

## 人乳头瘤病毒 16 型假病毒中和实验的建立和初步应用

# Establishment and Application of Human Papillomavirus Type 16 Pseudovirions Neutralization Assay

卢五迅 程 通 李少伟 潘晖榕 沈文通 陈毅歆 张 涛 郑 舟 张 军\* 夏宁邵\*

LU Wu-Xun, CHENG Tong, LI Shao-Wei, PAN Hui-Rong, SHEN Wen-Tong, CHEN Yi-Xin, ZHANG Tao, ZHENG Zhou, ZHANG Jun\* and XIA Ning-Shao\*

国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 厦门大学生命科学院 厦门 361005

National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**摘 要** 探讨了应用多质粒磷酸钙共转染方法在 293FT 细胞中生产 HPV16(human papillomavirus type 16)假病毒。蛋白印迹检测显示在转染后细胞的裂解上清中具有很好的 L1 蛋白活性,通过透射电镜可观察到形态与天然病毒粒子相似的假病毒颗粒。对 293FT 细胞的感染实验显示,该假病毒可有效将 EGFP 报告质粒导入靶细胞中进行表达,经测定其滴度约为  $2 \times 10^7$  TU/mL。通过与 4 株 HPV16 对照单抗的中和实验证明该假病毒可有效应用于中和实验。应用该方法从 18 株抗 HPV16 L1 的单克隆抗体中鉴定获得了 2 株中和单抗 3D10、PD1。所建立的 HPV16 假病毒生产和中和实验方法具有快速高效、低成本和易于检测的优点,适于进行较大规模应用,为快速准确鉴定 HPV16 中和单抗和候选疫苗的免疫保护效果提供了有效手段。

**关键词** 人乳头瘤病毒,假病毒,中和单抗

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)06-0990-06

**Abstract** Human papillomaviruses (HPV) are causally associated with cervical cancer and genital warts. Lack of permissive and productive cell cultures for HPV has hindered the study of HPV and evaluation of virus-neutralizing antibodies. So generation of infectious virions *in vitro* is highly desirable. In this report, we got high titer infectious HPV16 pseudovirions by calcium phosphate co-transfection of codon optimized HPV16 capsid genes L1 and L2 and reporter plasmids into 293FT cell line. Electron micrograph indicated that the pseudovirions were morphologically similar with the intact HPV16 virions. To evaluate the feasibility of using the pseudovirions to identify neutralizing monoclonal antibodies (mAbs), pseudovirions were incubated with 2-fold gradient dilution of the well identified mAbs V5, E70, U4 and D9 and then used to infect 293FT cells preplated in 96-well tissue culture plate. The infection of pseudovirions could be inhibited by neutralizing mAbs V5, E70 and U4 that recognize surface conformational epitopes on L1 VLP, but not by mAb D9 that is reactive to a linear epitope buried in VLP, which indicated that the pseudovirions could be used to evaluate the neutralization efficiency of mono- and polyclonal antibodies. The pseudovirions were then employed to identify neutralizing mAbs from 18 mAbs generated previously in our lab, 8 of which were conformational and 10 were linear. PD1 and 3D10, both of which recognized conformational epitopes on L1 VLP, had obviously strong neutralizing efficiency, with the neutralizing titer reached 81 920 and 20 480 respectively, while none of the linear mAbs were

Received: April 29, 2006; Accepted: June 6, 2006.

This work was supported by the grants from the Science and Technology Projects of Fujian Province (No. 2004YZ01-1&2003Y041) and the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET), China.

\* Corresponding author. Tel: 86-592-2184113; Fax: 86-592-2181258; E-mail: zhangj@xmu.edu.cn

福建省科技重点项目 (No. 2003Y041), 福建省科技重大专项 (No. 2004YZ01-1) 教育部跨世纪优秀人才培养计划。

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

neutralizing, which reflected that rare linear mAbs have neutralization activity. The mechanism of PD1 and 3D10 block the infection of HPV16 pseudovirions need to be further studied. The technologies about generation of HPV16 pseudovirions and screening neutralizing mAb in our report are economical and efficient, can be easily used in large scale. They pave the way for rapid and precise evaluation of the protection efficiency of our prophylactic HPV vaccine being developed now.

**Key words** human papillomavirus, pseudovirion, neutralizing monoclonal antibody

人乳头瘤病毒(HPV)为无包膜的环状双链 DNA 病毒,基因组大小约 8kb,包裹于由主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2 组成的病毒衣壳内。超过 50% 的宫颈癌与 HPV16 感染相关<sup>[1]</sup>, HPV 16 疫苗的研制是宫颈癌预防的最根本措施。目前对 HPV 疫苗免疫抗体的保护效果的评估方法主要有免疫缺陷小鼠组织移植<sup>[2]</sup>、体外感染原代上皮组织<sup>[3]</sup>以及类病毒颗粒(VLP)血凝抑制实验<sup>[4]</sup>等,但这些方法均存在操作复杂、效率低、实验周期长或不能直接反映抗体的中和保护作用等问题。研究显示利用 HPV VLP 可非特异性包裹质粒核酸的特点构建 HPV 假病毒是体外模拟 HPV 感染过程的有效方法<sup>[5,6]</sup>。最近 Buck 等<sup>[7]</sup>提出了将密码子优化的 HPV 结构蛋白表达质粒和报告质粒共转染 293TT 细胞可高效获得包装报告质粒的 HPV 假病毒,该方法相比其它应用重组病毒表达载体<sup>[5,8]</sup>和化学偶联<sup>[6,9]</sup>等生产假病毒的方法具有简便、效率高的优点,有很好的应用潜力。然而,该方法用脂质体进行质粒转染,在大量用于疫苗质控时成本高昂。为解决这一问题,本研究采用效率和经济更优的磷酸钙转染方法,并以 293FT 细胞为假病毒生产平台,获得了高滴度的 HPV16 假病毒,可有效应用于抗体的中和实验。该方法具有效率高、成本低和操作简便的优点,适合于进行较大规模的生产和应用,为 HPV16 预防疫苗的研究开发提供了有利的条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、细胞及单克隆抗体

质粒 p16L1h 和 p16L2h 由 Schiller 教授惠赠,分别含有经密码子优化后的 HPV16 L1 和 L2 表达元件<sup>[7]</sup>。报告质粒 pN31-EGFP 为本实验室构建<sup>[10]</sup>。以上三种质粒均按照文献[11]方法进行 CsCl 密度梯度超速离心纯化。细胞株 293FT 购自 Invitrogen 公司,培养于含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基中。HPV16 单克隆抗体 V5、U4、E70 和 D9 由 Christensen 博士惠赠<sup>[12]</sup>。蛋白分子量 marker 购自 PIERCE 公司,OptiPrep 购自 Sigma 公司。

### 1.2 磷酸钙共转染构建 HPV16 假病毒

将 293FT 细胞预先铺于 10cm 细胞培养皿( $7 \times 10^6$ /dish),5h 后将质粒 p16L1h、p16L2h 和 pN31-EGFP 用磷酸钙方法进行共转染,用量均为  $40\mu\text{g}$ 。磷酸钙转染方法:提前 5h 将 293FT 细胞预铺至 24 孔细胞培养板( $1.5 \times 10^5$ /well)或 10cm 细胞培养皿( $7 \times 10^6$ /dish),将  $0.5\text{mol/L}$  的  $\text{CaCl}_2$  溶液与等体积的  $\text{ddH}_2\text{O}$  混合,加入适量质粒,再缓慢加入 2 倍体积的  $2 \times \text{HeBS}$  ( $\text{pH} = 6.97$ )溶液中并吹泡混合均匀,静置 5min 后将混合液加至预铺的 293FT 细胞孔中,12h 后更换为完全培养基。同时对同样数量的细胞转染  $40\mu\text{g}$  的 pN31-EGFP 作为对照。48h 后进行观察并收集和裂解细胞,将收集的细胞裂解上清置  $-80^\circ\text{C}$  保存。

### 1.3 脂质体 Lipofectamine2000 转染哺乳动物细胞

提前 5h 将 293FT 细胞预铺至 24 孔细胞培养板( $1.5 \times 10^5$ /well)。取  $1\mu\text{g}$  pN31-EGFP 转染到预铺的细胞中,脂质体 Lipofectamine2000 转染方法见 Invitrogen 公司操作手册。12h 后更换为完全培养基 48h 后进行观察和检测。

### 1.4 HPV16L1 的蛋白印迹实验(Western blotting)

取少量细胞裂解上清样品进行 10% SDS-PAGE 电泳后转移到硝酸纤维素膜,按文献[11]方法进行蛋白印迹实验。使用的一抗为 HPV16 L1 单克隆抗体 D9,二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG。

### 1.5 Dot blotting 鉴定单抗识别表位的构象依赖性

将原核表达的 HPV16L1 VLP 样品(由北京万泰公司提供)和经煮沸变性解聚后的 VLP 样品( $0.3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ),分别进行 10 倍梯度稀释后点样到硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶封闭后与不同的单抗分别进行反应,显色方法参照蛋白印迹实验。与 VLP 反应性好而与 VLP 煮沸后的样品反应性差的单抗的识别表位应与特定的空间构象有关;与 VLP 煮沸后的样品好的单抗的识别表位应不受空间结构的影响,属于线性表位。

### 1.6 假病毒颗粒的纯化和透射电镜观察

在 NVT65 离心管(Beckman)中加 9mL 的 30% OptiPrep 和 4.0mL 收集的细胞裂解液,剩余的离心

管空隙用离心介质补充,16℃下 62 000r/min 离心 5h (NVT65 转头,Beckman 超速离心机)。取出,用针头穿刺离心管底部收集离心组分,每份约 250μL,以蛋白印迹实验方法检测各组分中的 L1 蛋白活性。取活性最高的组分上样到铜网,用 2% 的磷钨酸染色 15min,用 JEM2100 透射电镜(日本电子公司)观察颗粒。

1.7 感染滴度测定

收集获得的细胞裂解液用 10% DMEM 进行 10 倍梯度稀释( $10^{-2} \sim 10^{-6}$ ),分别取 100μL 稀释液感染铺于 24 孔细胞培养板中的 293FT 细胞( $1.5 \times 10^5$ /well),对照细胞裂解液也做同样的稀释感染。培养 48h 后用流式细胞仪(Beckman Coulter EPICS XL)检测孔中表达 EGFP 的细胞数量,测定假病毒的滴度(TU/mL)。

1.8 抗体滴度的测定

HPV16L1 VLP 以浓度 4μg/mL 包被 ELISA 板,每孔加样 100μL,4℃ 过夜后再 37℃ 包被 2h。吸弃液体,用封闭液 37℃ 封闭 2h,扣干后备用。将 100μL 经稀释后的待检样品加入上述预包被孔中,37℃ 孵育 45min,PBST 洗涤 5 次,扣干;分别加入 100μL 稀释好的羊抗鼠 IgG-HRP,37℃ 孵育 45min,PBST 洗涤 5 次,扣干;在各反应孔中依次加入 50μL 显色液 A、B,37℃ 显色 10min 后加入 50μL 终止液终止反应,在酶标仪上读  $OD_{450/620nm}$  值。抗体滴度的定义为:读值高于 Cut off 值以上的抗体最大稀释倍数。

1.9 绿色荧光的观察

表达绿色荧光蛋白的细胞置于 Nikon TE2000 倒置荧光显微镜下采用蓝光激发观察,用 Nikon DXM1200F CCD 采集荧光图像。

1.10 假病毒中和实验

将 293FT 细胞铺于 96 孔细胞培养板中( $1.5 \times 10^4$ /well)。5h 后进行中和实验,将不同样品分别用 10% DMEM 从 10 倍起进行连续倍比稀释,然后取 50μL 分别与 50μL 稀释于 10% DMEM 的假病毒液(moi = 0.1)混合。4℃ 孵育 1h 后分别加入预铺有 293FT 细胞的 96 孔细胞培养板中,37℃ 培养 48h 后用流式细胞仪分别检测各孔细胞的感染率。感染率为细胞样品在阳性区中的细胞数量百分率减去未感染的对照细胞样品在阳性区的数量百分率。感染抑制率 = (1 - 阻断孔的感染率/未阻断孔的感染率) × 100%。20 倍稀释后能达到 50% 以上感染抑制率的单抗为中和单抗<sup>[13]</sup>。

2 结果和分析

2.1 HPV16 假病毒的获得

对磷酸钙方法共转染 p16L1h 和 p16L2h 和 pN31-EGFP 后收获的 293FT 细胞裂解上清进行蛋白印迹实验。检测结果显示,细胞裂解上清中可检测到较强的 HPV16 L1 蛋白的表达活性,分子量约为 55kD 与预期相符(图 1)。应用 30% 的 OptiPrep 对细胞裂解液进行了超速离心,以蛋白印迹实验方法检测系列样品中的 L1 蛋白活性,结果显示活性主要集中于第 12 号组分。对该组分进行透射电镜观察,可观察到大量的 HPV16 假病毒颗粒(图 2),其直径约为 55nm,形态结构与文献报道的 HPV16 天然病毒颗粒结构基本一致<sup>[14]</sup>。

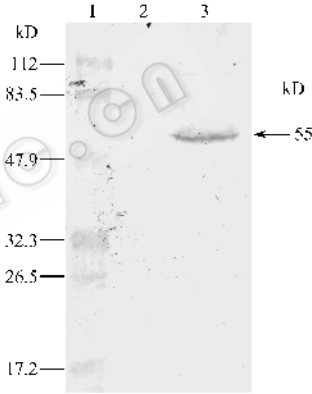


图 1 转染后 293FT 细胞裂解液中 HPV16 L1 蛋白的 Western blot 检测

Fig.1 Western blotting analysis of HPV16 L1 in lysates of 293FT cells

1: protein molecular weight marker; 2: transfected with pN31-EGFP; 3: cotransfected with p16L1h, p16L2h and pN31-EGFP.

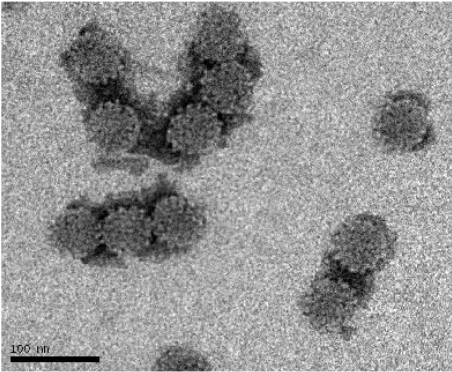


图 2 HPV16 假病毒颗粒的透射电镜观察

Fig.2 Electron micrograph of HPV16 pseudovirions

2.2 磷酸钙与脂质体方法对 293FT 细胞转染效率的对比

© 中国本实验室已对磷酸钙转染 293FT 细胞的方法进

行了优化改进 ,为比较改进后的磷酸钙方法与脂质体方法对 293FT 细胞的转染效率 ,我们分别通过磷酸钙和脂质体将 1.0μg 的报告质粒 pN31-EGFP 转入铺于 24 孔板中的 293FT 细胞( 1.5 × 10<sup>5</sup> /well ) ,转染后 48h 后用流式细胞仪检测报告基因转移效率和阳性细胞平均荧光强度。结果如表 1 所示 ,应用改进的磷酸钙方法对 293FT 细胞可以达到很好的转染效果( u = 13.25 ,P < 0.01 ) ,且其使用成本远低于脂质体方法 ,因此本研究将采用磷酸钙多质粒共转染方法生产假病毒。

表 1 磷酸钙与脂质体方法对 293FT 细胞转染效率的对比  
Table 1 Comparison of transfection efficiencies in 293FT cells by calcium phosphate and Lipofectamine2000

	Transfection efficiency	Mean fluorescence intensity
Calcium phosphate	98.5 %	262.4
Lipofectamine 2000	92.3 %	156.7

2.3 HPV16 假病毒对细胞的感染及滴度测定实验  
将获得的细胞裂解液取 1μL 在 24 孔细胞培养板中对 293FT 细胞( 2 × 10<sup>5</sup> /well ) 进行感染实验 ,37℃

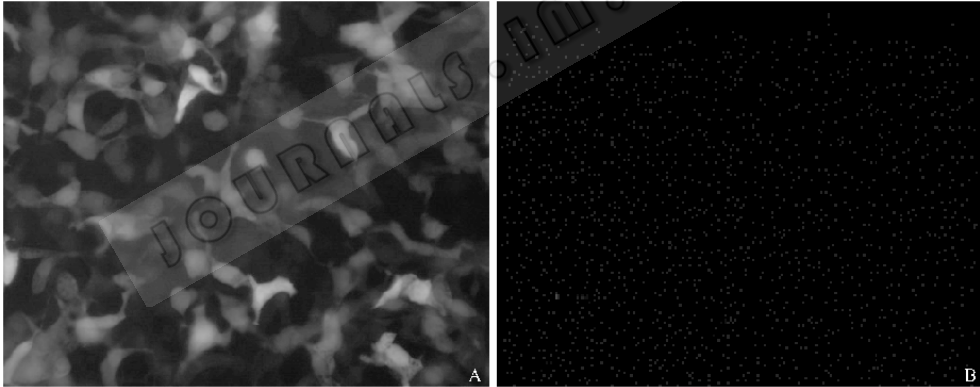


图 3 HPV16 假病毒对 293FT 细胞的感染实验

Fig.3 293FT cells infected with HPV16 pseudovirions

A : incubated with lysates of 293FT cells cotransfected with p16L1h , p16L2h and pN31-EGFP ;  
B : incubated with lysates of 293FT cells transfected with pN31-EGFP.

表 2 HPV16 对照单抗对假病毒感染的阻断  
Table 2 In vitro neutralization of HPV16 pseudovirions by control mAbs

mAb ID	Isotype	Epitope*	Neutralization titer
V5	IgG2b	C	1:650000
E70	IgG2b	C	1:5120
U4	IgG2a	C	1:640
D9	IgG1	L	< 1:20

\* C : conformational ; L : linear.

2.5 HPV16 中和单抗的筛选

对本实验室用重组 HPV16 L1 VLP 免疫筛选获得的 18 株抗 HPV16 L1 单抗用 HPV16 假病毒感染

孵育 48h 后观察并检测细胞中 EGFP 的表达情况。结果显示 ,HPV16 假病毒可有效将 EGFP 表达质粒导入 293FT 细胞中进行表达 ,而以同样方式单独转染 pN31-EGFP 后获得的细胞裂解液不能使靶细胞表达 EGFP( 图 3 )。在 293FT 细胞中对 HPV16 假病毒的感染滴度进行测定的结果显示其滴度约为 2 × 10<sup>7</sup> TU/mL。

2.4 HPV16 假病毒中和实验的建立

应用 4 株已证实的 HPV16 单克隆抗体对本研究获得的 HPV16 假病毒进行中和实验。这 4 株单抗中 ,V5、U4、E70 已被证明均识别构象表位 ,具有中和能力 ,D9 识别包埋于 HPV16 内部的表位 ,不具有中和能力<sup>[ 12 , 15 ]</sup>。其中 V5 识别的表位被认为是 HPV16 的优势中和表位 ,具有较强的中和能力<sup>[ 16 ]</sup>。对照单抗的对假病毒感染的阻断结果如表 2 所示 , HPV16 假病毒对 293FT 细胞的感染可被单抗 V5、U4、E70 所阻断 ,而不会被 D9 所阻断 ,其中 V5 具有较高的中和滴度。该结果证明本研究获得的 HPV16 假病毒可有效应用于中和实验。

293FT 细胞模型进行中和活性鉴定。结果如表 3 所示 ,单抗 3D10 和 PD1 可阻断 HPV16 假病毒对细胞的感染 ,其中和滴度分别为 1:20 480 和 1:81 920。Dot blotting 检测结果显示这两株单抗与 VLP 具有很好的反应性 ,而与 VLP 的煮沸后样品的反应性则有显著下降 ,说明其识别的表位依赖于特定的空间构象。

3 讨论

预防疫苗的免疫保护性主要体现于是否可诱导出高滴度中和抗体 ,因此对抗体的中和活性测定是疫苗评估和质量控制的重要依据。由于 HPV 的感染和

复制具有细胞分化状态依赖性和严格的宿主特异性 ,使其缺乏合适的动物模型 ,也难以通过常规的组织培养方法在体外建立细胞感染培养模型<sup>[17]</sup> ,成为 HPV 疫苗开发的主要障碍之一。

表 3 不同单抗的抗体滴度和中和滴度  
Table 3 Antibody titers and neutralizing titers  
of different HPV16 mAbs

mAb	ELISA titer	Epitope *	Neutralization titer
A1	4.4 × 10 <sup>4</sup>	C	< 1:20
A2	5.6 × 10 <sup>4</sup>	L	< 1:20
B2	9.3 × 10 <sup>4</sup>	L	< 1:20
B4	1.4 × 10 <sup>5</sup>	L	< 1:20
B6	1.8 × 10 <sup>5</sup>	L	< 1:20
1D12	5.4 × 10 <sup>2</sup>	C	< 1:20
3D10	2.6 × 10 <sup>3</sup>	C	1:20 480
9H3	4.4 × 10 <sup>4</sup>	C	< 1:20
B5	1.0 × 10 <sup>4</sup>	L	< 1:20
B8	2.0 × 10 <sup>4</sup>	C	< 1:20
B9	1.6 × 10 <sup>5</sup>	L	< 1:20
B11	2.0 × 10 <sup>5</sup>	L	< 1:20
C1	6.3 × 10 <sup>4</sup>	L	< 1:20
C3	1.6 × 10 <sup>4</sup>	L	< 1:20
PD1	1.0 × 10 <sup>4</sup>	C	1:81 920
PD2	1.3 × 10 <sup>3</sup>	C	< 1:20
PD5	4.9 × 10 <sup>3</sup>	L	< 1:20
PD6	4.4 × 10 <sup>4</sup>	C	< 1:20

\* C : conformational ; L : linear.

人们已提出多种方法以试图解决该问题。通过免疫缺陷小鼠异种移植方法<sup>[2]</sup>或在体外培养的诱导分化上皮组织中进行少量的体外 HPV 感染<sup>[3]</sup>可用于进行中和实验 ,但这些方法的技术复杂性和漫长的实验周期使其难以满足疫苗研发中大量中和性评估实验的需要。目前许多 HPV 的中和实验是通过替代方法进行的 ,如利用 HPV VLP 进行的 ELISA 检测<sup>[18]</sup>和血凝抑制实验<sup>[4]</sup>等 ,其分别是通过检测抗体结合 VLP 的能力或对其血凝特性的抑制效率来反映抗体的中和能力。这些方法相对较为简单 ,灵敏度也较好 ,但都不能直接反映抗体对病毒感染的阻断作用 ,而且会产生较多的假阳性结果 ,如常检出识别线性表位的非中和抗体<sup>[13]</sup> ,因此其结果不能完全真实地表现抗体的中和能力。

细胞内表达的 HPV 结构蛋白 L1 和 L2 具有组装为病毒颗粒的特性 ,可包裹细胞内的游离体病毒 DNA 或外源导入的报告质粒 ,利用该特性构建的 HPV 假病毒可用于有效模拟 HPV 与宿主细胞的相互作用过程。在早期主要应用重组痘苗病毒<sup>[8]</sup>、重组 SFV<sup>[5]</sup>和化学偶联<sup>[6,9]</sup>等方法构建 HPV 假病毒 ,但这些方法普遍存在操作复杂、生产效率低、实验周期长、稳定性差等问题 ,在大规模推广应用上存在很

多困难。2004 年 Buck 等<sup>[7]</sup>应用密码子优化后的 HPV 结构蛋白表达质粒与报告质粒通过脂质体共转染 293TT 细胞后可有效获得包装报告质粒的 HPV 假病毒。本研究选用 293FT 细胞替代 293TT 细胞。293FT 细胞是一种在 293F 细胞基础上经过改进的细胞系 ,具有很高的生长倍增速率。另外 ,293FT 细胞对脂质体或磷酸钙转染方法具有很高的转染效率 ,同时细胞内可表达 SV40 大 T 抗原 ,可支持带有 SV40 ori 的质粒进行游离型复制 ,有利于提高质粒的拷贝数 ,因此十分适宜于进行蛋白表达<sup>[19]</sup>。本研究利用磷酸钙方法在 293FT 细胞中成功建立携带 EGFP 报告质粒的 HPV 16 假病毒生产体系 ,并用于 HPV 16 抗体的中和实验 ,在效果和使用成本的综合比较上具有明显的优势。本研究建立的 HPV16 假病毒中和实验为快速准确鉴定 HPV 单抗的中和能力和 HPV 候选疫苗的免疫保护效果提供了有效手段 ,对于 HPV 疫苗的开发和质控具有的重要价值。该体系具有效率高、成本低、操作简便和易于检测等优点 ,适合于进行大量生产和应用 ,也为构建其它型的 HPV 假病毒提供了基础。

REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Munoz N , Bosch FX , Castellsague X *et al.* Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen ? The international perspective. *Int J Cancer* , 2004 , **111**( 2 ) :278 - 285

[ 2 ] White WI , Wilson SD , Bonnez W *et al.* *In vitro* infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *J Virol* , 1998 , **72**( 2 ) :959 - 964

[ 3 ] Meyers C , Frattini MG , Hudson JB *et al.* Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* , 1992 , **257**( 5072 ) :971 - 973

[ 4 ] Roden RB , Hubbert NL , Kimbaurer R *et al.* Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor. *J Virol* , 1995 , **69**( 8 ) :5147 - 5151

[ 5 ] Roden RB , Greenstone HL , Kimbaurer R *et al.* *In vitro* generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J Virol* , 1996 , **70**( 9 ) :5875 - 5883

[ 6 ] Kawana K , Yoshikawa H , Taketani Y *et al.* *In vitro* construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16 : incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids. *J Virol* , 1998 , **72**( 12 ) :10298 - 10300

[ 7 ] Buck CB , Pastrana DV , Lowy DR *et al.* Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* , 2004 , **78**( 2 ) :751 - 757

[ 8 ] Stauffer Y , Raj K , Masternak K *et al.* Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J Mol Biol* , 1998 , **283**( 3 ) :529 - 536

[ 9 ] Yeager MD , Aste-Amezaga M , Brown DR *et al.* Neutralization of human papillomavirus ( HPV ) pseudovirions : a novel and efficient approach to detect and characterize HPV neutralizing antibodies.

- [ 10 ] Cheng T(程通), Xu CY(许辰煜), Wang YB(王颖彬) *et al.*. Rapid and efficient expression of foreign genes in mammalian cells by baculovirus vectors. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2003, **19**(5): 581 – 587
- [ 11 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998
- [ 12 ] Christensen ND, Dillner J, Eklund C *et al.*. Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology*, 1996, **223**(1): 174 – 184
- [ 13 ] Pastrana DV, Buck CB, Pang YY *et al.*. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology*, 2004, **321**(2): 205 – 216
- [ 14 ] Bonne W, DaRin C, Borkhuis C *et al.*. Isolation and propagation of human papillomavirus type 16 in human xenografts implanted in the severe combined immunodeficiency mouse. *J Virol*, 1998, **72**(6): 5256 – 5261.
- [ 15 ] Bousarghin L, Combata-Rojas AL, Touze A *et al.*. Detection of neutralizing antibodies against human papillomaviruses (HPV) by inhibition of gene transfer mediated by HPV pseudovirions. *J Clin Microbiol*, 2002, **40**(3): 926 – 932
- [ 16 ] Wang Z, Christensen N, Schiller JT *et al.*. A monoclonal antibody against intact human papillomavirus type 16 capsids blocks the serological reactivity of most human sera. *J Gen Virol*, 1997, **78**(Pt 9): 2209 – 2215
- [ 17 ] Bedell MA, Hudson JB, Golub TR *et al.*. Amplification of human papillomavirus genomes *in vitro* is dependent on epithelial differentiation. *J Virol*, 1991, **65**(5): 2254 – 2260
- [ 18 ] Dillner J. The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol*, 1999, **9**(6): 423 – 430
- [ 19 ] Growth and Maintenance of the 293FT Cell Line. Invitrogen Life Technologies, 2003