

可调控表达甲型流感病毒 M2 蛋白的哺乳动物细胞系的建立与鉴定

刘晓宇, 郭建强, 姚立红, 陈爱珺, 付金奇, 张智清

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052

摘要: 甲型流感病毒 M2 蛋白是一种具有离子通道功能的跨膜蛋白, 其氨基酸序列非常保守, 可用于流感通用疫苗的研究。为了构建可调控的稳定表达甲型流感病毒 M2 蛋白的哺乳动物细胞系, 首先应用 PCR 方法从含有流感病毒 PR8 株第七节段全长基因的质粒中扩增得到 M2 基因。将该片段亚克隆到真核表达载体 pcDNA5/FRT/TO 上, 用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切鉴定正确后将重组质粒与表达 Flp 重组酶的 pOG44 质粒共转染 Flp-In T-REx-293 细胞, 使目的基因整合到宿主细胞染色体。筛选具有 Hygromycin B 抗性的细胞株。在该细胞的培养基中加入四环素以诱导目的基因表达, 48 h 后通过间接免疫荧光方法检测到 M2 蛋白的表达。共得到 16 株高表达 M2 蛋白的重组细胞株, 这些细胞株在传 10 代后仍能稳定表达目的蛋白。未加四环素诱导的细胞没有检测到 M2 蛋白, 说明四环素调控系统严格控制着目的基因的表达。今后, 该细胞系可用于流感病毒 M2 蛋白的功能研究、流感候选疫苗的免疫学评价以及流感病毒减毒活疫苗的研制。

关键词: 甲型流感病毒, 基质蛋白 2, 四环素, 哺乳动物细胞系

Establishment of a stable and inducible mammalian cell line expressing influenza virus A M2 protein

Xiaoyu Liu, Jianqiang Guo, Lihong Yao, Aijun Chen, Jinqi Fu, and Zhiqing Zhang

State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

Abstract: Matrix protein 2(M2) is an integral tetrameric membrane protein of influenza A virus, which functions as ion channel. M2 sequence has shown remarkable conservation, so there has been growing interest in it as “universal” vaccine. In order to establish a stable 293 cell line that express M2 protein under the control of the tetracycline operator, M2 gene was obtained by PCR amplification from the plasmid containing the segment 7 of influenza A virus strain A/PR/8/34 firstly. The PCR product was cloned into *Bam*H I /*Not* I restriction site of pcDNA5/FRT/TO vector, and cotransfected with pOG44 which express Flp recombinase into Flp-In T-REx-293 cell. Integration of pcDNA5/FRT/TO-M2 into the cell genome at the Flp Recombination

Received: October 8, 2010; **Accepted:** December 16, 2010

Supported by: Major Special Science and Technology Project for Prevention and Treatment of AIDS and Viral Hepatitis and Other Major Infectious Diseases (No. 2009ZX10004-710).

Corresponding author: Zhiqing Zhang. Tel: +86-10-63519655; E-mail: zhang_zq@hotmail.com

“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (No. 2009ZX10004-710) 资助。

Target (FRT) site brought the SV40 promoter and the initiation codon in frame with the hygromycin resistance gene. Thus, stable cell lines were selected for hygromycin resistance. The expression of M2 protein from hygromycin-resistant cell was induced by addition of tetracycline into the cell culture media, and then tested by indirect immunofluorescence assay (IFA). 16 strains with high expression of M2 were selected. After subculturing for more than ten passages, the cell lines still stably expressed M2 protein. No M2 protein could be detected without tetracycline induction, suggesting that the expression was strictly controlled by tetracycline operator. The cell lines expressing M2 will be useful for further functional studies of M2 protein, detection of immune response against natural structure M2 protein and development of live attenuated influenza virus vaccine with reverse genetics technique.

Keywords: influenza A virus, matrix protein 2, tetracycline, mammalian cell line

流行性感是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病。流感病毒根据核蛋白 (NP) 和膜蛋白 (MP) 的抗原特性及其基因特性的不同分为甲、乙、丙三型, 其中甲型流感病毒对人类的危害最大, 常引起世界流感大流行。2009 年爆发于墨西哥的甲型 H1N1 流感病毒是一种三元重配病毒, 人类普遍易感, 对人类生命健康造成了巨大的威胁。

流感病毒基质蛋白 2 (M2) 是流感病毒表面的一种膜蛋白, 虽然在病毒颗粒中含量很少, 但在病毒感染细胞的表面大量存在。M2 蛋白由 97 个氨基酸组成, 天然状态下以同源四聚体形成离子通道, 在病毒感染宿主细胞时起到降低病毒粒子内 pH 值的关键性作用^[1]。1918–2005 年间, 感染人的多种甲型流感病毒的 M2 蛋白胞外区 (M2e) 序列没有发生明显变化, 并且其特异性抗体能降低动物感染流感的风险, 因此 M2e 成为研制流感通用疫苗的重要候选蛋白^[2]。在评价 M2e 候选疫苗免疫后刺激的体液免疫水平时, 常选用重组的或化学合成的抗原来检测抗 M2e 抗体。但因为这些抗原与天然 M2 蛋白四聚体结构不尽相同, 所以检测到的抗体在流感自然感染中并不都能与天然 M2 蛋白特异性识别和结合^[3]。有研究表明, 疫苗的保护性与小鼠免疫后血清中针对真核细胞表达的 M2 蛋白的特异性抗体水平相关, 而与抗 M2e 合成肽的抗体水平不相关^[4]。所以用重组 M2 蛋白或化学合成的 M2e 多肽评价 M2e 抗体的保护作用具有一定的局限性。为此, Marina 等构建了表达 M2 蛋白的 HEK 细胞系, 用于评价针对天然 M2 蛋白的抗体水平^[5]。

采用反向遗传学技术改造流感病毒的某些重要基因使其毒力下降, 再拯救病毒以制备流感减毒活疫苗是一种新的研制流感病毒疫苗的方法^[6-8]。Matthew 等采用类似方法用表达突变 M2 蛋白的 293 T 细胞和 MDCK 细胞拯救流感病毒, 研究 M2 蛋白的突变对病毒包装及其感染性的影响^[9]。运用反向遗传学研究 M2 蛋白的功能并在此基础上研发流感病毒减毒活疫苗具有广阔的研究前景。

鉴于 M2 蛋白表达系统在研发与 M2 蛋白相关的流感通用疫苗中的重要作用, 本研究构建了表达 M2 蛋白的哺乳动物细胞系。考虑到 M2 的离子通道功能会对细胞造成损害, 我们选用了可用四环素调控的哺乳动物细胞表达系统。

1 材料与方 法

1.1 材 料

含流感病毒 A/PR/8/34(H1N1) 株第七节段全长序列的质粒为本室保存。pcDNA5/FRT/TO 质粒、pOG44 质粒、Flp-In T-REx-293 细胞系、脂质体 (Lipofectamine) 2000、灭瘟素 (Blasticidin)、吉欧霉素 (Zeocin)、潮霉素 B (Hygromycin B) 和四环素均购自 Invitrogen 公司。pGEM-T Easy 为 Promega 产品。限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 购自 NEB 公司。抗 M2 单克隆抗体购自 Abcam 公司, FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自中杉金桥公司。

1.2 方 法

1.2.1 M2 基因的克隆

M2 基因的读码框中含有一段间隔区, 以本室保存的含流感病毒 PR8 株第七节段的质粒为模板, 通

过 3 次 PCR 反应扩增得到流感病毒 M2 的全长基因。第 1 次 PCR 反应使用 1F 和 1R 引物扩增包括 M2 基因起始密码子在内的 26 个核苷酸, 第 2 次使用 2F 和 2R 引物扩增包括 M2 基因终止密码子在内的 268 个核苷酸。第 3 次以前两次 PCR 反应产物为模板, 使用 1F 和 2R 引物扩增全长的 M2 基因。引物序列见表 1。将获得的 M2 基因克隆到 pGEM-T Easy 载

体 (pGEMT-M2) 并进行 DNA 序列测定。

1.2.2 表达 M2 蛋白的真核表达载体的构建

用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切质粒 pGEMT-M2, 电泳回收约 300 bp 的基因片段, 将其亚克隆至 pcDNA5/FRT/TO 载体的 *Bam*H I 和 *Not* I 位点, 得到重组表达载体 pDFT-M2 (图 1A), 用双酶切和 PCR 方法鉴定插入片段。

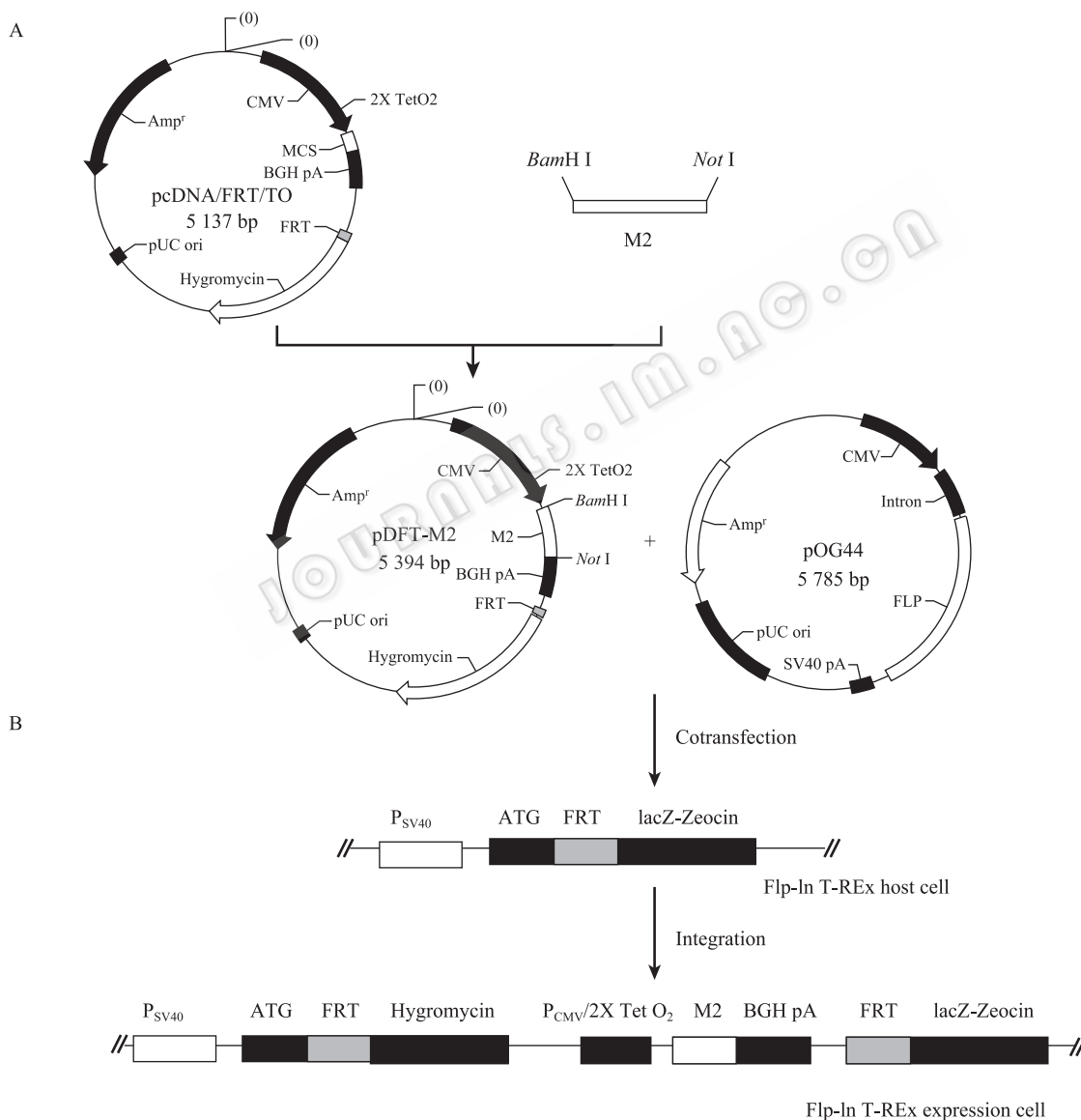


图 1 pDFT-M2 表达载体的构建与整合原理

Fig. 1 Construction and integration principle of the expression vector pDFT-M2. (A) Construction of pDFT-M2. (B) The Flp recombinase expressed from pOG44 catalyzes a homologous recombination between the FRT sites in the host cells and the pDFT-M2. Integration of the expression construct confers Hygromycin resistance and Zeocin sensitivity to the cells.

表 1 实验所需引物的序列

Table 1 Primers used in the study

Primer name	Sequence (5'-3')
1F	<u>GGATCC</u> ACCATGAGTCTTCTAACCGAG (<i>Bam</i> H I)
1R	TTTCTGATAGCGTTTCGACCTCG
2F	CGAGGTGCAACGCCTATCAGAAA
2R	<u>GCGGCCGC</u> TCACTACTCCAGCTCTATGCT (<i>Not</i> I)

The restriction enzyme sites for *Bam*H I (GGATCC) and *Not* I (GCGGCCGC) included in the PCR primes are indicated by underlining.

1.2.3 重组质粒转染 293 细胞

用含 10% 胎牛清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, 无抗生素) 在 24 孔细胞培养板中培养 FlpInTR-293 细胞, 细胞浓度约为 2×10^5 /孔。次日, 待细胞 80% 成片时, 采用脂质体转染法将构建的 pDFT-M2 与 pOG44 质粒共转染细胞。将 3 μ L 脂质体 2000 与 47 μ L opti-MEM 培养液混合, 在另一管中将 0.2 μ g pDFT-M2 和 1.8 μ g pOG44 与 43 μ L opti-MEM 混合, 然后将后者缓慢地逐滴加入前者中, 轻轻混匀, 室温孵育 20 min。将细胞洗 2 遍后加入 400 μ L opti-MEM, 然后将 100 μ L 混合物缓缓滴入。同时共转染 pcDNA5/FRT/TO 空质粒与 pOG44 质粒到 FlpInTR-293 细胞作为阴性对照。细胞在 37 $^{\circ}$ C CO₂ 孵箱中培养 6~10 h 后, 换含 2% FBS 的 DMEM 培养液。转染 48 h 后, 将细胞 1:10 传代, 待细胞贴壁后换含 10% FBS、15 μ g/mL 灭瘟素 (Blasticidin) 和 150 μ g/mL 潮霉素 B (Hygromycin B) 的 DMEM 培养液培养, 筛选出抗 Hygromycin B 的细胞 (共转染及整合原理见图 1B)。再用无限稀释法, 筛选抗 Hygromycin B 的细胞克隆。

1.2.4 四环素诱导转染细胞表达 M2 蛋白

将转染的细胞培养至 60%~70% 成片时, 在培养基中加入终浓度为 1 μ g/mL 的四环素诱导 M2 蛋白表达, 以不加四环素的相同细胞培养作为对照。诱导 48 h 后, 用预冷的甲醇固定细胞, 以抗 M2 单克隆抗体为一抗, FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,

作间接免疫荧光测定 (Indirect immunofluorescence assay, IFA) 检测目的蛋白表达, 在荧光显微镜下观察结果。

1.2.5 PCR 检测目的基因定点整合到细胞染色体

从 5×10^5 的细胞中提取基因组 DNA。用 pcDNA5/FRT/TO 质粒中插入片段两侧的序列 CMV Forward 和 BGH Reverse 为引物, 采用 PCR 方法, 分别从转染空载体或 pDFT-M2 的 FlpInTR-293 细胞基因组 DNA 中扩增目的片段。这对引物从转入空载体的对照细胞基因组中应扩增出 338 bp 的序列。而转染 pDFT-M2 的细胞由于在限制性酶切位点 *Bam*H I 和 *Not* I 之间插入了 M2 基因, 所以其扩增产物的长度应为 585 bp。

1.2.6 重组子定点整合的鉴定

将所筛选的细胞株培养成片后换成含 100 μ g/mL 吉欧霉素 (Zeocin) 的培养基继续培养 3 d, 用不含 Zeocin 的培养基继续培养同一细胞作为对照, 显微镜下观察细胞状态以评价其对 Zeocin 的敏感性。

1.2.7 转染细胞稳定性的鉴定

将筛选出的表达 M2 蛋白的细胞株分别在含有或不含有 Hygromycin B 的培养基中连续传 10 代, 期间监测目的蛋白表达, 以判断转染细胞的稳定性。

2 结果

2.1 M2 基因的克隆和真核细胞表达载体的构建

以含流感病毒 PR8 株第七节段的质粒为模板, 经过 3 次 PCR 扩增得到大小约为 317 bp 的两侧增加了酶切位点的 M2 基因 (图 2)。将 PCR 产物克隆至 pGEM-T Easy 载体, 获得重组质粒。经 DNA 测序鉴定证实插入序列正确。将该质粒用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后电泳回收目的片段, 连接到 pcDNA5/FRT/TO 载体上, 得到重组表达载体 pDFT-M2。后者经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切, 得到大小为 5 087 bp 和 307 bp 的两条片段, 其大小与预期相符 (图 3), 说明成功构建了 M2 的真核表达载体。

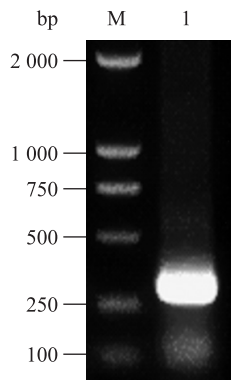


图 2 PCR 扩增 M2 基因

Fig. 2 Isolation of M2 gene by PCR. 1: PCR product of M2 gene; M: DNA marker DL2000.

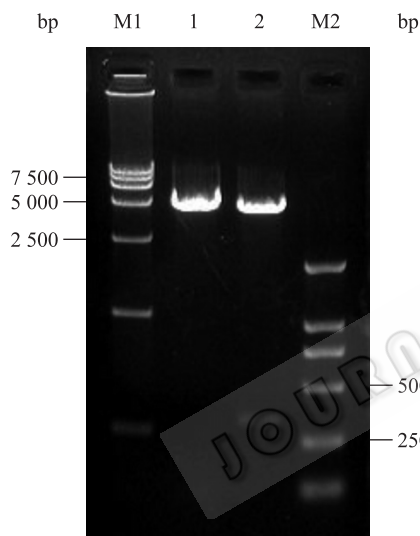


图 3 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant pDFT-M2 by enzyme digestion. M1: DNA marker DL15000; M2: DNA marker DL2000; 1: pcDNA5/FRT/TO digested with *Bam*H I and *Not* I ; 2: pDFT-M2 digested with *Bam*H I and *Not* I .

2.2 M2 蛋白的诱导表达及间接免疫荧光分析

将构建的真核表达载体 pDFT-M2 与 pOG44 质粒共转染 FlpInTR-293 细胞, 通过在含 Hygromycin B 的选择性培养基中培养, 筛选出定点整合了外源基因的重组细胞株^[10-11]。在细胞培养基中加入四环素诱导目的基因表达, 48 h 后用抗 M2 单克隆抗体作 IFA 检测。结果显示, M2 表达载体转染的细胞可见强的特异性黄绿色荧光, 而对照质粒转染组未见特异性荧光。未加四环素诱导的重组细胞株没有观察

到特异性荧光, 说明四环素调控系统严格控制着目的基因的表达^[12](图 4)。本轮共筛选到 16 株高表达 M2 蛋白的细胞株。

2.3 M2 基因整合到细胞基因组的鉴定

分别以转染空 pcDNA5/FRT/TO 质粒或 pDFT-M2 的 293 细胞基因组 DNA 为模板, 以质粒中插入片段两侧的序列为引物扩增, 结果前者得到 338 bp 的扩增产物, 后者得到 585 bp 的扩增产物, 表明插入 M2 基因的表达质粒整合到宿主细胞的基因组中 (图 5)。

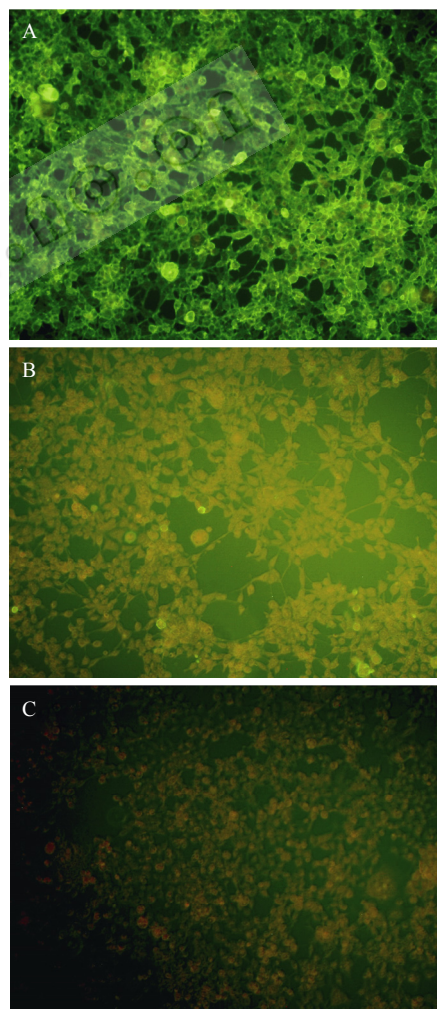


图 4 Flp-In-T-REx-293 细胞表达 M2 免疫荧光图(200×)

Fig. 4 Detection of M2 protein expressed in Flp-In-T-REx-293 cells with IFA (200×). pDFT-M2 transfected Flp-In-T-REx-293 cells. (A) With tetracycline induction. (B) Without tetracycline induction. (C) Negative control cells induced with tetracycline.

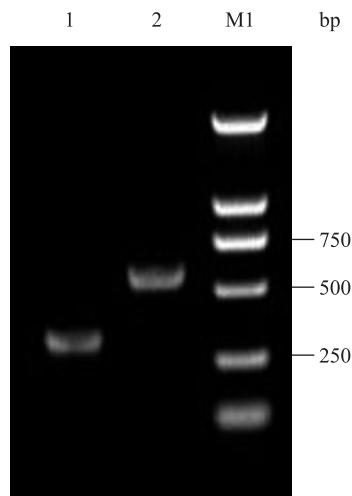


图5 PCR 鉴定 M2 基因整合到细胞基因组

Fig. 5 Identification of pDFT-M2 integrating into cell genome by PCR. M1: DNA marker DL2000; 1: Genome DNA from cells transfected with pcDNA5/FRT/TO; 2: Genome DNA from cells transfected with pDFT-M2.

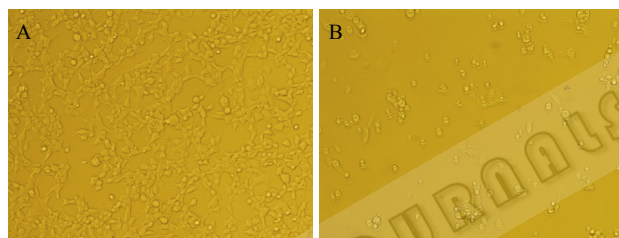


图6 筛选出的细胞株对吉欧霉素敏感性实验 (200×)

Fig. 6 Detection of Zeocin sensitivity of 293 cells transfected with pDFT-M2. (A) Without Zeocin in cell culture media. (B) With Zeocin in cell culture media.

2.4 重组子定点整合的鉴定

FlpInTR-293 细胞本身具有对 Zeocin 的抗性。重组表达载体与 pOG44 共转染后会使其整合到细胞基因组 FRT 位点, 使细胞失去对 Zeocin 的抗性, 即转染成功的细胞株应对 Zeocin 敏感。我们将所筛选出的细胞株分别在含有或不含有 Zeocin 的培养基中培养, 显微镜下观察结果显示, 在含有 Zeocin 培养基中的细胞停止生长并逐渐坏死, 而对照组细胞正常生长(图 6)。这一结果进一步证明重组子定点整合在细胞基因组的 FRT 位点。

2.5 重组细胞株的稳定性评价

将筛选的细胞株在含 Hygromycin B 的培养基中

连续传 10 代, 每代细胞用四环素诱导后作免疫荧光检测, 可以看到细胞仍能高效表达 M2 蛋白, 且表达水平没有明显变化, 说明我们构建的细胞系稳定性很好, 第 5 代和第 10 代细胞 IFA 检测结果见图 7A、B。即使将细胞株在未加 Hygromycin B 的培养基中连续传代培养 10 代, 同样也能高效表达 M2 蛋白, 结果见图 7C, 说明该细胞株非常稳定。

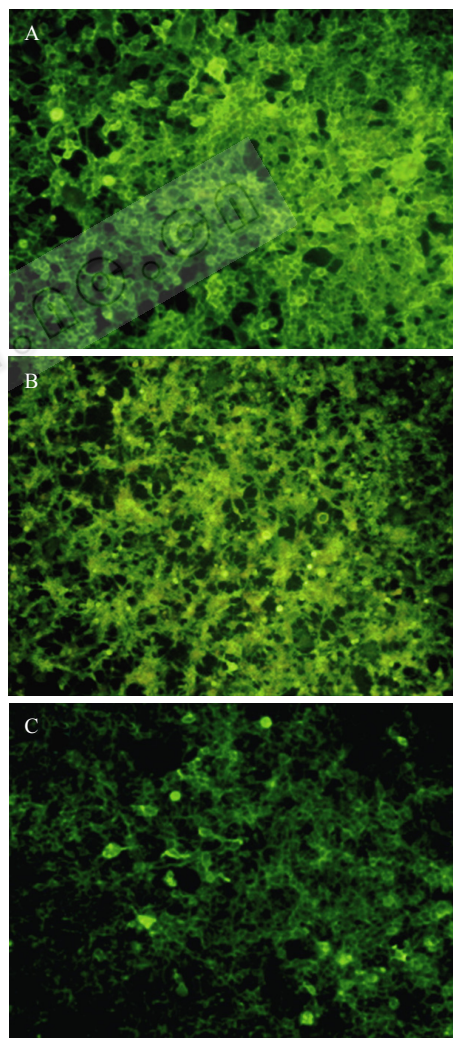


图7 筛选的细胞连续传代后表达 M2 蛋白的免疫荧光图 (200×)

Fig. 7 Detection of M2 protein expressed in the transfected 293 cells with IFA after serial passaging. (A) The fifth passage. (B) The tenth passage. (C) The tenth passage without Hygromycin B.

3 讨论

M2 蛋白具有离子通道活性, 在细胞膜上表达会打破细胞内外离子浓度平衡, 造成对细胞的毒性作用, 因而不利于建立持续表达 M2 蛋白的稳定细胞系^[13-14]。为了构建稳定表达 M2 蛋白的细胞系, 避免它可能对细胞产生的损害, 本课题选用了四环素诱导的哺乳动物细胞表达系统。pcDNA5/FRT/TO 是一种含有巨细胞病毒 (CMV) 启动子的哺乳动物细胞表达质粒, 该启动子后面插入了四环素操纵子序列 TetO₂。此质粒还含有 Flp 重组酶结合位点 (FRT) 和 Hygromycin B 抗性基因。与其匹配的 Flp-In T-Rex-293 细胞系染色体上也含有一个 FRT 位点, 并表达能与 TetO₂ 结合的四环素抑制子。将构建的含有 M2 基因的真核表达载体 pDFT-M2 与 pOG44 质粒共同转染 FlpInTR-293 细胞时, pOG44 编码的 Flp 重组酶介导 pDFT-M2 质粒在宿主细胞染色体的 FRT 位点发生同源重组^[15] (图 1B)。这种定点整合使 Hygromycin B 抗性基因插入到了细胞 SV40 启动子和 ATG 起始密码子下游, 从而使 Hygromycin B 抗性基因表达, 因此可通过这种新增加的抗性筛选定点整合的细胞。CMV 启动子启动目的基因表达依赖于四环素存在与否。不存在四环素时, FlpInTR-293 细胞表达的四环素抑制子与 TetO₂ 结合, 抑制目的基因转录; 存在时, 四环素与 TetR 结合使其脱离 TetO₂, 解除抑制, 从而使目的基因顺利表达。

本研究从筛选得到的细胞株基因组 DNA 中扩增出插入的目的片段, 表明 pDFT-M2 重组质粒整合到 FlpInTR-293 细胞基因组中 (图 5)。图 1B 示意的整合原理显示表达载体在细胞基因组 FRT 位点准确插入使得 lacZ-Zeocin 基因与其上游 SV40 启动子和 ATG 隔离, 因而 Zeocin 抗性基因不能表达, 使本来具有 Zeocin 抗性的细胞变为对 Zeocin 敏感。细胞对 Zeocin 敏感性实验结果可以间接证明表达质粒整合到了宿主细胞基因组 FRT 位点 (图 6)。这种通过定点整合构建的细胞系不仅表达水平高, 而且非常稳

定。从图 7 可以看到细胞连续培养 10 代仍能高效表达 M2 蛋白。这样稳定表达 M2 蛋白的细胞系完全可以满足今后研究的需要。

M2 蛋白对细胞可能具有毒性, 所以我们选用诱导表达系统以避免持续表达 M2 蛋白对细胞造成的损伤。图 4 显示未加四环素时 M2 蛋白几乎无表达, 说明四环素严格地控制着目的基因的表达。这也能解释为什么细胞连续培养 10 代仍然正常分裂、生长, 而未见细胞活力下降或细胞坏死。

本研究成功构建了四环素调控表达 M2 蛋白的哺乳动物细胞系, 并筛选出 16 株高表达的细胞株。M2 的表达严格受四环素的调控, 在多次传代后仍能稳定表达, 这为今后评价 M2 通用疫苗在体内诱导的免疫反应的保护性提供了新的平台, 并为应用反向遗传学方法研究流感减毒活疫苗奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Cheng XW, Guo YJ. Influenza Virus and Correlation Technique. Beijing: China Sanxia Publishing House, 1997: 28.
程小雯, 郭元吉. 流行性感冒病毒及其实验技术. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 28.
- [2] Schotsaert M, De Filette M, Fiers W, et al. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(4): 499-508.
- [3] Feng JQ, Zhang MX, Mozdzanowska K, et al. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virology*, 2006, 3: 102-114.
- [4] Mozdzanowska K, Zharikova D, Cudic M, et al. Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered by a synthetic matrix protein 2-based influenza A virus vaccine in the mouse. *Virology*, 2007, 4: 118-131.
- [5] De Filette M, Martens W, Roose K, et al. An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2. *J Biol Chem*, 2008, 283(17): 11382-11387.
- [6] Song HC, Nieto GR, Perez DR. A new generation of modified live-attenuated avian influenza viruses using a

- two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J Virol*, 2007, 81(17): 9238–9248.
- [7] Solorzano A, Ye JQ, Pérez DR. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modifications in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J Virol*, 2010, 84(9): 4587–4596.
- [8] Steel J, Lowen AC, Pena L, et al. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol*, 2009, 83(4): 1742–1753.
- [9] McCown MF, Pekosz A. The influenza A virus M₂ cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging. *J Virol*, 2005, 79(6): 3595–3605.
- [10] Gritz L, Davies J. Plasmid-encoded Hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Gene*, 1983, 25(2/3): 179–188.
- [11] Palmer TD, Hock RA, Osborne WR, et al. Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine deaminase gene in diploid skin fibroblasts from an adenosine deaminase-deficient human. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(4): 1055–1059.
- [12] Yao F, Svensjö T, Winkler T, et al. Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(13): 1939–1950.
- [13] Kurtz S, Luo G, Hahnenberger KM, et al. Growth impairment resulting from expression of influenza virus M2 protein in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of a novel inhibitor of influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(10): 2204–2209.
- [14] Ilyinskii PO, Gabai VL, Sunyaev SR, et al. Toxicity of influenza A virus matrix protein 2 for mammalian cells is associated with its intrinsic proton-channeling activity. *Cell Cycle*, 2007, 6(16): 2043–2047.
- [15] O’Gorman S, Fox DT, Wahl GM. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science*, 1991, 251(4999): 1351–1355.