

# 东北地区 J 亚群禽白血病病毒的 分子生物学特性分析

刘超男<sup>1,2</sup>, 高玉龙<sup>1</sup>, 景 龙<sup>2</sup>, 高宏雷<sup>1</sup>, 祁小乐<sup>1</sup>, 潘 伟<sup>1</sup>, 王笑梅<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 为了解近两年在中国东北地区出现的 J 亚群禽白血病病毒 (ALV-J) 的分子生物学特性, 作者从东北地区不同养禽场先后分离鉴定 12 株 ALV-J, 并对其 *env* 基因、3'UTR 和 3'LTR 区序列进行测定和比较分析。结果显示, 12 株 ALV-J 分别位于 *env* 基因遗传进化的 3 个不同分支 (group), 其中 group2 和 group3 中毒株在 *env* 基因分别出现大片段氨基酸缺失和与其他亚群毒株重组现象; 12 株 ALV-J 在 3'UTR 区仍存在较大差异, 具有完整 E 组分的 ALV-J 占主导地位; 12 株 ALV-J 在 3'LTR 区的变异主要集中于 U3 区, 但是位于 U3 区的 C/EBP、CArG box、Y box、PRE box 和 TATA box 等转录调控元件却高度保守。以上结果表明, 目前中国 ALV-J 的基因变异仍主要集中在 *env* 基因和 3'UTR 区, 且 *env* 基因已出现缺失或重组等新的变异趋势, 并可能是 ALV-J 流行范围扩大、组织嗜性和致肿瘤作用明显改变的重要遗传基础。

**关键词:** 东北地区; J 亚群禽白血病病毒; 3'非编码区; 转录调控元件

中图分类号: S852.659.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)07-0915-07

## Molecular Properties of Subgroup J Avian Leukosis Virus Isolated in Northeast China

LIU Chao-nan<sup>1,2</sup>, GAO Yu-long<sup>1</sup>, JING Long<sup>2</sup>, GAO Hong-lei<sup>1</sup>,

QI Xiao-le<sup>1</sup>, PAN Wei<sup>1</sup>, WANG Xiao-mei<sup>1\*</sup>

(1. Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 2. Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** In order to analyze the variation status and molecular properties of subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) in Northeast China, 12 strains of ALV-J were isolated from commercial egg-type chickens suffering from hemangiomas and myelocytomas of the region. The complete *env* gene, 3'untranslated region (3'UTR) and 3' long terminal repeat (LTR) sequences were amplified, cloned and sequenced. Sequence analysis of the *env* gene, 3'UTR and 3'LTR revealed several unique genetic characteristics of 12 recent isolates. Phylogenetic trees showed that the 12 isolates from different flocks fall into three separated groups. Among 12 isolates, the 3 isolates were classed into group2 showing 120 bp deletion in the *env* gene and 2 isolates were classed into group3 showing recombination between earlier ALV-J and endogenous virus sequence. In addition, the intact E element was found in majority of isolates and highly conserved; within the 3'LTR, the direct repeat region (R) and the 3'unique region 5(U5) were well conserved; albeit U3 region exhibited high mutations, the transcriptional regulatory elements including C/EBP, CArG box, Y box, PRE box and TATA box were highly conserved. These results suggested that the

收稿日期: 2010-01-20

基金项目: 国家重点实验室开放基金 (SKLVBD200901); 现代农业肉鸡产业技术体系建设 (nycytx-42-G3-01)

作者简介: 刘超男 (1978-), 男, 黑龙江桦南人, 讲师, 博士, 主要从事禽病免疫病理研究, Tel: 0451-55190405, E-mail: liuchaonan78@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 王笑梅, 研究员, E-mail: xmw@hvri.ac.cn

deletion and recombinant in envelope gene has become new variation tendency of ALV-J in China, and the variation of the envelope gene and 3' UTR were probably important in tissue tropism changes and induce tumors.

**Key words:** Northeast region; avian leukosis virus subgroup J; 3' untranslated region; transcription regulatory elements

J 亚群禽白血病病毒 (Avian Leukosis Virus Subgroup J, ALV-J) 是 1989 年 Payne 等在英国分离、鉴定出的一个新的禽白血病病毒亚群, 该亚群病毒主要引起肉用鸡发生髓细胞瘤 (ML) 以及其它各种恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。中国自 1999 年首次报道在白羽肉鸡中分离鉴定出 ALV-J 以来, 研究表明, 国内 ALV-J 已由最初在肉鸡中流行转为向蛋鸡、地方品系鸡扩展, 目前主要在蛋鸡群中传播<sup>[2-3]</sup>。早期 ALV-J 毒株主要引起肉鸡的骨髓细胞瘤, 近年 ALV-J 感染发病鸡体内可同时出现成髓细胞瘤、血管瘤和组织细胞瘤等多肿瘤样病变<sup>[4]</sup>。由于 ALV-J 感染宿主范围不断扩大, 致肿瘤病变更为复杂, 临床与其它病原混合感染状况严重, 因此对该病的防治和净化工作面临严峻的考验。为了解国内特别是东北地区蛋鸡群 ALV-J 的流行状况、流行毒株的分子特性及其变异趋势, 作者对 2008—2009 年国内东北地区发生禽白血病养鸡场的病料进行 ALV-J 的分离鉴定, 并对所分离的 12 株 ALV-J 的 *env* 基因和 3' UTR 区序列进行测定和比较研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒

对近两年中国东北地区临床上见有增生性结节和血管瘤病变的病料进行 ALV-J 的常规分离得到的毒株, 并对 ALV 抗原检测试剂盒 (IDEXX) 检测阳性的接种细胞应用 PCR 和间接免疫荧光法进行鉴定。

### 1.2 前病毒 DNA 的提取

DF-1 细胞在接种病毒 7 d 后, 反复冻融 3 次, 悬液经  $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min 收集细胞沉淀; 取细胞沉淀用盐酸胍裂解液充分裂解; 加入等体积苯酚-氯仿溶液 (酚: 氯仿: 异戊醇为 25: 24: 1), 充分混匀后, 连续抽提 2 次; 加入 100% 异丙醇室温静置 15 min,  $14\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min; 70% 异丙醇洗涤 DNA 沉淀后, 室温自然干燥, 溶解于适量的 TE 或去离子水中, 即为模板 DNA<sup>[5-6]</sup>。

### 1.3 病毒 *env* 基因和 LTR 序列的扩增和测序

参照已发表的 ALV-J 序列, 设计合成用于扩增前病毒基因组 *env* 基因和 LTR 序列的引物。引物 JE5F 5'-GTGCGTGGTTATTATTTCC-3' 和 JE7R 5'-TATTGCTGTTTCATCGTTA-3' 用于整个 *env* 基因和 E 元件 (或称为 XSR, exogenous virus specific region) 序列的扩增; 引物 JL7F 5'-AGCATGTATAGGCGCTGGC-3' 和 JL7R 5'-CATCCGCTTCATG-CAGGTGC-3' 用于病毒 LTR 序列的扩增。反应体系参照 LA Taq 试剂 (TaKaRa) 的说明。已知 ALV-J 毒株感染细胞 DNA 作为阳性对照, 未感染 DF-1 细胞基因组 DNA 作为阴性对照。PCR 扩增产物经 TA 克隆至 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司), 转化感受态细胞 Top10, 经 PCR 鉴定阳性的克隆送上海英骏公司进行核苷酸序列测定。

### 1.4 基因组序列的比较及进化树分析

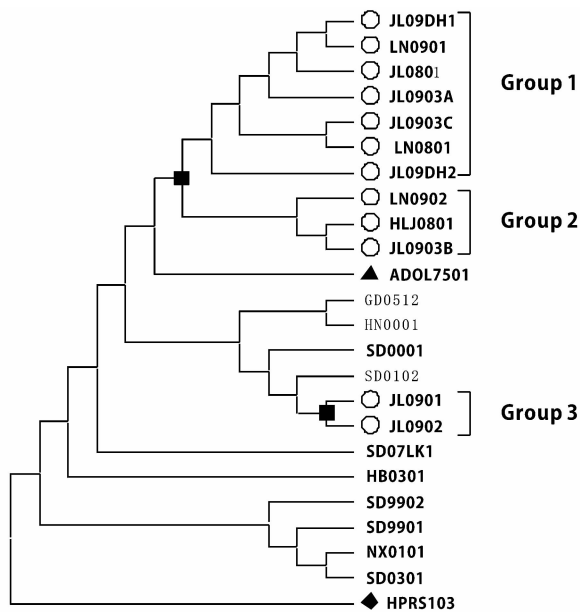
使用 DNASTar 软件对 *env* 基因和 LTR 测序结果进行剪辑和拼接, 并将 12 株 ALV-J 分离株与国内外已发表的毒株序列进行比较分析。应用 MEGA4.0 软件对 *env* 基因进行进化分析。借助 KEGG 数据库 MOTIF 在线分析服务系统, 对分离株的转录调控区作用元件进行定位分析。

## 2 结果

### 2.1 12 株 ALV-J 分离毒株 *env* 基因的遗传进化分析

病料接种细胞经间接免疫荧光检测 (图片未展示), 证实成功分离到 ALV-J 后, 特异性扩增 *env* 基因和 3' UTR 序列。应用实验室 2008—2009 年分离的 12 株 ALV-J 与原型毒株 HPRS-103 及国内外其它已发表毒株 *env* 基因序列进行比较, 结果显示, 12 株 ALV-J 分离株与 HPRS-103 核苷酸序列同源性的 86.0% ~ 92.9%, 其中 JL0901 和 JL0902 与 HPRS-103 的同源性最低。由 *env* 基因的遗传进化树可见, 作者实验室所分离毒株间亲缘关系较近, 大部分毒株位于同一个进化分支。根据 12 株病毒所在进化树分支差异, 将其分为 3 个 group, 其中

group1 和 2 进化关系较近,共同位于一个较大分支上,而 group3 则与国内早期白羽肉鸡分离株亲缘关系更近(图 1)。



○标记为 2008—2009 年作者实验室分离 ALV-J 毒株;◆标记为 ALV-J 原型毒株;▲标记为美国早期 ALV-J 毒株;其他未标记为国内 1999—2007 年 ALV-J 分离株  
○ indicate our experimental 12 ALV-J strains isolated in Northeast China during 2008-2009; ◆ indicate prototype ALV-J isolated in U K; ▲ indicate U S earlier strain isolated in 1997; no symbol indicate Chinese field ALV-J strains were isolated during 1999 to 2007

图 1 ALV-J 东北分离毒株与国内外代表性毒株 *env* 基因的遗传进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree of *env* gene of twelve experimental isolates from the Northeast China and representative subgroup J ALVs

## 2.2 12 株 ALV-J 分离毒株 *env* 基因氨基酸序列的比较分析

ALV-J 的 *env* 基因 ORF 全长 1 716 bp, 编码病毒囊膜糖基化蛋白, 包括 *gp85* 基因编码的膜表面糖蛋白亚单位(SU)和 *gp37* 基因编码的跨膜糖蛋白亚单位(TM)。group1 分支内 ALV-J 的 *gp85* 和 *gp37* 基因共编码 504 个氨基酸, 同源性在 99% 以上; 与原型株 HPRS-103 相比, 氨基酸同源性为 89.1%~89.5%, 且 group1 分支毒株 *env* 基因在 117 位均出现 1 个精氨酸(R)的缺失现象。group2 分支内毒株同样存在 117 位 R 的缺失现象, 与

HPRS-103 的氨基酸同源性为 89.3%~89.7%。此外, group2 分支内的毒株在 *gp85* 蛋白的 208—247 位氨基酸存在一个连续 40 个氨基酸的缺失现象, 目前国内已报道的 ALV-J 未见有在该位置的缺失现象。group3 分支病毒与 HPRS-103 *env* 基因氨基酸的同源性分别为 87.1% 和 86.1%, 后经 BLAST 分析发现, 该分支毒株为 ALV-J/E 囊膜基因重组病毒, 重组位点位于 *env* 基因 257—336 位氨基酸间, 该位点正好位于 *gp85* 和 *gp37* 蛋白交界位点(图 2)。

## 2.3 ALV-J 分离株 U3 区转录调控元件分析

与其它亚群 ALV 相同, ALV-J 的 R 和 U5 区序列高度保守, U3 区大小为 224 bp, 含有多种增强子序列, 增强子有细胞特异性, 一定程度上决定了病毒的宿主范围<sup>[7]</sup>。U3 区增强子序列下游还有其它几个重要序列, 包括 CCAAT 盒和 Hogness 盒, 这些调节因子对于前病毒的高效转录发挥着重要作用。通过与 HPRS-103 的 MOTIF 比较发现, 虽然 2008—2009 年 ALV-J 分离株的 U3 区序列变异较大, 但是其中 1 个 C/EBP 黏着位点, 2 个 CArG box、Y box 和 PRE box, 1 个 TATA box 等调控元件均高度保守(图 3)。

## 2.4 12 株实验室 ALV-J 分离株 *env* 基因和 3'UTR 结构分析

与 ALV-J 原型毒株 HPRS-103 序列相比, 12 株 ALV-J 东北分离株在跨膜糖蛋白(TM)序列的下游均存在不同程度的缺失(图 4), 其中大部分毒株在 rTM 区, 即相当于 HPRS-103 株 7 051—7 255 位存在 205 bp 的缺失。

ALV-J 3'UTR 的 5'端有 1 个其它亚群也存在的单拷贝正向重复单位 DR, 在 DR 的下游形成一个以前仅在急性转化型 Rous 肉瘤病毒 *src* 基因上游或下游发现的 E 组分。不同 J 亚群禽白血病病毒 E 组件大小略有差异, HPRS-103 为 147 bp, 而国内早期肉鸡毒株在该位置均有 127 bp 的缺失。在 12 株 2008—2009 年 ALV-J 毒株中, 9 株在该位点不再缺失, 仅 JL09DH2 和重组病毒 JL0901、JL0902 仍存在与早期白羽肉鸡毒株完全一致的缺失现象。此外, 经序列 MOTIF 分析, E 区段不缺失的 9 株 ALV-J 在该区段末端均保守存在与 HPRS-103 一致的转录因子 C/EBP 黏着位点序列 PU1 和 PU2。

HPRS103:	.....R.....	.....NT.....	.....DNN.....	.....KA.....	.....	90
LN0801	.....	.....	.....	.....	.....	90
LN0901	.....	.....	.....	.....R.....	.....	90
JL0801	.....	.....	.....	.....R.....	.....	90
JL0903A	.....	.....	.....	.....R.....	.....	90
JL0903C	.....	.....	.....	.....	.....	90
JL09DH1	.....	.....	.....	.....R.....	.....	90
JL09DH2	.....	.....	.....	.....R.....	.....	90
HLJ0801	.....	.....	.....	.....N.A.....	.....	90
LN0902	.....	.....	.....	.....N.A.....	.....	90
JL0903B	.....	.....	.....	.....N.A.....	.....	90
JL0901	.....R.....	.....NS.E.....	.....DN.A.....	.....N.....	.....N.....	90
JL0902	.....R.....	.....NT.....	.....DN.A.....	.....N.....	.....N.....	90
CON	GVHLLQQPGNVVWVWANKTGGQIDFCLSLQSATSPPRTICLIGIPQYPLSAFKGYVINVTACRSDDTDLASQTAQLIQLNTLTPWDPQELDI					

HPRS103:	.....T.....	.....E.NR.....	.....N.....	.....V.....	.....R.....	.....A.....	.....S.....	.....L.....	.....V.....	.....R.....	.....	180
LN0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	179
LN0901	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	179
JL0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	179
JL0903A	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	179
JL0903C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	179
JL09DH1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	179
JL09DH2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	179
HLJ0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	179
LN0902	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	179
JL0903B	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	179
JL0901	.....T.....	.....TD.N.....	.....N.....	.....E.....	.....SNNP.....	.....V.....	.....	.....	.....	.....	.....	180
JL0902	.....A.....	.....TD.D.....	.....N.....	.....I.....	.....E.....	.....SNNP.....	.....N.....	.....	.....	.....	.....	180
CON	LGSQMIKNGTISRICVIFGSVCYKNNGGSRVCHIFDGNFNGTGGAEAEIRDFTKWKGDHLIRPYVNSQSWTMVSPINTESFSISSRYCGF											

HPRS103:	.....D.....	.....N.....	.....S.....	.....R.....	.....K.....	.....G.G.....	.....T.....	.....EQ.....	.....	.....	.....	270
LN0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	269
LN0901	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	269
JL0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	269
JL0903A	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	269
JL0903C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	269
JL09DH1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	269
JL09DH2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	269
HLJ0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	229
LN0902	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	229
JL0903B	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....V.....	229
JL0901	.....FG.....	.....S.....	.....R.....	.....K.....	.....G.G.....	.....KQ.....	.....	.....	.....	.....	.....	270
JL0902	.....	.....S.....	.....	.....K.....	.....S.G.G.....	.....KQ.....	.....	.....	.....	.....	.....	270
CON	TSNETRYRGNLSDWCNSKGGEWSAGYSNGTQSSNTIDCAGNCTAEWNYAYGFTFGNKPEVLWNGTAKALPPGIFLCCDRAWQGP											

HPRS103:	R.....	.....I.....	$gp85$	.....	.....L.....	.....R.....	.....P.....	$gp37$	.....G.....	.....L.....	.....V.....	.....I.....	.....K.....	.....	359
LN0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	358
LN0901	.....	.....R.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	358
JL0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	358
JL0903A	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	358
JL0903C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	358
JL09DH1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....V.....	.....	.....	358
JL09DH2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	358
HLJ0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	318
LN0902	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	318
JL0903B	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	318
JL0901	.....RPV.....	.....K.....	.....A.....	.....H.....	.....DILK.....	.....LANSRTGI.....	.....RK.....	.....T.....	.....DDT.....	.....GP.....	.....IL.....	.....I.....	.....K.....	.....	360
JL0902	.....RPV.....	.....K.....	.....A.....	.....H.....	.....DILK.....	.....LANSRTGI.....	.....RK.....	.....T.....	.....DDT.....	.....GP.....	.....IL.....	.....I.....	.....K.....	.....	360
CON	SNALGGPCYLGLTMLSPIFNFTWMIYVGNITGHHSRISVSHLSSDCSDEVQLWSATARIFASFFAPGVAAAQALREIERLACWSVKQA														

HPRS103:	.....I.....	.....E.....	.....TS.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....R.....	.....DL.....	.....	449
LN0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	448
LN0901	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	448
JL0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	448
JL0903A	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	448
JL0903C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	448
JL09DH1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	448
JL09DH2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	448
HLJ0801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	408
LN0902	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	408
JL0903B	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	408
JL0901	.....	.....I.....	.....E.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	450
JL0902	.....	.....T.....	.....E.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	450
CON	NLTSVLNAMLKDMNSIRHAVLQNRAAIDFLLLAQQHGCQDVEGMCCFNLSDFHSEIFKALQAMKEHTEKIQVEDDPDGFTRITGSGF														

(接上页 Continued)

HPRS103:R	.....A.....V.....N.....	: 505
LN0801	.....	: 504
LN0901	.....	: 504
JL0801	.....	: 504
JL0903A	.....	: 504
JL0903C	.....	: 504
JL09DH1	.....	: 504
JL09DH2	.....F.....I.....	: 504
HLJ0801	.....	: 464
LN0902	.....	: 464
JL0903B	.....	: 464
JL0901	.....R.....F.....I.....	: 506
JL0902	.....F.....I.....	: 506
CON	GWLAKGVKTLIFALLVIVCLLAIIPCIKCFQDCLSRITMYQFMDIRIRYHIREQL	

图 2 12 株 ALV-J 东北分离毒株与 HPRS-103 囊膜基因推导氨基酸序列比较

Fig. 2 Alignment of deduced amino acid sequences of env gene of twelve experimental isolates from the Northeast China and HPRS-103

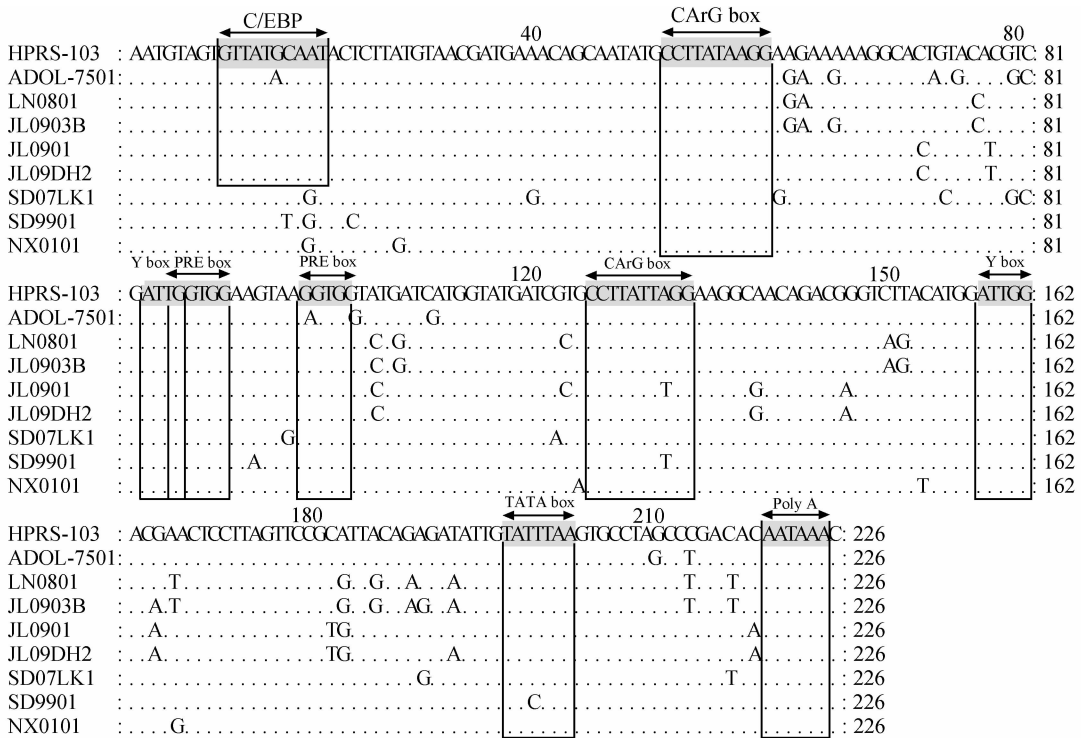


图 3 ALV-J 东北分离株 U3 区转录调控元件分析

Fig. 3 Transcriptional regulatory elements in U3 of selected subgroup J ALVs from the Northeast China

### 3 讨论

J 亚群禽白血病自首次报道以来,其流行特点已发生明显改变。ALV-J 的流行区域更大,宿主范围更广;致病性更强,发病日龄明显提前;所引起的肿瘤更加多样化;与其它病原混合感染情况严重,使得临床症状和病变越来越不典型,不易确诊<sup>[8]</sup>。

ALV-J 的 env 基因和 3'UTR 区一直是研究的热点,env 基因编码病毒囊膜糖基化蛋白。gp85 是

病毒囊膜蛋白表面的主要成分,决定病毒亚群的特性,ALV-J 抗原的高度变异性主要表现在 gp85 蛋白<sup>[9]</sup>。gp85 蛋白作为配体与细胞特异性受体结合,从而介导 ALV 与宿主细胞发生融合,使病毒进入细胞,因此病毒的囊膜蛋白对病毒的组织嗜性有重要影响,并决定其感染宿主的范围<sup>[10]</sup>。作者实验室 2008—2009 年所分离的 12 株 ALV-J 的 gp85 基因与 HPRS-103 的氨基酸同源性均较低,为 84.7%~89.3%,其中 group2 分支中的毒株在 gp85 编码蛋

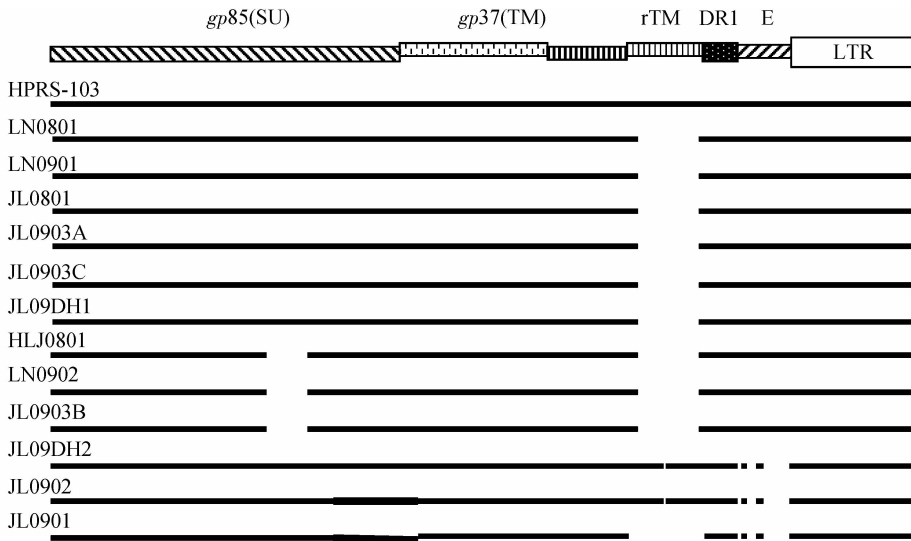


图 4 ALV-J 东北分离株囊膜基因和 3' UTR 结构

Fig. 4 Comparison of *env* gene and 3' UTR structure of twelve isolates from the Northeast China with HPRS-103

白的 208—247 位存在一个 40 个氨基酸的缺失现象。与之相似,美国早期毒株 ADOL-4817 与 HPRS-103 比较,其 *env* 基因的 3' 端改变了原有的保守状态,多出 13 个氨基酸。这一现象提示作为反转录病毒,ALV-J 在长期感染宿主过程中,同样表现出较高的遗传多样性和不稳定性,这是由于 *pol* 基因编码聚合酶的高序列出错率和基因的高重组率造成的。此外,加上宿主的免疫选择压力,使得禽白血病病毒的抗原变动性极高。有研究发现,不同亚群 ALV 间以及不同 ALV-J 毒株间可同时感染同一只鸡或同一细胞,不同病毒间可进行重组,从而产生具有新的生物学特性的重组病毒。禽类不同肉瘤和白血病病毒之间发生重配的频率超过 8%,ALV-J 原型毒株 HPRS-103 的形成就是外源性 ALV 与内源性反转录病毒元件 EAV 序列之间发生基因重组的结果<sup>[11]</sup>。本研究中 group3 中的 JL0901 和 JL0902 就是国内首次发现的 J 亚群和 E 亚群 ALV 自然重组病毒(ALV-J/E),重组位点位于 *gp85* 和 *gp37* 交界位点<sup>[12]</sup>。国内 ALV-J *env* 基因部分缺失或重组现象的出现,表明国内的 ALV-J 已出现新的变异趋势,使得该病的防控工作更加严峻。

ALV 的 3' UTR 区含有负责病毒转录和基因表达的主要控制元件,在调控病毒的复制和阐明病毒致病机制发挥重要的作用,这些调控元件主要位于 3' LTR 的 U3 区和紧邻 3' LTR 的上游序列<sup>[13]</sup>。有文献报道,E 组件并不是诱导肿瘤发生的必要因素,

但是研究表明 E 组件却可以显著提高某些易感品种鸡肿瘤的发生率<sup>[14]</sup>。国内学者研究表明,国内早期的 ALV-J 仅引起白羽肉鸡发病,但其 3' UTR 序列中 E 组件均发生 127 bp 的一致缺失现象<sup>[2-3,15]</sup>。目前关于 E 组分的具体功能还不十分清楚,但完整的 E 组件含有转录因子 C/EBP 的黏着位点 PU1、PU2 可发挥增强子的作用。随着 ALV-J 宿主范围的不断扩大,近几年感染蛋鸡致典型肿瘤病变的毒株中,大部分毒株的 E 组件都完整存在,且序列高度一致。本试验中,12 株 2008—2009 年 ALV-J 分离株中,有 9 株为 E 组件非缺失病毒,且 E 组件的序列完全一致,并在其 3' 端的 95—114 位和 125—143 位同样存在与 Pr-C RSV、HPRS-103 一致的转录因子 C/EBP 结合位点 PU1 和 PU2,推测国内近期 ALV-J 的高致瘤性可能与其存在完整的 E 组件有着一定的内在联系。

3' LTR 在致肿瘤机制中的重要性主要与 U3 区含有启动子和增强子序列有关,特别是慢转化型 ALV 的致瘤能力主要受 LTR 增强子的调节<sup>[7,13]</sup>。本试验中 12 株 ALV-J 的 U3 区序列有较大的变异,但是 U3 序列中的转录调控元件均高度保守存在,如 1 个 C/EBP 黏着位点,2 个 CArG box、Y box 和 PRE box,1 个 TATA box 等,进一步证实这些关键位点在决定病毒致瘤作用时发挥重要的作用。

上述研究表明,目前国内东北许多地区存在 ALV-J 感染现象,且流行区域不断扩大,不同地区

流行的 ALV-J 的主要变异仍集中在 *env* 基因,并呈现出缺失或重组等新的变异趋势,推测这些新毒株可能具有各自独立的起源。目前流行的 ALV-J 中,具有完整 E 组件的病毒占主导地位,并且不同毒株在该组件的序列高度一致,其转录因子 C/EBP 结合位点序列均保守存在。U3 区仍是 LTR 中相对变异较大的区域,但是其启动子和增强子序列却高度保守。复杂的 3'UTR 差异导致增强子的组织特异性,可能是不同 ALV-J 不一致的致肿瘤作用的主要原因。此外,本研究还发现,国内 ALV-J 流行毒株的序列,在原转录调控元件保守存在的基础上,越来越倾向于由弱启动子和增强子向强启动子和增强子转变。有关 *env* 基因和 LTR 的 U3 区在决定病毒组织嗜性、宿主发生肿瘤及肿瘤类型中的具体重要作用还有待于更深入的研究。

#### 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] 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(5): 369-375.
- [3] 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.
- [4] 成子强, 刘思当, 孟祥凯, 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.
- [5] MAAS R, ZOELLEN D, OEI H, et al. Replacement of primary chicken embryonic fibroblasts (CEF) by the DF-1 cell line for detection of avian leukosis viruses [J]. *Biologicals*, 2006, 34: 177-181.
- [6] 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.
- [7] ZAVALA G, CHENG S, JACKWOOD M W. Molecular epidemiology of avian leukosis virus subgroup J and evolutionary history of its 3 untranslated region [J]. *Avian Dis*, 2007, 51: 942-953.
- [8] 柴家前, 王贵强, 孙淑红, 等. J 亚群禽白血病病毒分子流行病学研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 2009, 30(1): 40-43.
- [9] SILVA R F, FADLY A M, HUNT H D. Hypervariability in the envelope genes of subgroup J avian leukosis viruses obtained from different farms in the United States[J]. *Virology*, 2000, 272: 106-111.
- [10] CHESTERS P M, HOWES K, PETHERBRIDGE L, et al. The viral envelope is a major determinant for the induction of lymphoid and myeloid tumours by avian leukosis virus subgroups A and J respectively [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 2553-2561.
- [11] BENSON S J, RUIS B L, FADLY A M, et al. The unique envelope gene of the subgroup J avian leukosis virus derives from ev/J proviruses, a novel family of avian endogenous viruses[J]. *J Virol*, 1998, 72(12): 10157-10164.
- [12] 刘超男, 高玉龙, 高宏雷, 等. J 亚群与 E 亚群禽白血病自然重组病毒的全基因序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(12): 978-981.
- [13] RUDELLE A. Transcription regulatory elements of the avian retroviral long terminal repeat [J]. *Virology*, 1995, 206: 1-7.
- [14] CHESTERS P M, SMITH L P, NAIR V. The E (XSR) element contributes to the oncogenicity of avian leukosis virus subgroup J [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87: 2685-2692.
- [15] 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: 1321-1330.

(编辑 白永平)