

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54(6):670-678; 4 June 2014

ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.010

整合 REV LTR 序列的 MDV 弱毒株的分离鉴定与生物学特性

陈瑞爱^{1,2,3}, 罗琼^{2,3}, 郭凯¹, 刘正伟¹, 李慧敏¹, 王建丽¹

¹ 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642

² 农业部动物疫病防控生物技术与制品创制重点实验室, 广东 肇庆 526238

³ 广东省兽用生物制品生物技术研究与应用企业重点实验, 广东 肇庆 526238

摘要:【目的】从非免疫健康三黄鸡中分离到一株马立克氏病病毒(MDV),命名为 MDV GD06 株,本工作系统研究了其生物学特性。【方法】PCR 扩增 GD06 株 Meq 基因及短末端重复区(RS)序列,进行序列分析,并用间接免疫荧光试验进行血清型特异性鉴定;通过接种 SPF 鸡和鸡胚成纤维细胞(CEF)来判定 GD06 株体内外的增殖能力;为确定 GD06 株的致病性,用 1 日龄 SPF 鸡进行攻毒试验。【结果】GD06 株为 MDV 血清 I 型病毒,其基因组中自然整合禽网状内皮增殖症病毒(REV)的长末端重复序列(LTR),Meq 基因富含脯氨酸的结构域比参考强毒株 Md5 多 59 个氨基酸,与 MD 商品化疫苗 CVI988/Rispens 和 814 株相符,具有弱毒株的特征。在接种 CEF 细胞 96、120、144、168、192 h, GD06 株病毒滴度分别为 1.9×10^5 、 3.9×10^5 、 6.1×10^5 、 6.5×10^5 、 5.8×10^5 PFU,明显比 CVI988/Rispens(病毒滴度分别为 1.3×10^5 、 3.5×10^5 、 5.0×10^5 、 5.7×10^5 、 4.7×10^5 PFU)高($P < 0.05$);接种 SPF 鸡 21、28 天, GD06 株在鸡体内的病毒滴度分别为 740 和 350 PFU,明显比 CVI988/Rispens 株(病毒滴度分别为 460、216 PFU)高($P < 0.05$),结果表明, GD06 株在 CEF 细胞和鸡体内具有比 CVI988/Rispens 更快的增殖能力。人工接种攻毒实验表明, GD06 株对 SPF 鸡没有致病性,不引免疫抑制。【结论】研究结果表明, MDV GD06 株为国内首次分离的自然整合有 REV LTR 序列的重组 MDV 弱毒株。

关键词: 马立克氏病病毒, GD06 株, LTR 序列

中图分类号: R37 **文章编号:** 0001-6209(2014)06-0670-09

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。该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,严重时感染率可达 100%。MD 一般表现为外周神经、性腺、虹膜、各种脏器、肌肉和皮肤发生单核细胞浸润,MDV 能引起多种功能障碍并可导致被感染鸡产生肿瘤和死亡,同时还引起鸡群的免疫抑制,给养禽业

造成重大经济损失^[1-2]。

在实验室条件下,当 MDV 与禽网状内皮组织增殖病病毒(reticuloendotheliosis virus, REV)在细胞上培养并连续传代时,REV 的长末端重复序列(LTR)可整合进 MDV 的基因组^[3-4]。MDV RM1 株是在 REV 病毒存在的情况下通过细胞连续传代而致弱的毒株,由于 REV 的存在,导致了 MDV 的短末端重复序列中插入了 REV 的 LTR 片段,这株病毒

作者简介:陈瑞爱(1970-),女,广东新兴人,教授,从事禽免疫抑制病研究。

收稿日期:2013-11-01;修回日期:2014-02-07

在体内能够很好地复制,也能够提供相对高水平的免疫反应^[5],但到目前为止,国外一直没有分离到整合有 REV LTR 片段的 MDV 野毒株。张志等对 MDV 和 REV 共感染鸡肿瘤病的研究发现,在自然感染的条件下,REV 除了能与 MDV 共感染同一只家禽外,还能整合进 MDV 基因组中,并且 REV 整合进 MDV 基因组的比例较高^[6],张志等首次报道了利用鸡的抗凝全血分离到整合进 REV 片段的自然 MDV 野毒 GX0101,随后周祥报道了从 MD 肿瘤病鸡的骨髓分离鉴定出了一株已经整合 REV 基因组片段的 MDV 重组强毒株^[7-8]。

近年来,随着 MDV 基因组分子操作水平的提高,REV LTR 片段在 MDV 基因组中的整合及其功能成为一个研究热点^[9-11],本文在国内外首次报道了从非免疫健康鸡场分离到自然整合 REV LTR 片段的 MDV 弱毒株。

1 材料和方法

1.1 材料

FITC 标记羊抗鼠 IgG 为 SIGMA 公司产品,LA Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker、dNTPs 等购自大连宝生物工程有限公司,REV GD1210 株为本实验室分离鉴定,鸡抗网状内皮组织增殖病病毒 (REV) 阳性血清购自中国兽医药品监察所,经间接免疫荧光鉴定,REV 阳性血清与 MDV 呈阴性反应。产生抗 I 型 MDV gB 蛋白的特异性单克隆抗体 GB2 的杂交瘤细胞由本实验室制备,把 MDV I 型 gB 基因原核表达蛋白免疫小鼠后,将免疫小鼠脾脏淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合制备而成,经本实验室利用间接免疫荧光检测,单克隆抗体 GB2 仅与 I 型 MDV 反应,与 II 或 III 型 MDV 不发生反应。MDV 血清 I 型 814^[12-13] 和 CVI988/Rispens^[14-15] 株为 MD 商品疫苗株,MDV 超强毒 Md5 株^[16] 由哈尔滨兽医研究所刘长军副研究员惠赠。1 日龄白来航 SPF 鸡由广东大华农动物保健品股份有限公司禽蛋分公司提供。

1.2 MDV GD06 株分离

MDV GD06 株由本实验室分离自非免疫的健康三黄鸡肉鸡场,采集三黄鸡抗凝血 5 mL,用淋巴细胞分离液分离白细胞,接种鸡胚成纤维细胞 (CEF)

后出现 MDV 蚀斑,蚀斑进行克隆后将其在液氮中冻存。

1.3 MDV GD06 株鉴定

为鉴定 GD06 株的血清型,将 100PFU GD06 株与 CVI988/Rispens 株分别接种至 CEF 细胞中,在接毒后第 4 天,待出现明显细胞病变后,弃去上清液,用 PBS 轻轻洗 1 遍,加入冰冷的丙酮/乙醇 (V/V = 3/2) 固定 10 min,空气中自然晾干;加入抗 MDV 血清 I 型 gB 的单抗 GB2,37℃ 温箱孵育 1 h 后用 PBS 洗 3 次;加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (二抗),37℃ 温箱孵育 1 h 后用 PBS 洗 3 次;每孔加 50 μL 甘油/PBS 溶液 (V/V = 1/1),于倒置荧光显微镜下观察荧光并拍照。

为鉴定 GD06 株中是否有 REV 污染,将一块 6 孔板 CEF 细胞分别接种 100 PFU MDV GD06 株或 10⁵TCID₅₀ REV GD1210 株,在接毒第 4 天,按 GD06 株血清型鉴定的方法进行间接免疫荧光检测,检验用一抗为 REV 阳性血清,二抗为 FITC 标记的羊抗鸡 IgG 抗体。

1.4 MDV GD06 株的 Meq 基因和 LTR 整合区域的序列扩增

MDV 的 Meq 基因为目前已知的唯一致病致肿瘤相关基因,可以有效区分强弱毒,设计引物 Meq-F, Meq-R (表 1),利用 PCR 方法扩增 GD06 株、Md5、CVI988/Rispens 和 814 株 Meq 基因。由于 GD06 株无 REV 污染,但在前期检测的过程中发现接种 GD06 株 CEF 细胞基因组中含有 REV 的 LTR 片段,根据 LTR 插入 MDV 的热点区域^[5],设计了引物 LTR-F, LTR-R (表 1),以 GD06 株基因组为模板进行 PCR 扩增,相同条件以 CVI988/Rispens 与 814 疫苗株的基因组为对照,PCR 反应同时以未接种病毒的 CEF 细胞 DNA 作为阴性对照。PCR 反应体系为 25 μL:10 × PCR Buffer 2.5 μL,上下游引物 (25 μmol/L) 各 1 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL,模板 DNA 约 200 ng, rTaq 2 U,灭菌双蒸水补至 25 μL。PCR 反应程序如下:95℃ 10 min,按 95℃ 1 min,58℃ 1.5 min,72℃ 2 min 进行 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。为了更加确定 REV LTR 的整合位点,根据参考文献^[17]扩增了 GD06 株基因组的 IRS 和 TRS 区域的序列并进行了序列测定。

表 1. 鉴定 GD06 株所用的引物

Table 1. Primers used to amplify the Meq gene and REV LTR sequences in MDV strain GD06

primer	sequence (5' - 3')	
Meq	Forward: GTTCTTCCGACTCTAAGCTA	Reverse: ACAGGTGAATTGTGACCGTT
LTR	Forward: AACCACAGCGTGTCTCTCT	Reverse: ACAATGCCTACTATTTCCA

1.5 MDV GD06 株的体内外增殖

GD06 株的体外增殖实验在 CEF 上进行, 以 CVI988/Rispens 为对照, 方法简述如下: 将 CVI988/Rispens 与 GD06 株分别接种于 2 块 6 孔细胞培养板, 每孔接种 100 PFU 的病毒。分别在接种 0、24、48、72、96、120、144、168、192 h 后消化接毒细胞, 每时间段病毒用 DMEM 10 倍梯度稀释至 10^{-3} 或 10^{-4} , 每滴度接种 5 个培养 20-24 h CEF 单层的直径 60 mm 的塑料平皿, 每个平皿接种 0.2 mL, 平皿置 37°C, 5% CO₂ 温箱培养 6 天, 第 7 天观察特征性细胞病变并测定蚀斑数。

GD06 株的体内增殖实验在 SPF 鸡中进行, 2 组 1 日龄 SPF 鸡饲养于 2 个带有正压过滤空气的 SPF 动物饲养隔离罩内, 每组 10 只, 以 2000 PFU/只的剂量分别腹腔接种 CVI988/Rispens 疫苗株和 GD06 株。接种后 7、14、21 和 28 d 每组各取 5 只鸡分离

血液白细胞, 每只鸡取 2×10^6 白细胞接种 CEF 单层, 置 37°C, 5% CO₂ 温箱培养, 第 7 天测定蚀斑数, 计算平均值, 绘制病毒的病毒血症生长曲线。

1.6 MDV GD06 株对 SPF 鸡的致病性实验

60 只白来航 SPF 鸡随机分为 2 组, 每组 30 只, 1 日龄时, 第 1 组腹腔接种 2000 PFU 的 MDV GD06 株, 第 2 组接种 CEF 细胞作为空白对照。各组鸡分别在 28、42 d 随机选取 6 只测量其体重、胸腺及法氏囊重, 比较各组鸡活体重与相对胸腺、法氏囊重。相对胸腺、法氏囊重为胸腺、法氏囊重除以活体重 $\times 100\%$ [18]。同时, 分别取胸腺和法氏囊于 10% 中性福尔马林固定, 4°C 保存。石蜡切片, HE 染色, 进行病理组织学观察。13 周后剩余鸡全部捕杀, 死亡鸡与最后捕杀鸡均进行剖检, 观察有无 MD 病变或肿瘤情况。

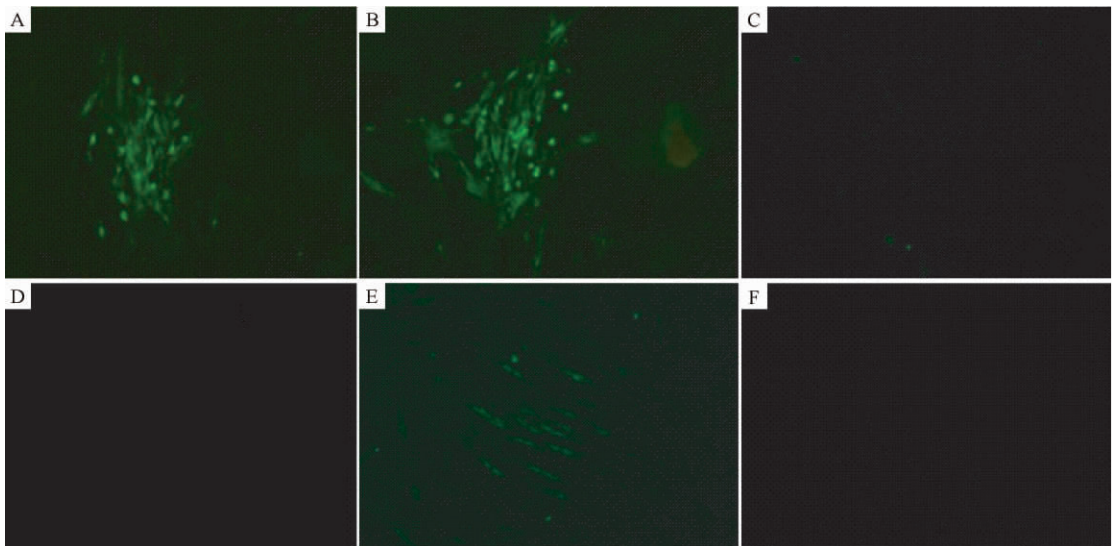


图 1. GD06 间接免疫荧光鉴定

Figure 1. Immunofluorescence analysis of CEF cells infected with GD06, CVI988/Rispens or REV GD1210 strain. 100 PFU of GD06, CVI988/Rispens or 10^5 TCID₅₀ of GD1210 viruses were inoculated into 6-well plates with CEF monolayer, respectively. The results showed that GD06 and CVI988/Rispens could react with monoclonal antibodies (McAb) GB2 to identify proteins gB which is the MDV-1-specific protein. And REV positive serum tests showed that it was positive reaction to GD1210 but negative reaction to GD06. A: GD06 with McAb GB2; B: CVI988 with McAb GB2; C: Uninfected CEF with McAb GB2; D: GD06 with REV positive serum; E: GD1210 with REV positive serum; F: Uninfected CEF with REV positive serum.

2 结果

2.1 间接免疫荧光试验 (IFA)

GD06 株、CVI988/Rispens 株或 REV GD1210 株分别感染 CEF, GD06 株与 CVI988/Rispens 株在 3 天左右出现蚀斑, 在第 4 天对 3 种病毒分别进行 IFA 检测, 检测结果见图 1。结果表明, GD06 株与 CVI988/Rispens 株能与识别 gB 蛋白的单抗 GB2 反应, 证明其为血清 I 型 MDV; GD06 株与 CVI988/Rispens 株感染细胞与 REV 抗体阳性血清呈阴性反应, 表明 GD06 株不存在 REV 污染。

2.2 MDV GD06 株基因序列分析

提取 MDV GD06 株接种细胞 DNA, 扩增 MDV Meq 基因, 扩增结果见图 2-A, GD06 株的扩增产物大小与 CVI988/Rispens、814 株相同, 比 Md5 扩增片段长。将 GD06 株 Meq 基因扩增产物进行 DNA 核苷酸序列的测定, 并将获得的序列与 GenBank 所公布的参考毒株 CVI988/Rispens 株 (GenBank: ABF72204.1)、814 株 (GenBank: AEV54966.1) 和 Md5 株 (GenBank: AAG14278.1) Meq 氨基酸序列进行比较分析发现, 与 CVI988/Rispens 和 814 疫苗株相似, GD06 株 Meq 基因的富含脯氨酸结构域比参考强毒 Md5 株多出 59 个氨基酸, 符合弱毒株的典型特征 (图 3)。

LTR 扩增结果见图 2-B, 利用表 1 中的 LTR 引物扩增, 其它基因 I 型疫苗株 (包括 CVI988/Rispens 与 814 疫苗株) 扩增的序列约为 1192 bp, GD06 株扩增序列约为 1725 bp (图 2-B)。经测序验证, 此 1725 bp 的片段除含有两对引物序列外, 还含有 533 bp 的整合序列, 将此 533 bp 序列经 Blast 序列比较判定为 REV 的 LTR 序列, 其与国内的 REV HLJR0901 株 (GenBank: GQ415646.2) 的 LTR 同源率为 100%。

将 GD06 基因组中的 IRS 和 TRS 区域进行扩增测序, 测定分析表明, 2 个相同的 LTR 序列分别插入了 GD06 株基因组的 IRS 和 TRS 区。MDV IRS 与 TRS 区域有许多相同的重复序列 (反向互补), LTR 具体插入序列与插入 IRS 区域的位点见图 4, 插入位点相对应 CVI988/Rispens 株 (GenBank: DQ530348.1) 全基因序列的 154219 bp 位点。LTR 插入 TRS 的区域恰好位于 IRS 插入区域的反向互

补区, 插入位点相对应 CVI988/Rispens 株全基因序列的 166644 bp 位点。

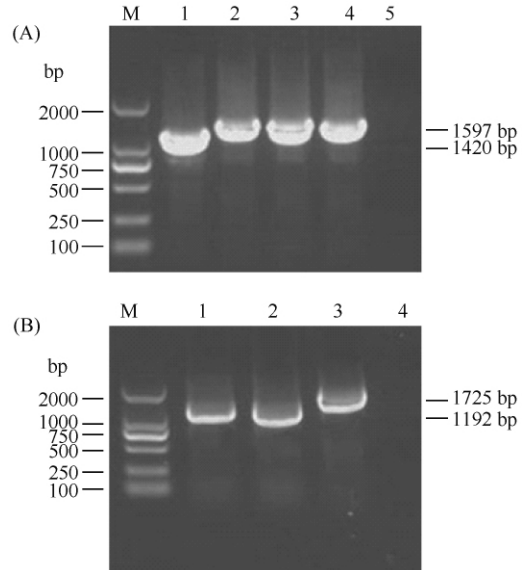


图 2. MDV GD06 株 PCR 鉴定

Figure 2. PCR results of MDV strain GD06. A: PCR test using primers specific for Meq were performed. M: DNA Marker; Lane 1: DNA from Md5; lane 2: CVI988/Rispens; lane 3: 814, lane 4: GD06 strain infected CEF cells; lane 5, DNA from uninfected CEF cells. B: PCR test using primers specific for LTR were performed. M: DNA Marker; Lane 1, 2 and 3, DNA from CVI988/Rispens, 814 and GD06 strain infected CEF cells, respectively; lane 4, DNA from uninfected CEF cells.

2.3 体内外增殖实验

GD06 株体内外增殖速度见图 5, 其中图 5-A 为 GD06 株与 CVI988/Rispens 株在 CEF 细胞 (体外) 中的增殖速度比较, 结果表明, 在接种 CEF 细胞后, GD06 株病毒滴度快速升高, 在 168 h 达到顶峰。统计结果表明, 在接种 CEF 细胞 96、120、144、168、192 h, GD06 株病毒滴度分别为 1.9×10^5 、 3.9×10^5 、 6.1×10^5 、 6.5×10^5 、 5.8×10^5 PFU, 明显比 CVI988/Rispens (96 h 后病毒滴度分别为 1.3×10^5 、 3.5×10^5 、 5.0×10^5 、 5.7×10^5 、 4.7×10^5 PFU) 高 ($P < 0.05$)。图 5-B 为 GD06 株与 CVI988/Rispens 在 SPF 鸡 (体内) 的增殖速度比较, 病毒血症分析可以发现, GD06 株在接种 SPF 鸡 21 天后达到高峰, 随后急速下降。统计结果表明, 在接种 21、28 天时, GD06 株在鸡体内的病毒滴度分别为 740 和 350 PFU, 明显比 CVI988/Rispens 株 (病毒滴度分别为 460、216 PFU) 高 ($P < 0.05$)。

2.4 对 SPF 鸡的致病性

GD06 株接种 1 日龄 SPF 鸡, 观察 13 周, 整个观

Majority	TTCCCAACCTCCTAICTGTACCCCCCTCTCCCGATACGGAGGAACCTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATC	
	510 520 530 540 550 560 570 580 590 600	
814-Meq.seq	TTCCCAACCTCCTAICTGTACCCCCCTCTCCCGATACGGAGGAACCTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATC	600
CVI988-Meq.seq	TTCCCAACCTCCTAICTGTACCCCCCTCTCCCGATACGGAGGAACCTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATC	600
Md5-Meq.seq	TTCCCAACCTCCTAICTGTACCCCCCTCTCCCGATACGGAGGAACCTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATC	575
GD06-Meq.seq	TTCCCAACCTCCTAICTGTACCCCCCTCTCCCGATACGGAGGAACCTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATC	600
Majority	TACGCTCGGGGCTTCCCCCTCCAACTCCTAICTGTACCCCCCTCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCCACCTC	
	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700	
814-Meq.seq	TACGCTCGGGGCTTCCCCCTCCAACTCCTAICTGTACCCCCCTCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCCACCTC	700
CVI988-Meq.seq	TACGCTCGGGGCTTCCCCCTCCAACTCCTAICTGTACCCCCCTCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCCACCTC	700
Md5-Meq.seq	TACGCTCGGGGCTTCCCCCTCCAACTCCTAICTGTACCCCCCTCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCCACCTC	575
GD06-Meq.seq	TACGCTCGGGGCTTCCCCCTCCAACTCCTAICTGTACCCCCCTCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCCACCTC	700
Majority	CCAICTACTCCCCATATTTCTACGCTCCGGGGCTCTGCTCGACCCACCCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCAGCTCCGGGGCTTCCCC	
	710 720 730 740 750 760 770 780 790 800	
814-Meq.seq	CCAICTACTCCCCATATTTCTACGCTCCGGGGCTCTGCTCGACCCACCCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCAGCTCCGGGGCTTCCCC	800
CVI988-Meq.seq	CCAICTACTCCCCATATTTCTACGCTCCGGGGCTCTGCTCGACCCACCCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCAGCTCCGGGGCTTCCCC	800
Md5-Meq.seq	CCAICTACTCCCCATATTTCTACGCTCCGGGGCTCTGCTCGACCCACCCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCAGCTCCGGGGCTTCCCC	623
GD06-Meq.seq	CCAICTACTCCCCATATTTCTACGCTCCGGGGCTCTGCTCGACCCACCCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCAGCTCCGGGGCTTCCCC	800

图 3. MDV GD06 株 *meq* 基因序列比对图

Figure 3. Sequence alignment of the *meq* genes of four different MDV strains. Similar to the vaccine strains 814 and CVI988/Rispens, the genome of strain GD06 contained a 59-aa insertion in the proline-rich domain of the Meq protein compared with very virulent strain Md5.

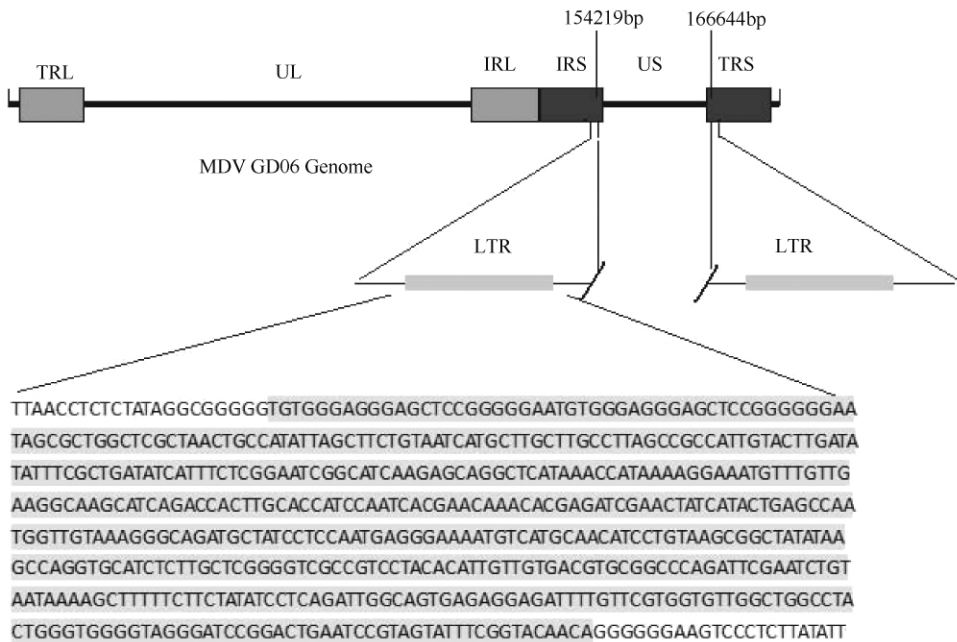


图 4. MDV GD06 株基因组结构图

Figure 4. Organization of the GD06 genome. The GD06 genome consists of a unique long (UL) region flanked by inverted repeats, terminal repeat long (TRL), internal repeat long (IRL), and a unique short region (US) also flanked by inverted repeats, internal repeat short (IRS) and terminal repeat short (TRS). Strain GD06 is a recombinant MDV having the long terminal repeats of reticuloendotheliosis virus naturally integrated into the repeat short (RS) regions of its genome. The inserted REV LTR is shaded in light gray.

察期中无 MD 特异性死亡与病变,无肿瘤形成。取接种后 28 天的肝脏和心脏作病理组织学检查,未发现 MDV 特有的病变(图 6)。对接种后 28、42 天 SPF 鸡体重、胸腺和法氏囊进行称重,结果表明,

GD06 株接种组 SPF 鸡体重、胸腺和法氏囊指数与空白对照鸡无显著差异 ($P > 0.05$, 表 2),不引起鸡群免疫抑制。

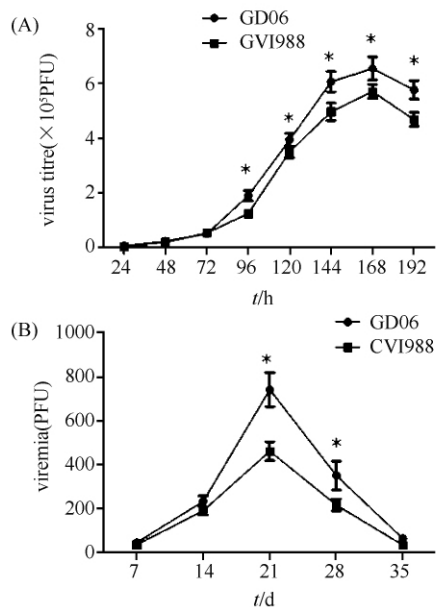


图 5. MDV GD06 株体内外增殖速度测定

Figure 5. Growth characteristics of GD06 *in vitro* and *in vivo*. A: CEF cells were infected with 100 PFU of each virus, and virus titers were determined at the indicated times post inoculation. B: one day old SPF chickens were infected with 2000 PFU of each virus, and the viremia were determined at the indicated times post inoculation. Each time point represents the mean of five independent experiments. Bars represent standard error. The asterisk (*) denotes statistically significant differences between groups ($P < 0.05$).

表 2. GD06 株感染对自来航 SPF 鸡法氏囊和胸腺发育的影响 ($n = 6$)

Table 2. Inhibitory influence of GD06 on development of the thymus and the Bursa in SPF chickens ($n = 6$)

age of chicken/d	groups	weight of body/g	(thymus/body weight) /%	(bursal/body weight) /%
28	GD06	265.4 ± 9.7*	0.65 ± 0.07	0.36 ± 0.12
	Control	263.8 ± 10.5	0.67 ± 0.15	0.35 ± 0.11
42	GD06	495.3 ± 33.2	0.78 ± 0.13	0.38 ± 0.12
	Control	500.4 ± 25.9	0.75 ± 0.11	0.40 ± 0.09

* The numbers in the table indicate: mean ± SD.

REV 在 MDV 基因组中的整合位点不固定,但是主要集中在 MDV 的 IRS/US 和 US/TRS 区,而且整合的序列主要是 REV 基因组的 LTR 序列^[23-24], LTR 本身是一个很强的启动子和增强子,根据 LTR 插入位点的不同,它可以激活或影响其下游不同基因的表达^[24],进而影响 MDV 的特性。MDV GD06 株 LTR 的插入位点位于其基因组的 IRS 和 TRS 区,为研究 LTR 插入对病毒基因表达及生物学特性的影响提供了良好的研究模型。

3 讨论

自 Isfort 等从污染 REV 的 MDV 细胞培养物中检测到 REV 的 LTR 片段并证实它们之间的基因重组后,国外并没有 MDV 自然重组毒在鸡体内分离的报道。我国科研人员在世界上先后分离到了整合进 REV LTR 片段的 MDV 野毒株^[7-8],这也许与我国养鸡业中大量存在着的 MDV 与 REV 共感染情况有很大关系^[19-21]。MDV GD06 株也是分离自鸡体内的自然重组毒,但国内分离到的整合进 REV LTR 片段的 MDV 野毒株均为 MDV 强毒株,本研究报道的 MDV GD06 株为自然整合有 REV LTR 片段的重组 MDV 弱毒株,这也是关于自然整合有 REV LTR 片段的重组 MDV 弱毒株分离的首次报道。

Witter 等^[5]发现 MDV RM1 株插入 REV-LTR 序列后,该毒株在鸡体内引起的免疫抑制和体内复制能力没有变化,但其致肿瘤能力却有所下降。孙爱军利用细菌人工染色体技术构建了 MDV 重组毒 GX0101 株的感染性克隆,利用此平台,证明了 REV-LTR 的插入减弱了其免疫抑制能力,并没有增强 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^[22]。两篇报道中的差异有可能是 LTR 插入序列有些许差异或 LTR 插入位点的不同导致的。

整合有 REV LTR 片段的 MD 重组病毒致病性、传播能力等生物学特性会发生改变^[22-25],GD06 株为基因组序列中自然整合 REV LTR 片段的弱毒株,经初步的生物学判定,其为 MDV 血清 I 型毒株。对 Meq 基因的序列分析发现,GD06 株致瘤相关基因 Meq 基因富含脯氨酸的结构域比参考强毒株 Md5 的 Meq 序列多出 59 个氨基酸,这一特征与 MD 商品化疫苗 CVI988/Rispens 和 814 株相符,在基因序列上表现出弱毒株的特征。同时,体内体外增殖

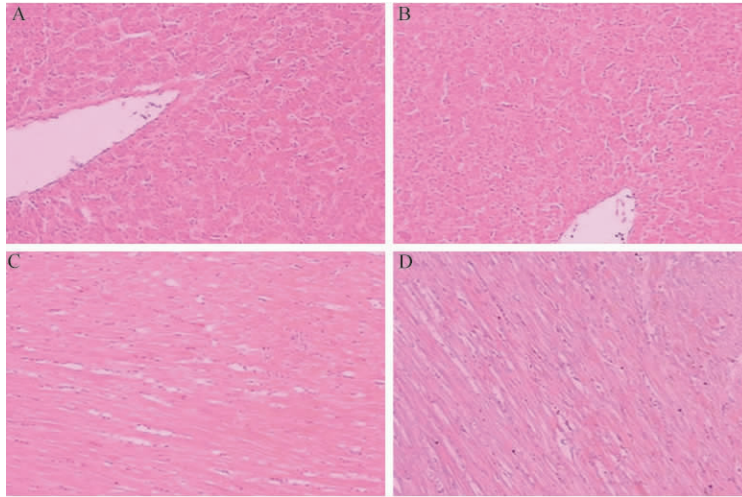


图 6. 感染 MDV GD06 株后 28 天肝脏、心脏的病理组织切片 (H. E. 染色, $\times 200$)

Figure 6. The liver and heart histopathology were shown by H-E staining after GD06 strain infection in chickens on 28 days post challenge. A: GD06 strain-infected liver; B: Uninfected control liver; C: GD06 strain-infected heart; D: Uninfected control heart. Original magnification: $\times 200$.

实验表明, GD06 株比 CVI988/Rispens 具有更快的增殖能力, 因此初步推断, GD06 株也许是自然弱毒株与 REV LTR 在自然界重组形成的, LTR 的插入增强了其体内体外的增殖能力。当然, 如果要证明这一推断, 必须利用实验室基因敲除技术对 GD06 株 LTR 缺失株与 GD06 株进行系统科学的比较才能得到证明。

本研究表明 MDV GD06 株对 SPF 鸡没有致病性, 接种后 13 周没有发生 MD 特有的病变和死亡, 不引起免疫抑制。体内实验表明 GD06 株比 CVI988/Rispens 具有更快的增殖能力。Gimeno IM 等^[26] 比较高保护力与低保护力 MD 疫苗的区别, 发现有高保护力的 MD 疫苗株往往在体内的复制能力较强, 因此, GD06 株理论上具备良好疫苗的一些特征, 其作为候选疫苗的保护效果有待进一步研究。

参考文献

- [1] Lee LF, Sharma JM, Nazerian K, Witter RL. Suppression and enhancement of mitogen response in chickens infected with Marek's disease virus and the herpesvirus of turkeys. *Infection and Immunity*, 1978, 21 (2): 474-479.
- [2] Payne LN, Biggs PM. Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 1967, 39 (2): 281-302.
- [3] Isfort R, Jones D, Kost R, Witter R, Kung HJ.

Retrovirus insertion into herpesvirus in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89 (3): 991-995.

- [4] Jones D, Isfort R, Witter R, Kost R, Kung HJ. Retroviral insertions into a herpesvirus are clustered at the junctions of the short repeat and short unique sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90 (9): 3855-3859.
 - [5] Witter RL, Li D, Jones D, Lee LF, Kung HJ. Retroviral insertional mutagenesis of a herpesvirus: a Marek's disease virus mutant attenuated for oncogenicity but not for immunosuppression or in vivo replication. *Avian Diseases*, 1997, 41 (2): 407-421.
 - [6] Zhang Z, Cui ZZ, Jiang SJ, Zhou J. Dual-infection of Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus from tumors in chickens. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2003, 25 (4): 36-40. (in Chinese)
- 张志, 崔治中, 姜世金, 周蛟. 鸡肿瘤病料中马立克氏病病毒和禽网状内皮组织增生症病毒共感染的研究. *中国预防兽医学报*, 2003, 25 (4): 36-40.
- [7] Zhang Z, Cui ZZ. Isolation of Recombinant Field Strains of Marek's disease Virus with Inserts from Reticuloendotheliosis Virus Genome. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2004, 34 (4): 317-324. (in Chinese)
- 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(C辑:*

生命科学), 2004, 34 (4): 317-324.

- [8] Zhou X, Wei P, Teng LQ. Identification of a field isolate of Marek's disease virus in tegrated with retroviral long terminal repeat (LTR) sequence. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2007, 39 (8): 22-26. (in Chinese) 周祥, 韦平, 滕丽琼. 整合进禽反转录病毒长末端重复序列的马立克氏病病毒的分离鉴定. 畜牧与兽医, 2007, 39 (8): 22-26.
- [9] Kim T, Mays J, Fadly A, Silva RF. Artificially inserting a reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into a bacterial artificial chromosome clone of Marek's disease virus (MDV) alters expression of nearby MDV genes. *Virus Genes*, 2011, 42 (3): 369-376.
- [10] 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 Diseases*, 2013, 57 (2 Suppl): 427-431.
- [11] Mays JK, Silva RF, Kim T, Fadly A. Insertion of reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into a bacterial artificial chromosome clone of a very virulent Marek's disease virus alters its pathogenicity. *Avian Pathology*, 2012, 41 (3): 259-265.
- [12] Zhang F, Liu CJ, Zhang YP, Li ZJ, Liu AL, Yan FH, Cong F, Cheng Y. Comparative full-length sequence analysis of Marek's disease virus vaccine strain 814. *Archives of Virology*, 2012, 157 (1): 177-183.
- [13] Tong KZ, Lin YH, Xu YW, Fu DX, Li CF, Liu CX, Piao ZZ, Dai KZ. Study on the immunization of chickens against Marek's Disease report on a naturally avirulent vaccine strain of Marek's disease herpesvirus. (*Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*), 1984, 15 (02): 34-41. (in Chinese) 童昆周, 林英华, 徐宜为, 付德霞, 李春风, 刘春萱, 朴钟洙, 戴克珍. 鸡马立克氏病(MD)免疫的研究—MD病毒弱毒疫苗株的培育和免疫试验. 畜牧兽医学报, 1984, 15 (02): 34-41.
- [14] Rispen BH, van Vloten H, Mastenbroek 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 Diseases*, 1972, 16 (1): 108-125.
- [15] Spatz SJ, Petherbridge L, Zhao Y, Nair V. Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispen) strains of Marek's disease virus. *The Journal of General Virology*, 2007, 88 (Pt 4): 1080-1096.
- [16] Witter RL, Sharma JM, Fadly AM. Pathogenicity of Variant Marek's Disease Virus Isolants in Vaccinated and Unvaccinated Chickens. *Avian Diseases*, 1980, 24 (1): 210-232.
- [17] 张锋. 马立克氏病毒“814”疫苗株全基因组序列测定及分析. 中国农业科学院, 硕士学位论文. 2010.
- [18] Rivas AL, Fabricant J. Indications of immunodepression in chickens infected with various strains of Marek's disease virus. *Avian Diseases*, 1988, 32 (1): 1-8.
- [19] Jiang SJ, Meng SS, Cui ZZ, Tian FL, Wang ZF. Epidemic Investigation of Co-infection of MDV, CAV and REV in spontaneous diseased chicken flocks in China. (*Virologica Sinica*), 2005, 20 (2): 164-167. (in Chinese) 姜世金, 孟珊珊, 崔治中, 田夫林, 王增福. 我国自然发病鸡群中 MDV、REV 和 CAV 共感染的检测. 中国病毒学, 2005, 20 (2): 164-167.
- [20] Wei P, Yang XY, Jiang LY, Li LP, Wei TC, Zhang AL, Li KR, Pan L, Yang KL, Wang GJ, Zhu RL, Li XC, Xu LJ. Co-infection of immunosuppressive viruses in commercial flocks in China. (*China Poultry*), 2007, 29 (8): 10-13, 27. (in Chinese) 韦平, 阳秀英, 蒋玲艳, 李莉萍, 韦天超, 张爱玲, 李康然, 潘玲, 杨克礼, 王桂军, 朱瑞良, 李新苍, 许兰菊. 我国商业鸡群多种免疫抑制性病毒共感染的研究. 中国家禽, 2007, 29 (08): 10-13, 27.
- [21] Yan Y, Diao YX, Wu HR, Li JX, Sun J. Epidemic investigation of the co-infection of MDV, REV and CAV from broiler breeder with phymatosis. (*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2010, 30 (8): 1049-1055. (in Chinese) 颜赞, 刁有祥, 吴焕荣, 李建侠, 孙杰. 肉种鸡肿瘤病料中 MDV、REV 和 CAV 共感染的检测. 中国兽医学报, 2010, 30 (8): 1049-1055.
- [22] Sun AJ, Xu XY, Petherbridge L, Zhao YG, Nair V, Cui ZZ. 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.
- [23] Davidson I, Borenshtain R. In vivo events of retroviral long terminal repeat integration into Marek's disease virus in commercial poultry: detection of chimeric molecules as a marker. *Avian Diseases*, 2001, 45 (1): 102-121.
- [24] Jones D, Brunovskis P, Witter R, Kung HJ. Retroviral insertional activation in a herpesvirus: transcriptional activation of US genes by an integrated long terminal

repeat in a Marek's disease virus clone. *Journal of Virology*, 1996, 70 (4) : 2460-2467.

- [25] Xu XY, Sun AJ, Cui YS, Cui ZZ. 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.

- [26] Gimeno IM, Witter RL, Hunt HD, Reddy SM, Reed WM. Biocharacteristics shared by highly protective vaccines against Marek's disease. *Avian Pathology*, 2004, 33 (1) : 59-68.

Isolation and characterization of a non-pathogenic Marek's disease virus with a naturally inserted REV LTR sequence

Rui ai Chen^{1,2,3*}, Qiong Luo^{2,3}, Kai Guo¹, Zhengwei Liu¹, Huimin Li¹, Jianli Wang¹

¹College of Veterinary medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

²Key Laboratory of Biotechnology and Bioproducts Development for Animal Epidemic Prevention, Ministry of Agriculture, P. R. China, Zhaoqing 526238, Guangdong Province, China

³Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology R&D of Veterinary Biological Products, Zhaoqing 526238, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] Marek's disease virus (MDV), GD06 strain, was isolated from healthy Three-Yellow chickens without MD vaccine. In this study, we characterized GD06 strain. [Methods] Meq gene and repeat short region of GD06 strain were amplified and analyzed, and the serotype was determined by indirect immunofluorescence assay. The growth characteristics of GD06 stain were evaluated in Specific Pathogen Free (SPF) chickens and chicken embryo fibroblasts. The pathogenicity of GD06 strain was assessed by challenge test using SPF chickens. [Results] GD06 strain was MDV-1 serotype with a naturally inserted reticuloendotheliosis virus long terminal repeat sequence. Similar to the vaccinated strains CVI988/Rispens and 814, the Meq gene of strain GD06 contained a 59-aa insertion in the proline-rich domain compared with very virulent strain Md5. On 96, 120, 144, 168 and 192 hours post infection, the virus titers of GD06 were higher than that of CVI988/Rispens *in vitro* ($P < 0.05$), and the viremia levels in GD06-infected group were significantly higher than that of CVI988/Rispens group on 21 and 42 days post inoculation ($P < 0.05$). The result of challenge test demonstrated that GD06 remained nonpathogenic for chickens and induced little immunosuppressive effects. [Conclusion] GD06 is an MDV-1 non-pathogenic strain naturally integrated with reticuloendotheliosis virus and long terminal repeat sequence.

Keywords: Marek's disease virus, GD06 strain, long terminal repeat sequence

(本文责编:张晓丽)

* Corresponding author. Tel: +86-20-85282847; E-mail: chensa727@126.com

Received: 1 November 2013/Revised: 7 February 2014