

# 种蛋中内源性禽白血病毒检测和鉴定

徐海鹏<sup>#</sup>, 孟凡峰<sup>#</sup>, 董 宣, 赵 鹏, 崔治中<sup>\*</sup>

(山东农业大学动物医学院, 泰安 271018)

**摘 要:** 某祖代种鸡群临床表现正常, 在开产后用商品化禽白血病毒抗体检测试剂盒(ALV-Ab)和禽白血病毒抗原检测试剂盒检测发现血清抗体阳性率及蛋清抗原阳性率均显著高于正常水平, 但对种蛋中抗原阳性的 23 只种鸡分别接种 DF1 细胞和 SPF 鸡胚来源的成纤维细胞(CEF)后均未分离到病毒。为探明该鸡群是否存在内源性禽白血病毒(ALV-E)以及能否干扰商品化抗体检测试剂盒的结果判定, 将 23 只种鸡所产种蛋分别孵化后逐一制备成 CEF 培养, 盲传 3 代后检测到其中 1 只鸡的细胞培养上清抗原检测为阳性。从该细胞培养上清液提取 RNA, RT-PCR 扩增其 *gp85* 基因, 序列分析证明该检出病毒为 E 亚群 ALV。将该 E 亚群 ALV 接种 SPF 鸡胚来源 CEF 后又可检出 p27 抗原, 显示该内源性 ALV 具备传染性。同时, 对该病毒 *gp85* 基因进行了原核表达, 表达产物免疫鸡后部分鸡血清经 ALV-Ab 抗体检测试剂盒检测为阳性。本研究分离到 1 株对 CEF 具备传染性的内源性 ALV-E, 并证明其诱导产生的抗体能够干扰对外源性 ALV 的鉴别诊断, 提示在进行临床类似情况的判定时要结合鸡群实际表现做全面分析。

**关键词:** 种鸡; E 亚群禽白血病毒; *gp85* 基因; 血清交叉反应; p27 抗原

中图分类号: S852.659.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)08-1317-07

## Detection and Identification of an Endogenous Subgroup E Avian Leukosis Virus in a Chicken Breeder Embryo

XU Hai-peng<sup>#</sup>, MENG Fan-feng<sup>#</sup>, DONG Xuan, ZHAO Peng, CUI Zhi-zhong<sup>\*</sup>

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

**Abstract:** A breeder chicken flock demonstrated 5%-6% positive rates in tests of antibodies to subgroups A/B avian leukosis virus (ALV) and egg albumen p27 antigen, although chickens were clinically health and their egg productivity was normal. However, no exogenous ALV was isolated when serum and egg albumen samples of more than 200 birds were inoculated in DF1 cell cultures. Then 23 breeders with high S/P values in ELISA for p27 antigen in their egg albumen were selected and kept from the breeder farms. Blood plasma and egg albumen samples were collected twice from each birds for inoculation of DF1 cells and SPF embryo-originated fibroblast (CEF) cultures, again there was no exogenous ALV isolated, in order to identify whether the virus is endogenous viruses. Fertilized eggs from these 23 breeders were incubated for 9-11 d and their CEF were prepared for each embryos, p27 antigen was detected in CEF supernatant from only one of the 23 breeder eggs. Its supernatant was further inoculated into DF1 and SPF embryo CEF culture, p27 was detected from only SPF embryo CEF but not DF1 cell cultures, indicating that there was endogenous but not exogenous ALV. By use of genomic RNA abstracted from viral particles in the supernatant with p27 detected as the template, *gp85* gene was amplified by RT-PCR. Se-

收稿日期: 2014-01-25

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项种鸡场禽白血病毒防控与净化技术的集成(#201203055)

作者简介: 徐海鹏(1986-), 男, 山东威海人, 硕士生, 主要从事分子病毒学研究, E-mail: xujianghaohaipeng@163.com; 孟凡峰(1990-), 男, 山东临沂人, 硕士生, 主要从事分子病毒学研究, E-mail: fanfengmeng@126.com。两人对本研究有同等贡献, 并列第一作者

\* 通信作者: 崔治中, 博士生导师, E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

quence comparison confirmed that the detected ALV belonged to subgroup E. After immunization with its gp85 protein expressed in *E. coli*, some chickens demonstrated antibody positive by ALV-A/B antibody detection ELISA kit. Influence or interference of ALV-E on results in tests with ALV antibody or p27 detection ELISA kits was discussed.

**Key words:** chicken breeder; subgroup E avian leukosis virus; gp85; serological response; p27 antigen

禽白血病是由禽白血病病毒(avian leukosis virus, ALV)引起的禽类多种良性和恶性肿瘤性疾病,临床上多以免疫抑制、生长抑制和多器官组织出现肿瘤等为主要特征<sup>[1]</sup>。根据病毒囊膜蛋白和与病毒的宿主特异性相关的 gp85 蛋白抗原性差异,禽白血病病毒可分为 A~J 共 10 个亚群,其中只有 A、B、C、D、E 和 J 亚群能感染鸡<sup>[2]</sup>。

与感染鸡的其他病毒有所不同,ALV 可分为内源性病毒和外源性病毒。鸡的外源性 ALV 是指不会通过宿主细胞染色体传递的病毒,包括 A、B、C、D 和 J 亚群。内源性 ALV 通常指 E 亚群 ALV,是可整合进宿主细胞染色体基因组的前病毒 cDNA,因而可通过染色体垂直传播。ALV-E 既可能是完整全基因组并能产生游离的病毒粒子,但通常致病性或致癌性很低或完全没有;也可能是不完整的病毒基因组,不能产生感染性病毒粒子,但可能不同程度地表达某些病毒结构蛋白<sup>[1]</sup>。内源性 ALV-E 虽然没有致病性,但它可干扰对外源性 ALV 感染的检测,特别是对 p27 抗原检测结果的评估,给诊断和净化 ALV 带来了很大的困难<sup>[3-4]</sup>。

由于中国在禽白血病方面一直未进行全面的净化措施,不同鸡群中 A、B、J 亚群 ALV 感染仍较普遍<sup>[5-12]</sup>,特别是在 2008—2009 年间,ALV-J 诱发的髓细胞样肿瘤和血管瘤更是在中国商品代蛋鸡中广泛流行,造成了很大的经济损失<sup>[13-15]</sup>。在国务院颁发的“国家中长期动物疫病防治规划(2012—2020)”中,鸡白血病被列为必须消灭或控制的 4 种禽病之一。

为了控制 ALV 的流行,中国启动了针对种鸡群的净化工作,并且农业部兽医局连续多年组织不同单位针对全国白羽肉鸡和蛋鸡的祖代以上种鸡场开展了 ALV 感染状态的强制性监控,这些措施促使种禽生产企业积极开展自我检测和监控。由于中国常见的 A、B、J 亚群感染后诱发的抗体均可以用商品化试剂盒进行检测,这使得企业能很方便地判断种鸡群的总体感染状态。在日常监测中,某进口祖代鸡场在开产后做例行抽样检测时发现,

在一批种鸡中有一定比例的血清样品呈现 ALV-A/B 亚群抗体阳性,而且在对种蛋蛋清的 ALV-p27 抗原检测中也有一定比例阳性。然而,整个鸡群无任何发病表现,产蛋率等技术指标也很正常,并且按照常规方法接种 DF1 细胞和 SPF 鸡胚来源的鸡胚成纤维细胞(CEF)也未分离到任何病毒。考虑到不同 ALV 对不同来源细胞受体的多样性,又推测是否存在不能适应 DF1 细胞的新的外源性 ALV。为此,作者又尝试了新的方法,即直接用 p27 抗原阳性的受精胚逐一制备成 CEF,再根据 p27 抗原检测结果来判断有无 ALV 感染,最终从细胞培养上清液中检测出 1 株有传染性的内源性 ALV-E。相对于中国已报道的 ALV-E 仅仅只是根据鸡基因组的检测<sup>[17]</sup>,本文对中国首次从细胞培养液中检出 ALV-E 的有传染性的游离病毒粒子做了详细鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 疑似感染鸡群中 ALV 的分离和鉴定

2012 年春,某进口祖代鸡场某批祖代鸡在开产后做例行抽样检测时发现,有 5%~6% 的鸡血清样品呈现 ALV-A/B 亚群抗体阳性或其种蛋蛋清检测出 ALV p27 抗原,但整个鸡群临床表现正常,产蛋性能也很稳定。从该鸡群中挑取种蛋蛋清 p27 抗原为阳性的 23 只鸡,每只鸡采集 2 个种蛋取蛋清分别接种 DF1 细胞和 SPF 鸡胚制备的鸡胚成纤维细胞(CEF),同时采集血液离心取血浆分别接种 DF1 细胞和 CEF,在含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中 37 °C 培养 7 d,盲传 1 代后继续维持 5~7 d,分别取细胞培养上清液以 IDEXX 公司的 ALV-p27 抗原检测试剂盒检测,判断是否存在 ALV 感染。

此外,将这 23 只可疑感染鸡进行人工授精,每只鸡分别取 2~3 枚受精种蛋孵化至 9~11 日龄后,按常规方法分别制备成 CEF,盲传 3 代后(每代培养约 4 d),再取细胞上清液用 ALV-p27 抗原检测试剂盒检测 p27 抗原。如果检测出 p27 阳性样品,分别将上清液接种 DF1 细胞和 SPF 鸡胚来源的

CEF, 确认其是否具有传染性。对 p27 抗原检测为阳性样品, 细胞和上清液分别保存于液氮和  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

### 1.2 ALV 分离毒株 *env* 基因的扩增及其序列分析

为了进一步对分离毒株进行亚群鉴定并确定其是否为传染性的游离病毒, 收集 p27 检测为阳性的细胞培养上清, 经高速离心去除细胞碎片后, 使用 RNA 提取试剂盒(OMEGA 公司)从 p27 检测为阳性的细胞培养上清液中提取游离病毒的基因组 RNA。以此为模板, 以 Oligo dT 为引物, 利用反转录试剂盒(TaKaRa)获得病毒基因组 cDNA; 针对 *env* 基因两侧的保守区设计并合成一对通用引物, ALV-F (GGATGAGGTGACTAAGAAAG) 和 ALV-R (AGTTAAGCCATGCCCCGTTAC), 并以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 目的片段大小为 1 900 bp。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带以凝胶回收试剂盒(OMEGA 公司)回收纯化。然后将回收产物连接到 pMD18-T 载体中, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 挑选单个菌落, 提取质粒分别进行酶切鉴定和 PCR 鉴定, 阳性克隆送上海生工公司测序。以同样的引物和方法, 以感染细胞的基因组 DNA 为模板, 用 PCR 扩增整合进感染细胞基因组的前病毒 cDNA 的相应片段。

利用 DNASTar 软件, 根据所得 *env* 基因序列的 ORF 推得 gp85 的氨基酸序列, 并与已发表的 ALV 各亚群代表株进行比对。

### 1.3 ALV 分离株 gp85 基因的原核表达及重组蛋白的纯化

设计和合成 1 对引物用于扩增分离毒株的 gp85 基因。正向引物为“GCGGATCCATGCT-GAATGTCTCTATGTG”, 加入了 1 个 *Bam*H I 位点(下划线部分), 反向引物为:“CTAGCTAGCT-CAGCTTCGTTTACGTCTTATAACC”, 加入 *Nhe*I 位点(下划线部分)。以克隆到的 *env* 基因质粒为模板进行 PCR 扩增, 并将 PCR 产物和大肠杆菌表达性载体 pET-His 经 *Bam*HI 和 *Nhe*I 双酶切后连接, 转化宿主菌 *E. coli* BL 21。经双酶切和 PCR 验证为阳性的菌落送至上海生工公司进行测序分析。

经测序验证后的阳性菌, 接种于 5 mL 含有氨苄青霉素( $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的 LB 培养基(Trypone 10 g $\cdot\text{L}^{-1}$ , Yeast Extract 5 g $\cdot\text{L}^{-1}$ , NaCl 10 g $\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.0), 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  控温摇床中过夜培养。次日取出 0.5 mL 培养物接种于 50 mL 的 LB 培养基中,  $37$

$^{\circ}\text{C}$  振荡培养 2 h 后(吸光光度为 0.6~0.8), 然后加入终浓度为  $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 IPTG, 继续于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  诱导 5 h, 在诱导前先取 1 mL 作为诱导前对照。同时, 按照上述的方法诱导表达非重组的 pET-His 载体, 作为阴性对照。将诱导表达的菌液取出, 超声波裂解破碎细菌后, 用 12% SDS-PAGE 电泳鉴定分析。

取诱导后的菌液 50 mL, 离心收集菌体, 超声波破碎后,  $4\ 000\times\text{g}$  离心 10 min, 弃上清。用 PBS (pH 7.2) 重悬沉淀(每毫升沉淀 7.5 mL PBS), 超声重悬液, 工作时间 1 s, 间隙时间 3 s, 全程时间 12 min, 总共 180 次。 $12\ 000\times\text{g}$  离心 10 min, 收集包涵体沉淀, 弃上清, 用 Buffer B(GenScript Corporation)溶解包涵体(7.5:1), 室温下孵育 30~60 min,  $12\ 000\times\text{g}$  离心 30 min, 弃沉淀, 将上清用针对 His 标签的镍柱蛋白纯化试剂盒(GenScript Corporation)进行纯化。纯化后, 采用  $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  尿素透析, 置半透膜中  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  透析复性 48 h, 分装于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。对纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析, 确定蛋白大小是否与理论计算的数值相符; 为了进一步鉴定表达蛋白的特异性, 使用带有 his 标签的抗体进行 Western blot 分析, 其操作过程按分子克隆实验手册进行<sup>[16]</sup>。

### 1.4 抗 gp85 小鼠血清和鸡血清的制备及其与 B 亚群 ALV 的交叉反应

将纯化好的 E 亚群 ALV 重组表达 gp85 蛋白用考马斯亮蓝 G250 法定量后, 加等量的弗氏完全佐剂, 颈部皮下注射 6 只 6 周龄昆明白小鼠, 每只 0.2 mL 含  $100\ \mu\text{g}$  蛋白, 2 周后用弗氏不完全佐剂乳化的 gp85 蛋白进行 2 次免疫,  $0.2\text{ mL}\cdot\text{只}^{-1}$ , 4 周后 3 免, 其中 2 只未免疫蛋白的昆明白小鼠作为阴性对照组。第 3 次免疫后 10 d, 心脏采血致死, 析出的血清置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。将所得的血清与 ALV-B 感染的阳性 DF1 细胞做间接荧光抗体反应, 观察该分离病毒的 gp85 诱导抗体与其他亚群 ALV 是否有交叉反应。用同样方法, 免疫 16 只 4 周龄的 SPF 鸡, 每只鸡 1 mL(含  $500\ \mu\text{g}$  纯化蛋白), 腿部肌肉多点注射, 2 周后 2 免, 4 周后 3 免, 3 次免疫后每周采集血清, 用 ALV-Ab 抗体检测试剂盒及 ALV-J 抗体检测试剂盒(IDEXX 公司产品)检测抗体反应。

## 2 结 果

### 2.1 疑似感染鸡群中外源性 ALV 的分离检测

选择种蛋蛋清 ALV-p27 抗原阳性且 S/P 值较

高的 23 只种鸡单独饲养,采集血浆分别接种 DF1 细胞和 SPF 鸡胚制备的 CEF,培养 14 d 后用 ELISA 检测试剂盒检测 ALV-p27 抗原均为阴性,重复检测也均为阴性,这表明所有可疑鸡都没有检测出外源性 ALV。

从每只种鸡各取 2 个蛋的蛋清分别接种 DF1 细胞和 CEF,盲传一代总计培养 14 d 后用 ELISA 检测试剂盒检测 ALV-p27 抗原,均为阴性,表明所有可疑鸡种蛋蛋清中都没有检测出外源性 ALV。

## 2.2 疑似感染鸡群中内源性 ALV 的分离鉴定

将种蛋抗原检测为阳性的 23 只种鸡的种蛋孵化至 9~11 日龄后,分别做成 CEF 培养,盲传三代。

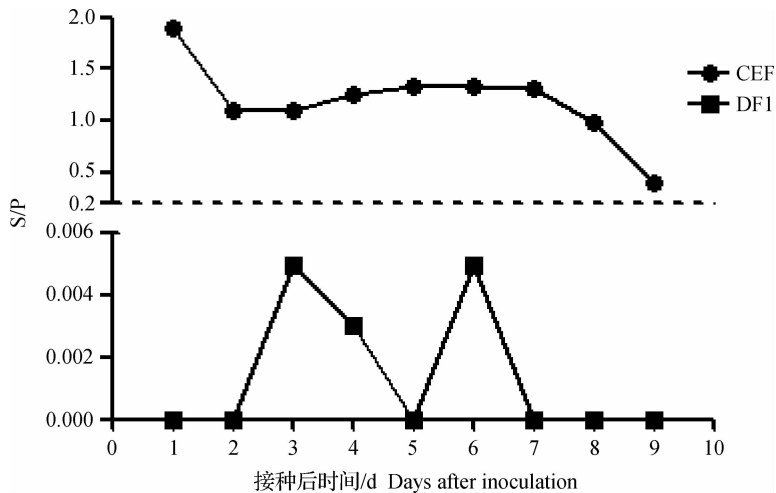


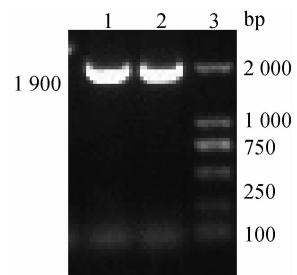
图 1 内源性 ALV 分离株接种 DF1 和 SPF 鸡胚 CEF 后的检测动态

Fig. 1 The dynamic in detection of ALV-E p27 in the supernatant of DF1 or SPF-origin CEF cultures inoculated with ALV from the positive breeder eggs

## 2.3 ALV 分离株 *env* 基因的扩增和 *gp85* 序列比较

以从 p27 抗原检测阳性的细胞培养上清液中提取的 RNA 作为模板,通过 RT-PCR 扩增了含有完整 *env* 基因大小约为 1.9 kb 的片段(图 2),扩增产物选择 4 个克隆测序,验证后序列分别编号为 viral-1、2、3、4。以感染细胞的基因组 DNA 为模板,用 PCR 扩增了整合进感染细胞基因组的前病毒 cDNA 的 *env* 片段,扩增产物选择 6 个克隆测序,验证后序列分别编号为 genome-1、2、3、4、5、6。通过 *gp85* 基因序列的比对,Viral-1、2、3、4 之间核酸相似性在 98.9%~99.4%,genome-1、2、3、4、5、6 之间的相似性在 99.4%~100%,Viral-1、2、3、4 和 genome-1、2、3、4、5、6 六个克隆之间的相似性在 99.4%~100%。而 genome-1、3 与 viral-2 三个克隆 100% 相似,该序列作为该检出病毒的代表序列提交至 GenBank,登录号为 KJ018762。该检出病毒

每代取上清液检测 ALV-p27 抗原,除 1 只鸡的鸡胚细胞培养上清液检测出 p27 抗原外,其余 22 只的鸡胚细胞培养物上清均未检出 p27 抗原。将该阳性上清样品接种 DF1 细胞培养 14 d 后,p27 检测始终为阴性,表明分离的 ALV 不是外源性 ALV;但同样的上清液接种商品化 SPF 鸡和祖代白羽肉鸡来源的 CEF 后,均可检测到 p27 抗原(图 1)。但是随着传代,ELISA 检测 p27 抗原的 S/P 值逐渐下降。上述结果表明该种蛋中检测到的 ALV 为内源性病毒,而且该病毒在常规 CEF 培养中的复制能力也很弱,很难在 CEF 上长期连续传代培养。



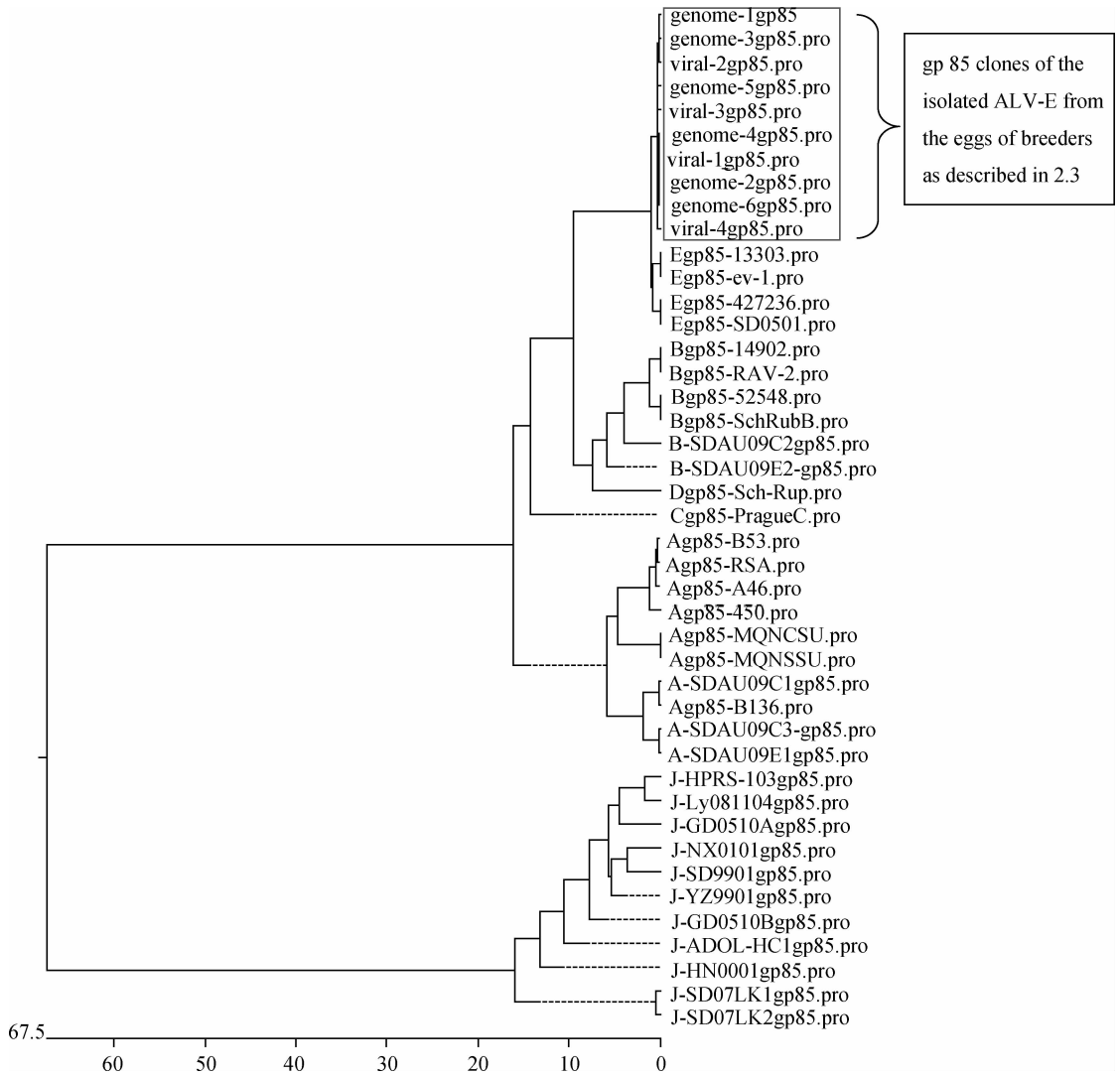
1、2. ALV *env* 基因;3. DL2000 DNA 相对分子质量标准  
1, 2. ALV *env* gene; 3. DL2000 DNA marker

图 2 内源性 ALV 分离株 *env* 基因片段的 RT-PCR 扩增  
Fig. 2 RT-PCR products of ALV *env* gene amplified from RNA extracted from cell culture supernatant as the template

的 *gp85* 序列与 GenBank 中公布的 4 个内源性 E 亚群 ALV 的相似性高达 97.1%~98.9%,而与外源性 A、B、C、D 亚群 ALV 的 *gp85* 的相似性仅在

81.2%~85.0%,与 ALV-J 的相似性更是低至 36.4%~39.1%。显然,从鸡胚中检测出的 ALV

属于内源性 E 亚群 ALV,进化树分析也表明,该毒株归属于 E 亚群 ALV(图 3)。



括号中的 10 个序列是 2.3 中描述的从种蛋检测到的病毒的 10 个克隆的序列

The top 10 sequences were clones amplified from the breeder eggs as described in 2.3

图 3 内源性 ALV 分离株与 ALV 不同亚群参考株之间 gp85 氨基酸序列的遗传进化树关系(用 Clustal W 法比较)  
Fig. 3 The phylogenetic relationship of gp85 amino acid sequence of ALV isolated from the breeder eggs with ALV reference strains of different subgroups (with Clustal W method)

## 2.4 鸡胚检出 ALV 与其他亚群的抗原交叉反应

将鸡胚检出毒株的 gp85 表达产物免疫小鼠,获得的血清作为一抗,与 B 亚群 ALV 感染的 DF1 细胞做 IFA,结果显示该血清可与 B 亚群的 ALV 呈现阳性反应,表明该检出病毒与 ALV-B 有抗原交叉反应。

将鸡胚检出毒的 gp85 表达产物免疫 16 只 SPF 鸡,3 次免疫后每周采集血清,用检测 ALV-Ab 抗体 ELISA 试剂盒检测,有 1 只鸡稳定地显示阳性反应,在三免后采集的 3 次血清都呈明显的阳性反应,

还有 2 只则只显示一过性阳性反应且读数较低。这一结果证明,该鸡胚检出的内源性 E 亚群 ALV 的 gp85 蛋白能在一部分鸡诱发与其他亚群特别是 A/B 亚群的抗体交叉反应。

## 3 讨论

ALV 是鸡群中最早发现也是最常见的病毒之一,它可引起一定比例感染鸡产生不同细胞类型的肿瘤,但多数感染鸡仅表现亚临床感染,呈现一定程度的免疫抑制、生长迟缓或产蛋性能下降。根据

ALV 囊膜蛋白 gp85 抗原性差异,国际上已公布有 A~J 共 10 个不同的亚群。但是,从鸡群中分离到的 ALV 只有 A、B、C、D、E 和 J 6 个亚群。其中 E 亚群是内源性的,即其前病毒 cDNA 存在于大多数鸡的染色体基因组中,在一定的条件下可从染色体基因组产生完整的病毒粒子或仅表达某些蛋白质<sup>[1]</sup>。通常内源性 ALV-E 没有致病性或致病性很低,但它会干扰对外源性 ALV 的检测,从而干扰禽白血病的鉴别诊断和净化程序。外源性 ALV 既能横向传染也能通过种蛋垂直传播,国际上对 ALV 的预防控制主要采取对种鸡群进行净化等综合措施,并取得了很大的成功。

从 20 世纪 90 年代以来,中国白羽肉鸡、黄羽肉鸡、蛋用型鸡先后遭受了 ALV 的侵害,造成了很大的经济损失,该病还有向黄羽肉鸡和中国特有的地方品系鸡蔓延的趋势<sup>[5-15]</sup>。为此,从 2010 年起农业部规定了对部分大型种鸡场 ALV 感染状态实施强制性监控,以推动中国种鸡场中 ALV 的净化。对鸡群 ALV 感染状态的检测和监控,最主要依靠对血清抗体及泄殖腔或蛋清中 p27 抗原的检测。虽然 p27 抗原是 ALV 的群特异性抗原,但随着多年来对种鸡群净化过程中的反复筛选,进口的种鸡群中虽然 ALV 的抗体或蛋清中 p27 抗原还有一定阳性率,但通常都很低(如低于 1%)。至于 ALV-E 是否也会产生与外源性 ALV 相应的抗体交叉反应还不清楚,此前也未见报道和研究。但是,根据过去连续三年对全国蛋用型祖代以上鸡场数万份样品检测结果表明,净化的种鸡场在血清抗体和蛋清 p27 抗原阳性率的两项指标都能达到这一标准(低于 1%)。

2 年前,某公司在进行例行抽样检测中,发现一肉用型祖代种鸡群 ALV-Ab 抗体阳性率和蛋清 p27 抗原阳性率显著高于正常范围,但鸡群生产性能正常,无任何发病表现,并且用对内源性 ALV-E 有抗性的 DF1 细胞未分离到病毒,这一现象使我们很困惑。为此从该鸡场挑选几十只蛋清 p27 抗原为阳性且在 ELISA 检测中 S/P 值较高的种鸡隔离饲养,采集血浆和种蛋连续 2 次分离病毒。在对 23 只种鸡样品的检测中,虽然培养的时间比标准的方法延长了 1 周(共 3 周,其间经二次消化细胞传代以保持良好的细胞状态),但是无论接种 DF1 细胞还是接种 SPF 鸡来源的 CEF,都没有检测到病毒,这表明这些鸡不存在外源性 ALV,在种蛋中也未分离到外源性 ALV。但该鸡群血清抗体和蛋清 p27 抗原阳

性率均显著高于正常水平,还是不敢轻易否定该种鸡群存在外源性 ALV 感染的可能性。鉴于 ALV 变异的多样性,作者怀疑是否存在一种针对不同细胞受体的外源性 ALV 新亚群。为此,作者用蛋清 p27 阳性鸡的 23 只种鸡所产种蛋直接制备 CEF 培养并检测 ALV,结果从 1 只种蛋制备的 CEF 培养上清液中检出 p27 抗原。当用该上清液分别接种 DF1 细胞和 SPF 鸡胚来源的 CEF 后,在对 ALV-E 有抵抗力的 DF1 细胞上完全没有病毒复制,而在能为不同亚群 ALV 生长的 SPF 鸡胚来源的 CEF 培养上清液中检出很高滴度的 p27(图 1),显示有病毒感染 CEF 并可继续复制。这表明这只鸡的种蛋中存在着传染性病毒粒子,但它仅是内源性的 ALV-E。为了进一步证明该细胞培养上清液中存在游离病毒粒子,将上清液高速离心后从上清中提取病毒基因组 RNA,通过 RT-PCR 扩增到 ALV 的 gp85 基因,序列比较又进一步证实了从该鸡胚中检测到的游离病毒确实是 E 亚群 ALV(图 2 和图 3)。实际上,经过 2 年的临床观察,不仅这批种鸡自身没有出现与 ALV 相关的临床病理表现,其后代在 1 年内也没有表现任何 ALV 相关的临床病理变化,本检测结果也再次说明了内源性 ALV-E 对鸡群确实几乎没有致病性,但可以干扰对鸡群 ALV 感染的检测和判断。虽然几年前,中国已报道了 ALV-E 的 gp85 序列<sup>[17]</sup>,但那是用 PCR 以鸡的基因组 DNA 为模板扩增出来的,代表的是整合进鸡基因组的 ALV-E。本研究则是从细胞培养上清液的病毒粒子提取的 RNA 为模板,以 RT-PCR 从有传染性的游离病毒粒子中扩增的 ALV-E 的 gp85 基因(见 2.2)。相对于已发表的内源性 ALV-E 只是根据从鸡的基因组扩增出 ALV-E 的全基因组序列<sup>[17]</sup>,而本文则是强调在中国首次从细胞培养上清中检测出能对 SPF 鸡的 CEF 呈现传染性的游离于细胞的病毒粒子。

为了证明内源性 ALV-E 也能诱发与其他亚群外源性 ALV 的交叉反应,本研究又用在大肠杆菌中表达的该病毒 gp85 基因产物免疫鸡。如结果 2.4 所示,一部分鸡的血清稳定地产生了能被常用的 ALV-Ab 抗体 ELISA 试剂盒所检出的抗体反应,这就解释了为什么该群种鸡在用 ALV-Ab 抗体 ELISA 检测试剂盒检测时阳性率显著高于标准水平。这一现象表明,某些遗传背景的品系鸡,其基因组中的内源性 ALV-E 在某种条件诱发表达量可

能会异常提高,也可能干扰对 ALV 抗体的检测。因此,对一些认为是 ALV 净化的鸡群,当对血清抗体检测阳性率显著高于标准时应有所怀疑,应结合鸡群的临床表现并取血浆或蛋清样品接种 DF1 细胞进行病毒分离鉴定来作最终判断。

然而本研究的结果还不足以回答另一个问题,即为什么这批种鸡会在开产前后有显著比例的个体表达和产生 ALV-E 且出现在种蛋中,还在一部分个体诱发抗体。这一问题只能留待相应品种鸡场的育种专家在今后的继续观察中加以研究解决。

#### 4 结 论

分离到 1 株对 CEF 具备传染性的内源性 ALV-E,其诱导产生的抗体能干扰对外源性 ALV 的鉴别诊断。

#### 参考文献:

[1] SAIF Y M, BARNES H J, GLISSON J R, et al. Disease of Poultry [M]. Iowa State University Press, 2003:64-81.

[2] COFFIN J M. Structure and Classification of Retroviruses [M]. New York: Plenum Press, 1992, 1: 19-49.

[3] SPENCER J L, GILKA F, GAVORA J S, et al. Distribution of lymphoid leukemia virus and p27 group-specific antigen in tissues from laying hens [J]. *Avian Dis*, 1984, 28(2): 358-373.

[4] CRITTENDEN L B, SMITH E J. A comparison of test material for differentiating avian leukemia virus group-specific antigens of exogenous and endogenous origin [J]. *Avian Dis*, 1984, 28(4): 1057-1070.

[5] CUI Z Z, DU Y, ZHANG Z, et al. Comparison of Chinese field strains of avian leukemia subgroup J viruses with prototype strain HPRS-103 and United States strains [J]. *Avian Dis*, 2003, 47(4): 1321-1330.

[6] XU B, DONG W, YU C, et al. Occurrence of avian leukemia virus subgroup J in commercial layer flocks

in China [J]. *Avian Pathol*, 2004, 33(1): 13-17.

[7] 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): 584-587.

[8] 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.

[9] SUN S, CUI Z. Epidemiological and pathological studies of subgroup J avian leukemia virus infections in Chinese local "yellow" chickens [J]. *Avian Pathol*, 2007, 36(3): 221-226.

[10] 李先桥, 史开志, 罗明星, 等. A、J 亚群禽白血病病毒感染肉用种鸡的诊断 [J]. *贵州畜牧兽医*, 2009, 33(4): 4-6.

[11] 赵冬敏, 张青婵, 崔治中. 芦花鸡中 B 亚群禽白血病病毒的分离与鉴定 [J]. *病毒学报*, 2010, 26(1): 53-57.

[12] 王鑫, 齐鹏飞, 杜艳, 等. 一例 A 亚型禽白血病病毒引起的纤维肉瘤的病理学和病毒学分析 [J]. *中国动物传染病学报*, 2011, 19(1): 11-16.

[13] LI Y, LIU X, LIU H, et al. Isolation, identification, and phylogenetic analysis of two avian leukemia virus subgroup J strains associated with hemangioma and myeloid leukemia [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 166(3-4): 356-364.

[14] WU X, QIAN K, QIN A, et al. Recombinant avian leukemia viruses of subgroup J isolated from field infected commercial layer chickens with hemangioma and myeloid leukemia possess an insertion in the E element [J]. *Vet Res Commun*, 2010, 34(7): 619-632.

[15] LAI H, ZHANG H, NING Z, et al. Isolation and characterization of emerging subgroup J avian leukemia virus associated with hemangioma in egg-type chickens [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 151(3-4): 275-283.

[16] MICHAEL R, JOSEPH S. Molecular Cloning [M]. Springer Harbor Laboratory Press, 2012: 1481-1483.

[17] 孔义波, 张兴晓, 姜世金, 等. SPF 鸡胚中内源性白血病病毒全基因序列鉴定与分析 [J]. *病毒学报*, 2008, 24(1): 53-58.

(编辑 白永平)