

禽流感病毒 *M2e* 基因与鸡 IgG *Fc* 基因在 巴斯德毕赤酵母中的融合表达

尚书文^{1,2}, 侯继波², 徐公豹², 牛明福¹, 王秀清¹,
何家惠², 陈溥言¹, 姜平¹

(1 南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室, 江苏 南京 210095; 2 江苏省农业科学院 兽医研究所, 江苏 南京 210014)

【摘要】【目的】得到融合蛋白 M2e-Fc, 并检测其免疫学特性, 为研制禽流感通用疫苗奠定基础。【方法】根据禽流感病毒 H5N1 的 M2e 蛋白氨基酸序列设计 2 条长互补引物, 通过重叠区互补扩增基因法扩增出目的基因 M2e, 然后与鸡 IgG *Fc* 片段基因一起克隆入毕赤酵母表达质粒中, 构建酵母表达载体。将阳性质粒线性化后电转化入感受态毕赤酵母 X-33 中, 再经甲醇诱导后, 通过 Tricine-SDS-PAGE 电泳及 Western-blotting 鉴定融合蛋白。之后用其免疫非免疫鸡, 检验其免疫原性。【结果】成功构建了表达 M2e 和 Fc 融合蛋白的酵母表达载体 pPICZαA-M2-Fc, 并通过 Zeocin 筛选及 PCR 鉴定出了阳性重组子; 阳性重组子经甲醇诱导后得到融合蛋白, Tricine-SDS-PAGE 电泳及 Western-blotting 鉴定证实, 融合蛋白得到正确表达, 并且可以与 M2e 阳性血清反应。动物免疫试验证实, 该融合蛋白可以诱导鸡产生抗 M2e 抗体, 具有良好的免疫原性。【结论】融合蛋白 M2e-Fc 在巴斯德毕赤酵母表达系统中得到了成功表达, 该融合蛋白具有较好的免疫原性, 为后期进行其他免疫试验奠定了基础。

【关键词】 禽流感病毒; *M2e* 基因; 鸡 IgG *Fc* 基因; 巴斯德毕赤酵母

【中图分类号】 S852.65⁺9.5; Q786

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)01-0017-06

Expression of a fusion protein of influenza virus matrix 2 protein ectodomain segments (*M2e*) and avian IgG *Fc* in *Pichia pastoris*

SHANG Shu-wen^{1,2}, HOU Ji-bo², XU Gong-bao², NIU Ming-fu¹,
WANG Xiu-qing¹, HE Jia-hui², CHEN Pu-yan¹, JIANG Ping¹

(1 Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China; 2 Institute of Veterinary Science of Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing, Jiangsu 210014, China)

Abstract: 【Objective】The study is to obtain a fusion protein M2e-Fc and to learn its immunogenicity. 【Method】According to the partiality codon of *Pichia pastoris*, influenza virus matrix 2 protein ectodomain segments (*M2e*) was amplified by SOE PCR using a couple of long primers. Then *M2e* gene and avian IgG *Fc* segments gene were digested and inserted into *Pichia pastoris* expression vector pPICZαA, and the expression plasmid pPICZαA-M2-Fc was obtained. The recombinant plasmid was linearized and transformed into competent *Pichia pastoris* X-33 strain by electroporation. Then the recombinant transformants were selected by Zeocin and identified by PCR using the 3' AOX and 5' AOX primers. The expression of the fusion protein in yeast cells was induced by addition of methanol every 24 hours to 1%, and was analyzed by Tricine-SDS-PAGE and Western blotting. 【Result】The fusion expression vector for M2e and Fc segments

* [收稿日期] 2007-01-17

[基金项目] 江苏省科技厅高技术项目(BG2006324)

[作者简介] 尚书文(1983—), 男, 河南镇平人, 在读硕士, 主要从事畜禽传染病防治研究。E-mail: Shangshuwen@126.com

[通讯作者] 侯继波(1960—), 男, 山东德州人, 研究员, 博士, 主要从事动物生物制品研究。E-mail: houjibo@x.cn

was successfully constructed, and the relative molecular mass of the fusion protein was measured to be 23kDa. The fusion protein was expressed at a yield of 321 mg per liter of culture with a specific antigenicity as demonstrated by Western blotting. After immunized chicken with M2e-Fc, anti-M2e antibody titer was determined by indirect ELISA. 【Conclusion】 The fusion protein M2e-Fc was successfully expressed and had good antigenicity.

Key words: influenza virus; matrix 2 protein ectodomain segments (M2e); avian IgG Fc; *Pichia pastoris*

禽流感(Avian Influenza, AI)是由 A 型流感病毒(AIV)引起的一种烈性禽类病毒性传染病,易感动物包括鸡、鸭、鹅、火鸡、野鸡、燕鸥、鸽等。根据禽流感病毒的致病性强弱,可将禽流感分为高致病性禽流感(HPAI)、低致病性禽流感(LPAI)和无致病性禽流感(NPAI)3 种。高致病性禽流感的历次流行和重复出现,给养禽业造成了严重损失,而且可以直接感染人并且致人死亡。禽流感病毒不仅是养禽业的大敌,更是人类的大敌,而防控禽流感最有效的措施就是免疫接种,但目前免疫所用的免疫原——禽流感病毒外膜蛋白 HA 和 NA 的基因均具有较高的突变率,易造成免疫失败。因此研制一种可以抵抗多种亚型流感病毒的通用疫苗是禽流感防控的当务之急。

流感病毒基质蛋白 2(M2)是流感病毒的外膜蛋白之一,其主要以四聚体形式存在于流感病毒粒子表面,作为粒子通道在流感病毒感染早期和后期,通过调控病毒内外的 pH 值而影响病毒粒子的复制。其氨基酸序列高度保守,在各个亚型流感病毒间同源性很高,在所检测的毒株中,其同源性高达 90%以上,而且氨基端的 10 个氨基酸在人流感和禽流感病毒中几乎完全相同^[1]。国内外关于人流感病毒 M2 的研究,对禽流感通用疫苗的研制具有非常积极的意义。作为抗原,M2 可以诱导产生保护性免疫应答,并具有一定程度的交叉保护力^[2-5],因此,M2 是研究流感通用疫苗的理想抗原。而且研究发现,M2 的主要保护性抗原决定簇在 M2 的膜外部分,即 M2 氨基端的 1~24 个氨基酸(M2e)^[6]。国内外已有的研究证实,M2e 同样可以诱导保护性免疫应答^[7-8]。但目前关于 M2 免疫学特性的研究,主要是针对人流感病毒 M2,且多采用小鼠作为实验动物模型,而关于禽流感病毒 M2 的相关研究报道极少。为此,本研究将半抗原 M2e 基因与载体鸡的 IgG Fc 片段基因相串联,在巴斯德毕赤酵母中进行了融合表达,并以鸡为动物模型研究了所得到的融合蛋白的免疫学特性,以期禽流感通用型疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)受体菌 X-33 和表达载体 pPICZα-A,均购于 Invitrogen 公司;质粒 pUC-Fc 由南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室构建保存。

1.1.2 试验动物 4 周龄非免疫鸡 15 只,由南京天邦生物科技有限公司动物中心提供,隔离饲养。

1.1.3 主要试剂 rTaq DNA 聚合酶、T₄ DNA ligase、dNTPs 和限制性内切酶,均购于 TaKaRa 公司;Tricine 购于上海生物工程公司;Zeocin 购于 Invitrogen 公司;弗氏完全佐剂购于 Sigma 公司;SDS-PAGE 低分子量标样购于生兴生物公司;D-葡萄糖、D-山梨醇、peptone-Y、酵母提取物、酵母氮源基础培养基(Yeast nitrogen base, YNB)和生物素等,购于美国 BBI 公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.4 引物设计与合成 根据禽流感病毒 H5N1 亚型的 M2e 氨基酸序列(MSLLTEVETPTR-NEWECRCSDSSD),遵循巴斯德毕赤酵母偏嗜性密码子,设计合成了 2 条长互补引物 P1 和 P2,二者 3'端均设计有 18 bp 的互补碱基,分别在基因两端引入 Xho I 和 BamH I 位点,并在 N 端引入 Kex2 酶切位点。引物 P1 和 P2 由大连 TaKaRa 公司合成;通用引物 5' AOX 和 3' AOX 由上海 Invitrogen 公司合成。其序列分别为:P1:5' GCC GAG CTC (Xho I 酶切位点) GAG AAA AGA (Kex2 酶切位点) ATG TCC TTG TTG ACC GAA GTT GAA ACC CCA ACC AGA AAT 3'; P2:5' CAC GGA TCC (BamH I 酶切位点) ATC GGA GGA ATC GGA ACA TCT ACA TTC CCA TTC ATT TCT GGT TGG GGT TTC AAC 3'; 5' AOX: 5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3'; 3' AOX: 5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3'。

1.2 AIV M2e 基因的重叠区互补扩增基因法(SOE PCR)扩增

PCR 反应总体系 50 μL: 10 × PCR 缓冲液

(Mg²⁺ free) 5 μ L; MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L; dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L; P1 (40 pmol/L) 2 μ L; P2 (40 pmol/L) 2 μ L; ddH₂O 36.5 μ L; rTaq 0.5 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,65 $^{\circ}$ C 退火 45 s(退火温度每个循环降低 0.5 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 30 个循环;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,52 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,15 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。PCR 产物用 1.5 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.3 表达载体的构建

PCR 扩增的 M2e 产物,用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切并回收。质粒 pUC-Fc 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba* I 消化,并回收大小约 500 bp 的片段。质粒 pPICZ α -A 用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 消化,回收 3 600 bp 大小的片段。将上述 3 个酶切片段用 T₄ DNA ligase 进行连接,转化感受态细胞 DH5 α 。*Xho* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定筛选出阳性质粒,命名为 pPICZ α A-M2-Fc,并送上海 Invitrogen 公司测序。

1.4 重组毕赤酵母的构建与鉴定

取感受态毕赤酵母 X-33 (80 μ L)与 10 μ L 线性化的 pPICZ α A-M2-Fc(约 10 μ g)相混合,转移至预冷的 0.2 cm 电转化杯(Bio-Rad)中,置冰上 5 min,1.5 kV、25 μ F、200 Ω 电击后,立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇,于 30 $^{\circ}$ C 静置 2 h,取 200 μ L 涂布于 YPDZ 平板,30 $^{\circ}$ C 培养至单菌落出现。同时设置空质粒 pPICZ α -A 对照。具体操作参照 Pichia Expression Kit 说明书进行。

采用 PCR 方法分析毕赤酵母转化子,用“煮-冻-煮”法制备 PCR 模板,使用 pPICZ α -A 通用引物 3'AOX 和 5'AOX 进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。同时设置空质粒转化酵母转化子对照和阳性质粒对照。

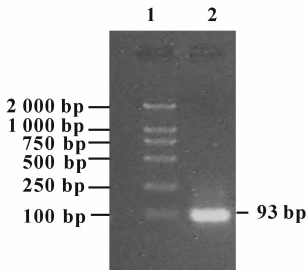


图 1 AIV M2e 基因 SOE PCR 扩增产物的电泳结果
1. DNA 分子量标准;2. SOE PCR 扩增产物
Fig.1 SOE PCR product of AIV M2e
1. DNA Marker DL2000;2. SOE PCR product of AIV M2e

1.5 重组毕赤酵母的诱导表达

将筛选到的阳性酵母菌和空质粒转化酵母菌,按 1 : 100 接种到 5 mL BMGY 培养基中,30 $^{\circ}$ C 230 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 达 3~6(约 22 h);室温离心,收集菌体重悬于 25 mL BMMY 培养基进行诱导表达。在 28 $^{\circ}$ C,250 r/min 条件下振荡培养,期间每隔 24 h 取样 1 次,同时补加甲醇至终体积分数为 1%。96 h 后,离心收集培养液上清。用 DNA/RNA 微量定量仪结合考马斯亮兰法(Bradford 法),测定表达上清中的蛋白含量。

1.6 Tricine-SDS-PAGE 和 Western-blotting 鉴定

Tricine-SDS-PAGE 的具体操作步骤参考文献[9]进行,然后薄层扫描分析目的蛋白占表达上清总蛋白的比例。用 M2e 偶联血蓝蛋白(KLH-M2e)作为抗原免疫 Balb/c 小鼠制备的多克隆血清以及阴性血清,并分别进行 Western-blotting 检测。

1.7 融合蛋白 M2e-Fc 的动物免疫试验

融合蛋白 M2e-Fc 与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化后,胸部肌肉注射免疫 5 只非免疫鸡,每只 100 μ g,作为试验组。同时设计阳性和阴性对照组,阳性对照组用 KLH-M2e 与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化后,胸部肌肉注射免疫 5 只非免疫鸡,每只 100 μ g;阴性对照组用等体积分空质粒转化酵母表达上清与同体积弗氏完全佐剂混匀乳化后,胸部肌肉注射免疫 5 只非免疫鸡。免疫前 1 d 和免疫后 21 d,翅静脉采血分离血清,以合成的 M2e 作为包被抗原,用间接 ELISA 法测定 M2e 抗体水平。

2 结果与分析

2.1 AIV M2e 的 SOE PCR 扩增

用根据 M2e 序列设计合成的 2 条长引物 P1 和 P2,以 SOE PCR 法互为模板互为引物扩增出约 93 bp 的目的条带(图 1)。

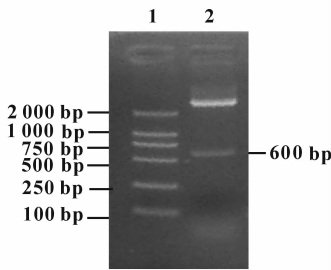


图 2 表达质粒 pPICZ α A-M2-Fc 的双酶切鉴定结果
1. DNA 分子量标准;2. pPICZ α A-M2-Fc 的 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切产物
Fig.2 Identification of recombinant plasmid pPICZ α A-M2-Fc
1. DNA Marker DL2000;2. Recombinant plasmid pPICZ α -M2-Fc digested by *Xho* I and *Xba* I

2.2 表达质粒 pPICZαA-M2-Fc 的鉴定

质粒用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切后可以切出大小约 600 bp 的片段(图 2),与 *M2e* 基因和 *Fc* 基因两个序列大小之和相符,因此判定为阳性质粒,命名为 pPICZαA-M2-Fc。测序结果表明,插入序列与目的序列 100%相符,阅读框正确。

2.3 重组毕赤酵母菌的 PCR 鉴定

由图 3 可见,空质粒转化子可扩增出大小约 600 bp 的片段,阳性重组子扩增出了 1 200 bp 左右的片段,与阳性表达质粒 pPICZαA-M2-Fc 扩增出的约 1 200 bp 的片段一致。

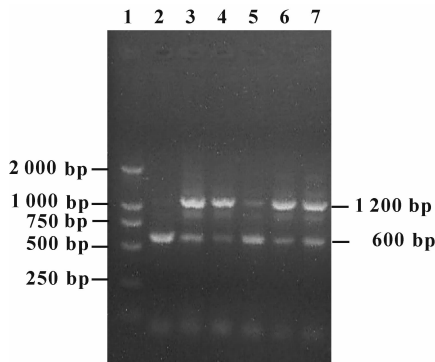


图 3 重组毕赤酵母的 PCR 鉴定

1. DNA 分子量标准;2. 以 pPICZαA/X-33 基因组为模板的 PCR 扩增产物;3~7. 以转化子 pPICZαA-M2-Fc/X-33 基因组为模板的 PCR 扩增产物

Fig. 3 Identification of *Pichia pastoris* transformants by PCR

1. DNA Marker DL2000;2. Identification of transformants pPICZαA/X-33 by PCR;3~7. Identification of transformants pPICZαA-M2-Fc/X-33 by PCR

2.4 融合蛋白 M2e-Fc 的表达与鉴定

Tricine-SDS-PAGE 电泳结果(图 4)显示,阳性重组毕赤酵母菌经甲醇诱导 24 h 时,无任何条带产生,说明融合蛋白 M2e-Fc 还未表达;诱导 48 h 时,在相对分子质量 23 ku 处开始出现 1 条条带,且该条带随诱导时间延长而逐渐变浓,至 96 h 时收获上清。而空质粒毕赤酵母的诱导上清在相应位置无条带产生。使用空质粒转化的毕赤酵母诱导上清作为标准品调零,经 RNA/DNA Calculator 结合考马斯亮蓝法测定,阳性上清中的蛋白浓度为 321 μg/mL。薄层扫描分析发现,目的蛋白占上清总蛋白含量的 91%。

2.5 融合蛋白 M2e-Fc 的 Western-blotting 分析

Western-blotting 分析结果(图 5)显示,在 23 ku 左右有 1 条清晰条带,而空白对照无明显条带;

用阴性血清进行 Western-blotting,也无任何肉眼可见条带产生。

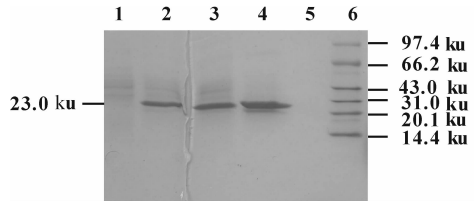


图 4 M2e-Fc 融合蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 电泳
1~4. pPICZαA-M2-Fc/X-33 诱导 24,48,72 和 96 h 的上清;
5. pPICZαA/X-33 诱导 96 h 的表达上清;6. 蛋白质分子量标准
Fig. 4 Analysis of the fusion protein M2e-Fc by Tricine-SDS-PAGE
1—4. Supernatant of pPICZαA-M2-Fc/X-33 after 24,48,72 and 96 h induction;5. Supernatant of pPICZαA/X-33 after 96 h induction; 6. Protein marker

2.6 融合蛋白 M2e-Fc 的免疫效果

免疫前,全群鸡血清中 M2e 的 ELISA 抗体为阴性;免疫 3 周后,试验组鸡 M2e 的 ELISA 抗体平均水平可达 1 : 1 600,高的可达 1 : 3 200,平均水平较阳性对照组稍低,差异不显著。

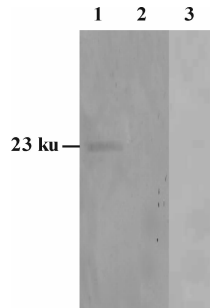


图 5 融合蛋白 M2e-Fc 的 Western-blotting 分析
1. pPICZαA-M2-Fc/X-33 表达上清与抗 M2e 阳性血清的孵育结果;
2. pPICZαA/X-33 表达上清与抗 M2e 阳性血清的孵育结果;
3. 融合蛋白与抗 M2e 阴性血清的孵育结果

Fig. 5 Western-blotting analysis of the M2e-Fc

1. pPICZαA-M2-Fc/X-33 with the positive anti-M2e serum;
2. pPICZαA/X-33 with the positive anti-M2e serum;3. pPICZαA-M2-Fc/X-33 with the negative anti-M2e serum

3 讨论

禽流感病毒是变异最快、亚型最多的病原之一,其外膜蛋白包括 HA、NA 和 M2 3 类,其中 HA 和 NA 基因的突变率很高。据文献[10]报道,HA 基因的每个核苷酸每年的替换几率为 6.7×10^{-3} ,NA 基因的替换几率则为 3.2×10^{-3} ,因而其在各个亚型流感病毒中均有很大的差异。但 M2 基因在各个

亚型的禽流感病毒中相对比较保守,具有很高的同源性。M2 是否可以作为免疫原诱导免疫保护,且其是否具有交叉保护力,现已成为研究热点之一。每 4 个 M2 蛋白单体可以在病毒粒子囊膜上形成 1 个同源四聚体跨膜 α 螺旋束,作为病毒的离子通道,该离子通道活性对流感病毒的复制周期至关重要,主要表现为两个方面:(1)在发生流感病毒胞吞作用和内体酸化后,M2 蛋白被激活,导致病毒内部的同步酸化,这种酸化削弱了病毒核酸和核衣壳之间的连接,有利于核酸的释放;(2)在病毒释放过程中,M2 蛋白离子通道活性可确保外来体不被酸化,从而阻止病毒血凝素形成不可逆转的构象变化^[11]。因此,如果有分子能够阻断 M2 通道,则该分子将是有效的抗流感药物。金刚烷胺就属于这类分子,其可有效封闭 M2 通道,从而抑制流感病毒的复制^[12]。M2 的抗体能否象金刚烷胺一样具有抗病毒活性,还有待于进一步的研究。

如今,关于流感病毒 M2 的研究,已经取得了许多可喜的进展。M2 蛋白的单克隆抗体可以抑制流感病毒在体外培养的细胞上复制^[6],并且在小鼠体内同样能够抑制流感病毒的复制^[13]。Sleppushkin 等^[14]研究发现,杆状病毒表达的 M2 蛋白可以诱导产生免疫保护,并具有交叉保护力。而 Frace 等^[15]也证实,M2 可以诱导产生交叉免疫保护功能。用 M2 与乙肝病毒核心抗原(HBc)偶联形成的融合蛋白(M2HBc)免疫小鼠,免疫小鼠对 A 型流感病毒攻毒具有 90%~100%的免疫保护力,而且这种保护力具有交叉性和持久性^[7]。合成的 M2e 抗原多肽,与佐剂混合后经鼻腔免疫小鼠,攻毒以后能产生明显的免疫保护,并且呼吸道中病毒滴度较对照组明显降低^[8]。Liu 等^[3]将合成的 M2e N 端与牛血清白蛋白偶联后免疫小鼠,产生了高滴度的 M2 特异性抗体,并且在攻毒免疫小鼠后可以产生免疫保护。而且 Liu 等^[4]还证实,多拷贝 M2e 抗原表位融合蛋白的免疫保护力明显高于低重复抗原表位的融合蛋白。在雪貂和猕猴上进行的相关免疫试验同样产生了免疫保护^[5]。综上所述,流感病毒 M2e 可以诱导产生保护性免疫应答,并且具有一定程度上的交叉保护力。

但是,目前的研究热点主要集中在人流感病毒,有关禽流感病毒的相关研究报道很少。Ernst 等^[8]报道,将禽流感病毒 H5N1 和 H9N2 的 M2e 基因与载体串联后在大肠杆菌中融合表达,融合蛋白纯化后偶联至脂质体上分别免疫小鼠,再分别攻毒,用

H9N2 亚型禽流感病毒攻毒后产生了明显的免疫保护,并且免疫小鼠肺脏中的病毒粒子滴度较对照组显著下降;用 H5N1 亚型禽流感病毒攻毒后,免疫小鼠肺脏中的病毒粒子滴度也较对照组显著下降。但这个试验也是以小鼠为动物模型,尚未见有关 M2e 在禽流感病毒本属宿主动物上产生免疫保护力的相关研究报道。

本试验按照禽流感病毒 H5N1 亚型 M2e 蛋白的氨基酸序列,根据毕赤酵母密码子偏嗜性设计、合成引物,扩增出 M2e 基因,并与载体 IgG Fc 片段串联之后在毕赤酵母中进行表达,得到了融合蛋白 M2e-Fc。Tricine-SDS-PAGE 电泳结果显示,该融合蛋白的相对分子质量约为 23 ku,较目的蛋白预测分子质量稍大,这主要是由于 Fc 片段的糖基化所致。Western-blotting 结果表明,该融合蛋白可以与 KLH-M2 免疫小鼠血清结合,但不与阴性血清结合,说明目的融合蛋白得到正确表达,并且鸡 IgG Fc 片段不与小鼠阴性血清起反应。重组毕赤酵母的诱导表达结果表明,在诱导 48 h 时,毕赤酵母开始表达目的蛋白,并且表达量逐渐升高;至 96 h 在上清中的融合蛋白含量约达 321 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

将半抗原 M2e 与载体 Fc 融合,就是将 M2e 与 IgG 的绞链区及 CH₂、CH₃ 区相结合,用以增加该蛋白在血液中的半衰期,而且 Fc 结构域可形成多聚分子,使重组蛋白具有更强的抗原结合力;另外,Fc 可以通过与其配体的相互作用,将 Fc 偶联的半抗原分子更好地递呈给抗原递呈细胞,从而提高半抗原的抗原性^[16]。本研究免疫试验初步证实,将半抗原 M2e 与载体 Fc 融合后,融合蛋白可以诱导产生较高水平的抗 M2e 抗体,说明该融合蛋白具有较好的免疫原性。有关其免疫保护力及其与普通载体抗原递呈效率的比较,将在以后的试验中进行。

4 结 论

本试验成功地将禽流感病毒 M2e 基因与鸡 IgG Fc 片段在毕赤酵母中进行了融合表达,初步证实 M2e 可以与小鼠抗 M2e 抗体结合;通过免疫试验,证实 M2e 具有较好的免疫原性,可诱导产生高水平的抗 M2e 抗体,为进一步研究其免疫学特性奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Takeuchi K, Lamb R A. Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemag-

glutinin during intracellular transport[J]. J Virol,1994,68(2): 911-919.

[2] Krystyna M,Jinqi F,Mark E,et al. Induction of influenza type A virus specific resistance by immunization of mice with a synthetic multiple antigenic peptide vaccine that contains ectodomains of matrix protein 2[J]. Vaccine,2003,21(20):2616-2626.

[3] Liu W L,Li H,Chen Y H. N-terminus of M2 protein could induce antibodies with inhibitory activity against influenza virus replication[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology,2003,35(2):141-146.

[4] Liu W L,Zou P,Liu Z Q,et al. High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity[J]. Vaccine,2004,23(3):366-371.

[5] Fan J,Liang X P,Melanie S H,et al. Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice,ferrets,and rhesus monkeys[J]. Vaccine,2004,22(23):2993-3003.

[6] Zebedee S L,Lamb R A. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions[J]. J Virol,1988,62(8):2762-2772.

[7] Neiryneck S,Deroo T,Saelens X,et al. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein [J]. Nat Med,1999,5(10):1157-1163.

[8] Ernst W A,Hyung J K,Terrence M T,et al. Protection against H1,H5,H6 and H9 influenza A infection with liposomal matrix 2 epitope vaccines[J]. Vaccine,2006,24:5158-5168.

[9] Schagger H,Von J G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 ku[J]. Analytical Biochemistry,1987,166(2):368-379.

[10] David A S. Genetics of influenza viruses[J]. Annu Rev Genet,2002,36:305-332.

[11] Takeda M,Pekosz A,Shuck K,et al. Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture[J]. J Virol,2002,76(3):1391-1399.

[12] Astrahan P,Kass I,Cooper M A,et al. A novel method of resistance for influenza against a channel-blocking antiviral drug [J]. Protein,2004,55(2):251-257.

[13] Treanor J J,Tierney E L,Zebedee S L,et al. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice[J]. J Virol,1990,64(3):1399-1402.

[14] Slepushkin V A,Xitz J M,Black R A,et al. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein [J]. Vaccine,1995,13(15):1397-1401.

[15] Frace A M,Klimov A I,Rowe T,et al. Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus[J]. Vaccine,1999,17(18):2237-2244.

[16] 周素芳,黄秉仁. Ig 融合蛋白的应用研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2002,22(3):45-49.

Zhou S F,Huang B R. Progress on Ig fusion proteins application[J]. Journal of Chinese Biotechnology,2002,22(3):45-49. (in Chinese)

(上接第 16 页)

[9] Cyprian A,Tsuyoshi K,Leslie D. Characterization of the T lymphocyte subsets and lymphoid populations involved in the induction of low-dose oral tolerance to human thyroglobulin [J]. Cellular Immunology,2001,212:1-15.

[10] Rifaat S,Carlos E A,Masayuki O,et al. Enhanced oral tolerance in transgenic mice with hepatocyte secretion of IL-10 [J]. The Journal of Immunology,2005,175:3577-3583.

[11] Jessica S,Melanie T,Jonathan H,et al. A novel model of sensitization and oral tolerance to peanut[J]. Protein Immunology,2004,113:293-303.

[12] Tang He,Helen B M. Intravenous administration of deaggregated mouse thyroglobulin suppresses induction of experimental autoimmune thyroiditis and expression of both Th1 and Th2 cytokines[J]. International Immunology,1997,9:679-687.

[13] Zhang G X,Xu H,Masahiko K,et al. The role of IL-12 in the induction of intravenous tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. The Journal of Immunology,2002,168:2501-2507.