

小反刍兽疫病毒 H 蛋白的原核表达及免疫原性测定

李丹, 宋浩志, 高维崧, 刘兴健, 张志芳, 李轶女*

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要: 小反刍兽疫是由小反刍兽疫病毒(pestes des petits ruminants virus, PPRV)引起的急性、接触性传染病, 对我国的畜牧业发展造成了严重的影响, 目前主要通过疫苗进行防控。为检测 PPRV 主要抗原蛋白血凝素(hemagglutinin, H)蛋白的免疫原性, 从 GenBank 数据库中查找了近年来公布的 H 蛋白氨基酸序列, 选择 1 条符合我国流行趋势的序列, 对其基因序列进行优化合成后克隆至 pET28a 载体上。筛选出表达量高的 Rosetta(DE3)菌株进行表达, 表达产物经 SDS-PAGE、Western Blot 及质谱分析鉴定。经镍柱亲和层析纯化出单一 H 蛋白, 取 20 μ g 与佐剂混合后免疫小鼠, 收集血清进行抗体效价检测, 结果显示, 血清中 H 蛋白抗体滴度在二免 2 周时达到 1:6 400, 表明 H 蛋白具有较好的免疫原性。进一步对二免 2 周时血清进行中和抗体检测显示, 小鼠血清对 PPRV 疫苗株具有中和效应, 中和效价不超过 1:40。研究结果对 H 蛋白用于 PPRV 疫苗的研发提供了理论依据。

关键词: 小反刍兽疫病毒; 血凝素蛋白; 疫苗; 大肠杆菌表达系统

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2021.0039

中图分类号: S852

文献标识码: A

Prokaryotic Expression and Immunogenicity Detection of the H Protein of Peste des Petits Ruminants Virus

LI Dan, SONG Haozhi, GAO Weisong, LIU Xingjian, ZHANG Zhifang, LI Yinyu*

Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Peste des petits ruminants is an acute and contagious infectious disease caused by the peste des petits ruminant virus (PPRV), which has a serious impact on the development of China's animal husbandry. At present, vaccination is the main method of prevention and control. In order to detect the main antigen protein hemagglutinin (H) protein of PPRV, searched its amino acid sequence published in recent years from the GenBank databases, and selected a sequence that conformed to the popular trend in China. The gene sequence was optimized and synthesized, and then cloned into the pET28a vector. The high-expressing Rosetta (DE3) strain was selected for expression and the product was identified by SDS-PAGE, Western Blot and mass spectrometry analysis. A single H protein was purified by nickel column affinity chromatography, and 20 μ g H protein was mixed with adjuvant to immunize mice, and serum was collected for antibody titer detection. The results showed that the serum antibody titer reached 1:6 400 after two weeks of the second immunization, indicating that H protein has good immunogenicity. Further testing of neutralizing antibodies on this serum showed that it had a neutralizing effect on the PPRV vaccine strain, and the neutralizing titer did not exceed 1:40. The results provide a theoretical basis for the use of H protein in the development of PPRV vaccines.

Key words: peste des petits ruminants virus; hemagglutinin protein; vaccine; *Escherichia coli* expression system

小反刍兽疫(pestes des petits ruminants, 反刍兽疫病毒(pestes des petits ruminants virus, PPR), 俗称羊瘟, 又称小反刍兽假性牛瘟, 是由小 PPRV)引起的一种急性、烈性、接触性疾病^[1], 其发

收稿日期: 2021-03-25; 接受日期: 2021-06-02

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0500108); 国家自然科学基金项目(32072796; 32002236)。

联系方式: 李丹 E-mail: lidancaas@163.com; * 通信作者 李轶女 E-mail: liyinv@caas.cn

病率和死亡率分别达到100%和90%^[2]。该病于1940年首次发生于非洲象牙海岸,之后逐渐蔓延^[3]。2003年以来,我国周边的缅甸、老挝、俄罗斯等国家相继爆发了严重的小反刍兽疫疫情^[4]。2007年7月我国西藏自治区日土县热帮乡龙门卡村发生PPR疫情后,又相继发生了多起流行疫病^[5],且该病传播速度快、风险高,对我国动物疫情的防控造成极大的威胁^[6]。我国已将其列为一类动物疾病,为最高关注级别。

目前,对于小反刍兽疫尚无有效的治疗方法,主要通过研制疫苗进行防控^[7]。传统疫苗如弱毒疫苗、灭活疫苗,虽然可以有效预防疫病的发生,但是无法通过血清学检测区分疫苗免疫动物与自然感染动物^[8],难以在PPR流行地区进行有效的调查,且在保存、使用和接种等方面均易出现相关问题^[9]。近年来,基因工程疫苗取得了巨大的进展,由于其具有安全、免疫效果可靠、易大量生产等特点,在预防小反刍兽疫疫情中发挥重要作用。但作为一种新型疫苗,基因工程疫苗仍有较多需要改进的地方^[10],如免疫效力有待提高及可能产生免疫耐受、插入突变等现象。近年来,PPR疫苗的研制仍是研究的热点。

小反刍兽疫病毒属于副黏病毒科、麻疹病毒属^[11],其基因组为单股负链RNA^[12],含有6个基因,依次为3'-N-P-M-F-H-L-5',编码核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝蛋白(H)和大蛋白(L)6个结构蛋白和C、V 2种非结构蛋白^[13]。其中,PPRV的H基因全长1 852 bp,编码609个氨基酸,分子量约为70 kD^[14]。PPRV H蛋白具有神经氨酸酶及血凝素活性^[15],其是病毒表面的主要抗原,与宿主细胞表面受体连接,可诱导机体产生中和抗体^[16-17]。因此,H蛋白可作为抗原进行PPRV疫苗研究。本研究将H蛋白在原核表达系统中进行表达,并通过菌株筛选及表达条件进行优化提高H蛋白表达量,将该抗原制备为疫苗在小鼠中对其免疫效果进行评价,以期H蛋白筛选出一种高表达条件,并对原核表达系统中表达的H蛋白免疫原性进行初步评价。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

SPF级实验小鼠购自北京维通利华实验动物

技术有限公司;T4 DNA连接酶、DNA聚合酶、重组酶购自北京诺维赞生物科技有限公司;质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒购自天根生化(北京)科技有限公司;限制性内切酶、Protein marker购自Thermo Scientific公司;鼠源PPRV H单克隆抗体购自英国皮比赖特研究所(Pirbright Institute);HRP标记山羊抗小鼠IgG购自Beyotime公司;化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;佐剂Montanide GEL 02 PR购自法国SEPPIC公司;TOP10、BL21(DE3)、BL21(DE3) pLySs、Rosetta(DE3)感受态细胞、Vero细胞由实验室保存;PPRV疫苗株(PPRV 75/1 Clone9)购自天康生物技术公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及DMEM培养基购自Gibco公司;ELISA及包涵体纯化所用试剂配方参照张伟业等^[18]的方法。其余试剂均为国产分析纯;PPRV的H基因由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,引物合成及测序由北京睿博兴科生物科技有限公司完成。

1.2 原核表达载体的构建

1.2.1 目的基因的优化合成 从GenBank数据库中查找目前公布的小反刍兽疫H蛋白的氨基酸序列,利用Mega^[19]软件进行序列比对,筛选出1条符合我国流行趋势的氨基酸序列,对其进行跨膜区预测及信号肽分析。综合考虑密码子使用情况及临近密码子使用频率等其他负面约束,对PPRV的H基因序列进行优化,并在其5'端添加起始密码子及BamH I酶切位点,3'端添加终止密码子及EcoR I酶切位点,将该基因序列送至南京金斯瑞生物技术有限公司进行合成,合成的基因连接于pUC57载体上,并命名为pUC57-PPRV H。

1.2.2 原核表达载体的构建 根据优化后的pUC57-PPRV H基因设计引物进行PCR扩增,引物序列为PPRV H-F1:5'-CGGGATCCATGACGCGC-CAGCGTGAACGTATC-3'; PPRV H-R1: 5'-CG-GAATTCTTACACCGGTTGCAGGTAACC-3'(下划线处分别表示BamH I和EcoR I酶切位点)。PCR程序为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,57℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,并利用胶回收试剂盒回收目的片段,利用BamH I和EcoR I双酶切后在T4 DNA连接酶作用下连接于pET28a载体上,转化TOP10感受态细胞,在卡那抗性平板上筛选出阳性菌落,提取质粒,并用BamH I和EcoR I进行双酶切鉴

定,鉴定正确的质粒送至北京睿博兴科生物科技有限公司测序。

1.3 重组蛋白的诱导表达

将重组质粒 pET28a-PPRV H 转化大肠杆菌 BL21(DE3)、Rosetta(DE3)、BL21(PLYSS)感受态细胞,在卡那抗性($50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)平板中筛选阳性菌落,挑取单菌落于 4.5 mL 相同浓度卡那抗性的无菌 LB 培养基中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 $2.5\sim 3.5\text{ h}$,加入不同浓度 IPTG 诱导 $6\sim 8\text{ h}$,同时,设置未加诱导剂作为对照。 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集菌体,并加入 $450\text{ }\mu\text{L}$ PBS 重悬,按照破碎 3 s 停 5 s 的原则进行超声破碎, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,收集上清及沉淀,分别取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 上清及沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

1.4 融合蛋白的亲纯化

在 200 mL 培养基中大量表达 PPRV H 蛋白,离心收集菌体。加入 20 mL 裂解缓冲液置于冰上裂解 30 min ,然后进行超声破碎(功率为 200 W)5 次,每次间隔 2 min , $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,收集沉淀,用 20 mL 包涵体洗涤液 I 和包涵体洗涤液 II 洗涤 1 次,弃多余液体,沉淀中加入 20 mL 脲 NTA-0 Buffer 缓冲液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜溶解。 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,取上清用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤后装入镍柱,收集穿透液重复上柱 2 次,分别用咪唑浓度为 50 、 100 、 $250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NTA-尿素缓冲液进行洗脱,收集洗脱液,进行 SDS-PAGE 检测纯化结果。

1.5 Western-blot 分析及质谱鉴定

将表达的蛋白样品进行 SDS-PAGE 后,用湿转法转移至硝酸纤维素膜上,在 3% 的 BSA 中过夜封闭,将鼠源 PPRV H 单克隆抗体稀释 $1\,000$ 倍后孵育 1.5 h ,再将 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 稀释 $5\,000$ 倍孵育 1.5 h ,每次孵育前用 PBST 将多余液体清洗干净。最后在膜上滴加化学发光液后置于化学发光仪中显色。对鉴定正确的样品,切取 SDS-PAGE 中大小合适的蛋白胶条置于 PBS 缓冲液中,送至上海欧易生物公司,使用 Easy-nLC 1200 液相系统、高 pH 分离液相色谱仪等进行质谱鉴定。

1.6 重组蛋白 PPRV H 免疫小鼠

将购买的 Balb/c 小鼠饲养至 7 周龄,取纯化的 PPRV H 蛋白样品 $20\text{ }\mu\text{g}$ 与佐剂 Montanide GEL 02 PR 按照 $7:1$ 混合后腹腔多点注射小鼠,同时,

设置 PBS 组作为阴性对照,每个样品设 10 个重复。从一免 2 周开始每周进行眼球后静脉取血,取得的血液室温静置 2 h , $2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 分离血清。免疫 3 周后,以相同剂量进行二次免疫,每周取血清置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.7 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清抗体滴度

对纯化好的 PPRV H 蛋白用蛋白定量试剂盒进行浓度测定,用包被缓冲液稀释至 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 加入 96 孔板中,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜包被。每孔加入 $300\text{ }\mu\text{L}$ 3% BSA,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱封闭 1.5 h 。将小鼠血清从 200 倍开始进行 2 倍倍比稀释后,每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 孵育 1.5 h ,同时将 PBS 组血清以相同倍数稀释作为阴性对照。以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 孵育 1 h 。每次抗体孵育前用 PBST 将多余液体清洗干净。加入 OPD 显色液于暗处显色 30 min ,加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸终止反应,在酶标仪中 492 nm 处测定吸光值。计算 P/N 值,样品组大于阴性对照 2.1 倍即为阳性。

1.8 中和抗体检测

将 Vero 细胞用含 10% FBS 及 1% 青霉素链霉素($1:1$)的 DMEM 培养基稀释至 10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 加入 96 孔板中培养约 10 h ,待细胞完全贴壁。将小鼠血清置于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅 30 min 使灭活补体,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后,用无血清 DMEM 培养基进行 2 倍倍比稀释。将稀释后的血清与等体积的 100 倍半数组织细胞感染量(median tissue culture infective dose, 100 TCID_{50}) PPRV 疫苗株混合,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 1 h 。每孔 $200\text{ }\mu\text{L}$ 加入培养好的 Vero 细胞中,每个样品设 5 个重复,同时设置空细胞对照组及病毒对照组。每天观察细胞发病状况,待病毒对照组全部发病时进行记录,能完全中和病毒的血清最大稀释倍数即为血清的中和抗体效价。

2 结果与分析

2.1 目的基因的优化合成

从 GenBank 数据库中获取小反刍兽疫 H 蛋白的氨基酸序列(GenBank:AJE30413.1),小反刍兽疫病毒 H 蛋白编码 609 个氨基酸,对其进行信号肽预测及跨膜区分析,结果显示,PPRV H 蛋白无

信号肽,其36~58位为跨膜区序列。去除跨膜区及胞内区序列,将其余氨基酸序列进行密码子优化,优化后基因长度为1 659 bp,通过密码子适用指数(codon adaptation index, CAI)及GC含量预测其表达水平,结果显示,H蛋白优化后序列的CAI达0.94,表明该基因序列的密码子使用情况较理想,GC含量为46.98%,在理想的GC含量范围内,预测该基因有较高的表达水平。将该序列送至南京金斯瑞生物技术有限公司进行合成。

2.2 原核表达载体的构建

设计引物通过PCR扩增出PPRV的H基因序

列,经琼脂糖凝胶电泳,在1 600 bp附近出现清晰的目的条带,与预期大小一致(图1A),对其进行回收后利用双酶切法连入pET28a载体,在卡那抗性平板中筛选出阳性菌株,提质粒后用*Bam*H I与*Eco*R I进行酶切鉴定,结果如图1B所示,在1 600 bp及5 300 bp附近分别出现目的基因及载体条带,与预期结果相符。将该质粒送至北京睿博兴科生物技术公司测序,测序结果与目的片段相符,表明原核表达载体pET28a-PPRV H构建成功。

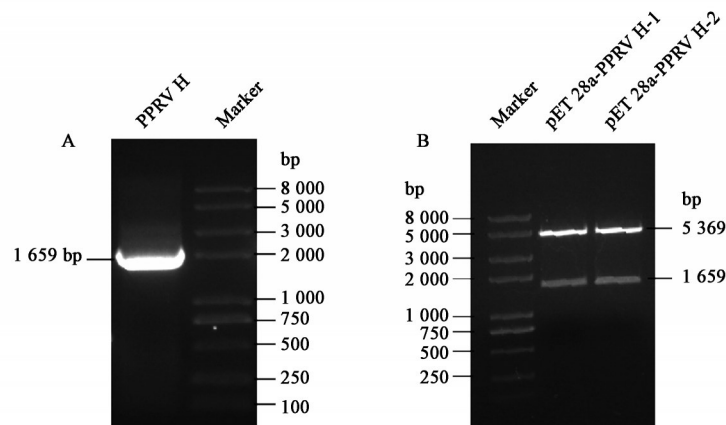


图1 目的基因的PCR扩增及重组质粒的*Bam*H I、*Eco*R I酶切鉴定。A:目的基因的PCR扩增。PPRV H—以pUC57-PPRV H为模板的PCR扩增产物。B:重组质粒的*Bam*H I、*Eco*R I酶切鉴定。pET 28a-PPRV H-1~2—重组质粒pET 28a-PPRV H经*Bam*H I、*Eco*R I双酶切后产物。

图1 目的基因的PCR扩增及重组质粒的*Bam*H I、*Eco*R I酶切鉴定

Fig.1 PCR amplification of the target gene and *Bam*H I and *Eco*R I digestion identification of the recombinant plasmid

2.3 重组蛋白的诱导表达

将重组质粒转化BL21(DE3)、Rosetta(DE3)、BL21(DE3)PLySs感受态细胞,经表达条件优化后,筛选出表达量高的Rosetta(DE3)菌株在37℃、0.5 mmol·L⁻¹ IPTG诱导7 h进行表达。表达产物经SDS-PAGE检测,与未诱导组相比,IPTG诱导后在65 kD附近出现清晰条带,与预期大小相符。且该蛋白主要出现在沉淀中,表明外源蛋白主要以包涵体形式表达,可溶性表达较少(图2)。

2.4 重组蛋白的亲和层析纯化及浓度测定

在大量诱导表达的菌液中收集菌体,经超声破碎、离心、洗涤、溶解等步骤后,将包涵体样品用镍柱进行亲和层析纯化,纯化的样品经SDS-PAGE检测,在咪唑浓度为100及250 mmol·L⁻¹的NTA-脲洗脱液中均有单一蛋白被洗脱下来,大小与目的

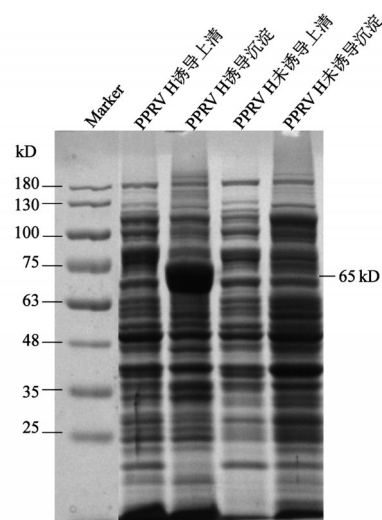
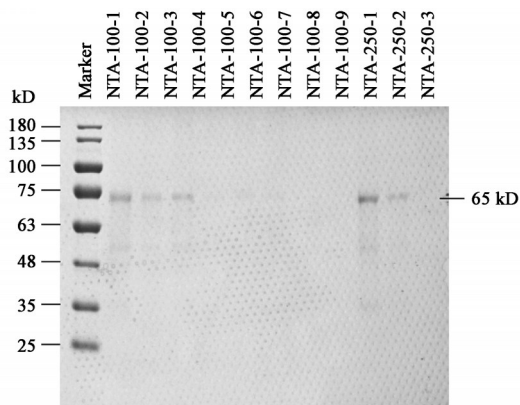


图2 重组蛋白在Rosetta菌株中的诱导表达

Fig.2 Induced expression of recombinant protein in Rosetta strains

蛋白相符(图3)。将纯化得到的单一蛋白样品混合后用BCA蛋白定量试剂盒进行浓度测定,结果显示,纯化得到的蛋白浓度为 $108\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。



注:NTA100及NTA250为PPRV H蛋白的不同浓度咪唑洗脱样品。

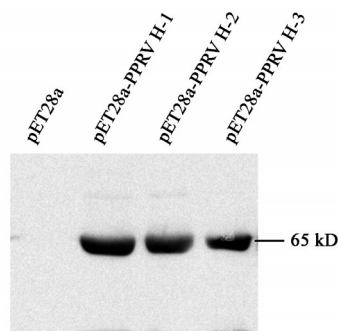
图3 重组蛋白的镍柱亲和纯化

Fig. 3 Nickel column affinity purification of recombinant protein

2.5 Western blot分析及质谱鉴定

以PPRV H单克隆抗体作为一抗,HRP标记山羊抗鼠IgG为二抗对纯化的样品进行Western blot试验,在约65 kD附近出现清晰条带,大小与预期一致,而对照中无相应条带(图4),表明目的蛋白在大肠杆菌中表达,且表达量较高。进一步

切取目的蛋白进行质谱鉴定,结果表明该蛋白为PPRV H蛋白。



注:pET28a—空载体经表达纯化后所得样品;pET28a-PPRV H-1~3—pET28a-PPRV H经表达纯化后所得蛋白样品。

图4 重组蛋白的Western blot分析

Fig. 4 Western blot analysis of recombinant protein

2.6 重组蛋白免疫小鼠后血清抗体效价检测

将 $20\ \mu\text{g}$ 纯化的PPRV H蛋白样品混合佐剂后以免疫小鼠,取血清后以 $0.5\ \mu\text{g}$ H蛋白作为抗原进行ELISA效价检测。一免2周时,样品组吸光值明显高于对照组,表明小鼠产生了PPRV H蛋白抗体,抗体滴度为1:100。随着时间延长抗体滴度逐渐升高,在两免2周时抗体滴度达到1:6 400,表明H蛋白可诱导小鼠产生较强的免疫反应(图5)。

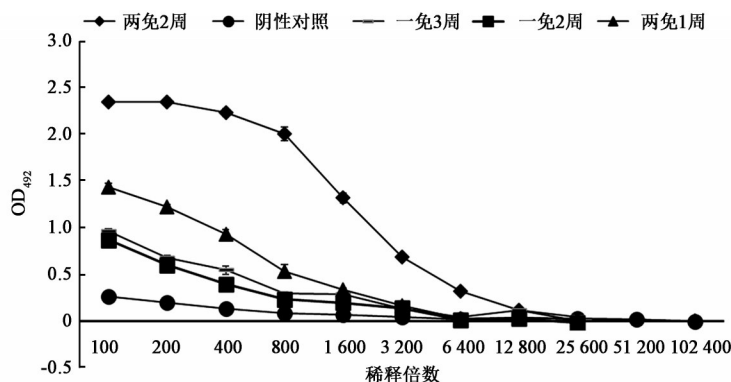


图5 重组蛋白免疫小鼠后引起的抗体效价检测

Fig. 5 Detection of antibody titer caused by recombinant protein immunization in mice

2.7 重组蛋白免疫小鼠后血清抗体效价检测

为测定血清对PPRV病毒的中和效价,进一步对两免2周时血清在Vero细胞上进行中和抗体检测。如图6所示,加入TCID₅₀的病毒感染细胞时,细胞出现明显聚集、皱缩等病变现象;当加入的小鼠

血清能完全抑制病毒扩增时,无病变现象出现;空细胞对照组无病变现象。结果显示,该血清对PPRV疫苗株具有明显的中和效应,根据Reed-Muench法计算后,其中和抗体效价不高于1:40。

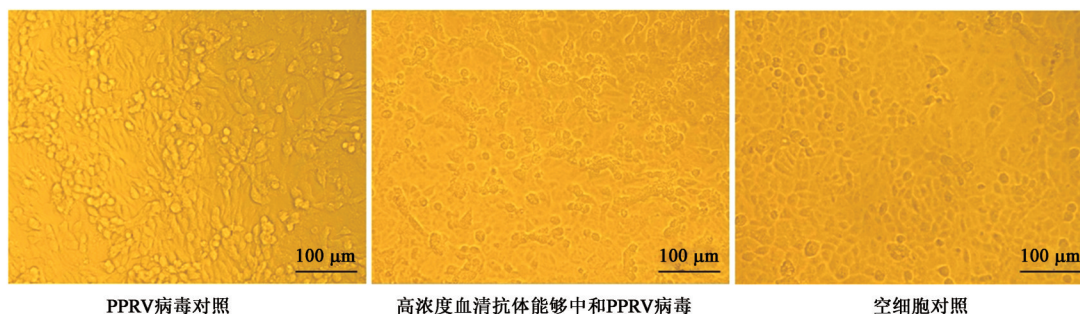


图6 不同稀释度血清抗体对PPRV病毒的中和效应

Fig.6 Neutralizing effect of different concentrations of serum antibodies on PPRV virus

3 讨论

近年来,随着生命科学的发展,小反刍兽疫疫苗的研发取得了明显的进展,灭活疫苗、基因工程疫苗、重组疫苗相继问世,对控制小反刍兽疫疫情蔓延具有重要作用。但这些疫苗通常需辅助剂以提高免疫效果,仍需开发出可引起强烈的细胞免疫应答和体液免疫应答的疫苗,以有效控制该病在我国的蔓延,甚至消灭该病,因此,对小反刍兽疫疫苗的研制引起了人们广泛关注。PPRV H蛋白是病毒粒子上的重要糖蛋白之一,具有神经氨酸酶活性和血凝素活性,其主要作用是作为受体连接病毒和宿主细胞,调节病毒吸附及侵入,并能诱导机体产生中和抗体^[7],是机体主要的保护性免疫原。

Tian等^[20]将H蛋白全长克隆至pET28a载体上,并在Rosetta菌株中进行表达,优化条件后其表达量仍较低,而选择将H蛋白的主要抗原位点分段进行表达,表达量明显提高,且能引起宿主的免疫反应,但抗原的完整性受到影响,进而可能影响后续试验。2006年,陈勇军等^[21]发现,将猪繁殖与呼吸综合症病毒GP5蛋白的跨膜区去掉,在原核表达系统中可明显提高该蛋白的表达量,并证实去掉跨膜区的GP5蛋白仍能诱导良好的体液免疫和细胞免疫。因此,为高效表达具有免疫活性的H蛋白,可将H蛋白跨膜区及胞内区序列去掉,保留其所有胞外区序列进行表达。另外,丁军颖等^[22]发现,菌株浓度不同时进行诱导表达,对丁肝抗原蛋白的表达具有重大影响。王劼等^[23]发现,菌株浓度、IPTG用量及诱导时间对目的蛋白表达量均有显著影响。因此,合适的表达条件对提高

外源蛋白的表达量具有重要意义。本研究对表达菌株及表达条件进行了优化,筛选出表达量高的菌株在合适的条件下表达H蛋白,为原核表达系统表达H蛋白提供了实验基础。

目前在大肠杆菌中表达PPRV H蛋白主要用于制备抗体^[24],本研究利用大肠杆菌Rosetta(DE3)菌株高效表达仅去除跨膜区的H蛋白,并对表达蛋白在小鼠中的免疫效果进行了评价,发现该蛋白在小鼠中引起了较强的免疫反应,血清抗体滴度在两免2周时达到1:6 400,并产生了PPRV病毒的中和抗体,表明大肠杆菌表达的H蛋白具有良好的免疫原性及反应原性,能诱导小鼠产生保护性中和抗体,说明原核表达的H蛋白作为PPRV亚单位疫苗的研究应用前景良好。

参 考 文 献

- [1] 王净,李学涛,王树红.小反刍兽疫流行状况分析与防控对策[J].今日畜牧兽医,2018,34(01):35-36.
- [2] ADOMBI C M, WAQAS A, DUNDON W G, *et al.* Peste des petits ruminants in benin: persistence of a single virus genotype in the country for over 42 years[J]. Transbound. Emerg. Dis., 2017, 64(4): 1037-1044.
- [3] KUMAR N, MAHERCHANDANI S, KASHYAP S K, *et al.* Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants: a comprehensive review[J]. Viruses, 2014, 6(6): 2287-2327.
- [4] AL-NAEEM A, ELZEIN E M, AL-AFALEQ A I. Epizootiological aspects of peste des petits ruminants and rinderpest in sheep and goats in saudi arabia[J]. Rev. Sci. Tech., 2000, 19(3): 855-858.
- [5] 郭敏华,陈维.羊小反刍兽疫的临床诊断[J].兽医导刊,2016(4):170.
- [6] 李玉东.小反刍兽疫及其防控措施[J].中国畜牧兽医文摘,2014(8):89-90.
- [7] 王善辉,高三阳,沈志强.小反刍兽疫疫苗的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2011(21):28-30.
- [8] 曹冬仲,赵柏林,曲萍,等.小反刍兽疫基因工程疫苗研究进展[J].动物医学进展,2015(11):101-105.

- [9] 高位相,张明,于瑞嵩,等.小反刍兽疫(PPR)疫苗研究进展[J].畜牧与兽医,2015,47(07):132-136.
- [10] 范大鹏.基因工程疫苗在动物疾病防治中的应用[J].现代畜牧科技,2019(03):141-142.
- [11] MAHAPATRA M, SELVARAJ M, PARIDA S. Comparison of immunogenicity and protective efficacy of PPR live attenuated vaccines (Nigeria 75/1 and Sungri 96) administered by intranasal and subcutaneous routes[J/OL]. *Vaccines*, 2020, 8(2): 168 [2021-09-29]. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020168>.
- [12] WANG Y, YUE X, JIN H, *et al.* A suicidal DNA vaccine expressing the fusion protein of peste des petits ruminants virus induces both humoral and cell-mediated immune responses in mice[J]. *J. Virol. Methods*, 2015, 225: 35-40.
- [13] YAN F, BANADYGA L, ZHAO Y, *et al.* Peste des petits ruminants virus-like particles induce a potent humoral and cellular immune response in goats[J/OL]. *Viruses*, 2019, 11(10): 918 [2021-09-29]. <https://doi.org/10.3390/v11100918>.
- [14] 赵玲娜.小反刍兽疫病毒H蛋白对病毒增殖的影响[D].北京:中国农业科学院,硕士学位论文,2016.
- [15] SETH S, SHAILA M S. The hemagglutinin-neuraminidase protein of peste des petits ruminants virus is biologically active when transiently expressed in mammalian cells[J]. *Virus Res.*, 2001, 75(2): 169-177.
- [16] DIALLO A, MINET C, LE GOFF C, *et al.* The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control[J]. *Vaccine*, 2007, 25(30): 5591-5597.
- [17] LI W, JIN H, SUI X, *et al.* Self-assembly and release of peste des petits ruminants virus-like particles in an insect cell-baculovirus system and their immunogenicity in mice and goats [J/OL]. *PLoS ONE*, 2014, 9(8): e104791 [2021-09-29]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104791>.
- [18] 张伟业.口蹄疫病毒铁蛋白纳米颗粒抗原的表达与鉴定[D].北京:中国农业科学院,硕士学位论文,2020.
- [19] KUMAR S, STECHER G, LI M, *et al.* Mega X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Mol. Biol. Evol.*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [20] 田晓灵,赵永刚,宋厚辉,等.小反刍兽疫H蛋白主要抗原表位的原核表达[J].中国动物检疫,2009,26(03):28-30.
- [21] 陈勇军.猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)GP5蛋白跨膜区删除对小鼠免疫效果的影响[D].南京:南京农业大学,硕士学位论文,2006.
- [22] 丁军颖,伊瑶,卢学新,等.不同温度、时间、IPTG和菌种浓度对丁肝抗原蛋白表达量的影响[J].医学研究杂志,2012,41(05):31-34.
- [23] 王劼,蒋思文,彭健.重组K88黏附素亚单位蛋白在大肠杆菌中的诱导表达[J].农业生物技术学报,2006,14(06):957-962.
- [24] 于瑞嵩,高位相,李凤平,等.西藏株小反刍兽疫病毒H蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备[J].微生物学通报,2018,45(10):2183-2190.