

谢丽华, 王志胜, 童玲, 等. 火鸡疱疹病毒亚克隆对活载体疫苗性能影响的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (6): 92-97.

XIE L H, WANG Z S, TONG L, et al. The influence of sub-clone of herpesvirus of turkey on performance of live vector vaccines [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (6): 92-97.

火鸡疱疹病毒亚克隆对活载体疫苗性能影响的研究

谢丽华^{1,2,3,4#}, 王志胜^{2,3,4#}, 童玲^{2,3,4}, 栗环环^{1,2,3,4}, 郑亚婷^{2,3,4}, 刘娅梅^{2,3,4},
张传健^{2,3,4}, 郭容利⁵, Armando Mario DAMIANI⁶, 芮荣兵⁷, 黄腾^{1*}, 王继春^{2,3,4*}

(1. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530004; 2. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏南京 210014;

3. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009;

4. 兽用生物制品(泰州) 国泰技术创新中心, 江苏泰州 225300; 5. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏南京 210014;

6. 国立库约大学医学科学院, 阿根廷 门多萨 5500; 7. 南京市六合区龙池街道畜牧兽医站, 江苏南京 211505)

摘要: 旨在比较火鸡疱疹病毒 (HVT) 亚克隆对构建活载体疫苗的影响。本研究采用同源重组方法, 在 HVT Fc126 的 *UL55* 与 *UL56* 基因间的非编码区插入 MiniF 序列, 构建重组病毒; 采用细菌人工染色体 (BAC) 技术, 分别提取病毒 DNA 后转入 DH10B 感受态细胞中, 构建 3 个对应的 BAC; 将传染性法氏囊病毒 (IBDV) 的 VP2 表达盒分别与 3 株 BAC 的 DNA 共转染鸡胚成纤维细胞 (CEF), 进行重组病毒的拯救; 将重组活载体、亲本毒株及商品化重组活载体的生长动力学进行比较; 将 3 株重组活载体接种 SPF 鸡后, 在免疫后第 3、4、5、6 周等共 4 个时间点采集血清进行琼脂扩散试验。结果: 获得 3 个纯化的 HVT-MiniF 亚克隆病毒, 然后获得 3 株对应的 HVT BAC, 分别命名为 HVT BAC-C1、HVT BAC-C2 和 HVT BAC-C3。限制性片段长度多态性 (RFLP) 鉴定发现这 3 个 BAC 亚克隆的基因组主体序列几乎一致, 略有差异; 进一步获得 3 株相对应的 VP2 重组 HVT 活载体, 分别命名为 HVT-VP2-C1、HVT-VP2-C2、HVT-VP2-C3; 生长动力学结果表明, 3 株 VP2 重组病毒与 2 株对照病毒的滴度在 6、24、36 和 72 h 存在显著性差异 ($P < 0.05$), 在 12 和 48 h 无明显差异 ($P > 0.05$); 琼脂扩散试验结果发现 3 个亚克隆的重组病毒均能产生较高抗体, 但都没有达到对照商品疫苗的水平; 3 个亚克隆重组病毒之间产生的抗体存在明显差异, 其中 HVT-VP2-C2 免疫鸡后产生的抗体最高。综上, HVT 在传代过程中可能易出现基因变异, 提示在构建重组活载体疫苗时, 应充分考虑不同亚克隆活载体的免疫效力差异, 做好种毒纯化。

关键词: 火鸡疱疹病毒; 亚克隆; 活载体疫苗; 细菌人工染色体; 免疫效力

中图分类号: S855 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)06-0092-06

The influence of sub-clone of herpesvirus of turkey on performance of live vector vaccines

XIE Lihua^{1,2,3,4#}, WANG Zhisheng^{2,3,4#}, TONG Ling^{2,3,4}, LI Huanhuan^{1,2,3,4}, ZHEN Yating^{2,3,4},
LIU Yamei^{2,3,4}, ZHANG Chuanjian^{2,3,4}, GUO Rongli⁵, Armando Mario DAMIANI⁶,
GUO Rongbing⁷, HUANG Teng^{1*}, WANG Jichun^{2,3,4*}

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Institute of Veterinary Immunology & Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important

Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China;

4. Guotai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China;

5. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China;

6. Faculty of Medical Sciences, National University of Cuyo, Mendoza 5500, Argentina;

7. Longchi Street Husbandry and Veterinary Service Center of Luhe District, Nanjing 211505, China)

Abstract: This study was to compare the influence of Herpesvirus of Turkey (HVT) sub-clones on the generation of live vector vaccines.

收稿日期: 2025-01-03; 修回日期: 2025-04-15

基金项目: 广西科技重大专项 (桂科 AA23062050)

第一作者: 谢丽华, 女, 硕士研究生; 王志胜, 男, 副研究员。#共同第一作者

*通信作者: 黄腾, 讲师, 研究方向: 家禽疱疹病毒免疫逃避和新型载体疫苗开发, E-mail: thomashwang@gxu.edu.cn; 王继春, 研究员, 研究方向: 活载体疫苗和基因工程疫苗研究, E-mail: jcwang@263.net。

Homologous recombination was to insert the MiniF into the non-coding region between *UL55* and *UL56* of HVT strain Fc126 to generate HVT-MiniF recombinants. After three rounds of plaque picking, three recombinant HVT sub-clones were obtained. Then, using the bacterial artificial chromosome technology, the viral DNA of MiniF recombinant HVT was extracted and was transferred into DH10B competent cells to construct three HVT bacterial artificial chromosomes (BAC). After co-transfection of the expression cassette harboring the infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 and the BAC DNA into CEFs (Chicken Embryo Fibroblasts, CEF), the growth kinetics of the vectored HVT recombinants, the parental strain and the commercial vaccine strain were tested. Finally, serum samples were collected from specific pathogen free (SPF) chickens at 3, 4, 5 and 6 weeks after immunization with the three recombinant live vectors so as to detect the antibody against IBDV with the method of agar gel precipitation test (AGP). The result showed that we first obtained three purified HVT-MiniF subcloned viruses, followed by three corresponding HVT bacterial artificial chromosomes (BACs) which were termed as HVT BAC-C1, HVT BAC-C2, and HVT BAC-C3, respectively. The RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) assay showed the same major fragments, but with differences between these three BACs. We obtained three recombinants HVT live vectors, namely HVT-VP2-C1, HVT-VP2-C2, and HVT-VP2-C3. The results of the growth kinetics showed that there were significant differences between these strains at 6, 24, 36 and 72 h ($P < 0.05$), but no significant differences at 12 and 48 h ($P > 0.05$). All three HVT recombinants from the three sub-clones induced high AGP antibodies which was still lower than the level of the commercial HVT vectored vaccines. There were obvious differences in AGP antibodies induced by the three recombinants, in which HVT-VP2-C2 produced the highest level of antibody. In summary, this study indicated that mutations might be likely to happen in the HVT genome during serial passages, highlighting the importance of selection of vaccine strains with consideration of the effect of sub-clone variations on the efficacy of HVT live-vectored vaccines.

Keywords: turkey herpesvirus; sub-clone; live vector vaccine; bacterial artificial chromosome; immunization efficacy

火鸡疱疹病毒 (HVT) 是疱疹病毒科甲型疱疹病毒亚科马立克病毒属的成员之一, 是马立克氏病病毒 (MDV) 血清 3 型, 最初从家养火鸡中分离出来^[1]。HVT 最初被用作预防鸡马立克氏病 (MD) 的活疫苗, 随着 MDV 毒力的增强, 尤其是对于 vv+MDV 和新出现的 HV-MDV 变异株, HVT 可能难于提供足够长效的防控能力^[2]。然而, HVT 疫苗具有高安全性, 可以实现自动化胚内接种, 不会对鸡群产生免疫抑制作用, 是性能优异的载体^[3]。HVT 构建活载体时在非必需区插入编码保护性抗原的基因来刺激保护性免疫反应, 从而诱导针对外源抗原的保护性反应^[4-5]。因此, 在免疫过程中, 可以将 HVT 活载体疫苗与针对超强毒株的细胞结合型疫苗 (如 HVT+CVI988) 混合使用, 以实现理想的保护效果^[6]。HVT 商业化的活载体疫苗包括表达传染性法氏囊病毒 (IBDV) VP2 蛋白的重组 HVT 活疫苗, 例如 Vaxxitek HVT-IBD、Vectormune rHVT-IBD 等, 均对 IBDV 有优良的保护效果, 其中 Vaxxitek HVT-IBD 的免疫效果优良, 在全球多个国家使用^[7-9]。

疱疹病毒重组活载体疫苗的构建主要有 4 种技术, 即同源重组、细菌人工染色体 (BAC)、黏粒以及 CRISPR/Cas9 基因编辑技术^[10]。BAC 是指通过同源重组构建带有 MiniF 的重组病毒, 其中 MiniF 携带能表达绿色荧光蛋白的基因, 再将重组病毒 DNA 转入感受态大肠杆菌中, 得到相应的含病毒基因组的细菌人工染色体。BAC 经过适当改造, 例如删除毒力基因或增加外源基因后, 通过拯救病毒得到重组病毒。BAC 低拷贝复制, 高度保守, 可以应用大量的原核工具对基因组进行编辑改造, 大大提高改造病毒

的效率^[11]。基于 BAC 的反向基因工程技术已经被用来进行病毒的多种研究, 对开发新型活载体疫苗也是非常高效的一种技术^[12]。

前期应用 BAC 重组方法构建了多株 HVT Fc126 病毒株重组 IBDV VP2 表达盒活载体疫苗株, 但不同重组株的性能差异较大^[13]。本研究在 HVT Fc126 病毒株 *UL55-UL56* 之间非编码区插入 MiniF 序列, 挑选重组病毒不同亚克隆构建 BAC, 再分别替换插入 IBDV VP2 表达盒, 构建亚克隆的重组活载体病毒, 拯救后进行相关比较分析, 为 HVT 重组活载体构建中种毒筛选的关键技术提供依据。

1 材料与方法

1.1 质粒、细菌、细胞和病毒

MiniF 质粒由柏林自由大学病毒研究所 Nikolaus Osterrieder 教授惠赠。DH10B 感受态细胞购自 Invitrogen 公司。HVT Fc126 病毒株来自中国兽医药品监察所 (CVCC AV19)。商品疫苗 Vaxxitek HVT-IBD 购买自梅里亚公司。IBDV NJ09 超强毒株为本实验室保存。鸡胚成纤维细胞 (CEF) 由本实验室自制。

1.2 试剂及试验动物

限制性内切酶 *Bam*H I 及 *Ex* *Taq* DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司; 高糖 DMEM 培养基、0.25% 胰酶及胎牛血清均购自 Sigma 公司; Plasmid Midi kit 试剂盒购自 QIAGEN 公司; 琼脂粉、氯化钠等均购买自南京生工生物有限公司。SPF 鸡胚购买自南京竹顺生物技术有限公司, 将鸡胚孵化得到 SPF 鸡。剔除弱雏后, 将 45 只健康鸡随机分成 5 组, 在隔离器中饲养观察。

1.3 重组 HVT-MiniF 的构建

根据 HVT Fc126 株全基因组序列 (GenBank 登录号: GCA_000839725.1), 设计特异性引物。按照文献 [14] 提取 HVT Fc126 病毒株 DNA 为 PCR 扩增模板, 扩增 UL55-UL56 两侧同源臂 HR1、HR2, 并通过酶切连接, 构建转移载体 T-HR1-MiniF-HR2。

分别提取转移载体 T-HR1-MiniF-HR2 和 HVT Fc126 DNA。将 HVT Fc126 病毒接到新鲜制备并长满单层的 CEF, 扩大病毒量。在 48 h 后, 观察细胞出现相应病变后, 收集细胞。先用 PBS 洗细胞, 再经胰酶消化后, 收取细胞, 按照文献 [14] 进行 DNA 提取, 将 1 μg HVT Fc126 DNA 和 5 μg 转移载体 T-HR1-MiniF-HR2 DNA 使用磷酸钙转染方法, 在 CEF 内进行同源重组。MiniF 携带编码绿色荧光蛋白 (EGFP) 的基因序列。若重组成功, 将会得到表达 EGFP 的重组 HVT 病毒。

1.4 重组 HVT-MiniF BAC 的构建及鉴定

在荧光显微镜下观察转染后的细胞, 并进行传代。挑取 1 个发出绿色荧光的蚀斑到长满的单层 CEF, 连续挑取 3 代, 得到 3 个纯化的重组 HVT-MiniF 亚克隆病毒。将 3 株重组亚克隆病毒分别在 CEF 上连续传代, 进行扩繁。根据文献 [14] 分别提取 3 株重组 MiniF HVT 亚克隆病毒的 DNA, 将 5 μg DNA 电转化到感受态细胞 DH10B 中, 并均匀涂布到含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 琼脂平板上, 在 32 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。挑取单菌落, 加入到含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 液体培养基中, 在 32 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上, 过夜培养后, 提取 DNA 进行鉴定。设计特异性引物, 进行扩增包含有 MiniF 的片段, 并进行测序。挑取 3 株 BAC 单克隆菌落, 加入到含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 液体培养基中, 在 32 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 的摇床中过夜培养, 从菌液提取的 DNA 用限制性内切酶 *Bam*H I 酶切, 进行限制性片段长度多态性 (RFLP) 鉴定。

1.5 重组病毒的拯救

IBDV VP2 表达盒由本实验室构建保存, 用到的 VP2 表达盒与 Vaxxitek HVT-IBD 中的 VP2 表达盒是同一序列。将 VP2 表达盒通过酶切连接上 HVT UL55-UL56 两侧同源臂 HR1、HR2, 得到 HR1-VP2-HR2。分别提取 3 个同源 HVT BAC DNA 和 HR1-VP2-HR2 DNA。将 9 日龄 SPF 鸡胚制备成 CEF, 次日在长满单层的 CEF 细胞上进行转染。分别将 3 株重组 HVT BAC DNA 与 HR1-VP2-HR2 共转染 CEF, 转染后在荧光显微镜上观察细胞。挑取不发

绿色荧光的蚀斑 (白色蚀斑) 到 CEF 上, 并连续挑取 3 代并继续传代培养。

1.6 体外生长动力学测定

将 3 株重组活载体病毒与 HVT Fc126 株及 Vaxxitek HVT-IBD 株按照感染复数 (MOI) = 0.01 接种到长满单层的 CEF 上。并在接种前、接种后的 6、12、24、36、48、72 h 的测定病毒滴度。HVT 属于细胞结合性病毒, 需将各个时间段的细胞经胰酶消化成单个细胞后, 离心收集细胞, 用 1 mL 培养基重悬细胞, 将细胞悬液由 10^{-1} 稀释到 10^{-7} , 并依次接到长满单层 CEF 的 96 孔板中, 观察 72 h, 记录产生蚀斑数量。根据 Reed-Muench 法计算病毒 $\text{TCID}_{50}^{[15]}$ 。重复测定 3 次, 根据测定结果, 绘制 3 株重组活载体病毒、亲本毒株 HVT Fc126 和商品疫苗株 Vaxxitek HVT-IBD 在体外培养的多步生长曲线。

1.7 动物免疫效力试验

将 45 只 1 日龄的 SPF 鸡随机分成 5 组, A、B、C、D 每组 10 只, E 组 5 只。在 1 日龄时, 将 A、B、C 这 3 组雏鸡分别皮下接种 5 000 PFU 3 株重组活载体病毒, D 组皮下接种 Vaxxitek HVT-IBD 5 000 PFU, E 组不免疫, 作为空白对照。接种后, 在第 3、4、5 和 6 周龄, 依次采集每只动物血清, 采用琼脂扩散试验 (AGP) 的方法检测 IBDV VP2 抗体滴度。将血清逐步稀释至 1:64, 与 IBDV NJ09 株全病毒进行 AGP 试验, 加完样品后, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 作用 24~48 h, 观察记录结果。

1.8 数据统计与分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件, 选择双因素方差分析 (Two-way ANOVA) 和 Tukey's 多重比较检验对病毒体外生长动力学以及 AGP 抗体进行显著性分析。

2 结果

2.1 重组 HVT-MiniF 的获得与纯化

通过常规的 PCR 和酶切连接, 成功将 MiniF 片段和同源臂 HR1 和 HR2 连接到载体上, 得到转移载体 T-HR1-MiniF-HR2。转移载体与 HVT Fc126 病毒 DNA 在 CEF 上共转染 24 h 后, 出现表达绿色荧光的细胞, 将细胞传代后, 开始出现绿色荧光蚀斑。选取一个重组病毒, 经过连续 3 次挑取绿色荧光蚀斑到长满单层的 CEF 上, 得到 3 个纯化的重组 HVT-MiniF 亚克隆病毒, 这 3 个重组 MiniF 亚克隆病毒的形态相似, 将它们分别命名为 HVT-MiniF-C1、HVT-MiniF-C2 和 HVT-MiniF-C3 (图 1)。

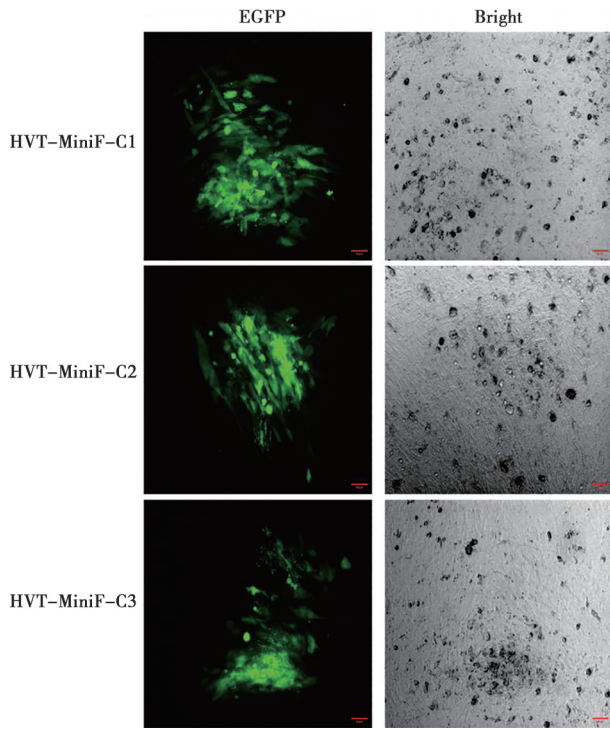
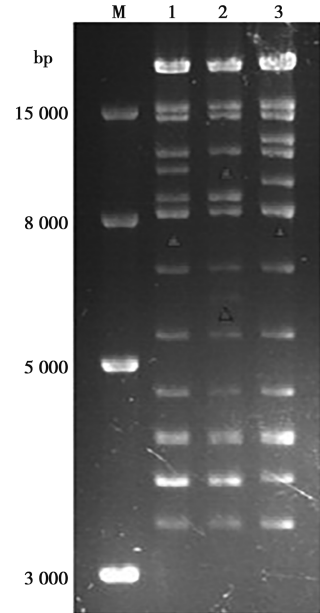


图 1 重组 HVT-MiniF 病毒蚀斑形态 (标尺=50 μm)

2.2 3 个亚克隆 HVT BAC 的获得与验证

将得到的 3 个 BAC, 命名为 HVT BAC-C1、HVT BAC-C2、HVT BAC-C3。图 2 表明, 3 株同源亚克隆 HVT BAC 的基因组, 经限制性内切酶 *Bam*H I 酶切后, 其条带大体一致, 但个别条带大小发生明显变化, 红色箭头所示为大小发生变化的条带, 3 个 BAC 之间存在差异, 与 HVT BAC-C2 相比, HVT BAC-C1 和 HVT BAC-C3 均缺少了一个 5 689 bp 的片段, 对应 *Bam*H I (45 310) 和 *Bam* H I (50 991) 两个酶切位点。将得到的 3 个 BAC 进行传代后, 多次进

行 RFLP 鉴定, 得到的条带与图 2 无异。RFLP 显示的差异是亚克隆在被构建成 BAC 之前, 基因组已经发生变异, 证明 HVT 在传代过程产生的亚克隆之间是存在差异的。

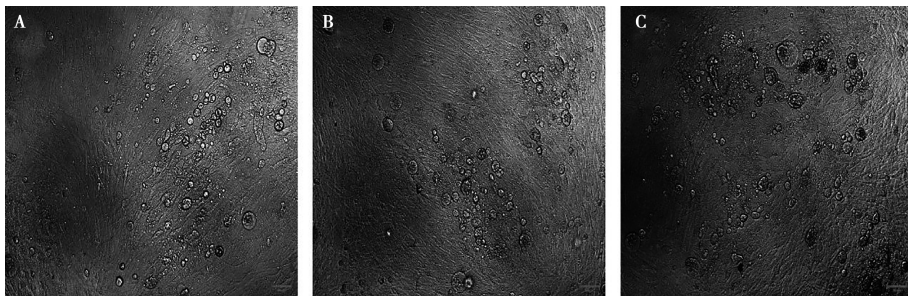


M. DNA ladder; 1. HVT BAC-C1; 2. HVT BAC-C2; 3. HVT BAC-C3。

图 2 3 个亚克隆 HVT BAC DNA 的 RFLP 鉴定

2.3 3 个重组病毒的拯救

将 3 个同源亚克隆 HVT BAC 分别与 IBVDV VP2 表达盒共转染 CEF 后, 挑取白色蚀斑, 并连续传代后得到纯化的拯救病毒, 即 HVT-VP2-C1、HVT-VP2-C2、HVT-VP2-C3 (图 3)。



A. HVT-VP2-C1; B. HVT-VP2-C2; C. HVT-VP2-C3。

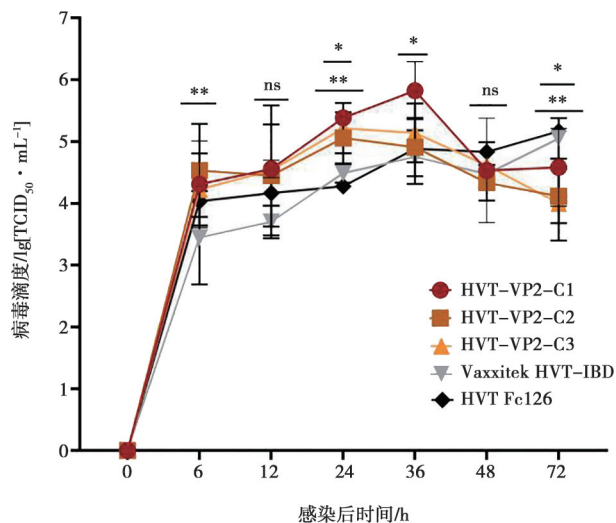
图 3 3 个亚克隆 HVT 拯救病毒蚀斑 (标尺=50 μm)

2.4 体外生长动力学测定与比较

图 4 显示, 3 株拯救病毒与 2 株对照组病毒的滴度在 6、24、36、和 72 h 存在显著性差异 ($P <$

0.05), 在 12 和 48 h 无明显差异 ($P > 0.05$)。Vaxxitek HVT-IBD 和 HVT Fe126 这 2 株病毒整体呈上升趋势, 在 72 h 达到最高值。3 株拯救病毒有着相

似的生长动力学, 没有存在显著性差异 ($P>0.05$), 在 24 或 36 h 时达到最高值, 然后开始降低。3 株拯救病毒基因组之间的差异没有明显影响病毒在体外复制。



ns 表示差异不显著, * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$, *** 表示 $P<0.001$ 。下同。

图 4 3 株拯救病毒和 Vaxxitek HVT-IBD、HVT Fc126 病毒的体外生长特性比较

2.5 3 个同源重组活载体疫苗毒株的免疫效力

由图 5 可知, 4 个病毒在 3~6 周抗体滴度呈现为逐渐增高的趋势, E 组没有检测到抗体。在第 4 周, A 组和 D 组之间存在显著性差异 ($P=0.0079$), B 组与 D 组存在显著性差异 ($P=0.0212$), 其他几组没有显著性差异 ($P>0.05$)。整体上看, D 组比 3 株拯救病毒产生的抗体更早、更高。在第 6 周时, 3 株拯救病毒抗体滴度都达到较高水平。虽然 3 株病毒为同源亚克隆拯救, 但 3 株重组病毒的效力并不一致, 且都没有达到商品疫苗的抗体滴度, 尤其在第 4 周时差异较大。虽然发生了变异, 但是没有严重影响到病毒的抗原性, 仍然产生了针对 VP2 的特异性抗体。

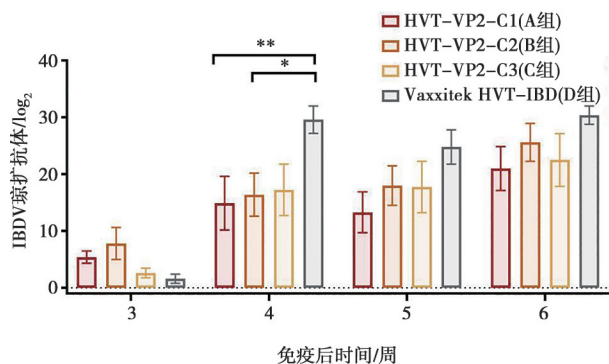


图 5 重组病毒和 Vaxxitek HVT-IBD 免疫后 VP2 抗体水平

3 讨论

HVT 是构建禽用活载体疫苗的首选, 它的基因组庞大, 具有多个非必需编码区, 并且可以克服母源抗体的干扰^[16]。在非必需区插入编码保护性抗原的基因, 对载体自身影响小, 还能刺激产生针对外源抗原的保护性免疫反应, 从而对马立克氏病和载体抗原的疾病产生保护。Vaxxitek HVT-IBD 是国外动保巨头的拳头产品, 该疫苗已经在多个国家注册^[17-18], 有垄断的风险, 要实现具有完全自主知识产权的 HVT-IBD 疫苗, 就要尝试进行包括插入位点选择在内的一系列优化设计。HVT *UL55* 和 *UL56* 之间的非编码区是 HVT 活载体外源基因的稳定插入位点^[19]。本研究采取在 HVT *UL55* 和 *UL56* 之间的非编码区插入与商品化对照疫苗 Vaxxitek HVT-IBD 相同的 VP2 表达盒, 避免了不同 VP2 表达盒对活载体效果的影响, 能够准确地判断亚克隆对重组活载体性能的作用。

构建 HVT 活载体疫苗的方法中, CRISPR/Cas9 和 Cre-LoxP 等方法不需要构建 HVT 的反向遗传系统, 可以快速获得重组病毒。然而, 这种方法在病毒纯化上存在一定的困难, 可能需要进行多次挑斑纯化, 在传代次数增加后, 基因组更易发生突变^[20]。本研究采用细菌人工染色体方法, 具有高度保守的特性, 病毒的 BAC 基因组在细菌中不易发生重组变异。为了方便比较亚克隆之间的差异, 将 3 个亚克隆分别构建成 BAC, 避免在细胞上反复多次传代中发生变异对研究结果的影响。BAC 这种高度保守的特性, 还利于将本研究构建好的 HVT BAC 作为后续构建 HVT 载体疫苗的平台, 特别是对于插入 2 个以上的外源基因表达盒, 优势显著。在构建好的感染性 BAC 基础上, 可以利用 CRISPR 技术和 Cre-LoxP 在合适的位点选择插入外源基因或者删除基因, 将两者结合起来或许是构建重组病毒更好的方法。

病毒在传代过程中发生变异是一种自然现象^[21], 但是其变异的速度在不同条件下可能差别较大, 例如在组织细胞, 特别是异源宿主细胞上传代易引起变异。HVT 在构建重组活载体时不可避免地需要在 CEF 上进行重组, 需要传代多次, 是导致亲本病毒变异的重要原因, 代次过高后会严重影响活载体性能。本研究挑选亚克隆时仅传 3 代, 之后扩增病毒提取 DNA, 病毒增殖总共未超过 5 代, 其基因组和性能均发生较明显的变化, 证实了 HVT 在 CEF 传代更易变异的特性。本研究是在重组 HVT-MiniF 后进行亚克隆纯化, 增加 MiniF 是否会对病毒的变异概率产生影响, 还有待进一步研究。在后续研究中, 将对全

基因组进行测序,发现变异位点,应用BAC技术平台进行修复,进一步研究具体变异位点对性能的影响。

综上,本研究发现HVT在传代过程中易产生变异,形成的亚克隆之间的差异可能会对拯救病毒的免疫效果产生较大影响。在构建重组HVT活载体疫苗过程中,应特别注意亚克隆基因组序列可能出现的变化,对重组活载体病毒进行克隆筛选是获得优良种毒的重要步骤。

参考文献:

- [1] METTENLEITER T C, KLUPP B G, GRANZOW H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9 (4): 423-429
- [2] 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.
- [3] PURCHASE H G. Prevention of Marek's disease: a review [J]. *Cancer Res*, 1976, 36 (2 pt 2): 696-700.
- [4] HEIN R, KOOPMAN R, GARCÍA M, et al. Review of poultry recombinant vector vaccines [J]. *Avian diseases*, 2021, 65 (3): 438-452.
- [5] BUBLOT M, PRITCHARD N, LE GROS F X, et al. Use of a vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody [J]. *J Comp Pathol*, 2007, 137 (Suppl 1): S81-S84.
- [6] LEMIERE S, WONG S Y, SAINT-GERAND A L, et al. Compatibility of turkey herpesvirus-infectious bursal disease vector vaccine with Marek's disease rispens vaccine injected into day-old pullets [J]. *Avian Dis*, 2011, 55 (1): 113-118.
- [7] PEROZO F, VILLEGAS A P, FERNANDEZ R, et al. Efficacy of single dose recombinant herpesvirus of turkey infectious bursal disease virus (IBDV) vaccination against a variant IBDV strain [J]. *Avian Dis*, 2009, 53 (4): 624-628.
- [8] TSUKAMOTO K, SAITO S, SAEKI S, et al. Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens [J]. *J Virology*, 2002, 76 (11): 5637-5645.
- [9] INGRAO F, RAUW F, VAN DEN BERG T, et al. Characterization of two recombinant HVT-IBD vaccines by VP2 insert detection and cell-mediated immunity after vaccination of specific pathogen-free chickens [J]. *Avian Pathol*, 2017, 46 (3): 289-299.
- [10] 杨明珠,陈晓春,宋佳诚,等.重组动物疱疹病毒活载体疫苗的构建与应用研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49 (1): 338-351.
- [11] MESSERLE M, CRNKOVIC I, HAMMERSCHMIDT W, et al. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94 (26): 14759-14763.
- [12] 吴志敏,苏博,伊淑帅,等.细菌人工染色体系统及其在后基因组学中的应用研究进展 [J]. *经济动物学报*, 2023, 27 (1): 68-73.
- [13] SHAH A U, WANG Z, ZHENG Y, et al. Construction of a novel infectious clone of recombinant herpesvirus of Turkey Fc-126 expressing VP2 of IBDV [J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10 (9): 1391.
- [14] WANG J, OSTERRIEDER N. Generation of an infectious clone of duck enteritis virus (DEV) and of a vectored DEV expressing hemagglutinin of H5N1 avian influenza virus [J]. *Virus Res*, 2011, 159 (1): 23-31
- [15] LIU X Y, CAO G Y, LUO Y, et al. Anti-pandemic influenza A (H1N1) virus potential of Xilingjiedu capsule *in vitro* [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2022, 35 (1): 123-128.
- [16] PAN X, LIU Q, NIU S, et al. Efficacy of a recombinant turkey herpesvirus (H9) vaccine against H9N2 avian influenza virus in chickens with maternal-derived antibodies [J]. *Front Microbiol*, 2023, 13: 1107975.
- [17] PARKER D, DE WIT S, HOUGHTON H, et al. Assessment of impact of a novel infectious bursal disease (IBD) vaccination programme in breeders on IBD humoral antibody levels through the laying period [J]. *Vet Rec Open*, 2014, 1 (1): e000016.
- [18] GELB J Jr, JACKWOOD D J, BRANNICK E M, et al. Efficacy of recombinant HVT-IBD vaccines administered to broiler chicks from a single breeder flock at 30 and 60 weeks of age [J]. *Avian Dis*, 2016, 60 (3): 603-612.
- [19] CHEN Y Q, SU G M, ZHANG J H, et al. HVT-vectored H7 vaccine protects chickens from lethal infection with the highly pathogenic H7N9 avian influenza virus [J]. *Vet Microbiol*, 2023, 285: 109852.
- [20] WANG H, TIAN J, ZHAO J, et al. Current status of poultry recombinant virus vector vaccine development [J]. *Vaccines (Basel)*, 2024, 12 (6): 630.
- [21] SHITRIT A, NISNEVICH V, ROZENSHTEIN N, et al. Shared sequence characteristics identified in non-canonical rearrangements of HSV-1 genomes [J]. *J Virol*, 2023, 97 (12): e0095523.