

# 表达鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白重组腺病毒的构建及免疫原性的初步分析

宋菲菲<sup>1,2</sup>, 康震<sup>3</sup>, 齐艳君<sup>3</sup>, 袁颖烁<sup>1,2</sup>, 张守峰<sup>2</sup>, 张乐萃<sup>1\*</sup>, 扈荣良<sup>2\*</sup>

(1. 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109; 2. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130122; 3. 寿光六和肉鸡养殖有限公司, 潍坊 262700)

**摘要:** 拟构建表达鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) QS10 株 S1 蛋白的重组复制缺陷型人 5 型腺病毒, 并在本动物上进行初步的免疫学试验。通过 RT-PCR 获得 S1 基因, 插入腺病毒表达系统穿梭质粒, 构建重组穿梭质粒 pac-Ad5 CMV-S1, 转染 293AD 细胞获得表达 S1 蛋白的重组腺病毒。PCR 检测显示, S1 基因已重组到腺病毒基因组; 间接免疫荧光和 Western blot 检测证明该重组病毒在 293AD 细胞中真实表达了具有免疫反应性的 IBV S1 糖蛋白。重组病毒培养滴度可达到  $10^7$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>。免疫接种 SPF 鸡后, 通过 ELISA 检测, 免疫鸡产生了针对 IBV 的特异性抗体。作者成功构建了表达 IBV S1 蛋白的重组腺病毒, 该重组病毒可在 SPF 鸡体内诱导产生 IBV 特异性抗体。

**关键词:** 鸡传染性支气管炎病毒; S1 蛋白; 人 5 型腺病毒载体; 免疫原性

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)09-1449-06

## Construction and Immunogenicity Detection of Recombinant Adenovirus Expressing S1 Gene of Infections Bronchitis Virus

SONG Fei-fei<sup>1,2</sup>, KANG Zhen<sup>3</sup>, QI Yan-jun<sup>3</sup>, YUAN Ying-shuo<sup>1,2</sup>,  
ZHANG Shou-feng<sup>2</sup>, ZHANG Le-cui<sup>1\*</sup>, HU Rong-liang<sup>2\*</sup>

(1. Qingdao Agricultural University, College of Animal Science and Technology, Qingdao 266109, China; 2. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, China; 3. Liuhe Broiler Cultivation Limited Company, Weifang 262700, China)

**Abstract:** To construct human adenovirus type 5 vectored recombinant virus expressing S1 glycoprotein gene of avian infectious bronchitis virus (IBV), S1 gene of IBV QS10 strain obtained through RT-PCR was inserted into shuttle plasmid of the adenoviral expression system, forming pacAd5 CMV-S1, as well as the backbone plasmid, which was linearized with *Pac* I and transfected into 293AD cells. Detection with PCR revealed that the recombinant virus was successfully packaged with a titer up to  $10^7$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>. Furthermore, The results of Western blotting and indirect immunofluorescence assay (IFA) indicated that the S1 gene was significantly expressed. Sera antibodies against IBV of the SPF chicken immunized with the recombinant virus were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The recombinant adenovirus expressing S1 gene of IBV was successfully constructed with potent capacity to induce the specific antibodies in chickens and had the good immunogenicity, which laid the foundation for further development of recombinant avian infectious bronchitis vaccine.

**Key words:** infectious bronchitis virus; S1 protein; human adenovirus type 5; immunogenicity

收稿日期: 2012-02-21

作者简介: 宋菲菲 (1987-), 女, 山东即墨人, 硕士生, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: songfeifei125@126.com

\* 通讯作者: 张乐萃, 教授, E-mail: lc Zhang@qau.edu.cn; 扈荣良, 研究员, E-mail: Ronglianghu@hotmail.com

鸡传染性支气管炎(Avian Infectious Bronchitis, IB)是由鸡传染性支气管炎病毒(Avian infectious bronchitis virus, IBV)引起的一种高度接触性、急性呼吸道疾病,给养禽业造成重大损失<sup>[1]</sup>。传统的弱毒苗和灭活苗是目前防治该病的主要办法<sup>[2-3]</sup>,但弱毒疫苗可在感染机体中引起持续的潜伏感染,并有可能成为IBV突变的主体和重组变异的供体,且存在毒力返强的隐患,弱毒疫苗的普遍使用是导致不同组织嗜性和血清型的变异毒株不断出现的重要原因<sup>[4-5]</sup>;而灭活疫苗虽然能弥补弱毒疫苗的缺陷,但其副作用较大,免疫后会引发较严重的局部反应,况且灭活疫苗对冠状病毒感染的免疫效果不确实<sup>[6-7]</sup>。因此急需开发一种安全有效、经济实用的新型疫苗。病毒活载体疫苗接种动物机体后,能够诱导体液免疫和细胞免疫,模拟弱毒活疫苗的免疫作用<sup>[8]</sup>,且易于大规模生产,为解决上述问题带来了新的希望。

IBV属冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属(Coronavirus),有囊膜的单股正链RNA病毒。病毒基因组编码3种主要的结构蛋白:核蛋白(Nucleocapsid protein)、膜蛋白(Membrane glycoprotein)及表面糖蛋白(Surface glycoprotein)<sup>[9]</sup>。其中,S蛋白由S1(92 ku)和S2(84 ku)2个亚单位构成。S1蛋白是IBV最主要的免疫原蛋白,该蛋白能诱导产生具有病毒中和活性的血凝抑制抗体<sup>[10]</sup>,其N端在病毒的毒力和组织嗜性上具有重要作用<sup>[11]</sup>。以S1蛋白为疫苗候选抗原,是IBV基因工程疫苗研究的热点。Tomely等<sup>[12]</sup>用重组痘苗病毒成功表达了S1蛋白,该蛋白可诱导小鼠可产生特异性中和抗体。Wang等<sup>[13]</sup>研究发现表达S1蛋白的重组鸡痘病毒能够增强免疫鸡对IBV强毒攻击的保护作用。Johnson等<sup>[14]</sup>以禽腺病毒为载体表达鸡传染性支气管炎病毒S1蛋白,攻毒保护试验证明,该重组疫苗对同源和异源毒株的攻毒保护率均高达90%~100%。鉴于上述成功经验,本研究采用了Cell Biolabs公司的人5型腺病毒包装系统,以QS10地方分离株的S1基因为靶基因,构建了表达鸡传染性支气管炎病毒S1蛋白的重组腺病毒,并通过SPF雏鸡的接种,对其免疫原性作了初步评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

复制缺陷型人5型腺病毒表达系统(RAPAd®

CMV Adenoviral Expression System)、293AD细胞均购自Cell Biolabs公司;IBV QS10毒株为本实验室(军事兽医研究所流行病室)分离并保存。DH5 $\alpha$ 大肠杆菌感受态细胞购自TaKaRa公司,羊抗兔荧光二抗(FITC)、羊抗鸡酶标二抗(RPH)、限制酶HindⅢ、BamH I均购自TaKaRa,Pac I购自NEB BioLabs。

### 1.2 重组腺病毒穿梭质粒的构建

根据新分离IBV QS10株的核苷酸序列,设计1对扩增S1基因的引物。上游引物:5'-CCCAAGCTTATGTTGGAACGACCGCTTTTAT-3',下游引物:5'-CGGGATCCCTAACGCCTAGAACGACGTGATCCA-3',由大连宝生物公司合成。在上、下引物的5'端分别引入HindⅢ和BamH I酶切位点,通过RT-PCR扩增出编码S1蛋白的cDNA片段,HindⅢ和BamH I双酶切处理PCR产物,插入腺病毒穿梭载体pacAd5 CMVK-NpA中,酶切、测序鉴定正确的重组质粒命名为pacAd5 CMV-S1。

### 1.3 重组腺病毒的获得

Pac I线性化重组腺病毒穿梭质粒pacAd5 CMV-S1及骨架质粒pacAd5 9.2-100,取0.5  $\mu$ g骨架质粒和2  $\mu$ g重组腺病毒穿梭质粒在8  $\mu$ L FuGENE® Transfection Reagent的介导下共转染9.4 cm<sup>2</sup>的293AD细胞,持续培养7~10 d,待细胞出现病变,反复冻融培养物3次,收取重组病毒液,即为原代重组腺病毒,命名为rAdV-S1,记为F0代。取F0代重组腺病毒接种新的293AD细胞,继续扩大培养。

### 1.4 重组腺病毒的鉴定

1.4.1 重组腺病毒的电镜观察 取病毒滴度稳定后的病毒冻融液,用1%磷钨酸溶液负染并电镜观察。

1.4.2 重组腺病毒的RT-PCR鉴定 分别以F2代、F4代、F9代、F14代rAdV-S1感染293AD细胞,Trizol裂解法提取感染细胞的总RNA,RT-PCR检测目的基因在转录水平的表达及遗传稳定性。每个代次各取3个克隆进行测序。

1.4.3 间接免疫荧光 将重组腺病毒(rAdV-S1)和野生型腺病毒(wtAdV,腺病毒空白穿梭载体和腺病毒骨架在293AD细胞内同源重组包装而成)作100倍稀释后,同步接种293AD细胞,37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h,用80%丙酮固定,依次与兔抗IBV阳性血清(本实验室制备并保存)和FITC

荧光标记的羊抗兔 IgG 于 37 ℃ 感作,最后用 PBST 清洗 3 次后荧光显微镜下观察结果。

1.4.4 Western blot 取重组腺病毒和野生型腺病毒分别感染 293AD 细胞,感染后 48 h 细胞出现病变但未脱落时弃去上清,裂解细胞并进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测,一抗为鸡抗 IBV 阳性血清(本实验室制备并保存),二抗为 HRP 标记的羊抗鸡 IgG, TMB 显色,观察结果。

## 1.5 动物免疫试验

1.5.1 重组病毒滴度测定 提前 1 d 将 293AD 细胞传入 96 孔板中,待汇合度达到 70% 时加入  $10^{-1} \sim 10^{-11}$  梯度稀释的 rAdV-S1 重组病毒液,每个梯度 8 个重复,最后一列孔为空白对照。持续培养 5 d,观察并记录细胞病变情况,按照 Reed-Muench 法计算病毒的滴度。

1.5.2 免疫试验和血清抗体的检测 将 10 只 1 日龄 SPF 雏鸡(哈兽研实验动物中心提供)随机分为 2 组,每组 5 只。第 1 组经肌肉注射 200  $\mu\text{L}$  ( $10^7$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>) rAdV-S1,第 2 组同样方法接种相同剂量的 wtAdV。14 d 后采集鸡血,获得一免血清,然后用相同剂量和途径加强免疫一次;二免后 14 d 再次采血,获得二免血清。将血清按 1:100 进行稀释,常规间接 ELISA 检测 IBV 抗体。

## 2 结果

### 2.1 骨架质粒和重组穿梭质粒的酶切鉴定

用 *Pac* I 酶切骨架质粒 pacAd5 9.2-100,得到 33 和 2.0 kb 2 条带,与理论结果一致;*Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切鉴定 pacAd5 CMV-S1,得到 6.2 和 1.6 kb 2 条带,与预期结果相符,见图 1。

### 2.2 重组腺病毒的获得

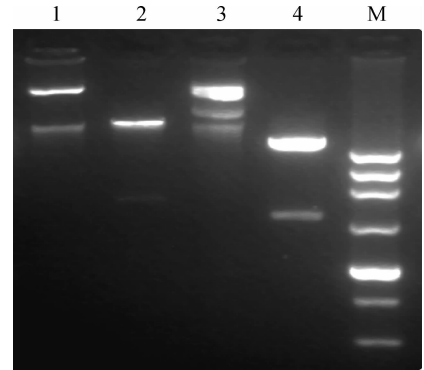
在 FuGENE® Transfection Reagent 的介导下,重组穿梭质粒和骨架质粒共转染生长良好的 293AD 细胞 6 d 后,细胞出现腺病毒感染的初期形态,少量细胞变圆但不脱落。8 d 后,感染细胞呈葡萄串状典型细胞病变(CPE)(图 2)。

### 2.3 重组腺病毒的鉴定

2.3.1 重组腺病毒电镜观察 病毒液经 1% 磷钨酸染色后,在电镜下可见腺病毒的典型特征外形(图 3)。

2.3.2 重组腺病毒的 RT-PCR 鉴定 分别以 F2 代、F4 代、F9 代、F14 代 rAdV-S1 感染 293AD 细胞,Trizol 裂解法提取感染细胞的总 RNA;利用 S1 基因扩增引物,通过 RT-PCR 扩增出与目的基因大

小相一致的片段(1.6 kb),以 wtAdV 作为阴性对照成立(图 4)。结果说明,由 rAdV-S1 介导的目的基因能够在 293AD 细胞中稳定转录。对 RT-PCR 片段亚克隆并测序的结果显示,目的基因转录的 mRNA 没有发生突变,说明 rAdV-S1 具有良好的遗传稳定性。



1. 骨架质粒 pacAd5 9.2-100; 2. *Pac* I 酶切 pacAd5 9.2-100 (~33 kb, 2 kb); 3. 重组穿梭质粒 pacAd5 CMV-S1; 4. *Hind* III、*Bam* H I 酶切 pacAd5 CMV-S1 (6.2 kb, 1.6 kb); M. TaKaRa 250 bp DNA 相对分子质量标准(4 500、3 000、2 250、1 500、1 000、750、500、250 bp)

1. Backbone plasmid pacAd5 9.2-100; 2. pacAd5 9.2-100 was digested with *Pac* I (~33 kb, 2 kb); 3. Recombinant shuttle plasmid pacAd5 CMV-S1; 4. pacAd5 CMV-S1 was digested with *Hind* III and *Bam* H I (6.2 kb, 1.6 kb); M. TaKaRa 250 bp DNA ladder marker (4 500, 3 000, 2 250, 1 500, 1 000, 750, 500, 250 bp)

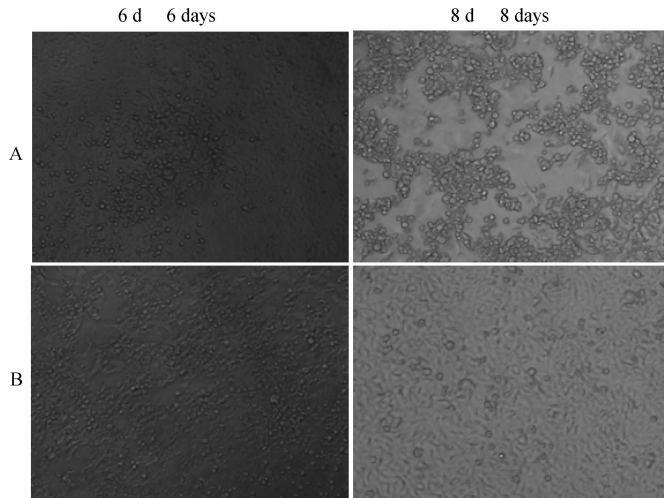
图 1 骨架质粒和重组穿梭质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction map of plasmids involved in transfection

2.3.3 目的基因的表达 Western blot 结果显示,rAdV-S1 感染的 293AD 细胞可见 1 条约 90 ku 的特异性蛋白 blot 条带,对照成立(图 5)。IFA 结果显示,rAdV-S1 感染 293AD 细胞 48 h 后染色可见明显的绿色荧光,对照成立(图 6)。这两项结果充分表明,S1 基因在 rAdV-S1 感染的 293AD 细胞中获得表达。

### 2.4 动物免疫试验

依据 Reed-Muench 法,F5 代 rAdV-S1 的滴度为  $10^7$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>。间接 ELISA 检测结果可知(表 1),试验组在初免后 14 d,可检测到一定水平的 IBV 特异性抗体,加强免疫后,鸡体内的抗体水平明显升高;而对照组 SPF 鸡体内没有检测到相应抗体。结果说明,重组腺病毒 rAdV-S1 可以诱导 IBV 特异性抗体的产生,具有一定的免疫原性。



A. 转染 6、8 d 的 293AD 细胞出现 CPE; B. 培养 6、8 d 的正常 293AD 细胞

A. Transfected cells, 6 days and 8 days after transfection, 293AD cells demonstrated CPE; B. Normal 293AD cells cultivated 6 days and 8 days

图 2 骨架质粒和重组穿梭质粒共转染后 293AD 细胞的生长和病变情况 (×100)

Fig. 2 293AD cell after transfected with backbone plasmid and recombinant shuttle plasmid, show CPE(×100)

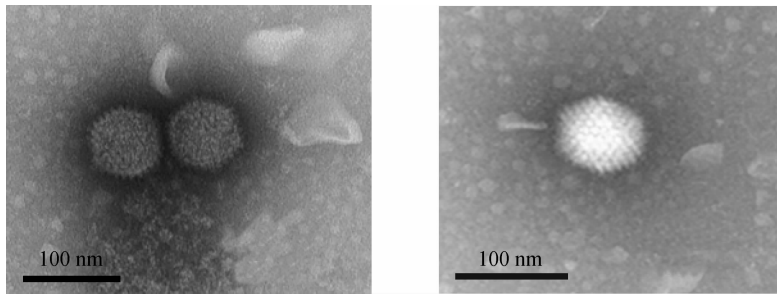
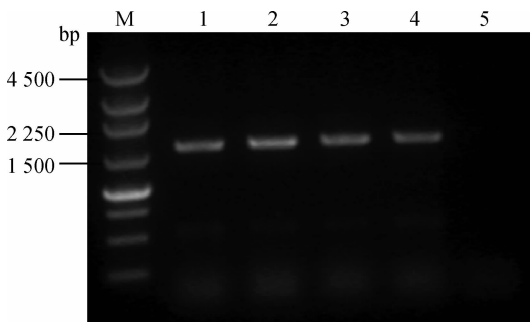


图 3 电镜下的重组腺病毒 rAdV-S1

Fig. 3 Identification of rAdV-S1 by electronmicroscope

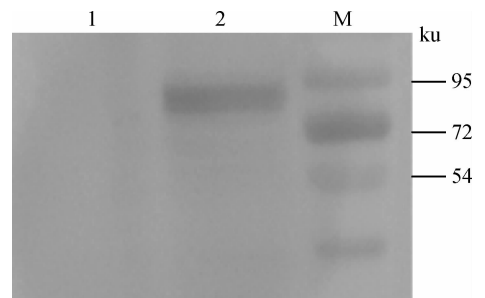


1~4. rAdV-S1 RT-PCR 产物; 5. 野生型腺病毒对照; M. TaKaRa 250 bp DNA 相对分子质量标准 (4 500、3 000、2 250、1 500、1 000、750、500、250 bp)

1-4. RT-PCR products of rAdV-S1; 5. Wild-type adenovirus control; M. TaKaRa 250 bp DNA ladder marker (4 500, 3 000, 2 250, 1 500, 1 000, 750, 500, 250 bp)

图 4 重组腺病毒 S1 基因的 RT-PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of rAdV-S1 by RT-PCR targeted to S1 glycoprotein gene

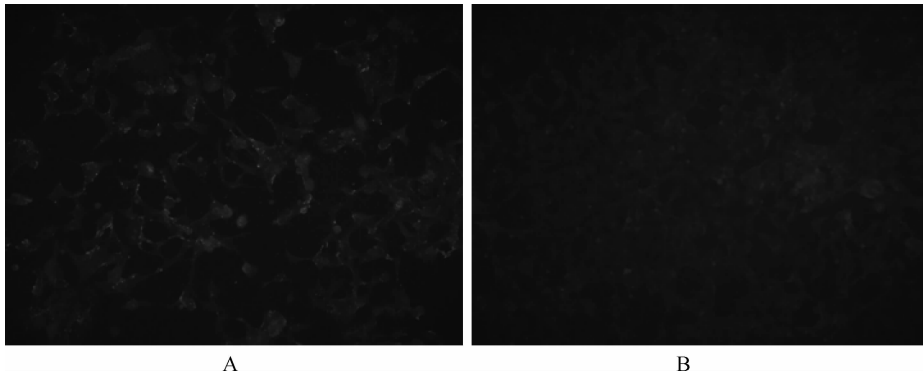


1. 野生型腺病毒感染的 293AD 细胞; 2. 重组腺病毒感染的 293AD 细胞

1. Wild-type adenovirus infected 293AD cells; 2. Recombinant adenovirus infected 293AD cells

图 5 Western blot 分析 S1 蛋白在 rAdV-S1 感染的 293AD 细胞中的表达

Fig. 5 Western blot analysis of S1 protein expression in rAdV-S1 infected 293AD cells



A. AdV-S1 感染的 293AD 细胞; B. 野生型腺病毒感染的 293AD 细胞  
A. AdV-S1 infected 293AD cells; B. Wild-type adenovirus infected 293AD cells  
图 6 IFA 检测 S1 蛋白在感染的 293AD 细胞中的表达

Fig. 6 Detection of S1 protein expression in rAdV-S1 infected 293AD cells by indirect immunofluorescence assay

表 1 rAdV-S1 免疫雏鸡特异性抗体的 ELISA 测定结果

Table 1 Results of OD<sub>492</sub>, alue of IBV antibody in immunized sera detected by ELISA

雏鸡编号 The No. of chick	一免 The first immune		二免 The second immune	
	试验组 Experiment group	对照组 Negative group	试验组 Experiment group	对照组 Negative group
1	0.119	0.053	0.217	0.042
2	0.241	0.041	0.459	0.038
3	0.145	0.039	0.575	0.046
4	0.154	0.048	0.471	0.041
5	0.175	0.084	0.439	0.039
$\bar{x} \pm s_x$	0.167 ± 0.020	0.053 ± 0.008	0.432 ± 0.058	0.041 ± 0.014

### 3 讨论

鸡传染性支气管炎在免疫鸡群中的频繁暴发,使得传统疫苗正逐渐丧失其在 IB 防治过程中作用<sup>[15]</sup>,病毒活载体疫苗等新型疫苗的研发为解决上述问题提供了新思路。理想的基因表达载体是基因治疗和疫苗研究的关键因素之一,腺病毒载体是继逆转录病毒载体之后在基因治疗中广为应用的一种基因表达载体,既能诱导机体产生体液免疫反应,又能诱导细胞免疫反应<sup>[16]</sup>,其宿主范围广,感染效率高,且能大量制备和纯化,是构建疫苗的理想载体。

本研究应用的腺病毒载体是 Cell Biolabs 公司的产品 RAPAd<sup>®</sup> Adenoviral Expression System,免去了以往传统方法在细菌水平上的同源重组质粒的筛选或是病毒水平上复杂的病毒噬斑分离工作,在短短一月内即获得了高滴度的表达鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白的重组人 5 型腺病毒,其自身的复制缺陷性也增加了病毒的安全性。另一方面,试验中

使用的 293AD 细胞是从普通 293 细胞中分离的 1 株黏附性高、外形扁平、表面积大的商品化细胞,进一步提高了转染和病毒繁殖的效率。

病毒活载体疫苗与病毒在自然状态下侵入方式相似,利于机体免疫系统产生免疫应答。同时,重组疫苗表达的蛋白在真核细胞内能够进行正确的加工、修饰,从而可以被天然蛋白诱生的抗体所识别<sup>[17-19]</sup>。为检测重组腺病毒 rAdV-S1 在细胞中表达的 S1 蛋白的特性,本研究选用纯化的 IBV 直接免疫动物制备的抗血清,因而应当能识别与天然 IBV S1 蛋白构象相似的重组蛋白。试验采用鸡抗 IBV 阳性抗血清作一抗,对感染 rAdV-S1 的 293AD 细胞总蛋白进行 Western blot 检验,出现了与 S1 蛋白大小相符的特异性条带(~90 ku),说明以复制缺陷型人 5 型腺病毒为载体表达的 IBV S1 蛋白可被鸡抗 IBV 阳性抗血清特异性识别。用兔抗 IBV 阳性血清做 IFA 试验同样证实 rAdV-S1 能够介导 S1 蛋白在真核细胞内表达。

本研究将重组腺病毒 rAdV-S1 免疫 SPF 雏鸡,诱导产生了 IBV 特异性抗体,加强免疫后,抗体水平明显升高,说明该重组腺病毒具有一定的免疫原性。为了确定该病毒作为基因疫苗的可行性,其免疫学效果有待于进一步研究和探索。

#### 4 结 论

本研究以 IBV QS10 地方分离株的 S1 基因为靶基因,成功构建了介导表达 QS10 株 S1 蛋白的复制缺陷型人 5 型腺病毒,在形态学和分子生物学两方面对该重组腺病毒进行了鉴定,并对获得的这株重组腺病毒进行了免疫原性的初步分析,证明该重组腺病毒能够在鸡体内诱导 IBV 特异性抗体的产生。

#### 参考文献:

- [1] CHU V C, MCELORY L J, CHU V, et al. The avian coronavirus infectious bronchitis virus undergoes direct low-pH-dependent fusion activation during entry into host cells[J]. *Virol*, 2006, 80: 3180-3188.
- [2] BIJLENGA G, COOK J K, GELB J, et al. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review[J]. *Avian Pathol*, 2004, 33: 550-557.
- [3] CAVANGH D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus[J]. *Avian Pathol*, 2003, 32: 567-582.
- [4] KUSTERS J G, NIESTERS H G M, BLEUMINK-PLUYM N M C, et al. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands[J]. *Gen Virol*, 1987, 68: 343-352.
- [5] WANG L, JUNKER D, COLLISSON E W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus[J]. *Virology*, 1993, 192: 710-716.
- [6] YANG Z Y, KONG W P, HUANG Y, et al. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice[J]. *Nature*, 2004, 428: 561-564.
- [7] STOHLMAN S A, KYUWA S, COHEN M, et al. Mouse hepatitis virus nucleocapsid protein-specific cytotoxic T lymphocytes are Ld restricted and specific for the carboxy terminus[J]. *Virology*, 1992, 189 (1): 217-224.
- [8] WEBSTER D P, DUNACHIE S, VUOLA J M, et al. Enhanced T cell mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara [J]. *PNAS*, 2005, 102(13): 4836-4842.
- [9] WEISS S R, NAVAS-MARTIN S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69: 635-664.
- [10] BINNS M M, BOURSWELL M E, CAVANAGH D, et al. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV [J]. *Gen Virol*, 1985, 66: 719-726.
- [11] KWON H M, JACKWOOD M W. Molecular cloning and sequence comparison of the S1 glycoprotein of the Gray and JMK strains of avian infectious bronchitis virus[J]. *Virus Genes*, 1995, 9: 219-229.
- [12] TOMLEY F M, MOCKETT A P, BOURSNEILL M E, et al. Expression of the infectious bronchitis virus spike protein by recombinant vaccinia virus and induction of neutralizing antibodies in vaccinated mice[J]. *Gen Virol*, 1987, 68: 2291-2298.
- [13] WANG X, SCHNITZLEIN W M, TRIPATHY D N, et al. Construction and immunogenicity studies of recombinant fowl poxvirus containing the S1 gene of Massachusetts 41 strain of infectious bronchitis virus [J]. *Avian Dis*, 2002, 46: 831-838.
- [14] JOHNSON M A, POOLEY C, IGNJATOVIC J, et al. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus[J]. *Vaccine*, 2003, 21: 2730-2736.
- [15] CAVANAGH D, NAQI S. Infectious bronchitis virus[M]//CALNEK B W, BARNES H J, BEARD C W, et al. Disease of Poultry. 9th ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1997: 511-526.
- [16] RUSSELL W C. Update on adenovirus and its vectors[J]. *Gen Virol*, 2000, 81: 2573-2604.
- [17] YAROSH O K, WANDEL A I, GRAHAM F L, et al. Human adenovirus types vectors expressing rabies glycoprotein[J]. *Vaccine*, 1996, 14(13): 1257-1264.
- [18] XIANG Z Q, YANG Y P, WILSON J M, et al. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier[J]. *Virol*, 1996, 219: 220-227.
- [19] PREVEC L, COMPELL J B, CHRISTIE B S, et al. A recombinant human adenovirus vaccine against rabies[J]. *Infect Dis*, 1990, 161: 27-33.