

# 鸡内源白血病毒 ev21 与慢羽非连锁分析和 LTR 区启动子活性分析

王 麒<sup>1</sup>, 王 晗<sup>2</sup>, 张秀玲<sup>1,4</sup>, 刘春杨<sup>1</sup>, 张乐超<sup>1</sup>, 李兰会<sup>1\*</sup>, 李祥龙<sup>3\*</sup>

(1. 河北农业大学动物科技学院, 保定 071001; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100;  
3. 河北科技师范学院, 秦皇岛 066600; 4. 中国农业科学院北京畜牧研究所, 北京 100193)

**摘要:** 旨在分析鸡内源 ev21 病毒与慢羽的连锁关系及其结构特征和启动子活性, 为建立无内源 ev21 病毒的慢羽种鸡提供检测方法, 并对 ev21 的启动转录活性进行探索。长片段 PCR 扩增获得鸡内源 ev21 病毒基因序列, 检测太行鸡、坝上长尾鸡、海兰褐、海兰灰及其祖代五个品系 259 份样本的病毒携带情况。利用 NCBI 数据库 Blast 比对分析并 PCR 获得病毒基因全长。构建 ev21 基因 5' 和 3' LTR 区的 pGL3-basic 重组质粒转染 A375 细胞检测其启动子活性。结果显示: 获得完整 ev21 病毒基因组全长 7 524 bp, 发现其反向插入在鸡 Z 染色体 g. 10681671-10681672 之间, 长片段 7 590 bp PCR 检测发现 ev21 与海兰灰慢羽鸡完全连锁, 但与太行鸡、坝上长尾鸡和海兰褐慢羽并不完全连锁, 尤其海兰褐快羽公鸡 ev21 全部阳性。ev21 基因 5' LTR 区具有高强度的启动子活性 ( $P < 0.01$ ), 3' LTR 区活性高于阴性对照, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。综上, 内源 ev21 病毒与鸡慢羽性状并不完全连锁, 7 590 bp 长片段 PCR 为内源 ev21 病毒的筛查提供检测方法, ev21 基因 5' LTR 区具有强启动子活性。

**关键词:** ev21; 慢羽; 染色体位置; LTR; 启动子活性

中图分类号: S852.659.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)05-0930-08

## Analysis of Non-linkage between Endogenous ALV-ev21 and Late Feathering of Chickens and Its Promoter Activity of LTR

WANG Qi<sup>1</sup>, WANG Han<sup>2</sup>, ZHANG Xiu-ling<sup>1,4</sup>, LIU Chun-yang<sup>1</sup>,  
ZHANG Le-chao<sup>1</sup>, LI Lan-hui<sup>1\*</sup>, LI Xiang-long<sup>3\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 3. Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066600, China; 4. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** The research was designed to analyze the linkage between the endogenous avian leucosis virus ev21 and phenotype of late feathering, as well as the promoter activity of LTR of ev21 gene. It was aimed to find the detection method for ev21 free breeding chickens. Long-range PCR was used to amplify the sequence of ev21 gene. The structure and its locus in chicken chromosome were analyzed based on the NCBI database. Two hundred and fifty-nine samples from 5 chicken lines were diagnosed for the detection of ev21. And 5' and 3' LTR were cloned into the pGL3-basic vector and were transiently transfected into A375 cells. The relative luciferase activity, which indicted the promoter activity of the transfected fragments, was detected. It was

收稿日期: 2016-11-15

基金项目: 河北省现代农业技术体系蛋鸡产业创新团队(HBCT2013090206); 河北省自然科学基金项目(C2015204176)

作者简介: 王 麒(1993-), 男, 河北井陘人, 硕士, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: 15369307136@qq.com

\* 通信作者: 李兰会, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: lanhui13@163.com; 李祥龙, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: lixianglongen@yahoo.com

showed that the genome of ev21 long for 7 524 bp was successfully cloned and it was integrated between g. 10681671-10681672 on chicken Z chromosome in reverse direction. Ev21 and late feathering were completely linked in Hy-line Gray, but were incompletely-linked in Taihang, Bashang and Hy-line Brown chicken. Especially, it was all positive in Hy-line Brown fast-feather rooster. 5' LTR of ev21 showed a high promoter activity ( $P < 0.01$ ), while 3' LTR did not show significantly higher activity than negative control ( $P > 0.05$ ). These data showed that ev21 integration was not linked with late feathering in chickens. PCR for 7 590 bp is a method for screening of ev21 in chickens. 5' LTR of ev21 had the high promoter activity.

**Key words:** ev21; late feathering; locus in chromosome; LTR; promoter activity

禽白血病毒是引起禽类各种造血细胞肿瘤性增生的一类逆转录酶病毒。根据寄主、抗体反应以及受体类型,鸡白血病毒分为六种亚型(A、B、C、D、E 和 J),其中 E 型白血病毒(ALVE)为内源性病毒,在鸡驯养前整合于鸡细胞基因组中,并遵循孟德尔遗传规律随鸡基因组复制而复制。鸡基因组中有 50 多种 ALV-E,许多内源 ALV-E 病毒由于不完整或甲基化或位置效应而转录沉默,但有些病毒元件是完整的,具备转录活性<sup>[1]</sup>。ALV-E 表达不仅影响外源病毒的感染和疾病发生,并对家禽的重要经济性状(如产蛋量、蛋重和蛋比重等)产生较大影响<sup>[2]</sup>,同时干扰外源病毒的鉴别诊断准确率<sup>[3-4]</sup>。S. Ka 等对鸡脑组织进行 cDNA 全阵列分析,发现低体重鸡与高体重鸡的主要差异表达基因为内源白血病毒 ALV-E<sup>[5]</sup>。携带有 ev3、ev6 或 ev9 缺陷表达的家禽对外源病毒 ALV 的易感性降低<sup>[6]</sup>,ev1 病毒插入鸡 TYR 基因内含子 4 导致隐性白突变<sup>[7]</sup>。ev21 是 ALV-E 的一种,慢羽白来航鸡及其后代均表现出的对外源淋巴白血病毒免疫性能减退、生产性能下降、死亡率升高等不良性状与慢羽基因中 ev21 的插入有关<sup>[8]</sup>。

引发商业蛋鸡血管瘤和髓细胞瘤的病毒是由内源白血病毒 3'UTR 与 ALV-J 重组形成的<sup>[9]</sup>,M. Feng 等利用免疫沉淀等试验发现慢羽 ev21 并不能与外源病毒 ALV-J 形成整合活性<sup>[10]</sup>。禽白血病毒基因的两端 LTR(long terminal repeats)区,负责控制病毒基因的转录,起 RNA 加工、调节、组装成病毒颗粒的作用,其结构依次为 U3、R 和 U5<sup>[11]</sup>,内源病毒 LTR 的启动子活性比外源病毒低 10 倍<sup>[12]</sup>。LTR 之间为结构基因编码区,依次为 *gag-pol-env*, *gag* 编码核心蛋白, *pol* 编码反转录酶、整合酶和蛋白酶, *env* 编码囊膜蛋白。内源和外源病毒相同的结构特征导致病毒的鉴定区分存在很大障碍。M.

H. Tixier-Boichard 等首次提出应用 PCR 技术检测鸡内源 ev21,通过扩增占位区 390 bp 片段以鉴定 ev21 的存在<sup>[13]</sup>,完整 ev21 病毒基因组序列未见报道。本试验通过长片段 PCR 扩增 7 590 bp 序列,准确地鉴定鸡基因组中内源白血病毒 ev21 的存在,并分析 ev21 与慢羽的连锁关系,建立筛选无 ev21 病毒慢羽种鸡的检测方法。研究 LTR 区启动子活性分析揭示 ev21 潜在致病性的分子基础,对认识其他脊椎动物内源病毒特征,分析其调控寄主生理都有重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

太行鸡、坝上长尾鸡、海兰褐、海兰灰及其祖代五个品种/品系 259 份血液 DNA 样品,其中快羽 146 份,慢羽 113 份。

### 1.2 试验试剂

Trans Start Taq DNA Polymerase、DNA Marker、血液 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒为北京全式金公司产品;TaKaRa LA Taq、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Sac* I、限制性内切酶 *Xho* I、pMD19-simple 载体为大连宝生物公司产品;质粒 DNA 小量提取试剂盒、无内毒素质粒 DNA 大量提取试剂盒为上海生工公司产品;pGL3-Basic 与 pRL-TK 载体、双荧光素酶报告基因检测试剂盒、T4 DNA Ligase 为美国 Promega 公司产品。引物合成和测序由北京六合华大基因公司完成。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 内源 ev21 病毒序列和检测

1.3.1.1 ev21 长片段 PCR 扩增和群体检测:参考 K. Wimmer 等引物<sup>[6]</sup>,ev21 S: 5'-GGAGGGAGAC-TATTTTACACG -3', ev21 A: 5'-GTTTAAACG-

GACCAACAGGCTAGTCTCTCG-3'。PCR 反应体系: 10 × PCR Buffer 2 μL, dNTP (2.5 mmol · L<sup>-1</sup>) 1.6 μL, 上、下游引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 各 0.5 μL, DNA 模板 0.5 μL, TaKaRa LA Taq 酶 (5 U · μL<sup>-1</sup>) 0.2 μL, H<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。PCR 反应程序: 94 °C 90 s; 98 °C 10 s, 68 °C 7 min, 32 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 终止反应。琼脂糖检测阳性产物送华大基因测序。

长片段 PCR 扩增 259 份基因组样品检测 ev21 病毒在不同品种/品系快慢羽鸡中的分布情况。

1.3.1.2 ev21 病毒基因组 3' 末端克隆和序列分析: 用 Primer Premier 5.0 以“1.3.1.1”获得序列和 NCBI 数据库中 X54094 序列为模板设计引物, 扩增 ev21 病毒 3' 末端及其与 Z 染色体连接序列。引物

1648S: 5'-AAACGACCACGATTCTCC-3', 1648A: 5'-GGGACTGGCAATCTTTCT-3', PCR 反应体系: 2 × Es Mix 5 μL, 1648S 和 1648A 各 0.4 μL, DNA 模板 0.5 μL, H<sub>2</sub>O 补足至 10 μL, PCR 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C 110 s, 32 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 终止反应。长片段 PCR 和 1648 引物对获得序列拼接后与 NCBI 数据库中 Nucleotide 序列和 Chicken Reference genomic sequences 序列 Blast 比对, 分析 ev21 病毒基因组结构特征, 及其在鸡基因组中的插入位点和连接序列。

1.3.2 ev21 病毒 LTR 区启动子活性分析

1.3.2.1 LTR 区目的片段获取: 以“1.3.1.1”和“1.3.1.2”拼接序列为模板设计引物扩增 ev21 基因 5' 和 3' LTR 序列(表 1), 检测其启动子活性。

表 1 LTR 区启动子活性检测引物

Table 1 Primers for promoter amplification of LTR region

引物名称 Primer	引物(5'-3') Sequence	产物长度/bp Products size	9679 序列位点 Location	T <sub>m</sub> /°C
514S	<u>cgagctc</u> GGGGAGTAGTGGGAATGG	514	822-1 335	67.0
514A	ccctcgagCGTTAAGCGAGACGGATG			
614S	<u>cgagctc</u> GTTGTACGCGTTAGGAG	614	8 163-8 776	65.0
614A	ccctcgagATGGCTTAGAATGGAGGA			

表中黑体小写字母为酶切位点保护碱基, 正向引物序列下划线部分为 Sac I 酶切位点, 反向引物序列下划线部分为 Xho I 酶切位点

以长片段 PCR 扩增阳性的基因组, 用 Trans Start Taq 酶扩增 5' 和 3' LTR 片段, 将目的片段纯化回收并与 pMD19-Simple 载体连接克隆。

1.3.2.2 报告基因载体的构建: 阳性菌液进行质粒小提, 用 Sac I / Xho I 对质粒和荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic 进行双酶切, 酶切体系: 质粒 DNA 400~1 000 ng, 10 × M Buffer 6 μL, Sac I 和 Xho I 各 1.5 μL, 加水补足至 60 μL, 37 °C 酶切 3~4 h。琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的片段。用 T4 DNA 连接酶连接目的片段和表达载体片段, 构建报告基因重组质粒。连接体系: 表达载体与目的片段的质量比为 1:1~1:5, T4 DNA 连接酶 0.5 μL, Ligation Buffer 1 μL, 加水补足至 10 μL。经 PCR 和双酶切鉴定阳性的重组质粒进行质粒大提。

1.3.2.3 细胞瞬时转染与双荧光素酶检测: A375 细胞接种于含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养, 细胞融合度达到 90%, 根据 Lipofectamine<sup>®</sup>

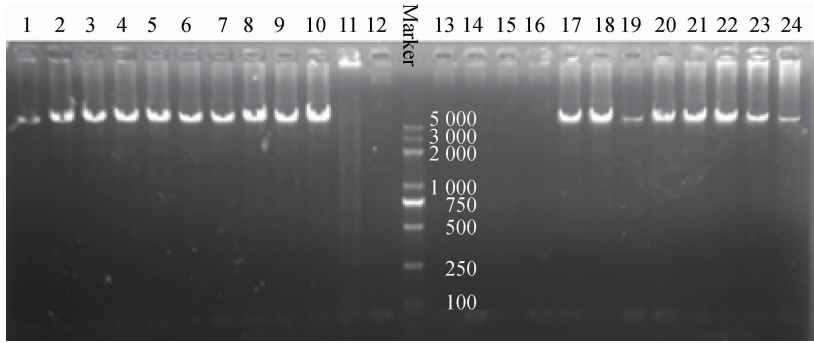
2000 Reagent 脂质体转染说明开始转染。脂质体与质粒 DNA 比例为 1:1, 重组质粒与内参 pRL-TK 载体比例为 9:1。转染 6 h 后, 用含血清的正常细胞培养液换液, 继续培养 48 h 后裂解细胞, 利用双荧光素酶检测试剂盒, GloMax-MultiJr 单管型多功能检测仪检测荧光素酶活性。

## 2 结果

### 2.1 内源 ev21 病毒检测 PCR 扩增

2.1.1 长片段 PCR 扩增和群体分析 由图 1 可见不同品种鸡 ev21S 和 ev21A 引物长片段 PCR 的扩增产物。

图 1 中 1 泳道为太行慢羽公鸡, 扩增出目的条带, 11~15 泳道为太行快羽公鸡, 均未扩增出目的条带; 2~10 泳道为海兰灰慢羽公鸡, 均扩增出目的条带; 16~20 泳道为坝上长尾鸡慢羽公鸡, 16 泳道



1 和 11~15. 太行鸡;2~10. 海兰灰;16~20. 坝上长尾鸡;21~24. 海兰褐

1 and 11-15. Taihang chicken; 2-10. Hy-line Gray; 16-20. Bashang chicken; 21-24. Hy-line Brown

图 1 长片段 PCR 产物(7 590 bp)

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of long-sequence PCR product (7 590 bp)

未扩增出目的条带,17~20 泳道均扩增出目的条带;21~24 泳道为海兰褐慢羽公鸡,均扩增出目的条带。目的条带经测序获得长 7 590 bp 基因序列,分析该序列发现其 g. 977-7590 区域与 ev1 (DQ118701)序列相似度 99%,g. 1-976 区域与慢羽鸡 ev21 非占区序列(X54093)相似度 99%。259 份基因组样品 ev21 检测结果见表 2。

由表 2 可知,太行鸡和坝上长尾鸡慢羽公鸡 ev21 阳性率高于 90.0%,太行慢羽母鸡阳性率为 65.5%,海兰灰及其祖代慢羽公鸡阳性率为 100.0%,海兰褐慢羽公母鸡阳性率为 100.0%;太行快羽公母鸡、海兰灰祖代快羽公母鸡和海兰褐快羽母

鸡 ev21 阳性率均为 0.0%,而海兰褐快羽公鸡阳性率为 100.0%。表明海兰灰及其祖代慢羽公鸡与 ev21 内源白血病病毒完全连锁,海兰褐慢羽公母鸡和快羽公鸡全部携带 ev21,但太行鸡和坝上长尾鸡慢羽鸡与 ev21 并不完全连锁。

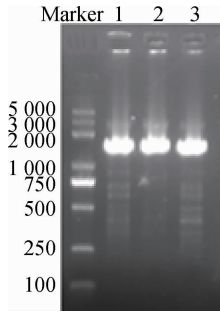
### 2.1.2 ev21 病毒 3'末端扩增和病毒结构分析

以太行鸡、坝上长尾鸡和海兰灰祖代 C 系 7 590 bp 扩增阳性基因组为模板,用 1648S 和 1648A 引物扩增 ev21 病毒基因组 3'末端序列,扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 2,扩增区域见图 3。阳性片段测序获得 1 648 bp 的碱基序列,其 g. 118-1648 区域与鸡内源病毒 ev21 占位区序列(X54094)相似度 99%。

表 2 ev21 内源白血病病毒在不同鸡种群中的分布情况

Table 2 Distribution of ev21 in various chicken strains

品种 Breed	合计 Total	性别 Gender	慢羽 Slow feather				快羽 Fast feather			
			阳性数 Positive	阴性数	合计	阳性率/% Percentage	阳性数	阴性数	合计	阳性率/% Percentage
太行鸡 Taihang chicken	120	公	32	2	34	94.1	0	24	24	0.0
		母	19	10	29	65.5	0	33	33	0.0
坝上长尾鸡 Bashang Longtail chicken	23	公	21	2	23	90.5	—	—	—	—
海兰灰 Hy-line Gray	16	公	14	0	14	100.0	—	—	—	—
		母	—	—	—	—	0	2	2	0.0
海兰灰祖代 Progenitor of Hy-line Gray	53	公	23	0	23	100.0	0	15	15	0.0
		母	—	—	—	—	0	15	15	0.0
海兰褐 Hy-line Brown	47	公	12	0	12	100.0	11	0	11	100.0
		母	11	0	11	100.0	0	13	13	0.0

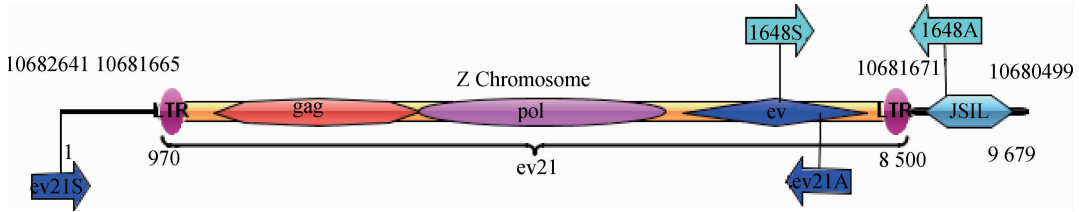


1. 太行鸡; 2. 坝上长尾鸡; 3. 海兰灰祖代 C 系  
1. Taihang chicken; 2. Bashang chicken; 3. C line of progenitor Hy-line Gray

图 2 三个品系鸡 ev21 3'末端 PCR 产物(1 648 bp)

Fig. 2 PCR product of 3' terminal fragment of ev21 in three chicken strains(1 648 bp)

拼接长片段扩增 7 590 bp、ev21 病毒 3'末端 1 648 bp和 JSIL 检测 1 450 bp 片段(本实验室数据),获得包括 ev21 病毒基因全长 7 524 bp 及其上下游序列共 9 679 bp,该序列提交 NCBI,序列号 KY235336,具体结构见图 3。该序列与鸡 Z 染色体序列 NC\_006127.4 比对成功,其中 g. 1-976 为鸡 Z 染色体序列,g. 977-8500 为 ev21 病毒 7 524 bp 全长序列,g. 977-1250 为长 274 bp 的 5'LTR 区,g. 8227-8500 为 3'LTR 区,LTR 之间依次为位于 g. 1530-3605 长 2 076 bp 的 gag 基因、g. 3574-6042 长 2 469 bp 的 pol 基因和位于 g. 6228-8060 长 1 833 bp 的 env 基因,g. 8501-9679 为鸡 Z 染色体序列。比对分析发现 ev21 反向插入在 Z 染色体的 g. 10681671-10681672(GenBank 登录号:NC\_006127)之间。



上方数字. Z 染色体 NC\_006127 位点;下方数字. 9 679 bp 序列位点;箭头标记. 引物起始位点;结构标注. ev21 的基因和特殊结构

The figures at top. Locus of NC\_006127 in Z chromosome; The subjacent figures. Locus of 9 679 bp sequence; Arrows marked. Location for primer binding; Label in structure. Genes and special structure of ev21

图 3 鸡 Z 染色体包含 ev21 病毒的 9 679 bp 序列结构

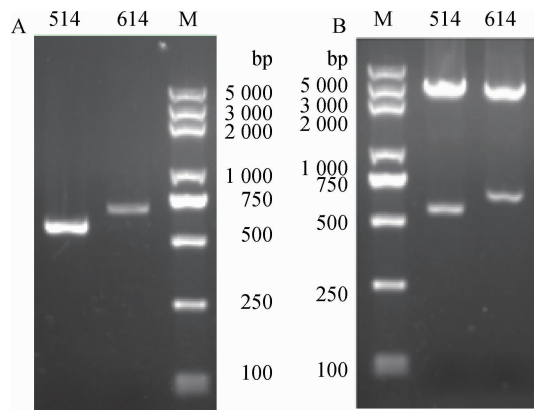
Fig. 3 Structure chart of 9 679 bp sequence contained ev21 virus genes in Z chromosome of chicken

ev21 病毒插入位点 Z 染色反义链序列为 CTACCC(NC\_006127 的 g. 10681666- 10681671), 9 596 bp 序列的 g. 971-976 和 g. 8501-8506 均为 CTACCC,即 ev21 内源病毒序列 5'和 3'LTR 区与 Z 染色体连接域为六个碱基重复,这符合逆转录病毒的基因结构特征。

### 2.2 ev21 病毒 LTR 区启动子活性分析

#### 2.2.1 目的片段的扩增和报告基因载体的构建

选取长片段 PCR 扩增阳性的太行鸡 DNA 为模板,扩增 ev21 序列 5' LTR 区和 3' LTR 区片段序列。由图 4A 可见,扩增片段大小与预期结果一致。将 5' LTR 的 514 bp 和 3' LTR 的 614 bp 目的片段克隆质粒与 pGL3-basic 载体质粒分别进行双酶切,回收纯化酶切产物后构建目的片段的 pGL3-basic 重组质粒,测序鉴定阳性克隆进行双酶切(图 4B),测序结果显示阳性克隆片段序列和插入方向与预期一致。



A. 514 和 614 bp PCR 产物;B. 514 和 614 bp 重组质粒双酶切产物

A. 514 and 614 bp PCR product; B. Result of 514 and 614 bp recombinant plasmid by digestion

图 4 514 和 614 bp PCR 产物和重组质粒双酶切结果

Fig. 4 Products of PCR and recombinant plasmid by digestion of 514 and 614 bp fragments

2.2.2 重组质粒启动子活性分析 A375 细胞接种到 24 孔板 24 h 后,细胞状态良好,将重组质粒和 pRL-TK 载体共转染 A375 细胞。转染 6 h 后,用正常培养基换液培养,再过 48 h,用细胞裂解缓冲液裂解细胞,检测萤火虫荧光信号和海肾荧光信号,二者比值即为重组质粒启动子活性。分析结果表明,5' 和 3' LTR 区域片段启动子活性比阴性对照分别高 260 倍和 33 倍,5' 末端的 514 bp 片段活性比对照高 260 倍,极显著高于 3' 末端 614 bp 片段活性 ( $P < 0.01$ ),但 3' 末端片段活性虽然比对照高 33 倍,但差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 5)。

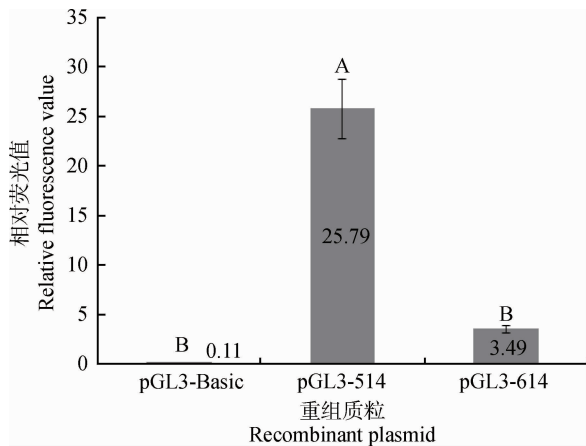


图 5 514 和 614 bp 片段的启动子活性  
Fig. 5 Relative promoter activity of 514 and 614 bp fragments

### 3 讨论

#### 3.1 内源性白血病 ev21 病毒检测

笔者利用长片段 PCR 扩增一次获得 7 590 bp 序列,包含 ev21 基因组的 6 614 bp,通过序列比对发现该序列中 g. 977-7590 与 ev1 基因(GenBank 登录号:AY013303)、g. 1-976 与慢羽 ev21 病毒未占位序列(GenBank 登录号:X54093)、g. 7318-7590 与慢羽 ev21 病毒占位序列(GenBank 登录号:X54094)相似度均为 99%。设计 1648A 和 1648S 引物扩增 ev21 病毒的 3' 末端序列,并利用 ev21 病毒鉴定用的占位区 1 450 bp 序列拼接后获得包含完整 ev21 病毒基因组(7 524 bp)的 9 679 bp 序列。陈孜孟等在海兰鸡基因组中发现 4 663 bp 内源白血病病毒缺陷型 ALV 基因组片段<sup>[14]</sup>,谭利强等在麻黄肉种鸡蛋清中检测到内源白血病毒的基因片段<sup>[15]</sup>。

利用 7 590 bp 长片段扩增检测了 ev21 在五个品种/品系鸡群 259 份基因组中的分布情况,发现太行慢羽母鸡阳性率为 65.5%,太行鸡和坝上长尾鸡

慢羽公鸡阳性率 90% 以上,海兰灰及其祖代慢羽公鸡、海兰褐慢羽母鸡和快羽公鸡病毒携带率均为 100%,而太行鸡、坝上长尾鸡和海兰灰的快羽鸡,以及海兰褐的快羽母鸡阳性率均为 0%。这一结果说明内源白血病病毒 ev21 与海兰灰及其祖代慢羽鸡完全连锁,但与太行鸡和坝上长尾鸡慢羽鸡并不完全连锁,尤其是海兰褐快羽公鸡也全部携带 ev21。利用 7 590 bp 长片段扩增可以准确地鉴定鸡内源 ev21 病毒的存在情况,通过该方法可以简单有效的筛选 ev21 阴性个体,以便建立 ev21 阴性的慢羽种鸡群。

将 9 679 bp 序列与鸡基因组序列比对发现 ev21 病毒反向插入在鸡 Z 染色体的 g. 10681671-10681672 之间,明确了 ev21 在鸡染色体中的具体位置。鸡慢羽表型的基因定位于 Z 染色体,本实验室研究发现慢羽性状与位于 Z 染色体 g. 10611410-10633009 区域的 PRLR 基因重复完全相关, ev21 病毒基因与 PRLR 基因间距 48 663 bp。

#### 3.2 ev21 病毒 LTR 区启动子活性分析

感染病毒细胞 RNA 中有高达 20% 的病毒 mRNA 和基因组 RNA 转录体, LTR 区的 U3 是强转录调控单位,内源白血病毒的弱致癌性被认为是由于 LTR 区弱的转录活性引起的,但本试验发现 ev21 的 5' LTR 区具有很强的转录启动子活性,而 3' LTR 也具有较弱的启动活性。B. R. Cullen 等指出活化的 5' LTR 存在时,禽白血病毒 3' LTR 不能有效启动转录<sup>[16]</sup>。通过在线软件 Softberry<sup>[17]</sup> (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=nsite&group=programs&subgroup=promoter>) 分析,发现 5' LTR 区 514 bp 片段存在 3 个 TATA 盒子,而 3' LTR 区 614 bp 片段只有 1 个 TATA 盒子;同时发现 514 bp 片段存在 8 个 miRNA,而 614 bp 片段只发现 2 个 miRNA。这可能是 5' LTR 上下游的调控元件参与了病毒的转录,导致其启动子活性极显著高于 3' LTR。朱文奇等体外试验发现 miR-155 显著下调内源白血病毒 ev1 的表达<sup>[18]</sup>。S. A. Herman 等研究发现感染病毒的成纤维细胞中没有检测到由 3' LTR 启动的转录本,然而由 5' LTR 启动的转录本占总 RNA 的 15%<sup>[19]</sup>。这一结果与本试验检测的 514 bp 片段高活性而 614 bp 片段低活性一致。K. F. Conklin 将 ev1、ev2 和 ev3 的 LTR 区 U3 域插入到劳斯氏肉瘤病毒中,发现三种内源病毒的启动活性没有变化,认为三者在鸡体

内的差异表达与 LTR 区 U3 域的单核苷酸变异没有关系<sup>[20]</sup>。内源病毒 ev21 在正常鸡体细胞内转录活性极低,而试验却发现 LTR 区出现很高的启动子活性,说明鸡基因组序列中可能存在其他负调控元件。Y. Yu 等指出 ALV-E 的高甲基化可能与其致癌阴性相关<sup>[21]</sup>,用 EMBOSS Cpgplot ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_cpgplot/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/))对 7 524 bp 序列进行分析发现整个 ev21 病毒基因序列中存在长度为 238~526 bp 的六处 CpG 岛,占整个病毒序列的 29.9%,分散在病毒基因的 5' UTR 区和基因结构域,这可能是 ev21 低转录活性弱致瘤性的关键。

#### 4 结 论

试验成功获得了 ev21 基因 7 524 bp 的全长序列,该病毒反向插入在鸡 Z 染色体的 g. 10681671-10681672 之间,并且 7 590 bp 序列长片段 PCR 扩增可以作为鉴定鸡内源白血病病毒 ev21 的检测方法。ev21 与海兰灰慢羽鸡完全连锁,但与太行鸡、坝上长尾鸡并不完全连锁。ev21 病毒 5' LTR 区具有高强度的启动子活性。

#### 参考文献(References):

- [1] RUTHERFORD K, BENKEL B F. Characterization of insertion sites and development of locus-specific assays for three broiler-derived subgroup E avian leukosis virus proviruses[J]. *Avian Pathol*, 2013, 42(4): 373-378.
- [2] GAVORA J S, KUHNLEIN U, CRITTENDEN L B, et al. Endogenous viral genes: association with reduced egg production rate and egg size in white leghorns[J]. *Poult Sci*, 1991, 70(3): 618-623.
- [3] 徐海鹏, 孟凡峰, 董 宣, 等. 种蛋中内源性禽白血病病毒的检测和鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(8): 1317-1323.
- XU H P, MENG F F, DONG X, et al. Detection and identification of an endogenous subgroup E Avian Leukosis virus in a chicken breeder embryo[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(8): 1317-1323. (in Chinese)
- [4] 郝建勇, 秦建如, 邱倩倩, 等. 不同样品对黄羽种鸡禽白血病病毒净化检测效果的影响[J]. *华南农业大学学报*, 2015, 36(6): 29-34.
- HAO J Y, QIN J R, QIU Q Q, et al. Effects of different samples on avian leukosis virus eradication and detection in yellow feather breeders[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2015, 36(6): 29-34. (in Chinese)
- [5] KA S, KERJE S, BORNOLD L, et al. Proviral integrations and expression of endogenous Avian leucosis virus during long term selection for high and low body weight in two chicken lines[J]. *Retrovirology*, 2009, 6: 68.
- [6] WIMMER K, SCHMIDT S P, VALLE-ZARATE A, et al. Molecular analysis of a new variant of the ev21 insertion/K-gene complex in the super slow feathering Nunukan chicken[J]. *J Anim Breed Genet*, 1996, 113(1-6): 323-329.
- [7] CHANG C M, COVILLE J L, COQUERELLE G, et al. Complete association between a retroviral insertion in the tyrosinase gene and the recessive white mutation in chickens[J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 19.
- [8] LEVIN I, SMITH E J. Molecular analysis of endogenous virus ev21-slow feathering complex of chickens. : 1. cloning of proviral-cell junction fragment and unoccupied integration Site[J]. *Poult Sci*, 1990, 69(11): 2017-2026.
- [9] LIU C N, ZHENG S M, WANG Y Q, et al. Detection and molecular characterization of recombinant avian leukosis viruses in commercial egg-type chickens in China[J]. *Avian Pathol*, 2011, 40(3): 269-275.
- [10] FENG M, TAN Y, DAI M M, et al. Endogenous retrovirus ev21 dose not recombine with ALV-J and induces the expression of ISGs in the host[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6: 140.
- [11] NORTON P A, COFFIN J M. Characterization of Rous sarcoma virus sequences essential for Viral gene expression[J]. *J Virol*, 1987, 61(4): 1171-1179.
- [12] CULLEN B R, SKALKA A M, JU G. Endogenous avian retroviruses contain deficient promoter and leader sequences[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, 80(10): 2946-2950.
- [13] TIXIER-BOICHARD M H, BENKEL B F, CHAMBERS J R, et al. Screening chickens for endogenous virus ev21 Viral element by the polymerase chain reaction [J]. *Poult Sci*, 1994, 73(10): 1612-1616.
- [14] 陈孜孟, 董 宣, 苏 帅, 等. 海兰鸡内源性白血病病毒位点序列鉴定与分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(11): 2050-2055.
- CHEN Z M, DONG X, SU S, et al. Identification

- and sequence analysis of endogenous Avian leukosis virus element in genome of hy-line brown layers[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(11): 2050-2055. (in Chinese)
- [15] 谭利强, 冯 敏, 郝建勇, 等. 麻黄肉种鸡蛋清中内源性禽白血病毒分离与遗传鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(3): 3-5, 8.  
TAN L Q, FENG M, HAO J Y, et al. Isolation and genetic identification of endogenous Avian leukosis virus strain from albumen of partridge breeder chicken [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 51(3): 3-5, 8. (in Chinese)
- [16] CULLEN B R, LOMEDICO P T, JU G. Transcriptional interference in avian retroviruses-implications for the promoter insertion model of leukaemogenesis [J]. *Nature*, 1984, 307(5948): 241-245.
- [17] SHAHMURADOV I A, SOLOVYEV V V. Nsite, NsiteH and NsiteM computer tools for studying transcription regulatory elements [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(21): 3544-3545.
- [18] 朱文奇, 胡序明, 陈世豪, 等. MiR-155 体外特异性靶向鸡内源性反转录病毒 ALVE1env 转录物的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(5): 7-11.  
ZHU W Q, HU X M, CHEN S H, et al. Studies on avian endogenous retrovirus ALVE1 env transcripts specifically targeted by miR-155 *in vitro* [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 48(5): 7-11. (in Chinese)
- [19] HERMAN S A, COFFIN J M. Differential transcription from the long terminal repeats of integrated avian leukosis virus DNA [J]. *J Virol*, 1986, 60(2): 497-505.
- [20] CONKLIN K F. Activation of an endogenous retrovirus enhancer by insertion into a heterologous context [J]. *J Virol*, 1991, 65(5): 2525-2532.
- [21] YU Y, ZHANG H M, TIAN F, et al. Quantitative evaluation of DNA methylation patterns for ALVE and TVB genes in a neoplastic disease susceptible and resistant chicken model [J]. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1731.

(编辑 白永平)