

密级:

论文编号:

中国农业科学院 博士学位论文

表达犬瘟热病毒 F 和 H 基因的重组犬 2 型
腺病毒的构建

**Construction of Recombinant Canine Adenovirus Type 2(CAV-2)
Expressing F and H Genes of Canine Distemper Virus (CDV)**

博士研究生: 周 洁

指导教师: 陈洪岩 研究员

申请学位类别: 农学博士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 动物病毒分子生物学与免疫学

培 养 单 位: 中国农业科学院研究生院

哈尔滨兽医研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Ph.D Dissertation

**Construction of Recombinant Canine Adenovirus Type 2(CAV-2)
Expressing F and H Genes of Canine Distemper Virus (CDV)**

Ph.D Candidate: Zhou Jie

Advisor: Prof. CHENG Hongyan

Major: Preventive Veterinary Medicine

Specialty: Molecular Biology and Immunology
of Animal Viruses

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2007

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	表达犬瘟热病毒 F 和 H 基因的重组犬 2 型腺病毒的构建				
论文作者	周 洁	指导教师	陈洪岩	培养单位	哈尔滨兽医研究所

	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
评阅人	盲 评				
答辩主席	华育平	教授	博士生导师	东北林业大学	野生动物疾病防制
	刘文周	教授	博士生导师	东北农业大学	预防兽医
答辩委员	师东方	教授	博士生导师	东北农业大学	预防兽医
	童光志	研究员	博士生导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医
	刘胜旺	研究员	博士生导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医
	于 力	研究员	博士生导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医
	曲连东	研究员	博士生导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医
答辩时间与地址		2007/06/16 哈尔滨兽医研究所			
记录人员		高玉龙			

摘 要

犬瘟热(CD)是由犬瘟热病毒(CDV)感染引起的急性、高度接触性传染病,是当前对养犬业、毛皮动物养殖业和野生动物保护业危害最大的疾病之一。虽然常规弱毒疫苗在控制CD的发生中起到非常重要的作用,但也存在难以克服的缺点,弱毒苗可引起免疫抑制和中枢神经系统的损坏,随着CDV宿主谱日趋扩大,弱毒疫苗的使用还可能致死某些易感动物并带来散毒的危险。因此研制安全、高效的犬瘟热疫苗具有重要的实际意义。活载体疫苗具有成本低、效果好和使用安全、方便等诸多优点。犬2型腺病毒(Canine Adenovirus type2, CAV-2)弱毒株是批准用于犬传染性肝炎和犬传染性喉气管炎免疫预防的疫苗株,其E3区是病毒复制的非必需区,缺失或插入外源基因不会影响病毒的复制。因此,CAV-2具有发展成为活疫苗载体的潜力。本研究旨在构建表达CDV的保护性抗原基因的E3区缺失的重组CAV-2病毒疫苗,以达到同时预防犬瘟热、犬传染性肝炎和犬传染性喉气管炎的目的。

本研究首先从 CAV-2 疫苗株中提取了全基因组,克隆了包括 E3 区及其侧翼序列 pVIII基因和部分 fiber 基因在内的 4164bp 的基因片段。对该片段的核苷酸序列及氨基酸序列的分析结果表明 CAV-2 的 E3 区全长 1504bp,正向有 2 个开放阅读框,分别编码大小为 13.3 kDa 和 40.7 kDa 的两个多肽。其中 13.3kDa 多肽的基因编码框与 pVIII基因的编码框有部分重叠。距 E3 区起始位置的上游 340bp 处发现一 TATA box,推测为 E3 区的启动子序列。将该片段的序列与强毒株 Toronto A26/61 株进行比较后发现二者在 E3 区仅有 2 个碱基不同,氨基酸同源性则为 100%,由此推断 E3 区编码的蛋白对 CAV-2 的毒力没有影响,这一结果为构建 E3 区缺失载体提供了理论依据。

根据对E3区及其侧翼序列的分析结果,分别选取基因组中24050bp~24953bp及26362bp~27238bp的序列作为转移载体的上/下游同源重组臂,针对这两段序列设计两对PCR引物并在上游同源臂的下游引物中和下游同源臂的上游引物中同时引入*Kpn* I 酶切位点,将扩增的两目的片段顺次克隆于pUC18载体中,缺失了1412bp的E3区序列,并在缺失位置插入了hCMV IE启动子、多克隆位点,增强型绿色荧光蛋白基因(EGFP)、SV40早期转录 PolyA信号,构建了E3区缺失的CAV-2转移载体pUC- Δ E3-EGFP。用该载体转染CAV-2亲本毒株感染的MDCK细胞,经过连续6轮蚀斑筛选获得了表达绿色荧光蛋白的重组病毒单一克隆株rCAV-2 Δ E3-EGFP。经鉴定rCAV-2 Δ E3-EGFP保持了亲本毒株的生物学性状并能够稳定表达外源基因,动物试验证实E3区的缺失对病毒的致病力无明显影响。本研究为进一步开展CAV-2活载体疫苗研制及相关基础研究提供了技术平台。

在成功构建了重组病毒 rCAV-2 Δ E3-EGFP 的基础上,利用 RT-PCR 扩增得到了犬瘟热病毒(CDV)A 株的融合蛋白基因(F)和血凝蛋白基因(H),对其进行序列分析后将 F 和 H 基因分别用 *Bgl* II 和 *Not* I 双酶消化后,定向插入到载体 pUC- Δ E3-EGFP 中,替代了 EGFP 基因,构建了重组转移载体 pUC- Δ E3-F 和 pUC- Δ E3-H。以 rCAV-2 Δ E3-EGFP 为亲本病毒,反向蚀斑筛选、纯化获得了表达 F 及 H 基因的重犬 2 型腺病毒 rCAV-2 Δ E3-F 和 rCAV-2 Δ E3-H。间接免疫荧光试验与 Western blot 试验均证明 CDV F 和 H 基因分别在在 rCAV-2 Δ E3-F 和 rCAV-2 Δ E3-H 感染

的 MDCK 细胞中获得表达,并具有良好的反应原性,为下一步重组活载体疫苗的研究奠定了基础。

为了配合CDV重组CAV-2载体疫苗现地试验的开展,用以鉴别重组病毒疫苗免疫的动物和自然感染CDV的动物,本研究利用基因工程抗原建立了检测CDV特异性抗体的间接ELISA诊断方法。参照Genbank中各株犬瘟热病毒(CDV)核衣壳蛋白(N)基因的核苷酸序列设计合成一对引物,扩增了CDVA株的N基因,经序列测定和分析后,将其定向克隆于原核表达载体pPROEXTM HTa中,将构建的重组质粒pPROEXTM HTa-N转化Rosetta感受态细胞, IPTG诱导表达了分子量约63kDa的重组N蛋白,经Western blot分析证实所表达的重组N蛋白具反应活性;用纯化后的蛋白作为抗原,建立了间接ELISA诊断方法,经阻断试验、交叉反应试验、敏感性试验及与进口试剂盒ELISA方法的对比试验等结果证实该诊断方法具有良好的特异性、敏感性,能够为我国在犬瘟热病流行病学调查及疫苗的免疫效果的监测等方面提供技术支持。

关键词: 犬腺病毒, 重组病毒, 犬瘟热病毒, 融合蛋白基因, 血凝蛋白基因, 核衣壳蛋白基因, 间接 ELISA

Abstract

Canine distemper, caused by canine distemper virus, is one of the most acute and highly contagious disease in canine farming, fur cultivation and wildlife conservation. Traditional attenuated vaccine has intrinsic short comings despite its important role in controlling the occurrence of CD: it can cause immunosuppression and lesion of CNS, it may be lethal to some susceptible animal and possess a wide host spectrum. So developing the safe, effective, low-priced vaccine has important actual meaning.

The living vector vaccine has many advantages such as low cost, effectivity, safety and convenience etc. Canine Adenovirus type 2 (CAV-2) attenuated strain is sanctioned to be used in canine infective hepatitis (CIHV) and Canine infectious laryngotracheitis (CILV) vaccine. E3 region of CAV-2 is the non-essential district to replicate, it will not influence the replication of virus to lack or insert the foreign gene of other species. So, CAV-2 has potentiality to develop into live vaccine vector. The purpose of this study is to construct a recombinant CAV-2 expressing protective antigen of CDV for preventing CD, CILV and CILV.

In the study, we cloned 4164bp gene fragment contains E3 region and its flanking sequences (pVIII gene and partial fiber gene) from genome of CAV-2 vaccine strain. Then the gene fragment was subcloned into pMD18-T simple vector and sequenced. The E3 region is 1504bp in length, two open reading frames were found in the rightward orientation, encoding 13.3 kDa and 40.7 kDa polypeptide respectively. A TATA box was found at the position 340bp upstream of E3 region, it corresponds to the early promoter of E3. Sequence comparison indicated that only two base pairs were different at E3 region between vaccine strain and highly pathogenic Toronto A26/61 strain, and the identities of deduced amino acid sequences between them is 100%. So, we concluded the polypeptides of E3 have no relation with pathogenicity of CAV-2.

According to the analysis results of E3 region and flanking sequences, we choose the sequences at 24050bp~24953bp and 26362bp~27238 bp as the upper and lower homologous arms respectively. Two pairs of primers were designed to add the same restriction enzyme site *Kpn* I at the lower primer of upper homologous arm and the upper primer of lower homologous arm. Amplified the homologous arms by PCR and cloned them into pUC18 plasmid respectively. So 1412bp of E3 region was deleted by ligated between two homologous arms. Then, a fragment contains hCMV IE promoter, Multiple Cloning Site, EGFP gene and SV40 polyadenylation signals derived from pEGFP-N1, a eukaryotic expression plasmid, was introduced into the position which E3 region was deleted, the generated plasmid was designated as pUC- Δ E3-EGFP. Transfected pUC- Δ E3-EGFP into MDCK cells which infected with CAV-2. Based on the expression of EGFP, recombinant CAV-2 harboring EGFP reporter gene, designated as rCAV-2 Δ E3-EGFP, was obtained after six rounds of plaque purification and PCR identification. rCAV-2 Δ E3-EGFP remained the biological properties of parental vaccine strain and could express foreign gene stably. We infected dogs with the same doses rCAV-2 Δ E3-EGFP and CAV-2, the results indicated pathogenicity of rCAV-2 Δ E3-EGFP was not changed. In summary, we

established recombinant CAV-2 construction system and optimized the purification methods which supplied a technique platform for investigation of live vector vaccine and relative basal research..

Based on pUC- Δ E3-EGFP plasmid, CDV A strain F and H gene were chosen as target antigens, were cloned into pUC- Δ E3-EGFP replaced EGFP gene respectively, generated the recombinant transfer vectors pUC- Δ E3-F and pUC- Δ E3-H. The plasmid pUC- Δ E3-F and pUC- Δ E3-H were transfected into MDCK cells infected with rCAV-2 Δ E3-EGFP by calcium phosphate-DNA coprecipitation method. The recombinant virus were selected by virus plaque and identified by PCR, named rCAV-2 Δ E3-F and rCAV-2 Δ E3-H. The results of Western blot and indirect immunofluorescence test showed that F and H could be expressed efficiently in rCAV-2 Δ E3-F and rCAV-2 Δ E3-H respectively. So rCAV-2 Δ E3-F and rCAV-2 Δ E3-H can be further developed as a live vectored vaccine against CIH、CIL and CD.

To differentiate the animal immunized with recombinant virus and those naturally infected with CDV, a differentiating antibodies diagnostic methods was developed based on recombinant CDV nucleocapsid protein. In this study, the N gene of CDV A strain was amplified and cloned into Prokaryotic expression plasmid pPROEXTM HTa. After transformation of Rosetta with recombinant plasmid carrying N gene, an 63kDa expressed fusion protein was identified by SDS-PAGE after inducing with IPTG, The immune reactivity of the recombinant protein were confirmed by Western Blot. The purified recombinant protein was used as antigen, established the indirect ELISA for detection the antibodies of CDV. With a series of experiment confirmed specificity, sensitivity and repeatability of the diagnosis method is excellent. The simple and fast diagnosis method using rN-CDV expressed as diagnosis antigen can be a technique support for further developing the commercial kit of diagnosis, prevalence survey and control & eradication program of CDV in China.

Key words: Canine adenovirus, recombinant virus, Canine distemper virus, Fusion protein gene, Hemagglutinin protein gene , Nucleocapsid protein gene , Indirect enzyme-linked immunosorbent assay

目 录

前 言	1
1 犬瘟热概述	1
1.1 犬瘟热病毒的结构特点	2
1.2 犬瘟热病的免疫预防	4
2 腺病毒载体的研究进展	7
2.1 腺病毒载体构建的理论基础	7
2.1.1 E1 区的结构与功能	8
2.1.2 E3 区的结构与功能	9
2.1.3 E4 区的结构与功能	9
2.2 腺病毒载体的类型	10
2.2.1 辅助病毒依赖缺陷型腺病毒载体	10
2.2.2 特殊细胞依赖缺陷型腺病毒载体	10
2.2.3 非依赖型腺病毒载体	11
2.3 腺病毒载体的优越性	11
2.4 腺病毒载体的应用	13
2.4.1 腺病毒载体在基因治疗中的应用	13
2.4.2 腺病毒载体在人载体疫苗中的应用	13
2.4.3 腺病毒载体在动物载体疫苗研究中的应用	14
3 犬腺病毒及犬腺病毒载体	15
3.1 犬腺病毒的基本生物学特性	15
3.2 犬腺病毒基因组结构特点	16
3.3 重组犬腺病毒载体的构建	17
4 本研究的目 的及意义	18
研究报告	20
实验一 犬 2 型腺病毒疫苗株 E3 区及其侧翼序列的克隆与序列分析	20
1 材料与方 法	21
1.1 细胞、病毒和菌种	21
1.2 主要试剂	21
1.3 病毒扩增	21
1.4 引物	21
1.5 病毒基因组的提取	21

1.6 目的基因的扩增.....	22
1.7 与pMD18-T的连接.....	22
1.8 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	22
1.9 转化.....	22
1.10 碱裂解法小量提取质粒DNA.....	23
1.11 重组质粒的序列测定与分析.....	23
2 结果.....	23
2.1 E3 区及其侧翼序列的PCR扩增结果.....	23
2.2 序列分析结果.....	24
3 讨论.....	28
实验二表达绿色荧光蛋白的E3 缺失重组犬 2 型腺病毒的构建及其生物学特性分析.....	30
1 材料和方法.....	31
1.1 病毒、载体及细胞.....	31
1.2 主要试剂.....	32
1.3 实验动物.....	32
1.4 E3 缺失转移载体的构建.....	32
1.5 中量法提取pUC- Δ E3-EGFP质粒并纯化.....	34
1.6 CAV-2 亲本病毒PFU的测定.....	34
1.7 重组质粒的转染.....	35
1.8 重组病毒的筛选及纯化.....	35
1.9 重组病毒的PCR鉴定.....	35
1.10 重组病毒生长特性的鉴定.....	36
1.11 重组病毒的形态学鉴定.....	36
1.12 重组病毒遗传稳定性检测.....	36
1.13 重组病毒作为疫苗载体的安全性评估.....	36
2 结果.....	36
2.1 E3 缺失转移载体的构建.....	36
2.2 重组病毒的筛选及纯化.....	41
2.3 单一克隆rCAV-2 Δ E3-EGFP的PCR鉴定.....	42
2.4 重组病毒的形态学鉴定.....	43
2.5 重组病毒的生长特性.....	44
2.6 遗传稳定性检测.....	45
2.7 重组病毒的安全性评估.....	46
3 讨论.....	47

3.1 关于E3 区及其缺失后的容量	47
3.2 关于报告基因的选择	48
3.3 关于转染的方法	49
3.4 关于重组病毒的筛选	49
3.5 关于重组病毒生物学特性的鉴定	49
实验三A株犬瘟热病毒F和H蛋白在重组犬腺病毒中的表达	51
1 材料及方法	52
1.1 病毒和细胞	52
1.2 质粒	52
1.3 主要试剂	52
1.4 SPF鸡胚	52
1.5 犬瘟热病毒的增殖	52
1.6 RT-PCR引物设计	53
1.7 病毒基因组RNA的提取	53
1.8 反转录	53
1.9 目的基因的PCR扩增	53
1.10 序列分析	54
1.11 重组转移的构建	54
1.12 重组病毒的筛选	54
1.13 重组病毒的PCR鉴定	54
1.14 间接免疫荧光鉴定	55
1.15 Western blot 分析	55
2 结果	56
2.1 F和H基因的扩增结果	56
2.2 F和H基因的核苷酸及推导的氨基酸序列分析	57
2.3 转移载体的构建	62
2.4 重组病毒的筛选及PCR鉴定	63
2.5 间接免疫荧光检测	64
2.6 Western blot结果分析	64
3 讨论	65
实验四 犬瘟热病毒间接ELISA诊断方法的建立	68
1 材料和方法	69
1.1 毒株	69
1.2 质粒和感受态细胞	69
1.3 主要试剂	69

1.4 血清.....	69
1.5 RT-PCR引物设计	69
1.6 病毒基因组RNA的提取	70
1.7 反转录.....	70
1.8 N基因的扩增	70
1.9 克隆载体的构建.....	70
1.10 表达载体的构建.....	70
1.11 N基因的诱导表达	70
1.12 重组N蛋白Western-blot分析	71
1.13 重组N蛋白的纯化.....	71
1.14 犬瘟热重组N蛋白抗体间接ELISA检测方法的建立	71
1.14.1 间接ELISA反应基本程序	71
1.14.2 最佳抗原包被量和血清稀释度的确定.....	72
1.14.3 酶标抗体最佳工作浓度的确定.....	72
1.14.4 待检血清最佳作用时间测定.....	72
1.14.5 酶标抗体最佳作用时间.....	72
1.14.6 最佳封闭液的确定.....	72
1.14.7 临界值的确定.....	72
1.14.8 与其它ELISA试剂盒的比对试验	72
1.14.9 特异性试验.....	73
1.14.10 敏感性试验.....	73
1.14.11 现地试验.....	73
2 结果.....	73
2.1 RT-PCR扩增结果	73
2.2 N基因的鉴定及测序结果分析	74
2.3 N基因原核表达载体的构建	76
2.4 N基因表达产物的检测	76
2.5 重组蛋白Western blot分析	77
2.6 重组蛋白的纯化.....	77
2.7 最佳抗原包被量和最佳血清稀释度的确定.....	78
2.8 待检血清最佳作用时间确定.....	78
2.9 酶标抗体工作浓度与作用时间的确定.....	79
2.10 最佳封闭液的确定	79
2.11 临界值测定	80
2.12 与其它试剂盒的符合性试验.....	80
2.13 敏感性试验.....	81
2.13.1 最低抗体检出效价	81

2.13.2 抗体消长曲线测定.....	81
2.14 特异性试验.....	82
2.14.1 阻断试验.....	82
2.14.2 交叉反应试验.....	82
2.15 现地实验.....	83
3 讨论.....	83
结 论.....	85
参考文献.....	86
致 谢.....	96
作者简介.....	97

前言

犬瘟热病是由犬瘟热病毒(canine distemper virus, CDV)感染犬和其它多种食肉目动物的一种高度传染性疾病,是目前对经济动物养殖业危害最大的疫病之一。幼犬感染CDV后多呈致死性经过,使幼犬尽早获得特异性免疫是防治本病的关键,用传统的弱毒疫苗免疫,常因幼犬体内存在的母源抗体的干扰而使免疫失效。经研究证实(Klonjowski *et al*, 1999)以腺病毒为载体的疫苗能够诱导细胞免疫、体液免疫、粘膜免疫,并能够对抗母源抗体的干扰,因此,研制以腺病毒为载体的CDV重组基因工程疫苗对于CD的防制具有很重要的意义。

腺病毒 (Adenovirus, Ad)作为基因表达载体的研制起始于20世纪60年代初,当时病毒学家观察到腺病毒基因组可与猴多瘤病毒40(SV40)基因组杂交,说明腺病毒基因组可承载异源性基因,此后腺病毒所具有的基因组结构简单易操作、宿主细胞广泛、易于增殖和纯化、能高效表达外源基因、安全性好等诸多优点使其成为基因治疗及基因工程疫苗研究的首选病毒载体之一。迄今分离得到的腺病毒已有100多个血清型,分别隶属于哺乳动物腺病毒属(Mastadenovirus)和禽腺病毒属(Aviadenovirus)。不同种属的腺病毒基因组结构和功能非常相似,而且各型腺病毒之间很少存在交叉免疫反应,这就为利用不同种属的腺病毒研制载体提供了丰富的材料。目前,人腺病毒(Human Adenovirus, HAV)载体是研究最透彻的,HAAd4和HAAd7载体疫苗已经应用于临床,犬腺病毒(Canine Adenovirus, CAV) (Fischer *et al*, 2002), 禽腺病毒(Aviadenovirus) (Johnson *et al*, 2003; Francois *et al*, 2004), 牛腺病毒(Bovine Adenovirus, BAV) (Wu *et al*, 2004), 猪腺病毒(Porcine Adenovirus, PAV) (Zakhartchouk *et al*, 2003), 绵羊腺病毒(Ovine Adenovirus, OAV) (Wuest *et al*, 2004)等多种动物腺病毒载体的研究也取得了较大进展。其中2型犬腺病毒(CAV-2)弱毒株是预防犬传染性肝炎和犬传染性喉气管炎的安全、有效的疫苗,开发CAV-2作为载体研制犬类及其它哺乳动物的基因工程活载体疫苗有着良好的应用前景。

1 犬瘟热概述

犬瘟热是一种急性、高度接触性传染病。该病传染性强,发病率高,临床症状多样,容易继发感染。感染的幼龄动物多为急性、致死性经过,成年动物可呈慢性持续性感染。本病以早期表现双相热、急性卡他性鼻炎、支气管炎并常发展为卡他性肺炎、通常伴发或以不定的神经症状为特点;一些病犬可发生急性胃肠炎、皮肤有湿疹样病变或水泡和脓泡、鼻和足垫发生过度角化等症状。CD最早流行于欧洲,Carre于1905年首次提出该病的病原是一种病毒,因此本病也成为Carre氏病。1926年Laidlaw和Duncan利用完全隔离饲养的犬和易感性极高的雪貂进行人工感染试验,首次复制出了致病因子。现在CD已呈世界性分布,是当前对养犬业、毛皮动物养殖业和野生动物保护业危害最大的疫病之一。经常引起大批犬、貂、狐等动物发病,病死率30~80%,雪貂可达100%,CD对犬的致死率仅次于狂犬病而居于第二位。近年来,CDV的宿主谱有不断扩大的趋势,陆续出现了大熊猫、猕猴、西湍等珍稀动物感染CDV的报道,Mee等(1993)从患Paget's慢性骨病

的病人组织中检测出了CDV的核酸，使该病再次受到动物学界及医学界的广泛关注。

1.1 犬瘟热病毒的结构特点

1.1.1 形态结构

CDV 粒子多数呈球形，亦有畸形和长丝状，直径为 150~330nm。核衣壳呈螺旋状，外覆近似双层轮廓的囊膜，膜上排列有 1.3nm 的杆状纤突，纤突上只含血凝素，无神经氨酸酶。CDV 只有一个血清型，但有不同的变异毒株。

1.1.2 基因组结构

CDV 是不分节段的负链 RNA 病毒。其基因组呈线状排列，全长 15616nt，3' 端 55nt 的前导序列和 5' 端 38nt 的尾随序列为启动调节序列，负责指导基因组的复制、转录及衣壳的形成过程。在两侧翼序列之间为各蛋白的编码基因，按 3'-5' 顺序排列依次为 N-P-M-F-H-L，各序列长度分别为 N1683nt，P1655nt，M1442nt，F2205nt，H1947nt，L6573nt。在每个结构蛋白基因的 3' 和 5' 端都存在着非编码区，这些区域包含一个半保守的聚腺苷酸化和终止信号((aUUAuaA4-8)及基因间的非转录三联核苷酸标志 CUU，(在 H-L 接合处为 CUA，在 L 和 5' 前导序列接合处为 CAA)，在此标志之后是一段半保守的序列(AGGAUCcAgCa)，作为下一个基因的转录起始信号 (Mohinderjit *et al*, 1993)。

1.1.3 亚单位结构及其功能

CDV 颗粒由核衣壳蛋白(Nucleocapsid Protein,N)、磷蛋白(Phosphoprotein,P)、膜蛋白(Matrix Protein,M)、融合蛋白(Fusion Protein,F)、血凝蛋白(Hemagglutinin Protein,H)及大蛋白(the large virus specific RNA directed RNA polymerase protein,L) 6 个结构蛋白和一个非结构蛋白-C 蛋白构成。其中 M、F、H 为包被蛋白，P、N、L 为芯髓蛋白。

N 蛋白分子量为 58kDa，从结构上可分为三个区，即可变区 N 末端(17~159aa)，可变区 C 末端(408~519aa)及高度保守区(160~407aa)。野毒株与疫苗株之间核苷酸和氨基酸的绝大多数差异均位于可变区内，N 蛋白的中间保守区在结构和功能上有重要作用。N 蛋白是形成核衣壳的主要蛋白，具有包裹和保护内部基因的功能。N 蛋白是一种保守性较强的免疫原性蛋白，CDV 感染后，核蛋白可引起机体强烈的抗体反应，尤其是当 H 和 F 蛋白的特异性抗体低于检测水平时，N 蛋白特异的抗体仍可被检测出 (Yoshida *et al*, 1998)，因此，N 蛋白是一种理想的诊断抗原。Yoshida 等 (1999) 构建了 OP-CDV 疫苗株一系列 N 蛋白缺失基因来研究 N 蛋白抗原表位。该结果表明 N 蛋白的 1~80 位和 337~358 位氨基酸残基是 CDV 核蛋白诱发抗体的主要抗原表位。用免疫荧光试验检测缺失基因表达的 N 蛋白在细胞中的位置，发现全长或 3' 端缺失基因表达的蛋白存在于转染细胞的细胞核内，而 5' 端缺失 1~80aa 基因表达的蛋白主要存在于胞质内，可见，核蛋白的 5' 末端 1~80aa 是其转运到细胞核所必需的。N 蛋白还含有 T 细胞表位，是麻疹病毒属中主要的交叉抗原，在病毒侵染时能诱发 MHC I 类抗原限制性 CTL 反应。据 Hanbuoger 等 (1991) 报道，CDV 的毒力与 N 蛋白密切相关，抗 CDV

蛋白的单抗L1能与细胞上传代致弱的CDV毒株的N蛋白结合,但不能与2株强毒株结合,然而,当这2个强毒株在Vero细胞上反复传代后,L1单抗便能和N蛋白结合。这似乎表明N蛋白存在着这样一个表位,该表位只存在于疫苗株或者反复传代的致弱株。

P蛋白是由磷蛋白基因上起始于59~61位的AUG的开放阅读框架所编码的一种糖基化蛋白,是病毒核衣壳的组成成分并具有聚合酶的活性。因P对蛋白水解作用非常敏感,在聚丙烯酰胺凝胶电泳中出现不规则的泳动,因此,已报道的分子量有所差异(Diallo *et al*, 1990)。

CDV的L蛋白分子量246 kDa,在所有副粘病毒中是最小的。L蛋白的主要结构特点包括具有高含量的Leu和Ile、存在一个线形不连续的高度保守区。L蛋白被认为是一种多功能酶单位,它不但具有特异性RNA聚合酶活性,在病毒RNA形成的过程中也起到多种酶的作用,如:初级mRNA转录本的加帽、聚腺苷化、甲基化及作为蛋白激酶(Mohinderjit *et al*, 1993)。这些保守的区域有6个I~VI)。在第III区发现一个保守的五肽结构QGDND(74~87位残基),相当于细胞RNA多聚酶中关键的GDD结构,因此这一区域代表大蛋白的模板识别和磷酸二脂键形成的活性位点。在第II区的631~650位氨基酸之间,每隔4个氨基酸出现一个碱性疏水性氨基酸,它们形成 α -螺旋结构,碱性氨基酸和模板RNA之间可能存在着接触,因此推测这一区域是RNA模板结合部位。在第VI区的1969~1937位氨基酸中存在GXXGXGK结构,这种结构和聚腺苷酸化及蛋白激酶活性有关。L和P在病毒粒子中含量很低,位于核衣壳内,是RNA依赖的RNA聚合酶的两个亚单位,两者形成的复合物具有完整的酶活性。病毒RNA聚合酶识别被核衣壳蛋白N紧紧包裹的RNA模板,P和N相结合后,使N蛋白发生结构上的改变,在RNA聚合酶阅读其模板时有利于核衣壳螺旋的伸展,为酶的作用留下足够的空间(Nishio *et al*, 1996)。

F蛋白是典型的I型糖蛋白,位于病毒的囊膜上,可分为三个主要的功能区,分别为附着区、融合区和穿膜区。它是以前体F0(分子量62kDa的形式被合成的,在其距-NH2100个氨基酸处经细胞蛋白酶裂解为F1(40kDa)、F2(23 kDa),二者以二硫键相连,此过程为发挥融合作用所必需的。在F1的N末端有一个长的疏水氨基酸片段称为融合序列,这段序列高度保守,可能与麻疹病毒属各成员间的交叉保护现象有关。根据二级结构推测,F1的N末端被F2所掩盖,只有在融合过程开始后通过构象的改变才能使其暴露出来,继而N末端穿过靶细胞膜促进病毒与靶细胞膜之间的融合(Varsanyi *et al*, 1987)。Von等(2001)的研究显示了靠近膜的切割的发生和调节F蛋白的功能。研究发现还存在一个新的裂解位点,在F0切割形成F1和F2亚单位时,可以将F1亚单位继续裂解产生F1a和F1b两个片段,F1b片段由一个跨膜区域(transmembrane segment)和一个细胞质尾(cytoplasmic tail)构成。裂解发生在细胞膜的附近,裂解位点位于第595~608位氨基酸残基之间,位于细胞膜附近的六个氨基酸是裂解所必需的,这六个氨基酸能被相应的MVF蛋白不同序列不同功能的氨基酸残基所替代。因此,不同序列的结构元件在功能上是可交换的,但近膜氨基酸的改变导致重组CDV的融合活性的降低。Alkhatb(1990)认为在F0蛋白前体裂解及裂解后进入细胞内的过程中,F蛋白的糖基化起着非常重要作用,而CDV F蛋白结构中糖基化位点高度保守,表明不同毒株的F蛋白具有相似的结构和功能。

F蛋白还是刺激机体产生中和抗体的主要蛋白,它所诱导的免疫反应能阻止病毒进一步侵染,并在病毒增殖的情况下对症状的发生具有一定的抑制作用,在限制感染的传播和阻止致命性疾病的发生中起重要作用(Erling *et al*, 1986)。F是异型免疫的主要交叉抗原(Befwee *et al*, 1986),在麻疹病毒成员中,CDV、MV和RPV群特异性表位主要是在F蛋白上。在犬瘟热病毒F蛋白

上存在着两个重要的辅助性 T 淋巴细胞表位,其位置在 F1 和 F2 断裂位点的周围,其中一个在 148~213 位氨基酸残基处,即 F2 片段的末端,而另一个则存在于 F1 的 N 末端序列上(第 212~283 位氨基酸残基处)。在断裂位点附近的辅助性 T 细胞表位,可能是犬抗原提呈细胞(APCS)最优先识别和提呈的位点。在 MVF 蛋白的 T 细胞表位(288~302 位氨基)和 B 细胞表位(404~414 位氨基酸)构成了嵌合多肽,能诱导出抗 MV 和 CDV 的保护性免疫应答。

H 蛋白是由 H 基因编码的一种 II 类糖蛋白,在其 N 末端的 35~55 位氨基酸形成 H 蛋白所特有的疏水锚定区,一方面作为穿膜的信号序列,一方面作为锚定区使其嵌在 M 蛋白上。H 蛋白的变异率在所有结构蛋白中最高(变异率按从高至低顺序依次排列为 H、N、L、P、F、M)为进一步了解 H 蛋白变异的分子基础,对许多毒株 H 基因进行了遗传多态性分析,结果表明,野毒株与疫苗株在核苷酸和氨基酸水平上存在着较大的差异(10%左右)。系统发生分析表明,CDV 存在着不同的基因型,对新的 CDV 分离毒株的序列分析表明 H 基因的遗传变异可能是近年来引起犬瘟热免疫后暴发的重要原因。H 蛋白上存在着许多中和性抗原表位,是诱导机体产生中和抗体的主要蛋白,在抗 CDV 免疫中起着非常重要作用。抗 CDVH 蛋白的 7 个抗原决定簇中的 6 个中和抗体能中和 CDV,但均不能封闭 MV 的感染及其血凝活性;能抑制 MV 血凝活性并能中和 MV 的抗 MVH 蛋白的单抗也不能中和 CDV,故 H 蛋白很可能在提议的新麻疹病毒属成员分类中起决定作用。此外, H 蛋白至少含有一个细胞毒性 T 淋巴细胞表位,在小鼠和犬体内能诱发特异的 CTL 活性(Sixt *et al*, 1998; Himma *et al*, 2003)。在病毒感染过程中, H 蛋白起到吸附和融合两方面的作用,病毒通过 H 蛋白吸附到细胞表面的受体上,并与 F 蛋白协作使 CDV 以囊膜与宿主细胞膜发生融合的方式进入宿主细胞。

M 蛋白即非糖基化的囊膜糖蛋白,它存在于病毒囊膜的内层,分子量为 34kDa,是 CDV 病毒粒子中最小的蛋白,也是在六种结构蛋白中最为保守的。脯氨酸和甘氨酸在 MV 和 CDV M 蛋白中的位置是非常保守的,这两种氨基酸为最强的二级结构终止物,其存在有利于蛋白质转角形成。其作用主要表现为:在装配过程中参与囊膜的形成,介导核衣壳与囊膜之间的识别并和病毒的出芽有关(Peoples *et al*, 1991; Wiley *et al*, 1985)。

1.2 犬瘟热病的免疫预防

CDV 呈世界性分布,易感宿主范围广,且可在大量不相关的动物物种中进行种间传播,消灭犬瘟热是一件难以实现的事情,但可以用疫苗来控制。在犬瘟热的防治过程中,经过了灭活苗到弱毒疫苗以及目前世界上广泛研究的基因工程疫苗几个阶段。

1.2.1 CDV 灭活苗

1923年Puntoni首次使用CDV感染犬脑组织的福尔马林灭活苗。该苗只能激发机体低水平的体液免疫对强毒攻击不能产生完全保护。但灭活苗对一些极其易感的群体都起到很好的保护效果,接种海貂可免受CDV致死性攻击。

1.2.2 麻疹(MV)疫苗

MV和CDV具有密切的抗原关系,其诱导的细胞免疫应答可抵抗CDV对免疫动物的攻击(Strating *et al*, 1975)。但免疫犬诱导产生的体液免疫应答与CDV没有交叉反应,即不能产生抗CDV中和抗体。T细胞交叉反应是副粘病毒科成员的普遍特性,对MV的细胞毒性T细胞反应在动物感染CDV后的康复过程中起着重要作用。因此,MV疫苗适用于因存在母源抗体干扰而不能或不宜马上接种犬瘟热弱毒疫苗的幼畜的主动免疫(Appel *et al*, 1984)。但MV疫苗和CDV灭活疫苗一样都不能提供动物持久的保护力。

1.2.3 弱毒疫苗

自1956年Haig、1959年Rockborn分别研制了雪貂传代减毒苗和适应鸡胚的活疫苗并取得了良好的免疫效果后一直沿用至今。弱毒疫苗在控制CDV的发生上起着积极作用,但它也存在着许多缺陷。如弱毒疫苗具有热不稳定,能引起免疫抑制和一定程度上损害神经系统,对某些免疫缺陷幼犬和野生食肉动物存在不安全性等。许多国家均有免疫群体爆发犬瘟热的报道(Blixenkrone *et al*, 1993; Gemma *et al*; 1996)。因此,寻求更安全有效的疫苗成为当前CDV研究的热点之一。

1.2.4 基因工程亚单位疫苗

Erling 等(1986)用单抗亲和层析法纯化CDV的H、F蛋白,并分别作为抗原接种犬后再用致死量攻击,结果为接种F抗原的动物受到良好的免疫保护,接种H抗原的犬有个别出现轻微症状。Viries 等(1988)在体外将CDV F、H蛋白多肽聚合形成100nm左右颗粒后,加入皂角糖苷,形成免疫刺激复合物,可诱导犬产生CDV中和抗体,鼻内途径攻毒,免疫犬不出现临床症状和病毒血症。虽然该亚单位苗呈现较好的免疫反应,但生产成本较高,除非改进技术降低成本,否则难以在生产上推广。

1.2.5 基因疫苗

Sixt等(1998)将CDV H、F基因分别插入真核载体PVIJ构建克隆载体PVIJ-CDV H, PVIJ- DVF, 转染鼠Ltk细胞验证其表达后,采用肌注和基因枪两种方式免疫BALB/c小鼠观察其体液和细胞免疫水平。肌注CDV H基因疫苗主要诱导产生IgG2a,而基因枪免疫产生的抗体类型仅为IgG1,而CDV F基因免疫产生了IgG 1和IgG2两种抗体类型。两种基因疫苗免疫均呈现I型介导的细胞毒性淋巴细胞应答。采用致死剂量的神经毒性CDV毒株攻毒时均能得到保护,然而有30%的CDV F基因免疫小鼠在攻毒后2个月内出现肥胖症状。Cherpillod 等(2000)将CDV强毒株A75/17的F、H、N基因克隆到真核表达载体PCI,构建了PCI-N、PCI-F、PCI-H三种质粒,三种质粒混合肌注SPF毕格犬,三次免疫后抗体滴度迅速升高,攻毒后达到峰值1:256,而对照组未能检测出中和抗体,且出现典型的犬瘟热症状。该研究首次报道了麻疹病毒属DNA疫苗在自然宿主中对强毒攻毒提供保护力。

细胞介导的免疫应答反应是DNA疫苗诱导机体抵抗病原体攻击的主要机制。而DNA疫苗激活B细胞反应较T细胞反应滞后。一般认为当体内中和抗体>1:100时,机体可免受强毒的攻击,而目前犬瘟热病毒DNA免疫诱发的中和抗体都未能达到该临界保护线。其原因在于抗体的产生有赖于B细胞识别进入细胞表面或问隙的完整抗原,因而分泌性抗原可更有效活化B细胞。然而DNA

免疫产生的蛋白和天然病毒感染有很大的差别,其产生的抗原蛋白是非细胞病变性的,因此不会导致细胞裂解,而且许多编码蛋白既不展示在细胞表面也不分泌到细胞外部。DNA免疫多产生非分泌性蛋白,所以抗体反应要缓慢得多。

DNA疫苗的安全性也是一个只得关注的问题:其一,质粒DNA有整合到宿主细胞基因组中的可能,因而便有可能导致抑癌基因的失活和原癌基因的激活;其二,抗原蛋白的持续表达(尤其是在肌细胞内)会引起机体的免疫耐受;其三,由于DNA能诱导小鼠产生抗双链DNA的自身抗体,从而加速狼疮性动物的发病。因此,人们对DNA疫苗是否会引起自身免疫疾病多持有疑问。

1.2.6 活载体疫苗

在表达CDV保护抗原的重组疫苗的研究中痘苗病毒和金丝雀痘病毒载体应用的比较广泛,但由于痘苗病毒其宿主范围广,对人类具有潜在危险性,而金丝雀痘病毒载体在哺乳动物体内不复制,因此更受到人们的青睐,在美国,犬瘟热金丝雀痘病毒载体活疫苗已批准上市。Taylor等(1991)首次在痘苗病毒(Vaccinia virus,VV)中表达了MV的H、F0、F1和F2基因。经实验证实,接种rVV-MV-H或rVV-MV-F+H后能诱导产生较高的MV中和抗体,虽未能产生可检测的CDV中和抗体,然而CDV攻毒后,除少数动物呈现轻微的CDV症状外,全部实验犬均能幸免。Wild等(1993)分别构建表达MV的H、M、F、N及CDV的F蛋白的重组疫苗,免疫小鼠表明,除了rVV-MV-H外均能对小鼠产生部分抗CDV的保护作用,而接rVV-MV-F的小鼠得到完全保护。Jones(1997)构建了痘苗病毒表达牛瘟病毒(RPV)的HA、F抗原的重组疫苗(VV-RPV HF),一次免疫无CDV母源抗体的幼貂后就能抵抗大剂量CDV强毒攻击产生了60%的保护力。这种疫苗对貂是极为安全的,且不存在CDV母源抗体的干扰作用。Stephensers(1997)将CDV的H、F基因插入痘苗病毒弱毒株NYVAC和金丝雀痘病毒弱毒株ALVAC株构建重组疫苗,接种幼貂能耐受强毒攻击。

近年来,通过病毒拯救系统已在体外组装了许多病毒,其中麻疹病毒属的麻疹病毒、牛瘟病毒和犬瘟热病毒已相继通过反向遗传系统进行了拯救,从而为研究已知变异株的减毒效应提供了方法,也可检测出因病毒变异导致的持续感染,更重要的是可能提供一种新的疫苗构建策略。在麻疹病毒属中,犬瘟热病毒和麻疹病毒在抗原上有许多交叉性,已有报道采用麻疹病毒的异源疫苗可诱发犬产生部分保护,特别是对于犬瘟热病毒活疫苗敏感群体的使用,已取得巨大的社会效益和经济效益。Messling(2001)在研究犬瘟热病毒蛋白生物学特性时,发现犬瘟热病毒和麻疹病毒的囊膜糖蛋白基因发生交换时,通过拯救系统仍能产生生活的重组病毒,该实验有可能给我们提供了一种新的犬瘟热疫苗构建思路,即在麻疹病毒活疫苗母体背景下,将MV的H基因替换为CDV囊膜糖蛋白H基因,可以想象,对于犬和其它经济动物而言,在没有致病力的前提下,rMV-CDVH可激发产生针对同源H蛋白的中和抗体,这样就弥补了常规MV活疫苗免疫犬不能产生抗CDV中和抗体的缺陷,此外,该重组疫苗同样可以不受CDV母源抗体的干扰,给处于母源抗体临界点的幼畜提供保护,也避免了CDV活疫苗对其它易感群体带来的感染和致死的危险。当然,该重组疫苗的潜在实用价值,仍需通过实验来进一步证实。

与痘病毒相比,腺病毒基因组要小得多。腺病毒载体的优点有两个:一是对热不敏感,在适合的培养系统中呈高滴度增殖,因而成本低;二是腺病毒能诱导粘膜免疫,特别是能制成药囊经口服途径接种预防消化道及呼吸道感染。目前,腺病毒载体具有两种类型,即非复制性载体和复

制性载体, 其中复制性载体构建的重组病毒在具有载体抗体存在的情况下, 也能诱导有效的粘膜免疫, 表明该复制性载体构建的疫苗能越过母源抗体的干扰, 将呈现良好的实用价值。Fischer等(2002)以具复制能力的犬CAV-2载体为基础, 分别构建了表达犬瘟热病毒囊膜糖蛋白H和F基因的重组载体(CAV-2-F, CAV-2-H), 对无CDV抗体的幼犬鼻内混合接种上述两重组病毒, 一次免疫就激发了较高水平的抗体并产生了免疫保护, 初步证实了复制性腺病毒重组疫苗粘膜免疫的价值。采用CAV-2载体构建的重组CDV疫苗皮下注射接种同一批次的幼犬时, 尽管该阶段实验犬体内已存在对载体的高滴度抗体, 追加免疫后仍激发了显著的血清抗体转化现象, 并对强毒攻击产生了坚强的保护力。结果表明皮下注射复制性重组CAV疫苗能够克服对腺病毒载体的主动和被动免疫带来的影响, 从而成为对具母源抗体的幼犬免疫的一种有效途径。

2 腺病毒载体的研究进展

2.1 腺病毒载体构建的理论基础

腺病毒属于线状双链 DNA(dsDNA)病毒, 无囊膜, 其基因组与核心蛋白结合形成病毒粒子内核, 蛋白质外壳是直径约 80nm 的正二十面体, 由 252 个壳粒组成, 几何排列成 240 个非顶角六邻体。在位于二十面体顶角的五邻体蛋白上各有一条(哺乳动物腺病毒和 2 群、3 群禽腺病毒)或二条(1 群禽腺病毒和 F 群人腺病毒)长度为 10~30nm 的纤维突起, 这些纤维以五邻体蛋白为基底由衣壳表面伸出, 顶端形成头节区(knob), 它是病毒感染细胞时结合于细胞受体的部分。病毒基因组每条链的 5'端结合着末端蛋白 TP, 它与腺病毒的感染性有关, 带有末端蛋白的病毒 DNA 可使其感染性提高 100 倍。

基因组长约30~43kd, 传统上将其划分为100个图距单位(map unit, m.u), 包括基因组两端长约40~200bp 反向末端重复序列(Inverted Terminal Repeat, ITR), 基因组5'端194~385bp载有的包装信号(packaging signal)和基因编码区。ITR在病毒复制的过程中与启动和增强早期基因的转录有关。其长度及重复次数因毒株的不同而异, 并与传代的次数有关。每一个ITR可分为AT富集区和GC富集区两部分; AT富集区长约50~52bp, 位于DNA分子的最末端, GC富集区长约50~110bp, 其同源性较差, 9~22bp是高度保守区。包装信号和ITR一样是病毒基因组复制和病毒包装不可缺少的顺式作用元件(cis element)(引自动物病毒学第二版)。

基因组编码区以DNA复制的起始时间为界可分为早期转录区和晚期转录区两种, 前者有E1、E2、E3、E4四个区, 编码病毒的调节蛋白; 后者有L1、L2、L3、L4、L5五个区, 编码病毒的结构蛋白。外源基因插入的主要区域为E1、E3和E4区。

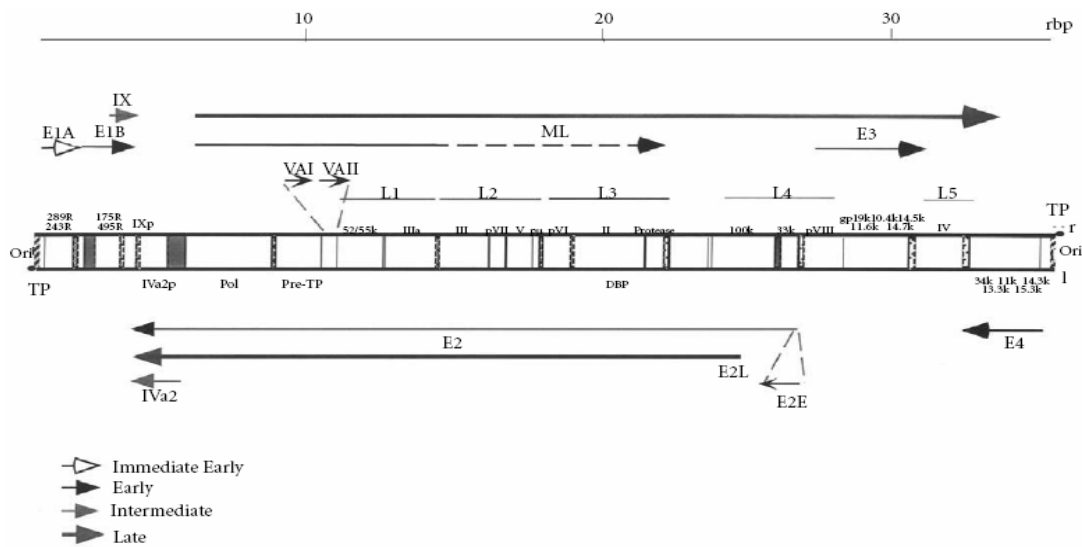


图1-1 Ad2的基因组结构示意图（引自Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy）
Fig.1-1 Genome structure of Ad2（from Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy）

2. 1. 1 E1 区的结构与功能

E1区位于腺病毒基因组的左端1.3~11.2 mu，长度为3.2kb，包含E1A和E1B两个转化基因。E1A基因定位在腺病毒基因组的最左端1.3~4.5mu内，它以r链为模板，从左至右转录形成3个mRNA。E1A蛋白的主要功能是反式激活其他病毒基因和细胞基因的转录，E1A蛋白还参与调节细胞代谢、促进病毒在细胞内的复制、使细胞更易感染病毒。E1B基因定位在4.6~11.2mu，其基因转录受E1A的13 S mRNA编码的蛋白产物反式激活。E1B基因主要转录合成22S和13SmRNA，E1B的13S mRNA编码的蛋白质具有反式激活基因转录的活性，可以反式调节腺病毒E1A、E1B、E2、E3和E4以及细胞热休克蛋白70 (hsp70)基因的表达；22S mRNA编码的蛋白质在增殖感染的细胞中，与E4基因编码的34kDa蛋白共同作用，可以影响腺病毒DNA复制和晚期mRNA的转运，并能抑制宿主细胞mRNA从核内向胞质的转运过程，从而关闭宿主细胞蛋白质的合成。

E1为病毒复制必需区，外源DNA插入E1区或取代部分E1区，构建的腺病毒载体必须在特殊的工程细胞中或非缺失的腺病毒辅助下才能复制增殖。E1区的缺失必须不影响两个区域：一个是病毒活力及病毒复制的起始部位左侧端的ITR（1~103bp）以及位于194~358bp的包装信号；另一区域是从3.5kb处到E1区的末端，为病毒装配及维持病毒活力所必需的IX基因。缺失E1区的表达载体在其他细胞上繁殖时，外源蛋白的表达量较低，为了提高外源基因的表达量，构建高效表达载体，外源基因通常同一强启动子相连。启动子一般可用巨细胞病毒(CMV)早期启动子或Rous肉瘤病毒(RSV)长末端重复(ITR)增强子序列，还可以用腺病毒主要晚期启动子（MLP）和三联先导序列(TPL)。表达盒的方向对于表达可能不太重要，但有文章报道以CMV早期启动子的表达盒右向表达β-gal比反向的表达高7倍（Addison *et al*, 1997）。

2.1.2 E3 区的结构与功能

腺病毒E3区位于腺病毒基因组L4区的pVIII蛋白基因和L5区纤维蛋白基因之间。因为腺病毒基因组大小不同,其E3区的起始位点有所差别。人腺病毒E3区位于限制性内切酶物理图谱的76~89mu.之间(Signas *et al*, 1986; 谭维彦等, 1994), 含有9~12个开放阅读框架(ORF), PAV(Reddy *et al*, 1996), BAV(Minal *et al*, 1992), CAV(Linne *et al*, 1992), MAV(Raviprakash *et al*, 1989)等具有不完整的E3区, 其长度约在1~1.9kb之间, 编码2~6个多肽, 与人腺病毒E3区编码蛋白具有同源性, OAV(Vrati *et al*, 1995)、CELO(Tikhomimv *et al*, 1998)、EDSV(李茂样等, 1997)的pVIII基因和fiber基因之间则不编码任何基因产物。

E3区是腺病毒生长的非必需区, 缺失或取代E3区的腺病毒在细胞上仍能生长, 但E3可去掉的DNA片段的最大极限还不十分清楚(Mauson *et al*, 1990), 插入E3区的外源基因一般不需要再加基因表达调控元件, 利用腺病毒本身的调节元件, 即外源基因可插在E3区启动子后在感染早期有效表达。由于病毒复制晚期产生大量结构蛋白, 因此也可将外源基因插在克隆化的腺病毒晚期表达元件, 即主要晚期启动子(MLP)和三联先导序列(TPL)之后, 顺序为Ad MLP-AdTPL-外源基因-Poly A信号一加工信号。研究表明, 在E3区构建载体插入的外源基因与E3区和晚期转录同向, 即从左向右才能高效表达(Chanda *et al*, 1990)。该区基因编码产物与调整宿主免疫反应有关, 因此, E3区缺失可能影响重组腺病毒在体内的生长特性, 使感染组织的病理变化发生改变, 如感染组织的淋巴细胞浸润增强(Morin *et al*, 1987; Ginsberg *et al*, 1989)等。

2.1.3 E4 区的结构与功能

E4区是另一个与腺病毒生活周期重要相关的区域, 也可作为外源基因的插入位点, 总共有6~7个基因表达盒(ORF1-6/7), 编码的产物中仅有一个即ORF3或ORF6是病毒生长绝对必需的, ORF3和ORF6通过主要晚期启动子增加转录的pre-mRNAs的稳定性, 在转录后水平上调节病毒晚期RNA, 同时突变ORF3和ORF6 编码蛋白时病毒不可复制, 而在重组病毒中只含有ORF6 就可以满足病毒复制的需要。该区基因产物E4蛋白在多个水平上调节细胞和病毒基因的表达, 包括病毒DNA的复制、晚期RNA的加工、晚期蛋白合成、E2基因的表达、病毒粒子的装配、宿主细胞的崩解以及腺联病毒的辅助功能等(Halbert *et al*, 1985; Huang *et al*, 1989; Rechardson *et al*, 1981; Weinberg *et al*, 1986)。E4区的缺失, 特别是参与晚期病毒蛋白表达调节的ORF3和ORF6的缺失, 将导致晚期蛋白表达减少, 降低机体对转导细胞的免疫损伤(Rechardson *et al*, 1981)。在E4区开放阅读框架(ORF)E4区的上游和右侧ITR之间为腺病毒转录的沉默区, 在该片段内插入一个转录控制子, 具有自我复制能力, 不受其他启动子的影响, 而且在此区域内插入的外源基因也不影响病毒的复制, 插入方向从左到右, 可减少腺病毒其他启动子对外源基因表达的干扰。在E4上游及右侧ITR之间插入在MLP和TPL控制下的外源基因, 外源基因的表达水平比E3区启动子的高8倍以上, 但在E4上游的表达载体受到插入容量的限制, 必须结合E3区或EI区缺失技术才能最大限度地扩大外源DNA的容量。

2.2 腺病毒载体的类型

目前所构建的腺病毒载体可归纳为三类,即辅助病毒依赖缺陷型载体、特殊细胞依赖缺陷型载体及非依赖型载体,这三类载体的外源蛋白表达量和应用目的有较大差异。

2.2.1 辅助病毒依赖缺陷型腺病毒载体

外源基因取代腺病毒MLP以后的大部分DNA序列,仅保留病毒复制和包装所必需的顺式作用元件的载体称为“无肠型”载体。这种载体的复制需要有野生型腺病毒互补,用野生型腺病毒合成的结构蛋白才能包装成成熟的病毒粒子,这类载体从理论上能容纳35kb外源基因,适用于克隆大片段DNA。Fisher等(1996), Kochanek等(1996)都构建了缺失病毒所有ORF区的腺病毒载体。腺病毒载体基因组存在最小包装限制性(约25kb), Parks等证实了为达到有效和稳定的扩增病毒载体, HD-Ad载体的基因组大小最终需定格在27~36 kb之间(Umana *et al*, 2001)。因此,如果这些载体所携带的基因不足27kb,为了达到最佳包装容量,通常是在基因组中插入一段填充非编码DNA,最好是人类非重复间隔DNA。由于HD-Ad载体缺少病毒复制和包装所需的基因序列,因此病毒载体复制包装必须要由辅助病毒提供腺病毒的所需元件。HD载体遇到的一个挑战是,载体的制备受到少量的辅助病毒的污染,有研究表明,这种污染使外源基因的存在时间减少10%(Reddy *et al*, 2002)。为了有效地消除辅助病毒的污染,病毒载体的包装和增殖一般是由Cre/IoxP系统控制。有研究表明这个系统可以将辅助病毒的污染降低到0.1~0.01%(在CsCl密度梯度离心纯化后)(Sato *et al*, 2002)。Umana等(2001)用酵母重组酶(FLPe)来代替细菌噬菌体P1 Cre重组酶来介导这种剪切,大大提高了剪切效率,并能够大批量生产HD腺病毒载体。研究表明,辅助依赖型腺病毒载体能减少对机体的毒性反应,使外源基因在细胞内的表达时间延长。目前,无肠性腺病毒载体已用于研究外源基因的延长表达(Kochanek *et al*, 2001; Kim *et al*, 2001),但距离临床应用还有很长的时间。

2.2.2 特殊细胞依赖缺陷型腺病毒载体

这类载体的一个共同特征是E1区缺失,必须在特殊的工程细胞中或非缺失的腺病毒辅助下才能复制增殖。Bett 等 (1993,1994)构建了缺失E1、E3区的重组5型HAd5载体,可容纳8.3kb的外源基因。复制缺陷型腺病毒载体是目前应用得最广泛的病毒载体之一,尤其在前期临床癌症治疗上已经显示了很好的效果。在体外,不管是转导自体移植肿瘤,还是转化树突状细胞(DCs),其效果都是很明显的。表达一系列的细胞因子(GM-CSF, IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α)的重组腺病毒也已用于临床试验中(Kay *et al*, 2001; Stewart *et al*, 1999),对于传染性疾病的预防和治疗,复制缺陷型腺病毒载体越来越显示出优势,最具有前景的报道是最近用于Ebola病毒和HIV的动物模型研究中(Sullivan *et al*, 2000; Shiver *et al*, 2002),被免疫的动物均对致死性剂量产生抵抗作用。但此类腺病毒载体也有其局限性:容量有限;外源基因表达时间短暂;诱发机体产生CD4、CD8 T细胞依赖的细胞免疫和体液免疫反应,使重复感染失效(Simon *et al*, 1993; Yang *et al*, 1994; Yei *et al*, 1994; Zsengeler *et al*, 1995; Wilmott *et al*, 1996),潜在产生复制能力的腺病毒(replication competent

Ad, RCA) (Boucher *et al*, 1994; Lochmuller *et al*, 1994) 等。根据RCAs的产生机制, 如腺病毒载体有多处缺失, 也会降低RCAs出现的机率, 减少宿主对病毒自身蛋白的免疫反应性, 利于载体的长期和重复应用。因此, 人们从互补细胞系和载体构建这两个方向对E1区缺失性载体进行了改进, 已构建出E1 和E4 区双缺失载体以及E1和E2区双缺失载体。经证实, E1和E2区双缺失载体的确能使外源基因的表达时间延长 (Hu *et al*, 1999)。Englehardt等(1994)将重组腺病毒的E2区进行温敏突变, 使E2A区在37℃时不表达。Gorziglia等(1996)通过缺失, 使E2A基因功能失活, 这种载体可阻断晚期基因的表达, 使病毒不能复制, 降低了机体的细胞免疫。Scariae等(1994)构建E1+E4缺失的腺病毒载体与克隆有E4区基因的质粒通过赖氨酸连接成复合体, 转染293细胞, 通过互补E4区功能构建的腺病毒载体取得了一定效果。Brough等(1996)用可诱导的E4-ORF6表达盒转染293细胞, 构建了E1、E4基因功能完全互补的293-ORF6细胞系。该细胞系的建立有助于构建E1、E4均缺失的腺病毒载体。Yeh等(1996)用Ad5 E4基因ORF6+ORF7转染293细胞, 获得了IGRP2细胞克隆, 并能表达ORF6/7mRNA。他们用此细胞系并通过空斑纯化方法获得了E1-E4-Ad载体。

Krougliak等(1995)用含有E4和pIX基因编码序列的载体转染293细胞, 得到了可表达E1、E4和pIX蛋白的两个细胞系, VK2-20和VK10-9。该细胞系不仅可有效转染DNA, 而且可使腺病毒及重组体得到增殖。他们用此细胞系构建了缺失2.7kbE3区和2.8kbE4区的重组病毒, 由于该重组体E4区与VK2-20和VK10-9E4区不重叠, 因而重新产生野生型腺病毒的可能性很小。VK2-20和VK10-9细胞系的成功构建, 为构建可克隆更大片段外源基因的腺病毒载体提供了可能。

2.2.3 非依赖型腺病毒载体

在E3区(或缺失部分E3区序列)或在E4区上游插入外源基因构建的腺病毒载体为复制非依赖型载体, 这种载体在体内各器官及细胞中能自动复制和表达外源蛋白, 被广泛应用于蛋白特征研究、诊断抗原制备和载体疫苗的研究。Johnson等(1988)在E3区构建了SV40启动子控制下的HSVgB蛋白高效表达载体, 在人源细胞系上感染重组病毒后12~60h都能表达gB。Ye等(1991)在Ad7 E3区切除80m.u的Hind III和87m.u的EcoRI位点之间的DNA序列, 插入乙型肝炎病毒的HbcAg或HbeAg基因, 外源基因直接受控于Ad7 E3启动子, 并将含HbsAg基因的外源基因表达盒插入基因组右端第159bp处, 即E4区上游和ITR之间, 构建了同时表达多种蛋白的重组Ad7载体, 研究表明, 双表达载体所表达的HbeAg的产量与仅含HbeAg的重组病毒相当, 并在免疫动物时取得了良好的免疫效果。

2.3 腺病毒载体的优越性

2.3.1 宿主范围广, 安全性好

腺病毒广泛存在于人、哺乳动物和禽类的眼、呼吸道、消化道内, 多数毒株为隐性感染。对人有致病性的腺病毒主要有Ad3、Ad8、Ad11等, 引起人的呼吸道感染、结膜炎等。自1996年美军开始应用Ad4和Ad7减毒疫苗以防止呼吸道感染, 百万人应用该疫苗未见不良反应(Top *et al*,

1971), 为人腺病毒载体应用的可能性提供了依据。在动物腺病毒中, 个别毒株能引起动物发病, 犬1型腺病毒能引起犬的传染性肝炎, 犬2型腺病毒能引起犬的传染性喉气管炎, 目前已有减毒苗应用; 从牛、马、羊、猪分离的腺病毒致病力不明显, 有些毒株致病性很弱。这些病毒长期在机体内繁殖, 用其构建的腺病毒载体作为重组疫苗可长期为机体提呈抗原, 提高免疫的保护率。在禽腺病毒中, 毒株间的致病性差别很大, I 群禽腺病毒可引起鹤鹑的支气管炎、II 群可引起火鸡的出血性肠炎和III群禽腺病毒可引起鸡的减蛋综合征(EDS)(引自禽病学)。其中鹤鹑支气管炎和火鸡出血性肠炎已有良好的疫苗, 长期应用无毒副作用, EDSV在自然界中毒力差异很大, 能在鸡体内长时间生长, 有些毒株对机体无明显致病作用, I 群禽腺病毒的CELO病毒的一些毒株对鸡无致病性。腺病毒在机体内复制未见病毒DNA与宿主基因组整合、激活细胞癌基因或病毒致癌基因整合至感染细胞引起细胞恶性增殖(Horowitz *et al*, 1990), 病毒感染后抑制感染细胞凋亡, 使外源蛋白基因高效表达, 成为重组腺病毒疫苗和基因治疗的良好载体。由于腺病毒载体使用安全, 因此受到了各国学者的重视, 目前除Ad4、Ad5、Ad7腺病毒载体被广泛应用外, OAV、BAV、PAV、CAV和FAV等动物腺病毒载体也在研究之中。

2.3.2 表达效率高

载体的转染(或感染)效率、目的基因的表达水平及表达持续时间等都是评价载体转移基因有效性的指标。由于腺病毒载体感染靶细胞是通过腺病毒的纤突与靶细胞的受体结合而实现的, 所以不同的靶细胞由于其表面受体分布有差异, 因而腺病毒载体对其感染的效率有明显差别。病毒感染效率的高低, 除与被感染的细胞类型有关外, 更重要的是与病毒本身的特性有关。如腺病毒载体的转染效率在大多数情况下比逆转录病毒载体高, 这主要是因为腺病毒的宿主范围广, 对分裂和静止的细胞都有感染性; 重组腺病毒是以受体介导的内吞作用进入靶细胞的, 这样可有效地逃避细胞囊泡系统捕获的特异机制。重组腺病毒DNA定位于核内, 能使外源基因高效表达, 并能进行磷酸化、糖基化加工(刘雪丰等, 1998)。Ye等(1994)将装入LacZ报告基因的重组腺病毒从鼻腔导入鼠的肺中, 结果所有的气管上皮细胞均可见LacZ基因的表达。Brody等(1994)通过腹腔内注射将LacZ重组腺病毒导入恶性间皮瘤腹水模型的腹腔内, 结果从回收的腹水瘤细胞中发现有70%为转染的阳性细胞。

2.3.3 应用方便

腺病毒可通过多种途径传播, 口服、点眼、滴鼻、气雾和注射均引起病毒感染, 给疫苗应用提供了方便, 特别适用于动物的群体免疫。以腺病毒为载体的重组活疫苗, 不仅刺激机体产生系统免疫而且还产生良好的局部粘膜免疫。有的腺病毒在体内生存数月或数年, 为机体长期提供外源蛋白抗原, 提高重组疫苗的保护力和转基因载体的治疗效果。

2.4 腺病毒载体的应用

2.4.1 腺病毒载体在基因治疗中的应用

在人类癌症的基因治疗中表达转基因的重组腺病毒载体显示出较好的治疗效果。利用表达粒性巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）的重组腺病毒治疗黑色素瘤的临床试验，显示了强大的抗癌效果（Ahmad *et al*, 2003）。病毒性肿瘤、黑色素瘤和致癌基因过表达引起的肿瘤能够表达诱导T-细胞免疫反应的肿瘤抗原。但是，许多肿瘤却可以规避有效的抗肿瘤T-细胞免疫反应，许多肿瘤病人存在这种肿瘤免疫耐受性。通过优化设计肿瘤免疫程序可以激发产生高效的抗肿瘤T-细胞免疫反应，至少在某些癌症可以得到有效的治疗。这些免疫方法包括用全肿瘤细胞疫苗、完整的肿瘤抗原或肿瘤抗原中的T-细胞表位来进行免疫，用腺病毒连续表达多个肿瘤抗原的CTL-表位，具有很好的抗肿瘤活性（Polo *et al*, 2002）。肿瘤组织选择性复制的腺病毒载体被用来表达抗肿瘤细胞因子激活物具有明显的抗癌和抑癌效果（Reik *et al*, 2004; Takayama *et al*, 2004）。树突状细胞（DCs）是很重要的抗原递呈细胞，能够活化T-细胞依赖抗肿瘤免疫反应，增强DCs的功能是新型治疗性疫苗研究的一个中心目标。一般的方法包括用诱导DC分裂和活化的信号分子进行免疫治疗；另外一个很重要的增强免疫反应的方案是将抗原更有效的靶向DCs（Ophorst *et al*, 2004）。利用基因工程病毒载体在DCs和其他抗原递呈细胞中表达抗原基因，可以将抗原表位递呈于细胞表面，递呈给效应性T-细胞，这种免疫方案将是激发机体免疫反应的最有效疫苗（Noureddini *et al*, 2006）。利用可在DCs细胞中持续表达抗原基因的载体转化DCs细胞，用转化的DCs细胞注射到人体内可以长期的刺激机体产生特异性的免疫反应（Hsu *et al*, 2005）。最新的研究发现，嵌合表达35血清型腺病毒纤突蛋白的HAd5可以更有效的转染DCs细胞（Dipaolo *et al*, 2006），表达CD21结合基序的腺病毒载体对B细胞有更好的感染作用（Mailly *et al*, 2006），这种对抗原递呈细胞的靶向作用可以明显提高转基因的表达，有望开发出高效的免疫治疗和疫苗载体。

2.4.2 腺病毒载体在人载体疫苗中的应用

重组腺病毒载体疫苗作为一种新型疫苗，在各种人和动物病毒病、细菌病和寄生虫病的免疫预防中进行了大量的研究。目前在人病毒病的重组腺病毒载体疫苗研究中，已进行研究的病原主要有猴免疫缺陷病毒（Human/Simian immunodeficiency virus, HIV/SIV）、狂犬病病毒（Rabies virus, RV）、丙型肝炎病毒（Hepatitis C virus, HCV）、乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）、SARS 冠状病毒（SARS-coronavirus）、麻疹病毒（Measles virus）（Putz *et al*, 2003）、登革病毒（Dengue virus）、巨细胞瘤病毒（Cytomegalovirus, CMV）（Shanley *et al*, 2005）、EB 病毒（Epstein-Barrvirus, EBV）、埃博拉病毒（Ebola virus）等，重组腺病毒均可有效的表达上述病毒的抗原基因，在实验动物和非人灵长类动物体进行的免疫试验表明，可以刺激产生特异性的细胞免疫和体液免疫反应，其中HIV 重组腺病毒载体疫苗已在人体进行了免疫试验（Robinson *et al*, 2002）。在利用重组腺病毒表达人疟原虫（malaria）CS 抗原蛋白进行的免疫研究中证明，其免

疫效果甚至比放射孢子体的免疫效果还要好 (Bruna-Romero *et al*, 2004)。尽管人源重组腺病毒在实验动物体内取得较好的免疫效果,但是在多数人不同程度的存在人腺病毒的中和抗体,这些中和抗体会阻碍重组腺病毒载体在体内有效的表达外源基因。甚至是中度水平的中和抗体也会降低重组腺病毒进入细胞的量,包括一些抗原递呈细胞。高剂量免疫尽管可以提高免疫效果,但是存在载体的毒性问题。怎样来避免腺病毒特异性的中和抗体是目前腺病毒载体疫苗研究中的一个主要的问题 (Moffatt *et al*, 2000)。将重组腺病毒载体用PEG包裹或者制成藻酸盐胶囊可以避开腺病毒的中和抗体,提高对细胞的感染效率 (Sailaja *et al*, 2002; Mittal *et al*, 2001)。利用不同血清型的腺病毒构建重组载体疫苗也可以避开中和抗体,提高转基因的表达效率,目前最常用的载体为HAd5型腺病毒,随着上述问题的发现,对其他血清型腺病毒以及非人类腺病毒载体的研究逐渐增多,如HAd2、HAd4、HAd7 (Purkayastha *et al*, 2005)、HAd12型腺病毒载体,来自动物的腺病毒载体有PAV-3、BAV-3、OAV,动物的腺病毒对人类细胞的转染效率不高,通过改造腺病毒的纤突蛋白可以改变腺病毒对某些细胞的嗜性 (Roy *et al*, 2004),从而提高重组腺病毒对不同细胞 (包括DCs、肌肉细胞、上皮细胞等)的转染效率,提高转基因的表达水平,同时避开了腺病毒中和抗体对细胞转染的阻碍作用。采用不同的基因疫苗来进行免疫可以提高抗HIV的免疫反应,如采用DNA初免,然后用腺病毒载体疫苗加强免疫可以明显的提高保护性免疫效果 (Takakura *et al*, 2005)。

2.4.3 腺病毒载体在动物载体疫苗研究中的应用

在动物疫病的腺病毒活载体疫苗的研究中HAd5型复制缺陷型的腺病毒载体是最常应用的。用表达伪狂犬病毒gD糖蛋白的重组痘病毒和重组腺病毒载体疫苗进行对比试验,证明腺病毒在刺激特异性抗体应答和免疫保护方面要好于痘病毒 (Gonin *et al*, 1996),并且可以多途径进行免疫,说明人腺病毒HAd5具有较广泛的细胞嗜性。重组腺病毒的免疫不受母源抗体的干扰,给有母源抗体的仔猪免疫伪狂犬病毒的重组腺病毒,可以产生高水平的抗体,并具有保护作用。给新生羔羊肠道免疫表达牛疱疹病毒gD糖蛋白的重组腺病毒,可以刺激肠道的局部粘膜免疫和全身免疫应答,说明空肠Peyer's结等局部淋巴组织能够起到免疫防御作用;以壳聚糖和乙二醇壳聚糖作为鼻腔免疫的佐剂也可以提高表达gD糖蛋白的重组腺病毒在牛体的免疫效果 (Gogev *et al*, 2004)。利用缺失E3的BAV-3表达牛疱疹病毒1型的全长gD糖蛋白基因,鼻内注射棉鼠可产生很强的gD和BAV-3特异性的IgA和IgG,说明可复制的牛腺病毒3型有希望用于研制重组载体疫苗用于粘膜免疫 (Zakhartchouk *et al*, 1998)。利用壳聚糖包装重组腺病毒,制备缓释胶囊,可以将腺病毒递呈到小肠粘膜表面,使转基因在粘膜系统表达,刺激产生更好的粘膜免疫反应。利用缺失E1/E3区基因的重组腺病毒表达了黄病毒科病毒的抗原基因,如日本乙型脑炎病毒 (JEV),黄热病毒 (YFV),蜱传性脑炎病毒 (TBEV),登革热病毒 (DFV)和HCV病毒的抗原基因,通过口服免疫重组腺病毒均可刺激产生保护性的体液和细胞免疫反应;而且腺病毒的嗜肝性,适用于HCV持续感染者的基因治疗。利用PAV3构建了表达猪瘟疫病毒 (classical swine fever virus, CSFV) E2基因的可复制重组腺病毒, E2基因置于PAV3主要晚期启动子 (MLP)的控制之下。用这种重组腺病毒免疫猪,可以完全保护致死剂量的CSFV的攻击,免疫猪没有出现临床和剖解

病理变化。外源基因插入后基因组长度达到了PAV3 基因组长度的106.8%，超过预期的长度；通过皮下和口服免疫试验证明，皮下免疫的效果最好，可达到完全的保护（Hammond *et al*, 2002；Hammond *et al*, 2003）。利用HAd5 型腺病毒载体表达BVDV E2 蛋白在小鼠体内也产生了较好的免疫应答（Elahi *et al*, 1999）。利用禽腺病毒构建了表达禽传染性支气管炎病毒（IBV）包膜突起蛋白S1 亚单位的重组腺病毒（血清型8），免疫仔鸡可以产生抗FAV抗体和IBVS1抗体，用同源或异源IBV攻击，保护率可达90%~100%，显示了IBV 腺病毒载体苗的巨大潜力。用禽腺病毒CELO载体表达IBDV 病毒宿主保护性抗原VP2 基因，将VP2 置于CMV 启动子控制之下，通过不同途径和不同剂量免疫家禽，证明重组病毒对禽类无致病性。通过口鼻免疫鸡，仅有很弱的保护作用，而通过皮下或皮内接种感染CELOa-VP2重组腺病毒，用IBDV强毒攻击后没有表现出临床症状和死亡，但是与商业化的IBDV疫苗一样不能够完全保护法氏囊不产生病损。采用不同的二次免疫方案，只有用该重组腺病毒二次免疫可以提高保护水平，而用纯化VP2 抗原、质粒DNA 或表达cMGF（鸡骨髓生长因子）二免均未提高免疫保护水平。这一结果显示CELO 腺病毒载体疫苗可以诱导鸡产生坚强的保护性免疫反应（Francois *et al*, 2004）。

3 犬腺病毒及犬腺病毒载体

3.1 犬腺病毒的基本生物学特性

犬腺病毒(Canine adenovirus, CAV)是腺病毒科哺乳动物腺病毒属中的一个成员，分为两型，犬1型腺病毒(CAV-1)即犬传染性肝炎病毒（Canine infectious hepatitis virus, CIHV），和犬2型腺病毒（CAV-2）即犬喉气管炎病毒（Canine infectious laryngotracheitis virus, CILV）。二者在毒力、可溶性抗原结构、细胞感染范围以及红细胞凝集范围（钟志宏，1990）方面都有所差别，但是应用CAV-2免疫的犬，却可有效的产生对CAV-1强毒的免疫力。一般认为犬CAV-2只能感染狗导致呼吸道疾病和腹泻，犬CAV-1是哺乳动物腺病毒中致病性最强的一种，它除能感染狐和狗外还能感染狼、貉、山狗、黑熊、负鼠和臭鼬，其中狗、山狗、狼、貉、负鼠和臭鼬主要表现肝炎症状，而狐狸和黑熊主要表现脑炎变化（Sumner *et al*, 1988）。但Shortridge等通过血清学调查认为马、兔、松鼠、刺猬和黑猩猩也是犬腺病毒的敏感动物。本病毒能实验感染豚鼠，而且置于低环境温度（4℃）或用免疫抑制剂可大大地提高其发病率，甚至可以激发其表现神经症状。该病毒具有腺病毒共同的结构特征：二十面体立体对称，无囊膜，直径80nm左右，表面由252个清晰的壳粒组成。由于本病毒性质稳定、结构致密，因此易于提纯。CAV像所有腺病毒一样能使感染细胞呈现典型的细胞病变（CPE）：开始时细胞圆肿发亮，逐渐聚集成葡萄串样，最后从瓶壁上脱落，这是随着病变的明显，细胞培养液也逐渐变酸，感染细胞内经常出现核内包涵体，最初是嗜酸性的，随后变为嗜碱性的（引自动物病毒学，第二版）。已证实犬CAV-2只能感染来自于本动物-狗的组织细胞，而犬CAV-1则不一样。除了能感染来自狗的组织细胞，如狗肾原代细胞、睾丸细胞、肺细胞、肝细胞及脾细胞外，还可感染猪、水貂、雪貂、豚鼠、仓鼠等与狗亲缘关系较远的动物原代细胞及DKL、IBRS-2、Vero等传代细胞系。犬腺病毒是使感染细

胞呈现细胞病变最早的腺病毒，而且细胞病变的出现时间与病毒的接毒量呈正相关。最快时接毒后 25~30 小时之内便出现明显的 CPE。犬腺病毒的增值过程是病毒蛋白在细胞浆中合成，然后转运到细胞核内与在其中复制的病毒核酸组装成完整的病毒粒子，通过核膜逆行性变化(CAV-1)或核膜出芽(CAV-2)的方式释放出来。

3.2 犬腺病毒基因组结构特点

犬腺病毒基本结构与人和其他的腺病毒结构基本相同。CAV-1和CAV-2在基因组成上存在着明显的差(Assaf *et al*, 1983; Cai *et al*, 1992; Darai *et al*, 1985; Hamelin *et al*, 1984; Hamelin *et al*, 1986; Liu *et al*, 1988; Spibey *et al*, 1989; Thompson *et al*, 1972; Uvenne *et al*, 1986; Whetstone *et al*, 1985)。例如，CAV-1和CAV-2的ITRs长度略有不同，CAV-1 Woc-4株的为160bp，CLL株为198bp，CAV-2毒株的为196~198bp，其中Toronto株为197bp。E1区是病毒复制的必需区，还具有参与细胞转化和促进或抑制细胞及病毒基因表达的作用，与人腺病毒不同，CAV-1的E1区不具备细胞完全转化的互补作用。CAV-1和CAV-2的E1区，同源率为75%，CAV-2 E1区截至E1B的第一个蛋白的末端编码区只比CAV-1长153bp。E3区是CAV繁殖的非必需区，但E3区的基因产物在体内具有抑制宿主抗病毒免疫防御的作用。CAV-1和CAV-2 E3两侧PⅧ基因和fiber蛋白基因具有高度同源性，但E3区存在明显区别，表现在CAV-2的E3区比CAV-1长出约500bp，两者编码的蛋白大小不同，分别为40.7kDa和22kDa。CAV-1和CAV-2均缺失VA RNA编码区序列，因此表明VA RNA与犬腺病毒两型之间的毒力差别，以及同型强病毒株之间的毒力差别没有关联。VA RNA在腺病毒蛋白合成上起重要的调控作用，其中VA RNA1的作用更明显，在VA RNA1缺失的变异株的感染细胞内，病毒mRNA产量正常，但病毒蛋白的合成却下降了10倍。纤突直径为2nm，长度随腺病毒型而不同，CAV-2的纤突为35~37nm，比CAV-1的纤突长10nm左右。两型犬腺病毒在血凝方面的差别和纤突结构有关，在和红细胞发生凝集时，两者可能使用不同的或不完全相同的RBC表面受体。CAV-1与CAV-2之间纤突基因的同源性约为80%。纤突蛋白在病毒吸附到细胞表面受体的感染过程中起着决定性作用，CAV-1与CAV-2纤突基因的不同预示着，两者在毒力和对不同的细胞亲嗜性上存在着差异，从而导致临床上表现不同的疾病。

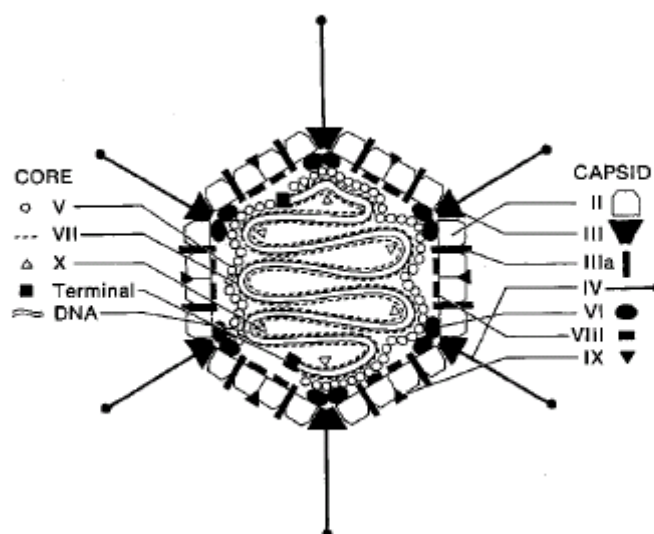


图1-2 CAV-2的病毒结构示意图（引自Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy）

Fig.1-2 Genome structure of CAV-2（from Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy）

3.3 重组犬腺病毒载体的构建

对于犬腺病毒目前多用CAV-2构建载体，因为其仅仅引起犬的温和感染，另外，CAV-2只能在犬的组织细胞中复制生长，安全性好；而CAV-1不仅可在犬细胞中复制，也可在其它种属包括人类细胞中复制，且致病力强。CAV-2具有与人腺病毒类似的优点：既可以感染分裂细胞也可以感染静止细胞，感染细胞类型广泛；可直接被运送到体内；载体易于制备，滴度高；载体的整合性能差，比较安全，具有很大的克隆能力，理论上CAV来源的载体可以克隆30kb大小的外源基因。但是，在用CAV构建人类基因转移载体前，必须考虑两个问题。首先是安全性问题，从安全角度讲，病毒载体是不能在人体内复制的。研究发现，CAV-2虽然在人细胞株293 KB HeLa中有低水平的复制，但它并不能包装成新的病毒颗粒，也不能在体内扩散，表明它是安全的，而且它也不会与人野生型腺病毒发生重组。其次是人体内是否预先存在针对CAV-2的免疫应答，研究发现针对人腺病毒的中和抗体，不能抑制CAV-2的空斑形成，表明人体内没有针对CAV-2的免疫反应。

Klonjowski等(1997)首次构建了含有报告基因LacZ的重组CAV-2载体，首先将CAV-2的E1区基因缺失，这不仅去除了其潜在的致癌能力，而且扩大了CAV-2克隆外源基因的能力。正常情况下，CAV的最大包装容量为野生型腺病毒基因组的105%，即在不缺失的情况下可插入将近1.6kb的外源基因。当E1区缺失后，插入容量增加到4kb。然而，E1区基因产物对于CAV-2的生长繁殖是必须的，为了提供这些产物，必须建立能表达E1区基因的犬互补细胞系。目前已建立了DK/E1⁺和MDCK/E1⁺两种犬转化细胞系，可以辅助CAV生长复制。构建重组病毒时，先将用于同源重组的CAV基因组5'端上游的ITR、顺式包装顺序((1~400bp)和下游的一段IX基因分离出来，分别插入质粒中。然后在它们之间(相当于E1区)插入真核基因表达元件如RSV启动子、报告基因LacZ，SV40，Poly A信号，即得到E1区缺失含有LacZ基因的重组CAV质粒Pcav-RSV-LacZ。下一步是将其与野生型CAV-2共转染MDCK/E1⁺细胞，使两者进行体内同源重组，空斑筛选后即可得到E1区被LacZ取

代的犬重组腺病毒载体CAV-RSV-LacZ。用此载体感染人、小鼠、大鼠、猴和犬细胞株,结果在各细胞株核内均可检测到LacZ基因的表达。将其注射到鸡胚内,在多个器官均检测到LacZ蛋白表达,这表明犬腺病毒载体在体外和体内均可有效地转移基因,有希望用于人类基因治疗、基因预防及重组疫苗开发。在已有工作的基础之上,Kremer等(2000)用CAV-2 Toronto A26/61株在E1反式互补细胞系中又构建了多个CAV-2载体:CAVGFP Δ E1a、CAVGFP、CAV β gal和CAV Δ E1等。构建的基本方法是先将转移基因引入转染质粒,转染质粒中外源基因的两侧含有与CAV-2 DNA中插入位点两侧重叠的序列,该质粒与含CAV-2全基因组的pTG5412质粒共转染E.coli BJ 5183,使其发生同源重组,得到含外源基因的全基因组重组质粒,然后再将重组全基因组从质粒中释放出来转染DK/E1细胞,即可得到重组病毒。通过酶切及Southern blot证明重组病毒正确后,制备病毒载体,测定滴度并纯化。由于用Manhattan株构建的载体其病毒/载体比率大于10000/1,无法用于测定转导效率,于是用Toronto株构建的载体比较了CAVGFP和AdGFP对人源细胞的转导效率。CAVGFP和AdGFP在相同条件下转导HT1080、HeLa和A172细胞,转导48h后检测转移基因的表达。结果发现在每一种检测细胞中,CAVGFP的转导效率比AdGFP高5-10倍。为了分析CAV载体的用途,他们还在体内对CAVGFP和CAV β gal进行了比较研究。将CAVGFP和CAV β gal接种8周龄小鼠,4天后在呼吸道的近端、远端及肺泡上皮可见lacZ基因的表达,而50%以上的细支气管和肺泡中未检测到表达。GFP在呼吸道中的表达略高,65%以上呼吸道远端能表达GFP。比较而言,CAV载体在人源细胞内与hAds同样有效,而且50%以上的人群有较高的抗Ad5和Ad2的中和抗体,仅2%的人群存在可检测的抗CAV-2抗体,且IgG和IgA在阻止腺病毒感染中起重要作用,由此可见CAV载体在腺病毒介导的基因转移中优于人腺病毒。法国的Fischer等(2002)首次用CAV-2 Manhattan株构建了犬瘟热的重组活疫苗载体。此复制型重组腺病毒经鼻内接种血清学阴性的幼狗,可产生高水平的中和抗体,以同样的方式接种具有CDV和CAV-2免疫力的幼狗不能产生免疫保护。同时他们发现以皮下接种具有CDV和CAV-2免疫力的幼狗,抗体明显阳转,可产生坚固的保护力,载体不受免疫水平的干扰。在国内还未有重组CAV活载体基因工程疫苗问世。

4 本研究的目的及意义

犬瘟热、犬传染性肝炎、犬传染性喉气管炎都是犬或其它毛皮动物的常见传染病,且经常混和感染。其中犬瘟热是一种急性、高度接触性传染病。该病传染性强,发病率高,临床症状多样,容易继发感染,是对当前养犬业、毛皮动物养殖业及野生动物保护业威胁最大的疫病之一。犬、貂、狐等动物发病,死亡率达30~80%,雪貂高达100%,感染的幼龄动物多为急性、致死性经过。目前各国均有犬瘟热发病率升高的趋势,并且临床症状也呈现多样化。

疫苗免疫是预防犬瘟热的主要手段,灭活苗由于只能激发机体低水平的体液免疫而有逐渐被淘汰的趋势。目前应用最为广泛的是弱毒苗,但由于母源抗体干扰,一过性免疫抑制及对野生动物不安全等因素导致免疫失败常有发生。因此研究安全、高效的新型疫苗具有重要意义。由于活载体疫苗成本低,接近常规弱毒疫苗,真实再现外源基因编码蛋白的抗原性,因此具有很高的研究及应用价值。

犬传染性肝炎的病原 CAV-1 是哺乳动物腺病毒中致病性最强的一种，主要引起犬的传染性肝炎和狐狸的脑炎，也可感染狼、貉、山狗、黑熊、负鼠和臭鼬等多种动物。CAV-2 是犬传染性喉气管炎的病原，主要引起犬的呼吸道疾病和腹泻，且一般为温和感染。目前世界上多使用 CAV-2 弱毒疫苗用于预防上述两种疾病。因为以 CAV-2 弱毒株免疫犬，不仅对 CAV-1 感染产生完全的交叉免疫保护作用，而且能够克服用 CAV-1 弱毒苗免疫所造成的排毒、眼色素层炎及其对 CAV-2 的不完全保护等缺点。

近年来，随着分子生物学技术的开展，对腺病毒基因工程疫苗的研究也开展起来，研究发现犬腺病毒具有基因工程载体的性质，而且犬腺病毒能够刺激机体产生细胞免疫、体液免疫和局部粘膜免疫，并能够对抗母源抗体的干扰。本研究拟利用犬 CAV-2 疫苗株构建可复制型表达载体，并将犬瘟热病毒的两个主要的免疫原性蛋白 F 蛋白和 H 蛋白分别插入该载体中获得分别表达 F 蛋白和 H 蛋白的重组犬 CAV-2，研制可同时预防犬传染性肝炎、犬传染性喉气管炎和犬瘟热的重组活载体基因工程疫苗。同时，为了配合重组活载体疫苗的使用及进行犬瘟热的流行病学调查，本研究拟建立检测犬瘟热特异性抗体的间接 ELISA 诊断方法。

研究报告

实验一 犬2型腺病毒疫苗株 E3 区及其侧翼序列的克隆与 序列分析

摘要：根据 GenBank 中犬 2 型腺病毒 Toronto A26/61 株的全基因序列，利用 DNASIS 软件分析其物理图谱，确定 E3 区位于 pVIII 基因和 fiber 基因之间，本实验从 CAV-2 疫苗株中提取了全基因组，克隆了包括 E3 区及其侧翼序列 pVIII 基因和部分 fiber 基因在内的 4164bp 的基因片段。对该片段的核苷酸序列及氨基酸序列的分析结果表明 CAV-2 的 E3 区全长 1504bp，正向有 2 个开放阅读框，分别编码大小为 13.3 kDa 和 40.7 kDa 的两个多肽。其中 13.3kDa 多肽的基因编码框与 pVIII 基因的编码框有部分重叠。距 E3 区起始位置的上游 340bp 处发现一 TATA box，推测为 E3 区的早期转录启动子序列。将该片段的序列与 Toronto A26/61 强毒株序列比较后发现二者在 E3 区仅有 2 个碱基不同，氨基酸同源性则为 100%，由此推断 E3 区编码的蛋白对 CAV-2 的毒力没有影响，这一结果为构建 E3 区缺失载体提供了理论依据。

关键词：犬2型腺病毒，E3区，侧翼序列，克隆，序列分析

犬腺病毒(Canine Adenovirus, CAV)是腺病毒科(Adenoviridae)哺乳动物腺病毒属的成员，分为犬1型腺病毒(CAV-1)和犬2型腺病毒(CAV-2)。CAV-1又叫犬传染性肝炎病毒(Canine infectious hepatitis virus, CIHV)是哺乳动物腺病毒中致病性最强的一种，是多种野生动物的重要致病因子之一，可以引起犬传染性肝炎、狐狸和熊的脑炎等；CAV-2又叫犬传染性喉气管炎病毒(Canine infectious laryngotracheitis virus, CILV)，主要引起犬的传染性喉气管炎和肠炎。尽管CAV-1和CAV-2在毒力、可溶性抗原结构、宿主细胞范围以及红细胞凝集范围方面均有所差别(钟志宏，1990)，但以CAV-2弱毒株免疫犬，不仅对CAV-1感染产生完全的交叉免疫保护作用，而且能够克服用CAV-1弱毒疫苗免疫所造成的排毒、眼色素层炎及其对CAV-2的不完全保护等缺点因此目前世界上所使用的犬腺病毒疫苗均为CAV-2弱毒疫苗。

腺病毒因具有结构简单，易于制备、包装容量大、宿主细胞范围广、病毒繁殖滴度高，并能高效表达其基因产物等优点成为目前应用最为广泛的病毒载体之一。CAV-2除具备上述优越性外，由于其仅能引起犬的温和感染，安全性好，因此在作为基因治疗载体及病毒活疫苗载体的研究中有巨大潜力。E3区是腺病毒体外复制的非必需区，E3区缺失或在其中插入外源基因均不影响病毒的复制(Mauson *et al*, 1990)，在腺病毒重组疫苗载体研究中常被用于克隆外源基因的区域，而其侧翼序列pVIII基因和fiber基因常作为病毒同源重组的同源臂，它们所编码的蛋白还与病毒感染密切相关。因此，分析CAV-2 E3区及其侧翼序列的遗传背景是构建E3区缺失CAV-2载体的首要前提。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒和菌种

MDCK细胞由本实验室传代培养，培养基为含10%胎牛血清的DMEM；CAV-2疫苗株由哈尔滨兽医研究所经济动物研究室提供，在MDCK细胞上增殖；受体菌DH5a由本实验室保存。

1.2 主要试剂

PrimeSTAR HS DNA聚合酶、*rTaq* DNA聚合酶、pMD18-T 载体、dNTP、IPTG、X-Gal、蛋白酶K、SDS均购自TaKaRa公司；DMEM购自GIBCO-BRL公司；胎牛血清购自天津灏洋生物公司；胶回收试剂盒（Gel Extraction Mini Kit）购自上海华舜生物工程有限公司；其它试剂为进口或国内分析纯产品。

1.3 病毒扩增

以0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA常规方法消化MDCK细胞，用含10%胎牛血清的DMEM 37℃静置培养，待细胞长满单层后，换成含2%胎牛血清的DMEM维持液，并按培养液量的1%接入CAV-2种毒，培养至80%的细胞出现病变时，收取细胞及维持液，将其反复冻融3次后，-70℃冻存备用。

1.4 引物

参照GenBank中犬2型腺病毒Toronto A26/61株的全基因序列，利用Oligo6.0设计一对引物，PCR扩增产物位于基因组24358bp~28152bp，包括了E3区及其上游的pVIII基因和下游的部分fiber基因在内的侧翼序列。引物序列如下：

CAV-2U: 5' TTT GTC AGG ACA ACC ACC AGA CAA GGC AC 3'

CAV-2L: 5' GTT TTA AAC AGG GTA CCT CCG CTT AGT CT 3'

1.5 病毒基因组的提取

用SDS-蛋白酶K裂解法提取病毒DNA。收获的细胞培养物12000rpm离心5 min，吸取上清液437.5μL于1.5mL EP管中，然后加入20mg/mL的蛋白酶K12.5μL，10%SDS 50μL（蛋白酶K

使用浓度为 500 μ g/mL, SDS 使用浓度为 1%), 轻轻混匀, 55 $^{\circ}$ C 30min 水浴后分别用等体积的酚/氯仿和氯仿各抽提一次, 上层水相用 1/10 体积的 3M NaAC (pH 5.2)、2 倍体积的冷乙醇沉淀, -20 $^{\circ}$ C 放置 1h, 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 15 min, 上清用 75%乙醇洗涤, 沉淀干燥后用适量 TE 重悬, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 目的基因的扩增

以上述提取的 CAV-2 基因组为模板, 扩增 E3 区及其侧翼序列。50 μ L 反应体系依次加入 5 倍 PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ Plus) 10 μ L、PrimeSTAR HS DNA Polymerase 1.25U、CAV-2U + CAV-2L (10 mM) 2 μ L、dNTP(各 2.5mM) 4 μ L、模板 1 μ L。同时设立 MDCK 细胞 DNA 和无 DNA 水对照。反应参数为: 95 $^{\circ}$ C 预热 2min, 98 $^{\circ}$ C 10S, 68 $^{\circ}$ C 4min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20min。反应结束后在 PCR 管中加入 0.5 μ L *rTaq* DNA 聚合酶和 0.5 μ L 2.5mM 的 d-ATP, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30min, 取 5 μ L PCR 产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.7 与 pMD18-T 的连接

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳, 用华舜小量胶回收试剂盒回收目的片段与 pMD18-T 载体连接。反应体系为: Target DNA 4.5 μ L; pMD18-T Vector 0.5 μ L; 2 \times ligation Buffer 5 μ L, 16 $^{\circ}$ C 连接 1h。

1.8 大肠杆菌感受态细胞的制备

用 TSS (Transformation and Storage Solution) 法制备 E.coli DH5a 感受态细胞。以无菌接种环取冻存的 E.coli DH5a 菌种划线接种于不加抗生素 LB 琼脂平板上, 同时在含有抗性的培养基上划线作对照, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。次日挑取生长良好的单个菌落, 于含 3mL LB 培养基的试管中 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜培养。将培养物按 1:100 接种于 200mL LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养约 3h, 至对数生长期。将培养物无菌分装于 50mL 离心管中, 8000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10min 弃上清, 沉淀用原始培养体积 10%的冰预冷的无菌 1 \times TSS 溶液重悬, 轻轻混匀 (冰上操作)。用 1.5mL 离心管分装感受态细胞, 100 μ L/管, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.9 转化

取 10 μ L 连接产物加入 100 μ L 自制的 DH5a 感受态细胞中, 轻轻混匀后冰浴 30min, 42 $^{\circ}$ C 热休克 90 秒后立即置于冰浴中 2min, 然后加入 800 μ L SOC 液体培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1h。取 100 μ L 培养物涂布于含有 IPTG、X-gal 和 Amp⁺的 LB 琼脂板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

1.10 碱裂解法小量提取质粒 DNA

挑取生长于 LB 培养基平板上的数个白色菌落，接种于装有 3~5mL 含有氨苄青霉素的 LB 培养液中，37℃ 振荡过夜培养。取 1.5mL 培养物于 1.5mL EP 管中，12000rpm 离心 1min 倒扣于吸水纸上待液体流尽，加入 100 μ L 溶液 I，彻底重悬；缓缓加入 200 μ L 新配制的溶液 II，轻轻颠倒混匀 3~5 次，冰上放置不超过 5min；加入 150 μ L 溶液 III，温和颠倒混匀，冰上放置 5min，12000rpm 离心 5min；取上清用等体积的饱和酚/氯仿、氯仿各抽提一次，取水相加入 2 倍体积的无水乙醇，室温放置 10min，12000rpm 离心 5min；弃上清，沉淀用 75% 的乙醇洗涤一次；离心弃上清，干燥后沉淀溶于 30 μ L TE 溶解，将初步鉴定为阳性的重组质粒命名为 pMD-E3。

1.11 重组质粒的序列测定与分析

将初步鉴定为阳性菌送生物公司测序，分析测序结果，并与 Toronto A26/61 (Genbank 登陆号 U77082) 强毒株进行核苷酸及氨基酸的同源性比较。

2 结果

2.1 E3 区及其侧翼序列的 PCR 扩增结果

提取 CAV-2 基因组 DNA，用特异性引物经 PCR 扩增后，得到的目的片段与预期大小一致(图 2-1)。

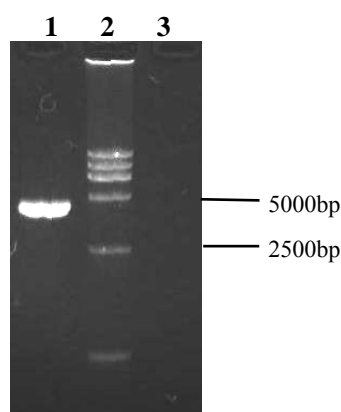


图 2-1 CAV-2 的 E3 区及其侧翼序列的扩增结果

1. PCR 产物.; 2. DL15000 Marker; 3. 阴性对照。

Fig. 2-1 The PCR amplified product of E3 region and flanking sequences of CAV-2

Lane1. PCR product; Lane2. DL15000 Marker; Lane3. Negative control.

2.2 序列分析结果

对扩增的目的基因进行了测序，其核苷酸序列与预测的各ORF及其编码的氨基酸序列见图2-2，各ORF在基因组中的相对位置见图2-3。

```

1      AGGACAACCACCAGACAAGGCAGCTGCGCAACCGCCTTTTCCAACACTGTACGCC
57  ATCTTCCAACAAAGCAGAGGCTCCCCACGGCATTAAAAATAAAAAACAGATCCCTCAGA
117 TCCCTCCTAAGAAGCTGTCTCTACCACAAGTCAGAGGAGCAGCTGCTGCGCACGCGAAAC
177 GACGCCGAAGCTTTGCTCAACAAATACTGTCAAGGACTCGAGTCCGGCACAGACTGAGCA
237 ATGTCTAAAGAAATACCAACCCCTTATATGTGGAGCTACCAACGCAAACGGGACACGCC
      M S K E I P T P Y M W S Y Q P Q T G H A
      ORF 1(pVIII gene)
297 GCCGCGCCTCCAGGACTACTCCACCCAAATGAATTGGTTTAGTGCTGGGCCATCAATG
      A G A S Q D Y S T Q M N W F S A G P S M
357 ATTAGTCAAGTTTATGGCATTAGAGACTTGCGCAACAAAGTTTGATAACCCAGGCAGAA
      I S Q V Y G I R D L R N K V L I T Q A E
417 ATAACCAAACTCCCAGAACAAATAATGGATCCGCCAATTTGGCCAGCTGCCATGCTTGT
      I T K T P R T I M D P P I W P A A M L V
477 CAGGAAGCCGCCACCCAAAACGGTCACTCTGCCCAGAAACCACCCCTAGAACAGGCT
      Q E A A P P K T V T L P R N H T L E Q A
537 ATGACCAACTCTGGGGCGCAGCTAGCGGGAGGACGACAGCTGTGCCCTCCCAAATAGGT
      M T N S G A Q L A G G R Q L C P S Q I G
      TATA box
597 ATAAAAAGCCCAGTGCTGGCTGGCACGGGCATTGAGCTTAGCGAAGACATCCCCAGCGCC
      I K S P V L A G T G I Q L S E D I P S A
657 TCCTGGATCAGGCCGACGGCATATTCCAGCTAGGAGGGGGTCTCGCTCGTCCTTCAGC
      S W I R P D G I F Q L G G G S R S S F S
717 CCAACGCAAGCATTCTCACCCTGCAACAGGCATCCTCGACCCGCGCGAGGAGGCGTG
      P T Q A F L T L Q Q A S S T P R A G G V
777 GGCACCTACAGTTTGTGCGCAATTTGTGCCAGAGGTATACCTTAACCCTTTTTCAGGA
      G T Y Q F V R E F V P E V Y L N P F S G
837 CCACCGGACACCTTCTCTGATCAGTTTCTTAACACTACGACATTGTAACCAACTCTGTCG
      P D T F P D Q F I P N Y D I V T N S V D
897 ATGGCTATGACTGAGGAGAGCATGGACCAGGTGGAGGTAACTGCCTGTGTGCTCAGCAT
      G Y D *
      M A M T E E S M D Q V E V N C L C A Q H
      ORF 2(13.3K)

```

957 GCCCAAACCTGCACGCGCCCTCGCTGCTTTGCAAAGGAGGGTTTATGTGCTAACTGGTTT
 A Q T C T R P R C F A K E G L C A N W F
 1017 TACAACCCAGCACTTGCCTTTGAAGGGTTTGATATTCCAGACTCTTACCAAGAGGGACAC
 Y N P A L A F E G F D I P D S Y Q E G H
 1077 GGTGTGGACATAGAAGTTAAGTGTTCACCACTCCAGCAAACTGTGCCACAATGGCCAT
 G V D I E V K C S H H S S K L C H N G H
 1137 GATATGATCTGCTCATACTCTCGCCTGGGATCCACATTAAACATAAGATGTATTGTGAAC
 D M I C S Y S R L G S H I N I R C I C N
 1197 AAGCCGCGGCCCCACATGAGCCTCATTGAGGCAGCCTGTTCTATGTATAACCTTAAC **TAG**
 K P R P H M S L I E A A C S M Y N L N *
 1257 ATAATATTATTA~~AACT~~GTGTTTACAGCTACCACCATA**ATG**CGCTTCAGCTTCTTCATCGC
ORF 3(40.7K) M R F S F F I A
 1317 CGCCGTTCTTTTCTGCACCACAGGGGCCAGCAATGACATTGTGACTTGCTGCGCCACAC
 A V L F C T T G A S N D I V T C C A H T
 1377 ACCTTGCCTCCTACACCTAGAAGTGGGCTTGGGGCCAATGTCAGTTGGATAAACTCTGA
 P C L L H L E V G L G A N V S W I N S D
 1437 CACAGGCCAGGCCCCGATTGCTCTCCAATGGCATGTGCAACGCTACCCAGCAAGGCCT
 T G Q A P I C L S N G M C N A T Q Q G L
 1497 GCAGTTTTCTGCAAACCTTTTCTGAGGATGGCCTGTACATCGCCCTCATTAAGGAGAGCAA
 Q F S A N F S E D G L Y I A L I K E S N
 1557 CTACGAGGGCGCTGAGCACTACTACCTTGTCTATATTTATGGAGACTGCTACCAAACCTGC
 Y E G A E H Y Y L V Y I Y G D C Y Q T A
 1617 AAATGAGTCTGCCCACGGGCCTATTTCCAGGCCCTCAACGAGATGCCTCTTCCAGCGT
 N E S A H G P I S R P L N E M P L P S V
 1677 AACCATAAATGCTTCCCTCTTCTATCCCGCCTTTCTGGAGCTGCCCCACAGTACAGCAA
 T I N A S L F Y P A F L E L P P Q Y S N
 1737 TGACCTTAGCAATGTGCGCTGG**TATAA**AGTAGACCCAGCGGCTTCCAAGCCCCAAAAAAT
 D L S N V R W Y K V D P S G F Q A Q K I
 1797 CTCTAAAGTCAGAAGCGGAGGCAGAAAAGAGAACCTGCATCCCAACTGGGCCTTGTTAC
 S K V R S G G R K E N L H P N W A L V T
 1857 CTATACTGGAGACCTTCTTGTCTTGCATGTTTCGCCAAACACCCTTGGACTGTGGCTGGC
 Y T G D L L V L H V S P N T L G L W L A
 1917 AGCCGTGCAGCATCGCGGGGGCGCACTAATTTTATTACCTTCAACATAACCGTACCCAA
 A V Q H R G G R T N F I T F N I T V P N
 1977 CTGGCAACAAAATCTAGTAACCATATTTAATCAACACGAGCCCCAAAAAAGGGCGATAA
 W Q Q N L V T I F N Q H E P P K K G D N
 2037 TTATGAGGACAGTTTTATGGAATGGACCCTGTTTAAAAAGCTCAAAAAAGGCCTATTAG
 Y E D S F M E W T L F K K L K K G L F R

2097 AGTAACTTGAGAGCCAAGTCAATATTCCCAGAGTGCCTCAACATCACCCGCGACGG
 V T C R A K S I F P E C V L N I T R D G
 2157 AACTTTCCTGCTTATTGGGGATAGCAAAAAGACCCCTATGTCATCCTGCTGCCCTTTT
 T F L L I G D S K K T P Y V I L L P F F
 2217 TGTAACCCCAAAGAAGACACTCCAATTTTAATGGCCCTTAGCCATTCCATGCCCGTCGC
 V N P K E D T P I L M A L S H S M P V A
 2277 CATACTGACACTGCAATGCCTATATATATTCCATCATGTTTTTTATTGTGGCCATGCT
 I P D T A M P I Y I S I M F F I V A M L
 2337 AGCCACCCTCAGCCTTCTAATGGGACTAAACAACAAATCAGGCCCATG **TAG**CTTGTCAA
 A T L S L L M G L N N K I R P M *
 2397 ATAAACTTACCTAATTTTTGCTAAGACGTCTGGGTCCTGCGTTTCT **ATG**TCCACCAAAGT
 ORF 4 (fiber gene) M S T K V
 2457 CCCCTCTTCCCAGCTTTGGTACTTCCACTTGTGCGCGGAGCCAGCCTGCGGATGTGCTT
 P S S Q L W Y F H L C A R A S L R M C L
 2517 GAAAGATAATGTGGTCTCTCCCAACAGCTTCCCGTTCACCAGCACCAGGGCCATGAAGCG
 K D N V V S P N S F P F T S T R A M K R
 2577 GACACGAAGAGCTCTACCTGCAAATTATGACCCTGTATATCCATACGACGCCCCGGGTC
 T R R A L P A N Y D P V Y P Y D A P G S
 2637 TTCCACACAACCCCTTTTTTTAATAACAAGCAAGGTCTCACTGAGTCACCCCCAGGAAC
 S T Q P P F F N N K Q G L T E S P P G T
 2697 CCTGGCTGTCAATGTTTCCCCTCCACTAACCTTTTCTACGTTAGGTGCCATTAACTTTC
 L A V N V S P P L T F S T L G A I K L S
 2757 CACAGGTCCCGGACTCACCTCAACGAGGGCAAGTTACAAGCCAGCTTAGGGCCCGGCTT
 T G P G L T L N E G K L Q A S L G P G L
 2817 CATCACAATACCGAGGGCCAAATCACTGTTGAAAATGTCAACAAGGTTTGTCTTTTAC
 I T N T E G Q I T V E N V N K V L S F T
 2877 CTCCCCATTACATAAAATGAAAACACTGTATCCCTAGCGCTAGGAGATGGGTAGAAGA
 S P L H K N E N T V S L A L G D G L E D
 2937 TGAAAATGGCACCCCTTAAAGTGACCTTCCCTACTCCCCCTCCCCGCTACAATTCTCCCC
 E N G T L K V T F P T P P P P L Q F S P
 2977 TCCCCTCACAAAACAGGTGGTACTGTTTCCTTGCCCCTGCAAGACTCCATGCAAGTGAC
 P L T K T G G T V S L P L Q D S M Q V T
 3057 AAATGGAAAACCTGGGCGTTAAGCCTACCACCTACGCACCTCCCTTGAAAAAACTGACCA
 N G K L G V K P T T Y A P P L K K T D Q
 3117 GCAAGTTAGCCTCAAGTAGGCTCGGGTCTACCGTGATTAACGAGCAGTTGCAAGCTGT
 Q V S L Q V G S G L T V I N E Q L Q A V
 3177 CCAGCCTCCCGCAACCACCTACAACGAGCCTCTTTCCAAAACGACAATTCTGTTTCTCT
 Q P P A T T Y N E P L S K T D N S V S L

```

3237 GCAAGTAGGTGCCGGCCTTGCCGTGCAGAGCGGAGCTTTGGTGGCAACCCCTCCCCGCC
      Q V G A G L A V Q S G A L V A T P P P P
3297 TCTCACCTTTACATCACCCCTAGAAAAAATGAAAACACAGTGTGCTACAAGTAGGCGC
      L T F T S P L E K N E N T V S L Q V G A
3357 GGGCTTGTCTGTACAAAACAACGCCCTAGTAGCCACACCTCCCCACCCTTAACCTTTGC
      G L S V Q N N A L V A T P P P P L T F A
3417 CTATCCCTTAGTAAAAAATGACAACCATGTAGCTCTAAGTGTGGAAGTGGTTTAAGAAT
      Y P L V K N D N H V A L S A G S G L R I
3477 ATCTGGAGGCAGCCTCACGGTGGCCACTGGACCTGGCCTTTCCCATCAAAATGGAACAAT
      S G G S L T V A T G P G L S H Q N G T I
3537 AGGGGCTGTAGCAGGTGCAGGCCTCAAGTTTGAAAACAATGCCATTCTTGCAAACTAGG
      G A V A G A G L K F E N N A I L A K L G
3597 CAACGGTCTAACCATTAGAGATGGCGCTATTGAAGCAACCAACCCCAGCTGCCCCAT
      N G L T I R D G A I E A T Q P P A A P I
3657 AACTCTGTGGACTGGGCCTGGCCCTAGCATTAAATGGCTTTATTAAGACACTCCAGTAAT
      T L W T G P G P S I N G F I K D T P V I
3717 TAGGTGCTTTATATGCCTAACCAGAGACGCAACTTAGTCACAGTAAATGCTAGCTTTGT
      R C F I C L T R D S N L V T V N A S F V
3777 GGGAGAGGGGGGTATCGAATAGTCAGCCCTACCCAGTCACAATTTAGCCTAATTATGGA
      G E G G Y R I V S P T Q S Q F S L I M E
3837 GTTTGATCAGTTTGGACAGCTTATGTCCACAGGAAACATTAACCTCCACCACTACTTGGGG
      F D Q F G Q L M S T G N I N S T T T W G
3897 AGAAAAGCCCTGGGGCAATAAACTGTACAGCCACGCCAAGCCACACCTGGAAACTGTG
      E K P W G N N T V Q P R P S H T W K L C
3957 CATGCCTAACAGAGAAGTTTACTCCACTCCCGCCGCCACCATCTCCCGCTGTGGACTAGA
      M P N R E V Y S T P A A T I S R C G L D
4017 CAGCATTGCAGTCGACGGTGCCCCAGCAGAAGTATCGACTGCATGCTAATTATTAACAA
      S I A V D G A P S R S I D C M L I I N K
4077 ACCAAAAGGCGTTGCCACTTACACCCTACCTTTAGGTTTTTAACTTTAACAGACTAAG
      P K G V A T Y T L T F R F L N F N R L S
4137 CGGAGGTACCCTGTTTAAAC
      G G T L F K N

```

图 2-2 CAV-2 E3 区及其侧翼序列的核苷酸及编码产物序列。起始密码子和终止密码子用黑体斜线表示，TATA box 用下划线表示。

Fig. 2-2 Partial nucleotide and deduced amino acid sequences of CAV-2 E3 region and its flanking sequences. Start and stop codons are blackened, TATA box are underlined.

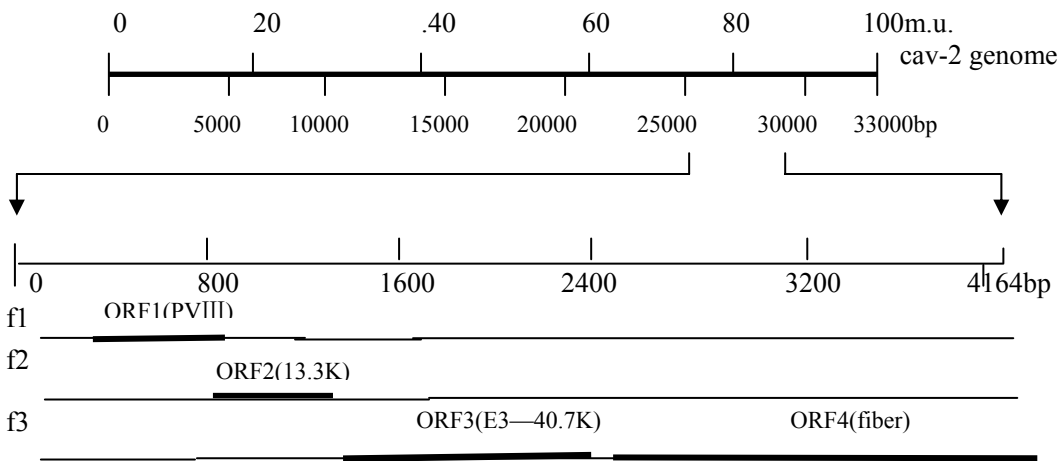


图 2-3 E3 区及其侧翼序列的编码框在基因组中的相对位置
Fig. 2-3 the position ORFs of region and it's flanking sequences

目的片段全长 4614bp，该片段包括 4 个完整的开放阅读框（ORFs），其中 ORF1 位于 pVIII 基因内部，编码 224 个氨基酸残基。在 600bp 处，即距 E3 区起始位置的上游 340bp 发现一 TATA box，推测为 E3 区的上游启动子序列所在的位置。E3 区位于 pVIII 基因和 fiber 基因之间，即图中 897~2104bp，全长 1504bp，正向有 2 个 ORF，即图中 ORF2 和 ORF3。ORF2 编码 118 个氨基酸残基，与 ORF1 间有 14bp 重叠，ORF3 编码 364 个氨基酸残基。ORF4 是 fiber 蛋白基因的编码框内部，本研究所克隆的 fiber 基因不完整。将该序列与 GenBank 中 Toronto A26/61 强毒株比较，发现二者只有 8 个碱基不同(见表 2-1)，核苷酸序列同源性高达 99.81%。疫苗株与强毒 Toronto A26/61 E3 区仅有 2 个碱基不同，且均为同义突变，所编码的氨基酸不发生改变。

表 2-1 疫苗株与 Toronto A26/61 的核苷酸序列比较

Table 2-1 Comparison of nucleotide sequence between vaccine strain and Toronto A26/61

	1968bp	2064bp	2089bp	2219bp	2503bp	3162bp	3548bp	3702bp
疫苗株	C	C	C	T	C	G	C	A
Toronto A26/61	T	T	T	C	T	A	T	T

3 讨论

腺病毒 (Adenovirus, Ad)作为基因表达载体的研制起始于 20 世纪 60 年代初，当时病毒学家观察到腺病毒基因组可与猴多瘤病毒 40(SV40)基因组杂交，说明腺病毒基因组可承载异源性基因，此后腺病毒所具有的基因组结构简单易操作、宿主细胞广泛、易于增殖和纯化、能高效表达外源基因、安全性好等诸多优点使其成为基因治疗及基因工程疫苗研究的首选病毒载体之一。目前重组腺病毒载体疫苗作为一种新型疫苗，在各种人和动物病毒病、细菌病和寄生虫病的免疫预防中

进行了大量的研究。

腺病毒基因组含有早期转录基因(E1-E4)和晚期转录基因(L1-L5), E1-E4 区与病毒复制、病毒代谢调节有关。E1、E3 和 E4 上游区都是外源基因主要的插入部位。E1 区缺失的腺病毒虽然可使外源基因高效表达, 但它是复制缺陷型的, 不能在人和动物体内生长和繁殖, 是构建基因治疗性表达载体时最常用的外源基因插入部位。E4 上游区存在一个转录沉默区, 在该区域插入外源基因不影响病毒的复制, 但插入的容量受到限制。E3 区是腺病毒的复制非必需区, E3 区插入外源基因不影响病毒的生长特性, 是常用的克隆外源基因的区域。

人与动物腺病毒中, 除羊腺病毒外(Vrati *et al*, 1995) E3 区都位于腺病毒基因组 L4 区的 pVIII蛋白基因和 L5 区纤维蛋白基因之间, 但各种腺病毒基因组大小不同, 其 E3 区的起始位点也有差别。人腺病毒 E3 区位于限制性内切酶物理图谱的 76~89m.u.之间(Signas *et al*, 1986; 谭维彦等, 1994), 而大部分动物腺病毒 E3 区的起始点右移至 80m.u 左右, 造成位点差异的主要原因是腺病毒基因组的右侧端变异较大, 而左侧晚期转录单位和 E2 区相对稳定。PAV(Reddy *et al*, 1996), BAV(Minal *et al*, 1992), CAV(Linne *et al*, 1992), MAV(Raviprakash *et al*, 1989)等具有不完整的 E3 区, 其长度约在 1~1.9kb 之间, 编码 2~6 个多肽, 与人腺病毒 E3 区编码蛋白具有同源性, OAV(Vrati *et al*, 1995)、CELO(Tikhomimv *et al*, 1998)的 pVIII基因和 fiber 基因之间则不编码任何基因产物。

完整的腺病毒E3区含有9~12个开放阅读框架, 其中7个编码产物已在感染细胞中确定, 分别为E3-12.5K、E3-6.7K、E3-gp19K、E3-11.6K、E3-10.4k、E3-14.5K、E3-14.7K。除了E3-12.5K(Dimitriov *et al*, 1997; Tollefson *et al*, 1996)。CAV-1和CAV-2 的E3区结构均为部分缺失, CAV-1的E3区比CAV-2少约500bp。CAV-2的E3区编码13.3 kDa和40.7 kDa 的两个蛋白, 但具体功能尚不清楚, 其两侧分别为pVIII蛋白基因和纤维蛋白基因, 二者所编码的蛋白均与病毒的毒力密切相关, 是构建E3区缺失载体不可缺少的部分。

本实验所用的CAV-2毒株是从国外进口的疫苗中分离得到的, 其安全、稳定并具有良好的免疫原性, 是构建载体疫苗的理想候选毒株。对其E3区及其侧翼序列进行了克隆和序列分析, 结果显示本实验所用CAV-2疫苗株的E3区及其侧翼序列正向存在4个ORFs,其所在位置及编码的多肽大小均与Tommy(1992)所报道的相一致。在E3区的上游340bp处, 即在pVIII基因的编码框内, 找到了E3区的早期转录启动子序列。有研究表明(Johnson *et al*, 1988), E3区的外源基因可利用腺病毒本身的调节元件, 即外源基因可插在E3区早期启动子后在感染早期有效表达。将扩增得到的E3区及其侧翼序列与Toronto A26/61强毒株进行序列比较, 发现二者pVIII基因的核苷酸同源性为100%, 其余序列中共有7个碱基不同, 其中5个碱基均分布在fiber基因编码框内。在E3区的虽有2个突变碱基, 但这两个毒株E3区的氨基酸同源性为100%, 这说明CAV-2 E3区及其编码的蛋白可能与病毒毒力的强弱无关, 本实验的结果为下一步构建E3缺失的CAV-2表达载体奠定了理论基础。

实验二 表达绿色荧光蛋白的 E3 缺失重组犬 2 型腺病毒的构建及其生物学特性分析

摘 要：根据实验一中对E3区及其侧翼序列的分析结果，分别选取基因组中24050bp~24953bp及26362bp~27238bp的序列作为转移载体的上/下游同源重组臂，针对这两段序列设计两对PCR引物并在上游同源臂的下游引物中和下游同源臂的上游引物中同时引入*Kpn* I 酶切位点。以pMD-E3为模板扩增了两目的片段，按照下游同源臂在先上游同源臂在后的顺序将二者分别克隆于pUC18载体中并通过*Kpn* I 酶切位点连接在一起，从而缺失了1412bp的E3区序列，并在缺失位置插入了hCMV IE启动子、多克隆位点，增强型绿色荧光蛋白基因（EGFP）、SV40早期转录 Poly A 信号，构建了E3区缺失的CAV-2转移载体pUC-△E3-EGFP。用该载体转染CAV-2亲本毒株感染的MDCK细胞，经过连续6轮蚀斑筛选获得了表达绿色荧光蛋白的重组病毒单一克隆株rCAV-2△E3-EGFP。经鉴定rCAV-2△E3-EGFP保持了亲本毒株的生物学性状并能够稳定表达外源基因，动物试验证实E3区的缺失对致病力无明显影响，为进一步开展CAV-2活载体疫苗研制及相关基础研究提供了技术平台。

关键词：E3 区缺失，绿色荧光蛋白，重组病毒

腺病毒基因组含有早期转录基因(E1-E4)和晚期转录基因(L1-L5)，E1-E4区与病毒复制、病毒代谢调节有关。E1、E3和E4上游区都是外源基因主要的插入部位。E1区缺失的腺病毒虽然可使外源基因高效表达，但它是复制缺陷型的，不能在人和动物体内生长和繁殖，是构建基因治疗性表达载体时最常用的外源基因插入部位。E4上游区存在一个转录沉默区，在该区域插入外源基因不影响病毒的复制，但插入的容量受到限制。E3区是腺病毒的复制非必需区，在E3区(或缺失部分E3区序列)插入外源基因构建的腺病毒载体为非依赖型可复制性载体，这种载体在体内各器官及细胞中能自主复制和表达外源基因，被广泛应用于蛋白特性研究、诊断抗原和亚单位疫苗及重组活载体疫苗的制备。重组腺病毒载体疫苗作为一种新型疫苗，在各种人和动物病毒病、细菌病和寄生虫病的免疫预防中进行了大量的研究。目前在人病毒病的重组腺病毒载体疫苗研究中，已进行研究的病原主要有人/猿免疫缺陷病病毒（Human/Simian immunodeficiencyvirus, HIV/SIV）、狂犬病病毒(Rabies virus, RV)、丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)、乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)、SARS 冠状病毒(SARS-coronavirus)、麻疹病毒(Measles virus) (Putz *et al*, 2003)、登革病毒(Dengue virus)、巨细胞瘤病毒(Cytomegalovirus, CMV) (Shanley *et al*, 2005)、EB 病毒(Epstein-Barrvirus, EBV)、埃博拉病毒(Ebola virus)等，重组腺病毒均可有效的表达上述病毒的抗原基因，在试验动物和非人灵长类动物体进行的免疫试验表明，可以刺激产生特异性的细胞免疫和体液免疫反应，其中HIV 重组腺病毒载体疫苗已在人体进行了免疫试验(Robinson *et al*, 2002)。在利用重组腺病毒表达人疟原虫(malaria) CS 抗原蛋白进行免疫研究中证明，其免疫效果甚至比放射孢子体的免疫效果还要好(Bruna-Romero *et al*, 2004)。在动物疫病的腺病毒活载体疫苗的研究中HAd5 型复制缺陷型的腺病毒载体是最常应用的。用表达伪狂犬病毒gD 糖蛋

白的重组痘病毒和重组腺病毒载体疫苗进行对比试验, 证明腺病毒在刺激特异性抗体应答和免疫保护方面要好于痘病毒 (Gonin *et al*, 1996), 并且可以多途径进行免疫, 说明人腺病毒HAd5 具有较广泛的细胞嗜性。而CAV-2的基本结构与人腺病毒相类似, 具有人腺病毒的优点。且CAV-2只能感染犬, 导致呼吸道疾病和腹泻, 对人类及其它动物不具感染性和致病性, 作为活病毒载体研制双价或多价疫苗有着明显的优势。本研究拟缺失CAV-2致弱毒株E3区的大部分序列, 选取E3区的侧翼序列作为同源重组臂, 以EGFP基因作为报告基因构建CAV-2表达载体, 并通过与亲本CAV-2的细胞内同源重组获得能够表达EGFP的重组CAV-2病毒, 对筛选到的遗传表达稳定的纯化重组病毒克隆进行生物学特性分析, 为进一步开展CAV-2活载体疫苗研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 病毒、载体及细胞

CAV-2疫苗株、感受态细胞DH5a的来源同实验一; pUC18载体购自大连宝生物工程公司; 质粒pEGFP-N1为Clontech公司产品, 带有hCMV立即早期启动子、MCS、EGFP和SV40 polyA 信号。

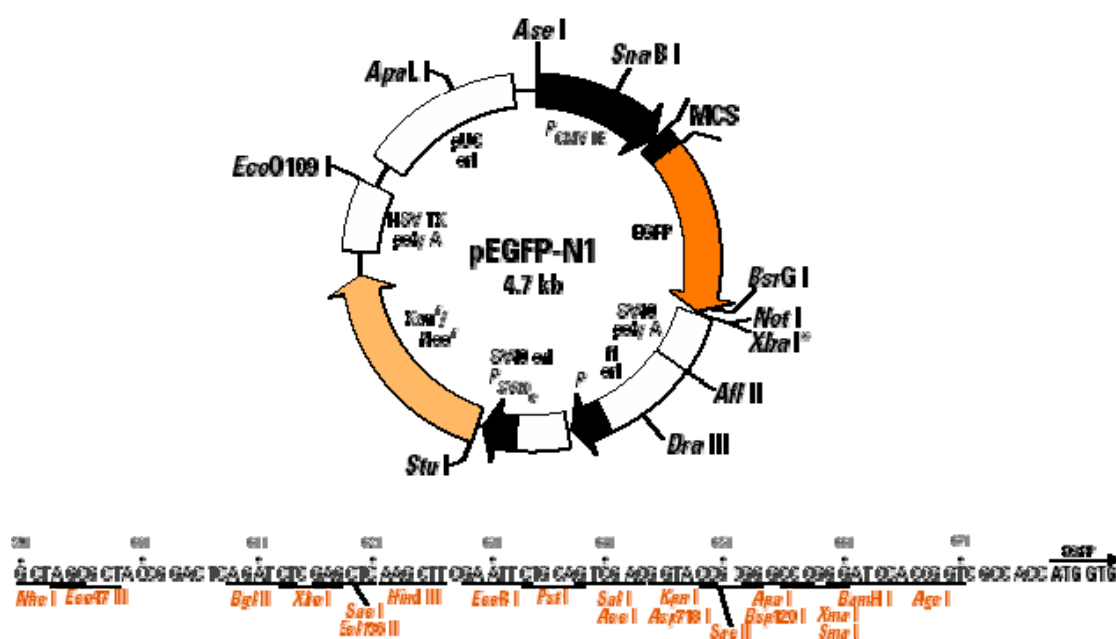


图 3-1 pEGFP-N1 真核表达载体

Fig. 3-1 Eukaryotic expression vector pEGFP-N1

1.2 主要试剂

DMEM 购自 GIBCO-BRL 公司；胎牛血清购自天津灏洋生物公司；PrimeSTAR HS DNA Polymerase, dNTP, DNA Marker, T4 DNA 连接酶, 限制性内切酶 *EcoR* I、*Kpn* I 和 *Spe* I 等均购自大连宝生物工程公司；磷酸钙转染试剂盒 (Calcium Phosphate Trtansfection Kit) 购自 Invitrogen 公司；小量胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司；中量质粒纯化试剂盒购自 Promega 公司；六孔板购自 Nunc 公司，蛋白酶 K 购于 Sigma 公司，低熔点琼脂糖购自 Bio-rad 公司。

1.3 实验动物

实验犬由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

1.4 E3 缺失转移载体的构建

1.4.1 E3 区的缺失

根据实验一中对 E3 区及其侧翼序列的核苷酸序列分析结果，分别选取 24050~24953bp 及 26362~27238bp 的序列作为转移载体的上/下游同源重组臂，设计两对引物，TS-U / TS-L 用于扩增上游同源臂 TX-U / TX-L 用于扩增下游同源臂。在上游同源臂引物的两端分别引入 *EcoR* I 和 *Kpn* I、*Spe* I 酶切位点，下游同源臂引物的两端分别引入 *Kpn* I 和 *Hind*III 酶切位点（序列中斜体部分）。

TS-U: 5' TTT GAA TTC CAA CCG CCT TTT TCC AAC 3'

TS-L: 5' TTT GGT ACC ACT AGT CCA CCT GGT CCA TGC TCT C 3'

TX-U: 5' TTC GGT ACC ACC CTC AGC CTT CTA AT 3'

TX-L: 5' TTT AAG *CTT* TTG GAA AGA GGC TCG TTG T 3'

以质粒 pMD-E3 为模板，PrimeSTAR HS DNA Polymerase PCR 扩增上/下游同源重组臂基因。PCR 反应参数为：98℃10s, 68℃1min, 30 个循环。扩增后得到的下游同源臂目的片段经 *Kpn* I 和 *Hind*III 双酶切与同样处理的 pUC18 质粒做以下体系的连接：载体 pUC18 0.5μL, 目的基因(PCR 产物)3.7μL, 10×T₄ DNA Ligase Buffer 0.5μL, T₄ DNA Ligase 0.5μL。在保温瓶中 16℃水浴，连接 1 小时，转化感受态细胞 DH5a, 挑取单个克隆菌，提取质粒鉴定正确后命名为 pUC-X。上游同源臂目的片段与 pUC-X 质粒同时进行 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切，将二者连接(方法同上)后缺失了两同源重组臂之间的 E3 区序列，得到的质粒命名为 pUC-ΔE3。

1.4.2 转移载体的构建

根据 pEGFP-N1 载体的核苷酸序列设计 1 对引物：pE-U/ pE-L

pE-U: 5' TTT *ACT AGT* CCG CCA TGC ATT AGT TAT T 3'

pE-L: 5' TTT *ACT AGT* GCA GTG AAA AAA ATG CTT 3'

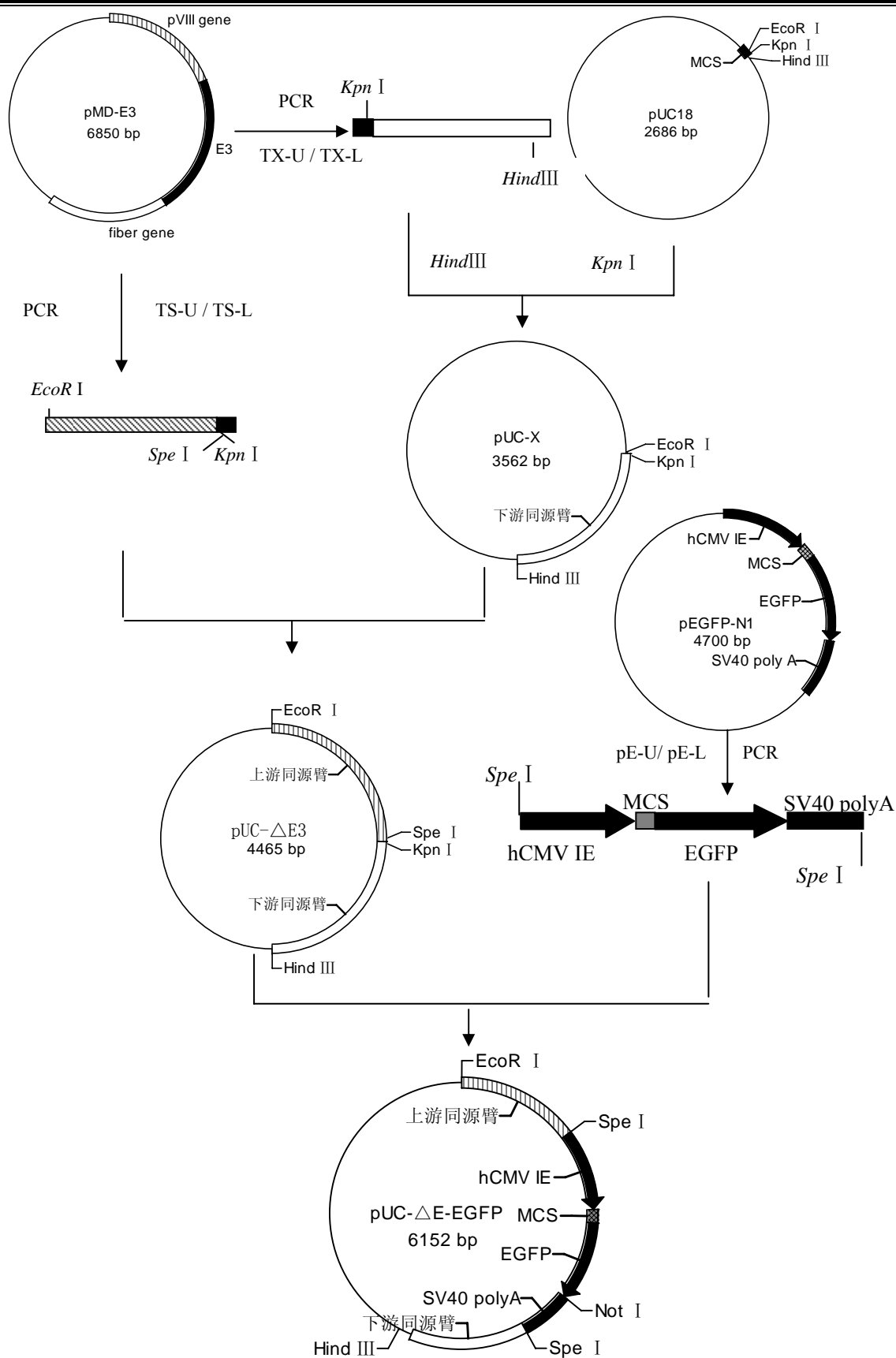


图 3-2 重组转移载体 pUC-ΔE3-EGFP 的构建流程

Fig. 3-2 Flowchart for construction of recombinant transfer vector pUC-ΔE3-EGFP

在上、下游引物的两端同时引入了 Spe I 酶切位点（序列中划线部分）这两对引物可以扩增包括 hCMV IE、MCS、EGFP、SV40 早期转录 PolyA 终止信号等在内的 1600bp 的片段。反应参数为：95℃ 5min, 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 30s, 共 30 个循环。将扩增得到的片段与 pUC-△E3 质粒同时进行 Spe I 酶切后相连接，通过酶切鉴定筛选出连接方向正确的质粒命名为 pUC-△E3-EGFP，完成了 E3 缺失转移载体的构建，构建过程见图 3-2。

1.5 中量法提取 pUC-△E3-EGFP 质粒并纯化

按 Promega 公司 Wizard PureFecton Plasmid DNA Purification System 试剂盒说明书进行。收集 25mL 细菌培养物，10000rpm 室温离心 10min，弃上清并用吸水纸吸尽残液。加入 1.25mL Cell Resuspension Solution 使细胞完全悬浮，然后再加入 1.25 mL Cell Lysis Solution，充分混匀后室温作用 5min，加入 1.75mL Neutralization Solution，立即颠倒 6~8 次混匀，10000rpm 室温离心 20min；将上清用 0.45µm 滤器过滤入新的离心管中，加入事先彻底混匀 Endotoxin Removal Resin 0.25mL，剧烈混匀后室温静置 10 min，期间间隔数秒混匀一次；将离心管放置在磁力棒上 (MagneSil™ Magnetic Separation Unit)，轻轻摇动使树脂完全吸附在管壁上，静置 30 秒至溶液清晰后吸取上清至一新的离心管中；加入 1mL 5M 的 Guanidine Thiocyanate，充分混匀后加入 0.75 mL MagneSil™ Paramagnetic Particles 于管中，振荡混匀后室温作用 2-3min，将管置于磁力棒上使颗粒吸附，溶液清晰并静置 30 秒后，弃上清，将管从磁力棒上取下；加入 1mL 4/10 Wash Solution 振荡重悬沉淀的颗粒，重复上述步骤，吸附弃上清；加入 2.5 mL 80% 的乙醇振荡悬浮颗粒，吸附弃上清并重复洗涤三次；沉淀室温干燥 10min，用 1.2 mL 灭菌去离子水重悬，剧烈振荡 10 秒后，室温静置 1 分钟，置于磁力棒上吸附后转移上清到新的离心管中，加入 0.5 倍体积的 7.5M 的醋酸纳和 2.5 倍上述液体总体积的 95% 的乙醇，混匀后 12000rpm 室温离心 15min，弃去上清，用 70% 乙醇洗涤沉淀，12000rpm 室温离心 5min，沉淀在无菌环境中自然干燥，加入 200µL 灭菌去离子水重悬 DNA，在紫外分光光度计检测质粒浓度后 -20℃ 保存备用。

1.6 CAV-2 亲本病毒 PFU 的测定

空斑滴定法 (Nickin, 1999) 测定病毒滴度：将 MDCK 细胞传代于 24 孔细胞培养板，培养至细胞长成单层，吸去培养液，用 PBS 洗细胞两次；将实验一中收取的 CAV-2 病毒液用无血清的 DMEM 培养液作 10 倍比稀释，每孔接种 200µL，每稀释度作 4 孔，37℃ 吸附 1h 后吸出病毒液；将 2% 的低熔点琼脂糖融化后降至 40℃ 左右，与事先在 37℃ 预热的 2×DMEM（含 4% 胎牛血清，0.02% 中性红）等体积混和，缓慢注入 24 孔板中，厚度约为 2mm，平放至琼脂凝固，置于 37℃ 培养，待蚀斑出现后计数，计算病毒液中的病毒含量。

滴度 $\text{PFU} / \text{mL} = \text{plaque number} / \text{dilution} \times \text{volume (mL)}$

1.7 重组质粒的转染

MDCK 细胞经消化后接种于六孔板中,培养至长满 80%时,给细胞换成新鲜的培养液,每孔 2mL,分别以 10^5 、 10^6 和 10^7 PFU/mL 的剂量感染亲本 CAV-2,2h 后钙转染试剂转染 pUC- Δ E3-EGFP 质粒每孔 4 μ g,具体操作为:分别准备两个 EP 管,标为 A、B,在 A 管内加入 7.2 μ L 2M CaCl₂ 和 4 μ g 质粒,加水补足 60 μ L,混匀。B 管加入 60 μ L 2 \times HBS。逐滴将 A 管内的液体加入 B 管,滴加同时用枪头在 B 管从液面不断向底部吹气泡,直到液体完全混匀(液体内没有肉眼可见的颗粒,晶莹透亮为止)。将混合好的 AB 液室温放置 30min 后加入已感染 CAV-2 的细胞中,轻轻晃动以混匀,置于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱培养 12h 后将细胞内的液体吸出,加入 10%DMSO(PBS 溶解, pH 7.2),准确作用 2.5min,加入新鲜的 DMEM 培养液。每隔 24h 在荧光显微镜下观察绿色荧光的表达及病变情况。当 90%的细胞出现 CPE,收获细胞培养物反复冻融三次,超声裂解,离心取上清-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.8 重组病毒的筛选及纯化

将收获的病毒液用含 2%犊牛血清的 DMEM 稀释后感染长满单层的 MDCK 细胞,每隔 12h 监测荧光。选择出现绿色荧光蛋白集中的位置用记号笔圈下,用细胞刮将圈外部分刮除,余下的细胞反复冻融后再次感染细胞,多次重复,直至在荧光显微镜下监测到被感染的大部分细胞中出现绿色荧光。待病变完全收取病毒液以无血清 DMEM10 倍比稀释后感染 MDCK 细胞,吸附 1h 后弃去细胞表面液体,加入 2mL 2 \times DMEM(含有 0.02%中性红染液和 4%血清)和 2%低熔点琼脂糖等体积混合凝胶,待出现明显的蚀斑时,在荧光显微镜下观察是否有绿色荧光出现。挑取有绿色荧光的蚀斑放入 1mL 无血清的 DMEM 培养液中,反复冻融 3 次后接种细胞进行新一轮的蚀斑纯化,直至所有病毒蚀斑在均呈现绿色荧光为止。将纯化到的重组病毒扩大培养,命名为 rCAV-2 Δ E3-EGFP。

1.9 重组病毒的 PCR 鉴定

在缺失的 E3 区内部以及 EGFP 的内部分别设计一对引物: Δ E3-S/ Δ E3-X ; EGFP-S/EGFP-X 。序列如下:

Δ E3-S: 5' GTA TGC CCA AAC CTG CAC 3'

Δ E3-X: 5' GCA TTG CAG TGT CAG GTA 3'

EGFP-S: 5' CGA CGT AAA CGG CCA CAA GTT 3'

EGFP-X: 5' ACT CCA GCA GGA CCA TGT GAT 3'

用重组病毒 rCAV-2 Δ E3-EGFP 感染细胞,病变完全后收取细胞培养物,SDS-蛋白酶 K 法提取重组病毒的核酸 DNA,用上述两对引物做 PCR 鉴定。若不能扩出 E3 区缺失部分的基因,而 EGFP 的基因条带特异而明显,则表明已经纯化完全。

1.10 重组病毒生长特性的鉴定

以 10^6 PFU/mL 的剂量分别将重组病毒 rCAV-2 Δ E3-EGFP 及 CAV-2 亲本病毒接种于长满单层 MDCK 细胞, 在接种后培养 24h、48h、72h、96h、120h 和 144h 收获病毒, 空斑滴定法测定病毒滴度, 绘制生长动力学曲线。

1.11 重组病毒的形态学鉴定

用经 6 代纯化后筛选到的重组病毒感染 MDCK 细胞, 观察细胞所形成的病变。所收获的细胞培养物超声破碎后, 离心取上清, 磷钨酸负染色, 置电镜下观察病毒形态。

1.12 重组病毒遗传稳定性检测

将纯化的 rCAV-2 Δ E3-EGFP 在 MDCK 细胞上连续传代 15 代, 测定每一代病毒的滴度; 用 1.9 中的方法对第 1、5、10 代病毒进行 PCR 鉴定, 并在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达的情况。

1.13 重组病毒作为疫苗载体的安全性评估

5 只 1 月龄的幼犬隔离饲养于哈尔滨兽医研究所动物房, 生长至 4 月龄时经血凝抑制试验检测犬腺病毒抗体为阴性。将 5 只犬随即分为 3 组: 第一组 2 只接种 rCAV-2 Δ E3-EGFP (5×10^8 PFU/mL), 肌注 5mL/只; 第二组两只接种同样剂量的 CAV-2; 第三组一只肌注 5mL DMEM 培养液。接种后每天观察犬的临床变化。3 周后剖检犬, 观察心、肝、脾、肾、肺、气管、腮腺、扁桃体、肩前淋巴结, 颌下淋巴结等器官的病理变化。

2 结果

2.1 E3 缺失转移载体的构建

分别以 TS-U/TS-L 和 TX-U/TX-L 为引物, 以 pMD-E3 质粒为模板扩增了两个片段, 与预期的上、下游同源臂大小一致 (图 3-3), 测序结果正确后将下游、上游同源臂先后克隆于 pUC18 载体, 利用 TX-U 和 TS-L 中共有的酶切位点 *Kpn* I 将二者连接得到中间克隆载体 pUC- Δ E3, 以 pE-U/pE-L 为引物扩增质粒 pEGFP-N1 得到了约 1600bp 片段 (图 3-4), 与预期的包含有 hCMV

立即早期启动子、MCS、EGFP 和 SV40 早期转录 polyA 信号的目的片段大小相符, 将该片段插入到 pUC- Δ E3 的 Spe I 酶切位点中, 构建的重组质粒中含有 3 个 HindIII 酶切位点, 若插入的方向为正, 酶切应得到约为 2830bp、1880bp 及 1450bp 的 3 个片段; 反向则为 2830bp、1750bp 及 1580bp 的 3 个片段, 筛选正向连接的质粒经测序正确后命名为 pUC- Δ E3-EGFP, 即为 E3 区缺失的重组转移载体。各中间产物及重组转移载体的酶切鉴定结果见图 3-5, 图 3-6, 图 3-7。

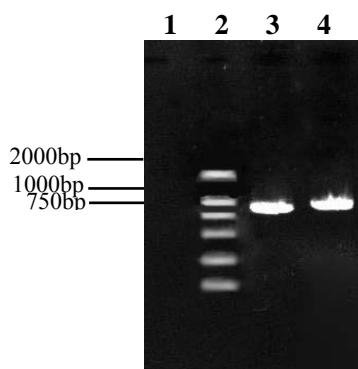


图 3-3 上、下游同源重组臂序列的扩增

- 1.阴性对照;
- 2.DL15000 Marker;
- 3.上游同源重组臂的 PCR 扩增结果;
- 4.下游同源重组臂的 PCR 扩增结果。

Fig.3-3 Amplification of upper and lower homologous arm

Lane1.Negative control;
Lane2. DL2000 Marker;
Lane3. PCR product of upper homologous arm;
Lane4. PCR product of lower homologous arm.

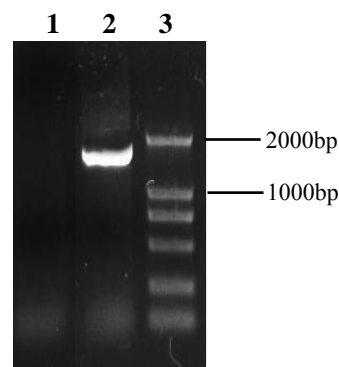


图 3-4 含有 hCMV IE、MCS、EGFP 和 SV40 polyA 信号的 pEGFP-N1 部分片段的 PCR 扩增结果

- 1.阴性对照;
- 2.PCR 扩增产物 ;
- 3.DL2000 Marker。

Fig.3-4 The PCR product of partial sequences contains hCMVIE、MCS、EGFP and SV40 polyA

Lane1.Negative control;
Lane2. PCR product;
Lane3. DL2000 Marker.

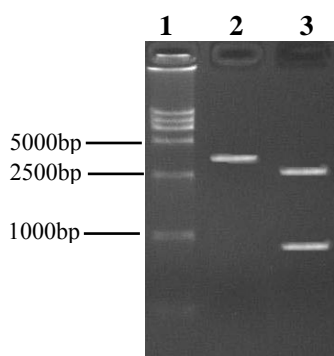


图 3-5 pUC-X 的酶切鉴定

- 1.DL15000 Marker;
- 2.pUC-X *Kpn* I 酶切结果(3562bp);
3. pUC-X *Kpn* I / *Hind*III 酶切结果。

Fig. 3-5 Identification of plasmid pUC-X by digestion with restriction endonucleases

Lane1. DL 15000 Marker;
Lane2. pUC-X digested with *Kpn* I(3562bp);
Lane3. pUC-X digested with *Kpn* I / *Hind*III(2702bp+880bp).

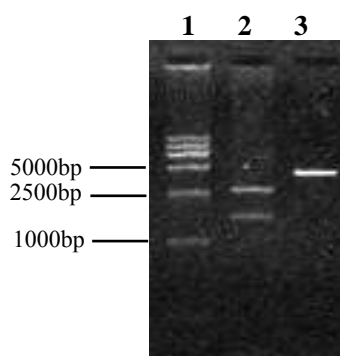
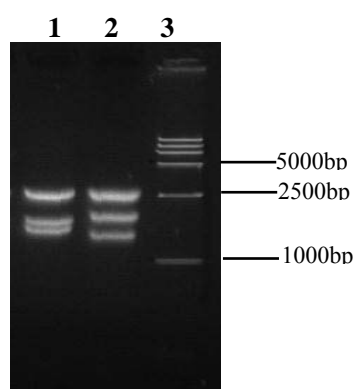


图 3-6 pUC- Δ E3 的酶切鉴定

- 1.DL15000 Marker;
- 2.*Hind*III 酶切结果;
- 3.*Kpn* I 酶切结果。

Fig. 3-6 Indification of plasmid pUC- Δ E3 by digestion with restriction endonucleases

Lane1.DL 15000 Marker;
Lane2.pUC- Δ E3 digested with *Hind*III(4465bp);
Lane3.pUC- Δ E3 digested with *Kpn* I / *Hind*III (2825bp+1640bp).

图3-7 *Hind*III 酶切筛选正向重组质粒

1. 外源表达元件反向插入；
2. 外源表达元件正向插入；
3. DL15000 Marker。

Fig. 3-7 Indification of pUC- Δ E3-EGFP with *Hind*III

Lane1. The foreign expression elements were opposite;

Lane2. The foreign expression elements were rightward;

Lane3. DL 15000 Marker.

```

1   TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
61  CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG
121 TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC
181 ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC
241 ATTCGCCATT CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT
301 TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA ACGCCAGGGT
361 TTTCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGCCAA GCTTGATGC CTGCAGGTGC
421 ACTCTAGAGG ATCCCCGGGT ACCGAGCTCG AATTCAACC GCCTTTTCC AACACTGTAC
481 GCCATCTTCC AACAAAGCAG AGGCTCCCCC ACGGCATTAA AAATAAAAAA CAGATCCCTC
541 AGATCCCTCC TAAGAAGCTG TCTCTACCAC AAGTCAGAGG AGCAGCTGCT GCGCACGCGA
601 AACGACGCCG AAGCTTTGCT CAACAAATAC TGTCAGGAC TCGAGTCCGG CACAGACTGA
661 GCAATGTCTA AAGAAATACC AACCCCTTAT ATGTGGAGCT ACCAACC GCA AACGGGACAC
721 GCCCGCGCG CCTCCAGGA CTACTCCACC CAAATGAATT GGTTTAGTGC TGGGCCATCA
781 ATGATTAGTC AAGTTTATGG CATTAGAGAC TTGCGCAACA AAGTTTGTAT AACCCAGGCA
841 GAAATAACCA AAATCCAG AACAATAATG GATCCGCCAA TTTGGCCAGC TGCCATGCTT
901 GTTCAGGAAG CCGCCCCACC CAAAACGGTC ACTCTGCCCA GAAACCACAC CCTAGAACAG
961 GCTATGACCA ACTCTGGGGC GCAGCTAGCG GGAGGACGAC AGCTGTGCC CTCCCAAATA
1021 GGTATAAAAA GCCAGTGCT GGCTGGCAGC GGCATTGAGC TTAGCGAAGA CATCCCCAGC
1081 GCCTCTGGA TCAGGCCCGA CGGCATATTC CAGCTAGGAG GGGGGTCTCG CTCGTCCTTC
1141 AGCCCAACGC AAGCATTCCT CACCCTGCAA CAGGCATCCT CGACGCCGCG CGCAGGAGGC
1201 GTGGGCACCT ACCAGTTTGT GCGCGAATTT GTGCCAGAGG TATACCTTAA CCCTTTTCA

```

1261 GGACCACCGG ACACCTTTC TGATCAGTTC ATTCCTAACT ACGACATTGT AACCAACTCT
 1321 GTCGATGGCT ATGACTGAGG AGAGCATGGA CCAGGTGGAC TAGTCCGCCA TGCATTAGTT
 1381 **ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA**
 1441 **CATAACTTAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA CGACCCCGC CCATTGACGT**
 1501 **CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG**
 1561 **TGGAGTATTT ACGGTAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA**
 1621 **CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA**
 1681 **CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG**
 1741 **TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTC**
 1801 **CAAGTCTCCA CCCCAATTGAC GTCAATGGGA GTTTGTTTTG GCACCAAAAT CAACGGGACT**
 1861 **TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT**
 1921 **GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTGGTTTAG TGAACCGTCA GATCCGCTAG CGCTACCGGA**
 1981 CTCAGATCTC GAGCTCAAGC TTCGAATTCT GCAGTCGACG GTACCGCGGG CCCGGGATCC
 2041 ACCGGTCGCC ACCATGGTGA GCAAGGGCGA GGAGCTGTTC ACCGGGTGG TGCCCATCCT
 2101 GGTCGAGCTG GACGGCGACG TAAACGGCCA CAAGTTCAGC GTGTCCGGCG AGGGCGAGGG
 2161 CGATGCCACC TACGGCAAGC TGACCCTGAA GTTCATCTGC ACCACCGGA AGTGCCCGT
 2221 GCCCTGGCCC ACCCTCGTGA CCACCCTGAC CTACGGCGTG CAGTGCTTCA GCCGTACCC
 2281 CGACCACATG AAGCAGCAGC ACTTCTTCAA GTCCGCCATG CCCGAAGGCT ACGTCCAGGA
 2341 GCGCACCATC TTCTTCAAGG ACGACGGCAA CTACAAGACC CGCGCCGAGG TGAAGTTCGA
 2401 GGGCGACACC CTGGTGAACC GCATCGAGCT GAAGGGCATC GACTTCAAGG AGGACGGCAA
 2461 CATCCTGGGG CACAAGCTGG AGTACAATA CAACAGCCAC AACGTCTATA TCATGGCCGA
 2521 CAAGCAGAAG AACGGCATCA AGGTGAACTT CAAGATCCGC CACAACATCG AGGACGGCAG
 2581 CGTGCAGCTC GCCGACCACT ACCAGCAGAA CACCCCATC GCGGACGGCC CCGTGCTGCT
 2641 GCCCGACAAC CACTACCTGA GCACCCAGTC CGCCTGAGC AAAGACCCCA ACGAGAAGCG
 2701 CGATCACATG GTCCTGCTGG AGTTCGTGAC CGCCGCCGGG ATCACTCTCG GCATGGACGA
 2761 GCTGTACAAG TAAAGCGGCC GCGACTCTAG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG
 2821 GTTTTACTTG CTTTAAAAA CCTCCACAC CTCCCCCTGA ACCTGAAACA TAAATGAAT
 2881 GCAATTGTTG TTGTTAACTT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC
 2941 ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT TCACTGCACT AGTGGTACCA CCCTCAGCCT
 3001 TCTAATGGGA CTAAACAACA AAATCAGGCC CATGTAGCTT GTCAAATAAA CTTACCTAAT
 3061 TTTTGCTAAG ACGTCTGGGT CCTGCGTTTC TATGTCCACC AAAGTCCCT CTTCCAGCT
 3121 TTGGTACTTC CACTGTGCG CGCGAGCCAG CTGCGGATG TGCTTGAAAG ATAATGTGGT
 3181 CTCTCCAAC AGCTTCCCGT TCACCAGCAC CAGGGCCATG AAGCGGACAC GAAGAGCTCT
 3241 ACCTGCAAAT TATGACCCTG TATATCCATA CGACGCCCC GGGTCTTCCA CACAACCCC
 3301 TTTTTTAAT AACAAGCAAG GTCTACTGA GTCACCCCA GGAACCCTGG CTGTCAATGT
 3361 TTCCCTCCA CTAACCTTT CTACGTTAGG TGCCATTAAT CTTCCACAG GTCCGGACT
 3421 CACCTCAAC GAGGGCAAGT TACAAGCCAG CTTAGGGCCC GGCCTCATCA CAAATACCGA
 3481 GGGCCAAATC ACTGTTGAAA ATGTCAACAA GGTTTTGTCT TTTACCTCCC CATTACATAA

3541 AAATGAAAAC ACTGTATCCC TAGCGCTAGG AGATGGGTGA GAAGATGAAA ATGGCACCCCT
 3601 TAAAGTGACC TTCCCTACTC CCCCTCCCC GCTACAATTC TCCCCTCCCC TCACAAAAAC
 3661 AGGTGGTACT GTTTCCTTGC CCCTGCAAGA CTCCATGCAA GTGACAAATG GAAAACTGGG
 3721 CGTTAAGCCT ACCACCTACG CACCTCCCTT GAAAAAACT GACCAGCAAG TTAGCTCCA
 3781 AGTAGGCTCG GGTCTACCG TGATTAACGA ACAGTTGCAA GCTGTCCAGC CTCCCGCAAC
 3841 CACCTACAAC GAGCCTCTTT CAAAAGCTT GCATGCCTGC AGGTCGACTC TAGAGGATCC
 3901 CCGGGTACCG AGCTCGAATT CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT GAAATTGTTA
 3961 TCCGCTCACA ATTCCACACA ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAG CCTGGGGTGC
 4021 CTAATGAGTG AGCTAACTCA CATTAATTGC GTTGCCTCA CTGCCCCTT TCCAGTCGGG
 4081 AAACCTGTCTG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGGC
 4141 TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGAATCGCTG CGCTCGGTCTG TTCGGCTGCG
 4201 GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA
 4261 CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC
 4321 GTTGTGGCG TTTTCCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCAGAAA ATCGACGCTC
 4381 AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG
 4441 CTCCCTCGTG CGCTCTCTG TCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCTTTCT
 4501 CCCTTCGGGA AGCGTGGCG TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA
 4561 GGTCTGTCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC
 4621 CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC
 4681 AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT
 4741 GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGAACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT
 4801 GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC
 4861 TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA
 4921 AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGAACGAAA ACTCACGTTA
 4981 AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAAAA
 5041 ATGAAGTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG
 5101 CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG
 5161 ACTCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC
 5221 AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCAGG TCCAGATTGA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC
 5281 CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCTGCA AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA
 5341 TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC
 5401 CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGTCCGG
 5461 TTCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTTAGCTC
 5521 CTTCCGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT
 5581 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAAGTCTAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG
 5641 TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGGCC
 5701 GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TAAAAAGTGC TCATCATTGG
 5761 AAAACGTTCT TCGGGCGGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT

5821 *GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG*
5881 *GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG*
5941 *TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT*
6001 *CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC*
6061 *ATTTCCTCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAAACCTA*
6121 *TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTTCG TC*

图3-8重组转移载体pUC-△E3-EGFP全序列

来自pUC18的序列用斜体表示,上/下游同源重组臂用下划线表示, hCMV IE启动子序列用粗体表示, 多克隆位点区用阴影表示, EGFP基因的起始和终止密码子用边框表示。

Fig.3-8 Complete sequence of pUC-△E3-EGFP

Sequences derived from PUC18 are showed as squiggly lines; the upper/ lower homologous arm, hCMV IE promoter, multiple cloning sites are indicated as underlines, boldfaces and shaded, respectively; start and stop codens of EGFP are boxes.

2. 2 重组病毒的筛选及纯化

pUC-△E3-EGFP 经紫外分光光度计测定浓度为 1.27μg/μL，按每 2μg/mL 的比例取纯化的重组质粒 pUC-△E3-EGFP 转染已被亲本 CAV-2 感染的 MDCK 细胞，在荧光显微镜下观察。转染 24h 后即可观察到瞬时表达的绿色荧光蛋白（图 3-9），72h 后可看到明显的细胞病变，收取病变的细胞培养物，反复冻融 3 次后接种 MDCK 细胞，用含 1%低熔点琼脂糖的 DMEM 培养细胞至出现明显的蚀斑时（见图 10），挑取在在荧光显微镜下呈现绿色荧光的蚀斑（见图 11）进行下一轮的纯化，用经过连续 6 次蚀斑纯化的重组病毒接种 MDCK 细胞，24h 后观察到几乎所有细胞均呈现绿色荧光（图 3-12），且所形成的蚀斑均为绿色。

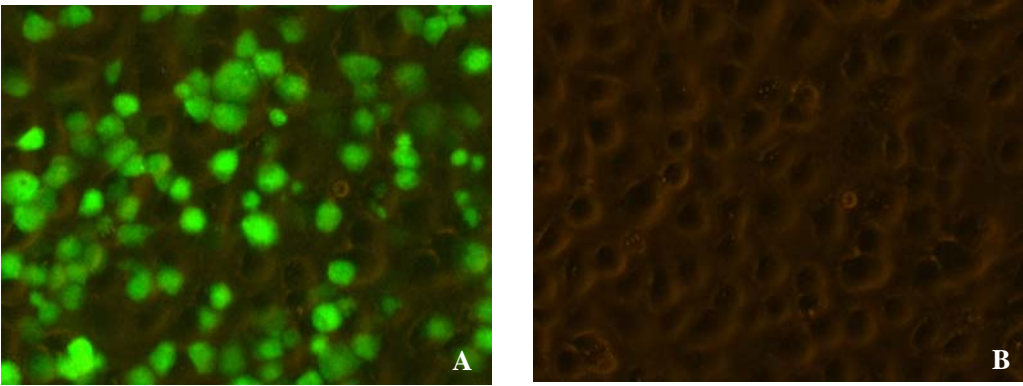


图 3-9 pUC-△E3-EGFP 转染 MDCK 细胞 24h 后观察到的瞬时表达（100×）
A. EGFP 在 MDCK 中的瞬时表达；B. MDCK 细胞对照。

Fig. 3-9 Transient expression of EGFP in MDCK cells after transfection 24 hours（100×）
A. Transient expression of EGFP in MDCK cells; B. MDCK cells.

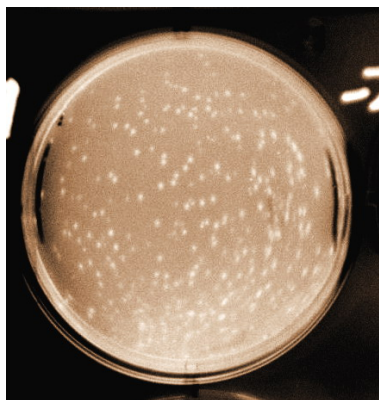


图 3-10 rCAV-2 Δ E3-EGFP 在 MDCK 细胞上形成的蚀斑
Fig.3-10 Plaque formed by rCAV-2 Δ E3-EGFP in MDCK cells

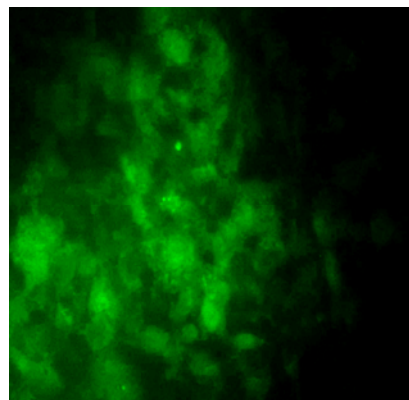


图 3-11 荧光显微镜下观察到的 rCAV-2 Δ E3-EGFP 在 MDCK 细胞上形成的蚀斑 (100 \times)
Fig.3-11 Plaque formed by rCAV-2 Δ E3-EGFP in MDCK cells (100 \times)

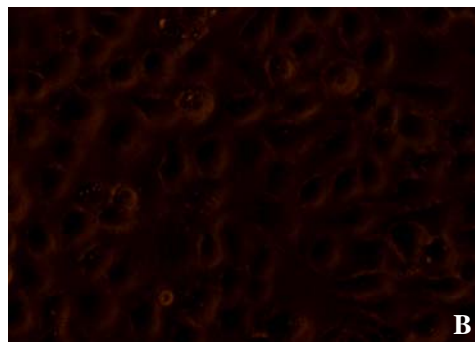
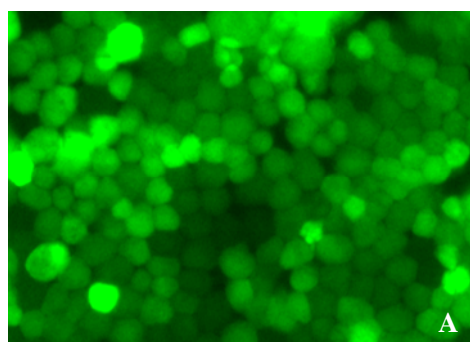


图 3-12 重组病毒 rCAV-2 Δ E3-EGFP 的纯化 (100 \times)
A. EGFP 在纯化后 rCAV-2 Δ E3-EGFP 中的表达; B.MDCK 对照。
Fig.3-12 rCAV-2 Δ E3-EGFP after six rounds pLaque assay (100 \times)
A. EGFP expressed in MDCK cells infected with rCAV-2 Δ E3-EGFP after six rounds purification; B.MDCK cells.

2.3 单一克隆 rCAV-2 Δ E3-EGFP 的 PCR 鉴定

收取纯化后重组病毒的细胞培养物, 提取病毒基因组 DNA, 分别用 E3 区内部的特异性引物 Δ E3-S/ Δ E3-X 及 EGFP 基因内部的特异性引物 EGFP-S /EGFP-X 对重组病毒进行 PCR 鉴定, 同时以野生型的 CAV-2 作为对照。若纯化完全, Δ E3-S/ Δ E3-X 仅能扩增出 CAV-2 基因组约 1300bp 的 E3 区片段; EGFP-S /EGFP-X 仅能扩增出重组病毒基因组中 650bp 的 EGFP 片段。结果如图 3-13 所示, PCR 鉴定结果与预期相符, 证明纯化得到的重组病毒 rCAV-2 Δ E3-EGFP 中无亲本病毒的污染。

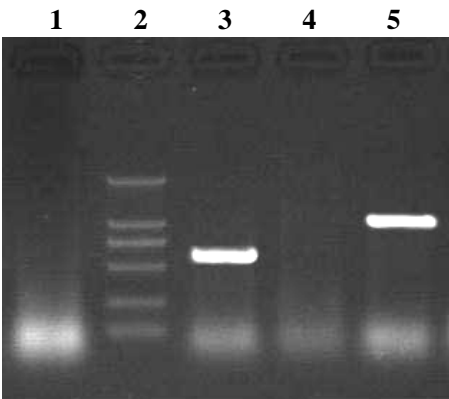


图 3-13 rCAV-2 Δ E3-EGFP 的 PCR 鉴定

1.引物 EGFP-S /EGFP-X 鉴定亲本 CAV-2; 2. DL 2000 Marker; 3. 引物 EGFP-S /EGFP-X 鉴定 rCAV-2 Δ E3-EGFP; 4. 引物 Δ E3-S/ Δ E3-X 鉴定 rCAV-2 Δ E3-EGFP; 5. 引物 Δ E3-S/ Δ E3-X 鉴定 CAV-2。

Fig .3-13 PCR identification of rCAV-2 Δ E3-EGFP

Lane1. CAV-2 amplified by primers EGFP-S /EGFP-X; Lane2. DL 2000 Marker ; Lane3. rCAV-2 Δ E3-EGFP amplified by primersEGFP-S /EGFP-X; Lane4. rCAV-2 Δ E3-EGFP amplified by primers Δ E3-S/ Δ E3-X; Lane5. CAV-2amplified by primers Δ E3-S/ Δ E3-X.

2. 4 重组病毒的形态学鉴定

重组病毒接种在 MDCK 细胞 72h 后,出现细胞肿胀变圆、葡萄串样等典型的 CAV-2 样病变(图 3-14)。在电镜下可见腺病毒样病毒粒子(图 3-15)。病毒粒子呈正二十面体结构,病毒表面由五邻粒和六邻粒构成的衣壳,还可见到由壳粒构成的正三角形结构(图中箭头所示)。

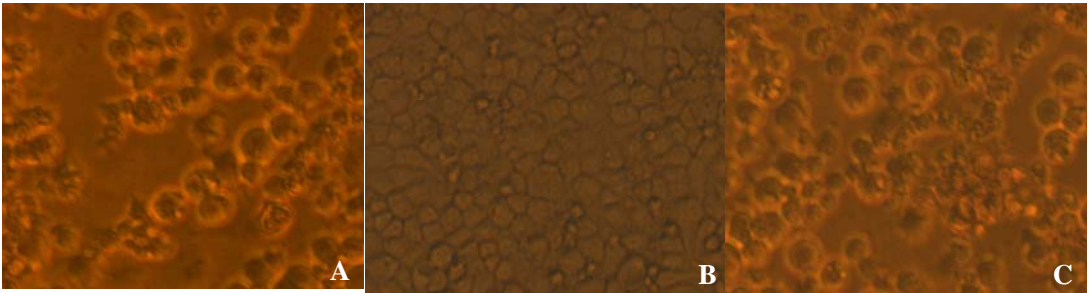
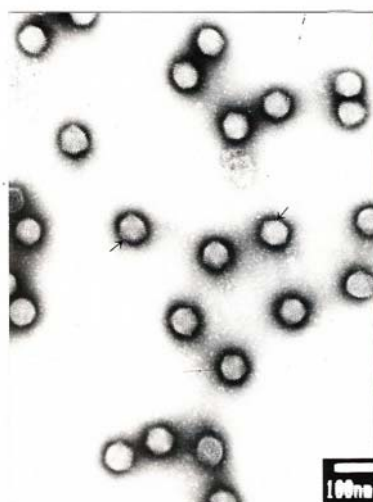


图 3-14 rCAV-2 Δ E3-EGFP 和 CAV-2 在 MDCK 细胞上形成的细胞病变(100 \times)

A. rCAV-2 Δ E3-EGFP 在 MDCK 细胞上形成的细胞病变; B. 正常的 MDCK 细胞; C. 亲本 CAV-2 在 MDCK 细胞上形成的细胞病变。

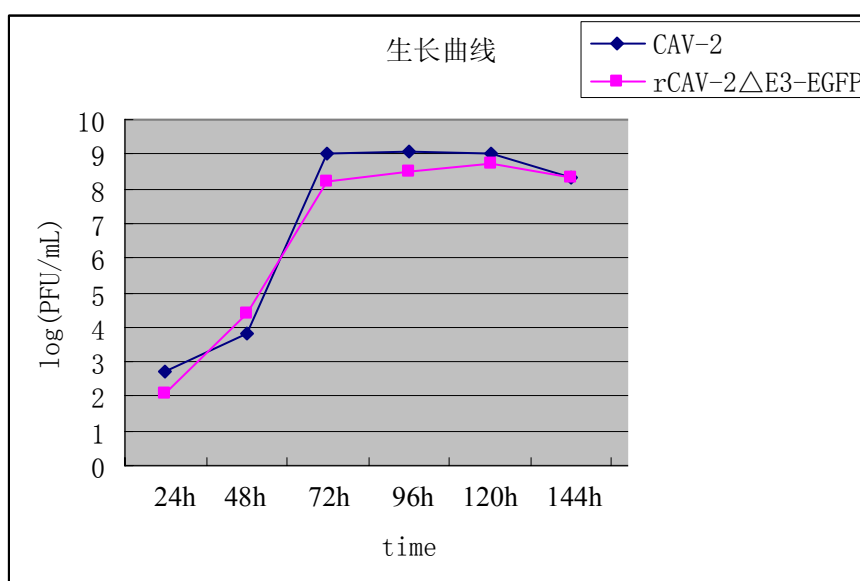
Fig. 3-14 CPE formed by rCAV-2 Δ E3-EGFP and CAV-2 in MDCK cells(100 \times)

A. CPE formed by rCAV-2 Δ E3-EGFP in MDCK cells; B. Normal MDCK cells; C. CPE formed by CAV-2 in MDCK cells.

图 3-15 电镜下观察到的重组病毒 rCAV-2 Δ E3-EGFPFig .3-15 E.M. of rCAV-2 Δ E3-EGFP

2.5 重组病毒的生长特性

将亲本病毒 CAV-2 和 rCAV-2 Δ E3-EGFP 分别以 10^6 PFU/mL 的剂量接种 MDCK 细胞，每隔 24h 测定病毒滴度，绘制生长曲线如图 3-16。从图中可以看出，CAV-2 和 rCAV-2 Δ E3-EGFP 生长曲线走势相似，从 24h 到 96h 期间病毒滴度不断升高，且二者的滴度相近；自 96h 以后达到平稳期，rCAV-2 Δ E3-EGFP 的滴度比 CAV-2 略低；120h 后病毒滴度有所下降。

图 3-16 rCAV-2 Δ E3-EGFP 的 MDCK 细胞生长曲线Fig.3-16 Growth kinetics of rCAV-2 Δ E3-EGFP and CAV-2 in MDCK cells

2.6 遗传稳定性检测

将纯化后的重组病毒 rCAV-2ΔE3-EGFP 连续传 15 代, 经测定每一代病毒的滴度相接近(见表 3-1)。选取第 5、10、15 代重组病毒进行 PCR 鉴定, 均只能扩增出特异性外源基因条带, 而 CAV-2 对照只能扩增出缺失的 E3 区基因 (图 3-17), 证明外源基因在传代过程中未丢失且无野生型病毒的污染。接种病毒 24h 后观察荧光结果显示 EGFP 在第 5、10、15 代重组病毒中均获得了表达 (3-18)。证实本实验所获得的重组病毒 rCAV-2ΔE3-EGFP 能够稳定表达外源基因。

表 3-1 rCAV-2ΔE3-EGFP 在 MDCK 细胞上传代后病毒滴度的变化
Table 3-1 Titer of series propagation rCAV-2ΔE3-EGFP in MDCK cell

代次	滴度 (PFU/mL)	代次	滴度 (PFU/mL)	代次	滴度 (PFU/mL)
1	5.2×10^8	6	5.0×10^8	11	6.1×10^8
2	4.7×10^8	7	5.6×10^8	12	5.2×10^8
3	6.0×10^8	8	5.2×10^8	13	4.9×10^8
4	4.1×10^8	9	5.6×10^8	14	6.9×10^8
5	5.6×10^8	10	6.4×10^8	15	5.7×10^8

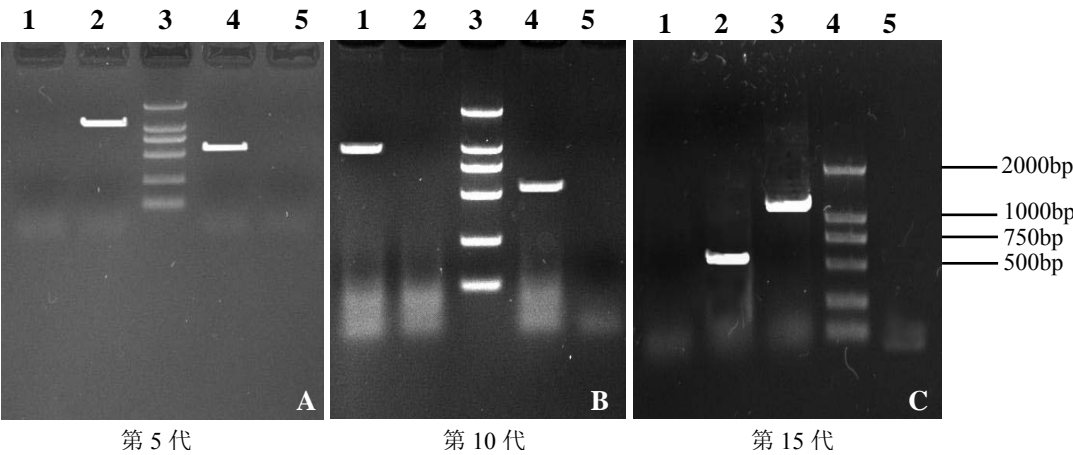


图 3-17 第 1-15 代 rCAV-2ΔE3-EGFP 的 PCR 鉴定

A1,B2,C5. 引物ΔE3-S/ΔE3-X 扩增 rCAV-2ΔE3-EGFP;

A2,B1,C3. 引物ΔE3-S/ΔE3-X 扩增 CAV-2;

A3,B3,C4. DL15000 Marker;

A4,B4,B2. 引物 EGFP-S /EGFP-X 扩增 rCAV-2ΔE3-EGFP;

A5,B5,C1. 引物 EGFP-S /EGFP-X 扩增 CAV-2。

Fig.3-17 Identification of rCAV-2ΔE3-EGFP from 1-15 passages by PCR

Lane A1,B2,C5. rCAV-2ΔE3-EGFP amplified by primers ΔE3-S/ΔE3-X;

Lane A2,B1,C3. CAV-2 amplified by primersΔE3-S/ΔE3-X;

Lane A3,B3,C4. DL15000 Marker;

Lane A4,B4,B2. rCAV-2ΔE3-EGFP amplified by primersEGFP-S /EGFP-X;

Lane A5,B5,C1. CAV-2 amplified by primersEGFP-S /EGFP-X.

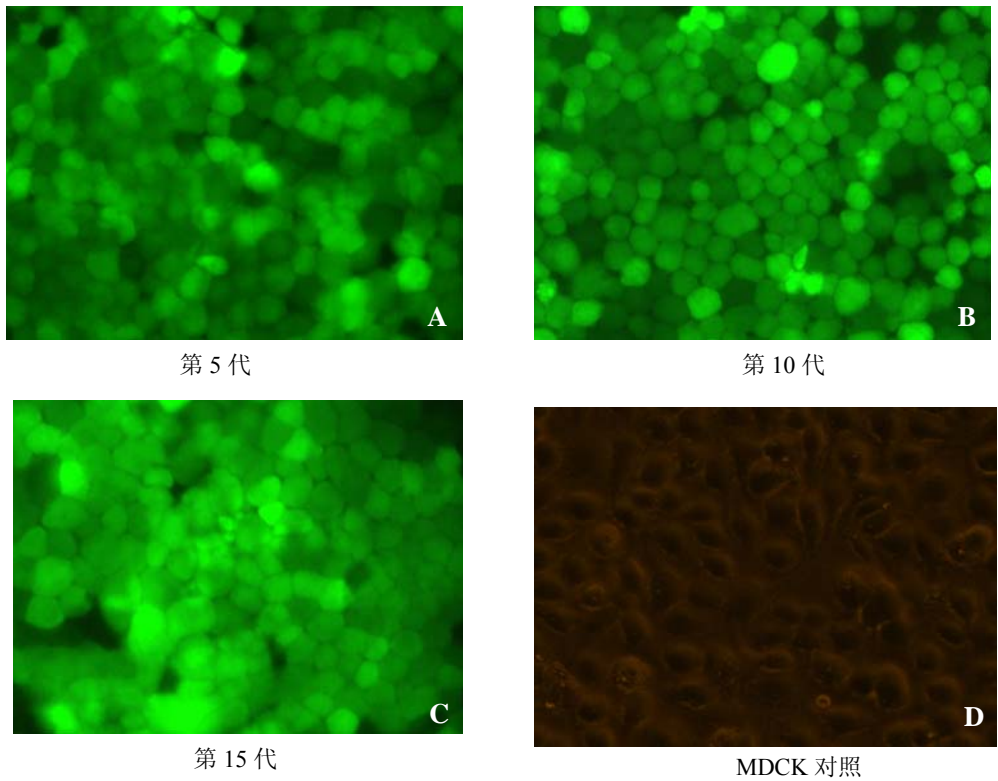


图 3-18 EGFP 在 rCAV-2 Δ E3-EGFP 中表达的稳定性检测 (100 \times)

Fig.3-18 Stability examination of EGFP expressed in rCAV-2 Δ E3-EGFP (100 \times)

2. 7 重组病毒的安全性评估

三组犬接种病毒后均无明显临床症状，3 周后剖检做病理切片。接种 CAV-2 犬、接种 rCAV-2 Δ E3-EGFP 犬与对照犬各组织器官病理变化的比较见表 3-2 及图 3-19。分析实验结果，接种 rCAV-2 Δ E3-EGFP 的犬组织无明显病变，仅个别组织出现淋巴细胞浸润，属正常免疫反应，说明 E3 区的缺失未使 CAV-2 的致病力增强。

表 3-2 试验犬接种亲本/重组病毒后病理变化的比较
Table 3-2 The pathologic symptom of dogs after inoculated CAV-2 or rCAV-2 Δ E3-EGFP

	接种 CAV-2 犬	接种 rCAV-2 Δ E3-EGFP 犬	对照犬
肝	— (图 3-19 A)	淋巴细胞浸润 (图 3-19 B)	(图 3-19 C)
肺	支气管内有红细胞和淋巴细胞浸润 (图 3-19 D)	肺泡内有蛋白析出并伴有淋巴细胞浸润 (图 3-19 E)	(图 3-19 F)
肠	小肠粘膜固有层淋巴细胞浸润 (图 3-19 G)	— (图 3-19H)	(图 3-19 I)

[^]注：表中—表示无明显病理变化

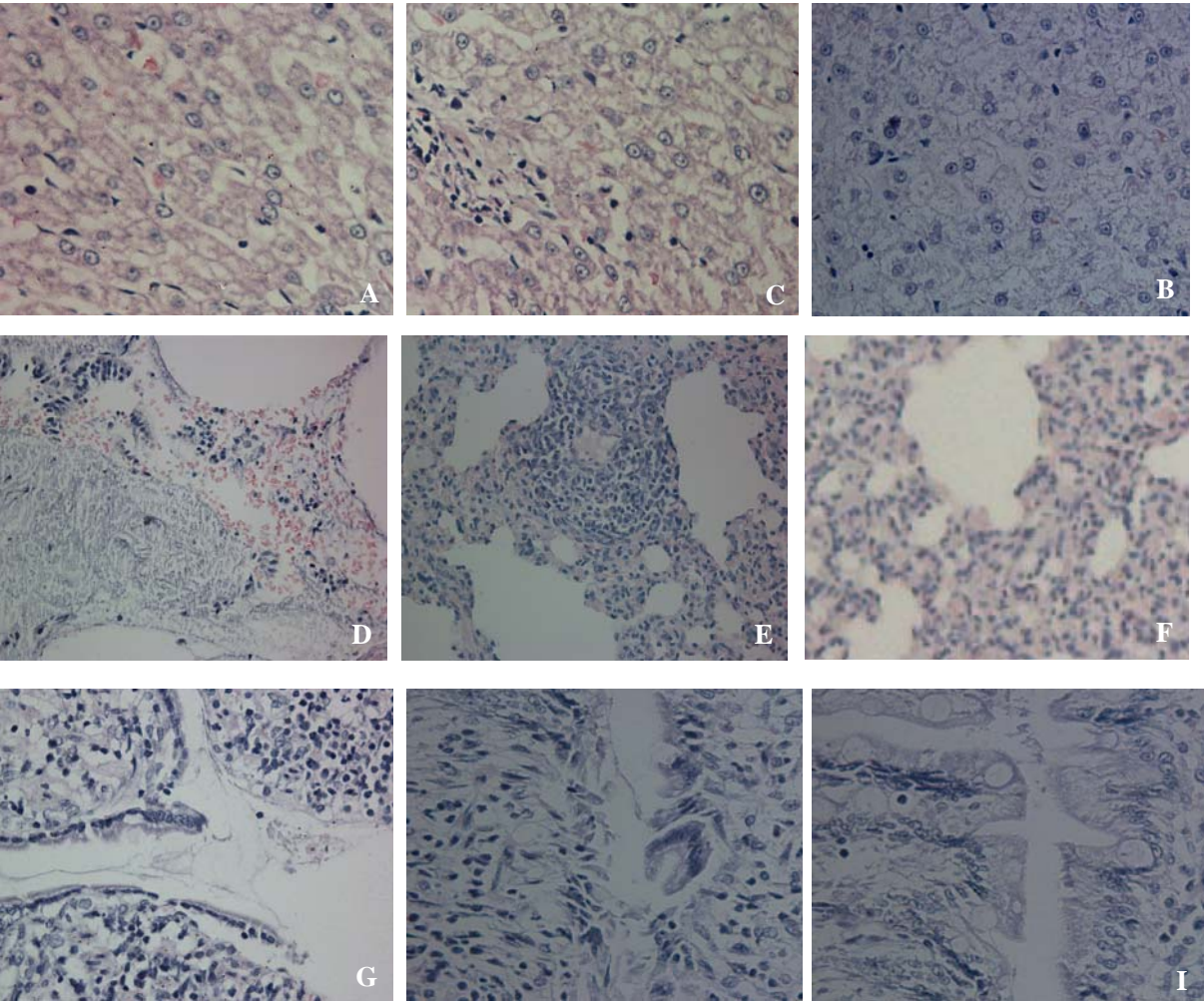


图 3-19 试验犬接种亲本/重组病毒后病理变化的比较 (40×)
Fig.3-19 The pathologic symptom of dogs after inoculated CAV-2 or rCAV-2 Δ E3-EGFP (40×)

3 讨论

3.1 关于 E3 区及其缺失后的容量

从理论上讲，重组腺病毒核衣壳 DNA 的容量只有野生型腺病毒 DNA 的 105%，即基因组大小为 31323bp 的 CAV-2 容纳外源基因的最大限度仅为 1560 bp 左右。在腺病毒早期研究中，人们发现腺病毒复制和包装所必需的顺式作用元件仅在病毒基因组两端，即反向末端重复序列和包装信号所在，加起来长度不到 1kb。这部分顺式作用元件称为病毒的最基本结构，除此之外的病毒基因组都可以被置换，其功能可用异位作用来补偿。腺病毒载体的构建策略通常为通过缺失基因组的部分区域而扩大插入外源基因容量，E3 区是腺病毒的基因组中最大的复制非必需区，因此在

E3 区(或缺失部分 E3 区序列)插入外源基因构建非依赖型可复制性重组活载体具有重大的研究价值和应用前景。

插入 E3 区的外源基因的转录受 E3 启动子或腺病毒 MLP 控制,一般不需要再加基因表达调控元件,且插入的外源基因与 E3 区和晚期转录同向,即从左向右才能高效表达。Johnson 等(1988)在 E3 区构建了 SV40 启动子控制下的 HSVgB 蛋白表达载体,在人源细胞系上感染重组病毒后 12~60h 都能表达 gB。转录分析发现 gB 基因直接受 MLP 和 E3 启动子控制,而 SV40 启动子被作为内含子,在 RNA 加工时被剪切掉。

Zakhartchouk 等(1998)构建了缺失完整 E3 区的 BAV3 病毒,将不含外源性启动子的全长或截短的 BHV-1 糖蛋白 gD 基因插入 BAV3 的 E3 区,并使之与 E3 区同向,感染 MDBK 细胞后 24h,用 SDS-PAGE 开始检测到 gD 的表达,且在感染 MDBK 细胞过程中一直持续表达。而在感染细胞中加入 DNA 合成抑制剂(AraC)时,gD 的表达降低,说明 gD 的表达部分由病毒 MLP 和 E3 启动子控制。与上述研究结果不同的是,Reddy 等(2002)首次将无任何调控序列的 GFP 基因分别插入 PAV3 不缺失 E3 区的 *Sac* I 和 *Snag* I 位点,并使之与 E3 转录方向一致,但仅能得到 GFP 基因插入 *Snag* I 位点的病毒,这说明 *Sac* I 位点所处的 E3 ORF 可能是病毒复制所需的。将无转录调控元件的 PRV gD 基因引入 E3 区缺失 595bp 的 PAV3 缺失 E3 区突变株后检测到,gD 的表达是一过性的,仅在感染后 12h 时能检测到,说明该区域的表达是暂时调控的。Rasmussen 等认为 CAV-2 如果完全缺失 E1 和 E3 区,理论上可插入 5.8kb 的外源 DNA 片段,但 E3 可缺失的最大极限还不十分清楚(1990),Fischer 等(2002)分别缺失了 CAV-2 E3 区 684 bp 和 1263 bp,所构建的载体均能使外源基因获得表达。邱微等(2003)构建了缺失 E3 区 1370 bp 表达载体,但外源基因的表达需要有外源启动子存在。本研究对 E3 区进行了最大限度的缺失,即缺失了 1412bp 的 E3 区片段,使 CAV-2 E3 区的容量增加到将近 3kb。为了保证外源基因的有效表达,我们在 E3 区启动子的下游同向加入了 hCMV IE 启动子,使外源基因同时受到两个启动子的控制。对于 E3 区的缺失,我们也采用了新的方法。在以往的研究中,一般需要通过多步 PCR 进行序列突变、酶切、连接用以缺失 E3 区。而我们在所选择的上、下游同源重组臂靠近缺失区域的一端引入相同的酶切位点,通过这两个片段之间的连接缺失掉了中间的 E3 区。与前人的研究相比,极大的减少了工作量。

3.2 关于报告基因的选择

为了筛选有外源基因插入的重组病毒,人们发展了与外源基因同时插入筛选标记基因的方法,常见的有抗生素基因、可提供病毒蚀斑颜色的报告基因等。报告基因的应用,大大减少了筛选病毒的工作量,但其中的报告基因又给重组疫苗的应用带来许多弊端,如携带抗生素基因的重组病毒免疫动物很可能会使动物机体产生抗药性;用携带大肠杆菌 *lacZ* 基因的重组病毒免疫动物也可能由于 *LacZ* 基因的表达而干扰重组病毒的免疫效果因为在自然界中的绝大多数动物体内都有抗大肠杆菌的免疫。EGFP 报告基因近年来被广泛用于体内外实验研究(Gedes *et al*, 1996; Tsien *et al*, 1998),表达的 EGFP 在紫外光激发下能发出绿色荧光,用荧光显微镜便可直接观察到,方便检测。另外 EGFP 可作为融合蛋白显示目的蛋白的表达而不影响目的蛋白的性质,对细胞也没有毒性作用(Liu *et al*, 1999)。CAV-2 的 E3 区只有 1521bp,尽管我们作了最大限度的缺失,但其包装容

量仍然有限,而源自质粒 pEGFP-N1 的 EGFP 只有 780bp,加上 hCMVIE 启动子、MCS 和 SV40 poly-A 信号仅 1600bp,这也是我们选用 EGFP 作报告基因主要原因。我们将质粒 pEGFP-N1 中所包括的各种表达元件按照与 E3 区转录相同的方向一并亚克隆至 E3 区缺失处,简化了载体构建的过程。

3.3 关于转染的方法

在转染时我们采用的方法是 CAV-2 亲本病毒先感染 MDCK 细胞再转染重组质粒 pUC- Δ E3-EGFP。这就需要用重组病毒进行多次纯化用以去除亲本 CAV-2 的污染。之所以采用这种方法是因为在本实验中很难像构建重组人腺病毒那样,用酶切过的病毒 DNA 和质粒 DNA 共转染获得重组病毒,原因首先是 MDCK 细胞不像 293 细胞那样具有较高的转染和重组效率,其次我们所用的 CAV-2 为弱毒株,感染力及毒力均有减弱,其 DNA 的转染能力自然不高。Klonjowski 等 (1997) 在构建 CAV-2 E1 缺失载体时就曾遇到上述问题。

3.4 关于重组病毒的筛选

重组病毒的筛选是本实验的难点。我们用重组质粒转染 CAV-2 亲本病毒感染后的 MDCK 细胞病变后而用收获的病毒液再次感染细胞则发现视野中仅有极少量的荧光。这说明亲本病毒与 pUC- Δ E3-EGFP 质粒的在细胞内发生同源重组的效率并不高,我们所收获的病毒大多为亲本病毒,我们曾尝试直接通过蚀斑筛选重组病毒,而事实证明这是很难办到的。对此我们所采用的办法是用记号笔将在荧光显微镜下观察到绿色荧光聚集的位置各自圈在尽量小的范围内,将余下的细胞刮除。用收获的细胞培养物再次感染细胞,如此反复多次,直至被感染的大部分细胞在视野中均能呈现绿色荧光,则表示重组病毒已成为优势病毒,这时再用蚀斑筛选重组病毒就很容易了。

3.5 关于重组病毒生物学特性的鉴定

我们对 rCAV-2 Δ E3-EGFP 进行了生物学特性研究,发现 rCAV-2 Δ E3-EGFP 的毒力和生长特性与亲代毒株都很相似。将 rCAV-2 Δ E3-EGFP 在 MDCK 细胞上连续传 15 代,每代病毒的滴度相近且 EGFP 基因能够在 rCAV-2 Δ E3-EGFP 中稳定表达。这对于重组病毒而言至关重要,若外源基因表达不稳定、在传代过程中丢失,将直接影响到重组病毒作为活疫苗载体的可行性。

目前,CAV-2 E3 区基因编码产物的功能尚不清楚,但 40.7 kDa 蛋白与 HAd-2 E3 区编码的 gp19 kDa 蛋白具有相似结构 (Tommy *et al*, 1992)。gp19 kDa 与病毒逃避机体免疫反应的作用有关,理论上缺失 gp19 kDa 蛋白基因的腺病毒可能更易被机体排斥,其毒力更低,但事实上其致病力明显增强 (Tatsis *et al*, 2004)。本实验所用的 CAV-2 毒株是从国外进口的疫苗中分离得到的,其安全、稳定并具有良好的免疫原性,为了验证缺失 E3 区是否能使其毒力发生改变,我们用相同剂量的 CAV-2 和 rCAV-2 Δ E3-EGFP 接种犬,观察三周未见明显临床症状。病理结果显示与正常犬相对比,

接种两种病毒的犬均无明显的病理变化，接种rCAV-2 Δ E3-EGFP的犬的肝、肺淋巴浸润略有增强，接种CAV-2犬的小肠小肠粘膜固有层有大量淋巴细胞浸润，而rCAV-2 Δ E3-EGFP接种犬则无该现象，以上均属于正常的免疫反应。表明E3区的缺失未使病毒的致病力发生明显改变，本研究所获得的重组病毒具有较好的安全性。

本研究成功构建了 E3 区缺失的重组 CAV-2 转移载体并获得了纯化的含有 EGFP 报告基因的重组 CAV-2，对其克隆纯化方法进行了优化，经鉴定该重组病毒生物学特性稳定，安全性好，为进一步开展 CAV-2 活载体疫苗研制及相关基础研究提供了技术平台。

实验三 犬瘟热病毒 A 株 F 和 H 蛋白在重组犬腺病毒中的表达

摘要：本研究利用 RT-PCR 扩增得到了犬瘟热病毒 (CDV) A 株的融合蛋白基因 (F) 和血凝蛋白基因 (H)，对其进行序列分析后将 F 和 H 基因分别用 *Bgl*II 和 *Not* I 双酶切后，定向插入到载体 pUC- Δ E3-EGFP 中，替代了 EGFP 基因，构建了重组转移载体 pUC- Δ E3-F 和 pUC- Δ E3-H。以 rCAV-2 Δ E3-EGFP 作为亲本病毒感染 MDCK 细胞，通过数次反向蚀斑筛选得到了分别携带 F 和 H 基因的 2 株重组 CAV-2，即 rCAV-2 Δ E3-F 和 rCAV-2 Δ E3-H。间接免疫荧光及 Western blot 试验表明 CDV F、H 基因在重组病毒中获得了表达并具有良好的反应原性，为下一步犬腺病毒与犬瘟热重组活载体二联疫苗的研究奠定了基础。

关键词：犬瘟热，融合蛋白基因，血凝蛋白基因，重组犬腺病毒，重组载体疫苗

犬瘟热(Canine Distemper, CD)是由犬瘟热病毒(Canine Distemper Virus, CDV)感染犬或其它食肉目动物所引起的急性、高度接触性传染病。临床上以双相热，红疹，结膜炎，白细胞减少及中枢神经系统损害为主要特征。该病自 1905 年首次报道以来，现已传至许多国家和地区，几乎呈世界性分布，是当前养犬业、毛皮动物养殖业及野生动物保护业威胁最大的疫病之一，犬、貂、狐等动物发病，死亡率达 30~80%，雪貂高达 100%，一旦暴发，经济损失惨重。犬瘟热病毒的宿主谱广泛，在自然条件下可感染的动物分布于哺乳纲真兽下纲食肉目所有 8 个科；研究发现其宿主谱有不断扩大的趋势，偶蹄目猪科、灵长目猕猴属、鳍足目海豹科的动物也有发生犬瘟热病的报道，Mee 等 (1993) 从患 Paget's 慢性骨病的病人组织中检测出犬瘟热核酸，推测 CDV 很可能是继狂犬病之后的第二种人畜共患病。目前各国均有犬瘟热发病率升高的趋势，并且临床症状也呈现多样化。疫苗免疫是防制犬瘟热的主要手段，灭活苗由于只能激发机体低水平的体液免疫而逐渐被淘汰；目前应用最为广泛是弱毒苗，但由于母源抗体干扰，宿主谱扩大，毒株可能发生变异，一过性免疫抑制等影响因素导致免疫失败常有发生 (Gemma *et al*, 1995, 1996; Blixenkrone-moll *et al*, 1993) 因此研究新型疫苗具有重要意义。

腺病毒为载体的重组活疫苗，不仅刺激机体产生系统免疫而且还产生良好的局部粘膜免疫，可对抗母源抗体的干扰，且可通过多种途径传播，口服、点眼、滴鼻、气雾和注射均引起病毒感染，给疫苗应用提供了方便，特别适用于动物的群体免疫。因此选用腺病毒作载体进行活载体重组疫苗的研究是有实用意义的。CAV-2 以犬为天然宿主，常用作弱毒疫苗用于犬传染性肝炎和犬传染性喉气管炎的预防，本研究拟将 CDV 中能够刺激机体产生中和抗体的两种主要的免疫原性蛋白 F 及 H 的编码基因插入表达载体 pUC- Δ E3-EGFP 中，用以构建表达 CDV-F 和 CDV-H 的重组 CAV-2，为研制能够同时预防犬传染性肝炎、犬传染性喉气管炎和犬瘟热病的重组活载体疫苗奠定基础。

1 材料及方法

1.1 病毒和细胞

重组 2 型犬腺病毒 rCAV-2 Δ E3-EGFP 由实验二构建，犬瘟热病毒 A 株种毒由哈尔滨兽医研究所经济动物研究室提供，在鸡胚成纤维细胞上增殖培养；MDCK 细胞由本实验室保存。

1.2 质粒

表达载体 pUC- Δ E3-EGFP 由实验二构建。

1.3 主要试剂

TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司 DEPC, LA Taq、限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Not* I、IPTG、NC 膜均购自 TaKaRa 公司；蛋白分子量标准购自 Fermentas 公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗犬 IgG、FITC 标记的兔抗犬 IgG 荧光抗体购自 KPL 公司，其它试剂同实验二。

1.4 SPF 鸡胚

由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

1.5 犬瘟热病毒的增殖

取 9~11 日龄的 SPF 鸡胚，先后用碘酒棉和酒精棉消毒气室部位，无菌取鸡胚，弃去头、四肢和内脏，剪成约 2mm 大小的组织块；用 Hank's 液洗涤组织块，去除污血后，以 5mL/胚的比例加入 0.25%胰酶溶液，放置在 37℃水浴中消化 15min；倒掉胰酶，用 Hank's 液洗涤 2~3 次后加入适当的含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液，分散细胞，用 6 层纱布过滤，制成 $10^6 \sim 10^7$ 个/ml 的细胞悬液，分散于细胞培养瓶中，制成鸡胚成纤维细胞（Chicken embryo fibroblast, CEF）待细胞长成单层后，弃去培养基，用 PBS 洗涤细胞以去除残留血清。取 A 株 CDV 种毒 1: 100 倍稀释后取少量接种细胞，37℃吸附 1h，加入 DMEM 维持液，继续培养至细胞病变完全，收获细胞培养物反复冻融 3 次后于 -70℃保存备用。

1.6 RT-PCR 引物设计

参照已发表的 CDV F 和 H 基因序列, 分别设计了用于分段扩增 F 基因的两对引物 F1U/F1L 和 F2U/F2L; 及用于扩增 H 基因的引物 HU/HL, 由上海生物工程公司合成。合成后所有上游引物均采用 DEPC 处理的灭菌水溶解。

F1U: 5'AGAAGGCAGATCATTATCGGAC 3'

F1L: 5'CATCTCTGCCCCAACTAATTAC 3'

F2U: 5' GAT GTG AAT TAG TTG GGC AGA GA 3'

F2L: 5' TGT TGG ACT ACC TGA GCC CTA A 3'

HU: 5' TAG GGC TCA GGT AGT CCA RCA AT3'

HL: 5' GTA TAC GGC CTA AAT CTT CGA CA3'

1.7 病毒基因组 RNA 的提取

参照 TRIzol Reagent 的说明书进行, 具体步骤如下: 取病毒悬液约 200uL 加入 1mL 的 TRIzol 裂解液, 颠倒混匀室温放置 5min, 加入 200uL 氯仿盖紧 EP 管用振荡 15S, 室温放置 2~3 min, 4℃ 12000rpm 离心 15min, 小心吸出上清加入等量的异丙醇混匀后于室温放置 10 min, 4℃ 12000rpm 离心 15min, 弃上清, 沉淀用 75%乙醇洗涤后真空干燥, 用 DEPC 水重悬, 紫外分光光度计测定 RNA 的浓度及纯度, 立即反转录或-70℃保存。

1.8 反转录

在 DEPC 处理的 EP 管里配置反应液, 模板 RNA 3μL, Random Primer 1μL (25pmol/μL) 混匀后置于 70℃ 5min, 于冰上依次加入以下组分: M-MLV × 5 Reaction Buffer 5μL, dNTP Mixture (10mmol/L) 4μL, Ribonuclease Inhibitor 1μL, M-MLV 1μL, 加灭菌 DEPC 水定容至 25μL, 37℃作用 1h, 70℃ 10min 后冰浴 2min, 所得的 cDNA 模板用于 PCR 扩增反应。

1.9 目的基因的 PCR 扩增

取上述反转录产物为模板 50μL 反应体系依次加入 TaKaRa LA Taq (5u/μL) 1μL, 10×LA pCRTM Buffer II (Mg²⁺ Plus) 10μL, 上游引物 (10 mM) 2μL、下游引物 (10 mM) 2μL、dNTP (各 2.5mM) 8μL、模板 3μL。PCR 反应参数为: 95℃预变性 3min, 94℃ 30S, 60℃ (F1) /55℃ (F2) /58℃ (H) 2min, 30 个循环, 72℃延伸 10min。取 5μL PCR 产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定条带大小正确后将 PCR 产物送英杰生物公司测序。

1.10 序列分析

选择GenBank中几种标准疫苗株Onderstepoort (AF378705)、Lederle株 (AF164967)、Convac(Z35493) 及从不同国家分离到的具有代表性的野毒株 5408P(AY86316)、11103B(DQ494319)、012689(AY649446)、A75/17(AF164947)、GN(EF445054)、SC01(EF)、Yanaka(AB028914)、5VD(AY297454)、HM6(AB040768)、MS01(DQ922630)、ZD01(EF445051)、NM(EF445053)、982645(AY542312)、25259(AY964114)、002601(AY395984)等与A株的F、H基因进行了核苷酸及氨基酸序列的比对。

1.11 重组转移载体的构建

通过对上述 PCR 产物基因测序结果的分析, 设计 2 对引物 rF-U/rF-L 和 rH-U/ rH-L 分别用于扩增包括完整阅读框的 CDV-F 和 CDV-H。在两条上游引物的 5'端均引入了 *Bgl* II 酶切位点, 两条下游引物的 5'端均引入了 *Not* I 酶切位点, 引物序列(斜线部分为酶切位点)如下:

rF-U: 5' CCC AGA TCT CCC CAT GCA CAA GGA AAT 3'

rF-L: 5' ATA GCG GCC GCT TAT TGC AGT TGA GTG AC 3'

rH-U: 5' CCC AGA TCT CGC AAT GCT CTC CTA CCA AGA C 3'

rH-L: 5' AAA GCG GCC GCT AGT GGT CAC ATG AGA ATC 3'

提取 A 株 CDV 基因组 RNA, 分别以 rF-U/ rF-L、rH-U/ rH-L 为引物经 RT-PCR 扩增了 CDV-H 及 CDV-F。两目的片段用 *Bgl* II 和 *Not* I 消化后, 分别与经过同样处理的 pUC- Δ E3-EGFP 载体连接, 用插入的外源基因替换了绿色荧光蛋白基因, 鉴定连接正确的质粒分别命名为 pUC- Δ E3-F、。重组表达质粒的构建过程如图 4-1 所示

1.12 重组病毒的筛选

MDCK 细胞在六孔板中培养至单层, 以每孔 10^7 PFU 的剂量接种重组病毒 rCAV-2 Δ E3-EGFP, 每孔 200 μ L 吸附 1h 后弃去感染液, 磷酸钙转染法(具体操作同实验二)分别转染纯化的重组质粒 pUC- Δ E3-F、pUC- Δ E3-H。待细胞病变完全后收取病毒液继续接种 MDCK 细胞, 在荧光显微镜下筛选无绿色荧光的蚀斑, 经多次蚀斑纯化直至用筛选到的重组病毒感染细胞后在荧光显微镜下观察不到绿色荧光为止, 将筛选到的重组病毒分别命名为 rCAV-2 Δ E3-F 和 rCAV-2 Δ E3-H, 扩大培养后-70℃保存。

1.13 重组病毒的 PCR 鉴定

SDS-蛋白酶 K 法(同实验一)提取重组病毒 rCAV-2 Δ E3-F 和 rCAV-2 Δ E3-H 的核酸 DNA, 分别用 rF-U/rF-L 和 rH-U/ rH-L 做 PCR 鉴定, 验证 F 和 H 基因是否重组到 rCAV-2 Δ E3-EGFP 的

基因组中，用引物 EGFP-S /EGFP-X 做 PCR 鉴定检验重组病毒的纯化是否完全。

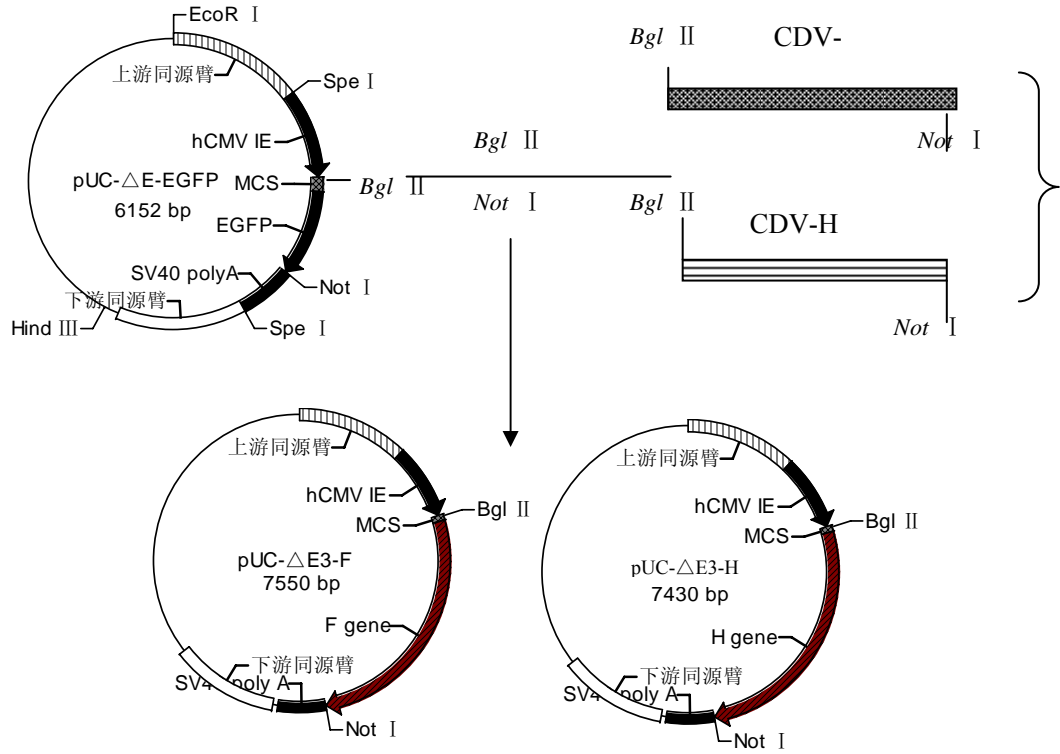


图 4-1 重组转移载体 pUC-ΔE3-F 和 pUC-ΔE3-H 的构建流程

Fig. 4-1 Flowchart for construction of the recombinant transfer vector pUC-ΔE3-F and pUC-ΔE3-H

1. 14 间接免疫荧光鉴定

将重组病毒 rCAV-2ΔE3-F 和 rCAV-2ΔE3-H 感染后的 MDCK 细胞分别用 0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA 消化；PBS 洗涤，2000rpm 离心 5min，将吹打均匀的细胞滴在载玻片上，自然干燥；冷丙酮固定 5-10min 后，自然干燥；用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min；CDV 单因子阳性血清用 PBS 稀释 100 倍，滴加在载玻片上，37℃作用 45min；载玻片用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min，用去离子水洗涤一次，自然干燥；取 FITC 标记的兔抗犬 IgG 荧光抗体用的 PBS 稀释到工作浓度，滴加在载玻片上，37℃作用 45min；用 PBS 洗涤 3 次，用去离子水脱盐后，自然干燥；滴加碱性甘油，加盖玻片，置于荧光显微镜下观察。

1. 15 Western blot 分析

用重组病毒rCAV-2ΔE3-F和rCAV-2ΔE3-H分别感染MDCK细胞待细胞病变完全，刮取细胞作为检测样品。加入等体积的2XSDS电泳上样缓冲液置于沸水中煮沸10min。处理好的样品进行10%凝胶SDS-PAGE蛋白电泳，具体操作按分子克隆实验指南（第二版）进行。

将6张滤纸和硝酸纤维素(NC)膜剪成与凝胶同样大小，在转移缓冲液中浸泡5min，按3张滤纸、

NC膜、PAGE凝胶、3张滤纸的顺序依次叠放在一起，按NC膜侧在阳极、凝胶侧在阴极将其放入转移槽中稳流（40mA）转印2h。转印结束将NC膜放入封口袋中，加入封闭液4℃封闭过夜。然后用PBST（0.05% Tween 20）洗涤三次，每次3~5min，加入用封闭液配制的1:100倍稀释的CDV多克隆抗血清，37℃感作1h，弃去一抗，用PBST洗3次，每次10min。然后加入用PBST稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗犬IgG，37℃感作1h，再用PBST漂洗3次后显色，待出现明显的条带时去离子水终止显色反应。

2 结果

2.1 F 和 H 基因的扩增结果

提取的病毒基因组 RNA 经反转录后用特异性引物 F1U/F1L 和 F2U/F2L 分别扩增了约 1200bp 和 1500bp 的两个片段（图 4-2）； HU/HL 扩增后得到了约 1900bp 的片段，与预期大小一致（图 4-3）。

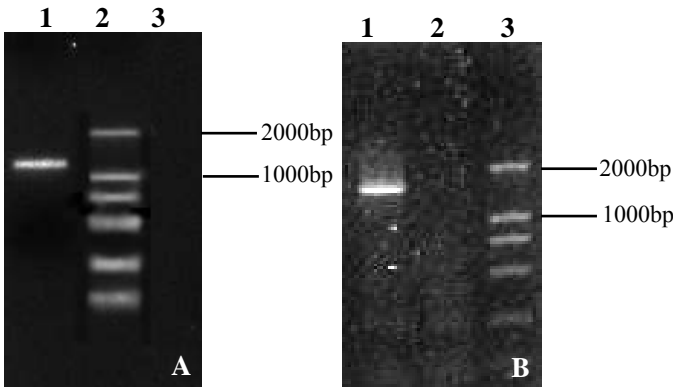


图 4-2 CDV F 基因的扩增

- A : 1. F1 基因的 PCR 扩增结果；
2. DL2000 Marker；
3. 阴性对照。
- B: 1. F2 基因的 PCR 扩增结果；
2. 阴性对照；
3. DL 2000 Marker。

Fig. 4-2 Amplification of F gene of CDV

- A : Lane1. PCR product of F1gene;
Lane2. DL2000 Marker;
Lane3. Negative control.
- B : Lane1. PCR product of F2gene;
Lane2. Negative control;
Lane3. DL2000 Marker.

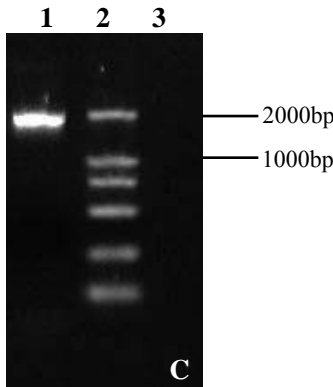


图 4-3 CDV H 基因的扩增

1. H 基因的 PCR 扩增结果；
2. DL 2000 Marker；
3. 阴性对照。

Fig. 4-3 Amplification of H gene of CDV

- Lane1. PCR product of H gene;
Lane2. DL2000 Marker;
Lane3. Negative control.

2.2 F 和 H 基因的核苷酸及推导的氨基酸序列分析

对 PCR 产物的测序结果进行了分析, A 株 CDV 的 F 基因编码框全长 1989bp, 共编码 662 个氨基酸残基, 与其它毒株进行比较发现 A 株 CDV 的 F 基因与标准疫苗株 Onderstepoort 的核苷酸及氨基酸序列同源性最高, 分别为 97% 和 96.4%。与另外 8 株的核苷酸同源性在 96.6%~91.6% 之间, 氨基酸同源性在 94.9%~89.8% 之间。H 基因编码框全长 1824bp, 共编码 607 个氨基酸残基, 与其它毒株进行了序列比较发现 A 株 H 基因与 Lederle 株 Onderstepoort 株序列同源性较高, 核苷酸同源性分别为 98.8% 和 96.6%; 氨基酸同源性分别为 97.5% 和 95.4%, 与其余毒株的核苷酸及氨基酸同源性分别在 90% 和 89% 以上。

```

1      ATGCACAAGGAAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCACACACATACCCAACAAAACCGCCCC
1      M H K E I P K S S K T H T H T Q Q N R P
61     CCACAACCCAGCACCAGCGACCCGACGAGACCAGGACCTCCCGAGCAGCAGACAGCATAACG
21     P Q P S T G P D E T R T S R A R H S I T
121    TCAGCTCAGCGATCCACGAACATATGATCCTCGAATTTGGACAGACCCGTCTCTACACC
41     S A Q R S T N Y D P R T L D R P V S Y T
181    ATGAACAGGACCAGGTCTCGCAAGCAAATCAGCTACAGATTGGAGAACATCTCAGTTAC
61     M N R T R S R K Q I S Y R L E N I S V H
241    GGAAACCACGAGGCTATTATCCAGCACATGCCAGAGAGTGTCTCCAAAGGAGCGAGATCC
81     G N H E A I I Q H M P E S V S K G A R S
301    CAGATCGAAAGGCGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCAGTGCTCCTGGTTAGTC
101    Q I E R R Q P N A I N S G S Q C S W L V
361    CTGTGGTGCCTCGGAATAGCCGGTCTCTTTCTTTGTTCCAAGGCTCAGATACATTGGAAT
121    L W C L G I A G L F L C S K A Q I H W N
421    AATTTGTCAACTATTGGGATTATTGGGACTGATAGTGCCATTATAAGATCATGGCTAGG
141    N L S T I G I I G T D S V H Y K I M A R
481    CCCAGTCACCACTACTTGGTCATAAACTGATGCCTAATGTTTCACTTATAGATAATTGT
161    P S H Q Y L V I K L M P N V S L I D N C
541    ACCAAAGCAGAATTAGGTGAGTATGAGAAATTATTGAATTCAGTCCTCGAACCAATCAAC
181    T K A E L G E Y E K L L N S V L E P I N
601    CAAGCTCTGACTCTAATGACCAAGAATGTGAAGCCCTTGACAGTCATTAGGGTCAGTAGG
201    Q A L T L M T K N V K P L Q S L G S A R
661    AGACAAAGGCGTTTTGCAGGAGTGGTACTTGACAGGTGCAGCTTTAGGAGTGCTACAGCT
221    R Q R R F A G V V L A G A A L G V A T A
721    GCACAAATCACTGCAGGAATAGCTTTACATCAATCCAACCTCAATGCTCAAGCAATCCAA
241    A Q I T A G I A L H Q S N L N A Q A I Q
781    TCTCTTAGAACCGCCTTGAACAGTCTAACAAGCTATTGAAGAAATTAGGGAGGCTACC
261    S L R T S L E Q S N K A I E E I R E A T

```

841 CAAGAAACCGTCATTGCCGTTCAAGGAGTCCAGGATTACGTTAACAACGAACCTCGTCCCT
281 Q E T V I A V Q G V Q D Y V N N E L V P
901 GCTATGCAACATATGTCATGTGAATTAGTTGGGCAGAGATTAGGGTTAAACTGCTTAGG
301 A M Q H M S C E L V G Q R L G L K L L R
961 TATTATACTGAGTTATTGTCAATATTTGGCCCGAGTTTACGTGACCCTATTTAGCCGAG
321 Y Y T E L L S I F G P S L R D P I S A E
1021 ATATCAATTCAAGCACTGAGTTATGCTCTTGGAGGAGAAATTCATAAGATACTTGAGAAG
341 I S I Q A L S Y A L G G E I H K I L E K
1081 TTGGGATACTCTGGAGGTGATATGATTGCAATCTTGGAGAGTCGGGGGATAAAACAAAA
361 L G Y S G G D M I A I L E S R G I K T K
1141 ATAACCTCATGTTGATATTCCCGGAAATTCATCATCCTAAGTATCTCATACCCAACCTTA
381 I T H V D I P G K F I I L S I S Y P T L
1201 TCAGAAGTCAAGGGGGTTATAGTCCACAGACTGGAAGCAGTTTCTTACAACATAGGATCA
401 S E V K G V I V H R L E A V S Y N I G S
1261 CAAGAGTGGTACACCACTGTCCCGAGGTATATTGCAACTAATGGTTACTTAATATCTAAT
421 Q E W Y T T V P R Y I A T N G Y L I S N
1321 TTTGATGAGTCATCCTGTGTATTCTGCTCAGAGTCAGCCATTTGTAGCCAGAACTCCCTG
441 F D E S S C V F V S E S A I C S Q N S L
1381 TACCCCATGAGCCCACTCTTACAACAATGTATTAGGGGCGACACTTCATCTGTGCCCGG
461 Y P M S P L L Q Q C I R G D T S S C A R
1441 ACCTTGGTATCTGGGACTATGGGCAACAAATTTATTCTGTCAAAGGTAACATCGTCGCA
481 T L V S G T M G N K F I L S K G N I V A
1501 AATTGTGCGTCTATACTATGTAAGTGTATAGCACAAGCACAATTATTAATCAGAGTCCT
501 N C A S I L C K C Y S T S T I I N Q S P
1561 GATAAGTTGCTGACATTCATTGCCTCCGATACCTGCCCACTGGTTGAAATAGATGGTGTA
521 D K L L T F I A S D T C P L V E I D G V
1621 ACTATCCAAGTTGGAGGCAGGCAATACCCTGATATGGTATATGAAAGCAAAGTTGCCTTA
541 T I Q V G G R Q Y P D M V Y E S K V A L
1681 GGCCCTGCTATATCACTTGAGAGGTTAGATGTAGGTACAAATTTAGGGAACGCCCTAAG
561 G P A I S L E R L D V G T N L G N A L K
1741 AAAGTGGATGATGCTAAGGTACTGATAGACTCCTCTAACCAGATCCTTGAGACAGTTAGG
581 K L D D A K V L I D S S N Q I L E T V R
1801 CGCTCTCCTTTAATTTTGGCAGTCTCCTCAGCGTTCCTATATTAAGTGGTACAGCCCTG
601 R S S F N F G S L L S V P I L S G T A L
1861 GCTTTGCTGTTGCTGATTTACTGTTGTAAAAGACGCTACCAACAGACACTCAAGCGGAAT
621 A L L L L I Y C C K R R Y Q Q T L K R N
1921 ACTAAGGTCGATCCGGCATTAAACCTGATCTAACCAGAACTTCGAAATCCTATGTGAGA
641 T K V D P A F K P D L T G T S K S Y V R

1981 TCACTCTGA
661 S L *

图4-4 CDV A株F 基因的核苷酸及推测的氨基酸序列

Fig. 4-4 Nucleotide and deduced amino acid sequences of F gene of CDV A strain

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1		94.5	93.6	92.6	91.7	93.3	93.6	97.0	92.9	98.2	1
2	5.8		95.8	96.1	93.1	95.1	95.8	93.8	96.7	93.8	2
3	6.8	4.3		97.1	93.4	95.3	100.0	93.3	97.6	93.8	3
4	7.9	4.0	3.0		93.9	96.0	97.1	92.1	99.3	92.4	4
5	8.9	7.4	7.0	6.5		94.9	93.4	91.6	94.5	91.4	5
6	7.1	5.1	4.9	4.2	5.3		95.3	93.1	96.6	92.9	6
7	6.8	4.3	0.0	3.0	7.0	4.9		93.3	97.6	93.8	7
8	3.1	6.5	7.1	8.5	9.1	7.3	7.1		92.4	96.6	8
9	7.6	3.4	2.5	0.7	5.8	3.5	2.5	8.1		92.8	9
10	1.8	6.6	6.6	8.1	9.3	7.6	6.6	3.5	7.7		10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

Onderstepoort
002601
5408P
012689
19876
25259
982645
A
A75/17
MS01

图4-5 CDVA株F基因与其它毒株的核苷酸序列的比较

Fig. 4-5 Comparison of nucleotide sequences of CDV F between A strain and other strains

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1		92.6	92.8	91.9	90.7	93.1	92.8	96.4	92.0	97.9	1
2	7.8		94.9	97.0	92.2	95.0	94.9	91.7	97.1	91.7	2
3	7.6	5.3		96.1	91.9	93.8	100.0	91.9	96.2	92.6	3
4	8.6	3.1	4.0		93.5	95.9	96.1	90.5	99.8	91.0	4
5	10.0	8.3	8.6	6.8		94.1	91.9	89.8	93.7	90.1	5
6	7.3	5.1	6.5	4.2	6.1		93.8	92.2	96.1	91.9	6
7	7.6	5.3	0.0	4.0	8.6	6.5		91.9	96.2	92.6	7
8	3.7	8.8	8.6	10.2	11.0	8.3	8.6		90.7	94.9	8
9	8.5	2.9	3.9	0.2	6.6	4.0	3.9	10.0		91.1	9
10	2.1	8.8	7.8	9.7	10.7	8.6	7.8	5.3	9.5		10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

Onderstepoort
002601
5408P
012689
19876
25259
982645
A
A75/17
MS01

图4-6 CDVA株F基因与其它毒株的氨基酸序列的比较

Fig. 4-6 Comparison of amino acid sequences of CDV F gene between A strain and other strains

1 ATGCTCTCCTACCAAGACAAGGTGGGTGCCTTCTACAAGGACAATGCAAGAGCCAATTCA
1 M L S Y Q D K V G A F Y K D N A R A N S
61 TCCAAGCTGTCCCCAGTGACAGAAGAGCATGGGGGCAGGAGACCACCTTATTGTGTGTTT
21 S K L S P V T E E H G G R R P P Y L L F
121 GTCCTTCTCATCCTATTGGTTGGAATCCTGGCCCTGCTTGCTATCACTGGAGTTCGATTT
41 V L L I L L V G I L A L L A I T G V R F

181 CACCAAGTATCAACTAGCAATATGGAATTTAGCAGATTGCTGAAAGAGGATATGGAGAAA
61 H Q V S T S N M E F S R L L K E D M E K
241 TCAGAGGCCGTACATCATCAAGTCATAGATGCCTTGACACCGCTCTCAAGATTATTGGG
81 S E A V H H Q V I D A L T P L F K I I G
301 GATGAGATTGGGTTACGGTTGCCACAAAAGCTAAACGAGATCAAACAATTTATCCTTCAA
101 D E I G L R L P Q K L N E I K Q F I L Q
361 AAGACAAATTTCTTCAATCCGAACAGAGAATTCGATTTCCGCGATCTCCACTGGTGCATT
121 K T N F F N P N R E F D F R D L H W C I
421 AACCCGCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTACAAATTACTGTGAGACAATTGGGATCAGA
141 N P P S K V K V N F T N Y C E T I G I R
481 AAATCTATTGCATCGGCAGCAAATCCCATCCTTTTATCAGCCCTCTCTGGGGGCAGGAGT
161 K S I A S A A N P I L L S A L S G G R S
541 GACATATTTCCACCATAACAGATGCAGTGGAGCTACTACTTCAGTAGGCAAAGTTTTCCCC
181 D I F P P Y R C S G A T T S V G K V F P
601 CTATCAGTCTCGTTATCCATGTCTTTGATCTCAAGAACCTCAGAGATAATCAATATGCTG
201 L S V S L S M S L I S R T S E I I N M L
661 ACCGCTACCTCAGACGGCGTGTACGGCAAACTTACTTGCTAGTGCCTGATGATATAGAA
221 T A T S D G V Y G K T Y L L V P D D I E
721 CGGGAGTTCGACACTCAAGAGATTCGAGTCTTTGAAATAGGGTTCATTAAGGTGGCTG
241 R E F D T Q E I R V F E I G F I K R W L
781 AATGACATGCCATTACTCCAAACAACCACTATATGGTCCTCCCGAGAATTCCAAAGCC
261 N D M P L L Q T T N Y M V L P E N S K A
841 AAGGTATGTACCATAGCAGTGGGTGAGTTGACACTGGCTTCCTTGTGTAGAGAAGAGAGC
281 K V C T I A V G E L T L A S L C V E E S
901 ACTGTATTATTATACCATGACAGCAGGGGTTACAAGATGGTATTCTAGTAGTGACACTG
301 T V L L Y H D S R G S Q D G I L V V T L
961 GGGATATTTGGGGCAACACCTATGGATCATATTGAGGAAGTGATACCTGTCGCTCACCCA
321 G I F G A T P M D H I E E V I P V A H P
1021 TCAATGGAGAAAATACATATAACAAACCACCGTGGTTTTATAAAGATTCAATTGCAACC
341 S M E K I H I T N H R G F I K D S I A T
1081 TGGATGGTGCCTGCCCTGGCCTCTGAGAAACAAGAACAACAAAAGGTTGGCTGGAGTCA
361 W M V P A L A S E K Q E E Q K G W L E S
1141 GCTTGTCAAAGAAAAACCTACCCCATGTGCAACCAACGTCATGGGAACCTTCGGAGGA
381 A C Q R K T Y P M C N Q T S W E P F G G
1201 GGACAGTTGCCATCTTATGGGCGGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTGACCTTCAA
401 G Q L P S Y G R L T L P L D A S V D L Q
1261 CTTAACATATCGTTCACATACGGTCCGTTTACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTAT
421 L N I S F T Y G P V I L N G D G M D Y Y

1321 GAAAGCCCACTTTTGAACCTCCGGATGGCTTACCATTCTCTCTAAAAACGGAACAATCTTT
441 E S P L L N S G W L T I P P K N G T I F
1381 GGATTGATAAAACAAAGCAAGTAGAGGAGACCAGTTCCTGTGATACCCCAAGTATTAACA
461 G L I N K A S R G D Q F T V I P Q V L T
1441 TTTGCGCCAGGGAATCATGTGGAATGTTATTACCTATTCAAACATCTCAAACATA
481 F A P R E S C G N C Y L P I Q T S Q T I
1501 GATAGAGATGTCCTCATCGAGTCCAATGTAGTGGTGTGCCTACACAGAGTTTAGATAT
501 D R D V L I E S N V V V L P T Q S F R Y
1561 GTCATAGCAACGTATGATATATCACGAAATGATCATGCGATTGTTATTATGTTTATGAC
521 V I A T Y D I S R N D H A I V Y Y V Y D
1621 CCAATCCGGACGATTCTTATACGCACCCATTTAGACTAACTACCAAGGGTAGACCTGAT
541 P I R T I S Y T H P F R L T T K G R P D
1681 TTCCTAAGGATTGAATGTTTTGTGTGGGATGATAATTTGTGGTGCACCAATTTTACAGA
561 F L R I E C F V W D D N L W C H Q F Y R
1741 TACGAGGCTAACATCGCCAACCTCTACAACCAGTGTGAGAATTTAGTCCGTATAAGATTC
581 Y E A N I A N S T T S V E N L V R I R F
1801 TCATGTGACCACAATCTCTCGTGA
601 S C D H N L S *

图4-7 CDV A株H基因的核苷酸及推测的氨基酸序列

Fig. 4-7 Nucleotide and deduced amino acid sequences of H gene of CDV A strain

Percent Identity																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1		92.9	95.2	94.8	93.6	95.6	91.2	98.3	90.6	92.5	91.3	97.7	97.9	91.3	99.9	97.3	1
2	7.6		94.2	93.9	92.8	94.6	91.3	92.9	90.4	98.8	91.1	92.6	93.2	91.5	92.8	93.3	2
3	5.0	6.1		98.6	95.7	97.4	92.5	95.2	91.7	94.1	92.4	95.1	95.6	92.8	95.1	95.7	3
4	5.4	6.5	1.4		95.0	97.1	92.2	94.8	91.3	93.8	92.1	94.7	95.2	92.4	94.7	95.2	4
5	6.7	7.6	4.5	5.2		96.7	91.3	93.3	90.2	92.7	90.9	93.5	93.9	91.5	93.5	93.9	5
6	4.6	5.7	2.7	3.0	3.4		92.8	95.5	91.8	94.4	92.5	95.4	95.9	93.0	95.5	95.9	6
7	9.4	9.4	8.0	8.3	9.4	7.6		91.2	96.4	91.3	97.1	91.0	91.5	98.7	91.1	91.4	7
8	1.7	7.6	5.0	5.4	7.1	4.7	9.4		90.5	92.5	91.2	97.9	98.1	91.3	98.3	97.5	8
9	10.1	10.4	8.9	9.3	10.6	8.8	3.7	10.3		90.5	98.8	90.1	90.6	96.6	90.5	90.8	9
10	7.9	1.2	6.2	6.5	7.8	5.9	9.4	8.0	10.3		91.2	92.3	92.8	91.5	92.4	92.9	10
11	9.3	9.6	8.1	8.5	9.8	8.0	3.0	9.4	1.2	9.5		90.8	91.3	97.2	91.2	91.5	11
12	2.3	7.9	5.1	5.6	6.9	4.8	9.8	2.2	10.7	8.2	9.9		98.0	91.0	97.7	97.4	12
13	2.2	7.2	4.6	5.0	6.5	4.3	9.2	1.9	10.1	7.6	9.3	2.1		91.4	97.9	97.9	13
14	9.4	9.2	7.7	8.1	9.2	7.4	1.3	9.4	3.5	9.2	2.9	9.7	9.2		91.2	91.5	14
15	0.1	7.7	5.1	5.6	6.8	4.7	9.6	1.7	10.2	8.1	9.4	2.3	2.2	9.5		97.3	15
16	2.8	7.2	4.4	5.0	6.4	4.2	9.3	2.5	9.9	7.6	9.1	2.7	2.2	9.2	2.8		16
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	

ZD01

5VD

5408P

11103B

012689

A75/17

Convac

GN

A

HM6

Lederle

MS01

NM

Onderstepoort

SC01

Yanaka

图4-8 CDV A株H基因与其它毒株的核苷酸序列的比较

Fig. 4-8 Comparison of nucleotide sequences of CDV H between A strain and other strains

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1		93.4	95.2	95.2	92.8	96.1	90.1	98.0	90.1	92.9	91.4	97.9	98.4	90.5	99.7	97.7	1
2	6.7		93.8	93.8	91.8	94.2	89.5	92.9	89.1	98.5	90.3	93.1	93.6	90.1	93.3	93.3	2
3	4.8	6.4		98.5	94.2	97.0	91.0	94.7	91.1	93.1	92.3	94.9	95.4	91.6	95.1	95.1	3
4	4.8	6.4	1.3		93.9	97.4	91.0	94.7	91.1	93.4	92.3	94.9	95.4	91.6	95.1	95.1	4
5	7.5	8.6	5.8	6.2		95.1	89.0	92.3	88.8	91.1	90.0	92.6	93.4	89.3	92.8	92.8	5
6	3.9	5.8	2.9	2.5	4.9		91.8	95.2	91.8	93.9	92.9	95.7	96.2	92.3	95.9	95.9	6
7	10.4	11.2	9.5	9.5	11.8	8.6		90.1	94.6	89.1	95.7	89.8	90.3	97.4	90.0	90.3	7
8	1.8	7.3	5.3	5.3	8.0	4.8	10.4		89.8	92.3	91.1	97.7	98.2	90.5	98.2	97.5	8
9	10.4	11.6	9.3	9.3	12.0	8.6	5.5	10.8		89.0	97.5	89.8	90.3	95.4	90.0	90.3	9
10	7.3	1.3	7.1	6.7	9.3	6.2	11.6	8.0	11.8		90.3	92.4	92.9	89.8	92.8	92.6	10
11	8.9	10.2	8.0	8.0	10.6	7.3	4.2	9.3	2.3	10.2		91.1	91.6	96.2	91.3	91.6	11
12	2.0	7.1	5.1	5.1	7.6	4.2	10.8	2.2	10.8	7.8	9.3		98.4	90.1	98.0	97.7	12
13	1.5	6.5	4.6	4.6	6.7	3.7	10.2	1.7	10.2	7.3	8.7	1.5		90.6	98.5	98.5	13
14	9.9	10.3	8.6	8.6	11.2	7.8	2.3	9.9	4.4	10.6	3.6	10.3	9.7		90.3	90.6	14
15	0.2	6.9	4.9	4.9	7.5	4.1	10.6	1.7	10.6	7.5	9.1	1.8	1.3	10.1		97.9	15
16	2.2	6.9	4.9	4.9	7.5	4.1	10.2	2.3	10.2	7.6	8.7	2.2	1.3	9.7	2.0		16
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	

ZD01

5VD

5408P

11103B

012689

A75/17

Convac

GN

A

HM6

Lederle

MS01

NM

Onderstepoort

SC01

Yanaka

图4-9 CDV A株H基因与其它毒株的氨基酸序列的比较

Fig.4-9 Comparison of amino acid sequences of CDV H between A strain and other strains

2.3 转移载体的构建

将扩增得到的 F、H 基因片段用 *Bgl* II 和 *Not* I 消化后,分别与经过同样处理的 pUC- Δ E3-EGFP 载体连接,构建了重组质粒 pUC- Δ E3-F 和 pUC- Δ E3-H。对重组质粒分别作 *Bgl* II 单酶切鉴定, *Bgl* II 和 *Not* I 双酶切鉴定所得到条带均与理论上的大小相一致(图 4-10, 图 4-11)。

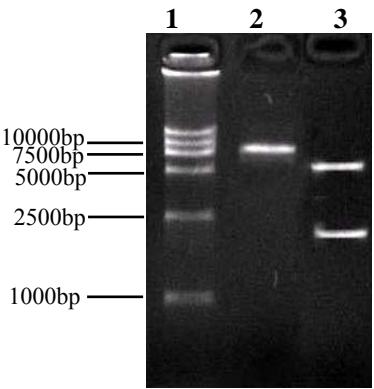
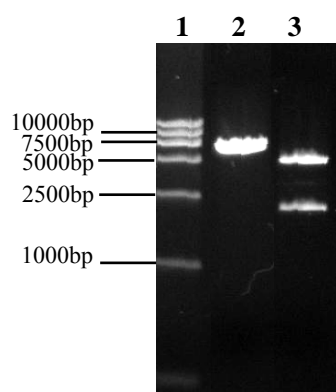


图 4-10 pUC- Δ E3-F 的酶切鉴定

- 1.DL15000 Marker;
2. *Bgl* II 酶切结果 (7550bp);
3. *Bgl* II/*Not* I 酶切结果 (5546bp+2004bp)。

Fig. 4-10 Indification of plasmid pUC- Δ E3-F by digestion with restriction endonucleases

- Lane1.DL 15000 Marker;
- Lane2. pUC- Δ E3-F digested with *Bgl* II (7550bp);
- Lane3. pUC- Δ E3-F digested with *Bgl* II/*Not* I (5546bp+2004bp).

图 4-11 pUC- Δ E3-H 的酶切鉴定

1.DL15000 Marker;

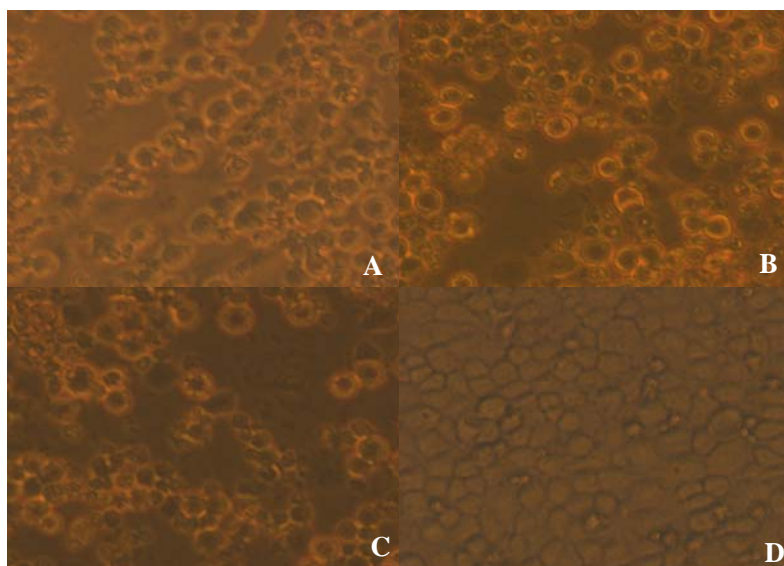
2. *Bgl* II 酶切结果 (7430bp);3. *Bgl* II/*Not* I 酶切结果 (5592bp+1838bp)。Fig. 4-11 Indification of plasmid pUC- Δ E3-H by digestion with restriction endonucleases

Lane1.DL 15000 Marker;

Lane2. pUC- Δ E3-H digested with *Bgl* II (7430bp);Lane3. pUC- Δ E3-H digested with *Bgl* II / *Not* I (5592bp+1838bp).

2.4 重组病毒的筛选及 PCR 鉴定

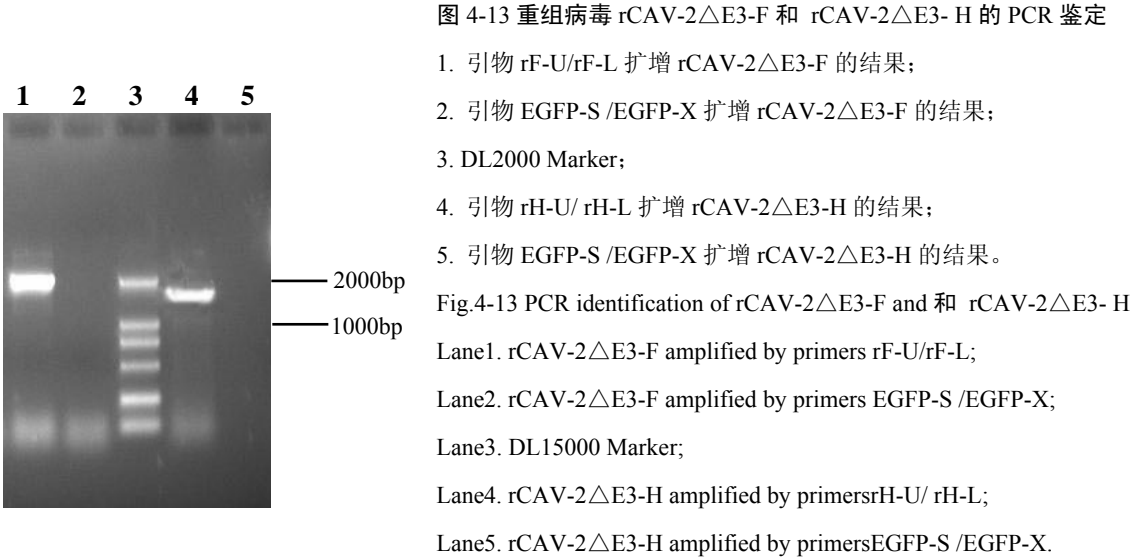
用纯化的重组质粒 pUC- Δ E3-F、pUC- Δ E3-H 分别转染 rCAV-2 Δ E3-EGFP 感染的 MDCK 细胞,病变完全后收取病毒液继续接种 MDCK 细胞,在荧光显微镜下筛选无绿色荧光的蚀斑,经多次蚀斑纯化直至用筛选到的单一克隆株感染细胞后在荧光显微镜下观察不到绿色荧光并能够形成典型的 CAV-2 样细胞病变为止(图 4-12),将筛选到的两株单一克隆重组病毒分别命名为 rCAV-2 Δ E3-F 和 rCAV-2 Δ E3-H。用引物 rF-U/rF-L 和 rH-U/ rH-L 对所筛选到的两种单一克隆株进行了 PCR 扩增,结果为阳性,而引物 EGFP-S /EGFP-X 扩增的结果为阴性(图 4-13)

图 4-12 rCAV-2 Δ E3-F 和 rCAV-2 Δ E3-H 在 MDCK 细胞上形成的细胞病变 (100 \times)A.rCAV-2 Δ E3-F 在 MDCK 上形成的 CPE; B. rCAV-2 Δ E3-H 在 MDCK 上形成的 CPE;

C. CAV-2 在 MDCK 上形成的 CPE; D.正常的 MDCK 细胞。

Fig. 4-12 CPE formed by rCAV-2 Δ E3-F and rCAV-2 Δ E3-H (100 \times)A.CPE formed by rCAV-2 Δ E3-F; B.CPE formed by rCAV-2 Δ E3-H; C. CPE formed by CAV-2;

D. Normal MDCK cells;



2.5 间接免疫荧光检测

间接免疫荧光结果（见图 4-14）证实 F 及 H 基因在重组病毒中均获得了表达。

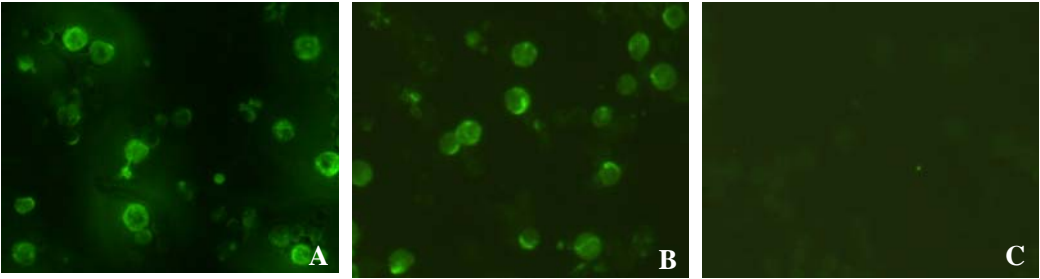


图 4-14 重组病毒在 MDCK 细胞上的间接免疫荧光 (100 \times)

A. rCAV-2 Δ E3-F; B. rCAV-2 Δ E3-H; C.MDCK 细胞。

Fig.4-14 Detection of rCAV-2 Δ E3-F and rCAV-2 Δ E3-H by indirect immunofluorescence test in MDCKcells (100 \times)

A. rCAV-2 Δ E3-F; B. rCAV-2 Δ E3-H; C. MDCK cells.

2.6 Western blot 分析

将重组病毒 rCAV-2 Δ E3-F 和 rCAV-2 Δ E3-H 分别接种 MDCK 细胞,待细胞病变达 80%以上时,刮取病变细胞作为检测样品进行 Western Blot,以 CAV-2 接种的 MDCK 细胞作对照。结果在 rCAV-2 Δ E3-F 的细胞培养物中检测到大小约为 43kDa 和 20kDa 的蛋白,与 F1、F2 蛋白大小一致;在 rCAV-2 Δ E3-H 的细胞培养物中检测到大小约为 68kDa 的蛋白,与 H 蛋白大小相一致;证明 F 及 H 蛋白在重组病毒中均获得了表达,并具有抗原反应原性(图 4-15, 图 4-16)

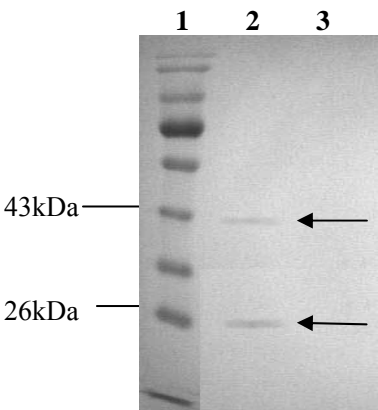


图 4-15 rCAV-2 Δ E3-F 的 Western blot 分析

- 1. 蛋白分子量标准;
- 2. rCAV-2 Δ E3-F 接种的 MDCK 细胞;
- 3. CAV-2 接种的 MDCK 细胞。

Fig.4-15 Western blot analysis of rCAV-2 Δ E3-F

- Lane1. Protein molecular weight standards;
- Lane2. MDCK cells infected by rCAV-2 Δ E3-F
- Lane3. MDCK cells infected by CAV-2.

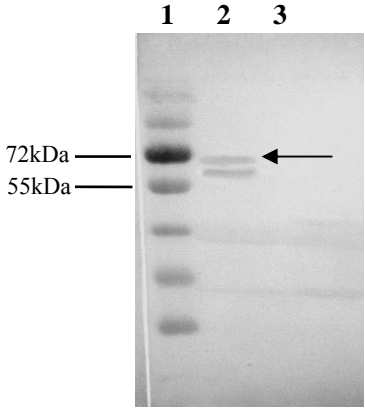


图 4-16 rCAV-2 Δ E3-H 的 Western blot 分析

- 1. 蛋白分子量标准;
- 2. rCAV-2 Δ E3-H 接种的 MDCK 细胞;
- 3. CAV-2 接种的 MDCK 细胞。

Fig.4-16 Western-blot analysis of rCAV-2 Δ E3-H

- Lane1. Protein molecular weight standards;
- Lane2. MDCK cells infected by rCAV-2 Δ E3-H;
- Lane3. MDCK cells infected by CAV-2.

3 讨论

CDV呈世界性分布，易感宿主范围广，且可在大量不相关的动物物种中进行种间传播，消灭犬瘟热是一件难以实现的事情（Barrett *et al*, 1999），如何有效的预防CD的一直是该病研究的焦点。从上世纪五十年代全球范围内开始使用减毒的活疫苗后，大大降低了其发病率。然而随着疫苗的应用也发现其存在着许多不足，它可引起免疫抑制和中枢神经的损害。此外，犬瘟热病毒的宿主谱日趋扩大，可引起许多陆栖和水生野生动物的发病和死亡，因此即使对犬安全的活疫苗，也有可能给这些群体带来灭顶之灾，加上由于疫苗使用不当、不完全免疫，或者在强大的免疫压力下，野毒株的抗原发生了某些改变，从而造成了世界各地犬瘟热爆发的报道（Johnson *et al*, 1995; Gemma *et al*, 1996; Ek-kommonen *et al*, 1997）。于是人们开始致力于研制安全高效的新型CDV疫苗。由于活载体疫苗成本低，接近常规弱毒疫苗，真实再现外源基因编码蛋白的抗原性，可激发细胞免疫、体液免疫因此具有很高的研究及应用价值。国外已有重组犬瘟热病毒重组活载体疫苗的相关报道，其中以痘病毒为载体的疫苗研究较多，但痘病毒宿主广泛，存在潜在的安全性问题，金丝痘病毒因安全性较好而更为人们所青睐，Stephensers（1997）将CDV的H，F基因插入痘病毒弱毒株NYVAC和金丝雀痘病毒弱毒株ALVAC株构建重组疫苗，接种幼貂能耐受强毒攻击。在美国，犬瘟热金丝雀痘病毒载体活疫苗已批准上市。腺病毒最近又有报道采用犬腺病毒为载体的重组犬瘟热病毒疫苗，从而达到双重免疫的效果。腺病毒也是一种比较受推崇的疫苗载体，本研究选取CAV-2作为CD重组疫苗的载体除了因其具备腺病毒载体的基本优点外，还有几下两个主要原

因：其一，CAV-2对CAV-1能够起到完全交叉保护能力，因此预防犬瘟热的同时能预防由CAV-1引起的犬传染性肝炎及CAV-2引起的犬传染性喉气管炎，起到多价疫苗的作用；其二，CAV-2不但能诱导机体产生细胞免疫和体液免疫，还能诱导局部粘膜免疫，能抵抗母源抗体，使机体产生对外源蛋白的主动免疫（Gallichan *et al*, 1999; Papp *et al*, 1997），因此可以对刚出生的幼犬实施免疫。

CDV病毒的结构蛋白主要有核衣蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质膜蛋白(M)、融合蛋白(F)、附着蛋白(H)，其中F、H为分布在囊膜表面的两种糖蛋白，囊膜糖蛋白为宿主免疫识别的主要靶抗原，是病毒的吸附和侵入宿主细胞过程中必不可少的。其中F蛋白是融合过程中所必需的，它所诱导的免疫反应能阻止病毒进一步侵染，并在病毒增殖的情况下对症状的发生具有一定的抑制作用。纯化的F蛋白免疫犬可免受致死量的CDV攻击（Blixenkron-Moller *et al*, 1992）。H蛋白是CDV与细胞受体结合的蛋白，决定着病毒的细胞嗜性，与F蛋白一起介导了病毒感染细胞合胞体的形成，H蛋白上分布着许多中和抗体表位，是产生中和抗体的主要抗原。具有中和作用的抗H蛋白抗体和抑制细胞融合的抗F抗体，在抗CDV感染的机制中发挥着重要作用。因此，在构建病毒的亚单位疫苗或重组基因工程疫苗方面，主要以这两个蛋白作为切入点（Norrby *et al*, 1986; Viries *et al*, 1988; Stephenser *et al*, 1997; Pardo *et al*, 1997; Sixt *et al*, 1998; Cherpillod *et al*, 2000）

在实验二中我们所构建的重组载体pUC- Δ E3-EGFP缺失了E3区1412bp的片断，从理论上讲可使外源基因的容量扩增至3000bp，但所插入的hCMV IE启动子、多克隆位点，绿色荧光蛋白基因、SV40早期转录PolyA信号等元件又占用了约1600bp的容量，而CDV-F和CDV-H基因片断大小分别为1998, 1824bp,若将二者直接插入载体pUC- Δ E3-EGFP中则会超过CAV-2核衣壳的包装限度。对此我们所采取的措施是，去除pUC- Δ E3-EGFP中的EGFP基因，即分别用CDV-F和CDV-H基因取代EGFP基因。为了方便筛选，我们用筛选获得的遗传稳定表达绿色荧光蛋白的单一纯化重组病毒克隆株rCAV-2 Δ E3-EGFP作为亲本病毒感染MDCK细胞，使其基因组分别与重组质粒rCAV-2 Δ E3-F和rCAV-2 Δ E3-H发生细胞内同源重组。我们通过筛选无绿色荧光的蚀斑来筛选重组病毒。因此在实验二中获得的重组病毒rCAV-2 Δ E3-EGFP纯化是否完全直接影响到rCAV-2 Δ E3-F和rCAV-2 Δ E3-H的筛选。

本实验对筛选的重组病毒进行了Western-blot检测，在感染rCAV-2 Δ E3-F的细胞培养物检测到了大小约为40kDa和23kDa的两个蛋白。CDV F蛋白的阅读框架比较复杂，Von等(2004)的研究发现F基因编码的最初形式为一种短期存在的先导蛋白F0 (Pre F0)。Pre F0 切割产生的肽段称为Pre，它的半衰期大约30 min。CDV F 蛋白氨基端延伸区域(残基1~135) 是一段较典型的信号序列。麻疹病毒的F糖蛋白通过先导F0 蛋白的切割形成F1和F2 亚单位才发挥其融合作用，F0 在蛋白水解作用后形成F1 和F2 两个亚单位之前PreF0 被完整地切割了。人们对此进行了更进一步的研究。Zimmer等（2001）等研究显示了靠近膜的切割的发生和调节F蛋白的功能。首先，观察到了三种麻疹病毒的F蛋白大约一个胞外域被切割至细胞膜的附近。此过程发生在F0 切割形成F1和F2亚单位时，病毒粒子里包含F1a和F1b片段。在表达CDV 或腮腺炎病毒的F 蛋白的细胞中，检测到位于跨膜区和细胞浆的F1b片段。F蛋白翻译时利用的是位于461~463的第4个AUG,从起始密码子到757位核苷酸为F2蛋白编码基因，编码99个氨基酸，分子量为23kDa。从758至2071位核苷酸为F1蛋白编码基因，编码438个氨基酸，分子量为40kDa。因此可以断定，本实验在rCAV-2 Δ E3-F中所检测到的两特异性蛋白为F1和F2蛋白，未能够检测到F0蛋白，即F0蛋白的断裂比较完全，这与

Fischer(2002)同时在重组病毒中同时检测到了3条蛋白带的结论有所区别,推测这可能与病毒的收获时期有关。在对rCAV-2 Δ E3-H中重组H蛋白的检测中,我们得到了与预期大小相符的约67kDa的蛋白,但在其它的下方出现一条分子量略小于H蛋白的特异性条带,推测为病毒系统对重组蛋白加工、剪切的结果。本实验利用在实验二中已验证的能够稳定表达外源蛋白的E3区缺失的CAV-2载体构建了表达了A株CDV的F和H基因的重组病毒,经Western-blot检测所表达蛋白具有良好的免疫活性。所获得的两株重组毒能否对动物机体产生良好的保护效果还有待于动物试验证实。

实验四 犬瘟热间接 ELISA 诊断方法的建立

摘要: 参照 Genbank 中各株犬瘟热病毒(CDV)核衣壳蛋白(N)基因的核苷酸序列设计合成一对引物, RT-PCR 扩增了 CDVA 株的 N 基因, 经序列测定和分析后, 将其定向克隆于原核表达载体 pPROEX™ HTa 中, 将构建的重组质粒 pPROEX™ HTa-N 转化 Rosetta 感受态细胞, IPTG 诱导表达了分子量约 63kDa 的重组 N 蛋白, 经 Western blot 分析证实所表达的重组 N 蛋白具反应活性; 用纯化后的蛋白作为抗原, 建立了间接 ELISA 诊断方法, 经阻断试验、交叉反应试验、敏感性试验及与进口试剂盒 ELISA 方法的对比试验等结果证实该诊断方法具有良好的特异性、敏感性, 能够为我国在犬瘟热病流行病学调查及疫苗的免疫效果的监测等方面提供技术支持。

关键词: 犬瘟热病毒, 核衣壳蛋白, 原核表达, 间接 ELISA

犬瘟热(Canine Distemper, CD)是由犬瘟热病毒(Canine Distemper Virus, CDV)感染犬或其它食肉目动物所引起的急性、高度接触性传染病。本病以早期表现双相热、急性卡他性鼻炎、支气管炎并常发展为卡他性肺炎、通常伴发或以不定的神经症状为特点; 一些病犬可发生急性胃肠炎、皮肤有湿疹样病变或水泡和脓泡、鼻和足垫发生过度角化等症状。本病有广泛的宿主嗜性, 目前已分布于世界各地, 是危害犬及其它特种经济动物最严重的传染病之一。由于犬瘟热的临床表现呈现多样化, 常与犬的肝炎、疱疹病毒病、副流感和钩端螺旋体病相混淆, 给临床诊断和实验研究带来了一定困难。

CDV 属副粘病毒科麻疹病毒属成员, 为不分节段的单股负链 RNA 病毒, 其基因组共编码核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质膜蛋白(M)、大蛋白(L)、融合蛋白(F)和血凝蛋白(H) 6 个结构蛋白。其中 N 蛋白在结构上分为 3 个区, 即可变区 N 末端(17~159aa)、可变区 C 末端(408~519aa)和高度保守的中间区(160~407aa), 中间保守区是其结构和功能的核心部分。N 蛋白是保守性较强的免疫原性蛋白, 在病毒感染时能引起强烈的抗体反应, 尤其是在感染初期 H(血凝蛋白)和 F(融合蛋白)的特异性抗体低于检测水平时, N 蛋白的特异性抗体仍能被检出(Yoshida *et al*, 1998)是免疫学诊断用的最佳抗原。据报道, 在接种病毒 9h 后可检测到 N 蛋白 Yoshida 等(1999)构建了 OP-CDV 疫苗株一系列 N 蛋白缺失基因来研究 N 蛋白抗原表位, 结果表明 1-80 位和 337-358 位氨基酸残基是 N 蛋白诱发抗体的主要抗原表位。利用 N 蛋白的这一特性, 本研究利用原核表达系统表达了 A 株 CDV 的 N 基因并以重组蛋白为抗原建立了检测特异性 CDV 抗体的间接 ELISA 诊断方法。该方法特异性好, 操作简便快捷, 易于推广, 能够为我国在犬瘟热病大批量诊断、疫情监测、流行病学调查等方面提供技术支持; 而且还可用于疫苗的免疫效果的监测, 为完善免疫策略提供依据。

1 材料和方法

1.1 毒株

犬瘟热病毒 A 株种毒由哈尔滨兽医研究所经济动物研究室提供，由本实验室在鸡胚成纤维细胞上增殖后冻存。

1.2 质粒和感受态细胞

克隆载体 pMD18-T 购自大连 TaKaRa 公司；pPROEXTM HTa-N 载体、感受态细胞 Rosetta 均由本实验室保存。

1.3 主要试剂

TRIzol Reagent、ProBondTM 蛋白纯化试剂盒购自 Invitrogen 公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗犬 IgG 酶标抗体 KPL 产品，Tween-20 购自 Sigma 公司；限制性内切酶 *Hind* III、*Xba* I、溶菌酶、T4 DNA 连接酶、DEPC、IPTG、NC 膜均购自 TaKaRa 公司；96 孔可拆酶联板（高吸附型）购自深圳金灿华有限公司；核酸胶回收试剂盒购自上海华舜公司；进口犬瘟热 ELISA 诊断试剂盒购自 EVL。

1.4 血清

用犬细小病毒和犬瘟热病毒二联苗（Nobivac，批号：A003A01）对 3 月龄幼犬进行免疫（皮下注射），第 4 周进行二次免疫，再过 3 周后进行第三次免疫，每次免疫后第 1、2、3 周分别采血，检测每次采血样品，确定三免后第二周血清作为 ELISA 检测的标准阳性血清；波特氏杆菌、犬细小病毒、犬副粘病毒，犬腺病毒等阳性血清均由本室制备保存；现地送检血清来自于河北、黑龙江、广东等地。

1.5 RT-PCR 引物设计

根据 Genbank 中已知的 CDV 的核苷酸序列，设计一对扩增 N 基因的引物，序列如下：

上游引物：5'-AGAGTAATCAATATGGCAAGCCTTCTTAA-3'

下游引物：5'-GACTGGTCTTGAAGCTTTAATTGAGTAGC-3'

1.6 病毒基因组 RNA 的提取

参照 TRIzol Reagent 的说明书进行，具体操作同实验三。

1.7 反转录

反转录过程按反转录试剂盒说明书进行，具体操作同实验三。

1.8 N 基因的扩增

50 μ L 反应体系依次加入 TaKaRa LA Taq(5u/ μ L) 1 μ L, 10x LA pCRTM Buffer II (Mg²⁺ Plus) 10 μ L, 上游引物 (10 mM) 2 μ L、下游引物 (10 mM) 2 μ L dNTP(各 2.5mM) 8 μ L、模板 3 μ L。PCR 反应参数为: 95℃ 预热 8min, 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min40s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10min, PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.9 克隆载体的构建

将 PCR 产物胶回收后与 pMD18-T 载体连接, 转化感受态 E.coli DH5a 细胞, 于含有 IPTG、X-gal 和 Amp⁺ 的 LB 琼脂平板上挑取白色单菌落, LB 摇菌后经碱裂解法提取得到重组阳性质粒, 记为 pMD18-T-N。经酶切及 PCR 鉴定正确后送大连 TaKaRa 公司测序。

1.10 表达载体的构建

利用 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点同时对 pMD18-T-N 和 pPROEXTM HTa-N 载体质粒进行双酶切, 回收后用 T₄ DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 连接产物转化感受态细胞 Rosetta。提取质粒经酶切及 PCR 鉴定正确后将重组质粒命名为 pPROEXTM HTa-N。

1.11 N 基因的诱导表达

将含重组质粒的 Rosetta 于含 Amp⁺ 的 LB 培养基中 37℃ 振荡过夜。取过夜培养物以 1: 100 接种到新鲜的 LB 培养基中, 摇菌至 OD₆₀₀ 为 1.0 时加入诱导剂 IPTG 至终浓度 0.1mM, 于 37℃ 诱导过夜收获细菌, 离心后菌体用 PBS 重悬, 加入新鲜配置的溶菌酶至终浓度 0.05mg/mL 于 4℃ 作用 2h 后, 超声波裂解菌体。取上清和沉淀分别加入等体积的 2 × SDS 上样缓冲液煮沸 5min 后进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析结果。同时设诱导的含空载体菌作为对照。

1.12 重组 N 蛋白 Western blot 分析

表达的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转印到硝酸纤维素膜上, 和 CDV 标准阳性血清反应, 然后用辣根过氧化物酶标记的羊抗犬 IgG 反应后显色 (具体操作同实验三)。

1.13 重组 N 蛋白的纯化

将含有重组质粒 pPROEXTM HTa-N 的 Rosetta 菌种在含 100 μ g/mL Amp 的 2 \times YT 培养平板上划线, 37 $^{\circ}$ C 培养后 12~14 小时后, 挑取单个菌落至 3ml 2 \times YT 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。以 1%接种于新鲜的 400mL 2 \times YT 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养约 3h, 在细菌浓度达到 0.5~0.6mg/mL 时, 加入 0.6mmol/L 的 IPTG 继续培养 5h。8000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 弃上清, 沉淀用 PBS 洗涤一次后, 8000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 沉淀用 1/6 体积的 Native Binding Buffer 重悬, 加入溶菌酶至终浓度 0.05mg/mL, 冰浴 30min。超声波裂解至溶液清亮。8000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 取上清经 SDS 电泳分析蛋白表达后采用 ProBondTM Purification system 进行纯化。

将柱子垂直固定于合适的支架上, 用灭菌水洗二遍, 加入树脂, 静置使液体排干, 加入适量 PH8.0 Binding Buffer, 悬浮树脂, 重复洗涤 2 次。将蛋白上清液加到树脂中, 轻轻混匀, 作用 1 小时以上。轻轻排出液体, 加入 8mL PH8.0 Binding Buffer 颠倒混匀, 收集排出液体; 加入 10ml PH8.0 Wash Buffer a 颠倒混匀, 收集排出液体; 再加入 8mL PH8.0 Wash Buffer b 颠倒混匀, 洗 3 次或更多, 收集排出液体; 加入 10mL Elution Buffer, 收集排除液体; 将每步反应收集到的洗脱液各取少量进行 SDS-PAGE 分析结果。将纯化得到的蛋白测定浓度后, 加入等体积甘油, 小量分装于 -70 $^{\circ}$ C 保存。

1.14 犬瘟热重组 N 蛋白抗体间接 ELISA 检测方法的建立

1.14.1 间接 ELISA 反应基本程序

重组 N 蛋白用 0.05mol/L、pH9.6 碳酸盐缓冲液 (CBS) 按一定浓度比例稀释后加入到微孔反应板中, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 包被 4h, 用 PBST 洗涤反应板 4 次, 每次 3 分钟, 扣干; 加入封闭液每孔 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 作用 2.5h, 洗涤同前; 待检血清用 PBST 做适当稀释后每孔加入 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 洗涤同前; 加入适当稀释的酶标抗体每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 洗涤同前; 加入现配制的底物液, 37 $^{\circ}$ C 作用一定时间, 用 2M H₂SO₄ 终止反应; 每个样品每次平行 2 孔, 取其平均值。在酶标仪上测定 OD₄₅₀ 值, 并按下列公式计算 P/N 值:

$$P/N \text{ 值} = \text{阳性对照孔 OD}_{450} \text{ 均值} / \text{阴性对照孔 OD}_{450} \text{ 均值}$$

1.14.2 最佳抗原包被量和血清稀释度的确定

重组蛋白以不同稀释度包被, CDV 标准阳性血清、阴性血清分别做 1:100、1:200、1:400 倍稀释进行 ELISA 方阵试验, HRP-羊抗犬 IgG 以 1:2000 稀释度加入。结果判定以阴性血清 OD₄₅₀ 值小于 0.2, 阳性血清 OD₄₅₀ 值为 1.0 左右, P/N 值最大时的抗原包被量、血清稀释度为最佳工作浓度。

1.14.3 酶标抗体最佳工作浓度的确定

以最佳稀释度稀释抗原包被酶标板, 加入最佳稀释度的 CDV 阴、阳性血清作用 60 min, HRP-羊抗犬 IgG 以 1:1000~1:4000 稀释, 每个稀释度 4 个重复, 按间接 ELISA 程序测定。

1.14.4 待检血清最佳作用时间测定

其它条件不变, 将血清作用时间分别设定为 35、45、60、90min, 按间接 ELISA 程序测定。

1.14.5 酶标抗体最佳作用时间

经上述确定的条件不变, 将 HRP-羊抗犬 IgG 以最佳工作浓度加入酶标板, 37℃ 分别作用 25、45、60、120min, 按间接 ELISA 程序测定。

1.14.6 最佳封闭液的确定

其它条件不变, 分别以 8% 羊血清、6% 鱼明胶、1% 牛血清白蛋白和 10% 脱脂奶粉封闭, 比较封闭效果。

1.14.7 临界值的确定

选用 25 份经进口试剂盒检测为阴性的血清, 采用所建立的间接 ELISA 体系进行测定, 结果进行统计学分析。根据 $\text{Cut-off} = \text{平均值} (\bar{X}) + 3 \times \text{标准差} (\text{SD})$, 计算 cut-off 值。

1.14.8 与其它 ELISA 试剂盒的比对试验

用 rN 蛋白建立的间接 ELISA 诊断方法与进口的商品化 CDV 间接 ELISA 诊断试剂盒及本实验室制备的全病毒 ELISA 检测 40 份血清样品, 计算 S/P 值, 确定检测结果并进行比较。计算建立的诊断方法对全病毒抗体检测试剂盒和进口试剂盒的符合率。

符合率 = (自制试剂盒检测已知阳性血清中阳性份数 + 自制试剂盒检测已知阴性血清中阴性

血清份数)/(参照试剂盒检测阳性份数+参照试剂盒检测阴性份数)

1.14.9 特异性试验

1.14.9.1 交叉反应试验

在同一条件下用建立的 ELISA 反应程序测定波特氏杆菌、犬副粘病毒、犬细小病毒、犬腺病毒阳性血清，每种血清做 3 个重复，同时做阴阳性对照。

1.14.9.2 阻断试验

取 4 份阴性血清，9 份阳性血清与 CDV 病毒液 37℃ 作用 1h，同时设用 PBS 稀释血清的对照，按间接 ELISA 程序操作，计算 OD 值下降的百分率。

1.14.10 敏感性试验

1.14.10.1 最低抗体检出效价

选取单因子阳性血清在稀释 100 倍的基础上进行 2 倍比稀释，采用所建立的间接 ELISA 体系检测能够检出阳性结果的最高稀释度。

1.14.10.2 抗体消长曲线测定

用重组蛋白建立的 ELISA 方法及全病毒 ELISA 检测试验犬接种疫苗后不同时间的抗体水平。

1.14.11 现地试验

用建立的间接 ELISA 方法，检测 227 份送检的血清样品，计算样品 CDV 抗体阳性率。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

提取的病毒基因组 RNA 用特异性引物经 RT-PCR 扩增后得到 1600bp 的目的片段，与预期大小一致（见图 5-1）。

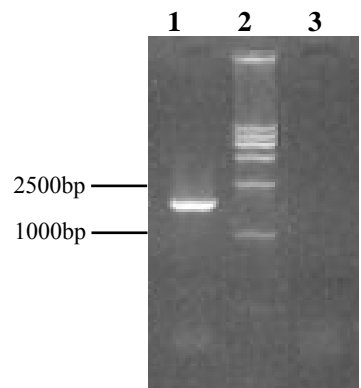


图 5-1 N 蛋白基因的 RT-PCR 扩增结果

1. N 基因的 PCR 扩增结果；2. DL15000 Marker；3. 水对照。

Fig. 5-1 RT-PCR product of N gene

Lane1. PCR product of Ngene; Lane2. DL15000 Marker; Lane3. Negative control.

2.2 N 基因的鉴定及测序结果分析

质粒 pMD18-T-N 测序结果显示 A 株 CDV 的 N 基因编码区含有一个开放阅读框架，共有 1572 个核苷酸组成，编码 523 个氨基酸(图 5-2)。与 Onderstepoor 株(AF378705)、A75/17 株(AF164967)、2544/han95 株(CDI9656)的 N 基因序列同源性分别为 97.5%、94%和 93.5%；编码的氨基酸序列的同源性分别为 98%、97%和 96%。

1	ATGGCTAGCCTTCTTAAAAGCCTCACACTGTTCAAGAGGACTCGGGACCAACCCCTCTT
1	M A S L L K S L T L F K R T R D Q P P L
61	GCCTCTGGCTCCGGGGAGCAATAAGAGGAATAAAGCATGTCATTATAGTCTAATCCCG
21	A S G S G G A I R G I K H V I I V L I P
121	GGTGATTCAAGCATTGTTACAAGATCTCGACTATTGGATAGACTTGTAGGTTGGTTGGT
41	G D S S I V T R S R L L D R L V R L V G
181	GATCCAGAAATCAACGGCCCTAAATTAAGTGGGATCTTAATCAGTATCCTCTCCTTGTTTC
61	D P E I N G P K L T G I L I S I L S L F
241	GTGGAATCCCCTGGACAGTTGATCCAGAGGATCATAGACGACCCTGATGTAAGCATCAAG
81	V E S P G Q L I Q R I I D D P D V S I K
301	TTAGTAGAGGTAATACCAAGCATCAACTCTGTTTGCAGTCTTACATTTGCATCCAGAGGA
101	L V E V I P S I N S V C G L T F A S R G
361	GCAAGTCTGGATTCTGAGGCAGATGAGTTCTTCAAAATTGTAGACGAAGGGTCGAAAGCT
121	A S L D S E A D E F F K I V D E G S K A
421	CAAGGGCAATTAGGCTGGTTGGAGAATAAGGATATAGTAGACATAGAAGTTGATGATGCT
141	Q G Q L G W L E N K D I V D I E V D D A
481	GAGCAATTCAATATATTACTAGCTTCCATCTTGCGTCAAATTTGGATCCTGCTAGCTAAA
161	E Q F N I L L A S I L A Q I W I L L A K

```

541   GCGGTGACTGCTCCTGATACTGCAGCCGACTCGGAGATGAGAAGGTGGATTAAGTATACC
181   A V T A P D T A A D S E M R R W I K Y T
601   CAGCAAAGACGTGTGGTCGGAGAATTTAGAATGAACAAAATCTGGCTTGATATTGTTAGA
201   Q Q R R V V G E F R M N K I W L D I V R
661   AACAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGGGGCGATTCATGGTGGCACTCATTTTGGACATC
221   N R I A E D L S L G R F M V A L I L D I
721   AAAAGATCCCCAGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTAC
241   K R S P G N K P R I A E M I C D I D N Y
781   ATGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATG
261   I V E A G L A S F I L T I K F G I E T M
841   TATCCGGCTCTTGGGTTGCATGAGTTTCCGGAGAATTAACAACATTGAATCCCTCATG
281   Y P A L G L H E F S G E L T T I E S L M
901   ATGCTATATCAACAGATGGGTGAAACAGCACCATACATGGTTATCTTGAAAACTCTGTT
301   M L Y Q Q M G E T A P Y M V I L E N S V
961   CAAAACAAATTTAGTGCAGGGTCCTACCCATTGCTCTGGAGTTATGCTATGGGGTTGGT
321   Q N K F S A G S Y P L L W S Y A M G V G
1021  GTTGAACCTGAAAACTCCATGGGAGGATTAAATTTCCGTCGATCTTACTTTGACCCAGCC
341   V E L E N S M G G L N F G R S Y F D P A
1081  TACTTCAGACTCGGGCAAGAAATGGTTAGACGATCTGCCGGCAAAGTAAGCTCCGCACTT
361   Y F R L G Q E M V R R S A G K V S S A L
1141  GCTGCCGAGCTTGGCATCACCAAGGAGGAAGCTCAGCTGGTGTGAGAAATAGCATCCAAG
381   A A E L G I T K E E A Q L V S E I A S K
1201  ACAACAGAGGACCGGACGATTCGAGCTACTGGTCCCAAGCAATCCCAAATTACCTTCCTG
401   T T E D R T I R A T G P K Q S Q I T F L
1261  CACTCGGAAAGATCCGAAGTCGCTAATCAACAACCCCGACCATCAACAAGAGGTCCGAA
421   H S E R S E V A N Q Q P P T I N K R S E
1321  AACCAGGGAGGAGACAGATACCCATTCACTTCAGTGATGAAAGGCCTCCAGGGCACACC
441   N Q G G D R Y P I H F S D E R P P G H T
1381  CCAGACGTCAACAGCTCTGAACGGAGTGAGCCACGCCACGCCAACCCAAATTACCCAAGAT
461   P D V N S S E R S E P R H D T Q I T Q D
1441  GATGGAATGATGATGACCGGAAATCGATGGAAGCAATCGCCAAGATGAGGATGCTTACT
481   D G N D D D R K S M E A I A K M R M L T
1501  AAGATGCTCAGTCAACCTGGGACCAGTGAAGATAGTTCTCCTGTTTATAATGATAGAGAG
501   K M L S Q P G T S E D S S P V Y N D R E
1561  CTACTCAATTAA
521   L L N *

```

图5-2 CDV A株N基因的核苷酸及推测的氨基酸序列

Fig.5-2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of N gene of CDV A strain

2.3 N 基因原核表达载体的构建

用限制性内切酶 *Hind* III 及 *Xba*I 同时对 pMD18-T-N 和 pPROEXTM HTa 载体质粒进行双酶切, 连接后转化感受态 Rosetta, 挑取单菌落少量提取质粒经酶切鉴定(图 5-3), 筛选出阳性质粒命名为 pPROEXTM HTa-N。

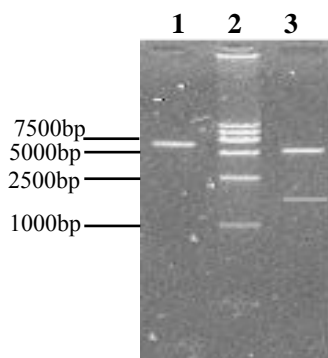


图 5-3 pPROEXTM HTa-N 的酶切鉴定

1. *Xba*I 酶切结果 (6280bp) ; 2. DL15000 Marker; 3. *Hind* III/*Xba*I 酶切结果 (4700bp+1580bp) 。

Fig.5-3 Identification of recombinant plasmid pPROEXTM HTa-N by digestion with restriction endonucleases

Lane1. pPROEXTM HTa-N digested with *Xba*I (6280bp) ; Lane2. DL 15000 Marker; Lane3. pPROEXTM HTa-N digested with *Hind* III/*Xba*I (4700bp+1580bp) .

2.4 N 基因表达产物的检测

收获的细菌裂解后经 SDS-PAGE 电泳分析表明含 pPROEXTM HTa-N 的 Rosetta 表达了约 63kDa 的融合蛋白 (见图 5-4), 与预期大小相一致, 且所表达的重组蛋白在存在于超生波裂解后的上清中。

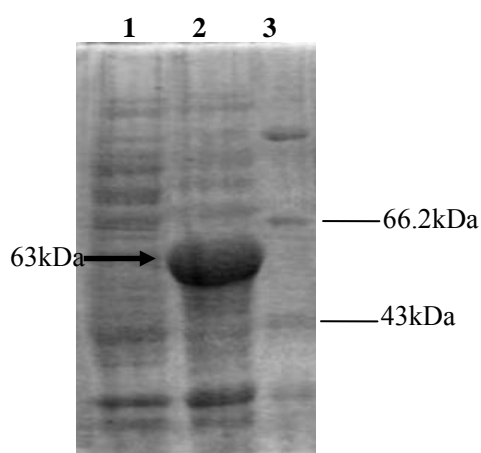


图 5-4 SDS-PAGE 检测重组 N 蛋白在 Rosetta 中的表达

1. 含 pPROEXTM HTa 质粒的 Rosetta 诱导后的表达产物;
2. 含 pPROEXTM HT-N 质粒的 Rosetta 诱导后的表达产物;
3. 蛋白分子量标准。

Fig.5-4 Expression of recombinant N protein in E.coli Rosetta analyzed by SDS-PAGE

Lane1.Expression products of E.coli Rosetta containing pPROEXTM HTa;

Lane2.Expression products of E.coli Rosetta containing pPROEXTM HTa-N induced by IPTG;

Lane3. Protein molecular weight standards.

2.5 重组蛋白 Western blot 分析

Western blot 结果可见在约 63kDa 处观察到特异性的反应条带（见图 5-5），表明所表达的蛋白可与 CDV 多抗血清发生特异的免疫反应。



图 5-5 重组 N 蛋白 Western-blot 分析结果

1. 含有 pPROEXTM HTa 质粒的细菌表达产物分析结果；2. 含 pPRO^{EX}HTa-N 质粒的细菌表达产物的分析结果。

Fig.5-5 Western blot analysis of recombinant N protein

Lane1. Expression products of Rosetta containing pPROEXTM HTa; Lane2. Expression products of Rosetta containing pPROEXTM HT-N.

2.6 重组蛋白的纯化

表达菌处理后用 ProBondTM 纯化试剂盒进行纯化。取少量纯化产物进行 SDS-PAGE，可见较纯的蛋白条带，与纯化前分子量一致（见图 5-6）。分光光度计测定纯化后重组蛋白的含量为 2.4mg/mL；薄层扫描确定其纯度为 95.3%。

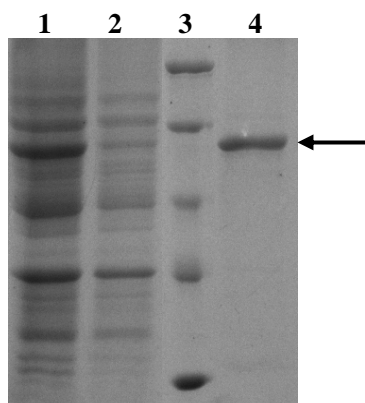


图 5-6 重组蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 结果

1. 纯化前的表达产物；2. 空载体对照；3. 蛋白分子量标准；4. 纯化的重组 N 蛋白。

Fig.5-6 SDS-PAGE of the purified recombinant N protein

Lane1. Expression products of Rosetta containing pPRO^{EX}HTa-N;
Lane2. Expression products of Rosetta containing pPROEXTM HTa;
Lane3. Protein molecular weight standards;
Lane4. purified protein.

2.7 最佳抗原包被量和最佳血清稀释度的确定

纯化的重组 N 蛋白、阳性血清和阴性血清分别作 2 倍比稀释，采用棋盘滴定法测得抗原最佳包被浓度为 0.168 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，血清最佳稀释度为 1:100。

表 5-1 抗原最佳包被浓度及血清最佳稀释度的确定
Table 5-1 Determination of the optimal antigen dilutions and serum dilutions

稀释 倍数	血清	抗原包被浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
		0.672	0.336	0.168	0.084
100 倍 稀释	阳性	0.388	0.994	0.845	0.642
	阴性	0.072	0.120	0.096	0.083
	P/N	5.39	8.28	8.8	7.73
200 倍 稀释	阳性	0.242	0.713	0.548	0.436
	阴性	0.049	0.091	0.072	0.061
	P/N	4.94	7.84	7.61	7.15
400 倍 稀释	阳性	0.182	0.464	0.394	0.284
	阴性	0.039	0.062	0.058	0.047
	P/N	4.67	7.48	6.79	6.04

2.8 待检血清最佳作用时间确定

抗原以 0.168 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被酶标板，将血清做 100 倍稀释，分别作用 30 min、45 min、60min、90 min，测定结果见表 5-2。据选择标准，确定血清的最佳作用时间为 45 min。

表 5-2 血清最佳作用时间的确定
Table 5-2 Determination for optimal time of serum reaction

	30 min	45 min	60 min	90 min
阳性血清 OD ₄₅₀ 值	0.497	0.863	0.738	0.490
阴性血清 OD ₄₅₀ 值	0.073	0.098	0.103	0.117
P/N	6.81	8.8	7.17	4.19

2.9 酶标抗体工作浓度与作用时间的确定

抗原以 0.168 μ g/mL 包被酶标板，将血清做 100 倍稀释，酶标抗体做 1:1000~1:4000 稀释做方阵试验，结果见表 5-3 及 5-4。据选择标准，确定酶标抗体的工作浓度为 1:2000，作用时间为 60min。

表 5-3 酶标抗体的最佳工作浓度的确定

Table 5-3 Check assay for optimal conjugate dilution

	酶标抗体的稀释度			
	1: 1000	1: 2000	1: 3000	1: 4000
阳性血清 OD ₄₅₀ 值	0.628	0.603	0.429	0.231
阴性血清 OD ₄₅₀ 值	0.174	0.074	0.060	0.047
P/N	3.61	8.15	7.15	3.21

表 5-4 酶标抗体作用时间的确定

Table 5-4 Check assay for optimal reaction time

	30 min	45 min	60 min	90 min
阳性血清 OD ₄₅₀ 值	0.335	0.561	0.719	0.472
阴性血清 OD ₄₅₀ 值	0.035	0.051	0.037	0.053
P/N	10.14	11	19.43	8.91

2.10 最佳封闭液的确定

以不同封闭液封闭酶标板，按 ELISA 程序测定不同封闭液的封闭效果，结果见表 5-5，可见以 10%脱脂乳的封闭效果最为理想。

表 5-5 确定封闭液的 ELISA 试验结果

Table 5-5 Result of determination for confining solution in ELISA

	1%BSA	10%脱脂乳	8%羊血清	6%鱼明胶
阴性血清 OD ₄₅₀ 值	0.035	0.037	0.049	0.040
阳性血清 OD ₄₅₀ 值	0.866	0.953	0.839	0.959
P/N	24.74	25.76	17.12	23.98

2.11 临界值测定

试验结果判定采用 P/N 法结合临界值（Cut-off）判定。选用 25 份经进口试剂盒检测为阴性的血清，采用所建立的间接 ELISA 体系进行测定，从以样品号为横坐标，以阴性血清 S/P 值为纵坐标得到的数值分布图可以观察到这些样品的 S/P 值主要分布在 0.1-0.25 之间，占样品总数的 84%，数据分布合理，可以作为制定判定标准的依据。

对结果进行统计学分析，阴性血清 OD₄₅₀ 的平均值 \bar{X} 为 0.146，方差 SD 为 0.052 根据 Cut-off=平均值（ \bar{X} ）+3×标准差（SD），计算 cut-off 值，结果为 0.302。

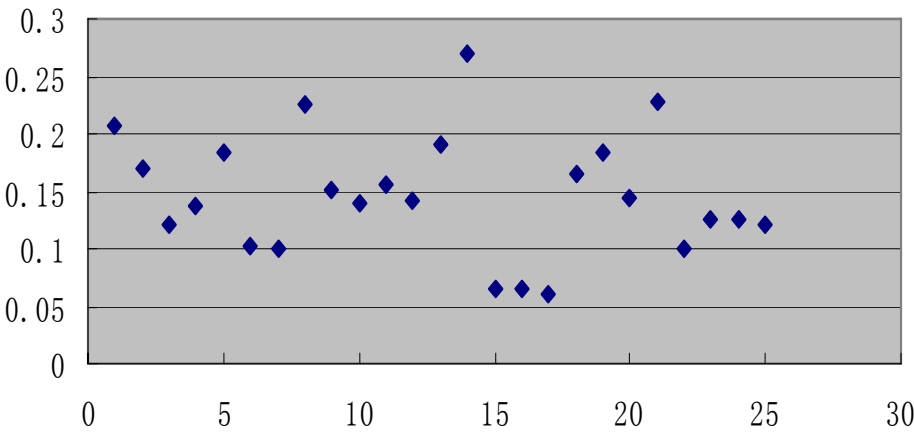


图 5-7CDV 阴性牛血清 S/P 值分布图
Fig. 5-7 Distribution Figure of S/P value of CDV negative sera

2.12 与其它试剂盒的符合性试验

检测 40 份血清样品，结果见表 5-6，用 rN 蛋白建立的间接 ELISA 诊断方法与进口的商品化 CDV 间接 ELISA 诊断试剂盒及本实验室制备的全病毒 ELISA 的阳性符合率均为 97.5%。

表 5-6 与进口试剂盒及全病毒 ELISA 方法检测结果比较
Table 5-6 The comparison of rN-ELISA、CDV-ELISA and EVL check kit

	阳性结果	阴性结果	与本试剂盒相阳性符合率
进口试剂盒	32	8	97.5%
全病毒-ELISA	32	8	97.5%
rN-ELISA	31	9	

2. 13 敏感性试验

2. 13. 1 最低抗体检出效价

检测 CDV 阳性单因子血清，当血清稀释倍数至 1:1600 时检测结果仍为阳性（见图 5-8），证明所建立方法具较好的敏感性。

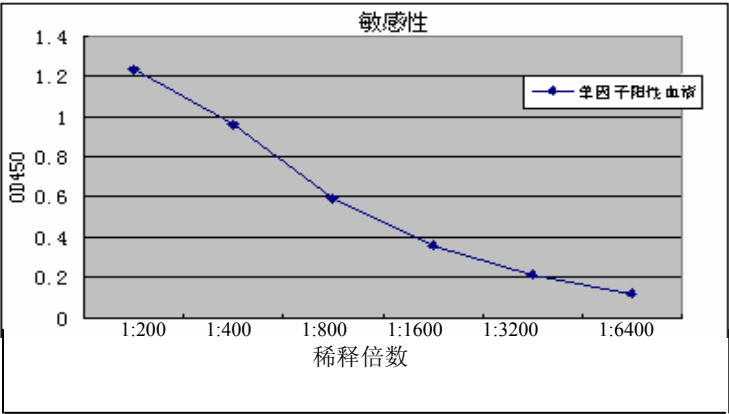


图 5-8 CDV 阳性单因子血清的最低检出效价

Fig. 5-8 Detection of the limit titer of CDV positive serum

2. 13. 2 抗体消长曲线测定

试验犬在多次接种犬瘟热、犬细小病毒二联苗（Nobivac，批号：A003A01）后不同时期的血清抗体效价。结果表明，用重组抗原建立的间接 ELISA 与全病毒 ELISA 检测结果的走势相同；试验犬在接种后 7 天可以检出抗体，一周后抗体逐渐增强（见图 5-9）。

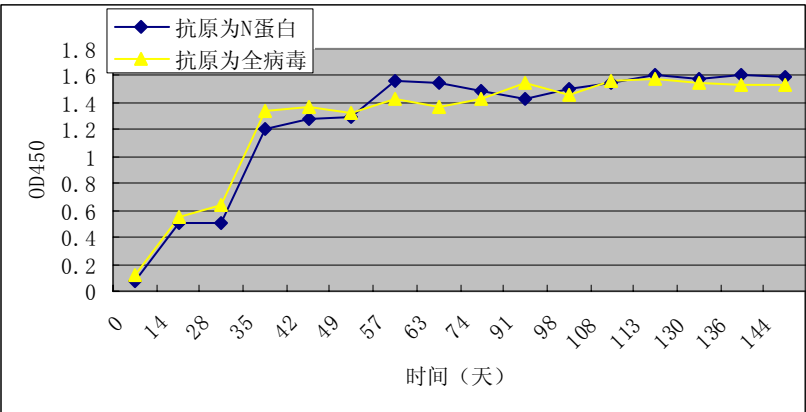


图 5-9 CDV 人工接种疫苗犬的抗体消长曲线

Fig. 5-9 Detection of immune bodys of the dogs

2. 14 特异性试验

2. 14. 1 阻断试验

取 4 份阴性血清，4 份阳性血清用 CDV 病毒液处理，间接 ELISA 检测结果及各血清的 OD₄₅₀ 值变化如表 5-10 所示，病毒液处理后的阳性血清，OD₄₅₀ 值明显下降，阴性血清的 OD₄₅₀ 值则无明显变化，表明重组抗原具有良好的特异性。

表 5-7 全病毒阻断抗原与阳性血清样品的反应试验结果
Table 5-7 Result of competitive inhibition test of virus against serum samples

	1	2	3	4	5	6	7	8
处理前 OD ₄₅₀ 值	0. 1445	0. 237	0. 1055	0.0575	0. 5375	2. 793	3	2. 379
处理后 OD ₄₅₀ 值	0. 1315	0. 2295	0. 1485	0. 114	0. 106	0. 3955	0. 345	0. 368
OD ₄₅₀ 值下降百分率	-----	-----	-----	-----	80.3%	85.8%	88.6%	73.6%

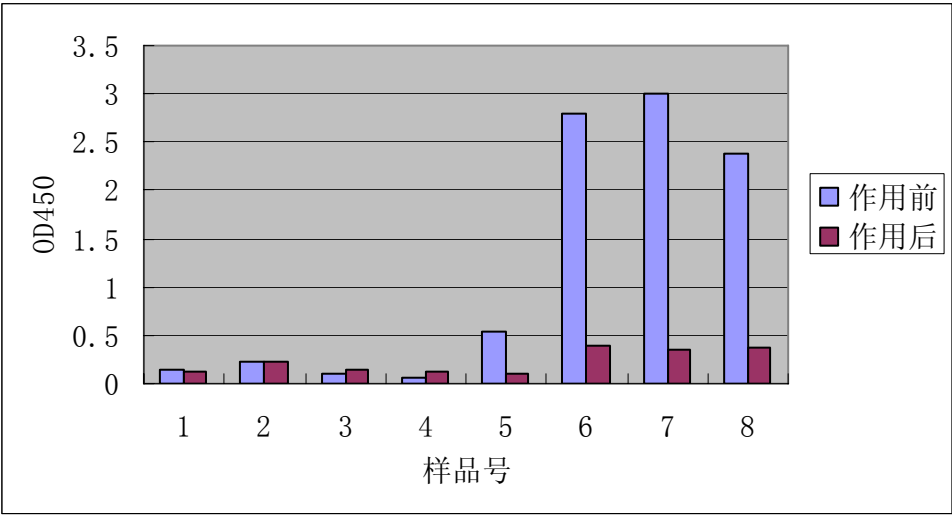


图 5-10 全病毒阻断抗原与阳性血清样品的反应试验结果

Fig. 5-10 Result of competitive inhibition test of virus against serum samples

2. 14. 2 交叉反应试验

取波特氏杆菌、犬副粘病毒、犬瘟热、犬 2 型腺病毒四种犬其它病原的阳性血清，进行交叉反应试验。结果如表 5-8。以下结果表明重组蛋白不与其它疾病阳性血清发生交叉反应，表现了很好的特异性。

表 5-8 交叉反应试验结果

Table 5-8 The result of cross-reaction

	犬细小病毒	犬腺病毒	犬副粘病毒	波特氏杆菌	+	-
OD ₄₉₀ 平均值	0.233	0.251	0.202	0.223	1.089	0. 227

2. 15 现地实验

应用建立的诊断方法对广东、河北，黑龙江等地送检的 227 份血清样品进行检测，结果发现有 175 份为阳性，阳性率为 77.09 %。

3 讨论

CDV 呈世界性分布，敏感宿主动物广泛，在大量的不相关动物种类中可以交叉感染且可进行种间传播，要想彻底消灭 CDV 较为困难。目前主要依赖弱毒苗来控制，但被免疫动物也未能得到完全保护，许多国家均有免疫动物群体暴发犬瘟热的报道，其临床症状也呈现多样化，分析其原因，除了母源抗体的干扰、疫苗效价低及使用不当等因素外，是否出现了 CDV 强毒变异株也有待于证实。近年来我国随着军犬、警犬、实验用犬饲养量的增加，经济动物养殖业规模的扩大及异地交流的增多，CD 在我国的发病率有升高的趋势。因此对 CDV 作出及时、准确的诊断，对监测疫情、流行病学调查及完善免疫策略等都具有重要意义。目前国内检测 CDV 的方法有很多，但各有弊端：病毒分离鉴定费时费力；传统的血清学检测方法、免疫电镜技术及 RT-PCR 方法等特异性高、结果确实，但对实验条件及操作人员的要求较高，因此多用于实验室研究，很难进入临床应用阶段；酶免疫测定技术将酶促反应的高效率和免疫反应的高度专一性有机的结合起来，具灵敏度高、特异性强、对仪器设备要求不高、成本低、操作简便快捷、无放射性污染、自动化程度高、试剂保存时间长等优点，适用于大批量现地检测工作，将可能成为做具推广价值的诊断方法，因此研制用以检测 CDV 的 ELISA 诊断试剂盒，不仅能够填补我国对于 CDV 大批量快速检测的空白，而且对 CD 的疫情监测、流行病学调查及完善免疫策略等都具有重要意义。

CDV 的 N 蛋白保守性较强,在病毒感染时能引起强烈的特异性抗体反应，因此重组 N 蛋白有望替代全病毒作为诊断用抗原。以往的研究证实若想通过传统方法获得足够量的 N 蛋白是非常困难的，而利用基因重组与表达技术则很容易解决这一问题。由于 N 蛋白是非糖基化蛋白，原核表达系统比较适合其表达,本研究选用了具有组氨酸标签的 pPROEX™ HT 载体系统。大肠杆菌中表达目的蛋白的形式有两种：包涵体和可溶性蛋白。以包涵体形式表达的蛋白，有其有利的一面，能够表达对宿主菌有毒或有致死性效应的目的蛋白，能够避免细胞内蛋白水解酶作用，有利于目标蛋白的富集和分离纯化；但亦有其不利的一面，包涵体要变性溶解，经复性后才能得到溶解的蛋白质，复性工艺可使目标蛋白的制备成本上升，并且在复性过程如何使蛋白继续保持有活性的溶解状态是一个仍在进行继续探索的课题（Villaverde *et al*, 2003; Chen *et al*, 2003; Lin *et al*, 2001）。

而以可溶形式表达的蛋白，具有天然一级结构，能够保持天然构象，因而纯化制备容易，更适合于大规模制备。因此，我们选择了多种宿主菌，对重组蛋白的表达条件进行了优化，结果发现以 Rosetta 为宿主菌，在 37℃，在细菌浓度达到 0.6mg/mL，IPTG 诱导浓度为 0.6mol/L 时重组 N 蛋白的表达效率最高，并以可溶形式存在。免疫印记实验结果证实了表达的重组 N 具有良好的抗原性及特异性。

本实验利用融合蛋白 N 端所带有的 6 个组氨酸标签，用 Ni-NTA 柱对其进行了纯化。Ni-NTA 金属树脂螯合层析利用蛋白中的组氨酸在接近中性的水溶液中，与过滤元素 Ni 形成络合物，PH 降至 5.9 可使氨基酸充分质子化，Ni²⁺有选择性的吸附咪唑基，不再与蛋白结合，可将有关蛋白洗脱下来。在蛋白纯化的过程中我们发现用试剂盒中所提供的 20mmol 咪唑浓度的洗液并不能将杂蛋白完全洗净，经过对纯化条件的摸索，最终发现 80mmol 咪唑浓度的洗液对宿主菌体杂蛋白洗脱效果最佳。以大肠杆菌表达的蛋白作抗原用于检测动物体内的抗体，面临的一个问题是纯化的抗原中存在大肠杆菌成份的污染而使检测结果出现假阳性，彻底除去大肠杆菌成份需较为复杂的纯化过程。本试验用正常的大肠杆菌提取物稀释被检血清，再进行检测，结果发现，没有吸附的值低于吸附后检测的样品，因此确定本实验纯化获得的重组 CDV N 蛋白纯度较高，待检样品不需要大肠杆菌吸附可直接检测，从而简化了检测程序。

本试验以纯化的重组 N 蛋白作为包被抗原建立了 CDV 抗体间接 ELISA 检测方法，采用棋盘滴定法，确定最佳抗原包被量为 0.167μg/mL，待检血清最佳稀释倍数为 1:100，对鱼明胶、兔血清、脱脂奶粉、BSA、羊血清等 5 种封闭液对国产及进口酶标板的封闭效果进行比较，最终确定采用国产酶标板，封闭液采用 10%脱脂奶粉；羊抗犬酶标抗体稀释倍数 1:2000，作用时间为 60min；确定了临界值为 0.302。经阻断试验、交叉反应试验、敏感性批内批间重复试验、与进口试剂盒及全病毒 ELISA 方法的对比试验等结果证实该诊断方法具有良好的特异性、重复性、敏感性，为制备标准化 CDV 检测试剂盒奠定基础。

结 论

1. 克隆了 CAV-2 疫苗株的 E3 区及包括 pVIII 基因和部分 fiber 基因在内的 E3 区侧翼序列, 通过与 Toronto A26/61 强毒株的序列比较, 发现二者 E3 区的氨基酸同源性的为 100%, 初步推断 E3 区编码的蛋白与病毒的毒力无关。
2. 构建了表达 EGFP 基因的 E3 区缺失的重组犬 2 型腺病毒 rCAV-2 Δ E3-EGFP, 该病毒具有稳定的生物学特性、保持亲本疫苗株的增殖特性、对动物机体致病性无明显改变, 具备作为疫苗载体的条件。
3. 构建了分别表达 CDV F 及 H 基因的重组犬 2 型病毒 rCAV-2 Δ E3-F 和 rCAV-2 Δ E3-H, 二基因在体外细胞内都可表达, 并具有良好的反应原性。
4. 克隆并在原核表达系统中高效表达了 CDV N 基因, 用纯化后的蛋白作为抗原, 建立了间接 ELISA 诊断方法, 该方法具有良好的敏感性、特异性。

参考文献

- [1] 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997, 1104-1130.
- [2] 卡尔尼克主编. 高福, 刘文军主译. 禽病学(第九版) 北京出版社, 1991, 427-498.
- [3] 李茂样, 金奇, 章金钥等. 减蛋综合征病毒pVIII基因和E3区序列测定及结构分析. 中国兽医学报, 1997, 17: 27-31.
- [4] 李文辉, 王树蕙. 快速构建腺病毒载体的新方法M. 国外医学病毒学分册. 1999, 6(4): 126-12.
- [5] 刘雪丰, 张连峰, 王丽华等. 腺病毒载体有效性和安全性改进J. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(4): 304-307.
- [6] 萨姆布鲁克I, 弗里奇E F, 曼尼阿蒂斯T (金冬雁, 黎孟枫译). 分子克隆实验指南. 第二版[M]. 北京: 科技出版社, 1992, 888-897.
- [7] 谭维彦, 阮力, 彭徽等J. 病毒学报, 1994, 10: 197-208.
- [8] 钟志宏, 夏咸柱, 范泉水. 狐狸脑炎病毒的分离鉴定和流行病学调查J. 兽医大学学报. 1990, 10(2): 111~116.
- [9] Addison CL, Hitt M, Kunsken D, *et al.* Comparison of the human versus cytomegalo virus immediate early gene promoters for transgene expression by adenovirus vectors. J Virol, 1997, 78: 1653-1661.
- [10] Ahmad K. Adenovirus vaccine works best. J The Lancet Oncol, 2003, 4: 558.
- [11] Alkhatib G, Richardson C, Shen SH. Intracellular processing, glycosylation, and cell surface expression of the measles virus fusion protein (F) encoded by a recombinant adenovirus. J Virology, 1990, 175(1): 262-270.
- [12] Appel MJ, Shek WR, Shesberadan H, *et al.* Measles virus and inactivated canine distemper, virus induce incomplete immunity to canine distemper. J Arch Virol, 1984, 82: 73-82.
- [13] Assaf R, Marsolais G, Yelle J, *et al.*, Hamelin C. Unambiguous typing of canine adenovirus isolates by deoxyribonucleic acid restriction-endonuclease analysis. Can J Comp Med. 1983 Oct, 47 (4): 460-463.
- [14] Befwee. Measles, Canine distemper and rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies. J Gen Viro 1986, 67: 1381-1392.
- [15] Bergelson JM, Cunningham GD, Kurt-Jones AK, *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. J Science, 1997, 275: 1320-1323.
- [16] Bett AJ, Haddara W, Prevec L, *et al.* An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 8802-880.
- [17] Bett AJ, Prevec L, Graham FL, *et al.* Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. J Virol, 1993, 67: 5911-5921.
- [18] Blixenkrone-Moller M, Svansson V, Have P, *et al.* Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. J Vet Microbial, 1993, 37: 163-173.
- [19] Blixenkron-Moller M, Svanssa V, Appel M, *et al.* Antigenic relationship between field isolates of

- morbilliviruses from different carnivores. *J Arch viral*, 1992, 123:289-294.
- [20] Boucher R C, Knowles M R. Gene therapy for cystic fibrosis using El deleted adenovirus: a phase trial in the nasal cavity. *Hum Gene Ther*, 1994, 5:615-639.
- [21] Brody S L, Jatfe H A, Han S K, *et al*. Direct in vivo gene transfer and expression in malignant cell using adenovirus vector. *Hum Gene Ther*, 1994, 5(4): 437-447.
- [22] Brough D E, Lizonova A Hsu C, *et al*. A gene transfer vector-cell line system for complete functional complementation of adenovirus early regions E1 and E4. *J Virol*, 1996, 70 (9):6497-6500.
- [23] Bruna-Romero O, Rocha C D, Tsuji M, *et al*. Enhanced protective immunity against malaria by vaccination with a recombinant adenovirus encoding the circumsporozoite protein of Plasmodium lacking the GPI-anchoring motif. *J Vaccine*, 2004, 22: 3575-3584.
- [24] Cai F, Weber J M. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the canine adenovirus type 1 proteinase. *J Virus Genes*. 1992, Aug, 6 (3) :307-312.
- [25] Charfer C, Degryse E, Gantzer M, *et al*. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Vrol*, 1996, 70(7): 4805-4810.
- [26] Chanda P K, Natuk R J, Mason B B, *et al*. High level expression of the envelope glycol proteins of the human immunodeficiency virus type 1 in presence of tev gene using help-independent adenovirus type I recombinants. *J Virology*, 1990, 175:535-547.
- [27] 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, 18:2927-296.
- [28] Chroboczek J, Bieber F, Jacrot B, *et al*. The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *J Virology*, 1992, 186:280-285.
- [29] Danthinne X. New tool for the construction of double recombinant adenoviruses. *J Virol. Methods*, 1999, 81:11-20.
- [30] Danthinne X, Werth. New tool for the generation of El-and/or E3-substituted adenoviral vectors. *Gene Ther*, 2000, 7(1): 80-87.
- [31] Darai G, Rosen A, Delius H, *et al*. Characterization of the DNA of canine adenovirus by restriction enzyme analysis. *J Inter virology*, 1985, 23 (1):23-28.
- [32] Diallo A. Morbillivirus group: genome organization and proteins. *J Vet Microbial*, 1990,23:155-163.
- [33] Dipaolo N, Ni S, Gaggari A, *et al*. Evaluation of adenovirus vectors containing serotype35 fibers for vaccination. *J Mol Ther*, 2006, 13(4): 758-765.
- [34] D W Kingsbury (ed), *The paramyxoviruses*. Plenum publishing corporation, New York.
- [35] Engelhardt J F, Ye X, Doranz B, *et al*. Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91:6196-6200.
- [36] Erling N. Protection against canine distemper virus in dogs after immunization with isolated

- fusion protein. J Virol, 1986, 5:536-541.
- [37] Elahi S M, Shen S H, Talbot B G, *et al.* Recombinant adenovirus expressing the E2 protein of bovine viral diarrhea virus induce humeral and cellular immune responses J. FEMS Microbiology Letters, 1999, 177: 159-166.
- [38] Fallaux F J, Bout A, van der Velde L, *et al.* New Helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. Hum Gene Ther, 1998, 9:1909-1917.
- [39] Fisher K J, Choi H, Burda J, *et al.* Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. J Virology. 1996, 217(1):624-634.
- [40] Francois A, Chevalier C, Delmas B, *et al.* Avian adenovirus CEL recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. J Vaccine, 2004, 22: 2351-2360.
- [41] Fu S, Deisseroth A B. Use of cosmid adenoviral vector cloning system for the in vitro construction of recombinant adenoviral vectors. Hum Gene Ther, 1997, 8(11):1321-1330.
- [42] Gemma T, Watari T, Akiyama K, *et al.* Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. J Vet Med Set, 1996, 58:547-550.
- [43] Gemma T, Watari K, Shin Y S, *et al.* Serological analysis of canine distemper virus using an immunocapture enzyme-linked immunosorbent assay. J Vet Med Sci, 1996, 58:791-794.
- [44] Gedes, HH and Kaether C. Green fluorescent protein: application in Cell Biology. FEBS Letter, 1996, 359:44-47.
- [45] Ginsberg HS, Lunbholm-Beauchamp U, Houswood L, *et al.* Role of early region3(E3) in pathogenesis of adenovirus disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:3823-3827.
- [46] Gorziglia M I, Kadan M J, Yei S ET AL. Elimination of both EI and E2 from adenovirus vectors further improves prospects for in vivo human gene therapy. J Virol, 1996, 70(6): 4173-4178.
- [47] Gogev S, de Fays K, Versali M F, *et al.* Glycol chitosan improves the efficacy of intra nasally administrated replication defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein D of bovine herpes virus. J Vaccine, 2004, 22: 1946-1953.
- [48] Grey K, Forrest S. Stuart T, *et al.* Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 9(6): 6186-6190.
- [49] Halbert D N, I R Cutt and T Shenk. Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression and host cell shutoff. J Virol, 1985, 56:250-257.
- [50] Hamburger D, Griot C, Zurbriggen A, *et al.* Vandevelde-M, Loss of virulence of canine distemper viruses associated with a structural change recognized by a monoclonal antibody. Experientia, 1991, Aug15; 47(8):842~845
- [51] Hamelin C, Jouvenne P, Assaf R. , *et al.* Genotypic characterization of type-2 variants of canine adenovirus. Am J Vet Res, 1986, Mar, 47(3):625-630.
- [52] Hamelin C, Marsolais G, Assaf R, *et al.* Inter specific differences between the DNA restriction profiles of canine adenoviruses. Experientia, 1984, May 15, 40 (5):482.

- [53] Hammond J M, Jansen E S, Morrissy C J, *et al.* Protection of pigs against 'in contact' challenge with classical swine fever following oral or subcutaneous vaccination with a recombinant porcine adenovirus. *J Virus Res*, 2003, 97: 151-157.
- [54] Hammond J M, McCoy R J, Jansen E S, *et al.* Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55(E2) gene protect pigs against classical swine fever. *J Vaccine*, 2000, 18: 1040-1050.
- [55] Himma K, Togashi K, Wakasa C, *et al.* Cytotoxic T-lymphocyte activity specific for hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus in dogs. *J Vet Med Sci*, 2003, 65:2109-112.
- [56] Horowitz M S, In Field B N, Naise DM, *et al.* Adenoviridae and their replication. *Virology*, 2nd ed, New York: Rarenpress, 1990,1679-1723
- [57] Hsu C, Boysen M, Gritton L D, *et al.* In vitro dendritic cell infection by pseudo typed adenoviral vectors does not correlate with their in vivo immunogenicity. *J Virology*, 2005, 332: 1-7.
- [58] Huang M M and P Hearing. Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J Virol*, 1989,63:2605-2615.
- [59] Hu H, Serra D, Amalfitano A, *et al.* Persistence of an adenovirus vector despite transduction of a neoantigen into immune-competent mice. *Hum Gene Ther*, 1999, 10:355-364.
- [60] Joel C, Laurent N, Cecile O, *et al.* Recombinational construction in *Escherichia coli* of infectious adenoviral genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94(2): 1414-1419.
- [61] Johnson D C, Ghosh-Choudhury G, Smoley J R. *et al.* Abundent expression of herpes simplex virus glycoprotein gB using an adenovirus vector. *Virology*. 1988, 164:1—14
- [62] Johnson M A, Pooley C, Ignjatovic J, *et al.* A recombinant fowl adenovirus expressing the *SI* gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *J Vaccine*, 2003, 21: 2730-2736.
- [63] Jones L, Tenorio E, Gorham, *et al.* Protective vaccination of ferrets against canine distemper with recombinant pox virus vaccine expressing the H or F genes of rinderpest virus. *J Am J Vet Res*, 1997, 58 (6) :590-530.
- [64] Kay MA, Glorioso JC, Naldini L, *et al.* Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med*, 2001, 7(1):33-40.
- [65] Klonjowski B, Gilardi-Hebenstreit P, Hadchouel J, *et al.* A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo. *Hum Gene Ther*, 1997, 8:2103-IS.
- [66] Klonjowski B C, Denesvre C, Eloit M, *et al.* Adenoviral Vectors for Vaccines. In Seth P, editor. *Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy*. Austin, Texas.1999, 681-700.
- [67] Kim J H, Jozkowicz A, Piedra P A, *et al.* Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98(23):13282-13287.
- [68] Kochaneks, Clemens R, Milani K. *et al.* A new adenoviral vector: replacement of all viral coding sequence with 28Kb of independently expressing both full-length dystrophin and galactosidase.

- Pro Nath.Acad.Sci USA 1996, 93:5731-5736.
- [69] Kochanek S, Schiedner G, Volpers C. High-capacity gutless adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther*, 2001, 3:454-463.
- [70] Kremer E J, Boutin S, Chillon, M, *et al.* Canine adenovirus: an alternative for adenovirus mediated genet ransfer. *J Virol*, 2000, 74:(1) 505-520.
- [71] Krougliak V, Graham F L. Development of cell lines capable of complementing E1, E4 and protein IX defective adenovirus type 5 mutants. *Hum Gene Ther*, 1995, 6(12):1575-1586.
- [72] Laidlaw P P and Dunkin G W. Studies in dog distemper: J The nature of the virus. *J Comp. Pathol*, 1926,39:222-230
- [73] Linne T. Diferences in the E3 region of the canine adenovirus type 1 and type 2. *Viru Res*, 1992, 23:119-133.
- [74] Liu YC, Abouhaidar MG, Sira S, Campbell J B. Characterization of the genome of a vaccine strain of canine adenovirus type 1. *J Virus Genes*, 1988 Oct, 2(1):69-81.
- [75] Liu HS, Jan MS, Chou CK, *et al.* Is green fluorescent protein toxic to the living cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260(3) :712-717
- [76] Lochmuller H, Jani A, Huard J, *et.al.* Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (E1+E3)during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther*, 1994, 5:1485-1491.
- [77] Lusky M, Christ M, Rittner K, *et al.* n vitro and in viro biology of recombinant adenovirus vectors with E1/E2A,or E1/E4deleted. *J Virol*, 1998, 72:2022-2032.
- [78] Mailly L, Renaut L, Rogee S, *et al.* Improved gene delivery to Blymphocytes using a modified adenovirus vector targeting CD21. *J Mol Ther*, 2006, 14 (2): 293-304
- [79] Mauson.B B, Daris A R, Bhat B M, *et al.* Adenovirus rectors for the expression of hepatitis B surface antigen; importance of regulatory elements in the adenovirus major late imtrom. *J Virology*,1990, 177:452-461.
- [80] Mee A P, Sharpe P T. Dogs, distemper and Paget'sdisease. *J Bioessays*,1993,15(12):783-789.
- [81] Mess ling V, Zimmer G,Herrlerqet al. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol*, 2001, 75:6418-6427.
- [82] Minal S K, Prevee L, Babiuk L A, *et al.* Sequence analysis of bovine adenovirus type 3 early region 3 and fiber protein genes. *J Gen Virol*, 1992, 73: 3295-3300.
- [83] Mittal S K, Aggarwal N, Sailaja G, *et al.* Immunization with DNA, adenovirus or both in biodegradable alginate microspheres: effect of route of inoculation on immune response. *J Vaccine*, 2001, 19: 253- 263.
- [84] Moffatt S, Hays J, HogenEsch H, *et al.* Circumvention of vector-specific neutralizing antibody response by alternating use of human and non-human adenovirus: implication in gene therapy. *J Virology*, 2000, 272:159-167.
- [85] Mohinderjit S.Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences:completion of the entire CDV genome sequence[J]. *Virol*,1993,193:66-72.

- [86] Mohinderjit S, Joseph P, Stuart D, *et al.* Canine distemper virus L gene: sequence and comparison with related viruses. *J Virology*, 1993, 193:50-56.
- [87] Moraes M P, Mayr G A, Grubman M J, *et al.* pAd5-Blue: direct ligation system for engineering recombinant adenovirus constructs. *J Biotechniques*, 2001, 31: 1056.
- [88] Morin J E., Lubeck M D, Barton J E, *et al.* Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigen in hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84:4623-4630.
- [89] Nickin J, Graeme-Cook K, Paget T, *et al.* virus assay, Instant notes in microbiology. 1999, 296-297 BIOS scientific publishers limited.
- [90] Nishio M, Tsurudome M, Kawano M, *et al.* Interaction between the nucleocapsid protein (NP) and phosphoprotein (P) of human parainfluenza virus type 2: one of the two NP binding sites on P is essential for granule formation. *J Gen virol*, 1996, 77: 2457-2463.
- [91] Norrby E, Utter G, Orville, *et al.* Protection against canine distemper virus in dogs after immunization with isolated fusion protein. *J Viral* 1986, 58, 2:536-541.
- [92] Nouredini S C, Krendelshchikov A, Simonenko V, *et al.* Generation and selection of targeted adenoviruses embodying optimized vector prosperities. *J Virus Res*, 2006, 116:185-195.
- [93] Ophorst OJAE, Kostense S, Goudsmit J, *et al.* An adenoviral type 5 type vector carrying a type 35 fiber as a vaccine vehicle: DC targeting, cross neutralization and immunogenicity. *J Vaccine*, 2004, 22: 3035-3044.
- [94] Pardo MC, Bauman JE, Mackowiak M, *et al.* Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin. *Am J Vet Res*, 1997, 58:833-836.
- [95] Parks R J, Graham F L. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J Virol*, 1997, 71:3293-3298.
- [96] Peoples M E. 1991 Paramyxovirus, M proteins: pulling it all together and taking it on the road, p427-456.
- [97] Polo J M, Dubensky T W. Virus-based vectors for human vaccine applications. *J Drug Discov Today*, 2002, 7: 719-727.
- [98] Purkayastha A, Su J, Carlisle S, *et al.* Genomic and bioinformatics analysis of HadV-7, a human adenovirus of species B1 that causes acute respiratory disease: implications for vector development in human gene therapy. *J Virology*, 2005, 332: 114-129.
- [99] Putz M M, Bouche F B, de Swart R L, *et al.* Experimental vaccines against measles in a world of changing epidemiology. *J Inter J Parasitol*, 2003, 33: 525-545.
- [100] Randrianarion-Jew toukoff V, Perricaudet M. Recombinant adenovirus as vaccine. *J Biologicals*, 1995, 23:145-157.
- [101] Raviprakash K S, Gmnhaus A E, Kholy M A, *et al.* The mouse adenovirus type 1 contains an unusual E3 regions. *J Virol*, 1989, 63:5455-5458.
- [102] Rechardson W D, Westphal H. A cascade of adenovirus early functions is required for expression of adeno-associated virus. *J Cell*, 1981, 27:133-141.

- [103] Reddy P S, Sakhuja K, Ganesh S, et al. Sustained human factor VIII expression in hemophilia A mice following systemic delivery of a gutless adenoviral vector. *Mol Ther*, 2002, 5(1): 63-73.
- [104] Reik A, Gregory P D, Case C C, et al. An oncolytic adenovirus armed with a GM-CSF activating designed Zinc-finger protein transcription factor: a potential cancer vaccine approach. *J Mol Ther*, 2004, 9 (S1): S238.
- [105] Robinson H L. New hope for an aids vaccine. *J Nature Revi Immunol*, 2002, 2: 239-250.
- [106] Roy S, Zhi Y, Clawson D, et al. Novel chimeric adenovirus vaccine vector. *J Mol Ther*, 2004, 9(s1): s389.
- [107] Reddy P S, Imdamakanti N, Derbyshire J B, et al. Porcine adenovirus types 1, 2 and 3 have short and simple early E3 regions. *J Virus Res*, 1996, 43:99-109.
- [108] Sailaja G, HogenEsch H, North A, et al. Encapsulation of recombinant adenovirus into alginate microspheres circumvents vector specific immune response. *J Gene Ther*, 2002, 9: 1722- 1729.
- [109] Saliki J, Cooper, E, Gustavson, et al. Emerging Morbillivirus Infections of Marine Mammals: Development of Two Diagnostic Approaches. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*2002,969: 51-59.
- [110] Sanae M, Miho M, Vumi K, et al. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(2): 1320-1324.
- [111] Sato M, Suzuki S, Kubo S, et al. Replication and packaging of helper-dependent adenoviral vectors. *J Gene Ther*, 2002, 9:472-476
- [112] Scariac A, Curiel D T, Kay M A, et al. Complementation of human adenovirus early region 4 deletion mutant in 293 cells using adenovirus-poly lysine-DNA complexes. *J Gene Ther*, 1994, 2(4):295-298.
- [113] Shanley J D, Wu C A. Intranasal immunization with a replication deficient adenovirus vector expressing glycoprotein H of murine cytomegalovirus induces mucosal and systemic immunity. *J Vaccine*, 2005, 23: 996-1003.
- [114] Shiver J W, Fu T M, Chen L, et al. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *J Nature*, 2002, 415(6869):331-335.
- [115] Signas C, Akusjarvi G, Petersson U, et al. Region E3 of human adenoviruses; differences between the oncogenic adenovirus-3 and the non-oncogenic adenoviruses-2. *J Gene*, 1986, 50(1-3):173-184
- [116] Simon R H, Engelhardt J F, Yang Y, et al. Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study. *Hum Gene Ther*, 1993, 4:771-780
- [117] Sixt N, Cardoso Vallier, et al. Canine distemper virus DNA vaccination induces humoral and cellular immunity and protects against a lethal intra cerebral challenge. *J Virol*, 1998, 72: 8472-8476.
- [118] Spibey N, Cavanagh H M. Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of two strains of canine adenovirus type 2. *J Gen Virol*. 1989 Jan, 70(Pt 1):165-172.
- [119] Stephensers C B, Weliter J, Thakor S R, et al. Canine distemper virus infection of ferrets as a model for testing morbillivirus vaccine strategies: NYVAC-and ALVAC-based CDV

- recombinants protect against symptomatic infection. *J Virol*, 1997, 76 (2):1506-1513.
- [120] Stewart A K, Lassam N J, Quirt I C, et al. Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a Phase I clinical trial. *J Gene Ther*, 1999, 6(3):350-363.
- [121] Stephensers CB, Weliter J, Thakor SR, et al. Canine distemper virus infection of ferrets as a model for testing morbillivirus vaccine strategies: NYVAC-and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. *J Viral*, 1997, 71:1506-1513.
- [122] Strating A. Measles vaccine in dogs: efficiency against aerosol challenge with virulent canine distemper virus. *J Am Vet Med Assoc*, 1975, 167 (1) :59-62.
- [123] Sullivan N J, et al. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *J Nature*, 2000,408:605-609.
- [124] Takakura M, Okuda K, Matsuda T, et al. Combination of DNA vaccine and adenovirus vector by cutaneous administration induced strong HIV-specific cellular immune responses in mice. *J Vaccine*,2005, 23: 847-848.
- [125] Takayama K, Ikegami A, Inoue H, et al. VEGF promoter-based conditionally replicative adenoviruses are useful for the treatment of malignant pleural mesothelioma. *J Mol Ther*, 2004, 9(S1): S238.
- [126] Tatsis N, Ertl H C J. Adenoviruses as vaccine vectors [J]. *Mol Ther*, 2004, 10 (4): 616-629.
- [127] Taylor J. Vaccinia virus recombinants expressing either the measles virus fusion or hemagglutinin glycoprotein protect dogs against canine distemper virus challenge. *J Virol*,1991,65(8):4263-4274.
- [128] Thompson H, Com well H J, Wright N G, et al. Canine adenovirus in organ cultures. *J Res Vet Sci*, 1972 Mar,13(2):191-193.
- [129]] Tikhomimv E E, Baburina T M, Neugodova G L, et al. Early transcription of FAV-I (CELO) avian adenovirus genome. *J Vopr Virsol*, 1998,43(6):279-283.
- [130] Tong-Chuan H E, Shibin Zhou, Luis T, et al. A Simplified system for Generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(3): 2509-2514.
- [131] Top F H, Busher E L, Bancroft W H, et al. Immunization with live type 7 and 4 adenovirus vaccine II Antibody response and protective effect against acute respiratory diseases due to adenovirus type 7. *J Infect. Dis*,1971,124:155.
- [132] Top F H, Grossman R A, Bartalloni P J, et al. Immunization with live type 7 and 4 adenovirus I safty, infectivity antigenicity and potency of adenovirus type 7 vaccine in human. *J infect Dis*, 1971.124:148-154.
- [133] Top F H, Busher E G, Bancro8 W H, , et al. Immunization with live type 7 and type 4 adenovirus vaccine 11.Antibody response and protective effect against acute respiratory diseases due to adenovirus type. *Infect Dis*, 1971,124:155-160.
- [134] Tsien, RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67:509-544.

- [135] Umana P, Gerdes C A, Stone D, et al. Efficient FLPC recombination enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination. *J Nat Biotech*, 2001, 19(6):582-585.
- [136] Uvenne P, Hamelin C. Comparative analysis of the CAV-1 and CAV-2 genomes. *J Intervirology*.1986,26(1-2): 109-114.
- [137] Varsanyi T M, Jomvacl H, Orvail C, et al. Polypeptides of two canine distemper virus strains: variation in the conserved N-terminal hydrophobic region. *J Virol*, 1987,157 :241-244.
- [138] Viries PDE, Uytdehaag F, Osterhaus A, et al. Canine distemper virus immune-stimulating complexes (Iscoms) but not measles virus iscoms protect dogs against CDV infection. *J Gen Viral*, 1988, 69:2071-2083.
- [139] Von Messling V, Zimmer G, Herrler G, et al. The Hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cytopathogenicity. *J Virol* ,2001 ,75 (14) :6418~6427.
- [140] Von Messling V ,Milosevic D, Devaux P,et al. Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers : partial membrane - proximal ectodomain cleavage enhances function. *J Virol* ,2004 ,78 (15) :7894-7903.
- [141] Vrati S, Boyle D B, Kocherhans R, et al. Sequence of ovine adenovirus hexon assembly, pVIII and fiber genes: early region E3 is not in the expected location. *J Virology*, 1995,209:400-408.
- [142] Wang K, Huang S, Kapoor M A, et al. Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J Virol*, 1998, 72:3455-3458.
- [137] Weinberg D H , Ketner G. Adenovirus early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression. *J Virol*, 1986, 57:833-838.
- [143] Whetstone C A. Should the criteria for species distinction in adenoviruses be reconsidered Evidence from canine adenoviruses 1 and 2. *J Inter virology*, 1985,23 (2) :116-120.
- [144] Wickham T J, Mathias P, Cheresch D A, et al. Integrins $\alpha_5\beta_3$ and $\alpha_5\beta_5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *J Cell*, 1993, 73:309-319.
- [145] Wild T F. Vaccination of mice against canine distemper virus induced encephalitis with vaccinia virus recombinants encoding measles or canine distemper virus antigens .*J Vaccine*, 1993,11(4):438-444.
- [146] Wiley D C. 1985 Viral membranes In: Fields, B. N. (ed) ,*Virology* Raven press, New York.
- [147] Wilmott R W, Amin R S, Perez C R, et al. Safety of adenovirus-mediated transfer of the humancystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the lungs of nonhuman primates. *Hum Gene Ther*, 1996, 7:301-318.
- [148] Wuest T, Both G W, Prince A M, et al. Recombinant ovine adenovirus induces a strong and sustained T cell response against the hepatitis C virus NS3 antigen in mice . *J Vaccine*, 2004, 22: 2717-2721.
- [149] Wu Q H, Tikoo S K. Altered tropism of recombinant bovine adenovirus type-3 expressing chimeric fiber .*J Virus Res*, 2004, 99: 9-15.
- [150] Yang Y, Nunes F A, Berencsi K,et al. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted

- adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:4407-4411.
- [151] Yei S, Mittereder N, Tang K, et al. Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated in vivo vector administration to the lung. *Gene Ther*, 1994;1:192-200.
- [152] Yei S, Mittereder N, Wert S, et al. In vivo evaluation of the safety of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the lung. *J Hum Gene. Then* 1994, 5(2): 731-744.
- [153] Yeh, Dedjue F, Orsini C, et al. Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 function unit. *J Viral*, 1996,70(1):559-565.
- [154] Ye W W, Mason B B, Chengarala M, et al. Co-expression of hepatitis B virus antigens by a non-defective adenovirus vaccine vector. *J Arch Virol*, 1991, 118:11-27.
- [155] Yoshida E, Iwatsuki K, Miyashita N, et al. Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. *J Vet Microbiol*, 1998,59:237-244.
- [156] Yoshida F, shin YS, Iwatsuli K, et al. Epitopes and nuclear localization analysis of canine distemper virus nucleocapsid protein by expression of its detection mutants. *J Vet Microbial*, 1999, 66, 4:313-320.
- [157] Zakhartchouk A, Yan Z, Tikoo S K, et al. A recombinant E1-deleted porcine adenovirus-3 as an expression vector. *J Virology*, 2003, 313:377-386.
- [158] Zsengeler ZK, Wert SE, Hull WM, et al. Persistence of replication-deficient adenovirus-mediated gene transfer in lungs of immune-deficient (nu/nu) mice. *Hum Gene Ther*, 1995, 6:457-467.

致 谢

首先向导师陈洪岩研究员致以崇高的敬意和由衷的感谢！感谢导师 5 年来对我的辛勤培养和殷切教诲。本论文是在导师的支持、理解和鼓励下完成的。导师渊博的学识，严谨的治学态度、忘我工作的敬业精神令我终生受益。

我的博士学位论文是在哈尔滨兽医研究所实验动物中心完成的，衷心感谢曲连东研究员在学习给予的悉心指导以及生活上给予的无私关怀。曲老师平易近人的品格，精益求精的科研态度，实事求是的工作作风永远是我学习的榜样。

感谢姜骞老师、李昌文老师在课题设计、实验操作及论文的撰写等方面给予的悉心指导。

感谢刘胜旺研究员、刘长明研究员、王云峰研究员，胡森老师在课题完成过程中提出宝贵的建议和提供的无私帮助。

感谢关云涛、刘家森、韩凌霞、刘怀然、孟庆文、司昌德、张洪英、刘立奎、胡守萍、危艳武等老师在实验过程中给予的帮助；感谢秦海斌、李慕瑶、许大明、李亚明、王文娟、闫虹光、甘一迪、苏洁、刘丹、秦红刚、尹兰兰、李文超、肖兵兵等同学在学习、生活中给予我的关心和帮助；感谢李娟、李世萍等工作人员精心完备的后勤保障。

感谢孙百明老师、李涛老师在生活中给予我的关怀与帮助。

感谢一直爱护我、理解我，为我辛勤操劳的父母，他们的殷切希望是我奋进的动力；感谢我的男友刘思谦，他多年来的支持与鼓励使我能以平和的心境面对困难，顺利完成学业。

再一次向所有曾经帮助、关心支持过我的亲人、老师和朋友们致以衷心的感谢，谢谢你们！

作者简介

周洁，女，生于 1978 年 10 月，吉林省吉林市人，1998.9—2002.7 吉林农业大学动物科技学院攻读兽医专业学士学位；2002 年 9 月考入中国农业科学院哈尔滨兽医研究所攻读预防兽医学硕士学位；因在读期间成绩优异，经中国农业科学院研究生院考核批准于 2004 年 9 月提前攻读博士学位，在哈尔滨兽医研究所完成博士学位论文。

发表文章：

1. 周洁，李昌文，张洪英，陈洪岩*，李建伟，曲连东. 犬瘟热病毒 A 株核衣壳蛋白基因的克隆、表达及特性分析. 中国预防兽医学报，2004，4：485-488
2. 周洁，姜骞，张洪英，刘家森，刘立奎，陈洪岩，韩凌霞，司昌德，曲连东*. 抗犬瘟热病毒重组核衣壳蛋白单克隆抗体的制备及鉴定. 中国预防兽医学报, 待发表.
3. 因博士课题的部分成果已申请专利，相关文章将在一年后允许发表。