

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

张纪元 崔治中* 丁家波 姜世金

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘 要 采用 PCR 方法分 3 段扩增出 J 亚群白血病病毒 NX0101 株的前病毒 cDNA, PCR 产物经克隆后顺次连接, 获得一个含有完整 ALV-J 前病毒 cDNA 的重组质粒, 命名为 pALV-J-NX。将此质粒 DNA 纯化后转染鸡胚成纤维细胞, 以针对 ALV-J 的单克隆抗体 JE9 对转染后的细胞作间接免疫荧光反应, 证明获得了具有感染性的病毒。测定原始野毒和分子克隆化病毒的半数组织感染量 (TCID₅₀), 分别人工接种 1 日龄商品代肉鸡并隔离饲养 17 周。接种野毒组死亡率为 26%, 髓细胞瘤发病率为 24%。接种分子克隆化病毒组死亡率为 22%, 髓细胞瘤发病率为 22%。结果表明, 克隆化病毒具有天然病毒的致病性并对肉用型鸡表现致瘤性。

关键词 J 亚群白血病病毒, 感染性克隆, 致病性

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)03-0437-04

禽白血病病毒 (*Avian leukosis virus*, ALV) 是在鸡群中普遍存在的一群反转录病毒, 鸡的经典白血病主要是由外源性的 A 和 B 亚群引起, 少数由 C 和 D 亚群引起^[1]。蛋鸡群中已基本上消灭了这类经典的外源性 ALV, 鸡群中只有无致瘤性的 E 亚群的内源性 ALV 感染。但在 1988 年, 英国从肉用型鸡群中分离到一株新的禽白血病病毒, 根据病毒干扰和血清中和试验分析确定了该病毒是一类不同于已知的 A-E 亚群的禽白血病病毒, 称之为 J 亚群 (ALV-J)^[2]。随后, 该病毒曾蔓延到所有养鸡国家, 使养鸡业面临一个相当严重的问题。我国直到 1999 年才开始发现和证实 ALV-J 在我国的存在^[3]。

RNA 病毒尤其是反转录病毒的一个非常显著特征就是病毒的 RNA 聚合酶缺乏校对机制, 从而造成遗传上的不稳定性和多样性^[4-6]。对一个高度变异的病毒毒株来说, 无论免疫压力的存在与否, 在传代过程中都可能不断形成遗传变异的毒株, 即分离到的病毒往往形成基因组上不完全相同的群体, 即由不同的“准种” (Quasispecies) 组成的群体。因此, 寻求单一起源的 ALV-J, 对于研究病毒是非常重要的。而反向遗传技术构建的感染性克隆所产生的病毒, 就是这种单一起源的病毒群体。但到目前为止, ALV-J 还只有原型株 HPRS-103 的感染性分子克隆^[7]。本研究则试图从 ALV-J 的中国分离株构建感染性克隆, 并进一步研究分子克隆化病毒在肉用型鸡上的致病性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒种和单克隆抗体 :NX0101^[8,10] 株 ALV-J 是 2001 年由本实验室从宁夏回族自治区某父母代种鸡场分离到, 所用的单克隆抗体为抗 ALV-J 的 gp85 的特异性单克隆抗体 JE9^[9]。

1.1.2 SPF 鸡胚、鸡胚成纤维细胞 (CEF) :SPF 鸡胚 购自济南斯帕法斯家禽有限公司。取孵化至 9~11 日龄的 SPF 鸡胚, 无菌操作取出胚体, 去眼、喙、四肢和内脏, 剪碎, 用 Hank's 液洗涤 3 次, 加入 5mL 0.25% 的胰酶, 37℃ 消化 15~20min, 弃去上清, 吹打分散, 细胞计数, 分装, 置于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养, 待长成单层后接种 NX0101, 继续培养 7~10d 后, 提取组织 DNA。

1.1.3 试剂 :pUC18、PCR Kit、T4 DNA 连接酶、X-Gal、IPTG 等均购于 TaKaRa 公司; FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体购于 Sigma 公司; 脂质体 (Lipofectamine) 购于 Gibco BRL 公司; 质粒纯化试剂盒 Mini Kit 购于 Qiagen 公司; LaSota 株 NDV 弱毒疫苗购于山东齐鲁动物保健品厂; NDV 灭活苗购于梅里亚公司。

1.2 NX0101 株 ALV-J 感染 CEF 中前病毒 cDNA 片段的扩增

CEF 在接种病毒并维持 7~10d 后, 将细胞洗涤后用胰酶消化收获, 抽提, 用乙醇沉淀 DNA 后室温下自然干燥, 溶解于适量 TE 中, 即为样品模板

基金项目 国家自然科学基金 (30270060)

* 通讯作者。Tel 86-538-8241560; Fax 86-538-8241419; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

作者简介 张纪元 (1978-), 男, 山东安丘人, 硕士研究生, 主要从事动物分子病毒学研究。E-mail: amiquezjy@163.com

收稿日期 2004-11-16, 修回日期 2005-02-23

DNA。根据已完成的 ALV-J NX0101 株前病毒基因组的序列,参考 GenBank 原型株 HPRS-103 (Z46390) 的序列,由上海生工生物工程有限公司合成 3 对引物(表 1)。PCR 按常规方法进行,反应体系(50 μ L): 10 \times PCR buffer 5 μ L, dNTP(2.5mmol/L)4 μ L,引物

(25 μ mmol/L)各 2 μ L,模板 DNA 约 20 μ L, *rTaq* 2U。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C 1min, 60 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 3min,进行 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10min 后置 4 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 用于构建质粒 pALV-J-NX 的 PCR 引物序列

Table 1 Primers used to generate plasmid pALV-J-NX

Primer	Sequence	The sites according to HPRS-103	Fragment generated/bp
NXF1	5'-GGCAAGCTTAATGTAGTGTATGCAGTAC-3'	# 1- # 18	
NXR1	5'-CTATAAATTTGTCAAGCGGAGCCCTA-3'	# 2709- # 2684	2709
NXF2	5'-GTAGCTATGGTTAGAGGGAGTATC-3'	# 2635- # 2658	
NXR2	5'-CTCATCTTTCTTAGTCACCTCATC-3'	# 5282- # 5259	2648
NXF3	5'-GTGAAAACAGGGACACTGATA-3'	# 5187- # 5208	
NXR3	5'-GTAGAATTCATGAAGCCTTCGGCTT-3'	# 7841- # 7827	2654

1.3 NX0101 株 ALV-J 前病毒 CDNA 克隆的构建

利用本实验室前期研究中完成的 ALV-J NX0101 株前病毒基因组的序列测定,经 MapDraw 软件对拼接的序列进行分析,发现 *Pst* I 和 *Kpn* I 在全基因组中都仅存在一个位点,所在位置恰好将全基因组分成长度上接近的 3 段(图版 II-A)。合成的引物 NXR1、NXF2、NXR2、NXF3 虽然没有引入酶切位点,但 PCR 产物都跨越了这两个单一酶切位点,即引物 NXF1 和 NXR1 的扩增片段与 NXF2 和 NXR2 的扩增片段的重叠序列之间有 *Pst* I 位点。同样,引物 NXF2 和 NXR2 的扩增片段与 NXF3 和 NXR3 的扩增片段的重叠序列之间有 *Kpn* I 位点。为便于克隆进 pUC18 质粒,在引物 NXF1 中引入 *Hind* III 位点,在引物 NXR3 引入 *Eco* R I 位点。将 NXF3、NXR3 为引物, NX0101 前病毒基因组为模板的 PCR 产物分别用 *Eco* R I 和 *Kpn* I 双酶消化,同法处理质粒 pUC18,经连接和转化后,挑取白色菌落鉴定克隆,将获得的重组质粒命名为 pC。再将 NXF1、NXR1 为引物, NX0101 前病毒基因组为模板的 PCR 产物分别用 *Hind* III 和 *Pst* I 双酶消化,同法处理质粒 pUCC,经连接和转化后,挑取单一菌落鉴定克隆,将获得的重组质粒命名为 p(A+C)。再将 NXF2、NXR2 为引物, NX0101 前病毒基因组为模板的 PCR 产物分别用 *Kpn* I 和 *Pst* I 双酶消化,同法处理质粒 p(A+C),经连接和转化后,挑取单一菌落鉴定克隆,将最后获得的重组质粒命名为 pALV-J-NX,并测序验证。然后该重组质粒经大量培养后,用质粒纯化试剂盒 Mini Kit 纯化,经定量后保存备用。

1.4 细胞的转染

所用 35mm 平皿里预先加上盖玻片,待平皿中 CEF 细胞长满 70%~80% 后进行转染。参照 Gibco BRL 公司 lipfectamine 说明书,取 2 μ g 质粒与 8 μ L 的

lipfectamine 混合于 1mL 不含血清和抗生素的 DMEM 液中,加入平皿中使混合液完全覆盖 CEF 细胞,6h 后,加入等体积的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续生长,待细胞活力恢复后用含 1% 胎牛血清的 DMEM 作为维持液。维持 8d 后取出盖玻片,用丙酮:乙醇(3:2)固定液固定 5min,供检测用。并取上清液接种另一新鲜 CEF 单层(于带盖玻片的平皿中),维持 8d 后按上述方法处理盖玻片,供检测用。

1.5 间接免疫荧光实验(IFA)

吸取 1:500 稀释的 JE9 单克隆抗体,小心加到 1.4 中固定好的盖玻片上,37 $^{\circ}$ C 作用 40min,1 \times PBS 洗涤 3 次。加上 1:120 稀释的 FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体,37 $^{\circ}$ C 作用 40min,1 \times PBS 洗涤 3 次。加一滴 50% 甘油于盖玻片上,在荧光显微镜下观察并拍摄实验结果。

1.6 感染性克隆病毒在细胞上清液中的病毒滴度

取 0.1mL 转染 8d 后的 CEF 的上清液接种新的长成单层的 CEF 2h 后换含 1% 胎牛血清的 DMEM,分别于第 3、6、8、10 天取细胞上清液测定病毒滴度。间接免疫荧光试验(IFA)检测判定结果方法同 1.4 中所述,按照 Reed-Muench 氏法计算病毒的 TCID₅₀。

1.7 感染性克隆化病毒的致病性试验

150 只商品代肉鸡随机分为 3 组,分别于 1 日龄人工接种原始野毒、分子克隆化病毒及空白对照。同时按常规程序进行免疫:7 日龄 LaSota 株 NDV 弱毒疫苗按疫苗使用量点眼、滴鼻各 1 次,同时颈部皮下注射 NDV 灭活苗 0.2mL/只。原始 NX0101 病毒定量为 10^{3.46} TCID₅₀/0.1mL,腹腔接种 0.2mL/只; rNX0101 病毒定量为 5^{4.017} TCID₅₀/0.1mL,腹腔接种 0.2mL/只,对照组腹腔注射等体积无病毒感染的细胞培养液作对照。试验过程中,3 组鸡隔离饲养 4

个月。饲养过程中观测鸡群生长状态并记录死亡鸡数。肉鸡发病死亡后,剖检并记录脏器的病变情况。同时采集死亡鸡的内脏及肿瘤组织,放入 15% 的福尔马林溶液中固定 12h 以上,用乙醇梯度脱水后透明组织,石蜡液透蜡、包埋,切片后苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin)染色。最后,显微镜观察、拍照、记录。另取死亡鸡的肝脏,剪碎后加 5 倍量冰浴的灭菌生理盐水,用无菌研磨器研磨,5000r/min,4℃ 冷冻离心 20min,取上清液,经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌后接种 CEF,37℃ 吸附 2h 后弃掉细胞上清液,用 15% DMEM 2.4% 琼脂糖(3:1)营养琼脂覆盖 CEF。维持 4~5d 后用 IFA 检测病毒蚀斑,方法同 1.5 中所述。

2 结果

2.1 NX0101 株 ALV-J 全基因组 cDNA 重组质粒 pALV-J-NX 的鉴定

分别用 *Hind* III、*Bam* HI、*Pst* I 和 *Kpn* I 单酶消化 ALV-J 全基因组 cDNA 感染性克隆重组质粒 pALV-J-NX 经琼脂糖凝胶电泳检测所有的条带与预期大小一致。使用 M13 Primers M1(引物序列 5'-AGT-CACGACGTTGTA-3') 和 M13 Primers RV(引物序列 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 引物对载体 pUC18 和全基因组 cDNA 接头进行序列测定,证明与 pUC18 连接处的序列分别与 ALV-J 前病毒基因组的 5' 及 3' 端一致。使用引物 NXR1 和 NXF2 对单一酶切位点 *Pst* I 两侧序列进行测定、使用引物 NXR1 和 NXF3 对单一酶切位点 *Kpn* I 两侧序列进行测定,结果均证明所得序列与 ALV-J 基因组相应位置的序列一致。

2.2 重组质粒感染性的鉴定

用重组 pALV-J-NX 质粒 DNA 转染的 CEF 继续培养 8d 后,进行 IFA 检测,一部分转染的细胞显示被 ALV-J 特异性单克隆抗体 JE9 识别的荧光,呈现典型的细胞质染色(图版 II-B-a)。转染后的细胞上清接种新的 CEF,维持 8d 后进行 IFA 检测,同样可见特异的被 ALV-J 特异性单克隆抗体 JE9 识别的荧光(图版 II-B-b)。未转染的对照细胞则检测不到此种荧光(图版 II-B-c)。这表明,不仅经转染的细胞中出现了 ALV-J 特异性抗原,而且转染细胞能产生理想的感染性 ALV-J 病毒释放到细胞培养的上清液中。由此产生的病毒称之为 rNX0101。

2.3 rNX0101 在 CEF 培养液中的滴度

用 rNX0101 感染 CEF 后,分别取第 3 天、第 6 天、第 8 天、第 10 天细胞上清液测定病毒的滴度,在感染后的第 3 天在上清液中尚检不出感染性病毒,

6~8d 可检测到上清液中感染性病毒的滴度从 $10^{0.64}$ TCID₅₀/0.1mL 升高到 $10^{3.04}$ TCID₅₀/0.1mL,在接种后第 10 天,可达 $10^{4.16}$ TCID₅₀/0.1mL。

2.4 感染性克隆化病毒的致病性

人工接种 1 日龄商品代肉鸡后连续观察 17 周。结果表明,接种 rNX0101 的 50 只鸡中,死亡 11 只,死亡率为 22%。其中 9 只出现肝脏肿大、弥漫性灰白色增生性结节等典型的 J 亚群白血病的肿瘤病变。在其组织切片中可见典型的髓细胞样肿瘤细胞,细胞质中含有嗜酸性颗粒,图版 II-C 为接种 rNX0101 后 32 天死亡的肉鸡肝脏肿瘤组织,肝脏组织中存在大小不等的肿瘤结节。另有 2 只死亡鸡虽未见明显肿瘤样病变,但在肝脏组织切片中可见典型的髓细胞样肿瘤细胞结节,髓细胞瘤发病率为 22%。接种 NX0101 的 50 只鸡中,死亡 13 只,死亡率为 26%,髓细胞瘤发病率 24%。另外 50 只对照鸡均未发生死亡,剖检也未见明显病变。此外,从人工接种 rNX0101 组死亡鸡的病变肝脏中仍能分离到 ALV-J 病毒。

3 讨论

反向遗传操作是研究病毒的重要手段,运用感染性分子克隆可以在分子水平上分析和改造病毒基因组,以期对病毒的复制及致病性进行研究。但直到现在,ALV-J 只有原型株 HPRS-103 获得了感染性分子克隆。由于原型株与我国分离的毒株还有遗传学差异,例如 J 亚群白血病中国分离株囊膜糖蛋白 gp85 与原型株 gp85 同源性在 88.9%~94.2%,而且中国株的基因组 E 元件中有 126 个碱基缺失^[10],所以以我国流行毒株为亲本毒,构建拥有自主知识产权的感染性分子克隆,对进一步研究 J 亚群白血病基因组的结构、功能和致病机理具有重要意义。同时,作为一种单一起源且遗传背景清楚的病毒,可以在动物做连续人工感染和再分离病毒实验,在严格的人工控制条件下比较研究宿主免疫反应对病毒演化的作用及其机制,从而为研制这类易突变病毒疫苗提供思路和理论依据。

保持克隆序列的完整性与真实性是构建感染性分子克隆中比较重要的问题,因为在 PCR 反应中 *Taq* 酶具有一定的错配率^[11],回收时在紫外线下切割,限制性内切酶的非特异性切割,质粒在大肠杆菌中的繁殖都有可能使 DNA 发生突变和缺失。如果 DNA 发生致死性突变或缺失,会使质粒不具有感染性。在本研究中,pALV-J-NX 质粒转染 8 天后的 CEF 中可以检测到被 ALV-J 特异性单克隆抗体 JE9

识别的荧光。为了排除质粒在 CEF 中瞬间表达产生的蛋白质和单克隆抗体发生反应,将转染后的 CEF 上清液接种新鲜的 CEF,维持 8d 后用 IFA 技术还可以检测到被 ALV-J 特异性单克隆抗体 JE9 识别的荧光,证明获得了具感染性的活病毒 rNX0101,且在培养液中效价可达到 $10^{4.16}$ TCID₅₀/0.1mL。

为了进一步研究分子克隆化病毒是否具有天然病毒的致病性,在商品代肉鸡上做了致病性试验。接种原始野毒组死亡率为 26%,髓细胞瘤发病率为 24%。接种分子克隆化病毒组死亡率为 22%,髓细胞瘤发病率为 22%。通过对接种 rNX0101 组死亡肉鸡病变组织中病原的分离,确定肿瘤是由病原 rNX0101 引起,表明 rNX0101 仍能引起肉用型鸡发生较高髓细胞瘤。

参 考 文 献

[1] Payne L N ,Fadly A M. Leukosis/Sarcoma group. In :Calnek B W , Barnes H J ,Beard C W ,et al. ed. Disease of Poultry. 10th ed. Ames : Iowas state University Press ,1997 414 - 466.

[2] Payne L N ,Brown S R ,Bumstead N ,et al. A novel subgroup of exogenous *Avian leukosis virus* in chickens. *Journal of General Virology* , 1991 ,72 :801 - 807.

[3] 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. *中国家禽学报* ,1999 ,1 :1 - 4.

[4] Bishop J M. Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann Rev Biochem* , 1983 **52** :301 - 354.

[5] Bowers W J ,Ruddell A. a1/EBP :a leucine zipper protein that binds CCAAT/enhancer elements in the *Vian leukosis virus* long terminal repeat enhancer. *J Virol* ,1992 **66** (11) :6578 - 6586.

[6] Boyce-Jacino M T , Donoghue K O , Faras A J. Multiple complex families of endogenous retrovirus are highly conserved in the genus Gallus. *J Virol* ,1992 **66** :4919 - 4929.

[7] Bai J ,Howes K ,Payne L N ,et al. Sequence of host-range determinants in the env gene of a full length , infectious proviral clone of exogenous *Avian leukosis virus* HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup(designed J). *Journal of General of Virology* , 1995 , **76** :181 - 187.

[8] 崔治中 ,杜 岩 ,张 志. 我国肉用型鸡群中 J 亚群白血病流行现状的调查. *中国预防兽医学报* ,2002 **24** :292 - 294.

[9] Qin A ,Lee L F ,Fadly A M ,et al. Development and characterization of monoclonal antibodies to subgroup J avian leukosis. *Avian Dis* , 2001 **45** :938 - 945

[10] Cui Z Z ,Du Y ,Zhang Z ,et al. 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.

[11] Frohman M A. Rapid amplification of complementary DNA for generation of full-length complementary DNAs thermal RACE. *Methods in Enzymology* ,1993 **218** :340 - 356.

Construction of infectious clone of subgroup J *Avian leukosis virus* strain NX0101 and its pathogenicity

ZHANG Ji-yuan CUI Zhi-zhong* DING Jia-bo JIANG Shi-jing

(College of Animal Science and Technology , Shandong Agricultural University , Tai 'an 271018 , China)

Abstract : By using PCR 3 fragments of provirus cDNA of *avian leukosis virus*(ALV-J) strain NX0101 were amplified from the genomic DNA of ALV-J infected cells ,and then combined in the right direction and sequences into recombinant plasmid pALV-J-NX , containing the whole genome of NX0101. After transfection of chicken embryo fibroblast (CEF) cells with plasmid pALV-J-NX DNA , the rescued virus was identified in CEF by indirect fluorescence antibody test with ALV-J specific monoclonal antibody JE9. The rescued virus could replicate in CEF at a titer of $10^{5.6}$ /mL. The chicken experiment demonstrated that the rescued virus was still able to induce tumors in commercial meat-type broilers.

Key words : Subgroup J *Avian leukosis virus* , Infectious clone , Pathogenicity

Foundation item :Chinese National Natural Science Foundation(30270060)

* Corresponding author. Tel :86-538-8241560 ; Fax :86-538-8241419 ; E-mail : zzcui@sdau.edu.cn

Received date :11-16-2004