

## YXXM 基序对 J 亚群禽白血病病毒复制的影响

冯少珍, 李娇, 曹伟胜\*, 廖明\*

华南农业大学兽医学院, 农业部动物疫病防控重点开放实验室, 广州 510642

**摘要:**【目的】毒株 NX0101 是骨髓瘤病变型 J 亚群禽白血病病毒, 其早期感染细胞能诱导 PI3K/Akt 信号转导通路的激活, 本文针对 NX0101 毒株是否存在 YXXM 基序及其作用进行了探讨。【方法】利用 TMpred 软件对 NX0101 毒株囊膜蛋白 (Env) 的氨基酸序列进行生物信息学分析, 通过搭桥 PCR 方法将 YXXM 基序相应的核苷酸序列突变后, 构建突变质粒并转染 DF-1 细胞, 拯救出 YXXM 突变体毒株 NX0101mt (Y/F, M/A), 利用 real-time PCR 和 ELISA 方法检测并比较 YXXM 突变前后毒株在 RNA 水平和蛋白水平的复制情况。【结果】NX0101 毒株 Env 胞浆区 554-557 位氨基酸存在典型的 PI3K 结合基序 YXXM。YXXM 基序突变后, 病毒 RNA 转录水平和病毒蛋白合成水平都显著下降。【结论】YXXM 基序对 NX0101 毒株在体外宿主细胞中复制发挥重要的作用。

**关键词:** J 亚群禽白血病病毒, 病毒 NX0101, YXXM 基序, 病毒复制

中图分类号: S852 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 12-1663-06

J 亚群禽白血病病毒 (subgroup J avian leukosis virus, ALV-J) 主要引起肉种鸡的骨髓瘤、血管瘤、淋巴瘤等多种肿瘤<sup>[1]</sup>, 已成为严重危害我国养鸡业的重要疾病之一。ALV-J 前体基因组的结构主要包括两端的非编码区 LTR 和中间的编码区 *gag-pol-env*。env 基因编码的病毒囊膜蛋白 (Env) 包括由 *gp85* 基因编码的膜表面糖蛋白亚单位 (SU) 和由 *gp37* 基因编码的跨膜糖蛋白亚单位 (TM)。ALV-J 感染宿主细胞, 首先是 SU 亚单位与细胞表面特异性受体 cNHE1 相互作用和结合, 伴随引起 TM 亚单位构象发生变化从而介导 ALV-J 与宿主细胞发生融合, 使病毒进入细胞<sup>[2-3]</sup>。由此可见, Env 对于 ALV-J 感染细胞有十分重要的意义。

YXXM 基序是典型的 PI3K 结合基序, 磷酸化的

YXXM 通过与 PI3K 亚基 p85 的 SH2 域结合使 PI3K 磷酸化并被激活<sup>[4]</sup>。研究报道指出, 不少病毒蛋白的编码氨基酸序列中存在特异性的“YXXM”基序。例如 A 型流感病毒 NS1 蛋白的氨基酸序列就含有 YXXM 基序<sup>[5]</sup>, 而具有致病性的外源性绵阳肺腺瘤病毒 (JSRV) env 基因编码的 TM 区同样含有 YXXM 基序<sup>[6]</sup>。叶建强分析发现 30 个 ALV-J 毒株 Env 的 TM 区都存在 YXXM 基序, 而内源性 ALV 的 Env 则没有此段序列<sup>[7]</sup>。目前, 对 ALV-J 毒株囊膜蛋白 TM 区的 YXXM 基序的功能和作用尚未有研究报道。

本研究将通过生物信息学手段, 分析骨髓瘤病变型 ALV-J 毒株 NX0101 的 Env 蛋白氨基酸序列<sup>[8]</sup>, 并通过点突变手段, 探索 YXXM 基序突变前后病毒复制水平的变化, 为进一步研究 ALV-J 的致

基金项目: NSFC-广东联合基金 (U0831002); 国家博士后科学基金 (20100470929); 广东省自然科学基金 (10451064201005432); 广东省科技计划项目 (2009A020101006); 国家自然科学基金 (30771612)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-85280240; E-mail: mliao@seau.edu.cn

作者简介: 冯少珍 (1980-), 女, 广东人, 博士后, 从事病毒分子生物学研究。E-mail: fengshaozhen111@hotmail.com

收稿日期: 2011-06-09; 修回日期: 2011-07-10

病性提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:**新生牛血清和 DMEM 营养液购自 Gibco 公司, lipofectamine™ 2000、Trizol 和 Platinum SYBR Green qPCR 试剂盒均购自 Invitrogen 公司, ALV 抗原 ELISA 检测试剂盒购自 IDEXX 公司, M-MLV 反转录试剂盒、pMD™ 18-T 载体以及内切酶 *Not* I 和 *Kpn* I 均购自 TaKaRa 公司, Alexa 488 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中衫金桥公司, 抗 ALV-J gp85 单克隆抗体由扬州大学兽医学院秦爱建教授赠送。ABI 7500 Real Time PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司。

**1.1.2 病毒的细胞培养:**DF-1 细胞株由扬州大学兽医学院秦爱建教授赠送。骨髓瘤病变型 ALV-J 毒株 NX0101 由山东农业大学动物科技学院崔治中教授馈赠。DF-1 细胞用含 10% 新生牛血清的 DMEM 营养液培养成单层后接种 ALV-J 病毒, 37℃

吸附 2-3 h, 换成含 2% 新生牛血清的 DMEM 维持液, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 7 d 后, 用 ALV 抗原 ELISA 检测试剂盒检测细胞培养上清; 病毒作为连续传代的接种物保存于 -70℃。

### 1.2 序列分析

根据 NX0101 毒株前体基因组序列推导的氨基酸序列 (GenBank: AAZ20134), 通过在线软件 Tmpred (www.ch.embnet.org/software/TMPRED\_form.html) 对其囊膜蛋白 Env 进行跨膜区分析。

### 1.3 NX0101 突变体质粒的构建

将 NX0101 毒株全基因组 cDNA (GenBank: DQ115805) 克隆至载体 pMD™ 18-T 中 (图 1), 获得重组质粒 pMDNX0101。参照 Ho 等<sup>[9]</sup> 方法, 以该重组质粒 pMDNX0101 为模板, 设计含有突变密码子 (TTT 和 GCT) 且互补的上下游引物 F2 和 R1 (表 1), 通过搭桥 PCR 方法, 获得翻译后含有突变位点 (Y554F 和 M557A) 的基因片段, 再通过 *Not* I 和 *Kpn* I 双酶切将含有突变密码子的片段克隆至质粒 pMDNX0101 中, 获得突变体质粒 pMDNX0101mt (Y554F, M557A)。

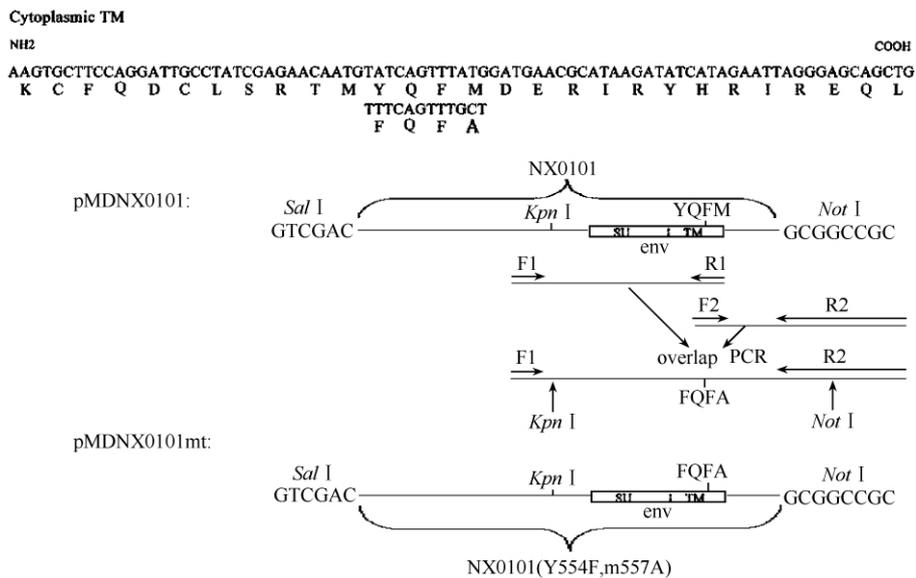


图 1 NX0101 毒株囊膜蛋白胞浆区序列及突变体质粒构建示意图

Fig. 1 Transmembrane sequence of envelope protein of virus NX0101 and construction of the mutation plasmid.

### 1.4 病毒拯救和鉴定

根据 lipofectamine™ 2000 操作说明, 将 1.3 部分中获得的重组质粒 pMDNX0101 和 pMDNX0101mt 分别转染 DF-1 细胞, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 h, 收获细胞培养上清。

用 ALV 抗原 ELISA 检测试剂盒检测细胞培养上清中是否含有病毒粒子。同时通过间接免疫荧光试验 (IFA) 来鉴定拯救的病毒是否为 J 亚群 ALV。收毒后, 用预冷 PBS 洗涤细胞 3 次, 用 4% 多聚甲醛 (PBS) 固定 15 min。用 PBS 洗涤后加入 1:200 稀释

的抗 ALV-J gp85 单克隆抗体, 4°C 湿盒过夜。用 PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。加入 1:200 稀释的 Alexa 488 标记的羊抗鼠 IgG, 37°C 孵育 1 h。PBST 洗涤后, 在荧光显微镜下观察、拍照。

转染细胞上清再次感染新的 DF-1 细胞, 37°C 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 7 天, 提取细胞基因组, 设计特异性引物 F3 和 R3 (表 1), 通过 PCR 方法扩增 *env* 基因片段, 扩增片段经上海 Invitrogen 公司测序检验。

## 1.5 病毒复制水平检测

用 ALV 抗原 ELISA 检测试剂盒检测细胞培养上清中病毒粒子的含量; 按照 Feng 等<sup>[10]</sup>报道方法检测病毒 RNA 合成水平。用 Trizol 裂解和提取细胞总 RNA, 取 1 μg 总 RNA 用 M-MLV 反转录试剂盒反转录成 cDNA, 反转录产物用于 real-time PCR 检测病毒 RNA 合成水平。Real-time PCR 利用 ABI 7500 Real Time PCR 仪, 根据 Platinum SYBR Green qPCR 试剂盒说明操作, 设计引物 F4/R4, F5/R5 和

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used for amplification of target and reference genes

Gene	Primer sequence (5'→3')	Product size/ bp	Accession number
NX0101	F1 CACTGGAGACCTACCGTTCT	1905	
	R1 CTAATTCTATGATATCTTATGCGTTCATCAGCAAACACTGAAACATTG		
NX0101	F2 CAATGTTTCAGTTTGCTGATGAACGCATAAGATATCATAGAATTAG	755	
	R2 TATGCGGCCGCTGAAGCCATCCGCTTCATGC		
<i>env</i>	F3 GATCAAGAACGGAAACAACAC	1405	DQ115805
	R3 TCGGACGCTACTGGTCACAA		
<i>env</i>	F4 GCTGCCATCGAGAGGTTACT	406	DQ115805
	R4 CGAACCAAAGGTAACACACCG		
LTR	F5 GGTGGAAGTAAGGTGCTATGATC	229	DQ115805
	R5 GCTTCATTAGGTGTTTCGTAGTC		
GADPH	F6 GGAAACTCATCCCTGAGCTG	81	M11213.1
	R6 GGTCAACAACAGAGACATTGG		

F, forward primer; R, reverse primer; Underline indicates the recognition site of restriction enzyme *Not* I.

F6/R6 (表 1), 检测 ALV-J *env* 基因和内参 GADPH 基因的表达情况。

## 2 结果

### 2.1 序列分析

利用 TMpred 在线软件不同模型预测 NX0101 毒株 Env 蛋白跨膜区后发现: 第 523 - 542 位之间 20 个氨基酸 (N 端氨基酸在细胞外, C 端氨基酸在细胞质内) 出现一个大的典型的跨膜区 (表 2)。Env 蛋白跨膜区的定位决定了其胞浆区位于第 543

表 2 TMpred 软件分析 NX0101 毒株 Env 蛋白跨膜区氨基酸序列

Table 2 Amino acid residues of Env predicted to be involved in transmembranes (N terminus outside) by TMpred analysis

#	from	to	length	score	orientation
1	47	68	22	2.278	o-i
2	338	359	22	637	i-o
3	391	410	20	1.269	o-i
4	523	542	20	2.578	i-o

outside to inside, o-i; inside to outside, i-o

位氨基酸之后。胞浆区第 12 - 15 位存在 YQFM 四个氨基酸 (图 1), YQFM 恰好构成一个 YXXM 基序。

### 2.2 YXXM 突变体病毒的拯救

通过搭桥 PCR 构建重组突变质粒, PCR 产物电泳结果及测序结果均表明扩增片段正确。PCR 扩增片段经过 *Kpn* I 和 *Not* I 双酶切 (图 1) 后连接至载体 pMDNX0101 中, 经测序证实成功获得重组突变质粒 pMDNX0101mt (TAT/TTT, ATG/GCT)。

利用 ELISA 方法检测转染细胞培养上清, 结果表明拯救的病毒 NX0101 和突变体病毒 NX0101mt (Y/F, M/A) 的 S/P 比值分别为 2.169625 和 1.966469, 均远大于 0.2, 为阳性, 说明转染细胞培养上清中含有 ALV 抗原。对转染了重组质粒 pMDNX0101 和 pMDNX0101mt 的细胞进行 IFA 检测, 结果显示大部分细胞的胞质中有被抗 ALV-J gp85 特异性单克隆抗体识别的较强的绿色荧光 (图 2), IFA 结果证实获得了突变前后的 ALV-J 病毒粒子。

将突变前后的病毒分别感染 DF-1 细胞, 提取细胞基因组并以其为模板, 经 PCR 反应扩增得到特异

性条带,电泳和测序结果证实片段大小均为 1405 bp (图 3),序列结果与预期相符,YXXM 基序对应的核

苷酸序列 TATCAGTTTATG 已成功突变为 TTTCAGTTTGCT,其余的核苷酸序列完全相同。

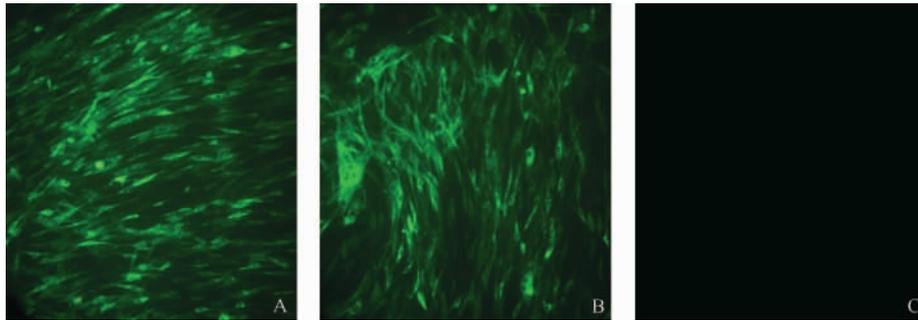


图 2 重组质粒 pMDNX0101 和 pMDNX0101mt 转染 DF-1 细胞的 IFA 结果

Fig. 2 IFA results of DF-1 cells transfected recombinant plasmids of pMDNX0101 (A), pMDNX0101mt (B) and without plasmid (C) after 3 days.

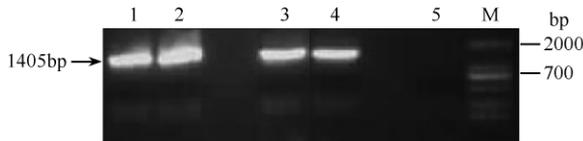


图 3 PCR 检测接种病毒后 DF-1 细胞基因组 DNA

Fig. 3 PCR amplification of genome DNA from DF-1 cells infected with virus using primers F3 and R3. 1, 2: PCR amplification using genome DNA from cells infected with mutation virus NX0101mt (Y554F, M557A) as template; 3, 4: PCR amplification using genome DNA from cells infected with virus NX0101 as template; 5: PCR amplification using genome DNA from cells infected with out virus as template; M: DL2000 DNA marker.

2.3 YXXM 突变前后病毒复制水平比较

将 1.4 部分中获得的 YXXM 突变前后病毒

NX0101 和 NX0101mt (Y554F, M557A) 分别感染 DF-1 细胞,培养 24 h 后提取细胞总 RNA,经过 RT-real time PCR 分析后发现,YXXM 突变后病毒的 env 基因和 LTR 基因的 RNA 复制水平均显著降低(图 4-A, B)。培养不同时间点取细胞上清进行 ELISA 检测,结果显示拯救的原病毒 NX0101 再次感染 DF-1 细胞后,6 天时细胞上清的 S/P 比值(2.273603)与转染后检测细胞培养上清的 S/P 比值(2.169625)相当,差异不大;但是拯救的 YXXM 突变病毒 NX0101mt (Y554F, M557A) 再次感染 DF-1 细胞后,6 天时细胞上清的 S/P 比值(0.22736)明显比转染后检测细胞培养上清的 S/P 比值(1.966469)低,差异显著(图 4-C)。

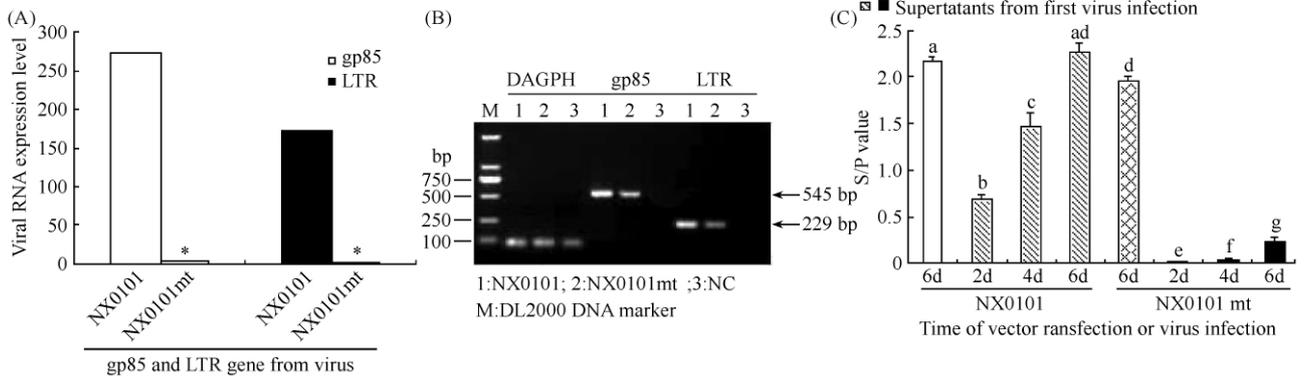


图 4 YXXM 基序突变前后病毒复制水平比较

Fig. 4 Comparison of replication level of virus with or without YXXM motif mutation. A: RNA replication level analysis by real-time PCR; B: Electrophoresis of real-time PCR products; C: Virus synthesis level analysis by ELISA. P < 0.05. Results are representative of three separate experiments.

ELISA 检测后,提取细胞基因组 DNA,用特异性引物 F4 和 R4 进行 PCR 扩增,结果显示均能检测到

大小为 545 bp 的 pol-env 基因片段(图 5),说明 YXXM 突变前后病毒前体基因插入到细胞基因组中。

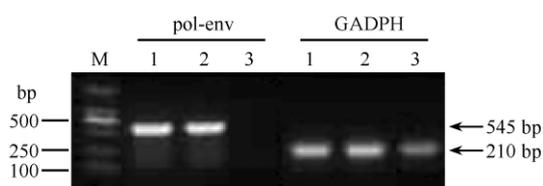


图5 PCR 扩增感染第一代细胞培养物的细胞基因组 DNA

Fig. 5 PCR amplification of genome DNA from DF-1 cells infected with cultural supernatants of the transfected cells. M: DL2000 DNA marker; 1: DNA from DF-1 cells infected with cultural supernatants containing virus NX0101; 2: DNA from DF-1 cells infected with cultural supernatants containing mutation virus NX0101mt; 3: DNA from DF-1 cells without infection.

### 3 讨论

ALV-J 毒株 Env 蛋白的 N 端为表面糖蛋白亚单位 SU, 位于胞膜外, C 端为跨膜糖蛋白亚单位 TM。在 NX0101 毒株前体基因组推导的氨基酸序列中, Env 蛋白跨膜区的定位 (523 - 542 位氨基酸) 决定了其胞浆区位于第 543 位氨基酸之后。NX0101 毒株胞浆区共 28 个氨基酸, 第 12 - 15 位为 YQFM, 恰好构成一个典型的 PI3K 调节亚基激活基序 YXXM<sup>[4]</sup>。由此推测, NX0101 毒株的 Env 蛋白胞浆区中存在潜在的能激活 PI3K 的 YXXM 基序。到目前为止, 研究报道指出有不少反转录病毒的囊膜蛋白胞浆区存在 YXXM 基序, 如外源性 JSRV 和山羊地方性鼻内肿瘤病毒 (ENTV)<sup>[11]</sup>, 以及部分 ALV-J 毒株<sup>[7]</sup>。

本研究通过设计密码子突变的互补引物和搭桥 PCR 方法, 成功拯救了 YXXM 突变毒株 NX0101mt (Y554F, M557A)。该突变毒株 NX0101mt 全基因组序列与原毒株 NX0101 的相比, 除了 YXXM 基序对应的核苷酸序列 TATCAGTTTATG 突变为 TTTCAGTTTGCT, 其余的核苷酸序列完全一样。YXXM 突变前后病毒复制水平比较显示, YXXM 突变后病毒的 RNA 复制水平和蛋白合成水平都显著下降, 由此推测, YXXM 基序对 NX0101 病毒在体外细胞感染和复制中有重要的作用。A 型流感病毒感染细胞能通过 NS1 蛋白中的 YXXM 基序与 p85 亚基结合从而激活 PI3K, PI3K 信号通路的激活有助于流感病毒在细胞中复制<sup>[5, 12-13]</sup>。JSRV<sub>21</sub> 毒株囊膜蛋白 TM 区的 YXXM 突变为 DXXM 后, 突变毒株不能感染宿主并引起羊病发, 可见完整的 YXXM 基

序是 JSRV 感染和复制必须的<sup>[14]</sup>, 后来有报道通过进一步研究, 指出 JSRV 囊膜蛋白的 YXXM 基序突变为 FXXM 或者 YXXT 后均削弱了细胞转化现象, YXXM 基序在 JSRV 引起的细胞转化中起着重要而非必要的作用<sup>[6, 9, 15]</sup>。叶建强建立了 ALV-J 毒株 4817 的 Env 表达细胞系, 该细胞系有类转化现象; 虽然 4817 毒株 Env 的 TM 区也存在 YXXM 基序, 而且 PI3K 抑制剂 LY294002 能使 Env 表达细胞系形态类转化发生逆转<sup>[7]</sup>, 但没有直接的实验数据证明 Env 表达细胞系类转化是由于 YXXM 基序激活 PI3K 细胞信号转导通路而引起的。ALV-J 毒株 (NX0101 和 HN06) 感染 DF-1 或者 CEF 细胞早期均能激活 PI3K, LY294002 抑制 PI3K/Akt 信号转导通路后, ALV-J 复制水平显著下降<sup>[10, 16]</sup>; YXXM 基序突变后 NX0101 毒株的复制水平也出现类似的结果, 然而 ALV-J 毒株 Env 蛋白中 YXXM 基序与 PI3K/Akt 信号转导通路是否存在相关性, 有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Cheng Z, Liu J, Cui Z, Zhang L. Tumors Associated with Avian Leukosis Virus Subgroup J in Layer Hens of During 2007 to 2009 in China. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2010, 72 (8): 1027 - 1033.
- [2] 赵振华. 禽白血病. 北京: 中国农业出版社, 2006: 17 - 23.
- [3] Chai N, Bates P. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J avian leukosis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006; 103 (14): 5531 - 5536.
- [4] Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, Neel BG, Birge RB, Fajardo JE, Chou MM, Hanafusa H, Schaffhausen B, Cantley LC. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, 1993, 72: 767 - 778.
- [5] Shin YK, Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA, Zhou Y. Effect of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on influenza A virus propagation. *Journal General Virology* 2007 88: 942 - 950.
- [6] 刘淑英, 马学恩, 齐景伟, 王宇. 绵羊肺腺瘤病毒 NM 株前病毒基因组的克隆与全序列分析. *中国病毒学 (Virologica Sinica)* 2006 21(5): 443 - 338.
- [7] 叶建强. J 亚群禽白血病病毒 Env 蛋白分子生物学特性研究. 扬州大学博士学位论文, 2005.
- [8] 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 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45 (3): 437 - 440.
- [9] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR.

- Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, 77:51–59.
- [10] 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 (Scientia Agricultura Sinica)*, 2011 (已接收).
- [11] Liu SL, Lerman MI, Miller AD. Putative phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) binding motifs in ovine betaretrovirus Env proteins are not essential for rodent fibroblast transformation and PI3K/Akt activation. *Journal of Virology*, 2003, 77(14):7924–7935.
- [12] Shin YK, Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA, Zhou Y. Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *Journal of General Virology*, 2007;88(Pt 1):13–18.
- [13] Ehrhardt C, Marjuki H, Wolff T, Nürnberg B, Planz O, Pleschka S, Ludwig S. Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cellular Microbiology*, 2006, 8:1336–1348.
- [14] Cousens C, Maeda N, Murgia C, Dagleish MP, Palmarini M, Fan H. In vivo tumorigenesis by Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) requires Y590 in Env TM, but not full-length orfX open reading frame. *Virology*, 2007, 367(2):413–421.
- [15] Palmarini M, Maeda N, Murgia C, De-Fraja C, Hofacre A, Fan H. A phosphatidylinositol 3-kinase docking site in the cytoplasmic tail of the Jaagsiekte sheep retrovirus transmembrane protein is essential for envelope-induced transformation of NIH 3T3 cells. *Journal of Virology*, 2001, 75(22):11002–11009.
- [16] Feng SZ, Cao WS, Liao M. PI3K/Akt pathway involved in early infection of some exogenous avian leukosis virus. *Journal of General Virology*, 2011, 92(7):1688–1697.

## Effect of YXXM motif on viral replication of subgroup J avian leukosis virus

Shaozhen Feng, Jiao Li, Weisheng Cao\*, Ming Liao\*

Key Laboratory of Animal Disease Control and Prevention, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** [Objective] It was reported that subgroup J avian leukosis virus strain NX0101 activates PI3K/Akt pathway during early infection in DF-1 cells. Whether there is YXXM motif in the amino acid sequence of NX0101 and the function of YXXM motif were studied. [Methods] The presence of internal transmembrane domains in the envelope protein of NX0101 was analyzed by Tmpred. Point mutation was introduced to change the YXXM motif in the NX0101 strain to FXXA. The plasmid containing the full genome of NX0101 with mutation within the YXXM motif in pMD18-T vector was constructed and transfected into DF-1 cells. Viral replication levels of NX0101 strain and the mutation one were tested and compared by real-time PCR and ELISA. [Results] The amino acid sequence of NX0101 strain had one YXXM motif (amino acids 554–557) in the cytoplasmic tail of envelope protein. The mutated NX0101 strain (Y554F, M557A) was rescued by reverse genetics technique. Viral replication of the mutated NX0101 strain was significantly lower than that of NX0101 strain in the level of either RNA or protein synthesis. [Conclusion] The results revealed that the YXXM motif was important for virus NX0101 replication in DF-1 cells.

**Keywords:** subgroup J avian leukosis virus, NX0101, YXXM motif, virus replication

(本文责编:王晋芳)

Supported by the NSFC-Guangdong Union Foundation (U0831002), by the National Science Foundation for Post-doctoral Scientists of China (20100470929), by the National Science Foundation of Guangdong Province (10451064201005432), by the Key Program of Science and Technology Development of Guangdong Province (2009A0201006) and by the National Natural Science Foundation (30771621)

\* Corresponding authors. Tel/Fax: +86-20-85280240; E-mail: mliao@scau.edu.cn

Received: 9 June 2011 / Revised: 10 July 2011