doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.05.01

一株表达 *EGFP* 基因的重组伪狂犬病毒的构建及其复制稳定性分析

杨明珠,陈晓春,张 媛,王秀丽,李俊平*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2021-12-01　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280(2022)05-0001-09　[中图分类号]S852.65

[摘　要]　为探寻伪狂犬病毒(Pseudorabies virus,PRV)基因缺失株 rPRV-bc-8 基因组 UL4-UL3 基因间区域是否可作为外源基因的插入位点,在实验室已构建的含有增强型绿色荧光蛋白(Enhance Green fluorescent protein,EGFP)基因的转移质粒 pMD-US6+7-EGFP-US2 的基础上,通过 DNA 体外分子克隆技术将 UL4 序列替换左同源臂 US6+7 序列,UL3 序列替换右同源臂 US2 序列,并将 PolyA 引入转移质粒,得到转移质粒 pMD-UL4-EGFP-UL3。利用脂质体转染法将转移质粒 pMD-UL4-EGFP-UL3 与亲本毒 rPRV-bc-8 共转染 PK-15 细胞,经蚀斑纯化成功得到一株能够稳定表达 *EGFP* 基因的重组伪狂犬病毒 rPRV-UL4-EGFP-UL3。通过倒置荧光显微镜观察以及 PCR 鉴定确定 *EGFP* 基因已成功插入到伪狂犬基因组的 UL4-UL3 之间,并通过细胞传代试验分析得到重组毒的遗传稳定性良好。通过体外增殖试验分析得到重组病毒 rPRV-UL4-EGFP-UL3 在细胞内的增殖速度较快,接种后 12 h 内滴度始终高于亲本毒 rPRV-bc-8,接种后 40 h 达到最高滴度 $10^{8.3}$ $TCID_{50}$/mL,与亲本毒的最高滴度接近,但是最高滴度的出现时间晚于亲本毒,并且在达到平台期后病毒滴度下降的比亲本毒快。通过对病毒培养液中荧光蛋白浓度进行测定,结果显示在接种后 56 h 时荧光蛋白浓度达到最高值 4793.9 ng/mL,之后进入平台期。综上结果表明构建的重组病毒具有良好的遗传稳定性及体外复制能力,并且外源基因 *EGFP* 在此位点具有良好的表达效果,为进一步相关重组病毒的构建奠定了基础。

[关键词]　伪狂犬病毒基因缺失株;同源重组;重组病毒;增强型绿色荧光蛋白

Construction of a Recombinant Pseudorabies Virus Expressing *EGFP* Gene and Analysis of Its Replication Stability

YANG Ming-zhu, CHEN Xiao-chun, ZHANG Yuan, WANG Xiu-li, LI Jun-ping*

(*China Institute of Veterinary Drug Control*, *Beijing* 100081, *China*)

Corresponding author: *LI Jun-ping*, *E-mail*:*lijunping*03@163.*com*

基金项目:中国兽医药品监察所“兽药行业公益性重点专项”(GY202017)

作者简介:杨明珠,硕士研究生,研究方向为生物制品学。

通讯作者:李俊平。E-mail:lijunping03@163.com

Abstract: In order to to explore whether the UI4 – UL3 intergenic region in the genome of the gene – deleted pseudorabies virus rPRV – bc – 8 can be used as an insertion site for exogenous genes, on the basis of the laboratory constructed transfer plasmid pMD – US6 + 7 – EGFP – US2 of EGFP gene, the left homology arm US6 + 7 sequence was replaced by the UI4 sequence, and the right homology arm US2 sequence was replaced by the UL3 sequence based on DNA *in vitro* molecular cloning technology, PolyA was introduced into the transfer plasmid at the same time to get pMD – UL4 – EGFP – UL3. The transfer plasmid pMD – UL4 – EGFP – UL3 and the parental virus rPRV – bc – 8 were co – transfected into PK – 15 cells by liposome transfection method. After plaque purification, recombinant pseudorabies virus rPRV – UL4 – EGFP – UL3 with stably expressed the *EGFP* gene was obtained. Through inverted fluorescence microscope observation and PCR identification, it was confirmed that *EGFP* gene had been successfully inserted into the UL4 – UL3 of the pseudorabies genome, and the genetic stability of the recombinant virus was found to be by the analysis of the cell passage test. On the basis of *in vitro* proliferation test analysis, the recombinant virus rPRV – UL4 – EGFP – UL3 proliferates faster in the cells, and the titer within 12 h after inoculation is always higher than that of the parental virus rPRV – bc – 8, and reaches the highest titer $10^{8.3}$ $TCID_{50}$/mL at 40 h after inoculation, which is close to the highest titer of the parent virus, but the highest titer appeared later than the parent virus, and after reaching the plateau, the virus titer decreased faster than the parent virus. By measuring the fluorescent protein concentration in the virus culture medium, the results showed that the concentration of fluorescent protein reached the highest value of 4793.9 ng/mL at 56 h after inoculation, and then entered the plateau phase. The above results show that the constructed recombinant virus has good genetic stability and *in vitro* replication ability, and the exogenous gene *EGFP* has a good expression effect at this site, which lays a foundation for the construction of further related recombinant viruses.

Key words: gene – deleted pseudorabies virus; homologous recombination; recombinant virus; enhanced green fluorescent protein

猪伪狂犬病是一种由伪狂犬病毒(Pseudorabies virus,PRV)感染引起的急性传染病,对养猪业危害巨大,主要造成仔猪腹泻、发热、呼吸症状、神经症状、衰竭死亡,生长猪呼吸困难、生长停滞,母猪不育、流产、死亡胎、木乃伊胎,康复猪可能存在潜伏感染,当康复猪免疫低下,会存在排毒的风险[1]。2011 年以来,伪狂犬病病毒变异株在我国暴发流行并不断蔓延全国[2],研究发现其致病力显著增强,传统疫苗 Bartha – K61 株不能提供完全的保护,迫切需要研制出针对变异株的新型疫苗。同时,随着分子生物学技术的发展,关于伪狂犬病的分子生物学研究取得了很大进展。PRV 含有多个复制非必需区,容纳外源基因的能力强,其中有些基因与病毒的毒力有关而不参与病毒的复制[3],若通过基因工程技术将 PRV 的毒力基因失活或者缺失,或者将外源基因插入到 PRV 基因组中构建重组病毒,不仅保持了原病毒的良好抗原性,还可以同时预防重组蛋白相关疫病,起到了一针多防的效果,大大提高生产效率,对多种病毒的防控具有重要意义。本研究在实验室前期对 PRV 研究的基础上将绿色荧光蛋白标记基因插入到 PRV 基因组的 UI4 – UL3 基因间区域,构建了能够稳定表达增强型绿色荧光蛋白(Enhance green fluorescent protein,EGFP)的重组伪狂犬病毒,并对其稳定性、体外增殖特性进行了研究,为下一步构建重组伪狂犬活载体疫苗奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　毒株与细胞　PRV－SX 株为中国兽医药品监察所在 2012 年于山西某猪场分离得到的一株高致病性流行毒株；rPRV－bc－8，是以 PRV－SX 株为基础构建的 TK 基因突变、US8 与 US9 基因缺失的弱毒株。PK15 细胞由中国兽医药品监察所保存。

1.1.2　载体及质粒　质粒 pMD－US6＋7－EGFP－US2 由实验室自行制备保存；pESAY－Blunt Simple Cliong kit 购自北京全式金生物技术有限公司。全基因合成质粒 pUC－polyA－UL3 订购于北京六合华大基因科技股份有限公司。

1.1.3　主要试剂　Top10 感受态细胞、质粒小提试剂盒、质粒小提中量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司；Axy Prep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒购自康宁生命科学有限公司；快捷型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒Ⅱ型购自北京百泰克生物技术有限公司，T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Sbf* Ⅰ、*Afl* Ⅱ购自 NEB(北京)有限公司；Kod one 购自东洋纺(上海)有限公司

1.2　方法

1.2.1　引物设计与合成　根据 GeneBank 上的 PRV 序列，自行设计合成系列扩增及鉴定用引物(表 1)，用于扩增左右同源臂以及鉴定重组病毒。

表 1　同源臂扩增及鉴定用引物

Tab 1　Primers for homology arm amplification and identification

引物名称	类型	引物序列(5'－3')	酶切位点	片段长度/bp
rPUL4F	左同源臂 UL4 序列	5'－TCCTGCAGGAGCGGCTTCCTGTCCATCC－3'	*Sbf* Ⅰ	997
rPUL4R	扩增用引物	5'－ACTTAAGCGGTTCGGTCTCTCTTTC－3'	*Afl* Ⅱ	
PUL3F	鉴定用引物	5'－CATCCTGGAGTGAGAGGC－3'		1710
PUL3R2		5'－CGGCAACGGAGCATCAACG－3'		

1.2.2　转移质粒 pMD－UL4－EGFP－UL3 的构建　利用 Axy Prep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒提取 PRV－SX 株基因组，以其为模板用引物 rPUL4F/rPUL4R 扩增左同源臂 UL4 基因，连接 pEASY－Blunt Zero 克隆载体，构建 pEASY－Blunt－UL4，测序正确后小提质粒备用。将质粒 pMD－US6＋7－EGFP－US2 与质粒 pEASY－Blunt－UL4 分别经 *Sbf* Ⅰ/*Afl* Ⅱ双酶切，回收目的片段后用 T4 连接酶连接，获得转移质粒 pMD－UL4－EGFP－US2，再将质粒 PMD－UL4－EGFP－US2与质粒 pUC－polyA－UL3 经 *Spe* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ双酶切，回收相应片段后经 T4 连接酶连接，获得转移质粒 pMD－UL4－EGFP－UL3(图 1)，提取高浓度无内毒素质粒，以备转染。

1.2.3　重组病毒的获得　准备一个铺有 PK－15 细胞的 24 孔板，在细胞密度达 90% 左右时，取 rPRV－bc－8 病毒液 1 μL 与 2 μL 转移质粒 pMD－UL4－EGFP－UL3，利用脂质体法共转染细胞，待细胞病变达 80% 以上后于－80 ℃及室温下冻融两次收毒。将转染后收集的病毒液接种于铺有单层 PK－15 细胞的六孔板中，吸附 1 h，弃去吸附液，每孔加入 3 mL 含有 1% 琼脂与 5% FBS 的培养液，待培养液凝固后倒置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中继续培养。接种 24 h 后在倒置荧光显微镜下观察，挑选单个荧光蚀斑于 0.5 mL DMEM 培养液中，震荡混匀后继续接种于长至单层的 PK－15 细胞，如此纯化 4 次后获得纯化病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3。

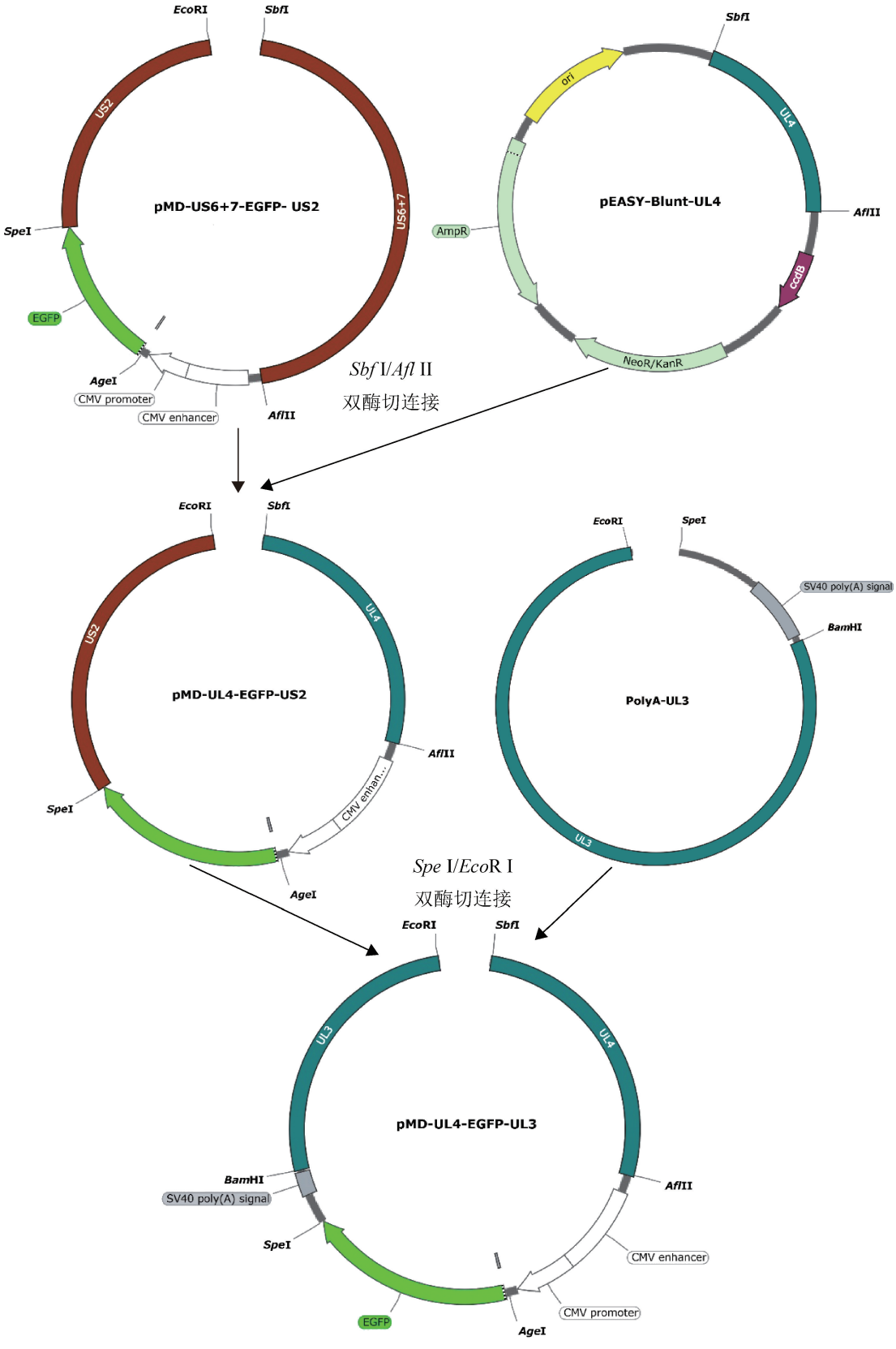


图 1　转移质粒 pMD – UL4 – EGFP – UL3 的构建示意图

Fig 1　Schematic diagram of the construction of the transfer plasmid pMD – UL4 – EGFP – UL3

1.2.4　重组病毒的鉴定　将纯化获得的重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 利用 DNA/RNA 提取试剂盒提取其基因组，用引物 PUL3F/PUL3R2 进行 PCR 鉴定，同时将野毒株 PRV－SX 株、亲本株 rPRV－bc－8 利用相同的引物扩增，比较扩增结果。

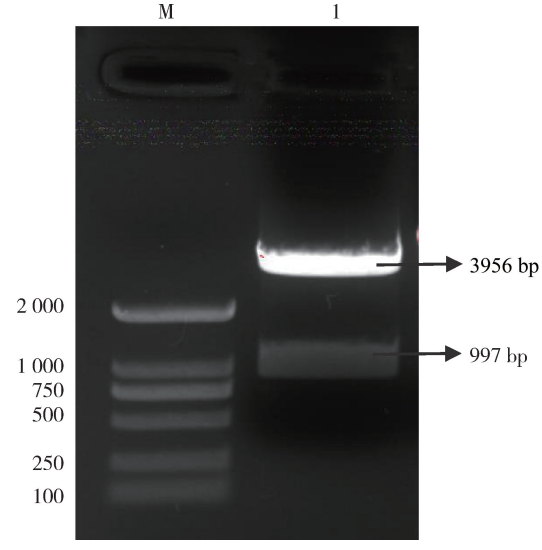
1.2.5　体外增殖实验　将 PRV－SX 株、rPRV－bc－8 以及 rPRV－UL4－EGFP－UL3 分别按 0.1 MOI 接种PK－15 细胞，分别在 12、24、32、40、48、56、64、72、80、88、96 h 收集感染细胞，并分别测定 $TCID_{50}$，比较三种毒株在不同培养时间下的滴度并绘制增殖曲线。

1.2.6　重组病毒的遗传稳定性　将重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 在 PK－15 细胞上连续传 20 代，分别提取重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 以及第 5、10、15、20 代重组病毒的 DNA，按步骤 1.2.4 的方法进行 PCR 鉴定。取重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 以及第 20 代重组病毒进行荧光蚀斑观察。

1.2.7　荧光蛋白浓度的测定　将亲本株 rPRV－bc－8、重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 分别按 0.1 MOI 接种 PK－15 细胞，分别在 12、24、32、40、48、56、64、72、80、88、96 h 收集感染细胞，离心取上清后通过分子荧光光谱仪进行荧光蛋白浓度的测定并绘制曲线。

2　结果与分析

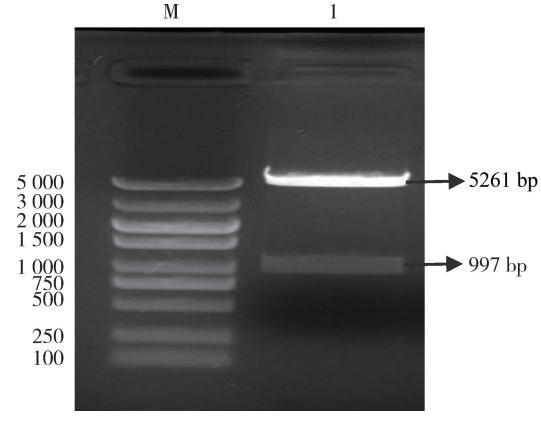
2.1　转移质粒的构建　质粒 pEASY－Blunt－UL4 经 *Sbf* I/*Afl* II 双酶切，切出 997 bp 和 3956 bp 两个片段（图 2），与预期大小一致，经测序确定结果与理论序列一致，表明质粒 pEASY－Blunt－UL4 构建成功；pMD－UL4－EGFP－US2 经 *Sbf* I/*Afl* II 双酶切，得到大小约为 997 bp 和 5261 bp 的两个片段（图 3），与预期大小一致，经测序确定结果与理论序列一致，表明质粒 pMD－UL4－EGFP－US2 构建成功。质粒 pMD－UL4－EGFP－UL3 经 *Spe* I/ *Eco*R I 双酶切得到大小约为 1166 bp 和 5226 bp 的两个片段（图 4），与预期大小一致，经测序确定结果与理论序列一致，表明质粒 pMD－UL4－EGFP－UL3 构建成功。



M：BM2000 DNA Marker；1：质粒 pMD－UL4－EGFP－UL3

图 2　pEASY－Blunt－UL4 的 *Sbf* I/*Afl* II 双酶切产物

Fig 2　The double enzyme digestion results of pEASY－Blunt－UL4

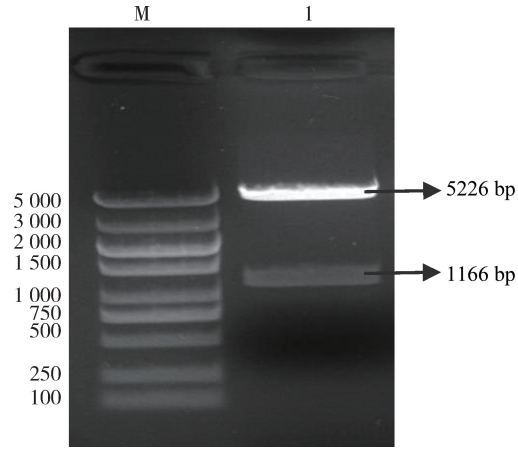


M：BM2000 DNA Marker；1：质粒 pMD－UL4－EGFP－US2

图 3　pMD－UL4－EGFP－US2 的 *Sbf* I/*Afl* II 双酶切产物

Fig 3　The double enzyme digestion results of pMD－UL4－EGFP－US2

2.2　重组病毒的纯化　将转染所收的病毒液接种于铺有单层 PK－15 细胞的六孔板，培养 24 h 后在倒置荧光显微镜下便能观察到绿色荧光（图 5），初步判断重组毒构建成功。挑选单个荧光蚀斑于 0.5 mL DMEM 培养液中，震荡混匀后继续接种于长至单层的 PK－15 细胞，如此纯化 4 次后获得纯化病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3（图 6）。



M：BM2000 DNA Marker；1：质粒 pMD－UL4－EGFP－UL3

图 4　pMD－UL4－EGFP－UL3 的 *Spe* I/ *Eco*R I 双酶切产物

Fig 4　The double enzyme digestion results of pMD－UL4－EGFP－UL3



图 5　培养 24 h 后产生的绿色荧光(10×10)

Fig 5　Green fluorescence after 24 h incubation(10×10)

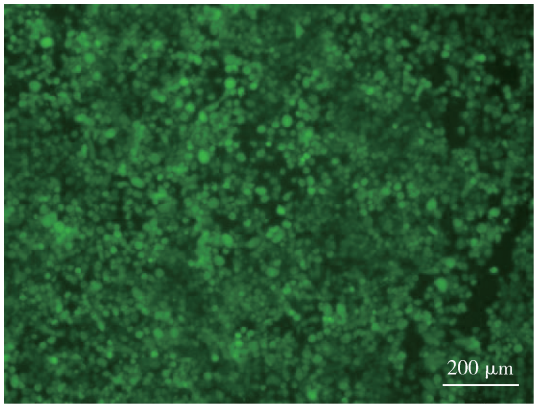
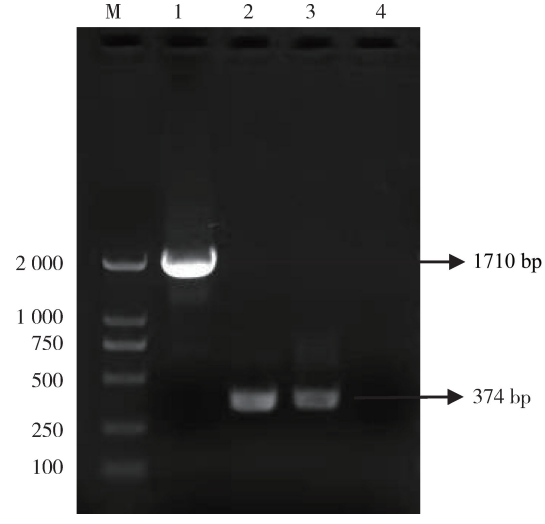


图 6　纯化得到的重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3

Fig 6　Purified recombinant virus rPRV－UL4－EGFP－UL3

2.3　重组病毒的鉴定　取 200 μL 重组病毒液利用 DNA/RNA 提取试剂盒提取其基因组，利用引物 PUL3F/PUL3R2 进行 PCR 鉴定，结果显示 rPRV－UL4－EGFP－UL3 扩增得到大小约为 1710 bp 的条带，野毒株 PRV－SX 与亲本毒 rPRV－bc－8 分别用相同的引物扩增得到同样的大小约为 374 bp 的条带(图 7)。经测序证明重组病毒基因组序列正确。



M：BM2000 DNA Marker；1：rPRV－UL4－EGFP－UL3；2：PRV－SX；3：rPRV－bc－8；4：Negative control

图 7　重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 的 PCR 扩增鉴定电泳图

Fig 7　Identification of recombinant virus rPRV－UL4－EGFP－UL3 by PCR

2.4　重组病毒的生长特性分析

2.4.1　体外增殖实验　将 rPRV－bc－8 以及 rPRV－UL4－EGFP－UL3 分别按 0.1MOI 接种 PK－15 细胞，分别在 12、24、32、40、48、56、64、72、80、88、96 h 收集感染细胞，并分别测定 $TCID_{50}$，比较两种毒株在不同培养时间下的滴度并绘制增殖曲线(图 8)。结果表明重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 在细胞内的增殖速度较快，接种后 12 h 内滴度始终高于亲本毒 rPRV－bc－8，接种后 40 h达到最高滴度 $10^{8.3}$ $TCID_{50}$/mL，但是最高滴度的出现时间晚于亲本毒，亲本毒 rPRV－bc－8

于 32 h达到最高滴度$10^{8.4}TCID_{50}$/mL。重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 的病毒滴度平台期较短，到达平台后滴度下降的比亲本毒快。

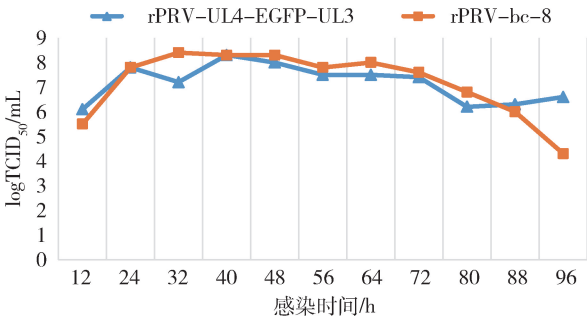
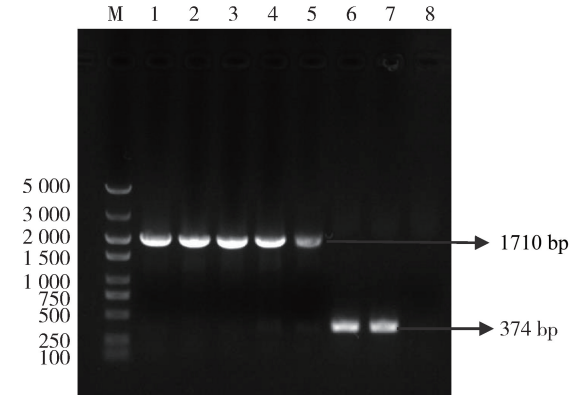


图 8　重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 与亲本毒 rPRV－bc－8 感染 PK15 细胞的一步生长曲线

Fig 8　One－step growth curve of recombinant virus rPRV－UL4－EGFP－UL3 and parental virus rPRV－bc－8 infecting PK15 cells

2.4.2　重组病毒的遗传稳定性　将重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 在 PK－15 细胞上连续传 20 代，分别提取第 5、10、15、20 代重组病毒的 DNA，以其为模板用引物 PUL3F/PUL3R2 进行 PCR 扩增鉴定，结果均扩增得到大小约为 1710 bp 的目的条带（图 9）。取重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3以及第 20 代重组病毒进行荧光蚀斑观察，结果显示重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3以及第 20 代重组病毒蚀斑大小相近，荧光亮度相似（图 10），表明重组病毒能够稳定遗传。

2.4.3　荧光蛋白浓度的测定　将亲本株 rPRV－bc－8、重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 分别按0.1MOI 接种 PK－15 细胞，分别在 12、24、32、40、48、56、64、72、80、88、96 h 收集感染细胞，离心取上清后通过分子荧光光谱仪进行荧光蛋白浓度的测定并绘制曲线（图 11）。结果表明重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 在细胞内表达 EGFP 蛋白的水平在感染细胞 56 h 后达到最高，荧光蛋白浓度达 4793.9 ng/mL，之后进入蛋白表达平台期。



M：BM5000＋ DNA Marker；1：rPRV－UL4－EGFP－UL3；2：rPRV－UL4－EGFP－UL3（P5）；3：rPRV－UL4－EGFP－UL3（P10）；4：rPRV－UL4－EGFP－UL3（P15）；5：rPRV－UL4－EGFP－UL3（P20）；6：PRV－SX；7：rPRV－bc－8；8：Negative control

图 9　重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 各代次 PCR 扩增鉴定电泳图

Fig 9　Identification of several generation of recombinant virus rPRV－UL4－EGFP－UL3 by PCR

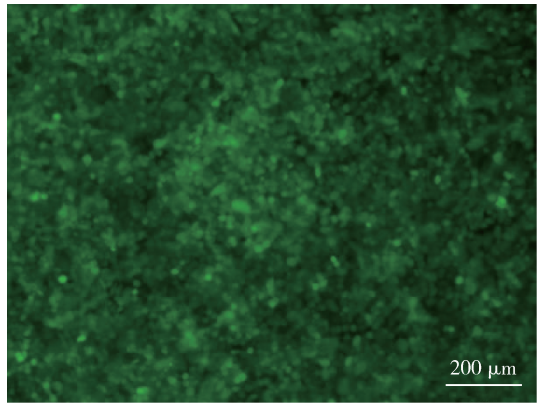


图 10　第 20 代重组病毒 rPRV－UL4－EGFP－UL3 感染 PK15 细胞

Fig 10　The 20th generation recombinant virus rPRV－UL4－EGFP－UL3 infects PK15 cells

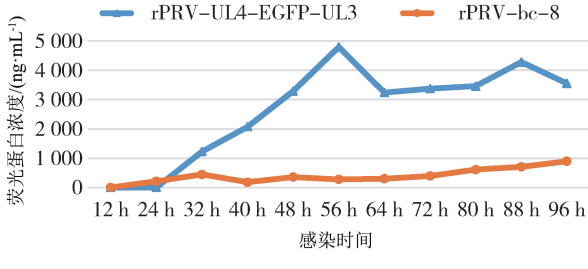


图 11　绿色荧光蛋白浓度测定结果图

Fig 11　Graph of green fluorescent protein concentration measurement results

3 讨 论

猪伪狂犬病是危害我国养猪业的重要疫病,其弱毒疫苗自使用以来免疫保护效果良好且应用广泛,是理想的重组病毒载体。近年来,随着对 PRV 分子生物学研究的深入,其作为重组病毒表达载体的类型越来越丰富,单毒力基因缺失及多毒力基因共缺失株的构建为疫苗株的安全性提供了保障,同时通过对 PRV 基因组上复制非必需区进行深入研究,可供外源基因插入的大量位点也逐渐被发掘,并通过多种成熟的重组技术,如传统同源重组技术、构建 PRV BAC、构建 PRV Fosmid 文库以及 CRISPR/Cas9 基因编辑技术等,实现了将多种猪的重大疫病病毒抗原基因作为外源基因成功插入到 PRV 的非必需区,如将非洲猪瘟病毒的 *CD2V* 蛋白基因插入 *TK* 基因区域[4],将猪流行性腹泻病毒 *S* 蛋白基因和猪轮状病毒 *VP7* 蛋白基因插入到 *gE* 基因区域[5],将猪圆环病毒 2 型的 *Cap* 蛋白基因插入 *PK* – *gG* 基因之间[6]、*UL22* – *UL24* 基因之间[7]、*US4* – *US6* 基因之间[8-9],将高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 *GP5* 基因插入到 *gG* 基因区域[10]等。

目前还没有研究显示 PRV 基因组上的 *UL4* – *UL3*基因之间的区域是否可以作为外源基因插入位点,但在同属疱疹病毒火鸡疱疹病毒的重组活载体疫苗研究中常将 *UL4* – *UL3* 基因之间的区域作为外源基因的插入位点,并且外源基因在此位点具有良好的表达效果[11]。因此本实验选取 PRV 基因缺失株 rPRV – bc – 8 基因组上的 *UL4* – *UL3* 基因之间的区域作为外源基因插入位点,利用同源重组技术成功构建了表达 *EGFP* 基因的重组病毒 rPRV – UL4 – EGFP – UL3。病毒传至 20 代,经鉴定及测序显示基因位置插入正确且无突变;对绿色荧光表达情况的观察说明 *EGFP* 基因能够成功表达;重组病毒在 PK15 细胞中的生长曲线表示重组病毒所达到的最高滴度与亲本毒无差异,说明外源基因的插入对重组病毒的增殖影响不大;对重组病毒的外源蛋白表达量进行了测定显示该位点可以有效进行外源基因的表达。因此将 PRV 基因缺失株 rPRV – bc – 8 基因组上的 *UL4* – *UL3* 基因间区域作为外源基因插入的位点在理论以及实践中是可行的,为下一步相关重组伪狂犬病毒的研发应用奠定了基础。

参考文献:

[1] 谷思睿, 赵 军, 陈弟诗, 等. 伪狂犬病毒潜伏感染相关病毒因子研究进展[J]. 病毒学报, 2021, 37(06): 1515 – 1524.
Gu S R, Zhao J, Chen D S, *et al*. Research progress on viral factors related to pseudorabies virus latent infection[J]. Chinese Journal of Virology, 2021, 37(06): 1515 – 1524.

[2] YU X L, ZHOU Z, HU D M, *et al*. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012[J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(1): 102 – 104.

[3] 赵 军, 黄剑波, 朱 玲, 等. 伪狂犬病毒表达载体的研究进展[J]. 猪业科学, 2016, 33(2): 102 – 104.
Zhao J, Huang J B, Zhu L, *et al*. Research progress of Pseudorabies virus expression vector[J]. Swine Industry Science, 2016, 33(2): 102 – 104.

[4] Feng Z H, Chen J H, Liang W W, *et al*. The recombinant pseudorabies virus expressing African swine fever virus CD2v protein is safe and effective in mice[J]. Virology Journal, 2020, 17(1):180.

[5] 毛汐语, 周雪珂, 殷鑫欢, 等. 表达 PEDV S 和 PoRV VP7 蛋白的重组伪狂犬毒株构建[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3345 – 3354.
Mao X Y, Zhou X K, Yin X H, *et al*. Construction of recombinant Pseudorabies virus strain expressing PEDV S and PoRV VP7 protein[J]. Microbiology China, 2019, 46(12): 3345 – 3354.

[6] 钞安军. 表达 PCV2 CAP 蛋白的重组猪伪狂犬病病毒的构建及小鼠免疫效力观察[D]. 河南农业大学, 2013.
Chao A J. Construction of recombinant Pseudorabies virus expressing CAP protein of PCV2 and its immune efficacy in mice[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2013.

[7] 杜文娟. 表达猪圆环病毒 2 型(PCV2) Cap 蛋白重组伪狂犬病病毒的构建及其生物学特性鉴定[D]. 中国农业科学院, 2016.
Du W J. Construction and biological characterization of a recombinant Pseudorabies virus expressing capsid protein of Porcine circovirus type 2[D]. Beijing: Chinese Academy of

Agricultural Sciences, 2016.

[8] Tong W, Zheng H, Li G, *et al*. Recombinant pseudorabies virus expressing E2 of classical swine fever virus (CSFV) protects against both virulent pseudorabies virus and CSFV[J]. Antiviral Research, 2020, 173(C):104652.

[9] Tong W, Li G X, Liang C, *et al*. A live, attenuated Pseudorabies virus strain JS-2012 deleted for gE/gI protects against both classical and emerging strains[J]. Antiviral Research, 2016, 130: 110-117.

[10] 陈 瑾. 表达高致病性猪蓝耳病病毒(HuN4 株)GP5 重组伪狂犬病毒的构建及鉴定[D]. 中国农业科学院, 2008.
Chen J. Construction and identification of the recombination Pseudorabies virus expressing GP5 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HuN4)[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008.

[11] Andoh K, Yamazaki K, Honda Y, *et al*. Turkey herpesvirus with an insertion in the UL3-4 region displays an appropriate balance between growth activity and antibody-eliciting capacity and is suitable for the establishment of a recombinant vaccine[J]. Archives of Virology, 2017, 162(4): 931-941.

(编 辑:李文平)