



非洲猪瘟病毒重组载体疫苗激发/加强免疫策略的初步研究

周晓慧¹, 卢会鹏², 张鑫宇¹, 夏晓莉¹, 孙怀昌¹

(1. 扬州大学 兽医学院, 江苏省重要动物疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009;

2. 江苏农牧职业技术学院, 江苏泰州 225300)

摘要 为了选择合理的非洲猪瘟病毒(ASFV)重组载体的激发/加强免疫策略, 构建表达 ASFV CD2v-p30-p54 融合抗原的重组伪狂犬病毒 rPRV-F1, 将其与表达相同融合抗原的重组腺病毒 rAd-F1 分为 rAd-F1/rAd-F1、rAd-F1/rPRV-F1、rPRV-F1/rPRV-F1、rPRV-F1/rAd-F1 4 个组合进行猪免疫试验, 分别于免疫后不同时间采血并分离血清进行 ELISA 抗体检测, 分离的外周血单个核细胞(PBMC)经 ASFV 抗原刺激后进行 IFN- γ 检测。免疫荧光与免疫转印试验结果显示, 构建的 rPRV-F1 能在感染细胞中正确表达 F1 融合蛋白。所有免疫猪均能检测到抗原特异性抗体, 加强免疫后的抗体水平显著升高。在测试的 4 个免疫方案中, 尽管 rAd-F1/rAd-F1 组合初次免疫后的抗原特异性抗体水平和 IFN- γ 表达水平最高, 但加强免疫后的抗体水平和 IFN- γ 表达水平最低。与此相反, 尽管 rPRV-F1/rAd-F1 组合初次免疫后的抗体水平和 IFN- γ 表达水平最低, 但加强免疫后的抗体水平和 IFN- γ 表达水平最高。这些研究结果表明 rPRV/rAd 是较好的 ASFV 重组载体疫苗的激发/加强免疫策略。

关键词 非洲猪瘟病毒; 重组载体疫苗; 免疫策略

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是目前威胁世界养猪业非常重要的传染病^[1]。由于尚无安全、有效的疫苗, 该病只能靠早期诊断、感染猪扑杀和生物安全措施进行控制, 但不足以控制该病的广泛流行^[2]。非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)疫苗研究的重点是基因缺失苗和重组病毒载体疫苗, 其中基因缺失苗是短期内较有希望的疫苗, 免疫猪可以抵抗同源毒株的攻击, 但多不能抵抗异源毒株的攻击, 而且存在基因重组、毒力返强和病毒扩散等生物安全风险^[3]; 重组载体疫苗是 ASFV 疫苗研制的长期目标, 重点研究免疫保护性抗原基因及其传递方式, 但相关研究很少^[4-5]。

已经用于 ASFV 重组载体疫苗研究的病毒载体主要有腺病毒、痘苗病毒和伪狂犬病毒。其中, 重组腺病毒载体疫苗用人腺病毒 5 型进行, 可以感染猪等哺乳动物的多种细胞, 抗原基因的表达水平较高, 但容易产生抗载体免疫而影响疫苗的再次免疫^[4]; 重组痘苗病毒载体疫苗用遗传改造型安卡拉株进行, 具有很好的安全性和较大的

外源基因装载容量, 但诱导的免疫应答以细胞免疫为主^[6-7]; 重组伪狂犬病毒载体疫苗具有安全性好、免疫周期长、成本低等优点, 且该病毒载体可以同时插入多个外源基因, 具有实现一针多防的目的优势。应用弱毒疫苗株构建的重组病毒, 免疫后可以诱导较好的体液免疫、细胞免疫以及粘膜免疫^[8], 是一个极具潜力的病毒活载体疫苗。

重组载体疫苗的激发/加强免疫策略可用相同和不同的病毒载体进行。其中, 不同载体组合的免疫策略可以减轻抗载体免疫, 并能诱导较全面的免疫应答, 但具体的载体组合需要进行筛选^[9-11]。为此, 本研究构建表达 ASFV CD2v-p30-p54 融合抗原的重组伪狂犬病毒 rPRV-F1, 将其与表达相同融合抗原的重组腺病毒(rAd-F1)组成 4 个组合进行猪免疫试验, 旨在筛选较好的 ASFV 重组载体疫苗的激发/加强免疫策略。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪外周血单个核细胞(PBMC)分离液购自天

收稿日期: 2022-09-05 修回日期: 2022-09-23

基金项目: 国家重点研发计划(N2017YFD0502303, 2018YFC0840404-3)。

第一作者: 周晓慧, 女, 博士研究生, 从事动物疫苗研究。E-mail: 89507732@qq.com

通信作者: 孙怀昌, 男, 教授, 主要从事预防兽医学研究。E-mail: sunh@yzu.edu.cn

津灏洋生物制品有限公司;ASFV 荧光 PCR 检测试剂盒购自青岛立见公司;猪干扰素 γ (IFN- γ) ELISA 检测试剂盒购自上海远慕生物科技有限公司;RPMI 1640 细胞培养液购自美国 Thermo scientific 公司;胎牛血清 (FBS) 购自上海双洙生物科技有限公司;刀豆蛋白 A (ConA) 购自美国 Thermo scientific 公司;肝素钠抗凝采血管购自山东永康生物科技有限公司;HRP 标记羊抗猪 IgG 抗体购自英国 Abcam 公司;TMB 显色液购自碧云天生物科技有限公司;高保真 PCR 酶与限制性内切酶购自宝日医生物技术有限公司;DH5 α 大肠杆菌、真核表达载体 pcDNA3.0、PK-15、HEK-293A 和 BHK-21 细胞系为扬州大学孙怀昌课题组保存;HNX 株 PRV 由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所提供;ASFV 抗体阳性血清由扬州大学农业部重点开放实验室 (P3 实验室) 提供;ASFV 融合基因 F1 (CD2v-p30-p54、1 992 bp) 由上海生工生物工程股份有限公司合成;表达 ASFV 融合基因 CD2v-p30-p54 的 rAd-F1 由扬州大学孙怀昌课题组构建^[12];ASFV p54、p30 和 CD2v 重组抗原由扬州大学孙怀昌课

题组制备。

1.2 PRV 同源重组载体的构建

用 *Pvu* II 酶切法切除 pcDNA3.0 载体的 NEO 表达盒,插入多克隆位点和 P2A 自裂解肽编码序列 (GenBank: MT559572.1) 后的改造载体命名为 pcDNA3-2。根据 HNX 株 PRV 的 *TK* 基因序列 (GenBank: KM189912.1) 设计 PCR 引物 (表 1), 利用酚/氯仿抽提法从 PRV 感染 PK-15 细胞提取病毒基因组 DNA, 以提取的 DNA 为模板, 用高保真 PCR 酶扩增 *TK* 基因的左、右同源臂, 插入 pcDNA3-2 载体后获得的同源重组载体命名为 pTK。根据绿色荧光蛋白 (*GFP*) 基因设计 1 对引物 (表 1), 反向引物引入 Flag 标签, 以 pEGFP-C3 (GenBank: U57607.1) 载体为模板进行 PCR 扩增, 克隆入 pTK 载体后获得的同源重组载体命名为 pTK-*GFP*。利用 *Nhe*I 和 *Eco*RV 双酶切法将 *F1* 融合基因从 pShuttle-*F1* 载体上切下, 插入 pTK-*GFP* 后获得的同源重组载体命名为 pTK-*F1*, 其融合基因表达盒的结构如图 1 所示。

表 1 本研究使用的 PCR 引物
Table 1 PCR primers used in this study

名称 Name	序列 (5'→3') Sequence	产物大小/bp Product size
L-For	GACGGATCGGGAGATCTCCGAGTAGTGCCGGTTG	1 301
L-Rev	ACGGCACCGCAAGAGCTCGCGACGATGTACGGGCCAGA	
R-For	TGAGGCGGAAAGAACCAGGATGCTTCATCGTCGGGGAC	1 066
R-Rev	GGCCGATTCATTAATGCAGGATGGGCGCTGCACAAA	
GFP-For	GAGAACCCCGGCCCGTTAACGTGAGCAAGGGCGAGG	775
GFP-Rev	TCTAGATGCATGCTCGAGGTAACTCACTTATCGTCATC	

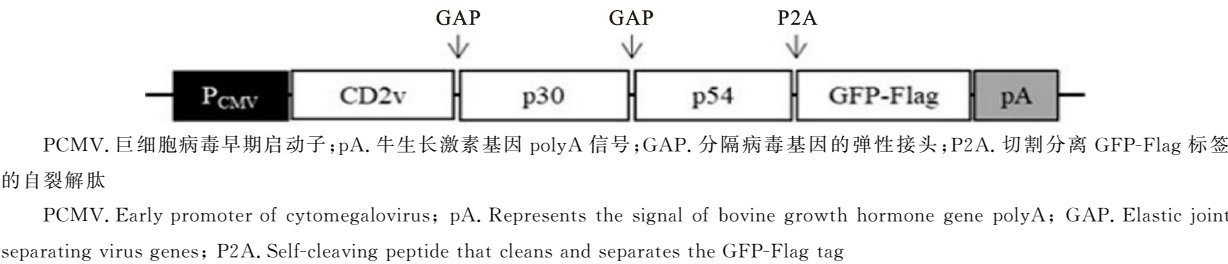


图 1 ASFV F1 融合基因表达盒的结构示意图

Fig. 1 Schematic structure of ASFV F1 fusion gene expression cassette

1.3 重组 PRV 的制备

重组 PRV-*F1* 的制备按照文献[13-14]的方法进行。将 BHK-21 细胞接种 6 孔细胞培养板, 培养至 80% 满层后, 按照 Lipofectamine™ 3000 Reagent 说明书进行基因转染, 同源重组载体为 1.5 μ g/孔, PRV 基因组 DNA 为 1 μ g/孔。当

80% 转染细胞出现病变时反复冻融 3 次, 离心后取上清液进行连续 10 倍稀释, 再次接种 BHK-21 细胞后用 1% 低熔点琼脂糖覆盖, 如此进行 3 轮病毒噬斑纯化。

在细胞培养皿 (底面积为 8 cm²) 中将 BHK-21 细胞培养至 80% 满层。用含 2% FBS 的 RP-

MI1640 培养基将纯化的重组 PRV-*F1* 进行连续 10 倍稀释,分别取 10^{-4} mL $^{-1}$ 、 10^{-5} mL $^{-1}$ 和 10^{-6} mL $^{-1}$ 的病毒稀释液 10 μ L 加入培养皿,每个稀释度设 8 个重复,感染后 1 h 吸弃病毒液,各皿用预热至 37 $^{\circ}$ C 的 1% 低熔点琼脂糖覆盖,凝固后在 CO₂ 培养箱内培养 48 h,在荧光显微镜下计数各皿的绿色荧光噬斑数,计算重组病毒的滴度。

1.4 重组 PRV 的鉴定

在 24 孔板培养 PK-15 细胞,培养 12 h 后用 rPRV-*F1* 感染(MOI=0.5)。感染后 24 h 吸弃病毒液,细胞用含 5 % 脱脂乳粉和 0.05 % Tween20 的 PBS 在 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,依次用 ASFV 抗体阳性血清(1:100)和 FITC 标记羊抗猪 IgG (1:2 000)进行免疫荧光染色,经 DAPI 反衬染色后进行荧光显微镜观察。在 70% 感染细胞出现病变时,将细胞培养物反复冻融 3 次,SDS-PAGE 分离后转印硝酸纤维素膜,依次用 ASFV 抗体阳性血清(1:500)和 HRP 标记羊抗猪 IgG (1:10 000)进行免疫印迹检测。

1.5 试验猪的免疫方案

将 15 头 21 日龄 ASFV 双阴性、PRV 阴性^[15-16]且未进行 PRV 疫苗接种的断奶仔猪平均分为 5 组($n=3$),第一组为 rAd-F1/rAd-F1 激发/加强免疫组,第二组为 rPRV-F1/rPRV-F1 激发/加强免疫组,第三组为 rAd-F1/rPRV-F1 激发/加强免疫组,第四组为 rPRV-F1/rAd-F1 激发/加强免疫组,免疫剂量均为 10^7 PFU/头,免疫途径为肌肉注射,激发免疫后第 21 天加强免疫 1 次,第五组为非免疫对照组。免疫后第 0、7、21、28、42、56 天采集抗凝血用于 PBMC 分离和 IFN- γ 检测,采集非抗凝血用于血清分离和抗体检测。

1.6 IgG 抗体检测

免疫猪的抗体检测用常规间接 ELISA 进行,每样品设 3 孔重复;包被抗原分别为 ASFV

CD2v、p30 和 p54 重组抗原(2.5 μ g/mL),其中 CD2v 抗原是大肠杆菌表达的 CD2v 胞内区蛋白片段^[17],37 $^{\circ}$ C 包被 1 h;封闭液为含 5 % 脱脂乳粉和 0.05 % Tween 20 的 PBS,37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;免疫猪血清稀释倍数为 1:200,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;HRP 标记羊抗猪 IgG 稀释倍数为 1:10 000,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;加入 TMB 底物,室温避光显色 15 min;用 1 mol/L 硫酸终止反应,立即用酶标仪读取各孔的 OD₄₅₀ 值;以 P/N>2.1 为判定标准,用 Graphpad 软件对各组的抗体水平(OD₄₅₀ 平均值)进行统计学分析,用 Excel 2021 软件进行柱形图绘制。

1.7 IFN- γ 检测

分别在免疫后第 0、7、21、28、42 和 56 天采集试验猪的抗凝血,按照外周血淋巴细胞分离试剂盒说明书进行 PBMC 分离;用细胞培养液将细胞调整为 5×10^6 个/mL,分装 96 孔细胞培养板,100 μ L/孔;分别加入 ASFV p54、p30 和 CD2v 重组抗原(10 μ g/mL),100 μ L/孔,每样品设 3 孔重复,设 Con A(5 μ g/mL)阳性对照和细胞培养液阴性对照;37 $^{\circ}$ C 刺激 72 h 后吸取各孔细胞培养上清,5 000 g 离心 10 min 后吸取上清液,按照 ELISA 检测试剂盒说明书进行猪 γ 干扰素检测,设空白对照孔和标准品孔,以标准品浓度为横坐标、OD₄₅₀ 值为纵坐标绘制回归曲线,根据曲线方程计算公式($R \geq 0.9900$)计算各孔的 IFN- γ 浓度。

2 结果与分析

2.1 PRV 同源重组载体的鉴定

对构建的 PRV 同源重组载体 pTK-*F1* 进行酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳显示能切出插入的 1 992 bp *F1* 融合基因。对重组质粒 DNA 进行测序,结果显示插入的 *F1* 基因无突变(图 2)。

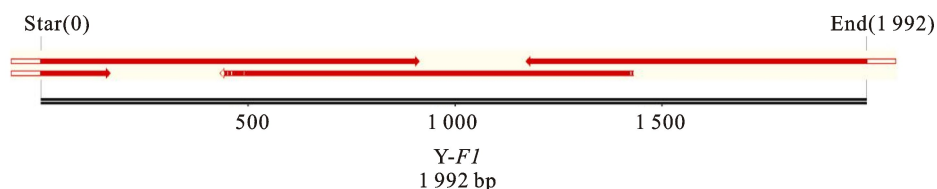


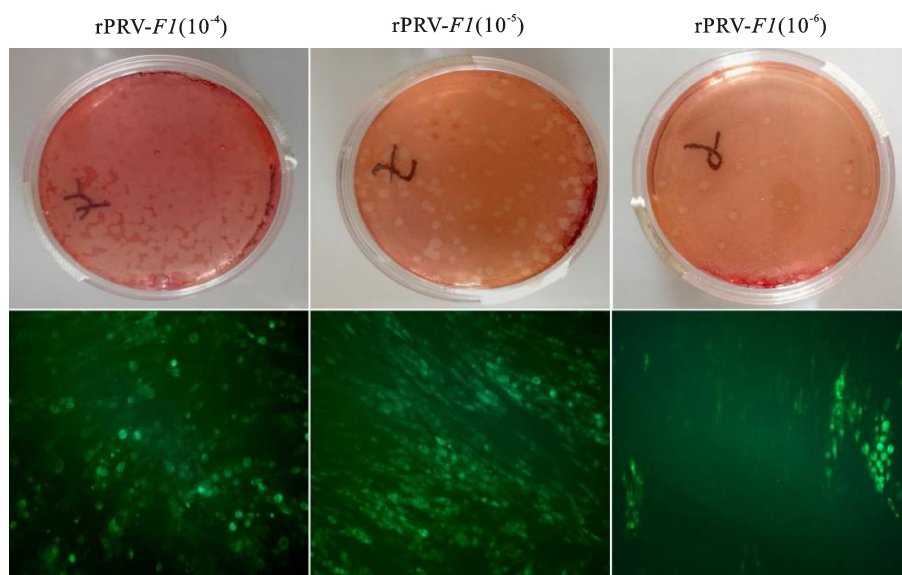
图 2 融合基因的序列分析

Fig. 2 Analysis of fusion gene sequence

2.2 重组 PRV 的制备

在同源重组载体与 PRV 基因组 DNA 共转染后 48 h 收集细胞裂解液,经 3 轮病毒噬斑纯化

后可见典型的 PRV 噬斑,荧光显微镜下观察的病毒噬斑为 GFP 阳性(图 3)。根据病毒噬斑数计算的 rPRV-*F1* 滴度为 2.3×10^9 TCID₅₀/mL。

图3 rPRV-*F1* 噬斑的观察Fig. 3 Observation of rPRV-*F1* plaques

2.3 重组 PRV 的表达检测

分别用 rPRV-*F1* 和 rAd-*F1* 感染细胞,感染后 24 h 用 ASFV 抗体阳性血清进行免疫荧光检测,结果显示两个重组病毒感染细胞均为免疫荧光检测阳性(图 4)。分别用 rPRV-*F1* 和 rAd-*F1* 感染细胞,设 PRV 和 rAd 感染对照组,感染后 36 h 用 ASFV 抗体阳性血清进行 Western

blot 检测,结果显示 rPRV-*F1* 和 rAd-*F1* 感染细胞均能检测到预期的约 128 ku *F1* 融合蛋白,而 PRV 和 rAd 感染细胞不能检测到蛋白条带(图 5-a 和 5-b);用 Flag 单克隆抗体进行免疫转印检测,结果显示 rPRV-*F1* 感染细胞能检测到 P2A 裂解释放的 GFP-Flag 融合蛋白,而 PRV 感染细胞未能检测到蛋白条带(图 5-c)。

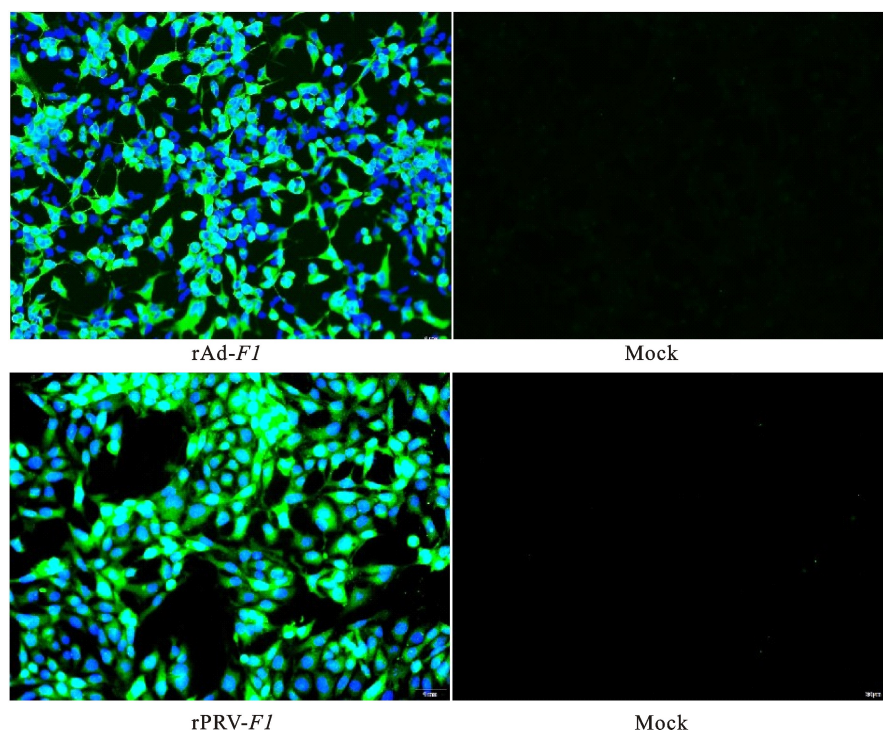


图4 重组病毒感染细胞的免疫荧光检测

Fig. 4 Immunofluorescence of recombinant virus-infected cells

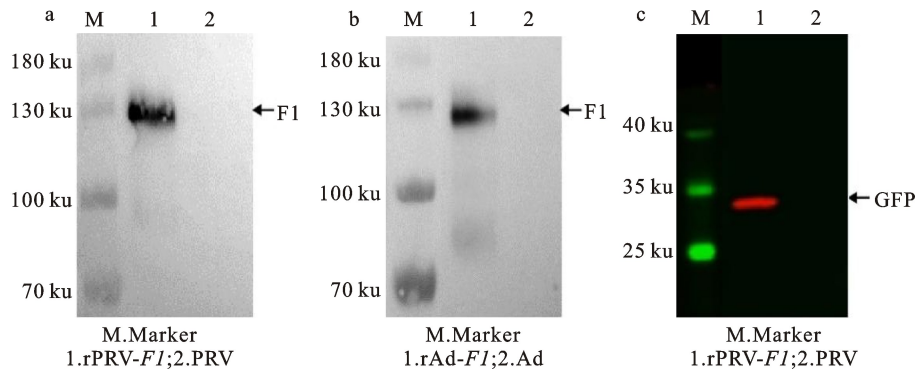


图 5 重组病毒感染细胞的 Western blot 检测

Fig. 5 Western blotting analysis of recombinant virus-infected cells

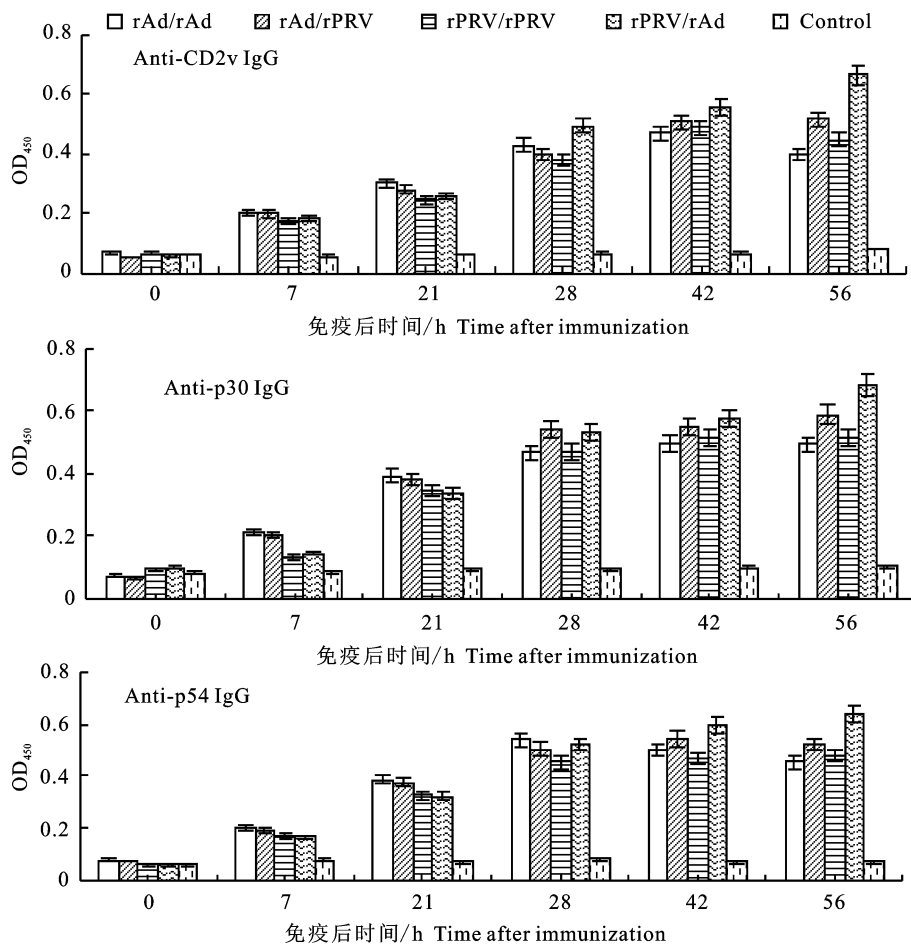


图 6 免疫猪的抗原特异性抗体检测

Fig. 6 Detection of antigen-specific antibodies in pigs immunized with different strategies

2.4 试验猪的抗体检测

从免疫后第 7 天起,所有免疫猪均能检测到抗原特异性 IgG 抗体,加强免疫后的抗体水平显著升高(图 6)。在初免后第 7 天,rAd-F1/rAd-F1 和 rAd-F1/rPRV-F1 免疫组的 CD2v 抗体水平高于其他两组($P < 0.05$),p30 抗体水平显著高于其他两组($P < 0.01$),4 个免疫组的 p54 抗体水

平无显著差异;在初免后第 21 天,rAd-F1/rAd-F1 免疫组和 rAd-F1/rPRV-F1 免疫组的 CD2v 抗体水平高于其他两组($P < 0.01$ 或 0.05),p30 和 p54 特异抗体水平显著高于其他两组($P < 0.05$);在初免后第 28 天(加强免疫后第 7 天),rPRV-F1/rAd-F1 免疫组的 CD2v 抗体水平显著高于其他 3 组($P < 0.05$ 或 0.01),rAd-F1/

rPRV-F1 和 rPRV-F1/rAd-F1 免疫组的 p30 抗体水平显著高于其他两组 ($P < 0.05$), rAd-F1/rAd-F1 免疫组的 p54 抗体水平显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$ 或 0.01); 到免疫后第 56 天(加强免疫后第 21 天), rPRV-F1/rAd-F1 免疫组的 CD2v 抗体水平显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$ 或 0.01), rAd-F1/rPRV-F1 和 rPRV-F1/rAd-F1 免疫组的 p30 抗体水平显著高于其他两组 ($P < 0.01$), rPRV-F1/rAd-F1 免疫组的 p54 抗体水平显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$ 或 0.01)。

2.5 试验猪的 γ 干扰素检测

在免疫后不同时间采血分离 PBMC, 分别用 ASFV CD2v、p30、p54 重组抗原刺激 72 h, 细胞培养上清检测结果显示, 从免疫后第 7 天起所有免疫猪均能检测到抗原特异性 γ 干扰素, 加强免疫后的 γ 干扰素表达水平显著升高(图 7)。在免

疫后第 7 天, 4 个免疫组的 3 种抗原特异性 γ 干扰素表达水平无显著差异; 在初免后第 21 天, 4 个免疫组的 CD2v 特异 γ 干扰素表达水平无显著差异, rAd-F1/rAd-F1 和 rPRV-F1/rAd-F1 免疫组的 p30 和 p54 特异 γ 干扰素表达水平高于其他两组 ($P < 0.05$); 在初免后第 28 天(加强免疫后第 7 天), rPRV-F1/rAd-F1 免疫组的 CD2v 特异 γ 干扰素表达水平显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$), rAd-F1/rAd-F1 和 rPRV-F1/rAd-F1 免疫组的 p30 特异 γ 干扰素表达水平显著高于其他两组 ($P < 0.05$), 4 个免疫组的 p54 特异 γ 干扰素表达水平无显著差异; 到免疫后第 56 天(加强免疫后第 21 天), rPRV-F1/rAd-F1 免疫组的 CD2v 特异 γ 干扰素表达水平显著高于其他 3 组 ($P < 0.01$ 或 0.001), p30 和 p54 特异性 γ 干扰素表达水平也显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$ 或 0.01)。

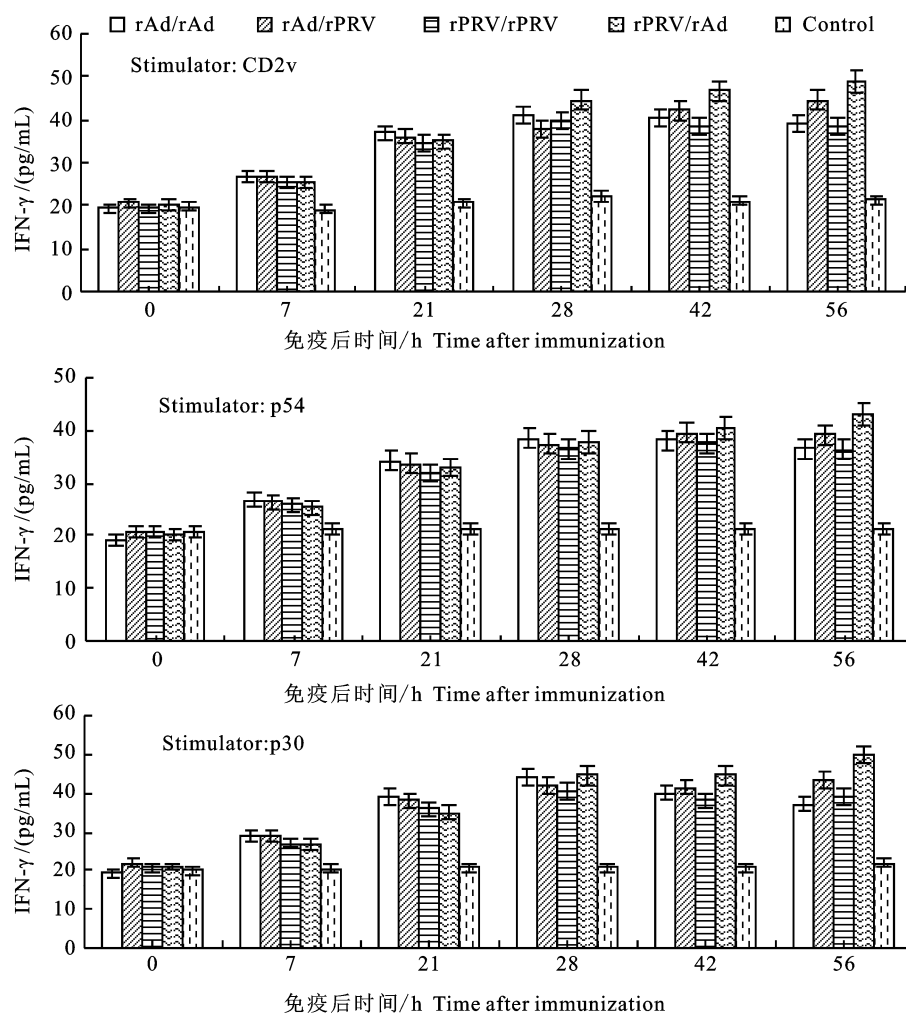


图 7 免疫猪 PBMC 的抗原特异性 γ 干扰素检测

Fig. 7 Detection of antigen-specific IFN- γ in PBMC from immunized pigs

3 讨论

ASFV 重组载体疫苗的研究重点包括免疫保护性抗原及其传递方法的选择^[18-19]。为此,本研究在构建 rPRV-F1 基础上,将其与表达相同融合基因的 rAd-F1 组成 4 个组合进行猪免疫试验,旨在筛选合理的 ASFV 重组载体疫苗的激发/加强免疫策略。为了便于 rPRV-F1 的筛选与纯化,本研究利用 P2A 自裂解肽将 ASFV 融合抗原与 GFP-Flag 隔开,不仅可以在荧光显微镜下直接进行 GFP 阳性病毒噬斑的挑选,而且 P2A 裂解释放的 F1 融合抗原可以独立诱导免疫应答。另外,rPRV-F1 感染细胞表达的 F1 融合蛋白较预测分子质量大 48 ku,可能与其中 CD2v 和 p54 的糖基化修饰有关^[20-21]。

在测试的 4 个免疫方案中,尽管 rAd-F1/rAd-F1 组合初次免疫后的抗原特异性抗体水平最高,但加强免疫后的抗体水平最低(p54 抗体水平除外),可能与 rAd 强免疫原性及其诱导的抗载体免疫有关^[20]。相反,尽管 rPRV-F1/rAd-F1 组合初次免疫后的抗原特异性抗体水平最低,但加强免疫后的抗体水平最高。在 F1 融合蛋白中,CD2v 是 ASFV 的血吸附蛋白,自然感染猪的血吸附抑制抗体水平很低,据此认为 CD2v 是弱免疫原性蛋白,可能与细胞 CD2 分子的序列同源性有关^[22-24]。但在本研究中,所有免疫猪的 CD2v 抗体水平与 p30 和 p54 抗体水平相似,可能与使用 CD2v 胞内区蛋白片段作为检测抗原有关,因为 CD2v 胞内区与细胞 CD2 分子无序列同源性,利用 CD2v 胞内区重组抗原可以在 ASFV 感染猪检测到高水平的特异抗体^[17]。

γ 干扰素是 ASFV 的保护性免疫指标之一^[25]。本研究结果显示,所有免疫猪的 PBMC 均能检测到抗原特异性 γ 干扰素表达,而且加强免疫后的 γ 干扰素浓度明显升高。在测试的 4 个免疫方案中,尽管 rAd-F1/rAd-F1 组合初次免疫后的抗原特异性 γ 干扰素表达水平最高,但加强免疫后的 γ 干扰素表达水平最低,进一步证明与 rAd 诱导的抗载体免疫有关。相反,尽管 rPRV-F1/rAd-F1 组合初次免疫后的抗原特异性 γ 干扰素表达水平最低,但加强免疫后的 γ 干扰素表达水平最高。

综合考虑抗原特异性抗体和 γ 干扰素应答两项指标,本研究结果表明 rPRV/rAd 组合是较好

的 ASFV 重组载体疫苗的激发/加强免疫策略。

参考文献 Reference:

- [1] VANDERWAAL K, DEEN J. Global trends in infectious diseases of swine[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(45): 201806068.
- [2] MLK M, SAEGERMAN C, DIXON L K, et al. African swine fever; update on eastern, central and southern Africa [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(4): 1462-1480.
- [3] BOSCH-CAMS L, LPEZ E, RODRIGUEZ F. African swine fever vaccines: a promising work still in progress[J]. *Porcine Health Management*, 2020, 6: 17.
- [4] LOKHANDWALA S, WAGHELA S D, BRAY J, et al. Adenovirus-vectored novel african swine fever virus antigens elicit robust immune responses in swine[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177007.
- [5] LOPERA-MADRID J, OSORIO J E, HE Y, et al. Safety and immunogenicity of mammalian cell derived and modified vaccinia ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2017, 185: 20-33.
- [6] NETHERTON C L, GOATLEY L C, REIS A L, et al. Identification and immunogenicity of African swine fever virus antigens[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1318.
- [7] JANCOVICH J K, CHAPMAN D, HANSEN D T, et al. Immunization of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank African swine fever virus immunogenic and protective proteins[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(8): e02219-17.
- [8] 吴昌义, 林瑞庆, 袁子国. 伪狂犬病毒作为疫苗载体的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(15): 30-32.
WU CH Y, LIN R Q, YUAN Z G. Research progress of pseudorabies virus as a vaccine vector and its application prospect in parasitology[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2010(15): 30-32.
- [9] 成传刚, 慕婷, 袁军, 等. 重组病毒载体疫苗研究进展[J]. 中国病毒病杂志, 2018, 8(4): 318-328.
CHENG CH G, MU T, YUAN J, et al. Research progress of recombinant viral vector vaccine[J]. *Chinese Journal of Viral Diseases*, 2018, 8(4): 318-328.
- [10] 郝晓芳, 张加勇, 徐佳, 等. 重组病毒载体疫苗的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(13): 68-71.
HAO X F, ZHANG J Y, XU J, et al. Research progress of recombinant viral vector vaccine[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016(13): 68-71.
- [11] ROLLIER CS, REYES-SANDOVAL A, COTTINGHAM MG, et al. Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2011, 23(3): 377-382.

- [12] LU H, ZHOU X, WU Z, *et al.* Comparison of the mucosal adjuvantivities of two Toll-like receptor ligands for recombinant adenovirus-delivered African swine fever virus fusion antigens[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2021, 239: 110307.
- [13] 毕研丽, 郭广君, 吕素芳, 等. 基于 Overlap PCR 方法进行猪伪狂犬病毒 TK 基因缺失载体的构建、鉴定及生物学分析[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(2): 40-43.
- BI Y L, GUO G J, LÜ S F, *et al.* Construction of a PRV sa strain TK gone deleted transfer vector by overlap PCR [J]. *China Animal Health Inspection*, 2011, 28(2): 40-43.
- [14] 何妍萍, 贾怀杰, 蔺国珍, 等. 猪伪狂犬病毒 BarthaK61 株 TK 缺失株的构建[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(6): 13-18.
- HE Y P, JIA H J, LIN G ZH, *et al.* Construction of pseudorabies virus BarthaK61 strain TK-null [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2013, 48(6): 13-18.
- [15] 李维华, 任慧英, 刘文华, 等. PCV2、PPV、PRV、PRRSV 和 CSFV 复合 PCR 的应用研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 12-15.
- LI W H, REN H Y, LIU W H, *et al.* Application of the multiplex PCR detecting PCV2, PPV, PRV, PRRSV and CSFV [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2008, 17(3): 12-15.
- [16] 赵 朴, 栗永华, 徐 力, 等. PRV 和 PCV2 二重 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 西北农业学报, 2015, 24(8): 7-10.
- ZHAO P, LI Y H, XU L, *et al.* Development and preliminary application of a duplex polymerase chain reaction for detecting pseudorabies virus and porcine circovirus 2 [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2015, 24(8): 7-10.
- [17] 周晓慧, 肖景景, 张鑫宇, 等. 非洲猪瘟病毒强免疫原性重组 CD2v 抗原的制备与初步应用[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(10): 2472-2480.
- ZHOU X H, XIAO J J, ZHANG X Y, *et al.* Preparation and preliminary application of highly immunogenic recombinant CD2v antigen of african swine fever virus [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(10): 2472-2480.
- [18] SOUZA A P, HAUT L, REYES-SANDOVAL A, *et al.* Recombinant viruses as vaccines against viral diseases [J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 2005, 38(4): 509-522.
- [19] TURLEWICZ-PODBIELSKA H, KURIGA A, NIEMYJSKI R, *et al.* African swine fever virus as a difficult opponent in the fight for a vaccine-current data [J]. *Viruses*, 2021, 3(7): 1212.
- [20] GOATLEY L C, DIXON L K. Processing and localization of the African swine fever virus CD2v transmembrane protein [J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(7): 3294-3305.
- [21] KAY-JACKSON P C, GOATLEY L C, COX L, *et al.* The CD2v protein of African swine fever virus interacts with the actin-binding adaptor protein SH3P7 [J]. *The Journal of General Virology*, 2004, 85(Pt1): 119-130.
- [22] HAGEDORN C, KREPPEL F. Capsid engineering of adenovirus vectors: overcoming early vector-host interactions for therapy [J]. *Human Gene Therapy*, 2017, 28(10): 820-832.
- [23] RUIZ-GONZALVO F, F RODRÍGUEZ, ESCRIBANO J M. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus [J]. *Virology*, 1996, 218(1): 285-289.
- [24] J M RODRÍGUEZ, R J YÁEZ, F ALMAZÁN, *et al.* African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells [J]. *Journal of Virology*, 1993, 67(9): 5312-5320.
- [25] TAKAMATSU H H, DENYER M S, LACASTA A, *et al.* Cellular immunity in ASFV responses [J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 110-121.

Prime/Boost Immunization Strategy of Vectored Vaccines against African Swine Fever Virus

ZHOU Xiaohui¹, LU Huipeng², ZHANG Xinyu¹, XIA Xiaoli¹ and SUN Huaichang¹

(1. College of Veterinary Medicine, Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225009, China;

2. the Key Laboratory for High-Tech Research and Development of Veterinary Biopharmaceuticals, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou Jiangsu 225300, China)

Abstract To select a rational prime/boost strategy for immunization of vectored vaccine against African swine fever virus (ASFV), the recombinant pseudorabies virus which expressed ASFV CD2v-p30-p54 fusion antigen, namely rPRV-F1, was generated. Together with rAd-F1 expressing the same fusion antigen, four different prime-boost schemes rAd-F1/rAd-F1, rAd-F1/rPRV-F1, rPRV-F1/rPRV-F1, rPRV-F1/rAd-F1 used to immunize pigs and their serum samples were collected on different days for the antigen-specific antibody detection. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated and stimulated with the three ASFV antigens for IFN- γ detection. Both immunofluorescence and Western blotting showed that the fusion antigen was correctly expressed in rPRV-F1-transduced cells. The antigen-specific antibodies were detected in all immunized pigs, which were significantly boosted by secondary immunization. Among the four immunization groups, the overall antibody level of rAd-F1/rAd-F1 immunization group was markedly increased after primary immunization, but it was the lowest after secondary immunization. In contrast, the overall antibody level of rPRV-F1/rAd-F1 immunization group was lower after primary immunization, but it was the highest after secondary immunization. Similarly, the overall antigen-specific IFN- γ response of rAd-F1/rAd-F1 immunization group was the strongest after primary immunization, but it was the weakest after secondary immunization. In contrast, the overall IFN- γ response of rPRV-F1/rAd-F1 immunization group was weaker after primary immunization, but it was the strongest after secondary immunization. These experimental data suggest that rPRV/rAd is the best prime/boost strategy for immunization of ASFV vectored vaccine.

Key words African swine fever virus; Vectored vaccine; Prime/boost immunization

Received 2022-09-05

Returned 2022-09-23

Foundation item The National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFD0502303, No. 2018YFC0840404-3).

First author ZHOU Xiaohui, female, doctoral student. Research area: animal vaccine. E-mail: 89507732@qq.com

Corresponding author SUN Huaichang, male, professor. Research area: preventive veterinary medicine. E-mail: sunh@yzu.edu.cn

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)