

CpG-ODN 增强表达犬瘟热病毒 H 蛋白重组质粒免疫效果的分析

徐向明¹,朱善元¹,张泉²,薛整风²,李厚达²

(1. 江苏畜牧兽医职业技术学院,泰州 225300;2. 扬州大学兽医学院,扬州 225009)

摘要: 为提高犬瘟热病毒(canine distemper virus,CDV)重组质粒的免疫应答水平,合成 4 条 CpG-寡脱氧核苷酸(CpG-oligodeoxynucleotides,CpG-ODN);通过体外淋巴细胞增殖试验确定 1 条刺激活性最显著的 CpG-ODN,序列为 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'。将 30 只健康毕格犬随机均分为 2 大组,每组再分为 5 小组,分别以不同的剂量肌肉注射 CDV 附着蛋白(H)重组质粒 pcDNA-H 和选定的 CpG-ODN。在免疫后的第 2、4、6 周分别测定各组动物的抗 CDV 中和抗体和 γ -干扰素水平。结果表明选定的 CpG-ODN 对提高抗 CDV 中和抗体效价和干扰素水平具有一定作用,且与对照组差异显著($P < 0.05$);但不同剂量的质粒 pcDNA-H 和 CpG-ODN 的效果不同,其中以 30 μg /只的 CpG-ODN 和 50 μg /只的 pcDNA-H 的剂量组合效果最佳。以选定剂量的 CpG-ODN 和 pcDNA-H 免疫 5 只健康毕格犬,同时以质粒 pcDNA-H 与生理盐水作为对照;4 周后所有动物均接种 CDV 组织匀浆毒。结果发现试验组动物均未出现犬瘟热临床症状,且攻毒后第 3 周 CDV 检测为阴性,而 pcDNA-H 对照组和生理盐水对照组动物的 CDV 检测阳性率为 2/5 和 5/5;这表明 CpG 能够明显促进重组质粒 pcDNA-H 的免疫保护作用。

关键词: CpG-ODN;犬瘟热;核酸疫苗;免疫应答;影响

中图分类号:S852.4

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2008)12-1737-06

The Analysis of the Immune Enhancing Effects of CpG-ODN on the Recombinant Plasmid which Contain the H Protein of Canine Distemper Virus

XU Xiang-ming¹, ZHU Shan-yuan¹, ZHANG Quan², XUE Zheng-feng², LI Hou-da²

(1. Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou 225300, China;

2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: To enhance the immunocompetence of recombinant plasmid against canine distemper virus, four CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) were designed and used in this research. Following lymphocytes proliferation test determined by ³H-TdR incorporation, one CpG-ODN was selected with optimistic immunostimulatory activity which sequence is 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'. 30 healthy Beagle dogs were assigned into two groups and each group was further divided into 5 subgroups. All the subgroups were tested with different dose of CpG-ODN and recombinant plasmid pcDNA-H (which contain the haemagglutinin gene of CDV) respectively. On the 2nd, 4th and 6th week after immunization, the neutralization antibody specific to CDV and the level of gama-interferon (IFN- γ) were determined, and the data showed that the CpG-ODN could elicit a better antibody response to CDV and increase the level of IFN- γ . Furthermore, the effect of different levels of CpG-ODN were dissimilar on improving immune response, while the optimistic CpG-ODN level is 30 μg with 50 μg pcDNA-H for each animal. Five

收稿日期:2008-09-02

基金项目:江苏省高校自然科学基金计划(04KJB230161)

作者简介:徐向明(1969-),男,博士,副教授,主要从事动物疾病的基因工程疫苗研究,E-mail: yzxmxu@163.com

Beagle dogs were inoculated with optimistic level of CpG-ODN and pcDNA-H, while another 10 dogs were only injected with pcDNA-H or normal saline water as control, all the animals were challenged with CDV 4 weeks post immunization, and the data showed that there were no Canine Distemper clinical symptom and no CDV infection in the first group, while 2(40%) and 5(100%) animals were infected with CDV in the pcDNA-H and normal saline water control group respectively.

Key words: CpG-ODNs; canine distemper; nucleic vaccine; immune response; effect

犬瘟热病毒(canine distemper virus)是犬科动物的重要病原,主要损害呼吸系统、消化系统,进而扩散到中枢神经系统^[1]。犬瘟热的免疫预防主要依赖于弱毒疫苗,但弱毒疫苗在一定程度上可损害神经系统,甚至造成免疫抑制;因此,寻求更为安全有效的疫苗是国内外研究的热点^[2-3]。目前,国外学者对 CDV 核酸疫苗的研究已取得了一定的进展,与传统疫苗相比更具安全性^[4-7];但不足的是刺激机体产生的抗体水平多不如传统疫苗^[8];因此寻求能增强核酸疫苗免疫效果的佐剂是解决问题的途径之一。作者在构建了含有 CDV 附着蛋白(H)基因的重组质粒,在动物体内进行基因免疫并取得成功的基础上^[8-9],进一步研究了非甲基化的硫代胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤(CpG)寡脱氧核苷酸(CpG-oligodeoxynucleotides, CpG-ODN)对 CDV 基因免疫增强作用,从而为 CDV 的预防拓宽了思路。

1 材料和方法

1.1 重组质粒

含犬瘟热病毒扬州分离株(CDV-YZ0101)附着蛋白(H)的重组质粒 pcDNA-H 为本实验室构建^[8],宿主菌为 DH5 α 。以无热源 QIAGEN plasmid mega kit(德国 QIAGEN 公司产品)制备和纯化重组质粒 DNA,最后溶解于无菌水中;用紫外分光光度计测定 DNA 浓度以及鲎试剂凝胶法测定内毒素含量后,以 5% 葡萄糖注射液调整浓度至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.2 CpG-ODN 序列

经硫代修饰的不含内毒素(LPS)的非甲基化 CpG-ODN 序列分别为 5'-TCGTCGTTAA-GTCGTTAAGTCGTT-3'、5'-TCGTCGTTTTGT-CGTTTTGTCGTT-3'、5'-TCGTCGTTTCGTCGTT-3'和 5'-AT AATCGACGTTCAAGCAAG-3',均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 主要试剂

聚乙烯亚胺(PEI, MW25000)为美国 Sigma 公司产品,其溶液参照 Boussif 等报道的方法配制^[10],使用时与 DNA 的比例为 1:1(体积比);鲎检测试剂为厦门鲎试剂实验厂有限公司产品;淋巴细胞分离液购自中国医学科学院血液学研究所;RPMI-1640 培养液与胎牛血清为美国 Gibco 公司产品;³H-胸腺嘧啶(³H-TdR)购自中国科学院上海原子能所;犬 IFN- γ ELISA 检测试剂盒为美国 Biosource 公司产品;RNA 抽提试剂盒(Total RNA Isolation system)为美国 Promega 公司产品,RT-PCR 试剂为上海生工生物工程公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

1.4 RT-PCR 引物

参照已发表的 CDV 核衣壳蛋白(N)基因序列(Accession No. AF378705、EF418783、EF375619、AF164967、EF042819),设计引物 PN-F(5'-GCAGAATTCATAGACGACCCTGATG-3')与 PN-R(5'-CGAGTCGACATTTGTCTCCTCCCT-3'),用于 CDV 感染的检测,由上海生工生物工程公司合成。

1.5 动物与细胞

普通级毕格犬(体质量均为 8 kg 左右),由扬州大学比较医学中心提供,经 RT-PCR 和 ELISA(北京世纪元亨动物防疫技术有限公司的 CDV 抗体 ELISA 试剂盒)检测未感染 CDV 且抗体阴性。前肢静脉无菌采集健康毕格犬抗凝血 5 mL,参考相关文献制备犬外周血淋巴细胞^[11]。用含有 100 IU/mL 青链霉素和 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。

1.6 CpG-ODN 的选定

将犬外周血淋巴细胞分装于 96 孔细胞培养板中(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$),分别加入不同 CpG-ODN(终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)至总体积为 200 μL ;同一 CpG-ODN 的试验组共设置 3 个重复孔。将细胞放入 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱继续培养 72 h 后,加适量³H-TdR(1.85

×10³ Bq/孔)继续培养 16~20 h。按参考文献[12]检测每分闪烁次数并计算刺激指数(stimulation index, SD),选定刺激活性最显著的 CpG-ODN 用于下一步试验。

1.7 动物分组和免疫

将 30 只健康毕格犬随机均分为二大组,每大组

再分为 5 小组,按照表 1 分别肌肉注射质粒 pcDNA-H(与 PEI 等体积混合)和 CpG-ODN。

1.8 血清样品的采集

各组动物均于免疫后的 2、4、6 周以前肢静脉采血,离心分离血清。

表 1 动物分组及其免疫方法

Table 1 Assignment and immunization of the animals

试验分组 Group	第 I 组 Group I		第 II 组 Group II	
	CpG-ODN	pcDNA-H	CpG-ODN	pcDNA-H
试验组 1 Experimental group I	10	50	30	10
试验组 2 Experimental group II	20	50	30	25
试验组 3 Experimental group III	30	50	30	50
试验组 4 Experimental group IV	40	50	30	100
对照组 Control group	—	50		100

1.9 CDV 中和抗体的监测

以固定病毒稀释血清法^[11]检测抗 CDV 抗体的中和效价。用 DMEM 培养液将血清作倍比稀释,分别加入等量的以 DMEM 培养液配置的病毒悬液(2×10³ TCID₅₀),于 25 °C 感作 2 h 后接种到 Vero 细胞单层;5 d 后判定结果,如出现多核巨细胞则作为未保护,同时设阳性血清、阴性血清对照。

1.10 血清 IFN-γ 的测定

按试剂盒说明采用双抗体夹心 ELISA 法测定采集血清中的 IFN-γ 含量。具体步骤为将包被抗体加入 ELISA 板(100 μL/孔),然后加入待测样品、对照和倍比稀释的标准品(5 ng/mL、2.5 ng/mL、1.25 ng/mL、625 pg/mL、312 pg/mL、156 pg/mL、78 pg/mL),最后加入酶标抗体(100 μL/孔)并显色,通过绘制标准曲线计算 IFN-γ 含量。

1.11 动物攻毒试验

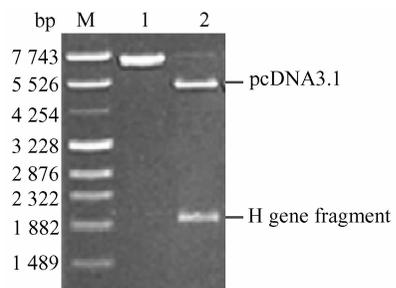
另选取 15 只健康毕格犬随机分为 3 组(试验组 5 只,pcDNA-H 对照组 5 只,生理盐水对照组 5 只)。试验组以剂量 30 μg/只的 CpG-ODN 和 50 μg/只的 pcDNA-H 通过肌肉注射进行免疫,同时以等量 pcDNA-H 和等量生理盐水分别接种对照组动物。于动物免疫后第 4 周,采用点眼和滴鼻方式接种 CDV 组织匀浆毒(CDV YZ0101,经 2 代盲传后,病毒 TCID₅₀为 10^{-5.0}/mL,原代毒经毕格犬复壮获得)。观察动物表现,于攻毒后第 3 周扑杀所有动物,检查各脏器组织病变;采集肺脏与淋巴结,以

Total RNA Isolation system 抽提 RNA 后,使用设计的引物以 RT-PCR 法检测 CDV N 基因^[13],从而确定动物的带毒情况。

2 结果

2.1 pcDNA-H 的纯化与检测

限制性内切酶消化及琼脂糖凝胶电泳表明纯化的重组质粒即 pcDNA-H(图 1);鲎试剂凝胶法显示所制备的质粒样品中内毒素含量为 50 EU/mg,符合 WHO 标准,能够用于体内注射并可忽略内毒素对 CpG-ODN 的干扰。



M. Lambda-pUC 相对分子质量标准;1. 重组质粒的 *Kpn* I 单酶切产物(7.4 kb);2. *Eco*R I 和 *Kpn* I 双酶切产物(5.4 和 2.0 kb)

M. Lambda-pUC mix marker; 1. The product digested with *Kpn* I (7.4 kb); 2. The product digested with *Eco*R I and *Kpn* I (5.4 and 2.0 kb)

图 1 重组质粒 pcDNA-H 酶切鉴定结果

Fig. 1 Restriction endonucleases analysis of recombinant plasmids of pcDNA-H

2.2 CpG-ODN 的刺激指数

犬外周血淋巴细胞经不同 CpG-ODN 作用 48 h 后,均表现为体积增大,但以 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3' 的作用效果最为明显。³H-TdR 掺入法试验结果也显示该序列的 CpG-ODN 刺激指数(SI)平均值为 5.2,显著高于 5'-TCGTCGTTAAGTCGTTAAGTCGTT-3' (3.2)、5'-TCGTCGTTTCGTCGTT-3' (3.8) 以及 5'-ATAATCGACGTTCAAGCAAG-3' (3.1)。因此选择 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3' 用于后续的动物试验。

2.3 CpG-ODN 对 pcDNA-H 的免疫增强作用

2.3.1 CpG-ODN 对抗体产生的影响 固定病毒

稀释血清法测定结果(表 2)显示,经不同 CpG-ODN 剂量(10、20、30、40 $\mu\text{g}/\text{只}$)与相同 pcDNA-H 剂量(50 $\mu\text{g}/\text{只}$)免疫健康毕格犬后,血清中抗 CDV 抗体中和效价均显著高于未使用 CpG-ODN 的对照组,且以 30 μg CpG-ODN 剂量组效果最佳。经相同 CpG-ODN 剂量(30 $\mu\text{g}/\text{只}$)与不同剂量 pcDNA-H (10、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{只}$)免疫健康毕格犬后,血清中抗 CDV 抗体中和效价在一定范围内与质粒 pcDNA-H 剂量具有正相关性,但不总是随剂量增加而升高,如 100 与 50 μg 剂量组的免疫刺激效果相当;同时该组试验同样揭示了 CpG-ODN 的免疫增强作用。研究表明以剂量 30 $\mu\text{g}/\text{只}$ 的 CpG-ODN 和 50 $\mu\text{g}/\text{只}$ 的 pcDNA-H 组合效果最佳。

表 2 CpG-ODN 对抗犬瘟热病毒中和抗体的影响

Table 2 Effects of CpG-ODN on the neutralization antibody specific to CDV

试验分组 Group	不同 CpG-ODN 剂量组			不同 pcDNA-H 剂量组		
	2 weeks	4 weeks	6 weeks	2 weeks	4 weeks	6 weeks
试验组 1 Experimental group I	$10^{-1.12a}$	$10^{-1.23a}$	$10^{-1.34b}$	$10^{-1.23a}$	$10^{-1.52b}$	$10^{-1.65c}$
试验组 2 Experimental group II	$10^{-1.25a}$	$10^{-1.65c}$	$10^{-1.76c}$	$10^{-1.33b}$	$10^{-1.67c}$	$10^{-1.88c}$
试验组 3 Experimental group III	$10^{-1.45b}$	$10^{-1.75c}$	$10^{-2.24d}$	$10^{-1.41b}$	$10^{-1.81c}$	$10^{-2.26d}$
试验组 4 Experimental group IV	$10^{-1.50b}$	$10^{-1.86c}$	$10^{-2.21d}$	$10^{-1.44b}$	$10^{-1.92c}$	$10^{-2.23d}$
对照组 Control group	$10^{-1.09a}$	$10^{-1.18a}$	$10^{-1.28a}$	$10^{-1.19a}$	$10^{-1.29a}$	$10^{-1.40b}$

表中数据分别为 3 只动物该指标的平均值;同一列数据标有不同字母者表示差异显著($P < 0.05$),下表同

The datum in the table is the average of the parameter of the 3 animals in one subgroup. Different letters indicate the data in same column is variant significantly ($P < 0.05$). The same as below

2.3.2 CpG-ODN 对干扰素产生的影响 通过对各组免疫动物不同时间段采集的血清进行 IFN- γ 检测,结果表明单独使用 pcDNA-H 对照组的 IFN- γ 的含量为 10.1 ~ 13.8 pg/mL ,而所有使用 CpG-

ODN 的试验组动物血清中 IFN- γ 的含量为 50.1 ~ 55.6 pg/mL ,组内差异不显著($P > 0.05$),但与对照组相比,差异显著($P < 0.05$)(表 3)。

表 3 CpG-ODN 对 γ -干扰素水平的影响

Table 3 Effects of CpG-ODN on the level of IFN- γ

试验分组 Group	不同 CpG-ODN 剂量组			不同 pcDNA-H 剂量组		
	2 weeks	4 weeks	6 weeks	2 weeks	4 weeks	6 weeks
试验组 1 Experimental group I	50.1 ^b	51.2 ^b	51.8 ^b	54.8 ^b	55.1 ^b	55.4 ^b
试验组 2 Experimental group II	52.3 ^b	53.2 ^b	54.2 ^b	54.2 ^b	52.1 ^b	55.3 ^b
试验组 3 Experimental group III	51.3 ^b	55.6 ^b	53.4 ^b	53.4 ^b	53.9 ^b	54.6 ^b
试验组 4 Experimental group IV	54.1 ^b	54.6 ^b	55.2 ^b	54.3 ^b	55.6 ^b	53.9 ^b
对照组 Control group	13.3 ^a	13.8 ^a	13.5 ^a	13.5 ^a	13.8 ^a	13.5 ^a

2.4 动物攻毒后的病理变化

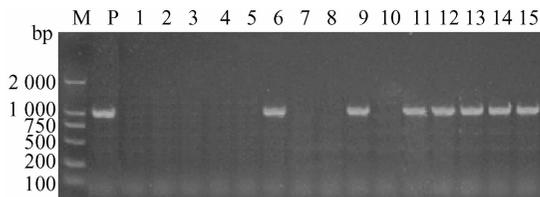
试验组 5 只动物各脏器均未见肉眼和显微组织

病变;5 只生理盐水对照组动物的脑、肺、肝、肠、脾均有较为显著的病理变化,表现为肺泡壁毛细血管

扩张充血,肺泡腔内可见较多浆液性渗出,并有中性粒细胞和巨噬细胞及脱落的肺泡上皮细胞;肝细胞肿大,胞浆疏松呈网状、半透明,严重区域肝细胞肿大呈球状;小肠黏膜上皮细胞变性、坏死脱落,肠壁水肿,有数量不等的炎细胞浸润;脾呈退行性变化,小动脉鞘周围淋巴细胞逸失,脾红髓可见单核细胞、嗜中性白细胞等炎细胞浸润,脾窦内可见含铁血黄素;脑组织局灶性神经细胞核固缩、液化坏死,形成染色较浅、质地疏松的筛网状病灶,部分区域神经细胞水肿,胞质呈空泡状改变;5 只 pcDNA-H 对照组未见肉眼病变,但有较为明显的组织显微病变。

2.5 动物攻毒后的带毒情况

RT-PCR 扩增结果显示,试验组动物于攻毒后第 3 周均未检测到 CDV,而从生理盐水对照组动物的组织样品中均能扩增出 CDV N 蛋白基因约 1 000 bp 片段,与预计大小(1 065 bp)一致,pcDNA-H 对照组中有 2 个肺脏组织可以扩增出 CDV N 蛋白基因(图 1)。这表明重组质粒 pcDNA-H 与 CpG 协同免疫动物后,可产生抵抗 CDV 攻击的保护力。



M. DNA Marker DL2000; P. CDV (YZ0101 株); 1~5. CpG 重组和质粒免疫的试验组动物; 6~10. 仅注射 pcDNA-H 的对照组动物; 11~15. 仅注射生理盐水的对照组动物

M. DNA Marker DL2000; P. CDV (YZ0101 株); 1-5. The animals immunized with the CpG and recombinant plasmids; 6-10: The animals only injected with recombinant pcDNA-H as control; 11-15. The animals only injected with normal saline water as control

图 1 动物攻毒后肺脏组织的 RT-PCR 检测结果

Fig. 1 RT-PCR detection in lung of infected animals by CDV

3 讨论

CDV 减毒活疫苗的广泛使用大大降低了 CD 发病率,但也存在许多不足,如可引起免疫抑制和中枢神经的损害。此外,CDV 的宿主谱日趋扩大,可引起许多陆栖和水生野生动物的发病和死亡,因此对犬安全的活疫苗,也有可能给这些群体带来灭顶之灾^[14-15]。目前,国外已经主要致力于犬瘟热基因

工程疫苗的研究,但刺激机体产生的抗体水平多不如传统疫苗;因此,探索能够增强核酸免疫效果的佐剂可能是重要的切入点。许多研究小组认为,犬瘟热基因工程疫苗的构建中应优先选择野毒株,这样才能增加预防的针对性,提高免疫效果^[16]。前期研究发现我国分离株至少在 H 基因方面已显示出与疫苗株存在着差异,因此,作者以本实验室分离克隆的中国分离株(CDV-YZ0101)为素材,将囊膜糖蛋白 H 基因定向插入真核表达载体 pcDNA3.1(-)中,构建了重组质粒 pcDNA-H,这对保持 H 的保真性,提高重组质粒的免疫效果具有重大的意义。因此,以忠于流行病学的毒株的 H 基因来构建用于核酸疫苗的研究,不仅为研发具有针对性和自主知识产权的 DNA 疫苗做了初步尝试,而且可为将来揭示犬瘟热病毒受体结合蛋白提供依据。

研究表明,CpG-ODN 可与 TLR-9 受体结合,激发天然免疫反应和获得性免疫反应,是一种良好的免疫佐剂^[12,17]。鉴于物种对 CpG 的识别具有种属特异性,通过对 4 条不同序列的硫代 CpG-ODN 刺激犬外周血淋巴细胞的试验,确定了 1 条具有较为理想的 CpG-ODN 序列 5'-TCGTCGTTTT-GTCGTTTTGTCGTT-3'(3 个 GTCGTT 基序以 TT 连接)。通过不同剂量 CpG-ODN 和不同剂量重组质粒 pcDNA-H 的动物免疫试验,确定了适宜的 CpG-ODN 与 pcDNA-H 剂量组合,从而为 CDV 的预防拓宽了思路,为进一步研究 CpG 寡核苷酸在犬用疫苗佐剂方面的应用提供了理论和实验依据。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的重要组成部分,其与 CpG 具有相似的免疫激活效应,因此,在本试验中,通过 QIAGEN 公司的无热源质粒纯化试剂盒对重组质粒 pcDNA-H 中的 LPS 进行了去除,并通过鲎试剂凝胶法确定了 LPS 含量在 50 EU 之内,这不仅可排除 LPS 干扰 CpG 协同刺激 pcDNA-H 在犬体内的免疫反应应答,也可保护实验犬免受 LPS 引起的发热、休克或死亡等毒副作用,更保证了研究结果的可靠性。

DNA 免疫最常用的接种方式是裸 DNA 肌肉注射,然而裸 DNA 易被组织液中的核酸酶降解,从而降低 DNA 的摄入量及转染效率。脂质体的应用初步克服了这个难题,却因价格昂贵致使许多研究只能停留在实验室水平。聚乙烯胺(PEI)与核酸疫苗的结合无疑给后者的研究推广带来了曙光^[18],PEI 能包裹大量 DNA,且具有较强的缓冲能力,可确保外源性 DNA 免受核酸酶的降解。此外,PEI

作为转染介质,还有毒性小,转染效率高,价格低廉等优点,受到广泛青睐。试验中,采用 PEI 包裹的方式将 CpG 和重组质粒 pcDNAH 包裹后,分组进行注射,最终的结果证实用 30 μg CpG 与 50 μg pcDNA-H 的免疫刺激效果最好,在此剂量均可有效刺激犬对犬瘟热 H 蛋白产生良好的免疫应答,而且避免了使用脂质体转染带来的昂贵费用,给进一步研制犬瘟热核酸疫苗奠定了基础。

研究以犬瘟热病毒中国(扬州)分离株为素材构建了重组质粒 pcDNA-H 在此基础上,以其和 CpG-ODN 混合后注射毕格犬诱发了较高水平的病毒中和抗体效价,细胞因子 IFN- γ 的含量比对照组也有大幅度的提高,这比 Sixt 等^[5]构建的 pVIJ-H 采用基因枪和肌注 2 种方法免疫小鼠,诱发的免疫应答效果更为有效,提示本试验采取的方案确实可行,可以为进一步研究犬瘟热核酸疫苗奠定基础。

参考文献:

- [1] KENTARO F, RYUICHI M, MISAKO Y, et al. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement of heparin-like molecule in CDV infection [J]. *Virology*, 2007, 359(2): 324-335.
- [2] 徐向明,崔治中. 犬瘟热基因工程疫苗研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2002, 6(18): 10-12.
- [3] ENGELHARDT P, WYDER M, ZURBRIGGEN A, et al. Canine distemper virus associated proliferation of canine footpad keratinocytes *in vitro* [J]. *Vet Microbiol*, 2005, 107(1-2): 1-12.
- [4] FISCHER L, TRONEL J, PARD-DAVID C, et al. Vaccination of puppies born to immune dams with a canine adenovirus-based vaccine protects against a canine distemper virus challenge [J]. *Vaccine*, 2002, 20(29-30): 3 485-3 497.
- [5] SIXT N, CARDOSO A, VALLIER A, et al. Canine distemper virus DNA vaccination induces humoral and cellular immunity and protects against a lethal intracerebral challenge [J]. *J Virol*, 1998, 72(11): 8 472-8 476.
- [6] CHERPILLOD P, TIPOLD A, GRIOT-WENK M, et al. DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper [J]. *Vaccine*, 2000, 18(26): 2 927-2 936.
- [7] FISCHER L, TRONEL J, MINRE J, et al. Vaccination of puppies with a lipid-formulated plasmid vaccine protects against a severe canine distemper virus challenge [J]. *Vaccine*, 2003, 21: 1 099-1 102.
- [8] 徐向明,崔治中,殷俊,等. 犬瘟热病毒中国分离株囊膜糖蛋白基因免疫小鼠诱发的抗体应答 [J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(6): 419-422.
- [9] 徐向明,殷俊,崔治中,等. 犬瘟热病毒扬州分离株融合蛋白 F 和附着蛋白 H 基因的序列分析 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2003, 24(4): 9-12.
- [10] BOUSSIF O, LEZOUALCH F, ZANTA M A, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(16): 7 297-7 301.
- [11] 汪谦. 现代医学实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 887-899.
- [12] 马艳琴,李光富,朱鸿飞,等. 体外筛选对猪具有免疫刺激活性的 CpG ODN [J]. 上海免疫学杂志, 2003, 23(4): 252-259.
- [13] FRISK A L, KONIG M, MORITZ A, et al. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 3 634-3 643.
- [14] GEMMA T, WATARI T, AKIYAMA K, et al. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area [J]. *J Vet Med Sci*, 1996, 58(6): 547-550.
- [15] EK-KOMMONEN C, SIHVONEN L, PEKKANEN K, et al. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland [J]. *Vet Rec*, 1997, 141(15): 380-383.
- [16] CHERPILLOD P, TIPOLD A, GRIOT-WENK M, et al. DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper [J]. *Vaccine*, 2000, 18(26): 2 927-2 936.
- [17] KRIEG A, YI A, MATSON S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation [J]. *Nature*, 1995, 374(6 522): 546-549.
- [18] NGUYEN DN, RAGHAVAN SS, TASHIMA LM, et al. Enhancement of poly(orthoester) microspheres for DNA vaccine delivery by blending with poly(ethyleneimine) [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(18): 2 783-2 793.