

文章编号: 1002-2694(2006)02-0157-03

# 甲型流感病毒 M2 基因真核表达载体的构建及序列分析\*

杨 靖<sup>1,2</sup>, 张卫东<sup>1,3</sup>, 李明远<sup>1</sup>, 曹 康<sup>4</sup>, 蒋忠华<sup>1</sup>, 李 虹<sup>1</sup>

**摘要:**目的 构建含有甲型流感病毒 M2 基因的真核表达载体并分析插入的 M2 基因序列。方法 从接种人流感病毒株 A/PR/8/34(H1N1) 的鸡胚尿囊液中提取病毒 RNA, 用特异引物进行 RT-PCR, 扩增 M2 基因。通过分子克隆技术将所扩增片段克隆入真核表达质粒载体 pcDNA3.1(+). 经双酶切、PCR 鉴定后挑选阳性克隆测序鉴定并对插入的 M2 基因序列进行分析。结果 经双酶切、PCR 及测序鉴定证实 M2 基因的真核表达载体构建成功。序列分析有 4 个氨基酸出现变异, 提交 Genbank 进行 Blast 比对显示同源性 97% (Genbank/NCBI AY768951)。结论 M2 四聚体蛋白具有 H<sup>+</sup> 通道功能, 能够协助病毒与宿主细胞膜融合后释放 RNP 复合物, 还能稳定 HA 蛋白的结构。M2 蛋白的高度保守性和具有交叉保护能力特性使之成为新型的通用流感疫苗的突破口。该结果将为甲型流感病毒基因工程疫苗, 通用疫苗和核酸疫苗的研究打下基础。

**关键词:** 甲型流感病毒; M2 基因; 真核表达载体

**中图分类号:** R373 **文献标识码:** A

## Construction and sequence analysis of the eukaryotic expression vector for M2 gene from influenza A virus

YANG Jing, ZHANG Wei-dong, LI Ming-yuan, CAO Kang, JIANG Zhong-hua, LI Hong

(Department of Microbiology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**ABSTRACT:** To construct the eukaryotic expression vector for M2 gene from influenza A virus and to analyze its sequence, the viral RNA was extracted from allantoic fluid of chicken embryos infected with influenza virus A/PR8/34(H1N1), and M2 gene was amplified by RT-PCR with specific primer. The amplified gene fragment was then cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+), the selected positive clones were subjected to sequence analysis of the inserted M2 gene after double enzymes digestion and PCR identification. It was found that the construction of the eukaryotic expression vector for M2 gene was successful after restrictive enzyme and PCR identification and sequence analysis. Sequence analysis demonstrated 4 amino acid variations and 97% of homology with influenza virus A/PR8/34(GenBank/NCBI AY768951). The results of the present investigation could provide a foundation for the further study on the development of DNA vaccine and broad-spectrum vaccine for influenza A virus infection.

**KEY WORDS:** influenza virus; M2 gene; eukaryotic expressing vector

1933 年 Smith 等人首先用雪貂分离出甲型流感病毒, 确定了流感的病因。自此, 人类对流感病毒进行了大量的科学研究, 但流感的预防和控制从始至终是困扰人类的一个难题。甲型流感病毒广泛存在于禽类和哺乳动物中, 也是目前致人类和各种动物流感的主型, 在人类和动物间流行时可导致高发病率和死亡率<sup>[1]</sup>。流感病毒的分子结构和宿主界限有利于流感病毒的复发和疾病的流行, 其表面的糖蛋白的高度变异更是导致流感疫苗免疫效果下降的主要原因<sup>[2]</sup>。核酸疫苗作为新一代疫苗越来越受到重视, 由于其能够同时刺激机体产生体液免疫

和细胞免疫, 易于操作, 经济有效, 目前已成为疫苗研究的热点<sup>[3]</sup>。

流感病毒基因组第 7 节段编码病毒的 M 蛋白, 包括 M1 和 M2。M2 蛋白是除 HA, NA 外的第三种跨膜蛋白, 含有 97 个氨基酸 (胞外区 24 个, 跨膜区 19 个, 膜内区 54 个), 不含糖基, 具有高度保守性,

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970830)

通讯作者: 李虹, Email: lhmf@mail.sc.cninfo.net

作者单位: 1. 四川大学华西基础与法医学院微生物学教研室, 四川成都 610041;

2. 郫阳医学院基础医学院微生物学教研室;

3. 河北医科大学基础医学院病原生物学教研室;

4. 成都医学院病原生物学教研室

它以四聚体的形式存在于类脂膜上<sup>[4]</sup>。自甲型流感病毒发现以来,在检测的毒株中 M2 蛋白的基因序列同源性可达 90%,未存在明显变异,尤其是 N 端的 10 个氨基酸在人流感病毒和禽流感病毒几乎完全相同<sup>[5]</sup>,因此 M2 蛋白被认为是流感病毒疫苗可刺激机体产生交叉保护效果的极具潜能保护性抗原,引起了研究人员的极大关注。Slepushkin 等<sup>[6]</sup>将流感病毒 M2 蛋白通过杆状病毒载体在细胞中表达,获得的产物经腹腔注射 BALB/C 小鼠后小鼠可以免受同型或异型甲型流感病毒的致死攻击。本课题针对流感病毒 M2 基因进行克隆并构建真核表达载体 pcDNA3.1(+)/M2,进行序列分析,以便为今后进一步深入开展核酸疫苗的免疫效果、免疫机制和携带流感病毒多个基因核酸疫苗的研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

1.1 载体和细胞株 真核表达载体 pcDNA3.1(+ ) 为 Invitrogen 公司产品。感受态大肠埃希菌 JM109 为 Takara 公司产品。

1.2 材料和试剂 人流感病毒株 A/PR/8/34 (H1N1) 由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制研究所国家流感中心提供。SPF 鸡胚由四川大学华西医学中心实验动物中心提供。DNA marker (dl2000) 为 Promega 公司产品。Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品。Premix Taq 为 Takara 公司产品。限制性内切酶 Xho I 和 Hind III、T4DNA 连接酶为 New England 公司产品。ReverAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 购于 Fermentas 公司。胶回收使用上海华舜生物公司试剂盒 Gel Extraction Min Kit。质粒提取使用 Omega 公司的 E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I。

1.3 流感病毒 RNA 的提取 取血凝效价为 1:2560 的病毒鸡胚尿囊液 200 $\mu$ l,加入 Trizol 试剂 200 $\mu$ l,混匀。加入氯仿 100 $\mu$ l,4 $^{\circ}$ C,12 000r/min,离心 15min。取上清,加入 150 $\mu$ l 异丙醇,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min,离心 15min。弃上清,加 500 $\mu$ l 75%乙醇,8 000r/min,离心 10min。弃上清,加入 50 $\mu$ l 1%DE-PC 处理水。

1.4 引物设计及 RT-PCR 根据已报道的流感病毒 M 基因序列 A/PR/8/34 (Genbank/NCBI AY768951)。由 Primer Premier 5.0 软件设计引物(本引物由上海博亚生物技术公司合成)。上游引物 Primer1(5' CCGAAGCTTTCTGGAAAATGATCTTCTTG 3') 设有 Hind III 酶切位点,下游引物 Primer2(5' GTCTCGAGTTACTCTAGCTCTATG

CTGAC 3') 设有 Xho I 酶切位点。根据 Fermentas 公司试剂盒说明,用特异引物 Primer2 反转录获得 M2 cDNA 后进行 PCR 扩增。反应条件为预变性 94 $^{\circ}$ C 4min,94 $^{\circ}$ C 30sec,48 $^{\circ}$ C 35sec,72 $^{\circ}$ C 35sec,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后进行胶回收。

1.5 pcDNA3.1(+ )/M2 真核表达载体构建 PCR 回收产物与载体 pcDNA3.1(+ )质粒经限制性内切酶 Hind III、Xho I 双酶切后,回收约 300bp 目的基因片段和 5.4kb 载体片段。将目的基因片段与载体片段按 5:1 摩尔比例加入到连接反应体系中,在 T4 连接酶作用下 16 $^{\circ}$ C 过夜连接,连接产物转化感受态大肠杆菌 JM109。用 Amp 抗性筛选阳性克隆。

1.6 pcDNA3.1(+ )/M2 真核表达质粒鉴定和序列分析 提取阳性克隆质粒 DNA,用 Hind III、Xho I 双酶切、PCR 方法及 ABI PRISM<sup>TM</sup>377XL DNA sequence 测序仪测序鉴定所筛选的阳性克隆。将所克隆片段的序列在 NCBI/GenBank 数据库进行 Blast 比对,并使用序列分析软件进一步进行序列分析。

## 2 结 果

2.1 RT-PCR 结果:通过 RT-PCR 得到一条分子量大小约 300bp 的单一特异性条带,与预期的 M2 片段大小相符。见图 1。

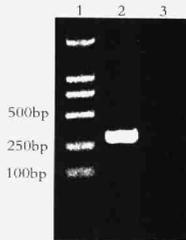


图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

1: DNA 分子标准; 2: RT-PCR 产物; 3: 阴性对照

### Fig.1 RT-PCR amplification of M2

1: DNA marker; 2: RT-PCR products; 3: negative control

2.2 pcDNA3.1(+ )/M2 真核表达重组质粒 PCR 及酶切鉴定:挑选阳性克隆,扩增并提取 DNA。经 Hind III/Xho I 双酶切鉴定,琼脂糖电泳后显现大小约 300bp 的基因片段,见图 2。阳性克隆进一步进行 PCR 鉴定,经琼脂糖电泳后出现目的基因片段,见图 3,由此说明插入片段的存 在。

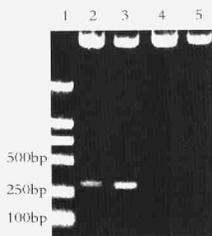


图2 双酶切鉴定重组质粒

1: DNA 分子标准; 2, 3: 酶切鉴定阳性克隆 (Hind III + Xho I); 4, 5: 酶切鉴定阴性克隆 (Hind III + Xho I)

Fig.2 Identification of recombinant plasmids digested by restriction endonuclease

1: DNA marker; 2, 3: positive clone Hind III + Xho I; 4, 5: negative clone Hind III + Xho I

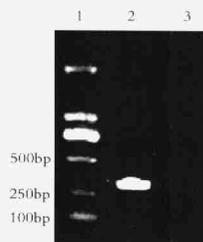


图3 PCR 鉴定重组质粒

1: DNA 分子标准; 2: PCR 鉴定阳性克隆; 3: PCR 鉴定阴性克隆

Fig.3 identification of recombinant plasmids by PCR

1: DNA marker; 2: positive clone; 3: negative clone

2.3 重组质粒序列测定和序列分析: 重组质粒送交北京三博远志生物技术公司测序, 目的序列测序结果提交 GenBank 进行 Blast 比对, 结果显示与流感病毒 A/PR/8/34 的 M2 基因同源性为 97%, 用 Primer Premier 5.0 软件和 ContigExpress Project 序列分析软件分析全长 291 个碱基中有 8 个不同导致 4 个氨基酸不同 (第 26 位 T-V, 第 38 位 T-I, 第 60 位 G-R, 第 69 位 K-T)。虽然仍然存在氨基酸的差异, 但位于 N 端的胞外区的 24 个氨基酸完全一样, 与报道<sup>[5]</sup>结果相符合, 证实了所克隆的片段正确。

### 3 讨论

M2 蛋白是甲型流感病毒的一种高度保守的跨膜蛋白, 在甲型流感病毒颗粒包膜上呈低密度表达, 平均每个病毒颗粒上有 10 个 M2 四聚体, 400 个血凝素三聚体, 100 个神经氨酸酶四聚体, 但在感染细

胞的胞膜上却是高密度表达 (与 HA 有相似的密度)<sup>[7]</sup>。M2 四聚体具有质子泵转运功能<sup>(5,8)</sup>, 能够协助病毒与宿主细胞膜融合再释放 RNP 复合体<sup>(9)</sup>; 同时还可降低将病毒跨膜蛋白由粗面内质网转运至胞膜的转运小泡的 pH 值, 从而阻止 HA 前体因酸性 pH 诱导引起的变构<sup>(10)</sup>。M2 蛋白所形成的离子通道可被金刚烷胺阻断<sup>(11)</sup>。Castrucci<sup>(12)</sup>利用金刚烷胺抗性为选择标准建立了甲型流感病毒 M 基因的反向遗传系统, 并利用该反向遗传系统证实 M2 羧基末端缺失谷氨酸的甲型流感病毒可产生金刚烷胺抗性, 但当病毒羧基末端缺失 5-10 个氨基酸残基则在有金刚烷胺存在的条件下不能继续复制繁殖。由此说明 M2 的羧基端在病毒的复制中起重要作用。

M2 蛋白的高度保守性和具有交叉保护能力特性使之成为新型的通用流感疫苗的突破口。Okau-da<sup>(13)</sup>和 Frace<sup>(14)</sup>等分别用表达完整的 M2 蛋白和表达缺失跨膜区的 M2 蛋白 (降低毒性和增加可溶性) 的质粒免疫动物, Neirynek<sup>(15)</sup>等则将 M2 蛋白保守性位点基因与乙型肝炎病毒核心蛋白进行融合表达的质粒接种动物。实验显示这几种质粒都诱导机体产生了保护作用, 不仅抑制了病毒生长繁殖, 而且降低了动物的死亡率。Watanabe<sup>(16)</sup>等进一步通过改造 M2 蛋白的离子通道活性来获得减毒活疫苗。Liu<sup>(17)</sup>等则发现针对 M2e (即 M2 蛋白胞外区的 24 个氨基酸) 中表位制备的单克隆抗体能产生良好的免疫保护作用。

pcDNA3.1 (+) 是一种真核表达质粒, 它携带有筛选用的 NEO 基因, 可用于稳定转染, 使外源蛋白表达量持续, 因而是本研究中较为理想的一种真核表达载体。本实验成功的构建了真核表达载体 pcDNA3.1 (+)/M2, 这为今后开展基因工程疫苗和核酸疫苗以及通用疫苗的进一步研究打下了基础。

### 参考文献:

- Potter CW. A History of influenza [J]. J Appl Microbiol, 2001, 91: 572-579.
- Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: Past and present [J]. Annu Rev Med 2000, 51: 407-421.
- Robinson H L. Nucleic acid vaccines: an overview [J]. Vaccine, 1997, 15: 785-787.
- Sugrue RJ, Hay AJ. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel [J]. Virology, 1991, 180: 617-624.
- Ito T, Gorman OT, Kawakawa Y, et al. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins [J]. J Virol, 1991, 65(10): 5491-5498.

株 *htpA* 基因与 Genbank 中嗜肺军团菌基因组 (YP-094723) 中相对应基因的核酸序列一致性为 98%, 分别于第 129(c→t)、183(a→t)、191(g→t) (箭头后为实测碱基) 位有三个碱基差异, 而二者翻译蛋白氨基酸序列一致性为 100%, 况且, 还不能排除此碱基差异不是在 PCR 扩增中由 DNA 聚合酶引入的错配造成的, 所以此一点也可佐证该蛋白在进化中结构功能上的保守性。嗜肺军团菌 HtpA 蛋白氨基酸序列与大肠杆菌 GroES、伯氏柯克斯体 *htpA*、肺炎衣原体、结核分支杆菌 10kDa 抗原同系物等小分子热休克蛋白具有较高的同源性, 提示它们具有相近的功能和生物学特性, 这些都需要今后多方的研究来证实。

我们构建了原核表达重组质粒 pG*htpA*, 并诱导其在宿主菌中成功表达出约 36kDa 的 GST-*htpA* 融合蛋白。下一步, 可以大量表达该融合蛋白, 经柱层析获得足量纯化融合蛋白, 继而对其进行酶切收获纯化的 HtpA 蛋白, 进而可对 HtpA 蛋白的结构及免疫学特性等进行多方面研究; 进而可将 *htpA* 与其它候选抗原、细胞因子、免疫佐剂分子等基因融合以构建核酸疫苗, 为探寻新的军团菌疫苗作尝试性研究。总之, 通过对嗜肺军团菌 *htpA* 基因及其表达产物的研究, 期望获得具有免疫原性和 (或) 佐剂功能的新型疫苗候选基因, 为军团菌感染的防治做

深入有益的探索和研究。

#### 参考文献:

- [1] N. P. Cianciotto, Pathogenicity of *Legionella pneumophila* [J]. Int J Microbiol, 2001, 291: 331 - 343.
- [2] Barry S. Fields, RF Benson, RE Besser et al, Legionella and legionnaires' Disease: 25 Years Investigation [J]. Clin Microbiology Reviews, 2002, 15(3): 506 - 526.
- [3] Paul S. Hoffman, Laura Houston, and Charles A. Butler, *Legionella pneumophila htpAB* Heat Shock Operon: Nucleotide Sequence and Expression of the 60-Kilodalton Antigen in *L. pneumophila*-Infected HeLa Cells [J]. Infect Immun, 1990, 58 (10): 3380 - 3387.
- [4] R Weeratna, D A Stamler, P H Edelstein, et al. Human and guinea pig immune responses to *Legionella pneumophila* protein antigens OmpS and Hsp60 [J]. Infect Immun. 1994, 62(8): 3454 - 3462.
- [5] F. 奥斯伯, R E 金斯顿等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998, 39: 366 - 37.
- [6] Chien M, Morozova I, Shi S, et al. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila* [J]. Science, 2004, 305 (5692): 1966 - 1968.
- [7] J. 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔著. 分子克隆实验指南 [M]. 第三版, 黄培堂等译, 北京: 科学出版社, 2002: 1228 - 1231.
- [8] Laemmli, U K, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680 - 685.
- [9] E. 哈洛, D. 莱恩, 抗体技术实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 159 - 186.
- [10] Lema MW, Brown A, Butler CA, et al. 1988. Heat-shock response in *Legionella pneumophila* [J]. Can J Microbiol, 34: 1148 - 1153.

收稿日期: 2005 - 01 - 06

(上接 159 页)

- [6] Slepshkin VA, Katz JM, Black RA, et al. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein [J]. Vaccine, 1995, 13: 1399 - 1402.
- [7] Zebedee SL, Lamb RA. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions [J]. J Virol, 1988, 62: 2762 - 2772.
- [8] Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity [J]. Cell 1992, 69: 517 - 528.
- [9] Zhirnov OP. Solubilization of matrix protein M1/M from virions occurs at different pH for orthomyxo- and paramyxoviruses [J]. Virology, 1990, 176: 274 - 279.
- [10] Steinhauer DA, Wharton SA, Skehel JJ, et al. Amantadine selection of a mutant influenza virus containing an acid-stable haemagglutinin glycoprotein: evidence for virus-specific regulation of the pH of glycoprotein transport vesicles [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 11525 - 11529.
- [11] Sansom MS, Kerr ID. Influenza virus M2 protein: a molecular modeling study of the ion channel [J]. Protein. Eng, 1993, 6(1): 65 - 74.

- [12] Castrucci MR, Kawaoka Y. Reverse genetics system for generation of an influenza A virus mutant containing a deletion of the carboxyl-terminal residue of M2 protein [J]. J Virol, 1995, 69(5): 2725 - 2785.
- [13] Okuda K, Ihata A, Watabe S, et al. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene [J]. Vaccine, 2001, 19: 3681 - 3691.
- [14] Frace AM, Klimov AI, Rowe T, et al. Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus [J]. Vaccine, 1999, 17: 2237 - 2244.
- [15] Neirynck 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: 1157 - 1163.
- [16] Tokiko Watanabe, Shinji Watanabe, Hiroshi Kida, et al. Influenza A virus with defective M2 ion channel activity as a live vaccine [J]. Virol, 2002, 299: 266 - 270.
- [17] Wanli Liu, Peng Zou, Ying-Hua Chen. Monoclonal antibodies recognizing EVETPIRN epitope of Influenza A virus M2 protein could protect mice from lethal Influenza A virus challenge [J]. Immunology Letters, 2004, 93: 131 - 136.

收稿日期: 2005 - 03 - 22