

# 不同异源启动子与 MDV gB 启动子及其复合启动子的活性比较

邱亚峰, 葛菲菲, 徐学清, 陈溥言\*

(南京农业大学动物疫病诊断与免疫重点实验室 南京 210095)

**摘要:**为了选择适宜的启动子调控外源基因的表达,以改善马立克氏病病毒为载体的重组病毒的免疫保护力。将 hCMV 立即早期启动子及增强子、SV40 早晚期启动子及增强子或 hCMV 立即早期增强子的部分序列分别与马立克氏病病毒(MDV)自身的囊膜糖蛋白 B 基因(gB)启动子核心部分在体外杂合,分别构建复合启动子  $P_{hCMV-gB}$ 、 $P_{SV-gB}$  或  $P_{en-gB}$ 。将这些启动子与虫荧光素酶报告基因相连,构建表达载体。利用脂质体将以上质粒与内标质粒(pSV- $\beta$ -LacZ)共转染鸡胚成纤维次代细胞,于转染后 48h,将细胞刮下来,利用荧光素酶测定试剂盒和  $\beta$ -半乳糖苷酶测定试剂盒分别测定转染细胞的荧光素酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性,通过荧光素酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的比值获得虫荧光素酶的相对活性,利用虫荧光素酶的相对活性进行启动子的活性比较。结果表明,复合启动子相对马立克氏病病毒自身的 gB 启动子,活性有不同程度的提高,其中复合启动子  $P_{hCMV-gB}$  的活性最高,而复合启动子  $P_{SV-gB}$  和  $P_{en-gB}$  的活性相当,但与商业强启动子相比,复合启动子活性要弱一些或相当。因此,从某种意义上讲,这些复合启动子既具有 gB 启动子的一些特性,又有商业强启动子的一些特性,为以马立克氏病病毒为载体的新兴疫苗的开发奠定了基础。

**关键词:**马立克氏病病毒;复合启动子;虫荧光素酶

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)02-0314-04

马立克氏病(Marek's disease, MD)是一种鸡的淋巴增生性肿瘤疾病,是由马立克氏病毒血清 1 型(MDV1)引起的,但是,可以由致弱的或天然不致病的疫苗株进行防治。疫苗株分为 3 种类型:致弱的血清 1 型,天然不致瘤的血清 2 型(MDV2)和天然不致病的火鸡疱疹病毒(HVT)。马立克氏病毒作为活载体插入外源基因,开发禽用疫苗有几个优点(1)一日龄免疫可以得到终生免疫;(2)宿主谱较窄,仅限于禽类,因此比较安全;(3)该病毒的基因组较大,有许多病毒复制非必须区,可以用于外源基因的插入<sup>[1]</sup>。在这些毒株中,致弱的 MDV1 如 CVI988 作为载体要明显优于 HVT。

对于疫苗的好坏主要取决于重组疫苗的稳定性和重组疫苗的免疫保护力两个因素。其中影响保护力的关键因素之一是适宜启动子的选择。重组马立克氏病毒疫苗常用的启动子有 hCMV 启动子<sup>[2]</sup>、SV40 早晚启动子<sup>[3,4]</sup>等。虽然利用外源的强启动子可以使外源基因较强的表达,但是,在免疫保护实验时经常受到母源抗体的干扰而使免疫保护力下降。有报道利用 MDV 自身的 gB 基因启动子进行重组病毒的构建,在动物实验时可以有效地避免母源抗体的干扰<sup>[1]</sup>。因此,为了提高以马立克氏病病毒为载体的重组病毒的免疫保护力,适宜启动子的筛选势在必行。

本文将 MDV 自身的 gB 基因启动子与商业化的强启动子在体外杂合,构建复合启动子,进行了适宜启动子的筛选。

基金项目:国家“863 计划”(2002AA245051)

\* 通讯作者。Tel 86-25-84396028 Fax 86-25-84396335 E-mail:aid@njau.edu.cn

作者简介:邱亚峰(1978-),男,山东济宁人,博士研究生,主要从事畜禽传染病的研究。E-mail:gffqyf@njau.edu.cn

收稿日期:2005-07-08 接受日期:2005-08-29 修回日期:2005-11-29

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒和菌种 9~10d SPF 鸡胚购自南京药械厂,原代和次代成纤维细胞(CEF)按常规方法制备。质粒 pGL3-Promoter(Cat. # E1761)和 pSV- $\beta$ -LacZ(Cat. # E1081)为 Promega 公司的产品;质粒 p<sub>hCMV</sub>-Luc(含有完整的 hCMV 启动子及增强子),pSV40-Luc(含有 SV0 启动子及增强子)和 p<sub>gB</sub>-Luc(含有 MDV gB 启动子,该启动子的克隆及功能分析另文发表)由本室构建并保存;质粒 pSK-gB(含有 MDV gB 启动子,该载体的构建另文发表),pCDNA3 和大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  由本室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶、dNTP、*rTaq* 酶和 T 载体连接试剂盒为 TaKaRa 公司产品;DNA 胶回收试剂盒为上海 Sangon 公司产品;FuGene 6 Transfection Reagent 为 Roche 公司产品;虫荧光素酶活性测定试剂盒和  $\beta$ -半乳糖苷酶测定试剂盒为 Promega 公司产品,其他试剂为分析纯。

### 1.2 引物设计和基因扩增

根据质粒 pSV- $\beta$ -LacZ 的 SV40 启动子的序列,设计一对引物,扩增大约 370bp 的 SV40 启动子核心区域(SV40 Core)(不含转录起始位点)。引物序列为 P1:5'-AGATCTGCGCA GCACCATGCCC-3'(含 *Bgl* II 酶切位点),P2:5'-CATATGACT

TCTGGAATAGCTG-3'(含 *Nde* I 酶切位点),以质粒 pSV- $\beta$ -LacZ 为模板,进行 PCR 扩增,反应条件 95°C 1min,94°C 30s,50°C 1min,72°C 45s,30 个循环,72°C 10min。

### 1.3 含复合启动子的转移载体的构建

PCR 扩增 P<sub>SV40 Core</sub>,按 T 载体连接试剂盒说明书将其克隆入 T 载体中,命名为 pMD18-T-SV40 Core,对 pGL3-Promoter 用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切以后,沉淀回收用作载体片,对质粒 pMD18-T-SV40 Core 用 *Bgl* II 和 *Nde* I 双酶切,电泳回收 P<sub>SV40 Core</sub>,对 pSK-gB(另文发表)用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切,电泳回收 gB 启动子核心部分(P<sub>gB Core</sub>),将上述酶切产物按一定比例进行连接,按常规的方法转化、提质粒以及酶切鉴定,阳性克隆命名为 pSV-gB-Luc,将 SV-gB 复合启动子命名为 P<sub>SV-gB</sub>(由 SV40 启动子及增强子的核心区域与 gB 核心启动子杂合而成)对 pCDNA3 用 *Bgl* II 和 *Nde* I 双酶切,电泳回收 470bp 左右的片段,该片段含有 hCMV 增强子的大部分序列,将该片段、pGL3-Promoter 用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切的结果以及 pSK-gB 用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切结果,按一定比例进行连接,按常规的方法转化、提质粒以及酶切鉴定,阳性克隆命名为 pen-gB-Luc,该复合启动子命名为 P<sub>en-gB</sub>(由 hCMV 增强子的部分序列与 gB 核心启动子杂合而成);对 pSV-gB-Luc 先用 *Nde* I 酶切,回收产物用 T4 DNA 聚合酶补平,再用 *Bgl* II 单酶切,电泳回收用作载体,另一方面对 pHCMV-Luc 先用 *Hind* III 单酶切,回收产物用 T4 DNA 聚合酶补平,再用 *Bgl* II 单酶切,电泳回收约 750bp 的片段,将上述两片段进行连接,按常规的方法转化、提质粒以及酶切鉴定,阳性克隆命名为 pHCMV-gB-Luc,该复合启动子命名为 P<sub>hCMV-gB</sub>(由完整的 hCMV 启动子及增强子与 gB 核心启动子杂合而成)。

### 1.4 CEF 的瞬时转染

按脂质体(FuGene 6 Transfection Reagent)使用说明书的方法进行转染。制备 CEF 的次代细胞,以  $9 \times 10^5$  的细胞接种 6 孔板,10% FCS,37°C 5% CO<sub>2</sub> 的条件培养 10~12h 以后,换上没有血清,没有双抗的 DMEM 营养液培养 1h,转染时再用上述营养液洗两边,制备转染试剂,取 97 $\mu$ L 没有血清的 DMEM,加入一灭菌的 Eppendorf 管中,然后加入 3 $\mu$ L 脂质体,轻敲管壁将其混匀,加 1 $\mu$ g 的 DNA 混合物(含有虫荧光素酶基因的质粒和内标质粒 pSV- $\beta$ -LacZ,两者各为 0.5 $\mu$ g)入上述溶液中,轻敲管壁将其混匀,放置于室温 15min,将其加入到裸的细胞上,随后补加无血清的营养液 900 $\mu$ L,旋转细胞培养板将其混匀,放置细胞培养箱中 4h 以后将营养液吸出,每孔加入 5% FCS 的营养液 2mL,继续培养直到对细胞进行处理为止。

### 1.5 虫荧光素酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶活性分析

根据 Promega 试剂盒说明书进行操作,具体做法:细胞转染 48h 后,弃营养液,加入 2~3mL PBS(无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>)洗涤 3 次,每孔加入 200 $\mu$ L 在室温下平衡好的 1 $\times$  Reporter Lysis Buffer,摇动培养板以使试剂分布均匀,室温下感作 15min(在感作的时候每两分钟摇动培养板一次),用细胞刮子将细胞从培养板上刮下来,将细胞裂解液转移到 1.5mL 离心管中,放置冰上,用震荡器混匀 10~15s,4°C 12000r/min 离心 2min,

将上清液移置新的离心管中待测或 -70°C 保存备用。

**1.5.1 虫荧光素酶活性的测定:**吸取 100 $\mu$ L Luciferase Assay Buffer 于测定管中,加入 20 $\mu$ L 细胞裂解上清液充分混匀,用 Lumant LB9507 荧光粒子计数器记数 10s 内的荧光光子数。

**1.5.2  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的测定:**取 150 $\mu$ L 细胞裂解上清液于离心管中,加入 150 $\mu$ L 2 $\times$  Assay Buffer 震荡混匀,37°C 孵育 30min(出现淡黄色),加 500 $\mu$ L 碳酸氢钠(1mol/L)充分混匀终止反应,在分光光度计 420nm 波长下读数。

**1.5.3 数据分析:**以  $\beta$ -半乳糖苷酶活性作为细胞转染效率的校正标准,将测得各启动子的荧光素酶的活性与各转染细胞的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性相比,得到启动子的荧光素酶的活性的相对值,每种启动子转染 3 次,得到 3 个相对值,然后取其平均值,数据用平均数  $\pm$  标准差(Mean  $\pm$  SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 SV40 启动子及增强子的核心区域的 PCR 结果

根据质粒 pSV- $\beta$ -LacZ 的 SV40 启动子的序列,设计一对引物,扩增大约 370bp 的 SV40 启动子及增强子的核心区域(P<sub>SV40 Core</sub>)(不含转录起始位点),PCR 产物经电泳鉴定后,发现扩增出约 370bp 的片段,与预期的结果相符。

### 2.2 pSV-gB-Luc 转移载体的构建

用 *Bgl* II 和 *Nde* I 双酶切 pMD18-T-SV40 Core,回收大约 370bp 的 SV40 启动子的核心区域,用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切 pSK-gB,回收大约 200bp 的 gB 启动子的核心区域,用 *Bgl* II 和 *Hind* III 消化 pGL3-Promoter,回收后与上面两目的片段同时连接。筛选阳性质粒 pSV-gB-Luc,用 *Bgl* II 和 *Hind* III 消化 pSV-gB-Luc,可切出约 600bp 的 SV-gB 复合启动子。以 pSV-gB-Luc 为模板,用 PCR 方法可扩增出约 370bp 的片段。酶切鉴定和 PCR 结果与预期的相符,说明获得阳性质粒 pSV-gB-Luc。

### 2.3 pen-gB-Luc 转移载体的构建

对 pCDNA3 用 *Bgl* II 和 *Nde* I 双酶切,电泳回收 470bp 左右的片段(含有 hCMV 增强子的大部分序列),用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切 pSK-gB,回收约 200bp 的 gB 启动子核心区域,用 *Bgl* II 和 *Hind* III 消化 pGL3-Promoter,回收后与上面两目的片段同时连接。筛选阳性质粒 pen-gB-Luc,用 *Bgl* II 和 *Hind* III 消化 pen-gB-Luc,可切出约 700bp 的 en-gB 复合启动子。酶切鉴定结果与预期相符,表明获得阳性重组质粒 pen-gB-Luc。

### 2.4 pHCMV-gB-Luc 转移载体的构建

用 *Hind* III 消化 pHCMV-Luc,回收产物用 T4 DNA 聚合酶补平,再用 *Bgl* II 单酶切,电泳回收约 750bp 的片段;用 *Nde* I 消化 pSV-gB-Luc,回收产物用 T4 DNA 聚合酶补平,用 *Bgl* II 单酶切,电泳回收后,与目的片段连接。筛选阳性质粒 pHCMV-gB-Luc,用 *Bgl* II 和 *Eco*R I 可以切出 1.0kb 的片段。酶切鉴定结果与预期相符,表明获得阳性重组质粒 pHCMV-gB-Luc。

### 2.5 启动子在 CEF 中的活性检测

将含有待测启动子活性的质粒载体(图 1)与内标质粒,用脂质体共转染入 CEF,于 48h 以后收集细胞,分析虫荧光素

酶和β-半乳糖苷酶活性,获得虫荧光素酶的相对活性(测得的数据见表1和表2,由于受到细胞数量、转染的效率、细胞状态等因素的影响,因此,不同表之间相同的启动子的数据没有可比性)。比较发现,复合启动子的活性都比完整的gB启动子活性高,其中P<sub>SV-gB</sub>大约是P<sub>gB</sub>活性的11倍左右,但是,要比完整的SV40启动子的活性要弱(图2-B);P<sub>en-gB</sub>的活性大约是P<sub>gB</sub>活性的10倍左右,而P<sub>hCMV-gB</sub>的活性要比P<sub>en-gB</sub>的高,但是比P<sub>hCMV</sub>的活性弱(图2-A)。

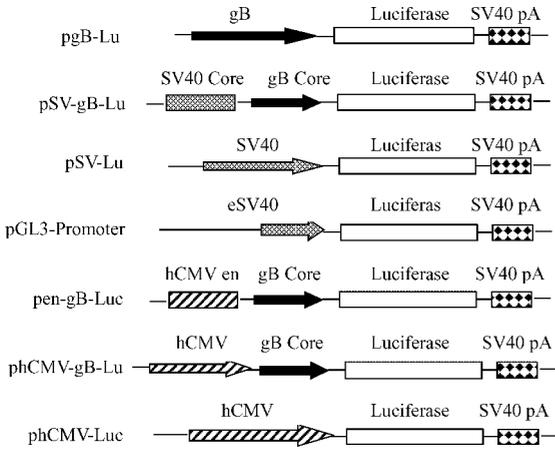


图1 转移质粒载体的结构

Fig.1 Structure of plasmid vector.

表1 以hCMV启动子及增强子元件与MDV gB核心启动子杂合构建的复合启动子活性测定

Table 1 Analysis of the activity of the composed promoters which were synthesized by hCMV promoter and enhancer with MDV gB core promoter

Name of plasmid	The activity of luciferase ( luc )	The activity of β-galactosidase ( lac )	The relative luciferase activity ( luc/lac )	Average	SD
pGL3-Promoter	85146	0.988	86180	86041	296.98
	83214	0.959	85700		
	84321	0.981	86243		
pgB-Luc	62994	0.976	64543	65934	1663.70
	32940	0.486	67777		
	58721	0.897	65482		
pen-gB-Luc	414650	0.736	592357	604223	10509.50
	551121	0.893	612357		
	607800	0.954	607956		
phCMV-gB-Luc	3119573	1.342	2324570	2336985	13771.92
	3706435	1.576	2351799		
	2960256	1.268	2334587		
phCMV-Luc	5069694	1.984	2555289	2554612	17506.8
	2898651	1.135	2553877		
	3203576	1.254	2554686		

The comparison for transcriptional activity of promoter was carried out by use of the average of the relative luciferase activity of every promoter. But for every promoter, three of relative luciferase activity was obtained by transfecting the CEF three times.

表2 以SV40启动子及增强子元件与MDV gB核心启动子杂合构建的复合启动子活性测定

Table 2 Analysis of the activity of the composed promoters which were synthesized by SV40 promoter and enhancer with MDV gB core promoter

Name of plasmid	The activity of luciferase ( luc )	The activity of β-galactosidase ( lac )	The relative luciferase activity ( luc/lac )	Average	SD
pGL3-Promoter	742840	0.867	856794	835327	26309.1
	779380	0.967	805978		
	668665	0.793	843210		
pgB-Luc	602444	0.998	603651	603430	112990.4
	1151903	1.686	683216.5		
	574196	1.097	523423.9		
pSV-gB-Luc	19513636	2.917	6689625	6613095	66717.73
	19201130	2.917	6582492		
	19156434	2.917	6567170		
pSV40-Luc	45231528	2.741	16501834	16516058	79755.79
	45505996	2.741	16601969		
	37230056	2.264	16444371		

The comparison for transcriptional activity of promoter was carried out by use of the average of the relative luciferase activity of every promoter. But for every promoter, three of relative luciferase activity was obtained by transfecting the CEF three times.

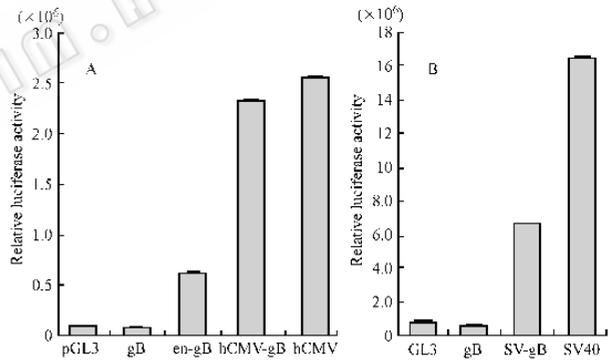


图2 不同启动子活性比较

Fig.2 Comparison of the activity of different promoters.

### 3 讨论

MDV基因的转录和翻译,是受到严格调控的。如当病毒感染细胞时,病毒基因的表达分为3个时期:立即早期、迟早期和晚期。但是,以MDV构建重组病毒时,异源的强启动子受到病毒的调控较少,在重组病毒免疫的早期,该启动子所控制地保护抗原基因大量表达,与机体中针对该抗原的母源抗体发生反应,使得针对该抗原的母源抗体下降,从而降低了机体对某种疾病的早期保护。如利用马立克氏病毒载体表达NDV F基因<sup>[3]</sup>,IBDV VP2基因<sup>[4]</sup>等,免疫效果不同程度地受到母源抗体的干扰。但是, Sonoda等<sup>[1]</sup>利用MDV I型自身的gB启动子构建重组病毒,表达NDV的F基因,免疫商品鸡,可以提供100%的保护,同时,并不影响重组病毒的稳定性。因此,进一步证实了MDV I型自身的gB启动子受到严格地调控,可以避免母源抗体的干扰,保证了免疫保护力。

真核基因转录的顺式作用元件按照功能可以分为启动子、增强子等,而启动子本身又有近端的(转录起始点和

TATA 盒等构成)核心启动子和远端的上游启动子之分<sup>[5]</sup>。复合启动子的构建,是将不同来源的启动子或增强子元件在体外进行杂合而成,如 CBA 启动子,是将 hCMV 的增强子与鸡的  $\beta$ -actin 启动子体外杂合而成,该启动子在多种细胞中具有较强转录活性<sup>[6,7]</sup>。

本研究一方面基于异源强启动子转录的高效性和 MDV 自身的 gB 启动子转录受到病毒复制的严格调控的特点,将来源于不同启动子的元件体外杂合,构建复合启动子,以期筛选到既能使外源基因高效表达,又可以避免母源抗体干扰的复合启动子,另一方面,通过启动子的改造,为开发具有独立自主知识产权的重组病毒疫苗奠定基础。

本文首次将 MDV I 型自身的 gB 启动子的核心区与其它的启动子元件进行体外杂合,构建复合启动子。通过对启动子的活性比较发现,复合启动子的活性相对于完整的 gB 启动子活性有不同程度的提高。其中  $P_{SV-gB}$ (由 SV40 核心启动子及增强子与 gB 核心启动子杂合而成)的活性约为 gB 启动子活性的 10 倍,同时,要比 SV40 早期启动子的活性高的多,说明 72bp 的增强子在 CEF 中可以增强转录,这一结果与国外学者的结论相符<sup>[8,9]</sup>。而  $P_{en-gB}$ (由 hCMV 增强子部分序列与 gB 核心启动子杂合而成)的活性与  $P_{SV-gB}$  的活性相当(根据两组数据中复合启动子与 gB 启动子活性比较获得),但是,要比  $P_{hCMV-gB}$ (由完整的 hCMV 的启动子及增强子和 gB 核心启动子杂合而成)的活性低,而  $P_{hCMV-gB}$  的活性要比  $P_{hCMV}$  的活性低。从某种意义上讲,该复合启动子的活性高低,受到不同来源的启动子元件的调控,使得这些复合启动子不仅具有强启动子的特性(复合启动子的活性比完整的 gB 启动子活性高,说明强启动子的元件在起作用),而且,具有 gB 启动子的一些特性(复合启动子的活性比完整的强启动子弱,说明 gB 启动子的元件在起作用),为下一步利用复合启动子构建重组病毒奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] Masashi S, Yumiko H, Hiroaki M, et al. Construction of recombinant Marek's disease virus type 1 (MDV1) expressing the *Escherichia coli LacZ* gene as a possible live vaccine vector: the US10 gene of MDV1 as a stable insertion site. *Vaccine*, 1994, **12** (10): 953-957.
- [2] 张雪莲, 范伟兴, 周玉传, 等. 表达绿色荧光蛋白的重组 CV1988 病毒的构建及特性分析. *中国病毒学*, 2003, **18** (5): 468-472.
- [3] Masashi S, Hideki N, Kengo S. Protection of chickens with or without maternal antibodies against both Marek's and Newcastle diseases by one-time vaccination with recombinant vaccine of Marek's disease virus type 1. *Vaccine*, 1998, **16**: 472-475.
- [4] Kenji T, Chiaki Y, Nobuhiko T. Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2. *Virology*, 1999, **257**: 352-362.
- [5] 沈翊琪, 方福德. 真核基因表达调控. 北京: 高等教育出版社, 施普林格出版社, 1997: 21.
- [6] Sangmi C, Thereses A, Kai-c S, et al. Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 2002, **20**: 139-145.
- [7] Zhi LX, Hiroyuki M, Akiko IW, et al. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*, 2001, **272**: 149-156.
- [8] Moreau P, Hen R, Wasylyk B, et al. The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. *Nucleic Acid Res*, 1981, **9** (22): 6047-6068.
- [9] Pontus B, Malihe E, Song X, et al. Electroporation in combination with a plasmid vector containing SV40 enhancer elements results in increased and persistent gene expression in mouse muscle. *Biochemical and Biophysical Communications*, 2002, **298**: 505-510.

## Comparison of the relative luciferase activity in secondary CEF by different heterogenous strong promoters, MDV gB promoter and the composed promoters

QIU Ya-feng, GE Fei-fei, XU Xue-qing, CHEN Pu-yan\*

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** To improve the protection efficiency of the recombinant Marek's disease viruses (MDV) in chickens with or without maternal antibodies, the work of selecting the optimal promoters for the construction of recombinant MDV was carried out. Combined with the efficient genetic manipulation, the composed promoters were constructed by use of the MDV gB core promoter with the regulatory elements from the early immediately promoter and enhancer of hCMV, the promoter and enhancer of SV40 or the partial enhancer of hCMV. And these composed promoters were ligated to the luciferase to construct the eukaryotic expressing vectors and named  $P_{hCMV-gB}$ ,  $P_{SV-gB}$  and  $P_{en-gB}$ , respectively. In vitro, these vectors and internal standard plasmid (pSV- $\beta$ -LacZ) were transiently co-transfected into secondary CEF by FuGene 6 Transfection Reagent. Furthermore, cells were harvested 48 hours after transfection. Then the luciferase activity was detected by a luciferase assay kit, at the same time, the  $\beta$ -galactosidase enzyme activity was detected by a  $\beta$ -galactosidase enzyme assay kit, and the luciferase activity was corrected by the  $\beta$ -galactosidase enzyme activity to get the relative luciferase activity. The relative luciferase activity was used as the transcriptional activity. By comparison of the relative luciferase activity of every promoter, it was found that these composed promoters could more effectively drive the reporter gene expression than the full length of gB promoter did. Among them,  $P_{hCMV-gB}$  robustly drove the reporter gene expression. On the other hand,  $P_{SV-gB}$  and  $P_{en-gB}$  appeared to have the same strength; But compared with the commercial strong promoters, the transcriptional activity of the composed promoter were less than as or the same as that of the strong promoters. Therefore, at a sense, it can be proposed that these composed promoters have not only the characteristic of MDV gB promoter, but also that of the commercial strong promoters. These provide the choices for further developing the new-type recombinant MDV vaccine.

**Keywords:** Marek's disease virus; Composed promoter; Luciferase

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2002AA245051)

\* Corresponding author. Tel: 86-25-84396028; Fax: 86-25-84396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

Received 8 July 2005/Accepted 29 August 2005/Revised 29 November 2005