

# 不同地区海兰褐蛋鸡中 J 亚群-禽白血病病毒株 gp85 基因的分子演化分析

代 阳, 杨其峰, 王 波, 刘绍琼, 王秀臻, 柴家前, 崔治中, 孙淑红\*

(山东农业大学动物医学院, 泰安 271018)

**摘 要:** 本研究通过对不同地区海兰褐蛋鸡群中分离的 5 株 J 亚群-禽白血病病毒 (ALV-J) 的囊膜糖蛋白基因 (gp85) 进行同源性分析, 阐述了不同海兰褐蛋鸡群中存在的 ALV-J 的分子演化规律。对 2008—2009 年分别从北京、陕西、山东泰安、济阳、曲阜等不同地区饲养的海兰褐蛋鸡分离到的 5 株 ALV-J, 用 PCR 方法克隆 gp85 基因、测序, 并与国内外已发表的 14 株 ALV-J gp85 基因进行同源性比较。结果表明, 5 株 ALV-J 与来自白羽肉鸡的 HPRS-103 株的同源性最近, 平均为 96.6% (96.4%~96.8%); 与来自国内海兰灰蛋鸡的 SD07LK1 株的同源性平均仅为 89.6% (89.3%~89.9%); 而 5 株 ALV-J 间的同源性高达 98.1% 以上 (98.1%~100%)。本研究发现, 不同地区的海兰褐蛋鸡中广泛存在的 ALV-J 可能有一个共同的来源, 即国外的白羽肉鸡。

**关键词:** 海兰褐蛋鸡; J 亚群-禽白血病病毒; gp85 基因; 同源性

中图分类号: S852.659.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)05-0635-04

## Molecular Evolution Analysis for gp85 Gene of Subgroup J-Avian Leukosis Viruses Strains from Hyline Egg-type Chickens in Different Areas

DAI Yang, YANG Qi-feng, WANG Bo, LIU Shao-qiong, WANG Xiu-zhen,  
CHAI Jia-qian, CUI Zhi-zhong, SUN Shu-hong\*

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

**Abstract:** By the homology analysis for gp85 genes of 5 strains of ALV-J isolated from Hyline laying hens, the molecular evolution of ALV-J was studied in the present study. The 5 strains of ALV-J were obtained from Beijing, Shanxi and Shandong. The gp85 genes were cloned by PCR and the sequence was measured and compared with 14 published reference ALV-J strains. The homology analysis showed that the 5 isolated strains of ALV-J shared 96.6% (96.4%-96.8%) and 89.6% (89.3%-89.9%) homology with the HPRS-103 strain isolated from white meat-type broiler and SD07LK1 strain isolated from egg-type chickens. The homology of the 5 strains was exceeded 98.1% (98.1%-100%). The result indicated that ALV-J strains from Hyline egg-type chickens may have the same origin, the white meat-type broiler chickens imported abroad.

**Key words:** Hyline egg-type chickens; subgroup J-avian leukosis viruses; gp85 gene; homology

J 亚群-禽白血病病毒 (Subgroup J of avian leukosis viruses, ALV-J) 是 20 世纪 80 年代末 Payne

等<sup>[1]</sup>从肉用型鸡中分离鉴定出来的禽白血病病毒 (Avian leukosis viruses, ALV) 新的亚群。20 世纪

收稿日期: 2010-01-06

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (200803019); 山东省中青年科学家基金 (2008BS07004); 山东农业大学青年科技创新基金

作者简介: 代 阳 (1988-), 女, 内蒙古海拉尔人, 2007 级动物医学院本科生; 杨其峰 (1987-), 山东泰安人, 2004 级动物医学院本科生, E-mail: ya012@163.com, 二人共为同等贡献作者

\* 通讯作者: 孙淑红 (1968-), E-mail: sunshuhong@sdau.edu.cn

90年代在世界范围内给肉鸡业造成了很大损失<sup>[2-3]</sup>。中国于1999年首次从白羽肉鸡中发现此病毒<sup>[4]</sup>,2005年,徐滨蕊等<sup>[5]</sup>在海兰褐蛋用鸡首次检测到ALV-J;2007年,王辉等首次从海兰灰蛋鸡分离到ALV-J<sup>[6]</sup>。

ALV-J的*gp85*基因高度易变,在鸡群中传播的过程中不断发生变异。我国白羽肉鸡中的ALV-J分离株与美国的4817株有最密切的系谱关系<sup>[7]</sup>;南方三黄鸡的ALV-J来源于引入的白羽肉种鸡<sup>[8]</sup>;海兰灰蛋鸡中的SD07LK1<sup>[6]</sup>株则更接近英国的原型株HPRS-103(GenBank登陆号:Z46390)。对不同ALV-J株的*gp85*基因的分子演化关系分析,有助于阐明我国不同地区饲养的海兰褐蛋鸡群中ALV-J的来源,从而为ALV-J的防控提供科学依据。

本研究对2008—2009年从国内不同地区的海兰褐蛋鸡中分离的5株ALV-J的*gp85*基因进行了克隆测序,并与其它来源的14株ALV-J作了比较分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 ALV-J株及其来源

TA081225株,2008年分离自山东泰安的海兰褐蛋鸡群,剖检见脾脏肿瘤;SX090915株,2009年分离自陕西的海兰褐蛋鸡群,剖检见各脏器萎缩,无肉眼可见肿瘤;QF081201株,2008年分离自山东曲阜的海兰褐蛋鸡群,剖检见肝脏、脾脏肿瘤;JY090305株,2009年分离自山东济阳的海兰褐蛋鸡群,剖检仅见颈部出现赘生物;BJ090201株,2009年分离自北京的海兰褐蛋鸡群,剖检见各脏器多处肿瘤。以上毒株均为作者于2008—2009年从不同地区海兰褐蛋鸡中分离到的ALV-J株,其分离与鉴定均按常规方法进行<sup>[8]</sup>。

### 1.2 主要试剂与仪器

PCR Kit购于TaKaRa公司;胰酶购自德国MERCK公司;凝胶回收试剂盒为美国OMEGA公司产品;Taq DNA聚合酶、dNTPs、DL2000 DNA Marker、T载体pMD18-T等均购自TaKaRa公司;其它常规试剂均为国产分析纯。

### 1.3 前病毒DNA的提取

将这5株J亚群-白血病毒病病毒感染后检测为阳性的同一批CEF,用0.25%胰酶消化,离心收集细胞,按常规方法提取其细胞基因组cDNA,最后溶于

TE缓冲液,置-20℃保存,作为PCR扩增用模板。

### 1.4 不同ALV-J毒株*gp85*基因的PCR扩增、克隆和测序

根据已发表的ALV-J原型株HPRS-103的*env*基因序列,设计合成一对引物用于扩增ALV-J*gp85*基因大小为951bp的片段,其正向引物:5'-CGGGATATCATGGGAGTTCAT-3',反向引物:5'-ATATTACTCGAGTCAGCGCC-3'。按常规PCR方法扩增不同ALV-J毒株的*gp85*基因,将纯化的PCR产物克隆到pMD18-T载体中,并确定片段的大小,用于转化感受态大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,挑选白色菌落,对抽提的质粒用Eco I和Hind III 2种限制性内切酶鉴定阳性克隆,将阳性克隆送上海生物工程公司测序。

### 1.5 序列分析

自GenBank选取相关病毒株的相关序列,它们分别是国际参考株0661(AF247566),4817(AF247385),ADOL-7510(AY027920),ADOL-Hc1(AF097731),HPRS-103(Z46390)和国内已发表的分离自海兰灰蛋鸡的参考毒株SD07LK1(EU264064)与白羽肉鸡的参考毒株NX0101(AY897227)、HN0001(AY897219)、SD9901(AY897220)、SD9902(AY897221)、YZ9901(AY897222)、SD0001(AY897223)、SD0002(AY897224)、SD0101(AY897225)。将获得的5株ALV-J*gp85*基因的氨基酸序列与选取的14个参考株进行比较,用DNASar Lasergen 6.0软件分析。

## 2 结果

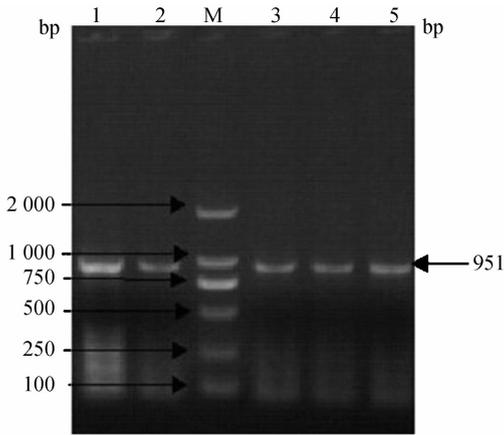
### 2.1 5个分离株*gp85*基因的PCR结果

取5 $\mu$ L PCR扩增产物在0.8%琼脂糖凝胶电泳上电泳25min,在凝胶成像系统下观察,5个毒株样品均在951bp左右出现特异性条带,符合预期大小(图1)。

### 2.2 5个分离株*gp85*编码的氨基酸序列与参考毒株的同源性比较

5个海兰褐蛋鸡分离毒株的*gp85*基因开放阅读框架(open reading fragment, ORF)全长均为924bp,编码308个氨基酸,它们之间*gp85*编码的氨基酸序列的同源性为98.1%~100%,其中QF081201和BJ090201株氨基酸序列同源性达到100%,表明它们可能为同一毒株来源,见表1。

5个分离株与已发表的其它ALV-J毒株的*gp85*



M. DL2000 DNA marker; 1. TA081225; 2. SX090915; 3. QF081201; 4. JY090305; 5. BJ090201

图 1 ALV-J *gp85* 基因特异性 PCR 产物电泳分析

Fig. 1 The PCR results of ALV-J *gp85* detection

基因同源性比较结果表明,它们与 5 株国际参考株之间的同源性平均为 90.8% (83.4%~96.8%),其中,这 5 个分离株与 HPRS-103 的同源性最高,平均为 96.6% (96.4%~96.8%); 5 个分离株与来自白羽肉用型鸡的 8 株国内参考株的 ALV-J *gp85* 同源性平均为 91.4% (87.9%~94.5%); 而与来自国内海兰灰蛋鸡的 SD07LK1 毒株的同源性平均为 89.6% (89.3%~89.9%)。这表明,虽同是国内分离株,这 5 株海兰褐蛋鸡分离株 ALV-J *gp85* 基因已经与来自国内海兰灰蛋鸡的 ALV-J 有很大的差异。

而来自白羽肉用型鸡的 8 株国内参考株与原型株 HPRS-103 的同源性平均为 91.9%; 海兰灰蛋鸡 SD07LK1 毒株与 HPRS-103 的同源性为 88.9%, 表明相对于原型株 HPRS-103, 白羽肉用型鸡和海

表 1 不同 ALV-J 毒株 *gp85* 氨基酸序列的同源性分析

Table 1 Homology analysis for amino acid identity of *gp85* among different ALV-J strains

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	毒株 Strain	%
82.4	93.5	90.9	90.8	91.9	90.9	92.2	90.2	90.9	90.6	90.9	89.5	87.6	91.9	91.9	92.2	91.5	92.2	1	ADOL-Hc1	
	83.7	83.4	83.6	82.1	84.4	83.7	82.4	84.4	86	81.4	86.9	84.4	83.4	83.4	83.7	83.4	83.7	2	ADOL-7501	
		90.9	91.4	92.2	93.2	94.2	90.5	92.5	91.6	90.3	90.5	88.9	96.4	96.4	96.8	96.4	96.8	3	HPRS-103	
			92.1	92.5	93.8	93.2	90.8	93.8	94.2	89.9	90.8	91.2	91.2	91.2	91.6	91.2	91.6	4	4817	
				92.1	92.1	92.8	91.4	92.1	91.8	89.8	90.8	89.1	90.8	90.8	91.1	91.4	91.1	5	0661	
					93.8	94.5	94.4	93.8	92.5	92.2	90.2	89.3	92.2	92.2	92.5	92.2	92.5	6	YZ9901	
						95.5	92.2	99.4	94.2	91.9	91.5	89.6	94.2	94.2	94.5	94.2	94.5	7	SD9902	
							92.8	95.5	92.9	93.2	91.2	89.3	93.2	93.2	93.5	93.5	93.5	8	SD9901	
								92.2	92.2	89.9	89.2	88.6	90.2	90.2	90.5	90.2	90.5	9	SD0101	
									94.2	91.9	91.5	89.6	93.5	93.5	93.8	93.5	93.8	10	SD0002	
										89.9	92.5	91.5	93.2	93.2	93.5	92.9	93.5	11	SD0001	
											88.9	87.9	89.6	89.6	89.9	89.6	89.9	12	NX0101	
												90.5	89.5	89.5	89.9	89.2	89.9	13	HN0001	
													89.9	89.3	89.6	89.6	89.6	14	SD07LK1	
														99.4	99.7	98.7	99.7	15	TA081225	
															99.7	98.1	99.7	16	SX090915	
																98.4	100	17	QF081201	
																	98.4	18	JY090305	
																		19	BJ090201	

兰灰蛋鸡 ALV-J *gp85* 发生了较大的变异,而作者从不同地区的海兰褐蛋鸡中分离到的 ALV-J 株的变异则较小。

### 2.3 5 个分离株 *gp85* 编码的氨基酸与参考毒株的遗传进化树分析

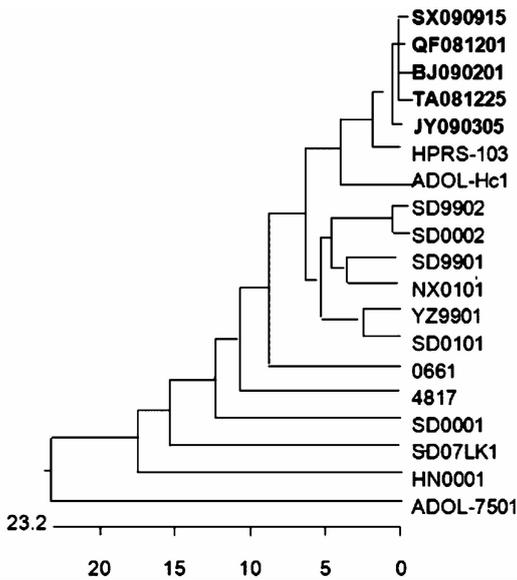
采用 DNASTar Lasergen 6.0 软件分析、绘制遗传进化树,如图 2 所示。结果显示,本研究的 5 个来自海兰褐蛋鸡群的分离株与来自海兰灰蛋鸡群的 SD07LK1 株虽然都是从国内蛋鸡群中分离到,但是它们之间的亲缘关系却很远,而与来自白羽肉鸡的

原型株 HPRS-103 的亲缘关系最近。

### 3 讨论

J 亚群-禽白血病病毒(ALV-J)的囊膜蛋白基因编码 *gp85* 和 *gp37*。其中,*gp85* 作为囊膜表面结构蛋白,是 ALV-J 的主要抗原性蛋白。而且,*gp85* 基因高度易变,在鸡群传播过程中不断发生变异。相同来源的 ALV-J 的 *gp85* 基因同源性相对较高。

作者对 2008—2009 年分别从北京、陕西、山东泰安、济阳、曲阜等不同地区饲养的海兰褐鸡分离到



Amino acid substitutions ( $\times 100$ )

图2 不同ALV-J毒株gp85推导氨基酸序列的遗传进化树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of gp85 among different ALV-J strains

的5株ALV-J进行了gp85基因的克隆、测序,并与国内外已发表的14株ALV-J gp85基因进行了同源性比较。结果表明,5个来自海兰褐蛋鸡群ALV-J分离株的gp85基因ORF全长均为924 bp,编码308个氨基酸,它们之间gp85编码的氨基酸序列的同源性为98.1%~100%。其中山东株QF081201和北京株BJ090201株氨基酸同源性达到100%,表明它们可能为同一毒株来源。

5个分离株与5株国际参考株之间的氨基酸序列同源性平均为90.8%(83.4%~96.8%),其中这5个分离株与HPRS-103的同源性最高,平均为96.6%(96.4%~96.8%);与来自白羽肉用型鸡的8株国内参考株的ALV-J gp85同源性平均为91.4%(87.9%~94.5%),与来自国内海兰灰蛋鸡群的SD07LK1毒株的同源性平均为89.6%(89.3%~89.9%)。而来自白羽肉用型鸡的8株国内参考株与原型株HPRS-103的同源性平均为91.9%;海兰灰蛋鸡源SD07LK1毒株与HPRS-103的同源性为88.9%。结果表明,相对于原型株HPRS-103,白羽肉用型鸡和海兰灰蛋鸡源ALV-J gp85发生了较大

的变异,而作者从不同地区的海兰褐蛋鸡中分离到的ALV-J株的变异则较小。而且,虽然同为国内分离株,但这5株海兰褐蛋鸡分离株ALV-J gp85基因已经与来自国内海兰灰蛋鸡的ALV-J存在很大的差异。

本研究发现,2008—2009年不同地区的海兰褐蛋鸡群中广泛存在的ALV-J可能有一个共同的来源,即国外的白羽肉鸡。

致谢:山东农业大学生物学博士后流动站。

#### 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(4): 801-807.
- [2] PAYNE L N. HPRS-103: a retrovirus strikes back. The emergence of subgroup J avian leucosis virus[J]. *Avian Pathol*, 1998, 27(S1): S36-S45.
- [3] PAYNE L N, HOWES K, GILLESPIE A M. Host range of Rous sarcoma virus pseudotype RSV (HPRS-103) in 12 avian species: support for a new avian retrovirus envelop subgroup, designed J[J]. *J Gen Virol*, 1992, 73: 2995-2997.
- [4] 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(学报版)*, 1999, 1: 1-4.
- [5] 徐镛蕊, 董卫星, 余春明, 等. 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.
- [6] 王辉, 崔治中. 蛋鸡J亚群白血病病毒的分离鉴定及序列分析[J]. *病毒学报*, 2008, 24: 369-375.
- [7] CUI Z 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(4): 1321-1330.
- [8] SUN S H, CUI Z Z. Epidemiological and pathological studies of subgroup J avian leukosis virus infections in Chinese local "yellow" chickens[J]. *Avian Pathol*, 2007, 36: 221-226.