

整合进禽反转录病毒基因组片段的鸡马立克氏病病毒重组野毒株的发现*

张 志 崔治中**

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要 用对禽网状内皮组织增生病毒(REV)的单抗从广东和广西分离到的二株马立克氏病病毒(MDV)野毒株做间接荧光抗体试验, 用 MDV 感染细胞的基因组 DNA 做斑点分子杂交及 PCR 显示, 这二株 MDV 基因组中已整合进 REV 的 LTR 序列. 根据 MDV 基因组上易插入 REV 的 LTR 的高频位点的序列合成 7 条引物, 根据 REV 的 LTR 合成 4 条引物, 由此交叉组成 28 对引物, 分别从这二个 MDV 野毒株扩增和克隆已整合进 MDV 的 REV-LTR 序列及其相连的 MDV 序列. 测序证明, 二株中的 REV-LTR 插入序列及在 MDV 基因组中短独特序列(US)上的插入位点完全相同. 表明这二个毒株很可能是一次重组事件在鸡群中形成的流行毒株.

关键词 禽网状内皮组织增生病毒 马立克氏病病毒 病毒重组

以禽网状内皮组织增生病毒(REV, 一种反转录病毒)为代表的禽反转录病毒和以马立克氏病病毒(MDV, 一种 α -疱疹病毒)为代表的疱疹病毒是引起禽类发生肿瘤的主要病原. 已发现, 当MDV在被REV污染的细胞培养上长期连续传代后, REV基因组的长末端重复区(LTR)序列可整合进MDV基因组的某些位点^[1,2]. Davidson等人^[3]采用Hot Spot-PCR的方法从发生肿瘤的病料中扩增出MDV的片段, 并从这些片段中又扩增出了REV的长末端重复序列(LTR). 虽然他们的结果业已表明, 在感染鸡体内MDV和REV也能发生基因组重组, 但迄今为止, 国内外一直

没有分离到整合有REV基因组片段的MDV野毒株. 近两年来, 我们发现鸡群肿瘤病料中MDV和REV的共感染现象非常普遍^[4], 这也促使我们进行MDV和REV间基因重组的研究. 本文报道了从肿瘤病鸡体内分离和鉴定出的已经整合REV基因组片段的MDV重组野毒株.

1 材料和方法

1.1 鸡胚成纤维细胞(CEF)

取孵化 9~11 日龄的 SPF 鸡胚(购自济南斯帕法斯

2003-12-23 收稿, 2004-06-07 收修改稿

* 国家自然科学基金重点资助项目(批准号: 30330450)

** E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

(SPF)种鸡公司), 按照常规制备, 待长成单层后接种病毒或病料。

1.2 参考株病毒和单克隆抗体

MDV参考毒株为MDV疫苗弱毒株CVI988和强毒株GA^[5], 已知REV毒株为本实验室保存的SD9901^[6]。在试验中使用的单克隆抗体有两类, 一类为抗MDV的抗体: H19和T65^[7]; 另一类为抗REV的抗体: 11B154和11B118^[8]。荧光抗体为FITC标记的绵羊抗鼠IgG (Sigma公司)。

1.3 野毒的分离和增殖

发生肿瘤的病鸡分别来自广东和广西的二个鸡场, 前者为30周龄的蛋用型鸡, 后者为40周龄的三黄种鸡, 均已用过CVI988/Rispens株MDV疫苗, 但仍有超过10%的肿瘤发生率。无菌操作采集病鸡的全血, 加入抗凝剂(3.8%柠檬酸钠)后摇匀, 将抗凝全血接种长成单层的鸡胚成纤维细胞(CEF), 置37°C和5%CO₂中培养8天, 如出现明显的MDV形成的病毒蚀斑, 则将细胞消化, 一部分细胞提取组织DNA, 另一部分接种到96孔细胞培养板培养, 准备进行荧光抗体试验。否则再将细胞连续传代3次, 在传代中如果出现病毒蚀斑, 则按照上述方法处理, 如传代3次均未出现病毒蚀斑, 则判定为阴性。

1.4 间接荧光抗体试验(IFA)

为了进一步验证分离的样品是MDV, 分别用MDV pp38的单克隆抗体H19和T65以及MDV I型gB特异性的单克隆抗体BA4进行IFA^[9]。为了确定同一细胞培养物中是否有REV共感染, 对接种MDV的细胞培养板再用抗REV的单克隆抗体11B118(1:500稀释)进行IFA, 同时用MDV参考毒株CVI988和GA^[5]以及REV毒株SD9901^[6]接种CEF作为阳性对照, 未接种的CEF作为阴性对照。

1.5 斑点分子杂交实验

分别取感染不同MDV野毒株的CEF提取的细胞DNA进行斑点杂交实验, 检测MDV的标记探针为含I型MDV特异性pp38基因片段克隆的#051质粒DNA, 用地高辛标记而成^[9]。REV的探针为携带REV

全基因组的cDNA克隆质粒PB101(由美国Case Western Reserve University医学院的Dr.Kung惠赠), 也用地高辛标记而成。地高辛标记的试剂盒购自Boeingman公司, 具体实验步骤参见厂家说明书。

1.6 REV毒株gag, pol, env基因和LTR的扩增以及LTR的序列分析

为了显示可能插入MDV基因组中的REV的不同基因片段, 根据已发表的SNV株REV的全基因组序列, 分别合成了扩增REV gag, pol和env基因特异性序列的相应引物(表1), 用分离到的MDV野毒株感染CEF提取的基因组DNA为模板, 分别进行PCR扩增^[10]。PCR的反应体系为: ddH₂O 16.5 μL, 10×PCR buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, MgCl₂ (15 mmol/L) 1.8 μL, P1(25 μmol/L) 1 μL, P2 (25 μmol/L) 1 μL, L-Taq酶 (5 U/μL) 0.2 μL, 基因组DNA (约100 ng/μL) 1 μL。PCR反应条件为: 95°C热变性4 min; 94°C, 1 min, 55°C退火60 s, 72°C延伸5 min, 30个循环; 72°C延伸10 min。同时用MDV毒株不含有REV插入片段的参考毒株CVI988和GA以及REV-SD9901株的基因组作为阴性和阳性对照, 并将扩增到的REV片段克隆进pGEM-T载体进行测序和序列分析。

1.7 REV和MDV间整合位点相关序列的扩增

根据已发表的文献^[1, 2, 11, 12], 尽管REV整合进MDV基因组的位点不固定, 但大部分的整合位点位于US区与TRs或IRs区的结合部, 即所谓的“热点整合”。因此我们推测, 如果REV在此区域内整合进MDV的基因组中, 只要选择合适的引物, 一条来自MDV基因组, 一条来自REV基因组中, 就可以扩增出整合进MDV基因组中的REV片段及其相连的MDV序列。为此, 分别根据已发表的MDV毒株MD5的基因组中US区与TRs或IRs区结合部的序列合成7条引物, 根据已知的SNV株REV基因组的LTR序列合成了4条引物(表1和2)。

在每次PCR中, 分别使用一条MDV引物和一条REV LTR引物配对, 从可能整合有REV基因组片段的MDV野毒株GD0202和GX0101感染的CEF提取的基因组DNA中扩增含有REV LTR的相关片段。同

表1 来自 REV 基因组用作扩增 REV-MDV 整合位点相关序列的引物

引物名称	序列	在REV基因组的位置 ^{a)}		扩增序列的大小 ^{b)}
		正向序列	反向重复序列	
REV-LTR P1	5'-CATACTGGAGCCAATGTT-3'	334-352		295 bp
REV-LTR P2	5'-AATGTTGTAGCGAAGTACT-3'	609-628		
REV-LTR P3	5'-TCGCCGTCCTACACATTGTTGTT-3'	451-473		
REV-LTR P4	5'-ATTGGAGAGTAGCATCTGC-3'	359-367		115 bp
REV-env P1	5'-AGCTAGGCTCGTATGAA-3'	6504-6520		
REV-env P2	5'-ATTGACCAGGTGGGTTGCA-3'	6920-6939		436 bp
REV-gag P1	5'-TAGCCTATTAGAATCCG-3'	1762-1778		
REV-gag P2	5'-ATGACTATGGCAGCCTG-3'	2161-2187		426 bp
REV-pol P1	5'-TACTCATGACTTTAGCG-3'	3621-3637		
REV-pol P2	5'-AGGGTCCAGCCTTTTGG-3'	4083-4099		479 bp

a) REV 基因组来自吉荣硕士学位论文(禽网状内皮组织增生症病毒分子生物学特性的研究. 扬州大学, 扬州, 2002); b) 该对引物在 REV 基因组中扩增片段的预期大小

表2 来自 MDV 基因组用作扩增 REV-MDV 整合位点相关序列的引物

引物名称	序列	在 MD5 株 MDV 基因组的位置	
		正向序列	反向重复序列
MDV-U5F1	5'-GCTGAACATCGAGAGTATTA-3'	151929~151948	166515~166496
MDV-U5IR1	5'-CCCAGCCCTAATGTACTAC-3'	153971~153990	无
MDV-TRsR1	5'-CTTCCGACGGGTGGCCTGAC-3'	152506~152525	165938~165919
MDV-U5F2	5'-GCTGATCTATATTGTGCTTTA-3'	163964~163991	无
MDV-eTRsF2	5'-GCGATTCCAACCGTT-3'	164944~164963	153495~153481
MDV-eTRsR2	5'-TTGCGACATATGCACTCCG-3'	153239~153259	165205~165186
MDV-RsR1	5'-GCGGTATGAGATGCACG-3'	165491~165507	152953~152937

时用只感染 MDV 毒株 GA 株、只感染 REV 毒株 SD9901 株以及感染 REV 毒株 SD9901 和 MDV 毒株 GA 的 CEF 提取的基因组 DNA 的混合组作为病毒感染对照, 用未感染病毒的 CEF 提取的基因组 DNA 作为阴性对照. 将扩增到的 PCR 产物克隆进 pGEM-T 载体(Promega 公司), 转化 TG1 大肠杆菌, 挑选白色菌落进行酶切鉴定. 将克隆中插入片段符合预定大小的阳性克隆送交上海生工公司进行测序, 测出的序列分别与 MDV 和 REV 基因组序列在 Internet 上进行 BLAST 比较, 并用 DNASTar 软件对测序结果及已发表的 MDV 和 REV 的序列进行比较.

2 结果

2.1 肿瘤病鸡血液中 MDV 的分离和鉴定

病鸡的抗凝全血接种 CEF 后 6~8 天便产生了典型的 MDV 的病毒蚀斑. 感染的细胞呈圆形, 折光性增强, 成葡萄状分布, 周围未形成病毒蚀斑的 CEF 形态良好, 未见细胞脱落、坏死等现象.

用 I 型 MDV 探针进行的斑点分子杂交试验中, 这 2 份样品均为阳性(表 3).

用 MDV 单抗进行的 IFA 中, 这 2 份样品均可以与 MDV 的 3 个特异性单克隆抗体呈现阳性反应(表 2). 荧光显微镜下可以清晰地看到在 MDV 形成的病毒蚀斑中, 感染的细胞浆被染成绿色, 细胞核没有被染色(图略). 表明从这 2 份样品中得到的蚀斑确实是 MDV 野毒株, 命名为 GX0101 和 GD0202.

2.2 MDV 分离毒株 GX0101 和 GD0202 中 REV 共感染状态的鉴定

(1) 斑点分子杂交试验: 在以 REV 全基因组 cDNA 克隆质粒标记的探针进行的斑点分子杂交试验中, 这 2 株 MDV 野毒株均呈现阳性反应. 表明在这 2 份 MDV 分离物中, 或者有 REV 的共感染, 或者在 MDV 基因组中插入了 REV 基因组成分.

(2) 荧光抗体试验: 在用 REV 的两个特异性的单克隆抗体对分离到的这 2 株 MDV 感染的 CEF 进行的 IFA 中, 结果均为阴性, 而已知 REV 毒株 SD9901 接种的 CEF 与这两种单抗呈现阳性反应. 说明这 2 株 MDV 中不存在 REV 的共感染, 只是在 MDV 基因组中存在 REV 的基因组序列.

表 3 我国 MDV 野毒株 GD0202 和 GX0101 中 REV 共感染或基因重组的检测结果

编号	IFA 检测结果					斑点分子杂交试验		REV 的 PCR 扩增			
	MDV 单克隆抗体		REV 单克隆抗体			REV	MDV	gag	pol	env	LTR
	H19	T65	BA4	11B154	11B118						
MDV 野毒株 GD0202	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
MDV 野毒株 GX0101	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
MDV 参考毒株 GA	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MDV 参考毒株 CV1988	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
REV 参考毒株 SD9901	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
未感染 CEF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(3) REV 毒株 *gag*, *pol*, *env* 和 LTR 的扩增以及 LTR 的序列分析: 以这 2 株 MDV 感染的 CEF 为模板, 分别扩增 REV 毒株的 *gag*, *pol*, *env* 和 LTR, 结果为只能扩增出 REV 的 LTR 特异性的片段, 而不能扩增出 REV 毒株的 *gag*, *pol* 和 *env* 的特异性片段(图略).

(4) 游离病毒的感染试验: 为了验证在分离到的 MDV 野毒株中确实不含有游离的 REV, 将收获的这 2 株 MDV 野毒株感染 CEF 的上清液离心和过滤, 再接种 CEF, 并分别进行上述试验, 结果斑点分子杂交试验、荧光抗体试验以及 REV 相关基因的扩增均为阴性.

上述结果都表明, 在分离到的 2 株 MDV 野毒株中, 不存在游离的 REV 感染, 但在基因组中已经整合了 REV 基因组的 LTR 序列(表 3).

2.3 REV-MDV 整合片段的 PCR 扩增

为了确定在重组野毒株中 MDV 与 REV 自然重组时的整合位置及整合进的序列片段, 分别用数条 MDV 引物和 REV 引物交叉配对进行 PCR, 即分别用合成的一条 MDV 引物和一条 REV 引物相互配对, 详见表 1 和 2. 以没有共感染但已证明含有 REV 的 LTR 序列的两个野毒株 GX0101 和 GD0202 感染的 CEF 的基因组 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增. 在所用的 28 对不同组合引物的 PCR 中, 只有 5 个组合的引物可从这 2 个野毒株得到 PCR 产物, 即引物 MDV UsIR1-REV LTR P1, MDV UsF1-REV LTR P4, MDV TRsR1-REV LTR P4, MDV eTRsF2-REV LTR P1 和 MDV UsF2-REV LTR P3 等相互配对时可以分别扩增出一条约 1.0, 1.5, 0.6, 0.6 和 0.3 kb 的特异性条带; 而其他引物的配对均没有扩增出特异性的条带. 同时用只感染 MDV 毒株 GA 株、只感染 REV 毒株 SD9901

株、感染 REV 毒株 SD9901 株和 MDV 毒株 GA 株的 CEF 的混合组以及未感染病毒的 CEF 提取的基因组为模板均没有扩增出特异性的条带, 详见表 4 和图 1.

表 4 MDV 引物与 REV 引物配对进行扩增的 PCR 结果^{a)}

引物	REV LTR P1	REV LTR P2	REV LTR P3	REV LTR P4
MDV-UsF1	- ^{b)}	-	-	1.5 kb
MDV-UsIR1	1.0 kb ^{c)}	-	-	-
MDV-TRsR1	-	-	-	0.6 kb
MDV-UsF2	-	-	0.3 kb	-
MDV-eTRsF2	0.6 kb	-	-	-
MDV-eTRsR2	-	-	-	-
MDV-RsR1	-	-	-	-

a) 本表中的模板为 MDV 野毒株 GD0202 和 GX0101 感染 CEF 提取的 DNA; b) PCR 阴性(每对引物至少扩增 3 次); c) PCR 扩增产物的大小

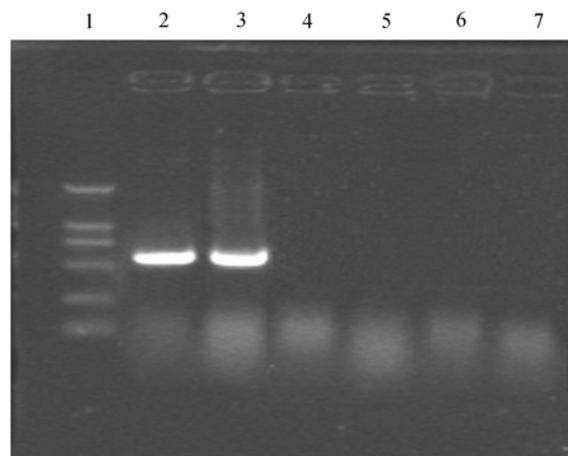


图 1 MDV 引物 eTRsF2 与 REV 引物 LTR P1 扩增 MDV 重组毒株 GX0101 和 GD0202 的 PCR 结果

1 示 DL2000 marker; 2 示重组毒株 GX0101 株感染的 CEF; 3 示重组毒株 GD0202 株感染的 CEF; 4 示未感染的 CEF; 5 示 MDV 毒株 GA 株感染的 CEF; 6 示 REV 毒株 SD9901 株感染的 CEF; 7 示 MDV 毒株 GA 株感染的 CEF 和 REV 毒株 SD9901 株感染的 CEF 的混合组

2.4 REV-MDV 整合位置相关片段的克隆和序列分析

分别将 GX0101 和 GD0202 株用引物 eTRsF2 和 REV LTR P1 扩增的约 0.6 kb 片段克隆进 pGEM-T 载体, 然后对此片段进行测序和序列分析, 从这两个重组 MDV 野毒株中扩增的特异性片段序列完全一致.

将序列传至网上进行 BLAST 序列分析, 可以很清晰地看出扩增和克隆的序列由两部分组成, 前一部分约 281 个碱基, 与网上的 REV 的序列高度同源, 后一部分为 321 个碱基, 又与已发表的 MDV 基因组的序列高度同源, 结果见图 2.

用 DNASTar 软件对这些序列进行分析, 并分别

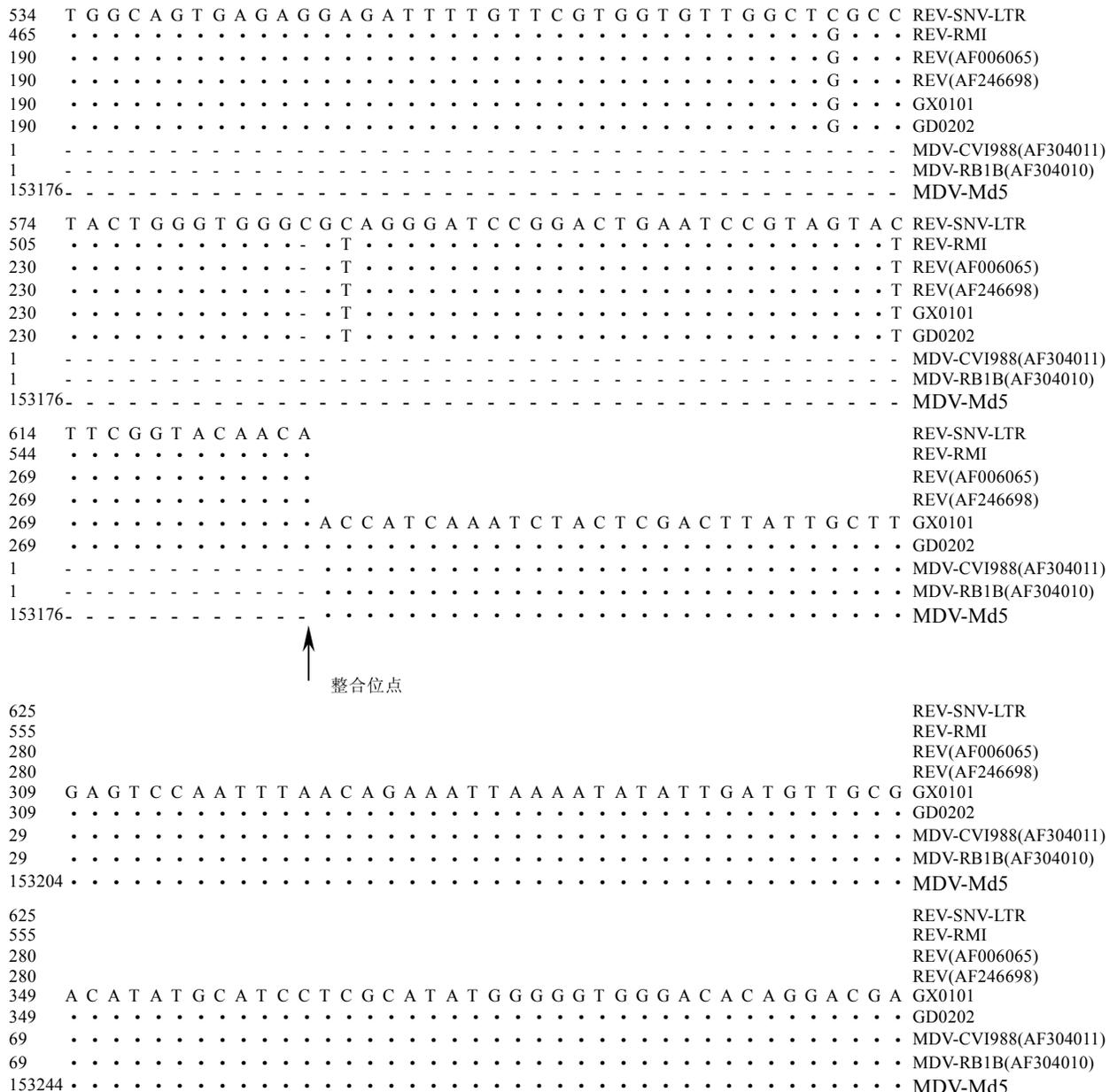


图 2 MDV 天然重组毒株 GX0101 和 GD0202 中 REV-MDV 整合序列的比较分析

与已发表的数株 REV^[6](SD9901, HA9901 和 SNV) 的 LTR 和已发表的 CVI988 (AF304010), RB1B (AF304011) 和 MDV 毒株 MD5 的序列进行了比较分析. 结果表明, 两个重组野毒株 GX0101 毒株和 GD0202 毒株该段序列的前 281 个碱基完全一致, 且与几个 REV 毒株的 LTR 序列的同源性均高达 96% 以上. 而来自两个野毒株扩增序列的第 282 个碱基至第 602 个碱基也完全一致, 且与 MD5 株 MDV 基因组第 153176~153496 之间的碱基也完全一致. 表明两株 MDV 重组野毒株均在 US 的左侧, 即相当于 MD5 株 MDV 基因组的第 153175 碱基的 5' 端插入了完全相同的 REV 的 LTR 序列(图 3).

3 讨论

在动物体内, 不同病毒间的基因重组一直是人们关心的生物现象, 因为这可能加快病毒毒力的遗传变异. Isfort 等人^[1]和 Jones 等人^[2]报道, 在被不产生细胞病变的 REV 污染的 CEF 上对 MDV 长期连续性传代的过程中, 发生了两种病毒间基因组的重组, 即 REV 的 LTR 序列整合进了 MDV 的基因组, 这是基因组为单股 RNA 的反转录病毒 (REV) 与基因组为 180 kb 双股 DNA 的疱疹病毒 (MDV) 在感染同一细胞时发生基因重组的首次报道. 为此, 人们自然关心, 在自然界如果 MDV 与 REV 感染同一只鸡时, 是否也会发生类似的现象, 并导致 MDV 致病性的变化. 不久前, Davidson 等人^[3]对肿瘤病鸡的样品 DNA 作 HS-PCR 也证明了, MDV 和 REV 间的基因重组确实可以发生在鸡体内, 然而, 他们并未能分离到这种天然的重组野毒株. 近两年, 我们的研究发现, 在用抗 MDV 的疫苗免疫后仍有很高肿瘤发病率的鸡群中, 不仅

能分离到 MDV, 而且大多数病例是 MDV 和 REV 的共感染, 即在肿瘤病鸡同时存在着这两种病毒的病毒血症^[13]. 这一现象鼓励了我们从这些鸡体内去进一步分离和鉴定整合有 REV 基因组序列的 MDV 天然重组野毒株. 虽然共感染是 MDV 和 REV 发生重组的条件, 但在具体样品中, 如果仍存在 REV 共感染, 又会干扰对重组 MDV 野毒株的鉴定. 幸运的是, 在分离到的 12 株 MDV 野毒株中, 只有 3 株在细胞培养上显示 REV 共感染^[4]. 没有 REV 感染的 9 个 MDV 野毒株中, 另有 4 个在斑点分子杂交试验和 PCR 中显示已整合进 REV 的 LTR^[4], 本文重点对其中两株野毒株 GX0101 和 GD0202 进行了较详细的研究.

我们分离的这两株 MDV 重组毒株, 一株 (GX0101) 是 2001 年从广西某蛋鸡场分离到的, 另一株 (GD0202) 于 2002 年分离自广东某肉用型三黄鸡种鸡场. 两个鸡场之间没有任何联系, 但分离的这两个 MDV 野毒株基因组中整合进的 REV 基因组的核酸序列完全相同, 在 MDV 基因组上的整合位点又完全一致. 显然, 这两个重组野毒株很可能是来自同一个原始重组病毒, 即由该原始重组病毒在鸡群中形成的流行毒株. 由于不同种病毒间基因重组频率非常低, 重组病毒能成为具有一定优势的流行毒株, 表明其一定有某种竞争优势. 目前, 有关这两株病毒的致病性研究正在进行中.

MDV 基因组中 REV 基因组成分整合的位点变异较大. 最初, Kost 等人^[14]和 Isfort 等人^[15]报道 MDV

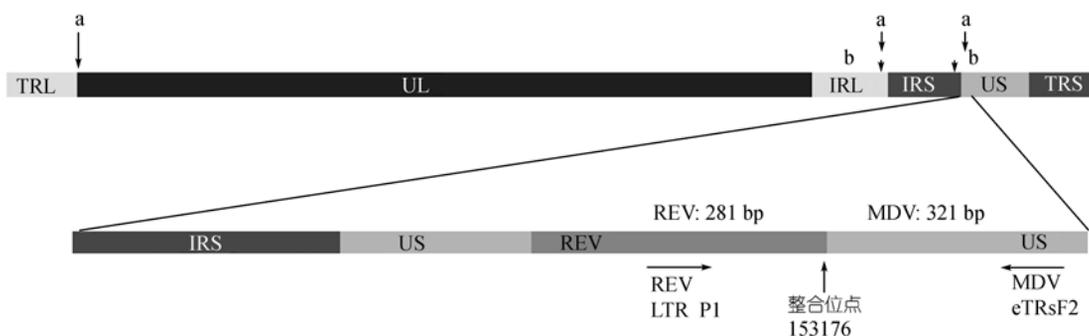


图 3 MDV 毒株 GD0202 和 GX0101 基因组中 REV 部分序列的整合位点示意图

a 示体外共培养时 REV 整合进 MDV 基因组中的高频位点区域^[2]; b 示体外共培养时 REV 整合进 MDV 基因组中的具体位点^[14]

的高代次细胞培养物中污染REV而导致REV基因组成分整合进MDV基因组时, REV序列的整合位点位于MDV基因组的US区右侧与TRS区的接合部, 相当于MDV毒株MD5的第164021碱基处。随后, Jones等人^[2]人工共感染REV和MDV时发现REV在MDV基因组上的整合位点不确定, 但主要集中在RS/US区, 而且整合的序列主要为REV基因组的单个LTR片段。例如, 一个含有REV基因组成分的MDV重组病毒(RMi)的整合位点在MDV基因组IRS/US结合部前370 bp处, 相当于MD5株基因组的第152745碱基处。而在我们分离和鉴定的MDV天然重组野毒株中, REV基因组成分整合的位点在MDV基因组的US区的左侧, 相当于MD5株MDV基因组的第153176碱基处。尽管体外共感染获得的重组病毒和在鸡体内分离到的天然重组病毒之间插入位点不同, 但整合的REV基因组序列却非常类似, 均为REV的LTR序列, 二者之间的同源性高达99%以上, 两者的差异显然与发生重组时参与的REV的LTR不同有关。在MDV基因组的整合位点处, MDV天然重组病毒和体外共感染的重组病毒插入的REV的LTR的3'端序列均为TCCGTTAGTATTTCCGTACAACA。Jones等人^[2]曾推测这种整合位点的非随机性分布取决于病毒体外培养时的选择压。Davidson等人^[3]虽然没有分离到重组野毒株, 但他们对肿瘤病的MDV整合情况研究后认为, REV的整合位点主要位于MDV基因组的US/RS接合部和UL/RL的接合部。

本研究所用的28对引物进行的PCR扩增中, 有5对引物可以扩增出大小不等的特异性片段。由于引物REV LTR P1和MDV eTRsF2最先扩增出0.6 kb的特异性片段, 因此选择该片段进行克隆和测序。测序结果表明该片段为REV LTR序列与MDV基因组重组的产物, 其余的片段是否为重组序列还有待进一步研究。但显然, 在同一个MDV基因组上, 可能同时存在大小不同的插入片段。

MDV的US/RS区是病毒增殖的非必需区, 不同毒株之间差异也较大, 如GA株US右侧缺失48 bp, MD5毒株US左侧比CU2毒株多700 bp, 所以此区域可以承受外源基因的插入, 但是外源基因的插入对

MDV本身的特性有何影响尚不清楚^[16]。据报道, REV的LTR序列在体外试验中对鸡胚成纤维细胞和许多组织具有较强的启动子活性, 它可以调节致癌基因c-myc的表达^[17]。最近的一项研究表明, REV LTR的启动子在鸡T细胞中尤其是MDV诱导转化的淋巴细胞系中的活性普遍增高^[18]。而本试验中, REV LTR整合进MDV后, 在这两株MDV毒株中插入的位点都恰好位于SORF1之后, SORF2之前, 因此, SORF2^[19]是REV LTR启动激活影响最大的基因。有关REV LTR在插入MDV基因组上该位点后对病毒的生物学特性的影响正在研究中。

参 考 文 献

- 1 Isfort R, Jones D, Kost R, et al. Retrovirus insertion into herpesvirus *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 991~995
- 2 Jones D, Isfort R, Witter R, et al. Retroviral insertions into a herpesvirus are clustered at the junctions of the short repeat and short unique sequences. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 3855~3859
- 3 Davidson I, Borenshtain R. *In vivo* events of retroiral long terminal repeat integration into Marek's disease virus in commercial poultry: detection of chimeric molecules as a marker. Avian Disease, 2001, 45(1): 102~121
- 4 张 志, 崔治中, 姜世金, 等. 鸡肿瘤病料中马立克氏病病毒和禽网状内皮增生病毒混合感染的研究. 中国预防兽医学报, 2003, 4: 274~278
- 5 Eidson C S, Schmittle S C. Studies on acute Marek's disease virus I Characteristics of isolates GA in chickens. Avian Diseases, 1968, 12: 467~476
- 6 赵文明, 丁家波, 崔治中. 网状内皮组织增殖病病毒(REV)不同分离株LTR基因的序列分析. 上海交通大学学报(农业科学版), 2001, 1(3): 18~21
- 7 Lee L F, Liu X, Witter R L. Monoclonal antibodies with specificity for three different serotypes of Marek's disease viruses in chickens. J Immunol, 1983, 130: 1003~1006
- 8 CUI Z, Lee L F, Silva R F, et al. Monoclonal anti-bodies against avian reticuloendotheliosis virus: identification of strain-specific and strain-common epitopes. J Immunol, 1986, 136: 4237~4241
- 9 崔治中, L F Lee. 用非放射性的Digoxigenin标记的DNA探针检出马立克氏病病毒DNA. 江苏农学院学报, 1991, 12(1): 1~6
- 10 Aly M M, Smith E J, Fadly A M. Detection of reticuloendotheliosis virus infection using the polymerase chain reaction. Avian Pa-

- thology, 1993, 22: 543~554
- 11 Endoh D, Ito M, Cho K O, et al. Retroviral sequence located in border region of short unique region and short terminal repeat of Md5 strain of Marek's disease virus type 1. *J Vet Med Sci*, 1998, 60: 227~235[DOI]
 - 12 Tulman E R, Afonso C L, Lu Z, et al. The genome of a very virulent Marek's disease virus. *J Virol*, 2000, 74: 7980~7988[DOI]
 - 13 金文杰, 崔治中, 刘岳龙, 等. 传染性法氏囊病病料中 MDV、CAV、REV 的共感染检测. *中国兽医学报*, 2001, 1: 6~9
 - 14 Kost R, Jones D, Isfort R, et al. Retrovirus insertion into herpesvirus: characterization of a Marek's disease virus harboring a solo LTR. *Virology*, 1993, 192: 161~169[DOI]
 - 15 Isfort R J, Qian Z, Jones D, et al. Integration of multiple chicken retroviruses into multiple chicken herpesviruses: herpesviral gD as a common target of integration. *Virology*, 1994, 203: 125~133[DOI]
 - 16 Witter R L, Li D, Jones D, et al. Retroviral insertional mutagenesis of a herpesvirus: a Marek's disease virus mutant attenuated for oncogenicity but for immunosuppression or *in vivo* replication. *Avian Disease*, 1997, 41: 407~421
 - 17 Jones D, Brunovskis P, Witter R, et al. Retroviral insertional activation in a herpesvirus: Transcriptional activation of US genes by an integrated long terminal repeat in a Marek's disease virus clone. *J Virol*, 1996, 70: 2460~2467
 - 18 Reicin A A. Reticuloendotheliosis virus long terminal repeat elements are efficient promoters in cells of various species and tissue origin, including human lymphoid cells. *Gene*, 1992, 121: 213~218[DOI]
 - 19 Hsiao-Ching L, Hsing-Jien K, Janet E F, et al. Growth hormone interacts with the Marek's disease virus SORF2 protein and is associated with disease resistance in chicken. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 9203~9208[DOI]