

含 *E. coli* F 因子的马立克氏病病毒 1 型 (MDV1) 转移载体的构建及初步应用

邱亚峰, 葛菲菲, 陈溥言

(南京农业大学动物医学院动物疫病诊断与免疫重点实验室, 南京 210095)

摘要: 【目的】为了构建 MDV1 细菌人工染色体, 以便快速有效地进行重组病毒的筛选, 进行了含 *E. coli* F 因子的马立克氏病病毒 1 型 (MDV1) 转移载体的构建。【方法】利用 DNA 重组技术, 构建了含有 *E. coli* F 因子的马立克氏病病毒 1 型 (MDV1) 转移载体, 利用脂质体, 将线性化的转移载体转染入已感染 CVI988 病毒的 CEF, 用 MX-HAT 药物筛选 3 代以后, 用 X-gal 染色, 挑取阳性克隆。【结果】经测序分析发现, 人工体外合成的单一 loxP 位点, 序列正确, 另外, 同源重组左臂和右臂序列正确, 并且相对连接。利用 *Sph* I 和 *Nhe* I 双酶切, 鉴定出含有同向 loxP 位点的转移载体, 将其命名为 pUS-BGS。将该载体用 *Nhe* I 线性化后, 用脂质体转染已感染 CVI988 病毒的 CEF, 用 MX-HAT 药物筛选 3 代以后, X-gal 染色, 可以观察到呈现蓝色的重组病毒。【结论】本研究报道了含有 *E. coli* F 因子以及两同向的 loxP 位点的 MDV1 转移载体的构建, 利用该载体可以有效地进行重组病毒的筛选, 为下一步 MDV1 细菌人工染色体的构建奠定了基础。

关键词: 马立克氏病病毒; 细菌人工染色体; F 因子

Construction of Transfer Vector of Marek's Disease Virus Serotype 1 (MDV1) Containing F Factor of *Escherichia coli* and its Primary Application

QIU Ya-feng, GE Fei-fei, CHEN Pu-yan

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture,

College of Veterinomy Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: 【Objective】The objective was to construct the bacterial artificial chromosome containing the MDV1 genome, and to further develop quickly and efficiently the recombinant virus of MDV1 by using BAC vector. 【Method】Using the DNA recombinant techniques, the transfer vector containing *E. coli* F factor was constructed. The linearizing vector was transfected into CEF, which was infected by CVI988 virus. After a three-cycle selection by MX-HAT, the infected CEF was stained with X-gal, and the positive clones were picked. 【Results】The sequence analysis showed that the loxP site synthesized in vitro was correct, and the sequences of the homologous recombinant left arm and right arm were correct. The two arms were connected with the reversed orientation. The positive plasmid, in which two loxP sites had the same orientation, was identified by *Sph* I and *Nhe* I, named pUS-BGS. This linearizing vector by *Nhe* I was transfected into CEF, which was infected by CVI988 virus, by use of lipofectamine 2000. After three-cycle selection by MX-HAT, the infected CEF was stained with X-gal, blue plaques were appeared. 【Conclusion】This research indicated that the transfer vector containing the *E. coli* F factor and two loxP sites, which had the same orientation, was constructed. And the results showed that this vector was efficient for the selection of recombinant MDV1. So this gave the basis for construction of the bacterial artificial chromosome of MDV1.

Key words: Marek's disease virus; Bacterial artificial chromosome; F factor

收稿日期: 2005-07-03; 接受日期: 2006-05-12

基金项目: 国家 863 高新技术发展项目(2002AA245051)

作者简介: 邱亚峰 (1978-), 男, 山东济宁人, 博士研究生, 研究方向为分子病毒学与免疫学。Tel: 86-25-84396028; Fax: 025-84396335, E-mail: gffqyf@njau.edu.cn。通讯作者陈溥言 (1942-), 男, 江苏南京人, 教授, 博士生导师, 研究方向为畜禽传染病。Tel: 025-84396028; Fax: 025-84396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

0 引言

【本研究的重要意义】马立克氏病毒是疱疹病毒科, α -疱疹病毒亚科的成员^[1-3], 根据病毒毒力、引起 T 淋巴细胞瘤的能力以及抗原性, 将其分为 3 个血清型: MDV I 型 (MDV-1)、MDV II 型 (MDV-2) 和 MDV III 型 (MDV-3)^[4,5]。在 MDV 重组病毒构建过程中, 由于 MDV 的严格的细胞结合性以及仅能在鸡或鸭的原代或继代细胞上有效增殖的特点, 使得重组病毒的构建费时、费力。而最近发展起来的细菌人工染色体 (BAC) 技术使得重组病毒的构建变得容易。本研究构建了含有 *E.coli* F 因子的 MDV I 型转移载体, 并将该载体与 MDV-1 CVI988 株病毒在鸡胚成纤维细胞中同源重组, 成功获得重组病毒 rMDV-BAC, 验证了该转移载体的有效性, 为 MDV-1 细菌人工染色体的构建奠定基础。【前人研究进展】在 BAC 技术发展起来以后, 科学工作者将其应用于基因组较大的病毒的克隆化研究中。如对鼠和人的细胞巨化疱疹病毒基因组的操作^[6,7]、对单纯疱疹病毒基因组的操作^[8]、对伪狂犬病毒基因组的操作^[9,10]以及对 EB 病毒基因组的操作^[11], 使得 BAC 技术对 DNA 病毒基因组的操作逐渐完善。最近, 一些学者将该技术应用于 MDV, 成功构建了含有 MDV 基因组的细菌人工染色体。Daniel S 等^[12]成功构建了 MDV 超超强毒株 584Ap80C 株的细菌人工染色体。Lawrence P 等^[13, 14]成功构建了 MDV RB1B 株和 CVI988 株病毒的细菌人工染色体。【本研究切入点】尽管利用 BAC 技术构建了 MDV 不同毒株的细菌人工染色体, 但是利用该技术构建重组病毒时, 不可避免地在重组病毒基因组中含有 BAC 骨架基因结构, 该基因结构有可能对重组病毒中其插入位点两侧的基因的转录产生干扰, 此外, 对重组病毒的稳定性可能产生影响。基于此, 本研究在构建转移载体时, 在 BAC 骨架的两侧引入两同向的 loxP 位点, 便于下一步利用 Cre/loxP 系统将 BAC 骨架基因结构从重组病毒中删掉。【拟解决的关键问题】本文成功构建了含有 F 因子的 MDV1 转移载体, 并将两个同向 loxP 位点引入 F 因子的两侧, 便于下一步应用 Cre/loxP 系统对重组病毒操作。将该转移载体与 MDV1 CVI988 株病毒在 CEF 细胞中进行同源重组, 获得重组病毒 rMDV-BAC, 为下一步 CVI988 病毒 BAC 的构建奠定基础, 同时, 为利用 CVI988 BAC 进行新型疫苗的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

CEF 原代和继代细胞按常规方法由 9~10 日龄 SPF 鸡胚 (购自南京药械厂) 制备。CVI988/Rispens 株由本室保存。

1.2 质粒与菌种

质粒 phCMVgpt 由本室构建保存, 质粒 pSK 和宿主菌 DH5 α 由本室保存, 质粒 pBlueloxP 和宿主菌 GS500 由美国伊利诺伊大学荣立军博士惠赠。

1.3 主要试剂

限制性内切酶 *Pac* I 和 *Nhe* I 为 NewEngland 公司产品; 其它限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、T₄多核苷酸激酶、ATP、牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP)、dNTP 和 LATAq 酶为大连宝生物公司产品; DNA 胶回收试剂盒为上海生工公司产品; DMEM 和转染试剂 Lipofectamine 2 000 为 Invitrogen 公司产品; X-gal 为 Promega 公司产品; 其它试剂为分析纯。

1.4 寡聚核苷酸的设计与双链 DNA 的合成

根据 *LoxP* 位点的序列, 设计互补的两条链, 并分别在 5'端加上 *Spe* I 和 *Sma* I 酶切位点, 序列如下 (粗体为 *loxP* 位点序列): P1:5'CTAGTATAACTTCG TATAATGTATGCTATACGAAGTTATCCC3'和 P2:5' GGGATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAG TTATA3'。根据 *Pst* I 和 *Nhe* I 酶切位点的序列, 设计一条链, 以合成 *Pst* I -*Nhe* I -*Pst* I Adaptor, 序列如下: 5'GCTAGCTGCA3'。上述寡聚核苷酸由大连宝生物公司合成, 合成双链的条件为: 95°C 5 min, 72°C 20 min, 66°C 20 min, 37°C 10 min。

1.5 引物设计与基因扩增

根据质粒 phCMVgpt 的序列设计一对引物, 用于基因表达盒的扩增, 在两条引物的 5'端都加上 *Pac* I 酶切位点, 如下 (斜体为酶切位点): 上游引物: 5'*TTA ATTAATCAATATTGGCCATTAGC3'*; 下游引物: 5'*TT AATTAAGGTTAATCGATTTTACCACAT3'*, PCR 反应的条件: 95°C 1 min, 94°C 30 s, 54°C 1 min, 72°C 2 min 30 个循环后 72°C 10 min。

根据 GenBank 中 MDV1 US 区的基因序列设计引物, 对于重组右臂, 跨幅约 3.0 kb, 包括 US2 部分序列、US3、ORF4 和 US6, 在引物 R1 和 R2 的 5'端分别引入 *Sma* I 和 *Nhe* I, 引物序列为 (斜体为酶切位点): R1: 5'*TACCCGGGGCCAATCCGGTACCACG3'* 和 R2: 5'*GGGCTAGCGGGTTCCTGTTCCGACC3'*;

对于左重组臂的扩增, 跨幅约 2.5 kb, 包括 MDV1 US10、ORF3 和 US2 的部分序列, 在引物 L1 和 L2 的 5'端分别引入 *Nhe* I、*Hind*III 和 *Spe* I, 序列如下(斜体为酶切位点): L1: 5'CAATTGCTAGCTACGGCGCAAATCTAGCA3'和 L2: 5'GCGAAGCTTACTAGTGGA TTCGTTTATAGTGC GG3'。两重组臂 PCR 反应的条件相同: 95°C 1 min, 94°C 30 s, 52°C 1 min, 72°C 5 min 30 个循环后 72°C 10 min。上述引物由大连宝生物公司合成。

1.6 含 MDV1 重组臂的转移载体的构建

按照 T4 多核苷酸激酶的说明书, 对含有 loxP 的双链 DNA 磷酸化, 最后, 70°C 5 min 灭活。对 pSK 用 *Spe* I 和 *Sma* I 双酶切, 回收以后与上面的片断连接, 按常规的方法转化, 涂布平板(涂时加入 X-gal 和 IPTG)、挑白斑、提质粒, 用缺失酶 *Bam*H I 鉴定, 若切的开为载体自连, 反之为阳性, 命名为 pSK-L; 对 pSK-L 用 *Pst* I 单酶切, 回收后去磷, 回收的片断与 *Pst* I -*Nhe* I -*Pst* I Adaptor 双链磷酸化的产物连接, 按常规的方法转化、挑菌、提质粒及鉴定, 鉴定时用 *Nhe* I 单酶切, 若切开为阳性, 命名为 pSK-NL, 反之为载体自连, 对其测序分析; 以 MDV1 CVI988 株的基因组为模板, PCR 扩增左右同源重组臂, 重组右臂 PCR 产物(约 3.0 kb)用 *Nhe* I 和 *Sma* I 消化, 回收后与 pSK-NL 经 *Nhe* I 和 *Sma* I 的的酶切产物连接, 按常规的方法转化、挑菌、提质粒及酶切鉴定, 阳性质粒命名为 pSKR-NL, 对左臂 PCR 产物(约 2.5 kb)用 *Hind*III 和 *Nhe* I 消化, 回收后与 pSKR-NL 经 *Hind* III 和 *Nhe* I 酶切产物连接, 按常规的方法转化、挑菌、提质粒及酶切鉴定, 获得质粒 pSK-USL, 该质粒含有方向相对的左右重组臂, 并对该质粒测序分析。

1.7 含有 *E. coli* F 因子的 MDV1 转移载体的构建

以质粒 phCMVgpt 为模板, PCR 扩增 hCMVgpt 基因表达盒, 按照 T 载体连接说明书, 将其克隆入 T 载体中, 命名为 pT-hCMVgpt, 用 *Pac* I 单酶切, 电泳回收约 1.5 kb 的条带, 与质粒 pBlueloxP 经 *Pac* I 的酶切回收产物连接, 按常规的方法转化、挑菌及提质粒, 利用 PCR 的方法进行质粒的鉴定, PCR 鉴定阳性的质粒再用 *Pac* I 酶切鉴定, 阳性质粒切出 1.5 kb 的条带, 命名为 pgBlueloxP。对 pgBlueloxP 用 *Nhe* I 酶切, 回收以后, 用 CIAP 去磷, 回收用作连接载体, 对 pSK-USL 用 *Spe* I 单酶切, 电泳回收约 5.6 kb 的条带, 与上述载体进行连接, 按常规的方法转化、挑菌及提质粒, 利用 PCR 的方法进行质粒的鉴定, PCR 鉴定阳

性的质粒再用 *Sph* I 和 *Nhe* I 酶切鉴定两 loxP 位点的位置, 若切出 3.0 kb 的条带说明两 loxP 位点在 BAC 骨架基因的两侧并同向, 命名为 pUS-BGS; 反之, 在同侧。

1.8 重组病毒的筛选

选择培养至 80%~90% 满的继代鸡胚成纤维细胞, 感染 CVI988 病毒 30~40PFU/35 mm 平皿, 感作 3 h, 用无小牛血清及抗生素的 DMEM 洗涤 3 次, 加入 1.2 ml 无血清及抗生素的 OPTI-MEM。然后将 2.5 μg 经 *Nhe* I 线性化的 pUS-BGS 质粒 DNA 用脂质体转染试剂 Lipofectamine 2 000 转染入细胞, 37°C、5%CO₂ 条件下培养 5 h, 吸弃上清, 加入 2% 小牛血清的 DMEM 培养基, 继续培养 4 d 收获病毒, 将其接种于经 MX-HAT 培养基提前 1 h 感作的继代 CEF, 吸附结束以后, 换上 MX-HAT 药物培养基筛选, 每 2 d 换 1 次液, 于第 5 天将感染的细胞消化下来, 再接种于新鲜的细胞上, 如此重复 3 次, X-gal 染色, 显微镜观察挑取蓝斑, 将该病毒命名为 rMDV-BAC。

2 结果与分析

2.1 测序分析

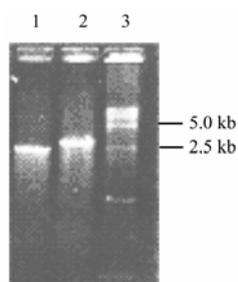
将人工合成的 LoxP 位点和 *Pst* I -*Nhe* I -*Pst* I Adaptor 分别克隆入 pSK 和 pSK-L 中, 经酶切鉴定阳性后, 对 pSK-NL 测序, 发现 loxP 位点完整的插入到 *Spe* I 和 *Sma* I 位点, *Pst* I -*Nhe* I -*Pst* I Adaptor 为 4 个同向的重复, 序列正确。

2.2 重组臂的扩增、克隆及序列测定

以 MDV1 CVI988 株的基因组为模板, PCR 扩增左右同源重组臂, 右臂约 3.0 kb, 左臂约 2.5 kb, 见图 1; 对右臂 PCR 产物用 *Nhe* I 和 *Sma* I 消化后, 电泳回收克隆入 pSK-NL 中, 获得 pSKR-NL; 对左臂用 *Hind*III 和 *Nhe* I 酶切, 电泳回收克隆入 pSKR-NL 的 *Hind*III 和 *Nhe* I 位点, 获得 pSK-USL, 对该质粒用 *Spe* I 单酶切可以切出约 5.6 kb 的条带, 用 *Nhe* I 和 *Hind* III 单酶切, 仅能使质粒线形化, 切出约 8.5 kb 的条带, 见图 2。对 pSK-USL 用载体两端的通用引物测序, 通过序列比较发现, 两重组臂相对连接, 与预想的结果一致。

2.3 转移载体的构建

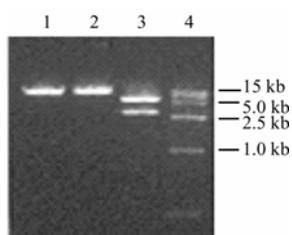
以质粒 phCMVgpt 为模板, PCR 扩增 hCMVgpt 基因表达盒, 结果扩增出约 1.5 kb 的条带, 见图 3; 电泳回收以后, 将其克隆入 T 载体中, 获得 pT-hCMVgpt, 对其用 *Pac* I 酶切, 电泳回收目的条带,



1. 重组左臂 PCR 产物; 2. 重组右臂 PCR 产物; 3. DNA marker(DL15000)
1. PCR amplified products of left arms; 2. PCR amplified products of right arms; 3. DNA marker (DL15000)

图 1 重组臂 PCR 产物

Fig.1 The PCR products of the recombinant arms



1. *Nhe* I 单酶切; 2. *Hind*III单酶切; 3. *Spe* I 单酶切; 4. DNA marker (DL15000)
1. pSK-USL/ *Nhe* I; 2. pSK-USL/ *Hind*III; 3. pSK-USL/ *Spe* I; 4. DNA marker (DL15000)

图 2 质粒 pSK-USL 酶切鉴定

Fig.2 Restriction enzyme analysis of plasmid pSK-USL

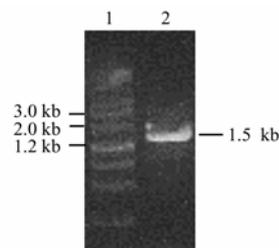
将其连入 pBlueLoxP, 获得 pgBlueLoxP, 阳性的质粒用 *Pac* I 酶切, 电泳可以看到 1.5 kb 的条带, 见图 4; 对 pSK-USL 用 *Spe* I 酶切, 电泳回收 5.6 kb 的条带, 将其克隆入 pgBlueLoxP, 通过 PCR 鉴定出阳性质粒, 对阳性质粒用 *Sph* I 和 *Nhe* I 酶切, 若两 loxP 位点同向, 并位于 BAC 骨架基因的两边时, 应切出约 3.0 kb 的条带, 将该质粒命名为 pUS-BGS, 见图 5。

2.4 重组病毒筛选

用脂质体将经 *Nhe* I 的 pUS-BGS 转染入经 CVI988 感染的 CEF, 4~5 d 后将细胞消化下来以后, 接种新鲜的细胞, 用 MX-HAT 药物培养基筛选, 如此重复 3 次, 用 X-gal 染色, 显微镜观察, 挑取蓝斑, 将该病毒命名为 rMDV-BAC, 见图 6。

3 讨论

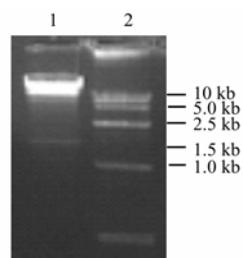
3.1 利用 *E. coli gpt* 和 *lacZ* 基因为筛选基因, 加快 MDV 重组病毒筛选速度



1. DNA marker; 2. 表达盒 PCR 产物
1. DNA marker; 2. PCR amplified products of the expressing cassette

图 3 hCMVgpt 表达盒 PCR 产物

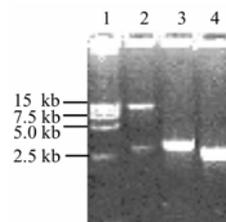
Fig.3 The PCR products of the expressing cassette



1. *Pac* I 单酶切鉴定; 2. DNA marker
1. pgBlueLoxP/ *Pac* I; 2. DNA marker

图 4 质粒 pgBlueLoxP 酶切鉴定

Fig.4 Restriction enzyme analysis of plasmid pgBlueLoxP

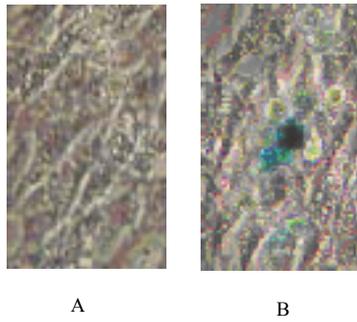


1. DNA marker(DL15000); 2. *Sph* I + *Nhe* I 双酶切鉴定; 3. 重组右臂 PCR 产物; 4. 重组左臂 PCR 产物
1. DNA marker (DL15000); 2. pUS-BGS/ *Sph* I + *Nhe* I; 3. PCR amplified products of right arms; 4. PCR amplified products of left arms

图 5 质粒 pUS-BGS 酶切鉴定

Fig.5 Restriction enzyme analysis of plasmid pUS-BGS

由于 MDV 的严格的细胞结合性以及仅能在鸡或鸭的原代或继代细胞上有效增殖的特点, 使得 MDV 重组病毒的筛选变得困难。有学者报道^[15,16]利用 *E. coli gpt* 基因为筛选基因构建重组病毒, 使用 MX-HAT



A. CVI988 病毒在 CEF 上的病变; B. 重组病毒 4 代在 CEF 上的蓝斑
A. The plaques of CVI988 in CEF; B. The fourth passage of rMDV-BAC in CEF

图 6 重组病毒 rMDV-BAC 感染 CEF 形成的蓝斑 (×200)
Fig. 6 The blue plaques of rMDV-BAC in CEF (×200)

药物培养基进行重组病毒的筛选, 可以有效地抑制亲本病毒的繁殖, 加快重组病毒的繁殖, 从而避免在重组病毒筛选过程中在体外连续传代。另外, *E.coli lacZ* 基因被广泛地应用于 MDV^[17-19]及其它病毒^[20]的重组病毒的筛选, 利用该基因进行重组病毒的构建, 仅使用一种底物 X-gal 进行显色, 便于重组病毒的纯化。本研究结合两种筛选基因的特点, 使用 *E.coli gpt* 和 *lacZ* 双筛选基因进行重组病毒的筛选, 加快了重组病毒筛选的速度。

3.2 构建转移载体时, 在 BAC 骨架基因的两侧引入两同向的 loxP 位点, 便于将来利用 Cre/loxP 重组酶系统对 BAC 骨架基因进行操作

在以往 MDV BAC 构建中, 没有引入 loxP 位点, 使得 BAC 衍生病毒中都含有 BAC 骨架基因, 这样就无法消除 BAC 基因对病毒的影响。Smith G A 等报道^[10]使用两步同源重组构建含有 BAC 基因的 prv 重组病毒, 并且在 BAC 骨架基因的两侧引入两同向的 loxP 位点, 便于下一步利用 Cre/loxP 重组酶系统对 BAC 衍生病毒进行操作。本研究构建了含有 BAC 基因的 MDV1 转移载体, 并在 BAC 基因的两侧引入两同向的 loxP 位点, 通过一步同源重组获得含有 BAC 基因的 MDV CVI988 株重组病毒, 为下一步利用 Cre/loxP 重组酶系统对 MDV BAC 衍生病毒进行操作奠定基础。

3.3 本研究为 MDV1BAC 的构建奠定基础, 进一步为以 MDV1 CVI988 株病毒为载体的新型疫苗的开发奠定基础

尽管国外已有 MDV BAC 的报道, 但是国内尚属空白, 本研究为构建具有中国自主知识产权的 MDV

细菌人工染色体奠定基础。本研究利用构建的载体与 MDV1 CVI988 株病毒进行同源重组, 构建重组病毒, 为下一步 MDV1 CVI988 株细菌人工染色体的构建奠定基础, 同时, 为以 MDV1 CVI988 株病毒为载体的新型疫苗的开发奠定基础。

4 结论

4.1 研究表明: (1) 构建的转移载体, 在与 MDV1 CVI988 株病毒进行同源重组之前, 必须利用 *Nhe* I 将载体线性化, 使两同源重组臂顺次位于 BAC 骨架基因的两端, 转染感染 MDV1 CVI988 株病毒的鸡胚成纤维细胞, 获得重组病毒。(2) 在 MDV 重组病毒筛选的过程中, 利用 MX-HAT 药物培养基连续筛选 3 代以后, 利用 X-gal 显色以后, 挑取阳性克隆, 可以获得相对较纯的 MDV 重组病毒。(3) 重组病毒获得, 说明试验中利用 PCR 获得 MDV1 同源重组臂可以与 MDV CVI988 株病毒进行同源重组, 与测序的结果相符。

4.2 将两同向的 loxP 位点引入 BAC 骨架基因的两端, 构建成 MDV1 转移载体, 为 MDV1 细菌人工染色体的构建奠定基础, 同时, 为改善 MDV1 BAC 衍生病毒奠定基础。

4.3 该载体的构建为下一步 MDV1 不同毒株的细菌人工染色体的构建奠定了基础, 同时, 也对 MDV2 和 MDV3 不同毒株的细菌人工染色体的构建给予一些启示。

References

- [1] Cantello J I, Anderson A S, Francesconi A, Morgan R W. Isolation of a Marek's disease virus (MDV) recombinant containing the *lacZ* gene of *E.coli* stably inserted within the MDV US2 gene. *Journal of Virology*, 1991, 65: 1584-1588.
- [2] Lee L F, Ping W, Sui D, Ren D, Kamil J, Kung H J, Witter R L. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97:6091-6096.
- [3] Van Regenmortael M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, Carstens E, Estes M K, Lemon S, Maniloff J, Mayo M A, McGeoch D, Pringle R C, Wichner R B. *Virus Taxonomy*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Academic Press, 1999.
- [4] Paycells L N. *Pathology, Marek's Disease*. Hingham, Mass: Kluwer Academic Publishers, 1985: 43-76.

- [5] Schatt K A. *Characteristics of the Virus, Marek's Disease*. Hingham, Mass: Kluwer Academic Publishers, 1985:77-112.
- [6] Borst E M., Halm G, Koszinowski U H, Messerle M. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *Journal of Virology*, 1999, 73: 8320-8329.
- [7] Messerie M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski U H. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1997, 94: 14759-14763.
- [8] Suter M, Lew A M, Grob P, Adema G J, Ackermann M, Shortman K, Fraefel C. BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: a bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent. Packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1999, 96:12697-12702.
- [9] Smith G A, Enquist L W. Construction and transposon mutagenesis in *E. coli* of a full-length infectious clone of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus. *Journal of Virology*, 1999, 73: 6405-6414.
- [10] Smith G A, Enquist L W. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2000, 97: 4876-4878.
- [11] Delecluse H, Hilsendegen T, Pich D, Zeidler R, Hammerschmidt W. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1998, 95: 8245-8250.
- [12] Daniel S, Tischer B K, Walter F, Nikolaus O. Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *Journal of Virology*, 2000, 74:11088-11098.
- [13] Lawrence P, Andrew C B, Susan J B, Ken H, Melanie A S, Nikolaus O, Venugopal K N. Oncogenicity of virulent Marek's disease virus cloned as bacterial artificial chromosomes. *Journal of Virology*, 2004, 78: 13376-13380.
- [14] Lawrence P, Ken H, Susan J B, Melanie A S, Simon E, Nikolaus O, Venugopal N. Replication-competent bacterial artificial chromosomes of Marek's disease virus: novel tools for generation of molecularly defined herpesvirus vaccines. *Journal of Virology*, 2003, 77:8712-8718.
- [15] Marshall D R, Reily J D, Liu X, Silva R F. Selection of Marek's disease virus recombinants expressing the *Escherichia coli* gpt gene. *Virology*, 1993, 195:638-648.
- [16] 张雪莲. 表达血清 1、3 型马立克氏病病毒 gB 主要抗原表位的重组 CVI988 病毒构建及免疫保护作用. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2003.
- Zhang X L. Construction and immune efficacy of recombinant CVI988 viruses expressing the major gB antigenic epitopes of MDV serotypes 1 and 3. *Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University*, 2003. (in Chinese)
- [17] Sakaguchi M, Hirayama Y, Maeda H, Matsuo K, Yamamoto M, Hirai K. Construction of recombinant Marek's disease virus type 1 (MDV1) expressing the *Escherichia coli* LacZ gene as a possible live vaccine vector: the US10 gene of MDV1 as a stable insertion site. *Vaccine*, 1994, 12: 953-957.
- [18] Parcels M S, Anderson A S, Cantello J L, Morgan R W. Characterization of Marek's disease virus insertion and deletion mutants that lack US1, US10, and/or US2 and neighbouring short-compent open reading frames. *Journal of Virology*, 1994, 68: 8239-8253.
- [19] Sakaguchi M, Urakawa T, Hirayama Y, Miki N, Yamamoto M, Zhu G S, Hirai K. Marek's disease virus protein kinase gene identified within the short unique region of the viral genome is not essential for viral replication in cell culture and vaccine-induced immunity in chickens. *Virology*, 1993, 195:140-148.
- [20] 陈化兰, 马文军, 于康震. 表达禽流感病毒血凝素基因的重组禽痘病毒的构建. *中国农业科学*, 2000, 33: 1-7.
- Chen H L, Ma W J, Yu K Z. Construction of a recombinant fowlpox virus expressing hemagglutinin gene of avian influenza virus. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, 33: 1-7. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)