

중합효소연쇄반응을 이용한 닭 종양성 질병의 감별진단에 관한 연구

성 환 우 · 김 선 중*

농림부 수의과학연구소
서울대학교 수의과대학*
(1998년 2월 7일 접수)

Differential diagnosis among Marek's disease, reticuloendotheliosis and avian leukosis by polymerase chain reaction

Hwan-woo Seong, Sun-jung Kim*

*National Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture & Forestry, Anyang 430-016, Korea
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 151-010, Korea**

(Received Feb 7, 1998)

Abstract : The present study attempted to apply polymerase chain reaction (PCR) to develop a rapid differential diagnosis among Marek's disease, reticuloendotheliosis and avian leukosis. The primers chosen to detect Marek's disease virus (MDV) flank the 132bp tandem direct repeat of the MDV genome. The primers selected for reticuloendotheliosis virus (REV) and avian leukosis virus (ALV) are based on proviral long terminal repeats of spleen necrosis virus and Rous-associated virus-2 genomes, respectively.

The specific PCR products of MDV, REV and ALV were observed with each primer and the reaction was not cross-reacted among the viruses. MDV-specific DNA was also amplified from the MDV-induced lymphoma (MDCC-MSB1) but not from the REV-induced tumor and ALV-induced lymphoma (LSCC-1104B1). In addition, proviral DNA of REV from REV-induced tumor and proviral DNA of ALV from ALV-induced lymphoma were also amplified by REV-specific and ALV-specific PCRs, respectively. Therefore these three PCR methods may be used to rapidly differentiate among MDV, REV and ALV-associated tumors in diagnosis.

Key words : Marek's disease, reticuloendotheliosis, avian leukosis, polymerase chain reaction, differential diagnosis.

서 론

닭에서의 종양은 마렉병(Marek's disease; MD), 조류 백혈병(avian leukosis) 및 세망내피증(reticuloendotheliosis; RE)으로 인한 것이 대부분이다. 마렉병은 cell-associated herpesvirus에 속하는 MD virus(MDV)의 감염으로 발생되며¹⁻³, 7~10주 이상의 잠복기를 거친 후 간장, 신장, 비장 등 각종 실질장기 및 말초신경에 림프구 침윤을 특징으로 하는 종양성 질병을 일으킨다. 닭의 백혈병은 조류 백혈병 바이러스(avian leukosis virus; ALV)의 감염으로 발생되며 간장, 신장, 비장 및 F낭 등 각종 실질장기에 만성종양이 나타난다. 세망내피증은 RE virus(REV)의 감염으로 발생되며, 잠복기가 3주 이내인 급성종양도 나타날 수 있지만⁴⁻⁵ 야외 계군에서는 주로 만성종양이 발생된다. REV로 인한 만성종양은 잠복기가 19~42주병으로 비교적 길고 F낭에 종양 형성율이 매우 높은 bursal lymphoma와 잠복기가 6주정도로 비교적 짧고 F낭에서는 종양이 거의 형성되지 않는 nonbursal lymphoma로 분류될 수 있다⁶⁻⁷.

ALV 감염으로 인해 발생한 종양은 B세포 유래로써⁸⁻⁹ 대부분이 T세포 유래인 마렉병 종양세포와는 구별이 가능하나 세망내피증 바이러스 유래 종양세포와는 감별이 쉽지 않은 것으로 알려져 있다¹⁰⁻¹¹. 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)은 Saiki *et al*¹²이 열에 저항성이 높은 Taq DNA 중합효소를 도입함으로써부터 질병진단에 널리 이용되고 있다. 닭의 질병에 대해서도 최근에 병원성 MDV를 검출하는 PCR¹³⁻¹⁵, 세망내피증 바이러스를 검출하는 PCR¹⁶⁻¹⁷이 보고된 바 있으며, ALV도 검출할 수 있는 PCR법이 개발된 바 있다¹⁸. 본 실험은 이러한 PCR법을 이용하여 닭의 주요 종양성 질병의 감별진단이 가능한지를 알아보기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

바이러스 : 병원성 MDV는 표준주 JM10과 국내 분리주 88-57¹⁹를 사용하였으며, REV는 표준주인 REV-T와 국내 분리주 REV-HI²⁰를 이용하였다. ALV는 Rous-associated virus(RAV)-1 및 RAV-2를 ATCC에서 구입하여 사용하였다. REV와 ALV는 계태아 섬유아세포(chicken

embryo fibroblast; CEF)에서 증식배양하여 사용하였고, MDV는 감염된 specific pathogen free(SPF) 닭으로부터 제조한 우모근 유제액을 사용하였다.

종양세포 : 마렉병 유래 종양세포로는 MDCC-MSB1 세포²¹를 사용하였고 백혈병 유래 종양세포는 LSCC-1104B1 세포²²를 이용하였다. 세망내피증 종양은 국내 분리주 REV-HI에 의해 유발된 종양세포²³를 사용하였다.

Oligonucleotide primers : MDV, REV 및 ALV 검출용 primer들은 앞서 보고한 바와 같이 합성하였다^{15,17-18}. 즉, MDV 검출용 primer는 MDV의 유전자중²⁴ 132bp tandem direct repeat 인접부위에 반응하는 sense primer(MDF1); 5'-CCACAATATAGGACCGCGAT-3'와 antisense primer(MDR1); 5'-GCGCTTGAATGTGGAAGTAG-3'로 하여 132bp tandem direct repeat가 2개일 경우에는 약 460bp, 3개일 경우에는 592bp가 증폭되도록 설계하였으며, RE provirus 검출용 primer는 spleen necrosis virus의 long terminal repeats(LTRs)의 유전자중²⁵ unique 3'(U3) 부분의 일부와 repeat (R) 부분 및 unique 5'(U5)의 일부가 증폭되도록 sense primer 1(REF1): 5'-CATACTGGAGCCAATGGTTGTAAAGGGCAGA-3'과 antisense primer 1(RER1): 5'-AATGTTGTACCGAAGTACT-3'로 하여 Aly *et al*¹⁶과 같이 291bp가 증폭되도록 하였다. ALV proviral DNA를 검출하기 위하여는 RAV-2 proviral DNA의 LTRs 유전자중²⁶ sense primer(LLF2): 5'-TGCTCGTAGTCGTCAGGG-AAT-3'와 antisense primer(LLR3): 5'-GTGCATGCCGAT-TGGTGGAA-3'로 하여 약 230bp가 증폭되도록 설계하여 DNA 합성기(392 DNA/RNA synthesiser, ABI)에서 합성하였다.

표적 DNA 추출 및 PCR : 1ml의 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)에 10% SDS 50 μ l를 넣은 DNA 추출 buffer에 감염세포 혹은 20% 장기유제액 50 μ l씩 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 처리한 다음, 동량의 Tris-HCl buffer equilibrated phenol을 넣어 서서히 흔들어 12,000rpm(Heraeus Biofuge 15 centrifuge)에서 10분간 원심하였다. 원심후 상층액을 채취하여 동량의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25 : 24 : 1, v/v; Gibco BRL)을 넣어 서서히 흔든 후 재차 원심하고, 상층액 400 μ l을 채취하였다. 채취한 상층액에 800 μ l의 cold ethanol과 3M sodium acetate 40 μ l를 가하여 -50 $^{\circ}$ C에서 3시간 이상을 정치한 뒤 12,000rpm에서 10분간 원심하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 진공건조기로 건조시킨 후 20 μ l 증류수로

풀어 PCR용 표적 DNA로 사용하였다.

PCR은 FTC-2000 Fast Air Temp-Cycler(대한메디칼)에서 50µl 양으로 하여 앞서 보고한^{15,17-18} 바와 같은 조건으로 반응시켰다. 즉, MDV와 REV 검출용 PCR은 94℃에서 120초간 predenaturation시킨 다음, annealing을 55℃에서 20초, elongation을 72℃에서 30초, denaturation을 94℃ 10초로 하여 40 cycles을 수행하였으며, ALV 검출용 PCR은 앞서 보고한¹⁸ 바와 같이 touchdown PCR을 수행했다.

PCR 산물의 결과 확인 : 10µl의 PCR 산물을 1µl의 gel loading buffer (0.25% bromophenol blue tracking dye in 25% Ficoll)와 혼합하여 ml당 0.5µg ethidium bromide가 포함된 1.5%의 agarose gel에 loading 한 후 100V에서 30분간 TAE buffer(0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA)에서 전개하였다. 전개후 UV light로 조사하여 증폭유무를 확인하였다.

결 과

MDV 검출용 PCR의 특이성 : MDV 감염체의 우모균과 REV와 ALV가 각각 감염된 CEF세포에서 DNA를 추출하여 MDV 검출용 primers(MDF1/MDR1)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 결과 병원성 MDV인 표준주 JM10과 국내분리주 88-57에서는 약 460bp의 MDV 특이 유전자 증폭산물이 관찰되었으나 REV와 ALV 감염세포에서는 이러한 특이적인 증폭산물이 나타나지 않아 특이성이 있는 것으로 나타났다(Fig 1)

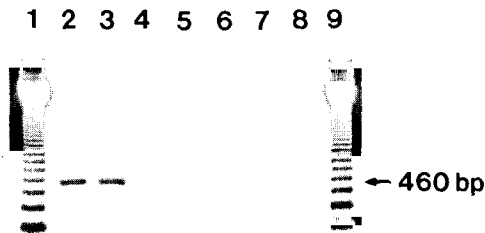


Fig 1. Specificity of the MDV PCR using primer pair MDF1/MDR1.

Lane 1 and 9, molecular-weight marker of 123-bp DNA ladder; lane 2, MDV JM10; lane 3, MDV 88-57; lane 4, REV-T; lane 5, REV-HI; lane 6, ALV RAV-1; lane 7, ALV RAV-2; lane 8, control reaction with template of CEF cell DNA.

REV 검출용 PCR의 특이성 : REV 표준주 REV-T와 국내분리주 REV-HI가 감염된 CEF세포 및 MDV와 ALV가 각각 감염된 우모균 및 CEF 세포에서 DNA를 추출하여 REV 검출용 primers(REF1/RER1)를 이용하여 PCR을 수행하였다. REV 표준주 및 국내 분리주 감염세포에서는 약 291bp의 REV 특이 유전자가 증폭되었으나 기타의 MDV 및 ALV에서는 이러한 증폭산물이 나타나지 않았다(Fig 2).

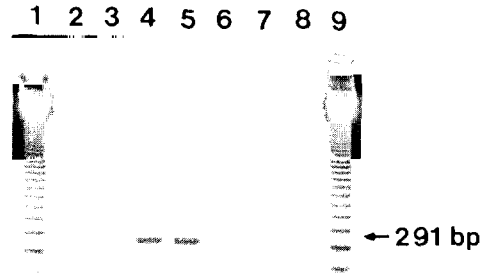


Fig 2. Specificity of the REV PCR using primer pair REF1/RER1.

Lane 1 and 9, molecular-weight marker of 123-bp DNA ladder; lane 2, MDV JM10; lane 3, MDV 88-57; lane 4, REV-T; lane 5, REV-HI; lane 6, ALV RAV-1; lane 7, ALV RAV-2; lane 8, control reaction with template of CEF cell DNA.

ALV 검출용 PCR의 특이성 : ALV 표준주 RAV-1와 RAV-2 및 REV가 각각 감염된 CEF세포 및 MDV 감염체의 우모균을 대상으로 ALV touchdown PCR을 수행하였다. RAV-1, RAV-2 감염세포에서는 특이적인 유전자 증



Fig 3. Specificity of the ALV PCR using primer pair LLF2/LLR3.

Lane 1 and 9, molecular-weight marker of 123-bp DNA ladder; lane 2, MDV JM10; lane 3, MDV 88-57; lane 4, REV-T; lane 5, REV-HI; lane 6, ALV RAV-1; lane 7, ALV RAV-2; lane 8, control reaction with template of CEF cell DNA.

폭이 가능하였으나 기타의 바이러스에서는 이러한 유전자 증폭이 관찰되지 않아 ALV 검출용 touchdown PCR은 특이성이 있는 것으로 판단되었다(Fig 3).

종양세포들에서의 감별진단 : 마력병 유래 종양세포인 MDCC-MSB1세포와 백혈병 유래 종양세포인 LSCC-1104B1세포 및 국내 분리주 REV-HI에 의해 유발된 세망내피종 종양세포에서 각각 DNA를 추출하여 각각의 PCR을 수행한 결과 다른 종양들과 교차반응없이 종양세포들을 특이적으로 감별할 수 있는 것으로 나타났다(Fig 4).

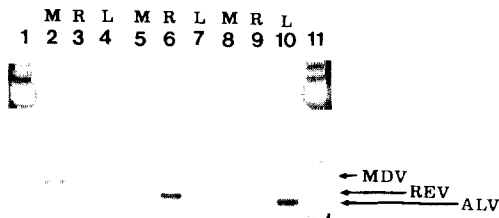


Fig 4. Differentiation of MDV-, REV- or ALV-induced tumors by PCR.

The primers are denoted as M for MDV, R for REV and L for ALV, Lane 1 and 11, molecular-weight marker of 123bp DNA ladder; lane 2, 3 and 4, MDV-induced lymphoma (MDCC-MSB1); lane 5, 6 and 7, REV-induced tumor; lane 8, 9 and 10, ALV-induced lymphoma(LSCC-1104B1).

고 찰

마력병 바이러스가 닭에 감염할 경우 감염되는 세포에 따라서 productive infection, latent infection, transforming infection의 세가지 감염형태를 취하는 것으로 알려져 있다. 바이러스 DNA 증식이 일어나 항원이 합성되는 productive infection은 주로 nonlymphocyte에서 일어나며, 감염된 세포당 1200 copies 이상의 게놈이 존재하는 것으로 알려져 있다²⁷. Latent infection은 lymphocyte에서 나타나며 세포당 약 5 copies 정도의 바이러스 게놈이 있고, transforming infection은 T lymphocyte에서만 나타나며, 세포당 약 5~15 copies 정도의 바이러스 게놈이 존재하는 것으로 알려져 있다²⁸. PCR은 10⁵개의 세포중 1 copy의 target DNA만 있어도 검출될 만큼 민감도 높은 것으로 알려져 있기 때문에¹² PCR을 이용하면 latent infection이나 transforming infection된 MDV도 이론적으로는 검출이

가능하다. 본 실험에서도 transforming infection 된 마력병 유래의 종양세포에서 DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과 MDV 유전자 검출이 가능하였다.

종양 유발능력이 있는 병원성 MDV는 MDV 유전자 unique long region 인접부위의 inverted region에 132bp로 구성된 tandem direct repeat가 1개 내지 3개 copies를 가지고 있는데 반해 약독화 된 MDV는 3개에서 100개 정도인 것이 확인된 바 있다²⁹⁻³¹. 본 실험에서 사용한 primer (MDF1/MDR1)는 132bp repeat 인접부위에 반응하는 primer로서 132bp repeat를 1개 copy를 가질 경우에는 328bp, 2개 copies를 가질 경우에는 460bp가 증폭되도록 설계하였다. 병원성 MDV인 표준주 JM10과 국내분리주 88-57은 약 460bp가 증폭되어 132bp repeat를 2개 copies를 가지는 것으로 나타났다. 또한 이러한 PCR법으로는 REV와 ALV와 교차반응없이 MDV만 특이적으로 검출할 수 있는 것으로 나타났으며(Fig 1), MD 백신 바이러스들은 검출되지 않는 것으로 나타나¹⁵ MDV로 인한 종양이나 감염계에서 MDV를 검출하는데 유용성이 있을 것으로 판단되었다.

REV나 ALV와 같은 retrovirus는 다른 RNA 바이러스들과는 다르게 RNA 의존성 DNA 중합효소를 갖고 있으며, 이 효소에 의하여 합성된 바이러스 DNA는 세포의 염색체 DNA에 삽입되어 proviral DNA로 존재하며 삽입 시에는 증식중에 형성된 LTRs도 같이 삽입되게 된다. 따라서 중합효소 연쇄반응법으로 감염세포에서 이들 바이러스 감염을 확인할 때 바이러스 RNA를 추출하여 complementary DNA 합성단계를 거친 후 PCR로 확인하는 방법보다는 세포의 DNA를 추출하여 PCR을 수행하면 보다 효과적일 수 있다. 본 실험에서도 이러한 특성을 이용하여 REV나 ALV의 LTRs에 특이적인 primer를 합성하여 PCR을 수행한 결과 모두 proviral DNA를 특이적으로 검출할 수 있었다.

ALV에 의한 만성종양은 바이러스가 감염세포 염색체의 c-myc 유전자 앞쪽에 삽입됨으로써 발생되며, 삽입된 provirus의 3' LTR에서 c-myc 유전자의 발현을 유도하기 때문인 것으로 알려져 있다³²⁻³³. 따라서 ALV로 발생한 종양세포에는 ALV provirus가 존재하며, 이들 종양세포로부터 DNA를 추출하여 PCR을 수행하면 ALV proviral DNA 검출이 가능할 것이다. 본 실험에서도 백혈병 유래 종양세포인 LSCC-1104B1 세포에서 DNA를 추출하여 touchdown PCR을 수행한 결과 약 230bp의 백혈병 바이

러스 특이 유전자 증폭이 가능하였다(Fig 4). REV에 의한 종양도 ALV와 유사한 과정을 거쳐 종양을 유발하는 것으로 알려져 있으며³⁴, 종양세포에는 RE provirus가 존재하고 있다. 따라서 RE 종양세포에서 DNA를 추출하여 RE proviral DNA를 검출하는 것은 이론적으로 가능하다. 본 실험에서도 국내 분리주에 의해 유발된 세망내피종 종양세포에서 DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과 proviral DNA 검출이 가능한 것으로 나타났다.

닭에서의 종양성 질병은 주로 종양 발생일령, 종양형성 장기, 종양세포의 조직학적 소견 등으로 감별진단을 실시하고 있으나 구별이 쉽지 않은 경우도 자주 있다. ALV로 인해 발생한 종양은 B세포 유래로써⁸⁻⁹ 대부분이 T세포 유래인 마력병 종양세포와는 구별이 가능하나 세망내피종 바이러스 유래 종양세포와는 감별이 쉽지 않은 것으로 알려져 있다^{7,10-11}. 본 실험에서 각각의 바이러스로 발생된 종양세포를 대상으로 PCR 방법으로 서로 감별진단을 시도한 결과 각각의 PCR법은 다른 종양세포들과 교차반응없이 특이적인 진단이 가능한 것으로 나타났다. 따라서 이러한 PCR법을 이용하면 야외 종양 발생계에서의 종양감별이 쉬울 것으로 기대된다.

결론

중합효소연쇄반응을 이용하여 닭의 주요 종양성 질병인 마력병, 세망내피종 및 백혈병을 감별진단하기 위하여 각각의 바이러스에 반응하는 primer들을 합성하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 각각의 PCR법은 다른 바이러스들과 교차반응없이 특이적으로 각 바이러스들을 검출할 수 있었다. 또한 마력병 종양세포, 백혈병 종양세포 및 세망내피종 종양세포에서 각각 DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과 서로 교차반응없이 특이적인 검출이 가능한 것으로 나타나 이러한 PCR법을 이용하면 닭의 주요 종양성 질병의 감별진단이 가능한 것으로 나타났다.

참고 문헌

1. Churchill AE, Biggs PM. Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature*, 215:528-530, 1967.
2. Nazerian K, Solomon JJ, Witter RL, et al. Studies on the etiology of Marek's disease. II. Finding of a herpesvirus in cell culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 127:

- 177-182, 1968.
3. Solomon JJ, Witter RL, Nazerian K. Studies on the etiology of Marek's disease. I. Propagation of the agent in cell culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 127: 173-177, 1968.
4. Olson LD. Histopathologic and hematologic changes in moribund stages of chicks infected with T-virus. *Am J Vet Res*, 28:1501-1507, 1967.
5. Taylor HW, Olson LD. Chronologic study of the T-virus in chicks. II. Development of hematologic changes. *Avian Dis*, 17:794-802, 1973.
6. Witter RL, Sharma JM, Fadly AM. Nonbursal lymphomas induced by nondefective reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol*, 15:467-486, 1986.
7. Witter RL, Smith EJ, Crittenden LB. Tolerance, viral shedding, and neoplasia in chickens infected with nondefective reticuloendotheliosis viruses. *Avian Dis*, 25: 374-394, 1981.
8. Cooper MD, Purchase HG, Bockman DE, et al. Studies on nature of the abnormality of B cell differentiation in avian lymphoid leukosis: Production of heterogeneous IgM by tumor cells. *J Immunol*, 113:1210-1222, 1974.
9. Payne LN, Rennie M. B cell antigen markers on avian leukosis tumor cells. *Vet Rec*, 96:454-456, 1975.
10. Neumann U, Witter RL. Differential diagnosis of lymphoid leukosis and Marek's disease by tumor-associated criteria. I. Studies on experimentally infected chickens. *Avian Dis*, 23:417-425, 1979.
11. Fadly AM, Witter RL. Studies of reticuloendotheliosis virus-induced lymphomagenesis in chickens. *Avian Dis*, 27:271-282, 1983.
12. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491, 1988.
13. Silva RF. Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease virus(MDVs) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome. *Avian Dis*, 36:521-528, 1992.

14. Zhu GS, Ojima T, Hironake T, *et al.* Differentiation of oncogenic and nononcogenic strains of Marek's disease virus type 1 by using polymerase chain reaction DNA amplification. *Avian Dis*, 36:637-645, 1992.
15. 성환우, 김재홍, 송창선 등. 重合酵素連鎖反應을 이용한 병원성 마렝병바이러스 검출 및 국내 肉鷄群의 감염실태 조사. *수의과학논문집*, 39:38-44, 1997.
16. Aly MM, Smith EJ, Fadly AM. Detection of reticuloendotheliosis virus infection using the polymerase chain reaction. *Avian Pathol*, 22:543-554, 1993.
17. 성환우, 김선중, 김재홍 등. 細網內皮症 provirus 및 抗原 早期 검출에 관한 연구. *수의과학논문집*, 39:45-53, 1997.
18. 성환우, 김재홍, 송창선 등. Touchdown Polymerase Chain Reaction을 이용한 조류 백혈병 바이러스의 검출. *수의과학논문집*, 39:76-83, 1997.
19. 김재홍, 이우용, 송창선 등. 육계에서의 마렝병 발생 : 일과성 마비. *농업논문집(가축위생편)*, 33:23-32, 1990.
20. 성환우, 김선중, 김재홍 등. 닭 세망내피증의 국내 발생. *농업과학논문집(가축위생)*, 38:707-715, 1996.
21. Akiyama Y, Kato S. Two cell lines from lymphomas of Marek's disease. *Biken J*, 17:105-116, 1974.
22. Hihara H, Shimizu T, Yamamoto H. Establishment of tumor cell lines cultured from chickens with avian lymphoid leukosis. *Natl Inst Anim Health Q(Jpn.)*, 14:163-173, 1974.
23. 성환우, 김선중, 김재홍 등. 국내분리 세망내피증 바이러스의 종양원성. *수의과학논문집*, 39:54-60, 1997.
24. Bradley WG, Hayashi M, Lancz G, *et al.* Structure of Marek's disease virus BamHI-H gene family genes of putative importance for tumor induction. *J Virol*, 63:2534-2542, 1989.
25. Shimotoono K, Mizutani S, Temin HM. Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements. *Nature*, 285:550-554, 1980.
26. Westaway D, Payne G, Varmus HE. Proviral deletions and oncogene base-substitutions in insertionally mutagenized *c-myc* alleles may contribute to the progression of avian bursal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:843-847, 1984.
27. Kaschka-Dierich C, Thomssen R. Studies on the temperature-dependent DNA replication of the herpesvirus of the turkey in chicken embryo fibroblasts. *J Gen Virol*, 45:253-261, 1979.
28. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, *et al.* Disease of Poultry. 9th ed. Iowa State University Press, Ames Iowa, 342-385, 1991.
29. Kanamori A, Nakajima K, Ikuta K, *et al.* Copy number of tandem direct repeats within the inverted repeats of Marek's disease virus DNA. *Biken J*, 29:83-89, 1986.
30. Maotani K, Kanamori A, Ikuta K, *et al.* Amplification of tandem direct repeat within inverted repeat of Marek's disease virus DNA during serial *in vitro* passage. *J Virol*, 58:657-660, 1986.
31. Silva RF, Witter RL. Genomic expansion of Marek's disease virus DNA is associated with serial *in vitro* passage. *J Virol*, 54:690-696, 1985.
32. Hayward WC, Neel BG, Astrin SM. ALV-induced lymphoid leukosis: activation of a cellular onc gene by promotor insertion. *Nature(London)*, 290:475-480, 1981.
33. Payne GS, Courtneidge SA, Crittenden LB, *et al.* Analysis of avian leukosis virus DNA and RNA in bursal tumors : viral gene expression is not required for maintenances of the tumor state. *Cell*, 23:311-322, 1981.
34. Swift RA, Shaller E, Witter RL, *et al.* Insertional activation of *c-myc* by reticuloendotheliosis virus in chicken B lymphoma : Nonrandom distribution and orientation of the proviruses. *J Virol*, 54:869-872, 1985.