

H3N2 型猪流感病毒 M2 蛋白表达分析

王晓杜, 陈培君, 沈阳, 邱亚峰, 邓绪芳, 史子学, 彭丽娜, 罗金燕, 刘超, 马志永

中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

摘要: 流感病毒的 M2 蛋白在流感病毒复制中起着重要作用, 是抗流感病毒的靶标分子。本研究以提取的病毒基因组 RNA 作为模板, RT-PCR 扩增 H3N2 亚型猪流感病毒 M2 基因, 分别构建了重组原核表达载体和重组真核表达载体, 建立了 M2 蛋白的原核和真核表达系统。通过大肠杆菌表达系统, 制备了 M2 重组蛋白, 并免疫大鼠制备了多克隆抗体。Western blotting 和间接免疫荧光方法检测表明所制备的抗体能识别真核表达的 M2 蛋白和病毒感染细胞后表达 M2 蛋白, 具有良好的特异性。重组 M2 真核表达载体转染 Vero 细胞, 表达的重组 M2 蛋白大小为 20 kDa, 定位于细胞浆中, 与病毒感染细胞中的 M2 蛋白定位相同。Western blotting 检测表明 M2 蛋白在病毒感染细胞 12 h 后才能检出, 晚于 NS1、NP 和 M1, 属于病毒复制的晚期蛋白, 可作为病毒复制晚期的指示分子。本研究为弄清 M2 蛋白在病毒复制过程中的生物学功能奠定了基础。

关键词: H3N2, 猪流感病毒, M2 蛋白, 多克隆抗体

Characterization of M2 gene of H3N2 subtype swine influenza virus

Xiaodu Wang, Peijun Chen, Yang Shen, Yafeng Qiu, Xufang Deng, Zixue Shi, Lina Peng, Jinyan Luo, Chao Liu, and Zhiyong Ma

Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Shanghai 200241, China

Abstract: M2 protein of influenza A virus is encoded by a spliced mRNA derived from RNA segment 7 and plays an important role in influenza virus replication. It is also a target molecule of anti-virus drugs. We extracted the viral genome RNAs from MDCK cells infected with swine influenza A virus (SIV) H3N2 subtype and amplified the SIV M2 gene by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using the isolated viral genome RNAs as template. The amplified cDNA was cloned into a prokaryotic expression vector pET-28a(+) (designated pET-28a(+)-M2) and a eukaryotic expression vector p3xFLAG-CMV-7.1 (designated p3xFLAG-CMV-7.1-M2), respectively. The resulted constructs were confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. We then transformed the plasmid pET-28a(+)-M2 into *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain and expressed it by adding 1 mmol/L of IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). The recombinant M2 protein was purified from the induced bacterial cells using Ni²⁺ affinity chromatography. Wistar rats were immunized with the purified M2 protein for producing polyclonal antibodies specific for it. Western blotting analysis and immunofluorescence analysis showed that the produced antibodies were capable of reacting with M2 protein expressed in p3xFLAG-CMV-7.1-M2-transfected cells as well as that synthesized in SIV-infected cells. We also transfected plasmid p3xFLAG-CMV-7.1-M2 into Vero cells and analyzed its subcellular localization by immunofluorescence.

Received: September 4, 2009; **Accepted:** November 11, 2009

Supported by: Shanghai Pujiang Program (No. 07pj14109), Key Project of Basic Research for National Non-profit Fund of China (No. 2007JB0264).

Corresponding author: Zhiyong Ma. Tel: +86-21-34293139; E-mail: zhiyongma@shvri.ac.cn

上海市浦江人才计划 (No. 07pj14109), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金重点项目 (No. 2007JB0264) 资助。

The M2 protein expressed in the Vero cells was 20 kDa in size and dominantly localized in the cytoplasm, showing a similar distribution to that in SIV-infected cells. Western blotting analysis of SIV-infected cells suggested that M2 was a late phase protein, which was detectable 12 h post-infection, later than NS1, NP and M1 proteins. It would be a potential molecular indicator of late phases replication of virus. Our results would be useful for studying the biological function of M2 protein in SIV replication.

Keywords: swine influenza virus, H3N2 subtype, M2 protein, gene expression

近年来流感病毒给人类带来巨大灾难,特别是高致病性禽流感不仅给鸡群带来毁灭性打击,也给人类带来了生命的威胁。而猪作为人、禽流感的混合器,在兽医公共卫生方面具有重要的研究意义,猪流感病毒 (Swine influenza virus, SIV) 不仅给养猪业带来重要影响,也可能给人类带来威胁,最近爆发于墨西哥的甲型 H1N1 病毒就是来源于猪流感病毒形成的三元重配病毒,给人类带来了巨大灾难^[1],因此,研究猪流感病毒的发病机理就显得尤为重要,同时也可为人流感的防控提供一些依据。

流感病毒是由 8 个基因组 RNA 组成的负链病毒,目前已知编码 11 种蛋白。M2 蛋白单体由流感病毒基因组片段 7 编码的 97 个氨基酸组成,包含 3 个结构域:暴露在外面的 N 端 24 个氨基酸,跨膜区的 19 个疏水氨基酸和 C 端朝向病毒内部的 54 个氨基酸。流感病毒的 M2 蛋白是一种整合在病毒壳膜上的离子通道蛋白,它们形成同源四聚体的离子通道,每个单元之间是通过二硫键相连,离子通道能被低的 pH 值所激活。在流感病毒复制中,病毒 HA 蛋白与受体结合,随着细胞的内存作用,在胞内形成内噬体,暴露在低 pH 下的 M2 蛋白形成离子通道, H⁺ 进入病毒粒子内, HA 蛋白构型发生转换并且与膜发生融合,打开病毒粒子的壳膜,低 pH 值减弱 M1 和 RNP 蛋白之间的相互作用,释放 RNP 进入细胞核^[2-4],所以 M2 蛋白在病毒入侵中起到关键作用。金刚烷胺抗流感病毒药物就是利用此功能,抑制离子通道的产生,从而抑制流感病毒的复制。最近研究报道了 M2 蛋白跨膜区的 2 个不同结构的高清晰图片,揭示了抗流感病毒药物金刚烷胺的绑定位点^[5-6]。金刚烷胺既能影响所有 A 型流感病毒的脱壳^[7-8],也能在另外一些亚型流感病毒复制的晚期,通过阻止病毒的包装和出芽抑制其复制^[9]。流感病毒 M2 作为抗病毒药物靶标,尽管金刚烷胺的作用机制已经清楚,但是在临床中具有较强的副作用,

因此研究以 M2 蛋白为靶标分子的新型抗病毒药物,为防治流感的大爆发做好准备工作是至关重要的。

流感病毒 M2 蛋白在病毒复制中具有重要作用,又是抗病毒研究的重要靶标分子,本研究利用分子生物学方法,克隆了 H3N2 亚型猪流感病毒的 M2 基因,分别构建了重组原核表达载体和重组真核表达载体,制备了其特异性抗体,分析了 M2 的表达特性,为 M2 蛋白的相关研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

猪流感病毒 (A/Swine/Jiangsu/2/2006(H3N2))、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21、Vero 细胞、MDCK 细胞、原核表达质粒 pET-28a(+)、真核表达质粒 p3xFLAG-CMV-7.1 由本室保存。Wistar 大鼠购于中国科学院上海实验动物中心。

AMV 反转录酶、PCR 扩增用 Taq 酶、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、T 载体试剂盒购自宝生物公司;质粒抽提和 DNA 片段回收试剂盒购自博大泰克生物技术公司;His band 凝胶纯化柱购于 Novagen 公司;弗氏佐剂购于 Sigma 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂购于 Invitrogen 公司;DMEM 和胎牛血清购于 Gibco 公司;HRP 标记的羊抗小鼠 IgG、HRP 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗大鼠 IgG、FITC 标记的羊抗小鼠 IgG、FITC 标记的羊抗大鼠 IgG 购自 Santa Cruz 公司;ECL 发光试剂盒购于 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆与原核表达

流感病毒感染 MDCK 细胞 12 h 后,提取细胞总 RNA,利用 olig(d)T 作为反转录引物,AMV 酶反转录合成 cDNA,M2 基因编码区引物:上游 5'-TATGAA TTCATGAGCCTTCTAACCG-3';下游 5'-CGCGTCG ACTTACTCCAGCTCTATGTT-3',RT-PCR 扩增获得

一个约 300 bp 的产物。*EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切亚克隆到 pET-28a(+)载体上,构建 pET-28a(+)-M2 重组表达载体。

pET-28(a)-M2 重组表达载体转化进大肠杆菌 BL21(DE3)后, 1 mmol/L IPTG 诱导 3 h, 15% SDS-PAGE 检测蛋白表达情况, 筛选阳性克隆。

1.2.2 原核表达产物的纯化与免疫

上述鉴定好的克隆菌株, 扩大培养。参照 Marshak 等^[10]的方法提取包涵体, 利用 His-Band Ni²⁺ 柱进行亲和层析纯化, SDS-PAGE 检测纯化效果, 纯化后 M2 蛋白免疫 Wistar 大鼠 (100 µg/只), 第一次采用弗氏完全佐剂 (1:1), 后面免疫采用弗氏不完全佐剂每 2 周免疫 1 次, 连续免疫 5 次。乙醚麻醉后心脏采血, 收集血清。

1.2.3 真核表达载体的构建和重组蛋白真核表达

利用上游引物 5'-TATGAATTCGATGAGCCTTCTAACCG-3' 和下游引物 5'-CGCGTCGACTTACTCCAGCTCTATGTT-3', 以质粒 pET-28a(+)-M2 为模板 PCR 扩增, 亚克隆该片段到真核表达质粒 p3xFLAG-CMV-7.1 上, *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定阳性克隆。阳性克隆扩大培养, 利用大提试剂盒, 提取高纯度的重组质粒 p3xFLAG-CMV-7.1-M2。

根据试剂盒说明书上的方法, 利用脂质体 Lipofectamine 2000, 转染重组质粒 p3xFLAG-CMV-7.1-M2 到单层 Vero 细胞中, 转染 24 h 收取细胞样品, BCA 试剂盒测定样品蛋白浓度。

收集样品进行 15% 凝胶 SDS-PAGE 电泳, 转印到硝酸纤维素膜上, 室温封闭 2 h 后, 适当比例稀释的一抗室温孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次, HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 漂洗 5 次, 添加 ECL 发光试剂盒底物, 暗室曝光胶片显色。

1.2.4 M2 多克隆抗体的效价和特异性检测

采用间接 ELISA 方法检测其效价, 利用原核表达产物包被 ELISA 板, 将收集到的血清按不同稀释度加入孔内, 37℃作用 1 h, PBST 漂洗 3 次, 加入 HRP 标记的二抗 37℃作用 1 h, 漂洗 5 次后, 加入 TMB 底物避光显色 30 min, 然后在酶标仪上 450 nm 测定 OD 值。

5 个 MOI (Multiple of infection, 多重感染复数)

的 H3N2 猪流感病毒接种 Vero 细胞, 37℃孵育 1 h, 弃上清, 更换含有 TPCK 胰酶的 DMEM 维持液, 不同时间点收集细胞样品, 裂解细胞样品后, 利用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。然后利用上述方法, Western blotting 检测病毒表达的 M2 蛋白和其他病毒蛋白。

Vero 细胞生长在盖玻片上, 按照上述方法转染真核表达质粒和接种病毒, 24 h 后, 去除上清, PBS 洗涤 3 次, 加入固定液 (4% 甲醛: 10% 甲醇) 固定 20 min, PBS 洗涤 3 次, 37℃下用 1% NP40 处理 30 min, PBS 洗涤 3 次, 10% 羊血清 37℃封闭 30 min, PBS 洗涤 3 次, 适当比例的一抗 37℃孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 荧光标记的二抗 37℃孵育 30 min, TBS 洗涤 3 次, DAPI 室温染色 10 min, 封片剂封片, 荧光显微镜下观察蛋白的亚细胞定位。

2 结果与分析

2.1 M2 基因的克隆和原核、真核表达载体的构建

SIV 的 M2 基因是流感病毒片段 7 的剪切体, RT-PCR 扩增出大约 300 bp 的片段 (图 1a), 经 DNA 序列分析, 所克隆的 M2 基因的开放阅读框架为 294 bp, 编码 97 个氨基酸, 与 A/swine/Shandong/nc/2005(H9N2) 和 A/chicken/Jiangsu/wa/2002(H9N2) 同源性分别高达 100% 和 97%。将该片段纯化回收后, 亚克隆到 pET-28a(+)载体上, 构建 pET-28a(+)-SIV-M2 重组原核表达载体, PCR、酶切和测序鉴定获得阳性克隆 (图 1b)。将该片段亚克隆到真核表达载体 p3xFLAG-CMV-7.1 上, 获得 p3xFLAG-CMV-7.1-SIV-M2 重组真核表达载体, 酶切鉴定和测序鉴定获得阳性克隆 (图 1c)。

2.2 原核表达及纯化

重组表达质粒 pET-28 a (+)-M2 转化进大肠杆菌 BL21(DE3)中, 1 mmol/L IPTG 诱导 3 h 后收样, SDS-PAGE 检测蛋白表达情况, 结果显示 M2 蛋白得到较好表达, 分子量大小为 20 kDa 左右。该阳性克隆菌株经大量培养, 诱导表达, 超声破碎后, 得到包涵体沉淀, 然后利用 Novagen 公司的 His-band 亲和层析柱纯化所得重组蛋白, 纯化后经 SDS-PAGE 分析, 显示 M2 蛋白纯化效果较好 (图 2), 获得了比较纯的抗原以进一步制备抗体。

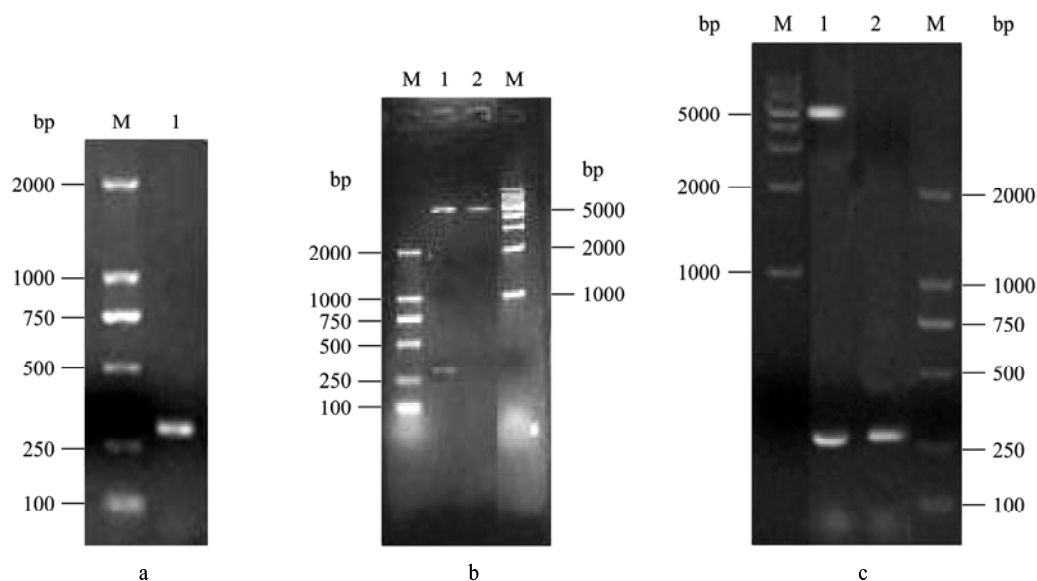


图1 SIV 的 M2 基因克隆和原核、真核表达重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 PCR amplification of swine influenza virus M2 gene and restricted enzymes digestion of pET-28a(+)-M2 and p3xFLAG-CMV-7.1-SIV-M2 plasmid. (a) PCR amplification of swine influenza virus M2 gene. M: DL2000 marker; 1: M2 PCR production. (b) Restricted enzymes digestion of pET-28a(+)-M2 plasmid. M: DL2000, 1 kb marker; 1: enzymes digestion of pET-28a(+)-M2; 2: enzymes digestion of pET-28a(+). (c) Restricted enzymes digestion of p3xFLAG-CMV-7.1-SIV-M2 plasmid. M: 1 kb, DL2000 marker; 1: enzymes digestion of p3xFLAG-CMV-7.1-SIV-M2; 2: PCR production of swine influenza virus M2 gene.

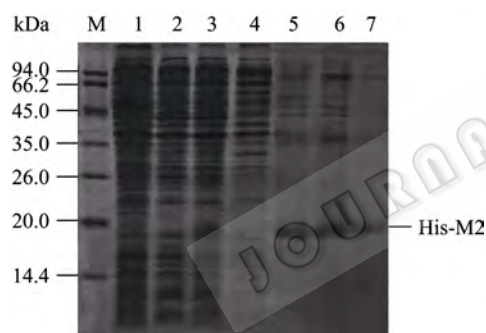


图2 SDS-PAGE 检测 pET-28a(+)-M2 的表达及纯化

Fig. 2 SDS-PAGE of inclusion bodies (pET-28a(+)-M2) and purification. M: protein marker; 1: lysate of BL21(pET-28a(+)) inducing by IPTG; 2: lysate of BL21 without inducing; 3: lysate of BL21(pET-28a(+)-M2) inducing by IPTG; 4: cracked supernatant BL21(pET-28a(+)-M2); 5-7: purification of inclusion bodies pET-28a(+)-M2.

2.3 抗 M2 抗体制备和特异性分析

2.3.1 抗 M2 抗体 ELISA 效价检测

高纯度的重组 M2 蛋白免疫 Wistar 大鼠, 重复 5 次免疫后麻醉心脏采血, 制备抗 M2 蛋白的抗血清。以原核表达的重组蛋白按适当浓度 (10–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 包被酶标板, 间接 ELISA 方法检测所制备血清效价, 结果显示 ELISA 效价为 1 : 12 800, 该抗体具有较高的效价。

2.3.2 Western blotting 检测真核表达及抗体特异性

M2 基因亚克隆到 p3xFLAG-CMV-7.1 真核表达

载体中, 转染试剂 Lipofectamine 2000 按说明书上的方法, 转染 2 μg 重组质粒 p3xFLAG-CMV-7.1-M2 至 Vero 细胞, 同时转染 p3xFLAG-CMV-7.1 和 p3xFLAG-CMV-7.1-M1^[11]作为对照, 收集转染细胞样品, 进行 Western blotting 检测, 一抗先用 M2 抗体 (1 : 1000) 显色, 显色完成后进行剥离, 去掉一抗, 然后加入抗 FLAG 标签的抗体, ECL 发光试剂盒显色, 显色结果见图 3。所制备的抗体能识别 M2 蛋白, 但不识别 M1, 表明具有良好的特异性。为了进一步验证这一结果, 使用流感病毒感染细胞样品检验了所制备抗体的特异性, 如图 4 所示, 流感病毒感染细胞样品检测到 M2 蛋白, 而对照没有, 表明所制备抗体的特异性良好, 可用于 M2 蛋白的研究。

2.4 病毒感染 Vero 细胞 M2 蛋白表达

5 个 MOI 流感病毒感染 Vero 细胞, 不同时间点进行取样, 同时设定未感染对照, 收集细胞样品, Western blotting 分析 M2 蛋白表达的时空变化, 并与病毒的 NS1、NP、M1 蛋白进行了比较。如图 4 所示, M2 蛋白在感染 12 h 才可被检测到, 其出现的时间点晚于病毒的 NS1、NP、M1 蛋白, 可以作为病毒复制的中后期标志蛋白。

2.5 间接免疫荧光检测 M2 蛋白亚细胞定位

Vero 细胞转染 p3xFLAG-CMV-7.1-M2 真核表达

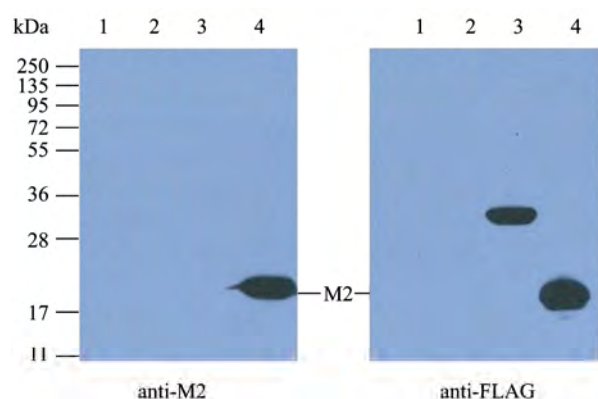


图3 重组流感病毒 M2 蛋白真核表达及其抗体特异性
Fig. 3 Eukaryotic expression of p3xFLAG-CMV-7.1-M2 and M2 antibody specificity. 1: blank control; 2: negative control (p3xFLAG-CMV-7.1); 3: FLAG-M1 protein; 4: FLAG-M2 protein.

质粒 24 h 后, 间接免疫荧光检测 M2 蛋白亚细胞定位。同时使用猪流感病毒感染 24 h 的 Vero 细胞为对照, 比较分析了 M2 蛋白的亚细胞定位。如图 5 所示, 真核表达的 M2 蛋白主要定位于细胞浆中, 病毒感染细胞中的 M2 蛋白也主要在胞浆中表达, 与真核转染的 M2 蛋白表达一致。

3 讨论

本研究克隆了猪流感 (A/Swine/jiangsu/2/2006 (H3N2)) M2 基因的全长编码区, 序列长度为 294 bp, 与 NCBI 上的序列比对分析表明, 其与 H9N2 亚型序列同源性高达 100% (A/swine/Shandong/nc/2005

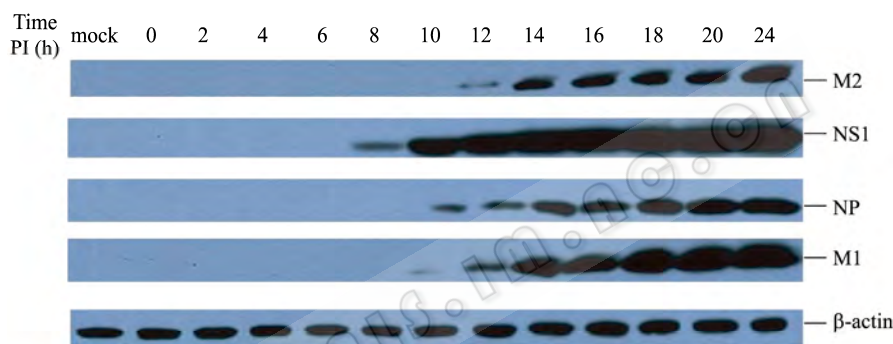


图4 病毒感染 Vero 细胞中不同蛋白时空表达情况以及 M2 抗体特异性

Fig. 4 Western blotting analysis the kinetics of viral protein expression of Vero cell infected with SIV and M2 antibody specificity. Mock is negative control, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 h were various times post-infection, expression analysis of SIV M2, NS1, NP, M1, β-actin were used as a protein loading control.

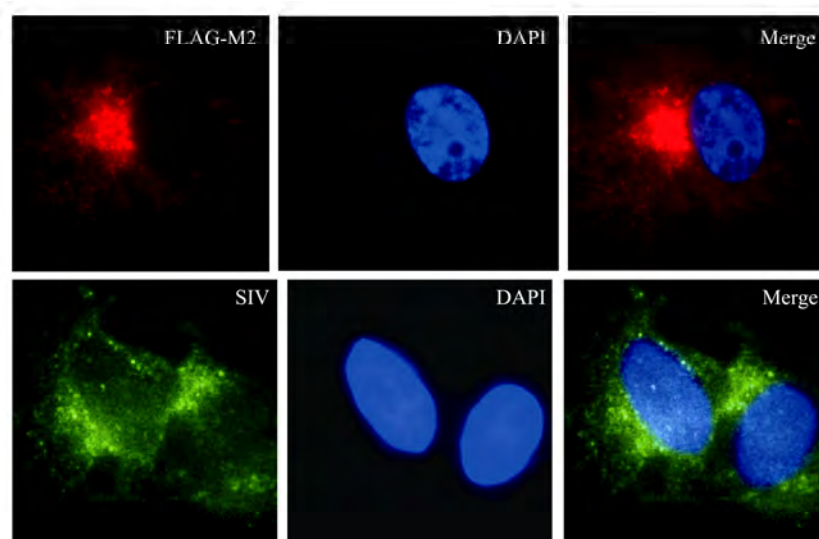


图5 免疫荧光对大鼠抗 M2 抗体特异性检测和流感病毒 M2 蛋白亚细胞定位

Fig. 5 Specificity analysis of M2 antibody and subcellular localization of SIV M2 protein. FLAG-M2 were stained with mouse anti-FLAG antibody (red). M2 protein of SIV infection were stained with rat anti-M2 antibody (green). The nucleus were stained with DAPI (blue). Merge is combined with two images.

(H9N2)) 和 97% (A/chicken/Jiangsu/wa/2002(H9N2))。这是由于流感病毒的遗传重组特性决定, 进化分析表明^[11], 该毒株与 H9N2 亲缘关系较近, 并且该病毒的 M2 和 H9N2 比较发现仅在 83 位和 88 位氨基酸由 A 变成 V, 这些突变没有改变氨基酸的性质, 推测该病毒在重配过程中 M 基因可能来源于 H9N2 毒株。

M2 蛋白在流感病毒复制中发挥重要作用, 本研究构建猪 H3N2 亚型流感病毒的 M2 重组原核表达和真核表达质粒, 建立了两种表达系统。利用原核表达系统制备较纯的抗原, 该方法制备的抗原具有便宜方便的特点。有研究表明 M2 蛋白膜外区具有高度保守性, 可以作为疫苗选择的对象^[12]。所以原核表达系统可以作为猪流感疫苗生产的一条途径。本研究建立的真核表达系统, 既能研究 M2 蛋白的亚细胞定位, 也能为研究该蛋白的功能打下基础。

本研究以原核表达产物免疫 Wistar 大鼠制备抗 M2 抗体, 具有较高的效价。特异性研究表明, 该抗体既能识别真核表达的 M2 蛋白, 同时也能识别病毒天然表达的蛋白, 为研究 M2 蛋白在病毒复制、病毒与细胞相互作用中所扮演的角色提供了较好的工具。在病毒感染细胞不同时间点取样, Western blotting 检测分析表明, M2 蛋白在病毒感染大约 12 h 后表达量开始急剧上升, 与病毒在此时间点复制速度增加密切相关^[13], NS1 蛋白最早出现, 标志着复制的开始, 由于 M2 蛋白出现时间稍微晚于其他早期蛋白, 因此该蛋白可以作为病毒复制晚期的标志。间接免疫荧光结果表明, 不管是在真核转染细胞中, 还是在病毒感染细胞中, M2 蛋白的亚细胞定位都是在胞浆中, 这与其离子通道蛋白的功能密切相关^[14]。

2009 年 3 月以来, 爆发在墨西哥的猪流感, 引起 100 多人死亡, 并迅速传播到全世界很多国家, 给人类带来巨大的灾难。本研究中的 M2 蛋白与新的甲型 H1N1 氨基酸序列分析表明, 它们之间存在 13、14、16、28、31、43、77、84、88 位氨基酸差异, 主要分布于 M2 蛋白的膜外区和膜内区, 跨膜区高度保守, 新型流感病毒毒力变化是否与此有关需要进一步研究。为了预防和控制流感的大爆发, 研究控制流感病的疫苗和药物已迫在眉睫, 本研究为以 M2 为靶标的抗流感药物研究提供了基础材料。

REFERENCES

- [1] Wang TT, Peter P. Unraveling the mystery of swine influenza virus. *Cell*, 2009, **137**: 983–985.
- [2] Bui M, Whittaker G, Helenius A. The effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus vRNPs. *J Virol*, 1996, **70**: 8391–8401.
- [3] Zhirnov OP. Isolation of matrix protein M1 from influenza viruses by acid-dependent extraction with nonionic detergent. *Virology*, 1992, **186**: 324–330.
- [4] Lamb RA, Krug RM. In Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2001: 1487–1531.
- [5] Stouffer AL, Acharya R, Salom D, *et al.* Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature*, 2008, **451**(7178): 596–599.
- [6] Schnell JR, Chou JJ. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature*, 2008, **451**(7178): 591–595.
- [7] Lamb RA, Zebedee SL, Richardson CD. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell*, 1985, **40**(3): 627–633.
- [8] Treanor JJ, Tierney EL, Zebedee SL, *et al.* Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *J Virol*, 1990, **64**(3): 1375–1377.
- [9] Ciampor F, Bayley PM, Nermut MV, *et al.* Evidence that the amantadine-induced, M2-mediated conversion of influenza A virus hemagglutinin to the low pH conformation occurs in an acidic trans Golgi compartment. *Virology*, 1992, **188**: 14–24.
- [10] Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR, *et al.* Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1996: 148–156.
- [11] Guo L, Wang XD, Ma ZY, *et al.* Cloning and characterization of M1 gene of H3N2 subtype swine influenza virus. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(5): 672–678.
郭林, 王晓杜, 马志永, 等. H3N2 亚型猪流感病毒 M1 基因克隆及表达特性分析. 生物工程学报, 2009, **25**(5): 672–678.
- [12] Ilyinskii PO, Gambaryan AS, Meriin AB. Inhibition of influenza M2-induced cell death alleviates its negative contribution to vaccination efficiency. *PLoS ONE*, 2008, **1**(e1417): 1–4.
- [13] Shen Y, Wang XD, Ma ZY, *et al.* Influenza A virus induces p53 accumulation in a biphasic pattern. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **382**(2): 331–335.
- [14] Sugrue RJ, Hay AJ. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology*, 1991, **180**: 617–624.