

表达 IBDV VP2 融合蛋白的重组 MDV 的构建及其免疫特性 Construction and Immunological Characterization of Recombinant Marek's Disease Virus Expressing IBDV VP2 Fusion Protein

刘红梅^{1,2}, 秦爱建^{1*}, 刘岳龙¹, 金文杰¹, 叶建强¹, 陈鸿军¹, 邵红霞¹, 李迎晓¹
LIU Hong-Mei^{1,2}, QIN Ai-Jian^{1*}, LIU Yue-Long¹, JIN Wen-Jie¹, YE Jian-Qiang¹, CHEN Hong-Jun¹,
SHAO Hong-Xia¹ and LI Ying-Xiao¹

1. 扬州大学江苏省动物预防医学重点实验室, 扬州 225009

2. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036

1. Key Lab of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

2. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

摘要 将增强型绿色荧光蛋白基因(eGFP)与鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)的VP2基因融合,插入马立克氏病毒(MDV) CVI988/Rispens的非必需区US10片段中,成功构建表达VP2融合蛋白的MDV CVI988转移载体pUC18-US10-VP2。将转移载体质粒与CVI988/Rispens疫苗毒共转染鸡胚成纤维细胞(CEF),筛选获得表达VP2融合蛋白的重组MDV(rMDV)。聚合酶链式反应(PCR)和间接免疫荧光实验(IFA)证明,rMDV传至第31代仍能稳定表达VP2融合蛋白。用rMDV免疫SPF鸡,进行IBDV攻毒保护试验,1日龄SPF鸡分别用1000PFU、2000PFU、5000PFU的rMDV进行免疫,33日龄用100LD₅₀的IBDV JS超强毒进行攻毒,鸡的免疫保护率分别为50%、60%、80%。值得注意的是,5000PFU的rMDV一次免疫1日龄SPF鸡,其法氏囊组织病理损伤等级与IBD中等毒力活疫苗常规二次免疫相当(2.0/1.5),其保护效果无显著差异($p > 0.05$),而非重组病毒免疫组相比较,保护效果差异显著($P < 0.01$),这表明构建的表达IBDV VP2融合蛋白的rMDV可以有效地为SPF鸡提供免疫保护作用。

关键词 CVI988/Rispens, 传染性法氏囊病病毒, 重组病毒, VP2

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0391-06

Abstract A transfer plasmid vector pUC18-US10-VP2 was first constructed by inserting the gene of the enhancer green fluorescent protein(eGFP) fused to the VP2 gene of very virulent Infectious bursal disease virus (IBDV) JS strain into the US10 fragment of the Marek's disease virus (MDV) CVI988/Rispens. The recombinant virus, designated as rMDV, was developed by co-transfecting CEF with the transfer plasmid vector and simultaneously infecting with the CVI988/Rispens virus. The PCR and IFA results indicated that the rMDV is stable after 31 passages. Chickens vaccinated with rMDV were protected from challenge with 100LD₅₀ of IBDV JS. The protection ratio of the chickens vaccinated with the 1000PFU, 2000PFU, 5000PFU of the rMDV were 50%, 60%, and 80% respectively. It is interesting that the average histopathology BF lesion scores of chicken group immunized with 5000PFU of rMDV by one-time vaccination was close to that of chicken group vaccinated with IBDV live vaccine

Received: October 25, 2005; Accepted: January 10, 2006.

This work was supported by Grant from the National High Technology Research and Development Program(No. 863-2002AA245051) and Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China(No. 200256).

* Corresponding author. Tel: 86-514-7979217; Fax: 86-514-7979217; E-mail: aijian @ yzu.edu.cn

国家高技术研究与发展计划项目(No. 2002AA245051)和高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金项目(No. 200256)资助。

NF8 strain for twice (2.0/1.5). There is no difference in protection between the groups ($P > 0.05$) but significant difference between groups immunized with 5000 PFU of rMDV and with normal MDV. This demonstrated that rMDV expressing VP2 fusion protein was effective vaccine against IBDV in SPF chickens.

Key words Marek's disease virus, Infectious bursal disease virus, recombinant virus, VP2

传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是由鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 引起的鸡和火鸡的一种高度接触性传染病。IBDV 主要影响法氏囊 (bursa of Fabricius, BF) B 淋巴细胞的分化, 导致不同程度的免疫抑制, 从而增加对并发和继发性病毒和细菌感染的易感性。

在 IBDV 的 5 种病毒蛋白中, VP2 作为所有中和性抗原表位、部分非中和性抗原表位和毒力相关抗原表位所在的蛋白一直是 IBD 疫苗研究的热点。目前, IBDV 主要宿主保护性抗原 VP2 蛋白已在大肠杆菌、酵母、真核细胞、病毒等多种表达系统中得到表达^[1-6], 其中病毒表达系统由于兼有亚单位疫苗和活疫苗的特点而备受人们的青睐。

马立克氏病毒 (Marek's disease virus, MDV) 是禽的一种疱疹病毒, 用其作为载体构建活病毒载体疫苗是近年来禽病毒基因工程研究中比较活跃的领域。国外许多实验室基于 MDV 的常规疫苗 (如 HVT, CV1988) 构建了多个表达 VP2 的重组疫苗。Darteil 等^[7] 和 Tsukamoto 等^[8] 分别利用 HVT 作载体在 HVT 基因组的不同位点插入由不同启动子调控的 IBDV VP2 基因, 筛选出多个表达 VP2 基因的重组病毒, 免疫鸡获得了 100% 的免疫保护。但随着野外 MDV 毒力变异增强, 就 MD 单价疫苗对野外强毒、超强毒和特超强毒攻击的免疫效力来说, HVT 疫苗显然不如 CV1988/Rispens^[9], 因此, 利用 CV1988 作载体表达 IBDV VP2 基因具有明显的现实意义。Tsukamoto 等^[10] 利用 SV40 启动子在 MDV CV1988 株的 US2 区构建了表达 IBDV VP2 基因的重组疫苗, 但接种的鸡在攻 IBDV 超强毒后保护率仅达 55%。为了进一步提高 IBDV 攻毒后的保护水平, 本试验选用 CV1988 作为载体, CMV 为启动子, MDV 的 US10 区 (已经证实是插入外源基因的最稳定区域^[11]) 为插入位点, 通过构建表达 IBDV VP2 融合蛋白的 pUC18-US10-VP2 转移载体, 与 MDV 活病毒同源重组, 获得了表达 VP2 融合蛋白的重组病毒, 动物免疫和攻毒保护试验表明, 免疫重组病毒对 IBDV 超强毒的攻击具有良好的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与疫苗: 9~10 日龄的 SPF 鸡胚购自山东 SPF 实验种鸡场自行孵化至使用日龄; CVI988/Rispens 疫苗购自北京农林科学院畜牧兽医研究所北京翎羽禽病防治技术开发有限公司, 液氮保存; IBDV JS 株毒价 $10^{3.6} \text{LD}_{50}/0.1 \text{mL}$, 本室分离鉴定; IBD 中等毒力活疫苗 NF8 (IBDV-NF8), 中牧实业股份有限公司南京药械厂。

1.1.2 主要试剂与工具酶: peGFP-C1 购自 Clontech 公司, pUC18-US10 质粒, pcDNA3.1-VP2 质粒 (本室构建保存)。各种限制性内切酶、Taq 酶购自上海生物工程公司, T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, DNA 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司, Lipofectin Reagent 购自 GIBCO 公司。IBDV VP2 特异性单抗 3H6 本室研制, Rhodamine 标记羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 含 VP2 融合基因表达盒转移载体的构建: 含 VP2 融合基因表达盒转移载体的构建策略 (图 1)。根据 peGFP-C1 载体中 eGFP 的阅读框设计引物 (5'-CCTCTAGAAAGCTTGCCACCATGGTGACCA-3', 含 HindIII 位点; 5'-CCTCTAGATTAGGATCCCTTGTACAGCTCG-3', 含 BamHI 位点) 扩增跨幅 720bp 的 eGFP 基因片段, 经 HindIII \ BamHI 双酶切后插入 pcDNA3.1-VP2 质粒载体中。根据 pcDNA3.1 载体序列, 设计引物 (5'-TTTGCATGCTTCGCGATGTACGGGCCA-3', 含 Sph I 位点; 5'-GTTGCATGCCATCCCCAGCTTGCCCTGCTATT 表达盒) 经 Sph I 单酶切后插入 pUC18-US10 质粒中, 得到含 VP2 融合基因表达盒的转移载体质粒 pUC18-US10-VP2。转移载体质粒经过 BamHI 酶切鉴定插入方向, 提取纯化转移载体质粒 DNA 并定量, -20℃ 保存备用。

1.2.2 rMDV 的筛选和鉴定: 参照文献 [12, 13], 感染病毒量为 200PFU/皿, 同时用 2.5 μg 纯化的载体质粒 DNA, 6 μL Lipofectin reagent 进行转染。具体操作按 Lipofectin reagent 使用说明书进行, 病毒感染和同步转染 12h 后换完全培养基, 24h 换维持液进行培养。当 35mm 平皿中出现葡萄串状带绿色荧光的蚀

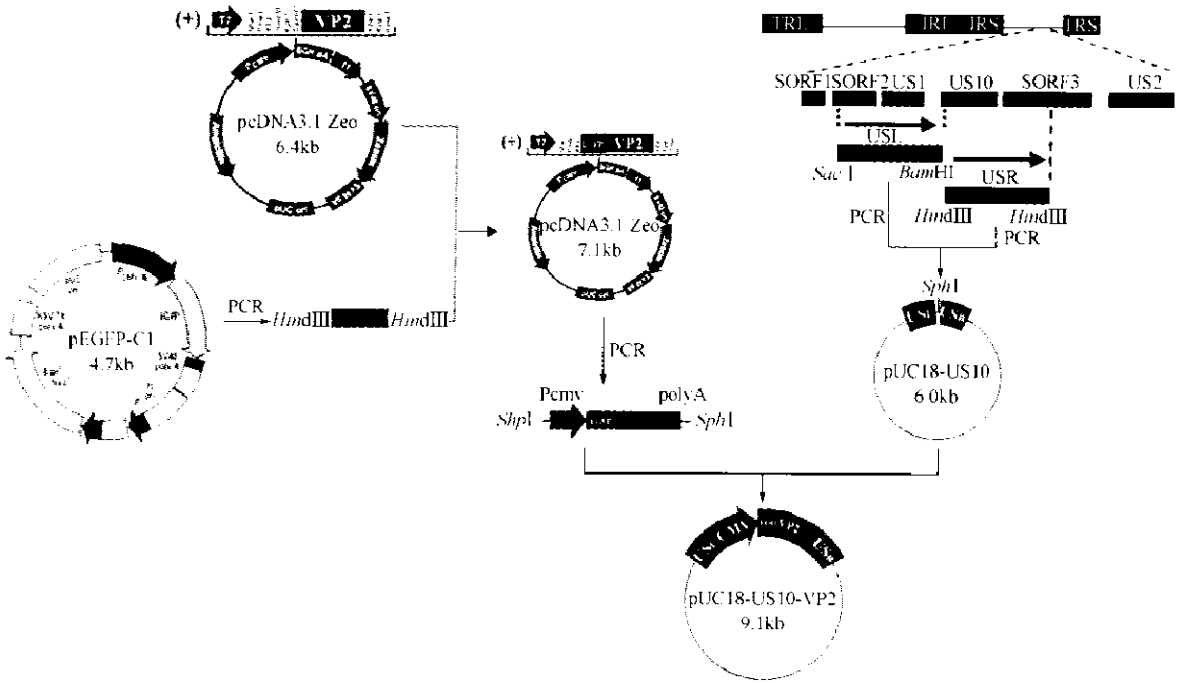


图1 含 VP2 融合基因表达盒转移载体的构建示意图

Fig. 1 Scheme for construction of transfer plasmid vector for expressing cassette of VP2 fused to eGFP

斑时,无菌取吸有 0.05% 胰酶的滤纸块,沾取独立的葡萄串状带绿色荧光的病毒蚀斑于培养液中,将培养液稀释,接种到新鲜制备的 CEF 细胞单层的 96 孔板上。当 96 孔板中某一孔出现独立的荧光蚀斑时,再利用 96 孔板倍比稀释下去,反复纯化,直到纯化出全部阳性蚀斑,重组病毒命名为 rMDV。rMDV 第 1 代(P1)和第 31 代(P31)基因组 DNA 提取按 Morgan 方法^[1]进行,用 VP2 引物进行 PCR 鉴定。rMDV 感染的细胞用乙醇:丙酮(2:3)固定,使用抗 IBDV 单抗 3H6 为一抗, Rhodamine 标记羊抗鼠 IgG 为二抗进行间接免疫荧光试验检测 VP2 在 rMDV 中的表达情况。

1.2.3 动物攻毒保护试验:取 1 日龄 SPF 鸡 60 羽,随机分 6 组,每组 10 羽。rMDV 设三组,免疫剂量分别为 1000PFU、2000PFU、5000PFU,对照组分别为 CVI988 疫苗(1000PFU/羽)和生理盐水,于 1 日龄颈部皮下免疫(0.1mL/羽);另设 IBDV-NF8 疫苗组,于 14 日龄滴鼻首免,24 日龄二免,免疫剂量均为 1000ELD₅₀/60 μ L/羽。各组于 33 日龄滴鼻接种 100LD₅₀ IBDV 超强毒 JS 株,攻毒剂量为 50 μ L/羽,攻毒后统计发病数和死亡数,10d 后宰杀所有 SPF 鸡,剖检观察法氏囊大体病变,并统计法氏囊损伤数。法氏囊用 10% 甲醛浸泡,制作病理组织切片,镜下观察显微病变,判定并统计法氏囊组织病理损伤等级,计算免疫保护率。

法氏囊组织病理损伤等级参照 Tsukamoto 的判定标准^[10]:0 = < 5% 的法氏囊滤泡被感染破坏;1 = 5% ~ 25% 的法氏囊滤泡被感染破坏;2 = 25% ~ 50% 的法氏囊滤泡被感染破坏;3 = 50% ~ 75% 的法氏囊滤泡被感染破坏;4 = > 75% 的法氏囊滤泡被感染破坏;5 = 几乎 100% 的法氏囊滤泡被感染破坏。0 ~ 1 表明几乎完全抑制 vvIBDV 的复制;2 ~ 4 表明抑制 vvIBDV 的复制的程度与使用活疫苗相当;5 表明不能抑制 vvIBDV 的复制。在生产实际中能造成经济损失的法氏囊组织病理损伤度是 5,0 ~ 4 可以认为鸡体获得了保护。

2 结果

2.1 重组病毒的构建及鉴定

以 pEGFP-C1 载体为模板进行 PCR 反应,扩增出与预期大小相一致的 720bp eGFP 基因片段,再以 pcDNA3.1-eGFP-VP2 质粒为模板进行 PCR 反应,扩增出与预期大小相一致的 3.12kb 基因片段(即含 VP2 融合基因的表达盒),说明扩增的目的片段正确(图 2)。构建的含 VP2 融合基因表达盒的转移载体质粒 pUC18-US10-VP2,经 *Bam*HI 酶切可切出 7.6kb 和 1.5kb,表明 VP2 融合基因表达盒已插入 pUC18-US10 载体质粒中,且插入方向为正向(图 3)。利用构建的转移载体质粒与 CVI988 活病毒在 CEF 上同源重组获得了稳定表达绿色荧光蛋白的 rMDV(图 4-A、B)。

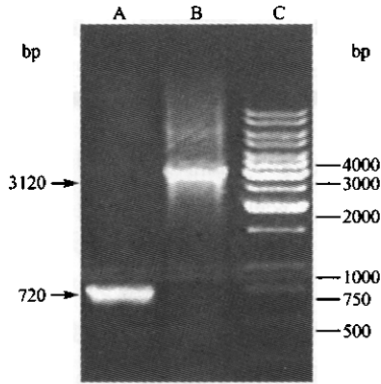


图2 eGFP和VP2表达盒的PCR扩增

Fig.2 eGFP and VP2 expressing cassette amplified by PCR

A: PCR product of eGFP; B: PCR product of VP2 expressing cassette; C: 1kb marker.

利用CEF扩增rMDV,提取rMDV感染CEF的总DNA进行PCR扩增。电泳结果显示,第1代和第31代rMDV感染CEF的总DNA中均可扩增出1.37kb左右的VP2条带,而以CVI988病毒感染CEF的总DNA为模板没有扩增出特异条带(图5),说明获得的rMDV基因组内含有VP2基因,且rMDV经过31次传代后仍很稳定。

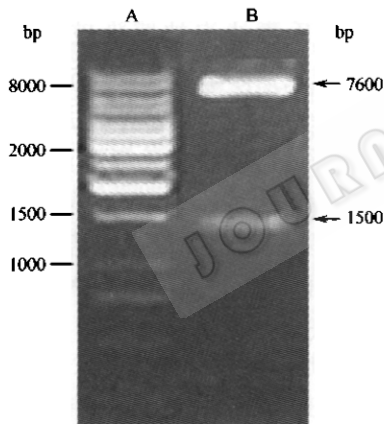


图3 转移载体质粒pUC18-US10-VP2的酶切鉴定

Fig.3 Identification of pUC18-US10-VP2 digested with BamHI

A: 1kb Marker; B: pUC18-US10-VP2.

2.2 重组病毒中外源基因的表达

rMDV感染CEF 4d后,在光镜下观察到rMDV感染CEF形成的特有空斑(图6-A),用荧光显微镜进行观察可以看到绿色荧光(图6-B),rMDV感染的CEF经用乙醇:丙酮(2:3)固定,抗IBDV单抗为一抗,Rhodamine标记羊抗鼠IgG为二抗进行间接免疫荧光试验,检测结果有特异的红色荧光(图6-C),说明构建的rMDV能够表达VP2蛋白。

2.3 重组病毒免疫SPF鸡能诱导机体产生免疫保护

试验组在攻毒后均有部分鸡出现IBD典型临床

症状。免疫5000PFU的rMDV组和IBDV-NF8组的临床症状较轻,仅有小部分鸡出现拉白色粪便现象;而CVI988疫苗组和生理盐水组100%出现严重的临床症状,病鸡精神萎靡,羽毛松乱,拉白色粪便,3~4d后陆续死亡,死亡率为80%~90%,剖检见法氏囊粘膜有弥漫性出血点,有的呈紫葡萄样,腿肌、胸肌有出血点。

攻毒10d后剖检观察存活鸡的法氏囊大体病变,rMDV组和IBDV-NF8组存活鸡的法氏囊的色泽、质地、大小均正常,没有水肿、出血、萎缩等肉眼可见的病变。对法氏囊组织切片进行观察,rMDV组的法氏囊淋巴滤泡出现0~75%的损伤,部分淋巴细胞坏死、数目减少,随免疫剂量的增加而减轻,以5000PFU免疫剂量的rMDV组的损伤最轻。依据判定标准,1000、2000和5000PFU剂量的rMDV组攻毒保护率分别为50%、60%、80%;IBDV-NF8组攻毒保护率为100%;而CVI988疫苗组和生理盐水组存活鸡的法氏囊均出现萎缩现象,对法氏囊组织切片进行观察,法氏囊淋巴滤泡大部分消失,滤泡内的淋巴细胞呈一片坏死状态,被破坏达100%,法氏囊病理损伤等级均为5.0,攻毒保护率为0。用t检验分析,发现以5000PFU免疫剂量的rMDV组保护效果与IBDV-NF8组的保护效果差异不显著($P > 0.05$),但与CVI988疫苗组的保护效果差异显著($P < 0.01$)。详细结果见表1。

3 讨论

在IBD防治中,目前主要使用弱毒、中等毒力活疫苗以及灭活疫苗,但弱毒苗存在潜伏感染以及毒力返强的危险;中等毒力疫苗存在损伤法氏囊,抗原性或致病性不稳定;灭活苗虽然安全,但不能对超强毒的感染提供有效的保护,而且这几种疫苗都无法进行疫苗和野毒感染的鉴别诊断。利用MDV作载体构建表达IBDV VP2基因的重组病毒,不仅可以克服以上缺陷,且在有效抵抗MDV强毒攻击的同时,激发鸡体免疫系统产生抵抗IBDV强毒攻击的反应(包括体液免疫和细胞免疫)。尽管构建的这种活病毒载体疫苗可能在相当长的一段时间里还无法取代传统疫苗,但它们是今后的发展方向。

MDV的疫苗株CVI988/Rispens作为从自然界分离的I型弱毒疫苗,在控制鸡的MD方面作出了巨大贡献,而将其作为载体表达外源基因是近几年国内外研究的热点^[8,10,15]。但是MDV1(CVI988/Rispens)是细胞结合性病毒,这增加了重组病毒筛选

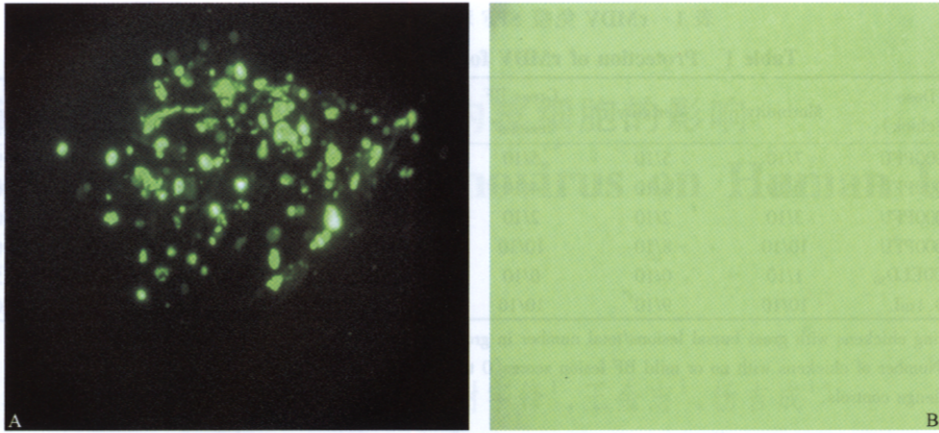


图 4 rMDV 感染 CEF 的荧光鉴定结果(100 ×)

Fig.4 Result of screening the rMDV in CEF by fluorescence assay

4-A: Fluorescence of rMDV in CEF by fluorescence microscopy; 4-B: Plaque of rMDV in CEF by light microscopy.

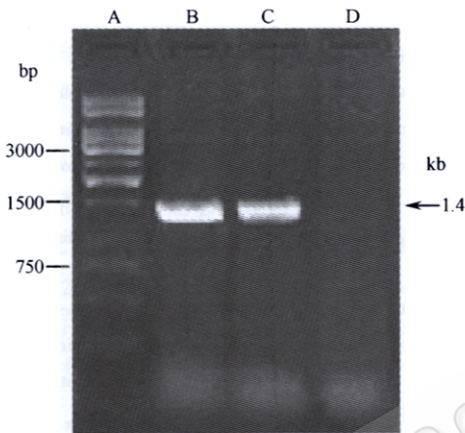


图 5 rMDV 表达 VP2 基因的 PCR 鉴定结果

Fig.5 The identification result of VP2 of rMDV by PCR

A: 1kb Marker; B: rMDV-P1 DNA; C: rMDV-P31 DNA; D: MDV CVI988 DNA.

稳定性。同时,通过绿色荧光蛋白作标志显示:表达的融合蛋白主要分布在细胞浆,并且可看到由部分蛋白聚合形成的胞浆包涵体,这与报道 VP2 蛋白非常容易聚集以及 IBDV 天然感染细胞时 VP2 蛋白主要在胞浆分布的特性一致^[4]。

IBDV 的靶器官是法氏囊,主要亲嗜未成熟的 B 淋巴细胞,使 B 淋巴细胞受损,从而导致鸡群发病或对其他致病因子的易感性增加。法氏囊淋巴滤泡受损后残存的部分淋巴组织是再生的基础,如果淋巴滤泡被完全摧毁,则再生将不可能发生。本试验比较三个免疫剂量的 rMDV 组攻毒后法氏囊组织病理损伤程度,免疫 5000PFU 的 rMDV 组的法氏囊组织病理损伤最轻,5/10 的法氏囊淋巴滤泡受损在 0~25% 之间,法氏囊组织病理损伤的平均值为 2.0,与 IBDV-NF8 组两次免疫的结果相当(1.5)。一般来说,若法氏囊组织损伤不大,残存的大部分淋巴组织将提供再生的基础,由疫苗引起的损伤将是暂时的、可逆的,法氏囊组织基本上可以恢复到正常状态。

纯化的难度。基于这种考虑,本试验将编码 IBDV 的主要保护性抗原 VP2 基因与 eGFP 基因融合插入构建的 MDV 载体中,利用 eGFP 作筛选标志纯化表达 VP2 融合蛋白的 rMDV,rMDV 经多次传代证明其

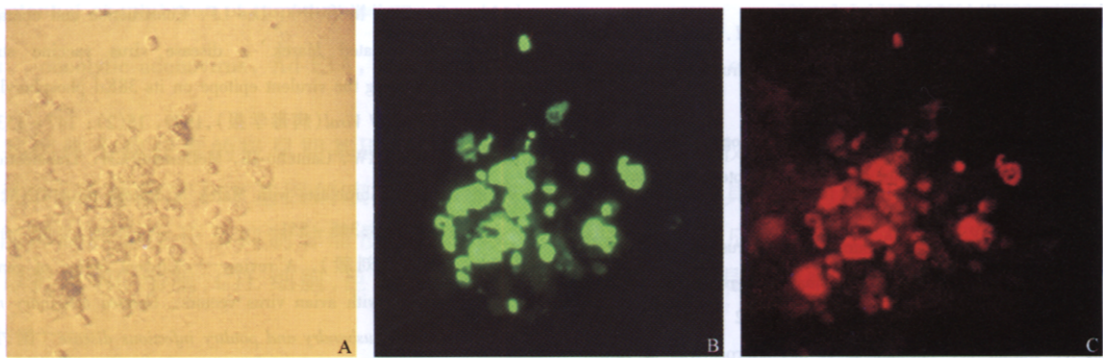


图 6 rMDV 表达 VP2 融合蛋白的鉴定结果

Fig.6 The identification of VP2 fusion protein expressed in CEF infected with rMDV by IFA

A: the virus plaques of rMDV with light microscopy; B: the eGFP expressing cells on 490nm light by fluorescence microscopy; C: the VP2 protein detection by IFA on 535nm light with goat anti-mouse IgG conjugated with rhodamine used a secondary anti-body by fluorescence microscopy.

表 1 rMDV 免疫 SPF 鸡的攻毒保护试验结果

Table 1 Protection of rMDV for SPF chickens against challenge

Vaccine	Dose (/chick)	Morbidity	Mortality	Gross BF lesions ^a	Histopathology BF lesion scores							Protection ^b
					0	1	2	3	4	5	Average	
rMDV	1000PFU	7/10	5/10	5/10			2	2	1	5	3.9	50% (5/10)
rMDV	2000PFU	6/10	4/10	4/10			2	4		4	3.6	60% (6/10)
rMDV	5000PFU	3/10	2/10	2/10	1	4	3			2	2.0	80% (8/10)
CVI988	1000PFU	10/10	8/10	10/10						10	5.0	0% (0/10)
IBDV-NF8	1000ELD ₅₀	1/10	0/10	0/10	2	3	4		1		1.5	100% (10/10)
None ^c	0.1mL	10/10	9/10	10/10						10	5.0	0% (0/10)

^a Number of surviving chickens with gross bursal lesions/total number in group.

^b Protection (%) = Number of chickens with no or mild BF lesion scores (0 to 4)/number tested × 100%.

^c Unvaccinated challenge controls.

利用鸡疱疹病毒作载体构建表达外源基因的重组病毒,其所产生的免疫保护率与载体疫苗的选择、外源基因插入位点和启动子的强弱等因素有关^[5,7,8]。重组病毒的免疫剂量和免疫方式对最终的免疫保护效果也有一定影响^[7,16]。本试验用不同免疫剂量的 rMDV 免疫 SPF 鸡,然后用 IBD 超强毒攻击,免疫保护率随免疫剂量的增加而增加,这与 Darteil 等报道的 rHVT 的免疫效果相类似^[7],但是 Darteil 等报道的 rHVT 的免疫剂量在 10⁴ PFU 时仅为 60%,10⁵ PFU 时才能达到 100% 的保护,高免疫剂量会阻碍其进一步应用。与 Tsukamoto 等^[10]报道的 rMDV CVI988 以 10⁴ PFU 免疫时获得的保护率 55% 相比,本试验仅为上述免疫剂量的一半(5000PFU)时,鸡体就获得了 80% 的保护率,表明构建的 rMDV 对 IBDV 的攻击具有较好的免疫保护作用。为了进一步提高其免疫效率,在今后的工作中,将进行不同启动子对重组病毒免疫效率的研究,以期研制出一种更高效的基因工程疫苗用于 IBD 的防制。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Azad AA, Jagadish MN, Brown A *et al.* Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*, 1987, **161**: 145 - 152
- [2] Jagadish MN, Vaughan PR, Irving RA *et al.* Expression and characterization of infectious bursal disease virus polyprotein in yeast. *Gene*, 1990, **95**: 179 - 186
- [3] Dybing JK, Jackwood DJ. Antigenic and immunogenic properties of baculovirus expressed infectious disease viral proteins. *Avian Dis*, 1998, **42**: 80 - 91
- [4] Heine HC, Boyle DB. Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens. *Arch Virol*, 1993, **131**: 277 - 92
- [5] Darteil R, Bublot M, Laplace E *et al.* Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induces protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology*, 1995, **211**: 481 - 490
- [6] Sheppard M, Werner W, Tsatas E *et al.* Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease. *Arch Virol*, 1998, **143**: 915 - 930
- [7] Darteil R, Bublot M, Laplace E *et al.* Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induces protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology*, 1995, **211**(2): 481 - 490
- [8] Tsukamoto K, Saito S, Saeki S *et al.* Complete, Long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens. *Journal of Virology*, 2002, **7**: 5637 - 5645
- [9] Witter RL. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis*, 1997, **41**: 149 - 163
- [10] Tsukamoto K, Kojima C, Komori Y *et al.* 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
- [11] Sakaguchi M, Hirayama Y, Maeda HK *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**: 953 - 957
- [12] Cui ZZ (崔治中), Qin AJ (秦爱建), Lee LF. Construction of a double-amino acid mutant in 38kD phosphorylated protein of Marek's disease virus vaccine strain CVI988. *Journal of Shandong Agricultural University* (山东农业大学学报—自然科学版), 2000, **31**(3): 231 - 235
- [13] Cui ZZ (崔治中), Lee LF. Construction and characterization of point-mutated Marek's disease virus vaccine strain CVI988 expressing the virulent epitope on its 38Kd phosphorylated protein. *Chinese J Virol* (病毒学报), 1999, **15**(2): 147 - 153
- [14] Morgan RW, Cantello JL, McDermott CH. Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. *Avian Dis*, 1990, **34**: 345 - 351
- [15] Liu Y (刘毅). A review—Current option of gene engineered vaccine with avian virus vectors. *Oversea veterinary medicine—animal husbandry and poultry infectious disease* (国外兽医学·禽禽传染病). 1998, **18**(4): 13 - 18
- [16] Tsukamoto KT, Sato S, Saito *et al.* Dual-viral vector approach induced strong and long-lasting protective immunity against very virulent infectious bursal disease virus. *Virology*, 2000, **269**: 257 - 267