

一株新亚群禽白血病病毒全基因组序列分析

李久庆², 刘强², 郭雷², 许传田¹, 崔宁^{1*}, 李冰², 崔治中³

(1. 山东省农业科学院 畜牧兽医研究所, 济南 250100; 2. 滕州市畜牧局, 滕州 277599;

3. 山东农业大学 动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: 为了解外源性禽白血病病毒(ALV)在山东省部分地区肉鸡中的流行状况, 采集无菌抗凝血分离血浆接种 DF-1 细胞、ELISA p27 抗原检测以及 DNA 提取进行 PCR 扩增等方法, 从山东省某地区大型养殖场不同个体养殖场出栏肉鸡群中分离鉴定出 1 株 ALV, 命名为 FC1505。分析其囊膜糖蛋白 gp85 氨基酸序列与近年来从地方品种鸡中疑似新亚群 ALV-K 分离株的相似性最高, 相似性均在 95% 以上, 而与其他已知亚群 ALV 的相似性均低于 90%。为了进一步分析该分离株分子特性, 对其进行全基因组测序, 并与已知亚群 ALV 分离株序列进行比较。结果表明, FC1505 分离株整个基因组中 *gag*、*pol* 和 *gp37* 基因相对保守, 与 ALV 参考毒株序列相似性都在 90% 以上, 但均与疑似 K 亚群的 ALV 分离株相似性最高; 全基因组序列分析进一步说明 FC1505 属于 ALV-K。本研究继我国江苏省和华南地区 K 亚群 ALV 报道后, 首次从山东地区肉鸡中鉴定到一株 ALV-K 并完成其全基因组序列分析。

关键词: 商品肉鸡; 禽白血病病毒; 分离鉴定; 全基因组序列分析

中图分类号: S852.659.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)09-1718-06

Genomic Sequence Analysis of a New Subgroup of Avian Leukosis Virus

LI Jiu-qing², LIU Qiang², GUO Lei², XU Chuan-tian¹, CUI Ning^{1*}, LI Bing², CUI Zhi-zhong³

(1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of

Agricultural Sciences, Jinan 250100, China;

2. Tengzhou Bureau of Animal Husbandary and Veterinary, Tengzhou 277599, China;

3. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: In order to understand the epidemic situation of exogenous avian leukemia virus (ALV) in broiler flocks in Shandong province, blood plasma were collected for virus isolation and identification by ELISA (detection of P27 antigen) and PCR. A strain of new ALV subgroup was isolated and identified from commercial broiler flocks in a farm of Shandong province, named FC1505. The *env* gene of the isolate was sequenced and indicated that the amino acid sequence of gp85 had the highest gp85 identity of more than 95% to the strains of suspected subgroup K of ALV from Chinese native breed chickens. Its gp85 identity to other known chicken ALV subgroups A-E and J was lower than 90%. In order to further analyze the molecular properties of the isolate, the genome of the virus was sequenced and compared with those from other ALV reference strain of different subgroups. The results showed that the *gag*, *pol* and *gp37* genes of the isolate were relatively conservative, with the identity more than 90%, and showed the highest identity to suspected ALV-K isolates. Whole genome sequence analysis supported that the FC1505 isolate

收稿日期: 2017-03-31

基金项目: 滕州市应用技术与开发计划(滕科 201505007-02)

作者简介: 李久庆(1969-), 男, 山东滕州人, 本科, 主要从事家禽疫病诊断与防控技术研究

* 通信作者: 崔宁, 主要从事动物分子病毒学研究, E-mail: enydia@163.com

belongs to ALV-K. Following the reports of K subgroup ALV in Jiangsu and Southern China provinces of China, this is the first report of an ALV-K isolate from broilers of Shandong province and its whole genome analysis.

Key words: broiler flock; avian leukosis virus; isolation and characterization; whole genome sequence analysis

禽白血病毒(avian leukosis virus, ALV)为反转录病毒科 α -反转录病毒属成员,具禽C型反转录病毒的特征^[1]。根据反转录病毒的生物学特性,ALV分外源性病毒和内源性病毒两种,其中外源性ALV的宿主都是鸡,包括A、B、C、D、J亚群^[2-4]以及近年来疑似为K亚群的ALV^[5-6],而内源性ALV以鸡为宿主的是E亚群。对鸡具有致病性的ALV以A、B和J亚群为主,目前我国鸡群中A、B两个亚群病毒报道较少,主要以J亚群为主^[7-11],同时K亚群在地方品种鸡群中的分离率逐年增加^[12]。目前我国鸡群ALV感染的现状是商品肉鸡、蛋鸡群中主要以ALV-J为主,地方品种鸡群中主要以ALV-K为主;发病鸡群中以ALV-J为主;健康鸡群以ALV-K为主。K亚群是2012年从江苏省地方品种鸡中分离到的一种新的ALV,近年来陆续从江苏省和华南地区饲养的不同地方品系鸡群中分离出^[12-13]。相对于其他亚群ALV,K亚群ALV分离株在细胞中的复制较慢,对SPF鸡的致病性也比较弱^[13]。其基因组结构属于典型的复制完整型的C型反转录病毒,囊膜糖蛋白gp85序列具有很高的相似性,与GenBank中已经发表的A~E五个经典亚群的相似性在77.7%~82.4%之间,与J亚群的相似性更是低于40%^[5-6]。本研究对山东省某地区大型养殖场不同个体养殖场出栏肉鸡群进行外源ALV检测,分离到一株K亚群ALV,并对其进行全基因组序列分析以追踪其溯源,为我国ALV-K流行病学研究提供素材。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品背景 从山东省某地方肉用型养殖场下属7个鸡场中出栏肉鸡群采集无菌抗凝血样品164份,饲养品种均带有地方品种鸡育种背景,包括各地固有的纯地方品种草鸡和黑脚麻鸡以及纯地方品种鸡通过与进口的快大型白羽肉鸡培育出的优黄肉鸡,日龄为50~80 d。

1.1.2 细胞 DF-1细胞由山东农业大学家禽肿瘤病研究室保存,用含10%的胎牛血清的DMEM传代,含2%的胎牛血清的DMEM维持,在5%CO₂的37℃培养箱进行培养。

1.1.3 试剂 DNA Marker DL2000/DL5000、pMD-18T载体和大肠杆菌DH5 α 克隆菌购自TaKaRa(大连)公司;DNA Gel Extraction Kit购自Omega公司;血液/组织/细胞DNA提取试剂盒为北京天根生化科技有限公司(Tiangen)产品;Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit购自美国IDEXX公司;DMEM培养基(高糖,含谷氨酰胺)、胎牛血清均为Gibco公司产品;胰蛋白酶购自Amresco公司。

1.2 病毒分离与鉴定

将采集的抗凝血离心,取血浆接种DF-1细胞,37℃CO₂培养箱中培养2 h,用含2%胎牛血清的DMEM维持培养5~7 d,收集上清液,用IDEXX公司的ALV抗原检测试剂盒检测p27抗原。将病毒分离获得p27抗原阳性的细胞扩增培养,用0.25%胰酶消化,反复冻融3次,细胞悬液经12 000 r·min⁻¹离心2 min收集细胞沉淀,按照血液/组织/细胞DNA提取试剂盒提取病毒前基因,作为含有ALV前病毒cDNA的模板。参照文献[5]针对env基因两侧的保守区合成一对通用引物Env-F/R,用于扩增ALV囊膜蛋白env基因的约2 200 nt片段,引物序列见表1。

1.3 前病毒全基因组克隆与测序

参照GenBank上发表的ALV-K(JS11C1, GenBank登录号KF746200)的全基因序列,设计合成用于扩增前病毒基因组的引物FC1-F/R、FC2-F/R、FC3-F/R(表1),对ALV分离株cDNA分为3个片段进行扩增,PCR产物连接至pMD-18T载体,转化DH5 α ,经筛选和鉴定,重组质粒经验证正确后送北京华大公司进行测序,每段进行三个克隆的测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primers used to amplify genes

| 引物 Primers | 核苷酸序列(5'→3') Sequence (5'→3') | 目的基因/nt Target gene |
|---------------|----------------------------------|------------------------|
| Env-F | GAGGTGACTAAGAAAGATGAGGCGAGCC | 2 200 |
| Env-R | CCATCAACCCAGGTGCACACCAATG | |
| FC1-F | GCGTGTAGTGTTATGCAATACTC | 2 827 |
| FC1-R | ACTAATTGCGTTAGCGCTAC | |
| FC2-F | AGGAAGAGATTGTCTGCAGGGC | 2 558 |
| FC2-R | CCAAATAACCTTATCAGTGTCCCTG | |
| FC3-F | CTACTAGCCAAGGCAATGTATGC | 2 483 |
| FC3-R | TGAAGCCTTCTGCTTCATGCA | |

1.4 前病毒全基因组序列分析

应用序列分析软件 DNASTar, 获得 ALV 分离株的 *gp85* 核苷酸序列, 推导其氨基酸序列分别与 GenBank 中已发表的不同亚群 ALV 的 *gp85* 氨基酸序列作相似性比较, 初步根据相似性程度及遗传

进化树来确定该分离株的亚群类型。进一步将 ALV 分离株的各个基因分别与国内外已报道的 ALV 毒株进行序列比较分析以追踪其溯源。用于比较分析的不同亚群 ALV 参考株和我国近年分离的 ALV 毒株信息见表 2。

表 2 用于序列比对的 ALV 分离株

Table 2 ALV strains used for comparison of the sequence

| ALV 亚群 Subgroup | 分离株(登录号) Isolate (Accession No.) |
|--------------------|---|
| A | RSV Schmidt-Ruppin A (L29199) |
| B | RSV Schmidt-Ruppin B (AF052428) |
| C | RSV-Prague C (J02342) |
| D | RSV Schmidt-Ruppin D (D10652) |
| E | ev-1 (AY013303), RAV-0 (XM73497) |
| J | HPRS-103 (Z46390), NX0101 (DQ115805), HPRS103 (Z46390) |
| Suspected K | JS11C1(KF746200), JS13LY12 (KM873217), JS13DX13 (KM873205), JS13-LH1 (KF999962), GDFX0601 (KP686142), GDFX0602 (KP686143), GDFX0603 (KP686144), GD13HY (KU500031), GD14LZ (KU605774), TW-3593 (HM582658), Km_5844 (AB670312), Km_5845 (AB670314), Km_6045 (AB764097), Tym_43 (AB617817.1), Sp-53 (AB617820), Hkd_026 (AB688622) |

2 结果

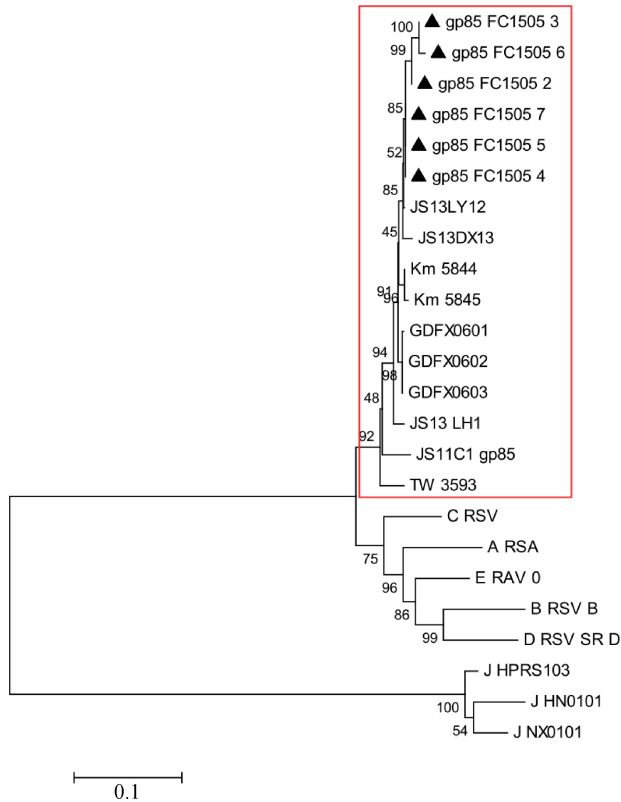
本研究结合病毒分离和 ELISA 方法检测共获得 25 个 ALV 阳性样品, 阳性比例高达 15.2%。本次调查的 7 个肉鸡鸡场有 6 个养殖场均存在不同程度的外源性 ALV 感染。

2.1 病毒 *env* 基因的扩增

经 PCR 扩增的 ALV 分离株 *env* 基因全长 1 787 nt, *gp85* 基因大小为 1 005 nt, *gp37* 基因大

小为 609 nt。其中 *gp85* 基因编码 335 个氨基酸, 6 个养殖场分离到的病毒 *gp85* 氨基酸相似性在 99% 以上, 说明它们属于一株病毒, 将该毒株命名为 FC1505。将它的氨基酸序列与 GenBank 中已发表的鸡源 ALV 已知 6 个不同亚群参考株以及新定义的 K 亚群的氨基酸序列进行相似性比较, 该分离毒株 *gp85* 氨基酸序列与 A、B、C、D 亚群参考毒株的相似性分别为 86.1%、83.7%、88.1% 和 83.7%; 与 E 亚群参考毒株的相似性平均为 87%; 而与 J 亚群

的相似性更低,不到 20%。然而,FC1505 株与前期从江苏省地方品系鸡分离的疑似 K 亚群的毒株以及 GenBank 中来自华南地区黄羽肉鸡分离株、台湾土著鸡分离株、日本原种鸡分离株的氨基酸序列相似性高达 95% 以上,说明从山东肉鸡场中分离的 FC1505 毒株可能也属于 ALV-K 亚群。在 ALV 不同亚群毒株 gp85 同源性比较的遗传进化树中,也显示了 FC1505 毒株与这些分离株独特的亚群关系(图 1)。



黑色正三角代表本研究分离的 FC1505 毒株;方框圈出的是 FC1505 毒株及其相似性高的毒株

Black equilateral triangle represents FC1505 strains isolated in this study; FC1505 isolates and its high homologous strains are circled in the Square

图 1 山东 ALV 分离株 gp85 氨基酸序列的遗传进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree for gp85 amino acid sequences of Shandong isolates and reference ALV strains of different subgroups

2.2 FC1505 前病毒全基因组序列分析

应用 DNASTar 软件中的 Seq Man 程序,将获得的三段序列进行剪辑和拼接,最终获得 FC1505 分离株前病毒全基因组序列,全长 7 497 nt,符合典型的 C 型复制完整型反转录病毒的特点,缺乏致癌基因。本毒株和其他 ALVs 的比较见图 2。FC1505 的三个主要基因 *gag*、*pol*、*env* 分别长 2 106、2 688、

1 791 nt,分别编码 702、896、591 个氨基酸。长末端重复序列位于病毒基因组的 5' 和 3' 端,长度为 281 nt,包含 U3-R-U5 元件。

2.3 FC1505 病毒基因组分段比较

将病毒基因组进行分段比较,结果见图 2。FC1505 的 *gag*、*pol* 和 *gp37* 基因与其他 ALVs 相比比较保守,相似性在 90% 以上,主要与日本分离株 Sp_53 等、广东分离株 GDFX0601 等以及江苏分离株 JS11C1 等相似性最高;与 E 亚群的相似性很高,分别为 96%、99% 和 98%。R 区和 U5 区序列与其他不同亚群相对比较保守,与 A 亚群和 C 亚群参考毒株的相似性均为 92%。U3 区和 R 区与分离自中国山东的毒株 SDAU09E1 相似性最高,达到 99%,与广东分离株 GDFX0603 等、日本分离株 CTS_053 等以及台湾分离株 TW-3593 等的相似性也在 93% 以上。5' UTR 序列与其他不同亚群相比相对比较保守,相似性在 94% 以上。3' UTRs 区除了与分离自日本、中国台湾、山东和华南地区的 ALV 相似性很高以外,与 J 亚群的 NX0101 以及其他的 ALV 相似性也比较高。

3 讨论

自 2012 年从我国江苏省地方品种鸡中分离到的一种命名为 K 亚群的 ALV 后,近年来陆续从江苏省和华南地区具有地方品系鸡育种背景的鸡群中分离到类似该亚群的病毒^[12-13]。2011 到 2014 年间,对来自山东、江苏和浙江三省份的临床样品分析表明其分离比例高于 ALV-J^[12]。本研究对山东省某地区养殖场出栏肉鸡群进行 ALV 检测,分离到一株 K 亚群 ALV,并获得其全基因组序列,进一步丰富了我国 ALV-K 流行病学研究资料。

本研究分离的 ALV 毒株 FC1505 来源于固有的纯地方品种优质土鸡草公鸡、黑脚麻鸡以及纯地方品种鸡通过与进口的快大型白羽肉鸡培育出的优黄肉鸡,与前期实验室分离的 JS11C1 及江苏分离株和华南地区分离的类似 K 亚群的 ALV 分离株的 gp85 序列具有很高的相似性。同时这些毒株具有相似的宿主背景特点,鸡群都具有我国地方品系育种背景。近年来,我国自繁自养的地方品系鸡汶上芦花鸡、东乡绿壳蛋鸡、琅琊鸡以及与地方品种鸡杂交培育的优质黄羽肉鸡鸡群中陆续被报道存在 K 亚群 ALV 的感染^[12-13],说明我国地方品种鸡群中 ALV-K 感染较为普遍。

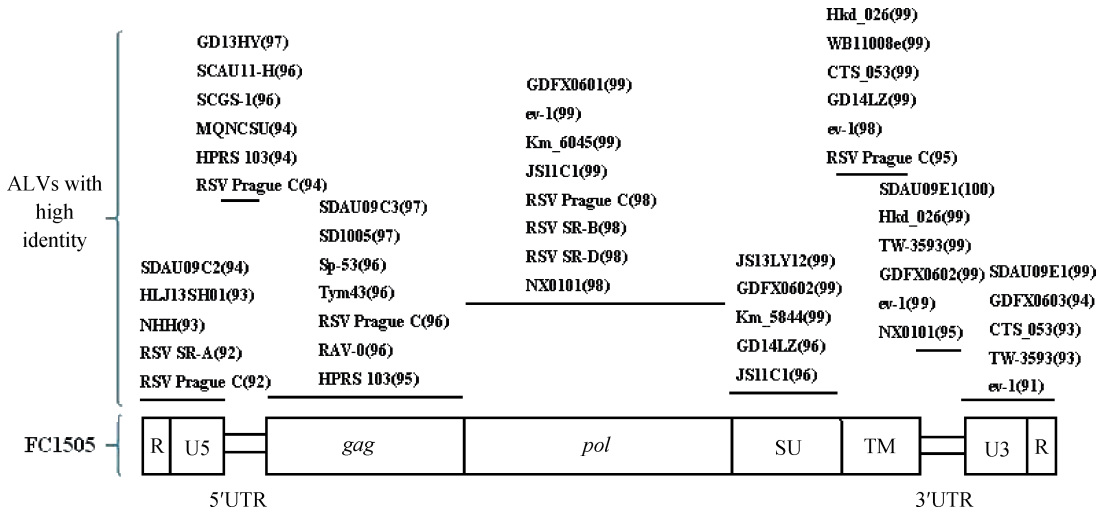


图 2 FC1505 和其他 ALVs 全序列分段比较

Fig. 2 Segmental sequence comparison between the isolate FC1505 and other ALVs

对 ALV-K 分离株 FC1505 进行全基因组序列分析发现其主要编码基因 *gag*、*pol*、*env*、3'UTR 以及 U3 区序列均与之前我国大陆报道的 K 亚群 ALV 分离株^[6] 具有很高的相似性,同时它与来自亚洲东部其他地区(包括日本)具有致脑胶质瘤的 ALV 分离株^[14-15] 和中国台湾土著鸡群的 ALV 分离株^[16] 的相似性也很高。据资料显示,17 世纪到 19 世纪,日本曾经与中国大陆和中国台湾存在鸡的贸易往来^[17-18],感染这些 ALV 的日本土著鸡品种(如矮脚鸡)可能与中国的很多地方品种鸡来源于一个祖先。所以推测这些毒株可能属于一个在我国甚至东亚地区的地方品系鸡群中已长期存在的特有的亚群。虽然这些分离株的 *gp85* 基因与来自于西方国家的 A~E 亚群尤其是 J 亚群截然不同,但 5'UTR、*gag*、*pol* 以及 3'UTR 均与 J 亚群分离株具有很高的相似性,说明不同亚群 ALV 也可能本身具有相同的宿主来源,或者它们之间可能存在一定程度的重组。ALV 属于反转录病毒,具有遗传不稳定性和多样性的特征^[19]。这提示我们在加强对西方引种祖代鸡群中 ALV 的监测的同时,应提高我国自繁自养的地方品系鸡群 ALV 的系统净化^[7, 20]。尤其是进口鸡群 ALV 在与我国地方品种鸡进行杂交培育时,应重视 ALV 的检测,杜绝不同亚群 ALV 可能发生重组产生新的病毒^[21]。

虽然目前尚无该亚群 ALV 感染鸡群早期致肿瘤的报道,但是其亚临床感染带来的影响不容忽视;同时,这些分离株与日本地方品种鸡群中具有引起脑胶质瘤特性的 ALV 病毒^[14] 相似性很高,所以也

应该加强对其生物学特性的深入分析。

4 结 论

本研究继我国江苏省和华南地区报道 K 亚群 ALV 后,首次从山东地区肉鸡中鉴定到一株 ALV-K 并获得其全基因组序列,进一步丰富了我国 ALV-K 流行病学研究资料。

参考文献(References):

[1] 赵振华. 禽白血病[M]. 北京:中国农业出版社,2006. ZHAO Z H. Avian leukemia[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006. (in Chinese)

[2] 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(4): 801-807.

[3] PAYNE L N. Developments in Avian leukosis research [J]. *Leukemia*, 1992, 6(Suppl 3): 150S-152S.

[4] PAYNE L N, NAIR V. The long view: 40 years of avian leukosis research[J]. *Avian Pathol*, 2012, 41 (1): 11-19.

[5] 王 鑫, 赵 鹏, 崔治中. 我国地方品种鸡分离到的 一个禽白血病病毒新亚群的鉴定[J]. 病毒学报, 2012, 28(6): 609-614. WANG X, ZHAO P, CUI Z Z. Identification of a new subgroup of avian leukosis virus isolated from Chinese indigenous chicken breeds[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2012, 28(6): 609-614. (in Chinese)

[6] CUI N, SU S, CHEN Z M, et al. Genomic sequence analysis and biological characteristics of a rescued

- clone of avian leukosis virus strain JS11C1, isolated from indigenous chickens[J]. *J Gen Virol*, 2014, 95(11): 2512-2522.
- [7] PAN W, GAO Y L, SUN F F, et al. Novel sequences of subgroup J avian leukosis viruses associated with hemangioma in Chinese layer hens[J]. *Virol J*, 2011, 8: 552.
- [8] 吴晓平, 钱 琨, 秦爱建, 等. 商品蛋鸡 J 亚群禽白血病病毒分离鉴定及序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(5): 351-355.
WU X P, QIAN K, QIN A J, et al. Isolation and sequences analysis of subgroup J avian leukosis viruses in commercial layer chickens[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2010, 32(5): 351-355. (in Chinese)
- [9] 李昕键, 严一铭, 李广伟, 等. 黄羽肉鸡 J 亚群禽白血病病毒分离鉴定与全基因组序列分析[J]. 动物医学进展, 2016, 37(2): 27-31.
LI X J, YAN Y M, LI G W, et al. Isolation, identification and full-genome sequence analysis of subgroup J Avian leukosis virus from yellow broilers[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016, 37(2): 27-31. (in Chinese)
- [10] 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.
CHENG Z Q, ZHANG L, LIU S D, et al. Emerging of Avian leukosis virus subgroup J in a flock of Chinese local breed [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(4): 584-587. (in Chinese)
- [11] GAO Y L, YUN B L, QIN L T, et al. Molecular epidemiology of avian leukosis virus subgroup J in layer flocks in China[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(3): 953-960.
- [12] DONG X, ZHAO P, XU B, et al. Avian leukosis virus in indigenous chicken breeds, China[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2015, 4(12): e76.
- [13] LI X J, LIN W C, CHANG S, et al. Isolation, identification and evolution analysis of a novel subgroup of avian leukosis virus isolated from a local Chinese yellow broiler in South China[J]. *Arch Virol*, 2016, 161(10): 2717-2725.
- [14] HATAI H, OCHIAI K, TOMIOKA Y, et al. Nested polymerase chain reaction for detection of the avian leukosis virus causing so-called fowl glioma[J]. *Avian Pathol*, 2005, 34(6): 473-479.
- [15] HATAI H, OCHIAI K, MURAKAMI M, et al. Prevalence of fowl glioma-inducing virus in chickens of zoological gardens in Japan and nucleotide variation in the *env* gene[J]. *J Vet Med Sci*, 2008, 70(5): 469-474.
- [16] CHANG S W, HSU M F, WANG C H. Gene detection, virus isolation, and sequence analysis of avian leukosis viruses in Taiwan country chickens[J]. *Avian Dis*, 2013, 57(2): 172-177.
- [17] IWATA N, OCHIAI K, HAYASHI K, et al. Avian retrovirus infection causes naturally occurring glioma: Isolation and transmission of a virus from so-called fowl glioma [J]. *Avian Pathol*, 2002, 31(2): 193-199.
- [18] OCHI A, OCHIAI K, KOBARA A, et al. Epidemiological study of fowl glioma-inducing virus in chickens in Asia and Germany[J]. *Avian Pathol*, 2012, 41(3): 299-309.
- [19] FADLY A M, PAYNE L N. Leukosis/sarcoma group[M]//SAIF Y M, BARNES H J, GLISSON J R, et al. Diseases of poultry[M]. Ames: Iowa State Press, Blackwell Publishing Company, 2003: 465-516.
- [20] 钱 琨, 沈海玉, 金文杰, 等. 苏皖地区规模化鸡场禽白血病净化的初步研究[J]. 中国家禽, 2012, 34(5): 8-11.
QIAN K, SHEN H Y, JIN W J, et al. Preliminary eradication effect of avian leukosis for large scale chicken farms in Jiangsu and Anhui province [J]. *China Poultry*, 2012, 34(5): 8-11. (in Chinese)
- [21] CAI L M, SHEN Y W, WANG G H, et al. Identification of two novel multiple recombinant avian leukosis viruses in two different lines of layer chicken[J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(10): 2278-2286.

(编辑 白永平)