

• 动物及兽医生物技术 •

## 表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的重组猪瘟疫化弱毒疫苗株的构建与鉴定

张玲楷, 李永锋, 谢利豹, 孙元, 王晓, 仇华吉

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江 哈尔滨 150069

张玲楷, 李永锋, 谢利豹, 等. 表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的重组猪瘟疫化弱毒疫苗株的构建与鉴定. 生物工程学报, 2018, 34(2): 216–223.

Zhang LK, Li YF, Xie LB, et al. Generation and characterization of recombinant classical swine fever virus C-strain expressing the cap protein of porcine circovirus type 2. Chin J Biotech, 2018, 34(2): 216–223.

**摘要:** 猪瘟 (CSF) 是由猪瘟病毒 (CSFV) 引起的一种毁灭性传染病, 给养猪业造成重大经济损失。猪瘟兔化弱毒疫苗 (C 株) 是一株非常安全、有效的优秀弱毒疫苗, 对各年龄和品种的猪都极其安全, 同时对不同基因亚型的 CSFV 均能提供有效的免疫保护。在现地, CSFV 和猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 混合感染的现象时常发生, 有必要研制针对这两种病毒混合感染的二价疫苗。本研究首次构建了表达 PCV2 Cap 蛋白的重组 C 株, 并评价了其在体内外的特性。结果表明, 该重组病毒与 C 株具有相近的体外增殖特征, 能够稳定表达 Cap 蛋白, 在家兔体内具有与 C 株相似的生物学表型, 在免疫家兔后 10 d, 抗 CSFV E2 抗体全部转阳, 然而抗 Cap 抗体未能转阳。本研究为进一步优化表达 PCV2 Cap 蛋白的重组 C 株奠定了基础。

**关键词:** 猪瘟病毒, 猪圆环病毒 2 型, 活病毒载体, 免疫原性

## Generation and characterization of recombinant classical swine fever virus C-strain expressing the cap protein of porcine circovirus type 2

Lingkai Zhang, Yongfeng Li, Libao Xie, Yuan Sun, Xiao Wang, and Hua-Ji Qiu

Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, Heilongjiang, China

**Abstract:** Classical swine fever (CSF), caused by classical swine fever virus (CSFV), is a devastating viral disease in swine, leading to significant economic losses to the pig husbandry. C-strain is one of the best modified live vaccines against CSF. The vaccine is highly safe and efficacious and can provide rapid and complete protection against essentially all genotypes of CSFV. Co-infections of pigs with CSFV and porcine circovirus type 2 (PCV2) occur frequently in the field, making it difficult

**Received:** June 24, 2017; **Accepted:** October 30, 2017

**Supported by:** Scientific Key Project of Harbin, China (No. 2014RFXJ045).

**Corresponding author:** Huaji Qiu. Tel/Fax: +86-451-51051708; E-mail: huajiqu@hvri.ac.cn

哈尔滨市优秀学科带头人项目 (No. 2014RFXJ045) 资助。

to control the associated diseases. Here, a recombinant C-strain rHCLV-Cap expressing the Cap protein of PCV2 was constructed and evaluated *in vitro* and *in vivo*. The recombinant had comparable phenotypes to C-strain in cell cultures and rabbits. At ten days post-immunization, anti-E2, but not anti-Cap, antibodies were detected in the rabbits inoculated with the recombinant virus. Our study warrants further work to construct C-strain-based bivalent vaccines.

**Keywords:** classical swine fever virus, porcine circovirus type 2, live virus vector, immunogenicity

猪瘟 (Classical swine fever, CSF) 是由猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 引起的一种严重危害养猪业的毁灭性传染病。临床上主要以高热稽留、广泛性出血和高死亡率为主要特征<sup>[1]</sup>。世界动物卫生组织 (OIE) 将其列入 OIE 疫病名录, 为须申报的动物传染病。我国制定的《国家中长期动物疫病防治规划 (2012–2020 年)》将其列为五种优先防治的“一类动物疫病”之一。尽管美国、加拿大和新西兰等部分发达国家消灭了该病, 但它仍是世界和我国养猪业的重要威胁<sup>[2–3]</sup>。

CSFV 是有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 为黄病毒科瘟病毒属成员, 基因组长约 12.3 kb, 含有一个开放阅读框 (ORF), 在宿主和病毒酶系统的作用下, 形成 4 种结构蛋白 (C、E<sup>ns</sup>、E1 和 E2) 和 8 种非结构蛋白 (N<sup>pro</sup>、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)<sup>[4–5]</sup>。

猪圆环病毒病 (Porcine circovirus-associated disease, PCVAD) 是由猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus 2, PCV2) 引起的多种病症的总称。PCV2 主要侵害免疫系统, 降低机体的抵抗力和免疫应答反应, 导致感染的猪只产生免疫抑制和继发感染其他病原微生物, 从而使死亡率明显上升<sup>[6]</sup>。该病可导致仔猪断奶后多系统综合征、皮炎和肾病综合征、繁殖障碍、肠道疾病、仔猪先天性震颤和仔猪渗出性皮炎等疾病, 给全球养猪业造成了巨大的经济损失。根据基因组序列不同, PCV2 分为 PCV2a、PCV2b、PCV2c 和 PCV2d 四个基因型, 近几年出现的 PCV2d 已逐渐成为优势基因型<sup>[7–8]</sup>。

近年来, 随着养猪规模的扩大, CSF 的流行和发病特点以及表现形式也发生了很大变化, 急性和典型性 CSF 病例在逐渐减少, 多以非典型性、慢性及隐性 CSF 形式出现<sup>[9]</sup>。研究发现, CSFV 常与其他病毒性、细菌性或寄生虫性病原混合感染, 其中尤其以 PCV2、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、伪狂犬病病毒 (PRV) 等病毒性疾病混合感染最常见<sup>[10]</sup>。猪群感染 PCV2、PRRSV 和 PRV 后, 不仅可直接危害猪只健康, 还可侵害猪体的免疫系统, 造成免疫抑制, 降低猪体对 CSFV 等病原体的抵抗力和对疫苗的反应性。研究表明, PCV2、PRV、PRRSV 单独或混合感染猪体后会影响 CSF 疫苗的免疫效果, 导致 CSFV 在猪体内的长期存留, 引起持续感染<sup>[11]</sup>。

猪瘟兔化弱毒疫苗株 (C 株或 HCLV 株) 是我国学者在 20 世纪 50 年代通过将 CSFV 强毒株在兔体内连续传 480 余代后培育而成的<sup>[12]</sup>。C 株是一株非常安全有效的弱毒疫苗, 可同时诱导体液免疫和细胞免疫, 对各种年龄的家猪和野猪均安全<sup>[12]</sup>; 用 C 株接种后 2–4 d, 即能对不同基因型的 CSFV 株均提供有效保护<sup>[13–14]</sup>。因此, 从安全性和免疫原性上看, C 株具有作为活病毒载体的潜力和优势。

本研究中, 我们在 C 株感染性克隆 N<sup>pro</sup> 蛋白的氨基酸 13 和 14 之间引入 PCV2 的主要保护性抗原 Cap 基因, 获得能够稳定表达 Cap 蛋白的重组病毒, 并评价该重组病毒在家兔体内的生物学特性和免疫原性, 为研制猪瘟和猪圆环病毒病二价疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、细胞和病毒

C株的感染性克隆 pCSFV-HCLV 和包含 *Cap* 基因的质粒 pMD18T-Simple-VP2-2A-Cap 由本实验室保存。SK6 细胞用含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (不含牛病毒性腹泻病毒和牛病毒性腹泻病毒的抗体) 培养, 并放置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 温箱中。C 株 (HCLV 株) 以及从感染性 cDNA 克隆拯救出的 C 株 (rHCLV) 均在 SK6 细胞中培养, 猪圆环灭活疫苗 LG 株购自维科生物技术有限公司。

### 1.2 感染性克隆 pHCLV-Cap 的构建

我们以感染性克隆 pCSFV-HCLV 为骨架构建重组感染性克隆 pHCLV-Cap (图 1)。简言之, 用表 1 中列出的引物通过重叠 PCR 将 *Cap* 基因插入到 N<sup>pro</sup> 蛋白第 13 位和第 14 位氨基酸之间。然后, 将 PCR 产物通过分子克隆技术克隆至 pCSFV-HCLV 获得 pHCLV-Cap, 并用多种核酸限制性内切酶和序列测定对获得的 pHCLV-Cap 进行鉴定。

### 1.3 重组病毒 rHCLV-Cap 的拯救

我们用之前报道的方法<sup>[15]</sup>拯救重组 C 株

rHCLV-Cap。具体操作步骤如下: 将 6 μg pHCLV-Cap 转染至 SK6 细胞, 然后将细胞传代 15 次。通过 3 次反复冻融收获病毒。用 CSFV 抗原捕获试剂盒检测重组病毒 rHCLV-Cap 第 1-15 代 E<sup>ms</sup> 蛋白的表达。通过 RT-PCR 从拯救出的病毒上清中提取的病毒基因组中扩增 N<sup>pro</sup>-*Cap* 融合基因、E2、NS5B 或者其他基因, 并进行测序鉴定。

### 1.4 间接免疫荧光试验

将拯救的病毒 rHCLV-Cap 接种于生长至 70% 单层的 SK6 细胞中, 2 h 后用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗 2 遍, 然后加入新鲜的含 2% 胎牛血清的 DMEM, 在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 环境中继续培养, 48 h 后弃上清, 用 4 °C 预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗细胞 2 次, 然后用 -20 °C 预冷的无水乙醇固定细胞 20 min, 加入针对 CSFV E2 蛋白的单克隆抗体 HQ06 或 PCV2 Cap 单克隆抗体 3A5, 37 °C 作用 2 h 后用 PBS 洗涤 3 次, 加入 1:100 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (Sigma 公司), 置于湿盒中 37 °C 作用 45 min, 用 PBS 分别洗涤 3 次后, 置于倒置荧光显微镜下观察。

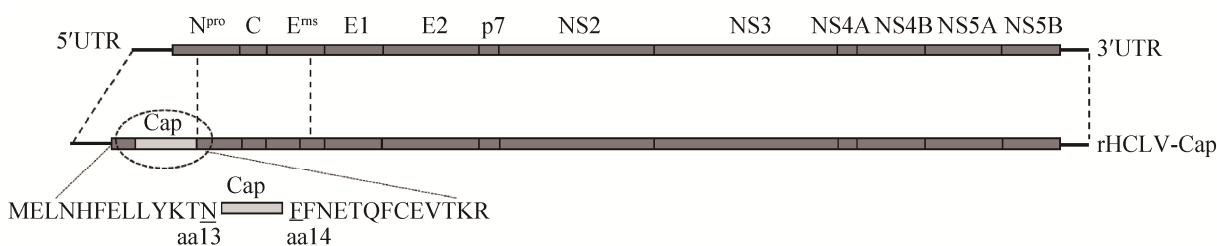


图 1 全长感染性克隆 pHCLV-Cap 的构建策略

Fig. 1 Strategy for the construction of pHCLV-Cap.

表 1 构建 pHCLV-Cap 所用的引物

Table 1 Primers used for construction of pHCLV-Cap

Primers	Sequences (5'-3')
pHCLV-Cap-F1	CACCTCGAGATGCTACGTG
pHCLV-Cap-R1	GTAACGCCTCCTTGGATACGGTTTGTGTTTGTATAA AAGTTCAAAG
pHCLV-Cap-F2	CTTTGAACCTTTTATACAA AACAAACACGTATCCAAGGAGGCGTTAC
pHCLV-Cap-R2	TACACCGGTTCCCTCCACTCCCATTTGGTTTTGTGTTAGGGTTAAGTGGGGGGTC

### 1.5 重组病毒的生长曲线测定

将 rHCLV-Cap 和 C 株分别以感染复数 (MOI) 为 0.1 的剂量接种于铺有 SK6 细胞的 24 孔板中, 37 °C 感染 2 h 后, 弃去病毒液, 更换新的培养液, 再将细胞放在含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 温箱中培养。每 12 h 反复冻融收获病毒, 用 Reed-Münch 方法通过间接免疫荧光试验检测收获病毒的滴度<sup>[16]</sup>, 并用 TCID<sub>50</sub>/mL 表示。实验重复 3 次, 然后计算出平均值和标准偏差。

### 1.6 家兔接种试验

动物实验已经过中国农业科学院哈尔滨兽医研究所动物福利委员会的批准, 其许可证为 SYXK(黑龙江) 2011022。我们将 27 只 14 周龄新西兰白兔随机分为 5 组, 每组 6 只 (除 D 组 3 只外)。A 组家兔通过耳缘静脉接种 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> rHCLV-Cap, B 组接种 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> rHCLV, C 组接种 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> C 株, D 组皮下接种 LG 株, E 组接种 1 mL 的 DMEM。接种之后, 每 6 h 记录家兔的直肠温度来监测它们的定型热反应, 接种后第 3 天从 A、B、C 和 E 组中随机选取 3 只家兔进行安乐处死, 采集家兔脾脏, 用荧光定量 RT-PCR 检测家兔脾脏中病毒的 RNA 拷贝数; 在接种后 3 w, 对 D 组的 3 只家兔及其他组剩余的 3 只家兔进行加强免疫, 免疫剂量及途径同初次免疫。

整个试验过程中, 每隔 3 天采集所有组家兔的血清, 将采集到的家兔血清样本用 CSFV 抗体 ELISA 检测试剂盒 (IDEXX) 和 PCV2 抗体 ELISA 检测试剂盒分别检测抗 E2 抗体和抗 Cap 抗体。

### 1.7 阻断 ELISA

免疫前以及免疫后每 3 天采血, 分离血清。用猪瘟抗体检测试剂盒 (IDEXX 公司, 批号 C281) 和 PCV2 Cap 抗体检测试剂盒 (Synbiotics 公司, 批号 SCIRCO1N17) 检测抗体水平, 具体操作方法见说明书。

### 1.8 定量 PCR/RT-PCR

我们通过荧光定量 RT-PCR 检测家兔脾脏中的病毒 RNA 水平<sup>[17]</sup>。具体方法如下: 25 μL 缓冲液的反应体系中包含 3 μL cDNA, 2.5 μL 10× Ex Taq 缓冲液, 2 μL dNTPs (各含 2.5 mmol/L), 各 1 μL HCLV-F 和 HCLV-R (10 μmol/L), 0.5 μL HCLV-JOE (10 μmol/L) 探针和 2 U Hot Star EX Taq DNA 聚合酶。循环条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s 和 60 °C 退火/延伸 45 s (40 个循环)。每个样本的实验进行 3 次重复。通过标准曲线计算病毒基因组的 RNA 拷贝数。

### 1.9 统计学分析

应用 SPSS 统计学软件对所有数据进行统计学分析, 比较各组间的差异。其中,  $P \geq 0.05$  为差异不显著,  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组病毒 rHCLV-Cap 的获得

将重组感染性克隆 pHCLV-Cap 转染 SK6 细胞拯救重组病毒 rHCLV-Cap, 用 IDEXX 猪瘟病毒抗原检测 ELISA 试剂盒对第 1–15 代的 SK6 细胞上清检测, 结果显示, 所拯救的第 10–15 代的重组病毒的 E<sup>ms</sup> 蛋白抗原为阳性 (图 2)。

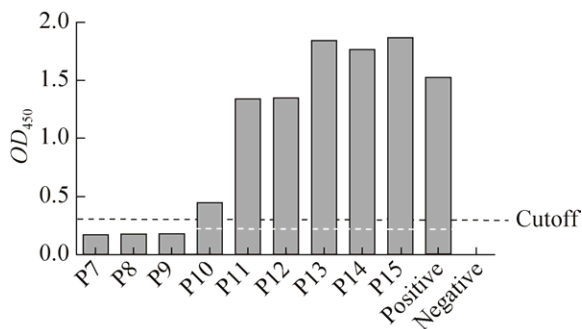


图 2 重组病毒 rHCLV-Cap 抗原捕获 ELISA 的检测  
Fig. 2 Detection of the recombinant virus rHCLV-Cap by antigen-capture ELISA.

按照病毒 RNA 提取说明书提取病毒基因组 RNA 后, 通过 RT-PCR 扩增并测序目的基因, 结果表明重组病毒基因组 RNA 包含  $N^{pro}$ -Cap 基因并与预期大小一致 (约 1.2 kb), 测序结果显示,  $N^{pro}$ -Cap 基因不存在任何突变。以上结果表明, 我们获得了包含 Cap 基因的重组病毒 rHCLV-Cap。

## 2.2 外源蛋白在重组病毒 rHCLV-Cap 中的表达

为了鉴定获得的重组病毒 rHCLV-Cap 中 Cap 蛋白的表达, 将 rHCLV-Cap 感染 SK6 细胞 48 h 后, 通过间接免疫荧光检测 Cap 蛋白, 结果显示, 用鼠源抗 Cap 单抗检测到感染重组病毒 rHCLV-Cap 的细胞产生特异性荧光 (图 3)。结果表明, 重组病毒 rHCLV-Cap 能够表达外源 Cap 蛋白。

## 2.3 重组病毒的生长动力学和遗传稳定性

我们评估了 rHCLV-Cap 的体外生长特性。重组病毒 rHCLV-Cap 与亲本病毒, 有着相似的生长能力 (图 4), 这表明 Cap 基因的插入不影响重组病毒的生长能力。

为了评价插入的 Cap 基因在病毒基因组中的

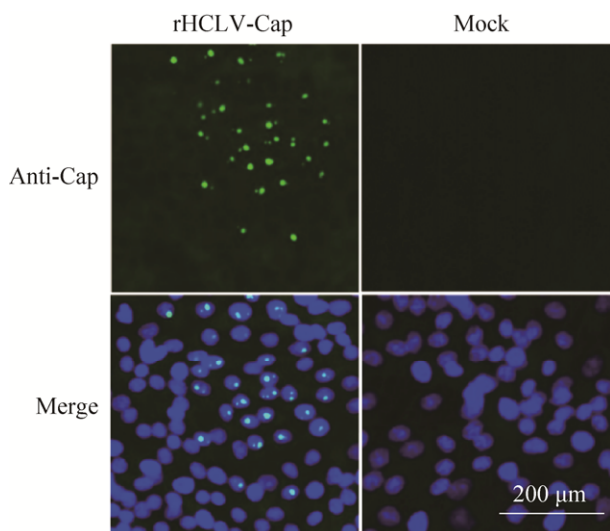


图 3 间接免疫荧光试验检测 Cap 蛋白在重组病毒 rHCLV-Cap 中的表达

Fig. 3 The expression of the Cap protein in the recombinant virus rHCLV-Cap examined by IFA.

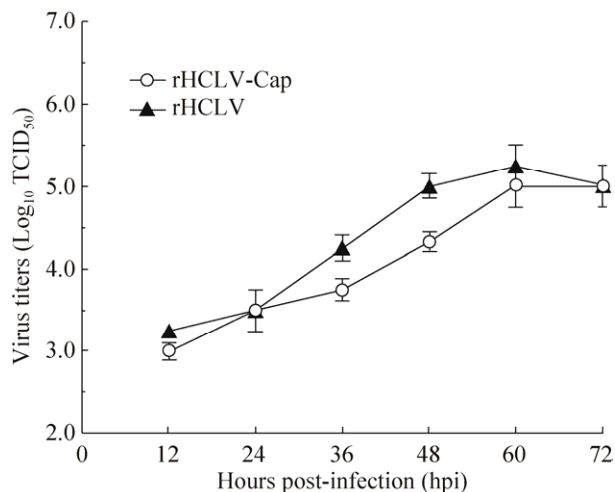


图 4 重组病毒 rHCLV-Cap 的生长曲线

Fig. 4 Growth property of the recombinant virus rHCLV-Cap in SK6 cells.

遗传稳定性, 我们将拯救成功的 rHCLV-Cap 在 SK6 细胞上连续传 20 代。将第 15–20 代 rHCLV-Cap 的  $N^{pro}$ -Cap 基因通过 RT-PCR 扩增并测序。结果表明, 所有子代病毒中均可扩增到预期大小约 1.2 kb 的目的基因 (图 5)。另外, 测序结果显示, Cap 基因在各代 rHCLV-Cap 的基因组中均保持完整和正确性。

## 2.4 重组病毒在家兔体内的生物学特性和免疫原性

为了检验 rHCLV-Cap 在家兔体内的生物学特性和免疫原性, 不同组的家兔接种指定的病毒, 在接种后的不同时间点检测接种家兔的体温和血清中的抗体水平。接种 C 株或 rHCLV 的家兔都在接种后 24 h 或 36 h 出现发热, 持续 18–24 h, 并且重组病毒 rHCLV-Cap 同样能保持引起定型热反应的生物学特性。值得注意的是, 免疫重组病毒的家兔在免疫后 10 d 可以产生抗 E2 抗体 (表 2), 并持续升高 (图 6)。这些数据表明, rHCLV-Cap 在家兔体内具有与 C 株一致的生物学特性和免疫原性。然而接种重组病毒在家兔体内不能较好地诱导产生抗 Cap 抗体 (图 7)。

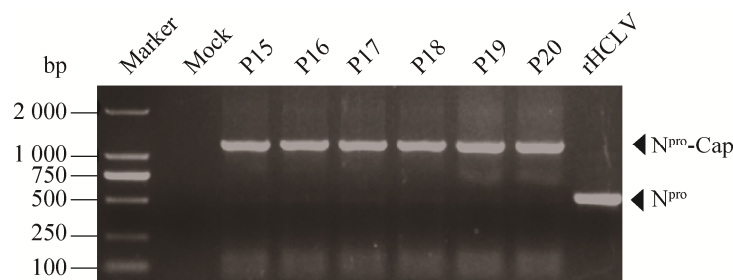


图 5 RT-PCR 检测 *Cap* 基因在重组病毒 rHCLV-Cap 中的遗传稳定性  
Fig. 5 The stability of the *Cap* gene in the recombinant virus rHCLV-Cap tested by RT-PCR.

表 2 重组病毒接种后家兔的定型热反应和脾脏中复制情况

Table 2 Fever response and viral replication of the rabbits inoculated with the recombinant virus

Groups	Viruses	Dose (TCID <sub>50</sub> )	Fever response	Viral replication	Seroconversion of antibodies against CSFV E2 (10 dpi)
A	rHCLV-Cap	10 <sup>4</sup>	5/6	3/3	3/3
B	rHCLV	10 <sup>4</sup>	6/6	3/3	3/3
C	C-strain	10 <sup>4</sup>	6/6	3/3	3/3
D	LG-strain	1 mL	ND	ND	0/3
E	DMEM	1 mL	0/6	0/3	0/3

ND: not determined.

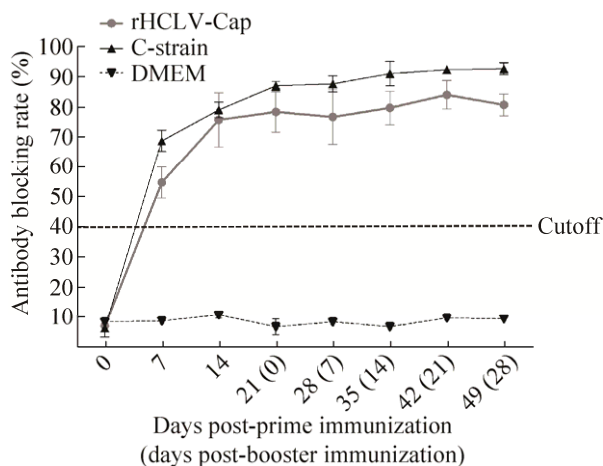


图 6 重组病毒免疫家兔后的抗 E2 特异性抗体  
Fig. 6 Anti-E2 antibodies of the rabbits immunized the recombinant virus rHCLV-Cap.

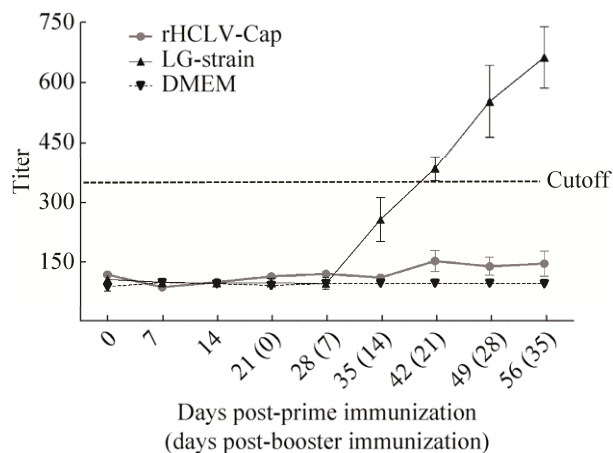


图 7 重组病毒免疫家兔后的抗 Cap 特异性抗体  
Fig. 7 Anti-Cap antibodies of the rabbits immunized the recombinant virus rHCLV-Cap.

### 3 讨论

在本研究中,我们以 PCV2 *Cap* 基因作为模式基因来评价 C 株作为活病毒载体的潜力。*Cap* 蛋白是 PCV2 的主要结构蛋白和免疫保护性

抗原,能刺激动物机体产生针对 PCV2 的特异性免疫应答。国内外研制的针对 *Cap* 蛋白的亚单位疫苗对不同基因型的 PCV2 感染具有良好的免疫保护力<sup>[18]</sup>。目前的研究表明,CSFV 中仅 N<sup>pro</sup> 蛋白和 C 蛋白可以允许外源基因的插入,而且在

N<sup>pro</sup> 蛋白中插入外源基因对 CSFV 生长特性影响较小<sup>[19-20]</sup>。本研究中将 *Cap* 基因插入 N<sup>pro</sup> 蛋白中并成功拯救出一株能够稳定表达 *Cap* 基因且保持亲本病毒生长特性的重组病毒。

将 C 株和 rHCLV-*Cap* 通过耳缘静脉接种家兔来评价其免疫原性, 接种的家兔表现出定型热反应。在本实验室之前的研究中, C 株的 3'-非编码区 (UTR) 被 CSFV 石门株的 UTR 替换后不会诱导产生定型热反应, 但是会保持其免疫原性<sup>[21]</sup>。在本研究中, *Cap* 基因的插入不仅没有改变 C 株在家兔体内的致病性, 而且也未影响 C 株的免疫原性。值得注意的是, 重组病毒能够诱导家兔产生针对 CSFV E2 的特异性抗体。

然而, 重组病毒并不能诱导家兔产生较稳定的抗 *Cap* 抗体。我们分析其主要有两种, 其一是重组病毒表达的 *Cap* 蛋白定位在细胞核内。这与之前的 *Cap* 蛋白的亚定位研究结果保持一致, 是由于 *Cap* 蛋白 N 端有一段 41 个氨基酸残基组成的核定位信号<sup>[22]</sup>。其二是重组病毒的滴度只有 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>, 重组病毒的滴度不能够表达足够量的 *Cap* 蛋白。前人研究发现 CSFV 感染细胞主要是通过 E<sup>ms</sup> 和 E2 蛋白与细胞表面蛋白的相互作用<sup>[23]</sup>。研究证实硫酸乙酰肝素是病毒蛋白 E<sup>ms</sup> 吸附宿主细胞的一个受体, E<sup>ms</sup> 蛋白第 476 位丝氨酸突变为精氨酸能够增强病毒对宿主细胞的吸附能力<sup>[24]</sup>; E2 蛋白上第 37 位的天冬氨酸突变为天冬酰胺, 能够增强病毒拮抗细胞抗病毒应答的能力<sup>[25]</sup>。因此, 在后续研究中我们需去除 *Cap* 蛋白核定位信号并提高病毒滴度来优化重组病毒, 并在家兔和猪只上进行免疫效力评价。

总之, 本研究以 C 株为活病毒载体构建表达 PCV2 *Cap* 蛋白的重组病毒 rHCLV-*Cap*, 此重组病毒在家兔体内保持与 C 株一致的生物学特性, 并且能够诱导家兔产生针对 CSFV E2 的抗体。然而不能诱导家兔产生针对 *Cap* 的抗体。今后我们

将通过提高重组病毒的病毒滴度和表达分泌型 *Cap* 蛋白的形式优化重组病毒。

## REFERENCES

- [1] Moennig V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Vet Microbiol*, 2000, 73(2/3): 93-102.
- [2] Edwards S, Fukusho A, Lefèvre PC, et al. Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol*, 2000, 73(2/3): 103-119.
- [3] Vandeputte J, Chappuis G. Classical swine fever: the European experience and a guide for infected areas. *Rev Sci Tech*, 1999, 18(3): 638-647.
- [4] Heimann M, Sosa GR, Martoglio B, et al. Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J Virol*, 2006, 80(4): 1915-1921.
- [5] Gottipati K, Ruggli N, Gerber M, et al. The structure of classical swine fever virus N<sup>pro</sup>: a novel cysteine autoprotease and zinc-binding protein involved in subversion of type I interferon induction. *PLoS Pathog*, 2013, 9(10): e1003704.
- [6] Ellis J, Hassard L, Clark E, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J*, 1998, 39(1): 44-51.
- [7] Zou WB, Qi DM. Research progress of genetic variation and evolution of porcine circovirus type 2. *Guangdong J Animal Vet Sci*, 2017, 42(3): 4-7 (in Chinese).  
邹伟斌, 齐冬梅. 猪圆环病毒 2 型的遗传变异和进化研究进展. *广东畜牧兽医科技*, 2017, 42(3): 4-7.
- [8] Jiang CG, Wang G, Tu YB, et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 in China. *Arch Virol*, 2017, 162(9): 2715-2726.
- [9] Ning YB, Wu WF. New epidemic characteristics of classical swine fever in China and the research of vaccine and immunization. *Chin J Vet Drug*, 2011, 45(8): 33-37 (in Chinese).  
宁宜宝, 吴文福. 我国猪瘟流行新特点与疫苗免疫研究. *中国兽药杂志*, 2011, 45(8): 33-37.
- [10] Ge XN, Wang F, Guo X, et al. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in China. *Virus*

- Res, 2012, 164(1/2): 100–106.
- [11] Huang YL, Pang VF, Lin CM, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection decreases the efficacy of an attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine. *Vet Res*, 2011, 42: 115.
- [12] Qiu HJ, Tong GZ, Shen RX. The lapinized Chinese strain of classical swine fever virus: a retrospective review spanning half a century. *Sci Agric Sin*, 2005, 38(8): 1675–1685 (in Chinese).  
仇华吉, 童光志, 沈荣显. 猪瘟兔化弱毒疫苗——半个世纪的回顾. *中国农业科学*, 2005, 38(8): 1675–1685.
- [13] Ferrari M. A tissue culture vaccine with lapinized Chinese (LC) strain of hog cholera virus (HCV). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1992, 15(3): 221–228.
- [14] Kaden V, Renner C, Rothe A, et al. Evaluation of the oral immunisation of wild boar against classical swine fever in Baden-Württemberg. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2003, 116(9/10): 362–367.
- [15] Li C, Huang JH, Li YF, et al. Efficient and stable rescue of classical swine fever virus from cloned cDNA using an RNA polymerase II system. *Arch Virol*, 2013, 158(4): 901–907.
- [16] Reed LJ, Münch H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, 1938, 27: 493–497.
- [17] Zhang XJ, Han QY, Sun Y, et al. Development of a triplex TaqMan real-time RT-PCR assay for differential detection of wild-type and HCLV vaccine strains of classical swine fever virus and bovine viral diarrhea virus 1. *Res Vet Sci*, 2012, 92(3): 512–518.
- [18] Beach NM, Meng XJ. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*, 2012, 164(1/2): 33–42.
- [19] Moser C, Tratschin JD, Hofmann MA. A recombinant classical swine fever virus stably expresses a marker gene. *J Virol*, 1998, 72(6): 5318–5322.
- [20] Riedel C, Lamp B, Heimann M, et al. Characterization of essential domains and plasticity of the classical swine fever virus core protein. *J Virol*, 2010, 84(21): 11523–11531.
- [21] Li C, Li YF, Shen L, et al. The role of noncoding regions of classical swine fever virus C-strain in its adaptation to the rabbit. *Virus Res*, 2014, 183: 117–122.
- [22] Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*, 2001, 285(1): 91–99.
- [23] Wang Z, Nie YC, Wang PG, et al. Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology*, 2004, 330(1): 332–341.
- [24] Hulst MM, van Gennip HGP, Moormann RJM. Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate due to a single amino acid change in envelope protein E<sup>ms</sup>. *J Virol*, 2000, 74(20): 9553–9561.
- [25] Li S, Wang JH, He WR, et al. Thioredoxin 2 is a novel E2-interacting protein that inhibits the replication of classical swine fever virus. *J Virol*, 2015, 89(16): 8510–8524.

(本文责编 郝丽芳)