

农业生物技术系列

现代生物技术 与畜禽疾病防治

陈溥言 主编
曹瑞兵 副主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

农业生物技术系列

现代生物技术与畜禽疾病防治

陈溥言 主编

曹瑞兵 副主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

现代生物技术与畜禽疾病防治/陈溥言主编. —北京:
化学工业出版社, 2005. 8

(农业生物技术系列)

ISBN 7-5025-7564-2

I. 现… II. 陈… III. 生物技术-应用-畜禽-动物疾
病-防治 IV. S858

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 098089 号

农业生物技术系列

现代生物技术与畜禽疾病防治

陈溥言 主编

曹瑞兵 副主编

责任编辑: 邵桂林 周 旭

责任校对: 宋 玮

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010) 64982530

(010) 64918013

购书传真: (010) 64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市延风装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 13 字数 220 千字

2005 年 9 月第 1 版 2005 年 9 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7564-2

定 价: 32.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

《现代生物技术与畜禽疾病防治》

主编及编写人员

主 编 陈溥言

副主编 曹瑞兵

编写人员 (按姓氏汉语拼音排序)

蔡梅红	曹瑞兵	陈溥言	姜 焱
刘华雷	刘文波	卢建红	邱亚峰
苏鑫铭	王 艳	张素芳	周 斌
周海霞			

前 言

近年来，禽流感、口蹄疫和疯牛病等一系列畜禽传染病的暴发流行给全球社会和经济造成了巨大损失，直接威胁着食品安全和人类健康。为了弄清这些动物疾病的发生规律和防治方法，逐步控制和消灭这些动物疾病，各国在研究重大动物疫病的病原、流行病学、致病机理、诊断方法，新型疫苗的研制与免疫保护等领域投入了巨大的人力和物力，并取得了显著的进展，积累了丰富的经验。

与此同时，食品的生物安全已被提到重要议事日程，提倡绿色食品、限制抗生素的使用、加强食品中药物残留检测等，使传统的防治畜禽疾病的方法面临新问题和挑战，从而促进了新型、高效、安全的生物药品的研究与开发，并应用于动物疫病的防治。

高新技术，尤其是现代生物技术的应用推动了畜禽疾病防治领域许多研究的发展，如：细菌人工染色体技术在疱疹病毒结构与功能研究中的应用；反向遗传技术在研究禽流感病毒毒力基因和新型疫苗中的应用；假病毒技术在病毒进入细胞的机制的研究中的应用。重组伪狂犬病毒疫苗、重组腺病毒载体疫苗及重组马立克病毒疫苗的研究在新型基因工程活载体疫苗的研究中具有代表性，是新型动物疫苗的发展方向。重组动物干扰素与抗菌肽等新型生物制剂有望在提高动物免疫力、减少畜产品抗生素的残留以及控制耐药细菌的产生等方面发挥作用。应用基因工程技术建立的一些鉴别诊断方法能够区分野毒感染和疫苗接种，在动物疫病的根除计划中将发挥重大的作用。

本着“发展高科技、实现产业化”的战略思想，我们总结了近年来在动物传染病学研究中的一些新的研究方法和原理，以及新型重组疫苗、基因工程药物的研究现状、存在问题和展望，编著成书。真诚希望本书能在动物传染病防治高新技术研究方面起到抛砖引玉的作用。但因知识和能力所限，尽管尽了最大的努力，本书仍会存在不妥或错误之处。敬请广大专家和读者批评指正。

陈溥言

2005年6月

目 录

第一章 细菌人工染色体技术及其在动物病毒研究中的应用	1
第一节 概述	1
一、细菌人工染色体的构建及其发展	2
二、Cre/LoxP 位点特异性重组系统	2
三、细菌人工染色体的应用	4
第二节 伪狂犬病病毒细菌人工染色体及其应用	5
一、伪狂犬病毒	5
二、伪狂犬病病毒细菌人工染色体的构建	8
三、伪狂犬病病毒细菌人工染色体的应用	12
第三节 马立克病毒细菌人工染色体	13
一、基本原理	13
二、应用	14
三、展望	15
参考文献	15
第二章 假病毒技术及其应用	17
第一节 概述	17
第二节 假病毒技术的相关知识	18
一、表型及表型混合	18
二、反转录病毒的结构及特性	21
第三节 假病毒技术的原理及其应用	27
一、假病毒构建的原理	27
二、假病毒构建的方法	29
三、假病毒技术的优缺点	31
四、假病毒技术构建的一般程序	31
五、假病毒构建的注意事项	32
第四节 几种常用的假病毒构建体系	33
一、鼠类白血病病毒假病毒构建体系	33
二、人类免疫缺陷病毒假病毒构建体系	34

第五节 假病毒技术在禽流感病毒研究中的应用	36
一、禽流感概述	36
二、血凝素	36
三、禽流感病毒假病毒体系的构建	39
第三章 反向遗传技术与动物传染病的防制	44
第一节 概述	44
第二节 反向遗传技术的基本原理和发展概况	45
一、反向遗传技术的基本原理	45
二、反向遗传技术的发展	45
第三节 反向遗传技术的技术路线和要点	47
一、反向遗传技术的技术路线	47
二、反向遗传技术的要点	50
第四节 反向遗传技术在几个重要动物疫病防制中的应用前景	51
一、病毒基因结构与功能的研究	52
二、新型疫苗的研究	55
三、开发新型病毒载体	57
参考文献	59
第四章 禽痘病毒载体疫苗及其在动物生产中的应用	66
第一节 概述	66
第二节 禽痘病毒的分子生物学特性及其作为痘苗载体的优势	66
一、禽痘病毒	66
二、禽痘病毒表达载体的优点	67
第三节 重组禽痘病毒的构建	68
一、重组禽痘病毒的构建步骤	68
二、外源基因的表达调控结构	69
三、重组病毒的筛选	71
四、构建重组病毒时应注意的事项	72
第四节 重组禽痘疫苗在几种常见禽病防制中的应用	73
一、传染性法氏囊病重组疫苗	73
二、鸡新城疫重组疫苗	73
三、传染性支气管炎重组疫苗	74
四、传染性喉气管炎病重组疫苗	74
五、禽流感重组疫苗	75

六、马立克病重组疫苗	75
第五节 重组禽痘病毒疫苗的安全性及前景展望	78
一、安全性	78
二、应用前景	78
三、存在问题	78
参考文献	79
第五章 腺病毒和腺病毒载体的研究及应用	82
第一节 腺病毒及其特征	82
一、概述	82
二、腺病毒的基本特征	82
第二节 腺病毒载体及其应用	84
一、腺病毒载体的优点及改造策略	84
二、腺病毒载体的应用	85
参考文献	86
第六章 重组马立克病疫苗	87
第一节 马立克病毒载体	87
一、概述	87
二、马立克病毒生长的非必需区	88
第二节 预防禽病的重组马立克病毒疫苗	94
一、新城疫	94
二、传染性法氏囊病	97
三、结语	97
参考文献	97
第七章 重组伪狂犬病疫苗研究	102
第一节 伪狂犬病概述	102
第二节 伪狂犬病基因工程亚单位疫苗	103
第三节 伪狂犬病核酸疫苗	104
第四节 重组伪狂犬病毒疫苗	105
一、以腺病毒为载体的重组伪狂犬病毒疫苗	105
二、以痘苗病毒为载体的重组伪狂犬病毒疫苗	105
三、以猪痘病毒为载体的重组伪狂犬病毒疫苗	105
四、以其他疱疹病毒为载体的重组伪狂犬病毒疫苗	106
五、以伪狂犬病毒为载体的重组伪狂犬病毒疫苗	106

第五节 基因工程缺失疫苗	107
一、自然弱毒疫苗	107
二、缺失疫苗	108
三、插入报告基因的基因缺失疫苗	110
四、伪狂犬病毒基因缺失疫苗的优势	112
第六节 基因工程活载体疫苗	112
第七节 小结与展望	114
第八章 动物干扰素的研究及应用	115
第一节 干扰素概述	115
一、干扰素基因及其蛋白质	115
二、干扰素诱生剂	117
三、干扰素的生物学功能	118
四、干扰素生物工程	122
五、干扰素的应用	123
参考文献	124
第二节 基因工程猪干扰素的研究	126
一、猪干扰素的分类及其产生细胞	126
二、猪干扰素的基因工程研究	127
三、猪干扰素的抗病毒作用研究	129
四、重组猪干扰素免疫调节活性的研究	131
五、猪体内病原特异的 γ 干扰素水平与机体抗病毒免疫保护的相关性研究	132
六、结语	132
参考文献	133
第三节 鸡干扰素的研究与生产应用	135
一、鸡干扰素研究概况	135
二、国内重组鸡干扰素的最新研究进展	136
三、鸡的基因工程干扰素在临床使用时需了解的事项	139
四、重组鸡干扰素的应用前景	139
第四节 基因工程犬 α 干扰素	140
一、犬 α 干扰素研究现状	140
二、笔者实验室的工作	140
第九章 抗菌肽及其应用	142

第一节 抗生素问题及抗菌肽概况	142
第二节 抗菌肽的特性	143
一、抗菌肽与传统抗生素的差异	143
二、抗菌肽的结构特点	144
三、抗菌肽的作用机制	144
四、抗菌肽结构与功能的关系	147
五、胞膜结构对抗菌肽活性的影响	148
第三节 抗菌肽的来源与分布	148
一、哺乳动物抗菌肽	149
二、两栖类动物抗菌肽	152
三、昆虫抗菌肽	154
四、海洋生物抗菌肽	160
五、植物抗菌肽	161
第四节 抗菌肽的基因工程研究现状	163
第五节 抗菌肽目的基因的获得及相关技术	165
一、重叠区扩增基因拼接法	165
二、降落 PCR	168
三、正义链和反义链的磷酸化、退火	169
第六节 抗菌肽表达策略	170
一、抗菌肽原核表达策略	171
二、抗菌肽真核表达策略	176
三、抗菌肽基因工程表达产物的检测	177
第七节 抗菌肽的应用及其前景	177
一、抗菌肽在转基因工程中的应用	177
二、抗菌肽在医药生产中的应用	178
三、抗菌肽在食品防腐剂中的应用	178
四、抗菌肽在饲料添加剂中的应用	179
第十章 动物疫病诊断新技术	181
一、基因工程表达产物在动物疫病诊断中的应用	181
二、实时荧光定量 PCR 技术	192
三、实时 PCR 检测技术	196

第一章 细菌人工染色体技术及其在动物病毒研究中的应用

第一节 概 述

人工染色体,是指一类能在生物细胞中独立、稳定存在和遗传的人工重组 DNA 分子,它至少应具备三种功能元件的类似组分:复制原点 (origin of replication)、着丝点 (centromere) 和端粒 (telomere)。1983 年, Murry 把酵母染色体的着丝点、自主复制序列和端粒子连接在一起,构建成了第一个人工染色体,称为酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome, YAC)。在此基础上, Burke (1987) 构建了第一个 YAC 载体,它可插入上百万碱基对大小的外源 DNA,是大片段基因组文库构建、染色体步移或登陆、物理图谱构建和基因组结构分析等的有力工具。但由于 YAC 有嵌合、重排和缺失现象,其插入片段的分离较难,转化效率低等不足,使 YAC 的应用和研究工作受到限制,这促使科学家们去积极研究构建新的人工染色体。目前已成功构建并应用的人工染色体主要有酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome, YAC)、细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC)、来源于 P1 的人工染色体 (P1 derived artificial chromosome, PAC)、哺乳动物人工染色体 (mammal artificial chromosome, MAC) 和人类人工染色体 (human artificial chromosome, HAC)。另外,植物人工染色体 (plant artificial chromosome, PAC) 的构建也在进行中。表 1-1 总结了人工染色体的种类和特点。

表 1-1 人工染色体的种类和特点

名 称	宿主细胞	功能元件来源	结构	插入片段容量/kb	来 源
酵母人工染色体(YAC)	酵母细胞	酵母染色体	线状 DNA	100~2000	Murry 等,1983
细菌人工染色体(BAC)	大肠杆菌	大肠杆菌 F 因子	环状质粒	<350	Shizuya 等,1992
来源于 P1 人工染色体(PAC)	大肠杆菌	P1 噬菌体	环状质粒	<300	Loannon 等,1994

续表

名称	宿主细胞	功能元件来源	结构	插入片段容量/kb	来源
哺乳动物人工染色体(MAC)	哺乳动物细胞	哺乳动物染色体	线状 DNA	>10000	Farr 等,1995
人类人工染色体(HAC)	人组织细胞	人的染色体	线状 DNA	>10000	Harrington 等,1997
植物人工染色体(PAC)	植物细胞	植物染色体	线状 DNA	>10000	In progression

一、细菌人工染色体的构建及其发展

BAC 构建的基础是 *E. coli* 及 F 因子。研究表明, F 因子在 *E. coli* 中的复制受到严格控制而保持低拷贝, 一般为每细胞单拷贝或两个拷贝, 此外, F 因子具有携带 1Mb 插入片段的潜能, 这就使得以此为基础、构建具有大容量克隆能力的 BAC 载体成为可能。1989 年, O'Connor 等首次用“染色体建造”的方法, 利用 F 因子构建载体 pMBO131 来克隆大片段 DNA。3 年后, 以 pMBO131 载体为基础, Shizuya 等将 T7、SP6 启动子序列, 含 *cosN* 及 *LoxP* 位点的 λ 噬菌体和 P1 噬菌体片段分别引入 pMBO131 载体, 首次构建 DNA 插入片段达 300bp 以上的 pBAC108L 载体, 该载体即使传代 100 代后, 仍可稳定遗传, 尚未检出缺失、重组及嵌合现象。第一代 BAC 载体的选择标志基因为氯霉素抗性基因, 为进一步方便克隆的筛选, 许多在常规质粒载体中已成熟使用的选择性标志基因纷纷被引入第一代 BAC 载体。1997 年, Mejia 将 β -半乳糖苷酶 *LacZ* 基因及抗新霉素 *neo* 基因插入 pBAC108L 载体, 转染人类 fibrosarcoma 细胞系, 在含 X-gal、IPTG 的平板上生长 48h 后, 出现 4.5%~10% 的蓝色细胞; 在 G418 存在下直径为 10cm 的培养皿中培养 10d, 出现 10~20 个抗性克隆; 同年, Baker 构建了含荧光素酶或绿色荧光蛋白 GFP 的 BAC 载体, 以此载体克隆 70~170kb 的人类基因组 DNA 并转染 HeLa 细胞和成纤维细胞后, 便利地筛选出表达 GFP 的克隆。至此, 具有快速筛选克隆能力的第二代 BAC 载体构建完成。

二、Cre/*LoxP* 位点特异性重组系统

Cre/*LoxP* 系统由 Cre 重组酶及其识别序列 *LoxP* 位点组成。大肠杆菌 P1 噬菌体 *cre* 基因的 38.5ku[●] 产物 (该产物是一种重组酶) 能识别并催化 *LoxP*

● 1u=1Dalton.

位点间的重组；*LoxP* 位点含 34bp，包括被 8bp 间隔的两个 13bp 反向重复，每个反向重复及其临近的 4bp 构成一个 Cre 蛋白的结合区，如图 1-1、图 1-2、图 1-3 所示。

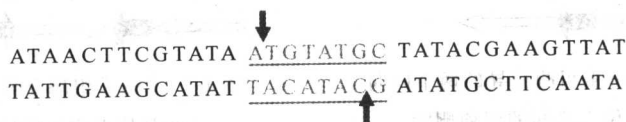


图 1-1 *LoxP* 序列

中部带下划线序列为核心序列，图示箭头所指为 Cre 酶切割位点

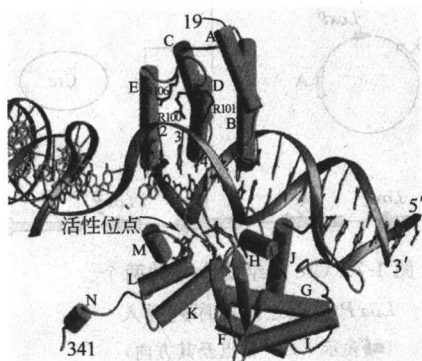


图 1-2 Cre 酶与 *LoxP* 位点结合
每一个 *LoxP* 位点可以结合两个 Cre

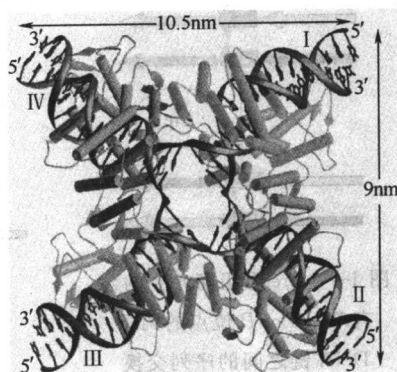


图 1-3 Cre 酶与 *LoxP* 位点结合介
导 DNA 链间的互换

DNA 链间的交换可发生在间隔区的 6bp 之间，一旦 Cre 重组酶介导的 DNA 剪切作用发生，便产生一个突出的 5' 末端。该间隔区是非对称性的，这种非对称性决定了 *LoxP* 位点具有方向性，从而最终决定了重组的拓扑学结果：非连锁分子间的重组能够形成共整合分子；同一分子内同向的两个 *LoxP* 位点间的 DNA 会由于重组的发生而被切除（图 1-4），而反向重复 *LoxP* 位点间的重组则导致 DNA 倒位（图 1-5），含有单一 *LoxP* 位点的两条 DNA 链之间发生序列交换（图 1-6），如果其中一条 DNA 链是环形的，则会发生序列的整合（图 1-7）。在基因组中 *LoxP* 序列自然发生的概率极低，其他相关序列引起的重组活性可以忽略不计。因此在应用该系统时就需要首先向目的系统中引入 *LoxP* 序列，然后通过一定的途径激活 Cre 重组酶的活性，以实现在 *LoxP* 位点的特异整合或重组。基于这一原理，Cre/*LoxP* 系统已在发育生物学、遗传学、基因工程及分子生物学领域得到了有效的利用。

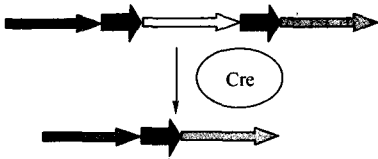


图 1-4 Cre 重组酶介导的两个同向 *LoxP* 位点之间的序列删除
(\blacktriangleright 表示 *LoxP* 位点及其方向)

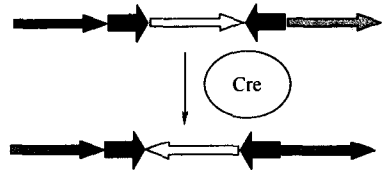


图 1-5 Cre 重组酶介导的两个反向 *LoxP* 位点之间的序列反转
(\blacktriangleright 表示 *LoxP* 位点及其方向)

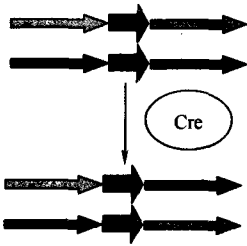


图 1-6 Cre 重组酶介导的含
有单一 *LoxP* 位点的两条
DNA 链之间的序列交换
(\blacktriangleright 表示 *LoxP* 位点及其方向)

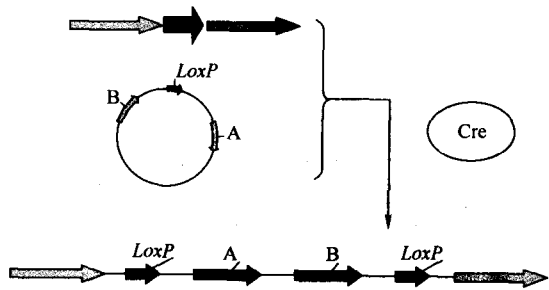


图 1-7 Cre 重组酶介导的两个
LoxP 位点之间的序列插入
(\blacktriangleright 表示 *LoxP* 位点及其方向)

三、细菌人工染色体的应用

BAC 载体一经构建成功，就被很快地应用于基因组文库的构建、基因的图位克隆、基因组物理图谱的构建、基因组测序、基因的组织结构分析以及基因表达调控和基因转化等研究中，它们在各类生物的基因组计划中发挥了重要作用。尽管 BAC 载体的插入片段小于 YAC，一般不超过 350kb，但其具有遗传稳定性好、嵌合率低、容易操作、转化效率高和筛选基因方便等优点，弥补了 YAC 的不足，所以一经问世就很快地代替了 YAC 应用于高等生物基因组文库的构建中。目前，许多生物的基因组文库都已被构建或在构建中。仅 Texas A&M BAC Center 现就有 50 多个动植物 BAC 文库。这些文库成为基因图位克隆、基因组物理作图、基因组组织结构分析和一些特殊基因组序列简单筛选的重要资源。

BAC 技术在克隆和研究病毒全基因组中也显示出巨大的应用价值。国外已经构建成了多种病毒的细菌人工染色体文库，在基因组测序、特异染色体文

库的构建、基因组物理图谱的构建以及基因转化等研究领域发挥了重要的作用。2000年, Gregory A. Smith等构建成功伪狂犬病病毒全基因组的细菌人工染色体, 随后利用此工具构建了许多重组病毒, 对该病毒的基因功能进行了深入研究, 并于2004年完成了该病毒全基因组的序列拼接。Daniel Schumacher等构建成功马立克病毒I型细菌人工染色体(MDV-I BAC), 利用此BAC系统方便地构建了第一个MDV-I *gB* 基因缺失株, 并证明 *gB* 基因对于病毒在细胞间的传递具有重要作用。2002年, Arban Domi等构建了痘苗病毒的细菌人工染色体(VAC BAC), 在BAC中稳定地插入了全长的VAC基因组。这个环化的质粒在大肠杆菌中稳定地复制, 并且具有感染性。在转染到哺乳动物细胞中时, 通过Cre/*LoxP*系统位点特异性重组的介导作用, 将BAC载体从病毒基因组中自动去除, 观察到了与野毒型相似的表现型。VAC BAC的成功构建, 为VAC中一些特殊序列的研究打下了基础。同年, Fu-Chun Zhou等构建了卡波西肉瘤病毒的细菌人工染色体(KSHV BAC), 此BAC具有感染性, 在大肠杆菌中同源重组; 对病毒基因组内一些未知基因的功能进行了分析, 建立了细胞模型, 为研究KSHV感染和致病机理的研究提供了有力的工具。

BAC能容纳大片段DNA, 能将分子量很大的基因组完整地克隆在一个载体上, 比以前所用的黏粒库等有较高的覆盖率, 可能使连不上的重叠群连接起来。而且可以方便地利用BAC分子克隆病毒全基因组, 进行基因功能的研究。因此, 尽管BAC的发展历史尚不足10年, 但却在大分子DNA的研究中得到了长足的发展, 并且随着研究的深入, BAC将越来越显示出其广阔的应用前景。

下面以伪狂犬病病毒细菌人工染色体构建工程为例来说明细菌人工染色体的建立方法及应用。

第二节 伪狂犬病病毒细菌人工染色体及其应用

一、伪狂犬病病毒

根据ICTV最新的病毒分类报告, 伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PrV)属于疱疹病毒科(Herpesviridae), α 疱疹病毒亚科(alphaherpesvirinae), 猪疱疹病毒I型(suid herpes virus I)。PrV在亲缘关系上与BHV-1、EHV-1以及VZV最近, 以在细胞培养上快速的溶细胞性、嗜神经性、神经潜

伏性和较宽的宿主范围为特征。PrV 的宿主几乎包括了除高等灵长类动物和人以外的所有哺乳动物及其他脊椎动物，并且能在来自温血和冷血动物的各种培养细胞上增殖，猪是 PrV 的自然宿主，并作为病毒的储存库。

PrV 的病毒粒子结构与所有其他疱疹病毒一样，是由含有基因组的核酸、含有 162 个壳粒的正二十面体的衣壳、蛋白质的皮层以及来自细胞膜的含有病毒编码（糖）蛋白的脂质双层囊膜构成（图 1-8，图 1-9）。

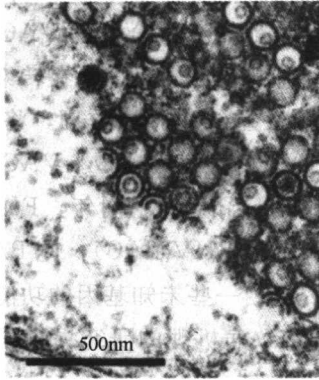


图 1-8 PrV 病毒粒子在细胞核中呈晶格状排列

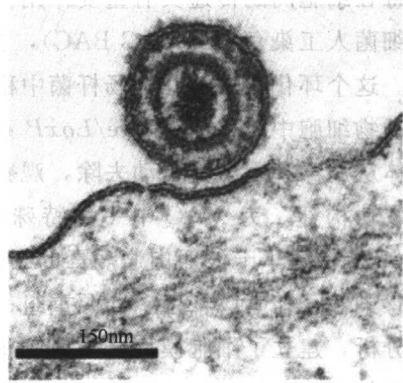


图 1-9 PrV 开始吸附 PSEK 细胞

PrV 的基因组是双股线性 DNA，大小 143461bp，G+C 含量高达 73%。病毒基因组由长独特区（UL）和短独特区（US），以及 US 两侧的末端重复序列（TR）与内部重复序列（IR）所组成。US 区的方向可与 UL 区一致，也可以相反，从而有两种异构体。目前基因组已经测序，当然，PrV 基因组的已测序列是由不同 PrV 毒株所测序列“拼凑”起来的。目前已确定的基因组的复制起点有 4 个，分别位于 UL 的左端、中部以及两个重复序列区（见图 1-10）。

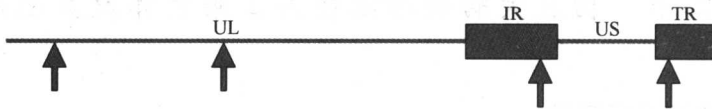


图 1-10 PrV 基因组结构

图中箭头表示基因组的 4 个复制起点，UL、US、IR、TR 分别表示长独特区、短独特区、内部重复序列和末端重复序列

伪狂犬病（PR）是家畜和野生动物的一种重要传染病，对猪的危害很大，现已成为仅次于口蹄疫和猪瘟的主要疫病之一。猪是本病的原发感染宿主，又

是病毒的长期储存宿主和排毒者。该病的发生和流行有两大特点：即以神经症状为主的两周龄内仔猪大批发病、死亡和以母猪繁殖障碍为特点的怀孕母猪流产、死胎、木乃伊胎或者弱胎和死胎。任何年龄的猪耐过 PrV 急性感染后，均能形成潜伏感染，病毒可在猪体内终生潜伏，且不表现临床症状，但在一定的条件下，潜伏状态的病毒能被激活，引起复发性感染并对外散毒，这种 PrV 潜伏-激活循环机制决定了 PrV 在感染猪群中永远存在，也因此对养猪业造成了极大危害。世界动物卫生组织（OIE）将其列为 B 类传染病，为畜产品进出口贸易必检项目之一。

PrV 具有宿主范围广、不感染人、基因组大和可供外源基因插入或替代的非必需基因多等特点，适合于将其改造成表达外源基因的活载体疫苗，国内外在这方面进行了诸多探索。Van Ziji 等以 TK、*gE* 和 11K 蛋白基因缺失减毒 PrV 作为活载体，把猪瘟病毒（classical swine fever virus, CSFV）的保护性抗原基因（即囊膜蛋白 *E2* 基因）与 PrV *gG* 启动子融合，构建了重组病毒。该重组病毒作为双价疫苗免疫，能使猪获得对 PrV 和 CSFV 两种强毒攻击的保护。其中对 CSFV 强毒攻击的完全保护需要 *E2* 蛋白 C 端疏水结构域的存在。*E2* 基因的插入不改变该 PrV 突变株的毒力和在培养细胞上的生长特性。Peeter 等把 CSFV *E2* 基因置于 hCMV *IE* 启动子控制下，将其整合于 PrV *gE* 基因缺失突变株的 *gD* 位点，构建了表达 *E2* 的 *gE*、*gD* 双基因缺失重组病毒。这种重组病毒作为双价疫苗，能使猪同时获得对 PrV 和 CSFV 两种强毒致死攻击的保护。由于 *gD* 基因缺失阻止了感染性 PrV 的产生，彻底解决了重组病毒的生物安全性问题。但比较而言，这种重组病毒的保护效果较差。Van Iddekinge 等把 CSFV *E2* 基因分别置于 PrV *gD* 启动子、*gE* 启动子和 hCMV *IE* 启动子控制下，将它们整合于 PrV 的 *gE* 位点。研究表明，整合于 PrV *gE* 位点的 *E2* 基因，只有在 hCMV *IE* 启动子控制下表达时，才具保护原性，即只有携带 hCMV *IE* 启动子控制的 *E2* 基因的 PrV 重组病毒才具有双价疫苗的作用。*gE* 位点插入外源基因不影响重组病毒的毒力和抗 PrV 强毒感染的保护效力，但插入该位点的 *E2* 基因的高效表达依赖于 hCMV *IE* 的控制。hCMV *IE* 启动子在真核细胞中起组成型启动子作用，其控制的 *E2* 基因表达开始于细胞感染早期并持续到感染细胞裂解期，这对于形成具有保护原性的完整 *E2* 蛋白是必要的。Knapp 等将牛疱疹病毒 I 型 (BHV-1) *gE* 和 *gI* 基因整合于 *gE*、*gI* 双缺失 PrV 突变株的 *gG* 位点进行表达，研究发现，*gE*、*gI* 双基因缺失的 PrV 病毒丧失的毒力因 BHV-1 *gE* 和 *gI* 基因的整合而恢复。表明 *gE-gI* 蛋白是不依赖于病毒和宿主的固有毒力