



新城疫病毒 *P* 基因假病毒的构建与初步应用

王海鸣^{1,2}, 郭 通^{2,3}, 丁 雨², 李 阳², 龚振兴¹, 王静静^{2*}, 刘华雷^{2*}

(1. 宁夏大学动物科技学院, 银川 750021; 2. 中国动物卫生与流行病学中心 禽病监测室, 青岛 266032;

3. 青岛农业大学动物医学院, 青岛 266109)

摘 要: 旨在构建一种安全、有效的新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)假病毒, 用于NDV核酸检测的质量控制。通过RT-PCR扩增NDV *P* 基因, 连接至慢病毒表达载体PLV-Puro, 构建了Puro-NDV/*P*。提取Puro-NDV/*P* 质粒及2个辅助质粒, 共转染293T细胞, 成功构建了含有NDV *P* 基因的假病毒颗粒。将构建的假病毒颗粒适当稀释后冻干, 制备为RNA阳性质控品, 并进行标定、均一性及稳定性检验。通过构建成功的NDV *P* 基因假病毒建立Taqman荧光定量PCR检测方法。结果显示, 随机抽取15份阳性质控品进行荧光RT-PCR检测, *C_t*值变异系数(CV)为0.90%, 均一性良好; 对制备好的阳性质控品测定其拷贝数为 6.58×10^2 copies·μL⁻¹。将质控品置于4℃、25℃短期保存(1周)、-20℃长期保存(6个月), 经荧光RT-PCR检测*C_t*值无显著变化, 稳定性良好。建立了基于NDV *P* 基因假病毒的实时荧光RT-PCR检测方法。该试验所制备的NDV假病毒具有均一性好、稳定性强等优点, 可用于NDV核酸检测试剂盒研发、评估和质控, 为NDV标准化检测提供了可靠工具。

关键词: 新城疫病毒; 假病毒; 阳性质控品; 荧光RT-PCR

中图分类号: S855.3; S852.659.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1605-08

Construction and Application of Newcastle Disease Virus *P* Gene Pseudovirus

WANG Haiming^{1,2}, GUO Tong^{2,3}, DING Yu², LI Yang², GONG Zhenxing¹,

WANG Jingjing^{2*}, LIU Hualai^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. Avian Disease Surveillance Room, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032,

China; 3. College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: This study aimed to construct a safe and effective Newcastle disease virus (NDV) pseudovirus for the quality control of NDV nucleic acid detection. The *P* gene of NDV was amplified by RT-PCR and linked to the lentiviral expression vector PLV-Puro to construct Puro-NDV/*P*. Puro-NDV/*P* plasmids and two helper plasmids were extracted, and a total of 293T cells were transfected, and pseudovirus particles containing NDV *P* genes were successfully constructed. The constructed pseudovirus particles were properly diluted and lyophilized to prepare RNA-positive quality controls, and calibrated, uniformity and stability tested. A Taqman fluorescence quantitative PCR detection method was established by successfully constructing NDV *P* gene pseudovirus. The results showed that 15 positive quality control products were randomly selected for fluorescence RT-

收稿日期: 2025-06-10

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800600)

作者简介: 王海鸣, 硕士生, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: whm20000903@163.com

* 通信作者: 王静静, 主要从事畜禽重要疫病防控, E-mail: shui21@163.com; 刘华雷, 主要从事重大动物疫病防控技术研究, E-mail: hualeiliuwy@163.com

PCR detection, and the *Ct* value coefficient of variation (*CV*) was 0.90%, which was good uniformity. The copy number of the prepared positive quality control products was 6.58×10^2 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$. The quality controls were stored at 4 °C, 25 °C for short-term storage (1 week), and -20 °C for a long time (6 months), and the *Ct* value was detected by fluorescence RT-PCR without significant change, and the stability was good. A real-time fluorescence RT-PCR detection method based on NDV *P* gene pseudovirus was established. The NDV pseudovirus prepared in this test has the advantages of good uniformity and stability, and can be used for the research and development, evaluation and quality control of NDV nucleic acid detection kits, providing a reliable tool for the standardized detection of NDV.

Keywords: Newcastle disease virus; pseudovirus; positive control; fluorescent quantitative RT-PCR

* **Corresponding authors:** WANG Jingjing, E-mail: shui21@163. com; LIU Hualei, E-mail: hualeiliuwy@163. com

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)强毒株引起的禽类烈性传染病,世界动物卫生组织(WOAH)将其列为法定报告的动物疫病。NDV 属于副黏病毒科(*Paramyxoviridae*)正禽腮腺炎病毒属(*Orthoavulavirus*),基因组为单股负链 RNA,包括 6 个基因片段,其中 *NP*、*P* 基因最为保守,常作为 NDV 核酸检测的靶基因。目前,NDV 检测主要依赖病毒分离鉴定和核酸检测,核酸检测因其高效性和准确性而得到广泛应用。在核酸检测过程中,阳性质控品可监控整个流程,确保检测结果的可靠性和准确性。与传统质粒质控品和 RNA 标准品相比,假病毒具有类似真实病毒的结构,可避免 RNA 降解和交叉污染,具有较好的稳定性。与新城疫病毒相比,虽然二者在结构上相似,但假病毒不具备复制能力^[1],因此更安全,可以在 BSL-2 实验室中操作。假病毒在高致病性病原微生物核酸检测领域发挥了重要作用。在新冠疫情期间,由于新型冠状病毒(SARS-CoV-2)具有高度传染性 & 生物安全风险,科研人员利用慢病毒载体构建了 SARS-CoV-2 假病毒,其被广泛应用于新冠病毒核酸检测试剂评价与质控,确保了试剂盒检测的准确性和检测人员的人身安全^[2]。用于构建假病毒的载体主要包括慢病毒(lentivirus, LV)、腺病毒(adenovirus, ADV)和腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)。在三种常用的病毒载体中,慢病毒载体由于其效率高、插入基因容量大和稳定性好,是制备假病毒的首选包装系统。因此,本研究选用慢病毒载体,以新城疫病毒较为保守的 *P* 基因为靶基因,构建了 NDV 的 *P* 基因假病毒颗粒作为阳性质控品,并对质

控品进行均一性和稳定性检验。该研究制备的阳性质控品,可用于 NDV 核酸检测试剂盒研发、评估和质控,为 NDV 标准化检测提供了可靠工具。

1 材料与方法

1.1 感受态、细胞株及质粒

DH5 α 感受态细胞购自生工生物工程(上海)有限公司;293T 细胞为本实验室保存;慢病毒基因过表达载体 PLV-Puro 以及慢病毒包装辅助载体 Ph1、Ph2 购自英茂盛业生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

Xba I、*Xho* I 限制性核酸内切酶、Recombinant DNase I、PCR 试剂盒、荧光 RT-PCR 试剂盒、切胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自北京擎科生物科技有限公司;Polyfect-C 转染试剂购自英茂盛业生物科技有限公司;全自动核酸提取试剂盒购自天隆科技有限公司。

1.3 NDV 假病毒的构建

将重组质粒 Puro-NDV/*P* 以及辅助质粒 Ph1、Ph2 共转染至 293T 细胞。转染后 48 h 收集细胞上清液,用 Recombinant DNase I 去除细胞上清液中残留 DNA,并利用文献[3]中 NDV 通用引物探针进行荧光 PCR 检测,引物探针序列见(表 1)。将荧光 PCR 检测为阴性的细胞上清液提取 RNA 后进行荧光 RT-PCR 鉴定^[3],反应程序:反转录 42 °C 5 min;预变性 95 °C 30 s;变性 95 °C 5 s,退火温度 59 °C 40 s,扩增设置 40 个循环,每个循环结束后进行荧光信号的采集。保留鉴定为阳性的细胞上清液,使用 PEG 慢病毒纯化试剂对假病毒进行纯化。

表1 荧光 RT-PCR/荧光 PCR 引物和探针

Table 1 Fluorescence RT-PCR/Fluorescence PCR primers and probes

引物/探针名称 Primer/probe name	序列(5'→3') Sequence
NDV-2471F	ACHATCAGYTG GTGCAACCC
NDV-2751R	CRGGRTCCAGAATYTTTCATCA
NDV-2751P-FAM	CAGGCGATGATGTCTATGATGGAGGC

1.4 NDV假病毒阳性质控品的制备

1.4.1 预冻干浓度筛选 利用无菌 PBS 将纯化的假病毒进行 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 稀释。分别取 200 μL 的样品提取 RNA, 进行荧光 RT-PCR 扩增。记录检测 C_t 值, 选择适当稀释度假病毒与脱脂乳 1:1 混匀后进行分装, $1\text{ mL} \cdot \text{瓶}^{-1}$, 冻干后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.4.2 阳性质控品均一性评价 随机抽取 15 份阳性质控品进行均一性检验。取 1 mL PBS 复溶冻干的假病毒, 提取 RNA, 采用荧光 RT-PCR 方法进行测定。通过分析 15 个检测结果的 C_t 值变异程度评价质控品的均一性: 若 C_t 值的变异系数(CV)小于 5%, 表明质控品具有良好的均一性; 若 C_t 值存在显著差异($CV > 5\%$), 则说明存在样品分装不均或冻干工艺不稳定等问题, 需进一步优化制备工艺。

1.4.3 阳性质控品的定量 用无菌水将假病毒颗粒依次进行 10、100、1 000 倍稀释, 通过数字 PCR 仪对冻干后的 NDV 假病毒阳性质控品进行定值, 计算其拷贝数。

1.4.4 阳性质控品稳定性评价 短期稳定性试验: 取冻干 NDV 假病毒阳性质控品分别放置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下储存一周, 于第 3 天、第 5 天、第 7 天各取 1 瓶阳性质控品, 复溶后提取 RNA, 进行荧光 RT-PCR 检测, 每次做 3 个重复。根据检测 C_t 值利用 SAS 8.2 中配对 t 检验计算 P 值, 进行差异显著性分析。 $P \leq 0.05$ 表明差异显著, $P > 0.05$ 表明差异不显著。

长期稳定性试验: 将 NDV 假病毒阳性质控品置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存 6 个月, 每月各抽取 1 瓶, 复溶后提取 RNA, 进行荧光 RT-PCR 检测, 每次做 3 个重复。根据检测 C_t 值计算 P 值, 进行差异显著性分析。

1.5 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立及应用

1.5.1 实时荧光 RT-PCR 特异性评价 方法特异性通过检测已制备的 NDV 假病毒阳性质控品及实验室保存的禽流感病毒(AIV)、鸡传染性喉气管

炎病毒(ILTV)、鸡传染性支气管炎病毒(IBV)、鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)和禽腺病毒(FAV)六种病原核酸来进行评价。

1.5.2 实时荧光 RT-PCR 敏感性试验 将数字 PCR 仪定值后的假病毒颗粒进行 10 倍倍比稀释后进行荧光 RT-PCR 检测, 评价方法的敏感性。

1.5.3 临床应用 采用实时荧光 RT-PCR 方法对实验室收集保存的 50 份禽类拭子进行 NDV 核酸检测, 以制备好的 NDV 假病毒阳性质控品制备 3 份作为阳性对照进行荧光 RT-PCR 检测。

2 结 果

2.1 NDV假病毒的构建

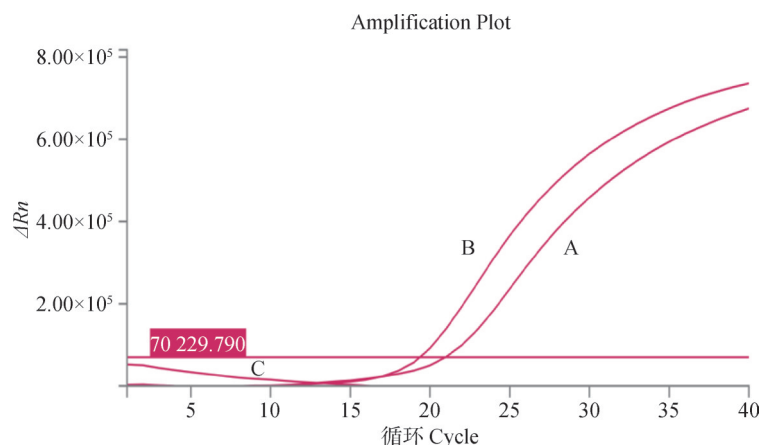
将 NDV P 基因与 PLV-Puro 载体连接、转化, 构建重组质粒 Puro-NDV/P, 并与辅助包装质粒 Ph1、Ph2 共转染 293T 细胞。转染后 48 h 收集细胞上清液, 经 Recombinant DNaseI 去除细胞液中残留 DNA, 随后提取细胞液 RNA 进行荧光 RT-PCR 检测, 出现典型的 S 型扩增曲线(图 1)。

2.2 NDV假病毒阳性质控品的制备

2.2.1 预冻干浓度筛选 将纯化后的假病毒进行 10 倍倍比稀释, 取 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 稀释度样品提取核酸, 进行荧光 RT-PCR 检测(图 2), 检测 C_t 值见(表 2)。综合考虑阳性质控的检测 C_t 值和制备成本, 选择 10^{-3} 稀释度样品冻干, 制备为 NDV 假病毒阳性质控品。

2.2.2 阳性质控品均一性评价 随机抽取冻干后的 15 份样品, 复溶后提取 RNA 进行荧光 RT-PCR 检测。检测结果显示, 15 份样品经检测平均 C_t 值为 28.56 ± 0.25 , CV 值为 0.90%(图 3、表 3), 表明样品间的离散程度低, 所制备样品均一性良好。

2.2.3 阳性质控品的定量 用 1 mL PBS 溶解冻干后的阳性质控品, 提取 RNA 后进行 10 倍倍比稀释, 取 $10^0 \sim 10^{-3}$ 稀释度样品进行反转录数字 PCR, 测定阳性质控品拷贝数为 $6.58 \times 10^2 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。



A. NDV 假病毒细胞上清液; B. 阳性对照; C. 阴性对照

A. NDV pseudovirus cell supernatant; B. Positive control; C. Negative control

图1 NDV 假病毒荧光 RT-PCR 鉴定结果

Fig. 1 NDV pseudovirus fluorescence RT-PCR identification results

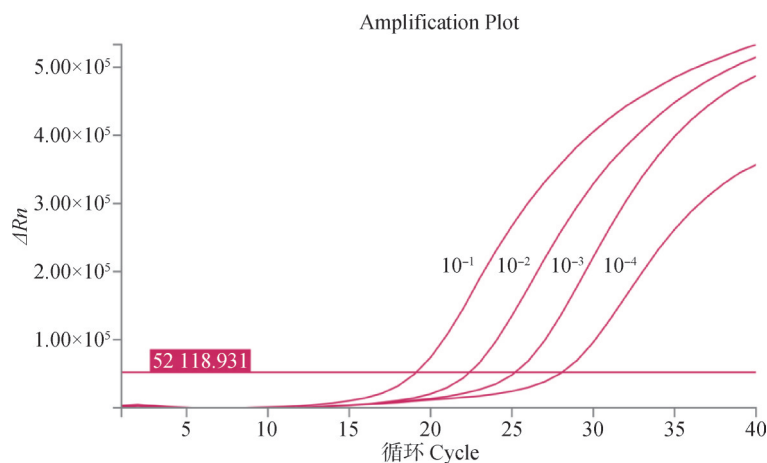


图2 不同稀释度 NDV 假病毒荧光 RT-PCR 扩增曲线图

Fig. 2 Amplification curves of different dilutions of NDV pseudovirus fluorescence RT-PCR

表2 不同稀释度 NDV 假病毒荧光 RT-PCR 检测结果

Table 2 Results of fluorescence RT-PCR detection of NDV pseudovirus at different dilutions

稀释度 Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Ct 值	19.06	22.39	25.20	28.22

2.2.4 阳性质控品稳定性评价 将制备的阳性质控品放置于4℃冰箱、25℃温箱中储存一周,以及-20℃冰箱储存6个月,分别于不同时间点取1瓶阳性质控品,进行荧光RT-PCR检测,每次做3个重复,计算平均Ct值,并与第0天阳性质控品Ct值进行比较,评价阳性质控品短期和长期储存的稳定性。结果显示NDV阳性质控品在4℃、25℃保存一周,以及-20℃保存6个月,检测Ct值均无显著差

异(表4)。说明制备的阳性质控品可在4℃、25℃环境下稳定存放7d,可在-20℃冰箱稳定存放至6个月。

2.3 NDV 假病毒阳性质控品荧光 RT-PCR 检测方法的建立及应用

2.3.1 特异性评价 采用建立的实时荧光RT-PCR方法对已制备的NDV P假病毒阳性质控品及实验室保存的AIV、IBV、ILTV、FAV、IBDV进行检测,仅检测出NDV P假病毒其余禽类常见传染病病毒均没有出现非特异性扩增,证明该方法具有良好的特异性。

2.3.2 敏感性结果 将已知拷贝数的NDV假病毒病毒液RNA采用倍比稀释(10倍倍比稀释成4个浓度),对 $6.58 \times 10^4 \sim 6.58 \times 10^1$ copies· μL^{-1} 的

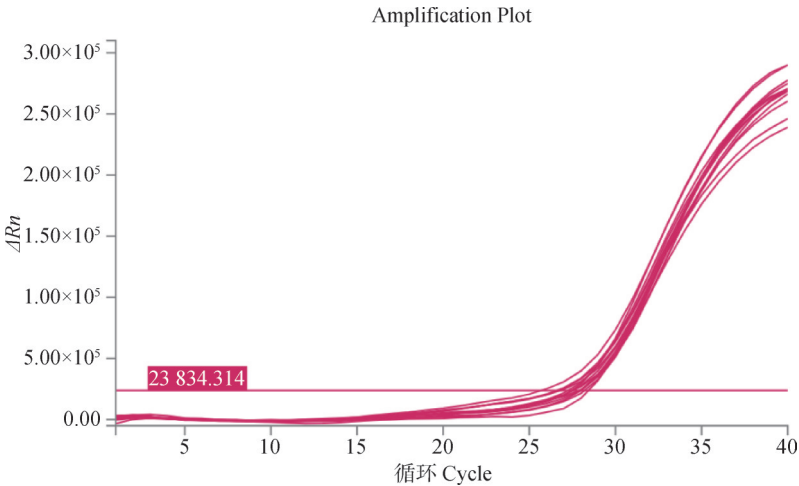


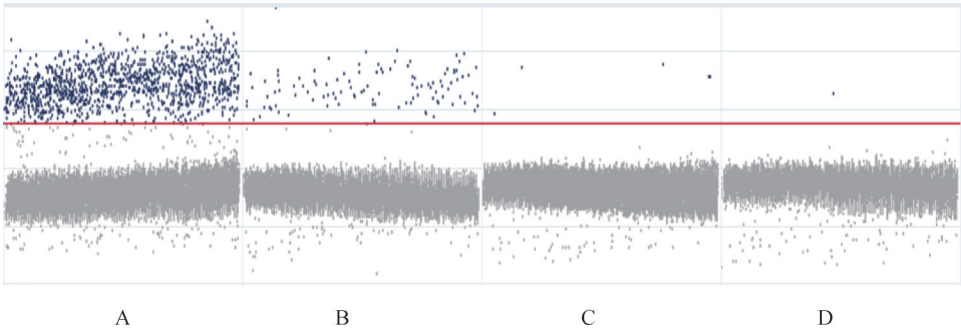
图3 NDV 假病毒阳性质控品均一性检验荧光 RT-PCR 扩增曲线

Fig. 3 Fluorescence RT-PCR amplification curves were used to test the uniformity of NDV pseudovirus positive controls

表3 NDV 假病毒阳性质控品均一性检验 *Ct* 值

Table 3 *Ct* value of NDV pseudovirus positive quality control uniformity test

样品编号 Sample No.	<i>Ct</i> 值 <i>Ct</i> value	样品编号 Sample No.	<i>Ct</i> 值 <i>Ct</i> value
1	28.401	10	28.622
2	28.534	11	28.575
3	28.895	12	28.291
4	28.752	13	27.985
5	28.521	14	28.973
6	28.456	15	28.826
7	28.658	$\bar{x} \pm s$	28.56 ± 0.25
8	28.319	CV	0.90%
9	28.716		



A. 10^0 稀释度样品; B. 10^{-1} 稀释度样品; C. 10^{-2} 稀释度样品; D. 10^{-3} 稀释度样品
A. 10^0 dilution sample; B. 10^{-1} dilution sample; C. 10^{-2} dilution sample; D. 10^{-3} dilution sample

图4 NDV 假病毒阳性质控品数字 PCR 定量

Fig. 4 Digital PCR quantification of NDV pseudovirus positive quality control products

稀释样品进行荧光 RT-PCR 检测,结果见图5。建立的 NDV *P* 假病毒荧光 RT-PCR 方法最低能检测到 $6.58 \times 10^2 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 临床应用 采用建立的 NDV 假病毒荧光 RT-PCR 方法对 50 份临床拭子进行 NDV 病毒核酸检测,检测结果见图6,3 份 NDV 假病毒阳性质控

表 4 阳性质控品稳定性检验结果

Table 4 Stability test results of positive quality controls

温度 Temperature	时间 Time	C_t 值 ($\bar{x} \pm s$) C_t value	P 值 P value
4 °C	第 0 天	28.56±0.25	—
	第 3 天	28.67±0.21	0.496 7
	第 5 天	28.03±0.50	0.211 1
	第 7 天	28.55±0.20	0.921 7
25 °C	第 0 天	28.56±0.25	—
	第 3 天	28.68±0.26	0.524 3
	第 5 天	28.54±0.31	0.923 6
	第 7 天	28.45±0.42	0.694 1
-20 °C	第 0 天	28.56±0.25	—
	1 个月	28.67±0.16	0.381 9
	2 个月	28.60±0.14	0.734 1
	3 个月	28.93±0.29	0.165 9
	4 个月	28.68±0.49	0.714 8
	5 个月	28.29±0.17	0.120 5
	6 个月	28.58±0.33	0.925 3

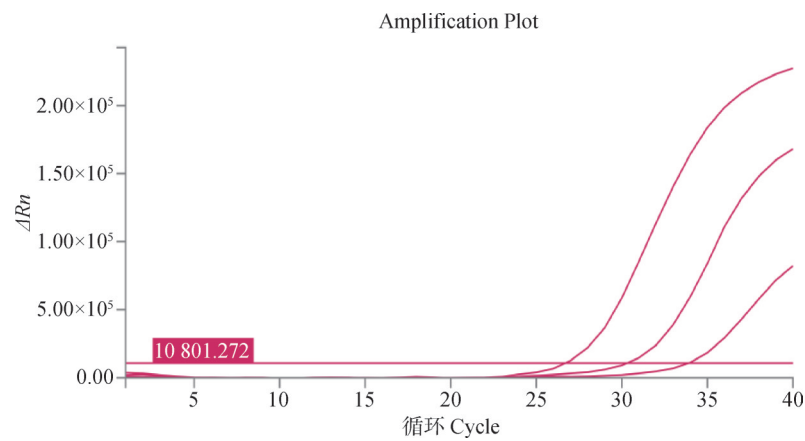


图 5 NDV 假病毒阳性质控品荧光 RT-PCR 敏感性试验结果

Fig. 5 Fluorescence RT-PCR susceptibility test results of NDV pseudovirus positive quality controls

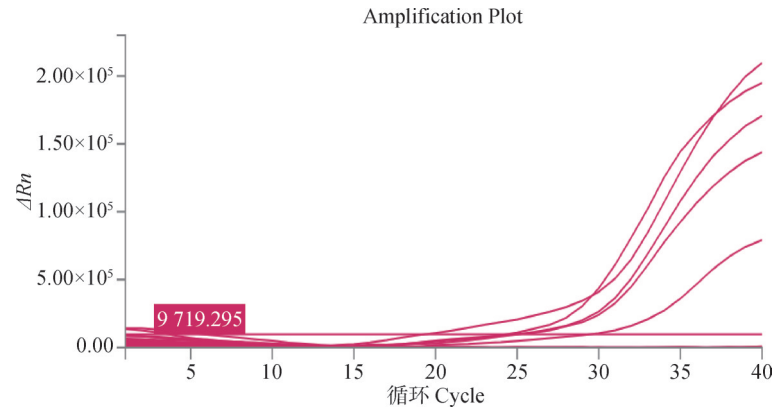


图 6 NDV 假病毒阳性质控品荧光 RT-PCR 临床应用试验结果

Fig. 6 Clinical application test results of fluorescent RT-PCR of NDV pseudovirus positive control

品及2份阳性样品均被检出,其余样本检测结果均为阴性,说明建立的NDV假病毒阳性质控品荧光RT-PCR方法具有良好的应用前景。

3 讨 论

假病毒,也称为假型病毒,根据其用途分为两类,一类是包装有外源基因片段的重组病毒颗粒^[4],另一类是用于表达外源蛋白的重组病毒颗粒。由于假病毒具有安全性高和与真病毒结构相似等优点,常作为活病毒的替代品,用于病原学研究和诊断试剂研发^[2,5-6]。慢病毒、腺病毒和腺相关病毒均可用于构建假病毒。其中,慢病毒包装系统转染效率高、基因整合能力稳定,是制备假病毒的常用包装系统。本研究利用慢病毒包装系统,构建了包含P基因的NDV假病毒,经检验证实其具有良好的均一性和稳定性,可用于NDV核酸检测的质量控制。国内外先后用慢病毒表达载体构建了新冠病毒^[7]、埃博拉病毒^[4]、乙型脑炎病毒^[8]、禽流感病毒^[9]、尼帕病毒^[10]、基孔肯雅热病毒^[11]等高致病性病原的假病毒,避免了使用原始活病毒可能带来的生物安全风险。与腺病毒或腺相关病毒载体相比,慢病毒载体具有更大的基因容量,但其制造成本较高,并且依赖于靶细胞的分裂活性。Sena-Esteves等^[12]通过优化293T细胞的转染条件和培养基成分,显著提高了慢病毒假病毒的产量,这为未来大规模生产NDV假病毒提供了参考方案。

本研究利用NDV假病毒制备了NDV阳性质控品,并验证了质控品的均一性和稳定性。结果表明,制备的阳性质控品荧光RT-PCR检测Ct值的变异系数仅为0.90%,表明质控品具有良好的均一性。此外,质控品在4℃、25℃环境下贮存7d及-20℃冰箱中储存6个月,荧光RT-PCR检测Ct值无显著变化($P>0.05$),证实其稳定性良好。黄益曼等^[13]制备的尼帕病毒假病毒可在-80℃下稳定储存6个月,而Neto等^[14]的研究表明冻干处理的埃博拉和马尔堡假病毒在4℃环境下可稳定保存12个月以上,这些研究表明适当的储存条件对维持假病毒稳定性至关重要。

新城疫是严重危害养禽业的重要疫病之一,该病于1926年首次发现于印度尼西亚,后来迅速蔓延至其他地区,并造成全球首次新城疫大流行,随后由于鹦鹉和鸽等观赏性鸟类的国际贸易分别造成了全球第二次和第三次新城疫大流行。20世纪90

年代以来,基因VII型NDV的出现导致了全球第四次新城疫大流行^[15-16]。目前,已有多家实验室针对新城疫病毒建立了一系列病原学检测方法。新城疫病毒NP和P基因较为保守,本研究制备了包含P基因的假病毒,可用于建立新城疫病毒通用核酸检测方法,而F基因是区分NDV强弱毒的关键基因,通常作为NDV强弱毒鉴别检测的靶基因。未来可制备包含多基因片段的NDV假病毒,以期能够更全面地满足NDV核酸检测需求。

4 结 论

本研究构建了NDV P基因假病毒,制备了NDV假病毒阳性质控品,经试验证实质控品具有良好的均一性和稳定性,可用于NDV检测方法建立、试剂盒研发,以及NDV核酸检测流程质控,为NDV标准化检测提供了可靠工具。

参考文献(References):

- [1] ZHU F C, LI Y H, GUAN X H, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10240): 1845-1854.
- [2] ZHANG L, LI Q, LIU Q, et al. A bioluminescent imaging mouse model for Marburg virus based on a pseudovirus system [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(8): 1811-1817.
- [3] 克军宏. 新城疫病毒通用荧光RT-PCR检测方法的建立和应用[D]. 塔里木:塔里木大学,2023.
KE J H. Establishment and Application of a Universal Fluorescent RT-PCR Method for the Detection of Newcastle Disease Virus [D]. Tarim: Tarim University, 2023. (in Chinese)
- [4] MATTIUZZO G, ASHALL J, DORIS K S, et al. Development of lentivirus-based reference materials for Ebola virus nucleic acid amplification technology-based assays [J]. *PloS One*, 2015, 10(11): e0142751.
- [5] WANG Y, ZHOU Z, WU X, et al. Pseudotyped viruses [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2023, 1407: 1-27.
- [6] 邓俊花,李昊轩,陈冬杰,等. 用于非洲猪瘟病毒多靶标核酸检测的DNA假病毒制备及定量[J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(7): 3555-3560.
DENG J H, LI H X, CHEN D J, et al. Preparation and quantification of DNA pseudovirus with multi-target

- nucleic acid detection for African swine fever virus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2025, 56(7): 3555-3560.
- [7] DONOFRIO G, FRANCESCHI V, MACCHI F, et al. A simplified SARS-CoV-2 pseudovirus neutralization assay[J]. *Vaccines*, 2021, 9(4): 389-400.
- [8] 龙彩韵,王瑞晨,姚晓慧,等. 乙型脑炎病毒部分NS1基因假病毒的构建[J]. 中国人兽共患学报, 2024, 40(3): 231-235.
- LONG C Y, WANG R C, YAO X H, et al. Construction of a pseudovirus containing partial NS1 gene of Japanese encephalitis virus [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2024, 40(3): 231-235. (in Chinese)
- [9] 胡敏昊,罗婉蓉,夏艺丹,等. 高致病性H5N8亚型禽流感假病毒的制备与验证[J]. 安徽预防医学杂志, 2024, 30(1): 1-5.
- HU M H, LUO W R, XIA Y D, et al. Preparation and validation of a highly pathogenic H5N8 avian influenza pseudovirus [J]. *Anhui Journal of Preventive Medicine*, 2024, 30(1): 1-5. (in Chinese)
- [10] LUO X, WANG C, HUANG Y, et al. Establishment of a neutralization assay for Nipah virus using a high-titer pseudovirus system[J]. *Biotechnol Lett*, 2023, 45(4): 489-498.
- [11] SU C, DING K, XU J, et al. Preparation and application of chikungunya pseudovirus containing double reporter genes[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 9844.
- [12] SENA-ESTEVES M, TEBBETS J C, STEFFENS S, et al. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes [J]. *J Virol Method*, 2004, 122(2): 131-139.
- [13] 黄益曼,宋敬东,韩 辉,等. 尼帕病毒N基因核酸检测方法对假病毒阳性标准品的制备及鉴定[J]. 疾病监测, 2022, 37(8): 1010-1014.
- HUANG Y M, SONG J D, HAN H, et al. Preparation and identification of pseudovirus positive reference material for Nipah virus N gene nucleic acid detection [J]. *Disease Surveillance*, 2022, 37(8): 1010-1014. (in Chinese)
- [14] NETO M M, WRIGHT E, TEMPERTON N, et al. Application and comparison of lyophilisation protocols to enhance stable long-term storage of filovirus pseudotypes for use in antibody neutralisation tests[J]. *J Appl Microbiol*, 2023, 134(2): 1-6.
- [15] ALEXANDER D J. Newcastle disease [J]. *British Poult Sci*, 2001, 42(1): 5-22.
- [16] WESTBURY H. Newcastle disease virus: an evolving pathogen?[J]. *Avian Pathol*, 2001, 30(1): 5-11.

(编辑 白永平)