

doi: 103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 03. 031

猿猴空泡病毒 40 病毒样颗粒的制备及纯化

刘瑞熙^{1,2}, 李晓雨¹, 杨 硕², 李小姣², 杨志荣¹, 刘兰军², 冯 甦¹

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610065; 2. 成都蓉生药业有限责任公司, 成都 610023)

摘 要: 本研究将猿猴空泡病毒 40(Simian virus 40, SV40)的主要衣壳蛋白 VP1 通过 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在昆虫细胞中大量表达, 并自我装配成形态结构及免疫原性均与天然病毒粒子相同或相似的 SV40 病毒样颗粒(SV40 virus-like particles, SV40 VLPs), 经表达条件优化及分子筛纯化, 成功制备出高纯度的 VLPs. 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果可见大小约为 46kDa 的 VP1 特异性条带. 间接免疫荧光试验(IFA)证实 VP1 蛋白能够与异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠抗体发生反应, 出现明显的特异性绿色荧光, 具有良好的抗原性. 纯化产物在透射电镜下可见直径约 45nm 的病毒样颗粒, 显示出成功组装了 SV40 VLPs, 免疫印迹试验证明 VLPs 能够与人抗 SV40 阳性血清发生反应, 具有良好的抗原性.

关键词: 猿猴空泡病毒 40(SV40); 病毒样颗粒(VLPs); VP1 蛋白; 杆状病毒

中图分类号: Q819 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)02-0437-06

Production and purification of simian vacuolating virus40 virus-like particles

LIU Rui-Xi, LI Xiao-Yu, YANG Shuo, LI Xiao-Jiao, YANG Zhi-Rong, LIU Lan-Jun, FENG Su

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. Chengdu Rongsheng Pharmaceuticals Co. Ltd, Chengdu 610023, China)

Abstract: Express the structural protein VP1 of Simian virus 40 (SV40) in Bac-to-Bac baculovirus expression system. The expressed protein was self-assembled to SV40 virus-like particles (SV40 VLPs). Then it was extracted and purified by ultracentrifugation and molecular sieve. VP1 specified band could be observed at 46kDa in polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE). Indirect immunofluorescence assay (IFA) proved that VP1 VLPs combined with fluorescein isothiocyanate(FITC)-labeled goat anti-mouse antibody to present green fluorescence. This indicated VP1 protein had good antigenicity. The purified VLPs could be observed under electron microscope with 45nm diameter, which indicated SV40 VLPs was successfully assembled. The Western-blot showed SV40 VLPs could react with human-derived anti-SV40 plasma, which also indicated VLPs had good antigenicity.

Key words: Simian vacuolating virus 40; Virus-like particles; VP1; Baculovirus;

1 引 言

猿猴空泡病毒 40(Simian virus 40, SV40)属于乳多空病毒科(Polyomaviridae)多瘤病毒属.

1960年由 Sweet 和 Hillcman 最早从脊髓灰质炎和腺病毒的疫苗中分离得到^[1]. 亚洲猿类特别是恒河猴是 SV40 的天然宿主, 感染 SV40 病毒可导致猴体急性病变或长期携带感染, 并能使幼鼠产生肿

收稿日期: 2014-11-29

作者简介: 刘瑞熙(1987-), 女, 陕西富平人, 助理研究员, 主要从事昆虫细胞杆状病毒表达系统研究开发. E-mail: liuruixi04@163.com

通讯作者: 冯甦. E-mail: fengsu_fs@163.com; 刘兰军. E-mail: Liulanjunchina@hotmail.com

瘤和多种培养细胞发生转化^[2]. 虽然目前还未从人体中分离到 SV40 全病毒颗粒, 但 SV40 与人的一些肿瘤关系密切已成为共识^[3], 且还有一些研究表明 SV40 与人类进行性多灶白质脑炎(PML)、神经疾病等其他疾病有联系, 在人类中具有更广泛的致病谱^[4]. 近年来, 国外对 SV40 的研究主要集中于 SV40 感染人类的原因以及其致癌机制和抗肿瘤免疫的研究^[5].

SV40 是由 72 个蛋白壳粒组成的, 二十面体对称的, 无包被的病毒颗粒, 直径大约为 45nm. 其病毒基因组大小仅有 5243bp, 是一种环形双链 DNA. SV40 由 VP1、VP2 和 VP3 三个衣壳蛋白构成, VP1 是其主要衣壳蛋白. 研究表明, 多种病毒的衣壳蛋白可通过昆虫细胞表达成功制备 VLPs^[6]. 如人类乳头瘤病毒(HPV)、埃博拉病毒(Ebola)、轮状病毒、戊型肝炎病毒、诺如病毒、兔出血症病毒等^[7-11]. 同样, SV40 VP1 蛋白也能够昆虫细胞中表达, 且无需其他衣壳蛋白的参与, 模仿其病毒的自然组装过程, 自我组装成形态结构与天然病毒粒子相同或相似的病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)^[10].

本研究将 SV40 VP1 蛋白通过 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在昆虫细胞中进行大量表达, 经表达条件优化及分子筛纯化, 成功制备了高纯度的 SV40 VLPs. 应用这种重组表达的 VLPs 可为 SV40 的诊断提供安全有效的诊断抗原, 为建立检测 SV40 感染的血清学方法以及研制有效的基因工程疫苗奠定良好基础, 具有一定的创新性.

2 材料与方法

2.1 材料

Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统、草地夜蛾卵巢细胞(Sf9 细胞)及 Sf900 II 培养基购自 Invitrogen 公司; DNA 连接试剂盒、Taq 酶、限制性内切酶购于大连宝生物公司 TAKARA 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; 细胞培养瓶购自 BD Falcon 公司; 鼠抗 SV40 阳性血清、人抗 SV40 阳性血清由成都蓉生药业有限责任公司血浆蛋白研究室保存; 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠 IgG, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人-IgG 购自 Sigma 公司; 30% 丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、Prestained SDS-PAGE Standard Low Range 购自 Bio-Rad; Broad Range protein molecular weight Marker 购自 Promega 公

司. IX73 倒置荧光显微镜购自 OLYMPUS 公司.

2.2 方法

2.2.1 基因序列的设计及合成 根据 GenBank 报道的 SV40 VP1 基因序列(1499~2593bp)(基因序列号: NC001669) 设计并优化用于表达的 VP1 基因序列(1107bp). 在 SV40 VP1 基因序列(1499~2593bp) 的 5' 端及 3' 端分别引入 *Bam*H I (GGATCC) 及 *Xba* I (TCTAGA) 酶切位点, 并将序列中间的 *Bam*H I 酶切位点在不改变氨基酸序列的前提下点突变去除(1035 位的 G 变为 T), pUC57/SV40 VP1 克隆质粒由苏州金唯智生物科技有限公司进行合成.

2.2.2 重组杆状病毒转移质粒的构建 用 *Bam*H I、*Xba* I 双酶切合成的克隆质粒 pUC57/SV40 VP1 及 pFastBac1 质粒, 切胶回收相应目的序列片段 SV40 VP1(1107bp) 和 pFastBac1(4775 bp). 用 DNA 连接试剂盒 16℃ 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 培养后, 接种于含氨苄青霉素的固体 LB 培养基平皿, 挑取阳性克隆子单克隆菌落, 再接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基培养扩增, 扩增成功后进行质粒提取、双酶切鉴定. 将所构建的重组杆状病毒转移质粒命名为 pFastBac1/SV40 VP1.

2.2.3 重组杆状病毒穿梭质粒的构建和鉴定 将 pFastBac1/SV40 VP1 质粒转化含杆状病毒穿梭载体 Baculovirus plasmid (Bacmid) 的 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞, 与 Bacmid 发生位点特异性转座, 37℃ 培养 4h, 取 10 μ L 涂布于含有 50 μ g/mL 卡那霉素、7 μ g/mL 庆大霉素、10 μ g/mL 四环素、100 μ g/mL Blue-gal 和 40 μ g/mL 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)的 LB 平板上, 37℃ 避光培养 48h, 通过蓝白斑筛选, 挑取白色菌落在同样的含上述 3 种抗生素的 LB 平板纯培养一代, 挑取克隆摇菌, 按 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统操作手册提取重组 Bacmid, 获得 2 个重组杆状病毒穿梭质粒 Bacmid-VP1(分别编号为 1 与 2). Bacmid-VP1 质粒大小约 135kb, 远大于目的基因长度(1107bp), 不便于利用限制性内切酶酶切的方法进行鉴定, 故参照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统操作手册进行聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR) 鉴定. 使用的引物位于转座位点两侧, PCR 产物理论长度为 2 条引物至克隆位点的距离(2300bp) 加上目的基因长度(1107bp), 约 3407bp. 鉴定的阳性重组质粒命名为 rBacmid-VP1.

2.2.4 重组杆状病毒 rBac-VP1 的制备 将 rBacmid-VP1 重组质粒与转染试剂 Cellfectin II Reagent(Invitrogen 公司)共转染对数生长期的 Sf9 细胞,同设空白细胞对照. 27℃培养 6h 后换新鲜 SF900 II SFM 无血清培养基,27℃继续培养 4~7 d,细胞出现典型细胞病变效应(CPE)时收获病毒,此为第 1 代重组杆状病毒 rBac-VP1. 用第 1 代 rBac-VP1 感染 Sf9 细胞以获得高滴度的第 2 代重组杆状病毒.

2.2.5 目的蛋白表达条件优化 用第 2 代重组杆状病毒 rBac-VP1 分别取 50 μ L、100 μ L、200 μ L 感染 6 孔板中的 Sf9 细胞,27℃生化培养箱中培养,分别于感染后 3d-7d 分别收获不同接种量感染的病毒上清,当日处理样品,Sf9 正常细胞上清作为对照. 按照同一接种量不同感染天数进行 12% SDS-PAGE 电泳分析.

2.2.6 转染细胞中目的蛋白 SDS-PAGE 检测 用重组杆状病毒 rBac-VP1 感染 Sf9 细胞进行表达,收集细胞病毒悬液,Sf9 细胞悬液作为对照,分别取 200 μ L 于 1.5mL EP 管中,13000r/min 离心 1min,分离上清及沉淀,沉淀用 PBS 洗涤 2 次后,加入 30 μ L dH₂O 重悬,重悬后的细胞沉淀及 30 μ L 培养上清中分别加入 10 μ L 4 \times Reducing 样品上样处理液,99℃加热 10min,13000r/min 离心 1min,分别取 15 μ L 进行 12% SDS-PAGE 电泳分析.

2.2.7 间接免疫荧光试验(IFA) 用重组杆状病毒感染 6 孔板培养的 Sf9 细胞,同时设空载体对照,待出现典型 CPE 后去除培养基. -20℃用预冷的 80%丙酮固定细胞 20min,弃固定液,挥干,加入 1:20 稀释的鼠抗 SV40 阳性血清室温结合 1h, PBS 洗涤 3 次后加入 1:64 稀释的异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠 IgG 室温避光作用 30min, PBS 洗涤 2 次,于倒置荧光显微镜下观察并分析结果.

2.2.8 SV40 VLPs 的制备及纯化 5 个 T75 瓶 Sf9 细胞传代至 5 个 T225 细胞培养瓶(corning 公司),终体积 45mL,根据优化后的实验条件用第 2 代重组杆状病毒 rBac-VP1 感染 Sf9 细胞,4.5mL/T225,27℃生化培养箱中培养 7d 后收获病毒. 使用 SF900 II SFM 培养基. 6000r/min 离心 10min 去除细胞沉淀,上清用冷冻离心机(Beckman Coulter Avanti J-26 XP)20000r/min 超速离心 2h 后,用 0.2M PBS (pH7.4)悬浮沉淀,沉淀复溶液进行凝胶层析过分子筛柱(superdexTM200 10/300GL),收集峰尖,SDS-

PAGE 检测纯化效果. BCA 法测定蛋白含量.

2.2.9 SV40 VLPs Western-blot 鉴定 纯化后的 SV40-VLPs 和正常 Sf9 正常细胞上清用 4 \times Reducing 样品上样缓冲液裂解处理,12% SDS-PAGE 电泳分离后,电转移至硝酸纤维膜上,以 1:200 倍稀释人抗 SV40 阳性血清为一抗,1:5000 倍稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗人为二抗,按 Bio-Rad 操作指南进行 Western-blot 鉴定,二氨基联苯胺(DAB)显色. 记录并分析结果.

2.2.10 SV40 VLPs 电镜观察 取适量纯化后的 SV40-VLPs 经 2%的磷钨酸负染后于透射电镜下进行电镜.

3 结果

3.1 重组杆状病毒转移质粒的酶切鉴定

合成的克隆质粒 PUC57/SV40 VP1 及 pFastBac 1 表达载体分别用 *Bam*H I、*Xba* I 双酶切后,经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测可见 SV40 VP1 片段约为 1107bp 左右,pFastBac1 片段约为 4775bp 左右,大小均与预期结果一致,切胶回收相应目的基因序列片段(见图 1).

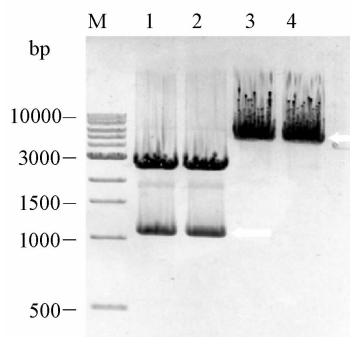


图 1 质粒 PUC57/ SV40 VP1 和 pFastBac 1 的双酶切鉴定

M:1kb DNA marker(NEB);1,2: PUC57/SV40 VP1 *Bam*H I /*Xba* I 双酶切产物;3,4: pFastBac1 *Bam*H I /*Xba* I 双酶切产物

Fig. 1 Identification of PUC57/ SV40 VP1 and pFastBac 1 by restriction analysis

用 *Bam*H I、*Xba* I 双酶切鉴定重组杆状病毒转移质粒 pFastBac1/ SV40 VP1,经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测可见两条 DNA 条带,大小分别在 4775bp 和 1107bp 左右,大小均与预期结果一致,结果证实重组杆状病毒转移质粒 pFastBac1/ SV40 VP1 构建成功.(见图 2)

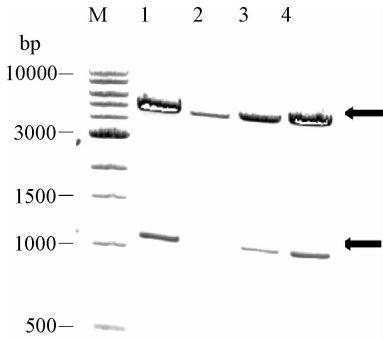


图 2 重组杆状病毒转移质粒 pFastBac1/SV40 VP1 的双酶切鉴定

M: 1kb DNA marker (NEB); 1, 2, 3, 4: pFastBac1/SV40 VP1①②③④质粒 *Bam*HI / *Xba*I 双酶切产物

Fig. 2 Identification of pFastBac1/SV40 VP1 by restriction analysis

3.2 重组杆状病毒穿梭质粒的鉴定

将构建成功的重组杆状病毒转移质粒 pFast-Bac1/ SV40 VP1 转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞, 得到重组杆状病毒穿梭质粒 Bacmid-VP1. PCR 鉴定结果显示扩增片段大小约为 3407bp, 与理论相符(2300bp + VP1 基因的长度 1107bp), 获得的 4 个发生正确转座的目的克隆为阳性重组质粒 rBacmid-VP1(见图 3).

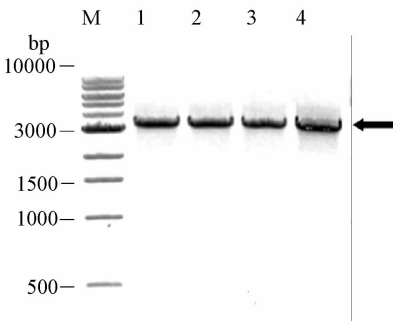


图 3 重组杆状病毒穿梭质粒 Bacmid-VP1 的 PCR 鉴定

M: 1kb DNA marker (NEB); 1, 2, 3, 4: Bacmid-VP1 菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of Bacmid-VP1 by PCR analysis

3.3 转染后 Sf9 细胞病变

rBacmid-VP1 转染对数生长期的 Sf9 细胞, 3d 倒置显微镜下可见转染的 Sf9 细胞生长缓慢, 细胞折光性降低, 细胞分裂停止, 6d 部分细胞膨大而破碎, 发生融合、裂解继而普遍悬浮等病变特征. 而用空载体杆状病毒转染的 Sf9 细胞对照并未出现细胞死亡漂浮及破裂等病变现象, 说明转染成功(见图 4).

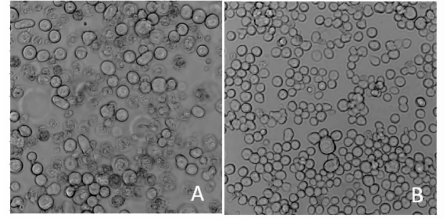


图 4 感染重组杆状病毒的 Sf9 细胞病变情况($\times 400$)

A: Bacmid-VP1 重组杆状病毒感染 Sf9 细胞病变; B: 空载体杆状病毒感染 Sf9 细胞对照

Fig. 4 CPE of Sf9 cell after Transfection($\times 400$)

3.4 昆虫细胞表达条件优化摸索

用第 2 代重组杆状病毒 rBac-VP1 分别取 $50\mu\text{L}$ 、 $100\mu\text{L}$ 、 $200\mu\text{L}$ 感染 6 孔板中的 Sf9 细胞, 27°C 生化培养箱中培养, 分别于感染后 3d~7d 分别收获不同接种量感染的病毒上清, 当日处理样品, Sf9 正常细胞上清作为对照. 按照同一接种量不同感染天数进行 12% SDS-PAGE 电泳分析. 根据电泳结果选定接种量为 $200\mu\text{L}$, 感染 7d 后收获病毒为最优条件(见表 1).

表 1 表达条件优化目的蛋白含量对比

Tab. 1 Content comparison of expressed protein from different optimization conditions

感染量(μL)	感染时间(d)				
	3	4	5	6	7
50	12.8	19.3	24.8	29.8	36.0
100	18.6	22.5	27.2	34.3	40.4
200	25.5	26.9	34.3	38.4	57.2

3.5 目的蛋白表达检测及鉴定

3.5.1 SDS-PAGE 检测 用重组杆状病毒 rBac-VP1 感染 Sf9 细胞进行表达, 收集细胞悬液, Sf9 细胞悬液作为对照. 12% SDS-PAGE 电泳检测结果显示: 在 46kD 左右可见明显表达的一条特异性条带, 大小与预期相符, 目的蛋白在上清及细胞中均有表达.(见图 5).

3.5.2 间接免疫荧光 IFA 试验 rBac-VP1 感染 Sf9 4d 后, 免疫荧光检测 VP1 表达. 如图所示, rBac-VP1 感染的 Sf9 细胞出现绿色荧光, 而空载体杆状病毒感染 Sf9 细胞对照中未见荧光, 说明 rBac-VP1 感染后, Sf9 表达 VP1 蛋白(见图 6).

3.6 SV40 VLP 制备及纯化

根据优化后的实验条件用第 2 代重组杆状病毒 rBac-VP1 感染 Sf9 细胞, 培养 7d 后收获病毒. $6000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min 去除细胞沉淀, 上清 $20000\text{r}/\text{min}$ 超速离心 2h 后, 用 0.2M PBS (pH7.4) 悬浮沉淀, 沉淀复溶液即为 SV40 VLPs,

用 superdex™ 200 10/300GL 纯化, 收集峰尖, SDS-PAGE 检测结果显示纯化效果较好(见图 7), BCA 法测定蛋白含量为 0.33mg/mL.

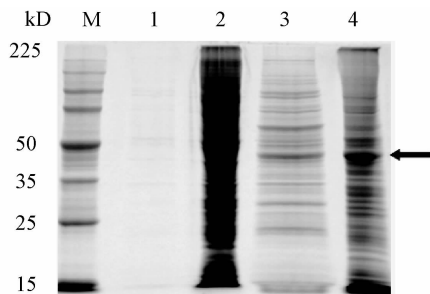


图 5 SDS-PAGE 检测结果

M: Broad Range protein molecular weight Marker (Promega); 1: Sf9 正常细胞上清; 2: Sf9 正常细胞沉淀; 3: rBac-VP1 病毒培养上清; 4: rBac-VP1 病毒培养沉淀

Fig. 5 SDS-PAGE assay result

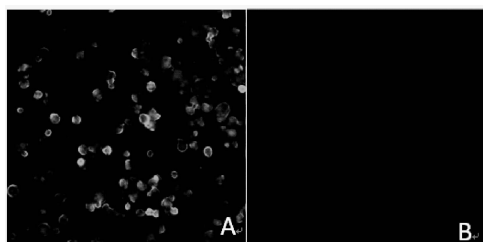


图 6 使用鼠抗 SV40 血清的间接免疫荧光检测结果
A: 感染 rBac-VP1 重组杆状病毒细胞; B: 空载体杆状病毒感染细胞

Fig. 6 IFA result of utilized mouse anti-SV40 antibodies serum reacted with rBac-VP1

3.7 SV40 VLPs 鉴定

3.7.1 Western-blot 鉴定 将纯化后的 SV40-VLPs 和 Sf9 正常细胞上清电转移至硝酸纤维膜上, 以 1:200 倍稀释人抗 SV40 阳性血清为一抗, 1:5000 倍稀释 HRP 标记的山羊抗人为二抗, 按 Bio-Rad 操作指南进行 Western-blot 鉴定, DAB 显色. Western blotting 的结果显示纯化后的 SV40 VLPs 在 46kDa 左右出现一条明显的特异性反应条带, 大小与 SDS-PAGE 电泳结果一致, 与预期相符(见图 8). 说明在昆虫细胞中自发装配成的 SV40 VLPs 具有良好的抗原性.

3.7.2 SV40 VLPs 电镜观察

取纯化后的 SV40-VLPs 经 2% 的磷钨酸负染后于透射电镜下进行电镜观察. 电镜照片可见形状规则大小约为 45nm 的 SV40 VLPs(见图 9A)及直径约为 VLPs 两倍大小的重组杆状病毒, 背景清晰(见图 9B), 证实了 SV40 VP1 能够自发装配成直径

约 45nm 的正二十面体 SV40 VLPs, 与理论相符.

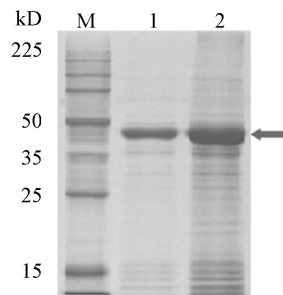


图 7 SV40-VLPs 分子筛纯化 SDS-PAGE 电泳结果
M: Broad Range protein molecular weight Marker (Promega); 1: 分子筛纯化峰尖; 2: SV40 VLPs 超速离心后沉淀复溶液

Fig. 7 SDS-PAGE result of purified SV40 VLPs

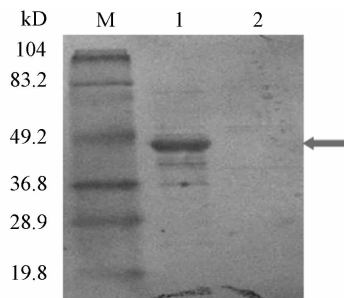


图 8 纯化后 SV40 VLPs western-blot 结果
M: Prestained SDS-PAGE Standard Low Range(Bio-Rad); 1: 纯化后 SV40 VLPs; 2: Sf9 正常细胞上清对照

Fig. 8 Western blot result of purified SV40 VLPs

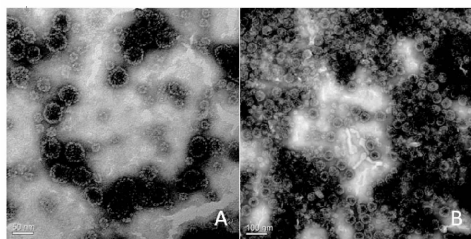


图 9 SV40 VLPs 电镜照片

A: SV40 VLPs; B: rBac-VP1 重组杆状病毒

Fig. 9 Electron micrographs of SV40 VLPs

4 讨论

昆虫细胞-杆状病毒表达体系是一种成熟的商品化的真核表达系统, 该表达系统将重组杆状病毒作为基因工程载体, 在昆虫细胞中实现外源基因的表达, 由于该系统具有良好的蛋白质翻译后加工系统, 外源基因的表达产物可被正确地加工修饰, 使所表达的蛋白能更好地保持免疫原性和抗原性, 具有高安全性、不感染脊椎动物细胞、对外源基因克隆容量大等优点.

本研究选用由 invitrogen 公司开发的 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统,它是大肠杆菌 DH10Bac 为载体,在辅助质粒编码的转座酶作用下发生位点特异性转座,通过三种抗性和蓝白斑技术筛选出白色的阳性克隆子,提取重组杆粒转染 Sf9 细胞,获得重组杆状病毒的。其特点是基因体外重组,阳性重组率高,试验进程较短,重组病毒体不需蚀斑纯化即可获得,与前几代的杆状病毒表达系统相比较,操作更方便、转座效率更高^[11]。

VLPs 是含有某种病毒的一个或者多个结构蛋白的空心颗粒,因缺乏病毒基因组而不能自主复制,不具有感染能力^[12]。使用杆状病毒表达系统表达 VP1 蛋白可以免去变性的步骤,得到构象完整的 VP1 衣壳蛋白,能够自我组装成形态结构与天然病毒粒子相同或相似的 VLPs,因而具有与天然病毒粒子相同或相似的抗原性及免疫原性,能有效地结合构象型抗体,是用于血清抗体检测的理想抗原^[13]。VLPs 之前曾被用来建立可以检测人类乳头状瘤病毒抗体的酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[14,15],由于多瘤病毒与乳头状瘤病毒有许多共同的生物学特征,因而也可以使用同样的技术用 SV40 VLPs 建立检测 SV40 病毒特异性抗体的 ELISA 方法。

本研究实现了 SV40 VP1 蛋白在真核系统中的表达,且无需其他衣壳蛋白的参与,真正组装成了 SV40 VLPs,并成功获得了具有良好抗原性的高纯度 VLPs,具有一定的创新性。为进一步建立检测 SV40 感染的血清学方法以及研制有效的基因工程疫苗等奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] Fagrouch Z, Karremans K, Deuzing I, *et al.* Molecular Analysis of a Novel Simian Virus 40 (SV40) Type in Rhesus Macaques and Evidence for Double Infections with the Classical SV40 Type[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2011, 49(4):1280.
- [2] 曹增,孙强明,孙娟,等. SV40 灭活疫苗的制备及其对小鼠免疫的研究[J]. *中国病毒学*, 2005, 20(2):159.
- [3] 赵晨雨,韩丹. SV40 与间皮瘤[J]. *昆明医学院学报*, 2012, (1B):174.
- [4] 严冬梅,张勇,赵溯,等. 一株高度变异的中国 SV40 分离株的全基因组序列分析[J]. *病毒学报*, 2006, 22(1):11.
- [5] 刘馨,孙茂盛,侯宗柳. SV40(Simain Virus40)的分子生物学研究进展[J]. *国外医学病毒学分册*, 2002, 9(3):65.
- [6] Kitai Y, Fukuda H, Enomoto T, *et al.* Cell selective targeting of a simian virus 40 virus-like particle conjugated to epidermal growth factor [J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155:251
- [7] Paavonen J, Jenkins D, Bosch F X, *et al.* Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2007, 369:2161.
- [8] Cox M M. Recombinant protein vaccines produced in insect cells[J]. *Vaccine*, 2012, 30:1759.
- [9] Vicente T, Roldão A, Peixoto C, *et al.* Large-scale production and purification of VLP-based vaccines [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, 107:S42.
- [10] Enomoto T, Kukimoto I, Kawano M, *et al.* In vitro reconstitution of SV40 particles that are composed of VP1/2/3 capsid proteins and nucleosomal DNA and direct efficient gene transfer[J]. *Virology*, 2011, 420:1.
- [11] 刘怀然,刘家森,胡迎东,等. 兔出血症病毒 VP60 基因在昆虫细胞中形成病毒样颗粒及其特性[J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17:448.
- [12] Liu F X, Wu X D, Li L, *et al.* Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges[C]. *Protein Expression and Purification*, 2013, 90:104.
- [13] 王亚君,华育平. 病毒样颗粒疫苗的研究进展[M]. *黑龙江畜牧兽医*, 2008(8):25.
- [14] Kirnbauer R, Hubbert N L, Wheeler C M, *et al.* A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16 [J]. *Natl Cancer Inst*, 1994, 86:494.
- [15] Viscidi R P, Kotloff K L, Clayman B, *et al.* Prevalence of antibodies to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in relation to cervical HPV infection among college women[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1997, 4:122.