

带有 REV-LTR 片段的马立克氏病病毒重组野毒株与超强毒株致病性和横向传播性比较

许晓云, 孙爱军, 崔言顺*, 崔治中*

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘要【目的】GX0101 是一株插入了禽网状内皮组织增生症病毒(REV)-LTR 片段的马立克氏病病毒(MDV)重组野毒株, 本文将其致病性、致肿瘤性和横向传播能力与超强毒参考株(vvMd5)进行比较。【方法】利用 MDV 特异性核酸探针对同罩饲养的对照鸡的羽毛囊 DNA 进行检测。【结果】在经抗 MDV 疫苗免疫的 SPF 鸡攻毒试验中表明, GX0101 株的致死率 28.6% 和致肿瘤率 7.1% 均低于超强毒参考株 Md5 的致死率 63.1% 和致肿瘤率 19.0%。但是, 利用 MDV 特异性核酸探针对同罩饲养的对照鸡的羽毛囊 DNA 检测表明, GX0101 从攻毒后第 28 天就有 6/15 的比例从羽毛囊中检出 MDV, 而与 vvMd5 接种鸡同一隔离罩的对照鸡, 在 35 d 时才在 2/14 的个体中检出 MDV, 即 GX0101 的横向传播能力大于超强毒株。这一结果表明, MDV 的致病性不一定与横向传播力相平行。【结论】由此推测, 显著增高的横向传播能力可能就是这一整合进 REV-LTR 的重组病毒株能在鸡群中逐渐流行开来的选择性竞争优势之一。

关键词: 马立克氏病毒; 重组病毒; 致病性; 横向传播; 斑点杂交

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)04-0540-04

不同科属病毒间的天然基因重组现象首先是在马立克氏病毒(MDV)与禽网状内皮组织增生症病毒(REV)间发现的^[1-2], 这是在污染有 REV 的鸡胚成纤维细胞(CEF)上对 JM 株 MDV 做连续传代过程中形成的。随后, 本实验室从自然发病的肿瘤病鸡中分离到携带有禽网状内皮组织增生症病毒(REV)-LTR 的马立克氏病毒重组野毒株 GX0101^[3]。本研究则试图进一步比较该天然重组 GX0101 株的致病性和横向传播能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料: GX0101 是由本实验室 2001 年从广西

某蛋鸡场分离的一株插入一段 REV-LTR 序列的马立克氏病毒重组野毒株^[3]。Md5 是超强毒(vv)参考株, 由美国农业部禽病与肿瘤研究所提供。攻毒剂量均为 1000PFU。300 只 1 日龄 SPF 雏鸡购自济南斯帕法斯 SPF 种鸡公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: Dig DNA labeling and Detection kit 购自 Roche 公司; NC 膜购自 Millipore 公司; 其它常规试剂均为国产分析纯; 恒温水浴锅、摇床等。

1.2 分组

300 只 1 日龄 SPF 来源雏鸡随机分成 3 组, 第一组 120 只, 其中 84 只在 1 日龄免疫血清 III 型 HVT 冻干疫苗, 并且在 3 日龄腹腔内接种 1000PFU 剂量的

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671571)

* 通信作者。崔言顺, Tel: +86-538-8241103; Fax: +86-538-8248156; E-mail: yscui@sdau.edu.cn; 崔治中, Tel: +86-538-8241560; Fax: +86-538-8241419; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

作者简介: 许晓云(1982 -)女, 山东莱芜人, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学研究。E-mail: xiaoyun19826@163.com

收稿日期: 2008-10-20; 修回日期: 2008-11-21

GX0101 20 只仅免疫血清 III 型 HVT 冻干疫苗不攻毒;16 只既不免疫也不攻毒。第二组 120 只,其中有 84 只 1 日龄免疫 HVT 冻干疫苗,并在 3 日龄接种 1000PFU 剂量的 vvMd5;20 只仅免疫 III 型 HVT 冻干疫苗,不攻毒;16 只既不免疫也不攻毒。第三组对照组 60 只 SPF 鸡,其中 30 只免疫血清 III 型 HVT 冻干疫苗,不攻毒,30 只不免疫也不攻毒。在最初 42 d 内,3 个组分别饲养在 3 个独立的隔离罩中。然后分别移至单独的清洁房间分开饲养至试验结束。在每组内,免疫 HVT 冻干疫苗、攻毒鸡都有相应标记,所有鸡在 1 日龄时 Lasota 株新城疫弱毒疫苗饮水免疫。1 周后所有 300 只 SPF 鸡均免疫 H5、H9、ND 灭活油乳疫苗。在攻毒后第 10、14、21、28、35 天采集羽毛囊做斑点杂交,并固定编号。

1.3 组织 DNA 的提取

参考文献 4 略加改进,提取羽毛囊 DNA。

1.4 斑点杂交反应

1.4.1 MDV 特异性核酸探针的制备:按照参考文献 5 的方法,用 Dig DNA labeling and Detection kit (Roche, # 11093657910) 标记 I 型 MDV 特异性的 pp38 基因片段 DNA 作为探针。

1.4.2 杂交反应:按参考文献 5 的方法,用 Dig DNA labeling and Detection kit (Roche, # 11093657910) 试剂盒做斑点杂交。

2 结果

2.1 二株 MDV 诱发鸡的死亡率和肿瘤发生率比较

从表 1 中可见比较 MDV 重组野毒株 GX0101 的死亡数和发生肿瘤鸡数都明显低于 vvMd5,说明 MDV 重组野毒株 GX0101 的致病性低于 vvMd5。根据 t 检验法死亡率间差异极显著 ($P < 0.01$),根据 t 检验法肿瘤率间差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 1 二株 MDV 在 HVT 免疫鸡诱发的死亡率和肿瘤发生率比较

Table 1 Comparison of two MDV strains for their mortality and oncogenicity in HVT-vaccinated chickens

Strain	Death number	Mortality/%	Tumor number	Oncogenicity /%
GX0101	24/84	28.6	6/84	7.1
vvMd5	53/84	63.1	16/84	19.0
control	0/30	0	0/30	0

2.2 MDVpp38 核酸探针灵敏度

图 1 显示了标记探针的灵敏度,从斑点杂交结

果来看,用标记的 MDVpp38 探针可检测到 1 pg 的 MDVpp38DNA。

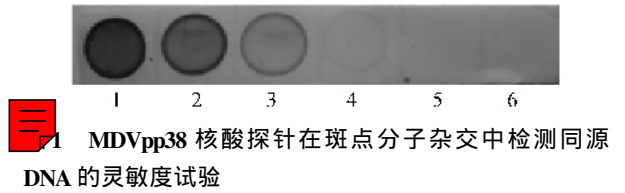


Fig. 1 Sensitivity of dot blot hybridization with pp38-specific probe in detection of the homologous DNA. 1. 1ng MDVpp38 nucleic acid; 2. 100 pg MDVpp38 nucleic acid; 3. 10 pg MDVpp38 nucleic acid; 4. 1 pg MDVpp38 nucleic acid; 5. negative control of SPF; 6. blank control.

2.3 斑点分子杂交检测感染鸡的羽毛囊中的 MDV

对羽毛囊 DNA 斑点分子杂交结果见图 2。该点杂交照片是选择了其中一组 MDV 感染鸡羽毛囊 DNA 的斑点杂交。从结果可以看出阴性对照不显色,阳性对照显深紫色,图中不同深度颜色的斑点代表不同样品呈现不同的阳性程度。

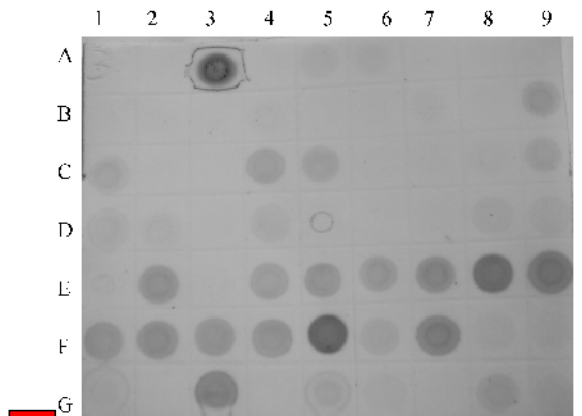


Fig. 2 Detection of MDV genomic DNA in feather tips by dot blot hybridization with MDV pp38 probe. A1. blank control; A2. negative control of SPF; A3. positive control of MDVpp38; A4-G9. sample DNA 1-60.

2.4 二株 MDV 病毒横向传染性的比较

从表 2 可以看出,经 HVT 疫苗免疫的鸡,经 vvMd5 攻毒后,在第 10 天就可从羽毛囊中检测到 MDV,而 GX0101 在攻毒后第 14 天才能检测到 MDV,而且检出率始终低于 vvMd5。然而,在与 GX0101 感染鸡同罩饲养的未经免疫也未接种 MDV 但作为接触感染的鸡,在同罩鸡攻毒后 28 d 即可从羽毛囊中检出 MDV;但在用 vvMd5 接种的鸡,这种横向感染在 35 d 后才发生。说明 GX0101 的横向传播能力强于 vvMd5。

表 2 二株 MDV 人工接种后在鸡羽毛囊中检出率的动态比较

Table 2 Dynamic comparison in detection of MDV genomic DNA from feather tips after challenges with MDV strain GX0101 or Md5

Strain	Detection of MDV genomic DNA from feather tips after challenges										
	10 d		14 d		21 d		28 d		35 d		
GX0101	HVT + Challenge +	0/14	0	8/14	57%	9/15	60%	10/20	50%	6/20	30%
	HVT - Challenge-	0/8	0	0/8	0	0/16	0	6/15	40%	6/15	40%
	HVT + Challenge-	0/8	0	0/8	0	0/20	0	0/20	0	0/20	0
vvMd5	HVT + Challenge +	2/14	14%	13/14	93%	15/15	100%	15/20	75%	12/20	60%
	HVT - Challenge-	0/8	0	0/8	0	0/16	0	0/14	0	2/14	14%
	HVT + Challenge-	0/8	0	0/8	0	0/20	0	0/20	0	0/20	0
Control	HVT - Challenge -	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/15	0	0/15	0
	HVT + Challenge-	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/15	0	0/15	0

3 讨论

近几年来,经 CVI988/Rispens 疫苗免疫后仍有些鸡群显示较高的肿瘤发生率。因此,国内外学者怀疑是否出现了能突破该疫苗保护作用的致病性更强的 MDV 野毒株。张志等 2001 年从广西某个发生肿瘤的鸡群中分离到一株带有 REV-LTR 的天然 MDV 野毒株 GX0101^[3],为了显示免疫失败是否与该流行株的致病性增强有关,张志(2004)和庄国庆(2006)分别在鸡中做了人工感染试验,表明 GX0101 对鸡的致病性高于强毒 GA^[3,6-7];本研究的重复性动物试验证明了 GX0101 对鸡的致病性和致肿瘤性低于 vvMd5(表 1)。因此,本研究试图进一步比较 GX0101 的另一个生物学特性——横向传播能力。结果表明, GX0101 的有效横向传播能力显著高于没有 REV-LTR 的 vvMd5,即与接种 GX0101 同一隔离罩中饲养的未接种病毒的鸡,能较早地从羽毛囊中检出 MDV,且检出率也高于 vvMd5。这表明在不同株 MDV 间其致病性与横向传播性间不一定是平行的。在自然饲养的鸡群中,虽然存在着 MDV 和 REV 的共感染^[8-9],但二者间发生基因重组的几率毕竟是很低的。而重组病毒 GX0101,作为一个流行株能被分离到说明它一定有某种竞争性优势,能够从最初发生重组的鸡逐渐在鸡群中传播扩大为流行株。根据本研究的结果,我们推测,显著增高的横向传播能力就可能是这一整合进 REV-LTR 的重组病毒株的选择性竞争优势之一。但这一推论有待进一步验证。为此,我们实验室以细菌人工染色体(BAC)为载体构建 GX0101 的传染性克隆,并在此基础上又构建了敲除了 REV-LTR 插入片段的传染性克隆,相

关动物实验正在进行中(未发表资料)。至于这一插入片段对病毒的致病性与致肿瘤性的影响,也可能在这一实验中得到部分回答。

本研究还证明了,用斑点杂交从羽毛囊中检测到 MDV 是检测大量样品中 MDV 感染的有效方法。姚瑞英等比较了斑点杂交与琼扩反应检测羽毛囊中 MDV 的灵敏度^[10],也证明了斑点杂交的检出率高于琼扩反应。从 1991 年以来,这一检测方法在本实验室有作为一种常用的方法,在大量临床和实验样品中连续应用了多年,先后已有多篇论文发表^[5,11-12],这是本研究选用这一方法来研究 MDV 横向传播的出发点。我们需要指出的是,本研究斑点杂交反应中应用的 DNA 探针是 I 型 MDV 特异的 pp38 基因片段。因此,即使在经 HVT 免疫过的鸡群,也不影响致病性 I 型 MDV 的检测^[5]。

参考文献

- [1] Isfort R, Jones D, Kost R, et al. Retrovirus insertion into her-pesvirus in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89: 991-995.
- [2] Jones D, Isfort R, Witter R, et al. Retroviral insertions into a her-pesvirus are clustered at the junctions of the short repeat and short unique sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90: 3855-3859.
- [3] 张志, 崔治中. 整合进禽反转录病毒基因组片段的鸡马立克氏病病毒重组野毒株的发现. *中国科学 C 辑 (Science in China Series C)* 2004, 34(4): 317-324.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [5] 崔治中, Lee LF. 用非放射性的 Digoxigenin 标记的 DNA 探针检出马立克氏病病毒 DNA. *江苏农学院学报 (Jiangsu Agricultural Research)*, 1991, 12(1): 1-6.

- [6] 张志, 崔治中, 姜世金, 等. 鸡肿瘤病料中马立克氏病病毒和禽网状内皮增生病毒混合感染的研究. 中国预防兽医学报(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*) 2003 4 : 274 - 278.
- [7] 庄国庆, 孙淑红, 崔治中, 等. 鸡马立克氏病毒和网状内皮增生病毒感染肉鸡时的相互作用. 中国病毒学(*Chinese Journal of Virology*) 2006 21(2): 157 - 162.
- [8] 张志, 王锡乐, 庄国庆, 等. 商品代肉鸡群中禽网状内皮组织增生病毒和马立克氏病病毒的混合感染. 中国预防兽医学报(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*) 2005 27(1) 39 - 41.
- [9] 张志, 庄国庆, 孙淑红, 等. 禽网状内皮组织增生病毒和马立克氏病病毒共感染对鸡的致肿瘤作用. 畜牧兽医学报(*Chinese Journal of Animal and Veterinary Science*), 2005 36 : 62 - 65.
- [10] 姚瑞英, 盘宝进, 白安斌, 等. 核酸探针杂交检测马立克氏病病毒与琼脂扩散试验比较. 广西畜牧兽医(*Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*), 1997, 13(1) 9 - 10.
- [11] 崔治中. 用非放射性 DNA 探针从感染鸡羽毛囊中检出 I 型马立克氏病病毒. 中国兽医科技(*Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*), 1992, 22(9): 20 - 21.
- [12] 吉荣, 崔治中, 丁家波, 等. I 型马立克氏病病毒特异性核酸探针试剂盒的制备和应用. 中国预防兽医学报(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 2002, 24(4) 263 - 265.

Comparison of pathogenicity and horizontal transmission ability between recombinant Marek 's disease virus field strain with REV-LTR and a very virulent reference strain

Xiaoyun Xu, Aijun Sun, Yanshun Cui*, Zhizhong Cui*

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract [**Objective**] GX0101 is a recombinant field strain of Marek 's disease virus(MDV) with a long terminal repeat(LTR) insert from reticuloendotheliosis virus, a chicken retrovirus. In this study, GX0101 strain was compared to a very virulent reference strain Md5 for their pathogenicity and transmission ability. [**Methods**] MDV genomic DNA in feather tips was tested and compared by dot blot hybridization with MDV specific probe in control chickens kept in the same isolators in which chickens were challenged with GX0101 or Md5. [**Results**] mortality and tumor rates of GX0101 were 28.6% and 7.1% for SPF chickens vaccinated against Marek 's disease virus. Mortality and tumor rates of vvMd5 were 63.1% and 19.0% in the same vaccinated SPF chickens. Mortality and tumor rates of GX0101 were lower than that of vvMd5. However, horizontal transmission ability of GX0101 was stronger than that of Md5. After 28 days challenged by GX0101, MDV was detected in 6 of 15 samples. after 35 days challenged by vvMd5, MDV was detected in 2 of 14 samples. [**Conclusion**] Horizontal transmission ability of MDV isolates was not necessarily parallel to their pathogenicity. It is suggesting that the increased horizontal transmission may be one of selective competitive advantages. Such advantages may help recombinant viruses with the LTR-insert become more and more popular gradually in chicken flocks.

Keywords : Marek 's disease virus ;recombinant virus ;pathogenicity ;horizontal transmission ;dot blot hybridization

(本文责编 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30671571)

* Corresponding author. Yanshun Cui, Tel : + 86-538-8241103 ; E-mail : yscui@sdau.edu.cn ; Zhizhong Cui, Tel : + 86-538-8241560 ; E-mail : zzcui@sdau.edu.cn

Received : 20 October 2008/Revised 21 November 2008