

HIV-1 膜蛋白在甲醇型酵母中的表达和抗原性的研究

Studies on Antigenicity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) External Glycoprotein as well as Its Expression in *Pichia pastoris*

赵丽辉^{1*}, 于湘晖², 姜春来², 吴永革², 沈家骢², 孔 维²

ZHAO Li-Hui^{1*}, YU Xiang-Hui², JIANG Chun-Lai², WU Yong-Ge², SHEN Jia-Cong² and KONG Wei²

1 长春理工大学生命科学技术学院, 长春 130022

2 吉林大学生命科学学院, 长春 130012

1 College of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China

2 College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China

摘 要 通过计算机辅助分析了中国广西 B/C 重组亚型 HIV-1 病毒株的 Env 蛋白(共 851 氨基酸残基)氨基酸的疏水性、潜在的抗原表位,与其它亚型的 Env 蛋白在氨基酸组成的保守性方面进行了比较,选择了 *env* 基因的 469-511aa, 538-674aa 和 700-734aa 三段保守性及抗原性都较强的氨基酸序列构建成嵌合基因,将嵌合基因构建到毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达载体 pPICZαB 中,利用甲醇诱导表达,对表达的蛋白进行了 Western blot 和 SDS-PAGE 分析,结果表明,三段基因能在毕赤酵母 *Pichia pastoris* 中表达,产物为 40kD 的特异性诱导糖蛋白,通过 Ni-sepharose 4B 金属 Ni 螯合层析柱分离纯化表达蛋白,酶联免疫检测结果表明,纯化的抗原有很强的抗原特异性,可以用于 HIV 检测试剂的研制和开发。

关键词 毕赤酵母, *env* 基因, 嵌合基因, 抗原特异性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0457-05

Abstract Based on the computer simulation, we analyzed hydrophobicity, potential epitope of recombined subtypes HIV-1 Env protein (851 amino acids) from Guangxi in China. Compared with conservative peptides of other subtypes in env protein, three sequences (469-511aa, 538-674aa, 700-734aa) were selected to recombine into a chimeric gene that codes three conservative epitope peptides with stronger antigenicity, and was constructed in the yeast expression plasmid pPICZB. Chimeric proteins were expressed in *Pichia pastoris* under the induction of methanol, and were analyzed by SDS-PAGE and Western blot. The results showed that fusion proteins of three-segment antigen were expressed in *Pichia pastoris* and that specific protein band at the site of 40kD was target protein, which is interacted with HIV-1 serum. The target proteins were purified by metal Ni-sepharose 4B, and were demonstrated to possess good antigenic specificity from the data of ELISA. This chimeric antigen may be used as research and developed into HIV diagnostic reagents.

Key words *Pichia pastoris*, *env* gene, chimeric gene, antigenic specificity

多数研究表明,在 HIV-1 感染早期,血浆 HIV-1 RNA 的表达量达到最高值后开始下降时抗体才能测出,临床上称为抗体转阳期(Seroconversion),抗 HIV-1 表面抗原 gp120 核心抗原 p24 抗体均不能被

Received: October 23, 2006; Accepted: February 2, 2007.

This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No.3017025).

* Corresponding author. Tel: 86-431-85695346; E-mail: zhaolihui2000@yahoo.com.cn

国家自然科学基金(No. 3017025)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

检出,临床上称之为空窗期,一般在急性临床症状产生后 2~6 周,中和抗体在急性症状出现后 3 个月以上才能被检测出来,称之为中和抗体产生的滞后现象,这一机理尚不清楚^[1-3]。有报道在急性感染病人中能检测到抗 gp120 抗体,提示中和抗体的延迟也许是目前所用检测方法不够灵敏所致。但也有些证据表明中和抗体的产生可能与 HIV-1 膜蛋白 gp120 的糖基的某一区域有关,尤其是 V2 区。若 V2 区的某一位点发生缺失,则在原发期就很快出现中和抗体。Graziosi 等认为 gp120 的糖基可能通过构型改变或占据有关抗原位点而掩盖了抗原的中和位点。gp120 的主要位点 V2、V3、C4 是中和抗体产生的主要位点,能和 CD4 结合, gp41 的 662~667 位点氨基酸顺序 ELDKWAS 也被认为是中和抗体产生的主要位点^[4],为此 Env 蛋白成为免疫学诊断的首选抗原。目前市场上已有四代 HIV 检测产品的问世,第四代 HIV 检测产品对不同 HIV-1 亚型(包括 O 亚型)毒株感染的细胞培养上清检出率达到 100%(15/15),对 255 份存在交叉反应可能的血清样品,产品出现 4~6 份假阳性,远低于其它代检测产品^[5]。为了提高 HIV 检测产品的准确性、广泛性,减少假阳性率的出现,我们用计算机辅助分析 Env 蛋白氨基酸的疏水性、潜在的抗原表位,并与其它亚型的 Env 蛋白氨基酸的保守性做了比较,选择了包括 C4(469-511aa)、C5(538-674aa)、C6(700-734aa)三段含有抗原较多的基因片段,将三段基因构建到酵母表达载体中。HIV-1 的外膜蛋白是糖基化蛋白,糖基化修饰对它的抗原性来说是十分重要的,为此我们用甲醇营养型酵母表达系统胞外表达嵌合蛋白^[6],检测抗原的抗原性,与在大肠杆菌表达系统表达的嵌合蛋白进行了比较,结果发现,糖基化蛋白的免疫原性比非糖基化蛋白好,检测率高,可以作为检测 HIV-1 不同亚型的检测试剂。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

巴斯德毕赤酵母菌 GS115 和质粒 pPICZαB 购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌 DH5α 由本室保存。PGEM-Teasy 载体、限制性内切酶、T4 连接酶、Taq DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司,酵母菌培养常用试剂及培养基见 Invitrogen 公司操作指南。

1.2 方法

1.2.1 目的基因片段的扩增 选择外膜蛋白 Env 中的三段抗原表位,其中前两段(469-511aa,538-674aa)位于 gp120 上的 C4 区,包含 gp120 和 gp41 的

交界区,此处是一个诱发机体产生抗体的重要区域,后一段(700-734aa)位于 gp41 上,在促进 HIV 和 CD4+T-细胞膜的融合起重要作用。三段基因经 PCR 引入的酶切位点后分别连接到 T-easy 载体中。T-easy 载体的 PCR 引物序列如下:第一段上游引物 5'-GAATTCGGAGCTCTATGGATATGAGGGACAATTGGAG-3'(引入 Sac I 酶切位点);下游引物 5'-GGATCCCCGTGGCCTGGGA-3'(引入 BamH I 酶切位点);第二段上游引物 5'-GGATCCCAGCTCCTGAGCGGC-3'(引入 BamH I 酶切位点),下游引物 5'-AAGCTTCAGCAGTTAGTGATGTCA-3'(引入 Hind III 酶切位点);第三段上游引物 5'-AAGCTTGTGAACAGAGTGCGGC-3'(引入 Hind III 酶切位点),下游引物 5'-CTCGAGCGGTACCCTCTCCACCTTCTTCTTATT-3'(引入 Kpn I 酶切位点)。反应条件:94℃,5min,94℃,1min,50℃,1min,72℃,3min,共 30 个循环,72℃终延伸 10min^[7]。

1.2.2 重组质粒的构建 pGEM-Teasy-chimeric 和 pPICZαB 同时用 EcoR I / Not I 双酶切,将嵌合基因连入 PICZαB 中,按 invitrogen 公司操作指南将酵母菌 GS115 制备成感受态,分别取出 80μL 与 5~10μg 经 Sac I 线性化的重组表达质粒 pPICZαB-chimeric 混合转入 0.2cm 电转杯,冰浴 5min,与 Bio-Rad gene pulser 电转仪 1500V,25μF,200Ω 条件下电转化后,立即加入 1mL 冰浴山梨醇,将菌液涂布于 YPD 选择固体培养基上,28~30℃ 孵育 2~3d,观察转化子的生长。

1.2.3 酵母基因组 DNA 的制备及阳性克隆的 PCR 检测 将转化菌落分别对应地点在 MD 和 MM 选择平板上,筛选在 MD 和 MM 培养基上生长良好的菌株。接种单菌落于 5mL YPD 液体培养基中,28~30℃ 培养 16~20h 后离心,收集菌体,用 200μL 裂解液悬浮菌体,加 200μL 0.5mm 玻璃珠和 200μL 饱和酚,震荡离心取上清,无水乙醇沉淀,RNA 酶消化、酚、氯仿抽提,最后用 40μL TE 溶解。以提取的酵母基因组 DNA 作为模板,用酵母载体上 AOX1 基因的通用引物进行 PCR 反应扩增,条件同上。两个引物分别为:

5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGCG-3'

3'-GCAAAATGGCATTCTGACATCC-5'

1.2.4 重组酵母的诱导表达与鉴定 接种单菌落于 5mL YPD 液体培养基中,28~30℃ 培养 16~20h,离心收集菌体并重悬于 100mL BMGY 培养基中,28~30℃ 培养至 OD = 2.0~6.0,离心收集菌体,用 50mL 3MMY 培养基重悬,使菌液的 OD = 1.0,25℃ 培养

5d, 每日补加甲醇于培养基中至终浓度为 1%, 离心收集上清液。取诱导表达的上清液 SDS-PAGE 进行分析, Western blot 鉴定表达产物, 一抗为 HIV 阳性血清, 以碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgG 抗体为二抗, 用 NBT/BCIP 显色。

1.2.5 产物的纯化与鉴定 将高表达重组将高表达重组菌的诱导表达培养液(BMMY)离心, 取上清液, 用 His 柱纯化蛋白, SDS-PAGE 分析蛋白的表达, Western blot 检测, 一抗为 HIV 阳性血清, 性磷酸酶标记的二抗为羊抗人 酚-硫酸法检测糖蛋白的含糖量^[8]。

1.2.6 ELISA 检测产物的抗原性 用包被液(50mol/L 碳酸盐缓冲液 pH9.6)将纯化的抗原稀释到终浓度为 1 μ g/mL, 包被 ELISA 板, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h, 每孔加入 200 μ L 封闭液(1% 脱脂奶粉-PBS) 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h。将人的血清样品用封闭液按 1:1000 稀释, 每孔加入 100 μ L, 室温下放置 2h; 将兔抗人的酶联二抗用封闭液按 1:5000 稀释抗后, 每孔加入 100 μ L, 室温下放置 30min。临用前取 100mmol/L PB(pH6.0)溶液 10mL, TMB 储存液 100 μ L, 30% H₂O₂ 15 μ L 混匀, 每孔加 100 μ L, 显色 10min, 在波长 450nm 检测吸光度。

2 结果

2.1 重组质粒 pPICZ α B-chimeric 的构建

我们将 HIV-1 外膜基因 *Env* 中的 469-511aa, 538-674 aa 和 700-734 aa 三处包含较多抗原位点的区域依次连入 T-easy-chimeric 中, 以 T-easy-chimeric 质粒为模板, 经 PCR 引入的酶切位点, 扩增出 680bp 左右的目的片段。PCR 产物经胶回收, 与 PGEM-T 载体相连, 用 *Eco*R I、*Not* I 双酶切, 将酶切产物胶回收。表达载体 pPICZ α B 用 *Not* I 和 *Eco*R I 双酶切, 胶回收酶切后的载体将 680bp 的基因片段与 pPICZ α B 表达载体连接, 转化大肠杆菌中, 筛选阳性克隆。酶切鉴定图谱见(图 1), 从图可以看出, pPICZ α B-chimeric 经 *Eco*R I/*Not* I 双酶切后, 分别得到 680bp 和 3600bp 两个片段, 证明重组质粒构建正确。pPICZ α B-chimeric 的 PCR 结果和 DNA 序列分析也证实重组质粒构建正确。

2.2 His⁺ Mut⁺ 表型筛选与阳性克隆鉴定

毕赤酵母表达系统在本实验室是新建立的系统, 我们采用了电穿孔法转化酵母细胞, 电穿孔转化法使用的参数是: 电压 1500V, 电容 25 μ F, 电阻 200 Ω , 采用 0.2cm 电极杯, 内盛转化细胞的容积以 100 μ L 为最佳。pPICZ α B 表达质粒为整合型质粒, 和酵母基因组重组使目的基因插入酵母基因组中才能

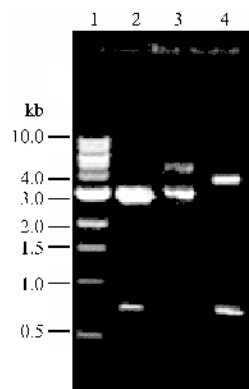


图 1 重组嵌和基因的鉴定图谱

Fig.1 Identification of chimeric gene by garose gel electrophoresis
1:1kb DNA Ladder; 2:Teasy-chimeric cut by *Eco*R I and *Not* I (3010bp, 680bp); 3:pPICZ α B-chimeric vector(3600+680); 4:pPICZ α B-chimeric cut by *Eco*R I and *Not* I(3600bp 680bp)

稳定表达目的蛋白。我们利用位于 *AOX1* 启动子上的 *Sac* I 酶切位点将 pPICZ α B-chimeric, pPICZ α B 分别用 *Sac* I 酶切线性化, 电转化 GS115, 有利于该质粒中的目的基因插入酵母基因组相应位点中。转化酵母在含有 Zeocin 选择固体培养基上 28~30 $^{\circ}$ C 孵育 2~3d 至大小适中的单菌落后, 经 HMD, HMM 固体培养基进行表型筛选, 由此得到的转化子在以甲醇为碳源的培养基中菌的生长速度快(Mut⁺型)。分别选取 10 个 Mut⁺ 表型转化子, 用酵母菌染色体上通用引物, 扩增酵母转化子基因组, PCR 鉴定阳性重组子。鉴定结果表明, 并非所有的 Mut⁺ 表型转化子都是阳性重组子, 在选取的 Mut⁺ 表型转化子中, 阳性重组率为 90%。在阳性重组子中, 嵌合基因通过双交换整合到毕赤酵母基因组中, 结果 *AOX1* 基因被嵌合基因所取代, 整合到毕赤酵母基因组中。提取酵母菌基因组, PCR 扩增的产物是 680bp 和侧翼 590bp 之和, 2200bp 是酵母菌基因组上的 *AOX1* 基因, 表明该表达质粒已插入毕赤酵母染色体上。作为阴性对照的空载质粒整合到赤酵母染色体上后, 因不存在外源基因部分, PCR 产物只是通用引物之间的片段, 即 590bp(图 2)。

2.3 重组菌的诱导表达与鉴定

选取 PCR 鉴定的阳性克隆进行甲醇诱导表达, 并以整合空载的 pPICZ α B 的 GS115 为阴性对照。挑取单菌落接种于 25mL MGYH 中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 24h, OD₆₀₀ 至 2.0~6.0, 将菌液转移到 50mL 无菌的聚丙烯酰胺管中, 1500~3000g 室温离心 5min, 弃上清, 沉淀用 BMMH 重悬, 使细胞 OD₆₀₀ 约为 1.0, 将培养物放于 500mL 锥形瓶中, 加 100% 甲醇至终浓度 1%, 每 24h 补加 1 次, 维持诱导 72h, 取样 1mL, 取上清液

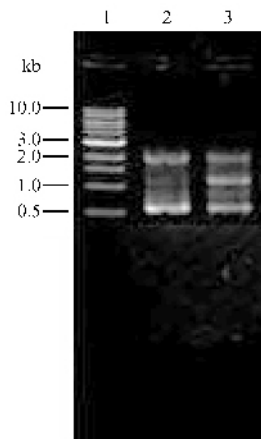


图2 酵母转化子的 PCR 分析

Fig.2 PCR analysis of *Pichia pastoris* clones

- 1 :1kb DNA ladder 2 :clone only carrying *AOX1* gene(2200bp + 590bp);
3 :clone carrying aim gene(2200bp + 1210bp).

按常规进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析。SDS-PAGE 分析表明,重组菌在约 40kD 处出现一条特异的蛋白质带(图 3a),一抗为 HIV-1 血清,碱性磷酸酶标记的羊抗人抗体为二抗的 Western 印迹的分析结果显示,该处出现一条明显的显色带,因此判定约 40kD 的特异蛋白为嵌合基因表达的蛋白(图 3b),由于表达的蛋白一部分降解,一部分易形成聚合体,所以我们看到多条带,通过对图 3a 的 SDS-PAGE 分析,表达的目的蛋白所占全部蛋白的 12% ~ 18%。尽管我们已经在大肠杆菌中表达出 HIV-1 的嵌合重组蛋白,但由于表达系统产生的重组蛋白不能糖基化,是以包涵体的形式存在,在蛋白复性过程中可能

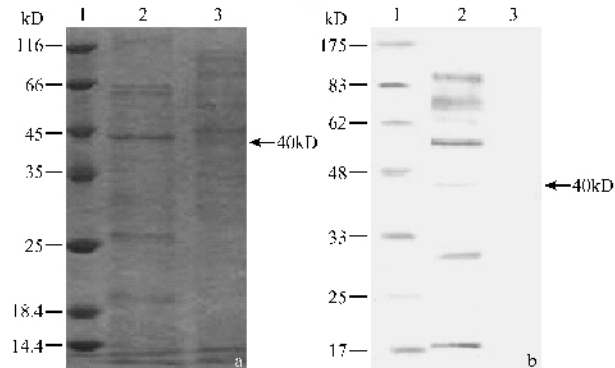


图3 重组表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig.3 SDS-PAGE and Western blot analysis of expressed products of recombinant yeast

- a. 1 :protein molecular weight marker 2 : induced supernatant of GS115/
Ppicz αB - chimeric strain(72h); 3 : induced supernatant of GS115/
Ppicz αB strain(72h ,control).
b. 1 : protein molecular weight marker 2 :induced supernatant of GS115/
Ppicz αB - chimeric strain(72h); 3 :induced supernatant of GS115/
Ppicz αB strain(72h ,control).

破坏二硫键,不能满足我们试验的需要。毕赤酵母是新近发展起来的真核表达系统,该系统具有与哺乳动物细胞相似的二硫键和翻译后的加工能力,推测从毕赤酵母中产生的重组蛋白在构象上接近天然蛋白,表达的蛋白经内质网及高尔基体加工后在糖基化方面应更接近天然蛋白。通过酚-硫酸法对目的蛋白进行糖含量的检测,结果证实表达产物确为糖蛋白,糖含量约为 32%。

2.4 表达蛋白的纯化

收集重组菌的上清溶液,通过 Ni-sepharose 4B 金属 Ni 螯合层析柱分离纯化目的产物,表达的融合蛋白 N-端为 6 个连续的组氨酸 (His),利用多聚组氨酸与过渡态金属 (Ni^+ 、 Zn^{++} 、 Cu^{++} 等)的高亲和力结合,可使用金属离子配体亲和层析进行快速纯化,纯化后蛋白的 SDS-PEGA 结果发现一条蛋白质带(图 4a),相应的用 HIV-1 阳性病人血清为第一抗体,碱性磷酸酶标记的羊抗人抗体为二抗进行 Western blot 鉴定其免疫原性,分析的结果也证实纯化的蛋白为目的蛋白(图 4)。

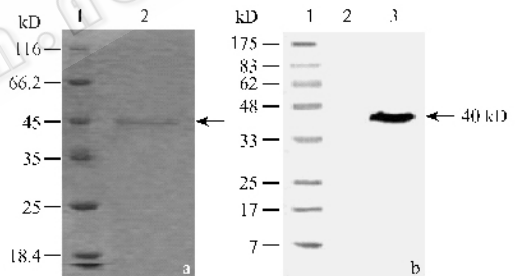


图4 纯化产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig.4 SDS PAGE analysis and Western blot analysis of purified products

- 1 :protein marker 2 :purified gp40 (left),induced supernatant of GS115/
pPICZ αB (right) 3 : purified gp40.

2.5 血清抗 HIV-1 抗体的检测

纯化的重组蛋白抗原包被免疫平皿(每孔 100ng),用 ELISA 间接法检测由中国药品监督管理局所提供的 20 份 HIV 阳性血清和 20 份 HIV 阴性血清(这 40 份样品是在全国范围内易感染高危人群中采集,经筛选最后确定为阴性和阳性的血清样品)。40 份血清样品几乎涵盖了当前我国所有 HIV-1 亚型,所以检测结果具有普遍性和特异性。ELISA 检测结果表明,以 0.8 为 cut-off 值,大于或等于此值判为阳性,低于此值判为阴性。对 20 份阳性血清进行检测的 OD 值均在 cut-off 值以上,特异性和准确性均达到 100%。对 20 份阴性血清进行检测的 OD 值在 cut-off 值以下,为阴性,特异性和准确性也达到 100%。说明我们所得到的抗原在检测阳性样品和

阴性样品的结果比较好、抗原覆盖率较高(图5)。

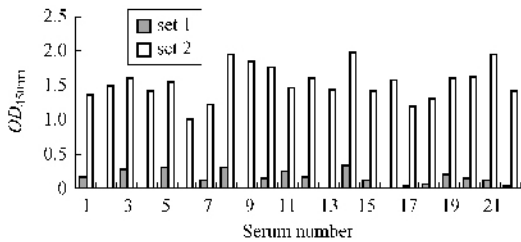


图5 纯化重组蛋白的抗原性检测

Fig.5 Evaluation of national anti-HIV panel with purified recombinant protein

Abscissa shows number of serums, ordinate show OD value(450nm), set 1 means the results negative serum (1, 2: negative control; 3~23: the negative serum); set 2 means the results of the positive serum (1, 2: positive control; 3~23: the positive serum).

3 讨论

毕赤酵母表达系统是近年来发展迅速、应用广泛的一种真核表达系统,尤其适用于糖蛋白的表达和制备,其自身分泌的蛋白少,便于产物的分离和纯化。由于 HIV 表面糖蛋白 Env 是很难表达的^[9],我们选择了 HIV-1 的外膜蛋白的 C4(469-511aa), C5(538-674aa), C6(700-734aa)三段基因构建到酵母菌表达载体中表达目的蛋白。结果发现三段嵌合基因在酵母菌中表达量较高,纯化的蛋白通过 ELISA 实验检测抗原,具有良好免疫原性。其中 C4 位于 V4 与 V5 之间的区域,是结合 CD4 分子的主要区域,也是外膜蛋白重要的中和部位,其诱导的抗体与大多数毒株具有交叉中和作用。538-576aa 区是 gp120 蛋白 C 末端区,此处氨基酸序列相对保守,577-600aa 属于 gp41N-端区域,在 gp120 和 gp41 的交界区含有的 46 个氨基酸残基不仅含有大量的 β 转角,而且亲水性相当好,加之保守程度高,因而被认为是高免疫原性区^[10],针对该区域的抗体代表了免疫印迹所能检测的几乎所有 gp120 的抗体,而且与感染者的临床症状无关^[11,12],根据该区段设计合成的多肽能检测出高达 90% 的 HIV-1 阳性血清^[13]。鉴于 gp41 的序列保守性比 gp120 强,含有多个 B 细胞抗原表位,针对 gp41 的基因序列可以具有更广泛的特异性,在 HIV 检测中也作为一项指标。Wain 等^[14]认为处于 gp41 上的 582-620 氨基酸残基的抗原性最强,这样在检测时灵敏度、特异性和抗原性都很强。为此,我们选择的三段免疫原性较强的区域,希望能得到检测灵敏度高、特异性好、检测结果准确的优势抗原,实验也证实了在毕赤酵母菌中表达目的蛋白,是糖基化的外膜蛋白,它的免疫原性比在原核表达系统中

表达的没有糖基化的蛋白的免疫原性强,检测率高,可以利用这种抗原开发新的检测试剂。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*, 1994, **68**: 4650 - 4655.
- [2] Moore JP, Cao Y, Ho DD, et al. Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 1994, **68**: 5142 - 5155.
- [3] Connick E, Marr DG, Zhang XQ, et al. HIV-specific cellular and humoral immune responses in primary HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1996, **12**: 1129 - 1140.
- [4] Zeng QR(曾庆平), Yang RY(杨瑞仪), Feng LI(冯丽玲), et al. Cloning, sequencing and *in vitro* expression of human RANTES gene. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, **17**(3): 349 - 351.
- [5] Weber B, Mbargane Fall EH, Berger A, et al. Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**: 2235 - 2239.
- [6] Zhang Y(张应玖), Jin NY(金宁一), Wang HW(王宏伟), et al. Expression of HIV-2 gp105 gene and characterization of gp105 in methylotrophic *Pichia pastoris*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报) 2001, **33**(4): 405 - 408.
- [7] Jiang J(蒋静), Zhao LH(赵丽辉), Yu XH(于湘晖), et al. Purification and analysis of antigenicity of chimeric antigen of HIV-1. *Chemical Journal of Chinese Universities* (高等学校化学学报), 2005, **12**(26): 12259 - 12263.
- [8] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 1956, **28**(3): 350 - 356.
- [9] Wang WX(汪文正), Jin NY(金宁一), Wang HW(王宏伟), et al. Fusion expression of structural protein gene gag and gp120 of HIV-1CN in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology* (细胞与分子免疫学杂志), 2002, **18**(5): 426 - 428.
- [10] Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell*, 1986, **145**: 637 - 648.
- [11] Palker TJ, Matthews TJ, Clark ME, et al. A conserved region at the COOH terminus of human immunodeficiency virus gp120 envelope protein contains an immunodominant epitope. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(8): 2479 - 2483.
- [12] Mohabatkar H, Ka SK. Prediction of exposed domains of envelope glycoprotein in Indian HIV-1 isolates and experimental confirmation of their immunogenicity in humans. *Braz J Med Biol*, 2004, **37**: 675 - 681.
- [13] Krowka JF, Singh B, Stites DP, et al. Epitopes of HIV-1 envelope glycoproteins recognized by antibodies in sera of HIV-1 infected individuals. *Clin Immunol Immunopathol*, 1991, pp.53 - 59.
- [14] Wain-Hobson S, Sonigo I, Danos O, et al. Constitutive expression and production in T-cell line infected with HIV-1. *Cell*, 1985, **40**: 9 - 17.