

表达猪瘟病毒石门株 E0 抗原的重组腺病毒构建及免疫性的研究

孙永科, 杨玉艾, 王养会, 张彦明*

(西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要: 应用 PCR 从 pMD18-T-E0 质粒中扩增编码 CSFV E0 蛋白的基因片段, 定向克隆到重组腺病毒 Adeasy-1 系统的穿梭质粒 pAdTrack-CMV 上, 采用细菌内同源重组“两步转化法”构建携带 CSFV E0 基因的重组腺病毒基因组质粒 pAdEasy-E0, 转染 293 细胞, 成功包装出重组腺病毒 pAd-E0, PCR 证实 E0 基因已整合至腺病毒基因组中, 用 Western blot 检测到重组病毒感染 293 细胞中 E0 蛋白的表达。重组病毒感染小鼠和猪, 结果 2 次免疫后产生明显的免疫应答, ELISA 检测小鼠血清抗体滴度分别为 1:512 和 1:10240; 猪血清抗体滴度分别为 1:16 和 1:64。本研究成功构建了表达猪瘟病毒 E0 基因的非复制型重组腺病毒, 该重组病毒感染小鼠可产生较高的抗体滴度, 免疫猪后能提供一定的保护效果。

关键词: 腺病毒; 猪瘟病毒; E0 基因; 同源重组

中图分类号: S852.65; Q784

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)05-0482-06

Construction and Immunological Characterization of the Recombinant Adenovirus Expressing the E0 Antigen of Classical Swine Fever Virus Shimen Strain

SUN Yong-ke, YANG Yu-ai, WANG Yang-hui, ZHANG Yan-ming*

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Classical swine fever virus (CSFV) E0 gene was amplified from the plasmid pMD18-T-E0 by PCR and cloned into the adenoviral shuttle plasmid pAdTrack-CMV. A two-step transformation protocol was employed for the construction of recombinant adenoviral plasmid pAdEasy-E0. The resultant recombinant DNA was transfected into 293 cells to yield packaged adenovirus. E0 gene was confirmed to be integrated into the genome of recombinant adenovirus by PCR, and the expression of E0 was detected in the 293 cells infected with recombinant adenovirus by Western blot. ELISA results showed that systematical immune responses to CSFV virus could be induced effectively in mice after twice immunizations through intraperitoneal route. The replication-defective recombinant adenovirus expressing (CSFV) E0 was constructed and could elicit favorable immune responses in mice, and offered protection for pigs to CSFV.

Key words: adenovirus; classical swine fever virus; E0 gene; homogenous recombination

猪瘟是严重危害养猪业的主要传染病之一, 猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)是引起猪瘟的病原, 它是具有囊膜的 RNA 病毒, 病毒粒子

含有 E0(或 E^{ms})、E1 和 E2 3 种囊膜糖蛋白, 其中 E0 和 E2 是病毒诱导机体产生中和抗体的两个主要保护性抗原, 同时也是病毒吸附进入敏感细胞的必需

收稿日期: 2006-06-07

基金项目: 陕西省重大科技攻关项目(2006kz07-G2); 国家自然科学基金项目(30471290)

作者简介: 孙永科(1977-), 男, 博士生, 主要从事分子病原学及基因工程疫苗的研究, E-mail: peter_0328@163.com

* 通讯作者: 张彦明(1956-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学方面的研究, Email: ylzhangym@sohu.com

蛋白^[1,2]。E0 可诱导产生 CSFV 的中和抗体,免疫猪可诱导产生对致死量 CSFV 的保护性免疫^[3]。由于编码 E0 的核酸序列在属内比编码 E2 的序列保守程度高,因而 E0 也可作为防治猪瘟的一种靶蛋白。CSFV 的宿主嗜性也与 E0 有关,用 E0 中和单抗可有效阻断 CSFV 对易感动物细胞的感染^[4]。E0 还表现出神经细胞毒性和抗凝集活性,CSFV 感染动物后所产生的 E0 蛋白在致病过程中起重要作用。E0 还是一种尿嘧啶特异的核酸酶,具有 RNase 活性,属于细胞外 RNase 家族^[5]。另外,E0 和 E2 嵌合抗原比单独使用 E2 抗原明显提高血清学诊断的敏感性,并且能提前 7 d 检测到猪瘟病毒感染^[6]。

以活病毒为载体的疫苗,可诱导机体产生针对目的抗原的免疫应答,是一种极具前景的新型疫苗。其中,重组复制缺陷型腺病毒具有较高的基因转移效率和诱导保护性免疫的作用,作为疫苗载体具有明显的优势^[7],可模仿病毒天然的感染方式,并直接在体内表达天然的、保持完整生物活性的抗原蛋白。因此常能诱导有效的特异性体液免疫应答和细胞免疫应答。本研究利用改进的 pAdEasy-1 系统,构建了表达 CSFV E0 基因的重组腺病毒 pAd-E0,在体外进行了有效表达,并在小鼠检测到较高的抗体水平,为研究 E0 蛋白的结构与功能、鉴别诊断技术和猪瘟基因工程疫苗奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 及骨架质粒 pAdEasy-1、大肠杆菌 DH5 α 及 BJ5183 株由本室保存;pMD18-T-E0 质粒由本室构建;HEK293 包装细胞由本室保存

限制性内切酶 *Bgl* II 及 *Kpn* I (TaKaRa)、T₄DNA 连接酶(MBI);限制性内切酶 *Pme* I、*Pac* I (New England BioLab);胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司);LipofectamineTM 2000、DMEM(Gibico);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗猪 IgG(北京中山生物工程公司)。

1.2 重组穿梭转移质粒的构建

根据插入 pMD18-T 载体 E0 全基因(699 bp)的 DNA 序列设计(登录号:3064068)CSFV E0 基因上、下游引物(上海生工生物工程技术有限公司)。上游引物:5'-AAAGGTACCATGGCGCCCAT-CACGGCCTA-3'(5'端含 *Bgl* II 限制酶切位点及起

始密码);下游引物:5'-CCCTCTAGATAGT-GACGACCTCCA-3'(5'端含 *Kpn* I 限制酶切位点)。以 pMD18-T-E0 质粒为模板,扩增编码 E0 蛋白的 DNA 片段。PCR 产物回收后,连入 pMD18-T 载体,以 *Bgl* II 及 *Kpn* I 双酶切得到的目的基因片段,插入至经同样酶切的穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中,酶切及测序(上海生工生物工程技术有限公司)鉴定阳性重组克隆后,将其命名为重组穿梭质粒 pAdTrack-E0。

1.3 重组腺病毒 pAd-E0 的构建

将腺病毒质粒 pAdEasy-1 转化于 BJ5183 感受态细菌,经筛选和酶切鉴定正确的克隆即为 pAdEasier-1 细菌,用氯化钙法制备感受态菌。取经 *Pme* I 酶线性化的 pAdTrack-E0,直接转化 pAdEasier-1 感受态细菌,用卡那霉素 LB 培养基平板筛选,挑取单菌落,用碱裂解法提取质粒后,经 *Bam*H I、*Pac* I 酶切和 PCR 鉴定后,获得阳性重组腺病毒质粒 pAdEasy-E0。

将 293 细胞按 2.5×10^5 /孔接种于 6 孔板中,待 85%~95% 的细胞融合时,将经 *Pac* I 酶切线性化后的质粒 pAdEasy-E0,按梯度用 LipofectamineTM 2000 转染 293 细胞。大约在转染后 10 d,将观察到细胞病变并且产生荧光的 293 细胞收集,培养上清置于 -20 °C 冻存。将收集的上清中含有 CSFV E0 基因片段的重组腺病毒命名为 pAd-E0。

用同样的方法,将空载穿梭质粒 pAdTrack-CMV 制备重组腺病毒 pAd-CMV,作为阴性对照。

1.4 重组腺病毒的扩增及滴度测定

取 pAd-E0 1 mL 感染培养瓶中 85%~95% 融合的 293 细胞,3~5 d 后,当约半数的 293 细胞脱落时,于 -70 °C/37 °C 水浴中反复冻融 3 次以裂解细胞,离心收集上清,继续感染 85%~95% 融合的 293 细胞。这样重复感染 10 次后进行病毒滴定。

将 293 细胞以 1×10^6 /孔密度接种 6 孔板,培养至融合为 85%~95%。取 10^{-3} ~ 10^{-8} 系列稀释病毒液,每孔细胞加入 1 mL,37 °C 感染 2 h 后,添加含 10% 血清的 DMEM 至 2 mL/孔,继续培养 48 h 后,用 Karber 方法计算出病毒滴度(pfu/mL)。pAd-CMV 用同样的方法进行扩增及测定滴度。

1.5 重组腺病毒 E0 基因的鉴定

取 50 μ L 病变细胞冻融液及 100 μ L 培养上清与 10 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL)在 37 °C 作用 2 h,然后进行苯酚和氯仿抽提,将水相加入 1/10 体积的 3

mol/L NaAc 和 2.5 倍体积的冰乙醇,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min,12 000 r/min 离心 15 min,沉淀用 TE 30 μL 溶解后作为模板,进行 PCR 扩增鉴定。

1.6 重组腺病毒 E0 蛋白表达的鉴定

将重组腺病毒感染的 293 细胞和少量上清收集,冻融 3 次后用超声波进一步裂解细胞,然后进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测,一抗为猪抗 CSFV(1:50),二抗为 HRP 标记的羊抗猪 IgG(1:2 000)。对照样品用相同的方法处理。

1.7 重组腺病毒接种小鼠和猪后血清抗体的检测

1.7.1 免疫接种小鼠及血清抗体的检测 取 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 8 只,分为 2 组,每组 4 只。一组用重组腺病毒疫苗进行免疫接种,另一组用非重组腺病毒免疫接种作为对照组,接种病毒量都为 1×10^8 pfu。免疫 2 次,每次接种后 7 d,对小鼠进行断尾采血,分离血清,参考中国兽药药品监察所提供的猪瘟单克隆抗体 ELISA 使用说明书,对 8 只 BALB/c 小鼠血清中的猪瘟抗体水平进行检测。

1.7.2 免疫接种猪及血清抗体的检测 将 10 头 6~7 周龄猪瘟抗体检测阴性的商品猪随机分为 3 组,第 1 组 4 头,用 pAd-E0 免疫,剂量为 1.2×10^9 pfu,分别于颈部肌肉和腹部皮下注射,21 d 后相同途径和剂量再次免疫;第 2 组 4 头,为 pAd-CMV 对照组,免疫剂量和方法同第 1 组;第 3 组 2 头,为空白对照组。从第 1 次免疫接种开始,每周颈静脉采血,分离血清,检测抗体水平。

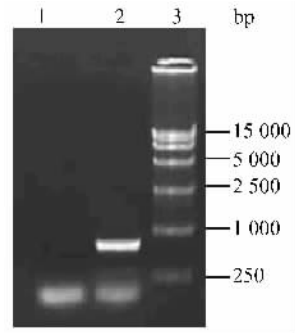
1.8 猪的攻毒试验

所有试验猪在第 2 次接种后的 20 d,用 1 000 TCID₅₀ 的猪瘟强毒石门株肌肉注射、点眼、滴鼻和经口攻击,攻毒后每天测量体温,观察临床症状。临床症状消失后,所有存活猪全部处死,观察主要脏器的病理变化。

2 结果

2.1 重组穿梭转移质粒 pAdTrack-E0 的构建

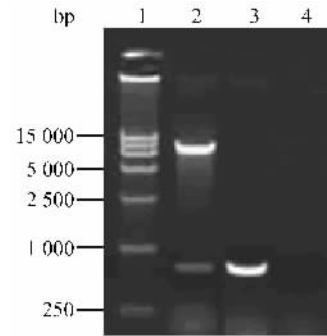
以 pMD18-T-E0 为模板,扩增 CSFV E0 的 DNA 片段,大小约 0.7 kb,结果与预期相符(图 1),用 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切得到的 E0 片段,将其克隆至腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV,挑取的阳性克隆命名为 pAdTrack-E0,酶切和 PCR 鉴定见图 2。测序鉴定证实重组穿梭载体中插入的 E0 基因正确。



1. PCR with H_2O as negative template; 2. CSFV E0 gene amplified from pMD18-T-E0; 3. DNA marker DL15000

图 1 PCR 扩增 CSFV E0 基因

Fig. 1 CSFV E0 gene amplified by PCR



1. DNA marker DL15000; 2. pAdTrack-E0 digested with *Bgl* II and *Kpn* I; 3. CSFV E0 gene amplified from pAdTrack-E0; 4. PCR with pAdTrack-CMV as negative template

图 2 pAdTrack-E0 酶切和 PCR 鉴定

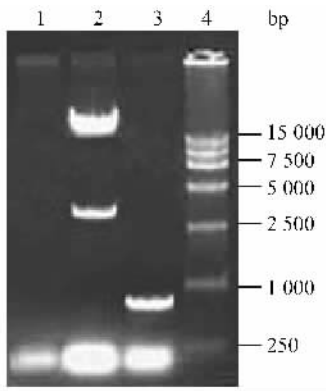
Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pAdTrack-E0

2.2 重组腺病毒 pAd-E0 的构建

将 pAdTrack-E0 用限制性内切酶 *Pme* I 线性化后,直接转化含有腺病毒骨架质粒的 BJ5183 感受态细胞,以获得重组的腺病毒骨架 pAdEasy-E0,经 *Pac* I 酶切后在电泳图上显示为一条大小为 3 kb 的小片段和一条大小约 30 kb 的大片段,鉴定结果以及 PCR 鉴定见图 3。

将 pAdEasy-E0 经 *Pac* I 线性化后,通过脂质体转染 293 细胞,8 d 后细胞出现肿胀、圆缩等明显致病变效应。

将有病变的细胞直接置于荧光显微镜下,在 pAd-E0 及不携带 CSFV E0 基因的 pAdEasy-CMV 转染的 293 细胞内可观察到绿色荧光(图 4A)。而



1. PCR with pAdEasy-CMV as negative template; 2. pAdEasy-E0 digested with *Pac* I; 3. CSFV E0 gene amplified from pAdEasy-E0; 4. DNA marker DL15000

图 3 pAdEasy-E0 酶切和 PCR 鉴定

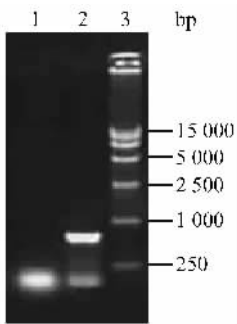
Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pAdEasy-E0



A. 带有绿色荧光腺病毒的 293 细胞; B. 脂质体转染的 293 细胞; C. 未转染的 293 细胞
A. The adenovirus with green fluorescent protein from 293 cells; B. 293 cells transfected with LipofectamineTM2000 only; C. Normal 293 cells

图 4 重组病毒 pAd-E0 感染 293 细胞后的 GFP 的表达

Fig. 4 Green fluorescence of 293 cells after inoculation with pAd-E0



1. PCR with pAd-CMV as negative template; 2. CSFV E0 gene amplified from pAd-E0; 3. DNA marker DL15000

图 5 重组腺病毒中 CSFV E0 基因的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of CSFV E0 gene form pAd-E0

两个阴性对照(293 细胞和未加 DNA 的脂质体转染的 293 细胞)没有观察到绿色荧光(图 4B、4C)。

2.3 重组腺病毒的滴度测定及 E0 基因的鉴定

取反复感染-收集-冻融 10 次的重组腺病毒上清,经 $10^{-3} \sim 10^{-8}$ 系列稀释后感染 293 细胞,48 h 后,用 Karber 方法计算出重组病毒的滴度为 6×10^8 pfu/mL。提取病毒 DNA,用扩增 E0 基因的引物能很好地从重组腺病毒 DNA 中扩增出 E0 基因,而非重组腺病毒则没有目的条带出现(图 5)。

2.4 重组腺病毒表达 E0 蛋白的 SDS-PAGE、Western blot 鉴定

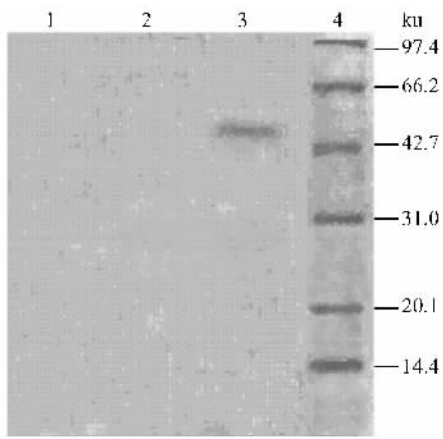
经 Western blot 分析,重组腺病毒在 293 细胞系中表达出现一条大小约为 45 ku 的蛋白条带,大小与预期蛋白分子量基本一致。而感染 pAdCMV 的细胞培养物则没有出现相应蛋白条带(图 6)。

2.5 免疫接种小鼠和猪血清的抗体水平

初次重组腺病毒免疫接种组的 4 只小白鼠血清抗体平均值为 1 : 512。用空白非重组腺病毒免疫作为对照组的 4 只小白鼠血清均为猪瘟抗体阴性。再次免疫接种后,重组腺病毒疫苗免疫组的 4 只小鼠血清抗体的滴度平均值为 1 : 10 240,对照组血清仍为猪瘟抗体阴性,表明该重组腺病毒能诱导动物产生抗猪瘟病毒的抗体。而 2 次免疫接种商品猪的平均抗体水平分别为 1 : 16 和 1 : 64。

2.6 攻毒后试验猪的临床症状和病理变化

2.6.1 临床症状 pAd-E0 免疫组在攻毒后第 4 天,4 头免疫猪中 3 头猪体温达 40 °C 以上,持续 48 h 左右,食欲稍微下降,其中 1 头在 72 h 后体温和食欲恢复正常,但另 2 头体温仍持续达 40 °C 以上,



1. Normal 293 cells; 2. pAdCMV infected 293 cells; 3. pAd-E0 infected 293 cells; 4. Prestained protein molecular marker

图6 pAd-E0 表达 E0 的 Western blot 鉴定

Fig. 6 Western blot of pAd-E0 expressed CSFV E0

先出现便秘,后腹泻,分别在第9天和第10天死亡。还有1头猪无症状。

pAd-CMV 和空白对照组的所有试验猪在攻毒后第2天体温升至40℃以上,病猪便秘,第3天食欲减退,精神沉郁,有些病猪发生呕吐,第4天很少采食,仅少量饮水,精神高度沉郁,四肢软弱无力,行动缓慢,摇摆不稳;普遍腹泻,两眼无神,有多量黏液脓性分泌物;腹下、耳和四肢内侧有出血点。第5天病猪伏卧不起,全身震颤,四肢呈游泳状划动。体温一直稽留在41℃左右。第6天开始陆续死亡,到第8天全部死亡,死前体温下降。

2.6.2 病理变化 pAd-E0 免疫组2头存活猪中,有1头下颌淋巴结、肠系膜淋巴结以及膀胱肿胀出血;1头肠系膜淋巴结和肾脏有出血。pAd-CMV 和空白对照猪死前下颌淋巴结、肠系膜淋巴结、腹股沟淋巴结、肾脏、脾脏、膀胱以及心脏均有明显的出血。

3 讨论

CSFV 编码的4种结构蛋白C、E0、E1和E2蛋白各有其生物学功能,其中最具有免疫学意义的是E0和E2。E0不仅是一种结构蛋白,而且也是一种重要的功能性蛋白,它与CSFV对宿主细胞的嗜性以及致病力有密切关系,可导致免疫抑制^[4],引起动物的淋巴细胞^[8,9]凋亡。E0是唯一可分泌到CSFV感染细胞的培养上清液中的糖蛋白^[4],也是CSFV的一个比较保守的蛋白,位于CSFV表面,刺激机体

产生中和抗体,并获得对猪瘟的免疫力^[10]。

Weilland等^[11]建立了8株抗CSFV的E0单抗,经与一组瘟病毒属毒株进行免疫过氧化物酶试验证明,其中7株单抗具有病毒中和活性,且不同的单抗之间具有协同中和作用,这种协同中和作用可将中和能力提高4倍。Rumenapf等^[1]以痘苗病毒为载体,插入E0基因,构建了重组病毒疫苗,动物试验表明,该疫苗能完全保护猪免受同源CSFV毒株的攻击,充分证明了E0基因是CSFV的一个主要保护基因,可用于研制CSFV基因工程疫苗。本试验将猪瘟强毒石门株E0在最新一代的非复制型腺病毒进行了高效表达,为进一步制备猪瘟基因工程疫苗奠定了基础。本研究利用改进的人类腺病毒C亚群的Ad5型的AdEasy-1系统,该系统缺失了腺病毒基因组的E1和E3区,这些片段的缺失可增强机体对外源抗原的免疫反应,更好地刺激机体产生免疫保护作用^[12]。因此与复制型腺病毒相比,非复制型腺病毒不仅更安全有效,而且以低剂量的方式产生抗原蛋白而不裂解细胞,故表达抗原的时间更持久,有利于激发长期的免疫反应。

试验过程中,笔者没有采用常规的将重组穿梭质粒线性化后,与腺病毒骨架质粒共同电转化BJ5183,通过细菌内的重组获得重组腺病毒DNA的方法,而是先将腺病毒骨架转化至BJ5183菌体中,然后将含有腺病毒骨架的BJ5183制成感受态,再将重组穿梭质粒线性化后转化该感受态,笔者将其称为“两步转化法”,该热休克转化方式较传统电转化效率高近100倍^[13]。笔者所获得的重组腺病毒连续传代10次,通过PCR和Western blot检测未发现E0基因丢失,证明pAd-E0克隆稳定表达E0基因。

为了研究重组腺病毒在动物体内诱导抗体的效果,笔者将 1×10^8 pfu单位的pAd-E0通过腹腔途径免疫小鼠,对血清抗体进行检测。初次免疫后,血清抗体的滴度为1:512,加强免疫后抗体滴度明显上升至1:10240。该结果说明笔者构建的表达猪瘟病毒E0基因重组非复制型腺病毒能在小鼠体内产生较高的抗体水平。另外,腺病毒作为一种活载体应用于基因工程疫苗,可能会受到宿主产生的针对腺病毒载体本身的特异性免疫的限制^[14],但以前的研究^[15,16]和本试验均发现,用同型非复制型腺病毒再次免疫时仍会取得较好的增强效果。

但是,用pAd-E0加强免疫猪后,并没有出现抗

体水平迅速上升的情况,并且,第一次免疫接种后抗 CSFV 抗体水平很低,仅为 1:16。不过,当用 1 000 TCID₅₀ 猪瘟强毒攻击时,却发现 4 头 pAd-E2 免疫接种组中仅有 2 头死亡,而对照组全部死亡,可见抗 CSFV 抗体水平的高低不是评价机体能否抵抗强毒攻击的唯一指标^[17],这有可能是因为接种了 pAd-E0 激发了机体其他的免疫机制,例如细胞免疫而抵抗了猪瘟病毒的攻击^[18]。这里需要说明的是,本课题的前期工作表明 100 TCID₅₀ 就可以导致所有非免疫猪死亡。采用 1 000 TCID₅₀ 的病毒量攻击,目的是检测在超致死量病毒攻击的情况下,本研究所构建的基因工程疫苗保护效果到底如何。

本研究构建了表达猪瘟病毒 E0 基因非复制型重组腺病毒,并对其免疫活性进行了初步研究,这将为下一步研制表达猪瘟病毒 E0 和 E2 双基因非复制型重组腺病毒疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Rumenapf T, Stark R, Meyers G, *et al.* Structural protein of hog cholera virus expressed by vaccinia virus; further characterization and induction of protective immunity [J]. *J Virol*, 1991, 65(2): 589~597.
- [2] Hulst M M, Van Gennip H G, Moormann R J, *et al.* 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^{ms} [J]. *J Virol*, 2000, 74 (20): 9 553~9 561.
- [3] Hulst M M, Moormann R J. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E^{ms} and E2 of classical fever virus; E^{ms} and E2 interact with different receptors[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78 (11): 2 779~2 787.
- [4] Bruschke C J, Hulst M M, Moormann R J, *et al.* Glycoprotein E^{ms} of pestivirus induces apoptosis in lymphocytes of several species [J]. *J Virol*, 1997, 71: 6 692~6 696.
- [5] Windisch J M, Schneider R, Stark R, *et al.* RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies[J]. *J Virol*, 1996, 70(1): 352~358.
- [6] Lin M, Trottier E, Mallory M. Enzyme-linked immunosorbent assay based on a chimeric antigen bearing antigenic regions of structural proteins E^{ms} and E2 for serodiagnosis of classical swine fever virus infection[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(7): 877~881.
- [7] Encke J, Putlitz Z J, Geissler M, *et al.* Genetic immunization generates cellular and humoral immune responses against the nonstructural protein of the hepatitis C virus in murine model [J]. *J Immunol*, 1998, 161: 4 917~4 923.
- [8] Hulst M M, Pauoto F E, Hoekman A, *et al.* Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E0 of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus [J]. *J Virol*, 1998, 72(1): 151~157.
- [9] Wendisch J N, Schneider R, Stark R, *et al.* RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies[J]. *J Virol*, 1996, 70: 352~358.
- [10] Kong M, Lengsfeld T, Pauly T, *et al.* Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins[J]. *J Virol*, 1995, 69: 6 479~6 486.
- [11] Welland E, Stark R, Haas B, *et al.* Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of disulfide-linked heterodimer [J]. *J Virol*, 1990, 64: 3 563 ~3 569.
- [12] Ginsberg H S, Lundholm-Beauchamp U, Horswood R L, *et al.* Role of early region 3(E3) in pathogenesis of adenovirus disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(10): 3 823~3 827.
- [13] Zeng M, Smith S K, Siegel F, *et al.* AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination[J]. *J Biotech*, 2001, 31: 260~262.
- [14] Schulick A H, Vassalli G, Dunn P F, *et al.* Established immunity precludes adenovirus mediated gene transfer in rat carotid arteries [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99: 209~219.
- [15] Papp Z, Babiuk L A, Baca-Estrada M E. The effect of preexisting adenovirus specific immunity on immune responses induced by recombinant adenovirus expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus type 1 [J]. *Vaccine*, 1999, 17: 933~943.
- [16] 赵小东, 韩 峰, 应 革, 等. 表达流行性感胃病毒 HA 基因非复制型重组腺病毒的构建及免疫效果的研究[J]. *病毒学报*, 2005, 25(1): 6~10.
- [17] Van Bekkum J G. Serological aspects of the vaccination against hog cholera with crystal violet vaccine [J]. *Tijdschr Diergeneesk*, 1966, 91: 149~170.
- [18] Kimman T G, Bianchi A T, Wensvoort G, *et al.* Cellular immune response to hog cholera virus (HCV): T cells of immune pigs proliferate in vitro upon stimulation with live HCV, but the E1 envelope glycoprotein is not a major T-cell antigen[J]. *J Virol*, 1993, 67: 2 922~2 927.