

乌骨鸡 J 亚群白血病的综合诊断及病毒分子生物学特性研究

秦四海¹, 刘立涛², 岳瑞超², 李 宁², 屈亚锦², 王广文², 胡东方², 刘思当^{2*}

(1. 临沂大学生命科学学院, 临沂 276000; 2. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271000)

摘 要: 乌骨鸡是中国特有的优良品种, 近年来聊城地区死淘的产蛋种鸡常见肝、脾肿大的肿瘤性疾病。2012 年 12 月收到聊城某乌骨种鸡场送检的 6 只病死鸡。通过剖检观察、病理组织学检查、PCR 检测及病毒分离鉴定, 最终确定为 J 亚群白血病病毒感染所致的髓样细胞瘤和血管瘤。设计 4 对引物, 对病毒全基因序列进行扩增, 得到全长为 7 647 bp, 其中 *gag* 长 2 016 bp, *pol* 基因长 2 622 bp, *env* 长 1 689 bp。跨 rTM 和 DR 区有 205 bp 的缺失, 相当于原型株 HPRS-103 的 7 049—7 253 bp 位置; 在先导区序列 leader 区域中有 1 个 19 bp 的插入序列。分离株与英国原型株 HPRS-103 差异较大, 但与近几年国内商品蛋鸡的分离株相似性很高, 可能来自商品蛋鸡。

关键词: 乌骨鸡; J 亚群禽白血病; 髓样细胞瘤; 血管瘤; 全基因序列分析

中图分类号: S852.659.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)03-0458-05

Study on Comprehensive Diagnosis and Molecular Characterization of Subgroup J Avian Leukosis Virus from Silkies

QIN Si-hai¹, LIU Li-tao², YUE Rui-chao², LI Ning², QU Ya-jin²,
WANG Guang-wen², HU Dong-fang², LIU Si-dang^{2*}

(1. College of life science, Linyi University, Linyi 276000, China;

2. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, China)

Abstract: The Silkie is a typical Chinese breed of chicken. In recent years, numbers of Silkies eliminated from farms in Liaocheng, were found to be infected with tumor diseases, showing hepatomegaly and splenomegaly. On Dec. 2012, 6 dead Silkies from a parent farm were found hepatomegaly and splenomegaly with tumor-like nodules by necropsy. By histological detection, PCR testing, virus isolation and identification, ultimately the Silkies were diagnosed myelocytoma and hemangioma, infected by avian leukemia virus subgroup J (ALV-J). To obtain virus genome sequences, four pairs of primers were designed. And finally 7 647 bp sequence, include *gag* gene (2 016 bp), *pol* gene (2 622 bp) and *env* gene (1 689 bp) were obtained. There was a 205 bp deletion cross rTM (redundant TM) and DR (direct repeat) area, equivalent to 7 049-7 253 position of the prototype ALV-J strain HPRS-103. In the leader sequence of 5'UTR (untranslated region), there was a 19 bp insertion sequence. The isolate was quite different with the British prototype strain HPRS-103, but was highly similar with stains isolated from commercial layers in recent years. Therefore, this isolate may come from commercial layer, which will bring great challenge to the control.

Key words: Silkies; ALV-J; myelocytoma; hemangioma; complete sequence analysis

收稿日期: 2013-09-11

基金项目: 国家自然科学基金(31172296)

作者简介: 秦四海(1961-), 男, 山东日照人, 教授, 主要从事猪禽传染病的防治, E-mail: qinsihai888@126.com; 刘立涛(1990-), 男, 山东潍坊人, 硕士生, 主要从事临床病理研究, E-mail: liulitao89@126.com。二人对此研究做出相同的贡献, 同为第一作者

* 通信作者: 刘思当, E-mail: liusid@sdau.edu.cn

J 亚群禽白血病病毒(subgroup J avian leukosis virus, ALV-J)最初是从英国肉种鸡中分离得到^[1],随后在世界范围内广泛散播,给养禽业造成了巨大的经济损失^[2]。ALV-J 感染所致肿瘤性疾病最初只见于肉种鸡,后来传至商品蛋鸡。近年来其宿主范围不断扩大,像麻鸡、芦花鸡、百日鸡等许多地方品种鸡也相继感染发病^[3-7],肿瘤表型也由最初的髓样细胞瘤向血管瘤、纤维肉瘤或复合瘤型转变。乌骨鸡作为一种名贵的地方鸡种,是中国特有的资源。迄今为止,尚未见乌骨鸡感染 ALV-J 及病毒全基因序列分析的报道。笔者通过对一乌骨鸡白血病例的研究,探索感染乌骨鸡白血病毒病的分子特性,以期对乌骨鸡白血病的防控提供依据。

山东聊城地区有多家乌骨种鸡饲养场,2012 年 12 月,本实验室收到聊城某乌骨种鸡场送检的 6 只病死的父母代种鸡,主诉该种鸡场饲养 280 日龄乌骨种鸡 5 000 套,从 250 日龄左右开始出现零星死亡。为了解其发病原因,对送检病鸡进行了综合诊断。

1 材料与方 法

1.1 材 料

主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司; ALV-J 单克隆抗体 JE9(崔治中老师惠赠); DNA 提取试剂盒购于 TIANGEN 公司; p27 抗原检测试剂盒, 购于 IDXX 公司; PCR 仪为 ABI 公

司产品;电泳仪,凝胶、成像仪为 Bio-Rad 公司产品; LEICA RM2235 切片仪;显微镜等。

1.2 方 法

1.2.1 外观及剖检观察 对送检的病死鸡先进行详细的体表观察,然后剖检观察内脏器官的病理变化。

1.2.2 病理组织学检查 分别取病死鸡肝、肾、脾、骨髓等组织,于 10% 中性福尔马林液中固定,常规石蜡切片,HE 染色,镜检。

1.2.3 PCR 检测 取肝组织 0.5 g,加 PBS 研磨,将研磨液 $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,取上清用 0.22 滤器过滤,接种长成单层的 DF-1 细胞,维持 7 d 收集细胞用试剂盒提取细胞 DNA。以提取的 DNA 为模板,通过 ALV-J 特异性检测引物(表 1)^[8] 进行特异性扩增。

1.2.4 病毒分离鉴定 取肝组织 0.5 g,加 PBS 研磨,将研磨液 $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,取上清用 0.22 滤器过滤,接种 96 孔板中长成单层的 DF-1 细胞,37 °C 5% 二氧化碳培养箱中孵育 1.5 h,换 1% DMEM 维持液,5 d 后 IDXX 试剂盒检测细胞上清中 p27 含量。同时用 ALV-J 单克隆抗体 JE9 对细胞进行间接免疫荧光检测。

1.2.5 全基因组扩增 参照 ALV-J 原型株 HPRS-103(Z46390.1) 全序列,设计合成 4 对引物(表 2)对其前基因序列进行扩增,扩增结果通过 Blast 比对后用 DANStar 中的 SeqMan 进行拼接。

表 1 J 亚群白血病病毒检测引物

Table 1 Detection primers of avian leukosis virus

引物名称 Primer name	序列 Sequence	退火温度/°C Annealing temperature	片段大小/bp Fragment
H5	5'-GGATGAGGTGACTAAGAAAG-3'	56	517
H7	5'-CGAACCAAAGGTAACACACG-3'		

表 2 J 亚群白血病病毒全基因序列扩增引物

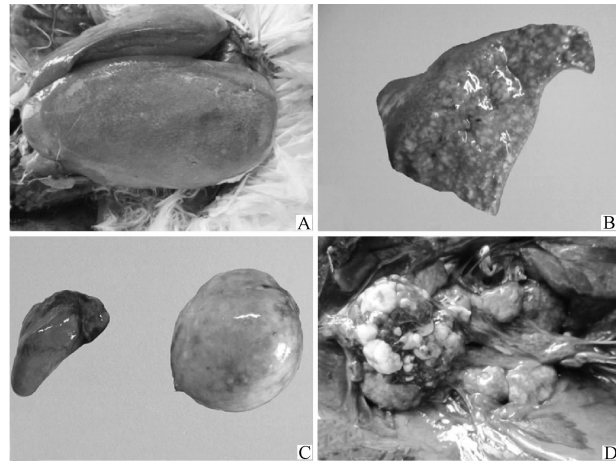
Table 2 Complete genome amplification primers of ALV-J

引物名称 Primer name	序列 Sequence	退火温度/°C Annealing temperature	片段大小/bp Fragment
1 F	5'-TAAAAGCTTTGTAGTGTTATGCAATACTC-3'	56	2 990
1 R	5'-TAGGTACCACAAGCTTGCGTTAACAG-3'		
2 F	5'-TCGTTTATTGCATGACTTGCG-3'	58	2 300
2 R	5'-CGAGAAGGTACCCA _t AT _t ACCTTAT-3'		
3 F	5'-GGATGAGGTGACTAAGAAAG-3'	56	2 200
3 R	5'-TTCCCCCTCCCTATGCAAA-3'		
4 F	5'-CCGCGAAAGGTGTTAAGACG-3'	56	890
4 R	5'-GCCATCCGCTTCATGCAG-3'		

2 结果

2.1 外观检查及剖检病变

病死鸡外观消瘦,鸡冠苍白、萎缩,腹部膨大,个别鸡趾部皮下有血泡。病死鸡的剖检病变大致相同,均表现肝、脾显著肿大(图 1A、C),极度肿大的肝几乎充满整个腹腔,质地硬实,有的肝表面及切面有明显的灰白色颗粒状结节(图 1B);肾、卵巢有不同程度的肿大(图 1D),表面和切面均有大小不等的灰白色肿瘤结节;骨髓颜色明显变淡,呈灰白色;骨骼表面未见肿瘤病变;坐骨神经也未见增粗。



A. 肝肿大;B. 肝切面有明显的灰白色颗粒状结节;C. 脾明显肿大;D. 肾和卵巢肿大

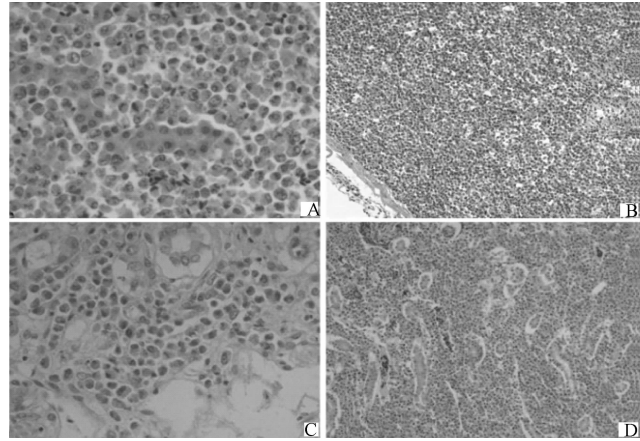
A. Hepatomegaly; B. Liver section with clear white granular nodules; C. Splenomegaly; D. Kidney and ovarian enlargement

图 1 剖检观察结果

Fig. 1 Result of gross examination

2.2 病理组织学检查

镜检可见肿瘤病灶主要由髓样瘤细胞组成,髓样瘤细胞形态基本一致,细胞体积大,呈圆形或椭圆形,胞质丰富,呈粉红色,内有大量圆球形嗜酸性颗粒,细胞核呈圆形、椭圆形或肾形,染色稍淡,空泡化,常偏于细胞一侧(图 2C,200×),有的肿瘤结节内可见瘤细胞核分裂相。整个肝失去其固有的组织结构,大量髓样瘤细胞呈灶状或条索状浸润、增生,肿瘤病灶密集分布,大小不一,肝组织仅有少量残留(图 2A,200×);脾白髓的数量、体积明显减少,红髓内的髓样瘤细胞多呈弥漫性浸润、增生,鞘动脉周围有灶状髓样瘤细胞浸润(图 2B,100×);在肾小管之间有大量髓样瘤细胞浸润(图 2D,100×)。



A. 肝组织仅有少量残留,大量髓样瘤细胞呈灶状增生,200×;B. 脾红髓内的髓样瘤细胞呈弥漫性增生,100×;C. 肾间质浸润的髓样瘤细胞,胞质内有大量粉红色圆球形嗜酸性颗粒,200×;D. 肾组织有大量髓样瘤细胞弥漫性浸润,100×

A. Only a small amount of liver tissue survived and large amount of myeloid tumor cells showed spotty proliferation,200×;B. Myeloid tumor cells in red pulp of spleen showed diffuse proliferation,100×;C. Myeloid Tumor cells with a lot of pink spherical eosinophilic granules in cytoplasm proliferated in the renal interstitium,200×;D. A large number of myeloid tumor cells proliferated diffusely in the renal interstitium,100×

图 2 病理组织学观察(HE)

Fig. 2 Result of histopathologic examination (HE staining)

2.3 PCR 检测

对所有送检鸡进行 PCR 检测,重复 3 次,结果均显示 ALV-J 阳性,片段大小 500 左右,和目的条带大小一致。

2.4 病毒分离鉴定

第 5 天检测细胞上清 p27 为阳性,单克隆抗体检测外源性 J 亚群白血病病毒为阳性(图 3)。说明该鸡群有 ALV-J 感染。

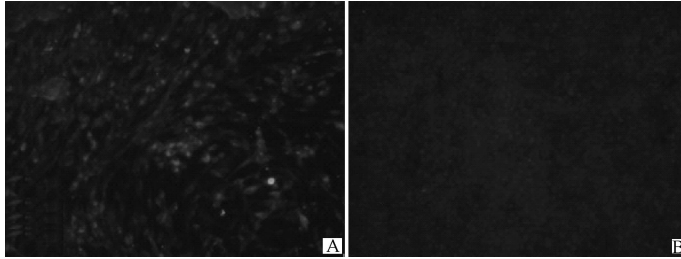
2.5 全基因序列分析

2.5.1 序列分析 扩增得到全长为 7 647 bp 序列,其中 *gag* 长 2 016 bp,*pol* 基因长 2 622 bp,*env* 长 1 689 bp。序列分析表明 *gag* 和 *pol* 基因相对保守,与参考株核酸相似性分别在 94.8%~97.4%和 97.4%~98.3%,氨基酸相似性为 95.4%~98%和 97.1%~98.6%;*env* 核酸相似性为 90.9%~97.5%,氨基酸相似性为 89.7%~95.5%。3'UTR 序列分析发现,跟原型株 HPRS-103 株比较,在 rTM 和 DR 区有 205 bp 的缺失,相当于 HPRS-103 原型株的 7 049—7 253 位置。E 元件在 7 386 位有

1 个碱基缺失,致使 *E* 元件长度为 146。在 5'UTR 的先导区序列 leader 区域中,有 1 个 19 bp 的插入序列,即 5'-CGCGGTTCCGGTTGCTCTG-3',通过 Blast 对比,发现与 TW-3577、GD1109 株中的插入序列一样。

2.5.2 进化树分析 以 HPRS-103(Z46390.1)、ADOL-7501(AY027920.1)、SDAU1001(JN389517.1)、

SD07LK1(FJ216405.1)、NX0101(DQ115805.1)、GD1109(JX254901.1)为参考株,通过 DANStar 中的 MegAlin,将分离株(SD12LC01) *env* 和参考株 *env* 基因用 Clustal W Method 进行比对,得到进化树(图 4),通过此进化树可以看出分离株 SD12LC01 株与最近分离的 GD1109 和 SDAU1001 株关系最近。



A. 接种研磨组织上清的 DF-1 细胞,产生绿色荧光,200×;B. 未接种研磨组织上清的 DF-1 细胞,无绿色荧光产生,100×

A. DF-1 cells inoculated with supernatant of grinding tissue show green fluorescence (200×);B. DF-1 cells uninoculated with supernatant of grinding tissue show no green fluorescence (100×)

图 3 间接免疫荧光结果

Fig. 3 Results of indirect immunofluorescence

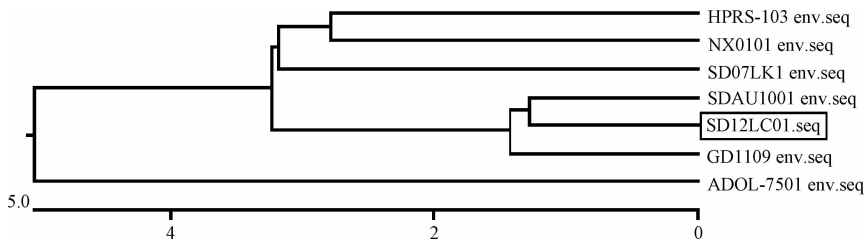


图 4 *env* 基因进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on *env* gene

3 讨论

通过综合诊断,确定该乌骨种鸡群已被 ALV-J 感染,发病鸡为髓样细胞瘤和血管瘤混合表型。

通过全序列分析,该乌骨鸡群的 ALV-J 感染株 3 个主要结构基因 *gag*、*pol*、*env* 与英国原型株 HPRS-103 相似性为 90.9%~98.3%。与最近分离于商品蛋鸡的 GD1109 和 SDAU1001 的 *env* 序列比较,其相似性达 96.6%~97.9%。rTM 区是 TM 的 1 个剪接产物,一直被认为是没有功能的多余部分,DR 区是 1 个基本运输元件,该元件有利于未剪切的 RNA 在细胞质中的聚集,是病毒转录本进行加工所必须的。分离株 rTM 和 DR 区片段缺失,与英国原型株 HPRS-103 差异较大,但是与近几年国内分离株相似性很高,特别是 SDAU1001,

对应的 HPRS-103 株的缺失位置完全一致。5'UTR 区的 19 bp 的插入也跟参考株 GD1109、TW-3577 对应的 HPRS-103 株的位置是一样的,序列也完全一致;与 SDAU1001 株仅仅是第 17 位碱基由 T 变为 C,说明感染乌鸡的 ALV-J 与中国近期商品蛋鸡分离株相比变异较小。推测该 ALV-J 分离株可能来自商品蛋鸡,这将为乌骨鸡白血病的防控带来重大难题。近几年 ALV-J 分离株插入序列的出现频率非常高。该 rTM 和 DR 区段缺失与先导区序列的插入跟 ALV-J 病毒进化是否有关,需要进一步研究^[9]。

E 元件完整长度为 150 bp,元件首先发现于复制型的急性转化的肉瘤病毒中^[10],常被认为与病毒的复制与致瘤性有关^[11],它有转录子的结合位点,可能是一个增强子。许多 ALV-J 毒株此区段发生

缺失性突变^[12-13],在部分中国血管瘤型 ALV-J 蛋鸡分离株中 *E* 元件有 1 个碱基的缺失^[14]。值得注意的是该分离株 *E* 元件相对原型株 HPRS-103 在 7 386 位也有 1 个碱基缺失,致使 *E* 元件长度为 146 bp。但是该分离株 *E* 元件跟它们缺失的碱基并不相同,*E* 元件 1 个碱基的缺失对分离株致病性的影响有待进一步研究。

4 结 论

聊城某乌骨种鸡场送检的病例经剖检、病理组织学检查、PCR 检测及病毒分离鉴定,确定为 J 亚群白血病病毒感染导致的髓样细胞瘤和血管瘤。ALV-J 病毒全基因序列为 7 647 bp,其中 *gag* 长 2 016 bp,*pol* 基因长 2 622 bp,*env* 长 1 689 bp。跨 rTM 和 DR 区有 205 bp 的缺失,在先导区序列 leader 区域中有 1 个 19 bp 的插入序列。分离株与原型株 HPRS-103 差异较大,但与近几年中国商品蛋鸡的分离株相似性很高,可能来自商品蛋鸡。

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, HOWES K, GILLESPIE A M, et al. Host range of Rous sarcoma virus pseudotype RSV (HPRS-103) in 12 avian species: support for a new avian retrovirus gp85 envelope subgroup J [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73(11): 2995-2997.
- [3] FADLY A M, SMITH E J. Isolation and some characteristics of a subgroup J-like avian leukosis virus associated with myeloid leukosis in meat-type chickens in the United States [J]. *Avian Dis*, 1999, 43(3): 391-400.
- [4] XU B R, DONG W X, YU C M, et al. Occurrence of avian leukosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China [J]. *Avian Pathol*, 2004, 33(1): 13-17.
- [5] 成子强, 张 利, 刘思当, 等. 中国麻鸡中发现禽 J 亚群白血病[J]. *微生物学报*, 2005, 45(4): 584-588.
- [6] 李 艳, 崔治中, 孙淑红. 黄羽肉鸡 J 亚群白血病病毒的分子生物学特性和致病性[J]. *病毒学报*, 2007, 23(3): 207-211.
- [7] 彭 昊, 吴元俊, 秦丽莉, 等. 不同品种禽类 ALV 和 REV 感染情况调查 [J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(12): 1989-1993.
- [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(1): 87-98.
- [9] 潘 伟, 高玉龙, 孙芬芬, 等. 蛋鸡 J 亚群禽白血病病毒 HB09JY03 株的分离鉴定及其全基因组序列分析 [J]. *中国兽医科学*, 2010, 40(11): 1110-1114.
- [10] BAI J, PAYNE L N, SKINNER M A. HPRS-103 (exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an env gene related to those of exogenous elements EAV-0 and E51 and E element found previously only in sarcoma viruses [J]. *J Virol*, 1995, 69(2): 778-784.
- [11] CHESTERS P M, SMITH L P, NAIR V. E (XSR) element contributes to the oncogenicity of avian leukosis virus (subgroup J) [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87(9): 2685-2692.
- [12] 杜 岩, 崔治中, 秦爱建, 等. 鸡的 J 亚群白血病毒的分离及部分序列比较 [J]. *病毒学报*, 2000, 16(4): 341-346.
- [13] 杨玉莹, 叶建强, 赵振华, 等. 禽白血病病毒 J 亚群内蒙株的分离与鉴定 [J]. *中国病毒学*, 2003, 18(5): 454-458.
- [14] LAI H, ZHANG H, NING Z, et al. Isolation and characterization of emerging subgroup J avian leukosis virus associated with hemangioma in egg-type chickens [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 151(3-4): 275-283.

(编辑 白永平)