

DOI:10.13350/j.cjpb.240702

• 论著 •

表达传染性支气管炎病毒 S1 重组腺病毒的构建及免疫原性分析^{*}

何杰珩,袁子岚,程晴,梁志鹏,张新宇,陈高捷,池仕红,袁生,郭锦玥^{**},黄淑坚,温峰^{**}

(佛山科学技术学院生命科学与工程学院,广东佛山 528225)

【摘要】 目的 构建表达传染性支气管炎病毒 S1 蛋白的重组腺病毒,并进行初步免疫原性分析。 **方法** 本研究利用腺病毒表达载体系统,利用同义点突变技术,消除 IBV-S1 基因中的 *Pac* I 和 *Pme* I 限制性酶切位点;将已突变的 S1 基因克隆至 pShuttle-CMV-N-DsRed 穿梭质粒中;使用 *Pme* I 线性化处理携带目的基因的穿梭质粒,并与 pAdEasy-1 质粒同时转化进行同源重组;后将重组质粒转染 HEK 293 细胞,包装成重组 Adv,构建 S1-CMV-pAd(293)重组病毒;并进行免疫实验验证抗体。 **结果** PCR 扩增出 S1 基因,大小约为 1 700 bp。S1 和 pShuttle-CMV-N-DsRed 穿梭质粒经酶切及测序结果表明,成功构建 S1-CMV 表达载体;在 BJ5183 感受态中进行同源重组,测序结果表明成功构建 S1-CMV-Pad 重组质粒。利用 HEK-293 细胞包装成重组腺病毒,能稳定产生红色荧光;经 Western blot 和 IFA 验证重组病毒成功表达 S1 (RBD)蛋白;以 10^6 TCID₅₀/mL 滴度肌肉免疫雏鸡,7~21 d 后均可检测到 S1 抗体,且抗体浓度仍呈增长趋势。 **结论** 本研究所构建的 S1-CMV-pAd 重组 Adv 为之后的免疫保护试验研究及 IBV-Adv 疫苗构建提供了基础实验支撑。

【关键词】 传染性支气管炎病毒;S1;腺病毒载体;重组病毒

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)07-0751-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Jul.;19(7):751-755.]

Construction of a recombinant adenovirus expression vector for the S1 gene of infectious bronchitis

HE Jieheng, YUAN Zilan, CHEN Qing, LIANG Zhipeng, ZHANG Xinyu, CHEN Gaojie, CHI Shihong, YUAN Sheng, GUO Jinyue, HUANG Shujian, WEN Feng (College of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528225, Guangdong, China)^{***}

【Abstract】 Objective The objective of this study was to construct a recombinant adenovirus that expresses the S1 protein of infectious bronchitis virus (IBV) and conduct preliminary analysis of its immunogenicity. **Methods** The adenovirus expression vector system was utilized to remove the *Pac* I and *Pme* I restriction enzyme sites in the IBV-S1 gene through synonymous mutations. The mutated S1 gene was then cloned into the pShuttle-CMV-N-DsRed shuttle plasmid. The shuttle plasmid carrying the target gene was linearized using *Pme* I and co-transformed with the pAdEasy-1 plasmid for homologous recombination. The resulting recombinant plasmid was transfected into HEK 293 cells to package the recombinant adenovirus, leading to the construction of the S1-CMV-pAd (293) recombinant virus. Immunological experiments were conducted to verify the antibody response. **Results** The S1 gene was successfully amplified through PCR, yielding a fragment of approximately 1700 bp. Enzyme digestion and sequencing confirmed the successful construction of the S1-CMV expression vector. Homologous recombination was accomplished in BJ5183 competent cells, as evidenced by sequencing results of the S1-CMV-pAd recombinant plasmid. The recombinant adenovirus, packaged in HEK-293 cells, consistently expressed red fluorescence. Utilizing the polyclonal anti-S1 rabbit antibodies prepared in our laboratory as a primary antibody in this experiment. Western blot and immunofluorescence assays confirmed the successful expression of the S1 protein by the recombinant virus. Immunization of chicken muscles with a titer of 10^6 TCID₅₀/mL resulted in detectable S1 antibodies from 7 to 21 days, with antibody concentrations displaying an upward trend. **Conclusion** The constructed S1-CMV-pAd recombinant adenovirus serves as a foundation for future immunoprotection experiments and the development of IBV-Adv vaccines.

【Keywords】 infectious bronchitis virus; S1; adenovirus vector; recombinant virus

^{*} **【基金项目】** 广东省教育厅科研项目(No. 2022KTSCX124);广东大学生科技创新培育专项资金资助项目(No. pdjh2023b0547);佛山科学技术学院学生学术基金项目(No. XSJJ202309KJA01, XSJJ202309ZRB06)。

^{**} **【通讯作者】** 郭锦玥, E-mail: guojinyue12@163.com; 温峰, E-mail: wenf@fosu.edu.cn

【作者简介】 何杰珩(1999-),男,广东佛山人,在读硕士,主要从事兽医病毒学方面的研究。E-mail: hejieheng302018@163.com

传染性支气管炎病毒 (Infectious bronchitis virus, IBV) 是目前我国禽类疾病的重要病原^[1]。IBV 和其他病毒的单独、混合或同时感染, 或者引发的继发感染, 对家禽的健康和养殖场的经济收益产生巨大影响。IBV 属于冠状病毒科 γ 冠状病毒属的一个代表种, 病毒粒直径在 90~200 nm 之间^[2]。是有囊膜的单股、非节段的线性 RNA 病毒, 基因组全长约 27.6 kb^[3]。其基因组结构从 5' 到 3' 分别为 UTR-ORF1a/b-S-3a-3b-E-M-4b-4c-5a-5b-N-6b-UTR^[4], 约三分之二的基因组被由 ORF1a 和 ORF1b 组成的两个大型开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 占据, 它们是编码病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的组成部分^[5]。剩下的基因组编码 4 种结构蛋白 (S、M、E、N)^[6] 和 4 种非结构蛋白^[7]。其中 Spike (S) 蛋白是高度糖基化的跨膜蛋白, 以三聚体结构形成棒状或花瓣状的尖突; 其糖基化前分子质量 128~160 ku, 但糖基化单体为 150~200 ku^[8]。S 蛋白负责病毒吸附于细胞上, 其因暴露于核内体中的酸性 pH 触发构象变化, 导致病毒包膜与细胞膜融合^[9]。S 蛋白在裂解序列 (如 RRFR) 中会裂解形成 S1 亚基和 S2 亚基^[4]。其中 S1 位于 S 蛋白的 N 端, 其包含病毒中和抗原表位, 并携带血清型特异性决定因子^[10], 与病毒的抗原性或致病性的息息相关^[11]。S2 蛋白则主要负责病毒与细胞膜融合^[2], 其与 S1 相互作用可能决定病毒附着的亲和性和特异性^[9], 从而决定了病毒宿主的范围^[12]。因此, S1 基因的变异对于 IBV 新基因型和血清型的出现至关重要。根据对 S1 序列的发育分析, 将已知的 IBV 毒株分为 7 个基因型和 36 个系, 大量的血清型和基因型对 IBV 预防造成挑战^[13]。

针对传染性支气管炎病毒, 疫苗免疫是最主要的防控方式。传统疫苗主要包括灭活疫苗和减毒的活疫苗两种, 但是 IB 具有多种血清型, 传统疫苗的保护效力十分有限, 而且传统疫苗病毒株稳定性差, 更有甚者会出现毒力返强的现象。因此, 针对目前 IBV 的流行及疫苗免疫现状, 迫切需要发展下一代疫苗。腺病毒 (Adenovirus, Adv) 是目前已知的体内基因传递的宝贵工具, 极大地影响了 Adv 载体在疫苗开发和基因治疗中的作用^[14]。而在 Adv 载体疫苗应用中以 Ad5 载体最为广泛, 其工作原理是编码抗原的 DNA 序列在 Adv 载体驱动表达, 免疫宿主后编码相关抗原的蛋白质, 并在相关细胞内表达。这引起了 CD8⁺ T 细胞的反应, 以及针对编码的转基因抗原的体液免疫反应^[15]。Adv 载体具有的低致病性、高滴度、体内转导基因及不整合到宿主细胞基因组等众多特点, 是其能成为目前应用最为广泛的病毒载体之一的其中几个优势^[16]。总的来说, 腺病毒载体疫苗拥有更巨大的开发

潜力, 为新型疫苗的开发提供平台。

材料与方法

1 材料

1.1 质粒、菌株及细胞 IBV (ZH01) S1 基因质粒 (pMD18T-IBV-S1) 由本实验室保存。感受态细胞 *E. coli* XL10、*E. coli* Top 10 由本实验室保存; pShuttle-CMV-N-DsRed 穿梭载体、含 pAdEasy-1 质粒的 *E. coli* BJ5183 菌株及 Stbl3 感受态细胞购于碧云天有限公司。HEK-293 细胞由本实验室保存。

1.2 主要试剂 氨苄青霉素 (AMP⁺)、卡那霉素 (KAN⁺)、PVDF 转印膜、IBV-S1 兔多克隆抗体由实验室保存; *Pac* I 和 *Pme* I 限制性内切酶, 购买于 NEB 公司; 高保真酶, DNA 及质粒纯化试剂购于自赛默飞世尔科技公司; DNA marker DL5000/10000 购自艾科瑞生物工程有限公司; 蛋白分子质量标准购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 $\times$) 及 HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验动物 7 周龄雏鸡由本校覃丽梅老师惠赠。

2 方法

2.1 定点突变 *Pac* I 是 Adv 载体构建中需要使用的线性化酶。根据 S1 基因进行酶切位点分析 (<https://www.genscript.com/tools/restriction-enzyme-map-analysis>), pMD18T-IBV-S1 存在 *Pac* I 酶切位点, 设计突变引物将 S1 第 819 个碱基由 T 突变为 C, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。上游引物 5'-CTCTGGCGTTAATCAATTTTACTTTTAC-3'; 下游引物 5'-GTAAAAGTAAAATTGATTAACGCCAGAG-3'; 采用上海碧云天生物技术有限公司定点突变试剂盒进行同义突变, 50 μ L 体系: 待突变模板质粒 1 μ L; 10 $\times$ BeyoFusionTM Buffer 1 μ L; 上下游引物各 1 μ L; dNTPmix 5 μ L; BeyoFusionTM DNA Polymerase 1 μ L, 其余用 Ultra Pure Water 补足。在 PCR 产物中加入 1 μ L *Dpn* I, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 将点突变产物转化 XL10 感受态细胞, 涂布在 Amp 抗性的 LB 琼脂平板上, 12 h 后挑取单个菌落鉴定筛选, 并提取质粒和送测。

2.2 S1 穿梭载体构建及腺病毒载体同源重组 将突变后的 S1 连接于 pShuttle-CMV-N-DsRed 载体, 构建 S1-CMV 穿梭载体。并转化 Top 10 感受态细胞, 挑取单个菌落进行培养后, 进行菌液 PCR 筛选阳性菌, 提取质粒。使用 *Pme* I 酶单酶切 S1-CMV 穿梭载体。于 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 8 h 进行线性化处理, 后根据碧云天的 BeyoAP Alkaline Phosphatase 方案, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 进行去磷酸化处理。酶切产物进行 DNA 回收。

将线性化的质粒转化 pAdEasy-1/BJ5183 感受态细胞,均匀涂于含 Kan (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 琼脂平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h (培养过夜长出的单克隆可能会大小不一,正常大小的菌落有可能是没有酶切完全的穿梭质粒,而重组的腺病毒质粒因为质粒大生长速度慢,所长出的克隆会比较小)。挑选较小的克隆抽提质粒,并送测序验证,将测序正确的质粒命名为 S1-CMV-pAd。由于在 BJ5183 感受态细胞中的质粒提取率较低,因此将测序正确的 S1-CMV-pAd 质粒转化重组酶缺陷型菌株 Stbl3 感受态细胞,挑取单克隆于含 Kan(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中培养,后提取重组 Adv 表达质粒,再用 *Pac* I 大量酶切重组质粒,并纯化酶切线性化产物。

2.3 HEK293 细胞包装质粒及验证 按照每孔 4×10^5 个 HEK293 细胞接种于 6 孔板,利用 Thermo Fisher Scientific LipofectamineTM3000 转染试剂进行转染。待大部分细胞皱缩脱落,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融,收集上清液即为第一代病毒原液(P0),于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。将收集的第一代病毒原液加入细胞量约为 80%~90% 的 293 细胞,并在含 5% CO_2 细胞培养箱中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 扩增病毒。直至细胞出现细胞病变效应(Cytopathic Effect,CPE),分别收集细胞及上清,并反复冻融,离心收集病毒。连续进行传代三次,至病毒稳定,第四代开始进行重组 Adv 的大量扩增,收集病毒将扩增的病毒分装于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。根据细胞荧光表达结果,用 Karber 法计算病毒的 TCID_{50} 。利用 Western blot 和 IFA 免疫荧光验证重组腺病毒。

2.4 重组 Adv 鸡免疫及抗体检测 设计 3 个重复实验组及空白组,实验组及空白组分笼饲养。实验组重组 Adv 以 $10^6\text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ 的滴度免疫 50 日龄雏鸡,经肌肉注射 1.5 mL/只。空白对照组仅免疫 1.5 mL DMEM。免疫后的 0、7、14 及 21 d 从翅下静脉采血,并分离血清。使用实验室制备的 IBV-S1 蛋白为抗原,进行 ELISA 试验测定免疫后 S1 抗体滴度变化。

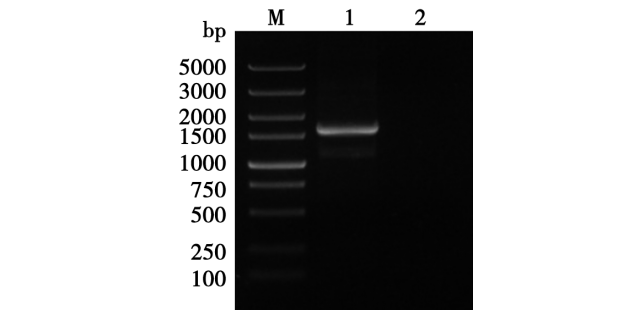
结 果

1 点突变实验

Pac I 限制性内切酶为 Adv 表达系统中特殊的线性化酶,对 S1 基因进行酶切位点分析,发现 S1 序列中存在的 *Pac* I 酶切位点。因此,对 S1 进行同义突变,以消除 S1 基因的 *Pac* I 酶切位点。测序结果显示,成功构建点突变质粒。

2 S1 基因的扩增

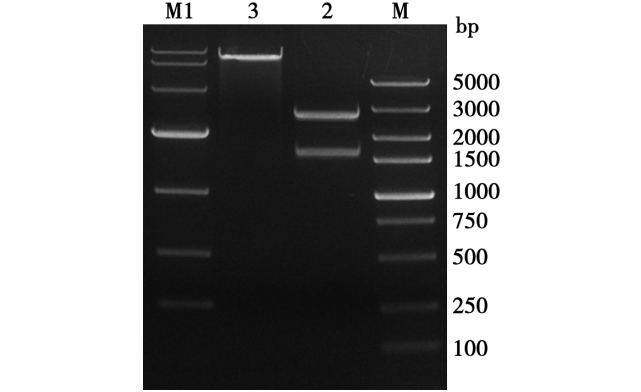
以上述点突变质粒模板扩增 S1 基因,具有 1 700 bp 左右的目的带(图 1),结果符合预期。



M DNA 标准 DL 5000 1 S1 2 阴性对照
图 1 S1 基因扩增
M DNA Marker DL 5000 1 S1 2 Negative control
Fig. 1 Amplification of the S1 gene

3 S1-CMV 的构建

回收将上述扩增的 S1 目的片段,并对 S1 片段进行双酶切处理,而 pShuttle-CMV-N-DsRed 穿梭质粒进行 *Bam*H I 单酶切,成功切出目的带(图 2)。回收正确的酶切片段,使用 T4 连接酶分别将 S1 基因连接至 pShuttle-CMV-N-DsRed 载体,进行转化并抽提质粒。S1-CMV 穿梭质粒经 *Pme* I 单酶切鉴定,在 9 000 bp 左右有目的条带,结果符合预期(图 3)。

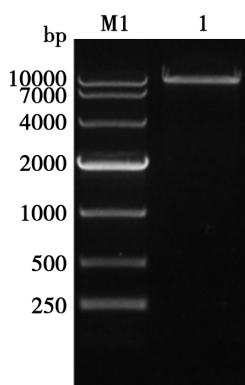


M DNA 标准 DL 5000 2 S1 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切 3
pShuttle-CMV-N-DsRed 空载 *Bam*H I 单酶切 M1 DNA 标准 DL 10000

图 2 *Bam*H I 和 *Sal* I 的酶切处理
M DNA Marker DL 5000 2 S1 *Bam*H I 和 *Sal* I Double enzyme digestion 3 Single enzyme digestion of pShuttle-CMV-N-DsRed empty *Bam*H I M1 DNA Marker DL 10000
Fig. 2 Enzyme digestion of *Bam*H I and *Sal* I

4 S1 重组腺病毒载体构建

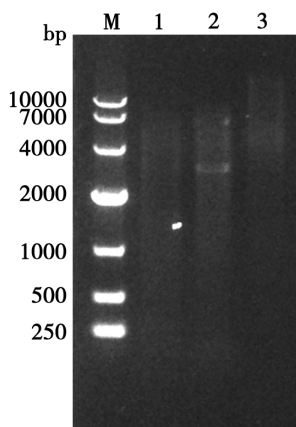
将经过线性化处理的 S1-CMV 转化至含 pAdEasy-1 载体的 BJ5183 感受态细胞中进行重组,由于重组 Adv 表达载体基因全长约为 35 kb,生长速度较慢,因此挑取小菌落进行验证。抽提表达质粒,通过 *Pac* I 酶切鉴定,S1 重组质粒样品有 30 kb 及 3 000 bp 的目的带(图 4)。经测序证实已经成功构建 S1 的 Adv 表达载体。重组 Adv 质粒分别命名为 S1-CMV-pAd。



M1 DNA 标准 DL 10000 1 S1-CMV

图 3 *Pme I* 酶切

M1 DNA Marker DL 10000 1 S1-CMV

Fig. 3 Enzyme digestion of *Pme I*

M DNA 标准 DL 10000 1 S1-CMV-pAd

图 4 串联载体 *Pac I* 酶切鉴定

M DNA Marker DL 10000 1 S1-CMV-pAd

Fig. 4 The tandem vector was identified by *Pac I* digestion

5 S1 重组重组腺病毒载体表达

S1-CMV-pAd 通过转染试剂转染至 293 进行表达,48 h 后倒置荧光显微镜拍摄结果显示成功表达红色荧光,如(图 5)所示。并且,随着时间的增加细胞感染增加,在第 7 d 可观察到“彗星云”现象。收集一代病毒,连续传代至病毒稳定。S1-CMV-pAd(293)重组病毒传至第四代能稳定复制,并且第四代滴度为 10^6 TCID₅₀/mL。

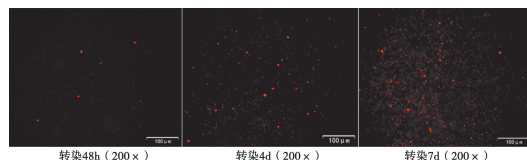


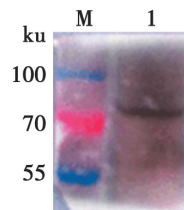
图 5 S1-CMV-pAd 转染结果

Fig. 5 Results of S1-CMV-pAd transfection

6 S1 重组重组腺病毒蛋白验证

使用实验室保存的 pET32a-S1(RBD)兔多克隆抗体为一抗,对 S1-CMV-pAd(293)表达的蛋白进行

Western blot 验证,结果显示出约 75 ku 目的条带(图 6)。通过 IFA 鉴定重组 Adv 感染 HEK293 细胞的蛋白表达,重组 S1-CMV-pAd(293)可检测出红色荧光及绿色荧光(图 7)。



M 蛋白 Marker 1 S1-CMV-pAd 表达的蛋白

图 6 重组腺病毒的 Western Blot 验证

M Protein Marker 1 S1-CMV-pAd protein

Fig. 6 Western blot validation of recombinant adenovirus and RBD protein

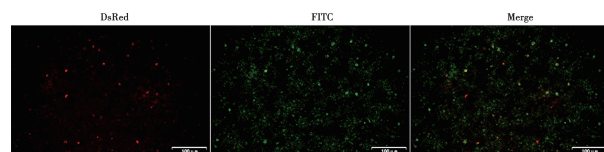


图 7 重组腺病毒的 IFA 鉴定

Fig. 7 Identification of recombinant adenovirus by IFA

7 重组腺病毒雏鸡免疫及抗体检测

使用本实验室保存的 S1 原核蛋白为抗原,检测免疫后 0、7、14 及 21 d 的小鸡血清 S1 抗体水平情况。在免疫 7 d 后 S1-CMV-pAd(293)免疫组的 S1 抗体开始上升,并在 14 d 和 21 d 后 S1 抗体仍呈上升状态,而对照组(DMEM)检测 S1 抗体水平持续平稳(图 8)。

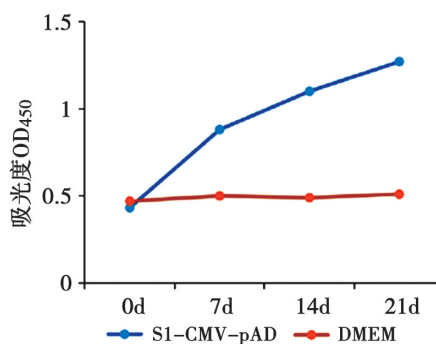


图 8 免疫后 S1 抗体增长曲线

Fig. 8 Growth curve of S1 antibody after immunization

讨论

IBV 是危害家禽产业健康发展的重要病原之一。其通过不断突变、重组,血清型、基因型也越来越复杂^[17],但是目前的疫苗免疫针对不同血清型或基因型的交叉保护作用有限。通过反向遗传技术等方式对疫苗株进行修改将有助于减少毒力返强现象^[18]。Ad5 最早于 1953 年在表现急性呼吸道症状人的腺样体中分离出^[19],后来被鉴定为人 Ad5 型(HAd5),而现在

Adv 基因型有 100 多种。与其他载体系统相比,Adv 具有较明显的优势。它们可以更容易地繁殖到高滴度和大量纯化,并支持外源基因的高水平表达。Adv 载体接种后先天免疫的激活导致抗原特异性体液和细胞介导的免疫应答^[20]。且已有研究表明重组腺病毒可用于表达不同的蛋白^[21]。Adv 系统的这些优点对于有效的疫苗保护至关重要。基于 Ad5 载体为体外基因转导、重组疫苗和基因治疗等领域提供有力的平台。

本研究基于 Ad5 载体构建 IBV S1 蛋白的重组腺病毒。通过对 S1 基因进行同义突变,消除基因中的 Pac I 酶切位点,即改变核苷酸位点而保留原始的氨基酸特性,测序结果显示成功突变。将 S1 基因克隆至 pShuttle-CMV-N-DsRed 载体构建穿梭质粒,经 Pac I 酶切处理后,转染至 HEK293 细胞,包装成可表达 S1 蛋白的重组腺病毒。由于 pShuttle-CMV-N-DsRed 载体可表达红色荧光蛋白,S1-CMV-pAd 重组腺病毒在转染后的 2~7 d 内均可检测到红色荧光蛋白表达,并且随着时间的增加荧光表达效果逐渐增强,并可稳定传至四代,第四代测得病毒滴度为 10^6 TCID₅₀/mL。经自制的兔抗 S1 抗体进行 IFA 和 Western blot 重复验证,证实 S1-CMV-pAd 能够介导真核细胞表达 IBV S1 蛋白,且以复制缺陷型 Ad5 型腺病毒为载体表达的 IBV S1 蛋白可被兔抗 IBV S1 阳性血清特异结合,这一结果与国内一些同类的研究相似^[22-23]。说明 S1-CMV-pAd 在 HEK293 细胞中表达的 S1 蛋白与天然的 S1 蛋白具有相似的免疫原性,为进一步研究该重组腺病毒在鸡体内的免疫学特性提供研究思路。以 10^6 TCID₅₀/mL 滴度肌肉免疫雏鸡,7 d 后可以检测到 S1 抗体,至 21 d 抗体仍呈增长趋势。说明本研究构建的重组腺病毒 S1-CMV-pAd 可以诱导雏鸡产生特异性的 IBV 抗体,为重组腺病毒载体疫苗构建提供基础。

【参考文献】

- [1] 赵静,薛佳,冯金玲,等. 2021 年鸡重要疫病的流行动态预测分析[J]. 中国兽医杂志,2021,57(2):1-6.
- [2] 蔡俊呈,任涛,陈礼斌,等. 鸡传染性支气管炎病毒研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技,2021,46(3):6-12.
- [3] Cavanagh D. Coronaviruses in poultry and other birds[J]. Avian Pathol,2005,34(6):439-448.
- [4] Houta MH, Hassan KE, El-sawah AA, et al. The emergence, evolution and spread of infectious bronchitis virus genotype GI-23 [J]. Arch Virol,2021,166(1):9-26.
- [5] Chen Y, Jiang L, Zhao W, et al. Identification and molecular characterization of a novel serotype infectious bronchitis virus (GI-28) in China [J]. Vet Microbiol,2017,198:108-115.
- [6] 封柯宇. 中国鸡传染性支气管炎病毒基因型变迁与 H120 株重组疫苗载体构建[D]. 华南农业大学,2019.
- [7] Ma T, Xu L, Ren M, et al. Novel genotype of infectious bronchitis virus isolated in China[J]. Vet Microbiol,2019,230:178-186.
- [8] Masters PS. The molecular biology of coronaviruses[J]. Adv Virus Res,2006,66:193-292.
- [9] Wickramasinghe IN, Van beurden SJ, Weerts EA, et al. The avian coronavirus spike protein [J]. Virus Res,2014,194:37-48.
- [10] Wickramasinghe IN, De vries RP, Grone A, et al. Binding of avian coronavirus spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity[J]. J Virol, 2011, 85 (17): 8903-8912.
- [11] Domanska-blicharz K, Lisowska A, Piku AA, et al. Specific detection of GII-1 lineage of infectious bronchitis virus[J]. Lett Appl Microbiol,2017,65(2):141-146.
- [12] Promkuntod N, Wickramasinghe IN, De Vrieze G, et al. Contributions of the S2 spike ectodomain to attachment and host range of infectious bronchitis virus [J]. Virus Res,2013, 177(2):127-137.
- [13] Hou Y, Zhang L, Ren M, et al. A highly pathogenic GI-19 lineage infectious bronchitis virus originated from multiple recombination events with broad tissue tropism[J]. Virus Res, 2020,285:198002.
- [14] Alhashimi M, El-kashif A, Sayedahmed EE, et al. Nonhuman adenoviral vector-based platforms and their utility in designing next generation of vaccines for infectious diseases[J]. Viruses, 2021,13(8):1493.
- [15] Kerstetter LJ, Buckley S, Bliss CM, et al. Adenoviral vectors as vaccines for emerging avian influenza viruses [J]. Front Immunol,2020,11:607333.
- [16] Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy[J]. J Gene Med,2004,6(Suppl 1):S164-171.
- [17] Rohaim MA, El naggar RF, Abdelsabour MA, et al. Evolutionary analysis of infectious bronchitis virus reveals marked genetic diversity and recombination events[J]. Genes (Basel),2020,11(6):605
- [18] Bande F, Arshad SS, Bejo MH, et al. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis[J]. J Immunol Res,2015,2015:424860.
- [19] Hilleman MR, Werner JH. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1954,85(1):183-188.
- [20] Wang WC, Sayedahmed EE, Mittal SK. Significance of preexisting vector immunity and activation of innate responses for adenoviral vector-based therapy[J]. Viruses,2022,14(12): 2727.
- [21] Cabrera-mora M, Fonseca JA, Singh B, et al. A recombinant chimeric Ad5/3 vector expressing a multistage plasmodium antigen induces protective immunity in mice using heterologous prime-boost immunization regimens[J]. J Immunol,2016,197 (7):2748-2761.
- [22] 耿合员,孙元,韩宗玺,等. 表达鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因重组腺病毒的构建[J]. 中国预防兽医学报,2011,33(3):173-176.
- [23] 宋菲菲,康震,齐艳君,等. 表达鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白重组腺病毒的构建及免疫原性的初步分析[J]. 畜牧兽医学报, 2012,43(9):1449-1454.

【收稿日期】 2023-12-22 【修回日期】 2024-03-10