

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(6): 807–812; 4 June 2009  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 禽流感病毒 M2e、NP 多表位嵌合肽抗原的构建及免疫原性

徐海, 侯红岩, 邓碧华, 郑其升, 侯继波\*

(江苏省农业科学院, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014)

**摘要:**【目的】为了克服传统禽流感疫苗各亚型之间无交叉保护的缺陷, 研制抗禽流感通用型疫苗。【方法】以禽流感病毒 M2e、NP 表位为基础串联 T 细胞表位构建 4 个原核表达载体: pET-3M2e、pET-3M2e-NP<sub>1,2</sub>-Fc、pET-3M2e-NP<sub>1,2</sub>-TCE、pET-TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub>。纯化重组蛋白并与弗氏佐剂混合制成疫苗, 胸部肌肉注射免疫 20 日龄非免疫鸡(150 μg/只), 4 个融合蛋白分为四组, 每组十只。ELISA 方法检测血清中 M2e 抗体水平; 在 MDCK 细胞上检测血清与 H9N2 亚型禽流感病毒的结合能力, 在鸡胚上检测其中和能力; 以流式细胞仪测定 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的变化。【结果】研究发现, 各免疫组均能检测到高水平的 ELISA 抗体, 免疫荧光显示抗血清均能跟病毒特异性结合, 中和试验表明抗血清不能中和病毒但能抑制病毒的复制。流式细胞仪检测显示外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞所占比例在免疫后均有明显升高( $P < 0.05$ ), TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub> 组 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞所占比例分别达到 47.23% 和 36.77%, 具有细胞免疫的特征。【结论】构建的嵌合肽抗原具有较好的免疫原性, 能刺激机体产生体液和细胞免疫, 为进一步研制抗禽流感通用型疫苗做出有益的探索。

**关键词:** 禽流感病毒; 原核表达; 抗原表位; 保守序列

**中图分类号:** S852.65      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0807-06

禽流感是由 A 型流感病毒引起的全身性或呼吸器官性传染病。该病毒隶属正粘病毒科流感病毒属, 鸡、火鸡、鸭和鹌鹑等家禽及野鸟、水禽、海鸟等均可感染, 甚至威胁人类的健康。

HA、NA、M2 为病毒的 3 种膜蛋白, 它们均能诱导机体产生抗体。M2 是流感病毒的膜蛋白之一, 有 97 个氨基酸残基组成其序列高度保守<sup>[1-2]</sup>, 在所检测的毒株中, 其同源性高达 90%, 其胞外区 24 肽是主要的抗原位点<sup>[3]</sup>。NP 是一种多功能蛋白, 是细胞毒性淋巴细胞识别的主要抗原, 含有 3 个独立的抗原位点, 以诱导细胞免疫为主<sup>[4-7]</sup>。当前的流感疫苗着眼于针对表面糖蛋白 HA 和 NA 分子的外膜区诱导较强的中和抗体来研制的, 但缺陷在于 HA 和 NA 分子容易发生抗原漂移或突变(每年每核苷酸突

变率为  $10^{-3}$ )<sup>[8-9]</sup>, 并且各个亚型之间不能交叉保护。这就需要不断的更新疫苗株以保证与流行株具有相同的抗原性。因此选择突变率低、通用型的靶抗原是禽流感疫苗的研究方向。

我们将 M2e 基因重复至 3 拷贝(3M2e)连接 NP 的两个保守 T 细胞表位(NP<sub>1,2</sub>)基因, 与鸡 IgY Fc 片段(Fc)基因、乙肝表面抗原和破伤风毒素的两个通用型 T 细胞表位(TCE)基因进行串联, 在原核表达载体 pET32a(+) 构建了能高效表达重组蛋白的质粒, 将重组蛋白与佐剂混合制成疫苗进行免疫学试验。结果证明, 以保守的 M2e 和 NP 抗原表位为基础构建的重组蛋白具有很好的免疫原性, 刺激机体产生体液免疫和细胞免疫, 为禽流感通用型疫苗的研究作出有益的探索。

**基金项目:** 江苏省高科技资助项目; 江苏省农业科学院基金资助项目

\* 通信作者。Tel: +86-25-84392008; E-mail: houjibo@jaas.ac.cn

**作者简介:** 徐海(1982-), 江苏扬州人, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学方面的研究。E-mail: hai-x@126.com

**收稿日期:** 2008-12-09; **修回日期:** 2009-02-27

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌株:** pET-3M2e 含有 3 拷贝 M2e 基因、pBV-M2e-Fc 含有鸡 IgY Fc 片断基因, 由国家兽用生物制品工程技术研究中心构建保存。pUC-TCE 含有乙肝表面抗原和破伤风毒素的两个通用型 T 细胞表位基因, 由大连宝生物合成。质粒 pUC-18、pET-32 $\alpha$  (+), 宿主菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3), 由本中心保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 限制酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶为大连宝生物公司产品, 其余试剂均为分析纯。HisTrap HP 层析柱购自美国 GE 公司, PCR 仪购自大连宝生物公司; Geldoc-It Imaging System 购自美国 UVP 公司; 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 荧光显微镜购自德国蔡司公司。

**1.1.3 实验雏鸡:** 购 1 日龄非免鸡购于南京青龙山鸡场, 试验前检测无禽流感病毒(AIV)抗体。

### 1.2 原核表达载体的构建

在本实验室构建的 pET-3M2e、pBV-M2e-Fc 基础上, 通过 PCR 及人工合成基因的方法获得目的基因 3M2e-NP<sub>1,2</sub>-Fc、3M2e-NP<sub>1,2</sub>、TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub>, 与表达载体 pET-32 $\alpha$  (+) 连接构建重组子 pET-3M2e-NP<sub>1,2</sub>-Fc、pET-3M2e-NP<sub>1,2</sub>、pET-TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub>, 酶切和测序鉴定。

### 1.3 重组菌的诱导表达、蛋白的纯化及 Western blot 分析

挑取重组菌 BL21 (pET-3M2e)、BL21 (pET-3M2e-NP<sub>1,2</sub>-Fc)、BL21 (pET-TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub>)、BL21 (pET-3M2e-NP<sub>1,2</sub>) 及宿主菌 BL21 (pET-32 $\alpha$ ) 单菌落, 37 °C 振荡培养过夜, 次日按 1:100 比例转接, 振荡培养约 2 h (OD<sub>600</sub> 达 0.4~0.6), 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mM, 37 °C 诱导 5 h, 收获细菌, SDS-PAGE 鉴定融合蛋白的表达。将人工合成纯度在 90% 以上的 M2e 24 肽偶联至血蓝蛋白(KLH)上(由上海波泰生物科技有限公司完成), 免疫 SPF 鸡制备抗 M2 特异性血清, 用于 Western blot 检测融合蛋白活性。根据 HisTrap HP 说明纯化蛋白, 经 Gene Quant-100 测定蛋白浓度, 调整浓度为 2 mg/ml, -20 °C 冻存备用。

### 1.4 疫苗的制备及免疫

将纯化的蛋白与弗氏佐剂乳化, 首免用完全弗氏佐剂, 二免用不完全弗氏佐剂乳化。20 日龄首

免, 3 周后加强免疫, 胸部肌肉注射 0.2 mL/150  $\mu$ g。4 种融合蛋白分为 4 个试验组, 另设阴性对照组, 每组十只。

### 1.5 免疫效果的检测

**1.5.1 抗体水平的检测:** 以本实验室建立的 ELISA 方法检测抗 M2e 抗体<sup>[10]</sup>。

**1.5.2 间接免疫荧光试验:** 将 MDCK 细胞在 96 孔细胞培养板 (Corning) 上以  $1.5 \times 10^6$  细胞/孔铺板, 24 h 长成单层细胞后每孔加入 200 个 TCID<sub>50</sub> 的 H9N2 病毒另留两个孔做对照, 继续培养 1h。弃掉培养液用 PBS 冲洗两次, 加入待检及阴性血清于 37 °C 孵育 1 h, PBS 冲洗两次, 加入荧光标记的羊抗鸡的二抗, 避光 37 °C 反应 30 min。用 PBS 洗涤 3 次后用荧光显微镜观察。

**1.5.3 鸡胚中和试验:** 将 H9N2 亚型禽流感病毒稀释成 100、50、25 个 EID<sub>50</sub> 每 100  $\mu$ L, 分别与阴、阳性血清及各免疫组二免后四周时的血清等量混合, 37 °C 孵育 1 h 后, 接种 9 日龄 SPF 鸡胚, 每个稀释度接 5 枚鸡胚。弃掉 24 h 内死亡的鸡胚, 观察鸡胚死亡情况并于 96 h 后测定鸡胚尿囊液的 HA, HA 大于 4 判为阳性, 计算血清的中和效价。

**1.5.4 外周血 T 淋巴细胞亚类的监测:** 鸡翅静脉采集 1.0 mL 肝素抗凝血, 用淋巴细胞分离液进行淋巴细胞分离。分离的淋巴细胞用含 5% 牛血清的 PBS (pH7.4) 洗涤 3 次后, 用 PBS 洗涤液调整细胞浓度至  $2 \times 10^7$  个细胞/mL。将适量淋巴细胞等体积分装到两个流式管中, 加入用 FITC、PE 双标记的 CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> 单抗避光室温反应 30 min, 1500  $\times$  g 离心, 将沉淀用淋巴细胞洗液重悬, 洗涤 3 次后用 1 mL PBS 重悬, 流式细胞仪进行检测。

## 2 结果

### 2.1 表达载体的构建

构建表达载体 pET-3M2e-NP<sub>1,2</sub>-Fc、pET-3M2e-NP<sub>1,2</sub>、pET-TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub> 用 EcoRV、HindIII 双酶切分别可以切出 820 bp、310 bp、470 bp 目的条带与预计的相符合, 序列测定结果显示插入片段的序列完全正确, 阅读框无移码。

### 2.2 融合蛋白的表达、纯化及鉴定

重组菌 BL21 (pET-3M2e)、BL21 (pET-3M2e-NP<sub>1,2</sub>-Fc)、BL21 (pET-3M2e-NP<sub>1,2</sub>)、BL21 (pET-TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub>) 在 IPTG 诱导下分别表达 28.5 kDa、50 kDa、

31.2 kDa、36.2 kDa 的融合蛋白, SDS-PAGE 检测融合蛋白与预计相符合。经过 HisTrap HP 柱纯化能到条带相对较为单一的纯蛋白。Western blot 显示, 融合蛋白能够与抗禽流感病毒 M2e 抗体特异性反应, 具有很高的免疫反应性。

### 2.3 免疫鸡只的体液应答

分别以人工合成的流感病毒 M2e 24 肽(H9、H5 两个亚型)包被酶标板, 检测免疫鸡只血清, 4 种融合蛋白均能引起机体的免疫反应, 抗体水平见图 1。二免后抗体水平有明显升高, 各组之间抗体水平差异显著。而以 H9、H5 两个亚型的 M2e 24 肽包被检测出的抗体水平无明显差异。文中只给出以 H9 亚型 24 肽包被检测结果。

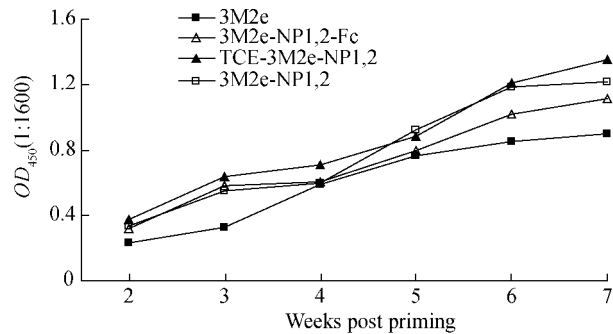


图 1 融合蛋白免疫后各组鸡抗 M2e 抗体的变化

Fig.1 M2e antibody levels of immunized chicken.

### 2.4 抗血清与病毒的结合能力

为证明免疫血清能够与病毒表达在感染细胞表面的 M2 结合, 用免疫组 TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub> 血清 1:100 稀释与感染病毒的 MDCK 细胞孵育, 加荧光二抗在荧光显微镜下观察结果表明, 在感染细胞的表面能够观察到荧光(图 2-A), 而阴性血清对照细胞表面没有荧光(图 2-B), 其它组的图片文中未列出。从而证明了表达的融合蛋白刺激机体产生的抗血清能够与流感病毒表达在细胞表面的 M2 结合。

### 2.5 鸡胚中和试验

免疫产生的抗血清能够与病毒表达在细胞表面的 M2 结合, 但为了验证抗血清是否具有中和能力, 用抗血清与 H9N2 禽流感病毒孵育后接种 9 日龄 SPF 鸡胚做中和试验。接胚 96 h 后测 HA, 以 TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub> 组结果为例: 病毒接种量为 25 个 EID<sub>50</sub> 时抗血清能够中和部分病毒, 存活胚 HA 均小于 4, 一枚死胚 HA 为 6; 病毒接种量为 50 个 EID<sub>50</sub> 时抗血清中和能力下降, 存活胚 HA 分别为 3、5, 三枚死胚 HA

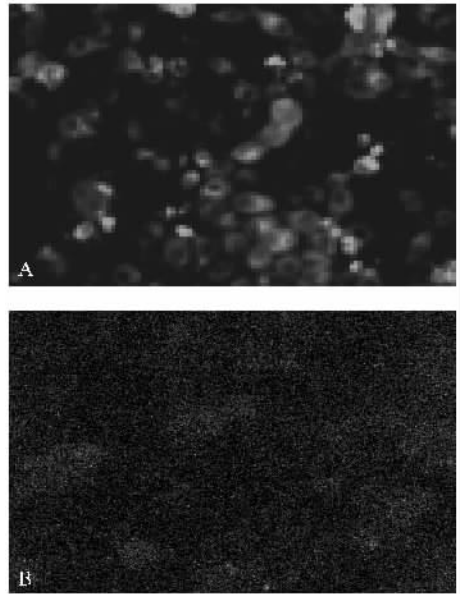


图 2 流感病毒感染的 MDCK 细胞免疫荧光

Fig.2 Immunofluorescence of influenza infected MDCK cells. A: Serum of immunized chicken incubate with influenza infected MDCK cells; B: Negative control.

均大于 5; 病毒接种量为 100 个 EID<sub>50</sub> 时抗血清只能抑制病毒的复制, 五枚胚 HA 均大于 7; AIV H9 阳性对照血清则能完全中和病毒; 阴性对照 HA 均大于 9。因此, 结果显示抗 M2e 抗体不能完全中和病毒, 只能抑制病毒的复制。

### 2.6 外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的亚类的动态变化

最新研究表明多肽疫苗也能引起机体的细胞免疫反应, 体现在各类功能性 T 淋巴细胞发生数量和免疫活性的改变, 利用流式细胞术可以检测 T 细胞数量的变化, 从而间接反应机体细胞免疫应答水平。从图 3 可以看出, 至二免后四周(第 7 周), 各疫苗免疫组的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的百分比分别为 3M2e (31.68%)、3M2e-NP<sub>1,2</sub>-Fc (38.71%)、3M2e-NP<sub>1,2</sub> (42.35%)、TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub> (47.23%); CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的百分比分别为 3M2e (24.26%)、3M2e-NP<sub>1,2</sub>-Fc (30.19%)、3M2e-NP<sub>1,2</sub> (33.82%)、TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub> (36.77%)。CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的比例较免疫前均有不同程度的升高, 其中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞上升均大于 10%, CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞上升均大于 5%, 其中 TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub> 组的升高最为明显。CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的检测结果在免疫前为随机抽取的 5 只鸡的检测平均值, 免疫后每组固定 3 只鸡跟踪监测 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的动态变化, 结果表示为 3 只鸡的平均

值。文中(图 4)仅给出 TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub> 组淋巴细胞 4 次检测的图片。

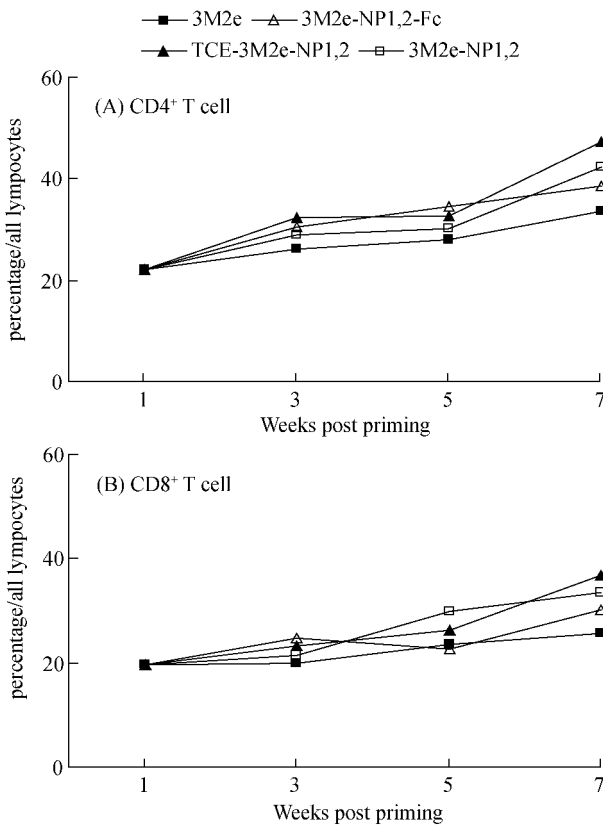


图 3 外周血 CD4<sup>+</sup> (A) 和 CD8<sup>+</sup> (B) T 淋巴细胞的亚类的动态变化

Fig.3 Dynamics of CD4<sup>+</sup> (A) and CD8<sup>+</sup> (B) T lymphocytes in peripheral blood of immunized chickens

### 3 讨论

禽流感病毒抗原型的不断改变,使得须经常变

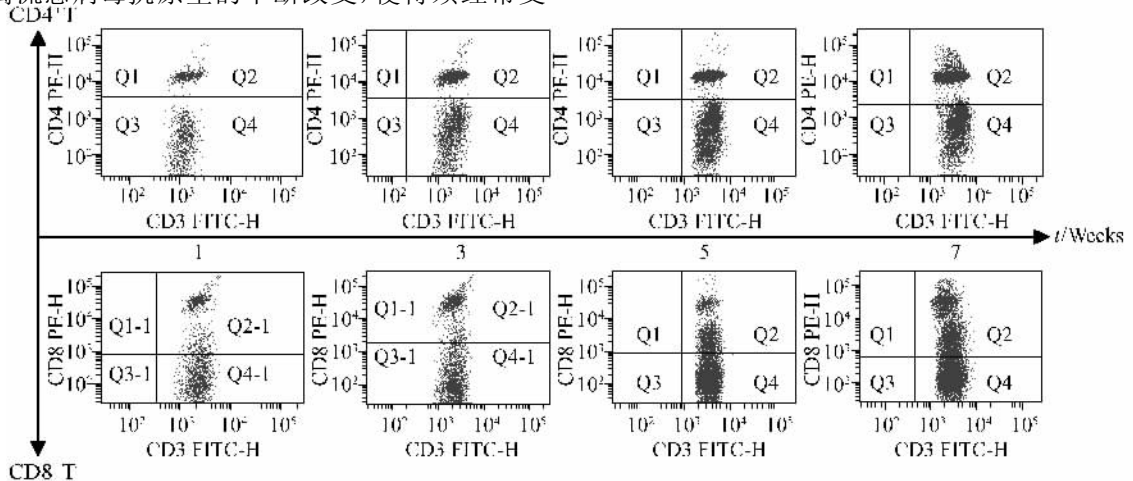


图 4 免疫组 TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub> 流式结果

Fig.4 Flow cytometry pictures of group TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub>.

更疫苗的成分,才不致于使注射了疫苗的鸡只免疫失败,因此寻求一种能提供交叉保护性的通用疫苗引起了很多研究者的注意。不同的研究人员通过将保守 M2 蛋白的膜外区域(M2e)融合到不同的半抗原载体上,在原核系统中表达的蛋白来构建一种通用疫苗。他们发现腹腔内或肌肉注射纯化的 M2 蛋白到小鼠体内能提供较高的保护率,而且这种保护具有交叉性。研究人员又研究了不同拷贝数的 M2e 诱导的免疫应答的区别。Liu WL 等<sup>[11]</sup> 串联了不同数目的 M2e,然后与 GST 融合表达,表达的融合蛋白免疫小鼠产生特异性抗体,抗体水平随 M2e 拷贝数的增多,也逐渐增高,攻毒之后,多拷贝抗原表位的融合的蛋白的免疫保护力明显高于低拷贝的,其中 16 个拷贝的可以保护 100%,4 个拷贝的可以保护 50%,而单拷贝的却没有保护力。2005 年,Filette 等<sup>[12]</sup> 又分别将 2 个和 3 个拷贝的 M2e 基因与 HBc 的 N 端基因串联,之后融合表达出两个融合蛋白,与按照化学方法偶联的 M2-HBc 分别免疫小鼠,并用单拷贝的 M2-HBc 融合蛋白作为对照,结果显示,此 3 个蛋白诱导产生的抗体水平更高,与单拷贝的差异显著,而且免疫保护力更高,免疫小鼠的症状也更轻,但是与单拷贝的差异不显著。在这 3 组内部,抗体水平和保护力均无显著差异。综上所述,多拷贝的 M2e 免疫效果比低拷贝的明显要好,但是不是越多越好,还是有一个限度,至今还没有相关报道。

本研究以大肠杆菌表达的融合蛋白 3M2e、3M2e-NP<sub>1,2</sub>-Fc、3M2e-NP<sub>1,2</sub>、TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub> 为免疫原,以非免鸡为动物模型进行免疫。通过 ELISA 方

法检测抗体得出: 四种融合蛋白配合弗氏佐剂免疫, TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub>产生的抗体最高, 其次是 M2e-NP<sub>1,2</sub>、3M2e-NP<sub>1,2</sub>-Fc, 抗体水平最低的是 3M2e。通过间接免疫荧光试验证实, 免疫产生的抗体能够与表达在感染细胞表面的 M2 特异性结合。在鸡胚上高浓度的抗血清能够部分中和低含量的 H9N2 亚型禽流感病毒, 在病毒含量较高时只能能够抑制其复制。

虽然许多研究认为对禽流感起免疫作用的主要是体液应答, 其中 HI 抗体能够中和病毒的感染, NI 抗体能够在一定程度上限制病毒的繁殖。但在对鼠和人的研究中发现, 识别来源于内部蛋白表位的 CTL 在对病毒的免疫应答中具有重要作用。只是在对鸡的试验中很难获得同样的免疫效果, Kadowaki 等<sup>[13]</sup>分析认为鼠和鸡之间疫苗保护效力的差异可能是它们在细胞介导的免疫应答动力学和病毒感染在它们体内的特性不同。因为在鼠, 流感病毒局限于呼吸道, 而在鸡致死性 H5 亚型病毒可产生全身性感染。对鸡的保护性免疫应答的失败可能是由于未能充分激活和动员体内的 CTL。为了检测疫苗免疫后对免疫活性细胞的影响, 我们使用流式细胞仪监测了免疫鸡外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的变化。从流式细胞仪检测的结果来看, 融合蛋白免疫组鸡在经两次免疫后 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞占外周血总淋巴细胞的比例逐渐升高, 符合细胞免疫的特征, 说明融合蛋白确实在一定程度上激活了机体的细胞免疫系统。而且可以发现在 3M2e 的上下游融合了 TCE、NP 抗原位点的融合蛋白 TCE-3M2e-NP<sub>1,2</sub> 激发的细胞免疫应答水平最高, 而且该组产生的抗体水最高也间接说明了 T 细胞表位在诱导免疫应答中发挥了一定的作用<sup>[14]</sup>。免疫后 CD4<sup>+</sup> T 细胞的变化比 CD8<sup>+</sup> T 细胞明显, 这与 CD4<sup>+</sup> T 细胞参与 B 细胞合成抗体的功能有关。在本实验中, 我们没有设空白对照, CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞的变化可能会让人想到 T 淋巴细胞的百分比是否会随着动物的年龄增长而增长。Suresh 等<sup>[15]</sup>研究了火鸡日龄与其淋巴细胞亚类分布比例及其免疫活性的影响, 结果发现外周血中 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例是 29.8%, CD8<sup>+</sup> T 细胞的比例是 13.6%, 并发现火鸡日龄对脾脏和外周血液中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞分布的相对比例没有影响, 而对胸腺中的 T 细胞亚类变化有影响。

总体来说, 以禽流感保守 M2e 为主要抗原区的基础上添加了核蛋白、通用型 T 细胞表位的多表位

疫苗与常规流感疫苗相比并没有显示出优势。虽然它们能很好的刺激机体产生免疫反应, 但免疫保护的效果还有待到有资质的机构做进一步验证, 尤其是需要弄清楚究竟是抗体还是 CTL 在抗流感病毒的免疫中发挥着主要的作用, 从而能更有目的地筛选表位用于流感疫苗的研制。研究中按照禽流感病毒 M2e 的保守序列合成基因, 这个序列与大多数的 H5N1 亚型流感病毒的序列极其接近, 文中只涉及到 H9N2 亚型禽流感病毒, 只是做了一个初步的研究, 并没有验证免疫血清对其他亚型流感病毒的复制是否有抑制作用。因此, M2 蛋白是不是可以成为一个理想的通用型疫苗还要有待进一步的研究, 本研究的内容可以作为一个参考。

## 参考文献

- [1] De Filette M, Jou W, Birkett A, et al. Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology*, 2005, 337(1): 149 - 161.
- [2] 管洁. 禽流感病毒 M2 蛋白研究进展. 微生物学免疫学进展 (*Progress in Microbiology and Immunology*), 2007, 35(2): 84 - 86.
- [3] David AS. Genetics of influenza viruses. *Annual Review of Genetics*, 36(2002): 305 - 332.
- [4] Epstein SL, Tumpey TM, Misplon JA, et al. DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emergence of Infectious Diseases*, 2002; 8(8): 796 - 801.
- [5] Berkhoff EGM, Geelhoed-Mieras MM, Fouchier RAM, et al. Assessment of the extent of variation in influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes by using virus-specific CD8 + T-cell clones. *Journal of General Virology*, 2007(88): 530 - 535.
- [6] Saha S, Yoshida S, Ohba K, et al. A fused gene of nucleoprotein (NP) and herpes simplex virus genes (VP22) induces highly protective immunity against different subtypes of influenza virus. *Virology*, 2006 (354): 48 - 57.
- [7] Wasilenko JL, Lee CW, Sarmiento L, et al. NP, PB1, and PB2 Viral Genes Contribute to altered replication of H5N1 Avian Influenza Viruses in Chickens. *Journal of General Virology*, 2008: 4544 - 4553.
- [8] 唐应华, 吴培培, 彭大新, 等. H5N1 亚型禽流感病毒基因重排后毒力的变化. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(6): 745 - 749.
- [9] Leser GP, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding

- surface distribution of HA, NA and M2 proteins. *Virology*, 2005, 342(2): 1215 – 227.
- [10] De Filette M, Ramne A, Birkett A, et al. The universal influenza vaccine M2e-HBc administered intranasally in combination with the adjuvant CTA1-DD provides complete protection. *Vaccine*, 2006, 24(5): 544 – 51.
- [11] Liu W, Peng Z, Liu Z, et al. High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity. *Vaccine*, 2004, 23(3): 366 – 371.
- [12] Filette MD, Fiers W, Martens W, et al. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine*, 2006, 24: 6597 – 6601.
- [13] Kadowaki S, Chen Z, Asanuma H, et al. Protection against influenza virus infection in mice immunized by administration of henagglutinin-expressing DNAs with electroporation. *Vaccine*, 2000, 18: 2779 – 2788.
- [14] Noton SL, Medcalf E, Fisher D, et al. Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *Journal of General Virology* (2007), 88: 2280 – 2290.
- [15] Suresh M, Shanna JM, Belzer SW, et al. Studies on lymphocyte subpopulations and the effect of age on immune competence in turkey. *Developmental and Comparative Immunology*, 1993, 17(6): 525 – 535.

## Construction and immunogenicity of chimeric peptide antigen composed of M2e and NP genes of avian influenza virus

Hai Xu, Hongyan Hou, Bihua Deng, Qisheng Zheng, Jibo Hou\*

(National of Research Center Veterinary Biological Medicine Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** [Objective] In order to overcome the defect of traditional avian influenza vaccine that lacks cross-protection among different serotypes, we developed a universal anti-influenza vaccine. [Methods] Based on the gene analysis for AIV matrix protein 2 and two cytotoxic T-lymphocyte epitopes, we constructed four prokaryotic expression vectors. The target gene was induced by IPTG and the fusion protein was mixed with Freund's adjuvant; then used to immunize 20-day-old chicken by intramuscular injection and boosted 3 weeks later. Blood samples were collected weekly following the primary vaccination. The anti-M2e antibody was detected with ELISA coated by synthesized peptide; the neutralizing ability of anti-serum was evaluated on MDCK cell line and chick embryo; the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte amounts in peripheral blood of immunized chicken were measured by flow cytometry. [Results] The fusion protein induced immunological reaction, and the antibody bound with the viral M2 protein expressed on the surface of MDCK cells. Serum could only inhibit the replication without neutralizing the virus. Flow cytometry results showed that CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte in peripheral blood increased obviously following immunization ( $P < 0.05$ ), which possessed the character of cell immunization. [Conclusion] Chimeric peptides kept good immunogenicity and provided useful probes for the control of avian influenza.

**Keywords:** Avian Influenza Virus; prokaryotic expression; antigen epitope; consensus sequence

(本文责编: 王晋芳)

\* Corresponding author. Tel: +86-25-84392008; E-mail: houjibo@jaas.ac.cn