*meq*与*lorf9*双基因缺失显著降低超强马立克氏病病毒的复制能力

孙爱军, 张改平, 庄国庆*

河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002

* 联系人, E-mail: gqzhuang2008@163.com

2019-09-16 收稿, 2019-10-13 修回, 2019-10-14 接受, 2019-12-16 网络版发表

国家自然科学基金(31802160)和河南农业大学高层次“拔尖人才”启动项目(30500690)资助

摘要 马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)感染引起以鸡体严重免疫抑制和内脏肿瘤为主要特征的马立克氏病(Marek's disease, MD). MDV的感染过程分为早期溶细胞感染、潜伏感染、肿瘤转化和再次激活感染4个阶段. 为了研究构建的*meq*与*lorf9*双基因缺失重组毒株在宿主体内的复制特性, 应用实时荧光定量PCR技术(Real-time PCR)对MDV感染后第6, 14日龄鸡脾脏中的病毒拷贝数进行检测, 结果表明, 双基因缺失病毒在早期溶细胞感染和潜伏感染期中的复制显著降低; 对MDV感染后第63日龄鸡的脾脏和羽毛囊中的病毒拷贝数进行定量分析, 结果表明*meq*与*lorf9*双基因缺失也显著降低了病毒在肿瘤转化期和再次激活阶段的感染拷贝数. 本研究为进一步探讨*meq*与*lorf9*双基因缺失在MDV致病和免疫机制中的作用提供了理论基础.

关键词 马立克氏病病毒, 实时荧光定量PCR, 鸡羽毛囊上皮细胞, 双基因缺失

马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)感染鸡引起以严重免疫抑制、神经症状和内脏肿瘤为主要特征的马立克氏病(Marek's disease, MD). 曾因其致病特征被归类于 γ 疱疹病毒亚科. 但按照基因组结构特征划分, MDV属于 α 疱疹病毒亚科. MDV的致病力取决于病毒毒株致病性强弱和宿主的易感性. 病毒从早期感染复制到成熟粒子的释放, 一般要经历4个阶段: 早期溶细胞性感染、潜伏感染、肿瘤转化期、在羽毛囊上皮细胞再次激活增殖和散播到环境中^[1]. 高致病力MDV导致易感鸡群在短时期内100%的死亡, 是影响世界养禽业的重要病毒之一. MDV感染造成世界养禽业每年约20亿美元的经济损失^[2].

根据血清型, MDV可分成三类: 第一类包括高度致肿瘤性的MDV-1及其衍生物; 第二类 and 第三类是自然分离的无致病性MDV-2和MDV-3(火鸡疱疹病毒,

HVT)^[1]. 3种血清型均可用来制备疫苗以预防控制MD的发生. 常用疫苗包括MDV-1体外细胞传代致弱疫苗. 例如, 温和型致肿瘤病毒CVI988株, 经体外细胞传代致弱后, 虽然在鸡体内复制及横向传播能力差, 但在鸡胚成纤维细胞(CEFs)中具有良好的增殖能力, 至今在全世界范围内仍被作为商业化疫苗而应用. MDV-2是从自然感染鸡只中分离的非致病性病毒, 具有一定的免疫保护能力, 在CEFs中也具有良好的复制能力, 也作为细胞结合型疫苗而商业化应用. HVT是从火鸡体内分离的非致病性病毒, 因与MDV-1有相似的抗原性而具有免疫保护力. 从20世纪70年代开始, HVT中的FC126株及其他疫苗株在全世界范围内商业化应用. 尽管HVT疫苗对超强毒株感染的免疫保护效果并不优于CVI988, 但HVT是应用最广泛的MDV疫苗^[3,4]. 以上三类病毒疫苗自20世纪70年代开始应用至今, 可以有效

引用格式: 孙爱军, 张改平, 庄国庆. *meq*与*lorf9*双基因缺失显著降低超强马立克氏病病毒的复制能力. 科学通报, 2020, 65: 167–173

Sun A J, Zhang G P, Zhuang G Q. *meq* and *lorf9* deletion significantly reduced capacity of replication of very virulent Marek's disease virus (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 167–173, doi: [10.1360/TB-2019-0374](https://doi.org/10.1360/TB-2019-0374)

控制MDV的发生,但不能完全阻止MDV在鸡体内复制.研究表明疫苗免疫可能促使MDV进化成更高致病力的毒株^[5].为了有效预防更高致病力MDV的感染,需要研发更有效的疫苗,而利用传统方法研发有效MDV疫苗已经遇到了瓶颈.随着分子生物学技术的发展,利用细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)或者CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)系统,对MDV基因组进行编辑可研发新型基因重组疫苗^[4]. 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/Cas系统,包括RNA介导的Cas9核酸内切酶(来源于链球菌)、单链引导RNA和反式作用RNA. CRISPR/Cas9可对病毒基因组进行修饰. Tang等人^[6]利用CRISPR/Cas9在HVT基因组中插入了IBDV编码的VP2基因构建成HVT-VP2. 结果显示,VP2基因序列随着病毒的增殖传代而保持遗传的稳定性;VP2作为外源基因的插入也没有改变病毒的体外复制特性. 因此CRISPR技术在MDV致病和免疫机制研究中具有广阔的应用前景.

MDV具有独特的基因组结构,包括一个长独特序列区(UL, 约113563 bp)和一个短独特序列区(US, 约10847 bp). 长独特区末端重复序列区域(TRL)和内部反向重复序列区域(TRL)(约13065 bp)及短独特区末端重复序列区域(TRS)和内部反向重复序列区域(约12264 bp). MDV基因组上有两类独特基因. 第一类是由独特基因组区域序列编码的,与其他 α 疱疹病毒(例如 HSV-1)没有同源性的基因,例如 *lorf9*, *lorf11*; 另一类是由反向重复序列区域编码的,在3个血清型之间序列差异较大的独特基因,包括*meq*基因^[7]. MDV编码的*meq*基因位于TRL和TRL区域. Meq蛋白序列包含DNA结合域、亮氨酸拉链聚合作用区域和转录/转录抑制活性区域. 其中, N末端的DNA结合域和亮氨酸拉链区域(leucine zipper regions, bZIP)与宿主原癌蛋白c-JUN高度相似^[8]. Meq既可自身形成同源聚合物(Meq/Meq),又能与c-JUN结合形成异源聚合物(Meq/JUN),两者在MDV引起的肿瘤细胞转化过程中均发挥重要作用^[9]. *meq*基因缺失毒株完全失去了致肿瘤性且具有良好的免疫保护力,但仍然会导致感染鸡体产生严重的免疫抑制,限制了其成为商品化的疫苗^[10]. 前期研究表明,通过敲除病毒早期复制相关基因,可以克服*meq*基因缺失引起的免疫器官萎缩的弊端,同时仍具备良好的免疫保护力(未发表数据). 作为MDV-1独特区域序列编

码的一个未知功能基因, *lorf9*位于UL区右末端,编码的产物大小约30 kD. 我们在前期研究中发现, LORF9缺失会显著降低病毒在体内的早期复制能力和致病性,但并不引起感染宿主淋巴器官萎缩. 这些结果表明, LORF9参与了MDV的致病过程, 尽管具体的分子机制还需要进一步探索. 很有意思的是, *meq*或者*lorf9*单基因缺失毒株感染动物均能显著降低MDV的致病性,但是*meq*和*lorf9*参与病毒致病的机制可能不同. 前期研究中我们检测了*meq*和*lorf9*基因缺失毒株在早期溶细胞感染期和潜伏感染早期的复制以及致病性状况^[11]. 为进一步比较单基因与双基因缺失对于病毒复制周期的影响,我们用荧光定量PCR(Real-time PCR)的方法检测病毒在脾脏和羽毛囊中的拷贝数情况. 为探讨*meq*与*lorf9*参与MDV的致病及免疫机制提供理论依据.

1 材料与方法

(i) 质粒与病毒. 本实验用的质粒载体为pMDTM18-T; 基因重组病毒Md5BAC Δ Meq, Md5BAC Δ LORF9和Md5BAC Δ Meq Δ LORF9的构建来自于原始毒株Md5BAC^[11], Md5毒株由山东农业大学崔治中老师惠赠.

(ii) 标准曲线的制备. 通过已知模板Md5BAC和pMD18-OVO的起始拷贝数的标准品做出标准曲线. 其步骤为: 以10倍梯度从 3×10^5 个拷贝数连续稀释到3个拷贝数. 拷贝数和质粒分子质量之间的转换使用下式计算:

$$\begin{aligned} \text{单个质粒分子量} &= [\text{DNA大小}(\text{bp})] \\ &\times [1 \text{ mol} / 6.02 \times 10^{23} \text{ mol}(\text{bp})] \\ &\times [\text{双链DNA平均分子量}(660 \text{ g}) / \text{mol}]. \end{aligned} \quad (1)$$

以稀释的样品为模板,使用Quant Studio 5检测系统进行Real-time PCR反应,检测结果用Quant StudioTM软件(版本1.4.3)进行分析. 20 μ L反应体系为: 梯度稀释标准质粒5 μ L(10 ng/ μ L), 上游引物1 μ L, 下游引物1 μ L, SYBR Green MasterMix I 10 μ L, ddH₂O 3 μ L. 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 在60 $^{\circ}$ C 1 min循环40次. 依据拷贝数的对数值与循环阈值(cycle threshold, CT)的线性关系制作标准曲线.

(iii) 病毒感染样品的提取. SPF鸡购自济南SPF家禽公司. 将2000PFU Md5BAC, Md5BAC Δ Meq和Md5BAC Δ Meq Δ LORF9分别接种25只1日龄SPF鸡,置于无菌隔离罩中饲养(动物实验编号LLSC1009601).

病毒感染后第6, 14和63天分别取3只鸡. 因鸡脾脏中含有病毒感染的成熟B细胞和T细胞. 而病毒的再次激活复制的部位主要发生在羽毛囊上皮细胞. 因此本研究分别分离脾脏组织和采集鸡羽毛囊, 提取脾脏组织和羽毛囊上皮细胞DNA, 用Real-time PCR方法分析病毒的拷贝数.

(iv) Real-time PCR方法测定病毒拷贝数. 利用苯酚-氯仿法从鸡脾脏组织细胞或者羽毛囊上皮细胞中提取DNA. Real-time PCR方法对样品中的MDV基因组拷贝数进行定量分析. 所用引物分别为MDV-infected cell protein(*ICP4*)基因引物(上游引物: 5'-TTATTCCG-TACTCACCG-3'; 下游引物: 5'-CATTATAAGTTCCATGCAAAC-3')和鸡卵铁转蛋白chicken ovotransferrin gene(*OVO*)基因引物(上游引物: 5'-CACTGCACACTC-TGT-3'; 下游引物: 5'-GCAATGCAATAACCTCCAA-3'). 通过标准曲线计算*ICP4*或*OVO*的拷贝数. 病毒基因组拷贝数用*ICP4*拷贝数与*OVO*拷贝数的比值表示.

(v) 统计学分析. 对于病毒拷贝数的检测, 每个时间点取3只SPF鸡的样品进行分析. Real-time PCR结果表示生物统计学意义重复的平均值. 数据统计分析软件为GraphPad Prism Version 5.01(GraphPad, 美国), $P < 0.05$ 表示统计学差异显著.

2 结果与分析

2.1 标准曲线的建立

标准曲线的建立是以构建的Md5BAC和pMDTM18-T载体标准品为模板, 设计MDV特异性的*ICP4*基因和细胞特异性*OVO*基因的引物进行扩增. 经过溶解性曲线分析, 两种基因的扩增没有交叉反应性. 为了防止因扩增效率不同而引起基因产物的量超出检测范围, 我们将模板的终浓度设定为10 ng/μL. 扩增结果显示*ICP4*与*OVO*的CT值与标准样品拷贝数的对数间存在良好线性关系(图1).

2.2 MDV早期溶细胞复制检测

MDV早期溶细胞复制发生于感染后第3~6天, 主要在B淋巴细胞中进行大量复制. 为了检测重组毒株在早期溶细胞感染的复制状况, 以不同组中感染后第6天分离的脾脏组织细胞DNA为模板扩增病毒DNA. 与预期一致, 阴性对照组没有检测到病毒, 而在原始毒株Md5BAC感染组, 病毒的拷贝数最高(每个脾脏组织细

图1 (网络版彩色) *ICP4*(a)和*OVO*(b)基因标准曲线图. x轴表示基因拷贝数的Log值; y轴表示CT值

Figure 1 (Color online) Standard curves of the *ICP4* (a) and *OVO* (b) genes. x axis represents the Log of copy number; y axis represents the CT value

胞含有277个拷贝); 致肿瘤基因*meq*敲除毒株的感染量降低(每个脾脏组织细胞含有173个拷贝), 但与原始毒株的差异不显著; *lorf9*基因敲除毒株的感染量显著降低(每个脾脏组织细胞含有35个拷贝). 很有意思的是, 与原始病毒相比, *meq*和*lorf9*基因同时敲除毒株的感染量最低, 每个脾脏组织细胞仅含有13个拷贝($P < 0.05$) (表1). 这些结果表明, 致肿瘤基因*meq*对病毒的早期溶细胞复制影响较小, *lorf9*与病毒的早期溶细胞复制相关.

2.3 MDV潜伏期复制检测

MDV感染后第7~8天开始进入潜伏期复制阶段, 其主要特征是病毒早期溶细胞复制相关基因的表达显著降低, 而与潜伏感染相关的基因表达显著升高. 为了检测MDV毒株在潜伏感染期的复制情况, 以感染后第14天分离的脾脏组织细胞DNA为模板扩增病毒DNA. 与预期一致, 阴性对照组没有检测到病毒, 而在原始毒株Md5BAC感染组, 每个脾脏组织细胞含有750个拷贝; 致肿瘤基因*meq*敲除毒株的感染量为每个脾脏组织细胞含有100个拷贝; *lorf9*基因敲除毒株的感染量为每个脾脏组织细胞含有148个拷贝; *meq*和*lorf9*基因同时敲除毒株的感染量为每个脾脏组织细胞含有7个拷贝

表1 比较感染后第6天脾脏细胞中的病毒基因组拷贝数^{a)}**Table 1** Comparison of genomic copy number of viruses in splenocytes at the 6th day post-infection

组别	ICP4的CT 平均值	OVO的CT 平均值	每个细胞中病毒 拷贝数平均值
Md5BAC	21.50	20.13	277
Md5BAC ΔMeq	22.60	20.59	173
Md5BAC ΔLORF9	26.19	21.35	35*
Md5BAC ΔMeqΔLORF9	27.70	20.77	13*
阴性对照	33.60	20.61	-

a) 所有病毒实验组中, 鸡只接种的病毒量为2000PFU. “-”表示没有病毒感染; “*”表示与亲本毒株相比, 差异非常显著

($P<0.05$, 表2). 这些结果表明, 致肿瘤基因*meq*与潜伏期相关, 而*lorf9*基因可能对病毒潜伏期的影响较小.

2.4 MDV肿瘤转化期复制检测

肿瘤转化期一般开始于潜伏感染后第14天, 为了检测MDV毒株在肿瘤转化期的复制情况, 以感染后第63天分离的脾脏组织细胞DNA为模板扩增病毒DNA. 阴性对照组没有检测到病毒, 而在原始毒株Md5BAC感染组, 每个脾脏组织细胞含有138个拷贝; 致肿瘤基因*meq*敲除毒株的感染量为每个脾脏组织细胞含有3个拷贝; *lorf9*基因敲除毒株的感染量为每个脾脏组织细胞含有78个拷贝; *meq*和*lorf9*基因同时敲除毒株的感染量为每个脾脏组织细胞含有1个拷贝($P<0.05$, 表3). 这些结果表明, 致肿瘤基因*meq*与潜伏期相关, 而*lorf9*基因可能对病毒潜伏期的影响较小.

2.5 MDV在羽毛囊上皮细胞复制检测

潜伏感染的淋巴细胞, 或者转化的肿瘤细胞随着血液循环到羽毛囊上皮. 在外界或者体内因素的刺激下, 潜伏感染的病毒被激活, 在羽毛囊上皮细胞中大量增殖, 产生的成熟病毒粒子散播到周围的环境中, 进一步感染新的宿主. 为了检测MDV在羽毛囊上皮细胞中再次激活复制的情况, 以感染后第63天分离的羽毛囊上皮细胞DNA为模板扩增病毒DNA. 阴性对照组没有检测到病毒, 而在原始毒株Md5BAC感染组, 每个羽毛囊上皮细胞含有138个拷贝; 致肿瘤基因*meq*敲除毒株的感染量为每个羽毛囊上皮细胞含有3个拷贝; *Lorf9*基因敲除毒株的感染量为每个羽毛囊上皮细胞含有78个拷贝; *meq*和*lorf9*基因同时敲除毒株的感染量为每个羽毛囊上皮细胞含有1个拷贝($P<0.05$, 表4). 这些结

表2 比较感染后第14天脾脏细胞中的病毒基因组拷贝数^{a)}**Table 2** Comparison of genomic copy number of viruses in splenocytes at the 14th day post-infection

组别	ICP4的CT 平均值	OVO的CT 平均值	每个细胞中病毒 拷贝数平均值
Md5BAC	21.05	20.71	750
Md5BAC ΔMeq	23.62	20.65	100*
Md5BAC ΔLORF9	22.77	20.55	148*
Md5BAC ΔMeqΔLORF9	27.79	20.50	7*
阴性对照	34.12	19.50	-

a) 所有病毒实验组中, 鸡只接种的病毒量为2000PFU. “-”表示没有病毒感染; “*”表示与亲本毒株相比, 差异非常显著

表3 比较感染后第63天脾脏细胞中的病毒基因组拷贝数^{a)}**Table 3** Comparison of genomic copy number of viruses in splenocytes at the 63rd day post-infection

组别	ICP4的CT 平均值	OVO的CT 平均值	每个细胞中病毒 拷贝数平均值
Md5BAC	23.31	20.65	138
Md5BAC ΔMeq	30.78	21.70	3*
Md5BAC ΔLORF9	26.01	21.07	78*
Md5BAC ΔMeqΔLORF9	33.19	22.08	1*
阴性对照	34.93	21.28	-

a) 所有病毒实验组中, 鸡只接种的病毒量为2000PFU. “-”表示没有病毒感染; “*”表示与亲本毒株相比, 差异非常显著

表4 比较感染后第63天羽毛囊细胞中的病毒基因组拷贝数^{a)}**Table 4** Comparison of genomic copy number of viruses in feather follicle cells at the 63rd day post-infection

组别	ICP4的CT 平均值	OVO的CT 平均值	每个细胞中病毒 拷贝数平均值
Md5BAC	17.96	21.81	9157
Md5BAC ΔMeq	31.43	21.95	2*
Md5BAC ΔLORF9	26.46	21.54	42*
Md5BAC ΔMeqΔLORF9	32.59	21.97	1*
阴性对照	34.51	21.88	-

a) 所有病毒实验组中, 鸡只接种的病毒量为2000PFU. “-”表示没有病毒感染; “*”表示与亲本毒株相比, 差异非常显著

果表明, *meq*或者*lorf9*基因缺失显著降低了病毒在羽毛囊上皮细胞中的增殖.

3 讨论

MDV编码多个与致病性相关独特基因, 包括磷酸化蛋白pp38(phosphorylated protein 38), vIL8(viral inter-

leukin 8), *vTR*(viral telomerase RNA,), *meq*基因^[8]. 作为UL区的一个特异基因, MDV-1编码的*lorf9*与MDV-2相似性为61%, 与MDV-3相似性为54%, 但与其他 α 疱疹病毒没有相似性^[12]. 我们前期的研究表明, *lorf9*缺失毒株显著降低了肿瘤发生率和致病性, 并且不引起淋巴器官的萎缩, 表明其在MDV致病过程中起到重要的调控作用(未发表数据). 同时敲除*meq*和*lorf9*的毒株在体外细胞培养过程中的复制与原始毒株没有差异^[11]. 在体内复制周期中, 以感染后第6天分离的脾脏组织细胞DNA为模板扩增病毒. 在原始毒株Md5BAC感染组, 病毒的拷贝数为每个脾脏组织细胞含有277个拷贝; 致肿瘤基因*meq*敲除毒株的感染量为每个脾脏组织细胞含有173个拷贝, 低于Md5BAC, 但差异不显著; *lorf9*基因敲除毒株的感染量显著降低, 为每个脾脏组织细胞含有35个拷贝; 很有意思的是, *meq*和*lorf9*基因同时敲除毒株的感染量最低, 每个脾脏组织细胞仅含有13个拷贝(表1). 这些结果表明, 致肿瘤基因*meq*对病毒的早期溶细胞复制影响较小, 而*lorf9*与病毒的早期溶细胞复制相关, 这些结果也与病毒感染鸡体引起的致病性相关^[11].

MDV感染后第7~8天开始进入潜伏期复制阶段. 其主要特征是病毒早期溶细胞复制相关基因的表达显著降低, 而与潜伏感染相关的基因表达显著升高^[13]. 以感染后第14天分离的脾脏组织细胞DNA为模板扩增病毒. 在原始毒株Md5BAC感染组, 每个脾脏组织细胞含有750个拷贝; 致肿瘤基因*meq*敲除毒株的感染量为每个脾脏组织细胞含有100个拷贝; *lorf9*基因敲除毒株的感染量为每个脾脏组织细胞含有148个拷贝; *meq*和*lorf9*基因同时敲除毒株的感染量株为每个脾脏组织细胞含有7个拷贝(表2). 这些结果表明致肿瘤基因*meq*与潜伏期相关, 而*lorf9*基因可能对病毒潜伏期的影响较小. Md5BAC Δ *Meq* Δ LORF9的早期溶细胞复制能力的降低, 可能导致毒株致病力的显著降低. 很有意思的是, LORF9的缺失并不影响肿瘤细胞的转化. 在感染后第14天的潜伏期, Md5BAC Δ LORF9的拷贝数是早期溶

细胞感染期的4倍. 而失去转化肿瘤能力的Md5BAC Δ -*Meq*毒株在第14天拷贝数比早期溶细胞感染期降低了2倍. 与预期结果一致的是Md5BAC Δ *Meq* Δ LORF9毒株在第6, 14和63天拷贝数均比原始毒株显著降低(表3).

在体内或者体外的因素刺激下, MDV于羽毛囊上皮细胞再次激活复制后产生成熟的病毒粒子, 并散播到外界环境中传播流行^[14]. 本研究检测了感染后第63日龄羽毛囊中的病毒拷贝数. 阴性对照组中没有检测到MDV感染, 而Md5BAC的阳性对照组的病毒拷贝数最高, 为平均每个细胞9157个拷贝. 本研究中检测到Md5BAC Δ *Meq*感染组在羽毛囊中的拷贝数是2个拷贝. Md5BAC Δ *Meq* Δ LORF9感染组仅有1个拷贝(表4). 导致双基因敲除病毒在羽毛囊中拷贝数低的因素包括: (1) Md5BAC Δ *Meq* Δ LORF9早期溶细胞感染显著降低, 导致潜伏感染和羽毛囊细胞再激活复制显著降低; (2) *meq*和*lorf9*基因同时敲除, 影响病毒潜伏期的形成, 导致再次激活复制的病毒量少; (3) 本研究中动物实验周期为63天, 病毒在羽毛囊中的复制是否随着时间的延长而增加有待于进一步检测; (4) MDV毒力强弱也是病毒在羽毛囊复制传播的重要因素. 本研究所用毒株Md5BAC为超强毒株. 更高毒力毒株双基因敲除对病毒在羽毛囊中复制能力的影响有待于进一步验证.

4 结论

本研究首先应用Real-time PCR技术成功构建了病毒特异性基因*ICP4*与宿主细胞特异性基因*OVO*的标准曲线. 利用Real-time PCR技术检测*meq*与*lorf9*双基因缺失重组毒株感染宿主不同阶段的组织样品中*ICP4*与*OVO*的拷贝数. 之后利用标准曲线对感染宿主不同阶段的组织样品中的*ICP4*与*OVO*拷贝数进行定量分析. 结果表明, 与亲本毒株比较, *meq*与*lorf9*双基因缺失病毒在早期溶细胞感染、潜伏感染、肿瘤转化和再次激活感染阶段的复制均显著降低. 本研究为我们进一步探讨MDV双基因敲除病毒株的致病和免疫机制打下了很好的理论基础.

参考文献

- 1 Calnek B W. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 255: 25-55
- 2 Davison T F, Nair V. Marek's Disease: An Evolving Problem. Amsterdam, Boston: Elsevier, 2004
- 3 Witter R L. Protective efficacy of Marek's disease vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 255: 57-90
- 4 Reddy S M, Izumiya Y, Lupiani B. Marek's disease vaccines: Current status, and strategies for improvement and development of vector vaccines. *Vet Microbiol*, 2017, 206: 113-120

- 5 Read A F, Baigent S J, Powers C, et al. Imperfect vaccination can enhance the transmission of highly virulent pathogens. [PLoS Biol](#), 2015, 13: e1002198
- 6 Tang N, Zhang Y, Pedrera M, et al. A simple and rapid approach to develop recombinant avian herpesvirus vectored vaccines using CRISPR/Cas9 system. [Vaccine](#), 2018, 36: 716–722
- 7 Lee L F, Wu P, Sui D, et al. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2000, 97: 6091–6096
- 8 Osterrieder N, Kamil J P, Schumacher D, et al. Marek's disease virus: From miasma to model. [Nat Rev Microbiol](#), 2006, 4: 283–294
- 9 Suchodolski P F, Izumiya Y, Lupiani B, et al. Both homo and heterodimers of Marek's disease virus encoded Meq protein contribute to transformation of lymphocytes in chickens. [Virology](#), 2010, 399: 312–321
- 10 Lee L F, Lupiani B, Silva R F, et al. 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: 1887–1892
- 11 Sun A, Luo J, Wan B, et al. *Lorf9* deletion significantly eliminated lymphoid organ atrophy induced by *meq*-deleted very virulent Marek's disease virus. [Vet Microbiol](#), 2019, 235: 164–169
- 12 Tulman E R, Afonso C L, Lu Z, et al. The genome of a very virulent Marek's disease virus. [J Virol](#), 2000, 74: 7980–7988
- 13 Nair V. Latency and tumorigenesis in Marek's disease. [Avian Dis](#), 2013, 57: 360–365
- 14 Kennedy D A, Dunn P A, Read A F. Modeling Marek's disease virus transmission: A framework for evaluating the impact of farming practices and evolution. [Epidemics](#), 2018, 23: 85–95

Summary for “*meq*与*lorf9*双基因缺失显著降低超强马立克氏病病毒的复制能力”

***meq* and *lorf9* deletion significantly reduced capacity of replication of very virulent Marek's disease virus**

Aijun Sun, Gaiping Zhang & Guoqing Zhuang^{*}

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

* Corresponding author, E-mail: gqzhuang2008@163.com

Marek's disease virus (MDV) is a highly contagious pathogen that causes neoplastic disease, named as Marek's disease (MD). Although it was first described as polynuropathy disease, MD also induces severe immunosuppression and tumors in infected chickens. Based on biological characteristics, MDV is classified into three serotypes. MDV-1 belonging to serotype 1, includes pathogenic strains and their derivatives. Serotype 2 (MDV-2) and 3 (MDV-2) are non-pathogenic strains, usually used as vaccines. Pathogenic MDV-1 is categorized into four pathotypes: Mild virulent (m), virulent (v), very virulent (vv), and very virulent plus (vv+). MD is the first neoplastic disease that has been successfully controlled by vaccine. By using vaccines, the morbidities and mortalities of chickens were significantly reduced in the farm. However, MDV continues to evolve, and more virulent strains have gradually been seen to break through vaccinal immunity, which results in outbreak of disease. In recent years, highly virulent strains have been isolated in the world, becoming a new threat for the control of MD.

The natural route of MDV infection is through inhalation of airborne cell-free virus particles from the contaminated dust and dander. Once the virus is inhaled, lung epithelial cells and macrophages are speculated to be the primary target cells for MDV infection. Then the virus infects and amplifies in B cells of lymphoid organs (early cytolytic infection). Finally, T cells, mainly activated CD4⁺ T cells are recruited to the lymphoid organs and become latently infected (latency, followed by late cytolytic infection) and therefore transformed (transformation). Reactivation (late cytolytic infection) describes the recurrence of cytolytic replication in response to intra- and/or extracellular stimuli. MDV encodes more than 100 genes. Among them, *meq* is an oncogenic gene that is unique to MDV-1 and consistently expressed in all MD lymphomas and cell lines. Deletion of the *meq* gene completely abrogates the tumorigenesis induced by virulent strains, however, still maintains the ability to induce lymphoid organ atrophy. The *meq*-deleted viral strain could not be used as vaccine even though possessing superior protection advantages. To overcome the disadvantage and improve the safety and usefulness of *meq*-deleted vaccine strain, in an earlier study, we generated a *meq* and *lorf9* deletion mutant virus as a vaccine candidate. It is important to know if the double-gene deletion vaccine strain still maintains the ability of reactivation and amplification in late cytolytic infectious stage, which may cause more viruses shedding into the environment. To test this hypothesis, Real-time PCR technology was used for quantitative analysis, by detecting MDV-specific *ICP4* and chicken *OVO* genes. Viral content was measured from splenocytes and feather follicle of 63-days old infected chickens. Standard curves were established in the first step, and then total DNA was extracted. *CT* values were obtained both for *ICP4* and *OVO* genes. Viral copy number per lymphocyte was calculated using the standard curve. The results indicate that the double-gene deletion mutant virus showed significantly reduced replication during latent and reactivation stages. This will be the theoretical basis for further analysis of immunological mechanism induced by the double-gene deletion mutant virus.

Marek's disease virus, Real-time PCR, chicken feather follicle cell, double gene deletion

doi: [10.1360/TB-2019-0374](https://doi.org/10.1360/TB-2019-0374)