

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.12.02

表达禽流感病毒 NP 和 M2 融合基因 重组乳酸菌的构建及鉴定

李琼燕, 杨桂连, 张成赛, 赵金辉, 晋玉北, 杨文涛*, 王春风*

(吉林农业大学动物科学技术学院 吉林省动物微生态制剂工程研究中心, 长春 130118)

[收稿日期] 2018-07-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 12-0009-07 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为了在乳酸菌中表达 H9N2 亚型禽流感病毒(AIV) NP 和 M2 基因并检测其反应原性, 先以 pMD19-T-M2 质粒作为模板, 采用 PCR 方法克隆 M2 全长基因, 然后将 M2 基因亚克隆入 pSIP409-pgsA'-NP 质粒中, 构建重组质粒 pSIP409-pgsA'-NP-M2, 再将重组质粒 pSIP409-pgsA'-NP-M2 通过电转化的方法转入植物乳杆菌 *Lb. plantarum* NC8 中, 制备重组菌 NC8-pSIP409-pgsA'-NP-M2 并诱导表达, 最后通过流式细胞术、免疫荧光和免疫印迹技术验证。结果表明, 重组菌 NC8-pSIP409-pgsA'-NP-M2 能够经诱导表达 NP-M2 融合蛋白, 并且与兔源 NP 单克隆抗体和抗 M2 的小鼠血清具有反应原性。试验为后续研究禽流感广谱口服疫苗奠定了基础。

[关键词] 禽流感病毒; NP 基因; M2 基因; 原核表达; 重组乳酸菌

Construction and Identification of Recombinant *Lactobacillus plantarum* NC8 Expressing NP Fused with M2 Proteins of Avian Influenza Virus

LI Qiong-yan, YANG Gui-lian, ZHANG Cheng-sai, ZHAO Jin-hui,

JIN Yu-bei, YANG Wen-tao*, WANG Chun-feng*

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University,

Jilin Provincial Engineering Research Center of Animal Probiotics, Changchun 130118, China)

Corresponding author: YANG Wen-tao, E-mail: yangwentao@jlau.edu.cn; WANG Chun-feng, E-mail: wangchunfeng@jlau.edu.cn

Abstract: To express the M2-NP fusion gene of the H9N2 subtype avian influenza virus and to study the reactivity of its prokaryotic expression product in *Lb. plantarum* NC8, pMD19-T-M2 plasmid supplied from the laboratory serves as the template, the M2 gene was then amplified by PCR. The M2 gene was subcloned in the pSIP409-pgsA'-NP vector to construct a recombinant plasmid pSIP409-pgsA'-NP-M2. The recombinant plasmid pSIP409-pgsA'-NP-M2 was transformed into *Lb. plantarum* NC8 by electroporation to prepare

基金项目: 国家十三五重点研发计划项目(2017YFD0501000, 2017YFD0500400); 吉林省教育厅科学技术研究项目(JJKH20170318KJ)

作者简介: 李琼燕, 硕士研究生, 从事动物粘膜免疫研究。

通讯作者: 杨文涛, E-mail: yangwentao@jlau.edu.cn; 王春风, E-mail: wangchunfeng@jlau.edu.cn

recombinant bacteria NC8-pSIP409-pgsA'-NP-M2. The NC8-pSIP409-pgsA'-NP-M2 was induced, and reactogenicity of antigens were detected using flow cytometry, immunofluorescence and Western-blot. The results showed that NP-M2 fusion protein was able to express on NC8-pSIP409-pgsA'-NP-M2. Antigens of recombinant bacteria were also recognized with anti-NP monoclonal antibody and anti-M2 mouse source serum, which play an important role on developing universal oral vaccine against avian influenza viruses.

Key words: avian influenza virus; NP gene; M2 gene; prokaryotic expression; recombinant bacteria

禽流感是由禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的疾病,无论是高致病性禽流感还是低致病性禽流感都需得到重视^[1-2],因为禽流感除了感染禽类,也能感染人、猪、犬等哺乳动物,甚至引起人类的死亡,被我国农业部列为甲类检测传染病^[3]。禽流感对于禽类的影响包括上呼吸道感染、产蛋量和体重下降、精神沉郁,严重可导致死亡。禽流感疫病的传播不仅严重损害我国养禽业的发展,同时危害到了人类的健康^[2,4]。

流感病毒基质蛋白 2(matrix protein2, M2)是存在于流感病毒表面的含量很少的跨膜蛋白之一,但其在被流感病毒感染的细胞表面大量存在^[5]。它具有离子通道功能,由胞外区、跨膜区和胞内区共同构成跨膜结构^[6]。此外, M2 蛋白在自 1918 年大流感爆发至今的各流行株中几乎没有出现变异,在各亚型间高度保守^[5]。基于以上特点, M2 蛋白成为流感通用疫苗的重要研究成分之一。

乳酸菌作为对机体有益的益生菌,拥有安全性高,容易培养的优点,是禽流感口服疫苗的理想载体^[2]。乳酸杆菌是一种乳酸菌,保护性抗原基因或免疫调节因子良好的转化或表达系统,可用作表达内源或外源蛋白的载体,在食品、保健、医疗等多种领域具有广阔的前景^[7]。植物乳杆菌(*Lb.plantarum* NC8)是从青储饲料中分离的一种乳酸菌,与动物源的乳酸菌相比,它的抗逆性更强,适合作为宿主菌表达外源蛋白^[2,8]。

本实验旨在将 AIV 中的 M2 基因与载体 pSIP409-pgsA'-NP 连接构建重组质粒,然后制备重组乳酸菌,验证其反应原性。

1 材料与方法

1.1 载体和菌株及主要试剂 质粒 pSIP409 -

pgsA'-NP 和 pMD19-T-M2 由吉林农业大学动物微生物研究室构建保存; *Lb.plantarum* NC8 由印度卡马拉杰大学 Anbazhagan.K 高级研究员惠赠; PCR 反应试剂、无缝克隆试剂盒购自中美泰和生物技术(北京)有限公司、限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III、碱性磷酸酶和核酸分子量标准均购自 Takara 公司; 凝胶回收及 PCR 产物纯化试剂盒为美国 OMEGA 公司产品; PVDF 转移膜为 Geman 公司产品; 兔源 H9N2 亚型禽流感核蛋白 NP 单克隆抗体购自长春佳博新生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自长春鼎国生物技术公司; 分子生物学实验所用其他常用试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.2 引物的设计与合成 根据 GenBank 上登录的 M2 基因序列,利用 Primer5.0 软件设计一对引物,并在下游引物加入 *Hind* III 酶切位点。引物序列如下: P1: 5'-TGAAGAATATGATAATGGTAGTGGTG-GCGGTG-3'; P2: 5'-CTGTAATTTGAAGCTTTCAT-TCCAATTCAATA-3'。上述引物送至吉林省库美生物科技有限公司合成。

1.3 目的基因 M2 的扩增与回收纯化 用 pMD19-T-M2 质粒为模版,以 P1 和 P2 为引物,PCR 扩增 M2 基因。反应体系为 10×Ex *Taq* 缓冲液 2.5 μL, dNTP 混合物 2.5 μL,上下游引物各 1.0 μL, pMD19-T-M2 质粒 1.0 μL, Ex *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL, 去离子水 16.5 μL。反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 3 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。取 1 μL PCR 产物加入到 8 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定。并按照 DNA 凝胶回收试剂盒操作说明书回收纯化 M2 基因。

1.4 重组质粒的构建及鉴定 将纯化回收的目的基因 M2 通过无缝克隆技术与载体 pSIP409-pgsA'-NP 进行连接,线性化载体 pSIP409-pgsA'-NP 由限制性核酸内切酶 *Hind*Ⅲ 单酶切得到,此外,在 NP 基因与 pSIP409-pgsA' 相连接处包含 *Xba* I 酶切位点。在离心管中加入线性化载体 50 ng,3 倍摩尔比于载体的目的基因,5 μ L 2 $\times$ Seamless Master Mix, ddH₂O 补到 10 μ L。混匀后在 50 $^{\circ}$ C 反应 15 min,然后将离心管放置于冰上。连接产物全量转化至大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中,涂布于含 200 μ g/mL EM 的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。挑取单个菌落至 5 mL 含 200 μ g/mL EM 的液体 LB 中,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。培养后的菌液用质粒小提试剂盒提取质粒,各取 2 μ L 质粒用凝胶电泳验证。将有条带的质粒进行 *Xba* I 和 *Hind*Ⅲ 双酶切验证。将阳性重组质粒送往吉林省库美生物科技有限公司进行测序。序列测定后应用 NCBI 上的 Blast 进行比较分析,将测序后的阳性质粒命名为 pSIP409-pgsA'-NP-M2。

1.5 重组乳酸菌的制备 将 *Lb.plantarum* NC8 在 MRS 液体培养基中培养过夜,以 1 : 50 的接种量转移到 MRS 液体培养基中(含有 20 g/L 甘氨酸),当 OD₆₀₀ 值至 0.3 时离心收集菌液并制备 *Lb.plantarum* NC8 感受态细胞。取 5 μ L 重组质粒 pSIP409-pgsA'-NP-M2 与 200 μ L 冰冷的乳酸菌感受态细胞混合,随后移入到预冷的 0.2 cm 电击杯中,置于冰上静止 5 min 后电转化。电转条件为 2000 V,400 Ω , 25 μ F。点击结束后将电击杯中的液体吸入到离心管中,同时加入 600 μ L 30 $^{\circ}$ C 预热的含蔗糖的 MRS 恢复性液体培养基,30 $^{\circ}$ C 厌氧培养 3 h。取 100 μ L 菌液,涂布于含 10 μ g/mL EM 的 MRS 琼脂平板,30 $^{\circ}$ C 厌氧培养直到有单菌落出现为止。将疑似阳性菌落挑至含 10 μ g/mL EM 的 MRS 液体培养基中 30 $^{\circ}$ C 厌氧培养。以菌液为模板进行 PCR 鉴定。将鉴定为阳性的菌命名为 NC8-pSIP409-pgsA'-NP-M2。

1.6 重组乳酸菌诱导表达 将重组菌 *Lb.plantarum*

NC8-pSIP409-pgsA'-NP-M2 与 NC8-pSIP409-pgsA' 接到含红霉素的 MRS 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C, 厌氧条件下培养约 12 h,按照 1 : 50 体积接于新鲜的含红霉素的 MRS 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 厌氧条件下培养至 OD₆₀₀ 值为 0.3 时加入 SppIP (终浓度 50 ng/mL) 诱导培养,30 $^{\circ}$ C 厌氧条件下培养 8 h 停止。

1.7 流式细胞术 取 200 μ L 诱导表达后的菌液离心收集菌体,加入 100 μ L 含 10 g/L 血清的 PBS,室温孵育 30 min 后离心弃上清。以 1 : 40 稀释的兔源 H9N2 亚型禽流感核蛋白 NP 单克隆抗体为一抗,室温孵育 1 h 后用 PBS 洗 2 次。以 1 : 100 倍稀释的山羊抗兔 FITC 为二抗,摇床室温避光孵育 1 h,用 PBS 洗 2 次后用 350 μ L PBS 悬起。用流式细胞仪检测,FlowJo 7.6 软件分析。

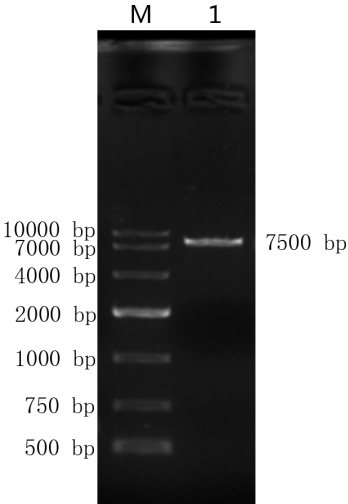
1.8 免疫荧光 取上述菌液 3 μ L 菌悬液滴加在载玻片中央,盖上盖玻片置于倒置荧光显微镜下观察。

1.9 Western blot 检测 取 5 mL 菌液离心收集重组乳酸菌菌体,用 PBS 洗涤两次,超声破碎 10 min 后离心弃上清,最后悬在 160 μ L PBS 中,加入 40 μ L 5 $\times$ SDS 上样缓冲液煮沸 5 min,-20 $^{\circ}$ C 保存用于 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。用 10%SDS-PAGE 凝胶进行电泳并按照《分子实验克隆实验指南》进行蛋白转印。转印后 PVDF 膜用 50 g/L 的脱脂奶粉常温摇床封闭 1 h,以 1 : 500 稀释的兔源 H9N2 型 AIV NP 单克隆抗体作为一抗,以 1 : 1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 为二抗,最后用 ECL 显色试剂盒显色。

2 结 果

2.1 载体片段的确定 将质粒 pSIP409-pgsA'-NP 通过酶切得到线性化载体,经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析回收所得载体的条带大约在 7500 bp 处观察可得,与预期大小相符。

2.2 目的基因 M2 的扩增 以 pMD19-T-M2 为模版,用所设计的引物进行 PCR 扩增,经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析结果显示 PCR 扩增产物的条带大约在 300 bp 处,与预期大小相符。

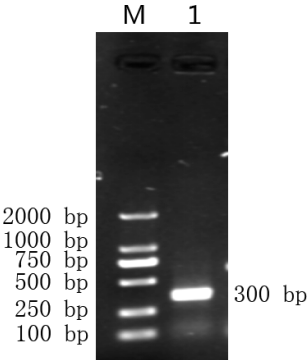


M: DNA 分子质量标准; 1: 酶切产物

M: DL10000 DNA Marker; 1: Product of Restriction enzyme digestion

图 1 载体 pSIP409-pgsA'-NP 凝胶电泳结果

Fig 1 Results of carrier pSIP409-pgsA'-NP by gel electrophoresis



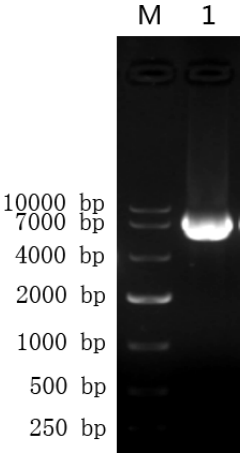
M: DNA 分子质量标准; 1: PCR 扩增产物

M: DL2000 DNA Marker ; 1: Amplification products by PCR

图 2 M2 基因的 PCR 扩增结果

Fig 2 Result of M2 gene by PCR

2.3 原核表达载体 pSIP409-pgsA'-NP-M2 的酶切鉴定 将载体与目的基因分别纯化后通过无缝克隆的方法构建重组质粒 pSIP409-pgsA'-NP-M2 (图 3)。用 *Xba*I和 *Hind*Ⅲ将重组质粒进行双酶切, 经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析结果可观察到约 6000 bp 的 pSIP409-pgsA'条带与 1800 bp 的 NP-M2 基因条带(图 4), 序列分析结果显示与 M2 基因序列一致, 说明目的基因已成功克隆于表达载体中。

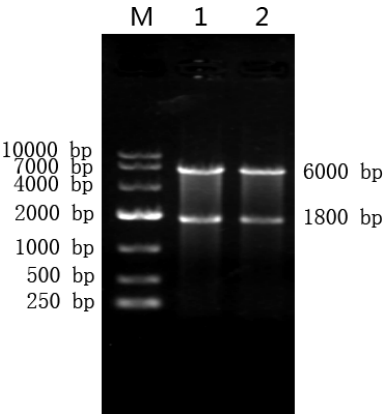


M: DNA 分子质量标准; 1: 重组质粒

M: DL10000 DNA Marker; 1: Recombinant plasmid

图 3 重组质粒 pSIP409-pgsA'-NP-M2

Fig 3 Enzymatic identification of recombinant plasmid pSIP409-pgsA'-NP-M2



M: DNA 分子质量标准; 1、2: 重组质粒酶切鉴定

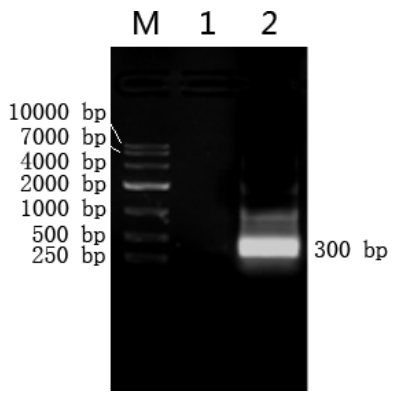
M: DL10000 DNA Marker ; 1,

2: Enzymatic identification of recombinant plasmid

图 4 重组质粒 pSIP409-pgsA'-NP-M2 的酶切鉴定

Fig 4 Enzymatic identification of recombinant plasmid pSIP409-pgsA'-NP-M2

2.4 重组菌 NC8-pSIP409-pgsA'-M2 的 PCR 验证 将重组质粒通过电转化法转入 *Lb. plantarum* NC8 感受态细胞中, 将疑似阳性重组菌 NC8-pSIP409-pgsA'-NP-M2 进行 PCR 鉴定, 在 300 bp 处观察到条带, 与预期大小一致(图 5)。此外, 序列分析结果显示与 M2 基因序列一致, 证明重组质粒成功转化入 *Lb. plantarum* NC8 中。



M: DNA 分子质量标准 (10000Marker) ;
1: 阴性对照; 2: NC8- pSIP409-pgsA'-NP-M2
M : DL10000 DNA Marker ; 1 : Negative control ;
2 : NC8- pSIP409-pgsA'-NP-M2;
图 5 重组乳酸菌的 PCR 鉴定

Fig 5 Identification of recombinant lactic acid bacteria by PCR

2.5 重组乳酸菌的流式细胞术鉴定 用 1.6 所述方法对重组乳酸菌进行诱导表达, 以免源 H9N2 亚型禽流感核蛋白 NP 单克隆抗体为一抗, FITC 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗孵育诱导表达后的重组菌。以免疫 H9N2 亚型禽流感蛋白 M2 的小鼠血清为一抗, FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗孵育。用流式细胞仪检测, FlowJo 7.6 软件分析。图 6 结果显示, 重组乳酸菌锚定表达了目的蛋白, 而转入空载体的乳酸菌未检测到目的蛋白。

2.6 免疫荧光验证 上述菌液在荧光显微镜下观察可见重组乳酸菌发绿色荧光, 而转入空载体的乳酸菌不发荧光(图 7), 提示重组乳酸菌锚定表达了目的蛋白。

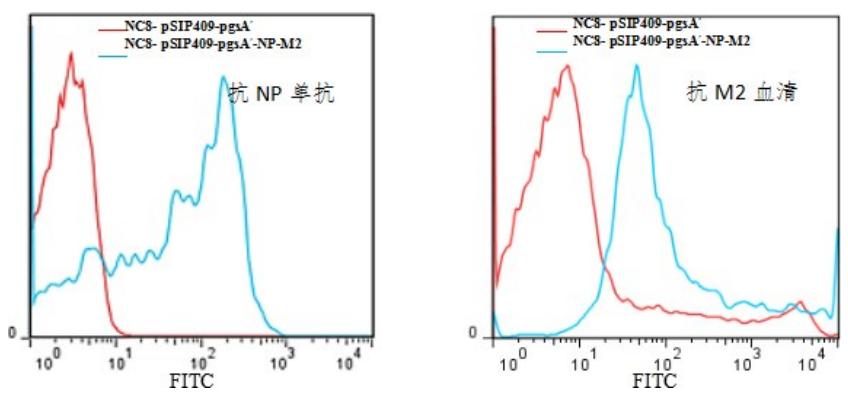


图 6 重组乳酸菌流式细胞术检测
Fig 6 Detection of recombinant lactic acid bacteria by flow cytometry

2.7 Western-blot 分析 用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳产物进行蛋白印迹鉴定, 在 91.6 kD 大小处出现一条蛋白印迹(图 8), 大小与预期相符, 说明重组乳酸菌 NC8-pSIP409-pgsA'-NP-M2 表达的外源蛋白具有反应原性。

3 讨论

H9N2 亚型禽流感四季皆可流行, 其传播途径很广泛^[9]。我国控制 H9N2 亚型 AIV 的传播主要依靠灭活疫苗免疫, 但研究显示, 使用 AIV 灭活苗免疫的鸡群仍然发生 H9N2 亚型 AIV 的感染, 并且感染病例呈现增加趋势^[10]。这一现象提示 H9N2 亚型 AIV 疫苗不能给鸡群提供完全而有效的保护

力^[11], 研制新型有效疫苗以防控 H9N2 的传播势在必行。

目前商品化甲型流感疫苗, 主要是以病毒表面的血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 作为抗原成分^[12]。但 HA 和 NA 易发生抗原漂移, 而且甲型流感病毒亚型很多, 各亚型病毒间不一定产生交叉保护作用, 这给甲型流感的防制带来极大的困难。AIV 核蛋白 NP 在病毒中的蛋白质含量最高^[13], 其存在于病毒体的内部, 在基因转移和变异方面也比较稳定。此外, 研究表明基于 M2 抗原研制的疫苗免疫可产生抗体, 引起特异性免疫^[14]。NP 和 M2 抗原序列保守, 在

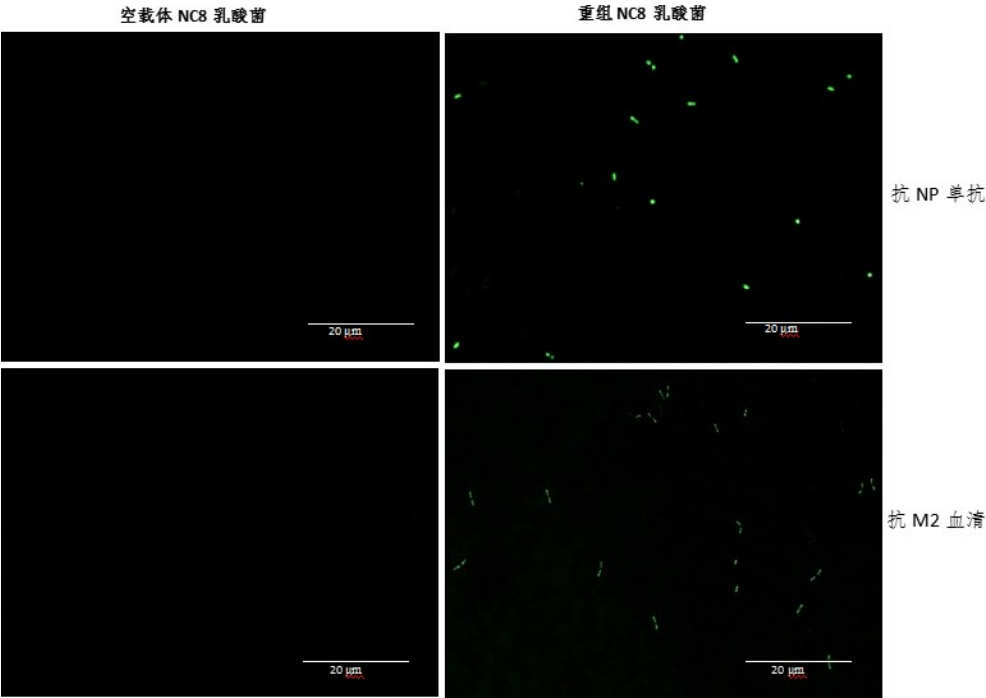
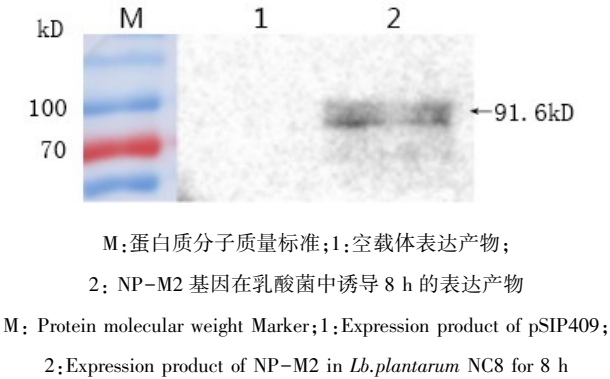


图 7 重组乳酸菌免疫荧光鉴定

Fig 7 Detection of recombinant bacteria by immunofluorescence experiments



M: 蛋白质分子质量标准;1:空载体表达产物;

2: NP-M2 基因在乳酸菌中诱导 8 h 的表达产物

M: Protein molecular weight Marker;1:Expression product of pSIP409;

2:Expression product of NP-M2 in *Lb.plantarum* NC8 for 8 h

图 8 重组乳酸菌的 Western-blot 分析

Fig 8 Western-blot analysis of recombinant gene NP-M2

不同亚型流感之间也具有较高的同源性,用以研究通用流感疫苗具有良好的前景。本实验制备了融合表达 AIV 保守抗原 NP 和 M2 的重组乳酸菌,旨在研制预防 AIV 的广谱型制剂。已经报道的数据显示,NP-M2 组合基因疫苗产生的保护作用远比使用单基因疫苗效果好^[15],进一步研究发现,NP-M2e 重组蛋白联合佐剂通过肌肉注射能使机体产生细胞免疫和体液免疫^[16],但通过注射途径免疫不仅费时费力,而且会使动物产生应激反应。然

而,重组乳酸菌作为一种能够通过口服途径给药的新型疫苗不仅具有安全、经济、方便和无应激反应的优势,还可以诱导粘膜免疫反应,更加有利于预防经呼吸道感染的病原体。

近年来,许多研究利用植物乳杆菌作为外源蛋白运载系统研制口服疫苗,但其表达的蛋白多分泌于胞内,在细胞壁的阻隔下会影响免疫效果。锚定基因 *pgsA* 来自于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),能将外源蛋白锚定在宿主菌表面^[17],该研究发现,与植物杆菌细胞内表达相比,外源蛋白展示在宿主菌表面能产生更强的免疫效果。本实验利用截断的锚定基因 *pgsA'* 将外源蛋白展示在宿主菌表面,通过流式细胞术和免疫荧光技术都已经证实外源蛋白可以展示宿主菌表面,这为下一步评价该重组乳酸菌的免疫效果奠定了重要基础。

参考文献:

[1] 叶冬青, 潘海峰. 禽流感的流行现状及防控措施[J]. 中国学校卫生, 2005, 12:983-985.
Ye D Q, Pan H F. Current status and control measures of avian influenza[J]. Chinese Journal of School Health, 2005, 12:

- 983-985.
- [2] 石少华, 杨文涛, 叶丽萍, 等. H9N2 亚型禽流感病毒 HA-DCpep 融合基因重组乳杆菌的构建及免疫原性分析[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(2):187-192.
- Shi S H, Yang W T, Ye L P, *et al.* Construction and immunogenicity analysis of recombinant *Lactobacillus plantarum* NC8 expressing HA and DCpep genes of H9N2 subtype avian influenza virus[J]. Veterinary Science in China, 2014, 44(2):187-192.
- [3] 李静丽, 张海祥, 刘 杨, 等. 禽流感病毒感染人类及其致病机制研究[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(1):94-97.
- Li J L, Zhang H X, Liu Y, *et al.* Infection and pathogenic mechanism of avian influenza virus in human [J]. Journal of Microbiology, 2017, 37(1): 94-97.
- [4] Yang W, Yang G, Zhao L, *et al.* *Lactobacillus plantarum* displaying conserved M2e and HA2 fusion antigens induces protection against influenza virus challenge[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(12):5077-5088.
- [5] 黄 恋, 彭 波, 李小曼, 等. H9N2 禽流感病毒 M2 DNA 疫苗初免-蛋白加强免疫的保护效果研究[J]. 激光生物学报, 2012, 21(5):441-445.
- Huang L, Peng B, Li X M, *et al.* Immune effect of DNA prime-protein boost immune strategybased on H9N2 avian influenza virus matrix protein 2[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2012, 21(5): 441-445.
- [6] Pancholi P, Lee D H, Liu Q, *et al.* DNA prime/canarypox boost-based immunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in a chimpanzee[J]. Hepatology, 2001, 33(2): 448-454.
- [7] Seegers J F. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects[J]. Trends Biotechno, 2002, 20(12):508-515.
- [8] Kolandaswamy A, George L, Sadasivam S. Heterologous expression of oxalate decarboxylase in *Lactobacillus plantarum* NC8[J]. Current microbiology, 2009, 58 (2): 117-121.
- [9] Ben-Yedidia T, Rudolph W. A universal influenza vaccine: the BiondVax story[J]. Expert Review of Vaccines, 2011, 10(11): 1509-1512.
- [10] Pu J, Wang S, Yin Y, *et al.* Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(2): 548-553.
- [11] 孙海龙, 左绍航, 王林果, 等. 当前养殖业中禽流感的流行及免疫现状[J]. 兽医导刊, 2012, 2: 30-32.
- Sun H L, Zuo S H, W L G, *et al.* The current epidemic and immunization status of avian influenza in the poultry industry [J]. Veterinary Orientation, 2012, 2:30-32.
- [12] 蔡若鹏, 杨文涛, 杨桂连, 等. 甲型流感病毒 NP 和 M2 的特性及其在疫苗研制中的应用[J]. 中国兽医学报, 2014, 34 (10):1704-1708.
- Cai R P, Yang W T, Yang G L, *et al.* The characteristics of NP and M2 in influenza A virus and their applications in vaccine development[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(10):1704-1708.
- [13] Liu X, Sun L, Yu M, *et al.* Cyclophilin A interacts with influenza impairs the early stage of the viral replication[J]. Celr Microbiology, 2009, 11(5):730-741.
- [14] 管 洁, 周育森. 禽流感病毒 M2 蛋白研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2007, 02:84-86.
- Guan J, Zhou Y S. Research progress on M2 protein of avian influenza virus [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2007, 2: 84-86.
- [15] Jimenez G S, Planchon R, Wei Q, *et al.* Vaxfectin-formulated influenza DNA vaccines encoding NP and M2 viral proteins protect mice against lethal viral challenge [J]. Hum Vaccin, 2007, 3:157-164.
- [16] Gao X, Wang W, Li Y, *et al.* Enhanced Influenza VLP vaccines comprising matrix - 2 ectodomain and nucleoprotein epitopes protects mice from lethal challenge[J]. Antiviral Res, 2013, 98: 4-11.
- [17] 蔡若鹏. 基于 pgsA 作为表面展示元件的重组植物乳杆菌表达系统的构建及验证[D]. 长春:吉林农业大学, 2015.
- Cai R P. Construction and validation of recombinant *Lactobacillus plantarum* expression system based l onpgsA as surface display component[D]. Changchun:Jilin Agricultural University, 2015.

(编辑:李文平)