

## H3N2 亚型猪流感病毒 M1 基因克隆及表达特性分析

郭林<sup>1,2</sup>, 王晓杜<sup>1</sup>, 刘庆伟<sup>1</sup>, 沈阳<sup>1</sup>, 邱亚峰<sup>1</sup>, 李向东<sup>1</sup>, 罗满林<sup>2</sup>, 马志永<sup>1</sup>

1 中国农业科学院 上海兽医研究所兽医公共卫生研究室, 上海 200241

2 华南农业大学兽医学院, 广州 510642

**摘要:** 从 H3N2 亚型猪流感病毒感染的鸡胚尿囊液中提取病毒基因组 RNA, 采用 RT-PCR 方法克隆 M1 全长基因, 将 M1 基因亚克隆至 pET-28a(+) 表达载体中, 构建重组表达质粒 pET-28a-M1, 将该重组质粒转化大肠杆菌 BL21 并经 IPTG 诱导表达。诱导产物经 SDS-PAGE 电泳分析显示重组蛋白 M1 获得大量表达, 表达蛋白纯化后免疫 Wistar 大鼠制备多克隆抗体。Western blotting 检测结果表明制备的抗 M1 蛋白多克隆抗体可以识别大肠杆菌表达的 M1 蛋白和病毒感染细胞的病毒 M1 蛋白。构建 M1 基因真核重组质粒 p3xFLAG-CMV-7.1-M1 并转染 Vero 细胞, Western blotting 检测表明抗 M1 蛋白多克隆抗体可以识别在 Vero 细胞中得到表达的 M1 蛋白, 成功建立 M1 基因的真核表达系统。分析了病毒感染过程中 M1 蛋白的变化及其作为病毒复制指示分子的可能性。鼠源 M1 蛋白多克隆抗体的制备和 M1 基因真核重组表达质粒的构建, 为进一步研究猪流感病毒的复制机理以及 M1 蛋白在病毒复制过程中的生物学功能奠定了基础。

**关键词:** 猪流感病毒, M1 基因, 克隆, 基因表达

## Cloning and characterization of M1 gene of H3N2 subtype swine influenza virus

Lin Guo<sup>1,2</sup>, Xiaodu Wang<sup>1</sup>, Qingwei Liu<sup>1</sup>, Yang Shen<sup>1</sup>, Yafeng Qiu<sup>1</sup>, Xiangdong Li<sup>1</sup>, Manlin Luo<sup>2</sup>, and Zhiyong Ma<sup>1</sup>

1 Department of Veterinary Public Health, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

2 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510624, China

**Abstract:** Influenza A virus matrix protein (M1) is encoded by a spliced mRNA derived from RNA segment 7 and plays an important role in the virus life cycle. In the present study, we extracted the viral genome RNAs from allantoic fluid of 9-day-old embryonated chicken eggs infected with swine influenza A virus (SIV) H3N2 subtype and amplified the SIV M1 gene by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using the isolated viral genome RNAs as template. The amplified cDNA was cloned into an expression vector pET-28a (+) (designated pET-28a-M1) and confirmed by DNA sequencing analysis. We then transformed the plasmid pET-28a-M1 into *Escherichia coli* BL21 strain for heterologous expression. The expression of M1 was induced by 1mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside. SDS-PAGE analysis of the induced bacterial cells revealed that the recombinant M1 protein was expressed in high yield level. Next, we purified the expressed recombinant M1 using Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography and immunized Wistar rat with the purified M1 protein for producing polyclonal antibodies specific for M1. Western blotting analysis showed that the produced antibodies were capable of reacting with M1 protein expressed in *Escherichia coli* as well as that

**Received:** November 11, 2008; **Accepted:** February 19, 2009

**Supported by:** Shanghai Pujiang Program (No. 07pj14109), Project of Basic Research for National Non-profit Institute of China (No. 64).

**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. 64)资助。

synthesized in SIV-infected cells. We further cloned the amplified M1 cDNA into a eukaryotic expression plasmid p3xFLAG-CMV-7.1 to construct the recombinant plasmid p3xFLAG-CMV-M1 for expressing M1 in eukaryotic cells. Western blotting analysis revealed that the M1 protein was expressed in p3xFLAG-CMV-M1-transfected Vero cells and recognized by the produced anti-M1 antibodies. Using the produced anti-M1 antibodies, we analyzed the kinetics of M1 protein in the virus-infected cells during influenza virus infection and estimated the possibility of M1 as an indicator of influenza virus replication. The recombinant M1 protein, anti-M1 antibodies and recombinant expression plasmids would provide useful tools for studies of biological function of M1 protein and the basis of SIV replication.

**Keywords:** swine influenza virus, M1 gene, cloning, gene expression

猪流感是由猪流感病毒(Swine influenza virus, SIV)引起的严重危害养猪业的重要呼吸道传染病,自1930年从猪体中首次分离到了H1N1亚型猪流感病毒以来,到目前,猪流感(Swine influenza, SI)已遍布美、欧、亚、非等世界各地<sup>[1,2]</sup>。在我国,猪流感在猪群中的流行日渐严重,呈现不断蔓延的趋势,其中以H3亚型为主,H3亚型在全国范围内流行<sup>[3,4]</sup>。同时,H3亚型流感病毒也是人流感病毒的一个主要亚型,受到人们关注。并且猪呼吸道上皮细胞具有感染人流感病毒和禽流感病毒的受体而成为毒株间基因重组的活载体<sup>[5-7]</sup>。因此,对H3N2亚型猪流感的研究具有重要的公共卫生学意义。

猪流感病毒是正粘病毒科A型流感病毒属的成员,其基因组的第7节段RNA转录过程中,经剪接合成2条不同的mRNA,指导翻译M1和M2基质蛋白。M1由252个氨基酸组成,是病毒的主要结构蛋白,占流感蛋白总量的30%~40%。M1具有型特异性,是流感病毒分型的主要依据之一<sup>[8,9]</sup>。M1是一种多功能蛋白,参与病毒生活周期的数个环节<sup>[10]</sup>,如在病毒感染细胞时,参与病毒脱壳,释放核糖核蛋白;与核糖核蛋白体(vRNP)结合使其从细胞核内转移到核外;以及直接与vRNP核接触来介导抑制流感转录酶的活性<sup>[11]</sup>。此外,M1还具有膜连接和RNA连接功能<sup>[12]</sup>以及控制病毒转录、控制被感染细胞中核膜内外物质运输等功能<sup>[13]</sup>。上述研究结果表明M1是一种参与病毒复制的结构蛋白,可以用作研究病毒复制等的候选蛋白。

猪既可感染人流感病毒又可感染禽流感病毒,是流感病毒的自然宿主,因此,猪是流感病毒研究的重要动物模型。目前国内外对于SIV的M1基因的研究很少,研究多集中在基因克隆和原核表达<sup>[14]</sup>、抗体调查<sup>[15]</sup>、基因进化分析<sup>[16]</sup>等,没有对M1的生物学功能进行深入的研究。本研究利用分子

生物学技术及基因表达技术对H3N2亚型猪流感病毒M1基因进行了克隆、表达、纯化及抗体的制备,建立了M1基因的真核表达系统,并使用所制备的抗体对M1的表达特性进行了分析,为研究猪流感病毒M1蛋白的功能及其在病毒复制中的作用机理奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒毒株

H3N2亚型(A/Swine/Jiangsu/2/2006(H3N2))猪流感病毒由中国农业科学院上海兽医研究所兽医公共卫生研究室保存。

### 1.2 主要试剂

T4 DNA连接酶、*Tfi* DNA Polymerase、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000转染试剂购自Invitrogen公司; His Bank Kits蛋白质纯化试剂盒购自Novagen公司; 各种限制性内切酶、pMD-18T simple载体购自TaKaRa公司; 小片段DNA纯化回收试剂盒购自博大泰克公司; 普通质粒小量提取试剂盒购自TIANGEN公司; 蛋白质预染marker购自晶美公司; 鼠源抗FLAG单克隆抗体购自Sigma公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒、HRP标记羊抗小鼠IgG、HRP标记羊抗大鼠IgG购于碧云天生物研究所; ECL发光试剂盒购自Pierce公司; 其他所需试剂和溶液参照《分子克隆实验指南》准备。

### 1.3 M1基因的克隆、原核表达和抗体制备

采用常规的酚-氯仿、乙醇沉淀方法,从接种H3N2亚型SIV的鸡胚尿囊液中提取RNA,用primer 5.0软件设计猪流感病毒M1基因的一对特异性引物,含EcoRI和SalI限制性酶切位点,进行RT-PCR扩增,预期扩增片段长度为759 bp。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳回收后酶切,连接到原核表达载体pET-28a的EcoRI-SalI酶切位点,并转化BL21(DE3)

大肠杆菌感受态细胞获得重组质粒 pET-28a-M1。经 PCR 和酶切鉴定的阳性克隆菌送上海英俊公司测序。pET-28a-M1 重组质粒阳性克隆菌落, 经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导, 取不同诱导时间的菌体, 12% SDS-PAGE 分析重组蛋白表达情况。根据最适条件扩大菌液培养量, 按照 His Bank Kits 说明书进行蛋白纯化, BCA 法测定总蛋白浓度。重组 M1 蛋白纯化鉴定后, 按 200  $\mu$ g/只剂量免疫 Wistar 大鼠, 弗氏佐剂为免疫佐剂, 每 2 周免疫 1 次, 设立未免疫 Wistar 大鼠为阴性对照组。间接 ELISA 法检测抗体效价。Western blotting 分析所制备抗体的特异性, 简述为: 用同样方法表达、纯化的重组 M1 蛋白和重组 NS1 蛋白(另文发表)电转印至 NC 膜上, 丽春红 S 染色; 显色后用 PBS 漂洗 3~5 次后, 以抗 M1 蛋白多克隆抗体为一抗, 以 HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG 为二抗, 进行 Western blotting 检测。SIV 感染 MDCK 细胞 12 h 后收集细胞, 设立未感染细胞为阴性对照, 细胞样品裂解处理后按以上方法进行 Western blotting 检测。Western blotting 显色方法采用 Pierce 公司的 ECL 发光试剂盒的方法。

#### 1.4 M1 基因真核表达载体的构建和真核表达

M1 基因的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收后酶切, 连接到真核表达载体 p3XFLAG-CMV-7.1 的 *EcoR* I-*Sal* I 酶切位点, 并转化 Top10 大肠杆菌感受态细胞获得重组质粒 p3XFLAG-CMV-7.1-M1(简称 FLAG-CMV-M1), 经 PCR 和酶切鉴定的重组质粒 FLAG-CMV-M1 送上海英俊公司测序。以脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 为转染试剂, 按说明书提供的方法, 将重组质粒 FLAG-CMV-M1 和对照空质粒 p3XFLAG-CMV-7.1 分别转染 Vero 细胞, 转染 24 h 后收集细胞样品, 以鼠源 FLAG 单克隆抗体作为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 进行 Western blotting 检测; Reprobing 时, 先用 stripping 缓冲液除去 NC 膜上的鼠源 FLAG 单克隆抗体, 再以抗 M1 蛋白多抗血清为一抗, 以 HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG 作为二抗, 进行 Western blotting 检测。

#### 1.5 在病毒感染过程中, M1 蛋白的表达检测

利用制备的抗 M1 蛋白抗体, 分析了 SIV 复制过程中 M1 蛋白的变化。SIV(感染复数为 2)经 1 h 吸附 MDCK 细胞后改换维持液(此时计时为 0 h), 每隔 1 h 采样 1 次, 直至 12 h。所有样品经 BCA 法测

定总蛋白浓度后, 等量(30  $\mu$ g)样品用于 Western blotting 分析。

#### 1.6 M1 蛋白作为病毒复制的指示分子

病毒一步生长曲线参考 Turpin 等<sup>[17]</sup>的方法进行, 简述为: 感染复数为 5 的 SIV 经 1 h 吸附 MDCK 细胞后改换维持液(此时计时为 0 h), 每隔 2 h 采样 1 次, 上清用于测定病毒毒价 TCID<sub>50</sub>, 病毒毒价滴定按常规方法进行; 细胞用于 Western blotting 检测 M1 蛋白, 所有样品经 BCA 法测定总蛋白浓度后, 等量(30  $\mu$ g)样品用于 Western blotting 分析。

## 2 结果

### 2.1 M1 基因克隆及原核、真核重组表达载体的构建和鉴定

琼脂糖凝胶电泳表明, 克隆的 M1 基因片段大小约为 759 bp, 与预期结果一致(图省略)。构建的 M1 基因原核表达载体 pET-28a-M1 和真核表达载体 FLAG-CMV-M1 经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切、PCR 鉴定后, 表明 M1 基因成功克隆到上述表达质粒(图省略), 并经测序分析进行了验证。

### 2.2 M1 基因核苷酸序列分析

pET-28a-M1 重组质粒的测序结果表明, 克隆的 M1 基因片段大小为 759 bp, 包含完整的 ORF, 编码 252 个氨基酸。与已发表的 A 型流感病毒 M1 基因核苷酸序列同源性分析结果表明, 本实验克隆的 M1 基因与毒株(A/Chicken/Jiangsu/wa/2002(H9N2)) M1 基因处于一个分支上, 序列同源性为 99%, 与毒株(A/Swine/Shandong/nc/2005(H9N2)) M1 基因序列的同源性为 98%, 与毒株(A/Swine/Shandong/w4/2003(H9N2))、(A/Swine/Jiangxi/wx2/2004(H9N2))、(A/Swine/Hangzhou/1/2006(H9N2))、(A/Swine/Jiangxi/1/2004(H9N2)) M1 基因序列同源性为 97%, M1 基因的系统进化树如图 1 所示。

### 2.3 M1 重组蛋白的表达和纯化

SDS-PAGE 电泳结果表明, 含 pET-28a-M1 重组质粒的 BL21(DE3)大肠杆菌经浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导后有预期的蛋白表达, 其分子量约为 30 kD, 如图 2 所示, 加 IPTG 的空白 pET-28a 对照样品则未见特异条带, 证明该 30 kD 蛋白带是 M1 基因表达产物。根据最适条件扩大菌液培养量, 用 His Bank Kits 进行 M1 蛋白的纯化。经 BCA 蛋白浓度测

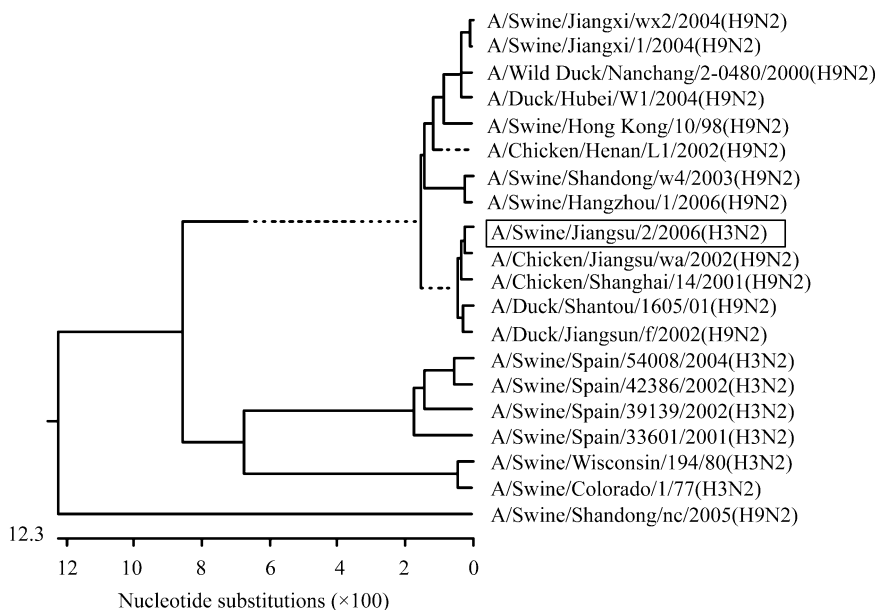


图 1 猪流感病毒 M1 基因的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of M1 gene.

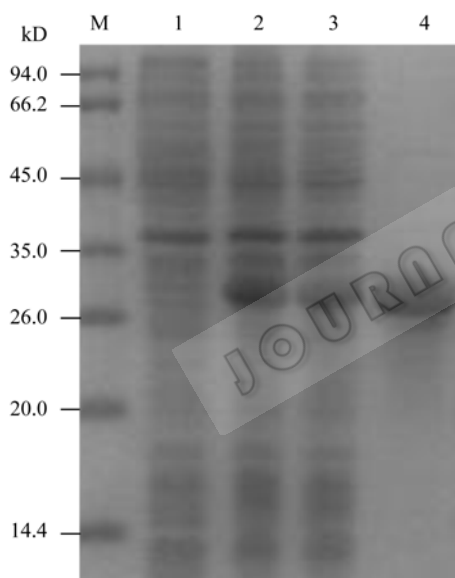


图 2 表达质粒 pET-28a-M1 在大肠杆菌 BL21 中诱导表达产物 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant M1 expressed in *E. coli* BL21. M: protein marker; 1: pET-28a vector induced with IPTG; 2-3: pET-28a-M1 induced with IPTG; 4: purification of pET-28a-M1 products.

定试剂盒, 测定重组蛋白浓度可以达到  $3.97 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 纯度达到 90% 以上。

## 2.4 抗 M1 蛋白多克隆抗体的制备和 ELISA 检测

M1 蛋白纯化鉴定后免疫 Wistar 大鼠, 5 次免疫后大鼠采血制备血清, 用间接 ELISA 法检测抗体水

平, 血清抗体效价可以达到  $10^4$ , 结果显示抗体水平较高。

## 2.5 抗 M1 蛋白多克隆抗体的特异性分析

### 2.5.1 M1 基因原核表达产物和病毒 M1 蛋白 Western blotting 检测

由于重组 M1 蛋白 N 端带有 His 标签, 为了排除所制备的抗体与 His 标签反应的可能性, 同样方法表达制备的 M1 蛋白和 NS1 蛋白电转印至 NC 膜上, 丽春红 S 染色, M1、NS1 泳道都出现目的条带 (M1 大小约为 30 kD, NS1 大小约为 28 kD, 图 3A), 表明 M1、NS1 蛋白成功转至 NC 膜上; 显色后用 PBS 漂洗 3~5 次, 以抗 M1 蛋白多克隆抗体为一抗进行 Western blotting 检测, 显色后 M1 蛋白泳道出现特异性条带, 阴性对照 NS1 蛋白泳道没有特异性条带 (图 3B), 表明抗 M1 蛋白多克隆抗体可以特异的识别纯化的 M1 蛋白。为了进一步验证 M1 抗体的特异性, SIV 感染 MDCK 细胞 12 h 后收集细胞样品, 设立未感染 MDCK 细胞样品为阴性对照, 以抗 M1 蛋白多克隆抗体为一抗进行 Western blotting 检测, 显色后病毒感染细胞样品出现特异性条带, 阴性对照不显色 (图 3C), 表明抗 M1 蛋白多克隆抗体可以特异性识别猪流感病毒 M1 蛋白。

### 2.5.2 M1 基因真核表达产物 Western blotting 检测

FLAG-CMV-M1 质粒和对照质粒 p3XFLAG-

CMV-7.1 转染 Vero 细胞后, 用鼠源 FLAG 单克隆抗体进行 Western blotting 检测, 结果显示转染重组质粒 FLAG-CMV-M1 的 Vero 细胞样品约在 36 kD (FLAG 标签大小约 6 kD) 处有一特异性条带, 转染对照质粒 p3XFLAG-CMV-7.1 的 Vero 细胞样品无此条带(图 4A), 表明 M1 基因已被成功转染入 Vero 细胞并得到表达; 用已制备的抗 M1 蛋白多克隆抗体对同一 NC 膜进行 Western blotting 检测, 结果显示转染重组质粒 FLAG-CMV-M1 的 Vero 细胞样品约 36 kD 处有一特异性条带, 转染对照质粒 p3XFLAG-CMV-7.1 的 Vero 细胞样品无此条带, 证明 Vero 细胞中表达的 M1 蛋白可以被抗 M1 蛋白多克隆抗体识别(图 4B)。

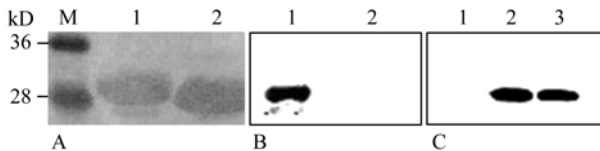


图 3 重组蛋白 M1、NS1 丽春红 S 染色结果(A)和抗 M1 蛋白抗体与重组蛋白 M1、NS1 及与猪流感病毒 M1 蛋白反应结果(B 和 C)(Western blotting)

Fig. 3 Staining result of ponceau S of recombinant M1 and NS1 protein (A) and Western blotting analysis of the reactivity of antiserum with recombinant M1 and NS1 protein and SIV M1 protein (B and C). M: protein marker; (A and B) 1: protein M1; 2: protein NS1. (C) 1: control MDCK cells; 2-3: MDCK cells infected with H3N2 SIV.

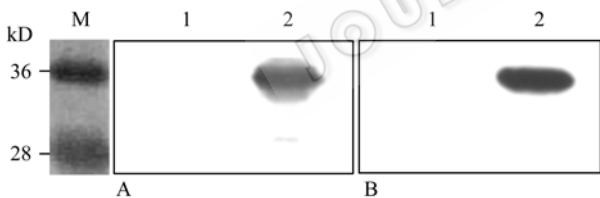


图 4 FLAG 单克隆抗体(A)和抗 M1 蛋白多克隆抗体(B)与 M1 基因细胞表达产物反应结果(Western blotting)

Fig. 4 Western blotting analysis of the expression of M1 gene in Vero cells using FLAG monoclonal antibodies (A) and the produced antiserum (B). M: protein marker; 1: control p3XFLAG-CMV-7.1-transfected vero cells; 2: p3XFLAG-CMV-M1-transfected vero cells.

## 2.6 SIV 复制过程中 M1 蛋白的表达检测

利用上述所制备的抗 M1 蛋白抗体, 分析了 SIV 复制过程中 M1 蛋白的变化。用 1.5 中的方法进行 Western blotting 分析。如图 5 所示, SIV (感染复数为 2) 感染 MDCK 细胞 5 h 后开始检测到 M1 蛋白, 随着病毒复制时间的延长 M1 蛋白表达量也增加, 在

10 h 后基本达到高峰并维持不变。

## 2.7 M1 蛋白作为病毒复制的指示分子

流感病毒 M1 蛋白是一个保守的、高丰度的病毒复制晚期结构蛋白, 在病毒复制的多个方面起着重要的作用<sup>[10]</sup>。利用上述所制备的抗 M1 蛋白抗体, 分析了 M1 蛋白是否可以作为流感病毒复制的指示分子。为了能够在病毒吸附后检测到病毒, 所使用的 SIV 感染复数为 5。如图 6 所示, 病毒吸附后(0 h), Western blotting 就可以检测到 M1 蛋白, 表明病毒已经进入了细胞, 到 4 h, 病毒的滴度开始上升, 此时 M1 蛋白的量也略有增加。此后, 随着病毒滴度的上升, M1 蛋白的量也增加, 二者有着良好的相关性, 表明 M1 可以作为病毒复制的指示分子。

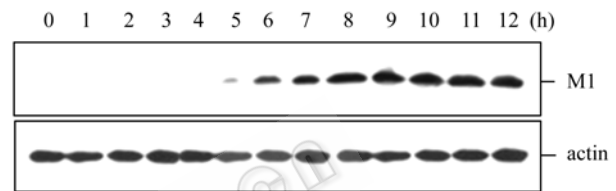


图 5 Western blotting 分析流感病毒复制过程中 M1 蛋白的变化

Fig. 5 Western blotting analysis of the kinetics of M1 expression in MDCK cell infected with SIV.

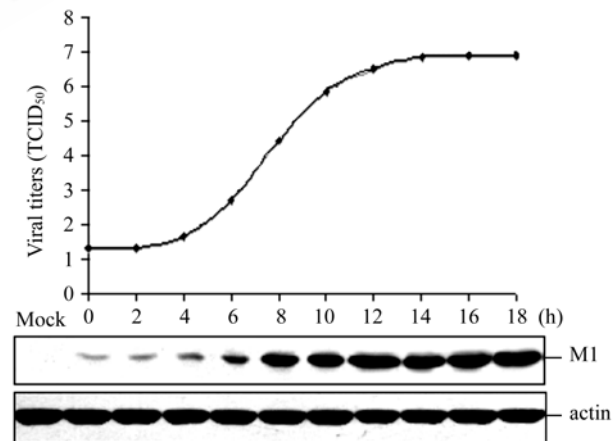


图 6 M1 蛋白作为病毒复制的指示分子

Fig. 6 M1 as an indicator of influenza virus replication.

## 3 讨论

M1 作为 SIV 的主要结构蛋白, 是开展研究 SIV 复制机理的候选蛋白。M1 蛋白还是一个多功能的蛋白, 在病毒粒子中, vRNP 和囊膜通过 M1 蛋白相互连接, 病毒蛋白 NS2 与连接有 M1 蛋白的 vRNP 有着密切关系<sup>[18]</sup>。vRNP 的核输出发生在病毒感染晚

期, 有证据证明 M1 蛋白在 vRNP 的核输出过程中是必需的<sup>[19]</sup>; M1 在 vRNP 的核输出过程中的作用可能是保护 vRNP 经核孔顺利输出, 也可能是 vRNP 从核基质释放过程中所必需的, 另外一种作用可能是 M1 蛋白作为 vRNP 在细胞质中的伴随分子可以阻止 vRNP 再输入细胞核<sup>[20]</sup>。Huang 等<sup>[21]</sup>则提出可能是 M1 蛋白与 vRNP 以及 NP 蛋白的共同作用使 vRNP 从细胞核转移到细胞质。上述研究结果表明 M1 蛋白在 vRNP 的核输出过程中起着不可缺少的作用, 影响着子代病毒的装配和释放, M1 蛋白的研究对于探索 SIV 感染的分子机制具有重要意义。

流感病毒不同亚型之间的基因重配是产生新的病毒亚型的重要途径。M1 基因核苷酸序列同源性分析结果表明, 本实验克隆的 M1 基因与已发表的 H9N2 亚型流感病毒的 M1 基因的序列同源性在 97%~99%, 推测本实验 H3N2 亚型猪流感病毒株的 M1 基因可能来源于 H9N2 亚型流感病毒株, 本研究所使用的病毒株可能是不同亚型的重组病毒。SIV 基因重配问题不仅给猪流感的防控工作带来挑战, 也给公共卫生安全埋下巨大的隐患。

本研究构建了 M1 基因的原核重组表达质粒 pET-28a-M1, 在大肠杆菌中大量表达的重组蛋白 M1, 经纯化后可以作为间接 ELISA 诊断抗原, 为下一步建立 ELISA 抗体诊断试剂盒奠定了基础; M1 基因具有型特异性, 重组蛋白免疫试验动物制备的多克隆抗体可以用于检测病毒抗原, 以建立猪流感的 ELISA 鉴别诊断试剂盒。抗 M1 蛋白多克隆抗体具有良好的特异性, 在 Western blotting 检测中可以识别大肠杆菌表达的 M1 蛋白和感染细胞中病毒特异性 M1 蛋白, 可以进一步用于 M1 蛋白功能分析。本研究构建的 M1 基因真核重组表达质粒 FLAG-CMV-7.1-M1 并转染 Vero 细胞, Western blotting 检测表明 M1 基因已被成功转染入 Vero 细胞并得到表达; Vero 细胞表达的 M1 蛋白可以被抗 M1 蛋白多克隆抗体识别, 再次证明抗 M1 蛋白多克隆抗体的良好特异性。本研究成功建立了 M1 基因的真核表达系统, 可以用此真核表达系统为工具, 进一步研究 M1 蛋白在 SIV 感染细胞后 M1 蛋白的细胞定位以及 M1 蛋白转录活性变化, 为研究 M1 蛋白在 SIV 复制中信号传导的作用和 SIV 感染细胞信号传导通路的分子机制提供了前期基础。

通过抗 M1 蛋白多克隆抗体的应用研究, 发现 SIV 感染 MDCK 细胞 4~5 h 后开始检测到 M1 蛋白的变化, 随着病毒复制时间的延长 M1 蛋白表达量也增加, 并与病毒滴度变化有良好的相关性。这一发现表明 M1 蛋白可以作为 SIV 感染复制的指示分子, 用于流感病毒研究的多个方面。根据 SIV 感染 MDCK 细胞后 M1 蛋白表达量的变化趋势推测 SIV 在 MDCK 细胞上的一个复制周期约为 10 h, 为进一步研究 SIV 复制机制以及与感染细胞相互作用的分子机制奠定了基础。

致谢 感谢中国农科院上海兽医研究所农业部寄生虫病重点实验室提供的实验设备。

## REFERENCES

- [1] Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, *et al.* Disease of Swine. 8th Ed. Ames, Iowa, USA: Iownd Sstate Press, 1999: 277-290.
- [2] Harlbur PG. Defining the causes of PRDC[C]. Swine consultant, Pfizer Animal Health, 1996, fall: 4-15.
- [3] Li HY, Yu KZ, Xin XG, *et al.* Serological studies versus isolation and identification of swine influenza virus in different regions in China. *Prog Vet Med*, 2003, **24** (3): 67-72.  
李海燕, 于康震, 辛晓光, 等. 部分省市猪流感的血清学调查及猪流感病毒的分离与鉴定. *动物医学进展*, 2003, **24** (3): 67-72.
- [4] Li HY, Li YB, Yu KZ, *et al.* Isolation and identification of swine influenza virus. *Chin J Prev Vet Med*, 2002, **24** (1): 12-17.  
李海燕, 李雁冰, 于康震, 等. 猪流感病毒的分离与鉴定. *中国预防兽医报*, 2002, **24** (1): 12-17.
- [5] Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: Our current understanding of the zoonotic risk. *Vet Res*, 2007, **38**(2): 243-260.
- [6] Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, *et al.* Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(4): 1651-1656.
- [7] Ito T, Kawaoka Y, Vines A, *et al.* Continued circulation of reassortant H1N2 influenza viruses in pigs in Japan. *Arch Virol*, 1998, **143**(9): 1773-1782.
- [8] Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, *et al.* Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus matrix gene segment. *J Virol*, 2002, **76**(21): 10717-10723.
- [9] Itoh M, Hotta H. Structure, function and regulation of expression of influenza virus matrix M1 protein. *Nippon Rinsho*, 1997, **55**(10): 2581-2586.
- [10] Helenius A. Unpacking the incoming influenza virus. *Cell*,

- 1992, **69**(4): 577–578.
- [11] Elster C, Larsen K, Gagno J, *et al.* Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. *J Gen Virol*, 1997, **78** (Pt 7): 1589–1596.
- [12] Sha B, Luo M. Structure of a bifunctional membrane RNA binding protein: influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol*, 1997, **4**(3): 239–244.
- [13] Watanabe K, Handa H, Mizumoto K, *et al.* Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J Virol*, 1996, **70**(1): 241–247.
- [14] Wang FK. Prokaryotic expression of M1, NS1 and NP gene of H9N2 swine influenza virus and development of ELISA based on recombinant protein NP. MS thesis, Shandong Agricultural University, 2007.  
王方昆. H9N2 亚型猪流感病毒 M1、NS1、NP 基因的原核表达和 NP-ELISA 检测技术的研究. 山东农业大学硕士学位论文, 2007.
- [15] Kitikoon P, Strait EL, Thacker EL. The antibody responses to swine influenza virus (SIV) recombinant matrix 1 (rM1), matrix 2 (M2), and hemagglutinin (HA) proteins in pigs with different SIV exposure. *Vet Microbiol*, 2008, **126**(1–3): 51–62.
- [16] Welman M, Arora DJ. Genomic analysis of matrix gene and antigenic studies of its gene product (M1) of a swine influenza virus (H1N1) causing chronic respiratory disease in pigs. *Virus Genes*, 2000, **21**(3): 157–165.
- [17] Turpin E, Luke K, Jones J, *et al.* Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication. *J Virol*, 2005, **79**(14): 8802–8811.
- [18] Yasuda J, Nakada S, Kato A, *et al.* Molecular assembly of influenza: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology*, 1993, **196**(1): 249–255.
- [19] Martin K, Helenius A. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*, 1991, **67**(1): 117–130.
- [20] Whittaker G, Bui M, Helenius A. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J Virol*, 1996, **70**(5): 2743–2756.
- [21] Huang X, Liu T, Muller J, *et al.* Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export. *Virology*, 2001, **287**(2): 405–416.

## 《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose)：主要说明作者写此文章的目的，或说明本文主要要解决的问题；方法(Methods)：重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要，可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results)：本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions)：如系基础研究，应写明本文的创新之处，及文章在讨论部分表述的观点；如系应用性研究，应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望，尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称，尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句，避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语，除非是那些人人皆知的(如DNA、ATP等)，或者确实是非常长，而且出现多次的短语才允许用缩写语，并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。