

含有禽网状内皮组织增生病毒基因组片段的 天然重组禽痘病毒的研究

丁家波 崔治中* 于立娟 孙淑红 姜世金

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘 要 将国内 5 个不同生产厂家来源的禽痘弱毒疫苗株和 1 株禽痘野毒株在鸡胚成纤维细胞(CEF)上连续传 5 代,用禽网状内皮组织增生病毒(*Reticuloendotheliosis virus*, REV)特异性的单克隆抗体进行间接免疫荧光试验(Immunofluorescence assay, IFA)均检测不到传染性 REV。但以 6 株禽痘病毒(FPV)感染的第 2 代和第 5 代细胞基因组提取物为模板,通过 PCR 均能扩增出 REV 的长末端重复序列(LTR)和囊膜蛋白(*env*)基因片段。用特异性核酸探针作分子斑点杂交(Dot blot)结果显示所扩增的 PCR 条带为特异的 REV-LTR 和 REV-*env* 基因片段。实验结果表明,国内的一些痘病毒疫苗和野毒株基因组中,已稳定地整合进了 REV 的基因组成分。

关键词 禽痘病毒 网状内皮增生病毒 整合

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)05-0588-05

禽网状内皮组织增生病毒(*Reticuloendotheliosis virus*, REV)有别于禽淋巴白血病毒(*Avian leukosis virus*, ALV),能引起肿瘤和免疫抑制的 C 型反转录病毒^[1,2],其基因序列的同源性哺乳动物的反转录病毒很接近^[3~6]。当多种病毒持续感染同一只鸡时,病毒的基因会发生相互作用^[7],人们已从共感染禽痘病毒(*Fowl pox virus*, FPV)和马立克氏病病毒(*Marek's disease virus*, MDV)的鸡体内分离出含有 FPV 基因同源序列的 MDV^[8]。而像 REV 这类禽反转录病毒基因成分整合进 MDV 基因组的现象更为常见^[9~12]。近年来,国外已有越来越多的关于 REV 污染禽痘疫苗及 REV 基因片段整合进 FPV 基因组中的报道^[13~16]。进一步研究发现,当有完整 REV 前病毒基因组整合到 FPV 基因组中时,对临床上会造成潜在的危害^[17],而且用这种病毒的基因组 DNA 转染鸡胚成纤维细胞时,能够检测到传染性 REV 的形成^[14]。种种研究表明,REV 的基因片段甚至完整的基因组整合在痘病毒基因组中的现象是普遍的,其可能带来的危害也应得到重视。

但到目前为止,尚未见有关我国禽痘疫苗毒和野毒株中 REV 的污染和基因整合的报道。为了解我国这方面的情况,我们收集了来自全国 5 个不同省份不同生产厂家的禽痘冻干疫苗和本实验室分离

的一株禽痘野毒,通过 PCR、核酸杂交和 IFA 的方法,证实了在我国禽痘疫苗株和野毒株基因组中,存在 REV 基因片段的整合。这是对国内 FPV 基因组中整合进 REV 基因组成分的首次报道。

1 材料和方法

1.1 毒株和细胞

从市场上购买的 5 支禽痘疫苗分别是由江苏、北京、山东、浙江、辽宁等地厂家生产的冻干产品,已在 4℃下保存数月,本研究中分别表示为 A、B、C、D、E 样品;1 株禽痘病毒野毒(SD-TA/2003)从山东某爆发禽痘的鸡场分离到。取临床上典型发病鸡的鸡痘,碾碎后加入含 1000U/mL 双抗的生理盐水于 37℃孵育 1h,离心,取上清接种 9~11 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔,3~4d 后收获鸡胚尿囊液。将收获的尿囊液稀释 100 倍,取 0.2mL 接种到适龄鸡胚,并以此连续传代到鸡胚绒毛尿囊膜上直至 FPV 特异的痘斑出现。经 SPF 鸡胚连传 3 代后冻存。用于制备鸡胚成纤维细胞的 SPF 鸡胚购自济南斯帕法斯公司。

1.2 材料和试剂

PCR Kit 购于 TaKaRa 公司;DNA Digoxigenin 标记和检测试剂盒购自 Roche 公司;REV 前病毒全基因组克隆质粒 pB101^[18]由美国 Case Western Universi-

基金项目 国家自然科学基金重点项目(C02030604)

* 通讯作者。Tel 86-538-8241560 Fax 86-538-8241419 E-mail: zzcui@sdaa.edu.cn

作者简介:丁家波(1975-),男,江苏泰州人,博士研究生,主要从事动物分子病毒学研究。E-mail: dingjiabo@sohu.com

收稿日期 2004-01-08,修回日期 2004-04-12

ty 医学院 Dr. Kung 惠赠 ;REV 特异的单克隆抗体 11B118^[19]由本实验室保存。PCR 引物合成和 PCR 产物的序列测定由上海 Sangon 公司完成。

1.3 原始冻干疫苗产品中病毒基因组 DNA 的提取
将收集的市售禽痘弱毒苗用 500μL 1 × PBS 稀释后 ,取 100μL 悬液按常规方法提取核酸。简略步骤如下 :每样品加入 400μL 的组织消化液和蛋白酶 K(100μg/mL) ,52℃ 消化 2h 以上。用苯酚和氯仿分别抽提两遍后 ,用 2 倍体积的无水乙醇沉淀核酸 ,最后溶解于含 RNA 酶的 TE 缓冲液中。

1.4 病毒在 CEF 中的传代和 DNA 的提取
每瓶冻干疫苗用 5mL 1 × PBS 稀释后 ,小滤器过滤 ,取 1mL 的滤液接种到已长满约 70% 的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 单层上 ,间隔 3 ~ 4d 后取上清接种到

另一瓶新鲜的 CEF 细胞上。按此法传至出现细胞病变时收获细胞。将收集的细胞消化 ,抽提 ,最后用乙醇沉淀 DNA ,溶解于含足量 RNA 酶的 TE 缓冲液中。取接种了野毒株的鸡胚尿囊液 0.5mL 到细胞上 ,按同样的方法传代。

1.5 PCR 和 nest-PCR 扩增 REV LTR 序列和 env 基因片段
分别用痘病毒冻干疫苗核酸提取物和病毒感染细胞的核酸提取物为模板 ,参照文献 [20 ,21] ,设计两对引物分别用于扩增 REV 的 LTR 和 env 基因片段 ,同时设计这两对引物的 nest-PCR 引物。4 对引物的序列见表 1。PCR 反应程序 :95℃ 4min ;95℃ 30s ,54℃ 30s ,72℃ 30s ,28 个循环 ,72℃ 10min。PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳观察。

表 1 用于扩增 REV-LTR 和 REV-env 基因片段的 PCR 和 nest-PCR 引物

Table 1 Primers for LTR and env gene fragments of REV			
Primers	Sequences	Positions in REV genome [△]	Fragment sizes/bp
FLTR(forward)	5'-CATACTGGAGCCAATGGTT-3'	335 ~ 352	293
RLTR(reverse)	5'-AATGTTGTACCGAAGTACT-3'	677 ~ 659	
FLTR-nes(forward)	5'-GTAAAGGGCAGATGCTA-3'	353 ~ 369	260
RLTR-nes(reverse)	5'-TACTACGGATTCAGTCC-3'	663 ~ 646	
Fenv(forward)	5'-AGCTAGGCTCGTATGAA-3'	6504 ~ 6520	438
Renv(reverse)	5'-TATTGACCAGCTGGGTTG-3'	6940 ~ 6923	
Fenv-nes(forward)	5'-ATGAAGACGGGCCTAA-3'	6515 ~ 6531	402
Renv-nes(reverse)	5'-AAAGGGGAGGCTAAGA-3'	6916 ~ 6910	

1.6 LTR 和 env 基因探针的标记及对样品的检测
以表 1 中的 FLTR、RLTR 以及 Fenv、Renv 为引物 ,以 pBI01 质粒 DNA 为模板 ,扩增 REV-LTR 和 REV-env 基因片段。REV-LTR 和 REV-env PCR 产物经测序验证无误后 ,作为标记用的探针 DNA。各取 2μg ,按 Digoxigenin DNA 标记说明书对 LTR 和 env 基因片段进行标记。将定量过的 LTR 和 env 基因 PCR 产物递度稀释 ,用标记好的探针进行斑点杂交实验 ,验证探针的灵敏性为 10pg(显色 10h)。取冻干疫苗产品和野毒及细胞核酸抽提物 1μL ,点样于硝酸纤维素膜上 ,经变性、中和、固定后 ,用 REV-LTR 和 REV-env 探针进行杂交。对 1.5 中获得的 PCR 产物也按同样的方法 ,用分子杂交进行特异性检测。

1.7 禽痘疫苗株和禽痘病毒野毒株中传染性 REV 的检测
禽痘病毒疫苗株和分离野毒株感染 CEF 后

18h ,用 0.25% 的胰蛋白酶将细胞单层消化成细胞悬液 ,再重新接种于预先放入盖玻片的 60mm 瓶皿中 ,维持 4d 后 ,取出盖玻片。用针对 REV 的单克隆抗体 11B118 做间接免疫荧光试验 (Immunofluorescence assay ,IFA) ,检测有无传染性 REV 的存在。将接种了病毒的细胞上清连传至第 5 代时 ,用同法检测 REV。

2 结果

2.1 FPV 野毒株感染鸡胚尿囊液和 FPV 疫苗产品中 REV 基因组的检测
用特异性核酸探针检测禽痘冻干疫苗核酸提取物时 ,A、B、C、D、E 5 个样品的 REV-LTR 和 REV-env 全为阴性。但 FPV 野毒株 SD-TA/2003 接种鸡胚的尿囊液核酸提取物中 REV-LTR 呈弱阳性 ,而 REV-env 仍呈阴性。以 5 支疫苗产品直接提取的 DNA 为

△吉 荣 .禽网状内皮增生症病毒分子生物学特性的研究 .硕士论文 .扬州 ,扬州大学运行医学系 2002.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

模板经 PCR 扩增后,电泳观察到 A、B、C 和 E 4 个样品出现微弱的相当于 REV-LTR 大小的条带,D 样品为阴性(图 1-A)。5 个样品的 *env* 基因 PCR 均为阴性。以这 5 个样品的 LTR 和 *env* 基因的 PCR 产物作为模板,用相应的 nest-PCR 引物(表 1)进行同一程序的 PCR 反应,结果所有样品的 REV-LTR 和 REV-*env* 基因均为强阳性。以野毒株尿囊液核酸提取物为模板,PCR 循环后,得到清晰的 REV-LTR 和 REV-*env* 基因片段。这些 PCR 产物不仅在电泳中大小符合,其特异性也为特异性核酸探针作分子斑点杂交得以验证(图 1-A、1-B、表 2)。

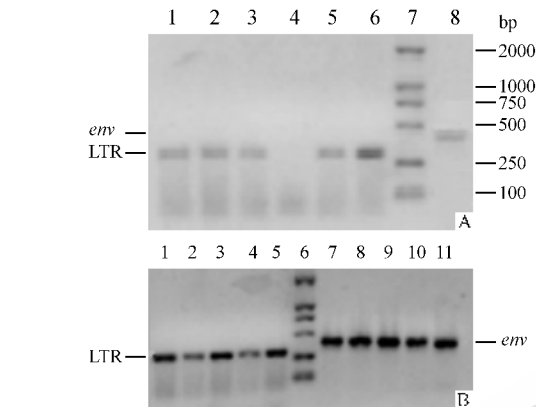


图 1 以 5 个 FPV 疫苗产品核酸提取物和 1 个野毒株鸡胚尿囊液核酸提取物中 REV-LTR 和 REV-*env* 扩增产物电泳图

Fig.1 PCR and nest-PCR for REV-LTR and REV-*env* gene fragments from the DNA extracted from 5 vaccine strain and a field strain from embryo allantoic liquid

A. PCR products of LTR and *env* gene fragments. 1~5. LTR PCR products of 5 FPV vaccine strain samples (293bp); 6. LTR PCR product of the field strain sample; 7. Marker 2000; 8. *env* gene fragment amplified from the field strain sample. *Env* gene fragments of the 5 vaccine strains were PCR negative (pictures not shown). B. nest-PCR products for LTR (260bp) and *env* gene fragments (402) of the 5 FPV strains. 1~5. LTR nest-PCR products for LTR; 6. Marker 2000; 7~11. Nest-PCR products for *env* gene fragments.

2.2 FPV 野毒株感染鸡胚尿囊液和 FPV 疫苗产品中传染性 REV 的检测

将 6 株 FPV 接种到放有盖玻片的平皿中,4d 以后,用 REV 特异性的单克隆抗体 11B118,经 IFA,未检测到 REV。将细胞连续传至第 5 代时,所有样品中仍未能用 IFA 检测到 REV。结果表明,在所检测的 FPV 疫苗株和野毒株中,无传染性 REV 颗粒的存在(表 2)。

表 2 不同方法对禽痘病毒疫苗株和野毒株基因组中 REV 污染和 REV 基因片段的检测

Table 2 The detection of REV contamination or REV-LTR and REV- <i>env</i> gene fragments in the samples of 5 FPV vaccine strains and 1 field strain												
Method	Gene	FPV vaccine lyophilized					FPV vaccine strains propagated in CEF					Field strain
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	
Dot blot	LTR	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>env</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
PCR	LTR	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>env</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
nest-PCR	LTR	+	+	+	+	+						
	<i>env</i>	+	+	+	+	+						
Reaction to Mab11B118 of REV in IFA		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- . Negative ; + . Positive.

2.3 FPV 野毒株和疫苗株传代细胞中 REV 基因组的检测

疫苗病毒经细胞传至第 2 代后,出现明显的细胞病变,细胞变圆,变亮,折光加强。以第 2 代和第 5 代的细胞核酸提取物作为模板,经 PCR 扩增后,所有 6 个样品的 REV-LTR 和 REV-*env* 全部为阳性(图 2、表 2)。在用 REV-LTR 和 REV-*env* 特异性核酸探针作斑点分子杂交时,也均为阳性。所有 6 株 FPV 感染的细胞核酸提取物在用 REV 特异性探针作分子杂交时,全部呈现阳性(图 3)。

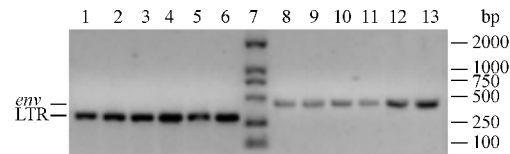


图 2 以 6 株 FPV 感染细胞的核酸提取物为模板的 REV-LTR 和 REV-*env* 扩增产物电泳图

Fig.2 PCR for REV-LTR and REV-*env* gene fragments from the DNA extracted from the CEF cells infected by the 6 FPV strains respectively 1~6. PCR products of REV-LTR; 7. Marker 2000; 8~13. PCR products of REV-*env* gene fragments.

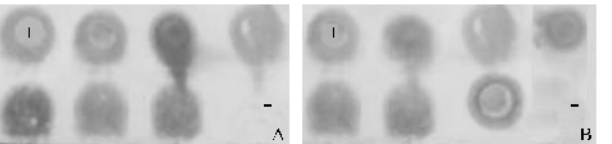


图 3 6 株病毒感染细胞的基因组 DNA 与 REV 特异性探针的斑点杂交图

Fig.3 Dot blot in the detection of LTR and *env* gene fragments from the extracts of 6 FPV infected CEF respectively A. Dot blot result of REV-LTR; B. Dot blot result of REV-*env*. “+” Positive control; “-” Negative control.

3 讨论

近几年来,REV 病毒基因组整合进 FPV 基因组中的现象开始引起人们的重视^[14~17],并且认为 REV LTR 整合到 FPV 的现象在 50 年之前就很普遍^[22]。

LTR 序列和 *env* 基因常用来检测 FPV 中是否有 REV 基因片段的整合^[22~23]。本研究通过 PCR 和核酸杂交检测 LTR 和 *env* 基因片段,并结合间接免疫荧光试验,对国内不同省份兽医生物制品厂生产的 FPV 疫苗进行 REV 污染和基因组整合情况的研究发现,所有样品 FPV 基因组中全部存在 REV 基因成分的整合,且临床发病的分离株,同样存在 REV 基因片段的整合。这一结果表明,无论是疫苗株还是流行毒株,整合有 REV 基因成分的 FPV 在我国已广泛存在。然而,本研究只是检测了所有 6 个 FPV 中的 REV-LTR 和 REV-*env*。虽然国外有报道表明,在有的 FPV 基因组中已整合进完整的 REV 基因组^[17],但本文所研究的 6 个 FPV 中,究竟是整合进 REV 基因组还是基因组片段,还有待进一步分析。

对所有的样品用 PCR 或核酸杂交检测之前,我们在处理的核酸样品中,加入足够量的 RNA 酶,以避免由于传染性(游离的)REV 病毒颗粒中基因组 RNA 引起的实验结果的假阳性。PCR 和核酸杂交显示的阳性结果,证实了 REV-LTR 和 REV-*env* 基因以 cDNA 的形式整合进 FPV 的基因组中。本实验起初用 PCR 方法,从疫苗产品核酸抽提物中只能部分(4/5)扩增出 REV-LTR 序列,REV-*env* 基因 PCR 全为阴性,这主要是由于模板量太少,当在细胞上传代增殖后,无论用 PCR 或核酸杂交,均能显示阳性结果。Singh 等^[7]在研究 REV 整合到 FPV 基因组中位点时发现,以所研究的 8 株 FPV 疫苗产品的核酸提取物为模板时,REV-LTR 的 PCR 结果全为阴性,而以其它 9 株 FPV 感染的细胞核酸提取物为模板时,PCR 结果全为阳性。为了提高实验检测的精确性,我们使用了 nest-PCR 的方法,非常灵敏地检测到了所有 FPV 疫苗样品中 REV-LTR 和 REV-*env* 基因片段。这是首次将 nest-PCR 用于 REV 基因整合的报道,也为我们从组织中直接检测基因整合现象提供了有益的方法。

几年前国外就报道了 REV 污染 FPV 疫苗的事件^[13],为了确定所研究的样品中是否有传染性 REV 的污染,本研究将疫苗株和分离的野毒株在细胞上连续传代,然后通过 REV 特异的单克隆抗体,进行 IFA 试验,结果所有样品均呈阴性。这表明,在我们从市

场上收集到的 FPV 弱毒疫苗冻干制品中,均未检测出传染性 REV 存在。然而,由于所检测的疫苗制品的保存条件和时间不详,我们无法判断新鲜的疫苗制品中究竟有无传染性 REV。REV 是一种抵抗力很弱的反转录病毒,是否由于 FPV 种毒中污染有 REV,但在疫苗保存的过程中 REV 已经失去传染性,这还有待对生产厂家的种毒进行检测。值得注意的是,REV 如果以完整前病毒的形式整合到 FPV 基因组,会不会在接种到鸡体后的某一过程中,从 FPV 基因组中游离出来,重新形成对鸡体有致病力 REV。病毒之间的重组对于病毒的进化和病毒毒力的变化显然是关联的。REV 部分和完整基因组的整合对 FPV 到底有什么样的影响,还有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Witter R L. Reticuloendotheliosis. In Calnek B W, Barnes H J, Beard C W, et al. Diseases of poultry. Ames: Iowa State University Press, 1991, 439-456.
- [2] Kang C Y, Temin H M. Lack of sequence homology among RNAs of avian leukosis-sarcoma viruses, reticuloendotheliosis viruses, and chicken endogenous RNA-directed DNA polymerase activity. *J Virol*, 1973, **12**: 1314-1324.
- [3] Barbacid M, Hunter E, Aaronson S A. Avian reticuloendotheliosis viruses: evolutionary linkage with mammalian type C retroviruses. *J Virol*, 1979, **30**: 508-514.
- [4] Tsai W P, Copeland T D, Oroszlan S. Purification and chemical and immunological characterization of avian reticuloendotheliosis virus gag-gene-encoded structural proteins. *Virology*, 1985, **140**: 289-312.
- [5] Lovinger G G, Mark G, Todaro G J, et al. 5'-terminal nucleotide noncoding sequences of retroviruses: relatedness of two old world primate type C viruses and avian spleen necrosis virus. *J Virol*, 1981, **39**: 238-245.
- [6] Rice N R, Bonner T I, Gilden R V. Nucleic acid homology between avian and mammalian type C viruses: relatedness of reticuloendotheliosis virus cDNA to cloned proviral DNA of the endogenous colobus virus CPC-1. *Virology*, 1981, **114**: 286-290.
- [7] Singh P, Schnitzlein W M, Tripathy D N. Reticuloendotheliosis virus sequences within the genomes of field strains of fowlpox virus display variability. *J Virol*, 2003, **77**(10): 5855-5862.
- [8] Brunovskis P, Velicer L F. The Marek's disease virus unique short region: alpha herpes virus homologs, fowlpox virus homologs, and Marek's disease virus-specific genes. *Virology*, 1995, **206**: 324-338.
- [9] 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.

- [10] Kost R , Jones D , Isfort R , *et al.* Retrovirus insertion into herpes-virus : characterization of a Marek 's disease virus harboring a solo LTR. *Virology* ,1993 ,**192** :161 – 169.
- [11] Isfort R J , Jones D , Kost R , *et al.* Retrovirus insertion into herpes-virus *in vitro* and *in vivo* . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1992 , **89** :991 – 995.
- [12] 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.
- [13] Fadly A M , Witter R L . Comparative evaluation of *in vitro* and *in vivo* assays for the detection of *reticuloendotheliosis virus* as a contaminant in a live virus vaccine of poultry. *Avian Dis* , 1997 , **41** (3) :695 – 701.
- [14] Hertig C , Coupar B E , Gould A R , *et al.* Field and vaccine strains of fowlpox carry integrated sequences from the *avian retrovirus* , *reticuloendotheliosis virus* . *Virology* , 1997 , **235** :367 – 376.
- [15] Moore K M , Davis J R , Sato T , *et al.* *Reticuloendotheliosis virus* (REV) long terminal repeats incorporated in the genomes of commercial fowl poxvirus vaccines and pigeon poxviruses without indication of the presence of infectious REV. *Avian Dis* , 2000 , **44** :827 – 841.
- [16] Singh P , Kim T J , Tripathy D N . Re-emerging fowlpox : Evaluation of isolates from vaccinated flocks. *Avian Pathol* , 2000 , **29** :449 – 455.
- [17] Garcia M , Narang N , Reed W M , *et al.* Molecular characterization of *reticuloendotheliosis virus* insertions in the genome of field and vaccine strains of *fowl poxvirus* . *Avian Dis* , 2003 , **47** (2) :343 – 354.
- [18] Boerkoel C F , Kung H J . Transcriptional interaction between retro-viral long terminal repeats (LTRs) : mechanism of 5 ' LTR suppression and 3 ' LTR promoter activation of c-myc in avian B-cell lymphomas. *J Virol* , 1992 , **66** (8) :4814 – 4823.
- [19] Cui Z Z , Lee L F , Silva R F , *et al.* Monoclonal antibodies against avian *reticuloendotheliosis virus* : identification of strain-specific and strain-common epitopes. *J Immunol* , 1986 , **136** (11) :4237 – 4242.
- [20] 吉 荣 , 刘岳龙 , 秦爱建 , 等 . 免疫抑制鸡群鸡传染性贫血病毒和网状内皮增生症病毒共感染检测. 中国兽药杂志 , 2001 , **35** (4) :1 – 3.
- [21] 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 , 2001 , **19** (1) :13 – 15.
- [22] Kim T J , Tripathy D N . Integration of *reticuloendotheliosis virus* into *fowlpox virus* , not a recent event. *Avian Dis* , 2001 , **45** :663 – 669.
- [23] Tadese T , Reed W M . Detection of specific *reticuloendotheliosis virus* sequence and protein from REV-integrated *fowlpox virus* strains. *J Virol Methods* , 2003 , **110** (1) :99 – 104.

Detection of *Reticuloendotheliosis Virus* Genomic Sequence in The Genome of Field and Vaccine Strains of *Fowl Poxvirus*

DING Jia-Bo CUI Zhi-Zhong* YU Li-Juan SUN Shu-Hong JIANG Shi-Jin

(College of Animal Science and Veterinary Medicine , Shandong Agriculture University , Tai 'an 271018 , China)

Abstract : Integration of *reticuloendotheliosis virus* (REV) into the genome of *fowl poxvirus* (FPV) has been reported recently. In order to determine whether this event has occurred in China , the presence of long terminal repeat (LTR) and envelop (*env*) gene fragments of REV provirus were detected from genomes of five FPV vaccines and a field isolate. When these six FPV strains were inoculated in the Chicken Embryo Fibroblast (CEF) cells and passed for 5 times respectively , the infectious REV could not be detected in immunofluorescence assay (IFA) with REV specific monoclonal antibody (MAb) 11B118. REV-LTR and REV-*env* gene fragments were amplified from the DNA extracts of the passage 2 and the passage 5 of FPV-infected CEF cells by PCR for all the 6 strains. Dot blot test proved the presence of LTR and *env* gene in the FPV-infected cell extracts and the PCR product for REV-LTR and REV-*env* . The results indicated that stable integrations of REV gene fragments in the genome of FPV vaccine and field strains were very common in China.

Key words : Integration , *Reticuloendotheliosis virus* (REV) , *Fowl poxvirus* (FPV)