

代昕宇, 李昀真, 孙亚杰, 等. 狂犬病颗粒样疫苗的制备及免疫评价 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (7): 44-51.

DAI X Y, LI Y Z, SUN Y J, et al. Preparation and immune evaluation of rabies virus-like particles vaccine [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (7): 44-51.

狂犬病颗粒样疫苗的制备及免疫评价

代昕宇, 李昀真, 孙亚杰, 胡博, 张成琪, 许丽文, 白雪*

(中国农业科学院特产研究所农业农村部经济动物疫病重点实验室, 吉林 长春 130112)

摘要: 为研发高免疫原性的新型狂犬病颗粒样疫苗, 利用 PCR 方法扩增狂犬病病毒 HEP-Flury 株的 G 蛋白和 M 蛋白基因序列, 将其依次克隆至 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统穿梭载体 pFastBac dual 上, 构建重组质粒 pFD-GM。制备基于 pFD-GM 的重组杆粒, 转染至 Sf9 细胞, 得到重组杆状病毒 rb-GM, 在 Sf-9 细胞中表达获得病毒样颗粒 VLP-GM。经 SDS-PAGE、Western blot 和间接免疫荧光鉴定, 重组杆状病毒成功表达了 G 蛋白 (约 56 kDa) 和 M 蛋白 (约 23 kDa); 经电镜观察, VLP-GM 大小约为 100 nm×50 nm, 呈表面带有纤突的子弹形状, 与典型的狂犬病病毒粒子类似。将 VLP-GM 免疫犬, 经测定犬在二次免疫后产生较灭活疫苗更高的中和抗体水平, 达到 7.81 U/mL, 并且与单独免疫 G 蛋白相比可刺激更多细胞因子如白细胞介素 4 (IL-4) 和 γ -干扰素 (IFN- γ) 生成。本研究成功表达了狂犬病病毒的病毒样颗粒 VLP-GM, 证明了其免疫原性, 为后续的疫苗研制和抗体制备奠定了基础。

关键词: 狂犬病病毒; 病毒样颗粒; Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)07-0044-08

Preparation and immune evaluation of rabies virus-like particles vaccine

DAI Xinyu, LI Yunzhen, SUN Yajie, HU Bo, ZHANG Chengqi, XU Liwen, BAI Xue*

(Key Laboratory of Special Animal Epidemic Disease, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

Abstract: In order to develop a novel virus-like particle rabies vaccine with high immunogenicity, the G protein and M protein sequences of rabies virus (HEP-Flury) were amplified by PCR and were cloned into a Bac-to-Bac baculovirus shuttle vector pFastBac dual in order to construct a recombinant plasmid pFD-GM. The recombinant baculovirus rb-GM which was based on pFD-GM was prepared and transfected into Sf9 cells to obtain VLP-GM. Identified by SDS-PAGE, Western Blot and indirect immunofluorescence, the recombinant baculovirus successfully expressed G protein (about 56 kDa) and M protein (about 23 kDa). Electron microscopic observation showed that the size of VLP-GM was about 100 nm × 50 nm, showing the shape of bullets with spikes on the surface, similar to the shape of typical rabies particles. The dogs immunized with VLP produced a higher level of neutralizing antibody than inactivated vaccine after secondary immunization, reaching 7.81 U/mL, and VLP stimulated the production of more cytokines IL-4 and IFN- γ than G protein alone in the dogs. In this study, rabies virus-like particle VLP-GM was successfully expressed and its immunogenicity was confirmed, which laid a foundation for follow-up vaccine development and antibody preparation.

Keywords: rabies; virus-like particle; Bac-to-Bac baculovirus expression system

狂犬病是由狂犬病病毒 (rabies virus, RABV) 引起的急性人畜共患传染病。RABV 为单股不分节段负链 RNA 病毒, 属于弹状病毒科 (*Rhabdoviridae*) 的狂犬病毒属 (*Lyssavirus*)^[1]。RABV 外形为头部半

圆形、尾部为平端的子弹状粒子, 直径为 65~80 nm, 长 130~240 nm。核衣壳呈螺旋对称, 表面具有囊膜, 内含有单链负义 RNA, 长度约 12 kbp, 编码 5 种结构蛋白, 分别为核蛋白 (NP)、磷蛋白 (PP)、基质蛋白 (MP)、糖蛋白 (GP) 和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (LP)^[2]。RABV 的结构蛋白中只有病毒囊膜表面的 GP 能使体内产生中和抗体^[3]。MP 是囊膜病毒从细胞出芽所必需的结构蛋白, 并与 GP 特异性相互作用^[4], 可以与 GP 共同组成病毒样颗粒 (VLP)。临床上对于狂犬病尚无有效的治疗办法, 病患一旦出现典型的神经系统症状, 死亡率近乎 100%。在各种

收稿日期: 2023-05-11; 修回日期: 2024-05-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32100408); 吉林省科技发展计划基金项目 (20210202050NC, 20200402111NC, 20210509057RQ); 中国农业科学院基本科研业务费专项 (1610342022005)

第一作者: 代昕宇, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 白雪, 研究员, 研究方向为动物病原流行病学与致病机制, E-mail: baixue01@caas.cn。

组 (5 只), HEP-G 免疫组 (5 只), 疫苗对照组 (英特威狂犬病灭活疫苗, 3 只) 和空白组 (2 只)。将 1.5 中制备好的抗原与佐剂 Montanide Gel 01 按照 10 : 1 的比例混合均匀后, 按照总蛋白量 2 mg/只注射于犬后肢内侧肌肉, 空白组注射等体积的 PBS。为探究免疫组产生抗体的最高水平, 参考 Qi 等^[7]的免疫方法, 首次免疫后 21 d 二次免疫, 免疫剂量同首次免疫, 疫苗组注射单剂量疫苗。每隔 7 d 静脉采血, 3 000 g 离心 10 min 分离血清, 56 °C 灭活 30 min, -20 °C 保存备用。取首免后 14 d 和二免后 14 d 血清, 使用荧光抗体病毒中和试验 (FAVN) 检测犬免疫后产生的病毒中和抗体水平 (VNA)^[8]; 取首免后 7 d 和二免后 7 d 血清, 采用上海酶联生物公司所生产的白细胞介素 4 (IL-4) 和 γ -干扰素 (IFN- γ) 细胞因子 ELISA 检测试剂盒 (CAS: ml024776, ml024776) 检测血清中细胞因子的含量。

1.7 小鼠免疫试验

6 周龄 BABL/c 雌性小鼠购自长春市丰隆生物技术有限公司, 平均体重约 20 g, 随机分为 4 组, 即 VLP-GM 免疫组 (5 只), HEP-G 免疫组 (5 只), 疫苗对照组 (英特威狂犬病灭活疫苗, 5 只) 和空白组 (5 只)。将 1.5 中制备好的抗原与佐剂 Montanide Gel 01 按照 10 : 1 的比例混合均匀后, 按照总蛋白量

200 μ g/只多点注射于小鼠后肢肌肉, 空白组注射等体积 PBS, 首次免疫后 21 d 进行二次免疫, 免疫剂量同首次免疫, 疫苗组注射单剂量疫苗。每隔 7 d 进行眼眶静脉丛采血, 血样处理方法同 1.6。使用荧光抗体病毒中和试验检测小鼠免疫后产生的病毒中和抗体水平^[8]。

1.8 总蛋白中有效蛋白含量测定

使用 His 蛋白层析纯化试剂盒纯化作为免疫样品的 HEP-G 和 VLP-GM 总蛋白, 上样量 10 mL, 收取流穿液, 4 °C 孵育 1 h 后, 使用咪唑洗脱并收取洗脱液, PAGE 验证蛋白所在洗脱液, 使用 BCA 测定纯化前后蛋白浓度, 计算有效蛋白含量。

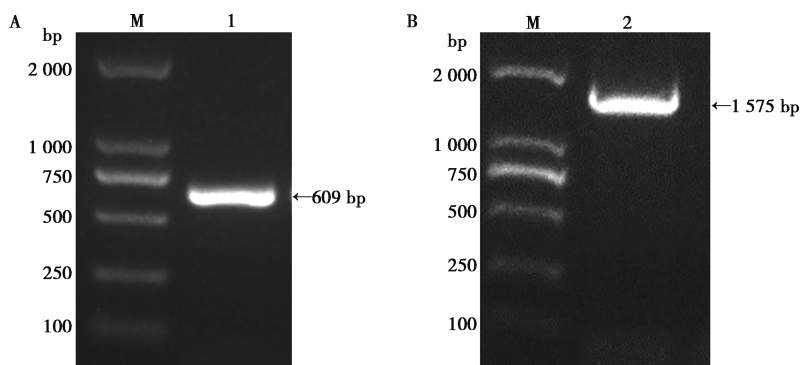
1.9 数据统计和分析

用 Graphpad Prism 8.0 绘图并使用 Two-way ANOVA 方法进行统计学分析, 数据以“平均数 \pm 标准差”表示。

2 结果

2.1 G 和 M 基因序列扩增

以 RABV HEP-Flury 株基因组的 cDNA 为模板, 利用 G1 和 M1 引物, 进行 PCR 扩增, 扩增结果如图 1 所示, M1 引物扩增出与预计大小一致的 609 bp 条带, G1 引物扩增出与预计大小一致的 1 575 bp 条带。



M. DNA 分子质量标准; 1. M1 引物 PCR 产物; 2. G1 引物 PCR 产物。

图 1 RABV M 基因 (A) 和 G 基因 (B) 全长扩增

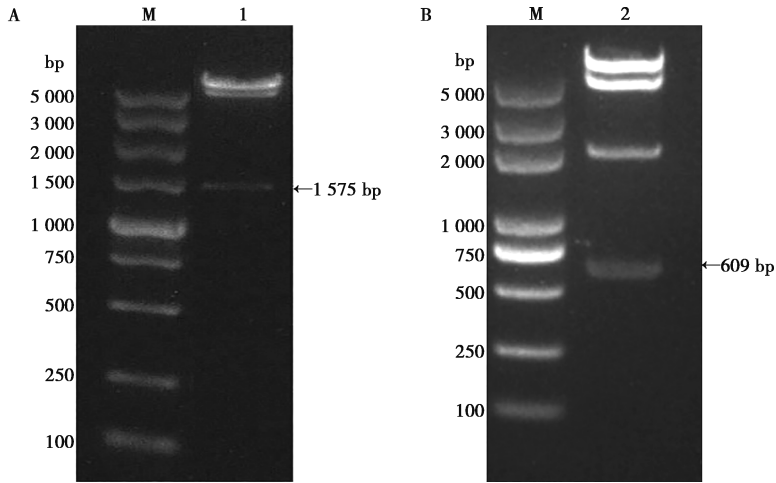
2.2 重组质粒 pFD-G 和 pFD-GM 双酶切鉴定

将 pFD-G 以 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切, pFD-GM 以 *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切, 双酶切结果如图 2 所示。pFD-G 切出与预计大小一致的 1 575 bp G 基因目的片段, pFD-GM 切出与预计大小一致的 609 bp M 基因目的片段。图 2B 中多余的杂带是由于引入 M 蛋白后加入了新的 *Nhe* I 酶切位点。

2.3 重组杆粒 Bac-G 和 Bac-GM 的鉴定

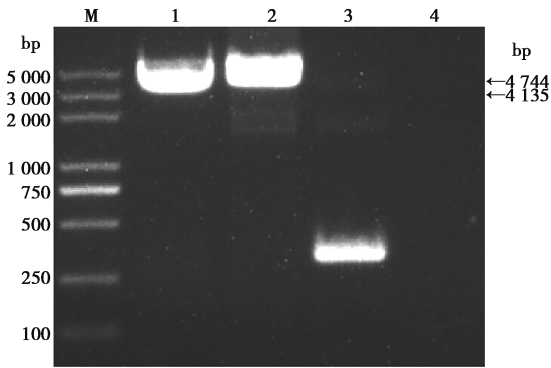
pFD-G 和 pFD-GM 经蓝白斑筛选出白色菌落后,

分别挑取单菌落进行菌液 PCR 鉴定, 结果如图 3 所示。pFD-G 的阳性菌落扩增出与预计大小一致的 2 560 bp 杆粒序列和 1 575 bp G 基因序列的目的片段, pFD-GM 阳性菌落扩增出与预计大小一致的 2 560 bp 杆粒序列、1 575 bp G 基因序列和 609 bp M 目的片段; 阴性蓝色菌落成功扩增出 300 bp 杆粒序列, 阴性对照成立。



M. DNA 分子质量标准; 1. pFD-G 双酶切; 2. pFD-GM 双酶切。

图2 重组质粒的双酶切鉴定



M. DNA 分子质量标准; 1. pFD-G 阳性菌株; 2. pFD-GM 阳性菌株; 3. 蓝色阴性菌株; 4. 空白对照。

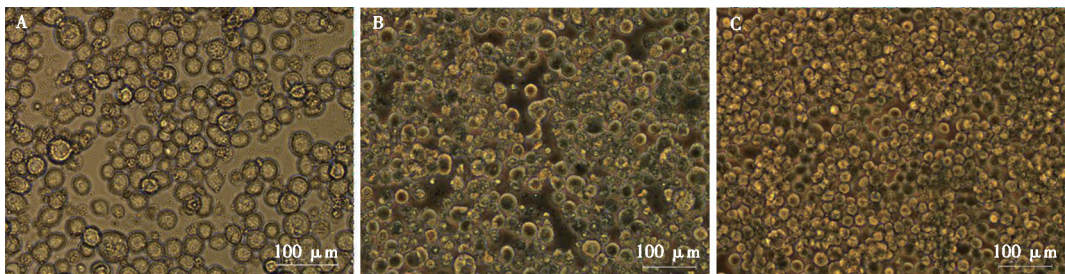
图3 蓝白斑筛选的PCR鉴定

2.4 重组杆状病毒的细胞病变观察

将P1代rb-G和rb-GM病毒接种Sf9细胞，接种前后细胞形态对比见图4。接种rb-G和rb-GM病毒的细胞发生明显病变，细胞变大变圆，部分细胞出现不规则形态的裂解，并从贴壁状态下脱落，漂浮在培养基内。

2.5 重组杆状病毒rb-G和rb-MG滴度测定

重组杆状病毒P0代和P1代的滴度测定结果见表1，P1代病毒滴度较P0代有明显提高，能够满足病毒扩增需要。



A. rb-G 感染后发生病变的细胞; B. rb-GM 感染后发生病变的细胞; C. 正常 Sf9 细胞。

图4 正常细胞与感染病毒后发生病变的细胞形态

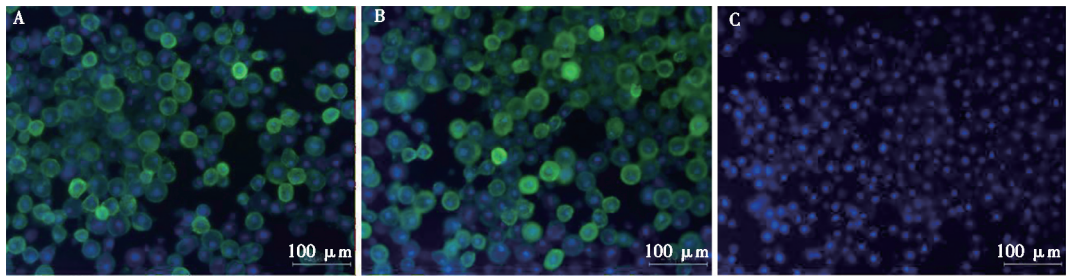
表1 重组杆状病毒的滴度 PFU/mL

重组杆状病毒	P0代	P1代
rb-G	1.21×10^6	1.87×10^7
rb-GM	1.14×10^6	1.56×10^7

2.6 间接免疫荧光检测

利用间接免疫荧光方法检测rb-G和rb-GM重组杆状病毒在Sf9细胞中的表达情况，结果如图5所示，rb-GM感染后的细胞和rb-G感染后的细胞可以观察到绿色荧光信号，表示与鼠抗RABV G蛋白单克

隆抗体发生结合反应，正常 Sf9 细胞只能看到核染的蓝色信号。



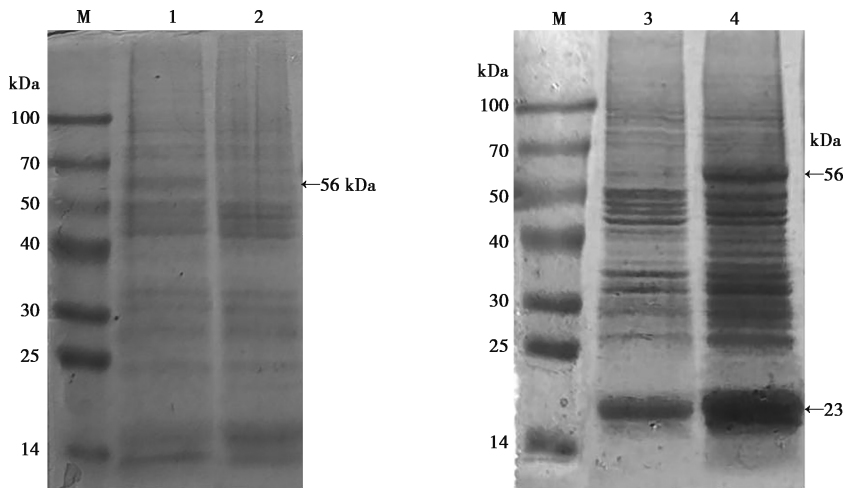
A. rb-GM 感染后的细胞; B. rb-G 感染后的细胞; C. 正常 Sf9 细胞。

图 5 间接免疫荧光检测

2.7 SDS-PAGE 和 Western blot 验证

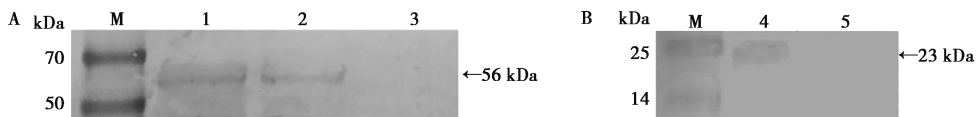
经 SDS-PAGE 验证 rb-G 和 rb-GM 重组杆状病毒在 Sf9 细胞中的表达情况，结果见图 6 所示。rb-G 重组杆状病毒感染 Sf9 细胞后 G 蛋白目的条带 (56 kDa) 表达明显增强，rb-GM 感染 Sf9 细胞后 G 蛋白和 M 蛋白 (23 kDa) 表达增强，并且 rb-GM 的总蛋白表达量高于 rb-G。

经 Western blot 验证 rb-G 和 rb-GM 重组杆状病毒在 Sf9 细胞中的表达情况，结果见图 7 所示。rb-G 重组杆状病毒感染 Sf9 细胞后表达出与预计大小一致的 G 蛋白目的条带 (56 kDa)，rb-GM 重组杆状病毒感染 Sf9 细胞后表达出与预计大小一致的 G 蛋白目的条带 (56 kDa) 和 M 蛋白目的条带 (23 kDa)，并且 rb-G 组的 G 蛋白目的条带更深。



M. 蛋白质分子质量标准 (100 kDa); 1. rb-G 表达产物; 2、3. 正常 Sf9 细胞对照; 4. rb-GM 表达产物。

图 6 SDS-PAGE 检测



M. 蛋白质分子质量标准 (100 kDa); 1. rb-G 表达产物; 2. rb-GM 表达产物; 3、5. 正常 Sf9 细胞对照; 4. rb-GM 表达产物。

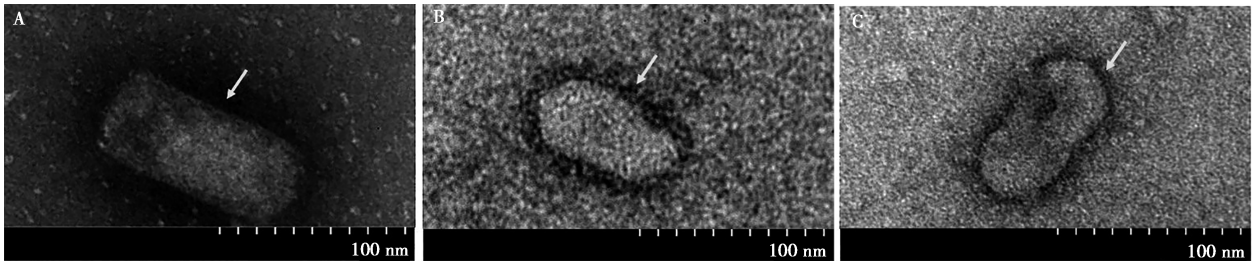
图 7 RABV G 蛋白 (A) 和 M 蛋白 (B) Western blot 检测

2.8 VLP-GM 的电镜观察

将 pFD-GM 转染后的病毒液样品用 1% 磷酸钨负染 180 s 后，用无菌吸水纸吸去多余液体，电镜观

察 rb-GM 重组杆状病毒表达的 VLP 大小和形态，结果如图 8 所示。观测可见典型的表面带纤突的子弹状病毒结构，长约 100 nm，宽约 50 nm，与野生狂犬病

毒具有类似的结构，确定形成了VLP。



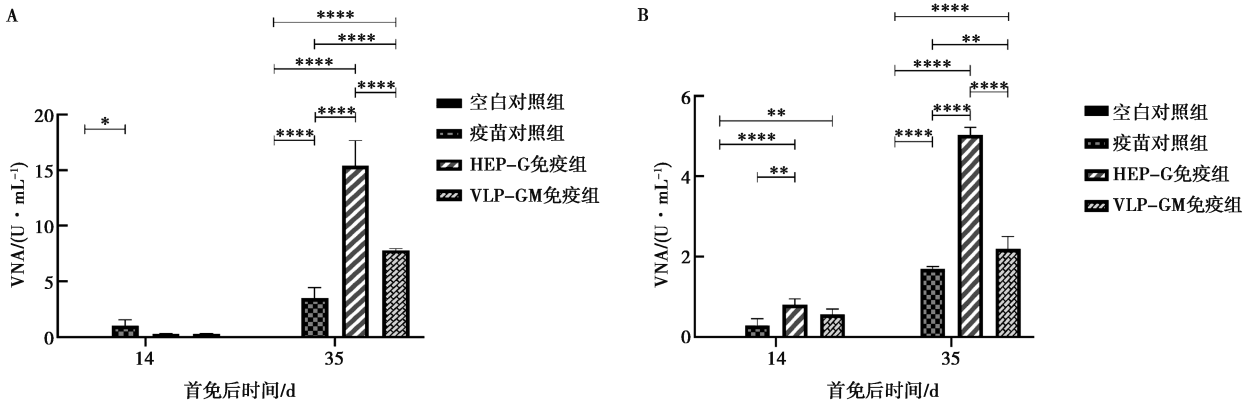
A~C. rb-GM 在 S19 细胞中表达后生成的 VLP (箭头所示)。

图 8 病毒样颗粒电镜观察

2.9 中和抗体检测

使用荧光抗体病毒中和试验 (FAVN) 法测定犬和小鼠血清中的 VNA 水平。如图 9A 所示，犬 VLP-GM 免疫组和 HEP-G 免疫组首次免疫 14 d 后中和抗体效价相比于疫苗对照组和空白对照组无显著差异，且抗体效价低于疫苗对照组；二免后 14 d 犬 VLP-GM 免疫组中和抗体效价上升至 7.81 U/mL，HEP-G 免疫组上升至 15.39 U/mL，与疫苗对照组和空白对照组相比差异极显著 ($P < 0.0001$)。如图 9B 所示，小鼠 VLP-GM 免疫组首免后 14 d 中和抗体效价与空白对照组间存在极显著差异 ($P < 0.01$)，与疫苗对照组相比无显著差异，二免后 14 d 抗体效价上升至 2.2

U/mL，与疫苗对照组间存在极显著差异 ($P < 0.01$)，与空白对照组相比差异极显著 ($P < 0.0001$)；HEP-G 免疫组首免后 14 d 中和抗体效价与疫苗对照组间存在显著性差异 ($P < 0.01$)，与空白对照组相比差异极显著 ($P < 0.0001$)，二免后 14 d 抗体效价上升至 5.03 U/mL，与空白对照组和疫苗对照组间差异极显著 ($P < 0.0001$)。综上，犬一免后，VLP-GM 和 HEP-G 免疫组效价较低，但二免后 14 d，犬与小鼠的 VLP-GM 免疫组、HEP-G 免疫组和疫苗对照组均能达到公认的 0.5 U/mL 以上的保护性水平，与空白对照组间差异极显著 ($P < 0.0001$)，且相比于疫苗对照组能诱导生成更高水平的中和抗体。



注：*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ，***表示 $P < 0.001$ ，****表示 $P < 0.0001$ 。下同。

图 9 犬 (A) 和小鼠 (B) 血清中和抗体检测

2.10 细胞因子检测

使用 IL-4 和 IFN- γ ELISA 检测试剂盒测定犬血清中的细胞因子水平。如图 10A 所示，VLP-GM 免疫组细胞因子 IFN- γ 表达量在首次免疫 7 d 后和二次免疫 7 d 后均与空白对照组和疫苗对照组间存在极显著差异 ($P < 0.0001$)，与 HEP-G 免疫组相比差异极显著 ($P < 0.01$)；HEP-G 免疫组首免 7 d 后与空白

对照组相比有极显著差异 ($P < 0.01$)，与疫苗对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$)，二次免疫后与疫苗对照组和空白对照组间均存在极显著差异 ($P < 0.0001$)。如图 10B 所示，VLP-GM 免疫组细胞因子 IL-4 表达量在首次免疫 7 d 后和二次免疫 7 d 后均与 HEP-G 免疫组、空白对照组和疫苗对照组存在极显著差异 ($P < 0.0001$)；HEP-G 免疫组一免后 7 d 与空白对照

组间存在显著差异 ($P < 0.05$), 二免后 7 d 存在极显著差异 ($P < 0.001$), 一免和二免后均与疫苗对照组

无显著性差异。

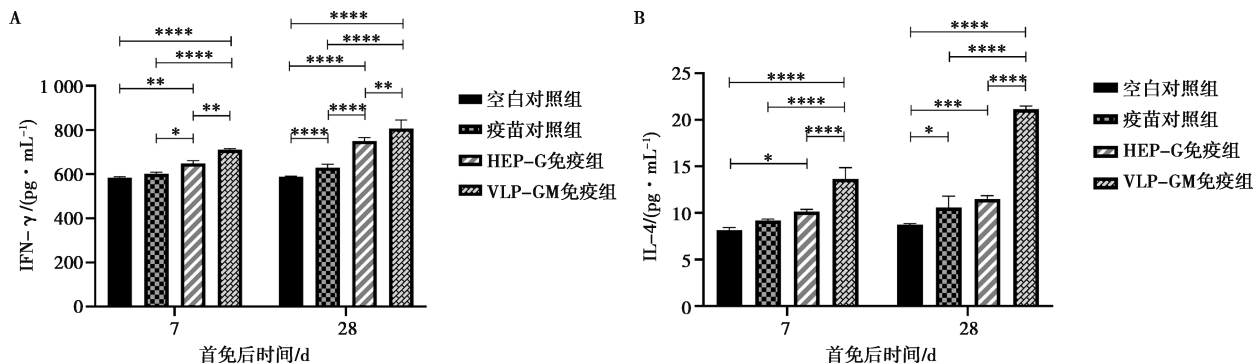
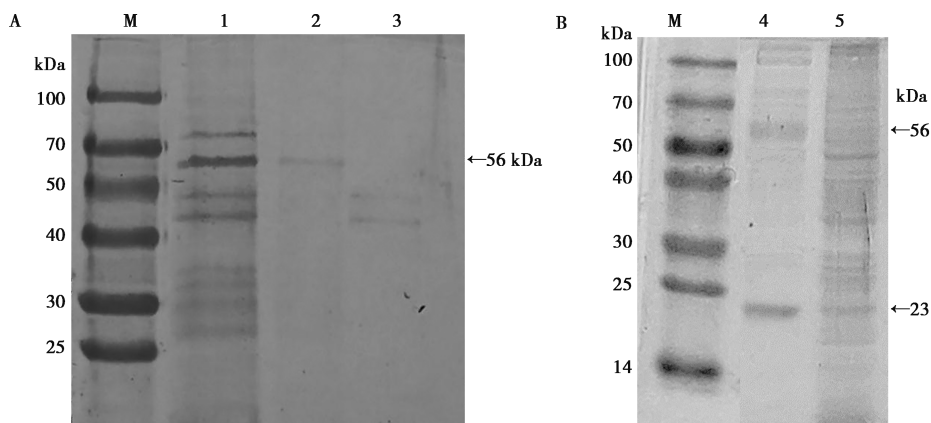


图 10 犬血清 IFN- γ (A) 和 IL-4 (B) 含量 ELISA 检测

2.11 总蛋白中有效蛋白含量测定

使用层析纯化免疫时使用的 HEP-G 和 VLP-GM 总蛋白, PAGE 验证纯化后的蛋白, 结果如图 11 所示, 纯化后背景条带纯净, 无杂带, 相比纯化前去除了大部分杂蛋白。使用 BCA 测定纯化前后的蛋白含

量, 测得纯化后 HEP-G 浓度从 5.468 至 0.227 mg/mL, 每 2 mg 总蛋白中约含有 0.083 mg G 蛋白; VLP-GM 纯化前浓度为 6.221 mg/mL, 纯化后浓度为 0.124 mg/mL, 每 2 mg 总蛋白中约含有 0.039 mg VLP-GM 蛋白。



M. DNA 分子质量标准; 1. 未纯化 HEP-G; 2. 纯化后 HEP-G; 3、5. 洗脱流穿液; 4. 纯化后 VLP-GM。

图 11 SDS-PAGE 检测蛋白纯化

3 讨论

昆虫杆状病毒表达系统是公认蛋白表达系统之一, 已被广泛应用于表达多种糖蛋白和病毒样颗粒, 如犬瘟热、RABV GP 和 SARS2 糖蛋白, 相比于原核表达系统, 本试验使用了受到广泛认可的 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统进行蛋白表达, 因此拥有更好的蛋白折叠和修饰效果。但杆状病毒表达系统传代多次后会形成逐渐积累的干扰颗粒 (DI), 而干扰颗粒中大部分基因被删除, 其中很可能包括需要表达的基因, 因此连续传代后重组蛋白的表达水平需要通过降低 MOI 感染以减少 DI 生成^[9]。本研究制备杆状

病毒后测定了 MOI 并在传代过程中保持低 MOI 以避免该问题。

在 VLP 的构建方式上, 可能的方式包括本研究中使用的单一杆状病毒携带多个外源基因 (多顺反子) 共同表达, 或由多个杆状病毒各携带 1 个外源基因 (单顺反子) 共同感染, 抑或采用两者结合的方式优化外源基因表达比例。但大规模的共感染通常效率较低, 无法保证所有病毒载体的同时感染会发生在同一个细胞中^[10], 因此采用共感染方式的 VLP 在后期的发展与应用上会遇到更多的阻碍。本研究选用的单一杆状病毒以共表达的方式生成 VLP, 形成了较共感染方式更好的核衣壳形态, 更容易扩大生产, 是

新型疫苗的优良候选。

病毒样颗粒模仿病毒的天然构象,重复多次展示抗原表位,刺激专职性抗原提呈细胞(APC),例如树突状细胞(DC)或单核细胞将抗原加工后与MHC-II类分子形成复合物,被CD4⁺辅助T细胞识别后激活体液免疫反应,并通过抗原的交叉递呈激活CD8⁺T细胞激活细胞免疫。因此免疫病毒样颗粒后,标志着B细胞增殖的IL-4和激活细胞免疫的IFN- γ 表达量显著增加,机体对与抗原相似的病毒产生持久且强力的免疫保护^[11-12]。本文通过免疫重组病毒所表达的GP和由MP与GP组成的病毒样颗粒,使免疫犬产生了对RABV有保护作用的特异性抗体。VLP-GM首免后14d中和抗体水平较低,可能与接种剂量和未纯化等原因有关,有待进一步的优化。二免后中和抗体水平高于公认的0.5U/mL数倍,平均值达到7.81U/mL,高于商用灭活疫苗组的3.51U/mL,并且相比于先前Qi等^[7]通过共感染方式表达的VLP单独免疫后28d时(1.76U/mL)能产生更高水平的中和抗体,能够对犬产生良好的保护作用。值得注意的是,HEP-G组免疫后中和抗体效价更高。根据纯化后蛋白的浓度测定结果,每2mg总蛋白中约含有0.039mgVLP-GM蛋白,并且其中M蛋白含量较高,相较于HEP-G蛋白免疫组的0.089mgG蛋白差异较大,在Western blot鉴定中HEP-G蛋白的56kDa处条带也较VLP-GM颜色更深,因此推测有效G蛋白含量可能是导致G蛋白免疫组中和抗体含量更高的原因。免疫后犬体内的细胞因子IL-4和IFN- γ 分泌量均有所上升,经过二次加强免疫后,HEP-G免疫组IL-4和IFN- γ 的分泌量与空白对照组差异非常显著,但与VLP-GM免疫组相比,HEP-G免疫组中IL-4和IFN- γ 的分泌量增加较少,IL-4的激活需要二次免疫后才有明显效果,证明病毒样颗粒有着更好的激活体内细胞因子通路、诱发更强大的免疫反应能力。单独进行G蛋白首次免疫后7d诱导产生的IL-4表达水平较低,而病毒样颗粒在该时间下即可激活大量IL-4表达,在要求快速诱导免疫反应的暴露后免疫上也具有优势。

综上所述,本研究通过杆状病毒表达系统共表达RABV GP和MP,构建了RABV病毒样颗粒VLP-

GM,接种犬后有效诱导了病毒中和抗体和细胞因子的产生,具有良好的免疫原性,为研制狂犬病新型疫苗提供了参考。

参考文献:

- [1] JACKSON A C. Rabies virus infection: an update [J]. *J Neurovirol*, 2003, 9 (2): 253-258.
- [2] HUANG J, ZHANG Y, HUANG Y, et al. The ectodomain of rabies virus glycoprotein determines dendritic cell activation [J]. *Antiviral Res*, 2017, 141: 1-6.
- [3] JOHNSON N, CUNNINGHAM A F, FOOKS A R. The immune response to rabies virus infection and vaccination [J]. *Vaccine*, 2010, 28 (23): 3896-3901.
- [4] MEBATSION T, WEILAND F, CONZELMANN K K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G [J]. *J Virol*, 1999, 73 (1): 242-250.
- [5] HAMPSON K, COUDEVILLE L, LEMBO T, et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9 (4): e0003709.
- [6] 费荣梅, 刘健. 野生动物狂犬病及其媒介作用 [J]. *畜牧与兽医*, 2007 (1): 52-55.
- [7] QI Y, KANG H, ZHENG X, et al. Incorporation of membrane-anchored flagellin or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit enhances the immunogenicity of rabies virus-like particles in mice and dogs [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 169.
- [8] CLIQUET F, AUBERT M, SAGNE L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody [J]. *J Immunol Methods*, 1998, 212 (1): 79-87.
- [9] VAN OERS M M. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system [J]. *J Invertebr Pathol*, 2011, 107: S3-S15.
- [10] VAN OERS M M, PIJLMAN G P, VLAK J M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology [J]. *J Gen Virol*, 2015, 96 (1): 6-23.
- [11] KANG H, QI Y, WANG H, et al. Chimeric rabies virus-like particles containing membrane-anchored GM-CSF enhances the immune response against rabies virus [J]. *Viruses*, 2015, 7 (3): 1134-1152.
- [12] KUSHNIR N, STREATFIELD S J, YUSIBOV V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development [J]. *Vaccine*, 2012, 31 (1): 58-83.