

## 基于 Erns 和 E2 基因的猪瘟标记疫苗研究概述

刘元杰 邹兴启 徐璐 朱元源 张乾义 王琴 赵启祖\*

(中国兽医药品监察所 北京 100081)

**摘要:** 猪瘟(Classical swine fever, CSF)是猪的一种急性、热性和致死性传染病。该病流行范围很广,而且致死率极高,给世界养猪业造成严重危害。目前,猪瘟流行地区或国家仍然采用接种弱毒疫苗的方法作为预防猪瘟的主要策略,但接种弱毒疫苗的传统预防控制方法无法区别猪瘟疫苗免疫抗体和野毒感染抗体。为了净化、消灭猪瘟,新型标记疫苗的研究已迫在眉睫。近些年,陆续有国内外研究者应用分子生物学和基因工程方法,对猪瘟野毒株或弱毒株进行基因修饰构建出新毒株,其中以 Erns 和 E2 为基础构建新毒株的方法占据着重要地位。部分候选疫苗具有较好的免疫效果,可用于区分免疫和自然感染动物,而且有望作为新一代疫苗来替代传统弱毒疫苗。

**关键词:** 猪瘟, 标记疫苗, Erns 和 E2, 基因突变, 基因重组

## Overview of researches on CSF marker vaccine based on Erns and E2

LIU Yuan-Jie ZOU Xing-Qi XU Lu ZHU Yuan-Yuan ZHANG Qian-Yi  
WANG Qin ZHAO Qi-Zu\*

(China Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Classical swine fever (CSF) is a kind of infectious disease which could induce acute, febrile and fatal disease in swine. This disease displays with wild prevalence and high mortality, and could lead to significant damage for the pig industry all over the world. At present, most CSF epidemic countries or areas still prevent the CSF virus (CSFV) infection mainly by the vaccination of CSFV live-attenuated vaccine (LAV). However, the traditional LAV could not differentiate the CSFV antibody of vaccinated pigs from infected ones, so it is very urgent to develop the new tag vaccines to purge and even eliminate CSF. In recent years, many domestic and international researchers continuously modify the genome of CSFV wild strains or attenuated strains by molecular biology and genetic engineering methods to construct new LAVs allow differentiation between infected and vaccinated animals (DIVA), and most of which are established based on Erns and E2 genes. Among these DIVA vaccines, some candidate vaccines could produce good immune effects and could be

**Foundation item:** Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest of China (No. 201303046)

\***Corresponding author:** Tel: 86-10-62103670; E-mail: zhaoqizu@163.com

**Received:** July 09, 2017; **Accepted:** November 09, 2017; **Published online** (www.cnki.net): November 10, 2017

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费资助(No. 201303046)

\*通讯作者: Tel: 86-10-62103670; E-mail: zhaoqizu@163.com

收稿日期: 2017-07-09; 接受日期: 2017-11-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-11-10

used to differentiate naturally infected pigs from vaccinated ones, and they are hopeful to replace the traditional attenuated strain vaccines in the future.

**Keywords:** CSF, Marker vaccine, Erns and E2, Genetic mutation, Gene recombination

## 1 引言

### 1.1 猪瘟和猪瘟病毒

猪瘟是由猪瘟病毒引起的高度接触性传染病,最早发现于美国俄亥俄州。世界动物卫生组织(OIE)将其列入 OIE 疫病名录(OIE-listed diseases),为必须申报的(Notifiable)动物传染病,我国也将其列为一类动物传染病<sup>[1]</sup>。该病在世界范围内流行,以流行范围广、发病率和致死率高为主要特征,给世界养猪业造成严重的危害。1997–1998 年荷兰猪瘟暴发造成的经济损失总计超过 2 亿美元<sup>[2]</sup>。近年来,猪瘟在亚洲、欧洲、南美洲等地区呈现复发的趋势,一些宣布已消灭猪瘟的国家(如法国、荷兰、德国、比利时等)又见猪瘟复发的报道<sup>[3]</sup>。目前,我国主要通过弱毒疫苗免疫防治猪瘟。C 株是全世界公认的具有良好免疫效果的弱毒疫苗,是由中国兽医药品监察所专家将猪瘟石门系强毒在兔体上连续传几百代后得到的免化弱毒疫苗<sup>[4]</sup>。世界范围内广泛使用的疫苗,包括东欧和其他亚洲国家的 K 株和 LC 株以及拉美国家的 Remis 株都是由 C 株演变而来。在我国,C 株一直在预防猪瘟方面起着非常重要的作用,王琴等对我国流行的不同临床致病力和不同基因亚型的 9 株猪瘟病毒流行毒株进行了免疫保护效力研究,结果表明,以 C 株疫苗种毒生产的猪瘟活疫苗(传代细胞源)对我国目前流行的猪瘟病毒高、中、低致病力毒株及不同基因亚型(1.1、2.1、2.2)流行毒株均具有很强的保护力,且免疫猪接种不同流行毒株毒后不排毒<sup>[5]</sup>,研究结果为我国继续使用猪瘟免化弱毒疫苗进行全面免疫提供了重要科学依据。但是,传统 C 株疫苗具有一定的局限性,不能区分免疫和自然感染动物,为了净化、消灭猪瘟,新型猪瘟标记疫苗将发挥重要作用<sup>[6]</sup>。

猪瘟病毒(CSFV)基因组大小约为 12.3 kb,含

有一个大的开放阅读框(ORF),编码一个 3 898 个氨基酸组成的多聚蛋白,该多聚蛋白由 4 个成熟的结构蛋白和 8 个非结构蛋白组成,各蛋白的排列顺序从 N 端到 C 端依次为 NH<sub>2</sub>-N<sup>Pro</sup>-C-Erns-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH。核心蛋白 C 是 CSFV 编码的第一个结构蛋白,比较保守,有结合病毒基因组 RNA、保护 RNA 和转录调节的作用。其抗原表位对 T、B 淋巴细胞介导的免疫反应有重要作用<sup>[7]</sup>。E1 嵌埋在病毒囊膜内,所以不能刺激机体产生中和抗体,但其与 E2 以异源二聚体的形式存在,E1E2 复合物可能是稳固病毒颗粒构型的主要结构蛋白。

E2 蛋白存在于病毒囊膜表面。在 CSFV 编码的蛋白中,E2 是最不保守的一种蛋白,为 CSFV 的主要保护性抗原,参与病毒的感染过程并诱导机体产生中和抗体<sup>[8]</sup>。其空间构型由 3 个疏水区和 3 个 N 端的链内二硫键构成。Wensvoort 等用了 13 株 CSFV 单抗阐述了 E2 的免疫特性,他认为 CSFV 表面的抗原决定簇主要分布在 A、B、C、D 4 个结构域中<sup>[9-10]</sup>,而且这 4 个结构域位于同一结构蛋白,Weiland 等通过体外实验证明了这个结构蛋白就是 E2 蛋白<sup>[11]</sup>。E2 蛋白由 ORF 编码的 690 (Arg)-1 060 (Leu)之间的 371 个氨基酸残基组成,在靠近 E2 蛋白 N 端上游有一段信号肽序列,其分子量为 51–58 kD。E2 蛋白的羧基端有一段约 40 个疏水性氨基酸残基构成的跨膜区(TMR),使得其主要以同源二聚体或与 E1 蛋白形成异源二聚体形式存在。Erns 由 ORF 268 (Glu)-494 (Ala)位的 227 个氨基酸组成,其糖基化程度很高,有 9 个潜在的糖基化位点,分子量约为 44–48 kD。但 Erns 没有疏水的跨膜区(TMR),而是以一种未知的机制连接到病毒粒子表面<sup>[9]</sup>。Erns 是仅次于 E2 的免疫原性糖蛋白,也能刺激机体产生中和抗体。由于

Erns 也是 CSFV 中比较保守的蛋白<sup>[12]</sup>, 因而可以作为 CSFV 标记疫苗用于鉴别感染与免疫抗体的靶抗原。

## 1.2 新型标记疫苗有望达到控制与净化的需求

标记疫苗是一种配以鉴别诊断方法的新型疫苗, 即可以通过血清学抗体检测区别免疫抗体与野毒感染抗体的一种新型疫苗。通过对野毒株或弱毒疫苗进行基因操作, 插入、移除或突变某一位点, 以区别于原始毒株。根据增加或消除某一标记位点, 可以将标记疫苗分为阳性标记和阴性标记。根据增加部分的来源, 可以将阳性标记分为外源性阳性标记和内源性阳性标记<sup>[13]</sup>。

世界范围内猪瘟的防治策略有预防性免疫接种和全面扑杀两种。对于大多数已经消灭猪瘟的国家, 如美国、加拿大、巴西、智利、南非、日本和欧盟国家, 通常采用扑杀病猪的策略来控制猪瘟。因为弱毒疫苗的使用对已消灭猪瘟的整体环境具有潜在的危险, 所以对于突发疫情, 扑杀病猪是有效遏制疫情的手段, 这样可以保证其相关产品在世界市场上的竞争力。1977 年, 欧盟委员会全面分析了这两种猪瘟防控策略, 最后得出了全面禁止疫苗使用在经济上更有利于养猪业的结论<sup>[14]</sup>。该结论促成了扑杀病猪这一策略的逐步实施和疫苗使用的逐步废除。然而, 对于大多数尚未消除猪瘟的国家, 则以预防性免疫接种为主要手段, 辅之以扑杀猪瘟感染或阳性动物的综合防控方法。疫苗免疫控制猪瘟, 可以对发病并确诊为猪瘟的病猪进行扑杀。而对于抗体检测阳性, 特别是在实施猪瘟净化时, 实施扑杀比较盲目, 容易将免疫抗体阳性猪扑杀, 从而造成很大的经济损失。标记疫苗可以识别免疫抗体与野毒感染抗体, 从而在进行扑杀病猪时更具有针对性, 可减少经济损失。

## 2 猪瘟标记疫苗的研究进展

近些年, 陆续有国内外研究者基于强毒或弱毒进行毒株的改造, 在过去的二十多年中出现了大量的猪瘟改造毒株。反向遗传操作技术作为当今

RNA 病毒分子遗传学研究的重要手段, 已广泛用于病毒遗传变异、致病机理、新型病毒载体和新一代标记疫苗研究等, 而反向遗传学技术的关键在于将病毒 RNA 转染至特定细胞。脂质体或电穿孔法是目前比较成熟的转染方法, BHK-21 细胞是应用最广泛的受体细胞。范运峰等用脂质体介质转染 CSFV Thiverval 株发现 BHK-21 细胞效率明显高于 PK15 细胞, 因此在体外转录后先电转至 BHK-21 细胞获得活病毒, 再感染 CSFV 易感细胞 PK15 细胞<sup>[15]</sup>。邹启启等在研究中发现 C 株在 SK6 细胞中的电转染效率很高, 转染可出现大量的阳性细胞, 所以创建了电转 SK6 细胞体外转录病毒 RNA 的方法, 成功构建了 C 株感染性克隆<sup>[16]</sup>。朱元源等利用猪瘟病毒低温诱变弱毒 T 株感染性克隆, 将其全长结构蛋白基因替换为猪瘟病毒石门毒株全长结构蛋白基因, 得到猪瘟石门重组病毒的全长感染性克隆 pSMT, 随后在 pSMT E1 蛋白的 C 端插入 Flag 抗原基因作为鉴别标记, 构建猪瘟石门重组标记病毒的感染性克隆 pSMT-Flag, 并经电转染法拯救出两株重组病毒<sup>[17]</sup>。

随着 CSFV 病毒学的发展, 研究者们逐渐认识到 CSFV 在感染中诱导产生的抗体主要是与结构蛋白 Erns、E2 和非结构蛋白 NS3 结合的。由于 NS3 所含有的抗原表位在瘟病毒属中具有很高的保守性<sup>[12]</sup>, 很难进行鉴别区分, 这使得 Erns 和 E2 成为进行标记疫苗候选毒株构建的基础。

### 2.1 基因突变疫苗

1990 年, 有研究者发现了 WH303 等 6 株猪瘟特异性单抗, 它们可以和 CSFV 的 56 个毒株反应, 但是不和其他瘟病毒属成员 BVDV 和 BDV 反应<sup>[18]</sup>。后来, 单抗 WH303 识别的最小表位基序被证明是 TAVSPTTLR<sup>[19]</sup>, 为后续基于 WH303 位点的突变毒株的构建提供了理论依据。

FlagT4v 是由猪瘟强毒 BICv 的 E1 中加入一个 Flag 片段, 将 E2 中 WH303 最小识别基序 TAVSPTTLR 突变构建而来的<sup>[20]</sup>。接种 FlagT4v 的猪血清可以分别与单抗 WH174 和单抗 Flag 结合,

但是却不和单抗 WH303 结合, 而以强毒 BICv 接种猪得到的抗血清可以同时和 WH174 及 WH303 单抗发生反应, 但是不和 Flag 单抗反应。该实验结果说明 FlagT4v 可以作为区分 CSFV 感染与野毒感染的标记疫苗。然而, FlagT4v 是在强毒基础上构建的, 所以存在着不可避免的生物安全隐患, 连续传代可能恢复毒性, 所以需要经过不断修饰来完善。Holinka 等从致死猪的脾脏中分离回复毒株 FlagT4SPv, 进行全基因组测序后与 FlagT4v 进行基因序列比对, 发现 FlagT4SPv 有 3 个氨基酸位点突变、18 个氨基酸残基和 1 个核苷酸的缺失, 其中 N850S 这一位点位于 WH303 最小识别基序<sup>[21]</sup>。基于以上发现, 在 FlagT4v 的基础上设计了 6 个突变毒株: FlagT4A109V、FlagT4N850S、FlagT4A993E、T4A109V、T4N850S、T4A993E, 在保持和敲除 Flag 的基础上, 分别对可能造成毒力恢复的 3 处氨基酸突变位点进行单独突变。其中 T4N850S 对猪有致病性, 证实了 N850S 突变是导致传代恢复毒性的原因。在此基础上, 设计了 FlagT4Gv, 对 FlagT4v 的 Flag 和 WH303 最小识别基序部分位点进行突变以提高其稳定性, 同时将第 850 位氨基酸由天冬酰胺突变为甘氨酸, 并成功拯救出活病毒。FlagT4Gv 不仅具有良好的免疫原性和基因稳定性, 而且在接种后 3 d 即可产生免疫反应<sup>[22]</sup>, 具有很好的保护效力。

最近出现的 C-DIVA 是第一个以弱毒突变 WH303 抗原表位构建的候选标记疫苗, 将 C 株的 TAVSPTTLR 片段突变了 1 个氨基酸、敲除 2 个氨基酸, 成功实现区别免疫与野毒感染<sup>[23]</sup>。

近十几年, 基因突变株的构建经历了从以强毒为基础到以弱毒为基础的转变, 而且在技术上正在不断完善。以弱毒为基础构建的毒株安全性相对较高, 减小了其回复突变为强毒的可能。

## 2.2 腺病毒活载体疫苗

哈尔滨兽医研究所仇华吉团队研究评估了腺病毒表达载体表达 CSFV 的 E2 蛋白, 构建出候选标记疫苗 rAdV-SFV-E2<sup>[24]</sup>。他们将其接种兔子,

发现接种后在 9–189 d 产生 CSFV 特异性中和抗体, 猪接种后第 5 代产生强烈的体液和细胞免疫应答, 而且可以在临床和病毒学上产生良好的保护性; 先存的母源抗体不会干扰 rAdV-SFV-E2 的免疫效力; 从安全、免疫剂量、母系遗传效果、二次免疫和伪狂犬疫苗共同免疫等方面综合来看, rAdV-SFV-E2 都具有较高的安全性<sup>[25]</sup>。Luo 等通过密码子优化的方法, 在毕赤酵母中加强了 Erns 蛋白的表达, 并建立了一种基于酵母表达 Erns 的间接 ELISA 方法, 该优化过的间接 ELISA 方法可以在感染后 6 d 从感染 CSFV 的猪血清样本中检测到 CSFV 特异性抗体, 并且可以区分野毒感染和 rAdV-SFV-E2 免疫, 还具有较高的敏感性和特异性<sup>[26]</sup>。肠道沙门氏菌对 rAdV-SFV-E2 的免疫效果有显著的加强作用<sup>[27]</sup>, 因此可作为 rAdV-SFV-E2 的佐剂。rAd-Erns-E2 株由腺病毒载体表达石门株 E2 和 Erns 构建而来, 对猪具有良好的保护作用, 而且免疫后的猪攻毒后没有出现 CSF 相关临床症状, 也没有检测到 CSFV 的存在<sup>[28]</sup>。

痘病毒、猪伪狂犬病病毒等复制性病毒载体具有高水平稳定表达外源基因的优点<sup>[1]</sup>。已有研究将 CSFVE2 基因插入痘病毒的 TK 基因中, 成功获得了能表达 E2 蛋白的 rSPV/CSFV-E2<sup>[29]</sup>, 并且通过后续研究证明了 rSPV/CSFV-E2 对猪具有很好的保护性<sup>[30]</sup>。也有研究者将 E2 基因插入猪伪狂犬病病毒的 gD 基因位点, 可以使猪伪狂犬病病毒丧失感染性, 使病毒不会从免疫动物传染到其他动物, 安全性大大提高并且同时可对猪伪狂犬病和猪瘟提供双重保护<sup>[31]</sup>。

病毒活载体疫苗具有很大的开发应用潜力, 美国梅岛口蹄疫腺病毒载体疫苗已经获批, 国内对腺病毒载体疫苗的研究也很多。但截至目前, 人类还不完全了解病毒的自然发生及变异机制, 不能确定其是否会产生携带外源基因的强毒突变株<sup>[1]</sup>, 这也意味着对此还需要做更深入细致的研究。

## 2.3 基因重组疫苗

基因重组疫苗作为标记疫苗的一种, 在国内

外的研究已比较成熟。Flc9 和 Flc11 分别由牛病毒性腹泻病毒 II(BVDV)5250 株的 N 端 176 个氨基酸(E2 的 ABC 区)和整个 Erns 段分别替换 C 株相关区域株构建而来<sup>[32]</sup>。Flc9 中的 E2 基因具有良好的免疫原性,与 BVDV 的中和反应滴度是 CSFV 的 2–6 倍。但是相比两基因替换株,Erns 和 E2 两基因敲除毒株更安全,因为他们不在动物中横向传播<sup>[33]</sup>。

CP7\_E2alf 是以 BVDVCP7 株为框架,通过反向遗传学方法用 CSFV187 株的 E2 基因替换 CP7 株相应区段构建而来<sup>[34]</sup>,具有良好的免疫原性。在肌肉接种后 1 周产生保护性,口服免疫 2 周产生保护性,可以用作紧急接种候选疫苗<sup>[35]</sup>。猪体内接种 CP7\_E2alf 后 14 d 和 6 个月后,细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量明显降低,而 IFN- $\gamma$  和 IgG2 含量却明显升高,这说明 CP7\_E2alf 在细胞免疫方面具有重要作用<sup>[36]</sup>。CP7\_E2alf 作为欧盟第一个被官方授权的标记疫苗<sup>[37]</sup>,不仅在保护效力和区别免疫与野毒感染方面有很好的效果<sup>[38]</sup>,而且基因具有稳定性<sup>[39]</sup>,这样在很大程度上规避了生物安全隐患。CP7\_E2alf 株的保护性强于 Flc11 株<sup>[40]</sup>,对其大面积普及应用可以有效减少因错误扑杀免疫抗体阳性猪而造成的经济损失<sup>[41]</sup>。

基因重组疫苗集合了多种毒株的基因,因而可以获得多联免疫效果。但是这种方法的一个潜在危险是重组的野毒株之间可能通过同源或非同源重组导致突变为强毒性毒株,造成一定的生物安全隐患。

#### 2.4 亚单位疫苗

最早的亚单位疫苗研究开始于 1993 年, Hulst 等构建了表达 CSFV E2 基因的重组体 pAcAS3gXE2 $\pm$ TMR,通过杆状病毒 AcNPV 共转染昆虫细胞 sf-2,用 20–100  $\mu$ g E2 蛋白免疫的猪可以抵抗 100 倍 LD<sub>50</sub> 的猪瘟强毒攻击<sup>[42]</sup>。在国外该疫苗已经被注册使用,但是免疫效果不如 C 株,而且需要免疫两次。中国台湾研究者利用巴斯德毕赤酵母系统成功表达了重组 E2 蛋白,并在其后的

动物试验中也取得了成功<sup>[43]</sup>。中国大陆对亚单位疫苗的研究比较深入,已有一个杆状病毒表达的 E2 亚单位疫苗被注册使用,还有正在研究的如 CHO 表达 E2 等,亚单位疫苗的应用前景很广阔。

亚单位疫苗的有效成分是病毒粒子的一部分,因此具有良好的安全性<sup>[44]</sup>。但是,亚单位疫苗需要有相应的鉴别诊断方法,目前有 Erns 抗体的检测试剂盒,可以配合 E2 亚单位疫苗使用。亚单位疫苗的免疫原性通常较低,需要与佐剂同时使用才能达到理想的保护效果。纳米磷酸钙佐剂对疫苗中的有效多肽成分具有很好的吸附能力,吸附率可以达到 70%<sup>[45]</sup>,黄芪多糖佐剂能够促进免疫球蛋白 mRNA 的表达与释放,增强免疫球蛋白水平,同时参与机体的补体反应,放大补体级联<sup>[46]</sup>,促进抗原识别部位柔性结构转变为刚性结构,从而增强猪瘟抗体形成。

### 3 问题与展望

随着兽用生物制品技术和分子生物学、基因工程方法研究的不断深入,CSF 标记疫苗技术正在不断发展。虽然迄今基于各种方法的弱毒株构建研究层出不穷,但是只有少数候选毒株可以经过考验得到官方授权,如德国动物疾病研究中心构建的 CP7\_E2alf 株。基于生物安全方面的考量,各种猪瘟标记疫苗在正式投入应用前仍需通过充分的试验资料证明其安全性和有效性<sup>[47]</sup>,而今后 CSF 标记疫苗的研究不仅是开发新的具有可行性的 CSF 标记疫苗设计策略,更重要的是要逐步解决已有备选 CSF 标记疫苗的优化和安全性、稳定性等的验证,其次需配套一个准确可靠的鉴别诊断方法,使其能够真正形成商品化产品。相信在未来,会有更多符合要求的标记疫苗问世,这些标记疫苗也将会在人类对抗 CSF 的过程中起到不可替代的作用。

### 参考文献

- [1] Wang CH, Sun Y, Qiu HJ. Progress in new-type vaccines against classical swine fever[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(7): 880-890 (in Chinese)  
王春花, 孙元, 仇华吉. 新型猪瘟疫苗研究进展[J]. 生物工

- 程学报, 2013, 29(7): 880-890
- [2] Pluimers FH, de Leeuw PW, Smak JA, et al. Classical swine fever in the Netherlands 1997-1998: a description of organisation and measures to eradicate the disease[J]. Preventive Veterinary Medicine, 1999, 42(3/4): 139-155
- [3] Tu CC. Epidemiological status of classical swine fever in China and its control measures[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2004 (in Chinese)  
涂长春. 中国猪瘟流行病学现状与防制研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2004
- [4] Qiu HJ, Tong GZ, Shen RX. The lapinized Chinese strain of classical swine fever virus: a retrospective review spanning half a century[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(8): 1675-1685 (in Chinese)  
仇华吉, 童光志, 沈荣显. 猪瘟兔化弱毒疫苗——半个世纪的回顾[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1675-1685
- [5] Wang Q, Fan XZ, Xu L, et al. Evaluation of CSF live vaccine (ST cell line) Efficacy against different epidemic virulent CSFV strains from China[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016, 52(12): 93-95 (in Chinese)  
王琴, 范学政, 徐璐, 等. 猪瘟活疫苗(传代细胞源)对我国不同猪瘟病毒流行毒株的免疫保护研究[J]. 中国兽医杂志 2016, 52(12): 93-95
- [6] Zou HT, Lan ZR, Jiang P. Research status of CSF marker vaccine[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2011, 32(11): 111-115 (in Chinese)  
邹海涛, 兰邹然, 姜平. 猪瘟标记疫苗研究现状[J]. 动物医学进展, 2011, 32(11): 111-115
- [7] Handschuh G, Caselmann WH. Bacterial expression and purification of hepatitis C virus capsid proteins of different size[J]. Journal of Hepatology, 1995, 22(2): 143-150
- [8] Wang Q, Tu CC. Classical Swine Fever[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 30-32 (in Chinese)  
王琴, 涂长春. 猪瘟[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 30-32
- [9] Wensvoort G, Terpstra C, de Kluijver EP, et al. Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus[J]. Veterinary Microbiology, 1989, 21(1): 9-20
- [10] Wensvoort G. Topographical and functional mapping of epitopes on hog cholera virus with monoclonal antibodies[J]. Journal of General Virology, 1989, 70(11): 2865-2876
- [11] Weiland E, Stark R, Haas B, et al. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer[J]. Journal of Virology, 1990, 64(8): 3563-3569
- [12] Kosmidou A, Ahl R, Thiel HJ, et al. Differentiation of classical swine fever virus (CSFV) strains using monoclonal antibodies against structural glycoproteins[J]. Veterinary Microbiology, 1995, 47(1/2): 111-118
- [13] Dong XN, Chen YH. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines[J]. Vaccine, 2006, 25(2): 205-230
- [14] Hulst MM, Panoto FE, Hoekman A, et al. Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E<sup>ns</sup> of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus[J]. Journal of Virology, 1998, 72(1): 151-157
- [15] Fan YF, Zhao QZ, Zhao Y, et al. Complete genome sequence of attenuated low-temperature Thiverval strain of classical swine fever virus[J]. Virus Genes, 2008, 36(3): 531-538
- [16] Zou XQ, Zhao QZ, Fan YF, et al. Construction of the full length infectious cDNA clones of CSFV C strain and virus rescue[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(2): 409-416 (in Chinese)  
邹兴启, 赵启祖, 范运峰, 等. 猪瘟病毒 C 株全长 cDNA 感染性克隆的构建及病毒拯救[J]. 中国农业科学, 2011, 44(2): 409-416
- [17] Zhu YY, Han T, Zou XQ, et al. Construction and rescue of recombinant classical swine fever virus with Shimen structure protein and flag marker[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(1): 187-194 (in Chinese)  
朱元源, 韩焘, 邹兴启, 等. 猪瘟病毒石门重组标记毒株的构建与拯救[J]. 中国农业科学, 2013, 46(1): 187-194
- [18] Edwards S, Sands JJ. Antigenic comparisons of hog cholera virus isolates from Europe, America and Asia using monoclonal antibodies[J]. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 1990, 97(2): 79-81
- [19] Lin M, Lin F, Mallory M, et al. Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-Terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum[J]. Journal of Virology, 2000, 74(24): 11619-11625
- [20] Holinka LG, Fernandez-Sainz S, O'Donnell V, et al. Development of a live attenuated antigenic marker classical swine fever vaccine[J]. Virology, 2009, 384(1): 106-113
- [21] Holinka LG, Fernandez-Sainz S, Sanford B, et al. Development of an improved live attenuated antigenic marker CSF vaccine strain candidate with an increased genetic stability[J]. Virology, 2014, 471-473: 13-18
- [22] Holinka LG, O'Donnell V, Risatti GR, et al. Early protection events in swine immunized with an experimental live attenuated classical swine fever marker vaccine, FlagT4G[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177433
- [23] Bruderer U, van de Velde J, Frantzen I. Discrimination within epitope specific antibody populations against Classical swine fever virus is a new means of differentiating infection from vaccination[J]. Journal of Immunological Methods, 2015, 420: 18-23
- [24] Sun Y, Li HY, Tian DY, et al. A novel alphavirus replicon-vectored vaccine delivered by adenovirus induces sterile immunity against classical swine fever[J]. Vaccine, 2011, 29(46): 8364-8372
- [25] Sun Y, Tian DY, 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
- [26] Luo YZ, Li L, Austermann-Busch S, et al. Enhanced expression of the E<sup>ns</sup> protein of classical swine fever virus in yeast and its application in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for antibody differentiation of infected from vaccinated animals[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 222: 22-27
- [27] Xia SL, Lei JL, Du ML, et al. Enhanced protective immunity of

- the chimeric vector-based vaccine rAdV-SFV-E2 against classical swine fever in pigs by a Salmonella bacterial ghost adjuvant[J]. *Veterinary Research*, 2016, 47: 64
- [28] Sun YK, Yang YA, Zheng HL, et al. Co-expression of Erns and E2 genes of classical swine fever virus by replication-defective recombinant adenovirus completely protects pigs against virulent challenge with classical swine fever virus[J]. *Research in Veterinary Science*, 2013, 94(2): 354-360
- [29] Hahn J, Park SH, Song JY, et al. Construction of recombinant swinepox viruses and expression of the classical swine fever virus E2 protein[J]. *Journal of Virological Methods*, 2001, 93(1/2): 49-56
- [30] Ganges L, Núñez JI, Sobrino F, et al. Recent advances in the development of recombinant vaccines against classical swine fever virus: cellular responses also play a role in protection[J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 177(2): 169-177
- [31] Peeters B, Bienkowska-Szewczyk K, Hulst M, et al. Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever[J]. *Journal of General Virology*, 1997, 78(12): 3311-3315
- [32] van Gennip HGP, van Rijn PA, Widjoatmodjo MN, et al. Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E<sup>RNS</sup> or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response[J]. *Vaccine*, 2000, 19(4/5): 447-459
- [33] Widjoatmodjo MN, van Gennip HGP, Bouma A, et al. Classical swine fever virus E<sup>rns</sup> deletion mutants: *trans*-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(7): 2973-2980
- [34] Reimann I, Depner K, Trapp S, et al. An avirulent chimeric *Pestivirus* with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus[J]. *Virology*, 2004, 322(1): 143-157
- [35] Leifer I, Lange E, Reimann I, et al. Modified live marker vaccine candidate CP7\_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization[J]. *Vaccine*, 2009, 27(47): 6522-6529
- [36] Renson P, Le Dimna M, Gabriel C, et al. Cytokine and immunoglobulin isotype profiles during CP7\_E2alf vaccination against a challenge with the highly virulent Koslov strain of classical swine fever virus[J]. *Research in Veterinary Science*, 2014, 96(2): 389-395
- [37] Blome S, Wernike K, Reimann I, et al. A decade of research into classical swine fever marker vaccine CP7\_E2alf (Suvaxyn® CSF Marker): a review of vaccine properties[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48: 51
- [38] Eblé PL, Geurts Y, Quak S, et al. Efficacy of chimeric Pestivirus vaccine candidates against classical swine fever: protection and DIVA characteristics[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 16(2/4): 437-446
- [39] Goller KV, Dräger C, Höper D, et al. Classical swine fever virus marker vaccine strain CP7\_E2alf: genetic stability *in vitro* and *in vivo*[J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(12): 3121-3125
- [40] Blome S, Aebischer A, Lange E, et al. Comparative evaluation of live marker vaccine candidates "CP7\_E2alf" and "flc11" along with C-strain "Riems" after oral vaccination[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 158(1/2): 42-59
- [41] Meyer D, Fritsche S, Luo Y, et al. The double-antigen ELISA concept for early detection of E<sup>rns</sup>-specific classical swine fever virus antibodies and application as an accompanying test for differentiation of infected from marker vaccinated animals[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(6): 2013-2022
- [42] Hulst MM, Himes G, Newbigin E, et al. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease[J]. *Virology*, 1994, 200(2): 558-565
- [43] Blome S, Moß C, Reimann I, et al. Classical swine fever vaccines-State-of-the-art[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 206: 10-20
- [44] Zhang S, Guo H, Xu H, et al. Research progress of new CSF vaccine[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 51(1): 72-75 (in Chinese)
- 张双, 郭慧, 徐浩, 等. 新型猪瘟疫苗的研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2015, 51(1): 72-75
- [45] Huang DS, Guo AZ. Effects of immunity in astragalin adjuvant on swine plague vaccine on piglets[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011, 38(6): 189-192 (in Chinese)
- 黄德尚, 郭爱珍. 黄芪多糖佐剂对猪瘟疫苗免疫效果的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(6): 189-192
- [46] Guo P, Wang XY, Xue FQ, et al. Calcium phosphate nanoparticles as adjuvant in peptide vaccine against classical swine fever[J]. *Chinese Journal of Veterinary Parasitology*, 2012, 20(6): 63-67 (in Chinese)
- 郭沛, 王霄旸, 薛飞群, 等. 纳米磷酸钙作为猪瘟多肽疫苗佐剂的研究[J]. *中国动物传染病学报*, 2012, 20(6): 63-67
- [47] Lin GJ, Deng MC, Chen ZW, et al. Yeast expressed classical swine fever E2 subunit vaccine candidate provides complete protection against lethal challenge infection and prevents horizontal virus transmission[J]. *Vaccine*, 2012, 30(13): 2336-2341