

• 生物技术与方法 •

一种快速精确编辑疱疹病毒基因组的方法

孙爱军^{1,2}, 王向茹^{1,2}, 杨帅康^{1,2}, 刘莹^{1,2}, 张改平^{1,2}, 庄国庆^{1,2}

1 河南农业大学 动物医学院, 河南 郑州 450046

2 河南农业大学 国家动物免疫学国际联合研究中心, 河南 郑州 450046

孙爱军, 王向茹, 杨帅康, 等. 一种快速精确编辑疱疹病毒基因组的方法. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1376-1384.

Sun AJ, Wang XR, Yang SK, et al. A rapid and accurate method for herpesviral genome editing. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1376-1384.

摘要: 为了快速且准确地对疱疹病毒基因组进行基因敲除、插入或者点突变等修饰, 通过同源重组将马立克氏病病毒 (MDV) 超强毒株 Md5 基因组克隆到细菌人工染色体 (BAC)。将筛选的阳性重组体 DNA 电转进 DH10B 菌株, 用 PCR 及限制性片段多态分析 (RFLP) 方法鉴定含 Md5 全基因组的 BAC 克隆。将阳性重组体 DNA 转入鸡胚成纤维细胞 (CEF), 拯救出重组病毒, 命名为 Md5BAC。进一步利用 Red 酶介导的两步法基因重组技术构建 MDV $lorf10$ 基因敲除毒株。为了验证被敲除基因功能的特异性, 将 $lorf10$ 插入原位点以构建基因复原毒株。将构建的重组毒株分别感染 CEF 细胞, 用间接免疫荧光试验确认重组病毒均包装成功; 病毒生长曲线结果表明, $lorf10$ 敲除不影响病毒的体外增殖。总之, 这为其他疱疹病毒的基因组编辑提供了技术参考。

关键词: 马立克氏病病毒, 同源重组, 细菌人工染色体, 基因组编辑

A rapid and accurate method for herpesviral genome editing

Aijun Sun^{1,2}, Xiangru Wang^{1,2}, Shuaikang Yang^{1,2}, Ying Liu^{1,2}, Gaiping Zhang^{1,2}, and Guoqing Zhuang^{1,2}

1 College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China

2 International Joint Research Center of National Animal Immunology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China

Abstract: To rapidly and accurately manipulate genome such as gene deletion, insertion and site mutation, the whole genome of a very virulent strain Md5 of Marek's disease virus (MDV) was inserted into bacterial artificial chromosome (BAC) through homogeneous recombination. The recombinant DNA was electroporated into DH10B competent cells and identified by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. An infectious clone of Md5BAC was obtained following transfection into chicken embryo fibroblast (CEF) cells. Furthermore, a $lorf10$ deletion mutant was constructed by two step Red-mediated homologous recombination. To confirm the specific role of gene deletion, the $lorf10$ was reinserted into the original site of MDV genome to make a revertant strain. All the constructs were rescued by transfection into CEF cells,

Received: July 9, 2020; **Accepted:** October 19, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31802160), Starting Foundation for Outstanding Young Scientists of Henan Agricultural University (No. 30500690), Henan Province Advanced Program of 2020 for Returned Overseas Scholar (No. 30602136).

Corresponding author: Guoqing Zhuang. Tel: +86-371-56990163; E-mail: gqzhuang2008@163.com

国家自然科学基金 (No. 31802160), 河南农业大学高层次“拔尖人才”项目 (No. 30500690), 2020 年度河南省留学回国人员科研择优项目 (No. 30602136) 资助。

respectively. The successful packaging of recombinant viruses was confirmed by indirect immunofluorescence assay. The results of growth kinetics assay and plaques area measurement showed that the *lorf10* is dispensable for MDV propagation *in vitro*. Overall, this study successfully constructed an infectious BAC clone of MDV and demonstrated its application in genome manipulation; the knowledge gained from our study could be further applied to other herpesviruses.

Keywords: Marek's disease virus, homologous recombination, bacterial artificial chromosome, genome editing

马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 属于 α 疱疹病毒, 能引起以感染宿主发生严重的免疫抑制和内脏肿瘤为主要特征的马立克氏病 (Marek's disease, MD)^[1]。MDV 分为 3 个血清型: 血清 I 型 (MDV-1), 包括致病性 MDV 及其衍生物; 血清 II 型 (MDV-2) 和 III 型 (MDV-3) 是自然分离的无致病性毒株, MDV-3 又称为火鸡疱疹病毒 (Herpesvirus of turkey, HVT)^[2]。MD 造成世界养禽业每年 10–20 亿美元的经济损失^[3]。虽然可以用疫苗有效控制 MD 的发生, 但不能完全抑制病毒在宿主体内的复制。随着疫苗的使用, MDV 的致病力不断进化, 高致病力的毒株突破疫苗的保护屏障而导致疾病的不间断发生^[4]。到目前为止, 依据致病力的强弱, MDV 可分为温和型 (Mild, mMDV)、强型 (Virulent, vMDV)、超强型 (Very virulent, vvMDV) 以及特超强型 (Very virulent plus MDV, vv+MDV) 毒株^[5]。为了更好地控制 MD, 有必要从分子水平探索 MDV 的致病机制。

Md5 基因组为大小约 180 kb 的线性双链 DNA。包括两个独特区: 长独特区 (UL) 和短独特区 (US); 长末端互补重复区 (TRL)、长内部互补重复区 (IRL)、短末端反向互补重复区 (TRS) 和短内部反向互补重复区 (IRS)。Md5 有 338 个开放阅读框 (ORF), 编码超过 100 个基因^[6]。其中 UL 区编码多个功能未知的特异基因, 包括 *pp38*、*meq* 和 *lorf10* 等。利用粘粒作为载体, Reddy 等构建了 Md5 感染性克隆 rMd5, 并分别敲除了 *pp38* 和 *meq* 基因, 并验证了基因缺失重组毒株的生物学功能^[7-8]。美国农业部禽病肿瘤研究所的 Silva 等利用粘粒载体, 将 BAC 载体 (pBelobAC11) 插入到 rMd5 的 *ul3* 和 *ul4* 的下游区域^[9]。为了消除以

粘粒为载体进行的 BAC 克隆对 rMd5 基因组结构可能造成的影响, 本研究将 Md5 基因组与 BAC 载体直接连接, 构建了重组毒株 Md5BAC。为了进一步研究 *lorf10* 在 MDV 体外增殖中的作用, 利用 Red 酶介导的两步法重组技术将 Md5BAC 中的 *lorf10* 敲除, 构建了 Md5BAC Δ LORF10 毒株。将 *lorf10* 重新插入敲除位点得到复原突变株 Md5BAC Δ LORF10-Re。体外增殖结果表明, 敲除 *lorf10* 与 MDV 的体外复制无关, 表明所构建的 Md5BAC 可以进行基因组的相关修饰。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、质粒及抗体

本研究用到的 MDV 超强毒株 Md5 由山东农业大学崔治中教授惠赠; BAC 载体质粒由英国动物健康研究中心 Venugopal Nair 教授惠赠; SPF 鸡蛋购自济南斯派福瑞禽业科技有限公司, 用于制备鸡胚成纤维细胞 (Chicken Embryo Fibroblast, CEF); CEF 主要用于质粒的转染、病毒的增殖等相关试验。单克隆抗体 (Mab) BD4 (MDV-gB) 由山东农业大学崔治中教授惠赠抗 MDV *lorf9* 多抗为本实验室制备 (未发表)。

1.2 MDV DNA 的提取

取 9 日龄的 SPF 鸡胚制备鸡胚成纤维细胞, 待细胞长成单层后, 接种 1 000 PFU Md5 毒株于 T25 细胞培养皿, 待细胞出现 60% 的病变时, 提取细胞基因组 DNA。加入 1 mL 细胞裂解液 (蛋白酶 K、SDS、NaCl 100 mmol/L, Tris-Cl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L), 60 °C 水浴中消化 2 h 后, 苯酚氯仿抽提, 最后用 -20 °C 预冷的无水乙醇沉淀 DNA, 溶于 50 μ L TE 中。

1.3 转染

取 5 μg Md5 感染的 CEF DNA 与 1 μg BAC 载体质粒共同转染鸡胚成纤维细胞, 5 d 后待细胞出现病变时, 用含 EDTA 的胰酶将细胞消化后, 接种到长有细胞单层的 T75 细胞瓶中 (含 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 霉酚酸、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 次黄嘌呤), 5 d 后待细胞出现病变时, 将感染的 CEF 消化接种到含有新鲜选择培养基的 CEF 单层, 如此进行 4 次, 以提高同源重组的发生率。最后一次筛选, 待细胞出现 60% 的病变时, 消化细胞, 提取细胞基因组 DNA。

1.4 转化

取 5 μg 经过选择培养基筛选的病毒感染的 CEF 基因组 DNA, 在 2 000 V、100 Ω 、25 μF 的条件下电转入感受态细胞 DH10B 中, 电击后, 加 1 mL SOC 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 3 h 后, 将菌液涂布于 LB 琼脂板上 (含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜培养。次日, PCR 鉴定, 挑取阳性菌落于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜培养。次日提取 MDVBAC DNA。

1.5 PCR 及 RFLP 鉴定

以提取的 Md5BAC 质粒为模板扩增 *meq*、*ul41*、*50*、*lorf9* 以及 BAC 载体携带的 *gpt* 基因, 初步鉴定质粒的正确性; 为了验证基因组的完整性, 将 Md5BAC 质粒进行限制性片段多态性分析 (RFLP), 用限制性内切酶 *Bam*H I 酶切后, 进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 重组病毒的拯救

取 10 μL LipfectamineTM2 000 于 90 μL opti-MEM 中; 取 5 μg 重组载体 DNA 于 100 μL opti-MEM 中; 室温放置 5 min 后, 将两者混匀后室温放置 20 min, 用 opti-MEM 补充至 1 mL, 逐滴加入到长有 CEF 单层的 6 孔细胞培养板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 6 h 后将液体换为含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养至病毒蚀斑形成, 将细胞消化, 传至新鲜 CEF 单层。连续传 3-4 代以扩大病毒量, 待病毒感染率达到

70%, 将其收获, 冻存于液氮中备用。

1.7 病毒的体外增殖检测

将 100 PFU 的病毒分别接种于 6 个铺满新鲜 CEF 细胞的 P60 细胞培养皿, 在感染后第 1、2、3、4、5、6 天, 分别消化细胞, 将消化的细胞按照 10 倍梯度稀释后, 接种于 35 mm 细胞培养皿, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 6 d 后进行病毒蚀斑计数。根据结果绘制病毒增殖曲线图, 比较病毒在体外增殖特性变化。

1.8 *lorf10* 缺失毒株以及复原毒株的构建

将 MDV 超强毒株 Md5 构建成传染性的 BAC 克隆, 在此基础上可以进行 MDV 基因组的修饰。我们利用 Red 介导的两步同源重组法, 构建 *lorf10* 缺失毒株, 首先, 设计带有 *lorf10* 的同源序列引物, 以 pEPkan-s 为模板, 扩增卡那霉素 (*kana*) 基因, 取 30 ng 纯化的 PCR 产物将其电转进含有 Md5BAC 的感受态细胞中, 42 $^{\circ}\text{C}$ 诱导重组酶的表达, 将卡那霉素基因取代 *lorf10*; 第二步重组利用 10% 的阿拉伯糖诱导 *I-Sce I* 酶表达, 从而将卡那霉素基因敲除。进而构建 Md5BAC Δ LORF10 毒株。

Md5BAC Δ LORF10 复原毒株的构建, 与基因缺失过程步骤一致, 采用 Red 介导的两步同源重组法。简要概述如下: 在第一轮同源重组的过程中, PCR 扩增 *lorf10* 和 *kana* 基因, PCR 产物中两端含有 *lorf10* 基因两端的同源臂, 取 30 ng 纯化的 PCR 产物将其电转进含有 Md5BAC Δ LORF10 的感受态细胞中, 42 $^{\circ}\text{C}$ 诱导重组酶的表达, 将 *lorf10-kana* 基因片段同源重组到 Md5BAC Δ LORF10 基因组中; 第二步重组利用 10% 的阿拉伯糖诱导 *I-Sce I* 酶表达, 从而将卡那霉素基因敲除, 进而构建 Md5BAC Δ LORF10-Re 毒株。

1.9 间接免疫荧光法检测重组病毒以及病毒蚀斑大小测定

将 100 PFU 重组病毒接种于 6 孔细胞培养板上的 CEF 细胞。培养至细胞出现 60% 蚀斑后, 将生长液倒掉, 加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗一遍,

用冷丙酮:乙醇(3:2)固定液固定5 min,用PBS冲洗1次,加0.5 mL(1:100稀释)单克隆抗体(Mab)BD4(MDV-gB)或者抗MDV LORF9多克隆抗体,放37 °C恒温培养箱反应45 min后,用PBS冲洗3次,将水分甩干,加入0.5 mL FITC标记的羊抗鼠IgG荧光抗体二抗(Sigma, USA),放37 °C温箱反应45 min,用PBS冲洗3次,在倒置荧光显微镜下观察和成像。随机选取50个病毒蚀斑成像,成像系统采用OLYMPUS荧光显微镜,放大倍数为40,蚀斑大小采用NIH ImageJ软件分析(<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>),数据分析采用GraphPad Prism version 8(GraphPad, USA)。以上数据至少重复3次。

1.10 统计学分析

对于病毒增殖试验,每个时间点的数据利用

Two-way ANOVA方法分析。从蚀斑计数结果得到的每个数据点表示生物重复的平均值。数据统计分析所用软件为GraphPad Prism version 8(GraphPad, USA),*P*值小于0.05表示统计学差异显著。

2 结果与分析

2.1 Md5BAC 传染性克隆的构建

分别提取BAC质粒与Md5基因组DNA,共同转染CEF细胞(图1A)。两者在CEF细胞上发生同源重组,BAC质粒插入Md5基因组的US2区域(图1B)。为了获得整合BAC质粒的重组Md5基因组克隆,利用选择性培养基筛选。将经过4轮的筛选获得的重组Md5基因组DNA进行鉴定(图1C),提取鉴定正确的重组Md5基因组DNA,转染CEF后获得Md5BAC传染性克隆(图1D)。

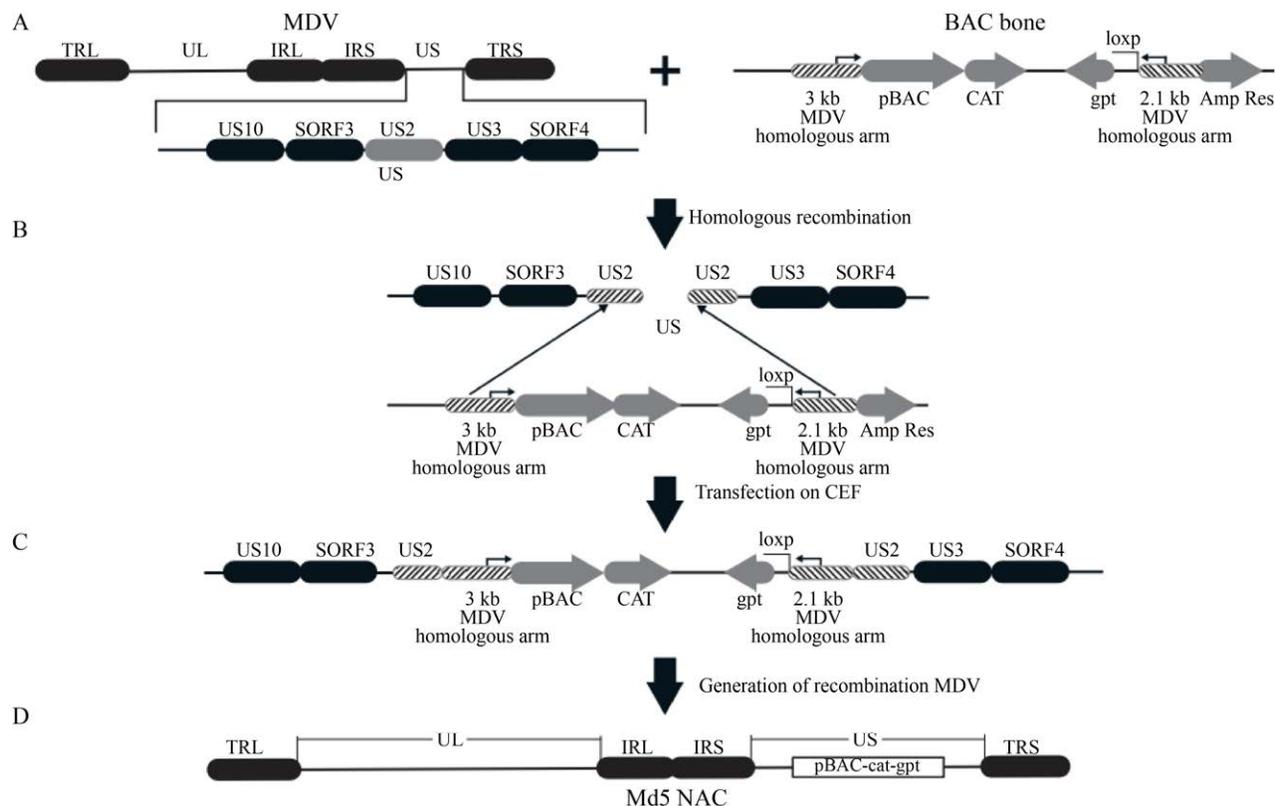


图1 构建Md5BAC传染性克隆流程图

Fig. 1 Construction of Md5BAC infectious clone. (A) BAC vector. (B) Md5 genome with homologous arms. (C) Recombination of Md5 and BAC Bone. (D) Md5BAC infectious clone.

2.2 Md5BAC 传染性克隆的鉴定

为了鉴定 Md5BAC, 分别设计引物扩增 Md5BAC 的 *meq*、*UL41*、*UL50*、*lorf9* 基因以及 BAC 载体携带的 *gpt* 基因, 扩增结果如图 2A 所示, 与预期结果相同。为了验证 Md5BAC 基因组的完整性, 用限制性内切酶 *BamH* I 酶切 Md5BAC 重组质粒, 进行限制性片段长度多态性分析 (RFLP), 结果显示, Md5BAC 酶切后的片段分布与模拟预测一致 (图 2B), 表明构建 Md5BAC 成功且保持了基因组的完整性 (图 2C)。

2.3 Md5BAC Δ LORF10 传染性克隆的鉴定

利用 Red 酶介导的两步重组法构建 *lorf10* 缺失毒株。将 pEPkan-S 质粒扩增的 *KanR*-*I-Sce* I 片段电转到含有 Md5BAC 的菌株中。阿拉伯糖诱导 *I-Sce* I 酶表达以敲除 *Kan^R* 序列。RFLP 分析表明, 相比较于 Md5BAC Δ LORF10, Md5BAC 与 Md5BAC Δ LORF10-Re 基因组中有 2 784 bp 序列的缺失 (图 3A)。以 Md5BAC、Md5BAC Δ LORF10 和 Md5BAC Δ LORF10-Re 基因组 DNA 为模板, 均能 PCR 扩增出 *meq*。从 Md5BAC 和

Md5BAC Δ LORF10-Re 中能扩增出包含 *lorf10* 的全长序列, 而 Md5BAC Δ LORF10 由于 *lorf10* 的缺失, 导致 PCR 扩增条带变小 (图 3B)。DNA 测序结果与预期完全一致。以上结果表明, 成功将 *lorf10* 从 Md5BAC 基因组中敲除。

2.4 间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定重组病毒

用 LipfectamineTM2 000 分别转染 500 ng Md5BAC、Md5BAC Δ LORF10 和 Md5BAC Δ LORF10-Re 获得重组病毒。接种 100 PFU Md5BAC、Md5BAC Δ LORF10 和 Md5BAC Δ LORF10-Re 于 CEF 细胞单层, 用抗 MDV gB 单克隆抗体进行 IFA 检测, 结果显示, Md5BAC、Md5BAC Δ LORF10 和 Md5BAC Δ LORF10-Re 均能在 CEF 细胞上形成 MDV 特异性蚀斑 (图 4A)。用抗 MDV LORF9 多克隆抗体进行 Western blotting 检测, 结果显示, 从 Md5、Md5BAC、Md5BAC Δ LORF10 和 Md5BAC Δ LORF10-Re 感染的细胞中均能够检测到 LORF9 的表达 (约 30 kDa) (图 4B)。这些结果表明, BAC 重组入 Md5 基因组, 以及 *lorf10* 的敲除和复原毒株都没有影响病毒的包装和复制。

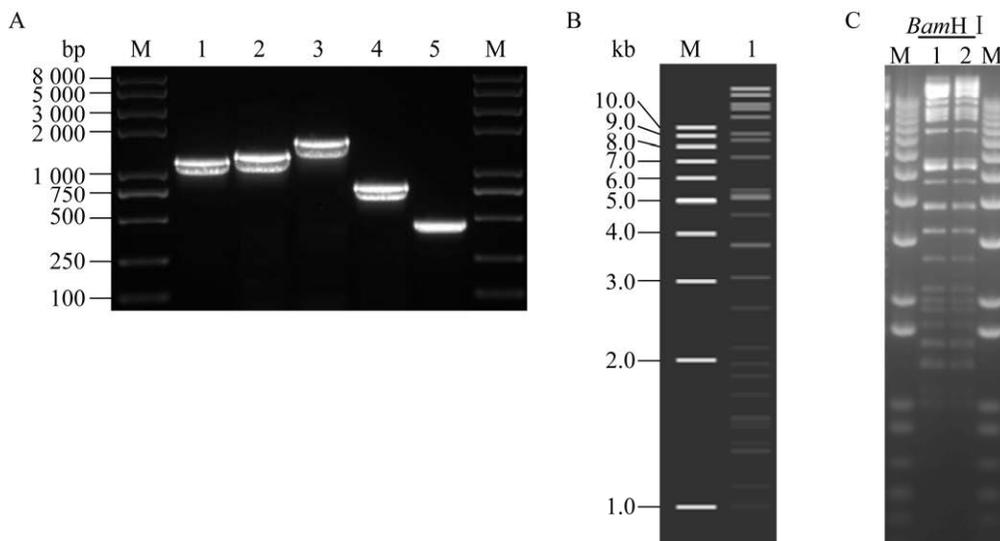


图 2 Md5BAC 的 PCR 分析以及 *BamH* I 酶切鉴定

Fig. 2 PCR and RFLP analysis of Md5BAC. (A) PCR analysis using primers of Md5BAC specific genes. 1: amplification of *meq*; 2: amplification of *UL41*; 3: amplification of *UL50*; 4: amplification of *lorf9*; 5: amplification of *gpt*. (B) Prediction of Md5BAC digestion by *BamH* I. (C) Electrophoresis analysis of Md5BAC digested by *BamH* I. M: DNA marker.

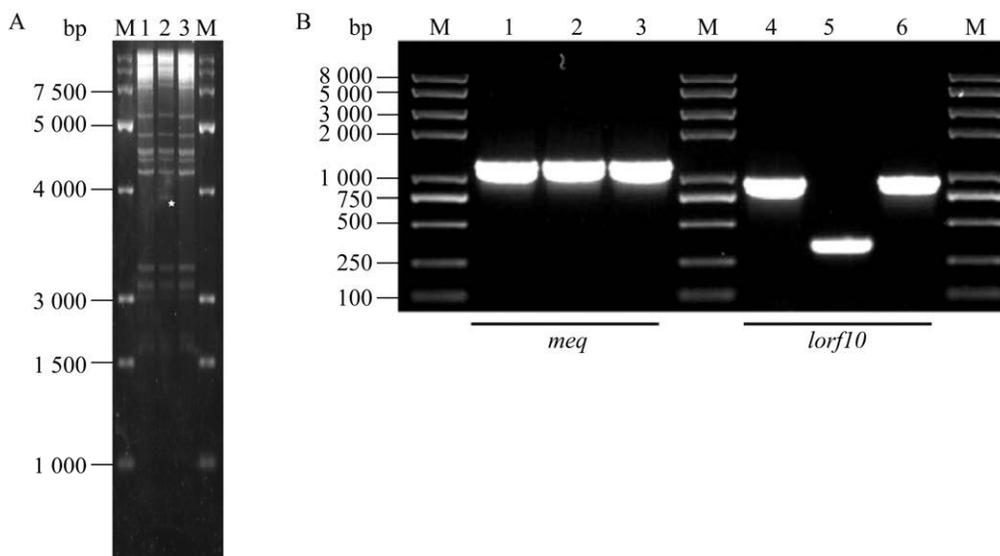


图3 *lorf10* 基因敲除和复原毒株 PCR 分析以及 RFLP 鉴定

Fig. 3 RFLP and PCR analysis of Md5BAC, Md5BAC Δ LORF10 and Md5BAC Δ LORF10-Re. (A) RFLP analysis of genomic DNA digested by *Sal*I. 1: Md5BAC; 2: Md5BAC Δ LORF10; 3: Md5BAC Δ LORF10-Re; *: specific band. (B) PCR analysis of *meq* and *lorf10* gene from Md5BAC (lanes 1 and 4); Md5BAC Δ LORF10 (2 and 5); Md5BAC Δ LORF10-Re (3 and 6). M: DNA marker.

2.5 *lorf10* 是病毒体外增殖非必需基因

为了检测 *lorf10* 是否为病毒体外复制所必需,将 100 PFU Md5、Md5BAC、Md5BAC Δ LORF10 和 Md5BAC Δ LORF10-Re 病毒分别感染 CEF 细胞,在感染后第 0、1、2、3、4、5、6 天进行病毒蚀斑计数定量。结果表明, Md5、Md5BAC、Md5BAC Δ LORF10 和 Md5BAC Δ LORF10-Re 在 CEF 上的增殖无显著性差异 (图 5A), 并且 *lorf10* 敲除及复原毒株与亲本毒株的蚀斑大小也无明显差异 (图 5B), 这些结果说明 *lorf10* 不是 MDV 体外增殖所必需的基因。

3 讨论

基因编辑是研究基因功能的生物工程手段。通过对生物遗传特性的改变,达到反向研究基因功能的目的。BAC 技术广泛应用于分子生物学、细胞生物学和病毒学等领域,常用于基因治疗和生物定向改造等^[10]。过去几十年里,基因编辑技术得到了极大的发展。从序列特异性的核酸内切

酶 (Cre/loxP)、锌指核酸酶 (ZFNs) 和转录激活因子样效应物核酸酶 (TALENs), 直至新兴的基因编辑技术 CRISPR, CRISPR 介导的基因编辑有着简便高效的优点,但由于技术不十分成熟,仍然存在着脱靶、特殊引物设计和特殊基因完整敲除难度大等问题^[11-12]。另外一种成熟的基因编辑技术, BAC 技术,在大基因组病毒,如疱疹病毒的研究领域中应用,可以对病毒编码的基因进行非常精确且高效的敲除、插入和点突变等修饰^[13-14]。例如,利用 BAC 技术验证了与 MDV 致肿瘤相关的 *microRNA* 和 *vTR* 等基因的功能^[15-16]。

我们成功构建了分离 MDV 野毒株 GX0101 的细菌人工染色体 GX0101BAC (vvMDV) 和 MDV 特超强毒株 686 的细菌人工染色体 686BAC (vv+MDV)^[17-18]。在 GX0101BAC 中,利用 Cre/loxP 介导的同源重组技术成功敲除 *meq*、1.8 kb mRNA 等基因^[19-21]。以 686BAC 为基因组修饰平台,利用 Red 酶介导的同源重组技术敲除了 686BAC 中的 *meq*、*RR*、*vIL8* 等基因^[22]。对 MDV 基因组功

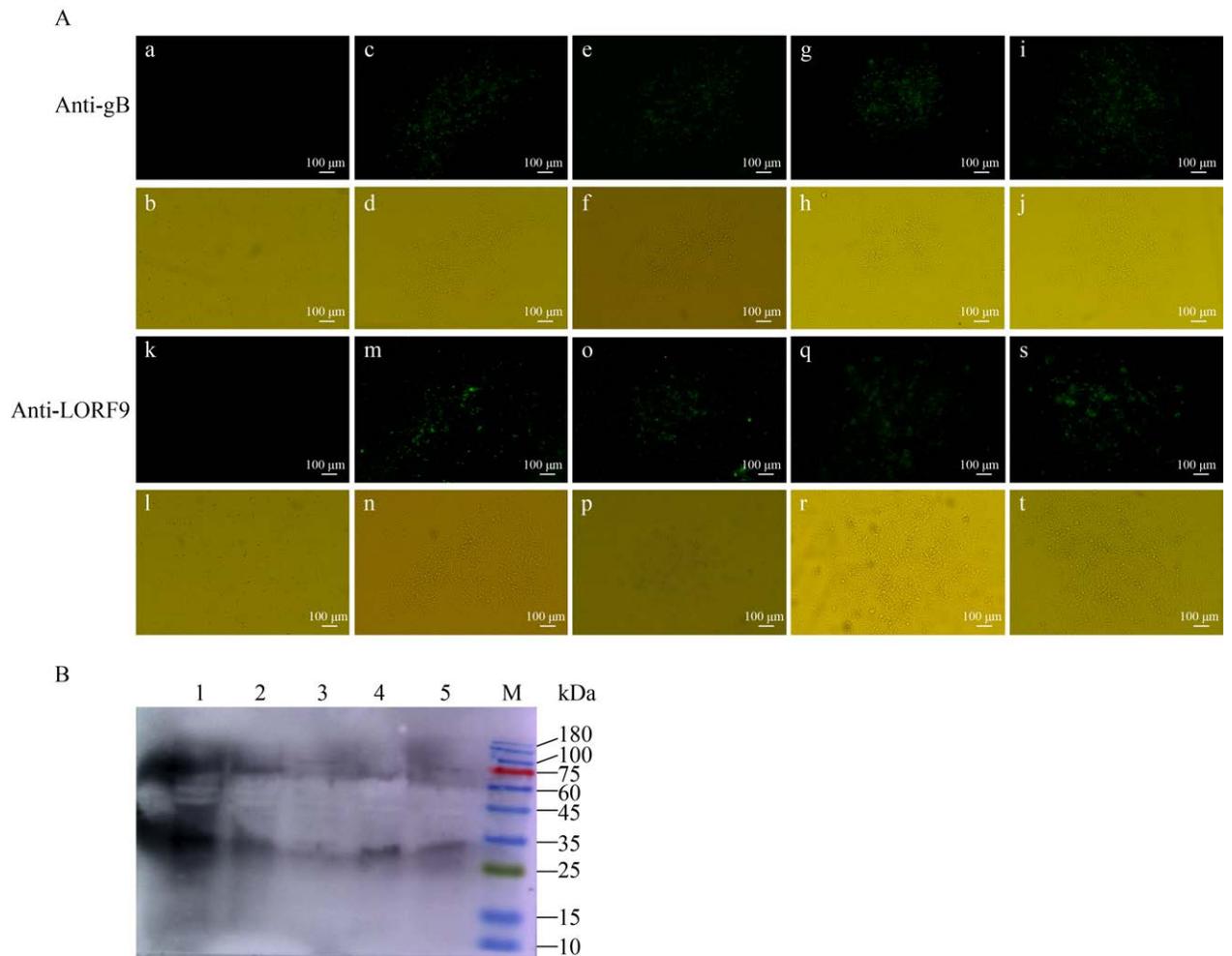


图 4 重组病毒感染 CEF 的 IFA 及 Western blotting 分析

Fig. 4 IFA and Western blotting analysis of recombinant virus infected CEF. (A) a, b, k, l represent negative control; c, d, m, n represent Md5; e, f, o, p represent Md5BAC; g, h, q, r represent Md5BACΔLORF10; i, j, s, t represent Md5BACΔLORF10-Re. Among of them, a, c, e, g, i are IFA images of plaque recognized by MDV-specific antibody gB (100×); k, m, o, q, s are IFA images of plaque recognized by MDV-specific antibody LORF9 (100×); b, d, f, h, j, l, n, p, r, t are regular images of plaque recorded by write light (100×). (B) 1: Md5BACΔLORF10-Re; 2: Md5BACΔLORF10; 3: Md5BAC; 4: Md5; 5: CEF; M: protein marker.

能的研究, 较早采用的是粘粒系统, 该系统将 180 kb 的 MDV 基因组分成 5 个基因组片段, 完成基因组修饰后, 将 5 个片段在鸡胚成纤维细胞上进行共转染, 以获得重组病毒^[7]。Silva 等利用粘粒为载体将 BAC 载体克隆到 rMd5 基因组^[9]。该修饰平台操作过程烦琐, 成功率低, 在同源重组过程中容易发生错配现象, 可能会造成重组毒株生物特性的改变。为了消除这些潜

在的影响, 本研究首次将 Md5 基因组与 BAC 载体直接连接, 构建了重组毒株 Md5BAC (图 1)。重组病毒的体外增殖并没有因为 BAC 的插入而改变 (图 4、5)。在此基因修饰平台上, 利用 Red 酶介导的两步重组法成功敲除 *lorf10* 也不影响病毒在体外细胞中的复制 (图 5), 但 *lorf10* 缺失是否影响病毒在体内的生物学特性有待于进一步验证。

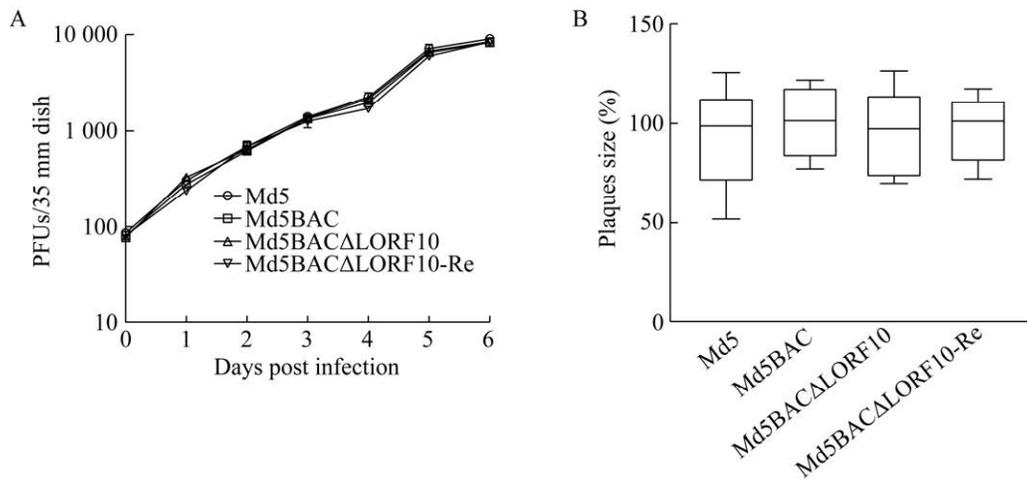


图5 重组病毒在 CEF 细胞上的增殖比较

Fig. 5 Viruses propagation analysis in CEF cell culture. (A) Viruses growth curve. (B) Plaque size assay.

Red 酶介导的同源重组是基于 Red 重组酶 (Exo、Beta、Gan 蛋白) 的基因重组技术, 利用这个技术能够高效且精准地对 MDV 基因组进行基因敲除、插入和点突变等修饰^[23-25]。相对于 Cre/loxP 进行基因修饰后会留有 22 bp 的 FRT 位点在基因组中, 为下一次基因修饰埋下隐患, Red 酶介导的同源重组技术可以任意精准地敲除、插入 MDV 基因组中的一个或多个基因, 以及进行任何基因的点突变, 相比于 CRISPR 技术^[26], Red 酶介导的同源重组技术可以方便和精准地制备复原毒株以验证敲除基因的正确性^[5,16]。本研究也首次利用 Red 酶介导的同源重组技术成功敲除了 MDVlorf10 基因, 体外试验表明, lorf10 的敲除不影响病毒增殖, 其在体内的功能仍需进一步验证。本研究为进一步构建其他疱疹病毒, 尤其是大基因组双链 DNA 病毒的基因组编辑平台进而进行相关的基因功能以及疫苗研发打下了良好的基础。

REFERENCES

- [1] Zhuang GQ, Sun AJ, Teng M, et al. A tiny RNA that packs a big punch: the critical role of a viral miR-155 ortholog in lymphomagenesis in marek's disease. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1169.
- [2] Osterrieder N, Kamil JP, Schumacher D, et al. Marek's disease virus: from miasma to model. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(4): 283-294.
- [3] Davison T, Nair V. Marek's disease: an evolving problem. Amsterdam: Elsevier, 2004.
- [4] Read AF, Baigent SJ, Powers C, et al. Imperfect vaccination can enhance the transmission of highly virulent pathogens. *PLoS Biol*, 2015, 13(7): e1002198.
- [5] Sun AJ, Luo J, Wan B, et al. *Lorf9* deletion significantly eliminated lymphoid organ atrophy induced by *meq*-deleted very virulent Marek's disease virus. *Vet Microbiol*, 2019, 235: 164-169.
- [6] Lee LF, Wu P, Sui DX, et al. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 6091-6096.
- [7] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(10): 7054-7059.
- [8] Lupiani B, Lee LF, Cui XP, et al. Marek's disease virus-encoded *meq* gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11815-11820.
- [9] Silva RF, Dunn JR, Cheng HH, et al. A MEQ-deleted Marek's disease virus cloned as a

- bacterial artificial chromosome is a highly efficacious vaccine. *Avian Dis*, 2010, 54(2): 862-869.
- [10] Hall RN, Meers J, Fowler E, et al. Back to BAC: the use of infectious clone technologies for viral mutagenesis. *Viruses*, 2012, 4(2): 211-235.
- [11] Jiang FG, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 505-529.
- [12] Zhang YY, Tang N, Sadigh Y, et al. Application of CRISPR/Cas9 gene editing system on MDV-1 genome for the study of gene function. *Viruses*, 2018, 10(6): 279.
- [13] Watanabe T, Nishimura M, Izumi T, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF66 is essential for late gene expression and virus production via interaction with ORF34. *J Virol*, 2020, 94(2): e01300-19.
- [14] Delecluse S, Poirey R, Zeier M, et al. Identification and cloning of a new western Epstein-Barr virus strain that efficiently replicates in primary B cells. *J Virol*, 2020, 94(10): e01918-19.
- [15] Kaufer BB, Trapp S, Jarosinski KW, et al. Herpesvirus telomerase RNA (vTR)-dependent lymphoma formation does not require interaction of vTR with telomerase reverse transcriptase (TERT). *PLoS Pathog*, 2010, 6(8): e1001073.
- [16] Zhao YG, Xu HT, Yao YX, et al. Critical role of the virus-encoded microRNA-155 ortholog in the induction of Marek's disease lymphomas. *PLoS Pathog*, 2011, 7(2): e1001305.
- [17] Sun AJ, Lawrence P, Zhao YG, et al. A BAC clone of MDV strain GX0101 with REV-LTR integration retained its pathogenicity. *Chin Sci Bull*, 2009, 54(15): 2641-2647.
- [18] Reddy SM, Sun AJ, Khan OA, et al. Cloning of a very virulent plus, 686 strain of Marek's disease virus as a bacterial artificial chromosome. *Avian Dis*, 2013, 57(2 Suppl): 469-473.
- [19] Sun AJ, Li YP, Wang JY, et al. Deletion of 1.8-kb mRNA of Marek's disease virus decreases its replication ability but not oncogenicity. *Virology*, 2010, 7: 294.
- [20] Sun AJ, Xu XY, Petherbridge L, et al. Functional evaluation of the role of reticuloendotheliosis virus long terminal repeat (LTR) integrated into the genome of a field strain of Marek's disease virus. *Virology*, 2010, 397(2): 270-276.
- [21] Li YP, Sun AJ, Su S, et al. Deletion of the *meq* gene significantly decreases immunosuppression in chickens caused by pathogenic Marek's disease virus. *Virology*, 2011, 8: 2.
- [22] Sun AJ, Lee LF, Khan OA, et al. Deletion of Marek's disease virus large subunit of ribonucleotide reductase impairs virus growth *in vitro* and *in vivo*. *Avian Dis*, 2013, 57(2 Suppl): 464-468.
- [23] Kuhlman TE, Cox EC. Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(6): e92.
- [24] Tischer BK, Einem JV, Kaufer BB, et al. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *BioTechniques*, 2006, 40(2): 191-197.
- [25] Kim T, Spatz SJ, Dunn JR. Vaccinal efficacy of molecularly cloned Gallid alphaherpesvirus 3 strain 301B/1 against very virulent Marek's disease virus challenge. *J Gen Virol*, 2020, 101(5): 542-552.
- [26] Luo J, Teng M, Zhai XS, et al. Efficient mutagenesis of Marek's disease virus-encoded microRNAs using a CRISPR/Cas9-based gene editing system. *Viruses*, 2020, 12(4): 466.

(本文责编 陈宏宇)