

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

郭桂杰, 孙淑红, 崔治中*

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要 【目的】分析我国 ALV-J 蛋鸡分离株的来源和进一步演变趋势。【方法】以 J 亚群禽白血病病毒(ALV-J)蛋鸡分离株 SD07LK1 感染的鸡胚成纤维细胞(CEF)基因组 DNA 作为其前病毒基因组模板, 根据已发表序列设计合成 9 对引物, 经 PCR 扩增出 9 段连续的、相互部分重叠的 DNA 片段和闭合环形前病毒两末端 LTR 的连接区段, 并分别连入 T 载体进行克隆、测序。【结果】用 DNASTAR 软件对测序结果进行剪辑和拼接, 首次完成了 ALV-J 蛋鸡分离株 SD07LK1 的前病毒全基因组核苷酸序列。【结论】将该序列与另外已完成的全基因组序列的比较表明, ALV-J 的整个基因组 gag 和 pol 基因相对保守, 各毒株间对应基因的同源性分别在 95.0% 以上, env 基因的同源性仅为 88.6% ~ 94.0%。

关键词: J 亚群禽白血病病毒; 蛋鸡; 全基因组核苷酸序列

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)03-0400-05

J 亚群禽白血病病毒(Subgroup J of avian leukosis virus, ALV-J)是最早从肉鸡中分离鉴定出来的禽白血病病毒(Avian leucosis virus, ALV)新的亚群^[1], 20 世纪 90 年代在全世界范围内的爆发给肉鸡业造成了巨大损失^[2]。我国于 1999 年首次从白羽肉鸡中发现此病毒^[4]。

国内外资料显示, ALV-J 主要引起肉用型鸡的骨髓细胞瘤, 导致很高的死亡率、肿瘤的发生、生产性能降低、淘汰费用的增加, 进而造成肉鸡饲养业的严重损失。Payne 和 Williams 通过实验室接种病毒发现蛋鸡对 ALV-J 是易感的^[3,11]。2002 年 Gingrich 发现在用于产蛋的白来航商品蛋鸡出现骨髓细胞瘤, 引起产蛋下降, 经过病毒分离发现一种含有 ALV-J 的 LTR 和 ALV-B env 基因的重组病毒^[12]。

在过去十多年中, ALV-J 主要在肉鸡中流行, 但在蛋鸡以及地方品系鸡中也发现了自然感染病

例, 并有病毒分离、鉴定的报道^[5,10]。

2007 年初, 我们从山东某鸡场送检的 17 周龄海兰灰商品代蛋鸡中分离到一株 ALV-J^[16], 为了解这个流行株的来源及其与国内外其它分离株的相互关系, 本研究对其全基因组做了扩增和序列测定, 进行了相关分析, 并与国内外完成的其它毒株做了比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒 (1) 鸡胚成纤维细胞(CEF): 取 9 ~ 11 日龄的 SPF 鸡胚(SPAFAS, 济南) 常规制作原代 CEF。(2) 病毒 SD07LK1^[16]: 分离于 2007 年初山东某鸡场送检的 17 周龄海兰灰商品代蛋鸡。(3) 病毒的增殖: 原代 CEF 长成单层后, 取数瓶接种 -70℃ 冻存的 SD07LK1 病毒悬液, 37℃, 5% CO₂, 培养 4 ~ 5 d, 取其中一瓶, 用 0.25% 胰酶消化、重悬,

基金项目 国家科技支撑计划(2006BAD06A08); 山东省中青年科学家奖励基金(2008BS07004)

* 通信作者。Tel: +86-538-8241560; Fax: +86-538-8241419; E-mail: zczui@sdau.edu.cn

作者简介 郭桂杰(1984 -) 男, 山东聊城人, 硕士研究生, 从事动物病毒学研究。E-mail: guogjie1125@163.com

收稿日期 2008-10-29; 修回日期 2008-11-26

传代至加有飞片的 35 mm 平皿中,待长成单层后,用固定液(丙酮:乙醇=6:4)固定,以抗 ALV-J 特异性单克隆抗体(Monoclonal Antibody, MAb)JE9^[15]与 FITC 标记的羊抗鼠二抗(Sigma)联合做 IFA,在荧光显微镜下进行观察。同时用未感染的 CEF 作对照,以验证感染细胞中 SD07LK1 的存在。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR Kit 购于 TaKaRa 公司;胰酶购自德国 MERCK 公司;凝胶回收试剂盒为美国 OMEGA 公司产品;T 载体 pMD18-T、T4DNA 连接酶等均购自 TaKaRa 公司;其他常规试剂均为国产分析纯。

1.2 SD07LK1 前病毒基因组 cDNA 的提取

将 SD07LK1 感染后经 IFA 检测为阳性的同一批

CEF,用 0.25% 胰酶消化,离心(200 × g)收集,按常规方法提取其基因组 DNA,最后溶于 TE 缓冲液,置 -20℃ 保存,用作 PCR 扩增 SD07LK1 前病毒线性 cDNA 的模板。

同时,将大量病毒一次性接种数瓶单层的原代 CEF,感染后 8~24 h 期间,每隔 3 h 取样,如前操作分别提取基因组 DNA 作为模板,以备从中扩增 SD07LK1 闭合环形前病毒两末端 LTR 的连接区段。

1.3 PCR 引物设计

参照已发表的 ALV 的序列,以 HPRS103 (GenBank Accession No. Z46390)为标准株,设计合成了用于扩增 SD07LK1 前病毒基因组 cDNA 的相互连续且部分重叠的 9 对引物(表 1)。

表 1 扩增 SD07LK1 前病毒基因组 cDNA 的引物序列

Table 1 Primers for PCR in amplification of SD07LK1 cDNA fragments

Segment	Primers	Sequence(5'→3')	Fragment sizes/bp
1	5-LTRF	GGCTCTTATGTAACGATG	611
	g1R	GGAAATCACCTTTATGACGG	
2	g2F	GTGATAGTTAGGAATAGTG	1174
	g2R	TTGGGCAGGTCCTAAAATAA	
3	g3F	TTATATGTCTCCCCGCTGCT	1017
	g3R	GGTAATAGTGATGTCGGCTCC	
4	g4F	TATCAGCGCTCGGTGTAT	1155
	p1R	CGCAACTGCTCATAAAAAGGG	
5	p2F	GTAGCAGAACCCAGGATAG	807
	p2R	CAACAAACGCGGAGTCAG	
6	p3F	GGGTGTACAACAACCTGGA	1307
	Env1R	CCCTGGACAACGGAAATAA	
7	Env2F	TCTGCTGCCATCGAGAGTTACT	2423
	Env2R	GTGCTCGTAGTTGTCAG	
8	3-LTRF	GCTGCCCTTGCTTGTGCATAG	964
	3-LTRR	TGTCACAGGTGCTCGTAGT	
9	3-LTRF	GCTGCCCTTGCTTGTGCATAG	753/967
	LTRR	ACCCTACTCCACCAATCG	

1.4 SD07LK1 前病毒基因组 cDNA 的 PCR 扩增、克隆和测序

按照标准 Taq PCR 试剂盒(TaKaRa)的方法说明,用 9 对引物分别对 SD07LK1 前病毒基因组 cDNA 进行扩增,将各段 PCR 产物分别连入载体 pMD18-T,经转化、筛选和鉴定后,阳性克隆进行核苷酸序列测定。

1.5 SD07LK1 株的比较

使用 DNASTAR 软件对测序结果进行剪辑和拼接,并将 SD07LK1 株与国内外完成的不同毒株,不同基因 ORF 编码的核苷酸序列进行同源性比较。

2 结果

2.1 SD07LK1 前病毒 cDNA 的全基因组核苷酸序列

利用 DNASTAR 软件对 9 个 PCR 片段克隆的测序结果进行剪辑和拼接,完成了 ALV-J 蛋鸡分离株 SD07LK1 前病毒 cDNA 全基因组的核苷酸序列 (GenBank accession No. FJ216405),该序列全长 7734 nt,与已发表 ALV-J 毒株的全基因组序列长度均有或多或少的差别。其 3 个主要基因 ORF 编码序列的核苷酸起止位点和长度分别为: gag 基因相

于碱基位 606 ~ 2711 ,长 2106 nt ;*pol* 基因相当于碱基位 2729 ~ 5350 ,长 2622 nt ;*env* 基因相当于碱基位 5304 ~ 6995 ,长 1692 nt ,与已发表的从肉鸡分离的 3 个毒株 :HPRS103(GenBank Accession No. Z46390) , ADOL-7501(GenBank Accession No. AY027920) 和 NX0101(GenBank Accession No. DQ115805) 相符。两端相同的长末端重复序列(LTR) 全长为 327 nt ,其中 U3 相当于碱基位 1 ~ 226 和 7408 ~ 7633 ,长 226 nt ;R 相当于碱基位 227 ~ 247 和 7634 ~ 7654 ,长 21 nt ;U5 相当于碱基位 248 ~ 327 和 7655 ~ 7734 ,长 80 nt。3' 端非编码区(3'UTR) 相当于碱基位 6996 ~ 7632 ,全长为 637 nt ,其中 Ins. TM (insertion encoding transmembrane segment of TM) 相当于碱基位 6798 ~ 7017 ,长 220 nt ;rTM(redundant non-functional TM) 相当

于碱基位 7018 ~ 7114 ,长 97 nt ;DR1 相当于碱基位 7155 ~ 7247 ,长 93 nt ;E(XSR) 相当于碱基位 7248 ~ 7396 ,长 149 nt。

2.2 SD07LK1 前病毒 cDNA 全基因组序列与已知 ALV-J 毒株相应序列的同源性比较

将 ALV-J/SD07LK1 株 cDNA 全基因组序列与已知毒株的相应基因组核苷酸序列 ,经 DNASTAR 软件中的 Clustal V 方法进行同源性分析(表 2)。得知 :与已完成全基因组序列的 3 株 ALV-J(HPRS103 , ADOL-7501 , NX0101) 比较 ,SD07LK1 株的 *gag* 和 *pol* 基因表现出较好的保守性 ,而 LTR 序列和决定亚群特异性的 *env* 基因存在较大的差异。图 2 显示了 SD07LK1 株与其他 3 个 ALV-J 毒株基本相似的基因组结构。

表 2 SD07LK1 与已知 ALV-J 各毒株主要基因或片段核苷酸序列的大小及同源百分比

Table 2 Pair distances of SD07LK1 genome and the representatives ALV-J strains

Gene	SD07LK1	HPRS103	ADOL-7501	NX0101
LTR	327 nt	95.4%(325 nt)	92.0%(325 nt)	93.5%(325 nt)
<i>gag</i>	2106 nt	97.2%(2106 nt)	95.3%(2106 nt)	96.5%(2106 nt)
<i>pol</i>	2622 nt	97.6%(2622 nt)	98.0%(2622 nt)	98.1%(2622 nt)
<i>env</i>	1692 nt	94.0%(1692 nt)	88.6%(1692 nt)	93.1%(1692 nt)
3'UTR	637 nt	86.0%(748 nt)	87.9%(522 nt)	67.2%(595 nt)
Ins. TM	220 nt	96.4%(220 nt)	94.7%(208 nt)	93.2%(220 nt)
rTM	97 nt	64.9%(210 nt)	85.7%(7 nt)	57.7%(184 nt)
DR1	93 nt	91.4%(93 nt)	89.2%(93 nt)	84.6%(91 nt)
E(XSR)	149 nt	87.1%(147 nt)	87.8%(147 nt)	50.0%(14 nt)
Genome	7734 nt	44.1%(7841 nt)	53.1%(7612 nt)	54.5%(7688 nt)

3 讨论

10 余年来禽白血病 J 亚群在世界各地肉鸡群中大量出现 ,特别是近几年 ALV-J 所致肉种鸡发病的潜伏期逐渐缩短 ,最早可见 24 日龄发病病例 ,给肉鸡产业造成巨大损失和威胁^[7] ,使全世界各大肉用型种鸡公司消耗巨资实施全面清除 ALV-J 的计划 ,而蛋鸡 ALV-J 能引起蛋鸡的产蛋率下降 ,死亡率升高 ,它的发现给中国养鸡业甚至世界养鸡业提出了新的挑战^[5]。本文以 ALV-J 蛋鸡分离株 SD07LK1 所感染 CEF 的基因组 DNA 为模板 ,以能覆盖其前病毒基因组全序列的相互连续而部分重叠的 9 对引物进行 PCR 反应 ,并将各扩增产物分别加以克隆 ,测序 ,从而首次完成了 ALV-J 蛋鸡分离株的前病毒 cDNA 全基因组核苷酸序列 ,对该序列进行分析 ,可以看出 ,该序列具有反转录病毒典型的基因组结构特点 ,即 5'LTR、*gag*、*pol*、*env*、3'LTR。

反转录病毒在其前病毒 cDNA 发生整合前有一

闭合环形时期^[13] ,据此合成了针对环形结构的 PCR 引物 3-LTRF 和 LTRR ,通过收集 SD07LK1 感染后不同时期的细胞 DNA 为模板 ,变换多个 PCR 反应条件 ,最终扩增到 753 bp 和 967 bp 的目的片段 ,因此 ,与 HPRS103 , ADOL-7501 和 NX0101 相比较 ,SD07LK1 株的全基因组核苷酸序列在 3'LTR 末端多出两个 T ,5'LTR 前端多出两个 A。

反转录病毒发生高错率和高重组率的序列一般位于 3'UTR。本研究测得的 SD07LK1 株的 3'UTR 与 HPRS103 株的变异接近 8% ,与 ADOL-7501 株的变异接近 9% ,而与 NX0101 株的变异却高达 14.9% ,这主要是由于 SD07LK1 株的 3'UTR 包含“ E(XSR)”区^[6]成分(bp # 7248 ~ 7396) ,而 NX0101 株 ,美国的野毒株 4817 和目前来源于白羽肉鸡的其他国内毒株在此处均有不同程度的缺失^[16]。这在一定程度上揭示了蛋鸡分离株 SD07LK1 株与从白羽肉用型鸡分离的中国毒株有着不同的来源。有报道表明 ,“ E(XSR)”区成分在 J 亚群禽白血病病毒的致肿瘤

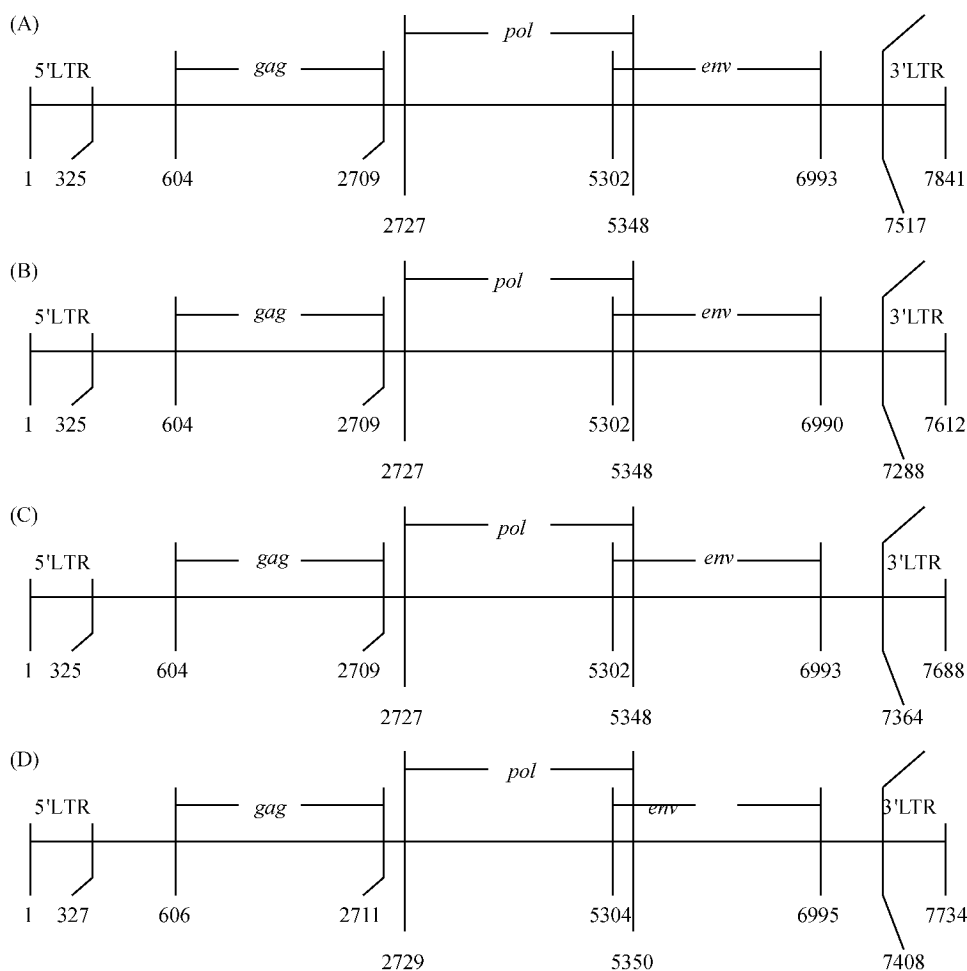


图2 四株 ALV-J 全基因组结构简图

Fig.2 Proviral genomic structures of four different ALV-J. A : HPRS103 ; B : ADOL-7501 ; C : NX0101 ; D : SD07LK1.

性发挥有一定的作用^[14]。

迄今为止,仅零星地报道了蛋鸡 ALV-J 的部分序列^[8-9],未见其全基因组序列的报道,这在一定程度上影响了对蛋鸡 ALV-J 的进一步研究。本研究完成的中国蛋鸡分离株 SD07LK1 前病毒全基因组核苷酸序列,可作为蛋鸡 ALV-J 参考株,对于进一步研究病毒之间核苷酸序列的差异与病毒致病性的关系,分析我国 ALV-J 蛋鸡分离株的来源和进一步演变趋势提供了有用的数据资料。

参考文献

[1] Payne LN, SR Brown, N Bumstead, et al. A novel subgroup of exogenous avian leucosis virus in chickens. *Journal of General Virology* ,1991 ,72 :801 - 807.

[2] Payne LN. HPRS-103 : retrovirus strikes back. The emergence of subgroup J avian leucosis virus. *Avian Pathology* ,1998 27 :36 - 45.

[3] Payne LN, AM Gillespie, K Howes. Myeloid leukaemogenicity and transmission of the HPRS-103 strain of avian leucosis virus. *Leukemia* ,1992 6 :1167 - 1176.

[4] 杜岩,崔治中,秦爱建.从市场商品肉鸡中检测出 J 亚群白血病病毒. *中国家禽学报 (Chinese Poultry Science)* ,1999 ,1 :1 - 4.

[5] 徐镇蕊.用 ALV - Jgp85 单克隆抗体证明蛋鸡存在 J 亚群禽白血病. *畜牧兽医学报 (Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica)* 2005 ,36 :269 - 271.

[6] Bizub D, RA Katz, AM Skalka. Nucleotide sequence of noncoding regions in Rous-associated virus-2 : comparisons delineate conserved regions important in replication and oncogenesis. *Journal of Virology* ,1984 49 :557 - 565.

[7] Gharaibeh S, Brown T, Villegas P, et al. Myelocytoma in a 24-day-old commercial broiler [DB/OL]. [Http://www. Vet uga.edu/ivcvm/1999](http://www.Vet uga.edu/ivcvm/1999)

[8] Xu B, Dong W, Yu C, et al. Occurrence of avian leucosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China. *Avian Pathology* 2004 33 (1) : 3 - 17.

- [9] 徐镛蕊,董卫星,余春明.蛋鸡 J 亚群禽白血病的分子生物学诊断.病毒学报(*Chinese Journal of Virology*), 2005, 21(4):289-292.
- [10] 李艳,崔治中,孙淑红.黄羽肉鸡 J 亚群白血病毒病的分子生物学特性和致病性.病毒学报(*Chinese Journal of Virology*), 2007, 23(3):207-211.
- [11] Williams SM, WM Reed, AM Fadly. Influence of age of exposure on the response of line 0 and line 63 chickens to infection with subgroup J avian leukosis virus. In: Proc. International Symposium on ALV-J and other avian retroviruses, Raischholzhausen, Germany 2000, pp 57-76.
- [12] Gingrich E, Porter RE, Lupiani B, et al. Diagnosis of myeloid leucosis induced by a recombinant avian leucosis virus in commercial white leghorn egg laying flocks. *Avian Disease* 2002, 46:745-748.
- [13] Panganiban AT, Temin HM. Circle with two tandem LTRs are precursors to integrated retrovirus DNA. *Cell*, 1984, 36(3):673-679.
- [14] Peter M Chesters, Lorraine P Smith, Venugopal Nair. E (XSR) element contributes to the oncogenicity of Avian leukosis virus (subgroup J). *Journal of General Virology*, 2006, 87, 2685-2692.
- [15] 秦爱建,崔治中, Lee L, 等.抗 J 亚群禽白血病毒囊膜糖蛋白特异性单克隆抗体的研制及其特性.畜牧兽医学报(*Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*), 2001, 32:556-562.
- [16] 王辉,崔治中.蛋鸡 J 亚群白血病毒病的分离鉴定及序列分析.病毒学报(*Chinese Journal of Virology*) 2008, 24:369-375.

Sequence analysis for the complete proviral genome of Avian Leukosis Virus (Subgroup J) strain SD07LK1 isolated from layers

Guijie Guo, Shuhong Sun, Zhizhong Cui*

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

Abstract [Objective] To study the source and trend in evolution of ALV-J strains from layers in China. **[Methods]** The genomic DNA extracted from chicken embryo fibroblasts (CEF) infected by ALV-J strain SD07LK1 isolated from layers was used as template to amplify the ALV-J proviral DNA by PCR. Nine continuous and overlapping fragments were amplified with nine pairs of primers according to published sequences, then cloned into the T vector and sequenced. **[Results]** The complete sequence of the whole genome of ALV-J Chinese strain SD07LK1 was first established. **[Conclusion]** Comparisons of SD07LK1 sequence with that of the other Avian leukosis virus strains, by using DNASTAR software, demonstrated that the genes *gag* and *pol* of ALV-J were relatively conservative, the nucleotide identity of all the strains was over 95.0%. However, the gene *env* identity was only in the ranges between 88.6 and 94.0%.

Keywords: subgroup J of avian leukosis virus, layers, the complete sequence of the whole genome

(本文责编 张晓丽)