

DOI:10.13350/j.cjpb.230122

• 综述 •

载体介导的猪瘟疫病毒囊膜蛋白疫苗的研制现状*

李文桂**,陈雅棠

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

【摘要】 猪瘟疫病毒(CSFV)是一种常见的猪场感染病毒,常引起猪瘟疫,其防治疫苗研制备受关注。囊膜蛋白是一种有效的疫苗候选分子,本文综述伪狂犬病毒(rPRV-E2)、鸡痘病毒(rFPV-E0/E2)、Semliki 森林病毒(rSFV-E2)、水疱性口炎病毒(rVSV-E2)、猪痘病毒(rSPV-E2)、腺病毒(rAdV-E2)、牛痘病毒(rVV-E2)、猪繁殖和呼吸综合征病毒(rPRRSV-E2)、杆状病毒(rBuV-E2)、猪霍乱沙门氏菌(rSc-E2)、鼠伤寒沙门氏菌(rSt-E2)、干酪乳杆菌(rLc-VP2-E290/E2-Tα1)、根瘤农杆菌(rAt-E2)和酵母(rPP-E2)等载体介导的 CSFV 囊膜蛋白疫苗的构建及其免疫机制等方面研制现状。

【关键词】 猪瘟疫病毒;囊膜蛋白;疫苗;综述

【中图分类号】 R37

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)01-0105-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jan;18(1):105-110,116.]

The status in the research of vector-based vaccine of envelope protein of Classical swine fever virus

LI Wen-gui, CHEN Ya-tang (Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Classical swine fever virus (CSFV) is one type of pathogen agents causing the classical swine fever, it recently becomes highlight to control this virus by use of the vaccine. The envelope protein is an attractive candidate molecule of vaccine, it's outlined on the status in the research of construction and immune mechanism of vector-based vaccine of envelope protein of CSFV, those vaccines include: *Pseudorabies virus* (rPRV-E2), *fowlpox virus* (rFPV-E0/E2), *Semliki forest virus* (rSFV-E2), *Vesicular stomatitis virus* (rVSV-E2), *Swinepox virus* (rSPV-E2), *Adenovirus* (rAdV-E2), *Vaccinia virus* (rVV-E2), *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (rPRRSV-E2) and *Buculovirus* (rBuV-E2), *Salmonella choleraesuis* (rSc-E2), *Salmonella typhimurium* (rSt-E2), *Lactobacillus casei* (rLc-VP2-E290/E2-Tα1), *Agrobacterium tumefaciens* (rAt-E2) and *Yeast* (rPP-E2).

【Key words】 Classical swine fever virus; envelope protein; vaccine; review

***猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus, CSFV), 又称猪霍乱病毒(*hog cholera virus*, HCV), 是一种常见的猪场感染病毒, 常引起猪瘟疫, 临床以高热稽留、皮肤和黏膜大量出血点为特征, 常接种灭活疫苗、减毒疫苗、亚单位疫苗、核酸疫苗、标记疫苗、嵌合疫苗等进行防治^[1]。灭活疫苗需要大剂量接种, 但诱导的保护力较差; 减毒活疫苗可诱导较好的保护力, 但存在毒力不稳、毒性较大和返祖等缺陷; 亚单位疫苗需要大剂量注射, 成本较高, 但接种效果并不稳定; DNA 疫苗可诱导全面的免疫应答, 但有整合入宿主基因组的风险, 常出现基因沉默或不表达等问题; 标记疫苗和嵌合疫苗存在增殖缓慢和滴度较低等问题, 因此, 亟需研发新型疫苗。

CSFV 的基因组大小为 12.3 kb, 含有一个开放阅读框(ORF), 可编码 4 种结构蛋白: 衣壳蛋白 C(p14)、E0(E^{ms} 或 GP48)、E1(GP33) 和 E2(GP55) 以及 7 种非结构蛋白。E0 蛋白的氨基酸序列较为保守, 是病毒吸附、进入敏感细胞的必需蛋白, 与宿主的嗜性有关, 可诱导宿主产生中和性抗体^[2-3], E1 蛋白为囊膜糖蛋白, 可诱导有效的保护力^[4], E2 蛋白由⁶⁹⁰Arg 至¹⁰⁶⁰Leu 之间的 370 个氨基酸组成, 存在 A、B、C 和 D 这 4 个抗原区, 其中 B 区和 C 区是抗原决定簇的所在区。该蛋白易发生抗原变异, 是主要的保护性抗原, 常以同源或异源二聚体的形式存在于感染细胞的表面, 刺激宿主产生中和性抗体^[5], 提示

E0、E1 和 E2 等囊膜蛋白可作为靶抗原进行开发。

病毒和细菌是人类常见的病原体, 经过减毒改造后可作为疫苗载体使用。这些载体介导的疫苗具有灭活疫苗和活疫苗的优势, 能主动感染宿主的细胞, 协助外源基因进入细胞, 产生细胞因子和趋化因子, 从而诱导长期的免疫应答。目前伪狂犬病毒、鸡痘病毒、Semliki Forest 病毒、水疱性口炎病毒、猪痘病毒、腺病毒、牛痘病毒、猪繁殖和呼吸综合征病毒、杆状病毒、沙门氏菌、干酪乳杆菌、根瘤农杆菌和酵母等载体的减毒株, 均可以开发为疫苗载体进行探索。本研究拟概述这些载体介导的 CSFV 囊膜蛋白疫苗的构建及其免疫机制等方面研制现状。

1 病毒作为表达载体

1.1 伪狂犬病毒 伪狂犬病毒(PRV)的基因组较大, 可插入 >40 kb 的外源基因, 是一种优良的病毒载体^[6]。首先, 提取 pGE2S 作为模板克隆 E2 的编码基因, 插入 pTK2.5 得 pTK-E2, 与 pGEM-GFP 连接得 pTK-E2-GFP, 加 PRV 的 HS9304

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 30801052, 30671835, 30500423, 30200239)。

** **【通讯作者(简介)】** 李文桂 (1967-), 男, 博士, 研究员, 主要从事病原微生物的分子生物学和分子免疫学研究。
E-mail: cqliwengui@163.com

株转染幼仓鼠肾细胞株(BHK-21),进行筛选和培养,通过免疫荧光提示重组病毒能够呈现融合蛋白的分子。以 pCD-E2 为模板扩增 E2 基因,插入 pBSLR-GFR 得 pBSLR-E2,加 PRV^ΔTK 株转染猪肾细胞株(PK-13),筛选培养后,常规提取重组病毒中的 DNA 用作模板,采取 PCR 技术能扩增出长度 1.2 kb 的 E2 基因片段。随后,分别以 pCD-E2 和 pSdtk-GP5 为模板扩增 E2/GP5 基因,插入 pMD18-T 得 pMD18-T-E2/GP5,与 pHgAlacZ 连接得 pGP5-E2-lacZ,加 PRV 的 TK gE 株转化非洲绿猴肾细胞株(Vero),筛选培养后借助 Western blot 显示患者血清可结合重组病毒表达的 51 ku 的 E2 和 34 ku 的 GP5 蛋白。提取 CSFV 的 C 株总 RNA 为模板扩增 E2 基因,插入 pEasy-blunt 得 pEasy-E2,与 pMD-US6-US7-EGF-US2 连接得 pMD-US6-US7-E2-US2,加 PRV 的 BE 株转染 PK15 细胞株,筛选培养后,通过免疫荧光提示重组病毒能够呈现融合蛋白的分子。后将 E1 插入 pHB^Δ2.4 得 pHB^Δ2.4-E1,加 RRV 的减毒株转化 SK-6 细胞株,筛选和培养后,借助 Western blot 显示患者血清可结合重组病毒表达的 50 ku 的 E1 蛋白。通过肌肉注射将 2×10⁷ PFU 重组病毒接种 12 周龄的仔猪,在第 1 次注射后 4 周重复 1 次,显现血清的中和抗体滴度在第 1 次注射后 4~9 周提升,在第 1 次注射 9 周达较高水平,此时采用肌肉注射将 10² TCID₅₀ 猪瘟病毒的 HCV 株进行感染攻击,在攻击后 1 周发现血清的病毒滴度明显降低,评估免疫组和对照组的免疫效果,存活率分别为 100%(4/4)和 0(0/4)^[7-11]。Wang 等^[12-14]将重组 PRV 疫苗肌肉注射仔猪也可对抗猪瘟病毒的石门株的感染攻击。

1.2 鸡痘病毒 鸡痘病毒(FPV)仅感染禽类,在哺乳动物的体内呈一过性感染,是一种非复制型的病毒载体,基因组较大,可容纳 25 kb 的外源基因,仅在胞浆中复制,是构建多价疫苗的理想载体^[15]。将 pMD18-E0 作为模板扩增 E0 基因,插入 pFPV-P11 得 pFPV-E0,与 pFPV-Psy 连接得 pFPV-Psy-E0,加 FV282 株转化鸡胚成纤维细胞株(CEF),筛选培养后提取重组病毒中的 DNA 用作模板,可扩增出长度 0.7 kb 的 E0 基因片段;通过肌肉注射将 1×10⁸ PFU 重组病毒注射 2 月龄的仔猪,在第 1 次注射后 1 和 2 周重复 2 次,在第 1 次注射后 4 周采用肌肉注射将 100 LD₅₀ 猪瘟病毒的石门株进行攻击,在攻击后 10 d 评估免疫组和对照组的免疫效果,存活率分别为 75%(6/8)和 0(0/6)。将重组 FPV-E0/E2 疫苗接种仔猪也可部分对抗猪瘟病毒的石门株的攻击感染^[16-18]。

1.3 Semliki 森林病毒 Semliki 森林病毒(SFV)衍生的 DNA/RNA 载体具有病毒传代快, RNA 复制和表达水平高,可表达许多外源蛋白^[19]。将 pCDST 用作模板扩增 1.2 kb 的 E2 基因,插入 pSFV1CS 得 pSFV1CS-E2,转化 BHK-21 细胞株,筛选培养后借助免疫荧光发现重组病毒能呈现融合蛋白的分子;通过肌肉注射将 100 μg 重组质粒接种 5 周龄的仔猪,在初次注射后 3 周重复 1 次,在初次注射后 5 周显现血清 IgG 提升,此时采用肌肉注射将 10⁶ TCID₅₀ 猪瘟病毒的石门株进行攻击,在攻击后 9 d 提示血、脾、肾和淋巴结的病毒负荷明显降低,计数免疫组和对照组的存活率,结果分别为 100%(5/5)和 33.3%(1/3);接着通过肌肉注射将 600 μg 质粒接种 8 周龄的仔猪,在初次注射后 3 和 6 周强化 2 次,在初次注射后 10 周显示血清

IgG 的滴度为 1:8,此时采取肌肉注射将 10⁶ PFU 猪瘟病毒的石门株进行攻击,在攻击后 16 d 提示血清 IgG 的滴度为 1:1024^[20-22]。通过初次免疫-加强方案可诱导高水平的记忆性 T 细胞,提高免疫应答的效果^[23],孙元等^[24]采取该方案获得了理想的保护效果。

1.4 水疱性口炎病毒 水疱性口炎病毒(VSV)是一种疫苗载体,可诱导粘膜型的免疫应答^[25]。抽提 CSFV 的 C 株基因组 DNA 为模板扩增 1.2 kb 的 E2 基因,插入 pSK-VSV 得 pSK-VSV-E2,加 pSK-N、pSK-P 和 pSK-L 等辅助质粒转化 BHK-21 细胞株,筛选培养后借助 Western blot 发现患者血清识别重组病毒表达的 99.72 ku 的二聚体蛋白;通过肌肉注射将 1×10⁷ PFU 重组病毒接种 BALB/c 鼠,在注射后 1 月显现血清 IgG 的滴度为 1:25 600,中和实验提示该血清在体外可抑制 CSFV 有毒株对 PK-15 细胞的侵袭。接着,将 E2 基因插入 pBABEpuro 得 pBABE-E2,加 pVSV-G 辅助质粒转化 PK-15 细胞株,筛选培养后提取重组病毒中的 DNA 用作模板可扩增出长度 1.2kb 的 E2 基因片段^[26-27]。

1.5 猪痘病毒 猪痘病毒(SPV)的毒力较弱,只有一个宿主,可作为一种疫苗载体^[28]。首先,将 E2 基因插入 pSP1 得 pSP1-E2,加 SPV^ΔTK 株转化 PK-15 细胞株,筛选培养后采取 Western blot 显示患者血清识别重组病毒表达的 100 ku 的二聚体 E2 蛋白。接着,将 E2 基因插入 pUSG11/P28 得 pUSG11/P28-E2,加 SPV^ΔTK 株转化 BHK-21 细胞株,筛选培养后用 Western blot 检测发现重组病毒表达 45 ku 的 E2 蛋白可被患者的血清所结合;采取肌肉注射将 2×10⁶ TCID₅₀ 重组病毒接种仔猪,在初次注射后 2 周重复 1 次,在初次注射后 5 周显现血清 IgG 提升,血 PBMC 分泌大量 IFN-γ 和 IL-4,此时通过滴鼻将 1×10⁵ TCID₅₀ 猪瘟病毒的石门株进行攻击,在攻击后 2 周发现血清的病毒滴度降低,肝脾肺肾组织的病变显著减轻^[29-30]。

1.6 腺病毒 腺病毒(Adv)具有宿主范围广、增殖快、可同时表达多个基因和对表达产物进行翻译和修饰等优点,是一种安全高效的疫苗载体^[31]。将 E2 基因插入 pJJ362 得 pJJ408,加 PAV^ΔTK 株转化 PK-15 细胞株,筛选培养后提取重组病毒中的 DNA 用作模板可扩增出长度 570 bp 的 E2 基因片段;借助皮下注射将 1×10⁷ TCID₅₀ 重组病毒接种 5 周龄的仔猪,在接种后 5 周显示血清 IgG 提升,此时采用皮下注射将 10^{3.5} TCID₅₀ 猪瘟病毒 Weybride 株进行攻击,在攻击后 2 周提示临床症状明显减轻。接着,通过口服途径将 2×10⁶ TCID₅₀ 重组病毒接种 5 周龄的仔猪,在接种后 6 周显现血清 IgG 提升,此时采用口服将 10³ TCID₅₀ 猪瘟病毒的石门株攻击,在攻击后 12 d 计数免疫组和对照组的存活率,结果分别为 60%(3/5)和 0(0/5)。随后,将 pCDST 与 pshuttle-CMV 重组得 pSC-E2,电转含 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态,筛选 pAdv-E2,转化人胚肾细胞株(293T),筛选培养后通过 Western blot 显示患者血清识别重组病毒表达的 53 ku 的 E2 蛋白;借助肌肉注射将 10⁸ TCID₅₀ 重组病毒注射大白兔,在注射后 5 周显现血清 IgG 提升,在注射后 6 周通过静脉注射将 100RID₅₀ 猪瘟兔化弱病毒株进行攻击,在攻击后 3 d 提示脾组织的病毒负荷为 0^[32-34]。

猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的 ORF5 基因编码

GP5 蛋白(也称囊膜蛋白 E),该蛋白含有主要的中和抗体表位,具有较好的免疫原性,IL-2 可促进淋巴细胞的增殖和分化,是一种免疫佐剂^[35-36]。将重组病毒接种昆明鼠、大白兔和仔猪均可对抗猪瘟病毒的石门株的攻击^[37-40]。

1.7 牛痘病毒 牛痘病毒(VV)的宿主范围广,可插入 25 kb 的外源基因,外源蛋白的表达效率高,且能进行修饰^[41]。首先,将 pHCK11 用作模板扩增 E2 基因,插入 pHC3.8 得 pHC3.8-E2,与 pGS62 连接得 pGS62-E2,加牛痘病毒的 TS7 株转化 CVI 细胞株,筛选培养借助 Southern 杂交发现猪瘟病毒的 E2 基因成功插入牛痘病毒的基因组中;通过腹腔注射将 2×10^7 PFU 重组病毒接种仔猪,在注射后 4 周显现血清的中和抗体滴度为 1:32,此时采取滴鼻将 5×10^7 TCID₅₀ 猪瘟病毒 ALfort 株进行攻击,在攻击后 5 d 显现血清的中和抗体滴度为 1:64,计数免疫组和对照组的存活率分别为 100%(3/3)和 0(0/3)。接着,将重组病毒皮下注射仔猪也可得到较好的免疫效果^[42-43]。

1.8 猪繁殖和呼吸综合征病毒 猪繁殖和呼吸综合征病毒(PRRSV)的转录调控序列(TRS)主要参与亚基因组 RNA 的转录,在 TRS 的 5' 端可插入外源基因进行转录^[44]。提取 CSFV 的基因组 DNA 为模板分别扩增 E2₂₅₆₋₃₃₀ 和 E2₈₂₈₋₈₄₂ 片段,插入 pF112-ABC-NSP2^Δ480-620 得 pF112-ABC-E2₂₅₆₋₃₃₀/E2₈₂₈₋₈₄₂,与 pF112-DEF 连接得 pF112-E2₂₅₆₋₃₃₀/E2₈₂₈₋₈₄₂,转化 BHK-21 细胞株,筛选培养后借助免疫荧光发现重组病毒能呈现融合蛋白的分子。采取肌肉注射将 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 重组病毒注射 4 周龄的仔猪,在注射后 4 周显示血清的中和抗体提升,此时通过肌肉注射将 $10^{5.5}$ TCID₅₀ 猪瘟病毒的石门株进行攻击,在攻击后 3 周提示肺脾肾组织的病变明显减轻^[45-48]。

1.9 杆状病毒 昆虫杆状病毒表达系统能增加外源基因的表达效率,可对表达产物进行修饰:比如糖基化、磷酸化和蛋白切割等。将人工合成的 E2syn 基因插入 pFastBac1 得 pFastBac-E2syn,转化 DH10Bac 感受态,筛选重组 Bacmid-E2syn,转化 SF9 细胞,筛选培养后通过 Western blot 提示患者血清识别重组病毒表达的 55 ku 的 E2 蛋白;采用皮下注射或肌肉注射将重组蛋白加 ISA660VG 佐剂接种仔猪或 BALB/c 鼠均可诱导有效的保护力^[49-50]。

2 细菌作为表达载体

2.1 猪霍乱沙门氏菌 猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)是一种胞内寄生菌,经过改造可以表达外源基因^[51],抽提 CSFV 的基因组 DNA 为模板扩增 E2 基因,插入 pVAX1 得 pVAX1-E2,电转猪霍乱沙门氏菌的 C500 株,筛选培养后提取重组菌中的 DNA 用作模板可扩增出长度 1 050 bp 的 E2 基因片段;通过口服或肌肉注射将 1×10^9 CFU 重组菌接种家兔,在初次接种后 2 和 4 周重复 2 次,显现血清 IgG 在第 1 次接种后 2~6 周提升,在初次接种后 6 周达较高水平,此时借助肌肉注射将 20ID₅₀ 猪瘟免疫弱毒株进行攻击,在攻击后 1d 计数定型热反应,评估口服组、肌注组和对照组的免疫效果,保护力分别为 67%(2/3)、75%(3/4)和 0(0/4)^[52]。IL-15 可调节免疫应答,是一种免疫佐剂^[53]。将 pCB-ME2-IL-15、pCC-ME2-IL-15 和 pCI-ME2-IL-15 分别电转猪霍乱沙门氏菌 C500 株,筛选重组菌;将重组菌口服家兔可对抗猪瘟免疫弱毒株的

静脉注射攻击^[54]。

2.2 鼠伤寒沙门氏菌 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, St)是一种胞内寄生菌,具有粘膜免疫佐剂的作用,可诱导宿主产生粘膜免疫和全身免疫应答,可有效表达插入的外源基因^[55]。将 pGEM-E2 作为模板克隆 E2 基因,插入 pYA3341 得 pYA3341-E2,电转鼠伤寒沙门氏菌 X3730 株进行甲基化修饰后,再电转 X4550 株,筛选培养后通过 Western blot 发现患者血清识别重组菌表达的 42 ku 的 E2 蛋白;采用口服将 2×10^{11} CFU 重组菌接种仔猪,在初次口服后 2 周强化 1 次,在初次口服后 4 周显现血清 IgG 提升,血 PBMC 增殖^[56]。

2.3 干酪乳杆菌 干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)可定植肠道,吸附粘膜,具有抗胆汁酸和免疫佐剂的作用,是一种可口服的疫苗载体。猪瘟病毒的 NS2-3 基因编码 E290 多肽,该蛋白含有 TH 和 CTL 表位,在免疫应答中发挥作用, α -1 胸腺素(Thymosin α -1, T α 1)是一种免疫佐剂^[57-59]。将人工合成的 E290 基因插入 pPG-VP2 得 pPG-VP2-E290,电转干酪乳杆菌 393 株,筛选培养后借助 Western blot 提示患者血清识别重组菌表达的 70 ku 的 VP2-E290 融合蛋白;通过口服将 10^{12} CFU 重组菌接种家兔,在初次口服后 1、2、14、15、16、28、29 和 30 d 重复 8 次,在初次口服后 38 d 显示血清 IgG 提升,脾 CTL 反应增强,此时通过静脉注射将 40ID₅₀ 猪瘟免疫弱毒株进行攻击,在攻击后 4 d 计数定型热反应,发现免疫组和对照组的保护力分别为 100%(3/3)和 0(0/3);接着,将重组菌口服 BALB/c 鼠也可得到类似结果^[50-63]。

2.4 根癌农杆菌 苜蓿(*Medicago sativa*)能够对表达蛋白进行修饰,可保留蛋白的生物活性^[64]。将 E2 基因插入 pVTS 得 pVTS-E2,转化根癌农杆菌 LBA4404 株,筛选重组菌,转染苜蓿的子叶,培育转基因植物,ELISA 证实每克转基因苜蓿的子叶含 10 μ g 的 E2 蛋白;采用口服将 25 g 转基因苜蓿免疫 BALB/c 鼠,在初次口服后 30 d 重复 1 次,显现血清 IgG 和粪 SIgA 的滴度在初次口服后 30~45 d 提升,在初次口服后 45 d 达较高水平^[65]。

烟草(*Nicotiana benthamiana*)是常用的转基因植物反应器^[66]。首先,将 E2 基因插入 pCR4 得 pCR4-E2,与 pVX6His2Acp 连接得 pVX6-E2,转化根癌农杆菌 LBA4404 株,转染烟草的子叶,培育转基因烟草;通过 Western blot 发现患者血清识别转基因烟草表达的 34 ku 的 E2 蛋白;采用皮下注射将 500 μ L 转基因烟草的抽提液(含 50 μ g 的 E2 蛋白)加弗氏佐剂接种大白兔,在初次注射后 21 和 45 d 重复 2 次,在初次注射后 60 d 显示血 IgG 提升。接着,将 E2 基因插入 pCAMIA1300 得 p1300MELCH,转化根癌农杆菌 LBA4404 株,转染烟草的子叶,培育转基因植物。采取肌肉注射将 100 μ g 纯化蛋白加 IMS1313 佐剂免疫仔猪,在初次注射后 20 d 重复 1 次,在初次注射后 34 d 显现血清 IgG 提升,此时通过滴鼻将 10^4 CD₅₀ 猪瘟病毒的 YC11WB 株进行攻击,在攻击后 2 周提示血清的病毒负荷为 0^[67-68]。

衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)只有一个叶绿体,易于转化^[69]。以 pGEM-E2 为模板扩增 1 020 bp 的 E2 基因,插入 pAtp-X 得 pAtp-E2,与 p64C 连接得 p64C-E2,基因枪轰击法转化衣藻的叶绿体,培育转基因植物,通过 Western blot 提示患

者血清识别转基因衣藻表达的 51 ku 的 E2 蛋白^[70]。

莴苣(*lactuca sativa*)是一种可食蔬菜,常用作植物反应器^[71]。将 pGEM-E2 与 pBI121 重组得 pBI121-E2,转化根瘤农杆菌 LBA4404 株,转染莴苣的子叶,培育转基因植物,SDS-PAGE 发现每克根茎组织含 0.21~0.53 mg 的 E2 蛋白;采用口服将 100 μL 抽提物(含 10 μg 的 E2 蛋白)接种 BALB/c 鼠,在初次口服后 2、3 和 4 周强化 3 次,在初次口服后 8 周显现血清 IgG 提升^[72]。

水稻(*Oriza sativa*)易于储藏和运输,可开发作为植物反应器^[73]。将 pGEM-E2 与 pMYN75 重组得 pMYN75-E2,基因枪轰击法转化水稻的子叶,培育转基因植物,SDS-PAGE 提示每克谷子含 4.0~5.1 mg 的 E2 蛋白;通过口服将 10 g 谷子(含 5 mg 的 E2 蛋白)喂食 4 周龄的仔猪,在初次口服后 10 和 20 d 重复 2 次,在初次口服后 30 d 显现血清 IgG1、IgG2 和粪 sIgA 的滴度提升;ELISPOT 证实血 PBMC 中 IgA⁺/IgG⁺ SFC_s 的数目增加,血 PBMC 增殖,分泌大量 IL-8 和 CCL2 等细胞因子^[74]。

百脉根(*lotus corniculatus*)是一种优良的豆科牧草,叶绿体转化法以定点整合的方式导入外源基因可消除位置效应和基因沉默,可以多顺反子的形式表达多个基因^[75-76]。将 pGEM-E2 与 p16APT 重组得 p16APT-E2,电转百脉根的叶绿体,培育转基因植物;提取转基因植物中的 DNA 用作模板可扩增出长度 999 bp 的 E2 基因片段^[77]。

玉米(maize)的种子可以表达外源蛋白^[78]。将 E2 基因插入 pCAMBIA1300 得 pCAMBIA1300-E2,转化根瘤农杆菌 LBA4404 株,转染玉米的子叶,培育转基因植物;提取转基因玉米中的 RNA 用作模板,RT-PCR 提示 7/22 株存在 1.1 kb 的 E2 基因片段^[79]。

亚麻芥(*Camelina sativa*)具有抗旱、抗寒、抗倒伏或耐盐碱的优良特性,是一种较好的植物反应器^[80]。将人工合成的 E2-E^{ms} 基因插入 pUC57 得 pUC57-E2-E^{ms},与 pPHAP1301 重组得 pPHAP1301-E2-E^{ms},转化根瘤农杆菌 LBA4404 株,转染亚麻芥的子叶,培育转基因植株;通过 Western blot 显示患者血清识别转基因植株表达的 76 ku 的 E2-E^{ms} 融合蛋白;采取灌胃途径将 20 μg 重组蛋白接种 BALB/c 鼠,在初次口服后 1 周重复 1 次,显现血清 IgG 滴度在初次口服后 4~8 周提升,在初次口服后 6 周达较高水平^[81]。

2.5 毕赤酵母 毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是 2 种常见的酵母菌,利用其表面展示系统可表达外源抗原^[82]。以 CSFV 的总 RNA 为模板扩增 E2 基因,插入 pPIC9K 得 pPIC9K-E2,电转毕赤酵母 SMD1168 株,筛选培养后通过 Western blot 发现患者血清识别重组酵母表达的 56 ku 的 E2 蛋白。随后,以 pVEXE2 扩增 255 bp 的 E2BC 片段,插入 p1V5AG 得 p1V5AG-E2BC,电转酿酒酵母 W303 株,筛选培养后借助免疫荧光提示重组酵母能够呈现融合蛋白的分子^[83-84]。

3 结语

虽然大部分载体介导的猪瘟疫病毒囊膜蛋白疫苗接种宿主后可产生一定的保护力,但它们诱导的保护性免疫应答的水平较低,尚未达到预期水准;杆状病毒表达的重组蛋白活性较高,

但产量较低,生长周期长;病毒载体的自身蛋白及其双链 RNA 具有免疫佐剂效应,但病毒载体自身具有潜在的致癌和致病性,人群普遍具有抗病毒的抗体,影响其免疫效果;重组乳酸菌长期低剂量口服有可能产生免疫耐受现象;重组沙门氏菌苗的表达产物与天然蛋白存在差异,表达水平较低;转基因植物疫苗少被公众认可和接受;酵母菌表达的重组蛋白活性较低,不易纯化。

随着科技的进步,对猪瘟疫病毒的基因组学、蛋白质组学、代谢组学、转录组学以及表观遗传学进行进一步探索,从而阐明猪瘟疫病毒囊膜蛋白的抗原结构与功能的关系,筛选新的抗原分子,构建多价高效的复合基因疫苗或含有基因佐剂的混合基因疫苗或多表位疫苗;探究这些疫苗的免疫原性、转化效率、MHC 限制性以及能否长期在宿主体内表达;研究新型佐剂、疫苗载体和制备融合蛋白,提高疫苗的免疫原性;在宿主体内准确评估新型疫苗分子的保护性免疫机制;进一步探究猪瘟疫病毒囊膜蛋白家族及其它相关蛋白生物学功能,提升疫苗的设计水准;摸索纳米微粒技术引入新型疫苗是否可延长免疫应答的时间,诱导记忆性 T 细胞的产生;阐明其机制可为载体介导的猪瘟疫病毒囊膜蛋白疫苗研发提供理论基础。

【参考文献】

- [1] Moennig V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy[J]. Vet Microbiol,2000,73(1):93-102.
- [2] Hulst MM,Moormann RJ. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E^{ms} and E2 of Classical swine fever virus; E^{ms} and E2 interact with different receptors[J]. J Gen Virol,1997,78(11):2779-2787.
- [3] Hulst MM,Gennip GP,Moorm JM. 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):9553-9561.
- [4] Wensvoort G,Boonstra J,Bodzinga BG. Immunoaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of Hog cholera virus[J]. J Gen Virol,1990,71(3):531-540.
- [5] K nig 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(10):6479-6486.
- [6] Thomsen DR,Marotti KR,Palermo DP,et al. Pseudorabies virus as a live virus vector for expression of foreign genes[J]. Gene,1987,57(3):261-265.
- [7] 潘兹书,张楚瑜,陈玉栋,等. 表达猪瘟疫病毒 E2 基因和 gfp 报道基因的伪狂犬病毒双基因转移载体的构建[J]. 武汉大学学报(理学版),2002,48(4):466-470.
- [8] 范伟兴,张雪莲,魏荣,等. 含绿色荧光蛋白基因和猪瘟疫 E2 基因的伪狂犬病毒 Bartha-K61 株 TK 基因缺失转移载体的构建[J]. 中国兽医杂志,2003,39(3):3-8.
- [9] 刘燕,田志军,周艳君,等. 表达多个外源基因的重组伪狂犬病毒的构建及其细胞培养特性研究[J]. 中国预防兽医学报,2007,29(2):81-85.
- [10] 韩爽,陈晓春,邓永,等. 表达猪瘟疫 E2 基因的重组伪狂犬病毒构建及其生物学特性分析[J]. 中国兽药杂志,2018,52(5):29-37.
- [11] Van Zijl M,Wensvoort G,De Kluyver E,et al. Live attenuated Pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog

- cholera virus* protects swine against both pseudorabies and hog cholera[J]. J Virol,1991,65(5):2761-2765.
- [12] Wang YM, Yuan J, Cong X, et al. Generation and efficacy evaluation of a recombinant *Pseudorabies virus* variant expressing the E2 protein of *classical swine fever virus* in pigs [J]. Clin Vaccine Immunol,2015,22(10):1121-1129.
- [13] Abid M, Teklue T, Li YF, et al. Generation and immunogenicity of a recombinant *Pseudorabies virus* co-expressing *classical swine fever virus* E2 protein and *porcine circovirus type 2* capsid protein based on fosmid library platform[J]. Pathogens,2019,8(4):279.
- [14] Tong W, Zheng H, Li GX, et al. Recombinant *Pseudorabies virus* expressing E2 of *classical swine fever virus* (CSFV) protects against both virulent *Pseudorabies virus* and CSFV[J]. Antiviral Res,2020,173:104652.
- [15] Pastoret PP, Vanderplasschen A. *Poxviruses* as vaccine vectors [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis,2003,26(5):343-355
- [16] 王养会,李谱华,张森涛,等. 表达猪瘟疫病毒石门株 E0 基因重组鸡痘病毒的构建及动物免疫试验[J]. 病毒学报,2008(1):59-63.
- [17] 张浩,郭抗抗,张彦明,等. 共表达猪瘟疫病毒 E0、E2 基因重组鸡痘病毒的遗传稳定性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(8):36-40.
- [18] Guo KK, Zhang WM, Zhang YM, et al. Construction of a recombinant *fowlpox virus* expressing the E0/E2 proteins of *classical swine fever virus* and its evaluation in experimental animals[J]. Asian J Animal Vet Adv,2009,6(7):654-666.
- [19] Liljestr m P, Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the *Semliki Forest virus* replicon [J]. Biotechnol(N Y),1991,9(12):1356-1361.
- [20] 李娜,仇华吉,李国新,等. 基于 Semliki Forest 病毒 RNA 复制子的猪瘟疫 RNA 疫苗的初步研究[J]. 中国生物工程杂志,2005,25(1):53-58.
- [21] 李娜,赵建军,赵和平,等. 基于甲病毒复制子载体的猪瘟疫 DNA 疫苗的免疫效力评价[J]. 生物工程学报,2007,23(3):434-439.
- [22] Li N, Qiu HJ, Zhao JJ, et al. A *Semliki Forest virus* replicon vectored DNA vaccine expressing the E2 glycoprotein of *classical swine fever virus* protects pigs from lethal challenge [J]. Vaccine,2007,25(15):2907-2912.
- [23] Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime_boost strategy: exciting prospects for improved vaccination[J]. Immunol Today,2000,21(4):163-165.
- [24] 孙元. 猪瘟疫病毒复制子载体 DNA 疫苗与重组腺病毒活载体疫苗联合免疫效果评价[J]. 生物工程学报,2009,25(5):679-685.
- [25] Schnell MJ, Buonocore L, Kretschmar E, et al. Foreign glycoproteins expressed from recombinant *Vesicular stomatitis viruses* are incorporated efficiently into virus particles [J]. PNAS,1996,93(21):11359-11365.
- [26] 陈景艳,李文雯,钱永华. 表达猪瘟疫病毒 E2 蛋白的复制型水疱性口炎假病毒的拯救[J]. 动物医学进展,2009,30(9):7-10.
- [27] 田宏,刘湘涛,林彤,等. 重组猪瘟疫病毒 E2 基因逆转录病毒载体的构建及其表达活性[J]. 中国兽医学报,2007,27(4):460-463.
- [28] Fan HJ, Lin HX. Recombinant *Swinepox virus* for veterinary vaccine development[J]. Meth Mol Biol,2016,1349(1):163-175.
- [29] Hahn J, Park SH, Song JY, et al. Construction of recombinant *swinepox viruses* and expression of the *classical swine fever virus* E2 protein[J]. J Virol Meth,2001,93(1-2):49-56.
- [30] Lin H, Ma Z, Chen L, et al. Recombinant *Swinepox virus* expressing glycoprotein E2 of *Classical swine fever virus* confers complete protection in pigs upon viral challenge[J]. Front Vet Sci,2017(4):81.
- [31] Tatis N, Ertl HC. *Adenoviruses* as vaccine vectors[J]. Mol Ther,2004,10(4):616-629.
- [32] Hammond JM, McCoy RJ, Jansen ES, et al. Vaccination with a single dose of a recombinant *Porcine adenovirus* expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever[J]. Vaccine,2000,18(11-12):1040-1050.
- [33] Hammond JM, Jansen ES, Morrissy CJ, et al. Oral and subcutaneous vaccination of commercial pigs with a recombinant *Porcine adenovirus* expressing the *Classical swine fever virus* gp55 gene[J]. Arch Virol,2001,146(9):1787-1793.
- [34] 孙元,仇华吉,祁巧芬,等. 表达猪瘟疫病毒 E2 蛋白的重组腺病毒的构建及其在兔体内的免疫原性分析[J]. 生物工程学报,2008,24(10):1734-1739.
- [35] Pirzadeh B, Gagnon CA, Dea S. Genomic and antigenic variations of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* major envelope GP5 glycoprotein[J]. Can J Vet Res,1998,62(3):170-177.
- [36] Malek TR. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells[J]. J Leukoc Biol,2003,74(6):961-965.
- [37] 李宏宇,孙元,常天明,等. 共表达猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 基因和猪瘟疫病毒 E2 基因的重组腺病毒的构建及其在小鼠模型上的免疫原性分析[J]. 中国预防兽医学报,2010,32(3):161-166.
- [38] 何雷,张彦明,徐彦召,等. 共表达猪瘟疫病毒 E2 基因和猪白细胞介素 2 基因的重组腺病毒的构建及其免疫原性研究[J]. 病毒学报,2010,26(5):385-391.
- [39] 杨洋,高博,宫婷,等. 猪瘟疫病毒 E2 蛋白基因重组人 5 型腺病毒的构建及鉴定[J]. 中国生物制品学杂志,2012,25(7):805-808,815.
- [40] 梁易晓,张会,王志鹏,等. 表达猪瘟疫病毒 E0-E2 蛋白的重组腺病毒疫苗免疫效力研究[J]. 中国预防兽医学报,2020,42(4):377-382.
- [41] Mackett M. *Vaccinia virus* as a vector for delivering foreign antigens[J]. Semin Virol,1990,1(1):39-47.
- [42] Rumenapf T, Stark R, Meyers G, et al. Structural proteins of *Hog cholera virus* expressed by *Vaccinia virus*: further characterization and induction of protective immunity [J]. J Virol,1991,65(2):589-597.
- [43] K nig 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(10):6479-6486.
- [44] Kim DY, Calvert JG, Chang KO, et al. Expression and stability of foreign tags inserted into NSP2 of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV)[J]. Virus Res,2007,128(1):106-114.
- [45] 童武,周艳君,徐彦召,等. 表达猪瘟疫病毒 E2 蛋白重组猪繁殖与

- 呼吸道综合征病毒的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(7): 505-509.
- [46] 徐彦召, 周艳君, 童武, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 HuN4-F112 弱毒株 NSP2 区表达猪瘟病毒 E2 基因表位的研究[J]. 病毒学报, 2013, 29(1): 17-25.
- [47] 高飞, 曲泽慧, 姜一峰, 等. 重组猪瘟病毒 C 株 E2 蛋白的猪繁殖与呼吸综合征病毒的构建及鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2015, 23(5): 1-9.
- [48] Gao F, Jiang YF, Li GX, et al. *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* expressing E2 of *Classical swine fever virus* protects pigs from a lethal challenge of highly-pathogenic PRRSV and CSFV[J]. *Vaccine*, 2018, 36(23): 3269-3277.
- [49] 王遵宝, 贺笋, 李俊辉, 等. 昆虫细胞-杆状病毒系统分泌表达的猪瘟病毒 E2 蛋白及其免疫原性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(4): 383-388.
- [50] Li M, Wang YF, Wang Y, et al. Immune responses induced by a *BacMam virus* expressing the E2 protein of *Classical swine fever virus* in mice[J]. *Immunol Lett*, 2009, 125(2): 145-150.
- [51] Shiau AL, Chen YL, Liao CY, et al. Prothymosin alpha enhances protective immune responses induced by oral DNA vaccination against pseudorabies delivered by *Salmonella choleraesuis* [J]. *Vaccine*, 2001, 19(28): 3947-3956.
- [52] 乔红伟, 孙金福, 韩文瑜, 等. 猪霍乱沙门菌载体介导猪瘟病毒 DNA 免疫研究[J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 865-870.
- [53] Saikh KU, Kissner TL, Nystrom S, et al. Interleukin-15 increases vaccine efficacy through a mechanism linked to dendritic cell maturation and enhanced antibody titers[J]. *Clin Vac Immunol*, 2008, 15(1): 131-137.
- [54] 韩国全, 郭万柱, 张博, 等. 猪霍乱沙门菌 C500 运载猪瘟病毒新型基因疫苗在家兔体内的免疫应答[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(12): 1561-1565.
- [55] Darji A, Zurlage S, Garbe AI, et al. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, 27(4): 341-349.
- [56] 许信刚, 王丹, 董德文. 表达猪瘟病毒 E2 蛋白重组减毒鼠伤寒沙门氏菌活载体疫苗株的构建及动物免疫试验[J]. 中国兽医学报, 2011, 41(9): 901-906.
- [57] Scheppeler L, Vogel M, Zuercher AW, et al. Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle[J]. *Vaccine*, 2002, 20(23): 2913-2920.
- [58] Armengol E, Wiesmuller KH, Wienhold D, et al. Identification of T_H cell epitopes in the structural and non-structural proteins of *Classical swine fever virus* [J]. *Gen Virol*, 2002, 83(3): 541-556.
- [59] Li CL, Zhang T, Saibara T, et al. Thymosin alpha1 accelerates restoration of T cell-mediated neutralizing antibody response in immunocompromised hosts[J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(1): 39-46.
- [60] 徐义刚, 崔丽春, 葛俊伟, 等. 表达重组猪瘟病毒 E290 多肽的干酪乳杆菌口服免疫特性及诱导特异性 CTL 反应的研究[J]. 生物工程学报, 2007, 23(5): 930-934.
- [61] 徐义刚, 崔丽春, 葛俊伟, 等. 猪瘟病毒 T 细胞表位 E290 多肽与猪细小病毒 VP2 蛋白在干酪乳杆菌中的共表达及免疫小鼠特异性抗体的测定[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 667-672.
- [62] Xu YG, Cui LC, Tian CY, et al. Immunogenicity of recombinant *Classical swine fever virus* CD8⁺ T lymphocyte epitope and *Porcine parvovirus* VP2 antigen coexpressed by *Lactobacillus casei* in swine via oral vaccination[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(11): 1979-1986.
- [63] Xu YG, Guan XT, Liu ZM, et al. Immunogenicity in swine of orally administered recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing *Classical swine fever virus* E2 protein in conjunction with thymosin α -1 as an adjuvant[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(11): 3745-3752.
- [64] Streatfield SJ, Howard JA. Plant-based vaccines [J]. *Int J Parasitol*, 2003, 33(5): 479-493.
- [65] Legocki AB, Miedzinska K, Czaplinska M, et al. Immunoprotective properties of transgenic plants expressing E2 glycoprotein from CSFV and cysteine protease from *Fasciola hepatica* [J]. *Vaccine*, 2005, 23(15): 1844-1846.
- [66] Donson J, Kearney CM, Hilf ME, et al. Systemic expression of a bacterial gene by a *tobacco mosaic virus*-based vector [J]. *PNAS*, 1991, 88(16): 7204-7208.
- [67] Marconi G, Albertini E, Barone P, et al. In plant production of two peptides of the *Classical swine fever virus* (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of potato virus X [J]. *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 29.
- [68] Park Y, An DJ, Choe S, et al. Development of recombinant protein-based vaccine against *Classical swine fever virus* in pigs using transgenic *Nicotiana benthamiana* [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 624.
- [69] Kindle KL, Richards KL, Stern DB. Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *PNAS*, 1991, 88(5): 1721-1725.
- [70] He DM, Qian KX, Shen GF, et al. Recombination and expression of *Classical swine fever virus* (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007, 55(1): 26-30.
- [71] Mart nez-Gonzalez L, Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, et al. Oral immunization with a lettuce-derived *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit induces neutralizing antibodies in mice [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2011, 107(3): 441-449.
- [72] Yiu JC, Liu CW, Su RY, et al. Immunogenicity of a lettuce-derived vaccine candidate expressing the E2 protein against *Classical swine fever virus* [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2013, 113(3): 483-490.
- [73] Nochi T, Takagi H, Yuki Y, et al. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain and needle-free vaccination [J]. *PNAS*, 2007, 104(26): 10986-10991.
- [74] Jung M, Shin YJ, Kim J, et al. Induction of immune responses in mice and pigs by oral administration of *Classical swine fever virus* E2 protein expressed in rice calli [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(12): 3219-3230.
- [75] 王宝琴, 王小龙, 张永光, 等. FMDV vp1 基因在豆科牧草百脉根中的转化与表达 [J]. 中国病毒学, 2005, 20(5): 526-529.
- [76] Heifetz PB. Genetic engineering of the chloroplast [J]. *Biochimie*, 2000, 82(6-7): 655-666.

(5470);1432-1435.

[56] Lo M K, Rota P A. The emergence of Nipah virus, a highly pathogenic paramyxovirus[J]. J Clin Virol, 2008, 43(4): 396-400.

[57] Yob JM, Field H, Rashdi AM, et al. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia[J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(3): 439-441.

[58] Rahman SA, Hassan L, Epstein JH, et al. Risk factors for Nipah virus infection among pteropid bats, Peninsular Malaysia[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(1): 51-60.

[59] Johnson K, Vu M, Freiberg AN. Recent advances in combating Nipah virus[J]. Fac Rev, 2021(10)d: 74.

[60] Rahman SA, Hassan SS, Olival KJ, et al. Characterization of Nipah virus from naturally infected Pteropus vampyrus bats, Malaysia[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(12): 1990-1993.

[61] Murray K, Selleck P, Hooper P, et al. A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans[J]. Science, 1995, 268(5207): 94-97.

[62] Ward MP, Black PF, Childs AJ, et al. Negative findings from serological studies of equine morbillivirus in the Queensland horse population[J]. Aust Vet J, 1996, 74(3): 241-243.

[63] Young PL, Halpin K, Selleck PW, et al. Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus[J]. Emerg Infect Dis, 1996, 2(3): 239-240.

[64] Halpin K, Young PL, Field HE, et al. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 8): 1927-1932.

[65] Pourrut X, Souris M, Towner JS, et al. Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in Rousettus aegyptiacus[J]. BMC Infect Dis, 2009(9): 159.

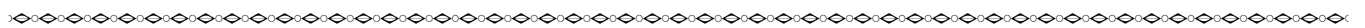
[66] Amman BR, Schuh AJ, Albarino CG, et al. Marburg virus persistence on fruit as a plausible route of bat to primate filovirus transmission[J]. Viruses, 2021, 13(12): 2394.

[67] Tan CW, Yang X, Anderson DE, et al. Bat virome research: the past, the present and the future[J]. Curr Opin Virol, 2021(49): 68-80.

[68] Wu Z, Yang L, Ren X, et al. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases[J]. ISME J, 2016, 10(3): 609-620.

[69] Gupta P, Singh MP, Goyal K, et al. Bats and viruses: a death-defying friendship[J]. Virusedisease, 2021: 1-13.

【收稿日期】 2022-08-17 【修回日期】 2022-11-01



(上接 104 页)

[48] Kutsuna S, Saito S, Ohmagari N. Simultaneous diagnosis of dengue virus, Chikungunya virus, and Zika virus infection using a new point-of-care testing (POCT) system based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method[J]. J Infect Chemother, 2020, 26(12): 1249-1253.

[49] Ys A, Bsb C, Mgc B. Lab-on-paper for all-in-one molecular diagnostics (LAMDA) of zika, dengue, and chikungunya virus from human serum[J]. Biosensors Bioelectronics, 2020, 165(1): 112400

[50] Teoh BT, Sam SS, Tan KK, et al. Development of a simple single-tube reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of dengue virus from clinical samples[J]. BMC Infect Dis, 2013, 21(8): 387.

[51] Aonuma H, Yoshimura A, Kobayashi T, et al. A single fluorescence-based LAMP reaction for identifying multiple parasites in mosquitoes[J]. Exp Parasitol, 2010, 125(2): 179-183.

[52] Tanner NA, Zhang Y, Evans TC. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification [J]. Biotechniques, 2012, 53(2): 81-89.

[53] 林文慧, 邹秉杰, 宋沁馨, 等. 多重环介导等温扩增技术研究进展 [J]. 遗传, 2015, 37(9): 899-910.

【收稿日期】 2022-08-22 【修回日期】 2022-11-01



(上接 110 页)

[77] 杨宗岐, 李轶女, 张志芳, 等. 猪瘟病毒 E2 基因在百脉根叶绿体基因组中定点整合载体的构建[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2648-2654.

[78] Woodard SL, Mayor JM, Bailey MR, et al. Maize (*Zea mays*)_ derived bovine trypsin: characterization of the first large_ scale, commercial protein product from transgenic plants [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2003, 38(2): 123-130.

[79] 祁喜涛, 李国强, 胡建广. 猪瘟病毒 E2 基因转化玉米研究[J]. 分子植物育种, 2010, 8(5): 899-903.

[80] 高立虎, 蔡永智, 王爱英, 等. KLU 基因转化亚麻芥的初步研究 [J]. 河南农业科学, 2013, 42(10): 25-30.

[81] 杨贺, 李余先, 李晓微, 等. 猪瘟表面抗原 E2-Erns 蛋白在亚麻芥种子中的表达及活性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(10): 4212-4216.

[82] Stubbs AC, Martin KS, Coeshott C, et al. Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell_ mediated immunity[J]. Nat Med, 2001, 7(5): 625-629.

[83] 韩雪清, 刘湘涛, 张涌, 等. 猪瘟病毒 E2 基因在 *Pichia pastoris* 中的表达及其免疫活性的初步研究[J]. 生物工程学报, 2002, 18(2): 208-211.

[84] 刘小凤, 汪倩, 罗明阳, 等. 猪瘟病毒 E2 蛋白 BC 抗原域的酿酒酵母表面展示[J]. 微生物前沿, 2017, 6(3): 72-78.

【收稿日期】 2022-08-26 【修回日期】 2022-11-08