

小反刍兽疫病毒化学合成表位多肽对小鼠的免疫效果研究

刘文华¹, 王志亮^{2*}, 吴晓东², 孙成友²

(1. 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109; 2. 中国动物卫生与流行病学中心 国家外来动物疫病诊断中心, 青岛 266032)

摘要: 利用化学合成的小反刍兽疫病毒(PPRV)表位多肽免疫小鼠, 以期了解表位多肽的免疫效果。首先利用表位预测软件筛选针对 PPRV *F* 和 *H* 基因的 4 条表位多肽, 并进行化学合成。将合成多肽免疫小鼠, 通过 ELISA、MTT 法、NK 细胞杀伤活性测定及 T 细胞亚群检测等免疫试验分析预测表位的抗原性。结果表明: 在筛选的 4 条表位多肽中, H242-255、F528-541 和 H349-362 具有较好的体液免疫功能; H242-255、H392-405 具有较好的细胞免疫功能。其中 H242-255 多肽能够满足两方面的功能, 有望作为候选表位疫苗成分。试验结果为筛选有效表位用于 PPRV 表位疫苗的研究奠定了基础。

关键词: 小反刍兽疫病毒; 表位多肽; NK 细胞杀伤活性; MTT 法; T 细胞亚群检测

中图分类号: S852.659.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)03-0438-07

Research of the Immune Efficacy of Chemical Synthetic Epitope Polypeptide of Peste des Petits Ruminants Virus on Mice

LIU Wen-hua¹, WANG Zhi-liang^{2*}, WU Xiao-dong², SUN Cheng-you²

(1. *Animal Science and Veterinary Medicine College, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China*; 2. *National Diagnostic Center for Exotic Animal Diseases, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China*)

Abstract: Epitope polypeptides of peste des petits ruminants virus (PPRV) were synthesized and its immunogenicity was examined in mice. Four epitope polypeptides against *F* and *H* gene of PPRV were selected by the epitope prediction software and acquired by chemical synthesis, then were administered subcutaneously at dose of 100 μ g to BALB/c mice, and the epitope antigenicity was analyzed by immunoassays of ELISA, MTT, the killing activity of NK cell and T lymphocyte subsets detection. As a result, H242-255, F528-541 and H349-362 had better humoral immune function among the four epitope polypeptides, while H242-255 and H392-405 had better cellular immune function. Thus, peptide of H242-255 can satisfy the two immunologic functions, and can be used as a candidate epitope vaccine component. The study had great significance by screening efficient epitopes for the development of PPRV epitope vaccines.

Key words: peste des petits ruminants virus; epitope polypeptide; the killing activity of NK cell; MTT; T lymphocyte subsets detection

小反刍兽疫是由小反刍兽疫病毒(peste des petits ruminants virus, PPRV)引起的山羊、绵羊、

收稿日期: 2014-06-25

作者简介: 刘文华(1970-), 女, 山东莱阳人, 副教授, 博士, 主要从事兽医微生物学与免疫学的教学和科研工作, E-mail: whliu2668@qau.edu.cn

* 通信作者: 王志亮, 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事外来病的诊断技术和分子生物学研究, Tel: 86-532-87839188, Fax: 86-532-87839922,

E-mail: zlwang111@163.com

羚羊等小反刍动物易感的烈性病毒性传染病。该病传播速度快,发病率和死亡率高,被 OIE 规定为法定报告疫病,中国规定为 I 类动物疫病。目前该病主要依靠疫苗进行预防,临床使用的弱毒苗免疫效果良好^[1-2]。但弱毒苗存在毒力返强的潜在危险,所以近年来研究者一直致力于开发安全有效的新型疫苗用于 PPR 的预防,如以山羊痘病毒为载体构建的双价疫苗^[3-4]。表位的认识为疫苗的开发提供了一条新思路,基于此开发的表位疫苗可以弥补传统疫苗的毒副作用、安全隐患等不足,并可以通过集中优势抗原表位来增强免疫针对性;通过优化组合不同病毒的抗原表位以及同一病毒不同血清型表位为多价苗和联苗的开发奠定了基础。尽管表位疫苗的研究起步较晚,但已开展的一些研究工作^[5-9]表明,它在未来疫苗的开发中具有广阔的应用前景。

已知 PPRV 刺激机体产生中和抗体的表位位于血凝素基因(*H*)和融合蛋白基因(*F*)上,本研究采用生物信息学方法,利用表位预测软件对 PPRV 的 *H* 和 *F* 基因的抗原表位进行预测和筛选,并通过小鼠免疫试验分析预测表位的抗原性,为筛选有效表位用于 PPRV 表位疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自南京青紫兰科技有限公司;K562 细胞由扬州大学医学院潘兴元博士惠赠;弗氏完全佐剂、不完全佐剂及 HRP-兔抗羊 IgG 和 HRP-兔抗鼠 IgG 为 SIGMA 公司产品;Cyto Tox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒为 Promega 公司产品;淋巴细胞亚群抗小鼠 CD3e-FITC、CD4(L3T4)-PE、CD8a-PE-Cy5 单抗购于 eBioscience 公司;犊牛血清、RPMI 1640 为 Invitrogen 公司产品;MTT、ConA 为上海生工产品。PPRV 阴阳性血清和牛瘟病毒(RPV)阳性血清由中国动物卫生与流行病学中心国家外来病诊断中心提供。

1.2 基因序列的选择

1.2.1 序列分析软件 生物信息学 MHC I 类分子预测采用网络服务器 SYPEITHI (<http://www.syfpeithi>)、Bimas (<http://www.bimas.cit.nih.gov>)、Multipred (<http://sdmc.lit.org.sg/multipred>)。生物信息学 MHC II 类分子预测采用网络服务器 SYPEITHI 和 MultiPred。生物信息学

B 细胞表位预测采用网络服务器 Bcepred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>)。蛋白酶体切割位点预测采用 PAProC (<http://www.paproc2.de/paproc1/paproc1.html>)。

1.2.2 表位多肽的合成及偶联 利用本实验室已完成全基因组测序的 2 株分别来自西藏自然感染山羊和岩羊的 PPRV 野毒株(GenBank 登录号分别为 JF939201 和 JX217850)及 GenBank 登录的 PPRV 的 *H* 基因和 *F* 基因编码的氨基酸序列,根据上述软件预测结果合成下列 4 条表位多肽:H349-362 (LYLSSHRGIKDDDEC)、H242-255 (PSTDLGIGHF-LRVFC)、H392-405 (CSFCNGTGSGPW-SEG)和 F528-541(CNPGLKPDLTGTSKS)。同时分别合成与大分子蛋白 KLH 和 BSA 偶联的多肽。上述多肽由金斯瑞生物科技有限公司合成,所有合成多肽纯度均达 90%以上。

1.2.3 候选表位抗原性分析 用 BSA 偶联的 4 种多肽($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)分别包被酶标板 4°C 过夜,用 5% 的脱脂奶 37°C 封闭 2 h。每孔加入山羊源 PPRV 阳性血清(1:50 稀释)各 $100 \mu\text{L}$,同时设相同稀释倍数的阴性山羊血清和 RPV 阳性血清作为对照, 37°C 温育 1 h, PBST 洗涤后加入 HRP-兔抗羊 IgG(1:10 000 稀释), 37°C 温育 1 h,加入 TMB 底物溶液, 37°C 避光显色 15 min 后用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2SO_4 终止,测定 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 。组间差异应用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析,评估候选表位血清结合力强弱。

1.3 小鼠的多肽免疫

将 KLH 偶联多肽与弗氏完全佐剂等量混合进行乳化作为免疫原。一免的免疫原制备时使用弗氏完全佐剂,二免及以后使用弗氏不完全佐剂。取 4~6 周龄 BALB/c 小鼠 50 只,随机分为 5 组,其中 4 组试验组分别皮下多点免疫与 KLH 偶联的 4 种多肽,另外 1 组免疫 KLH 作为对照,每只小鼠免疫剂量为 $100 \mu\text{g}$ 。首免后间隔 2 周进行二免,再间隔 2 周进行三免,免疫剂量及免疫途径相同。

1.4 ELISA 检测小鼠血清抗体

分别于免疫前、首免后 1 周、2 周、二免后 1 周、2 周以及三免后 1 周和 2 周进行小鼠眼睑采血,分离血清。用 BSA 偶联的相应多肽和载体 KLH 包被酶标板($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),将分离的小鼠血清进行 1:200 稀释,将 HRP-兔抗鼠 IgG 进行 1:10 000 稀释,用间接 ELISA 检测小鼠血清中针对不同免疫原

的特异性抗体水平。

1.5 小鼠脾淋巴细胞增殖试验(MTT法)

二免和三免后2周各组分别取免疫小鼠5只,无菌条件下取小鼠脾,按常规方法分离脾细胞并计数^[10]。进行MTT试验时以含10%犊牛血清的RPMI 1640完全培养液调整细胞浓度至 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,然后于96孔细胞板内每孔加入100 μL 脾细胞悬液,试验孔分别用相应的多肽或丝裂原ConA(使终质量浓度达 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)作为刺激剂,同时设不加刺激剂的细胞对照孔,每个样品均重复3孔。混匀后置 37°C 5% CO_2 培养箱培养66 h,再每孔加入20 μL MTT ($5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),继续培养4 h。然后每孔加入150 μL 的DMSO,振荡10 min使紫黑色结晶完全溶解。用酶联免疫检测仪测定 $\text{OD}_{490 \text{ nm}}$,分析各组脾淋巴细胞的增殖能力。以待测样品 $\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 值减去不加刺激剂对照孔 $\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 平均值代表淋巴细胞增殖能力。应用SPSS17.0软件中的单因素方差分析进行差异显著性检验。

1.6 小鼠脾NK细胞杀伤活性测定

将K562细胞培养到旺盛生长状态,在NK细胞杀伤活性检测前进行最适靶细胞数目的确定。根

据靶细胞最适数目的测定结果,调整脾淋巴细胞浓度使效靶比为50:1,作为效应细胞。具体操作和结果计算按照Cyto Tox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit使用说明书进行。计算结果应用SPSS17.0软件中的单因素方差分析对各免疫组NK细胞杀伤活性进行差异显著性检验。

1.7 小鼠T细胞亚群检测

取分离的脾细胞悬液各100 μL 分别加入3种不同荧光标记的荧光染料(FITC-CD3、cy5-CD4、PE-CD8)各1 μL ,同时设置各染色抗体单染对照管和空白管。将样品避光染色30~40 min,每10 min摇1次。染色结束后的样品即可上流式细胞仪测定。圈定 CD3^+ 淋巴细胞亚群,应用ELITE4.5软件分析各类淋巴细胞表达情况,将所得数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 候选表位抗原性分析

以预测的4种候选表位多肽包被ELISA板,再分别用山羊源的PPRV阳性血清、阴性血清及RPV阳性血清进行免疫反应性分析,结果见表1。

表1 候选表位血清反应分析($\text{OD}_{450 \text{ nm}}, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Serum reaction analysis of candidate epitopes ($\text{OD}_{450 \text{ nm}}, \bar{x} \pm s$)

血清 Serum	候选表位 Candidate epitopes			
	H242-255	H349-362	H392-405	F528-541
PPRV 阳性血清	$0.485 \pm 0.013^{**}$	$0.321 \pm 0.024^*$	0.199 ± 0.014	$0.486 \pm 0.001^{**}$
PPRV 阴性血清	0.188 ± 0.002	0.219 ± 0.009	0.195 ± 0.000	0.143 ± 0.009
RPV 阳性血清	0.183 ± 0.004	0.226 ± 0.007	0.184 ± 0.002	0.138 ± 0.006

*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$

由表1结果可知:应用SPSS17.0软件中的单因素方差分析结果显示,表位H242-255、F528-541作为包被抗原时,PPRV阳性血清与相应的阴性血清相比达到差异极显著水平($P < 0.01$);表位H349-362包被时,PPRV阳性血清与相应的阴性血清相比差异显著($P < 0.05$);表位H392-405包被时,阴阳性血清相比差异不显著($P > 0.05$)。据此可以推断表位多肽H242-255、F528-541和H349-362具有成为功能表位的潜能,而H392-405表位不与PPRV阳性血清反应,说明不具备B细胞表位功能,是否具有T细胞表位功能还有待进一步验证。而RPV阳性血清在4个表位多肽均表现为差异不

显著($P > 0.05$),可认为4个表位多肽与RPV阳性血清没有交叉反应性。

2.2 多肽的体液免疫反应

4种偶联KLH的多肽免疫小鼠后均可刺激产生相应的抗体,结果见图1。各免疫组ELISA抗体自免疫后1周后即可检测到,并逐步上升,三免后2周抗体基本维持在一定水平。二免后不同表位免疫组间及多肽免疫组与载体免疫组差异均不显著($P > 0.05$);三免后各组间差异仍不显著($P > 0.05$)。尽管多肽免疫后可以刺激小鼠产生高滴度抗体,但这只能说明合成的多肽具有免疫原性,不能证明其针对性。

2.3 多肽免疫小鼠的淋巴细胞增殖反应

分离脾淋巴细胞,经 ConA 和相应的 4 种多肽刺激后用 MTT 法检测淋巴细胞的增殖能力。二免后 2 周,用不同的刺激剂各免疫组间及与空载体组间差异均不显著($P>0.05$)。三免后 2 周,各免疫组的淋巴细胞增殖能力比较结果见图 2。结果显示:ConA 的刺激效果显著优于同等浓度的多肽刺

激剂,4 种多肽的刺激效果没有显著差异。ConA 刺激作用下,H392-405 组的淋巴细胞增殖能力显著高于其他组($P<0.01$);多肽刺激作用下,H392-405 组、H242-255 组和 H349-362 组的淋巴细胞增殖能力显著高于 KLH 载体对照组($P<0.01$)。上述结果表明:H392-405、H242-255 和 H349-362 多肽具有细胞免疫功能。

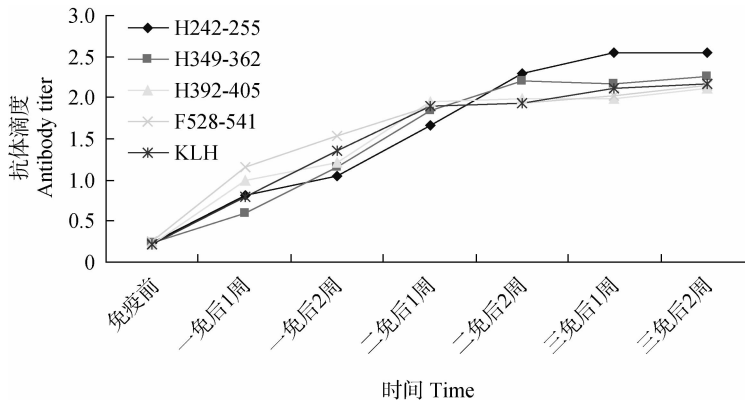


图 1 多肽诱导小鼠产生的特异性抗体水平

Fig. 1 Specific antibody response in mice immunized with polypeptides

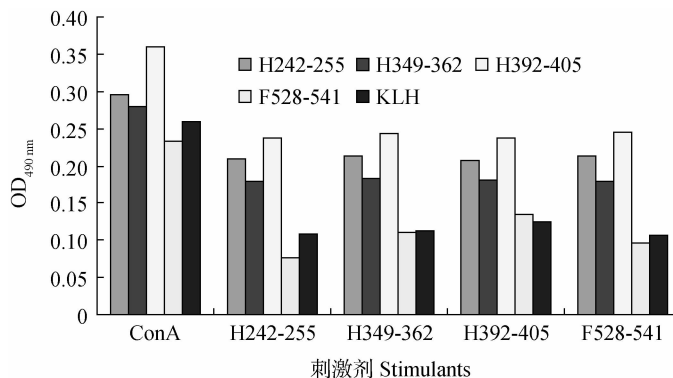


图 2 多肽三免后 2 周的小鼠脾细胞对不同刺激剂刺激的增殖反应

Fig. 2 Proliferative response of spleen lymphocytes from mice immunized with different stimulants after 2 weeks of the third immunization

2.4 小鼠 NK 细胞杀伤活性测定结果

将 K562 细胞作为靶细胞,偶联多肽免疫小鼠的脾细胞作为效应细胞,测定的最适靶细胞数目为 $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,按照效靶比为 50 : 1 的比例将效应细胞稀释到适宜浓度,检测免疫组小鼠的 NK 细胞杀伤活性。结果见表 2。二免后 2 周,所有组均检测不到 NK 细胞杀伤活性;三免后 2 周,所有组均检测到 NK 细胞杀伤活性,其中偶联多肽免疫组 H242-255、H392-405 和 F528-541 的 NK 细胞活性显著高于 KLH 载体免疫组和 H349-362 组($P <$

0.05);H349-362 与 KLH 载体免疫组差异不显著($P>0.05$)。综合上述结果可知:H242-255、H392-405 和 F528-541 多肽免疫组小鼠具有较高的 NK 细胞杀伤活性。

2.5 小鼠脾 T 淋巴细胞亚群分析

分离小鼠脾淋巴细胞,用流式细胞术三色分析法检测 CD3^+ 、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 、 $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ T 淋巴细胞的比例,结果见图 3。对各免疫组淋巴细胞比例进行方差分析,结果见图 4、5。

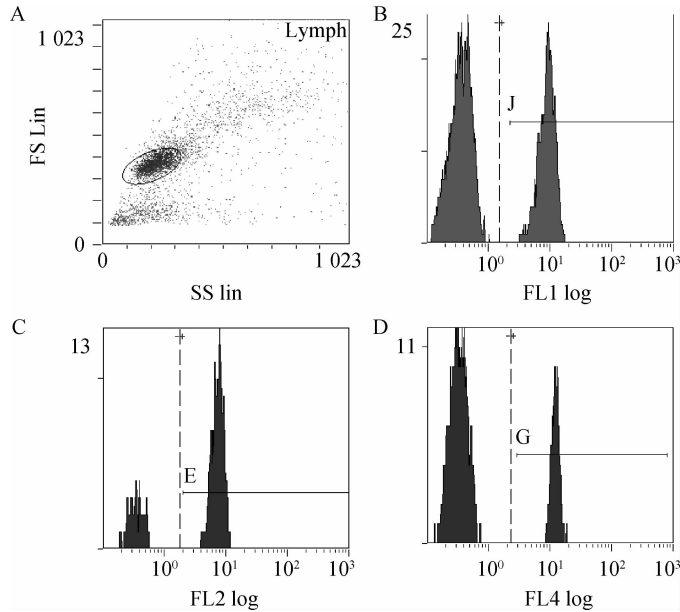
表 2 小鼠脾脏 NKC 杀伤活性检测结果

Table 2 NK cytotoxicity assay of spleen lymphocytes from mice

时间	H242-255	H349-362	H392-405	F528-541	KLH
二免后 2 周	0	0	0	0	0
三免后 2 周	18.4±0.59 ^a	13.45±2.02 ^b	17.77±1.99 ^a	19.11±1.54 ^a	11.81±2.18 ^b

不同字母间差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母间差异不显著 ($P > 0.05$)

Different letters in the same row means significant difference ($P < 0.05$), and the same letter in the same row means not significant difference ($P > 0.05$) between the treatments of different epitope polypeptides



A. 淋巴细胞圈门; B. CD3⁺T 淋巴细胞; C. CD4⁺T 淋巴细胞; D. CD8⁺T 淋巴细胞

A. Detection of lymphocyte; B. Detection of CD3⁺T lymphocyte; C. Detection of CD4⁺T lymphocyte; D. Detection of CD8⁺T lymphocyte

图 3 流式细胞术三色分析法

Fig. 3 Flow Cytometer of three colour analysis method

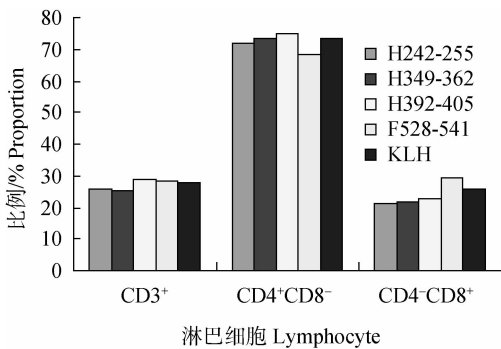


图 4 二免后 2 周小鼠脾淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞的比

Fig. 4 CD3⁺、CD4⁺ and CD8⁺ expression on lymphocytes in spleen 2 weeks after the second immunization

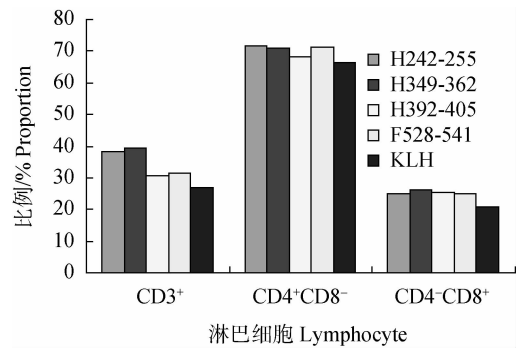


图 5 三免后 2 周小鼠脾淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞的比

Fig. 5 CD3⁺、CD4⁺ and CD8⁺ expression on lymphocytes in spleen 2 weeks after the third immunization

由图 4 可知,二免后 2 周,4 个多肽免疫组与载体 KLH 免疫组在 $CD3^+$ 、 $CD4^+CD8^-$ 、 $CD4^-CD8^+$ T 淋巴细胞水平上以及 $CD4^+CD8^-$ 及 $CD4^-CD8^+$ T 细胞比值的差别均不明显;由图 5 可见,三免后 2 周,各组间 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞水平出现差异,在 $CD3^+$ T 细胞水平上,H349-362 和 H242-255 多肽免疫组极显著高于其他免疫组($P < 0.01$);在 $CD4^+CD8^-$ 、 $CD4^-CD8^+$ T 细胞水平上,4 个多肽免疫组均明显高于 KLH 载体免疫组($P < 0.05$),但 $CD4^+CD8^-$ 及 $CD4^-CD8^+$ T 细胞比值变化差异不明显。三免与二免相比,H349-362 和 H242-255 多肽免疫组在 $CD3^+$ T 细胞水平上出现极显著升高($P < 0.01$),其余没有统计学上的差异。

综合上述结果,在筛选的 4 条表位多肽中,H242-255、F528-541 和 H349-362 具有较好的体液免疫功能;H242-255、H392-405 具有较好的细胞免疫功能。其中 H242-255 多肽能够满足这 2 个方面的条件,有望作为候选表位疫苗成分。

3 讨论

随着免疫原由全病原向亚单位、蛋白质分子、表位多肽过渡,其诱发的免疫反应针对性逐渐增强,但免疫原性却呈现降低的趋势,从而使得许多小分子疫苗不能激发有效的保护性应答。这已成为目前生物技术疫苗研究领域亟待突破的主要障碍之一。所以,如何根据表位图谱,设计免疫原性强而不影响其抗原特异性的疫苗已成为今后疫苗研究的重点。

3.1 关于抗原表位的预测

近年来,随着免疫学理论、生物信息学技术和计算机科学技术的广泛应用,人们对表位预测的研究方法和思维方法有了新的进展,直接应用生物信息学技术手段进行表位预测已成为可能。目前已经开发了许多专业软件、数据库、Web 服务器等表位预测工具^[11]。在使用各种不同软件进行表位预测时,所获得的结果往往有差异,如何提高预测表位的命中率是实验的关键。在本研究中,我们应用多款不同网络服务器的不同算法进行了表位的筛选,尽可能使获得的表位在各种预测软件中都能得到“认可”。

3.2 关于候选表位抗原性分析

体液免疫是通过 B 淋巴细胞产生抗体发挥效应的,而此过程受 Th 细胞的调节。同时 B 细胞又可作为抗原提呈细胞向 Th 细胞递呈抗原表位而活

化 Th 细胞。因此,我们期望筛选到能诱导良好体液免疫的抗原表位。如果预测的 Th 细胞和 B 细胞表位具有功能,那么在 PPRV 感染的机体中应该含有针对该表位的抗体,而抗体水平的高低可以从一个侧面反映表位功能的强弱。基于此,我们通过 PPRV 阳性血清进行了预测表位血清结合力的分析。结果表明预测的 4 条表位多肽中有 3 条可能具有潜在的 B 细胞表位。众所周知,PPRV 与 RPV 具有交叉免疫性,为了确保表位多肽与 PPRV 的特异性关系,设置了 RPV 阳性血清的对照,结果排除了交叉反应的可能性。

由于表位多肽是小分子半抗原,不能直接刺激机体产生免疫应答,因此我们将合成的多肽小分子与大分子蛋白载体—KLH 进行了偶联,使之转变为完全抗原。同时,为了便于检测表位免疫产生的抗体和提高包被效率,我们又将合成的多肽小分子与大分子蛋白载体—BSA 进行了偶联作为包被抗原。试验证明了 BSA 偶联多肽具有良好的包被效果。

3.3 关于 NK 细胞杀伤活性

NK 细胞是一种主要存在于外周血和脾的多功能细胞群,主要生物学功能为非特异性杀伤肿瘤细胞、抗感染和免疫调节作用,所杀伤的靶细胞通常为肿瘤细胞和病毒感染或转化的细胞,本试验应用的 K562 就是一种常用作靶细胞的肿瘤细胞。本试验利用 Promega 公司开发的非放射性细胞毒性检测试剂盒来检测 NK 细胞杀伤活性,大大降低了成本,并消除了以往用同位素检测存在的安全性问题。但该法受外界因素的影响比较大,尤其是背景乳酸脱氢酶(LDH)释放值太高很容易干扰试验结果。因此,试验时应尽量避免可引发效应细胞和靶细胞的自发 LDH 释放的因素,如保证 K562 细胞培养到旺盛生长状态,在洗涤效应细胞和靶细胞时尽量轻柔,以免破坏细胞的完整性。

3.4 关于 T 淋巴细胞亚群分析

$CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞是机体内参与特异性免疫应答的两类最重要的淋巴细胞,其中 $CD4^+$ T 细胞主要识别由 MHC-II 类分子递呈的抗原,活化后产生的细胞因子在诱导细胞免疫和体液免疫效应中均发挥重要作用; $CD8^+$ T 细胞通过识别由 MHC-I 类分子递呈的抗原肽,活化后产生效应 T 细胞主要参与细胞免疫应答。利用流式细胞术监测 T 淋巴细胞数量的变化,可以间接反映机体的细胞免疫应答水平。T 淋巴细胞在外周血中的含量要比脾中

的多,为提高检测细胞数量,在进行较大动物的流式检测时可以送外周血。

利用软件预测表位有一定的局限性,如 B 细胞表位多为构象表位,而通过软件分析只能预测线性表位,由本试验结果可知,利用软件预测的 4 条表位多肽的免疫性与试验结果并不完全一致,所以预测表位与实际抗原结构未必完全符合,必须通过免疫学试验加以验证。

参考文献 (References):

- [1] KHAN H A, SIDDIQUE M, ARSHAD M, et al. Post-vaccination antibodies profile against peste des petits ruminants (PPR) virus in sheep and goats of Punjab, Pakistan[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2009, 41(4): 427-430.
- [2] ASIM M, RASHID A, CHAUDHARY A H, et al. Production of homologous live attenuated cell culture vaccine for the control of peste des petits ruminants in small ruminants[J]. *Pakistan Vet J*, 2009, 29(2): 72-74.
- [3] BERHE G, MINET C, GOFF C L, et al. Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections[J]. *J Virol*, 2003, 77(2): 1571-1577.
- [4] 邵长春,高世功,张 强,等.表达小反刍兽疫病毒 H 基因的山羊痘病毒通用转移载体的构建及鉴定[J]. *农业科学与技术(英文版)*, 2009, 10(3): 15-18, 35. SHAO C C, GAO S G, ZHANG Q, et al. Construction and identification of a goat pox virus transfer vector to express peste des petits ruminant H gene[J]. *Agricultural Science and Technology*, 2009, 10(3): 15-18, 35.
- [5] 骆利敏,李 明,夏 虎,等.乙型肝炎病毒多表位抗原 DNA 疫苗的免疫原性[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20(5): 517-521. LUO L M, LI M, XIA H, et al. Immunogenicity of a multiple epitope DNA vaccine against hepatitis B virus[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2004, 20(5): 517-521. (in Chinese)
- [6] WANG J L, LIU M Q, HAN J, et al. A peptide of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1 generating a neutralizing antibody response, and an immunostimulatory peptide[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 125(3-4): 224-231.
- [7] TIAN L, WANG H N, LU D, et al. The immunoreactivity of a chimeric multi-epitope DNA vaccine against IBV in chickens[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(1): 221-225.
- [8] LIU S, SHI L, CHENG Y B, et al. Evaluation of protective effect of multi-epitope DNA vaccine encoding six antigen segments of *Toxoplasma gondii* in mice [J]. *Parasitol Res*, 2009, 105(1): 267-274.
- [9] GORSE G J, BADEN L R, WECKER M, et al. Safety and immunogenicity of cytotoxic T-lymphocyte poly-epitope, DNA plasmid (EP HIV-1090) vaccine in healthy, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-uninfected adults[J]. *Vaccine*, 2008, 26(2): 215-223.
- [10] 巢警受,张 岚,杜 娟,等. MTT 法检测蛙皮活性多肽促进小鼠淋巴细胞增殖作用[J]. *吉林医药学院学报*, 2011, 32(1): 15-17. CHAO J S, ZHANG L, DU J, et al. Detection of effect of *Rana Chensinensis* skin's active polypeptide on stimulating proliferation of lymphocytes by MTT[J]. *Journal of Jilin Medical College*, 2011, 32(1): 15-17. (in Chinese)
- [11] 黄艳新,鲍永利,李玉新.抗原表位预测的免疫信息学方法研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2008, 24(9): 857-861. HUANG Y X, BAO Y L, LI Y X. Immunological information research progress of antigen epitope prediction method[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2008, 24(9): 857-861. (in Chinese)

(编辑 白永平)