

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.13.04

J亚群禽白血病病毒分离株 HLJ09SH01 株感染性克隆的构建及其致病性研究

纪晓琳, 王琦, 高玉龙, 王永强, 秦立廷, 祁小乐, 高宏雷, 王笑梅*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室/禽传染病研究室, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: 为构建J亚群禽白血病病毒(ALV-J)分离株的感染性克隆并鉴定其对蛋鸡和肉鸡致病力的差异, 本研究从黑龙江地区分离鉴定一株ALV-J分离株HLJ09SH01, 以其核酸为模板, 采用PCR方法分3段扩增其前病毒cDNA, PCR产物经克隆酶切后依次连接, 获得一个含有完整ALV-J前病毒cDNA的重组质粒, 命名为pBlue-HLJ09SH01。将其转染DF-1细胞, 进行病毒拯救。通过间接免疫荧光、禽白血病抗原试剂盒检测及反转录酶活性试剂盒检验, 表明拯救的病毒为ALV-J, 命名为rHLJ09SH01。将其分别人工接种11日龄蛋鸡和肉鸡鸡胚, 孵育出壳后隔离饲养32周。致瘤性试验结果表明, rHLJ09SH01可以导致57.9%的蛋鸡发生肿瘤, 83.3%的肉鸡发生肿瘤。表明该感染性克隆具有亲本病毒的致病性。

关键词: J亚群禽白血病病毒; 感染性分子克隆; 致病性

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)01-0015-04

Construction of an infectious molecular clone of a subgroup J avian leukosis virus isolation HLJ09SH01 and its pathogenicity

Ji Xiao-lin, WANG Qi, GAO Yu-long, WANG Yong-qiang, QIN Li-ting, QI Xiao-le,
GAO Hong-lei, WANG Xiao-mei*

(Division of Avian Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: To construct the infectious clone of subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) and identification of the oncogenicity of the rescued virus in layers and broilers, the sequence the provirus cDNA of ALV-J was amplified by PCR from ALV-J HLJ09SH01 isolated in Heilongjiang province and the infectious clone of pBlue-HLJ09SH01 was constructed based on the vector of pBluescript II KS(+). The rescued virus of rHLJ09SH01 was generated by transfecting pBlue-HLJ09SH01 into the DF-1 cells and identified by indirect immunofluorescence assay, avian leukosis virus antigen test kit, reverse transcriptase assay. Furthermore, the 11 day old embryos of SPF layers and commercial broilers were inoculated with the rHLJ09SH01 via allantoic cavity and the results showed the rHLJ09SH01 caused typical tumors in SPF layer (57.9%) and broiler (83.3%) during 32 week period of observation after hatching, which demonstrated that the rescued virus possesses pathogenicity as parent virus.

Key words: avian leukosis virus subgroup J; infectious molecular clone; pathogenicity

*Corresponding author

收稿日期: 2012-05-30

基金项目: 国家自然科学基金(31072146); 现代农业肉鸡产业技术体系建设(nycyt-x-42-G3-01); 哈尔滨市科技攻关计划项目(2010AA6AN034)

作者简介: 纪晓琳(1987-), 女, 黑龙江佳木斯人, 硕士研究生, 主要从事禽白血病方面研究。

* 通信作者: E-mail: xmw@hvri.ac.cn

J亚群禽白血病病毒(Avian leukosis virus subgroup J) ALV-J属于反转录病毒中的Al-pharretrovirus家族,其前病毒基因组结构为5'-LTR-leader-gag/pol-env-rTM-DR1-E-LTR-3'。1988年从英国肉鸡中分离到第一株ALV-J原型病毒HPRS-103,其宿主范围、病毒囊膜干扰和交叉中和试验与A、B、C、D、E亚群不同,而独立成为一个亚群^[1-2]。HPRS-103主要引起肉鸡产生以骨髓瘤为主的各种类型肿瘤^[1-2]。1997年Flady报道了美国也出现了ALV-J感染肉鸡群的现象^[3]。1999年,ALV-J首次在中国肉鸡群中被分离到^[4],随着其在中国鸡群中的传播,宿主范围逐渐扩大,能够感染肉鸡和蛋鸡,并在蛋鸡群中大规模流行^[5]。ALV-J能够导致某些蛋鸡群中60%的鸡发生肿瘤,并导致超过20%的被感染鸡死亡,或者导致蛋鸡产蛋率严重下降,临床上引起包括血管瘤、髓细胞瘤、组织肉瘤、成红细胞瘤等多种类型的肿瘤,给养殖业造成一定的经济损失^[6-7]。

反转录病毒的RNA聚合酶缺乏校对机制,其基因组有一个插入宿主基因组的过程,从而造成ALV-J在遗传上的多变性。在分离ALV-J过程中,同时可以分离出ALV其他亚群,给研究其致病机理造成困难。本研究构建了单一来源的ALV-J的感染性克隆rHLJ09SH01,并进行蛋鸡和肉鸡的致病性试验,为研究ALV-J对蛋鸡和肉鸡致病力差异奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 病毒株、细胞、载体和实验动物 ALV-J HLJ09SH01分离株为本实验室分离鉴定;DF-1细胞、pBluescript II KS(+)载体和DH5a菌种为本实验室保存;11日龄SPF来航蛋鸡和商品系肉鸡由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 各种限制性内切酶、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase、DNA Marker、dNTP等购自TaKaRa公司;质粒提取试剂盒、核酸凝胶回收试剂盒购自Axygen公司;Plasmid Midi Kits购自QIAGEN公司;反转录酶活性检测试剂盒购自Roche公司;兔抗鸡FITC-IgG购自Sigma公司。

1.3 引物设计 以GenBank中登录的ALV-J原型株(Z46390)为参考,设计合成用于扩增前病毒基因

组的引物(表1)。

表1 扩增pBlue-ALV-J前病毒基因组(pre-DNA)所用引物
Table1 Primers used for ALV-J pre-DNA amplification

Primer	Sequence	Primer position to HPRS-103 (bp)
F1	5'-CCCGGCCGTGTAGTGTATGCAATAC TCTTATGTAACGATGAAAC-3' (<i>Eag</i>)	1-37
R1	5'-GGCCATTTTCATGTCTAGATT-3'	3600-3620
F2	5'-GGCGAGGGAATGGAATCTAGAC-3'	3587-3608
R2	5'-GCGCCAGGAGTAAGAAATCGATG-3'	6633-6655
F3	5'-CGAGCAGCCATCGATTCTTACTC-3'	6625-6648
R3	5'-CCCTCGAGTGAAGCCATCCGCTTCATG CAGGTGCTCGTAGTTGTCAGG-3' (<i>Xho</i>)	7802-7841

1.4 HLJ09SH01株前病毒cDNA克隆的构建 根据已完成的ALV-J HLJ09SH01株前病毒基因组的序列(HQ634806),经MapDraw软件对拼接的序列进行分析,采用PCR方法分3段扩增SD1009株的前病毒cDNA(图1),PCR产物经克隆酶切后顺次连接,获得1个含有完整ALV-J前病毒cDNA的重组质粒,命名为pBlue-HLJ09SH01。

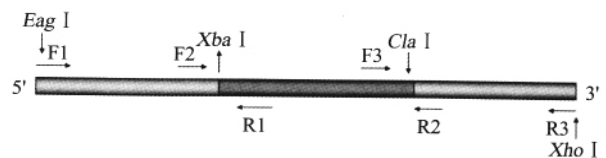


图1 引物、扩增片段在ALV-J前病毒基因组相对位置
Fig.1 The location of the primers and the amplified fragments in ALV-J proviral DNA

1.5 细胞转染及病毒拯救 采用QIAGEN Plasmid Midi Kits制备纯化pBlue-HLJ09SH01,由Lipofectamine™ 2000分别介导转染约80%的单层DF1细胞,同时以正常的DF1细胞为对照,转染后72h收获病毒,反复冻融3次后连续在DF1中传代。

1.6 病毒粒子的鉴定

1.6.1 间接免疫荧光(IFA)检测 将第7代拯救病毒按常规方法接种于约60%单层的DF1细胞96孔板中,7d后按常规方法进行IFA检测,一抗为抗ALV-J的多克隆抗体,二抗为兔抗鸡FITC-IgG。同时设不接种病毒细胞对照。

1.6.2 ALV抗原检测 按照IDEXX Avian Leukosis Virus Antigen Test (ALV-Ag)试剂盒操作方法检测病毒的P27抗原。

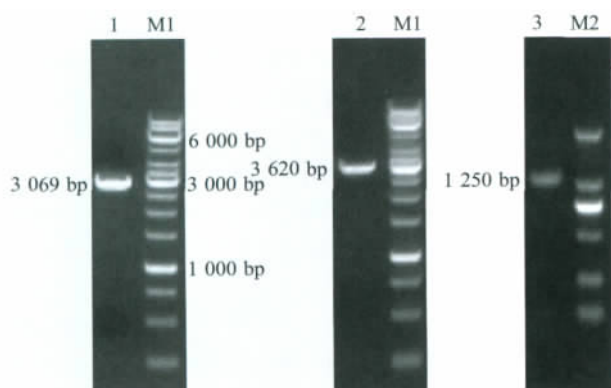
1.6.3 反转录酶活性检验 采用Roche的Reverse transcriptase assay试剂盒按照试剂盒说明书对拯救病毒的第7代进行反转录酶活性的检测。

1.7 致病性试验 将0.25 mL的rHLJ09SH01 ($10^{2.5}/\text{mL}$ TCID₅₀)经鸡胚静脉接种11日龄SPF蛋鸡

胚和肉鸡鸡胚, 待孵育出壳后, 分别饲养 32 周。在饲养过程中, 对病死鸡进行解剖, 各脏器样品进行 HE 染色, 确定肿瘤类型。32 周后统一迫杀并对肿瘤进行观察。

2 结果

2.1 ALV 感染性克隆的构建 以细胞培养 ALV HLJ09SH01 分离株的 DNA 为模板, 分别采用 3 对特异性引物, 对 ALV 前病毒 DNA 分 3 段进行 PCR 扩增(图 2); 并以该前病毒 cDNA 为模板, F3、R3 为引物, PCR 扩增。以 *Cla* 和 *Xho* 双酶切 PCR 产物及 pBluescript II KS(+), 经连接和转化后, 挑取白色菌落进行鉴定, 阳性重组质粒命名为 pbw-c。以分离株 HLJ09SH01 的前 cDNA 为模板, F1、R1 为引物进行 PCR 扩增, 产物与 pbw-c 以 *Eag* 和 *Xba* 双酶切, 经连接和转化后, 挑取单一菌落鉴定, 阳性重组质粒命名为 pbw-c-a。再以分离株 HLJ09SH01 的前 cDNA 为模板, F2、R2 为引物进行 PCR 扩增, 将产物与 pbw-c-a 分别以 *Xba* 和 *Cla* 进行双酶切, 经连接和转化后, 挑取单一菌落鉴定, 将阳性重组质粒命名为 pbw-c-a-b。以 *Cla* 和 *Xho* 双酶切鉴定 pbw-c, 以 *Eag* 和 *Kpn* 双酶切鉴定 pbw-c-a, 以 *Eag* 单酶切鉴定 pBlue-HLJ09SH01, 均获得与预期一致的片段, 表明构建了 pBlue-HLJ09SH01。



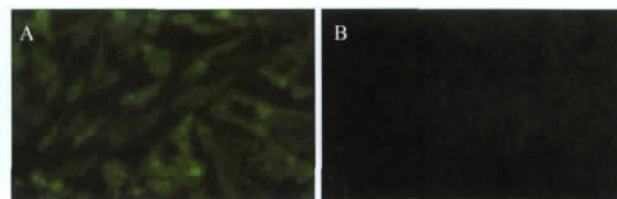
M1: DL10000 DNA Marker; M2: DL2000 DNA mMarker; 1: The PCR production of HLJ09SH01 cDNA amplified by F2 and R2; 2: The PCR production of HLJ09SH01 cDNA amplified by F1 and R1; 3: The PCR production of HLJ09SH01 cDNA amplified by F3 and R3

图 2 pBlue-HLJ09SH01 构建过程中 PCR 扩增产物图
Fig.2 PCR amplification of ALV cDNA fragments

2.2 拯救病毒 rHLJ09SH01 的鉴定

2.2.1 IFA 鉴定 rHLJ09SH01 与抗 ALV-J 多克隆抗

体呈现阳性反应, 感染组 DF-1 细胞表面以及胞浆有明显绿色荧光, 对照组细胞没有绿色荧光(图 3), 表明拯救了病毒。



A: rHLJ09SH01 infected DF-1 cells B: Mock infected DF-1 cells

图 3 rHLJ09SH01 的 IFA 检测结果
Fig.3 The result of IFA test for rHLJ09SH01

2.2.2 试剂盒检验 以 IDEXX Avian Leukosis Virus Antigen Test (ALV-Ag) 检测第 7 代拯救病毒, 并绘制标准曲线。通过 ELISA 检测, 取多次检测的平均数为 1.306, 阳性孔在 OD_{650nm} 吸光度平均值为 0.368, 表明拯救了病毒。

2.2.3 反转录酶试剂盒检验拯救病毒 采用 Roche 的 Reverse transcriptase assay 试剂盒, 通过 HIV 绘制标准曲线, 再通过吸光度确定第 7 代拯救病毒的反转录酶活性, 通过 ELISA 检测, 取多次检测的平均数, ELISA 在 OD_{450nm} 处吸光度值为 3.128, 所对应的反转录酶活性为 1.5281, HIV 标准品反转录酶活性分别为 0.0625、0.125、0.25、0.5 和 1, 并以其绘制标准曲线。表明拯救病毒具有反转录酶活性。

2.3 rHLJ09SH01 在 DF-1 培养液的滴度 将第 7 代病毒液接种单层 DF-1 (10⁶ 个) 细胞, 于感染后 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 和 7 d 分别取细胞上清, 通过检测反转录酶活性, 反映 rHLJ09SH01 在体外的生长复制水平(图 4)。

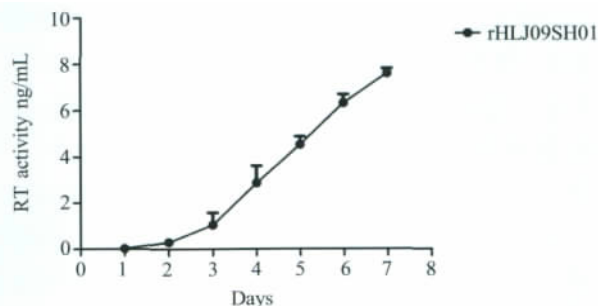
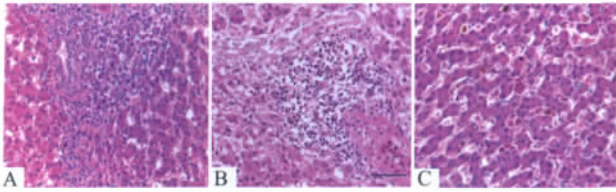


图 4 拯救病毒复制动力学曲线
Fig.4 Replication kinetics curve of rescued virus

2.4 rHLJ09SH01 的致病性 感染 rHLJ09SH01 的蛋鸡中存在 57.9% 的鸡发生肿瘤(11/19), 被感染肉鸡中有 83.3% 鸡发生肿瘤(10/12), 对照组没有鸡出现肿瘤。肉鸡和蛋鸡发生肿瘤的位置均在肝脏、肾

脏、肺脏和小肠等器官。剖检可见明显的肿瘤，病理切片可以观察有大量瘤细胞浸润正常细胞(图 5)。



A: 蛋鸡肝脏的 HE 染色结果; B: 肉鸡肝脏的 HE 染色结果;
C: 对照组蛋鸡肝脏的 HE 染色结果

A: Histological examination of liver showing infiltration of the hepatic portal area by myeloblasts characterized by abundant eosinophilic cytoplasm; B: Histological examination of liver showing foci of erythroblasts accompanied by necrosis of the surrounding hepatocytes. All histological examinations used HE staining; C: Histological examination of liver from the mock SPF layer

图 5 蛋鸡和肉鸡感染 rHLJ09SH01 后肝脏出瘤的病理结果
(Bar=50 μm)

Fig.5 Histological examination of tumors from chickens infected with rHLJ09SH01 (Bar=50 μm)

3 讨论

针对目前分离的 ALV-J 存在与其他病毒或 ALV 其他亚群交叉感染的情况，很难纯化得到单一的病毒。构建单一来源 ALV-J 的感染性克隆是获得病毒纯化培养的有效方法。由于反转录病毒的感染性克隆不需要人工插入启动子，为了排除质粒瞬时转染蛋白的可能性，本研究将转染后的病毒接种 DF1 细胞，并维持 7 d，依次传代，每一代次均在 DF1 中维持 7 d，再进行病毒活性检测，最终确定获得拯救病毒。

本研究在蛋鸡分离 ALV-J 的基础上构建了感染性克隆，并拯救出病毒。为进一步探究拯救病毒是否具有天然病毒的致病性，进行了 rHLJ09SH01 感染性蛋鸡和肉鸡的致病性试验。结果表明，rHLJ09SH01 可以导致蛋鸡和肉鸡发病，分别引起 57.9% 的蛋鸡和 83.3% 的肉鸡发生肿瘤。虽然 rHLJ09SH01 是蛋鸡来源的 ALV-J，但仍可以导致肉

鸡发病，并且肉鸡发生肿瘤的比率高于 SPF 蛋鸡，可能是因为本研究持续进行了 238 d，已远远超过正常商品代肉鸡的饲养周期，肿瘤的发生本身是一个多因素的过程，所以 rHLJ09SH01 致商品代肉鸡的出瘤率高于 SPF 蛋鸡。

目前鲜有关于 ALV-J 致肉鸡发病的报道，本研究结果表明，国内流行的 ALV-J 也可以导致肉鸡发病。在本研究中，rHLJ09SH01 导致肉鸡发病的情况发生在人工感染后 70 d，ALV-J 导致商品代肉鸡发病的时间超过其正常饲养周期，虽然父母代肉鸡饲养周期较长，但其饲养数量较少，净化及预防措施相对完善，这可能是目前鲜有 ALV-J 感染肉鸡的报道的原因。

参考文献：

- [1] Payne L N, Gillespie A M, Howes K. Induction of myeloid leukaemia and other tumours with the HPRS-103 strain of ALV [J]. *Vet Rec*, 1991, 129: 447-448.
- [2] Payne L N, Gillespie A M, Howes K. Myeloid leukaemogenicity and transmission of the HPRS-103 strain of avian leukosis virus [J]. *Leukemia*, 1992, 6: 1167-1176.
- [3] Fadly A M, Smith E J. Isolation and some characteristics of a subgroup J-like avian leukosis virus associated with myeloid leukaemia in meat-type chickens in the United States [J]. *Avian Dis*, 1999, 43: 391-400.
- [4] Du Y, Cui Z, Qin A. Subgroup J of avian leukosis viruses in China [J]. *China Poult Sci*, 1999, 3: 1-4.
- [5] Gao Yu-long, Yun Bing-ling, Qin Li-ting, et al. Molecular epidemiology of avian leukosis virus subgroup j in layer flocks in china [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50: 953-960.
- [6] Cheng Zi-qiang, Liu Jian-zhu, Cui Zhi-zhong, et al. Tumors associated with avian leukosis virus subgroup J in layer hens during 2007 to 2009 in China [J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72: 1027-1033.
- [7] Gao Yu-long, Qin Li-ting, Pan Wei, et al. Avian leukosis virus subgroup J in layer chickens, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16: 1637-1638.

(本文编辑：张朝霞)