

DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2012.09.015

狂犬病病毒糖蛋白膜外区密码子优化、 原核表达及纯化*

鞠美芳, 殷相平, 柳纪省

摘要:目的 有效检测狂犬病毒抗原。方法 本研究利用生物信息学软件对狂犬病病毒 aG 株糖蛋白膜外区进行分析, 采用密码子优化策略将该序列的大肠杆菌稀有密码子优化成大肠杆菌常用密码子。将优化的序列合成与表达载体 pET-28a(+) 分别双酶切、胶回收后连接并转化至 Rosetta(DE3) 菌株。挑选阳性重组表达菌经 IPTG 诱导表达后, 进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。同时对最佳表达条件进行了研究, 重组菌在 30℃、IPTG 终浓度为 0.6 mmol/L、诱导表达 6 h 时重组蛋白的表达量达到最大值。结果 狂犬病病毒 aG 株糖蛋白膜外区通过密码子优化后能够在大肠杆菌中成功表达, 表达产物具有良好的反应原性。结论 该项研究为后续检测狂犬病毒抗原的 ELISA 试剂盒的研发建立基础。

关键词: 狂犬病病毒; 糖蛋白膜外区; 密码子优化; 原核表达

中图分类号: R373.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2012)09-0932-06

Codon optimization, prokaryotic expression and purification of glycoprotein extracellular domain of rabies virus

JU Mei-fang, YIN Xiang-ping, LIU Ji-xing

(Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Grazing Animal Disease of Ministry of Agriculture of China, Lanzhou 730046, China)

ABSTRACT: Bioinformatics software was used to analyze the gene of glycoprotein extracellular domain from rabies virus aG strain, and optimize *E. coli* rare codon of this sequence into *E. coli* normal codon by codon optimization strategies in this study. The optimized sequence was synthesized and constructed into prokaryotic expression vector pET-28a(+) and transformed into the expression system of Rosetta(DE3) induced by IPTG. The recombinant protein of glycoprotein extracellular domain was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Meanwhile, the best expression conditions were studied, and the results indicated that recombinant proteins reached a maximum level when the recombinant bacteria at the condition of 30℃, final concentration of IPTG at 0.6 mM and the time of induction by IPTG at 6 h. This study shows that extracellular domain aG strain of the rabies virus glycoprotein can be successfully expressed in *E. coli* by codon optimization and expression products have good reactivity. The study paves the way for the development of ELISA kits to detect the rabies virus or antigens of rabies virus.

KEY WORDS: rabies virus; glycoprotein extracellular domain; codon optimization; prokaryotic expression

Supported by the Biological Medicine Special Program of Lanzhou City(No. 2011-1-61)

Corresponding author: Liu Ji-xing, Email: liujixing@hotmail.com

狂犬病(Rabies virus)又称恐水病,是急性、烈性、自然疫源性人兽共患传染病,其病原体是狂犬病病毒(Rabies virus, RABV)。人被带 RABV 的动

物咬伤、抓伤后,主要接种狂犬疫苗和抗狂犬病血清来预防。一旦发病目前没有特殊有效的治疗方法,病死率几乎 100%^[1]。目前狂犬病仍然在世界多个国家和地区广泛流行,主要发生在亚洲和非洲的一些发展中国家,我国也是狂犬病的高发区,连续 8 年狂犬病人报告病死数一直居我国 37 种法定报告传染病之首,已成为严重危害我国公共卫生的重大

* 兰州市生物医药专项(2011-1-61)

通讯作者:柳纪省,Email:liujixing@hotmail.com

作者单位:中国农业科学院兰州兽医研究所,家畜疫病病原生物学国家重点实验室,农业部草食动物疫病重点开放实验室,兰州 730046

疫病^[2]。

糖蛋白(GP)是RV五种结构蛋白中唯一一个位于成熟病毒颗粒表面的蛋白质,在病毒感染中发挥重要作用^[3]。GP是一种跨膜蛋白,也是惟一的糖基化蛋白,有利于自身的形成及功能的发挥^[4-6],影响着RV的稳定性、致病性和免疫原性等生物活性,与血凝(HA)、免疫溶解(IL)、细胞融合及凋亡有关。在病毒转录翻译时,切除前体糖蛋白N端的19个氨基酸构成的疏水性信号肽,可形成由505个氨基酸组成的成熟GP,可以分3个区域:膜内区,是第162-505位氨基酸,位于羧基端,又叫附着区,和基质蛋白接触;跨膜区,是嵌在细胞膜中的部分,又叫穿膜区,是第440-461位氨基酸构成的连续疏水区;膜外区,是1-439位氨基酸,又叫抗原区,含有多个抗原位点和表位,可识别宿主细胞的受体并与之结合^[7],刺激宿主免疫系统,诱导机体产生保护性中和抗体^[8]和细胞免疫反应,并能抵抗RV经外周和脑内途径的攻击。各毒株G的氨基酸序列比其他结构蛋白的保守性都低,跨膜区和膜内区在不同株中的差异较明显,同源性仅50%~60%,也因为其变异大,常用于不同毒株抗原性的区分^[9];而膜外区的保守性略高,同源性大于90%。同时糖蛋白膜外区在病毒致病性和嗜神经性中发挥关键作用。因此,对糖蛋白膜外区进行原核表达,对检测狂犬病毒糖蛋白抗原具有重要意义。

从RV中纯化GP不仅费时、费力,而且存在安全性问题^[10],通过生物信息学和基因工程技术表达出狂犬病毒的特异性的重组GP,与传统的灭活病毒相比,用时少、产量高、成本低、纯度高,用该重组蛋白作为包被抗原研制试剂盒,可提高试剂盒的生物安全性,同时还有可能减少试剂盒的非特异性反应^[11]。

由于外源基因在大肠杆菌中表达时,可能含有大肠杆菌的转录终止信号或稀有密码子影响目的蛋白的正确表达或表达量,所以本研究用大肠杆菌稀有密码子计算器(RACC)分析狂犬病毒aG株基因序列,将大肠杆菌稀有密码子优化成大肠杆菌常用密码子,然后合成基因并与大肠杆菌表达载体pET-28a(+)连接,转化到表达菌Rosetta(DE3)后IPTG诱导表达出带有6×His标签的RV GP膜外区蛋白,经SDS-PAGE和Western blotting鉴定并纯化,为建立检测狂犬病毒抗原的ELISA检测试剂盒奠定基础。

1 材料

1.1 含优化基因的重组质粒pMD-G2由上海生物工程技术有限公司合成,原核表达载体pET-28a(+)为中国农科院兰州兽医研究所传染病实验室保存。大肠杆菌感受态细胞Rosetta(DE3),核酸Marker及限制性内切酶EcoR I、Hind III为大连宝生物公司(Takara)产品;彩色预染蛋白Marker M216-01购自GenStar;异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自上海生工公司;牛血清白蛋白(BSA)、4×蛋白上样buffer购自Sigma公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗人的免疫球蛋白IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司;抗狂犬病人免疫球蛋白为国家标准品第五批;其余常规试剂均为实验室分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 GP膜外区基因的序列分析 将实验室保存的RV aG株测序得到的GP膜外区基因序列用分子生物学软件DNAMAN比对、用Mega5建立系统进化树;用DNASar分析蛋白序列的亲水性、抗原性等;用NIH的结构基因组学和蛋白质组学MBI实验室的网页的稀有密码子计算器(RACC)对基因序列进行分析。

1.2.2 GP膜外区重组原核表达质粒的构建和鉴定 将上海生物工程技术有限公司合成的含有优化基因的重组克隆质粒命名为pMD-G,将它和pET28a(+)载体分别同时加EcoR I和Hind III两种限制性内切酶,放到37℃水浴锅中双酶切4 h,经1%的琼脂糖凝胶电泳后,切胶纯化优化基因和载体片段,将两种回收产物和T4 DNA连接酶混匀后,16℃连接4 h,转化至大肠杆菌感受态细胞DH5α,涂布于含Kan^r的LB琼脂平板上,37℃培养过夜,挑斑摇菌,提取质粒,用限制性内切酶EcoR I和Hind III双酶切鉴定,把阳性的GP膜外区重组表达质粒命名为pET-G,并送上海生工测序。

1.2.3 GP膜外区重组表达菌的诱导表达及SDS-PAGE鉴定 将阳性GP膜外区重组表达质粒pET-G转化至表达菌株Rosetta(DE3)中,涂布于含Kan^r的LB琼脂平板,倒置于37℃过夜;挑取数个单菌落,分别接种到含Kan^r的5 mL的LB液体培养基中,37℃ 180 r/min振荡培养12 h;将培养的菌液按1:100比例接种于含Kan^r的LB液体培养基中,37℃ 180 r/min扩大培养至OD值为0.6时,加入IPTG至终浓度为0.6 mmol/L,然后在30℃ 180 r/min振荡培养6 h诱导表达目的蛋白;取1.0 mL菌液,12 000 r/min离心2 min,弃去上清液,加

pH7.4 的 PBS 溶液和 4 × 蛋白上样 buffer 重悬菌体,然后 100℃ 煮沸 7 min,取 10 μL 上样于 5% 浓缩胶、10% 分离胶,以浓缩胶电压 70V、分离胶电压 120V 进行 SDS-PAGE。同时对转化至 Rosseta (DE3)的空载体 pET-28a(+)也用相同条件诱导作为对照。

1.2.4 GP 膜外区蛋白的大量表达、纯化及浓度测定 阳性重组菌按上一步条件大量诱导表达后,用默克公司的 His · Tag 蛋白亲和纯化法,先离心收集菌体,加入冰浴预冷的结合缓冲液以 10 : 1 的体积比重悬菌体后,超声破碎,离心分别收集上清和沉淀。用含 6 mol/L 尿素的结合缓冲液重悬沉淀,冰上放置 1 h,彻底溶解包涵体。离心,去除不溶成分后,用 0.45 μm 滤膜过滤,以备纯化。Novagen 的聚丙烯空色谱柱中,先加灭菌的去离子水,浸湿滤芯后流出,然后将装 His · Bind 树脂的瓶轻轻上下翻转重悬均匀后加入空色谱柱中,依次加入灭菌去离子水、离子化缓冲液、结合缓冲液进行清洗、离子化和平衡。当结合缓冲液降到树脂上表面时,轻轻加入处理过的包涵体溶液,然后依次加入结合缓冲液、漂洗缓冲液、洗脱缓冲液,最终把目的蛋白洗脱下来。也可直接用剥离缓冲液将 Ni²⁺ 和目的蛋白同时都洗脱下来。

将纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 分析,并在英国产的品牌型号为 Nanovue 的超微量分光光度计上,以洗脱缓冲液为空白对照,用吸光度 280 法测定蛋白质的含量,-20℃ 保存。

1.2.5 GP 膜外区表达蛋白的 Western blotting 鉴定 诱导后的蛋白制样,经 SDS-PAGE 后转印至硝酸纤维素膜,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min;用含 3% BSA 的 PBST 溶液封闭过夜。PBST 洗膜 3 次,每次 10 min;与 1:1500 稀释的一抗(即狂犬病人免疫球蛋白国家标准品)于 37℃ 结合 1.5 h。PBST 洗膜 3 次,每次 10 min;加入 1:50000 稀释的二抗(即辣根过氧化物酶标记的抗人的免疫球蛋白 IgG),室温下轻摇孵育 1 h。PBST 洗膜 3 次,每次 10 min;用 TIANGEN 公司的 HRP-DAB 底物显色试剂盒染色,当膜上开始出现褐色时,迅速用 PBS 溶液冲洗以终止染色(防止背景加深)。经 DAB 显色结果,可以检查表达产物是否具有特异性免疫活性。

2 结果

2.1 GP 膜外区基因的序列分析

2.1.1 RV aG 株 G 蛋白膜外区核苷酸序列同源性比较 将实验室保存的 RV aG 株测序得到的 GP

膜外区基因序列与 1993 年白宛鹤发表的 3aG 株序列相比没有发生插入或缺失,只有 1 处碱基发生基因突变,但其编码氨基酸相同,因此属于无义突变。

将 GP 膜外区基因序列用 NCBI 中的 blast 软件比对分析发现,与 GenBank 中序列号为 AEV43277.1、AEV43275.1、AEV43278.1 的 4aG 株及 AAG34721.1 的 PG 株氨基酸序列相似性在 99% 以上,与中国疫苗株 334 株、Nishigahara 株(Ni-CE、RCEH)相比氨基酸序列相似性为 97%;与登录号为 JN234417.1、JN234416.1、JN234414.1、JN234412.1、JN234415.1、JN234413.1、JN234411.1 的 4aG 株、AY009097.1 的 PG 株、L04522.1 的中国疫苗株相比,核苷酸序列相似性在 99.7% 以上;与 334 株相比,核苷酸序列相似性为 99.2%;与 Nishigahara 株(Ni-CE、RCEH)的核苷酸序列相似性为 97%,与国际标准攻毒株(CVS)的核苷酸序列相似性为 92%。4aG 株、CVS 株、Nishigahara 株等都是狂犬病代表性的毒株,所以可以预见研发 GP 膜外区试剂有良好的交叉保护作用。

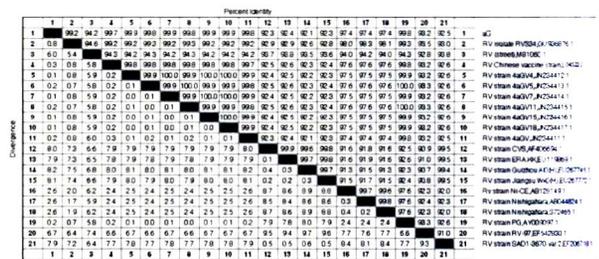


图 1 RV aG 株 G 蛋白膜外区核苷酸序列同源性比较
Fig.1 Homology comparison of glycoprotein extracellular domain

2.1.2 RV aG 株 G 蛋白膜外区基因序列建立系统进化树 将 GP 膜外区基因序列用 MEGA5 建立系统进化树,结果如图 2 所示,这 21 株病毒可以分为五个基因群,实验中分离的 aG 株毒与 4aG 株的 V、V4、V5、V7、V11、V15、V18 及 PG 株在同一枝上,亲缘关系最近;与 334 株、中国疫苗株、Nishigahara 株的亲缘关系也很近;与街毒、97 株的亲缘关系均较远;分离自我国贵州、江苏的毒株及 CVS、ERA、SAD 株在同一枝上,与目的基因的亲缘关系最远。

2.1.3 RV aG 株 G 蛋白膜外区基因的优化分析 用稀有密码子计算器(RACC)对狂犬病毒 aG 株糖蛋白膜外区基因序列进行分析,发现其中共有 39 组大肠杆菌稀有密码子,在全部密码子 440 组中占 8.8%,具体如下:

精氨酸(Arg)的稀有密码子(AGG, AGA, CGA),分别位于 87、98、110、126、155、187、199、202、

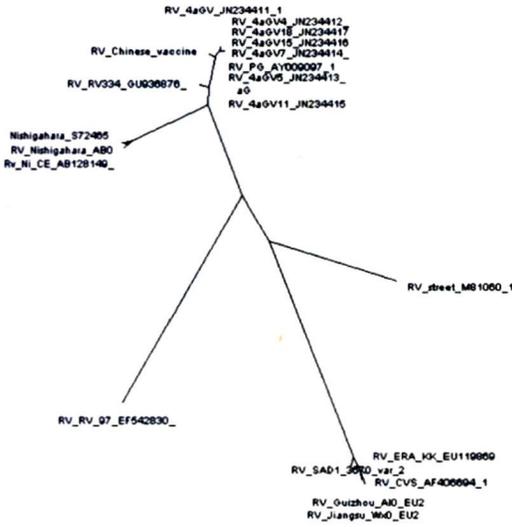


图 2 糖蛋白膜外区基因的系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of glycoprotein extracellular domain

216,237,283,302,308,336,349,353,共 16 个;

亮氨酸(Leu)的稀有密码子(CTA),分别位于 115,188,218,222,290,共 5 个;

异亮氨酸(Ile)的稀有密码子(ATA),分别位于 10,22,57,138,165,294,320,366,367,388,共 10 个;

脯氨酸(Pro)的稀有密码子(CCC),分别位于 16,109,257,312,343,397,401,424,共 8 个;

将精氨酸(Arg)的稀有密码子(AGG,AGA,CGA)用 CGU,CGC,CGG 替代;

亮氨酸(Leu)的稀有密码子(CTA)用 UUA,UUG,CUU,CUC,CUG 替代;

异亮氨酸(Ile)的稀有密码子(ATA)用 AUU,AUC 替代;

脯氨酸(Pro)的稀有密码子(CCC)用 CCU,CCA,CCG 替代;

再次用稀有密码子计算器(RACC)进行分析,优化后的基因序列中没有大肠杆菌稀有密码子。

将 aG 株 GP 膜外区优化后的核苷酸序列,用 NCBI 中的 blast 软件比对分析发现,与 GenBank 中登录号为 FJ465407.1 的狂犬病毒隔离 926/93 的 GP 基因相似性为 73 %。

用分子生物学软件 DNASTar 中的 Protean 分别对优化前后的基因编码的氨基酸序列进行抗原性、亲水性等分析。该蛋白有很多亲水性区域,在 108~133,146~177,198~219 区段的亲水性较多,该亲水性区域与抗原表位基本呈正相关,有众多抗原指数。

2.2 将含有合成的 GP 膜外区优化基因的重组克

隆载体 pMD-G 和实验室保存的 pET-28a(+) 表达载体同时分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,1% 的琼脂糖凝胶电泳如图 3。

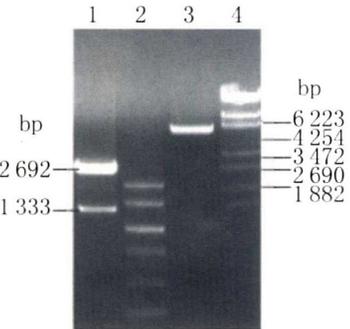


图 3 重组克隆质粒 pMD-G 和 pET-28a(+) 的双酶切鉴定 1: 重组克隆质粒 pMD-G 的双酶切产物; 2: 核酸分子量标准 DL2000; 3: pET-28a(+) 的双酶切产物; 4: 核酸分子量标准 λ-EcoT14 I

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pMD-G2 and pET28a(+) digested by *EcoR* I + *Hind* III

1: The product of recombinant plasmid pMD-G digested by *EcoR* I + *Hind* III; 2: DL2000 DNA Marker; 3: The product of plasmid pET28a(+) (5 369 bp) digested by *EcoR* I + *Hind* III; 4: λ-EcoT14 I digest marker

2.3 重组表达质粒 pET-G 的双酶切鉴定 将获得的重组表达质粒 pET-G 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,结果与预期大小相符(图 4),表明重组原核表达载体构建成功。

2.4 GP 膜外区表达蛋白的 SDS-PAGE 鉴定及最佳表达条件的确定 (1)SDS-PAGE 结果显示,重组菌有明显的诱生条带,(从载体起始密码子到目的蛋白终止密码子)大于理论值 49.245 kD 处出现一条粗的蛋白带,大小与预期 6×His-GP 的理论值 51 kD 相近,而相同条件诱导的空载体转化菌及未诱导的阳性表达菌没有出现相同的条带(图 5),表明该蛋白初步得到了表达。

(2)将阳性重组表达菌分别在不同终浓度的 IPTG(0.2mmol/L、0.6mmol/L、1.0mmol/L)、不同温度(37℃、30℃)进行诱导,发现重组菌在 30℃ IPTG 终浓度为 0.6mmol/L 时诱导表达的重组蛋白量最多,随着诱导时间的增加,其表达量随之增加,在 6 h 时达到最大值(图 6),过柱纯化后得到目的蛋白(图 7)。

(3)在英国产的 Nanovue 的超微量分光光度计中,用吸光度 280 法测定纯化后的蛋白质的含量,浓度达 0.69 mg/mL。

2.5 GP 膜外区表达蛋白的 Western blotting 鉴定

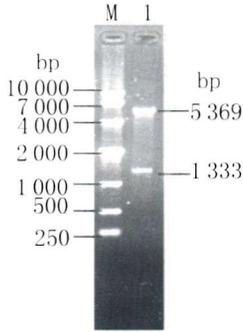


图 4 重组表达质粒 pET-G 的双酶切鉴定
M:核酸分子量标准 DL10000; 1: pET-G 的双酶切产物

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pET-G digested by *EcoR* I + *Hind* III
M: DL10000 DNA marker; 1: The product of recombinant plasmid pET-G digested by *EcoR* I + *Hind* III

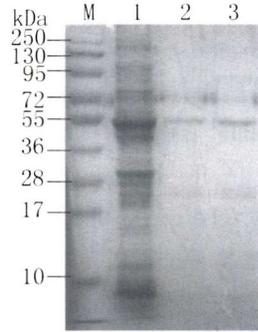


图 7 SDS-PAGE 分析纯化蛋白
M:预染的蛋白分子量标准; 1:重组质粒 pET-G 表达的蛋白; 2-3:纯化后的目的蛋白

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of the purified protein
M: Prestained protein molecular weight marker; 1: The unpurified protein; 2-3: The purified protein

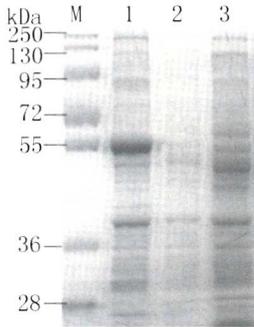


图 5 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析
M:预染的蛋白分子量标准; 1:重组质粒 pET-G 诱导 6h; 2:空载体; 3:未诱导的重组质粒 pET-G

Fig. 5 SDS-PAGE identification of the recombinant protein
M: Prestained protein molecular weight marker; 1: The pET-G induced with IPTG for 6 h; 2: Blank control; 3: The pET-G induced without IPTG

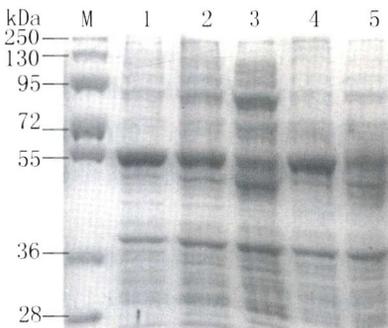


图 6 SDS-PAGE 分析诱导重组蛋白表达的最佳条件
M:预染的蛋白分子量标准; 1-3:重组质粒 pET-G 在 30℃ 0.6 mmol/L、1.0 mmol/L、0.1 mmol/L IPTG 诱导 6 h; 4-5:重组质粒 pET-G 在 30℃、37℃ 0.6 mol/L IPTG 诱导 6 h

Fig. 6 SDS-PAGE analysis on the best expression condition of the recombinant protein
M: Prestained protein molecular weight marker; 1-3: The pET-G induced with 0.6 mmol/L, 1.0 mmol/L, and 0.1 mmol/L IPTG at 30℃ for 6 h; 4-5: The pET-G induced with 0.6 mmol/L IPTG at 30℃, 37℃ for 6 h

Western blotting 检测后,发现与蛋白凝胶上目的蛋白相同位置对应的硝酸纤维素膜上出现了一条印迹(图 8-2 泳道),而未诱导的阴性对照菌液中并未出现相应条带,表明阳性重组表达菌 pET-G 诱导表达的蛋白可被狂犬病人免疫球蛋白国家标准品和 HRP 标记的抗人的免疫球蛋白 IgG 特异识别,说明目的蛋白具有良好的反应原性。

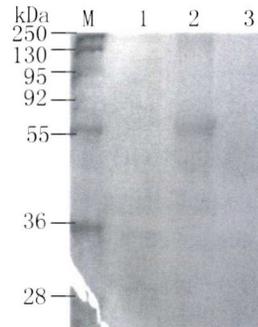


图 8 表达蛋白的蛋白免疫印迹法分析
M:预染的蛋白分子量标准; 1:未诱导的重组菌 pET-G; 2:诱导的重组菌 pET-G; 3:空载体

Fig. 8 Western blotting identification of the recombinant protein pET-G
M: Prestained protein molecular weight marker; 1: The pET-G induced without IPTG; 2: The pET-G induced with IPTG for 6 h; 3: Blank control

3 讨论

由于已有的检测狂犬病抗原抗体的 ELISA 试剂盒种类很少,并且价钱昂贵,为了配合本课题组研究的动物狂犬病基因工程疫苗抗原、抗体的有效检测,所以本研究在前期研究的基础上,通过原核表达狂犬病毒糖蛋白膜外区,建立一种检测狂犬病毒抗原的 ELISA 诊断方法。

将实验室测序得到的狂犬病病毒 aG 株 GP 膜

外区基因序列进行生物信息分析,与很多有代表性的毒株的核苷酸相似性达 99%,如 GenBank 中的 4aG 株、PG 株、中国疫苗株、334 株,因此狂犬病毒糖蛋白膜外区比较保守,可以作为目的基因进行狂犬病的分子生物学诊断。

目前,人们已在原核系统和真核系统中表达了不同 RV 毒株的全长糖蛋白^[12-14],另外,为了研究糖蛋白中不同区域的功能,合成了糖蛋白的多肽及合成肽疫苗,但是糖蛋白主要依赖自身二级结构及三级结构的完整性诱导中和抗体,所以免疫效果不理想。所以本研究没有直接合成多肽,而是将核苷酸序列优化后合成利于在大肠杆菌中表达的基因。

在大肠杆菌中表达的外源蛋白,与天然蛋白相比构象和免疫原性均有差异,由于缺乏糖基化等转译后加工,因此不能作狂犬病疫苗,仅能作为诊断试剂^[15],但满足本研究的实验要求,且大肠杆菌表达系统的遗传背景清楚,培养周期短,经济,仍是我们合成外源蛋白的首选。经 RACC 分析 GP 膜外区基因,大肠杆菌的稀有密码子大部分是分散开的,有 6 组是两两串连在一起,此时可以更改密码子或更换表达菌株。所以实验中利用简并性合成优化的密码子序列。

外源基因在大肠杆菌中编码的蛋白质可以分布在细胞质中、细胞周质中或是分泌到细胞外,主要形成包涵体。本实验中用 pET 表达系统构建编码外源基因的重组质粒时,能高效表达外源蛋白,以致没有足够的时间和空间正确折叠而形成包涵体。包涵体的形成使目的蛋白具有产量大、纯度高、相对集中、易于提取和纯化、抗蛋白酶水解的特性。原核表达载体 pET-28a(+) 中携带了 6×His 标签,利于过柱纯化,且该标签分子量小,保证纯化的表达蛋白具有较高的纯度,对后继反应的影响小。

经 Western blotting 鉴定,表达的 GP 膜外区可被人狂犬病免疫球蛋白国家标准品及 HRP 标记的抗人的免疫球蛋白 IgG 特异识别,说明该蛋白具有良好的抗原性及特异性等免疫学活性。本研究获得的 GP 膜外区蛋白不仅可直接用作 RV 免疫诊断试剂为下一步研制特异性的 RV 免疫球蛋白打下基础,而且将有助于 RV 相关的基础和应用研究的开展。

参考文献:

[1] Brückner G. Rabies-the role of the World Organisation for animal health in mobilising global control[J]. *Vaccine*, 2009, 27(51): 7139-7140. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.09.038

[2] Yu YX. Rabies and rabies vaccine [M]. Beijing: Medicine Science and Technology Press of China, 2001. (in Chinese)

俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001.

[3] Dietzschold B, Wunner WH, Wiktor TJ, et al. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80(1): 70-74. DOI:10.1073/pnas.80.1.70

[4] Otvos LJ, Thurin J, Kollat E, et al. Glycosylation of synthetic peptides breaks helices. Phosphorylation results in distorted structure[J]. *Int J Pept Protein Res*, 1991, 38(5): 476-482. DOI: 10.1111/j.1399-3011.1991.tb01529.x

[5] Hu ZP, Zhong J. Research approach of rabies virus[J]. *J Microbes Infect*, 2007, 2(2): 120-125. (in Chinese)

胡志鹏, 钟江. 狂犬病病毒研究进展[J]. *微生物与感染*, 2007, 2(2): 120-125.

[6] Ito Y, Ito N, Saito S, et al. Amino acid substitutions at positions 242, 255, 268 in rabies virus glycoprotein affect spread of viral infection[J]. *Microbiol Immunol*, 2010, 54(2): 89-97. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2009.00192.x

[7] Zhang KS, Guo JH, Xu ZF, et al. Diagnosis and molecular characterization of rabies virus from a buffalo in China; a case report [J]. *Virol J*, 2011, 8:101. DOI: 10.1186/1743-422X-8-101

[8] Cox JH, Dietzschold B, Schneider LG. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization[J]. *Infect Immun*, 1977, 16(3): 754-759.

[9] Mousli M, Turki I, Kharmachi H, et al. Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate: A novel *in vitro* tool to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture[J]. *J Virol Methods*, 2007, 146(1-2): 246-256. DOI:10.1016/j.jviromet.2007.07.015

[10] Seif I, Coulon P, Rollin PE, et al. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein[J]. *J Virol*, 1985, 53(3): 926-934.

[11] Zhang XL, Zhao TZ, Qiao MM, et al. Expression and identification of rabies virus glycoprotein in *Escherichia coli* [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2009, 17(2): 125-129. (in Chinese)

张向利, 赵铁柱, 乔明明, 等. 狂犬病病毒糖蛋白在大肠埃希菌中的表达及鉴定[J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(2): 125-129.

[12] Bassi E, Vernal J, Zanluca C, et al. Expression, purification and immunodetection of a recombinant fragment (residues 179-281) of the G protein from rabies virus ERA strain[J]. *Protein Expr Purif*, 2008, 59(2): 309-313.

[13] Dietzschold B, Gore M, Marchadier D, et al. Structural and immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine[J]. *J Virol*, 1990, 64(8): 3804-3809.

[14] Bunschoten H, Gore M, Claassen IJ, et al. Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein[J]. *J Gen Virol*, 1989, 70(Pt2): 291-298.

[15] Qian Y, Sun MB, Zhang M, et al. Expression of glycoprotein of rabies virus aG strain in CHO cells [J]. *Chin J Biologicals*, 2005, 18(3): 212-214. (in Chinese)

钱源, 孙明波, 张鸣, 等. 狂犬病毒 aG 株糖蛋白在 CHO 细胞中的表达[J]. *中国生物制品学杂志*, 2005, 18(3): 212-214.