

谢青梅, 封柯宇, 沈勇. 动物病毒重组活载体疫苗研究进展 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 102-110.  
XIE Qingmei, FENG Keyu, SHEN Yong. Advances in recombinant live vector vaccines for animal viruses[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(5): 102-110.

# 动物病毒重组活载体疫苗研究进展

谢青梅, 封柯宇, 沈勇

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 病毒活载体疫苗作为一种新型疫苗, 与传统疫苗相比, 具有极大的优势与应用前景, 是当今与未来疫苗研制与开发的重要方向之一。目前在人类医学和兽医领域, 病毒活载体疫苗均取得了大量的研究成果。本文综述了主要的兽用病毒疫苗载体及重组活载体疫苗的最新研究进展, 并分析了其发展趋势, 为进一步研制新型重组病毒疫苗提供参考。

**关键词:** 活载体疫苗; 动物病毒; 兽医疫苗学; 重组病毒疫苗; 免疫

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)05-0102-09

## Advances in recombinant live vector vaccines for animal viruses

XIE Qingmei, FENG Keyu, SHEN Yong

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** As a new type of vaccine, virus live vector vaccine has great advantages and application prospects compared with traditional vaccine, and it's an important direction of current and future vaccine development. At present, in the fields of human medicine and veterinary medicine, virus live vector vaccine has achieved a lot of research achievements. In this paper, the latest research progress of main veterinary virus vaccine vectors and recombinant live vector vaccines were reviewed, and their development trends were analyzed, so as to provide a reference for the further development of new recombinant virus vaccines.

**Key words:** live vector vaccine; animal virus; veterinary vaccinology; recombinant virus vaccines; immunity

随着畜牧业的不断发展, 动物养殖方式规模化, 畜禽疫病的防控显得尤为重要。疫苗免疫是预防和控制畜禽疾病最有效、最具成本-效益的措施。目前兽医疫苗领域使用的疫苗主要是传统减毒活疫苗和灭活疫苗。这些疫苗显著降低了一些重大疾病对畜禽生产的危害, 为畜牧业发展提供了保证。但随着畜禽养殖水平的发展、疫病防控形势的变化, 这些疫苗也显现出缺陷与不足。

减毒活疫苗通常非常有效, 因为它们可以诱导细胞免疫和体液免疫反应, 其疫苗毒株通常是通过筛选天然弱毒及人工传代致弱获得, 这也意味着疫苗毒株研制具有不确定性, 研发周期较长, 并且致

弱毒株存在毒力返强的风险<sup>[1]</sup>。灭活疫苗通常比较安全, 但是不能诱导机体细胞免疫, 可能不如减毒疫苗有效, 其接种剂量大, 成本较高。传统疫苗通常是一种疫苗预防一种疾病, 由于需要考虑不同抗原之间拮抗及竞争关系, 因此多联多价疫苗较少。近几年, 新型病毒疾病的爆发给人类健康和畜禽养殖都造成了极大的威胁, 如何快速、有效地制备针对流行毒株的疫苗候选毒株给疫苗研发者提出了挑战。

随着 DNA 重组技术、病毒反向遗传操作及基因编辑等基因工程技术的发展, 疫苗研究正逐渐从传统的灭活和弱毒疫苗向基因工程疫苗过渡, 特别是重组活载体疫苗的研制, 越来越引起人们的广泛

收稿日期: 2019-05-19 网络首发时间: 2019-07-22 13:19:30

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20190722.0912.006.html>

作者简介: 谢青梅 (1972—), 女, 教授, 博士, E-mail: [qmx@scau.edu.cn](mailto:qmx@scau.edu.cn)

基金项目: 广东省教育厅资助项目 (2017KZDM008)

关注。基因工程重组活载体疫苗是利用基因工程技术将编码病原体保护性抗原的基因导入活载体中使之表达的活疫苗,主要包括重组病毒载体活疫苗和重组细菌载体活疫苗<sup>[2]</sup>。活载体疫苗兼具灭活疫苗的安全性好及活疫苗的免疫效果好、成本低等优点,减少了毒力返祖的风险;诱导免疫动物产生的免疫比较广泛,包括体液免疫和细胞免疫,甚至黏膜免疫;载体中可以插入多个不同病原的抗原基因并同时表达,从而实现一针防多病的目的,为多价疫苗或多联疫苗的研制提供了可能;利用成熟的疫苗载体,可以快速制备针对新发或流行毒株的疫苗候选毒株,大大减少了疫苗毒株的研制周期<sup>[3]</sup>。

目前用于研究的细菌疫苗载体有沙门氏菌、卡介苗、大肠埃希菌和乳酸杆菌等。用于研究的病毒疫苗的载体包括痘病毒、疱疹病毒、腺病毒、不分节段的单股 RNA 病毒等<sup>[4]</sup>。这些载体广泛用于兽用活载体疫苗研究领域。病毒载体因病毒基因组的复制特点和病毒生物学特性的不同,而应用于不同动物和疫病的预防。本文综述几种疫苗活载体在兽医领域的应用及最新研究进展,旨在为新型疫苗的研制提供有价值的参考。

## 1 痘病毒活载体疫苗

痘病毒是基因组最大的 DNA 病毒,也是最早研究的病毒疫苗载体,1982 年首次报道牛痘病毒作为载体表达外源基因<sup>[5]</sup>,此后人们一直在从事痘病毒载体开发及重组病毒活载体疫苗的研究。痘病毒载体最大优势是容量大,其基因组约 180~300 kb,对外源基因插入耐受性强,至少可以容纳 30 kb 的外源片段而不丧失感染力<sup>[6]</sup>,可以插入多个外源基因,且有较高的表达水平,具备成为多价疫苗载体的良好前景。痘病毒有大量的非必需片段,其可用作插入外源基因的位点,胸苷激酶基因(Thymidine kinase gene, *TK*)是常用于外源基因插入的位点<sup>[7-8]</sup>。此外痘病毒具有增殖滴度高、稳定性好的特点,接种后可诱导细胞免疫和体液免疫,具有持久免疫力,细胞质中完成全部复制过程,不会整合到宿主基因组,因此安全性好<sup>[9]</sup>。目前主要的痘病毒载体包括痘苗病毒、牛痘苗病毒、鸡痘病毒(Fowlpox viruses, FPV)、猪痘病毒(Swinepox virus, SPV)、金丝雀痘病毒(Canarypox virus, CNPV)和羊痘病毒(Capripox, CPV)等活载体。痘病毒基因组庞大且不具备感染性,目前还没有足够容量的克隆载体构建反向遗传操作系统,构建重组痘病毒的常规方法是利用同源重组<sup>[10]</sup>。CRISPR/Cas9 基因编辑技术作为一种成熟的基因编辑技术,已应用于痘病毒重组

病毒疫苗的构建<sup>[11]</sup>。该技术也具有高效率、特异性、简单性和低成本等特点,特别适用于具有多种免疫原疫苗的构建。

重组痘病毒是最早用于商品化的兽用活载体疫苗,20 世纪 90 年代之后,表达新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)*F* 基因的重组鸡痘病毒、表达 NDV *HN* 和 *F* 基因的重组鸡痘疫苗和表达 H5 亚型禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)血凝素(*HA*)蛋白的禽痘载体疫苗陆续通过美国农业部(USDA)的认证并商品化<sup>[12]</sup>。除此之外,兽用疫苗领域应用禽痘病毒载体已成功表达了传染性法氏囊病毒(Infectious bursal disease virus, IBDV) *VP0*、*VP2* 和 *VP243* 基因<sup>[8, 13]</sup>、马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV) *gB* 和 *gC* 基因<sup>[14-15]</sup>、传染性喉气管炎病毒(Infectious laryngotracheitis virus, ILTV) *gB* 和 *gD* 基因<sup>[16-17]</sup>、传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV) *S1* 基因<sup>[18-19]</sup>、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) *GP3* 和 *GP5* 基因<sup>[20]</sup>、猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2) *ORF1* 和 *ORF2* 基因<sup>[19]</sup>以及口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus, FMDV)和小反刍兽疫病毒(Peste des petits ruminants virus, PPRV)的衣壳蛋白<sup>[19]</sup>等, *IL-18*、*IL-6*、*IFN II* 等细胞因子基因也与抗原基因分别或串联插入载体中,在机体中同时表达增强载体疫苗免疫效力<sup>[21-23]</sup>。山羊痘载体已应用于反刍类动物疫苗研究,包括表达 O 型 FMDV *VP1* 基因<sup>[24]</sup>、牛瘟病毒(Rinderpest virus, RPV) *H* 蛋白<sup>[25]</sup>、PPRV *H* 蛋白<sup>[26]</sup>、蓝舌病病毒(Blue tongue virus, BTV) *VP7* 蛋白<sup>[27]</sup>等疫苗的开发。猪痘病毒载体应用于表达 PCV2 型 *Cap* 蛋白、PRRSV 多表位肽<sup>[28]</sup>、猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2) 保护性抗原<sup>[29]</sup>的活载体疫苗的构建。金丝雀痘病毒载体系统已被用作一系列兽医疫苗的平台,包括针对犬瘟热病毒、猫白血病毒、狂犬病病毒和马流感病毒等疫苗<sup>[3]</sup>。

## 2 疱疹病毒活载体疫苗

疱疹病毒的基因组较大(约 150 kb),可以插入多个外源基因。疱疹病毒构建的活载体疫苗可诱导特异性黏膜免疫,可以在神经细胞中建立无症状的潜伏感染,实现一次接种,终生免疫。作为兽用疫苗活载体研究的疱疹病毒主要包括伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)、火鸡疱疹病毒(Herpesvirus of turkey, HVT)、鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)、鸭瘟病毒(Duck enteritis virus, DEV)和

牛疱疹病毒 I 型等。其中, HVT 和 PRV 活载体疫苗是病毒基因工程疫苗研究中的热点。由于病毒基因组较大, 早期重组疱疹病毒构建方法与重组痘病毒方法相同, 依赖同源重组技术。随着细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 的发明, 有了足够容量的载体容纳疱疹病毒基因组, 使得构建疱疹病毒感染性克隆成为现实。目前重组疱疹病毒构建主要基于 BAC 感染性克隆, 利用 Red/ET 等重组工程技术对病毒基因组进行修饰<sup>[30]</sup>。目前, CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术被报道用于 PRV<sup>[31]</sup>、DEV<sup>[32]</sup> 病毒载体疫苗的构建中。不同于痘病毒只能利用自身启动子, 疱疹病毒可以利用 CMV、SV40 和 CAG 等启动子启动外源基因表达, 病毒本身的 *gB*、*TK* 基因的启动子对启动外源基因的表达也有良好的效果<sup>[33]</sup>。

PRV 宿主范围很广, 猪是唯一的贮存宿主, PRV 也感染犬、羊、牛、猫、兔、狐狸、水貂等动物, 但不感染人。Bartha-K61 等疫苗毒株在世界养猪业已使用数十年, 其安全性已得到广泛的认同, 具有成为猪用疫苗载体的潜力。通过对 PRV 基因功能的研究发现, *gE*、*gI*、*gG*、*gC* 及 *TK* 等基因为复制非必须区, 其中 *gE*、*gI* 及 *TK* 为毒力相关基因, 通过敲除强毒株的 *gE*、*gI* 及 *TK* 实现病毒减毒致弱, 同时这些位点可作为外源免疫原基因的插入位置, 构建二联或多联多价疫苗<sup>[34]</sup>。Lei 等<sup>[35]</sup> 在 *gE/gI/TK* 基因缺失株 rPRV-TJ 的基础上构建了一种表达 CSFV E2 蛋白的重组病毒, 经过免疫的猪可产生抗 PRV 或抗 CSFV 的中和抗体。Klingbeil 等<sup>[36]</sup> 利用 Bartha 株 BAC 克隆, 将 *gG* 基因替换为密码子优化后的 H1N1 型猪流感病毒 (SIV) *HA* 基因, 重组病毒单次免疫可诱导高水平的 *HA* 特异性抗体。Hong 等<sup>[37]</sup> 以 PRV *TK/gE* 缺失株为载体, 构建能共同表达 FMDV 蛋白前体 P1-2A 和猪细小病毒 (Porcine Parvovirus, PPV) VP2 蛋白的重组 PRV, 结果表明该重组病毒具有较高的免疫原性和安全性。徐高原等<sup>[38]</sup> 用 *gG* 基因缺失的 PRV 表达日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 的 NS1 蛋白, 接种小鼠后能够抵抗 PRV 强毒的攻击, 也获得了对 JEV 的细胞免疫和体液免疫反应。邓晓辉<sup>[39]</sup> 在 *TK* 基因缺失的 PRV ZJ 株 BAC 克隆的基础上在 *gE* 基因插入 PPV VP2 和 PCV2 *Cap* 串联基因, 2 种抗原基因在重组病毒中均能够表达。除了病毒性抗原基因, 寄生虫抗原基因如日本血吸虫谷胱甘肽-S 转移酶 (*Sj26GST*) 和脂肪酸结合蛋白基因 (*SjFABP*)<sup>[40]</sup>、鼠弓形体 SAG1 和 MIC3 蛋白基因<sup>[41]</sup> 均可以利用 PRV 载体表达。

HVT 已被全世界家禽业广泛用作针对马立克氏病 (Marek's disease, MD) 的安全有效的疫苗。HVT 也被认为是构建表达外源抗原基因多价重组活疫苗和诱导产生保护性免疫最有效载体之一。HVT 在有母源抗体存在的情况下也能引起持续性感染, 将单剂疫苗接种于 18 胚龄的鸡胚或 1 日龄雏鸡即可诱导终生免疫。第 1 代 rHVT 疫苗是使用基因组重组技术生产的, 这种方法需耗费大量时间。目前广泛使用的方法是将 HVT 基因组克隆到黏粒 (Cosmid) 或细菌人工染色体 (BAC) 中, 利用反向遗传操作, 使其他病毒的保护性抗原基因能够快速、有针对性地插入到 HVT 基因组中<sup>[42]</sup>。Iqbal<sup>[43]</sup> 在携带 HVT 基因组的 BAC 克隆的基础上, 将高致病性 H7N1 型 AIV 病毒的 *HA* 基因插入 HVT 基因组中。重组病毒不仅提供针对高致病性 H7N1 型 AIV 的保护, 而且还提供针对强毒 MDV 的保护。Gergen 等<sup>[44]</sup> 将 NDV *F* 基因以及 ILTV *gD* 和 *gI* 基因插入 HVT 基因组非必需区域, 构建一个双重组 HVT, 通过卵内途径接种单剂量 HVT-NDV-ILT 的鸡可以产生高水平保护力, 免受速发型 NDV、ILTV 和 MDV 强毒的攻击 (保护率分别为 97%、94% 和 97%)。此外, HVT 被用于表达 H5N1 型 AIV *HA* 和 *NA* 基因<sup>[45]</sup>、NDV *HN* 基因和 *F* 基因<sup>[46]</sup>、IBDV *VP2* 基因<sup>[47]</sup>、禽白血病病毒 (Avian leukosis virus, ALV) *env/gag* 基因<sup>[48]</sup>、艾美球虫 *EalA* 基因<sup>[49]</sup>、鸡衣原体多型外膜蛋白片段 (PmpD-N)<sup>[50]</sup> 的保护性抗原的载体。由于 HVT 作为禽用疫苗载体具有巨大优势, 表达 NDV 的 F 蛋白、IBDV 的 VP2 蛋白和 H5 AIV 的 HA 抗原的重组 HVT (rHVT) 疫苗在美国、巴西等国家获得批准使用<sup>[51-53]</sup>。在我国传染性法氏囊病病毒、火鸡疱疹病毒载体活疫苗 (vHVT-013-69 株) 也已获得商业化应用。除了 HVT 载体, 其他禽类疱疹病毒也被开发用于疫苗载体, 例如 MDV-2 型的 SB-1 株<sup>[54]</sup> 和 MDV-1 型的 CVI988 株<sup>[55]</sup>, 这 2 种 MDV 疫苗载体增加了禽类病毒疫苗载体的选择。

DEV 减毒活疫苗具有安全性高、易于生产的优点, 能够诱导广泛和强烈的免疫应答, 在疫苗接种后数小时内诱导保护性免疫, 这些特征使 DEV 成为非常理想的水禽活病毒载体。目前可用于修饰 DEV 的方法策略与 HVT 基本相同, 利用同源重组或利用感染性克隆进行反向遗传操作。Liu 等<sup>[56]</sup> 通过同源重组方法将鹅源的 H5N1 型高致病性禽流感病毒 (HPAIV) 的 *HA* 基因插入 *US2* 或 *gI/gE* 基因缺失位点, 以构建表达 AIV HA 抗原的 2 株重组 DEV 病毒。Wang 等<sup>[57]</sup> 构建了 DEV 中国疫苗株



C-KCE BAC 克隆,利用同源重组将 H5N1 型 AIV HA 基因插入 DEV UL55 区并拯救出重组病毒,该重组病毒对 DEV 及 H5N1 型 AIV 均有良好的保护效果。Zou 等<sup>[58]</sup>将 1 型和 3 型鸭甲肝病毒 (Duck hepatitis A virus, DHAV) VP1 基因串联插入疫苗株 C-KCE UL27 和 UL26 之间,重组病毒对 1 型和 3 型 DHAV 攻毒均能完全保护。陈柳等<sup>[59-60]</sup>在鸭瘟病毒疫苗株感染性克隆的基础上,分别构建表达小鹅瘟病毒 (GPV) 主要免疫原蛋白 VP2 基因和鸭坦布苏病毒 (DTMUV) E 基因的重组病毒,重组病毒对雏鸭和雏番鸭 100% 安全,可诱导鸭产生外源蛋白特异性抗体,对 DEV 和 DTMUV 攻毒保护率均达到 100%。Zou 等<sup>[61]</sup>首次将 CRISPR / Cas9 系统应用于修饰 DEV 基因组,构建重组 DEV 病毒 C-KCE-HA / PrM-E,可以作为预防 H5N1 型 AIV、DTMUV 和 DEV 感染的三联活疫苗候选毒株。

ILTV 疫苗是家禽生产中广泛使用的疫苗,可通过滴鼻、喷雾或饮用水免疫预防多种疾病,操作便捷。Pavlova 等<sup>[62]</sup>研究表明 *gE*、*gI* 和 *pUS9* 基因缺失的 ILTV 可用于重组病毒载体。Veits 等<sup>[63]</sup>的研究表明 UL0 对于体外病毒复制是不必要的,UL0 缺失导致毒力减弱但仍具有良好的免疫保护效果,可插入外源基因,是一个良好的重组疫苗载体。Shao 等<sup>[64]</sup>在 US9 缺失的 ILTV 突变体中插入基因 VII 型 NDV 的 *F* 基因,试验证明重组病毒比 LaSota 疫苗更有效地限制了基因型 VII NDV 的复制,接种较低剂量疫苗也可提供足够的临床保护。

### 3 腺病毒活载体疫苗

腺病毒种类较多,宿主范围广,不同腺病毒基因组大小差异较大 (26~45 kb)。腺病毒可诱导先天性和获得性免疫<sup>[4, 65]</sup>,能引起强烈的体液免疫和细胞介导的抗原特异性应答<sup>[66]</sup>,并可通过注射和口服接种。对于兽用疫苗,腺病毒良好的热稳定性具有巨大的优势,使用简单生产工艺和疫苗佐剂即可在 45 °C 环境中保存 6 个月不失活,这对于偏远农牧地区疫苗保存和使用具有重要意义<sup>[67]</sup>。动物腺病毒 (AAV) 和人腺病毒 (HAV) 主要抗原决定衣壳蛋白之间的相似性较小,血清交叉中和能力较弱,AAV 能感染人体细胞但不能复制,因此不存在针对性免疫应答。同时 HAV 与 AAV 缺乏同源序列,因此共复制和重组现象概率较低。因此 AAV 应用于人载体疫苗更为安全,同理,HAV 也适用于动物载体疫苗<sup>[4]</sup>。

目前构建重组腺病毒活载体疫苗与培养的技术简单而成熟。腺病毒作为载体经历了 3 个阶段。

第 1 代腺病毒载体:一般将 *E1* 或 *E3* 基因缺失的腺病毒载体称为第 1 代腺病毒载体<sup>[68]</sup>,病毒失去了复制能力,此类型载体在未经过纯化时可引发机体产生较强的炎症反应和免疫反应,且产生了启动抑制外源基因表达的肿瘤坏死因子,纯化后可以安全使用,体内表达周期可达 4 周;第 2 代腺病毒载体:将 *E2* 区表达 DNA 结合蛋白的基因进行温度敏感性突变,使病毒在不适宜温度范围内晚期基因产物不表达,病毒滴度急剧下降,目前应用相当局限;第 3 代腺病毒载体缺失了全部或大部分腺病毒基因,仅可保留 *ITR* 和包装信号共约 500 bp 的顺式作用元件,需要有辅助病毒和互补细胞系才能包装产生病毒颗粒<sup>[69]</sup>。这一载体系统需要腺病毒突变体作为辅助病毒。目前兽用疫苗研究中广泛的腺病毒载体仍是第 1 代腺病毒载体,常用的有禽腺病毒 (FAvV) 和人腺病毒 5 型载体 (Human adenovirus type 5 vectors, Ad5)。基于腺病毒的兽医疫苗的开发有几个原因:1) 某些烈性传染病没有针对性的良好疫苗,例如裂谷热病毒 (Rift Valley fever virus, RVFV),表达 RVFV 表面糖蛋白的重组腺病毒单次剂量免疫可保护绵羊、山羊和牛免受 RVFV 致命威胁<sup>[70]</sup>;2) 现有的疫苗价格昂贵,例如狂犬病病毒灭活疫苗<sup>[71]</sup>,因此无法用于常规预防性接种,而以重组腺病毒为基础的狂犬疫苗成本较低,用于非人类灵长类动物,具有长达 22 个月的保护<sup>[71]</sup>;3) 现有的疫苗病毒易被母源抗体中和,从而早期免疫无效,例如犬瘟热病毒 (Canine distemper virus, CDV) 疫苗,而表达 CDV 糖蛋白的重组腺病毒疫苗对高母源抗体的幼犬也有效<sup>[71]</sup>。

禽腺病毒 FAdV-I *ORF8*、*ORF9*、*ORF10* 可作为外源基因插入位点,目前已报道的 FAdV 载体疫苗有表达 IBDV 的 *VP2* 基因<sup>[72]</sup>、IBV 的 *SI* 基因<sup>[73]</sup> 和 AIV HA 基因重组禽腺病毒,其都能起到良好的免疫保护效果。目前腺病毒载体在禽类上主要用于禽流感病毒疫苗的开发<sup>[74-76]</sup>。人腺病毒 5 型载体 (Ad5) 系统可以作为猪用疫苗载体,已有研究人员构建出表达 FMDV 核衣壳蛋白<sup>[77]</sup>、CSFV E2 蛋白<sup>[78]</sup> 和 PRRSV GP5 蛋白<sup>[79]</sup> 的重组腺病毒。

重组腺病毒的另一种用途是开发免疫区分型 (Differentiating infected from vaccinated animals, DIVA) 疫苗。重组腺病毒疫苗通常只表达 1 或 2 种来自相关病原体的蛋白,即主要中和抗体反应的抗原。因此,对疫苗的免疫反应只会是正常感染的一个子集,通常可以开发一种检测方法来区分疫苗接种和野毒感染的动物。在接种 DIVA 疫苗的地区也可以进行监控疫病感染,对于国际上通报畜禽病原

体, DIVA 疫苗提供了一种鉴别感染的方法, 从而保护健康动物的国际贸易。例如小反刍兽疫病毒 (PPRV), 它是绵羊和山羊的一种重要疾病病原, 对发展中国家造成严重影响。现有的 PPRV 减毒活疫苗不可能进行 DIVA 检测。而表达 PPRV 表面糖基蛋白的重组腺病毒可以保护绵羊/山羊免受疾病的侵袭<sup>[80]</sup>, 由于缺乏对高免疫原性核衣壳蛋白的抗体, 这种动物可以很容易地与受感染的动物区分开来<sup>[80]</sup>。并且这种疫苗的最低有效剂量相对较低<sup>[81]</sup>, 这使得 DIVA 疫苗即使对价值较低的绵羊和山羊家畜也具有成本效益。

## 4 新城疫病毒活载体疫苗

新城疫病毒 (NDV) 疫苗广泛用于养禽生产中, NDV 作为载体具有很多优点: NDV 疫苗免疫保护效果好; 病毒重组率低, 安全性高; 可在鸡胚上增殖, 生产成本低; 比较稳定, 可以通过饮水或气雾方式进行免疫; 可以诱发黏膜免疫; 表达蛋白少, 对宿主的免疫干扰小。作为 RNA 病毒, 重组新城疫病毒构建依赖反向遗传操作系统。1999 年, Peeters 等<sup>[82]</sup>构建基于 T7 RNA 聚合酶的 NDV 反向遗传学系统并拯救出 NDV Lasota 疫苗株。此后 NDV 反向遗传操作系统逐渐发展成熟, 也为 NDV 活载体疫苗的发展打下基础。Nakaya 等<sup>[83]</sup>利用 NDV 反向遗传操作系统将 AIV HA 基因插入到 NP 上游, NP 与 P、P 与 M、M 与 F、F 与 HN 基因之间及 L 基因下游均能拯救获得重组病毒, AIV HA 基因也均可表达, 外源基因插入位置越接近 NDV 基因组的 3' 末端表达量越高, 但对 NDV 复制的干扰也更强, Zhao 等<sup>[84]</sup>成功将 GFP 基因插入 NDV VG/GA 疫苗株不同的基因之间 (NP/P、P/M、M/F、F/HN 和 HN/L) 并拯救重组病毒。通过分析不同重组病毒 GFP mRNA 的表达量发现, P 和 M 基因之间的非编码区是外源基因在 NDV 基因组中的最佳插入位置。有研究人员将 NDV 的 F 和 HN 蛋白的胞外域用禽副黏病毒 2 型 (APMV-2) 或禽副黏病毒 8 型 (APMV-8) 的对应部分替代, 在此基础上嵌合 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒 HA 蛋白, 拯救的重组嵌合 NDV 与 NDV 特异性抗体反应性低, 免疫商品鸡后, 能克服 NDV 母源抗体的干扰, 并能有效诱导产生针对 HA 的抗体, 可抵抗 H5N1 亚型 HPAIV 的攻击<sup>[85-86]</sup>。目前 NDV 载体主要用于表达 H5、H7、H9 型 HA 及 NA 基因疫苗的研制。在我国, 以 LaSota 疫苗株为载体构建的表达 AIV H5 亚型 HA 基因的重组新城疫病毒所研制的禽流感、新城疫重组二联活疫苗 (rL H5 株) 于 2007 年获得新兽药证书<sup>[87]</sup>。报道显

示, 以 NDV 作为载体成功构建的表达 IBDV 的 VP2 基因<sup>[86]</sup>、ILTV 的糖蛋白 gB 和 gD 基因<sup>[88]</sup> 和 IBV SI 基因<sup>[89]</sup> 的重组 NDV 具有良好的安全性和免疫保护力。

## 5 其他动物病毒载体疫苗

水泡性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV)、口服脊髓灰质炎减毒活疫苗 (Oral poliovirus vaccine, OPV) 在人用载体疫苗方面研究较多, 在动物疫苗方面也有少量应用。柯勇等<sup>[90]</sup>以 VSV 为载体, 利用反向遗传操作在 G 和 L 基因间插入猪流行性腹泻病病毒 (Porcine epidemic diarrhoeal disease virus, PEDV) 纤突蛋白 S 基因并成功拯救重组病毒, 重组病毒能够有效激发机体产生高水平中和抗体。OPV 可作为载体表达口蹄疫病毒的抗原表位, 重组病毒可以诱导动物产生特异性中和抗体, 保护试验动物不受口蹄疫病毒攻击<sup>[12]</sup>。猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 作为一种 RNA 病毒, 有学者将其疫苗毒株开发为疫苗载体, 例如以 PRRSV 为载体成功构建了表达 CSFV E2 蛋白<sup>[91]</sup> 和 PCV2 ORF2 基因<sup>[92]</sup> 的重组病毒。鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 属于  $\gamma$  冠状病毒, 是基因组最大的 RNA 病毒之一, 研究人员构建了 IBV 疫苗株反向遗传系统, 利用反向遗传操作技术将纤突蛋白 SI 基因替换成流行毒株 SI 基因, 重组疫苗株能够对供体流行毒株的攻击提供保护<sup>[93]</sup>。Yang 等<sup>[94]</sup>利用 IBV H120 株反向遗传操作系统将 5ab 基因替换为 NDV HN 基因, 拯救获得的重组病毒能够表达蛋白并能诱导机体产生保护性抗体。

## 6 展望

不同的病毒载体在刺激机体免疫方面存在差异, 例如在小鼠的疟疾模型中, 与腺病毒载体相比, 痘病毒 MVA 载体诱导较低的 CD8<sup>+</sup> T 细胞应答, 在第 1 周即达到峰值, 且能增加 T<sub>CM</sub> 细胞 (Central memory T cells) 的产生。而腺病毒载体持续抗原表达, 导致动力学延迟, T<sub>E</sub> (Effector T cells) 和 T<sub>EM</sub> (Effector memory T cells) 反应缓慢且持续, CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 细胞在 3 周时达到峰值, 这种现象可能与抗原表达的持续时间有关<sup>[95]</sup>。此外, 痘病毒载体和腺病毒载体易受母源抗体及体内中和抗体影响, 导致免疫失败, 因此在腺病毒载体选择上常使用不同血清型的异源动物的腺病毒作为载体, 痘病毒载体在插入免疫原基因的同时会插入白介素或干扰素等免疫调节因子, 提高免疫应答的同时减少痘病毒载体本身的免疫抑制反应。而疱疹病毒 HVT 作为载

体受母源抗体影响小,一次免疫后终生持续存在。在选择能够诱导特定抗原基因的适当免疫应答的病毒载体时,应考虑以上载体性质。目前有研究将不同病毒载体与已知或新的佐剂组合,增加或进一步调节引发的免疫应答。

兽医疫苗学作为一门学科正面临着许多挑战。目前畜牧业集约化养殖模式也催生了一系列问题,疫病防控便是其中最重要的问题,生产中使用的的大多数疫苗都是几十年前开发的,由于长期疫苗选择,病毒抗原漂移与转换成病毒抗原特性发生了很大的变化,导致疫苗对流行毒株效果不佳。此外,新的疫病如高致病性禽流感、非洲猪瘟等不断出现,也给畜牧业造成了巨大的威胁。高强度的疫苗免疫对动物生长及生产造成了负面影响,同时对于规模化养殖场也是巨大的劳动负担。对于这些问题,病毒活载体疫苗提供了一种解决方案。利用病毒活载体可以快速获得针对流行毒株的疫苗候选毒株,大大缩短了疫苗研发时间;构建多联多价疫苗可以减少免疫次数及改变免疫方法,减少了免疫工作量。同时病毒活载体疫苗的研制也对疫苗研发者提出了更高的要求,在病毒载体、抗原基因的选择、插入基因位置、病毒稳定性与外源基因表达量、佐剂选择等方面做出调整与优化才能最大程度发挥载体疫苗的效果。目前使用腺病毒、疱疹病毒和痘病毒作为活疫苗载体,在人类医学和兽医学领域都得到了广泛的研究,作为一种转基因产物,其安全性仍是人们最关心的问题。进一步提高病毒活载体疫苗的安全性与靶向性是未来载体疫苗发展的方向。活载体疫苗等新型疫苗显示出广阔的应用前景,其具备的一系列显著优势必将得到更加深入和广泛的研究与应用,并将为畜禽等动物传染性疾病防治以及食品安全和人类健康发挥重要作用。

#### 参考文献:

- [1] COSTA C D, WALKER B, BONAVIDA A. Tuberculosis vaccines: State of the art, and novel approaches to vaccine development[J]. *Int J Infect Dis*, 2015, 32: 5-12.
- [2] DRAPER S, HEENEY J. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(1): 62-73.
- [3] JORGE S, DELLAGOSTIN O A. The development of veterinary vaccines: A review of traditional methods and modern biotechnology approaches[J]. *Biotechnol Res Innov*, 2017, 1(1): 6-13.
- [4] ERTL H C J. Viral vectors as vaccine carriers[J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 21: 1-8.
- [5] MACKETT M, SMITH G L, MOSS B. Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(23): 7415-7419.
- [6] FAKRI F, BAMOUH Z, GHZAL F, et al. Comparative evaluation of three capripoxvirus-vectored peste des petits ruminants vaccines[J]. *Virology*, 2018, 514: 211-215.
- [7] 郭巍, 曲娟娟, 相文华, 等. 通用山羊痘病毒 TK 基因缺失转移载体的构建[J]. *吉林农业大学学报*, 2008, 30(5): 739-742.
- [8] 金宁一, 刘毅, 郭志儒, 等. 重组传染性法氏囊病病毒 VP2/VP243 基因表达及保护性和免疫原性[J]. *中国生物制品学杂志*, 2000, 13(1): 2-5.
- [9] 庞乐君, 刁天喜. 痘病毒疫苗载体[J]. *国际药学研究杂志*, 2004, 31(3): 154-157.
- [10] 孙蕾, 吴艳涛, 张体银, 等. 鸡痘病毒通用高效表达载体的构建及其初步应用[J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(5): 429-432.
- [11] OKOLI A, OKEKE M I, TRYLAND M, et al. CRISPR/Cas9: Advancing orthopoxvirus genome editing for vaccine and vector development[J]. *Viruses*, 2018, 10(1): 50-76.
- [12] 郝晓芳, 张加勇, 徐佳, 等. 重组病毒载体疫苗的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2016(13): 68-71.
- [13] 刘毅, 金宁一, 郭志儒, 等. 传染性法氏囊病病毒 VP2/VP0 基因在重组鸡痘病毒中的表达[J]. *中国兽医学报*, 1999, 19(2): 126-128.
- [14] LEE L F, BACON L D, YOSHIDA S, et al. The efficacy of recombinant fowlpox vaccine protection against marek's disease: Its dependence on chicken line and B haplotype[J]. *Avi Dis*, 2004, 48(1): 129-137.
- [15] HEINE H G, FOORD A J, YOUNG P L, et al. Recombinant fowlpox virus vaccines against Australian virulent marek's disease virus: Gene sequence analysis and comparison of vaccine efficacy in specific pathogen free and production chickens[J]. *Vir Res*, 1997, 50(1): 23-33.
- [16] 姬向波. 传染性喉气管炎 (ILTV) 重组鸡痘病毒 (rFPV-gB-gD-IgG) 和 DNA(pcDNA-gB) 疫苗对鸡免疫效果的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [17] 姬向波, 刘文波, 魏建超, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒 gB 基因重组 DNA 疫苗的构建与免疫试验[J]. *中国病毒学*, 2006, 21(5): 481-484.
- [18] 管倩. 鸡传染性支气管炎病毒 SI 基因与鸡 IL-18 基因在禽痘病毒载体中的共表达[D]. 郑州: 河南农业大学, 2008.
- [19] TIAN Z C, SUN Y K, WANG Y F, et al. The immunological efficacies of recombinant fowlpox virus expressing the SI gene of LX4 strain of infectious bronchitis virus in specific-pathogen-free (SPF) chickens[J]. *Acta Vet Et Zoo techn Sin*, 2006, 37(6): 580-586.
- [20] 沈国顺, 金宁一, 秦晓光, 等. 表达 PRRSV GP5、GP3 和猪 IL-18 的重组鸡痘病毒的构建及鉴定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2006, 19(6): 583-585.
- [21] 许晨旭. 共表达 H5 亚型 AIV HA 基因和鸡 IL-6 基因重组鸡痘病毒的构建及免疫效力评价[D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
- [22] 王振国, 金宁一, 马鸣啸, 等. 共表达 H5 亚型 AIV HA 基因与鸡 IL-18 基因的重组鸡痘病毒的构建[J]. 中



- 国兽医学报, 2006, 26(4): 390-393.
- [23] 程坚, 刘秀梵, 彭大新, 等. 表达鸡 II 型干扰素基因的重组鸡痘病毒的构建[J]. *农业生物技术学报*, 2002, 10(2): 152-155.
- [24] 李继东, 才学鹏. O 型口蹄疫病毒 VP1 基因重组山羊痘病毒活载体疫苗的研究[J]. *宁夏大学学报(自然版)*, 2017, 38(4): 371-376.
- [25] 文明, 程振涛, 岳筠, 等. 山羊痘病毒 P32 基因序列分析及其 B 细胞表位预测[J]. *生物技术*, 2007, 17(5): 12-14.
- [26] 孙一瑞, 张敏敏, 李翠翠, 等. 采用非洲地区广泛应用的绵羊痘弱毒株构建表达小反刍兽疫病毒 H 蛋白的重组疫苗[J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(3): 226-229.
- [27] 冯杰, 崔燕, 余四九, 等. 羊痘病毒及其载体研究进展[J]. *贵州畜牧兽医*, 2018(1).
- [28] 范红结, 蔺辉星, 陆承平. 表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的重组猪痘病毒载体疫苗及其制备方法: CN201210340309.6[P]. 2012-12-19.
- [29] 黄冬艳. 表达猪链球菌 2 型保护性抗原重组猪痘病毒的构建、特性分析及其小鼠免疫评估[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [30] LAN D, SHI X, WANG Y, et al. Construction of a recombinant HVT virus expressing the HA gene of avian influenza virus H5N1 via Rde/ET recombination system[J]. *Acta Microbiol Sin*, 2009, 49(1): 78-84.
- [31] 于之清, 童武, 郑浩, 等. 使用 CRISPR/Cas9 技术构建新型重组伪狂犬病毒疫苗的初步研究[J]. *中国动物传染病学报*, 2017, 25(4): 6-12.
- [32] 邹忠, 黄坤, 金梅林. 基于 CRISPR/Cas9 技术构建鸭肠炎病毒载体-禽流感-鸭坦布苏病毒基因工程三价疫苗[C]//中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会生物技术学分会暨中国免疫学会兽医免疫分会第十二次学术研讨会论文集. 昆明: 哈尔滨维科生物技术开发公司, 2016: 266.
- [33] 王林青, 郑兰兰, 李坤, 等. 猪伪狂犬病毒载体重组疫苗研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(2): 160-164.
- [34] 吴昌义, 林瑞庆, 袁子国. 伪狂犬病毒作为疫苗载体的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2010(15): 30-32.
- [35] LEI J L, XIA S L, WANG Y M, et al. Safety and immunogenicity of a *gE/gI/TK* gene-deleted pseudorabies virus variant expressing the E2 protein of classical swine fever virus in pigs[J]. *Immunol Lett*, 2016, 174: 63-71.
- [36] KLINGBEIL K, LANGE E, TEIFKE J P, et al. Immunization of pigs with an attenuated pseudorabies virus recombinant expressing the haemagglutinin of pandemic swine origin H1N1 influenza A virus[J]. *J Gen Virol*, 2014, 95(4): 948-959.
- [37] HONG Q, QIAN P, LI X, et al. A recombinant pseudorabies virus co-expressing capsid proteins precursor P1-2A of FMDV and VP2 protein of porcine parvovirus: A trivalent vaccine candidate[J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(11): 1677-1683.
- [38] 徐高原, 陈焕春, 徐晓娟, 等. 乙型脑炎重组伪狂犬病毒 TK-gG-NS1+ 的安全性及免疫性[J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(2): 145-147.
- [39] 邓晓辉. 共表达猪细小病毒 VP2 和猪圆环病毒 2 型 Cap 的重组伪狂犬病毒的构建及其鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [40] WEI F, ZHAI Y J, JIN H T, et al. Development and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing Sj26GST and SjFABP from *Schistosoma japonicum*[J]. *Vaccine*, 2010, 28(32): 5161-5166.
- [41] NIE H, FANG R, XIONG B Q, et al. Immunogenicity and protective efficacy of two recombinant pseudorabies viruses expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 and MIC3 proteins[J]. *Vet Parasitol*, 2011, 181(2/3/4): 215-221.
- [42] BAIGENT S J, PETHERBRIDGE L J, SMITH L P, et al. Herpesvirus of turkey reconstituted from bacterial artificial chromosome clones induces protection against Marek's disease[J]. *J Gen Virol*, 2006, 87(4): 769-776.
- [43] IQBAL M. Progress toward the development of polyvalent vaccination strategies against multiple viral infections in chickens using herpesvirus of turkeys as vector[J]. *Bioengineered*, 2012, 3(4): 222-226.
- [44] GERGEN L, COOK S, LEDESMA B, et al. A double recombinant herpes virus of turkeys for the protection of chickens against Newcastle, infectious laryngotracheitis and Marek's diseases[J]. *Avian Pathol*, 2019, 48(1): 45-56.
- [45] 赵冬凤, 高轩, 刘新文, 等. 表达 H5N1 亚型禽流感 HA-NA 基因重组火鸡疱疹病毒的构建[J]. *中国动物检疫*, 2008, 25(4): 20-22.
- [46] SHARMA J M, ZHANG Y, JENSEN D, et al. Field trial in commercial broilers with a multivalent in ovo vaccine comprising a mixture of live viral vaccines against Marek's disease, infectious bursal disease, newcastle disease, and fowl pox[J]. *Avian Dis*, 2002, 46(3): 613-622.
- [47] DARTEIL R, BUBLLOT M, LAPLACE E, et al. Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens[J]. *Virology*, 1995, 211(2): 481-490.
- [48] LIU Y, LI K, GAO Y, et al. Recombinant Marek's disease virus as a vector-based vaccine against avian leukosis virus subgroup J in chicken[J]. *Viruses*, 2016, 8(11): 301-313.
- [49] CRONENBERG A M, VAN GEFFEN C E, DORRESTEIN J, et al. Vaccination of broilers with HVT expressing an *Eimeria acervulina* antigen improves performance after challenge with *Eimeria*[J]. *Acta Virol*, 1999, 43(2/3): 192.
- [50] 何诚, 刘杉杉, 褚军, 等. 鸚鵡热衣原体重组 HVT 活载体疫苗的构建与免疫效力测定[C]//中国畜牧兽医学会 2014 年学术年会论文集. 广州: 中国畜牧兽医学会, 2014: 243.
- [51] Merial. VAXXITEK[R/OL]. (2016-02-12)[2019-04-13]. <https://www.merial.us/vaxxitek.aspx>.
- [52] Ceva. VECTORMUNE[R/OL]. (2014-04-15)[2019-04-12]. <https://www.vectormune.com/>.
- [53] MSD. INNOVAX[R/OL]. (2015-06-22)[2019-04-12]. <https://www.innovax-vaccines.com/>.

- [54] PETHERBRIDGE L, XU H, ZHAO Y, et al. Cloning of *Gallid herpesvirus 3* (Marek's disease virus serotype-2) genome as infectious bacterial artificial chromosomes for analysis of viral gene functions[J]. *J Virol Meth*, 2009, 158(1): 11-17.
- [55] ISHIHARA Y, ESAKI M, SAITOH S, et al. Combination of two Marek's disease virus vectors shows effective vaccination against Marek's disease, infectious bursal disease, and newcastle disease[J]. *Avian Dis*, 2016, 60(2): 473.
- [56] LIU X, WEI S, LIU Y, et al. Recombinant duck enteritis virus expressing the HA gene from goose H5 subtype avian influenza virus[J]. *Vaccine*, 2013, 31(50): 5953-5959.
- [57] WANG J, GE A, XU M, et al. Construction of a recombinant duck enteritis virus (DEV) expressing hemagglutinin of H5N1 avian influenza virus based on an infectious clone of DEV vaccine strain and evaluation of its efficacy in ducks and chickens[J]. *Virol J*, 2015, 12: 126-139.
- [58] ZOU Z, MA J, HUANG K, et al. Live attenuated vaccine based on duck enteritis virus against duck hepatitis a virus types 1 and 3[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1613.
- [59] 陈柳, 余斌, 倪征, 等. 表达小鹅瘟病毒 VP2 蛋白重组鸭瘟病毒的构建及其生物学特性[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(14): 2813-2821.
- [60] 陈柳, 余斌, 倪征, 等. 表达鸭坦布苏病毒 E 蛋白的重组鸭瘟病毒的构建及其生物学特性[J]. *浙江农业学报*, 2015, 27(11): 1889-1895.
- [61] ZOU Z, HUANG K, WEI Y, et al. Construction of a highly efficient CRISPR/Cas9-mediated duck enteritis virus-based vaccine against H5N1 avian influenza virus and duck Tembusu virus infection[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 1478. [2019-04-15]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01554-1>.
- [62] PAVLOVA S, VEITS J, METTENLEITER T C, et al. Identification and functional analysis of membrane proteins gD, gE, gI, and pUS9 of Infectious laryngotracheitis virus[J]. *Avian Dis*, 2013, 57(S2): 416-426.
- [63] VEITS J, METTENLEITER T C, FUCHS W. Five unique open reading frames of infectious laryngotracheitis virus are expressed during infection but are dispensable for virus replication in cell culture[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(6): 1415-1425.
- [64] SHAO Y, SUN J, HAN Z, et al. Recombinant infectious laryngotracheitis virus expressing Newcastle disease virus F protein protects chickens against infectious laryngotracheitis virus and Newcastle disease virus challenge[J]. *Vaccine*, 2018, 36(52): 7975-7986.
- [65] EWER K J, LAMBE T, ROLLIER C S, et al. Viral vectors as vaccine platforms: From immunogenicity to impact[J]. *Curr Opin Immunol*, 2016, 41: 47-54.
- [66] ZHU J, HUANG X, YANG Y. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both toll-like receptor-dependent and -independent pathways[J]. *J Virol*, 2007, 81(7): 3170-3180.
- [67] ALCOCK R, COTTINGHAM M G, ROLLIER C S, et al. Long-term thermostabilization of live poxviral and adenoviral vaccine vectors at supraphysiological temperatures in carbohydrate glass[J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(19): 12-19.
- [68] ALI M, LEMOINE N R, RING C J. The use of DNA viruses as vectors for gene therapy[J]. *Gen Ther*, 1994, 1(6): 367-384.
- [69] MORRAL N, O'NEAL W, RICE K, et al. Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12816-12821.
- [70] WARIMWE G M, GESCHARISHA J, CARR B V, et al. Chimpanzee adenovirus vaccine provides multispecies protection against rift valley fever[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6:20617. [2019-04-16]. <https://doi.org/10.1038/srep20617>.
- [71] PANNIPA C, PAKAMATZ K, PIYALAMPORN H, et al. Cost comparison of rabies pre-exposure vaccination with post-exposure treatment in Thai children[J]. *Vaccine*, 2006, 24(9): 1478-1482.
- [72] 潘群兴, 王永山, 何孔旺, 等. 传染性法氏囊病病毒株 VP2 基因在重组腺病毒中的表达[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(3): 312-316.
- [73] 耿合员, 孙元, 韩宗玺, 等. 表达鸡传染性支气管炎病毒 SI 基因重组腺病毒的构建[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(3): 173-176.
- [74] HASSAN A O, AMEN O, SAYEDAHMED E E, et al. Adenovirus vector-based multi-epitope vaccine provides partial protection against H5, H7, and H9 avian influenza viruses[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e186244.
- [75] WANG X, WANG X, JIA Y, et al. Coadministration of recombinant adenovirus expressing GM-CSF with inactivated H5N1 avian influenza vaccine increased the immune responses and protective efficacy against a wild bird source of H5N1 challenge[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2017, 37(10): 467-473.
- [76] LIN S C, LIU W C, LIN Y F, et al. Heterologous prime-boost immunization regimens using adenovirus vector and virus-like particles induce broadly neutralizing antibodies against H5N1 avian influenza viruses[J]. *Biotechnol J*, 2013, 8(11): 1315-1322.
- [77] MEDINA G N, MONTIEL N, STURZA D, et al. Evaluation in cattle of fiber-modified adenovirus vector-vaccine against foot-and-mouth disease[J]. *Clin Vacc Immunol Cvi*, 2015, 23(2): 415-426.
- [78] SUN Y, TIAN D Y, Su L, et al. Comprehensive evaluation of the adenovirus/alphavirus-replicon chimeric vector-based vaccine rAdV-SFV-E2 against classical swine fever[J]. *Vaccine*, 2013, 31(3): 528-544.
- [79] YUAN S, TIAN D Y, LI S, et al. Comprehensive evaluation of the adenovirus/alphavirus-replicon chimeric vector-based vaccine rAdV-SFV-E2 against classical swine fever[J]. *Vaccine*, 2013, 31(3): 538-544.
- [80] ROJAS J M, MORENO H, VALCÁRCEL F, et al. Vaccination with recombinant adenoviruses expressing the



- peste des petits ruminants virus F or H proteins overcomes viral immunosuppression and induces protective immunity against PPRV challenge in sheep[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101226.
- [81] HOLZER B, TAYLOR G, RAJKO-NENOW P, et al. Determination of the minimum fully protective dose of adenovirus-based DIVA vaccine against peste des petits ruminants virus challenge in East African goats[J]. *Vet Res*, 2016, 47(1): 1-6.
- [82] PEETERS B P, LEEUW O S D, KOCH G, et al. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence[J]. *J Virol*, 1999, 73(6): 5001-5009.
- [83] NAKAYA T, CROS J, PARK M S, et al. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector[J]. *J Virol*, 2001, 75(23): 11868-11873.
- [84] ZHAO W, ZHANG Z, ZSAK L, et al. P and M gene junction is the optimal insertion site in Newcastle disease virus vaccine vector for foreign gene expression[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(1): 40-45.
- [85] STEGLICH C, GRUND C, RAMP K, et al. Chimeric newcastle disease virus protects chickens against avian influenza in the presence of maternally derived NDV immunity[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72530.
- [86] KIM S, PALDURAI A, SAMAL S K. A novel chimeric Newcastle disease virus vectored vaccine against highly pathogenic avian influenza virus[J]. *Virology*, 2017, 503: 31-36.
- [87] 邹伟斌, 陈丹, 谢少霞, 等. 基因工程活载体疫苗的研究进展[J]. *广东畜牧兽医科技*, 2016, 41(4): 1-5.
- [88] ZHAO W, SPATZ S, ZHANG Z Y, et al. Newcastle disease virus (NDV) recombinants expressing infectious laryngotracheitis virus (ILTV) glycoproteins gB and gD protect chickens against ILTV and NDV challenges[J]. *J Virol*, 2014, 88(15): 8397-8406.
- [89] ZHAO R, SUN J, QI T, et al. Recombinant Newcastle disease virus expressing the infectious bronchitis virus S1 gene protects chickens against Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus challenge[J]. *Vaccine*, 2017, 35(18): 2435-2442.
- [90] 柯勇, 肖贤, 毕波, 等. 表达猪流行性腹泻病毒纤突蛋白的重组水泡性口炎病毒构建和鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(2): 76-82.
- [91] 高飞, 曲泽慧, 姜一峰, 等. 重组猪瘟病毒 C 株 E2 蛋白的猪繁殖与呼吸综合征病毒的构建及鉴定[J]. *中国动物传染病学报*, 2015, 23(5): 1-9.
- [92] 张挺杰, 刘星, 孙涛, 等. 表达猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因的重组猪繁殖与呼吸综合征病毒的构建与鉴定[J].

病毒学报, 2015(1): 65-73.

- [93] ARMESTO M, EVANS S, CAVANAGH D, et al. A recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene belonging to the 4/91 serotype[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e24352.
- [94] YANG X, ZHOU Y, LI J, et al. Recombinant infectious bronchitis virus (IBV) H120 vaccine strain expressing the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against IBV and NDV challenge[J]. *Arch Virol*, 2016, 161(5): 1209-1216.
- [95] ARTURO R S, SARANYA S, TAMARA B, et al. Single-dose immunogenicity and protective efficacy of simian adenoviral vectors against *Plasmodium berghei*[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 41(5): 732-741.

【责任编辑 李晓卉】



谢青梅, 珠江学者, 主要从事动物免疫与生物安全、动物健康养殖领域的教学科研工作。担任华南农业大学动物科学学院副院长、广东省第十二次党代会代表、广东省家禽产业技术体系首席专家等职务。

兼任广东省动物病毒载体疫苗工程技术研发中心副主任, 广东省畜禽健康养殖与环境控制企业重点实验室副主任, 中国畜牧兽医学会禽病学分会常务理事、动物微生物学会常务理事、世界家禽学会会员。2011—2012 年赴美国农业部农业研究中心禽病与肿瘤研究所和美国密歇根州立大学访问学习。近 5 年, 承担国家自然科学基金等课题 28 项, 发表学术论文 200 多篇, 其中以第一作者或通信作者发表 SCI 论文 65 篇, 且以主要共同作者在《Nature》上发表论文 1 篇。申请国家发明专利 33 项, 获授权专利 14 项。曾获得广东省科学技术三等奖等科研奖励 9 项。独立培养硕士研究生 46 人、博士生 7 人、博士后 3 人, 获得广东省教学成果一等奖 2 项、二等奖 1 项和华南农业大学教学成果一等奖 6 项。获得“全国巾帼建功标兵”“南粤优秀教师”“广东省畜牧兽医杰出科技工作者”“广州市优秀女科技工作者”“华南农业大学优秀共产党员”“华南农业大学教书育人奖”“十佳班主任”和“十佳导师”等荣誉称号。