

焦凤超, 赵瑜, 董建国, 等. J亚群禽白血病毒 HN24XY03 株分离鉴定及全基因组序列分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (7): 103-114.  
JIAO F C, ZHAO Y, DONG J G, et al. Isolation, identification, and whole genome sequence analysis of the subgroup J avian leukosis virus HN24XY03 strain [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (7): 103-114.

## J亚群禽白血病毒 HN24XY03 株分离鉴定及全基因组序列分析

焦凤超, 赵瑜, 董建国, 何书海, 曲哲会, 李迎晓\*, 陈敏\*

(信阳农林学院动物科技学院, 河南 信阳 464000)

**摘要:** 为了解信阳地方土鸡中J亚群禽白血病毒(ALV-J)的遗传进化情况,对疑似感染ALV的鸡进行了核酸检测、病理组织学观察,并采集肝脏组织接种鸡胚成纤维细胞DF-1进行病毒分离;对分离到的ALV-J全基因组进行PCR扩增并测序;使用MegAlign软件对病毒全序列进行核苷酸相似性比对,同时对gp85、3'UTR和U3区进行序列分析,并使用MEGA 11.0软件构建遗传进化树。结果:PCR扩增出ALV-J特异性条带;病理组织学观察结果显示,病鸡肝脏、脾脏组织结构紊乱,可见大量髓样瘤细胞增生;肝脏组织处理液接种DF-1细胞后,细胞上清液经ELISA检测P27抗原呈阳性,将分离株命名为HN24XY03。全基因组序列分析表明,HN24XY03株全长7609 bp,符合典型禽反转录病毒基因组结构特点,与25株ALV-J参考毒株全基因组核苷酸序列的同源性为94.3%~95.8%,其中与广西分离株GX14NN01和GX16YL02株同源性最高,亲缘关系最近;gp85基因及推导氨基酸序列分析显示,HN24XY03株与ALV-J广西分离株GX14NN01、GX17NN05亲缘关系较近,处于同一分支;与ALV-J原型株HPRS103相比,HN24XY03 gp85蛋白存在34个氨基酸变异位点和1个位点(D61-)缺失,其中9个位于hr1区,9个位于hr2区;3'UTR序列分析结果显示,分离株HN24XY03为UTR-Δr-TM毒株;利用SoftBerry NSITE在线分析程序分析发现,与英国分离株HPRS103相比,HN24XY03 U3区转录调控元件相对保守。本研究结果丰富了信阳地方土鸡ALV-J的分子流行病学资料,为进一步研究ALV-J在我国地方品种鸡群中的遗传进化和致病性奠定了基础。

**关键词:** J亚群禽白血病毒;分离鉴定;gp85基因;序列分析

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)07-0103-12

## Isolation, identification, and whole genome sequence analysis of the subgroup J avian leukosis virus HN24XY03 strain

JIAO Fengchao, ZHAO Yu, DONG Jianguo, HE Shuhai, QU Zhehui, LI Yingxiao\*, CHEN Min\*

(College of Animal Science and Technology, Xinyang Agricultural and Forestry University, Xinyang 464000, China)

**Abstract:** In order to understand the genetic evolution of avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) in local chickens in the Xinyang area, histopathological observation and PCR detection were carried out in chickens suspected of avian leukosis. Liver tissue samples were collected from the chickens and were inoculated with DF-1 cells for virus isolation. Then, the whole genome of ALV-J was amplified and sequenced by polymerase chain reaction (PCR), the nucleotide similarity was compared by the MegAlign software, and the gp85, 3'UTR and U3 regions were analyzed. Based on the whole genome, the gp85 gene and its deduced amino acid sequence, the genetic evolution tree was constructed using the MEGA11.0 software. The results were as follows: The PCR test showed that the positive sample amplified the ALV-J-specific band. The histopathological results showed that the liver and spleen tissues of the diseased chickens were structurally disordered, and a large number of medullary tumor cells were proliferated. After DF-1 cells were inoculated with liver tissue treatment solution, the cell supernatant was positive for P27 antigen by ELISA. The isolate was named HN24XY03. The whole genome sequence analysis showed that HN24XY03 was 7609 bp in length, which was consistent with the genomic structure of typical retroviruses, and the homology of the whole genome nucleotide with 25 ALV-J reference strains was 94.3%~95.8%. Among them, it had the highest homology with the Guangxi isolates

收稿日期: 2024-08-01; 修回日期: 2025-04-24

基金项目: 信阳农林学院科技服务团队项目(2022FWTD); 信阳农林学院青年教师科研基金项目(QN2023019); 信阳农林学院科技创新团队项目(KJCXTD-201901)

第一作者: 焦凤超, 男, 硕士, 教授

\*通信作者: 李迎晓, 硕士, 副教授, 主要从事动物病毒流行病学研究, E-mail: liyingxiao81@163.com; 陈敏, 博士, 副教授, 主要从事动物肠道病毒流行病学研究, E-mail: chenmin@xyafu.edu.cn。

GX14NN01 and GX16YL02, and they had the closest genetic relationship. The analysis of the *gp85* gene and the deduced amino acid sequence showed that HN24XY03 was closely related to the ALV-J Guangxi isolates GX14NN01 and GX17NN05, and they was in the same branch. Compared with HPRS103, there were 34 amino acid variant sites and 1 locus (D61-) deletion of the HN24XY03 *gp85* protein, of which 9 were located in the HR1 region and 9 were located in the HR2 region. The analysis of the 3'UTR sequence showed that HN24XY03 was a UTR- $\Delta$ r-TM strain. The SoftBerry NSITE online analysis program showed that, compared with the British isolate HPRS103, the transcriptional regulatory elements in the U3 region of HN24XY03 were relatively conserved. The results of this study provided data for the molecular epidemiological study of ALV-J in local chickens in the Xinyang area, and laid a foundation for further research on the genetic evolution and pathogenicity of ALV-J.

**Keywords:** avian leukosis virus; isolation and identification; *gp85* gene; sequence analysis

禽白血病 (avian leukosis, AL) 是由反转录病毒科、反转录病毒属的禽白血病病毒 (avian leukosis virus, ALV) 引起的一种疾病, 可导致发病鸡出现多种形式的肿瘤、免疫抑制、产蛋率下降、增重缓慢、对其他病原的易感性增加以及疫苗接种失败风险加大等, 给世界养禽业带来巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。根据病毒囊膜糖蛋白、宿主范围以及抗体中和作用, ALV 被分为从 A~K 共 11 个不同的亚群<sup>[2-3]</sup>。在感染鸡的 ALV 中, A、B、C、D、J 和 K 亚群属于外源性 ALV; E 亚群是内源性 ALV, 通常不具有致病性。ALV-A、ALV-B、ALV-K 和 ALV-J 在临床上较为常见, ALV-A 和 ALV-B 可诱发淋巴性白血病和肉瘤, ALV-J 主要诱发髓细胞性白血病、血管瘤和淋巴瘤。ALV-K 复制能力和致病性弱, 近 10 年来, 不断在中国地方品种鸡群中潜伏传播<sup>[4]</sup>。自 1988 年 ALV-J 在英国首次被分离以来<sup>[5]</sup>, 以色列、中国、法国、美国等国家相继出现 ALV-J 的感染报道<sup>[6-9]</sup>。中国自 1999 年首次分离鉴定出 ALV-J 后<sup>[7]</sup>, 各省相继出现 ALV-J 感染蛋鸡、地方鸡种麻鸡、黄羽肉鸡等<sup>[10-14]</sup>。尤其是近年来在中国地方品种鸡群中, ALV-J 的感染变得越来越具有破坏性。ALV-J 会导致产蛋量严重下降, 并造成高死亡率; 此外, 它对中国地方鸡种源的安全性构成了严重威胁<sup>[14]</sup>。俞燕<sup>[15]</sup>对中国 26 个地方品种鸡进行了禽白血病的流行病学调查, 发现其中 22 个鸡种的 ALV-J 抗体检测呈阳性。何书海等<sup>[16]</sup>对信阳地区部分规模化地方土鸡养殖场进行血清学和分子流行病学调查显示, 当地土鸡群中 ALV-A/B 抗体的阳性率为 5%, 而 ALV-J 抗体的阳性率为 36%。此外, 还发现了不同亚群 ALV 的混合感染案例。

ALV-J 的基因组为单股、正链、线性 RNA, 长 7.2~7.8 kb, 两侧为长末端重复序列 (LTR) 和非编码区 (UTR), 中间部分为 3 个基因编码区, 形成反转录病毒基因组的结构特点, 即 LTR-*gag-pol-env*-LTR。同时具有 5' 端的帽子结构和 3' 端的多聚 A。其中, *env* 基因编码产物为囊膜蛋白, 以二聚体形式存在, 分别为表面蛋白 *gp85* (surface glycoprotein unit,

SU) 和跨膜蛋白 *gp37* (trans-membrane protein, TM)<sup>[17]</sup>。囊膜蛋白, 尤其是 *gp85*, 在病毒的致病性、肿瘤形成和宿主范围等方面起着重要作用<sup>[18]</sup>。在 ALV-J 病毒的进化过程中, 其基因组序列经历了不断的变异和重组, 特别是 *env* 基因和 3'UTR 是前病毒基因组中最易变的区域, 表现出极高的变异性, 因此, 开展 ALV-J 分子流行病学研究对于揭示其遗传变异情况和致病机制具有重要意义。

近年来, 信阳地区土鸡 ALV 感染时有发生, 为了解当地土鸡养殖场 ALV 的分子特征, 本研究对信阳市发生疑似肿瘤土鸡进行病毒分离和病毒全基因组扩增, 与 GenBank 中已公布的部分参考毒株序列进行了同源性比对和序列分析, 为进一步完善 ALV-J 在地方品种鸡群中的流行情况, 以及病毒的遗传进化、致病性研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料与细胞

病料组织来源于信阳市罗山县某散户土鸡养殖场疑似感染 ALV 的 5 月龄病鸡。该养殖场饲养的土鸡从 4 月龄开始出现采食量下降、消瘦、腹泻等情况, 后期每日出现零星死亡。剖检病死鸡可见肝脏异常肿大、脾脏肿大、肠道臌气等病变。鸡胚成纤维细胞 DF-1 由信阳农林学院兽医病理学实验室保存。

### 1.2 主要试剂

血液/细胞/组织基因组 DNA/RNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit Pro、2×Rapid *Taq* Master Mix 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司; DL2000 DNA Marker、DL5000 DNA Marker、2×FidCycle Fast 高保真 PCR Mix、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、零背景 TOPO-Blunt 平末端克隆试剂盒、DH5 $\alpha$  感受态细胞、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 注射用青霉素钠、注射用硫酸链霉素购自华北制药股份有限公司; ALV ELISA 抗原检测试剂盒购自哈尔滨国生生物科技股份有限公司。

### 1.3 样品采集和病原检测

取 100 mg 病鸡肝脏和脾脏，加入 1 mL 无菌 PBS 充分匀浆后，离心取 300  $\mu$ L 上清液，依照试剂盒说明书提取病毒 DNA/RNA。根据参考文献 [19-21] 方法进行 ALV，禽腺病毒 (FA<sub>AdV</sub>)，马立克氏病病毒 (MDV) 和网状内皮增生症病毒 (REV) 的 PCR/RT-PCR 检测，引物信息见表 1。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 PCR/RT-PCR 检测引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段长度/bp
ALV A-E-F	GGATGAGGTGACTAAGAAAG	295~326
ALV A-E-R	GGGAGGTGGCTGACTGTGT	
ALV J-F	GGATGAGGTGACTAAGAAAG	545
ALV J-R	CGAACCAAAGGTAACACACG	
FA <sub>AdV</sub> -F	AATGTCACNACCGARAAGGC	830
FA <sub>AdV</sub> -R	CBGCBTRCATGTACTGTGTA	
MDV-F	CTGACGGCCTATCTGAGGAG	856
MDV-R	GGAAACCACCAGCCGTAGAC	
REV-F	TGAGGGAAAATGTCATGCAACATCC	204
REV-R	ATCCCTACCCACCCAGTAG	

### 1.4 病理组织学观察

采集病鸡肝脏、脾脏，用 10% 福尔马林固定后，制备常规石蜡切片，HE 染色后观察并记录结果<sup>[22]</sup>。

### 1.5 病毒分离鉴定

将阳性病料组织充分匀浆后，冻融 3 次，离心取上清液，加入青霉素 (终浓度为 2 000 IU/mL)、链霉素 (终浓度为 1 000  $\mu$ g/mL) 处理，用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤后，将病毒悬液接种 DF-1 细胞，添加等量 PBS 液的 DF-1 细胞作为阴性对照。盲传 3 代后，取细胞上清液用 ALV ELISA 检测试剂盒检测 ALV 编码的 P27 抗原<sup>[23]</sup>。

### 1.6 前病毒基因组 DNA 制备

取 ALV P27 抗原阳性 DF-1 细胞沉淀，按照血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取前病毒基因组 DNA。

### 1.7 ALV-J 全病毒基因组扩增

#### 1.7.1 引物设计

参照文献 [24-25] 合成 ALV-J 全基因组分段扩增引物，具体信息见表 2。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 2 ALV-J 亚群病毒全基因组扩增引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段长度/bp	退火温度/℃
P1-F	TGTAGTGTATGCAATGCAATACTCTTATGTAACG	2 758	57
P1-R	TTGAGCGGAATAGCCAGATGTAG		
P2-F	AGGGAGTATCCTGGGAAGAG	2 818	61
P2-R	ACAACGGAAATAATAACCACGC		
P3-F	GAGGTGACTAAGAAAGATGAGGCCGA	2 134	58
P3-R	GGTGTTCGCAATCGTTAGGGACTCA		
P4-F	CTTGAATAGTCTAAAGACCAAATAA	734	55
P4-R	CTCCCGATTTCCTCAAGTA		

#### 1.7.2 目的片段的分段扩增

以感染病毒的 DF-1 细胞 DNA 为模板，进行 ALV-J 基因组分段 (P1~P4) 扩增。扩增体系为：上、下游引物各 2  $\mu$ L，2 $\times$ FidCycle Fast Mix 25  $\mu$ L，cDNA 2  $\mu$ L，RNase free H<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L。扩增程序：98  $^{\circ}$ C 预变性 30 s；98  $^{\circ}$ C 变性 10 s，退火 15 s (退火温度见表 2)，72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s，35 个循环；72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min。

### 1.8 扩增产物的序列分析

将分段基因的胶回收产物分别连接 TOPO-Blunt

克隆载体，将重组质粒用 M13F/R 引物 PCR 检测无误后送检测序，序列拼接后利用 Lasergene 7.0 MegAlign 软件和 MEGA 11.0 软件与 GenBank 中公布的 30 株 ALV 序列 (表 3) 进行全基因组、gp85 基因及推导氨基酸序列比对和遗传进化树的构建，并分析 gp85 蛋白氨基酸突变位点；利用 Lasergene 7.0 MegAlign 软件分析 3'UTR 中 r-TM、DR 和 E element 的结构；使用 SoftBerry 在线服务分析系统中的 NSITE 程序分析 LTR U3 区域的转录因子元件 (<http://www.softberry.com>)。

表 3 参考毒株信息

分离株	亚群	分离时间	分离地	GenBank 登录号
RAV-1	A	2017	美国	MF926337
SDAU09E3	B	2011	中国	KM058055
Prague C	C	1977	捷克布拉格	J02342
Schmidt-Ruppig D	D	1992	日本	D10652
ev-1	E	2001	美国	AY013303
JS13LY19	K	2018	中国江苏	MG770235
HPRS103	J	1988	英国	Z46390
GX14NN01	J	2014	中国广西	MN066154
GX16YL02	J	2016	中国广西	MN066147
GX17NN05	J	2017	中国广西	MN066145
GD18ZJ01	J	2018	中国广东	MT538244
GD17HZ01	J	2017	中国广东	MT538238
GX14HG04	J	2014	中国广西	KX058878
GX15MM6-2	J	2015	中国广西	KU934276
GDQY1201	J	2012	中国广东	JX423792
GX16YL01	J	2016	中国广西	MN735297
GD15MM01	J	2015	中国广西	MN066152
HN17ZZ02	J	2017	中国	MN735300
GX15MM61	J	2015	中国广西	MN066150
GX14NN02	J	2014	中国广西	MN735293
GX17YL01	J	2017	中国广西	MN066143
GD18HZ01	J	2018	中国广东	MT538240
GX14LT07	J	2014	中国广西	KX034517
NHH	J	2010	中国江苏	HM235668
GX16NN04	J	2016	中国	MN735296
NX0101	J	2005	中国宁夏	DQ115805
CAUYL01	J	2009	中国北京	JF932004
SCAU1903	J	2019	中国山东	MT175600
HB2020	J	2020	中国湖北	ON840093
SDAU1701	J	2017	中国山东	KY980657

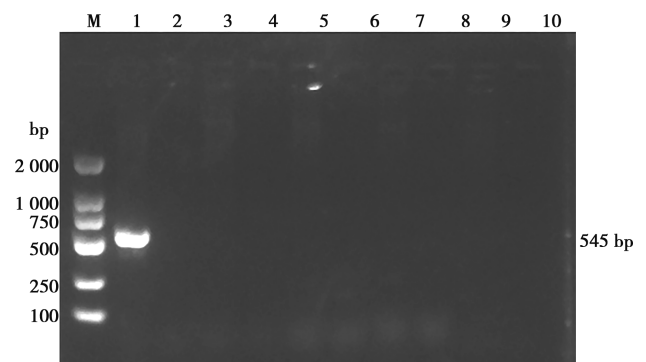
## 2 结果与分析

### 2.1 病原 PCR 检测

发病鸡肝脏组织病料 PCR/RT-PCR 检测结果显示, 只有 ALV-J 扩增出大小约 545 bp 阳性条带, 其他病毒均为阴性 (图 1)。

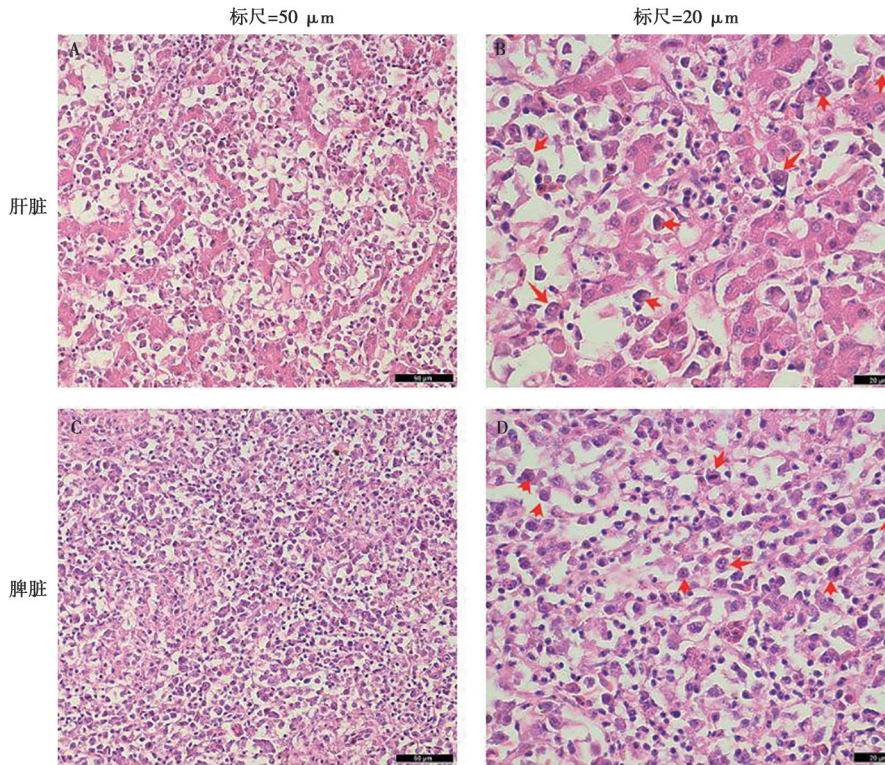
### 2.2 病理组织学观察

由图 2 可以看出, 肝脏原有的组织结构紊乱, 肝细胞变性、坏死, 局部有炎性细胞浸润, 肝脏中可见大量的散在或局灶分布的髓样瘤细胞; 脾脏结构紊乱, 界限不清, 瘤细胞广泛增生, 大小相似, 呈髓样瘤细胞。



M. DL2000 DNA Marker; 1. ALV-J; 3. ALV A-E; 5. FAdV; 7. MDV; 9. REV; 2, 4, 6, 8, 10. 为阴性对照。

图 1 疑似病料 PCR/RT-PCR 检测结果



注：箭头所示为髓样瘤细胞。

图2 病理组织学观察结果 ( HE )

### 2.3 病毒的分离与鉴定

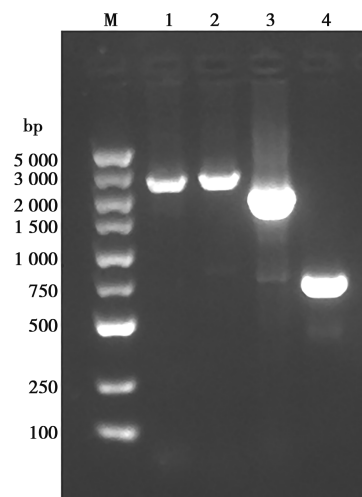
接种组织悬液的 DF-1 细胞与对照组相比无明显细胞病变。使用 ALV ELISA 检测试剂盒检测细胞上清液，结果显示，接种组织悬液的细胞培养物上清液的 ALV 均为阳性，而对照组检测结果为阴性。将分离到的 ALV 毒株命名为 HN24XY03。

### 2.4 全基因组扩增与序列分析

#### 2.4.1 全基因组扩增与序列拼接

利用 P1~P4 这 4 对引物成功扩增出 4 个预期目的片段，如图 3 所示。序列拼接后的全基因组全长为 7 609 bp ( GenBank 登录号：PQ118392 )，在 3 个主要的 ORF 编码基因中，*gag* 基因位于基因组 604 ~ 2 709 nt，长度为 2 106 bp，编码 702 个氨基酸；*pol* 基因位于基因组 2 718 ~ 5 348 nt，长度为 2 631 bp，编码 877 个氨基酸；*env* 基因位于基因组 5 302 ~ 6 990 nt，长度为 1 689 bp，编码 563 个氨基酸。该分离株两端相同的长末端重复序列 LTR 包括 U3-R-U5，全长为 323 bp，位于基因组 1~323 nt 和 7 287~7 609 nt。5' UTR 长度为 379 bp，3' UTR 长度为

520 bp。符合典型反转录病毒基因组的结构特点，即 LTR-*gag-pol-env*-LTR ( 图 4 )。



M. DL5000 DNA Marker; 1~4. 分别为 P1~P4 分段基因。

图3 HN24XY03 株全基因组分段扩增结果

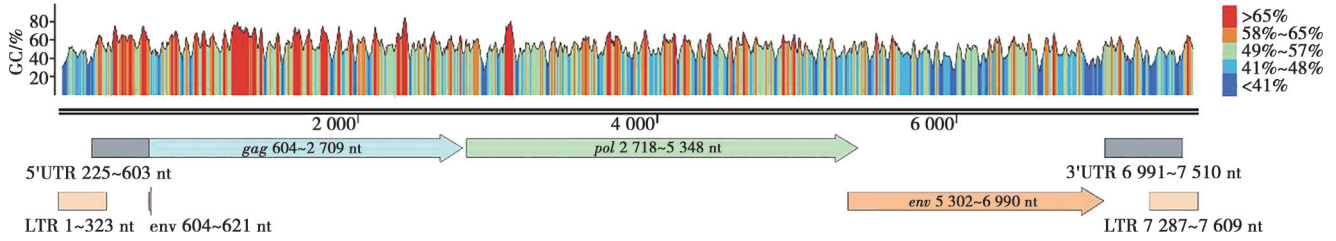


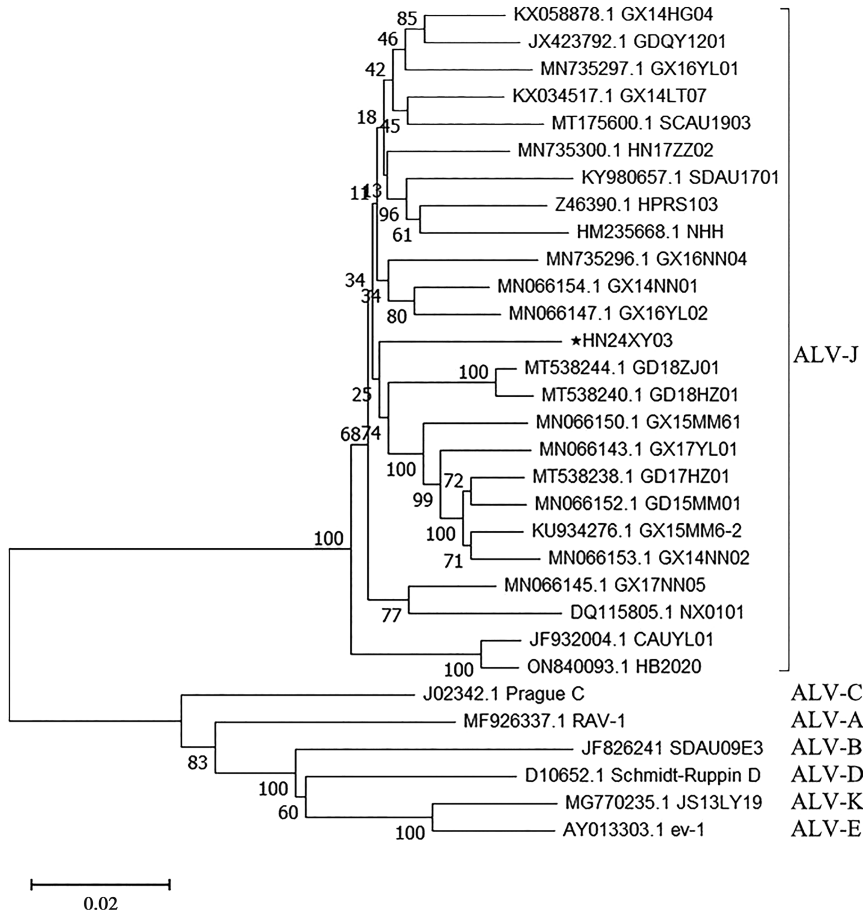
图 4 HN24XY03 株全基因组结构示意图

### 2.4.2 全基因组序列分析

应用 MegAlign 工具中的 Clustal W 方法，将 HN24XY03 株与 GenBank 中登录的 25 株 ALV-J 参考毒株和来自 ALV-A、ALV-B、ALV-C、ALV-D、ALV-E 和 ALV-K 亚群的 6 株参考毒株进行全基因组核苷酸序列的同源性分析。结果显示，HN24XY03 株与其他 25 株 ALV-J 全基因组核苷酸的同源性为 94.3% ~ 95.8%，其中与参考株 GX14NN01 和 GX16YL02 株同源性最高为 95.8%，与英国原型株 HPRS103 同源性稍低为 94.6%，与来自 ALV-A、ALV-B、ALV-C、ALV-D、ALV-E 和 ALV-K 亚群

的 6 株参考毒株的核苷酸序列相似性为 82% ~ 83.7%。

系统发育树分析显示（图 5），32 株 ALV 形成两大分支，HN24XY03 株与 25 株 ALV-J 参考毒株处于同一大分支上，与 GX14NN01 和 GX16YL02 等 11 株 ALV-J 亚型毒株处于一个分支；而 HN24XY03 株与其他亚群的 6 株 ALV 毒株（RAV-1、Schmidt-Ruppin B、Prague C、Schmidt-Ruppin D、ev-1 和 JS13LY19）处于不同分支，差别较大，亲缘关系较远。



注：★表示本试验分离株，下同。

图 5 基于全基因组序列遗传进化分析

利用 Lasergene 7.0 MegAlign 软件对 HN24XY03 株的各基因片段与 ALV 各亚群参考毒株进行同源性比对。结果显示, *gag* 和 *pol* 基因相对保守, HN24XY03 的 *gag* 基因与各参考毒株相似性在 93.1%~95.8%, *pol* 基因与各参考毒株相似性在 95.8%~97.3%; HN24XY03 株 LTR 和 *env* 均与 J 亚群参考毒株同源性较高, 分别为 91.6%~95.4% 和 92.4%~96.3%, 而与其他亚群 ALV 毒株的同源性较低, 分别为 64.9%~88.5% 和 49.3%~50.8%, 表明该毒株为 J 亚群 ALV (表 4)。

表 4 HN24XY03 与 ALV 参考毒株核苷酸序列相似性比较

参考毒株	HN24XY03 毒株的基因			
	LTR	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>
RAV-1	88.5	94.8	95.8	49.6
SDAU09E3	82.5	93.1	96.2	49.3
Prague C	87.4	95.5	96.5	50.1
Schmidt-Ruppin D	86.3	94.4	96.1	50.7
ev-1	67.3	94.1	97.3	50.8
JS13LY19	64.9	94.5	97.0	50.4
HPRS103	95.0	95.3	96.2	92.8
GX14NN01	93.5	95.7	96.7	96.1
GX16YL02	94.4	95.8	96.9	95.0
GX17NN05	92.9	94.5	96.8	96.3
GD18ZJ01	95.4	95.1	96.8	95.0
GD17HZ01	92.3	94.9	96.8	95.5
GX14HG04	93.5	95.7	97.3	94.7
GX15MM6-2	94.4	94.9	97.1	94.8
GDQY1201	94.7	95.2	96.8	95.6
GX16YL01	93.8	95.3	96.7	94.4
GD15MM01	92.0	94.9	97.0	94.7
HN17ZZ02	94.4	95.4	96.9	94.7
GX15MM61	92.9	95.0	96.6	94.6
GX14NN02	92.9	95.5	97.0	94.6
GX17YL01	92.9	95.0	96.2	95.1
GD18HZ01	93.5	94.8	96.8	95.1
GX14LT07	93.2	95.6	97.1	94.5
NHH	94.9	95.8	95.6	93.6
GX16NN04	92.3	95.6	96.1	94.0
NX0101	94.1	94.1	96.5	92.5
CAUYL01	93.2	94.1	96.7	93.7
SCAU1903	91.6	95.2	96.7	93.8
HB2020	92.9	95.0	96.8	93.8
SDAU1701	95.0	94.7	96.3	92.4

## 2.5 gp85 基因序列分析

*gp85* 基因序列同源性分析显示, HN24XY03 株与其他 25 株 ALV-J 亚群参考毒株核苷酸相似性为 87.3%~95.3%, 与广西分离株 GX14NN01、GX17NN05 相似性最高为 95.3%, 与宁夏分离株 NX0101 相似性最低为 90.7%。系统发育树分析显示 (图 6), HN24XY03 株与 25 株 ALV-J 参考毒株处于同一大分支上, 与 ALV-J 亚群广西分离株 GX14NN01、GX17NN05 同源关系较近, 处于一个小分支。

*gp85* 蛋白氨基酸序列同源性分析显示, HN24XY03 株与其他 25 株 ALV-J 亚群参考毒株氨基酸相似性为 90.8%~96.2%, 与广西分离株 GX14NN01、GX17NN05 相似性最高为 96.1%; 系统发育树分析显示 (图 7), HN24XY03 株与 25 株 ALV-J 参考毒株处于同一大分支上, 与 ALV-J 亚群广西分离株 GX14NN01、GX17NN05 同源关系较近, 处于一个小分支, 与来自 ALV-A、ALV-B、ALV-C、ALV-D、ALV-E 和 ALV-K 亚群的 6 株参考毒株亲缘关系较远, 明显处于不同分支。氨基酸序列比对发现, 与英国分离参考毒株 HPRS103 相比, HN24XY03 株存在 34 个氨基酸变异位点 (R21Q、N48D、N63K、D65E、S68N、K75Q、A76T、N115G、R117S、V120T、V128F、R136A、A143E、D148A、L150S、V156I、V168T、R175S、S182G、R189G、D191S、L192Q、W195C、S197G、R200G、K212G、S214P、S215N、G219S、T226A、E239N、Q240K、V243T、I294M) 和 1 个位点 (D61-) 缺失, 其中 9 个位于 hr1 区, 9 个位于 hr2 区 (图 8)。

## 2.6 HN24XY03 分离株 3'UTR 和 U3 区序列分析

3'UTR 序列分析结果显示, 与原型株 HPRS-103 相比, HN24XY03 株以及亲缘关系较近的 ALV-J 广西分离株 GX16YL02、GX14NN01、GX17NN05 均发生 r-TM 序列缺失, 皆为 UTR- $\Delta$ r-TM 毒株 (图 9); 利用 SoftBerry NSITE 在线分析程序分析发现 HN24XY03 株 LTR 长度为 323 bp, 与英国 ALV-J 原型株 HPRS-103 相比, HN24XY03 株 U3 区包含的 C/EBP、E2BP、NFAP-1、CArG box、Y box、TATA box、PRE box 高度保守, 但由于 58、59 位的碱基突变, 丢失了 1 个 CArG box (图 10)。

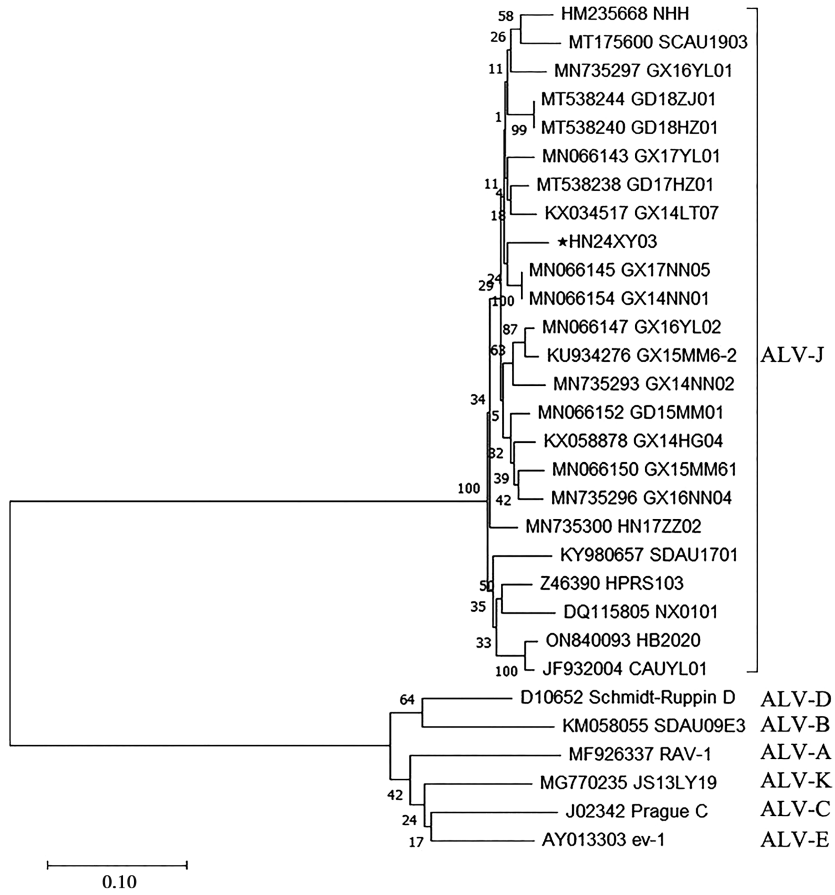


图 6 基于 *gp85* 核苷酸序列的遗传进化分析

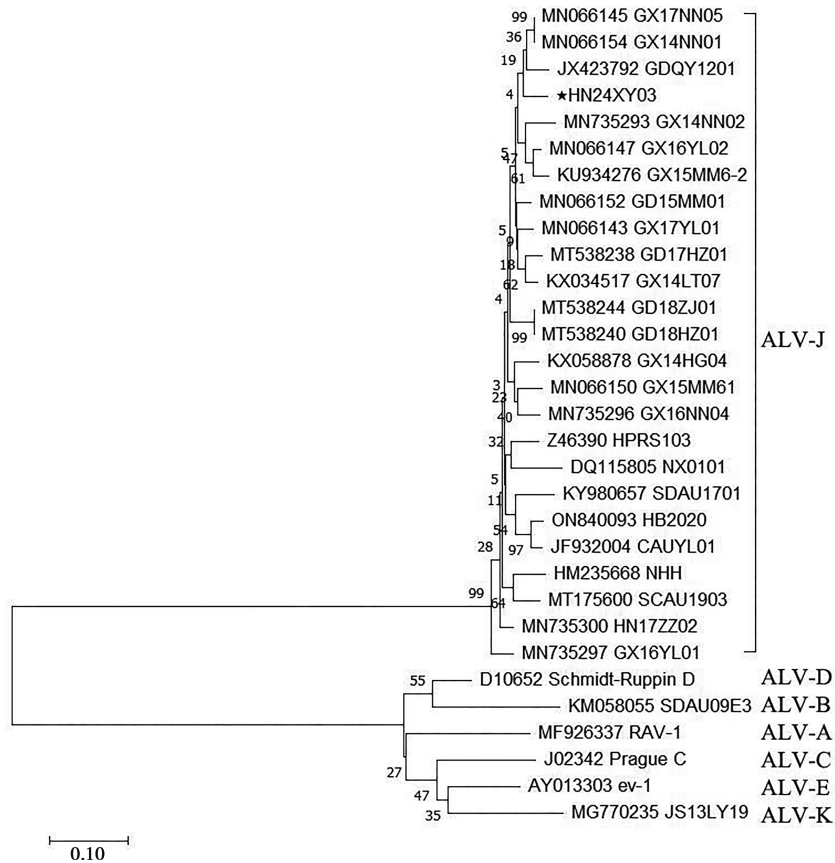


图 7 基于 *gp85* 氨基酸序列的遗传进化分析



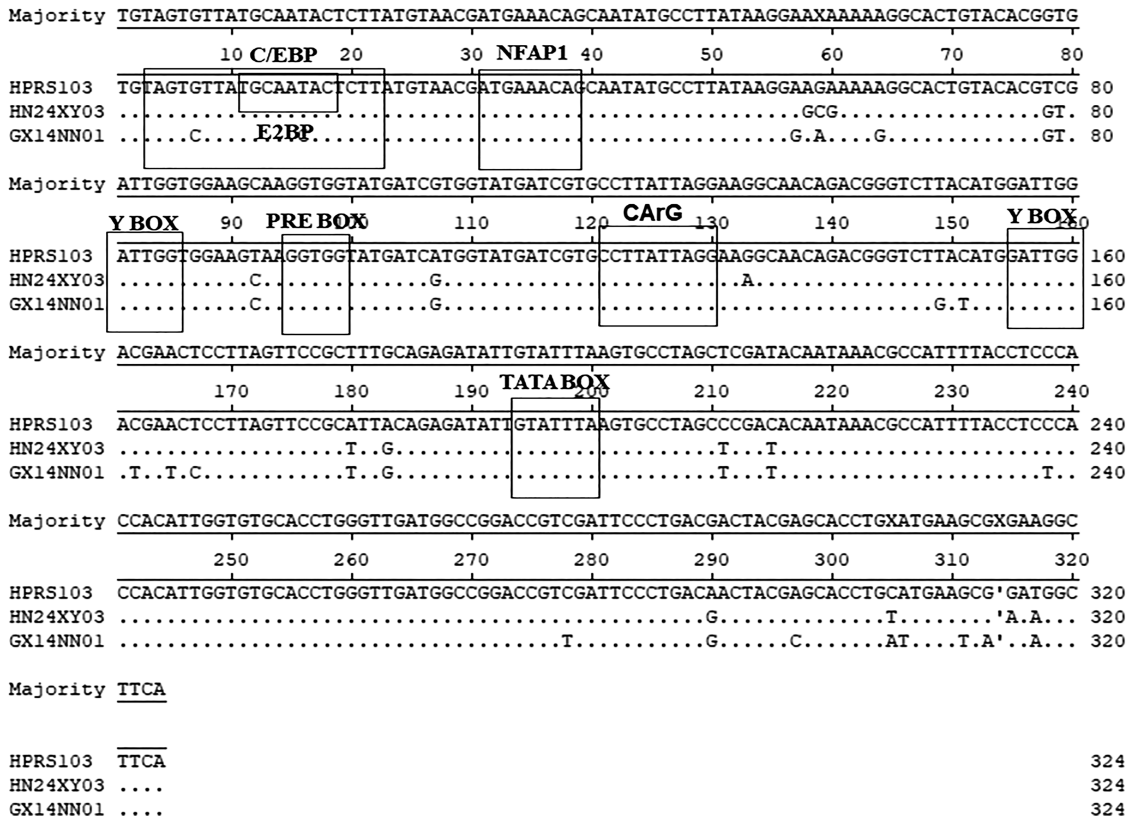


图 10 HN24XY03 株 U3 区转录调控元件

### 3 讨论

我国农业农村部关于推进动物疫病净化工作的意见〔农牧发〔2021〕29号〕指出，要以种畜禽场为重点，扎实开展禽白血病、禽沙门菌病等垂直传播性疫病净化，从源头提高畜禽健康安全水平。通过国家根除计划的实施，我国禽白血病疫情得到了有效控制，白肉鸡和蛋鸡养殖场的发病率逐年下降。然而，许多研究表明，ALV-J 仍在我国的大多数地方鸡群中流行，并且在长期的进化过程中已经培育出许多突变株，对家禽业构成了潜在的巨大威胁<sup>[26]</sup>。Meng 等<sup>[27]</sup>从中国某地方鸡养殖场中分离出 10 株 ALV-J，研究发现其与中国原始毒株存在较大偏差。Li 等<sup>[28]</sup>对中国江西省的 8 个地方鸡群中进行了系统的流行病学调查，从 560 个样本中分离出 71 株 ALV-J，部分毒株与之前从商品肉鸡、蛋鸡和其他鸡群中分离出的菌株，甚至与美国、俄罗斯分离出的毒株高度一致，而部分毒株表现出不同的分子特征，处于一个独立的进化分支，解释了中国地方鸡群中 ALV-J 的复杂背景和未来的演变趋势。本研究从信阳地区疑似肿瘤土鸡病料中分离到 1 株 ALV，全基因组序列分析结果显示，HN24XY03 株与 ALV-J 全基因组核苷酸的相似性为 94.3% ~ 95.8%，与广西分离株 GX14NN01、

GX16YL02 同源性最高，为研究当地 ALV-J 的遗传进化和致病性奠定了基础。

gp85 含有病毒受体决定簇，其高变区和可变区决定了 ALV 的中和活性和特异性<sup>[29]</sup>。ALV-J gp85 易于突变以获得对抗自然选择的进化优势<sup>[30]</sup>。通过比对 ALV-A 至 ALV-E 的 gp85 氨基酸序列发现，gp85 蛋白包含 5 个变异区域，分别为 HR1、HR2、VR1、VR2 和 VR3<sup>[31]</sup>，而 ALV-J 的 gp85 基因与其他亚群中相应基因的序列相似性仅有 40%<sup>[32]</sup>。氨基酸序列比对发现，与英国分离参考毒株 HPRS103 相比，HN24XY03 株存在 34 个氨基酸变异位点和 1 个位点 (D61-) 缺失，其中 9 个位于 hr1 区，9 个位于 hr2 区。张瑶<sup>[17]</sup>发现，ALV-J gp85 与受体结合区域为第 37 ~ 283 位区域的不连续序列，而 gp85 蛋白的 E114-、R117G、N123I 这 3 个位点的协同突变可导致病毒与 chNHE1 亲和力增强。A123I 突变可能会增强 gp85 蛋白 N 端 RBD 区域的稳定性，并减少空间位阻，从而增加 gp85 与 chNHE1 受体结合的可能性<sup>[33]</sup>。HN24XY03 株在 hr1、hr2 区分别存在 9 个突变位点，其影响有待于进一步研究。

类似于成熟真核 mRNA 的 3'非翻译区，ssRNA (+) 病毒基因组 RNA 的 3'UTR 也是具有多种功能的结构，3'UTR 与来自病毒和宿主的核苷酸和蛋白质直

接或间接地相互作用,参与调控病毒基因组 RNA 的环化、复制和翻译<sup>[34]</sup>。ALV-J 3'UTR 包括 r-TM、DR1 和 E element 结构, r-TM 曾被认为是病毒复制的非必需部分,但后来的研究发现,它与 ALV-J 对产蛋鸡的致病性有关<sup>[35]</sup>, DR-1 对于病毒 mRNA 从细胞核的输出非常重要<sup>[36]</sup>, E element 与病毒的致癌性和体内复制相关<sup>[9,37]</sup>。Xu 等<sup>[38]</sup>的研究表明,中国大多数 ALV-J 毒株在 3'UTR 中的 r-TM 区域发生了缺失,通过构建含有不同 3'UTR 的 ALV-J 感染性克隆和亚基因组载体,证明了 3'UTR 直接影响病毒的组织偏好性,其可以作为增强子促进病毒复制,而含有  $\Delta$ -r-TM 3'UTR 的 ALV-J 毒株在原代细胞中增殖速度最快。本试验对 3'UTR 序列分析结果显示,与原型株 HPRS-103 相比,HN24XY03 株以及亲缘关系较近的广西分离株 GX16YL02、GX14NN01、GX17NN05 均发生 r-TM 区域缺失,与上述研究结果相符,预期的影响有待于进一步研究证实。

位于 LTR 内的 U3 区域基因长度为 224~233 个核苷酸,其参与逆转录病毒的转录和宿主原癌基因的激活。U3 区包含多种顺式作用元件,这些元件可以与宿主细胞的转录因子和其他调节蛋白相互作用,进而驱动 RNA 聚合酶转录病毒并控制转录速率。U3 区的突变对病毒毒力有重要影响<sup>[39]</sup>。Ma 等<sup>[14]</sup>对 2013 年至 2018 年期间的 260 个中国临床土鸡样本进行了鉴定,共分离出 18 株 ALV-J, U3 区序列分析发现,18 个临床分离株的转录调控元件相对保守,包括 2 个 CArG box、1 个 TATA box、1 个 C/EBP、2 个 Y box 和 2 个 PRE box,但大多数毒株的 U3 区序列存在 5 个独特的碱基突变。而 HN24XY03 株 U3 区包含 2 个 Y box、C/EBP、E2BP、NFAP-1、CArG box、TATA box、PRE box 等转录调控元件各 1 个,与 HPRS103 株相比,由于 58、59 位的碱基突变,丢失了 1 个 CArG box 结构,其影响有待于进一步研究。

综上,本研究通过 PCR 检测、病理组织学观察及病毒分离鉴定等方法,从送检的信阳地方土鸡中分离到 1 株 UTR- $\Delta$ r-TM ALV-J,该毒株 U3 区序列转录调控元件相对保守,为进一步研究 ALV-J 的致病性奠定基础。

## 参考文献:

- [1] 周钊灿,游广炬,杨金易,等. J、K 亚群禽白血病病毒的分离和囊膜蛋白(gp85)基因序列分析[J]. 中国兽医杂志, 2024, 60(4): 1-10.
- [2] PAYNE L N, NAIR V. The long view: 40 years of avian leukosis research [J]. Avian Pathol, 2012, 41(1): 11-19.
- [3] 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.
- [4] 郭妍妍,梁灿新,李锦群,等. 广东地方品种鸡 ALV-K 分子流行病学及 gag 基因 12 bp 缺失对病毒体外复制能力影响的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(11): 3956-3966.
- [5] 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.
- [6] FADLY A M, SMITH E J. Isolation and some characteristics of a subgroup J-like avian leukosis virus associated with myeloid leukemia in meat-type chickens in the United States [J]. Avian Dis, 1999, 43(3): 391-400.
- [7] 杜岩,崔治中,秦爱建,等. 鸡的 J 亚群白血病病毒的分离及部分序列比较[J]. 病毒学报, 2000(4): 341-346.
- [8] DAVIDSON I, BORENSHTAIN R. The feather tips of commercial chickens are a favorable source of DNA for the amplification of Marek's disease virus and avian leukosis virus, subgroup J [J]. Avian Pathol, 2002, 31(3): 237-240.
- [9] HUE D, DAMBRINE G, DENESVRE C, et al. Major rearrangements in the E element and minor variations in the U3 sequences of the avian leukosis subgroup J provirus isolated from field myelocytomatosis [J]. Arch Virol, 2006, 151(12): 2431-2446.
- [10] XU B, DONG W, YU C, et al. Occurrence of avian leukosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China [J]. Avian Pathol, 2004, 33(1): 13-17.
- [11] SUN S, CUI Z. Epidemiological and pathological studies of subgroup J avian leukosis virus infections in Chinese local "yellow" chickens [J]. Avian Pathol, 2007, 36(3): 221-226.
- [12] 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(4): 584-587.
- [13] LIN W, LI X, DAI Z, et al. Molecular epidemiology of J-subgroup avian leukosis virus isolated from meat-type chickens in southern China between 2013 and 2014 [J]. Arch Virol, 2016, 161(11): 3039-3046.
- [14] MA M, YU M, CHANG F, et al. Molecular characterization of avian leukosis virus subgroup J in Chinese local chickens between 2013 and 2018 [J]. Poult Sci, 2020, 99(11): 5286-5296.
- [15] 俞燕. 地方品种鸡群禽白血病流行病学调查及检测净化技术研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- [16] 何书海,徐永杰,涂有志,等. 信阳土鸡禽白血病的分子生物学与形态学诊断[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(1): 81-86.
- [17] 张瑶. J 亚群禽白血病病毒囊膜蛋白与细胞受体结合域鉴定及亲和力差异研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [18] MUNGUIA A, FEDERSPIEL M J. Avian sarcoma and leukosis virus envelope glycoproteins evolve to broaden receptor usage under pressure from entry competitors [J]. Viruses, 2019, 11(6): 519.
- [19] 李海娟,石梦雅,谷战明,等. ALV 与 MDV 混合感染造成鸡群临床肿瘤暴发的诊断[J]. 中国家禽, 2018, 40(14): 57-61.
- [20] XIE Z, FADL A A, CIRSHIEK T, et al. Detection of avian adenovirus by polymerase chain reaction [J]. Avian Dis, 1999, 43(1): 98-105.
- [21] 刘兰,梁雄燕,李拓凡,等. 散养土鸡 J 亚群禽白血病病毒和网状内皮组织增生症病毒混合感染的诊断[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(4): 47-49.
- [22] 肖静,万金隆,杨江宇,等. 禽白血病的病理及分子生物学诊断[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(6): 2671-2679.

- [23] 陈玫婷, 郑从森, 梁泽贤, 等. 1株J亚群禽白血病病毒 *env* 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50 (5): 1785-1795.
- [24] QU Y, SUN H, SUN M, et al. Sequence analysis for the complete proviral genome of avian leukosis virus subgroup J associated with haemangiomas, leiomyosarcomas and myelomas in layer flocks [J]. Acta Vet Hung, 2012, 60 (3): 343-354.
- [25] SU Q, CUI Z, ZHANG Z, et al. Whole-genome analysis of an emerging recombinant avian leukosis virus in yellow chickens, south China [J]. Transbound Emerg Dis, 2020, 67 (5): 2254-2258.
- [26] LI H Q, ZHANG F F, CHEN L, et al. Whole-genome analysis reveals possible sources of ALV-J infection in an anyi tile-like gray chicken flock [J]. Poult Sci, 2022, 101 (5): 101764.
- [27] MENG F, LI Q, ZHANG Y, et al. Characterization of subgroup J avian leukosis virus isolated from Chinese indigenous chickens [J]. Virol J, 2018, 15 (1): 33.
- [28] LI H, TAN M, ZHANG F, et al. Diversity of avian leukosis virus subgroup J in local chickens, Jiangxi, China [J]. Sci Rep, 2021, 11 (1): 4797.
- [29] 沈遼, 何倩, 秦爱建, 等. 禽白血病病毒衣壳蛋白 *p15* 基因慢病毒表达载体的构建及其在鸡肝癌细胞系中的表达 [J]. 畜牧与兽医, 2021, 53 (4): 89-94.
- [30] WANG Z, CUI Z. Evolution of *gp85* gene of subgroup J avian leukosis virus under the selective pressure of antibodies [J]. Sci China C Life Sci, 2006, 49 (3): 227-234.
- [31] BOVA C A, MANFREDI J P, SWANSTROM R. *env* genes of avian retroviruses: nucleotide sequence and molecular recombinants define host range determinants [J]. Virology, 1986, 152 (2): 343-354.
- [32] BAI J, PAYNE L N, SKINNER M A. HPRS-103 (exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an *env* gene related to those of endogenous elements EAV-0 and E51 and an E element found previously only in sarcoma viruses [J]. J Virol, 1995, 69 (2): 779-784.
- [33] YU M, ZHANG Y, ZHANG L, et al. N123I mutation in the ALV-J receptor-binding domain region enhances viral replication ability by increasing the binding affinity with chNHE1 [J]. PLoS Pathog, 2024, 20 (2): e1011928.
- [34] LIU Y, ZHANG Y, WANG M, et al. Structures and functions of the 3' untranslated regions of positive-sense single-stranded RNA viruses infecting humans and animals [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 453.
- [35] WANG Q, GAO Y, WANG Y, et al. A 205-nucleotide deletion in the 3' untranslated region of avian leukosis virus subgroup J, currently emergent in China, contributes to its pathogenicity [J]. J Virol, 2012, 86 (23): 12849-12860.
- [36] OGERT R A, LEE L H, BEEMON K L. Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm [J]. J Virol, 1996, 70 (6): 3834-3843.
- [37] 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.
- [38] XU M, QIAN K, SHAO H, et al. 3'UTR of ALV-J can affect viral replication through promoting transcription and mRNA nuclear export [J]. J Virol, 2023, 97 (11): e0115223.
- [39] TOMIOKA Y, OCHIAI K, OHASHI K, et al. Genome sequence analysis of the avian retrovirus causing so-called fowl glioma and the promoter activity of the long terminal repeat [J]. J Gen Virol, 2004, 85 (3): 647-652.