

# 基于甲病毒复制子载体的猪瘟 DNA 疫苗的免疫效力评价 Alphavirus Replicon-vectored Plasmid DNA-based Vaccine Elicits Protective Immunity Against Classical Swine Fever Virus

李 娜<sup>1,2</sup> 赵建军<sup>2</sup> 赵和平<sup>2</sup> 孙 元<sup>2</sup> 朱庆虎<sup>2</sup> 童光志<sup>2\*</sup> 仇华吉<sup>2\*</sup>

LI Na<sup>1,2</sup>, ZHAO Jian-Jun<sup>2</sup>, ZHAO He-Ping<sup>2</sup>, SUN Yuan<sup>2</sup>, ZHU Qing-Hu<sup>2</sup>, TONG Guang-Zhi<sup>2\*</sup> and  
QIU Hua-Ji<sup>2\*</sup>

1 东北农业大学动物医学院 哈尔滨 150030

2 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室猪传染病研究室 哈尔滨 150001

1 College of Veterinary Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2 National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

**摘 要** 此前已构建了基于 Semliki Forest 病毒(Semliki Forest virus, SFV)复制子载体的表达猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)E2 基因的新型猪瘟 DNA 疫苗 pFV1CS-E2, 通过动物试验证实, 该疫苗以 600 $\mu$ g/头的剂量免疫 3 次, 免疫猪能抵抗致死剂量猪瘟强毒的攻击。为进一步评价该疫苗在较低的免疫剂量和较少的免疫次数情况下的免疫效力, 将 DNA 疫苗 pSFV1CS-E2 和空载体 pSFV1CS 按 100 $\mu$ g/头的剂量, 接种猪只 2 次, 然后用致死剂量的猪瘟强毒石门株进行攻击。结果表明, pSFV1CS-E2 免疫组( $n=5$ )所有免疫猪在加强免疫后均产生了猪瘟特异性中和抗体, 攻毒后所有猪只抗体迅速升高, 除了短期体温升高外, 未出现任何其它临床症状, 部分猪出现短期轻微病毒血症, 个别猪的部分脏器出现轻微病变; 而空载体免疫组( $n=3$ )猪只在攻毒前一直没有检出特异性抗体, 攻毒后全都出现典型的猪瘟临床症状和严重的病毒血症, 有 2 头猪分别于攻毒后第 10 和 11d 死亡, 剖检时可见典型猪瘟病理变化。结果表明, 基于甲病毒复制子载体的猪瘟 DNA 疫苗有望成为具有开发价值的猪瘟标记疫苗。

**关键词** 猪瘟病毒, 甲病毒复制子载体, DNA 疫苗

中图分类号 S8 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0434-06

**Abstract** We have shown previously that a Semliki Forest virus (SFV) replicon vectored DNA vaccine (pSFV1CS-E2) expressing the E2 glycoprotein of classical swine fever virus (CSFV) conferred full protection for pigs immunized three times with 600 $\mu$ g of the vaccine. This study aims to evaluate the efficacy of the DNA vaccine with lower dosage and fewer inoculations. Pigs were immunized twice with 100 $\mu$ g pSFV1CS-E2 ( $n=5$ ) or control plasmid pSFV1CS ( $n=3$ ), respectively. Pigs immunized with pSFV1CS-E2 developed high titers of specific neutralizing antibodies against CSFV after the booster, and the antibody titers increased rapidly upon challenge. The immunized animals showed no clinical symptoms except short-term fever and low-level viremia, whereas the control pigs immunized with the control plasmid produced no detectable antibody before challenge and showed obvious clinical signs following challenge, and 2 pigs died on 10 or 11 days post-challenge. All control animals developed

Received: October 20, 2006; Accepted: January 9, 2007.

This work was supported by the grants from the National Basic Research Program of China (973 program) (No. 2005CB523202) and the National High-Tech R&D Program of China (No. 2006AA10A204).

\* Corresponding authors. Tel/Fax: +86-451-85935041; E-mail: huajiqu@hvri.ac.cn; gztong@hvri.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部, http://journals.im.ac.cn  
国家 863 高技术研究发展计划项目(No. 2006AA10A204) 和国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No. 2005CB523202)

extended viremia as detected by nested RT-PCR and real-time RT-PCR. Severe pathologic lesions typical of CSFV infection were observed at necropsy. We conclude that the alphavirus replicon-vectored DNA-based vaccine can be potential marker vaccine against CSFV.

**Key words** classical swine fever virus, alphavirus replicon vector, DNA vaccine

猪瘟(classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起的一种烈性传染病,是危害世界养猪业的重要传染病之一。CSFV属于黄病毒科瘟病毒属,为单股正链 RNA 病毒,含有唯一的开放阅读框架,编码一个大的多聚蛋白,经蛋白酶水解加工后,产生 4 种结构蛋白(C、E<sup>ms</sup>、E1 和 E2)和 7 种非结构蛋白(N<sup>pro</sup>、p7、NS2-3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)<sup>[1]</sup>。E2 蛋白是一种囊膜糖蛋白,可诱导产生中和抗体,能对猪瘟强毒攻击提供完全的免疫保护;E<sup>ms</sup>是可分泌糖蛋白,也能诱生中和抗体,并可对强毒攻击提供部分保护。

目前,我国自主研发的猪瘟免化弱毒疫苗(C 株)的广泛使用有效控制了国内 CSF 的大规模流行,尽管如此,猪瘟仍在我国广大养猪地区时有发生,有的地区呈地方性流行。近年来,猪瘟免疫失败现象频频发生,非典型慢性猪瘟屡屡出现,主要是由于猪瘟弱毒疫苗在免疫程序不合理时可引起免疫耐受,并且易受母源抗体干扰。此外,弱毒疫苗免疫猪与野毒感染猪很难通过常规方法加以区分,不利于猪瘟的净化。这些问题引起人们对弱毒疫苗的重新审视。因此,许多学者一直致力于研制更加安全有效、能与野毒感染相区分的“标记疫苗”(marker vaccines,或 DIVA vaccines)<sup>[2]</sup>,并建立与之配套的鉴别诊断手段。

近年来,甲病毒(alphaviruses)特别是 Semliki Forest 病毒, Semliki Forest virus, SFV)衍生的 DNA/RNA 载体被广泛用于外源基因的表达。在此类载体中,甲病毒 RNA 首先翻译产生病毒复制酶复合物,由其催化从 RNA 到 RNA 的复制。这种复制过程是在宿主细胞的细胞浆中进行的,效率极高,所以由其介导的重组 RNA 就可在细胞浆内得到大量复制,从而使外源基因获得高效表达。

此前我们构建了基于 SFV 复制子载体、表达 CSFV E2 基因的新型 DNA 疫苗 pSFV1CS-E2<sup>[3]</sup>,用此疫苗按 600 $\mu$ g/头的剂量,通过肌肉注射途径免疫猪,共免疫 3 次,间隔 3 周,免疫猪产生了低水平的抗体,并且能抵抗致死剂量猪瘟强毒的攻击<sup>[4]</sup>。有报道表明,对于复制子载体疫苗,免疫剂量过大反而不利于外源基因的表达,而使用较少的剂量可以诱导

更有效的免疫应答<sup>[5,6]</sup>。鉴于此,我们尝试以较低的免疫剂量(100 $\mu$ g/头)和较少的免疫次数(2 次)对猪只进行免疫,进一步评价该疫苗的免疫效力。

## 1 材料和方法

### 1.1 免疫

将购自无 CSFV 猪场的 8 头 5 周龄左右的仔猪,用 IDEXX 猪瘟病毒抗体检测试剂盒( IDEXX,北京)检测为阴性后,随机将其分为 2 组,分别接种溶于 1 mL 灭菌生理盐水的 100 $\mu$ g 空质粒 pSFV1CS(3 头)和表达 CSFV E2 的复制子载体疫苗 pSFV1CS-E2(5 头),共免疫 2 次,间隔 3 周。

### 1.2 攻毒

第二次免疫后 5 周,通过颈部肌肉注射 1 mL 新近复壮的 CSFV 石门强毒血毒(10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL),对所有猪只进行攻毒。攻毒后,每天记录所有猪的直肠温度和临床变化,病死猪及处死猪进行病理剖检,同时采集各脏器,进行组织病理学检查。

### 1.3 抗体检测

免疫后每周、攻毒后每隔 1d(攻毒后 0~8d)或隔 2d(攻毒后 9d 直至扑杀),采血分离血清,用 CSFV 抗体检测试剂盒( IDEXX 公司)基于猪瘟病毒中和性单克隆抗体的竞争 ELISA 试剂盒)检测 CSFV 特异性中和抗体产生情况。

### 1.4 免疫组化

剖检时,取所有猪的扁桃腺、淋巴结、脾脏和肾脏等组织,制备成冰冻切片,用冷丙酮固定后,加入 20 倍稀释的 CSFV 抗血清,用含有 0.05%吐温-20 的 PBS(PBST)洗 3 遍后,加入 FITC 标记的羊抗猪 IgG(Sigma 公司)。用 PBST 洗 2 遍,再用 PBS 洗 1 遍,然后封片,置荧光显微镜下观察<sup>[7]</sup>。

### 1.5 RT-nPCR

攻毒后每隔 1d(攻毒后 0~8d)或 2d(攻毒后 9d 直至扑杀),采集所有猪只的抗凝血(用 4%柠檬酸钠抗凝),用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)提取血液中总 RNA,用 AMV 将其反转录后,按已报道的 RT-nPCR 方法<sup>[8]</sup>进行检测。

### 1.6 荧光定量 RT-PCR

攻毒后不同时间采集抗凝血,用 TRIzol 试剂提

取总 RNA 溶于 40 $\mu$ L DEPC 处理的灭菌双蒸水中, 取 20 $\mu$ L 反转录成 cDNA 后, 用已报道的荧光定量

RT-PCR 方法<sup>[9]</sup>检测试验猪攻毒后 CSFV 病毒载量。引物和探针序列见表 1。

表 1 检测 CSFV 的荧光定量 RT-PCR 所用的引物和探针序列

Table 1 The primers and probe used in real-time RT-PCR for quantitative detection of CSFV

Reference strain	Primers and probe	Sequences
CSFV	CSFV-F	5'-CCCTGGCTGGTCTAAG-3'
(NC_000294.1)	CSFV-Probe	5'-FAM-CCTGAGTACAGGACAGTCGTCAGTACTT-TAMARA-3'
	CSFV-R	5'-CATGCCCTCGTCCAC-3'

## 2 结果

### 2.1 pSFV1CS-E2 免疫猪产生了 CSFV 特异性中和抗体

pSFV1CS-E2 免疫猪在加强免疫 1 周后, 猪瘟特异性中和抗体开始产生, 此后持续升高, 一直到攻毒前(46.2  $\pm$  13.0)% , 攻毒后抗体水平短时下降, 但从

攻毒后第 2 天起, 抗体迅速升高, 一直持续到试验结束, 达到最大值(83.8  $\pm$  4.8)% ; 而空质粒对照猪免疫后至攻毒前均未产生特异性抗体(< 15%)( $P < 0.01$ ), 只是在攻毒后第 6 天抗体开始升高, 至第 11 天后下降(图 1)。攻毒后第 10 天和第 11 天分别死亡 1 头(# 11 和 # 13)。

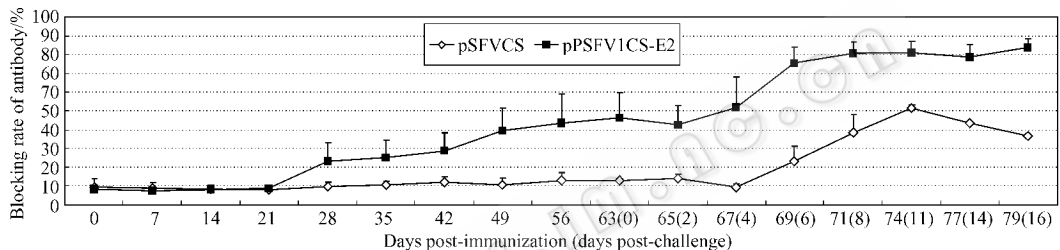


图 1 免疫猪攻毒前后免疫猪抗体产生动态

Fig. 1 Antibody response of immunized pigs before and after virulent challenge

### 2.2 pSFV1CS-E2 免疫猪攻毒后组织中病毒抗原明显减少

剖检时, 取试验猪组织制备冰冻切片, 用免疫组化检测攻毒后组织中病毒抗原。结果表明, 从所有对照组猪的扁桃体、淋巴结、脾脏、肾脏等组织中均检出了大量病毒抗原, 而 pSFV1CS-E2 免疫猪仅在其个别组织中检测到少量病毒抗原(表 2)。

表 2 免疫猪攻毒后主要脏器中 CSFV 抗原分布

Table 2 Antigen distributions in the tissues of immunized pigs following virulent challenge detected by immunohistochemistry

Groups	No.	Tissues			
		Tonsil	Lymph node	Spleen	Kidney
pSFV1CS-E2	1	-	-	-	+
	2	-	-	+	-
	3	-	-	+	+
	5	+	-	-	-
	6	-	-	-	+
	pSFV1CS	11	+++	++	++
	13	+++	++	++	+
	31	++	++	+	++

- , no positive cells detected; + , 1 to 2 positive cells detected on section; ++ , 1 to 2 positive cells detected in one visual field; +++ , > 2 positive cells detected in one visual field.

### 2.3 pSFV1CS-E2 免疫猪攻毒后病毒血症时间缩短并且血液中病毒载量显著减少

用 RT-nPCR 检测试验猪攻毒后血液中病毒 RNA 结果表明, pSFV1CS-E2 免疫组仅在攻毒后第 4 天和 6 天分别有 4/5 和 3/5 检出了 CSFV RNA, 并且均是在 RT-nPCR 的第二轮扩增中才检出的, 其余所有时间点均未检测到 CSFV RNA(0/5); 而空载体对照组所有猪(3/3)在攻毒后第 2 天直到死亡(或剖杀)前均检出了 CSFV RNA, 大部分时间点是在 RT-nPCR 的第一轮扩增中检出的(表 3)。

用荧光定量 RT-PCR 检测试验猪攻毒后血液中病毒载量, 结果显示, pSFV1CS-E2 免疫猪(除 3# 外)仅在攻毒后第 4 天检出了较低水平的病毒 RNA, 每微升血液不超过  $10^4$  ( $1.89 \times 10^2 \sim 6.56 \times 10^3$ ) 个拷贝, 其余时间点检测结果均为阴性, 而对照猪在攻毒后第 2 天即可检出病毒 RNA, 每微升血液超过  $10^4$  ( $2.08 \times 10^4 \sim 7.12 \times 10^5$ ) 个拷贝, 明显高于疫苗免疫组( $P < 0.01$ ), 到第 4 天病毒拷贝数达到最高值 ( $1.36 \times 10^6 \sim 1.96 \times 10^7$ ), 比 pSFV1CS-E2 免疫组高  $10^4$  左右( $P < 0.001$ )。此后虽稍有下降, 但一直持续

到死亡或剖杀(表 4)。这个结果与 RT-nPCR 检测结果基本相符。

表 3 用 RT-nPCR 检测免疫猪攻毒后血液中 CSFV RNA

Table 3 Detection of CSFV viral RNA in immunized pigs following virulent challenge by RT-nested PCR

Groups	No.	Days post-challenge								
		0	2	4	6	8	11	14	16	
pSFV1CS-E2	1	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	2	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	pSFV1CS	11	-	++	++	+	+	/	/	/
	13	-	++	++	+	+	++	/	/	
	31	-	+	++	++	+	+	++	++	

- , not detected ; + , detected by 1 round ; ++ , detected by 2 rounds of RT-nPCR amplification ; / , pigs died of disease.

表 4 用荧光定量 RT-PCR 检测免疫猪攻毒后血液中病毒载量 ( $\times 10^3$  拷贝数/ $\mu\text{L}$  血液)

Table 4 Viral loads in immunized pigs following virulent challenge detected by real-time RT-PCR ( $\times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$  blood)

Groups	No.	Days post-challenge								
		0	2	4	6	8	11	14	16	
pSFV1CS-E2	1	-	-	0.83	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	6.56	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	0.189	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	4.03	-	-	-	-	-	-
	pSFV1CS	11	-	712	19600	1350	248	/	/	/
	13	-	618	4340	300	158	414	/	/	
	31	-	20.8	1360	538	516	466	514	514	

- , not detected ; / , pigs died of disease.

## 2.4 pSFV1CS-E2 免疫猪免于致死剂量 CSFV 强毒的攻击

pSFV1CS-E2 免疫组攻毒后,除部分猪在攻毒后第 3~6 天,有 1~3 天直肠温度高出  $40^\circ\text{C}$  外(图 2),未见有其它临床症状,保护率达 100%(5/5)。攻毒后 16d 将免疫猪扑杀后剖检,除了个别猪在淋巴结或脾脏有轻微病变外,在其它脏器无可见的病理变化。而所有对照猪从攻毒后第 2 天起一直稽留高热(最高达  $41.8^\circ\text{C}$ ) (图 2),同时出现猪瘟的典型临床

症状:厌食、震颤、卧地不起、结膜炎、排稀便、耳朵、四肢、腹部和臀部皮肤有出血斑点等。两头猪分别于攻毒后第 10 天和 11 天死亡。对照猪发病率和死亡率分别为 100% 和 66.7%(3/3 和 2/3)。所有对照猪都出现典型的猪瘟病理变化:扁桃体出血、有坏死灶、淋巴结肿大、出血,呈大理石状,脾脏有梗死灶,肾脏有大量出血点,形似麻雀蛋,膀胱有多个出血点,回盲瓣扣状肿等。

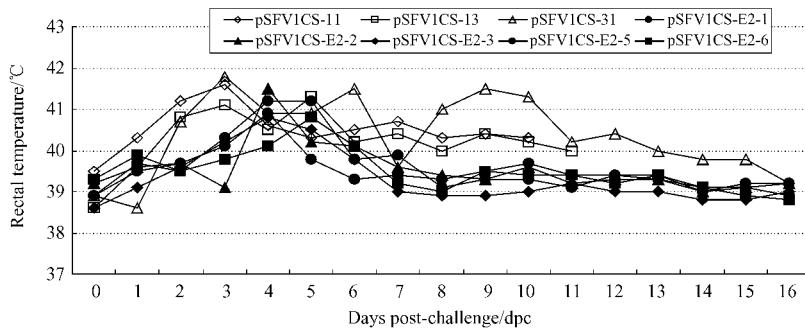


图 2 免疫猪攻毒后体温变化

Fig.2 Rectal temperatures of immunized pigs following virulent challenge

## 3 讨论

DNA 疫苗是 20 世纪 90 年代初发展起来的一种

新型疫苗。DNA 疫苗具有很多优点,但也存在许多缺点,比如导入细胞和机体的效率差,抗原表达水平低,存在安全隐患<sup>[10]</sup>,尤其在大动物中,DNA 疫苗

接种量大,但激发的免疫反应弱,不易达到所需的免疫效果等。为了克服这些局限性,研究人员采取了不同的改进策略,如使用 CpG 基序、细胞因子和其它刺激分子作为佐剂,采用 Prime-boost 免疫策略<sup>[11]</sup>,开发表达水平高、安全性好、能激发较强免疫应答的疫苗载体。

由甲病毒(主要是 SFV 或 SINV)衍生的 DNA/RNA 复制型载体,由于具有安全、操作方便、表达外源基因效率高等优点,在基因免疫<sup>[12,43]</sup>和基因治疗<sup>[14]</sup>中得到广泛应用。已经证明,这种基于复制子的 DNA 疫苗优于常规 DNA 疫苗<sup>[13,15-21]</sup>。研究发现,复制子载体疫苗表达效率的提高不止是因为外源抗原表达量的增多<sup>[17,22]</sup>;用这种疫苗转染细胞后,其 RNA 复制酶合成大量双链 RNA(dsRNA)复制中间体,激活 RNase L 和 RNA 依赖的蛋白激酶(PKR),导致被转染细胞的凋亡,因此复制子疫苗也被称为“自杀性”DNA 疫苗。dsRNA 还可激活并诱导树突状细胞(DC)的成熟<sup>[23]</sup>,增加 DC 等抗原递呈细胞对凋亡细胞的摄取<sup>[24]</sup>。研究证明,共转染凋亡基因 CD95/Fas 或 caspase,可以增加常规 DNA 疫苗的免疫原性和表达效率<sup>[25,26]</sup>。Leitner 等用表达抗凋亡基因 Bcl-X(L)的质粒和表达黑色素瘤分化抗原 TRP-1 的 SINV 复制子载体疫苗一同递送,虽然转染细胞存活时间变长,抗原表达量增加,体内产生抗体提高,但由于干扰了细胞凋亡,大大降低了小鼠对于肿瘤攻击的保护作用<sup>[27]</sup>。而经同样操作的常规 DNA 疫苗,其效力并不受 Bcl-X(L)的影响。这些研究结果证实了细胞凋亡在诱导免疫反应中的重要作用,并为复制子载体疫苗通过细胞凋亡增强免疫反应提供了强有力的佐证。dsRNA 还可被天然免疫受体(如 Toll-like 受体 3,TLR-3)识别,产生高水平的 I 型干扰素(IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$ )或其它细胞因子,前者是宿主细胞在病毒感染后释放的主要细胞因子<sup>[28,29]</sup>,对树突状细胞的分化和成熟有重要促进作用<sup>[28]</sup>,在免疫应答中起强大的佐剂作用,大大提高了复制子载体疫苗抗病毒或抗肿瘤效应<sup>[29]</sup>。这一系列过程类似于 RNA 病毒自然感染所激发的免疫应答。

有研究者比较了不同剂量的 SFV 复制子载体疫苗 pSCA-SSI 的免疫效果,发现  $1\mu\text{g}$  诱导的抗体滴度反而高于  $10\mu\text{g}$  和  $100\mu\text{g}$ <sup>[21]</sup>,说明对于复制型载体疫苗来说,免疫接种的剂量并不是越多越好。正如上述,细胞凋亡是复制子疫苗免疫效率增强的必要条件<sup>[27]</sup>,但并非诱导细胞凋亡的能力越强,对激发的免疫反应越有利。Sasaki 等将流感病毒 HA 基因

表达质粒与部分失活的突变型 caspase(可在诱导凋亡小体前表达抗原蛋白)表达质粒联合免疫小鼠,能显著增强 HA 的免疫反应,但与诱导细胞凋亡的野生型 caspase 表达质粒联合免疫却不能增强免疫反应<sup>[25]</sup>。另外,复制子载体疫苗剂量过多,宿主细胞摄入后,产生大量 dsRNA,迅速诱导细胞凋亡,反而影响抗原的表达和处理,从而影响免疫效果。

我们此前构建了基于 SFV 复制子载体的表达 CSFV E2 基因的新型猪瘟 DNA 疫苗 pSFV1CS-E2,通过动物试验证实,该疫苗以  $600\mu\text{g}/\text{头}$  的剂量免疫 3 次,可以诱导猪瘟特异性抗体,免疫猪能抵抗致死剂量猪瘟强毒的攻击<sup>[4]</sup>。鉴于前人报道的低剂量复制子载体疫苗可以诱导更好的免疫效果,同时出于成本考虑,我们尝试用较低的免疫剂量( $100\mu\text{g}/\text{头}$ )和较少的免疫次数(2 次)。这在已发表的以肌肉注射方式对 CSFV 基因疫苗进行效力评价的研究报道中,免疫次数和剂量都是最少的<sup>[30-32]</sup>。按此策略免疫猪只,二免后抗体水平持续上升至较高水平,攻毒后 2 天起,抗体快速上升,表明产生了回忆性免疫应答,攻毒猪均获得了完全的临床保护(5/5)。虽然 RT-nPCR 和荧光定量 RT-PCR 检测到个别猪攻毒后出现短期(攻毒后第 4~6 天)病毒血症,但病毒载量很低(RT-nPCR 第二轮扩增才能检出,病毒 RNA 载量不高于  $10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  血液),而对照组在攻毒后第 2 天直到死亡(或剖杀)其血液中 CSFV 拷贝数一直处于较高水平(高达  $10^6 \sim 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  血液)。表明复制子疫苗有效降低了病毒载量,缩短了病毒血症时间<sup>[33,34]</sup>。

总之,我们构建的复制子载体疫苗在较低的免疫剂量和较少的免疫次数情况下,仍然提供了对猪瘟强毒攻击的完全临床保护,表明这种复制子疫苗有望开发为防制猪瘟的新型候选疫苗。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Moser C, Stettler P, Tratschin JD, et al. Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus. *J Virol*, 1999, **73**(9): 7787-7794.
- [2] van Oirschot JT. Diva vaccines that reduce virus transmission. *J Biotechnol*, 1999, **73**(2-3): 195-205.
- [3] Li N(李娜), Qiu HJ(仇华吉), Li GX(李国新), et al. A Semliki Forest virus RNA replicon-based DNA plasmid encoding classical swine fever virus E2 gene induces immune response in mice. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2005, **25**(1): 53-58.
- [4] Li N, Qiu HJ, Zhao JJ, et al. A Semliki Forest virus replicon vectored DNA vaccine expressing the E2 glycoprotein of classical swine fever virus protects pigs from lethal challenge. *Vaccine*,

- [ 5 ] Zhou X, Berglund P, Rhodes G, *et al.* Self-replicating SemLike Forest virus RNA as recombinant vaccine. *Vaccine*, 1994, **12**:1510 - 1514.
- [ 6 ] Colombage G, Hall R, Pavy M, *et al.* DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with prM and E proteins elicits long-lived and protective immunity against the flavivirus, Murray Valley encephalitis virus. *Virology*, 1998, **250**:151 - 163.
- [ 7 ] Choi C, Chae C. Localization of classical swine fever virus from chronically infected pigs by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 2003, **40**(1):107 - 113.
- [ 8 ] Li Y(李艳), Qiu HJ(仇华吉), Wang XR(王秀荣), *et al.* A reverse transcription-multiplex nested polymerase chain reaction for detection and differentiation of wild-type and vaccine viruses of classical swine fever virus. *Agricultural Sciences in China(中国农业科学)*, 2006, **39**(9):1907 - 1914.
- [ 9 ] Risatti GR, Callahan JD, Nelson MW, *et al.* Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**(1):500 - 505.
- [ 10 ] Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, *et al.* Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, **772**:30 - 39.
- [ 11 ] Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nat Rev Immunol*, 2001, **1**:209 - 219.
- [ 12 ] Dubensky TW Jr, Driver DA, Polo JM, *et al.* Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *J Virol*, 1996, **70**:508 - 519.
- [ 13 ] Berglund P, Smerdou C, Fleeton MN, *et al.* Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**:517 - 518.
- [ 14 ] Herweijer H, Latendresse JS, Williams P, *et al.* A plasmid-based self-amplifying Sindbis virus vector. *Hum Gene Ther*, 1995, **6**:1161 - 1167.
- [ 15 ] Berglund P, Tubulekas I, Liljestrom P. Alphaviruses as vectors for gene delivery. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**(4):130 - 134.
- [ 16 ] Schlesinger S. Alphavirus vectors: development and potential therapeutic applications. *Exp Opin Biol Ther*, 2001, **1**(2):177 - 191.
- [ 17 ] Leitner WW, Ying H, Driver DA, *et al.* Enhancement of tumor-specific immune response with plasmid DNA replicon vectors. *Cancer Res*, 2000, **60**(1):51 - 55.
- [ 18 ] Driver DA, Polo JM, Belli BA, *et al.* Plasmid DNA-based alphavirus expression vectors for nucleic acid immunization. *Curr Res Mol Ther*, 1998, **1**:510 - 517.
- [ 19 ] Cheng WF, Hung CH, Chai CY, *et al.* Enhancement of sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by linkage of herpes simplex virus type 1 VP22 protein to antigen. *J Virol*, 2001, **75**(5):2368 - 2376.
- [ 20 ] Schirmacher V, Forg P, Dalemans W, *et al.* Intra-pinna anti-tumor vaccination with self-replicating infectious RNA or with DNA encoding a model tumor antigen and a cytokine. *Gene Ther*, 2000, **7**(13):1137 - 1147.
- [ 21 ] Deng Y(邓瑶), Meng X(孟昕). Comparative study on SFV-based DNA vaccine and the conventional DNA vaccine. *Chinese Journal of Virology(病毒学报)*, 2002, **18**(4):328 - 330.
- [ 22 ] Leitner WW, Hwang LN, deVeer MJ, *et al.* Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nat Med*, 2003, **9**(1):33 - 39.
- [ 23 ] Wang L, Smith D, Bot S, *et al.* Non-coding RNA danger motifs bridge innate and adaptive immunity and are potent adjuvants for vaccination. *J Clin Invest*, 2002, **110**:1175 - 1184.
- [ 24 ] Ying H, Zaks TZ, Wang RF, *et al.* Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nat Med*, 1999, **5**(7):823 - 827.
- [ 25 ] Sasaki S, Amara RR, Oran AE, *et al.* Apoptosis-mediated enhancement of DNA-raised immune responses by mutant caspases. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(6):543 - 547.
- [ 26 ] Chattergoon MA, Kim JJ, Yang JS, *et al.* Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(9):974 - 979.
- [ 27 ] Leitner WW, Hwang LN, Bergmann-Leitner ES, *et al.* Apoptosis is essential for the increased efficacy of alphavirus replicase-based DNA vaccines. *Vaccine*, 2004, **22**(11-12):1537 - 1544.
- [ 28 ] Asselin-Paturel C, Trinchieri G. Production of type I interferons: plasma cytotid dendritic cells and beyond. *J Exp Med*, 2005, **202**(4):461 - 465.
- [ 29 ] Tough DF. Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leuk Lymphoma*, 2004, **45**(2):257 - 264.
- [ 30 ] Yu XI(余兴龙), Tu CC(涂长春), Li ZS(李作生), *et al.* Study on a DNA vaccine expressing the E2 gene of classical swine fever virus. *Chinese Virology(中国病毒学)*, 2000, **15**(3):264 - 271.
- [ 31 ] Ganges L, Barrera M, Nunez JI, *et al.* A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine*, 2005, **23**:3741 - 3752.
- [ 32 ] Andrew ME, Morrissy CJ, Lenghaus C, *et al.* Protection of pigs against classical swine fever with DNA-delivered gp55. *Vaccine*, 2000, **18**:1932 - 1938.
- [ 33 ] Rumenapf T, Stark R, Meyers G, *et al.* Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol*, 1991, **65**:589 - 597.
- [ 34 ] Hulst MM, Westra DF, Wensvoort G, *et al.* Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J Virol*, 1993, **67**:5435 - 5442.