

用 ALV-J gp85 单克隆抗体证明蛋鸡存在 J 亚群禽白血病

徐镛蕊¹, 董卫星², 余春明¹, 冯小宇¹, 李 宁¹, Lucy F. Lee³, Maoxiang Li³

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094; 2. 安徽省农业委员会畜牧局, 合肥 230001;

3. Avian Disease and Oncology Lab. USDA. East Lansing, MI 48823, USA)

摘要: 采用免疫组化法, 对病理学初步诊断为蛋用型鸡 J 亚群白血病的自然发病鸡的肿瘤、骨髓、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、心脏、胰脏、输卵管、卵巢、腺胃、骨骼肌、大脑、坐骨神经, 用特异性抗 J 亚群禽白血病病毒(ALV-J) 囊膜糖蛋白 gp85 的单克隆抗体进行检测, 待检的组织切片中均检出阳性抗原, 免疫组化的研究结果与病理学诊断结果相一致。在国内外首次发现并报道蛋用型鸡 J 亚群禽白血病的自然病例。

关键词: J 亚群禽白血病病毒; 抗 ALV-J gp85 单克隆抗体; 免疫组化; 蛋用型鸡

中图分类号: S858.315.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)03-0269-03

自从 1991 年 Payne^[1] 在英国发现 J 亚群禽白血病以来, 此病给许多国家的肉鸡业造成重大损失。J 亚群禽白血病不同于已知的亚群 A、B、C、D、E, ALV-J 的靶细胞为骨髓细胞, 引起骨髓细胞瘤病。有关蛋用型鸡 J 亚群禽白血病的自然病例, 国内外未见报道。作者于 2002 年 5 月在临床发病的海兰褐蛋鸡中发现了骨髓细胞瘤病的自然病例。死亡率占全群的 10% 以上, 致死率 100%。通过尸体剖检, 骨骼上的肿瘤多见于趾骨及胸骨内侧, 呈结节状的生长, 呈淡黄色。组织病理学观察, 瘤细胞与正常骨髓细胞相似, 细胞核呈空泡状, 常位于细胞的一侧, 一般有一个明显的核仁, 胞浆内充满圆形的嗜酸性颗粒, 初步诊断为 J 亚群禽白血病^[2]。为了进一步确诊, 本研究采用抗 J 亚群白血病病毒囊膜蛋白 gp85 的单克隆抗体对经病理学诊断的自然病例的组织切片进行了 ALV-J 的免疫组织化学研究。

1 材料与方法

1.1 材料

抗 ALV-J gp85 单克隆抗体由美国农业部禽病与肿瘤研究所提供。HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京鼎国生物技术发展中心。SPF 鸡购自北京市

实验动物研究中心。

1.2 待检病料

从临床发病的海兰褐蛋鸡中发现了骨髓细胞瘤病的自然病例。病鸡临床表现为精神沉郁, 食欲丧失, 鸡冠苍白, 严重贫血, 极度消瘦, 腹泻, 趾骨部位皮肤和翅膀羽毛囊出血, 当出血部位结痂后, 用手将痂皮剥去, 血流从毛囊喷出, 死亡率占全群的 10% 以上, 致死率 100%。通过尸体剖检、组织病理学观察, 初步诊断为 J 亚群禽白血病。病料取自临床发病的海兰褐蛋鸡的骨髓、肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、心脏、胰脏、输卵管、卵巢、腺胃、骨骼肌、大脑、坐骨神经等。用 10% 的福尔马林溶液固定, 石蜡包埋, 切片, 40℃ 烤片 12 h 备用。同时设 2 组对照, 对照组 (1) 替代试验的 5 只鸡的病料同试验组; 对照组 (2) 5 只鸡的组织材料取自 SPF 鸡。

1.3 免疫组化操作方法^[3]

1.3.1 脱蜡 将切片置入二甲苯中脱蜡, 再从无水乙醇、梯度乙醇下行至水。

1.3.2 封闭 先用 3% H₂O₂ 封闭 20 min, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。再用正常羊血清封闭 20 min。

1.3.3 加一抗 试验组滴加 ALV-J gp85 单克隆抗体于组织切片上, 37℃ 孵育 1 h。用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。替代试验的对照组 (1) 用 PBS 替代一抗, 其余步骤同试验组一致。阴性对照组 (2) 的处理方法同试验组完全相同。

1.3.4 加二抗 加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37℃ 孵育 1 h。用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。

收稿日期: 2004-01-16

基金项目: 国家自然科学基金(30371073); 北京市自然科学基金(5053027)

作者简介: 徐镛蕊(1955-), 女, 安徽蚌埠人, 教授, 硕士, 从事畜禽疾病诊断及动物分子病理学研究

1.3.5 显色 在组织切片上滴加 0.05 mol 的 DAB(含 0.1% 的 H_2O_2), 显色 7 min, 用蒸馏水终止显色。

1.3.6 复染 苏木精染液中染核 1 min。

1.3.7 分色 1% 的盐酸酒精分色 10s。

1.3.8 蓝化 在自来水中蓝化 10 min。

1.3.9 梯度酒精脱水 透明 封片镜检。

1.4 细菌学检查

无菌取肝、脾和关节囊液分别接种于血琼脂培养基和麦康凯培养基, 置温箱 37 °C 培养 24 h。

2 结果

试验结果发现, 在胰腺中, 胰岛的内分泌细胞的胞浆内和外分泌部、腺泡上皮细胞胞浆内检出阳性抗原。在肝脏中, 肝细胞的胞浆内、肿瘤细胞的胞浆以及枯否氏细胞内呈现阳性抗原着色, 胞浆内有颗粒状棕色的阳性抗原着色(图 A)。肾脏中抗原阳性反应主要在皮质部, 肾小管上皮细胞胞浆内检出阳性抗原, 近曲小管比远曲小管着色深, 在肾小管的游离面呈强阳性反应, 着色最深(图 B)。肾小球仅有极微弱的着色反应。在骨髓中可见多灶状肿瘤细胞的增生, 胞浆的颗粒染成棕色(图 C)。而 Arshad 在研究 ALV-J 对组织嗜性的不同试验中在骨髓中均未发现阳性抗原^[4,5], 但 Ghrstbeh 的免疫组化研究在骨髓中发现阳性抗原与本研究结果相一致^[6]。胶质细胞的胞浆中可见棕色的阳性抗原。在心脏的心肌纤维的胞浆及浆膜检出阳性抗原。有些部位呈强阳性反应, 胞浆内有深棕色颗粒。脾脏的肿瘤细胞的胞浆中的颗粒呈现着色反应(图 D)。输卵管黏膜上皮细胞的胞浆内呈现阳性反应。固有层的分枝管状腺的腺细胞的胞浆内有阳性抗原颗粒, 肺脏的细支气管上皮细胞, 肺泡壁的毛细血管及肺泡上皮细胞有着色反应。在性腺中卵巢的血管周围的肿瘤细胞的胞浆内有着色反应。坐骨神经的轴突和髓鞘可见着色反应。腺胃腺泡上皮细胞的基部、肌膜层中平滑肌中呈现阳性反应。

替代试验的对照组(1)和阴性对照组(2)中均未出现着色反应, 没有检测到 ALV-J 阳性抗原。

3 讨论

3.1 此前, 世界上仅见肉用型鸡发生 J 亚群白血病的报道, 蛋用型鸡发生该病是徐镛蕊等首次发现及报道^[7]。本研究通过抗 J 亚群禽白血病病毒囊膜蛋

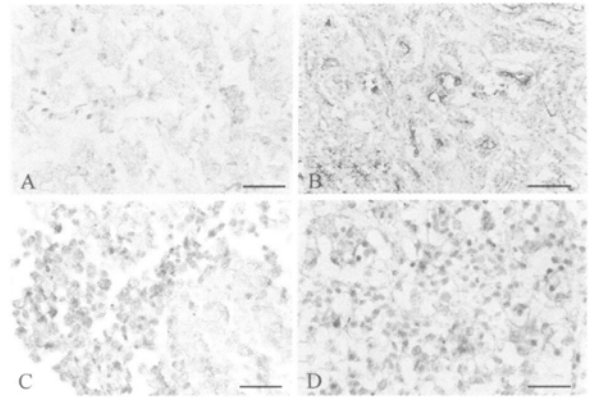


图 1 抗 J 亚群禽白血病病毒囊膜蛋白 gp85 特异性单克隆抗体的免疫组化检测

Fig. 1 Photomicrographs of immunohistochemical staining for ALV-J gp85 antigen in tissues from ALV-J naturally diseased egg-type chickens

- A. 肝脏内有颗粒状棕色的阳性抗原着色, 标尺示 20 μ m; B. 肾小管上皮细胞胞浆内检出阳性抗原, 肾小管的游离面呈强阳性反应, 标尺示 50 μ m; C. 骨髓中肿瘤细胞的胞浆内颗粒染成棕色, 标尺示 20 μ m; D. 脾脏的肿瘤细胞的胞浆中的颗粒呈现着色反应, 标尺示 20 μ m
- A. Positive staining in the liver, Bar= 20 μ m; B. Intense staining in the free surface of renal tubule, Bar= 50 μ m; C. Positive staining in the marrow, Bar= 20 μ m; D. Positive staining in the spleen, Bar= 20 μ m.

白 gp85 特异性单克隆抗体的免疫组化研究, 从自然病例的许多组织上检出了 ALV-J 特异性抗原, 与病理学诊断结果相一致。对于该发病鸡群 ALV-J 的 PCR 扩增和序列分析, 检出 ALV-J 亚群特异性片段^[7]。本研究的免疫组化研究结果显示, ALV-J 可损害发病鸡的输卵管, 这与临床上蛋鸡的产蛋量持续较低(60%~70%)有关, 有 1/3 的剖检病鸡卵巢和输卵管幼稚型, 到产蛋日龄还不发育, 或有些卵巢有发育卵泡输卵管略有些发育, 但输卵管粗细不均^[8], 说明 ALV-J 对产蛋鸡生产性能的危害很大。

3.2 J 亚群禽白血病病毒引起骨髓细胞瘤病。在骨髓、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、卵巢、胰脏等脏器中可见大量的骨髓瘤细胞。肿瘤细胞胞浆内充满圆形粗大的嗜酸性颗粒, 具有特征性。组织切片上不会与其他亚群的淋巴细胞白血病相混淆。由 A、B、C、D 亚群禽白血病病毒引起的淋巴细胞白血病的肿瘤细

胞是大小比较一致的成淋巴细胞^[9],很容易与骨髓细胞瘤区分。尽管该病有其组织病理学的特点,但进一步确诊,必须用抗 ALV-J 囊膜蛋白 gp85 的单克隆抗体检出抗原。

参考文献:

- [1] Payne L N, Brown S R, Bumstead N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72: 801~ 807.
- [2] 徐镛蕊,吕艳丽,董卫星,等. 鸡骨髓细胞瘤病的病理学诊断[J]. *畜牧兽医学报*, 2002, 33(6): 562~ 564.
- [3] 王百沄,李玉松,黄高 17. 病理学技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001. 397~ 418.
- [4] Arshad S S, Howes K, Barron G S, et al. Tissue tropism of the HPRS-103 strain of J subgroup avian leukosis virus and of a derivative acutely transforming virus [J]. *Vet Pathol*, 1997, 34: 127~ 137.
- [5] Arshad S S, Smith L M, Howes K, et al. Tropism of subgroup J avian leukosis virus as detected by *in situ* hybridization[J]. *Avian Pathol*, 1999, 28: 163~ 169.
- [6] Ghrstbeh S, Brown T, Stedman N, et al. Immunohistochemical localization of avian leukosis virus subgroup J in tissues from naturally infected chickens[J]. *Avian Diseases*, 2001, 45(4): 992~ 998.
- [7] Xu Bir rui, Dong Weir xing, Yu Chur ming, et al. Occurrence of avian leukosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China[J]. *Avian Pathology*, 2004, 33 (1): 13~ 17.
- [8] 徐镛蕊,董卫星,冯小宇,等. 采用 SP 法检测商品蛋鸡感染 J 亚群禽白血病病毒对产蛋性能的影响[J]. *中国家禽*, 2003, 25(6): 10~ 12.
- [9] Calnek B W. 禽病学[M]. 高 福,苏敬良,译. 第 10 版. 北京:中国农业大学出版社, 1999. 529~ 577.

Occurrence of ALV-J in Egg-type Chickens Certified by Monoclonal Antibody against ALV-J gp85

XU Bir rui¹, DONG Weir xing², YU Chur ming¹, FENG Xiao-yu¹, LI Ning¹,
Lucy F. Lee³, Maoxiang Li³

(1. *College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;*

2. *Animal Husbandry Bureau, Anhui Agriculture Committee, Hefei 230001, China;*

3. *Avian Disease and Oncology Lab. USDA, East Lansing, MI USA 48823, USA*)

Abstract: Immunohistochemical method was used to detect avian leukosis virus subgroup J from egg-type chicken, which was preliminarily diagnosed to appear subgroup J avian leukosis. The organs from these chickens were examined by ALV-J gp85 monoclonal antibody, these organs included marrow, liver, spleen, kidney, lung, heart, pancreas, oviduct, ovary, ventriculus glandularis, skeletal muscle, cerebrum, ischiaticus nerve. The results from immunohistochemistry using monoclonal antibody against gp85 envelope protein of avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) revealed that all examined organs contained detectable antigen of ALV-J. The result of immunohistochemistry agrees with that of pathology diagnosis. It is the first study at home and abroad that discovered and reported natural disease of ALV-J in egg-type chickens.

Key words: avian leukosis virus subgroup J; ALV-J gp85 McAb; immunohistochemistry; egg-type chicken