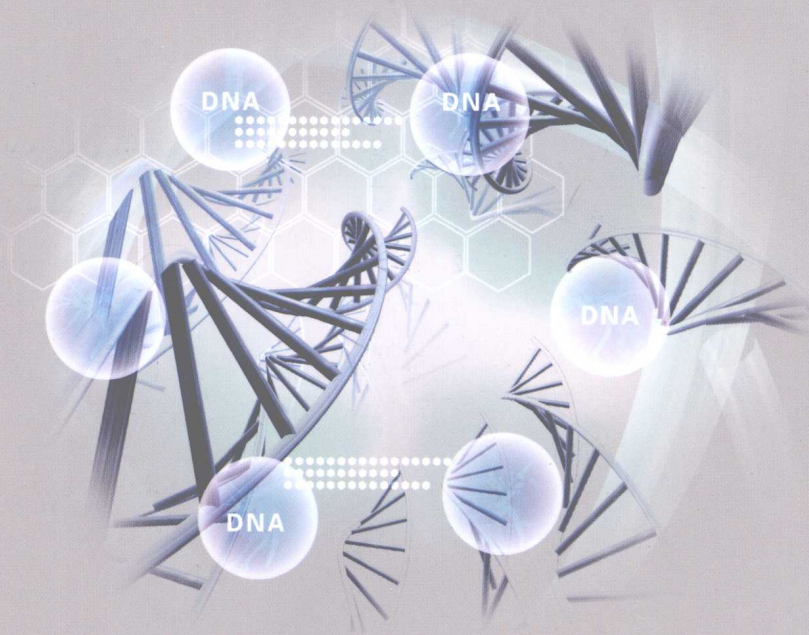


华夏英才基金学术文库

“十一五”国家重点图书

动物 基因工程疫苗 原理与方法

童光志 王云峰 等编著



化学工业出版社

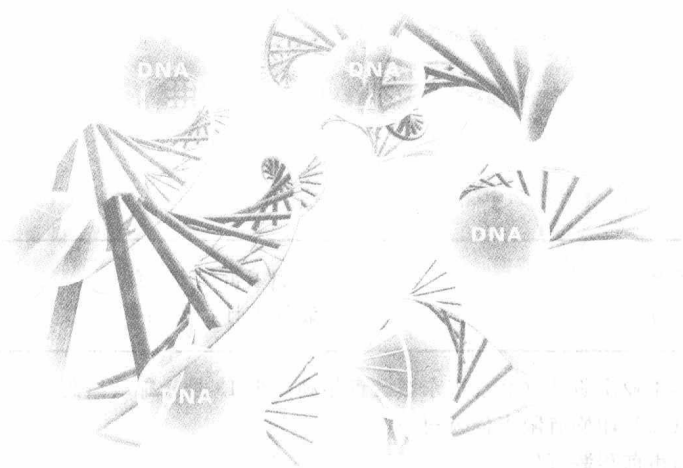


华夏英才基金学术文库

“十一五”国家重点图书

动物 基因工程疫苗 原理与方法

童光志 王云峰 等编著



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

动物基因工程疫苗原理与方法/童光志, 王云峰等编著.
北京: 化学工业出版社, 2009. 4

(“十一五”国家重点图书)

(华夏英才基金学术文库)

ISBN 978-7-122-04824-0

I. 动… II. ①童…②王… III. 基因工程-应用-兽疫-
疫苗-研究 IV. S852. 5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 023396 号

责任编辑: 邵桂林

文字编辑: 史 懿

责任校对: 宋 玮

装帧设计: 史利平

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京云浩印刷有限责任公司

装 订: 三河市前程装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张 26 1/4 字数 652 千字 2009 年 5 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 85.00 元

版权所有 违者必究

《动物基因工程疫苗原理与方法》

编著人员

童光志 王云峰 王笑梅 孟庆文 崔尚金 刘胜旺 仇华吉
刘思国 冯 力 刘 明 智海东 薛 飞 崔红玉 曾伟伟
祁小乐 高宏雷 刘长军 孙永科 石星明 安同庆 李 媛
陈建飞 韩宗玺 韩凌霞 赵 凯

序 言

疫苗作为人类征服传染病的有利工具，已有一百余年的历史。在 20 世纪的诺贝尔医学及生理学奖中，有 15 次授予了在免疫学领域有杰出贡献的科学家。从牛痘苗的发现到天花被消灭，免疫学在抗感染性疾病方面不断取得辉煌成就的同时，也为医学各领域带来了崭新的突破。现代免疫学主要以基因活化及分子作用为基础，探索免疫细胞的生命活动与功能，阐明细胞与细胞间、免疫系统与机体之间的相互关系。以“抗原特异的适应性免疫应答”的理论为依据，建立了以免疫学有效防控相关疾病的基础，从而使我们可以利用研发的新型疫苗如重组疫苗、DNA 疫苗、口服疫苗等去征服严重威胁生命安全的传染病，如禽流感、结核病等。人类基因组计划的成功，将生物学带入到基因组学时代，直至现在的后基因组学时代，即功能基因组学与蛋白质组学时代，为免疫学理论和技术的发展提供了新的平台。在现代生物技术的推动作用下，疫苗在种类上已由原有的经典疫苗发展出被誉为疫苗史上“第二次革命”的重组疫苗以及“第三次革命”的核酸疫苗，在用途上由最初用于预防传染性疾病预防发展为预防和治疗传染与非传染疾病，甚至还开辟了一些新的用途。疫苗研制已发展成为一门集微生物学、免疫学、流行病学、生物化学、分子生物学和遗传学为一体的综合性学科。

近年来，随着新的生物学技术的建立、改进和完善，极大地推动了疫苗研制开发及其相应基础研究的发展，并由此产生了许多新的理论、概念以及新的技术。由于生物技术的迅速发展，使得曾经作为经验归纳学科的免疫学、疫苗学出现了革命性的变化，免疫学所涉及的理论范围的扩大，以及疫苗学在应用中所积累的丰富知识及经验，使人类在征服传染病、肿瘤以及其他疾病方面有了得心应手的工具和系统的技术理论。因此，在人类展望 21 世纪生物学的辉煌之时，作为直接用于消除这些威胁人类健康疾病的疫苗学而言，具有了更为明显和重要的意义。

同时，免疫学提供的研究手段与模型系统，与基因组学、蛋白组学、遗传学、分子生物学、细胞生物学、发育生物学、结构生物学、生物化学、生理学及新兴的生物信息学等多个前沿学科相结合，必将产生一个又一个理论及应用上的突破，从而更好地理解生老病死的基本现象，揭示疾病发生的本质。

本书作者为我所兽医生物技术国家重点实验室的一批从事新型疫苗研究和开发工作、富有朝气、敢于创新的青年科学家们，他们结合自己在研究过程中积累的丰富知识和实践经验，系统介绍了当今世界上新型疫苗的研究成果和开发动态，重点对基因工程疫苗研究原理与方法进行了详细的论述。相信本书的出版发行必将为从事生物高科技的专业人才、大专院校的教师、研究生、本科生和进修人员等提供崭新的专业视野，从而促进新型疫苗的不断研发，故乐为之作序。

中国工程院院士 沈学军

2008 年 11 月

前言

疫苗免疫接种不是预防动物传染性疾病的唯一方法，但却是最有效而实用的方法。

早期，人们利用传统疫苗并结合其他综合防治措施，已经成功地在一些国家和地区消灭了某些动物传染病，但是由于病原微生物所具有的某些特殊性质，开发常规疫苗越来越面临着有更大的困难和更高的技术要求。

以基因工程、细胞工程、发酵工程和酶工程为主体的现代生物技术于20世纪70年代出现以后，为动物疫苗的研制和基础理论的发展注入了新的活力，大大拓宽了传统疫苗及非特异性免疫的概念。以反义核酸产品和直接免疫用核酸建立的“新核酸免疫”，以及对特异性传统疫苗及非特异性疫苗起增强作用的“副免疫”制品，正在不断扩大“免疫”一词的内涵。基因工程技术最早出现于20世纪80年代，它的出现具有里程碑式的意义，它不仅使人们摆脱了传统的疫苗研究策略，也为研制新一代的疫苗提供了崭新的方法。从此，人们可以利用分子生物学技术，对病原微生物的基因组进行改造，以降低其致病性，提高其免疫原性，或者将病原微生物基因组中的一个或多个对防病治病有用的基因克隆到无毒的原核或真核表达载体上，制成疫苗接种动物，使其产生免疫力和抵抗力，达到防控传染病的目的。基因工程技术的出现使得疫苗研究的手段和效率得到了空前的提高。目前，利用基因工程技术已经和正在研制开发的新型疫苗有基因工程亚单位疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗、合成肽疫苗、抗独特型疫苗等。

基因工程亚单位疫苗是利用基因工程技术，取出微生物中编码保护性抗原肽段的基因，与质粒等载体重组，导入受体菌（细菌、酵母）或细胞等，使之高效表达，产生大量保护性肽段，提取后加入佐剂即成为亚单位苗。常用于亚单位疫苗的生产系统。

基因工程活载体疫苗又称重组活毒疫苗。通常以动物病毒弱毒或无毒株，如痘苗病毒、疱疹病毒等作为载体，插入外源抗原基因构建成重组活病毒载体，转染细胞，使载体病毒获得表达外源基因的新的特性，此种重组体疫苗称为基因工程活载体疫苗。其具有颗粒特性，免疫原性良好。目前，在禽类病原基因工程活载体疫苗研制过程中的应用极为广泛。

基因缺失疫苗即利用基因工程技术造成病毒基因组中负责毒力的基因缺失而制成的疫苗。缺失突变不发生返祖现象，突变株稳定。在禽用疫苗中正着手研究传染性喉气管炎、沙门氏菌病等病的基因缺失疫苗。

核酸疫苗又称DNA疫苗、基因疫苗，是由编码某病原体蛋白抗原的基因及其真核重组表达载体质粒组成，经肌内注射等方法将之导入动物细胞内，由宿主细胞表达目的抗原蛋白，从而诱发机体的体液和细胞免疫反应，达到防控疾病的目的。核酸疫苗既具有亚单位疫苗或灭活疫苗的安全性，又具有活疫苗的免疫力全面的优点，具有广阔的应用前景。

合成肽疫苗是应用基因工程技术或化学方法制备的具有保护作用的类似天然抗原决定簇的小肽，以其制成的疫苗称为合成肽疫苗。这类疫苗的特点与亚单位疫苗有某些相似之处，也存在着亚单位疫苗所具有的问题。

以基因工程技术生产的各类型疫苗中，除核酸疫苗外，其他几种类型都已有一些商品化成品问世，它们都正在为疾病的防控发挥着重要作用。但这些新型疫苗尚需不断改进，只有达到效力优越、易于生产和成本低廉的要求后，才能替代传统疫苗。自然，对于一些目前不能或难于人工培养生产的病原，有潜在致癌性或免疫病理作用的病原，以及常规方法制造的疫苗效力不符合要求的病原等，基因工程技术将会对这些疫苗的制造发挥作用。

基因工程技术在兽用疫苗研制中的应用具有广阔的前景，将来许多常规疫苗可能被安全高效的基因工程苗所替代，一些目前还没有可用疫苗或虽有疫苗而生产上尚存在很大困难的疫病，也都寄希望于应用基因工程技术来解决。兽用基因工程疫苗的安全问题比较容易控制和处理，因此，有理由认为，基因工程疫苗将在兽用疫苗生产上首先得到突破。对于基因工程疫苗的研究国外起步较早，并且已经有多个基因工程疫苗成功投放市场。在教学方面，基因工程疫苗也是“Vaccine”等疫苗学著作重点介绍的章节。

虽然我国动物基因工程疫苗研究起步较晚，但是也已经取得了突破性进展。已研制出多种动物疫苗，为我国动物疫苗的研究开辟了新的天地，为我国的畜禽生产和疫病防控提供了有力支持。但是笔者在工作中发现：一方面是一线科研工作者在动物基因工程疫苗的研究开发过程中的经验体会急需集结成册，以便相关人员参考学习；另一方面是国内缺乏一本专门介绍动物基因工程疫苗的专著。显然，编写一本适合我国实际情况的动物基因工程疫苗著作是必要且适时的。本书即在这样的背景下应运而生。

本书共分16章，囊括了基因工程疫苗的发展历程、研究进展、疫苗设计、疫苗免疫评价等多个方面的内容，内容详尽，既可以作为高等农业院校师生和科研单位研究人员的参考书，也可以作为动物疫苗生产企业的技术参考，它的出版必将有力地促进我国动物基因工程疫苗的发展和研究水平。

本书在编写过程中得到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各位同仁的大力支持，在本书付梓之际对他们的辛勤工作表示衷心的感谢！

由于作者科研工作繁重，动物基因工程疫苗的发展又日新月异，虽然本书的各位编者竭尽能力求完美，但仍不免有不足及疏漏之处，望广大读者和专家批评指正。



2008年11月8日于哈尔滨

目 录

第1章 疫苗的历史、发展和前景	1
1.1 疫苗概念的产生及其历史	1
1.2 疫苗的应用及其效果分析	3
1.3 疫苗研究新技术的发展	6
1.3.1 传统疫苗	7
1.3.2 基因工程疫苗	7
1.4 疫苗对消灭和控制动物传染病的发展前景	8
参考文献	8
第2章 疫苗免疫学基本理论	9
2.1 疫苗相关免疫学基础	9
2.1.1 免疫系统	9
2.1.2 免疫器官	9
2.1.3 免疫细胞	11
2.1.4 抗原	13
2.1.5 抗体	15
2.1.6 免疫球蛋白的基本结构和功能	16
2.2 免疫应答的基本过程	17
2.2.1 非特异性免疫应答	17
2.2.2 特异性免疫应答	19
2.3 疫苗有效免疫反应的基本要素	22
2.3.1 抗原方面的因素	22
2.3.2 机体方面的因素	22
2.3.3 免疫方法的影响	23
2.4 疫苗免疫的主动免疫反应	23
2.4.1 抗原提呈	23
2.4.2 抗原竞争	24
2.4.3 体液免疫和细胞免疫反应的动态变化	25
2.4.4 免疫反应的调节	25
2.4.5 免疫记忆和免疫促进效应	26
2.4.6 全身性免疫、局部免疫和初乳免疫	27
2.4.7 被动免疫	28
参考文献	28

第3章 疫苗佐剂	30
3.1 疫苗佐剂的作用机理	30
3.1.1 调节免疫	30
3.1.2 提呈抗原	31
3.1.3 细胞毒性 T 细胞应答	31
3.1.4 储存作用	32
3.2 植物佐剂	32
3.2.1 皂苷类	32
3.2.2 免疫刺激复合物佐剂	32
3.2.3 蜂胶佐剂	33
3.2.4 香菇多糖	34
3.2.5 云芝多糖	34
3.2.6 黄芪多糖	34
3.3 细菌佐剂	35
3.3.1 脂多糖	35
3.3.2 胞壁酰二肽及其衍生物	35
3.3.3 霍乱毒素	35
3.3.4 大肠杆菌不耐热肠毒素	36
3.3.5 百日咳毒素	36
3.3.6 短小棒状杆菌	36
3.3.7 卡介苗	37
3.3.8 单磷酰脂质 A	37
3.4 矿物油佐剂	37
3.4.1 油乳剂	37
3.4.2 MF59 佐剂	37
3.5 矿物盐佐剂	38
3.5.1 铝佐剂 (铝胶)	38
3.5.2 磷酸钙佐剂	39
3.5.3 氢氧化铁凝胶佐剂	40
3.5.4 硒	40
3.6 细胞因子佐剂	40
3.6.1 白细胞介素-1	41
3.6.2 白细胞介素-2	41
3.6.3 白细胞介素-12	41
3.6.4 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子	41
3.6.5 干扰素	42
3.6.6 其他细胞因子	42
3.7 核酸佐剂	43
3.7.1 免疫刺激序列 (CpG 基序)	43
3.7.2 表达与免疫相关的细胞因子的核酸载体	46

3.7.3 双链 RNA	46
3.8 投递系统	47
3.9 新佐剂的选择和研究方向	47
参考文献	49
第4章 疫苗设计的技术基础	51
4.1 经典疫苗及新型疫苗的技术特点	51
4.1.1 经典疫苗的技术要点	51
4.1.2 新型疫苗的特点	52
4.2 当前疫苗研究的趋势	52
4.2.1 新型疫苗的分子设计	52
4.2.2 新型疫苗的规模化生产	53
4.2.3 开发配套的鉴别诊断技术	53
4.2.4 新型佐剂的使用	53
4.2.5 动物用生物制品工程研究中心建设	53
4.3 常规活疫苗的研发原则	53
4.3.1 病原自然弱毒株	53
4.3.2 异源免疫	53
4.3.3 异源动物或细胞传代致弱	54
4.3.4 改变体外培养传代环境	54
4.4 基因工程疫苗及其研发原则	54
4.4.1 亚单位疫苗及其研发原则	54
4.4.2 基因缺失疫苗及其研发原则	55
4.4.3 活载体疫苗及其研发原则	55
4.4.4 核酸疫苗及其研发原则	56
4.4.5 合成多肽疫苗及其研发原则	58
4.4.6 T细胞疫苗	60
4.5 基因工程疫苗设计中优化基因表达的关键因素	61
4.5.1 密码子最佳化	61
4.5.2 翻译终止效率	62
4.5.3 真核细胞中的异源蛋白表达	62
4.6 计算机辅助疫苗设计技术	63
4.6.1 计算机辅助疫苗设计技术的原理与方法	63
4.6.2 计算机辅助疫苗设计技术的应用与常用工具	64
4.6.3 计算机辅助疫苗设计的产业前景	65
4.7 利用免疫蛋白质组学方法筛选高效疫苗	65
4.7.1 免疫蛋白质组学	65
4.7.2 免疫蛋白质组学的技术体系	66
4.7.3 免疫蛋白质组学在疫苗候选靶位筛选中的应用	67
4.7.4 展望	67
参考文献	68

第5章 疫苗效果的免疫学评价	69
5.1 疫苗开发的原则与开发步骤	69
5.2 疫苗效果免疫学评价的一般原则	69
5.2.1 方法	69
5.2.2 安全性	70
5.2.3 免疫效果	70
5.2.4 保护效果	70
5.2.5 流行病学评价	70
5.3 疫苗效果的免疫学评价方法	70
5.3.1 疫苗免疫效果的实验室评估	70
5.3.2 疫苗免疫效果的临床评估	73
5.4 疫苗效果的流行病学评价	74
5.4.1 传染病的流行与疫苗的作用策略	74
5.4.2 传染病的流行及其流行病学特征	74
5.4.3 疫苗在控制传染病流行中的作用	76
5.4.4 疫苗的免疫策略	76
5.4.5 疫苗效果的流行病学指标	77
5.4.6 疫苗效果调查的流行病学设计	78
参考文献	79
第6章 基因工程疫苗概述	81
6.1 基因工程疫苗的概念	81
6.2 基因工程亚单位疫苗	82
6.2.1 细菌性疾病亚单位疫苗	82
6.2.2 病毒性疾病亚单位疫苗	83
6.2.3 激素亚单位疫苗	83
6.3 基因突变疫苗及基因缺失疫苗	83
6.4 基因工程活载体疫苗	84
6.4.1 复制性活载体疫苗	84
6.4.2 非复制性载体疫苗	85
6.5 核酸疫苗	85
6.6 转基因植物可食疫苗	85
6.7 合成肽疫苗	86
6.8 抗独特型疫苗	87
6.9 畜禽基因工程疫苗产业发展现状与前景	87
6.9.1 国际畜禽基因工程疫苗产业化现状	88
6.9.2 国内畜禽基因工程疫苗产业化现状	88
6.9.3 21世纪面临的机遇、挑战和策略	89
参考文献	90
第7章 基因工程亚单位疫苗	92
7.1 基因工程亚单位疫苗的种类	92

7.2	基因工程亚单位疫苗抗原基因的选择	93
7.3	基因工程亚单位疫苗的抗原表达系统	93
7.3.1	原核表达系统	93
7.3.2	酵母表达系统	96
7.3.3	昆虫细胞表达系统	101
7.3.4	哺乳动物细胞表达系统	104
7.4	外源蛋白表达操作案例	110
7.4.1	原核表达外源蛋白	110
7.4.2	毕赤酵母表达外源蛋白	111
7.4.3	昆虫细胞 (Bac-to-Bac 系统) 表达外源蛋白	114
7.4.4	脂质体法转染真核细胞	115
7.5	亚单位疫苗研究与应用	115
7.5.1	原核表达系统在亚单位疫苗研究中的应用	115
7.5.2	真核表达系统在亚单位疫苗研究中的应用	116
7.6	展望	117
	参考文献	117
第8章	转基因植物疫苗	119
8.1	植物生物反应器生产可食用疫苗研究进展	120
8.1.1	可食用疫苗的表达系统	120
8.1.2	可食用疫苗的可行性	121
8.2	转基因植物疫苗的载体系统	123
8.2.1	外源基因转移的植物病毒载体	123
8.2.2	外源基因转移的质粒载体	125
8.2.3	载体卡盒	130
8.2.4	载体构建中常用的选择标记基因及报告基因	131
8.2.5	外源基因的转化方法	135
8.2.6	转入基因的状况和表达以及基因沉默	145
8.3	转基因植物疫苗的植物受体系统	148
8.3.1	植物基因转化受体系统的类型及其特性	148
8.3.2	植物基因转化受体系统建立的程序	149
8.3.3	植物基因转化受体系统建立中常遇的问题	152
8.4	转基因植物操作案例	153
8.4.1	根癌农杆菌介导的基因转化方法	153
8.4.2	发根农杆菌介导的植物转化	161
8.4.3	基因枪轰击法 (瞬时表达)	163
8.5	转基因植物疫苗存在的问题与对策	163
8.5.1	受体植物不理想	164
8.5.2	重组抗原蛋白表达量低	164
8.5.3	转基因植物疫苗的免疫原性弱	164
8.5.4	安全性问题	165

8.5.5 植物大量表达外源基因时出现长势弱的现象	165
8.5.6 口服时抗原的消化降解	165
8.5.7 重组蛋白的提纯	165
8.5.8 免疫耐受	165
8.6 展望	166
参考文献	166
第9章 病毒基因缺失疫苗	169
9.1 基因缺失疫苗研究概况	169
9.2 畜禽基因缺失疫苗制备原理与技术	171
9.2.1 疱疹病毒基因缺失疫苗的制备原理和方法	171
9.2.2 反转录病毒基因缺失疫苗的制备原理与方法	175
9.2.3 RNA病毒基因缺失疫苗的制备原理与方法	175
9.3 畜禽基因缺失疫苗的研究与应用现状	180
9.3.1 伪狂犬病基因缺失疫苗的研究	180
9.3.2 牛传染性鼻气管炎基因缺失疫苗的研究	180
9.3.3 马疱疹病毒基因缺失疫苗的研究	181
9.3.4 反转录病毒基因缺失疫苗的研究	181
9.3.5 RNA病毒基因缺失疫苗的研究	181
9.3.6 畜禽基因缺失疫苗的应用现状	182
9.4 畜禽基因缺失疫苗的展望	182
参考文献	183
第10章 病毒活载体疫苗	186
10.1 重组病毒活载体疫苗的技术特点	186
10.2 重组活载体疫苗的设计原则	187
10.2.1 抗原的选择	187
10.2.2 活载体的选择	187
10.2.3 转移载体的构建	188
10.2.4 外源基因插入位点的选择	188
10.3 痘病毒载体疫苗	188
10.3.1 痘病毒的分子生物学	189
10.3.2 痘苗病毒载体疫苗	190
10.3.3 禽痘病毒载体疫苗	195
10.4 疱疹病毒载体	209
10.4.1 伪狂犬病病毒载体疫苗	209
10.4.2 1型牛疱疹病毒载体疫苗	217
10.4.3 马立克病病毒载体	218
10.5 腺病毒	223
10.5.1 腺病毒载体的概述	223
10.5.2 腺病毒载体的构建	225
10.5.3 改进腺病毒载体的方法	231

10.5.4	展望	234
10.6	反转录病毒	235
10.6.1	反转录病毒概述	235
10.6.2	反转录病毒载体的包装原理	235
10.6.3	反转录病毒载体的分类	236
10.6.4	反转录病毒载体的构建	238
10.6.5	反转录病毒的优缺点	238
10.6.6	近年来反转录病毒载体的改进	239
10.6.7	展望	240
10.7	甲病毒 RNA 复制子疫苗	241
10.7.1	基本原理和特点	241
10.7.2	甲病毒复制子疫苗的优缺点	242
10.7.3	甲病毒复制子疫苗的免疫机理	242
10.7.4	几种主要的甲病毒 RNA 复制子	243
10.7.5	甲病毒表达载体构建策略	246
10.8	重组活载体疫苗的局限性	247
10.8.1	安全性	247
10.8.2	母源性抗体干扰	248
10.8.3	重组病毒的表达量	249
10.8.4	病原性及免疫效力	249
10.9	重组病毒活载体疫苗的发展方向	249
	参考文献	251
第 11 章	细菌性载体疫苗	256
11.1	沙门菌载体	256
11.1.1	鼠伤寒沙门菌菌株特征	257
11.1.2	鼠伤寒沙门菌减毒株的构建原理	257
11.1.3	重组减毒鼠伤寒沙门菌疫苗构建及其免疫机制	257
11.1.4	重组鼠伤寒沙门菌株的构建方法	261
11.1.5	结语	264
11.2	重组 BCG 载体	265
11.2.1	重组 BCG 载体的优点	265
11.2.2	重组 BCG 载体的研究进展	265
11.2.3	rBCG 诱导的免疫应答及免疫途径对免疫效果的影响	268
11.2.4	rBCG 存在的一些问题	269
11.2.5	重组卡介苗菌株的构建方法	269
11.2.6	展望	273
11.3	乳酸菌(乳酸杆菌和乳酸乳球菌)载体	273
11.3.1	乳酸杆菌载体	274
11.3.2	乳酸乳球菌	279
11.4	弧菌载体疫苗	282

11.4.1	弧菌载体	282
11.4.2	适用减毒弧菌的表达系统	283
11.4.3	平衡致死质粒的保持	283
11.4.4	对细菌载体应用的更多考虑	284
11.5	志贺菌载体疫苗	285
11.5.1	志贺菌载体	285
11.5.2	志贺菌传递质粒 DNA	285
11.6	李斯特菌载体	285
11.6.1	李斯特菌疫苗	286
11.6.2	李斯特菌载体	286
11.6.3	减毒李斯特菌在肿瘤治疗中的应用	286
11.6.4	李斯特菌传递质粒 DNA	287
11.7	枯草芽孢杆菌整合载体	287
11.7.1	芽孢杆菌整合载体的研究历程	287
11.7.2	枯草芽孢杆菌整合载体的整合机理及方式	288
11.7.3	枯草芽孢杆菌整合载体疫苗的构建	289
11.7.4	芽孢杆菌整合载体的应用	291
	参考文献	291
第 12 章	核酸疫苗	294
12.1	DNA 疫苗的特点	295
12.1.1	DNA 疫苗的主要优点	295
12.1.2	DNA 疫苗的局限性	297
12.2	DNA 疫苗的免疫应答机制	298
12.2.1	从诱导产生的免疫应答类型方面来探讨 DNA 免疫机制	299
12.2.2	从接种途径方面来探讨 DNA 免疫的机制	301
12.3	DNA 疫苗的构建与评价	303
12.3.1	选择合适的目的基因和载体	304
12.3.2	DNA 疫苗的构建	305
12.3.3	提高抗原蛋白表达量和免疫原性	305
12.3.4	验证抗原蛋白的表达情况	306
12.3.5	DNA 疫苗的免疫学效果评价	306
12.3.6	安全性分析	307
12.4	提高 DNA 疫苗免疫效果的策略	307
12.4.1	编码抗原的目的基因的改造	307
12.4.2	疫苗质粒载体的选择和优化	308
12.4.3	基因佐剂	309
12.4.4	免疫途径和免疫方法	315
12.4.5	DNA 疫苗免疫方式的改进	317
12.4.6	DNA 疫苗的靶向策略	318
12.4.7	接种方案	321

12.4.8 疫苗剂型的改进·····	322
12.5 DNA疫苗在畜禽疾病控制中的应用研究与发展趋势·····	323
12.5.1 禽的相关DNA疫苗·····	323
12.5.2 猪的相关DNA疫苗·····	325
12.5.3 牛的相关DNA疫苗·····	326
12.5.4 犬的相关DNA疫苗·····	327
12.5.5 细菌病的DNA疫苗·····	327
12.5.6 寄生虫病的DNA疫苗·····	328
12.6 DNA疫苗的安全性问题·····	329
12.6.1 重组质粒能否整合到宿主细胞基因组中导致原癌基因的 激活或抑癌基因的抑制·····	329
12.6.2 重组质粒能否诱导自身免疫反应,产生抗DNA抗体·····	330
12.6.3 重组质粒持续表达外源抗原能否产生不良后果·····	330
12.6.4 重组质粒是否具有生殖毒性·····	331
12.6.5 重组质粒与细胞因子合用能否导致其他风险·····	331
12.6.6 DNA疫苗标准化的问题·····	331
12.6.7 风险与效率比·····	332
12.7 结语·····	332
参考文献·····	333
第13章 A型流感病毒反向遗传学操作技术及其在疫苗研制过程中的应用·····	336
13.1 流感病毒的分子生物学·····	336
13.1.1 流感病毒的结构与编码蛋白的功能·····	336
13.1.2 流感病毒的复制·····	339
13.2 流感病毒反向遗传学技术的发展·····	341
13.2.1 借助辅助病毒拯救流感病毒·····	341
13.2.2 由克隆的基因拯救A型流感病毒·····	341
13.3 反向遗传学操作技术在流感病毒疫苗研究中的应用·····	344
13.3.1 弱毒流感疫苗株的拯救·····	344
13.3.2 病毒感染与疫苗免疫动物鉴别诊断·····	344
13.4 流感病毒8质粒系统实验操作方法·····	345
13.4.1 pHW2000双向转录载体·····	345
13.4.2 以pHW2000为载体的病毒拯救·····	346
13.5 展望·····	347
参考文献·····	348
第14章 新城疫病毒的反向遗传操作及其在新型疫苗研制中的应用·····	349
14.1 RNA病毒的反向遗传操作·····	349
14.1.1 概述·····	349
14.1.2 感染性分子克隆的构建·····	350
14.1.3 感染性分子克隆的体外操作·····	352
14.1.4 结语·····	353

14.2	新城疫病毒概述	353
14.2.1	新城疫病毒的生物学特性	354
14.2.2	新城疫病毒的分子生物学特性	357
14.2.3	新城疫的诊断、免疫与防治	361
14.3	新城疫病毒的反向遗传操作技术原理及操作	363
14.3.1	分子水平构建 cDNA 等元件	364
14.3.2	拯救过程	365
14.3.3	验证分析	366
14.3.4	操作过程的注意事项	367
14.4	反向遗传操作技术在新城疫病毒中的应用	367
14.4.1	研究结构和功能的关系	367
14.4.2	插入报告基因的重组病毒	371
14.4.3	标记疫苗/嵌合疫苗	372
14.4.4	禽用载体疫苗	373
14.4.5	用于人类传染病预防的疫苗载体	374
14.4.6	载体修饰用于肿瘤的治疗	376
14.4.7	结语	378
	参考文献	378
第15章	细菌人工染色体技术及其在新型疫苗研制中的应用	382
15.1	细菌人工染色体技术的产生	382
15.2	细菌人工染色体的结构功能及其遗传特性	383
15.3	细菌人工染色体的构建策略及构建方法	384
15.3.1	细菌人工染色体的构建策略	384
15.3.2	细菌人工染色体的构建方法	385
15.4	细菌人工染色体的构建操作案例	387
15.4.1	材料	387
15.4.2	重组鸡马立克病病毒转移载体的构建	387
15.4.3	重组鸡马立克病病毒的获得	389
15.4.4	电转化感受态细胞 DH10B 的制备	389
15.4.5	BAC 分子克隆化病毒的筛选	389
15.4.6	BAC-DNA 拯救重组病毒生长特性的测定	390
15.5	细菌人工染色体作为疫苗的应用及探索	390
15.6	细菌人工染色体疫苗的修饰系统	393
15.6.1	Red/ET 重组系统	393
15.6.2	Red/ET 重组的机制	394
15.7	细菌人工染色体疫苗诱导机体免疫应答的机制	397
15.8	细菌人工染色体疫苗的优越性及其存在的不足	398
15.8.1	细菌人工染色体疫苗的优越性	398
15.8.2	细菌人工染色体疫苗存在的问题与对策	398
15.9	展望	398