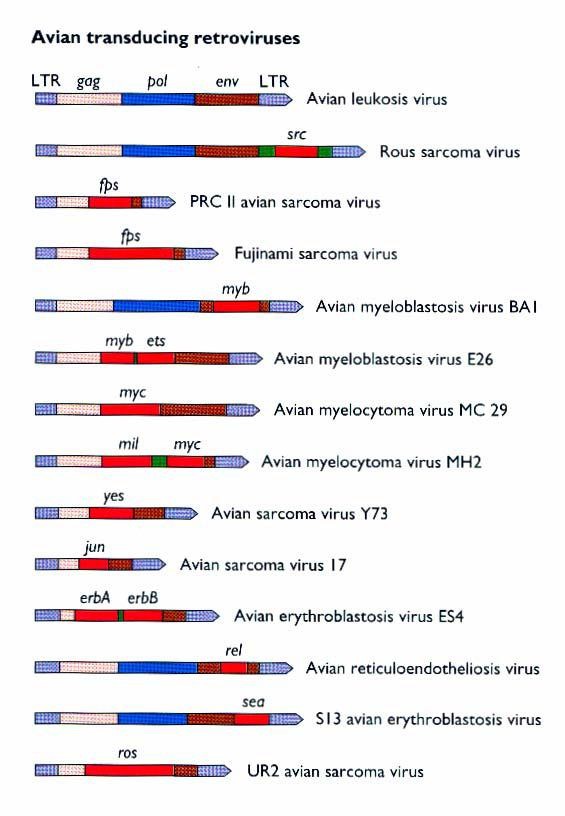
Table 1-1 Acutely transforming ALV carrying different oncogenes and tumor type

| 毒株名称 | 肿瘤基因 | 基因产物 | 主要肿瘤类型 | 体外转化的细胞 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| RSV，B77，S1，S2 | src | Nr ptk | 肉瘤 | 成纤维细胞 |
| FuSV, UR1,  PCR II,PCR IV | fps | Nr ptk | 肉瘤 | 成纤维细胞 |
| Y73, ESV | yes | Nr ptk | 肉瘤 | 成纤维细胞 |
| UR2 | ros | R ptk | 肉瘤 | 成纤维细胞 |
| RPL30 | eyk | R ptk | 肉瘤 | 成纤维细胞 |
| ASV-17 | jun | Tf | 肉瘤 | 成纤维细胞 |
| ASV-31 | qin | Tf | 肉瘤 | 成纤维细胞 |
| AS42 | mat | Tf | 肉瘤 | 成纤维细胞 |
| ASV-1 | crk | Ap | 肉瘤 | 成纤维细胞 |
| AEV-ES4 | ErbA, erbB | Tf, R ptk | 成红细胞增生症，肉瘤 | 成红细胞，成纤维细胞 |
| AEV-R | ErbA, erbB | Tf, R ptk | 成红细胞增生症 | 成红细胞 |
| AEV-H | erbB | R ptk | 成红细胞增生症，肉瘤 | 成红细胞，成纤维细胞 |
| S13 | sea | R ptk | 成红细胞增生症，肉瘤 | 成红细胞，成纤维细胞 |
| E26 | myb,ets | Tf | 成髓细胞增生症，成红细胞增生症 | 成纤维细胞，成红细胞 |
| AMV | myb | Tf | 成髓细胞增生症 | 成髓细胞 |
| MC29 | myc | Tf | 髓细胞瘤，成红细胞增生症 | 未成熟巨噬细胞，成纤维细胞 |
| CMII | myc | Tf | 髓细胞瘤 | 未成熟巨噬细胞，成纤维细胞 |
| 966 ALV-J | myc | Tf | 髓细胞瘤 | 未成熟巨噬细胞， |
| OK10 | myc | Tf | 内皮细胞瘤 | 未成熟巨噬细胞，成纤维细胞 |
| MH2 | myc,mil | Tf, S/tk | 内皮细胞瘤 | 未成熟巨噬细胞，成纤维细胞 |

Note: Revised from *Diseases of Poultry* (13th edition)

Nr ptk: Non-receptor protein tyrosine kinase; R ptk: Receptor protein tyrosine kinase; Tf: Transcription factor.

3



**图1-2** **部分鸡急性致瘤性ALV基因组结构示意图（*The Biology of Cancer*, Garland Science）**

**Fig.** **1-2** **Diagram of genomic structures of acutely transforming ALV(*The Biology of Cancer*, Garland Science)**

#### 1.1.4.3 急性致瘤性ALV的产Th

通过“转导（transduction）”的方式获得宿主的原癌基因是大多数反转录病毒共有的特点（Arshad *et al*., 1997; Payne *et al*., 1993）。作为一种反转录病毒，ALV在感染鸡后，其前病毒DNA可插入、整合到宿主基因组中，随宿主细胞基因组的复制而复制（Chesters *et al*., 2011）。研究表明，前病毒基因组的插入位点有一定嗜好，宿主原癌基因（c-onc）以及一些宿主生长调控基因的上游是前病毒DNA插入的高频位点（Li *et al*., 2014; Justice *et al*., 2015a; Justice *et al*., 2015b）。ALV通过“启动子插入”和“增强子激活”两种方式持续促进宿主原癌基因的表达，从而诱发细胞转化和肿瘤形成（Neel *et al*., 1981; Kanter *et al*., 1988）。在这个过程中，有一部分前病毒DNA在转录病毒mRNA或子代病毒vRNA时，通过基因重组的方式产生了携带原癌基因的缺陷型病毒（图1-3）。一般认为，5’端重组位点的形成是前病毒DNA与宿主肿瘤基因发生重组的结果，这是以DNA-DNA的作用形式发生的；3’端重组位点的形成是由ALV 和肿瘤基因组成的杂合

mRNA与辅助病毒RNA之间重组的结果，这是以RNA-RNA的作用形式发生的，两次重组之后最终产生了携带肿瘤基因的缺陷型病毒基因组（Martin, 2004; Rubin, 2011）。

4



**图1-3 急性致瘤性ALV产生示意图（Vogt, P. K., 2012）**

**Fig.** **1-3** **Diagram of formation of acutely transforming ALV(Vogt, P. K., 2012)**

#### 1.1.4.4 ALV的病毒蛋白

目前，研究人员对组成ALV的蛋白特性、位置和合成已进行了深入研究。根据结构和功能，ALV的蛋白可以分为核心蛋白、酶蛋白和囊膜蛋白三类（图1-4）。



**图1-4 禽反转录病毒粒子模式图（*Principles of Virology*, ASM Press）Fig. 1-4 Diagram of avian retrovirus particle (*Principles of Virology*, ASM Press)**

核心蛋白（Gag）：即病毒的非糖类结构蛋白。这些非糖类结构蛋白的氨基酸序列在同属内病毒间比较保守，具有相似的抗原性。Gag蛋白初始产物通常是一个大的蛋白前体，然后在病毒蛋白酶的作用下，加工成几种成熟的蛋白质。

酶蛋白（Pol）：反转录病毒的酶蛋白包含蛋白酶、反转录酶、整合酶三种。在ALV中，蛋白酶来自于一种大前体蛋白Pr180（180kD，*gag-pol*基因的翻译产物）经裂解后变成的多聚蛋白前体Pr76。大前体蛋白中*pol*基因部分，再经蛋白酶作用后氨基端形成反转录酶（RT），羧基端形成整合酶（IN）。

囊膜蛋白（Env）：该蛋白由两条肽链组成，较小的一条贯穿病毒囊膜，称为跨膜蛋

5

白；较大的一条链通过二硫键和氢键与前者相连，暴露于囊膜外，称为表面蛋白。二者均来自*env*基因编码的前体蛋白Pr92。表面蛋白（SU, gp85）具有受体结合功能，它还是诱导宿主产生中和抗体的蛋白。SU极易变异，反录病毒抗原的高度变异性主要体现在这一蛋白质上。穿膜蛋白（TM, gp37）参与感染过程中病毒与宿主细胞膜融合。

### 1.1.5 ALV的遗传变异和重组

#### 1.1.5.1 ALV基因组的变异和进化

(1) ALV-J *gp85*基因的变异与进化

ALV 是最易发生突变的病毒之一，其中ALV-J 囊膜蛋白*gp85*基因的变异性更强

（Venugopal *et al*., 1997; Cui *et al*., 2003; Zhang *et al*., 2003; Wang *et al*., 2005; Wang *et al*., 2006; Pan *et al*., 2011; Pan *et al*, 2012; Jiang *et al*., 2014）。ALV-J不同毒株间*gp85*差异很大，即使同一株病毒或同一分离物内的准种也有很大的多样性（朱静，2013； 毛亚卿等,

2013）。崔治中（2016）将过去25年里国内外147个代表毒株的*gp85*序列，利用现代病毒分子流行病学技术，比较分析了ALV-J的准种多样性及其在不同选择压作用下的演变。结果发现，ALV-J的*gp85*范围发生了很大变异，但这种变异并不是越来越偏离原型毒HPRS-103，而是在一定的范围内多方向变异。但其变异的程度在逐渐而缓慢地增大，它们相互间的偏离程度比对原始毒的偏离程度要大。分析还发现，大多数毒株*gp85*在遗传系谱发生树中的分布与毒株来源鸡的类型有一定关系。除了少数毒株列外，来自同一类型鸡的毒株，往往都集中分布在一个区域。这似乎表明，在对ALV-J的*gp85*序列做比较分析时，遗传系谱分析比数字化的同源性程度比较表更能代表毒株间的遗传演变关系。ALV的*gp85*囊膜基因的高频突变率使ALV具有了跨种传播的潜力。申艳玮等

（2016）将ALV-J顺次感染易感宿主禽（鸡、火鸡），然后过渡到抗性宿主禽（ft鸡、鹌鹑和鸭），实现了对抗性宿主ft鸡和鹌鹑的感染，但鸭未感染。通过有义突变与沉默突变比值分析，发现hr2区突变是实现跨种传播的关键区域（Shen *et al*., 2014）。

(2)中国鸡群中ALV基因组3’末端序列的多样性及其演变

由于基因组RNA的二聚体结构和反转录酶活性作用，反转录病毒通常有很高的突变频率。1999-2005年期间从我国白羽肉鸡分离到许多株ALV-J，它们间的*gp85*有较大的差异，对它们的LTR的分析表明，虽然在LTR的一些区域也有许多变异，但都在“E”位点有一个共同的127bp的缺失性突变（Wang *et al*., 2006）。而且，这一缺失性突变与

6

美国在1995年分离到的ALV-J的“4817”株完全相同。由于大片段的缺失性突变一旦发生后相对稳定，可以作为一种遗传标志。这一结果是与这期间及此前多年中我国白羽肉鸡种鸡主要从美国进口这一事实相符。近年来在中国蛋鸡群中ALV-J发病严重，对2008年以来ALV-J蛋鸡分离株的3′非编码区分析表明，89.5%的ALV-J蛋鸡分离株的3′UTR出现了205bp的缺失，94.7%的ALV-J蛋鸡分离株保留了完整的E元件，出现了不同于肉鸡分离株的特征（高玉龙等，2012）。进一步研究表明，缺失205bp的ALV-J在鸡血管内皮细胞上的复制效率与致病能力显著高于完整病毒，这表明ALV-J的3’末端非编码序列在病毒致病中发挥了一定作用（Wang *et al*., 2012）。

#### 1.1.5.2 ALV基因组的重组

ALV重组能够发生在外源性病毒之间，外源性病毒和内源性病毒之间以及外源性病毒和非同源的细胞基因组之间。目前研究认为，ALV-J来自某个外源型ALV与内源性病毒（ev/J）的重组产物（Bai *et al*., 1995; Benson *et al*., 1998; Venugopal *et al*., 1998）。近几年发生在不同亚群ALV间的重组事件不断被报道。Silva等（2007）报道了在美国几种马立克氏病疫苗中分离到的外源性ALV-A毒株，该病毒是含有ALV-A的*gp85*基因和内源性病毒成分的重组病毒。Cai等（2013）在中国感染鸡群中分离到一株重组的ALV毒株，测序发现，它是由ALV-C的*gp85*基因、ALV-E的*gp37*基因和ALV-J的LTR重组而成的。张青禅（2010）在中国地方品系鸡中分离到一株ALV-A毒株SDAU09E1，发现LTR区域携带了部分ALV-E序列成分。这些发生在不同亚群禽白血病病毒之间的重组可能会引起病毒的变异，尤其是带有内源性LTR的重组外源性病毒，它可诱导低水平的p27抗原表达，从而使感染重组外源性病毒的鸡逃逸检测而造成广泛传播。

### 1.1.6 ALV的复制和Th活史

#### 1.1.6.1 经典ALV的复制

与其它反转录病毒一样，在ALV的生活史中，都需要“反转录”这一过程。具体而言，经典的慢性致瘤性ALV的复制主要过程为：病毒吸附进入宿主细胞、前病毒cDNA的形成及整合、病毒RNA的转录和蛋白质的转译、病毒粒子的释放（图1-5）。

ALV病毒粒子吸附到细胞膜上是一个非特异过程，但不同亚群ALV需要结合细胞膜上的特异性受体蛋白（Zingler *et al*., 1995; Chan *et al*., 1996; Adkins *et al*., 1997; Snitkovsky *et al*., 2000; Tonelli *et al*., 2001; Wang *et al*., 2001; Chai and Bates, 2006; Mei *et*

7

*al*., 2015）。ALV-A的细胞膜上的受体为TVA，是一种低密度脂蛋白。ALV-B/D/E的细胞受体称为TVBs3和TVBs1，它们属于肿瘤坏死因子超家族蛋白。ALV-J的细胞受体则是chNHE1和chANXA2. ALV进入宿主细胞后，其正链单股RNA基因组在病毒粒子的反转录酶的作用下反转录为cDNA，在病毒的整合酶的作用下整合进细胞染色体基因组的某个位点。新的病毒基因组RNA将从整合进细胞基因组上的前病毒DNA序列转录产生。病毒RNA分子产生后，其可作为mRNA与聚核糖体相结合，转译产生各种病毒蛋白质，也可作为新形成的病毒子的基因组RNA。与聚核糖体结合的mRNA，被翻译形成衣壳蛋白、反转录酶和整合酶、以及囊膜蛋白，集聚于细胞质膜上组装成为新的病毒粒子，并以出芽的方式从细胞释放出去。



**图1-5** **反转录病毒的生活周期**

**Fig.** **1-5** **Life cycle of retrovirus**

#### 1.1.6.2 复制缺陷型ALV的复制

由于大部分急性致瘤性ALV在获得肿瘤基因的同时，丢失了其复制所必须的基因，因此它们无法单独形成完整的病毒粒子，不能在任何细胞上单独生长复制。只有当与作为“辅助病毒”的复制完整型ALV共同存在时，才能复制并形成病毒粒子。这时，缺陷型病毒的基因组被辅助病毒形成的所有病毒蛋白及病毒外壳所包装，随同辅助病毒释

8

放到细胞外并识别和感染新的宿主细胞。在感染的细胞中，它们的基因组有可能复制出前病毒DNA并整合进细胞基因组，也可再转录产生新的缺陷性病毒基因组RNA，但仍然不能独立形成有传染性的病毒粒子。此外，还有少数急性致瘤性ALV本身就是一种非复制缺陷型病毒，比如某些RSV毒株，这些毒株携带的v-*src*基因位于ALV *env*基因的下游，可独立转录表达Src蛋白。因此，它们单独感染易感细胞后能独立自我复制。

### 1.1.7 ALV的致病性

ALV对鸡群的致病性主要表现为两个方面：第一是ALV诱发肿瘤导致死亡，其死亡率通常为1-2%左右，但偶而也可达到20%甚至更高；其次是ALV感染所诱发的生产性能下降、对免疫疫苗的应答水平降低等亚临床症状。其致病的严重程度既决定于不同毒株的致病性，还与宿主遗传易感性和许多其它因素如传播途径和剂量相关。根据侵害细胞及造成病变的不同，ALV可诱发的肿瘤性疾病主要包括：淋巴细胞白血病、骨髓细胞瘤、纤维肉瘤、粘液瘤、血管瘤、血管肉瘤、内皮瘤等实质器官上的肿瘤结节。

### 1.1.8 ALV的致病和致瘤机制

#### 1.1.8.1 慢性致瘤性ALV的致病和致瘤机制

ALV具有转化宿主细胞的能力，急性转化型和慢性转化型病毒转化细胞的机制不同。慢性转化型ALV基因组中不含有致瘤基因，它们致肿瘤是通过LTR插入，间接启动宿主染色体基因组中原癌基因的转录（Hayward *et al*., 1981; Sourvinos *et al*., 2000; Ka *et al*., 2009）。细胞的原癌基因被LTR中的启动子或增强子激活，导致细胞肿瘤基因的异常表达而形成肿瘤，这个过程中LTR的U3区及env蛋白对于肿瘤的类型和发生具有重要的影响和作用。通常，ALV-A/B插入激活*c-myc*或*c-myb*基因而引起B淋巴细胞肿瘤，ALV-J通过激活*c-myc*基因诱发髓细胞瘤。研究表明，不同亚群ALV插入宿主基因组的位点有着不同偏好。ALV-J更倾向于插入到MYC、TERT和ZIC1基因之前；除了

MYC、MYB、Mir-155和TERT基因外，ALV-A/B更倾向于插入到宿主的TNFRSF1A、

MEF2C、CTDSPL、TAB2、RUNX1、MLL5、CXorf57和BACH2基因的上游，这些基因与淋巴细胞瘤的发生发展具有重要关系。

最近，很多研究者从不同角度揭示了ALV的致病机制。冯少珍等（2011）证实，

PI3K/Akt信号转导通路在ALV-J的感染中被激活，PI3K/Akt的激活降低了宿主细胞的自噬反应活性，利于病毒的复制和释放。Fan 等（2012）对感染ALV-J的DF1蛋白

9

质组进行了解析，为进一步研究其致病机制奠定了基础。

#### 1.1.8.2 miRNA在ALV致病和致瘤中的作用

MicroRNAs（miRNAs）是真核生物中一类内源性的、具有调控功能的非编码RNA，其大小长约20~25个nt。成熟的miRNAs被组装进RNA诱导的沉默复合体（RNA-induced silencing complex, RISC），通过碱基互补配对的方式识别靶mRNA，并根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶mRNA或者阻遏靶mRNA的翻译。miRNA参与了包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等多种调控活动。最近的研究表明，miRNA在ALV的致病中同样发挥了重要作用。

ALV感染诱发了宿主*bic*基因，即miR-155的过量表达，miR-155与*c-myc*基因共同促进B淋巴细胞瘤的发生发展（Tam *et al*., 1997; Tam *et al*., 2002）。Wang等（2013）使用miRNA芯片检测感染ALV-J的10周龄SPF鸡的肝脏组织，发现有12个miRNAs表达显著上调，另外有5个miRNAs则表现为下调。目前，已有多个宿主来源的miRNA功能被解析。例如，gga-miR-221和gga-miR-222通过促进细胞增殖、迁移，抑制细胞凋亡促进ALV-J诱发肿瘤的发展（Dai *et al*., 2015）；gga-miR-375能够靶向调控肿瘤基因YAP1，作为抑癌基因发挥作用。在ALV感染过程中，宿主gga-miR-375表达下调，客观上促进了ALV-J诱发肿瘤的发展（Li *et al*., 2014）。宿主来源的microRNA不仅参与了肿瘤的发生发展过程，还参与了与病毒的相互作用。有研究表明，宿主microRNA-23b可以通过靶向IRF1促进ALV-J的复制。gga-miR-1650可以通过与ALV-J的5' UTR相互作用，降低Gag蛋白的表达，抑制ALV-J的复制（Wang *et al*., 2014）。ALV-J感染鸡骨髓树突状细胞后，可以通过改变与细胞代谢调控相关的miRNA表达，从而影响细胞分化、导致细胞凋亡（Liu *et al*., 2016）。研究还发现，ALV-J的E区可通过经典途径编码

miRNA，由于5’UTR的E区对某些品系鸡的致瘤是必需的，这暗示ALV-J编码的miRNA

在病毒致瘤中可能发挥重要作用（Yao *et al*., 2014）。

#### 1.1.8.3 急性致瘤性ALV的致病和致瘤机制

急性转化性ALV携带了不同的肿瘤基因，它们可能在长期的进化过程中通过重组从正常细胞的基因组获得，正常调控过程不能控制其转录与表达（Swanstrom *et al*., 1983; Sugden., 1993; Weiss *et al*., 2011）。肿瘤基因产物的大量表达引起细胞的肿瘤性转化。例如MC29、CM和OK10株携带有*myc*肿瘤基因，编码转录因子，诱导骨髓单核细胞肿

10

瘤；AMV BAI-A株病毒带有*myb*，编码转录调控子，诱导成髓细胞和前髓细胞肿瘤；禽成红细胞性白血病病毒（AEV）的H株带有*erbB*，基因产物为表皮生长因子受体，诱导成红细胞性白血病；AEV的ES4株带有*erbA*和*erbB*, AMV的E26株带有*myb*和*ets*，这两个基因编码转录因子（Martin, 2001; Vogt, 2012）。下面详细介绍携带v-*src*肿瘤基因的RSV和携带v-*fps*肿瘤基因的FSV。

**Rous肉瘤病毒（RSV）**1910年，Rous用鸡肉瘤无细胞滤液接种鸡引起了肉瘤，从而发现Rous肉瘤病毒（Rous *et al*., 1910），该病毒携带v-*src*肿瘤基因。研究表明，早期的RSV毒株为复制缺陷型病毒，如BH-RSV株、RSV-29株（Steck and Rubin, 1966; Rubin, 2011）。然而，随着病毒的传代，逐渐获得一种复制完整型的RSV，其携带的v-s*rc*基因插入到*env*基因下游，独立表达pp60src的磷蛋白，这也是已知的唯一携带有病毒肿瘤基因的完整型病毒，其代表株为Prague、Schmidt-Ruppin株等（Schwartz *et al*., 1983; Barnier *et al*., 1989）。1976年Bishop等在鸡正常细胞中发现了有与v-*src*同源的癌基因，写作c-*src*以示区别，这是首次在正常细胞中发现的具有转化潜能的基因。

Schmidt-Ruppin株基因组中v-*src*基因全长为1581bp，编码独立的大小约60 kDa的蛋白，它可作为蛋白激酶可以使酪氨酸发生磷酸化。C-*src*编码的Src蛋白是非受体型蛋白酪氨酸激酶Src家族的代表（Anand *et al*., 1993; Chen *et al*., 1994; Jove *et al*., 2000; Schlessinger, 2000），是重要的信号转导分子，可经由生长因子受体、G蛋白受体以及粘附分子受体而活化。Src蛋白含有SH2区、SH3区、激酶区和调节区，通过第2位肉豆蔻酸化的Gly与细胞膜内面相连（Cross *et al*., 1984）。Tyr530为PTK活性调节位点。对鸡Src研究表明，在未受刺激的细胞中，Tyr527处于磷酸化状态，磷酸化的Tyr527 与

Src蛋白SH2区域结合，掩蔽了催化区，故PTK活性很低（Liu *et al*., 1993）。Src蛋白作为细胞内信号转导过程中的重要一员，在细胞生长、增殖、分化、运动和凋亡等生理过程中起着重要作用（Schlessinger, 2000; Sudol *et al*., 2011）。

同c-*src*的编码产物相比，v-*src*基因编码的Src肿瘤蛋白存在Tyr527的缺失或突变

（Cooper *et al*., 1986; Sefton *et al*., 1986）。在正常的Src蛋白中，处于磷酸化状态的Tyr527发挥对蛋白功能的负调控作用，缺失了Tyr527的Src肿瘤蛋白则处于持续的活化状态，具有极高的PTK活性（Anderson *et al*., 1985; Cooper *et al*., 1986; Brott *et al*., 1991）。已有研究表明，将宿主Src蛋白的Tyr527以Phe替换，所形成的突变体在细胞整个周期过程

11

中，均具有很高的PTK活性（Kmiecik *et al*., 1987）。处于持续活化状态的Src肿瘤蛋白磷酸化细胞底物，最终引起细胞不受控的生长，造成细胞的转化和癌变。

在很多人类肿瘤中，同样存在Src蛋白的异常表达。目前发现，某些结肠癌中Src酪氨酸激酶活性升高，晚期结肠癌病例中，有12％的病例显示存在有Src密码子531处截短的Src突变体，并且证实这种突变体具有激酶活性，具有转化作用和转移促进作用

（Wong *et al*., 1999）。此外，在皮肤癌和乳腺癌中Src的酪氨酸激酶活性也明显升高。

**Fujinami肉瘤病毒（FSV）**1913年，Fujinami肉瘤病毒（FSV）首先在日本被分离，起初认为它和RSV是同一病毒的不同毒株，但直到上世纪80年代，研究人员通过核酸杂交才确定FSV携带了不同于v-*src*的肿瘤基因，并将其命名为v-*fps*基因（Hanafusa *et al*., 1980; Lee *et al*., 1980）。现已分离到的携带v-*fps*肿瘤基因的病毒还有PRC II、PRC

VI、UR1和16L等（Breitman *et al*., 1981; Vogt *et al*., 1981; Wang *et al*., 1981; Neel *et al*., 1982; Carlberg *et al*., 1984），所有病毒均为复制缺陷型病毒。目前，FSV的前病毒基因组和PRC II的部分序列已得到解析（Shibuya *et al*., 1982; Huang *et al*., 1984）。FSV基因组全长4463bp，携带2622bp 的v-*fps*致瘤基因，编码130KD的Gag-fps融合蛋白（Shibuya *et al*., 1982）。与Fujinami病毒相比，PRCII的细胞转化效率和致肿瘤能力均较低，这可能与它所携带的v-*fps*肿瘤基因缺失了1020bp的碱基有关(Lee *et al*., 1980; Guyden and Martin, 1982; Duesberg *et al*., 1983). FSV和PRC II与携带v-*fes*肿瘤基因的猫白血病病毒具有高度的序列同源性（Barbacid *et al*., 1981; Shibuya *et al*., 1982）。

哺乳动物c-*fes*基因编码92kDa的蛋白，禽类c-*fps*基因编码98kDa的蛋白（Young *et al*., 1984; Pfaff *et al*., 1985; Weinmaster *et al*., 1986）。Fes蛋白含有一个酪氨酸激酶区、一个SH2区和F-Bar结构域，其中SH2区对Fes的酪氨酸激酶活性发挥重要的调控作用。禽Fps蛋白临近SH2区的N-端区含有决定亚细胞定位的250个氨基酸，有一个潜在的肉豆蔻酸化位点。人的Fes蛋白主要存在于胞浆、胞核，部分与胞膜结合，禽Fps蛋白主要存在于胞浆。该蛋白在未分化的髓系造血细胞以及髓系白血病细胞中高表达。

Fps/Fes为胞浆内蛋白酪氨酸激酶，具有自身酪氨酸磷酸化活性。其在未成熟造血细胞中表达的特点提示可能参与造血细胞的增生与分化（Huang *et al*., 1985; Greer *et al*., 1990）。将人的*fes*基因导入髓系造血细胞也可诱导其分化（Yu *et al*., 1989）。Fes-/-小鼠表现淋巴系及髓系造血障碍，伴随先天免疫缺陷和STAT异常活化，且*fes*缺陷所致的

12

细胞因子反应增高可引起异常粒细胞增殖及巨噬细胞系功能缺陷（Hackenmiller *et al*., 2000）。v-*fps*肿瘤基因与c-*fps*原癌基因的主要差别在于：v-*fps*肿瘤基因编码的是Gag-fps融合蛋白（Foster *et al*., 1983）。N-端发生Gag替换足以活化Fes/Fps蛋白的转化活性，在大多数v-*fps*中发生的散在突变也可活化其癌基因活性（Foster *et al*., 1985; Cheng *et al*.，

1999）。研究表明，缺失*fps*-3′ 端激酶活性区的毒株失去转化能力；缺失中间部分的毒株仍然保持着细胞转化和致肿瘤能力，只是效率比野毒感染低10倍；而5′端大段缺失的毒株则完全失去肿瘤形成能力（Ariizumi and Shibuya, 1985）。v-*fps*编码的Gag-fps肿瘤蛋白作为一种非受体酪氨酸激酶可以结合多种宿主细胞蛋白并将其磷酸化，例如SHC (McGlade *et al*., 1992)、rasGAP (Ellis *et al*., 1990)、PI3K (Fukui *et al*., 1991)、PDGF-beta受体（Anderson and Ismail, 1998）等，激活下游信号通路，最终引起细胞的转化和癌变。

### 1.1.9 ALV的流行病学和流行特点

鸡是本群病毒的自然宿主，但不同品种鸡对病毒感染和肿瘤发生的抵抗力相差很大。我国学者报道从东北地区的一些野鸟中检测到ALV，其流行病学意义还有待阐明（李德龙等, 2013;杨波等, 2013; Li *et al*., 2013; Hao *et al*., 2014; Jiang *et al*., 2014; Zeng *et al*., 2014; Han *et al*., 2015）。在人工接种的条件下，有些ALV毒株呈现出较广的宿主范围，在接种非常年幼动物或在诱导免疫抑制的动物连续传代后，一些ALV甚至能在一些特别的宿主适应并复制。最近我国学者也报道，人工接种ALV-J可感染ft鸡和鹌鹑并在体内复制，感染的ft鸡会诱发淋巴细胞瘤，其具体的机制有待进一步验证（李建亮，2015）。

外源性禽白血病有两种传播方式：垂直传播和水平传播。ALV对外界的抵抗力较低，横向传播的能力较其它病毒也相对弱许多。雏鸡在2周龄以内感染ALV，发病率和感染率很高，4-8周龄雏鸡感染后发病率和死亡率则大大降低。垂直传播在流行病学上非常重要，它是主要的传播方式，决定了感染的延续性、持续性。发生病毒血症的母鸡产出的鸡蛋常带毒，孵出的雏鸡也带毒。这种先天性感染的雏鸡常有免疫耐受现象，它不产生抗肿瘤病毒抗体，长期带毒排毒，是重要传染源。

### 1.1.10 ALV的检测和诊断

#### 1.1.10.1 病毒分离和鉴定

病毒分离最常用的样品为全血、血浆、血清、组织、泄殖腔和阴道拭子、肿瘤病灶、蛋清和鸡胚等。病料研磨并经0.24μm滤器过滤后，接种CEF或者DF-1细胞系，通过

13

抵抗力诱导因子试验（RIF）、补体结合试验、非产毒细胞激活试验（NP）、表型混合试验（PM）等方法进行病毒的分离鉴定。Qin等（2001）制备获得了四株ALV-J单克隆抗体，这四株单抗特异针对J亚群囊膜糖蛋白，可以从其它亚群中特异性识别J亚群病毒，在用于ALV-J的分离鉴定方面具有十分重要的意义。

#### 1.1.10.2 血清学检测

目前，市场上已有用于多种检测ALV-A/B抗体和ALV-J抗体的ELISA试剂盒出售，并被广泛应用于ALV的血清学流行病学调查（郭慧君等， 2010）。但是，有些生产批号的试剂盒有时也会产生一些假阳性反应，这与市场上供应的有些批次的ALV抗体

ELISA 检测试剂盒出现假阳性反应相关。研究人员系统比较研究了检测鸡血清抗体的

ELISA和IFA的相关性（段伦涛等, 2014； 李薛等， 2012）。研究表明，ELISA检测鸡血清中ALV-A/B抗体的S/P值与IFA检测ALV-A/B的血清效价之间具有显著相关性。这为在必要的情况下利用IFA来代替ELISA提供了科学依据，特别是当待检血清样品数量较少时或对特定厂商特定批次的试剂盒的质量有疑问时（崔治中，2015）。

#### 1.1.10.3 病毒基因检测

Smith等（1998）对于不同针对ALV-J的检测方法在自然发病样品及试验发病样品中的特异性和敏感性进行了研究，PCR方法比常规的诊断试验更加快速、特异并且敏感。

Zavala等（2002）以试验性感染ALV-J的羽髓DNA为模板，设计了一对可以从前病毒序列中扩增2.1kb的长片段的引物用来检测ALV-J前病毒。除了对于ALV-J基于PCR反应的定性反应，Kim等（2002）对于ALV-J的定量RT-PCR进行了探索。此外，还有包括多重PCR、LAMP、SYBR Green荧光定量PCR、竞争ELISA、基因芯片等诸多方法应用于ALV的基因检测（Silva *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2010; Sun *et al*., 2011; Zhou *et al*., 2011; 王莉等, 2013; Dai *et al*., 2015; Peng *et al*., 2015; Qian *et al*., 2015;苏霞等 ,

2015）。崔治中等（2011）研制了RT-PCR加特异性核酸探针斑点杂交检测外源性ALV的方法和相关的试剂盒。其基本做法是，在提取病料组织样品的RNA后作RT-PCR，对其产物再分别用四种不同特异性的U3核酸探针作交叉分子杂交反应。斑点分子杂交可在24h内完成检测并报告结果。初步研究证明，该法不仅可用于直接检测病料样品或疫苗中的外源性ALV，它也可用做核心鸡群净化ALV时对病毒分离法的补充。

14

### 1.1.11 ALV的防控措施

#### 1.1.11.1 免疫接种

目前，市场上并没有有效的ALV疫苗应用于商业生产。早在二十年前，欧美国家就有学者对ALV疫苗进行研究，但没有成功。随着ALV在商业化鸡群被基本净化，ALV疫苗研究暂时搁置（Zander *et al*., 1975）。最近，我国学者的研究表明，在使用合适佐剂的基础上，灭活疫苗可以对某些特定的亚群起到一定保护作用（窦文文等, 2013；Li *et al*.，

2013; 聂杰等, 2014；Zhang *et al*., 2014; Xu *et al*., 2015; Hou *et al*., 2016）。特别是，免疫灭活疫苗的种鸡母源抗体能转移到种蛋卵黄中，由此提供的母源抗体可为雏鸡提供一定的保护作用，有助于预防或减少横向感染。但需要强调的是，不应该对疫苗免疫效果的期待值太高，疫苗只能作为核心种鸡群净化的一种辅助手段。

#### 1.1.11.2 药物应用

对已发生鸡白血病的病鸡或感染的鸡群，药物治疗是没有意义的。但是，对于有待净化的原种鸡场来说，特别是ALV感染严重且正处在净化初期阶段的原种鸡场来说，可考虑对雏鸡群选用适当的抗白血病毒药物，用以减少病毒在雏鸡群中的横向传播

（Chen *et al*., 2007; Qian *et al*., 2014; Wei *et al*., 2015）。张在平等（2011）根据ALV的*pol*基因序列设计合成5对shRNA序列，构建siRNA表达重组质粒并转染DF-1细胞，有3种siRNA在mRNA水平对ALV-J的抑制率可达29 %~ 86 %；张莉等（2013）研究表明，笃斯越桔花色苷能够抑制ALV-A感染DF-1细胞；Qian K等（2014）研究表明，Genistein可以通过抑制ALV-J的转录和释放，抑制ALV-J在DF-1细胞上的复制。但这些药物大部分仅仅停留在体外细胞的研究水平，在临床实际应用效果有待进一步验证。由于白血病毒是一类反禽转录病毒，可以参照用于治疗人的艾滋病的抗病毒药物，这些药物具有抗反转录酶或抗蛋白酶活性从而发挥其抑制反转录病毒复制作用。在ALV感染的核心种鸡群，合理的使用这类药物有可能提高每一世代的净化效率从而缩短净化的周期。

#### 1.1.11.3 抗病育种

随着分子遗传学的发展，遗传抗病性成为畜牧生产中防控传染病的新的有效途径。特别是近年来，强毒株不断出现、疫苗免疫失败、抗生素残留等问题日益引起人们的关注，筛选培育抗病品种逐渐成为畜禽养殖业的未来发展趋势。充分利用不同品系鸡资源，发现与抗病性状、免疫关联密切的基因和位点，是抗病育种的关键内容。国外有研究证

15

实，编码对外源性ALV感染的细胞易感性和抵抗力的等位基因频率，在不同品系鸡群中差异很大（Crittenden *et al*., 1969; Motta *et al*., 1973）。无内源性ALV商品鸡系的成功建立也表明，培育抗病鸡群是一种切实可行的ALV防控措施（Bacon *et al*., 2004; Zhang *et al*., 2008）。中国养禽业历史悠久，资源丰富，具有世界独有的品种基因库。但迄今为止，关于不同地方品系鸡对ALV遗传抗性的系统研究相对较少。曾有报道，tvar5 和tvar6的突变使得中国某地方品系鸡获得了对ALV-A的遗传抵抗力（Chen *et al*., 2015）。

#### 1.1.11.4 净化措施

目前，净化是防控ALV最为有效最为彻底的方法。对于核心种鸡群，国际上的跨国育种企业对ALV的系统净化总结出一套血浆分离病毒与胎粪棉拭子检测ALV-P27相结合的淘汰外源ALV感染鸡群的最可靠方法。将每只核心鸡群的种鸡血浆无菌采集后接种于DF-1细胞，1d后换液，继续培养该细胞9d后收集细胞上清液，使用检测ALV-P27抗原的ELISA试剂盒检测有无外源性ALV的感染。近年来，随着我国的各科研团队对

ALV的深入研究，提出建议从以下方面改进其检测技术：①采用特异性抗体通过IFA方式检测ALV分离培养后的DF-1细胞；②选择最灵敏的ALV特异性抗原p27检测试剂盒；③RT-PCR结合特异性的核酸探针进行分子斑点杂交试验，对外源性ALV直接从血浆中检测（崔治中，2015a； 崔治中，2015b）。为了避免使用可能被ALV所污染的活疫苗，通常还应该严格的进行疫苗中ALV的检测（Zhao *et al*., 2014）。根据有无各亚群ALV抗体的产生来排除污染疫苗所进行的鸡体检查法；根据疫苗接种DF-1细胞传代1-2次，培养14d后，检测细胞上清中ALV-P27抗原或用IFA检测接种培养后的细胞；根据RT-PCR结合分子斑点杂交直接从疫苗检测外源性ALV等。另外，蚊蝇在内的某些昆虫对于水平传播较弱的ALV也可能起到传染疾病的作用，种鸡场的密封饲养显得很有必要；参照人类艾滋病的抗病毒药物治疗，选择某些抗反转录酶和抗蛋白酶的药物用于雏鸡群ALV的减弱传播或根治在未来可能前景光明。

## 1.2 反向遗传学在病毒学研究中的应用

经典遗传学遵循“表型性状到基因”的技术路线来研究遗传物质的本质和生命发生发展规律，随着越来越多生物体基因的发现及其序列的测定，人们发现可以直接从基因入手开展遗传学研究，即采用“基因到表型性状”的研究路线。由于这种思路与经典遗传学所用思路逆向而行，因此称之为“反向遗传学（Reverse genetics）”，与之相关的各

16

种技术统称为反向遗传学技术（Reverse genetic manipulation）。狭义的反向遗传学仅指对微生物的反向遗传操作和研究，尤其是对RNA病毒的反向遗传操作，这是因为RNA病毒的基因组一般比较小，更利于反向遗传操作。目前已有很多病毒的反向遗传学研究系统被建立起来，成功实现了病毒的“拯救”。反向遗传学技术具有方法简便、定点可控等优点，在研究病毒分子生物学以及病毒的致病机理中发挥着重要的作用。

### 1.2.1 反向遗传学的原理

由于几乎所有基因操作技术是以DNA为对象，因此DNA病毒的反向遗传操作比较容易。RNA病毒具有基因组的不稳定性和易降解性，病毒RNA一旦脱离病毒核衣壳的保护就难以存在，因此在体外操作RNA较为困难。反向遗传学技术的发展改变了这一状况，通过将RNA反转录为cDNA，可以在DNA水平上方便地研究RNA病毒的基因复制和表达、病毒致病机理、病毒与宿主细胞的相互作用等。

RNA病毒反向遗传学技术的核心是构建病毒的感染性cDNA克隆。对正链RNA病毒而言，首先获得病毒的全基因组序列，将其连接到合适的载体上，构建病毒的全长cDNA分子克隆；然后，将RNA聚合酶启动子元件导入该分子克隆中，通过体外转录获得病毒RNA；最后，将获得的病毒RNA感染合适宿主或转染易感细胞系，拯救出与亲本病毒具有相同活性的病毒。对负链RNA病毒而言，由于他们基因组本身没有感染性，因此需要先行构建一系列含有RNA复制酶以及核蛋白编码序列的辅助质粒，将这些辅助质粒与负链RNA病毒的感染性克隆质粒共同转染宿主细胞，经过细胞转录，获得核糖核蛋白复合物（RNP），实现病毒的复制和包装，得到拯救的病毒粒子。

此外，决定RNA病毒能够通过构建感染性克隆来开展分子生物学研究的另外一个重要因素是，病毒是否有合适的体外增殖系统或敏感细胞系。对于缺乏敏感细胞系的RNA病毒，可以构建病毒的复制子，即仅保留了病毒基因组复制所必须的非结构蛋白编码基因和编码区的顺式结构作用元件的缺陷型基因组。将该复制子转染细胞系，通过基因的瞬时或稳定表达来评价反向遗传操作对RNA病毒基因组复制或者表达的影响。这种技术对研究一些生物安全级别比较高的病毒提供了可行平台。

### 1.2.2 ALV的反向遗传学

反转录病毒的一个基本特点是，虽然其遗传信息存在于病毒RNA中，但在感染细胞中，病毒RNA首先反转录为DNA，然后再整合到宿主基因组中，以前病毒DNA 的

17

形式长期存在。反转录病毒的这一特性为其反向遗传学操作提供了极大的便利。目前，反向遗传操作技术在ALV 的研究中得到了广泛应用，并取得了一系列成果。张纪元等

（2005）通过PCR获得ALV-J毒株NX0101前病毒基因组全长序列，将其分为三段使用限制性内切酶连接到合适的载体中，获得了包含完整NX0101全长基因组的感染性克隆质粒，转染CEF获得了拯救病毒，并可在肉鸡中诱发与亲本毒类似的髓样细胞瘤。此后，很多研究人员采用类似的方法获得了ALV的感染性克隆并成功拯救到了病毒（张贺楠等, 2010； 王超等, 2011； 王琦等, 2011； 林艳等, 2013； 纪晓琳等，2013）。

反向遗传学在ALV基因组结构功能以及病毒疾病机制的研究中发挥了重要作用。冯少珍等（2011）通过搭桥PCR方法将ALV-J毒株NX0101的*env*基因中YXXM基序进行核苷酸序列突变，拯救出YXXM突变体毒株，发现病毒RNA转录水平和病毒蛋白合成水平显著下降，表明YXXM基序对NX0101毒株在体外宿主细胞中复制发挥重要的作用。Chesters等（2002）分别将ALV-A和ALV-J的*env*基因进行替换，获得不同嵌合病毒，通过动物实验证实，*env*基因是致瘤细胞谱系嗜性的主要决定因素。流行病学调查发现，我国ALV-J流行株在3’UTR区域多存在205bp的缺失（Lai *et al*., 2011; Li *et al*., 2013），根据这一结果，Wang等（2012）拯救获得了缺失205bp的HLJ09SH01和包含205bp的HLJ09SH01A205，动物实验证实HLJ09SH01通过引起血管内皮生长因子及其受体的高表达诱导了血管瘤，提高了病毒致瘤率和致死率，阐明了ALV-J致瘤性增强的分子机制。此外，病毒序列分析还发现，我国ALV-J分离株的5’UTR区域多含19bp的插入（Gao *et al*., 2015），Gao等（2015）等拯救了包含及缺失19bp插入的两株ALV-J，发现在5’UTR的19bp插入通过类似“增强子”的功能，促进了病毒的转录和复制。

## 1.3 基因芯片技术在动物病毒学研究中的应用

随着分子生物学技术的发展，运用组学的方法从全局的角度分析疾病的发生机制逐渐得到广泛应用。转录组（transcriptome）是指细胞转录的、参与蛋白质翻译的mRNA的总和。因此，转录组学是在整体水平上研究细胞编码基因转录情况及转录调控规律的科学。任何一种细胞其基因表达的种类和数量都有特定的模式，称为基因表达谱，它决定着细胞的生物学行为。

基因芯片技术是近年来在生命科学领域中迅速发展起来的新技术。它是指通过微加工和微电子技术在固体芯片表面构建微型生物化学分析系统，实现对组织、细胞、蛋白

18

质、核酸、糖类以及其他生物组分进行准确、快速、大信息量的检测。这种微流体检测系统固定在某固相载体，通过微加工工艺在硅片等载体上，点阵固定信息分子，形成二维生物分子微阵列。在一定的条件下与标记的样品分子进行生化反应，反应结果用化学荧光法、酶标法、同位素法显示，再用扫描仪等光学仪器进行数据采集，最后通过生物信息学方法进行数据分析，从而实现对DNA、RNA和蛋白质等高效快捷的测试和分析。通过基因组芯片，可以对上万个基因的转录本实现检测，从而揭示基因之间的相互关系。

目前，基因芯片技术已经被广泛应用于多种宿主与病毒相互作用的探索研究中，基因芯片技术同样为禽类病毒性疾病致病机制研究，如流感病毒、马立克病毒（Marek's disease virus, MDV）、新城疫病毒（Newcastle disease virus, NDV）、感染性支气管炎（Avian infectious bronchitis virus, IBV）等病毒，提供了支持。为研究H5N1亚型AIV感染鸡脾脏的转录组差异，Zhao等（2015）使用Affymetrix鸡基因组芯片对H5N1感染鸡脾脏进行转录组表达分析。共获得AIV 感染组与对照组差异表达有信息注释的基因

2457条，GO分析表明2457个差异表达的基因基于生物学过程分类，可以归为24个类别。为揭示IBV的致病机制和宿主的抗病毒机制，丛峰（2015）比较分析了IBV感染早期和晚期脾脏基因差异表达情况。结果表明脾脏作为重要免疫器官参与了宿主对IBV的免疫反应，提示IL6、STAT1、MYD88、IRF1和NFKB2等基因可能在宿主抵抗IBV感染过程中发挥重要作用。Hu等（2012）通过Affymetrix GeneChip Chicken Genome

Arrays探索了MDV超强毒RB1B株感染鸡胸腺组织后不同致病阶段蛋白质组和转录组的差异变化。研究结果表明，在RB1B感染第7、14、21和28d的鸡胸腺有86个病毒差异表达基因，为进一步解释马立克氏病毒发病机制和致癌机理提供了线索。Hang 等

（2012）通过基因芯片技术探讨了ALV-J JS09GY3株感染SPF鸡后法氏囊组织中的差异转录本。结果共鉴定到594个差异表达的转录子。其获得的ALV-J JS09GY3株感染鸡法氏囊反应谱为更好的理解ALV-J感染的分子机制提供了理论基础。

## 1.4 核苷类药物在抗HIV治疗中的应用

### 1.4.1 核苷类药物的应用概况

艾滋病亦称获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency syndrome, AIDS），是由艾滋病的病原体即人类免疫缺陷病毒（human immumodeficiency virus, HIV）感染引起的、以T细胞免疫功能缺陷为主的综合征。自1981年首例艾滋病被发现至今，全

19

球死于AIDS的人已逾2500万，给人类的生命健康带来极大威胁（Hahn *et al*., 2000）。药物治疗是防控AIDS的一种有效途径，到目前为止，经美国FDA批准上市用于抗HIV感染治疗的药物有22种。按照药物发挥作用的机制和靶点，这些药物可以分为：HIV-1核苷类逆转录酶抑制剂（NRTIs），核苷酸类逆转录酶抑制剂(NtRTIs)，非核苷酸类逆转录酶抑制剂（NNRTIs），HIV-1蛋白酶抑制剂（PIs），以及融合抑制剂（Samuel *et al*., 2006）。

目前，被批准应用于临床的HIV-1核苷类逆转录酶抑制剂共有7种：AZT、ddI、

ddC、d4T、3TC、FTC、abacavir/ABC（图1-6）。核苷类逆转录酶抑制剂均为DNA合成天然底物的衍生物；AZT及d4T为脱氧胸苷的类似物；ddC，FTC及3TC为脱氧胞苷的类似物；ddI及tenofovir为脱氧腺苷的类似物，ABC为脱氧鸟苷的类似物，它们均需在细胞内经不同激酶转化为活性三磷酸衍生物，方可发挥抑制HIV-1反转录酶（RT）的功能。它们均为HIV-1逆转录酶底物的竞争性抑制剂，抑制RT活性，阻碍前病毒DNA合成；并由于在结构上3’缺乏轻基，当它们结合到前病毒DNA链的3’末端时，不能再进行5’-3’磷酸二酯键的结合，终止了病毒DNA链的延长，由此抑制HIV复制。它们与HIV-1 RT亲和力远比与细胞内正常DNA聚合酶亲和力强，因此具有较高的治疗指数。

O

HN CH3

O N

O

HO HO

N3

NH2

N



O N



O

HO

O

HN CH3

O N

O

HO

NH2

N



O N

O

S

AZT ddC d4T

3TC

O



N

NH

N

N

H

O



N

N

N

N

O

HO O

NH

NH2

N

HO O

O

S

NH2

F

N

ddI

abacavir

FTC

**图1-6** **已上市的HIV-1核苷类逆转录酶抑制剂的化学结构**

**Fig.** **1-6** **Chemical structural formula of lanched commercial NRTIs**

其中，拉米夫定（Lamivudine, 3TC, Epivir）具有很强的抑制HIV-1逆转录酶活性，单独治疗可在1w内使病毒载量下降至10 %-1 %。拉米夫定对细胞毒性低，口服迅速吸收，生物利用度为86 %，口服2 mg/ kg时药物达峰时间为1-1.5 h，*C*max为1.5±0.57μg/ml，

AUC为4.58 mg/ L·h，与血浆蛋白结合率<36 %, t1/ 2为5-7 h.3TC与AZT、ddI、奈韦拉平、沙奎那韦、司他夫定、地拉韦定有协同抗HIV-1作用。使用剂量为150 mg、2次/

20

d. 制剂有：片剂150mg，口服液10 mg/ ml。

### 1.4.2 HIV耐药性的产Th及其检测

抗逆转录病毒药物的研发和应用经历了漫长的过程。非核苷类逆转录酶抑制剂

（NNRTIs）药物问世后，联合非核苷类药物的二联或三联治疗便迅速在AIDS患者中使用，并取得了非常好的效果。这种联合用药方法以后被命名为高效抗逆转录病毒治疗

（highly active antiretrovirus therapy, HAART）。HAART疗法的出现，可以控制HIV感染的病程，延长患者的生命，但是HIV耐药性的出现，不仅成为HAART失败最重要的原因之一，而且使未来的抗HIV治疗更加复杂。HIV出现耐药性是其基因的高度变异性和药物选择压力共同作用的结果。首先，HIV感染是以病毒的高度复制和更新为特征。再者，由于HIV逆转录酶缺乏校读功能，病毒RNA逆转录到DNA有很大的碱基错配几率

(Haase *et al*., 1999; Menendez *et al*., 2002)。

HIV的RT是一个多功能的酶，具有RNA依赖和DNA依赖的DNA聚合酶活性，能以病毒RNA为模板催化前病毒DNA的合成；还有RNase H活性，能在前病毒合成阶段降解

RNA/DNA杂合链。RT中具有不同的氨基酸突变，是耐药性产生的结构基础（图1-7）。对NRTIs的研究结果表明，RT基因的单突变就可导致对逆转录酶抑制剂较高程度的耐药，若多个密码子发生改变往往引起高度耐药。在临床接受过AZT治疗的病人体内检测到的最常见的与耐药有关的突变多是以下几种突变的组合：M41L，D67N，K70R，

L210W, T215Y/F和K219Q（Hooker *et al*., 1996; Larder *et al*., 1999）。



**图1-7** **HIV-1 RT中与耐药性有关的氨基酸突变位点（《抗艾滋病药物研究》，人民卫生出版社）**

**Fig.** **1-7** **Drug-resistance amino acid mutation sites in RT of HIV-1(*Research on the anti-AIDS drugs*, People's Medical Publishing House)**

21

## 1.5 本研究的目的和意义

由带有肿瘤基因的急性致瘤性ALV诱发急性肉瘤的报道多为零星散发，且近十几年来也少有报道。近三、四年来，ALV-J商品代蛋鸡中诱发的肿瘤/血管瘤广泛流行的同时，在一些蛋鸡群与“817”肉杂鸡群中，出现了一定比例的体表纤维肉瘤。人工造病试验表明，1日龄SPF鸡接种肉瘤研磨液10-14d后可以发生同样类型的肉瘤，证明这些肿瘤确实是急性肉瘤（刘绍琼等, 2011；Chen *et al*., 2012;李传龙等, 2012；王鑫等, 2012；李德庆等， 2013）。急性ALV肿瘤的群发既是我国禽病专家的挑战，也给我国禽病专家在急性ALV致肿瘤的分子生物机制方面的研究提供了新的资源和机会（崔治中，2012）。

本研究以“817”肉杂鸡颈部皮下肉瘤和海兰褐蛋鸡腹腔肠系膜纤维肉瘤为研究对象，通过病毒分离、PCR扩增等方法鉴定两株急性致瘤性ALV所携带的肿瘤基因；通过反向遗传学方法证实携带完整v-*fps*肿瘤基因的缺陷型病毒是诱发急性肿瘤的分子基础；通过动物试验研究Fu-J (SDAU1005)对SPF鸡的肿瘤特性；通过基因芯片技术初步探讨v-*fps*肿瘤基因诱发细胞转化的分子机制；通过急性肿瘤的模型研究抗HIV核苷类药物拉米夫定对ALV-J复制的抑制作用。通过以上研究，解释急性肿瘤在我国鸡群中群发的原因和途径，阐明急性致瘤性ALV急性致瘤的分子基础，建立急性致瘤性ALV反向遗传操作平台，为养禽生产中急性致瘤性ALV的防控提供技术支持，为深入研究v*-fps*和v-*src*肿瘤基因的致瘤机制奠定基础。

22

# **2** 材料和方法

## 2.1 材料

### 2.1.1 病料来源

两份不同来源的肉瘤病料由本实验室收集、保存。其中，1#病料收集自ft东某鸡场感染了ALV-J的40日龄左右的“817”肉杂鸡，该鸡群中出现了多例颈部皮下肉瘤。2#病料收集自ft东新泰某鸡场一只感染了ALV-J的240日龄左右的海兰褐商品代蛋鸡，剖检该病鸡腹腔内腰椎下可见乒乓球大小的肉瘤块群。人工造病试验和纤维切片观察证实这两例肉瘤病料均为急性致瘤性ALV所诱发的急性纤维肉瘤。

### 2.1.2 试验动物

6-8周龄Balb/c雌性小鼠购自ft东大学实验动物中心，SPF鸡胚及雏鸡购自ft东省济南赛斯家禽科技有限公司。

### 2.1.3 主要分子Th物学试剂

PCR buffer（含Mg2+）、dNTP、Taq DNA聚合酶、PMD18-T载体连接试剂盒、限制性内切酶、AMV反转录酶、两步法反转录试剂盒、SYBR Green I荧光定量试剂盒均购自宝生物工程（大连）有限公司；病毒RNA提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂购自OMEGA公司；血液组织细胞基因组提取试剂盒、蛋白定量考马斯亮蓝专用染色液购自天根生化科技（北京）有限公司；Trans 2K DNA Marker、Trans 15K DNA

Marker购自北京全式金生物技术有限公司；完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂购自Sigma公司；Stained Protein Molecular Weight Marker购自Thermo公司；DMEM培养基、新生牛血清、胎牛血清、胰蛋白酶购自GIBCO公司；96孔、24孔和6孔细胞培养板购自

Costar公司，ELISA板购自NUNC公司；Lipfactamine 2000购自美国Invitrogen公司；酵母浸出液、蛋白胨、乙醇、2-巯基乙醇、异戊醇﹑氯仿、SDS等均为国产分析纯；琼脂糖、蛋白酶K、氨苄青霉素购自Amresco; Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit、Avian Leukosis Virus ALV-J Antibody Test Kit购自IDEXX公司。

### 2.1.4 主要配制试剂

#### 2.1.4.1 分子克隆配制试剂

(1) PBS缓冲液：称取NaH2PO4·2H2O 0.2g，Na2HPO4·12H2O 2.9g, NaCl 8.0g，溶于ddH2O，定容至1000ml。

23

(2) LB培养基：称取胰蛋白胨10g，酵母提取物5g, NaCl 10g，溶于950 ml ddH2O, NaOH

调节pH值至7.0，定容至1000ml，高压灭菌后保存备用。

(3) IPTG: 称取1.2g IPTG，加入40ml ddH2O，溶解后定容至50ml，0.24μm滤器过滤后，置于-20℃避光保存。

(4) 0.1M CaCl2溶液：称取1.1 g无水CaCl2，加入90 ml ddH2O中，定容于100ml, 0.24μm滤器过滤后，保存于-20℃。

(5) 50×TAE电泳缓冲液：在80 ml去离子水中加入24.2g Tris·HCl, 5.71ml冰醋酸，10ml

0.5 M EDTA（pH 8.0），加ddH2O定容至100 ml，高压灭菌后保存备用。

#### 2.1.4.2 SDS-PAGE配制试剂

(1) 2×SDS上样缓冲液：1mol/L Tris·HCl(pH6.8) 2ml，二巯基乙醇2ml, 10%SDS 8ml，

1%溴酚蓝4ml，甘油4ml，加入ddH2O定容至20ml。

(2) 5×Tris-Glycine电泳缓冲液：Tris·HCl 7.55g, Glycine 47g, 10%SDS 25ml，加入去离子水定容至500ml。

(3) 30%聚丙烯酰胺储存液：称取29g丙烯酰胺和1g双甲叉丙烯酰胺，加热至37℃溶解，加入ddH2O定容至500ml，置于4℃避光保存。

(4) 12%分离胶：去离子水3.3mL; 30%丙烯酰胺贮液4.0ml, 1.5 mol/L Tris·HCl(pH8.8) 2.5ml, 10% SDS 100µl，10%过硫酸胺100µl，TEMED 4µl，混匀后即可灌胶。

(5) 4% 浓缩胶：去离子水2.1ml；30%丙烯酰胺贮液0.5ml, 1.0 mol/L Tris·HCl (pH6.8)

0.38ml, 10%SDS 30µl，10%过硫酸胺30µl，TEMED 3µl，混匀后即可灌胶。

(6)考马斯亮蓝染色液：45ml甲醇，45ml去离子水，10ml冰乙酸，溶解后加入0.25g

考马斯亮蓝R250。

(7)脱色液：45ml甲醇，45ml去离子水，10ml冰乙酸，混匀备用。

#### 2.1.4.3 Western blot配制试剂

(1)转移缓冲液：Glycine 14.4g，Tris·HCl 3.03g，甲醇200ml，加ddH2O水定容至1000ml。

(2)封闭液：称取脱脂奶粉2.5g，溶于100mL PBS中。

(3)洗脱液：将5 ml Tween-20加入1L PBS溶液中。

(4)显色液：超敏ECL化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

#### 2.1.4.4 蛋白Ni柱纯化配制试剂

24

（1）Buffer B: 称取NaH2PO4·2H2O 1.5601g，Tris·HCl 0.1576g，尿素48.08g，加入80ml ddH2O，用1M NaOH调pH至8.0，然后定容至100ml。

（2）Buffer C: 称取NaH2PO4·2H2O 1.5601g，Tris·HCl 0.1576g，咪唑0.058g，尿素48.08g，加入80ml ddH2O，用1M NaOH调pH至8.0，然后定容至100ml。

（3）Buffer E: 称NaH2PO4·2H2O 1.5601g，Tris·HCl 0.1576g，咪唑1.702g，尿素48.08g，加入80ml ddH2O，用1M NaOH调pH至8.0，然后定容至100ml。

(4) 6M Gu·HCl、0.2M乙酸：称取Gu·HCl 28.659g，吸取575μl冰乙酸，加入ddH2O定容至50ml。

(5) 100mM NiSO4: 称取NiSO4.6H2O 0.2629g，加入ddH2O定容至100ml。

(6) 2%SDS: 称取SDS 2g，加入ddH2O定容至100ml。

(7) 100mM EDTA （pH8.0）：称取EDTA 2.9225g，加入70ml ddH2O，用1M NaOH 调

pH至8.0，ddH2O定容至100ml。

#### 2.1.4.5 ELISA配制试剂

(1)碳酸盐缓冲液：称取Na2CO3 0.2756g, NaHCO3 0.6216g，加入ddH2O定容至100ml，使用NaOH调节pH至9.0，置于4℃保存。

(2)封闭液：称取5g脱脂奶粉，加入100ml PBS中溶解，置于4℃保存。

(3)洗液：吸取5 ml Tween-20加入1L PBS中，充分混匀。

(4)底物反应液：将17mg邻苯二胺和25μl 30%H2O2加入到50ml柠檬酸-磷酸盐缓冲液中，充分混匀，置于4℃避光保存。

(5)终止缓冲液：3M H2SO4.

#### 2.1.4.6 免疫组化试验配制试剂

(1) 10%福尔马林溶液：取10ml甲醛溶液与90ml去离子水，充分混匀。

(2) 3%H2O2-甲醇：用甲醇将30% H2O2 溶液稀释10倍，充分混匀。

(3)梯度乙醇：将无水乙醇与去离子水混合，稀释至95%、80%、70%不同浓度。

(4)柠檬酸盐缓冲液：称取21.01g柠檬酸溶解于1000ml ddH2O，配成0.1M柠檬酸溶液A，称取29.41g柠檬酸三钠溶解于1000ml ddH2O，配成0.1M柠檬酸三钠溶液B。使用时，量取9ml柠檬酸溶液A和41ml柠檬酸三钠溶液B加入到450ml ddH2O中，充分混匀。

(5)苏木精染液：称取2g苏木精溶解于500ml无水乙醇中，配成溶液A，称取20g硫酸

25

铝钾溶解于700ml ddH2O中，配成溶液B。使用时，将溶液A和溶液B液充分混合，加入0.2g碘酸钠，混匀后加入20ml 冰醋酸，摇动至颜色变成深红色。

### 2.1.5 抗体

FITC标记的羊抗鼠IgG、FITC标记的羊抗鸡IgG购自美国Sigma公司；PE标记羊抗鼠IgG购自北京全式金公司；J亚群禽白血病病毒（ALV-J）单克隆抗体JE9（Qin *et al*., 2001）、禽网状内皮组织增生症病毒（REV）单克隆抗体11B118由本实验室保存（Cui *et al*., 1986）；鼠抗A亚群禽白血病病毒（ALV-A）单因子血清由本实验室制备、保存。

### 2.1.6 菌种和载体

大肠杆菌DH5α 菌株、E. coli（DE3）菌株由本实验室保存。克隆载体PMD-19T

（simple）购自宝生物工程（大连）有限公司，PMD-19T（simple）载体特点如图2-1和2-2所示；表达载体pET-32 a (+) 和pET-28 a (+) 购于Novagen 公司，pET-32 a (+) 载体特点如图2-3和2-4所示，pET-28 a (+)载体特点如图2-5和2-6所示。



**图2-1** **pMD19-T(simple)克隆载体图谱**



**Fig.** **2-1** **The physical map of pMD19-T(simple) cloning vector**

**图2-2** **PMD-19T(simple)载体克隆位点**

**Fig.** **2-2** **The cloned insert site of PMD-19T(simple) vector**

26



**图2-3** **pET-32a(+)表达载体图谱**



**Fig.** **2-3** **The physical map of pET-32a(+) expression vector**

**图2-4** **pET-32a(+) 表达载体克隆位点**



**Fig.** **2-4** **The multiple cloning sites (MCS) of pET-32a(+) expression vector**

**图2-5** **pBluescript II SK(+)表达载体图谱**

**Fig.** **2-5** **The physical map of pBluescript II SK(+) vector**



**图2-6** **pBluescript II SK(+)载体克隆位点**

**Fig.** **2-4** **The multiple cloning sites(MCS) of pBluescript II SK (+) vector**

27

### 2.1.7 主要仪器

PCR仪（ABI），凝胶成像系统（BIO-RAD），分光光度计（Eppendorf），荧光倒置显微镜（NIKON TE2000），倒置显微镜（宁波永新），水平摇床WD-9405B（北京六一仪器）、酶标仪（BIO-RED），DYYnl-3IA/3IB 型核酸电泳槽和DYYnl-2 型稳压稳流电泳仪（北京六一仪器），超纯水系统（Millipore），超声仪（宁波新芝），漩涡振荡器（天根），超低温冰箱（Thermo），电子天平，水浴锅，超净工作台（Heal Force）、大容量台式高速冷冻离心机（Hitachi），普通台式高速冷冻离心机（Beckman），荧光定量PCR 仪

（ABI 7500），CO2培养箱（Heal Force），孵化器（Grumbac），禽用正/负压隔离器（SPF

鸡隔离罩，黑龙江灵鼠科技开发有限责任公司）。

## 2.2 常规试验操作方法

### 2.2.1 鸡胚成纤维细胞（CEF）的制备

取9-10日龄SPF鸡胚，将胚蛋气室端向上直立于蛋座上，用碘酊消毒气室，以镊子击破蛋壳，无菌取出鸡胚置于灭菌平皿中，剪去头部、翅爪和内脏，用PBS缓冲液洗去表面血液，转入灭菌小烧杯中。用无菌的手术剪刀剪成1mm3大小的组织块，再用PBS缓冲液洗涤1次。加入0.25%胰蛋白酶，37℃水浴中消化20min，加新生牛血清终止消化。使用200目滤器过滤，制成细胞悬液，离心洗涤，分装于细胞培养瓶中（500万/瓶）。置37℃，5％CO2培养箱中培养。

### 2.2.2 ELISA检测ALV抗原

使用ALV抗原ELISA检测试剂盒（IDEXX, USA）检测细胞上清中的p27含量。简要步骤如下：

(1)取出ELISA反应板，在A1和B1孔内各加入100μl阴性对照，在C1和D1孔内各加入100μl阳性对照，在检样孔加入100μl被检样品。25℃孵育1h。

(2)用约350μl ddH2O洗涤反应板孔，重复4次，最后一次在吸水纸上轻轻拍打反应板，去除反应孔内的水。

(3)每反应孔加100μl辣根过氧化物酶标记的抗p27抗体，25℃孵育1h。

(4)重复步骤(2)。

(5)每反应孔加100μl TMB底物溶液，25℃孵育15 min。

(6)每反应孔加100μl 终止液，终止反应。

28

(7)酶联检测仪测量样品OD650 波长的吸光度，记录结果。

(8)结果判定标准：被检样品中是否含有p27抗原与其OD650波长的吸光度有关。被检样品抗原的相对含量通过计算样品与阳性对照比值（S/P）来确定。S/P大于0.2，表示样品中p27抗原为阳性。S/P小于等于0.2，表示样品为阴性。

### 2.2.3 间接免疫荧光（IFA）

取需要进行IFA检测的细胞样品，吸出细胞上清液，用预冷的PBS缓冲液轻轻冲洗三遍，使用固定液（丙酮：乙醇=3: 2）固定细胞，按如下步骤进行检测：

(1)用PBS缓冲液液轻轻冲洗3次，每次5min，清洗固定液。

(2)自然晾干后加入稀释后的抗体，每孔100μl，37℃温箱中作用45 min。

(3)弃去一抗，用PBS缓冲液冲洗3次，每次5min。

(4)每孔加入100μl 荧光素标记的抗体，37℃温箱中作用45min。

(5)弃去二抗，用PBS缓冲液冲洗3次，每次5min，加入少量50％的甘油，防止挥发，在荧光显微镜下观察荧光。

### 2.2.4 组织/细胞DNA的提取

使用天根生化科技（北京）有限公司的血液组织细胞基因组提取试剂盒提取组织或培养细胞DNA。简要步骤如下：

(1)取5106个体外培养细胞，加入200μl GA缓冲液，充分震荡至悬浮。对于组织：称取1g左右的组织，使用研磨器研磨为细胞悬液，12000g离心1min去上清，加入200μl

GA缓冲液，充分震荡至悬浮。

(2)加入20μl蛋白酶K溶液，混匀，56℃放置过夜，每隔一段时间颠倒混合一次，待彻底消化后简短离心去除管盖内壁的水珠。

(3)加入200μl GB缓冲液，充分颠倒混匀，70℃放置10min，简短离心去除管盖内壁的水珠。

(4)加入200μl无水乙醇，在振荡器上震荡15s，简短离心去除管盖内壁的水珠。

(5)将所得溶液加入到吸附柱CB3中，12000g离心1min，倒掉废液。

(6)向吸附柱CB3中加入500μl GD缓冲液，12000g离心1min，倒掉废液。

(7)重复步骤（6）。

(8)将吸附柱CB3放回收集管中，12000g离心2min，倒掉废液，将吸附柱置于室温数

29

分钟，以彻底晾干吸附柱中残余的漂洗液。

(9)将吸附柱CB3置于干净的离心管中，向吸附膜中央滴加60μl洗脱缓冲液TE，室温放置5min, 12000g离心2min，将溶液收集到离心管中。

### 2.2.5 细胞上清/血清中病毒RNA的提取

使用E. Z. N. A. TM (Omega, Norcross, GA, USA) Viral RNA提取试剂盒提取培养细胞上清或者鸡血清中的病毒RNA. 简要步骤如下：

(1)在一支1.5ml离心管中加入560μl QVL裂解液和5.6μl Carrier RNA。

(2)在上述离心管中加入140μl细胞上清或者血清，涡旋振荡30s。

(3)室温孵育10min，简短离心，去除管盖内壁的水珠。

(4)加入560μl无水乙醇，涡旋振荡30s。

(5)将离心管中的650μl液体转移至HiBind RNA吸附柱中。12000g离心30s，倒掉废液，将吸附柱放回收集管。

(6)重复步骤（5）。

(7)加入500ml RWA洗液，12000g离心30s，倒掉废液，将吸附柱放回收集管。

(8)加入500ml RWB洗液，12000g离心30s，倒掉废液，将吸附柱放回收集管。

(9) 12000g离心3min，使吸附膜完全变干，倒掉废液。

(10)将吸附柱放入一个1.5ml离心管中，向膜中央加35μl的DEPC水。37℃放置7min, 12000g离心1 min，收集病毒RNA，置于-70℃冰箱保存备用。

### 2.2.6 常规PCR扩增

通常使用25μl反应体系进行PCR扩增，PCR体系（25l）如表2-1。

**表2-1** **常规PCR反应体系**

Table 2-1 Reaction system of routine PCR experiment (first step)

| 成分 | 体积（μl） |
| --- | --- |
| ddH2O 10×Buffer (含 Mg2+) dNTP (2.5mmol/L)  F 引物 (25μM) R 引物(25μM) rTaq (5U/μl)  DNA 模板 (100ng/μl) | 18.2  2.5  2.0  0.5  0.5  0.3  1.0 |

30

常规PCR反应条件为：95℃预变性5 min，95℃变性40 s，59~62℃退火40 s，72℃延伸1~3min，共31个循环，最后72℃延伸10 min. PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳进行分析，于凝胶成像仪下观察并记录结果。

### 2.2.7 RT-PCR扩增

以病毒RNA为模板，使用Takara primeScriptTM RT-PCR Kit，进行RT-PCR扩增反应。主要步骤如下：

(1)反转录反应

在ependoff管中配制混合液（如表2-2）。

**表2-2** **反转录反应体系（第一步）**

Table 2-2 Reaction system of reverse transcription experiment (first step)

| 成分 | 体积（μl） |
| --- | --- |
| dNTP (10mM) | 0.5 |
| 下游引物(2μM) | 1 |
| RNA | 1 |
| DEPC ddH2O | 2.5 |
| **Total volum** | 5 |

PCR仪上进行变性、退火反应：65℃、5min；4℃保存。在上述ependoff管中加入反应液（如表2-3）.

**表2-3** **反转录反应体系（第二步）**

Table 2-3 Reaction system of reverse transcription experiment (second step)

| 成分 | 体积（μl） |
| --- | --- |
| 5×primeScriptTM Buffer | 5 |
| 上述反应液 | 2 |
| RNase Inhibitor (40U/ul) | 0.3 |
| primeScriptTM RT 酶 | 0.5 |
| DEPC ddH2O | 2.2 |
| **Total volum** | 10 |

在PCR仪上进行反转录反应：42℃，30min；95℃，5min；4℃保存。

(2) PCR反应

以上述反转录反应液为模板，进行PCR扩增。体系及反应条件为如步骤2.5.4所示。

PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳进行分析，于凝胶成像仪下观察并记录。

31

### 2.2.8 扩增产物的回收

使用E. Z. N. A. TM (Omega, Norcross, GA, USA) 凝胶回收试剂盒回收试剂盒回收

PCR或RT-PCR扩增产物，简要步骤如下：

(1)在1%琼脂糖凝胶中切下目的条带，称重，加入等体积的Binding Buffer，置于55℃水浴中，每2-3 min颠倒一次，使其彻底溶解。

(2)将溶解后的液体转移入离心管柱，12000g离心1 min，倒掉废液。

(3)加入300μL Binding Buffer, 12000g离心1 min，倒掉废液。

(4)加入700μL SPW Buffer, 12000g离心1 min，倒掉废液。

(5) 12000g离心1 min，将柱子装入新的离心管中，加入5μl Elution Buffer, 12000g离心

1 min，将收集的DNA置于-20℃保存备用。

### 2.2.9 回收产物的连接

将PCR回收产物连接到载体pMD-18T中，反应体系如表2-4。

**表2-4** **回收产物连接反应体系**

Table 2-4 Reaction system of ligation experiment

| 成分 | 体积（μl） |
| --- | --- |
| PMD-18T Vector | 1 |
| PCR 片段 | 4 |
| Solution I | 5 |
| **Total volum** | 10 |

16℃连接过夜，-20℃保存备用。

### 2.2.10 感受态细胞制备

参照《分子克隆实验指南》，使用CaCl2制备制备感受态细胞，步骤如下：

(1)将大肠杆菌DH5α菌株划线接种LB板，37℃过夜培养。

(2)挑取单菌落接种于2.5 ml LB培养基中，37℃过夜培养，取1 ml菌液转移入100 ml LB培养基中，37℃摇动培养1.5 h至半浑浊半透明状态。

(3)用20mL预冷的0.1 mol/L CaCl2重悬每份沉淀，冰浴30 min；

(4) 4℃，3000g离心10 min离心10 min，弃掉上清。

(5)用20 ml预冷的0.1 moL/L CaCl2重悬每份沉淀，-80℃保存备用。

32

### 2.2.11 连接产物的转化

（1）将连接产物加入到100μl感受态细胞中，冰浴30 min。

（2）42℃热激90 s。

(3)热激后立即将离心管转移到冰上，放置2 min。

(4)向离心管中加入800μl LB培养基，37℃150 rpm培养1 h。

(5) 3000g离心5 min，去除上清，用残余上清回溶菌体，涂布于LB Amp平板。

(6)待接种液被完全吸收后，37℃倒置过夜培养。

### 2.2.12 质粒的提取

使用E. Z. N. A. TM (Omega, USA)质粒提取试剂盒提取质粒，步骤如下：

(1)取5ml 过夜培养的细菌12000g离心1min，保留菌体，弃掉上清。

(2)加入250μl solutionⅠ，震荡悬浮细菌沉淀。

(3)加入250μl solutionⅡ，多次温和颠倒混合，充分裂解菌体。

(4)加入350μl solutionⅢ，多次颠倒混合，室温静置2min。

(5) 12000g离心10min，吸取上清加入吸附柱中。

(6)加入500μl溶液HB, 12000g离心1min，弃掉废液。

(7)加入750μl Wash Buffer, 12000g离心1min，弃掉废液。

(8) 12000g离心1min，彻底去除残留的废液。

(9)将吸附柱置于1.5ml离心管，在中央加65μl Elution Buffer，37℃静置5 min。

(10) 12000g离心1min，洗脱质粒DNA，置于-20℃保存备用。

### 2.2.13 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒的双酶切反应体系如表2-5所示。

**表2-5** **限制性内切酶双酶切反应体系**

Table 2-5 Reaction system of double enzyme digestion experiment

| 反应液成分 | 体积（μl） |
| --- | --- |
| 限制性内切酶 1 | 1 |
| 限制性内切酶 2 | 1 |
| 10×Buffer | 2 |
| 质粒 | 6 |
| ddH2O | 10 |

将体系混匀，于合适温度水浴消化2h，酶切完成后取10μl酶切产物用0.8%琼脂糖

33

凝胶电泳观察。

### 2.2.14 SDS-PAGE蛋白质电泳

(1)按照电泳装置的使用说明，将玻璃板固定在灌胶支架上，装好洁净的玻璃板。

(2)分离胶和积层胶的制备：按前述方法配制12%分离胶和5%的积层胶。

(3)待积层胶凝固后，小心拔下梳子。将凝胶固定于电泳装置上，加入样品。在80V电压条件下，样品在积层胶中电泳约30min后，将电压改为120V，待溴酚蓝带电泳至分离胶的底部约5mm时，停止电泳。

(4)剥离凝胶，将其浸泡在考马斯亮蓝R-250染色液中，在水平摇床上染色过夜，更换

为脱色液，在水平摇床上快速脱色，其间更换脱色液3~4次，直至凝胶上的条带清晰，观察条带并拍照记录。

### 2.2.15 免疫印迹（Western blot）

#### 2.2.15.1 半干法转膜

(1)电泳结束后将胶条割至合适大小，浸入电转液中。

(2)膜处理：预先裁好与胶条同样大小的滤纸和PVDF膜，将膜先浸入甲醇中30s，随后放入电转液中，滤纸直接浸入电转液中。

(3)转膜：采用BIO-RAD转膜装置，由下到上依次为滤纸（3张）、PVDF膜、凝胶、滤纸（3张）。接通电源，冰浴200mA转膜2h。

#### 2.2.15.2 Western blot检测CEF蛋白

(1)待转膜完毕后，将膜小心取出，封闭液37℃封闭1h。

(2)弃封闭液，用洗脱液洗膜，洗涤3次，每次10min。

(3)加入一抗，4℃过夜。

(4)弃一抗，用PBST洗膜，洗涤3次，每次10min。

(5)加入辣根过氧化物酶标记的二抗，室温孵育1h。

(6)弃二抗，用PBST洗膜，洗涤3次，每次10min。

(7)加入显色液，使用成像系统显影成像。

### 2.2.16 免疫组织化学染色

(1)取需要染色的组织，10%福尔马林溶液中固定24h，分别经80%乙醇、90%乙醇和无水乙醇脱水，浸入二甲苯中，将透明的组织块浸在58-60℃石蜡中放置，待石蜡冷却

34

凝固，修整蜡块，切片。用于免疫组化的切片用多聚赖氨酸处理。

(2) 60℃烤片30min，组织切片依次经过两道二甲苯，每道15min。

(3)组织切片经过无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇、75%乙醇、H2O，每次5min。

(4) 3% H2O2-甲醇混合液室温消化20min, PBS洗5min。

(5)抗原修复：柠檬酸盐缓冲液中92-98℃加热15min, PBS 洗5min。

(6)羊血清孵育10min，滴加200μl一抗，37℃孵育1h, PBS 洗3次，每次5min。

(8)滴加200μl HRP标记羊抗鼠二抗，37℃孵育1h, PBS 洗3次，每次5min。

(9) DAB显色15min，水洗终止显色。

(10)苏木精复染1min，自来水返蓝。

(11)组织切片依次经过由低到高梯度酒精，每道3min。

(12)组织切片经过两道二甲苯透明，每道5min。

(13)中性树胶封片，显微镜下观察。

## 2.3 Fu-J (SDAU1005)株急性致瘤性ALV的分离鉴定

### 2.3.1 Fu-J (SDAU1005)病毒悬液的传代和扩增

#### 2.3.1.1 肉瘤组织滤过悬液的制备

取1cm3的肉瘤组织置于研磨器中，加入5ml PBS缓冲液，充分研磨后取匀浆液，

13000g，4℃离心10min，使用0.24μm滤器过滤，分装到1.5ml离心管中，-80℃保存。

#### 2.3.1.2 Fu-J (SDAU1005)病毒的传代和扩增

分别使用体外培养的CEF和1日龄SPF雏鸡进行Fu-J (SDAU1005)病毒的传代和扩增。取制备的肿瘤研磨滤过液0.1ml接种CEF, 24h后弃生长液，换1%的维持液并培养9d，上清经ALV-p27抗原ELISA检测试剂盒检测为阳性者，收集细胞上清液，称为细胞一代毒；取细胞一代毒接种新的CEF，采用相同方法获得细胞二代毒，以此类推，直到细胞五代毒，保存至-80℃冰箱中。取0.1ml原代肉瘤组织滤过液，颈部皮下接种10只1日龄SPF雏鸡，待肿瘤组织生长至直径约2cm左右时，收集肉瘤组织，记为第二代肉瘤组织，以此类推，传至第六代。

#### 2.3.1.3 辅助ALV-J病毒SDAU1005的纯化

采用有限稀释法获得辅助ALV-J病毒SDAU1005。将研磨过滤的肿瘤病毒悬液接种

CEF细胞，维持6d。检测细胞上清p27抗原，使用0.25%的胰酶消化细胞，进行细胞计

35

数，取1万个细胞转至1ml的培养液中，将吸取的1万个细胞轻轻混匀，按100μl/孔接种于96孔板的第一排。随后，在96孔板的每个孔中均加入约4万个新鲜CEF细胞（100μl

DMEM培养）。使用八道移液器吸取第一排孔中100μl细胞，加入第二排，混匀后再取

100μl加之第三排，以此类推，最后100μl丢弃。维持培养6d后进行传代，再次维持6d。检测细胞上清p27，优先选择最高稀释度的阳性孔。将阳性细胞继续传代放大，收集细胞上清，作为纯化的辅助病毒SDAU1005病毒液。

### 2.3.2 肉瘤组织DNA和病毒RNA的提取

按前述方法，提取原代肿瘤组织和感染了Fu-J (SDAU1005) 病毒悬液的CEF 的

DNA，置于-20℃冰箱保存备用；同时提取感染了Fu-J (SDAU1005)病毒悬液的CEF培养上清中的病毒RNA，置于-80℃冰箱保存备用。

### 2.3.3 PCR/RT-PCR扩增和克隆测序

#### 2.3.3.1 引物设计

本实验室前期工作中，在原代肿瘤的DNA中扩增到含有不同缺失的缺陷型基因组

Fu-J1~5（Chen H *et al.*, 2012）。在此基础上，参考已扩增序列以及Fujinami肉瘤病毒

（FSV）、PRCII肉瘤病毒的病毒核酸序列，设立了用于扩增Fu-J 前病毒基因组的三对引物，引物位置如图2-7所示，引物序列见表2-6。这三对引物所扩增的序列相互重叠，可据此拼接出Fu-J全长前病毒基因组序列。所设计的每对引物均有一条位于辅助ALV-J的基因组，另一条位于v-*fps*肿瘤基因，已保证所扩增的片段为Fu-J病毒的嵌合体片段，排除辅助ALV-J和c-*fps*基因的干扰。本研究中所用引物均由上海生工公司合成。



**图2-7** **扩增Fu-J前病毒基因组的引物位点示意图**

**Fig.** **2-7** **Schematic diagram of primers used for Fu-J proviral sequence amplification**

该示意图修改自陈浩博士毕业论文（陈浩，2012）

This diagram was revised from PhD. Thesis (Chen Hao, 2012)

36

**表2-6** **扩增Fu-J前病毒基因组的引物序列**

Table 2-6 Specific primers to amplify the proviral genome of Fu-J

| 序号  No. | 引物名称  Primer name | 序列  Sequence(5′-3′) | 扩增基因或片段  Amplified fragmentor gene |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | 5'LTR-F  5'fps-R | TGTAGTCTTATGCAATACTCTTATGTA  CCAGCTGAGAGAACATGTGGTGCAG | Fu-J 5'LTR-fps sequence |
| 2 | 5'gag-F  3'fps-R | CCCCATATGCCTTATGGATGGACGC  CCTGTGGATGCAGTGCTTGCTTTCC | Fu-J 5'gag-fps sequence |
| 3 | 3'fps-F  3'LTR-R | GCAGCCCATTTACATCGTCATGGAG  AATGAAGCCTTCCGCTTCATGCAGGT | Fu-J fps-3'LTR sequence |

#### 2.3.3.2 PCR/RT-PCR扩增、克隆测序与序列分析

以步骤2.3.2中提取的原代肿瘤DNA和病毒RNA为模板，使用上述三对引物同时进行PCR和RT-PCR扩增，将扩增产物使用凝胶纯化回收，与PMD-18T载体连接，转化DH5α感受态大肠杆菌，涂板后挑取单菌落，通过菌液PCR进行验证，鉴定为阳性克隆的菌液送上海生工生物工程公司进行序列测定，测定结果用DNAStar软件进行拼接分析和同源性比较。

### 2.3.4 Fps蛋白和p19gag蛋白的原核表达

#### 2.3.4.1 引物设计

Fps蛋白原核表达载体PET-fpsq, PET-fpsh由本实验室构建、保存。由于Fps蛋白较长，因此分两段进行扩增表达，PET-fpsq、PET-fpsh质粒分别表达Fps蛋白的N端和

C端。使用PET-32a(+)载体构建p19gag原核表达质粒。使用Primer Premier 5.0软件设计引物，上游加入*Eco*R I酶切位点，下游加入终止密码子“TGA"和*Hin*d III酶切位点，，扩增长度468bp的片段。上游引物为PET-P19 F: cgGAATTCATGGAAGCCGTCATAAA，下游引物为PET-P19 R: tgtAAGCTTTCAATAACAGGATGTGCCA。

#### 2.3.4.2 PCR扩增及回收纯化

以提取的肉瘤组织DNA为模板，使用引物PET-P19 F和PET-P19 R进行PCR扩增。

PCR扩增体系和反应条件如前所述。1%凝胶电泳分析，纯化回收目的片段并定量。

#### 2.3.4.3 原核表达重组质粒pET-32-p19的构建

将pET-32a(+)空载体与获得的目的片段分别使用*Eco*R I和*Hin*d III限制性内切酶双酶切。通过1%的凝胶电泳进行分析，回收酶切产物，将载体片段和目的基因片段使用T4连接酶16℃连接过夜，转化DH5α感受态。挑取平板上的单菌落，接种LB培养

37

基，振荡培养。通过菌液PCR 检测挑选阳性菌，提取质粒，置于-20℃保存备用。

#### 2.3.4.4 重组质粒的酶切鉴定和测序分析

将获得的阳性质粒进一步通过双酶切进行验证，酶切体系如前所示。对于酶切片段正确的质粒，送上海生工测序，使用DNAstar Lasergene (Version 7.1) 软件进行分析。

#### 2.3.4.5 诱导条件的筛选及优化

挑取单菌落，接种于5ml LB培养基中，37℃摇振培养过夜，按1: 100比例转种于

5ml培养基，37℃振荡培养至菌液OD600大约0.8，按IPTG终浓度为0.1、0.5、1.0mM浓度梯度加入到菌液中，继续振摇培养6h。分别于诱导2、4、6、8h取样收集菌体取样收集菌体。然后进行SDS-PAGE蛋白质电泳，分析表达情况，以确定最佳的IPTG诱导浓度和最佳诱导表达时间。

#### 2.3.4.6 重组蛋白的大量表达

诱导最佳条件确定后，将重组质粒转化DE3感受态细胞，37℃过夜培养，挑选单菌落至LB培养基中，37℃震荡培养过夜，按1: 100进行转种1000ml LB培养基中，37℃振摇培养，当OD600达到0.8时，加入IPTG进行诱导表达。

#### 2.3.4.7 重组蛋白的纯化

收集诱导培养的重组菌，4℃，5000g离心15min将菌体沉淀用PBS重悬洗涤，超声裂解。然后4℃，12000g离心20min，弃去上清，沉淀用Buffer B溶解，4℃、12000g离心20min，通过Ni-NTA纯化，SDS-PAGE检测纯化结果。蛋白纯化步骤简要如下：

(1)样品的处理：步骤同上。

(2)蛋白纯化：首先使用Buffer B平衡Ni柱；将处理的样品过柱，用2倍柱体积的Buffer

C清洗Ni柱至流出液至OD280≤0.01；用Buffer E洗脱目的蛋白至流出液OD280≤0.01，使用1.5ml 离心管回收纯化的蛋白。

(3) Ni-NTA再生：2 倍柱体积的6M GuHCl, 0.2M 乙酸洗柱；5 倍柱体积的ddH2O洗柱；

3倍柱体积的2% SDS洗柱；5倍柱体积的ddH2O洗柱；5倍柱体积的无水乙醇洗柱；5倍柱体积的ddH2O洗柱；5 倍柱体积的ddH2O洗柱；5 倍柱体积的100mM NiSO4洗柱；

10 倍体积的ddH2O洗柱。

#### 2.3.4.8 重组蛋白的复性

将透析袋用透析夹子加紧，把纯化蛋白质加入到透析袋内，并加入蛋白质复性液和

38

甘油，用夹子将透析袋的另一端加紧，将含有蛋白的透析袋分别放入4M尿素、3M的尿素、2M尿素和1M尿素透析。SDS-PAGE检测复性的纯化蛋白，测定浓度。

#### 2.3.4.9 蛋白浓度的测定

使用天根生化科技（北京）有限公司的蛋白定量试剂盒进行蛋白定量，简要步骤如下：将0、10、20、30、40、50、60μl牛血清白蛋白标准溶液加入到5ml离心管中，加入PBS 补足到150μl；将适当体积的样品加入到5ml离心管中，并用PBS补足到

150μl。向各管中加入2.85ml 考马斯亮蓝染液，室温放置10 min。用分光光度计测定

OD595吸光值，记录读数；以不含牛血清白蛋白的样品的吸光值作为空白对照。绘制标准曲线，计算样品中的蛋白质浓度。

#### 2.3.4.10 SDS-PAGE蛋白质电泳

按照前述方法制备SDS-PAGE电泳积层胶和分离胶，将收集的蛋白样品与等体积的2SDS Loading Buffer混合，煮沸5min，迅速转移到-20℃冰箱中降温，各取20μl样品加入上样孔中进行SDS-PAGE电泳，考马斯亮蓝染色、脱色、观察并记录。

### 2.3.5 鼠抗Fps和p19gag蛋白单因子血清的制备

#### 2.3.5.1 目的蛋白免疫Balb/c小鼠

Fps单因子血清的制备：将两种蛋白1: 1混合后，取100μg纯化的蛋白抗原与等量的弗氏完全佐剂乳化，皮下注射5只6周龄Balb/c小鼠；p19gag单因子血清的制备：将

100μg纯化的p19gag蛋白与等量的弗氏完全佐剂乳化，背部皮下注射5只6周龄Balb/c小鼠。每隔2周将适量的抗原与等量的弗氏不完全佐剂超声乳化，加强免疫，共免疫3次。三免10d后进行抗体水平的检测。

#### 2.3.5.2 间接ELISA检测方法的建立及判定标准

为检测小鼠抗Fps单因子血清和小鼠抗p19gag单因子血清的抗体效价，分别按照以下程序建立间接ELISA方法：

(1)用碳酸盐缓冲液稀释抗原至1μg/ml，每孔100μl，4℃过夜，PBST洗涤3次，每次

5min。

(2)使用2.5%脱脂奶粉封闭液进行封闭，每孔200μl，37℃作用1h, PBST洗涤3次，每次5min。

(3)将稀释后的血清加入反应孔，每孔100μl，37℃作用1h, PBST洗涤3次，每次5min。

39

(4)将稀释的HRP 标记的羊抗鼠IgG二抗加入反应孔，每孔100μl，37℃作用1h, PBST

洗涤3次，每次5min。

(5)每孔加TMB底物100μl，室温作用15min。

(6)每孔加3M H2SO4终止液50μl，终止反应，使用酶标仪读取OD450吸光值。

(7)间接ELISA判定标准：以被检样本的OD450值是阴性样本OD450值的2倍，即为阳性，1.5<比值<2.0为可疑，比值<1.5为阴性。

#### 2.3.5.3 间接ELISA检测小鼠免疫后的抗体水平

将小鼠的血清以102-105的稀释比例加入到反应孔中，之后加入HRP标记的羊抗鼠

IgG二抗，加入底物显色后读取OD450吸光值，判断小鼠抗体是否已达到需要水平。

### 2.3.6 IFA检测感染Fu-J (SDAU1005)的CEF

#### 2.3.6.1 Fu-J (SDAU1005)病毒悬液感染CEF

在六孔板中接种CEF，待细胞长成70%汇合度时，将“817”肉杂鸡颈部皮下肉瘤研磨液接种CEF，维持2h后换为含有1%新生牛血清的DMEM培养液。维持7d后吸出细胞上清液，PBS缓冲液冲洗三遍，使用固定液（丙酮：乙醇=3: 2）固定细胞，保存备用。

#### 2.3.6.2 IFA检测感染的CEF

取上一步感染的细胞进行IFA检测。分别以鼠抗Fps单因子血清（50稀释）、JE9单抗（100稀释）或者鸡抗ALV-J单因子血清（200稀释）为一抗；以FITC标记的羊抗鼠IgG抗体、PE标记的羊抗鼠IgG抗体或者FITC标记的羊抗鸡Ig Y抗体为二抗进行IFA反应，在荧光显微镜下观察荧光。

### 2.3.7 Western blot检测感染Fu-J (SDAU1005) 的CEF蛋白

#### 2.3.7.1 蛋白样品的制备

取Fu-J(SDAU1005)病毒悬液感染的CEF, PBS冲洗3遍，用细胞刮将6孔板一个孔里的细胞刮下后收集到1.5ml离心管中，加200μl RIPA裂解液裂解。待裂解完全后，加入等体积的2SDS Loding Buffer，煮沸10min，随后迅速置于冰上，4℃，14000g离心2min，置于-80℃保存备用。

#### 2.3.7.2 Western blot

制备SDS-PAGE凝胶，上样后电泳，半干法转膜。分别以鼠抗Fps单因子血清和鼠抗p19gag单因子血清为一抗，以HRP标记的羊抗鼠Ig G为二抗进行Western blot检测。

40

ECL化学发光法显影，拍照记录。

## 2.4 复制缺陷型Fu-Js感染性克隆的构建和病毒拯救

### 2.4.1 SDAU1005感染性克隆质粒的构建

#### 2.4.1.1 引物设计

根据已发表的ALV-J复制完整型病毒SDAU1005的全基因组序列，使用Primer Premier 5.0软件预测病毒序列中的酶切位点。结果发现，SDAU1005前病毒基因组序列中，不含有*Mlu* I和*Sal* I限制性内切酶的识别位点。并且，*Sph* I、*Mun* I在序列中仅包含有一个单酶切位点，将SDAU1005基因组序列分为三段。因此，分别设计三对引物扩增SDAU1005全基因组。其中，第一对上游引物加入*Mlu* I位点，下游引物加入*Sph* I位点；第二对上游引物加入*Mlu* I和*Sph* I位点，下游引物加入*Mun* I和*Sal* I位点；第三对上游引物加入*Mun* I位点，下游引物加入*Sal* I位点。引物序列如表2-7所示。

**表2-7** **构建SDAU1005感染性克隆质粒所用引物**

Table 2-7 Primers used in this study to construct infectious clone of SDAU1005

| 编号  No. | 引物名称  Primer name | 序列  Sequence(5′-3′) | 扩增片段  Application | 片段大小  Size of fragment |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1\* | SD 1-F  SD 1-R | ACGCGTTGTAGTCTTATGCAATAC  CTCCCGAAAGCATGCAGGCAACAG | Fragment I | 3929 bp |
| 2 | SD 2-F  SD 2-R | ACGCGTTCCTGTTGCCTGCATGCTT  AGGTCGACAGAGCATAGTCAATTGTC | Fragment III | 2460 bp |
| 3 | SD 3-F  SD 3-R | AGGACAATTGACTATGCTCTCTCCT  GTCGACAATGAAGCCTTCAGCTT | Fragment III | 1323 bp |

Note: \* underlined nucleic acid means restriction enzyme sites (more details in the text).

#### 2.4.1.2 质粒的构建

以肉瘤组织DNA为模板，使用上述引物进行PCR扩增和质粒构建。构建过程示意图如图2-8所示。简要步骤如下：

(1) PCR扩增片段I，II，III。

(2)将片段II与PMD-19T (simple)载体相连接，构建质粒PMD-J-F2.

(3)分别使用*Mlu* I和*Sph* I限制性内切酶双酶切回收的片段I和质粒PMD-J-F2，使用

T4连接酶将两者连接，构建质粒PMD-J-F12。

(4)分别使用*Mun* I和*Sal* I限制性内切酶双酶切回收的片段III和质粒PMD-J-F12，使用T4连接酶将两者连接，构建质粒PMD-SDAU1005。

41

Ⅰ

Ⅲ

*Mlu* I



*Sph* I *Mun*I

*Sal* I

Sequential cloning in PMD-19T



Ⅱ



|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| LTR | *gag* | *pol* | *env* | LTR |

**图2-8** **SDAU1005感染性克隆质粒构建示意图**

**Fig.** **2-8** **Schematic diagram showing construction of SDAU1005 infectious clone plasmids**

设计引物分三段扩增SDAU1005前病毒DNA，两端各加入*Mlu* I和*Sal* I限制性内切酶识别位点，分别使用*Sph* I 和

*Mun* I两个限制性内切酶将三个片段连接成为全长感染性克隆质粒。

The whole SDAU1005 genome was amplified by three fragments and assembled using the *Sph* I and *Mun* I restriction enzymes as illustrated. *Mlu* I and *Sal* I restriction enzyme sites were added in the plasmid.

### 2.4.2 SDAU1005感染性克隆质粒的转染和病毒拯救

#### 2.4.2.1 SDAU1005感染性克隆质粒转染CEF

将培养CEF细胞传代到24孔板中，待细胞达到90%贴壁时进行转染。转染使用invitrogen公司的Lipofectamine 2000。取2μg重组PMD-SDAU1005质粒混合于50μl无血清DMEM中，同时取2µl lipfectamine混合于50μl无血清DMEM中，混匀后室温放置5 min，将两者混匀，室温放置20min。将混合液加入含1.5 ml无血清DMEM的细胞培养孔中，摇晃混匀，继续培养。6h后换含血清的DMEM继续培养。48h后，取出培养的细胞，PBS缓冲液清洗，使用固定液（丙酮：乙醇=3: 2）固定，以JE9单抗为一抗，进行IFA检测；同时使用ELISA检测试剂盒检测细胞上清中的p27抗原，步骤同前。

#### 2.4.2.2 rSDAU1005病毒的拯救

将大提的PMD-SDAU1005质粒转染24孔板的CEF。维持7d后，使用ELISA检测试剂盒检测细胞上清中的p27抗原，抗原阳性者，使用0.25%的胰蛋白酶细胞细胞，进行传代，继续维持7d.7d后再次进行细胞消化、传代。收集细胞上清，作为拯救的rSDAU1005病毒，冻存于-80℃。固定留存的CEF细胞，使用JE9单抗进行IFA检测。

#### 2.4.2.3 rSDAU1005病毒与亲本毒复制动态的比较

取拯救的rSDAU1005病毒和亲本毒测定TCID50，利用Reed-Muench法在组织培养细胞上测定TCID50。将相同量的拯救病毒和亲本毒接种CEF，每天收集细胞上清分别测定TCID50，绘制病毒增值曲线。TCID50测定步骤如下：

(1)接种CEF细胞于96孔板，待细胞长成单层。

42

(2)取出−80℃冻存的病毒液，置于冰上融化。取12支无菌1.5mL离心管，分别加入900μl DMEM，吸取100μl病毒液加入第一支离心管中，震荡混匀。更换新的枪头，吸取100μL转移至第二管中，震荡混匀。重复操作，完成连续的10倍稀释液。

(3)吸取每一稀释度的病毒液100μl，加入在96孔板上长成单层的CEF上，每个病毒液稀释度做一列，第12列为阴性对照。37℃，5%CO2，培养7-10天。取上清使用IDEXX公司ALV抗原ELISA试剂盒检测p27，按照Reed-Muench法标准公式计算TCID50。

### 2.4.3 Fu-Js感染性克隆质粒的构建

#### 2.4.3.1 引物设计

根据本研究扩增到的Fu-J和已发表的Fu-J1~5前病毒全基因组序列，设计引物扩增六种缺陷型病毒的前基因组序列。使用Primer Premier 5.0软件预测病毒序列中的酶切位点。结果发现，Fu-J和Fu-J1~5这六个前病毒全基因组序列中均不含有*Eco*R I和*Sal* I酶切位点，且均含有一个*Xho* I和*Not* I单酶切位点。因此设计三对引物，分三段扩增Fu-Js的前病毒全基因组序列。其中，第一对上游引物加入*Eco*R I位点，下游引物加入*Xho* I位点；第二对上游引物加入*Eco*R I和*Xho* I位点，下游引物加入*Not* I和*Sal* I位点；第三对上游引物加入*Not* I位点，下游引物加入*Sal* I位点。引物序列如表2-8所示。

**表2-8** **构建Fu-Js感染性克隆质粒所用引物**

Table 2-8 Primers used in this study to construct infectious clone of Fu-Js

| 编号  No. | 引物名称  Primer name | 序列  Sequence(5′-3′) | 扩增片段  Application | 片段大小  Size of fragment |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1\* | Fu 1-F  Fu 1-R | GAATTCTGTAGTCTTATGCAATAC  ATGTAACCTGTTCCTCTCGAGCC | Fragment 1 | 892 bp |
| 2 | Fu 2-F  Fu 2-R | GAATTCATACGCGTATTGAAGGCGG  GTCGACAGGCGGCCGCTGAACACCTC | Fragment 2 | 2744bp |
| 3 | Fu 3-F  Fu 3-R | TTCAGCGGCCGCCTGCGTG  GTCGACAATGAAGCCTTCAGCTT | Fragment 3 | 3771 bp |
| 4 | env-F  env-R | GGATGAGGTGACTAAGAAAG  ACACTACATTTCCCCCTCCCTAT | Confirm the rescue  Of rSDAU1005 | 2060 bp |
| 5 | 5'gag-F  3'fps-R | CCCCATATGCCTTATGGATGGACGC  CCTGTGGATGCAGTGCTTGCTTTCC | Confirm the rescue  Of rFu-J | 2363 bp |

Note: \* underlined nucleic acid means restriction enzyme sites (more details in the text).

#### 2.4.3.2 质粒构建

以提取的第六代肉瘤组织DNA为模板，使用上述引物进行PCR扩增和质粒构建。构建过程示意图如图2-9所示。简要步骤如下：

43

(1) PCR扩增片段I，II，III。

(2)将片段II与PMD-19T (simple)载体相连接，构建质粒PMD-Fu-F2.

(3)分别使用*Eco*R I和*Xho*l I限制性内切酶双酶切纯化的片段I和质粒PMD-Fu-F2，使用T4连接酶将两者连接，构建质粒PMD-Fu-F12。

(4)分别使用*Not* I和*Sal* I限制性内切酶双酶切纯化的片段III和质粒PMD-Fu-F12，使用T4连接酶将两者连接，构建质粒PMD-Fu-J。

(5)以本实验室保存的Fu-J1~5部分质粒为模板，通过重叠PCR方法，分别扩增出五种不同的片段III，使用*Not* I和*Sal* I限制性内切酶双酶切纯化的五种片段III和质粒PMD-Fu-F12，使用T4连接酶将两者连接，构建质粒PMD-Fu-J1, PMD-Fu-J2，PMD-Fu-J3, PMD-Fu-J4和PMD-Fu-J5。



Ⅱ



Ⅰ

Ⅲ



*Eco*R I *Xho* I *Not* I *Sal* I

Sequential cloning in PMD-19T



|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| LTR | Δ*gag* | *fps* | Δ*pol* | Δ*env* | LTR |

**图2-9** **Fu-J感染性克隆质粒构建示意图**

**Fig.** **2-9** **Schematic diagram showing construction of Fu-J infectious clone plasmids**

设计引物分三段扩增Fu-J前病毒DNA，两端各加入*Eco*R I和*Sal* I限制性内切酶识别位点；分别使用*Xoh* I和*Not* I

两个限制性内切酶将三个片段连接成为全长感染性克隆质粒。

The whole Fu-J genome was amplified using three fragments and assembled using the *Xoh* I and *Not* I restriction enzymes as illustrated in the diagram. *Eco*R I and *Sal* I restriction enzyme sites were added in the plasmid.

### 2.4.4 Fu-Js质粒的转染和病毒拯救

#### 2.4.4.1 Fu-Js质粒转染CEF

为检测PMD-Fu-J和PMD-Fu-J1-5六种质粒是否能够在细胞中表达，将构建的六种质粒转染CEF，维持36h后，使用固定液固定细胞，以鼠抗Fps单因子血清为一抗，通过IFA和Western blot检测转染了六种质粒的CEF细胞中Gag-fps融合蛋白的表达。

#### 2.4.4.2 rFu-Js病毒的拯救

由于Fu-Js病毒为复制缺陷型病毒，本研究采用共转染的策略拯救rFu-Js病毒。将PMD-SDAU1005和六种PMD-Fu-Js质粒分别按一定比例共转染CEF细胞。维持7d后传代，继续维持7d。取细胞上清作为拯救毒rFu-J和rFu-J1~5。其中，拯救毒rFu-J携带有完整的v-*fps*肿瘤基因。

44

#### 2.4.4.3 rFu-Js病毒的鉴定

取上一步收集的拯救病毒（细胞上清），按照前述方法提取病毒RNA，分别使用引物（表2-8）进行RT-PCR扩增。其中，引物4特异性扩增ALV-J的*env*基因，引物5特异性扩增*fps*基因。引物5的上游位于*gag*基因，下游位于*fps*基因，保证扩增到的是*gag*-*fps*融合基因，避免内源性c-*fps*基因或辅助ALV的干扰。此外，将拯救的六种rFu-Js病毒接种新鲜的CEF细胞，维持7d后，使用ELISA试剂盒检测细胞上清中的p27抗原。同时，使用鼠抗Fps单因子血清或鸡抗ALV-J单因子血清通过IFA进行检测。

### 2.4.5 动物实验研究拯救毒rFu-Js的致瘤性

将6种拯救病毒接种CEF，测定其TCID50。分别通过翅下接种1日龄SPF鸡，每种病毒接种10只鸡，每只接种103个TCID50的拯救病毒，同时设置rSDAU1005攻毒组作为对照。具体分组如表2-9所示。所有实验动物均按组别分别饲养在负压隔离器内，每天观察肿瘤的发生情况。若发现肿瘤发生，衡量肿瘤的直径，记录肿瘤的生长速度。剖杀发生肿瘤的鸡，将原代肿瘤组织进行研磨，经0.24μm滤器过滤，继续颈部皮下接种1日龄SPF鸡进行传代，连传五代。收集每一代的肿瘤组织，浸泡于福尔马林溶液，

HE染色制备切片。同时提取每一代肿瘤组织的DNA，置于-20℃备用。

**表2-9** **拯救病毒rFu-Js (rSDAU1005)接种SPF鸡实验分组**

Table 2-9 Groups of pathogenecity experiments of rFu-Js(rSDAU1005) on SPF chickens

| 组别  Group | 数量  number | 接种病毒  Name of resued virus | 接种剂量  Dose | 部位  Inoculation site |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1  2  3  4  5  6  7  8 | 10  10  10  10  10  10  10  10 | RFu-J1(rSDAU1005) rFu-J2(rSDAU1005) rFu-J3(rSDAU1005) rFu-J4(rSDAU1005) rFu-J5(rSDAU1005) rFu-J6(rSDAU1005) rSDAU1005  DMEM | 103 TCID50  103 TCID50  103 TCID50  103 TCID50  103 TCID50  103 TCID50  103 TCID50  0.5mL | Under the wings under the wings under the wings under the wings under the wings under the wings under the wings  Under the wings |

### 2.4.6 免疫组化和IFA检测拯救毒rFu-J诱发的肿瘤

#### 2.4.6.1 免疫组织化学染色

取颈部皮下肿瘤，10%福尔马林溶液中固定后切片，按前述方法，以鼠抗Fps单因子血清为一抗，HRP 标记羊抗鼠Ig G为二抗，进行免疫组化染色，显微镜下观察记录。

45

#### 2.4.6.2 IFA检测肿瘤中的rFu-J病毒

将第五代肿瘤组织的研磨滤过液接种新鲜的CEF，维持7d。通过ELISA检测试剂盒检测细胞上清中的p27抗原，同时使用固定液固定CEF，以鼠抗Fps单因子血清和鸡抗ALV-J单因子血清为一抗进行IFA检测。

## 2.5 SJ (SDAU1102)株急性致瘤性ALV的分离鉴定

### 2.5.1 SJ (SDAU1102)病毒悬液的传代和扩增

2#病料来自于ft东新泰某海兰褐商品代蛋鸡场的一只240日龄海兰褐蛋鸡。人工造病试验证实，该纤维肉瘤是急性肉瘤。将该肉瘤块研磨，经0.24μm滤器过滤，分别在鸡体上和细胞上进行病毒的传代和扩增。在鸡体上传至第六代，在CEF上传至第五代。收集的肉瘤组织和病毒上清置于-80℃保存备用。

### 2.5.2 肉瘤组织DNA提取和病毒RNA提取

提取原代肉瘤组织DNA、原代肉瘤滤过液感染CEF的DNA和原代肉瘤滤过液感染CEF细胞上清的病毒RNA. DNA置于-20℃保存备用，RNA置于-80℃保存备用。

### 2.5.3 PCR/RT-PCR扩增和克隆测序

#### 2.5.3.1 引物设计

研究表明，该肉瘤病料中存在复制完整型的ALV-J。根据参考文献（陈浩，ft东农业大学，2012），使用1-4对引物扩增辅助ALV-J病毒的前病毒全基因组序列（表2-10）。如图2-10所示，第1、2、3对引物分别扩增ALV-J的*gag*基因，*pol*基因和*env*基因。由于ALV在复制过程中，会出现环形结构，据此设计第4对引物，扩增两端LTR序列。

由于该肉瘤为急性肉瘤，通过设计引物扩增全基因组序列。首先分别设计针对可诱发肉瘤的肿瘤基因的下游引物，如*fps*，*src*，*ros*，*yes*，*myb*，*myc*，*jun*等基因，配合使用针对*gag*基因和*pol*基因的上游引物，以原代肉瘤DNA为模板进行PCR扩增，以此推断该急性致肿瘤病毒所携带的肿瘤基因。确定该病毒所携带的肿瘤基因后，使用第5对和第6对引物，扩增病毒的全基因组序列。其中，第5对引物上游分别位于5’LTR 和

*pol*基因，下游引物位于*src*肿瘤基因，可扩增gag-src或*pol*-*src*嵌合体片段；第6对引物上游位于*src*肿瘤基因，下游位于3’LTR，可扩增*src*-*env*嵌合体片段（图2-10）。

46



**图2-10** **扩增SDAU1102和SJ前病毒基因组的引物位点示意图**

**Fig.** **2-10** **Positions of primers used for SDAU1102 and SJ proviral sequence amplification**

**表2-10** **扩增SDAU1102和SJ前病毒基因组的引物序列**

Table 2-10 Specific primers to amplify the proviral genome of SDAU1102 and SJ

| 编号  No. | 引物名称  Primer | 序列  Sequence(5′-3′) | 位置  Location | 目的基因  Target |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | gag-F  gag-R | CACCACATTGGTGTGCACCTGGGT  GAAGGGGCCACTGGTCAATCCACA | #239-#262  #2800-#2823a | Gag sequence |
| 2 | pol-F  Pol -R | GAGATTGTCTGCAGGGCCTAGGGCT  TGGCAGCAAGGGTGTCTTCTCCG | #2684-#2708  #5399-#5421 | Pol sequence |
| 3 | env-F  env-R | GAGGTGACTAAGAAAGATGAGGCGA  CATCTCCCCCTCCCTATGCGAAAGC | #5280-#5304  #7305-#7329 | Env sequence |
| 4c | 3' UTR-F  5' UTR-R | GGCTTCGGTTGTACGCGGATAGGA  CTTCCAACGACCCTCTGAGTGCTCG | #7131-#7154  #510-#534 | LTR circular  sequence |
| 5 | 5'LTR-F  3'pol-F src-R | TGTAGTCTTATGCAATACTCTTATGTA TAATATATCTATGCAGCAGGCTAGGG  CAAAGTACCACTCTTCAGCCTGGAT | #1-#27  #4529-#4554  #427-#451b | LTR-gag-src or LTR-pol-src  sequence |
| 6 | src-F  3'LTR-R | CTCGCAGACCCCCAACAAGACAGCA  AATGAAGCCTTCCGCTTCATGCAGGT | #93-#117b  #7627-#7652 | src-env-LTR  sequence |

A. primers were designed according to the proviral genome sequence of ALV-J JS09GY6 (Gene bank accession number: GU982310) isolated from commercial layers in China.

B. primers were designed according to chicken v-*src* oncogene (Gene bank accession number: NM\_205457).

C. ALV genome could form circular structure during replication in host cells, 3' UTR-F and 5' UTR-R were designed to target this sequence.

#### 2.5.3.2 PCR-RT/PCR扩增

以提取的原代肉瘤组织DNA为模板，使用设计的第5对、第6对引物，扩增急性急性致瘤性ALV SJ株的前病毒全基因组或部分基因组。以提取的细胞上清病毒RNA为模板，使用设计的第5对、第6对引物，进行RT-PCR扩增。

#### 2.5.3.3 克隆测序和序列拼接

将PCR或RT-PCR产物用0.8%琼脂糖凝胶进行电泳鉴定，切胶纯化回收，与PMD-18T载体相连接，转化DH5α大肠杆菌感受态细胞，挑取阳性克隆，送上海生工

47

生物工程公司进行序列测定，测定结果用DNAStar软件进行拼接分析和同源性比较。

### 2.5.4 p60v-src蛋白的原核表达

#### 2.5.4.1 引物设计

使用Premier 5.0软件对v-*src*基因的开放阅读框序列进行分析，发现该序列中不含

*Eco*R I 和*Xho* I 酶切位点。据此设计引物，上游引物序列为PET-src-F:

GCGGATCCGAATTCATGGGGAGTAGC（下划线为*Eco*R I酶切位点）；下游引物序列为PET-src-R: TGCTCGAGCTACTGGGGCTCTGTCGAGG（下划线为*Xho* I酶切位点）。

#### 2.5.4.2 PET-src载体的构建

以原代肿瘤DNA为模板进行PCR扩增。胶回收纯化PCR产物，同时用*Eco*R I和*Xho* I双酶切纯化产物和PET-28a(+)载体。将酶切产物和载体回收纯化并定量，使用T4连接酶进行连接反应，构建原核表达重组质粒PET-src。转化DH5α大肠杆菌感受态细胞，挑取阳性克隆，送上海生工测序，测定结果用DNAStar软件进行拼接分析和同源性比较。大提序列正确的质粒，置于-20℃保存备用。

#### 2.5.4.3 **p60v-src**蛋白的原核表达

将原核表达重组质粒PET-src转化DE3感受态大肠杆菌，挑取阳性克隆，进行p60v-src蛋白的原核表达，通过SDS-PAGE凝胶电泳检测表达的蛋白。摸索IPTG最佳浓度、最佳诱导温度和时间。按照最佳诱导条件，大量诱导表达Src蛋白。定量后置于-80℃保存。

### 2.5.5 鼠抗p60v-src蛋白单因子血清的制备

将获得的p60v-src蛋白与弗氏完全佐剂和不完全佐剂进行混合乳化，分三次免疫小鼠。三免10d后，尾静脉采血，通过建立的ELISA检测方法，测定血清效价。当达到所需的效价后，大量采血分离血清，置于-20℃保存备用。

### 2.5.6 Western blot检测感染SJ (SDAU1102)的CEF蛋白

用细胞刮收集六孔细胞板中感染了SJ (SDAU1102)的CEF细胞，RIPA裂解液裂解后SDS-PAGE凝胶电泳。半干法转膜，以鼠抗p60v-src单因子血清为一抗进行Western blot反应，通过化学发光检测试剂盒显影。本实验同时以未接毒处理的CEF 和仅感染

SDAU1102的CEF为空白对照，以未免疫蛋白的小鼠血清为阴性对照。

### 2.5.7 免疫组化检测原代肉瘤中的**p60v-src**蛋白

收集原代肿瘤组织，浸于福尔马林中固定，以鼠抗p60v-src单因子血清为一抗，通过

48

免疫组化方法检测组织中的Src抗原。同时，以未免疫蛋白的小鼠血清为阴性对照。

### 2.5.8 复制缺陷型SJs感染性克隆的构建

#### 2.5.8.1 引物设计

使用Primer Premier 5.0软件按照分析SJ-1, 2，3，4，5前病毒全基因组序列，发现在SJ-1序列中，仅存在*Mlu* I的单酶切位点，且不含有*Eco*R I和*Sal* I限制性内切酶的识别位点。在SJ-2~5序列中，存在*Nhe* I和*Mlu* I的单酶切位点。因此，设计三对引物扩增SJ-1~5的前病毒全基因序列（表2-11）。其中，第一对引物用于扩增SJ-1~5的第二部分，上游加入*Mlu* I酶切位点，下游加入*Sal* I酶切位点；第二对引物用于扩增SJ-1第一部分，上游加入*Eco*R I酶切位点，下游加入*Mlu* I和*Sal* I酶切位点；第三对引物用于扩增SJ-2~5第一部分，上游加入*Nhe* I酶切位点，下游加入*Mlu* I和*Sal* I酶切位点。

**表2-11 构建复制缺陷型SJ-1~5感染性克隆的引物**

Table 2-11 Specific primers used in this study for construction of infectious clone of SJ-1~5

| 编号  No. | 引物名称  Primer name | 序列  Sequence(5′-3′) | 应用  Application |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | Mlu-F  Sal-R | ACTCGCCAAGGACGCGTGGGAAATC  GTCGACAATGAAGCCTTCAGCTT | Amplification of fragement II of SJ |
| 2 | SJ1-EcoR-F  SJ1-Mlu-R | GAATTCTGTAGTCTTATGCAATAC  GTCGACGCTCCCTAATTCTATACGCGT | Amplification of fragement I of SJ-1 |
| 3 | SJ2-Nhe-F  SJ2-Mlu-R | ATCTTTTGCTAGCCGCCTCAAGTC  GTCGACTTCCCACGCGTCCTTGGCGAG | Amplification of fragement I of SJ-2~5 |

#### 2.5.8.2 复制缺陷型病毒SJ-1感染性克隆质粒的构建

(1)以原代肿瘤组织DNA为模板，使用第2对引物，扩增SJ-1片段I（图2-11A），与PMD-19T（simple）连接，构建质粒PMD-SJ1-1。

(2)以原代肿瘤组织DNA为模板，使用第1对引物，扩增SJ-1片段II（图2-11A）。

(3)同时使用*Mlu* I和*Sal* I双酶切纯化的片段II和质粒PMD-SJ1-1，胶回收纯化片段，使用T4连接酶连接，构建质粒PMD-SJ1。将构建的质粒PMD-SJ1送上海生工测序，序列正确者大提质粒，置于-20℃保存备用。

#### 2.3.8.3 复制缺陷型病毒SJ-2-5感染性克隆质粒的构建

(1)以原代肿瘤DNA为模板，使用第3对引物，扩增SJ-2~5的片段I，将扩增产物分别与PMD-19T（simple）连接，构建质粒PMD-SJ2-1，PMD-SJ3-1，PMD-SJ4-1，PMD-SJ5-1.

(2)以原代肿瘤组织DNA为模板，使用第1对引物，扩增SJ-2~5的片段II（图2-11B）。

49

(3)同时使用*Mlu* I和*Sal* I双酶切纯化的片段II和质粒PMD-SJ2-1, PMD-SJ3-1，PMD-SJ4-1，PMD-SJ5-1，胶回收纯化片段，使用T4连接酶连接，分别构建质粒PMD-SJ2-12，PMD-SJ3-12，PMD-SJ4-12，PMD-SJ5-12.

(4)将构建的质粒PMD-SJ2-12, PMD-SJ3-12，PMD-SJ4-12, PMD-SJ5-12与构建的感染性克隆质粒PMD-SDAU1005分别使用*Nhe* I和*Sal* I双酶切，胶回收纯化片段，使用T4连接酶连接，分别构建质粒PMD-SJ2，PMD-SJ3，PMD-SJ4，PMD-SJ。送上海生工测序，将质粒置于-20℃保存备用。

**A. rSJ-1**

Ⅰ

*Eco*R I *Mlu* I

Ⅱ

*Sal* I

Sequential cloning in PMD-19T

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| LTR | Δ*gag* | *src* | Δ*env* | LTR |

**B. rSJ- 2, 3, 4, 5**

Ⅱ

*Mlu* I *Sal* I

Ⅰ

*Nhe* I

Ligation

Ⅰ+II

*Nhe* I *Sal* I

Sequential cloning in PMD-SDAU1005

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| LTR | *gag* | Δ*pol* | *src* | Δ*env* | LTR |

**图2-11** **SJ-1-5感染性克隆质粒构建示意图**

**Fig 2-11 Schematic diagram showing construction of SJ-1-5 infectious clone plasmids**

A: 设计引物分两段扩增SJ-1病毒基因组，使用*Mlu* I限制性内切酶进行连接；B: 设计引物分两段扩增SJ-2~5的3’序列，使用*Mlu* I限制性内切酶进行连接，再使用*Nhe* I和*Sal* I两个限制性内切酶将其连入PMD-SDAU1005质粒。A: The SJ-1 proviral genome was amplified using two fragments and assembled using *Mlu* I restriction enzyme. B: 3'

Terminal part of SJ-2-5 proviral genomes were amplified with two fragments using *Mlu* I restriction enzyme firstly, and assembled using the *Nhe* I and *Sal* I restriction enzymes, as illustrated in the diagram.

### 2.5.8 复制缺陷型SJs感染性克隆的转染和检测

在24孔板中接种CEF，待细胞达到90%贴壁时使用Lipofectamine 2000进行转染。

6h后换含血清的DMEM继续培养。48h后，取出培养的细胞，PBS缓冲液清洗，使用固定液（丙酮：乙醇=3: 2）固定，以鼠抗p60v-src单因子血清为一抗，以FITC标记的羊抗

50

鼠Ig G为二抗进行检测。同时，用细胞刮收集转染的CEF, RIPA裂解液裂解，以鼠抗

src单因子血清为一抗，HRP标记的羊抗鼠IgG为二抗，通过Western blot进行检测，观察五种感染性克隆质粒中p60v-src蛋白的表达情况。

## 2. 6 Fu-J(SDAU1005)病毒Th物学特性和致病性的研究

### 2.6.1 辅助病毒和缺陷型病毒荧光定量PCR方法的建立

#### 2.6.1.1 引物设计

Fu-J (SDAU1005) 病毒悬液本质上是由复制完整型ALV-J毒株SDAU1005和携带

v-*fp*s 肿瘤基因的缺陷型病毒Fu-J 组成的，为准确定量Fu-J (SDAU1005) 病毒中

SDAU1005和Fu-J的相对含量，本研究分别建立了针对辅助ALV-J病毒和缺陷型病毒的荧光定量PCR方法。设计两对引物，第一对引物可特异性扩增ALV-J毒株的*gp85*基因；第二对引物可特异性扩增v-*fps*肿瘤基因，上游结合到*gag*基因，下游结合到*fps*基因，因此可以排除内源性c-*fps*基因和辅助ALV-J病毒对PCR的干扰（表2-12）。

**表2-12** **用于荧光定量PCR的引物**

Table 2-12 Primers used for real-time PCR

| 编号  NO. | 引物名称  Primer name | 序列  Sequence(5′-3′) | 目的基因  Target | 片段大小  Fragment Size |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | gp85-F  gp85-R | 5'-AACCAATCATGGACGATGGTA-3'  5'-TCCAAAGGTAAACCCATATGC-3' | gp85 | 255 bp |
| 2 | fps-F  fps-R | 5'-GCGAGGGGAACGGACTAATT-3'  5'-CACGCTGTGACATCCACTTCTT-3' | v-fps | 326 bp |

#### 2.6.1.2 质粒标准品的制备

以原代肉瘤组织DNA为模板，分别使用表2-12中的引物1和引物2进行PCR扩增。反应结束后，将PCR产物回收纯化，与PMD 18-T载体连接并转化DH5α感受态细胞，构建重组质粒PMD-gp85和PMD-fps。使用分光光度计对重组质粒PMD-gp85和PMD-fps定量，记录其在260和280nm处的吸光值，按以下公式计算重组质粒拷贝数：拷贝数（拷贝/μl）=DNA质量浓度/DNA分子量。其中DNA质量浓度=260nm吸光度稀释倍数6.021023, DNA分子量=DNA碱基数324.5。

#### 2.6.1.3 荧光定量PCR的建立和条件优化

分别以阳性质粒标准品质粒PMD-gp85和PMD-fps为模板进行荧光定量PCR扩增。使用矩阵法对上下游引物和退火温度进行优化，以得到最佳反应体系和反应条件。

#### 2.6.1.4 荧光定量PCR标准曲线的建立

51

分别将1109拷贝/μl的重组质粒进行10倍梯度稀释至浓度范围1109~1101拷贝

/μl，以其为模板，在最佳反应条件下同时扩增，每个稀释度设置3个重复，进行荧光定量PCR反应监测，绘制标准曲线。反应体系如表2-13所示。

**表2-13** **荧光定量PCR反应体系**

Table 2-13 Reaction system of real-time PCR

| 组成成分  Regents | 体积 （μl）  Volume |
| --- | --- |
| SYBR Premix ExTaqTM（2×） | 10.0 |
| ROX Reference DyeⅡ（50×） | 0.4 |
| 上游引物（10μM） | 0.4 |
| 下游引物（10μM） | 0.4 |
| 灭菌蒸馏水 | 6.8 |
| **Total** | 20.0 |

反应程序为：95℃预变性15s；95℃变性5s，60℃退火34s，扩增40个循环。为了分析SYBR Green I PCR扩增特异性，制作扩增反应的两个熔解曲线，条件为：95℃15s，

60℃1min，95℃15s，60℃15s。设立空白对照（ddH2O代替引物及模板）。

#### 2.6.1.5 荧光定量PCR的敏感性、特异性和重复性检测

荧光定量PCR的敏感性检测：将1109拷贝/μl的重组质粒进行10倍梯度稀释至浓度范围1109至1101拷贝/μl，进行荧光定量PCR反应，进行敏感性检测。同时以等量的质粒DNA为模板，进行常规PCR反应，取扩增产物5μl，用1%的琼脂糖凝胶电泳进行分析，计算两种方法所能检测出的最低模板浓度，比较两者敏感性的差异。

荧光定量PCR的特异性检测：分别以ALV-A/B/J、MDV、CAIV、IBDV、ARV、

NDV、AIV的DNA或cDNA为模板，使用所建立的实时荧光定量PCR方法进行检测，同时设置ddH2O为阴性对照。

荧光定量PCR的重复性检测：对不同梯度浓度稀释的质粒标准品进行实时荧光定量PCR检测，每个梯度进行3次反应，通过组内的CT值变异系数（标准偏差/重复值平均数）评估所建立方法的重复性。另外，以三份不同肉瘤组织DNA为模板进行荧光定量PCR检测，分析该方法的批内和批间重复性。批内重复：将上述3份DNA分别设立3个重复，在同一条件下同时检测，计算批内变异系数；批间重复：将上述3份DNA在同一条件下进行3次独立的荧光定量PCR检测，计算批间变异系数。

#### 2.6.1.6 数据分析

52

荧光定量PCR标准曲线的再现性是通过变异系数（标准偏差/平均值）来衡量的，批间和批内的CT值重复性的变异系数分别在3%或10%是可接受的；通过CV显示的x％的SD/均值对批间和批内的变异进行评估；使用ABI公司的SDS 5.0软件对数据进行统计；使用SPSS 19.0软件对数据进行统计学分析。

### 2.6.2 不同代次Fu-J (SDAU1005)细胞传代毒Fu-J含量的研究

#### 2.6.2.1 细胞上清中病毒RNA的提取

提取原代肿瘤研磨滤过液和第2、3、4、5代细胞上清毒中的病毒RNA，使用紫外分光光度计对RNA定量，置于-80℃冰箱中保存备用。

#### 2.6.2.2 反转录反应

以提取的五代病毒上清RNA为模板，使用通用引物进行反转录反应。

#### 2.6.2.3 荧光定量PCR

分别使用荧光定量PCR的引物gp85-F/gp85-R和fps-F/fps-R，以2.4.1.3中的每个代次病毒RNA转录的cDNA产物为模板，进行荧光定量PCR反应，每个样品设立三个重复。通过标准曲线公式计算每一代次病毒中缺陷型病毒与复制完整型辅助病毒拷贝数，通过两者的比值衡量每代次病毒中Fu-J的相对含量。

### 2.6.3 不同方式接种Fu-J (SDAU1005)毒株对SPF鸡的致病性

为研究Fu-J (SDAU1005)对SPF鸡的致病性和致瘤性，将110只1日龄SPF鸡分为

4个组，分组方式如表2-14所示。其中，第1、2、3组的鸡分别通过颈部皮下、腹腔和静脉接种103 TCID50的Fu-J (SDAU1005)病毒液。每组各放入10只鸡，作为接触传播组，研究该病毒的横向传播能力。第4组为空白对照组，不做任何处理。每周对4个组的鸡采集抗凝血，接种CEF检测病毒血症，并观察是否有肿瘤出现。第5周时将所有存活的鸡处死、剖检，收集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胸腺、法氏囊和肿瘤组织，福尔马林固定后HE染色，镜检观察，同时记录每只鸡不同器官的肿瘤发生情况。本研究中所有鸡均饲养在负压隔离器内，操作按照动物福利保护的原则进行。

53

组别

Group

数量

No. chickens

**表2-14** **动物实验分组**

**Table** **2-14** **Groups of the animal experiment**

接种毒株和数量

Strains and inoculation dose

接种途径

Infection route

20 103 TCID50 Fu-J (SDAU1005) Subcutaneously (sc.)

1

10 - -

20 103 TCID50 Fu-J (SDAU1005) Intraperitoneally (ip.)

2

10 - -

20 103 TCID50 Fu-J(SDAU1005) Intravenously (iv.)

3

10 - -

4 20 - -

### 2.6.4 不同方式接种Fu-J (SDAU1005)毒株的抗原分布

第3w时，收集死亡鸡的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胸腺、法氏囊和肿瘤组织，每组鸡器官收集三份。每份组织称取0.1g，提取DNA，紫外分光光度计对所提取的DNA定量。以提取的DNA为模板，分别使用引物gp85-F/gp85-R和fps-F/fps-R，对组织中辅助病毒和缺陷型病毒前病毒DNA定量，利用建立的定量方法计算每个器官中的病毒拷贝数。所有数据进行三次重复，使用SPSS19.0软件进行分析。

### 2.6.5 免疫Fps蛋白对鸡体肿瘤的抑制作用

#### 2.6.5.1 Fps原核表达蛋白的制备

大量诱导分两段表达的Fps蛋白，使用BCA蛋白定量试剂盒对诱导表达的两端蛋白进行定量，将两段蛋白等比例混合，与等量的弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂混合。

#### 2.6.5.2 动物实验设计

将60只SPF鸡随机分为三组，每组20只。第一组鸡在7日龄、21日龄分别肌肉注射免疫200μg Fps蛋白，第二组分别在7日龄、21日龄日龄肌肉注射相应体积的PBS，第三组作为阴性对照。28d 时，第一组和第二组的鸡颈部皮下接种等量的Fu-J

（SDAU1005）病毒悬液，观察记录肿瘤生长情况，实验观察至49d。每周采血，以ELISA

方法对所有实验鸡血清中的Fps抗体进行检测分析。

## 2.7 Fu-J (SDAU1005)感染CEF的转录组学分析

### 2.7.1 样品制备、RNA抽提和纯化

#### 2.7.1.1 样品制备

本实验分为三个组：Fu-J (SDAU1005)接毒组，SDAU1005接毒组和空白对照组。

54

同样将制备的Fu-J (SDAU1005) 肿瘤悬液或纯化的SDAU1005接种CEF，每个组的CEF

均接种104TCID50病毒，维持7d，收集各组细胞。

#### 2.7.1.2 细胞RNA的提取

使用Trizol抽提培养细胞RNA，方法简要如下：

(1)收取培养细胞至1.5ml离心管，加Trizol后，室温放置5min，使其充分裂解。

(2) 12000g离心5min，弃沉淀。

(3)按200μl氯仿/ml Trizol加入氯仿，振荡混匀后室温放置15min. (4) 4℃12000g离心15min。

(5)吸取上层水相，至另一离心管中。

(6)按0.5ml异丙醇/ml Trizol加入异丙醇混匀，室温放置10min。

(7) 4℃12000g离心10min，弃上清，RNA沉于管底。

(8)按1ml 75%乙醇/ml Trizol加入75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀。

(9) 4℃12000g离心5min，弃上清。

(10)室温晾干，使用50μl DEPC水溶解RNA样品，置于-70℃冰箱保存备用。

### 2.7.2 样品RNA的放大和标记

使用Agilent表达谱芯片配套试剂盒样品RNA的放大和标记，Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color (Agilent technologies, Santa Clara, USA)和标准操作流程对样品total RNA中的mRNA进行放大和标记。

### 2.7.3 芯片杂交和扫描

使用Agilent表达谱芯片配套的试剂盒，按照标准流程在杂交炉滚动杂交17小时(65℃, l0 rpm)，杂交cDNA的上样量为1.65μg，并按照流程在洗缸中洗片。杂交完成后，使用Agilent Microarray Scanner (Agilent technologies, Santa Clara, USA)进行扫描，使用Feature Extraction 10.7软件读取数据，使用Gene Spring 11.0软件进行数据的归一化处理，所用的算法为Quantile。

### 2.7.4 芯片数据分析

数据采用上海伯豪生物技术有限公司的SBC分析系统进行差异表达基因的筛选，设定fold change>4或fold change<0.25（*p*<0.05）为差异表达基因。通过GO聚类分析差异表达基因的生物学功能，通过KEGG数据库分析差异表达基因所参与的信号通路。

55

### 2.7.5 荧光定量RT-PCR

为验证基因芯片实验数据，选择基因芯片数据的差异表达基因，通过荧光定量PCR进行验证。以步骤2.5.1.2中提取的细胞RNA为模板，使用反转录试剂盒(Takara, 大连)将其反转录为cDNA。使用SYBRPremix Ex TaqTM II（Takara，大连）试剂盒，进行荧光定量PCR扩增（ABI7500, USA）。使用引物如表2-15所示，步骤同前。以鸡-actin基因为内参，通过2-ct方法进行数据的统计学分析，每个样品进行3次生物学重复。

**表2-15** **相对荧光定量PCR引物（芯片）**

Table 2-15 primers for relative real-time quantitative PCR

| 引物名称  Primer name | 序列  Sequence(5′-3′) | 目的基因  Target gene | 片段长度  Fragment size |
| --- | --- | --- | --- |
| CHP1-F  CHP1-R | 5'-TTGCTGCCGTTTAGTTGC-3'  5'-GAGGCTGGTGAAGCGACT-3' | CHP1 | 136 bp |
| ATG2B-F  ATG2B-R | 5'-GGAGCGAAGTTGGATGTG-3'  5'-CTGCTTAGGCTTTCTGGT-3' | ATG2B | 119 bp |
| RHOH-F  RHOH-R | 5'-ATTCTATCAAGTGCGTGCTG-3'  5'-GTGGGTCTGTAGTTGTCTGG-3' | RHOH | 100 bp |
| CDKL1-F  CDKL1-R | 5'-GTAACGATTCCAGACCCAG-3'  5'-CCTCCCTAACGCTGTCAAA-3' | CDKL1 | 166 bp |
| STK32C-F  STK32C-R | 5'-GCTCTTCGCTTGTCTCCC-3'  5'-CATGGCGTACATCTTCTCG-3' | STK32C | 188 bp |
| C9ORF39-F  C9ORF39-R | 5'-GCTGGGAGGATGTGAGTG-3'  5'-GTGCAGTGTTGCAGGGTT-3' | C9ORF39 | 165 bp |
| ACTL6A-F  ACTL6A-R | 5'-CGTCCTCCAAGTGTCAGA-3'  5'-CAGCACCAAAGTCACAGTTAT-3' | ACTL6A | 104 bp |
| FBN3-F  FBN3-R | 5'-GCTATGACCGAACTCCCG-3'  5'-TGTTGGGCTCCTCTTCAC-3' | FBN3 | 186 bp |
| VCAM1-F  VCAM1-R | 5'-GCTGGTATGGACTTTGAG-3'  5'-TACTTGTGCTGGTGGATT-3' | VCAM1 | 165 bp |
| LECT2-F  LECT2-R | 5'-GCCTGGTGTCCACTGCTT-3'  5'-TGTCTGCTGGCTCCGTAA-3' | LECT2 | 151 bp |

### 2.7.6 差异表达基因编码蛋白的互作分析

应用预测蛋白相互作用工具String 9.1 ([http: //string. embLde](http://string.emblde/))，选择Gallus gallus数据库，设定confidence为0.4，对本研究所获得的差异表达基因编码蛋白之间相互作用的分析。

## 2.8 拉米夫定抑制Fu-J (SDAU1005)复制和肿瘤Th长的研究

### 2.8.1 拉米夫定在培养细胞上对Fu-J (SDAU1005)复制的抑制

#### 2.8.1.1 拉米夫定细胞毒性的检测（CCK-8）

56

为检测拉米夫定对CEF的细胞毒性，探索药物的工作浓度，用PBS将拉米夫定药片（葛兰素史克制药苏州有限公司）分别倍比稀释为0、1、2、3、4、5、10、20μg/ml，分别加于铺满细胞的96孔板中（200μl/孔），置于37℃、5% CO2培养箱内培养，每天置显微镜下观察细胞形态，连续观察6d。使用CCK-8测定细胞活性，每个剂量药物检测3个孔，以正常细胞作为对照。加入CCK-8(20μl/孔) 3h后，读取OD450的吸光值。

#### 2.8.1.2 体外培养细胞的病毒感染和药物处理

分别使用含0、1、2、4μg/ml不同浓度拉米夫定的培养基培养原代CEF, 12h细胞铺成单层后，接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液，2h后更换新的含有拉米夫定的培养液，维持6d，每天收集细胞上清检测p27抗原，6d后收集细胞，保存备用。

#### 2.8.1.3 荧光定量PCR和western blot检测病毒拷贝量

收集步骤2.6.1.2中维持6d的细胞，一部分提取细胞总蛋白。平衡蛋白浓度后进行SDS-PAGE电泳，每孔上样20μl。半干法转膜，分别以ALV-J单抗JE9、鼠抗Fps单因子血清和-actin单抗（碧云天，北京）为一抗，进行western blot反应。

收集步骤2.6.1.2中维持6d的细胞，提取细胞总RNA，反转录为cDNA，分别使用针对*gp85*, v-*fps*和-actin的引物进行荧光定量PCR反应。其中*gp85*, v-*fps*引物如前所示，-actin的引物如表2-16所示。以鸡-actin基因为内参，通过2-ct方法进行数据的统计学分析，以未加药组CEF中辅助ALV-J和缺陷型Fu-J的拷贝数为基准，计算不同剂量加药组CEF中辅助ALV-J和缺陷型病毒Fu-J的相对量，以此评价不同浓度拉米夫定对辅助ALV-J和缺陷型病毒Fu-J复制的抑制率。

**表2-16** **相对荧光定量PCR引物（受体）**

Table 2-16 primers for relative real-time quantitative PCR

| 引物名称  Primer name | 序列  Sequence(5′-3′) | 目的基因  Target gene | 片段长度  Fragment size |
| --- | --- | --- | --- |
| NHE-F  NHE-R | 5'-ACCACCTTTTTGAGGAGTTT-3'  5'-AGCAATCAGCCCATAAATGA-3' | ChNHE 1 | 128 bp |
| ANXA-F  ANXA-R | 5'-AACCGCAGCAATGAACAGAG-3'  5'-TTAAGCTCCTGATTTGTCCGT-3' | ChANXA 2 | 239 bp |
| Actin-F  Actin-R | 5'-GAGAAATTGTGCGTGACATCA-3'  5'-CCTGAACCTCTCATTGCCA-3' | -actin | 152 bp |

### 2.8.2 拉米夫定影响反转录酶活性的研究

#### 2.8.2.1 pSK-gp85质粒的构建

57

为获得体外转录的RNA模板，以肿瘤DNA为模板，扩增ALV-J的*gp85*基因。设计上游引物pSK-gp85-F: cggaagcttGATGTACACCTTGTAG，下游引物pSK-gp85-R：

cccgaattcCCGTTTTATTCTGCTAGG. 其中上游引物加入*Hind* III识别位点，下游加入*Eco*R I限制性内切酶识别位点。将回收纯化的gp85基因与质粒pBluescript II SK(+)使用*Eco*R I和*Hind* III限制性内切酶进行双酶切、纯化、连接，构建质粒pSK-gp85.

#### 2.8.2.2 体外转录mRNA

采用江苏百奥迈科生物技术有限公司（中国，南通）的T7体外转录试剂盒体外转录RNA，按照说明书进行操作，简要步骤如下：

(1)在DEPC处理的RNase-free ependoff管中依次加入反应试剂，体系如表2-17所示。

**表2-17** **mRNA体外转录反应体系**

Table 2-17 Reaction system of mRNAin vitro transcription

| 成分 | 体积（ul） |
| --- | --- |
| 10×转录反应缓冲液 | 2 |
| dNTP | 4 |
| Xhol I 线性化的 pSK-gp85 质粒 | 4 (1μg) |
| RNase-free H2O | 9 |
| 总体积 | 19 |

(2)将ependoff管放入PCR仪中，60℃反应30min，去除模板中的RNA酶。

(3)待反应体系冷却后加入1μl T7 RNA聚合酶，37℃反应2h。

(4) 70℃加热10min灭活T7 RNA聚合酶。

(5)反应结束后，在体系中加入1μl RNase-free DNase (5U/ml)，37℃保温30min。

(6)补水到100μl，用等体积的Tris饱和酚-氯仿抽提一次。加入0.1倍体积的3M NaAc和2倍体积的乙醇，混匀后12000g，离心30min，弃上清后加入1ml 70%的乙醇，振荡后最高转速离心2min，弃上清，晾干，所得沉淀即体外转录所得的RNA。

(7)对获得的体外转录RNA通过紫外分光光度计定量，测定样品A260和A280，根据

A260/A280的比值判断RNA的质量。测定RNA原液浓度后，按照公式计算拷贝数。拷贝数=(6.02×1023)×(RNA浓度ng/μl×109) /(RNA碱基数×340)。

#### 2.8.2.3 反转录反应

使用商品化的ALV反转录酶（宝生物，大连），以体外转录获得的RNA为模板，以荧光定量下游引物gp85-R为引物，进行反转录反应。共设置四个反应体系，其中，

58

1-3号反应体系分别加入1μl、2μl和4μl的1mg/ml的拉米夫定水溶液，4号反应体系中不加拉米夫定，作为空白对照。每个体系重复3次。体系如表2-18所示。

**表2-18** **加入不同剂量拉米夫定反转录反应体系**

Table 2-18 Reaction system of reverse transcription containing different dose of lamivudine

| 成分 | 1#体系(μl) | 2#体系(μl) | 3#体系(μl) | 4#体系(μl) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| MgCl2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 10×RT Buffer | 1 | 1 | 1 | 1 |
| RNase-free H2O | 3 | 2 | - | 4 |
| dNTP | 1 | 1 | 1 | 1 |
| RNase inhibitor | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| AMV 反转录酶 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| gp85-R (2μM) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 拉米夫定(1mg/ml) | 1 | 2 | 4 | - |
| RNA 模板 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 总体积 | 10 | 10 | 10 | 10 |

#### 2.8.2.4 荧光定量PCR

取上述各组反转录液2μl，采用实时荧光定量PCR对每组cDNA进行定量，根据建立的标准曲线计算拷贝数。假定4#反应体系的反转录效率为100%（即反转录酶活性为100%），以4#反应体系获得的cDNA拷贝数为基准，计算另外三个体系的cDNA拷贝数与4#反应体系获得的cDNA拷贝数，以此作为AMV反转录酶的相对活性，判断拉米夫定对AMV反转录酶活性的影响。

### 2.8.3 拉米夫定对CEF ALV-J受体表达影响的研究

为研究拉米夫定对CEF ALV-J受体蛋白表达的影响，将体外培养的CEF分为四组，前三组分别使用含1μg/ml，2μg/ml，4μg/ml拉米夫定的培养基进行培养，第四组为空白对照组。处理24h后收集细胞，提取总RNA，反转录获得cDNA。以1μl的cNDA为模板，使用表2-16中的引物，进行SYBR Green I荧光定量PCR反应。通过鸡-actin的表达量对几种目的基因的表达量进行校正，2-ΔΔCt计算不同组细胞中的受体蛋白表达水平。

### 2.8.4 拉米夫定对病毒入侵和释放影响的研究

病毒入侵细胞效率的检测参考Qian等人的做法（Qian *et al*., 2014），将体外培养的

CEF分为四个组，前三组分别使用含1μg/ml，2μg/ml，4μg/ml拉米夫定的培养基进行培养，第四组为空白对照组。将Fu-J (SDAU1005)病毒同时接种四组CEF, 1.5h后使用

59

PBS清洗，胰酶消化。2000g，4℃离心收集细胞，使用PBS重悬并通过超声破碎仪破碎细胞。12000g，4℃离心，去除细胞碎片，将上清进行超速离心（60000g, 4℃）以去除细胞膜及细胞器，使用ELISA试剂盒检测该上清中p27抗原的含量。该实验重复三次，通过统计学分析四个组的p27数值是否有差异。

病毒释放效率的检测参考Qian等人（Qian *et al*, 2014）的做法，将体外培养的CEF分为四个组，同时接种Fu-J (SDAU1005) 病毒，48h后PBS清洗，并分别更换含有1μg/ml，2μg/ml，4μg/ml拉米夫定的培养基，孵育24h。分别收集细胞上清和细胞，并将细胞反复冻融，超声破碎仪破碎细胞，收集裂解液。使用ELISA试剂盒检测细胞上清和细胞内的p27抗原含量。该实验重复三次，通过统计学分析四个组的p27数值是否差异。

### 2.8.5 拉米夫定对鸡体Fu-J (SDAU1005)复制和肿瘤Th长的抑制

将160只1日龄SPF鸡随机分为8组，每组20只，动物实验的分组和处理方式如

表2-19所示。其中，第1、2、3、4组的鸡在1日龄时均通过颈部皮下接种103 TCID50的Fu-J (SDAU1005)病毒悬液；第5、6、7、8组的鸡在1日龄时均通过腹腔注射的方式接种103 TCID50的Fu-J (SDAU1005)病毒悬液。实验组（1、2、3、5、6、7组）的鸡自1日龄起连续7d肌肉注射不同剂量的拉米夫定（400μl），对照组（4、8组）的鸡接种相同体积的DMEM。饲养周期为30d，观察并记录死亡情况。对于1、2、3、4组的鸡，每2-3d记录颈部皮下攻毒组的肿瘤生长大小和死亡情况；对于5、6、7、8组的鸡，每周采集所有实验动物的血浆，提取病毒RNA，通过SYBR Green I荧光定量PCR对血浆中的辅助ALV和缺陷ALV载量进行定量，计算病毒的拷贝数。出于动物福利保护的原则，对颈部皮下肿瘤直径超过35mm、或者健康状态极其不佳的鸡，及时施以安乐死。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 分组  Group | 数量  No. chickens | 接种方式  Infection route | 处理  Treatment |
| 1 | 20 | Subcutaneous (sc.) | 1mg lamivudine |
| 2 | 20 | Subcutaneous (sc.) | 2mg lamivudine |
| 3 | 20 | Subcutaneous (sc.) | 3mg lamivudine |
| 4 | 20 | Subcutaneous (sc.) | DMEM |
| 5 | 20 | Intraperitoneal (ip.) | 1mg lamivudine |
| 6 | 20 | Intraperitoneal (ip.) | 2mg lamivudine |
| 7 | 20 | Intraperitoneal (ip.) | 3mg lamivudine |
| 8 | 20 | Intraperitoneal (ip.) | DMEM |

**表2-19** **拉米夫定抑制Fu-J (SDAU1005)复制动物实验分组情况Table 2-19 Groups of the chickens to establish the animal model**

60

### 2.8.6 给药组鸡肿瘤中病毒耐药性的检测

为检测给药组鸡肿瘤中病毒是否产生了对拉米夫定的耐药性，收集给药组（第3、7组）鸡的肿瘤组织。将给药组鸡的肿瘤组织研磨，经0.24μm滤器过滤，对其TCID50进行定量。按照表2-20的分组方式，同时接种相同TCID50的原始病毒和给药组鸡肿瘤滤过液。使用含有1μg/ml拉米夫定的培养液培养第1组和第3组的CEF，使用不含拉米夫定的DMEM培养液培养第2组和第4组的CEF，维持6d。每天收集细胞上清，通过

ELISA试剂盒检测上清中的p27抗原量。第7d时，收集每组的细胞，提取病毒RNA，通过荧光定量PCR对辅助ALV-J和缺陷型ALV进行定量，通过数据分析判断在给药过程中的病毒是否产生耐药性。此外，提取原始病料的DNA和给药组肿瘤的DNA，扩增

*pol*基因，观察*pol*基因在给药前后是否发生有趋势明显的碱基突变。

**表2-20** **给药组鸡肿瘤中病毒耐药性检测**

Table 2-20 Detection of lamivudine-resistant mutants in tumors from administrated chickens

| 分组  Group | 接种病毒  Viral infection | 培养液  Treatment |
| --- | --- | --- |
| 1 | Primary virus | 1μg/ml lamivudine |
| 2 | Primary virus | DMEM |
| 3 | Isolated virus | 1μg/ml lamivudine |
| 4 | Isolated virus | DMEM |

61

# **3** 结果与分析

## 3.1 Fu-J前病毒全基因组序列的扩增和分析

### 3.1.1 病毒悬液的传代和辅助病毒的纯化

#### 3.1.1.1 辅助病毒SDAU1005的纯化

通过有限稀释法培养感染了Fu-J (SDAU1005)的CEF，经过三次传代后，获得了纯化的辅助病毒SDAU1005。通过PCR扩增证实，纯化的SDAU1005毒株中不含缺陷型的Fu-J病毒；将纯化的SDAU1005毒株颈部皮下接种1日龄SPF鸡后，在3个月的时间内接种鸡均未发生急性肿瘤，表明获得了不含急性致瘤病毒的纯化辅助病毒。

#### 3.1.1.2 病毒悬液的传代和定量

将原代肉瘤组织研磨，经0.24μm滤器过滤后，制备病毒悬液。分别在鸡体上和体外培养细胞上进行传代扩增。收集每代次的肉瘤组织和细胞上清，-80℃保存备用。由Reed-Muench法算得，本研究所用的原代肉瘤组织滤过液的病毒量为104.2 TCID50/0.1ml；第一代细胞毒为104.1 TCID50/0.1ml；第二代细胞毒为104.3 TCID50/0.1ml，第三代细胞毒为104.2 TCID50/0.1ml，第四代细胞毒为104.2 TCID50/0.1ml，第五代细胞毒为104.1 TCID50/0.1ml；纯化的SDAU1005毒为103.8 TCID50/0.1ml。

### 3.1.2 Fu-J前病毒全基因组结构和序列的分析

以鸡第五代肿瘤DNA为模板，除了辅助病毒ALV-J SDAU1005的前病毒基因组序列，同时可扩增获得到Fu-J株的前病毒全基因组序列。测序结果分析表明，Fu-J前病毒基因组全长7399 bp，它是一株携带了v-*fps*肿瘤基因的急性致瘤性病毒，其前病毒cDNA的基因组结构可描述为：5'LTR-Δ*gag*-*fps*-Δ*pol*-Δ*env*-3'LTR（图3-1）。Fu-J在获得v-*fps*肿瘤基因的同时，它丢失了*gag*基因的部分序列。因此，Fu-J是一株不具有独立复制能力的缺陷型病毒，它需要辅助病毒提供*pol*和*env*的基因产物方可复制。除此之外，Fu-J的*pol*基因3’端及*env*基因5’端也发生了缺失突变。将Fu-J的前病毒基因组序列与辅助完整型ALV-J病毒SDAU1005比对发现，Fu-J的5’LTR及残存的*gag*基因与已测序的SDAU1005对应区域同源性高达99.9%，3’LTR及非编码区与SDAU1005对应区域同源性为99.5%，表明Fu-J与SDAU1005之间具有比较近的亲缘关系。因此，

62

SDAU1005不但是Fu-J的辅助病毒，而且是Fu-J的近缘病毒。根据毒株命名的国际规则，该病毒悬液被命名为Fu-J (SDAU1005)。

Fu-J

325 622

1713/1714 4397/4398

*fps* .



|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | △*gag* |  | △ *pol* |
| LTR |  |  |  |
| \*  3982 4314 | | | | |

6527

6528 6697 7399

4857 6839

LTR

2745 5320 5366

SDAU1005

325 622 2727

*gag*

LTR

*pol*

*env*

LTR

7008 7652

**图3-1** **携带完整v-*fps*肿瘤基因的复制缺陷型病毒Fu-J及其辅助病毒的基因组结构示意图**

**Fig.** **3-1** **Schematic structures of replication defective ALV Fu-J and its helper virus SDAU1005**

同辅助病毒SDAU1005相比，Fu-J为一株携带完整v-*fps*肿瘤基因的复制缺陷型病毒。图中“\*"代表酪氨酸磷酸化位点，”"代表*gag*-*fps*融合基因的终止密码子。绿色、黄色、蓝色和红色部分分别代表*gag*、*pol*、*env*和*fps*基因。Fu-J was a replication-defective virus carrying complete v-*fps* oncogene compared to that of SDAU1005, which function as

Its helper virus. Asterisk indicates canonical site for phosphorylated tyrosine, dot represents the terminator of long open reading frame in the *gag-fps* hybrid gene. Boxes in green, yellow, blue and red stand for *gag*, *pol*, *env* and *fps* region.

序列分析表明，在Fu-J的*gag*-*fps*基因衔接处（即Fu-J的1712-1715 bp），存在疑似重组位点“GACC"，它位于*gag*基因的p27编码区域，与c-*fps*的exon2相连接（图3-2）。在Fu-J的*fps-pol*基因衔接处（即Fu-J的4394-4396 bp，SDAU1005的2724-2726

bp），存在疑似重组位点“ATA”，该重组位点恰好位于c-*fps* mRNA加尾信号序列

“AATAAA”。Fu-J株病毒基因组中的两个重组位点仅含有3-4个碱基的共有序列，这意味着ALV肿瘤基因的获得可能并非通过同源重组的机制发生，非同源性末端接合

（Non-homologous end joining, NHEJ）机制有可能促进了病毒肿瘤基因的获得。在Fu-J的*pol*-*env*基因衔接处（即Fu-J的6527-6528 bp），两端各存在一段类似的重复序列。因此，推测Fu-J中*pol*-*env*的1983bp缺失可能是通过同源重组的方式或者复制过程中的跳跃发生的。

63

**A. *pol*/ *env* deletion**

4857 6839

SDAU1005

Fu-J

……acgag a**gtggctcgcga**g**a**t**g**g**g**gg……g**gtggctcgcga**a**a**g**g**t**g**tt……

＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊ ＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊ ＊ ＊ ＊

6527 6528

……acgag g**gtggctcgcga**a**a**g**g**t**g**tt……



＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊ ＊ ＊ ＊

**B. 5' *gag-fps* junction**

SDAU1005 atg gaa gcc…1071bp…gca tta ttg a**GA CC**g ggg gaa ttg……

···

*gag* sequence

\*＊＊

1713

*fps* sequence

Fu-J atg gaa gcc…1071bp…gca tta ttg a**GA CC**c cag ccc cag……



C-*fps* mRNA

···

\*＊＊

……cag ttg cac c**GG CC**c cag ccc cag……

\*＊＊

**C. 3' *fps-pol* junction**

SDAU1005

Fu-J

C-*fps* mRNA

……ctc cgc ttg aca aat tt**A TA**g gga ggg cca ctg ttc……

\*＊＊

*fps* sequence 4397 *pol* sequence

……cgg tgc gct gct gcg aa**A TA**g gga ggg cca ctg ttc……

\*＊＊

……cgg tgc gct gct gcg aa**A TA**a aag tcg gct ctg cag……

\*＊＊

**图3-2** **p*ol*/*env*缺失鸡病毒-宿主细胞间可能的重组位点分析**

**Fig.** **3-2** ***pol*/*env* deletion and possible junctions between viral and cellular domains in the genome of Fu-J**

A: Fu-J的*pol*/*env*缺失区域序列分析，结果表明在*pol*/*env*缺失区域两的两侧存在同源序列；B：将Fu-J基因组与

SDAU1005同源序列和细胞c-*fps*序列进行比对，箭头所示位置即疑似v-*fps*基因的左侧*gag*-*fps*重组位点；C：将Fu-J基因组与SDAU1005同源序列和细胞c-*fps*序列进行比对，箭头所示位置即疑似v-*fps*基因的右侧*fps*-*pol*重组位点。图中加粗且有星号注释的碱基代表了Fu-J中*po*l/*env*缺失区两端的同原序列。图3-2B和图3-2C中，绿色代表

SDAU1005的*gag*序列，紫色代表SDAU1005的*pol*序列，红色代表*fps*序列。“・”代表*gag*-*fps*融合基因的终止密码子，下划线代表疑似重组位点，“\*”代表同源序列。

A: Sequence analysis of *pol*/*env* deletion region in Fu-J revealed that, homologous sequence was flanking around this region. B: The Fu-J viral DNA was aligned with homologous sequence of SDAU1005 and cellular *fps* gene. The left-hand *gag*-*fps* junction site is indicated by arrows. C: The Fu-J viral DNA was aligned with homologous sequence of SDAU1005 and cellular *fps* gene. The right-hand *fps*-*pol* junction site is indicated by arrows. In Fig. 3-2A, bold fonts in red stands for homologous sequences and labeled by asterisk underline. In Fig. 3-2B and Fig. 3-2C, nucleotides in green stands for SDAU1005 *gag* sequence, nucleotides in purple stands for SDAU1005 *pol* sequence, nucleotides in red stands for *fps* sequence. Dot means the initiator codon of the *gag-fps* gene; ellipsis represents nucleotides due to space limitation, underlining stands for the predicted recombination site, and asterisks indicate homologies between those sequences.

64

### 3.1.3 Fu-J编码蛋白质的分析

使用Lasergene软件预测，v-*fps*基因的插入使得Fu-J编码融合的Gag-fps蛋白（图3-3）。由于插入的*fps*基因中，包含有终止密码子“TGA”（Fu-J的4314bp），因此，Fu-J基因组编码1230aa的Gag-fps融合蛋白（包括Gag编码的364个氨基酸和Fps编码的

866个氨基酸），预测蛋白大小为137kDa. P137gag-fps融合蛋白的Fps部分由一个F-BAR结构域、一个SH2结构域、两个螺旋转角结构域和一个激酶结构域组成，在细胞中发挥激酶的功能。P137gag-fps融合蛋白的Fps部分与c-*fps*原癌基因的表达产物NC P98fps同源性高达99.9%，仅有一个氨基酸的突变（V340A）。这可能与该病料的传代次数较少有关。



**图3-3** **Fu-J编码P137gag-fps融合蛋白结的结构示意图**

**Fig.** **3-3** **Structure diagram of Fps portion of P137gag-fps protein**

P137gag-fps 融合蛋白由364个氨基酸的Gag残基和866个氨基酸的Fps残基部分组成。其中，Fps残基包含一个F-BAR、两个螺旋转角、一个SH2和一个激酶结构域，激酶结构域中含有磷酸化活性位点。

P137gag-fps protein was consisted of 364 aa Gag residues and 866 aa Fps residues. Fps residues contained a F-BAR domain, two helix-turn-helix domains, a SH2 domain and a kinase domain which including an active phosphorylation site.

### 3.1.4 Fu-J基因组结构与Fu-J1~5及FSV、PRCII基因组结构的比较

之前的研究中（陈浩，2012），以第一代肿瘤DNA为模板，通过PCR扩增到了Fu-J1~5的前病毒基因组。Fu-J与它们的病毒基因组具有非常类似的结构（图3-4）。Fu-J1~5均携带有v-*fps*肿瘤基因，并且它们的*gag*-*fps*重组位点均完全一致。区别在于，Fu-J1~5携带的v-*fps*肿瘤基因均存在3’端缺失突变，并且v-*fps*肿瘤基因与ALV基因的衔接位点差别很大。值得注意的是，由于Fu-J1~5携带的v-*fps*肿瘤基因3’端存在缺失突变，这导致v-*fps*肿瘤基因丢失了自身的终止密码子，因此，Fu-J1~5需要利用ALV序列作为终止密码子转录翻译Gag-fps-env融合蛋白。由于3’-*fps*的缺失突变破坏了融合蛋白的激酶结构域，这可能使Fu-J1~5编码的融合蛋白丧失致瘤能力，下文将予以详细研究和讨论。

65

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**SDAU1005**

7652

**Fu-J**

.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |

\*

7341

**Fu-J1 Fu-J2 Fu-J3 Fu-J4 Fu-J5**

4206

\*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |

4165

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |

\*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |

4060

\*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |

3929

3940

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |

.

4203

.

3942

3945

4110

97

6542

4350

.

56

54

.

52

5677

47

.

62

**图3-4** **Fu-J与Fu-J1~5基因组结构比对示意图**

**Fig.** **3-4** **Comparison of genome structures between Fu-J and Fu-J1~5**

同Fu-J相比，Fu-J1~5携带了不同长度的v-*fps*肿瘤基因，它们具有相同的左侧*gag*-*fps*重组位点，但右侧重组位点差异很大。图中“\*”代表酪氨酸磷酸化位点，“・”代表*gag*-*fps*融合基因的终止密码子。绿色、黄色、蓝色和红色部分分别代表*gag*、*pol*、*env*和*fps*基因。

Comparing with Fu-J, Fu-J1~5 carried different length of v-*fps* oncogenes. All of them had the same left-hand *gag*-*fps* recombinatnt site, but the right-hand recombinant site varied considerably. In this picture, asterisk indicates canonical site for phosphorylated tyrosine, dot represents the terminator of long open reading frame in the *gag-fps* hybrid gene. Boxes in green, yellow, blue and red stand for *gag*, *pol*, *env* and *fps* region.

Fu-J与携带v-*fps*肿瘤基因的FSV和PRCII具有相似的基因结构（图3-5）。三株病毒的左侧重组都是发生在*gag*基因和c-*fps*基因的exon2之间，具体位点略有差异。三者均编码Gag-fps融合蛋白，由于它们重组位点存在差异，并且PRCII编码蛋白的Fps部分发生缺失突变，因此Fu-J、FSV和PRCII分别编码137kDa、130 kDa及105 kDa的Gag-fps融合蛋白。其中，FSV编码由308个Gag氨基酸残基和874个Fps氨基酸残基的P130gag-fps融合蛋白，PRCII-P105编码由357个Gag氨基酸残基和534个Fps氨基酸残基的P105gag-fps融合蛋白，Fu-J-P137编码由364个Gag氨基酸残基和866个Fps氨基酸残基的P137gag-fps融合蛋白。由此可见，Fu-J编码融合蛋白的Gag部分最长，PRCII次之，FSV最短。

66

**SDAU1005**



325 622

LTR

*gag*

2745

2727

5320 5366

*pol* *env*

7008 7652

LTR

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| *gag* | | | v-*fps* △ *pol* | |
| LTR |  |  |  |  |

**Fu-J**

325 622 △

1713/1714

4397

.



4314



6527 6697

7341

**FSV**

*gag*

347 626△1549/1550

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| LTR |  |  |

v-*fps*

4285

4442 4788

LTR

.

LTR

4174

**PRC II**

301/302

616

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
|  |  |

2017

v-*fps*

1906

.

**图3-5** **Fu-J、FSV和PRC II病毒基因组结构比对示意图**

**Fig.** **3-5** **Comparison of genome structures between Fu-J, FSV and PRC II**

Fu-J、FSV和PRC II具有类似的病毒基因组结构，但三者的重组位点略有不同。同Fu-J和FSV相比，PRC II所携带的v-*fps*肿瘤基因存在1020 bp的缺失，造成了病毒致瘤性的降低。图中“\*”代表酪氨酸磷酸化位点，“・”代表*gag*-*fps*融合基因的终止密码子。绿色、黄色、蓝色和红色部分分别代表*gag*、*pol*、*env*和*fps*基因。

As illustrated above, Fu-J, FSV and PRC II had the similar viral genomic structures. However, the recombination sites of them were different from each other. Moreover, there was a 1020 bp deletion in the v-*fps* region of PRC II when copared with those of FSV and Fu-J. In this picture, asterisk indicates canonical site for phosphorylated tyrosine, dot represents the terminator of long open reading frame in the *gag-fps* hybrid gene. Boxes in green, yellow, blue and red stand for *gag*, *pol*, *env* and *fps* region.

### 3.1.5 Fps蛋白和p19gag蛋白的原核表达

#### 3.1.5.1 Fps蛋白的分段表达

由于Fps蛋白较大，因此分两段进行表达。取本实验室保存的PET-fpsq和PET-fpsh原核表达重组质粒，转化入DE3感受态大肠杆菌，在1mM ITPG，32℃的条件下诱导表达6h。将重组表达菌诱导表达后，进行SDS-PAGE电泳分析，发现诱导表达的重组菌分别在37.1 kDa和65.8 kDa处出现特异表达带，与预期结果相符合（图3-6）。重组大肠杆菌大量诱导表达后分别超声波破碎，收集包涵体和清，经Ni-NTA-Resin纯化，BCA方法定量。其中，Fpsq蛋白浓度为4μg/μl，Fpsh蛋白浓度为3μg/μl，将纯化的蛋白保存于-20℃备用。

67

**kDa**



116.0

66.2

**1** 2 M 3 4 5 6 7 8 9

65.8 kDa

45.0

35.0

37.1kDa

25.0

18.4

14.4

**图3-6** **SDS-PAGE 检测两段Fps重组蛋白的表达**

**Fig.** **3-6** **SDS-PAGE analysis of expressive products of two Fps recombinant proteins**

1: 诱导不含质粒的DE3蛋白；2： 诱导转化PET-32a (+) 质粒的DE3蛋白；M: Marker; 3-6: 0,1,3,5h时诱导包含PET-32a (+) -fpsq质粒的DE3蛋白（37.1 kD）；7-9: 1, 3, 5h时诱导包含PET-32a (+) -fpsh 质粒的DE3蛋白（65.8 kD）。

1: Whole cell protein from IPTG-induced *E coli*. BL21 (DE3) cells; 2: Whole cell protein from IPTG-induced *E. coli.* BL21 (DE3) cells containing PET-32a(+); M: Protein Molecular Weight Marker; 3-6: Whole cell protein from IPTG-induced *E coli.*

BL21(DE3) cells containing recombinant plasmid pET-32a-fpsq after 0,1,3,5h (37.1 kD); 7-9: Whole cell protein from IPTG-induced *E coli.* BL21 (DE3) cells containing recombinant plasmid pET-32a-fpsh after 1,3,5h (65.8 kD).

#### 3.1.5.2 PET-P19重组表达质粒的构建

以肿瘤组织DNA为模板扩增p19基因，连入pET-32a(+)原核表达载体，构建PET-P19原核重组表达质粒。将重组质粒使用*Eco*R I和*Hind* III双酶切，通过1%的琼脂糖凝胶电泳观察酶切效果，结果表明PET-P19质粒可被切为两个条带。PET-P19原核重组表达质粒的双酶切电泳图如图3-7所示。

**bp** **M** 1



15000

7500

5000

3000

1500

1000

500

**图3-7** **原核表达载体pET-p19双酶切电泳图**

**Fig.** **3-7** **Validation of the recombinant plasmids of pET-p19**

M: DNA分子质量标准；1: pET-p19双酶切。

M: DNA marker; 1: restriction enzyme digestion analysis of pET-p19 plasmid.

68

#### 3.1.5.3 p19gag蛋白的诱导、表达和纯化

将原核重组表达质粒PET-p19转化入DE3大肠杆菌，探索IPTG、温度、诱导时间的最佳条件。经比较，PET-p19最佳诱导条件为1mM ITPG，32℃诱导6h。按照探索的最佳条件进行诱导表达，结果发现，PET-p19可表达约35.8kDa的重组蛋白，PET-32a(+)空载体可表达约21kDa 的载体蛋白，未转化质粒的大肠杆菌没有特定诱导蛋白的表达

（图3-8）。经超声波处理后分别收集上清和沉淀物进行SDS-PAGE 电泳，发现p19gag目的条带主要出现在上清中，表明该蛋白主要以可溶性蛋白的形式表达。使用Ni柱纯化诱导蛋白，经SDS-PAGE电泳确认纯化蛋白为单一条带后，经BCA法定量浓度，置于-20℃保存备用。该蛋白浓度为2.4μg/μl。

**kDa** **M** 1 2 3 4

180



130

95

72

55

43

34 35.8kDa

26

17

**图3-8** **SDS-PAGE 检测p19gag重组蛋白的表达**

**Fig.** **3-8** **SDS-PAGE analysis of expressive products in different induction time**

1: 诱导不含质粒的DE3; 2: 诱导包含PET-32a (+)质粒的DE3; 3: 诱导前包含PET-p19质粒的DE3; 4: Ni柱纯化后的p19gag重组蛋白；M: 蛋白Marker。

1: Whole cell protein from IPTG-induced E coli. DE3 cells; 2: Whole cell protein from IPTG-induced E. coli. DE3 cells containing PET-32a (+); 3: Whole cell protein from IPTG-induced E coli. DE3 cells containing recombinant plasmid pET-p19 6h; 4: Recombinat p19gag protein purified by Ni resion; M: Protein Molecular Weight Marker.

### 3.1.6 鼠抗Fps和鼠抗p19gag单因子血清的获得

将经Ni-Resin纯化的Fps重组蛋白和p19gag重组蛋白免疫Bac/c小鼠，三次免疫后采集血清，利用建立的ELISA方法检测血清效价。其中，鼠抗Fps单因子血清的抗体滴度可达到1: 20,000，鼠抗抗p19gag单因子血清的抗体滴度可以达到1: 10,000，符合实验要求。大量收集小鼠血清，置于-20℃保存。

69

### 3.1.7 IFA检测感染Fu-J (SDAU1005)的CEF

分别以鼠抗Fps单因子血清和鸡抗ALV-J单因子血清为一抗，以PE标记的羊抗鼠Ig G和FITC标记的羊抗鼠Ig G为二抗，对Fu-J (SDAU1005)感染的CEF进行间接免疫荧光检测（图3-9）。结果发现，CEF可以被ALV-J辅助病毒感染感染（绿色荧光），也可以被Fu-J感染（红色荧光）。将两幅图片重合，黄色荧光则表明有一部分细胞同时被SDAU1005和Fu-J所感染。



a

b

c

d

e

f

**图3-9** **IFA检测感染了Fu-J (SDAU1005)的CEF**

**Fig.** **3-9** **IFA analysis of Fu-J(SDAU1005) infected CEFs**

a：以鸡抗ALV-J单因子血清为一抗，通过IFA检测Fu-J (SDAU1005)感染的CEF (200)；b：以鼠抗Fps单因子血清为一抗，通过IFA检测Fu-J (SDAU1005)感染的CEF (200)；c：为（a）（b）两图的合并图。d：以未感染CEF为空白对照，以鸡抗ALV-J单因子血清为一抗，进行IFA检测(200)；e： 以未感染CEF为空白对照，以鼠抗Fps单因子

血清为一抗，进行IFA检测(200)；f： 为（d）（e）两图的合并图。

A: IFA of Fu-J (SDAU1005) infected CEFs using chicken anti-ALV-J mono-specific serum as antibody (200); b: IFA of Fu-J (SDAU1005) infected CEFs using mouse anti-fps mono-specific serum as antibody (200); c: merged with (a) and (b); d: IFA of untreated CEFs using chicken anti-ALV-J mono-specific serum as antibody (200); e: IFA of untreated CEFs using

Mouse anti-fps mono-specific serum as antibody (200); f: merged with (d) and (e).

### 3.1.8 Western blot检测感染Fu-J (SDAU1005) 的CEF蛋白

为了确定Fu-J编码表达的Gag-fps融合蛋白的大小，提取感染了Fu-J (SDAU1005)的CEF总蛋白，SDS-PAGE电泳后转膜，进行western blot检测（图3-10）。结果表明，当使用鼠抗Fps单因子血清和鼠抗p19gag单因子血清作为一抗检测时，感染Fu-J

（SDAU1005）的CEF细胞在140kDa左右同时有一特异性条带被识别，而单独感染

SDAU1005和未处理的CEF总蛋白中则无此条带。这表明，该蛋白条带即为Fu-J所编

70

码的p137gag-fps融合蛋白。作为对照，鼠抗ALV-J单克隆抗体JE9均可识别感染了Fu-J

（SDAU1005）病毒悬液和感染了SDAU1005的CEF中一条80kDa左右的条带。



**图3-10** **Western blot检测感染了Fu-J (SDAU1005)的CEF Fig. 3-10 Western blot analysis of Fu-J (SDAU1005) infected CEFs**

分别以鼠抗Fps单因子血清（a）、鼠抗p19单因子血清（b）和ALV-J单抗（c）为一抗进行Western blot检测。样品分别为：

感染了Fu-J (SDAU1005) 的CEF总蛋白(line1), 感染了SDAU1005的CEF总蛋白(line2)和未感染CEF总蛋白(line3). Western blot analysis of Fu-J (SDAU1005) infected CEFs. Western blot analysis of cell lysates from CEFs infected by Fu-J (line 1), CEF infected by SDAU1005 (line 2), and uninfected CEF (line 3) using mouse anti-fps mono-specific serum (a), mouse anti-p19gag mono-specific serum (b), and monoclonal antibody JE9 (c).

## 3.2 Fu-J(SDAU1005)感染性克隆的构建和缺陷型病毒的病毒拯救

### 3.2.1 SDAU1005感染性克隆的构建和病毒拯救

#### 3.2.1.1 SDAU1005感染性克隆的构建

使用Primer Premier 5.0软件分析SDAU1005的前病毒基因组序列，根据限制性内切酶识别位点，将全基因组分为三段进行PCR扩增（图3-11），通过酶切的方式连入PMD-19T (simple)载体，构建感染性克隆质粒PMD-SDAU1005. *Mlu* I和*Sal* I双酶切质粒，1%凝胶电泳，该质粒可被切为载体和全基因组两段，且全基因组大小符合预期

（图3-12）。交由上海生工进行测序，测序正确者大量提取感染性克隆质粒，冻存于-20℃，保存备用。

71

**bp** **M** 1 2 3

15000



10000

5000

3000

1500

1000

500

**图3-11** **SDAU1005感染性克隆构建扩增电泳图**

**Fig.** **3-11** **Electrophoresis of PCR amplification for SDAU1005 infectious clone plasmid**

M: Maker; 1: SD-1的PCR扩增产物；2: SD-2的PCR扩增产物；3: SD-3的PCR扩增产物。

M: Maker; 1: PCR product of SD-1 fragment of SDAU1005; 2: PCR product of SD-2 fragment of SDAU1005; 3: PCR

Product of SD-3 fragment of SDAU1005.

**bp** **M** 1



15000

10000

5000

3000

1500

1000

500

**图3-12** **PMD-1005感染性克隆质粒酶切电泳图**

**Fig.** **3-12** **Electrophoresis of restriction enzyme digestion of SDAU1005 infectious clone plasmid**

M: Maker；1:使用*Mlu* I和*Sal* I双酶切PMD-1005感染性克隆质粒。

M: Maker; 1: restriction enzyme digestion of SDAU1005 infectious clone plasmid using *Mlu* I and *Sal* I.

#### 3.2.1.2 SDAU1005感染性克隆瞬时转染的检测

为检测构建的感染性克隆质粒PMD-SDAU1005能否在CEF中转录表达，将提取的质粒转染体外培养的CEF。转染36h后固定CEF，以ALV-J单抗JE9为一抗，FITC标记的羊抗鼠Ig G为二抗进行IFA检测。检测结果显示，转染CEF的细胞浆中出现绿色荧光，这表明感染性克隆质粒PMD-SDAU1005在CEF中可以转录表达。

#### 3.2.1.3 SDAU1005的病毒拯救

将感染性克隆质粒PMD-SDAU1005转染新鲜的CEF，维持5d后传代，再次维持

5d并传代。7d后使用ELISA试剂盒检测细胞上清中的p27. S/P值达到2.0后，收集上清，作为拯救病毒rSDAU1005冻存于-80℃。将拯救病毒rSDAU1005重新接种新鲜的

72

CEF，维持7d后检测上清p27抗原为阳性；以ALV-J单抗JE9为一抗进行IFA检测，结果亦显示感染细胞的细胞浆中显现绿色荧光，表明拯救病毒具备感染性（图3-13）。



**A**

**B**

**图3-13** **拯救病毒rSDAU1005感染CEF的IFA检测**

**B**

**Fig.** **3-13** **IFA analysis of rSDAU1005 infected CEF**

A: 以ALV-J单克隆抗体JE9检测感染了rSDAU1005的CEF；B: 未接毒空白对照.

A: IFA analysis of rSDAU1005 infected CEF using ALV-J mAb JE9 as antibody; B: unfected CEF.

#### 3.2.1.4 拯救病毒的复制动态

为研究拯救病毒与亲本病毒的复制效率是否存在显著差别，分别将拯救毒和亲本毒接种新鲜的CEF细胞，每隔一天收集上清检测TCID50，绘制病毒的复制动态折线图。结果显示，拯救病毒和亲本病毒的复制效率没有显著差别，这表明，拯救病毒具有与亲本毒类似的复制效率（图3-14）。

**SDAU1005 rSDAU1005**

**5**

**Virus titres (log TCID 50 ml-1)**

**4**

**3**

**2**

**1**

**0**

**0** 2 4 6 8 **10** **12**

**Time (days post-infection)**

**图3-14** **拯救病毒rSDAU1005与亲本病毒复制动态比较**

**Fig.** **3-14** **Comparison of viral replication dynamics between rSDAU1005 and parental virus**

每隔一段时间收集感染病毒后的细胞上清，通过测定病毒的滴度绘制病毒增殖曲线。本研究重复三次，数据通过平均值±标准差的形式展示。

The growth curves were determined by assaying the viral titres. The viral titres harvested at different intervals were calculated and expressed as TCID50 ml–1. The mean±SD values from three independent experiments are shown.

73

### 3.2.2 Fu-Js感染性克隆的构建

#### 3.2.2.1 Fu-Js感染性克隆的构建

使用Primer Premier 5.0软件分析Fu-J和Fu-J1~5的前病毒基因组序列，将全基因组分为三段进行扩增，构建感染性克隆质粒PMD-Fu-J和PMD-Fu-J1~5。以原代肿瘤DNA为模板进行PCR扩增（图3-15），将三个片段连入载体PMD-19T (simple)。使用*Eco*R I和*Sal* I双酶切质粒，1%凝胶电泳，六个质粒均可被切为载体和全基因组两段，且全基因组大小符合预期（图3-16）。测序验证后，大量提取质粒，冻存于-20℃备用。

**bp** **M** 1 2 3 4 5 6 7 8



15000

10000

7500

5000

3000

1500

1000

500

**图3-15** **Fu-Js感染性克隆扩增产物电泳图**

**Fig.** **3-15** **Electrophoresis of PCR products of Fu-Js infectious clone plasmids**

M: Maker; 1: Fu-1片段的PCR扩增产物；2: Fu-2片段的PCR扩增产物；3-8:六种感染性克隆的Fu-3片段的PCR

扩增产物。

M: Maker; 1: PCR product of Fu-1 fragment of Fu-Js; 2: PCR product of Fu-2 fragment of Fu-Js; 3-8: PCR product of

Fu-3 fragment of Fu-J1~5.

**bp** **M** 1 2 3 4 5 6

15000

10000

7500

5000

3000

1500

1000

500

**图3-16** **PMD-Fu-Js感染性克隆质粒双酶切产物电泳图**

**Fig.** **3-16** **Electrophoresis of restriction enzyme digestion of Fu-Js infectious clone plasmids**

M: Maker; 1-6: 使用*Eco*R I和*Sal* I双酶切六种PMD-Fu-Js感染性克隆质粒。

M: Maker; 1: restriction enzyme digestion of PMD-Fu-Js infectious clone plasmid using *Eco*R I and *Sal* I.

#### 3.2.2.2 Fu-Js感染性克隆瞬时转染的检测

为检测构建的感染性克隆质粒PMD-Fu-Js能否在CEF中转录表达，将提取的质粒转染体外培养的CEF。以鼠抗Fps单因子血清为一抗，FITC标记的羊抗鼠Ig G为二抗

74

进行IFA检测。检测结果显示，转染CEF的细胞浆中出现绿色荧光，这表明六种感染性克隆质粒PMD-Fu-J和PMD-Fu-J1~5均在CEF中可以转录表达（图3-17）。为了进一步验证所构建质粒表达融合蛋白的大小，收集瞬时转染的CEF，提取总蛋白，以鼠抗

Fps单因子血清为一抗进行Western blot检测（图3-17）。检测结果表明，六种感染性克隆质粒PMD-Fu-J和PMD-Fu-J1-5分别可以表达137.1、138.1、132.3、128.9、122.7 和

122.8 kDa的融合蛋白。

**(A)**



**a**

**b**

**c**

**d**

**e**

**f**

**(B)**

**kDa**

180

130

95

**1** 2 3 4 5 6 7 8



**图3-17** **IFA和western blot检测转染了PMD-Fu-Js的CEF**

**Fig.** **3-17** **IFA and Western blot analysis of CEF transfected with PMD-Fu-Js infectious clone plasmids**

A: 以鼠抗Fps单因子血清为一抗，IFA检测转染PMD-Fu-J(a)、PMD-Fu-J1(b)、PMD-Fu-J2(c)、PMD-Fu-J3(d)、PMD-Fu-J4(e)和PMD-Fu-J5(f)的CEF. B: 以鼠抗Fps单因子血清为一抗，Western blot检测转染了PMD-Fu-J(1)、PMD-Fu-J1(2)、PMD-Fu-J2(3)、PMD-Fu-J3(4)、PMD-Fu-J4(5)和PMD-Fu-J5(6)的CEF总蛋白，以转染了

PMD-SDAU1005(7)和未转染的CEF总蛋白(8)为对照。

A: IFA of CEF transfected with infectious clone plasmids PMD-Fu-J (a)、PMD-Fu-J1 (b)、PMD-Fu-J2 (c)、PMD-Fu-J3 (d)、PMD-Fu-J4 (e) and PMD-Fu-J5 (f) using mouse anti-fps monospecific serum as antibody. B: Western blot anaylysis of CEF transfected with plasmids PMD-Fu-J (1)、PMD-Fu-J1 (2)、PMD-Fu-J2 (3)、PMD-Fu-J3 (4)、PMD-Fu-J4 (5) and PMD-Fu-J5

(6) using mouse anti-fps monospecific serum as antibody, CEF transfected with PMD-SDAU1005 (7) and untransfected CEF were served as control.

### 3.2.3 Fu-Js缺陷型病毒的拯救

在成功构建辅助病毒感染性克隆和缺陷型病毒感染性克隆的基础上，将

PMD-SDAU1005质粒分别与PMD-Fu-J及Fu-J1~5质粒共转染CEF. 细胞盲传3代，维

75

持7d后收获细胞上清，所获得的6种拯救病毒分别命名为rFu-J (rSDAU1005)及rFu-J1~5

（rSDAU1005）。为了验证拯救病毒的感染性，提取细胞上清中6种拯救病毒RNA，分别使用ALV-J和Fu-J特异性引物RT-PCR扩增，均可扩增到目的条带（图3-18）。将6种拯救病毒接种新的CEF，维持7d后，固定感染的细胞，以鼠抗Fps单因子血清为一抗进行IFA检测。结果显示，感染了6种拯救病毒CEF的细胞浆中均出现绿色荧光，表明6种缺陷型病毒被成功拯救（图3-19）。

**1** 2 3 4 5 6 7 8

***Fps***

******

***env***



**图3-18** **RT-PCR扩增拯救病毒上清中的缺陷型病毒和辅助病毒**

**Fig.** **3-18** **RT-PCR amplification of replication-defective and helper rescued viruses in the supernatant**

1-6: RT-PCR扩增拯救病毒rFu-J (rSDAU1005) 和rFu-J 1~5 (rSDAU1005)中的缺陷型病毒（fps）和辅助病毒（env）；

7: RT-PCR扩增拯救病毒rSDAU1005(env)；8：空白对照。



**A**

**B**

**C**

**D**

**E**

**F**

1-6: RT-PCR amplification of replication-defective (fps) and helper virus (env) in the rescued rFu-J (rSDAU1005) and rFu-J 1~5 (rSDAU1005) viral stocks; 7: RT-PCR amplification of rSDAU1005 (env); 8: Blank control.

**图3-19** **IFA检测感染了六种拯救病毒的CEF**

**Fig.** **3-19** **IFA detection of CEF infected with six kinds of rescued viral stocks**

以鼠抗Fps单因子血清为一抗，通过IFA检测感染了拯救病毒rFu-J (rSDAU1005) (A)、rFu-J1(rSDAU1005) (B)、rFu-J2 (rSDAU1005) (C)、rFu-J3 (rSDAU1005) (D)、rFu-J4 (rSDAU1005) (E)、rFu-J5 (rSDAU1005) (F)的CEF。

IFA detection of CEF infected with rFu-J (rSDAU1005) (A), rFu-J1(rSDAU1005) (B), rFu-J2 (rSDAU1005) (C), rFu-J3 (rSDAU1005) (D), rFu-J4 (rSDAU1005) (E) and rFu-J5 (rSDAU1005) (F) using mouse anti-fps monospecific serum.

### 3.2.4 拯救病毒的致瘤性研究

#### 3.2.4.1 拯救病毒诱发鸡肿瘤的情况

将6种拯救病毒分别翅下接种1日龄SPF小鸡，每种病毒接种10只鸡，设置

rSDAU1005攻毒组作为对照。28d时，接种rFu-J的小鸡中，有2只出现肿瘤，接种其

76

他拯救病毒的鸡及对照组鸡均未出现肿瘤（图3-20）。为促进病毒释放和肿瘤的生长，将2只鸡的肿瘤切下、研磨，把滤过液继续接种1日龄SPF小鸡，持续传代。在传代过程中，小鸡出现肿瘤的时间不断缩短，肿瘤的生长速度逐渐加快。当传至第4代时，第

8d即可触摸到肿瘤，其生长速度与野毒基本一致。



**A**

**B**

**C**

**图3-20** **拯救病毒诱发SPF鸡的肿瘤组织**

**Fig.** **3-20** **Fibrosarcomas induced by rFu-J(rSDASU1005) rescued viral stocks**

A/B: 35d时，rFu-J (rSDASU1005)拯救病毒悬液诱发的第一代肿瘤；C: rFu-J (rSDASU1005)拯救病毒悬液诱发的第五代鸡肿瘤。

A/B: Original fibrosarcomas induced by rFu-J (rSDASU1005) rescued viral stocks. C: The fifth-generation of fibrosarcomas induced by rFu-J (rSDASU1005) rescued viral stocks.

**表3-1** **拯救病毒诱发的肿瘤在鸡体传代过程中每代肿瘤生长速度**

**Talbe 3-1 Growth rate of fibrosarcomas of different generations during passage in chickens**

Diameters post-inoculation (cm)

| NO. Generation |  | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 7d | 11d | 14d | 21d | 28d |
| 1 | - | - | + | 4.30 | 8.60 |
| 2 | - | + | 4.23±0.11 | 12.38±0.78 | 18.31±1.23 |
| 1 3 | - | + | 7.43±0.34 | 16.94±0.89 | 21.47±1.88 |
| 4 | - | 4.23±0.50 | 8.71±0.67 | 19.94±1.26 | 25.32±1.52 |
| 5 | - | 6.34±0.22 | 13.39±0.71 | 22.38±1.63 | 24.73±1.83 |
| 1 | - | - | + | 5.10 | 10.20 |
| 2 | - | + | 5.12±0.23 | 15.22±1.23 | 22.50±1.84 |
| 2 3 |  | + | 7.64±0.34 | 16.92±1.08 | 24.20±1.25 |
| 4 | + | 4.21±0.10 | 10.32±1.43 | 24.10±1.82 | 28.84±2.27 |
| 5 | + | 7.48±0.23 | 13.85±1.15 | 25.28±1.53 | 29.94±2.31 |
| Wild-type | + | 9.93±0.74 | 15.42±1.32 | 31.54±1.37 | 35.31±1.98 |

Note: -: not fell obvious particles; +: feel the grain size of the particles.

The mean±SD values were calculated from data of three chickens used for serial passage.

#### 3.2.4.2 拯救病毒诱发肿瘤组织中病毒和抗原的检测

为验证诱发的肿瘤组织是由拯救的病毒所引发，取第五代的肿瘤组织，福尔马林固定，HE染色，可观察到肿瘤组织由纤维细胞组成。免疫组化结果显示，拯救病毒rFu-J

77



**A**

**B**

**C**

**D**

**E**

**F**

诱发的肿瘤细胞可以被鼠抗Fps单因子血清所识别（图3-21）。同时，将该肿瘤病料的滤过研磨液接种CEF，以鸡抗ALV-J单因子血清和鼠抗Fps单因子血清为一抗进行IFA检测，表明滤过液中含有ALV辅助病毒及缺陷型病毒（图3-21）。提取拯救病毒所诱发的肿瘤DNA，通过PCR扩增rSDAU1005的*env*基因及rFu-J的*fps*基因，结果表明，与构建的质粒序列相比对，*env*基因同源性在99.2-99.7%之间，且未发生插入或缺失突变；*fps*基因未发生有义突变。

**图3-21** **拯救病毒诱发肿瘤组织（第五代）中Fps抗原和拯救病毒的检测**

**Fig.** **3-21** **Detection of Fps antigen and rescued viruses in the fifth-generation of fibrosarcomas induced by rescued viral stocks**

A：拯救病毒诱发肿瘤组织（第五代）的HE显微切片(100×)；B：拯救病毒诱发肿瘤组织（第五代）的HE显微切片

（200×）；C： 以鼠抗Fps单因子血清为一抗，免疫组化检测拯救病毒诱发肿瘤组织（第五代）中的Fps抗原（100

×）；D：以鼠抗Fps单因子血清为一抗，免疫组化检测拯救病毒诱发肿瘤组织（第五代）中的Fps抗原(200×)；E: 以鸡抗ALV-J单因子血清为一抗，检测拯救病毒诱发肿瘤组织（第五代）悬液接种的CEF；F：以鼠抗Fps单因子血清为一抗，检测拯救病毒诱发肿瘤组织（第五代）悬液接种的CEF。

A: HE staining of fifth-generation of fibrosarcomas induced by rescued rFu-J (rSDAU1005) viral stocks (100×); B: HE staining of fifth-generation of fibrosarcomas induced by rescued rFu-J (rSDAU1005) viral stocks (200×); C: Immunohistochemical staining of fifth-generation of fibrosarcomas using mouse anti-fps monospecific serum as antibody

(100×); D: Immunohistochemical staining of fifth-generation of fibrosarcomas using mouse anti-fps monospecific serum as antibody (200×); E: IFA detection of CEF infected with rFu-J (rSDAU1005) using chicken anti-ALV-J monospecific serum; F: IFA detection of CEF infected with rFu-J (rSDAU1005) using mouse anti-fps serum.

78

## 3.3 SJ (SDAU1102)的分离鉴定和基因组分析

### 3.3.1 SDAU1102的纯化和病毒的定量

将来自海兰褐商品代蛋鸡的纤维肉瘤研磨，经0.24μm滤器过滤后制备病毒悬液。同时在鸡体和体外培养的CEF细胞上进行病毒的传代，各传至第五代。通过有限稀释法获得纯化的辅助病毒SDAU1102。根据Reed-Muench法对不同悬液的病毒效价进行定量，其中，本研究所用的原代肉瘤组织滤过液的病毒量为103.8 TCID50/0.1ml；第一代细

胞毒为103.7 TCID50/0.1ml；第二代细胞毒为104.1 TCID50/0.1ml，第三代细胞毒为103.9

TCID50/0.1ml，第四代细胞毒为104.1 TCID50/0.1ml，第五代细胞毒为103.8 TCID50/0.1ml；纯化的SDAU1005毒为104.2 TCID50/0.1ml。

### 3.3.2 SDAU1102前病毒全基因组核苷酸序列的扩增和分析

本研究首先对病毒悬液中复制完整型ALV毒株SDAU1102的前病毒全基因组序列进行了测定。分别以原代肿瘤DNA和感染了病毒悬液的CEF细胞DNA为模板，通过

PCR分四段扩增，将测序结果进行拼接，获得了SDAU1102前病毒前基因组序列（图3-22）。该序列全长7652 bp，具有典型的复制完整型ALV基因组结构。将推导的GP85蛋白与其余参考株GP85蛋白进行比对，根据ALV的GP85蛋白绘制系谱进化树，结果表明SDSAU1102为J亚群ALV（图3-23）。SDAU1102其余主要基因及非编码序列与其他参考株的核苷酸序列和推导编码蛋白的序列同源性如表所示（表3-2）。序列比对发现，SDAU1102 的全基因组序列与中国蛋鸡分离株JS09GY06 具有非常高的同源性

（98.0%），与其余ALV-J毒株的同源性在93.8% ~95.6%之间。

**bp** M 1 2 3 4

15000



10000

5000

3000

1500

1000

500

**图3-22** **辅助病毒SDAU1102的PCR扩增电泳图**

**Fig.** **3-22** **Electrophoretogram of PCR products of helper virus SDAU1102**

M: Maker; 1: LTR扩增片段；2: *gag*扩增片段；3: *pol*扩增片段；4: *env*扩增片段。

M: Maker; 1: PCR amplification of LTR fragment; 2: PCR amplification of *gag* fragment; 3: PCR amplification of *pol*

Fragment; 4: PCR amplification of *env* fragment.

79



A MAV-1\_gp85. pro

A SDAU09C3\_gp85. pro A SDAU09C1\_gp85. pro

C Prague\_C\_gp85. pro K JS11C1\_gp85. pro

K TW3593\_gp85. pro E ev-1\_gp85. pro

E SD0501\_gp85. pro

D D-S-RD\_gp85. pro B MAV-2\_gp85. pro

B SDAU09C2\_gp85. pro B SDAU09E3\_gp85. pro J ADOL\_7501\_gp85. pro

J HN0001\_gp85. pro

J SD07LK1\_gp85. pro

J JS09GY06\_gp85. pro SDAU1102\_gp85. pro

J YZ9902\_gp85. pro

J HPRS103\_gp85. pro J Js-nt\_gp85. pro

J NX0101\_gp85. pro



**图3-23** **辅助病毒SDAU1102 GP85蛋白系谱进化树**

**Fig.** **3-23** **Predigree evolutionary tree of GP85 protein between SDAU1102 and other reference strains**

**表3-2** **SDAU1102主要基因及非编码序列与其他参考株的核苷酸序列和推导编码蛋白的序列同源性比较**

**Table 3-2 Multiple alignments of SDAU1102 genome and amino acid sequence with other ALV-J reference strains.**

Known ALV-J strain

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | HPRS-103 | ADOL-7501 | NX0101 | SD07LK1 | JS09GY6 |
| LTR (325bp) | 92.9 % | 91.7 % | 92.3 % | 91.1 % | 99.1 % |
| Leader sequence (296bp) | 91.0 % | 90.6 % | 91.0 % | 89.9 % | 99.0 % |
| gag | 96.0 % | 94.6 % | 96.0 % | 96.2 % | 98.0 % |
| (2106bp; 701aa) | 97.4 % | 95.9 % | 95.9 % | 98.0 % | 98.7 % |
| pol | 97.6 % | 98.2 % | 98.2 % | 98.6 % | 97.8 % |
| (2622bp; 873aa) | 98.5 % | 98.9 % | 97.4 % | 98.9 % | 98.5 % |
| gp85 | 93.8 % | 87.3 % | 92.8 % | 93.6 % | 97.0 % |
| (921bp; 307aa) | 87.9 % | 84.7 % | 87.6 % | 89.3 % | 93.8 % |
| gp37 | 92.6 % | 95.9 % | 94.2 % | 94.2 % | 99.0 % |
| (591bp; 197aa) | 91.4 % | 96.4 % | 94.4 % | 93.9 % | 99.5 % |
| DR1 | 96.8 % | 92.5 % | 88.2 % | 92.5 % | 96.8 % |
| E element (146bp) | 92.5 % | 93.8 % | ND | 87.7 % | 95.2 % |
| ND: not determined. |  |  |  |  |  |

SDAU1102

### 3.3.3 SJ前病毒全基因组核苷酸序列的扩增和分析

#### 3.3.3.1 SJ前病毒全基因组序列扩增和拼接

80

以原代肉瘤组织DNA和感染了病毒悬液CEF的DNA为模板，通过PCR扩增拼接获得急性致瘤性ALV的前病毒基因组序列（图3-24）。本研究同时扩增到五种携带v-*src*肿瘤基因的病毒基因组序列，我们分别将其命名为SJ-1, SJ-2，SJ-3, SJ-4和SJ-5（以下简称SJ1~5）。v-*src*肿瘤基因的获得使得它们均丢失了自身基因组的必须序列，因此，它们均是复制缺陷型病毒，它们均需要辅助病毒提供自身必须的基因产物方可复制（图3-25）。SJ1~5的5’LTR区域及残留的*gag*、*pol*基因与SDAU1102同源性分别在94.2-96.1%之间，SJ1~5残留的*env*及3’非编码区域与SDAU1102同源性为97.0%。由于SJ1~5 与

SDAU1102之间具有很近的亲缘关系，因此推断，SDAU1102不仅是SJ1~5的辅助病毒，而且是SJ1~5的近缘病毒。因此，该病毒悬液可被命名为SJ-1~5 (SDAU1102)。

**bp** **M** 1 2 3

7500



5000

3000

1500

1000

500

**图3-24** **SJs缺陷型病毒扩增电泳图**

**Fig.** **3-24** **Electrophoretogram of PCR products of replication-defective viruses**

M: Maker; 1: SJ扩增片段；2: SJ2扩增片段；3: SJ3扩增片段。

M: Maker; 1: PCR amplification of SJ1 fragment; 2: PCR amplification of SJ2 fragment; 3: PCR amplification of SJ3fragment.

2745

5320

5366

**SDAU1102**

325 622

*gag*

2727

*pol* *env*

6469



7008 7328 7652

**SJ-1**

**SJ-2**

689

1008 2588/2589 3772

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |

4972 5094 6674/6675 7858

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |

**SJ-3**

4870

4871

6451/6452

7635

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |

**SJ-4**

**SJ-5**

4871

4880

5879

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

6394/6395 7578

7231/7232 8415

**图3-25** **缺陷型病毒SJ-1~5及其辅助病毒SDAU1102的基因组结构示意图**

**Fig.** **3-25** **Genomic structures of replication-defective SJ-1~5 and their helper virus SDAU1102**

81

通辅助病毒SDAU1102相比，SJ-1, SJ-2, SJ-3, SJ-4, SJ-5为携带不同长度v-*src*肿瘤基因的复制缺陷型病毒；它们具有相同的3’端衔接位点，但是5’端衔接位点差异很大。图中绿色、黄色、蓝色和红色部分分别代表*gag*、*pol*、*env* 和

*src*基因，黑色代表*src*基因上游的非编码序列。

SJ-1~5 were replication-defective viruses carrying different lengths of v-*src* oncogenes compared to that of SDAU1102. All of the genomes of SJ-1~5 had the same 3' right-hand junction but different 5' left-hand junctions. In this picture, boxes in green, yellow, blue and red stand for *gag*, *pol*, *env* and v-*src* region, and boxes in dark stands for non-coding sequences upstream from v-*src* oncogene.

#### 3.3.3.2 SJ1~5前病毒全基因组序列的分析比较

将SJ1~5的前病毒全基因组序列与辅助病毒SDAU1102的序列进行比对分析。结果表明，SJ1~5 具有类似的病毒基因组结构，它们均包含相同的*src*-*env* 重组位点

“GACAGCCCGGATA”，该重组位点含有9个SDAU1005病毒基因组和c-*src*基因的共有碱基序列。3’重组位点的形成引入了终止密码子“TAG”，这使得p60c-src的Tyr527及其C端几个氨基酸发生了缺失突变（图3-26B）。

不同于3’端重组位点的稳定性，SJ1~5的5’端重组位点则显示出了多样性（图3-26A）。对SJ-1而言，SDAU1102前病毒基因组的690-6469bp被1899bp的c-*src*序列所取代（包括318bp的非编码序列及1581bp的ORF序列），在SJ-1的687-694bp处存在5’端疑似重组位点“GAAGGAAA”。对SJ-2, 3, 4而言，v-*src*基因与*pol*基因的3’端相衔接，三者的*pol*-*src*重组位点序列如图2所示。需要指出的是，三者所携带的v-*src*基因长度不同。SJ-2中插入的v-*src*基因包含121bp的非编码序列及1581bp的ORF序列；SJ-3中插入的v-*src*基因仅包含1581bp的完整ORF，不含有非编码序列；SJ-4中插入的v-*src*基因不但不包含非编码序列，还缺失了ORF 5'端63bp的碱基。对于SJ-5而言，SJ-5中截短的v-*src*基因与*env*基因的5'端相衔接，5'端重组位点的形成恰好引入了起始密码子“ATG”，因此SJ-5中v-*src*基因的ORF全长为1353bp。

尽管SJ-1~5中均携带v-*src*肿瘤基因，但并非五种病毒基因组都可以表达Src蛋白。序列分析表明，SJ-3,4,5中的v-*src*基因不包含非编码序列，无法转录单独的mRNA。它们直接与*pol*或*env*基因编码序列相衔接，理论上编码*pol*-*src*或者*env*-*src*嵌合体mRNA。但是，从*pol*或*env*基因的起始密码子开始算起，到v-*src*肿瘤基因的起始密码子，碱基数并不是3的整数倍。因此，推断SJ-3,4,5无法直接表达Src蛋白。SJ-1和SJ-2中携带的v-*src*开放阅读框之前，还有包含携带splice acceptor site的非编码序列，因此，根据序列推测SJ-1和SJ-2可以转录v-*src*的mRNA，表达相应的蛋白。

82

**A. 5' *gag*/ *pol*-*src* junction**

622

*Gag* sequence

690 1008



**SJ-1**



…… atg gaa…51bp…cct tct aa**G AAG GAA A**gg tga gcg…316bp…atg ggg agc……



*Pol* sequence

\* \*\* \*

4973 5094



M G S



**SJ-2**

…… atc cgt gtg ctt gc**G GAG GGG** agc ggc ggg gtt…102bp…atg ggg agc agc……

\* \*\*\* \*\*\*

M G S S

*Pol* sequence

4871

**SJ-3**

…… taa atc cac gcg aga gtg gct cgc gag **ATG GGG** agc agc aag agc aag ccc……

\*\*\* \*\*\*

M G S S K S K P





*Pol* sequence

4880

**SJ-4**

…… gcg aga gtg gct cgc gag atg ggg **GAT AGC ACC CAC CAC GGG G**ga ttc cca……

\*\* \*\*\* \*\* \*\*\* \*\*\* \*\* \*

M G D S T H H G G F P

5881



**SJ-5**

*Pol* sequence

…… aca ttt ttg atg gga att tta at**G GCA CTG GCT GG**c ggc gtc acc act ttc……

\* \*\*\* \*\*\* \* \*\*

M A L A G G V T

**B. 3' *src*-*env* junction**

6468

**SDAU1102**



……gag gta cag cta tgg agt gc**G ACA GCC CGG ATA** ttt gcc tct ttc……

\*\* \*\*\* \*\* \* \*

v-*src* coding sequence

2588

**SJ-1**

……acc tcg aca gag ccc cag ta**G ACA GCC CGG ATA** ttt gcc tct ttc……

T S T E P Q .

\*\* \*\*\* \*\* \* \*

***C-src* mRNA**

……acc tcg aca gag ccc cag ta**C -CA GCC TGG AGA** gaa cct ata ggc……

\*\* \*\*\* \*\* \* \*

T S T E P Q Y Q P G E N L .

**图3-26** **SJ-1~5的5’端和3’端衔接位点序列分析**

**Fig.** **3-26** **Schematic diagram of left-hand and right-hand recombination sites in SJ-1~5**

A：5’端*gag/pol*-*src*重组位点序列示意图，SJ-1~5中的重组位点含有同源序列。B：3’端*src*-*env*重组位点序列示意图，SJ-1~5均含有SDAU1102和c-*src*肿瘤基因的同原序列“GACAGCCCGGATA”。绿色字体代表*gag*基因序列，蓝色字体代表*env*基因序列，红色字体代表*src*基因序列，黑色加粗字体代表重组位点，标注星号的碱基意味着是辅助病毒和c-*src*中一致的序列，下方代表着根据合谷氨酸推导的氨基酸序列，圆点代表终止密码子。

A: The left-hand recombination junctions showing heterogeneity. SJ-1 to SJ-5 had different junction sites, while homologous sequences in those sites indicated that homologous recombination was possibly involved in the generation of those junction sites. B: Sequence analysis showed that the genomic sequences of SJ-1 to SJ-5 all contained the same right-hand *src*-*env*

Junction with the sequence" GACAGCCCGGATA," in which 9 out of 13 bp were homologous between the SDAU1102 genome and the 3' region of the c-*src* gene. Sequences in green represent the viral *gag* gene, sequences in purple represent the viral *pol* gene, sequences in blue represent the viral *env* gene, and sequences in red represent the v-*src* oncogene. The underlined sequences are assumed recombination sites and nucleic acids noted by asterisks indicate homologous nucleic acids shared by both c-*src* mRNA and the SDAU1102 viral sequence. The amino acid sequences were translated from the corresponding nucleic acid sequence above. Dots represent stop codons.

83

#### 3.3.3.3 SJ-1~5与其余携带v-*src*肿瘤基因ALV的序列比对

与其它携带v-*src*肿瘤基因的急性致瘤性ALV相比，SJ-1与自然分离株S-1, S-2

及rASV-PR2257 株具有相似的病毒基因组结构（Nehyba *et al*., 1984; Dezelee *et al*.,

1994）。它们的5’ 重组位点均位于*gag*及v-*src*非编码序列之间，但具体位点略有差异

（图3-27）。SJ-1，S-1, PR2257的3'重组位点发生在v-*src*的3' 端和*env*之间，S-2 的

3'重组发生在v-*src*的3’端非编码序列和*pol*之间。3'重组的发生使SJ-1中Src蛋白的

Tyr527突变为终止密码子，故SJ-1编码526aa的p60v-src蛋白；S-1和S-2分别使用*env*基因序列和*pol*基因序列作为终止密码子，故分别编码568aa和556aa的p64v-src和p62v-src融合蛋白；PR2257中v-*src*肿瘤基因中发生了插入突变，使得其使用非编码序列作为终止密码子，故编码587aa的p66v-src肿瘤蛋白。总之，与c-*src*原癌基因的产物p60c-src蛋白相比，这些病毒编码肿瘤蛋白的C端均发生了缺失或者替换突变，共同缺失了p60c-src蛋白的Tyr527氨基酸。SJ-1携带的v-*src*肿瘤基因与c-*src*肿瘤相比，基因序列同源性高达99.6%，仅存在7个碱基突变：G96A, T210C, T609C, G809A, A903C, T1044C, 和

C1581G；两者氨基酸序列同源性高达99.9%，仅存在1个氨基酸突变（G270E），较高的同源性可能与SJ (SDAU1102)较少的传代次数有关。

SJ-2~4与RSV的传代株RSV-29及BH-RSV具有相似的病毒基因组结构（Lerner *et al*., 1984），其5’ 重组位点均位于*pol*-*src*之间， 但RSV-29及BH-RSV的5’ 重组位点位于*pol*基因终止密码子“TAA”之后，而SJ2~4的5’重组位点则位于*pol*基因编码序列中。SJ2~4的3’重组位点位于*src*基因与*env*基因之间，而RSV-29及BH-RSV的3’重组位点则位于*src*基因与3’非编码序列之间。

84

**A.**

**SJ-1**

689 1008 2588



3128

3772

640



**S-1**

**S-2**



**.**

743 819

2399

2516

4209

**.**

4808

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | |
|  |  |  |  |  |
| 716 | 2296 |  | 3387 | 3986 |

**PR2257**

630 707



2309 3017 3781 4413

**.**

2470

**B.**

**SJ-2**



4972 5094 6674 7858

**BH-RSV**

**RSV 29**

**SR-RSV PR-C**

**SDAU1102**

**图3-27** **SJ1~5病毒基因组与其余携带v-*src*肿瘤基因病毒基因组的比较**

**Fig. 3-27 Comparison of genomic structures of SJ-1~5 and other acutely transforming viruses carrying v-*src* oncogene** A: SJ-1与S-1, S-2及PR2257分离株具有类似的基因组结构，但*gag*-*src*衔接位点并不相同，携带的*src*基因非编码序列长度也不一致。B: SJ-2、BH-RSV及RSV-29具有类似的基因组结果，它们均为复制缺陷型病毒。SR-RSV，PR-C为携带v-*src*基因的复制完整型病毒。图中绿色、黄色、蓝色和红色部分分别代表*gag*、*pol*、*env*和*src*基因，黑色代表*src*基因上游的非编码序列。

A: Comparison of genomic sequences of SJ-1, S-1, S-2, and PR2257 revealed similar genomic structures but different *gag-src* junctions. In addition, v-src oncogenes they carried were different from each other. B: Comparison of genomic sequences of SJ-2 and other ATVs carrying the v-*src* oncogene revealed that the genomic structure of SJ-2 was similar to those of BH-RSV and SR-RSV, which were the replication-defective viruses that had the shortest passage times of all RSV strains. SR-RSV and PR-C are replication-competent viruses carrying the v-*src* oncogene. In this figure, the green boxes represent the *gag* region, the purple boxes represent the *pol* region, the blue boxes represent the *env* region, the red boxes represent the v-*src* coding region, and the grey boxes represent the v-*src* non-coding regions. Dots represent stop codons.

In this picture, boxes in green, yellow, blue and red stand for *gag*, *pol*, *env* and v-*src* region, and boxes in dark stands for non-coding sequences upstream from v-*src* oncogene.

### 3.3.4 p60v-src蛋白的原核表达

#### 3.3.4.1 PET-src重组表达质粒的构建

以肿瘤组织DNA为模板，PCR扩增v-*src*基因，连入pET-28a(+)原核表达载体，构建PET-src原核重组表达质粒。将测序验证的重组质粒使用*Eco*R I和*Xhol* I限制性内切酶双酶切，对重组质粒进行验证。将重组质粒测序验证，序列正确的质粒保存于-20℃备用。PET-src原核重组表达质粒的双酶切电泳图如图所示（图3-28）。

85

**bp** **M** 1



15000

10000

5000

3000

1500

1000

500

**图3-28** **原核表达载体pET-src双酶切产物电泳图**

**Fig.** **3-28** **Electroperisis of restriction enzyme digestion of the recombinant plasmids of pET-src**

M: DNA分子质量标准；1： 使用*Eco*R I和*Xho* I双酶切质粒pET-src。

M: Maker; 1: restriction enzyme digestion of the recombinant plasmids of pET-src with *Eco*R I and *Xho* I.

#### 3.3.4.2 **p60v-src**蛋白的诱导、表达和纯化

将原核重组表达质粒PET-src转化入DE3感受态大肠杆菌，探索最佳诱导条件。经比较，PET-src最佳诱导条件为1mM ITPG，28℃诱导7h。按照探索的最佳条件进行诱导表达，结果发现，PET-src可表达约60kDa的重组蛋白，未转化质粒的大肠杆菌和转化了PET-28a空载体的大肠杆菌没有特定诱导蛋白的表达（图3-29）。经超声波处理后分别收集上清和沉淀物进行SDS-PAGE电泳，发现p60v-src蛋白主要以包涵体的形式表达。使用Ni柱纯化诱导蛋白，经SDS-PAGE电泳确认纯化蛋白为单一条带后，经BCA法定量浓度，该蛋白浓度为4.2μg/μl。

**kDa** **M** 1 2 3 4



180

130

95

72

55

43

60.0kDa

34

26

17

**图3-29** **p60v-src重组蛋白SDS-PAGE电泳图**

**Fig.** **3-29** **SDS-PAGE of p60v-src recombinant protein**

M: 蛋白Marker（低分子量）；1： 诱导不含质粒的DE3; 2: 诱导包含PET-28a (+) 质粒的DE3; 3: 诱导前包含PET-src

质粒的DE3; 4: Ni柱纯化后的p60v-src重组蛋白。

M: Molecular Weight Marker; 1: Whole cell protein from IPTG-induced E coli. BL21 (DE3) cells; 2: Whole cell protein from IPTG-induced E. coli. BL21 (DE3) cells containing PET-28a(+); 3: Whole cell protein from IPTG-induced E coli. BL21 (DE3) cells containing recombinant plasmid pET-src; 4: purified p60v-src recombinant protein.

86

### 3.3.5 鼠抗p60v-src单因子血清的获得

将纯化的p60v-src重组蛋白免疫Bac/c小鼠，三次免疫后采集血清，利用建立的ELISA方法检测血清效价。结果显示，所获得的单因子血清的抗体滴度可达到1: 20,000，符合实验要求。大量收集小鼠血清，置于-20℃保存备用。

### 3.3.6 Western blot检测感染SJ (SDAU1102)的CEF蛋白

为了确定SJ编码表达的Src蛋白的大小，收集SJ (SDAU1102)感染的CEF，提取总蛋白，SDS-PAGE电泳后转膜。以鼠抗p60v-src单因子血清为一抗进行Western blot检测。结果表明，当以鼠抗p60v-src单因子血清作为一抗检测时，感染SJ (SDAU1102) 的

CEF细胞在60 kDa左右同时有一特异性条带被识别，而单独感染SDAU1102和未处理的CEF总蛋白中则无此条带（图3-30）。对照组中（以未免疫小鼠血清为一抗）均没有特异性条带被识别。这表明，SJ编码表达p60v-src蛋白。

**(A) 1** 2 3 (b) **4** 5 6





**180**

**130**

**95**

**72**

**55**

**43**

**图3-30** **Western blot检测感染SJ (SDAU1102)的CEF Fig. 3-30 Detection of p60v-src in viral stocks infected CEFs**

A： 以鼠抗p60v-src单因子血清为一抗，在感染SJ (SDAU1102) 的CEF中可检测到60kDa的蛋白（泳道1），感染

SDAU1102的CEF（泳道2）和未处理CEF（泳道3）中均未检测到条带；B：以未免疫蛋白的小鼠血清为一抗，感染SJ (SDAU1102)的CEF（泳道4）、感染SDAU1102的CEF（泳道5）和未处理CEF（泳道6）均未检测到条带。

A: Western blot analysis demonstrated a specific band with a molecular weight of approximately 60 kDa in CEFs infected with viral stocks when mouse anti-src mono-specific serum was used (column 1) as an antibody, while no bands were detected in CEFs infected with SDAU1102 (column 2) and untreated CEFs (column 3). B: As a control, no bands were detected in CEFs infected with viral stocks (column 4), CEFs infected with SDAU1102 (column 5), and untreated CEFs (column 6) using mouse serum pre-immunization with Src protein, as the first antibody.

### 3.3.7 免疫组化检测SJ (SDAU1102)诱发的急性肿瘤组织

为了进一步证实肿瘤是由SJ (SDAU1102)感染所诱发的，以鼠抗p60v-src单因子血清为一抗，使用免疫组化方法检测p60v-src蛋白在肿瘤组织中的表达情况。结果表明，组

87

成肿瘤组织的纤维状细胞均为p60v-src蛋白阳性，并且抗原均匀分布于细胞质内。对照组中，未免疫p60v-src蛋白的小鼠血清无法识别肿瘤组织中的抗原（图3-31）。



**图3-31** **免疫组化检测肿瘤组织中p60v-src抗原**

**Fig.** **3-31** **IHC detection of p60v-src antigen in original tumor tissues**

1：以鼠抗p60v-src单因子血清为一抗，IHC检测原代肿瘤组织中抗原(200×)；2: 以鼠抗p60v-src单因子血清为一抗，

IHC检测原代肿瘤组织中抗原(1000×)，可见大部分肿瘤细胞均为阳性，抗原主要分布在细胞浆中；3： 以鼠阴性血清为一抗，IHC检测原代肿瘤组织中抗原(200×)；4: 以鼠阴性血清为一抗，IHC检测原代肿瘤组织中抗原(1000×)。1: IHC of fibrosarcoma using mouse anti-src mono-specific serum as antibody (200×); 2: IHC of fibrosarcoma using mouse anti-src mono-specific serum as antibody (1000×). It also revealed that the p60v-src protein was expressed in almost all tumor

Cells and mainly distributed in the cytoplasm; 3: IHC of fibrosarcoma using negative serum as antibody (200×); 4: IHC of fibrosarcoma using negative serum as antibody (1000×).

### 3.3.8 SJ-1~5在不同代次肿瘤组织中的数量相对变化

首先通过PCR方法比较了SJ-2~5在不同代次肿瘤组织中的相对数量变化。分别以前五代肿瘤组织DNA为模板，PCR扩增、连接T载体，随机选择50个阳性克隆测序并统计所扩增每种病毒基因组的数量。SJ-2, 3, 4, 5在第一代肿瘤组织中克隆数分别为27

（54%）、10(20%)、9(18%)、4（8%）；在第二代肿瘤组织中克隆数分别为38(76%)、8(16%)、4(18%)、0（0%）；在第三代肿瘤组织中克隆数分别为46(92%)、4（8%）、

0(0%)、0（0%）；在第四、五代肿瘤组织中仅能扩增SJ-2。为了研究SJ-1与SJ-2在不同代次肿瘤组织里的数量变化，分别设计两对引物通过荧光定量PCR对两者的数量进行了定量。结果表明，在第1,2,3,4,5代肿瘤组织中，SJ-1与SJ-2数量的相对比例分别为：5.43、7.45、8.37、8.83、10.50。综合以上数据，获得了五种病毒在不同代次病毒中

88

相对数量的比值。每一代病毒中，SJ-1~5所占比例如表3-3和图3-32所示；由图表可以看出，在病毒传代过程中，五种病毒的相对数量在发生着有规律的变化。SJ-3,4,5在传代过程中逐渐被淘汰，SJ-1和SJ-2被选择，并且SJ-1在数量上逐渐占据优势。

**表3-3** **每代次肿瘤组织中SJ-1~5相对比例变化**

Table 3-3 Proportion of SJ-1~5 in fibrosarcomas of each generation

|  | SJ-1(%) | SJ-2(%) | SJ-3(%) | SJ-4(%) | SJ-5(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1th | 74.59 | 13.74 | 5.08 | 4.53 | 2.06 |
| 2nd | 84.95 | 11.40 | 2.39 | 1.25 | 0.00 |
| 3rd | 88.48 | 10.57 | 0.95 | 0.00 | 0.00 |
| 4th | 89.83 | 10.17 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 5th | 91.30 | 8.70 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

**100**



**Proportion of SJ-1~5**

**75**



**20**

**10**

SJ-1 SJ-2 SJ-3 SJ-4 SJ-5

**0**



**1th** 2nd 3rd 4th 5th



**图3-32** **每代次肿瘤组织中SJ-1~5相对比例变化**

**Fig.** **3-32** **Changes of proportion of SJ-1~5 in fibrosarcomas of each generation**

### 3.3.9 SJs感染性克隆的构建

以原代肿瘤组织的DNA为模板，PCR扩增分别获得SJ-1~5的六个片段，通过酶切、连接构建五种缺陷型病毒的感染性克隆质粒（图3-33）。使用*Eco*R I和*Mlu* I限制性内切酶对SJ-1进行双酶切，核酸凝胶电泳观察可见1800 bp左右和5000 bp左右的条带（图3-34）；使用*Nhe* I和*Sal* I限制性内切酶对SJ-2~5进行双酶切，核酸凝胶电泳观察可见

5000 bp左右和7000 bp左右的条带（图3-34）。将酶切鉴定正确的质粒送上海生工测序，测序结果无误后，大提质粒，-20℃保存备用。

89

**bp**

15000

7500

5000

3000

1500

1000

500

**M** 1 2 3 4 5 6



**图3-33** **SJ-1~5感染性克隆扩增产物电泳图**

**Fig.** **3-33** **Electrophoretogram of PCR products of infectious clone of SJ-1~5**

M: Maker; 1: Fragment1扩增片段；2: Fragment3扩增片段；3-6: SJ-2, 3，4，5的Fragment2扩增片段。

M: Maker; 1: PCR product of fragment 1; 2: PCR product of fragment 3; 3-6: PCR product of fragment 2.

**bp**

15000

10000

7500

5000

3000

**M 1** 2 3 4 5

1500



1000

500

**图3-34** **双酶切鉴定SJs感染性克隆质粒电泳图**

**Fig.** **3-34** **Electrophoretogram of restriction enzyme digestion of SJs infectious clone plasmids**

M: Maker; 1: *Eco*R I/*Sal* I双酶切PMD-SJ-1感染性克隆质粒；2-5: *Nhe* I/*Sal* I双酶切PMD-SJ-2,3,4,5感染性克隆质粒. M: Marker; 1: Restriction enzyme digestion of PMD-SJ-1 infectious clone plasmid using *Eco*R I and *Sal* I; 2-5: Restriction enzyme digestion of PMD-SJ-2, 3, 4, 5 infectious clone plasmid using *Nhe* I and *Sal* I.

### 3.3.10 SJs感染性克隆瞬时转染的检测

为了研究SJ-1~5五种缺陷型病毒基因组在宿主细胞内能否表达Src蛋白，将五种缺陷型病毒的感染性克隆质粒转染CEF，维持36h后，以鼠抗src单因子血清为一抗进行

IFA检测，结果表明，只有转染了感染性克隆质粒PMD-SJ1和PMD-SJ2的CEF显示阳性，转染其余质粒的CEF均未检测到阳性，这表明只有SJ-1和SJ-2可以表达src蛋白

（图3-35）。

90



**A**

**B**

**C**

**D**

**E**

**F**

**图3-35** **IFA鉴定转染SJs感染性克隆质粒的CEF**

**Fig.** **3-35** **IFA detection of CEF transfected with PMD-SJs infectious clone plasmids**

以鼠抗p60v-src单因子血清为一抗，IFA检测转染了PMD-SJ-1 (A), PMD-SJ-2 (B), PMD-SJ-3 (C), PMD-SJ-4 (D), PMD-SJ-5 (E)的CEF，以未转染细胞为空白对照(F)。

IFA detection of CEF transfected with PMD-SJ-1 (A), PMD-SJ-2 (B), PMD-SJ-3 (C), PMD-SJ-4 (D), PMD-SJ-5 (E) using mouse anti-src monospecific serum, untransfected CEF was served as control.

## 3.4 Fu-J (SDAU1005)病毒Th物学特性和致病性的研究

### 3.4.1 辅助病毒和缺陷型病毒荧光定量PCR方法的建立

#### 3.4.1.1 PMD-gp85和PMD-fps标准质粒的构建

以“817”肉杂鸡来源的肿瘤组织DNA为模板，通过PCR扩增，分别获得*gp85*部分片段和v-*fps*部分片段（图3-36），连入PMD-18T载体，构建标准质粒PMD-gp85和PMD-fps。经测序验证无误后，大提质粒并定量，计算其拷贝数，将两个标准质粒分别梯度稀释（从108 copies/μl稀释到101 copies/μl），-20℃保存。

**bp**



2000

1000

750

500

250

100

**M** 1 2

**图3-36** **PCR扩增*gp85*部分片段和v-*fps*部分片段电泳图**

**Fig. 3-36 Electrophoretogram of PCR amplification of *gp85* and v-*fps* gene** M: Maker; 1: PCR扩增ALV-J *gp85*部分片段；2: PCR扩增v-*fps*部分片段。M: Maker; 1: PCR amplification of *gp85* gene; 2: PCR amplification of *v-fps* gene.

91

#### 3.4.1.2 标准曲线的建立

使用优化后的条件进行实时荧光定量PCR反应，以10倍梯度浓度稀释的PMD-gp85和PMD-fps为模板进行扩增，分别获得了检测ALV-J gp85和v-*fps*基因的动力学曲线和标准曲线。对*gp85*基因而言：在模板浓度为108-101拷贝/μl具有良好的线性关系，R2值达到0.999。使用ABI公司SDS分析软件生成的标准曲线，横坐标为质粒标准品拷贝数的对数值（X），纵坐标为CT值。拷贝数对数值（X）与CT值的关系为y = -3.513x +

31.79. 对试验中每个梯度模板的CT值进行统计分析。结果表明，9个稀释度标准质粒的CT值变异系数（CV）为0.05%-0.98%。对*v-fps*基因而言：在模板浓度为108-101拷贝/μl具有良好的线性关系，R2值达到0.999，标准曲线为：y = -3.401x + 32.29, R²= 0.999 ，

9个稀释度标准质粒的CT值变异系数（CV）为0.02%-0.91%（图3-37）。



(a)

(b)

(c)

(d)

**图3-37** **ALV-J*gp85*基因和v-*fps*肿瘤基因质粒标准品扩增曲线和标准曲线**

**Fig.** **3-37** **Amplification curves and standard curves used for*gp85* and v-*fps* gene real-time PCR assays**

a：梯度稀释标准质粒的ALV-J *gp85*基因扩增曲线；b: ALV-J *gp85*基因标准曲线；c：梯度稀释标准质粒的v-*fps*基因扩增曲线；d: v-*fps*基因标准曲线。

A: Amplification curves using plasmid PMD-gp85; b: Standard curve of ALV-J *gp85* gene, standard curve (y = -3.513x + 31.79) for *gp85* gene quantification (R2 = 0.999) was analyzed with the ABI SDS software 1.4. c: Amplification curves using plasmid PMD-fps; d: Standard curve of v-*fps* gene, standard curve (y = -3.401x + 32.29) for v-*fps* gene quantification (R2 = 0.999) was analyzed with the ABI SDS software 1.4.

#### 3.4.1.3 荧光定量PCR的重复性检测

取3份Fu-J (SDAU1005) 诱发的肿瘤样品，提取组织DNA，进行实时荧光定量PCR检测。结果显示，无论是针对ALV-*gp85*基因还是v-*fps*基因，批内重复和批间重复的变异系数均小于2%，表明所建立的方法具有良好的重复性，可以进行稳定、可靠的检测。

92

**表3-3** **荧光定量PCR的重复性检测**

**Table** **3-3** **Reproducibility of the real-time PCR assay**

Coefficient of



Viral load

Target gene Reproducibility tests Results(±SD)

variation

(copies/μL-1)

*gp85*

v-*fps*

Intra-assay reproducibility

Inter-assay reproducibility

Intra-assay reproducibility

Inter-assay reproducibility

15.20±0.10 0.66 5.28104

16.71±0.12 0.60 1.97104

15.57±0.06 0.37 4.15104

16.20±0.19 1.23 1.42105

15.13±0.21 1.38 5.51104

15.77±0.21 1.32 3.64104

19.20±0.04 0.22 7.08103

19.69±0.09 0.44 5.08103

19.12±0.07 0.37 7.30103

19.55±0.38 1.95 5.56103

19.20±0.17 0.89 7.08103

19.50±0.24 1.24 5.75103

Note: The tumor samples were detected in intra-assay and inter-assay tests. The mean intra-assay coefficients of variations (CVs) were below 1% and inter-assay CVs were below 2% in the method, indicating a good reproducibility.

#### 3.4.1.4 荧光定量PCR的特异性检测

为了验证ALV-J *gp85*荧光定量PCR方法的特异性，用标准质粒PMD-fps和ALV-A/B、MDV、CAIV、IBDV、ARV、NDV、AIV的DNA或cDNA进行检测，检测结果均无扩增信号，而质粒标准品有良好的扩增。为了验证v*-fps*荧光定量PCR方法的特异性，用标准质粒PMD-gp85和ALV-A/B、MDV、CAIV、IBDV、ARV、NDV、AIV的DNA或cDNA进行检测，检测结果均无扩增信号，而质粒标准品有良好的扩增，表明本研究建立的两种方法具有良好的特异性。

#### 3.4.1.5 荧光定量PCR的灵敏度检测

用梯度稀释的标准质粒PMD-gp85和PMD-fps测定SYBR Green I实时荧光定量

PCR和常规PCR方法的灵敏度，所有反应均进行三次重复。对*gp85*的荧光定量PCR而言：该方法的检测灵敏度为101 copies/μl，普通PCR的检测灵敏度为102 copies/μl，荧光定量PCR方法是普通PCR方法灵敏度的10倍（图3-38）。对v-*fps*的荧光定量PCR而言：该方法的检测灵敏度为101 copies/μl，普通PCR的检测灵敏度为103 copies/μl，荧光定量PCR方法是普通PCR方法灵敏度的100倍（图3-39）。

93

Copy number of PMD-gp85

Sensitivity PCR assays

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 108 | 107 | 106 | 105 | 104 103 | 102 | 101 |
| Conventional PCR  SYBR-Green CT value | 6.18 | 9.50 | 13.13 | 16.30 | 20.01 24.15 | 27.03 | 30.71 |



**图3-38** **ALV-J*gp85*基因荧光定量PCR灵敏度与普通PCR比较**

**Fig.** **3-38** **Sensitivity comparisons between ALV-J*gp85* real-time PCR and conventional PCR**

Copy number of PMD-fps

Sensitivity PCR assays

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 108 | 107 | 106 | 105 | 104 103 | 102 | 101 |
| Conventional PCR  SYBR-Green CT value | 5.21 | 8.35 | 11.84 | 15.30 | 18.62 22.20 | 25.44 | 28.90 |



**图3-39** **v-*fps*基因荧光定量PCR灵敏度与普通PCR比较**

**Fig.** **3-38** **Sensitivity comparisons between v-*fps* real-time PCR and conventional PCR**

### 3.4.2 不同代次Fu-J (SDAU1005)细胞传代毒Fu-J含量的比较

为了检测Fu-J (SDAU1005)不同代次细胞上清毒中Fu-J和SDAU1005的相对数量，收集每一代细胞上清毒，提取病毒RNA，使用通用引物进行反转录反应。通过荧光定量PCR方法，对每一代病毒中的缺陷型病毒Fu-J和辅助病毒SDAU1005进行定量。分别记录每一代病毒中Fu-J和SDAU1005的CT值，以SDAU1005的量为参照，假定每一代病毒中SDAU1005的拷贝数为“1”，计算Fu-J相对于SDAU1005的相对量。图3-40显示了每一代病毒中Fu-J/ SDAU1005的比值。由图可见，随着病毒代次的增加，病毒液中Fu-J的相对含量越来越少，病毒液传至第三代时，几乎检测不到Fu-J的存在。

**0.25**



**0.209**

**0.023**

**0.003**

**0.20**

**Fu-J/SDAU1005 ratio**

**0.15**

**0.10**

**0.05**

**0.00**

**1st** 2nd 3rd 4th 5th

**图3-40** **每代次细胞上清毒中Fu-J/SDAU1005的相对比值**

**Fig.** **3-40** **Relatively ration of Fu-J/SDAU1005 in viral stocks of different generations**

94

### 3.4.3 不同方式接种Fu-J (SDAU1005)毒株对SPF鸡的致病性

#### 3.4.3.1 不同方式接种Fu-J (SDAU1005)后病毒血症和接触传播的检测

为了研究Fu-J (SDAU1005)病毒液的致病性，将Fu-J (SDAU1005)病毒通过颈部皮下、腹腔和静脉三种途径接种1日龄SPF来航鸡，病毒血症动态如表3-4所示。结果表明，颈部皮下接种Fu-J (SDAU1005)病毒液后1周，接种Fu-J (SDAU1005)病毒液的鸡有5只（26.3%）为病毒血症阳性，第3周时有3只为阳性（42.9%）；通过腹腔和静脉接种Fu-J (SDAU1005) 病毒液后1周，所有鸡全部呈现阳性（100%）。然而，三个组中的未接毒SPF鸡病毒血症阳性率均低于20%，表明该病毒的接触传播效率较低。

三种接种方式均可诱发鸡的急性纤维肉瘤，当第4周时，颈部皮下接种的所有鸡在接种部位均发生了肿瘤；腹腔接种的所有鸡均在腹腔中生长了肿瘤团块；静脉接种的所有鸡在内脏器官中有肿瘤发生。这些结果进一步证实了，Fu-J (SDAU1005)病毒液是一种急性致瘤性ALV。但是，无论是通过何种方式接种病毒悬液，所有对应的横向接触传播组的鸡均未发现有发现肿瘤生长，表明缺陷型病毒不容易通过接触传播。

**表3-4** **不同方式接毒组鸡的病毒血症和肿瘤发生率**

**Table** **3-4** **Viremia, and tumor incidence of chickens in each groups after inoculation**

| No. | Viral stock | Way | 1w | Viremia  2w | 3w | Tumor incidence  Total |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Fu-J(SDAU1005) | s.c. | 5/19 (26.3%) | 8/17 (47.1%) | 3/7 (42.9%) | 19/20 (95%) |
| 1 | Horizontally control |  | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) |
|  | Fu-J(SDAU1005) | i.p. | 18/18 (100%) | 17/17 (100%) | 11/11 (100%) | 18/20 (90%) |
| 2 | Horizontally control |  | 1/10 (10%) | 2/10 (20%) | 2/10 (20%) | 0/10 (0%) |
|  | Fu-J(SDAU1005) | i.v. | 17/17 (100%) | 14/14 (100%) | 6/6 (100%) | 17/20 (85%) |
| 3 | Horizontally control |  | 1/10(10%) | 2/10 (20%) | 2/10 (20%) | 0/10 (0%) |
| 4 | Control group |  | 0/19 (0%) | 0/19 (0%) | 0/19 (0%) | 0/20 (0%) |

Note: s. c.: subcutaneous injection; i. p.: intraperitoneal injection; i. v.: intraperitoneal injection.

#### 3.4.3.2 不同方式接种Fu-J(SDAU1005)病毒液诱发肿瘤的部位和组织学特点

分别通过颈部皮下、腹腔和静脉三种方式接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液，统计感染鸡发生肿瘤的器官和数量，结果表明，不同接毒方式对病毒悬液的致肿瘤类型有很大影响。当通过颈部皮下接种病毒悬液时，所有鸡均在注射部位出现肿瘤（20/20），但在内脏器官中较少有肿瘤发生，这表明携带v-*fps*肿瘤基因的急性致瘤性ALV所诱发的肿

95

瘤转移性并不强。当通过腹腔注射病毒悬液时，所有鸡腹腔中均有肿瘤团块生长（20/20），腹腔中的肿瘤组织往往呈现弥漫性生长，覆盖了整个腹腔，有些肿瘤会转移到肝脏（7/20）或者脾脏（3/20），如图3-41所示。当通过静脉接种病毒悬液时，在全身多个脏器均有肿瘤发生，肝脏肿瘤占60%（12/20），脾脏肿瘤占40%（8/20），肾脏肿瘤占10%（2/20），心脏肿瘤占35%（7/20），胸肌中肿瘤块占75%（15/20）。但是，无论是何种接种方式，病理组织组织切片显示，所有产生的肿瘤类型均为纤维肉瘤（表3-5）。

**表3-5** **不同接种方式感染鸡的器官肿瘤发生率**

**Table** **3-5** **Tumor incidence in different organs from chickens infected with Fu-J (SDAU1005) by three different ways**

| Organ | Subcutaneous (sc.) | Injection approach  Intraperitoneal (ip.) | Intravenous (iv.) |
| --- | --- | --- | --- |
| Lung | 0/20 (0%) | 0/20 (0%) | 0/20 (0%) |
| Bursa | 0/20 (0%) | 0/20 (0%) | 0/20 (0%) |
| Liver | 2/20 (10%) | 7/20 (35%) | 12/20 (60%) |
| Spleen | 0/20 (0%) | 3/20 (15%) | 8/20 (40%) |
| Kidney | 0/20 (0%) | 0/20 (0%) | 2/20 (10%) |
| Heart | 1/20 (5%) | 0/20 (0%) | 7/20 (35%) |
| Thymus | N/Aa | 0/20 (0%) | 0/20 (0%) |
| Pectorales | 0/20 (0%) | 0/20 (0%) | 15/20 (75%) |
| Peritoneal tumor | 0/20 (0%) | 18/20 (90%) | 0/20 (0%) |
| Subcutaneous tumor | 19/20 (95%) | 0/20 (0%) | 0/20 (0%) |

96

**F**



**A**

**B**

**C**

**D**

**E**

**F**

**G**

**H**

**I**

**J**

**K**

**L**

**图3-41** **不同接种方式诱发不同器官的肿瘤及其组织切片**

**Fig. 3-41 Tumour tissues induced by viral stocks of Fu-J (SDAU1005) and histologic section** A: 颈部皮下接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液诱发的颈部皮下肉瘤; B: 腹腔接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液诱发的腹腔肿瘤; C: 腹腔接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液诱发的肠系膜肿瘤; D: 腹腔接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液诱发的肝脏肿瘤; E: 静脉接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液诱发的心脏肿瘤; F: 静脉接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液诱发的肝脏肿瘤; G: 静脉接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液诱发的腺胃肿瘤; H: 静脉接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液诱发的腹部体表肿瘤。I: 皮下接种诱发颈部皮下肿瘤的HE染色切片(200); J: 静脉接种诱发肝脏肿瘤的HE染色切片(200); K:静脉接种诱发心脏肿瘤HE染色切片(200); L: 静脉接种诱发腺胃肿瘤HE染色切片(200)。

A: Subcutaneous tumours at the inoculation sites in chickens infected with Fu-J (SDAU1005) subcutaneously; B: Abdominal tumor in chickens infected with Fu-J (SDAU1005) intraperitoneally; C: Mesenteric tumor in chickens infected with Fu-J (SDAU1005) intraperitoneally; D: Liver tumor in chickens infected with Fu-J (SDAU1005) intraperitoneally; E: Cardiac tumor in chickens infected with Fu-J (SDAU1005) intraperitoneally; F: Liver tumor in chickens infected with Fu-J (SDAU1005) intravenously; G: Glandular stomach tumour in chickens infected with Fu-J (SDAU1005) intravenously; H: Body surface tumor in chickens infected with Fu-J (SDAU1005) intravenously; I: Section of subcutaneous tumours induced by Fu-J (SDAU1005) infection (200); J: Section of liver tumor induced by Fu-J (SDAU1005) infection (200); K: Section of cardiac tumor induced by Fu-J (SDAU1005) infection (200); L: Section of glandular stomach tumour induced by Fu-J (SDAU1005) infection (200).

#### 3.4.3.3 辅助病毒和缺陷型病毒在感染鸡体内的含量

为了研究不同接种途径辅助病毒和缺陷型病毒在感染鸡体内的分布情况，收集三种接种途径感染鸡的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胸腺、法氏囊、骨髓和肿瘤组织，提取DNA，通过real-time PCR对以上感染鸡器官中的前病毒基因组的拷贝数进行了定

97

量，定量结果如表3-6和图3-42所示。结果表明，当通过颈部皮下注射病毒悬液时，鸡体的大部分器官中可检测到辅助病毒，但缺陷型病毒仅大量存在于肿瘤组织中。当通过腹腔注射的途径接种病毒悬液时，两种病毒分布形式与颈部皮下接种类似，但在肝脏、脾脏、肾脏、心脏和法氏囊等器官中，辅助病毒和缺陷型病毒的拷贝数均要显著高于颈部皮下接种时相应脏器中病毒的拷贝数。当通过静脉方式接种病毒悬液时，辅助病毒和缺陷型病毒在全身脏器中广泛分布。并且，辅助病毒和缺陷型病毒的含量之间存在一定的相关关系，即：在某个器官中辅助病毒含量多时，在该脏器中缺陷型病毒含量也相对较高。无论何种接种方式，肿瘤组织中辅助病毒和缺陷病毒的含量都是最高的。

**表3-6** **不同途径感染鸡不同器官中前病毒基因组拷贝数**

**Table** **3-6** **Quantitation of the proviral genome in chicken different tissues**

| The viral copy number (copies/μl) | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Virus | Tissues |  |  |  |  |
|  |  | Subcutaneous (sc.) | Intraperitoneal (ip.) | Intravenous (iv.) | Horizontal |
|  | Lung | 3.80105 a | 5.89105 a | 7.24104 b | 1.24104 c |
|  | Bursa | 5.37104 a | 6.46104 b | 5.62104 b | N/A c |
|  | Liver | 9.33103 a | 2.40104 b | 2.40104 b | 3.97103 c |
|  | Spleen | 5.01103 a | 1.32104 b | 4.90105 c | N/A d |
| SDAU1005 | Kidney | 1.38104 a | 3.89104 b | 4.90104 b | 4.73103 |
|  | Heart | 1.17105 a | 3.39105 b | 1.95105 b | 7.43104 c |
|  | Thymus | - | 1.51106 a | 4.07105 b | 4.32104 c |
|  | Marrow  Tumor | 6.92105 a  5.25106 a | 7.94105 a  7.59106 a | 5.89104 c  5.75106 a | 5.34104 d  - c |
| Lung | | 4.68101 a | 1.32101 b | 2.29103 c | N/A d |
| Bursa | | 5.01101 a | 2.63101 b | 8.51102 c | N/A d |
| Liver | | 3.16100 a | 1.00101 b | 5.25102 c | N/A d |
| Spleen | | 1.12101 a | 2.09101 b | 1.95103 c | N/A d |
| Fu-J Kidney | | 1.51101 a | 1.86102 b | 4.79102 c | N/A d |
| Heart | | 8.32101 a | 3.55102 b | 2.63102 b | N/A c |
| Thymus | | - | 4.37102 b | 8.13102 c | N/A d |
| Marrow | | 5.37101 a | 4.57101 a | 1.20103 c | N/A d |
| Tumor | | 1.17106 a | 2.09106 b | 1.62106 a |  |

1. The numbers in the table represent the means of SDAU1005 and Fu-J viral copy number in different organs. N/A represents not detected.

2. Copy numbers followed by different superscript letter was significantly different (*p*<0.05) based on Duncan's multiple range test.

98

**A** B C





SDAU1005

**8** Fu-J **8**

SDAU1005

Fu-J **8**

SDAU1005 Fu-J



**6** 6 6

**log of copy number**

**log of copy number**

**log of copy number**

**4** 4 4

**2** 2 2

**0** 0 0

**图3-42** **不同接种方式下感染鸡不同器官中辅助病毒和复制缺陷型病毒的拷贝数**

**Fig.** **3-42** **Quantitation of Fu-J and its helper virus SDAU1005 proviral genome in chicken different tissues**

A：颈部皮下接种感染鸡不同器官中辅助病毒和复制缺陷型病毒的拷贝数；B：腹腔接种感染鸡不同器官中辅助病毒和复制缺陷型病毒的拷贝数；C： 静脉接种感染鸡不同器官中辅助病毒和复制缺陷型病毒的拷贝数。

A. Copy number of SDAU1005 and Fu-J in chickens infected by subcutaneous injection; B. Copy number of SDAU1005 and Fu-J in chickens infected by intraperitoneal injection; C. Copy number of SDAU1005 and Fu-J in chickens infected by

Intraperitoneal injection.

### 3.4.4 急性肿瘤传播方式的模拟实验

前文研究表明，急性致瘤性ALV无法通过接触方式传播，因此尝试研究肿瘤通过注射器针头传播的可能性。使用1ml注射器针刺肿瘤组织，先后持续针刺五只1日龄SPF鸡，观察肿瘤发生情况，实验重复五次。结果表明，被污染注射器针头刺过的前三只鸡均发生了肿瘤，第四只及以后接种的鸡没有发生肿瘤（表3-7）。这提示，我国鸡群中局部流行的颈部皮下纤维肉瘤可能与疫苗接种时，反复使用污染病毒的针头有关。

**表3-7** **使用污染病毒的针头连续针刺诱发肿瘤情况**

Table 3-7 Development of tumors induced by syringe needle contaminated with acutely transforming ALVs

| 肿瘤发生率（发生肿瘤个数/总数）  Incidence of tumor days post-inoculation (occurrence number / total) | | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 9 d | 12 d | 15 d | 18 d | 21 d | 28 d |
| 1 | 2/5 | 4/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| 2 | 0/5 | 1/5 | 2/5 | 4/5 | 4/5 | 4/5 |
| 3 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 |
| 4 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |

### 3.4.5 免疫Fps蛋白对鸡体肿瘤的抑制作用

为了研究鸡Fps抗体对Fu-J (SDAU1005)诱发肿瘤的抑制作用，将原核表达的两段

Fps蛋白分别在7日龄和21日龄免疫SPF鸡，通过ELISA方法检测鸡血清中的Fps抗体。结果表明，两次免疫Fps蛋白可以诱导鸡产生特异性抗体，28日龄时免疫鸡的血清

99

中Fps抗体达到较高水平（图3-43A）。在二免后一周（28日龄）通过颈部皮下接种Fu-J

（SDAU1005）诱发肿瘤的研磨滤过液。本研究同时设置未免疫对照组和空白对照组。接毒后连续三周采集鸡血清，检测血清中抗体效价，同时记录鸡颈部皮下肿瘤生长情况。结果发现，蛋白免疫组的鸡Fps抗体效价在接毒后三周逐渐降低，而未免疫组的鸡Fps抗体效价则在接毒后略有升高（图3-43A）。然而，两个组的鸡颈部皮下肿瘤的生长趋势和生长速度没有显著差异，表明Fps抗体对鸡肿瘤的生长没有抑制作用（图3-43B）。

**A**

**1.5**

**Attacked**

Immunization

Non-immunization

**The second**

**Attacked**

**The first**

Control

**1.0**

**OD450 value**

**0.5**

**0.0**

**B**

**5**

**4**

**Tumor size(cm)**

**3**

**0** 7 14 21 28 35 42 49

**Days**

Immunization

Non-immunization

**2**

**1**

**0**

**0** 3 6 9 **12** 15 18 **21**

**Days post-infection**

**图3-43** **免疫及接毒后鸡血清中Fps抗体动态及免疫组肿瘤生长对比**

**Fig.** **3-43** **Dynamics of Fps antibody and tumor growth after immunation in chickens**

A：三次免疫Fps原核表达蛋白后接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液，不同组鸡中的Fps抗体动态；B：免疫组和非免疫组的鸡颈部皮下接种病毒悬液后，肿瘤生长动态。两组肿瘤生长速度无显著差异。

A: Dynamics of Fps antibody in chickens inoculated with a Fu-J (SDAU1005) viral stock after Fps protein immunation.

B: Dynamics of tumor growth in chickens with Fps protein immunation and non-immunation.

## 3.5 Fu-J(SDAU1005)感染CEF的转录组学分析

### 3.5.1 样品制备

将体外培养的CEF分为三个组：C-F组接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液，C-J组接种等量的SDAU1005病毒，C组为CEF对照，每个组设置三个重复。维持7d后，提取细胞上清中的病毒RNA，通过RT-PCR检测三个组中的病毒。确认接毒组细胞感染病毒后，提取三个组，共计9份细胞总RNA。通过3种不同的质量控制方法对所提RNA进行评

100

价，结果表明所提取的RNA质量均符合基因芯片杂交实验所需要求，可进行下一步实验（表3-8）。将每一组中的三个RNA重复样本混合，作为三个pool，进行芯片杂交。

**表3-8** **用于基因芯片杂交的RNA样品质检结果**

**Table** **3-8** **Results of quality inspection of RNA used for gene chip hybridization**

样本名称

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Sample Name |  | RIN | 28S/18S | Result |
| C-1 | 2.05 | 9.4 | 2.1 | 合格 |
| C-2 | 2.04 | 9.7 | 2.1 | 合格 |
| C-3 | 2.05 | 9.8 | 2.2 | 合格 |
| C-F-1 | 1.99 | 9.7 | 2.0 | 合格 |
| C-F-2 | 2.02 | 9.8 | 2.1 | 合格 |
| C-F-3 | 2.00 | 9.5 | 2.1 | 合格 |
| C-J-1 | 2.00 | 9.6 | 2.2 | 合格 |
| C-J-2 | 2.05 | 9.7 | 2.1 | 合格 |
| C-J-3 | 2.04 | 9.5 | 2.0 | 合格 |

A260/ A280

2100 Result结果

注：RIN> 7.0，28S/18S> 0.7, A260/A280 =2.0左右，表明RNA质量合格。

### 3.5.2 差异基因分析

将基因芯片的原始数据进行归一化处理，比较C-F组转录本和C-J组转录本的差异表达。结果发现，共有1253个转录子发生了4倍及以上的差异表达，其中有493个转录子表达上调，760个转录子表达下调。对本研究所检测到差异表达基因结合各种期刊文献进行功能分析，对涉及到宿主凋亡、细胞生长、血管形成、肿瘤转移等方面的基因进行归类，结果见表3-9、3-10、3-11、3-12.

**表3-9** **涉及凋亡的部分差异基因**

Table 3-9 Partial differential expressed genes involved in Apoptosis

|  | 基因名称  Gene name | 基因代号  Gene symbol | 差异倍数  Fold change |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Calcineurin-like EF hand protein 1 | CHP1 | 38.25633 |
|  | Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha) | PIK3R1 | 8.111443 |
|  | Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1 | NTRK1 | 5.164128 |
|  | Interferon regulatory factor 1 | IRF1 | 4.23274 |
| Apoptosis | PERP, TP53 apoptosis effector | PERP | 0.217175 |
|  | Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta | PRKAR1B | 0.197451 |
|  | Apoptotic peptidase activating factor 1 | APAF1 | 0.197229 |
|  | Cytochrome c, somatic | CYCS | 0.196261 |
|  | Checkpoint kinase 2 | CHEK2 | 0.112248 |

101

**表3-10** **部分涉及细胞生长的差异基因**

Table 3-10 Partial differential expressed genes involved in Cell growth

|  | 基因名称  Gene name | 基因代号  Gene symbol | 差异倍数  Fold change |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Interleukin 7 receptor | IL7R | 24.73193 |
|  | Caspase recruitment domain family, member 11 | CARD11 | 15.13521 |
|  | CD47 molecule | CD47 | 10.10694 |
|  | Jumonji, AT rich interactive domain 2 | JARID2 | 8.59825 |
|  | Neuropeptide Y receptor Y1 | NPY1R | 6.844783 |
|  | T-box 2 | TBX2 | 6.265706 |
| Colony stimulating factor 1 receptor/fms-related tyrosine kinase 4 | | CSF1R | 5.751125 |
|  | T-box 5 | TBX5 | 5.73455 |
| Cell growth | Fms-related tyrosine kinase 4 | FLT4 | 4.524671 |
|  | Transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box) | TCF7 | 4.499198 |
|  | T-box 20 | TBX20 | 4.257483 |
|  | Fibroblast growth factor 4 | FGF4 | 4.133136 |
|  | Fibroblast growth factor receptor 3 | FGFR3 | 4.115519 |
|  | Bone morphogenetic protein 7 | BMP7 | 0.159033 |
|  | Insulin-like growth factor binding protein 1 | IGFBP1 | 0.117015 |
|  | Tumor protein p73 | TP73 | 0.109103 |
|  | Nephroblastoma overexpressed gene | NOV | 0.045349 |

**表3-11 部分涉及血管生成的差异基因**

Table 3-11 Partial differential expressed genes involved in Angiogenesis

| 基因名称  Gene name | 基因代号  Gene symbol | 差异倍数  Fold change |
| --- | --- | --- |
| Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) | IGF2 | 11.02116 |
| Fibroblast growth factor 13 | FGF13 | 8.717731 |
| Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 | ANG | 6.251853 |
| Fibroblast growth factor receptor 2 | FGFR2 | 5.153774 |
| Chemokine (C-C motif) ligand 1 | CCL1 | 5.030583 |
| Angiogenesis |  |  |
| Fibroblast growth factor 3 | FGF3 | 4.72679 |
| TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 3 | TAB3 | 4.62166 |
| Fibroblast growth factor receptor 4 | FGFR4 | 4.452208 |
| Platelet derived growth factor C | PDGFC | 4.058335 |
| Angiopoietin 1 | ANGPT1 | 4.019854 |

102

**表3-12** **部分涉及肿瘤转移的差异基因**

Table 3-12 Partial differential expressed genes involved in Metastasis

| 基因名称  Gene name | 基因代号  Gene symbol | 差异倍数  Fold change |
| --- | --- | --- |
| Myosin IIIB | MYO3B | 31.57651 |
| keratin | keratin | 27.50033 |
| Cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1 | CYP7B1 | 18.94146 |
| Matrix metallopeptidase 9 | MMP9 | 9.44333 |
| T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 | TIAM1 | 7.495075 |
| Metastasis |  |  |
| Hyaluronan synthase 3 | HAS3 | 6.692704 |
| CD44 molecule (Indian blood group) | CD44 | 5.158933 |
| High mobility group box 1 | HMGB1 | 5.072276 |
| NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 4 | NME4 | 0.164579 |
| Breast cancer metastasis-suppressor 1-like | BRMS1L | 0.044992 |

### 3.5.3 GO分析结果

对差异表达转录子进行GO功能注释，分别从参与的生物过程（Biological Process），分子功能（Molecular Function）和细胞组分（Cellular Component）进行统计并作图（图3-44）。差异基因的分子功能主要是蛋白结合功能（binding）、催化活性（catalytic activity）、转运活性（transporter activity）、分子转导活性（molecular transducer activity）、转录调控活性（transcription regulator activity）和酶调控活性（enzyme regulator activity）等；差异蛋白的亚细胞定位主要在细胞质（cell）、细胞器（organelle）、大分子复合物

（macromolecular complex）和胞外区（extracellular region）等；在蛋白参与的生物过程中，主要涉及到细胞过程（cellular process）、代谢过程（metabolic process）、生物学调节（biological regulation）、定位（localization）、发育过程（developmental process）和应激反应（response to stimulus）等。

103

**（A）（B）**

**500** **400**

**400**

**Number of genes**

**300**

**200**

**100**

**300**

**200**

**Number of genes**

**100**

**0** **0**

**（C）400**

**300**

**Number of genes**

**200**

**100**

**0**

**图3-44** **GO分析结果**

**Fig.** **3-44** **The result of gene ontology**

A：蛋白的分子功能，B：亚细胞分布，C：生物学过程

A: molecular function, B: cellular component, C: biological process

### 3.5.4 KEGG通路注释

利用KAAS（KEGG Automatic Annotation Server）将差异表达基因与KEGG数据库中的序列进行比对，进行信号通路分析，共提取到与差异表达基因相关的41种信号/代谢通路。这些差异基因主要参与了神经活性因子-受体相互作用（Neuroactive ligand-receptor interaction）、紧密连接（Tight junction）、代谢信号通路（Metabolic

pathways）、GnRH信号通路（GnRH signaling pathway）、VEGF信号通路（VEGF signaling pathway）、Wnt信号通路等（Wnt signaling pathway）。

### 3.5.5 差异表达基因在染色体中的分布

将差异表达基因在鸡染色体中的分布进行分析，结果如图3-45所示。从图中可以

104

看出，差异表达基因分布于不同的染色体中。排在前10位的染色体分别是chrl、chr3、

chr4、chr2、chr5、chrZ、chr8、chr7、chrUn\_random和chr6，分别有172、109、105、

100、75、62、54、49、44和42个差异表达基因，有的染色体仅有几个差异表达基因，比如chr16和chrW。

**200**

**150**

**Number of genes**

**100**

**50**

**0**

**图3-45** **差异表达基因在鸡染色体的分布**

**Fig.** **3-45** **Distribution of differentially expressed genes in chromosomes**

### 3.5.6 荧光定量RT-PCR验证芯片数据

为了检验芯片结果的可靠性，随机选择10个宿主基因通过real-time PCR进行验证，其中芯片检测上调基因5个，下调基因5个，结果如表3-13所示。结果显示，荧光定量PCR的结果与基因芯片的结果基本一致，表明基因芯片结果真实可靠。

**表3-13** **荧光定量PCR验证基因芯片结果**

Table 3-13 Comparison of results of real-time PCR and gene chip

| 基因名称  Gene name | 基因代号  Gene symbol | 差异倍数  Fold change | 荧光定量  Quratation |
| --- | --- | --- | --- |
| CHP1 | Calcineurin-like EF hand protein 1 | 38.25633 | 45.24±7.61 |
| ATG2B | Autophagy related 2B | 21.53485 | 28.53±4.27 |
| RHOH | Ras homolog family member H | 19.63717 | 21.29±5.52 |
| CDKL1 | Cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase) | 14.99929 | 10.40±2.37 |
| STK32C | Serine/threonine kinase 32C | 9.035148 | 8.35±1.48 |
| C9ORF39 | Centlein, centrosomal protein | 0.115227 | 0.13±0.02 |
| ACTL6A | Actin-like 6A | 0.102691 | 0.11±0.03 |
| FBN3 | Fibrillin 3 | 0.096644 | 0.06±0.02 |
| VCAM1 | Vascular cell adhesion molecule 1 | 0.052414 | 0.04±0.01 |
| LECT2 | Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 | 0.022516 | 0.02±0.01 |

105

### 3.5.7 差异表达基因编码蛋白的互作分析

应用网络工具String 9.1对本研究筛选的差异基因编码蛋白之间的相互作用进行预测。在线分析时选择Gallus gallus数据库，综合打分值设定为0.4，对97个与肿瘤发生有关的差异表达基因编码蛋白进行关联分析。共有91个差异表达基因编码的蛋白可被

数据库识别，这些被识别的蛋白的相互作用网络图如图3-46所示。在此网络图中，有些蛋白可以和其它许多蛋白之间发生相互作用，这些蛋白称之为关键蛋白分子。



**图3-46** **使用String 9.1预测分析差异表达基因编码蛋白的相互作用**

**Fig.** **3-46** **Analysis of interaction network of proteins coded by differentially expressed genes**

绿线：相邻；红线：蛋白融合；蓝线：同时出现；紫线：实验证实；淡蓝线：数据证实；黄线：文献证实。Green line: neighborhood evidence; Red line: fusion evidence; Blue line: coocurrence evidence; Violet line: experimental evidence; Wathet line: database evidence; Yellow line: textmining evidence.

## 3.6 拉米夫定抑制Fu-J (SDAU1005)复制和肿瘤发Th的研究

### 3.6.1 拉米夫定对体外培养CEF的影响

为了检测拉米夫定对体外培养CEF细胞是否具有细胞毒性作用，分别使用含有终

106

浓度0,1, 2, 3, 4, 5, 10, 20μg/ml拉米夫定的DMEM培养基培养细胞，使用CCK-8检测不同浓度拉米夫定对CEF细胞活性的影响。结果表明，当拉米夫定终浓度低于5μg/ml时，药物对体外培养CEF的细胞活性没有显著影响。因此，选用1, 2, 4μg/ml三个浓度的拉米夫定进行后续试验研究。

### 3.6.2 拉米夫定对Fu-J (SDAU1005)在CEF上复制的影响

以接种了Fu-J (SDAU1005)的CEF细胞为靶细胞，研究拉米夫定对缺陷型病毒及其辅助ALV-J的抑制作用（图3-47）。细胞上清的ALV-p27抗原检测结果表明，终浓度1-4μg/ml时，拉米夫定能有效抑制辅助病毒SDAU1005的复制，并且这种抑制作用是剂量依赖型的。荧光定量PCR和western blot的结果也表明，在接种病毒的CEF细胞中，拉米夫定能同时有效抑制辅助病毒SDAU1005和携带v-*fps*肿瘤基因的Fu-J病毒的复制，随着剂量增大，抑制效果随之增强。



**图3-47** **不同浓度拉米夫定对Fu-J及其辅助病毒复制的抑制作用**

**Fig.** **3-47** **Inhibitory effects of lamivudine in different concentrations on replication of Fu-J and its helper virus in CEF cells infected with Fu-J stock**

A： 使用ELISA检测试剂盒检测使用含不同浓度拉米夫定的DMEM培养基培养的细胞上清中ALV-p27抗原含量。B：

使用荧光定量PCR对ALV-J gp85基因和v-fps基因的定量结果。以鸡-actin为内参，通过2-CT法计算，*t*-检验比较各组差异。C：以ALV-J单抗JE9和鼠抗Fps单因子血清为一抗，western blot检测使用含不同浓度拉米夫定的DMEM培养基培养的细胞中Gp85蛋白和Fps蛋白含量。其中：1为空白对照组CEF, 2-4为1, 2, 4μg/mL拉米夫定处理组CEF. *p*0.01 (\*\*)时差异极显著，*p*0.001 (\*\*\*)时差异及其显著，全部实验均进行三次生物学重复。

A: Comparisons of ALV p27 antigen levels in cell culture supernatants by ELASA. The vertical axis represents the s/p values in ELISA, the cut-off value of positive criteria was 0.2; B: Comparisons of expression level of genomic RNA fragments *gp85* specific to SDAU1005 and *fps* to Fu-J by real-time PCR. The expression levels were normalized with the expression level of chicken-actin mRNA and performed by using the 2-CT method. Differences in the expression level were assessed by

Student's *t*-tests. Differences were considered highly significant when *p*0.01 (\*\*) and extremely significant *p*0.001 (\*\*\*).

The error bars represent the SEM. The data are based on the results of three independent experiments. C: Detection of ALV-J gp85 and Fps proteins in Fu-J (SDAU1005) viral stock infected CEF cells by western blot analysis. Line 1: control group; line 2-4: cells treated with 1, 2, 4μg/mL lamivudine.

107

### 3.6.3 拉米夫定对AMV反转录酶的活性的影响

#### 3.6.3.1 体外转录mRNA模板的制备

为检测拉米夫定对AMV反转录酶活性的影响，首先制备体外转录的mRNA模板。构建载体PSK-gp85，将其线性化后，使用体外转录试剂盒进行体外转录。将转录的RNA标准品通过紫外分光光度计测定A260和A280，计算拷贝数。结果表明，该标准品浓度为2.41109 copies/μl 。

#### 3.6.3.2 荧光定量PCR检测拉米夫定对反转录酶活性的影响

为了验证拉米夫定能够抑制ALV反转录酶的活性，本研究使用商品化的ALV反转录酶，在不同反应体系中分别加入不同浓度的拉米夫定，同时进行反转录反应。随后通过荧光定量PCR检测不同体系中反转录产物的含量，将不加拉米夫定的反转录体系中产物的拷贝数作为参照，计算不同浓度拉米夫定对反转录酶活性抑制效率。结果表明，加入拉米夫定后，反应体系中反转录效率显著降低，这表明拉米夫定能有效抑制ALV反转录酶的活性，这种抑制作用随着浓度的增大而增强（表3-14）。

**表3-14** **拉米夫定对ALV反转录酶活性的抑制**

Table 3-14 Inhibitory effect of lamivudine on ALV reverse transcriptase activity

| Group | Lamivudine added into RT  reaction | CT value of real-time PCR  (mean±SD)a | Copy number of RT  Products | Relative activity of  Reverse transcriptaseb |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 1μg/mL | 24.72±0.23B | 2.84103 | 46% |
| 2 | 2μg/mL | 25.77±0.18C | 1.21103 | 24% |
| 3 | 4μg/mL | 27.53±0.19D | 2.90102 | 6% |
| 4 | - | 23.97±0.23A | 5.26103 | 100% |

A. CT values of real-time PCR followed by different superscript letter was significantly different (*p*<0.05) based on Duncan's multiple range test.

B. The relative activity of reverse transcriptase was calculated of copy numbers of RT products in each groups divided by copy number of RT products in group 4.

### 3.6.4 拉米夫定对CEF病毒受体表达和病毒入侵及释放的影响

为检测拉米夫定对CEF细胞ALV-J受体表达的影响，本研究检测了不同浓度拉米夫定对CEF细胞ALV-J受体表达的影响。荧光定量PCR的结果表明，与未加药组的CEF细胞相比，1-4μg/ml的拉米夫定不影响CEF细胞上ALV-J受体chNHE和chANXA2的表达（图3-48A, 3-28B）。

为研究拉米夫定能否抑制病毒进入CEF，首先使用不同浓度拉米夫定处理CEF，接种105 TCID50的Fu-J (SDAU1005)病毒悬液，2h后使用ELISA方法检测CEF胞浆中的

108

ALV-p27抗原含量。结果表明，不同浓度拉米夫定处理的CEF与未经处理的CEF胞浆ALV-p27抗原量无显著差异，这表明拉米夫定对病毒入侵无抑制作用（图3-48C）。为研究拉米夫定能否抑制病毒自宿主细胞释放，首先使用104 TCID50的Fu-J (SDAU1005)病毒悬液接种CEF, 48h后分别加入含不同浓度拉米夫定的DMEM培养液维持，24h后使用ELISA方法检测CEF胞浆及上清中的ALV-p27抗原含量。结果表明，空白组与药物处理组之间没有差异。这表明，拉米夫定对ALV-J在CEF中的组装和释放没有抑制作用（图3-48D）。

**A** B

**1.5**



**1.0**

**chNHE 1**

**0.5**

**1.5**

**1.0**

**chANXA 2**

**0.5**

**0.0**

**No virus 1μg** 2μg 4μg DMEM

**0.0**

**No virus 1μg** 2μg 4μg  **DMEM**

**C D**

control



**0.15**

**0.10**

**p27(S/P)**

**0.05**

**0.00**

**1μg** 2μg 4μg DMEM

**0.6**



**0.4**

**p27(S/P)**

**0.2**

**0.0**

1μg 2μg 4μg

**Cytoplsma p27** supernatant **p27**



**图3-48** **拉米夫定对CEF中ALV-J受体表达和病毒入侵、释放的影响**

**Fig.** **3-48** **Effects of lamivudine on CEF receptor expression and virus entry and release**

A：荧光定量PCR 检测含不同浓度拉米夫定培养的CEF中ALV-J 受体chNHE 1的表达；B：荧光定量PCR 检测含不同浓度拉米夫定培养的CEF中ALV-J受体chANXA 2的表达. C: ELISA检测细胞胞浆中ALV-p27抗原量以研究拉米夫定对病毒入侵的影响；D: ELISA检测细胞胞浆和上清中ALV-p27抗原含量以研究拉米夫定对病毒释放的影响。

A: The expression level of chNHE 1 was quantified by real-time PCR. No significant differences were observed in those groups. B: The expression level of chANXA 2 was quantified by real-time PCR. No significant differences were observed in those groups. C: The cytoplasmic ALV p27 antigen was determined by ELISA to investigate the effect of lamivudine on virus entry into CEF. No significant differences were observed in those groups. D: The cytoplasmic and supernatant ALV p27 antigen was determined by ELISA to investigate the effect of lamivudine on virus release. No significant differences were observed in those groups. The error bars indicated SEM. The results were representative of three independent experiments.

109

### 3.6.5 拉米夫定对Fu-J (SDAU1005)在鸡体的复制和肿瘤Th长的影响

为检测拉米夫定能否抑制ALV-J在鸡体上的复制，将Fu-J (SDAU1005)病毒悬液通过颈部皮下接种1日龄SPF鸡。接种病毒的同时，每天分别对实验组的鸡肌肉注射1mg，

2mg, 4mg的拉米夫定水溶液，连续给药7天，记录每组鸡的肿瘤生长情况，同时设置空白对照，每天肌肉注射相同剂量的PBS。结果表明，对照组鸡的颈部皮下肿瘤出现时间最早，5d即可触摸到肿瘤，并且肿瘤细胞生长迅速，15d左右的时间平均直径即已达到4cm；而注射了1mg，2mg，4mg拉米夫定溶液的鸡颈部皮下肿瘤出现时间明显延迟，分别在第6d，第7d，第8d可触摸到肿瘤，并且肿瘤早期的生长速度慢于未用药组（图3-49 A）。然而，相对于对照组，用药组的鸡肿瘤后期生长速度并没有明显的降低。

此外，本研究建立了另外一种抗ALV药物筛选的动物模型。将Fu-J (SDAU1005)病毒悬液腹腔接种1日龄SPF鸡，同时分别肌肉注射1mg，2mg，4mg拉米夫定溶液，连用7d，记录死亡情况，同时每周检测各组鸡血清中的病毒载量。结果表明，对照组、注射1mg、2mg、4mg拉米夫定药物组的生存中值分别为19d，21d，24d，26d；死亡率分别为100%、100%、90%、70%，这说明拉米夫定确实能够延长腹腔接种Fu-J病毒鸡的生存时间，降低其死亡率（图3-49 B）。荧光定量PCR的结果表明，给药组鸡血清中辅助病毒SDAU1005和缺陷型病毒Fu-J的病毒载量均显著低于对照组，拉米夫定对病毒的抑制作用是剂量依赖性的；并且，其对缺陷型病毒的抑制作用略强于辅助病毒（图3-49

CD）。这表明，拉米夫定是通过抑制ALV-J的复制，从而抑制了肿瘤的生长，延缓了发病鸡的死亡。

110

**A** **B**

**4** **100**

1mg

2mg

4mg

DMEM

**p<0.0001**

DMEM

**3** **80**

**tumor size(cm)**

**Percent survival**

**60**

**2**

**40**

**1** **20**

1Mg 2mg 4mg control

**0**

**0** 5 **10** 15 20 **25**

**time**

**0**

**0** 5 **10** 15 20 25 **30**

**Survival days**

**C D**



\*\*\*

\*\*

\*\*\*

\*\*\*\*\*\*

\*\*\*

\*\*

\*\*\*\*\*\*

**6** 1mg

**log of SDAU1005 copy number**

2mg

**log of Fu-J copy number**

1mg

5 2mg



\*\*

\*\*\*

\*\*\*

\*\*

\*\*\*

\*\*\*

\*\*\*

\*\*\*

4mg **4**

**4** DMEM

**3**

**2**

**2**

**1**

4Mg DMEM

**0**

**1w** 2w **3w**

**0**

**1w** 2w 3w

**图3-49** **拉米夫定对鸡体内Fu-J及其辅助病毒复制的抑制**

**Fig.** **3-49** **Effect of lamivudine on Fu-J replication in chickens**

A：颈部皮下接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液的不同组的鸡肿瘤生长情况。拉米夫定的应用延缓了肿瘤出现时间，减慢了肿瘤的早期生长；B：腹腔接种Fu-J (SDAU1005)病毒悬液的不同组的鸡生存曲线；C：荧光定量PCR检测腹腔接毒组鸡血清中SDAU1005病毒载量，结果表明拉米夫定可抑制SDAU1005在鸡体内的复制；D：荧光定量PCR检测腹腔接毒组鸡血清中Fu-J病毒载量，结果表明由于辅助病毒SDAU1005载量的降低，Fu-J病毒载量随之降低。通过*t*-检验比较不同组鸡体内病毒载量的差异，*p*0.01 (\*\*)时差异极显著，*p*0.001 (\*\*\*)时差异及其显著，全部实验均进行三次生物学重复。

A: Growth of subcutaneous tumors induced by Fu-J virus in different groups. Administration of lamivudine delayed the tumor occurrence time and slowed down the speed of tumor growth at the early stage. B: Survival plots of chickens infected with Fu-J virus intraperitoneally in different groups. Survival patterns of chickens in different groups showed a significant different from each other. C: SDAU1005 plasma viral loads post-inoculation determined by real-time PCR demonstrated that Lamivudine could inhibit SDAU1005 replication in chickens. D: Fu-J plasma viral loads post-inoculation determined by

Real-time PCR demonstrated that the replication of Fu-J virus was inhibited due to the reduction of SDAU1005. Differences in the expression level were assessed by Student's *t*-tests. Differences were considered highly significant when *p*0.01 (\*\*) and extremely significant *p*0.001 (\*\*\*). The error bars represent the SEM. The data are representative of the results of three

Independent experiments.

### 3.6.6 给药组鸡肿瘤中病毒分离株耐药性的检测

为检测拉米夫定的使用能否导致ALV-J耐药株的产生，收集4mg给药组鸡的颈部皮下肿瘤组织，将其研磨过滤，制备病毒悬液。将该给药组肿瘤分离病毒与原始病毒悬液同时接种CEF，分别使用空白DMEM和含有1μg/ml拉米夫定的DMEM培养基维持

111

7d，使用ELISA试剂盒进行检测。结果发现，在空白DMEM培养的CEF上，两个毒株均可良好复制，两者没有显著差异（图3-50A）。然而，在含有1μg/ml拉米夫定的DMEM培养基培养的CEF上，两个毒株的复制均受到抑制，并且两者的复制动态没有显著差异。这表明，拉米夫定对给药组肿瘤分离病毒依然有较强的抑制作用。随后，本研究通过荧光定量PCR方法研究了拉米夫定对给药组肿瘤分离病毒和原始病毒悬液的抑制作用。结果发现，拉米夫定对两株病毒均具有较强的抑制作用，拉米夫定对两者的抑制率没有显著差别（图3-50B）。此外，本研究提取了给药组肿瘤组织的DNA，使用特异性引物扩增其*pol*基因，与原始病毒的*pol*基因进行比对，结果并未发现有规律的突变。综上所述，给药组肿瘤中的第一代病毒没有拉米夫定耐药株产生。

**A** **B**

primary virus (DMEM)

**1.5** isolated virus (DMEM)

ns

ns

ns

ns

ns

ns

ns ns

ns ns

primary virus (LAM)

**1.5** control

primary virus (LAM) isolated virus (LAM)



ns

ns

50.8% 50.1%

58.1% 58.3%

**comparative viral RNA**

**1.0** isolated virus (LAM)

**p27(S/P)**

**1.0**

**0.5** **0.5**

**0.0**

**1d** 2d 3d 4d 5d **6d**

**Time**

**0.0**

**SDAU1005** Fu-J

**图3-50** **ALV-J拉米夫定耐药株的检测**

**Fig.** **3-50** **Detection of lamivudine-resistant ALV-J mutants in tumors from administrated chickens**

A：将原始病毒悬液和给药组鸡肿瘤中分离的病毒悬液同时接种CEF，使用含有1μg/mL拉米夫定维持6d, ELISA检测细胞上清中ALV-p27动态；B：第7d时提取细胞上清中的病毒RNA，对其中的辅助病毒和缺陷型病毒使用荧光定量PCR方法进行定量，计算拉米夫定对原始病毒悬液和给药组鸡肿瘤中分离的病毒悬液的抑制率。通过*t*-检验比较抑制率的差异，*p*0.01 (\*\*)时差异极显著，*p*0.001 (\*\*\*)时差异及其显著，ns, *p*> 0.05时差异不显著（ns）。本实验进行三次平行重复。

A: CEF cells were infected with primary viral stock and administrated isolated viral stock respectively and maintained in DMEM with or without 1μg/mL lamivudine for 6 days, and ALV-p27 antigen was measured from cellular supernatant everyday. B: Viral RNA was extracted on the 7th day and both helper virus and replication-defective virus were quantitated by real-time PCR. Inhibition ratio of lamivudine was calculated to estimate the inhibitory effect of lamivudine on primary viral stock and isolated viral stock. Differences in the expression level were assessed by Student's *t*-tests. Differences were considered highly significant when *p*0.01 (\*\*) and extremely significant *p*0.001 (\*\*\*). The error bars represent the SEM. ns, no significant difference (*p*> 0.05).

112

# **4** 讨 论

## 4.1 Fu-J(SDAU1005)的分离鉴定和基因组序列分析

ALV是一种可以引起禽类多种肿瘤性疾病的反转录病毒，除了诱发淋巴细胞瘤、髓细胞瘤、血管瘤、组织肉瘤、纤维肉瘤等多种肿瘤外，ALV感染还可引起鸡产蛋下降、免疫抑制和生长迟缓等亚临床病理作用，给全球养禽业造成巨大经济损失（Payne *et al*.，

2012）。根据致瘤速度的快慢，ALV可分为慢性转化型和急性转化型ALV。慢性转化型

ALV一般需要20w左右诱发宿主肿瘤，而急性转化型ALV由于携带了肿瘤基因（v-*onc*），可在2w左右时间内诱发宿主肿瘤(Weiss *et al*., 2011)。除了个别毒株外，大部分急性致瘤性ALV在获得肿瘤基因的同时，丢失了其必需基因，因此急性致瘤性病毒多为“复制缺陷型突变株”，因此，它们需要复制完整型ALV作为“辅助病毒”方可复制。

2011年，本实验室在“817”肉杂鸡颈部皮下纤维肉瘤分离到了一株可在短时间内诱发不同品系鸡纤维肉瘤的急性致瘤性ALV（刘绍琼等, 2011； 李传龙等， 2012）。前期的工作中，以原代纤维肉瘤病料DNA为模板，除了扩增到ALV-J病毒SDAU1005株的基因组外，还扩增到了五种携带不完整的v-*fps*肿瘤的病毒基因组Fu-J1, Fu-J2, Fu-J3, Fu-J4和Fu-J5（Chen *et al*., 2012）。本研究在前期工作的基础上，将肿瘤在鸡体上传代，以第五代的纤维肉瘤DNA为模板，扩增到了携带完整v-*fps*肿瘤基因的缺陷型病毒Fu-J。测序分析表明，SDAU1005不但是Fu-J的辅助病毒，而且是其近缘病毒，因此将该毒株命名为Fu-J (SDAU1005). Fu-J携带完整的v-*fps*肿瘤基因，其v-*fps*基因5’端与ALV-*gag*相连接，3’端与ALV-*pol*相连接，编码137kDa的Gag-Fps融合蛋白。两端衔接位点序列分析表明，Fu-J是SDAU1005在感染宿主的过程中，与宿主c-*fps*基因的重组产物。此外，Fu-J基因组中大部分*env*基因发生了缺失。该缺失可能与病毒基因组的二级结构有关，或者通过同源重组的机制发生。该缺失对病毒的生物学意义尚不明确，这可能与缺失株复制时间较短，从而获得复制优势有关。但显然，*env*基因的缺失并未影响Fu-J的致瘤能力。

将Fu-J的病毒基因组序列与Fu-J1~5五种缺陷型病毒基因组序列进行比对。根据序列比对结果，我们推测缺陷型病毒的产生过程大致为：复制完整型ALV-J毒株SDAU1005在感染宿主后，插入到宿主c-*fps*基因上游，随后转录为*gag*-*fps*杂合RNA并与SDAU1005病毒RNA共同包装进一个病毒粒子。在反转录酶执行其功能时，杂合RNA和病毒RNA

113

发生了重组，产生了多种多样的携带v-*fps*肿瘤基因的缺陷型ALV，而试验研究中扩增到的Fu-J1~5就是其中的几个代表。

目前，世界上仅分离到Fujinami 肉瘤病毒（FSV）、PRC II、PRC VI、UR1和16L等携带v-*fps*肿瘤基因的急性致瘤性ALV (Hanafusa *et al*., 1980; Lee *et al*., 1980; Vogt *et al*., 1981; Wang *et al*., 1981; Neel *et al*., 1982)，其中FSV的前病毒基因组和PRC II的序列已得到解析（Shibuya *et al*., 1982; Huang *et al*., 1984）。本研究对Fu-J与FSV、PRC II的病毒基因组序列及其编码蛋白进行了分析比对。Fu-J，FSV及PRC II分别编码137kDa、140 kDa和105 kDa的Gag-fps融合蛋白，它们编码蛋白长度的差别主要与Gag残基的长度有关。研究表明，Gag蛋白通过改变细胞定位或三维结构调控v-*fps*基因转化细胞能力和致瘤能力（Blume-Jensen *et al*, 2001）。Fu-J-P137gag-fps融合蛋白的Gag残基部分比FSV-P130gag-fps融合蛋白和PRC II-P105gag-fps融合蛋白的Gag残基部分略长。然而，Fu-J在体外具有非常高的致肿瘤作用，这表明融合蛋白中Gag残基的增加并未显著影响病毒在体外诱发鸡体肿瘤的能力。值得注意的是，Fu-J-P137gag-fps融合蛋白的Fps残基与鸡c-*fps*原癌基因产物NP98相比，仅发生了一个氨基酸的突变，这可能与Fu-J (SDAU1005)的传代次数较少有关。本实验室之前的研究表明，相对于其他急性转化型毒株，Fu-J

（SDAU1005）体外转化CEF细胞、形成转化灶的能力较弱。研究表明，肿瘤基因某些位点的突变会增强病毒转化CEF及体外致瘤能力。Fu-J-P137gag-fps融合蛋白中较低的Fps残基突变率是否与Fu-J (SDAU1005)较弱的体外转化能力有关，需要进一步研究。

病毒与宿主原癌基因之间的重组在反转录病毒中非常普遍，有研究表明，在ALV-J诱发的肿瘤中，在60%以上的肿瘤组织中可以分离到急性致瘤性病毒。Chesters等（2001）在ALV-J诱发的骨髓瘤中，鉴定到多种携带不同长度v-*myc*肿瘤基因的急性致瘤性ALV，并推断肿瘤的发生于c-*myc* 的激活密切相关。由于c-*fps* 基因在髓细胞系中高表达

（Feldman *et al*, 1985），而c-*fps*参与血液细胞的生长和分化，自然也会产生疑问：c-*fps*基因是否与ALV-J诱发的髓细胞瘤相关？因此在日常的病料检测中，收集了多份ALV-J诱发的肿瘤病料，使用相应引物进行PCR和RT-PCR扩增，但既未检测到杂合子RNA，也没有检测到携带v-*fps*肿瘤基因的前病毒DNA。这似乎表明，ALV与宿主c-*fps*之间的重组是一个偶发事件。

114

## 4.2 rFu-Js感染性克隆的构建、病毒拯救和致瘤性分析

目前为止，我们扩增到了携带完整v-*fps*肿瘤基因的急性转化型病毒Fu-J株及具有类似基因组结构的Fu-J1~5株。Fu-J1~5携带了不同长度的v-*fps*肿瘤基因，而这些v-*fps*基因的3’端均存在缺失突变。这直接导致Gag-Fps融合蛋白激酶结构域的缺失，这使我们产生疑问：这些缺陷型病毒中哪一个或哪几个与急性致瘤直接相关？

为解决本问题，本研究构建了辅助病毒和六种缺陷型病毒的感染性克隆，通过反向遗传学的方法研究了这些缺陷型病毒的致瘤能力。本研究中所使用的病毒拯救方法类似于重组慢病毒的构建过程，其理论基础为：将辅助病毒的感染性克隆质粒和缺陷型病毒的感染性克隆质粒共转染CEF细胞，辅助病毒首先被拯救。随后，缺陷型病毒的基因组被包装进拯救的辅助病毒，从而获得拯救的缺陷型病毒。实际操作中我们发现，共转染方法虽然可以拯救出缺陷型病毒，但其拯救效率并不高，两种质粒的比例起重要作用。经过优化摸索，当辅助病毒感染性克隆质粒与缺陷型病毒感染性克隆质粒的摩尔浓度比为1: 5时，可以获得相对较好的拯救效果。

本研究通过动物实验，验证了六种缺陷型病毒在鸡体上的致瘤能力。结果发现，仅携带完整v-*fps*肿瘤基因的rFu-J可以诱发一定比例的肿瘤，而Fu-J1~5在鸡体上无法诱发肿瘤。事实上，根据现有研究结论和试验现象也推测到这一结果。首先，v-*fps*基因编码非受体蛋白激酶，该激酶通过磷酸化某些细胞蛋白，持续激活下游信号分子，比如SHC (McGlade *et al*., 1992)、rasGAP (Ellis *et al*., 1990)、PI3K (Fukui *et al*., 1991)、PDGF-beta受体（Anderson and Ismail, 1998）等，从而引起细胞转化诱发肿瘤，v-*fps*基因的激酶活性区域对其致瘤能力起决定性作用。Fu-J1~5所携带的v-*fps*肿瘤基因恰好缺失此区域，因此，有理由推断Fu-J1~5不具备致肿瘤的能力。其次，将肿瘤研磨液在鸡体上传代，我们在低代次鸡肿瘤中（三代内）扩增到了Fu-J1~5的前病毒DNA，然而在三代以上的肿瘤中，仅能扩增到携带完整v-*fps*基因的Fu-J病毒。这可能是由于携带缺失v-*fps*肿瘤基因的Fu-J1~5无法诱发肿瘤，在鸡体传代过程中，它们被逐渐淘汰；而携带完整v-*fps*肿瘤基因的Fu-J最终获得了增殖优势并稳定复制。鸡体上的传代客观上对病毒起到了筛选作用。

值得注意的是，本研究中第一代拯救病毒rFu-J (rSDAU1005)仅可诱发较低的肿瘤发生率（2/10），随后将拯救病毒诱发的原代肿瘤组织研磨过滤，在鸡上继续传代。随着

115

传代次数的增加，肿瘤的生长速度逐渐提高。对于该现象，我们有两种推测：第一种可能是，急性致瘤性ALV在感染、转化宿主细胞是病毒与宿主相互作用的复杂过程，由于第一代病毒量较低，造成病毒转化致瘤的能力较低，被转化的细胞在组织中生长受到抑制，而将组织研磨的过程相当于将病毒人为释放，促进了病毒的传播和复制。此外，这也有可能与病毒在宿主体内不断复制的过程中发生了碱基突变，从而获得了更强的复制能力或者更强的致瘤能力。其具体的机制还需要进一步研究。

## 4.3 SJ(SDAU1102)的分离鉴定和基因组序列分析

本研究中涉及的2#肉瘤病料来自ft东新泰某海兰褐商品代蛋鸡场240日龄左右的商品代海兰褐蛋鸡。剖检时发现在该病鸡的腹腔内腰椎下，有一个乒乓球大小的肉瘤块群。对该肉瘤块的不同部位作组织切片观察，表明是典型的纤维肉瘤。进一步的人工接种实验证明，该肉瘤可诱发急性纤维肉瘤。由此判断，该肉瘤同样为急性致瘤性ALV所诱发的急性肉瘤（王鑫等, 2012； 李德庆等，2013）。本研究采用PCR扩增的方法，对该急性致瘤性ALV及其辅助病毒进行了分离鉴定和基因组序列扩增。以原代肉瘤组织

DNA为模板，除了扩增到复制完整型J亚群ALV病毒SDAU1102株外，还扩增到了五种携带v-*src*肿瘤基因的缺陷型病毒，将其命名为SJ-1, SJ-2，SJ-3, SJ-4和SJ-5。序列分析表明，SDAU1102不但是SJ-1~5的辅助病毒，而且是其近缘病毒。因此所分离毒株命名为SJ (SDAU1102)。感染病毒悬液CEF的IFA和肿瘤组织的免疫组化实验证实了肿瘤时由表达Src蛋白的急性致瘤性ALV所诱发。这是世界上首个以ALV-J为辅助病毒、携带v-*src*肿瘤基因的复制缺陷型病毒的分离鉴定和报道。

目前分离到的携带v-*src*肿瘤基因的急性致瘤性ALV 主要包括以下三类：RSV、

S1/S2及PR2257株（Schwartz *et al*., 1983）。其中，所有的RSV均来自于1901年Rous所发现的鸡肿瘤，早期传代次数少的毒株如RSV-29, BH-RSV均为复制缺陷型，后期传代次数较多的毒株如PR-C, SR-RSV中的v-*src*基因插入到*env*基因下游，均为复制完整型病毒（Dutta *et al*., 1989）。SJ-1~5是从第一代肿瘤组织中分离到的，它们均为复制缺陷型病毒，该发现为以下结论提供了直接证据，即：辅助病毒与宿主原癌基因重组首先形成缺陷型病毒，缺陷型病毒通过进一步的重组最终形成类似PR-C, SR-RSV的复制完整型急性致瘤性病毒。

SJ-1~5都是在原代肿瘤组织中分离到的，在同一份病料中同时分离到五种不同形式

116

的病毒，这展现出自然重组形成急性致瘤性ALV的多样性。事实上，在之前的研究中同样观察到类似的现象。当把td缺失株td109接种鸡后，在诱发的肿瘤中分离到二十余株携带不同长度*src*基因、并且重组位点各异的rASV（Wang *et al*., 1984）。在ALV-J诱发的髓样细胞瘤中，除了携带*myc*基因的966株外，还可以通过PCR扩增到多种多样的携带v-*myc*基因的急性致瘤性ALV（Venugopal., 2000; Chesters *et al*., 2001）。此外，在Fu-J 诱发的纤维肉瘤中，同样扩增到了六种不同形式的携带v-*fps*肿瘤基因的病毒

（Chen *et al*, 2012）。这些结果表明：在辅助病毒与宿主原癌基因发生自然重组的初期，可以产生不同类型的缺陷病毒，这可能与发生重组时不需要很高的序列同源性有关。

本研究同样探索了在肿瘤组织的传代过程中，SJ-1~5相对数量的变化。结果发现，在肿瘤病料传代的过程中，SJ-1和SJ-2的数量相对上升，SJ-3,4,5的数量则相对下降，到第4代时，SJ-3,4,5几乎检测不到。这表明，在鸡体传代过程中，SJ-1~5由于某种选择作用，它们的相对数量发生着有规律的变化。这有可能是由于SJ-3,4,5由于无法引起肿瘤，在不断传代过程中被逐渐淘汰。SJ-1及SJ-2虽然均可诱发肿瘤，但由于SJ-1具有较短的基因组长度，因而在复制过程中周期较短，在传代中最终占据数量优势。对连 续五代肿瘤组织中急性致瘤性病毒的测序使我们对病毒的演化过程有了更直观的认识。SJ (SDAU1102)的分离鉴定同样给我们提出了与上文类似的问题：SJ-1~5的哪一个

或哪几个毒株可以表达p60v-src蛋白从而诱发肿瘤？由于序列分析表明，SJ-3,4,5无法表达有功能的Src蛋白，因此，本研究构建了SJ-1~5五种缺陷型病毒的感染性克隆质粒，将其转染CEF细胞进行IFA检测。实验结果表明，确实仅SJ-1和SJ-2可以表达p60v-src蛋白。本研究虽然没有进行进一步的病毒拯救，但通过质粒的转染实验和对不同代次肿瘤组织中缺陷型病毒数量的研究，有理由判断：仅SJ-1和SJ-2可以表达p60v-src蛋白、诱发肿瘤。事实上，有研究表明，直接将感染性克隆质粒接种15I5×71品系鸡可以诱发鸡的肿瘤（Fung *et al*., 1983），我们也依照报道的方法，将感染性克隆质粒接种1日龄

SPF鸡。然而，所有接种质粒的鸡并未发生肿瘤。我们推测，这可能与鸡的品系，或者是接种的途径和剂量有关。

## 4.4 Fu-J(SDAU1005)的病毒复制及其致瘤性的研究

### 4.4.1 Fu-J(SDAU1005)病毒复制特性的研究

为研究Fu-J (SDAU1005)体外培养CEF进行传代时的复制特性，本研究首先建立

117

了可对ALV-*gp85*基因和v-*fps*基因进行精确定量的real-time PCR方法。两种方法特异性好，灵敏度高，可以作为研究病毒增殖动态和抗原分布的重要工具。对不同代次细胞毒中辅助病毒和缺陷型病毒定量结果表明，随着细胞传代次数的增加，缺陷型病毒Fu-J的相对量迅速下降，而前期的动物实验也证实了高代次的细胞传代毒其致瘤性大大降低。事实上，REV缺陷型病毒T株的复制也存在类似现象。携带v-*rel*肿瘤基因的缺陷型病毒T株在鸡胚成纤维细胞（CEF）或狗胸腺细胞上传代后，其急性致瘤性很快会丧失，这是由于体外传代导致了缺陷型病毒的丢失（Breitman *et al*, 1980）。本实验中，对病毒定量的结果提示我们：相对于辅助病毒，急性致瘤性ALV的含量并不高，因此急性致瘤性ALV分离鉴定的最佳方法是宿主体内传代，使用体外培养细胞传代很有可能导致缺陷型病毒的丢失。另一方面，这也提示我们：体外培养细胞传代是一种获得纯化的辅助病毒的简单方式。

### **4.4.2** **Fu-J(SDAU1005)** 对**SPF**鸡的致病性、致瘤性的研究

急性致瘤性ALV由于携带了某种肿瘤基因，它可以在短时间内诱发感染鸡的肿瘤。本研究中的Fu-J病毒携带v-*fps*肿瘤基因，历史上所分离到的其余携带v-*fps*肿瘤基因的病毒均以A/B亚群或内源性E亚群为辅助病毒(Lee *et al*., 1980; Neel *et al*., 1982; Vogt, Neil, Moscovici *et al*., 1981; Wang *et al*., 1981)，而Fu-J是分离到的第一株以ALV-J为辅助病毒的缺陷型病毒。目前，国内对ALV-J相关的急性致瘤性ALV致病性和致瘤性研究相对较少。本研究通过颈部皮下、腹腔和静脉接种三种不同的接种方式接种SPF鸡，系统研究了Fu-J (SDAU1005)病毒对SPF鸡的致病性和致瘤性特点。

急性致瘤性ALV所诱发肿瘤的类型，与该病毒携带的肿瘤基因密切相关（Kalland *et al*., 2009; Vogt, 2012）。Fu-J株携带了v-*fps*肿瘤基因，表达130kDa的Gag-fps融合蛋白。c-*fps/fes*基因的正常表达对髓细胞系的分化和免疫功能起重要调节作用，但c-*fps/fes*不受控的过表达则会诱发多种类型的肿瘤（Greer, 2002; Haigh *et al*., 1996）。*fps/fes*转基因小鼠可患严重的心脏和神经系统异常，并患多种淋巴瘤或间胚叶肿瘤（Yee *et al*., 1989a; Yee *et al*., 1989b）。本研究进一步揭示，无论通过何种接种方式，Fu-J (SDAU1005) 诱发宿主不同器官肿瘤的类型均为纤维肉瘤，镜检观察未发现典型的J亚群ALV诱发髓样细胞瘤。并且，Fu-J株诱发的鸡纤维肉瘤的转移性并不强，肿瘤发生转移的比例较小。这些特点与v-*fps*产物P137gag-fps蛋白的生物学功能和活性密切相关。使用荧光定量PCR

118

方法研究了病毒感染与肿瘤发生之间的相关关系，结果表明，Fu-J病毒主要分布在肿瘤组织中，分布趋势与辅助病毒的抗原分布具有类似的规律，表明Fu-J对辅助病毒具有很强的依存关系。

在Fu-J (SDAU1005)接触传播能力的研究中，无论是荧光定量PCR检测，还是临床病理观察，均未发现缺陷型病毒具有横向传播的能力。事实上，由于急性致瘤性ALV是一种缺陷型病毒，它很难形成在鸡群中的流行爆发，历史上鸡的急性肿瘤也仅是散发。然而，在国内发病鸡场中发生了一定比例的颈部皮下纤维肉瘤的局部流行，这可能存在其他病毒传播途径。我们注意到：绝大部分鸡场爆发的急性肿瘤多发生在鸡的颈部皮下，因此我们怀疑：疫苗接种可能在急性肿瘤的传播中起到一定作用。在国内很多鸡场，每只鸡需要接种NDV, H9-AIV, H5-AIV, IBV等多种灭活油乳剂疫苗。如果注射器针头刺到偶然发生的肿瘤，在接下来的免疫中没有及时更换注射器，极易造成病毒的传播。本研究通过实验进行了验证，将接触过肿瘤组织的注射器针头连续颈部皮下接种五只鸡，发现前三只鸡确实可以发生类似的急性肿瘤，提示我们：及时更换免疫用的注射器针头是防控急性致瘤性ALV的关键。

### **4.4.3** **Fps**抗体对**Fu-J (SDAU1005)**诱发肿瘤抑制作用的研究

鸡体抗肿瘤免疫效应是通过多种途径实现的，既有细胞免疫应答，又有体液免疫应答。随着单克隆抗体生产技术的成熟，越来越多的肿瘤抗原特异性单克隆抗体被应用于人类肿瘤疾病的临床治疗中，并取得了一定效果，如靶向抗原CD20的抗体用于B淋巴细胞瘤的治疗，靶向表皮生长因子受体抗体用于结肠癌的治疗等。本研究中，Fu-J

（SDAU1005）感染宿主后表达的P137gag-fps融合肿瘤蛋白在致肿瘤过程中发挥了极其重要的作用。这使得我们思考：鸡抗Fps抗体能否抑制Fu-J (SDAU1005)诱发肿瘤的生长和发展？

本研究首先将与佐剂混合的原核表达的Fps蛋白免疫SPF鸡，确认该蛋白可以诱发

SPF鸡产生Fps特异性抗体。随后接种Fu-J (SDAU1005)病毒，研究Fps抗体对肿瘤生长的抑制作用。然而遗憾的是，虽然免疫鸡血清中含有较高效价的特异性抗体，但对鸡肿瘤的生长没有显著的抑制作用。这可能是由于细胞介导的免疫是抗肿瘤免疫效应的主体，体液免疫因素在某些情况下起到协同作用。另外，由于本研究中的肿瘤时由病毒引起，细胞免疫对于感染细胞中病毒的清除起着重要作用。因此，在v-*fps*肿瘤基因诱发

119

的鸡急性肿瘤中，体液免疫对肿瘤的清除作用不显著。

## 4.5 感染Fu-J (SDAU1005)的CEF转录组分析

肿瘤的发生发展是一个连续的过程，各种综合因素协同引起了DNA的损害，继而引起原癌基因和抑癌基因表达水平的异常，使得细胞的表型出现了明显不同于正常细胞的变化，最终转变成肿瘤细胞。对于感染了急性致瘤性ALV毒株Fu-J (SDAU1005)的宿主细胞而言，由于病毒基因组中肿瘤基因的过表达，促进了细胞的持续增殖，赋予了细胞不死的特性，最终导致细胞的转化和癌变。通过基因芯片技术，了解细胞转化过程中基因水平的改变，有助于深层认识v-*fps*肿瘤基因引起细胞转化和癌变的分子机制。

### **4.5.1** 细胞凋亡相关基因

与感染辅助病毒SDAU1005的CEF相比，感染Fu-J (SDAU1005)的CEF有10个涉及到细胞凋亡的基因表达发生显著改变。其中，CHP1、PIK3R1、IRF1等基因显著上调，CYCS、PERP、APAF1等基因显著下调。细胞凋亡大多由抑癌基因产物所引发，而细胞凋亡功能的抑制是肿瘤发生的必要条件。其中，CHP1能够结合NHE1细胞质调节区域中靠近细胞膜的部位，从而维持细胞内环境稳定，调节细胞生长和死亡，CHP1的高表达能够影响白血病细胞的生长（李庆华等，2005）。PIK3R1能够促进多发性骨髓瘤细胞的发展和侵袭转移，靶向PIK3RI的RNAi技术可以在体外明显抑制RPMI8226骨髓瘤细胞的侵袭能力（Tang J. *et al*., 2014）。Apaf 1在哺乳动物线粒体依赖性凋亡通路中发挥重要作用，是一种直接的凋亡激活剂。在凋亡发生过程中，许多蛋白质直接或间接的与Apaf 1发生相互作用。在大肠癌、膀胱癌、骨肉瘤等肿瘤组织中，Apaf1呈低表达

（Zou *et al*., 1997）。细胞周期检测点激酶主要包括CHEK1和CHEK2，它们在DNA的损伤修复信号转导通路中起重要作用，CHEK2的异常表达会影响DNA损伤的修复或复制阻滞，增加肿瘤的易感性（Dong *et al*., 2014）。因此，CHEK2通常被认为是一种潜在的抑癌基因，它在多种恶性肿瘤组织低表达或者缺失。根据以上结果我们推测，v-*fps*基因产物抑制了感染细胞的凋亡过程，从而利于细胞的增殖和转化，促进肿瘤细胞的形成和生长。

### **4.5.2** 细胞增殖相关基因

当细胞受到外界致癌因素持续刺激的情况下，极易发生基因的突变，这些分子由于突变、以为或者扩增导致功能异常或者过度表达，从而促进细胞的持续增殖，导致细胞

120

的癌变。在肿瘤多阶段演进初期，肿瘤细胞即获得了无限增殖的能力，这也是肿瘤浸润、转移的生物学前提和基础。本研究中，鉴定到了一系列与细胞增殖有关的差异基因，比如IL7R、CARD11、CD47、JARID2、NPY1R、FGF4、FGFR3、BMP7、IGFBP1、TP73、

NOV等基因。研究表明，IL-7/IL-7R高表达与非小细胞肺癌的分期、淋巴结转移和预后不良正相关。在肺癌细胞中，IL-7通过IL-7R调控AP-1复合物中c-*fos*, c-*jun*表达及磷酸化，促进c-*fos*和c-*jun*形成异二聚体，调控基因转录（Al-Rawi *et al*., 2004）。CARD11是膜相关鸟甘酸激酶家族唯一的淋巴细胞特异性成员，研究表明，它可以作为上游信号传导分子激活NF-κB信号通路，进而对原发性胃肠道弥漫性大B细胞淋巴瘤的发生发展发挥作用（Pavan *et al*., 2008）。JARID2基因在葡萄膜黑色素瘤细胞的生长、转移和克隆形成能力中起着重要的作用（刘博等，2015）。NPY1R在乳腺癌外周血中的表达水平明显高于正常组，并且NPY1R在外周血中的表达水平与临床分期、淋巴结转移和ER、

PR、HER2具有相关性（Korner *et al*., 2008）。T box家族是目前新发现的一个转录因子家族，它们在许多物种的发育过程中起着关键作用。T box家族多个成员在肿瘤上皮-间质转化中发挥重要功能，与肿瘤分期、转移、预后及肿瘤干细胞特性密切相关（Fernando *et al*., 2010; Imajyo *et al*., 2012; Gentsch *et al*., 2013）。BMP7由骨基质细胞分泌，可通过激活诱导细胞衰老的通路，如p38、p21和NDRG1通路，诱导癌症干细胞样细胞的衰老。BMP7的连续注射可以抑制小鼠肿瘤干细胞的生长（Kobayashi *et al*., 2011）。IGFBP-1可以下调ERK1/2、MMP-2、MMP-9的蛋白表达水平及其活性，IGFBP-1在肝癌组织中低表达，与肝癌患者的病理特征相关（Liew *et al*., 2005）。NOV基因与多种组织恶性肿瘤的发生发展、转移及浸润有关。NOV基因在多数肿瘤中起负向调节作用，能够促进肿瘤细胞的分化、抑制肿瘤细胞的增殖。研究发现，RSV病毒的v-*src*肿瘤基因可导致感染CEF中NOV基因呈下调表达，这可能促进了转化细胞的锚定非依赖生长和迁移

（Masker *et al*., 2007）。本研究中，Fu-J病毒的v-*fps*肿瘤基因同样导致CEF中NOV基因下调表达，这表明两种肿瘤基因的致癌机制具有相似通路。

### **4.5.3** 血管形成相关的基因

血管生成作为肿瘤的生物能力之一，能够影响肿瘤的发展速度，在肿瘤形成发展过程中具有重要意义。促进血管生成的因子主要包括血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)，成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)，

121

血小板去衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)，转化生长因子(transforming growth factor, TGF)，血管生成素(angiopoietin, ANG)及多种趋化因子。本研究中，我们鉴定到多个促进血管形成的上调差异表达基因，如IGF2、FGF13、FGFBP2、MMP13、

ANG、CCL1、PDGFC和ANGPT1等。目前，已鉴定出的FGF家族成员共有22个，它们能够促进内皮细胞的有丝分裂，细胞增殖和迁移等活动，是机体内最为有效的血管生成促进因子之一。本研究中，感染Fu-J病毒CEF的FGF3,4,7,13,18以及FGFBP2均显著上调，表明FGF家族蛋白在v-*fps*肿瘤基因诱发肿瘤的血管形成中其重要作用。此外，与血管形成相关的基因ANG和ANGPT1也显著上调。ANGPT1通过促进内皮细胞存活和血管成熟而刺激肿瘤生长（Ikushima *et al*., 2013），在ALV-J感染的法氏囊淋巴细胞中，也观察到了该基因的上调表达（Hang *et al*., 2010）。我们推测，这几个差异表达基因参与了肿瘤血管的形成，从而促进原发肿瘤的生长、侵袭和转移。

### **4.5.4** 肿瘤细胞迁移相关的基因

多数类型的肿瘤细胞都具有局限化的早期持续增殖阶段和传播至远端组织的器官的晚期转移阶段。本研究中，鉴定到了多个可以促进肿瘤细胞迁移的差异表达基因，如

TIAM1、细胞角蛋白、CD44等。TIAM1是RhoGEFs家族成员，参与调控Rho类蛋白的活性，连接细胞外信号与细胞骨架的通讯，它广泛表达于多种肿瘤细胞，通过TIAM1-Rac通路调控肿瘤细胞的侵袭和转移，诱导成纤维细胞的恶性转化（Lambert *et al*., 2002; Malliri *et al*., 2002）。MMP-2、MMP-9等基因是一组Zn2+依赖的细胞外蛋白水解酶，它对细胞外基质及血管基底膜起降解作用，并可释放血管活性因子，促进血管形成，从而促进转移（Brooks *et al*., 1996; Chernov *et al*., 2009）。大多数上皮细胞的中间丝细胞骨架是由细胞角蛋白组成，有研究表明肝细胞癌中表达角蛋白的细胞具有更强的转移能力，且角蛋白表达对肝癌细胞迁移有促进作用（Supriatno *et al*., 2003）。CD44 蛋白参与细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的特异性粘连。近年来发现CD44表达与肿瘤转移关系密切。CD44可能通过影响癌细胞的骨架构象和分布，从而影响癌细胞的运动能力和癌转移（Bourguignon *et al*., 2001; Marhaba *et al*., 2004; Nagano *et al*., 2004）。

## 4.6 拉米夫定抑制Fu-J (SDAU1005)复制的研究

禽白血病曾给中国的养禽业带来巨大经济损失，然而，由于ALV亚群多、病毒基因组变异快、难以诱发保护性中和抗体等诸多原因，尚无有效的疫苗可供使用（Qian *et*

122

*al*., 2014; Wei *et al*., 2015）。垂直传播是ALV感染的最重要方式，因此淘汰和净化ALV阳性种群是最根本的防控手段。拉米夫定是核苷类似物抗病毒药物，它可在细胞内磷酸化，以环腺苷磷酸的形式嵌入到病毒DNA中，导致DNA链合成终止。它可以有效抑制乙肝病毒和艾滋病病毒的复制。拉米夫定可以抑制HIV反转录酶的活性，抑制但不可以完全阻止HIV的复制。拉米夫定于1995年11月被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于艾滋病患者的治疗，在人类临床治疗上得到广泛应用。作为一种反转录病毒，反转录酶在ALV-J的生活史中同样发挥着重要作用，我们有理由推测拉米夫定同样可以抑制ALV-J的复制。

为了研究拉米夫定对ALV-J 是否存在有效的抑制作用，本研究以接种了Fu-J

（SDAU1005）的CEF细胞为靶细胞，分别使用含有不同浓度拉米夫定的DMEM培养基进行培养，证实拉米夫定可以在体外培养细胞上抑制ALV-J的复制。我们随后对拉米夫定体外抑制ALV-J复制的机制进行了研究。结果表明，拉米夫定可以抑制ALV反转录酶的活性，但对病毒进入细胞和释放没有抑制作用，对ALV-J细胞受体的表达也没有明显影响。这表明，拉米夫定有可能通过竞争性结合反转录酶，抑制ALV反转录酶的活性，终止cDNA链的合成，从而抑制ALV-J的复制。动物实验的结果同样表明，拉米夫定可以有效抑制辅助病毒SDAU1005和缺陷型病毒Fu-J在鸡体上的复制，从而减缓颈部皮下肿瘤的早期生长速度、延长腹腔接种病毒鸡的生存时间、降低其死亡率。但是，动物实验结果显示：药物的使用无法彻底杀伤病毒，外源性反转录病毒一旦整合入宿主细胞并将其转化癌变，肿瘤细胞便可快速增殖，ALV-J病毒也会随之复制。因此，拉米夫定适合治疗感染初期鸡群，或者用于预防ALV-J的横向传播，加快ALV净化的进程。

之前的研究表明，持续使用拉米夫定治疗HIV会造成HIV耐药株的产生。为了检测持续使用拉米夫定情况下，ALV-J能否产生耐药株，检测了第一代给药组肿瘤组织中ALV-J的耐药性。结果发现，第一代给药组肿瘤中分离到的ALV-J没有产生拉米夫定的耐药性。因此，拉米夫定有做为抗ALV-J药物使用的可能。需要指出的是，本课题重点阐明了拉米夫定对ALV的抑制作用及其机制，能否在鸡群中推广使用需要进一步研究和论证。事实上，严格的净化措施是防控ALV的关键。即使拉米夫定可应用于临床实践，也仅仅是作为辅助措施，而非治疗手段应用于个别地方品系鸡的核心种群，以缩短净化周期，加快净化进程。

123

# **5** 结 论

5.1“817”肉杂鸡颈部皮下肉瘤中分离到的急性致瘤性ALV携带完整的v-*fps*肿瘤基因，海兰褐蛋鸡肠系膜纤维肉瘤中分离到的急性致瘤性ALV携带v-*src*肿瘤基因。

5.2仅携带完整v-*fps*肿瘤基因的急性致瘤性ALV可诱发鸡的急性肿瘤。

5.3急性致瘤性ALV在形成的初期，会产生一系列具有相似基因组结构的“准种”病毒。随着病毒在鸡体的传代，具有诱发肿瘤能力的“准种”病毒最终获得了复制优势。

5.4 CEF感染Fu-J (SDAU1005)后，会引起一系列基因的表达变化，这些基因的差异表达最终诱发了细胞转化和致瘤。

5.5抗HIV核苷类药物拉米夫定可以通过抑制ALV反转录酶的活性，在体外和体内抑制ALV-J的复制。

124

# **6** 参考文献

陈浩，王一新，赵鹏，李建亮，李德庆， 崔治中. 禽白血病/肉瘤病毒肿瘤基因及其与致肿瘤机制的关系. 畜牧兽医学报, 2012, 03: 336-342.

崔治中，赵鹏，孙淑红，王鑫， 李文平. 鸡致病性外源性禽白血病病毒特异性核酸探针交叉斑点杂交检测试剂盒的研制. 中国兽药杂志, 2011, 08: 5-11.

崔治中. 禽白血病病毒的亚群和准种多样性及其在不同选择压作用下的演变. 生命科学, 2016, 03: 283-294.

崔治中. 禽白血病病毒研究的过去、现在和将来. 生命科学, 2012, 04: 305-309.

崔治中. 我国J亚群禽白血病的防控及其启示. 中国家禽, 2015, 06: 1-3.

崔治中. 种鸡场禽白血病防控和净化技术方案. 中国家禽, 2015, 23: 1-7.

丛锋. IBV感染鸡肾脏和脾脏转录组学分析及鸡IFITM1抑制IBV和NDV复制机制的研究. 中国农业科学院博士毕业论文, 2015。

段伦涛，赵鹏，董宣，王一新，崔治中. 对鸡群A/B亚群禽白血病病毒抗体ELISA检测阳性率的可靠性评估. 中国畜牧兽医, 2014, 06: 197-203.

窦文文，李宏梅，成子强，刘建柱， 刘海港， 井维芳， 崔治中， 郭慧君. ALV-Jgp85重组蛋白与免疫佐剂联合接种雏鸡诱导免疫保护的研究. 中国预防兽医学报, 2013, 03: 232-236.

冯少珍，李娇，曹伟胜，廖明. YXXM基序对J亚群禽白血病病毒复制的影响. 微生物学报, 2011, 12: 1663-1668.

冯少珍，李娇，吴晓婵，曹伟胜，廖明. PI3K/Akt信号转导通路在ALV-J感染中作用的初步研究. 中国农业科学, 2011, 16: 3446-3453.

高雁怩，高奇，李晓菲，贠炳岭， 祁小乐， 王永强， 刘长军， 崔红玉， 张艳萍， 高宏雷， 王笑梅，高玉龙. 3’-U3区碱基突变不影响禽白血病病毒的体外复制能力. 畜牧兽医学报, 2015, 04: 608-614.

高玉龙，贠炳岭，秦立廷，潘伟，王永强，高宏雷，祁小乐，王笑梅. 蛋鸡J亚群禽白血病病毒3’非编码区序列特征分析. 畜牧兽医学报, 2012, 11: 1841-1846.

郭慧君，李中明，李宏梅，柴家前，马诚泰，王洪进，崔治中. 3种ELISA试剂盒检测不同

125

亚型外源性鸡白血病病毒的比较. 畜牧兽医学报, 2010, 03: 310-314.

纪晓琳，王琦，高玉龙，王永强，秦立廷，祁小乐，高宏雷，王笑梅. J亚群禽白血病病毒分离株HLJ09SH01株感染性克隆的构建及其致病性研究. 中国预防兽医学报, 2013, 01: 15-18.

李传龙， 张恒， 赵鹏， 崔治中. ALV-J 相关的鸡急性纤维肉瘤发病模型的建立. 中国农业科学, 2012, 03: 548-555.

李德龙， 高玉龙， 曾祥伟， 杨波， 刘婉思， 高奇， 秦立廷， 高宏雷， 王笑梅， 刘思当. 东北地区野生鸟类 J 亚群禽白血病分子流行病学调查及部分基因组序列分析. 畜牧兽医学报, 2013, 03: 488-494.

李德龙， 刘婉思， 杨波， 高奇， 曾祥伟， 秦立廷， 高宏雷， 刘思当， 高玉龙， 王笑梅. 东北地区野生鸟类 B 亚群禽白血病的分子流行病学调查及 *env* 基因的序列分析. 中国兽医科学, 2013, 02: 208-212.

李德庆， 赵鹏， 王鑫， 汪晓飞， 崔治中. 鸡胚和雏鸡接种 ALV-J 相关急性纤维肉瘤浸出液的致病性比较. 畜牧兽医学报, 2013, 02: 250-255.

李建亮. 不同遗传背景鸡群来源J亚群禽白血病病毒*gp85*的分子演变分析. ft东农业大学博士论文, 2015。

李庆华，庞天翔，韩忠朝. CHP调节NHE1活性影响细胞生长和死亡. 中国生物工程杂志, 2005, 10: 63-67.

李薛，李德庆，赵鹏，崔治中. ELISA与IFA检测鸡血清ALV-A/B特异性抗体相关性比较. 病毒学报, 2012, 06: 615-620.

林艳， 夏静， 邹年莉， 郭明萍， 王富妍， 赵扬， 文心田， 曹三杰， 黄勇. 1 株髓细胞瘤型 J

亚群禽白血病病毒感染性克隆的构建与病毒拯救. 畜牧兽医学报, 2013, 05: 754-759.

刘博，邱纯，李鹏，毕建军，吴晴，钮蓓蓓. 靶向敲除JARID2基因对葡萄膜黑色素瘤细胞生长与转移的影响. 上海交通大学学报（医学版）, 2015, 05: 642-646.

刘绍琼，王波，张振杰，王健，孙淑红，崔治中. 817肉杂鸡肉瘤组织分离出A、J亚型禽白血病病毒. 畜牧兽医学报, 2011, 03: 396-401.

毛娅卿，李卫华，董宣，刘金华，赵鹏. 差异极大的不同准种隐藏于同一J亚型禽白血病病毒野毒株中. 中国科学：生命科学, 2013, 06: 492-498.

126

聂杰，张丹丹，井维芳，任庆亚，崔治中，郭慧君，李宏梅. 不同剂量CpG-ODN佐剂与ALV-J gp85重组蛋白联合免疫诱导种母鸡血清抗体和母源抗体的比较. 农业生物技术学报, 2014, 02: 219-224.

申艳玮，何孟莲，张吉，赵满达， 王桂花， 成子强. 禽白血病病毒J 亚群跨种传播研究. 病毒学报, 2016, 01: 46-55.

苏霞，朱瑞豪，陈小玲，杨丽聪，周宏专， 徐福洲， 杨兵. 鸡传染性贫血病毒、网状内皮增生症病毒与禽白血病病毒基因芯片检测方法的建立. 华北农学报, 2015, 06: 91-96.

王超，缪华先，谢宝婵，张伟伟，吴润，刘光清. J亚型禽白血病病毒的拯救与鉴定. 中国预防兽医学报, 2011, 11: 837-840.

王莉，黄安宁，李槿年，张丹俊，刘雪兰. J亚群禽白血病SYBR GreenⅠ荧光定量PCR检测方法的建立. 中国预防兽医学报, 2013, 09: 733-737.

王琦， 王永强， 康忠惠， 高玉龙， 潘伟， 秦立廷， 李久宽， 祁小乐， 高宏雷， 王笑梅. 蛋鸡

J亚群禽白血病病毒分离株SD1009株感染性克隆的构建与病毒拯救. 中国兽医科学, 2011, 11: 1111-1116.

王鑫，李德庆，边小明，何羽婷，赵鹏， 崔治中. 海兰褐产蛋鸡ALV-J亚型相关纤维肉瘤的鉴别诊断及人工造病试验. 中国兽医科学, 2012, 06: 582-586.

王鑫，赵鹏，崔治中. 我国地方品种鸡分离到的一个禽白血病病毒新亚群的鉴定. 病毒学报, 2012, 06: 609-614.

杨波，高玉龙，高宏雷，秦立廷，刘婉思， 李德龙， 高奇， 曾祥伟， 王笑梅. 我国东北地区野生鸟类A亚群禽白血病病毒分子流行病学调查及*env*基因序列分析. 中国预防兽医学报, 2013, 03: 245-247.

张贺楠，齐岩，史伟伟，梁艺瑜，刘洪波，张小桃，曹伟胜，廖明. 血管瘤病变型J亚群禽白血病病毒E元件缺失突变体的构建. 中国预防兽医学报, 2010, 02: 94-97.

张纪元，崔治中，丁家波，姜世金. J亚群白血病病毒NX0101株感染性克隆化病毒的构建及其致病性. 微生物学报, 2005, 03: 437-440.

张莉，雷用东，盖丽丽，赵晓燕， 童军茂， 王丹， 马越， 张超. 笃斯越桔花色苷抗禽白血病病毒A亚群活性的试验研究. 华北农学报, 2013, 06: 174-180.

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. ft东农业大学博士

127

论文, 2010.

张在平，马学恩，杨海彦，田进，孟庆文. 靶向*pol*基因siRNA抑制J亚型禽白血病病毒复制的研究. 中国预防兽医学报, 2011, 05: 344-347.

朱静. 同一J亚型禽白血病毒野生株存有差异极大的不同准种. 中国家禽, 2013, 20: 60。

Adkins, H. B., Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M. M., Pesola, J. M., Joung, J. A. Identification of a cellular receptor for subgroup E avian leukosis virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 11617-11622.

Al-Rawi, M. A., Rmali, K., Watkins, G., Mansel, R. E., Jiang, W. G. Aberrant expression of interleukin-7 (IL-7) and its signalling complex in human breast cancer. *Eur J Cancer*, 2004, 40: 494-502.

Anand, R., Wilkinson, J. M., Kellie, S. Localisation of pp60c-src to the surface membrane of

Human platelets. *Oncogene*, 1993, 8: 3013-3020.

Anderson, D. H., and Ismail, P. M. v-*fps* causes transformation by inducing tyrosine phosphorylation and activation of the PDGFbeta receptor. *Oncogene*, 1998, 16: 2321-2331.

Anderson, S. K., Gibbs, C. P., Tanaka, A., Kung, H. J., Fujita, D. J. Human cellular *src* gene: nucleotide sequence and derived amino acid sequence of the region coding for the carboxy-terminal two-thirds of pp60c-src. *Mol Cell Biol*, 1985, 5: 1122-1129.

Ariizumi, K., Shibuya, M. Construction and biological analysis of deletion mutants of Fujinami sarcoma virus: 5'-*fps* sequence has a role in the transforming activity. *J Virol*, 1985, 5: 660-669.

Arshad, S. S., Howes, K., Barron, G. S., Smith, L. M., Russell, P. H., Payne, L. N. Tissue tropism of the HPRS-103 strain of J subgroup avian leukosis virus and of a derivative acutely transforming virus. *Vet Pathol*, 1997, 34, 127-137.

Bacon, L. D., Fulton, J. E., Kulkarni, G. B. Methods for evaluating and developing commercial chicken strains free of endogenous subgroup E avian leukosis virus. *Avian Pathol*, 2004, 33(2): 233-243.

Bai, J., Howes, K., Payne, L. N., Skinner, M. A. Sequence of host-range determinants in the

128

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 Gen Virol*, 1995, 76: 181-187.

Bai, J., Payne, L. N., Skinner, M. A. HPRS-103 (exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an *env* gene related to those of endogenous elements EAV-0 and E51 and an E element found previously only in sarcoma viruses. *J Virol*, 1995, 69: 779-784.

Barbacid, M., Breitman, M. L., Lauver, A. V., Long, L. K., Vogt, P. K. The transformation-specific proteins of avian (Fujinami and PRC-II) and feline (Synder-Theilen and Gardner-Arnstein) sarcoma viruses are immunologically related. *Virology*, 1981, 110: 411-419.

Barnier, J. V., Dezelee, P., Marx, M., Calothy, G. Nucleotide sequence of the *src* gene of the Schmidt-Ruppin strain of Rous sarcoma virus type E. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 1252.

Benson, S. J., Ruis, B. L., Fadly, A. M., Conklin, K. F. The unique envelope gene of the subgroup J avian leukosis virus derives from ev/J proviruses, a novel family of avian endogenous viruses. *J Virol*, 1998, 72: 10157-10164.

Blume-Jensen, P., Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 2001, 411: 355-365. Breitman, M. L., Neil, J. C., Moscovici, C., Vogt, P. K. The pathogenicity and defectiveness of

PRCII: a new type of avian sarcoma virus. *Virology*, 1981, 108: 1-12.

Breitman, M. L., Lai, M. M. C., Vogt, P. K. Attenuation of avian reticuloendotheliosis virus: loss of the defective transforming component during serial passage of oncogenic virus in fibroblasts. *Virology*, 1980, 101(101): 304-6.

Brooks, P. C., Stromblad, S., Sanders, L. C., von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W. G., Quigley, J. P., Cheresh, D. A. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*, 1996, 85: 683-693.

Brott, B. K., Decker, S., O'Brien, M. C., Jove, R. Molecular features of the viral and cellular Src kinases involved in interactions with the GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol*, 1991, 11: 5059-5067.

129

Cai, L., Shen, Y., Wang, G., Guo, H., Liu, J., Cheng, Z. Identification of two novel multiple recombinant avian leukosis viruses in two different lines of layer chicken. *J Gen Virol*, 2013, 94: 2278-2286.

Carlberg, K., Chamberlin, M. E., Beemon, K. The avian sarcoma virus PRCII lacks 1020 nucleotides of the *fps* transforming gene. *Virology*, 1984, 135: 157-167.

Chai, N., Bates, P. Na+/H+ exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J avian leukosis virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 5531-5536.

Chan, C., Gill, G. N. Mutational analysis of the nucleotide binding site of the epidermal growth factor receptor and v-Src protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 1996, 271: 22619-22623.

Chen, W, Liu, Y, Li, H. Intronic deletions of tva receptor gene decrease the susceptibility to infection by avian sarcoma and leukosis virus subgroup A. *Sci Rep*, 2015, 5.

Chen, H., Wang, Y., Zhao, P., Li, J., Cui, Z. Acute fibrosarcomas caused by avian leukosis virus subgroup J associated with v-*fps* oncogene. *J Ani Vet Ad*, 2012: 2910-2916.

Chen, J., Parsons, S., and Brautigan, D. L. Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-*src* transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*, 1994: 269: 7957-7962.

Chen, M., Granger, A. J., Vanbrocklin, M. W., Payne, W. S., Hunt, H., Zhang, H., Dodgson, J. B., Holmen, S. L. Inhibition of avian leukosis virus replication by vector-based RNA interference. *Virology*, 2007, 365: 464-472.

Cheng, Z., Liu, J., Cui, Z., Zhang, L. Tumors associated with avian leukosis virus subgroup J in layer hens during 2007 to 2009 in China. *J Vet Med Sci*, 2010, 72: 1027-1033.

Cheng, H., Rogers, J. A., Dunham, N. A., Smithgall, T. E. Regulation of c-Fes tyrosine kinase and biological activities by N-terminal coiled-coil oligomerization domains. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 8335-8343.

Chernov, A. V., Sounni, N. E., Remacle, A. G., Strongin, A. Y. Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *J Biol Chem*, 2009, 284: 12727-12734.

130

Chesters, P. M., Howes, K., McKay, J. C., Payne, L. N., Venugopal, K. Acutely transforming avian leukosis virus subgroup J strain 966: defective genome encodes a 72-kilodalton Gag-Myc fusion protein. *J Virol*, 2011, 75: 4219-4225.

Chesters, P. M., Howes, K., Petherbridge, L., Evans, S., Payne, L. N., Venugopal, K. The viral envelope is a major determinant for the induction of lymphoid and myeloid tumours by avian leukosis virus subgroups A and J, respectively. *J Gen Virol*, 2002, 83: 2553-2561.

Cooper, J. A., King, C. S. Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60c-src. *Mol Cell Biol*, 1986, 6: 4467-4477.

Cooper, J. A., Gould, K. L., Cartwright, C. A., Hunter, T. Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src:

Implications for regulation. *Science*, 1986, 231: 1431-1434.

Crittenden L B, Motta J V. A survey of genetic resistance to leukosis-sarcoma viruses in commercial stocks of chickens. *Poul Sci*, 1969, 48(5): 1751-7.

Cross, F. R., Garber, E. A., Pellman, D., Hanafusa, H. A short sequence in the p60src N terminus

Is required for p60src myristylation and membrane association and for cell transformation.

*Mol Cell Biol*, 1984, 4: 1834-1842.

Cui, N., Su, S., Chen, Z., Zhao, X., Cui, Z. Genomic sequence analysis and biological characteristics of a rescued clone of avian leukosis virus strain JS11C1, isolated from indigenous chickens. *J Gen Virol*, 2014, 95: 2512-2522.

Cui, Z., Du, Y., Zhang, Z., Silva, R. F. Comparison of Chinese field strains of avian leukosis subgroup J viruses with prototype strain HPRS-103 and United States strains. *Avian Dis*, 2003, 47: 1321-1330.

Dai, M., Feng, M., Liu, D., Cao, W., Liao, M. Development and application of SYBR Green I real-time PCR assay for the separate detection of subgroup J Avian leukosis virus and multiplex detection of avian leukosis virus subgroups A and B. *Virol J*, 2015, 12: 52.

Dai, Z., Ji, J., Yan, Y., Lin, W., Li, H., Chen, F., Liu, Y., Chen, W., Bi, Y., Xie, Q. Role of gga-miR-221 and gga-miR-222 during Tumour Formation in Chickens Infected by Subgroup J Avian Leukosis Virus. *Viruses*, 2015, 7: 6538-6551.

Dalgleish, A. G. Retroviruses and oncogenes. *Br J Rheumatol*, 1989, 28: 350-357.

131

Dezelee, P., Barnier, J. V., Briest'anska, J., Geryk, J., Karakoz, I., Michailik, A. A., Nehyba, J., Yatsula, B. A., Rynditch, A. V., Calothy, G. New case of c-*src* gene transduction: the generation of virus PR2257. *Folia Biol (Praha)*, 1994, 40: 211-223.

Dong, Y. S., Hou, W. G., Li, X. L., Jin, T. B., Li, Y., Feng, D. Y., Liu, D. B., Gao, G. D., Yin, Z. M.,

Qin, H. Z. Genetic association of CHEK2, GSTP1, and ERCC1 with glioblastoma in the Han Chinese population. *Tumour Biol*, 2014, 35: 4937-4941.

Dong, X., Zhao, P., Li, W., Chang, S., Li, J., Li, Y., Ju, S., Sun, P., Meng, F., Liu, J., Cui, Z.

Diagnosis and sequence analysis of avian leukosis virus subgroup J isolated from Chinese Partridge Shank chickens. *Poult Sci*, 2015, 94: 668-672.

Dong, X., Zhao, P., Xu, B., Fan, J., Meng, F., Sun, P., Ju, S., Li, Y., Chang, S., Shi, W., Cui, Z. Avian leukosis virus in indigenous chicken breeds, China. *Emerg Microbes Infect*, 2015, 4, e76.

Duesberg, P. H., Phares, W., Lee, W. H. The low tumorigenic potential of PRCII, among viruses of the Fujinami sarcoma virus subgroup, corresponds to an internal (*fps*) deletion of the transforming gene. *Virology*, 1983, 131: 144-158.

Dutta, A., Wang, L. H., Hanafusa, T., Hanafusa, H. Partial nucleotide sequence of Rous sarcoma virus-29 provides evidence that the original Rous sarcoma virus was replication defective. *J Virol*, 1989, 55: 728-735.

Ellis, C., Moran, M., McCormick, F., and Pawson, T. Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature*, 1990, 343: 377-381.

Fan, Z., Hu, X., Zhang, Y., Yu, C., Qian, K., Qin, A. Proteomics of DF-1 cells infected with avian leukosis virus subgroup J. *Virus Res*, 2012, 167: 314-321.

Feldman, R. A., Gabrilove, J. L., Tam, J. P., Moore, M. A., Hanafusa, H. Specific expression of the human cellular fps/fes-encoded protein NCP92 in normal and leukemic myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 2379-2383.

Fernando, R. I., Litzinger, M., Trono, P., Hamilton, D. H., Schlom, J., and Palena, C. The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human

132

Tumor cells. *J Clin Invest*, 2010, 120: 533-544.

Foster, D. A., Hanafusa, H. A fps gene without gag gene sequences transforms cells in culture and induces tumors in chickens. *J Virol*, 1983, 48: 744-751.

Foster, D. A., Shibuya, M., Hanafusa, H. Activation of the transformation potential of the cellular *fps* gene. *Cell*, 1985, 42: 105-115.

Frisby, D. P., Weiss, R. A., Roussel, M., Stehelin, D. The distribution of endogenous chicken retrovirus sequences in the DNA of galliform birds does not coincide with avian phylogenetic relationships. *Cell*, 1979, 17: 623-634.

Fukui, Y., Saltiel, A. R., Hanafusa, H. Phosphatidylinositol-3 kinase is activated in v-*src*, v-*yes*, and v-*fps* transformed chicken embryo fibroblasts. *Oncogene*, 1991, 6: 407-411.

Fung, Y. K., Crittenden, L. B., Fadly, A. M., Kung, H. J. Tumor induction by direct injection of cloned v-*src* DNA into chickens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 353-357.

Gao, Y., Guan, X., Liu, Y., Li, X., Yun, B., Qi, X., Wang, Y., Gao, H., Cui, H., Liu, C., Zhang, Y., Wang, X., Gao, Y. An avian leukosis virus subgroup J isolate with a Rous sarcoma virus-like 5'-LTR shows enhanced replication capability. *J Gen Virol*, 2015, 96: 150-158.

Gao, Y., Yun, B., Qin, L., Pan, W., Qu, Y., Liu, Z., Wang, Y., Qi, X., Gao, H., Wang, X.

Molecular epidemiology of avian leukosis virus subgroup J in layer flocks in China. *J Clin Microbiol*, 2012, 50: 953-960.

Gao, Y. L., Qin, L. T., Pan, W., Wang, Y. Q., Le Qi, X., Gao, H. L., and Wang, X. M. Avian leukosis virus subgroup J in layer chickens, China. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16: 1637-1638.

Gentsch, G. E., Owens, N. D., Martin, S. R., Piccinelli, P., Faial, T., Trotter, M. W., Gilchrist, M. J., Smith, J. C. In vivo T-box transcription factor profiling reveals joint regulation of embryonic neuromesodermal bipotency. *Cell Rep*, 2013, 4: 1185-1196.

Greer, P. Closing in on the biological functions of Fps/Fes and Fer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 278-289.

Greer, P., Maltby, V., Rossant, J., Bernstein, A., Pawson, T. Myeloid expression of the human c-*fps*/*fes* proto-oncogene in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 1990, 10: 2521-2527.

133

Guyden, J. C., Martin, G. S. Transformation parameters of chick embryo fibroblasts transformed by Fujinami, PRCII, PRCII-p, and Y73 avian sarcoma viruses. *Virology*, 1982, 122: 71-83.

Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4 +T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17: 625 -656.

Hackenmiller, R., Kim, J., Feldman, R. A., Simon, M. C. Abnormal Stat activation, hematopoietic homeostasis, and innate immunity in c-*fes*-/- mice. *Immunity*, 2000, 13: 397-407.

Hahn BH, Shaw GM, Cock KM, et al. AIDS as a zoonosiis: scientific and pubic health implications. *Science*, 2000, 287: 607-614.

Haigh, J., McVeigh, J., Greer, P. The fps/fes tyrosine kinase is expressed in myeloid, vascular endothelial, epithelial, and neuronal cells and is localized in the trans-golgi network. *Cell Growth Differ*, 1996, 7: 931-944.

Han, C., Hao, R., Liu, L., Zeng, X. Molecular characterization of 3'UTRs of J subgroup avian leukosis virus in passerine birds in China. *Arch Virol*, 2015, 160: 845-849.

Hanafusa, T., Hanafusa, H. Isolation of leukosis-type virus from pheasant embryo cells: possible presence of viral genes in cells. *Virology*, 1973, 51: 247-251.

Hanafusa, T., Hanafusa, H., Metroka, C. E., Hayward, W. S., Rettenmier, C. W., Sawyer, R. C., Dougherty, R. M., Distefano, H. S. Pheasant virus: new class of ribodeoxyvirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73: 1333-1337.

Hanafusa, T., Wang, L. H., Anderson, S. M., Karess, R. E., Hayward, W. S., Hanafusa, H. Characterization of the transforming gene of Fujinami sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 3009-3013.

Hang, B., Sang, J., Qin, A., Qian, K., Shao, H., Mei, M., Ye, J. Transcription analysis of the response of chicken bursa of Fabricius to avian leukosis virus subgroup J strain JS09GY3. *Virus Res*, 2014, 188: 8-14.

Hao, R., Han, C., Liu, L., Zeng, X. First finding of subgroup-E avian leukosis virus from wild ducks in China. *Vet Microbiol*, 2014, 173: 366-370.

134

Hayward, W. S., Neel, B. G., and Astrin, S. M. Activation of a cellular *onc* gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature*, 1981, 290: 475-480.

Hooker, D. J., Tachedjian, G., Solomon, A. E. An in vivo mutation fornl leucine to tryptophan

At position 210 in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to high-level resistane to 3'-azido-3'deoxythymidine. *J Virol*, 1996, 70: 1086-1090.

Hou, M., Zhou, D., Li, G., Guo, H., Liu, J., Wang, G., Zheng, Q., and Cheng, Z. Identification of a variant antigenic neutralizing epitope in hypervariable region 1 of avian leukosis virus subgroup J. *Vaccine*, 2016, 34: 1399-1404.

Huang, C. C., Hammond, C., Bishop, J. M. Nucleotide sequence of v-*fps* in the PRCII strain of avian sarcoma virus. *J Virol*, 1984, 50: 125-131.

Huang, C. C., Hammond, C., Bishop, J. M. Nucleotide sequence and topography of chicken c-*fps*. Genesis of a retroviral oncogene encoding a tyrosine-specific protein kinase. *J Mol Biol*, 1985, 181: 175-186.

Ikushima, Y. M., Arai, F., Nakamura, Y., Hosokawa, K., Kubota, Y., Hirashima, M., Toyama, H., Suda, T. Enhanced Angpt1/Tie2 signaling affects the differentiation and long-term repopulation ability of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430: 20-25.

Jiang, L., Zeng, X., Hua, Y., Gao, Q., Fan, Z., Chai, H., Wang, Q., Qi, X., Wang, Y., Gao, H., Gao, Y., Wang, X. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein *gp85* of avian leukosis virus subgroup J wild-bird isolates from Northeast China. *Arch Virol*, 2014, 159: 1821-1826.

Jove, R., Hanafusa, H. Cell transformation by the viral *src* oncogene. *Annu Rev Cell Biol*, 2000, 3: 31-56.

Justice, J. F. t., Morgan, R. W., Beemon, K. L. Common Viral Integration Sites Identified in Avian Leukosis Virus-Induced B-Cell Lymphomas. *MBio*, 2015a, 6: e01863-01815.

Justice, J. t., Malhotra, S., Ruano, M., Li, Y., Zavala, G., Lee, N., Morgan, R., Beemon, K. The MET gene is a common integration target in avian leukosis virus subgroup J-induced chicken hemangiomas. *J Virol*, 2015b, 89: 4712-4719.

135

Ka, S., Kerje, S., Bornold, L., Liljegren, U., Siegel, P. B., Andersson, L., Hallbook, F. Proviral integrations and expression of endogenous avian leucosis virus during long term selection for high and low body weight in two chicken lines. *Retrovirology*, 2009, 6: 68.

Kalland, K. H., Ke, X. S., Oyan, A. M. Tumour virology-history, status and future challenges.

*APMIS*, 2009, 117: 382-399.

Kanter, M. R., Smith, R. E., Hayward, W. S. Rapid induction of B-cell lymphomas: insertional activation of c-*myb* by avian leukosis virus. *J Virol*, 1988, 62: 1423-1432.

Kim, Y., Gharaibeh, S. M., Stedman, N. L., Brown, T. P. Comparison and verification of quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (QC-RT-PCR) and real time RT-PCR for avian leukosis virus subgroup J. *J Virol Methods*, 2002, 102: 1-8.

Kmiecik, T. E., Shalloway, D. Activation and suppression of pp60c-src transforming ability by

Mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell*, 1987, 49: 65-73.

Kobayashi, A., Okuda, H., Xing, F., Pandey, P. R., Watabe, M., Hirota, S., Pai, S. K., Liu, W., Fukuda, K., Chambers, C., Wilber, A., Watabe, K. Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J Exp Med*, 2011, 208: 2641-2655.

Korner, M., Waser, B., Reubi, J. C. High expression of neuropeptide Y1 receptors in ewing sarcoma tumors. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 5043-5049.

Lai, H., Zhang, H., Ning, Z., Chen, R., Zhang, W., Qing, A., Xin, C., Yu, K., Cao, W., Liao, M. Isolation and characterization of emerging subgroup J avian leukosis virus associated with hemangioma in egg-type chickens. *Vet Microbiol*, 2011, 151: 275-283.

Lambert, J. M., Lambert, Q. T., Reuther, G. W., Malliri, A., Siderovski, D. P., Sondek, J., Collard, J. G., Der, C. J. Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3) K-independent mechanism. *Nat Cell Biol,* 2002, 4: 621-625.

Larder, B. A., Blor, S., Kemp, S. D. Afamily of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transeriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antirnicrob Agents Chemotherap*, 1999, 43: 1961-1971.

136

Lee, W. H., Bister, K., Pawson, A., Robins, T., Moscovici, C., Duesberg, P. H. Fujinami sarcoma virus: an avian RNA tumor virus with a unique transforming gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 2018-2022.

Lerner, T. L., Hanafusa, H. DNA sequence of the Bryan high-titer strain of Rous sarcoma virus: extent of *env* deletion and possible genealogical relationship with other viral strains. *J Virol*, 1984, 49: 549-556.

Li, D., Qin, L., Gao, H., Yang, B., Liu, W., Qi, X., Wang, Y., Zeng, X., Liu, S., Wang, X., Gao,

Y. Avian leukosis virus subgroup A and B infection in wild birds of Northeast China. *Vet Microbiol*, 2013, 163: 257-263.

Li, H., Shang, H., Shu, D., Zhang, H., Ji, J., Sun, B., Li, H., Xie, Q. gga-miR-375 plays a key role in tumorigenesis post subgroup J avian leukosis virus infection. *PLoS One*, 2014, 9, e90878.

Li, X., Dong, X., Sun, X., Li, W., Zhao, P., Cui, Z., Wang, X. Preparation and immunoprotection of subgroup B avian leukosis virus inactivated vaccine. *Vaccine*, 2013, 31: 5479-5485.

Li, Y., Liu, X., Liu, H., Xu, C., Liao, Y., Wu, X., Cao, W., Liao, M. Isolation, identification, and phylogenetic analysis of two avian leukosis virus subgroup J strains associated with hemangioma and myeloid leukosis. *Vet Microbiol*, 2013, 166: 356-364.

Li, Y., Liu, X., Yang, Z., Xu, C., Liu, D., Qin, J., Dai, M., Hao, J., Feng, M., Huang, X., Tan, L., Cao, W., Liao, M. The MYC, TERT, and ZIC1 genes are common targets of viral integration and transcriptional deregulation in avian leukosis virus subgroup J-induced myeloid leukosis. *J Virol*, 2014, 88: 3182-3191.

Liew, C. F., Wise, S. D., Yeo, K. P., Lee, K. O. Insulin-like growth factor binding protein-1 is independently affected by ethnicity, insulin sensitivity, and leptin in healthy, glucose-tolerant young men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90: 1483-1488.

Liu, D., Dai, M., Zhang, X., Cao, W., Liao, M. Subgroup J avian leukosis virus infection of chicken dendritic cells induces apoptosis via the aberrant expression of microRNAs. *Sci Rep*, 2016, 6, 20188.

137

Liu, X., Marengere, L. E., Koch, C. A., Pawson, T. The v-*src* SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 5225-5232.

Lucas, G. M., Flexner, C. W. Directly administered antiretroviral therapy in the treatment of HIV infection: benefit or burden*AIDSPatientCareSTDS*, 2002, 16: 527-35.

Maeda, N., Fan, H., Yoshikai, Y. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. *Rev Med Virol*, 2008, 18: 387-405.

Malliri, A., van der Kammen, R. A., Clark, K., van der Valk, M., Michiels, F., Collard, J. G. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature*, 2002, 417: 867-871.

Marhaba, R., and Zoller, M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol*, 2004, 35: 211-231.

Martin, G. S. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 2011, 2: 467-475. Martin, G. S. The road to Src. *Oncogene*, 2004, 23: 7910-7917.

Masker, K., Golden, A., Gaffney, C. J., Mazack, V., Schwindinger, W. F., Zhang, W., Wang, L. H., Carey, D. J., udol, M. Transcriptional profile of Rous Sarcoma Virus transformed chicken embryo fibroblasts reveals new signaling targets of viral-src. *Virology*, 2007, 364: 10-20.

McGlade, J., Cheng, A., Pelicci, G., Pelicci, P. G., Pawson, T. Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 8869-8873.

Mei, M., Ye, J., Qin, A., Wang, L., Hu, X., Qian, K., Shao, H. Identification of novel viral receptors with cell line expressing viral receptor-binding protein. *Sci Rep*, 2015, 5: 7935.

Menendez-Arias, L. Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases. *Prugr Nudeic Acid Res Mol Biol*, 2002, 71: 91-147.

Morgan, H. R. Avian leukosis-sarcoma virus antibodies in wildfowl, domestic chickens and man in Kenya. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1973, 144: 1-4.

Moscovici, C., Samarut, J., Gazzolo, L., Moscovici, M. G. Myeloid and erythroid neoplastic responses to avian defective leukemia viruses in chickens and in quail. *Virology*, 1981,

138

113: 765-768.

Motta, J. V., Crittenden, L. B., Pollard, W. O. The inheritance of resistance to subgroup C leukosis-sarcoma viruses in New Hampshire chickens. *Poult Sci*, 1973, 52(2): 578-586.

Nagano, O., Saya, H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci*, 2004, 95: 930-935.

Neel, B. G., Hayward, W. S., Robinson, H. L., Fang, J., Astrin, S. M. Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell*, 1981, 23: 323-334.

Neel, B. G., Wang, L. H., Mathey-Prevot, B., Hanafusa, T., Hanafusa, H., and Hayward, W. S. Isolation of 16L virus: a rapidly transforming sarcoma virus from an avian leukosis virus-induced sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 5088-5092.

Nehyba, J., Svoboda, J., Karakoz, I., Rynditch, A. V., Geryk, J. Genome structure of a new avian sarcoma virus PR2257 determined by restriction analysis. *Folia Biol (Praha)*, 1988, 34: 289-300.

Pan, W., Gao, Y., Qin, L., Ni, W., Liu, Z., Yun, B., Wang, Y., Qi, X., Gao, H., Wang, X.

Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein GP85 of ALV-J isolates from Mainland China between 1999 and 2010: coexistence of two extremely different subgroups in layers. *Vet Microbiol*, 2012, 156: 205-212.

Pan, W., Gao, Y., Sun, F., Qin, L., Liu, Z., Yun, B., Wang, Y., Qi, X., Gao, H., and Wang, X. Novel sequences of subgroup J avian leukosis viruses associated with hemangioma in Chinese layer hens. *Virol J*, 2011, 8: 552.

Pavan, A., Spina, M., Canzonieri, V., Sansonno, S., Toffoli, G., De Re, V. Recent prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma indicate NF-kappaB pathway as a target for new therapeutic strategies. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49: 2048-2058.

Payne, L. N., Nair, V. The long view: 40 years of avian leukosis research. *Avian Pathol*, 2012, 41: 11-19.

Payne, L. N., Brown, S. R., Bumstead, N., Howes, K., Frazier, J. A., Thouless, M. E. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *J Gen Virol*, 1991, 72 (4):

139

801-807.

Payne, L. N., Gillespie, A. M., Howes, K. Recovery of acutely transforming viruses from myeloid leukosis induced by the HPRS-103 strain of avian leukosis virus. *Avian Dis*, 1993, 37: 438-450.

Peng, H., Qin, L., Bi, Y., Wang, P., Zou, G., Li, J., Yang, Y., Zhong, X., Wei, P.. Rapid detection of the common avian leukosis virus subgroups by real-time loop-mediated isothermal amplification. *Virol J*, 2015, 12: 195.

Pfaff, S. L., Zhou, R. P., Young, J. C., Hayflick, J., Duesberg, P. H. Defining the borders of the chicken proto *fps* gene, a precursor of Fujinami sarcoma virus. *Virology*, 1985, 146: 307-314.

Qian, K., Gao, A. J., Zhu, M. Y., Shao, H. X., Jin, W. J., Ye, J. Q., Qin, A. J. Genistein inhibits the replication of avian leucosis virus subgroup J in DF-1 cells. *Virus Res*, 2014, 192: 114-120.

Qian, K., Liang, Y. Z., Yin, L. P., Shao, H. X., Ye, J. Q., Qin, A. J. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for rapid detection of capsid protein antigen p27 of avian leukosis virus. *J Virol Methods*, 2015, 221: 115-118.

Qin, A., Lee, L. F., Fadly, A., Hunt, H., Cui, Z. Development and characterization of monoclonal antibodies to subgroup J avian leukosis virus. *Avian Dis*, 2001, 45: 938-945.

Rous, P. A Transmissible Avian Neoplasm. (Sarcoma of the Common Fowl.). *J Exp Med*, 1910, 12: 696-705.

Rubin, H. The early history of tumor virology: Rous, RIF, and RAV. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 14389-14396.

Samuel, D., Duclos-Vallee, J. C. The difficulty in timing for liver transplantation in cirrhotic patients coinfected with HIV: in search for a prognosis score. *Liver Transpl*, 2006, 12: 699-701.

Sandelin, K., Estola, T., Ristimaki, S., Ruoslahti, E., Vaheri, A. Radioimmunoassay of the group-specific antigen in detection of avian leukosis virus infection. J Gen Virol, 1974, 25: 415-420.

140

Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 2000, 103: 211-225. Schwartz, D. E., Tizard, R., Gilbert, W. Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. *Cell*,

1983, 32: 853-869.

Sefton, B. M., Hunter, T. From c-*src* to v-*src*, or the case of the missing C terminus. *Cancer Surv*, 1986, 5: 159-172.

Shen, Y., Cai, L., Wang, Y., Wei, R., He, M., Wang, S., Wang, G., Cheng, Z. Genetic mutations of avian leukosis virus subgroup J strains extended their host range. *J Gen Virol*, 2014, 95: 691-699.

Shi, M., Tian, M., Liu, C., Zhao, Y., Lin, Y., Zou, N., Liu, P., Huang, Y. Sequence analysis for the complete proviral genome of subgroup J Avian Leukosis virus associated with hemangioma: a special 11 bp deletion was observed in U3 region of 3'UTR. *Virol J*, 2011, 8: 158.

Shibuya, M., Hanafusa, H. Nucleotide sequence of Fujinami sarcoma virus: evolutionary relationship of its transforming gene with transforming genes of other sarcoma viruses. *Cell*, 1982, 30: 787-795.

Shibuya, M., Wang, L. H., Hanafusa, H. Molecular cloning of the Fujinami sarcoma virus genome and its comparison with sequences of other related transforming viruses. *J Virol*, 1982, 42: 1007-1016.

Shimoda, M., Sugiura, T., Imajyo, I., Ishii, K., Chigita, S., Seki, K., Kobayashi, Y., Shirasuna,

K. The T-box transcription factor Brachyury regulates epithelial-mesenchymal transition in association with cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma cells. *BMC Cancer*, 2012, 12: 377.

Silva, R. F., Fadly, A. M., Taylor, S. P. Development of a polymerase chain reaction to differentiate avian leukosis virus (ALV) subgroups: detection of an ALV contaminant in commercial Marek's disease vaccines. *Avian Dis*, 2007, 51: 663-667.

Smith, E. J., Williams, S. M., Fadly, A. M. Detection of avian leukosis virus subgroup J using the polymerase chain reaction. *Avian Dis*, 1998, 42: 375-380.

Snitkovsky, S., Niederman, T. M., Carter, B. S., Mulligan, R. C., Young, J. A. A

141

TVA-single-chain antibody fusion protein mediates specific targeting of a subgroup A avian leukosis virus vector to cells expressing a tumor-specific form of epidermal growth factor receptor. *J Virol*, 2000, 74: 9540-9545.

Snyder, M. A., Bishop, J. M. A mutation at the major phosphotyrosine in pp60v-src alters

Oncogenic potential. *Virology*, 1984, 136: 375-386.

Sourvinos, G., Tsatsanis, C., Spandidos, D. A. Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis.

*Folia Biol (Praha)*, 2000, 46: 226-232.

Steck, F. T., Rubin, H. The mechanism of interference between an avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. II. Early steps of infection by RSV of cells under conditions of interference. *Virology*, 1966, 29: 642-653.

Sudol, M. From Rous sarcoma virus to plasminogen activator, *src* oncogene and cancer management. *Oncogene*, 2011, 30: 3003-3010.

Sugden, B. How some retroviruses got their oncogenes. *Trends Biochem Sci*, 1993, 18: 233-235.

Sun, F., Ferro, P. J., Lupiani, B., Kahl, J., Morrow, M. E., Flanagan, J. P., Estevez, C., Clavijo, A. A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of long terminal repeat regions and envelope protein gene sequences of Reticuloendotheliosis virus in avian blood samples. *J Vet Diagn Invest*, 2011, 23: 937-941.

Supriatno, Harada, K., Kawaguchi, S., Yoshida, H., Sato, M. Effect of p27Kip1 on the ability of invasion and metastasis of an oral cancer cell line. *Oncol Rep*, 2003, 10: 527-532.

Swanstrom, R., Parker, R. C., Varmus, H. E., Bishop, J. M. Transduction of a cellular oncogene: the genesis of Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 2519-2523.

Tam, W., Ben-Yehuda, D., Hayward, W. S. bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Mol Cell Biol*, 1997, 17: 1490-1502.

Tam, W., Hughes, S. H., Hayward, W. S., Besmer, P. Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leukosis virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythroleukemogenesis. *J Virol*, 2002, 76:

142

4275-4286.

Tonelli, M., Peters, R. J., James, T. L., Agard, D. A. The solution structure of the viral binding domain of Tva, the cellular receptor for subgroup A avian leukosis and sarcoma virus. *FEBS Lett*, 2001, 509: 161-168.

Troesch, C. D., Vogt, P. K. An endogenous virus from Lophortyx quail is the prototype for envelope subgroup 1 of avian retroviruses. *Virology*, 1985, 143: 595-602.

Vardhanabhuti, S., Blakemore, S. J., Clark, S. M., Ghosh, S., Stephens, R. J., Rajagopalan, D. A comparison of statistical tests for detecting differential expression using Affymetrix oligonucleotide microarrays. OMICS, 2006, 10: 555-566.

Venugopal, K. Avian leukosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses. *Res Vet Sci*, 1999, 67: 113-119.

Venugopal, K., Howes, K., Barron, G. S., Payne, L. N. Recombinant env-gp85 of HPRS-103 (subgroup J) avian leukosis virus: antigenic characteristics and usefulness as a diagnostic reagent. *Avian Dis*, 1997, 41: 283-288.

Venugopal, K., Howes, K., Flannery, D. M., Payne, L. N. Isolation of acutely transforming subgroup J avian leukosis viruses that induce erythroblastosis and myelocytomatosis. *Avian Pathol*, 2000, 29: 497-503.

Venugopal, K., Smith, L. M., Howes, K., Payne, L. N. Antigenic variants of J subgroup avian leukosis virus: sequence analysis reveals multiple changes in the env gene. *J Gen Virol*, 1998, 79 (4): 757-766.

Vogt, P. K. Retroviral oncogenes: a historical primer. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 639-648.

Vogt, P. K., Neil, J. C., Moscovici, C., Breitman, M. L. PRCII, a representative of a new class of avian sarcoma viruses. *Haematol Blood Transfus*, 1981, 26: 424-428.

Wang, L. H., Hanafusa, H. Avian sarcoma viruses. *Virus Res*, 1988, 9: 159-203.

Wang, L. H., Beckson, M., Anderson, S. M., Hanafusa, H. Identification of the viral sequence required for the generation of recovered avian sarcoma viruses and characterization of a series of replication-defective recovered avian sarcoma viruses. *J Virol*, 1984, 49: 881-891.

143

Wang, L. H., Feldman, R., Shibuya, M., Hanafusa, H., Notter, M. F., Balduzzi, P. C. Genetic structure, transforming sequence, and gene product of avian sarcoma virus UR1. *J Virol*, 1981, 40: 258-267.

Wang, Q., Gao, Y., Ji, X., Qi, X., Qin, L., Gao, H., Wang, Y., Wang, X. Differential expression of microRNAs in avian leukosis virus subgroup J-induced tumors. *Vet Microbiol*, 2013, 162: 232-238.

Wang, Q., Gao, Y., Wang, Y., Qin, L., Qi, X., Qu, Y., Gao, H., Wang, X. A 205-nucleotide deletion in the 3' untranslated region of avian leukosis virus subgroup J, currently emergent in China, contributes to its pathogenicity. *J Virol*, 2012, 86: 12849-12860.

Wang, Q., Ji, X., Gao, Y., Qi, X., Wang, X., Wang, Y., Qin, L., Gao, H., Wang, X.. Overexpression of microRNA gga-miR-1650 decreases the replication of avian leukosis virus subgroup J in infected cells. *J Gen Virol*, 2014, 94: 2287-2296.

Wang, Q. Y., Dolmer, K., Huang, W., Gettins, P. G., Rong, L. Role of calcium in protein folding and function of Tva, the receptor of subgroup A avian sarcoma and leukosis virus. *J Virol*, 2001, 75: 2051-2058.

Wang, Z., Cui, Z. The Mutation Tendency of the gp85 Gene of Chinese Field Strains of ALV-J from 1999 to 2003. *Virologica Sinica*, 2005, 20: 393-398.

Wang, Z., Cui, Z. Evolution of gp85 gene of subgroup J avian leukosis virus under the selective pressure of antibodies. *Sci China C Life Sci*, 2006, 49: 227-234.

Wei, R., Ma, X., Wang, G., Guo, H., Liu, J., Fan, L., Cheng, Z. Synergistic inhibition of avian leukosis virus subgroup J replication by miRNA-embedded siRNA interference of double-target. *Virol J*, 2015, 12: 45.

Weinmaster, G., Zoller, M. J., Pawson, T. A lysine in the ATP-binding site of P130gag-fps is

Essential for protein-tyrosine kinase activity. *EMBO J*, 1986, 5: 69-76.

Weiss, R. A., Vogt, P. K. 100 years of Rous sarcoma virus. J Exp Med, 2011, 208: 2351-2355. Wong, B. R., Besser, D., Kim, N., Arron, J. R., Vologodskaia, M., Hanafusa, H., and Choi, Y.

TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-*Src*. *Mol Cell*, 1999, 4: 1041-1049.

144

Xu, Q., Ma, X., Wang, F., Li, H., Zhao, X. Evaluation of a multi-epitope subunit vaccine against avian leukosis virus subgroup J in chickens. *Virus Res*, 2015, 210: 62-68.

Yao, Y., Smith, L. P., Nair, V., Watson, M. An avian retrovirus uses canonical expression and processing mechanisms to generate viral microRNA. *J Virol*, 2014, 88: 2-9.

Yee, S. P., Mock, D., Greer, P., Maltby, V., Rossant, J., Bernstein, A., Pawson, T. Lymphoid and mesenchymal tumors in transgenic mice expressing the v-*fps* protein-tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, 1989, 9: 5491-5499.

Yee, S. P., Mock, D., Maltby, V., Silver, M., Rossant, J., Bernstein, A., Pawson, T. Cardiac and neurological abnormalities in v-*fps* transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 5873-5877.

Yeni, P. Update on HAART in HIV. *J Hepatol*, 2006, 44: S100-S103.

Young, J. C., Martin, G. S. Cellular localization of c-*fps* gene product NCP98. *J Virol*, 1984, 52: 913-918.

Yu, G., Smithgall, T. E., Glazer, R. I. K562 leukemia cells transfected with the human c-*fes* gene acquire the ability to undergo myeloid differentiation. *J Biol Chem*, 1989, 264: 10276-10281.

Zavala, G., Jackwood, M. W., Hilt, D. A. Polymerase chain reaction for detection of avian leukosis virus subgroup J in feather pulp. *Avian Dis*, 2002, 46: 971-978.

Zander, D. V., Raymond, R. G., McClary, C. F., Goodwin, K. Eradication of subgroups A and B lymphoid leukosis virus from commercial poultry breeding flocks. *Avian Dis*, 1975, 19: 403-423.

Zeng, X., Gao, Y., Li, D., Hao, R., Liu, W., Han, C., Gao, H., Qi, X., Wang, Y., Liu, L., Wang,

X. Molecular characteristics of the complete genome of a J-subgroup avian leukosis virus strain isolated from Eurasian teal in China. *Virus Genes*, 2014, 49: 250-258.

Zeng, X., Liu, L., Hao, R., Han, C. Detection and molecular characterization of J subgroup avian leukosis virus in wild ducks in China. *PLoS One,* 2014, 9, e94980.

Zhang, H., Bacon, L. D., Fadly, A. M. Development of an endogenous virus-free line of chickens susceptible to all subgroups of avian leukosis virus. *Avian Dis*, 2008, 52:

145

412-418.

Zhang, L., Cai, D., Zhao, X., Cheng, Z., Guo, H., Qi, C., Liu, J., Xu, R., Zhao, P., and Cui, Z. Liposomes containing recombinant gp85 protein vaccine against ALV-J in chickens. *Vaccine*, 2014, 32: 2452-2456.

Zhang, X., Liao, M., Jiao, P., Luo, K., Zhang, H., Ren, T., Zhang, G., Xu, C., Xin, C., Cao, W. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of subgroup J avian leukosis virus. *J Clin Microbiol*, 2010, 48: 2116-2121.

Zhang, Z., Cui, Z., Zhao, H. Sequence Analysis of envelope glycoproteins (gp85) of Chinese Isolotes of J Avian Leukois Viruses in the Period of 2000-2001. *Chin J Vet Sci*, 2003, 23: 25-27.

Zhao, P., Dong, X., Cui, Z. Isolation, identification, and *gp85* characterization of a subgroup A avian leukosis virus from a contaminated live Newcastle Disease virus vaccine, first report in China. *Poult Sci*, 2014, 93: 2168-2174.

Zhou, G., Cai, W., Liu, X., Niu, C., Gao, C., Si, C., Zhang, W., Qu, L., Han, L. A duplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction for the detection and quantitation of avian leukosis virus subgroups A and B. *J Virol Methods*, 2011, 173: 275-279.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to

C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 1997, 90: 405-413.

Zingler, K., Belanger, C., Peters, R., Agard, E., Young, J. A. Identification and characterization of the viral interaction determinant of the subgroup A avian leukosis virus receptor. *J Virol*, 1995, 69: 4261-4266.

146

# **7** 致 谢

值此论文完成之际，向我的导师崔治中教授致以最崇高的敬意和最深的谢意！

导师虽年逾古稀，但始终奔波忙碌在动物疫病防控的第一线，为我国畜牧业的健康发展建言献策、贡献力量。他严谨的治学态度、精诚敬业的工作作风、对科学前沿敏锐的洞察力、博大精深的学识，一直深深激励着我前行！导师为我的成长倾注了大量心血，在学习和科研上给予耐心细致的指导，使处在困惑中的我茅塞顿开、豁然开朗。师恩厚重，铭记在心，无以回报！

感谢本实验室赵鹏副教授、苏帅老师和常爽老师对我的关心和帮助！

感谢动科学院各位老师对我的关怀和指导！在此期间，我获益于赵孝民教授、柴同杰教授、崔岩顺教授、成子强教授、刁有祥教授、朱瑞良教授、常维ft教授、姜世金教授、孙淑红教授、郭慧君副教授的意见和建议，在此表示衷心的感谢！

感谢李建亮老师和我的师兄陈浩博士、武专昌博士，是他们带领我走进科学实验的大门，从最基础、最简单的操作教起，让我有机会徜徉于动物病毒学知识的海洋！

感谢实验室师兄姐孙亚妮博士、邱玉玉博士、李卫华博士、徐英萍博士、张振杰博士、马诚太博士、董宣博士在试验中给予的鼓励与帮助！感谢实验室博士研究生李阳、孟凡峰，硕士研究生陈孜孟、张芙寿、陈文清、琚思迪、孙鹏、崔贺、李思菲、苏红芹、栾怀彪、房立春、许书珍、陈俊霞、张言坤、韩妮、崔帅、赵颖洁、任志浩、李晓晗、刘英楠、吕艳艳、付佳媛等师弟妹的大力协助！

感谢学院预防兽医平台实验室的王淑静老师和本实验室的科研辅助人员孙文丽、鲁金、吕汉英等为我的试验付出的辛勤劳动！

感谢女友孙晓龙博士，她在我失败时给我信心，在我骄傲时给我警告！

我要特别感谢我的家人在我多年的求学过程中给予物质和精神方面的帮助和支持，他们用无私的爱包容我的喜怒哀乐、用无言的辛劳承载我的酸甜苦辣，伴我一路前行！

衷心感谢帮助过我的每一个人！

王一新

2016-4-15

147

# **8** 攻读学位期间发表论文情况

1. **Wang** Y#, Li J#, Li Y, Fang L, Sun X, Chang S, Zhao P\*, Cui Z\*. Identification of Avian leukosis virus subgroup J associated acutely transforming viruses carrying the v-*src* oncogene in layer chickens. *Journal of General Virology*. 2016, 97(5): 1240-1248.

2. **Wang Y**#, Xu S#, Li S, Su H, Chang S, Li Y, Sun X, Zhao P\*, Cui Z\*. Lamivudine inhibits the replication of ALV-J associated acutely transforming virus and its helper virus and tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 15(6): 1306.

3. **Wang Y**#, Li J#, Li Y, Fang L, Sun X, Chang S, Zhao P\*, Cui Z\*. Identification of ALV-J associated acutely transforming virus Fu-J carrying complete v-*fps* oncogene. *Virus Genes*. 2016, 52(3): 365-71.

4. Luan H#, **Wang Y#,** Li Y, Cui Z, Chang S\*, Zhao P\*. Development of a real-time quantitative RT-PCR to detect REV contamination in live vaccine. *Poultry Science*. 2016, 26.

5. Li Y#, **Wang Y#**, Fang L, Fu J, Cui S, Zhao Y, Cui Z, Chang S\*, Zhao P\*. Genomic analysis of the chicken infectious anemia virus in a Specific-Pathogen-Free chicken population, first report in China. *BioMed Research International*. 2016, in press.

6. **王一新**，陈浩，赵鹏，李建亮， 崔治中\*. 用单因子血清识别急性致瘤性ALV 诱发肿瘤组织中的fps肿瘤抗原. 微生物学报, 2013, 03: 299-305.

7. **王一新#**，栾怀彪#，许书珍，李阳， 常爽， 崔治中， 赵鹏\*. 禽网状内皮组织增生症病毒LN1201株的全基因组序列测定及其U3区的独特性. 中国预防兽医学报，已录用.

8. 许书珍#，**王一新#**，李阳，栾怀彪， 常爽， 崔治中， 赵鹏\*. 龙胜凤鸡中一株A亚群禽白血病病毒的基因组分析及其对SPF鸡的致病性. 中国预防兽医学报，已录用.

9. **Wang Y#**, Fang L#, Li J, Li Y, Cui S, Sun X, Chang S, Zhao P\*, Cui Z\*. Rescue of ALV-J associated acutely transforming viruses carrying different lengths of the v-*fps* oncogene and analysis of their tumorigenicity. *Archives of Virology*. Minor Revision.

148