

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2018.08.015

## • 免疫学技术与方法 •

人 CD4 胞外区蛋白在杆状病毒-昆虫细胞系统中的表达纯化及性质鉴定<sup>①</sup>

乔佳明 张芝晴 张振勇 李少伟 夏宁邵 顾颖 (厦门大学公共卫生学院分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361102)

中图分类号 Q74 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2018)08-1201-05

**[摘要]** 目的: 通过条件优化实现人 CD4 蛋白胞外区在杆状病毒-昆虫细胞表达系统中的高效表达, 并对纯化获得的人 CD4 蛋白胞外区进行抗原性与免疫原性分析。方法: 通过选择人 CD4 分子胞外片段构建重组杆状病毒(pAc-CD4), 然后感染昆虫细胞进行蛋白的表达, 采用镍离子亲和层析纯化。运用 SDS-PAGE、Western blot、体积排阻色谱、ELISA、SPR 法等分析纯化得到目的蛋白的理化性质和抗原性。通过弗氏佐剂与目的蛋白混合免疫 BALB/c 小鼠, 监测小鼠免疫血清的抗体生成。结果: 经纯化可获得纯度 90% 以上的人 CD4 蛋白, 每升细胞培养液最终可获得 11.2 mg 的目的蛋白, 且该人 CD4 胞外区蛋白具有良好的抗原性。小鼠血清监测结果显示人 CD4 蛋白能有效刺激机体产生免疫应答, 显示其具有良好的免疫原性。结论: 本研究通过杆状病毒-昆虫细胞系统进行高效表达, 获得抗原性和免疫原性良好的人 CD4 胞外区蛋白, 为 HIV 受体和感染的研究奠定基础。

**[关键词]** 杆状病毒-昆虫细胞表达系统; 人 CD4; 免疫

**Expression purification characterization of human CD4 derived from baculovirus-infected insect cells**

QIAO Jia-Ming ZHANG Zhi-Qing ZHANG Zhen-Yong LI Shao-Wei XIA Ning-Shao GU Ying. State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China

**[Abstract]** **Objective:** To establish a robust method for expression and purification of the extracellular fragment of human CD4 in the baculovirus-based insect cell expression system by the virtue of optimization of experimental condition. To character the purified CD4 protein in physicochemical property, antigenicity and immunogenicity. **Methods:** The gene encoding the extracellular fragment of human CD4 was cloned into baculovirus vector(pAc-CD4) for production of recombinant baculovirus, then the CD4 protein was expressed in baculovirus-infected insect cells. SDS-PAGE, Western blot, High-performance size-exclusion chromatography, ELISA, SPR were carried out to characterize physicochemical properties of CD4 protein. BALB/c mice were immunized by CD4 formulated with Freund's adjuvant, the immunogenicity was measured by HIV neutralization assay. **Results:** The CD4 obtained from insect cell expression system possesses a high purity of more than 90% and approximate yield of 11.2 mg/L. The CD4 protein demonstrates an excellent reactivity against anti-CD4 antibody and a good immunogenicity in mice. **Conclusion:** Our study successfully established a robust method for expression and purification of the extracellular fragment of human CD4 in the baculovirus-insect cell system and pave a way to the investigation on HIV receptor and infection.

**[Key words]** Baculovirus-based insect cell expression system; Human CD4; Immunization

人 CD4 分子是一种单链跨膜蛋白, 其胞外区具有 4 个 Ig 样的结构域, 其中远端能够与主要组织相

容性复合体 II (Major histocompatibility complex class II, MHC II) 类分子结合, 胞质区可以结合酪氨酸蛋白激酶 p56<sup>lck</sup>, 在部分 T 细胞、胸腺细胞、单核-巨噬细胞、EB 病毒转化的 B 细胞等表面均有表达<sup>[1]</sup>。作为细胞表面受体, 其在细胞之间、细胞内外的信号分子的相互作用起着十分关键的作用。

CD4 分子具有重要的免疫学功能, 它能够参与机体的免疫应答。当抗原侵入机体以后, 在细胞免

<sup>①</sup>本文为国家自然科学基金(No. 81671645)。

作者简介: 乔佳明, 男, 硕士, 主要从事 HIV 病毒包膜蛋白方面研究,

E-mail: 381090358@qq.com。

通讯作者及指导教师: 顾颖, 女, 博士, 副教授, 主要从事 HIV 病毒学方面的研究, E-mail: guying@xmu.edu.cn。

疫反应中,会被抗原提呈细胞(Antigen presenting cell, APC)识别并加工处理,然后以 MHC II-抗原肽复合物的形式提呈给 CD4<sup>+</sup>T 细胞识别,其中 CD4 分子起到辅助受体的作用,其识别的是 MHC II 分子的非多态区<sup>[2]</sup>。在体液免疫反应中,抗原经 APC 递呈给 CD4<sup>+</sup>辅助性 T 细胞,活化 B 细胞产生抗体,部分 B 细胞分化成为记忆性 B 细胞,当机体受二次感染时,就会产生免疫应答反应产生抗体抵抗抗原。因此,CD4 分子在机体正常的免疫功能中起着重要作用,CD4 分子也成为许多疾病治疗的重要靶标<sup>[3]</sup>。

另外,在 HIV-1 感染过程中,CD4 作为首要的受体,起到了至关重要的作用。成熟的 CD4 分子与 HIV-1 表面的包膜糖蛋白 gp120 结合,然后引起包膜蛋白构象变化,进而与胞外的辅助受体 CCR5 或者 CXCR4 结合,这样拉近了病毒与细胞距离,从而二者之间发生膜融合,进而病毒成功感染细胞<sup>[4-8]</sup>。因此,抑制 HIV 与 CD4<sup>+</sup>细胞的结合成为 HIV 药物治疗的热点之一。

CD4 分子的不同功能,使其在各方面有了广泛的应用。最常见的是 CD4 胞外区与 Fc 融合形成融合蛋白,使得重组蛋白具有更长的半衰期,更适合于体内应用。例如 Fc 具有穿过胎盘、结合补体,还可以介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用及补体依赖的细胞毒性等。另外,将 CD4 与某些靶向分子融合,靶分子在 CD4 的介导下与靶细胞等目标物相结合,发挥靶向分子的治疗效果<sup>[9,10]</sup>。此外,CD4 抗体也被广泛应用,其中 TNX-355、cM-T412、OKT4 在某些疾病的临床治疗中已发挥了重要作用<sup>[11]</sup>。大量的研究通过不同的表达系统,如原核表达系统、真核哺乳动物细胞表达系统等来表达可溶性的 CD4 (只包括胞外区,不包括疏水穿膜区)<sup>[12]</sup>,制备 CD4 融合蛋白药物或抗 CD4 的抗体等运用于 AIDS 等其他相关疾病的研究<sup>[13,14]</sup>。但是这些表达系统表达纯化方法一般都太复杂,且存在一些如原核表达系统翻译后加工修饰系统不完善等问题。

本研究将全长 CD4 胞外区基因构建于杆状病毒表达载体,利用昆虫细胞表达系统进行 CD4 胞外区蛋白的表达,通过镍柱纯化即可获得高纯度的 CD4 蛋白,并对其抗原性与免疫原进行分析,结果显示其具有较好的生物学活性,这为 HIV 受体和感染的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验材料、试剂 表达载体 pAcgp67B 由本

实验室保存和构建;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本实验室保存;昆虫细胞 S9 和 High Five 购自 Invitrogen 公司;单抗 15A7 由本实验室制备;HIV-1 感染性克隆 NL4-3 由朱桦教授馈赠,相应的病毒由本实验室生产保存;BALB/c 雌鼠(6 周龄)购自上海斯莱克实验动物有限公司。

1.1.2 工具酶、生化试剂及纯化介质 核酸相关工具酶购自 TaKaRa 公司;Gibson 组装液由本实验室制备保存;转染试剂 Cell Fectin Reagent 购自 Invitrogen 公司;昆虫培养基购自 Expression systems 公司;ELISA 显色液等材料购自北京万泰公司;质粒小提试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒购自 TianGen;相关引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;Ni-NTA 介质购自 GE Healthcare 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 人重组 CD4 胞外区蛋白的构建与表达纯化

利用本实验室自行构建的 pAcgp67B 表达载体,进行引物设计(上游引物: pAc-CD4-F: 5'-CATTCT-GCCTTTGCGGCGGATCCCATGAAGAAAGTGGTGCT-GGGC-3'和下游引物: pAc-CD4-R: 5'-TCAGATCTG-CAGGCGGCCGCTTACTGCTGCTGCTGCTGCCA-TGTGGGCAGAACCCTTGAT-3')将 CD4 序列构建到重组质粒 pAc-CD4 中,并转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中进行扩增。然后将重组质粒和线性杆状病毒共同转染至由无血清培养基培养的 S9 昆虫细胞中,12 h 后更换有血清的培养基,即可获得重组杆状病毒。再之后经过 10 cm 细胞板、500 ml 锥形瓶的扩大培养,即可获得大量的重组杆状病毒。再利用现有的病毒感染 High Five 昆虫细胞,培养 72 h 到 96 h 后收获细胞上清,通过 30 kD 的膜包进行浓缩,浓缩后上清经 10 000 r/min 离心去除沉淀,上清经 Ni-NTA 介质进行目的蛋白的纯化,50 mmol/L 咪唑洗脱杂蛋白,250 mmol/L 咪唑洗脱目的蛋白,最后将目的蛋白透析于 PBS 中保存。

#### 1.2.2 人重组 CD4 胞外区蛋白的活性与均一性鉴定

1.2.2.1 蛋白均一性检测 将纯化获得的人重组 CD4 胞外区蛋白,用 12% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离鉴定,并用考马斯亮蓝染液染色观察其组分均一性。同时通过电转仪将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,用封闭液 1 于 4 $^{\circ}$ C 封闭 10 h 到 12 h,再用一抗 15A7 室温孵育 1 h,之后用洗液漂洗 3 次,每次 5 min,二抗使用 GAM-HRP 室温孵育 1 h,同样漂洗 3 次后,显色曝光拍照。

利用分子筛检测蛋白在溶液中的均一性:将样

品以 0.5 ml/min 的流速通过 G3000, 记录蛋白样品不同组分的出峰情况。

**1.2.2.2 ELISA 检测活性** 将纯化获得的蛋白以 100 ng 的量包被于 ELISA 检测板上, 之后将单抗 15A7 以首孔 10  $\mu\text{g/ml}$  的浓度 3 倍稀释 12 个梯度, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后, 用洗液洗板 5 次后甩干, 再加入 GAM-HRP 二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后洗板甩干。加入显色液 A 液和 B 液 37 $^{\circ}\text{C}$  放置 10 min 进行显色, 0.2 mmol/L 浓硫酸终止显色反应。然后置于双波长(450 nm 和 630 nm) 读板仪下读取 OD 值, 并用 GraphPad Prism 软件处理数据作图。

将本实验室制备保存的 HIV gp120 蛋白以 200 ng 的量包被于 ELISA 检测板上, 再将标记了生物素的 CD4 蛋白以首孔 10  $\mu\text{g/ml}$  的浓度 3 倍稀释 12 个梯度, 步骤同上, 加入 SA-HRP 后, 显色终止。然后置于双波长(450 nm 和 630 nm) 读板仪下读取 OD 值, 并用 GraphPad Prism 软件处理数据作图。

将 CD4 蛋白以首孔 20  $\mu\text{g/ml}$  的浓度 3 倍梯度稀释, 再与 HIV-1 病毒进行孵育 1 h, 然后感染 Tzmb1 细胞。48 h 后固定细胞, 显色, 利用 Elispot 读板数点。

**1.2.3 SPR 测定 CD4 与 15A7 结合活性** 首先, 偶联 GAM 至 CM5: 用 70% 的甘油 Normalize CM5 芯片 2 次, Prime 1 次后以 HBS-EP 为缓冲液, 以 5  $\mu\text{l/min}$  的速率用 80  $\mu\text{l}$  EDC/NHS 活化芯片 4 个通道 根据预结合确定的浓度与 pH 将 GAM 偶联至芯片 4 个通道(GAM 60  $\mu\text{g/ml}$ , 稀释于 20 mmol/L pH5.0 醋酸-醋酸钠缓冲液, 用量 80  $\mu\text{l}$ ) 用 80  $\mu\text{l}$  的乙醇胺封闭芯片。最后用 pH2.2~2.6 的 20 mmol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液洗以 30  $\mu\text{l/min}$  的流速再生 3 次, 每次再生 5  $\mu\text{l}$ , 把结合不牢固的 GAM-Fc 和乙醇胺洗下来。其次, 摸索适当的单抗浓度、上样速率、上样量等使响应值在合理范围。本研究所使用的单抗上样流速为 30  $\mu\text{l/min}$ , 上样时间为 3.7 min。最后, 进行待测样品抗原性检测, 通过编写程序让 Biacore3000 自动上样。

#### 1.2.4 人重组 CD4 胞外区蛋白免疫原性评价

**1.2.4.1 BALB/c 小鼠免疫** 取 6 周龄 BALB/c 小鼠 4 只, 采集眼球后静脉血, 留作阴性对照血清使用。免疫原与弗氏佐剂混合乳化均匀, 采取少量多点皮下注射免疫。初次免疫使用完全弗氏佐剂, 免疫剂量为 200  $\mu\text{g/只}$ , 加强免疫使用非完全弗氏佐剂, 免疫剂量为 100  $\mu\text{g/只}$ 。免疫周期为 2 周, 每次免疫前 1 天, 采集小鼠眼球血, 以备后续检测使用。将血清于 37 $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min 后, 12 000 r/min 离心

10 min 取上清血清, 并冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$  备用。

**1.2.4.2 免疫血清与抗原反应性检测** 将免疫血清取 1.5  $\mu\text{l}$  稀释于 148.5  $\mu\text{l}$  20% NBS(含有 20% 胎牛血清的 PBS) 中, 进行 3 倍梯度稀释, 做 ELISA 检测免疫血清与抗原的反应性。

**1.2.4.3 免疫血清中和能力检测** 将免疫血清置于 56 $^{\circ}\text{C}$  水浴灭活 30 min, 首孔取 12  $\mu\text{l}$  血清溶于 138  $\mu\text{l}$  DMEM 培养基中, 然后进行 3 倍梯度稀释, 再与感染剂量为 100 个 TCID<sub>50</sub> 病毒孵育 40~48 h。之后弃上清, 用含有 1% 甲醛和 0.2% 戊二醛的 PBS 固定液固定细胞 5 min, 再用 75  $\mu\text{l}$  PBS 清洗固定液两次。然后加入显色液显色, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后用 Elispot 读板数点计数。

## 2 结果

**2.1 人重组 CD4 胞外区蛋白的制备和鉴定** 利用昆虫细胞表达系统来表达 CD4 胞外区蛋白。将本实验室留存的 CD4 胞外区基因序列, 通过 PCR 和分子克隆技术导入到昆虫细胞表达载体 pAcgp67B 中, 然后利用杆状病毒进行表达。将昆虫细胞上清用镍柱纯化, 纯化结果如图 1 所示, SDS-PAGE 显示目的蛋白分子量大小在 50 kD 左右, 其纯度约 90%, 产量约 11.2 mg/L, 能够满足小鼠免疫的需求。Western blot 结果显示 CD4 胞外区蛋白成功表达。

**2.2 人重组 CD4 胞外区蛋白的活性分析** 本研究通过体积排阻色谱、酶联免疫吸附试验等技术对目的蛋白各方面性质进行鉴定。通过 HPSEC 检测, 结果如图 2A 显示目的蛋白在溶液中均一性良好。经过 ELISA 检测结果显示, 本研究所获得的目的蛋白

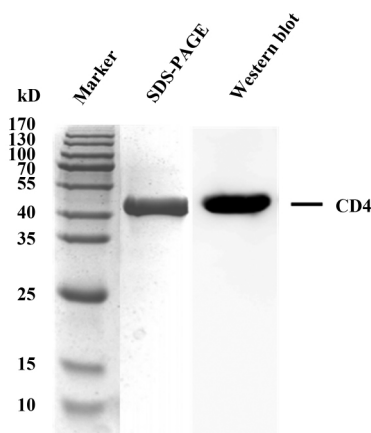


图 1 CD4 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 结果  
Fig. 1 SDS-PAGE and Western blot result of purified CD4 protein

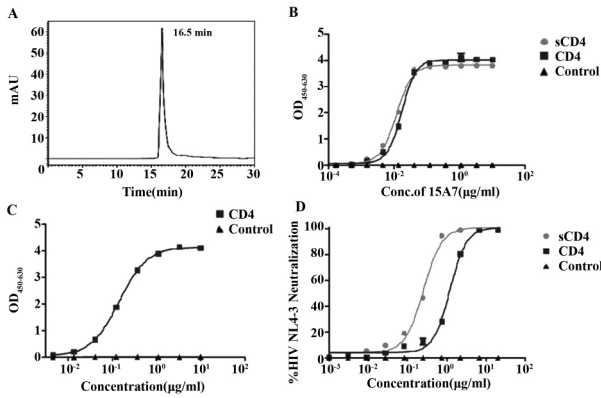


图 2 CD4 蛋白的理化性质结果

Fig. 2 Characterization of CD4 protein

Note: A. HPSEC analysis; B. Antigenicity analysis using monoclonal antibodies 15A7; C. Antigenicity analysis using HIV gp120; D. Activity analysis using HIV virus; sCD4. Commercialized soluble CD4; CD4. CD4 from this study.

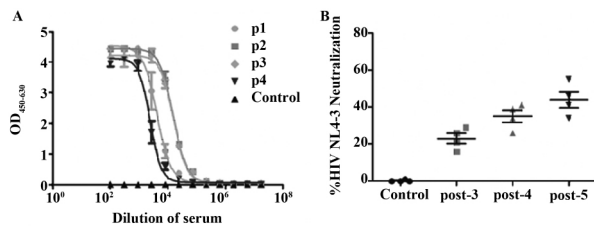


图 3 CD4 蛋白的免疫原性结果

Fig. 3 Immunogenicity of CD4 protein

Note: A. Immunogenicity analysis using anti-CD4 mouse serum; B. Neutralization of anti-CD4 mouse serum to HIV.

与目前市场上有的商品化可溶性 CD4 蛋白( soluble CD4, sCD4) 抗原性相当,如图 2B 所示。同时如图 2C 所示生物素标记的目的蛋白与本实验室制备的 HIV gp120 蛋白有很好的反应性,也说明该目的蛋白有较好的活性。通过 CD4 先与 HIV 病毒孵育阻断病毒感染 Tzmb1 细胞,将目的蛋白以不同浓度梯度与 HIV 病毒孵育,二者相互结合,然后感染 Tzmb1 细胞,结果如图 2D 所示,说明目的蛋白能够与 HIVNL4-3 病毒结合,达到阻断 HIV 病毒感染 Tzmb1 细胞的效果。以上结果均表明,经镍柱纯化得到的目的蛋白在溶液中性质均一且有比较好的抗原性。

利用 SPR 法检测 CD4 与单抗 15A7 的结合活性,结果显示  $K_D = 1.96 \times 10^{-9}$ ,  $\chi^2 = 9.05$ ,表明 CD4 与单抗 15A7 有良好的结合活性。

2.3 人重组 CD4 胞外区蛋白的免疫原性分析 为了检测获得的目的蛋白的免疫原性,使用纯化后的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠,检测小鼠血清结合与

中和滴度。结果如图 3A、B 所示,在第 5 针免疫之后,所有实验组小鼠( p1-p4) 血清均与免疫原有较好的结合活性,且均对 HIV NL4-3 病毒具有不同程度的中和滴度。说明本研究的目的蛋白具有类似天然的结构,具有较好的免疫原性,可以有效地刺激小鼠体内的免疫应答产生中和抗体,可用于 HIV 抗体以及受体等的研究。

### 3 讨论

人 CD4 分子在正常情况下,能够参与机体的免疫防御、免疫自稳和免疫监视功能。但当其正常的免疫功能失调或者遭到破坏时,就会导致疾病<sup>[15]</sup>。因此 CD4 分子以及 CD4 单抗成为许多疾病的治疗靶标,如自身免疫病、移植排斥反应、肿瘤以及 AIDS 等。能够在体外大量表达 CD4 蛋白对于攻克这些疾病的研究具有非常重要的意义<sup>[4, 13]</sup>。

早在 20 世纪 70 年代发现 CD4 分子以来,人们就开始尝试利用各种表达系统来表达 CD4 蛋白。最初从淋巴细胞表面分离,再到利用原核表达系统经大肠杆菌表达,以及利用真核表达系统哺乳动物细胞表达<sup>[16]</sup>。但这些表达纯化方法一般都比较复杂,且存在一些如原核表达系统翻译后加工修饰系统不完善等问题。相比以往的研究报道,本研究利用杆状病毒昆虫细胞表达系统表达 CD4 胞外区蛋白<sup>[17-21]</sup> 不仅培养操作简单、花费少,而且运用无血清培养基悬浮培养,具有易于扩大培养的优点。同时利用昆虫细胞内源的 gp67 信号肽实现目的蛋白的分泌表达,细胞上清利用镍柱一步纯化,即可得到纯度较高的目的蛋白,纯化方法简单快捷,每批次目的蛋白产量平均能够达到 11 mg/L。同时该昆虫表达系统表达的糖蛋白具有一定的糖基化修饰<sup>[22, 23]</sup>,能够满足目的糖蛋白的表达需求,对于该系统表达纯化得到人 CD4 胞外区蛋白,通过 WB、ELISA、体积排阻色谱等结果,表明目的蛋白具有良好的抗原性以及溶液中均一性良好。另外,小鼠免疫实验结果说明目的蛋白具有良好的免疫原性。因此,利用杆状病毒昆虫细胞表达系统,能够高效、简便、大量的表达纯化得到人 CD4 胞外区蛋白,能够为 CD4 分子以及 CD4 抗体等的研究提供充足的原料。

随着对 CD4 分子相关功能和机制的深入研究,CD4 分子跨膜区以及胞质区的功能逐渐被研究者挖掘,后续我们将尝试利用杆状病毒昆虫细胞表达系统进行 CD4 全长或其他功能区段蛋白的制备,为 HIV 受体和感染等方面的研究奠定基础。

## 参考文献:

- [1] Wittlich M, Wiesehan K, Koenig BW, *et al.* Expression, purification and membrane reconstitution of a CD4 fragment comprising the transmembrane and cytoplasmic domains of the receptor [J]. *Protein Exp Purif* 2007, 55(1): 198-207.
- [2] Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults [J]. *Blood* 2008, 112(5): 1557-1569.
- [3] Wan YY, Flavell RA. How diverse-CD4 effector T cells and their functions [J]. *J Mol Cell Biol* 2009, 1(1): 20-36.
- [4] Hou W, Fang C, Liu J, *et al.* Molecular insights into the inhibition of HIV-1 infection using a CD4 domain-1-specific monoclonal antibody [J]. *Antiviral Res* 2015, 122: 101-111.
- [5] Cerutti N, Mendelow BV, Napier GB, *et al.* Stabilization of HIV-1 gp120-CD4 receptor complex through targeted interchain disulfide exchange [J]. *J Biol Chem* 2010, 285(33): 25743-25752.
- [6] Freeman MM, Seaman MS, Rits-Volloch S, *et al.* Crystal structure of HIV-1 primary receptor CD4 in complex with a potent antiviral antibody [J]. *Structure* 2010, 18(12): 1632-1641.
- [7] Cerutti N, Killick M, Jugnarain V, *et al.* Disulfide reduction in CD4 domain 1 or 2 is essential for interaction with HIV glycoprotein 120 (gp120), which impairs thioredoxin-driven CD4 dimerization [J]. *J Biol Chem* 2014, 289(15): 10455-10465.
- [8] Bui VC, Nguyen TH. Insights into the interaction of CD4 with anti-CD4 antibodies [J]. *Immunobiology* 2017, 222(2): 148-154.
- [9] Rawool DB, Bitsaktis C, Li Y, *et al.* Utilization of Fc receptors as a mucosal vaccine strategy against an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* [J]. *J Immunol* 2008, 180(8): 5548-5557.
- [10] Rider DA, Havenith CE, de Ridder R, *et al.* A human CD4 monoclonal antibody for the treatment of T-cell lymphoma combines inhibition of T-cell signaling by a dual mechanism with potent Fc-dependent effector activity [J]. *Cancer Res* 2007, 67(20): 9945-9953.
- [11] Reichert JM. Antibodies to watch in 2010 [J]. *MAbs* 2010, 2(1): 84-100.
- [12] Preusser A, Jonas G, Willbold D. Purification of recombinantly expressed human cluster determinant 4 cytoplasmic domain [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003, 786(1-2): 39-44.
- [13] 李 岚, 计云霞, 袁 霖. 抗人 CD4 D1D2 结构域多克隆抗体对 HIV-1 的抑制作用 [J]. *中国病毒病杂志*, 2014, 4(2): 106-111.
- Li L, Ji YX, Yuan L. Inhibition of anti-CD4 D1D2 domain polyclonal antibodies on HIV-1 [J]. *Chin J Viral Dis* 2014, 4(2): 106-111.
- [14] Moldovan MC, Yachou A, Levesque K, *et al.* CD4 dimers constitute the functional component required for T cell activation [J]. *J Immunol* 2002, 169(11): 6261-6268.
- [15] 崔 健, 肖 鹤, 冯健男, 等. CD4 分子功能表位及拮抗剂研究进展 [J]. *军事医学科学院院刊* 2007, 31(2): 170-174.
- Cui J, Xiao H, Feng J, *et al.* CD4 Function epitope and antagonist—their research advances [J]. *Bulletin Acad Milit Med Sci* 2007, 31(2): 170-174.
- [16] Julien JP, Cupo A, Sok D, *et al.* Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer [J]. *Science* 2013, 342(6165): 1477-1483.
- [17] 林庆山, 蒋 婕, 李婷婷, 等. 杆状病毒-昆虫细胞系统表达的戊型肝炎病毒衣壳蛋白 p495 的纯化、结构解析以及免疫原性分析 [J]. *病毒学报* 2016, 32(3): 342-348.
- Lin QS, Jiang J, Li TT, *et al.* Expression, purification, structure determination and immunogenicity assay of hepatitis E virus capsid protein p495 derived from baculovirus-based insect cell [J]. *Chin J Virol* 2016, 32(3): 342-348.
- [18] Steele KH, Stone BJ, Franklin KM, *et al.* Improving the baculovirus expression vector system with vankyrin-enhanced technology [J]. *Biotechnol Prog* 2017, 33(6): 1496-1507.
- [19] Monteiro F, Bernal V, Chaillet M, *et al.* Targeted supplementation design for improved production and quality of enveloped viral particles in insect cell-baculovirus expression system [J]. *J Biotechnol* 2016, 233: 34-41.
- [20] Mabashi-Asazuma H, Kuo CW, Khoo KH, *et al.* A novel baculovirus vector for the production of nonfucosylated recombinant glycoproteins in insect cells [J]. *Glycobiology* 2014, 24(3): 325-340.
- [21] 谢秋玲, 陶 悦, 张小秦, 等. 人 Cosmc 胞外段蛋白在昆虫细胞 Sf-9 中的表达与纯化研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(10): 1507-1511.
- Xie QL, Tao Y, Zhang XQ, *et al.* Expression and purification of recombinant human Cosmc extracellular domain in Sf-9 insect cells [J]. *Chin J Immunol* 2016, 32(10): 1507-1511.
- [22] Tomiya N, Betenbaugh MJ, Lee YC. Humanization of lepidopteran insect-cell-produced glycoproteins [J]. *Acc Chem Res* 2003, 36(8): 613-620.
- [23] Harrison RL, Jarvis DL. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins [J]. *Adv Virus Res* 2006, 68: 159-191.

[收稿 2017-12-21 修回 2018-01-16]

(编辑 刘格格)