

## 黄羽肉鸡 J 亚群白血病毒病的分子生物学特性和致病性

李艳, 崔治中\*, 孙淑红

(山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018)

**摘要:**通过接种鸡胚成纤维细胞(CEF)、聚合酶链式反应(PCR)技术及特异性单抗的间接荧光抗体反应(IFA),首次从中国地方品系-黄羽肉鸡中分离到 J 亚群白血病毒(ALV-J),并对其 *gp85* 基因和 3' Ter 序列及其致病性作了比较分析。结果显示, GD0510A、GD0510B 和 GD0512 的 *gp85* 基因编码的氨基酸序列与国内毒株 HN0001 同源性最高,分别为 94.1%、92.5%和 95.8%, GD0510A 和 GD0512 的 3' Ter 核酸序列与国内毒株同源性比较高。分离到的两株 ALV-J (GD0510A 和 GD0512)感染 1 日龄肉鸡后出现明显生长抑制( $P < 0.05$ ),并诱发中枢免疫器官法氏囊和胸腺萎缩。两株病毒单独感染均能降低鸡体对新城疫病毒和禽流感病毒(AIV-H5)疫苗的抗体滴度, GD0512 感染鸡后能明显抑制感染鸡对新城疫病毒疫苗的免疫反应( $P < 0.05$ ),而 GD0510A 感染鸡后在 4w 时也能明显抑制感染鸡对禽流感病毒(AIV-H5)疫苗的免疫反应( $P < 0.05$ )。研究证实在我国地方品系黄羽肉鸡存在 ALV-J 的感染,分子生物学特性研究表明该毒株可能是来自白羽肉鸡且能造成感染鸡的免疫抑制。

**关键词:**黄羽肉鸡; J 亚群白血病毒(ALV-J); 免疫抑制

**中图分类号:** S858.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2007)03-0207-05

J 亚群禽白血病毒(Subgroup J of avian leukosis virus, ALV-J)是上世纪 80 年代末从肉用型鸡中分离鉴定出来的禽白血病毒(Avian leukosis virus, ALV)新的亚群<sup>[1]</sup>。自 1989 年 Payne 首次报道此病以来,几乎世界各大洲的肉鸡群中均有该病报道。我国的白羽肉用型鸡中就已观察到类似的肿瘤病,但直到 1999 年我国才首次分离到该病毒,并对该分离株做了致病性试验<sup>[2,3]</sup>。但很多年以来只局限于从白羽肉鸡中分离到 ALV-J。虽然国内已有蛋鸡和中国地方品系-麻鸡中发生 J-亚群白血病的报道<sup>[4,5]</sup>,并用 PCR 扩增到 ALV-J 的核酸序列,但并没有分离到病毒本身。本研究从中国的地方品系-黄羽肉鸡中分离到 ALV-J,并对其分子演变和致病性做了比较实验。

### 材料与方法

**1 病料来源及病毒分离鉴定** 病料来自我国南方鸡场,为地方品系的黄羽肉用型鸡的父母代种鸡。近几年来,这些鸡场种鸡在开产前常出现死亡高峰,大多数死亡鸡出现肝脾肿大并散布大量细小的增生性结节,部分鸡肾脏有增生性肿

瘤块或胸前肋前内侧有增生性结节。非常类似于白羽肉用型鸡病的 J 亚群禽白血病。取肿瘤病料接种鸡胚成纤维细胞(CEF)或将种蛋孵育至 9~11 日龄,再制做 CEF。在培养 5d 后,将细胞消化再接种进放有飞片的小平皿上,继续培养 5d,用 ALV-J 特异性单抗 JE-9<sup>[6]</sup>做间接免疫荧光试验(IFA)。

**2 ALV-J 的 env 基因和 3' Ter 的扩增、克隆和测序** 接种病料的 CEF,在培养 10d 后,将细胞单层消化离心沉淀后溶解在 25μl TE 中提取基因组 DNA 作为含有 ALV-J 前病毒 cDNA 的模板 DNA。根据已发表的资料合成一对引物,用于扩增 ALV-J 囊膜糖蛋白 *env* 基因和 3' Ter 的大小约 2.2kb 的片段<sup>[2,7,8]</sup>。其正向引物的序列为 5'-gctgccatcgagaggttact-3',反向引物的序列为 5'-agttgtcaggggaatcgac-3'。将纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 载体进行连接,并确定插入片段大小,用于转化感受态大肠杆菌,挑选白色菌落,对抽提的质粒用 *EcoR* 和 *Hind* 两种限制性内切酶鉴定阳性克隆。将阳性克隆送交上海生工生物工程公司测序。用 DNASTAR Lasergen6.0 软件分析。

**3 ALV-J GD0512 株、GD0510A 株和 NX0101 株的致病性试验**

**3.1 病毒的准备** ALV-J GD0512 株,每 0.1 ml 感染细胞培养上清中含有  $10^{2.8}$  个 TCID<sub>50</sub>; ALV-J GD0510A 株,每 0.1 ml 感染细胞培养上清中含有  $10^{2.125}$  个 TCID<sub>50</sub>; ALV-J NX0101 株,由本实验室分离自宁夏一白羽肉种鸡场<sup>[9]</sup>,每 0.1 ml 感染细胞培养上清中含有  $10^{3.46}$  个 TCID<sub>50</sub>。三株病毒在接种鸡时均调整到每毫升含  $5 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>。

**3.2 实验动物的感染和免疫** 1 日龄 AA 系商品代肉鸡 120 只,随机分成 4 组,平均每组 30 只。每只鸡分别腹腔接种 0.2ml 稀释液,病毒含量均为  $10^3$  TCID<sub>50</sub>。第一组接种灭

收稿日期:2006-10-11;修回日期:2006-12-25

基金项目:国家自然科学基金重点项目资助(30330450)

作者简介:李艳(1980-),女,山东招远人,硕士研究生,专业为动物病毒学。

\*通讯作者:崔治中, E-mail: zczui@sdau.edu.cn

菌 Hank's 作为阴性对照,第二组接种 GD0512,三组接种 GD0510A,四组接种 NX0101。在一周龄时颈部皮下注射新城疫(ND)油乳剂灭活苗(南京梅里亚公司)0.3 ml/只,肌肉注射禽流感灭活疫苗(H5)(青岛易邦生物工程有限公司)0.3 ml/只。在 14~28 日龄之间每隔 3d 分别按 2 倍量饮水免疫鸡传染性法氏囊病弱毒 B<sub>87</sub> 株疫苗(北京家禽研究所)。分别在 2w、3w、4w 和 5w 全部称重,并在用 ND 和 H5 的灭活疫苗免疫后 3w 和 4w 采血,分别检测 HI 抗体滴度。

## 结 果

### 1 病毒分离鉴定结果

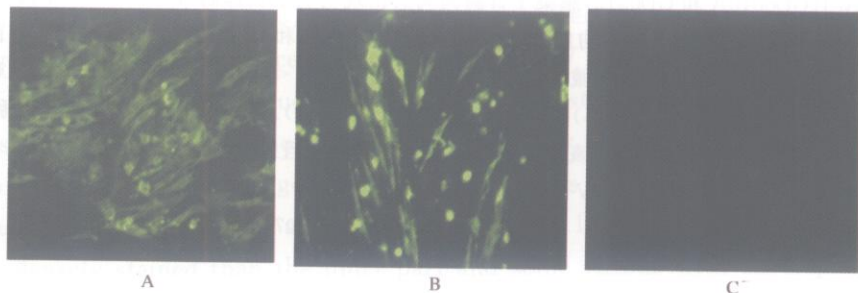


图 1 IFA 检测病料接种的 CEF 中的 ALV-J

Figure 1 Detection of ALV-J from inoculated CEF by IFA

A. Inoculated CEF by GD0510A; B. Inoculated CEF by GD0512; C. Uninfected CEF.

### 2 ALV-J 的 gp85 基因和 3 Ter 序列分析

2.1 不同 ALV-J 毒株 gp85 基因编码的氨基酸同源性比较 将从黄羽肉鸡分离到的 GD0510A、GD0510B 和 GD0512 与从白羽肉鸡分离到的国际参考株 HPRS-103、ADOL-7501、0661、4817、6683、6827 及国内分离株 SD9901、SD9902、SD0002、HN0001、SD0101、SD0301、NX0101、SD0001 和 YZ9901 等 15 个 ALV-J 毒株的 gp85 基因编码的氨基酸序列的同源性作了比较。结果显示,与国外毒株相比, GD0510A、GD0510B 和 GD0512 与美国分离株 6683 同源性最高,分别为 92.5%、91.9% 和 90.2%,与美国分离株 ADOL7501 同源性最低,分别为 86.0%、85.3% 和 84.4%;与国内毒株相比, GD0510A、GD0510B 和 GD0512 与 HN0001 同源性最高,分别为 94.1%、92.5% 和 95.8%,与 NX0101 同源性最低,分别为 89.6%、89.0% 和 89.3%。GD0510A 和 GD0510B 与 GD0512 间的同源性分别为 91.9%、91.2%,而来自同一鸡群的 GD0510A 和 GD0510B 同源性为 98.4%。

2.2 不同 ALV-J 毒株 3 Ter 序列比较 将 ALV-J 野毒株 GD0510A 和 GD0512 与国内外参考株的 3 Ter 核酸序列进行比较。结果显示,相对于 ALV-J

1.1 IFA 检测结果 2005 年 10 月份送检的样品(编号 GD0510A)和 12 月份送检的样品(编号 GD0512)接种 CEF 后,用对 ALV-J 特异单抗做 IFA 检测可以看到胞质有绿色荧光、胞核无荧光的典型阳性 CEF 细胞,由此可以确定已经分离到 ALV-J 毒株,图 1 C 为阴性对照。

1.2 PCR 检测结果 取 5μl PCR 扩增产物在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳上电泳 45min,在凝胶成像系统下观察,样品 GD0510A 和 GD0512 在 2200bp 左右出现特异性条带,符合预期大小(图 2)。

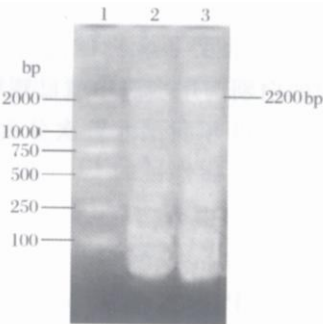


图 2 ALV-J 特异性 PCR 结果

Figure 2 The result of PCR for ALV-J detection

1. DNA marker; 2. GD0510A; 3. GD0512.

的原型株 HPRS-103,从黄羽肉鸡分离到的野毒株的 3 Ter 序列也存在着显著的缺失性突变。除了像所有早年从我国白羽肉鸡分离的许多 ALV-J 野毒一样,在相当于 HPRS-103 株基因组 bp # 7 356~7 494 区的序列(为“E”成分)有缺失外,还与另两株白羽肉鸡中分离到的毒株 HN0001 和 SD0001 一样,在相当于 HPRS-103 bp # 7 005~7 275 区也发生了缺失性突变。特别是 2005 年从黄羽肉鸡分离到的 GD0512 株与 2000 年从白羽肉鸡分离到的 HN0001 株间,不仅两个缺失的序列完全相同,而且缺失区两侧的序列也几乎完全相同。相比之下,同

是 2005 年从黄羽肉鸡分离到的 GD0510A 与 GD0512 间却存有差异,在 bp # 7 005 ~ 7 275 区, GD0510A 株比 GD0512 株多 40 个碱基,在第二个大缺失区后, GD0512 和 HN0001 株还另有一个 10bp 缺失区,而 GD0510A 则无此缺失。来自同一鸡群的 GD0510A 和 GD0510B 3 Ter 序列同源性为 100 %。

3 三株 AL V-J 野毒的致病性试验结果

表 1 不同 AL V-J 毒株感染对肉鸡生长的抑制作用 (x ±s)

Table 1 Inhibitory effect of different AL V-J strain infection on growth rates of broilers( x ±s)

Group	Age of chickens (wks)			
	2	3	4	5
Control	213. 0 ±27. 9a(20)	372. 4 ±41. 0Aa(20)	646. 8 ±98. 7Aa(20)	967. 4 ±102. 4Aa(17)
GD0512	188. 0 ±34. 0b(23)	329. 3 ±47. 1Bb(23)	590. 2 ±73. 3ABb(23)	832. 5 ±136. 6BCbc(20)
GD0510A	195. 9 ±44. 6ab(17)	326. 6 ±72. 3ABb(17)	562. 1 ±101. 8ABbc(17)	847. 1 ±121. 1BCbc(17)
NX0101	209. 0 ±27. 7a(27)	325. 8 ±43. 0ABb(26)	550. 4 ±70. 8Bbc(24)	774. 4 ±116. 9Cc(24)

The numbers in the table indicate: x ±s (sample size). Different capital letters indicate that the differences were very significant (P<0. 01). The different small letters indicate that the differences were significant (P<0. 05). The same letters indicate the differences were not significant (P>0. 05).

3. 2 对 NDV 疫苗免疫后抗体反应的抑制作用

三株野毒 AL V-J 感染后均降低了感染鸡对 ND 疫苗的抗体滴度。GD0512 感染组在免后 3w、4w, ND 苗抗体滴度显著低于对照组 (P<0. 05), GD0510A 感染组在免后 3w、4w, ND 苗抗体滴度虽然也低于对照组,但差异均不显著 (P>0. 05), NX0101 感染组在免后 3w、4w 对鸡的免疫抑制作用最明显,与对照组差异均极显著 (P<0. 01) (表 2)。

表 2 不同 AL V-J 毒株感染对 NDV HI 抗体滴度的影响 (Log2, x ±s)

Table 2 Influence of infection with different AL V-J strains on NDV HI antibody titers (log2, x ±s)

Group	Weeks after NDV vaccination	
	3	4
Control	4. 30 ±1. 38Aa(20)	4. 25 ±1. 69Aa(17)
GD0512	3. 30 ±1. 61ABb(23)	2. 95 ±2. 04ABCb(20)
GD0510A	3. 59 ±1. 41ABab(17)	3. 35 ±1. 90ABab(17)
NX0101	2. 88 ±1. 98Bbc(24)	2. 25 ±2. 03BCbc(24)

The numbers in the table indicate: x ±s (sample size). Different capital letters indicate that the differences were very significant (P<0. 01). The different small letters indicate that the differences were significant (P<0. 05). The same letters indicate the differences were not significant (P>0. 05).

3. 3 对 AIV- H5 疫苗免疫后 HI 抗体反应抑制作用 三个毒株 AL V-J 感染后均降低了感染鸡对 AIV- H5 疫苗的抗体滴度,但 GD0512 感染组与对

3. 1 不同 AL V-J 野毒感染对鸡生长性能的影响

1 日龄 AA 肉鸡攻毒后从 2w 开始显示生长迟缓,而且日趋明显。5w 时, GD0512 和 GD0510A 攻毒鸡生长状况均严重滞后于对照组 (P<0. 01) (表 1)。但与从白羽肉鸡分离到的 NX0101 相比,似乎从黄羽肉鸡分离到的这两个毒株对白羽肉鸡生长的抑制作用较弱,虽然统计学上差异还不显著。

照鸡相比差异不显著 (P>0. 05),而 GD0510A 感染组在免后 3w AIV- H5 的抗体滴度显著低于对照组 (P<0. 05),在免后 4w 这种差异不再显著 (P>0. 05)。NX0101 感染组 AIV- H5 疫苗的抗体滴度不仅显著低于对照组 (P<0. 05),而且也低于其他两株病毒感染鸡的抗体滴度,虽然三株病毒感染鸡间的差异还不显著(表 3)。

表 3 不同 AL V-J 毒株感染对 AIV- H5 HI 抗体滴度的影响 (Log2, x ±s)

Table 3 Influence of different AL V-J strain infection on AIV- H5 HI antibody titers(log2, x ±s)

Group	Weeks after AIV- H5 vaccination	
	3	4
Control	3. 37 ±1. 50Aa(20)	4. 88 ±2. 25Aa(17)
GD0512	2. 70 ±1. 49ABab(23)	4. 15 ±2. 76Aab(20)
GD0510A	2. 12 ±1. 69ABCbcd(17)	3. 53 ±2. 27Aab(17)
NX0101	1. 67 ±1. 24BCcd(24)	3. 04 ±2. 49Ab(24)

The numbers in the table indicate: x ±s (sample size). Different capital letters indicate that the differences were very significant (P<0. 01). The different small letters indicate that the differences were significant (P<0. 05). The same letters indicate the differences were not significant (P>0. 05).

3. 4 对肉鸡中枢免疫器官的影响 35 日龄时,随机从各组取 8 只鸡解剖并分离胸腺和法氏囊称重。GD0512、GD0510A 和 NX0101 感染组胸腺和法氏囊与体重比均低于对照组,但只有 GD0512 和 NX0101 感染组鸡法氏囊/体重比显著小于对照组

( $P < 0.05$ )。

表 4 不同 ALV-J 毒株感染对肉鸡中枢免疫器官的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Influence of different ALV-J strain infection on the ratios of thymus and Bursa to body weight ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Thymus/body weight (%)	Bursa/body weight (%)
Control	0.25 $\pm$ 0.08(8)	0.21 $\pm$ 0.10a(8)
GD0512	0.21 $\pm$ 0.10(8)	0.18 $\pm$ 0.09ab(8)
GD0510A	0.20 $\pm$ 0.10(8)	0.12 $\pm$ 0.06b(8)
NX0101	0.19 $\pm$ 0.05(8)	0.17 $\pm$ 0.07ab(8)

The note is the same as that of Table 4.

## 讨 论

J 亚群禽白血病病毒 (ALV-J) 最初是从白羽肉鸡中发现的,在上世纪 90 年代,J 亚群白血病在全世界暴发,给肉鸡业造成了巨大的损失<sup>[10]</sup>。国际上各个种鸡公司在过去十多年里,在 ALV-J 的净化上作出了极大的努力,已将白羽肉鸡中对该病毒的感染率降到了相当低的程度,并已建立了一些无 ALV-J 的种群。由于我国的白羽肉鸡祖代鸡都是每年从国外引进更新的,因此,该病毒在我国白羽肉鸡中的感染率也越来越少。但是,近年来,除了在蛋鸡中发现 ALV-J 感染外,在我国地方品系的麻鸡中也发现了 J 亚型白血病<sup>[4,5]</sup>,但均未分离到病毒。本研究首次从我国黄羽肉鸡中分离到 ALV-J,为研究该病毒的分子生物学特性和致病性实验提供条件。

通过对 ALV-J 不同毒株 gp85 基因编码的氨基酸序列和 3' Ter 序列的比较发现,黄羽肉鸡来源的 GD0510A、GD0510B 和 GD0512 最接近 2000 年从白羽鸡分离到的 HN0001 株。我们以往的研究发现,从中国的白羽肉鸡分离到的所有 ALV-J 在其 3'-末端的“E”区,都有一个约 127bp 的缺失性突变。这一缺失性突变的位置和序列与美国的野毒株 4817 几乎完全一致<sup>[11]</sup>。而本研究从黄羽肉鸡分离到的三株 ALV-J,在 3' Ter 中除了“E”区缺失外,在 rTM 区(相当于原型株 HPRS-103 基因组的 bp # 7 005 ~ 7 275),其中 GD0512 株与 2000 年从白羽肉鸡中分离到的 HN0001 株几乎完全一致,再加上 GD0512 与 HN0001 的 gp85 基因编码的氨基酸序列的同源性为 95.8%,与其他 14 株国内外参考株相比也是最高的。因此可以推测,中国地方品系黄羽肉鸡中的 ALV-J 不是独立形成的,而是来自白羽肉鸡。至于是通过横向传播还是由于从快大型白羽

肉鸡引种引起的,已无法查询。考虑到 ALV-J 主要是垂直感染,而横向传播能力很弱,特别是在现实中把这两种不同类型鸡混养的可能性很小,因此可以推断,我国地方品系黄羽肉鸡中的 ALV-J 是由于引种不当引起的。

我们曾报道,ALV-J 的中国野毒株 NX0101 感染可在肉用型鸡和蛋用型 SPF 鸡造成免疫抑制,使感染鸡对鸡新城疫灭活疫苗免疫后的抗体反应显著下降,而且该毒株对肉用型鸡的免疫抑制作用大于对蛋用型 SPF 鸡的免疫抑制作用<sup>[12]</sup>。在白羽肉鸡的致病性实验中,来自黄羽肉鸡的 GD0510A 和 GD0512 株 ALV-J 也有免疫抑制作用,也能降低感染鸡对 NDV 和 AIV 灭活疫苗的抗体反应。但是它们在白羽肉鸡的免疫抑制作用比来自白羽肉鸡的 NX0101 株弱。至于在其他品系鸡如蛋用型 SPF 鸡或中国地方品系鸡,GD0510A 和 GD0512 株是否也比 NX0101 株弱,还有待于进一步比较研究。

本研究从中国地方品系黄羽肉鸡中成功分离到 ALV-J,证明了中国地方品系黄羽肉鸡中存在 ALV-J 感染,表明 J 亚群白血病正不知不觉地在中国本土鸡中蔓延,提示在保护我国特有鸡种的同时应注意鸡群的白血病净化工作,防止 ALV-J 进一步向中国地方鸡种蔓延。

## 参考文献:

- [1] Payne L N, Brown S R, Bumstead N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leucosis virus in chickens [J]. J Gen Virol, 1991, 72: 801-807.
- [2] 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 [J]. 中国家禽学报, 1999, 1: 1-4.
- [3] 杜岩, 崔治中. J 亚群禽白血病病毒中国分离株的人工致病性试验 [J]. 中国农业科学, 2002, 35 (4): 430-433.
- [4] 徐银蕊. 用 ALV-J gp85 单克隆抗体证明蛋鸡存在 J 亚群禽白血病 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36 (3): 269-271.
- [5] 成子强, 张利, 刘思当, 等. 中国麻鸡中发现禽 J 亚群白血病 [J]. 微生物学报, 2005, 45 (4): 584-587.
- [6] 秦爱建, 崔治中, Lee L, 等. 抗 J 亚群禽白血病病毒囊膜糖蛋白特异性单克隆抗体的研制及其特性 [J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32 (6): 556-562.
- [7] Smith L M, Brown S R, Howes K, et al. Development and application of polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leucosis virus [J]. Virus Res, 1998, 54 (1): 87-98.
- [8] Smith EJ, Williams S M, Fadly A M, et al. Detection of avian leucosis virus subgroup J using the polymerase chain reaction [J]. Avian Dis, 1998, 42: 375-380.

- [9] 张志,赵宏坤,崔治中. 宁夏肉用种鸡 J 亚群禽白血病的实验室诊断[J]. 中国兽医科技,2002,32(11):25-26.
- [10] Payne L N. HPRS-103:a retrovirus strikes back. The emergence of subgroup J avian leucosis virus[J]. Avian Pathol,1998,27(Supp1): S36-S45.
- [11] Cui 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 [J]. Avian Dis,2003,47:1321-1330.
- [12] Cui Z,Sun S,Wang J. Reduced serologic response to Newcastle disease virus in broiler chickens exposed to a Chinese field strain of subgroup J avian leukosis virus [J]. Avian Dis,2006,50:191-195.

## Molecular Biology and Pathogenicity of Subgroup J Avian Leukosis Virus Isolated from Yellow Chickens

LI Yan, CUI Zhi-zhong\*, SUN Shu-hong

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

**Abstract:** Avian leukosis viruses of subgroup J (ALV-J) were firstly isolated from yellow chickens by inoculating the samples into chick embryo fibroblast (CEF), the PCR amplification of the infected CEF genomic DNA and the indirect fluorescence assay (IFA) with ALV-J specific monoclonal antibody JE-9. The amino acid sequences of gp85 genes of the isolates of GD0510A, GD0510B and GD0512 were highly homologous with that of the Chinese strain HN0001, the homogeneity was 94.1%, 92.5% and 95.8% respectively. The sequences of 3' Ter of them were highly homologous to other Chinese strains. Immunosuppression was detected when 1-day-old commercial broilers were infected with ALV-J strains GD0510A and GD0512, the body weight was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Antibody reaction to Newcastle disease virus vaccine was inhibited significantly ( $P < 0.05$ ) after chickens were infected with GD0512, antibody reaction to AIV-H5 also was inhibited significantly ( $P < 0.05$ ) on fourth week after chickens were infected with GD0510A. It was the first time to report ALV-J isolation from Chinese local breed of yellow chickens, and it was speculated that these virus strains might come from white chickens according to sequence comparisons.

**Key words:** yellow chicken; ALV-J; immunosuppression

Corresponding author: CUI Zhi-zhong, Email: zzcui@sdau.edu.cn