

禽网状内皮组织增殖病病毒 gp90 蛋白单克隆抗体的制备及其识别区分析

孙明铭, 李晓齐, 曹红, 王永强, 郑世军

中国农业大学动物医学院 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

孙明铭, 李晓齐, 曹红, 等. 禽网状内皮组织增殖病病毒 gp90 蛋白单克隆抗体的制备及其识别区分析. 生物工程学报, 2015, 31(1): 75–85.

Sun MM, Li XQ, Cao H, et al. Development of monoclonal antibodies against the gp90 protein of reticuloendotheliosis virus and mapping of their recognition regions. Chin J Biotech, 2015, 31(1): 75–85.

摘要: 为了制备禽网状内皮组织增殖病病毒 (REV) gp90 蛋白的单克隆抗体, 应用 His-gp90 融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 取免疫鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞 (SP2/0) 进行融合, 经过筛选、3 次亚克隆后获得 3 株稳定分泌抗 REV-gp90 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株, 分别命名为 3G5-B8、3G5-A10 和 1G12。经间接 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 方法检测, 单克隆抗体的亲和力解离常数 (K_d) 分别为 6.483×10^{-10} 、 4.844×10^{-10} 和 9.330×10^{-10} , 3 株单抗的亚型分别为 IgG1、IgG1 和 IgG2b。经 Western blotting 和间接免疫荧光实验检测, 3 株单抗均能识别 REV 感染 DF-1 细胞后产生的 gp90 蛋白。以 Western blotting 方法利用单抗检测不同截短的 gp90 蛋白, 初步确定 3G5-B8 和 3G5-A10 2 株单抗抗原识别区均位于 gp90 蛋白第 200–245 位氨基酸, 而 1G12 株单抗识别区包含第 230–235 位氨基酸。这些单抗为 REV 的诊断和致病机理研究奠定了基础。

关键词: 禽网状内皮组织增殖病病毒, gp90 蛋白, 单克隆抗体, 亲和力, 抗原表位

Received: April 14, 2014; **Accepted:** July 25, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31272543), Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (No. NYCYT-X-41).

Corresponding author: Shijun J. Zheng. Tel/Fax: +86-10-62734861; E-mail: sjzheng@cau.edu.cn

Yongqiang Wang. Tel/Fax: +86-10-62734483; E-mail: vetwyq@cau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31272543), 现代农业产业技术体系建设专项资金 (No. NYCYT-X-41) 资助。

网络出版时间: 2014-11-24

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140225.html>

Development of monoclonal antibodies against the gp90 protein of reticuloendotheliosis virus and mapping of their recognition regions

Mingming Sun, Xiaoqi Li, Hong Cao, Yongqiang Wang, and Shijun J. Zheng

State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: In order to develop monoclonal antibodies (McAbs) against the gp90 protein of reticuloendotheliosis virus (REV), the His-tagged gp90 protein of REV was used to immunize BALB/c mice. Hybridomas were generated by fusing mouse myeloma cells SP2/0 with the splenocytes from the immunized mice. After screening and 3 rounds of cloning process, 3 hybridomas (3G5-B8, 3G5-A10 and 1G12) that stably secreted McAbs against the REV-gp90 were obtained. The isotypes of the McAbs were determined to be IgG1, IgG1 and IgG2b. The McAbs specifically bound to gp90 in REV-infected DF-1 cells, as demonstrated by Western blotting and indirect immunofluorescence assay. The recognition regions on gp90 that were recognized by 3G5-B8/3G5-A10 and 1G12 were located between amino acids 200 to 245 and 230 to 235, respectively, as demonstrated by Western blotting analysis. These McAbs will be useful in the diagnosis and pathogenesis study of REV.

Keywords: reticuloendotheliosis virus, gp90 protein, monoclonal antibody, affinity, antigen epitope

禽网状内皮组织增殖病 (Reticuloendotheliosis, RE) 是由禽网状内皮组织增殖病病毒 (Reticuloendotheliosis virus, REV) 群引起的家禽免疫抑制性疾病, 该病以禽的胸腺、法氏囊等免疫器官萎缩、肝脾坏死等为特征。REV 包括缺陷型 REV-T 株、非缺陷型 REV-A 株、脾坏死病毒 (SNV) 和鸭传染性贫血病毒 (DIAV) 以及鸡合胞体病毒 (CSV)^[1-4]。各国分离到的毒株的抗原性虽然不完全相同, 但具有亲密的种系进化关系^[5], 且都能引起感染禽的免疫抑制。REV 感染后, 病禽细胞免疫和体液免疫受到明显抑制, 干扰疫苗的免疫效果, 增加对其他病原的易感性, 从而造成严重的经济损失^[6]。

REV 属于反转录病毒科禽类 C 型反转录病毒, 其核酸是单股正链线性 RNA 的二聚体^[7]。REV 基因组结构大多为 5'-LTR-gag-pol-env-LTR-3', gag 基因编码 p12、pp18、pp20、p30、

p10 五种结构蛋白^[8], pol 基因编码反转录酶。囊膜基因 env 编码 gp90 和 gp20 两个糖蛋白, 它们是由 env 编码的前体蛋白水解后产生的, 较小的 gp20 贯穿于病毒的囊膜, 称为跨膜蛋白 (TM), 较大的 gp90 暴露于病毒囊膜的表面, 称为表面蛋白 (SU)^[9]。其中, gp90 蛋白作为病毒的外膜糖蛋白, 其 C 末端暴露于感染细胞的表面, 具有多个糖基化位点, 含有顺式、构象表位, 易产生中和抗体, 被认为是病毒的免疫原性蛋白^[10-12]。相关研究表明, gp90 蛋白可能与 REV 的毒力、变异性、致病性等有关^[13]。目前, 国内尚未开发出检测 REV 的商品化试剂盒, 使用进口试剂盒大大增加了养殖场的生产成本, 为解决此问题, 本研究成功制备了针对 gp90 蛋白的单克隆抗体并对抗体的识别区进行了实验分析, 为 REV 临床诊断试剂盒的研制及 REV 致病机理的深入研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、毒株、细胞及实验动物

REV SNV 株由中国农业大学动物医学院陈福勇教授惠赠；pET-28a-gp90 和 pGEX-6P-1-gp90 表达工程菌株由本实验室保存；鸡传染性贫血病毒 (CAV)、禽白血病病毒 (ALV)、传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 和禽呼肠孤病毒 (ARV) 分别感染细胞后收取的细胞裂解物由本实验室制备并保存；表达 IBDV VP4、ALV gp85、CAV VP2 蛋白的 BL21 工程菌株由本实验室制备保存；骨髓瘤细胞系 SP2/0、DF-1 细胞、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 菌种、质粒 pET-28a 由本实验室保存，6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自中国医学科学院实验动物研究所。

1.2 主要仪器和试剂

压力搅拌式浓缩杯购自默克化工技术 (上海) 有限公司；DMEM 购自 Gibco 公司；胎牛血清购自 Hyclone 公司；HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、马抗山羊 IgG、FITC 标记兔抗小鼠 IgG 均购自北京鼎国昌盛生物技术公司；HAT、HT 选择培养基、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、IgG 抗体亚类检测试剂盒均购自 Sigma 公司；离心机购自 Sigma 公司；96 孔板酶标仪购自 TECAN 公司。

1.3 蛋白表达与纯化

在 5 mL LB 选择培养基中复苏含质粒 pET-28a-gp90、pGEX-6P-1-gp90 的 BL21 菌株，37 °C 振摇过夜后，转接入 200 mL LB 选择培养基，37 °C 振摇培养至 $OD_{600} = 0.4-0.6$ ，加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，18 °C 诱导表达 16 h，离心收集菌体。菌体经超声波裂解后，4 °C，12 000 r/min 离心 30 min，收取沉淀。

提取的包涵体按照文献[14]所述方法进行

稀释复性，获得重组蛋白。

1.4 抗 gp90 蛋白单克隆抗体的制备

小鼠免疫：以 PBS 稀释 His-gp90 蛋白，按 50 μ g/只的抗原量进行免疫。首免抗原与等体积弗氏完全佐剂乳化后进行多点皮内注射；二免、三免抗原与弗氏不完全佐剂乳化后进行多点皮下注射。首免、二免间隔 3 周，二免、三免间隔 3 周。三免 3 周后断尾采血分离血清，应用文献[15]所介绍的间接 ELISA 方法测定血清效价，阴阳性临界值 阴性样本 OD_{450} 平均值+3 标准差 (3SD)。当效价大于 1 10 000 时，小鼠达到融合制备单克隆抗体的标准。细胞融合前 3 天，小鼠腹腔注射抗原 (50 μ g/只) 作为加强免疫，加强免疫后第 3 天取脾脏，分离脾细胞并与骨髓瘤细胞融合。

细胞融合、阳性杂交瘤细胞的筛选参照文献^[16]的方法：用 GST-gp90 蛋白包被的酶标反应板进行间接 ELISA，以免疫鼠血清为阳性对照，未免疫鼠血清以及 SP2/0 细胞培养液为阴性对照，间隔 2 d 后进行第 2 次筛选。选取 2 次筛选阳性值较高的孔按照有限稀释法进行亚克隆，用含未免疫 BALB/c 小鼠胸腺细胞培养液的 20% DMEM 进行培养。连续亚克隆 3 次，选择能稳定分泌单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞作为建株细胞。

腹水的制备和纯化采用常规方法，按照文献[16]和[17]所述方法进行。挑选经产 BALB/c 小鼠，腹腔注射灭菌液体石蜡 1 mL/只，7 d 后腹腔注射杂交瘤细胞 2.5×10^6 个/只，采集的腹水经离心后收集上清。按照饱和硫酸铵沉淀法进行纯化，透析除盐，分装保存于 -80 °C。

1.5 抗 gp90 蛋白单克隆抗体的鉴定

1.5.1 单克隆抗体亲和力的测定及亚类鉴定

按照间接 ELISA 方法测定单克隆抗体的亲

和力^[18]:用 100 ng/孔复性的 GST-gp90 蛋白包被酶标板,封闭好后加入倍比稀释的单抗,初始浓度为 5 μg/mL,之后按常规方法操作,显色终止后,测定 OD_{450} 值。以 OD_{450} 吸光值为纵坐标,抗体浓度为横坐标作散点图,进行抗原-抗体结合饱和度分析,计算抗原抗体结合率为 50%时抗体摩尔浓度,将此数值进行换算即可得到抗体的亲和力解离常数 (K_d)。

用抗体亚类检测试剂盒,按照说明书进行单克隆抗体亚类的鉴定。

1.5.2 单克隆抗体的特异性鉴定

取 1 mL 表达 REV gp90、IBDV VP4、ALV gp85、CAV VP2 蛋白的菌液,12 000 r/min 离心 30 s,用 100 μL PBS 重悬菌体,之后将 4 种蛋白的大肠杆菌全菌裂解液进行电泳 (SDS-PAGE),再用制备的单抗进行 Western blotting 检测。

同时,用 Western blotting 技术检测实验室

保存的 CAV、ALV、IBDV 和 ARV 感染细胞后收取的细胞裂解物及 REV 感染 DF-1 细胞后的细胞裂解物,用纯化的单抗检测。

1.5.3 间接免疫荧光实验 (IFA) 鉴定单抗

将 DF-1 细胞接种于 48 孔板, 4×10^4 个细胞/孔,待细胞密度达到 30%时,将 REV 接种细胞,并设置相应的阴性对照。培养 7 d 后,用 4% 多聚甲醛固定和 0.2% Triton X-100 透化处理,用 1% BSA 封闭后加入制备的单抗作为一抗,以 FITC 标记的抗鼠 IgG 抗体为二抗,经反应、洗涤、加盖片后,置于荧光显微镜下进行检测。

1.5.4 单克隆抗体抗原识别区的确定

根据 REV-gp90 基因序列 (GenBank Accession No. DQ003591.1),利用分子生物学技术将 gp90 从 N 端和 C 端分别进行截短,第 1 次截短以 100 个氨基酸残基为单位,第 2 次截短以 10 个氨基酸残基为单位,根据 pET-28a 质粒的多克隆位点设计引物 (表 1),上游引物设

表 1 gp90 截短体 PCR 引物

Table 1 PCR primers of truncated gp90 sequences

Primer name		Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
Δ1:1-100aa	Forward	CCGGAATTCATGGACTGTCTCACCAACCT	300
Δ1:1-100aa	Reverse	CCGCTCGAGTCTTAGGTTAAACACACAT	
Δ2:1-200aa	Reverse	CCGCTCGAGTACGCACAGACTCTTCCCGA	600
Δ3:145-344aa	Forward	CCGGAATTCATCCTACAGAAAACAAAGC	600
Δ3:145-344aa	Reverse	CCGCTCGAGTACCTGGTGGAGGACATAGC	
Δ4:245-344aa	Forward	CCGGAATTCATGCCACTAATCCCAAGCT	300
Δ5:200-344aa	Forward	CCGGAATTCGGTGAAAGACTAGAGGAAAT	435
Δ6:215-344aa	Forward	CCGGAATTCAGTATCACCCCTTAGCCCTG	390
Δ7:225-344aa	Forward	CCGGAATTCAGAGGAGTAGATCTGGATCCC	360
Δ8:235-344aa	Forward	CCGGAATTCGACATACTGGAAGCTACTCAC	330
Δ9:1-210aa	Reverse	CCGCTCGAGTGTGTGCTGATGATTTCCCTC	630
Δ10:1-220aa	Reverse	CCGCTCGAGTGGCTAAAGGGTGATACTGTA	660
Δ11:1-230aa	Reverse	CCGCTCGAGTATCCAGATCTACTCCTCTTG	690
Δ12:1-245aa	Reverse	CCGCTCGAGTATTAAGGACCTGGTGAGTAG	735

计添加 *EcoR* I 位点,下游引物设计添加 *Xho* I 位点,其中截短体 $\Delta 1$ 、 $\Delta 2$ 、 $\Delta 9$ 、 $\Delta 10$ 、 $\Delta 11$ 、 $\Delta 12$ 共用上游引物,截短体 $\Delta 3$ 、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 7$ 、 $\Delta 8$ 共用下游引物。以实验室保存的 pET-28a-gp90 为模板构建不同截短的 gp90 原核表达载体,诱导表达出 gp90 不同截短的重组蛋白,用 Western blotting 方法检测单抗与不同 His-gp90 截短体融合蛋白的反应情况,推测单抗可能识别的区域。所有引物由上海生工生物技术公司合成。

2 结果与分析

2.1 融合蛋白 His-gp90 以及 GST-gp90 的复性

将实验室保存的含 *gp90* 基因的表达载体在大肠杆菌原核表达系统中表达,超声波裂解后只在沉淀中含有目的蛋白,通过稀释复性的方法分别在分子量大小约 40 kDa (图 1A) 和 64 kDa (图 1B) 处获得 His-gp90、GST-gp90 可溶性重组蛋白。

2.2 抗 gp90 蛋白单克隆抗体的制备及特异性鉴定

小鼠经过 3 次免疫后,以间接 ELISA 方法

测定血清效价,测定结果均大于 $1 \times 10\ 000$ 。取小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合,按间接 ELISA 方法进行筛选。经过 3 次亚克隆后,得到 3 株能够稳定分泌抗 gp90 蛋白单抗的杂交瘤细胞株,分别命名为 3G5-B8、3G5-A10 以及 1G12。将杂交瘤细胞腹腔注射小鼠获得腹水并纯化,获得高纯度抗体 (图 2A)。

用 Western blotting 方法检测原核表达蛋白鸡传染性贫血病毒 (CAV) His-VP2 (34 kDa)、禽白血病病毒 (ALV) His-gp85 (34 kDa)、传染性法氏囊病病毒 (IBDV) His-VP4 (33 kDa)、禽网状内皮组织增殖病病毒 (REV) His-gp90 (40 kDa)。结果表明 (图 2B), 3 株单抗均能识别原核表达的 gp90 蛋白,而不识别其他病毒的原核表达蛋白。同时,用 Western blotting 方法检测 CAV、ALV、IBDV、ARV 以及 REV 感染细胞后收取的细胞裂解物 (图 2C),表明 3 株单抗只能识别 REV 感染细胞后产生的 gp90 蛋白,而不识别对照组其他全病毒蛋白。因此,所获单抗均为针对 REV-gp90 蛋白的特异性抗体。

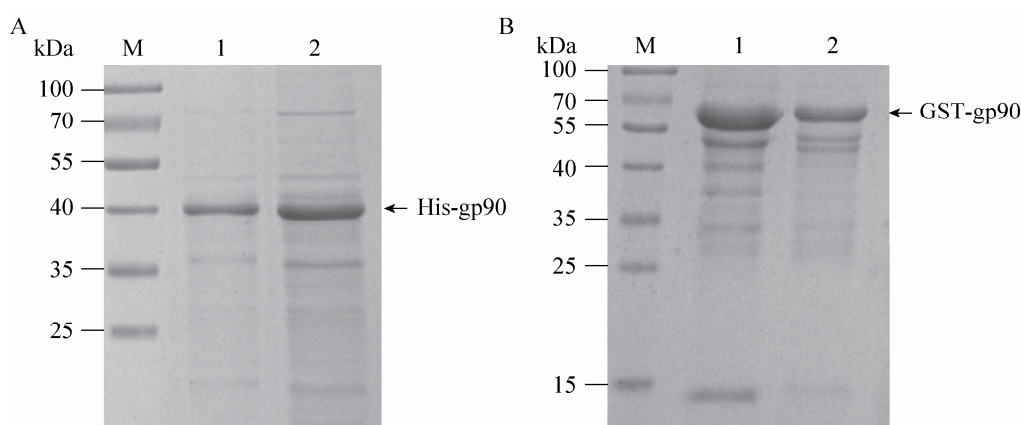


图 1 SDS-PAGE 检测复性的 gp90 融合蛋白

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of refolded gp90 fusion protein. (A) His-gp90 refolded protein. M: protein marker; 1: refolded protein; 2: inclusion body protein. (B) GST-gp90 refolded protein. M: protein marker; 1: inclusion body protein; 2: refolded protein.

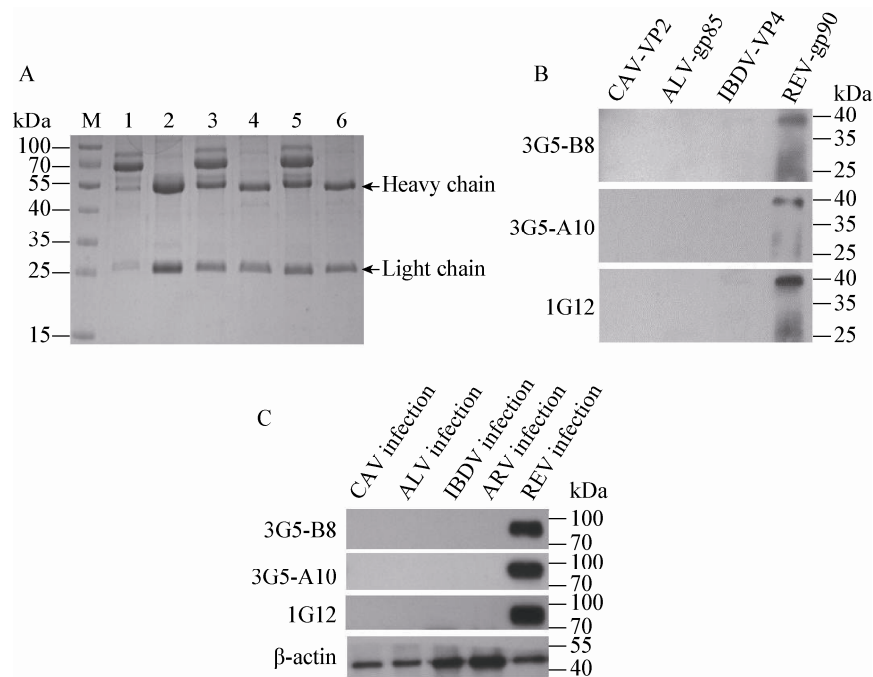


图2 单抗的纯化和特异性鉴定

Fig. 2 Anti-gp90 antibody purification and identification of specificity of anti-gp90 McAbs. (A) Purification of 1G12, 3G5-B8 and 3G5-A10 monoclonal antibodies. M: protein marker; 1, 3, 5: 1G12, 3G5-B8 and 3G5-A10 before purification, respectively; 2, 4, 6: 1G12, 3G5-B8 and 3G5-A10 after purification, respectively; (B–C) Analysis of the specificity of anti-gp90 McAbs.

2.3 单克隆抗体亚类鉴定及亲和力测定

用抗体亚类检测试剂盒,按照间接ELISA方法测定3株单抗的亚型,结果表明3G5-B8与3G5-A10杂交瘤细胞株分泌的单抗亚类为IgG1,而1G12株分泌的单抗亚类为IgG2b。

应用间接ELISA方法测定3株单抗亲和力。结果表明3株单抗亲和力解离常数(K_d)分别为 6.483×10^{-10} 、 4.844×10^{-10} 和 9.330×10^{-10} ,均属于高亲和力抗体。

2.4 单抗能够识别REV感染DF-1细胞产生的gp90蛋白

单抗的特异性鉴定结果显示3株单抗能很好地识别REV感染细胞中的gp90蛋白,不识别其他病毒感染的阴性对照,说明单抗能特异识别REV蛋白。以间接免疫荧光实验检测,结果同样表明3株单抗均能与REV感染的DF-1

细胞反应(图3)。

2.5 单克隆抗体抗原识别区的确定

将gp90蛋白截短并在原核细胞中表达(图4A, 4B)。用Western blotting方法检测3株单抗对于截短蛋白的识别情况,结果如图4C–E所示,3株单抗的抗原识别位点位于第200–245位氨基酸之间。

根据上述方法按照图5A所示进一步表达gp90不同截短蛋白,用Western blotting方法检测截短蛋白的表达(图5B)以及3株单抗对于截短蛋白的识别情况(图5C–E),结果表明3G5-B8、3G5-A10 2株单抗的抗原识别位点只能初步预测在第200–245位氨基酸之间,1G12株单抗识别位点基本能够确定包含第230–235位氨基酸。3株单抗的抗原识别区示意图如图5F所示。该结果表明,3株单抗的识别区不完全相同。

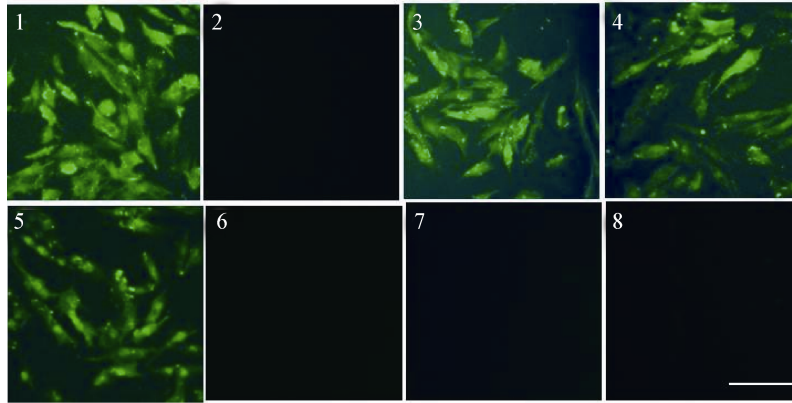


图 3 单抗识别病毒感染产生的 gp90 蛋白

Fig. 3 Anti-gp90 McAbs recognize gp90 protein in REV-infected DF-1 cells. 1-7: REV infection. 1: REV-positive chicken serum; 2: REV-negative chicken serum; 3-5: 3G5-B8, 3G5-A10 and 1G12 McAbs; 6: IgG1 isotype control; 7: IgG2b isotype control; 8: Mock, anti-REV serum. The scale bar represents 200 μ m.

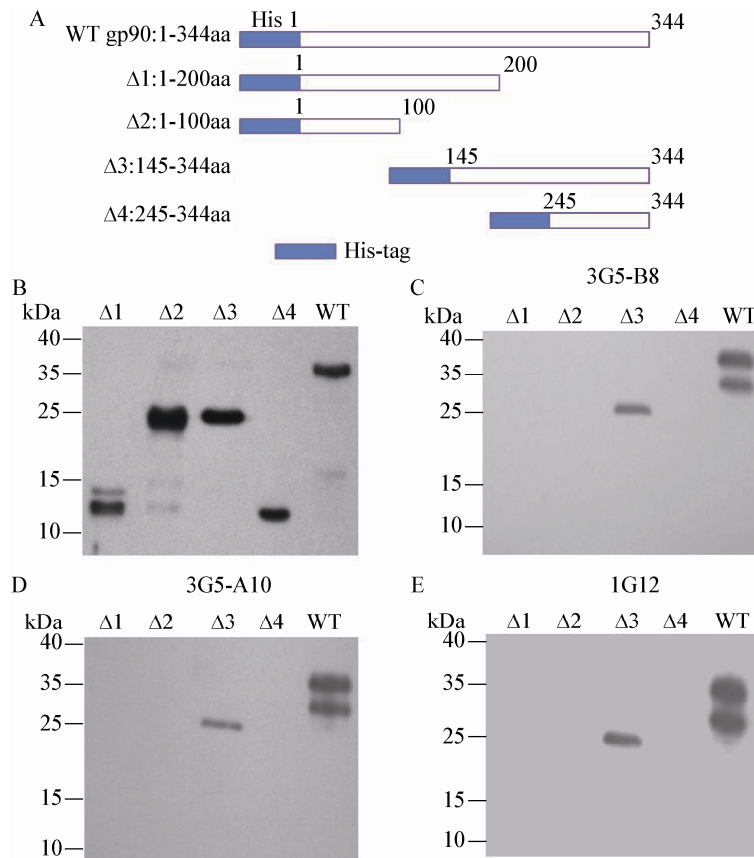


图 4 单抗抗原识别区分析 (I)

Fig. 4 Recognition regions analysis of anti-gp90 McAbs (I). (A) Schematics of the genes encoding the full-length and truncated gp90 proteins (Δ 1 through Δ 4). (B) Detection of truncated gp90 proteins by Western blotting using anti-His-tag McAb. (C-E) Detection of truncated gp90 proteins by Western blotting using indicated McAbs.

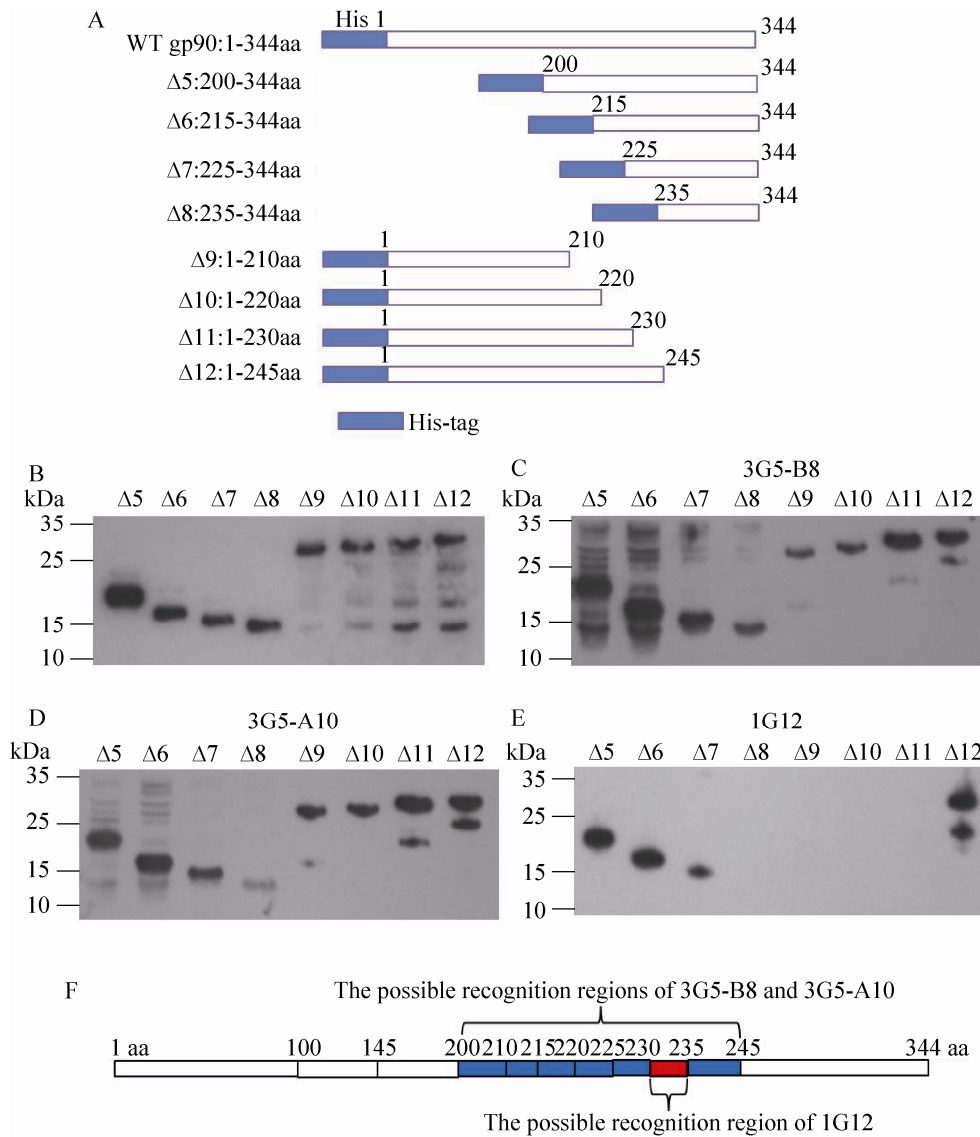


图 5 单抗抗原识别区分析 (II)

Fig. 5 Recognition regions analysis of anti-gp90 McAbs (II). (A) Schematics of the genes encoding the full-length and truncated gp90 proteins ($\Delta 5$ through $\Delta 12$). (B) Detection of truncated gp90 proteins by Western blotting using anti-His-tag McAb. (C-E) Detection of truncated gp90 proteins by Western blotting using indicated McAbs. (F) Schematic of the possible recognition regions of anti-gp90 McAbs.

3 讨论

REV 对低日龄鸡感染较为严重, 感染后易形成免疫抑制和免疫耐受。而 REV 与 MDV、CAV、ALV 等免疫抑制性病毒在鸡群中混合感

染给养禽业带来的危害越来越严重^[19-21]。gp90 蛋白能够产生中和抗体, 是病毒的免疫原性蛋白, 决定 REV 抗原的高度变异性。

将 REV-gp90 蛋白在大肠杆菌中表达得到的是包涵体蛋白, 以包涵体蛋白作为免疫原虽

然也能筛选到单克隆抗体,但是不易筛选到识别空间表位的单抗。本研究通过稀释复性方法获得可溶性蛋白,国内有学者在毕赤酵母中成功表达了 gp90 可溶性蛋白,并利用此蛋白建立了检测 REV 抗体的间接 ELISA 方法^[22-23]。在 REV 单克隆抗体应用方面早在 1986 年就有相应的报道^[24],并初步建立了 REV 抗原检测的 ELISA 方法^[25],但此方法尚未开发成商品化试剂盒,而对养殖场鸡群 REV 的检测不得使用价格高昂的进口试剂盒,为解决这一问题,我们针对 REV-gp90 抗原制备单克隆抗体,探索建立检测 REV 试剂盒的可能性。国内学者在 2010 年和 2011 年分别制备出了针对 env 蛋白^[26]和 gp90 蛋白^[27]的单克隆抗体并对抗体进行了初步鉴定工作。在 REV 单克隆抗体抗原识别区的确定方面,Xue 等^[7]通过 M13 噬菌体随机肽库筛选将 1 株 REV-A 株 gp90 单抗的识别表位确定在 213SVQYHPL219 之间,并初步确定此位点在大部分 REV 毒株中是高度保守的,可能是 REV 的群特异性表位。虽然国内外已经有了多株针对 REV 的单抗,但这些抗体的抗原识别区及其亲和力还不十分明确。业已证明,抗体的亲和力决定抗体的生物学功能,亲和力不同的抗体纵然都能识别相同抗原,但亲和力高的抗体识别及中和作用强于亲和力低的抗体,因此不同亲和力的抗体使用范围和目的也是不相同的。本研究获得的抗体均属于高亲和力抗体,将在实践中有广泛的应用。

抗原识别区的确定有利于进一步研制临床诊断方法。在本研究中,原核表达 gp90 不同长度的截短蛋白,初步确定 3G5-B8 和 3G5-A10 2 株单抗的抗原识别区位于第 200-245 位氨基酸,而 1G12 株单抗的识别区包含第 230-235 位

氨基酸。但若要精确 1G12 株的抗原识别区域,则需要根据 230-235 位氨基酸的序列特点,构建不同长度的 gp90 短肽片段进行特异性分析,从而锁定此株单抗的识别区域。根据单抗抗原识别区的初步鉴定结果,可以将 1G12 株单抗作为捕获抗体,3G5-B8 或 3G5-A10 株单抗作为酶标抗体探索建立双抗体夹心 ELISA 检测抗原的方法。本研究中所获得的单抗具有高亲和力的特点,并初步确定了其抗原识别区,为深入研究 REV 的致病机理提供了重要生物学材料,为研制检测 REV 的临床诊断试剂盒以及多肽疫苗奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Witter RL, Smith EJ, Crittenden LB. Tolerance, viral shedding, and neoplasia in chickens infected with non-defective reticuloendotheliosis viruses. *Avian Dis*, 1981, 25(2): 374-394.
- [2] Mosser AG. Polypeptide composition of spleen necrosis virus, a reticuloendotheliosis virus. *J Virol*, 1975, 15(5): 1088-1095.
- [3] Purchase HG, Ludford C, Nazerian K, et al. A new group of oncogenic viruses: reticuloendotheliosis, chick syncytial, duck infectious anemia, and spleen necrosis viruses. *J Natl Cancer Inst*, 1973, 51(2): 489-499.
- [4] TRAGER W. A new virus of ducks interfering with development of malaria parasite (*Plasmodium lophurae*). *Proc Soc Exp Biol Med*, 1959, 101(3): 578-582.
- [5] Bohls RL, Linares JA, Gross SL, et al. Phylogenetic analyses indicate little variation among reticuloendotheliosis viruses infecting avian species, including the endangered Attwater's prairie chicken. *Virus Res*, 2006, 119(2): 187-194.
- [6] Qiu YY, Sun SH, Cui ZZ. Immuno-suppression of reticuloendotheliosis virus infection on antibody

- responses to different vaccines in SPF chickens. *Virolog Sin*, 2006, 21(1): 34–37 (in Chinese).
邱玉玉, 孙淑红, 崔治中. 网状内皮增生病毒病病毒感染 SPF 鸡对疫苗免疫反应的抑制作用. *中国病毒学*, 2006, 21(1): 34–37.
- [7] Xue M, Shi X, Zhang J, et al. Identification of a conserved B-cell epitope on reticuloendotheliosis virus envelope protein by screening a phage-displayed random peptide library. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e49842.
- [8] Tsai WP, Copeland TD, Oroszlan S. Purification and chemical and immunological characterization of avian reticuloendotheliosis virus gag-gene-encoded structural proteins. *Virology*, 1985, 140(2): 289–312.
- [9] Delwart EL, Panganiban AT. Role of reticuloendotheliosis virus envelope glycoprotein in superinfection interference. *J Virol*, 1989, 63(1): 273–280.
- [10] Filardo EJ, Lee MF, Humphries EH. Structural genes, not the LTRs, are the primary determinants of reticuloendotheliosis virus A-induced runting and bursal atrophy. *Virology*, 1994, 202(1): 116–128.
- [11] Davidson I, Yang H, Witter RL, et al. The immunodominant proteins of reticuloendotheliosis virus. *Vet Microbiol*, 1996, 49(3/4): 273–284.
- [12] Delwart EL, Panganiban AT. N-linked glycosylation and reticuloendotheliosis retrovirus envelope glycoprotein function. *Virology*, 1990, 179(2): 648–657.
- [13] Delwart EL, Panganiban AT. Role of reticuloendotheliosis virus envelope glycoprotein in superinfection interference. *J Virol*, 1989, 63(1): 273–280.
- [14] Sun BB. Identification and crystal structure of MDV CTL epitope presenting by chicken B15 and study of its immune protection [D]. Beijing: China Agricultural University, 2013 (in Chinese).
孙贝贝. 鸡 B15 MDV CTL 表位的鉴定与晶体结构解析及其免疫保护效果研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- [15] Wu Y. Preparation of monoclonal antibodies against the gp85 protein of subgroup B Avian Leukosis Virus[D]. Beijing: China Agricultural University, 2011 (in Chinese).
吴艳. B 亚群鸡白血病病毒 gp85 蛋白单克隆抗体制备[D]. 北京: 中国农业大学, 2011.
- [16] Yokoyama WM. *Current protocols in immunology*. John Wiley&Sonc, Inc, 1995.
- [17] Li SJ. Development and application of monoclonal antibodies against the IBDV VP2 and VP5 proteins[D]. Beijing: China Agricultural University, 2013 (in Chinese).
李善吉. 传染性法氏囊病毒 VP2 和 VP5 单克隆抗体的制备鉴定及应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- [18] Eryl Liddell J, Cryer A. *A practical guide to monoclonal antibodies*. New York: John Wiley & Sons, 1991: 110–115.
- [19] Jiang SJ, Meng SS, Cui ZZ. Epidemic investigation of Co-infection of MDV, CAV and REV in Spontaneous Diseased Chicken Flocks in China. *Virolog Sin*, 2005, 20(2): 164–167 (in Chinese).
姜世金, 孟珊珊, 崔治中. 我国自然发病鸡群中 MDV、REV 和 CAV 共感染的检测. *中国病毒学*, 2005, 20(2): 164–167.
- [20] Zhang Z, Cui ZZ, Jiang SJ. Isolation and identification of reticuloendotheliosis virus from tumors infected with subgroup J Avian Leukosis Virus. *Chin J Vet Sci*, 2004, 24(1): 10–13 (in Chinese).
张志, 崔治中, 姜世金. 从 J 亚群禽白血病肿瘤中检测出禽网状内皮组织增生症病毒. *中国兽医学报*, 2004, 24(1): 10–13.
- [21] Su S, Cui N, Sun A, et al. Sequence analysis of the whole genome of a recombinant Marek's disease virus strain, GX0101, with a reticuloendotheliosis virus LTR insert. *Arch Virol*, 2013, 158(9): 2007–2014.
- [22] Li K, Gao H, Gao L, et al. Development of an indirect ELISA for serological detection of reticuloendotheliosis virus using the gp90 protein

- expressed in *Pichia pastoris*. *J Virol Methods*, 2012, 180(1/2): 43–48.
- [23] Li K, Gao H, Gao L, et al. Recombinant gp90 protein expressed in *Pichia pastoris* induces a protective immune response against reticuloendotheliosis virus in chickens. *Vaccine*, 2012, 30(13): 2273–2281.
- [24] Cui ZZ, Lee LF, Silva RF, et al. Monoclonal antibodies against avian reticuloendotheliosis virus: identification of strain-specific and strain-common epitopes. *J Immunol*, 1986, 136(11): 4237–4242.
- [25] Cui ZZ, Lee LF, Smith EJ, et al. Monoclonal-antibody-mediated enzyme-linked immunosorbent assay for detection of reticuloendotheliosis viruses. *Avian Dis*, 1988, 32(1): 32–40.
- [26] Zhang WJ, Pei ZF, Niu ZX. Expression and purification of REV env protein and preparation of its mAb. *Chin J Vet Sci*, 2010, 30(2): 180–182 (in Chinese).
张文娟, 裴宗飞, 牛钟相. REV 囊膜糖蛋白的表达、纯化及单克隆抗体的制备和初步鉴定. *中国兽医学报*, 2010, 30(2): 180–182.
- [27] Shi XM, Zhang J, Zhao Y, et al. Development and identification of the monoclonal antibodies against recombinant reticuloendotheliosis virus gp90 protein. *Acta veter et Zootech Sin*, 2011, 42(9): 1289–1294 (in Chinese).
石星明, 张晶, 赵妍, 等. 禽网状内皮增生症病毒 gp90 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(9): 1289–1294.

(本文责编 陈宏宇)



《生物工程学报》入选“中国精品科技期刊”

2014年9月26日,中国科学技术信息研究所发布了《2014年版中国科技期刊引证报告(核心版)》,《生物工程学报》入选300种“第3届中国精品科技期刊”,为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

《2014年中国科技期刊引证报告(核心版)》,涵盖了1989种中国科技核心期刊2013年的评价指标。通过对影响因子和总被引频次等指标进行综合评价,《生物工程学报》综合评分列生物工程类核心期刊第一名。

