

表达猪瘟病毒 E0-E2 基因重组腺病毒疫苗 在兔体上的免疫原性分析

张小苗^{1,2△}, 张恒^{2△}, 杨玉艾¹, 张志³, 孙健², 陶晓珊², 李晓成³, 范根成^{2*}, 孙永科^{1*}

(1. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南昆明 650201; 2. 青岛易邦生物工程有限公司

山东省动物疫苗重点实验室, 山东青岛 266114; 3. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032)

摘要: 研究表达猪瘟病毒 E0-E2 基因重组腺病毒疫苗(rAd-E0-E2)在兔体上的免疫原性, 并确定其最小免疫保护剂量。将 rAd-E0-E2 按 10 倍梯度稀释为 $10^{7.0}$ IFU、 $10^{6.0}$ IFU、 $10^{5.0}$ IFU, 分别免疫接种家兔, 14 d 后, 用猪瘟脾淋苗对各组兔子进行攻毒。结果 $10^{7.0}$ IFU 组和猪瘟脾淋苗组均未出现定型热反应(0/4), 脾重/体重指数比值分别为 0.055%、0.05%, 脾组织切片均未见充血、淤血, 用 RT-PCR 和 IFA 方法均未检测到脾脏内有猪瘟脾淋苗病毒; $10^{6.0}$ IFU 组 3/4 出现定型热反应, 脾重/体重指数比值为 0.074%, 脾组织切片 3/4 可见充血、淤血, 用 RT-PCR 和 IFA 方法可检测到 3/4 脾脏有猪瘟脾淋苗病毒; $10^{5.0}$ IFU 组和对照组全部出现定型热反应(4/4), 脾重/体重指数比值分别为 0.099% 和 0.102%, 脾组织切片充血、淤血严重, 用 RT-PCR 和 IFA 方法均可检测到兔子脾脏内有猪瘟脾淋苗病毒。结果表明与对照组均不保护和猪瘟脾淋苗组全部保护相比, rAd-E0-E2 在兔体的最小免疫保护剂量为 $10^{7.0}$ IFU, 本研究成功完成了 rAd-E0-E2 在兔体上的免疫原性分析。

关键词: 猪瘟病毒; E0-E2 基因; 重组腺病毒疫苗; 兔; 免疫原性

中图分类号: S852.651

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2015)09-0008-05

DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2015.09.003

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由黄病毒科瘟病毒属的猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种猪的高度接触性传染病, 病死率极高, 给世界养猪业造成了巨大的经济损失。我国面对这样的烈性传染病采用疫苗接种来预防其发生, 降低发病率和死亡率。猪瘟疫苗的发展经历了早期的灭活疫苗、弱毒疫苗、基因工程疫苗。目前广泛使用的是弱毒疫苗, 我国批准使用的弱毒疫苗是由中国兽医药品监察所研制的猪瘟疫化弱毒疫苗^[1]。长期以来, 猪瘟疫化弱毒疫苗的普遍使用, 使 CSFV 野毒株及疫化弱毒抗原发生了变异, 出现了慢性感染、隐性感染等非典型流行形式, 很难区分猪群中的疫苗免疫猪和野毒感染猪, 致使疫情难以控制, 或造成免疫失败, 这不但影响猪群中猪瘟的净化, 而且给猪肉出口造成障碍^[2-3]。为此, 研制更安全、更高效可以进行鉴别诊断的新型基因工程标记疫苗是全世界养猪业的迫切要求。本实验室从 pMD18-T-E0 质粒、pMD18-T-E2 质粒中扩增编码 E0、E2 基因, 构建重组腺病毒穿梭质粒 pAd Track-

E0、pAd Track-E2。通过 PET32a 载体将 E0 和 E2 基因串联, 形成 PET-E0-E2, 然后再将 E0-E2 克隆到腺病毒穿梭载体上得到重组腺病毒穿梭质粒 pAd Track-E0-E2, 转化到大肠埃希菌 BJ5183 感受态细胞中, 得到重组腺病毒骨架载体 pAd Easy-E0-E2, 转染人胚胎肾细胞(HEK 293), 获得了含有目的基因的重组腺病毒(rAd-E0-E2)^[4-7]。通过对家兔接种 10 倍梯度稀释的 rAd-E0-E2, 14 d 后用猪瘟脾淋苗攻毒, 每隔 6 h 测兔体温, 通过体温的变化、脾重/体重指数比(%)、脾脏组织病理学变化、RT-PCR 和 IFA 方法对猪瘟脾淋毒攻毒兔进行检测和分离鉴定等技术共同判断说明 rAd-E0-E2 在兔体的免疫保护效力以及最小免疫保护剂量。分析表达猪瘟病毒 E0-E2 基因重组腺病毒疫苗(rAd-E0-E2)在兔体的免疫原性, 确定出最小免疫保护剂量^[8]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验用病毒、疫苗、细胞、实验动物 猪瘟重组腺病毒疫苗(rAd-E0-E2), $\geq 2 \times 10^{7.0}$ IFU/mL^[9],

收稿日期: 2015-07-09

基金项目: 云南省高校兽医公共卫生重点实验室资助(A3007954)

作者简介: 张小苗(1989—), 女, 云南保山人, 硕士研究生, 主要从事分子病原学与免疫学研究。张恒(1987—), 男, 山东新泰人, 硕士, 兽医师, 主要从事动物分子病毒学与新型动物疫苗研究。△同等贡献作者。*通讯作者

其毒价测定采用 IFA 方法^[10-11]得到,由青岛易邦生物工程有限公司技术中心(山东省动物疫苗重点实验室)冻干保存,作为试验样品稀释接种家兔;猪瘟活疫苗(兔源)简称猪瘟脾淋苗,批号 201401,20 头份/mL,由青岛易邦生物工程有限公司冻干苗车间生产,用于作为本试验的阳性对照;ST 细胞,由本实验室液氮罐保存;1.5 kg~3 kg 健康易感 SPF 家兔购自青岛康大兔业发展有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 双抗、1×PBS、80%冷丙酮、500 mL/L 甘油,柱式动物 RNAout 提取试剂盒,北京天恩泽公司产品;两步法 RT-PCR 试剂盒、Taq PCR Master Mix, TaRaKa 公司产品;体温计,上海鹿得医疗器械贸易有限公司产品;玻璃研磨均浆器,涿州市琦瑞玻璃制品厂产品;电子天平(JA1103 型),上海民桥精密科学仪器有限公司产品;核酸电泳仪(YYD-8C 型),北京六一仪器厂产品;PCR 仪(Applied Biosystems),爱普拜斯应用生物系统贸易(上海)有限公司产品;BIO-RAD Gel Doc XR+ 凝胶成像系统,美国伯乐产品;CO₂ 培养箱(RCO3000T-5-VBC),REVC0 产品;荧光显微镜,Olympus 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 免疫前后体温测定 购回兔子的第 3 天开始上下午各测体温 1 次,连续测 3 d,从 28 只兔子中挑选体温波动不大(± 0.5 °C)的 20 只,随机分成 5 组,每组 4 只,1、2、3 组按照 $10^{7.0}$ 、 $10^{6.0}$ 、 $10^{5.0}$ IFU/只剂量肌肉注射 rAd-E0-E2 疫苗;4 组肌肉注射每头份 150 倍稀释的猪瘟脾淋苗;5 组为生理盐水对照。同时上、下午各测体温 1 次,连续测 3 d。

1.2.2 攻毒前后体温测定 免疫后第 14 d 攻毒,用无菌生理盐水将每头份猪瘟脾淋苗稀释 150 倍,通过耳静脉注射给每组家兔,攻毒剂量为 1 mL/只,攻毒前 2 d 和攻毒当天上、下午各测体温 1 次,攻毒 24 h 后,每隔 6 h 测体温 1 次,连续测 3 d 至体温恢复正常。

1.2.3 攻毒后脾重/体重指数 将攻毒后体温恢复正常的家兔称重、解剖取脾脏称重,计算脾重/体重指数比(%),通过图表说明 rAd-E0-E2 受保护组与未受保护组的差异情况,同时做脾脏切片,观察脾脏的病理变化。

1.2.4 RT-PCR 检测脾脏中猪瘟脾淋毒 取各组家兔脾脏用匀浆器充分研磨,按柱式动物 RNAout 提取试剂盒提取 RNA,以猪瘟脾淋苗特异性引物进行 RT-PCR 检测脾脏中的猪瘟脾淋疫苗毒,进一步证明 rAd-E0-E2 的保护效力^[12-14]。

1.2.5 IFA 分离鉴定脾脏中猪瘟脾淋毒 取各组家兔脾脏加 PBS(含双抗)低温下充分研磨,组织悬液离心后经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤器过滤。同时,将猪睾丸细胞系(ST 细胞)铺平于 6 孔板中,当细胞长到 80% 单层时,接种过滤的悬液,盲传 3 代。将 ST 细胞用冷丙酮 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 固定 30 min,1×PBS 洗涤 3 次,将 1:300 稀释的猪瘟病毒特异性抗体加到固定好的 ST 细胞上, 37°C 孵育 1 h,1×PBS 洗涤 3 次,再加 1:500 稀释的 FITC 标记的兔抗猪 IgG, 37°C 孵育 1 h,1×PBS 洗涤 3 次,6 孔板中每个孔加适量 500 mL/L 甘油,在荧光显微镜下观察试验结果^[15]。

2 结果

2.1 免疫前、免疫后实际测温结果

按照 1.1 的方法进行实际测温,将结果绘制时间-体温曲线(图 1),从图 1 中可以看出,免疫前各组家兔体温波动不大;用 rAd-E0-E2($10^{7.0}$ 、 $10^{6.0}$ 、 $10^{5.0}$ IFU)免疫组家兔体温在正常范围内,用猪瘟脾淋苗免疫组家兔出现兔体反应热(≥ 40.5 °C)与常规猪瘟脾淋苗检测结果一致^[16]。

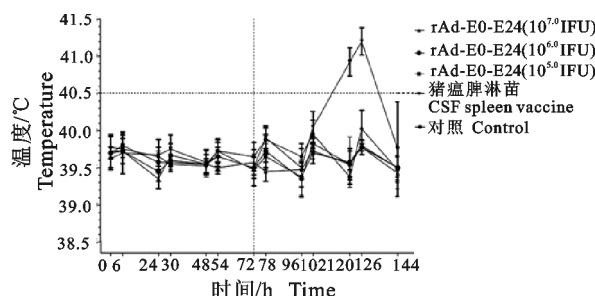


图 1 免疫前后实际测温

Fig. 1 Actual temperature detected before and after immunization

2.2 rAd-E0-E2 对免疫兔的保护作用

免疫 14 d 后,各组兔子用猪瘟脾淋苗攻毒,将实际测温情况绘制时间-体温曲线(图 2),从图 2 中可以看出,攻毒前 2 d 各组免疫兔体温在正常波动范围内(< 40.5 °C),攻毒后 $10^{7.0}$ IFU 组(0/4)和猪瘟脾淋苗组(0/4)均未出现定型热反应, $10^{6.0}$ IFU 组(3/4)出现定型热反应, $10^{5.0}$ IFU 组(4/4)出现定型热反应,对照组(4/4)出现定型热反应^[17-18]。

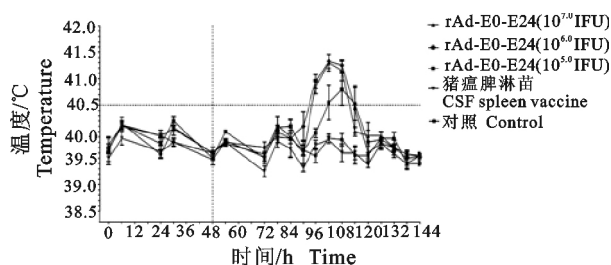


图 2 用猪瘟脾淋毒攻毒后免疫兔产生的定型热反应

Fig. 2 Fever reactions of the immunized rabbits following challenge with CSF spleen virus

2.3 攻毒后脾重/体重指数

经脾重/体重指数比分析发现(图 3), $10^{7.0}$ IFU 组与 $10^{5.0}$ IFU 组、 $10^{7.0}$ IFU 组与对照组差异显著($P < 0.05$); 猪瘟脾淋苗组与 $10^{5.0}$ IFU 组、猪瘟脾淋苗组与对照组差异显著($P < 0.05$); 然而, $10^{7.0}$ IFU 组与 $10^{6.0}$ IFU 组、 $10^{7.0}$ IFU 组与猪瘟脾淋苗组、 $10^{6.0}$ IFU 组与 $10^{5.0}$ IFU 组、 $10^{6.0}$ IFU 组与猪瘟脾淋苗组、 $10^{6.0}$ IFU 组与对照组、 $10^{5.0}$ IFU 组与对照组差异不显著($P > 0.05$)。

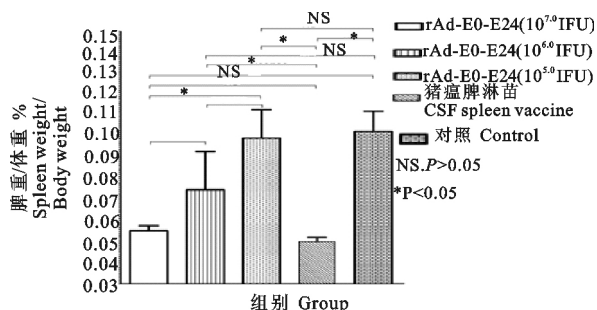
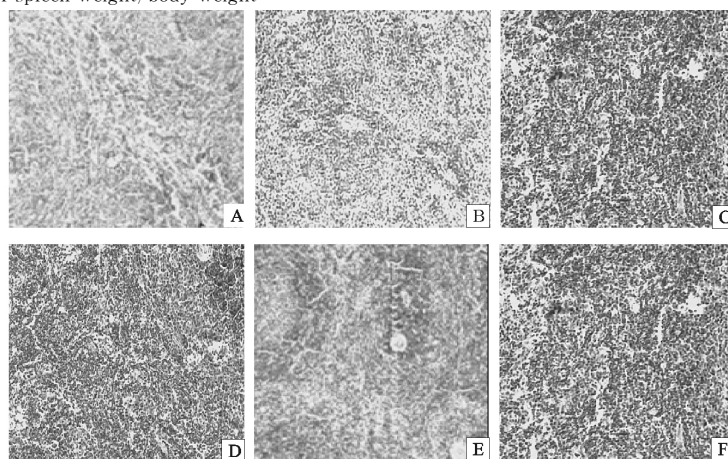


图 3 脾重/体重指数比

Fig. 3 Percentage of spleen weight/body weight



A. $10^{7.0}$ IFU; B. $10^{6.0}$ IFU(保护); C. $10^{6.0}$ IFU(未保护); D. $10^{5.0}$ IFU; E. 猪瘟脾淋苗; F. 对照

A. $10^{7.0}$ IFU; B. $10^{6.0}$ IFU(protected); C. $10^{6.0}$ IFU(unprotected); D. $10^{5.0}$ IFU; E. CSF spleen vaccine; F. Control

图 4 不同组脾脏病理组织学观察结果(HE, 200×)

Fig. 4 Histopathological observation results of spleen in different groups(HE, 200×)

表 1 RT-PCR 检测猪瘟脾淋病毒

Table 1 RT-PCR detection of CSF spleen virus

组别 Groups	疫苗 Vaccine	剂量 Dose	保护比 Protection ratio
1	rAd-E0-E2	$10^{7.0}$ IFU	4/4
2	rAd-E0-E2	$10^{6.0}$ IFU	1/4
3	rAd-E0-E2	$10^{5.0}$ IFU	0/4
4	猪瘟脾淋苗 CSF Spleen vaccine	1/150	4/4
5	生理盐水 Normal saline	1 mL	0/4

2.6 IFA 分离鉴定脾脏中猪瘟脾淋毒

间接免疫荧光(IFA)结果显示, $10^{7.0}$ IFU 组(图 5A)和猪瘟脾淋苗组(图 5E)均未出现特异性绿色荧光(0/4); 而对照组(图 5F)均出现特异性绿色荧

2.4 脾脏病理组织学观察

将攻毒后体温趋于正常的兔子剖检, 取脾脏做石蜡切片, 显微镜下观看脾脏病理组织变化(图 4)。 $10^{7.0}$ IFU 组(图 4A)攻毒后脾组织切片未见充血、淤血; $10^{6.0}$ IFU 组(图 4B)攻毒后脾组织切片未见充血、淤血, 而 $10^{6.0}$ IFU 组(图 4C)攻毒后脾组织切片充血、淤血严重; $10^{5.0}$ IFU 组(图 4D)攻毒后脾组织切片充血、淤血严重; 猪瘟脾淋苗组(图 4E)攻毒后脾组织切片未见充血、淤血; 对照组(图 4F)攻毒后脾组织切片充血、淤血严重。

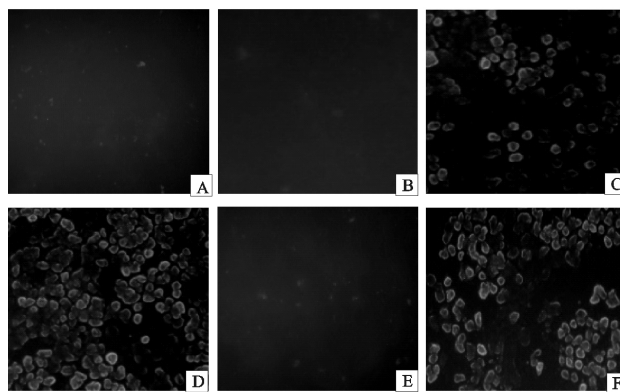
2.5 RT-PCR 检测攻毒后免疫兔脾脏内猪瘟脾淋病毒

以猪瘟脾淋苗特异性引物为模板进行 RT-PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明, $10^{7.0}$ IFU 组(0/4)和猪瘟脾淋苗组(0/4)攻毒后均未检测到猪瘟脾淋苗病毒, 对照组(4/4)均检测到猪瘟脾淋苗病毒; $10^{6.0}$ IFU 组(3/4)能检测到猪瘟脾淋苗病毒、 $10^{5.0}$ IFU 组(4/4)均检测到猪瘟脾淋苗病毒(表 1)。

光(4/4); $10^{6.0}$ IFU 组(图 5B)能起保护作用的兔子 IFA 检测未出现特异性绿色荧光(1/4), 而 $10^{6.0}$ IFU 组(图 5C)没有能起保护作用的兔子 IFA 检测出现特异性绿色荧光(3/4); $10^{5.0}$ IFU 组(图 5D)IFA 检测出现特异性绿色荧光(4/4)。

3 讨论

本研究是在前期已经构建的表达猪瘟病毒 E0-E2 基因重组腺病毒疫苗(rAd-E0-E2)的基础上, 以 SPF 家兔作为实验动物模型, 通过测兔体定型热反应、脾重/体重指数比、RT-PCR、IFA、病理组织学变化等免疫学、病理学、分子生物学技术共同评价了 rAd-E0-E2 在兔上的免疫保护效力。



A. $10^{7.0}$ IFU; B. $10^{6.0}$ IFU(保护); C. $10^{6.0}$ IFU(未保护); D. $10^{5.0}$ IFU; E. 猪瘟脾淋苗; F. 对照

A. $10^{7.0}$ IFU; B. $10^{6.0}$ IFU(Protected); C. $10^{6.0}$ IFU(Unprotected); D. $10^{5.0}$ IFU; E. CSF spleen vaccine; F. Control

图 5 不同组脾脏 IFA 特异性鉴定(200×)

Fig. 5 Specificity identification of spleens in different groups by indirect IFA(200×)

通过以上方法比较分析发现, $10^{7.0}$ IFU 组和猪瘟脾淋苗组均未出现定型热反应(0/4);脾组织切片未见充血、淤血;用 RT-PCR 和 IFA 方法均未检测到兔子脾脏内猪瘟脾淋苗病毒,说明 rAd-E0-E2 ($10^{7.0}$ IFU)在兔体的免疫攻毒保护试验中起到保护作用(4/4)。 $10^{6.0}$ IFU 组出现定型热反应(3/4);相对应的兔脾组织切片可见充血、淤血(3/4);用 RT-PCR 和 IFA 方法可检测到对应兔子脾脏内猪瘟脾淋苗病毒(3/4),说明 rAd-E0-E2($10^{6.0}$ IFU)在兔体的免疫攻毒保护试验中起到保护作用(1/4)。 $10^{5.0}$ IFU 组和对照组全部出现定型热反应(4/4);脾组织切片充血、淤血严重(4/4);用 RT-PCR 和 IFA 方法均可检测到兔子脾脏内猪瘟脾淋苗病毒(4/4),说明 rAd-E0-E2 ($10^{5.0}$ IFU)在兔体的免疫攻毒保护试验中没有起到保护作用(0/4)。以上结果进一步分析表明, rAd-E0-E2 可诱导机体产生猪瘟特异性免疫,此抗体在最小免疫保护剂量是 $10^{7.0}$ IFU 时对猪瘟脾淋苗病毒攻击具有保护作用。试验中脾重/体重指数比、RT-PCR、IFA、病理组织学变化检测结果与家兔体温反应结果一致,四种试验方法检测结果可以有效地对体温反应可疑或者轻热的家兔进行判定,避免了体温反应结果产生的不确定性。本试验结果的一致性为四种试验方法用于 rAd-E0-E2 在家兔上的免疫原性分析提供有力依据。

根据中华人民共和国兽用生物制品规程(2000 版)和中华人民共和国兽药典(2010 年版)规定,现行的猪瘟疫苗免疫效力检验主要依靠家兔或猪进行动物试验^[19-20]。因用猪进行检验成本太高、不易操作、耗时长,故在生产实际中多采用兔体定型热反应,但是兔体定型热反应仍然存在试验耗时、操作繁琐、重复性较差、敏感性较低等缺点,且受试验动物的个体差异、环境因素等多方面影响,因此本试验通

过比较 rAd-E0-E2 家兔体温反应热与脾重/体重指数比、RT-PCR、IFA、病理组织变化检测结果的相关性,给出了脾重/体重指数比、RT-PCR、IFA、病理组织学变化等方法用于 rAd-E0-E2 在家兔上的免疫原性分析的可行性。本研究依然采用家兔进行效检,同时用以上四种方法进行验证,避免了传统方法因家兔质量和环境等因素对体温检测结果的影响,提高了检测结果的可靠性和可重复性。

本试验通过表达猪瘟病毒 E0-E2 基因重组腺病毒疫苗(rAd-E0-E2)在兔体上的免疫原性分析,不仅能够检验 rAd-E0-E2 的保护效力,还确定出最小免疫保护剂量,有利于 rAd-E0-E2 效力质量检测应用,更对后期的大规模生产培养工艺优化具有积极的评价指导作用,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Sun S Q, Yin S H, Guo H C, et al. Genetic typing of classical swine fever virus isolates from China[J]. Transb Emerg Dis, 2013, 60(4): 370-375.
- [2] Leifer I, Everett H, Hoffmann B, et al. Escape of classical swine fever C-strain vaccine virus from detection by C-strain specific real-time RT-PCR caused by a point mutation in the prime-binding site[J]. J Virol Meth, 2010, 166(1-2): 98-100.
- [3] Everett HE, Crudgington BS, Sosan-Souule O, et al. Differential detection of classical swine fever virus challenge strains in C-strain vaccinated pigs[J]. BMC Vet Res, 2014, 10(1): 281.
- [4] 孙永科, 杨玉艾, 张彦明, 等. 表达猪瘟病毒石门株 E0 抗原的重组腺病毒构建及免疫性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(5): 482-487.
- [5] 孙永科, 杨玉艾, 张彦明, 等. 表达猪瘟病毒石门株 E2 抗原的重组腺病毒构建及免疫性研究[J]. 病毒学报, 2007, 23(2): 137-141.
- [6] 杨玉艾, 初晓辉, 孙永科, 等. 猪瘟病毒 E0 和 E2 蛋白融合表达的重组腺病毒构建及免疫保护性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(6): 419-423.
- [7] 孙永科. 表达猪瘟病毒石门株 E0/E2 基因重组腺病毒的构建

- 及其免疫效果研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2007.
- [8] 李传龙,张恒,崔治中,等. ALV-J 相关的鸡急性纤维肉瘤发病模型的建立[J]. 中国农业科学,2012,45(3):548-555.
- [9] Sun Y K, Yang Y A, Zheng H L. Co-expression of Erns and E2 genes of classical swine fever virus by replication-defective recombinant adenovirus completely protects pigs against virulent challenge with classical swine fever virus[J]. Res Vet Sci, 2013,94:354-360.
- [10] 张恒,李传龙,崔治中,等. 禽白血病 A 亚群病毒 gp85 的单一因子血清制备及其特异性鉴定[J]. 微生物学报,2011,51(1):134-140.
- [11] 张恒,范根成,杜元钊,等. 一种猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗病毒含量测定方法[P]. 中华人民共和国国家知识产权局. CN 104535764 A,2015. 04. 22.
- [12] 蒋卉,戴志红,王在时,等. 猪瘟兔化弱毒疫苗效力检验替代方法研究 I 家兔效力检验 ELISA 方法初探[J]. 中国兽医杂志,2013,49(5):9-12.
- [13] 祖立闯,谢金文,沈志强,等. 猪瘟疫苗质量的替代检验方法研究进展[J]. 动物医学进展,2015,36(2):76-79.
- [14] 陈锴,姚华伟,王长江,等. 荧光定量 PCR 作为猪瘟兔化弱毒疫苗效价检验替代方法的研究与应用[J]. 中国农业科学,2013,46(1):162-169.
- [15] 李春红,唐满华,陈瑞爱. 猪瘟兔化弱毒疫苗效价检验替代方法研究进展[J]. 当代畜牧,2014(12):34-38.
- [16] 何雷,张彦明,徐彦召,等. 共表达猪瘟病毒 E2 基因和猪白细胞介素 2 基因的重组腺病毒的构建及其免疫原性研究[J]. 病毒学报,2010,26(5):385-391.
- [17] 何雷,张彦明,向华,等. 表达猪白细胞介素 2 基因重组腺病毒的构建及其免疫增强作用[J]. 西北农业学报,2010,19(11):1-7.
- [18] 孙元,祁巧芬,仇华吉,等. 表达猪瘟病毒 E2 蛋白的重组腺病毒的构建及其在兔体内的免疫原性分析[J]. 生物工程学报,2008,24(10):1734-1739.
- [19] 农业部第四届兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程[M]. 北京:化学工业出版社,2000.
- [20] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京:中国农业出版社,2011.

Immunogenicity Analysis of Recombinant Adenoviruses Expressing E0-E2 Genes of Classical Swine Fever Virus Vaccine in Rabbits

ZHANG Xiao-miao^{1,2}, ZHANG Heng², YANG Yu-ai¹, ZHANG Zhi³,

SUN Jian², TAO Xiao-shan², LI Xiao-cheng³, FAN Gen-cheng², SUN Yong-ke¹

(1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan, 650201, China;

2. Key Laboratory for Animal Vaccine of Shandong Province, YEBIO Bioengineering Co. Ltd of Qingdao,

Qingdao, Shandong, 266114, China; 3. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong, 266032, China)

Abstract: Study on the immunogenicity of recombinant adenoviruses expressing E0-E2 genes of classical swine fever virus vaccine (rAd-E0-E2) in rabbits and determination of the minimum vaccination dose were conducted. Ten-fold dilution of rAd-E0-E2 into $10^{7.0}$ IFU, $10^{6.0}$ IFU, $10^{5.0}$ IFU was made. Rabbits were vaccinated by each dilution and challenged with CSF spleen vaccine virus 14 dpi. In group $10^{7.0}$ IFU and group CSF spleen vaccine, there were no Stereotypia thermal response (0/4), the mean value of spleen weight/body weight in both groups were respectively 0.055%, 0.05%, the histopathologic examination of the spleens turned out without hyperemia or congestion. There was no CSF spleen vaccine virus detected by RT-PCR and IFA methods; In Group $10^{6.0}$ IFU, 3/4 rabbits showed Stereotypia thermal response, the mean value of spleen weight/body weight was 0.074%, the histopathologic examination of the spleens showed 3/4 hyperemia or congestion. 3/4 CSF spleen vaccine virus is detected by RT-PCR and IFA methods; In Group $10^{5.0}$ IFU and the control group, all appeared Stereotypia thermal response (4/4), the mean values of spleen weight/body weight in both were respectively 0.099%, 0.102%, the histopathologic examination of the spleens showed serious hyperemia and congestion, CSF spleen vaccine virus was detected by RT-PCR and IFA methods. Compared to the control group, which offers 0% protection and group CSF spleen vaccine, which offers 100% protection, the minimum vaccination dose of rAd-E0-E2 to protect the rabbit is $10^{7.0}$ IFU. This study successfully completed the immunogenicity analysis of rAd-E0-E2 and determined the minimum vaccination dose in rabbits.

Key words: Classical swine fever virus; E0-E2 gene; recombinant adenovirus vaccine; rabbit; immunogenicity