

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(5): 677-682; 4 May 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

表达 O 型口蹄疫病毒 VP1 基因的重组病毒 BHV-1 的构建与鉴定

任宪刚, 薛飞*, 朱远茂, 童光志, 王延辉, 冯军科, 祖立闯, 李娇, 史鸿飞, 高欲燃

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所大动物传染病研究室, 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

摘要【目的】为了构建表达口蹄疫病毒(O/China/99)VP1 基因的牛疱疹病毒 1 型, 将人工合成的口蹄疫病毒 VP1 基因插入到巨细胞病毒(CMV)启动子之下构建 gE 基因缺失转移载体。【方法】利用磷酸钙介导转染法将该转移载体与亲本病毒 BHV-1/gE⁻/LacZ⁺ 的基因组 DNA 共转染牛鼻甲细胞后收获增殖的病毒。通过筛选白色病毒蚀斑, 得到重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1。【结果】PCR 检测结果表明 VP1 基因已经插入到了重组病毒 BHV-1/gE⁻ 的基因组中, 间接免疫荧光试验和 Western blot 证实了 BHV-1/gE⁻/VP1 中的 VP1 基因在感染的细胞中获得了表达。【结论】本研究成功地构建了表达口蹄疫病毒 VP1 基因的重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1, 为研制口蹄疫及其他重要牛传染病的 BHV-1 病毒载体疫苗奠定了基础。

关键词: 口蹄疫病毒; VP1 基因; 牛疱疹病毒 1 型; 磷酸钙介导转染

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)05-0677-06

牛传染性鼻气管炎(Infectious bovine rhinotracheitis, IBR)是由牛疱疹病毒 1 型(Bovine herpesvirus-1, BHV-1)引起的以牛呼吸道病为主要临床症状的疾病, 是造成养牛业损失的一种重要传染病。BHV-1 为 α 疱疹病毒, 基因组为 135 kb 左右的双链 DNA, 像其他疱疹病毒一样, BHV-1 基因组中有许多病毒复制非必需基因, 可允许插入外源 DNA, 且 BHV-1 具有感染宿主范围小, 弱毒株致弱背景明确的优点, 是最有望成为构建多价牛传染病疫苗的理想载体, 现已有很多外源病毒 DNA 成功地插入到了 BHV-1 基因组中^[1-2]。

口蹄疫(Foot and mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus, FMDV)引起偶蹄

动物的一种高度接触性、传染性疾病, FMD 能够形成全球大规模流行, 造成巨大经济损失。FMDV 属于小 RNA 病毒科, 基因组为单股正链 RNA。研究证实结构蛋白 VP1 具有与细胞受体结合的主要功能, 是病毒感染细胞的关键, 且 VP1 蛋白可在体外实验及自然宿主中诱导产生中和抗体, 是研究各种 FMD 基因工程疫苗的首要候选蛋白。Kit 等于 1991 年构建了表达 FMDV(O1K)VP1 蛋白表位基因的重组 BHV-1, 其中 VP1 蛋白表位基因被插入到 BHV-1 gC 基因的氨基端, 与 gC 基因表达产物实现了融合表达。用该重组病毒免疫牛, 能够诱导产生抗 FMDV VP1 多肽的抗体, 并使免疫牛产生抗 BHV-1 强毒攻击感染的免疫保护^[3-4]。这一实验研究初步说明用

基金项目: 国家 863 计划(2006AA10A204)

* 通信作者。Tel: +86-451-85935154; E-mail: fxue@hvri.ac.cn

作者简介: 任宪刚(1978-)男, 黑龙江人, 博士研究生, 主要从事牛呼吸道病研究。

收稿日期: 2008-12-25; 修回日期: 2008-01-22

BHV-1 作载体来表达外源基因是可行的。

为了构建表达 FMDV VP1 基因的重组 BHV-1, 为研制口蹄疫及其他重要牛传染病的 BHV-1 病毒载体疫苗奠定了基础, 本研究利用人工合成的 O 型 FMDV(O/China/99)VP1 基因质粒与构建 BHV-1 gE 基因缺失转移载体时所用的质粒, 构建了含 VP1 表达盒的 gE 基因缺失转移载体, 该载体含有巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)早期启动子控制下的 VP1 基因、以及用于同源重组的 BHV-1gE 基因上游与下游同源重组序列。用该转移载体与自行构建的呈 gE 基因缺失、并引入大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因(β -Galactosidase gene, *LacZ*)的重组病毒 BHV-1/gE⁻/LacZ⁺ 基因组 DNA 共转染牛鼻甲细胞, 采用反向病毒蚀斑筛选法, 获得了表达 VP1 基因的重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1, 为 BHV-1 作为病毒活载体研制口蹄疫疫苗以及其他重要牛传染病疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、病毒与质粒:牛肾细胞(Madin-Darby bovine kidney, MDBK)和牛鼻甲细胞(Bovine Turbinate, BT)为本实验室保存;呈 gE 基因缺失、并引入大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因(β -Galactosidase gene, *LacZ*)的重组病毒 BHV-1/gE⁻/LacZ⁺ 为本实验室构建保存;O 型 FMDV(O/China/99)VP1 基因由上海生工有限责任公司合成并克隆至实 pUC57 载体, 命名为 pUC57-VP1 质粒;含有 BHV-1gE 基因的上游同源重组序列及巨噬细胞病毒早期启动子(cytomegalovirus immediate-early, CMV)控制下的 *LacZ* 基因的 pGEM-TgILdgELacZ 质粒以及含有 BHV-1gE 基因下游同源重组序列的质粒 pGEM-TgE_{SN} 均为本实验室构建并保存。

1.1.2 主要试剂:鼠抗 FMDV(O/China/99)VP1 蛋白多克隆抗体为本实验室制备;辣根过氧化物酶(HRP)标记和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗鼠 IgG 为 Sigma 公司产品。MEM 干粉培养基为 GIBCO 产品;新生牛血清为杭州四季青产品;T4 DNA 连接酶及限制性内切酶为 Promega 公司产品;甲基纤维素、低熔点琼脂糖为 BBI 公司产品, 其他试剂为国产分析纯。

1.2 细胞培养及病毒增殖

用含 10% 新生牛血清的 MEM 培养 MDBK 细胞和 BT 细胞, 用含 0.25% 胰蛋白酶、0.1% EDTA 的

PBS 消化分散细胞并按时培养传代。待细胞长成单层后, 接种用无血清的培养液适当稀释的病毒, 37℃ 孵育 1 h 后, 补加含 5% 新生牛血清的 MEM 继续培养, 当细胞病变达 80% 左右时收获病毒。

1.3 病毒基因组 DNA 的制备

用长成单层的 MDBK 细胞接种适当稀释的病毒后, 待病变达 80% 左右时, 弃去培养液, 以预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次, 加入细胞裂解液(含 1% SDS、100 μ g/mL 蛋白酶 K、1 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH8.0), 于 37℃ 水浴中继续作用 3 h。用酚-氯仿法抽提病毒基因组, 制备的基因组用于 PCR 扩增及病毒转染。

1.4 转移载体的构建

采用常规的分子生物学方法构建转移载体(图 1), 该载体含有巨细胞病毒(cytomegalovirus immediate-early, CMV)早期启动子控制下的 VP1 基因、以及用于同源重组的 BHV-1gE 基因上游与下游同源重组序列。

1.5 转移载体与亲本病毒 BHV-1/gE⁻/LacZ⁺ 基因组 DNA 的共转染

采用磷酸钙法进行转染, 将 2.5 μ g 经 *Nsi* I 酶切的 gE 基因缺失转移载体与病毒基因组共转染 BT 细胞, 用 25% 的 DMSO, 待出现 80% 细胞病变后收获培养物。

1.6 重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1 的筛选

将收获的病毒液冻融 3 次, 用 0.20 μ m 的针式过滤器过滤, 按 1:10 作倍比稀释后, 接种单层 MDBK 细胞, 37℃ 作用 1 h, 弃去病毒液, 覆盖含 2% 血清和 1% 甲基纤维素的 MEM, 于 37℃ 培养, 待出现明显病毒蚀斑时, 弃去 MEM, 并充分洗去甲基纤维素, 覆盖含 3% 血清和 1% 低熔点琼脂糖的 MEM, 并按 150 μ g/mL 浓度添加 X-gal 进行染色, 24 h 后观察结果。挑取分散较好的白色病毒蚀斑, 继续进行蚀斑克隆纯化, 直到所有病毒蚀斑均为白色。

1.7 重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1 的 PCR 鉴定

将获得的单一白色病毒蚀斑接种 MDBK 细胞进行增殖, 提取病毒基因组, 使用引物 5'-ATTAGGATCCATGGGGTTGACGCTCGCAGCAGAC-3' 和 5'-CGCCAAGCTTATTACGCCACAATCTTTTGTCTGTCT-3' 对 VP1 基因的插入进行鉴定。

1.8 VP1 基因表达的 Western blot 检测

分别以 100 TCID₅₀ 的重组病毒及亲本病毒感染 MDBK 细胞, 待细胞病变达 90% 时弃去培养液, 刮取细胞进行 SDS-PAGE 电泳, 并电转移至硝酸纤维素

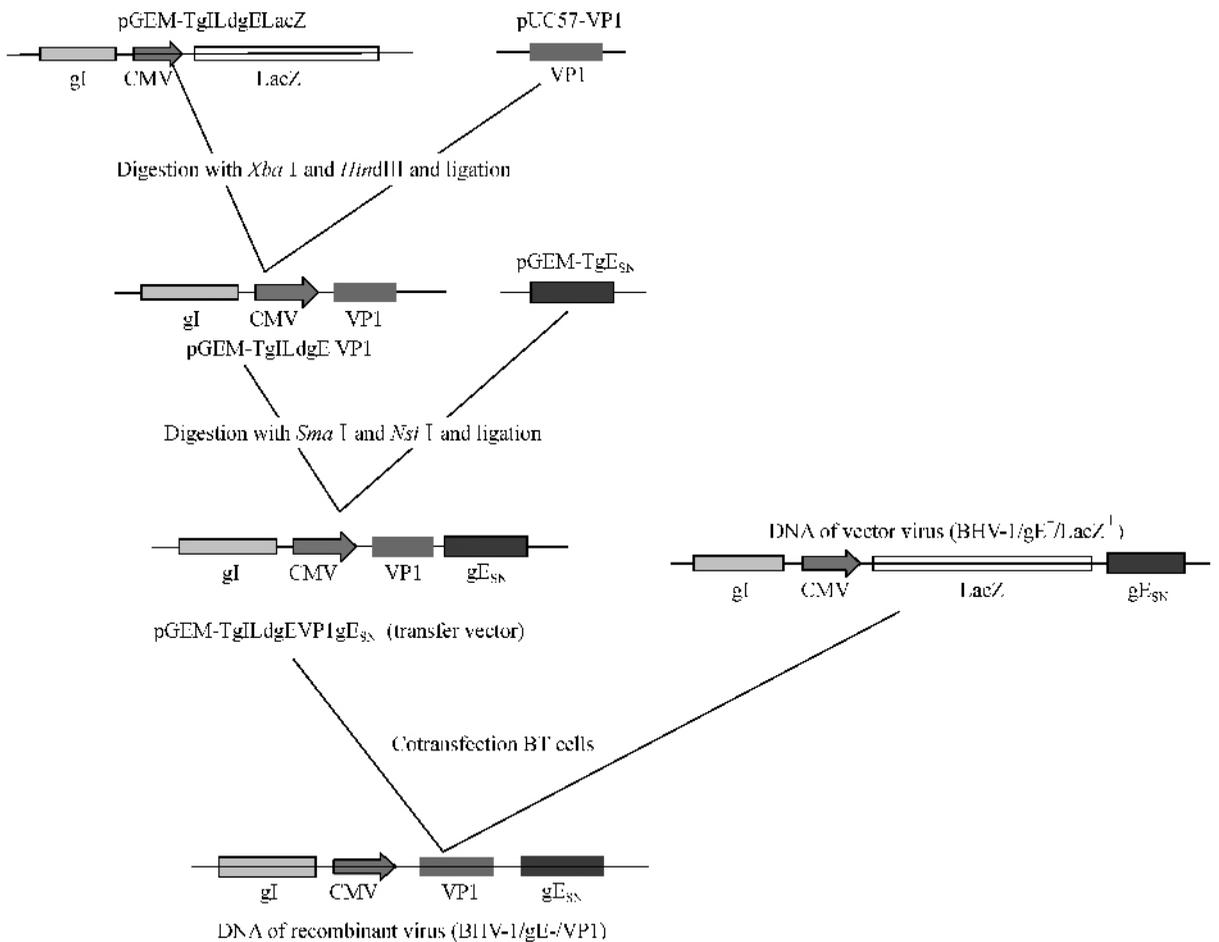


图 1 转移载体的构建

Fig.1 Construction of transfer vector. The plasmids pUC57-VP1 and pGEM-TgILdgelacZ were digested with *Xba*I and *Hind*III then ligated and the resulting plasmid named pGEM-TgILdgelacZ-VP1. pGEM-TgILdgelacZ-VP1 and plasmid pGEM-TgESN were then digested with *Sma*I and *Nsi*I and then resulted in the transfer vector pGEM-TgILdgelacZ-VP1-gESN. Recombinant BHV-1 expressing FMDV VP1 gene was acquired by homologous recombination between genomic DNA of vector virus and the transfer vector plasmid by cotransfection BT cells.

膜,以 1:200 稀释的鼠抗 FMDV VP1 蛋白的多克隆血清作为一抗、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1:2000)为二抗,在 4-氯-1-萘酚溶液中显色^[5]。

1.9 VP1 基因表达的 IFA 检测

分别以 100 TCID₅₀ 的重组病毒及亲本病毒感染 BT 细胞,待细胞病变达 90% 时弃去营养液,75% 的冷乙醇 4℃ 固定 30 min,1:50 稀释的鼠抗 FMDV VP1 的多克隆血清为一抗、FITC 标记的山羊抗鼠 IgG(1:100)作为二抗,荧光显微镜(Leica DMIRES2)下观察。

2 结果

2.1 转移载体的构建及共转染

成功构建了含有 VP1 表达盒的转移载体 pGEM-TgILdgelacZ-VP1-gESN,该转移载体含有用于同源重组的基因序列,用该转移载体与亲本病毒的基因组共转染 BT 细胞后,可发生同源重组,经筛选后可获得重组

病毒(见图 1)。

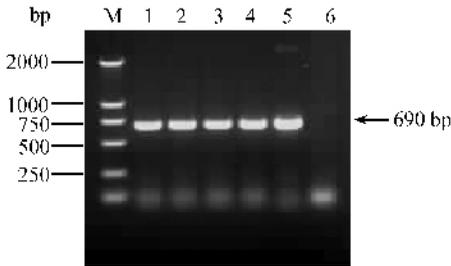
2.2 重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1 的筛选

收获的病毒液冻融 3 次,按 1:10 倍比稀释后接种 MDBK 细胞,以甲基纤维素固定病毒蚀斑,并以终浓度 150 μg/mL 的 X-gal 进行染色,挑取白色蚀斑,按此法筛选。经 3 轮的病毒蚀斑筛选后不再有蓝色病毒蚀斑出现。将白色病毒蚀斑连续纯化 15 轮后用于 PCR 及免疫印迹(Western blot)和间接免疫荧光试验检测。

2.3 重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1 的 PCR 鉴定

将获得的白色病毒蚀斑经 MDBK 细胞增殖后,提取病毒基因组 DNA,经 VP1 特异性引物扩增、琼脂糖凝胶电泳后,结果以白色病毒蚀斑制备的 DNA 样品均扩增出了约 690 bp 的特异性扩增条带,与预期大小相同,结果表明 FMDV VP1 基因已经成功插入到了重组病毒 BHV-1 基因组中(图 2),即已获得

了在 BHV-1/gE 基因位置插入 FMDV VP1 的重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1。同时用接种亲本病毒 BHV-1/gE⁻/LacZ⁺ 制备的对照 DNA 样品则无特异性扩增条带。

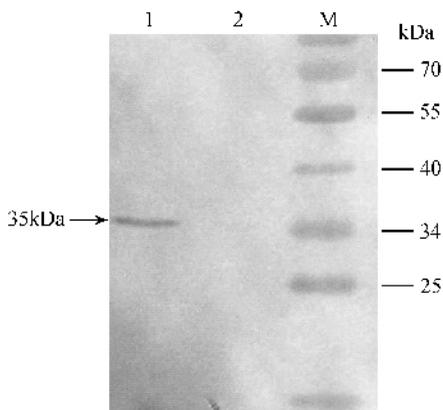


2.2 重组病毒的 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of recombinant virus by PCR. 1-4. MDBK cells infected with different virus plaques of recombinant BHV-1/gE⁻/VP1; 5. Positive control, pUC57-VP1 ϕ . MDBK cells infected with parental BHV-1/gE⁻/LacZ⁺; M. DNA Marker DL2000.

2.4 VP1 基因表达的 Western blot 检测

以重组病毒及亲本病毒感染 MDBK 细胞的裂解物进行 SDS-PAGE, 转移至硝酸纤维素膜后以抗 FMDV VP1 的多克隆抗体为一抗、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗分别作用后, 于 4-氯-1-萘酚溶液中显色。结果在接种重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1 的样品中可见一条大约 34 kDa 的免疫印迹条带, 与预期表达的 VP1 分子量理论值相符, 而接种亲本病毒 BHV-1/gE⁻/LacZ⁺ 的样品无免疫印迹条带(见图 3)。这说明 FMDV VP1 基因在重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1 感染的 MDBK 细胞中获得了表达。



2.3 重组病毒的 Western blot 检测

Fig.3 Analysis of recombinant virus by Western blot. 1. MDBK cell lysates infected with BHV-1/gE⁻/VP1; 2. MDBK cell lysates infected with BHV-1/gE⁻/LacZ⁺; M. Prestained protein marker(MBI).

2.5 VP1 基因表达的 IFA 检测

以重组病毒及亲本病毒分别接种感染 BT 细胞, 待出现 90% 细胞病变后, 以抗 FMDV VP1 多克隆抗体为一抗、FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗作用

后, 在荧光显微镜下观察。结果感染重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1 的 BT 细胞产生了绿色的特异性荧光, 而感染亲本病毒 BHV-1/gE⁻/LacZ⁺ 的 BT 细胞无可见荧光(见图 4)。这说明重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1 中的 VP1 基因在感染的 BT 细胞中获得了表达。

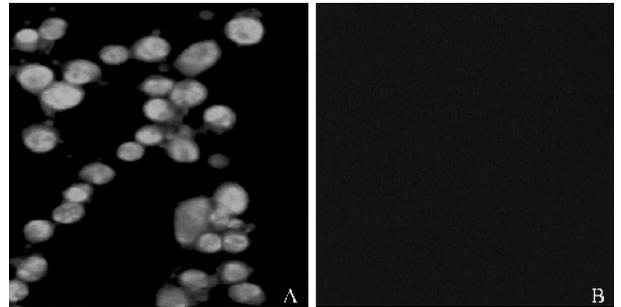


图 4 重组病毒的 IFA 鉴定

Fig.4 Identification of recombinant virus by IFA. A: BT cells infected with BHV-1/gE⁻/VP1 (100 fold); B: BT cells infected with BHV-1/gE⁻/LacZ⁺ (100 fold).

3 讨论

FMD 严重危害家畜的生产力和畜产品质量, 给畜牧业和进出口贸易造成较大的经济损失, 直接威胁着国际贸易和国家声誉及人类食品卫生安全。目前用于 FMD 防制的疫苗主要为灭活疫苗, 灭活疫苗能够诱导动物产生中和抗体, 在预防和控制 FMD 中发挥了重要的作用, 然而, 由于存在潜在的可引起 FMD 暴发的危险因素, 如灭活不彻底等, 使得开发新型 FMD 疫苗势在必行。这些新型疫苗包括基因工程亚单位疫苗、合成肽疫苗、病毒活载体疫苗、核酸疫苗和抗独特型抗体疫苗等。其中, 病毒活载体疫苗可以诱导动物机体产生体液免疫和细胞免疫, 保护效果更好, 应用前景更广, 因此也一直是研究口蹄疫新型疫苗的热点, 如以疱疹病毒、禽痘病毒、腺病毒等为载体的 FMD 疫苗^[6-8]。

IBR 也是造成养牛业损失的一种重要疫病, 其临床上主要表现为呼吸道症状、孕畜流产、犊牛脑膜炎等, 并且急性的 IBR 感染可继发严重的细菌感染, 造成患畜死亡。其病原 BHV-1 属于疱疹病毒科, 与其他疱疹病毒一样, BHV-1 基因组中有许多病毒复制非必需基因, 这些基因的缺失有的可以降低毒力, 如胸苷激酶基因 (thymidine kinase, TK)^[9], 有的基因缺失使得病毒基因不能编码产生相应的糖蛋白, 如 gE 基因, 以 gE 基因缺失突变株制备疫苗免疫动物, 动物不产生相应的抗体, 采用血清学方法可以区分疫苗免疫牛和感染牛, 因此又称为标记疫苗。目前, 一

些欧洲国家已经启动了旨在根除 IBR 的计划,这些计划的制定和实施就是以使用 IBR gE 缺失标记疫苗为基础的^[10]。另外非必需基因的缺失,能够允许其他牛病病原的保护性基因的插入,这样所构建的重组 BHV-1 有望制成二价或多价的基因工程活载体疫苗,达到一次免疫能够防制两种或多种重要牛传染病的目的。现已有多种外源病毒 DNA 成功地插入到了 BHV-1 的基因组,如牛病毒性腹泻病毒的 E2 基因已被成功地插入到了 BHV-1 的基因组中^[11-12]。

病毒活载体疫苗要求外源基因能够有效的表达。如 Kit 等将编码 FMDV VP1 蛋白表位的基因置于 BHV-1 gC 基因的启动子之下,构建的重组 BHV-1 免疫牛能够产生抗 FMDV 的多肽抗体,并能够抵御 BHV-1 强毒的攻击。Qian P 等将 VP1 基因插入到减毒的伪狂犬病毒 gG 基因的启动子之下构建重组病毒,用该重组病毒免疫动物,能够抵御伪狂犬病毒强毒的攻击,虽然对 FMDV 的攻击不能够提供完全的保护,但能够延迟发病,并能减轻临床症状,Qian P 等认为 gC 基因的启动子不是强启动子以及 VP1 蛋白只具有有限的抗原表位是造成对 FMDV 攻击只能提供部分保护的原因,而本研究是将整个 VP1 基因置于目前已知真核细胞中最强的启动子—CMV 启动子之下,使得 VP1 基因能够更有效地表达;与此同时,本实验室在此研究基础上,已经开展了将 FMDV 的整个结构蛋白(P1-2A)作为外源基因插入到 CMV 启动子之下来构建重组病毒的研究,以期得到免疫原性更好的疫苗株。疫苗的安全性是评价疫苗的重要指标,编码糖蛋白 gE 的基因不仅是 BHV-1 的非必需基因,而且也是 BHV-1 重要的毒力基因。中国兽医药品监察所于 20 世纪 80 年代从匈牙利引进一株经过多年使用、证实安全性良好的 BHV-1 弱毒疫苗株-Bartha-Nu/67,而本研究中所使用的亲本病毒 BHV-1/gE⁻/LacZ⁺就是将 BHV-1 Bartha Nu/67 株的 gE 基因人为缺失 1000 bp 左右,并且在基因缺失处插入了报告基因-LacZ 基因(未发表资料)。

此外,本研究所用的 VP1 基因序列信息来自中国农科院兰州兽医研究所于 1999 年从来自西藏牛舌水泡皮组织样品中分离的牛源 FMDV(O/China/99)基因组序列测定显示 VP1 基因系泛亚毒株分支^[13]。而泛亚毒株则是广泛流行于欧亚大陆的 FMDV,对牛具有较强的感染性与致病性。因此选用泛亚毒株的 VP1 基因序列信息来构建重组病

毒,有较强的针对性与实用性。由此可见,本研究所构建的重组病毒 BHV-1/gE⁻/VP1 具有明确的背景,有望成为一种良好的基因活载体疫苗,同时也为研制其他重要牛传染病的 BHV-1 活载体疫苗奠定了基础。

参考文献

- [1] 郭巍,朱远茂,薛飞,等.牛疱疹病毒 1 型作为活病毒载体的研究进展.中国生物工程杂志(*China Biotechnology*),2005(增刊):32-35.
- [2] Muylenkes B, Thiry J, Kirten P, et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research*, 2007, 38:181-209.
- [3] Kit M, Kit S, Little SP, et al. Bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus)-based viral vector which expresses foot-and-mouth disease epitopes. *Vaccine*, 1991, 9:564-572.
- [4] Kit S, Kit M, DiMarchi RD, et al. Modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine expressing monomer and dimer forms of foot-and-mouth disease capsid protein epitopes on surface of hybrid virus particles. *Archives Virology*, 1991, 120:1-17.
- [5] 薛飞,相文华,沈荣显.山羊试验感染绵羊进行性肺炎病毒的抗体应答反应.中国兽医学报(*Chinese Journal of Veterinary Science*),1998,28(18):126-128.
- [6] Qian P, Li XM, Jin ML, et al. An approach to a FMD vaccine based on genetic engineered attenuated pseudorabies virus: one experiment using VP1 gene alone generates an antibody responds on FMD and pseudorabies in swine. *Vaccine*, 2004, 22:2129-2136.
- [7] Zheng M, Jin N, Zhang H, et al. Construction and immunogenicity of a recombinant fowlpox virus containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virological Methods*, 2006, 136:230-237.
- [8] Du Y, Jiang P, Li Y, et al. Immune responses of two recombinant adenoviruses expressing VP1 antigens of FMDV fused with porcine granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine*, 2007, 25:8209-8219.
- [9] Kit S, Qvi H, Gaines JD, et al. Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves. *Archives Virology*, 1985, 86:63-83.
- [10] van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Veterinary Microbiology*, 1996, 53:43-54.
- [11] Kweon CH, Kang SW, Choi EJ, et al. Bovine herpes virus expressing envelope protein (E2) of bovine viral diarrhoea virus as a vaccine candidate. *Journal of Veterinary Medical*

Science, 1999, 61(4): 395 – 401.

- [12] Schmitt J, Becher P, Thiel HJ, et al. Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 by bovine herpesvirus-1 from synthetic ORF and incorporation of E2 into recombinant

virions. *Journal of General Virology*, 1999, 80: 2839 – 2848.

- [13] 张显升, 刘在新, 赵启组, 等. 口蹄疫病毒 China/99 基因组 RNA 序列测定及比较分析. 中国科学(C 辑) (*Science in China (Series C)*) 2003, 33(5): 461 – 467.

Construction and identification of recombinant BHV-1 expressing foot and mouth disease virus VP1 gene

Xiangang Ren, Fei Xue^{*}, Yuanmao Zhu, Guanzhi Tong, Yanhui Wang, Junke Feng, Lichuang Zu, Jiao Li, Hongfei Shi, Yuran Gao

(Division of Livestock Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract [Objective] In order to construct the recombinant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) which expressed foot and mouth disease virus (FMDV) VP1 gene, we constructed a BHV-1 gE gene transfer vector by inserting the synthetic VP1 gene of FMDV (O/China/99) under the immediate-early promoter of cytomegalovirus. **[Methods]** The mixtures of parental virus (BHV-1/gE⁻/LacZ⁺) DNA and transfer vector was transfected into bovine turbinate cells using calcium phosphate-mediated transfection. Then the propagated viruses were harvested. The recombinant BHV-1 (designated BHV-1/gE⁻/VP1) was obtained by selection for white virus plaques. **[Results]** PCR results showed that VP1 gene was successfully inserted into the genome of BHV-1/gE⁻. The expression of VP1 in infected cells was proved by indirect immunofluorescence assay and Western blotting. **[Conclusion]** The research provided a basis for development of BHV-1 vector vaccines for FMD and other important bovine infectious diseases.

Keywords : FMDV ; VP1 gene ; bovine herpesvirus-1 ; calcium phosphate-mediated transfection

(本文责编 : 张晓丽, 谷志静)