

猪霍乱沙门菌载体介导猪瘟病毒 DNA 免疫研究

Salmonella choleraesuis C500 Delivering DNA Immunization Against Classical Swine Fever Virus

乔红伟², 孙金福², 韩文瑜², 李作生¹, 余兴龙¹, 涂长春^{1,2*}

QIAO Hong-Wei², SUN Jin-Fu², HAN Wen-Yu², LI Zuo-Sheng¹, YU Xing-Long¹ and TU Chang-Chun^{1,2}

1 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062

2 吉林大学农学部, 长春 130062

1 The Institute of Veterinary Sciences, The Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China

2 Agricultural Division of Jilin University, Changchun 130062, China

摘 要 构建了猪瘟病毒(CSFV)主要保护性抗原 E2 基因的真核表达质粒 pVAXE2。将其电转化猪霍乱沙门氏菌 C500 疫苗株,得到了携带 pVAXE2 质粒的猪霍乱沙门氏菌工程菌株 S. C500/pVAXE2,对该菌株的特征、培养特性和生化特性进行了鉴定。分别用 1×10^8 CFU、 2×10^9 CFU S. C500/pVAXE2 经口服或肌肉注射免疫小鼠和家兔,间接 ELISA 检测免疫动物的特异性抗体。在第三次免疫后 2 周用 20ID₅₀ 猪瘟兔化弱毒和致死量猪霍乱沙门氏菌强毒株对免疫兔进行攻击。结果表明,S. C500/pVAXE2 保持了猪霍乱沙门氏菌原有形态特征、培养特性和生化特性,免疫鼠和兔都产生了抗 CSFV 和猪霍乱沙门氏菌的 ELISA 抗体,免疫家兔能抵抗猪瘟兔化弱毒株和猪霍乱沙门氏菌强毒株的攻击。显示了以 S. C500 为 DNA 运输载体构建二联或多联猪用疫苗的可行性。

关键词 猪瘟病毒, DNA 免疫, 猪霍乱沙门氏菌弱毒疫苗株

中图分类号 Q75 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0865-06

Abstract Classical Swine Fever Virus (CSFV) E2 protein eukaryotic expression plasmid pVAXE2 was constructed. The plasmid pVAXE2 was transformed into *Salmonella choleraesuis* C500(S. C500) attenuated vaccine strain by electroporation to generate *Salmonella choleraesuis* engineering strain S. C500/pVAXE2. The characterization of S. C500/pVAXE2 in morphology, growth, biochemistry and serology indicated that it retained the same properties as its original strain S. C500 with exception of kanamycin resistance originated from the plasmid pVAXE2. The plasmid stable in the bacteria after 15 passages. Kunming mice and rabbits were vaccinated three times at two weeks interval with S. C500/pVAXE2 in oral and intramuscular routes at the dosage of 1×10^8 CFU for mice and 2×10^9 CFU for rabbits each time. The specific antibody response against CSFV and *Salmonella choleraesuis* was detected by ELISA. Two weeks after the third boost the immunized rabbits were challenged with 20 ID₅₀ of hog cholera lapinized virus (HCLV), followed by a virulent strain of *Salmonella choleraesuis* two week later than HCLV challenge. The results showed that all immunized mice and rabbits produced significant antibodies against CSFV and *Salmonella choleraesuis*, and the immunized rabbits demonstrated the effective protection against the challenge of HCLV and virulent *Salmonella choleraesuis*. These results indicated the potential of developing multiplex swine DNA vaccine by using this bacteria as the vector.

Key words CSFV, DNA immunization, *Salmonella choleraesuis*

Received: May 7, 2005; Accepted: July 12, 2005

This work was supported by a grant from The National "863" Project of China (No. 2004AA213101).

* Corresponding author. Tel: 86-431-7960009; E-mail: zhangchun_tu@hotmail.com

国家高技术研究与发展计划项目资助(No. 2004AA213101).

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

基因疫苗的免疫效果与免疫接种方式密切相关,通常基因疫苗免疫采用注射和基因枪免疫两种接种方式。1995年,Sizemore等^[1]提出了以具有侵袭性的减毒胞内寄生菌为载体将真核表达质粒导入宿主细胞的新型接种方式。此后,以减毒志贺氏菌(*Shigella*)^[2]、减毒鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)^[3]、减毒人伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)^[4]、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)^[5]等胞内寄生菌为载体运送基因疫苗的研究相继报道。重组胞内寄生菌经口服或注射免疫后可通过细菌感染的方式将质粒DNA直接导入诸如巨噬细胞、树突细胞(DC)等专职递呈细胞(APC),被运送至相关粘膜和淋巴组织,诱导细胞免疫和体液免疫反应^[6],并可获得对载体菌的免疫。

猪霍乱沙门氏菌C500弱毒株(*Salmonella choleraesuis* C500, S. C500)是我国广泛使用的预防仔猪副伤寒的标准疫苗株^[7],具有良好的免疫原性和安全性。猪瘟(Classical Swine Fever, CSF)是当前危害我国养猪业的重要烈性传染病之一,猪瘟病毒(CSFV)的囊膜蛋白E2蛋白是其主要宿主保护性抗原,用E2基因制备基因疫苗进行免疫,能够诱导产生特异性免疫保护反应^[8]。本研究构建了以S. C500弱毒株为运送载体的CSFV E2基因疫苗工程菌,用口服和注射两种途径免疫实验动物,评价了其对猪瘟病毒和猪霍乱沙门氏菌强毒株攻击的免疫保护效果,初步探索了研制猪瘟和仔猪副伤寒二联疫苗的可行性。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、毒株

真核表达质粒载体pVAX1购自Invitrogen公司,带有卡那霉素抗性基因;猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis* C500)弱毒株购于黑龙江生物制品厂,批号为黑生药字(98)071120;猪霍乱沙门氏菌标准强毒株C78-2(批号078-2 90.3.16)购自中国兽药监察所;猪瘟兔化弱毒疫苗株(HCLV),本室保存;猪瘟兔化弱毒疫苗株基因组全长cDNA(PpoCSFV.DNA)为本室构建^[9]。

1.2 抗原、血清、酶标抗体

大肠杆菌表达并纯化的猪瘟病毒E2抗原、兔抗猪瘟病毒E2抗原阳性血清和阴性血清、鼠抗猪瘟病毒E2抗原阳性血清和阴性血清为本室制备保存;猪霍乱沙门氏菌菌体抗原本室制备;取S. C500弱毒株7h培养物,离心收集细菌,用pH8.0 TE悬浮、洗涤、离

心,菌体再悬浮于1/10体积的pH 7.4 PBS中,超声波裂解菌体,12 000r/min离心10min,收集上清,测定菌体蛋白浓度,保存备用;HRP标记的山羊抗兔IgG和山羊抗鼠IgG酶标二抗购自Sigma公司。

1.3 工具酶、试剂、试剂盒

各种限制酶、T4 DNA连接酶、dNTP分别购自Promega公司、Gibco公司和华美生物工程公司;Taq plus DNA polymerase购自上海生物工程有限公司;司本甘油包裹剂由本室自制^[8];质粒提取和片段回收用DNA回收试剂盒,购自华舜生物工程公司。

1.4 真核表达质粒pVAXE2的构建

1.4.1 CSFV E2基因的PCR扩增:根据已发表的HCLV基因序列[GenBank Accession No. AF091507]设计引物,其中上、下游引物分别引入BamH I和EcoR I酶切位点,以PpoCSFV.DNA为模板扩增E2基因。

上游引物 P1 :CGATCCACCAATCGTATTAACGGGACAGATCGTGC

下游引物 P2 :CGAATTCCTAGTCAAACCGTACTGATATCACC

反应体系:PpoCSFV.DNA模板0.3μL、dNTP 4μL、上下游引物各1μL、buffer 5μL、Taq plus DNA polymerase 0.2μL、去离子水38.5μL至总体积50μL。

循环参数:95℃ 5 min, 95℃ 50s、55℃ 50s、72℃ 2min 25个循环,72℃延伸10 min。扩增产物大小1050bp。

1.4.2 CSFV E2基因真核表达质粒的构建、鉴定及序列测定:用BamH I和EcoR I双酶切PCR扩增产物E2基因片段,用试剂盒回收E2目的片段,克隆到pVAX1相应位点,构建重组表达质粒pVAXE2,并用BamH I和EcoR I双酶切鉴定重组质粒。具体操作参照文献[10]进行。选择重组质粒阳性克隆送上海生物工程技术服务有限公司进行序列测定。

1.5 pVAXE2电转化猪霍乱沙门菌C500株

用基因电转化仪(BTX ECM399 Genetronics, Inc)将pVAXE2电转化S. C500株,构建沙门氏菌工程菌S. C500/pVAXE2,用全菌进行PCR鉴定,同时提取质粒进行酶切鉴定。电转化主要操作步骤:将S. C500接种于50mL液体LB培养基,振荡培养6h,收集菌体,10%无菌甘油洗涤菌体2次,取菌体50μL加入离心管,置液氮速冻10s,加入pVAXE2质粒1μL,混匀,置电极杯中进行电击(电压1300V,电阻200Ω,电容25μF,放电时间5ms)。电转化后,加入600μL LB培养基,混匀,至1.5mL离心管,振荡培养45 min,取100μL涂布卡那抗性平板,37℃过夜培养。

1.6 工程菌 S. C500 /pVAXE2 生长特性、生化特性、药敏特性及血清学鉴定

对工程菌 S. C500 /pVAXE2 进行形态学、生长特性、生化特性、药敏特性及血清学鉴定 ,以受体菌 S. C500为对照 ,方法参照文献进行^[11]。

1.7 质粒稳定性试验

用菌落点种和抗生素选择培养法鉴定质粒在转化菌 S. C500/pVAXE2 中的遗传稳定性^[12]。挑取 S. C500 /pVAXE2 单菌落分别接种于含卡那霉素和无卡那霉素的 LB 中 ,37℃培养 16 ~ 18 h ,分别连续传代 15 代。各取少量第 15 代培养液分别做 1×10^{-6} 稀释 ,取每个稀释度 200 μ L 分别涂布于无卡那霉素的 LB 平板 ,37℃培养 16 ~ 18 h。随机挑取 100 个菌落分别点种于含卡那霉素的 LB 平板上 ,37℃培养 16 ~ 18 h ,进行菌落计数 ,计算菌落生长率。

1.8 实验动物免疫

昆明系小鼠 18 ~ 20 g ,青紫蓝家兔 2 ~ 2.5 kg 分别由长春药检所动物室和长春市高新技术开发区实验动物中心提供。

将实验小鼠随机分为 5 组 ,即实验组为 S. C500 /pVAXE2 胫前肌注射组、S. C500 /pVAXE2 口服组 ;对照组为司苯甘油包裹质粒 pVAXE2 胫前肌注射组、空白 pVAX1 质粒载体转化的猪霍乱沙门氏菌 S. C500 /pVAX1 胫前肌注射组、猪霍乱沙门氏菌 C500 胫前肌注射组 ,实验组与对照组各组每组 10 只。细菌注射或口服免疫组 ,每只小鼠免疫剂量均为 1×10^8 CFU/只 ,质粒注射组免疫剂量为 50 μ g/只。

青紫蓝家兔随机分为 4 组 ,即实验组为 S. C500 /pVAXE2 胫前肌注射组、S. C500 /pVAXE2 口服组 ;对照组为司苯甘油包裹质粒 pVAXE2 胫前肌注射组、司苯甘油包裹质粒 pVAX1 胫前肌注射组 ,实验组与对照组每组各 4 只 ,细菌注射或口服免疫组家兔免疫剂量均为 2×10^9 CFU/只 ,质粒注射组免疫剂量为 0.5mg/只。

实验小鼠及家兔均免疫 3 次 ,每次间隔 2 周。口服组接种前灌服 NaHCO₃ 溶液 ,小鼠 0.5 mL/只、家兔 2mL/只 ;每次免疫前和第三次免疫后 14 d 采血 ,用间接 ELISA 方法检测免疫动物抗 CSFV 特异性抗体水平^[13]。用上述制备的猪霍乱沙门氏菌菌体抗原包被酶标反应板 ,0.15 μ g/孔 ,以间接 ELISA 检测免疫兔抗猪霍乱沙门氏菌特异性抗体水平。

1.9 免疫家兔攻毒

在第三次免疫后 14d ,用 20ID₅₀ 剂量的 HCLV 耳静脉接种家兔(攻毒前进行 ID₅₀ 测定) ,检测体温反

应 1 周 ,绘制体温曲线。待家兔体温正常后 ,每只兔用致死剂量猪霍乱沙门氏菌标准强毒株皮下接种 ,观察家兔免疫保护效果^[7]。

2 结果

2.1 表达 E2 抗原的真核表达质粒的构建与工程菌 S. C500/pVAXE2 的鉴定

将 PCR 扩增的 E2 目的片段(约为 1050bp)用 BamH I /EcoR I 双酶切克隆到 pVAX1 中 ,构建得到含 CSFV E2 基因的 DNA 疫苗质粒 pVAXE2 ,用 BamH I /EcoR I 双酶切鉴定得到约 1050bp 的 E2 目的基因片段 ,测序结果表明目的基因编码序列和阅读框正确。

用重新设计的一对引物对电转化得到的 S. C500/pVAXE2 进行全菌 PCR 鉴定 ,结果扩增得到了与设计相符的 600bp 部分 E2 基因特异片段。用 S. C500/pVAXE2 菌株的培养物提取 pVAXE2 重组质粒进行电泳 ,呈现多条质粒条带现象 ,与转化质粒 pVAXE2 电泳条带不同 ,不能进行酶切鉴定 ,重复进行多次转化和质粒提取 ,结果一致(图 1)。为了证实重组质粒 pVAXE2 在 S. C500/pVAXE2 中是否被降解以及进一步对转化菌质粒进行酶切鉴定 ,将提取自 S. C500/pVAXE2 菌的质粒转化 DH5 α ,再提取质粒进行电泳 ,电泳条带则与转化质粒 pVAXE2 电泳条带完全一致(图 1) ,用 BamH I /EcoR I 双酶切 ,得到 1050bp 的 E2 目的基因片段(图略) ,说明虽然提取自 S. C500 /pVAXE2 菌的质粒电泳呈多条带现象 ,但 pVAXE2 在沙门氏菌中未被降解 ,仍是完整的质粒。

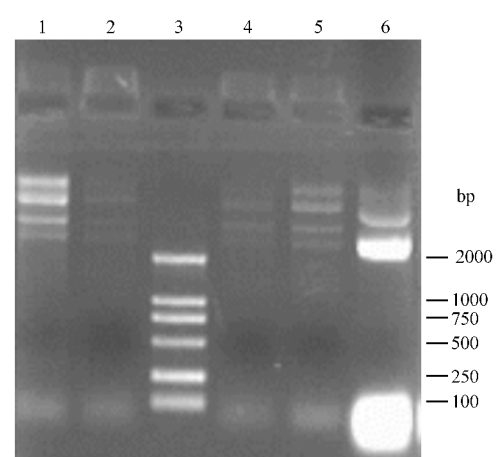


图 1 S. C500/pVAXE2 工程菌中提取质粒的电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of plasmids extracted from different S. C500/pVAXE2 preparations

1、2、4、5 : plasmid from S. C500/pVAXE2 prepared at different time ; 3 : Marker DL2000 ; 6 : plasmid from DH5 α transformed with the plasmid extracted from S. C500/pVAXE2.

2.2 工程菌 S. C500 /pVAXE2 生长特性、生化特性、药敏特性及血清型鉴定

涂片镜检表明工程菌 S. C500 /pVAXE2 仍为革兰氏阴性小杆菌,在含糖 LB 培养基上生长呈无色、透明、光滑、稍扁平的菌落。生化试验表明重组菌能发酵葡萄糖、麦芽糖、甘露糖、木糖、鼠李糖,产酸产气,不发酵乳糖、蔗糖、阿拉伯糖、肌醇,可利用枸橼酸;产生硫化氢;脲基质阴性。工程菌 S. C500 /pVAXE2 获得了卡那霉素抗性。血清学鉴定表明重组菌 S. C500 /pVAXE2 血清型仍为 O7。重组菌 S. C500 /pVAXE2 除药敏特性因质粒转化而改变外,其形态、生长和生化特性以及血清型与受体菌株完全一致。

2.3 S. C500/pVAXE2 的质粒遗传稳定性

S. C500/pVAXE2 菌在卡那霉素和无卡那霉素选择条件下连续传代 15 代,随机点种在含卡那霉素 LB 平板上的菌落生长率为 100%,表明该菌中 pVAXE2 质粒没有丢失,能够稳定遗传。

2.4 免疫小鼠抗 CSFV 特异性血清抗体检测

用 ELISA 方法检测实验组和对照组小鼠抗 CSFV E2 抗体水平,结果 S. C500/pVAXE2 注射和口服免疫小鼠与脂质体包裹质粒 pVAXE2 免疫组小鼠均能产生抗 CSFV E2 抗体,而且 S. C500/pVAXE2 注射和口服免疫组抗体水平相当,但是 2 组的抗体水平均高于 pVAXE2 免疫组。空载体质粒转化菌对照接种组(S. C500/pVAX1)和猪霍乱沙门菌疫苗株接种组均未检测到抗 E2 抗体(见图 2)。

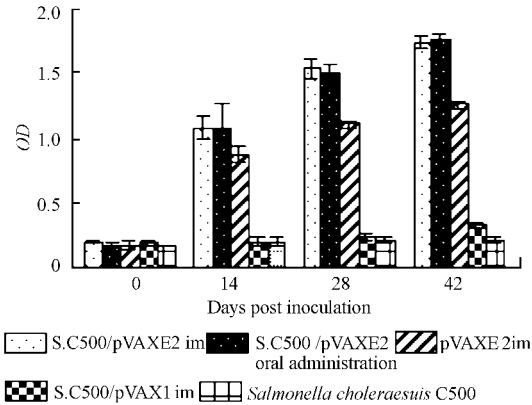


图 2 免疫鼠抗 E2 抗原 ELISA 抗体检测
Fig. 2 Detection of antibody against E2 antigen from immunized mice by ELISA

2.5 免疫家兔血清特异性抗体检测

2.5.1 免疫家兔抗 CSFV 特异性抗体检测:用 ELISA 法检测免疫家兔抗 CSFV E2 特异性抗体,结果显示 pVAXE2 质粒接种组的抗体水平低于工程菌

注射和口服免疫组。S. C500/pVAXE2 注射组经一次免疫接种抗体水平即达高峰,第二次免疫和第三次免疫后抗体水平无明显变化。S. C500 /pVAXE2 口服组第二次免疫后抗体水平达到高峰,与肌注组抗体水平相当(见图 3)。

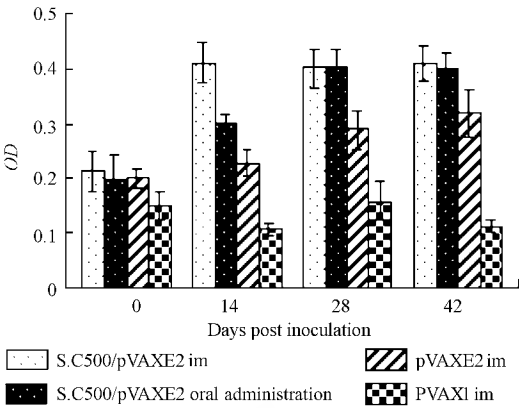


图 3 免疫家兔抗 E2 抗原 ELISA 抗体检测
Fig. 3 Detection of antibody against E2 antigen from immunized rabbits by ELISA

2.5.2 免疫家兔抗猪霍乱沙门氏菌特异性抗体检测:用间接 ELISA 法检测免疫家兔血清中抗猪霍乱沙门氏菌抗体,结果表明 S. C500 /pVAXE2 肌注组和口服组均产生了较高的抗体水平,pVAXE2、pVAX1 质粒免疫组家兔均未检测到抗猪霍乱沙门氏菌抗体(见图 4)。

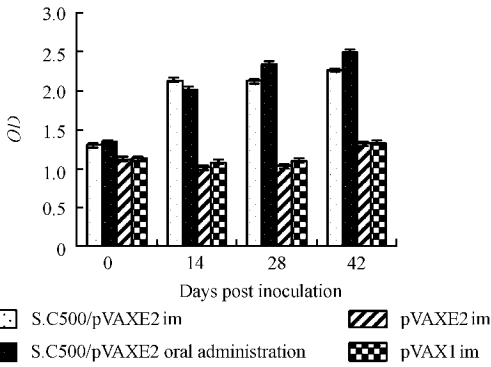


图 4 免疫兔抗猪霍乱沙门氏菌 ELISA 抗体检测
Fig. 4 Detection of antibody against Salmonella choleraesuis from immunized rabbits by ELISA

2.6 免疫家兔攻毒

2.6.1 免疫家兔 HCLV 攻毒:免疫家兔在第三次免疫后 14d,用 20ID₅₀ 的 HCLV 进行攻毒,攻毒 24h 后每隔 8h 测体温一次,绘制平均体温曲线(见图 5)。结果表明 pVAX1 质粒注射对照组的家兔全部呈定型热反应,pVAXE2 质粒免疫组 1/4 只家兔呈现定型热反应,3/4 只家兔为一过性热反应。S. C500/pVAXE2 肌注组和口服免疫组中各有 1/4 只家兔未出现任何热反应,其余家兔为一过性热反应。结果表明工程

菌 S. C500/pVAXE2 注射和口服免疫均诱导家兔产生了一定的抗 HCLV 特异性保护。

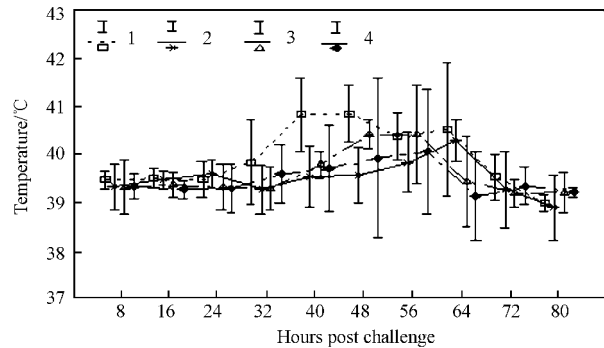


图5 免疫兔 HCLV 攻毒后体温变化

Fig. 5 Body temperature of rabbits challenged with HCLV
1: pVAX1 im; 2: S. C500/pVAXE2 im; 3: S. C500/pVAXE2 oral administration; 4: pVAXE2 im.

2.6.2 免疫家兔猪霍乱沙门菌强毒株攻毒：免疫家兔在 HCLV 攻毒后 2 周，体温恢复正常后，用致死剂量猪霍乱沙门菌强毒株攻毒。结果 pVAXE2、pVAX1 质粒免疫组家兔全部死亡，工程菌肌注免疫组和口服免疫组分别有 3/4 只和 2/3 只家兔获得保护（见表 1）。

表 1 免疫家兔猪霍乱沙门氏菌强毒株攻毒保护结果
Table 1 Protection of immunized rabbits after challenged with virulent *Salmonella choleraesuis* strain

Vaccine	Protection
pVAX1 (im)	0/4
pVAXE2 (im)	0/4
S. C500/pVAXE2 (im)	3/4
S. C500/pVAXE2 (oral administration)	2/3*

*：一只家兔攻毒前意外死亡。

3 讨论

本研究用猪霍乱沙门氏菌疫苗株作为运送载体，初步构建了猪霍乱沙门氏菌工程菌株 S. C500/pVAXE2。以肌注和口服不同途径免疫家兔，均能诱导产生对 HCLV 和致死剂量猪霍乱沙门氏菌标准强毒株攻击的有效保护。而且 S. C500/pVAXE2 免疫组 E2 抗体水平均高于 pVAXE2 质粒免疫组。实验结果证实了猪霍乱沙门氏菌弱毒株可以介导 CSFV 的 DNA 免疫，并产生比单纯质粒免疫高的抗体水平，兔体攻毒试验也初步证明沙门氏菌介导的 DNA 免疫略好于单纯质粒的免疫效果。

沙门氏菌与大肠杆菌不同，用氯化钙处理制备感受态细胞进行质粒转化不易获得阳性转化子，电转化法可获得较高的转化率。这可能是由于沙门氏菌细胞壁富含 LPS，LPS 对进出细胞的物质具有屏障

作用，而 Ca^{2+} 的存在有利于维持 LPS 结构的稳定性。虽然质粒转化后可以在猪霍乱沙门氏菌细胞内稳定地遗传下去，但从转化菌提取的质粒与转化大肠杆菌提取的同一质粒相比，电泳时呈现较多的条带（见图 1），而且不易进行酶切鉴定。对转化菌进行质粒酶切鉴定时，需将提取自工程菌 S. C500/pVAXE2 的质粒再转化 DH5 α ，然后自 DH5 α 中提取质粒进行酶切鉴定（数据略）。多次转化沙门氏菌和质粒提取均为同一结果，推测原因可能是弱毒猪霍乱沙门氏菌细胞内的各种酶类或其它因素（如遗传性状）导致转化的质粒 pVAXE2 形成不同拓扑结构的缘故，说明弱毒猪霍乱沙门氏菌质粒相容性不强，并不十分适合质粒的增殖，需要进行必要的遗传修饰后才能成为合格的质粒载体。目前情况下弱毒猪霍乱沙门氏菌中质粒结构的不均一性是否影响其诱导的 DNA 免疫反应有待进一步阐明。

利用胞内寄生菌为载体介导 DNA 疫苗免疫具有显著的优点，省去了大量制备、纯化质粒的繁琐环节，有利于降低生产成本，且可制备口服基因疫苗。另外，用低拷贝相容性质粒构建外源基因真核表达质粒，共转化沙门氏菌构建多联基因疫苗也具有良好的发展前景^[14]。本研究虽然证实弱毒猪霍乱沙门氏菌可以介导 DNA 免疫，在探索应用该沙门氏菌介导猪病毒性疫病 DNA 免疫方面进行了有益的尝试。但是兔体攻毒试验并没有获得完全保护，说明猪霍乱沙门氏菌能真正成为 DNA 免疫高效载体之前可能需要进行一系列的遗传修饰或改造。

REFERENCES (参考文献)

[1] Sizemore DR , Branstrom AA , Sadoff JC. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* , 1995 , 270 : 299

[2] Sizemore DR , Branstrom AA , Sadoff JC. Attenuated bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Vaccine* . 1997 , 15 (8) : 804 - 807

[3] Darji A , Guzman CA , Gerstel B *et al.* Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium* . *Cell* , 1997 , 91 : 765 - 775

[4] Pasetti MF , Anderson RJ , Noriega FR *et al.* Attenuated deltaguaBA *Salmonella typhi* vaccine strain CVD915 as a live vector utilizing prokaryotic or eukaryotic expression systems to deliver foreign antigens and elicit immune responses. *Clin Immunol* , 1999 , 92 (1) : 76 - 89

[5] Shiao AL , Chen YL , Liao CY *et al.* Prothymosin alpha enhances protective immune responses induced by oral DNA vaccination against pseudorabies delivered by *Salmonella choleraesuis* . *Vaccine* ,

- [6] Dietrich G , Spreng S , Gentschev I *et al.* Bacterial systems for the delivery of eukaryotic antigen expression vectors. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* , 2000 , **10**(5) : 391 – 399
- [7] Ministry of Agriculture Veterinary Biological Product Regulation Committee Compiled. The People 's Republic of China Veterinary Biological Product Regulation , Beijing : Chemical Industry Publishing Company. 2000 , pp. 164 – 166
- [8] Yu X , Tu C , Li H *et al.* DNA-mediated protection against classical swine fever virus. *Vaccine* , 2001 , **19**(11-12) : 1520 – 1525
- [9] Yu XI(余兴龙) , Tu CC(涂长春) , Xu XR(徐兴然) *et al.* Cloning of the Full-length cDNA of HCLV Genome and Phylogenetic Analysis. *High Technology Letters*(高技术通讯) 2003 , **13**(5) : 38 – 42
- [10] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [11] Wang SR(王世若) , Chen ZZ(陈宗泽) , Liang HC(梁焕春) *et al.* Veterinary Microbiology and Immunology Laboratory Procedure. Changchun : Ji Lin People Publishing Company , 1984 , pp. 15 – 70
- [12] Hang JS , Wang CC , Ren DM *et al.* Immunogenicity of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* expressing a 45-peptide hybrid antigen gene of *Plasmodium falciparum* . *Med Col PLA* , 1997 , **12** : 166 – 171
- [13] Yu XI(余兴龙) , Tu CC(涂长春) , Xu XR(徐兴然) *et al.* Development of an indirect ELISA for detection of antibodies against hog cholera virus employing recombinant mE2 expressed in *E. coli* . *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*(中国预防兽医学报) , 1999 , **21**(3) : 220 – 222
- [14] Bauer H , Darji A , Chakraborty T *et al.* Salmonella-mediated oral DNA vaccination using stabilized eukaryotic expression plasmids. *Gene Ther* , 2005 , **12**(4) : 364 – 372