

马立克氏病病毒 meq 基因敲除株感染性克隆的免疫效果评价

李延鹏¹, 康孟佼², 苏帅³, 丁家波², 崔治中³, 朱鸿飞^{1*}

(¹ 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

(² 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

(³ 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要:【目的】比较和评价了敲除 meq 基因的 MDV 感染性克隆作为新型 DNA 疫苗的免疫保护效果。【方法】将 1 日龄 SPF 鸡饲养于正压过滤空气的 SPF 动物饲养隔离罩内。1 日龄时, 将 SPF 鸡以 10 μg / 只的剂量通过大腿肌肉注射的方式接种溶解于 PBS 缓冲液中的敲除 meq 基因的 MDV 感染性克隆 GX0101 Δ meq-BAC, 分别在免疫后 5 天或 12 天以 500 PFU/只的剂量接种超强毒 rMd5。饲养 90 天, 观察死亡情况, 对每一只鸡剖检并取心脏与肝脏做石蜡切片, 进行病理观察。【结果】免疫 5 天后攻毒, CVI988/Rispens 对超强毒 rMd5 的保护指数可达到 87%, GX0101 Δ meq-BAC 对 rMd5 的保护指数仅达 33%; 而免疫 12 天后对 rMd5 的保护指数为 53%。【结论】相对于细胞结合疫苗 CVI988/Rispens, DNA 疫苗在机体内的病毒拯救是使其获得保护力的前提条件, 因此有一定的免疫空当期。以 GX0101 Δ meq-BAC 作为疫苗免疫不仅能使雏鸡在受到超强毒感染时发病延迟, 而且还能提供较好的免疫保护效果。

关键词: 马立克氏病病毒; meq 基因敲除; 感染性克隆; 免疫效果

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0942-07

马立克氏病 (Marek's disease, MD) 是由马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 引起的全球范围内的鸡的一种传染性肿瘤病, 它以 T 淋巴细胞瘤、多发性神经炎、免疫抑制为主要特征。马立克氏病病毒可经空气传播, 传染力很强, 未经免疫的易感鸡群感染可造成很高的死亡率^[1-2]。接种疫苗是预防和控制该病的主要途径, 同时, 该病也是世界上第一个可以用疫苗来预防的肿瘤性疾病。目前商品化的马立克氏疫苗为致弱的 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; 其中最有效、应用最广泛的疫苗为 CVI988/Rispens 株^[2-6]。

上述传统的 MDV 疫苗对控制 MD 发挥了巨大作用, 但是传统疫苗却存在着许多的缺点。MDV 疫苗用原代鸡胚成纤维细胞 (chicken embryo fibroblast, CEF) 进行生产, 因此需要消耗大量 SPF 鸡胚; 同时由于 MDV 严格的的细胞结合特性导致在生产中不可能获得足够量的细胞游离病毒, 因此目前广泛使用的细胞结合型 MDV 疫苗必须与细胞保存于液氮中超低温储存和运输^[7], 储存运输成本高, 使用不方便。HVT 疫苗虽可以冻干保存, 但因其保护效果差及受母源抗体的影响比较大等因素均限制了其广泛使用^[8]; 更为严峻的是, MDV 自被发现以来, 其毒力有不断增强的趋势^[9], 特别是对于

基金项目: 国家自然科学基金 (30671571)

* 通信作者。Tel: +86-10-62819061; Fax: +86-10-62819061; E-mail: bioclub@vip.sina.com

作者简介: 李延鹏 (1979-), 男, 山东济宁人, 博士研究生, 主要从事动物疫苗与分子免疫学研究。E-mail: liyanpeng79@163.com

收稿日期: 2010-03-21; 修回日期: 2010-04-12

近年出现的 MDV 特超强毒株, 目前使用的 MDV 疫苗并不能提供足够的免疫保护力。随着对 MDV 分子生物学特别是基因功能研究的逐步深入, 基因的重组技术为获得高效疫苗提供了新的途径, 其中以禽痘病毒作为载体表达 MDV 的外源基因^[10-11]、构建 MDV 致病基因缺失株^[12]以及 DNA 疫苗^[13]都为尽可能获得更为有效的 MDV 疫苗提供了更好的思路。

本实验室于 2001 年在中国广西分离了一株 MDV, 命名为 GX0101, 以细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosomes, BAC) 为载体我们成功地构建了 MDV 中国流行株-GX0101 的感染性克隆 bac-GX0101^[14]。在 BAC 克隆的基础上又构建了敲除 meq 基因 (致病致肿瘤相关基因) 的突变株 GX0101 Δ meq, 通过 SPF 鸡进行的实验证明 GX0101 Δ meq 可在鸡体内稳定复制, 对鸡没有致病性, 以其作为候选疫苗进行的免疫效力试验表明, GX0101 Δ meq 能诱导比 CVI988/Rispens 疫苗株更好的对 MD 超强毒 rMd5 的免疫保护效果^[15]。含有 MDV 全基因组的 BAC 克隆, 不但有利于研究 MDV 基因的功能^[16-17], 而且将感染性克隆的 DNA 注入活体内可以拯救出活病毒, 其本身也可以作为一种新型的 DNA 疫苗^[13, 18]。本实验首次利用敲除马立克病毒强毒株-GX0101 Meq 基因的感染性质粒 GX0101 Δ meq-BAC 免疫 1 日龄 SPF 鸡, 研究发现以 GX0101 Δ meq-BAC 作为疫苗免疫雏鸡能在超强毒攻击时提供一定的免疫保护, 为 MDV 新型疫苗的研制提供了新的思路和技术途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 SPF 鸡胚和质粒: 9-10 日龄 SPF 鸡胚购自济南斯帕法斯家禽有限公司; CVI988/Rispens 为商品疫苗株, MDV 超强毒参考株 rMd5^[19]由美国农业部禽病与肿瘤研究所馈赠。敲除 meq 基因的 MDV 的感染性质粒 GX0101 Δ meq-BAC 及用来免疫的含有 BAC 骨架的对照质粒 pDS-pHAI-US2^[14]由本实验室构建保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: 细胞培养基购自美国 Invitrogen 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。质粒提取试剂盒购自德国 Qiagen 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。二氧化碳培养箱购于上海力申科学仪器有限公司。

1.2 GX0101 Δ meq-BAC 作为疫苗的免疫效力实验

为了研究 GX0101 Δ meq-BAC 作为 DNA 疫苗的免疫保护效果, 将 90 只 1 日龄 SPF 鸡随机分为 6 组, 每组 15 只, 分别饲养于 6 个带有正压过滤空气的 SPF 动物饲养隔离罩内。1 日龄, 第 1、2 组鸡以 10 μ g/只的剂量大腿肌肉接种 GX0101 Δ meq-BAC, 第 3 组鸡以 2000 PFU/只的剂量腹腔接种 CVI988/Rispens 疫苗株, 第 4 组鸡以 10 μ g/只的剂量大腿肌肉接种 pDS-pHAI-US2 质粒作为免疫对照组, 第 5 组鸡大腿肌肉注射等体积的 PBS 缓冲液, 作为攻毒对照组, 第 6 组鸡为空白对照组。第 1 组鸡在免疫后 12 天以 500 PFU/只的剂量攻击 MDV 超强毒 rMd5, 第 2、3、4、5 组鸡均在免疫 5 天后以 500 PFU/只的剂量攻击 MDV 超强毒 rMd5。在免疫、攻毒后观察各组鸡的生长态势, 记录各组鸡只死亡情况并对死亡鸡只剖检, 取疑似马立克特有病变脏器做石蜡切片, HE 染色, 进行病理组织学观察。在攻毒后 13 周, 剖检所有的存活鸡, 眼观大体病变。同时分别取心脏、肝脏于 10% 中性福尔马林固定, 4 $^{\circ}$ C 保存。石蜡切片, HE 染色, 进行病理组织学观察。

GX0101 Δ meq-BAC 免疫感染 rMd5 组与 CVI988/Rispens 免疫感染 rMd5 组以及攻毒对照组鸡死亡后剖检观察病变, 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只数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 (protection index, PI) 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^[12]。

2 结果

2.1 GX0101 Δ meq-BAC 免疫后感染 rMd5 各组鸡的临床与剖检观察

各组鸡在免疫攻毒后进行临床观察, 在攻毒后 13 周处死并剖检所有存活鸡, 进行肉眼观察。空白对照组鸡群个体大小均匀, 长势正常。与空白对照组相比。第 5 组攻毒对照组与第 4 组 pDS-pHAI-US2 质粒免疫组的鸡感染 rMd5 后鸡群个体消瘦且

大小不均,羽毛粗乱、无光泽,生长发育迟缓;第5组攻毒对照组死亡14只鸡,个别出现失明,双侧肢体瘫痪;内脏出现严重的鸡马立克氏病特有的白色肿瘤结节;pDS-pHAI-US2免疫对照组死亡13只鸡,剖检,内脏出现严重的鸡马立克氏病典型病变,肿瘤明显。CVI988/Rispens疫苗免疫组仅死亡1只鸡,出现典型的神经症状,但剖检没有发现可眼观的典型鸡马立克氏病病变,其余鸡只均正常。GX0101 Δ meq-BAC免疫12d后攻毒组,鸡群个体大

小均匀,长势正常,有5只鸡死亡,经过剖检,发现其内脏有轻度的马立克氏病症状,其余鸡正常;免疫5d后攻毒组,鸡大小不均,生长发育状况差,有8只鸡死亡,个体瘦弱,个别出现肢体麻痹现象,经过剖检发现有不同程度的脾脏、坐骨神经肿大;腺胃黏膜出血、脱落;肝脏、脾脏、心脏出现较大的白色肿瘤结节等典型的马立克氏病症状。各组鸡免疫攻毒后的存活率曲线(图1)。



组鸡 rMd5 攻毒后的存活率曲线

Fig. 1 Survival curves after rMD5-challenge in chickens vaccinated with GX0101 Δ meq-BAC or CVI988/Rispens or pDS-pHAI-US2 and the control group. Each chicken was immunized at 1 day of age and maintained in isolation for 13 weeks. Non-immunization group served as the negative control. The groups 1 and 2 were inoculated intramuscularly with 10 ug of GX0101 Δ meq-BAC/chicken and the group 3 was immunized intraperitoneally with 2000 PFU of CVI988/Rispens/chicken and the group 4 was inoculated intramuscularly with 10 ug of pDS-pHAI-US2 at 1 day of age. Chickens in group 2, group 3 or group 4 were challenged with 500 PFU of rMd5 strain at day 5 and the group1 was challenged at day 12. The mortalities of different groups were recorded weekly. Dead chickens during the experiment were evaluated for MDV-specific gross lesions.

2.2 GX0101 Δ meq-BAC 免疫后感染 rMd5 各组鸡病理变化

为了更细致客观的评价 GX0101 Δ meq-BAC 的保护性, 整个实验过程, 每组死亡鸡或最后处死鸡均做剖检, 并取心脏、肝脏做石蜡切片, 进行组织病理学观察, 部分病理图片见图 2, 与空白对照组鸡的内脏器官切片相比; GX0101 Δ meq-BAC 免疫 12 d 后攻毒组心肌纤维正常, 心肌纤维间有少量的淋巴细胞浸润; 免疫 5 d 后攻毒组存活鸡心肌纤维正常, 心肌纤维间有少量的淋巴细胞浸润但淋巴细胞未聚集成灶, 未形成肿瘤结节, 死亡鸡只心肌纤维间大量的中大小淋巴细胞集聚成灶, 取代正常心肌纤维细胞。CVI988/Rispens 免疫组绝大多数心肌纤维正常, 无任何病变, 极少数有微量淋巴细胞浸润。pDS-pHAI-US2 免疫组与攻毒对照组切片显示心肌纤维萎缩, 间质增宽, 大中小淋巴细胞在心肌纤维间浸润性生长、压迫, 取代正常心肌纤维细胞。GX0101 Δ meq-

BAC 免疫后 12 d 攻毒组与空白对照组相比肝细胞索间少量的淋巴细胞浸润; 免疫后 5 d 攻毒组肝细胞索间质增宽, 其间少量的淋巴细胞浸润, 个别区域淋巴细胞聚集成病灶。CVI988/Rispens 免疫组肝细胞有轻微的颗粒变性。pDS-pHAI-US2 免疫组与攻毒对照组切片显示大中小淋巴细胞形成的肿瘤灶压迫并取代正常肝组织, 同时可见肿瘤细胞周边肝细胞坏死、崩解, 被淋巴细胞取代。

总体来讲, 攻毒对照组与 pDS-pHAI-US2 质粒免疫组组织损伤明显, 切片全部呈现不同严重程度的马立克氏病组织学病变, 显示马立克氏病组织学病变切片比例为 30/30。CVI988/Rispens 免疫组有 3/30 的切片显示轻度的马立克氏病组织学病变。在 GX0101 Δ meq-BAC 免疫后 5 d 攻毒, 有 19/30 的切片显示不同严重程度的马立克氏病组织学病变, 免疫后 12 d 攻毒, 显示马立克氏病组织学病变切片比例为 12/30。

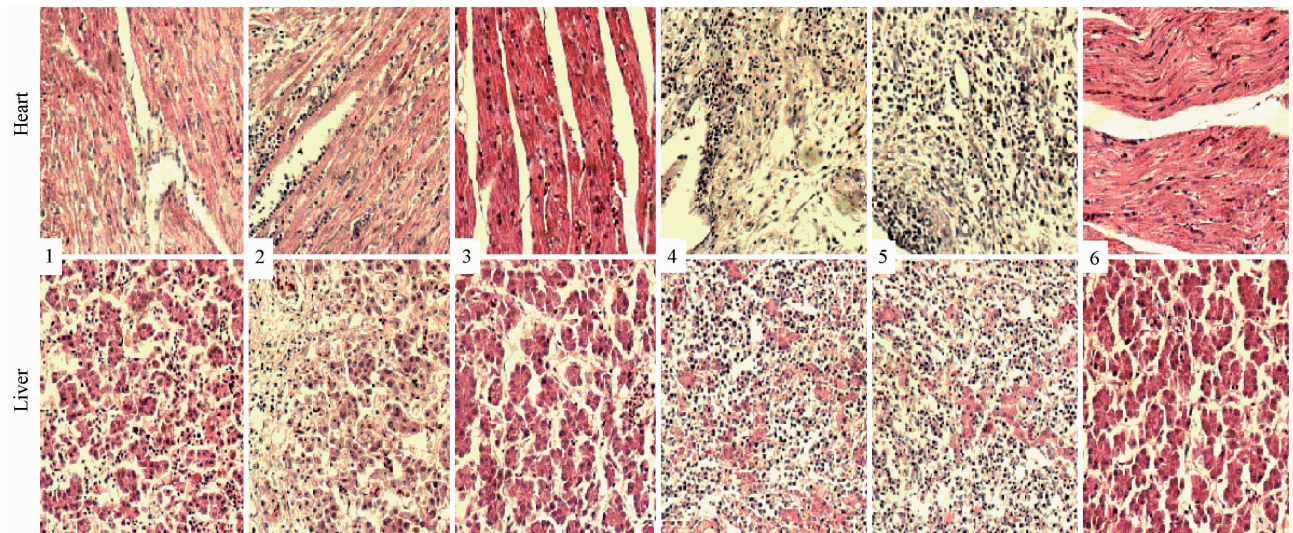


图 2 各组鸡感染 rMd5 后 90 天心脏、肝脏的病理组织切片 (H. E 染色, 200 ×)

Fig. 2 Comparisons of heart and liver histo-sections from chickens sacrificed 90 days after challenge with vvMd5 in different groups (H. E, 200 ×).

1: GX0101 Δ meq-BAC + rMD5 at day 12; 2: GX0101 Δ meq-BAC + rMD5 at day 5; 3: CVI988/Rispens rMD5 at day 5; 4: pDS-pHAI-US2 + rMD5 at day 5; 5: PBS + rMD5 at day 5; 6: Control.

2.3 GX0101 Δ meq-BAC 作为 DNA 疫苗对 SPF 鸡的保护效果

通过在 GX0101 Δ meq-BAC 免疫后不同时间攻击超强毒 rMd5 观察 GX0101 Δ meq-BAC 对 SPF 鸡的保护效果, 同时比较了 GX0101 Δ meq-BAC 作为候选 DNA 疫苗和 CVI988/Rispens 疫苗的保护率。各组鸡在整个实验过程中的死亡情况及各疫苗的保护效果见表 1。攻毒对照组与 pDS-pHAI-US2 质粒免疫对照组表现出 100% 的鸡马立克氏病特有的死亡和

损伤现象; 同期 CVI988/Rispens 免疫后感染 rMd5 的 SPF 鸡群则表现出 13% 的鸡马立克氏病特有的死亡和损伤现象, CVI988/Rispens 对超强毒 rMd5 的保护指数可达到 87%。GX0101 Δ meq-BAC 免疫 5 d 后感染 rMd5 组表现出 67% 的鸡马立克氏病特有的死亡和损伤现象, 对 rMd5 的保护指数仅达到 33%; 免疫 12 d 后感染 rMd5 组表现出 47% 的鸡马立克氏病特有的死亡和损伤现象, GX0101 Δ meq-BAC 对 rMd5 的保护指数可以达到 53%。

表 1 GX0101Δmeq-BAC 免疫后对超强毒的抵御效果

Table 1 Preventive effect of GX0101Δmeq-BAC vaccination against vvMDV challenge

Vaccines	Challenged with/d	Mortality/%	MD lesions/%	PI ^a
GX0101Δmeq-BAC	rMd5(12)	5/15(33)	7/15(47)	53 ^a
GX0101Δmeq-BAC	rMd5(5)	8/15(53)	10/15(67)	33 ^b
CVI988/Rispens	rMd5(5)	1/15(6.7)	2/15(13)	87
pDS-pHAI-US2	rMd5(5)	13/15(87)	15/15(100)	-
PBS	rMd5(5)	14/15(93)	15/15(100)	-
Control	-	0/15(0)	0/15(0)	-

Note: One-day-old SPF chickens were vaccinated with the GX0101Δmeq-BAC or CVI988/Rispens vaccine and challenged 5 or 12 days later with rMd5 strain. Mortality were observed for 13 weeks after chickens challenged with rMd5 strain, and both dead and survival chickens necropsies were subjected to examinations. PI = protection index. ^a indicates significant difference ($p < 0.05$) in PI among the two experimental groups.

3 讨论

与其它疱疹病毒一样,MDV 的基因组 DNA 具有感染性^[20],通过把含有 MDV 基因组的 BAC 克隆转到敏感细胞上可以很容易拯救出病毒^[21]。基于这种原理,最近,Tischer^[13]利用减毒的 MDV 584A p80C 株(其保护效果与 CVI988/Rispens 相当)的感染性克隆 BAC20 作为 DNA 疫苗并对其免疫效率进行了检验,试验结果表明:BAC20 作为 DNA 疫苗的免疫效果(42% 的保护率)低于 CVI988/Rispens 疫苗株(约 75% 的保护率);该研究同时比较了质粒 DNA 以不同免疫形式(溶于 PBS 中、磷酸钙沉淀、壳聚糖包裹、在 DH10B 大肠杆菌中及利用基因枪)免疫 1 日龄鸡后的保护效果,发现质粒 DNA 以溶于 PBS 的方式免疫鸡的效果要远远好于其它形式,其主要原因可能是其它几种状态的质粒都处于包裹或沉淀状态,不利于重组病毒的拯救,这也间接说明了保护性免疫应答的产生是由于拯救了重组病毒。2003 年 Petherbridge 利用 CVI988/Rispens 的感染性克隆 pCVI988 作为 DNA 疫苗也证实了此种疫苗的保护作用^[22]。

Tischer 与 Petherbridge 的研究同时发现,基于 BAC 的感染性质粒免疫鸡后只能通过体内拯救出感染性病毒才能发挥作用,而不具备拯救性的克隆质粒不具有免疫效力,其过程为免疫的感染性质粒在体内拯救出病毒,实质还是以活病毒的形式起到免疫效果,因此,感染性质粒含有何种类型的 MDV 基因组拯救的病毒将会对其免疫效力产生重大影响,到目前为止,除了近几年报道的基因缺失苗外,还没有发现比 CVI988/Rispens 更好的疫苗^[23]。本实验室构建的敲除致病致肿瘤基因 Meq 的基因缺失毒 GX0101Δmeq 作为候选疫苗在 SPF 鸡上进行的免疫效力实验表明, GX0101Δmeq 具有比

CVI988/Rispens 更好的保护效果。因此我们推测 GX0101Δmeq-bac 在理论上应该会获得比 pCVI988 更好的保护效果,在与 Petherbridge 的实验比较中,我们的攻毒剂量与攻毒毒力虽然不同,但我们均同时用 CVI988/Rispens 活疫苗作为对照, Petherbridge 的实验中攻毒后 CVI988/Rispens 可以提供 100% 的保护,而本研究中 CVI988/Rispens 仅可以提供 87% 的保护率,说明我们的攻毒毒力更强,即使这样, GX0101Δmeq-bac 在免疫 5 天后攻毒时仍获得了与 pCVI988(免疫 7 天后攻毒)相同的保护效果,这也证实了我们的上述推断。

考虑到 MDV 在自然环境中感染鸡的时间可能会比较早,为了更好的考察 GX0101Δmeq-BAC 作为疫苗的保护效果,我们设置了两个 GX0101Δmeq-BAC 免疫组,分别在免疫后的 5 d 与 12 d 进行攻毒,结果发现, GX0101Δmeq-BAC 免疫后 5 d 时攻毒与 12 d 攻毒相比,保护效果比较差,部分原因可能是在 5 日龄时小鸡更加易感的缘故,另外, GX0101Δmeq-BAC 在体内由感染性克隆 DNA 到拯救足够的活病毒并发挥免疫效果需要一定的时间也是重要的原因,这说明,与 CVI988/Rispens 相比, GX0101Δmeq-BAC 作为疫苗会有一定的免疫空当期。

本次研究发现, GX0101Δmeq-BAC 的保护效果并没有超过细胞结合型 MDV 疫苗 CVI988/Rispens,一部分原因与其在鸡的体内拯救活病毒需要一定的时间有关,另一部分原因, DNA 疫苗免疫效力的发挥与机体细胞摄入 DNA 的量有很大关系,因此将来有必要在 DAN 疫苗的免疫剂量及免疫途径上进行进一步的改进与优化。虽然在实验条件下,以 GX0101Δmeq-BAC 作为 DNA 疫苗的保护效果还不是很理想,但考虑到自然感染的剂量没有实验室攻毒这么高,发作时间可能也没有实验室攻毒这么直

接快速, 因此在实际自然感染情况下, DAN 疫苗可能会有更好的保护表现, 但这种推断需要在实验室模拟自然感染的条件下进行理论证明。本研究还发现, 与攻毒对照组或 pDS-pHAI-US2 质粒免疫对照组相比, GX0101 Δ meq-BAC 免疫组即使部分发病, 发病鸡的发病时间也明显延迟。同时与现有传统 MDV 疫苗相比, BAC DNA 可以方便的通过大肠杆菌进行大量生产, 节约成本; 生产的疫苗可以在 4℃ 或 -20℃ 保存, 有利于储藏运输, 具有独特的优势, 因此, BAC DNA 可为目前及将来的 MDV 预防提供一种新的思路和尝试。

参考文献

- [1] Gimeno IM, Witter RL, Reed WM. Four distinct neurologic syndromes in Marek's disease: effect of viral strain and pathotype. *Avian Disease*, 1999, 43 (4): 721-737.
- [2] Schat KA, Calnek BW, Fabricant J. Characterisation of two highly oncogenic strains of Marek's disease virus. *Avian Pathology*, 1982, 11 (4): 593-605.
- [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] Rispen BH, van Vloten H, Mastebroek N, Maas HJ, Schat KA. 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 Disease*, 1972, 16 (1): 108-125.
- [5] Schat KA, Calnek BW. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *Journal of The National Cancer Institute*, 1978, 60 (5): 1075-1082.
- [6] Kawamura H, King DJ, Jr, Anderson DP. A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys. *Avian Disease*, 1969, 13 (4): 853-863.
- [7] Sharma JM. In vitro cell association of Marek's disease herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*, 1971, 32 (2): 291-301.
- [8] Witter RL, Burmester BR. Differential effect of maternal antibodies on efficacy of cellular and cell-free Marek's disease vaccines. *Avian Pathology*, 1979, 8 (2): 145-156.
- [9] Witter RL. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Disease*, 1997, 41 (1): 149-163.
- [10] Nazerian K, Witter RL, Lee LF, Yanagida N. Protection and synergism by recombinant fowl pox vaccines expressing genes from Marek's disease virus. *Avian Disease*, 1996, 40 (2): 368-376.
- [11] Nazerian K, Lee LF, Yanagida N, Ogawa R. Protection against Marek's disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B of Marek's disease virus. *Journal of Virology*, 1992, 66 (3): 1409-1413.
- [12] Lee LF, Lupiani B, Silva RF, Kung HJ, Reddy SM. 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.
- [13] Tischer BK, Schumacher D, Beer M, Beyer J, Teifke JP, Osterrieder K, Wink K, Zelnik V, Fehler F, Osterrieder N. A DNA vaccine containing an infectious Marek's disease virus genome can confer protection against tumorigenic Marek's disease in chickens. *Journal of General Virology*, 2002, 83 (Pt 10): 2367-2376.
- [14] 孙爱军, Petherbridge L, Zhao YG, 李延鹏, Nair VK, 崔治中. 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.
- [15] 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 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50 (03): 380-386.
- [16] Jarosinski KW, Osterrieder N, Nair VK, Schat KA. Attenuation of Marek's disease virus by deletion of open reading frame RLORF4 but not RLORF5a. *Journal of Virology*, 2005, 79 (18): 11647-11659.
- [17] Brown AC, Baigent SJ, Smith LP, Chattoo JP, Petherbridge LJ, Hawes P, Allday MJ, Nair V. Interaction of MEQ protein and C-terminal-binding protein is critical for induction of lymphomas by Marek's disease virus. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 2006, 103 (6): 1687-1692.
- [18] Suter M, Lew AM, Grob P, Adema GJ, Ackermann M, Shortman K, Fraefel C. BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: A bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 1999, 96 (22): 12697-12702.
- [19] Reddy SM, Lupiani B, Gimeno IM, Silva RF, Lee LF, Witter RL. 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.

- [20] Morgan RW, Cantello JL, McDermott C H. Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. *Avian Disease*, 1990, 34 (2): 345-351.
- [21] 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.
- [22] Petherbridge L, Howes K, Baigent SJ, Sacco MA, Evan S, Osterrieder N, Nair V. 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.
- [23] Witter R L, Kreager KS. Serotype 1 viruses modified by backpassage or insertional mutagenesis; approaching the threshold of vaccine efficacy in Marek's disease. *Avian Disease*, 2004, 48 (4): 768-782.

Evaluation the immuno-protective effect of an infectious clone of *meq*- deleted Marek ' s disease virus

Yanpeng Li¹, Mengjiao Kang², Shuai Su³, Jiabo Ding², Zhizhong Cui³, Hongfei Zhu^{1*}

(¹ The Institute of Animal Science (IAS), Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100193, China)

(² China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

(³ Animal Science and Technology College, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: [**Objective**] To evaluate the immuno-protective effect of GX0101Δmeq-BAC containing an infectious meq-null Marek ' s disease virus genome. [**Method**] One-day-old SPF birds were reared separately in isolators with positive filtered air. On day 1 of age, chickens immunized with 10μg of GX0101Δmeq-BAC suspended in PBS, challenge infection with 500PFU very virulent rMD5 was performed at day 5 and 12 post-immunization separately. During 90 days after challenge, all bird were recorded and checked for necropsy. The samples of heart and liver were collected for histo-sections. [**Results**] The protective index of the two vaccines used was 87 and 33 for CVI988/Rispens and GX0101Δmeq-BAC, respectively, after challenged with the very virulent virus rMd5 at day 5 post-immunization. When challenged with rMd5 at day 12 post-immunization, the protection index of GX0101Δmeq-BAC increased to 53%. [**Conclusion**] Except that GX0101Δmeq-BAC can confer protection against very virulent Marek ' s disease virus, a delay in the development of Marek ' s disease could be observed in some chickens vaccinated with GX0101Δmeq-BAC. On the other hand, compared with CVI988/Rispens, the reconstruction of GX0101Δmeq-BAC in the body is a prerequisite for access to protection. Therefore, there is a blank period after immunization, which provides a chance for infection with the wild Marek ' s disease virus.

Keywords: Marek ' s disease virus; meq deletion; infectious clone; protective immunity

(本文责编:张晓丽)