DOI：10.3969/j.issn.1002－2694.2019.00.178

·综　述·

# 狂犬病病毒糖蛋白重组表达及其基因工程疫苗研究进展

张莹辉，姚文生，康　凯，薛　麒，李启红，陈小云，杜吉革，朱　真，印春生

**摘　要**：狂犬病病毒糖蛋白（RVGP）是唯一暴露于病毒颗粒表面的抗原，能够诱导宿主产生中和抗体，也是唯一存在于所有新型狂犬病疫苗中的病毒成分。本文综述了国内外学者利用原核系统，以及包括酵母系统、植物系统、昆虫细胞系统在内的真核系统和哺乳动物细胞系统、病毒载体系统来表达具有免疫原性的重组狂犬病病毒糖蛋白（rRVGP），并对其与天然RVGP在结构和激发机体免疫反应方面的相似性进行的相关研究，为狂犬病基因工程新型疫苗提供研究思路。

**关键词**：狂犬病；糖蛋白；重组表达；基因工程疫苗

**中图分类号**：R373.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1002－2694(2020)01－0065－05

# Research progress of recombinant expression of rabies virus glycoprotein and its genetic engineering vaccine

ZHANG Ying-hui，YAO Wen-sheng，KANG Kai，XUE Qi，LI Qi-hong，
CHEN Xiao-yun，DU Ji-ge，ZHU Zhen，YIN Chun-sheng

（*China Institute of Veterinary Drugs Control*，*Beijing* 100081，*China*）

**Abstract**：Rabies virus glycoprotein (RVGP) is the only antigen that is exposed to the surface of viral particles, being capable of inducing the host to produce neutralizing antibodies. And it is the only viral component present in all new rabies vaccines. This paper reviews the various methods for expression immunogenic recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) using prokaryotic system, eukaryotic system and viral vector system through a large numbers of literatures readings and summaries. It also summarizes the similarity of rRVGP and natural rabies of viral glycoprotein (RVGP) in structure and immune response to the body, which provides a certain idea for the study of rabies genetic engineering vaccine.

**Keywords**：rabies; glycoprotein; recombinant expression; genetic engineering vaccine

Supported by the China National Key R&D Program during the 13th Five-year Plan Period (No.2016YFD0501004)
Corresponding author：Yin Chun-sheng，Email：zjs62158844@sohu.com

## 1　狂犬病病毒（RV）及其G蛋白（RVGP）

狂犬病病毒（Rabies virus，RV）属于弹状病毒科（Rhabdoviridae）狂犬病毒属（Lyssavirus），是一种具有包膜的单链负股RNA病毒，它携带有5种结构蛋白：核蛋白、磷蛋白、基质蛋白、包膜糖蛋白和依赖RNA的RNA聚合酶[1]。RVGP是一种跨膜蛋白，天然的RVGP具有三聚体结构，构成了病毒表面的棘突[2]，在病毒出芽之前，RVGP位于狂犬病病毒包膜和感染细胞的质膜中，包含胞质内区域，疏水性跨膜区域和胞外区域，3种单体的结合形成了三聚体[3]。它是目前发现的唯一可以刺激机体产生中和抗体的抗原，也是唯一一种存在于所有新型狂犬病疫苗中的成分[4]。RVGP的免疫原性很可能依赖于其三聚体空间构象[5]，它能够在一定程度上诱导动物机体产生中和抗体，从而保护其不受狂犬病病毒的攻击[6]。研究显示RVGP存在3种不同的构象，即天然构象、低pH无活性构象和疏水的瞬时构象，在低pH环境中，三种构象的转换实现了病毒和细胞膜融合，从而完成感染的过程[7]，此外，有研究者发现糖基化对RVGP的抗原性、稳定性及

十三五国家重点研发计划项目（No.2016YFD0501004）
通讯作者：印春生，Email：zjs62158844@sohu.com；
ORCID：0000-0001-5935-8486
**作者单位**：中国兽医药品监察所，北京　100081

其正确表达和分泌也具有不可忽视的重要作用[8]，经过正确糖基化的 RVGP 分子可诱导机体的免疫应答。

## 2 rRVGP 在不同细胞系统中的表达研究进展

传统的狂犬病疫苗是由活的或灭活的狂犬病病毒组成的，从以巴斯德狂犬病疫苗为起始的神经组织疫苗到禽胚疫苗，再到细胞培养疫苗，狂犬病疫苗不断的改进和完善[9]，目前 Vero 细胞系狂犬病疫苗已大量生产，广泛应用于人和动物狂犬病的预防和暴露后接种。传统疫苗中含有与野毒株相同特征的抗原，可诱导机体产生针对 RVGP 的病毒中和抗体，同时活化辅助细胞以及细胞毒性 T 细胞，从而对致死性的狂犬病毒脑内攻击具有保护效力[10]。目前所使用的传统病毒疫苗生产成本较高，且存在一定的生产和使用风险[11]，并且在一些狂犬病发病率较高的国家，仍需要使用较为经济的疫苗产品进行单次免疫以达到预防狂犬病的目的[12]。因而研制更加经济、安全、有效的新型狂犬病疫苗成为越来越多研究者关注的重点，目前正在研发中的新型狂犬病疫苗主要有亚单位疫苗、DNA 疫苗、活载体疫苗等[13]。

建立 rRVGP 表达系统，不仅要能够产生高浓度的 rRVGP，同时还要分析其与天然结构 RVGP 间的相似度，比较接种动物后所产生的免疫反应是其最好的分析方法。在天然合成过程中，RVGP 经过翻译和修饰，至少有一个序列进行了糖基化，因而其能够到达细胞表面[14]，但在表达 rRVGP 过程中，常常为了获得高水平的 rRVGP 而使用了不稳定的和疏水性的分子，因而存在一定的不可溶问题。虽然使用遗传和生物化学方法可以获得具有免疫原性且可溶的 rRVGP，但重组分子本身免疫原性的大小取决于其寡聚体的结构[15]，因此这些方法所产生的蛋白分子免疫原性并不高[16]，不过其作为诊断工具仍具有潜在的价值[17]。这也体现出了跨膜结构的重要作用，因为在正确折叠的胞外区域中包含着最重要的抗原表位[18]。有研究者将重组 RVGP 全长基因和截短(去除跨膜结构)基因的载体所表达的两种 rRVGP 注入小鼠，结果显示前者对狂犬病毒攻击保护率为 100%，后者保护率仅为 66.6%，表明了 RVGP 的天然跨膜结构对小鼠的保护性免疫应答非常重要[3]。因此，建立可以产生高水平的、功能性强的类天然 rRVGP 表达系统十分重要。众所周知，弹状病毒属成员能够感染植物、哺乳动物以及昆虫，因此可以使用不同的系统来表达 rRVGP，在国内外研究中，rRVGP 已经在许多细胞系统中实现了表达。

**2.1 原核系统** 自原核系统表达蛋白的方法使用以来，已有许多中外学者使用不同标签和表达载体在大肠杆菌中表达不同长度的 rRVGP。将 rRVGP 全长基因连接在含 GST 标签的 pGEX-5X-1 载体上，在大肠杆菌中进行表达，可以获得溶解度较高的 rRVGP，并且其具有抗原特异性，与抗狂犬病病毒抗体具有良好的亲和力[19]。但大多数原核表达系统所产生的 rRVGP 都以包涵体形式存在，这对该蛋白的纯化和使用造成了一定的困难，多数只能用于实验室研究。

**2.2 真核系统** 在真核系统中表达的 rRVGP 其 N 端进行了糖基化，因而具有一定的免疫原性。用于表达 rRVGP 的真核系统主要有酵母系统、植物系统和昆虫细胞系统。

**2.2.1 酵母系统** rRVGP 在酿酒酵母表达载体中表达时被糖基化并与酵母中的膜结合，使用免疫印迹和免疫沉淀方法能够检测到这些分子，当将其肌肉注射豚鼠时，能够保护豚鼠免受致死性狂犬病毒攻击，但对小鼠脑内攻毒没有作用[20]。另外，使用多形汉逊酵母来表达截短的 rRVGP 片段，能产生经过正确 N-糖基化的可溶性蛋白，将该蛋白纯化后接种家兔，发现其与全长的 rRVGP 具有相似的免疫原性，可用于检测针对整个病毒粒子和天然糖蛋白的抗体[17]。

**2.2.2 植物系统** 植物系统中表达 rRVGP 的优点在于其成本低，可以大规模生产，且在表达过程中能够形成正确折叠和糖基化的 rRVGP[21]，且这种 rRVGP 可以口服给药。例如，将狂犬病毒基因导入玉米基因组中，rRVGP 可以在玉米籽粒中以高水平表达并长期储存而不会过度变质，将其对绵羊给药时，可产生与商业疫苗相当的免疫保护效果[22]。但当将其用于暴露后接种时，口服免疫也许不能完全抵抗病毒的攻击，因此限定了该方法只适用于感染之前的预防接种。

**2.2.3 昆虫细胞系统** 研究表明，在昆虫细胞系统种表达的 rRVGP 具有良好的免疫原性，能够保护某些动物免受致命狂犬病毒攻击，具有一定的使用价值。例如使用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达载体系统克隆 rRVGP 基因，并在草地夜蛾细胞(Sf9)中表达，可获得高效表达的 rRVGP，免疫小鼠后其血清具有中和活性，表明这种表达方法保留了 rRVGP 天然构象的生物活性[23]。陈奇等[24]人构建了表达狂犬病病毒 SRV9 株糖蛋白的重组杆状病毒载体，

转染至 Sf9 中表达,将其表达产物接种小鼠可诱导其产生抗狂犬病病毒中和抗体,100%达到了中和抗体的保护水平。使用质粒载体在果蝇 S2 细胞中也能表达 rRVGP,由于 S2 细胞的生长不依赖固体底物,因此这些细胞可大量悬浮培养[25]。同时,在 S2 细胞中产生的 rRVGP 是寡聚化的,且具有免疫原性,能保护小鼠免受狂犬病病毒的攻击[26]。

2.3　哺乳动物细胞系统　哺乳动物细胞系统表达的蛋白其分子结构和理化特性最接近天然的高等生物蛋白,目前,许多第二代狂犬病疫苗都是基于哺乳动物细胞生产的,但只有少数方法表达出了稳定的 rRVGP,其中一个原因可能是在哺乳动物系统中所表达的 rRVGP 其糖基化模式与所使用的细胞类型有关,而且可能随着细胞培养条件的改变而变化[27]。有实验证实,在 BHK-21 细胞中产生的 rRVGP 依赖于相应的培养条件才能形成必要的抗原表位[28]。哺乳动物细胞系统表达蛋白生产周期较长且蛋白产量低,因此大大提高了生产成本,也是该系统的缺陷所在。

2.4　病毒载体系统　许多病毒经过基因工程改造后可用于表达 rRVGP,目前已有越来越多的研究人员开始关注这一狂犬病疫苗开发的新方法。目前狂犬病的重组活载体疫苗研究主要包括基因重组痘病毒减毒活疫苗、痘病毒载体疫苗、腺病毒载体疫苗以及新城疫病毒载体疫苗、伪狂犬病毒载体疫苗、副流感病毒载体疫苗、犬瘟热病毒载体疫苗等,这些疫苗在免疫动物后都具备安全性,且经过口服或肌肉注射给药后能产生一定的保护效力,而且这些病毒载体均为常见的弱毒毒株,作为疫苗生产用弱毒株广泛应用于临床实践中,均有良好的安全性,因此重组后能够表达 rRVGP 的病毒亦有较好的生物安全性。利用减毒牛痘病毒(VACV)重组其他遗传物质能够产生针对多种感染因子的新型疫苗,包括编码狂犬病病毒糖蛋白的重组 VACV,将其对野生动物口服给药,能够很好的预防野生动物狂犬病[29]。有报告显示将减毒重组 VACV 载体疫苗以口服的方式在全球范围内使用,2.5 亿剂疫苗中没有任何野生动物的不良反应报告,该疫苗在 50 种脊椎动物中都具有安全性,且对多种动物具有免疫原性和功效[30]。牛痘-狂犬病糖蛋白重组口服疫苗和腺病毒-狂犬病糖蛋白重组口服疫苗对浣熊的狂犬病防治也有一定的效果[31]。腺病毒-狂犬病重组疫苗能够使用人腺病毒载体来表达具有免疫原性 rRVGP,将其对红狐狸给药后,发现血清样品中连续 16 周存在狂犬病毒中和抗体,在对病毒攻击保护方面,最长可达一年以上时间[32]。王颖等[33]人将狂犬病病毒 SRV9 株糖蛋白基因克隆到腺病毒表达系统中,构建重组穿梭质粒,并获得表达狂犬病病毒 SRV9 株 rRVGP 的缺陷型重组人 5 型腺病毒,将该腺病毒腹腔接种昆明小鼠,14d 后均产生了抗狂犬病中和抗体,有效保护率达 90%。另外,将表达 rRVGP 的重组无毒新城疫病毒 La Sota 毒株(rL-RVG)对动物肌内接种,可诱导大量狂犬病病毒中和抗体产生,能够对连续狂犬病病毒攻击提供完全保护[34]。同时新城疫活载体疫苗可以通过多种途径免疫,即便通过呼吸道免疫也能够引起有效的免疫反应,且新城疫病毒不会整合到宿主基因组中,具有良好的生物安全性[35],于桂梅等[35]人构建的重组 NDV 能够使 rRVGP 稳定高效表达,在犬、猫和老鼠注射后能够产生大量针对 RV 的中和抗体。此外,为研制新型有效的狂犬病重组活载体疫苗,袁子国[36]、李业伟[37]分别构建了能够表达狂犬病病毒 CVS-11 株和 SRV9 株糖蛋白的重组伪狂犬病病毒,分别对犬和猫进行肌肉注射免疫,结果显示重组病毒可以有效地刺激动物机体产生免疫反应,具有一定的免疫保护效力,能够达到灭活疫苗的相应水平,另外口服给药的免疫保护力低于肌肉注射。狂犬病毒糖蛋白重组副流感病毒 5(PIV5-G)作为狂犬病病毒感染的新型疗法,也能够保护小鼠免受狂犬病病毒感染[38],因此 PIV5-G 重组疫苗对于预防和治疗狂犬病毒感染具有一定的应用前景。反向遗传技术使得犬瘟热病毒作为疫苗载体也具有一定的应用潜力,李翠霞等[39]人构建的犬瘟热病毒/狂犬病病毒二联活载体疫苗可在犬体内产生远高于 RV 中和抗体保护临界值的特异性抗体,为研制高效、安全、廉价的 CDV-RV 二联活载体疫苗奠定基础。

## 3　rRVGP 作为疫苗使用的问题及意义

在细胞系统中表达的 rRVGP 需要进行纯化后才能用作疫苗接种。对 rRVGP 进行纯化最大的挑战是将 rRVGP 与其他蛋白分离,同时要保留它的三聚体结构以及重要的抗原表位,细胞冷冻、解冻、裂解和浓缩都对 rRVGP 的纯化有着重要的影响。许多纯化方法都会使糖蛋白的寡聚体状态遭到破坏,丧失重要的抗原表位,从而使其缺乏应有的免疫原性。在有洗涤剂存在的条件下,可以避免 rRVGP 的聚集和沉淀。如使用 CHAPS 去污剂与 Tris、NaCl、10%二甲基亚砜(DMSO)和 EDTA 配制洗涤剂,能够使 rRVGP 大量溶解,在进行小鼠试验时发现其能够保护小鼠 100%免受致命狂犬病毒的攻

击[40]。同时,重组动物细胞系统中膜蛋白的表达水平通常较低,因此,在细胞系统中表达的 rRVGP 大多只能用作免疫学分析,只有少部分能作为商品化疫苗进行生产。

病毒活载体疫苗由于能够直接在动物体内产生具有天然结构和免疫原性的 rRVGP,且能够刺激机体的免疫反应,产生能够抵抗狂犬病毒攻击的特异性抗体,因此,国内外学者将其作为下一代狂犬病疫苗进行了广泛的研究,不同种类的病毒载体疫苗在研发过程中的临床应用中都表现出了很好的安全性和免疫效力。目前口服的狂犬病重组痘病毒减毒活疫苗的应用已在消除某些欧洲国家和美国野生动物狂犬病中起到了良好的作用,同时也已用于控制以色列野生动物狂犬病长达十多年。由于在体外环境中产生 rRVGP 的质量和数量与体内环境产生的有所不同,因此在研发病毒载体型 rRVGP 疫苗时,其在病毒体内产生及递送的 rRVGP 量对于提高保护性免疫应答具有重要的作用,是疫苗质量的决定性的指标。不同病毒载体在刺激机体的免疫反应方面存在一定的差异,如痘病毒和腺病毒载体容易受母源抗体和体内中和抗体的影响,而疱疹病毒所受影响则较小,容易产生持续的免疫反应。病毒载体疫苗作为一种转基因产物,其在基因重组后的安全性和遗传稳定性也是评估疫苗能否持续发挥作用的重要标准。

## 4 展 望

虽然大量研究者致力于研究基于细胞膜表达的 rRVGP 作为狂犬病疫苗使用的可能性,但鉴于细胞膜上 rRVGP 的表达水平有限、纯化困难以及免疫原性无法保证等原因,使用各种细胞系统表达 rRVGP 都仅限于实验研究或免疫学分析,很少有真正用于商品化生产的疫苗产品。而近年来研究热度比较高的病毒载体疫苗,可使 rRVGP 在产生时具有同天然 RVGP 相似性很高的抗原表位和免疫原性,且能直接释放到靶动物体内,无需人工进行纯化,这种病毒载体疫苗用于狂犬病免疫更简单和直接,是相较于其他基因工程疫苗和传统的细胞培养疫苗更廉价和高效的疫苗。目前,国内已有研发重组腺病毒载体的 rRGVP 疫苗并已获得临床试验审批,有望在今后几年用于生产实践。在世界范围内病毒载体疫苗也将是狂犬病疫苗下一步的研发重点,具有广阔的应用前景,其安全性和靶向性是未来重要的研究方向。

**利益冲突**:无

**引用本文格式**:张莹辉,姚文生,康 凯,等. 狂犬病病毒糖蛋白重组表达及其基因工程疫苗研究进展[J].中国人兽共患病学报,2020,36(1):65-69. DOI:10.3969/j.issn.1002－2694.2019.00.178

## 参考文献:

[1] Blanchard T. *Rabies* and other *Lyssavirus* diseases[J]. Lancet (North American Edition), 2004, 363(9424):1906-1907.DOI:10.1016/S0140-6736(04)16367-8

[2] Crick J. *Rabies* Virus genome [M]. Rabie in the Tropics,1985. DOI:10.1007/978-3-642-70060-6_2

[3] Gupta P K,Sharma S, Walunj SS, et al. A DNA vaccine that encodes *Rabies* virus glycoprotein lacking transmemrane domain enhances antibody response but not protection[J]. Acta Virol, 2006, 50(2):87.DOI:10.1097/01.aids.0000198085.39831.91

[4] Ertl HCJ. Novel vaccines to human *Rabies*[J]. Plos Neglect Tropl D, 2009, 3(9):e515.DOI:10.1371/journal.pntd.0000515

[5] Fernando Bastida-González, Celaya-Trejo Y, José Correa-Basurto, et al. Predicted 3D model of the *Rabies* virus glycoprotein trimer[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016:1-11.DOI:10.1155/2016/1674580

[6] Koraka P, Bosch BJ, Cox M, et al. A recombinant *Rabies* vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice[J]. Vaccine, 2014, 32(36):4644-4650.DOI:10.1016/j.vaccine.2014.06.058

[7] Gaudin Y, Ruigrok RWH, Knossow M, et al. Low-pH conformational changes of *Rabies* virus glycoprotein and their role in membrane fusion[J]. J Virol, 1993, 67(3):1365-1372.DOI:10.1016/0166-0934(93)90022-J

[8] Renata DFB, Hudacek A, Sawatsky B, et al. Inactivated recombinant *Rabies* viruses displaying canine distemper virus glycoproteins induce protective immunity against both pathogens[J]. J Virol, 2017, 91(8):e02077-16.DOI:10.1128/JVI.02077-16

[9] 杨正时,严子林.狂犬病疫苗的发展与现状及评述[J].中国微生态学杂志,2013,25(02):217-222.DOI:10.13381/j.cnki.cjm.2013.02.008

[10] Johnson N, Cunningham AF, Fooks AR. The immune response to *Rabies* virus infection and vaccination[J]. Vaccine, 2010, 28(23):3896-3901.DOI:10.1016/j.vaccine.2010.03.039

[11] Cruz E T, Iris Angélica Feria Romero, Juan Gabriel López Mendoza, et al. Efficient post-exposure prophylaxis against *Rabies* by applying a four-dose DNA vaccine intranasally[J]. Vaccine, 2008, 26(52):6936-6944.DOI:10.1016/j.vaccine.2008.09.083

[12] Ortiz-Prado E, Ponce J, Darío Ramírez, et al. *Rabies* epidemiology and control in ecuador[J]. Glob J Health Sci, 2016, 8(3):113-121.DOI:10.5539/gjhs.v8n3p113

[13] Omezuruike OI.*Rabies* vaccines: its role, challenges, considerations and implications for the global control and possible eradication of *Rabies*[J]. Int J Anim Vet Adv, 2010, 2(4).

[14] Shakin-Eshleman S H, Remaley A T, Eshleman J R, et al. N-linked glycosylation of *Rabies* virus glycoprotein. Individual se-

quons differ in their glycosylation efficiencies and influence on cell surface expression[J]. J Biol Chem, 1992, 267(15): 10690-10698.DOI:10.1016/0014-5793(92) 80497-5

[15] Maillard AP, Gaudin Y. *Rabies* virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type[J]. J Gen Virol, 2002, 83(Pt 6): 1465-1476.DOI:10.1099/0022-1317-83-6-1465

[16] Rath A, Choudhury S, Batra D, et al. DNA vaccine for *Rabies*: Relevance of the trans-membrane domain of the glycoprotein in generating an antibody response[J]. Virus Res, 2005, 113(2):143-152.DOI:10.1016/j.virusres.2005.05.002

[17] Qian W, Aguilar F, Wang T, et al.Secretion of truncated recombinant *Rabies* virus glycoprotein with preserved antigenic properties using a co-expression system in Hansenula polymorpha[J]. J Microbiol,2013,51(2):234-240.DOI:10.1007/s12275-013-2337-0

[18] Gaudin Y, Moreira S, Bénéjean J, et al. Soluble ectodomain of *Rabies* virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane-anchored glycoprotein[J]. J Gen Virol,1999, 80 (Pt 7)(7):1647-1656.

[19] Liwei Yan, Wei Gong, Wenbing Zhu, et al. Expression and purification of *Rabies* virus glycoprotein and analysis of its specific binding capacity to memory B cells[J].Chin J Biotechnol, Nov 25, 2017, 33(11): 1840-1849. DOI: 10. 13345/j. cjb. 170060

[20] Pourcq K D, Schutter K D, Callewaert N. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives[J]. Appl Microbio Biot, 2010, 87(5):1617-1631.DOI: 10.1007/s00253-010-2721-1

[21] Singh A, Saxena G, Verma P C. Oral *Rabies* vaccine design for expression in plants[J]. Methods MolBiol, 2016, 1404:547-567.DOI:10.1007/978-1-4939-3389-1_36

[22] Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E, Juan López, et al. Induction of a protective immune response to *Rabies* virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the *Rabies* virus glycoprotein[J]. Vaccine, 2012, 30(37): 5551-5556. DOI:10.1016/j.vaccine.2012.06.039

[23] Wang XL, Cchen FF, Yuan W, et al. Expression of insect cell-based *Rabies* virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity efficacy in mice[J]. J Nanjing Med University(Nat Sci), 2015.DOI:10.1128/CVI.05258-11

[24] 陈奇，张守峰，刘晔，等.狂犬病病毒糖蛋白的杆状病毒表达及其免疫原性研究[J].病毒学报，2012，28(5)：501-505.DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002311

[25]Moraes AM, Moraes, Jorge SAC, Astray R M, et al. *Drosophila* melanogaster S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development[J]. Biotechnol Adv, 2012, 30(3): 613-628. DOI: 10. 1016/j. biotechadv.2011.10.009

[26] Yokomizo AY, Jorge SAC, Astray R M, et al. *Rabies* virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line[J]. Biotechnol J, 2007, 2(1):102-109.DOI:10.1002/biot.200600211

[27] Butler M.Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals[J]. Appl Microbio Biot, 2005, 68(3):283-291.DOI:10.1007/s00253-005-1980-8

[28] Sakai M, Kankanamge P J, Shoji J, et al. Studies on the conditions required for structural and functional maturation of *Rabies* Virus glycoprotein (G) in G cDNA-transfected cells[J]. Microbiol Immunol, 2004, 48(11): 853-864. DOI: 10. 1111/j. 1348-0421.2004.tb03617.x

[29] Jacobs B L, Langland J O, Kibler K V, et al. Vaccinia virus vaccines: Past, present and future[J]. Antiviral Res, 2009, 84(1):1-13.DOI:10.1016/j.antiviral.2009.06.006

[30] Maki J, Guiot A L, Aubert M, et al. Oral vaccination of wildlife using a vaccinia-*Rabies*-glycoprotein recombinant virus vaccine (RABORAL V-RG): a global review[J]. Vet Res, 2017, 48(1):57.DOI:10.1186/s13567-017-0459-9

[31] Fehlnergardiner C, Rudd R, Donovan D, et al. Comparing ONRAB(R) and RABORAL V-RG(R) oral *Rabies* vaccine field performance in raccoons and striped skunks, New Brunswick, Canada, and Maine, USA[J]. J Wildl Dis, 2012, 48(1):157-167.DOI:10.7589/0090-3558-48.1.157

[32] Brown LJ, Rosatte RC, Fehlnergardiner C, et al. Oral vaccination and protection of red foxes (Vulpes vulpes) against *Rabies* using ONRAB®, an adenovirus-*Rabies* recombinant vaccine [J]. Vaccine, 2014, 32(8):984-989.DOI:10.1016/j.vaccine.2013.12.015

[33] 王颖，张守峰，刘晔，等.狂犬病病毒糖蛋白重组人腺病毒的构建及免疫效果的初步研究[J].病毒学报，2011，27(05)：442-446.DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002203

[34] Ge J, Wang X, Tao L, et al. *Newcastle disease virus*-vectored *Rabies* vaccine is safe, highly immunogenic, and provides long-lasting protection in dogs and cats[J]. J Virol, 2011, 85(16):8241-8252.DOI:10.1128/JVI.00519-11

[35]于桂梅.表达狂犬病毒G蛋白的重组新城疫病毒接种牛羊的免疫原性研究[D].北京：中国农业科学院，2015. DOI:10.7666/d.Y2787520.DOI:10.7666/d.Y2787520

[36] 袁子国，张才，王晓虎，等.表达狂犬病病毒CVS-11株糖蛋白的重组伪狂犬病病毒在犬体内的免疫效果[J].中国兽医科学，2009，39(11)：984-989. DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2009.11.010

[37] 李业伟.表达狂犬病病毒糖蛋白重组伪狂犬病毒的构建及免疫原性研究[D].长春：吉林大学，2012.

[38] Huang Y, Chen Z, Huang J, et al. *Parainfluenza* virus 5 expressing the G protein of *Rabies* virus protects mice after *Rabies* virus infection[J]. J Virol, 2015, 89(6):3427-3429.DOI: 10.1128/JVI.03656-14

[39] 李翠霞.表达狂犬病病毒G蛋白重组犬瘟热病毒Snyder Hill株的研究[D].北京：中国农业科学院，2018.

[40] Ramya R, Mohana Subramanian B, Sivakumar V, et al. Expression and solubilization of insect Cell-Based *Rabies* Virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective efficacy in Mice[J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(10):1673-1679.DOI:10.1128/CVI.05258-11

收稿日期：2019-04-01　编辑：王晓欢