

某海兰褐鸡场祖代、父母代及商品代鸡 血管瘤型 ALV-J 的分离与鉴定

倪伟^{1,2}, 秦立廷², 孙洪磊¹, 曲悦¹, 孙美玉², 高玉龙², 于宏³, 王笑梅^{2*}, 刘思当^{1*}

(1. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
兽医生物技术国家重点实验/禽传染病研究室, 哈尔滨 150001; 3. 泰安市畜牧兽医局, 泰安 271018)

摘要: 从山东省某海兰褐鸡场祖代、父母代种鸡和商品代蛋鸡中获得疑似血管瘤型禽白血病(Avian leukosis, AL)病料。采用病理剖检、IFA、分子生物学检测, 确定为 J 亚群禽白血病。从祖代、父母代病料中各分离到 1 株 J 亚群禽白血病病毒(J subgroup of avian leukosis virus, ALV-J), 从商品代蛋鸡中分离到 4 株 ALV-J。根据原型毒株 HPRS103 设计 1 对 *gp85* 基因引物, 获得 *gp85* 基因序列。获得的 *gp85* 基因序列与各亚群参考毒株序列核苷酸同源性比对, 结果显示: 分离自商品代蛋鸡的 Commercial03 株、Commercial04 株、Commercial06 株和父母代分离株 Parent02 株位于同一分支, 同源性在 97.2%~97.9%, 与 HPRS103 株同源性 94.7%~95.2%; Commercial05 株与祖代分离株 Grandparent01 株在同一分支, 与 HPRS103 株同源性为 98.3%, 4 株分离自商品代的 ALV-J 同源性为 95.0%~99.9%。表明商品代蛋鸡中的 ALV-J 可能来自父母代或祖代种鸡的垂直传播, 也可能来自于其他来源的水平传播。从同一鸡场祖代、父母代及商品代鸡中分离得到 ALV-J, 这在我国还是首次。对后续研究其基因突变、致瘤机制等奠定了良好的基础。

关键词: 血管瘤; J 亚型禽白血病; 分离鉴定; 遗传分析

中图分类号: S852.659.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)09-1341-05

The Isolation and Detection of Haemangiomas Type of ALV-J about Grandparent, Parent and Commercial Layers in a Hyline Brown Chicken Farm

NI Wei^{1,2}, QIN Li-ting², SUN Hong-lei¹, QU Yue¹, SUN Mei-yu²,
GAO Yu-long², YU Hong³, WANG Xiao-mei^{2*}, LIU Si-dang^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. Division of Avian Infectious Disease, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 3. Acta Veterinaria Station of Tai'an, Tai'an 271018, China)

Abstract: Some suspected haemangiomas type of avian leukosis samples were got from one Hyline brown chicken farm in Shandong Province. Six subgroup J avian leukosis viruses (ALV-J) were isolated and identified, among those were strains two virus strains were isolated from parent and grandparent breeding chickens respectively, the other four strains from commercial chickens. The *gp85* gene of all the six ALV-J strains were amplified by PCR with a pair of specific primers designed according to the HPRS103 strain. The analysis of sequence of *gp85* gene by DNASTAR software showed that Commercial strains 03, 04 and 06 were in the same embranchment with Parent02, the rate of homology was between 97.2% and 97.9%, the rate of homology with HPRS103 was between 94.7% and 95.2%; Commercial 05 strain and Grandparent 01 strain were

收稿日期: 2011-01-20

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(nycytx-42-G3-01); 兽医生物技术国家重点实验室开放课题基金(SKLVBF201005)

作者简介: 倪伟(1986-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事禽免疫抑制病研究, E-mail: nikeer59@126.com

* 通讯作者: 王笑梅, E-mail: xmw@hvri.ac.cn; 刘思当, E-mail: liusidang@126.com

in the same embranchment, the rate of homology with HPRS103 is 98.3%. The rate among four commercial strains is 95.0%-99.9%. All above implied that ALV-J infected in egg-type groups partially comes from grandparent breeding chickens or parent breeding chickens through vertical transmission, or from other resources through horizon transmission. The isolation of the six strains from grandparent, patent and commercial layers is the first reported in China, and it lays a good foundation for the research about gene mutation and tumorigenic mechanism.

Key words: haemangioma; J subgroup of ALV; isolation and detection; heredity analysis

禽白血病是由禽白血病病毒引起的家禽多种肿瘤性疾病的总称,主要以造血细胞恶性增生为特征,包括淋巴细胞性白血病、成红细胞性白血病、成髓细胞性白血病、骨髓细胞性白血病、血管瘤、内皮瘤、肾真性瘤、纤维肉瘤和骨化石瘤等^[1-2]。J亚群禽白血病(Subgroup J avian leukosis)是由J亚群禽白血病病毒(Avian leukosis virus of subgroup J, ALV-J)引起的一种以免疫抑制、生长抑制和髓细胞癌变为特点的传染性骨髓细胞瘤病。

ALV-J自1991年从英国肉鸡中分离出来^[3],已在世界范围内广泛流行。我国在1999年从市场上商品代肉鸡中分离并检测出了ALV-J^[4],2002年徐镛蕊^[5]在海兰褐蛋鸡中发现ALV-J以来,随后又发现了ALV-J与网状内皮增生症病毒的混合感染^[6],同时J亚群禽白血病的肿瘤表现形式也越发多样化,伴发髓细胞瘤、成髓细胞瘤和血管瘤及其混合感染^[7]等。本研究对山东某一发生疑似血管瘤型ALV的海兰褐祖代鸡场及其子代鸡场采集病料,通过病理解剖、组织学观察、分子生物学检测等确定为ALV-J,并从祖代、父母代鸡中分别分离到1株ALV-J,从商品代中分离到4株ALV-J,并进行遗传进化分析。

1 材料与方 法

1.1 病料来源

山东省某海兰褐种鸡场商品代蛋鸡在进入产蛋期时,采食少,外观消瘦且生长缓慢,鸡冠发白、肿头肿眼、翅下有囊肿、腿部及趾间有血疱;剖检发现肝脏表面有灰白色肿瘤灶,且有血疱,脾脏上有白色肿瘤结节,在肋骨内测、胸骨上有白色肿瘤结节等疑似禽白血病症状。此商品代蛋鸡的直系父母代、祖代鸡场个别种鸡瘦弱、鸡冠苍白、消瘦疑似禽白血病。

1.2 所用主要试剂和细胞

各种限制性内切酶,PrimeStarTM HS DNA polymerase、DNA marker、PMD-18-T载体等购自

大连宝生物工程有限公司;质粒小量提取试剂盒和凝胶回收试剂盒为QIA GEN公司产品;大肠杆菌DH5 α 感受态细胞和DF-1细胞均为本实验室保存。

1.3 病理组织学观察

外观检查和剖检疑似ALV病鸡,采集肝脏、肾脏、脾脏、骨髓等组织及血管瘤发生部位,中性福尔马林固定,常规制作石蜡切片,HE染色,镜检。

1.4 病毒分离鉴定

取100 mg病变部位的组织,研磨过滤接种DF-1细胞,37℃CO₂培养箱吸附1 h后换1%血清培养液维持7 d,盲传3代。然后将细胞传至6孔板,做IFA试验。同时将病料组织按照Tissue DNA提取试剂盒说明书提取前病毒基因组DNA,引物H5/H7^[8](H5:GGATGGTGGCTGACTGTGT;H7:CGAACCAAAGGTAACACACG)PCR扩增,预期扩增片段545 bp。

1.5 gp85 序列分析

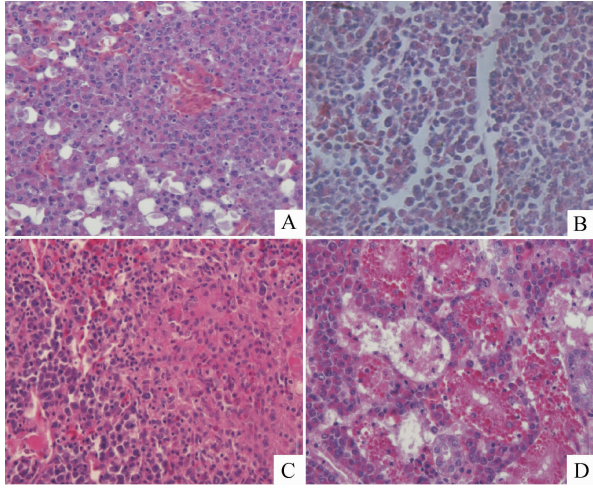
设计ALV-J gp85引物(F:GGAGTTCATC-TATTGCAACAACC;R:GCGCCTGCTACGGTGTGT)^[9]进行PCR扩增,1%琼脂糖凝胶电泳。预期扩增片段924 bp。将gp85特异性引物扩增的产物回收、纯化后,连至PMD18-T载体进行序列测定。利用DNAStar软件,将测序得到的结果与十几株国内外ALV-J gp85核苷酸序列进行相似性分析并制作遗传进化图谱。参考毒株为NX0101(DQ115805)、HPRS103(EF058157)、ADOL-Hc1(AF452249)、ADOL-7501(AY027920)、GD0512(EF103133)、GD06SL1(EF107624)、HB0301(AY897229)、SCAU-0901(FJ619190)、MDJ-1(HM038031)、JL3-1(FJ462344)、HuB2(HQ533156)、JS09GY6(GU982310)。

2 结 果

2.1 组织学观察

肝脏中有大大小小的肿瘤病灶,窦状隙内大量

红细胞充盈,血管周围有大小不等的髓细胞浸润,肝细胞有空泡变性,可见残存的肝索及中央静脉(图 1A);骨髓的原有结构消失,大量髓细胞增生(图 1B);脾脏白髓的体积、数量明显减少,红髓内的髓细胞多呈弥漫性增生,鞘动脉周围有灶状髓细胞浸润,淋巴细胞大量坏死减少,成纤维细胞增生(图 1C);肾小管上皮完全坏死,形成嗜酸性蛋白滴,间质充满大量髓细胞(图 1D)



A. 肝脏中肿瘤灶; B. 骨髓中大量的髓细胞; C. 脾脏中红髓内髓细胞增生; D. 肾脏中髓细胞增生

A. Tumor cells in liver ; B. Abundant myelocytes in bone marrow ; C. Myelocytes hyperplasia in spleen ; D. Myelocytes cells in kidney

图 1 ALV 病鸡肝脏组织学观察 (400×)

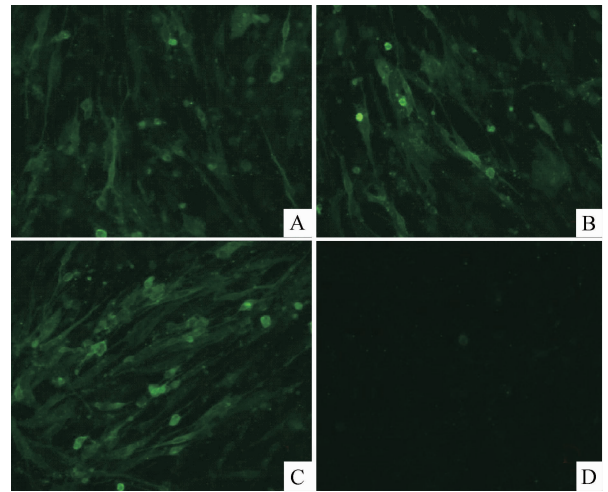
Fig. 1 Pathological section of liver of ALV infected chickens (400×)

2.2 病毒分离鉴定结果

将祖代、父母代及商品代病料研磨液过滤后接种 DF-1 细胞,盲传 3 代后做 IFA,接毒 DF-1 细胞轮廓清楚,出现特异性的胞浆染色,发出荧光信号呈现阳性反应;而正常细胞未发出特异性荧光信号。表明 ALV-J 病毒在 DF-1 细胞中增殖。H5/H7 引物扩增出现预期 545 bp 片段(图 2)。

2.3 gp85 序列测定及分析

通过 gp85 基因扩增得到 924 bp 的片段。测序,将获得的核苷酸序列提交 NCBI 并进行 BLAST 检测,证明所扩增的片段为 ALV-J 的特异片段。分别进行了遗传进化树分析(图 3)和核酸序列同源性分析(图 4)。



A~C. 祖代、父母代、商品代病毒接种 DF-1 细胞 7 d 后显示特异性荧光信号; D. 正常 DF-1 细胞无特异性荧光

A-C. Special fluorescence signals appeared seven days after DF-1 cells infected with grandparent, parent and commercial viruses

D. The normal DF-1 cells had no fluorescent signals

图 2 IFA 鉴定结果 (100×)

Fig. 2 The identification results by IFA (100×)

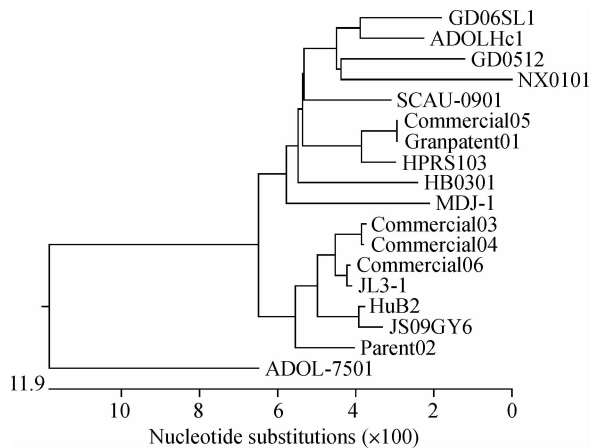


图 3 各毒株 gp85 核苷酸序列进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of gp85 nucleotide sequence of ALV isolates and reference strains

3 讨论

ALV 的 gp85 基因含有病毒宿主决定簇,可识别靶细胞膜上的特异性受体,对病毒的细胞嗜性和抗原性等起着重要的作用,是区分各个亚群的决定性基因^[10]。本研究所分离 ALV-J gp85 序列全长为 921 和 924 bp,分别编码 307 个氨基酸和 308 个氨基酸。利用 DNASTAR 软件对 gp85 基因进行分析,6 株病毒 gp85 核苷酸序列同源性较高,同源性

在 94.7%~100%，但是 6 株分离病毒分布于 2 个进化分支上，Commercial05 株与祖代分离株 Grandparent01 株在同一分支上，与 HPRS103 株同源性的 98.3%，由于分离自祖代海兰褐蛋种鸡的 Grandparent01 株与 HPRS103 株的同源性最高，可以推测祖代种鸡的感染来自国外的引种，而商品代的 Commercial05 株与 Grandparent01 株同源性 100%，证明祖代种鸡感染 ALV-J 可以垂直传播给子代。然而，其中分离自商品代蛋鸡的 Commercial03 株、Commercial04 株、Commercial06 株和父母代分离株 Parent02 株位于同一分支，与 HPRS103 株的同源性仅在 94.7%~95.2%，而与

本研究室所分离的 JL3-1 和 HuB2 同源性较高 (96.2%~99.8%)。这可能是因为病毒在传播过程发生变异，或者与其他来源的水平传播有关。禽白血病病毒属于反转录病毒科 C 型反转录病毒属，遗传物质为 RNA，依赖于反转录酶将 RNA 反转录为 cDNA 整合入鸡体细胞基因组内，本身错配率高，容易发生变异；病毒在商品代鸡体内变异加强，临床症状表现多态性，也有可能与其他来源的水平传播有关；鸡体在受到其他病毒的感染时，也有可能使禽白血病病毒发生变异；且病毒在鸡体内不断传代过程中，病毒也有可能发生突变导致其临床症状的改变及多态性变化。

		Percent Identity																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
Divergence	1	■	99.9	95.1	99.0	97.2	95.1	92.5	97.5	98.8	92.2	93.4	92.2	93.4	92.6	97.1	88.4	92.6	95.1	1	Commercial03
	2	0.1	■	95.2	98.9	97.3	95.2	92.6	97.4	98.7	92.3	93.5	92.3	93.5	92.7	97.0	88.5	92.7	95.2	2	Commercial04
	3	5.2	5.1	■	95.0	94.7	100.0	94.1	93.9	94.8	93.4	93.8	94.5	95.5	93.7	93.7	88.1	94.9	98.3	3	Commercial05
	4	1.0	1.1	5.3	■	97.9	95.0	92.9	98.0	99.8	92.9	93.8	92.4	93.9	93.2	97.6	88.4	93.7	95.0	4	Commercial06
	5	3.0	2.9	5.5	2.2	■	94.7	93.1	96.2	97.7	93.5	94.0	92.9	93.9	92.2	95.8	88.7	93.8	94.7	5	Parent02
	6	5.2	5.1	0.0	5.3	5.5	■	94.1	93.9	94.8	93.4	93.8	94.5	95.5	93.7	93.7	88.1	94.9	98.3	6	Grandparent01
	7	8.2	8.0	6.7	7.5	7.6	6.7	■	92.5	92.8	93.0	92.4	93.6	94.0	91.5	92.3	87.8	92.4	94.3	7	MDJ-1
	8	2.4	2.6	6.2	1.9	3.7	6.2	7.9	■	98.0	92.9	92.7	92.4	93.8	92.4	99.1	87.3	93.3	94.2	8	HuB2
	9	1.2	1.3	5.6	0.2	2.4	5.6	7.5	1.9	■	92.9	93.8	92.4	93.9	93.2	97.6	88.4	93.7	94.8	9	JL3-1
	10	7.9	7.8	7.2	7.3	7.1	7.2	7.3	7.0	7.3	■	94.7	93.5	94.7	92.9	92.7	86.6	96.3	93.6	10	GD06SL1
	11	6.9	6.8	6.7	6.5	6.6	6.7	8.4	7.3	6.5	5.6	■	92.7	93.4	92.8	92.3	86.5	94.1	93.9	11	GD0512
	12	8.2	8.1	5.8	7.9	7.5	5.8	6.7	7.4	7.9	6.7	7.6	■	94.7	91.7	92.5	86.9	93.8	94.6	12	HB0301
	13	6.7	6.6	4.5	6.1	5.9	4.5	6.5	5.8	6.1	5.5	6.8	5.3	■	92.1	93.6	87.5	95.2	95.2	13	SCAU-0901
	14	8.3	8.2	6.6	7.7	8.5	6.6	9.7	8.2	7.7	7.4	7.5	8.6	8.0	■	92.3	84.6	93.7	94.2	14	NX0101
	15	3.0	3.1	6.5	2.4	4.3	6.5	8.3	0.8	2.4	7.5	7.9	7.4	6.2	8.4	■	86.9	92.7	94.0	15	JS09GY6
	16	13.2	13.1	14.1	13.2	13.0	14.1	14.3	13.9	13.2	14.9	15.1	14.6	14.1	19.0	14.6	■	87.2	87.5	16	ADOL-7501
	17	7.3	7.2	5.2	6.4	6.4	5.2	7.9	6.6	6.4	3.7	5.7	6.0	4.5	6.5	7.2	15.4	■	94.5	17	ADOL Hc1
	18	5.2	5.1	1.8	5.3	5.5	1.8	6.3	5.8	5.5	6.9	6.5	5.5	4.7	6.1	6.1	14.6	5.7	■	18	HPRS103

图 4 分离株核苷酸序列与各亚群参考株的同源性比较

Fig. 4 Homologous comparisons of the gp85 nucleotide acid sequence of isolated with other reference chicken ALV strains of different subgroups

目前国内外分离到的引起血管瘤表现的禽白血病病毒包括 ALV-A^[11-13]、ALV-B^[14] 和 ALV-J^[15]。临床表现为在病鸡皮肤或内脏器官表面有血疱，血疱破裂后流血不止，病鸡表现贫血症状，常死于大量失血。组织学观察可见肝脏小血管灶性增生，周围髓细胞浸润，胞核偏位，胞质充满嗜酸性颗粒细胞，组织切片可见血管内皮细胞增生形成的血管瘤及髓细胞浸润，而本研究中的病理组织学观察仅发现髓细胞浸润，这可能与不同毒株致病性的差异、感染鸡的品种、日龄等方面有关，其致病机制需要进行进一步的研究。本研究从具有血缘关系的同一祖代、父母代、商品代鸡中分离获得禽白血病病毒，这在我国还是首次，为商品代鸡 ALV-J 感染的流行病学调查、传播途径等研究提供有效证据，并对研究其基因突变、发病机理及血管瘤嗜性等后续研究奠定了良

好的基础。

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] BAI J, PAYNE L N, SKINNER M A. HPRS-103 (exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an env gene related to those of endogenous elements EAV20 and E51 and an E element found previously only in sarcoma viruses[J]. J Virol, 1995, 69:779-784.

[3] PAYNE L N, BROWN S R, BUN STEAD N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens[J]. J Gen Virol, 1991, 72: 801-807.

[4] 杜 岩, 崔治中, 秦爱建, 等. 从市场商品肉鸡检出 J

- 亚群禽白血病病毒[J]. 中国家禽学报,1999,21(1): 1-4.
- [5] 徐镛蕊,董卫星,何召庆,等. 间接荧光抗体法快速诊断海兰褐蛋鸡 J 亚群禽白血病的研究[J]. 中国兽医杂志,2002,38(9): 7-9.
- [6] 商营利,刘思当,丁宝君,等. 鸡混合感染 J 亚群禽白血病病毒与禽网状内皮增殖症病毒的初步研究[J]. 家禽科学,2003,5: 13-15.
- [7] 成子强,刘思当,张 利,等. 商品蛋鸡骨髓细胞瘤-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.
- [8] 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 leukosis virus[J]. *Virus Res*, 1998, 54: 87-98.
- [9] 杨 凤,孙洪磊,倪 伟,等. 山东不同品系蛋鸡禽白血病流行病学调查[J]. 畜牧兽医学报,2011,42(5): 698-703.
- [10] BAI J, HOWES K, PAYNE L N, et al. Sequence of host range determinants in the *env* gene of a full-length infectious proviral clone of exogenous avian leucosis. HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup(designated J)[J]. *J Gen Virol*, 1995, 76(1): 181-187.
- [11] GRANT J W, GALLAGHER P J, HENDINGER C. Hemangioblastoma. An immunohistochemical study of ten cases[J]. *Acta Neuropathol*, 1988, 76(1): 82-86.
- [12] BURSTEIN H, GILEAD M, BENDHEIM U, et al. Viral aetiology of hemangiosarcoma outbreaks among layer hens[J]. *Avian Pathol*, 1984, 13: 715-726.
- [13] 乔彦华,王永强,庞 平,等. A 亚群禽白血病病毒 QC6281 株的分离与 *gp85* 基因序列分析[J]. 中国兽医杂志,2008,44(12): 9-12.
- [14] 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.
- [15] 张小桃,赖汉漳,张贺楠,等. 血管瘤相关禽白血病病毒 CD08 的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志,2009,45(11): 8-10.

(编辑 白永平)