

梅 梅, 钱 科, 唐应华, 等. J 亚群禽白血病病毒 *SUJ* 及兔 *IgGFc* 基因在腺病毒表达系统中的融合表达 [J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 848-853.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.021

J 亚群禽白血病病毒 *SUJ* 及兔 *IgGFc* 基因在腺病毒表达系统中的融合表达

梅 梅^{1,2,3}, 钱 科⁴, 唐应华^{1,3}, 秦爱建^{2,3}, 侯继波^{1,3}

(1. 江苏省农业科学院, 江苏 南京 210014; 2. 扬州大学江苏省动物预防医学重点实验室, 江苏 扬州 225009; 3. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009; 4. 江苏省出入境检验检疫局, 江苏 南京 210001)

摘要: 为获得 J 亚群禽白血病病毒 (ALV-J) 囊膜蛋白 gp85 和兔 IgGFc 的融合蛋白, 通过腺病毒表达系统融合表达 ALV-J *SUJ* 和兔 *IgGFc* (*rIgGFc*) 基因。将 pcDNA3.1-*SUJ-rIgGFc* 用 *Xho* I、*Kpn* I 进行双酶切, 获得 *SUJ-rIgGFc* 基因, 将其克隆至 pShuttle-CMV 质粒, 构建穿梭载体 pShuttle-CMV-*SUJ-rIgGFc*, 重组质粒转化含 pAdeasy-1 的 BJ5183-AD-1 感受态细胞, 获得重组腺病毒质粒 pAd-*SUJ-rIgGFc*, 最后转染人 293T 细胞。表达的融合蛋白可被 ALV-J 单克隆抗体 JE9 以及羊抗兔 IgG 识别, 重组蛋白的分子量大小约 9.5×10^4 , 且与 JE9 及羊抗兔 IgG 都有很好的反应性; 免疫共沉淀试验结果显示融合蛋白可与 DF1 细胞膜蛋白混合物反应并获得差异蛋白。该融合蛋白可与 ALV-J 宿主细胞蛋白发生特异性反应。

关键词: J 亚群禽白血病病毒; gp85 基因; 兔 IgGFc; 腺病毒; 融合表达

中图分类号: S858.35.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)04-0848-06

Fusion expression of subgroup J avian leukosis virus *gp85* gene with rabbit *IgGFc* gene in adenovirus expression system and its application

MEI Mei^{1,2,3}, QIAN Ke⁴, TANG Ying-hua^{1,3}, QIN Ai-jian^{2,3}, HOU Ji-bo^{1,3}

(1. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Key Lab of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 3. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China; 4. Jiangsu Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

Abstract: To obtain the fusion protein of subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) envelope protein gp85 and rabbit IgGFc, ALV-J *gp85* gene fused with rabbit *IgGFc* was expressed by adenovirus expression system. The ALV-J *gp85* (*SUJ*) and rabbit *IgGFc* (*rIgGFc*) gene were digested from plasmid pcDNA3.1-*SUJ-rIgGFc* with *Xho* I and *Kpn* I and cloned into pShuttle-CMV to construct the recombinant plasmid pShuttle-CMV-*SUJ-rIgGFc* which was transformed into BJ5183-AD-1

收稿日期: 2015-12-14

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31201881); 教育部创新团队项目 (IRT0978); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目 (CXL2_0938X1)

作者简介: 梅 梅 (1982-), 女, 江苏东台人, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事动物免疫学研究。(E-mail) jacqui18@163.com

通讯作者: 秦爱建, (E-mail) aijian@yzu.edu.cn; 唐应华, (E-mail) tynghua@126.com

competent cells containing pAdeasy-1 to construct the recombinant adenovirus plasmid pAd-*SUJ-rIgGFc*. The recombinant adenovirus was obtained by transfecting the recombinant plasmid pAd-*SUJ-rIgGFc* into 293T cells. The fusion protein can be recognized by mAb JE9 specific to gp85 of ALV-J and antibodies against rabbit IgG with the molecular weight about 9.5×10^4 . The result of Co-IP showed that the fusion protein *SUJ-rIgGFc* reacted with the membrane proteins from DF1 cells and produced differential proteins, indicative of the specific re-

action between fused protein and the protein from host cells of ALV-J.

Key words: subgroup J avian leukosis virus; *gp85* gene; rabbit *rlgGfc*; adenovirus; fusion expression

禽白血病病毒(Avian leukosis virus, ALV)是能引起禽多种类型肿瘤的反转录病毒,包括A~J等10个亚群。上世纪80年代末,Payne等^[1]首次从肉鸡中分离鉴定出J亚群禽白血病病毒(Subgroup J avian leukosis virus, ALV-J)。1999年杜岩等^[2]首次在国内从白羽肉鸡中分离到ALV-J。ALV-J在世界范围内的流行给养禽业造成了巨大的经济损失^[3]。目前,ALV-J不仅可以引起肉鸡产生肿瘤,而且可引发蛋用型鸡群^[4-5]和地方品系鸡群^[6]产生肿瘤。近年来,ALV-J引起的混合感染日趋严重,最新研究报道,ALV-J已从最初导致鸡群的髓细胞瘤,演变成可同时导致鸡群的髓细胞瘤、血管瘤^[7]和平滑肌瘤^[8],这可能是由于抗原变异致使ALV-J感染特性和宿主范围发生了改变。

ALV-J的囊膜蛋白Env是病毒感染细胞的关键因素。Env蛋白是由SU蛋白和TM蛋白组成,其中SU蛋白由SU基因表达,含有病毒-受体决定簇^[9],是决定宿主范围和亚群特异性的关键因素^[10]。2006年Chai等^[11]利用ALV-J HPRS103株的SU和兔IgGfc融合蛋白分离到DF1细胞表面ALV-J受体NHE-1。但是,由于J亚群禽白血病病毒的SU基因呈现高度变异,且变异程度较其他亚群高^[12],因此SU基因的突变很可能会影响到病毒受体种类、组织亲嗜性和宿主范围,ALV-J很可能存在除NHE-1以外的新受体。

免疫共沉淀试验(Co-IP)是研究病毒受体的经典免疫学方法,通过固定在琼脂糖珠上葡萄球菌A蛋白能结合IgGfc端这一特性,实现诱饵蛋白对靶蛋白的捕获。因此,本研究以吴晓平^[13]构建的质粒pcDNA3.1-*SUJ-rlgGfc*为原型,将*SUJ-rlgGfc*基因克隆至腺病毒表达载体,通过哺乳动物细胞表达融合蛋白SUJ-rlgGfc,以此为诱饵蛋白为进一步分离鉴定ALV-J新受体提供工具。

1 材料与方法

1.1 质粒、引物、菌体、病毒、细胞

质粒pcDNA3.1-*SUJ-rlgGfc*、pAdEasy-1、pShuttle-CMV由本实验室(江苏省动物预防医学重点实验室)保存;*SUJ-rlgGfc*基因上、下游引物(P1:5'-GGGGTA-

CCATGAGGCGAGCCCTCTCTTTG-3';P2:5'-GGAAT-TC TCATTTACCCGAGAGCG-3')由吴晓平^[13]设计合成,并由本实验室保存;大肠杆菌DH5 α 由本实验室保存,大肠杆菌BJ5183-AD-1和XL-10超级感受态细胞购自Stratagene公司;ALV-J(JS09GY07)由本实验室保存;293T细胞购自Stratagene公司。

1.2 主要试剂

ALV-J特异性单抗JE9由本实验室保存,HRP标记的山羊抗鼠IgG、HRP标记的山羊抗兔DAB显色液购自AMRESCO公司,FITC标记的山羊抗鼠IgG、FITC标记的山羊抗兔IgG等抗体购自Sigma公司,Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司,T4 DNA连接酶购自美国Promega公司,蛋白质标准分子量Marker、DNA Marker、LA DNA Polymerase和限制性核酸内切酶*Xho*I、*Kpn*I均购自Fermentas(MBI)公司,*Pme*I和*Pac*I限制性内切酶购自NEB公司,反转录酶(M-MLV)、dNTP等购自TaKaRa公司,Protease inhibitor cocktail购自罗氏公司。

1.3 重组穿梭质粒的构建与鉴定

将pcDNA3.1-*SUJ-rlgGfc*和pShuttle-CMV分别用*Kpn*I、*Xho*I进行双酶切,经琼脂糖凝胶电泳回收后,两者以3:1的摩尔比,16℃连接过夜。反应体系(10 μ l)如下:10 \times Ligation Buffer 1 μ l,目的片段DNA(*SUJ-rlgGfc*)7 μ l,pShuttle-CMV 1 μ l,T4 DNA Ligase 1 μ l。连接产物转化DH5 α 感受态细胞,碱裂解法小量提取质粒DNA。对提取的质粒DNA用*Kpn*I、*Xho*I进行双酶切鉴定,酶切体系如下:*Kpn*I、*Xho*I各2 μ l,10 \times Buffer Tango 2 μ l,质粒8 μ l,补去离子水至20 μ l。37℃反应5 h。反应结束后取酶切产物进行电泳分析。

1.4 pShuttle-CMV-*SUJ-rlgGfc*的线性化

将重组穿梭质粒pShuttle-CMV-*SUJ-rlgGfc*用*Pme*I单酶切线性化,体系如下:pShuttle-CMV-*SUJ-rlgGfc* 15 μ l,10 \times Buffer B 4 μ l,*Pme*I 2 μ l,补去离子水至总体积40 μ l。37℃酶切6 h,反应结束后取酶切产物进行电泳分析并切胶回收。

1.5 重组腺病毒质粒的构建及鉴定

将线性化的pShuttle-CMV-*SUJ-rlgGfc* 5 μ l(约1 μ g)电转化BJ5183-AD-1感受态细胞,电转化参

数:200 Ω , 2.5 kV, 25 μ F。挑菌提取质粒,用 *PacI* 进行酶切鉴定。酶切体系如下:质粒 2 μ l, *PacI* 1 μ l, 10 \times Buffer 2 μ l, 补超纯水至 20 μ l; 37 $^{\circ}$ C 酶切 5 h, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

1.6 重组腺病毒质粒 pAD-SUJ-rIgGFc 的大量培养和纯化

将 pAD-SUJ-rIgGFc 转化 XL-10 感受态细胞, 方法参考 AdEasyTM 腺病毒载体系统说明书。挑取 XL-10 阳性克隆菌, 经 *PacI* 酶切鉴定正确后, 将阳性菌落扩大培养, 用 QIAGEN 试剂盒大量提取质粒并纯化。最后用 50 μ l 去内毒素的超纯水溶解质粒。

1.7 重组腺病毒的制备

取 5 μ g 线性化的重组腺病毒质粒 pAD-SUJ-rIgGFc 转染 293T 细胞, 方法按照 LipofectamineTM 2000 试剂盒说明书进行, 同时设空载体作对照。待细胞出现病变后收集细胞上清和细胞作为种毒, 保存于 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.8 RT-PCR 检测 293T 细胞中 SUJ-rIgGFc 的表达

用重组腺病毒和亲本腺病毒分别感染 293T 细胞, 待细胞出现病变后收集细胞, 用 Axygen 总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 反转录后进行 PCR。反转录体系 (25 μ l): 总 RNA 16 μ l, 5 \times RT Buffer 5 μ l, 下游引物 P2 1 μ l, dNTP 1 μ l, M-MLV 1 μ l (10 U/ μ l), RNasin 1 μ l, 轻弹混匀, 于 42 $^{\circ}$ C 反应 90 min。PCR 反应体系 (20 μ l): PCR mixture (2 \times , Fermentas) 10 μ l, 上下游引物 P1/P2 各 1 μ l, 模板 cDNA 2 μ l, 补去离子水 6 μ l; 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 2 μ l PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.9 免疫荧光试验检测 SUJ-rIgGFc 融合蛋白在 293T 细胞中的表达

将分别感染重组腺病毒和亲本腺病毒的 293T 细胞用丙酮-乙醇 (3:2) 固定 5 min, 吹干后分别用间接免疫荧光和直接免疫荧光检测融合蛋白 SUJ-rIgGFc 在 293 细胞中的表达情况。IFA 分别以 JE9 (1:200) 为一抗, FITC 标记的羊抗鼠 IgG (1:200) 为二抗进行荧光检测; DFA 以 FITC 标记的羊抗兔 IgG 为抗体进行荧光检测。

1.10 Western blot 检测 SUJ-rIgG Fc 融合蛋白在 293T 细胞中的表达

将重组腺病毒感染 293T 细胞, 96 h 后收获细

胞并裂解, 离心取上清进行 SDS-PAGE。转印后用脱脂乳过夜封闭, 分别与 JE9 单抗 (1:400)、HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:5 000) 和 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:5 000) 反应。同时设亲本腺病毒感染的 293T 细胞为阴性对照。

1.11 融合蛋白在免疫共沉淀试验中的应用

MDCK 细胞适合无血清培养, 因此免疫共沉淀试验所需重组蛋白使用 MDCK 细胞无血清培养获得。将重组腺病毒感染 MDCK 细胞 (*MOI*=0.1), 72 h 后收集细胞, 预冷 PBS 洗涤 2 次, 经 NP-40 裂解液 (含 Protease inhibitor cocktail) 4 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清与 Protein A Beads 进行免疫沉淀, 形成 SUJ-rIgGFc-Protein A Beads。

收获 DF1 细胞, 预冷 PBS 洗涤 3 次, 经 NP-40 细胞裂解液 4 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 600 g 离心 5 min 去除细胞核及细胞碎片, 收获上清以 6 000 g 离心 10 min 去除细胞器后, 于 4 $^{\circ}$ C 条件下 13 500 g 离心 1 h, 沉淀用预冷的含蛋白酶抑制剂的 NP-40 裂解液重悬。向 DF1 细胞膜蛋白中加入 Protein A-rIgG 以去除非特异性结合, 再与 SUJ-rIgGFc-Protein A Beads 结合物充分孵育, 经洗涤后所获得的免疫沉淀蛋白经 SDS-PAGE 和胶体银染进行分析。试验同时设 rIgG-Protein A Beads 和 Protein A Beads 为阴性对照。

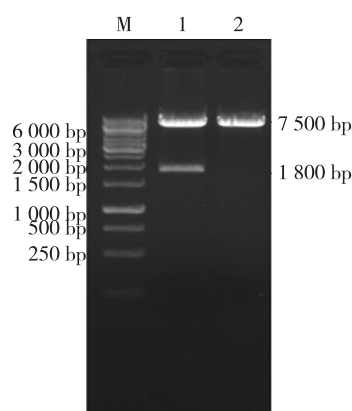
2 结果

2.1 重组穿梭质粒 pShuttle-CMV-SUJ-rIgGFc 的鉴定

将 pcDNA3.1-SUJ-rIgGFc 和 pShuttle-CMV 分别用 *KpnI*、*XhoI* 进行双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳回收后, 两者以 3:1 的摩尔比, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 挑菌提取质粒后经 *KpnI*、*XhoI* 双酶切鉴定, 得到 2 条特异型条带, 大小分别为 7 500 bp 和 1 800 bp, 而空载体双酶切后仅得到 1 条大小为 7 500 bp 的条带 (图 1), 说明目的基因已成功插入到 pShuttle-CMV 中。将构建正确的重组穿梭质粒命名为 pShuttle-CMV-SUJ-rIgGFc。

2.2 重组腺病毒质粒 pAd-SUJ-rIgGFc 的鉴定

将线性化的 pShuttle-CMV-SUJ-rIgGFc 电转化 BJ5183-AD-1 感受态细胞。挑菌提取质粒后 *PacI* 酶切鉴定, 得到 2 条特异条带, 大小分别为 30 kb 和 4.5 kb (图 2), 说明目的基因已整合到腺病毒基因

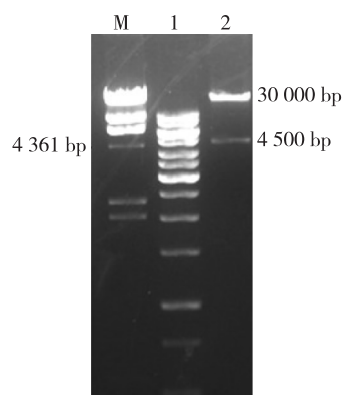


M: 1 kb DNA marker; 1: pShuttle-CMV-*SUJ-rIgGfc* 酶切产物; 2: pShuttle-CMV 酶切产物。

图 1 重组穿梭质粒 pShuttle-CMV-*SUJ-rIgGfc* 的酶切鉴定

Fig. 1 The digestive identification of recombinant shuttle plasmid pShuttle-CMV-*SUJ-rIgGfc*

组中, 获得重组腺病毒质粒, 并将其命名为 pAD-*SUJ-rIgGfc*。



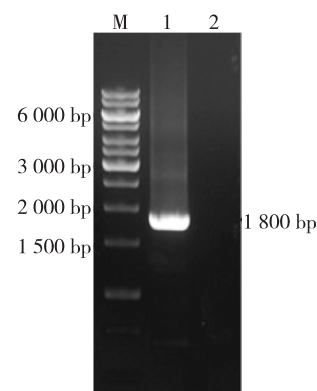
M: λ DNA-Hind III marker; 1: 1 kb DNA marker; 2: 重组腺病毒质粒 *Pac* I 酶切产物。

图 2 重组腺病毒质粒 pAd-*SUJ-rIgGfc* 的酶切鉴定

Fig. 2 The digestive identification of recombinant adenovirus plasmid pAd-*SUJ-rIgGfc*

2.3 RT-PCR 鉴定重组腺病毒

收获重组腺病毒感染的 293T 细胞, 提取细胞总 RNA, 以目的基因 *SUJ-rIgGfc* 上、下游引物 (P1、P2) 进行 RT-PCR 扩增, 同时设亲本腺病毒感染的 293T 细胞为阴性对照。RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳得到 1800 bp 大小的条带, 与目的基因大小一致, 而对照组没有条带 (图 3)。说明目的基因已成功整合到病毒基因组。



M: 1 kb DNA marker; 1: 重组腺病毒感染 293T 细胞的 RT-PCR 扩增产物; 2: 正常 293T 细胞 RT-PCR 扩增产物。

图 3 重组腺病毒的 RT-PCR 鉴定

Fig. 3 RT-PCR identification of recombinant adenovirus

2.4 免疫荧光试验检测重组腺病毒在 293T 细胞中的表达

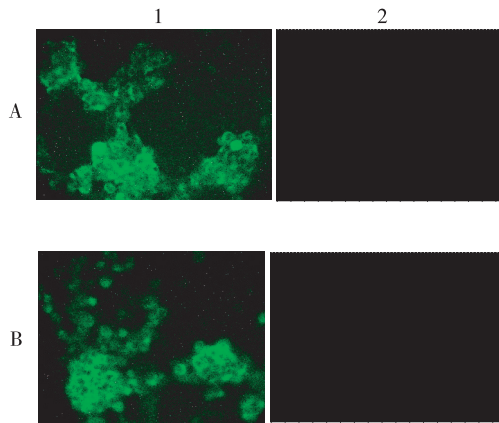
用重组腺病毒质粒转染 293T 细胞, 细胞发生病变后取重组病毒感染 293T 细胞, 72 h 后, 用丙酮-乙醇固定, 分别用间接免疫荧光 (IFA) 和直接免疫荧光 (DFA) 检测融合蛋白 *SUJ-rIgGfc* 在 293 细胞中的表达情况。结果显示, 重组腺病毒与 JE9 和 FITC 标记的羊抗兔 IgG 都发生特异性反应, 产生特异性荧光, 而野生腺病毒感染的 293T 细胞均未出现荧光 (图 4)。说明融合蛋白 *SUJ-rIgG* 在 293T 细胞中得到很好的表达。

2.5 Western-blot 分析重组蛋白表达

将重组腺病毒感染 293T 细胞, 96 h 后裂解细胞, 离心取上清进行 SDS-PAGE, 分别用 ALV-J 特异型单抗 JE9 和羊抗兔 IgG 进行 western-blot 分析。结果 (图 5) 在约 9.5×10^4 处均出现 1 条特异性条带, 而野生腺病毒感染的 293T 细胞没有出现相应的条带。说明融合蛋白在重组腺病毒感染的 293T 细胞中获得表达, 其分子量大小约为 9.5×10^4 , 与预期大小相符。

2.6 免疫共沉淀试验分析融合蛋白在 ALV-J 受体鉴定中的初步应用

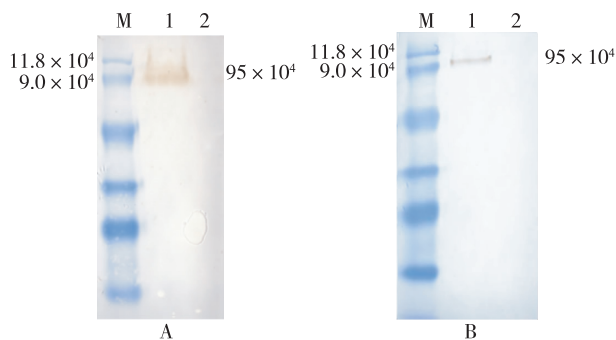
DF1 细胞膜蛋白混合物与 Protein A-rIgG 反应去除非特异性结合后, 再分别与 *SUJ-rIgGfc*-Protein A Beads 和 *rIgGfc*-Protein A Beads 充分振荡孵育, 获得的沉淀进行 SDS-PAGE 和胶体银染。结果 (图 6) 显示, 在 DF1 细胞膜蛋白与 *SUJ-rIgGfc* 融合蛋白免疫共沉淀产物中, 发现 3 条蛋白质条带, 大小约



A: 293T 细胞与单抗 JE9 反应; B: 293T 细胞与 FITC 标记的羊抗兔 IgG 反应。1: 重组腺病毒感染的 293T 细胞; 2: 野生腺病毒感染的 293T 细胞。

图 4 免疫荧光分析融合蛋白 SUJ-rIgG 在 293T 细胞中的表达 ($\times 100$)

Fig.4 IFA analysis of fusion protein SUJ-rIgG expressed in 293T cells



A: JE9 单抗与重组腺病毒感染的 293T 细胞裂解物反应; B: HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体与重组腺病毒感染的 293T 细胞裂解物反应。M: 预染蛋白质 Marker; 1: 重组腺病毒感染的 293T 细胞裂解产物; 2: 野生型腺病毒感染的 293T 细胞裂解产物。

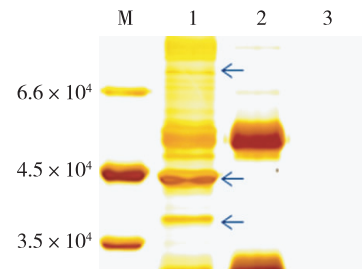
图 5 Western-blot 分析融合蛋白在重组腺病毒感染的 293T 细胞中的表达

Fig.5 Western-blot analysis of fusion protein expressed in 293T cells infected by recombinant adenovirus

7.8×10^4 、 4.2×10^4 和 3.8×10^4 , 而对照中并未发现, 说明融合蛋白 SUJ-rIgGFc 能够与 ALV-J 宿主细胞系蛋白发生特异性反应, 可作为进一步验证病毒受体或病毒感染相关蛋白的有力试验材料。

3 讨论

近年来, 世界各地发生 ALV-J 感染的报道日益增多, ALV-J 的流行面越来越大, 发病宿主范围不断



M: 普通蛋白 Marker; 1: DF1 细胞裂解物与 SUJ-rIgGFc-Protein A 结合物免疫共沉淀蛋白; 2: DF1 细胞裂解物与 rIgG-Protein A 免疫共沉淀蛋白; 3: DF1 细胞裂解物与 Protein A 免疫共沉淀蛋白。

图 6 DF1 细胞膜蛋白与融合蛋白 SUJ-rIgGFc 免疫共沉淀 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of Co-IP products from membrane protein of DF1 cell and fusion protein SUJ-rIgGFc

扩展。ALV-J 不同于其他亚群病毒, 其在肉用型鸡中的横向传染能力要比其他亚群在蛋用型鸡中的横向传播能力强^[14], 而最显著的区别是 ALV-J 以引起禽的髓细胞瘤为主, 而其他亚群如 A、B 亚群主要引起淋巴瘤^[15]。这可能与不同组织细胞表面存在的不同受体相关。目前很多关于病毒受体的研究表明, J 亚群禽白血病病毒受体有多种类型, 宿主细胞很可能存在不止一个受体, 包括特异性和非特异性的, 因此鸡体组织存在除 NHE-1 以外新的 ALV-J 受体的可能性相当大, 值得进行深入研究。而深入研究病毒受体, 自然需要病毒表面抗原的介入。在病毒受体的研究领域广泛采用免疫共沉淀这一经典的免疫学方法, 因此如采用该方法去捕捉病毒受体, 则要准备好捕获受体蛋白的诱饵蛋白。

本试验通过腺病毒表达系统成功表达了 SUJ-IgGFc。腺病毒载体作为基因高效传递和表达的工具被广泛应用于外源基因导入哺乳动物细胞。与其他病毒载体相比, 它具有广泛的细胞嗜性和高效的转导效率^[16], 病毒滴度高, 可容纳大片段外源基因, 能够对重组蛋白进行正确的折叠和修饰, 表达产物可在无血清培养的包装细胞系中大量增殖, 可进行纯化和浓缩^[17]等优点, 这也正是本试验选用 AdEasyTM XL Adenoviral Vector System 和 MDCK 来表达融合蛋白 SUJ-rIgGFc 的原因所在。

本研究中采用免疫荧光、Western-blot 等方法对 SUJ-rIgGFc 的表达进行了鉴定。IFA 结果表明, SUJ-rIgGFc 在 293T 细胞得到很好的表达, 且表达的融合蛋白可同时被 ALV-J 特异性单抗 JE9 以及羊抗

兔 IgG 抗体识别。Western-blot 结果显示,融合蛋白 *SUJ*-rIgGFc 与 JE9 和羊抗兔 IgG 都具有很好的反应性,且重组蛋白大小 9.5×10^4 。这些结果都说明 ALV-J *SUJ* 基因和兔 *IgGFc* 基因已成功导入到真核细胞内,并在真核细胞中得到很好的包装和修饰,完全可以作为捕获 ALV-J 受体的诱饵蛋白,用于 J 亚群禽白血病病毒受体的分离,为进一步分离 ALV-J 受体提供有效的物质基础。

参考文献:

- [1] PAYNE L N, BROWN S R, BUMSTEAD N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leucosis virus in chickens[J]. Journal of Gen Virol, 1991, 72: 801-807.
- [2] 杜 岩,崔治中,秦爱建,等.从市场商品肉鸡中检出 J 亚群禽白血病病毒[J].中国家禽,1999, 3(1): 1-4.
- [3] PAYNE L N. HPRS-103: a retrovirus strikes back. The emergence of subgroup J avian leucosis virus[J]. Avian Pathol, 1998, 27: S36-S45.
- [4] XU B, DONG W, YU C, et al. Occurrence of avian leukosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China[J]. Avian Pathol, 2004, 33(1): 13-17.
- [5] 徐镔蕊,董卫星,余春明,等.用 ALV-J gp85 单克隆抗体证明蛋鸡存在 J 亚群禽白血病[J].畜牧兽医学报,2005, 36(3): 269-271.
- [6] 成子强,张 利,刘思当,等.中国麻鸡中发现禽 J 亚群白血病[J].微生物学报,2005, 45(4): 584-588.
- [7] ZHANG H N, LAI H Z, QI Y, et al. An ALV-J isolate is responsible for spontaneous haemangiomas in layer chickens in China[J]. Avian Pathology, 2011, 40(3): 261-267.
- [8] QU Y, SUN H L, SUN M Y, et al. Sequence analysis for the complete prociral genome of avian leukosis virus subgroup J associated with haemangiomas, leiomyosarcomas and myelomas in layer flocks[J]. Acta Veterinaria Hungarica, 2012, 60(3): 343-354.
- [9] ADKINS H B, BLACKLOW S C, YOUNG J. Two functionally distinct forms of a retroviral receptor explain the nonreciprocal receptor interference among subgroups B, D and E avian leukosis viruses[J]. Virology, 2001, 75: 3520-3526.
- [10] BOVA C A, MANFREDI J P, SWANSTROM R. Env genes of avian retroviruses: nucleotide sequence and molecular recombinants define host range determinants[J]. Virology, 1986, 152(2): 343-354.
- [11] CHAI N, BATES P. Na⁺/H⁺ exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J avian leukosis virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(14): 5531-5536.
- [12] VENUGAPOL K. Avian leukosis virus subgroup J: A rapidly evolving group of oncogenic retroviruses[J]. Res Vet Sci, 1999, 67: 113-119.
- [13] 吴晓平.商品蛋鸡源 J 亚群禽白血病病毒分离株生物学特性研究[D].扬州:扬州大学,2010.
- [14] SUN H L, QIN M, XIAOY H, et al. Haemangiomas, leiomyosarcoma and myeloma caused by subgroup J avian leucosis virus in a commercial layer flock[J]. Acta Veterinaria Hungarica, 2010, 58(4): 441-451.
- [15] 秦爱建. J 亚群白血病病毒囊膜蛋白 *env* 基因的生物学和生物化学特性[D].扬州:扬州大学,1999.
- [16] DING C, LIU H. Advance in adenovirus vector[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2007, 28(10): 64-67.
- [17] 耿合员,孙 元,韩宗玺,等.表达鸡传染性支气管炎病毒 *SI* 基因重组腺病毒的构建[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(3): 175.

(责任编辑:张震林)