

研究报告

Research Report

家犬用狂犬病口服基因工程疫苗的研究初探

潘艳^{1,2} 金硕^{1,2} 卢摇^{1,2} 梁晶晶^{1,2} 李晓宁^{1,2*} 罗廷荣^{1,2*}

1 广西大学, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁, 530004; 2 广西大学动物科学技术学院, 南宁, 530004

* 共同通信作者, tingrongluo@gxu.edu.cn; lizylyzzy2007@qq.com

摘要 中国的狂犬病主要由农村家犬通过咬伤传染所致, 为了研制高效实用的家犬用狂犬病口服基因工程疫苗, 本研究把狂犬病病毒 G 蛋白基因插入真核表达质粒 pIRESneo, 构建重组表达质粒 pIRESneo-G, 转化入鼠伤寒减毒沙门氏菌 SL3261, 构建重组口服疫苗 SL3261-pIRESneo-G。通过口服免疫小鼠, 检测免疫血清中和抗体水平及其病毒保护效果。结果显示, 经小鼠口服免疫接种一次后第三周能产生高水平的中和抗体水平, 达到 WHO 要求的 0.5 IU/mL; 免疫小鼠经肌肉注射 100 LD₅₀/0.03 mL 的野毒株 GX074 后获 56% 保护效果。

关键词 狂犬病病毒, G 蛋白, 口服疫苗, 减毒沙门氏菌

Research of the Rabies Oral Genetic Engineering Vaccine for Domestic Dogs

Pan Yan¹ Jin Shuo² Lu Yao² Liang Jingjing^{1,2} Li Xiaoning^{1,2*} Luo Tingrong^{1,2*}

1 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Guangxi University, Nanning, 530004; 2 College of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Guangxi University, Nanning, 530004

* Co-corresponding authors, tingrongluo@gxu.edu.cn; lizylyzzy2007@qq.com

DOI: 10.13417/j.gab.038.004001

Abstract Rabies in China is mainly caused by dogs biting in rural areas. To develop an effective rabies oral genetic engineering vaccine for domestic dogs, we inserted the Glycoprotein gene of the rabies virus (RV) into eukaryotic expressin plasmids pIRESneo, and constructed recombinant expressing plasmids pIRESneo-G. We electrotransfected pIRESneo-G into a attenuated *salmonella typhimurium* SL3261 and constructed a recombinant oral vaccine SL3261-pIRESneo-G. We investigated immune serum neutralizing antibody level and its protective effect against rabies virus by oral immunization of mice. The results showed that high levels of neutralizing antibodies were produced in the third week after oral immunization of mice, reaching the WHO's requirement of 0.5 IU/mL. 56% protective effect was obtained by intramuscular injection of 100 LD₅₀/0.03 mL wild strain GX074 in immunized mice.

Keywords Rabies virus, Glycoprotein, Oral vaccine, Attenuated *Salmonella typhimurium*

狂犬病(Rabies)是一种由狂犬病病毒(rabies virus, RV)引起的人兽共患传染病, 致死性非常高, 一旦发病几乎 100% 死亡。全球每年因狂犬病死亡的病例高达 4~7 万例。中国狂犬病的发病和死亡人数居全球第二, 仅次于印度(<http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmLfiles/mohbgt/pwsbgb/index.htm>)。广西是狂犬病的老疫区和高发区, 多年来死亡人数居全国之首, 形势非常严峻(谭明杰等, 2005; Liu et al., 2007;

潘沛江等, 2017)。

中国狂犬病发生的特点是, 人的狂犬病主要通过犬只咬伤而传播。广西家犬数量庞大, 达 500 万头, 部分貌似健康的家犬携带狂犬病病毒, 1999~2007 年平均阳性率高达 3.22% (Tang et al., 2014; 罗廷荣等, 2017, 中国狂犬病年会, 9-10)。带毒家犬是该病防控的源头关键, 因此加强家犬免疫是控制我区狂犬病的有效途径。然而, 兽医技术人员在给家犬免疫注射

基金项目: 本研究由国家自然科学基金项目(项目编号 31570147)资助

引用格式: Pan Y., Jin S., Lu Y., Liang J.J., Li X.N., and Luo T.R., 2019, Research of the rabies oral genetic engineering vaccine for dogs, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 38(9): 4001-4007 (潘艳, 金硕, 卢摇, 梁晶晶, 李晓宁, 罗廷荣, 2019, 家犬用狂犬病口服基因工程疫苗的研究初探, 基因组学与应用生物学, 38(9): 4001-4007)

过程中,存在被犬咬伤致病的潜在危险。因此,在中国乡村地区口服疫苗是防控该病的最有效免疫方式。

随着基因工程技术的迅猛发展,狂犬病口服基因工程疫苗也取得了长足进步,二十世纪八十年代欧洲在应用口服疫苗防控野生动物狂犬病方面已有成功的经验。Kieny 等(1984)首次运用重组痘病毒成功表达 RV 糖蛋白(glycoprotein, G),免疫小鼠产生很高的中和抗体,攻毒获得有效保护。Rupprecht 等(1986; 1988)用痘病毒为载体表达 RV G 蛋白,在欧洲免疫野生动物浣熊,与弱毒口服疫苗相比,产生更高的抗体且保护期更长。1988 年美国宾夕法尼亚州和加拿大安大略省使用该疫苗进行大规模野外投放,取得很好的免疫效果(Johnston et al., 1988)。

本研究以减毒沙门氏菌为载体表达 RV G 蛋白,口服免疫小鼠,观察免疫效果,探讨其做为口服基因工程疫苗的可行性。

1 结果与分析

1.1 成功构建重组表达质粒 pIRESneo-G

用特异性引物 ERA-G0 (+)和 ERA-G10 (-)扩增 RV ERA 株的 G 基因,克隆到 pMD-18T 载体上,再亚克隆到真核表达载体 pIRESneo 构建重组表达质粒 pIRESneo-G,该质粒经 *EcoR* I /*Bst*X I 双酶切和 PCR 扩增鉴定,获得与预期 1 700 bp 大小一致的目的片段(图 1),对阳性克隆进行测序分析,与模板序列同源性达 100%,表明已成功构建了重组表达质粒 pIRESneo-G。

1.2 制备重组 G 蛋白沙门氏菌

将纯化的重组表达质粒 pIRESneo-G 电转化到沙门氏菌 LB5000 内进行甲基化修饰。从 LB5000 中提取 pIRESneo-G 并纯化,再电转化到终宿主菌沙门

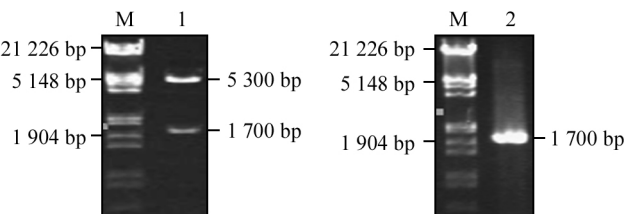


图 1 构建重组表达质粒 pIRESneo-G
注: M: *EcoR* I +*Hind* III Marker; 1: *EcoR* I /*Bst*X I 双酶切鉴定;
2: PCR 鉴定
Figure 1 Construction of recombinant plasmid pIRESneo-G
Note: M: *EcoR* I +*Hind* III Marker; 1: Recombinant plasmid pIRESneo-G with *EcoR* I and *Bst*X I ; 2: PCR product of the G gene

氏菌 SL3261 中,成功转化了重组 G 蛋白的沙门氏菌(图 2)。转化了 pIRESneo-G 的沙门氏菌 SL3261 可以从小鼠肠道进入组织中表达 G 蛋白。

1.3 重组 G 蛋白在小鼠体内表达

1 010 CFU/mL 重组菌 SL3261-pIRESneo-G 经口服小白鼠后分别于第 10 天、第 20 天、第 30 天对实验小白鼠实行安乐死,无菌收集各器官组织,进行免疫组化实验(图 3)。用 RV G 蛋白单克隆抗体 MAb 15-13 为一抗和羊抗鼠 IgG 为二抗进行免疫组化染色,观察重组菌 L3261-pIRESneo-G 在小鼠各组织器官中 G 蛋白的表达情况。结果显示,小鼠口服重组菌第 10 天、第 20 天和第 30 天,在小鼠的胃、肠、肝脏和脾脏均检出 G 蛋白的表达。

1.4 重组菌的安全性

重组菌 SL3261-pIRESneo-G 培养在液体培养基中,测定 *OD*₄₆₀ 值。通过口服、肌注、腹腔注射小鼠,来验证重组菌 SL3261-pIRESneo-G 的安全性。每天 7:00、12:00、18:00 和 23:00 4 个时间点观察小鼠的临床变化。 $10^4 \sim 10^{10}$ CFU/mL 浓度的重组菌,通过不同途径接种小鼠,均未出现发病死亡的情况(表 1)。除了肌肉注射的小鼠出现轻微的局部肿胀情况外,口服和腹腔注射的小鼠均表现正常,说明重组菌 SL3261-pIRESneo-G 对小鼠安全、无毒性。

1.5 重组菌口服免疫小鼠

小鼠免疫实验设 4 组:生理盐水组、SL3261 组、SL3261-pIRESneo 组、SL3261-pIRESneo-G 组。小鼠口服免疫后第 1~7 周断尾采血,分离血清,用 ELISA 方法检测血清中和抗体水平。

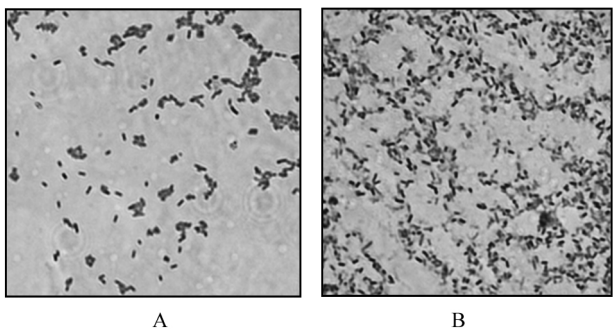


图 2 转化重组质粒 pIRESneo-G 的沙门氏菌(100×)
注: A: LB5000-pIRESneo-G; B: SL3261-pIRESneo-G
Figure 2 Electrotransformation of recombinant plasmid pIRESneo-G into *Salmonella typhimurium* (100×)
Note: A: LB5000-pIRESneo-G; B: SL3261-pIRESneo-G

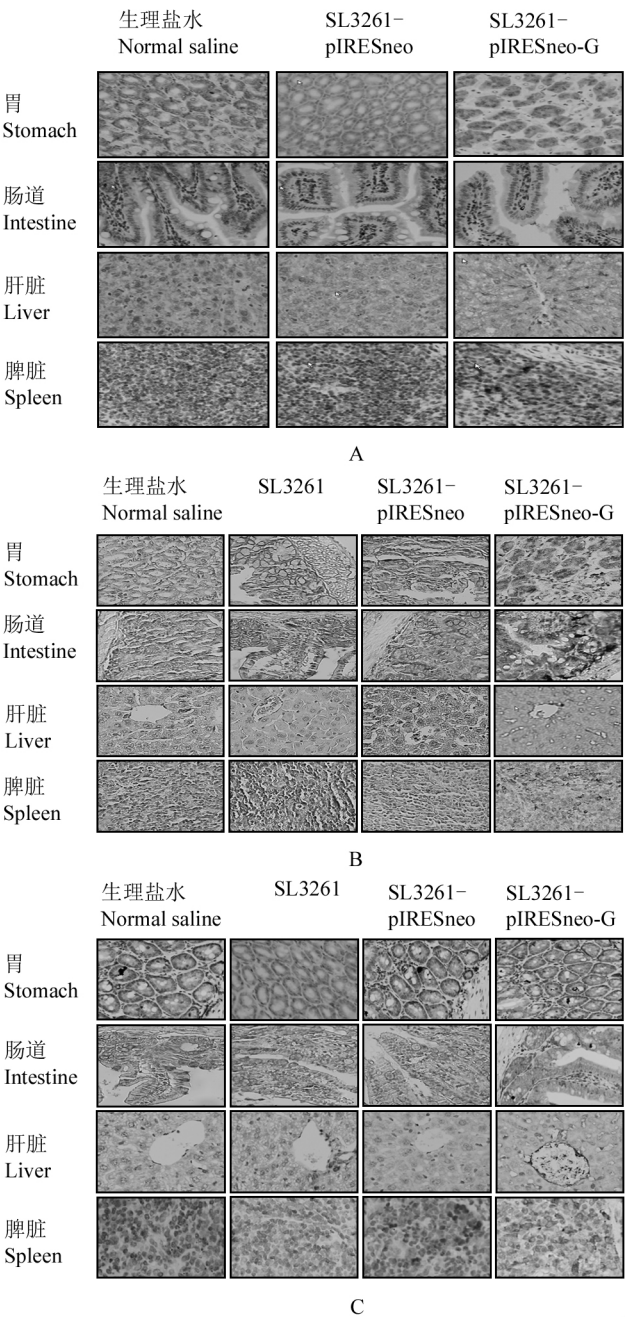


图3 免疫组化试验检测G蛋白在小鼠体内表达(100×)
注: A: 口服第10天; B: 口服第20天; C: 口服第30天
Figure 3 Immunohistochemistry tests of G protein in mice (100×)
Note: A: 10 d post oral immunization; B: 20 d post oral immunization; C: 30 d post oral immunization

生理盐水组、SL3261组、SL3261-pIRESneo组的小鼠血清没有检测到中和抗体,但是口服菌SL3261-pIRESneo-G组的小鼠血清中和抗体水平明显提高,免疫第3周所有小鼠血清中和抗体水平平均达到0.5 IU/mL以上,抗体滴度为0.592~1.585 IU/mL,并持续到第7周(表2)。说明重组菌SL3261-pIRESneo-G作为口服疫苗,可明显地诱导小白鼠产生有效

表1 重组菌SL3261-pIRESneo-G接种小鼠的状态
Table 1 The condition of mice inoculated with SL3261-pIRESneo-G

组别 Group	小鼠编号 Mice No.	不同浓度SL3261-pIRESneo-G处理的小鼠状态(CFU/mL) The condition of mice challenged with different concentration of SL3261-pIRESneo-G (CFU/mL)						
		10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
口服 Oral route	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-
肌肉注射 Intramuscular injection	1	±	±	±	±	-	-	-
	2	±	±	±	±	-	-	-
	3	±	±	±	-	-	-	-
	4	±	±	±	-	-	-	-
腹腔注射 Ntraperitoneal injection	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-
阴性对照 Negative control	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-

注: ±: 局部肿胀; -: 正常
Note: ±: Local swelling; -: Normal

的中和抗体。

1.6 小鼠免疫保护实验

重组菌SL3261-pIRESneo-G口服免疫小鼠第2周,肌肉注射野毒株GX074进行攻毒试验。SL3261-pIRESneo-G组在攻毒第13天、第14天各死亡2只小鼠,其余5只小鼠均存活到实验结束(21 d),存活率达56% (5/9) (图4),高于阴性对照组,存活率0 (0/5)和空载体组SL3261-pIRESneo,存活率20% (1/5);稍低于ERA疫苗组80% (4/5)。结果说明,重组菌SL3261-pIRESneo-G口服免疫小鼠能够产生有效的保护力。

2 讨论

狂犬病是一种世界流行的高死亡率传染病。99%以上的人死亡病例来自发展中国家。发达国家特别是荷兰、法国、德国等欧洲国家通过口服免疫野生动物以及给家养宠物注射狂犬病疫苗的方式消灭了狂

表 2 免疫小鼠血清中和抗体水平(IU/mL)

Table 2 Neutralizing antibody in mice serum vaccinated with SL3261-pIRESneo-G (IU/mL)

组别	小鼠编号	免疫时间(周)							
Group	Mice No.	Week after vaccination (week)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
生理盐水	1	0.057	0.043	0.015	0.003	0.013	0.037	0.040	0.043
Normal saline	2	0.048	0.126	0.012	0.000	0.043	0.049	0.044	0.060
SL3261	1	0.068	0.057	0.061	0.085	0.094	0.043	0.061	0.064
	2	0.003	0.038	0.261	0.043	0.052	0.085	0.063	0.085
SL3261-pIRESneo	1	0.085	0.047	0.051	0.051	0.053	0.069	0.088	0.083
	2	0.063	0.089	0.084	0.132	0.136	0.102	0.176	0.179
SL3261-pIRESneo-G	1	0.043	0.093	0.084	0.684	1.459	1.496	1.220	1.585
	2	0.043	0.053	0.108	1.172	1.126	1.018	0.993	0.956
	3	0.017	0.001	0.242	0.624	0.740	0.774	0.798	0.734
	4	0.085	0.059	0.168	0.592	0.688	0.961	0.956	0.795

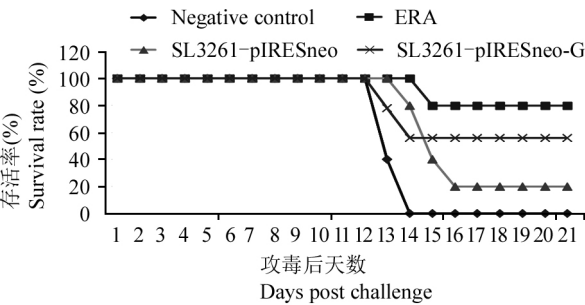


图 4 重组菌 SL3261-pIRESneo-G 免疫小鼠后攻毒 GX074 小鼠存活率

Figure 4 Survival rates of mice immunized with recombinant vaccine SL3261-pIRESneo-G after RV GX074 challenge

犬病(Newmark, 1988; Cliquet et al., 2013; Müller et al., 2015)。而中国大量的家犬散养在农村,免疫密度低,造成狂犬病高发。全面免疫接种是控制狂犬病最有效的方式,但中国犬只数量庞大,特别是在农村地区要做好家犬免疫需要花费大量的人力物力,同时防疫人员还存在着被咬伤致病风险。因此,迫切需要研发和推广免疫方式更为简单、安全的口服疫苗。

目前,在研发狂犬病口服疫苗方面,学者们构建了减毒活疫苗(Wandeler et al., 1988)、痘病毒载体重组苗(Kieny et al., 1984)、腺病毒载体重组苗(Choi et al., 2015; Kim et al., 2017)、转基因番茄重组苗(Singh et al., 2015) 以及利用反向遗传学技术构建的重组苗(Cliquet et al., 2013; Zhou et al., 2015; Yang et al., 2016)等,以减毒沙门氏菌为载体制备的狂犬病重组口服疫苗未见报道。减毒沙门氏菌口服疫苗通过粘膜免疫刺激免疫系统产生细胞免疫和体液免疫,同时具有繁殖迅速、培养简便等优点,在多种病原体如病毒、细菌、寄生虫的口服疫苗研发中得到越来越多的

关注。以猪霍乱减毒沙门氏菌为载体的猪伪狂犬病病毒(pseudorabies, PRV) gD 基因口服疫苗免疫小鼠,能够诱导机体产生抗 PRV 的抗体,刺激淋巴细胞增值和细胞毒性 T 细胞反应,并且在攻毒 PRV 强毒株时,小鼠得到有效保护(Shiau et al., 2001)。将炭疽杆菌 PA 基因导入鼠伤寒减毒沙门氏菌 SL3261,口服免疫小鼠。在炭疽杆菌的攻击下,经口服免疫的小鼠获得有效保护(Coulson et al., 1994)。SL3261 是一种 aroA 基因缺失的减毒株,近年的研究表明 SL3261 能够进入多种细胞表达外源基因(黄建生等, 1996, 微生物学报, 36(3): 234-236; 董坚等, 2008)。

以活的弱毒 RV 如 SAD B19 株、SAD Bern 株等制备的口服疫苗存在着毒力返强、散毒的风险。斯洛文尼亚于 1995 年发起了口服疫苗清除狐狸狂犬病的行动。2012 年 5 月,人们捕获了一只出现典型狂犬病症状的红狐(赤狐)。在它的脑组织和唾液腺中检测到了 RV N 基因,核苷酸序列分析发现与疫苗株 SAD B19 的 N 基因同源性高达 100% (Hostnik et al., 2014)。2015 年 7 月,研究人员从罗马尼亚一只临床疑似狂犬病牛的脑组织中分离到了 RV,核苷酸序列分析发现该毒株 N、G 基因与疫苗株 SAD B19 的同源性为 100% (Vuta et al., 2016)。

RV G 基因是一个非常重要的毒力基因,它与病毒的毒力、致病性、免疫原性、吸附、传播、复制密切相关(Dietzschold et al., 2008)。本研究将 RV G 基因插入质粒 pIRESneo 构建重组质粒 pIRESneo-G,将重组质粒转染 BHK-21 细胞,间接免疫荧光检测到 G 蛋白能在仓鼠细胞 BHK-21 中表达(王卫华, 2006)。将重组质粒 pIRESneo-G 转化鼠伤寒减毒沙门氏菌

SL3261, 制备成口服基因工程疫苗 SL3261-pIRES-neo-G; $10^4 \sim 10^{10}$ CFU/mL 浓度的重组菌通过口服、肌肉注射、腹腔注射等途径接种小鼠均无致病性, 胃、肠、肝脏和脾脏均未发现组织异常病变, 说明本研究以减毒鼠伤寒沙门氏菌为载体制备的 RV G 蛋白重组口服疫苗安全可靠, 避免了 RV 口服疫苗毒力返强的潜在危险。

分别于免疫第 10 天、第 20 天、第 30 天, 采用免疫组化的方法检测到小鼠胃、肠道、肝脏、脾脏等主要消化器官均有 RV G 蛋白的表达, 说明该重组菌已在小鼠体内寄生。但随着时间的延长 G 蛋白的表达也逐渐减少, 这是因为 SL3261 是一种 *aroA* 基因缺失株, 基因缺失导致芳香族氨基酸营养缺陷, 因此在小鼠体内难以获得充足的养分而继续存活。小鼠口服免疫重组菌 SL3261-pIRESneo-G 第 3 周产生了较高的中和抗体(0.5 IU/mL 以上), 并持续到第 7 周。根据 World Health Organization (2013) 狂犬病专家评判指标, 认为口服免疫中和抗体水平等于或高于 0.5 IU/mL, 表示在野毒攻击时能得到有效的保护。一次口服免疫的小鼠经肌肉注射攻毒后获得 56% 的保护率, 与疫苗株 ERA (80%) 相比略低。可在第一次口服免疫的基础之上, 加强进行二免, 会提高免疫保护效果。

综上所述, 本研究采用分子生物学新技术开发针对犬的狂犬病口服基因工程疫苗, 免疫小鼠能够产生较高的中和抗体, 抵抗野毒的攻击。本研究小组正在利用该重组口服疫苗给家犬投服, 检测在家犬的免疫效果, 争取将来通过更多的实验来证实该重组口服疫苗的可靠性、安全性和实用性, 为减少人狂犬病发病数, 维护社会稳定, 保障公共健康安全提供技术支撑。

3 材料与方法

3.1 小鼠、病毒与菌株

4 周龄的 BALB/c 小鼠购自广西医科大学动物实验中心; RV 疫苗株 ERA、野毒株 GX074、质粒 pIRESneo 由广西大学动物科学技术学院预防兽医学实验室保存; 减毒鼠伤寒沙门氏菌 LB5000 和 SL3261 分别由山东大学口腔医学院和中山大学附属第一医院消化内科惠赠。

3.2 主要试剂

TRIZOL、*Taq* DNA polymerase、dNTP 购自上海生工公司; M-MuLV 反转录酶购自美国 Promega 公

司; pMD18-T vector 购自日本 TaKaRa 公司; Rnasin 购自华美生物工程公司; 酵母提取物和胰蛋白胨购自大连宝生物公司; 大肠埃希氏工程菌 DH5 α 为广西大学动物科学与技术学院预防兽医学保存; RV G 蛋白小鼠单克隆抗体 MA b 15-13 日本岐阜大学源宣之教授馈赠; Goat Anti-Mouse IgG, H&L Chain Specific Rhodamine Conjugate 购自美国 Merck 公司; SerelisaTM 狂犬病抗体检测试剂盒购自法国新百克斯公司。

3.3 培养基的配制

胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, NaCl 100 g, 加 1 000 mL 灭菌去离子水, 调 pH 至 7.0, 15 磅(121 $^{\circ}$ C) 高压灭菌 20 min, 即为普通液体培养基。在培养基中加入 2% 琼脂, 高压灭菌后, 倒制固体平板培养基。

3.4 重组表达质粒的构建

根据发表在 GenBank 的 G 基因序列设计引物, 上游引物 ERA-G0: 5'-GAA TTCAACATCCCTCAAA AGACTTA-3' 和下游引物 ERA-G10: 5'-GCCCAATG CATTGGCATGGAGTTCAAGGAGGACTA-3', 5' 端和 3' 端分别引入 *EcoR* I 和 *Bst*X I 酶切位点(斜体部分), 扩增狂犬病 ERA 毒株的 G 蛋白基因, 用 PCR 和双酶切法鉴定, 同时对插入的 G 基因进行序列测定。验证正确后, 用 *EcoR* I 和 *Bst*X I 酶切 pMD18-T-G 重组质粒, 酶切产物用 T4 DNA 连接酶连接到经 *EcoR* I 和 *Bst*X I 双酶切并纯化的空载体质粒 pIRESneo 上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养过夜。挑取阳性单个菌落进行培养并抽提质粒, 用 PCR 和双酶切方法鉴定, 对插入基因进行测序验证。

3.5 电转化

取 100 μ L 感受态细胞(LB5000 或 SL3261), 冰浴 20 min 融化, 加入 1 ng pIRESneo-G 重组质粒。转移入预冷的电击杯, 电场强度 12.5 kV/cm, 电击脉冲宽度 5 ms 电击后迅速加入 900 μ L 37 $^{\circ}$ C 预热的 SOC 培养基。37 $^{\circ}$ C 220 r/min 复苏 2 h, 取 100 μ L 菌液涂布平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h。

3.6 免疫组化

组织切片的制备: 组织样品胃、肠道、肝脏、脾脏浸泡于 4% 多聚甲醛固定, 转移入 20% 蔗糖溶液中 4 $^{\circ}$ C 过夜。蜡块制作、切片、贴片, 用 0.01 mol/L KPBS 清洗 3 次, 5 min/次。加入 0.3% 的过氧化氢甲醇溶液(甲醇 80 mL+0.01 mol/L KPBS 100 mL+30% 过氧化氢)浸泡 30 min, 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次, 5 min/次。

加入 0.3% Triton X 100 (30% Triton X 100+0.01 mol/L KPBS 100 mL)作用 30 min, 0.01 mol/L KPBS 清洗 3 次, 5 min/次。

免疫组化染色: 加入用血清稀释液(牛血清白蛋白 1.00 g+0.01 mol/L PBS 100 mL+叠氮钠 0.08 g)稀释的一抗 RV G 蛋白小鼠单克隆抗体 MAb 15-13, 4℃孵育 24 h; 0.01 mol/L KPBS 洗 3 次, 5 min/次。加入 0.01 mol/L KPBS 稀释的酶标二抗 Goat Anti-Mouse IgG, 室温孵育 2 h。0.01 mol/L KPBS 洗 3 次, 5 min/次。加入显色液, 进行免疫组织化学显色, 加入 0.01 mol/L KPBS 终止反应。梯度酒精脱水之后, 封片, 拍照。

3.7 ELISA 方法检测 RV 中和抗体

于重组菌 SL3261-pIRESneo-G 免疫小鼠第 0 周、第 1 周、第 2 周、第 3 周、第 4 周、第 5 周、第 6 周、第 7 周, 断尾采血分离血清, 用 ELISA 方法检测 RV 的中和抗体, 具体方法按试剂盒说明书操作进行。

3.8 重组菌安全性实验

用液体培养基培养重组菌 SL3261-pIRESneo-G, 37℃培养 16~20 h, OD_{460} 在 0.4~0.8 之间时, 通过平板计数法、显微计数法和比浊法进行综合判定培养重组菌 SL3261-pIRESneo-G 浓度。4 周龄的 BALB/c 小鼠共 112 只随机分成 28 组, 每组 4 只。制备 10^4 ~ 10^{10} CFU/mL 浓度的重组菌, 将每个浓度的重组菌分别通过口服、肌注、腹腔注射 3 种方式攻毒小鼠, 来验证重组菌 SL3261-pIRESneo-G 的安全性。每天 7:00、12:00、18:00 和 23:00, 4 个时间点观察小鼠的临床变化。

3.9 小鼠免疫保护实验

4 周龄的 BALB/c 小鼠共 24 只随机分成 4 组, 即阴性对照组(生理盐水组) 5 只、ERA 疫苗组 5 只、SL3261-pIRESneo 空载体组 5 只、重组菌 SL3261-pIRESneo-G 组 9 只。 10^9 CFU/mL 浓度的重组菌 SL3261-pIRESneo-G 口服免疫小鼠第 2 周, 肌肉注射剂量为 100 LD₅₀/0.03 mL 的野毒株 GX074 进行攻毒试验, 观察攻毒 3 周内重组菌的免疫保护效果。

作者贡献

罗廷荣为本研究论文的负责人, 负责试验方案设计和数据处理; 潘艳负责试验的操作和论文撰写; 金硕、卢摇和梁晶晶参与试验的部分操作、数据的处

理; 罗廷荣和李晓宁负责试验指导和文章的修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(项目编号 31-570147)资助。

参考文献

- Choi J., Yang D.K., Kim H.H., Jo H.Y., Choi S.S., Kim J.T., Cho I.S., and Kim H.W., 2015, Application of recombinant adenoviruses expressing glycoprotein or nucleoprotein of rabies virus to Korean raccoon dogs, Clin. Exp. Vaccine Res., 4(2): 189-194
- Cliquet F., Robardet E., and Picard Meyer E., 2013, Genetic strain modification of a live rabies virus vaccine widely used in Europe for wildlife oral vaccination, Antiviral Res., 100 (1): 84-89
- Coulson N.M., Fulop M., and Titball R.W., 1994, *Bacillus anthracis* protective antigen, expressed in *Salmonella typhimurium* SL3261, affords protection against anthrax spore challenge, Vaccine, 12(15): 1395-1401
- Dietzschold B., Li J., Faber M., and Schnell M., 2008, Concepts in the pathogenesis of rabies, Future Virol., 3(5): 481-490
- Dong J., Chen M.Q., Yang J., Wang X.C., Wu Z.P., Chen Y., Wang Z.Q., and Li M., 2008, Recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine SL3261-pcDNA3.1+/flk-1 (n1-4) inhibits growth of colorectal cancer in BALB/c mice, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi (Journal of World Chinese consumption), 16(2): 163-170 (董坚, 陈明清, 杨军, 王熙才, 伍治平, 陈艳, 王志强, 李淼, 2008, 重组减毒沙门氏菌疫苗 SL3261-pcDNA3.1+/flk-1(n1-4)抗小鼠大肠癌的生长, 世界华人消化杂志, 16(2): 163-170)
- Johnston D.H., Voigt D.R., MacInnes C.D., Bachmann P., Lawson K.F., and Rupprecht C.E., 1988, An aerial baiting system for the distribution of attenuated or recombinant rabies vaccines for foxes, raccoons, and skunks, Rev. Infect Dis., 10(Suppl 4): S660-664
- Hostnik P., Picard-Meyer E., Rihtaric D., Toplak I., and Cliquet F., 2014, Vaccine-induced rabies in a red fox (*Vulpes vulpes*): isolation of vaccine virus in brain tissue and salivary glands, J. Wildl. Dis., 50(2): 397-401
- Kieny M.P., Lathe R., Drillien R., Spohner D., Skory S., Schmitt D., Wiktor T., Koprowski H., and Lecocq J.P., 1984, Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus, Nature, 312(5990): 163-166
- Kim H.H., Yang D.K., Nah J.J., Song J.Y., and Cho I.S., 2017, Comparison of the protective efficacy between single and

- combination of recombinant adenoviruses expressing complete and truncated glycoprotein, and nucleoprotein of the pathogenic street rabies virus in mice, *V. J.*, 14:122
- Liu Q., Xiong Y., Luo T.R., Wei Y.C., Nan S.J., Liu F., Pan Y., Feng L., Zhu W., Liu K., Guo J.G., and Li H.M., 2007, Molecular epidemiology of rabies in Guangxi Province, South of China, *J. Clin. Virol.*, 39(4): 295-303
- Müller T.F., Schröder R., Wysocki P., Mettenleiter T.C., and Freuling C.M., 2015, Spatio-temporal use of oral rabies vaccines in fox rabies elimination programmes in Europe, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 9(8): e0003953
- Newmark P., 1988, New vaccine and initiative mean end of rabies in sight for Europe? *Nature*, 336(6198): 416
- Pan P.J., Mo J.J., Yang Y.P., He W.T., Wang J., Jiang L.N., Zhou S.W., and Tan Y., 2017, Epidemiological characteristics and harmfulness of rabies from 2005 to 2015 in Guangxi, China, *Yingyong Yufang Yixue (Journal of Applied Preventive Medicine)*, 23(2): 98-99 (潘沛江, 莫建军, 阳益萍, 何为涛, 王晶, 蒋丽娜, 周树武, 谭毅, 2017, 广西 2005~2015 年狂犬病的流行危害及特征应用, *应用预防医学*, 23(2): 95-99)
- Rupprecht C.E., Hamir A.N., Johnston D.H., and Koprowski H., 1988, Efficacy of a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine in raccoons (*Procyon lotor*), *Rev. Infect. Dis.*, 10 (Suppl 4): S803-S809
- Rupprecht C.E., Wiktor T.J., Johnston D.H., Hamir A.N., Dietzschold B., Wunner W.H., Glickman L.T., and Koprowski H., 1986, Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83(20): 7947-7950
- Shiau A.L., Chen Y.L., Liao C.Y., Huang Y.S., and Wu C.L., 2001, Prothymosin alpha enhances protective immune responses induced by oral DNA vaccination against pseudorabies delivered by *Salmonella choleraesuis*, *Vaccine*, 19 (28-29): 3947-3956
- Singh A., Srivastava S., Chouksey A., Panwar B.S., Verma P.C., Roy S., Singh P.K., Saxena G., and Tuli R., 2015, Expression of rabies glycoprotein and ricin toxin B chain (RGP-RTB) fusion protein in tomato hairy roots: a step towards oral vaccination for rabies, *Mol. Biotechnol.*, 57(4): 359-370
- Tan M.J., Li R.C., Mo Z.J., Huang L.R., Dong Y.H., Xie Y.H., and Yang J.Y., 2005, Analysis of epidemiological characteristics of rabies and strategies for its prevention and treatment from 2000 to 2004 in Guangxi Zhuang Autonomous Region, *Jibing Jiancang (Disease Surveillance)*, 20(11): 568-570 (谭明杰, 李荣成, 莫兆军, 2005, 广西 2000~2004 年狂犬病流行病学特征分析, *疾病监测*, 20(11): 568-570)
- Tang H.B., Pan Y., Wei X.K., Lu Z.L., Lu W., Yang J., He X.X., Xie L.J., Zeng L., Zheng L.F., Xiong Y., Minamoto N., and Luo T.R., 2014, Re-emergence of rabies in the Guangxi province of Southern China, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8(10): e3114
- Vuta V., Picard-Meyer E., Robardet E., Barboi G., Motiu R., Barbuceanu F., Vlagioiu C., and Cliquet F., 2016, Vaccine-induced rabies case in a cow (*Bos taurus*): molecular characterisation of vaccine strain in brain tissue, *Vaccine*, 34(41): 5021-5025
- Wandeler A.I., Capt S., Kappeler A., and Hauser R., 1988, Oral immunization of wildlife against rabies: concept and first field experiments, *Rev. Infect. Dis.*, 10(Suppl 4): S649-S653
- Wang W.H., 2006, Construction of recombinant plasmids of G gene of rabies virus ERA strain and its deleted mutants and expression of glycoprotein on BHK-21 cells, Thesis for M.S., Guangxi University, Supervisor: Luo T.R., pp.32-33 (王卫华, 2006, 狂犬病 ERA 株 G 基因及其缺失片段表达载体的构建和糖蛋白的表达, 硕士学位论文, 广西大学, 导师: 罗廷荣, pp.32-33)
- World Health Organization, 2013, WHO expert consultation on rabies. second report, World Health, Organ. Tech. Rep., (982): 1-139
- Yang D.K., Kim H.H., Choi S.K., Kim J.T., Lee K.B., Lee S.H., Cho I.S., 2016, Safety and immunogenicity of recombinant rabies virus (ERAGS) in mice and raccoon dogs, *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 5(2): 159-168
- Zhou M., Wang L., Zhou S.Q., Wang Z., Ruan J.C., Tang L.J., Jia Z.M., Cui M., Zhao L., and Fu Z.F., 2015, Recombinant rabies virus expressing dog GM-CSF is an efficacious oral rabies vaccine for dogs, *Oncotarget*, 6(36): 38504-38516