

HIV-1 gp160 截短蛋白在酿酒酵母中的表达

杨坤宇^{1,2}, 李少伟^{2*}, 张毅¹, 李庶甘¹, 何芳萍², 林庆山²,
周正³, 张军², 夏宁邵²

(1. 厦门出入境检验检疫局, 中国福建 厦门 361012; 2. 厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 中国福建 厦门 361005; 3. 武汉大学, 中国湖北 武汉 430072)

摘要: 利用 PCR 技术从 pNL-43 上扩增出截短的编码 gp160 蛋白的基因片断, 克隆到酿酒酵母表达载体 YEpFLAG-1 上构建表达质粒 YEp-gp160 Δ 12, 电转化到酿酒酵母中, 用缺色氨酸的 SC 培养基筛选出阳性克隆, 重组子经 YP 培养基诱导后进行全菌蛋白的 SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析, 筛选出高表达菌株. 纯化后的重组 gp160 Δ 12(rgp160 Δ 12)蛋白经 ELISA 鉴定显示具有良好的生物活性.

关键词: 人免疫缺陷病毒 型(HIV-1); gp160; 酿酒酵母; 表达

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)04-0298-05

Expression of Truncate HIV-1 Envelope Glycoprotein gp160 in *Saccharomyces cerevisiae*

YANG Kun-yu^{1,2}, LI Shao-wei^{2*}, ZHANG Yi¹, LI Shu-gan¹, HE Fang-ping²,
LIN Qing-shan², ZHOU Zheng³, ZHANG Jun², XIA Ning-shao²

(1. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361012, Fujian, China; 2. Xiamen University, National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, Xiamen 361005, Fujian, China; 3. Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China)

Abstract: The coding sequence of truncate gp160 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into yeast expression vector YEpFLAG-1 to construct plasmid of YEp-gp160 Δ 12. The plasmids were transformed into yeast Bj3505, and the recombinant strains were identified by cultivating in SC media without tryptophan. After induction in YP media, the whole proteins of recombinant cells were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting, and the high-yielding cells were selected. The ELISA performed with a panel of human sera suggested that the purified recombinant gp160 Δ 12 (rgp160 Δ 12) has good bioactivity.

Key words: HIV-1; gp160; yeast; expression

(*Life Science Research*, 2011, 15(4): 298~302)

人免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV) 是引起获得性免疫缺陷综合征 (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) 的致病原, 分为 型(HIV-1)和 型(HIV-2)两种, 亚洲以 HIV-1 型为主. gp160 是 HIV-1 的表面包膜糖蛋

白, 由 gp120 和 gp41 以非共价键连接组成, 常常以多聚体(多以三聚体)形式存在^[1]. gp160 可以和 HIV 感染初期产生的抗体反应^[2,3], 将 gp160 抗体用于 HIV 抗原检测, 可以使窗口期由 2~3 个月缩短到 2 周左右^[4,5].

收稿日期: 2011-03-04; 修回日期: 2011-06-30

基金项目: 国家高技术研究发展计划重点项目(863 计划)(2006AA020905); 国家自然科学基金资助项目(3050092); 教育部新世纪优秀人才培养计划项目(NCET-0500567)

作者简介: 杨坤宇 (1979-), 男, 福建厦门人, 博士, 主要从事医学分子病毒学研究, E-mail: yangkuny@xmu.edu.cn; * 通讯作者: 李少伟(1976-), 男, 福建泉州人, 博士, 厦门大学副教授, 主要从事医学分子病毒学研究, E-mail: shaowei@xmu.edu.cn, Tel: 0592-2187880, Fax: 0592-21812584.

gp160 属跨膜蛋白, 含有大段的疏水区, 蛋白质性质比较特殊, 至今还没有用大肠杆菌表达 rgp160 的报道. 酵母表达 rgp160 的报道也很少, Alex Franzusoff^[6]等人曾用酵母表达出 rgp160, 但重组蛋白质性质不稳定, 容易沉淀, 需用 8 mol/L Urea 和 1% SDS 进行溶解. 目前多以真核表达系统表达截短的 rgp160 蛋白 (rgp140), Antu K. Dey 等^[7]用哺乳动物细胞表达的 rgp140 具有三聚体结构, 也具有 gp160 前体上很多重要的中和构象表位. 但表达成本高, 不利于大规模生产. 通过 GCG 软件分析 gp160 的氨基酸性质, 发现跨膜区(gp41) 上的氨基酸 511~537 (Aa511~Aa537) 和氨基酸 679~703(Aa679~Aa703)是两段强疏水区, 本实验用 PCR 扩增技术缺失这两段疏水区后, 成功地利

用酿酒酵母表达了具有 gp160 活性的截短蛋白 rgp160Δ12.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

宿主大肠杆菌 TOP10F['] 购自 Invitrogen 公司; 酵母菌株 Bj3505, 表达质粒 YEpFLAG-1 由王海林博士惠赠; 克隆质粒 pMD18-T 购自 Takara 公司.

1.1.2 引物

根据质粒 pNL-43 上 HIV gp160 基因编码序列, 用 DNASTAR 软件设计克隆和 YEpFLAG-1 载体通用测序引物, 如表 1, 引物由上海博亚公司合成.

表 1 HIV-1 gp160 截短蛋白编码序列的克隆和测序引物

Table 1 The cloning and sequencing primers for coding sequence of HIV gp160

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size /bp
160FP	5'-ggatccaccaccatgagtagctacagaaaaattgtg-3'	36
160RP	5'-gcgcccgcttattctttttctctctgcacc-3'	30
160Δ1FP	5'-gcagagagaaaaagagcacaggccagacaattattg-3'	37
160Δ2FP	5'-ccacagccaatttggat-3'	18
160Δ2RP	5'-tatccctgcctaactctatt-3'	20
YaN21	5'-agcacaataacgggtattg-3'	21
YeC21	5'-acatgcgtacacgcgtctgta-3'	21

1.1.3 工具酶与其它

限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、Taq 聚合酶均购自 Takara 公司; 去糖基化酶 Endo-H 购自 NEB 公司; HIV(1+2 型)抗体免疫印记确诊试剂盒购自 GeneLabs 公司.

LB 培养基, SC 固体培养基 (0.67% yeast nitrogen base, 0.1% yeast synthetic drop-out media without tryptophan, 2% bacteriological agar), SC 液体培养基 (0.67% yeast nitrogen base, 0.1% yeast synthetic drop-out media without tryptophan), YP 培养基 (1% glucose, 3% glycerol, 1% yeast extract, 2% peptone, 100 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 6.4); -Trp DO Supplement 购自 Clontech 公司, Adenine semisulfate salt 和 Yeast Nitrogen Base 购自 Sigma 公司.

CB(包被抗原用)buffer: 2.93 g NaHCO₃, 1.59 g Na₂CO₃, 去离子水定容至 1 000 mL; TENG buffer: 50 mmol/L Tris-base, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10% Glycerol, pH 8.0.

1.1.4 GCG Wiscosin Package 软件

美国 Accelrys 公司产品, 购自创腾科技有限

公司, 安装于 RedHat Linux WS3.0 操作系统, 版本号 11.0, License Number: 85852.

1.2 方法

1.2.1 HIV-gp160 蛋白的疏水性及二级结构分析

先将 HIV-gp160 氨基酸序列转换成 GCG Wiscosin Package 软件通用格式, 再用 Pep-tidestructure 软件包中的 Kyte-Doolittle 算法分析 HIV-gp160 蛋白的疏水性及二级结构.

1.2.2 酵母表达载体的构建

以 pNL-43 为模板, 用 160Δ1FP、160RP、160FP、160Δ2FP、160Δ2RP 等引物进行 PCR 扩增^[8], 获得缺失了 Aa511~Aa537 和 Aa679~Aa703 的 gp160Δ12 基因. 将 PCR 产物连接到 pMD18-T 克隆载体, 经 BamH I/Not I 酶切处理, 连接到酵母表达载体 YEpFLAG-1 上得到 YEp-160Δ12 表达质粒.

1.2.3 YEp-gp160Δ12 转化酵母 Bj3505

用电穿孔转化方法将表达质粒电转化入酵母菌株 Bj3505, 取 200 μL 转化液涂布于色氨酸缺陷的 SC 平板上, 30 °C 培养 2~3 d, 观察转化子的生长

1.2.4 PCR 鉴定重组菌株

从 SC 平板上随机挑取单菌落至 10 μ L 去离子水中, 加 5 μ L Lyticase(5 U/mL, Sigma 公司), 混匀, 30 $^{\circ}$ C 温育 10 min, -80 $^{\circ}$ C 10 min, 取 5 μ L 裂解物用表 1 中的测序引物 YaN21 和 YcC21 对重组菌落进行 PCR 鉴定. 对反应产物进行琼脂糖凝胶电泳分析.

1.2.5 诱导表达

接种重组菌株于 100 mL SC 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 温育培养 48 h, 2 000 g 离心 5 min 收集菌体, 用 150 mL YP 培养基重悬细胞, 在 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养诱导 3 d^[9]. 将培养液 4 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用去离子水洗涤两次, 将菌体储存于-80 $^{\circ}$ C 中.

1.2.6 rgp160 Δ 12 的表达鉴定

按每克细胞加入 5 mL 裂解缓冲液 TENG 的比例重悬细胞, 在 83 000~90 000 kPa 高压下破碎 4 次. 重组菌株的裂解上清经 5% SDS-PAGE 电泳分离后进行 Western blotting 检测. 一抗为 HIV 阳性血清.

1.2.7 rgp160 Δ 12 的分离纯化和去糖基化

YE_p-gp160 Δ 12 重组菌株裂解上清用饱和硫氨酸进行分级沉淀, 再按 1:20 比例用 TENG(含 100 mmol DTT) 溶解含有目的蛋白的沉淀. 传统的电洗脱方法纯化 rgp160 Δ 12.

纯化后的 rgp160 Δ 12 蛋白在 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 加入去糖基化酶 Endo-H 在 37 $^{\circ}$ C 中酶解 60 min.

1.2.8 EIA 检测

用间接法检测 rgp160 Δ 12 的血清学活性. 将纯化后的 rgp160 Δ 12 用 CB 缓冲液稀释至 3 mg/L, 每个反应孔包被 100 μ L (96 孔板购自北京万泰生物公司), 封闭后加入 100 μ L 用小牛血清稀释了 500 倍的 HIV 阳性血清或 HIV 阴性血清作为一抗, 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 用酶标二抗(鼠抗人)进行显色.

2 结果与分析

2.1 HIV-gp160 蛋白的疏水性及二级结构分析

用 GCG Wiscosin Package 上 Peptide structure 软件包中的 Kyte-Doolittle 运算方法分析 HIV-gp160 氨基酸二级结构, 结果显示 gp160 上含有 28 个潜在的糖基化位点, gp41 上有两段疏水性很强的区域, 分别在 Aa511~Aa537 和 Aa679~Aa703.

2.2 PCR 鉴定重组菌株

用酵母表达载体上的引物 YaN21 和 YcC21 进行 PCR 扩增鉴定, 从图 1 可以看出 YE_p-gp160 Δ 12 转化的菌株扩增出约 2 300 bp(理论值为 2 301 bp)的特异的基因片断, 而对照菌株未能扩增出相应的特异性条带, 说明含有目的基因片断的表达质粒已经成功电转进酵母中.

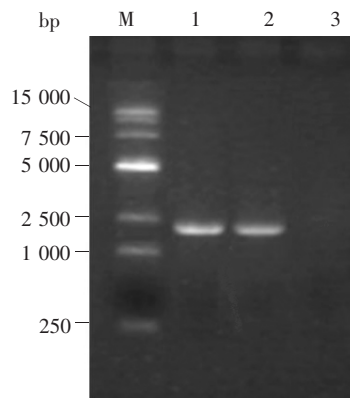


图 1 PCR 验证 Y_ep-gp160 Δ 12 电转化酵母菌株
M: DNA 相对分子质量; 1: Y_ep-gp160 Δ 12 重组菌株 (1); 2: Y_ep-gp160 Δ 12 重组菌株(2); 3: 对照菌株.

Fig.1 The recombinant strains were confirmed by PCR

M: DNA molecular Marker; 1: Y_ep-gp160 Δ 12 recombinant strain (1); 2: Y_ep-gp160 Δ 12 recombinant strain (2); 3: Control strain.

2.3 重组蛋白的诱导表达

YE_p-gp160 Δ 12 重组菌株用不含变性剂的缓冲液 TENG 重悬后, 再用 APV2000 高压均质机进行破碎, 裂解上清用 5% SDS-PAGE 分离鉴定, 以 HIV 阳性血清作为一抗进行 Western blotting 分析, 结果如图 2, YE_p-gp160 Δ 12 重组菌株 (lane1~lane4) 的裂解上清在 160 kDa 有一条特异的蛋白带, 与 gp160 单体相对分子质量相符, 而对照菌株 (lane5) 的裂解上清没有特异性条带, 说明 rgp160 Δ 12 可以在酿酒酵母 Bj3505 中表达, 且性质稳定, 可以溶解于上清中.

天然的 gp160 常常以三聚体的形式存在, 三聚体对 HIV 病毒生活周期的正常运转非常重要^[10-12]. 酿酒酵母 Bj3505 表达的 rgp160 Δ 12 经 5% 的 SDS-PAGE 电泳分离后, 在 160 kDa 和 480 kDa 处分别有一条特异的蛋白带 (图 2, lane1~lane4), 说明 rgp160 Δ 12 在酵母表达上清中以单体和三聚体的形式存在.

2.4 重组蛋白的分离纯化

为了获得高纯度的 rgp160 Δ 12 蛋白, 进行后续的研究工作, 用饱和硫氨酸对 rgp160 Δ 12 溶液进

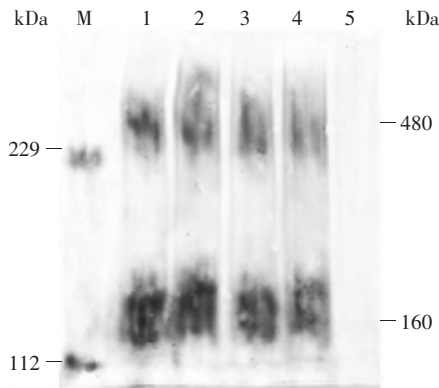


图 2 Western blotting 检测重组菌株裂解上清的抗原活性
M: 蛋白质相对分子质量; 1: YEp-gp160Δ12 重组菌株(1)裂解上清; 2: YEp-gp160Δ12 重组菌株(2)裂解上清; 3: YEp-gp160Δ12 重组菌株(3)裂解上清; 4: YEp-gp160Δ12 重组菌株(4)裂解上清; 5: YEpFlag-1 重组菌株裂解上清.

Fig.2 Western blotting of supernatant of cell lysates

M: Protein molecular weight marker; 1: Supernatant of YEp-gp160Δ12 recombinant cell (1) lysate; 2: Supernatant of YEp-gp160Δ12 recombinant cell (2) lysate; 3: Supernatant of YEp-gp160Δ12 recombinant cell (3) lysate; 4: Supernatant of YEp-gp160Δ12 recombinant cell (4) lysate; 5: Supernatant of recombinant YEpFlag-1 lysate.

行分级沉淀, 目的蛋白主要在 35%~60% 饱和度中沉淀. 将该区间沉淀的蛋白用 TENG (含 1% SDS 和 100 mmol DTT) 缓冲液溶解后, 进行电洗脱纯化. 结果如图 3(lane1, lane3)所示, rgp160Δ12 达到了很高的纯度. 由于样品处理中加入了 100 mmol DTT, 纯化后的 rgp160Δ12 蛋白只以单体的形式存在(图 3, lane1).

为了考查酿酒酵母表达的 rgp160Δ12 是否形成 N-糖基化, 用特异性酶解 N-糖链的去糖基化酶(*Endo-H*)对纯化后的 rgp160Δ12 进行消化处理, 再经 SDS-PAGE 分离鉴定. 处理前的 rgp160Δ12 相对分子质量约 160 kDa(图 3, lane1 & lane3), 处理后的 rgp160Δ12 相对分子质量约为 100 kDa(图 3, lane2 & lane4), 说明 rgp160Δ12 蛋白在酵母中进行了 N-糖基化.

2.5 间接法检测 rgp160Δ12 血清学活性

用 HIV(1+2 型)抗体免疫印记确诊试剂对 68 份血清样品进行检测, 共获得 13 份 HIV 阳性血清和 55 份 HIV 阴性血清. 经流行病学调查和临床诊断, 其中一份标本为 HIV 感染一个月内的血清样品. 利用这些血清对 rgp160Δ12 包被的反应板进行检测, 表 1 显示 rgp160Δ12 能检测出所有的 HIV 阳性血清, 灵敏度达 100%, 55 份阴性血清检测出 52 份, 特异性为 94.55%. 阳性预测值为

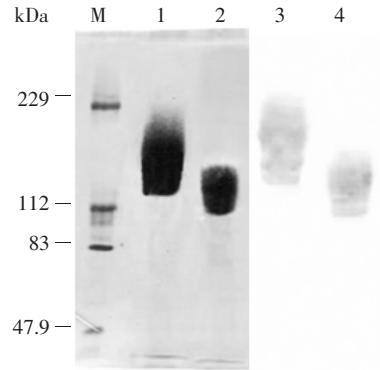


图 3 rgp160Δ12 的纯度和 N-糖基化分析

M: 蛋白相对分子质量; 1: 纯化后的重组 gp160Δ12 蛋白(SDS-PAGE); 2: 纯化后并去糖基化的重组 gp160Δ12 蛋白(SDS-PAGE); 3: 纯化后的重组 gp160Δ12 蛋白(Western blotting); 4: 纯化后并去糖基化的重组 gp160Δ12 蛋白(Western blotting).

Fig.3 Analysis of purity and N-glycosylation of rgp160Δ12

M: Protein molecular weight marker; 1: Purified rgp160Δ12 (SDS-PAGE); 2: Purified rgp160Δ12 deglycosylated by *Endo-H* (SDS-PAGE); 3: Purified rgp160Δ12 (Western blotting); 4: Purified rgp160Δ12 deglycosylated by *Endo-H* (Western blotting).

81.25%, 阴性预测值为 100%. 结果提示 rgp160Δ12 具有良好的生物活性.

表 2 间接法检测 rgp160Δ12 血清学活性

Table 2 Detection of serological activity of rgp160Δ12 by indirect ELISA

Conformation	gp160Δ12		
	No.	Positive	Negative
HIV positive	13	13	0
HIV negative	55	3	52
Total	68	16	52
Sensitivity		100.00%	(13/13)
Specificity		94.55%	(52/55)
Positive predictive value		81.25%	(13/16)
Negative predictive value		100.00%	(52/52)

3 讨论

HIV-1 gp160 属包膜糖蛋白, 含有大段的疏水区, 其重组蛋白容易沉淀, 我们做过大量实验, 摸索溶解条件, 发现除了少数表面活性剂如 SDS、SAS、sarkosyl 等能部分溶解 rgp160 外, 不含表面活性剂的缓冲液很难将其溶解, 不利于后续纯化, 这与报道的基本一致^[6]. 本实验将 gp41 上的 Aa511~Aa537 和 Aa679~Aa703 两段强疏水区缺失后, rgp160Δ12 能溶解在不含表面活性剂的非变性缓冲液中, 说明 gp41 上的疏水区会严重影响 gp160 的溶解性. 而且, rgp160Δ12 具有类似于 gp160 的三聚体结构

说明 gp41 上两段疏水区的缺失并不影响 rgp160 Δ 12 聚体的形成,提示这两段疏水区对 gp160 形成某种特殊的构象结构的作用比较小,这两段疏水区的缺失可能对 gp160 的生物活性影响较小。

天然的 gp160 含有大量的 N-糖基化位点 Asn-X-Ser/Thr(X 除了脯氨酸以外的任何氨基酸),正确的糖基化对 HIV 病毒的蛋白折叠、活性都有重要作用^[13]。酵母表达的 rgp160 是否具有 N-糖基化对 rgp160 是否具有天然 gp160 的性质非常重要。酵母细胞和哺乳动物细胞一样,都是在滑面内质网的寡糖核心 Man₈GlcNAc₂ 上开始蛋白的 N-糖基化。但由于酵母细胞中缺乏哺乳动物细胞中的 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶、半乳糖基转移酶、唾液酸转移酶等酶,多了 α -1, 2 甘露糖转移酶、 α -1, 3 甘露糖转移酶、 α -1, 6 甘露糖转移酶等酶,酵母细胞不能形成与哺乳动物细胞一样的 N-糖链,而是容易形成高甘露聚糖型糖链 Man₉GlcNAc₂^[14, 15]。酵母表达的 rgp160 Δ 12 能形成 N-糖基化(图 3),但形成了何种形式的糖侧链,以及这些糖链对 rgp160 Δ 12 生物活性的影响如何,本实验还未进行深入探讨,这是我们以后需要解决的问题。如果仅仅从检测活性考虑,rgp160 Δ 12 可以检测出所有 13 份 HIV 阳性血清(表 2),特别是可以检测出 1 份感染一个月内的 HIV 阳性血清,说明糖侧链并没有覆盖 rgp160 Δ 12 上某些关键的表位点,不会严重影响 rgp160 Δ 12 的生物活性。

凝集素亲和层析是纯化重组 gp160 蛋白的有效方法^[16-18]。但我们实验发现,仅仅采用某种方法如过滤层析、离子交换层析、凝集素亲和层析等,对 rgp160 Δ 12 的纯化效果非常差。为了尽快获得高纯度的 rgp160 Δ 12 蛋白以便后续研究,本文采用电洗脱的方式进行纯化,这种纯化方式可能会对 rgp160 Δ 12 的生物活性产生不利的影响。在后续工作中,我们会尝试将几种方法联合应用,探讨以非变性的纯化方法获得高纯度的 rgp160 Δ 12 蛋白,同时探索通过电洗脱纯化获得的 rgp160 Δ 12 的复性条件,进一步研究 rgp160 Δ 12 的生物活性。

参考文献(References):

[1] MOULARD M, ACHSTETTER T, KIENY M P, *et al.* Kex2p: a model for cellular endoprotease processing human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 225 (2): 565-572.

[2] CHEN Jian-min, WANG Li-qiang, SAHU G K, *et al.* Detection of antibodies to human immunodeficiency virus (HIV) that recognize conformational epitopes of glycoproteins 160 and 41

often allows for early diagnosis of HIV Infection[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 186(3): 321-331.

[3] JEHUDA C T, SLADE B A, POWELL J D, *et al.* Polyclonal B-cell activation reveals antibodies against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in HIV-1-seronegative individuals [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87(10): 3972-3976.

[4] SAVILLE R D, CONSTANTINE N T, CLEGHORN F R, *et al.* Fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(7): 2518-2524.

[5] WEBER B, GURTNER L, THORSTENSSON R, *et al.* Multi-center evaluation of a new automated fourth-generation human immunodeficiency virus screening assay with a sensitive antigen detection module and high specificity[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(6): 1938-1946.

[6] FRANZUOFF A, VOLPE A M, JOSSE D, *et al.* Biochemical and genetic definition of the cellular protease required for HIV-1 gp160 processing[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(7): 3154-3159.

[7] DEY A K, DAVID K B, KLASSE P J, *et al.* Specific amino acids in the N-terminus of the gp41 ectodomain contribute to the stabilization of soluble, cleaved gp140 envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1[J]. *Virology*, 2007, 360(1): 199-208.

[8] MAROZSAN A J, ARTS E J. Development of a yeast-based recombination cloning/system for the analysis of gene products from diverse human immunodeficiency virus type 1 isolates[J]. *Journal of Virological Methods*, 2003, 111(2): 111-120.

[9] NGAMKITITDECHAKUL C, TWINING S S. Buffered non-fermenter system for lab-scale production of secreted recombinant His-tagged proteins in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechniques*, 2002, 33(6): 1296-300.

[10] WEISSENHORN W, DESSEN A, HARRISON S C, *et al.* Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41[J]. *Nature*, 1997, 387(6631): 426-430.

[11] CHAN D C, FASS D, BERGER J M, *et al.* Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein[J]. *Cell*, 1997, 89: 263-273.

[12] RHODES R D, SPITALI M, HUTCHINSON G, *et al.* Expression, characterization and purification of simian immunodeficiency virus soluble, oligomerized gp160 from mammalian cells[J]. *Journal of General Virology*, 1994, 75(pt1): 207-213.

[13] DERBY, N R, GRAY S, *et al.* Isolation and characterization of monoclonal antibodies elicited by trimeric HIV-1 Env gp140 protein immunogens[J]. *Virology*, 2007, 366(2): 433-445.

[14] STRUM-RAMIREZ K M, HULSE-POST D J, GOVORKOVA E A, *et al.* Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia?[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(17): 11269-11279.

[15] CREGG J M, CERECHINO J L, SHI J, *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, 16(1): 23-52.

[16] TAVERNA M, NGUYET T T, VALENTIN C, *et al.* A multi-mode chromatographic method for the comparison of the N-glycosylation of a recombinant HIV envelope glycoprotein (gp160s-MN/LAI) purified by two different processes[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 68(1): 37-48.

[17] VANCOTT T C, VEIT S C, KALYANARAMAN V, *et al.* Characterization of a soluble, oligomeric HIV-1 gp160 protein as a potential immunogen[J]. *Journal Immunology Methods*, 1995, 183(1): 103-117.

[18] JEFFS S A, GORIUP S, KEBBLE B, *et al.* Expression and characterisation of recombinant oligomeric envelope glycoproteins derived from primary isolates of HIV-1[J]. *Vaccine*, 2004, 22(8): 1032-1046.