

不同致病型马立克氏病病毒 1.8kb 基因家族序列比较 *

张纪元¹, 丁家波¹, 崔治中^{1**}, 姜世金¹, Bublot Michel²

(1. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安, 271018; 2. Merial Select, Inc, 29 Ave. Dony, Garnier Lyon, 69007, France)

Comparison of 1.8kb gene family of Marek's Disease Viruses of Different Pathotypes

ZHANG Ji-yuan¹, DING Jia-bo¹, CUI Zhi-zhong^{1**}, JIANG Shi-jin¹, Bublot Michel²

(1. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. Merial Select, Inc, 29 Ave. Dony, Garnier Lyon, 69007, France)

Abstract : In this study, sequences of the 1.8kb gene family of 12 different strains of Marek's disease viruses were compared. These strains covered 4 different pathotypes, i.e., vaccine, virulent, very virulent, and very virulent plus strains, plus three field strains isolated in China. The results demonstrated that the homology of the upstream regulating sequences of the gene family was more than 92.5% among 12 strains, vaccine strain CVI988/Rispens had more mutations especially with a "CTCGG" deletion between TATA box and a SP1 enhancer. There were 3-7 consecutive repeats of 132 bp in the 1.8 kb gene family of vaccine strain CVI988/Rispens, but only 2 copies were detected in the left strains of all pathotypes. However, there were also only 2 copies of 132 bp repeats found even in Chinese vaccine strain 814, indicating that expansion of 132 bp repeat copies did not have an important role as suggested before. The homology of 1.8 kb gene family was more than 97% among different strains. There were 2 ORF in the 1.69 kb non-spliced cDNA, encoding two peptides of 63 and 64 amino acids respectively. Both peptides were highly conservative, there were some variations among different strains, but these changes did not show any relationship to pathotypes or geographical distribution of strains.

Key words : Marek's disease viruses; Pathotypes; 1.8kb gene family; Sequence comparison

摘要: 为了分析鸡马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)的致病性与其 1.8kb 基因家族的关系,本研究比较了四个不同致病型 12 个毒株的该基因家族的同源性关系,即弱毒疫苗株、强毒株、超强毒株、特超强毒株和中国野毒株。结果表明:不同毒株间 1.8kb 基因家族的上游调控序列的同源性在 1.8kb 基因家族转录方向上大于 92.5%,序列间有缺失突变,其中大多数突变发生在弱毒株上。CVI988 在 TATA box 和上游 SP1 位点间丢失小片段“5 CTCGG 3'”。1.8kb 基因家族中存在 132bp 串连重复序列,CVI988 包含 3-7 个 132bp 串连重复序列拷贝,强毒株、超强毒株、特超强毒株通常只包含 2 个串连重复序列。但是已知的中国疫苗毒株 814 株也只有 2 个重复序列,表明重复序列的拷贝数不是引起病毒毒力变化的主要原因。各毒株的 1.8kb 基因家族同源性在 97% 以上。其中未剪切的 1.69kb cDNA 中有两个阅读框,分别编码 63 和 64 个氨基酸组成的多肽。不同毒株的这二个多肽都很保守,虽然也有一些氨基酸变异,但这些变异与病毒的致病型或地域分布没有明显的关系。

关键词: 马立克氏病病毒;致病型;1.8kb 基因家族;序列比较

中图分类号:R 512.6 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2005)03-0277-06

以马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)为代表的疱疹病毒是引起禽类发生肿瘤的主要病原,同时马立克氏病(Marek's disease, MD)也

是迄今为止能够用疫苗预防的唯一的肿瘤性疾病。对 MD 的研究,不仅在农业上有重要意义^[1],而且对肿瘤生物学的研究也颇有价值。现在认为

收稿日期:2004-10-27,修回日期:2005-02-02

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870008);法国 Merial 公司资助项目

作者简介:张纪元(1978-),男,山东安丘籍,硕士研究生,专业为动物病毒学。

** 通讯作者:崔治中(1944-),男,江苏江阴籍,研究方向为分子病毒学。Corresponding author. Tel.:0538-8241560, E-mail:zzcui@sadu.edu.cn

MDV 引起肿瘤的发生与三个基因相关:132 碱基对重复序列两侧的基因、pp38 和 meq^[2-7]。在 meq 基因中,疫苗株 CVI988/ Rispens 和 814 株缺失 CAC 三个碱基,并引起一个脯氨酸的缺失^[9]。对于 pp38 基因的碱基序列比较发现,CVI988/ Rispens 出现一个引起抗原决定簇发生改变的碱基变异。尽管在这些研究中发现了碱基或氨基酸变异,但是这些变异与 I 型 MDV 的致病性是否相关仍未有定论。

位于 U_L 和 IR_L 连接区 BamHI-H 片段内的 1.8kb 基因家族^[8],能转录不同 mRNA,且仅在强毒 MDV 表现很强的转录活性,转录起始位点位于相对 pp38 起始位点的 -670 到 -680 处^[5,7],但以相反的方向转录,受共用的一段启动子和增强子区域调控^[7]。相似的结构也出现在位于 U_L 和 TR_L 连接区的 BamHI-D 片段内。随着病毒在 CK、CEF 上的连续传代,1.8kb 基因家族发生扩增,扩增的产生原因主要是 132bp 串联重复序列拷贝数的增加,传代的病毒会失去致瘤性。因为在致瘤性很强的 MDV 毒株中 132bp 重复序列只有 2-3 个重复,而在非致瘤毒株中这一序列的拷贝数不等^[3],同时导致转录产物丢失。这些发现表明 1.8kb 基因家族的转录产物或者它们编码的蛋白质在病毒的致瘤性上充当着重要的角色。针对 1.8kb 的反意寡核苷酸能抑制 MD 细胞系的增殖,更支持了这种假设^[6]。1989 年 Bradley 等发表了 1.8kb 基因家族的转录图谱^[4]。1992 年 Fang 等对 1.8kb 基因家族中的 1.69 kb cDNA 和 1.5kb cDNA 进行了分析,并确定了 cDNA 中潜在的阅读框^[8],1.8kb 基因家族在 BamHI-H 片段内转录图谱见图 4.A。近来,Silva 等证明了 132bp 拷贝数的增加伴随着病毒致弱的过程,但其本身不能有效的导致病毒的致弱^[9]。本研究通过对包括毒力温和型疫苗毒、强毒、超强毒、特超强毒毒株共 7 个公认的参考株与 3 个中国分离株的 1.8kb 基因家族进行了克隆测序并与 GA 和 MD5 共 12 个毒株的 1.8kb 基因家族和编码多肽进行序列比较,旨在寻找 1.8kb 基因家族与不同致病型 MDV 之间的可能存在的相关性。

1 材料与方法

1.1 毒株、菌株与载体

研究所用的 MDV 毒株:特超强毒 584A 株、特超强毒 648A、超强毒 RB1B、超强毒 MD11、强毒 RB1B 都是在美国农业部禽病和肿瘤学研究所的保存毒株;疫苗毒 CVI988/ Rispens 是大约 43 代的保存毒^[10];中国疫苗株 814 株和中国标准株 Jing-1 株

分别由哈尔滨兽医研究所和北京农林科学院畜牧兽医研究所分离培养;MDV 的野毒株 GX0102、HB0202、GD0203 分别是本实验室在 2001 年和 2002 年从广西、河北和广东省的病料中分离得到。*E. coli* TG1,由本实验室保存;T 载体 pMD18-T,购自大连 TaKaRa 生物工程公司。

1.2 分子生物学试剂

T₄DNA 连接酶、PCR 反应应用试剂、限制性内切酶 *EcoR* 和 *Pst*、凝胶回收纯化试剂盒、X-gal、IPTG 及 DL2000 marker 等均购自大连 TaKaRa 生物工程公司。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中发表的 GA 株的全基因序列 (no. AF147806) 自行设计 3 对引物,引物(由上海生物工程公司合成)序列见表 1。

表 1 用于扩增 1.8kb 基因家族及其上游调控序列的 PCR 引物序列

Table 1 Primers used to generate 1.8kb gene family and its upstream regulating sequences			
Primers	Sequences	Positions in GA genome	Fragment sizes/ bp
F1 (forward)	5'-CCTCCA TAGCAC TTTCA TCGCA-3	11103-11124	849
R1 (reverse)	5'-ATGCAAA TGA GC AGT GCGAAC-3	11952-11931	
F2 (forward)	5'-TGCGA TGAAA GTG CTA TGGA GG-3	11124-11103	317
R2 (reverse)	5'-GA GAA TCCCTA TGA GAAA GCGC-3	10808-10829	
F3 (forward)	5'-GGA TCCCCCA AAGCA TA-3	9495-9511	1336
R3 (reverse)	5'-GCGCTTCTCA TAGGGATTCTC-3	10829-10808	

1.4 PCR 用 DNA 模板的制备

本文中所有的 MDV-CEF 基因组 DNA 样品,除 CVI988/ Rispens 株从美国带回外,其余均是在本实验室从感染细胞提取的。即按常规方法由 9 日龄 SPF 鸡胚(由山东济南斯帕法斯公司提供)制备鸡胚成纤维细胞(CEF),将不同的 MDV 分别接种 1 代 CEF,CO₂ 培养箱中 37 培养至出现 80% 细胞病变后收获,将收集的细胞消化,抽提,最后用乙醇沉淀 DNA,干燥后溶解于适当体积的 TE Buffer (10mmol/L Tris-Cl,1mmol/L EDTA,pH8.0)中,核酸定量约为 50~100ng/μL,即为扩增 MDV 基因组相关片段的模板 DNA。

1.5 PCR 扩增 1.8kb 基因家族

PCR 按常规方法进行,反应体系为 50μL,其中 10 × PCR buffer 5μL, dNTP (2.5mmol/L each) 4μL,引物 (25μmol/L) 各 2μL,模板 DNA 约

20μL, rTaq 2U。在 53 ~ 55 范围内适当调节退火温度,根据不同长度 PCR 产物在 72 适当调节延伸时间。

1.6 重组质粒的构建及阳性克隆筛选鉴定

将包含不同毒株 1.8kb 基因家族及其上游调控序列的 PCR 扩增产物用凝胶回收纯化试剂盒回收所需片段,与 pMD18-T 载体进行连接,将连接产物分别转化 *E. coli* TG1 感受态细胞,挑选白色菌落接种 Amp⁺LB 培养基,提取质粒。用 *Ecor* 和 *Pst* 进行双酶切筛选阳性克隆。

1.7 1.8kb 基因家族的序列测定与比较分析

将筛选的阳性克隆交由上海生物工程有限公司和上海博亚生物工程有限公司进行 DNA 序列测定,用 DNA Star 软件分别比较 1.8kb 基因家族上游调控序列和由 ORF-A 编码的 63 个氨基酸的蛋白质序列及由 ORF-C 编码的 64 个氨基酸的蛋白质序列。

2 结果

2.1 1.8kb 基因家族及其上游调控序列的 PCR 扩增结果

曾设想利用一对引物扩增全长的 1.8kb 基因及其上游调控序列,但是没有得到很好的扩增,因此将该序列分成相互重叠的 3 段进行扩增,F1 (forward)和 R1 (reverse)扩增包含上游调控序列和部分 1.8kb 基因的 DNA 片段,F3 (forward)和 R3 (reverse)扩增 132bp 重复序列下游的 1.8kb 基因的 DNA 片段,F2 (forward)和 R2 (reverse)扩增包含 132bp 重复序列的 DNA 片段,将 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果与预期片段大小一致。

2.2 不同致病型 MDV 的 1.8kb 基因家族上游调控序列的比较

对所测的 1.8kb 基因家族上游调控序列的比较表明,该段序列在不同毒株间相对稳定,序列的同源性在 1.8kb 基因家族转录方向上,其中 584A、648A、HB0202 同已经报道的 GA 和 MD5 的序列完全一致,在 Jing-1 和弱毒株 CV1988/ Rispens 及 814 上有相对一致的突变,其中 CV1988/ Rispens 在 TATA box 和上游 SP1 位点间丢失小片段“5 CTCGG 3”。MDV 的 1.8kb 基因家族上游调控序列的比较见图 1。

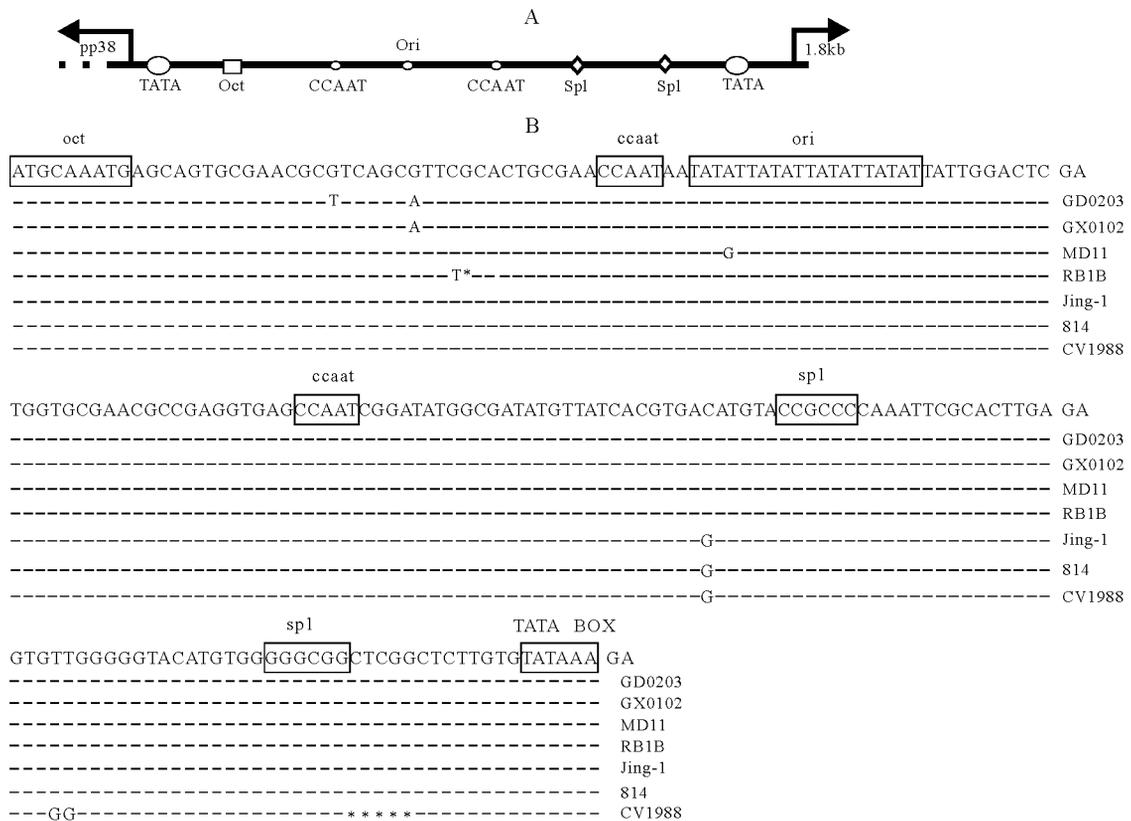


图 1 不同致病型 MDV 的 1.8kb 基因家族上游调控序列的比较

Fig. 1 The alignment of the upstream regulating sequences of MDV from different strains

A: The structure of the upstream regulating sequences of 1.8kb gene family; "ori" represent the MDV origins of replication;B: Other enhancer motifs were indicated according with the sequences in box, "*"represents the deletion

2.3 不同致病型 MDV 的 132bp 串连重复序列拷贝数的比较

由于使用 F2(forward)和 R2(reverse)扩增得到的 PCR 产物包括引物序列和 132bp 的上下游部分序列,因此含 1、2、3 个 132bp 重复序列的病毒 DNA 的扩增产物分别为 185bp,317bp 和 449bp,依次类推。扩增 CVI988/ Rispens 株的 132bp 串连重复序列的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。可见 CVI988/ Rispens 株在该基因家族中可含有不同拷贝数的 132bp 串连重复序列,最多的含有 7 个 132bp 串连重复序列的拷贝。然而其余毒株的 132bp 串连重复序列的拷贝数仅为 2 个。病毒毒株的来源、分离时间、致病型及 132bp 拷贝数见表 2。

2.4 1.8kb 基因家族的序列分析及比较

用 DNAStar 软件比较测定的 10 个毒株与已发表的 GA 株和 MD5 株的 1.8kb 基因家族的核酸序列,结果表明,所有毒株的 1.8kb 基因家族其核酸组成比较稳定,同源性在 98.8% 以上。

从图 3. A 中可以清楚的看到,ORF-A 阅读框架位于 *Bam*HIH(no. M26392)片段的 880-1069 位,

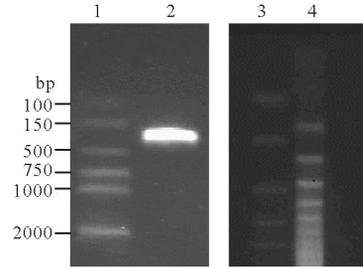


图 2 PCR 扩增 132bp 重复序列

Fig. 2 Special amplified PCR 132bp tandem repeats

1/3, DL2000 Marker; 2, F2 (forward) and R2 (reverse) amplified 132bp tandem repeats using 814 strain samples, the result showed that the band contained 2 copies of 132bp repeats(317bp). The same results were detected when F2 (forward) and R2 (reverse) amplified 132bp tandem repeats using RB1B, Md11, 584A, 648A, Jing-1, HB0202, GD0203, GX0102 strain samples; 4, F2 (forward) and R2 (reverse) amplified 132bp tandem repeats using CVI988 strain samples, the bands of 185bp,317bp,449bp,681bp,813bp,945bp were detected

各毒株编码的由 63 个氨基酸的构成的蛋白质序列比较见图 3, ORF-A 位于 *Bam*HIH(no. M26392)片段内的 880-1069 位,发生突变的氨基酸用黑体表示,GA* 株和 MD5* 的序列为引用的已发表的序列,序列号分别为 no. AF147806, no. AF243438。

编码 64 个氨基酸的阅读框架 ORF-C 位于

表 2 MDV 毒株的基本资料

Table2 Data of different MDV strains

Strain Name	Resource	Isolated in years	Pathotype	The copy of 132bp
CVI988/ Rispens ^[10]	Avian Disease and Oncology lab (ADOL)	The beginning of the seventies	m	at least seven
648A ^[11]	ADOL	The end of the eighties	vv +	two
584A ^[11]	ADOL	The beginning of the nineties	vv +	two
GA ^[12]	ADOL	The end of the sixties	v	two
MD5 ^[13]	ADOL	The beginning of the eighties	vv	two
MD11 ^[14]	ADOL	The beginning of the eighties	vv	two
RB1B ^[14]	ADOL	The beginning of the eighties	vv	two
814 ^[15]	Harbin China	The beginning of the eighties	m	two
Jing-1	Beijing China	The beginning of the eighties	v	two
HB0202	Hebei China	2002	Wild type, remained detected	two
GD0203	Guangdong China	2002	Wild type, remained detected	two
GX0102	Guangxi China	2001	Wild type, remained detected	two

```

1-----63
MMKRFVQGSRSSGTVDHRQHRPGMSLLGRPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSCNVERMG GA*
MMKRFVQGSRSSGTADHRQHRPGMSLLGRPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSCNVERMG Md5*
MMKRFVQGSRSSGTADHRQHRPGMSLLGRPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSRNVERMG 584A
MMKRFVQGSRSSGTADHRQHRPGMSLLGRPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSCNVERMG 648A
MMKRFVQGSRSSGTADHRQHRPGMSLLGRPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSCNVERMG 814
MMKRFVQGSRSSGTADHRQHRPGMSLLGRPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSCNVERMG Jing-1
MMKRFVQGSRSSGTADHRQHRPGMSLLGRPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSCNVERMG CVI988
MMKRFVQGSRSSGTADHRQHRPGMSLLARPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSCNVERMG GD0203
MMKRFVQGSRSSGTADHRQHRPGMSLLGRPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSCNVERMG GX0102
MMKRFVQGSRSSGTADHRQHRPGMSLLGRPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSCNVERMG HB0202
MMKRFVQGSRSSGTADHRQHRPGMSLLGRPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSCNVERMG MD11
MMKRFVQGSRSSGTADHRQHRPGMSLLGRPMGVVSVWSHLLMLWSFIGGMSDAAGSCNVERMG RB1B
    
```

图 3 不同毒株间 ORF-A 编码的由 63 个氨基酸构成的蛋白质的序列比较

Fig. 3 Comparison of the 63-aa peptide encoded by ORF-A among MDV strains of different pathotypes

*Bam*HI-H(no. M26392)片段的 1 283-1 475 位,起始于第 2 个 132bp 重复序列的 87~89 个碱基处,阅读框架包含完整的第 1 个 132bp。编码的多肽产生两个完全相同的由 13 个氨基酸构成的肽段,一个位于 N 端,另一个在靠近 C 端的位置。如果再加上序列中间出现的“LARVLHTSLALL”,使整个蛋白质序列呈现 3 个“L*****L*LL”(其中 * 代表不同的氨基酸)结构单元。ORF-C 与 132bp 在基因组中的相对关系见图 4. B,构成的蛋白质序列比较见图 5, ORF-C 位于 *Bam*HI-H (no. M26392) 片段内的 1283-1475 位,“ ”内的氨基酸为完全相同的氨基酸肽段,下划线强调的氨基酸序列同“ ”内的氨基酸序列存在类似的“L*****L*LL”结构单元,其中 L 用倾斜字体表示,其余序列中发生突变的氨基酸用黑体表示。GA* 株和 MD5* 的序列为引用的已发表的序列,序列号分别为 AF147806 和 AF243438。

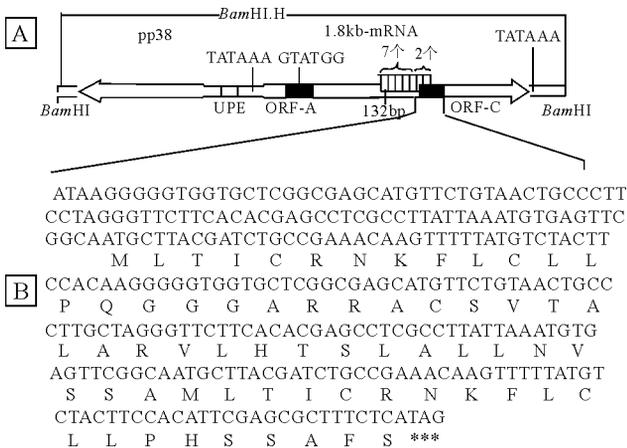


图 4 1.8kb 基因家族在 *Bam*HI-H 片段的转录图谱^[4,8]及 ORF-C 与 132bp 的关系

Fig. 4 Transcriptional map of 1.8kb gene family and relationship between 132bp repeats and ORF-C Two of the 132bp repeats are shown, with each repeat delineated by brackets. “***” represent stop code



图 5 不同毒株间 ORF-C 编码的由 64 个氨基酸构成的蛋白质的序列比较

Fig. 5 Comparison of the 64-aa peptide encoded by ORF-C among MDV strains of different pathotypes

3 讨论

由于 MDV 超强毒株 (vv MDV) 和特超强毒株 (vv⁺ MDV) 的不断出现,即使过去公认有效的细胞结合性二价疫苗 (HVT + SB1) 或 CVI988/ Rispens 株疫苗,也不能产生理想的免疫效果。这就促使人们去探讨和研究 MDV 毒力变异的根本原因。最近 20 多年来,人们一直采用严格饲养设施中的动物试验来完成 MDV 毒株毒力的检测和鉴定^[10],但是动物试验成本较高,而且经常受一些不确定因素的影响,再加上测定 MDV 毒力的试验持续的时间太长,因此人们越来越试图用分子生物学的方法作为判定 MDV 致病性及其毒力的首选方法。为了在基因组水平或氨基酸水平上鉴别出 MDV 在致病型上的差别,人们已经对不少基因或基因片段进行了比较如 pp38 基因, meq 基因, gB 基因^[16,17], gE 基因^[18], gI 基因^[19]等,尽管发现有些差异,但还是不能阐明变异和致病性之间的相关性。因此,本研究又把目光投在 1.8kb 基因家族上。1.8kb 基因家族被人们认为是 MDV 致肿瘤有关的序列^[4,6,8],本研究就是想通过比较不同致病型 MDV 的 1.8kb 基因家族,希望由此发现 1.8kb 基因家族与不同致病型 MDV 之间可能存在的相关性,为进一步进行 MDV 深入的研究提供数据。

通过对不同毒株间 1.8kb 基因家族的上游调控序列的比较研究,我们发现,12 个 MDV 毒株间在该基因家族序列的突变主要发生在弱毒株上, CVI988 和其余毒株之间存在最大的差异,在 TATA box 和上游 SP1 位点间丢失小片段“5 CTCGG 3”。但其生物学意义还有待研究。Fukuchi^[2]等描述了 I 型 MDV 病毒连续在 CEF 上传代会失去致瘤性,同时 1.8kb 基因序列发生扩增。Maotani^[3]等报道了扩增的原因主要是 132bp 重复序列拷贝数的增加。比较分析 1.8kb 基因家族我们发现, CVI988/ Rispens 株可以包含多个 132bp 重复序列,然而已知的另一个弱毒株 814 株和其他的包括强毒株、超强毒株、特超强毒株以及中国地方分离毒株都仅仅包含 2 个重复序列,可见重复序列的拷贝数不是引起病毒毒力变化的主要原因。

各毒株的 1.8kb 基因家族同源性在 98.8% 以上。ORF-A 和 ORF-C 编码的多肽高度一致, ORF-C 起始于第 2 个 132bp 重复序列的 87-89 个碱基处,阅读框架包含完整的第 1 个 132bp。编码的多肽产生两个完全相同的由 13 个氨基酸构成的肽段,一个位于 N 端,另一个在靠近 C 端的位置,加上序

列中间出现的“LARVLHTSLALL”,使整个蛋白质序列呈现有规律性的“L*****L*LL”结构单元。这种重复序列在生物学意义上还有待进一步研究。从图4.B中我们可以看到132bp重复序列拷贝数的继续增加均发生在ORF的上游,并不引起ORF-C阅读框架的改变。

在本研究中,我们比较了12个包括不同致病型的I型MDV毒株的1.8kb基因家族和编码蛋白质,尽管发现了一些差异,但这些差异似乎多数都是随机突变。过去的研究发现,中国分离到的不同致病型毒株在gE基因上有特定的碱基变化作为演化的遗传标志^[17],但是从1.8kb基因家族看不出与致病性的直接关系,也看不出具有中国地方特色的变异。

参考文献

- [1] Calnek B W, Witter R L. Neoplastic disease/ Marek's Disease [A]. Calnek B W. Diseases of Poultry [M]. 10th ed. Iowa: Iowa State University Press, 1977. 367-413.
- [2] Fukuchi K, Tanaka L, Schierman R, et al. The structure of the Marek's disease virus DNA: the presence of unique expansion in nonpathogenic DNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 751-754.
- [3] Maotani K, Kanamori A, Ikuta K, et al. Amplification of a tandem direct repeat within inverted repeats of the Marek's disease virus DNA during serial *in vitro* passage [J]. J Virol, 1986, 58: 657-659.
- [4] Bradley G, Hayashi M, Lancz G G, et al. Structure of the Marek's disease virus BamHI-H gene family: genes of putative importance for tumor induction [J]. J Virol, 1989, 63: 2534-2542.
- [5] Bradley G, Lance G, Tanaka A, et al. Loss of Marek's disease virus tumorigenicity is associated with truncation of RNAs transcribed within BamHI-H [J]. J Virol, 1989, 63(10): 4129-4135.
- [6] Kawamura M, Hayashi M, Furuichi T, et al. The inhibitory effects of oligonucleotides, complementary to Marek's disease virus mRNA transcribed from the BamHI-H region, on the proliferation of transformed lymphoblastoid cells MDCC-MSB1 [J]. J Gen Virol, 1991, 72(pt5): 1105-1111.
- [7] Cui Z Z, Lee L F, Liu J L, et al. Structural analysis and transcriptional mapping of the Marek's disease virus gene encoding pp38, an antigen associated with transformed cells [J]. J Virol, 1991, 65(12): 6509-6515.
- [8] Peng F, Bradley G, Tanaka A, et al. Isolation and characterization of cDNA from BamHI-H gene family RNAs associated with the tumorigenicity of the Marek's disease virus [J]. J Virol, 1992, 66: 7389-7396.
- [9] Silva R F. Expansion of a unique region in the Marek's disease virus genome occurs concomitantly with attenuation but is not sufficient to cause attenuation [J]. J Virol, 2004, p. 733-740.
- [10] Rispens B H, Vloten H Van, Mastebroek N, et al. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI988) and its use in laboratory vaccination trials [J]. Avian Dis, 1972, 16: 108-125.
- [11] Witter R L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates [J]. Avian Disease, 1997, 41: 149-163.
- [12] Eidson C S, Schmittle S C. Studies on acute Marek's Disease. I. Characteristics of isolate GA in chickens [J]. Avian Dis, 1968, 12: 467-476.
- [13] Witter R L, Sharma J M, Fadly A M. Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolates in vaccinated and unvaccinated chickens [J]. Avian Disease, 1980, 24(1): 210-232.
- [14] Schat K A, Calnek B W, Fabricant J. Characterization of two highly oncogenic strains of Marek's disease virus [J]. Avian Pathol, 1982, 11: 593-605.
- [15] 童昆周, 林英华, 徐宜为, 等. 鸡马立克氏病(MD)免疫的研究—MD病毒弱毒疫苗株的培育和免疫实验 [J]. 畜牧兽医学报, 1984, 15: 107-113.
- [16] Yoshida S, Lee L F, Yanageda N, et al. Identification of serotypes and 3 Marek's disease virus gB homology of herpes simplex virus and their expression by fowl pox virus recombinants [J]. Virology, 1994, 200: 484-493.
- [17] 柠晓檬, 赵晓岩, 刘长军, 等. 马立克氏病病毒(MDV) 814株B抗原的克隆及部分序列分析 [J]. 病毒学报, 1996, 12: 355-359.
- [18] 刘岳龙, 崔治中, 何良梅, 等. 特超强毒648A株马立克氏病病毒的囊膜糖蛋白gE基因的克隆和序列分析 [J]. 微生物学报, 2001, 41: 155-161.
- [19] 崔治中, 何良梅. 特超强毒型马立克氏病病毒囊膜糖蛋白I基因序列及与其它致病型毒株的比较 [J]. 中国病毒学, 2000, 15: 180-187.