

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(3):380–386; 4 March 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

敲除 *meq* 的鸡马立克氏病毒强毒株对超强毒的免疫保护作用

苏帅¹, 李延鹏², 孙爱军¹, 赵鹏¹, 丁家波³, 朱鸿飞², 崔治中^{1*}

(¹ 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

(² 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100081)

(³ 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘要:【目的】比较和评价一株敲除了 *meq* 基因的马立克氏病毒(MDV)的致病性及其诱发的保护性免疫作用。【方法】将1日龄SPF鸡150只随机分为5组,每组30只,分别饲养于正压过滤空气的SPF动物饲养隔离罩内。1日龄时,第1和第5组鸡以2000 PFU/只的剂量腹腔接种GX0101Δ*meq*,第2组鸡以2000 PFU/只的剂量腹腔接种CVI988/Rispens疫苗株,第3和第4组鸡不接种任何病毒作为对照组。免疫接种5 d后,第1、2、3组分别以500 PFU/只的剂量攻击MDV超强毒株vv rMd5。饲养90 d,观察死亡情况,对各组死亡鸡只剖检,并取疑似马立克特有病变脏器做石蜡切片,于攻毒后90 d处死全部存活鸡并随机取心脏、肝脏、脾脏做病理切片。【结果】单独接种GX0101Δ*meq*的第5组没有任何马立克氏病临床症状和特有的组织学病变,接种GX0101Δ*meq*再感染超强毒株vv rMd5的第1组也没有马立克氏病特有的组织学病变,但CVI988/Rispens免疫后感染超强毒株vv rMd5的第2组显示马立克氏病特有病变的病理切片比例为9/42,单独接种超强毒株vv rMd5的第3组死亡率为87%,死亡鸡出现肉眼观典型肿瘤率为25%,免疫接种GX0101Δ*meq*和CVI988/Rispens的第1组和第2组对超强毒株vv rMd5攻击的保护指数分别为100%和89%。【结论】本实验构建的MDV *meq* 基因缺失株-GX0101Δ*meq*可在体外稳定复制,不仅对SPF鸡没有致病性和致瘤性,而且能诱导比CVI988/Rispens疫苗株更好的对超强毒MDV的免疫保护效果。

关键词: 马立克氏病病毒; *meq* 基因敲除; 致病性; 致瘤性; 免疫保护作用

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0380-07

马立克氏病(Marek's disease, MD)是鸡的一种传染性肿瘤病,以淋巴组织增生和肿瘤形成为特征。本病由鸡马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)引起,病毒可经空气传播,传染力很强,对未经免疫的易感鸡群可造成很高的死亡率,给养禽业造成重大经济损失。MDV归属于α-疱疹病毒亚科中的马立克氏病毒属,其分为3个紧密联系而又有所不同的血清型,血清I型病毒有致病性,可引起T细胞淋巴瘤以及其它病变。血清II型与III型病毒分

别分离自鸡与火鸡体内,没有致病性。根据MDV的3种血清型,科研工作者研制了血清I型、II型和III型疫苗,目前商品化MDV疫苗为致弱的I型CVI988/Rispens株、无致病性的II型SB1株和III型火鸡疱疹病毒(herpesvirus of turkey, HVT)FC126株^[1-2]。随着超强毒MDV的出现,在此基础上又研制出二价、三价(多价)疫苗^[3-4]。

MD疫苗的广泛应用对控制该病的发生发挥了巨大作用,但传统疫苗也存在着许多的不足之处,随

基金项目: 国家自然科学基金(30671571)

* 通信作者。Tel: +86-538-8241560; Fax: +86-538-8241419; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

作者简介: 苏帅(1985–),男,山东枣庄人,硕士研究生,主要从事动物分子病毒学研究。E-mail: sushuaisdau@163.com

收稿日期: 2009-10-13; **修回日期:** 2009-11-24

着新致病型和毒力型病毒株的不断出现以及毒力的不断增强,当前的疫苗均不能绝对有效地保护鸡免于 MDV 感染,甚至会引起已免疫的鸡群发病;更严重的是,当前使用的 MD 疫苗并不能通过免疫完全消除病毒,免疫鸡仍然能够感染强毒并向环境中排毒,这种情况不可避免地导致了 MDV 的毒力因免疫压力及选择而不断增强^[5]。

传统疫苗的上述不利因素使学者们将研究的方向转向新型疫苗的开发上,近年来发展起来的黏粒 (Cosmid) 系统^[6-9]与细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 系统^[10-11]极大的方便了 MDV 基因组功能的研究。美国禽病与肿瘤实验室利用黏粒系统构建了超强毒株 vv rMd5, 在 BAC 克隆的基础上又构建了敲除 *meq* 基因的突变株-rMd5Δ*meq*。鉴于 *meq* 基因是 MDV 的主要致肿瘤基因^[12], 实验证明该突变株不再具有致病性, 而且在 SPF 鸡上进行的免疫效力实验表明, rMd5Δ*meq* 对 MDV 具有良好的保护效果^[13]。

与黏粒系统相比, BAC 系统存在操作简单、省时省力以及系统稳定的优点, 目前越来越多的研究工作都基于 BAC 系统进行 MDV 基因功能的研究^[14-16], 本实验室于 2001 年在中国广西分离了一株 MDV, 命名为 GX0101^[17], 其毒力介于 GA 株(强毒)与 Md5(超强毒)之间^[18], 本实验室以 BAC 为载体成功地构建了 MDV 野毒株 GX0101 的感染性克隆 bac-GX0101^[19]。

虽然我国有大型鸡场的都已采用了国际市场上最有效的 CVI988/Rispens 株细胞结合疫苗, 但发生马立克氏病肿瘤的投诉仍时有发生。为此, 不论是养禽业还是学术界都试图进一步改进疫苗。鉴于美国利用传染性克隆技术已成功地将超强毒株 Md5 中的两个与致肿瘤相关的 *meq* 基因敲除, 获得的 *meq* 基因缺失株-r Md5Δ*meq* 不仅不再具有致病性, 而且还具有良好的保护性免疫效果。推想, 如果也用类似的技术, 将我国分离的 MDV 野毒株的 *meq* 基因敲除, 有可能构建一个对我国 MDV 流行具有更好免疫保护效果的疫苗株。鉴于实验室已构建了 MDV 野毒株 GX0101 的 BAC 克隆, 本研究将构建 GX0101 的 *meq* 基因缺失株, 并测试其致病性及保护性免疫效力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 SPF 鸡和 MDV 毒株: 9-10 日龄 SPF 鸡胚

购自济南斯帕法斯家禽有限公司, MDV 疫苗株 CVI988/Rispens 为商品疫苗。rMd5^[6]是超强毒 (vv) MDV 参考株由美国农业部禽病与肿瘤研究所馈赠。

1.1.2 主要试剂和仪器: 卡那霉素、氯霉素购自美国 Biosharp 公司, 阿拉伯糖购自北京索莱宝科技有限公司, 抗鸡 IgG 荧光抗体购于 Sigma 公司, 细胞培养基购自美国 Invitrogen 生命技术公司, 细菌培养基购自英国 OXOID 公司。T 载体 pMD18-T、限制性内切酶等均购自 TaKaRa 公司, 其他常规试剂均为国产分析纯。凝胶回收试剂盒为美国 OMEGA 公司产品。质粒抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司。PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。冷冻离心机、电转仪、PCR 仪和分光光度计购于 Eppendorf 公司。凝胶成像系统购于 Bio-Rad 公司。生物安全柜、二氧化碳培养箱购于上海力申科学仪器有限公司。

1.2 GX0101Δ*meq* 的构建

利用 BAC 克隆技术, 本实验室已将一株 MDV 的中国野毒株 GX0101 全基因组克隆进 BAC 载体, 并用该重组克隆 bac-GX0101 的质粒 DNA 转染细胞, 拯救了传染性病毒。在此基础上, 参考 Jarosinski 等的方法^[20], 通过同源重组利用卡那霉素抗性基因 (kanamycin resistance gene, *kan^r*) 取代 bac-GX0101 的两个 *meq* 基因。方法简述如下: 设计引物如下, Δ*Meq*-Kana-F: 5'-AGAAACATGGGGCATA GACGATGTGCTGCTGAGAGTCACAATGCCGATCAG **TGTAGGCTGGAGCTGCTTC**-3', Δ*Meq*-Kana-R: 5'-CTTGACAGGTGTATACCAGGGAGAAGGCCGGGCACGG TACAGGTGTAAAGAGC**ATTCCGGGGATCCGTCGA C**-3', 引物 5' 端分别含有与 MDV 基因组 *meq* 基因的前后 50 bp 序列同源的同源臂 (大写字母), 用来同源重组。引物 3' 端 20 个碱基来源于卡那霉素抗性基因 (斜体加粗), 用来扩增该抗性基因, 所扩增的 *kan^r* 两端含有 34 bp 的 Flp 识别位点 (flp recognition target, FRT)。以质粒 PKD13 为模板, 用 PCR 扩增两端分别为 MDV 基因组 *meq* 基因上游和下游各 50 bp 序列的卡那霉素抗性基因。鉴定 *meq* 基因敲除的上下游引物序列为: *Meq*-F: 5'-CATAGACGAT GTGCTGCTG-3'; *Meq*-R: 5'-GTGCTGGAATGTAA GAATAAA-3', 分别位于 MDV 基因组 *meq* 基因的二侧, 当长度为 1020 bp 的 *meq* 基因没有敲除时扩增片段约 1160 bp, 敲除时扩增片段约 200 bp。

将已用限制酶 *Dpn* I 消化 1 h 的卡那霉素抗性基因的 PCR 产物, 利用电转化仪在 2000 V/100Ω/

25 μ F 的条件下电转化已含有 GX0101-BAC 的大肠杆菌 EL250 中^[19], 转化菌涂于含有卡那霉素抗性的 LB 平板, 放置在生化培养箱 32℃ 培养 16 h 后挑取单菌落, 利用 PCR 鉴定 kan^r 是否取代了 *meq* 基因^[10]。验证成功后, 用 0.1% 的阿拉伯糖诱导表达 FLP 重组酶, FLP 重组酶能够识别卡那霉素抗性基因两侧 34 bp 的 FRT 位点, 通过位点特异性重组将中间的卡那霉素抗性基因去除, 仅在作用位点处留下一个单拷贝 FRT 位点^[20]。经 PCR 确认后再利用同样的方法利用 kan^r 取代另外一个 *meq* 基因。将敲除两个 *meq* 基因的 BAC DNA 经 PCR 验证后转染 CEF^[21], 拯救的 *meq* 基因缺失病毒命名为 GX0101 Δ *meq* (构建该基因缺失株的操作过程另文详细叙述)。

1.3 CVI988/Rispens 疫苗株感染细胞作为抗原检测鸡血清中特异性抗体

将 MDV 疫苗株 CVI988/Rispens 接种新鲜的鸡胚成纤维细胞 (CEF), 待出现 MD 蚀斑, 将瓶中的细胞传到 96 孔板上, 出现 MD 蚀斑后, 用冷的丙酮:乙醇 (3:2) 固定液固定 8 min, 置于冰箱中保存备用。在检测抗体前, 用 PBS 洗 1 次, 将鸡血清按 10 倍逐级稀释, 加到 96 孔板中, 放 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中反应 45 min 取出后, 用 PBS 洗 3 次, 将水分甩干, 加上 FITC 标记的抗鸡 IgG 荧光抗体 (购于 Sigma 公司, 按说明书用 PBS 配制工作浓度) 50 μ L, 放 37℃ 恒温箱中反应 45 min, 取出后, 用 PBS 洗 3 次, 将水分甩干, 加上 50% 的甘油。在倒置荧光显微镜下观察, 以能显示 MDV 蚀斑荧光的血清最大稀释倍数为其抗体效价。

1.4 敲除 *meq* 基因的重组 GX0101 对 SPF 鸡的保护性免疫作用

为了研究 GX0101 Δ *meq* 在实验室条件下的免疫保护效果, 将 1 日龄 SPF 鸡 150 只随机分为 5 组, 每组 30 只, 分别饲养于 5 个带有正压过滤空气的 SPF 动物饲养隔离罩内。1 日龄时第 1 组鸡以 2000 PFU/只的剂量腹腔接种 GX0101 Δ *meq*, 第 2 组鸡以 2000 PFU/只的剂量腹腔接种 CVI988/Rispens 疫苗株, 第 3 组为攻毒对照组, 第 4 组为空白对照组, 第 5 组鸡以 2000 PFU/只的剂量腹腔接种 GX0101 Δ *meq*。免疫接种 5 天后, 第 1、2、3 组分别以 500 PFU/只的剂量攻击 MDV 超强毒株 vv rMd5。攻毒后每周观察鸡的生长态势。实验期间, 对各组死亡鸡只剖检, 并取疑似马立克特病病变脏器做石蜡切片, HE 染色后进行病理组织学观察。在攻毒后 90 天, 所有的存活鸡均被处死并剖检, 观察鸡的病

变, 同时, 每组随机选取 5 只, 分别取心脏、脾、肝脏于 10% 中性福尔马林固定, 4℃ 保存。石蜡切片, HE 染色, 进行病理组织学观察。

GX0101 Δ *meq* 免疫感染 vv rMd5 组与 CVI988/Rispens 免疫感染 vv rMd5 组以及攻毒对照组的鸡死亡后观察病变, 记录实验期间的死亡率以及 MD 引起的病变情况。每一组鸡的 MD 病变百分数由病变鸡除以存活鸡与死亡鸡的总和乘以 100 得来。疫苗免疫效力由保护指数 (PI)^[13] 来确定, PI 计算方法为攻毒对照组的鸡产生 MD 病变百分数减去免疫组鸡产生 MD 病变百分数再除以攻毒对照组鸡产生 MD 病变百分数乘以 100, 为了增加结果的客观性, 实验重复一次。

2 结果

2.1 GX0101 Δ *meq* 中敲除 *meq* 基因的验证

当以分别位于 *meq* 基因的二侧的序列作为一对引物做 PCR 时, 从未敲除 *meq* 基因的 GX0101 扩增出约 1160 bp 片段, 从敲除了 *meq* 基因的 GX0101 Δ *meq* 扩增出的片段仅约 200 bp 片段, 所得 PCR 产物与预期大小相符 (图 1)。对扩增产物测序表明, GX0101 Δ *meq* 中的 *meq* 基因确实已被敲除掉。

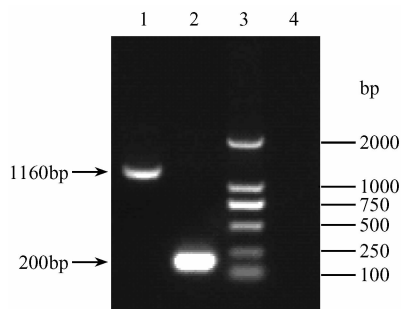


图 1 比较 GX0101 和 GX0101 Δ *meq* *meq* 基因敲除前后的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification for normal and deletion the *meq* oncogene of GX0101. 1: GX0101; 2: GX0101 Δ *meq*; 3: DL2000 marker 4: Negative control.

2.2 GX0101 Δ *meq* 免疫、vv rMd5 攻毒鸡的临床与剖检观察

与空白对照组相比, 攻毒对照组的鸡感染 vv rMd5 后鸡群个体小且大小不均, 生长发育状况差, 羽毛粗乱、无光泽, 共济失调, 陆续死亡 (图 2)。GX0101 Δ *meq* 和 CVI988/Rispens 免疫组的鸡感染 vv rMd5 后个体大小均一, 长势正常。攻毒后 90 天, GX0101 Δ *meq* 免疫组没有鸡只死亡, CVI988/Rispens 免疫组有 6 只死亡。仅免疫 GX0101 Δ *meq* 鸡组群个

体大小均匀,长势正常,没有鸡只死亡。攻毒对照组有 52 只鸡死亡。在攻毒后 90 天把所有存活鸡处死并剖检,进行肉眼观察。与空白对照组相比,攻毒对照组肝脏、脾脏、心脏肿瘤明显,CVI988/Rispens 免疫鸡有极个别表现轻微的 MDV 症状外(无肉眼可见明显病变),其余鸡均正常,而 GX0101Δmeq 免疫后感染 vv rMd5 组以及没有感染 vv rMd5 组所有鸡均正常。

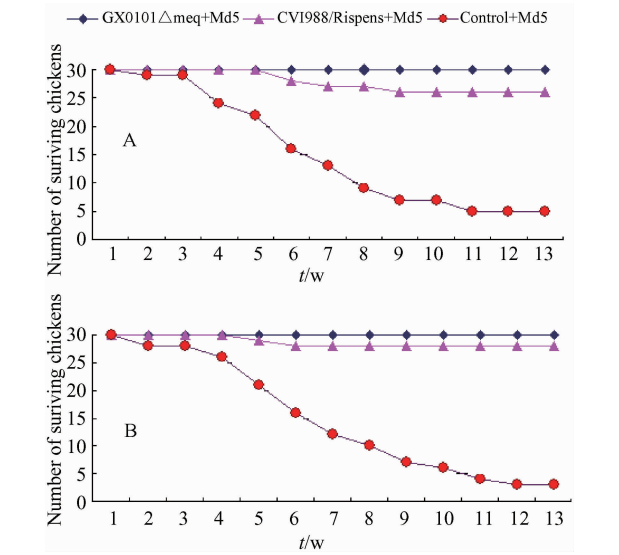


图 2 经 GX0101Δmeq 和 CVI988/Rispens 免疫鸡再用 vv rMd5 攻毒后的死亡曲线

Fig. 2 Mortality curves after vv MDV-challenge in chickens vaccinated with GX0101Δmeq or CVI988/Rispens and the control group. A: The mortality curve of the first experiment; B: The mortality curve of the repeat experiment. Each chicken was inoculated with 2000 PFU of the indicated viruses at 1 day of age and maintained in isolation for 13 weeks. Non-immunization group served as the negative control. The three experimental groups were challenged with 500 PFU of vv rMd5 strain on day 5 after immunization. The mortalities of different groups were recorded weekly. Dead chickens during the experiment were evaluated for MDV-specific gross lesions.

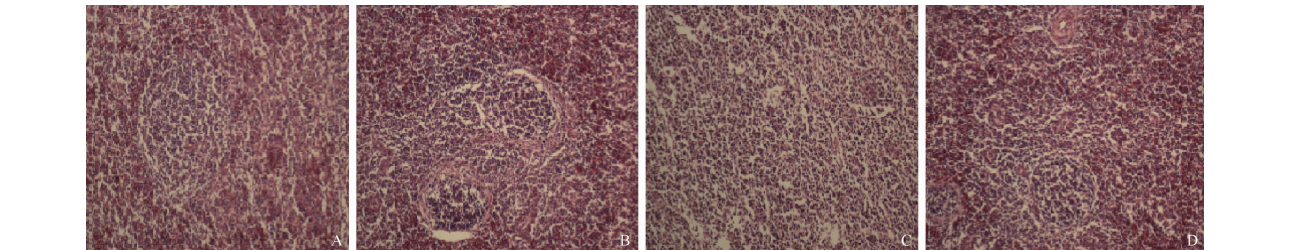


图 3 各组鸡感染 vv rMd5 后 90 天剖杀的脾脏病理组织切片 (H. E 染色,200 ×)

Fig. 3 Comparisons of spleen histo-sections from chickens sacrificed 90 days after challenge with vv rMd5 in different groups (H. E, 200 ×). A: Vaccinated with CVI988/Rispens and then challenged with vv rMd5 in group 2; B: Vaccinated with GX0101Δmeq and then challenged with vv rMd5 in group 1; C. Only challenged with vv rMd5 in group 3; D. Normal control in group 4.

2.3 GX0101Δmeq 免疫、vv rMd5 攻毒鸡的病理变化

整个实验过程,每组鸡只死亡都做剖检,并取疑似马立克病特有病变脏器做石蜡切片,以进一步作出判断是否有典型病变。GX0101Δmeq 不仅对鸡没有致病性,并且 GX0101Δmeq 免疫后还能完全预防 vv rMd5 攻毒的死亡(表 1)。为了更细致的观察 GX0101Δmeq 的致病性以及免疫保护性,各组随机取了 5 只鸡分别取心脏、肝脏、脾脏进行了组织病理学观察,结果显示,空白对照组显示马立克病特有病变切片比例为 0/30,GX0101Δmeq 免疫、vv rMd5 攻毒组显示特有病变切片比例为 0/30,GX0101Δmeq 免疫、vv rMd5 未攻毒组显示特有病变切片比例为 0/30, CVI988/Rispens 免疫组病变比例为 9/42,而攻毒对照组的马立克氏病组织损伤明显,病变切片比例为 100/108。图 3 为脾脏病理图,由图可见, GX0101Δmeq 免疫组与空白对照组脾红白髓结构正常,CVI988/Rispens 免疫组部分鸡脾脏红白髓结构正常但白髓区域较疏松,而攻毒对照组红白髓正常结构消失且无生发中心结构,多为大中小淋巴细胞,间质结缔组织增生,结构疏松,出现较大空隙。

表 1 经 GX0101Δmeq 免疫鸡对超强毒 MDV 致癌性的预防作用

Table 1 Preventive effect of GX0101Δmeq vaccination on tumorigenesis induced by vvMDV.			
Virus		Died/no. tested	Tumors/no. tested
Experiment 1	rMd5	25/30	8/30
	GX0101Δmeq + rMd5	0/30	0/30
	GX0101Δmeq	0/30	0/30
Experiment 2	rMd5	27/30	7/30
	GX0101Δmeq + rMd5	0/30	0/30
	GX0101Δmeq	0/30	0/30

Each chicken was inoculated with 2000 PFU of the indicated virus by subcutaneous route and challenged with 500 PFU of vv rMd5 5 days later.

2. 4 GX0101 和 GX0101Δmeq 诱发抗体水平比较

5 周龄时,检测了 8 只仅接种 GX0101Δmeq 的鸡对 MDV 的抗体阳性率为 100%,其诱发的抗体效价为 4. 58 ±0. 14(Log10),而 6 只仅用 GX0101 攻毒鸡诱发的抗体效价为 4. 25 ±0. 29(Log10),差异显著。这一结果表明,不仅 GX0101Δmeq 对鸡没有致病性,而且在鸡诱发特异性抗体的能力明显高于其原始病毒 GX0101。

2. 5 meq 基因敲除毒株 GX0101 对 SPF 鸡的免疫保护作用

通过观察在 SPF 鸡群中攻超强毒 vv rMd5 后产生的保护效果,比较了 GX0101Δmeq 作为候选疫苗

和 CVI988/Rispens 疫苗的保护率。未免疫 SPF 鸡群表现出 97% 的马立克病的特有的死亡和组织损伤现象(表 2),经 GX0101Δmeq 免疫后,vv rMd5 攻毒组以及未攻毒组的全部鸡均没有出现这种现象,并且后者的全部鸡与空白对照组相比,大小均一,长势正常,没有任何病变,组织切片正常,表明 GX0101Δmeq 对鸡体无致癌作用。而 CVI988/Rispens 免疫、vv rMd5 攻毒的 SPF 鸡群则分别表现出 11% 的 MD 轻微症状。因此,基于 MD 的发生率判断, GX0101Δmeq 和 CVI988/Rispens 对超强毒 rMd5 的免疫保护指数分别为 100% 和 89%。

表 2 GX0101Δmeq 对 SPF 鸡的致病性及其免疫保护效果
Table 2 Pathogenicity and immunoprotective efficacy of GX0101Δmeq in SPF chickens

Vaccines	Challenged with	Experiment 1			Experiment 2			Summary		
		MD mortality/%	MD lesions/%	PI	MD mortality/%	MD lesions/%	PI	MD mortality/%	MD lesions/%	PI ^a
GX0101Δmeq	rMd5	0/30(0)	0/30(0)	100	0/30(0)	0/30(0)	100	0/60(0)	0/60(0)	100 ^a
CVI988/Rispens	rMd5	4/30(13)	4/30(13)	87	2/30(6. 7)	3/30(10)	89	6/60(10)	7/60(11)	89 ^b
-	rMd5	25/30(83)	30/30(100)	-	27/30(90)	28/30(93)	-	52/60(87)	58/60(97)	-
-	-	0/30(0)	0/30(0)	-	0/30(0)	0/30(0)	-	0/60(0)	0/60(0)	-
GX0101Δmeq	-	0/30(0)	0/30(0)	-	0/30(0)	0/30(0)	-	0/60(0)	0/60(0)	-

Note: One-day-old SPF chickens were vaccinated with the GX0101Δmeq or CVI988/Rispens vaccine and challenged 5days later with vv rMd5 strain. Mortality were observed for 13weeks after chickens challenged with vv rMd5 strain. , and both dead and survival chickens necropsies were subjected to examinations. PI = protection index. ^aindicates significant difference (p <0. 05) in PI among the two experimental groups.

3 讨论

自 1968 年首次分离 MDV 以来^[22],养禽业采用疫苗免疫来预防 MD 已有近 40 年的历史了,但随着 MDV 的致病性在不断演化,MDV 的毒力和致病性逐渐增强,因而所用的疫苗从 III 型 HVT 单价疫苗到 II 型 SB-1 加 HVT 双价疫苗,最后不得不用致弱的 I 型 CVI988/Rispens 疫苗株。

从鸡群中 MDV 的流行来看,已从以弱病毒株(mMDV)为主,到以强病毒株(vMDV)为主,以至近 10 年来超强病毒(vvMDV)株越来越普遍,并出现了特超强病毒株(vv + MDV)^[5]。面对常规疫苗几乎即将无效的现实,科学家利用各种方法构建了各种 MDV 候选疫苗,但其免疫效果并不比 CVI988/Rispens 更好^[3, 23-25]。按照 MDV 演变规律,其毒力很有可能会在今后几年变得更强^[26],近年来,在我国,即使在一些已用 CVI988/Rispens 免疫的鸡群,仍有肿瘤发生率上升的趋势,虽然国内还没有相关分离到特超强毒株的报道,但 MDV 却一直在进行着变异,本实验室分离的野毒株 GX0101,其毒力虽比 Md5(超强毒)小,但其横向传播能力却远远大于 Md5^[18],序列分析发现,其基因组中重组进一段禽

网状内皮增殖病毒(REV)的部分 LTR 序列,是我国南方地区分离到的一个流行株^[17]。本实验室利用 BAC 系统敲除 LTR 序列后的动物实验也表明,LTR 的插入不是增强 GX0101 毒株的致病性和致肿瘤能力,而是增强了 GX0101 毒株的横向传播能力,从而使 GX0101 毒株具有一定的竞争优势,成为流行毒株(待发表资料)。由于国内还没有出现特超强毒(648A)的报道,所以我们敲除中国特有的马立克氏病毒流行株-GX0101 毒株的 meq 基因,并证明其免疫可抵御超强毒 Md5 的攻击,同时进一步证明了 meq 基因的致癌性。

近年来,使用商品疫苗 CVI988/Rispens 株免疫后,鸡群中出现瘫痪的现象时有发生。为了对现有疫苗进行改进和更有效地控制鸡马立克氏病,国外实验室已经鉴定出 MDV 的许多致病基因^[6-7, 20]。本实验室利用 BAC 系统敲除了野外分离株 GX0101 的 meq 基因,对敲除 meq 基因的 GX0101Δmeq 进行的致病性分析发现,与原始毒 GX0101 相比, GX0101Δmeq 对鸡没有造成任何肉眼与显微镜观察可见的病变损伤或死亡。基于上述原因,考察了 GX0101Δmeq 作为潜在候选疫苗对 SPF 鸡的免疫保护效果,结果显示,免疫 GX0101Δmeq 后以 vv rMd5

攻毒,所有 SPF 鸡均长势良好,没有出现 MDV 特有的病变,100% 的鸡均受到良好保护。就免疫保护效果而言,GX0101 Δ meq 较 CVI988/Rispens 疫苗株免疫能更有效地保护异源强毒株 MDV 导致的淋巴瘤发生和死亡。

目前寻求 MD 弱毒苗的传统方法所需周期很长且已经停滞不前(自上世纪 70 年代 CVI988 被分离到并上市以来,还没有更好的疫苗被开发出来)^[25],利用基因工程手段可以大大加快 MD 疫苗的研发进程。到目前为止,与其它敲除了一些复制非必须基因的重组病毒(毒力虽然减弱,但依旧有致瘤性)相比,敲除 *meq* 基因可以完全丧失 MDV 的致瘤性,因此,可以设想,当破坏力强的优势 MDV 爆发后,现有的疫苗不能提供有效的交叉保护时,就可以分离优势毒株,并以致病性基因的缺失株作为疫苗来对毒力不断变异的 MDV 提供持续的保护,为 MD 的防治提供新的思路与技术平台。

总之,*meq* 基因缺失株 MDV 的致病性完全丧失,具有良好的保护效果,但是作为疫苗,还需要去除重组病毒中的卡那霉素和氯霉素抗性基因。同时,作为一种新型疫苗,其生物安全性还需要大量的田间实验来进一步证实。

参考文献

- [1] Rispens BH, van Vloten H, Mastenbroek N, et al. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Diseases*, 1972, 16 (1): 108-125.
- [2] Schat KA, Calnek BW. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *Journal of The National Cancer Institute*, 1978, 60 (5): 1075-1082.
- [3] Witter RL. Protection by attenuated and polyvalent vaccines against highly virulent strains of Marek's disease virus. *Avian Pathology*, 1982, 11 (1): 49-62.
- [4] Schat KA, Calnek BW, Fabricant J. Characterisation of two highly oncogenic strains of Marek's disease virus. *Avian Pathology*, 1982, 11 (4): 593-605.
- [5] Witter RL. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Diseases*, 1997, 41 (1): 149-163.
- [6] Reddy SM, Lupiani B, Gimeno IM, et al. Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 2002, 99 (10): 7054-7059.
- [7] Cui X, Lee LF, Hunt HD, et al. A Marek's disease virus vIL-8 deletion mutant has attenuated virulence and confers protection against challenge with a very virulent plus strain. *Avian Disease*, 2005, 49 (2): 199-206.
- [8] Cui X, Lee LF, Reed WM, et al. Marek's disease virus-encoded vIL-8 gene is involved in early cytolytic infection but dispensable for establishment of latency. *Journal of Virology*, 2004, 78 (9): 4753-4760.
- [9] Lupiani B, Lee LF, Cui X, et al. Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 2004, 101 (32): 11815-11820.
- [10] Schumacher D, Tischer BK, Fuchs W, et al. Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *Journal of Virology*, 2000, 74 (23): 11088-11098.
- [11] Petherbridge L, Howes K, Baigent SJ, et al. Replication-competent bacterial artificial chromosomes of Marek's disease virus: novel tools for generation of molecularly defined herpesvirus vaccines. *Journal of Virology*, 2003, 77 (16): 8712-8718.
- [12] Osteorieder N, Kamil JP, Schumacher D, et al. Marek's disease virus: from miasm to model. *Microbiology*, 2006, 4: 283-294.
- [13] Lee LF, Lupiani B, Silva RF, et al. Recombinant Marek's disease virus (MDV) lacking the Meq oncogene confers protection against challenge with a very virulent plus strain of MDV. *Vaccine*, 2008, 26 (15): 1887-1892.
- [14] Niikura M, Dodgson J, Cheng H. Direct evidence of host genome acquisition by the alphaherpesvirus Marek's disease virus. *Archives of Virology*, 2006, 151 (3): 537-549.
- [15] Baigent SJ, Petherbridge LJ, Smith LP, et al. Herpesvirus of turkey reconstituted from bacterial artificial chromosome clones induces protection against Marek's disease. *Journal of General Virology*, 2006, 87 (Pt 4): 769-776.
- [16] Cui HY, Wang YF, Shi XM, et al. Construction of an infectious Marek's disease virus bacterial artificial chromosome and characterization of protection induced in chickens. *Journal of Virological Methods*, 2009, 156 (1-2): 66-72.
- [17] Zhang Z, Cui ZZ. Isolation of recombinant field strains of Marek's disease virus integrated with reticuloendotheliosis virus genome fragments. *Science in China(Life Sciences)*, 2005, 48 (1): 81-88.
- [18] 许晓云,孙爱军,崔言顺,等. 带有 REV-LTR 片段的马立克氏病病毒重组野毒株与超强毒株致病性和横向传播性比较. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49 (4): 540 - 543.

- [19] 孙爱军, Petherbridge L, Zhao YG, 等. 带有 REV-LTR 片段的 MDV 野毒株 GX0101 BAC 克隆的构建及拯救病毒的致病性分析. *科学通报 (Chinese Science Bulletin)*, 2009, 54 (11): 1541-46.
- [20] Jarosinski KW, Osterrieder N, Nair VK, et al. Attenuation of Marek's disease virus by deletion of open reading frame RLORF4 but not RLORF5a. *Journal of Virology*, 2005, 79 (18): 11647-11659.
- [21] Morgan RW, Cantello JL, McDermott CH. Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. *Avian Diseases*, 1990, 34: 345-351.
- [22] Churchill A E. Herpes-type virus isolated in cell culture from tumors of chickens with Marek's disease I. Studies in cell culture. *Journal of The National Cancer Institute*, 1968, 41 (4): 939-950.
- [23] Churchill AE, Chubb RC, Baxendale W. The attenuation, with loss of oncogenicity, of the herpes-type virus of Marek's disease (strain HPRS-16) on passage in cell culture. *Journal of General Virology*, 1969, 4 (4): 557-564.
- [24] Nazerian K. Attenuation of Marek's disease virus and study of its properties in two different cell cultures. *Journal of The National Cancer Institute*, 1970, 44 (6): 1257-1267.
- [25] Witter RL, Kreager KS. Serotype 1 viruses modified by backpassage or insertional mutagenesis: approaching the threshold of vaccine efficacy in Marek's disease. *Avian Diseases*, 2004, 48 (4): 768-782.
- [26] Gimeno IM. Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow. *Vaccine*, 2008, 26 Suppl 3 C31-41.

Protective immunity of a *meq*-deleted Marek's disease virus against very virulent virus challenge in chickens

Shuai Su¹, Yanpeng Li², Aijun Sun¹, Peng Zhao¹, Jiabo Ding³, Hongfei Zhu¹, Zhizhong Cui^{1*}

(¹Animal Science and Technology College, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

(²Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

(³China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the pathogenicity and immunoprotective effect of a wild strain of Marek's Disease Virus (MDV) after deleting of its *meq* oncogene. [Methods] Total 150 one-day-old SPF chickens were divided into 5 groups of 30 birds each and kept in 5 isolators with positive pressure-filtered air. At first day, 2000 PFU of *meq*-deleted GX0101Δ*meq* were inoculated intra-abdominally (i. a.) into each bird in groups 1 and 5, 2000 PFU of commercial vaccine CVI988/Rispens were injected i. a. for group 2. No viral challenge was made in groups 3 and 4 as controls. Five days later, chickens in groups 1, 2, 3 were challenged i. a. with very virulent (vv) MDV strain rMd5. During 90 days after challenge, all dead birds were recorded and checked for necropsy. The tumor-suspected tissues were examined by histo-sections. In the end, all survival birds were killed for necropsy. The samples of heart, liver and spleen were collected for histo-sections. [Results] Challenge with vv rMd5 caused 87% mortality and 25% of dead birds with gross tumors in non-vaccinated chickens of group 3 but there was no mortality in group 5 inoculated with GX0101Δ*meq*. Commercial vaccine CVI988/Rispens gave 89% protective index against vv rMd5 challenge and there were 9/42 histo-sections with suspected lymphocyte filtrated nodules in group 2. But vaccination with GX0101Δ*meq* provided 100% protective index against challenge with vv rMd5 and there was no tumor lesion even in histo-sections in group 1. [Conclusion] The *meq*-deleted mutant GX0101Δ*meq* is able to replicate in cell cultures stably, it has no pathogenicity and oncogenicity to chickens and is able to induce better protective immunity against vvMDV challenge than commercial vaccine CVI988/Rispens.

Keywords: Marek's disease virus; *meq* gene deletion; pathogenicity; oncogenicity; protective immunity

(本文责编:张晓丽)