

张志会, 滕蔓, 刘金玲, 等. 马立克病病毒 *meq* 基因缺失毒株 HN302 $\Delta$ *meq* 的构建及致病性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (10): 71-79.  
ZHANG Z H, TENG M, LIU J L, et al. Generation and pathogenicity analysis of a *meq*-deleted mutant HN302 $\Delta$ *meq* of Marek's disease virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (10): 71-79.

## 马立克病病毒 *meq* 基因缺失毒株 HN302 $\Delta$ *meq* 的构建及致病性分析

张志会<sup>1,2,3</sup>, 滕蔓<sup>1,3</sup>, 刘金玲<sup>1,3</sup>, 郑鹿平<sup>1,3</sup>, 王伟东<sup>1,2,3</sup>, 张文凯<sup>1,3,4</sup>,  
张多<sup>1,3,4</sup>, 李林燕<sup>1,3,4</sup>, 张卓<sup>1,2,3</sup>, 柴书军<sup>1,3</sup>, 樊剑鸣<sup>2</sup>, 罗俊<sup>1,3,4\*</sup>

- 河南省农业科学院动物疫病防控研究所中英禽病国际研究中心, 河南 郑州 450002;
- 郑州大学公共卫生学院, 河南 郑州 450001;
- 龙湖现代免疫实验室, 河南 郑州 450046;
- 河南科技大学动物科技学院功能微生物与畜禽健康实验室, 河南 洛阳 471003)

**摘要:** 马立克病 (MD) 是由马立克病病毒 (MDV) 感染引起的一种重要的家禽免疫抑制病与肿瘤病, 严重危害世界养禽业。随着 MDV 持续进化及毒力增强, 急需研发新型高效的 MD 疫苗以加强该病的有效防控。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 以 MDV 变异株 HN302 为亲本毒株, 成功构建了 *meq* 基因缺失的毒株 HN302 $\Delta$ *meq*, 经过 PCR 扩增鉴定及测序分析, 证实 *meq* 基因缺失且传代稳定。间接免疫荧光试验 (IFA) 和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析均证实 HN302 $\Delta$ *meq* 感染鸡胚成纤维细胞 (CEF) 中无 *meq* 基因表达, 并且 *meq* 基因的缺失不影响其他病毒基因的表达。利用 RT-qPCR 分析 HN302 $\Delta$ *meq* 在 CEF 中的体外增殖曲线, 结果显示 *meq* 基因的缺失不影响 MDV 体外复制。1 日龄 SPF 鸡攻毒试验结果显示, 与亲本毒株 HN302 相比, HN302 $\Delta$ *meq* 对宿主无致病性, 其诱导的 MD 发病率、死亡率和肿瘤发生率均为 0, 且未观察到明显的免疫器官萎缩。上述数据表明, HN302 $\Delta$ *meq* 的毒力明显丧失, 具备继续作为疫苗候选株开展相关研究的可能性。本研究成功构建了 MDV 变异株 HN302 的 *meq* 基因缺失毒株, 为后续 MDV 的致病机制及新型疫苗研究奠定了基础。

**关键词:** 鸡; 马立克病病毒; *meq* 基因; CRISPR/Cas9; 基因编辑; 致病性

**中图分类号:** S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)10-0071-09

## Generation and pathogenicity analysis of a *meq*-deleted mutant HN302 $\Delta$ *Meq* of Marek's disease virus

ZHANG Zhihui<sup>1,2,3</sup>, TENG Man<sup>1,3</sup>, LIU Jinling<sup>1,3</sup>, ZHENG Luping<sup>1,3</sup>, WANG Weidong<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Wenkai<sup>1,3,4</sup>,  
ZHANG Duo<sup>1,3,4</sup>, LI Linyan<sup>1,3,4</sup>, ZHANG Zhuo<sup>1,2,3</sup>, CHAI Shujun<sup>1,3</sup>, FAN Jianming<sup>2</sup>, LUO Jun<sup>1,3,4\*</sup>

- Institute of Animal Health & UK-China Centre of Excellence for Research on Avian Diseases, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
- College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
- Longhu Laboratory, Zhengzhou 450046, China;
- Laboratory of Functional Microbiology and Animal Health, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** Marek disease (MD), caused by Marek's disease virus (MDV), is one of the most serious avian immunosuppressive and neoplastic diseases, and it brings damage to the healthy development of global poultry industry. Due to the persistent evolution and increasing virulence of MDV, it is urgent to develop novel and high efficient MD vaccines against this disease. Herein, using the CRISPR/Cas9-based gene editing technique, we successfully constructed a *meq*-deleted MDV mutant named HN302 $\Delta$ *meq* using the highly virulent MDV Chinese

收稿日期: 2023-08-31; 修回日期: 2024-08-01

基金项目: 国家自然科学基金 (U21A20260); 国家重点研发计划 (2023YFE0106100); 河南省杰出青年科学基金 (232300421009); 河南省农业科学院自主创新项目 (2024ZC096)

第一作者: 张志会, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 罗俊, 研究员, 主要从事动物病毒学研究, E-mail: luojun593@aliyun.com.

variant HN302 as a parental virus. The stable deletion of the *meq* gene from the viral genome of HN302Δ*meq* was confirmed by both of polymerase chain reaction (PCR) amplification and subsequent DNA sequencing. Indirect immunofluorescence assay (IFA) and reverse transcriptional real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis also confirmed that the Meq protein did not express in HN302Δ*meq*-infected CEFs, and the deletion of *meq* did not affect the expression of other MDV-1 genes. The *in vitro* proliferation curve of the virus determined by qPCR showed that deletion of *meq* did not affect virus replication. Animal experiments on 1-day-old SPF chickens showed that, compared with the parental HN302, the pathogenicity of HN302Δ*meq* had been significantly weakened, and all of the cumulative morbidity, mortality, and tumor incidence of MD in virus-challenged birds were 0, without any serious atrophy of immune organs. These data indicated that, compared with HN302, the virulence of HN302Δ*meq* was significantly omitted and it might possible to be used for future studies on MD vaccine candidate strains. In conclusion, we successfully constructed a *meq*-deleted mutant of the virulent MDV Chinese variant, of which the virulence was significantly eliminated; and this study might serve as an important basis for future research on MDV pathogenesis and development of novel MD vaccines.

**Keywords:** chicken; Marek's disease virus; *meq* gene; CRISPR/Cas9; gene editing; pathogenesis

马立克病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 属于 α 疱疹病毒亚科、马立克病病毒属, 感染宿主鸡可以引起严重的免疫抑制、神经损伤及内脏多发性 T 细胞淋巴瘤, 最终导致发病鸡大批死亡, 每年给我国乃至世界养禽业造成巨大经济损失<sup>[1]</sup>。MDV 共有 3 种不同的血清型, 仅血清 1 型 MDV (MDV-1) 分离株对宿主具有致病性和致瘤性。在最新的病毒学分类中, MDV-1 已被重新命名为禽 α 疱疹病毒 2 型 (*Gallid alphaherpesvirus 2*, GaAHV-2)<sup>[2]</sup>。随着 MDV 疫苗长期广泛的应用, 在强大的免疫压力下, MDV 的毒力也在不断进化。根据对宿主致病性和毒力的差异, MDV-1 分离株又被进一步分为多种不同致病型, 如弱毒 MDV (mMDV)、强毒 MDV (vMDV)、超强毒 MDV (vvMDV) 和特超强毒 MDV (vv+MDV)<sup>[3]</sup>。MDV-1 感染后造成的宿主免疫抑制, 极易导致其他疫苗的免疫失败、继发感染以及诱发其他疾病, 如并发禽白血病或高致病性禽流感, 从而导致间接的经济损失或引发严重的公共卫生事件<sup>[4]</sup>。近年来, 部分 MDV 流行毒株的遗传进化和变异, 尤其是 vv+MDV 毒株和超强毒 MDV 变异株 (HV-MDV) 的出现, 更是已经突破了传统 MD 商品疫苗 (如 HVT、SB-1、CVI988 和 814 等) 所提供的免疫保护, 导致我国以至全球的 MD 疫情频发<sup>[5-9]</sup>。

为了更好地保障世界养禽业健康发展, 尽快研发下一代新型高效的 MD 疫苗已迫在眉睫。*meq* 基因是公认的 MDV 主要致瘤基因, 该基因全长 1 020 bp, 在 MDV 基因组中有 2 个拷贝, 可在 MDV 诱导的肿瘤细胞中持续表达。*meq* 基因编码的 Meq 蛋白多以二聚体的形式存在, 因其蛋白结构与肿瘤蛋白 FOS 结构相似, 被认为是一种致瘤蛋白和转录激活因子<sup>[10]</sup>。已有研究表明, 利用细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 和基因同源重组技术, 将 *meq* 基因从病毒基因组中敲除, 可以消除 MDV 对宿主的致瘤性<sup>[11-13]</sup>。因此, *meq* 基因一直是 MD 肿瘤发

生机制和疫苗候选毒株研究的热点。最近几年, 作为新一代基因编辑技术, 基于成簇的规律间隔的短回文重复序列 (cluster regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 及其相关蛋白 9 (Cas9) 的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 已被广泛应用于病毒学研究, 尤其是大基因组 DNA 病毒, 如疱疹病毒的基因编辑和疫苗研究<sup>[14-16]</sup>。与 BAC 克隆和基因同源重组技术相比, CRISPR/Cas9 系统不仅编辑效率高、操作简便、成本低廉, 而且能对靶标基因进行精确编辑而无外源基因干扰。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 国内外学者已成功编辑了 Md5、GX0101、RB-1B 以及 BS/15 毒株的 *meq* 基因以及其他一些重要的 MDV 蛋白编码基因或非编码 RNA<sup>[17-25]</sup>, 为深入研究 MDV 基因功能、致病致瘤机制以及新型疫苗株的构建提供了重要技术支撑。

最近, 实验室对此前从国内分离的一批 MDV 毒株进行了致病性和致病型鉴定, 从中发现 1 株超强毒 MDV 变异株 HN302, 该毒株不仅突破了 HVT 和 CVI988 疫苗的免疫保护, 而且在中国鸡群中出现并至少流行 10 年以上, 这可能是导致免疫鸡群 MD 疫情频发的重要因素之一<sup>[6]</sup>。在遗传进化关系上, HN302 与绝大部分 MDV 中国分离株处于同一个进化分支<sup>[5,8]</sup>, 有可能具有更好的免疫抗原性。为进一步探讨其作为新型 MDV 疫苗候选毒株的亲本毒株的可能性, 本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 对 HN302 的 *meq* 基因进行了缺失、病毒克隆纯化以及一系列的生物学特性鉴定, 最终获得 *meq* 基因缺失的 MDV 毒株 HN302Δ*meq*, 为后续研究 MDV 基因功能、致病机制、疫苗开发等奠定了重要基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞和动物

MDV 中国超强变异株 HN302, 由河南省农业科学院动物疫病防控研究所分离保存<sup>[6]</sup>。SPF 种蛋, 购

自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司, 自行孵化至9日龄用于制备原代鸡胚成纤维细胞 (chicken embryonic fibroblasts, CEF)。1日龄 SPF 白来航鸡, 购自济南斯派福瑞家禽科技有限公司。

## 1.2 主要试剂

M199培养基、Opti-MEM培养基和胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS), 购自Gibco公司; 磷酸胰蛋白胨肉汤培养基 (tryptone phosphate broth, TPB), 购自BD公司; 0.25%胰酶、双抗、蛋白酶K溶液 (10 mg/mL)、1 mol/L Tris-HCl (pH=8.0)、0.5 mol/L EDTA溶液 (pH=8.0)、鸡外周血淋巴细胞分离液, 购自Solarbio公司; 2×Easy Taq PCR Super Mix、DH5α感受态、TRIzol试剂, 购自TaKaRa公司; PrimeScript™ RT Master Mix, 购于宝日医生物技术 (北京) 有限公司; pX459-gRNA组合质粒gR-F3和gR-R2<sup>[18]</sup>、MDV gB基因和鸡内参基因 *ovo* 阳性对照质粒 pMD19T-gB和pMD19T-OVO, 均由河南省农业科学院动物疫病防控研究所制备保存; MDV-Meq免源多抗, 由英国 Pirbright 研究所 Venugopal Nair 教授馈赠; MDV-gB鼠源单抗5E8, 由河南省农业科学院动物疫病防控研究所制备保存<sup>[26]</sup>; DyLight 488标记的羊抗鼠IgG和DyLight 594标记的羊抗兔IgG, 购自亚科因 (武汉) 生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒 E. Z. N. A.® Endo-free Plasmid Mini Kit, 购自Omega Bio-Tek公司; 转染试剂 Trans IT-X2™ Dynamic Delivery System, 购自Mirusbio公司; 血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒和胶回收试剂盒, 购自Tiangen公司; FastStart Universal SYBR Green Master (ROX), 购自Roche公司; 鸡外周血淋巴细胞分离液试剂盒, 购自Solarbio公司。

## 1.3 meq 基因编辑及效果分析

为便于MDV基因缺失株的PCR鉴定及筛选, 采取双gRNAs靶向 $meq$ 基因前后两端的策略, 将 $meq$ 基因中间序列完整切除, 以期产生较大的基因编辑双链DNA缺口, 来明显区分PCR扩增的野生型条带和基因编辑条带。简述如下: 提前24 h在24孔板中按照 $2.5 \times 10^5$ 个/孔的剂量接种细胞, 置于38.5℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 制备CEF单层。按照Trans IT-X2™ Dynamic Delivery System试剂说明书, 将Trans IT-X2和本研究所此前制备保存的pX459-gRNA质粒对gR-F3/gR-R2<sup>[18]</sup>均匀混合后, 共转染CEF单层, 置于培养箱中培养, 24 h后按照1 000 PFU/孔、3 000 PFU/孔、5 000 PFU/孔和7 000 PFU/孔接种HN302病毒液, 感染48 h后用胰蛋白酶消化细胞单层, 取其中一半病毒/细胞培养物, 4 000 r/min离心5 min, 弃去上清液保留细胞沉淀, 加入80 μL的1×

Squishing Buffer (10 mmol/L Tris HCl, 1 mmol/L EDTA, 25 mmol/L NaCl和200 μg/mL蛋白酶K), 经过温浴裂解 (65℃ 30 min, 95℃ 5 min) 后得到细胞/病毒总DNA, 使用表1列示的引物对 $meq$ -F/ $meq$ -R对 $meq$ 基因进行PCR扩增 (95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30个循环; 72℃延伸5 min), PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行分析。

表1 用于MDV  $meq$  基因编辑鉴定的引物

引物名称	序列 (5'→3')	片断长度/bp
$meq$ -F	TGCTGGAATGTTAAGAATAAATTCGCAC	1 121
$meq$ -R	TCAGGGTCTCCCGTCACCTGGAAACCACCA	
$yg$ -gB-F	TCTAGGGCATGGCACACGCAC	125
$yg$ -gB-R	GAATACGGAACACAGAGCGG	
$yg$ -OVO-F	AAGCAAGAGAAATGGGCTGAT	133
$yg$ -OVO-R	AGGAGGGGAAGACATCCAGTA	
$yg$ -RLORF4-F	TGCTTGTTTTGGTAATTTGCTC	275
$yg$ -RLORF4-R	TACTGGAACACAAGACTATGAGGAC	
$yg$ -RLORF5a-F	AATACCTCATCGCAGAGACGC	162
$yg$ -RLORF5a-R	CTCGTTCCGTTTCGCTCTTTC	

## 1.4 meq 基因缺失毒株的克隆纯化

取上述经PCR扩增鉴定确认已发生基因编辑的另一半病毒/细胞培养物, 进行有限梯度稀释后, 转接至新的CEF单层6孔板中, 置于38.5℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养3~5 d, 待观察到明显MDV噬斑后, 于显微镜下挑取单个噬斑至新的CEF单层24孔板中, 继续培养48 h后进行PCR鉴定。如此重复, 对PCR鉴定阳性的克隆孔连续进行2~3轮单噬斑病毒克隆纯化。最终经PCR鉴定全部病毒克隆均为阳性编辑时, 对其 $meq$ 基因编辑目的片段的PCR产物进行切胶回收, 纯化后连接pMD19-T载体并转化DH5α感受态细胞, 过夜培养挑取单菌落, 用 $meq$ -F/ $meq$ -R引物对进行PCR鉴定, 挑选阳性克隆摇菌培养, 然后送样至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序分析。确认获得特异性的 $meq$ 基因编辑缺失毒株HN302Δ $meq$ 之后, 将其扩大培养、测定病毒滴度, 最后置于液氮中保存。取1支冻存毒株, 复苏后将其在CEF单层中连续传代培养, 分别收集第1~5、10、15代次病毒样品, 提取DNA并同上进行PCR鉴定, 评估 $meq$ 基因编辑毒株的传代稳定性。

## 1.5 间接免疫荧光试验 (IFA)

将HN302与HN302Δ $meq$ 分别感染24孔板CEF

单层, 置于 38.5 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 待显微镜下观察到明显病毒噬斑后弃去培养基, 用 1:1 的甲醇/丙酮细胞固定液固定 (200 μL/孔), 室温静置 10 min; 弃去固定液, 加入含 5% 脱脂奶的 PBST (含 0.05% Tween-20 的 PBS) 溶液, 500 μL/孔, 37 °C 温箱封闭 30 min。然后依次添加 MDV-gB 单抗 5E8 (1:50 000) 和 DyLight 488 标记的羊抗鼠 IgG (1:1 000), 100 μL/孔, 置于 37 °C 温箱中分别孵育 30 min; 用 PBST 缓冲液按序洗涤之后, 继续依次添加 MDV-Meq 多抗 (1:1 000) 和 DyLight 594 标记的羊抗兔 IgG (1:1 000), 100 μL/孔, 37 °C 温箱中分别孵育 30 min。上述每个步骤反应完成后, 都需用 PBST 缓冲液洗涤 3 遍, 最后一步完成时添加 PBST 缓冲液 200 μL/孔, 使用倒置荧光显微镜观察结果。

### 1.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

将 HN302 与 HN302Δmeq 分别感染 6 孔板 CEF 单层, 置于 38.5 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3~4 d 后收集细胞, 利用 TRIzol 试剂提取总 RNA。使用 5× PrimeScript RT Master 反转录制备 cDNA, 使用 Fast Universal SYBR® Green Master 置于荧光定量 PCR 仪 (7500 Fast Real-Time PCR Systems, 美国 ABI 公司) 进行 RT-qPCR 扩增, 用于 MDV 病毒基因扩增的特异性引物详见表 1, 每个试验组均设置 3 个独立重复。以 ICP4 基因作为参照, 通过 RT-qPCR 染料法检测 meq、gB、pp38、RLORF4 和 RLORF5a 的相对表达水平。

### 1.7 病毒体外增殖曲线测定

将 HN302 与 HN302Δmeq 按照 500 PFU/孔的剂量接种 CEF 单层, 在 24~120 h 时间内每间隔 24 h 收集细胞, 利用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 以质粒标准曲线为样本参照进行 RT-qPCR 扩增<sup>[18]</sup>, 所用 MDV-1 病毒基因特异性引物详见表 1, 每个试验组均设置 3 个独立重复。最后通过计算 gB 与 ovo 基因拷贝数的比值, 对每百万细胞中 MDV gB 基因的拷贝数进行定量, 绘制体外病毒增殖曲线。

### 1.8 动物攻毒试验

1 日龄 SPF 鸡 108 只, 随机分为 3 组, 每组 36 只, 分别置正压隔离器中单独饲养。分组当天, 第 1 组作为阴性对照组, 接种等体积 CEF 阴性细胞悬液, 第 2 组和第 3 组分别通过腹腔接种 HN302 和 HN302Δmeq 病毒感染细胞悬液 (2 000 PFU/只)。攻毒后逐日观察, 记录试验鸡的临床表现、肿瘤发生和

死亡情况。整个试验周期 74 d 结束时, 所有存活鸡均处以安乐死并进行剖检, 检查肝脏、脾脏、肾脏和腺胃肿瘤发生情况。因样品采集而安乐死或攻毒后 7 d 内因应激反应导致的早期死亡鸡概不纳入统计, 剩余鸡计为攻毒总数。所有出现 MD 临床症状、发病死亡和试验结束存活鸡剖检发现肿瘤的, 均归类为 MD 病例。所有发病死亡鸡和试验周期结束存活鸡剖检发现肿瘤的, 均合并归类为 MD 肿瘤发生病例。MD 肿瘤发生率 = MD 肿瘤病例数/总数×100%。

### 1.9 体重和免疫器官指数测定

如 1.8 所述 MDV 接种感染 14 d 后, 每隔 1 周从攻毒组和阴性对照组中各随机选取 5 只鸡称量体重。在攻毒后 14 d 和 21 d 的鸡称重后处以安乐死, 分别剖检采集胸腺、法氏囊以及脾脏, 分别称量记录, 并计算免疫器官指数。免疫器官指数 = 免疫器官重量/体重×100%。

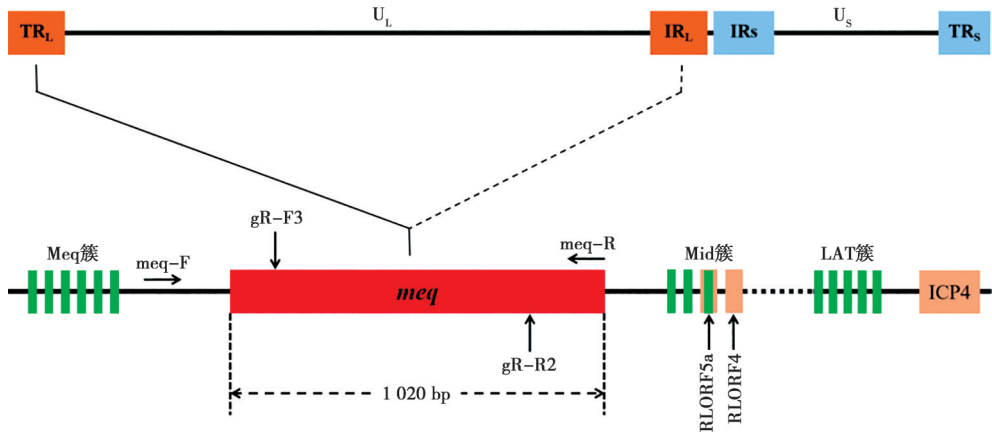
### 1.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism Version 8.0 (GraphPad Software, Inc., 美国) 和 SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics, 美国) 绘制感染鸡生存曲线, 同时分析攻毒组和对照组试验鸡的体重及免疫器官指数, 数据以“平均数±标准差”表示, 组间比较采用 Log rank 检验是否存在显著性差异,  $P < 0.05$  表示具有统计学意义。

## 2 结果

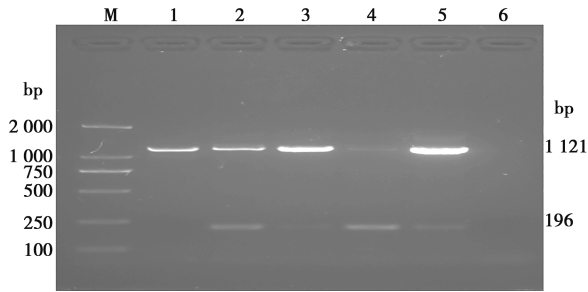
### 2.1 gRNA 质粒转染及 meq 基因编辑的 PCR 分析

为了构建 MDV 变异株 HN302 的 meq 基因缺失毒株, 首先用靶向 meq 基因前后两端的 1 对 pX459-gRNA 质粒组合 gR-F3/gR-R2 转染 CEF, 然后接种感染 HN302 病毒液, 通过质粒转染/病毒感染的方式进行基因编辑。MDV 感染 48 h 后, 收集 CEF 并用表 1 列示的靶向 meq 基因两侧的特异性引物对 meq-F/meq-R 进行 PCR 扩增, 分析 meq 基因编辑的效果。gRNAs 及 PCR 引物识别靶点在 MDV 基因组中的相对位点如图 1 所示。PCR 扩增及电泳分析结果显示, 在全部 pX459-gRNA 质粒转染并接种 HN302 病毒的 CEF 中, 除了扩增出一条约 1 121 bp 大小的野生型条带之外, 还同时扩增出一条约 196 bp 大小的基因编辑小条带; 而在未转染 gRNA 质粒/HN302 阳性感染或阴性对照 CEF 中, 均未扩增出基因编辑的突变型小条带 (图 2)。



注：TR<sub>L</sub>表示长末端重复序列，U<sub>L</sub>表示长独特区，IR<sub>L</sub>表示长内部重复序列，IR<sub>S</sub>表示短内部重复序列，U<sub>S</sub>表示短独特区，TR<sub>S</sub>表示短末端重复序列。

图1 MDV基因组中 *meq* 基因座位及 gRNA 靶点示意

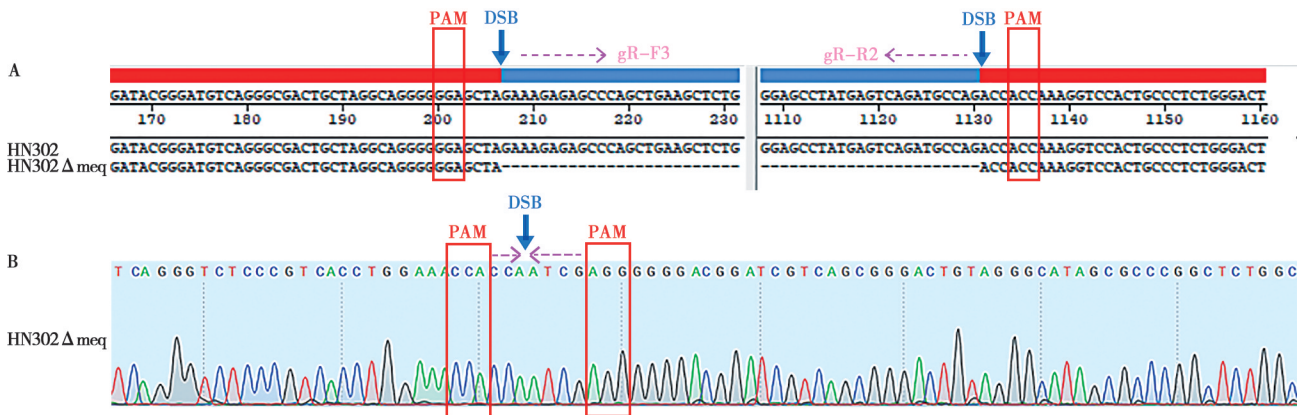


M. DNA 分子量；1. HN302 亲本毒株；2~5. 分别表示病毒接种剂量为 1 000、3 000、5 000 和 7 000 PFU/孔；6. CEF 阴性对照。

### 2.2 *meq* 基因缺失 MDV 克隆的纯化及鉴定

将上述 PCR 鉴定发生基因编辑的病毒/细胞培养物进行有限稀释、梯度接种、单个噬斑挑选、PCR 鉴定以及连续 3 轮的克隆纯化，最终获得一个 *meq* 基因缺失的 MDV 毒株，命名为 HN302Δ*meq*，病毒克隆号为 C10-1-1。通过 PCR 扩增并克隆该毒株的 *meq* 基因编辑突变型小条带，测序分析与野生型基因序列对比，证实 HN302Δ*meq* 确已发生 *meq* 基因编辑及缺失（图 3）。

图2 PCR 分析 pX459-gRNA 质粒转染 CEF 中 *meq* 基因的编辑效果

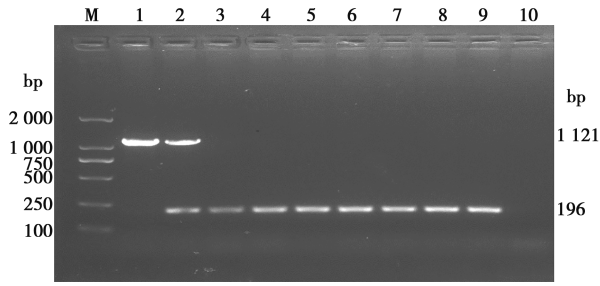


注：PAM 表示前间隔序列邻近基序，DSB 表示 DNA 双链断裂位点。

图3 *meq* 基因序列比对 (A) 和 HN302Δ*meq* 基因编辑序列图谱 (B)

将 HN302Δ*meq* 扩大培养并连续传代 15 次，并利用 PCR 检测第 1~5、10、15 代子代病毒，结果显示不同代次病毒 DNA 中均只能扩增出 196 bp 的突变

型 *meq* 基因编辑产物，说明 HN302Δ*meq* 稳定性良好且未发生回复突变（图 4）。



M. DNA 分子量; 1. HN302 亲本毒株; 2. 未纯化的混合基因编辑病毒; 3~9. 表示 HN302Δmeq 毒株分别传代 1、2、3、4、5、10 和 15 次; 10. CEF 阴性对照。

图 4 PCR 分析 HN302Δmeq 基因编辑的传代稳定性

### 2.3 meq 基因缺失毒株 HN302Δmeq 的基因表达分析

为进一步鉴定 meq 基因的缺失并分析其是否会影

响其他病毒基因的表达, 首先利用 IFA 染色检测了亲本毒株 HN302 和编辑毒株 HN302Δmeq 感染 CEF 单层中 MDV-1 特异性蛋白 Meq 和 gB 的表达。结果显示, 与 HN302 相比, HN302Δmeq 感染 CEF 中仅观察到绿色荧光染色的特异性病毒噬斑, 而未见红色荧光染色的病毒噬斑 (图 5), 说明 HN302Δmeq 中 Meq 蛋白无表达, 进一步证实所获得的编辑毒株发生了 meq 基因缺失。利用 RT-qPCR 检测部分病毒基因表达的结果显示, HN302Δmeq 中除了 meq 基因未检出表达之外, 其他被检基因如 gB、pp38、RLORF4 和 RLORF5a 均正常表达, 且其相对表达量在编辑毒株与亲本毒株之间无显著差异 ( $P>0.05$ ) (图 6), 说明 meq 基因的编辑缺失并不影响这些蛋白编码基因的表达。

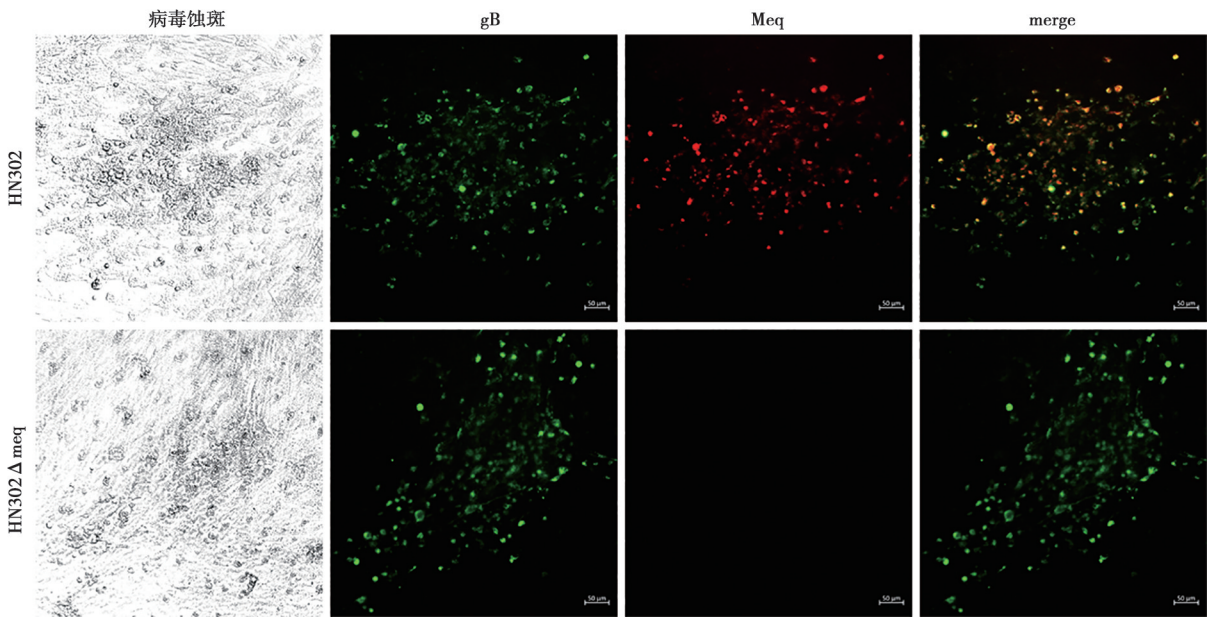
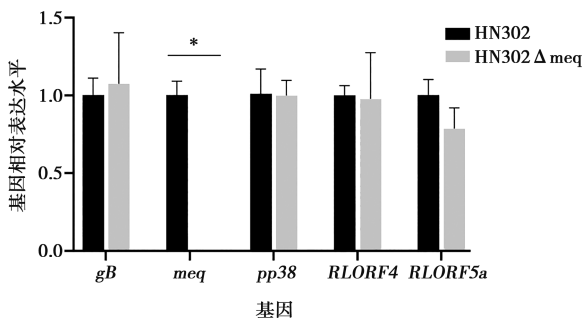


图 5 HN302Δmeq 感染 CEF 中 gB 和 Meq 蛋白表达的 IFA 分析 (比例尺 = 50 μm)



注: \* 表示  $P<0.05$ 。

图 6 RT-qPCR 分析 MDV 感染 CEF 中部分病毒基因表达水平

### 2.4 meq 基因缺失对 HN302 体外增殖能力的影响

为分析 meq 基因缺失对 MDV 体外复制能力是否会产生影响, 通过 RT-qPCR 检测了亲本毒株与编辑毒株感染 CEF 中 MDV-1 gB 基因和宿主基因 ovo 的拷贝数并进行定量分析。结果显示, 亲本毒株 HN302 和编辑毒株 HN302Δmeq 的体外增殖曲线非常相似 (图 7), 且在感染后同一时间点 2 个毒株之间的 gB 基因拷贝数差异不显著 ( $P>0.05$ )。

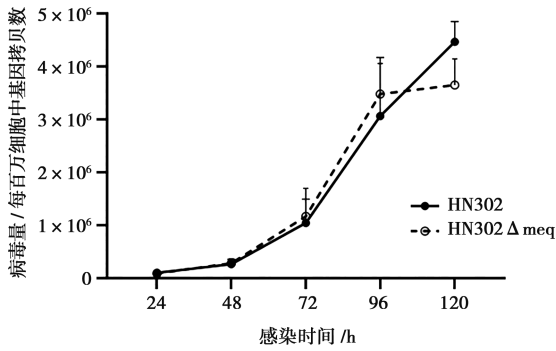


图7 HN302Δmeq 基因缺失毒株在 CEF 中的增殖曲线

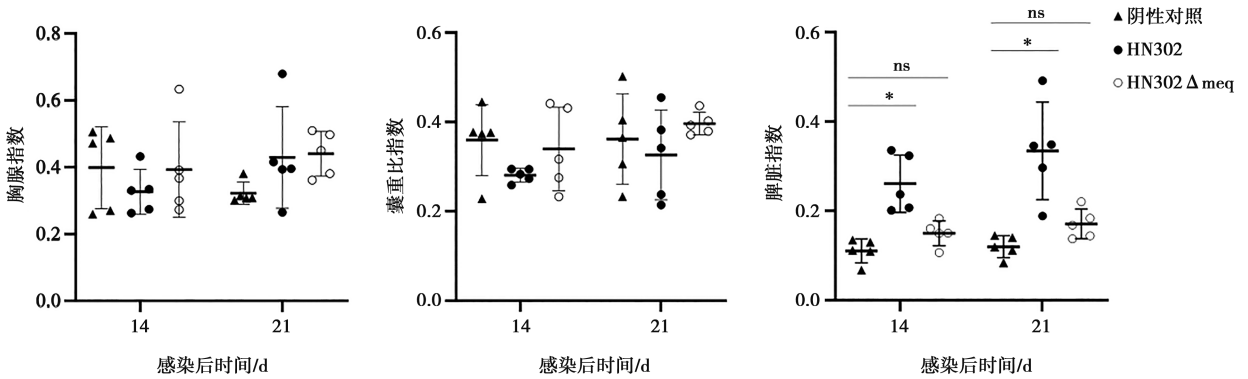
### 2.5 meq 基因缺失对 HN302 免疫抑制的影响

在病毒感染后 74 d 内，HN302 感染鸡的体重均低于阴性对照组，而 HN302Δmeq 组对宿主鸡体重的消极影响均弱于 HN302 组且与阴性对照组基本一致，两两比较均无显著性差异 ( $P>0.05$ )，见表 2。在感染后 14 d 和 21 d，HN302 感染组的囊重比指数和胸腺指数均低于阴性对照组，而 HN302Δmeq 感染组与阴性对照组基本一致，均优于 HN302 攻毒组；在脾脏指数中，HN302Δmeq 感染组与阴性对照组之间无显著差异，而 HN302 感染组显著高于阴性对照组 ( $P<0.05$ )，见图 8。

表 2 HN302 和 HN302Δmeq 感染鸡的体重

g/只

组别	感染后时间/d							
	14 (n=5)	21 (n=5)	28 (n=5)	35 (n=5)	42 (n=5)	49 (n=5)	56 (n=5)	74 (n=10)
阴性对照	125.49±15.54	183.40±22.38	240.09±14.94	302.77±25.17	433.95±21.11	495.60±41.63	649.85±65.06	882.10±130.28
HN302	109.79±15.44	152.17±21.61	203.81±17.26	284.26±33.40	389.19±47.25	422.71±54.91	563.83±94.29	764.67±127.79
HN302Δmeq	114.97±7.11	188.05±13.45	234.85±38.93	278.74±48.15	441.33±40.92	497.60±57.86	610.10±72.54	873.90±139.85



注：\* 表示  $P<0.05$ ，ns 表示无差异显著性。

图 8 HN302 和 HN302Δmeq 感染鸡的免疫器官指数

### 2.6 meq 基因缺失对 HN302 致病性及致瘤性的影响分析

CEF 阴性对照组、HN302 和 HN302Δmeq 攻毒组除了攻毒 7 d 内因应激反应导致早期死亡的鸡（为 3 只、3 只和 1 只）、第 14 和 21 天样品采集而安乐死的鸡（每组 10 只）之外，各组试验鸡有效统计总数分别为 23 只、23 只和 25 只（表 3）。至 74 d 整个试验周期结束时，统计显示 HN302 和 HN302Δmeq 两组之间的 MD 累计发病率、死亡率和肿瘤发生率均存在明显差异（表 3）。其中，HN302 感染鸡的 MD 发病率和死亡率分别为 82.6%（19/23）和 60.9%（14/23），而 HN302Δmeq 感染鸡的相关指数均为 0。对全部存活鸡进行剖检，HN302Δmeq 攻毒鸡中均未

观察到实质性内脏器官的肿瘤生成，而 HN302 感染鸡的累计肉眼肿瘤发生率为 43.5%（10/23）。上述数据表明，本试验周期内 HN302Δmeq 对宿主未表现出致病性和致瘤性，与病毒感染试验鸡的生存曲线结果相一致（图 9）。

表 3 各组鸡的发病及肿瘤发生情况

组别	总数	病例数	死亡数	肿瘤数
阴性对照	23	0	0	0
HN302	23	19	14	10
HN302Δmeq	25	0	0	0

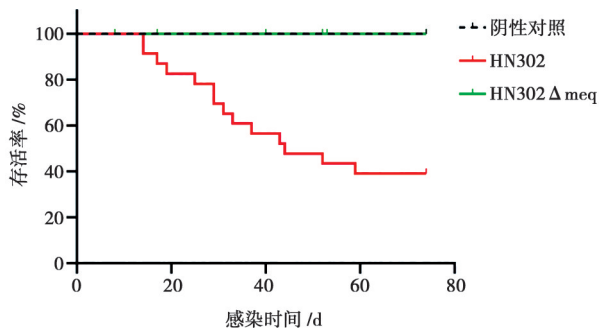


图9 HN302和HN302Δmeq感染鸡的存活曲线

### 3 讨论

在过去的50年中,MDV毒力持续进化,MD疫苗免疫失败及免疫鸡群频繁发病的报道屡见不鲜<sup>[5-8]</sup>,但疫苗接种仍是控制MD的主要策略。然而,目前使用的MD经典疫苗可能已接近其免疫效力的生物学阈值,急需研发新的疫苗以改善当前MD疫情防控的现状<sup>[27]</sup>。从遗传进化上来看,在过去20年中,MDV在中国乃至世界范围内已经发生了明显的分化<sup>[5-8]</sup>,因此,从抗原性角度分析,利用中国本土分离的MDV流行毒株作为亲本毒株,来构建新型的MDV疫苗株或许可以提供更好的免疫原性,以应对中国本土MDV流行导致的疫情。我们前期研究发现,分离自国内MD疫苗免疫发病鸡群的MDV变异株HN302<sup>[6]</sup>,能够突破HVT和CVI988疫苗的免疫保护,毒力显著高于vvMDV标准毒株Md5,但其诱导的MD发病进程相对缓慢、最终导致的致瘤率却很高,并且对宿主的免疫抑制也并不是十分明显,预示其具有作为疫苗研发亲本毒株的潜力。因此,本研究选择HN302作为研究对象,通过CRISPR/Cas9基因编辑技术对 $meq$ 基因进行编辑和缺失,构建具有自主知识产权的 $meq$ 基因缺失疫苗候选毒株并对其部分生物学特性和致病性进行了鉴定。

利用gRNA质粒转染并结合病毒感染的模式,通过CRISPR/Cas9系统介导的基因编辑,对HN302毒株 $meq$ 基因的编辑效果进行了PCR扩增分析,并通过病毒单噬斑挑选、克隆纯化以及测序验证等一系列过程,成功构建了 $meq$ 基因缺失的MDV毒株HN302Δ $meq$ (克隆号C10-1-1),且在CEF中连续传代后稳定性良好。利用IFA染色和RT-qPCR分析,进一步证实HN302Δ $meq$ 的 $meq$ 基因被完全缺失,病毒感染CEF中无Meq蛋白表达且不影响其他主要病毒蛋白或基因的表达。病毒体外增殖曲线分析发现, $meq$ 基因的缺失也不影响HN302Δ $meq$ 的体外复制能力。上述研究结果表明,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术缺失 $meq$ 基因,不影响vvMDV的无关

基因表达及体外复制等生物学特征,与此前研究报道一致<sup>[18]</sup>。随后,利用1日龄SPF鸡攻毒试验,评估了HN302Δ $meq$ 的致病性特征。结果发现,编辑缺失 $meq$ 基因之后,HN302Δ $meq$ 对宿主生长性能及免疫器官的消极影响均小于亲本毒株HN302,并且其感染导致宿主的MD发病率、致死率和肿瘤发生率均为0,亦未见引起明显的脾脏肿大,这表明HN302Δ $meq$ 对宿主的致病性和致瘤性已被消除,可以作为疫苗候选毒株开展进一步的MD疫苗研究。

此前研究表明, $meq$ 基因缺失株rMd5Δ $Meq$ 可提供优于CVI988疫苗的免疫保护力,但其仍具有诱导淋巴器官萎缩的重要缺陷<sup>[28-29]</sup>。随后,研究人员通过将其在细胞上连续传代进行致弱,较好地解决了这一问题<sup>[30]</sup>。国内相关研究也发现,利用BAC克隆和基因同源重组技术将MDV毒株GX0101和LMS的 $meq$ 基因进行敲除,最终建立的疫苗株SC9-1和rMSΔ $meq$ 都可以为受试的MDV流行毒株提供比CVI988更好的免疫保护效果<sup>[12,31-32]</sup>。利用类似技术获得的另外一个MD疫苗候选毒株SC9-2,虽然具有免疫保护作用,但它仍然可对宿主产生免疫抑制<sup>[33]</sup>。研究人员将其在CEF上连续传代40次,成功消除了其对宿主产生的免疫抑制,并且动物试验显示子代病毒SC9-2/40对SPF鸡的保护作用优于CVI988<sup>[34]</sup>。上述研究表明,MD疫苗候选毒株对宿主的免疫抑制可通过传代致弱而消除,从而生产一种安全有效的MD疫苗。如前所述,MDV亲本毒株HN302具有致病慢、致瘤强的特征<sup>[6]</sup>,可能与其在宿主体内复制速度较慢有关。目前,我们还不清楚HN302Δ $meq$ 在经历后续传代培养并可能加快复制速度之后,是否会出现免疫抑制,一旦出现类似情况,或许也可以通过传代致弱这一途径,进一步探讨利用其开发新型MDV疫苗毒株的可能性。

综上,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术,本研究成功构建了国内分离的MDV变异株 $meq$ 基因编辑缺失毒株HN302Δ $meq$ ,具有进一步用于创制MDV新型疫苗毒株的潜力。同时,HN302Δ $meq$ 毒株的建立,也为后续研究超强毒MDV变异株的遗传进化、致病和致瘤机制奠定了重要基础。

### 参考文献:

- [1] KENNEDY D A, CAIRNS C, JONES M J, et al. Industry-wide surveillance of Marek's disease virus on commercial poultry farms [J]. Avian Dis, 2017, 61 (2): 153-164.
- [2] GATHERER D, DEPLEDGE D P, HARTLEY C A, et al. ICTV virus taxonomy profile: Herpesviridae 2021 [J]. J Gen Virol, 2021, 102 (10): 001673.

- [3] WITTER R L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates [J]. Avian Dis, 1997, 41 (1): 149-163.
- [4] GIMENO I M, SCHAT K A. Virus-induced immunosuppression in chickens [J]. Avian Dis, 2018, 62 (3): 272-285.
- [5] DENG Q, SHI M, LI Q, et al. Analysis of the evolution and transmission dynamics of the field MDV in China during the years 1995-2020, indicating the emergence of a unique cluster with the molecular characteristics of vv+MDV that has become endemic in southern China [J]. Transbound Emerg Dis, 2021, 68 (6): 3574-3587.
- [6] TENG M, ZHENG L P, LI H Z, et al. Pathogenicity and pathotype analysis of Henan isolates of Marek's disease virus reveal long-term circulation of highly virulent MDV variant in China [J]. Viruses, 2022, 14 (8): 1651.
- [7] ZHENG L P, TENG M, LI G X, et al. Current epidemiology and co-infections of avian immunosuppressive and neoplastic diseases in chicken flocks in central China [J]. Viruses, 2022, 14 (12): 2599.
- [8] SONG B, ZEB J, HUSSAIN S, et al. A review on the Marek's disease outbreak and its virulence-related meq genovariation in Asia between 2011 and 2021 [J]. Animals (Basel), 2022, 12 (5): 540.
- [9] LIU J L, TENG M, ZHENG L P, et al. Emerging hypervirulent Marek's disease virus variants significantly overcome protection conferred by commercial vaccines [J]. Viruses, 2023, 15 (7): 1434.
- [10] JONES D, LEET L, LIU J L, et al. Marek disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89 (9): 4042-4046.
- [11] LUPIANI B, LEE L F, CUI X, et al. Marek's disease virus - encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101 (32): 11815-11820.
- [12] LI Y, SUN A, SU S, et al. Deletion of the Meq gene significantly decreases immunosuppression in chickens caused by pathogenic Marek's disease virus [J]. Virol J, 2011, 8: 2.
- [13] ZHANG Y, LIU C, YAN F, et al. Recombinant gallid herpesvirus 2 with interrupted meq genes confers safe and efficacious protection against virulent field strains [J]. Vaccine, 2017, 35 (36): 4695-4701.
- [14] 滕蔓, 刘金玲, 郑鹿平, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在病毒学中的应用及进展 [J]. 病毒学报, 2020, 36 (5): 946-954.
- [15] TENG M, YAO Y, NAIR V, et al. Latest advances of virology research using CRISPR/Cas9-based gene-editing technology and its application to vaccine development [J]. Viruses, 2021, 13 (5): 779.
- [16] 罗俊, 刘金玲, 郑鹿平, 等. 家禽疱疹病毒 CRISPR/Cas9 基因编辑最新研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53 (10): 1-11.
- [17] 张峰, 于正浩, 兰兴鸽, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术缺失 MDV 分离株 meq 基因的研究 [J]. 中国家禽, 2019, 41 (9): 26-32.
- [18] 滕蔓, 郑鹿平, 刘金玲, 等. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建马立克病病毒超强毒株原癌基因 meq 缺失株及其鉴定 [J]. 病毒学报, 2020, 36 (4): 675-684.
- [19] 杨森, 滕蔓, 刘金玲, 等. 鸡马立克病疫苗株 CVI988/Rispens meq 基因编辑及缺失毒株的构建与鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51 (8): 1970-1976.
- [20] ZHANG Y, TANG N, SADIGH Y, et al. Application of CRISPR/Cas9 gene editing system on MDV-1 genome for the study of gene function [J]. Viruses, 2018, 10 (6): 279.
- [21] ZHANG Y, LUO J, TANG N, et al. Targeted editing of the pp38 gene in Marek's disease virus-transformed cell lines using CRISPR/Cas9 system [J]. Viruses, 2019, 11 (5): 391.
- [22] TANG N, ZHANG Y, PEDRERA M, et al. A simple and rapid approach to develop recombinant avian herpesvirus vectored vaccines using CRISPR/Cas9 system [J]. Vaccine, 2018, 36 (5): 716-722.
- [23] 楚钰淑, 滕蔓, 周子誉, 等. LAT 基因簇 miRNA 的 CRISPR/Cas9 基因编辑对马立克病病毒体外复制的影响分析 [J]. 病毒学报, 2021, 37 (6): 1428-1439.
- [24] LUO J, TENG M, ZAI X, et al. Efficient mutagenesis of Marek's disease virus - encoded microRNAs using a CRISPR/Cas9 - based gene editing system [J]. Viruses, 2020, 12 (4): 466.
- [25] 王伟东, 滕蔓, 郑鹿平, 等. miR-M11 基因编辑对马立克病病毒体外复制的影响 [J]. 河南农业科学, 2023, 52 (1): 134-143.
- [26] TENG M, ZHOU Z Y, YAO Y, et al. A new strategy for efficient screening and identification of monoclonal antibodies against oncogenic avian herpesvirus utilizing CRISPR/Cas9-based gene-editing technology [J]. Viruses, 2022, 14 (9): 2045.
- [27] MAHONY T J. Understanding the molecular basis of disease is crucial to improving the design and construction of herpesviral vectors for veterinary vaccines [J]. Vaccine, 2015, 33 (44): 5897-5904.
- [28] LEE L F, LUPIANI B, SILVA R F, et al. Recombinant Marek's disease virus (MDV) lacking the Meq oncogene confers protection against challenge with a very virulent plus strain of MDV [J]. Vaccine, 2008, 26 (15): 1887-1892.
- [29] LEE L F, KREAGER K S, ARANGO J, et al. Comparative evaluation of vaccine efficacy of recombinant Marek's disease virus vaccine lacking Meq oncogene in commercial chickens [J]. Vaccine, 2010, 28 (5): 1294-1299.
- [30] LEE L F, HEIDARI M, ZHANG H, et al. Cell culture attenuation eliminates rMd5ΔMeq - induced bursal and thymic atrophy and renders the mutant virus as an effective and safe vaccine against Marek's disease [J]. Vaccine, 2012, 30 (34): 5151-5158.
- [31] SU S, CUI N, ZHOU Y, et al. A recombinant field strain of Marek's disease (MD) virus with reticuloendotheliosis virus long terminal repeat insert lacking the meq gene as a vaccine against MD [J]. Vaccine, 2015, 33 (5): 596-603.
- [32] ZHANG Y, HAN N, SUN P, et al. Capacity of the meq-deleted strain Marek's virus SC9-1 to acquire the meq gene by natural recombination [J]. Bing Du Xue Bao, 2017, 33 (1): 89-95.
- [33] SU S, CUI N, LI J, et al. Deletion of the BAC sequences from recombinant meq-null Marek's disease (MD) virus increases immunosuppression while maintaining protective efficacy against MD [J]. Poult Sci, 2016, 95 (7): 1504-1512.
- [34] SUN P, CUI N, LIU L, et al. Attenuation of a recombinant Marek's disease virus lacking the meq oncogene and evaluation on its immune efficacy against Marek's disease virus [J]. Poult Sci, 2020, 99 (4): 1939-1945.