

# 血管瘤相关 J 亚群禽白血病病毒 ZH-08 株的分离与全基因组序列测定

张小桃, 史伟伟, 刘红波, 张贺楠, 廖明, 辛朝安, 曹伟胜\*

(华南农业大学兽医学院 农业部动物疫病防控重点开放实验室, 广州 510642)

**摘要:** 本研究从临床表现为典型血管瘤型禽白血病病例的广东某肉种鸡场的病鸡中, 分离到 1 株 J 亚群禽白血病病毒(ALV-J), 命名为 ZH-08。利用 ELISA 抗原检测、PCR 和间接免疫荧光试验对分离株进行鉴定, 结果都呈阳性。依据 ALV-J 原型株 HPRS-103 前病毒全基因组序列设计并合成 3 对引物, 采用分段扩增的方法完成了分离株的全基因组序列测定。结果显示该分离株基因组序列全长 7 597 bp, 与已公开的全基因组序列大小比较略有差异, 但符合典型的复制完全型反转录病毒的基因组结构, 基因序列中不含已知致癌基因。将该分离株的亚群特异性 *gp85* 基因序列与国内外各参考株相应序列进行相似性比较, 发现 ZH-08 与 YZ9901 株相似性最高(93.7%)。基于 *gp85* 核苷酸序列的系统进化分析表明: ZH-08 株与 SD07LK1 株的亲缘关系最近。本研究为该毒株的生物学特性以及致病机制研究奠定了基础。

**关键词:** 血管瘤; J 亚群禽白血病病毒; 全基因组序列; *gp85*

中图分类号: S852.659.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)02-0193-07

## Isolation and the Full-length Genome Sequencing of Subgroup J Avian Leukosis Virus ZH-08 Isolate Associated with Hemangioma

ZHANG Xiao-tao, SHI Wei-wei, LIU Hong-bo, ZHANG He-nan, LIAO Ming,  
XIN Chao-an, CAO Wei-sheng\*

(Key Laboratory of Animal Disease Control and Prevention of the Ministry of Agriculture/College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** A subgroup J avian leukosis virus (ALV-J), designated as ZH-08, was isolated from broiler breeder flock with a novel hemangioma case in Guangdong Province. The identified results of ELISA test, PCR and immunofluorescence assay (IFA) specific for ALV-J, were all positive. Based on the public full-length proviral genome sequence of ALV-J prototype strain HPRS-103, three pairs of primers were synthesized, and the full-length proviral genome of ZH-08 isolate was sequenced by the method of fragment amplification. The full-length proviral genome sequence of ZH-08 isolate is 7 597 bp, its size has a little difference from that of published full-length genome sequences, but its structure corresponds with typical retroviral genome structure for completely copy ability, the known oncogenes were not included in its genome. According to the *gp85* sequence comparison of ZH-08 isolate with those of the other reference strains at home and abroad, the similarity with YZ9901 isolate was the highest (93.7%). Phylogenetic analysis based on *gp85* gene showed that ZH-08 isolate had the closest linkage to SD07LK1 isolate. This study provide the basis of biological characteristics and pathogenesis research of ZH-08 isolate.

收稿日期: 2009-10-14

基金项目: 广东省自然科学基金(8151064201000065); 国家自然科学基金(30771612); NSFC-广东联合基金(U0831002); 广东省科技计划项目(2008B02070009); 广东省科技计划项目(2009A020101006)

作者简介: 张小桃(1983-), 男, 河南焦作人, 硕士生, 主要从事动物病毒分子生物学研究, Tel: 020-85280242, E-mail: zhang110995.student@126.com

\* 通讯作者: 曹伟胜, E-mail: caoweish@scau.edu.cn

**Key words:** hemangioma; subgroup J avian leukosis virus; full-length genome sequence; *gp85*

禽白血病(Avian Leukosis, AL)是由禽白血病病毒/肉瘤病毒群病毒(ALV/RSV)引起的禽类多种良性和恶性肿瘤性疾病,临床上多以免疫抑制、生长抑制和多器官组织出现肿瘤等为其主要特征<sup>[1]</sup>。禽白血病病毒(Avian leukosis virus, ALV)分为外源性和内源性两类,外源性病毒能够诱发肿瘤的形成,而内源性病毒没有致癌性。禽白血病主要是由A、B和J亚群外源性ALV引起,其中J亚群禽白血病病毒(ALV-J)是20世纪90年代初被鉴定出的新亚群,最早分离自一例肉鸡髓细胞性白血病病例<sup>[2]</sup>。国内由杜岩等<sup>[3]</sup>首次分离和鉴定到ALV-J,随后各地都有相关报道。禽白血病存在多种病变型,其中以淋巴细胞性白血病和髓细胞性白血病对养禽业危害最大,血管瘤病例的报道在国内外较少见。血管瘤型禽白血病属于内皮性肿瘤,多为血管内皮细胞增生形成,医学上对反转录病毒诱发血管瘤的机制尚了解不多<sup>[4]</sup>。国外Burstein等<sup>[5]</sup>最早报道了蛋鸡的血管瘤病例,经过病毒分离诊断为ALV-A引起的血管瘤病例,并且发现该禽血管瘤病毒基因组序列缺少致癌基因。国内辛朝安等<sup>[6]</sup>最早报道了安徽、河南等地鸡场出现一种以趾、翼、胸部皮肤以及肝脏等器官外表有血疱的病例,证实新的病变型——血管瘤型禽白血病在我国的存在。齐新永等<sup>[7]</sup>根据血清学检测和病理学观察,证实了在上海2个规模化商品蛋鸡场中发生了由ALV-J引起的血管瘤和骨髓细胞瘤为主的多种肿瘤性疾病。成子强等<sup>[8]</sup>报道了山东某鸡场商品蛋鸡发生髓细胞瘤病和血管瘤病混合感染的病例,通过免疫组化检测,将其诊断为J亚群禽白血病,结合病理学观察推断髓细胞瘤的发生早于血管瘤,血管瘤只是一种表现现象,其主要病症仍然为髓细胞瘤病。何爱飞等<sup>[9]</sup>也报道了我国贵阳乌当地区商品蛋鸡发生血管瘤型禽白血病的病例。从上述不同地区的报道可以明显看出,血管瘤型禽白血病正在我国呈扩散的趋势,但至今国内外血管瘤相关J亚群禽白血病病毒的分离和全基因组核苷酸序列测定还未见报道,一定程度上影响了对血管瘤相关ALV-J的致病机制研究。

2008年,广东某种禽场隐性白肉种鸡发生疑似禽白血病疫情,本研究对采自患病鸡的组织样品进行了病原的分离鉴定,结合临床病变观察,经多种实验室检测检测方法检测,将其确诊为ALV-J引起的血管瘤型相关

禽白血病。同时通过分段扩增的方法,完成了该分离株的全基因组核苷酸序列测定,这将有助于了解分离株的来源以及与不同病变型分离株之间的联系。

## 1 材料和方法

### 1.1 病料来源与处理

2008年,广东某种鸡场隐性白肉种鸡从85日龄陆续出现流血死亡病例,至230日龄仍有出血现象,眼观发病鸡鸡冠苍白,体表有血疱,血疱破溃,流血不止。随机选取呈现血管瘤的送检患病鸡进行剖检,无菌采集肝、脾等组织,加入灭菌PBS与石英砂,在研钵中充分研磨,反复冻融3次,6 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,取上清经0.22 μm滤器过滤除菌备用。

### 1.2 主要试剂与仪器

ALV-J特异性单抗JE9由扬州大学兽医学院秦爱建教授惠赠;Ex Taq DNA聚合酶、DL2000 Marker、Wide Range DNA Marker(100~6 000)是TaKaRa公司产品;pGEM-T easy载体、T4 DNA连接酶是Promega公司产品;小量胶回收试剂盒是上海华舜生物工程有限公司产品;ALV抗原检测试剂盒(ALV-Ag Test Kit)是美国IDEXX公司产品;SQ Tissue组织DNA试剂盒是OMEGA公司产品;FITC-羊抗鼠IgG是北京中杉金桥生物技术有限公司产品;OLYMPUS-BHS荧光显微镜;美国ABI 9700型PCR扩增仪。

### 1.3 细胞培养

用胰蛋白酶消化铺满的DF-1细胞,接种至分别放有飞片的2组平皿,待DF-1细胞生长成70%~80%单层时,吸弃生长液,样本接种组细胞接种“1.1”中制备的病料上清,对照组细胞接种PBS作为阴性对照,37℃感作1 h,然后换2%小牛血清含量的细胞维持液。继续培养6 d,期间观察细胞的生长状况。第7天时,分别取出2个飞片进行间接免疫荧光试验。将剩余DF-1细胞反复冻融3次,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,细胞沉淀用于提取ALV前病毒基因组DNA,细胞上清按照IDEXX ALV抗原检测试剂盒说明书进行ELISA检测。

### 1.4 间接免疫荧光试验(IFA)

将取出的2个飞片用预冷丙酮-乙醇4℃固定10 min。用PBS洗涤3次,空气干燥。自然风干后

将 ALV-J 单抗 JE9 按 1 : 500 稀释,滴加至试验组和空白组细胞,37 °C 孵育 45 min。PBS 洗涤 3 次后,加入羊抗鼠 IgG 荧光标记抗体,继续 37 °C 孵育 45 min。经 PBS 洗涤后,在荧光显微镜下观察。

### 1.5 模板 DNA 的制备与 PCR 检测

以收集的细胞沉淀制备前病毒 DNA 作为 PCR 模板,按照 SQ Tissue DNA 试剂盒说明书进行。同时参照 Smith 等<sup>[10]</sup>方法,合成 H5/H7 用于检测 ALV-J,预计扩增产物为 545 bp。PCR 反应体系组成:总体积 50  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ ,10 $\times$ PCR 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ ,5 U  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  Ex Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{L}$ ,

表 1 全基因组扩增引物

片段 Fragments	引物名称 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequences	扩增片段大小/kb Amplified size
A	A-F	TGTAGTCTTATRCAATACCCTT	3.7
	A-R	CTGTTACATCTAGCGACCG	
B	B-F	CGTATGTAGCACCCGTAGGT	2.0
	B-R	GGTAATAACCACGCACACAAGTAT	
C	C-F	AGCGATAGTCGTAAGTACAGCCT	2.9
	C-R	GAATTCTGAAGCCTTCCGCTTCATGCAGGT	

### 1.7 ZH-08 株前病毒 DNA 的 PCR 扩增、克隆和测序

以前病毒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,各段 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳、纯化后,回收产物连接 pGEM-T easy 载体,按说明 16 °C 连接 4~6 h,连接产物转化感受态 DH5 $\alpha$ ,涂菌于含 100 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 氨苄青霉素的 LB 固体培养板,37 °C 过夜培养,挑取单个菌落 37 °C 摇床培养,菌液 PCR 鉴定,分别选取 3 个阳性菌液送上海英骏生物技术有限公司测序。A 片段 PCR 扩增条件:94 °C 变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 3.5 min,30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。B 片段 PCR 扩增条件:94 °C 变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。C 片段采用 Touch down PCR 反应条件:94 °C 变性 3 min;94 °C 变性 15 s,68 °C(每个循环降 1 °C)退火 10 s,72 °C 延伸 3 min 进行 16 个循环;94 °C 变性 15 s,53 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 3 min,进行 30 个循环;72 °C 延伸 8 min。

利用 DNASTar 基因分析软件,对测序结果进行核苷酸序列的剪辑和拼接,将分离株 *gp85* 基因核苷酸序列与国内外各参考毒株相同区域核苷酸序列进行相似性分析,并用 MEGA 4.0 基因分析软件绘制分离株与各参考毒株的 *gp85* 基因序列的系统进

2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP 混合物 4  $\mu\text{L}$ ,25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,灭菌双蒸水 36.5  $\mu\text{L}$ 。扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 后延伸 6 min。反应结束后,于 1% 琼脂糖凝胶中电泳。

### 1.6 全基因核苷酸序列扩增引物设计

参考 GenBank 公开的 ALV-J 序列,以原型株 HPRS-103 为标准株,采用分段扩增的方法,设计并合成 3 对引物扩增 ZH-08 株全基因组核苷酸序列(表 1),这 3 对引物相互连续且扩增片段部分重叠,其中 C 段覆盖亚群特异性 *gp85* 基因序列。

化图谱。

## 2 结果

### 2.1 鸡群发病情况

流行病学调查表明:患病禽群从 12~13 周已有爪部、胸腹部、颈部和翅部等体表流血,发病死亡(图 1),尤其是 25 周以后,有时 1 d 内可发现 5~8 只患血管瘤的病鸡,至 230 日龄仍有患病鸡流血等现象,整个禽群累积淘汰损失 20%。对送检病鸡进行剖检:肝脏肿大且表面有血疱,脾脏肿大且可见灰白色的肿瘤病灶;皮下出血处有血疱,或暗红色凝血块(图 2)。

### 2.2 细胞培养的病毒检测

对本样本接种细胞和未接种对照细胞的上清培养物进行抗原检测,结果样本接种细胞培养上清呈阳性(OD=1.261,S/P=1.496);而未接种对照组细胞培养上清呈阴性(OD=0.034,S/P=0.018)。结果说明试验组 DF-1 细胞培养中存在外源性 ALV 增殖,而阴性对照组无外源性 ALV 增殖。样本接种细胞 IFA 检测结果显示,细胞的胞质和表面有明显的特异荧光,说明样本接种细胞能与 ALV-J 特异性单抗 JE9 发生结合;未接种对照细胞表面和胞质内均未见绿色荧光,见图 3。以上结果说明从送检组织中分离到 1 株 ALV-J,命名为“ZH-08”。

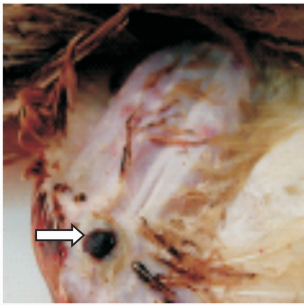


图 1 病鸡翅部皮肤有出血疱(箭头所示)  
Fig. 1 Bleeding blister in wing skin (indicated by arrow)

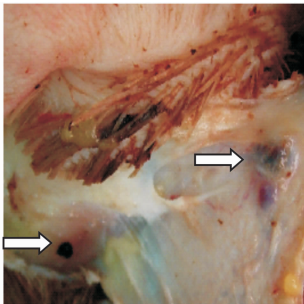
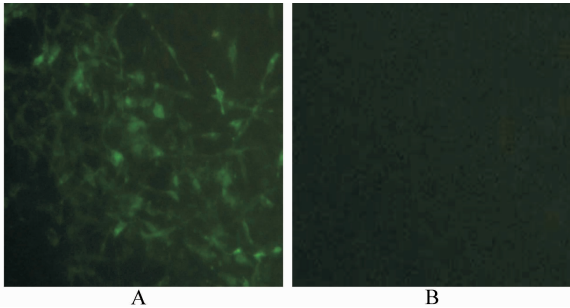


图 2 病鸡头部皮下暗红色凝血块(箭头所示)  
Fig. 2 Dark red blood clots in the head skin (indicated by arrow)



A. ZH-08 株感染组; B. 阴性对照组  
A. ZH-08 isolate; B. Negative control

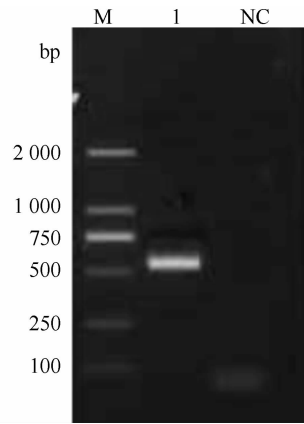
图 3 ALV-J 接种细胞的 IFA 检测结果  
Fig. 3 Detection of ALV-J in infected and control cells by IFA test

### 2.3 PCR 检测结果

以制备的前病毒基因组 DNA 作为模板, H5/H7 为引物, 进行亚群特异 PCR 检测。结果从样本接种组细胞 DNA 中扩增出约 545 bp 的片段, 与预计的片段大小相符; 而未接种对照组未扩增出相应的片段(图 4)。

### 2.4 ZH-08 株全基因组 PCR 扩增结果

以样本接种组和未接种对照组的细胞 DNA 为模板, 分别用设计合成的 3 对引物进行 PCR 扩增, 结果显示从试验组的细胞 DNA 分别扩增出大小约 3.7、2.0、2.9 kb 的目的片段, 与预计片段大小相



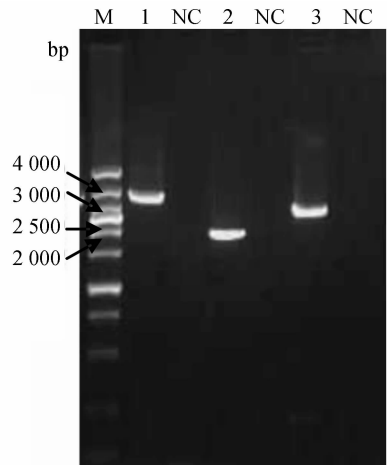
M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. 试验组细胞 DNA 扩增产物; NC. 阴性对照

M. DL2000 DNA Marker; 1. Product of ALV-J amplification of trial DNA; NC. Negative control

图 4 ALV-J 接种细胞的 PCR 产物检测

图 4 The detection of PCR products amplified from ALV-J infected and negative cells by electrophoresis

符; 而未接种对照组均未扩增出相应的片段(图 5)。



M. 大范围 DNA 相对分子质量标准 (100~6 000); 1. A-F/A-R 引物扩增产物; 2. B-F/B-R 引物扩增产物; 3. C-F/C-R 引物扩增产物; NC. 阴性对照

M. Wide Range DNA Marker (100—6 000); 1. Amplified product with A-F and A-R primers; 2. Amplified product with B-F and B-R primers; 3. Amplified product with C-F and C-R primers; NC. Negative control

图 5 ZH-08 株全基因组 PCR 扩增结果

图 5 PCR results of whole genome amplification of ZH-08 isolate

### 2.5 ZH-08 株全基因组测序结果与分析

将各段阳性重组质粒分别测序, 得到的结果利用 DNASTAR 软件进行剪辑和拼接, 获得了 ZH-08 株前病毒 DNA 的全基因组核苷酸序列。ZH-08 株

基因组核苷酸全长 7 597 bp, 在长度上与已公开的 ALV-J 毒株全基因组核苷酸序列存在一定差异<sup>[2,11]</sup>。ZH-08 株前病毒基因组大体结构为 5'-LTR-*gag-pol-env*-LTR-3', 符合典型的复制完全型反转录病毒的基因组结构, 基因组序列中不含已知的致癌基因。基因组两端的长末端重复序列 (LTR) 全长为约 313 bp, 其中两端的 U3 相当于 1-213 和 7 284-7 498 碱基位, 长度约 214 bp; R 相当于 214-234 和 7 499-7 519 碱基位, 长度为 21 bp; U5 相当于 235-313 和 7 520-7 597 碱基位, 长度为 79 bp。该分离株 LTR 中 U3 区具有典型的反转录病毒转录调控元件, 其中 Y box、TATA box、CAAT box、CArG box、PRE box 等都很保守。ALV 中重要的启动子位点 Y 盒分别位于 U3 序列的 81-85 和 145-149 碱基位, 其可作为鸡 YB-1/EF1 DNA 结合因子作用区域。具有转录起始作用的 TATA 盒位于 U3 序列的 184-190 碱基位。CAAT 盒位于 U3 序列的 39-43 碱基位, CAAT LTR Enhancer 盒位于 U3 序列的 8-16 碱基位, 两者分布于不同的位置, 可作为 A1/1EBP 和 VBP(bZip)DNA 结合因子作用区域的 CAAT 增强子, 其中 CAAT LTR Enhancer 盒存在 1 个碱基的变异。在 U3 序列的 47-56 和 110-119 碱基位存在 2 个 CArG 盒。2 个与病毒感染时诱导的 LTR 结合活性有关的 PRE 基序位

于 U3 序列的 84-88 和 95-99 碱基位。该分离株 3 个主要 ORF 核苷酸序列的位置和长度分别如下: *gag* 基因核苷酸序列相当于 592-2 683 碱基位, 长度为 2 092 bp; *pol* 基因核苷酸序列相当于 2 701-5 322 碱基位, 长度为 2 622 bp; *env* 基因核苷酸序列相当于 5 276-6 968 碱基位, 长度为 1 693 bp。

## 2.6 *gp85* 基因核苷酸序列分析

将 *gp85* 基因核苷酸序列提交 NCBI 并进行 BLAST, 证明所扩增片段为 ALV-J 的特异序列。其中 *gp85* 基因全长 924 bp, 预计编码 308 个氨基酸, 利用 DNASTar(5.07) 分析的结果表明: ZH-08 株 *gp85* 与 YZ9901 株相应核苷酸序列相似性最高 (93.7%), 与 A 亚群参考株 RAV-1 相似性最低 (48.8%), 与其它各参考株 *gp85* 核苷酸相似性在 50.6%~93.4% (表 2)。基于 *gp85* 核苷酸序列的系统进化分析表明: ZH-08 株与 SD07LK1 株的亲缘关系最近 (图 6), 所分析各地 ALV-J 毒株在同一个进化枝, 而 A、B 和 E 亚群 ALV 毒株亲缘关系较近, 同属一个进化枝。与 HPRS-103 株 *gp85* 核苷酸序列比对发现, ZH-08 株 *gp85* 核苷酸序列在 181-183 位缺失 3 个碱基, 在 643-647 位连续 5 个碱基发生突变, 不同位置碱基的缺失和突变对该毒株生物学特性的影响有待进一步研究。

表 2 10 株 ALV *gp85* 核苷酸序列相似性分析

Table 2 Similarity analysis of nucleotide sequences of *gp85* of 10 ALV isolates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	* * *	86.3	93.1	93.4	91.8	48.8	50.6	93.0	51.0	93.7	1 ZH-08 <i>gp85</i>
2	14.7	* * *	86.6	86.4	83.5	48.2	49.0	85.3	49.7	86.1	2 ADOL-7501 <i>gp85</i>
3	7.0	14.6	* * *	95.6	92.7	48.1	50.6	92.2	50.8	94.5	3 BJ0303 <i>gp85</i>
4	6.0	14.4	3.6	* * *	93.5	49.1	51.0	92.2	51.0	95.0	4 HPRS-103 <i>gp85</i>
5	8.5	19.0	6.8	6.2	* * *	49.4	51.5	92.3	51.1	94.0	5 NX0101 <i>gp85</i>
6	89.4	90.6	92.3	87.7	86.7	* * *	82.4	44.1	85.0	45.0	6 RAV-1 <i>gp85</i>
7	86.1	93.1	86.3	85.1	82.2	19.5	* * *	44.6	86.3	45.7	7 RAV-2 <i>gp85</i>
8	7.1	16.5	7.3	7.6	8.2	88.6	87.4	* * *	50.5	93.1	8 SD07LK1 <i>gp85</i>
9	85.5	90.1	86.3	86.0	84.7	16.7	15.4	86.4	* * *	45.6	9 SD0501 <i>gp85</i>
10	5.9	15.5	5.4	4.8	5.9	87.1	85.0	7.0	84.5	* * *	10 YZ9901 <i>gp85</i>

右上三角区域内数据为序列相似度; 左下三角区域内数据为序列的差异度

Data in the upper right portion indicate Percent identity; Data in the lower left portion indicate Divergence

## 3 讨论

J 亚群禽白血病在世界各地不断暴发, 因肿瘤发生和生产性能的下降, 对世界养禽业造成了巨大的经济损失<sup>[12]</sup>。起初, ALV-J 引起的肉种鸡髓细胞

性白血病最为严重。Xu 等<sup>[13]</sup>首次报道了商品蛋用型鸡发生骨髓细胞瘤病病例, 诊断为 ALV-J 引起的禽白血病, 从而提示蛋用型鸡也可发生 J 亚群禽白血病。笔者曾从广东地方品系麻黄肉种鸡中分离到 ALV-J, 一定程度上说明 ALV-J 的宿主范围较广,

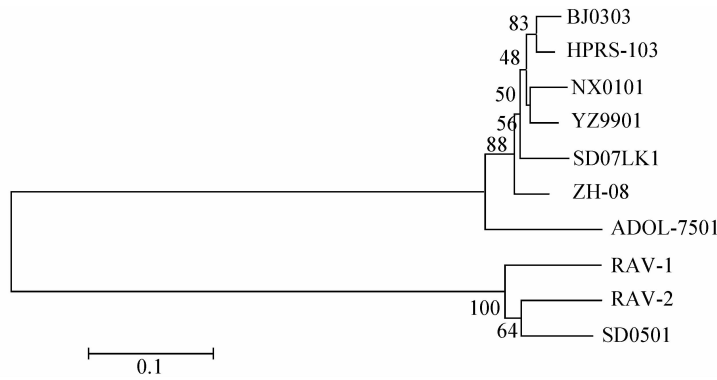


图 6 10 株 ALV *gp85* 片段的系统进化分析

Fig. 6 Phylogenetic tree of the *gp85* fragment for 10 ALV isolates

地方品系也受到 ALV-J 的威胁<sup>[14]</sup>。最近血管瘤型禽白血病在我国不断出现,提示了禽白血病的临床表现呈现多样化的趋势。本文从临床表现血管瘤的病鸡样品中分到 1 株禽白血病病毒,经实验室检测及 *gp85* 基因序列分析,证明分离株为 J 亚群禽白血病病毒,进一步提示了血管瘤型禽白血病在我国部分地区呈现流行趋势。有资料显示<sup>[3,7,13]</sup>,ALV-J 主要引起骨髓瘤,很少引起血管瘤,而且 ALV 多数毒株均能引起一种以上的肿瘤,这与成子强等<sup>[8]</sup>的报道相符。本文报道的禽白血病病例中,虽肉眼未观察到其它典型的肿瘤类型,但由于未进行病理组织切片观察,并不能完全排除其他肿瘤类型的存在。不同分离株的致瘤类型是否会受到病毒、宿主、甚至环境等多方面的影响,这些疑问有待在下一步的动物回归试验中证实。

ALV 在复制过程中通过反转录方式将其遗传信息整合到鸡基因组中,由于病毒的 RNA 聚合酶缺乏校对机制和整合的随机性,从而造成 ALV 基因组容易出现基因突变和重组,HPRS-103 全基因组序列分析显示,ALV-J 极有可能是外源 ALV 和内源性反转录病毒经过多次重组事件而产生的<sup>[15]</sup>。在 ALV-J 出现之前,Brown 等<sup>[16]</sup>报道 ALV 致肿瘤特异性主要与病毒囊膜基因和长末端重复序列有关,本文将分离株的 *gp85* 序列与国内外各参考株的相应序列进行了相似性比较,并进行了系统进化分析,结果提示 ZH-08 株与髓细胞瘤相关 YZ9901 株相似性最高,与髓细胞瘤相关 SD07LK1 株的亲缘关系最近,ZH-08 株是否来源于髓细胞瘤型流行株有待进一步证实。Chesters 等<sup>[17]</sup>推测 E(XSR) 元件在 ALV-J 的致肿瘤性方面发挥了一定作用。

将 ZH-08 株与原型株 HPRS-103 的 E(XSR) 元件核苷酸序列比较发现相似性高达 96.6%,但这 2 株 ALV-J 属于不同病变型的分离株,ZH-08 株的致瘤机制有待进一步研究。

参考已公开 ALV-J 的序列,设计并合成 3 对引物,作者首次完成了 1 株血管瘤相关分离株的前病毒 DNA 全基因组核苷酸序列测定,为后续血管瘤型 J 亚群禽白血病的研究提供了重要信息。有资料显示<sup>[5,8-9]</sup>,ALV-A、ALV-B 和 ALV-J 都可以在临床上引起血管瘤型禽白血病,本文完成的前病毒全基因组核苷酸序列将有助于分析各病毒核苷酸序列的差异与病毒致病性的关系,并为该毒株的生物学特性以及致病机制研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] SAIF Y M, BARNES H J, GLISSON J R, et al. Disease of Poultry [M]. 11th ed. Iowa: Iowa State University Press, 2003:64-81.
- [2] PAYNE L N, BROWN S R, BUNSTEAD N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens[J]. *Journal of General Virology*, 1991, 72(4): 801-807.
- [3] 杜岩,崔治中,秦爱建. 从市场商品肉鸡中检出 J 亚群禽白血病病毒[J]. *中国家禽学报*, 1999, 1: 1-4.
- [4] GRANT J W, GALLAGHER P J, HENDINGER C. Hemangioblastoma. An immunohistochemical study of ten cases[J]. *Acta Neuropathol*, 1988, 76(1): 82-86.
- [5] BURSTEIN H, GILEAD M, BENDHEIM U, et al. Viral aetiology of hemangiosarcoma outbreaks among layer hens[J]. *Avian Pathology*, 1984, 13(4): 715-

- 726.
- [6] 辛朝安,曹伟胜,罗开健,等. 鸡血管瘤型白血病诊断初报[J]. 养禽与禽病防治,2006,2(11): 2.
- [7] 齐新永,刘佩红,孙泉云,等. 上海地区商品代蛋鸡 J 亚群禽白血病的病理学观察[J]. 中国兽医科学,2007,37(9): 798-801.
- [8] 成子强,刘思当,崔治中,等. 商品蛋鸡成髓细胞瘤、血管瘤型 J 亚群白血病病理学初报[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(7): 935-940.
- [9] 何爱飞,徐春志,雷云华,等. 蛋鸡血管瘤型禽白血病的诊断[J]. 动物医学进展,2009,30(1): 112-115.
- [10] 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 Research*, 1998, 54(1): 87-98.
- [11] 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[J]. 微生物学报,2009,49(3): 400-404.
- [12] SPENCER J L, CHAN M, NADIN D S. Relation between egg size and subgroup J avian leucosis virus in eggs from broiler breeders[J]. *Avian Pathology*, 2000, 29: 617-622.
- [13] XU B R, DONG W X, YU C M, et al. Occurrence of avian leucosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China[J]. *Avian Pathology*, 2004, 33 (1): 13-17.
- [14] 张小桃,卢受昇,曹伟胜,等. J 亚群禽白血病病毒 SCAU-0901 株的分离鉴定[J]. 中国兽医科学,2009, 39(8): 674-678.
- [15] SACCO M A, HOWES K, SMITH L P, et al. Assessing the roles of endogenous retrovirus EAV-HP in avian leucosis virus subgroup J emergence and tolerance[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(19): 10525-10535.
- [16] BROWN D W, ROBINSON H L. Influence of env and long terminal repeat sequences on the tissue tropism of avian leucosis viruses[J]. *Journal of Virology*, 1988, 62(12): 4828-4831.
- [17] CHESTERS P M, SMITH L P, NAIR V. E (XSR) element contributes to the oncogenicity of avian leucosis virus (subgroup J)[J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87: 2685-2692.