

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(9):1264-1272; 4 September 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 致蛋鸡血管瘤 J 亚群禽白血病病毒 cDNA 全序列分析

吴晓平, 秦爱建\*, 钱琨, 金文杰, 邵红霞, 朱钰峰, 沈海玉

(扬州大学兽医学院, 扬州 225009)

**摘要:**【目的】了解近年来我国商品蛋鸡群中以血管瘤为主要表型的 J 亚群禽白血病病毒 (Avian Leukosis Virus subgroup J, ALV-J) 的分子生物学特性, 为控制 ALV-J 在鸡群中流行提供基础资料。【方法】采用 PCR 扩增和序列分析技术, 对分离自血管瘤或者血管瘤与髓样细胞瘤 (Myeloid Leukosis, ML) 并存的 3 株蛋鸡 ALV-J 毒株前病毒 DNA 的全序列及 3 株商品蛋鸡血管瘤型分离毒和 1 株商品蛋鸡 ML 型分离毒的致病关键性序列进行研究。【结果】来自血管瘤或者血管瘤与 ML 并存的商品蛋鸡分离毒株与来自肉鸡分离毒株的全序列差异明显, 在遗传进化树上分属两个大的分支; 研究发现商品蛋鸡血管瘤及 ML 混合病例分离毒 JS09GY3 与 JS09GY6 株的引物结合位点 (Primer Binding Site, PBS)-Leader 中出现极为罕见的连续 19 bp 的插入突变, 其与劳斯相关病毒 1 (Rous Associated Virus type 1, RAV-1)、劳斯相关病毒 2 (Rous Associated Virus type 2, RAV-2) 及劳斯肉瘤病毒施密特-鲁宾二氏 [Rous sarcoma virus (strain Schmidt-Ruppin B), RSV-SRB] 毒株序列相同; 通过对 U3 区调控元件的分析, 发现血管瘤商品蛋鸡病例分离毒 NHH 与 JS09GY5 的 U3 区各发生 1 处连续序列缺失, 出现了极为独特的 c-Est-1、TCF11 及 C/EBP 结合位点, 这些调控元件可能与病毒的致肿瘤特性相关; 所测的 5 株血管瘤商品蛋鸡分离毒均保留完整 E 元件, 而所有肉鸡分离毒的 E 元件均发生了几乎相同的大部分序列缺失; 首次发现血管瘤商品蛋鸡分离毒 JS09GY3 的 E 元件中有 11bp 的连续插入序列。【结论】商品蛋鸡血管瘤型 ALV-J 与肉鸡分离毒在全序列上差异明显, U3、DR1 和 E 元件等区域有一部分特殊的突变与毒株的宿主类型和肿瘤表型有一定关系, 其功能尚需进一步研究。而血管瘤型、髓样细胞瘤型 ALV-J 可能是 ALV-J 与其它反转录病毒的重组毒。

**关键词:** 血管瘤; 蛋鸡; J 亚群禽白血病病毒; 全基因序列分析

**中图分类号:** S852      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1264-09

鸡的禽白血病病毒分为 6 个亚群, A-E 和 J 亚群<sup>[1]</sup>。ALV-J 在世界各国均有发生, 感染造成死亡、肿瘤、生产下降等, 经济损失巨大<sup>[2]</sup>。ALV-J 宿主范围广, 能够感染原鸡、火鸡和 11 个鸡品种<sup>[3]</sup>。病毒在遗传上不稳定, 尤其 SU 变异明显<sup>[4]</sup>。宿主免疫和混合感染等选择压力使病毒变异更为迅速<sup>[5]</sup>。在我国, ALV-J 不断从白羽肉鸡向地方鸡群和蛋用型鸡群扩展<sup>[6-8]</sup>, 肿瘤表型多样<sup>[9-10]</sup>, 其中, 蛋鸡以血管瘤为主要表型并造成流行。ALV-J 不断蔓延可

能与环境和宿主因素相关, 但更重要的是病毒抗原变异使病毒感染特性和宿主范围发生改变。了解我国目前流行于血管瘤商品蛋鸡的 ALV-J 的分子基础, 对于揭示该病的发病机理和提出控制策略具有重要意义。本文对分离于商品蛋鸡血管瘤病例、血管瘤与 ML 并存病例的 ALV-J 毒株以及分离于白羽肉鸡 ML 病例及黄羽肉鸡 ML 病例的 ALV-J 毒株进行了序列比较分析, 探讨了 ALV-J 感染宿主范围扩大、可能致病的分子机理。

**基金项目:** 联合国基金重点项目 (U0831002); 国家行业专项 (200803019); 江苏省高校自然科学重大基础研究项目 (07KJA23021)

\* 通信作者。Tel: +86-514-87979224; E-mail: aijian@yzu.edu.cn

**作者简介:** 吴晓平 (1978-), 女, 山东莱州人, 博士研究生, 主要从事 ALV 研究。E-mail: pingping19781015@yahoo.cn

**收稿日期:** 2010-02-22; **修回日期:** 2010-05-22

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** LA PCR 反应体系、pGEM-T easy vector 购自 Takara 公司, DNA Gel 回收试剂盒购自 Axygen 公司, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  本实验室保存。Eppendorf 台式冷冻离心机, AB 9700 PCR 仪, BIO-RAD PAC200 电泳仪, UVP 凝胶成像系统。

**1.1.2 病毒和细胞:** 本实验室 1999 - 2009 年从多个地区分离的 ALV-J 毒株和参考毒株的背景见表 1, 其中 NHH 与 HN 获赠于华南农业大学廖明教授。5 株白羽肉鸡 ML 型分离毒、1 株黄羽肉鸡 ML 型分离毒和 3 株血管瘤型蛋鸡分离毒共 9 株 ALV-J 进行了全序列测定及分析。4 株蛋鸡分离毒进行了部分序列测定, 其中 HA08 (ML 型)、JS09GY2 (血管瘤型)、JS09GY5 (血管瘤型) 进行了 *env* 及 3'UTR 的序列测定, HN (血管瘤型) 进行了 5'LTR 的序列测定。

表 1 1999 - 2009 年从国内分离的 13 株 ALV-J 及 4 株参考毒株背景

Table 1 Backgrounds of 13 ALV-J isolates in 1999 - 2009 and 4 reference stains

Strains	Year	Province/Country	Host Breed	Tumor Phaenotype	Accession Number
<i>HPRS103</i>	1995	UK	White broiler	- - -	Z46390
<i>ADOL - 7501</i>	2001	USA	White broiler	- - -	AY027920
<i>NX0101</i>	2001	Ningxia (宁夏)	White broiler	- - -	DQ115805
<b>YZ9901</b>	1999	Jiangsu (江苏)	White broiler	ML	- - -
<b>YZ9902</b>	1999	Jiangsu (江苏)	White broiler	ML	HM235670
<b>SD9901</b>	1999	Shandong (山东)	White broiler	ML	- - -
<b>NM2002 - 1</b>	2002	Inner Mongolia (内蒙)	White broiler	ML	HM235669
<b>JS-nt</b>	2003	Jiangsu (江苏)	White broiler	ML	HM235667
<b>HAY013</b>	2008	Jiangsu (江苏)	local "yellow"	ML	HM235665
<i>SD07LK1</i>	2007	Shandong (山东)	Commercial layer	- - -	FJ216405
HN *	2007	Hainan (海南)	Commercial layer	Hemangioma	HM235666
<b>NHH</b>	2007	Henan (河南)	Commercial layer	Hemangioma	HM235668
HA08	2008	Jiangsu (江苏)	Commercial layer	ML	HM235664
<b>JS09GY3</b>	2009	Jiangsu (江苏)	Commercial layer	ML + Hemangioma	GU982308
<b>JS09GY6</b>	2009	Jiangsu (江苏)	Commercial layer	ML + Hemangioma	GU982310
JS09GY2	2009	Jiangsu (江苏)	Commercial layer	ML + Hemangioma	GU982307
JS09GY5	2009	Jiangsu (江苏)	Commercial layer	ML + Hemangioma	GU982309

Reference strains showed as italic. The strains determined for the full-length sequences in this study indicated as bold. The strains for *env* and 3'UTR sequence showed as general style. "\*" means the strain was examined for 5'LTR.

**1.1.3 引物设计:** 根据 HPRS103 原型毒株的全序列, 设计引物, 将前 cDNA 分为末端相互交叠的 3 段, 将这 3 段序列分别命名为 A、B、C。前 cDNA 全

序列分段扩增引物序列见表 2。引物由上海申能博彩公司合成。

表 2 全序列扩增引物设计

Table 2 The primers for the full-length cDNA of ALV-J

Primers (Location)	Primer sequence (5'→3')	Size/bp	Restriction site
AF(1)	GCCAGCTGTGTAGTGTATGCAATACTCTT	2552bp	<i>Pvu</i> II
AR(2534 - 2554)	GCATGGGAATTCCTCCCTCCTA		<i>Eco</i> RI
BF(2543 - 2562)	CGAATTCCTCCATGCGAAAATCT	2721bp	<i>Eco</i> RI
BR(5245 - 5263)	CTTGATCATCCTTTGGGTGATGT		-
CF(5104-5125)	AGGTCGACCCCGGTTAAGATACGAAT	2737bp	<i>Sal</i> I
CR(7841 - 7818)	GAATTCTGAAGCCATCGCTTCATGCAGGT		<i>Eco</i> RI

### 1.2 病毒前 cDNA 全序列扩增和测序

**1.2.1 PCR 扩增全序列:** 以接种感染 ALV-J 后维持培养 7 - 10 d 的 DF1 细胞基因组作为模板, 50  $\mu$ L 体系进行 PCR 扩增, 分别加入 10  $\times$  LA Buffer ( $Mg^{2+}$  plus) 5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol each/L) 4  $\mu$ L, 上下游引物 (25 pmol) 各 1  $\mu$ L, LA Taq 酶 0.5  $\mu$ L, 模板

(100 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 加 ddw 补足 50  $\mu$ L。

A 段反应程序 (Touchdown PCR): 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 进入主循环, 95 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 每个循环降 1 $^{\circ}$ C, 直至退火温度为 50 $^{\circ}$ C, 95 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。B 段和 C 段反应程序: 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 进入主

循环, 95°C 1 min, 50°C 2 min, 72°C 3 min, 30 个循环, 72°C 延伸 10 min。

**1.2.2 全序列测定:** 上述 PCR 产物经电泳检测后, 用 Axygene DNA Gel 回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收, 具体步骤按照产品说明; 回收的片段连接 pGEM T Easy 载体, 转化大肠杆菌 DH5a, 每个毒株的每个片段随机挑选 2 个阳性克隆送上海英骏生物有限公司测序, 以排除 PCR 过程中引起的错配。运用 DNASTar 进行序列拼接、比对及分子遗传进化分析。应用 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 序列数据库 (<http://www.genomes.ad>)<sup>[11]</sup> MOTIF 检索分析服务系统, 对 ALV-J 的 U3 转录调控区、DR1 及 E 元件中的作用元件进行定位分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 全序列分析

9 株 ALV-J 毒株与 4 株参考毒株的前病毒 DNA

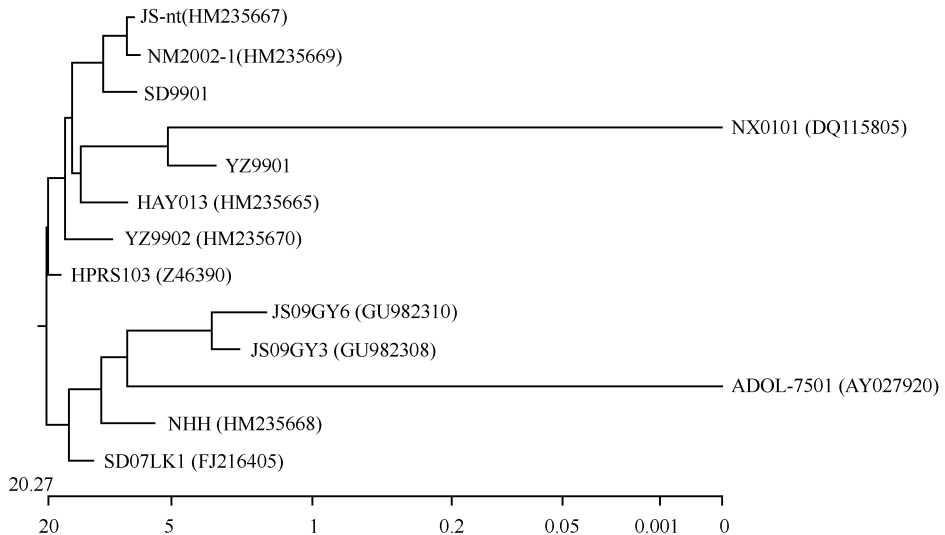


图 1 不同来源 ALV-J 毒株全序列遗传进化树分析

Fig. 1 The phylogenetic tree analysis of the complete sequences of ALV-J strains. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The scale bar indicates substitutions per nucleotide position. The isolates are bold, others are the reference strains.

JS09GY5 和 JS09GY6) 的 LTR 分析可见: 1999、2002 - 2003、2007 - 2008、2009 年分离的毒株与原型毒 HPRS103 的同源性的平均值分别为 97.5%、97.8%、94.1% 和 93.2%, 而肉鸡分离毒与原型毒 HPRS103 的同源性平均为 97.3%, 蛋鸡分离毒与原型毒 HPRS103 的同源性平均为 94%。

R 区在 LTR 中最保守, 除了血管瘤蛋鸡分离毒 NHH 在 R 区第 13 位发生 C-T 突变, 其它毒株序列完全相同。U5 区相对保守, 所测病毒及 HPRS103 相互之间的同源性为 98.0% - 100%。而 U3 区变

全序列的遗传进化树分析见图 1。由图可见, 商品蛋鸡分离株 ALV-J (血管瘤型 JS09GY3、JS09GY6、NHH 和 ML 型 SD07LK1) 和肉鸡 ALV-J (HPRS103、YZ9901、YZ9902、SD9901、JS-nt、NM2002-1、NX0101 和 HAY013) 明显分属于两个大的分支, 两个分支之间的同源性在 94.4% - 96.1% 之间, 遗传距离较远。

同时可见: 中国肉鸡分离毒株相互之间的遗传距离较近, 分布在肉鸡分离毒大分支中与原型毒平行的群组中。而中国血管瘤商品蛋鸡分离株与 USA 肉鸡分离毒株 ADOL-7501 位于同一群组中, ADOL-7501 是变异性极强的毒株, 在多个研究中证实与中国肉鸡分离毒株同源性很低<sup>[12-13]</sup>, 中国蛋鸡分离毒可能来源于引进的美国白羽肉用型种鸡。

### 2.2 非编码区序列分析

**2.2.1 U3 在 LTR 中保守性最低:** 对 13 株分离毒 (SD9901、YZ9901、YZ9902、NM2002-1、JS-nt、HAY013、NHH、HN、HA08、JS09GY2、JS09GY3、

异相对较大, 多个毒株有不同程度的缺失和替换突变, 其中较为突出的是: 商品蛋鸡单纯血管瘤病例分离毒 NHH 的 U3 区在相对于原型毒 HPRS103 U3 区的第 108 - 118 位缺失 11 个连续的碱基; 商品蛋鸡血管瘤与 ML 病例分离毒 JS09GY5 在原型毒的 U3 区域第 6 - 15 位缺失 10 个碱基的重复序列。

从 U3 区的遗传进化树分析(图 2)可见: 所测 6 株中国肉鸡分离毒在进化树中位于同 1 个较为独立的群组中, 保守性较强, 呈现出毒株遗传地位与宿主品种之间的相关性; 商品蛋鸡血管瘤型分离株 HN

和商品蛋鸡 ML 型分离毒 HA08 毒株与多数的 USA 参考毒株划分为 1 个单独的分支; 而 5 株商品蛋鸡血管瘤相关病例分离毒包括 NHH、JS09GY2、

JS09GY3、JS09GY5 和 JS09GY6 则分为另外 1 个相对独立的小分支, 表现出遗传地位与宿主类型及临床肿瘤类型之间的相关关系。

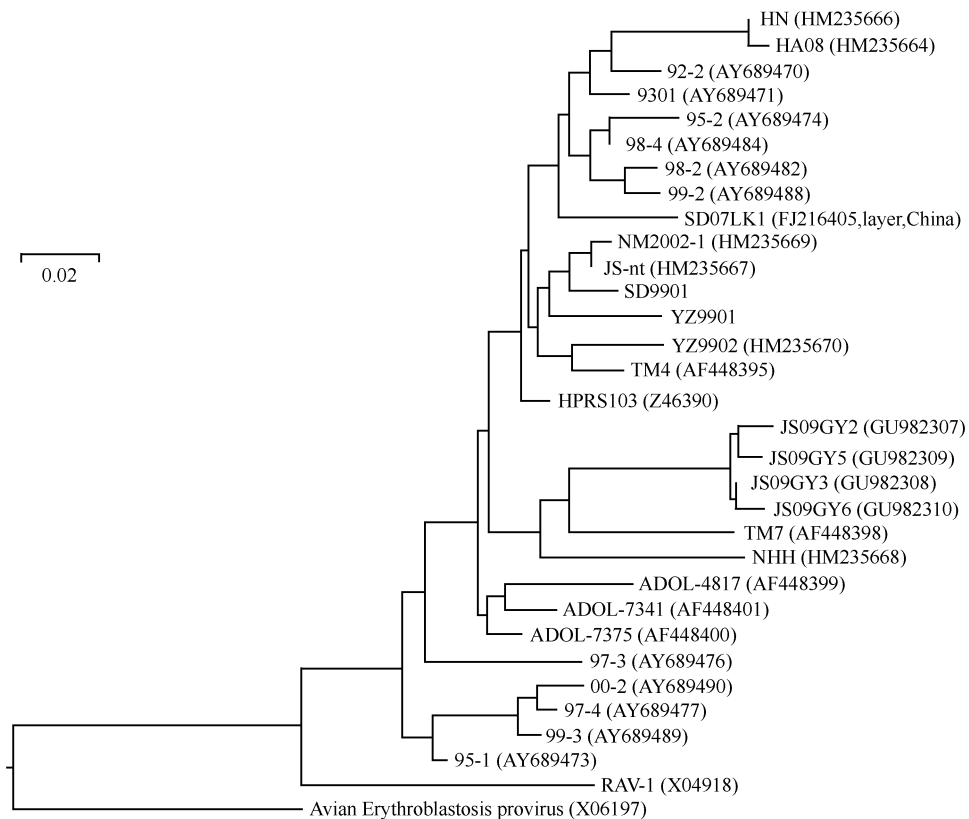


图 2 U3 区遗传进化树分析

Fig. 2 The phylogenetic tree of the U3 region of ALV-J strains. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position. The isolates are bold, others are the reference strains.

**2.2.2 U3 潜在转录因子结合位点分析:** 通过 KEGG/MOTIF 数据库对所测的 13 株 ALV-J 及 4 株参考毒株 (HPRS103、SD07LK1、NX0101 和 ADOL-7501) U3 区顺式作用元件分布模式进行定位分析鉴定 (图 3), 结果共鉴定出 23 - 34 个不等的有效顺式作用元件, 其中包括转录结合因子 NF-Y、Oct-1、c-Ets-1、C/EBP、TCF11、GKLF Motif、Lmo2; 此外还发现 HSF、GATA-1 和 GATA-2 等反式作用因子特异结合位点。

值得注意的是, 商品蛋鸡单纯血管瘤型分离毒 NHH 和商品蛋鸡血管瘤与 ML 型分离毒 JS09GY2、JS09GY3、JS09GY5 和 JS09GY6 毒株的 U3 区中含有多个独特的顺式作用元件, 而同时缺失某些在肉鸡分离毒中较为保守的结合位点。NHH 和 JS09GY2 在 U3 区域的第 172 - 182 位含有 1 个独特的 c-Ets-1 顺式作用元件, 而其它毒株中未发现此结合位点; NHH、JS09GY2、JS09GY3 和 JS09GY6 均在 U3 区域的第 7 - 20 位具有 1 个特殊的 C/EBP 结合位点, 除了在原型毒中亦存在此位点之外, 在其它毒株中没

有发现; JS09GY2、JS09GY3、JS09GY5 与 JS09GY6 的 U3 区内含有其它毒株所不具备的调控元件 TCF11; 而 NHH、JS09GY2、JS09GY3、JS09GY5 和 JS09GY6 均不含商品肉鸡分离毒所具备有 GKLF 结合位点。所测的 6 株血管瘤商品蛋鸡分离毒除了 NHH 之外, 均缺失 Lmo2 结合位点, 而肉鸡分离毒均保守含有此结合位点。

**2.2.3 PBS-Leader 分析:** PBS-leader 在多数毒株中高度保守, 除了商品蛋鸡血管瘤相关毒株 (包括 JS09GY3、JS09GY6 和 NHH) 之外, 其他毒株不论其分离时间与分离宿主的差异, 同源性均在 95.7% - 100%。

商品蛋鸡血管瘤病例分离毒 NHH 的 leader 序列发生了 1 处 AT 插入突变和多处点突变, 与其他毒株差异较大, 同源性低至 90.0% - 92.1%。商品蛋鸡血管瘤与 ML 混合病例分离毒 JS09GY3 与 JS09GY6 的 PBS-Leader 序列与其他毒株不同, 在相对于 HPRS103 的 574 - 575 位之间插入了 1 段 19 bp 的序列: 5'-GCGCGTTCCGTTGCTCT-3'。通过

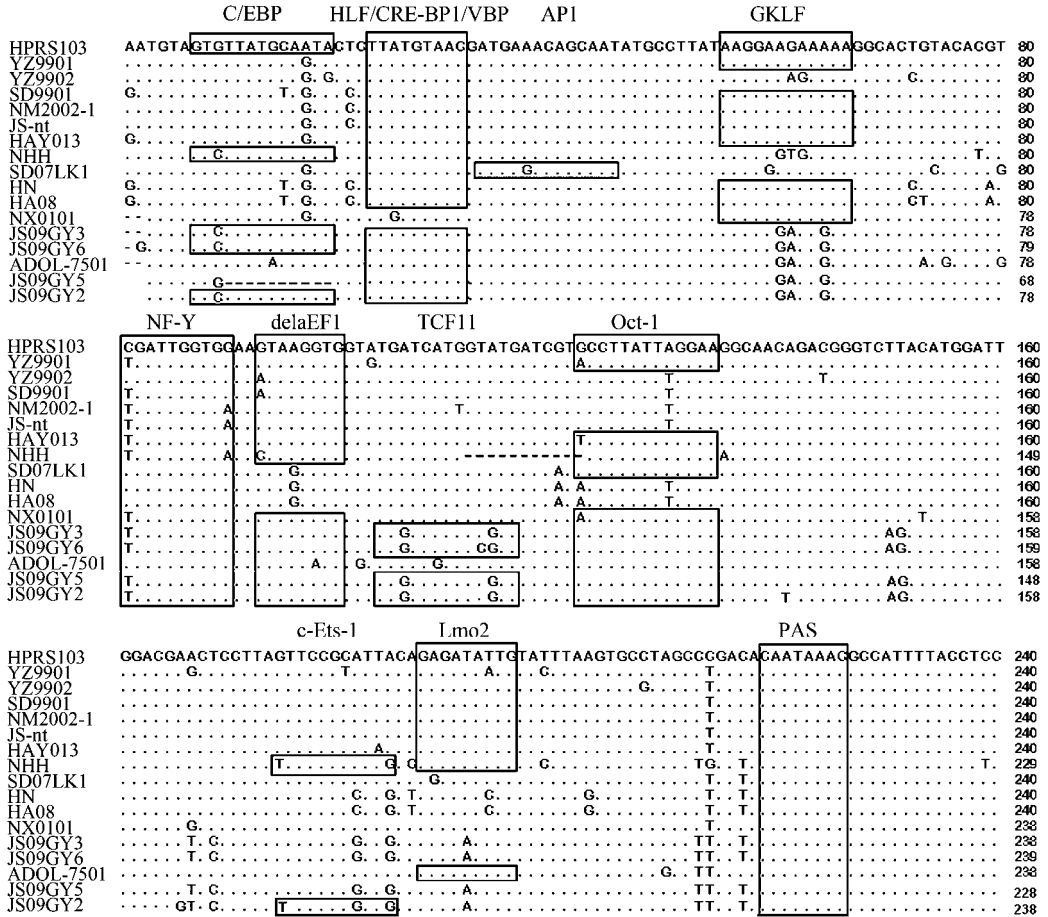


图3 U3区 Motif 分析

Fig. 3 Motif analysis of U3 region. Bases deletions showed as “-” and nucleotide same to HPRS103 indicated as “.”. Motifs were indicated in panes.

BLAST 分析,发现这段序列也存在于 RAV-1、RAV-2 及 RSV-SRB 等毒株中,JS09GY3 与 JS09GY6 的 PBS-Leader 与这 3 种病毒的同源性高达 93%,而与 ALV-J 原型毒 HPRS103 的同源性则仅为 89.8%。这说明了这 2 株病毒可能是 ALV-J 与这几种病毒中的某 1 种的重组体(图 4),这种 PBS-Leader 序列的重组方式尚属首次报道。

**2.2.4 Non-functional TM 分析:** Non-functional TM 区域中各毒株含有不等的缺失,99 年分离的毒株 YZ9901、YZ9902、SD9901 与原型毒同源性较高;而 02 年和 03 年分离的毒株 NM2002-1、JS-nt 缺失则多于上述毒株;07 年分离的 ALV-J SD07LK1 只剩下 96 个碱基,08 年分离的 NHH 及 09 年分离的 JS09GY2、JS09GY3、JS09GY5 和 JS09GY6 的 Non-functional TM 只剩下 6 个碱基。由此可见,随着毒株分离时间的推移,ALV-J 的 Non-functional TM 呈现出消减的趋势,直至几乎消失。

**2.2.5 DR1 序列分析:** DR1 在所有毒株中均保守存在,没有任何的缺失、插入突变,只在固定的几个

位点上发生点突变(图 5)。值得注意的是,分离自同品种的毒株其点突变往往一致:肉鸡分离毒第 16、17、21、48、49、83、89 位均发生点突变;血管瘤商品蛋鸡分离株发生点突变的位点为第 19 和 51 位。

通过同源性分析可知,血管瘤商品蛋鸡分离株 NHH、JS09GY2、JS09GY3、JS09GY5、JS09GY6 和 SD07LK1 的 DR1 与原型毒的 DR1 同源性最高,分别是 98.9%、95.7%、95.7% 和 93.5%。而肉鸡分离毒与原型毒 HPRS103 同源性均较低,在 89.2 - 90.3% 之间,然而各株肉鸡分离毒之间的同源性高达 98.9% - 100%。根据 Motif 分析,可见 DR1 中含有 v-Myb 结合位点、cap、MZF1 等转录调控因子的粘着点,而且这几个结合位点在多数毒株中保守存在,可能参与病毒转录、复制等过程。

**2.2.6 E element 分析:** E 元件序列同源性分析见图 6。血管瘤商品蛋鸡源(JS09GY3、JS09GY6 和 NHH)的 E 元件与原型毒的同源性高达 96%,但 JS09GY3 的 E 元件发生了明显的 11bp 的连续序列插入,这种明显的插入突变在 ALV-J 中尚属首次发

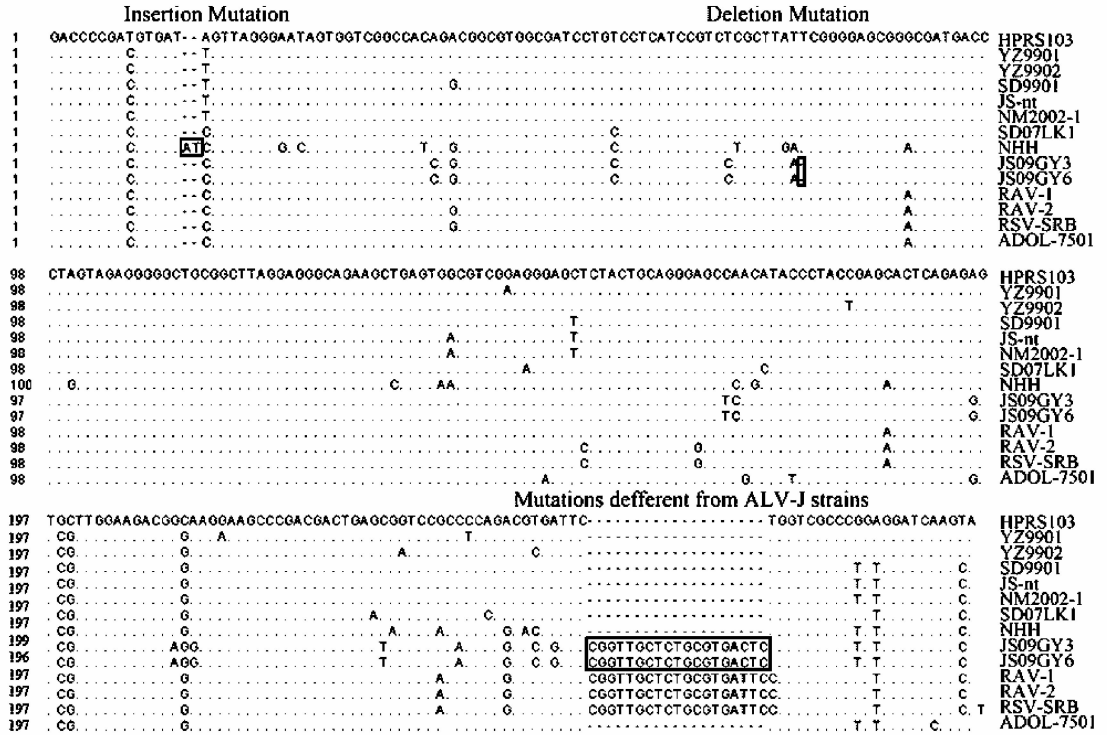


图 4 PBS-Leader 序列分析

Fig. 4 Alignment of PBS-Leader sequences. Bases deletions showed as “-” and nucleotide same to HPRS103 indicated as “.”. Mutations were indicated in panes.

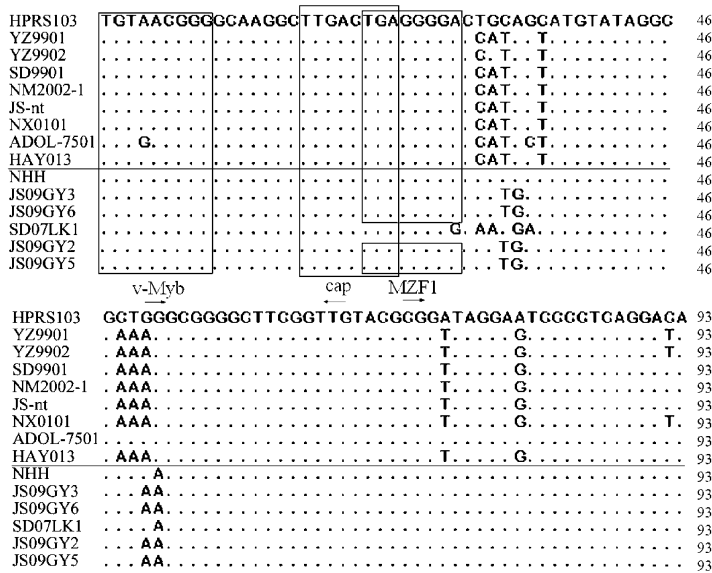


图 5 DR1 序列分析

Fig. 5 Alignment of DR1 sequences. Bases same as prototype strain showed “.”, strain beyond line were isolates from broilers and strains from layer chickens under the line. Motifs were indicated in panes.

现。而分离自感染肉鸡的 ALV-J 毒株均发生相同的缺失,只保留了 23 个碱基的保守序列。蛋鸡分离毒 JS09GY2、JS09GY3、JS09GY5 与 JS09GY6 株的 E 元件在第 30 位上缺失“C”,从而产生了 1 个独特的 c-Ets-1 调控元件,而其它毒株中未发现。

2.2.7 gag、pol、env 序列分析: 所测毒株及原型毒

HPRS103 相互之间的 gag 基因的核苷酸序列同源性在 94.8% - 99.9% 之间,而氨基酸同源性在 96.3% - 99.6% 之间。pol 基因核苷酸同源性为 97.9% - 99.0%,氨基酸同源性在 98.2% - 99.5% 之间,保守性极强。

12 个所测毒株与参考毒株 HPRS103 之间的

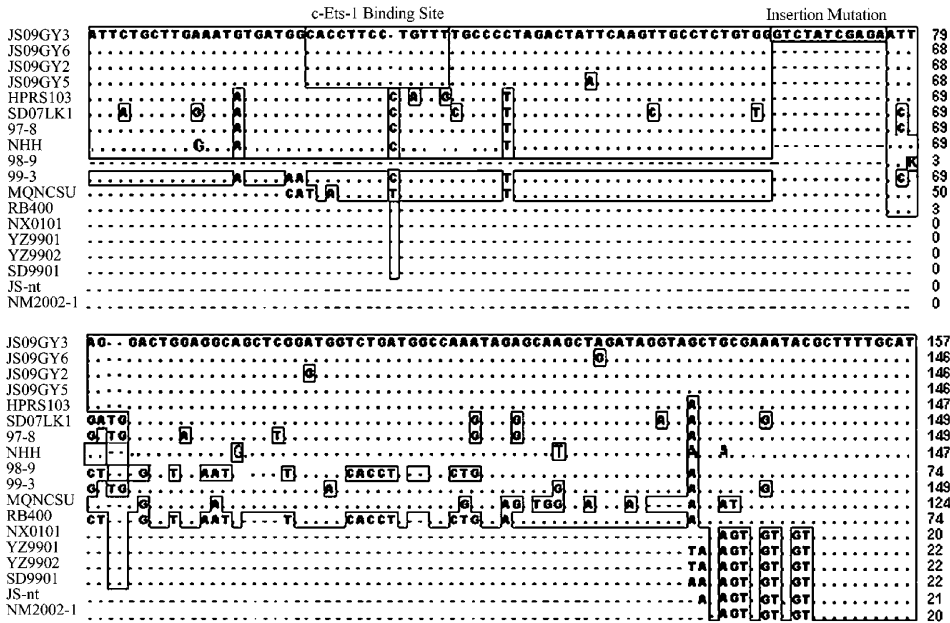


图6 E元件序列分析

Fig. 6 Alignment of E element. Sequences same to JS09GY3 showed as “.”, deletion sequence showed “-”.

*gp85* 核苷酸序列同源性在 88.7% - 95.2% 之间波动。值得注意的是,蛋鸡分离的 ALV-J 包括 NHH、JS09GY3、JS09GY5 和 JS09GY6 均发生了 1 - 2 处氨基酸的缺失突变。NHH 的 *gp85* 蛋白中的氨基酸缺失与多株黄羽肉鸡分离毒的氨基酸缺失相同,如 NHH 在 129 位缺失天冬酰胺 (N),黄羽肉鸡源 ALV-J GD0512、GD0510A 等毒株在 SU 的第 129 位也均发生相同的氨基酸缺失;同时,NHH 在 183 位还发生了精氨酸 (R) 缺失,发生相同缺失的还有黄羽肉鸡分离毒 GD06SL1、GD06SL3 和 GD06SL4。然而,血管瘤商品蛋鸡分离毒 ALV-J JS09GY3、JS09GY5 与 JS09GY6 *gp85* 蛋白的第 179 位缺失赖氨酸 (K),这种缺失在其它的白羽肉鸡源 ALV-J SU 中较为罕见。

### 3 讨论

ALV-J 可以感染所有品种鸡,但是不同品种鸡感染后产生肿瘤的类型和比例却差异显著。Susan M. Williams 等以 ADOL-Hc1 感染 SPF 来杭鸡,主要引起淋巴细胞白血病和血管瘤<sup>[10]</sup>。杜岩等对 4 株中国分离毒株分别接种 11 日龄的 SPF 鸡胚进行人工致病性试验没有发现孵出鸡发病,说明蛋鸡感染 ALV-J 及肿瘤表型与病毒特性有关。事实上,在 2004 年前临床上没有发现蛋鸡感染 ALV-J 产生的肿瘤。然而,近年来 ALV-J 在蛋鸡中呈流行趋势,某些鸡场血清学检测阳性率达到了 10% - 25%,而其中以血管瘤为主要症状的病例占到 50%<sup>[7]</sup>,因此,分析不同来源 ALV-J 核酸序列,有助于揭示 ALV-J

致蛋鸡血管瘤及多种肿瘤表型的分子机理。

本研究中通过分离自不同时间、不同地域、不同品种宿主的多株病毒的前病毒 cDNA 的序列比对,发现血管瘤商品蛋鸡分离毒 ALV-J 发生了较大变异,主要变异集中在 *gp85*、U3、E element、non-functional TM,多个毒株发生了程度不同的序列缺失突变及插入突变,且变异毒株之间的这几个序列的同源性多与宿主品种或分离时间相关联;其次是 U5、*gp37* 和 Leader 以及 *gag* 基因,保守性最高的是 R 和 *pol* 基因。从全序列的遗传发育树分析可见,肉鸡源 ALV-J 和血管瘤商品蛋鸡源 ALV-J 差异明显,可能分别来自于两个不同的来源。

反转录病毒的基因具有不稳定性,进化迅速<sup>[14]</sup>。ALV-J 与其他的反转录病毒重组多见于 3'UTR 的上游序列<sup>[15-16]</sup>。本研究发现蛋鸡血管瘤分离毒 JS09GY3 及 JS09GY6 的 PBS-Leader 序列中相对于 ALV-J 原型毒有 1 段 19bp 的插入性突变,而这段序列只在 RAV-1、RAV-2 及 RSV-SRB 的 Leader 序列中具备,说明这两株病毒可能是 ALV-J 与这种反转录病毒的重组体。有资料表明,ALSV 的 5' leader 对病毒基因 RNA 的包装效率产生影响<sup>[17]</sup>,特别影响到病毒的转录与复制,并决定病毒毒力与组织嗜性<sup>[18-19]</sup>,本研究发现致蛋鸡血管瘤 ALV-J 的突变,可能与病毒的致病性相关。

LTR 中 U3 区对肿瘤的类型和发生中有重要影响和作用,ALV 和 RSV 的 LTRs 是强转录增强子和启动子单位,可以在许多细胞类型中利用细胞内的转录因子达到高水平的转录。分析发现蛋鸡血管瘤

相关的 ALV-J 毒株的 U3 区中含有几个独特的结构域, C/EBP、c-Ets-1 和 TCF11, 分别和病毒转录、血管上皮分化及肿瘤转移有关。C/EBP 结合域存在可能会导致 C/EBP 与 NF- $\kappa$ B 相互作用从而引起转录激活<sup>[20]</sup>。原癌基因 c-Ets-1 主要表达于癌细胞和血管内皮细胞, 是与肿瘤血管发生和侵袭转移有关的转录因子<sup>[21]</sup>, 因此, 商品蛋鸡血管瘤相关病例含有这些结合位点可能会对病毒的致病性及致癌性产生影响。

E 组分过去仅发现于有复制能力的急性转化性肉瘤病毒 RSVs<sup>[22]</sup>, 在病毒演化过程中, E 元件发生不同程度的缺失, Zavala G 等研究发现, 在其所研究的毒株中有大于 50% 的毒株存在 E 元件部分序列缺失现象, 但可能不会影响毒株的致癌性<sup>[23]</sup>。同时, 有实验证实, E 元件缺失对于病毒对 O 系鸡的致病性没有影响, 但是却会降低病毒在 15I 系鸡中的复制能力<sup>[24]</sup>。本研究发现大部分蛋鸡分离毒中 E 元件完整, 仅 JS09GY3 的 E 元件发生了连续 11 个碱基的插入突变, 而在肉鸡分离毒中 E 元件则发生了程度不一的缺失, 多数只剩下了 23 个碱基的序列。临床引起蛋鸡血管瘤与 ML 并发的毒株 JS09GY3 与 JS09GY6<sup>[25]</sup> 的 E 元件中含有 1 个 c-Ets-1 调控元件, 而这一调控元件在蛋鸡血管瘤毒株 NHH 的 U3 区中也存在, 这可能与病毒致血管瘤的特性相关。

## 参考文献

- [ 1 ] Payne LN. HPRS-103: a retrovirus strikes back. The emergence of subgroup J avian leukosis virus. *Avian Pathology*, 1998, 27: 36-45.
- [ 2 ] Bai J, Howes K, Payne LN, Skinner MA. 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 (designated J). *Journal General Virology*, 1995, 76: 181-187.
- [ 3 ] Payne LN, Howes K, Gillespie AM, Smith LM. Host range of Rous sarcoma virus pseudotype RSV (HPRS-103) in 12 avian species: support for a new avian retrovirus envelope subgroup, designated J. *Journal General Virology*, 1992, 73 (11), 2995 - 2997.
- [ 4 ] Silva RF, Fadly AM, Hunt HD. Hypervariability in the envelope gene of subgroup J avian leucosis virus obtained from different farms in the United States. *Viology*, 2000, 272 (1): 106-111
- [ 5 ] Wang Z, Cui Z. Evolution of gp85 gene of subgroup J avian leukosis virus under the selective pressure of antibodies. *Science in China: Series C Life Sciences*, 2006, 49 (3): 227-234.
- [ 6 ] Xu B, Dong W, Yu C, He Z, Lv Y, Sun Y, Feng X, Li N, Lee LF, Li M. Occurrence of avian leukosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China. *Avian Pathology*, 2004, 33 (1): 13-17.
- [ 7 ] 齐新永, 孙泉云, 陈关明. 上海地区蛋鸡 J 亚群禽白血病的血清学调查. 动物医学进展 (*Progress of Veterinary Medicine*), 2007, 28 (11): 110-111.
- [ 8 ] 郭桂杰, 孙淑红, 崔治中. J 亚群禽白血病病毒蛋鸡分离株 SD07LK1 全基因组核苷酸序列的比较分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49 (3): 400-404.
- [ 9 ] 成子强, 张利, 刘思当, 张玲娟, 崔治中. 中国麻鸡中发现禽 J 亚群白血病. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45 (4): 584-588.
- [ 10 ] Williams SM, Reed WM, Bacon LD, Fadly AM. Response of white leghorn chickens of various genetic lines to infection with avian leukosis virus subgroup J. *Avian Diseases*, 48 (1): 61-67.
- [ 11 ] Kanehisa M, Goto S. Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28 (1): 27-30.
- [ 12 ] 张小桃, 卢受昇, 张贺楠, 陈平洁, 赖汉漳, 廖明, 曹伟胜. J 亚群禽白血病病毒 SCAU-0901 株的分离鉴定. 中国兽医科学 (*Veterinary Science in China*), 2009, 39(8): 674-678.
- [ 13 ] 吴永平. 中国株 J 亚群禽白血病病毒全基因组序列的测定与分析. 山东农业大学的学位论文, 2004 年.
- [ 14 ] Nichol S. RNA viruses. Life on the edge of catastrophe. *Nature*, 1996, 384: 218-219.
- [ 15 ] Gingerich E, Porter RE, Lupiani B, Fadly AM. Diagnosis of myeloid leukosis induced by a recombinant avian leukosis virus in commercial white leghorn egg laying flocks. *Avian Diseases*, 2002, 46: 745-748.
- [ 16 ] Lupiani B, Pandiri AR, Mays J, Hunt HD, Fadly AM. Molecular and biological characterization of a naturally occurring recombinant subgroup B avian leukosis virus with a subgroup J-like long terminal repeat. *Avian Diseases*, 2006, 50: 572-578.
- [ 17 ] Donze O, Spahr PF. Role of the open reading frames of Rous sarcoma virus leader RNA in translation and genome packaging. *EMBO Journal*, 1992, 11: 3747-3757.
- [ 18 ] Brown DW, Robinson HL. Influence of env and long terminal repeat sequences on the tissue tropism of avian leukosis viruses. *Journal of Virology*, 1988, 62: 4828-4831.
- [ 19 ] Chesters PM, Howes K, Petherbridge L, Evans S, Payne LN, 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. *Journal General Virology*, 2002, 83: 2553-2561.
- [ 20 ] Sears RC, Sealy L. Multiple forms of C/EBP $\beta$  bind the EFII enhancer sequence in the Rous sarcoma virus long terminal repeat. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14: 4855-4871.



- [21] Khatun S, Fujimoto J, Toyoki H, Tamaya T. Clinical implications of expression of ETS-1 in relation to angiogenesis in ovarian cancers. *Cancer Science*, 2003, 94: 769-773.
- [22] Bai J, Payne LN, Skinner MA. 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. *Journal of Virology*, 1995, 69: 779-784.
- [23] Zavala G, Cheng S, Jackwood MW. Molecular epidemiology of avian leukosis virus subgroup J and evolutionary history of its 3' untranslated region. *Avian Diseases*, 2007, 51 (4): 942-953.
- [24] Wei Guo, Stanley CW, C Martin Stoltzfus. Selective Inhibition of Splicing at the Avian Sarcoma Virus src 3' Splice Site by Direct-Repeat Posttranscriptional cis Elements. *Journal of Virology*, 2000, 74 (18): 8513-8523.
- [25] 吴晓平, 钱琨, 沈海玉, 王平平, 邵红霞, 金文杰, 秦爱建. 商品蛋鸡血管瘤和髓细胞瘤型J亚群禽白血病的分子诊断及病理学研究. *中国动物传染病学报* (*Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*), 2009, 17(3):33-38.

# Full-length cDNA sequence analysis of avian leukosis viruses subgroup J isolated from chickens with clinical hemangioma

Xiaoping Wu, Aijian Qin<sup>\*</sup>, Kun Qian, Wenjie Jin, Hongxia Shao, Yufeng Zhu, Haiyu Shen

**Abstract:** [ **Objective** ] To understand the molecular characteristics of subgroup J Avian Leukosis Viruses (ALV-J) isolated from chickens with clinical hemangioma, as well as to get more information for controlling the spread of ALV-J in layer chickens flocks. [ **Method** ] We amplified the full-length viral cDNA sequences of three layers isolates associated with simple hemangioma or coexisting of hemangioma and myeloid leukosis (ML) by PCR. We also obtained some partial sequences of three layer isolates related to hemangioma and one layer isolate from ML case. Then we analyzed and compared the sequences by using DNASTAR software. [ **Results** ] The phylogentic analysis showed the significant differences in the complete sequences between isolates from layer hemangioma cases and from broilers, which were grouped to two branches in the phylogenetic tree. We noted a special 19bp insertion mutation in Primer Binding Site (PBS)-Leader sequences in both JS09GY3 and JS09GY6 isolates from layer chickens with hemangioma and ML, which sequence was same to Rous Associated Virus type 1 (RAV-1), Rous Associated Virus type 2 (RAV-2) and Rous sarcoma virus (strain Schmidt-Ruppin B) (RSV-SRB). In addition, different continuous sequences deletions were found in the U3 regions of NHH and JS09GY5. By motif analysis, we found some distinct motifs including c-Est-1, TCF11 and C/EBP only in the isolates from layers with hemangioma. The five isolates associated with layer hemangioma exhibited intact E element sequences but almost identical substantial deletion was found in all Chinese broiler isolates. An 11bp continuous nucleotide insertion in the E element of JS09GY3 was found. [ **Conclusion** ] Isolates from layer showing hemangioma and broilers exhibited evident difference. We found some special mutation sites in U3, DR1 and the E element showed some potential relationship with the host breeds and the tumor phenotype, which function needs to be investigated in future. The isolates from layer cases with coexisting of hemangioma and ML were the recombinants of ALV-J and other retroviruses.

**Keywords:** hemangioma; layer chicken; Avian leukosis virus subgroup J; sequences analysis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China and Guangdong province (U0831002), the R&D Special Foundation for Public Welfare Industry (200803019) and the Major Basic Research of Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (07KJA23021).

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-514-87979224; E-mail: aijian@yzu.edu.cn

Received: 22 February 2010/ Revised: 22 May 2010