

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.06.01

禽网状内皮组织增生症病毒单抗制备及 在外源病毒检测中的应用

陈晓春, 赵 炜, 苏 佳, 王 嘉, 侯力丹, 黄小洁, 吴华伟, 李俊平*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2021-11-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 06-0001-08 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 将禽网状内皮组织增生症病毒(REV)囊膜蛋白 gp90(SU)的基因合成后连接至原核表达载体中进行表达, 获得 REV-SU 蛋白, 通过 Ni 柱亲和层析获得纯化的重组蛋白, 免疫 BALB/c 小鼠, 应用杂交瘤技术获得 1 株分泌特异性抗 REV-SU 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞系(2A2 株), 该细胞株制备的腹水与不同 REV 毒株具有良好的反应性, 荧光效价可达 1:51200, 与不同禽白血病病毒毒株和其他常见禽的病原均没有交叉反应, 特异性良好。应用该单克隆抗体建立的间接免疫荧光法能检出至少 5 TCID₅₀ REV 感染, 与多克隆抗体作为检测一抗具有同等的效力, 且检测背景更加纯净, 适用于外源性 REV 检验。

[关键词] 禽网状内皮组织增生症病毒; 外源病毒检验; gp90; 单克隆抗体; 间接免疫荧光法

Preparation of Monoclonal Antibody against Avian Reticuloendotheliosis Virus and Its Application in Exogenous Viruses Detection

CHEN Xiao-chun, ZHAO Wei, SU Jia, WANG Jia, HOU Li-dan,

HUANG Xiao-jie, WU Hua-wei, LI Jun-ping*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: LI Jun-ping, E-mail: lijunping03@163.com

Abstract: To establish an indirect immunofluorescence staining method for detecting exogenous viruses, the gene of the envelope protein gp90 (SU) of avian reticuloendotheliosis virus (REV) was synthesized and ligated into prokaryotic expression vector for expression, and REV-SU protein was obtained in this study. Then, the purified recombinant protein was obtained by Ni affinity chromatography. After immunizing BALB/c mice, a hybridoma cell line (strain 2A2) secreting specific monoclonal antibody against REV-SU protein was obtained with hybridoma technique. The ascites prepared using this cell line had high reactivity with different REV strains, with

基金项目: 中国兽医药品监察所“兽药行业公益性重点专项”(GY202012)

作者简介: 陈晓春, 预防兽医学博士, 从事兽用生物制品质量控制研究。

通讯作者: 李俊平, E-mail: lijunping03@163.com

the immunofluorescence titer reaching 1:51200, but no cross-reaction with different avian leukosis virus strains or other conventional avian viruses, showing high specificity. The indirect immunofluorescence assay established with the monoclonal antibody secreted by this cell line could detect more than 5 TCID₅₀ REV, as the same effect as the detection based on polyclonal antibody, and the detection background was more pure. The results confirm that this method is suitable for the detection of exogenous REV.

Key words: avian reticuloendotheliosis virus; exogenous viruses detection; gp90; monoclonal antibody; indirect immunofluorescence assay

禽网状内皮组织增生症(Reticuloendotheliosis, RE)是指由反转录病毒科网状内皮组织增生症病毒(Reticuloendotheliosis virus, REV)群引起的几种禽类的一群病理综合征,主要包括矮小综合征、淋巴组织及其他组织形成的慢性肿瘤、急性网状细胞肿瘤等^[1],能引起严重的免疫抑制。该病在禽群中普遍存在,而且一旦种禽感染,可通过垂直传播迅速波及整个群体。疫苗中污染 REV 被认为是近些年引起 RE 传播和流行的主要途径,报道最多的是被 REV 污染的禽痘疫苗和马立克氏病疫苗使用后引起的严重经济损失^[2-3],其次是禽成髓细胞性白血病病毒作为反转录酶的来源而广泛用于生化研究,其种毒含有低水平的 REV^[4]。2004 年,丁家波等利用间接免疫荧光法(Indirect immunofluorescence assay, IFA)、PCR 和核酸杂交等方法,对国内多家企业生产的禽痘病毒疫苗和禽痘病毒(Fowl pox virus, FPV)临床分离株进行了 REV 污染和基因整合情况研究,发现所有疫苗样品的 FPV 基因组和临床分离株中均检出 REV 核酸阳性或病毒阳性,这是我国首次关于 FPV 基因组中整合进 REV 基因组成分的报道^[5]。2005-2009 年,李俊平等对 203 批次禽用活疫苗采用 IFA 法进行 REV 污染检测,结果检出鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒活疫苗和鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒)2 个品种共 8 个批次呈阳性(3.9%)^[4]。

目前,我国已强制要求兽用活疫苗生产必须使用 SPF 鸡胚,彻底杜绝用非免疫鸡胚制备活疫苗,在一定程度上保证了禽用疫苗的质量和养禽业的健康发展。《欧洲药典》和《英国药典(兽药)》只对生产禽源疫苗的种毒和生产原材料(主要是 SPF 鸡

胚)进行 REV 污染的检测,对成品中是否污染 REV 没有要求检测。《日本农林水产省兽医生物制品标准》要求对成品进行 REV 污染检测。我国从 2010 年版《中国兽药典》开始将 REV 和禽白血病毒(Avian leukosis virus, ALV)的检测列入禽外源病毒检测必检项目^[3]。REV 检测采用 IFA 方法进行,使用的一抗为 SPF 鸡制备的多克隆抗体,染色效果良好。但制备多克隆抗体过程繁琐、周期长、成本高,而且多克隆抗体本身的特异性也有待提高。为降低制备成本,进一步提高检验的特异性,本研究制备了针对 REV 主要囊膜蛋白 gp90 的单克隆抗体,并建立了基于单抗的 IFA 方法,用于外源性 REV 检验。

1 材料

1.1 细胞与动物 SP2/0 骨髓瘤细胞、BALB/c 小鼠等单克隆抗体制备用材料均由北京六合华大蛋白研发中心有限公司提供。鸡胚成纤维细胞(Chick embryo fibroblast, CEF)按照现行《中国兽药典》附录进行制备。

1.2 病毒

1.2.1 REV REV-T 株由中国兽医药品监察所保存;CY 1111 株(2011 年,山东,蛋鸡)^[6]、SY 1209 株(2012 年,辽宁,蛋鸡)^[6]、HS/1412 R 株(2014 年,辽宁,蛋鸡)^[7]、HLJR 0901 株(2009 年,黑龙江,蛋鸡)^[8],均由哈尔滨兽医研究所提供;HA 1101 株(2011,江苏,蛋鸡)^[9],由扬州大学教育部禽类预防医学重点实验室提供;IBD-C 1605 株(2015,山东,REV 污染疫苗)^[10]、REV 161214 株(2016,河北,蛋鸡)、SDAUS-1 株(2016,河北,公鸡精液),由山东农业大学家禽肿瘤病实验室提供。

1.2.2 ALV ALV - A (RAV - 1 株)、ALV - B (RAV - 2 株) 由中国兽医药品监察所保存; ALV - C (RAV - 49)、ALV - J (HPRS - 103) 由哈尔滨兽医研究所提供; ALV - K (SDAUAK 11 株)^[11] 由山东农业大学家禽肿瘤病实验室提供。

1.2.3 其他病毒 鸡新城疫病毒 (NDV) La Sota 株、鸡传染性法氏囊病毒 (IBDV) B87 株、火鸡疱疹病毒 (HVT) Fc126 株、鸡马立克氏病毒活疫苗 (MDV) CVI 988 株、禽腺病毒 I 群 (FAdV - I) YR36 株, 均由中国兽医药品监察所保存。

1.3 菌种、载体 表达载体 pET - 30a、表达菌 BL21 及蛋白表达与纯化试剂均由北京六合华大蛋白研发中心有限公司提供。

1.4 其他试剂 FITC 标记的抗小鼠 IgG, sigma 公司产品; 新生牛血清, Hyclone 公司产品; M199 细胞培养液, Gibco 公司产品。

2 方 法

2.1 免疫原的制备 根据 GenBank 上公布的 REV 序列, 采用 DNASTar 软件对 SU 蛋白进行二级结构、亲疏水性、抗原性和功能区的分析, 选取抗原表位相对集中的 53 ~ 362 aa 蛋白序列作为目的片段。对该区域的核苷酸片段 (1098 bp) 进行合成, 并在 5' 和 3' 端加入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点, 用于载体的克隆。序列合成在北京六合华大蛋白研发中心有限公司进行。

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 分别对合成的序列和质粒 pET - 30a 进行双酶切, 将纯化回收的片段和表达载体酶切产物用 DNA Ligation Kit 连接后转化至感受态细胞 (BL21)。挑取单克隆菌株培养, 经 PCR 鉴定后, 用 IPTG (0.5 mmol/L) 16 °C 诱导过夜, 离心收获菌体, 超声破菌 (500 W, 180 次, 每次 5 s, 间隔 5 s)。通过镍柱纯化, 经 SDS - PAGE 电泳检测纯度在 85 % 以上时, 作为单抗的免疫原。

2.2 单克隆抗体的制备与鉴定 用上述纯化蛋白按每只小鼠 30 μg ~ 60 μg 的剂量, 多次皮下注射 4 只 BALB/c 雌性小鼠。采用间接 ELISA 检测小鼠抗体效价, 对血清效价较高的小鼠, 用免疫原 50 μg

进行腹腔注射免疫冲击一次, 免疫后 3 日, 按常规方法进行细胞融合。将上述融合细胞培养物经 SU 蛋白包被的 ELISA 板进行两次筛选, 挑选 ELISA 阳性的杂交瘤细胞株上清采用 IFA 方法筛选与 REV 全病毒具有良好反应性的细胞株。然后选取免疫荧光检测为阳性的细胞株采用有限稀释法进行亚克隆, 直至细胞克隆抗体阳性率达 100 %, 扩大培养后液氮中保存。对筛选出的杂交瘤细胞株分别进行亚型鉴定、细胞稳定性检测、无菌检验、支原体检验、外源病毒检验。

2.3 腹水的制备 经鉴定合格后, 制备小鼠腹水。取 9 周龄 BALB/c 小鼠 10 只, 腹腔注射降植烷, 每只 0.5 mL。7 ~ 10 d 后每只小鼠腹腔注射杂交瘤细胞 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7 / 0.5 \text{ mL}$, 7 ~ 10 d 后观察小鼠状态, 待小鼠腹部明显膨大、行动不便时, 抽取小鼠腹水, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清, -40 °C 保存。间隔 2 ~ 3 d, 若腹水再次产生, 可再次采集。

2.4 效价测定 将 REV - T 株病毒液用含 2% 新生牛血清的 M199 培养液稀释成 100 TCID₅₀/0.1 mL, 接种已长成良好 CEF 单层的 96 孔板, 100 μL/孔。然后置 37 °C、含 5% CO₂ 的温箱中培养 5 d, 冷甲醇固定。将腹水进行 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200、1:102400 稀释, 测定效价。

2.5 特异性试验 对接种了 ALV (RAV - 1 株和 RAV - 2 株)、NDV (La Sota 株)、IBDV (B87 株)、FAdV - I (YR36 株)、HVT (Fc126 株)、MDV (CVI 988 株) 等病原 (毒株信息见 1.2 项) 的带毒细胞进行检测, 观察是否出现特异性荧光, 以确定该单抗的特异性。

2.6 单抗反应性协作标定 委托中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、山东农业大学家禽肿瘤病实验室、扬州大学教育部禽类预防医学重点实验室对该单抗进行不同 REV 毒株反应性和不同亚型 ALV 毒株反应性验证试验。毒株信息见 1.2 项。

2.7 IFA 方法的建立

2.7.1 IFA 试验程序

2.7.1.1 病毒感染细胞板的制备 将阳性病毒用

含 2% 新生牛血清的 M199 培养液稀释成 $100\text{ TCID}_{50}/0.1\text{ mL}$, 接种已长成良好 CEF 单层的 96 孔板, $100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$ 。然后置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 的温箱中培养 5 d, 进行间接免疫荧光染色。

2.7.1.2 固定 采用冷甲醇固定细胞板, 自然晾干, $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.7.1.3 加一抗(单克隆抗体) 将待检的单克隆抗体用 PBS 稀释适宜倍数, 加入 REV 感染细胞板中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育。

2.7.1.4 洗涤 弃去板孔中的一抗, 用 PBS 洗涤并轻微振荡洗涤。

2.7.1.5 荧光二抗染色 尽量弃尽洗液, 每孔加入用 PBS 作适当稀释的荧光标记的羊抗小鼠 IgG, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育。

2.7.1.6 洗涤 方法同 2.7.1.4 项。

2.7.1.7 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光(波长 490 nm) 观察。被感染的 CEF 细胞呈现绿色荧光, 有完整的细胞形态, 周围未感染细胞不着色, 视野发暗。

2.7.1.8 结果判定 正常细胞对照背景最暗且无特异性荧光。根据荧光强弱, 其结果可判为 - (无特异性荧光, 背景纯净)、+ (1 个视野内有 1 个左右的特异性荧光)、++ (1 个视野内有 1~10 个特异性荧光)、+++ (1 个视野内有 10 个以上特异性荧光)。

2.7.2 IFA 试验最适工作条件的确定

2.7.2.1 一抗工作浓度的确定 按照 2.7.1 项程序, 以 REV 单克隆抗体作为一抗, 工作浓度设 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400 稀释度, 以呈现“+++”荧光强度的最大稀释倍数作为一抗的最适工作浓度。

2.7.2.2 二抗工作浓度的确定 以上述确定的反应条件, 将二抗分别作 1:100、1:200、1:400 稀释, 进行 IFA 反应, 以呈现“+++”荧光强度的最大稀释倍数作为二抗的最适工作浓度。

2.7.2.3 一抗作用时间的确定 以上述确定的反应条件, 分别以 30 min、45 min、60 min 作为一抗作用时间, 进行 IFA 反应, 观察比较一抗作用时间对

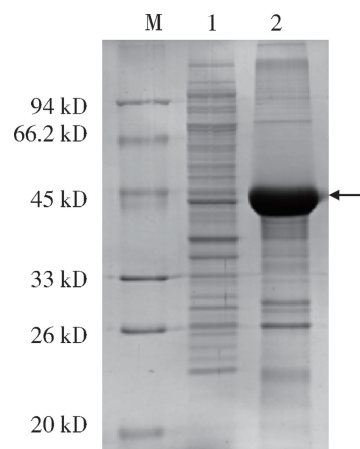
试验结果的影响, 确定一抗最适作用时间。

2.7.2.4 二抗作用时间的确定 以上述确定的反应条件, 分别以 30 min、45 min、60 min 作为二抗作用时间, 进行 IFA 反应, 观察比较二抗作用时间对试验结果的影响, 确定二抗最适作用时间。

2.8 人工感染试验 取鸡传染性支气管炎活疫苗(H120 株)、鸡新城疫病毒活疫苗(La Sota 株)和鸡马立克氏病活疫苗(CVI 988 株)三种疫苗各 1 批, 样品处理前每 500 羽份分别加入含 50 TCID_{50} 、 10 TCID_{50} 、 5 TCID_{50} 、 1 TCID_{50} 的 REV-T 株阳性病毒, 同时设定未添加 REV 的疫苗对照组, 按照《中国兽药典》2015 年版三部附录 3304 进行样品处理、接种和传代培养, 采用上述建立的 IFA 方法进行荧光染色, 确定该方法最小检出限。同时采用 REV 多克隆抗体进行比较和验证。

3 结果与分析

3.1 重组 SU 蛋白的表达 重组菌经诱导表达后, 超声破菌, 离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。结果在沉淀中检测到大量的目的蛋白, 说明该重组蛋白表达形式为包涵体表达(图 1)。



M:Marker; 1: 超声后上清; 2: 超声后沉淀

M:Marker; 1:Supernatant after ultrasound;

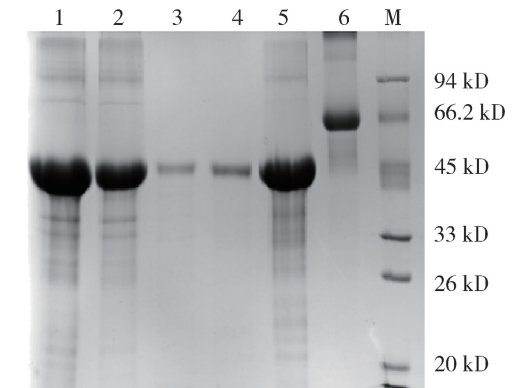
2:Precipitation after ultrasound

图 1 REV-SU 蛋白可溶性分析

Fig 1 Solubility analysis of REV-SU protein

3.2 重组 SU 蛋白的纯化与鉴定 纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 以 BSA 为标准, 通过 SDS-PAGE 凝胶扫描分析估计蛋白浓度为 0.5 mg/mL ,

纯度为 85%。SDS - PAGE 结果显示在约 46 kD 处有明显蛋白条带(图 2)。



M:Marker;1:蛋白原样;2:流穿;

3: 15 mmol/L 咪唑洗脱;4: 60 mmol/L 咪唑洗脱;

5: 500 mmol/L 咪唑洗脱;6: 0.5 mg/mL BSA

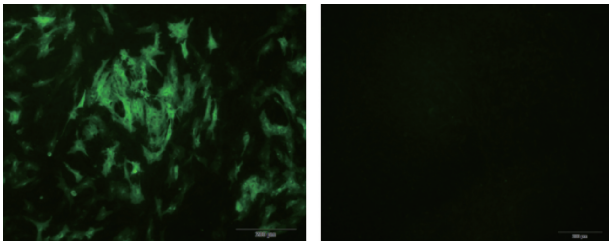
M:Marker; 1:Original protein; 2:Flow through; 3:Eluted by 15 mmol/L imidazole; 4:Eluted by 60 mmol/L imidazole;

5:Eluted by 500 mmol/L imidazole; 6: 0.5 mg/mL BSA

图 2 REV - SU 蛋白纯化 SDS - PAGE 图

Fig 2 SDS - PAGE of purified REV - SU protein

3.3 杂交瘤细胞的筛选 采用 REV - T 株对 ELISA 阳性的杂交瘤细胞进行 IFA 筛选,结果筛选出 1 株与病毒产生特异性荧光的杂交瘤细胞,命名为 Mab - SU - 2A2 株。结果见图 3。



Mab-SU-2A2细胞上清

CEF正常细胞对照

图 3 杂交瘤细胞上清液 IFA 检测

Fig 3 IFA with hybridoma cell supernatant

3.4 杂交瘤细胞的鉴定结果 纯净性检验结果表明,杂交瘤细胞株 Mab - SU - 2A2 株无菌生长,无支原体生长,无外源病毒污染,纯净性良好;该细胞株亚型为 IgG2a 亚型;连续培养 10 代,培养上清 IFA 效价均在 1:10 ~ 1:20,稳定性好。

3.5 腹水效价测定 大量制备小鼠腹水,用 IFA 方法测定抗体效价,结果表明,Mab - SU - 2A2 株单抗腹水稀释至 1:51200 时,细胞仍可见特异性绿色荧光(图 4),IFA 效价为 1:51200。

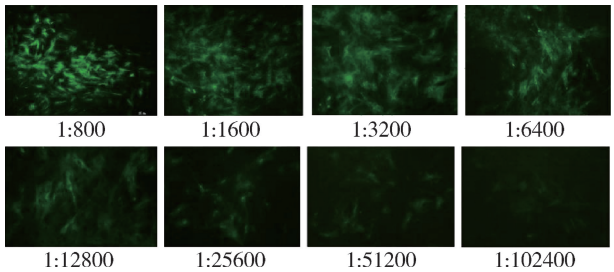


图 4 单抗 2A2 腹水效价测定结果

Fig 4 Determination of IFA titer of Mab 2A2 ascites

3.6 特异性试验 对接种了 ALV (RAV - 1 株和 RAV - 2 株)、NDV (La Sota 株)、IBDV (B87 株)、FAdV - I (YR36 株)、HVT (Fc126 株)、MDV (CVI 988 株)病原的带毒细胞进行 REV 单抗荧光染色,均未检测到特异性荧光,说明该单抗特异性良好。

3.7 协作标定结果 三家实验室协作标定结果显示,Mab - SU - 2A2 株单克隆抗体对于不同的 REV 毒株具有良好的反应性,分离株分别分离自山东、辽宁、黑龙江、吉林、河北等地,分离年份从 2011 年至 2016 年,样品来源包括蛋鸡、公鸡精液及受污染的 IBDV 疫苗(图 5);与分离自不同年份的 A、B、C、J、K 等亚群的 ALV 毒株均无交叉反应(图 6),特异性良好。

3.8 IFA 方法条件优化 经优化,确定 IFA 最适反应条件为:一抗 1:800 稀释,作用时间 60 min;二抗 1:200 稀释,作用时间 60 min。

3.9 人工感染试验 结果表明,采用 REV 单克隆抗体作为一抗对污染了不同剂量 REV 的鸡传染性支气管炎活疫苗(H120 株)、鸡新城疫病毒活疫苗(La Sota 株)和鸡马立克氏病活疫苗(CVI 988 株)三种疫苗进行检测的最低检出量分别为 5 TCID₅₀、5 TCID₅₀、10 TCID₅₀,与鸡抗 REV 多克隆抗体作为一抗进行荧光染色结果相当(分别为 5 TCID₅₀、10 TCID₅₀、10 TCID₅₀),且背景更加纯净(图 7)。

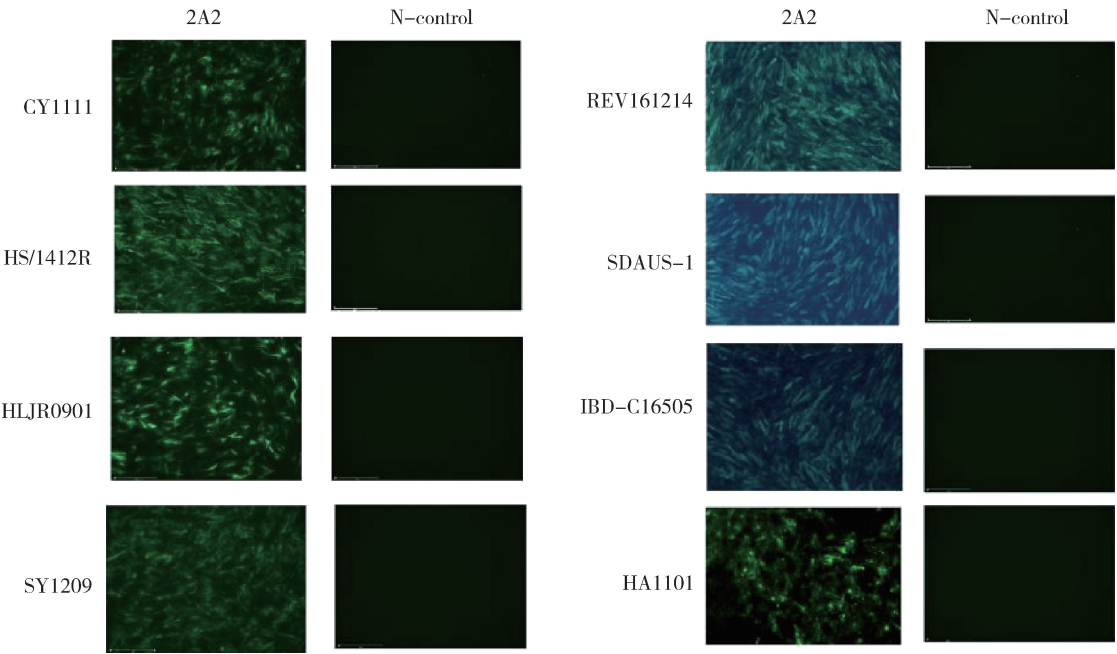


图 5 单抗 2A2 与不同 REV 毒株反应性结果

Fig 5 Reaction between Mab – Su – 2A2 with different REV strains

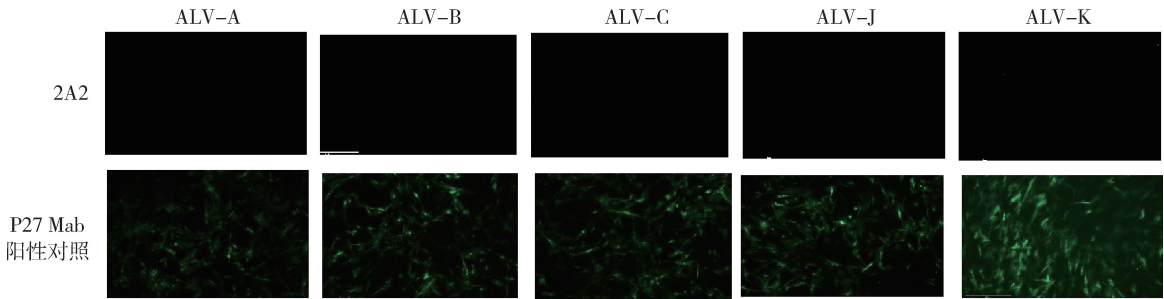
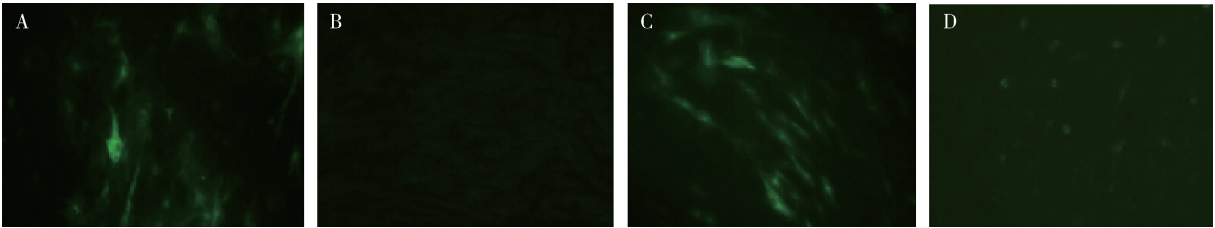


图 6 单抗 2A2 与不同 ALV 毒株反应性结果

Fig 6 Reaction between Mab – Su – 2A2 with different ALV strains



A: 10 TCID₅₀ 污染组 REV 单抗染色; B: 疫苗对照组 REV 单抗染色;

C: 10 TCID₅₀ 污染组 REV 多克隆抗体染色; D: 疫苗对照组 REV 多克隆抗体染色

A: Stained with REV Mab in 10 TCID₅₀ contaminated group; B: Stained with REV Mab in negative control;

C: Stained with REV Pab in 10 TCID₅₀ contaminated group; D: Stained with REV Pab in negative control

图 7 活疫苗中人工感染 REV 的 IFA 检测

Fig 7 IFA detection of artificial – infected REV in live vaccine

4 讨论与结论

REV 感染可引起鸡群生产性能下降和免疫功能低下,一旦疫苗污染 REV,可对养殖业造成巨大经济损失^[1]。因此对禽用活疫苗进行 REV 污染检测是确保疫苗产品质量和严格控制 REV 的重要手段。《中国兽药典》2010 年版三部收录了外源性 REV 检验方法^[12],该方法的颁布实施对禽用生物制品的质量控制起到了至关重要的作用。2021 年,李雪莲随机抽取 4 种市售活疫苗,利用 RT-PCR 法、《中国兽药典》IFA 检测法和 SPF 鸡检查法检测活疫苗中的 REV 污染,比较三种检测方法的优劣。结果表明,RT-PCR 法方便、快捷,但会出现假阳性;SPF 鸡检查法结果可靠,但周期较长,成本高;IFA 检测法与传统鸡检查法相比具有快速、准确、成本低的优点,便于临床推广应用^[13]。《中国兽药典》2010 年版和 2015 年版中该方法采用 REV 多克隆抗体作为荧光染色的一抗,在实施过程中发现,受细胞状态、接种样品品种等因素的影响,偶尔会出现检测背景不清的现象。

gp90 蛋白是一种膜表面糖蛋白,在不同时期和地域的 REV 分离株基因组中其氨基酸同源性超过 95%^[14],保守性好,常被作为 REV 检测和禽病毒性淋巴瘤(MDV 和 ALV)鉴别诊断的一个重要靶标蛋白^[15-16]。因此本研究将 REV 囊膜蛋白 gp90(SU)作为免疫原制备了单克隆抗体。该单抗与不同 REV 毒株均具有良好的反应性,且与不同 ALV 毒株和常见禽源病毒均没有交叉反应,特异性良好。采用该单克隆抗体建立的 IFA 方法可检出至少 5 TCID₅₀的 REV 感染,与多克隆抗体作为检测一抗具有同等效力,且检测背景更加纯净清晰。该成果已被《中国兽药典》2020 年版三部收录^[17],用于禽用生物制品及原材料中外源性 REV 的检测,为有效控制我国禽用活疫苗质量、完善国家标准和动物疫病防控提供了技术支持。

致谢:感谢哈尔滨兽医研究所高玉龙研究员、扬州大学钱琨博士、山东农业大学赵鹏教授对本文给予的大力支持和帮助!

参考文献:

- [1] Saif Y M. 禽病学(第十二版) [M]. 北京:中国农业出版社, 2010: 663-688.
Saif Y M. Disease of poultry [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2010: 663-688.
- [2] Jackson C A, Dunn S E, Smith D I, *et al.* Proventriculitis, "nakanuke" and Reticuloendotheliosis in chickens following vaccination with herpesvirus of turkeys (HVT) [J]. Australian Veterinary Journal, 1977, 53 (9): 457-459.
- [3] Yuasa N, Yoshida I, Taniguchi T. Isolation of a Reticuloendotheliosis virus from chickens inoculated with Marek's disease vaccine [J]. National Institute of Animal Health Quarterly, 1976, 16 (4): 141-151.
- [4] 李俊平. 禽网状内皮组织增生症病毒与 A 亚群白血病病毒共感染的致病性分析 [D]. 中国农业大学, 2015.
Li J P. Analysis on pathogenicity of coinfection of avian Reticuloendotheliosis virus with leukosis virus subgroup A [D]. China Agricultural University, 2015.
- [5] 丁家波, 崔治中, 于立娟, 等. 含有禽网状内皮组织增生症病毒基因组片段的天然重组禽痘病毒的研究 [J]. 微生物学报, 2004, 44 (5): 588-591.
Ding J B, Cui Z Z, Yu L J, *et al.* Detection of Reticuloendotheliosis virus genomic sequence in the genome of field and vaccine strains of fowl poxvirus [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44 (5): 588-591.
- [6] Ke Y B, Yan P Z, Hui W Z, *et al.* Isolation and full-genome sequence of two Reticuloendotheliosis virus strains from mixed infections with Marek's disease virus in China [J]. Virus Genes, 2015, 50: 418-424.
- [7] Yan P Z, Zheng H Y, Xing G L, *et al.* A high frequency of Gallid herpesvirus-2 co-infection with Reticuloendotheliosis virus associated with high tumor rates in Chinese chicken farms [J]. Veterinary Microbiology, 2019, 237 (108418): 1-7.
- [8] 邓小云, 祁小乐, 高玉龙, 等. 禽网状内皮组织增生症病毒的分离鉴定及其体外复制研究 [J]. 中国动物传染病学报, 2020, 18 (1): 23-27.
Deng X Y, Qi X L, Gao Y L, *et al.* Identification and replication of Reticuloendotheliosis virus [J]. Chinese Journal of Animal Infection Diseases, 2020, 18 (1): 23-27.
- [9] Ji M, Yan P B, Jian Q Y, *et al.* Transcriptional profiling of host gene expression in chicken embryo fibroblasts infected with Reticuloendotheliosis virus strain HA1101 [J]. Plos One, 0126992 (4): 1-15.
- [10] Li Y P, Dong X, Yang C H, *et al.* Isolation, identification, and

- whole genome sequencing of Reticuloendotheliosis virus from a vaccine against Marek's disease [J]. *Poultry Science*, 2015, 94 (4): 643 – 649.
- [11] Su Q, Li Y, Li W H, *et al.* Molecular characteristics of avian leukosis viruses isolated from indigenous chicken breeds in China [J]. *Poultry Science*, 2018, 97 (8): 2917 – 2925.
- [12] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 [S]. 2010 年版. 北京: 中国农业出版社.
- Chinese veterinary Pharmacopoeia Commission. The Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China Volume III [S]. 2010 edition. Beijing: China Agricultural Press.
- [13] 李雪莲, 张雪乾, 单峰, 等. 禽活疫苗中网状内皮组织增生症病毒污染的检测方法比较 [J]. *家禽科学*, 2021, 3: 41 – 46.
- Li X L, Zhang X Q, Shan F, *et al.* Comparison of diagnostic methods of avian Reticuloendotheliosis virus contamination in poultry live vaccines [J]. *Poultry Science*, 2021, 3: 41 – 46.
- [14] Deng X Y, Qi X L, Gao Y L, *et al.* Molecular characteristics of gp90 gene of 14 Reticuloendotheliosis viruses isolated in China [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12 (12): 1954 – 1957.
- [15] 栾晓宁, 郭龙宗, 马广斌, 等. 基于 p30 – gp90 融合蛋白的禽网状内皮组织增生症病毒抗体间接 ELISA 方法的建立 [J]. *中国动物检疫*, 2021, 38 (10): 107 – 114.
- Luan X N, Guo L Z, Ma G B, *et al.* Development of an indirect ELISA for detection of antibodies against avian Reticuloendotheliosis virus based on a recombinant p30 – gp90 fusion protein [J]. *Animal Quarantine of China*, 2021, 38 (10): 107 – 114.
- [16] Fei Y, Ying C, Li H Q, *et al.* Immunoprotection induced by CpG – ODN/Poly(I:C) combined with recombinant gp90 protein in chickens against Reticuloendotheliosis virus infection [J]. *Antiviral Research*, 2017 (147): 1 – 10.
- [17] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 [S]. 2020 年版. 北京: 中国农业出版社.
- Chinese veterinary Pharmacopoeia Commission. The Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China Volume III [S]. 2020 edition. Beijing: China Agricultural Press.

(编辑:李文平)