

兔出血症病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及对家兔的免疫保护效果

王芳^{1*}, 胡波¹, 任雪枫², 范志宇¹, 杨龙圣¹, 徐为中¹, 张则斌¹, 何孔旺¹

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所, 南京 210014; 2. 江苏省动物疫病预防控制中心, 南京 210036)

摘要: 用 RT-PCR 方法扩增兔出血症病毒(RHDV)衣壳蛋白 VP60 基因, 通过克隆、转化得到重组穿梭载体 Bacmid-VP60, 用此质粒转染 Sf9 昆虫细胞, 得到重组病毒 rAcV-Bac-VP60, 经 RT-PCR、IFA、SDS-PAGE、Western blotting、HA 和 HI 鉴定, 结果显示重组 VP60 蛋白在 Sf9 昆虫细胞中得到表达。在不加任何佐剂的情况下, 用表达的蛋白免疫 3 月龄非 RHD 免疫兔, 结果显示, 免疫后 21 天, 兔体内可产生抗 RHDV 抗体, 抗体血凝抑制效价为 $2^6 \sim 2^7$, 该抗体可以抵抗血凝效价为 2^{10} 致死剂量 RHDV 强毒的攻击, 本研究为兔病毒性出血症基因工程疫苗的研制奠定了基础。

关键词: 兔出血症病毒; 衣壳蛋白; 杆状病毒表达系统; 重组杆状病毒; 表达; 免疫

中图分类号: S858.2913.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)10-1382-06

Expression of the Capsid Protein of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in Insect Cells and Its Protective Efficacy to Rabbits

WANG Fang^{1*}, HU Bo¹, REN Xue-feng², FAN Zhi-yu¹, YANG Long-sheng¹,

XU Wei-zhong¹, ZHANG Ze-bin¹, HE Kong-wang¹

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Animal Disease Control Center, Nanjing 210036, China)

Abstract: The objective of this study is to develop genetic engineering vaccine to rabbit haemorrhagic disease. RT-PCR was used to amplify the capsid protein VP60 gene of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). After being cloned and transformed, the recombinant shuttle vector, Bacmid-VP60, was constructed and transfected into Sf9 insect cells, then a recombinant baculovirus, named rAcV-Bac-VP60 was obtained. The identification by IFA, SDS-PAGE, Western blotting, HA and HI showed that the recombinant protein of VP60 was expressed in Sf9 insect cells. The expressed protein was applied to immunize three-month-old rabbits that without immunizing with RHD vaccine. The results showed that the anti-RHDV antibodies were induced and developed after 21 days of immunization, the anti-RHDV titers in serum ranged from 2^6 to 2^7 . When challenged with 2^{10} HA units of infectious RHDV, the control rabbits died, while the immunized animals survived. The results indicated that the recombinant proteins expressed by recombinant baculovirus could be ideal candidate for RHDV vaccines.

Key words: rabbit haemorrhagic disease virus; capsid protein; baculovirus expression system; recombinant baculovirus; expression; immunization

收稿日期: 2007-10-24

基金项目: 江苏省科技成果转化专项资金(BA2004032-020); 江苏省农业科学院基金(025056110639)

作者简介: 王芳(1972-), 女, 新疆伊宁人, 副研究员, 博士, 主要从事畜禽传染病免疫机理及诊断方法研究

* 通讯作者: 王芳, Tel: 025-84390337, E-mail: rwangfang@126.com, Fax: 025-84390330

兔出血症,又称兔瘟,是由兔出血症病毒(Rabbit haemorrhagic disease virus, RHDV)引起的一种以急性、高度传染性、大面积死亡为特征的兔传染病。感染兔通常于 48~72 h 死亡,表现出以肝变性坏死和肺出血为典型特征的组织病变,给全世界养兔业造成了巨大的经济损失^[1-2]。目前该病的主要预防措施是使用组织灭活疫苗免疫,然而用于制作疫苗的非免疫兔来源很不确定,给疫苗的生产带来了很大限制,因此需要探索新的生产疫苗的途径。

近年来的研究认为,RHDV 属杯状病毒,含有一条单股正链 RNA,由 7 437 个核苷酸组成,与一般的杯状病毒不同,RHDV 只有 2 个开放阅读框(ORF)^[3],ORF1 的 3'端部分序列编码 RHDV 衣壳蛋白 VP60,其基因片段长度为 1 740 bp,共编码 580 个氨基酸。VP60 是 RHDV 重要的结构蛋白,与诱导抗病毒感染的免疫反应直接相关。本研究在昆虫细胞中成功表达了 RHDV 衣壳蛋白 VP60,并对该表达产物进行了兔体免疫保护试验,为 RHDV 基因工程疫苗的研制奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 种毒、质粒、细胞与菌种

兔出血症病毒(RHDV)皖阜株,由江苏省农业科学院兽医研究所保存;Sf9 昆虫细胞、pFastBacTM 1 质粒、大肠杆菌 DH10Bac 由扬州大学秦爱建教授惠赠。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂 RNAiso Regent、ExTaqTM (5 U/ μ L)、DNA Marker DL2000 及 DL15000、pMD-18T 载体、限制性内切酶 *EcoR* I、和 *Sal* I、*T*₄ DNA Ligase(大连宝生物工程有限公司);小量胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司);胰蛋白胨(Tryptone)、酵母提取物(Yeast extract)(OXOID 公司);昆虫培养基 Grace's、胎牛血清 FBS(GIBCO 公司);转染试剂 LipofectaminTM 2000(Invitrogen 公司);HRP 标记的羊抗兔 IgG、FITC 标记的羊抗兔 IgG、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 RHDV RNA 的提取

将 DEPC 处理过的水按 1:10 加入组织中,研磨成悬液,装入用 DEPC 处理过的 1.5 mL EP 管中,于 -20 °C 反复冻融 3 次;4 °C,以 7 200 r/min 离心 20 min,取 200 μ L 上清;加入 800 μ L Trizol,振

荡混匀后,室温放置 10 min;加入 210 μ L 氯仿,剧烈振荡后,室温放置 1 min;4 °C,10 000 r/min 离心 15 min,取 750 μ L 上层水相;加入 0.5 mL 异丙醇,混匀,-20 °C,放置 15 min;4 °C,10 000 r/min 离心 10 min;去上清,加入 1 mL 75%乙醇洗涤;4 °C,8 000 r/min 离心 5 min,去上清;室温干燥 20 min,加入 10 μ L DEPC 处理过的水,使充分溶解。

1.4 RT-PCR

1.4.1 引物设计 参照 GenBank 中中国吉林株 RHDV 基因组序列(AY523410),利用 Primer 5.0 软件自行设计 1 对引物(由大连宝生物工程有限公司合成)。上游引物 P1:5'-ATAGTCGACATG-GAGGGCAAAG-3';下游引物 P2:5'-GCCTC-GAGTCAGACATAAGAAAAGCCA-3'。在上游引物的 5'端加入 *Sal* I 酶切位点,下游引物的 5'端引入 *Xho* I 酶切位点。

1.4.2 反转录 反转录体系:10 \times Buffer 2 μ L、10 mmol/L dNTPs 2 μ L、下游引物 1 μ L、RNA 酶抑制剂 0.5 μ L、RNA 模板 12 μ L,AMV 反转录酶 0.5 μ L,H₂O(DEPC 处理)2 μ L,总体积为 20 μ L,瞬间离心混匀,65 °C 反应 15 min,42 °C 孵育 1 h,95 °C 5 min,-20 °C 保存备用。

1.4.3 PCR 反应体系:10 \times Reaction buffer 2.5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L、2.5 mmol/L dNTPs 0.5 μ L、50 mmol/L P1 0.5 μ L、50 mmol/L P2 0.5 μ L、模板 RNA 4.0 μ L、ddH₂O 15 μ L、EX TaqTM polymerase 0.5 μ L,总体积 25 μ L,瞬间离心混匀,采用热盖进行 PCR 扩增反应:94 °C 变性 3 min;94 °C 变性 1 min,57 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min,结束反应。

1.5 T/A 克隆与鉴定

用核酸凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,然后按照 pMD-19T-Vector 试剂盒说明,将目的片段克隆入 pMD-19T-Vector,转化 DH5 α 感受态细胞。挑选单菌落培养并提取质粒,用 *Sal* I 和 *Xho* I 酶切,37 °C,2 h,筛选阳性克隆并送大连宝生物工程有限公司(大连市)测序。

1.6 重组转移载体的构建

用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Xho* I 分别消化供体质粒 pFastBacTM 1 和 T/A 克隆,回收目的片段,用 *T*₄ DNA Ligase 4 °C 连接 12 h,转化 DH5 α 感受态细胞。筛选阳性克隆并鉴定,得到重组转移载体 pFastBacTM 1-VP60。

1.7 重组杆状病毒穿梭质粒的获得及鉴定

1.7.1 重组杆状病毒穿梭质粒的构建和提取 将 pFastBac™1-VP60 质粒转化含有穿梭载体 Bacmid 的 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞,37℃,于 LB 液体培养基中培养 4 h 后,取 100 μL 转化产物涂于含有 50 μg/mL 卡那霉素、7 μg/mL 庆大霉素、10 μg/mL 四环素以及 100 μg/mL X-gal 和 20 μg/mL IPTG 的 LB 平板上,37℃培养 48 h 后,挑选白色菌落,在同样的含 3 种抗生素的 LB 平板上继续接种传代 1 次,获得纯培养,接种含有 3 种抗生素的 LB 液体培养基中,37℃,振荡(180 r/min)培养 24 h,用提取重组穿梭质粒 DNA 专用的溶液 I、II、III 提取 bacmid 质粒(见杆状病毒表达系统手册)。

1.7.2 重组杆状病毒穿梭质粒的鉴定 以重组 Bacmid DNA 为模板,以通用 pUCM13 上游引物和特异性 VP60 下游引物进行 PCR 鉴定。同时设立未插入外源基因片段的 DH10Bacmid 质粒对照组,以 pUCM13 上下游引物进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系及 PCR 扩增反应条件见杆状病毒表达系统手册。鉴定为阳性的重组质粒命名为 Bacmid-VP60。

1.8 转染昆虫细胞

以 Lipofectamin™2000 为共转染试剂,按照说明转染 Sf9 单层细胞。转染后每 12 h 观察 1 次,直到细胞病变明显时,收集细胞及上清液,作为重组杆状病毒原液,-20℃保存。将含目的基因 VP60 的重组杆状病毒命名为 rAcV-Bac-VP60。

1.9 重组病毒的传代与初步鉴定

1.9.1 重组病毒的传代 将第 1 代病毒液冻融 2 次后,以 1% 体积比接种 Sf9 细胞,得到第 2 代重组病毒。

1.9.2 RT-PCR 鉴定重组病毒 收集第 2 代感染重组病毒的 Sf9 细胞,按照前文所述方法提取细胞 RNA,以目的基因上、下游引物进行 RT-PCR。

1.10 重组病毒的蚀斑纯化

以第 2 代重组病毒为毒种进行蚀斑纯化,方法见杆状病毒表达系统手册。

1.11 表达产物的鉴定

1.11.1 间接免疫荧光检测(IFA) 于 24 孔细胞培养板上,将纯化的重组病毒接种对数生长期的 Sf9 细胞,培养至发生病变时,用 RHDV 高免血清以 IFA 检测重组蛋白的表达。

1.11.2 SDS-PAGE 将纯化的重组病毒以 1% 的体积比感染 Sf9 细胞,96 h 后收集病变细胞及培养

液,分装于 1.5 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 5 min,保留培养上清,用 PBS 重悬细胞并洗涤 2 次后,溶于 500 μL PBS,反复冻融 3 次后,超声裂解,3 000 r/min 离心 5 min,取上清,加入上样缓冲液,煮沸 5 min,11 000 g 离心 1 min,取 20 μL 上清作为电泳样品进行 SDS-PAGE。

1.11.3 Western blotting 采用半干转印法。同 1.11.2 将样品电泳后,取下凝胶,0.65 mA/cm²,转印 1.5 h 后,将其转印于 NC 膜上,应用 RHDV 高免血清按常规方法进行 Western blotting 反应。

1.11.4 HA 分别取 1.11.2 处理的细胞裂解上清和细胞培养上清 50 μL 于圆底大孔血凝板,以生理盐水作倍比稀释后,加入等体积 1% 人“O”型红细胞悬液,振荡均匀后,置 4℃作用 45 min 后观察结果。同时以其他重组杆状病毒作为阴性对照,以 RHD 病兔肝脏 1:5 匀浆上清作为阳性对照。

1.11.5 HI 于圆底大孔血凝板加入 50 μL RHDV 血清,以生理盐水作倍比稀释后,加 4 个血凝单位的表达蛋白于各孔,将血凝板置 37℃作用 30 min 后,每孔加 1% 人“O”型红细胞悬液 50 μL,立即摇匀,置 4℃作用 45 min,观察结果。

1.12 免疫保护试验

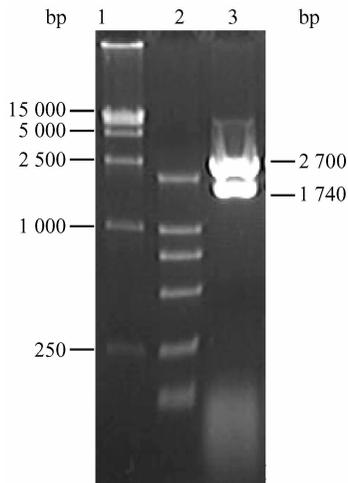
1.12.1 免疫抗原的制备 将重组杆状病毒接种于 Sf9 细胞,120 h 后收毒,测表达蛋白的 HA 效价,用灭菌生理盐水稀释至抗原溶液的 HA 效价为 2⁸。

1.12.2 实验动物分组、接种及攻毒 将 15 只非免疫家兔于免疫前采血测 HA 效价,并分成 3 组,每组 5 只,第 1 组注射 1 mL 上述抗原,第 2 组注射 2 mL 上述抗原,第 3 组作为对照组,注射生理盐水,免疫期间每隔 7 d 采一次血并测 HA 效价,于免疫后第 21 天以 HA 效价大于 10 的 RHDV 强毒肝脏悬液(肝组织:灭菌生理盐水=1:9)1 mL 攻击,观察 14 d,并记录结果。

2 结果

2.1 RHDV VP60 基因片段的扩增和测序

将 RT-PCR 反应产物克隆入 pMD18-T 载体后,酶切鉴定结果显示,有 2 条分别为 2 700 和 1 740 bp 左右的片段(图 1),阳性质粒 T-VP60 测序结果表明,插入的目的基因全长 1 740 bp,与 GenBank 公布的序列同源性达到 90.5%~97.8%,读码框架正确。



1. DNA 相对分子质量标准 (DL15000); 2. DNA 相对分子质量标准 (DL2000); 3. T-VP60/*Sal* I + *Xho* I
1. DNA marker (DL15000); 2. DNA marker (DL2000); 3. Restriction digestion of T-VP60 by *Sal* I + *Xho* I

图 1 T-VP60 双酶切结果

Fig. 1 Restriction enzyme digestion of T-VP60

2.2 重组转移载体的酶切鉴定

重组转移载体酶切消化后,经琼脂糖凝胶电泳,可见 2 条分别为 4 800 和 1 740 bp 左右的片段(图略)。

2.3 重组表达载体的 PCR 鉴定

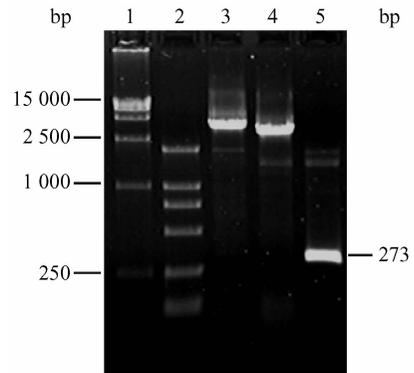
以 pUC/M13 上、下游引物扩增重组质粒的产物约为 4 000 bp(图 2 第 3 泳道),以 pUC/M13 上游引物与特异性 VP60 基因下游引物扩增重组质粒的产物约为 3 000 bp(图 2 第 4 泳道),而以 pUC/M13 上、下游引物对未插入外源基因片段的空 Bacmid 质粒进行扩增的产物大小为 273 bp(图 2 第 5 泳道),证明转座成功,重组杆状病毒构建完成。

2.4 转染后的细胞病变

重组穿梭质粒 Bacmid-VP60 转染 Sf9 细胞,5 d 后观察到细胞肿大变圆,分裂停止,细胞间紧密连接消失,细胞折光性增强,而未转染细胞则无此变化,说明转染成功。

2.5 RT-PCR 鉴定重组病毒

提取感染第 2 代重组病毒的 Sf9 细胞 RNA,以目的基因上、下游引物进行 RT-PCR,电泳条带为 1 740 bp,说明目的基因已经随杆状病毒基因组整合入 Sf9 细胞中。



1. DNA 相对分子质量标准 (DL15000); 2. DNA 相对分子质量标准 (DL2000); 3、4. Bacmid VP60 PCR 鉴定; 5. Bacmid PCR 鉴定

1. DNA Marker (DL15000); 2. DNA Marker (DL2000); 3、4. PCR analysis of Bacmid-VP60; 5. PCR analysis of Bacmid

图 2 重组 Bacmid 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR analysis of recombinant Bacmid

2.6 重组病毒的纯化

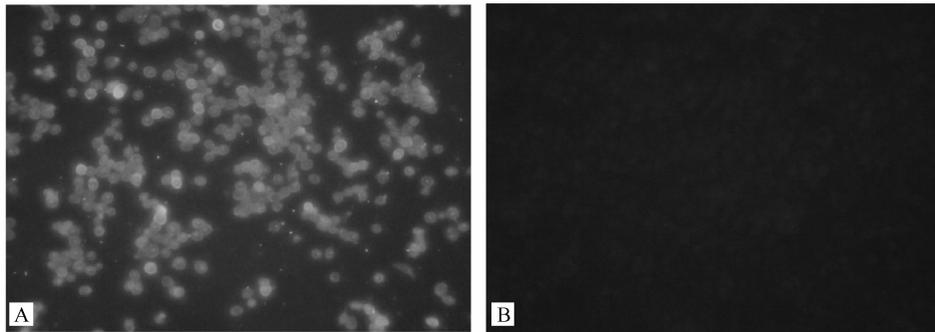
重组病毒按 $10^{-3} \sim 10^{-8}$ 进行稀释,分别吸附于细胞培养孔,观察 8 d,于 10^{-6} 孔挑取 5 个蚀斑,分别接种于单层细胞扩增培养。

2.7 表达产物的鉴定

2.7.1 间接免疫荧光 经 IFA 检测,Bacmid-VP60 感染的 Sf9 细胞具有很强的特异性荧光(图 3A),而 Bacmid 感染 Sf9 对照细胞无特异的荧光(图 3B),说明 VP60 蛋白得到表达,且表达产物存在于昆虫细胞内。

2.7.2 SDS-PAGE 和 Western blotting 结果 电泳和转印结果显示:VP60 基因在昆虫细胞中表达了约 60 ku 的特异性条带,而对照样品感染野生 Bacmid 的 Sf9 细胞裂解产物和 Sf9 细胞裂解产物均未显示相应的条带。免疫印迹与电泳的目的条带位置相符,说明目的蛋白得到表达(图 4)。

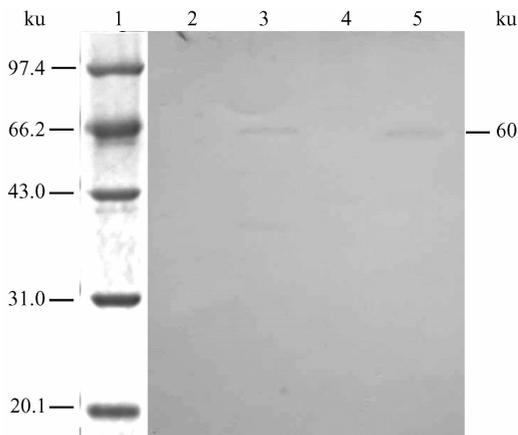
2.7.3 HA 和 HI 由 HA 试验结果可以看出重组病毒感染细胞裂解上清和细胞培养上清均能凝集 1% 人“O”型红细胞悬液,而其他重组杆状病毒不能凝集 1% 人“O”型红细胞悬液,RHD 病兔肝脏 1:5 匀浆上清能凝集红细胞悬液。当接种重组病毒后 120 h 收毒,发现感染细胞裂解上清和细胞培养上清血凝效价均可达 2^{12} 以上,同时表达的 VP60 蛋白的血凝特性可被 RHDV 高免血清所抑制,表明表达的 VP60 蛋白具有与 RHDV 相似的生物学活性。



A. 感染 Bacmid-VP60 的细胞; B. 感染野生 Bacmid 的细胞
A. Cells infected with Bacmid-VP60; B. Cells infected with wild Bacmid

图3 表达蛋白的免疫荧光鉴定

Fig. 3 Analysis of expressed protein by immunofluorescence



1. 蛋白质相对分子质量标准; 2. 感染野生 Bacmid 的 Sf9 细胞裂解产物; 3. 感染重组毒的 Sf9 细胞裂解产物; 4. Sf9 细胞裂解产物; 5. 感染重组毒的 Sf9 细胞培养上清

1. Proteins molecular mass standard; 2. Splitting of cells infected with wild Bacmid; 3. Splitting of Sf9 cells infected with Bacmid-VP60; 4. Splitting of Sf9 cells control; 5. Supernant of Sf9 cells infected with Bacmid-VP60

图4 表达蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 4 Analysis of expressed protein by Western blotting

2.8 免疫保护试验结果

15 只非免疫家兔于免疫前采血,测得血清 HI 效价在 $2^0 \sim 2^3$,第 1 组家兔于攻毒后第 4 天有 1 只死亡(非免瘟死亡),保护率为 80%;第 2 组家兔于攻毒后 14 d 内全部健活,保护率为 100%。这 2 组家兔攻毒前,血清 HI 效价在 $2^5 \sim 2^7$;第 3 组家兔攻毒后 3 d 内全部死亡,表现典型的兔瘟症状(表 1)。

3 讨论

目前随着家兔养殖规模的扩大,兔出血症疫苗的需求量逐渐增大,然而用于制备疫苗的非免疫兔的来源很不稳定,给传统组织灭活苗的制备带来了诸多不便。另外,由于组织灭活苗本身的种种缺点,使人们对兔出血症疫苗的研究,逐渐转向既能起到保护作用,又能解决生物安全问题的基因工程疫苗的研制。国外对兔出血症基因工程疫苗已进行了广泛研究,并取得了较好的研究成果,目前已经在多种系统中表达了 VP60 蛋白,如大肠杆菌^[4]、酵母^[5]、昆虫细胞^[6-8]、痘病毒^[9-10]和植物^[11-12]等。其中,杆状病毒系统具有很多优势,它具有类似于哺乳动物细胞的翻译后修饰功能,使重组蛋白在结构和功能

表 1 不同剂量重组表达蛋白免疫后对 RHDV 攻毒的保护性

Table 1 Protection of rabbits against challenge with RHDV after vaccination with different dosage of recombinant protein

试验组 Test group	1 mL 组 1 mL group	2 mL 组 2 mL group	对照组 Control group
动物数量 Animal number	5	5	5
攻毒后死亡数量 Death number	1	0	5
保护率/% Rate of protection	80	100	0

上更接近天然蛋白。另外,杆状病毒只能感染非脊椎动物,对家兔等畜禽及人类都十分安全,因此,利用该系统表达的 VP60 蛋白可作为疫苗抗原免疫家兔从而起到预防兔瘟的作用。

本研究利用杆状病毒表达系统成功表达了 RHDV 的 VP60 蛋白,蛋白的血凝效价可达 2^{12} 以上,间接免疫荧光和 Western blotting 结果表明,表达产物具有反应原性。动物免疫试验结果显示,在不添加任何佐剂的情况下,给家兔免疫 HA 效价为 2^8 的细胞培养物 1 mL,即可抵抗 RHDV 强毒的攻击,说明该表达蛋白具有良好的免疫原性。有研究表明^[6-7,13] RHDV 的 VP60 蛋白在杆状病毒中表达可在体外自聚成与天然 RHDV 病毒粒子在物理形态和免疫原性上无任何差别的病毒样颗粒(VLPs),并且该病毒样颗粒不包裹核酸,因而不具有感染性。这些结果为研制兔瘟基因工程疫苗及建立 RHDV 诊断方法等奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘胜江,薛华平,蒲伯清,等. 一种新的家兔病毒病—兔病毒性出血症[J]. 畜牧与兽医,1984,16:253-255.
- [2] 杜念兴,徐为燕,刘胜江,等. 兔出血症研究[J]. 中国农业科学,1991,24(1):1-10.
- [3] CLARKE I N, LAMB DEN P R. The molecular biology of caliciviruses[J]. J Gen Virol,1997, 78(2):291-301.
- [4] BOGA J A, CASAIS R, MARIN M S, et al. Molecular cloning sequencing and expression in *Escherichia coli* of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus(Spanish isolate AST/89) [J]. J Gen Virol,1994, 75(Pt9):2 409-2 413.
- [5] BOGA J A, MARTIN ALONSO JM, CASAIS R, et al. A single dose immunazation with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection [J]. J Gen Virol, 1997, 78(Pt9):2 315-2 318.
- [6] SIBILIA M, BONIOTTI M B, ANGOSCINI P, et al. Two independent pathways of expression lead to selfassembly of the rabbit haemorrhagic disease virus capsid protein[J]. J Virol,1995, 69(9):5 812-5 815.
- [7] LAURENT S, VAUTHEROT J F, MADELAINE M F, et al. Recombinant rabbit haemorrhagic disease virus capsid protein in bacuovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection[J]. J Virol, 1994,68(10):6 794-6 798.
- [8] MARIN M S, MARTIN ALONSO J M, PEREZ ORDOYO GARCIA L I, et al. Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus;an efficient vaccine[J]. Virus Res, 1995,39(2-3):119-128.
- [9] BARCENA J, MORALES M, VAZQUEZ B, et al. Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus[J]. J Virol,2000;74(3): 1 114-1 123.
- [10] TORRES J M, SANCHEZ C, RAMIREZ M A, et al. First field trial of a transmissible recombinant vaccine against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease[J]. Vaccine, 2001,19(31):4 536-4 543.
- [11] MARTIN-ALONOSO J M, CASTANON S, ALONSO P, et al. Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit haemorrhagic disease virus capsid protein[J]. Transgenic Res, 2003,12(1):127-130.
- [12] CASTANON S, MARTIN-ALONSO J M, MARIN M S, et al. The effect of the promoter on expression of VP60 gene from rabbit haemorrhagic disease virus in potato plants[J]. Plant Science, 2002, 162(1):87-95.
- [13] NAGESHA H S, WANG L F, HYATT A D. Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers[J]. Arch Virol, 1999, 144(12):2 429-2 439.