



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

马立克氏病疫苗毒和野毒 PCR 鉴别检测方法的建立及猫疱疹病毒重组毒的构建

ESTABLISHMENT OF PCR DIFFERENTIAL DETECTION METHOD FOR MAREK'S DISEASE VACCINE VIRUS AND WILD VIRUS AND CONSTRUCTION OF FELINE HERPESVIRUS RECOMBINANT VIRUS

研 究 生: 周冬玉
CANDIDATE: ZHOU DONGYU
学 号: 2019302110197
STUDENT NO.:
专 业: 临床兽医学
MAJOR: CLINICAL VETERINARY MEDICINE
导 师: 韩丽 副教授
SUPERVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR HAN LI

中国 武汉
WUHAN, CHINA
二〇二二年六月
JUNE, 2022

华中农业大学硕士学位论文

马立克氏病疫苗毒和野毒 PCR 鉴别检测方法的建立及猫 疱疹病毒重组毒的构建

Establishment of pcr differential detection method for Marek's
disease vaccine virus and wild virus and Construction of feline
herpesvirus recombinant virus

研 究 生： 周冬玉

学 号： 2019302110197

指导教师： 韩 丽 副教授

指导小组： 胡长敏 教 授

周东海 副教授

邱昌伟 副教授

丁 一 副教授

朱红梅 副研究员

专业： 临床兽医学

研究方向： 小动物疾病

获得学位名称： 农学硕士

获得学位时间： 2022 年 6 月

华中农业大学动物科学技术学院、动物医学院

二〇二二年六月

目录

摘要	i
Abstract	iii
缩略语表 (Abbreviation)	vi
第一章 文献综述	1
1.1 研究问题的由来	1
1.2 马立克氏病的研究进展	2
1.2.1 马立克氏病的流行性与危害	2
1.2.2 马立克氏病的临床特征与病理变化	5
1.2.3 马立克氏病的病原学特征	5
1.2.4 马立克氏病疫苗的研究进展	9
1.2.5 马立克氏病的诊断与治疗	10
1.3 猫传染性鼻支气管炎的研究进展	13
1.3.1 猫疱疹病毒的基因组结构	13
1.3.2 猫疱疹病毒编码的基因及功能	15
1.3.3 猫疱疹病毒的生命周期	16
1.3.4 猫传染性鼻支气管炎的流行性与临床特征	17
1.3.5 猫传染性鼻支气管炎的诊断与治疗	18
1.3.6 猫传染性鼻支气管炎疫苗的研究进展	19
1.4 细菌人工染色体技术及其在疱疹病毒载体疫苗上的应用	21
1.4.1 BAC 载体	21
1.4.2 BAC 载体在疱疹病毒载体疫苗上的应用	22
1.4.3 疱疹病毒作为载体的优势	23
1.5 研究目的及意义	24
第二章 马立克氏病疫苗毒和野毒 PCR 鉴别检测方法的建立	25
2.1 实验材料	25

2.1.1 主要实验材料	25
2.1.2 实验试剂与仪器	25
2.1.3 主要溶液配制	27
2.2 实验方法	28
2.2.1 样品基因组的制备	28
2.2.2 引物的设计及合成	30
2.2.3 引物的验证	30
2.2.4 MDV SYBR green I 荧光定量检测方法	31
2.2.5 MDV PCR 检测方法的建立	38
2.2.6 MDV PCR 特异性实验	39
2.2.7 MDV PCR 敏感性实验	39
2.2.8 MDV PCR 重复性实验	39
2.2.9 MDV PCR 符合率实验	39
2.2.10 对 MD 免疫失败鸡的诊断	39
2.3 结果与分析	40
2.3.1 区分 MD 野毒和疫苗毒的基因序列的筛选	40
2.3.2 引物的筛选验证	41
2.3.3 MDV SYBR green I 荧光定量检测方法	43
2.3.4 MDV PCR 检测方法的建立	46
2.3.5 MDV PCR 特异性实验结果	47
2.3.6 MDV PCR 敏感性实验结果	48
2.3.7 MDV PCR 重复性实验结果	49
2.3.8 MDV PCR 符合率实验结果	50
2.3.9 对 MD 免疫失败鸡的诊断结果	51
2.3 讨论	53
2.3.1 MD 疫苗毒和野毒 PCR 鉴别检测方法建立的必要性	53
2.3.2 MDV SYBR green I 荧光定量 PCR 检测方法不成立的原因分析	54
2.3.3 MD 疫苗毒和野毒 PCR 鉴别检测方法建立的优势与不足	54

2.4 小结.....	56
第三章 猫疱疹病毒重组毒的构建.....	57
3.1 实验材料.....	57
3.1.1 细胞株, 病毒株与质粒.....	57
3.1.2 主要引物.....	57
3.1.3 主要实验仪器与设备.....	58
3.1.4 主要试剂耗材.....	58
3.1.5 相关溶液的配制.....	59
3.2 实验方法.....	59
3.2.1 rFHV-gG ⁻ /EGFP ⁺ 的构建策略.....	59
3.2.2 BAC 转移载体的构建步骤.....	61
3.2.3 sgRNA 质粒的构建.....	64
3.2.4 慢病毒的包装与收获.....	66
3.2.5 细胞培养.....	66
3.2.6 病毒的增殖与滴度测定.....	67
3.2.7 CRFK-Cas9-sgG 细胞转染条件的摸索.....	67
3.2.8 转移载体转染 CRFK-Cas9-sgG 细胞后感染 FHV-I.....	68
3.2.9 rFHV-gG ⁻ /EGFP ⁺ 重组病毒的鉴定.....	69
3.2.10 rFHV-gG ⁻ /EGFP ⁺ 重组病毒的筛选与纯化.....	70
3.2.11 rFHV-gG ⁻ /EGFP ⁺ 的体外生长特性.....	70
3.2.12 rFHV-gG ⁻ /EGFP ⁺ 的遗传稳定性.....	71
3.3 结果与分析.....	71
3.3.1 BAC 转移载体的构建.....	71
3.3.2 表达靶向 gG 基因 sgRNA 的稳转细胞系(CRFK-Cas9-sgG)的构建.....	72
3.3.3 rFHV-gG ⁻ /EGFP ⁺ 的构建.....	74
3.3.4 rFHV-gG ⁻ /EGFP ⁺ 的鉴定纯化.....	75
3.3.5 rFHV-gG ⁻ /EGFP ⁺ 的体外生长特性.....	78
3.3.6 rFHV-gG ⁻ /EGFP ⁺ 的遗传稳定性.....	78

3.4 讨论	79
3.4.1 以猫疱疹病毒为载体构建重组疫苗的意义	79
3.4.2 rFHV-gG ⁻ /EGFP ⁺ 重组毒的构建策略	81
3.4.3 rFHV-gG ⁻ /EGFP ⁺ 重组毒的纯化	81
3.5 结论	83
第四章 全文总结	84
参考文献	85
致谢	99

摘要

马立克氏病 (Marek's disease, MD) 是由马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 引起的肿瘤性疾病, 具有较高的发病率和死亡率, 严重危害了家禽养殖业。接种疫苗是防控马立克氏病的有力手段, 但是马立克氏病病毒毒力不断增强, 现有疫苗无法提供完全的保护力。新研发的疫苗虽然能有效防控超强毒力毒株的感染, 但是目前的检测技术无法对新研发的疫苗毒和野毒进行区分, 市场上亟需新的检测技术为诊断马立克氏病病毒、辅助净化鸡群提供支持。

猫疱疹病毒 (feline herpesvirus, FHV-1) 所致的猫上呼吸道疾病是临床中常见的一种严重的、高度的接触性传染病, 常与其他猫病共同危害猫群的生命安全。目前临床上针对多数猫病均未有免疫效果较好的疫苗, 疱疹病毒作为新型疫苗研发的工具载体有较好的免疫保护效果和市场应用前景, 因此构建猫疱疹病毒重组疫苗对猫用疫苗的研发具有重大意义。

基于此, 本研究建立了区分马立克氏病疫苗毒和野毒的 PCR 鉴别检测技术, 构建了带有细菌人工染色体元件的猫疱疹病毒重组毒。具体研究结果如下:

1. MD 疫苗毒和野毒的 PCR 鉴别检测方法的建立

本研究对 NCBI GenBank 数据库上所发表的 140 余株马立克氏病病毒株序列进行了全基因组分析, 确定了马立克氏病 CVI988 和 814 疫苗毒相较于野毒 (MDV-1) 在 *meq* 基因位置有 177 bp 的碱基插入, 新研发的疫苗株 SC9-1 与野毒株相比缺失了 *meq* 基因, rMDV-MS- Δmeq 相较于野毒缺失了 *meq* 基因的前半部分的 468 bp 的碱基序列。基于此设计引物并对引物反应条件进行优化, 最终建立了区分马立克氏病 CVI988、814、SC9-1、rMDV-MS- Δmeq 疫苗毒和野毒的 PCR 检测方法。以 MDV-1、814 疫苗毒、鸡传染性贫血病毒 (CIAV)、鸡传染性支气管炎病毒 (IBV)、鸡传染性法氏囊病毒 (IBDV)、禽白血病病毒 (ALV)、鸡包涵体肝炎 (IBH)、禽流感病毒 (IAV)、新城疫病毒 (NDV)、鸡胚成纤维细胞 (CEF) 基因组为模板进行特异性实验, 结果显示仅有 MDV-1、814 疫苗毒有特异性扩增; 以 MDV-1 和 814 疫苗毒为模板并设置阴性对照进行敏感性检测, 结果显示本方法灵敏度均为 0.01 ng/ μ L; 以 MDV-1 和 814 疫苗毒为模板并设置阴性对照进行重复性检测, 结果显示 3 次重复扩增结果稳定; 使用本方法对临床样本进行符合率

检测，结果显示本方法阳性样品符合率 100%，阴性样品符合率 100%。以上结果表明，本研究建立的区分马立克氏病野毒和疫苗毒的 PCR 检测方法特异性强，灵敏性良好，扩增结果稳定，临床样品检测符合率高。

湖南某地种鸡场某 3 周龄鸡在 1 日龄免疫后仍表现出疑似马立克氏病的神经症状，但不确定是由野毒还是疫苗毒引起。应用本方法对病死鸡进行诊断，将扩增出的野毒和疫苗毒目的片段分别送测序以验证本方法的准确性。测序结果显示扩增出的目的片段分别与 MDV-I 和疫苗毒株相一致，表明该方法可用于诊断 MDV-I 并与 CVI988、814 疫苗株以及 SC9-1、rMDV-MS- Δmeq 新研发的疫苗株相区分。

2. 猫疱疹病毒重组毒（rFHV-gG/EGFP⁺）的构建

本研究旨在利用 CRISPR-Cas9 技术精准切割病毒 gG 基因并利用同源重组将 gG 替换成 BAC 相关元件获得重组的猫疱疹病毒。首先，利用慢病毒包装系统构建了表达靶向 gG 基因 sgRNA 的 CRFK-Cas9 细胞系（CRFK-Cas9-sgG），将含有 gG 基因两端同源臂的 BAC 转移载体转染该细胞后，同时以 MOI=0.1 的感染剂量感染 FHV-I，收取细胞盲传后，挑选在 Eco-gpt 压力筛选下带有绿色荧光的重组病毒。结果表明，CRISPR-Cas9 技术的协同作用下于第二次盲传时便获得了重组毒。

为了确定该重组毒的正确性，通过 PCR 鉴定以及将该重组毒基因组转染至真核细胞进行验证，并进一步分析该重组毒的体外生长特性以及遗传稳定性。结果表明，PCR 能扩增出与预期相符的目的条带且测序结果与参考序列一致，转染真核细胞能拯救出具有感染性的病毒粒子，表明该病毒正确克隆至 BAC 载体；该重组毒的体外生长特性与野毒没有明显差异，体外增殖也具有遗传稳定性，表明 BAC 元件插入猫疱疹病毒基因组 US3 以及 US6 之间不影响其体外培养及增殖的基本特性。

综上所述，本研究建立了区分马立克氏病 CVI988、814 以及 SC9-1、rMDV-MS- Δmeq 疫苗毒和野毒的 PCR 检测方法，并将其进行初步应用，可作为新型检测技术进一步开发利用，为马立克氏病的诊断以及鸡群净化提供技术支持。同时构建了带有细菌人工染色体（BAC）元件的猫疱疹病毒重组荧光毒，为猫用疫苗研发建立反向遗传操作平台奠定基础。

关键词:马立克氏病病毒 I 型；疫苗毒；聚合酶链式反应；猫疱疹病毒；细菌人工染色体

Abstract

Marek's disease (MD) is a tumor disease caused by Marek's disease virus (Marek's disease virus, MDV), which has a high incidence rate and mortality rate, which seriously endangers the poultry breeding industry. Vaccination is a powerful means to prevent and control Marek's disease, but the virulence of Marek's disease virus is increasing, and the existing vaccines can't provide complete protection. Although the newly developed vaccine can effectively prevent and control the infection of super virulent strains, the current detection technology can't distinguish the newly developed vaccine virus from wild virus. There is an urgent need for new detection technology in the market to provide support for the diagnosis of Marek's disease virus and auxiliary purification of chickens.

Feline herpesvirus (FHV-I) caused by feline upper respiratory tract disease is a serious and highly contagious disease in clinic. It often endangers the life safety of felines together with other feline diseases. At present, there is no vaccine with good immune effect for most feline diseases in clinic. As a tool carrier for the research and development of new vaccines, herpesvirus has good immune protection effect and market application prospect. Therefore, the construction of cat herpesvirus recombinant vaccine is of great significance to the research and development of cat vaccines.

Based on this, this study established a PCR differential detection technology to distinguish Marek's disease vaccine virus from MDV-I, and constructed a recombinant feline herpesvirus virus with bacterial artificial chromosome. The specific research results are as follows:

1. Establishment of PCR identification and detection method for MD vaccine virus and MDV-I

In this study, genome-wide analysis was conducted on the sequences of more than 140 Marek's disease virus strains published in NCBI GenBank database. It was determined that Marek's disease CVI988 and 814 vaccine viruses had 177 bp base insertion at the position of *meq* gene compared with MDV-I. The newly developed vaccine strain SC9-I lost *meq* gene

compared with MDV-I, and rMDV-MS- Δmeq lost 468 bp base sequence of the first half of *meq* gene compared with MDV-I. Based on this, the primers were designed and the reaction conditions were optimized. Finally, the PCR detection method for distinguishing Marek's disease CVI988, 814, SC9-1, rMDV-MS- Δmeq vaccine virus and MDV-I was established. Using the genomes of MDV-I and 814 vaccine viruses, CIAV, IBV, IBDV, ALV, IBH, IAV, NDV and CEF as templates, the results showed that only MDV-I and 814 vaccine viruses had specific amplification; MDV-I and 814 vaccine viruses were used as templates and negative controls were set for sensitivity detection, the results showed that the sensitivity of this method was 0.01 ng/ μ L; MDV-I and 814 vaccine viruses were used as templates and negative controls were set for repeated detection, the results showed that the results of three repeated amplification were stable; The coincidence rate of clinical samples was tested by this method, the results showed that the coincidence rate of positive samples and negative samples was 100%. The above results show that the PCR detection method established in this study to distinguish MDV-I and vaccine virus has strong specificity, good sensitivity, stable amplification results and high coincidence rate of clinical samples.

A 3-week-old chicken in a breeding farm in Hunan Province still showed neurological symptoms suspected of Marek's disease after being immunized at the age of 1 day, but it was uncertain whether it was caused by MDV-I or vaccine virus. This method was used to diagnose dead chickens, and the amplified target fragments of MDV-I and vaccine virus were sent to sequencing to verify the accuracy of this method. Sequencing results showed that the amplified target fragments were consistent with MDV-I and vaccine strains respectively, indicating that this method can be used to diagnose MDV-I and distinguish it from CVI988 and 814 vaccine strains and SC9-1 and rMDV-MS- Δmeq newly developed vaccine strains.

2. Construction of recombinant virus rFHV-gG⁻/EGFP⁺

The purpose of this study is to accurately cut the virus gG gene by CRISPR-Cas9 technology and replace the gG with BAC related elements by homologous recombination to obtain the recombinant cat herpesvirus. Firstly, CRFK-Cas9 cell line (CRFK-Cas9-sgG) expressing sgRNA targeting gG gene was constructed by lentivirus packaging system. After

BAC transfer vector containing homologous arms at both ends of gG gene was transfected into the cell, FHV-I was infected with MOI = 0.1 at the same time. After cell blind transmission, the recombinant virus with green fluorescence was selected under Eco-gpt pressure. The results showed that the recombinant virus was obtained in the second blind transmission under the synergy of CRISPR-Cas9 technology.

In order to determine the correctness of the recombinant virus, the recombinant virus genome was identified by PCR and transfected into eukaryotic cells, and the growth characteristics and genetic stability of the recombinant virus in vitro were further analyzed. The results showed that the target bands were amplified by PCR, and the sequencing results were consistent with the reference sequence. Transfected eukaryotic cells could save infectious virus particles, indicating that the recombinant virus was correct; The growth characteristics of the recombinant virus in vitro are not significantly different from those of wild virus, and the proliferation in vitro also has genetic stability, indicating that the insertion of BAC element between feline herpesvirus genome US3 and US6 does not affect the basic characteristics of its culture and proliferation in vitro.

In conclusion, this study established a PCR detection method to distinguish Marek's disease CVI988, 814, SC9-1, rMDV-MS- Δmeq vaccine virus and wild virus, and preliminarily applied it, which can be further developed and utilized as a new detection technology to provide technical support for the diagnosis of Marek's disease and chicken purification. At the same time, the recombinant virus of feline herpesvirus with bacterial artificial chromosome (BAC) was constructed, which laid the foundation for the research and development of feline vaccine and the establishment of reverse genetic operation platform.

Keywords: Marek's disease virus type I; vaccine virus; polymerase chain reaction(PCR); feline herpesvirus; bacterial artificial chromosome

缩略语表（Abbreviation）

缩略词	英文全称	中文全称及注释
BAC	Bacterial artificial chromosome	细菌人工染色体
bp	Base pair	碱基对
Cas9	CRISPR associated protein 9	CRISPR 相关蛋白 9
CEF	Chicken embryo fibroblast	鸡胚成纤维细胞
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
CRFK	Crandell feline kidney	猫肾细胞
CRISPR	Clustered regular interspersed short palindromic repeats	规律间隔成簇短回文重复序列
d	Day	天
ddH ₂ O	Deionized water	去离子水
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	细胞培养基
EGFP	Enhancer green fluorescence protein	增强绿色荧光蛋白
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FHV-I	Felid herpesvirus-1	猫疱疹病毒I型
g	Gram	克
gG	Glycoprotein G	糖蛋白 G
gpt	Xanthine-guanine phosphoribosyl transferase	黄嘌呤、鸟嘌呤磷酸核糖转移 酶
h	Hour	小时
HR	Homologous recombination	同源重组
IRS	Inter repeat sequence	内部重复序列
kb	Kilobase pair	千碱基对
L	Literate	升
MDV	Marek's disease virus	马立克氏病病毒
MDV-I	Marek's disease virus type I	马立克氏病病毒 I 型

mg	Milligram	毫克
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
ng	Nanogram	纳克
OD	Optical density	光密度
ORF	Open-reading frame	开放阅读框
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
r/min	Round per minute	转/分
SDS	Sodium dodecyl sulfate sodium salt	十二烷基硫酸钠
sgRNA	Single guide RNA	向导 RNA
TCID ₅₀	Tissue culture infective dose	半数感染量
TK	Thymidine kinase	胸苷激酶
TRS	Terminal repeat short	末端重复短序列
μg	Microgram	微克
μL	Microliter	微升
UL	Unique long region	长独特区
US	Unique short region	短独特区

第一章 文献综述

1.1 研究问题的由来

马立克氏病(Marek's disease, MD)是一种由马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)感染引起的家禽的恶性肿瘤性疾病,呈世界性分布,且具有较高的发病率和高达100%的死亡率(Nair 2005)。MD 引起的 T 细胞淋巴瘤、神经系统疾病以及免疫缺陷等不可逆性症状严重危害养禽业,每年给全球造成数十亿美元的经济损失。近年来,随着 MDV 毒力不断增强,频频出现 MD 免疫失败的报道。免疫后的鸡只也可能会再次感染 MDV,造成野毒和疫苗毒的混合感染,而野毒和疫苗毒的混合感染在存活的鸡体内可能会发生重组导致新型毒株的出现。新型疫苗的研发虽然可以有效防控超毒力毒株的感染,但是目前尚无检测技术用于区分新研发的疫苗毒以及野毒,亟需建立严格区分 MD 野毒和疫苗毒的新型检测方法。因此,本研究建立的 MD 疫苗毒和野毒的 PCR 鉴别检测方法为净化鸡群提供了支持,并有望用于下一步技术开发。

随着人们生活质量的整体提高,我国的宠物行业迅速发展起来,宠物猫宠物狗的数量显著增加,相应的医疗现状也引起大家的广泛关注。猫疱疹病毒(felid herpesvirus, FHV-1)所引起的猫上呼吸道疾病是临床上常见的急性传染病之一,严重危害宠物以及猫科动物的健康,不容忽视。目前该病的防控手段是接种疫苗,但是市场上的猫用疫苗多为进口产品所引导,成本较高,且在疫情影响下,猫用疫苗更是达到了“一苗难求”的地步,甚至出现了疫苗造假的现象,国内也未有获批的商品化疫苗,新型、高效疫苗的研发刻不容缓。利用细菌人工染色体技术(BAC),进行以疱疹病毒为载体的疫苗研发能够有效用于疾病防控。因此,本研究以猫疱疹病毒为载体构建了带有细菌人工染色体(BAC)的重组毒,为猫用疫苗研发建立方向操作技术平台奠定了基础。

1.2 马立克氏病的研究进展

1.2.1 马立克氏病的流行性与危害

1.2.1.1 马立克氏病的流行特征

MD 的主要感染宿主为鸡，但是也可以感染火鸡、山鸡和鹌鹑等。在 20 世纪初被报道之后逐年来在世界范围内广泛性分布。至 2016 年，世界上有一半的国家报告了 MDV 感染病例，而我国是 MD 的流行地区，如图 1-1 所示。MDV 主要通过直接或间接接触传播，由于 MDV 在鸡胚孵化时的温度以及湿度条件下难以存活故而不能通过垂直传播。患病鸡以及病毒携带者是本病的主要传染源，MDV 潜伏感染的特性导致感染鸡终身带毒，潜伏感染的病毒在外界刺激下极易被重新激活从而导致感染鸡多次感染。感染鸡的羽毛囊上皮脱落后含有的成熟病毒粒子在环境中长期存在，可与粉尘等混合随空气流动扩大传播范围，一些昆虫乃至患病鸡屋舍的尘土都有可能成为该病的传播媒介(李航 2021)，从而导致多处鸡群感染并造成死亡，给该病的防控造成困难。MDV 具有较强的传播能力以及更高的感染率和致死率，能感染各个年龄层的宿主，其中雏鸡和母鸡易感性更高(Zhao et al 2008)。

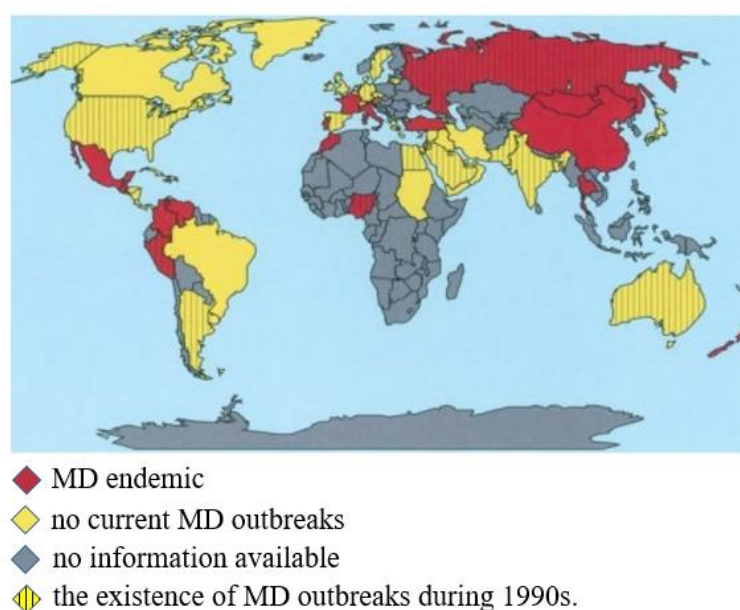


图 1-1 MDV 的流行分布(Silva and Gimeno 2007)

Fig.1-1 Prevalence and distribution of MDV

1.2.1.2 马立克氏病的毒力进化

自 20 世纪初首次报道 MD 至今, MDV 毒力随着疫苗的使用不断增强, 如图 1-2 所示。20 世纪 60 年代, 在小规模的家禽养殖业中, MD 引起的临床症状较为单一, 多为神经症状, 死亡率也较低。随着工业化时代的到来, 家禽养殖业向高度密集型产业转变, 大幅提高了生产能力, 但是也导致了商业鸡的遗传多样性降低。集约化的养殖模式导致易感宿主持续的存在, 极大程度上促进了病毒的传播及变异, 导致多地养鸡场爆发了大规模的 MD 疫情。MDV-I 细胞培养传代减毒病毒株 HPRS-16 和 HVT-FC126 致弱毒株疫苗的应用有效控制了 MD, 使 MD 造成的损失大幅减少, 但是也导致了 MDV 由 mMDV 向 vvMDV 的转变。首批疫苗的应用并未抑制 MDV, 相反在 70 年代末, vvMDV 的出现使养禽业再次受到重创。对此, 防控策略也进行了相应的修改, HVT-FC126 和 SB-1 组成的二价疫苗的出现能有效预防 vvMDV 毒株。好景不长, 90 年代初, vv+MDV 的出现造成了 MD 的再一次爆发, 鸡群的发病率及死亡率进一步增加。基于经验, 再次引入了 CVI988 减毒疫苗株以及由 CVI988、SB-1 和 HVT-FC126 组成的三价疫苗对 MD 进行防控。随后我国研发的 814 疫苗株也具有和 CVI988 保护力相当的免疫效果, 在我国被广泛应用。尽管接种疫苗能够极大程度上控制 MD, 但是并不能防止病毒的传播和感染, MDV 仍在不断发展。近年来, MD 免疫失败的报道屡见不鲜, 我国南方田间出现的 vv+MDV 毒株可以突破现有疫苗的保护力并且发展迅速(Shi et al 2020b), 有向我国北方流行的趋势, 给养禽业带来了新的威胁, 且多种数据表明 MDV 的毒力进化还在继续, 而目前尚未有更好的疫苗可以遏制这一趋势。疫苗免疫水平以及毒力进化程度之间的失衡可能是 MDV 毒力不断演化的重要原因, 现有毒株在免疫过的鸡只体内仍然能够存活导致病毒在鸡体内适应性时间增长进而诱发新型毒株可能也是 MDV 毒力不断增强的原因(Nair 2005)。

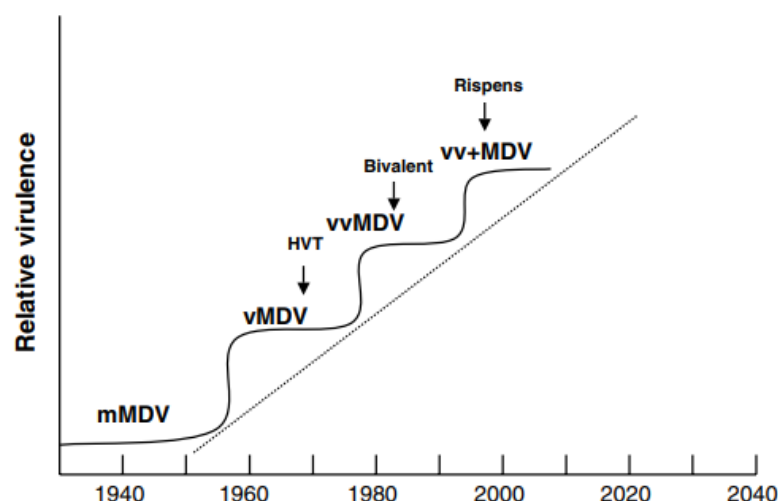


图 1-2 MDV-I 毒力演化过程(Nair 2005)

Fig.1-2 MDV-I virulence evolution process

1.2.1.3 马立克氏病的危害

MD 是威胁养禽业的重要传染病之一，一旦未及时察觉鸡群中的感染者，便会造成整个鸡群的污染，甚至影响附近鸡群，对养鸡场以及养殖业造成巨大冲击。MD 的危害主要体现在以下两个方面：（1）MDV 毒力的不断增强导致其宿主范围不断扩大，致病性更强，影响更多动物的健康发展；（2）MD 自身作为一种免疫抑制性疾病会诱导宿主产生免疫抑制，从而引发多种疾病共同感染，严重危害养禽业(崔红玉 2007)。

MDV 毒力的不断增强导致其致病性愈加严重，从最初的地方性轻度麻痹综合征演变为如今的高度传染性、全球流行的致命性疾病，同时也导致其感染宿主也在不断扩大，从最初被报道的家禽扩大到包括我国在内的火鸡、珍珠鸡等(Nair 2005)。随着 MDV 毒力的持续性增强，宿主范围可能扩大到其他鸟类鸡甚至是鸟类。

MD 给养禽业带来的经济负担主要是来自母鸡以及肉鸡死亡率和发病率的直接损失（产蛋率、产肉量大幅下降，料蛋比、料肉比大幅增加），以及广泛使用疫苗和控制措施造成的间接损失(Rozins et al 2019)。但是疫苗的使用并无法限制其感染以及传播，感染 MD 后引起机体的免疫抑制可能会导致宿主对其他疾病的疫苗的免疫应答下降，造成更严重的损失(崔红玉 2007)。

MDV 作为一种能够诱发肿瘤的免疫抑制性疾病，在感染早期和晚期均可引起免疫抑制，导致淋巴细胞丢失、病毒诱导的免疫调节变化和肿瘤细胞诱导的免疫抑制(Morrow

and Fehler 2004)。早期阶段的关键特征包括淋巴细胞破坏，导致胸腺或法氏囊萎缩，以及抑制 T 细胞有丝分裂原刺激的巨噬细胞活化(Haq et al 2013)。淋巴细胞上各种表面分子(如 MHC-I 类)的下调也有助于 MDV 的免疫逃避策略。晚期免疫抑制可能是由 MDV 从潜伏期重新激活引起的，引起与早期相似的影响(Reddy 2006)。Kennedy 等(Kennedy et al 2018)表明 MDV 大约每月一次被重新引入养鸡场，MDV 的感染引起机体免疫抑制导致宿主的免疫应答反应无法抵御其他病原的攻击进而诱发多种疾病共同感染，严重危害养禽业的健康。

1.2.2 马立克氏病的临床特征与病理变化

宿主感染后的典型特征为 T 细胞淋巴瘤以及神经麻痹，根据其临床症状以及病理变化具体可分为以下类型：主要侵害坐骨神经以及臂神经的神经型症状，典型特征表现为双腿劈叉及单侧翅膀下垂，卧地不起，往往因为无法进食导致死亡，从剖检结果来看，患病鸡受损的神经异常肿胀、颜色呈灰白色、神经纹理消失；不易被察觉的内脏肿瘤型症状，其中腹腔神经丛最易受到侵害，患病鸡精神萎靡、食欲不振，通过触诊发病鸡腹部可察觉到硬块，剖检后则能清楚观察到发病鸡内脏器官（包括性腺、肝脏、肾脏等）呈灰白样的肿瘤性病变，数量不一，大小各异，质地坚硬，切面呈脂肪样(许达 2020)；影响视力导致“灰眼病”的眼部疾病，更有甚者导致完全失明，但是该种类型的临床病症较少；毛囊肿大形成皮肤结节以及瘤状物的皮肤型症状(Witter et al 2005)，往往在鸡只褪毛后才能观察到。20 世纪 70 年代随着疫苗的使用，MD 得到了较好的控制，但是随着 MDV 的不断进化，更强毒株的爆发导致目前疫苗的保护效力有限(Tusche et al 2012)。

1.2.3 马立克氏病的病原学特征

1.2.3.1 马立克氏病病毒的基因组结构

MDV，隶属于疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科马立克病毒属(Boodhoo et al 2016)，是一种致癌性疱疹病毒。1975 年，Von Bulow 和 Biggs(Bülow and Biggs 1975)等人根据间接免疫荧光、琼脂糖凝胶沉淀实验以及中和实验结果将 MDV 分为三种血清型，包括以 GA 等毒株为代表的致病株 MDV-I 型，以 HPRS-24 株为代表的非致癌性毒株 MDV-II 型，还

有以 FC-126 株为代表的火鸡疱疹病毒 MDV-III。其中只有 MDV-I 在受感染的鸡中引发肿瘤，故而通常描述的 MDV 一般为 MDV-I 致病株。MDV-I 根据其毒力强弱又可进一步划分为致弱型毒株（主要包括减毒株 CVI988）、温和型毒株（mMDV，包括 Cu-2 毒株）、强毒型毒株（vMDV，主要包括 GA 毒株）、超强毒型毒株（vvMDV，主要包括 Md5 毒株）以及特超强型毒株（vv+MDV，主要包括 548A）(Witter et al 2005)。

MDV 基因组为线性双链 DNA，通常以环状和线性两种形式存在于宿主细胞中，大小约为 175-180 kb，约编码 100 个蛋白，由一个长独特区（unique long region, UL）和一个短独特区（unique short region, US）组成 (Lee et al 2000a)，每个区域的两侧都有倒置的重复序列，分别命名为长末端重复序列（terminal repeat long region, TRL），长内部重复序列（internal repeat long region, IRL），短末端重复序列（terminal repeat short region, TRS）和短内部重复序列（internal repeat short region, IRS）(Cebrian et al 1982)，其中病毒的特异性基因主要分布在倒置重复区域，如图 1-3 所示。

MDV 具有与其他疱疹病毒类似的病毒粒子的形态特征，不同的是，该病毒是一种严格的细胞结合型病毒并且引起较为缓慢的细胞病变，以有囊膜的完整性病毒粒子和无囊膜的不完整性病毒粒子的形式存在，机体中只有在羽毛囊上皮细胞形成的有囊膜的病毒粒子才具有感染性 (Calnek et al 1970)。脱落的羽毛囊皮屑中的完整病毒粒子在室温下能够保存半年甚至更久，引起鸡群感染，具有极大的传播风险 (Beasley et al 1970)。体外培养时细胞结合状态下能够良好保存于液氮且具有感染性，而游离型病毒粒子较容易丧失感染性，极易被消毒剂等灭活 (Calnek 2001)。

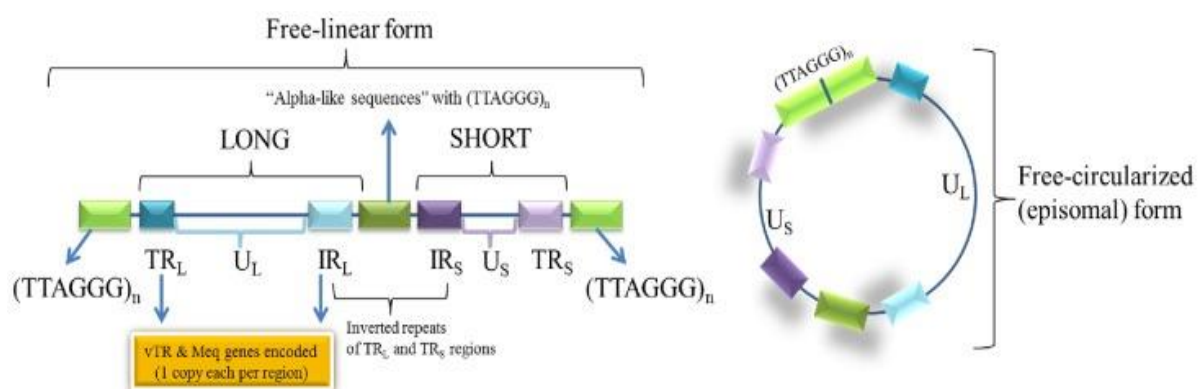


图 1-3 马立克氏病病毒的基因组结构示意图 (McPherson and Delany 2016)

Fig.1-3 Schematic diagram of genome structure of Marek's disease virus

1.2.3.2 马立克氏病病毒编码的基因及功能

MDV 基因组包含 200 多个基因, 目前已知共编码 100 多种蛋白质。所有血清型中各区域的基因组结构和基因含量相似, 但是存在关键性差异。具有致病性的 MDV-I 毒株的重复区域特异性存在与致瘤相关的基因, 主要包括 Marek's EcoRI Q (*meq*) 致癌基因, 磷蛋白 38 (*pp38*), 病毒白介素 8 (*vIL-8*) 以及病毒端粒酶 (*vTR*) (李晓青 2015), 这些基因极大程度上促成了 MDV-I 的生物学特征。

meq 基因是 MDV-I 所特有的基因, 不同毒力的毒株 *meq* 基因较为保守(Osterrieder et al 2006), 由于是在 MDV-I EcoRI Q 片段中鉴定到的而得名。该基因在 MDV-I 型基因组中有两个拷贝, 分别位于长独特区的两个重复序列。*meq* 基因 N 端编码长度为 339 个氨基酸的碱性亮氨酸拉链 (basic leucine zipper, bZIP) 蛋白, 该蛋白与转录因子的 jun/fos 家族具有显著同源性(Kung et al 2001)。其 C 端富含脯氨酸, 当与酵母转录因子的 DNA 结合域融合时, 表现出反式激活功能(Stolz and McCormick 2020)。*meq* 基因能与自身以及 jun/fos 家族形成二聚体, 从而影响细胞抗凋亡因子和病毒转化相关基因的表达, 并与细胞周期控制因子和 MERE 启动子位点结合以上调其自身表达, 进而导致机体组织性病变(McPherson and Delany 2016)。*meq* 基因的敲除能够消除 MDV-I 的致瘤作用(Osterrieder et al 2006), 但是其体外复制水平与亲本毒株相比并没有削弱, 表明 *meq* 基因与 MDV-I 的致病性有密不可分的关系, 但是并不是 MDV-I 感染和复制的必需基因(Lupiani et al 2004)。动物实验中 *meq* 基因无效表达的病毒感染鸡不会发展为淋巴瘤则表明 *meq* 基因对淋巴细胞的转化至关重要(Lupiani et al 2004)。

pp38 磷蛋白因其表达产物大小为 38 kDa 而得名, 整个 ORF 含有 290 个氨基酸, 跨越 MDV-I 基因组的 UL 和 IRL 的连接点。*pp38* 和 *pp24* 共用 65 个 N 端氨基酸, 被广泛认为是感染溶解转换的生物标志物。机体内以 *pp24* 和 *pp38* 两个磷蛋白形成的复合物形式调控 *pp38-pp24/1.8kb* mRNA 双向启动子的上调表达, *pp38-pp24/1.8kb* mRNA 双向启动子的高活性与病毒在细胞间扩散和潜伏感染有关(Chen et al 2009)。通过给易感 MDV-I 的鸟类接种 *pp38* 缺失突变体病毒的动物实验表明 *pp38* 参与了淋巴细胞的早期溶细胞感染, 但对于羽毛滤泡上皮细胞的裂解感染和肿瘤的诱导则不是必需的(Reddy et al 2002a)。

与宿主趋化因子 IL-8 同源的 *vIL-8* 是 MDV-I 的另一种间接致瘤基因，是最早在疱疹病毒中发现的 CXC 趋化因子之一。据其理化特性推测 *vIL-8* 参与募集靶细胞进行感染或充当诱饵以减少细胞 IL-8 介导的免疫反应。研究表明，该基因敲除后，MDV-I 的致病性及裂解期复制水平显著下降，其同源性可能促进 MDV-I 的感染和肿瘤的生长 (Strieter et al 1995)。

鸡端粒酶 RNA 亚基的病毒同源物，称为 *vTR*。*vTR* 位于 MDV-I 基因组长独特区两侧的重叠区域内，是核蛋白的组成成分，既是裂解基因又是潜伏基因。研究表明，用 *vTR* 缺失病毒感染的鸡体内的淋巴瘤体积较小，传播范围较小。因此，*vTR* 在肿瘤发生过程中表现出辅助功能，诱导肿瘤的发展、维持和传播，提高了由 MDV-I 引起淋巴瘤的发病率，增加了其临床症状的严重程度 (Chhab et al 2010)。

1.2.3.3 马立克氏病病毒的感染阶段

MDV-I 体外感染时的生命周期与多数疱疹病毒的复制模式类似，最终病毒以细胞结合的形式通过细胞间桥进行扩散从而产生细胞病变 (Churchill and Biggs 1967)。在宿主体内，易感鸡通过直接或间接吸入受污染的皮屑或尘土中的病毒粒子至呼吸道感染 MDV-I。MDV-I 感染一般历经四个阶段，前两个阶段的界限相对清晰，某些细胞类型中的潜伏感染是转化的先决条件，但随着淋巴瘤在后期的发展，转化感染和潜伏感染可能与不同细胞群中的溶细胞感染混合存在，而永久性免疫抑制与细胞溶解性感染同时发生。第一阶段是持续大约 3-6 天的溶细胞性感染，该阶段病毒进行裂解性复制增殖且达到复制的顶峰，其初级靶细胞为 B 淋巴细胞，在受感染的细胞表面 MHC-I 类分子会大量持续下调导致机体内被病毒感染的细胞忽视 CD8⁺ 细胞主导的细胞毒性免疫反应 (Calnek 2001)，产生免疫逃避，从而导致 MDV-I 在机体造成多器官感染。B 细胞以及后来被激活的 CD4⁺ 细胞不仅可以作为转化的靶点和潜在 MDV-I 基因组的储存库，还是病毒在感染宿主体内传播的手段，并允许转移到皮肤上；第二阶段为持久性的潜伏感染期，在这一阶段病毒复制水平降低而机体细胞免疫的靶细胞转变为活化的 T 淋巴细胞；第三阶段为第二次溶细胞性感染，感染鸡在 2-3 周内淋巴器官再次受到侵害并可以在内脏器官的上皮组织上观察到局部病变灶、炎症反应甚至死亡，由于不同毒株毒力差异，因此该阶段的感染并不是所有 MDV-I 感染都会产生的；第四阶段为肿瘤细胞的增殖转化期，感

染后 28 天左右, 病毒基因组整合到宿主基因组上, 主要靶向的 T 淋巴细胞转化并增殖最终可能会形成淋巴瘤(Jarosinski et al 2006), 如图 1-4 所示。无论转化事件最终如何, 迁移的淋巴细胞都会将 MDV-I 转运到皮肤中的羽毛滤泡上皮细胞中形成具有感染性的完整的病毒粒子, 这可能是由于 MDV-I pUL47 外皮蛋白在宿主不同组织的差异表达和定位使病毒无法包装成完整的病毒粒子导致的。

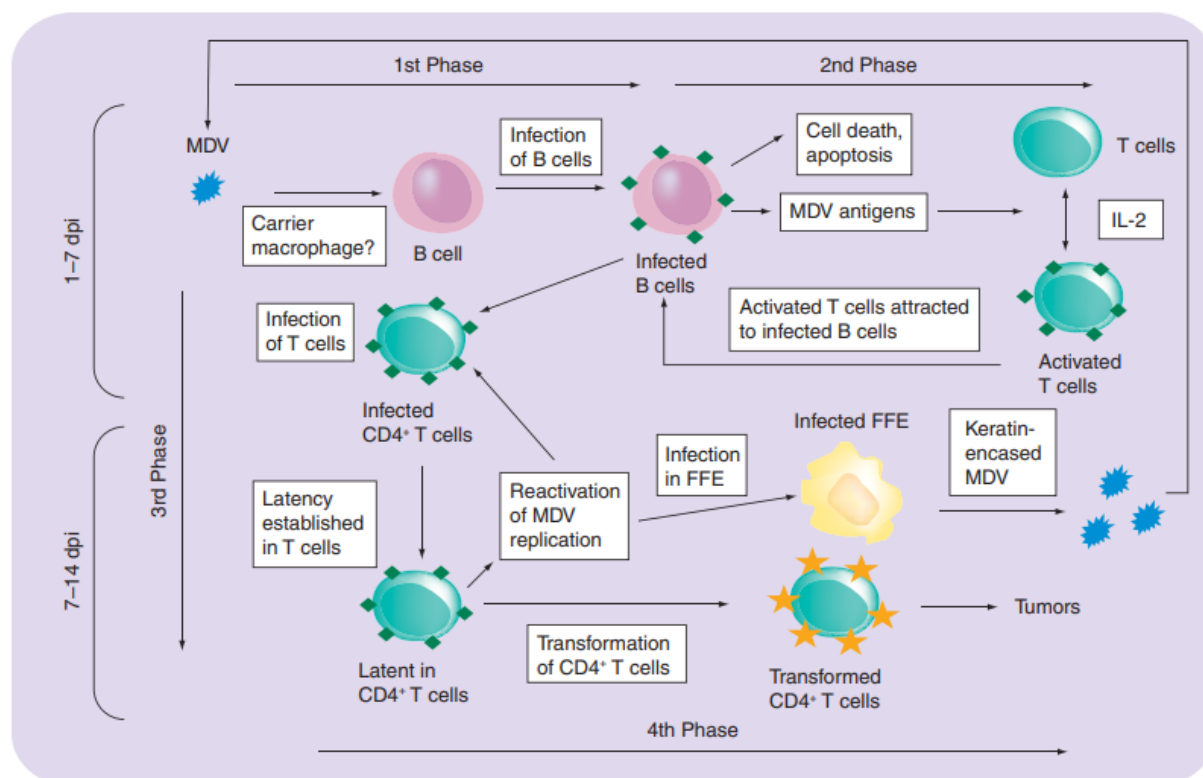


图 1-4 马立克氏病病毒的感染阶段(Jarosinski et al 2006)

Fig.1-4 Infection phases of Marek's disease virus

1.2.4 马立克氏病疫苗的研究进展

随着 MD 的几次大爆发以及 MDV 毒力的不断演化, MD 疫苗防控策略也在不断调整。目前临床应用效果最好的是 CVI988 和 814 疫苗毒株, 被广泛应用的还有基于这两种疫苗的二联苗或三联苗。病毒的持续进化和更强毒力的 MDV-I 致病毒株的出现对养禽业造成的威胁和损失是可以预见的, 因此, 新型疫苗的研发迫在眉睫(Shi et al 2020a)。

载体克隆系统在分子生物学中的应用是非常广泛的, 多应用于小片段基因的克隆, 对于真核生物基因克隆是无能为力的, 类似于 MDV 这种长达 170kb 的基因组更是束手无策, 对其基因功能研究也较为匮乏。自 1997 年 Messerle(Messerle et al 1997)将小鼠巨

细胞病毒（MCMV）全基因组克隆为细菌人工染色体（BAC）并且能够在真核细胞中重建病毒后代、在大肠杆菌中能高效产生病毒突变体后，一种新型的针对于疱疹病毒基因组的新方法被开发出来。2002 年，Reddy 等(Reddy et al 2002b, Lupiani et al 2004)利用粘粒系统在 vvMDV 上构建的 rMd5 Δ pp38 突变株病毒滴度明显降低，具有相当于 CVI988 疫苗的保护效果；2008 年，Lee 等(Lee et al 2008)构建了一个 *meq* 基因缺失株 rMd5 Δ *meq*，它在无特定病原体（SPF）鸡中完全丧失了致病性，可以提供优于 CVI988 疫苗的保护作用；2011 年，Li 等(Li et al 2011)构建的 GX0101 Δ *meq* 突变株也具有良好的免疫保护效果；2015 年，Su 等(Su et al 2015)利用 BAC 技术构建的重组病毒 SC9-1 在 SPF 鸡中稳定复制，完全丧失了致病性和致瘤性，能够抵抗 vvMDV(rMd5)的攻击，具有优于 CVI988 的免疫保护效力，被选为 MDV 候选疫苗。目前优于 CVI988 保护效力的疫苗尚且需要进一步的田间实验以验证其保护效力。

MDV 基因工程疫苗除却以减弱 MDV 致病性的基因缺失疫苗以外还有以 MDV 为载体的基因重组疫苗。据报道已有多家实验室以 MDV 为病毒载体表达鸡传染性法氏囊病毒（IBDV）的 VP2 蛋白，能够同时预防 IBD 和 MD(刘红梅等 2006)。Lee 等(Lee et al 2000b)以 FPV 为病毒载体分别表达 MDV 的保护性抗原 gB、gI、gE 和 UL32 所构建的重组疫苗联合免疫效果良好。朱潇静等(朱潇静等 2021)利用 BAC 技术以 MDV 为载体构建了表达 NDV F 蛋白的 MDV-BAC 重组病毒，虽然其临床效果尚未得到验证，但是利用 BAC 技术构建重组疫苗的方法可行性高且能达到“一针多治”的目的。

1.2.5 马立克氏病的诊断与治疗

MD 可以通过典型的临床特征进行初步诊断，例如劈叉，游泳状姿势，“灰眼病”和皮肤结节等，通过剖检观察到内脏器官淋巴细胞肿瘤性病变以及肿大的神经均可确诊。MD 引起的临床病症往往以混合形式存在，单纯的依靠某种类型的临床病症极易造成误诊，需要进一步进行确诊。例如淋巴白血病也会引起淋巴瘤，可通过 HE 染色后观察肿瘤细胞形态对两种病进行鉴别诊断(许晓云 2009)。目前对于 MD 的实验室诊断方法主要包括病毒分离和鉴定，病原的抗原及抗体检测(Lee et al 1983)，聚合酶链式反应。

1.2.5.1 病毒的分离

病毒的分离往往被视为 α 疱疹病毒诊断的黄金标准。鉴于 MDV 在体内和体外均以高度细胞相关的方式复制且无囊膜包裹的病毒粒子在环境中极易失活，因此在进行发病鸡的组织细胞取样时应注意采取的组织部位以及样品的保存方式，一般采取发病鸡羽毛囊样品通过淋巴细胞培养分离技术对病毒进行分离，采取其他病变组织样品则需注意低温保存及运输。将待测样品接种于新鲜制备的鸡胚成纤维细胞上，置于细胞培养箱中观察，接毒后细胞明显的病变斑出现时间一般为 7-15 天且需要盲传几代。病毒的分离培养也可以通过病变斑的形态大小对不同血清型的 MDV 进行区分，例如 MDV-I 接种于细胞后形成的病变斑折光性较强，呈现出圆形细胞聚集状、大小为 1 mm 左右的噬斑，而 HVT 接种后形成的噬斑较为分散。该方法是较为准确可靠的，但是耗时、耗力、成本较高，且样品保存和运输过程较为繁杂，故一般不用于临床上的常规检测。

1.2.5.2 病毒的抗原及抗体检测

目前市场上已经有针对于 MDV 共同以及分型的特异性抗体，可以通过病毒中和实验(SN)，酶联免疫吸附实验(ELISA)，免疫荧光实验(IFA)，琼脂免疫扩散实验(AGP)(李航 2021)等对采取的羽毛囊上皮细胞以及其他组织样品进行抗原的检测，但是该方法特异性不强，可能会出现假阳性结果(Zelnik et al 2004)。

1.2.5.3 聚合酶链式反应

相较于病毒分离和血清学检测的长周期，高费用等缺点，聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测技术的便捷、灵敏、快速的特点使之成为目前病原诊断较为理想的手段，已逐步发展为检测疱疹病毒新的“金标准”(Wang et al 2017)。主要包括PCR检测技术，环介导等温扩增技术(LAMP)、交叉引物等温扩增技术(CPA)、重组酶聚合酶扩增技术(RPA)(陈洋宙 2018)等。

MDV 基因组上独特的基因序列可以作为 PCR 诊断的切入点。例如 MDV-I 基因组上特异性存在的致癌性基因 *meq*、*pp38* 以及 132 bp 重复序列等基因，可以用于 MDV 的诊断(Handberg et al 2001)。为了对病毒载量进行精确定量，张颖等(张颖等 2007)建立了对 MDV-I 的绝对定量检测方法；程洋等(程洋等 2013)基于 *meq* 基因建立了检测 MDV-I

的 SYBR Green I qPCR 检测方法；屈素洁等(屈素洁等 2015)基于 *meq* 基因建立了用于检测 MDV-I 的 TaqMan 探针 FQ-PCR 检测方法；吕红超等人(吕红超等 2016)基于 132 bp 重复序列以及 *meq* 基因建立了鉴别 MDV 强弱毒株的 PCR 检测方法。多重 PCR 多用于同时检测和区分多种合并感染的病毒。Kannaki 等(Kannaki et al 2021)开发了一种简单、有效的多重 PCR 方法，用于同时检测家禽的 MD、白血病和网状内皮细胞增多症三种肿瘤性疾病。基于 PCR 的技术依赖于热循环仪或复杂的实时 PCR 系统等实验室设备，应用 LAMP 方法可以直接检测养殖环境中的 MDV，而无需使用先进的实验室设备，已逐步成为监测鸡场 MDV 污染的强大工具(Woźniakowski and Samorek-Salamonowicz 2014)。

1.2.5.4 DNA 探针技术

新一代的非放射性核酸探针标记技术可以特异性的与 MDV 的 DNA 分子杂交从而进行 MDV 的分型检测，并且该种探针可以重复利用至少三次，广泛适用于对批量样品的检测(李光富等 1995)。

1.2.5.5 MD 的治疗手段

目前 MD 没有有效的治疗方法。由于 MD 病毒粒子能在环境中长久存在且可以通过空气运输扩大感染范围，因此雏鸡从破壳起就面临着 MDV 的挑战。雏鸡出壳后应尽快免疫，同时应在免疫力产生之前的 7 天内注意雏鸡的日常管理工作(Tsukamoto et al 2002)以及鸡场的环境卫生、饲养条件和疫病监测。为避免造成更大的经济损失，在进行严格的疫苗接种的同时，养鸡场应着重注意日常管理以及卫生清洁，制定严格的卫生制度彻底消毒，定期清扫鸡舍以及饲喂用具，保障营养平衡，提高自身抵抗力，种蛋孵化时应格外注意环境的消毒。疑似感染 MD 的鸡一经发现，应及时隔离，确诊后立即扑杀(李航 2021)，养鸡场应做好隔离封锁，避免动物流动，并对鸡群进行全方位的疫病检测，对发病鸡以及隐性感染的鸡做无害化处理，确保鸡群无 MDV 污染后进一步消毒方能解除封锁。

MD 毒力的持续增强严重威胁着养禽业的发展，虽然目前新研发的疫苗能够有效防控超强毒株的感染，但是尚未有新型的检测技术用以区分 MD 疫苗毒和野毒，因此建立新型检测技术用以区分 MD 新研发的疫苗毒和野毒对 MD 的诊断与净化具有重大意义。

1.3 猫传染性鼻支气管炎的研究进展

1.3.1 猫疱疹病毒的基因组结构

猫传染性鼻支气管炎作为临床上常见的、严重性的传染病，是由猫疱疹病毒（feline herpesvirus, FHV-I）引起的。该病毒隶属于 α 疱疹病毒亚科水痘病毒属，是有囊膜的线性双链 DNA 病毒(Gaskell et al 2007)。FHV-I 于 1958 年首次分离，此后的所有 FHV-I 分离株均具有相似的抗原特征，因此只存在一种血清型(Gaskell et al 2007)。病毒粒子由包膜、衣壳、皮层和核心四部分构成，为圆形或椭圆形，成熟的病毒粒子大小范围为 120-180 nm(Davison and Clements 2010)，它们由包含双链病毒 DNA 核心基因组、围绕核心的二十面体衣壳、围绕衣壳的外皮层和从中突出糖蛋白尖峰的脂质双层包膜组成(Colgrove et al 2016)，如图 1-5 所示。

FHV-I 基因组全长约为 134 kb，具有与其他水痘病毒相似的典型 D 型结构，双链 DNA 病毒基因组由两段独特序列组成，称为长独特区（unique long region,UL）和短独特区（unique short region,US）。US 区域两侧有一对序列相同但方向相反的重复序列，称为末端重复短序列（terminal repeat short,TRS）和反向重复短序列（inverted repeat short,IRS）(Rota et al 1986b, Maeda et al 1998, Tai et al 2010)，Tai 等(Tai et al 2010)首次报道了 FHV-I 的完整的基因组序列，表明 FHV-I 基因组含 78 个开放阅读框（open reading frame,ORF），共编码 74 种不同的蛋白，其中 UL 含 64 个 ORF，US 含 7 个 ORF，还有 1 个 ORF 跨越 UL 和 TRS，US 两侧末端重复序列和反向重复序列含 3 个 ORF，如图 1-6 所示。

FHV-I 在已有研究中的猫源性培养细胞中尤其是猫肾细胞中易于复制及增殖，但是在外界环境中抵抗力较弱，对酸碱度，温度，氯仿以及乙醚等有机溶剂较为敏感(Lewin et al 2018)，容易被紫外线、消毒剂等灭活(Eleraky et al 2002)，作为气溶胶也相对不稳定(Gaskell and Willoughby 1999)。

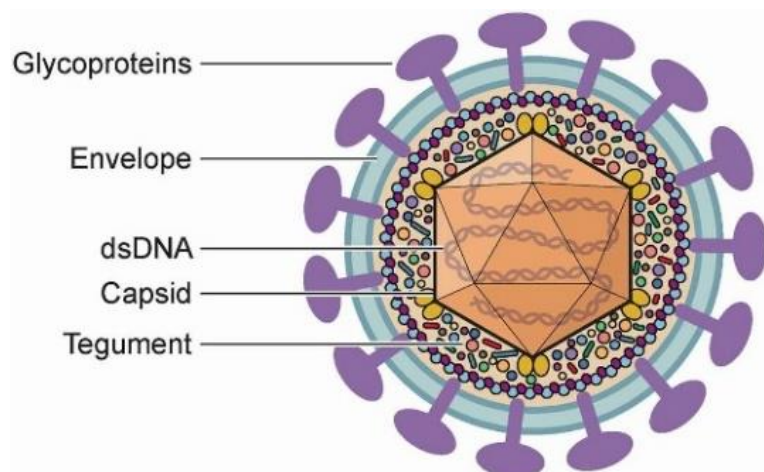


图 1-5 猫疱疹病毒病毒粒子结构示意图(Zhu and Viejo-Borbolla 2021)

Fig.1-5 Schematic diagram of feline herpesvirus particle structure

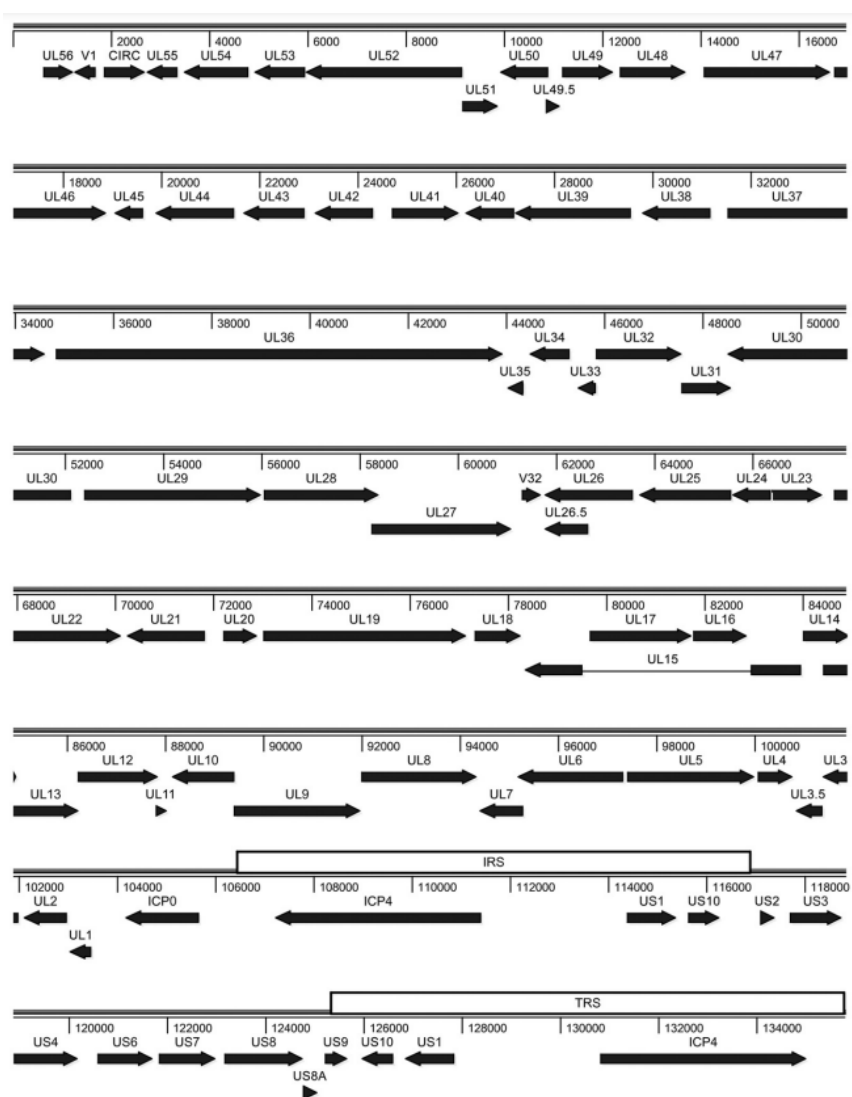


图 1-6 猫疱疹病毒基因组结构示意图(Tai et al 2010)

Fig.1-6 Schematic diagram of genome structure of feline herpesvirus

1.3.2 猫疱疹病毒编码的基因及功能

FHV-I 基因组已被证实编码 74 种不同的蛋白(Tai et al 2010), 其中包括 23 种病毒粒子相关蛋白(Fargeaud et al 1984)和 13 种包膜蛋白。UL 区主要编码 UL27 (gB)、UL44 (gC) 等糖蛋白, 以及衣壳蛋白、胸苷激酶 (TK, UL23) 等蛋白。US 区主要编码糖蛋白以及丝氨酸/苏氨酸激酶(PK)等蛋白(Grail et al 1991), 其中糖蛋白主要包括 US6(gD)、US8 (gE)。目前已鉴定出 gE、gC、胸苷激酶 (TK、UL23) 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (US3) 为病毒潜在的毒力因子(Gaskell et al 2007), 同时也是 α 疱疹病毒中病毒生长的非必需蛋白。位于 UL 的 UL27 (gB)、UL44 (gC)、UL22 (gH)、UL1 (gL) 四种糖蛋白以及位于 US 的 US6 (gD)、US8 (gE)、US4 (gG)、US7 (gI) 四种糖蛋白为已经鉴定的八种糖蛋白, 其中 UL 的 gC 以及 US 的 gE、gI、gG 是非必需蛋白。这些糖蛋白已被很好地表征并且在疱疹病毒科中是保守的(Rota et al 1986a), 都与膜附着、补体结合和病毒粒子通过细胞间扩散渗透进入细胞有关(Ross and Binns 1991), 也在抗体诱导和细胞介导的免疫以及病毒的识别、侵入、感染、释放的过程中发挥重要作用(Fargeaud et al 1984)。

gB 蛋白是疱疹病毒科中非常保守的重要的免疫原性糖蛋白, 可以刺激机体产生高水平的中和抗体, 在介导病毒进入细胞及胞间扩散中发挥至关重要的作用(Maeda et al 1995)。研究表明, FHV-I 的 gB 蛋白能够被犬疱疹病毒的抗体所识别(Spatz and Maes 1993), 也能够与兔抗单纯疱疹病毒 gB 蛋白的血清发生反应(Limcumpao et al 1990)。表达 gB 蛋白的重组痘苗病毒免疫小鼠也能诱导小鼠产生高水平的中和抗体(Limcumpao et al 1991), 这些研究均表明高度同源的 gB 蛋白在不同毒株中存在相同的抗原表位, 可能在功能上也具有相似性。gB 蛋白作为病毒复制过程中的必需蛋白, 其特性使之成为抗疱疹病毒感染研究的重点。

gC 蛋白作为复制的非必需蛋白, 是一种肝素结合蛋白, 具有凝血活性。该基因可以发生重组以产生新型毒株, 借此新分离到的毒株可以通过 gC 的突变检测进行区分(Hamano et al 2004)。

gD 蛋白作为疱疹病毒囊膜的重要组成部分, 具有同 gB 蛋白一样能刺激机体产生较高水平抗体的功能, 同 gC 蛋白一样具有凝血活性, 但是 gD 蛋白不和肝素结合, 具有

宿主特异性。因此，可以 FHV-I 的 gD 蛋白为靶标进行病原学诊断以及抗 FHV-I 感染的疫苗研究(Maeda et al 1996)。

目前对于 FHV-I 的 gH、gE、gI 基因认识还存在不足。已知的是，gH 蛋白是疱疹病毒中高度保守的必需蛋白，是宿主免疫过程中的主要抗原，需要 gL 蛋白的参与才能成熟表达(Spatz et al 1994)，有利于吸附稳定，诱导细胞融合。gE 蛋白和 gI 蛋白作为非必需蛋白也需要两者共同表达才能发挥其介导病毒在胞间传播的作用。

gG 蛋白是 FHV-I 复制增殖的非必需基因，在 Richter 利用细菌人工染色体技术(BAC)构建的 FHV-I 突变株的临床实验表明 gG 在病毒的致病过程中具有重要作用，且 gG 缺失可减弱 FHV-I 毒性(Spatz et al 1994)。基于此，本研究选择的靶标蛋白为 gG。

1.3.3 猫疱疹病毒的生命周期

所有的 α 疱疹病毒都被认为具有类似于单纯疱疹病毒 (HSV) 的复制模式。主要感染过程包括吸附与入侵、脱壳与入核、生物合成、组装和释放(Walsh 2003)。

疱疹病毒最主要的入侵细胞的方式是通过病毒表面的囊膜糖蛋白与细胞受体识别结合，吸附于细胞膜表面，在囊膜糖蛋白以及 gH-gL 复合体的作用下，致其构象改变后与细胞膜融合介导病毒进入细胞。病毒进入细胞后，其皮层和核衣壳被释放到细胞质中，病毒核心通过核孔进入细胞核。进入细胞核的病毒基因组在宿主自身连接酶的作用下迅速成环，启动病毒立即早期基因的转录，最先表达的立即早期基因进一步调节早期基因和晚期基因的表达，其中早期基因稳定表达的蛋白参与基因组的复制(Larson et al 2012)。在立即早期基因和早期基因的共同作用下，晚期基因转录表达出病毒的衣壳蛋白、包膜蛋白以及参与装配和转运的蛋白。病毒基因组与核衣壳在细胞核内组装成熟之后出核进入细胞质，被囊膜包裹，最后出芽释放(Fargeaud et al 1984)，如图 1-7 所示。

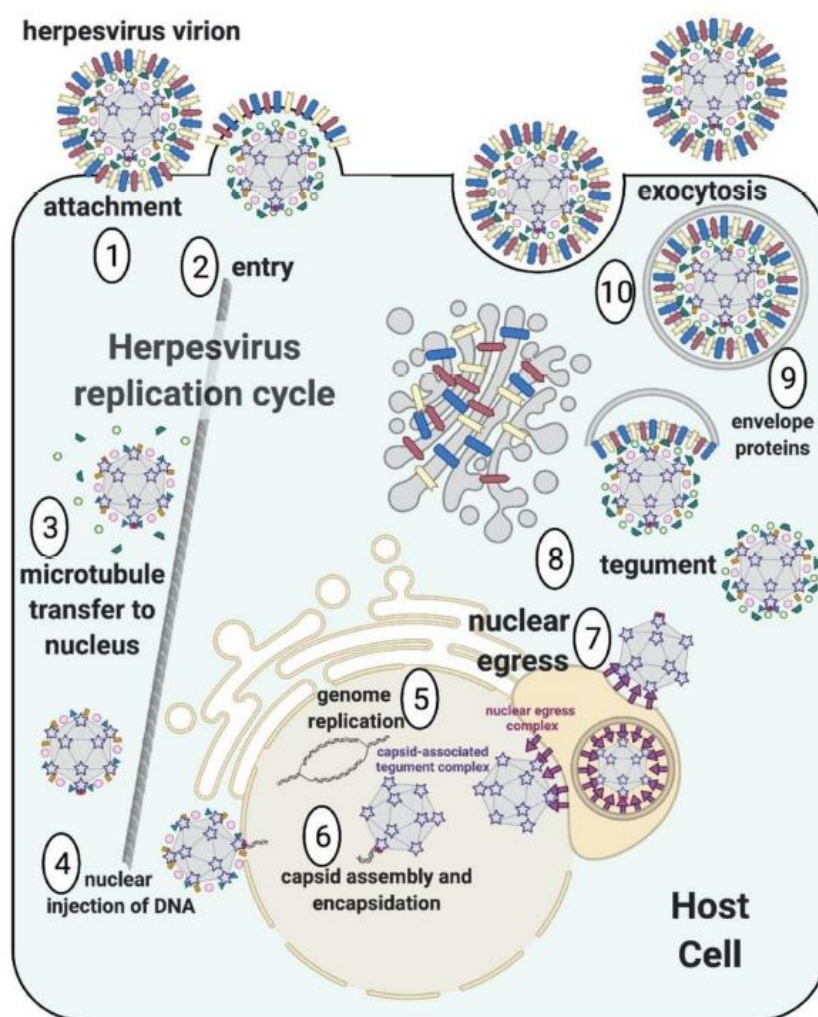


图 1-7 疱疹病毒的生命周期模式图(Draganova et al 2021)

Fig.1-7 Life cycle pattern of herpesvirus

1.3.4 猫传染性鼻支气管炎的流行性与临床特征

FHV-I 目前在世界上广泛分布，较其他疱疹病毒而言，FHV-I 具有种属特异性，其宿主范围仅限于猫科动物，主要感染动物为猫(Townsend et al 2013)，其中幼仔猫相较于成年猫有更高的感染率和死亡率。临床特征以上呼吸道疾病和眼部疾病为主，包括打喷嚏、浆液性眼鼻分泌物，同时伴有抑郁、食欲不振、发热和流涎等症状，严重者可能会诱发继发性细菌感染和纤维蛋白坏死性支气管肺炎导致死亡。越来越多的血清学研究表明，猫作为 FHV-I 的自然宿主，其中高达 97%曾接触过病毒(Maggs and Clarke 2005)，高达 80%会在接触后持续感染，45%会持续间歇性的排毒(Contreras et al 2018)。近年来有报道称包括狮子，猎豹，东北虎，华南虎等野生猫科动物也频频被感染(Junge et al 1991, Witte et al 2017)。

FHV-I 的主要传染源是处于急性发病期的猫，同时潜伏感染期的猫也会在外界环境刺激下使体内病毒重新激活导致发病从而成为病毒传播的潜在感染源。处于急性发病期的猫，体内病毒大量复制增殖，具有感染性的病毒粒子通过眼鼻、口腔等向外界排毒造成其他动物的感染，少数情况下也可能会通过垂直传播造成仔猫的直接死亡。FHV-I 引起的疾病临床表现和严重程度取决于病毒株以及个体动物的年龄和免疫状态，幼龄动物对病毒的易感性普遍较高(Sykes 2014)。成年猫感染后表现出不明显的临床症状，但是病毒在上呼吸道，眼部，口鼻部位复制增殖，并不断排毒进而增加其他动物的感染风险。初生幼仔猫感染 FHV-I 后由于母源抗体没有明显的临床症状直接进入潜伏感染阶段，感染初期症状一般是精神不振，抑郁，打喷嚏，发热，眼鼻浆液性分泌物等，随着病情加重，进入急性感染期，表现出明显的炎症反应，分泌物逐渐变成粘液脓性，严重者呼吸困难并伴有咳嗽，眼部因诱发炎症致使失明，更有甚者继发全身性感染出现死亡，病死率高达 50%(Maggs 2005)。急性感染期之后的患病猫进入终生潜伏感染期，这也是疱疹病毒感染的标志。潜伏感染期的病毒主要存在于三叉神经，视神经等部位，在痊愈猫免疫力低下或是不同的生物应激，或给予皮质类固醇时，FHV-I 被再次激活导致痊愈猫的二次感染，以此循环往复危害宠物猫乃至野生猫科动物的健康，给疾病防控带来困难。

1.3.5 猫传染性鼻支气管炎的诊断与治疗

FHV-I 所引起的疾病与猫传染性鼻-结膜炎、猫肺炎等仅凭临床症状很难区分(Cao et al 2022)。在感染的早期阶段，不同病毒所引起的疾病临床症状相似导致无法准确区分病毒类型，需要进一步确诊。目前对该病的诊断方法同多数疱疹病毒大致相同，主要包括血清学检测(Neuerer et al 2008, Digangi et al 2011)，病毒分离和鉴定(Henzel et al 2012)，PCR 检测技术(Marsilio et al 2004, Streck et al 2013, Kim et al 2020)。同 MDV 病毒检测方法类似，病毒分离是最准确、最可靠的鉴定方法，但是耗时太长，不利于临床检测；血清学检测方法无法检测潜伏感染的病毒且特异性不强，在临床应用上具有一定的局限性；PCR 检测技术经过不断的发展逐渐适用于临床，该方法耗时短、灵敏性高、特异性强，且能够进行临床大量样品的检测。DNA 探针技术以及分子杂交技术的融合应用更加推动该方法的发展。

FHV-I 的防控策略主要是接种疫苗，但是其疫苗研究现状以及病毒潜伏感染致使感染猫终身带毒的特性使疫苗的接种对象局限于未感染的幼猫(Maggs 2005)。接种的疫苗种类主要分为减毒活疫苗和灭活疫苗，其中减毒活疫苗也有可能引入病毒造成病毒的潜伏感染，由此市场上的普遍选择是灭活的三联苗“妙三多”(Summers et al 2017)。但是接种灭活疫苗也并不能完全防止该病的感染，仅能缓解感染后引起的病症，降低反复感染的风险、载毒量和排毒量(牛江婷 2021)，因此在接种疫苗的同时应着重注意易感宿主的日常护理，保持宿主干净整洁的生活环境，高质量把控猫群数量变动和活动，对环境进行定期消毒等(Gourkow and Phillips 2015)。

FHV-I 感染后的临床特征主要是上呼吸道疾病和眼病疾病，对症下药是治疗的最佳手段，应根据感染猫病情的轻重缓急辅以不同的治疗。初步感染的猫应注重于眼部疾病抗菌消炎、全身抗病毒抗菌为主，主要采用的治疗眼部疾病以及抗病毒的药物有泛昔洛韦、雷特格韦、乳铁蛋白等(Beaumont et al 2003, Thomasy et al 2016, Spertus et al 2019)，其中 L-赖氨酸、黄芪多糖和三氟胸苷是治疗 FHV-I 感染的特效药(Maggs et al 2003, 刘健等 2017)。病情严重者应同时辅以肠胃平衡营养、体液酸碱平衡等支持疗法(张继一等 2009)，反复感染的猫应保障感染猫身体营养平衡的条件下主要以全身抗病毒治疗为主，确定病毒感染源以及外界刺激因素以消除致病因素(Gould 2011)，保证其所处环境的干净、卫生与整洁。

1.3.6 猫传染性鼻支气管炎疫苗的研究进展

FHV-I 常与其他病原体混合感染引起猫上呼吸道疾病，其中主要是猫杯状病毒以及猫细小病毒，三者的混合感染是该病防控的难点，目前市场上大多数疫苗也是关于三个病毒的多联苗，主要包括灭活苗和弱毒活疫苗(Day et al 2016)。

1.3.6.1 灭活疫苗

灭活疫苗由于病原微生物感染性被破坏而不具备复制能力故其安全性较高，但是灭活疫苗不能产生细胞免疫，更不能产生持续的体液免疫，需要多次加强免疫。防控 FHV-I 常用的效果较好的灭活苗是硕腾公司的“妙三多”疫苗，也是国内唯一有兽药批号的猫用灭活疫苗(于得静 2021)。“妙三多”疫苗用于皮下或是肌肉注射，8 周龄或以上的健康

猫首次免疫，3-4 周后加强免疫，可在之后选择是否再次加强免疫(Richards et al 2006)，此后根据猫的活动范围选择时限，频繁外出活动或是出入公共场所的 1 年接种一次，反之则三年接种一次。但是该疫苗也完全预防感染，同时在疫情影响下该三联苗处于长期缺货状态导致市场上出现假疫苗，使猫用宠物疫苗又面临一个新的困境。

1.3.6.2 弱毒活疫苗

弱毒活疫苗可以诱导机体产生体液免疫和细胞免疫，刺激机体产生较高的抗体水平，一般临床上会优选该疫苗进行接种。弱毒活疫苗包括两种：皮下给药和鼻内给药。与单独以一种方式接种的猫相比，两种方式同时给药具有更好的保护效果。但是弱毒活疫苗存在毒力返强的风险，并且接种不当会导致其成为病原体感染动物。对于怀孕或是患有猫免疫缺陷病毒病的猫不建议接种弱毒活疫苗。国内外报道的 FHV-I、FCV 双联苗和 FHV-I 非必需基因 gE、gI 缺失苗(Kruger et al 1996, Sussman et al 1997, 孙国凤 1997)在临床应用上有一定效果，但是均不能预防处于潜伏感染期的带毒猫的再次感染。目前国内市场上没有针对 FHV-I 临床应用效果较好的疫苗。

1.3.6.3 基因工程疫苗

在动物饲养数量以及动物疾病病原不断变异的现状下，传统疫苗已不能满足目前市场现状的需求，开发出具有预防性和治疗性的 FHV-I 疫苗成为目前疫苗研究的主要方向(Aschner and Herold 2021)。

诸多学者也尝试通过基因工程改进 FHV-I 疫苗，Maeda 和 Spatz 等(Spatz et al 1994, Maeda et al 1996)构建了表达 FHV-I 糖蛋白 D 的重组痘病毒和杆状病毒，以表征其作为免疫原的特性和潜力。目前已经构建了许多 FHV-I 缺失/插入突变体，包括 TK 缺失突变体，其中一些突变体已经整合了其他基因，如 FCV 衣壳基因(Yokoyama et al 1995, Yokoyama et al 1998)；gE、gI 缺失突变体(Kruger et al 1996)；gI 插入突变体（似乎也影响上游基因 gD 的转录模式和表达）(Willemse et al 1996)；以及 gC 下游的“ORF2”插入突变体(Willemse et al 1994)。总的来说，这些缺失/插入突变体疫苗对猫的毒性较低，并提供一定的疾病防护，尤其是通过口鼻途径。但是迄今为止还没有一种疫苗上市，这可能是因为还未进行充分的安全实验(Thiry et al 2009)。

1.4 细菌人工染色体技术及其在疱疹病毒载体疫苗上的应用

1.4.1 BAC 载体

细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosomes, BAC) 是一种可以稳定保存 300kb 或更大外源 DNA 的低拷贝质粒载体, 常用作基因组和转基因研究的大容量克隆载体 (Heintz and Gong 2020)。BAC 载体主要含有五个基础元件: oriS、repE、parA、parB、parC。人工构建的 BAC 载体在大肠杆菌中受到严格的复制控制, 可保证遗传的稳定性 (游小燕等 2021), repE 的作用是促进 DNA 复制, parA、parB 和 parC 基因的存在确保了基于 F 因子的 DNA 分子在细胞分裂期间准确地分配给子细胞 (崔红玉 2007); parB 还负责从细胞中排除外来 F 质粒 (Heintz and Gong 2020)。这些特性促进了质粒的维持和稳定性, 而这种低拷贝数和绝缘环境的结合限制了细胞内 BAC 分子间重组的机会 (Shizuya et al 1992)。与其他载体相比, BAC 具有更高的克隆能力、稳定性、操作效率以及后续在大肠杆菌操作的可便性。

BAC 载体在发展过程中经历了两次突破性的发展。1992 年, Shizuya 等 (Shizuya et al 1992) 成功构建了以氯霉素抗性基因为筛选标记的第一代 BAC 载体。随后, Mejia (Mejia and Monaco 1997) 等在 BAC 载体上插入 LacZ 基因使之便于用蓝白色菌落对重组子进行筛选。Baker 等在 BAC 载体上插入荧光素酶或 GFP 基因, 形成的重组病毒可以通过荧光来筛选目的克隆, 其拯救的病毒还可以通过第一代中 BAC 载体上引入的 Cre/loxP 系统删除 BAC 载体, 构建成使用较为广泛的第二代 BAC 载体。随着分子生物学技术的不断应用和发展, BAC 载体的结构及其筛选功能更加完善, 许多常规的选择性筛选基因也更多的被引入 BAC 载体中 (王倩和王斌 2002), 使 BAC 载体筛选更加直观方便。

利用同源重组将外源基因组克隆至 BAC 载体, 并通过电穿孔将连接混合物或环状中间体引入到具有良好特征的重组缺陷型大肠杆菌菌株中, 形成单拷贝质粒 (Heintz and Gong 2020)。这种技术允许病毒基因组在大肠杆菌中以 BAC 质粒的形式存在, 将 BAC 质粒转染到真核细胞中可以获得具有感染性的 BAC 克隆, 以此达到病毒基因组在原核细胞和真核细胞之间穿梭的目的 (刘洁 2020)。利用原核重组功能对大肠杆菌中的病毒基因组进行突变也是具有可操作性的, 从而进一步产生突变或是缺失病毒。通过同源重组在大肠杆菌中进行疱疹病毒基因改造既不需要限制性位点, 也不需要克隆步骤, 并且允

许引入多种 DNA 修饰。这种基于 BAC 载体的技术为系统挖掘疱疹病毒基因组中存储的信息提供了一种安全、快速和有效的方法(Schalkwyk et al 1995), 有助于分析作为感染性 BAC 克隆的疱疹病毒基因组, 了解它们在发病机制中的作用, 研究它们作为治疗靶点的潜力, 同时可以用于疫苗的合理设计以及作为基因治疗工具的使用, 为 FHV-I 和 MDV 相关毒力因子的表征和新候选疫苗的开发提供合适的平台(Adler et al 2003)。

1.4.2 BAC 载体在疱疹病毒载体疫苗上的应用

BAC 克隆和重组介导的基因工程是促进特定重组疱疹病毒产生的两种技术。BAC 载体相较于其他载体具有优越的克隆能力、稳定性以及可操作性, 使其被广泛应用到整个疱疹病毒基因组中。其中包括单纯疱疹病毒(Dolan et al 1998), 马疱疹病毒 (EHV-I) (Davison and Scott 1986), 水痘带状疱疹病毒 (VZV) (Davison and Scott 1986), 伪狂犬病病毒 (PRV) (Klupp et al 2004), FHV-I(Costes et al 2006), MDV(Costes et al 2006)。

其中首个包含整个 FHV-I 基因组的 BAC 克隆于 2006 年产生, Costes 等人为了探究 FHV-I 基因组上 gG 基因的特性及其功能, 构建了靶向 gG 基因的 FHV-BAC 克隆, 并证明该 BAC 克隆具有感染性。在随后的几年时间里, 通过 BAC 技术构建了包括 gC、gE、US3 编码的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (PK) 单独缺失以及 gE 和 TK 双重缺失在内的多种 FHV-I 突变体。无论是靶向 FHV-I 非必需基因构建表达外源病毒主要抗原序列的疱疹病毒 BAC 载体, 还是利用 BAC 技术靶向 FHV-I 毒力基因致力于构建的缺失突变体均尚未在体内进行表征, 但体外特征表明这些突变体作为减毒疫苗有进一步研究的潜力(Tai et al 2010, Tai et al 2016)。

BAC 载体技术的大容量和高稳定性极大的推动了对疱疹病毒科基因组结构, 致病机制以及疫苗开发的研究进程(Witter et al 1970)。除却最突出的 MDV 的致瘤基因 *meq*, 以及 *pp38*、*vIL-8* 等基因, 利用 BAC 载体技术对 MDV 基因组进行研究, 结果表明, *gE*、*gI*、*UL46* 是 MDV 复制时的非必需基因; 而缺失 *RLORF4* 则会导致 MDV 致病性减弱; 直接或间接调节水平传播能力的任何一个基因缺失的都会抑制 MDV 的传播能力(Silva and Gimeno 2007)。同时, 利用 BAC 载体构建 MDV 重组毒的动物免疫的保护性实验结果也表明, 拯救出的重组毒能够对强毒株产生一定的免疫效果(Petherbridge et al 2003, Cui et al 2008)。利用 BAC 载体构建的正确表达外源保护性抗原的重组毒也具有生物学

活性(Lan et al 2008)。这提示了利用反向遗传操作系统进行新型病毒载体疫苗研发的巨大潜力。

1.4.3 疱疹病毒作为载体的优势

疱疹病毒因其庞大的基因组且含有很多非必需基因以及其持续性潜伏感染的特性成为有吸引力的候选疫苗载体。在兽用疫苗的范围内，疱疹病毒载体疫苗已得到充分研究，可用作商品化载体疫苗帮助预防不同物种的疾病。疱疹病毒是多价重组疫苗的有利载体(Mishima et al 2001)，其中 FHV-I/MDV 作为疫苗载体，其宿主范围有限，降低了跨种感染的可能性；疱疹病毒具有大约 120-180 kb 的基因组而且携带多种非必需基因，可被编码致病微生物免疫原性抗原的外源序列所取代，不仅能够稳定遗传且能达到同时预防多种疾病的目的(Yokoyama et al 1997)；疱疹病毒潜伏感染的特性使其作为病毒载体疫苗在外界刺激下诱导宿主免疫的体液和细胞反应，刺激机体产生持续的抗体水平，减少免疫次数以及免疫剂量；疱疹病毒作为疫苗载体可被高效编辑且能作为冻干苗便于保存；在细胞上连续传代的毒株毒力减弱，生物安全性较高。

1.5 研究目的及意义

MDV 引起的 MD 严重危害养殖业，造成巨大的经济损失，且随着 MDV 毒力的不断增强，现有疫苗无法提供有效的免疫保护力。虽然新型疫苗能够有效防控超强毒力毒株，但是目前尚未有区分新型疫苗毒和野毒的检测方法。基于此，本研究致力于建立快速有效地诊断 MD 并区分 MDV-I 与疫苗毒株的检测方法，可用于筛选、净化鸡群，作为新型检测技术进行下一步开发，为 MD 的诊断以及鸡群净化提供技术支持。

FHV-I 引起的上呼吸道疾病在临床上最为常见，且具有较高的传染性和致死率。但是针对该病的防控，目前国内市场上没有获批的商用疫苗，而常用的进口疫苗成本较高且无法满足市场需求，甚至出现了疫苗滥用、造假的现象。基于此，本研究利用同源重组技术以及 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建了 gG 基因缺失的带有细菌人工染色体（BAC）元件的 FHV-I 重组病毒，为其基因功能研究、基因防治和猫用疫苗的开发建立反向遗传操作平台奠定基础。

第二章 马立克氏病疫苗毒和野毒 PCR 鉴别检测方法的建立

2.1 实验材料

2.1.1 主要实验材料

MDV-I型毒株，CVI988、814 疫苗毒株均由武汉科前生物股份有限公司馈赠。

火鸡疱疹病毒株疫苗（HVT），鸡传染性贫血病毒（CIAV），鸡传染性支气管炎病毒（IBV），鸡传染性法氏囊病毒（IBDV），禽白血病病毒（ALV），鸡包涵体肝炎（IBH），禽流感病毒（AIV），新城疫病毒（NDV）由本实验室保存。

马立克氏病患鸡的羽毛囊上皮样本及其肝组织来自湖南某地白羽种鸡场。

鸡胚成纤维细胞（CEF）由本实验室制作并保存。

大肠杆菌（*E.coli*）DH5 α 由本实验室制备并保存。

2.1.2 实验试剂与仪器

2.1.2.1 主要试剂耗材

本研究使用的试剂耗材见表 2-1。

表 2-1 本研究使用的试剂及耗材

Table 2-1 Reagents and consumables used in this study	
试剂耗材	购买公司
琼脂糖粉	武汉擎科创新生物科技有限公司
DL2000 plus DNA Marker	武汉擎科创新生物科技有限公司
DL5000 DNA Marker	南京诺唯赞生物科技有限公司
10 $\times$ DNA loading buffer	南京诺唯赞生物科技有限公司
EasyTaq $^{\text{®}}$ DNA Polymerase	北京全式金生物技术有限公司
TransTaq $^{\text{®}}$ DNA Polymerase	北京全式金生物技术有限公司
High Pure dNTPs(2.5 mM)	北京全式金生物技术有限公司
pMD18-T Vector	北京全式金生物技术有限公司

T4 DNA Ligase	北京全式金生物技术有限公司
FastStart Universal SYBR® Green Master(ROX)	Sigma-Aldrich（上海）贸易有限公司
DNAiso Reagent	宝生物工程（大连）有限公司
DEPC 水（DNase、RNase free）	上海碧云天生物技术有限公司
质粒小提试剂盒	北京天根生化科技有限公司
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	Magen 公司
Tris-base	美国 MP 公司
氯化钠、二水合 EDTA 二钠、冰乙酸	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇、无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
酵母提取物（yeast extract）	美国 BD 公司
胰蛋白胨（tryptone）	美国 BD 公司
琼脂粉（agar）、10cm 无菌平皿	Biosharp 公司
ABW FBS	上海诺娃医药科技有限公司
青链霉素储存液	吉诺生物医药技术有限公司
DMSO	PanReac AppliChem

2.1.2.2 主要仪器

本研究使用的仪器见表 2-2。

表 2-2 本研究使用的仪器

Table 2-2 Instruments used in this study	
仪器设备	购买公司
低温冰箱	Haier 公司
超纯水仪	Milli PORE 公司
核酸定量测定仪	Thermo Fisher 公司
EDC-810 型 PCR 仪	北京东胜创新生物科技有限公司
JY2001 电子天平	上海精科学精密仪器有限公司天平仪器厂
DYH-III 电泳仪、核酸水平电泳槽	北京六一仪器厂
凝胶成像分析系统	美国 Alpha 公司

恒温振荡培养箱、DK-S22 型恒温水浴锅	上海精宏试验设备有限公司
16°C水浴锅	英国 Amersham Biosciences 公司
SCW-CZ-650 型洁净工作台	苏州宏瑞净化科技有限公司
XW-80A 微型涡旋混合仪	上海沪西分析仪器厂有限公司
BD-BGC1 蓝光切胶仪	无锡博弗瑞德生物科技有限公司
立式高压灭菌锅	上海博讯实业有限公司
猪警-2000 便携式荧光定量 PCR 检测设备	湖南国测生物科技有限公司
MCO-18AC 二氧化碳培养箱	普和希健康医疗器械（上海）有限公司

2.1.3 主要溶液配制

50×TAE 缓冲液：称取 242 g Tris 和 37.2 g 二水合 EDTA 二钠溶解于 800 mL 去离子水中，加 57.1 mL 冰乙酸，充分溶解混匀，定容至 1 L，室温保存，用时稀释成 1×TAE 溶液。

氨苄青霉素（Amp）贮存液：按 100 mg/mL 的比例将氨苄青霉素粉剂溶解于去离子水中，使用 0.22 μm 细菌滤器过滤除菌，适量分装，-20°C 保存。

大肠杆菌 LB 液体培养基：分别称取胰蛋白胨(Tryptone)10 g，酵母粉(Yeast Extract) 5 g，NaCl 10 g，溶于 1 L 去离子水中，121°C 高温蒸汽灭菌 20 min，室温保存。

大肠杆菌 LB 固体培养基：在 LB 液体培养基中加入 1.5% 琼脂粉，121°C 高温蒸汽灭菌 20 min，放置室温/水浴锅，待培养基温度降至 50-60°C 左右（手背可以接受的温度），在超净台里加入相应的抗生素后，倒平皿，待培养基凝固后，标记好置于 4°C 备用，为避免假阳性，抗生素平皿放置不要超过 2 个月。

0.1 mol/L CaCl₂ 溶液：称量 2.22 g CaCl₂ 粉末溶于 200 mL 单蒸水中，121°C 高温蒸汽灭菌 20 min 后，4°C 保存备用。

75% 甘油溶液：量取 75 mL 丙三醇，加入 25 mL 单蒸水中，混匀后，121°C 高温蒸汽灭菌 20 min 后，室温保存。

含有 15% 甘油的 0.1 mol/L CaCl₂：量取 15 mL 丙三醇，加入 85 mL 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液，混匀后，121°C 高温蒸汽灭菌 20 min 后，4°C 保存备用。

1×PBS: 称取NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ 1.15 g、KH₂PO₄ 0.2 g、EDTA 0.25 g, 依次溶于900 mL去离子水中, 121℃高温蒸汽灭菌20 min后, 常温保存备用。

细胞消化液: 分别称取胰酶粉末 2.5 g 加入在 121℃高温蒸汽灭菌 20 min 后的 PBS 溶液中, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 分装后, 置 4℃保存备用。

细胞基础培养液: 称取13 g DMEM粉末至900 mL去离子水中, 搅拌至粉末完全溶解, 加入3.7 g NaHCO₃至培养基中, 用1 mol/L HCl调节pH值在6.8-7.0范围, 定容1 L后用0.22 μm滤膜过滤至灭菌的蓝色广口瓶中, 标记日期, 置4℃储存备用。

细胞生长液: 向 DMEM 细胞基础培养基中加入 10%FBS, 选择性的加入 1%青链霉素, 4℃储存备用。

2.2 实验方法

2.2.1 样品基因组的制备

2.2.1.1 CEF 细胞的制备

(1) 取9-11日龄的鸡胚, 用75%酒精消毒气室部位。无菌条件下用剪刀除去气室部分的卵壳, 去除壳膜。

(2) 用小镊子刺破并掀起绒毛尿囊膜, 将镊子伸入胚体头部, 夹住鸡胚的颈部, 轻轻放在灭菌平皿里, 用无菌的PBS清洗胚体两次。

(3) 用眼科剪刀剪去头以及可见的四肢, 打开胚体胸腔和腹腔, 小心刮掉内脏后, 再次用无菌的PBS清洗胚体, 至少两次。

(4) 将胚体放入一个新的无菌平皿里, 用眼科剪将其充分剪碎至乳糜状。

(5) 将剪碎的组织导入无菌的细菌瓶, 用PBS冲洗两次, 加入5 mL 0.25%的胰酶, 放在37℃水浴锅, 消化30 min, 间隔5 min摇动细菌瓶, 使组织脱离瓶底。

(6) 消化好后, 取出细菌瓶, 静置5 min, 用移液枪弃掉胰酶上清。

(7) 将DMEM生长液(含10%FBS)中和胰酶, 轻轻摇晃, 静置5 min。

(8) 用移液枪弃掉上清培养液, 重复步骤(7)两遍。

(9) 用吸管吹吸数次, 使细胞分散脱落。

(10) 用8层纱布盖住一个新的细菌瓶口，并制造一个底部凹陷的漏斗形状，立刻将(9)中的细胞悬液倒入纱布上。

(11) 吸取适量的细胞悬液分装于细胞培养瓶或培养板，补充适量的生长液，放置于37℃、5%CO₂培养箱培养。

2.2.1.2 CEF 细胞的冻存

- (1) 预先配制冻存液，DMSO：胎牛血清比例为 0.5：9.5，于 4℃冰箱保存预冷；
- (2) 将铺满单层的 CEF 细胞用胰酶消化至单个悬浮状态；
- (3) 吸取细胞悬浮液加入 15 mL 离心管中，1000 r/min，离心 5 min，弃去上清；
- (4) 用配制好的冻存液重悬细胞沉淀，每支冻存管中加入 1 mL 重悬细胞液，密封后标记冻存细胞名称和冻存日期；
- (5) 将冻存管放入细胞冻存盒（浸润异丙醇）后放置于-80℃冰箱，12 h 后转入液氮罐。

2.2.1.3 病毒基因组提取

将 MDV 接种于 CEF，待细胞病变约为 70%时收取细胞，使用宝生物工程（大连）有限公司的 DNAiso Reagent 试剂盒提取 MDV 病毒基因组，具体操作如下：

- (1) 向 200 μL MDV 细胞培养物上清中加入 500 μL DNAiso Reagent，涡旋混匀，室温孵育 5 min；
- (2) 10000 r/min 离心 10 min，取上清转移至新管；
- (3) 加入 350 μL 异丙醇，12000 r/min 离心 10 min，弃上清；
- (4) 加入 1 mL 无水乙醇，7500 r/min 离心 5 min，弃上清；
- (5) 重复 (4)；
- (6) 室温静置数分钟，干燥沉淀；
- (7) 加入 50 μL 去离子水溶解沉淀，获得病毒 DNA 溶液。

取部分疑似马立克氏病病死鸡的肝组织剪碎成米粒大小的组织块后用同样的方法提取基因组的同时提取 CVI988、814、CIAV、IB、IBDV、ALV、IBH、IAV、NDV、CEF 细胞基因组。

2.2.2 引物的设计及合成

本研究依据文献调研针对 NCBI GenBank 数据库所发表的 140 余株 MDV 基因组进行全基因组分析，通过 Primer Premier 5 软件设计引物。本研究所需引物皆由武汉擎科创新生物科技有限公司合成。引物序列及 PCR 扩增长度见表 2-3。

表 2-3 引物序列
Table 2-3 Sequence of the primers

引物名称	引物序列（5'→3'）	长度（bp）			
		MDV 野毒株	CVI988/814 疫苗株	SC9-1	rMDV-MS- △meq
meq-F	ACTCCTCCACCTCCCTCACC	286	463	无条带	无条带
meq-R	GAGGGCAGAAGAGGGAATGGG				
meq-F1	AACGCTCCACATTGCTCCG	293	470		
meq-R1	GAAGATGCCCTCCGGAGATG				
meq-F2	GTTCCCAACCTCCTATCTGTA	298	475		
meq-R2	GTACACGGCTCGGTAACAGG				
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	385	562		
M13-F	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA				

2.2.3 引物的验证

本研究以 2.2.1 中提取的 MDV-I 型毒株基因组为模板，基于 2.2.2 中设计的三对引物进行 MDV PCR 检测方法的条件摸索。参考北京全式金生物技术有限公司 EasyTaq® DNA Polymerase 说明书，依据引物的退火温度设置温度梯度（58℃、60℃、62℃、64℃、66℃）进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，确定最佳退火温度，以确定最佳反应条件。扩增反应体系如表 2-4 所示，扩增反应程序如表 2-5 所示。

表 2-4 PCR 反应体系

Table 2-4 Preparation of the PCR system

System composition	Reagent dosage
10×Easy Taq Buffer	1 μL
dNTP Mixture (2.5 mmol/L each)	2 μL
Forward Primer (10 μmol/L)	2 μL
Reverse Primer (10 μmol/L)	2 μL
Template	1 μL
EasyTaq® DNA Polymerase (5 U/μl)	0.5 μL
DEPC 水	up to 25 μL

表 2-5 PCR 程序

Table 2-5 Procedure of the PCR Amplification

Time	Temperature	Cycles
95°C	5 min	} 32
95°C	30 s	
58-66°C	30 s	
72°C	1 kb/min	
72°C	10 min	
25°C	1 min	

2.2.4 MDV SYBR green I 荧光定量检测方法

2.2.4.1 MDV SYBR green I 荧光定量 PCR 标准品的制备

2.2.4.1.1 PCR 产物回收纯化

以2.2.3中确定的测序正确的野毒株条带与疫苗毒株条带为模板，按照TransTaq® DNA Polymerase说明书进行PCR扩增。扩增反应体系如表2-6所示，扩增反应程序如表2-7所示。

表 2-6 扩增 PCR 反应体系

Table 2-6 Preparation of the amplification PCR system

System composition	Reagent dosage
10×TransTaq Buffer	1 μL
dNTP Mixture (2.5 mmol/L each)	2 μL
Forward Primer (10 μmol/L)	2 μL
Reverse Primer (10 μmol/L)	2 μL
Template	1 μL
TransTaq® DNA Polymerase (5 U/μl)	0.5 μL
DEPC 水	up to 25 μL

表 2-7 PCR 程序

Table 2-7 Procedure of the PCR Amplification

Time	Temperature	Cycles
95°C	5 min	} 32
95°C	30 s	
64°C	30 s	
72°C	1 kb/min	
72°C	10 min	
25°C	1 min	

扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后进行纯化，具体操作步骤如下：

称取适量琼脂糖粉末，加入相应量的1×TAE电泳缓冲液，加热至琼脂糖完全溶解，稍微冷却后按1/10000添加GEL RED，摇匀倒入胶模中，插入相应的梳子。待凝胶完全凝固，小心拔出梳子，将凝胶放入装有1×TAE电泳缓冲液的电泳槽中，使电泳缓冲液刚好没过胶面。取适量PCR产物，加入10×DNA loading buffer，点样后以120 v的电压电泳跑胶30 min。紫外灯下切下含目的片段的琼脂糖胶。用DNA琼脂糖胶回收试剂盒回收PCR或酶切产物。具体步骤如下：

(1) 将目的产物经合适浓度琼脂糖凝胶电泳，使目的片段与其他DNA片段尽量分开。

(2) 于长波紫外灯下, 用洁净手术刀片切取含目的DNA片段的琼脂糖凝胶块, 放入2 mL EP离心管中。

(3) 加入等体积的溶胶液 (Binding Buffer), 置于55℃左右水浴10 min, 其间手指轻弹EP管, 使凝胶完全溶化。

(4) 将回收柱放入2 mL收集管中, 然后将溶化并冷却的凝胶液体转至回收柱内 (最多700 μ L), 12000 r/min, 离心1 min。

(5) 弃去滤液, 将回收柱放入同一个收集管中, 加入300 μ L溶胶液 (Binding Buffer), 室温放置1 min, 12000 r/min离心1 min。

(6) 弃去滤液, 将回收柱放入同一个收集管中, 加入600 μ L洗涤液 (Wash Buffer), 12000 r/min离心1 min。

(7) 重复操作步骤 (6);

(8) 弃去滤液, 空柱12000 r/min, 离心2 min;

(9) 将回收柱放入1.5 mL EP离心管中, 室温放置5 min使酒精挥发完全。

(10) 在柱子底部的膜中央滴加适量如 20 μ L 洗脱液 (Elution Buffer) 或去离子水, 室温放置 2 min, 12000 r/min 离心 2 min, 离心管中的液体即为回收的目的 DNA 片段, 用核酸定量测定仪检测浓度后可直接用于下一步实验或保存于-20℃备用。

2.2.4.1.2 PCR 产物与载体酶连

经回收纯化后的PCR产物与pMD18T-Vector 16℃酶连过夜, 连接反应体系如表2-8所示:

表 2-8 酶连反应体系

Table 2-8 Ligase reaction system

System composition	Reagent dosage
10×T4 DNA Ligase Buffer	2 μ L
T4 DNA Ligase (置冰上)	1 μ L
pMD18T-Vector	1 μ L(100 ng)
PCR 产物	2 μ L(400 ng)
DEPC 水	Up to 20 μ L

2.2.4.1.3 CaCl₂ 处理法制备感受态

(1) 菌种复苏：取-80℃保存的 DH5 α 菌种划线接种于 LA 平皿上，做好标记，于 37℃温箱培养过夜。挑取单菌落接种于 1 mL LB 液体培养基中，置于 37℃摇床中，200 r/min 震荡培养 10 h。

(2) 菌液扩大培养：次日将活化的菌液按 1:1000 转接到 50 mL LB 培养基中，置于 37℃摇床，160 r/min 震荡培养 3-4 h。

(3) 当 OD_{600nm}≈0.5 时，取出培养物，冰上静置 30 min。

(4) 4℃条件下，5000 r/min 离心 10 min，在无菌超净台中弃去上清，收集菌体，将管倒置于干滤纸上 1 min，吸干残留的培养液，加入 30 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬菌体，冰浴 15 min。

(5) 4℃条件下，5000 r/min 离心 10 min，在无菌超净台中弃去上清，收集菌体，加入 1 mL 预冷的含有 15%甘油的 0.1 mol/L CaCl₂，轻轻吹散，重悬菌体，冰浴 10 min。

(6) 取感受态细胞悬液 100 μ L 每管分装于 1.5 mL 预冷的灭菌离心管中，24 h 内使用效果较好。如果暂时不用，可再保存于-80℃冰箱中。

2.2.4.1.4 连接产物的转化

酶连反应结束后取 10 μ L 连接产物直接转化至 DH5 α 感受态细胞中，转化步骤如下：

(1) 取出在-80℃冰箱中保存的感受态细胞，置于冰上解冻。

(2) 待感受态细胞解冻后，无菌环境下取 10 μ L 酶连产物加入装有感受态细胞的离心管中，轻轻吹打，冰上静置 30 min。

(3) 静置结束后，将感受态在 42℃水浴锅中热激 90 s，热激结束后将离心管迅速置于冰上冷却 2 min，每管加 800 μ L LB 培养基，置于 37℃摇床，160 r/min 复苏 1 h。

(4) 将复苏后的菌液取 200 μ L 或者 5000 r/min 离心 5 min 后弃去培养基至仅剩 200 μ L，涂布含有 Amp 的 LA 琼脂平皿中。待平皿表面无明显液滴后，将平皿倒置于 37℃恒温培养箱中培养过夜。

2.2.4.1.5 质粒转化子的 PCR 鉴定

在无菌环境下挑取转化子到含有 20 μL 灭菌水的 1.5 mL EP 管中，充分吹散菌体，无菌取出 15 μL 到外开的 1.5 mL EP 管中，电磁炉水浴锅沸水中煮 10 min，使其基因组充分释放，将煮过的菌液 12000 r/min 离心 5 min，取 2.5 μL 上清至 PCR 管中用作鉴定 PCR 的模板。1.5 mL EP 中加入相应抗生素的 LB 液体培养基过夜培养用于下步实验。使用 EasyTaq® DNA Polymerase，采用 pMD18T 载体上的通用引物（M13-F、M13-R）进行 PCR 扩增鉴定，其反应体系如表 2-9 所示，反应条件如表 2-10 所示。

表 2-9 鉴定 PCR 反应体系

System composition	Reagent dosage
10×Easy Taq Buffer	2.5 μL
dNTP Mixture (2.5 mmol/L each)	1 μL
Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.5 μL
Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.5 μL
Template	2.5 μL
Easy Taq DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.5 μL
DEPC 水	up to 25 μL

表 2-10 鉴定 PCR 的反应程序

Time	Temperature	Cycles
98°C	10 min	} 32
95°C	30 s	
59°C	30 s	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
25°C	1 min	

若鉴定的转化子疑似正确，则将内开离心管中剩余的 5 μL 菌液接种到 5 mL 含有相应浓度抗生素的 LB 培养基中，37°C 震荡培养 16 h，提取质粒后送测序。

2.2.4.1.6 质粒的提取

本研究使用 TIANGE 质粒小提试剂盒提取质粒，操作步骤参考试剂盒说明书，具体步骤如下：

（1）柱平衡步骤：向吸附柱 CP3 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μL 的平衡液 BL，1200 r/min 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

（2）取 5 mL 左右过夜培养的菌液，加入离心管中，12000 r/min 离心 1 min，尽量吸除上清。

（3）向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μL 溶液 P1（请先检查是否已加入 RNaseA），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀（注意：如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低）。

（4）向离心管中加入 250 μL 溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。

（5）向离心管中加入 350 μL 溶液 P3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12000 r/min 离心 10 min（注意：P3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白沉淀，可再次离心后取上清）。

（6）将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱 CP3 中（吸附柱放入收集管中），尽量不要吸出沉淀。12000 r/min 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中。

（7）向吸附柱 CP3 中加入 600 μL 漂洗液 PW（先检查是否已加入无水乙醇），12000 r/min 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中。

（8）重复操作步骤（7）。

（9）将吸附柱 CP3 放入收集管中，12000 r/min 离心 2 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。将吸附柱 CP3 开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

（10）将吸附柱 CP3 置于一个新的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加 100 μL 预热的去离子水，室温放置 2 min，12000 r/min 离心 2 min 将质粒溶液收集到离心管中。洗脱缓冲液体积不应少于 50 mL，体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。

(11) 将得到的溶液重新加入吸附柱中, 室温放置 2 min, 12000 r/min 离心 2 min, 将质粒溶液收集到离心管中, 做好标记, 冻于-20℃冰箱。

(12) 菌种保存: 将测序正确的样品转接接到含相应抗生素的LB液体培养基中, 37℃摇床180 r/min培养过夜。无菌操作取1 mL菌液用75%的甘油至终浓度为20-25%左右保菌保存于-80℃。

将试剂盒提取好的疑似正确的重组质粒送北京擎科生物技术有限公司进行测序, 进一步确定外源片段连接正确且无突变, 若正确则进行菌种保存。

2.2.4.2 MDV SYBR green I 荧光定量检测方法的条件优化

本研究以 2.2.4.1 中确定的标准品以及 2.2.1 中提取的 CEF 基因组和 DEPC 水为模板, 采用 2.2.3 中确定的 *meq-F* 引物对, 使用 SYBR green I 在无污染环境中进行 PCR 扩增条件的优化。参考 SYBR green I 说明书, 分别采用两步法和三步法设置不同的扩增温度 (62℃、64℃、66℃、68℃) 用以摸索最优的反应程序。本研究所使用的 SYBR green I 放置于-20℃保存, 使用时需要在冰上解冻且整个过程需要避光操作。本研究反应程序均在猪警-2000 便携式荧光定量 PCR 检测设备上进行。具体反应体系如表 2-11 所示, 两步法和三步法反应程序如表 2-12 和 2-13 所示:

表 2-11 SYBR green I PCR 反应体系

Table 2-11 The reaction system of SYBR green I PCR

System composition	Reagent dosage
Template	100 ng
Forward Primer (10 μmol/L)	1.5 μL
Reverse Primer (10 μmol/L)	1.5 μL
FastStart Universal SYBR® Green Master(ROX)	10 μL
DEPC 水	up to 20 μL

表 2-12 SYBR green I PCR 的两步法反应条件

Table 2-12 The two step reaction conditions of SYBR green I PCR

Time	Temperature	Cycles
95°C	10 min	
95°C	15 s	} 45
62-68°C	30 s	
94°C	30 s	
60°C	1 min30 s	

表 2-13 SYBR green I PCR 的三步法反应条件

Table 2-13 The three step reaction conditions of SYBR green I PCR

Time	Temperature	Cycles
95°C	10 min	
95°C	15 s	} 45
62-68°C	30 s	
72°C	2 min	
94°C	30 s	
60°C	1 min30 s	

两步法反应程序在 62-68°C 时收集荧光信号，三步法反应程序在 72°C 时收集荧光信号，最后在 94°C 和 60°C 时仪器进行熔解曲线的绘制。

2.2.5 MDV PCR 检测方法的建立

以 2.2.1 中提取的 MDV-I 型毒株、CVI988、814、HVT 疫苗毒株基因组为模板，按照 2.2.3 中优化后的引物、反应体系以及反应程序进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析后送测序确定扩增是否正确，以此建立 PCR 检测方法。

2.2.6 MDV PCR 特异性实验

用 2.2.1 中提取的 MDV-I 型毒株、814 疫苗毒株、CIAV、IBV、IBDV、ALV、IBH、IAV、NDV、CEF 基因组为模板，按照 2.2.3 中优化后的引物、反应体系以及反应程序进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，评估其特异性。

2.2.7 MDV PCR 敏感性实验

将 2.2.1 中提取的 MDV-I 型毒株、814 疫苗毒株、CEF 基因组进行核酸定量，调整至终浓度为 10 ng/ μ L 后，做 10 倍比稀释，连续稀释 5 个梯度为模板（10 ng/ μ L、1 ng/ μ L、0.1 ng/ μ L、0.01 ng/ μ L、0.001 ng/ μ L），按照 2.2.3 中优化后的引物、反应体系以及反应程序进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，评估其敏感性。

2.2.8 MDV PCR 重复性实验

以 2.2.1 中的 MDV-I 型毒株、CVI988、814 疫苗毒株、CEF 基因组为模板，每个模板设置 3 次重复，按照 2.2.3 中优化后的引物、反应体系以及反应程序进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，对其稳定性进行评估。

2.2.9 MDV PCR 符合率实验

按照 2.2.1 中的方法，对湖北某种鸡场提供的 23 例临床病料进行病毒基因组总 DNA 的提取，其中样品的阴性以及阳性结果经武汉科前生物有限公司判定。分别以上述临床病料为模板，按照 2.2.3 中优化后的引物、反应体系以及反应程序进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，进而评估本研究建立的 PCR 检测方法的符合率。

2.2.10 对 MD 免疫失败鸡的诊断

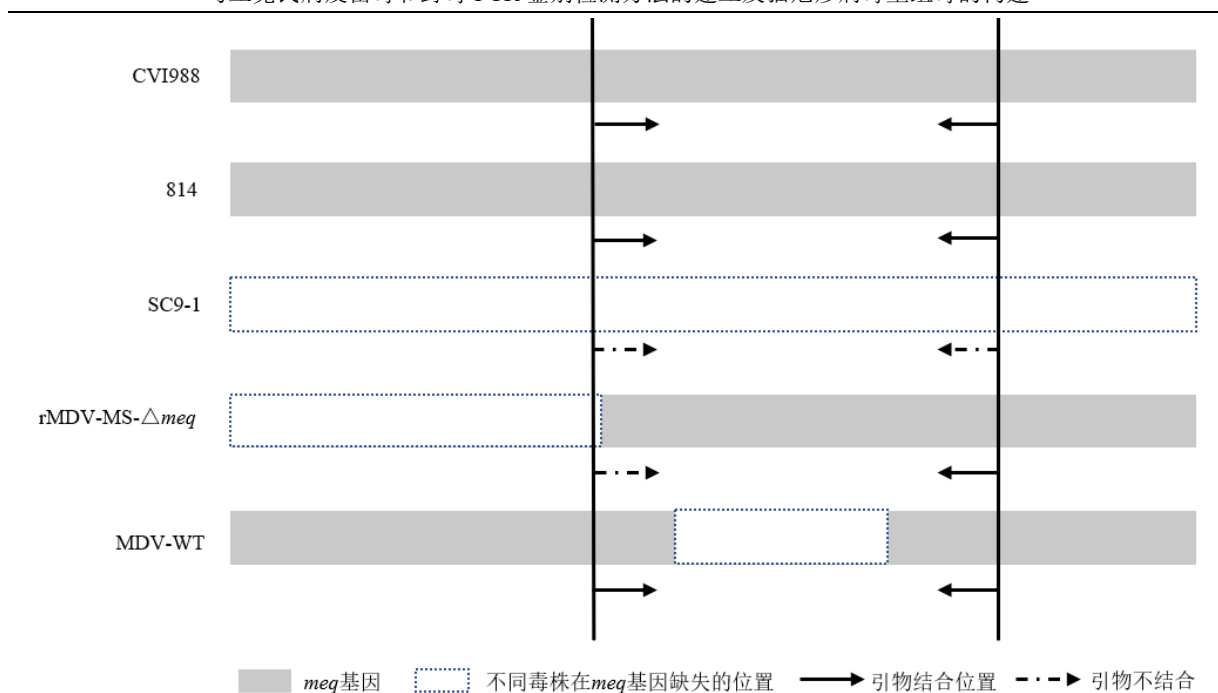
湖南某地白羽种鸡场中某三周龄鸡表现出单侧腿部着地、站立不稳、突然死亡等疑似 MD 的初期症状，但是由于该鸡于 1 日龄接种了马立克氏病疫苗，尚不确定该病死鸡的突然死亡是由 MD 野毒还是疫苗毒引起的，因此提取该病死鸡羽毛囊上皮细胞以及肝

组织样品利用本研究建立的 PCR 检测方法对其进行诊断。按照 2.2.1 中的方法进行羽毛囊上皮细胞以及肝组织样品基因组总 DNA。分别以 MDV-I 型毒株、814 疫苗毒株、疑似马立克氏病病死鸡组织基因组、CEF 基因组为模板，按照 2.2.3 中优化后的引物、反应体系以及反应程序进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析后送测序判断检测结果。

2.3 结果与分析

2.3.1 区分 MD 野毒和疫苗毒的基因序列的筛选

MDV 根据其 DNA 序列同源性和基因组结构相似性被归属于 α 疱疹病毒亚科，基因组长度约为 180 kb，编码约 100 个基因，其中编码衣壳蛋白、被膜蛋白、磷酸化蛋白、糖蛋白的基因均与 α 疱疹病毒科基因具有高度同源性，例如 ICP4、ICP22、gB、gC、gD、gH、gL、gM 等。MDV 编码致瘤性的基因只存在于 MDV-I 型毒株中，包括主要致瘤基因 *meq*、*vTR*，以及间接致瘤基因 *vIL-8*、*pp38*、1.8 kb 家族等。*meq* 基因是 MDV 所特有的且在不同毒力毒株中高度保守。基于此，本研究针对 NCBI GenBank 数据库所发表的 140 余株 MDV 全基因组序列进行比对分析发现，自然致弱毒株 CVI988 与 814 疫苗株相较于野毒株在 *meq* 基因位置有差异，有 177 bp 的碱基插入，新研发的疫苗株 SC9-1 与野毒株相比缺失了 *meq* 基因，rMDV-MS- Δ *meq* 相较于野毒缺失了 *meq* 基因的前半部分的 468 bp 的碱基序列，比对结果如图 2-1 示意图简要表示。

图 2-1 MDV 野毒和疫苗毒 *meq* 基因的引物结合位置Fig.2-1 Primer binding position of *meq* gene between MDV wild virus and vaccine virus

2.3.2 引物的筛选验证

以 MDV-I 毒株、814 疫苗毒株为模板，以 *meq*-F、*meq*-F1、*meq*-F2 三对引物对，按照 EasyTaq DNA Polymerase 扩增体系说明书，分别设置不同温度（58℃、60℃、62℃、64℃、66℃）进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，以确定最佳退火温度。结果表明，当采用 *meq*-F 引物对以退火温度为 64℃ 时，MDV-I 毒株基因组扩增出与预期条带相符的 286 bp 大小的条带，814 疫苗毒株基因组扩增出与预期条带相符的 486 bp 大小的条带，且扩增特异性好，条带亮度强，如图 2-2 所示。分别将以上扩增出的最佳条带切胶送测序，测序结果表明 MDV-I 野毒株、疫苗株序列均与 NCBI 上的参考序列一致，如图 2-3 和 2-4 所示。

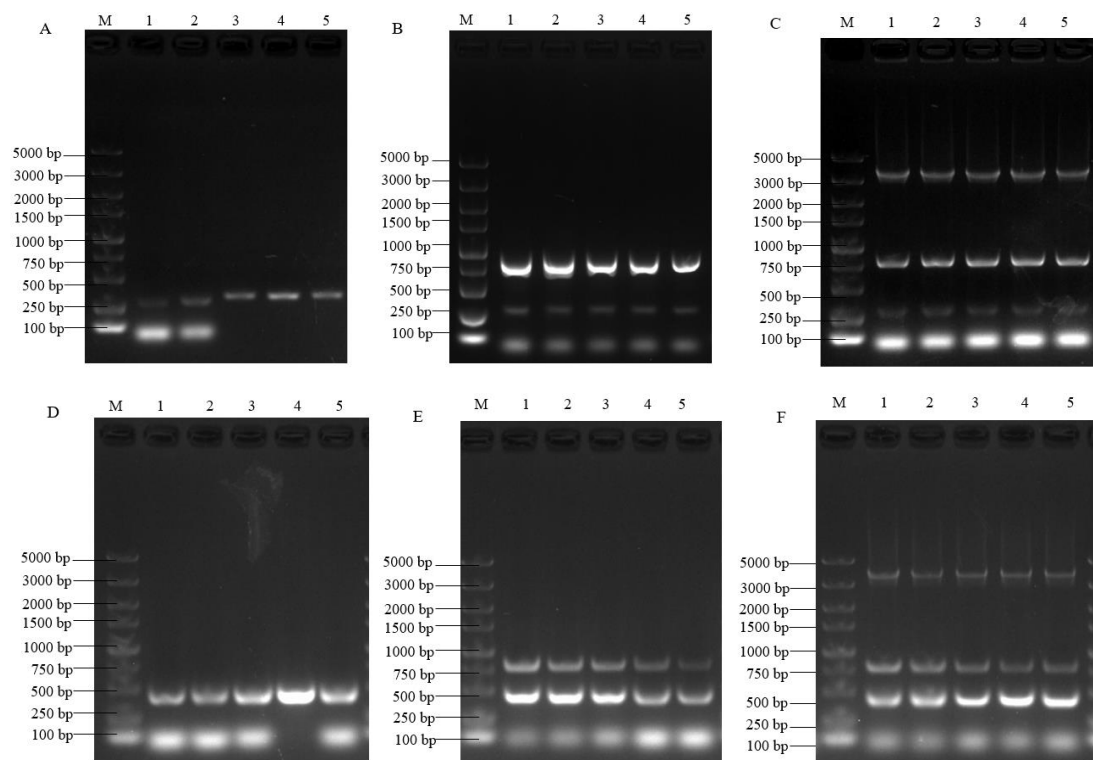


图 2-2 引物的验证

Fig.2-2 Primer validation

M: DL5000 marker; A,B,C: MDV-I 毒株, 分别以 *meq*-F、*meq*-F1、*meq*-F2 引物对按照 58℃、60℃、62℃、64℃、66℃进行扩增; D,E,F: 814 疫苗毒株, 分别以 *meq*-F、*meq*-F1、*meq*-F2 引物对按照 58℃、60℃、62℃、64℃、66℃进行扩增

```

1      ACTCCTCCACCTCCCTCACCGGATGAACCTAACGCTCCACATTGCTCCGGTTCCCAACCT
1      .....GAATATCTTGCTCCGGTTCC.AACCT

61     CCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATACGGAGGAACCTTTCGCGCCAGCTCTGCTCGACC
26     CCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATACGGAGGAACCTTTCGCGCCAGCTCTGCTCGACC

121    CCACCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA
86     CCACCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA

181    CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTCGCGCCAGCTCTGCTCG
146    CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTCGCGCCAGCTCTGCTCG

241    ACCCCACACCTCCCATCTGTACTCCCCATTCCCTCTTCTGCCCTC
206    ACCCCACACCTCCCATCTGTACTCCCCATTCCCTCTTCTGCCCTC
    
```

图 2-3 MDV-I测序结果

Fig.2-3 Sequence Results of the MDV-I

上述比对序列中 1-418 为 NCBI MDV-I型毒株序列, 上述比对序列中 1-388 为测序结果

```

1      ACTCCTCCACCTCCCTCACCGGATGAACCTAACGCTCCACATTGCTCCGGTTCCCAACCT
      || | | | | ||||| |||||
1      .....CGATTCTAATTGCTCGGTTCC.AACCT
61     CCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATACGGAGGAACTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACC
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
28     CCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATACGGAGGAACTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACC
121    CCACC...TCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
88     CCACCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA
178    CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCG
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
148    CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCG
238    ACCCCACACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTTTCTACGCTCCGGGGCTCTGCTCGACC
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
208    ACCCCACACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTTTCTACGCTCCGGGGCTCTGCTCGACC
298    CCACCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
268    CCACCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA
358    CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCG
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
328    CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCG
418    ACCCCACACCTCCCATCTGTACTCCCCATTCCCTCTTCTGCCCTC..
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
388    ACCCCACACCTCCCATCTGTACTCCCCATTCCCTCTTCTGCCCTCAA

```

图 2-4 MDV 疫苗毒株测序结果

Fig.2-4 Sequence Results of the MDV Vaccine virus

上述比对序列中 1-418 为 NCBI 疫苗毒株序列，上述比对序列中 1-388 为测序结果

2.3.3 MDV SYBR green I 荧光定量检测方法

2.3.3.1 MDV 标准品的制备

2.3.3.1.1 野毒和疫苗毒株模板的扩增

以 2.3.2 中确定的测序正确的野毒株条带与疫苗毒株条带为模板，以 *meq-F* 和 *meq-R* 为引物进行 PCR 扩增，扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明，野毒和疫苗毒分别扩增到了与预期相符合的 286 bp 和 463 bp 大小的条带。表明野毒和疫苗毒片段扩增成功，如图 2-5 所示。

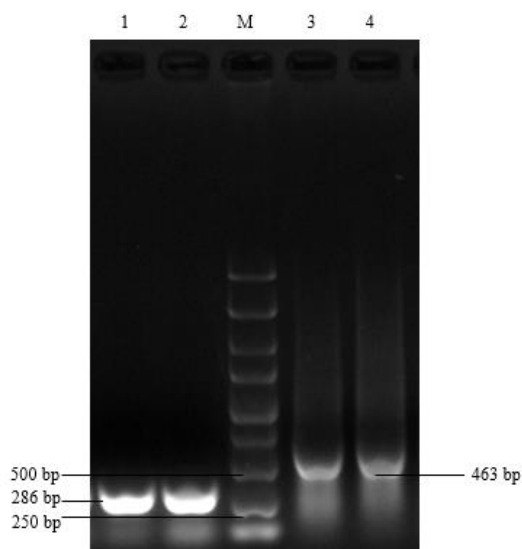


图 2-5 野毒和疫苗毒的扩增

Fig.2-5 Amplification of wild and vaccine viruses

M: DL5000 marker; 1-2: 野毒产物扩增; 3-4: 疫苗毒产物扩增

2.3.3.1.2 质粒的鉴定

使用通用载体引物（M13-F、M13-R）对转化子进行 PCR 鉴定。结果表明，野毒和疫苗毒分别扩增到了与预期相符合的 385 bp 和 562 bp 大小的条带，将疑似正确的条带送测序进行验证，测序结果表明与 NCBI 数据库提供的序列以及 PCR 扩增序列完全一致。表明野毒和疫苗毒的标准品制备完成，如图 2-6 所示。

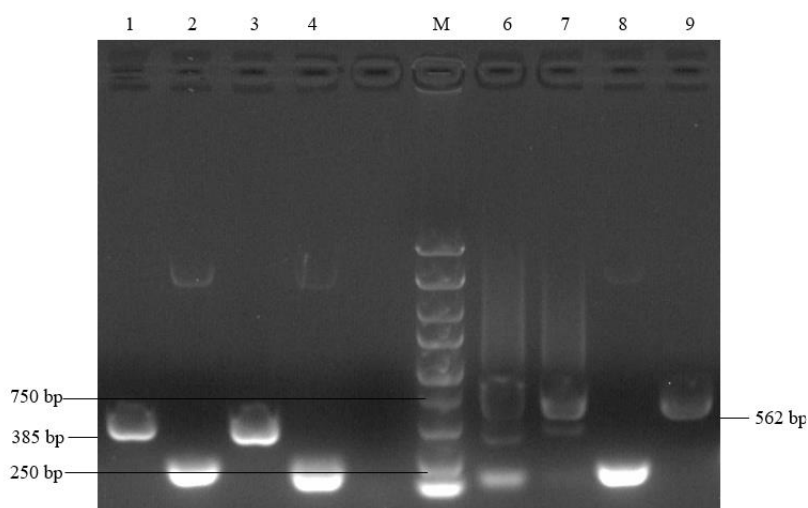


图 2-6 野毒和疫苗毒转化子的 PCR 鉴定结果

Fig.2-6 PCR identification results of wild virus and vaccine virus transformants

M: DL5000 marker; 1-4: 野毒转化子挑取克隆; 6-9: 疫苗毒转化子挑取克隆

2.3.3.2 MDV SYBR green I 荧光定量检测方法的条件优化

以 2.3.3.1 中确定的标准品以及 2.2.1 中提取的 CEF 基因组和 DEPC 水为模板，以 *meq-F* 和 *meq-R* 为引物，使用 SYBR green I 在无污染环境中进行两步法和三步法的 PCR 扩增。结果表明：使用三步法反应程序时，不同温度条件下，DEPC 水阴性对照均成立。但是以 CEF 基因组为模板的阴性对照组一直有所扩增，因此也无法通过 T_m 值的差异对野毒和疫苗毒进行区分，结果如图 2-7 所示。使用两步法反应程序时，不同温度条件下，DEPC 水阴性对照均成立。但是 60℃ 时，以 CEF 基因组为模板的 PCR 反应有明显的扩增，随着扩增时退火温度的升高，虽然该反应可以消除，但是野毒株和疫苗毒株标准品的 T_m 值没有明显差别，无法通过 T_m 值的差异对野毒和疫苗毒进行区分，如图 2-8 所示。

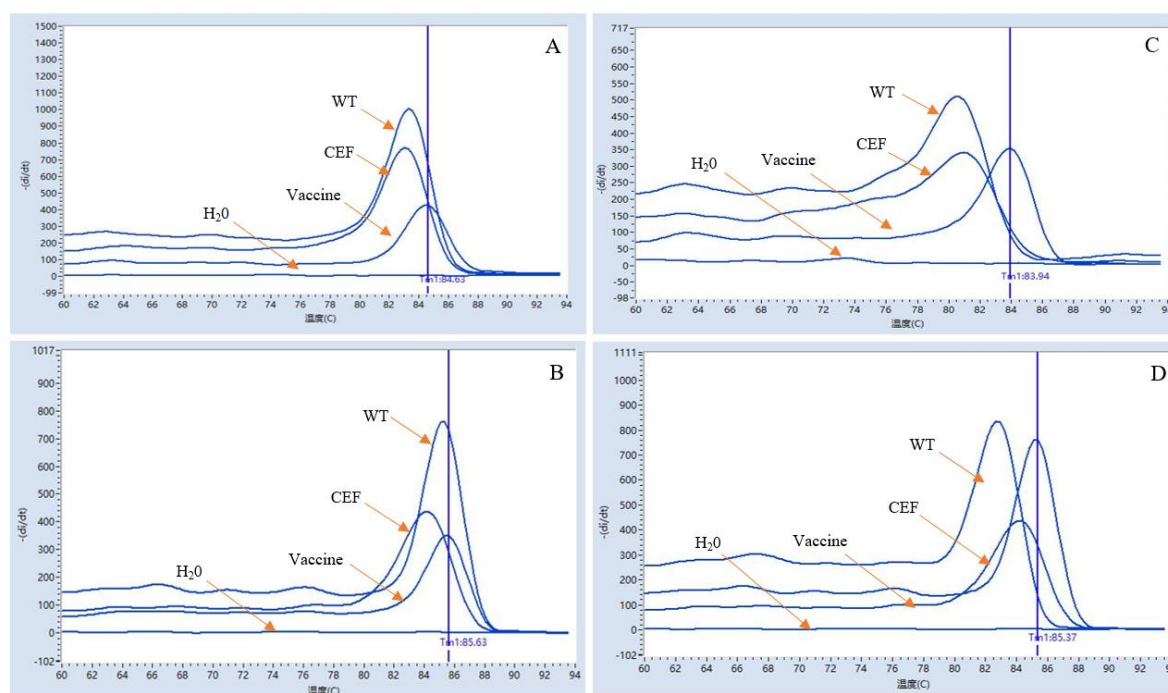


图 2-7 三步法熔解曲线

Fig.2-7 Three step melting curve

A-D: 温度依次是 62℃、64℃、66℃、68℃

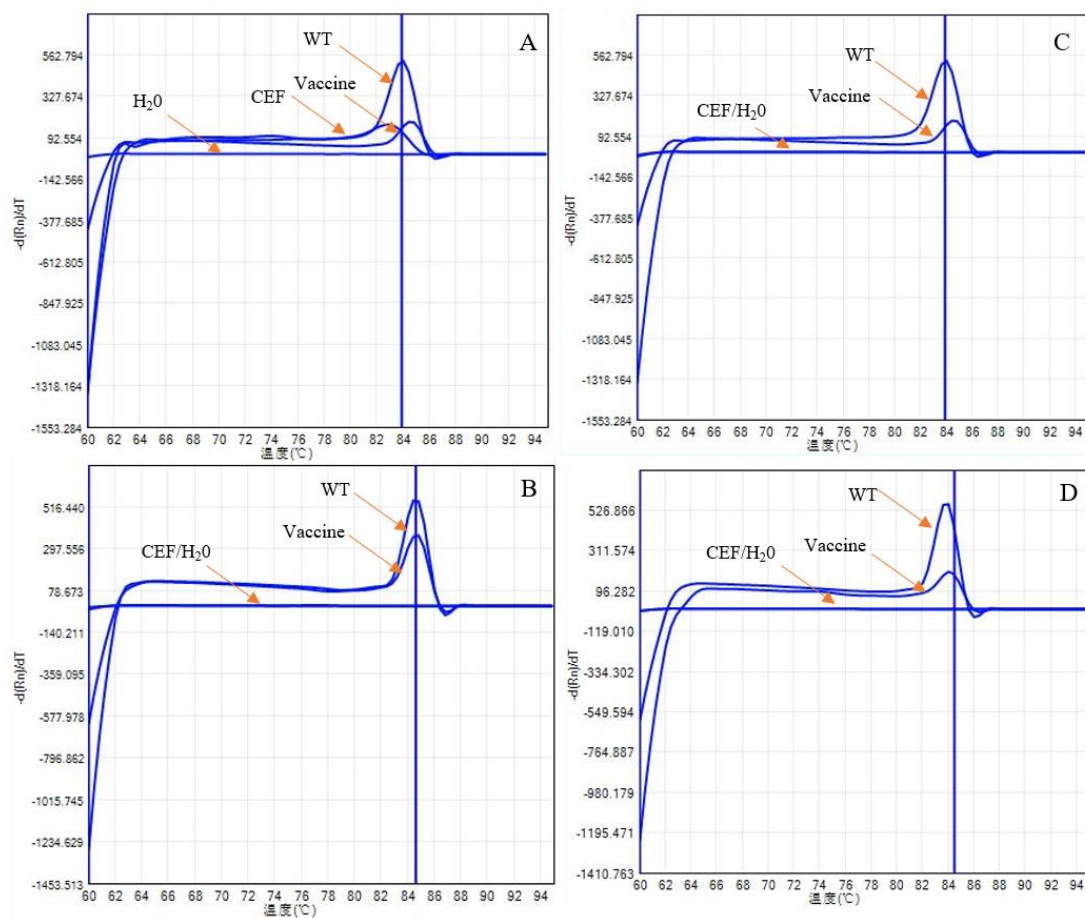


图 2-8 两步法溶解曲线

Fig.2-8 Two step melting curve

A-D: 温度依次是 62°C、64°C、66°C、68°C

2.3.4 MDV PCR 检测方法的建立

以 MDV-I 型毒株、CVI988、814、HVT 疫苗毒株为模板，以 *meq-F* 和 *meq-R* 为引物，通过优化的 PCR 条件，设置 35 个循环数，进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离。结果显示，MDV-I 型毒株基因组扩增出与预期条带相符的 286 bp 大小的条带，CVI988、814 疫苗毒株扩增出与预期条带相符的 463 bp 大小的条带，HVT 疫苗毒株未扩增出相应条带，如图 2-9 所示。

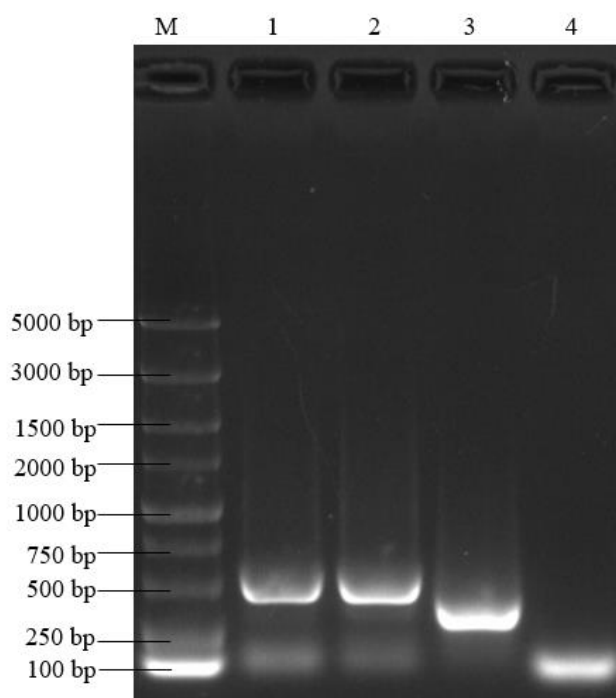


图 2-9 MDV PCR 诊断方法

Fig.2-9 Diagnostic method of the PCR for MDV

M: DL5000 marker; 1: 814; 2: CVI988; 3: MDV-I; 4: HVT

2.3.5 MDV PCR 特异性实验结果

以 MDV-I 型毒株、814 疫苗毒株、CIAV、IB、IBDV、ALV、IBH、IAV、NDV、CEF 基因组为模板，以 *meq-F* 和 *meq-R* 为引物，通过优化的 PCR 条件，进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离。结果表明，MDV-I 型毒株基因组扩增出与预期大小相符的 286 bp 大小的条带，CVI988、814 疫苗毒株扩增出与预期大小相符的 463 bp 大小的条带，而 CIAV、IB、IBDV、ALV、IBH、IAV、NDV、CEF 均未扩增出条带，如图 2-10 所示，表明本研究所建立的 PCR 方法能够特异性扩增 MDV-I 型毒株和疫苗毒株，并对二者进行区分。

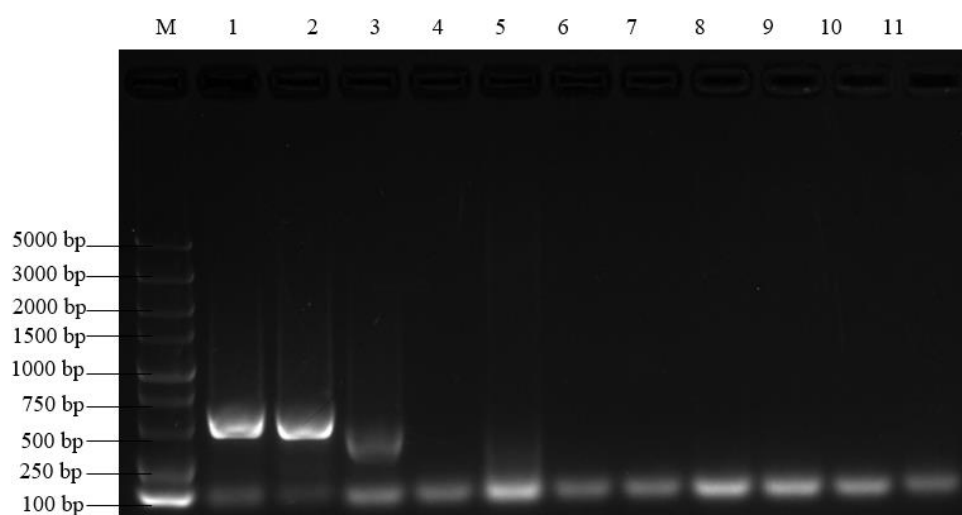


图 2-10 MDV PCR 检测特异性实验结果

Fig.2-10 Specificity test of the PCR for MDV

M: DL5000 marker; 1: CVI988; 2: 814; 3: MDV-I; 4: IBH; 5: CIAV; 6: ALV; 7: IBV;

8: IBDV; 9: AIV; 10: NDV; 11: 阴性对照 (CEF)

2.3.6 MDV PCR 敏感性实验结果

以 MDV-I 型毒株基因组、814 疫苗毒株（终浓度为 $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ）10 倍比连续稀释 5 个梯度（ $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $0.01 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $0.001 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ）以及 CEF 基因组为模板，以 *meq-F* 和 *meq-R* 为引物，通过优化后的 PCR 条件，进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离。结果表明，以 MDV-I 型毒株基因组 PCR 扩增为模板的检测下限为 $0.01 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，以 814 疫苗毒株基因组 PCR 扩增为模板的检测下限为 $0.01 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，如图 2-11 和 2-12 所示。表明本研究所建立的 PCR 方法敏感性良好，适用于 MDV 检测。

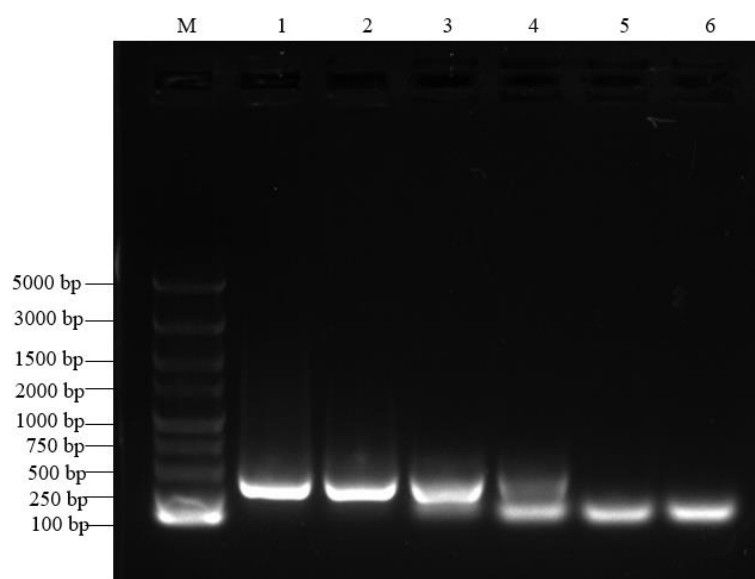


图 2-11 MDV-I PCR 检测敏感性实验结果

Fig.2-11 Sensitivity test of the PCR for MDV-I

M: DL5000 marker; 1: 10 ng; 2: 1 ng; 3: 0.1 ng; 4: 0.01 ng; 5: 0.001 ng;

6: 阴性对照 (CEF)

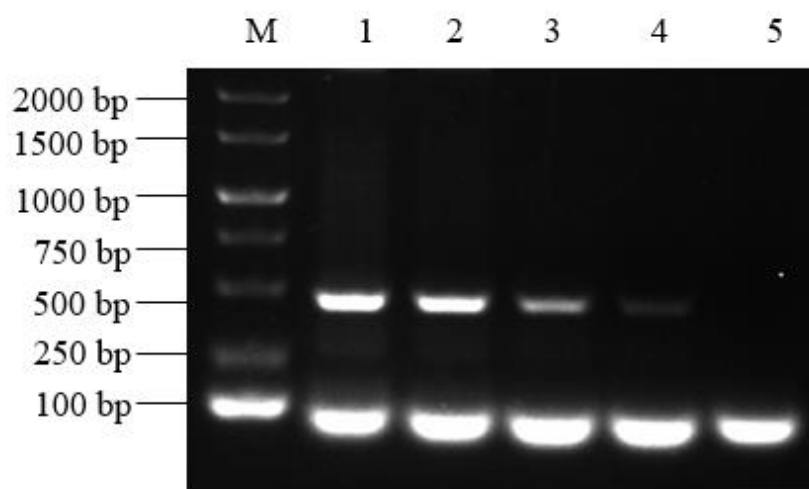


图 2-12 814 PCR 检测敏感性实验结果

Fig.2-12 Sensitivity test of the PCR for 814

M: DL2000 marker; 1: 10 ng; 2: 1 ng; 3: 0.1 ng; 4: 0.01 ng; 5: 0.001 ng

2.3.7 MDV PCR 重复性实验结果

以 MDV-I 型毒株、CVI988、814 疫苗毒株、CEF 基因组为模板，以 *meq-F* 和 *meq-R* 为引物，通过优化后的 PCR 条件，进行 3 次重复实验，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳

分离。结果表明,3 次实验结果高度一致且均扩增出与预期相符的条带,如图 2-13 所示,表明本研究所建立的 PCR 方法存在良好的重复性,扩增结果稳定。

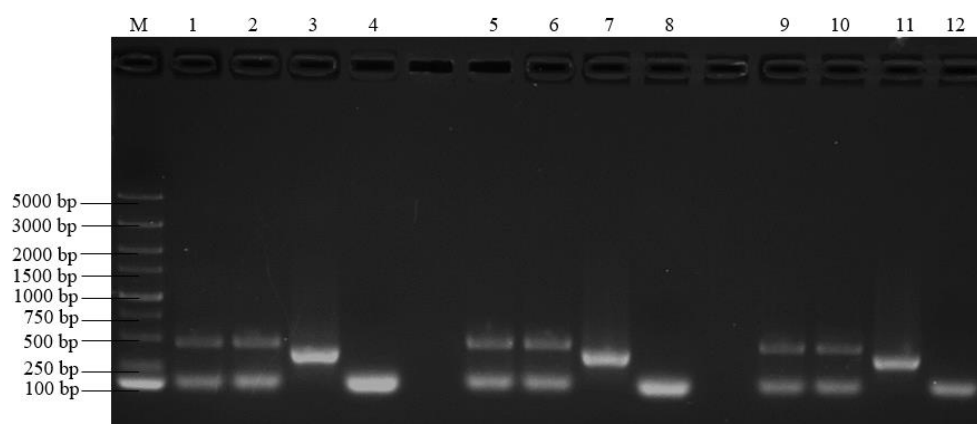


图 2-13 MDV PCR 检测重复性实验结果

Fig.2-13 Repetitive test of the PCR for MDV

M: DL5000 marker; 1、5、9: 814; 2、6、10: CVI988; 3、7、11: MDV-I; 4、8、12: 阴性对照 (CEF)

2.3.8 MDV PCR 符合率实验结果

以 2.2.9 中的 23 例临床病料的核酸为模板,以 *meq-F* 和 *meq-R* 为引物,通过优化后的 PCR 条件,进行 PCR 扩增,扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳分离。结果表明,在 23 例临床病料中有 12 例是 MDV-I 感染的病死鸡,临床符合率一致。从凝胶电泳分析,不同病料的扩增强度有所差异,这可能是因为不同鸡只感染 MDV-I 的程度不同或者是混合感染了其他病毒致使感染鸡死亡,检测结果如图 2-14 所示。

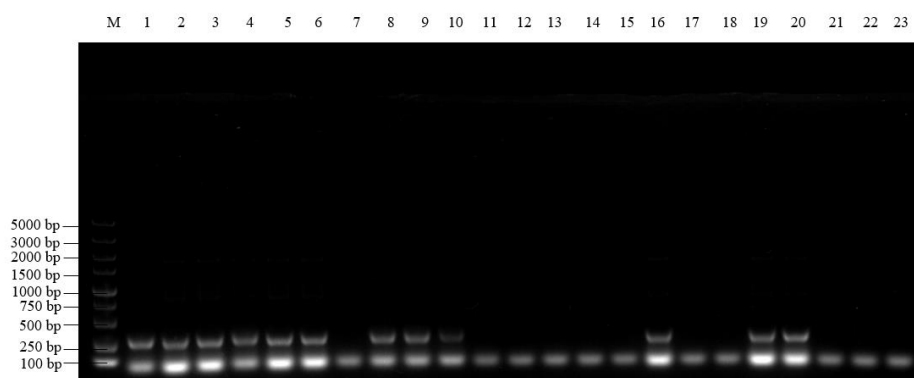


图 2-14 MDV PCR 符合率实验结果

Fig.2-14 Coincidence rate experimental results

M: DL5000 marker; 1-23: 临床样品检测

2.3.9 对 MD 免疫失败鸡的诊断结果

提取该病死鸡羽毛囊上皮细胞基因组后，以 MDV-I 型毒株、814 疫苗毒株、疑似 MD 病死鸡基因组、CEF 基因组为模板，以 *meq-F* 和 *meq-R* 为引物，通过优化后的 PCR 条件，进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离。结果表明，该病死鸡基因组可以扩增到分别与野毒株：286 bp 和疫苗毒株：463 bp 大小符合的条带，如图 2-15 所示。测序结果表明扩增序列与 2.3.2 中 MDV-I 型毒株和疫苗毒株的序列相一致，确诊该病死鸡为免疫失败的鸡，如图 2-16 和图 2-17 所示。

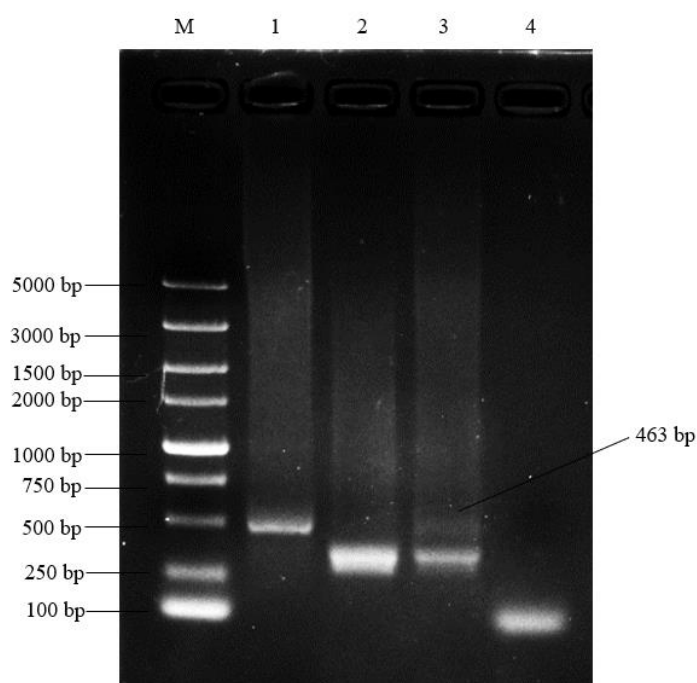


图 2-15 MD 免疫失败鸡的诊断结果

Fig.2-15 Diagnostic results of MD immune failure chickens

M: DL5000 marker; 1: 814; 2: MDV-I; 3: 病死鸡基因组; 4: 阴性对照 (CEF)

```

1   ACTCCTCCACCTCCCTCACC GGATGAACCTAACGCTCCACATTGCTCCGGTTCCCAACCT
      | | | | | | | | | | | | | |
1   .....GAATATCTTGCTCCGGTTCC.AACCT

61  CCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATACGGAGGAACTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
26  CCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATACGGAGGAACTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACC

121 CCACCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
86  CCACCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA

181 CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCG
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
146 CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCG

241 ACCCCACACCTCCCATCTGTACTCCCCATTCCCTCTTCTGCCCTC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
206 ACCCCACACCTCCCATCTGTACTCCCCATTCCCTCTTCTGCCCTC
    
```

图 2-16 MDV-I 测序结果

Fig.2-16 Sequencing Results of the MDV-I

上述比对序列中 1-418 为 NCBI MDV-I 型毒株序列，上述比对序列中 1-388 为测序结果

```

1   ACTCCTCCACCTCCCTCACC GGATGAACCTAACGCTCCACATTGCTCCGGTTCCCAACCT
      | | | | | | | | | | | | | |
1   .....CGAATCCTAATTGCTCGGTTCC.AACCT

61  CCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATACGGAGGAACTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
28  CCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATACGGAGGAACTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACC

121 CCACC...TCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
88  CCACCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA

178 CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCG
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
148 CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCG

238 ACCCCACACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTTTCTACGCTCCGGGGCTCTGCTCGACC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
208 ACCCCACACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTTTCTACGCTCCGGGGCTCTGCTCGACC

298 CCACCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
268 CCACCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAA

358 CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCG
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
328 CCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCG

418 ACCCCACACCTCCCATCTGTACTCCCCATTCCCTCTTCTGCCCTC..
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
388 ACCCCACACCTCCCATCTGTACTCCCCATTCCCTCTTCTGCCCTCAA
    
```

图 2-17 MDV-I 测序结果

Fig.2-17 Sequencing Results of the MDV-I

上述比对序列中 1-418 为 NCBI 疫苗毒株序列，上述比对序列中 1-388 为测序结果

2.4 讨论

2.4.1 MD 疫苗毒和野毒 PCR 鉴别检测方法建立的必要性

从MDV的流行趋势来看, MDV在不断的变异, 其毒力也在不断增强, 而在未来其毒力还可能会进一步增强。为研制出预防马立克氏病毒超强毒株的疫苗, Su等(Su et al 2015)构建了 meq 基因缺失株GX0101 Δmeq , 并且通过筛选获得了具有良好复制能力以及在一定程度上能够有效控制超强MDV的SC9-1候选疫苗株。刘长军等分别通过两次同源重组构建了 meq 基因缺失中间体病毒株rMDV-MS- Δmeq , 在该研究中构建的重组病毒同样具有良好的免疫保护效力。而目前市场上广泛采用的CVI988和814疫苗毒株在最近几年频繁出现了免疫失败的情况(Shi et al 2020b), 免疫后的鸡只也有极大可能会感染野毒, 导致鸡只野毒和疫苗毒混合感染, 而混合感染的病毒在存活的鸡只体内重组可能会诱发毒力更强的毒株出现。新研发的疫苗能有效防止超强毒力毒株的感染, 但是目前尚未有新的检测方法用以区分新研发的疫苗毒以及野毒, 因此及时、准确的诊断MD并对MDV-I型毒株和疫苗毒株进行区分是至关重要的。

MD 疫苗免疫失败的原因不仅是近几年 MDV 毒株毒力增强, 还可能存在的原因是雏鸡早期感染 CIAV、禽网织内皮组织增生症病毒 (REV) 等免疫抑制病破坏鸡群的免疫功能。马立克氏病感染鸡群常常和 ALV、CIAV、REV 等共同感染(Sun et al 2017), CIAV 和 REV 都可以抑制 MD 疫苗的免疫应答, 使 MDV 在感染鸡体内不断增殖(Zhang et al 2017), 导致 MD 的严重性和影响性进一步扩大。因此, 能够特异性的诊断 MD 对于 MD 的防控是必不可少的。

为了能及时诊断 MD 并对 MD 疫苗毒和野毒进行区分, 避免对养殖业造成无法估量的重创, 本研究建立了能够区分 MDV-I型毒株和现有的 CVI988、814 疫苗毒株以及 SC9-1 等新研发的疫苗株的 PCR 检测方法, 该方法不仅能够区分有潜在应用意义的 SC9-1 疫苗株和 rMd5 Δmeq 基因缺失疫苗株, 且能够特异性扩增 MDV-I型毒株和疫苗毒株, 为鸡群净化 MD 提供了技术支持。

2.4.2 MDV SYBR green I 荧光定量 PCR 检测方法不成立的原因分析

本研究旨在建立用于区分 MDV-I 以及 CVI988、814 疫苗株以及 SC9-1 等新研发的疫苗株的 PCR 检测方法, 尝试利用 SYBR green I 实时荧光定量检测方法, 通过野毒和疫苗毒熔解曲线的 T_m 值差异达到检测并区分 MD 疫苗株以及野毒的目的, 但是结果并不理想, 考虑原因可能有以下几点。

本研究参考 FastStart Universal SYBR® Green Master(ROX)说明书, 分别采用两步法和三步法反应程序, 设置不同的退火温度用以摸索最佳扩增条件。结果表明, 在阴性对照 (DEPC 水) 成立的条件下, 当采用两步法反应程序进行扩增时, 虽然随着温度升高可以消除阴性对照 (CEF) 非特异性反应扩增带来的影响, 但是无法从野毒和疫苗毒熔解曲线的 T_m 值的差异来对两者进行区分, 这可能是由于 PCR 产物长度或是 GC 含量的影响导致的。当采用三步法反应程序进行扩增时, 始终无法随着温度升高来消除阴性对照 (CEF) 扩增带来的影响, 故而也无法对野毒和疫苗毒进行区分。利用 SYBR green I 实时荧光定量检测始终会面临的问题是该染料可以与任一 dsDNA 分子相结合, 因此一旦有引物二聚体形成或是有非特异性扩增都会观察到曲线扩增。阴性对照 (CEF) 中的非特异性反应持续存在甚至始终无法消除, 这可能是由于在条件摸索中发生非特异性反应而产生 dsDNA 分子, 导致 SYBR green I 荧光染料非特异性结合进而无法使对照成立。基于此, 利用 SYBR green I 荧光染料并无法对 MD 疫苗毒和野毒进行诊断以及区分。

2.4.3 MD 疫苗毒和野毒 PCR 鉴别检测方法建立的优势与不足

本研究通过对 NCBI GenBank 数据库中 140 余株 MD 毒株的全基因组序列比对分析, 确定 CVI988、814 疫苗毒株的 *meq* 基因相较于 MDV-I 型毒株插入了 177 bp 的碱基 (Zhang et al 2012), 新型疫苗毒株 SC9-1 序列和野毒株序列相比缺失了 *meq* 基因, 而 rMDV-MS- Δ *meq* 则缺失了 *meq* 基因的前半部分的 468 bp 的碱基序列。基于此设计三对引物并通过优化条件确定扩增效果较好的 *meq*-F 引物对。本研究建立了区分 MDV-I 以及 CVI988 和 814 疫苗株以及新型疫苗株的 PCR 检测方法。该方法以 MDV-I 毒株为模板可扩增出与预期大小符合的 286 bp 的片段, 以 CVI988、814 疫苗毒株为模板可扩增出与预期大小符合的 463 bp 的片段, 从而诊断出 MDV-I 型同时区分 MDV-I 型和疫苗毒株。将 MDV-I 毒株、CVI988、814

疫苗毒株与禽类其他疾病病原（例如CIAV、IBV、IBDV等）进行特异性分析，其他病原均未有非特异性扩增，表明本研究建立的PCR鉴别检测方法特异性好。分别以MDV-I毒株、814疫苗毒株为模板进行灵敏度测试，两株毒的PCR检测下限均可达到0.01 ng/ μ L,表明该检测方法灵敏度良好。分别以MDV-I毒株、CVI988、814疫苗毒株为模板进行重复性实验，3次实验结果具有高度一致性，表明该检测方法扩增效果稳定。将该方法应用于接种过疫苗但有疑似MD感染症状的病死鸡的诊断，并将PCR扩增后的片段送测序以验证该方法的正确性，测序结果表明PCR扩增出的片段分别与相应的MDV-I毒株和野毒株序列相一致，确诊该病死鸡确实是由于免疫失败造成的死亡。本研究建立的MDV PCR诊断方法不仅可以诊断出MDV-I型毒株而且可以区分MDV-I型毒株和CVI988、814疫苗毒以及SC9-1等新研发的疫苗毒，将该方法应用于临床实践中可以及时对鸡群进行MD防控，保障养禽业的健康发展。

张颖(张颖等 2007)和Baigent等(Baigent et al 2005)均采用TaqMan探针双重荧光定量PCR方法来检测MDV，值得注意的是，探针法往往需要样本与探针序列的高度匹配率，因此探针法易造成假阴性结果，导致漏检错检，影响该病的及时发现，而且探针法成本较高。本研究建立的检测方法针对MDV的*meq*基因的保守区，且特异性较好，对相关禽病均无扩增反应，更为简便，快速有效且费用低廉。程洋(程洋等 2013)等人则采用的是另一种荧光染料SYBR Green I用以诊断MDV野毒，对比而言，本研究建立的PCR检测方法不仅能够诊断MDV，还能用以区分MDV野毒以及CVI988、814疫苗毒株乃至新型疫苗毒株。本研究也尝试采用该检测技术用以鉴别MDV和疫苗毒，但是无法规避该染料自身的副作用。吕红超(吕红超等 2016)等人采用常规PCR检测方法鉴别MD的强弱病毒株，但是其中一对引物扩增产生较多非特异性反应。本研究建立的检测方法依据*meq*基因序列的差异性不仅可以用于区分MD疫苗株以及野毒株，还能够区分具有潜在应用意义的新型疫苗毒株。

本研究建立的PCR鉴别检测方法虽然能够简单有效的区分MDV野毒和疫苗毒，但是存在潜在的分子污染的可能性，且常规PCR检测方法无法即时可视化检测结果，需要扩增后通过凝胶电泳分析获得。

2.5 小结

本研究最终建立了区分 MD 野毒与 CVI988、814 疫苗毒以及新研发的 SC9-1、rMDV-MS- Δmeq 等疫苗毒株的 PCR 检测方法,该方法特异性好、敏感性良好、扩增效果稳定,并将其进行了初步应用。

第三章 猫疱疹病毒重组毒的构建

3.1 实验材料

3.1.1 细胞株，病毒株与质粒

表达 Cas9 蛋白的猫肾传代细胞系 (Crandell Reese Feline Kidney, CRFK) CRFK-Cas9, 293FT 细胞由本实验室保存。

猫疱疹病毒 (FHV-I) 由本实验室分离并保存。

pMD2.G(#12259), psPAX2(#12260), Lenti-Guide-Puro(#52963)由本实验室保存。

pHA2 质粒由华中农业大学动物科学技术学院动物医学院刘正飞教授馈赠。

3.1.2 主要引物

本研究主要引物见表 3-1。

表 3-1 引物序列

Table 3-1 Sequence of the primers

引物名称	引物序列 (5'→3')	长度 (bp)
pHA2-gGLarm-F	TCGCTGGAAAGCTTAACTCGCCTTCATAAGCCATC	2524
pHA2-gGLarm-R	CCTTAATTAAGGTAAGAAGGATGAATGCTATTGTGGA	
pHA2-gGRarm-F	TTAATTAAAGTCTCATATG	2226
pHA2-gGRarm-R	AAGCTTTCCAGCGATGTTCAATAAGTGT	
pHA2-JD-F	TGAGCAAAGACCCCAACGAG	5479
pHA2-JD-R	CAGTCGGCTTGCGAGTTTAC	
TK-JD-F	TGCTATACTGGCGTAGTCTCT	427
TK-JD-R	TCTATCTGTTCTCCGGTTCTT	
repE-JD-F	AACAGCGGTTATCAATCACAAGA	450
repE-JD-R	TCACTAAGCCGAAACTGCGTAAA	
rFHV-BAC-LJD-F	GTTTTCTCCCATCTCTCCC	3724

rFHV-BAC-LJD-R	TTTCGTCTCAGCCAATCCCT	
rFHV-BAC-RJD-F	CCTCCCCCTGAACCTGAAAC	
rFHV-BAC-RJD-R	GAACCTGGGCATAAAACCTTCTACA	3184
FHV-gG-sgRNA-F	CCATACGCTTCGAAGGTCTAACC	
FHV-gG-sgRNA-R	GGTTAGACCTTCGAAGCGTATGG	
Lenti-puro-JD-F	ATACGATACAAGGCTGTTAGAGAG	
Lenti-puro-JD-R	CTGTCCCTGTAATAAACCCGAAAA	450

3.1.3 主要实验仪器与设备

本研究使用的仪器设备如表 3-2 所示，部分参考第二章 2.1.2。

表 3-2 主要实验仪器及设备

Table 3-2 Main test instruments and equipment

仪器设备	购买公司
活细胞工作站（倒置荧光显微镜）	Thermob fisher scientific
5424R 型冷冻离心机	德国 Eppendorf（艾本德）股份公司
超高速冷冻离心机	美国贝尔曼库尔特公司

3.1.4 主要试剂耗材

本研究使用的试剂耗材部分参考第二章 2.1.2。

表 3-3 主要试剂耗材

Table 3-3 Reagents and consumables used in this study

试剂耗材	购买公司
DL15000 DNA Marker	南京诺唯赞生物科技有限公司
无内毒素质粒大提试剂盒	北京天根生化科技有限公司
蛋白酶 K（Proteinase K）、RNaseA	北京天根生化科技有限公司
Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase	南京诺唯赞生物科技有限公司
BsmBI	TAKARA

Solution I	TAKARA
T4 polynucleotide kinase	NEB
Lip8000™转染试剂	上海碧云天生物技术有限公司
Quick shuttle	北京博奥龙免疫技术有限公司
霉酚酸	Selleck
黄嘌呤	Selleck
次黄嘌呤	Selleck
PEI(24765-2)	Polysciences
Puromycin(S7417)	Selleck
Polybrene(107689)	Sigma

3.1.5 相关溶液的配制

部分试剂参考第二章 2.1.3。

细胞维持液：向 DMEM 细胞基础培养基中加入 4%FBS、选择性的加入 1%青链霉素，4℃保存备用。

1.6%-2%低熔点琼脂糖：称取3.2-4 g低熔点琼脂糖粉末，加200mL去离子水后，121℃高温蒸汽灭菌20 min，4℃贮存备用。

Eco-gpt 压力筛选抑制剂：霉酚酸（25 μg/mL）、黄嘌呤（250 μg/mL）、次黄嘌呤（25 μg/mL）。

3.2 实验方法

3.2.1 rFHV-gG⁻/EGFP⁺的构建策略

转移载体包含 BAC 骨架、FHV-I 基因 gG 的两端同源臂、原核抗生素筛选基因 CAM、绿色荧光蛋白基因 EGFP 以及真核抗生素筛选基因 Eco-gpt。其中筛选基因 CAM、Eco-gpt 和 EGFP 分别用于重组病毒在 *E.coli* DH10B 和 CRFK-Cas9-sgG 细胞中的验证和筛选。

本研究利用同源重组将 FHV-I 全基因组克隆至 BAC 载体中，具体构建策略如下图 2-1 所示：

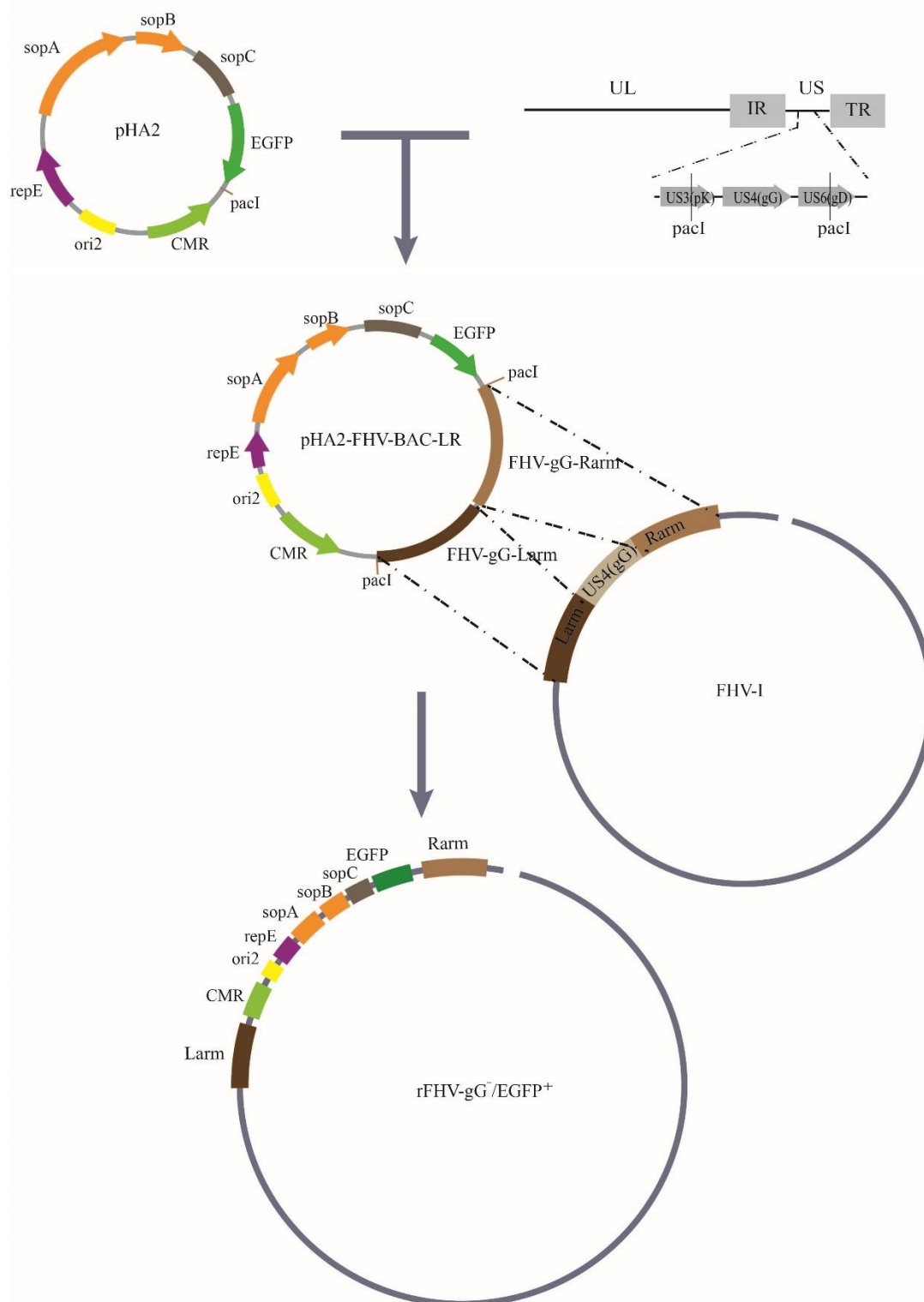


图 3-1 rFHV-gG-/EGFP⁺的构建策略

Fig.3-1 Construction strategy of rFHV-gG-/EGFP⁺

3.2.2 BAC 转移载体的构建步骤

3.2.2.1 同源臂的扩增及纯化

以病毒基因组为模板，用 pHA2-gGLarm、pHA2-gGRarm 引物对，用高保真酶 Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase 分别扩增出两端同源臂，经 1% DNA 琼脂糖凝胶电泳分析后，按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书回收片段，具体步骤参考第二章 2.2.4.1。用两端引物（pHA2-gGLarm-L、pHA2-gGRarm-R）将同源臂串联，扩增反应体系如表 3-4 所示，扩增反应程序如表 3-5 所示。

表 3-4 同源臂扩增反应体系

Table 3-4 Homologous arm amplification reaction system	
System composition	Reagent dosage
5×SF Buffer(with 10 mM MgSO ₄)	10 μL
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μL
Forward Primer (10 μmol/L)	2 μL
Reverse Primer (10 μmol/L)	2 μL
Template	1 μL(20 ng)
Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μL
DMSO	0.5 μL
25 mM MgSO ₄	0.5 μL
去离子水	up to 50 μL

表 3-5 同源臂扩增反应程序

Table 3-5 Homologous arm amplification reaction procedure		
Time	Temperature	Cycles
95°C	30 s	} 32
95°C	10 s	
61°C	20 s	
72°C	1kb/15 s	
72°C	10 min	
25°C	1 min	

3.2.2.2 pHA2 载体酶切回收

pHA2 以及串联后的同源臂片段用限制性内切酶 *PacI* 酶切，酶切体系如表 3-6：

表 3-6 酶切反应体系

Table 3-6 The reaction system of particular restriction enzyme

System composition	Reagent dosag
10×Buffer（根据说明书选择）	2 μ L
<i>PacI</i> （置冰上）	1 μ L
pHA2 载体（PCR 纯化产物）	1 μ L(1 μ g)
去离子水	Up to 30 μ L

置于 37℃ 水浴锅中酶切 15 min 后，经 1% DNA 琼脂糖凝胶电泳分析后，按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书回收片段，具体步骤参考第二章 2.2.4.1.1。

3.2.2.3 同源臂片段与 pHA2 载体酶连

经回收纯化后的同源臂片段与酶切回收后的 pHA2 载体 16℃ 酶连过夜，连接反应体系参考第二章 2.2.4.1.2。

3.2.2.4 CaCl_2 处理法制备感受态

具体步骤参考第二章 2.2.4.1.3。

3.2.2.5 连接产物的转化

具体步骤参考第二章 2.2.4.1.4。

3.2.2.6 质粒转化子的 PCR 鉴定

具体步骤参考第二章 2.2.4.1.5。

3.2.2.7 质粒的提取

本研究使用 TIANGE 无内毒质粒大提试剂盒提取质粒，操作步骤参考试剂盒说明书，具体步骤如下：

(1) 将适量测序正确的质粒对应的菌液接种到含有20 mg/mL CMR的细菌瓶中，37℃摇床180 r/min培养过夜。

(2) 细菌瓶摇菌后，50 mL离心管分装菌液，8000 r/min，离心10 min，弃上清，重复操作直至菌体收集完成。

(3) 弃去上清时尽可能吸尽残余菌液。每管加500 μ L solution I（已加RNaseA）重悬菌体之后分装到2 mL离心管中，每管500 μ L。

(4) 每管加入500 μ L solution II，温和颠倒7-10次，直至上清清亮。

(5) 加入250 μ L Buffer N3，轻柔颠倒至白色絮状。4℃，12000 r/min，离心10 min。

(6) 上清转入新的1.5 mL EP管中，加入0.1倍体积的ETR，轻轻混后放置于冰上10 min，每2 min颠倒1次。混匀后溶液变浑浊，置冰上后变清亮（准备：吸附柱中提前加入200 μ L Buffer GPS浸润，静置时间大于5 min，12000 r/min，离心1 min，倒掉收集管中的液体）。

(7) 将EP管放于42℃水浴中5 min，此时溶液再次变浑浊。12000 r/min，离心3 min（室温），ETR溶液沉于管底。

(8) 小心将上清转移到新的2 mL的EP（切勿吸入蓝色ETR）管中，加0.5倍体积的无水乙醇，混匀，室温静置2 min。

(9) 转入浸润过的吸附柱中，每次最多700 μ L，静置2 min，12000 r/min，离心1 min。

(10) 弃去收集管中的液体，加入500 μ L Buffer HB，12000 r/min，离心1 min。

(11) 弃去收集管中的液体，加入700 μ L DNA Wash Buffer（已加无水乙醇）洗柱子，室温12000 r/min，离心1 min。

(12) 重复操作步骤（11）。

(13) 弃去收集管中的液体，12000 r/min，空柱离心 2 min；

(14) 将柱子放入新的 EP 管中，置于 55℃烘箱中 15 min，同时将 Endotoxin-free EB 也于 55℃预热以提高洗脱效率；

(15) 取 80 μL Endotoxin-free EB 洗脱液, 加入柱子中央, 静置 2 min, 12000 r/min, 离心 2 min, 检测质粒浓度, 于 -80°C 保存。测序以及菌种保存步骤参考第二章 2.2.4.1.6。

3.2.3 sgRNA 质粒的构建

3.2.3.1 sgRNA 序列设计与合成

通过 NCBI 查找目的基因的序列, 根据实验目的选择目的基因上的一段外显子输入到 <http://crispor.tefor.net>, 按照网站中提示的步骤和信息, 选择分数较高的 sgRNA 序列。根据载体质粒的酶切位点, 将选择的 sgRNA 序列以及与其互补配对的序列末端加上粘性末端, 在生物公司合成与这两条单链相同的引物。

3.2.3.2 sgRNA 磷酸化和退火

将生物公司合成的 sgRNA 序列及其互补序列的引物稀释至 100 $\mu\text{mol/L}$, 通过磷酸化酶将引物 5' 端补上磷酸基团, 用于后续的连接, 退火后两条引物互补形成双链, 反应体系如表 3-7。反应程序为 37°C 30 min, 95°C 5 min, 以 0.1°C/s 的速度缓慢降温至 25°C 。

表 3-7 引物退火体系

Table 3-7 The reaction system of primer annealing

System composition	Reagent dosag
T4 kinase buffer	2 μL
sgRNA-F	1 μL
sgRNA-R	1 μL
T4 polynucleotide kinase	1 μL
去离子水	Up to 10 μL

3.2.3.3 载体的酶切回收

对载体 Lenti-Guide-Puro 进行酶切, 酶切反应体系如表 3-8。

表 3-8 酶切反应体系

Table 3-8 The reaction system of particular restriction enzyme

System composition	Reagent dosag
载体质粒	1 μ L(1 μ g)
NEB buffer 3.1	5 μ L
BsmB I	1 μ L
去离子水	Up to 50 μ L

55℃酶切 60 min 后，向酶切产物中加入 DNA loading buffer，经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后，按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书回收，具体步骤参考第二章 2.2.4.1.1。

3.2.3.4 退火产物与载体连接转化

将退火产物稀释 200 倍。连接体系如表 3-9。

表 3-9 酶连反应体系

Table 3-9 Ligase reaction system

System composition	Reagent dosag
Solution I	5 μ L
酶切载体	1 μ L(50 ng)
sgRNA 退火引物	1 μ L
去离子水	Up to 10 μ L

混合体系于 16℃水浴 2 h 后转化入 DH5 α 中，具体步骤参考第二章 2.2.4.1.4。

3.2.3.5 sgRNA 质粒的提取及鉴定

具体操作步骤参考第三章 3.2.2.7。

3.2.4 慢病毒的包装与收获

待提前铺于 6 孔板中 293FT 细胞密度达到 80%左右时进行转染，用 200 μ L DMEM 分别稀释对应的质粒和 PEI，慢病毒包装的质粒质量比例为 Vector:pSPAX2:pMD2.G=1.3:1:0.7。将混合物孵育 15 min 后加入到培养板中，8 h 后换成完全培养基，48 h 后收获一次上清并重新补入 2 mL 新鲜培养基，72 h 再收获一次上清。将两次收获的细胞上清合并，4 $^{\circ}$ C, 3000 r/min 离心 10 min，将上清转移到新的离心管中，4 $^{\circ}$ C, 12000 r/min 离心 30 min，然后过 0.45 μ m 滤器，收集的滤液即为慢病毒液，分装后置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱。

3.2.5 细胞培养

3.2.5.1 细胞复苏

- (1) 从液氮容器中取出冻存的细胞，排净渗入的液氮后迅速浸入 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中，并快速摇动使其尽快融化；
- (2) 从 42 $^{\circ}$ C 水浴中取出冻存管，用酒精棉球擦拭管壁后旋开盖子，吸出细胞液；
- (3) 1000 r/min，离心 5 min 直接接种于 T25 培养瓶，置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 恒温箱静置培养，待细胞贴壁后（6 h 左右），更换一次完全培养基，继续培养。
- (4) 待细胞长满单层后于超净工作台中弃去完全培养基，用胰酶洗一次之后加入 1 mL 胰酶放置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 恒温箱消化 3 min。
- (5) 加入 4 mL 完全培养基轻轻吹打细胞使其呈单个悬浮状态后 1:5 弃去培养液加入新鲜培养液置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 恒温箱静置培养，待细胞长满后重复此步骤进行细胞传代培养。

3.2.5.2 细胞冻存

具体步骤参考第二章 2.2.1.2。

3.2.6 病毒的增殖与滴度测定

将实验室保存的 FHV-I 以 $\text{MOI}=0.1$ 接种于准备好的铺满单层的 CRFK-Cas9 细胞中，待细胞病变接近于 80% 时，收取所扩增的病毒。

将保存的病毒反复冻融 3 次，12000 r/min 离心 3 min 沉淀细胞碎片，取上清，分装后置 -80°C 保存。取出一份分装保存的病毒置于 4°C 冰箱中解冻，将病毒液在灭菌的 1.5 mL EP 管内作连续的 $10\times$ 稀释，具体操作如下：

(1) 吸取 100 μL 病毒液，加入已装有 900 μL 无血清的 DMEM 的 1.5 mL EP 管内，混合液充分振荡混匀。

(2) 更换新的枪头，吸取 100 μL 上述混合液至第二个已装有 900 μL 无血清的 DMEM 的 1.5 mL EP 管内，混合液充分振荡混匀。

(3) 更换新的枪头，再吸取 100 μL 上述混合液转移至第三个已装有 900 μL 无血清的 DMEM 的 1.5 mL EP 管内。重复上述操作，即获得一系列 $10\times$ 等比稀释的病毒液（一般稀释至 10^{-12} ）。

(4) 将 CRFK-Cas9 细胞提前接种到 96 孔细胞培养板上，当细胞长至约 90% 时，用无菌 PBS 洗涤细胞两次，在洗涤后的细胞里加入 100 μL /孔含有 4% FBS 的细胞培养基。

(5) 取每个稀释度的病毒液接种于提前铺好的细胞密度约为 90% 时的 96 孔细胞板 1 纵列中，每孔 100 μL ，最后一列细胞只加 100 μL DMEM 培养基作为阴性对照。

(6) 1 h 后更换维持液，置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养，7 h 后观察细胞病变，记录每列 50% 细胞发生病变的细胞孔数。Spearman-Kärber 法计算病毒的 TCID_{50} 。

(7) 纯化后的重组毒按上述方法进行同样操作以计算重组毒的病毒滴度。

3.2.7 CRFK-Cas9-sgG 细胞转染条件的摸索

参考 Lip8000 和 Quick shuttle 转染试剂说明书，以转染转移载体用量 4 μg 为基准，分别设置不同浓度的转染试剂转染提前铺好于 6 孔细胞板的密度约为 90% 的 CRFK-Cas9-sgG 细胞，Lip8000 转染试剂的用量分别为 4.8 μL 、5.6 μL 、6.4 μL ，Quick shuttle

转染试剂的用量分别为 3 μL 、4 μL 、5 μL ，24 h 后观察荧光情况，以摸索出最适宜的转染试剂的用量，具体转染步骤如下：

（1）转染的前一天将CRFK-Cas9-sgG细胞传代至6孔细胞板，保证20 h后细胞可以长满至80%-90%。

（2）第二天将转染所用试剂和培养基拿出放室温或者4℃，并且给6孔细胞板细胞换新的培养液。

（3）取BAC转移载体质粒于终体积为500 μL DMEM中，涡旋混匀；取转染试剂于终体积为500 μL DMEM中，涡旋混匀，将上述混合液分别置于室温5 min后混匀室温孵育20 min。

（4）取出细胞培养板将上述混合液均匀滴加入板子缓慢混匀后置于 37℃，5%CO₂ 培养箱中培养，待 6 h 后弃去转染混合液，加入复温后的含 10%FBS 的新鲜培养基，24 h 后观察转染情况。

3.2.8 转移载体转染 CRFK-Cas9-sgG 细胞后感染 FHV-I

按照3.2.7中的转染条件，用5 μL 转染试剂转染4 μg BAC核心质粒至CRFK-Cas9-sgG细胞，通过荧光和抑制剂筛选得到含BAC核心质粒的重组病毒。具体操作如下：

（1）按照3.2.7中的转染步骤转染细胞后，同时以MOI=1感染细胞继续培养观察细胞病变以及荧光；

（2）待FHV-I感染细胞6 h后，加入抑制剂培养，实时观察细胞病变以及荧光，每48h更换一次含有抑制剂的培养液，之后每天观察细胞状态，直至出现CPE并且荧光显微镜观察出现绿色荧光。

（3）待细胞荧光强度最强时收取细胞上清以及细胞样，反复冻融后重新接种于铺满单层且添加了抑制剂的CRFK-Cas9-sgG细胞中。

（4）每天观察细胞状态并每48 h更换一次含有抑制剂的培养液，待病变充分时，收集细胞毒用于后续筛选纯化。最长可以维持96 h，期间可以更换新的细胞生长培养基。如果没有病变，则灭菌后扔弃培养物。

3.2.9 rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组病毒的鉴定

将出现 CPE 和绿色荧光的细胞毒反复冻融 3 次，离心弃掉细胞碎片接种于提前铺好的长满单层的 CRFK-Cas9-sgG 细胞上，同时添加抑制剂抑制野毒的增殖。以上过程重复两次使重组毒高于野毒比例。至少纯化两次后取 100 μ L 病毒液，用病毒 DNA 提取试剂盒提取病毒基因组，分别以 BAC 基本元件、病毒基因组上重要基因以及重组部分接头引物对进行初步的 PCR 鉴定，同时设置野毒以及单蒸水作为对照，PCR 反应体系以及反应程序参考第二章 2.2.4.1.5。

待鉴定正确后进一步多轮筛选获得纯化的重组毒。将纯化后重组毒以及野毒大批量扩增之后使用超高速冷冻离心机进行超离，沉淀用 PBS 过夜溶解后用酚仿醇进行基因组的抽提并用 Quick shuttle 转染试剂将重组毒的基因组转染至真核细胞以验证重组病毒的基本结构的完整性。具体步骤如下：

(1) 根据测定的病毒滴度，按 MOI=0.01 量接种病毒至准备好的单层 CRFK-Cas9-sgG 细胞上，待 80%以上细胞出现病变时收获细胞培养物。

(2) 细胞培养物反复冻融 3 次，收集至 50 mL 离心管中，4 $^{\circ}$ C，2000 r/min 离心 10 min。

(3) 收取病毒上清进行进一步离心，4 $^{\circ}$ C，5000 r/min 离心 10 min。最后所有上清收集到玻璃瓶中（如果上清中仍有细胞碎片可以重复离心一次）。

(4) 将上清加至超速离心管中，电子称上配平（精确到 0.01 g）。

(5) 用超高速冷冻离心机离心，4 $^{\circ}$ C，25000 r/min 离心 120 min。

(6) 离心结束后弃掉上清，将超速离心管倒扣在滤纸上，数分钟后沉淀用少量 PBS 放于 4 $^{\circ}$ C溶解。

(7) 用等体积苯酚：氯仿：异戊醇（三者体积比为 25：24：1）混合液抽提溶解后的基因组，加入混合液颠倒数次混匀（动作要轻柔，防止基因组断裂）。4 $^{\circ}$ C，12000 r/min，离心 10 min。

(8) 可见溶液分成了三层，取最上层溶液到 2 mL 离心管中。

(9) 重复步骤（7）和步骤（8），2-3 次。

(10) 向最后抽提的病毒上清液中加入 0.6 倍体积的异丙醇, -20°C 静置 2 h, 静置结束后, 4°C , 10000 r/min 离心 10 min, 轻轻倒掉上清。

(11) 向离心管中加入 1 mL 预冷的 75%乙醇清洗两遍后, 置于超净工作台 10 min 吹干 (不宜太干, 否则不易溶解)。

(10) 最后用适量灭菌水溶解基因组, 置于 -80°C 保存。

(11) 将 -80°C 保存的重组病毒和野毒基因组转染提前铺好的长满单层的 CRFK-Cas9 细胞中, 每天观察细胞病变以及荧光表达情况。具体转染步骤参考第三章 3.2.5。

3.2.10 rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组病毒的筛选与纯化

另取 20 μL 初步纯化后的病毒液用不含血清的 DMEM 稀释适当的倍数后, 接种 6 孔细胞板中长至单层的 CRFK-Cas9-sgG 细胞, 6 孔细胞板细胞放入培养箱吸附 2 h, 每 20 min 十字交叉法混匀一遍。然后, 用配制好的低熔点琼脂糖覆盖细胞, 待琼脂糖凝固 (10 min 左右) 后, 将细胞放入培养箱继续培养。24 h 观察细胞状态, 荧光显微镜观察到明显的 CPE 和绿色荧光时, 挑取携带有绿色荧光的病变斑。将所挑取的细胞样反复冻融 3 次, 同样的方法感染 CRFK-Cas9-sgG 细胞并再次挑取绿色荧光处的病变斑。重复纯化 3-5 次后, 待重组病毒感染的 6 孔细胞板细胞 CPE 处均有绿色荧光时进行 PCR 鉴定以及真核细胞转染以验证重组位置是否正确。将正确重组毒命名为 rFHV-gG⁻/EGFP⁺。

3.2.11 rFHV-gG⁻/EGFP⁺的体外生长特性

将确定滴度的 rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组病毒以及野毒以 $\text{MOI}=0.01$ 接种于提前铺好的长满单层的 CRFK-Cas9-sgG 细胞中, 接种前 CRFK-Cas9 细胞用不含血清的培养基清洗两遍, 再加入含有 4%FBS 的培养基, 感染后每间隔 12 h 收取细胞上清, 冻入 -80°C 待检。收取时间点包括 12 h、24 h、36 h、48 h。

将收取的不同时间点的细胞上清接种于提前铺好的长满单层的 96 孔板细胞中, 用以确定重组病毒和野毒的体外生长特性。每组实验重复三次。具体操作步骤参考第三章 3.2.7。

3.2.12 rFHV-gG⁻/EGFP⁺的遗传稳定性

将纯化后的 rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组病毒反复冻融 3 次，离心弃掉细胞碎片后接种于提前铺好的长满单层的 CRFK-Cas9 细胞中，待细胞病变达到 80%左右时收取细胞以及上清样品保存于-80℃。将重组病毒按照上述操作连续传代 20 次后，通过 BAC 基本元件、病毒基因组上的 TK 基因以及重组部分接头引物对 PCR 鉴定传代 20 次后的重组病毒的稳定性，PCR 反应体系以及反应程序参考第二章 2.2.4.1.5。

3.3 结果与分析

3.3.1 BAC 转移载体的构建

以病毒基因组为模板，用 pHA2-gGLarm、pHA2-gGRarm 引物对进行 PCR 扩增，分别扩增出与预期大小相符合的 2524 bp、2226 bp 的左右同源臂的条带，测序结果显示同源率为 100%。通过限制性内切酶 PacI 酶切 pHA2 载体电泳分离后得到与预期大小相符合的 7500 bp 的条带。将左右同源臂串联后用 PacI 酶切连接至同样被酶切的 pHA2 载体，转化至 DH5 α 感受态挑取阳性克隆，鉴定正确的克隆提质粒后送测序验证，测序结果显示同源率为 100%，说明 BAC 转移载体质粒构建成功，命名为 pHA2-FHV-BAC-LR，如图 3-2 所示。

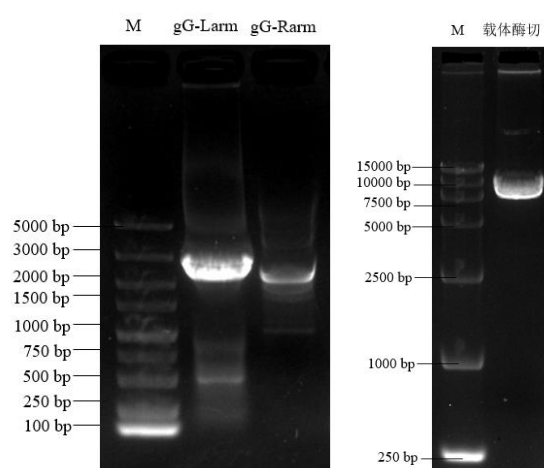


图 3-2 同源臂的扩增和载体的酶切

Fig.3-2 Homologous arm amplification and vector digestion

M: DL5000 marker; M: DL15000 marker

3.3.2 表达靶向 gG 基因 sgRNA 的稳转细胞系(CRFK-Cas9-sgG)的构建

3.3.2.1 sgRNA 重组质粒的构建

将磷酸化退火后的 sgRNA 与酶切后的 Lenti-Guide-puro 载体酶连 16°C 过夜，转化 DH5 α 感受态后挑取单菌落进行鉴定，鉴定正确的阳性克隆提质粒后送测序验证，测序结果显示与目的序列一致，说明 sgRNA 质粒构建成功，命名为 Lenti-Guide-puro-FHVgG-sgRNA，如图 3-3 所示。

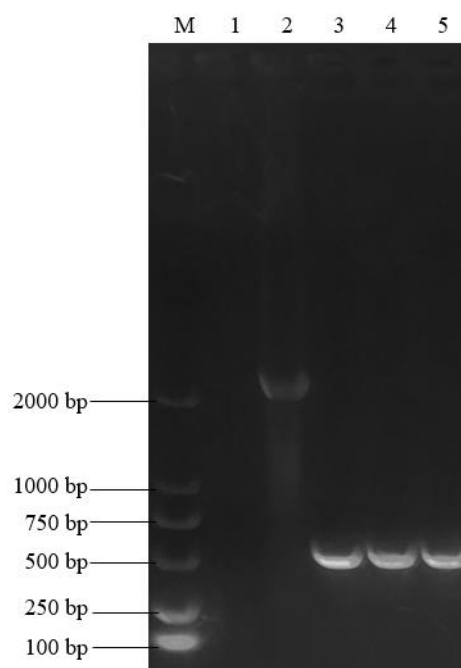


图 3-3 sgRNA 转化子的 PCR 鉴定

Fig.3-3 PCR identification of sgRNA transformants

M: DL2000 marker; 1: 阴性对照; 2: 空载对照; 3-5: 挑取的单菌落

3.3.2.2 嘌呤霉素（puromycin）杀死 CRFK-Cas9 细胞的最低浓度测定

通过慢病毒系统在 CRFK-Cas9 细胞上表达靶向 FHV-I 病毒 gG 基因的 sgRNA，同时该系统的载体质粒 Lenti-Guide-puro 上携带有 puromycin 的抗性基因，可以对后续整合该抗性基因的阳性克隆进行压力筛选。为了确保 puromycin 能够在短时间内（4-5d）杀死无抗性基因的 CRFK-Cas9 细胞而不影响感染后携带抗性的阳性细胞，对 puromycin 杀死 CRFK-Cas9 细胞的最低浓度进行了条件摸索。结果表明，当 puromycin 浓度为 2

$\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞能够在第 5 天全部死亡。因此, puromycin 对 CRFK-Cas9 细胞的最低致死浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$, 如表 3-10 所示。

表 3-10 嘌呤霉素对 CRFK-Cas9 细胞杀死浓度测定

Table 3-10 Determination of the killing concentration of puromycin on CRFK-Cas9 cells

puromycin ($\mu\text{g/mL}$)	3 d	4 d	5 d	6 d
0	++++	++++	++++	++++
1	++++	++++	++++	++++
1.5	++++	++++	+++	++
2	+++	++	-	-
2.5	+	-	-	-

3.3.2.3 慢病毒感染 CRFK-Cas9 细胞

将慢病毒收获后感染 CRFK-Cas9 细胞, 48 h 后更换为含有 $2 \mu\text{g/mL}$ puromycin 的完全培养基进行压力筛选, 以获得表达靶向 gG 基因 sgRNA 的稳转细胞系, 命名为 CRFK-Cas9-sgG。结果表明, 进行压力筛选第 5 天后, 不进行慢病毒感染的对照细胞完全死亡, 而慢病毒感染后的细胞系仍有较多存活, 结果如图 3-4 所示。

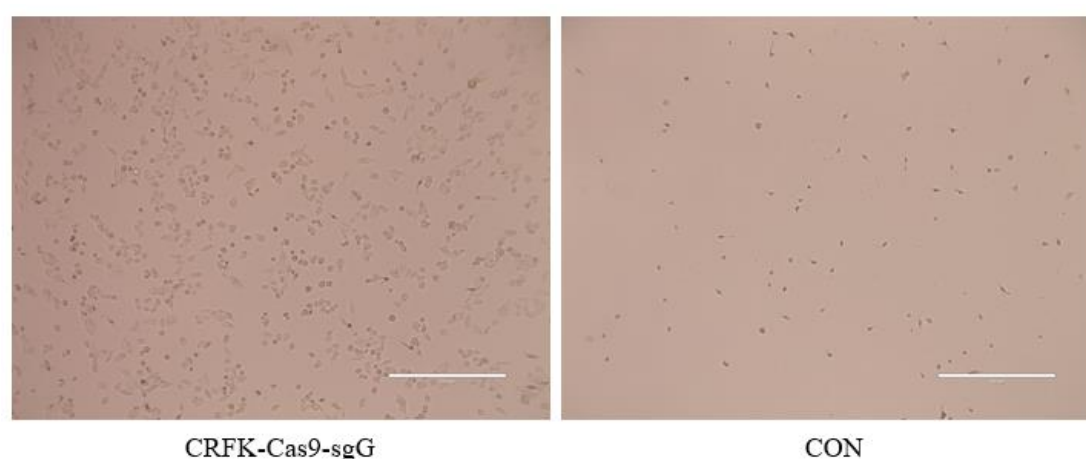


图 3-4 表达靶向 gG 基因 sgRNA 的细胞系的构建

Fig.3-4 Construction of cell lines expressing sgRNA targeting gG gene

3.3.3 rFHV-gG⁻/EGFP⁺的构建

3.3.3.1 CRFK-Cas9-sgG 细胞的最佳转染条件

将 DNA 与转染试剂以不同的用量比例分别转染提前铺好的 CRFK-Cas9-sgG 细胞。结果表明，在 6 孔细胞板中，Lip8000 转染试剂随着转染试剂用量的增加，转染效率大幅度下降，且 Lip8000 转染试剂对细胞毒性较大；相较而言，Quick shuttle 转染试剂随着其用量的增加，转染效率明显提升且对细胞毒性较小，适用于本实验中对 CRFK-Cas9-sgG 细胞转染大片段质粒，结果如图 3-5 所示。

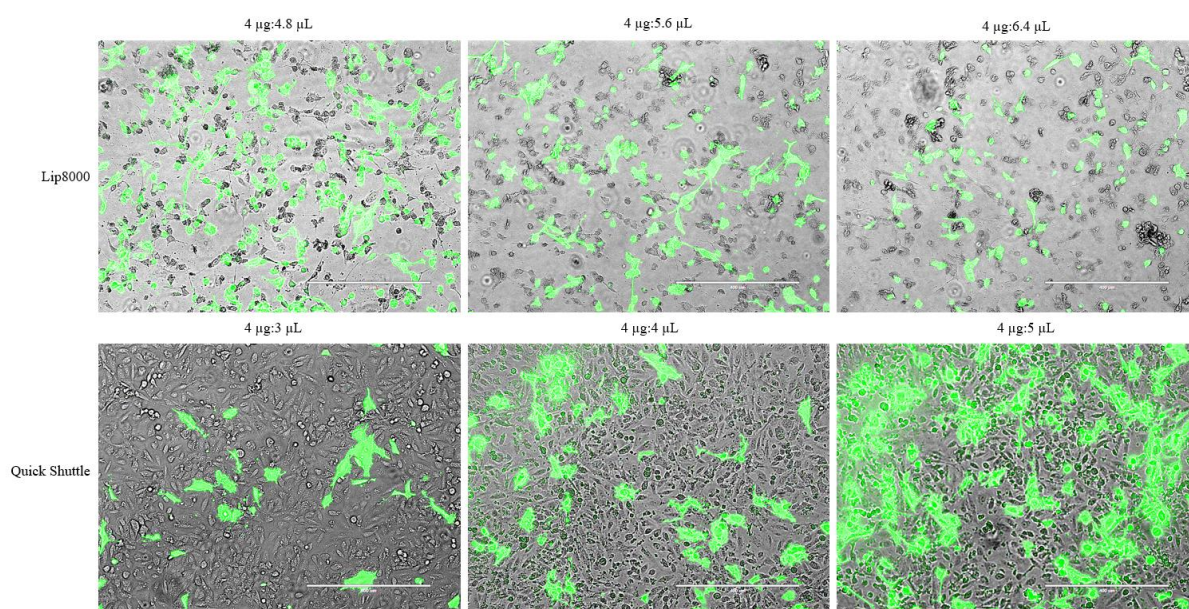


图 3-5 CRFK-Cas9-sgG 细胞转染条件的摸索

Fig.3-5 Exploration of transfection conditions of CRFK-Cas9-sgG cells

3.3.3.2 转移载体转染 CRFK-Cas9-sgG 细胞后感染 FHV-I

以 3.3.3.1 中确定的转染条件转染 CRFK-Cas9-sgG 细胞后，低 MOI 感染 FHV-I，持续观察细胞荧光以及病变情况，收取病变的细胞盲传至提前加入抑制剂的新的细胞上，如此重复以获得重组毒。结果表明，第一次盲传后可观察到明显的细胞病变（CPE）和绿色荧光，收取细胞后进行第二次盲传，可观察到明显的细胞荧光，即视为疑似正确的重组病毒，如图 3-6 所示。

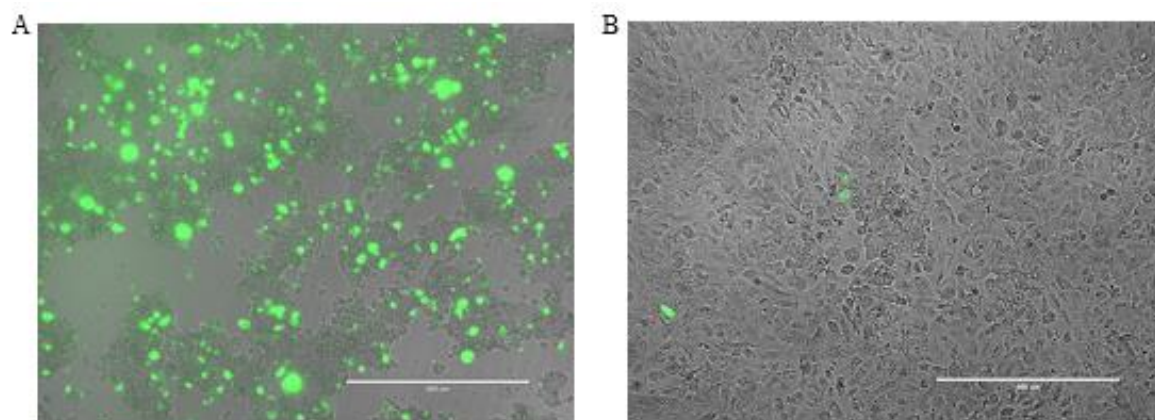


图 3-6 细胞毒盲传结果

Fig.3-6 Cytotoxic blind transmission results

A: 第一次盲传; B: 第二次盲传

3.3.4 rFHV-gG⁻/EGFP⁺的鉴定纯化

将疑似正确的重组毒用抑制剂筛选,筛选两轮后提取病毒基因组,以 TK-JD-F、repE-JD-F、rFHV-BAC-LJD-F、rFHV-BAC-RJD-F 引物对进行 PCR 鉴定。结果表明,在对照成立的情况下,重组毒能扩增到和野毒大小相符合的 427 bp 的病毒基因组上的 TK 基因,也能扩增到与预期大小相符合的 450 bp 的 BAC 基本元件 repE 基因,同时扩增到了与预期相符合的 3724 bp 和 3184 bp 的左右臂重组接头位置,而野毒均未有扩增。以上扩增到的所有条带经过测序验证与目的序列是完全一致的。表明该重组毒在初步的 PCR 鉴定过程中是正确的,如图 3-7 和图 3-8 所示。

将初步鉴定正确的重组病毒接种于新细胞,经空斑纯化实验筛选 3 轮左右以获得纯化的重组毒。结果表明,在荧光显微镜观察下,所有 CPE 处均产生绿色荧光,说明病毒已经充分纯化,如图 3-9 所示。

将纯化超离后用酚仿醇抽提的重组毒和野毒的基因组用 Quick shuttle 转染试剂转染至提前准备好的长满单层的 CRFK-Cas9 细胞中。结果表明,24 h 后可观察到转染野毒和重组病毒基因组的细胞孔均产生病变斑,且转染重组病毒基因组的病变斑处能观察到荧光,转染野毒基因组的病变斑则没有荧光,如图 3-10 所示。真核转染成功拯救出带有 BAC 的重组毒。

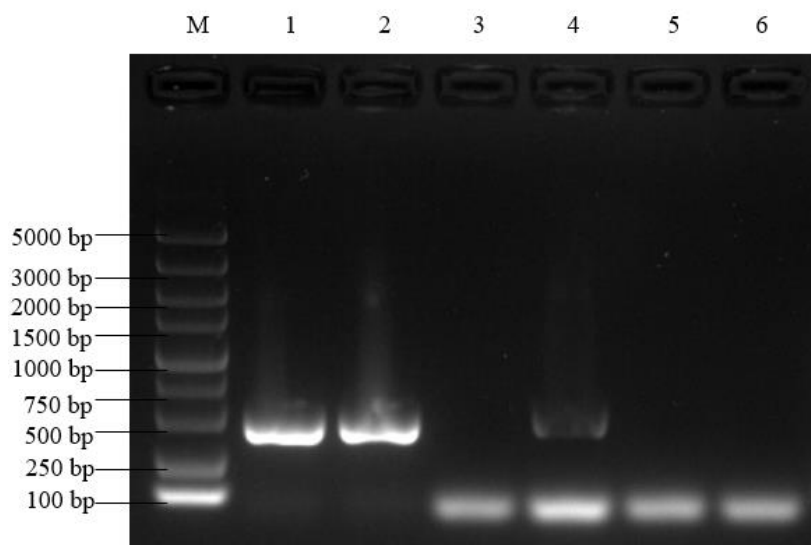


图 3-7 rFHV-gG⁻/EGFP⁺ TK/repE 基因的 PCR 鉴定

Fig.3-7 PCR identification of TK/repE gene of rFHV-gG⁻/EGFP⁺

M: DL5000 marker; 1: rFHV- gG⁻/EGFP⁺扩增 TK 基因; 2: FHV-I 扩增 TK 基因; 3、6: 阴性对照 (H₂O);
4: rFHV- gG⁻/EGFP⁺扩增 repE 基因; 5: FHV-I 扩增 repE 基因

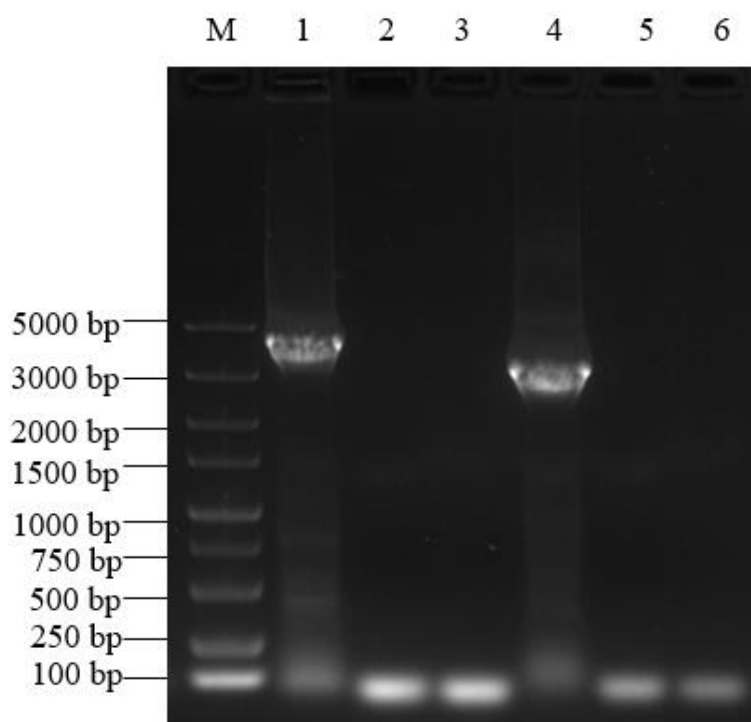


图 3-8 rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组位置的 PCR 鉴定

Fig.3-8 PCR identification of rFHV-gG⁻/EGFP⁺

M: DL5000 marker;1: rFHV-gG⁻/EGFP⁺扩增左臂接头重组的位置; 2: FHV-I 扩增左臂接头重组的重组位置;
3、6: 阴性对照 (H₂O); 4: rFHV-gG⁻/EGFP⁺扩增右臂接头重组的位置; 5: FHV-I 扩增右臂接头重组的位置

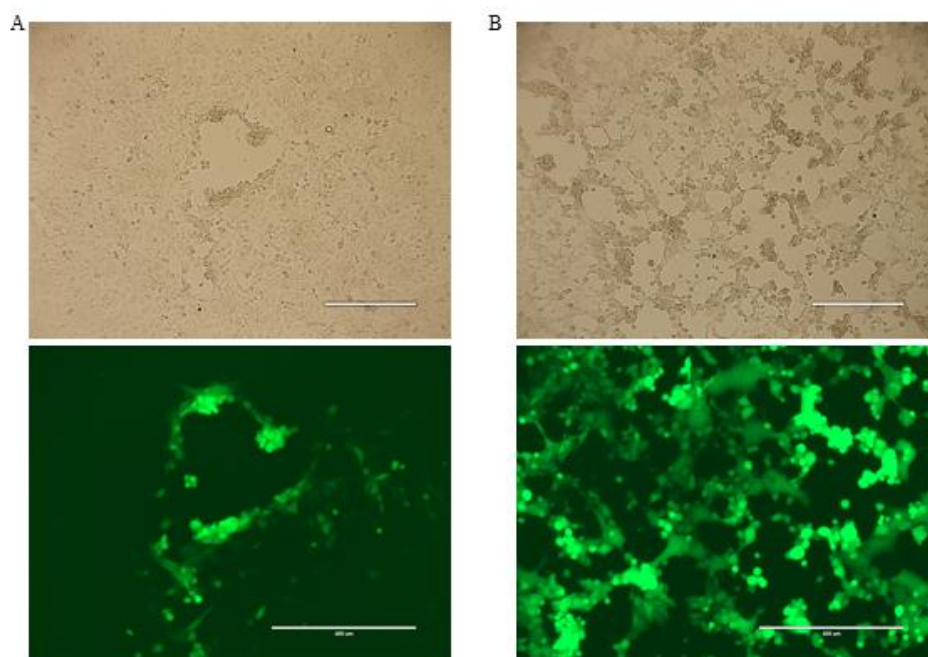


图 3-9 rFHV-gG/EGFP⁺空斑筛选结果

Fig.3-9 Plaque screening results of rFHV-gG/EGFP⁺

A: 病毒空斑纯化筛选; B: 纯化后感染病变

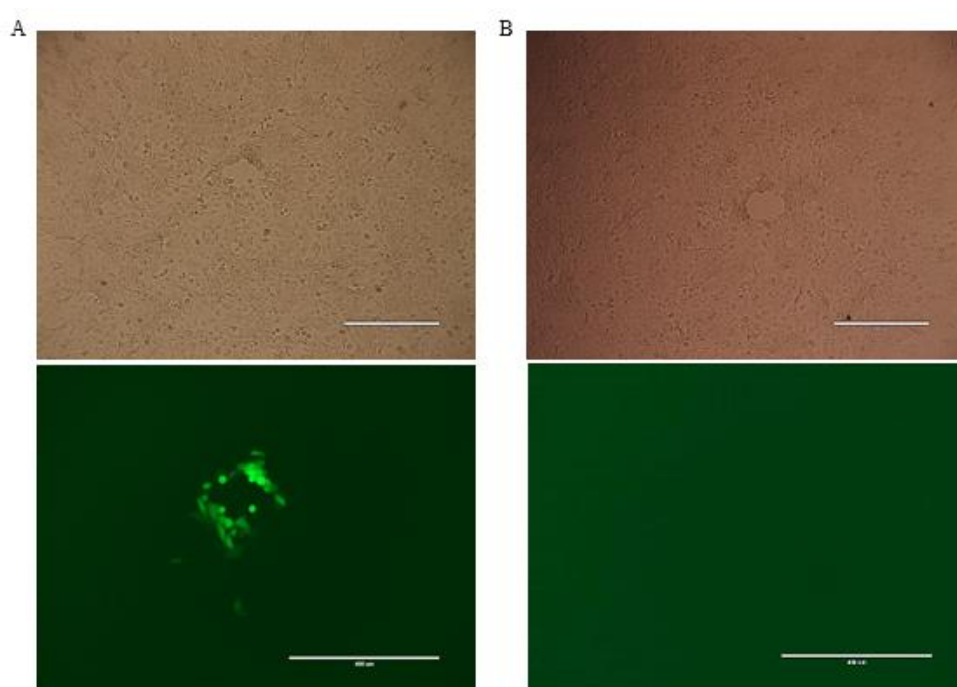


图 3-10 病毒基因组转染验证结果

Fig.3-10 Validation results of viral genome transfection

A: 重组病毒基因组转染; B: 野毒基因组转染

3.3.5 rFHV-gG⁻/EGFP⁺的体外生长特性

将收取的不同时间点的细胞上清接种于提前铺好的长满单层的 96 孔板细胞中，通过其增殖曲线观察 rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组毒和野毒的体外生长特性是否存在差异。结果表明，rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组毒和野毒的增殖曲线基本上是一致的，说明了 BAC 元件替换到 FHV-I 病毒基因组 US3 和 US6 之间不影响其体外增殖及其基本结构。结果如图 3-11 所示。

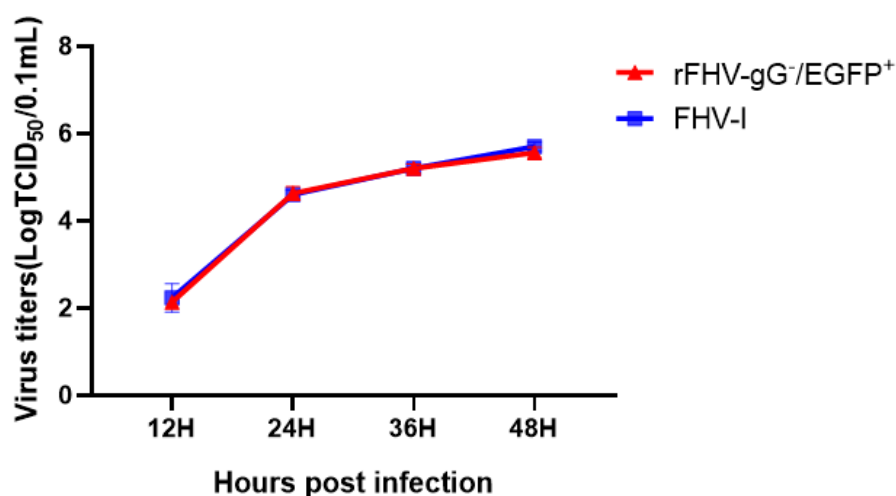


图 3-11 rFHV-gG⁻/EGFP⁺和 FHV-I 的增殖曲线

Fig.3-11 Multiplication curve of the rFHV-gG⁻/EGFP⁺and FHV-I

3.3.6 rFHV-gG⁻/EGFP⁺的遗传稳定性

将连续传代 20 次的 rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组病毒提取病毒基因组后，用 TK-JD-F、repE-JD-F、rFHV-BAC-LJD-F、rFHV-BAC-RJD-F 引物对进行 PCR 鉴定。结果表明，在对照都成立的情况下，连续传代 20 次的重组毒能扩增到和野毒大小相符合的 427 bp 的 TK 基因，也能扩增到与预期大小相符合的 450 bp 的 BAC 基本元件 repE 基因，同时扩增到了与预期相符合的 3724 bp 和 3184 bp 的左右臂重组接头位置，而野毒均未有扩增，结果如图 3-12 所示。以上扩增到的所有条带经过测序验证与目的序列是完全一致的。表明该重组毒能够在连续传代过程中保持稳定性，BAC 元件替换到 US3 和 US6 之间是稳定的。

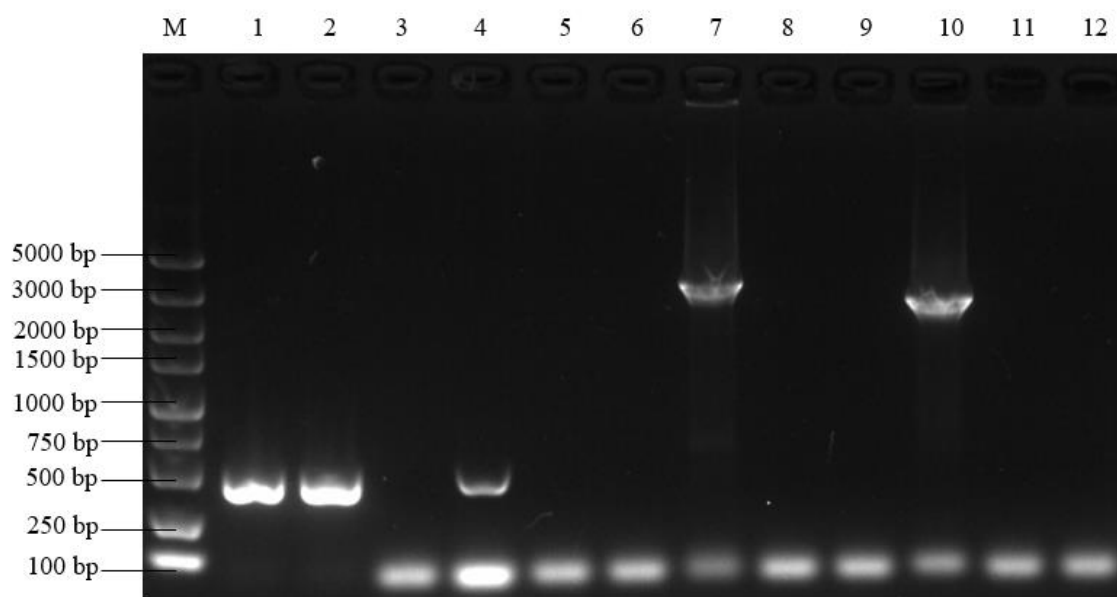


图 3-12 rFHV-gG-/EGFP⁺连续传代 20 次后的 PCR 鉴定

Fig.3-12 PCR identification after 20 consecutive passages of the rFHV-gG-/EGFP⁺

M: DL5000 marker; 1、4、7、10: 以 rFHV-gG-/EGFP⁺为模板分别扩增 TK、repE、BAC 左右臂接头;

2、5、8、11: 以 FHV-I 为模板分别扩增 TK、repE、BAC 左右臂接头;

3、6、9、12: 阴性对照 (H₂O)

3.4 讨论

3.4.1 以猫疱疹病毒为载体构建重组疫苗的意义

FHV-I 自 1958 年被分离出来, 至今没有专门针对 FHV-I 的疫苗, 这可能是由于目前研究技术对 FHV-I 基因组结构功能和发病机制研究的有限性以及 FHV-I 和其他病毒联合致病且具有潜伏感染的特性导致的。从近年来世界各地不同的分离株来看, FHV-I 的血清型单一, 但是存在毒力差异, 这表明 FHV-I 在遗传进化过程中相对稳定, 有助于相关毒力基因功能的研究以及疫苗开发。基于国内小动物疾病研发发展较晚, 目前临床上应用最为广泛的是进口灭活苗“妙三多”。但是自 2019 年疫情爆发以来, 该疫苗成本高且在国内市场上供不应求的状态促使猫用疫苗研发迫在眉睫。FHV-I 引发相应疾病的预防和治疗方案有限, 以疱疹病毒为载体利用细菌人工染色体技术构建重组疫苗为猫用疫苗研发提供了技术平台。

为了研发出高效、安全、便捷的疫苗，诸多实验室借助细菌人工染色体技术平台构建多重高效的重组载体疫苗，以期望达到较好的临床免疫效果。自 1997 年成功构建出 MCMV 细菌人工染色体感染性克隆后，疱疹病毒作为细菌人工染色体技术载体逐步登上历史舞台。2006 年，为了研究 gG 蛋白的结构及功能性质，Bérénice Costes 等人基于 FHV-I BAC 克隆和限制性内切酶介导重组的原始技术生产了各种 FHV-I gG 基因缺失的重组菌株，并证实其具有感染性。2010 年，Tai 等人首次报道了第一个完整且带注释的 FHV-I 基因组序列以及包含整个 FHV-I 基因组并在体内和体外均具有感染性的 BAC 克隆。利用 BAC 相较于其他载体更大的容纳量、更高的克隆能力、稳定性以及操作效率，Tai 等人将 FHV-I 全基因组克隆为在原核系统中能稳定表达的 BAC，并且将其转染真核细胞后能成功拯救出病毒，同时利用 Cre/loxP 重组技术切除 BAC 载体后的毒株在有限的临床实验中与亲本毒株表型相似。这一 FHV-I 的感染性克隆为 FHV-I 基因功能探索及其疫苗研发奠定了基础。疱疹病毒基因组 BAC 化后在原核中能够稳定传代的特性使其能够利用细菌的 DNA 修饰技术进行改造，这充分表明 BAC 技术作为新型疫苗研发技术平台的巨大潜力。

疱疹病毒 BAC 化的分子克隆病毒使疱疹病毒基因组能够在原核和真核细胞中穿梭且稳定存在，而原核细胞中的 DNA 修饰技术能够便捷的对病毒基因组进行基因改造。其中能否成功构建具有感染性的疱疹病毒的表达载体是 BAC 技术能否成功应用的关键。目前除了杆状病毒的 bac to bac 系统和腺病毒的 AdeasyTM 系统已经逐步商品化，大多数双链 DNA 病毒还没有标准化的重组方案。近几年新开发出更加高效、便捷的产生重组 DNA 分子的方法可能也会更利于重组疱疹病毒的构建。2005 年，Li 等(Li and Elledge 2005)开发了一种高度工程化的克隆方法，即交配辅助遗传整合克隆(MAGIC)。该方法使用细菌交配和同源重组催化 DNA 片段从一个质粒转移到另一个质粒，使基因从一个表达环境统一、无缝的转移到另一个表达环境，从而允许对大量不同的克隆进行相同的处理，并且可以对大片段进行有效处理和转移。蒋思婧等(Jiang et al 2010)基于 MAGIC 技术构建了重组 PRV BAC 载体，短时间内获得了具有感染性的克隆化病毒，极大的提高了效率，避免 DNA 的体外操作，简化了实验流程。颜富课题组(Yuan et al 2022)利用核酸外切酶结合 RecET 重组(ExoRecET)直接克隆了疱疹病毒基因组获得了感染性 PRV BAC 克隆，避免了环状基因组提取的弊端以及多轮噬斑纯化，同时降低了传代造成的病

毒突变的可能性。以疱疹病毒为载体建立反向遗传操作平台对疱疹病毒发病机制和基因功能的研究有显著优势,有助于确定新的抗病毒靶点,并研发出更有效、更安全的疫苗。

3.4.2 rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组毒的构建策略

本研究构建 rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组毒的中心策略是以 gG 为靶标基因,利用同源重组将 BAC 载体正确插入 FHV-I 基因组中替换 gG 基因,同时利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术增加重组效率进而成功构建含有 BAC 的重组病毒,致力于构建能够同时表达其他病毒保护性抗原的疫苗,进而达到“一苗多用”的目的。

糖蛋白 gG 在 α 疱疹病毒中被描述为具有 I 型膜拓扑结构的次要的非必需膜锚定糖蛋白。FHV-I gG 是一种结构蛋白,作为病毒粒子包膜上的趋化因子结合蛋白,是在细胞培养时病毒复制的非必需蛋白。基于此,本研究以编码 gG 的 US4 基因为靶标基因,将 FHV-I 基因组克隆至 BAC 载体。

本研究首先构建了表达靶向病毒基因组上 gG 基因 sgRNA 的稳转细胞系,在该细胞系的基础上转染 BAC 转移载体后感染 FHV-I,在待细胞产生大量荧光以及病变后,收取细胞反复冻融的上清转接至新细胞中,在新细胞中观察到具有荧光的病变斑即为待确定的重组毒。在此过程中 BAC 转移载体的转染效率对重组毒的构建有至关重要的作用,转染效率越高,得到重组毒的概率就愈大。CRISPR/Cas9 基因编辑技术在构建重组病毒的过程中一定程度上增加了重组效率。BAC 载体技术已被应用到多种疱疹病毒感染性克隆的构建中,其中大多数疱疹病毒重组毒的构建方式均是在宿主细胞上共同转染线性化 BAC 载体和病毒基因组,通过 GFP 荧光表达筛选重组病毒。相较于转移载体的酶切回收而言,提取 BAC 质粒能够较大程度上保证其纯度以及质量,而相较于扩毒纯化后进行基因组转染而言,采用病毒感染的方式也能够较短时间内获得重组毒,同时降低了成本。

3.4.3 rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组毒的纯化

本研究在利用同源重组技术进行重组毒构建时,同时利用了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,该技术不仅在一定程度上提高了同源重组的正确性,而且提高了重组毒的纯化效率。

Bérénice Costes 和 Tai 等在构建 FHV-BAC 克隆时，均选择以 gG 为 BAC 插入的靶位点基因，但是 Tai 等人构建的重组病毒经测序表明插入位点为基因组末端附近的 UL 端，且在 BAC 插入位点的上游整合了细胞基因组的部分序列。本研究在构建重组病毒时，在表达靶向 gG 基因 sgRNA 的稳转细胞系基础上转染 BAC 转移载体后感染 FHV-I 的第一代至第二代便产生了重组毒，测序结果也表明本研究构建的带有 BAC 的 FHV-I 重组病毒的重组位点序列与目的序列是完全一致的，因此应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在较大程度上确保了同源重组的正确性以及高效性。同时重组病毒产生后，sgRNA 的切割作用会导致 FHV-I 基因组断裂从而提高 rFHV-gG⁻/EGFP⁺重组毒筛选纯化时的效率。

3.5 结论

本研究将 FHV-I 的全基因组正确克隆至 BAC 载体，构建了带有 BAC 元件的 gG 缺失的 FHV-I 重组荧光病毒，并表明该重组毒具有与野毒一致的体外生长特性以及稳定的遗传特性。

第四章 全文总结

- （1）本研究最终建立了区分 MD 野毒与 CVI988、814 疫苗毒以及 SC9-1、rMDV-MS- Δmeq 新研发的疫苗毒株的 PCR 检测方法。
- （2）本研究建立的方法特异性好、敏感性高、扩增效果稳定，并进行了初步应用。
- （3）本研究将 FHV-I 的全基因组正确克隆至 BAC 载体，构建了带有 BAC 元件的 gG 缺失的 FHV-I 重组荧光病毒。
- （4）本研究构建的重组毒具有与野毒一致的体外生长特性以及稳定的遗传特性。
- （5）本研究利用的 CRISPR-Cas9 技术能精准切割病毒 gG 基因，提高了重组毒的纯化效率。

参考文献

1. 陈洋宙. 鸡马立克氏病病毒 Meq 蛋白特异性单克隆抗体研制及其初步应用.[硕士学位论文]. 扬州: 扬州大学 图书馆, 2018.
2. 程洋, 冯泽清, 杨辉林, 刘益平, 朱庆. 鸡马立克氏病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. 四川农业大学学报, 2013, 31: 427-432.
3. 崔红玉. 鸡马立克氏病病毒细菌人工染色体的构建.[硕士学位论文]. 中国农业科学院, 2007.
4. 李光富, 陈溥言, 蔡宝祥, 张林元, 邓小昭, 刁振宇. 地高辛核酸探针用于马立克氏病病毒分型鉴定. 中国兽医科技, 1995, 25: 19-20.
5. 李航. 鸡马立克氏病的流行病学、诊断与防控. 现代畜牧科技, 2021: 106-107.
6. 李晓青. 马立克氏病病毒分子生物学研究进展. 山东畜牧兽医, 2015, 36: 58-60.
7. 刘红梅, 秦爱建, 刘岳龙, 金文杰, 叶建强, 陈鸿军, 邵红霞, 李迎晓. 表达 IBDV VP2 融合蛋白的重组 MDV 的构建及其免疫特性. 中国畜牧兽医学会家畜传染病学分会第六届理事会第二次会议暨教学专业委员会第六届代表大会, 中国黑龙江大庆, 2006, 460-463.
8. 刘健, 杨显超, 李凯航, 李鑫, 徐锋, 杨德全, 葛杰, 鞠厚斌, 周锦萍. 抗猫传染性鼻气管炎病毒药物的体外筛选. 中国畜牧兽医, 2017, 44: 3385-3390.
9. 刘洁. MiR-B10-3p 在牛疱疹病毒 5 型体外潜伏感染再激活中的作用研究.[博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学 图书馆, 2020.
10. 吕红超, 张艳萍, 孙国荣, 高玉龙, 李志杰, 郑惠文, 包珂岩, 王笑梅, 刘长军. 鸡马立克氏病强弱病毒株 PCR 鉴别检测方法在诊断中的应用评价. 中国预防兽医学报, 2016, 38: 567-571.
11. 牛江婷. 猫疱疹病毒 1 型调控 IFI16 炎症小体介导炎症反应的分子机制研究.[博士学位论文]. 长春: 吉林农业大学 图书馆, 2021.
12. 屈素洁, 施开创, 胡杰, 张步娴, 尹彦文, 栗艳琼, 莫胜兰, 李军, 邹联斌. 荧光定量 PCR 检测鸡马立克氏病血清 1 型病毒方法的建立及应用. 上海畜牧兽医通讯, 2015: 19-21.

13. 孙国凤. 猫重组双价疫苗的开发. 生物技术通报, 1997: 34-35.
14. 王倩, 王斌. 细菌人工染色体的研究和应用. 中国生物工程杂志, 2002: 18-24.
15. 许达. 鸡马立克氏病的主要病理变化. 现代畜牧科技, 2020: 76,78.
16. 许晓云. 带有 REV-LTR 的 MDV 重组野毒株生物学特性的研究.[硕士学位论文]. 泰安: 山东农业大学 图书馆, 2009.
17. 游小燕, 吴梦, 刘雪芹, 何琦琳, 范晓玲. 基于细菌人工染色体的大基因质粒制备及应用研究. 基因组学与应用生物学, 2021, 40: 296-300.
18. 于得静. 猫疱疹病毒 I 型灭活疫苗的制备及宠物猫免疫效果评价.[硕士学位论文]. 长春: 吉林农业大学 图书馆, 2021.
19. 张继一, 杨作丰, 王竹, 赵玉军. 猫病毒性鼻气管炎的诊断与防治. 现代畜牧兽医, 2009: 44.
20. 张颖, 刘长军, 秦运安, 张艳萍, 张晓巍, 郝永清. 应用双重实时荧光定量 PCR 方法检测鸡马立克氏病血清 1 型病毒. 中国预防兽医学报, 2007: 46-51.
21. 朱潇静, 王芮, 张欣欣, 靳家鑫, 路闻龙, 丁大顺, 霍翠梅, 李青梅, 孙爱军, 庄国庆. 利用细菌人工染色体技术构建整合 F 基因的重组 MDV 疫苗株. 中国生物工程杂志, 2021, 41: 33-41.
22. Adler H, Messerle M, Koszinowski UH. Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes[J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13: 111-121.
23. Aschner CB, Herold BC. Alphaherpesvirus Vaccines[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2021, 41: 469-508.
24. Baigent SJ, Petherbridge LJ, Howes K, Smith LP, Currie RJW, Nair VK. Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR[J]. *J Virol.Methods*, 2005, 123: 53-64.
25. Beasley JN, Patterson LT, McWade DH. Transmission of Marek's disease by poultry house dust and chicken dander[J]. *Am. J Vet Res*, 1970, 31: 339-344.
26. Beaumont SL, Maggs DJ, Clarke HE. Effects of bovine lactoferrin on in vitro replication of feline herpesvirus[J]. *Veterinary ophthalmology*, 2003, 6: 245-250.
27. Boodhoo N, Gurung A, Sharif S, Behboudi S. Marek's disease in chickens: a review

- p>with focus on immunology[J].
- Veterinary research*
- , 2016, 47: 119.
28. Bülow Vv, Biggs PM. Precipitating antigens associated with Marek's disease viruses and a herpesvirus of Turkeys[J]. *Avian Pathology*, 1975, 4: 147-162.
29. Calnek BW. Pathogenesis of Marek's disease virus infection[J]. *Curr. Top. Microbiol*, 2001, 255: 25-55.
30. Calnek BW, Adldinger HK, Kahn DE. Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease[J]. *Avian diseases*, 1970, 14(2): 219-233.
31. Cao N, Tang Z, Zhang X, Li W, Li B, Tian Y, Xu D. Development and Application of a Triplex TaqMan Quantitative Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of Feline Calicivirus, Feline Parvovirus, and Feline Herpesvirus 1[J]. *Front.Vet. Sci*, 2022, 8: 792322.
32. Cebrian J, Kaschka-Dierich C, Berthelot N, Sheldrick P. Inverted repeat nucleotide sequences in the genomes of Marek disease virus and the herpesvirus of the turkey[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 555-558.
33. Chbab N, Egerer A, Veiga I, Jarosinski KW, Osterrieder N. Viral control of vTR expression is critical for efficient formation and dissemination of lymphoma induced by Marek's disease virus (MDV) [J]. *Veterinary research*, 2010, 41: 56.
34. Chen R, Ding J, Wang B. The construction and characterization of the bi-directional promoter between pp38 gene and 1.8-kb mRNA transcripts of Marek's disease viruses[J]. *Virology journal*, 2009, 6: 212.
35. Churchill AE, Biggs PM. Agent of Marek's Disease in Tissue Culture[J]. *Nature*, 1967, 215: 528-530.
36. Colgrove RC, Liu X, Griffiths A, Raja P, Deluca NA, Newman RM, Coen DM, Knipe DM. History and genomic sequence analysis of the herpes simplex virus 1 KOS and KOS1.1 sub-strains[J]. *Virology*, 2016, 487: 215-221.
37. Contreras ET, Hodgkins E, Tynes V, Beck A, Olea-Popelka F, Lappin MR. Effect of a Pheromone on Stress-Associated Reactivation of Feline Herpesvirus-1 in

- Experimentally Inoculated Kittens[J]. *J Vet Intern Med*, 2018, 32: 406-417.
38. Costes B, Thirion M, Dewals B, Mast J, Ackermann M, Markine-Goriaynoff N, Gillet L, Vanderplasschen A. Felid herpesvirus 1 glycoprotein G is a structural protein that mediates the binding of chemokines on the viral envelope[J]. *Microbes and infection*, 2006, 8: 2657-2667.
39. Cui H, Wang Y, Shi X, Tong G, Lan D, He L, Qiu H, Liu C, Wang M. Construction of Marek's Disease Virus Serotype 814 Strain as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome[J]. *Chin J Biotechnol*, 2008, 24: 569-575.
40. Davison A, Clements J. Herpesvirus systematics[J]. *Vet Microbiol*. 2010, 16;143(1):52-69.
41. Davison AJ, Scott JE. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus[J]. *J Gen Virol*, 1986, 67 (Pt 9): 1759-1816.
42. Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD, Squires RA, Vaccination Guidelines Group of the World Small Animal Veterinary A. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats[J]. *J Small Anim Pract*, 2016, 57: E1-E45.
43. Digangi BA, Gray LK, Levy JK, Dubovi EJ, Tucker SJ. Detection of protective antibody titers against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus in shelter cats using a point-of-care ELISA[J]. *J Feline Med. Surg*, 2011, 13: 912-918.
44. Dolan A, Jamieson FE, Cunningham C, Barnett BC, McGeoch DJ. The genome sequence of herpes simplex virus type 2[J]. *J Virol*, 1998, 72: 2010-2021.
45. Draganova EB, Valentin J, Heldwein EE. The Ins and Outs of Herpesviral Capsids: Divergent Structures and Assembly Mechanisms across the Three Subfamilies[J]. *Viruses*, 2021, 13 (10):1913.
46. Eleraky NZ, Potgieter LN, Kennedy MA. Virucidal efficacy of four new disinfectants[J]. *J Am Anim Hosp Assoc* , 2002, 38: 231-234.
47. Fargeaud D, Jeannin CB, Kato F, Chappuis G. Biochemical study of the Feline Herpesvirus 1. Identification of glycoproteins by affinity[J]. *Archives of virology*, 1984, 80: 69-82.

48. Gaskell R, Dawson S, Radford A, Thiry E. Feline herpesvirus[J]. *Veterinary research*, 2007, 38: 337-354.
49. Gaskell R, Willoughby K. Herpesviruses of carnivore[J]. *Veterinary Microbiology*, 1999, 69: 73-88.
50. Gould D. Feline herpesvirus-1: ocular manifestations, diagnosis and treatment options[J]. *J Feline Med Surg*, 2011, 13: 333-346.
51. Gourkow N, Phillips CJ. Effect of interactions with humans on behaviour, mucosal immunity and upper respiratory disease of shelter cats rated as contented on arrival[J]. *Prev Vet Med*, 2015, 121: 288-296.
52. Grail A, Harbour DA, Chia W. Restriction endonuclease mapping of the genome of feline herpesvirus type 1[J]. *Archives of virology*, 1991, 116: 209-220.
53. Hamano M, Maeda K, Mizukoshi F, Mochizuki M, Tohya Y, Akashi H, Kai K. Genetic rearrangements in the gC gene of the feline herpesvirus type 1[J]. *Virus genes*, 2004, 28: 55-60.
54. Handberg KJ, Nielsen OL, Jørgensen PH. The use of serotype 1- and serotype 3-specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens[J]. *Avian Pathol*, 2001, 30: 243-249.
55. Haq K, Schat KA, Sharif S. Immunity to Marek's disease: Where are we now[J]. *Dev Comp Immunol*, 2013, 41: 439-446.
56. Heintz N, Gong S. Working with Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) and Other High-Capacity Vectors[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020, 2020(10).
57. Henzel A, Brum MC, Lautert C, Martins M, Lovato LT, Weiblen R. Isolation and identification of feline calicivirus and feline herpesvirus in Southern Brazil[J]. *Braz J Microbiol*, 2012, 43: 560-568.
58. Jarosinski KW, Tischer BK, Trapp S, Osterrieder N. Marek's disease virus: lytic replication, oncogenesis and control[J]. *Expert review of vaccines*, 2006, 5: 761-772.
59. Jiang S, Zhong X, Zhai C, Chen L, Ma L, Jin M, Chen H. Constructing recombinant herpesvirus BAC vectors with mating-assisted genetically integrated clone method[J].

- Biotechnology letters*, 2010, 32: 903-907.
60. Junge RE, Miller RE, Boever WJ, Scherba G, Sundberg J. Persistent cutaneous ulcers associated with feline herpesvirus type 1 infection in a cheetah[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1991, 198: 1057-1058.
 61. Kannaki TR, Edigi P, Yalagandula N, Haunshi S. Simultaneous detection and differentiation of three oncogenic viral diseases of chicken by use of multiplex PCR[J]. *Animal biotechnology*, 2021: 1-6.
 62. Kennedy DA, Dunn PA, Read AF. Modeling Marek's disease virus transmission: A framework for evaluating the impact of farming practices and evolution[J]. *Epidemics*, 2018, 23: 85-95.
 63. Kim SJ, Park YH, Park KT. Development of a novel reverse transcription PCR and its application to field sample testing for feline calicivirus prevalence in healthy stray cats in Korea[J]. *J Vet Sci*, 2020, 21: e71-e71.
 64. Klupp BG, Hengartner CJ, Mettenleiter TC, Enquist LW. Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome[J]. *J Virol*, 2004, 78: 424-440.
 65. Kruger JM, Sussman MD, Maes RK. Glycoproteins g1 and gE of feline herpesvirus-1 are virulence genes: safety and efficacy of a g1-gE deletion mutant in the natural host[J]. *Virology*, 1996, 220: 299-308.
 66. Kung HJ, Xia L, Brunovskis P, Li D, Liu JL, Lee LF. Meq: an MDV-specific bZIP transactivator with transforming properties[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 255: 245-260.
 67. Lan D, Shi X, Wang Y, Cui H, Liu C, Wang M, Hu W, Tong G. Reconstituting turkey herpesvirus with bacterial artificial chromosome clones[J]. *Acta microbiologica Sinica*, 2008, 48: 811-817.
 68. Larson A, Oh HS, Knipe D, Klivanov A. Decreasing Herpes Simplex Viral Infectivity in Solution by Surface-Immobilized and Suspended N,N-Dodecyl,methyl-polyethylenimine[J]. *Pharm Res*, 2012, 30(1):25-31.
 69. Lee LF, Liu X, Witter RL. Monoclonal antibodies with specificity for three different

- serotypes of Marek's disease viruses in chickens[J]. *J Immunol*, 1983, 130: 1003-1006.
70. Lee LF, Lupiani B, Silva RF, Kung H-J, Reddy SM. 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: 1887-1892.
71. Lee LF, Wu P, Sui D, Ren D, Kamil J, Kung HJ, Witter RL. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000a, 97: 6091-6096.
72. Lee SI, Takagi M, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. Difference in the meq gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1[J]. *The Journal of veterinary medical science*, 2000b, 62: 287-292.
73. Lewin AC, Kolb AW, McLellan GJ, Bentley E, Bernard KA, Newbury SP, Brandt CR. Genomic, Recombinational and Phylogenetic Characterization of Global Feline Herpesvirus 1 Isolates[J]. *Virology*, 2018, 518: 385-397.
74. Li MZ, Elledge SJ. MAGIC, an in vivo genetic method for the rapid construction of recombinant DNA molecules[J]. *Nature genetics*, 2005, 37: 311-319.
75. Li Y, Sun A, Su S, Zhao P, Cui Z, Zhu H. Deletion of the Meq gene significantly decreases immunosuppression in chickens caused by pathogenic Marek's disease virus[J]. *Virology journal*, 2011, 8: 2-2.
76. Limcumpao JA, Horimoto T, Xuan X, Takahashi E, Mikami T. Immunological relationship between feline herpesvirus type 1 (FHV-1) and canine herpesvirus (CHV) as revealed by polyvalent and monoclonal antibodies[J]. *Arch Virol*, 1990, 111: 165-176.
77. Limcumpao JA, Horimoto T, Xuan XN, Tohya Y, Azetaka M, Takahashi E, Mikami T. Homologous and heterologous antibody responses of mice immunized with purified feline herpesvirus type 1 and canine herpesvirus glycoproteins[J]. *J Vet Med Sci*, 1991, 53: 423-432.
78. Lupiani B, Lee LF, Cui X, Gimeno I, Anderson A, Morgan RW, Silva RF, Witter RL, Kung HJ, Reddy SM. Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication[J]. *Proc Natl Acad Sci*

- USA, 2004, 101: 11815-11820.
79. Maeda K, Hirasawa K, Kawaguchi Y, Ono M, Mori T, Gemma T, Yokoyama N, Doi K, Mikami T. Expression and identification of the feline herpesvirus type 1 glycoprotein B (gp143/108) [J]. *Virus research*, 1995, 39: 55-61.
80. Maeda K, Horimoto T, Mikami T. Properties and functions of feline herpesvirus type 1 glycoproteins[J]. *J Vet Med Sci*, 1998, 60: 881-888.
81. Maeda K, Ono M, Kawaguchi Y, Niikura M, Okazaki K, Yokoyama N, Tokiyoshi Y, Tohya Y, Mikami T. Expression and properties of feline herpesvirus type 1 gD (hemagglutinin) by a recombinant baculovirus[J]. *Virus research*, 1996, 46: 75-80.
82. Maggs DJ. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1[J]. *Clin Tech Small Anim Pract*, 2005, 20: 94-101.
83. Maggs DJ, Clarke HE. Relative sensitivity of polymerase chain reaction assays used for detection of feline herpesvirus type 1 DNA in clinical samples and commercial vaccines[J]. *Am J Vet Res*, 2005, 66: 1550-1555.
84. Maggs DJ, Nasisse MP, Kass PH. Efficacy of oral supplementation with L-lysine in cats latently infected with feline herpesvirus[J]. *Am J Vet Res*, 2003, 64: 37-42.
85. Marsilio F, Di Martino B, Aguzzi I, Meridiani I. Duplex polymerase chain reaction assay to screen for feline herpesvirus-1 and Chlamydomphila spp. in mucosal swabs from cats[J]. *Vet Res Commun*, 2004, 28 Suppl 1: 295-298.
86. McPherson MC, Delany ME. Virus and host genomic, molecular, and cellular interactions during Marek's disease pathogenesis and oncogenesis[J]. *Poult Sci*, 2016, 95: 412-429.
87. Mejía JE, Monaco AP. Retrofitting vectors for Escherichia coli-based artificial chromosomes (PACs and BACs) with markers for transfection studies[J]. *Genome Res*, 1997, 7: 179-186.
88. Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 14759-14763.

89. Mishima M, Xuan X, Nishikawa Y, Makala L, Yokoyama N, Nagasawa H, Mikami T. Construction of recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* surface antigen 1[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2001, 117: 103-106.
90. Morrow C, Fehler F. 2004. 5 - Marek's disease: A worldwide problem, In: Davison F, Nair V (Eds.) *Marek's Disease*[J]. Academic Press, Oxford, 49-61.
91. Nair V. Evolution of Marek's disease – A paradigm for incessant race between the pathogen and the host[J]. *Vet J*, 2005, 170: 175-183.
92. Neuerer FF, Horlacher K, Truyen U, Hartmann K. Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats[J]. *J Feline Med Surg*, 2008, 10: 247-251.
93. Osterrieder N, Kamil JP, Schumacher D, Tischler BK, Trapp S. Marek's disease virus: from miasma to model[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 283-294.
94. Petherbridge L, Howes K, Baigent SJ, Sacco MA, Evans S, Osterrieder N, Nair V. Replication-competent bacterial artificial chromosomes of Marek's disease virus: novel tools for generation of molecularly defined herpesvirus vaccines[J]. *J Virol*, 2003, 77: 8712-8718.
95. Reddy SM. Book Review: Marek's Disease: An Evolving Problem[J]. *Veterinary Pathology*, 2006, 43: 396-397.
96. Reddy SM, Lupiani B, Gimeno IM, Silva RF, Lee LF, Witter RL. Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002a, 99: 7054-7059.
97. Richards JR, Elston TH, Ford RB, Gaskell RM, Hartmann K, Hurley KF, Lappin MR, Levy JK, Rodan I, Scherk M, Schultz RD, Sparkes AH. The 2006 American Association of Feline Practitioners Feline Vaccine Advisory Panel report[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2006, 229: 1405-1441.
98. Ross LJ, Binns MM. Properties and evolutionary relationships of the Marek's disease virus homologues of protein kinase, glycoprotein D and glycoprotein I of herpes simplex virus[J]. *J Gen Virol*, 1991, 72 (Pt 4): 939-947.

99. Rota PA, Maes RK, Ruyechan WT. Physical characterization of the genome of feline herpesvirus-1[J]. *Virology*, 1986a, 154: 168-179.
100. Rozins C, Day T, Greenhalgh S. Managing Marek's disease in the egg industry[J]. *Epidemics*, 2019, 27: 52-58.
101. Schalkwyk LC, Francis F, Lehrach H. Techniques in mammalian genome mapping[J]. *Curr Opin in Biotechnol*, 1995, 6: 37-43.
102. Shi MY, Li M, Wang WW, Deng QM, Li QH, Gao YL, Wang PK, Huang T, Wei P. The Emergence of a vv + MDV Can Break through the Protections Provided by the Current Vaccines[J]. *Viruses*, 2020b, 12(9): 1048.
103. Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 8794-8797.
104. Silva RF, Gimeno I. Oncogenic Marek's disease viruses lacking the 132 base pair repeats can still be attenuated by serial in vitro cell culture passages[J]. *Virus genes*, 2007, 34: 87-90.
105. Spatz SJ, Maes RK. Immunological characterization of the feline herpesvirus-1 glycoprotein B and analysis of its deduced amino acid sequence[J]. *Virology*, 1993, 197: 125-136.
106. Spatz SJ, Rota PA, Maes RK. Identification of the feline herpesvirus type 1 (FHV-1) genes encoding glycoproteins G, D, I and E: expression of FHV-1 glycoprotein D in vaccinia and raccoon poxviruses[J]. *J Gen Virol*, 1994, 75 (Pt 6): 1235-1244.
107. Spertus CB, Pennington MR, Van de Walle GR, Badanes ZI, Judd BE, Mohammed HO, Ledbetter EC. Effects of orally administered raltegravir in cats with experimentally induced ocular and respiratory feline herpesvirus-1 infection[J]. *Am J Vet Res*, 2019, 80: 490-497.
108. Stolz ML, McCormick C. The bZIP Proteins of Oncogenic Viruses[J]. *Viruses*, 2020, 12 (7): 757.
109. Streck AF, Rüster D, Truyen U, Homeier T. An updated TaqMan real-time PCR for

- canine and feline parvoviruses[J]. *J Virol Methods*, 2013, 193: 6-8.
110. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 27348-27357.
111. Su S, Cui N, Zhou Y, Chen Z, Li Y, Ding J, Wang Y, Duan L, Cui Z. 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: 596-603.
112. Summers SC, Ruch-Gallie R, Hawley JR, Lappin MR. Effect of modified live or inactivated feline herpesvirus-1 parenteral vaccines on clinical and laboratory findings following viral challenge[J]. *J Feline Med Surg*, 2017, 19: 824-830.
113. Sun G-R, Zhang Y-P, Zhou L-Y, Lv H-C, Zhang F, Li K, Gao Y-L, Qi X-L, Cui H-Y, Wang Y-Q, Gao L, Pan Q, Wang X-M, Liu C-J. Co-Infection with Marek's Disease Virus and Reticuloendotheliosis Virus Increases Illness Severity and Reduces Marek's Disease Vaccine Efficacy[J]. *Viruses*, 2017, 9: 158.
114. Sussman MD, Maes RK, Kruger JM. Vaccination of Cats for Feline Rhinotracheitis Results in a Quantitative Reduction of Virulent Feline Herpesvirus-1 Latency Load after Challenge[J]. *Virology*, 1997, 228: 379-382.
115. Sykes JE. Pediatric feline upper respiratory disease[J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2014, 44: 331-342.
116. Tai SH, Niikura M, Cheng HH, Kruger JM, Wise AG, Maes RK. Complete genomic sequence and an infectious BAC clone of feline herpesvirus-1 (FHV-1) [J]. *Virology*, 2010, 401: 215-227.
117. Tai SHS, Holz C, Engstrom MD, Cheng HH, Maes RK. In vitro characterization of felid herpesvirus 1 (FHV-1) mutants generated by recombineering in a recombinant BAC vector[J]. *Virus research*, 2016, 221: 15-22.
118. Thiry E, Addie D, Belák S, Boucraut C, Egberink HF, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie M, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford A, Truyen U,

- Horzinek M. Feline Herpesvirus Infection[J]. *J Feline Med Surg*, 2009, 11: 547-555.
119. Thomasy SM, Shull O, Outerbridge CA, Lim CC, Freeman KS, Strom AR, Kass PH, Maggs DJ. Oral administration of famciclovir for treatment of spontaneous ocular, respiratory, or dermatologic disease attributed to feline herpesvirus type 1: 59 cases (2006-2013) [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2016, 249: 526-538.
120. Townsend WM, Jacobi S, Tai SH, Kiupel M, Wise AG, Maes RK. Ocular and neural distribution of feline herpesvirus-1 during active and latent experimental infection in cats[J]. *BMC Vet Res*, 2013, 9: 185.
121. Tsukamoto K, Saito S, Saeki S, Sato T, Tanimura N, Isobe T, Mase M, Imada T, Yuasa N, Yamaguchi S. Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens[J]. *J Virol*, 2002, 76: 5637-5645.
122. Tusche C, Steinbrück L, McHardy AC. Detecting patches of protein sites of influenza A viruses under positive selection[J]. *Mol Biol Evol*, 2012, 29: 2063-2071.
123. Walsh SR. Viral genomes[J]. *CMAJ*, 2003, 168: 544-544.
124. Wang J, Liu L, Wang J, Sun X, Yuan W. Recombinase Polymerase Amplification Assay- A Simple, Fast and Cost-Effective Alternative to Real Time PCR for Specific Detection of Feline Herpesvirus-1[J]. *PloS one*, 2017, 12: e0166903.
125. Willemse MJ, Chalmers WS, Cronenberg AM, Pfundt R, Strijdeven IG, Sondermeijer PJ. The gene downstream of the gC homologue in feline herpes virus type 1 is involved in the expression of virulence[J]. *J Gen Virol*, 1994, 75 (Pt 11): 3107-3116.
126. Willemse MJ, Chalmers WS, Sondermeijer PJ. In vivo properties of a feline herpesvirus type 1 mutant carrying a lacZ insertion at the gI locus of the unique short segment[J]. *Vaccine*, 1996, 14: 1-5.
127. Witte CL, Lamberski N, Rideout BA, Vaida F, Citino SB, Barrie MT, Haefele HJ, Junge RE, Murray S, Hungerford LL. Epidemiology of clinical feline herpesvirus infection in zoo-housed cheetahs (*Acinonyx jubatus*) [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2017, 251: 946-956.
128. Witter RL, Calnek BW, Buscaglia C, Gimeno IM, Schat KA. Classification of Marek's

- disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology[J]. *Avian Pathol*, 2005, 34: 75-90.
129. Witter RL, Nazerian K, Purchase HG, Burgoyne GH. Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus[J]. *Am J Vet Res*, 1970, 31: 525-538.
130. Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E. Direct detection of Marek's disease virus in poultry dust by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Arch Virol*, 2014, 159: 3083-3087.
131. Yokoyama N, Fujita K, Damiani A, Sato E, Kurosawa K, Miyazawa T, Ishiguro S, Mochizuki M, Maeda K, Mikami T. Further development of a recombinant feline herpesvirus type 1 vector expressing feline calicivirus immunogenic antigen[J]. *J Vet Med Sci*, 1998, 60: 717-723.
132. Yokoyama N, Maeda K, Kawaguchi Y, Ono M, Tohya Y, Mikami T. Construction of the recombinant feline herpesvirus type 1 deleted thymidine kinase gene[J]. *J Vet Med Sci*, 1995, 57: 709-714.
133. Yokoyama N, Maeda K, Mikami T. Recombinant viral vector vaccines for the veterinary use[J]. *J Vet Med Sci*, 1997, 59: 311-322.
134. Yuan H, Zheng Y, Yan X, Wang H, Zhang Y, Ma J, Fu J. Direct cloning of a herpesvirus genome for rapid generation of infectious BAC clones[J]. *J Adv Res*, 2022.23: 2090-1232.
135. Zelnik V, Harlin O, Fehler F, Kaspers B, Göbel TW, Nair VK, Osterrieder N. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Marek's disease virus-specific antibodies and its application in an experimental vaccine trial[J]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2004, 51: 61-67.
136. Zhang F, Liu C-J, Zhang Y-P, Li Z-J, Liu A-L, Yan F-H, Cong F, Cheng Y. Comparative full-length sequence analysis of Marek's disease virus vaccine strain 814[J]. *Arch. Virol*, 2012, 157: 177-183.
137. Zhang Y, Cui N, Han N, Wu J, Cui Z, Su S 2017. Depression of Vaccinal Immunity to

- Marek's Disease by Infection with Chicken Infectious Anemia Virus[J]. *Front Microbiol*,2017, 8: 1863.
138. Zhao Y, Petherbridge L, Smith LP, Baigent S, Nair V 2008. Self-excision of the BAC sequences from the recombinant Marek's disease virus genome increases replication and pathogenicity[J]. *Virol J*,2008, 5: 19.
139. Zhu S, Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus[J]. *Virulence*, 2021, 12: 2670-2702.

致谢

时光荏苒，岁月如梭，研究生生涯转眼间就接近尾声了，三年来的种种在脑海里一闪而过，踏入校门、走进实验室的那一刻仿佛就在昨天。三年时光里，不论是学习还是生活，我都获益匪浅。

首先非常感谢我的导师韩丽副教授和张安定教授对我课题的指导，从两位老师身上我学习到了其严谨的科学态度以及缜密的思维逻辑，尤其是碰到科学问题时不怕困难和精心钻研的精神，不仅是学习和科研，生活上两位老师也给予了我无微不至的关怀，不论是因为疫情不得不就地过年时老师们的关照，还是享受生活接近自然的春游，我都感受到了老师们对学生的爱护和关心，这也将在今后的工作和学习中给予我莫大的帮助。

感谢陈焕春院士、金梅林教授给我们提供优良的科研平台。感谢动物科学技术学院动物医学院、农业微生物学国家重点实验室，湖北省生猪健康养殖协同创新中心的各位领导，各位老师们提供的技术平台支持和实验材料的帮助，让我能够在良好的环境中顺利完成自己的课题。感谢武汉科前生物股份有限公司的领导和师兄师姐对我实验材料提供的支持。

感谢国家重点研发计划（2016YFD0500801）对本课题的资助。

感谢靳泽华师姐和蔡聪师兄对我实验以及课题的帮助和指导，培养我设计实验的能力，指导我解决问题，训练我的逻辑思维能力。感谢和魁静在实验和生活中给予我的帮助和关心。感谢易辰阳、王晓萍、吴月、徐磊、卢曦、刘冉等师兄师姐给予我的指导和帮助，感谢已经毕业的成泽、彭嘉安、王珊、黄英等师兄师姐以及已毕业的田晓刚等的帮助，感谢杨高平、周丽婷、叶贵珊等给予我的帮助和支持，感谢张玮瑾、张承凤、胡欣月、杨旭、严霞、冯凡琛、曾悦、曾红玉、夏坤龙、高培颖、王裕华、崔淑悦、戴秉倩等师弟师妹们的帮助，祝实验顺利。

感谢我的父母，在我研究生期间给予我无条件的理解、帮助和支持。

衷心感谢一路以来给予我帮助的老师同学、师兄师姐、师弟师妹以及家人朋友。

周冬玉

二〇二二年六月