

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (11):1353 – 1361; 4 November 2014
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.013

敲除 *Meq* 基因的重组鸡马立克氏病毒与 CVI988/Rispens 疫苗株免疫保护效力的比较

段伦涛[#], 苏帅[#], 王一新, 李思菲, 孙鹏, 陈文青, 崔治中^{*}

山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018

摘要:【目的】比较敲除 *meq* 基因的马立克氏病毒 (MDV) 与标准疫苗株 CVI988/Rispens 对 MDV 超强毒 GX0101 攻毒的免疫保护作用。【方法】本实验将 1 日龄 SPF 鸡 120 只随机分成 4 组, 每组 30 只, 分别饲养在正压过滤空气的 SPF 动物饲养隔离罩内。1 日龄时, 第 1 组鸡以 2000PFU/只的剂量颈部皮下接种 SC9-1; 第 2 组鸡以 2000PFU/只的剂量颈部皮下接种 CVI988/Rispens; 第 3、4 组为不免疫攻毒对照组。免疫接种后 5 d 后, 第 1、2、3 组分别以 2000PFU/只的剂量腹腔接种 MDV GX0101。饲养至 90 日龄, 记录死亡情况, 对死亡鸡只剖检, 并取疑似马立克特有病变脏器做病理切片。期间, 检测不同免疫状态下病毒 GX0101 的增殖动态以及禽流感、新城疫灭活苗在鸡体诱导产生抗体的水平。对含有 MDV 母源抗体的海兰褐鸡的试验方案与 SPF 鸡一致。【结果】SC9-1 株免疫对感染 MDV GX0101 攻击 SPF 鸡、海兰褐鸡均提供 100% 的免疫保护作用; CVI988/Rispens 对 SPF 鸡、海兰褐鸡分别提供 86.7%、93% 的免疫保护作用。未免疫 SPF 鸡攻毒组死亡率为 53.3%, 肿瘤率为 16.7%; 未免疫海兰褐鸡攻毒组死亡率为 36.7%, 肿瘤率为 6.67%; 相比, 空白对照组鸡只没有任何病变及死亡。荧光定量结果显示, 淋巴细胞和羽毛囊 DNA 中, SC9-1 免疫组鸡体内 GX0101 的病毒拷贝数显著低于 CVI988/Rispens 免疫组。血凝抑制试验结果显示, SC9-1 免疫攻毒组鸡的产生的 AIV、NDV 抗体水平高于 CVI988/Rispens 免疫攻毒组。【结论】SC9-1 株免疫无论在 SPF 鸡还是含有 MDV 母源抗体的海兰褐鸡均能提供比 CVI988/Rispens 更好的免疫保护效果。

关键词: 马立克氏病毒, SC9-1, 标准疫苗株 CVI988/Rispens, 基因 *meq*, 免疫保护作用

中图分类号: R37 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 11-1353-09

马立克氏病 (Marek's disease, MD) 是由马立克氏病毒 (Marek's disease virus, MDV) 引起的鸡的一种肿瘤性疾病, 病毒可经空气、灰尘传播, 具有较强的传染力^[1], 对未免疫的鸡群可造成很高的死亡

率, 给养禽业带来了重大的经济损失。MDV 分为 3 个血清型, 血清 I 型可引起 T 细胞淋巴瘤, 血清 II 型和血清 III 型没有致病性。根据血清型的不同, 目前商品化的 MDV 疫苗主要有 I 型 CVI988/Rispens

基金项目: 国家自然科学基金广东省联合基金项目 (U1131005)

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

作者简介: [#] 并列第一作者。段伦涛 (1987 -), 男, 山东淄博人, 硕士研究生, 主要从事动物分子病毒学研究, E-mail: dlt15069845856@163.com; 苏帅 (1985 -), 男, 山东滕州人, 博士研究生, 主要从事动物分子病毒学研究, E-mail: ssu6307@163.com

收稿日期: 2014-01-27; **修回日期:** 2014-03-10

株, II 型 SB1 株和 III 型 HVT FC126 株^[2-4]。MDV 疫苗的广泛应用对控制 MDV 的爆发发挥了巨大作用,但是随着疫苗的使用,MDV 的毒力不断增强^[5-6]。传统疫苗很难提供完全的保护效果,即使已经使用 MDV 商品化疫苗 CVI988/Rispens 免疫的鸡场也常有 MDV 野毒引起的肿瘤发生。

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。令人庆幸的是美国禽病与肿瘤实验室利用黏粒系统^[7]构建了超强毒株 vv rMd5,在 BAC 克隆^[8]的基础上构建了敲除 *meq* 基因的突变株 Δ rMd5 Δ meq,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,rMd5 Δ meq 对 MDV 具有良好的保护效果。近年来,越来越多的人关注重组禽网状内皮组织增生病毒 LTR 对 MDV 生物学活性的影响,利用同源重组技术构建了不同的重组 MDV。2013 年,Lupiani 等构建了含有 REV-LTR 的重组 MDV CVI988/Rispens,证实 REV-LTR 插入能够提高 CVI988/Rispens 的增殖能力和保护能力^[9]。

2001 年,本实验室从广西已经免疫过 CVI988/Rispens 疫苗的某蛋鸡场分离到自然重组病毒 GX0101^[10],在其基因组中整合有 REV-LTR 片段,具有较强的横向传播能力和致病性,为 MDV 超强毒^[11-12]。

在 GX0101 的感染性克隆 bac-GX0101 基础上,本实验室利用同源重组技术将 GX0101 的致瘤基因 *meq* 敲除掉,构建了 GX0101 Δ meq^[13],证实 GX0101 Δ meq 对 SPF 鸡不再具有致病性,并且能诱导比 CVI988/Rispens 更好的对 MDV 超强毒 Md5 免疫保护效果^[24]。但是作为 MDV 候选疫苗, GX0101 Δ meq 依然含有卡那霉素抗性基因,苏帅等敲除掉卡那霉素抗性基因,筛选出具有良好复制能力的毒株,命名为 SC9-1 (文章待发表)。为了评价 SC9-1 的免疫效力,本研究比较了 SC9-1 与商品化疫苗 CVI988/Rispens 对 SPF 鸡以及含有 MDV 母源抗体海兰褐鸡对 MDV 超强毒 GX0101 的免疫保护效果。更进一步通过免疫后攻毒,检测病毒的增殖动态以及灭活苗在机体内诱导抗体水平,比较 SC9-1 与商品化疫苗 CVI988/Rispens 的免疫效力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及病毒:SPF 鸡购自济南斯帕法斯家禽有限公司,海蓝褐鸡购自泰安东岳种禽有限公司, MDV GX0101^[10] 由本实验室分离保存, CVI988/Rispens 为商品疫苗, SC9-1 毒株^[14] 由本实验室提供。

1.1.2 主要试剂和仪器:DMEM 购自 HyClone 公司,淋巴细胞分离液、红细胞裂解液、平衡酚均购自 Solarbio 公司,氯仿,无水乙醇,低温离心机购自 BECKMAN COULTER 公司,SYBR Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) 试剂盒购自 TaKaRa 公司,7500 荧光定量 PCR 仪购自 ABI 公司,分光光度计购于 Eppendorf 公司。

1.2 SC9-1 对 SPF 鸡的免疫保护作用

为了评价 SC9-1 毒株与商品化疫苗 CVI988/Rispens 株对 SPF 鸡感染 MDV GX0101 的免疫保护作用,将 120 只 1 日龄 SPF 鸡随机分为 4 组,每组 30 只,饲养于 4 个正压过滤空气的 SPF 动物隔离罩内。1 日龄,第 1 组鸡以 2000PFU/只的剂量颈部皮下注射 SC9-1,第 2 组鸡以 2000PFU/只的剂量颈部皮下注射 CVI988/Rispens 株,第 3 组鸡作为攻毒对照组,第 4 组为空白对照组。免疫后 5 天,1、2、3 组分别以 2000PFU/只的剂量腹腔接种 MDV GX0101,4 组不做任何处理。攻毒后每周观察鸡的生长态势。饲养至 90 日龄,实验期间,做好各组的死亡情况记录,并剖检各组的死亡鸡只,将疑似马立克特病变的器官做石蜡切片,HE 染色进行病理组织学观察,统计肿瘤病理变化的情况。

1.3 SC9-1 对海蓝褐鸡的免疫保护作用

为了评价 SC9-1 毒株与 CVI988/Rispens 对含有 MDV 母源抗体的海兰褐鸡感染 GX0101 株的免疫保护作用,利用海蓝褐鸡进行平行式重复试验,试验设计如 1.2。

1.4 检测 SC9-1 免疫后 GX0101 接种病毒的增殖动态

为了研究在 SC9-1 和 CVI988/Rispens 两种免疫状态下 GX0101 病毒在鸡体内的增殖动态,每个组随机选取 6 只鸡并编号,在攻毒后 5、10、14、21、28 天,采集抗凝血以及羽毛囊,提取淋巴细胞、羽毛囊

DNA。通过分光光度计定量后稀释到大约 50ng/ul, 作为荧光定量模板。利用 SYBR GREEN 实时荧光定量 PCR 的方法对鸡体内的 GX0101 病毒拷贝数进行绝对定量。

1.4.1 检测 MDV GX0101 的荧光定量 PCR 方法的建立:设计针对 *meq* 基因的荧光定量 PCR,检测免疫 SC9-1 后攻毒 GX0101 的增殖动态;同时,设计针对 REV-LTR 序列的荧光定量 PCR,检测免疫 CVI988/Rispens 后攻毒 GX0101 的增殖动态^[13] (表

1)。反应体系如下: SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (2 ×) 10 μL, PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, Rox Reference Dye II (50 ×) 0.4 μL, Template DNA 2 μL, ddH₂O 6.8 μL, 总体积 20 μL。扩增条件:95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 min。根据荧光定量 PCR 的 CT 值,计算 GX0101 的病毒拷贝数。

表 1. 检测 MDV GX0101 和 REV-LTR 的荧光定量 PCR 引物
Table 1. The primers for Real-time PCR detection of MDV strain GX0101 and REV-LTR

primer	sequences (5'→3')	products size/bp	use of primer
Meq-F	GACGCCGCTCGGAGAAGAC	175	used as the SYBR Green Real-time PCR primers to detect MDV GX0101 <i>meq</i> .
Meq-R	CCATAGGGCAAACCTGGCTCAT		
LTR-F	TATCATTTCGGAATCGGCATC	317	used as the SYBR Green Real-time PCR primers to detect MDV GX0101 LTR.
LTR-R	AAATCTCCTCTCACTGCCAATCT		

1.4.2 检测 MDV GX0101 的荧光定量 PCR 标准曲线的制备:提取感染 GX0101 病毒的 CEF 细胞的 DNA,通过以下 2 对引物扩增 *meq* 和 LTR 基因片段 (表 2),克隆进 PMD18-T 载体,阳性质粒分别命名

为 PMD-meq、PMD-LTR,计算其拷贝数。将 PMD-meq、PMD-LTR 质粒逐级稀释为 10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷ 个拷贝每 2 μL 作为模板,利用荧光定量 PCR 检测对应的 CT 值,以此制备标准曲线。

表 2. 扩增 *meq*、LTR 基因片段的 PCR 引物
Table 2. The PCR primers for the amplification of *meq* and LTR

primer	sequences (5'→3')	products size/bp	use of primer
Meq-BF	TAGGCAGGCCTCTCTTGCAGGT	1242	the PCR primers of <i>meq</i> -amplified to built standard curve
Meq-BR	CCCCAGAGGATTTTTTATGTCAG		
LTR-BF	CTTAGCCGCCATTGCTACTTGATA	362	the PCR primers of LTR-amplified to built standard curve
LTR-BR	AAATCTCCTCTCACTGCCAATCT		

1.5 SC9-1 免疫鸡 AIV、NDV 抗体水平的检测
14 日龄,所有鸡只均免疫 AIV-H9N2、NDV 灭活苗,免疫后 3、4、5 周,每组随机挑选 12 只采集非抗凝血,分离血清检测 AIV-H9N2、NDV 抗体水平,比较 SC9-1、CVI988/Rispens 免疫后攻毒鸡灭活苗诱导抗体水平的差异。

2 结果

2.1 SC9-1 对 SPF 鸡的免疫保护作用结果
整个试验过程,空白对照组以及 SC9-1 免疫后 GX0101 攻毒组鸡只均未发生由 MDV 引起的死亡和肿瘤病变,90 天后剖检未见肿瘤发生,病理切片也没有观察到 MDV 特有的组织病变; CVI988/Rispens 免疫后 GX0101 攻毒组死亡 3 只,死亡率为

3/30,心脏,肝脏,脾脏,肾脏做组织切片,可见明显的淋巴细胞浸润,其中 2 只发现明显肿瘤,90 天后剖检发现 1 只明显肿瘤;GX0101 攻毒组死亡 16 只,死亡率为 16/30 (图 1-A),其中 2 只肝脏上有明显的剖检肿瘤病变,所有死亡鸡只取心脏,肝脏,脾脏,肾脏做组织切片均可见明显的淋巴细胞浸润,90 天后剖检观察到 3 只发生明显的内脏肿瘤 (表 3)。

2.2 SC9-1 对海兰褐鸡的免疫保护作用结果
整个试验过程,空白对照组和 SC9-1 免疫攻毒组鸡只均未发生由 MDV 引起的死亡和组织病变; CVI988/Rispens 免疫攻毒组死亡 2 只,剖检无眼观肿瘤出现,肝脏病理切片可观察到 MDV 引起的淋巴细胞浸润,试验结束后,剖检存活鸡只均正常。GX0101 攻毒对照组死亡比例为 11/30 (图 1-B),病理组织切片均有 MDV 引起的病理变化,80 日龄死

亡 1 只个体发生明显肝脏肿瘤,90 d 后全部剖检,只有 1 只肝脏出现白色肿瘤结节,再随机取 5 只做切片镜检均有 MDV 引起的组淋巴细胞浸润、增生(表 4)。

表 3. SC9-1 对 SPF 鸡的免疫保护效果
Table 3. Pathogenicity and immunoprotective efficacy of SC9-1 in SPF chickens.

vaccines	challenged with	SPF chickens			
		MD mortality / %	MD tumors / %	MD lesions / %	PI
SC9-1	GX0101	0	0	0	100
CVI988 /Rispens	GX0101	10	10	13	87
-	GX0101	53	17	100	-
-	-	0	0	0	-

One-day-old chickens were vaccinated with the SC9 - 1 or CVI988 /Rispens vaccine and challenged 5days later with GX0101 strain. Mortality was observed for 13weeks after chickens challenged with GX0101 strain, and both dead and survival chickens necropsies were subjected to examinations. PI = protection index.

表 4. SC9 - 1 对海兰褐鸡的免疫保护效果
Table 4. Pathogenicity and immunoprotective efficacy of SC9-1 in Hy-line brown chickens

vaccines	challenged with	Hy-line brown chickens chickens			
		MD mortality / %	MD tumors / %	MD lesions / %	PI
SC9-1	GX0101	0	0	0	100
CVI988 /Rispens	GX0101	7	0	7	93
-	GX0101	37	7	100	-
-	-	0	0	0	-

One-day-old chickens were vaccinated with the SC9-1 or CVI988 /Rispens vaccine and challenged 5days later with GX0101 strain. Mortality was observed for 13weeks after chickens challenged with GX0101 strain, and both dead and survival chickens necropsies were subjected to examinations. PI = protection index.

2.3 GX0101 在免疫鸡体内的增殖动态

2.3.1 检测 MDV GX0101 的荧光定量 PCR 标准曲线: 检测 PMD-meq 的标准曲线为 $y = -3.2906x + 36.525$, $R^2 = 0.9996$, 计算得 meq 质粒标准品的扩增效率 $E = (10^{-1/-3.2906} - 1) \% = 101\%$, 检测 PMD-LTR 的标准曲线为 $y = -3.33x + 37.719$, $R^2 = 0.9993$, LTR 质粒标准品的扩增效率 $E = (10^{-1/-3.33} - 1) \% = 99.7\%$ 。且已知荧光定量 PCR 反应有效性的确认条件为相关系数 $R^2 > 0.98$, 标准曲线斜率范围 $-3 - -3.5$, 扩增效率 $E = 0.9 - 1.2$ 。

2.3.2 SC9-1、CVI988/Rispens 免疫 SPF 鸡后 GX0101 的增殖动态:结果显示,无论是在淋巴细胞还是在羽毛囊 DNA 中,免疫后攻毒组,GX0101 的增殖水平都显著低于攻毒对照组。与 CVI988/Rispens 免疫组相比,SC9-1 免疫后,GX0101 增殖一直维持在较低水平,SC9-1 明显抑制 GX0101 病毒的增殖。而 CVI988/Rispens 免疫组,GX0101 病毒在淋巴细

胞内攻毒第 10 天出现高峰,并且一直维持在较高水平(图 2-A),在羽毛囊中攻毒后第 21 天出现高峰,显著高于 SC9-1 免疫组(图 2-B)。

2.3.3 SC9-1、CVI988/Rispens 免疫海兰褐鸡后 GX0101 的增殖动态:荧光定量结果显示,5 次的结果均表明 SC9-1 免疫组淋巴细胞感染病毒的量显著低于 CVI988/Rispens 免疫组和 GX0101 攻毒组。CVI988/Rispens 免疫组与 GX0101 攻毒对照组中淋巴细胞感染 GX0101 病毒量呈逐渐升高的趋势(图 3-A)。

结果显示,5 次病毒定量检测 SC9-1 免疫组的羽毛囊细胞中 GX0101 病毒含量一直保持很低水平,从攻毒后 14 d 病毒含量显著低于 CVI988/Rispens 免疫组与攻毒对照组;CVI988/Rispens 免疫组在前 4 次检测中病毒量水平都较低,攻毒后 28 天羽毛囊病毒含量较前 4 次检测明显增多;GX0101 攻毒对照组羽毛囊病毒含量呈逐渐升高的趋势(图 3-B)。

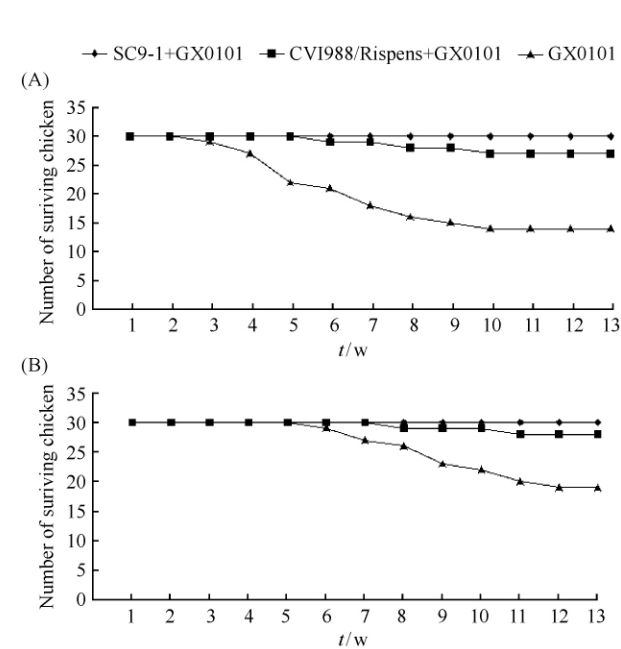


图 1. vvMDV GX0101 攻毒后各组鸡的死亡曲线

Figure 1. Mortality curve after vvMDV-challenge in chickens vaccinated SC9-1 or CVI988 and the control group. A is the mortality curve of the SPF chickens; B is the mortality curve of the hy-line brown chickens. And the chickens in control group are all regular growing.

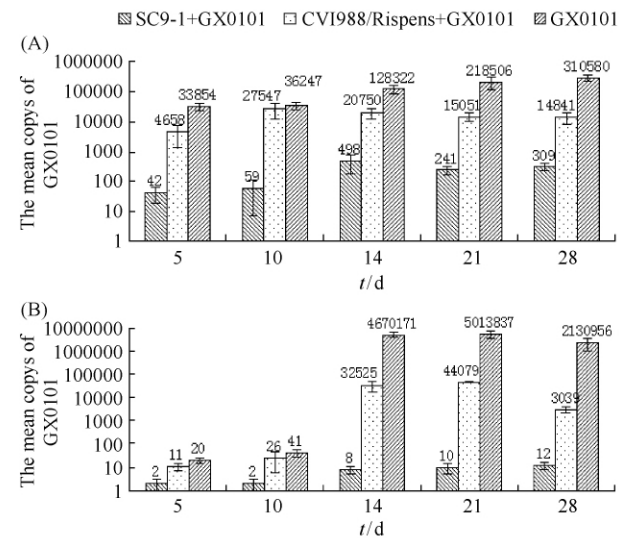


图 2. GX0101 接种病毒在 SPF 鸡体内的增殖动态

Figure 2. The copy numbers of MDV GX0101 in 100ng template DNA of GX0101-challenged SPF chickens vaccinated SC9-1 or CVI988 and the control group. A is the results of real-time PCR of SPF chicken's lymphocyte DNA. B is the results of real-time PCR of SPF chicken's FFE DNA.

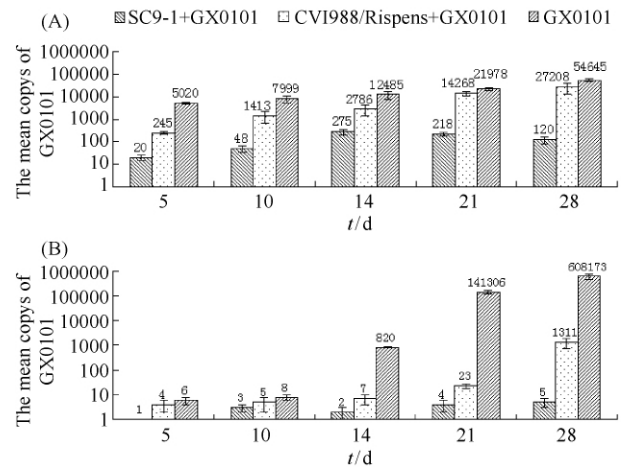


图 3. GX0101 接种病毒在海兰褐鸡体内的增殖动态

Figure 3. The copy numbers of MDV GX0101 in 100ng template DNA of GX0101-challenged hy-line brown chickens vaccinated SC9-1 or CVI988 and the control group. A is the results of real-time PCR of hy-line brown chicken's lymphocyte DNA. B is the results of real-time PCR of hy-line brown chickens' FFE DNA.

2.4 SPF 鸡免疫 SC9-1、CVI988/Rispens 后灭活油苗诱导抗体水平比较

血凝试验确定鸡胚扩增的 H9 病毒血凝价为 1:128, NDV 血凝价为 1:128, 用这两个毒株做血凝抑制试验确定鸡血清对应的抗体效价, 通过 SPSS 统计软件比较各组之间相同周次的血清抗 H9 与 NDV 的抗体效价的差异性。

结果显示, SPF 鸡在免疫后 3 周, 每个组的 H9 抗体效价没有显著差异 ($P > 0.05$); 免疫后 4 周, GX0101 攻毒对照组 H9 抗体水平显著低于两个免疫组和完全空白组, 此时两个免疫组的 H9 抗体水平差距开始增大; 免疫后 5 周, SC9-1 免疫组与完全空白组 H9 抗体水平差异不显著, 但两组 H9 抗体水平却显著高于 CVI988/Rispens 免疫组和 GX0101 攻毒组 ($P < 0.05$) (表 5)。SPF 鸡在 ND 灭活油乳苗免疫后的 3、4、5 周检测中两个免疫组和完全空白对照组两两之间 NDV 抗体水平没有显著差异, 攻毒对照组在第 3、4 周显著低于其他 3 组, 直到第 5 周这种差异性才缩小 (表 5)。

2.5 海兰褐鸡免疫 SC9-1、CVI988/Rispens 后灭活油苗诱导抗体水平比较

血凝抑制试验结果显示, 海兰褐鸡在 H9 灭活油乳苗免疫后 3、4、5 周, 两个免疫组和完全空白组的 H9 抗体水平都显著高于攻毒对照组, 但是三者

之间抗体水平没有显著性差异(表 6)。在 NDV 灭活油乳苗免疫后 3 周,SC9-1 免疫组的 ND 抗体水平与空白对照组没有差异,却高于 CVI988/Rispens 免疫组和显著高于 GX0101 攻毒对照组,在第 4 周

SC9-1 免疫组 ND 抗体水平显著高于 CVI988/Rispens 免疫组和 GX0101 攻毒对照组,到第 5 周时 CVI988/Rispens 免疫组的 ND 抗体水平才与 SC9-1 免疫组接近(表 6)。

表 5. SPF 实验组 H9-HI 抗体滴度差异性及 NDV-HI 抗体滴度差异性比较
Table 5. The comparison of AIV-H9 (log2) and NDV antibody titers of in SPF chickens.

strain	HI titers on AIV-H9 (log2)			HI titers on NDV (log2)		
	3 w. p. v (10/30)	4 w. p. v (10/30)	5 w. p. v (10/30)	3 w. p. v (10/30)	4 w. p. v (10/30)	5 w. p. v (10/30)
SC9-1 + GX0101	7 ± 2. 33 ^a	9. 125 ± 0. 991 ^a	9. 875 ± 0. 354 ^a	7. 5 ± 0. 756 ^a	7. 625 ± 0. 518 ^a	7. 75 ± 1. 035 ^a
CVI988 + GX0101	7. 5 ± 2. 204 ^a	7. 625 ± 2. 615 ^{ab}	8. 625 ± 1. 408 ^{bc}	7. 25 ± 1. 035 ^a	7. 125 ± 0. 835 ^{ab}	7. 875 ± 0. 354 ^a
GX0101	6. 25 ± 3. 536 ^a	7 ± 0. 926 ^b	7. 75 ± 1. 488 ^c	5. 375 ± 0. 916 ^b	6 ± 1. 773 ^b	7. 125 ± 0. 835 ^a
Control	7. 25 ± 1. 282 ^a	8. 875 ± 0. 991 ^a	9. 375 ± 0. 744 ^{ab}	7. 5 ± 0. 756 ^a	7. 75 ± 1. 165 ^a	8. 125 ± 1. 356 ^a

The numbers in the table indicate: mean ± s (sample size). The difference comparison is confined to the same week. The different small letters indicate that the differences were significant ($P < 0.05$). The same letters indicate the differences were not significant ($P > 0.05$). w. p. v is the meaning of weeks post vaccination.

表 6. 海兰褐实验组 H9-HI 抗体滴度差异性及 ND-HI 抗体滴度差异性比较
Table 6. The comparison of AIV-H9 (log2) and NDV antibody titers of in Hy-Line Brown chickens

strain	HI titers on AIV-H9 (log2)			HI titers on NDV (log2)		
	3 w. p. v (10/30)	4 w. p. v (10/30)	5 w. p. v (10/30)	3 w. p. v (10/30)	4 w. p. v (10/30)	5 w. p. v (10/30)
SC9-1 + GX0101	8 ± 1. 291 ^a	8. 75 ± 1. 165 ^a	9. 375 ± 0. 916 ^a	6. 625 ± 0. 744 ^a	8. 75 ± 0. 463 ^a	8. 75 ± 0. 886 ^a
CVI988 + GX0101	8 ± 1. 732 ^a	8. 25 ± 1. 408 ^a	8. 875 ± 1. 642 ^a	5. 875 ± 1. 356 ^{ab}	7. 5 ± 0. 535 ^b	8 ± 0. 926 ^a
GX0101	6 ± 1. 773 ^b	6. 25 ± 1. 669 ^b	7 ± 2. 07 ^b	5 ± 1. 069 ^b	5. 875 ± 0. 991 ^c	6. 635 ± 1. 768 ^b
Control	8. 375 ± 0. 916 ^a	8. 75 ± 1. 035 ^a	9 ± 0. 926 ^a	6. 875 ± 0. 835 ^a	8. 25 ± 0. 886 ^{ab}	8. 625 ± 1. 061 ^a

The numbers in the table indicate: mean ± s (sample size). The difference comparison is confined to the same week. The different small letters indicate that the differences were significant ($P < 0.05$). The same letters indicate the differences were not significant ($P > 0.05$). w. p. v is the meaning of weeks post vaccination.

3 讨论

鸡马立克氏病是目前世界上唯一能用疫苗预防的肿瘤病,随着疫苗的使用,MDV 的毒力不断的增强^[15-18],面对这些问题,国内外对 MDV 的致病机理进行了深入研究^[19-23],试图研制具有更好免疫保护效果的 MDV 疫苗,美国农业部禽病与肿瘤研究所利用同源重组技术敲除掉 vvMDV Md5 的 meq 基因,构建了 rMd5Δmeq,大量试验证实,无论在 SPF 鸡、商品代鸡, rMd5Δmeq 都能提供比 CVI988/Rispens 更好的免疫保护作用。GX0101 基因组自然重组 REV-LTR 片段,具有较强的复制、横向传播能力,基于这一独特毒株,我们敲除掉其 meq 基因后,证实 GX0101Δmeq 不但完全丧失致病性,而且能提供比 CVI988/Rispens 更好的免疫保护作用^[24]。但

是作为疫苗候选株,GX0101Δmeq 基因组中残留卡那霉素抗性基因,在此基础上,苏帅等人诱导掉卡那霉素抗性基因,筛选出具有良好复制能力的 SC9-1。

本研究比较了 SC9-1、CVI988/Rispens 对于 SPF 鸡以及含有 MDV 母源抗体的海兰褐鸡感染 vvMDV GX0101 的免疫保护效果。SC9-1 对感染 MDV GX0101 的 SPF 鸡、海兰褐鸡均提供 100% 的免疫保护作用,相比,MDV 商品化疫苗 CVI988/Rispens 分别提供 86.7%、93% 的免疫保护作用。对于 SPF 鸡,CVI988/Rispens 免疫攻毒组死亡 3 只鸡,其中 2 只出现明显的肿瘤结节,试验结束剖检存活鸡只,发现 1 只鸡有明显的肿瘤结节。对于海兰褐鸡,由于 MDV 母源抗体的保护,CVI988/Rispens 免疫攻毒组死亡 2 只鸡,剖检没有可眼观肿瘤发生。SC9-1 免疫攻毒组没有任何鸡只死亡以及 MDV 引起的肿瘤结节。因此,SC9-1 无论在 SPF 鸡还是含有 MDV 母

源抗体的海兰褐鸡均能提供比 CVI988/Rispens 更好的免疫保护效果。前期试验结果显示, CVI988/Rispens 对于 SPF 鸡感染 MDV Md5 的免疫保护指数为 89.0%, 而 GX0101 Δ meq 的免疫保护指数为 100.0%。虽然两次试验所使用攻毒毒株不同, 但是 MDV 商品化疫苗 CVI988/Rispens 免疫保护指数几乎相同, 两种攻毒模式的致病力相似, 基于 GX0101 Δ meq、SC9-1 均提供 100% 的免疫保护作用, 可以推断 SC9-1 与 GX0101 Δ meq 相比, 免疫保护效果没有改变, 敲除 *kana* 抗性基因并不影响 SC9-1 的免疫保护作用。

为了进一步分析 SC9-1、CVI988/Rispens 免疫后, GX0101 接种病毒的增殖情况, 我们利用荧光定量 PCR 方法对攻毒后不同时间 GX0101 病毒拷贝进行定量。对于 SPF 鸡, 相比 GX0101 攻毒组, SC9-1、CVI988/Rispens 免疫后 GX0101 的增殖水平显著降低。但是, 与 CVI988/Rispens 免疫组相比, SC9-1 株免疫对 GX0101 株增殖的抑制作用更强。而 CVI988/Rispens 免疫组, GX0101 病毒在淋巴细胞内攻毒第 10 天出现高峰, 并且一直维持在较高水平, 在羽毛囊中攻毒后第 21 天出现高峰, 显著高于 SC9-1 免疫组。SC9-1 免疫组羽毛囊中 GX0101 的病毒含量较低, 几乎不再向外排毒。因此, CVI988/Rispens 免疫组并不能有效抵御 GX0101 通过羽毛囊向外传播。对于海兰褐鸡, SC9-1、CVI988/Rispens 免疫后 GX0101 的增殖水平同样显著降低。由于 MDV 母源抗体的保护作用, CVI988/Rispens 免疫组, GX0101 病毒在淋巴细胞、羽毛囊的高峰出现在攻毒后第 28 天。而 SC9-1 免疫组 GX0101 的病毒含量较低, 几乎完全抑制 GX0101 在羽毛囊的复制, 有效抵御 GX0101 向外传播。

AIV-H9、NDV 灭活油苗诱导抗体水平比较结果显示, SC9-1 免疫攻毒组要高于 CVI988/Rispens 免疫攻毒组, 但是差异不显著, 证实 SC9-1 与 MDV 商品化 CVI988/Rispens 相似, 对灭活苗诱导抗体不存在免疫抑制。

国内至今没有分离到 MDV 特超强毒的报道, 出于生物安全, 本实验室并没有评价 SC9-1 对 MDV 特超强毒的免疫保护效果。虽然 rMd5 Δ meq 能提供较好的免疫保护效果, 但是其依然具有较强的免疫

抑制作用, 不得不再次通过细胞培养传代致弱。SC9-1 的亲本病毒 GX0101 是中国分离株, 抗原性比 rMd5 Δ meq 更类同于中国流行株, 因此更适用于中国^[25]。MDV GX0101 致病性显著低于 rMd5 Δ meq 的亲本毒 Md5, 但是横向传播能力却强于 Md5; 可以推测, SC9-1 比 rMd5 Δ meq 具有更强的横向传播能力。因此, 在规模化养殖鸡场, 即使少数几只鸡漏免, 也可以通过接触感染减少由于漏免带来免疫失败。本实验室对 SC9-1 在实验室内以及野外与 MDV 野毒株重组获得 meq 基因的能力进行了多次评价, 试验结果证实 SC9-1 均没有获得 meq 基因, 因此 SC9-1 通过重组获得缺失的 meq 基因的可能性极低。

总之, 敲除 *meq* 的重组鸡马立克氏病毒 SC9-1 对 MDV 超强毒 GX0101 株的免疫保护作用优于商品化疫苗 CVI988/Rispens。SC9-1 预防超强毒或新出现的特超强毒 MDV 诱发的鸡马立克氏病, 其保护性免疫效果优越于 CVI988/Rispens 株疫苗。作为疫苗使用, 其生物安全性正在经过大量的田间实验验证。

参考文献

- [1] Biggs PM, Payne LN. Studies on Marek's disease. I. experimental transmission. *Journal of The National Cancer Institute*, 1967, 39 (2) :267-280.
- [2] Rispens BH, van Vloten H, Mastenbrok N, Maas HJ, Schat KA. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Diseases*, 1972, 16 (1) :108-125.
- [3] Witter RL, Silva RF, Lee LF. New serotype 2 and attenuated serotype 1 Marek's disease vaccine viruses: selected biological and molecular characteristics. *Avian Disease*, 1987, 31 (4) :829-840.
- [4] Schat KA, Calnek BW. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *Journal of the National Cancer Institute*, 1978, 60 (5) :1075-1082.
- [5] Witter RL. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Diseases*, 1997, 41 (1) :149-163.
- [6] Biggs PM, Purchase HG, Bee BR, Dalton PG. Preliminary report on acute Marek's disease (fowl paralysis) in Great Britain. *The Veterinary Record*, 1965,

- 77 (45) :1339-1340.
- [7] Cui XP, Lee LF, Henry HD, Reed WM, Lupiani B, Reddy SM. 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] Schumacher D, Tischer BK, Fuchs W, Osterrieder N. 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.
- [9] Lupiani B, Lee LF, Kreager KS, Witter RL, Reddy SM. Insertion of reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into the genome of CVI988 strain of Marek's disease virus results in enhanced growth and protection. *Avian Disease*, 2013, 57 (2) :427-431.
- [10] 张志, 崔治中. 整合进禽反转录病毒基因组片段的鸡马立克氏病病毒重组野毒株的发现. 中国科学 (*Science China*), 2004, 34 (4) :317-324.
- [11] Xu X, Sun A, Cui Y, Cui Z. Comparison of pathogenicity and horizontal transmission ability between recombinant Marek's disease virus field strain with REV-LTR and a very virulent reference strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49 (4) : 540-543. (in Chinese)
- 许晓云, 孙爱军, 崔言顺, 崔治中. 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, 2009, 49 (4) :540-543.
- [12] 崔治中. 禽反转录病毒与 DNA 病毒间的基因重组及其流行病学意义. 病毒学报 (*Chinese Journal of Virology*), 2006, 22 (2) :150-154.
- [13] Sun AJ, Petherbridge Lawrence, Zhao YG, Li YP, Venugopal K. Nair, Cui ZZ. A BAC clone of MDV strain GX0101 with REV-LTR integration retained its pathogenicity. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54: 2641-2647.
- [14] 苏帅. 重组马立克氏病毒及其突变株生物学活性的比较研究. 山东农业大学博士学位论文, 2013.
- [15] Schat KA, Z Xing. Specific and nonspecific immune responses to Marek's disease virus. *Developmental & Comparative Immunology*, 2000, 24 (2-3) :201-221.
- [16] Calnek BW, Schat KA, Ross LJ, Shek WR, Chen CL. Further characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes. I. In vivo infection. *International Journal of Cancer*, 1984, 33 (3) :389-398.
- [17] Morimura T, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. Pathogenesis of Marek's disease (MD) and possible mechanisms of immunity induced by MD vaccine. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1998, 60 (1) :1-8.
- [18] Schat KA. Importance of cell-mediated immunity in Marek's disease and other viral tumor diseases. *Poultry Science*, 1991, 70 (5) :1165-1175.
- [19] Bradley G, Hayashi M, Lancz G, Tanaka A, Nonoyama M. Structure of the Marek's disease virus BamHI-H gene family: genes of putative importance for tumor induction. *Journal of Virology*, 1989, 63 (6) :2534-2542.
- [20] Hooft van Iddekinge BJ, Stenzler L, Schat KA, Boerrigter H, Koch G. Genome analysis of Marek's disease virus strain CVI-988: effect of cell culture passage on the inverted repeat regions. *Avian Diseases*, 1999, 43 (2) :182-188.
- [21] Liu JL, Ye Y, Lee LF, Kung HJ. Transforming potential of the herpesvirus oncoprotein MEQ: morphological transformation, serum-independent growth, and inhibition of apoptosis. *Journal of Virology*, 1998, 72 (1) :388-395.
- [22] Liu JL, Lin SF, Xia L, Brunovskis P, Li D, Davidson I, Lee LF, Kung HJ. MEQ and V-IL8: cellular genes in disguise. *Acta Virologica*, 1999, 43 (2-3) :94-101.
- [23] Karsten Tischer B, Daniel S, Daniëlle CV, Vladimir Z, Vautherot JF, Nikolaus O. High-level expression of Marek's disease virus glycoprotein C is detrimental to virus growth in vitro. *Journal of Virology*, 2005, 79 (10) :5889-5899.
- [24] Su S, Li Y, Sun A, Zhao P, Ding J, Zhu H, Cui Z. Protective immunity of a meq-deleted Marek's disease virus against very virulent virus challenge in chickens. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (3) : 380-386. (in Chinese)
- 苏帅, 李延鹏, 孙爱军, 赵鹏, 丁家波, 朱鸿飞, 崔治中. 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. 微生物学报, 2010, 50 (3) :380-386.
- [25] Su S, Cui N, Sun AJ, Li YP, Ding JB, Chen ZM, Zhao P, Cui ZZ. Sequence analysis of the whole genome of a recombinant Marek's disease virus strain, GX0101, with a reticuloendotheliosis virus LTR insert. *Archives of Virology*, 2013, 158: 2007-2014.

Comparison of immunoprotection between vaccination with *meq*-deleted Marek's disease virus and vaccine strain CVI988/Rispens

Luntao Duan[#], Shuai Su[#], Yixin Wang, Sifei Li, Peng Sun, Wenqing Chen, Zhizhong Cui^{*}

Animal Science and Technology Collage, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] To evaluate and compare the immunoprotection between a *meq*-deleted Marek's disease virus (MDV) and CVI988/Rispens against MDV very virulent strain GX0101. [Methods] In total 120 one-day-old SPF chickens were divided into 4 groups (30 each) and kept in 5 isolators with positive pressure-filtered air. At 1 day of age, 2000 PFU of SC9-1 was inoculated subcutaneously into each bird in group 1; 2000 PFU of commercial vaccine CVI988/Rispens was inoculated subcutaneously into each bird in group 2. No viral challenge was made in group 3 and 4 as controls. Five days later chickens in group 1, 2, 3 were challenged intra-abdominally with 2000 PFU of very virulent MDV strain GX0101. During 90 days after challenge, all dead birds were recorded and checked for necropsy. The tumor-suspected tissues were examined by histopathological biopsy. The antibody titers induced by AIV and NDV vaccination and propagation dynamics of MDV GX0101 were detected. At the same time, parallel tests were performed on Hy-Line Brown chickens containing MDV maternal antibody. [Results] SC9-1 stain provided 100% protective efficiency against very virulent GX0101 challenge in SPF and Hy-Line Brown chickens. CVI988/Rispens provided 86.7% protective efficiency against very virulent GX0101 challenge in SPF chickens and 93% in Hy-Line Brown chickens. Challenge with GX0101 caused 53.3% mortality and 16.7% of birds with gross tumors in SPF chickens while there was 36.7% mortality and 16.7% of birds with gross tumors in Hy-Line Brown chickens, and there was no tumor lesion in histopathological biopsy in control group. The results of qPCR demonstrated that the copies of GX0101 viral genomes in SC9-1 vaccinated chickens was lower than CVI988/Rispens vaccinated chickens in lymphocyte and feather follicle DNA. The results of hemagglutination inhibition test demonstrated that antibody titers of AIV and NDV was higher in SC9-1 vaccinated chickens than that in CVI988/Rispens vaccinated chickens. [Conclusion] SC9-1 stain's immunoprotection against MDV is more effective than CVI988/Rispens strain's both in SPF chickens and commercial Hy-Line Brown chickens containing maternal antibody.

Keywords: Marek's disease virus (MDV), SC9-1, CVI988/Rispens, gene *meq*, protective immunity efficacy

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Guangdong Joint Funds from the National Natural Science Foundation of China (U1131005)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-538-8241560; E-mail: zzcui@sdaa.edu.cn

[#] Those authors contributed equally to this work.

Received: 27 January 2014 / Revised: 10 March 2014