

H₉ 亚型禽流感病毒血凝素基因 重组禽痘病毒的构建

陈红英¹, 黄青云², 崔保安¹, 李新生¹, 赵 丽³, 管 倩¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642;

3 郑州牧业高等专科学校 动物医学系, 河南 郑州 450003)

[摘要] **【目的】**获得表达 H₉ 亚型禽流感病毒血凝素(HA)基因的重组禽痘病毒。**【方法】**将含禽痘病毒启动子 LP2EP2 驱动的 HA 基因, 插入到禽痘病毒转移载体 pSY681 中, 获得重组转移载体 pSY681/HA。用脂质体将其转染已感染亲本禽痘病毒 S-FPV-017 株的鸡胚成纤维细胞, 使其在鸡胚成纤维细胞内与禽痘病毒基因组发生同源重组, 产生表达 HA 的重组禽痘病毒 rFPV-HA。在含有 X-gal 的营养琼脂培养基上进行蓝斑筛选后, 对重组病毒进行多次蚀斑克隆, 并用间接免疫荧光法对感染重组病毒鸡胚成纤维细胞中 HA 的表达产物进行鉴定。**【结果】**以重组禽痘病毒 DNA 为模板, 利用 HA 基因特异引物进行 PCR, 扩增出 1 条约 1.7 kb 左右的带。以间接免疫荧光法证实重组禽痘病毒能表达 HA。**【结论】**成功构建了表达 H₉ 亚型禽流感病毒 HA 基因的重组禽痘病毒, 且构建的重组禽痘病毒能表达具有生物学活性的 HA。

[关键词] H₉ 亚型禽流感病毒; HA 基因; 重组禽痘病毒; 基因工程疫苗

[中图分类号] S851.31

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)12-0007-07

Construction of recombinant fowlpox virus expressing haemagglutinin gene of H₉ avian influenza virus

CHEN Hong-ying¹, HUANG Qing-yun², CUI Bao-an¹,
LI Xin-sheng¹, ZHAO Li³, GUAN Qian¹

(1 College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China;

3 Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, Henan 450003, China)

Abstract: **【Objective】** Recombinant fowlpox viruses (rFPV) were developed expressing H₉ avian influenza virus (AIV) haemagglutinin (HA). **【Method】** HA cDNA was cloned into *Bam*H I site of pSY538 plasmid and then subcloned into *Sfi*I site of pSY681 plasmid containing *LacZ* gene. The plasmid, pSY681/HA, was used to transfect on the chicken embryo fibroblasts cell (CEF) pre-infected with fowlpox virus S-FPV-017. By selection of blue plaques on the CEF overlaid with agar containing X-gal, the rFPV-HA recombinants were obtained and identified by restriction enzyme analysis and PCR. HA in the recombinant virus-infected CEF was indentified by indirect immune of luorescence assay. **【Result】** The results indicated that recombinant fowlpox viruses contained HA gene. The expression of HA was detected in the recombinant virus-infected CEF by indirect immunofluorescence using antibody against AIV. **【Conclusion】** The re-

* [收稿日期] 2008-01-02

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划专项(2006BAD06A08)

[作者简介] 陈红英(1965—), 女, 四川仁寿人, 副研究员, 博士, 主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。E-mail: chhy927 @163. com

[通讯作者] 崔保安(1948—), 男, 河南荥阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

E-mail: baoancui@henau. edu. cn

combinant fowlpox virus (rFPV-HA) was developed and had biological activity.

Key words: H₉ avian influenza virus; haemagglutinin gene; recombinant fowlpox virus; genetic engineering vaccine

近年来,由 H₉ 亚型禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的禽流感(AI)在我国部分地区广泛流行,给养禽业造成了严重的经济损失。油乳剂灭活苗虽对该亚型禽流感的控制发挥了重要作用,但由于其价格高、使用不便,且使用后会干扰免疫监测和流行病学调查,存在免疫应激强烈、影响肉品品质等缺陷^[1],其应用受到了一定限制。

禽痘病毒(Fowlpox virus, FPV)是近年来研究开发并逐渐转向实际应用的一个新的病毒载体^[2-3],能够高效表达外源基因,已成功应用于多种禽病源基因的表达,如马立克病毒 gB 及 pp38 基因、禽流感病毒血凝素(HA)和核蛋白(NP)基因、传染性法氏囊病毒 A 片段病毒蛋白(Viral protein, VP)2-4-3 或 VP2 基因,新城疫病毒血凝素-神经氨酸酶(Hemagglutinin-neuraminidase, HN)及融合蛋白(Fusion, F)基因等^[4-8],并在接种后显示了良好的免疫原性。与痘苗病毒相比,FPV 具有宿主特异性,不容易散毒,对人类及其他哺乳动物无危险性等优点。FPV 基因组庞大,可插入较长外源基因,构建多价或多联重组病毒活疫苗,诱导机体产生体液免疫和细胞免疫^[9-11],具有明显的优势,因而 FPV 是具有广阔应用前景的动物病毒载体。

为了克服 AI 油乳剂灭活苗的缺陷,本研究利用禽痘病毒 S-FPV-017 疫苗株作为载体,构建表达 H₉ 亚型禽流感病毒血凝素(HA)基因的重组禽痘病毒(rFPV-HA),以期禽流感防治提供一种新型疫苗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和质粒 禽痘病毒 S-FPV-017、含有禽痘病毒早晚期启动子 LP2/EP2 的 pSY538 质粒、含有禽痘病毒同源臂的 pSY681 质粒和含有 *LacZ* 基因的 pSC11 质粒,均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所惠赠。H₉ 亚型 AIV HA 基因的克隆质粒 pGEMHA,由河南省动物性食品安全重点实验室构建并保存。

1.1.2 SPF 鸡胚 9~11 日龄 SPF 鸡胚购自梅里亚维通实验动物技术有限公司。

1.1.3 试剂 FITC 标记的兔抗鸡 IgG(二抗)购自 Sigma 公司;鸡抗 H₉ 亚型 AIV 阳性血清购自中

国农业科学院哈尔滨兽医研究所;Wizard PureFec-tion Plasmid DNA Purification、碱性磷酸酶、T₄ DNA 连接酶(T₄ DNA Ligase)购自 Promega 公司;Lipofectamine™ 2000 Reagent 试剂盒购自 Invitrogen 公司;EX Taq DNA 聚合酶, X-gal 和 IPTG, DNA Marker DL2000, 限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*Bam*H I、*Sfi* I、*Not* I 等均为宝生物工程(大连)有限公司产品;低熔点琼脂糖购自 Amresco 公司;DMEM 购自 GIBCO 公司;小牛血清白蛋白(BSA)购自华美生物工程公司。

1.2 HA 基因重组禽痘病毒转移载体的构建

1.2.1 HA 基因的 PCR 扩增 根据 pGEMHA 质粒的 HA 基因序列设计 1 对引物,上、下游引物的两端均引入 *Bam*H I 酶切位点(下划线部分)。上游引物 P1:5'-CGG GAT CCA TGG AGA AAA TAG TGC TT-3';下游引物 P2:5'-CCC GGA TCC TTA AAT GCA AAT TCT GC-3'。该引物可以扩增 HA 基因的全部序列,预期扩增的片段长度为 1 701 bp。引物由上海生物工程公司合成。

取 pGEMHA 质粒 1 μL,加入 10×Ex Taq 反应缓冲液 5 μL、10 mmol/LdNTP 混合物 1 μL、上游引物 P1 (50 μmol/L)1 μL、下游引物 P2 (50 μmol/L)1 μL、灭菌双蒸水 40.5 μL,混匀,加入 Ex Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL 进行 PCR 反应。PCR 反应程序为:96 ℃ 3 min;94 ℃ 1 min,56 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,36 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)进行电泳检测。

1.2.2 HA 基因重组禽痘病毒转移载体的构建及鉴定 回收 1.2.1 中 PCR 产物,经 *Bam*H I 酶切、电泳、回收,将 HA 片段插入到同样处理的质粒 pSY538 中,构建重组质粒 pSY538/HA(图 1)。转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,提取重组质粒 pSY538/HA 进行 PCR 鉴定及用 *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Sal* I 进行酶切鉴定。挑选 2 个 PCR 和酶切鉴定均为阳性的重组菌进行序列测定。用 *Xba* I 和 *Pst* I 酶切 pSC11 质粒,用 *Not* I 酶切 pSY681 质粒,补平后连接得到重组质粒 pSY681/*LacZ*。用 *Sfi* I 酶切重组质粒 pSY538/HA,切下含有禽痘病毒早晚期启动子 LP2EP2 的 HA 基因片段,插入到

pSY681/LacZ 的 *Sfi* I 位点上,构建转移载体 pSY681/HA(图 2)。转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,提取重组质粒。对重组质粒 pSY681/HA 进行 PCR 鉴定,并用 *Not* I 进行酶切鉴定。

1.3 重组 rFPV-HA 的获得

质粒 pSY681/HA 的纯化参照 Wizard Pure-Fection Plasmid DNA Purification 使用说明进行。鸡胚成纤维细胞 (Chicken embryo fibroblasts,

CEF) 单层长满至 80% 培养瓶时,用 DMEM 培养液洗涤 CEF 单层细胞,然后感染禽痘亲本病毒 S-FPV-017,37 °C 感染 1.5 h 后吸弃病毒液,进行转染,转染程序按 Lipofectamine™ 2000 Reagent 试剂盒使用说明进行。转染后换成全培养液,于体积分数 5% CO₂、37 °C 培养箱中继续培养,待病变达到 80% 单层细胞时收获细胞,反复冻融 3 次后,用于重组病毒的筛选。

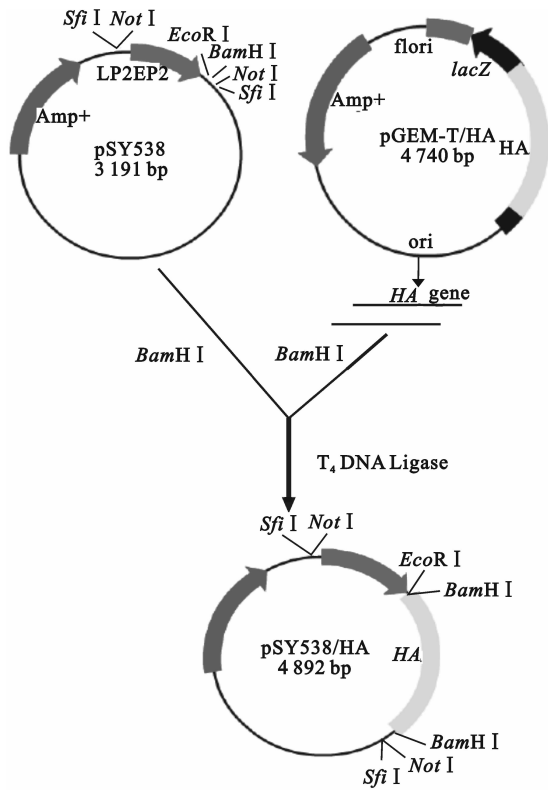


图 1 重组质粒 pSY538/HA 的构建流程图

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pSY538/HA

1.4 重组 rFPV-HA 的筛选及纯化

取上述转染种毒接种 CEF 单层细胞,37 °C 感作 2 h 后吸去感染液,加入含 10 g/L 低熔点琼脂糖的 DMEM 营养琼脂,置细胞培养箱中培养 72~96 h,待出现典型的细胞病变,再覆盖一层含 250 μg/mL X-gal 的 DMEM 营养琼脂进行染色,继续培养 12~24 h 后挑取蓝斑,放入 1 mL 无血清 DMEM 培养液中,反复冻融 3 次后,进行新一轮的蚀斑纯化,共进行 5 轮蚀斑纯化。同时以禽痘病毒 S-FPV-017 接种 CEF 单层细胞为阴性对照(CK)。

1.5 重组 rFPV-HA 基因组中 HA 基因的 PCR 鉴定

收取 rFPV-HA 感染后产生病变的鸡胚成纤维细胞,加入 100 g/L SDS 使其终浓度为 4 g/L,再加入蛋白酶 K 使其终浓度为 40 μg/mL,37 °C 消化 3~

4 h,用等体积饱和酚及等体积饱和酚/氯仿各抽提 1 次,水相中加入 2 倍体积冷乙醇和 1/10 体积 3 mol/L NaAc(pH 4.8),混匀,于 -20 °C 冰箱沉淀 1 h;12 000 g、4 °C 离心 15 min,弃上清液,用体积分数 70% 乙醇洗涤沉淀,真空干燥,沉淀用灭菌的 TE 溶解后作为模板备用。在 LP2EP2 上设计 1 条用于检测 HA 基因的上游引物,引物序列为 5'-TTG GCA TAT AAA TAGATC TGT ATC-3',用该引物和扩增 HA 基因的下游引物 P2 可以扩增 1 710 bp 的片段。引物由上海生物工程公司合成。

取重组病毒 DNA 6 μL,加入 10×Ex Taq 反应缓冲液 5 μL、10 mmol/L dNTP 混合物 1 μL、上游引物 P1 (50 μmol/L) 1 μL、下游引物 P2 (50 μmol/L) 1 μL、灭菌双蒸水 35.5 μL,混匀,加入

ExTaq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L 进行 PCR 反应。PCR 反应条件为:96 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,36 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)进行电泳检测。

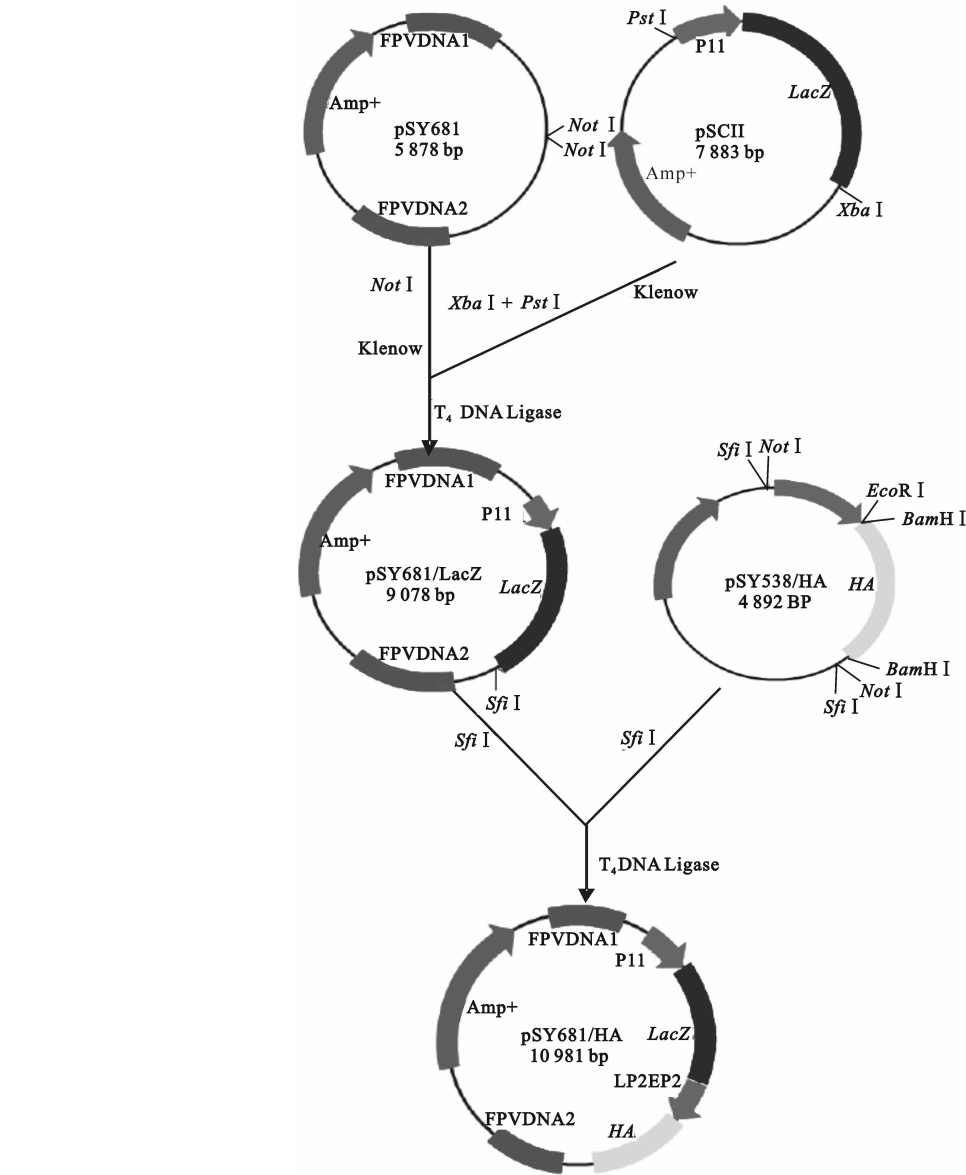


图 2 重组质粒 pSY681/HA 的构建流程图

Fig. 2 Construction of recombinant plasmid pSY681/HA

1.6 感染重组 rFPV-HA 的 CEF 中 HA 表达产物的间接免疫荧光鉴定

将纯化的重组禽痘病毒接种于 24 孔细胞培养板的单层 CEF 上,37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2 条件下培养至 CEF 出现明显病变,移去培养液,以 PBS 洗涤、冷甲醇固定细胞,加入 1 : 200 稀释的鸡抗 H_9 亚型 AIV 阳性血清和含 10 g/L BSA 的 PBS,37 $^{\circ}$ C 作用 1 h。以含体积分数 0.5%吐温-20 的 PBS 洗涤 5 次,再加入 1 : 1 000 稀释的兔抗鸡 IgG-FITC 荧

光抗体,37 $^{\circ}$ C 下作用 30 min,最后以含体积分数 0.5%吐温-20 的 PBS 洗涤 3 次,置于倒置荧光显微镜下观察。以正常 CEF 和感染禽痘病毒 S-FPV-017 的 CEF 为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pSY538/HA 和 pSY681/HA 的鉴定
重组质粒 pSY538/HA 和 pSY681/HA 的酶切和 PCR 鉴定结果见图 3 和图 4。

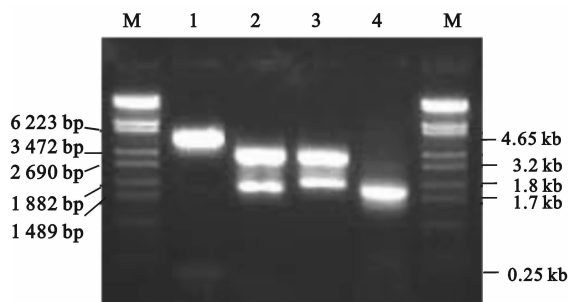


图3 重组质粒 pSY538/HA 的酶切和 PCR 鉴定结果

M. DNA Marker λ -EcoT14 I Fragment; 1. *EcoR* I 酶切;
2. *Bam*H I 酶切; 3. *Sal* I 酶切; 4. PCR 产物

Fig. 3 Identification of pSY538/HA by digestion

(*EcoR* I, *Bam*H I and *Sal* I) and PCR

M. DNA Marker λ -EcoT14 I Fragment; 1. *EcoR* I ;

2. *Bam*H I ; 3. *Sal* I ; 4. PCR product

重组质粒 pSY538/HA 进行 PCR、电泳, 出现 1 条长约 1.7 kb 的特异条带; 经 *EcoR* I 酶切、电泳得到大小约 4.65 和 0.25 kb 的 2 条带; 经 *Bam*H I 酶切、电泳得到大小约 3.2 和 1.7 kb 的 2 条带; 经 *Sal* I 酶切、电泳得到约 3.1 和 1.8 kb 的 2 条带(图 3), 与预期的结果相符。重组质粒 pSY538/HA 的测序结果表明, 重组质粒 pSY538/HA 中 HA 的核苷酸序列及阅读框均完全正确, 而且 HA 基因正向置于禽痘病毒早晚期启动子 LP2EP2 的下游。转移载体 pSY681/HA 用 LP2EP2 启动子上的引物和 HA 基因的下游引物 P2 进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳后可以观察到 1 条约为 1.7 kb 的带; 经 *Not* I 酶切、电泳出现 2 条带, 其中一条大小约 1.9 kb, 另一条大小约为 9 kb(图 4), 与预期的 HA 片段大小相一致。表明含禽痘病毒早晚期启动子 LP2EP2 驱动的 HA 基因片段已正确地插入到 pSY681 的 *Sfi* I 位点上。

2.2 重组 rFPV-HA 的纯化

将 pSY681/HA 转染至已感染禽痘病毒 S-FPV-017 的 CEF, pSY681/HA 与 FPV 间发生同源重组, 由于所形成的重组病毒带有 *LacZ* 基因, 故其在含 X-gal 的营养琼脂上产生蓝色蚀斑(图 5A), 对照无蓝色蚀斑(图 5B)。通过在培养皿和 96 孔培养板上多次连续蓝斑筛选, 得到纯化的、生长稳定的重组禽痘病毒 rFPV-HA, 形成的蚀斑均为蓝色。

2.3 重组 rFPV-HA 基因组中 HA 基因的 PCR 鉴定

从 rFPV-HA 感染的 CEF 中提取 DNA, PCR 扩增出 1 条长度约 1.7 kb 的条带, 而用禽痘病毒 S-FPV-017 株 DNA 进行 PCR 扩增, 无扩增产物(图

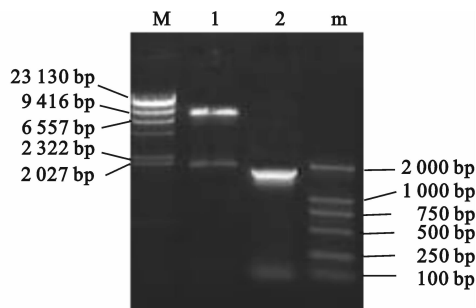


图4 重组质粒 pSY681/HA 的酶切和 PCR 鉴定结果

M. DNA Marker λ -Hind III Fragment; 1. *Not* I 酶切;

2. PCR 产物; m. DNA Marker DL2000

Fig. 4 Analysis of pSY681/HA by

digestion (*Not* I) and PCR

M. DNA Marker λ -Hind III Fragment; 1. *Not* I ;

2. PCR product; m. DNA Marker DL2000

6), 表明 HA 基因已重组到禽痘病毒基因组中。

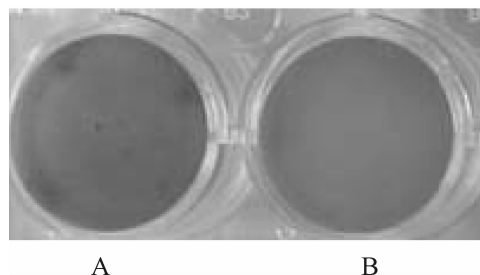


图5 重组病毒 rFPV-HA 感染 CEF 后形成的蓝色蚀斑

A. rFPV-HA; B. CK

Fig. 5 Blue plaques of recombinant

fowlpox viruses rFPV-HA

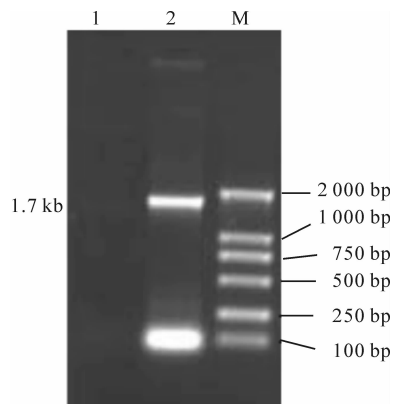


图6 重组禽痘病毒 rFPV-HA 中 HA 基因的 PCR 鉴定结果

1. 禽痘病毒 S-FPV-017; 2. 重组禽痘病毒 rFPV-HA;

M. DNA Marker DL2000

Fig. 6 Identification of HA gene in the recombinant rFPV-HA by PCR

1. Fowlpox virus S-FPV-017; 2. Recombinant

virus rFPV-HA; M. DNA Marker DL2000

2.4 感染重组 rFPV-HA 的 CEF 中 HA 表达产物的间接免疫荧光鉴定

间接免疫荧光试验显示,感染 rFPV-HA 的 CEF 胞浆和胞膜区均呈特异性绿黄色荧光(图 7),

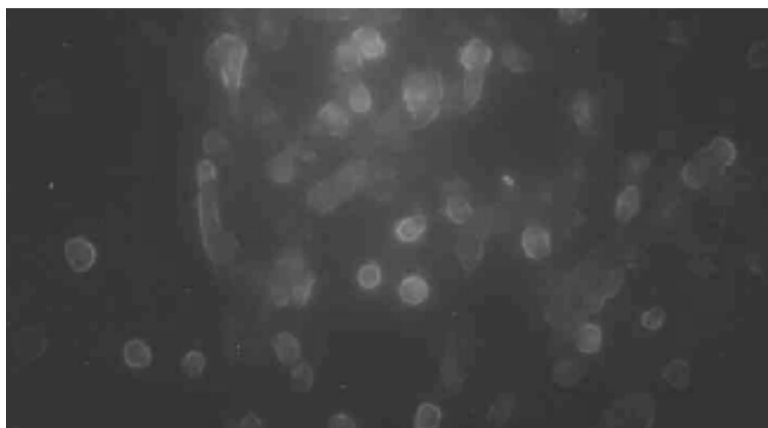


图 7 感染重组 rFPV-HA 的 CEF 中 HA 表达产物的免疫荧光鉴定结果($\times 400$)

Fig. 7 Immunofluorescence detection of the expressed HA in rFPV-HA infected CEF($\times 400$)

3 讨 论

在疫苗控制 AI 流行和传播研究中,为了克服灭活疫苗对免疫监测的干扰,人们已经开发了多种基因工程疫苗。由于 HA 是 AIV 中最主要的保护性抗原,故一般利用 HA 基因来构建基因工程疫苗。AIV 编码的其他蛋白,如表面蛋白 NA、M2 和内部蛋白 NP,均可诱生机体的体液免疫或细胞免疫,但它们在保护性免疫应答方面所起的作用远不及 HA 重要。Johansson 等^[12]研究发现,含 HA 和 NA 基因的核酸疫苗能提供良好的免疫保护;只含 HA 基因的核酸疫苗也能完全抑制机体排毒,但仅含 NA 基因的核酸疫苗只能降低排毒。Webster 等^[13]的研究表明,表达 HA 基因的重组禽痘病毒可对鸡产生 100% 的保护;表达 NP 基因的重组禽痘病毒,即使在加强免疫的条件下也不能提供保护;而共同表达 NP 和 HA 基因的重组病毒,与单一表达 HA 基因的重组病毒相比,免疫效果反而下降。以上研究结果充分证明,HA 是 AIV 中最主要的保护性抗原,能为机体提供良好的免疫保护力。

目前,研究较多的表达 HA 基因工程疫苗有:表达 HA 基因的重组禽痘病毒疫苗、利用杆状病毒表达 HA 蛋白而制备的亚单位疫苗及插入 HA 基因的核酸疫苗,上述 3 种疫苗均不干扰免疫监测。但从已有的研究结果来看,亚单位疫苗的免疫原性不够强,需加入佐剂才能诱导其产生较强的免疫应

而接种禽痘病毒 S-FPV-017 的 CEF 和正常 CEF 则未呈现特异性绿黄色荧光着色,表明重组禽痘病毒 rFPV-HA 感染 CEF 后,能有效表达亚型禽流感病毒的 HA 抗原。

答且生产成本较高;核酸疫苗的研制才刚刚起步,还有很多关键性问题亟待解决。表达 HA 基因的重组禽痘病毒活载体疫苗,是目前研究最为深入、并且最有可能首先应用于临床的基因工程疫苗^[14]。重组禽痘病毒基因工程苗的保护力高,如表达 H₅ 亚型 AIV HA 的重组禽痘病毒疫苗对 1 日龄和 5 周龄雏鸡的保护率达 100%^[15]。此外,这种疫苗还有低成本的优势。因此,本研究选择禽痘病毒作为构建抗 H₅ 亚型禽流感基因工程疫苗的载体。

本试验成功地将 AIV HA 基因和 LacZ 报告基因重组于 pSY681 上,构建了 HA 基因重组禽痘病毒表达载体,并在鸡胚成纤维细胞上转染成功,经过连续 3 代的蓝斑克隆和筛选,获得了含 AIV HA 基因的重组禽痘病毒。经多次传代、筛选和纯化,使得每个经 X-gal 染色的病毒蚀斑均呈现蓝色,得到了 100% 纯度的重组病毒。同时经多次传代纯化后的重组病毒,X-gal 染色未见白色蚀斑出现,证明该重组病毒的遗传性状稳定。

本试验用 PCR 方法证明了重组禽痘病毒 HA 基因的存在,但是外源基因的存在并不意味着外源基因的表达。为了证明所构建的重组病毒是否对外源基因进行了忠实而有效的表达,本研究采用了以 H₅ 亚型 AIV 阳性血清为一抗的间接免疫荧光试验,对 HA 糖蛋白的表达进行检测,结果证实重组禽痘病毒不仅携带有 H₅ 亚型 AIV HA 外源基因,还对外源基因进行了有效表达。Taylor 等^[16]用免

疫荧光染色法证明, *HA* 基因重组禽痘病毒所表达的糖蛋白主要存在于被感染细胞(即 CEF)的细胞膜上,这说明用重组禽痘病毒表达的 *HA* 糖蛋白,其不仅抗原性与病毒感染后宿主细胞合成的糖蛋白相同,而且存在部位也完全一样。这一点在本试验中也得到证实。

AIV 中广泛存在抗原漂移和抗原转换的现象,其抗原变异的频率很高。在 AIV 编码的各种蛋白中,又以 *HA* 的变异频率最高。因此在 AIV 防治中,应针对当地流行毒株的 *HA* 亚型研制疫苗。本研究以 2002 年 H_9 亚型 AIV 分离株的 *HA* 基因构建重组禽痘病毒疫苗,对防治目前正在我国发生和流行的 H_9 亚型禽流感具有现实意义。

[参考文献]

- [1] Suarez D L, Schultz-Cherry S. Immunology of influenza virus: a review [J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24(2/3): 269-283.
- [2] Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(21): 11341-11348.
- [3] Beukema E L, Brown M P, Hayball J D. The potential role of fowlpox virus in rational vaccine design [J]. Expert Rev Vaccines, 2006, 5(4): 565-577.
- [4] Boyle D B, Selleck P, Heine H G. Vaccinating chickens against avian influenza with fowlpox recombinants expressing the H7 haemagglutinin [J]. Aust Vet J, 2000, 78(1): 44-48.
- [5] Karaca K, Sharma J M, Winslow B J, et al. Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F gene [J]. Vaccine, 1998, 16(16): 1496-1503.
- [6] Nazerian K, Witter R L, Lee I F, et al. Protection and synergism by recombinant fowl pox vaccines expressing genes from Marek's disease virus [J]. Avian Dis, 1996, 40(2): 368-376.
- [7] Heine H G, Foord A J. 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]. Virus Res, 1997, 50(1): 23-

- 33.
- [8] 智海东, 王云峰, 张 晶, 等. 传染性喉气管炎新城疫鸡痘重组病毒免疫效力的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(8): 807-811.
Zhi H D, Wang Y F, Zhang J, et al. Efficiency of the recombinant fowlpox virus expressing gB gene of larngotracheitis virus and fusion gene of Newcastle disease virus [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2005, 36(8): 807-811. (in Chinese)
- [9] Cottingham M G, van Maurik A, Zago M, et al. Different levels of immunogenicity of two strains of Fowlpox virus as recombinant vaccine vectors eliciting T-cell responses in heterologous prime-boost vaccination strategies [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(7): 747-757.
- [10] Jäger E, Karbach J, Gnjatich S, et al. Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(39): 14453-14458.
- [11] Harrison J M, Bertram E M, Boyle D B, et al. 4-1BBL coexpression enhances HIV-specific CD8 T cell memory in a pox-virus prime-boost vaccine [J]. Vaccine, 2006, 24(47/48): 6867-6874.
- [12] Johansson B E, Bucher D J, Kilbourne E D. Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection [J]. J Virol, 1989, 63(3): 1239-1246.
- [13] Webster R G, Rott R. Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin [J]. Cell, 1987, 50(5): 665-666.
- [14] Bublot M, Pritchard N, Swayne D E, et al. Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1081: 193-201.
- [15] Swayne D E, Beck J R, Kinney N. Failure of a recombinant fowlpox virus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowlpox vaccine [J]. Avian Dis, 2000, 44(1): 132-137.
- [16] Taylor J, Weinberg R, Kawaoka Y, et al. Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant vaccine [J]. Vaccine, 1988, 6(6): 504-508.