



专论与综述

动物病毒学专栏

## 鸡马立克病毒的研究进展

崔治中\*<sup>1</sup> 苏帅<sup>1</sup> 罗俊<sup>2,5</sup> 钱琨<sup>3</sup> 庄国庆<sup>4</sup> 孙爱军<sup>4</sup> 滕蔓<sup>2,5</sup>

1 山东农业大学动物科技学院 山东 泰安 271018

2 河南省农业科学院动物免疫学重点实验室 农业部动物免疫学重点实验室 河南省动物免疫学重点实验室 河南 郑州 450002

3 扬州大学教育部禽类预防医学重点实验室 江苏 扬州 225009

4 河南农业大学牧医工程学院 河南 郑州 450002

5 河南科技大学动物科技学院 动物疫病与公共卫生重点实验室 河南 洛阳 471003

**摘要:** 马立克病毒(Marek's disease virus, MDV)是一类可感染鸡诱发急性或亚急性淋巴细胞肉瘤的疱疹病毒。本文在对 MDV 的经典病毒学及分子生物学研究的早期成果进行概述的基础上,对近十多年来感染性克隆技术用于探索 MDV 主要蛋白基因的功能、以病毒编码的全部蛋白质为对象的蛋白组学、病毒编码的有调控作用的 RNA 及基因工程疫苗等方面的研究进展进行综述,并展望 MDV 进一步的研究方向和内容。

**关键词:** 马立克病毒, 感染性克隆, 蛋白组学, 调控性 RNA, 重组疫苗

## Progress in Marek's disease virus

CUI Zhi-Zhong\*<sup>1</sup> SU Shuai<sup>1</sup> LUO Jun<sup>2,5</sup> QIAN Kun<sup>3</sup> ZHUANG Guo-Qing<sup>4</sup>  
SUN Ai-Jun<sup>4</sup> TENG Man<sup>2,5</sup>

1 College of Animal Science, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

2 Key Laboratory of Animal Immunology, Ministry of Agriculture, Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002, China

3 Key Laboratory for Avian Preventive Medicine, Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

4 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China

5 Key Laboratory of Animal Disease and Public Safety, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China

**Abstract:** Marek's disease viruses (MDV) is a group of important herpesviruses, which can induce acute

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (U1604232, 31602050, 31802160); China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (2018T110703); Henan Province Thousand Talents Program-Leading Talents in Basic Research; Fund for Distinguished Young Scholars from Henan Academy of Agricultural Sciences (2019JQ01); Special Funds for Scientific Research and Development from Henan Academy of Agricultural Sciences (2019CY012)

\*Corresponding author: E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

**Received:** 18-01-2019; **Accepted:** 20-05-2019; **Published online:** 29-05-2019

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(U1604232, 31602050, 31802160); 中国博士后基金特别资助项目(2018T110703); 中原千人计划-中原基础研究领军人才; 河南省农业科学院杰出青年科技基金(2019JQ01); 河南省农业科学院科研发展专项资金(2019CY012)

\*通信作者: E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

**收稿日期:** 2019-01-18; **接受日期:** 2019-05-20; **网络首发日期:** 2019-05-29

or sub-acute immunosuppressive and neoplastic disease in chickens, namely Marek's disease (MD). Based on a brief overview of early studies on the classical and molecular virology of MDV, the progresses in the last decade are reviewed in different aspects, such as the application of the technique of infectious bacterial chromosome clone (BAC) to study viral gene functions, the studies on proteomics of MDV protein-coding genes, the regulatory functions of virus-encoded non-coding RNAs, and the recombinant MDV vaccines. Furthermore, the expected subjects or aspects for the further study on MDV are also discussed.

**Keywords:** Marek's disease viruses, Infectious clones, Proteomics, Regulation RNA, Recombinant vaccines

马立克病毒(Marek's disease virus, MDV)属于疱疹病毒科。根据病毒的血清学反应,将 MDV 分为 3 个血清型 MDV1、MDV2 和 MDV3。其中 MDV1 是指具有不同致病性(如致肿瘤、免疫抑制、翅腿麻痹及死亡等)的野毒株。MDV2 代表一些从临床健康鸡分离到的非致病性病毒,其代表株为 SB1。MDV3 则是从火鸡分离到的非致病性病毒,又称火鸡疱疹病毒(Herpesvirus of turkeys, HVT),其代表株为 FC126。根据基因组结构,这三类病毒属于该病毒属的 3 个种,即 Gallid herpesvirus 2 (MDV1)、Gallid herpesvirus 3 (MDV2)、Meleagrid herpesvirus 1 (MDV3)。致病性 MDV 野毒株的致病性强弱差别很大,从弱到强分为弱毒(mMDV)、强毒(vMDV)、超强毒(vvMDV)和特超强毒(vv+MDV)。大多数 vvMDV 或 vv+MDV 在给 7 日龄左右 SPF 鸡人工接种后,可在接种后 90 d 内诱发 90%甚至 100%的死亡率,有一定比例的鸡在 1-2 个月内急性死亡,而在 6-8 周及以后死亡的鸡,大多数可在不同内脏出现大小不一的点状或块状肿瘤;而且在 CVI988/Rispens 疫苗免疫鸡,用 vv+MDV 攻毒后,仍有 20%-30%发病死亡率<sup>[1]</sup>。

与其它疱疹病毒相比,MDV 最显著的特性是细胞结合性,即在细胞培养上不产生游离于细胞培养液中有感染性的病毒粒子(特别是 MDV1)。在感染后不同时期的病鸡体内,除羽毛囊上皮细胞外,其它任何脏器或体液中都分离不到游离病毒,病毒严格存在于活细胞内。只有感染 MDV 的羽毛囊上皮细胞能产生游离病毒,在上皮细胞死亡后仍然存在有感染性的病毒粒子。

随着医学疱疹病毒及其它病毒分子生物学的研究进展,在过去 40 年中对 MDV 的分子生物学研究也日趋深入。

## 1 MDV 基因组早期研究概述

虽然早在 1971 年就已用核酸生物物理和生物化学方法确定了 MDV 的基因组是长度约为 160-180 kb 的线性双股 DNA,但由于基因组太长,直到 1980 年才研究清楚 MDV 基因组的基本结构。通过分子杂交技术分析数个限制性内切酶片段间的相互同源性关系,阐明了 MDV 基因组是由 6 个基本片段组成的,即一个长独特片段(Unique long,  $U_L$ )和一个短独特片段(Unique short,  $U_S$ ),  $U_L$  两侧的长末端重复序列(Terminal repeat long,  $T_{RL}$ )和长内部重复序列(Internal repeat long,  $I_{RL}$ ),  $U_S$  两侧的短末端重复序列(Terminal repeat short,  $T_{RS}$ )和短内部重复序列(Internal repeat short,  $I_{RS}$ )。正是通过不同疱疹病毒基因组结构的比较,才将 MDV 重新定位为  $\alpha$  疱疹病毒<sup>[1]</sup>。

在随后的十多年里,通过与其它医学疱疹病毒,特别是单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)相关基因的同源性比较鉴定出了几十个 MDV 基因,包括一部分结构基因和功能基因,如囊膜糖蛋白 gB、gC、gD、gE、gI、gK、gL、gM 等就用与 HSV 类似的命名,还有其它一些基因也与 HSV 类似,分别以基因组片段  $U_L$  或  $U_S$  加编号(如  $U_L1$ 、 $U_S4$ )或用位于长独特片段、短独特片段中的阅读框架加编号(如  $LORF1$ 、 $SORF4$ )或用细胞内蛋白(Intracellular protein, ICP)加编号(如  $ICP4$ )来命名。同时,也发现和鉴定出 7 个 MDV1 特异性的基因,

如肿瘤基因 *meq*、*pp24/pp38* 磷蛋白基因、*1.8kb* 基因家族、潜在感染相关转录子基因 (Latency associated transcripts, LATs)、病毒端粒酶 RNA 基因 (*vTR*)、病毒脂酶 (*vLP*) 和 *IL8* 基因 (*vIL8*)。其中 *pp24/pp38* 基因是最早发现的 MDV 特有基因<sup>[2]</sup>, 截至目前还没有从其它病毒甚至其它任何生物体发现类似的基因, 除了敲除后影响病毒在细胞培养上的复制速度外, 其真正的生物学功能尚不清楚。只是已有研究证明 *pp24/pp38* 所形成的异二聚体蛋白可与 *pp38* 基因与 *1.8 kb* RNA 基因之间的双向启动子相结合显示增强转录的作用<sup>[3]</sup>。*vTR*、*vLP* 和 *vIL8* 3 个基因实际上都是鸡染色体基因中存在的类似基因, 所以在基因的缩写前都带有一个小写“v”以表示病毒基因。

在 MDV 的基因中最重要也是研究最深入的独特基因是与致肿瘤相关的 *meq* 基因, 在基因组上该基因有 2 个拷贝。*meq* 基因中有一个亮氨酸拉链结构 (Leucine zipper), 即每 7 个氨基酸就有一个亮氨酸, 这是蛋白质中的一种结构基元 (Motif), 这种结构与转录增强子活性相关<sup>[4]</sup>。细胞内 *Meq* 蛋白多是以二聚体的形式存在。*meq* 基因可编码 339 aa 组成的蛋白质, 它的亮氨酸拉链结构类似于当时已知的 *jun/fos* 肿瘤基因家族的亮氨酸拉链功能区。此外, 还有一个类似于 WT-1 肿瘤抑制因子基因的多脯氨酸重复区。许多实验, 特别是 *meq* 基因敲除后的强毒不再具有致肿瘤作用的实验都证明了该基因对 MDV 致肿瘤发挥关键的作用<sup>[5]</sup>。

由于 MDV 基因组很大, 且早期 DNA 人工测序效率不高, 第一个 MDV 全基因组序列直到 20 世纪末才真正完成<sup>[6]</sup>。这是以 GA 株 vMDV 为对象完成的, 该病毒全基因组长 174 kb, 全基因组测序结果也进一步证明了早期用内切酶分析法确定的 MDV 基因组结构中的 6 个基本片段。不久后 vvMDV Md5 株的全基因组也发表了, 其比 GA 株略大, 长约 178 kb。近几年来, 由于细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 克隆技术的应用和全自动 DNA 测序技术的发展, 更多 MDV

毒株的全基因组完成了测序。

## 2 MDV 基因组感染性克隆的构建及其应用进展

虽然早在 20 世纪 80 年代就已成功构建了一些基因组较小病毒的感染性克隆, 但由于 MDV 基因组很大, 将近 180 kb, 无法用普通的质粒如 pUC18 系列建立相应的感染性克隆。直到 21 世纪初, 科学家才有可能逐渐利用粘粒 (Cosmid) 或 BAC 等系统构建不同毒力 MDV 毒株的感染性克隆。这一技术的成功显著推动了 MDV 全基因组测序、基因功能以及基因工程疫苗等相关研究的进展。

### 2.1 以粘粒为载体系统的 MDV 感染性克隆的构建及相关基因功能研究

粘粒是由质粒 pBR322 和  $\lambda$  噬菌体的 *cos* 粘性末端构建而成, 大小为 4.6 kb, 但它容量为 29–45 kb, 即插入如此大小的外源基因仍能在相应的宿主菌中复制。Reddy 等<sup>[7]</sup>将 MDV 基因组分成相互重叠的 5 段, 克隆进 5 个独立的重组粘粒中, 用这 5 个重组粘粒 DNA 同时转染鸡胚成纤维细胞 (Chicken embryo fibroblast, CEF), 成功获得 Md5 株 MDV 的感染性克隆; 他们又进一步构建了敲除 *pp38* 基因的重组病毒 Md5 $\Delta$ *pp38*, 用于在细胞和鸡体内研究 *pp38* 基因与 MDV 生物学活性的关系; 研究证明 *pp38* 与淋巴细胞中早期溶细胞感染有关, 但不介导肿瘤的形成。Lupiani 等<sup>[5]</sup>利用该重组粘粒系统构建了 *meq* 基因缺失株 Md5 $\Delta$ *meq*, 证实 *meq* 基因并非病毒复制的必需基因, 但是对于 MDV 的潜伏感染和细胞转化活性具有一定的作用。Lucy 等进一步研究发现 *meq* 基因缺失株 MDV 在接种 SPF 鸡后不再诱发肿瘤, 这直接证明了 *meq* 基因的致肿瘤作用; 而且接种了 Md5 $\Delta$ *meq* 的鸡能够有效抵抗 vvMDV 乃至 vv+MDV 攻毒的致病作用, 为后续 MDV 基因工程疫苗的研究奠定基础<sup>[8-9]</sup>。

由于用重组粘粒构建 MDV 感染性克隆是用带有 MDV 基因组不同片段的多个重组粘粒转染 CEF 而得到的克隆化重组病毒, 不仅构建技术的重复性

较差, 而且多个重组粘粒在转染细胞形成感染性 MDV 全基因组时在细胞培养上可能有多个细胞内形成不同的感染性病毒粒子。此外, 在多个重组粘粒相互重组形成全基因组的过程中所形成的不同感染性病毒基因组分支不一定完全相同, 这会影响到此后进一步研究的稳定性。因此, 随着 BAC 克隆技术的推广, 粘粒逐渐被取代。

## 2.2 以 BAC 为载体系统的 MDV 感染性克隆的构建及相关基因功能研究

BAC 系统是以 F 质粒(F-plasmid)为基础构建而成的细菌染色体克隆载体, 大小为 7.2 kb, 可插入并有效携带大小达到 150–300 kb 的外源基因。2000 年, Schumacher 等利用 BAC 系统首次成功构建了含有无致病力 MDV 全基因组的感染性克隆, 随后利用同源重组技术构建了缺失 *gB* 基因的重组 MDV, 并对 *gB* 基因功能进行了初步研究<sup>[10]</sup>。此后, BAC 系统广泛应用于疫苗株 CVI988/Rispens<sup>[11]</sup>、HVT<sup>[12]</sup>、814<sup>[13]</sup>、SB1<sup>[14]</sup>以及不同毒力 MDV 毒株感染性 BAC 克隆的构建<sup>[15–18]</sup>。2007 年, 研究者利用 BAC 系统构建了超强毒株 RB1B 的感染性克隆, 证实 *UL13* 基因是 MDV 横向传播的必需基因, 并且通过全基因组的测序比较, 推测 MDV 是病毒复合体<sup>[19–20]</sup>。随后, 在 2011 年, Spatz 等构建了从欧洲分离的 MDV 超强毒 C12/130 的 BAC 感染性克隆, 在不同的感染性克隆中, pC12/130-10 拯救的病毒呈现超强毒力; pC12/130-15 拯救的病毒呈现弱毒力, 通过全基因组测序发现两株感染性克隆基因存在差异, 证明了所分离到的超强毒 C12/130 培养物是具有不同致病性 MDV 的病毒复合体, 但是并没有发现造成两种 MDV 毒力差别的直接相关基因<sup>[21]</sup>。2009 年, Sun 等同样利用 BAC 系统构建了第一株 MDV 与 REV 自然重组病毒 GX0101 的感染性克隆<sup>[16]</sup>, 并进一步构建了其 REV-LTR 缺失株 GX0101ΔLTR, 证实 REV-LTR 的插入能够增强 MDV 的横向传播能力, 这是 GX0101 在鸡群中从比例极低的状态不断演化成流行毒株的竞争优势。我们实验室在 GX0101 感染性克隆的基础上敲除掉 *meq* 基

因, 进一步证实 *meq* 基因不仅是 MDV 致肿瘤的主要原因, 而且与 MDV 诱发的免疫抑制以及 MDV 感染后 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数量的下调密切相关<sup>[22]</sup>。基于 GX0101 的 BAC 克隆, Su 等在国内首次利用高通量测序技术完成了 GX0101 的全基因组测序及分析, 解析了其基因组结构特性; 构建了其 *meq* 基因缺失株 SC9-1, 证实 SC9-1 完全丧失致肿瘤性, 并且能够诱导比 CVI988/Rispens 更好的免疫保护效果<sup>[23–24]</sup>。Lupiani 等将 REV-LTR 插入 CVI988/Rispens BAC 感染性克隆能够显著增强病毒的复制能力和免疫保护效果<sup>[25]</sup>。

## 2.3 BAC 感染性克隆技术显著推进了不同毒株 MDV 全基因组测序

截至目前, 基于 BAC 克隆已经完成了 7 株 MDV 的全基因组测序, 涉及弱毒(CVI988/Rispens)、超强毒(RB1B, GX0101)以及特超强毒(584A)不同毒力的血清 I 型 MDV<sup>[20,23,26–27]</sup>。对于不同毒株基因组序列的差异分析, 有助于发现与 MDV 致病性或其它生物学活性相关的分子基础, 并将为今后 MDV 致病基因研究提供大量有用的信息。

## 2.4 MDV 感染性克隆技术对其它基因功能研究的进展

MDV 的致病机理一直是研究的热点。近年来, 利用 MDV BAC 感染性克隆, 越来越多的基因功能被确定, 相关的致病机理也逐渐被揭示。*pp14* 基因是 MDV 的神经毒性因子, 虽然与病毒的致病性以及复制无关, 但是能够增强病毒的神经毒力<sup>[28]</sup>。证实了 MDV 编码的核糖核酸还原酶基因是病毒复制的必需基因, 以及 ORF012 编码的新型核磷蛋白是病毒复制的必需蛋白<sup>[29–30]</sup>。对 MDV *UL5* 基因的单核苷酸(I682R)点突变后, 病毒的致病性以及复制能力减弱, 并且能诱导一定的免疫保护<sup>[31–32]</sup>。利用 BAC 感染性克隆构建的 MDV *VP22* 突变株表明 *VP22* 基因诱导 DNA 损伤进而影响 MD 肿瘤的形成<sup>[33]</sup>。最新的研究表明, 通过优化 MDV BAC 感染性克隆 *UL54*、*UL49*、*UL30* 基因的密码子构建的突变株, 可以延缓 MD 的致病进程以及死亡率<sup>[34]</sup>。*ICP27*

不是 MDV 复制和致肿瘤的必需基因, 但却是横向传播的必需基因<sup>[35]</sup>。MDV VP23 与 IRF7 相互作用, 阻断其与 TBK1 的结合, 从而抑制 IRF7 的激活, 进而抑制 DNA 传感途径<sup>[36]</sup>。同时, 利用不同 MDV 突变株感染易感鸡群, 通过分析宿主基因表达的差异, 有助于从宿主角度进一步揭示 MDV 的致病机理<sup>[37]</sup>。

CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 系统作为基因编辑技术研究的热点, 在 MDV 基因功能研究中的应用已经引起人们的关注。利用 CRISPR/Cas9 系统成功构建了 CVI988/Rispens 的 *pp38*、*meq* 基因缺失株, 表明 CRISPR/Cas9 系统可以应用到不同血清型的 MDV 毒株以及 MDV1 转化的细胞系中, 以研究 MDV 基因在肿瘤细胞中的作用以及 MDV 的分子致病机制<sup>[38]</sup>。

随着现代分子生物学技术的发展和运用, MDV 感染性克隆技术在基因组结构与功能、病毒与宿主之间的相互作用以及基因工程疫苗等方面的研究更趋成熟, 它使 MDV 庞大的基因组能够稳定地保存、增殖和突变, 并且操作简便而安全。

### 3 MDV 的蛋白质组学

蛋白质组学(Proteomics)以基因组编码的全部蛋白质为研究对象, 从整体的角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态, 了解蛋白质之间的相互作用与联系, 从而深入认识有机体的各种生理和病理过程。近年来细菌或酵母双杂交系统、二维凝胶电泳(Two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)、差异凝胶电泳(Differential in-gel electrophoresis, DIGE)、同位素标记相对和绝对定量(Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)、蛋白质芯片(Protein chip)技术等诸多蛋白质组学技术研究手段纷纷应用于 MD 的研究, 使得我们能够通过 MDV 蛋白质组学水平阐明细胞游离病毒形成机制、病毒致病及致肿瘤的机理, 为 MD 的控制以及新型疫苗的研发提供新的思路。

#### 3.1 应用细菌或酵母双杂交系统对 MDV 蛋白质组学的研究

早期, Niikura 等利用大肠杆菌双杂交系统筛选 MDV 和鸡体相互作用的蛋白质, 其中鉴定到鸡生长激素(Growth hormone, GH)、LY6E、MHC II 分子  $\beta$  微球蛋白和 CD74 分子、生长相关翻译控制的肿瘤蛋白(Growth related translationally controlled tumor protein, TPT1)、补体成分 C1q 结合蛋白(C1QBP)、视网膜母细胞瘤结合蛋白 4(Retinoblastoma-binding protein 4, RBBP4)和烯醇化酶( $\alpha$ -Enolase, ENO1)等几种鸡源蛋白与多种 MDV 编码蛋白相互作用<sup>[39]</sup>, 然而这些蛋白的相互作用仍有待体内实验来证实。Niikura 等 2004 年的研究验证了他们同一研究课题组之前的两个发现: 一是利用酵母双杂交试验鉴定鸡生长激素 GH 和 MDV 编码的 SORF2 蛋白之间有相互作用<sup>[40]</sup>; 二是利用大肠杆菌双杂交试验显示鸡 LY6E 和 MDV 编码的 US10 蛋白之间的相互作用<sup>[41]</sup>。除了体外相互作用, 研究还发现 GH 和 SORF2 蛋白在 MDV 感染的细胞中共表达; MHC B2/B15 单倍型鸡中 GH 基因的多态性与 MDV 转化病变组织的数量相关更加突出了这两种蛋白相互作用的重要性<sup>[40]</sup>。类似地, LY6E 基因多态性与 MDV 感染鸡的存活时间和腺胃肿瘤发病率相关<sup>[41]</sup>。这些发现初步显示了蛋白质组学方法在解析 MD 不同遗传抗性品系鸡机制中的作用。

#### 3.2 应用非凝胶的“鸟枪”蛋白质组学对 MDV 的分析研究

基于非凝胶的“鸟枪”蛋白质组学分析是研究 MDV 与宿主相互作用和 MDV 转化细胞生理学的另一种方法。Buza 等 2007 年报道了利用差异去污剂分馏(Differential detergent fractionation, DDF)结合二维液相色谱电喷雾串联质谱(2D-LC-ESI-MS/MS)方法综合分析 MDV 转化细胞系 UA-01 的蛋白质组, 鉴定了 3 870 种来自细胞的蛋白多肽和 21 种 MDV 蛋白<sup>[42]</sup>。生物信息学模型揭示了与 UA-01 癌症细胞表型一致的几个主要生物学过程。此外, 该研究还鉴定了整合素和细胞外信号调节激酶/促分

裂原活化蛋白激酶(ERK/MAPK)途径是 MDV 转化细胞中最主要的活化途径,提示这些蛋白分子在肿瘤转移中的重要性<sup>[42]</sup>。同一课题组 2008 年利用相同的技术手段全面分析比较了静息、超抗原活化和 MDV 转化的 3 种 CD4<sup>+</sup> T 细胞之间的蛋白质组<sup>[43]</sup>。与静息和活化的 T 细胞相比,MDV 转化细胞特有的途径显示出强烈的可溶性因子介导的反应,包括细胞因子、生长因子和激素的表达。超抗原活化和 MDV 转化的 CD4<sup>+</sup> T 细胞糖异生途径的缺失表明在这些细胞中可能诱导能量产生替代途径,以满足细胞的能量需求。

### 3.3 强阳离子交换色谱和微毛细管反相液相色谱-串联质谱的应用

Ramaroson 等 2008 年利用强阳离子交换色谱和微毛细管反相液相色谱-串联质谱分析了 Md5 MDV 感染 CEF 5 d 后的蛋白质表达。在这种定性比较中,分别从对照组和 MDV 感染组的 CEF 中鉴定到 1 460 和 1 676 个非磷酸化蛋白质,其中两组共表达的蛋白质有 1 009 种<sup>[44]</sup>。该研究还鉴定了 342 和 483 磷酸化的蛋白质多肽,分别来自对照组和 MDV 感染组的样品,其中 41 种蛋白质是共同表达的。对于 MDV 编码蛋白而言,CEF 感染 5 d 后鉴定了 86 种 MDV 蛋白的表达<sup>[45]</sup>。虽然这些结果只是定性比较,但这种方法显示该技术适用于定量分析,并且分析包含了那些具有极端等电点的蛋白质,而这些蛋白质可能被基于凝胶的比较蛋白质组学所排除。

### 3.4 二维蛋白电泳和差异凝胶电泳在 MDV 蛋白质组学研究上的应用

近年来,有相关研究报道了利用二维蛋白电泳(2-DE)和差异表达蛋白质组学鉴定研究 MDV 发病不同阶段宿主体内蛋白的动态表达情况<sup>[46-48]</sup>。在这些研究中,Thanthrige-Don 等解析了鸡脾脏蛋白质组中 517±84 个蛋白质点,其中 61 个蛋白斑点质谱鉴定为 48 种蛋白质是 MDV 感染组和对照组鸡之间差异表达的蛋白。基于生物信息学分析显示 MDV 感染影响细胞各种生物学过程,包括抗原加工和呈递、泛素蛋白酶体蛋白降解、细胞骨架形成、细胞

代谢、信号转导和翻译调节等。MDV 感染的法氏囊中鉴定的 24 个差异蛋白主要与肿瘤生物学、蛋白折叠、信号转导、免疫、细胞增殖和凋亡有关,其中肿瘤相关蛋白病毒感染后第 14 天和第 21 天显著上调<sup>[46]</sup>。Chen 等采集了 MDV 超强毒 RB1B 株感染后 21 d 的羽髓样本,二维电泳图谱以及差异蛋白质组学分析发现攻毒组 and 对照组之间表达差异大于两倍的蛋白点有 41 个,其中攻毒组表达上调的蛋白点 25 个,下调的蛋白点 7 个,新出现的蛋白点有 9 个;这些蛋白涉及到物质代谢、细胞骨架成分、细胞增殖及免疫相关等,差异最明显的蛋白是代谢相关蛋白(40%)和细胞增殖蛋白(25%)<sup>[47]</sup>。随后,Hu 等利用二维电泳和质谱分析技术对 RB1B 株感染的鸡胸腺蛋白质组进行了动态分析,共鉴定出 119 个差异表达的蛋白质,这些差异蛋白点主要集中在感染 MDV 后 21、28 和 35 d;GO 注释结果显示这些蛋白涉及包括代谢、免疫、细胞凋亡和死亡、应激以及肿瘤等各个方面,其中有 7 类蛋白共 20 个差异蛋白点(包括巨噬细胞游走抑制因子、热休克蛋白 90 等)与免疫、肿瘤发生、发展和转移等直接相关<sup>[48]</sup>。Thanthrige-Don 等<sup>[49]</sup>利用差异蛋白质组学方法,分析了 MDV 强毒株 JM-16 感染遗传抗性 B21 品系和易感 B19 品系鸡脾脏中的差异蛋白表达;鉴定了 20 种差异表达的蛋白质,包括抗氧化剂分子伴侣,以及参与细胞骨架形成、蛋白质降解、抗原呈递、信号转导、蛋白质翻译和延伸、RNA 加工以及细胞增殖,结果提示这些生物过程可能导致鸡对 MD 的不同遗传抗性。2012 年,Chien 等利用 ERLIC/IMAC/LC-MS/MS 分析技术定量分析了不同 MDV 毒株感染 CEF 的蛋白质组和磷酸化蛋白质组,分别鉴定到 1 002 种蛋白和 539 种磷酸化蛋白与病毒感染相关,其中 eIF4E 和 4E-BP1 蛋白值得关注<sup>[50]</sup>。这些蛋白质组学结果为全面解析 MDV 致病和致肿瘤机制提供了新的证据。

尽管转录组分析初步揭示了可能涉及病毒发病机制和免疫的重要基因和途径,但是基因转录谱会受到其表达蛋白的反馈调控。此外,转录组分析

还存在一些不足,这其中包括基因表达与相应蛋白质表达水平的不一致,以及不能提供关于蛋白质翻译后的修饰(例如磷酸化或乙酰化)信息,这些修饰在病毒致病过程中可能发挥重要的作用。蛋白质组学以其高通量优势为探寻基因功能的奥秘提供了一种新的思路和研究手段<sup>[51]</sup>。蛋白质组学技术有助于扩展我们对 MDV 与宿主相互作用的认识,同时为理解病毒发病机制和免疫提供了新的研究思路。未来利用蛋白质组学技术的研究方向重点是发现 MDV 基因组内新的蛋白,尤其与病毒致病相关的新基因、新蛋白、分析游离病毒粒子的组成和功能、鉴定不同易感鸡品系的保护性抗原或多肽、鉴定病毒与宿主之间的相互作用。

## 4 MDV 基因组编码的有调控作用的 RNA

### 4.1 关于有调控作用的非编码 RNA

最新研究发现,病毒基因组中也编码很多非编码的 RNA 基因,参与调控病毒复制、感染与致病过程。MicroRNA (miRNA) 是一类长度约为 21–24 nt 的非编码小分子 RNA,在转录后水平参与调控一系列重要的生命过程,包括胚胎发育、细胞分化、凋亡、造血、疾病和肿瘤发生等。miRNA 已被广泛报道于人类、动物、植物以及大的 DNA 病毒基因组中。目前已发现鉴定的病毒 miRNA 有数百种,绝大部分由疱疹病毒编码,也有一些属于多瘤病毒属和逆转录病毒属<sup>[52-53]</sup>。目前,这些病毒 miRNA 中的绝大部分已经得到实验鉴定,但绝大多数 miRNA 的功能尚不清楚。

### 4.2 不同血清型编码 MDV 的 miRNA

MDV1 编码的 miRNA 首次报道于 2006 年,随后在 MDV2 和 HVT 基因组中相继报道<sup>[54-58]</sup>。MDV1、MDV2 和 HVT 均编码 miRNA,虽然这些 miRNA 在基因序列上没有同源性,但它们的基因座位在病毒基因组中具有高度保守性。同一病毒编码的大部分 miRNA 都位于 MDV 反转重复序列区域 (TR<sub>L</sub>/IR<sub>L</sub>),并形成典型的 miRNA 基因簇<sup>[59]</sup>。MDV1 共编码 14 个 miRNA 前体基因,加工生成的 26 个

成熟体 miRNA 在 MDV1 的 TR/IR 中形成 3 个 miRNA 基因簇:分别被命名为 Meq 基因簇(包括 miR-M2、miR-M3、miR-M4、miR-M5、miR-M9 和 miR-M12)、Mid 基因簇(miR-M1、miR-M11 和 miR-M31)和 LAT 基因簇(miR-M6、miR-M7、miR-M8、miR-M10 和 miR-M13)<sup>[54,56]</sup>。MDV2 共编码 18 个 miRNA 前体基因,加工生成 36 个成熟 miRNA 分子,其中绝大部分都位于病毒基因组 TR<sub>L</sub>/IR<sub>L</sub> 中聚集形成一个很大的基因簇,仅有 miR-M17 单独位于 IR<sub>S</sub>/TR<sub>S</sub> 中 ICP4 的 ORF 中<sup>[55]</sup>。MDV3 共编码 17 个 miRNA 前体基因,加工生成 28 个成熟 miRNA 分子,绝大部分 miRNA 同样都位于 TR<sub>L</sub>/IR<sub>L</sub> 中,基因组织形式与 MDV2 miRNA 非常相似,形成一个大的 miRNA 基因簇<sup>[57-58]</sup>。

### 4.3 与致病性 MDV1 相关的 miRNA 功能

由于 3 种不同血清型 MDV 中仅有 MDV1 具有致病及致瘤性,因此 MDV1 编码的 miRNA 功能首先成为研究热点。研究发现,在病毒感染的 CEF 细胞和 T 淋巴瘤细胞系 MSB-1 以及 MD 肿瘤组织中,均存在 MDV1 miRNA 的大量表达。但 MSB-1 和 MD 肿瘤组织中 miRNA 的表达水平平均高于 MDV1 感染的 CEF 细胞样品<sup>[56]</sup>。不同毒力 MDV1 编码的 miRNA 表达水平量也存在差异,如 vv+MDV 毒株 615K 诱导的脾脏肿瘤中 Meq 基因簇 miRNA 的表达水平比 vvMDV 毒株 RB1B 诱导的脾脏肿瘤中的表达高数倍,而 LAT 基因簇 miRNA 的表达水平则未发现明显差异<sup>[60]</sup>,预示 Meq 基因簇的 miRNA 在 MDV 的致瘤机制方面可能具有更重要的作用。根据 vvMDV 毒株 GX0101 感染鸡体内的 MDV1 miRNA 动态表达谱,可将 26 个成熟体 miRNA 分为早期表达和晚期表达两大类,他们具有明显的组织特异性和时空差异性,与 MDV1 感染、致病及致瘤的进程密切相关<sup>[61-62]</sup>。

由于 miRNA 靶基因的发现及鉴定非常困难,目前仅有少数几个 MDV1 miRNA 的功能有较多的研究报道。为了深入研究这些 miRNA 的功能,有学者通过建立 MDV 感染细胞的 cDNA 文库、结合

生物信息学方法对潜在调控的靶基因进行了预测<sup>[60]</sup>。Meq 基因簇编码的病毒 miRNA 最受关注, 尤其是其中的 miR-M4-5p 在 MD 肿瘤细胞系及实质肿瘤中被认为是表达丰度最高的 miRNA 之一。目前 miR-M4-5p 已被证实是宿主 miRNA-155 (miR-155) 的同功分子<sup>[63]</sup>, 而后者已被公认是一个原癌基因。利用 BAC 克隆和 Rec E/T 重组技术将 miR-M4-5p 从 vMDV 毒株 pRB1B-5 或 vvMDV 毒株 GX0101 的病毒基因组中敲除, 结果发现基因缺失的 RB1B 失去转化感染 T 细胞的能力, 致瘤性完全丧失<sup>[64]</sup>, 而 GX0101 中缺失 miR-M4-5p 虽然仍具有一定的致病性, 但被感染鸡的肿瘤发生率也显著下降<sup>[65]</sup>, 这两项研究充分说明 miR-M4-5p 虽然不是 MDV1 致瘤的唯一决定因子, 但其与 MD 肿瘤发生极其相关。进一步研究发现, miR-M4-5p 不仅靶向调控 MDV1 病毒基因 *UL28* 和 *UL32* 的表达, 与病毒的复制和包装有关, 还调控众多宿主靶基因如 *GPM6B*、*RREB1*、*c-Myc*、*MAP3-K7IP2*、*PU.1*、*C/EBP* 及 *hnRNPAB*<sup>[66-67]</sup>。最新研究发现, 通过靶向下调 *LTBP1* 的表达, miR-M4-5p 还可以抑制 TGF- $\beta$ 1 的胞外分泌及活化, 从而抑制 TGF- $\beta$  信号通路的传递, 最终激活宿主原癌基因 *c-Myc* 的过表达而促进肿瘤发生<sup>[68]</sup>。除了 miR-M4-5p 之外, 敲除 Meq 基因簇内的其它 miRNA<sup>[69]</sup>, 发现这些 miRNA 与 MDV1 的致病及致瘤也密切相关, 其中该基因簇编码的 miR-M3-5p 可通过靶向抑制 TGF- $\beta$  信号通路关键信号分子 *SMAD2* 的表达, 进而保护被感染细胞免于凋亡, 为病毒的复制和增殖提供生存空间<sup>[70]</sup>。

Mid 基因簇的 miR-M31-3p 与宿主鸡的 gga-miR-221 拥有相同的种子序列<sup>[60]</sup>, 可能具有相似的功能。gga-miR-221 调控细胞周期的关键抑制因子 p27Kip1 蛋白的表达, 该蛋白的下调表达可促进肿瘤细胞的生长及增殖。将 miR-M31-3p 从 GX0101 的基因组中敲除可以降低病毒的致病性和致瘤率<sup>[71]</sup>, 很好地佐证了 miR-M31-3p 可能参与调控 MD 肿瘤发生的推论。然而, 当基因缺

失 miR-M11-5p 或整个 Mid 基因簇 miRNA, GX0101 的致病性和致瘤率却会显著增强, 预示 miR-M11-5p 在 MD 肿瘤发生的过程中可能扮演抑癌因子的角色。

LAT 基因簇 miRNA 位于病毒潜伏感染相关转录本(LATs)的第一个 LAT 内含子中, 与 LATs 具有相同的转录起始点, 随着 LATs 的转录、剪切、加工生成 miRNA 成熟体分子。LATs 在病毒潜伏感染的后期、肿瘤转化细胞系及实体肿瘤中大量表达。从转录方向看, LAT 基因簇 miRNA 可能是 ICP4 的反义 RNA。已有研究发现该基因簇的 miR-M7-5p 靶向调控 ICP4 和 ICP27 的蛋白表达, 与 MDV 潜伏感染的建立或维持有关<sup>[72]</sup>。

虽然在病毒 miRNA 调控 MDV 感染、致病及致瘤的调控机制方面已经取得了一些重要的研究进展, 但同一基因簇 miRNA 的功能是否相似或不同, 不同基因簇 miRNA 之间在潜伏感染、诱发肿瘤或抑制癌变之间的平衡与调控, 都有待于进一步深入研究<sup>[73]</sup>。最新研究发现, MDV 基因组中还编码长链非编码 RNA<sup>[74]</sup>, 而且宿主细胞的外泌体也可以转运病毒非编码 RNA<sup>[75]</sup>, 但目前对他们的功能还所知甚少。此外, 宿主 miRNA 也参与调控 MDV 的感染及致病, 它们与病毒 miRNA 共同调控宿主的网络及机制仍有待揭示。最近, 简便高效的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术正开始应用于家禽疱疹病毒的基因功能研究<sup>[38]</sup>, 尤其是我们对 MDV1 编码 miRNA 的基因编辑已取得成功, 这将有利于促进对非编码 RNA 调控 MDV 致病或致瘤的分子机制研究。

## 5 MDV 基因工程疫苗研究进展简介

MD 是第一个能用疫苗有效预防控制的病毒性肿瘤病, 实际上, 在过去近 50 年中, 全球养鸡业从应用疫苗预防 MD 的生产实践中获得了极大的经济效益。3 个血清型的 MDV 都可用做 MD 疫苗, 但以与致病性 MDV 同属 MDV1 的 CVI988/RISPENS 株的效果最好。虽然突破

CVI988/Rispens 免疫保护作用的现场投诉也时而发生,但最近 20 多年来, CVI988 仍一直是被全球养鸡业公认预防 MD 最好的疫苗。CVI988 是 20 世纪 70 年代初从健康鸡分离到的一株弱毒 MDV1, 经在 CEF 细胞上连续传代进一步致弱后用作疫苗。为了研发比 CVI988 保护力更好的疫苗, 美国农业部禽病和肿瘤学研究所前所长、美国科学院院士 Witter 曾从 20 世纪 80 年代开始就尝试 MDV1 的不同毒株在 CEF 细胞上连续传代致弱的病毒对 MD 的保护性免疫作用, 在近 20 年的研究中, 没有发现任何一株病毒能提供比 CVI988/Rispens 更好的保护性免疫, 他认为除了用基因工程方法研发新的 MD 疫苗外, 用常规病毒学的方法已不可能得到比 CVI988/Rispens 更好的疫苗了。因此, 从 20 世纪末开始, 科学家们开始尝试用基因工程的方法研发新的 MD 疫苗, 包括将 MDV 不同野毒株敲除不同潜在的致病基因后用作疫苗。

### 5.1 以禽痘病毒为载体表达 MDV 基因的基因工程疫苗

20 世纪 90 年代早期研究者们开始利用禽痘病毒(Fowl pox virus, FPV)作为载体表达 MDV 编码的多种蛋白, 并比较了它们的免疫效果。例如, 重组的 FPV 表达 MDV1 gB 可以 100% 保护 SPF 鸡, 但对母源抗体阳性鸡只能保护 23% 强毒 MDV 感染鸡。重组 FPV 表达 MDV1 编码的 gC、gD、UL47 或者 UL48 对于母源抗体阳性鸡没有保护力。另外, 表达 MDV1 编码的 gC、gD、UL47 或者 UL48 重组 FPV 对表达 gB 的重组 FPV 没有增强免疫效力的作用。但是, 用 FPV-gB 和 HVT 作为多价苗免疫时具有增效作用。相比于 FPV 表达单个基因的免疫效果, FPV 表达 gB、gE 和 gI 或者 gB、gE、gI 和 UL32 (分别是 72% 和 70%) 时具有显著的免疫增效作用<sup>[76]</sup>。尽管这些疫苗具有显著的免疫保护性能, 但是由于鸡体存在 FPV 抗体抑制疫苗的免疫效果, 因而没有商品化的价值, 而且这些疫苗的免疫效果也不比 CVI988/Rispens 好。

### 5.2 通过敲除特定致病基因构建 MDV 基因工程疫苗候选株

近些年来, 多个实验室利用感染性克隆技术构建了敲除某个特定基因的重组病毒, 这不仅可用于识别和研究参与 MDV 复制、免疫抑制、致瘤和致病的基因及其功能, 也可以通过鸡体试验分别判定这些基因缺失病毒做为疫苗候选株的潜在可能性。

#### 5.2.1 *pp38* 基因的敲除

MDV 编码 38 kD 的磷酸化蛋白, 通常在早期感染的细胞和淋巴瘤细胞系及肿瘤细胞中表达。敲除 vvMDV Md5 毒株的 *pp38* 基因实验表明, *pp38* 是 MDV 早期溶细胞感染复制相关的基因, 但其不影响 MDV 在羽毛囊上皮细胞中的感染; 虽然 *pp38* 基因缺失株 MDV 的毒力显著降低, 但是仍能转化 T 细胞生成肿瘤, 所以不是一个理想的疫苗候选株<sup>[7]</sup>。

#### 5.2.2 *vIL8* 基因的敲除

MDV 编码一个类化学因子 *vIL8*, 与细胞编码的 CXC 化学因子如白介素-8 (IL-8) 高度同源; 从 MDV 基因组中敲除 *vIL8* 会导致病毒毒力降低, 研究表明 *vIL8* 与病毒早期溶细胞感染相关, 但对于潜伏期感染没有影响<sup>[77]</sup>。免疫保护性实验表明 *vIL8* 敲除毒株对于 MDV 母源抗体阳性鸡抵抗特超强毒株感染具有中等保护作用, 但 *vIL8* 敲除毒株仍然保留致病作用, 不能作为商品化疫苗使用<sup>[78]</sup>。

#### 5.2.3 *vTR* 基因的敲除

端粒酶主要是由反转录酶和一个 RNA 亚单位(端粒酶 RNA, TR)组成的核蛋白。MDV 基因组包含两个序列完全一样的病毒编码的 RNA 亚单位, 从病毒基因组中敲除 *vTR* 基因可使病毒的致瘤性降低, 但不影响病毒在体内的早期复制过程。研究表明 MDV *vTR* 模板链序列的突变可能使病毒完全失去致瘤性, 突变病毒具有与 CVI988 一样的抵抗超强毒 RB1B 株的免疫保护力<sup>[79]</sup>, 但其后续的研究进展尚不清楚。

#### 5.2.4 *meq* 基因的敲除

利用粘粒和 BAC 技术, 分别以超强毒株和特超强毒株为对象构建 *meq* 敲除毒株, 研究表明 *meq*

敲除毒株完全失去致瘤性,但仍然具有早期溶细胞感染能力<sup>[5,18]</sup>,有可能作为疫苗的候选株,并已证明它们可提供较好的保护免疫。

### 5.3 敲除 *meq* 基因的 Md5Δ*meq* 和 SC9-1 具有比 CVI988/Rispens 更好的免疫效果

动物实验表明,利用粘粒技术将 vvMDV Md5 敲除 *meq* 基因后构建的基因工程疫苗候选毒株 Md5Δ*meq*,在实验室条件下对有无母源抗体的鸡都能诱发比 CVI988/Rispens 疫苗更好的保护性免疫效果,不仅对超强毒株 Md5 的攻毒如此,对特超强毒 648A 株的攻毒也是如此<sup>[8]</sup>。但是, Md5Δ*meq* 在 SPF 鸡可诱发中枢免疫器官显著萎缩及增重减慢,这是阻碍其成为商品化疫苗候选株的一个重要的生物安全问题,而该毒株在 CEF 连续传 40 代致弱后虽不会再引起免疫器官萎缩,但对 MDV 母源抗体阳性鸡的免疫保护力降低<sup>[6,80]</sup>,使其很难进一步商品化。

我们实验室在 GX0101 株 BAC 克隆的基础上<sup>[16]</sup>构建了敲除 *meq* 基因的重组病毒 GX0101Δ*meq*;再将 GX0101Δ*meq* 病毒中的卡那霉素抗性基因敲除,构建了符合我国转基因生物安全标准的基因工程疫苗候选株 SC9-1 (GX0101Δ*meq*Δ*kal*),在 SPF 鸡的实验表明 GX0101Δ*meq* 和 SC9-1 都能对超强毒 Md5 攻毒表现出比 CVI988/Rispens 更好的保护性免疫效果<sup>[24]</sup>;而且,在经 CEF 连续传若干代后,SC9-1 不仅不会诱发中枢免疫器官萎缩,而且对其它灭活疫苗免疫后的抗体反应不会产生不良影响。此外,更严格的生物安全试验表明,该株疫苗即使利用鸡胚免疫接种也不会诱发免疫抑制。SC9-1 疫苗不仅对 SPF 鸡表现良好的保护性免疫,对其它不同品种的规模化饲养鸡也同样显示出更好的免疫效果<sup>[24]</sup>。该株疫苗已获得了农业部农业转基因生物安全证书,并且通过了农业部兽医生物制品审评委员会的临床试验,获得了新兽药证书。

### 5.4 人工插入 REV-LTR 序列的 CVI988/Rispens

在 MDV 基因组插入反转录病毒启动子/增强子序列会引起病毒致弱。例如 RM1 是 REV-LTR 插入

致病株 JM/102W 而致弱的毒株。RM1 与 CVI988/Rispens 相比,其早期溶细胞复制得到了增强,在抵抗特超强毒株感染时具有很好的免疫保护效果。但是, RM1 也引起免疫器官萎缩。为了验证 LTR 的功能,利用 BAC 将 LTR 插入超强 MDV 基因组使病毒致弱,再经体外细胞传代使得病毒完全失去致病性,但同时免疫保护力降低而不能作为疫苗商品化应用<sup>[81]</sup>。

Lupiani 等利用基因重组技术将 RM1 中的 REV-LTR 整合到 CVI988/Rispens 疫苗株,构建了重组病毒 CVRM,与 CVI988/Rispens 相比增加了体外增殖能力,不引起鸡体免疫器官萎缩且免疫保护力优于 CVI988/Rispens<sup>[25]</sup>。

值得注意的是,SC9-1 株 MDV 的亲本毒 GX0101 就是在 2001 年从病鸡分离到的一株带有 REV-LTR 的天然重组病毒,当将其中的 REV-LTR 序列敲除后,病毒在感染鸡体内的复制能力和病毒血症水平都显著降低<sup>[17]</sup>。

### 5.5 以 MDV 为疫苗载体表达其它病毒的免疫原性基因

早在 20 世纪 80 年代,研究者就开始尝试应用 HVT 做为载体表达新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)、传染性法氏囊病毒(Infectious bursal disease virus, IBDV)和禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)的相关抗原基因。20 世纪 90 年代早期开始用 MDV1 作为表达 IBDV、NDV、AIV 和传染性喉气管炎病毒(Infectious laryngotracheitis virus, ILTV)的载体。由于 MDV 受母源抗体干扰作用较小,而且鸡体一旦感染 MDV 就终身带毒,可持续产生免疫刺激作用,这显示出 MDV 作为载体表达其它病毒抗原的潜在优势。其中表达 IBDV 的 VP2 重组 HVT 疫苗已作为商业化疫苗在国内外被广泛应用,而且相对于市场上其它疫苗显示出很强的市场竞争优势,这鼓励了许多疫苗公司和研究机构试图研发用于防控其它病毒病的重组 MDV 疫苗。

早期认为 2 个或者更多 HVT 载体疫苗表达外源基因的混合物可成为控制多种禽病的有效措施,

而研究发现同时使用 2 个重组 HVT 载体会引起相互干扰,从而降低了免疫保护力,可能是不同重组 HVT 载体在宿主内的增殖速度不同引起的<sup>[82-83]</sup>。取而代之的方法是利用一个载体表达多个外源基因,或者将 HVT 和 MDV1、MDV2 载体疫苗结合使用表达外源基因。

### 5.6 利用 CRISPR/Cas9 技术构建重组 MDV 疫苗

利用 BAC 进行 MDV 基因工程疫苗研发的技术和流程已经非常成熟,目前在世界范围内广泛应用。但是, BAC 的操作过程繁琐,需要构建穿梭载体、经过几次阳性克隆筛选以及病毒的拯救等,费时且耗力。CRISPR 系统是微生物抵抗病毒及外源遗传因素入侵的天然免疫机制,其中 2 型 CRISPR/Cas9 系统,包括 RNA 介导的 Cas9 核酸内切酶(来源于链球菌)、一条单链引导 RNA 和反式作用 RNA 共同组成基因编辑器<sup>[84]</sup>。CRISPR/Cas9 在细胞基因组修饰和动物模型构建中取得了重大成功,也被用于几个大的 DNA 病毒基因组修饰,包括 1 型 HSV、腺病毒、伪狂犬病毒、牛痘、鸭瘟病毒等<sup>[85]</sup>。Tang 等利用 CRISPR/Cas9 成功地在 HVT 基因组中插入了 IBDV 的 VP2 基因构建成 HVT-VP2,重组病毒在 CEF 上连续传 20 代次后分析结果显示,插入的 VP2 DNA 序列随着病毒的增殖没有变化且蛋白表达稳定,而且 VP2 的插入没有改变病毒的复制特性<sup>[85]</sup>。这是第一个用 CRISPR/Cas9 构建 HVT 重组病毒报道,与传统的同源重组和 BAC 技术构建 HVT 重组病毒相比,CRISPR/Cas9 具有成本低廉、操作简便和有效及无外源基因干扰等特点。

## 6 MDV 研究的期待和展望

科学研究的动力源自科学家对某些自然现象的兴趣。出于现实,科学家的研究目标和列题也必须从社会的需求出发,对于作为应用学科的预防兽医学更是如此,也就是说研究结果必须对社会有用。大多数研究成果应该能不同程度地用于或服务于生产,如果是基础研究,要考虑到其后续研究的

潜在可能性或对今后深入研究的推动作用。通观 MDV 研究的 50 多年历史,早期的研究成果多数对疫病的诊断和防控以及深入认识 MDV 和 MD 的性质也是有用的。至于近 20 年 MDV 的分子生物学研究,其结果多数只是将现代分子生物学的不同阶段发展起来的新技术、新概念在 MDV 上再重复应用一遍而已,多数只是添了一点所谓科学数据,发表的论文被“引用”,但不是被“应用”。在当前科学研究的对象和领域越来越多,而我们的研究资源和人力精力又总是有限,在考虑对 MDV 开展进一步研究时要慎重地选择今后的研究目标和方向。

为了提高对 MDV 基础研究的价值,应该首先考虑研究 MDV 在病毒,特别是疱疹病毒中显示的特殊生物学性状及其相关基因和基因产物的分子生物学机制。其中最关键的显然是 MDV 的致肿瘤作用及相关的 *meq* 肿瘤基因和表达产物。在过去 20 年中,虽然在这方面已取得了许多重要的进展,但对其进一步深入研究的潜力还很大,特别是如何应用近 10 年来发展起来的新技术和新概念综合起来研究。

另一个最值得关注的 MDV 特性是其细胞结合性,即除了在羽囊上皮中可形成有感染性的细胞游离病毒粒子外,在现有的细胞培养和已检测过的鸡体细胞中都不能形成有感染性的细胞游离 MDV1 病毒粒子,病毒的传染性有赖于活细胞间的直接接触感染。这是 MDV 有别于其它疱疹病毒的一大特点,阐明这一特性的分子机制不仅是病毒学领域的基础性研究,而且也具有很高经济价值的应用前景。近几十年来在国内外最广泛使用的 CVI988/Rispens 疫苗及其它 1 型疫苗,都是细胞结合疫苗,即必须在液氮中保存,这不仅给生产应用带来很大的不便,也显著增加了疫苗的成本。从 20 世纪 80 年代以来,科学家们一直试图解决这个问题,但几乎没有任何进展。我们现在能否尝试把现代基因组学、蛋白组学、调控性小 RNA、感染性克隆和 CRISPR 技术和概念综合应用起来解决这个问题,而不是用某一项新技术或新概念来回答这个

问题。一旦解决了这个问题的分子机制, 就可以考虑用类似于 CRISPR 技术来对某些细胞做基因编辑, 从而形成能为 MDV 复制并产生游离病毒的细胞系用于 MDV 疫苗的大生产。

当然, MDV 的基因工程疫苗应该是今后一段时期内最受关注的研究。由于用 HVT 作为载体表达 IBDV VP2 基因的基因工程疫苗有效用于预防鸡传染性法氏囊病, 在国内外市场取得了巨大成功, 激励了许多企业和研究机构纷纷开展同类的研究。但是, 因为 HVT 本身作为 MD 的疫苗已不能有效地预防控制 vvMDV 诱发的肿瘤, 表达其它病毒抗原的重组 HVT 就更不能有效预防 MD。在应用 HVT 载体疫苗后, 还必须同时使用 MDV1 疫苗来预防控制对鸡群同样危害性很大的 MD, 因此必须考虑能否用 MDV1 疫苗病毒作为载体来表达所感兴趣的其它病毒抗原基因。这样的研究也在一些实验室尝试中。最后必须要意识到, 并不是每一个按设计构建好的重组病毒都能用作商业化疫苗的, 实际上目前在市场上广泛应用的表达 IBDV vp2 的重组 HVT 疫苗也是从众多重组病毒中通过鸡体实验筛选出来的。

还有一个小的仅属于经典病毒学的研究目标是, 明确中国鸡群有没有能够突破 CVI988/Rispens 疫苗的保护性免疫的 vv+MDV 流行株。虽然早在 20 世纪 90 年代, 欧美就已报道了 vv+MDV 的多个野毒株, 但中国一直没有真正证实有 vv+MDV 的流行。虽然这只是一个经典病毒学问题, 但必须要用足够数量的动物实验来证明, 而不是仅仅根据用过疫苗的鸡群仍发生肿瘤并分离到 MDV 就能轻易下结论的。

## REFERENCES

- [1] Schat KA, Nair V. Marek's Disease[A]/Saif CYM Disease of Poultry[M]. 12th ed. Ames, USA: Iowa State Press, A Blackwell Publishing Company, 2008: 452-514
- [2] Cui ZZ, Lee LF, Liu JL, et al. Structural analysis and transcriptional mapping of the Marek's disease virus gene encoding *pp38*, an antigen associated with transformed cells[J]. Journal of Virology, 1991, 65(12): 6509-6515
- [3] Ding JB, Cui ZZ, Lee LF. Marek's disease virus unique genes *pp38* and *pp24* are essential for transactivating the bi-directional promoters for the 1.8 kb mRNA transcripts[J]. Virus Genes, 2007, 35(3): 643-650
- [4] Jones D, Lee L, Liu JL, et al. Marek disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the *fos/jun* oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(9): 4042-4046
- [5] 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[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(32): 11815-11820
- [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[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 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[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(10): 7054-7059
- [8] Lee LF, Lupiani B, Silva RF, et al. Recombinant Marek's disease virus (MDV) lacking the *Meq* oncogene confers protection against challenge with a very virulent plus strain of MDV[J]. Vaccine, 2008, 26(15): 1887-1892
- [9] Lee LF, Kreager KS, Arango J, et al. Comparative evaluation of vaccine efficacy of recombinant Marek's disease virus vaccine lacking *Meq* oncogene in commercial chickens[J]. Vaccine, 2010, 28(5): 1294-1299
- [10] Schumacher D, Tischer BK, Fuchs W, et al. 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[J]. Journal of Virology, 2000, 74(23): 11088-11098
- [11] Petherbridge L, Howes K, Baigent SJ, et al. Replication-competent bacterial artificial chromosomes of Marek's disease virus: novel tools for generation of molecularly defined herpesvirus vaccines[J]. Journal of Virology, 2003, 77(16): 8712-8718
- [12] Baigent SJ, Petherbridge LJ, Smith LP, et al. Herpesvirus of turkey reconstituted from bacterial artificial chromosome clones induces protection against Marek's disease[J]. Journal of General Virology, 2006, 87(4): 769-776
- [13] Cui HY. Cloning of marek's disease virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome[D]. Harbin: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007 (in Chinese)  
崔红玉. 鸡马立克氏病病毒细菌人工染色体的构建[D]. 哈尔滨: 中国农业科学院硕士学位论文, 2007
- [14] Petherbridge L, Xu HT, Zhao YG, et al. Cloning of *Gallid herpesvirus 3* (Marek's disease virus serotype-2) genome as infectious bacterial artificial chromosomes for analysis of viral gene functions[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 158(1/2): 11-17
- [15] Petherbridge L, Brown AC, Baigent SJ, et al. Oncogenicity of

- virulent Marek's disease virus cloned as bacterial artificial chromosomes[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(23): 13376-13380
- [16] Sun AJ, Lawrence P, Zhao YG, et al. A BAC clone of MDV strain GX0101 with REV-LTR integration retained its pathogenicity[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54(15): 2641-2647
- [17] 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[J]. *Virology*, 2010, 397(2): 270-276
- [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[J]. *Avian Diseases*, 2013, 57(2 Suppl): 469-473
- [19] Jarosinski KW, Margulis NG, Kamil JP, et al. Horizontal transmission of Marek's disease virus requires U<sub>S</sub>2, the U<sub>L</sub>13 protein kinase, and gC[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(19): 10575-10587
- [20] Spatz SJ, Petherbridge L, Zhao YG, et al. Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispens) strains of Marek's disease virus[J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88(4): 1080-1096
- [21] Spatz SJ, Smith LP, Baigent SJ, et al. Genotypic characterization of two bacterial artificial chromosome clones derived from a single DNA source of the very virulent gallid herpesvirus-2 strain C12/130[J]. *Journal of General Virology*, 2011, 92(7): 1500-1507
- [22] 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[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 2
- [23] Su S, Cui N, Cui ZZ, et al. Complete genome sequence of a recombinant Marek's disease virus field strain with one reticuloendotheliosis virus long terminal repeat insert[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(24): 13818-13819
- [24] Su S, Cui N, Zhou Y, et al. A recombinant field strain of Marek's disease (MD) virus with reticuloendotheliosis virus long terminal repeat insert lacking the *meq* gene as a vaccine against MD[J]. *Vaccine*, 2015, 33(5): 596-603
- [25] Lupiani B, Lee LF, Kreager KS, et al. Insertion of reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into the genome of CVI988 strain of Marek's disease virus results in enhanced growth and protection[J]. *Avian Diseases*, 2013, 57(2 Suppl): 427-431
- [26] Spatz SJ, Zhao YG, Petherbridge L, et al. Comparative sequence analysis of a highly oncogenic but horizontal spread-defective clone of Marek's disease virus[J]. *Virus Genes*, 2007, 35(3): 753-766
- [27] Spatz SJ, Rue C, Schumacher D, et al. Clustering of mutations within the inverted repeat regions of a serially passaged attenuated gallid herpesvirus type 2 strain[J]. *Virus Genes*, 2008, 37(1): 69-80
- [28] Tahiri-Alaoui A, Smith LP, Kgosana L, et al. Identification of a neurovirulence factor from Marek's disease virus[J]. *Avian Diseases*, 2013, 57(2 Suppl): 387-394
- [29] 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*[J]. *Avian Diseases*, 2013, 57(2 Suppl): 464-468
- [30] Schippers T, Jarosinski K, Osterrieder N. The ORF012 gene of Marek's disease virus type 1 produces a spliced transcript and encodes a novel nuclear phosphoprotein essential for virus growth[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(2): 1348-1363
- [31] Hildebrandt E, Dunn JR, Cheng HH. Characterizing *in vivo* stability and potential interactions of a UL5 helicase-primase mutation previously shown to reduce virulence and *in vivo* replication of Marek's disease virus[J]. *Virus Research*, 2015, 203: 1-3
- [32] Hildebrandt E, Dunn JR, Cheng HH. The Mut UL5-I682R Marek's disease virus with a single nucleotide mutation within the helicase-primase subunit gene not only reduces virulence but also provides partial vaccinal protection against Marek's disease[J]. *Avian Diseases*, 2015, 59(1): 94-97
- [33] Bencherit D, Remy S, Le Vern Y, et al. Induction of DNA damages upon Marek's disease virus infection: implication in viral replication and pathogenesis[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(24): e01658-17
- [34] Eschke K, Trimpert J, Osterrieder N, et al. Attenuation of a very virulent Marek's disease herpesvirus (MDV) by codon pair bias deoptimization[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(1): e1006857
- [35] Ponnuraj N, Tien YT, Vega-Rodriguez W, et al. The *Herpesviridae* conserved multifunctional infected-cell protein 27 (ICP27) is important but not required for replication and oncogenicity of Marek's disease alphaherpesvirus[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(4): e01903-18
- [36] Gao L, Li K, Zhang Y, et al. Inhibition of DNA-sensing pathway by Marek's disease virus VP23 protein through suppression of interferon regulatory factor 7 activation[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(4): e01934-18
- [37] Subramaniam S, Preeyanon L, Cheng HH. Transcriptional profiling of *Meq*-dependent genes in Marek's disease resistant and susceptible inbred chicken lines[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78171
- [38] 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[J]. *Viruses*, 2018, 10(6): 279
- [39] Niikura M, Liu HC, Dodgson JB, et al. A comprehensive screen for chicken proteins that interact with proteins unique to virulent strains of Marek's disease virus[J]. *Poultry Science*, 2004, 83(7): 1117-1123
- [40] Liu HC, Kung HJ, Fulton JE, et al. Growth hormone interacts with the Marek's disease virus SORF2 protein and is associated with disease resistance in chicken[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(16): 9203-9208
- [41] Liu HC, Niikura M, Fulton JE, et al. Identification of chicken lymphocyte antigen 6 complex, locus E (*LY6E*, alias *SCA2*) as a putative Marek's disease resistance gene via a virus-host protein interaction screen[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2003, 102(1/4): 304-308
- [42] Buza JJ, Burgess SC. Modeling the proteome of a Marek's disease transformed cell line: a natural animal model for CD30 overexpressing lymphomas[J]. *Proteomics*, 2007, 7(8): 1316-1326

- [43] Buza JJ, Burgess SC. Different signaling pathways expressed by chicken naive CD4<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> lymphocytes activated with staphylococcal enterotoxin B, and those malignantly transformed by Marek's disease virus[J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(6): 2380-2387
- [44] Ramarason MF, Ruby J, Goshe MB, et al. Changes in the *Gallus gallus* proteome induced by Marek's disease virus[J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(10): 4346-4358
- [45] Liu HCS, Soderblom EJ, Goshe MB. A mass spectrometry-based proteomic approach to study Marek's disease virus gene expression[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 135(1): 66-75
- [46] Thantrige-Don N, Abdul-Careem MF, Shack LA, et al. Analyses of the spleen proteome of chickens infected with Marek's disease virus[J]. *Virology*, 2009, 390(2): 356-367
- [47] Chen XH, Hu XM, Yu C, et al. Differential protein analysis of chicken skin infected with Marek's disease virus[J]. *Acta Virologica*, 2014, 58(1): 43-52
- [48] Hu XM, Qin AJ, Qian K, et al. Analysis of protein expression profiles in the thymus of chickens infected with Marek's disease virus[J]. *Virology Journal*, 2012, 9: 256
- [49] Thantrige-Don N, Parvizi P, Sarson AJ, et al. Proteomic analysis of host responses to Marek's disease virus infection in spleens of genetically resistant and susceptible chickens[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 34(7): 699-704
- [50] Chien KY, Blackburn K, Liu HC, et al. Proteomic and phosphoproteomic analysis of chicken embryo fibroblasts infected with cell culture-attenuated and vaccine strains of Marek's disease virus[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(12): 5663-5677
- [51] Bernhard OK, Diefenbach RJ, Cunningham AL. New insights into viral structure and virus-cell interactions through proteomics[J]. *Expert Review of Proteomics*, 2005, 2(4): 577-588
- [52] Sullivan CS, Ganem D. MicroRNAs and viral infection[J]. *Molecular Cell*, 2005, 20(1): 3-7
- [53] Boss IW, Plaisance KB, Renne R. Role of virus-encoded microRNAs in herpesvirus biology[J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(12): 544-553
- [54] Burnside J, Bernberg E, Anderson A, et al. Marek's disease virus encodes MicroRNAs that map to *meq* and the latency-associated transcript[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(17): 8778-8786
- [55] Yao YX, Zhao YG, Xu HT, et al. Marek's disease virus type 2 (MDV-2)-encoded microRNAs show no sequence conservation with those encoded by MDV-1[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(13): 7164-7170
- [56] Yao YX, Zhao YG, Xu HT, et al. MicroRNA profile of Marek's disease virus-transformed T-cell line MSB-1: predominance of virus-encoded microRNAs[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(8): 4007-4015
- [57] Yao YX, Zhao YG, Smith LP, et al. Novel microRNAs (miRNAs) encoded by herpesvirus of turkeys: evidence of miRNA evolution by duplication[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(13): 6969-6973
- [58] Waidner LA, Morgan RW, Anderson AS, et al. MicroRNAs of Gallid and Meleagrid herpesviruses show generally conserved genomic locations and are virus-specific[J]. *Virology*, 2009, 388(1): 128-136
- [59] Luo J, Teng M, Fan JM, et al. Marek's disease virus-encoded microRNAs: genomics, expression and function[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(10): 1174-1180
- [60] Morgan R, Anderson A, Bernberg E, et al. Sequence conservation and differential expression of Marek's disease virus microRNAs[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(24): 12213-12220
- [61] Luo J, Sun AJ, Teng M, et al. Expression profiles of microRNAs encoded by the oncogenic Marek's disease virus reveal two distinct expression patterns *in vivo* during different phases of disease[J]. *Journal of General Virology*, 2011, 92(3): 608-620
- [62] Zhao P, Li XJ, Teng M, et al. *In vivo* expression patterns of microRNAs of *Gallid herpesvirus 2* (GaHV-2) during the virus life cycle and development of Marek's disease lymphomas[J]. *Virus Genes*, 2015, 50(2): 245-252
- [63] Zhao YG, Yao YX, Xu HT, et al. A functional MicroRNA-155 ortholog encoded by the oncogenic Marek's disease virus[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(1): 489-492
- [64] 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[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(2): e1001305
- [65] Yu ZH, Teng M, Sun AJ, et al. Virus-encoded miR-155 ortholog is an important potential regulator but not essential for the development of lymphomas induced by very virulent Marek's disease virus[J]. *Virology*, 2014, 448: 55-64
- [66] Muylkens B, Coupeau D, Dambrine G, et al. Marek's disease virus microRNA designated Mdv1-pre-miR-M4 targets both cellular and viral genes[J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(11): 1823-1837
- [67] Dang L, Teng M, Li HZ, et al. Marek's disease virus type 1 encoded analog of miR-155 promotes proliferation of chicken embryo fibroblast and DF-1 cells by targeting *hmRNPAB*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 207: 210-218
- [68] Chi JQ, Teng M, Yu ZH, et al. Marek's disease virus-encoded analog of microRNA-155 activates the oncogene c-Myc by targeting *LTBP1* and suppressing the TGF- $\beta$  signaling pathway[J]. *Virology*, 2015, 476: 72-84
- [69] Teng M, Yu ZH, Sun AJ, et al. The significance of the individual Meq-clustered miRNAs of Marek's disease virus in oncogenesis[J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(3): 637-649
- [70] Xu S, Xue CY, Li JP, et al. Marek's disease virus type 1 microRNA miR-M3 suppresses cisplatin-induced apoptosis by targeting *Smad2* of the transforming growth factor beta signal pathway[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(1): 276-285
- [71] Teng M, Yu ZH, Zhao P, et al. Putative roles as oncogene or tumour suppressor of the mid-clustered MicroRNAs in *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV2) induced marek's disease lymphomagenesis[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(5): 1097-1112
- [72] Strassheim S, Stik G, Rasschaert D, et al. mdv1-miR-M7-5p, located in the newly identified first intron of the

- latency-associated transcript of Marek's disease virus, targets the immediate-early genes *ICP4* and *ICP27*[J]. *Journal of General Virology*, 2012, 93(8): 1731-1742
- [73] 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[J]. *Frontier in Microbiology*, 2017, 8: 1169
- [74] Figueroa T, Boumart I, Coupeau D, et al. Hyperediting by ADAR1 of a new herpesvirus lncRNA during the lytic phase of the oncogenic Marek's disease virus[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(11): 2973-2988
- [75] Nath Neerukonda S, Egan NA, Patria J, et al. Comparison of exosomes purified via ultracentrifugation (UC) and Total Exosome Isolation (TEI) reagent from the serum of Marek's disease virus (MDV)-vaccinated and tumor-bearing chickens[J]. *Journal of Virological Methods*, 2019, 263: 1-9
- [76] Lee LE, Witter RL, Reddy SM, et al. Protection and synergism by recombinant fowl pox vaccines expressing multiple genes from Marek's disease virus[J]. *Avian Diseases*, 2003, 47(3): 549-558
- [77] Cui XP, Lee LF, Reed WM, et al. Marek's disease virus-encoded vIL-8 gene is involved in early cytolitic infection but dispensable for establishment of latency[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(9): 4753-4760
- [78] Cui XP, Lee LF, Hunt HD, et al. A Marek's disease virus vIL-8 deletion mutant has attenuated virulence and confers protection against challenge with a very virulent plus strain[J]. *Avian Diseases*, 2005, 49(2): 199-206
- [79] Kaufner BB, Arndt S, Trapp S, et al. Herpesvirus telomerase RNA (vTR) with a mutated template sequence abrogates herpesvirus-induced lymphomagenesis[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(10): e1002333
- [80] Lee LF, Heidari M, Zhang HM, et al. Cell culture attenuation eliminates rMd5ΔMeq-induced bursal and thymic atrophy and renders the mutant virus as an effective and safe vaccine against Marek's disease[J]. *Vaccine*, 2012, 30(34): 5151-5158
- [81] Kim T, Mays J, Fadly A, et al. 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[J]. *Virus Genes*, 2011, 42(3): 369-376
- [82] Gimeno IM. Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow?[J]. *Vaccine*, 2008, 26(Suppl 3): C31-C41
- [83] Reddy SM, Izumiya Y, Lupiani B. Marek's disease vaccines: current status, and strategies for improvement and development of vector vaccines[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 206: 113-120
- [84] Jiang FG, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2017, 46: 505-529
- [85] Tang N, Zhang YY, Pedrera M, et al. A simple and rapid approach to develop recombinant avian herpesvirus vectored vaccines using CRISPR/Cas9 system[J]. *Vaccine*, 2018, 36(5): 716-722