

陈伟国, 邝智祥, 张翔宇, 等. *tva* 受体基因起始密码子突变对鸡感染 A 亚群禽白血病病毒的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 367-373.
CHEN Weiguo, KUANG Zhixiang, ZHANG Xiangyu, et al. Effect of initiation codon mutation within *tva* receptor gene on chicken resistance to infection by avian leukemia virus subgroup A[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 367-373.

tva 受体基因起始密码子突变对鸡感染 A 亚群禽白血病病毒的影响

陈伟国^{1†✉}, 邝智祥^{2†}, 张翔宇¹, 李文雪¹, 徐慧娟¹, 朱学风¹, 谢青梅^{1✉}

(1 华南农业大学 动物科学学院/广东省畜禽健康养殖与环境控制重点实验室, 广东 广州 510642;

2 广东爱健康生物科技有限公司, 广东 清远 511800)

摘要:【目的】探索 *tva* 受体基因起始密码子突变 (*tva* c.3G>A) 对鸡感染 A 亚群禽白血病病毒 (Avian leukemia virus subgroup A, ALV-A) 的影响。【方法】利用 Sanger 测序和 RT-PCR 验证我国黄羽肉鸡存在 *tva* c.3G>A 突变。利用流式细胞术检测 *tva* c.3G>A 突变对鸡体外感染 RCASBP(A)-GFP 荧光报告病毒的影响。通过 ALV-A 体内攻毒试验, 探究 *tva* c.3G>A 突变对鸡体内感染 ALV-A 的影响。利用直接测序方法对我国黄羽肉鸡品系 *tva* c.3G>A 突变位点进行基因分型。【结果】Sanger 测序和 RT-PCR 结果鉴定我国黄羽肉鸡品系 *tva* 基因编码区第 3 位碱基由 G 突变为 A, 该突变引起 *tva* 基因起始密码子序列由 ATG 突变为 ATA。流式细胞术检测结果显示野生型 *tva* c.3G/G 鸡胚成纤维细胞 (Chicken embryo fibroblast, CEF) 对 RCASBP(A)-GFP 易感, 纯合突变型 *tva* c.3A/A CEF 抗 RCASBP(A)-GFP 感染, 表明 *tva* c.3G>A 突变导致鸡体外抗 RCASBP(A)-GFP 的感染。ALV-A 体内攻毒试验的结果表明, *tva* c.3G>A 突变导致鸡体内抗 ALV-A 的感染。*tva* c.3G>A 突变位点基因分型发现, CB01、CB08、CB10 和 CB15 品系存在纯合抗性基因型 *tva* c.3A/A, 频率分别为 0.10、0.15、0.23 和 0.08。【结论】*tva* c.3G>A 突变引起鸡在体外、体内抗 ALV-A 感染, *tva* c.3G>A 突变位点可作为 ALV-A 的遗传抗性位点。

关键词: A 亚群禽白血病病毒; *tva* 受体基因; 起始密码子; 突变; 遗传抗性; 黄羽肉鸡

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)03-0367-07

Effect of initiation codon mutation within *tva* receptor gene on chicken resistance to infection by avian leukemia virus subgroup A

CHEN Weiguo^{1†✉}, KUANG Zhixiang^{2†}, ZHANG Xiangyu¹, LI Wenxue¹, XU Huijuan¹, ZHU Xuefeng¹, XIE Qingmei^{1✉}

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Health Aquaculture and Environmental Control, Guangzhou 510642, China;

2 Guangdong Love-Health Biotechnology Co., Ltd., Qingyuan 511800, China)

Abstract: 【Objective】To explore the effect of initiation codon mutation within *tva* receptor gene (*tva*

收稿日期: 2022-06-15 网络首发时间: 2022-10-09 09:45:31

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20221006.1613.002.html>

作者简介: 陈伟国, 高级实验师, 博士, 主要从事动物健康养殖与安全生产、抗病育种研究, E-mail: wgchen81@scau.edu.cn; 邝智祥, 高级畜牧师, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 88631608@qq.com; †表示同等贡献; 通信作者: 谢青梅, 教授, 博士, 主要从事动物免疫与生物安全和家禽疾病防控研究, E-mail: qmx@scau.edu.cn

基金项目: 广东省重点领域研发计划 (2020B020222001); 国家重点研发计划 (2021YFD1300100); 清远市科技计划项目 (2021DZX019)

c.3G>A) on resistance of chickens to infection by avian leukemia virus subgroup A (ALV-A). 【Method】 Sanger sequencing and RT-PCR were used to verify the presence of *tva* c.3G>A mutation in Chinese yellow-feathered broilers. The effect of *tva* c.3G>A mutation on infection of chickens by RCASBP(A)-GFP fluorescence reporter virus *in vitro* was detected using flow cytometry. The effect of *tva* c.3G>A mutation on infection of chickens by ALV-A was investigated using ALV-A challenge test *in vivo*. Direct sequencing was used to genotype *tva* c.3G>A mutation site within Chinese yellow-feathered broiler lines. 【Result】 The results of Sanger sequencing and RT-PCR identified the mutation from G to A on the third base in the coding region of *tva* gene of Chinese yellow-feathered broilers, which caused the mutation from ATG to ATA in the initial codon sequence of *tva* gene. The result of flow cytometry showed that chicken embryo fibroblasts (CEFs) of wild-type *tva* c.3G/G were susceptible to infection by RCASBP(A)-GFP, while the homozygous mutant *tva* c.3A/A CEFs were resistant to infection by RCASBP(A)-GFP, indicating that *tva* c.3G>A mutation led to chicken resistance to infection by RCASBP(A)-EGFP *in vitro*. The results of ALV-A challenge test *in vivo* also indicated that *tva* c.3G>A mutation led to chicken resistance to infection by ALV-A. Genotyping of *tva* c.3G>A revealed that homozygous resistance genotype *tva* c.3A/A was present in lines CB01, CB08, CB10 and CB15, with the frequencies of 0.10, 0.15, 0.23 and 0.08, respectively. 【Conclusion】 The *tva* c.3G>A mutation causes chicken resistance to infection by ALV-A *in vitro* and *in vivo*, and the *tva* c.3G>A mutation site can be used as the genetic resistance site of ALV-A.

Key words: Avian leukemia virus subgroup A; *tva* receptor gene; Initiation codon; Mutation; Genetic resistance; Yellow-feathered broiler

禽白血病是由禽白血病病毒 (Avian leukemia virus, ALV) 引起的一类禽免疫抑制性肿瘤性传染病。可自然感染鸡群的禽白血病病毒包括 ALV-A~E、J 和 K 7 个亚群, 其中 ALV-A 是引起我国鸡群发生禽白血病的主要病原^[1-2]。ALV-A 可使感染鸡群产生免疫抑制、生产性能下降, 乃至发生特征性肿瘤而死亡, 给养禽业造成巨大的经济损失^[3-4]。目前, 该病鲜有商品化疫苗和有效的治疗方法, 主要通过净化种群和生物安全措施进行预防^[5]。然而, 近年来禽白血病的流行病学调查研究发现, ALV-A 在我国地方鸡种^[6-7]、商品肉鸡^[8]、蛋鸡^[9]及野生鸟类^[10]中普遍存在。可见, 现有措施并不能完全控制 A 亚群禽白血病在中国的发生与流行, 该病已成为威胁我国养鸡业 (尤其是种鸡业) 可持续健康发展的重大疾病之一。因此, 研发更适合防控我国 A 亚群禽白血病的新策略已迫在眉睫。国外已有研究证实, 提高宿主对 A 亚群禽白血病的遗传抗性, 开展 A 亚群禽白血病的抗病育种可成为防控该病的有效策略^[11-13]。

ALV-A 由 *tva* 受体基因编码的细胞表面特异性受体 Tva 介导侵入宿主细胞, 继而发生感染^[14]。*tva* 受体基因的遗传突变会导致 Tva 受体蛋白的完全缺失或表达一个不适宜作为 ALV-A 受体的缺陷型 Tva 受体蛋白, 从而引起宿主细胞对 ALV-A 的

感染产生遗传抗性^[15]。在国外白来航近交品系 *tva* 受体基因中已经鉴定了 *tva*^{r1}、*tva*^{r2}、*tva*^{r3} 和 *tva*^{r4} 4 个 ALV-A 遗传抗性位点^[16-17]。Chen 等^[18]首次从中国鸡种中成功鉴定了 *tva*^{r5} 和 *tva*^{r6} 2 个 ALV-A 遗传抗性位点。另外, 我们前期研究 (未发表) 发现中国鸡种 *tva* 受体基因存在新的自然突变位点: *tva* 基因编码区第 3 位碱基由 G 突变为 A, 推测该突变引起 *tva* 基因起始密码子序列由 ATG 突变为 ATA, 将该 *tva* 基因自然突变命名为 *tva* c.3G>A, 但其对宿主感染 A 亚群禽白血病病毒的影响尚不清楚。因此, 本研究拟通过 ALV-A 体外感染试验和体内攻毒试验, 从体外、体内 2 个层面验证 *tva* c.3G>A 突变是否引起宿主对 ALV-A 的感染产生遗传抗性, 以期鉴定新的 ALV-A 遗传抗性位点。

1 材料与方法

1.1 试验动物、病毒、细胞株及质粒

黄羽肉鸡品系 CB01~CB15^[19]抗凝血样采自于温氏食品集团股份有限公司, 每个品系随机采取 36~60 份血样, 共 670 份血液样品。1 日龄无特定病原 (Specific pathogen free, SPF) 鸡苗购自广东大华农有限公司。ALV-A GD08 株、DF-1 细胞系为广东省畜禽健康养殖与环境控制重点实验室保存。RCASBP (A)-GFP 重组质粒为广东省畜禽健康养殖与环境控

制重点实验室前期构建并保存^[18]。

1.2 主要试剂

血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 质粒小量提取试剂盒、无内毒素质粒大量提取试剂盒、凝胶 DNA 回收试剂盒均购自 OMEGA 公司; ReverTra Ace[®]qPCR RT Kit、KOD-FX 购自 Toyobo 公司; FastStart SYBR Green Master(Rox) 购自 Roche 公司; 反转录试剂盒、pMD19-T、PrimeScript[®] One Step RT-PCR Kit 购自 Takara 公司; Opti-DMEM 无血清培养基、DMEM 细胞培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青链霉素均购自 Gibco 公司; TRIZOL reagent、Lipofectamine 3000 转染试剂购自 Invitrogen 公司。

表 1 *tva* 受体基因全长序列 PCR 扩增引物信息
Table 1 Primers used to amplify the whole sequence of *tva* receptor gene

片段 Fragment	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	片段大小/bp Segment size
1	P1-F	GTTCAGCAGATCCTCATCTCCCG	62	1 308
	P1-R	GGCCATTGTGCGATCTAAGAGGG		
2	P2-F	AGCCCTCTTAGATCGCACAA	60	1 253
	P2-R	GTGACACCGAGCACAAAATG		
3	P3-F	GTTGGAGCTGGATGAGCACT	60	1 132
	P3-R	TGAGGGAATTCCTGTCACCT		

1.4 *tva* 基因 mRNA 的 RT-PCR 扩增

采用 Trizol 法提取 *tva* c.3G>A 突变位点野生型 *tva* c.3G/G 和纯合突变型 *tva* c.3A/A 种鸡血液的总 RNA, 参考反转录试剂盒说明书反转录成 cDNA。参考文献 [18] 中的引物序列和 PCR 反应体系、扩增条件, 利用 KOD-FX 高保真酶 RT-PCR 扩增 *tva* 基因整个编码序列。回收、纯化的 RT-PCR 产物克隆入 pMD19-T, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果应用 Lasergene 7.1 软件进行分析。

1.5 鸡胚成纤维细胞分离与培养

采集 10 日龄鸡胚消毒后, 用镊子打开气室和壳膜, 夹起鸡胚, 用眼科剪刀和镊子剔除头、爪、骨头和内脏, 把鸡胚组织块置于平皿中, 用 PBS 液漂洗去除血污。将漂洗好的组织块放入 5 mL 离心管, 用眼科剪刀剪至肉糜状, 用 0.25%(w) 的胰酶在 37 ℃ 水浴箱中消化 15~20 min, 加入适量的小牛血清终止消化。使用 200 目细胞滤膜过滤后, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清液, 用完全培养基对细胞进行重悬, 分装入无菌培养皿中, 获取纯化的鸡胚成纤维细胞 (Chicken embryo fibroblast, CEF), 细

1.3 黄羽肉鸡品系 *tva* 基因的遗传变异分析

参考 NCBI 数据库中鸡 *tva* 基因的 DNA 序列 (GenBank 登录号: AY531262.1), 应用 Primer 5.0 软件设计 3 对引物, 分 3 个片段 (1、2 和 3 段)PCR 扩增 *tva* 基因全长序列 3 607 bp, 引物信息见表 1。提取黄羽肉鸡品系 CB01~CB15 血液样品的基因组 DNA, 用该 3 对引物 PCR 扩增 *tva* 基因全长序列。将 PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 应用 DNASTAR 和 Mutation Surveyor 基因序列分析软件比对 *tva* 基因序列和测序序列, 分析黄羽肉鸡品系 *tva* 基因的遗传变异, 对 *tva* c.3G>A 突变位点进行基因分型。

胞置于 CO₂ 体积分数为 5%、37 ℃ 的培养箱内培养。

1.6 流式细胞术检测 RCASBP(A)-GFP 报告病毒感染

将重组质粒 RCASBP(A)-EGFP 转染入 DF-1 细胞中, 转染后第 7 天, 拯救并收集 DF-1 细胞上清液中表达绿色荧光蛋白的重组病毒 RCASBP(A)-GFP, 测定病毒感染单位 (IU) 后, 分装保存于 -80 ℃ 备用。分离与培养 *tva* c.3G>A 突变位点野生型 *tva* c.3G/G、杂合突变型 *tva* c.3G/A 和纯合突变型 *tva* c.3A/A CEF, 分别接种于 24 孔板中, 每孔接种 5×10⁴ 个细胞, 培养 24 h 后, 每孔接种 5×10⁵ IU/mL 的 RCASBP(A)-GFP 病毒液。孵育 2 h 后, 弃掉病毒液, 用含 1%(v) 胎牛血清的维持液继续培养。感染后第 1、2、3、7 天, 使用 Cytomics FC 500 分析仪 (Beckman Coulter, USA) 通过荧光激活细胞分选 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) 定量 *tva* c.3G>A 突变位点不同基因型 CEF 的 GFP 阳性细胞百分比。

1.7 ALV-A 体内感染试验

前期研究发现 *tva* c.3G>A 突变主要存在于 CB06 品系。从 CB06 品系随机挑选 75 只 1 日龄雏

鸡随机分为 3 组, 每组 25 只商品鸡和 3 只 SPF 鸡作为对照, 饲养于 3 个隔离器, 并随意提供饲料和水。1 日龄时, 每只雏鸡腹腔接种 ALV-A GD08 株病毒液 (S/P=2.1)0.2 mL, 5 日龄时, 再攻毒 1 次。攻毒后 1 周, 采集每只雏鸡抗凝血样, 抽取全基因组 DNA, 通过直接测序方法对每只雏鸡 *tva* c.3G>A 突变位点进行基因分型。攻毒后 1 个月, 采集雏鸡的血样, 利用 Trizol 试剂盒抽提血样总 RNA, 利用 ALV-A GD08 株特异性检测引物, RT-PCR 检测每只雏鸡的病毒血症情况, 确定 *tva* c.3G>A 突变不同基因型雏鸡对 ALV-A GD08 株的感染状态^[18]。

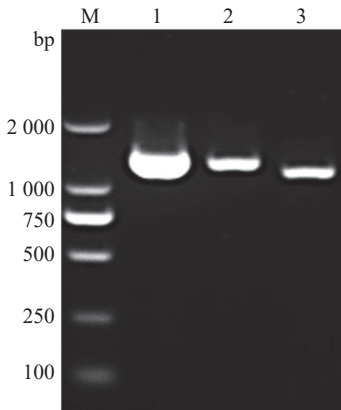
1.8 统计分析

所有数据均使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行绘图和数据分析, 2 组数据比较采用独立样本 *t* 检验分析, 数据结果以平均值±标准差表示。利用 Popgene 软件分析 *tva* c.3G>A 突变位点在我国黄羽肉鸡品系中的基因型频率分布。

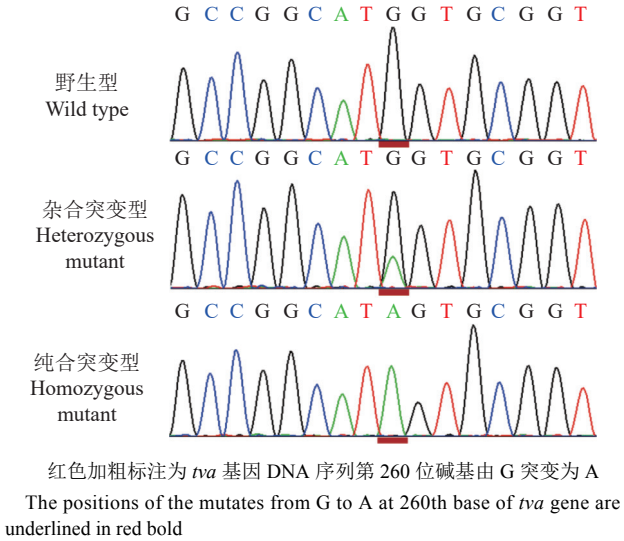
2 结果与分析

2.1 黄羽肉鸡品系中 *tva* c.3G>A 突变位点的鉴定

为了剖析中国黄羽肉鸡品系 *tva* 受体基因的遗传变异, 分 3 个片段 PCR 扩增每只鸡 *tva* 受体基因的基因组区域。如图 1 所示, PCR 扩增出 *tva* 基因的 1、2 和 3 片段的目的条带, 片段大小与预期结果相符。将 PCR 产物进行 Sanger 测序, 发现中国黄羽肉鸡品系 *tva* 基因 DNA 序列第 260 位碱基存在由 G 突变为 A 的自然突变 (图 2), 进一步分析推测该突变致使 *tva* 基因编码区第 3 位碱基由 G 突变为 A, 引起 *tva* 基因起始密码子序列由 ATG 突变为 ATA, 将该 *tva* 基因自然突变命名为 *tva* c.3G>A。为了证实纯合突变型 *tva* c.3A/A 转录本存在 G>A 突变, RT-PCR 扩增野生型 *tva* c.3G/G 和纯合

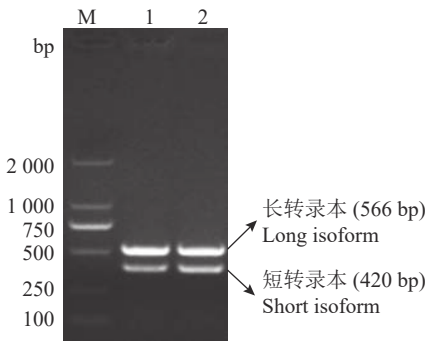


M: DL2000 marker; 1~3: *tva* 基因的 1、2 和 3 片段
M: DL2000 marker; 1~3: Fragment 1, 2 and 3 of *tva* gene
图 1 *tva* 基因 3 个片段的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplified results of three fragments of *tva* gene



红色加粗标注为 *tva* 基因 DNA 序列第 260 位碱基由 G 突变为 A
The positions of the mutates from G to A at 260th base of *tva* gene are underlined in red bold
图 2 *tva* c.3G>A 突变位点不同基因型测序图
Fig. 2 Sequence traces for *tva* c.3G>A mutation sites of different genotypes

突变型 *tva* c.3A/A 血液 *tva* 基因整个编码序列。结果如图 3 所示, *tva* c.3G/G 和 *tva* c.3A/A 基因型血样均扩增出 566 和 420 bp 的条带, 表明 *tva* c.3G>A 突变位点在不同基因型血样均可扩增出 *tva* 基因长、短 2 个转录本。RT-PCR 产物的克隆测序结果表明, 与野生型 *tva* c.3G/G 相比, 纯合突变型 *tva* c.3A/A 基因型 2 个 *tva* cDNA 序列第 3 位碱基均由 G 突变为 A, 引起 *Tva* 受体蛋白氨基酸序列第 1 个氨基酸由甲硫氨酸 (M) 改变为异亮氨酸 (I)。



M: DL2000 marker; 1: 野生型 *tva* c.3G/G; 2: 纯合突变型 *tva* c.3A/A
M: DL2000 marker; 1: Wild type *tva* c.3G/G; 2: Homozygous mutant *tva* c.3A/A

图 3 *tva* c.3G>A 突变位点不同基因型血样全长 *tva* 编码序列的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 RT-PCR amplified results of the full-length *tva* coding sequences for blood samples from different genotypes of *tva* c.3G>A mutation site

2.2 *tva* c.3G>A 突变致宿主体外抗 ALV-A 感染

RCASBP(A)-EGFP 重组质粒转染 DF-1 细胞 48 h 后, 用倒置荧光显微镜观察到 GFP 荧光标记蛋白表达, 表明成功拯救了 RCASBP(A)-GFP 荧光报告病毒 (图 4)。为探究 *tva* c.3G>A 突

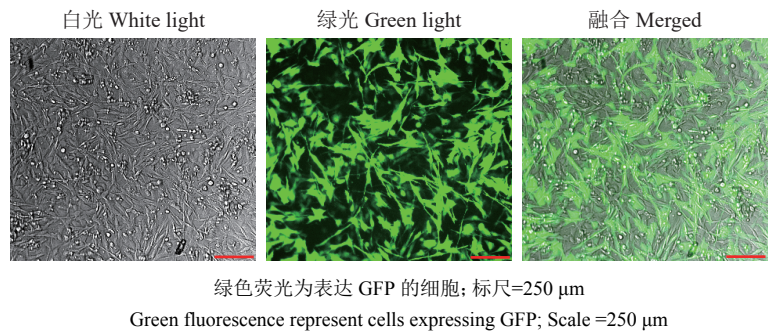


图4 RCASBP(A)-EGFP 质粒转染 DF-1 细胞 48 h 后的绿色荧光蛋白表达

Fig. 4 Expression of green fluorescent protein in DF-1 cells after transfection with RCASBP(A)-EGFP plasmid for 48 h

变对宿主细胞体外感染 ALV-A 的影响, 利用拯救的 RCASBP(A)-GFP 荧光报告病毒分别感染 *tva* c.3G/G、*tva* c.3G/A 和 *tva* c.3A/A CEF, 感染后不同时间点利用流式细胞术检测 RCASBP(A)-GFP 对 *tva* c.3G>A 突变位点不同基因型 CEF 的感染情况, 结果如图 5 和 6 所示。野生型 *tva* c.3G/G CEF 和杂合突变型 *tva* c.3G/A CEF 对 RCASBP(A)-GFP 病毒易感, 而纯合突变型 *tva* c.3A/A CEF 抗 RCASBP(A)-GFP 的感染, 表明 *tva* c.3G>A 突变导致宿主体外抗 RCASBP(A)-GFP 的感染。

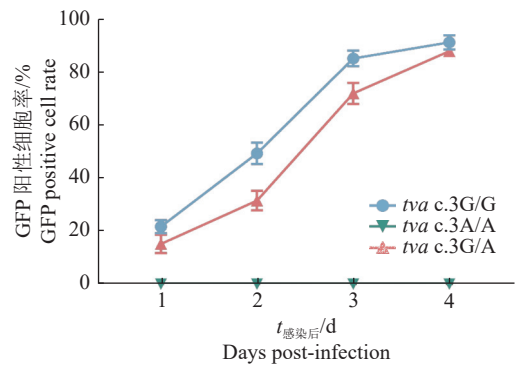


图5 *tva* c.3G/G、*tva* c.3G/A 和 *tva* c.3A/A CEF 感染 RCASBP(A)-EGFP 的过程

Fig. 5 Time course of infection of *tva* c.3G/G, *tva* c.3G/A and *tva* c.3A/A CEFs with RCASBP(A)-EGFP

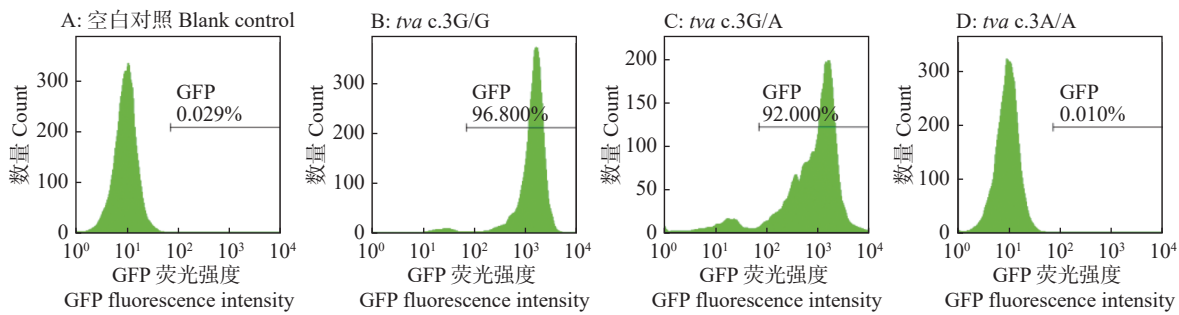


图6 流式细胞术检测 *tva* c.3G>A 突变位点不同基因型 CEF 感染 RCASBP(A)-GFP 7 d 后的 GFP 阳性细胞率

Fig. 6 GFP positive cell rates for CEFs of different genotypes of *tva* c.3G>A mutation site seven days after infection with RCASBP(A)-GFP detected by flow cytometry

2.3 *tva* c.3G>A 突变致宿主体内抗 ALV-A 感染

为探究 *tva* c.3G>A 突变对宿主体内感染 ALV-A 的影响, 利用 ALV-A 野毒感染 *tva* c.3G>A 突变野生型、杂合突变型、纯合突变型雏鸡。作为阳性对照, 9 只 SPF 雏鸡攻 ALV-A 野毒后均为 ALV-A 阳性, 说明 ALV-A 体内攻毒试验成立。ALV-A 攻毒试验结果显示, 野生型 *tva* c.3G/G 雏鸡 (25 只) 攻 ALV-A 野毒后均为 ALV-A 阳性, 杂合突变型 *tva* c.3G/A 雏鸡 (28 只) 攻 ALV-A 野毒后病毒血症阳性率为 75%, 而纯合突变型 *tva* c.3A/A 雏鸡 (22 只) 攻 ALV-A 野毒后均为 ALV-A 阴性 (表 2)。

结果表明, *tva* c.3G>A 突变导致宿主体内抗 ALV-A 的感染, ALV-A 体内攻毒试验结果与 ALV-A 体外感染试验结果一致, 证实 *tva* c.3G>A 突变位点为 ALV-A 的遗传抗性位点。

2.4 *tva* c.3G>A 抗性位点在不同黄羽肉鸡品系的基因型频率分布

不同黄羽肉鸡品系 *tva* c.3G>A 抗性位点的基因分型结果如表 3 所示。CB01、CB08、CB10 和 CB15 品系中检测到 *tva* c.3G>A 抗性位点的杂合基因型 *tva* c.3G/A, 其频率分别为 0.05、0.05、0.10 和 0.14, 在 CB01、CB08、CB10 和 CB15 品系中检测到

表 2 ALV-A 攻毒后雏鸡病毒血症阳性率

Table 2 Positive infection rate of viremia in chicks infected by ALV-A

雏鸡 Chick	基因型 Genotype	阳性样品数/总样品数 No. of positive samples/Total No. of samples	阳性感染率/% Positive infection rate
SPF	<i>tva</i> c.3G/G	9/9	100
	<i>tva</i> c.3G/G	25/25	100
CB06	<i>tva</i> c.3G/A	21/28	75
	<i>tva</i> c.3A/A	0/22	0

表 3 我国黄羽肉鸡品系 *tva* c.3G>A 抗性位点的基因型频率分布

Table 3 Genotypic frequency of *tva* c.3G>A resistance locus in Chinese yellow-feathered broiler lines

品系 Line	样品数/只 No. of samples	基因型 Genotype		
		<i>tva</i> c.3G/G	<i>tva</i> c.3G/A	<i>tva</i> c.3A/A
CB01	60	0.85	0.05	0.10
CB02	50	1	0	0
CB03	36	1	0	0
CB04	30	1	0	0
CB05	48	1	0	0
CB06	60	1	0	0
CB07	30	1	0	0
CB08	60	0.80	0.05	0.15
CB09	30	1	0	0
CB10	60	0.67	0.10	0.23
CB11	35	1	0	0
CB12	45	1	0	0
CB13	60	1	0	0
CB14	30	1	0	0
CB15	36	0.78	0.14	0.08

纯合抗性基因型 *tva* c.3A/A, 其频率分别为 0.10、0.15、0.23 和 0.08, 其余黄羽肉鸡品系所检样品均为野生型 *tva* c.3G/G。

3 讨论与结论

本研究鉴定了中国黄羽肉鸡品系 *tva* 受体基因中存在 1 种自然突变位点, 即 *tva* 基因编码区第 3 位碱基由 G 突变为 A, 引起 *tva* 基因起始密码子序列由 ATG 突变为 ATA, 致使宿主对 ALV-A 体外、体内的感染产生遗传抗性, 证实 *tva* c.3G>A 突

变位点为 ALV-A 的遗传抗性位点。据我们所知, 本研究首次报道了受体基因起始密码子序列突变可以引起宿主遗传性抗特定 ALV 亚群的感染, 这增强了我们对 ALV-A 宿主共同进化的理解。

尽管种鸡群净化策略和生物安全措施已用来控制禽白血病^[20], 但这些传统方法并不能完全消除禽白血病在中国和东南亚国家的发生与流行^[21-22]。ALV 在鸡群中的流行, 致使暴露于 ALV 的宿主可能会受到选择性压力而对 ALV 的感染产生完全抗性或者至少降低了对 ALV 感染的易感性。*tva*、*tvb*、*tvc* 和 *chNEH1* 受体基因分别编码 Tva、Tvb、Tvc 和 NHE1 受体蛋白, 分别介导宿主细胞对 ALV-A、ALV-B/D/E、ALV-C 和 ALV-J 的感染^[14, 23-25]。受体基因的遗传突变会导致受体蛋白的完全缺失或表达一个缺陷型受体蛋白, 从而引起宿主对 ALV 的感染产生遗传抗性。目前, 已在国外某些白来航近交品系和中国肉鸡品系中鉴定了致使宿主细胞对 ALV-A、ALV-B/D/E 和 ALV-C 感染产生遗传抗性的受体基因遗传突变^[16, 24, 26]。Elleder 等^[16]在白来航品系 C 中发现 *tva* 基因第 619 碱基由 C 变为 G(*tva*^{r1}), 引起编码的氨基酸由 Cys 改变为 Trp, 大大降低 ALV-A 囊膜糖蛋白与 Tva 受体的亲和力, 从而对 ALV-A 的感染产生遗传抗性。Elleder 等^[16]在白来航品系 7₂ 中发现 *tva* 基因碱基序列第 305—306 位点插入 CTCG 4 个碱基 (*tva*^{r2}), 导致 Tva 受体蛋白缺失表达, 从而产生对 ALV-A 的抗性。Chen 等^[18]研究发现中国鸡种存在 *tva*^{r3}、*tva*^{r4}、*tva*^{r5} 和 *tva*^{r6} ALV-A 遗传抗性位点, 其为位于 *tva* 受体基因内含子 1 破裂点信号保守区域的 4 种缺失突变, *tva*^{r3} 为 *tva* 基因第 507—516 碱基 (序列为 ACCCCGCCCC) 缺失、*tva*^{r4} 为 *tva* 基因第 507—511 碱基 (序列为 ACCCC) 缺失、*tva*^{r5} 为 *tva* 基因第 502—511 碱基 (序列为 CGCTCACC CC) 缺失、*tva*^{r6} 为 *tva* 基因第 502—516 碱基 (序列为 CGCTCACCCCGCCCC) 缺失, 这 4 种 *tva* 受体基因遗传突变均影响 *tva* 基因 mRNA 的剪切, 降低了 ALV-A 囊膜糖蛋白与 Tva 受体蛋白结合的亲和力, 从而降低宿主细胞对 ALV-A 的易感性。本研究在我国黄羽肉鸡品系中发现 *tva* 受体基因始密码子序列由 ATG 突变为 ATA, 引起 Tva 受体蛋白氨基酸序列第 1 个氨基酸由甲硫氨酸 (M) 改变为异亮氨酸 (I), 推测该突变导致 Tva 受体蛋白的表达完全缺失, 从而引起宿主抗 ALV-A 的感染。

抗病育种是控制禽白血病的有效策略和重要途径, 为评估不同黄羽肉鸡品系对 ALV-A 的遗传

抗性, 本研究对 15 个黄羽肉鸡品系 *tva* c.3G>A 抗性位点进行了基因分型, 结果发现 CB01、CB08、CB10 和 CB15 品系存在 *tva* c.3G>A 抗性位点, 其纯合抗性基因型 *tva* c.3A/A 的频率分别为 0.10、0.15、0.23 和 0.08, 提示这些黄羽肉鸡品系具有良好的抗 ALV-A 遗传改良潜力, 可从这些鸡品系中筛选出培育抗 ALV-A 感染的育种素材, 并运用于 ALV-A 遗传抗性鸡品种的选育, 为实现 A 亚群禽白血抗病育种提供理论依据和技术支撑。

参考文献:

[1] 李德娟, 崔梦笛, 王学静, 等. 禽白血病毒及其受体研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(9): 34-41.

[2] 王鑫, 赵鹏, 崔治中. 我国地方品种鸡分离到的一个禽白血病毒新亚群的鉴定[J]. 病毒学报, 2012, 28(6): 609-614.

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

[4] 崔治中. 禽白血病毒研究的过去、现在和将来[J]. 生命科学, 2012, 24(4): 305-309.

[5] 崔治中. 种鸡场禽白血病防控和净化技术方案[J]. 中国家禽, 2015, 37(23): 1-7.

[6] 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.

[7] SU Q, LI Y, LI W, et al. Molecular characteristics of avian leukosis viruses isolated from indigenous chicken breeds in China[J]. *Poultry Science*, 2018, 97(8): 2917-2925.

[8] 冯敏, 谭利强, 代曼曼, 等. 种禽场 A 亚群禽白血病原学调查及分离株遗传进化分析[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(4): 11-15.

[9] 钱琨, 朱钰峰, 沈海玉, 等. 地方蛋鸡群 A 亚群禽白血病毒的分离与全基因组序列分析[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(10): 1005-1010.

[10] 杨波, 高玉龙, 高宏雷, 等. 我国东北地区野生鸟类 A 亚群禽白血病毒分子流行病学调查及 *env* 基因序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(3): 245-247.

[11] BACON L D, HUNT H D, CHENG H H. A review of the development of chicken lines to resolve genes determining resistance to diseases[J]. *Poultry Science*, 2000, 79(8): 1082-1093.

[12] JIE H, LIU Y P. Breeding for disease resistance in poultry: Opportunities with challenges[J]. *World's Poultry Science Journal*, 2011, 67(4): 687-696.

[13] CHENG H H, KAISER P, LAMONT S J. Integrated genomic approaches to enhance genetic resistance in chickens[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2013, 1: 239-260.

[14] BATES P, YOUNG J A, VARMUS H E. A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor[J]. *Cell*, 1993, 74(6): 1043-1051.

[15] BARNARD R J, ELLEDER D, YOUNG J A. Avian sarcoma and leukosis virus-receptor interactions: From classical genetics to novel insights into virus-cell membrane fusion[J]. *Virology*, 2006, 344(1): 25-29.

[16] ELLEDER D, MELDER D C, TREJBALOVA K, et al. Two different molecular defects in the *Tva* receptor gene explain the resistance of two *tvar* lines of chickens to infection by subgroup A avian sarcoma and leukosis viruses[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(24): 13489-13500.

[17] REINISOVA M, PLACHY J, TREJBALOVA K, et al. Intronic deletions that disrupt mRNA splicing of the *tva* receptor gene result in decreased susceptibility to infection by avian sarcoma and leukosis virus subgroup A[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(4): 2021-2030.

[18] CHEN W, LIU Y, LI H, et al. Intronic deletions of *tva* receptor gene decrease the susceptibility to infection by avian sarcoma and leukosis virus subgroup A[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9900.

[19] LIAO C T, CHEN S Y, CHEN W G, et al. Single nucleotide polymorphism variants within *tva* and *tvb* receptor genes in Chinese chickens[J]. *Poultry Science*, 2014, 93(10): 2482-2489.

[20] KREAGER K S. Chicken industry strategies for control of tumor virus infections[J]. *Poultry Science*, 1998, 77(8): 1213-1216.

[21] MENG F, LI Q, ZHANG Y, et al. Characterization of subgroup J avian leukosis virus isolated from Chinese indigenous chickens[J]. *Virology Journal*, 2018, 15(1): 33.

[22] LI H, TAN M, ZHANG F, et al. Diversity of Avian leukosis virus subgroup J in local chickens, Jiangxi, China[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 4797.

[23] ADKINS H B, BLACKLOW S C, YOUNG J A. Two functionally distinct forms of a retroviral receptor explain the nonreciprocal receptor interference among subgroups B, D, and E avian leukosis viruses[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(8): 3520-3526.

[24] ELLEDER D, STEPANETS V, MELDER D C, et al. The receptor for the subgroup C avian sarcoma and leukosis viruses, *Tvc*, is related to mammalian butyrophilins, members of the immunoglobulin superfamily[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(16): 10408-10419.

[25] CHAI N, BATES P. Na/H exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J avian leukosis virus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(14): 5531-5536.

[26] LI X, CHEN W, ZHANG H, et al. Naturally occurring frameshift mutations in the *tvb* receptor gene are responsible for decreased susceptibility of chicken to infection with avian leukosis virus subgroups B, D, and E[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(8): e01770-e01717.