

研究报告

# 表达猪瘟疫病毒 E2 蛋白的重组腺病毒的构建及其在兔体内的免疫原性分析

孙元, 祁巧芬, 梁冰冰, 成丹, 李娜, 于墨洋, 王宇飞, 刘霓虹, 朱庆虎, 仇华吉

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室猪传染病研究室, 哈尔滨 150001

**摘要:** 为了构建猪瘟疫重组腺病毒载体疫苗, 通过细菌内同源重组法构建了含有猪瘟疫病毒 E2 基因的重组腺病毒 rAdV-E2。测定其一步生长曲线, 同时用间接免疫荧光试验和 Western blotting 检测外源基因表达, 然后用 rAdV-E2 免疫家兔, 免疫后 6 周用猪瘟疫化弱毒疫苗株(C 株)进行攻击, 攻毒后 3 d 取其脾脏, 用实时荧光定量 RT-PCR 检测 C 株病毒 RNA。结果表明, 该重组腺病毒传至第 10 代时, 毒价可达  $1.0 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL; 外源基因可在其中得到稳定表达; rAdV-E2 接种兔免疫后 2 周产生猪瘟疫特异性抗体, 免疫后 5 w 抗体达到峰值, 攻毒后 rAdV-E2 接种兔和 C 株接种兔均未出现定型热反应, 从其脾脏也未检测到 C 株病毒 RNA, 而野生型腺病毒接种兔均出现了定型热反应, 并且从其脾脏检测大量 C 株病毒 RNA, 其含量达到了  $10^3$  拷贝/ $\mu$ L 以上。由此表明, rAdV-E2 可望开发为猪瘟疫候选疫苗。

**关键词:** 猪瘟疫病毒, E2 基因, 重组腺病毒, 免疫原性, 家兔

## Generation and Immunogenicity of a Recombinant Adenovirus Expressing the E2 Protein of Classical Swine Fever Virus in Rabbits

Yuan Sun, Qiaofen Qi, Bingbing Liang, Dan Cheng, Na Li, Moyang Yu, Yufei Wang, Nihong Liu, Qinghu Zhu, and Huaji Qiu

Division of Swine Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 15000, China

**Abstract:** Classical swine fever (CSF), which is caused by classical swine fever virus (CSFV), causes significant losses in pig industry in many countries in Asia and Europe. The E2 glycoprotein of CSFV is the main target for neutralizing antibodies. In this study, a recombinant replication-defective human adenovirus expressing the CSFV E2 gene (rAdV-E2) was generated and evaluated for the immunogenicity in rabbits. The results showed that the rabbits immunized with rAdV-E2 developed high-level CSFV-specific antibodies. The rAdV-E2-immunized rabbits were all free of the regular fever and the viral replication in the spleen upon challenge with C-strain, which were seen in the rabbits immunized with the parent adenovirus of rAdV-E2. This indicates that the recombinant adenovirus can be an attractive candidate vaccine against CSF.

**Keywords:** classical swine fever virus, E2 gene, recombinant adenovirus, immunogenicity, rabbit

**Received:** March 16, 2008; **Accepted:** May 5, 2008

**Supported by:** the National High-tech Research and Development Programs of China (863 Programs) (No. 2006AA10A204).

**Corresponding author:** Huaji Qiu. Tel/Fax: +86-451-85935041; E-mail: huajiqiu@hvri.ac.cn

国家高技术研究发展计划项目(“863 计划” No. 2006AA10A204)资助。

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种严重危害养猪业的毁灭性传染病。该病死亡率高达80%~90%,世界动物卫生组织(OIE)将其列入OIE须报告疫病名录,我国也将其列为一类传染病。CSFV为有囊膜的正链RNA病毒<sup>[1]</sup>。基因组大小约为12.3 kb,含有一个大的开放阅读框架(ORF),编码一个由3 898个氨基酸残基组成的多聚蛋白,此多聚蛋白经病毒和宿主细胞酶的作用,形成4个成熟的结构蛋白(C、E<sup>ms</sup>、E1和E2)以及至少7个非结构蛋白。E<sup>ms</sup>和E2糖蛋白是CSFV的主要保护性抗原,均能独自诱导机体产生中和性抗体,保护机体免受强毒的攻击<sup>[2]</sup>。E2蛋白由ORF编码的<sup>690</sup>Arg至<sup>1060</sup>Leu之间的370个氨基酸残基组成,位于病毒囊膜表面,参与病毒的感染过程。在猪瘟疫病毒编码的蛋白中,E2是最不保守的一种蛋白,但又是猪瘟疫病毒的主要保护性抗原,能诱导机体产生中和抗体,成为近年来研制新型疫苗和血清学诊断抗原及CSFV抗原变异的主要对象。

随着分子生物学技术的迅速发展,特别是重组DNA技术的建立,使得各种病毒用作载体成为可能。目前比较成熟的病毒载体主要有逆转录病毒、腺病毒及痘苗病毒等载体。其中,腺病毒载体以其安全、高效、宿主范围广、转移和表达外源基因能力强的特点,成为继逆转录病毒载体后在基因治疗、基因免疫等方面应用开发得较早的一种病毒载体<sup>[3]</sup>。尤其是复制缺陷型腺病毒载体,近年来在活载体疫苗的构建上得到了广泛的应用。这种载体到目前为止已经发展到了第三代,由于缺失了病毒非必要基因区(E1/E3),使得能够携带大片段的外源基因,而且只能够在特定的细胞系中繁殖。另外,该载体系统还引入了CMV启动子,使得外源基因可以高水平的表达<sup>[4]</sup>。

诸多研究证实,利用腺病毒载体构建活载体疫苗有很好的免疫效果。Wang等<sup>[5]</sup>构建了表达猪圆环病毒2型衣壳蛋白的重组腺病毒,将此重组病毒免疫猪后,能够检测到高水平的特异性抗体,攻毒后免疫猪得到完全保护。Zhou等<sup>[6]</sup>构建了表达鸡源鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白(MOMP)基因的重组腺病毒,用重组腺病毒免疫SPF雏鸡,然后用强毒菌株攻击,90%的雏鸡获得了保护。Wesley等<sup>[7]</sup>用表达

H3N2亚型猪流感病毒核蛋白和血凝素蛋白的重组腺病毒接种猪,4w后产生了病毒特异性的HI抗体,并对强毒的攻击提供了完全的保护。为了明确腺病毒是否可以作为猪瘟疫基因工程疫苗载体,本研究构建了表达CSFV E2基因的重组腺病毒,并在家兔上评价了其免疫原性。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、载体和生化试剂

腺病毒载体系统包括腺病毒骨架载体pAdEasy-1和腺病毒穿梭载体pShuttle-CMV,以及大肠杆菌BJ5183感受态菌均购自Stratagene公司,质粒pCDST(含有CSFV E2基因的质粒)<sup>[16]</sup>由军事兽医研究所涂长春研究员惠赠,大肠杆菌JM109、DH5 $\alpha$ 感受态细胞和293T细胞由哈尔滨兽医研究所兽生物国家重点试验室保存。Pme I和Pac I均为NEB BioLabs产品。猪瘟疫兔化弱毒疫苗(C株)由哈尔滨维科生物技术公司生产。

### 1.2 重组腺病毒穿梭载体的构建

用限制性内切酶Bgl II和EcoR V双酶切腺病毒穿梭载体pShuttle-CMV,纯化回收酶切后的载体。用BamH I和EcoR V双酶切pCDST,纯化回收酶切后的E2基因。将目的基因与穿梭载体连接,按常规方法转化至JM109感受态菌,经卡那霉素抗性筛选,挑取菌落接种至5 mL含有卡那霉素的LB液体培养基中,培养过夜,提取质粒,进行PCR、酶切和测序鉴定。测序正确的命名为pSC-E2。

### 1.3 重组腺病毒质粒的获得

将pSC-E2用限制性内切酶Pme I线性化,电转化至含有腺病毒骨架载体AdEasy-1的BJ5183感受态菌(AdEasy-1-BJ5183)中。经卡那霉素抗性筛选,提取质粒,用Pac I酶切鉴定,将阳性重组腺病毒质粒进行测序,正确的命名为pAdV-E2。

### 1.4 转染

将pAdV-E2转化DH5 $\alpha$ 感受态菌,以大量增殖重组质粒。用质粒中量提取试剂盒提取重组腺病毒质粒,用Pac I酶切,乙醇沉淀灭菌,超净工作台无菌吹干,用无菌超纯水溶解沉淀,保证质粒的浓度约为1~2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,用Lipofectamine 2000转染试剂进行转染。具体操作按说明书进行。

## 1.5 重组腺病毒的纯化与鉴定

将包装的初代重组腺病毒(命名为 rAdV-E2)反复冻融后,离心取上清,接种 293 细胞,连续传 10 代,观察细胞病变情况;取 6、8 和 10 代病毒,用蛋白酶 K 处理后,通过 PCR 检测目的基因。同时取 6、8 和 10 代重组腺病毒感染的 293 细胞,用猪瘟病毒 E2 单抗 6E10<sup>[8]</sup>和 HQ06<sup>[9]</sup>进行间接免疫荧光试验及 Western blotting 分析,以检测目的基因的表达情况。

### 1.5.1 间接免疫荧光试验

将 293 细胞铺于 6 孔板中,当长到 80%单层时,接种 20MOI(Multiplicities of infection)rAdV-E2, 48 h 后将 rAdV-E2 感染的 293 细胞用冷丙酮固定 10 min,加入抗 CSFV E2 的单克隆抗体 HQ06, 37°C 作用 2 h,应用 PBS 洗涤后,加入荧光标记羊抗鼠 IgG 37°C 作用 30 min, PBS 洗涤后,吹干,加入缓冲甘油,于荧光显微镜下检测。

### 1.5.2 Western blotting

将感染 rAdV-E2 的 293 细胞用细胞裂液裂解后,收取上清,进行 SDS-PAGE(用表达 CSFV E2 蛋白的重组杆状病毒 rAc-Shimen-E2<sup>[10]</sup>感染的 Sf9 细胞作为阳性对照,用野生型的腺病毒感染的 293 细胞作为阴性对照),之后转印到硝酸纤维素膜上,用脱脂牛奶封闭后,加入抗 E2 的单克隆抗体 HQ06, 37°C 作用 1 h,用 PBS 洗涤后,加入辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG, 37°C 作用 45 min,洗涤后加入 DAB 显色液,观察膜颜色。

## 1.6 重组腺病毒的增殖滴度测定

分别用 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub> 重组腺病毒(rAdV-E2)和野生型腺病毒(wtAdV,应用腺病毒穿梭载体与腺病毒骨架载体同源重组后,在 293 细胞内包装而成)接种 293 细胞,分别于接种后 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 和 72 h 收取病毒并进行毒价测定,建立重组腺病毒与野生型腺病毒的一步生长曲线,分析两者在生长动力学上是否存在差异。

## 1.7 免疫接种与攻毒

选取经 ELISA 方法检测为猪瘟抗体阴性的 14 周龄健康长耳大白兔 15 只(购自黑龙江省生物制品一厂)随机分成 3 组,每组 5 只,第 1 组(1#~5#)经后腿肌肉注射接种 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>(1 mL)的重组腺病毒 rAdV-E2,第 2 组(6#~10#)通过耳静脉注射 100 RID<sub>50</sub> 的猪瘟兔化弱毒疫苗(C 株),第 3 组(11#~15#)接种

wtAdV,接种剂量和途径同第 1 组。免疫后每周对所有家兔通过耳静脉采血,收集血清,应用基于 CSFV E2 蛋白中和性单克隆抗体的阻断 ELISA 试剂盒按说明书检测猪瘟抗体(IDEXX 公司)。免疫后 6 周,用 100 RID<sub>50</sub> C 株通过耳静脉接种对所有试验兔进行攻击,攻毒后每隔 6 h 测定家兔直肠温度,连续测定 3 d,确定家兔是否存在定型热反应。攻毒后 3 d,剖杀所有试验兔,采集脾脏,应用已报到的实时荧光定量 RT-PCR<sup>[11]</sup>检测其中 C 株病毒 RNA 含量。

## 2 结果

### 2.1 重组腺病毒 rAdV-E2 的遗传稳定性及目的基因在细胞中的表达

重组腺病毒 rAdV-E2 传至第 5 代后,于 24~48 h 内细胞病变完全(细胞变大、变圆、聚集成葡萄串样)(图 1)。取第 6、8 和 10 代重组腺病毒,用 PCR 均能检测到目的基因(1.2 kb)(图 2)。用间接免疫荧光试验及 Western blotting 均能检测到 E2 蛋白在 rAdV-E2 感染的 293 细胞中的表达(图 3 和图 4)。

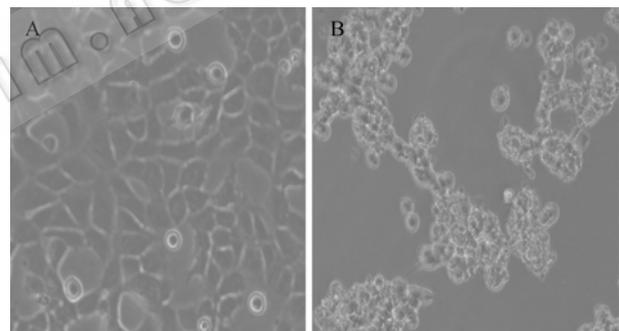


图 1 重组腺病毒 rAdV-E2 在 293 细胞上引起的细胞病变  
Fig. 1 CPEs in 293 cells induced by infection with rAdV-E2  
(A) normal 293 cells; (B) 293 cells infected with rAdV-E2

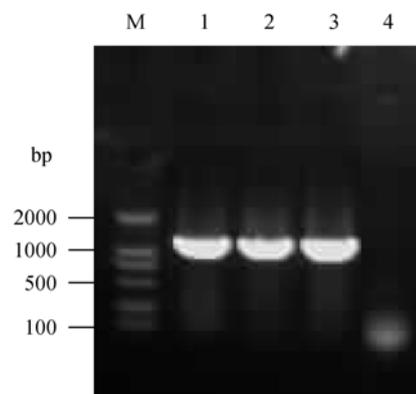


图 2 重组腺病毒 rAdV-E2 的 PCR 鉴定  
Fig. 2 Identification of rAdV-E2 by PCR  
M: DL 2000 marker; 1~3: rAdV-E2 of passages 6, 8 and 10; 4: H<sub>2</sub>O control

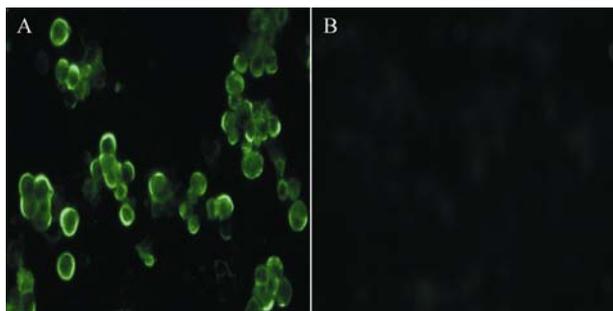


图 3 用间接免疫荧光试验检测重组腺病毒 rAdV-E2 感染 293 细胞中 E2 蛋白表达

Fig. 3 Detection of E2 expression in 293 cells infected with the recombinant adenovirus rAdV-E2 by indirect immunofluorescence assay

(A) rAdV-E2 infected 293 cells; (B) wtAdV infected 293 cells

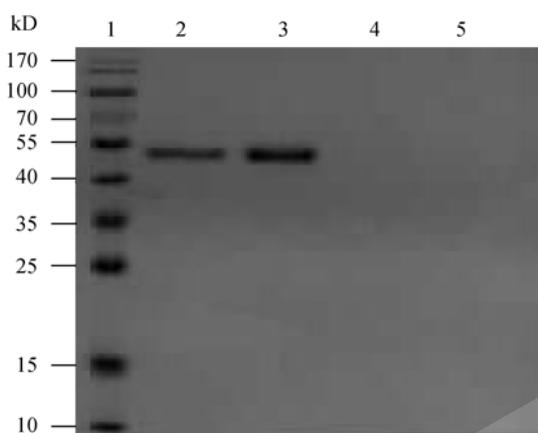


图 4 用 Western blotting 分析 E2 蛋白在重组腺病毒 rAdV-E2 感染细胞中的表达

Fig. 4 Western blotting analysis of E2 protein expression in rAdV-E2 infected 293 cells using anti-E2 monoclonal antibody

1: prestained protein marker; 2: rAdV-E2 infected 293 cells; 3: baculovirus expressed recombinant E2 protein<sup>[10]</sup>; 4: normal 293 cells; 5: wild-type adenovirus infected 293 cells

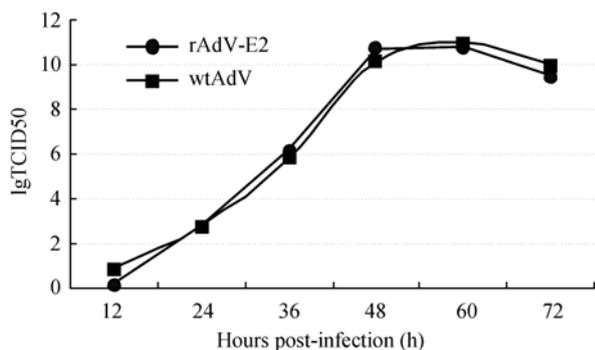


图 5 重组腺病毒 rAdV-E2 的一步生长曲线

Fig. 5 The one-step growth curve of the recombinant adenovirus rAdV-E2

## 2.2 重组腺病毒 rAdV-E2 的一步生长曲线

通过病毒滴度测定,发现重组腺病毒 rAdV-E2 与其亲本病毒一步生长曲线(即病毒增殖滴度与时

间关系的曲线,反映病毒生长繁殖规律)没有明显差异(图 5)。电镜观察显示,重组腺病毒感染 293 细胞后 24 h,可观察到少量完整病毒粒子,大部分没有核酸;在感染后 48 h 病毒粒子几乎全部组装完全,病毒滴度达到峰值,随后逐渐减少(结果未显示)。

## 2.3 重组腺病毒 rAdV-E2 诱导的免疫应答

rAdV-E2 免疫组于免疫后 2 周开始产生猪瘟特异性抗体(抗体阻断率大于 40%),随后抗体水平逐渐升高,于免疫后 5 周抗体达到峰值,正如预期,C 株免疫组免疫后 1 周开始产生较高滴度猪瘟抗体,并持续升高至免疫后 5 周,而 wtAdV 免疫对照组一直没有产生猪瘟特异性抗体(图 6)。

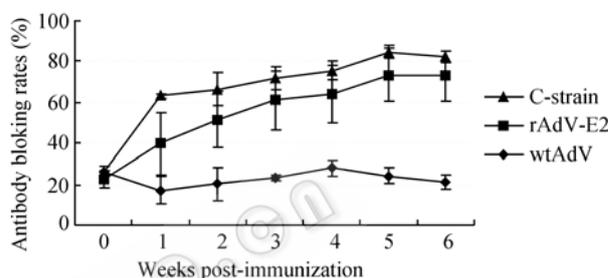


图 6 重组腺病毒 rAdV-E2 免疫兔后产生的抗体滴度

Fig. 6 Detection of serum antibody titers induced by the recombinant adenovirus rAdV-E2 in rabbits using blocking ELISA

## 2.4 重组腺病毒 rAdV-E2 对免疫兔的保护作用

攻毒后 rAdV-E2 免疫兔和 C 株免疫兔均未出现定型热反应,而 wtAdV 对照组家兔全部(5/5)出现了定型热反应(图 7),实时荧光定量 RT-PCR 检测结果

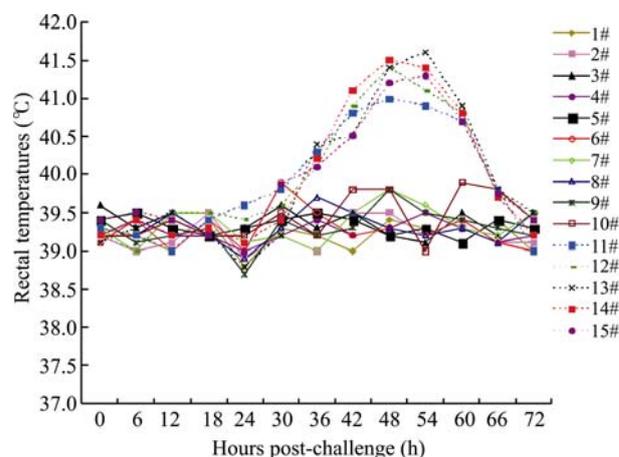


图 7 用 C 株攻毒后免疫兔产生的定型热反应

Fig. 7 Fever reactions of the immunized rabbits following challenge with C-strain

表明,从 rAdV-E2 免疫兔脾脏中均没有检测到 C 株病毒 RNA,而从接种 wtAdV 对照兔脾脏中均能检测到病毒 RNA,含量达到了  $10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  以上(表 1)。这说明,AdV-E2 可诱导机体产生猪瘟特异性抗体,此抗体对猪瘟病毒攻击具有保护作用。

表 1 用实时荧光定量 RT-PCR 检测攻毒后免疫兔脾脏内猪瘟病毒 RNA 含量

Table 1 Detection of the viral RNA in the spleens of the immunized rabbits following challenge with C-strain by real-time RT-PCR

Groups	Numbering of rabbits	Viral RNA loads of C-strain (copies/ $\mu\text{L}$ )
rAdV-E2	1#	-
	2#	-
	3#	-
	4#	-
	5#	-
	6#	-
	7#	-
C-strain	8#	-
	9#	-
	10#	-
	11#	$3.83 \times 10^3$
wtAdV	12#	$7.20 \times 10^4$
	13#	$1.81 \times 10^3$
	14#	$5.81 \times 10^3$
	15#	$6.12 \times 10^3$

-: not detectable

### 3 讨论

近年来, E1 和 E3 区缺失的腺病毒载体越来越得到研究者的青睐,因为这种载体有诸多优势:安全、易于制备、操作方便、可携带较大的外源片段、可感染的宿主细胞多、导入效率高、理化性质稳定、易于分离纯化、不整合到宿主细胞的基因组中<sup>[12]</sup>。另外,重组腺病毒可同时表达多个基因,而且还可以对表达产物进行正确的翻译后修饰,应用这种腺病毒载体构建的活载体疫苗在诱导体液免疫上较 DNA 疫苗及灭活疫苗效果好,而且在动物体内不存在人腺病毒抗体,不用考虑母源抗体的干扰问题<sup>[13]</sup>。

目前,已有用腺病毒载体构建表达 CSFV 主要保护抗原的重组疫苗的报道。Hammond 等<sup>[14]</sup>构建了表达 CSFV E2 基因的重组猪腺病毒(Recombinant porcine adenovirus, rPAdV),用该重组腺病毒免疫猪

后能够完全抵抗致死量 CSFV 的攻击。Hammond 等<sup>[15]</sup>又将表达 E2 基因的质粒 DNA 对猪只进行初免,然后用表达 E2 基因的重组猪腺病毒加强免疫,这种免疫策略能使猪抵抗致死量 CSFV 的攻击。

本研究应用了复制缺陷型腺病毒载体系统,构建了含有猪瘟病毒 E2 基因的重组腺病毒 rAdV-E2,应用 Western blotting 及间接免疫荧光试验均能检测到猪瘟病毒 E2 蛋白的表达。通过比较 rAdV-E2 与野生型腺病毒的一步生长曲线,发现两者在增殖特点上没有明显区别。为了分析 rAdV-E2 是否具有免疫原性,在兔体上进行了免疫攻毒试验。试验结果显示,免疫后 2 周即可检测到猪瘟特异性抗体的产生,在免疫后 5 周抗体滴度达到峰值(部分家兔抗体阻断率达到 80%以上),这说明 rAdV-E2 具有较好的免疫原性。从抗体曲线图中可看出, rAdV-E2 免疫组的抗体略低于猪瘟病毒 C 株免疫组,笔者认为这可能与疫苗免疫原性和免疫途径有关。由于本研究中应用的是 E1 和 E3 区缺失的腺病毒载体,免疫后不产生针对 E1 和 E3 的抗体,而抗腺病毒载体抗体主要由这两种蛋白诱导,所以加强免疫时无需考虑抗腺病毒载体抗体的问题,因此可以用构建的猪瘟重组腺病毒 rAdV-E2 进行加强免疫,从而使接种动物达到更好的免疫效果。

C 株是在家兔上反复传代致弱而得到的一株猪瘟弱毒疫苗,对猪只有良好的安全性和免疫效力。尽管 C 株对不同年龄猪没有致病性,但对家兔(特别是大白兔)有一定的致病性,通过耳静脉接种家兔可以产生定型热(体温升高  $1^\circ\text{C}$  以上,持续 12 h 以上),并且疫苗病毒在体内淋巴组织内广泛复制,其中脾脏中病毒含量最高。因此,通常采用耳静脉接种家兔,在其发热后期取其脾脏来制备 C 株疫苗种毒。接种过 C 株的家兔(获得免疫保护)再次接种 C 株时则不再出现定型热。利用 C 株在家兔上的这一特点,可以评价疫苗的免疫效力。本研究以家兔作为模型评价了构建的重组腺病毒 rAdV-E2 的免疫效力。首先用 rAdV-E2 接种家兔,然后用 C 株进行攻击,结果显示,接种 rAdV-E2 的家兔与接种 C 株的家兔一样,攻毒后均未出现定型热,并且用我们建立的实时荧光定量 RT-PCR 从其脾脏中均未检出猪瘟弱毒疫苗 RNA,而接种野生型腺病毒的对照家兔在攻毒后全部出现定型热,并且在其脾脏中可检出大量拷

贝的弱毒 RNA( $10^3$  拷贝数/ $\mu\text{L}$  以上), 这表明, rAdV-E2 可以保护家兔免于 C 株的攻击。

猪瘟重组腺病毒 rAdV-E2 在兔体上显示了很好的免疫效力, 这为其在猪体上的免疫效力评价提供了依据。当然, 该候选疫苗对猪只的确切免疫保护效果有待于进一步验证。目前, 猪体免疫效力试验正在进行中。

## REFERENCES

- [1] Moennig V. Introduction to classical swine fever virus, disease and control policy. *Vet Microbiol*, 2000, **73**(2-3): 93-102.
- [2] Meyers G, Tautz N, Stark R, *et al.* Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*, 1992, **91**(1): 368-386.
- [3] Adam E, Nasz I. Significance of recombinant adenovirus in experimental gene therapy. *Orv Hetil*, 1995, **136**(15): 755-761.
- [4] Ambriović A, Adam M, Monteil M, *et al.* Efficacy of replication-defective adenovirus-vectored vaccines: protection following intramuscular injection is linked to promoter efficiency in muscle representative cells. *Virology*, 1997, **238**(2): 327-335.
- [5] Wang X, Jiang P, Li Y, *et al.* Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol*, 2007, **121**(3-4): 215-224.
- [6] Zhou J, Qiu C, Cao XA, *et al.* Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydomonas psittaci* in chicks. *Vaccine*, 2007, **25**(34): 6367-6372.
- [7] Wesley RD, Tang M, Lager KM. Protection of weaned pigs by vaccination with human adenovirus 5 recombinant viruses expressing the hemagglutinin and the nucleoprotein of H3N2 swine influenza virus. *Vaccine*, 2004, **22**(25-26): 3427-3434.
- [8] Peng WP. Epitope identification of classical swine fever virus E2 protein by phage display. *Master Degree Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences*, 2007.
- [9] 彭伍平. 利用噬菌体展示技术鉴定猪瘟病毒 E2 蛋白抗原表位. 中国农业科学院研究生院硕士论文, 2007.
- [9] Hou Q, Peng WP, Sun Y, *et al.* Expression of the truncated E2 protein of Classical swine fever virus in *Escherichia coli* and preparation of a monoclonal antibody against the E2 protein. *Vet Sci China*, 2008, **38**(1): 6-10.
- [9] 侯强, 彭伍平, 孙元, 等. 猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原区编码基因的原核表达及其单克隆抗体的制备. *中国兽医科学*, 2008, **38**(1): 6-10.
- [10] Peng WP, Xia ZH, Hou Q, *et al.* Differences in glycosylation of the E2 protein between virulent Shimen strain and a virulent C-strain of classical swine fever virus. *Chin J Virol*, 2007, **23**(5): 389-393.
- [10] 彭伍平, 夏照和, 侯强, 等. 猪瘟病毒石门强毒株和兔化弱毒疫苗株 E2 蛋白糖基化位点差异分析. *病毒学报*, 2007, **23**(5): 389-393.
- [11] Zhao JJ, Cheng D, Li N, *et al.* Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of Classical swine fever virus. *Vet Microbiol*, 2008, **126**(1-3): 1-10.
- [12] Randrianarison-Jewtougoff V, Perricaudet M. Recombinant adenoviruses as vaccines. *Biologicals*, 1995, **23**(2): 145-157.
- [13] Bangari DS, Mittal SK. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine*, 2006, **24**(7): 849-862.
- [14] Hammond JM, McCoy RJ, Jansen ES, *et al.* Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever. *Vaccine*, 2000, **18**(11-12): 1040-1050.
- [15] Hammond JM, Jansen ES, Morrissy CJ, *et al.* A prime-boost vaccination strategy using naked DNA followed by recombinant porcine adenovirus protects pigs from classical swine fever. *Vet Microbiol*, 2001, **80**(2): 101-119.
- [16] Yu X, Tu C, Li H, *et al.* DNA-mediated protection against classical swine fever virus. *Vaccine*, 2001, **19**(11-12): 1520-1525.