

DOI:10.13350/j.cjpb.230404

• 论著 •

## 昆虫杆状病毒系统表达人流感多表位基因盒的研究\*

李凯<sup>1,2</sup>, 丁焱<sup>1</sup>, 庄忻雨<sup>2</sup>, 田明尧<sup>2</sup>, 曹亮<sup>3</sup>, 朱光泽<sup>4\*\*</sup>, 金宁一<sup>2\*\*</sup>(1. 泰兴市虹桥镇畜牧兽医站, 江苏泰兴 225400; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所;  
3. 吉林医药学院; 4. 长春中医药大学附属医院检验科)

**【摘要】** **目的** 通过昆虫-杆状病毒表达系统表达人流感病毒多表位基因盒, 为进一步研发通用型流感疫苗提供实验依据。 **方法** 将甲型流感病毒 H1N1 颈部区 (345aa-566aa) 和 H1/H3/B 亚型 HA2 片段经 4GS Linker 串联 M2e 及 ferritin 蛋白构成的 HA2-M2e-ferritin (简称 HMf), 参照 A/Jilin/JYT-01/2018 (H1N1) 毒株的全基因组序列, 将其 HA2 基因和 HMf 基因序列按照昆虫细胞密码子偏好性进行优化合成, 经两次双酶切后分别克隆至 pFastBacTM 双载体中。热激法将重组质粒转化入 DH10BacTM 大肠埃希菌感受态, 含目的基因的 pFastBacDual-HA2-HMf 转移载体与 DH10Bac 的 Bacmid 质粒重组, 构建重组转移质粒 rBacmid-HA2-HMf。在脂质体介导下, 用 rB-HA2-HMf 转染 Sf9 细胞进行重组杆状病毒的拯救。通过限制性酶双酶切、测序、重组 Bacmid PCR、Western blot 和间接免疫荧光法 (IFA) 鉴定目的蛋白的表达。用重组杆状病毒感染悬浮 sf9 细胞, 收取细胞悬液, 经超速离心、蔗糖密度梯度离心获得重组蛋白, 利用透射电镜对重组蛋白进行观察分析。 **结果** HA2 和 HMf 基因共表达, 将 HA2 全长和 HMf 成功插入 pFastBacTMDual 双顺载体, 包装并拯救出携带人流感多表位基因的重组杆状病毒 rBDV-HA2-HMf。重组转移质粒 pFastBacDual-HA2/HMf 经限制性双酶切鉴定, 重组穿梭质粒 rBacmid-HA2/HMf 经菌液 PCR 鉴定、杆状病毒共表达人流感多表位基因盒经 Western blot 和 IFA 鉴定成功, 透射电镜下观察到重组蛋白形成的约 20 nm 的类病毒样颗粒。 **结论** 成功构建重组杆状病毒, 其表达的流感多重保守抗原具有反应原性, 为进一步研发通用型流感疫苗奠定了实验依据。

**【关键词】** 流感病毒; 重组杆状病毒; 颈部区结构域; 多重保守抗原; 疫苗**【中图分类号】** R373.1**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2023)04-0390-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Apr;18(4):390-394.]

**Expression of human influenza multi epitope genes by insect baculovirus system**LI Kai<sup>1,2</sup>, DING Yan<sup>1</sup>, ZHUANG Xin-yu<sup>2</sup>, TIAN Ming-yao<sup>2</sup>, CAO Liang<sup>3</sup>, ZHU Guang-ze<sup>4</sup>, JIN Ning-yi<sup>2</sup> (1. Animal Husbandry and Veterinary Station, Hongqiao Town, Taixing City, Taizhou City, Jiangsu 225400, China; 2. Changchun Veterinary Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; 3. Jilin Medical College; 4. Laboratory Department, Affiliated Hospital of Changchun University of Traditional Chinese Medicine)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To express human influenza virus multi-epitope gene box through insect baculovirus expression system, so as to provide scientific basis for further development of universal influenza vaccine. **Methods** The H1N1 neck region (345aa-566aa) and H1/H3/B subtype HA2 fragments of influenza A virus were optimized and synthesized according to the codon preference of insect cells by the sequence of HA2-M2e ferritin (HMf) gene composed of M2e and Ferritin proteins linked by 4GS Linker, and then cloned into pFastBacTM dual vector after twice double digestion; The heat shock method was used to transform the recombinant plasmid into the competent state of DH10BacTM *E. coli*. The pFastBacDual HA2-HMf transfer vector containing the target gene was recombined with the Bacmid plasmid of *E. coli* DH10Bac to construct the recombinant transfer plasmid rBacmid HA2-HMf. RB-HA2-HMf was transfected into Sf9 cells by liposome to rescue the recombinant baculovirus. The expression of the target protein was identified by restriction double enzyme digestion, sequencing, recombinant Bacmid PCR, Western Blot and indirect immunofluorescence assay (IFA). The recombinant baculovirus infected the suspended sf9 cells, collected the cell suspension, obtained the recombinant protein by ultracentrifugation and sucrose density gradient centrifugation, and analyzed the recombinant protein by electron microscope. **Results** HA2 and HMf genes were co expressed. The full length of HA2 and HMf were successfully inserted into the vector using pFastBacTM Dual bicistronic vector, and the recombinant baculovirus rBDV-HA2-HMf carrying human influenza multi epitope genes was packaged and rescued. The recombinant transfer

\* **【基金项目】** 长春市科技发展计划项目 (No. 21ZGY30); 吉林省教育厅科学技术研究项目 (No. JJKH20210482KJ)。\*\* **【通讯作者】** 金宁一, E-mail: ningyik@126.com; 朱光泽, E-mail: linan0912@126.com**【作者简介】** 李凯 (1995-), 男, 江苏人, 硕士。研究方向: 预防兽医学。E-mail: 1694593631@qq.com

plasmid pFastBacDual HA2/HMf was digested by restriction double enzymes, the recombinant shuttle plasmid rBacmid-HA2/HMf was identified by bacterial solution PCR, and the baculovirus co epitope gene box of human influenza was identified successfully by Western blot and IFA. The virus like particles of about 20 nm could be seen under TEM.

**Conclusion** The results indicate that the multiple conserved influenza antigens expressed by recombinant baculovirus have reactivity, which provides scientific basis for further development of universal influenza vaccine

**【Key words】** influenza virus; recombinant baculovirus; structure domain of neck region; multiple conservative antigens; vaccines

人流感病毒主要分为甲、乙、丙、丁 4 种类型<sup>[1]</sup>,其中毒性较强的甲型流感病毒因抗原易发生变异,分为 18 种不同的血凝素(HA)亚型和 11 种不同的神经氨酸酶(NA)亚型<sup>[2]</sup>。除丁型流感病毒外,其余都可感染人类,其中甲型流感中的 H1N1、H3N2 以及 H5N1 是引起流感大流行的主要病原体<sup>[3]</sup>,在 20 世纪仅 3 次大流行(1918 年西班牙 H1N1、1957 年亚洲 H2N2 及 1968 年香港 H3N2)就夺走了超过 5 000 万人的生命<sup>[4]</sup>。流感病毒具有高度传染性,能在短期内突然发生并迅速蔓延,造成不同程度的流行甚至世界性的大流行<sup>[5]</sup>,对全球人力和物力资源造成巨大损失,因此流感的预防与控制对人类公共卫生事业具有重要意义<sup>[6]</sup>。

2017 年末到 2018 年初出现流感肆虐,各地流感病毒检测阳性率达到很高水平,预防流感发生与传播的最佳方式就是疫苗接种<sup>[7]</sup>。由于流感的主要抗原 HA 和 NA 常常发生变异和漂移,导致接种流感疫苗具有时效性,这给疫苗的研制带来很大困难,人们对于通用型流感疫苗的渴望日益增长<sup>[8]</sup>。流感病毒的 HA 蛋白是主要诱发保护性免疫反应的抗原位点,HA 的作用是绑定到宿主细胞受体从而诱导病毒进入,因此是中和抗体的主要目标<sup>[9]</sup>。虽然 HA 蛋白结构高度变异,但其第二亚基(HA2)形成相对保守的颈部结构域,在病毒感染早期起重要作用<sup>[10]</sup>。M2 蛋白是流感的主要膜蛋白之一,研究发现针对 M2 蛋白的单克隆抗体在细胞培养中具有抑制流感复制的功能,M2e 同样具有此功能<sup>[11]</sup>。铁蛋白形成纳米笼结构,是一种在治疗中具有功能性的纳米材料<sup>[12]</sup>。多表位流感疫苗是通过流感病毒不同亚型主要保护性抗原表位进行筛选,将多种不同抗原表位间连接特定的 Linker 以构成多表位表达盒,将其单独或串联其他基因克隆至相应的表达载体构建的疫苗<sup>[13]</sup>。杆状病毒-昆虫细胞表达系统最基本的用途就是用来表达外源蛋白,还可以作为外源基因的传递系统将外源基因插入到哺乳动物细胞启动子下游,利用昆虫细胞包装重组杆状病毒,然后感染哺乳动物细胞,从而将外源基因带入哺乳动物细胞进行表达,杆状病毒只能在昆虫细胞内复制,安全性得到保证<sup>[14]</sup>。本研究通过优化合成甲型流感病毒

H1N1 的 HA2 区域(345aa-566a)、H1/H3/B 亚型 HA2 片段(48aa)经 4GSLinker 串联两个拷贝的 M2e 及 Ferritin 蛋白构成的 HA2-M2e-ferritin(简称 HMf),并分别在 H1N1-HA2 基因末端添加 Anti-Flag 基因, HMf 末端添加 6×His 标签。将 H1N1 病毒颈部区 HA2 和 HA2-M2e-Ferritin(HMf)基因分别插入 pFastBacDual 的多角体蛋白启动子 pPh 和 pP10 启动子后,利用 Bac-to-Bac 杆状病毒/昆虫细胞系统表达,为广谱流感病毒疫苗的研发提供新思路。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

**1.1 细胞和载体** DH10BAC 感受态细胞购自博迈德生物公司;杆状病毒转移载体 pFastBacDual 及 Sf9 细胞由本实验室保存。

**1.2 主要试剂和仪器** T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司;Goat Anti-Mouse IgG H&L,克隆感受态细胞 Trans1-T1, Blue Plus<sup>®</sup> Protein Marker, ProteinFind<sup>®</sup> Anti-His Mouse Monoclonal Antibody 和 ProteinFind<sup>®</sup> Anti-DYKDDDDK Mouse Monoclonal Antibody 均购自北京全式金公司;限制性内切酶和 DNA Mark 购自日本 TaKaRa 公司;牛血清白蛋白(BSA)购自 Gentihold 公司;X-gal, IPTG 溶液(50 mg/mL)购自中国 Solarbio 公司;Fast Digest XhoI 和 Fast Digest KpnI 及 GibcoGrace's Insect Medium Unsupplemented 购自美国 Thermo Scientific<sup>™</sup> 公司;胎牛血清购自美国 GBICO 公司。

### 2 方法

**2.1 引物和序列合成** pGH-T-HA2 和 pGH-T-HMf 由吉林省库美生物科技有限公司优化合成,通用引物 Puc/M13F 与 p10R 和 Puc/M13R 与 PHF 参照 Invitrogen 提供的用户指南。引物序列如表 1。

**2.2 重组质粒 pFastBacDual-HA2-HMf 的构建与鉴定** 将 pGH-T-HA2、pFastBacDual 进行 EcoR I 和 Hind III 双酶切,酶切产物进行胶回收,参照 T4 连接酶操作说明连接 HA2 基因和 pFastBacDual 载体,得到重组转移载体 pFastBacDual-HA2。将 pFastBacDual-HA2、pGH-T-HMf 经 XhoI 和 KpnI 进行双酶切,胶回收酶切产物,将 pFastBacDual-HA2 载

体和 HMf 基因连接后转化克隆感受态细胞 Trans1-T1。挑取单个菌进行培养,提取质粒进行酶切鉴定,并委托吉林省库美生物科技有限公司进行测序。

表 1 PCR 引物  
Table 1 PCR primer

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence	基因 Gene	片段大小(bp) Size of products
Puc/M13F	CCCAGTCACGACGTT GTAAAACG	p10+HMf	2939
p10R	AGCGGATAACAATTT CACACAGG		
Puc/M13R	CGGACCTTTAATTCA ACCC	pHF+HA2	1387
pHF	TTCATACCGTCCC ACCAT		

**2.3 重组质粒 pFastBacDual-HA2-HMf 的转座及重组 Bacmid 鉴定** 将构建的 pFastBacDual-HA2-HMf 重组转移载体和 pFastBacDual 空载体(阴性对照)分别热转化 DH10BAC 感受态细胞,热应激后分别加入 800 μL 预热室温的 SOC 无抗性培养基,37 °C、225 r/min 震荡培养 5 h 以上。取 100 μL 菌液均匀涂布在蓝白斑平板(卡那霉素、庆大霉素和四环素),37 °C 倒置培养 48 h 以上。挑选白斑培养后再次划线,37 °C 倒置培养 24 h,挑取白色菌落,用通用引物 Puc/M13F、p10R 和 Puc/M13R、PHF 对重组 Bacmid 进行 PCR 鉴定,阳性重组转座子命名为 rBacmid-HA2-HMf。

**2.4 重组杆状病毒的制备** 取 Sf9 铺六孔板并培养 24 h,确认 Sf9 细胞密度在  $(1.5 \sim 2.5) \times 10^6$  个细胞/mL 范围内,存活率高达 95% 以上,更换完全培养基为 1 mL 双无 Grace's 培养基。用双无 Grace's 培养基分别稀释阳性重组杆粒 Bacmid-HA2-HF (4 μg) 和 Cellfectin™ II Reagent (8 μL),室温静置 15 min;将稀释的重组杆粒 Bacmid-HA2-HMf 和 Cellfectin™ II Reagent 混合,轻轻混匀,室温孵育 20 min;逐滴加入转染混合物,27 °C 孵育细胞 4 h;吸出转染培养物,加入 2 mL 完全培养基,27 °C 孵育 72 h,直至观察到细胞被病毒感染。收上清在 Sf9 细胞上传毒 3 代。

**2.5 Western blot 检测 HA2-HMf 蛋白的表达** 收集感染 rBacmid-HA2-HMf 的 Sf9 细胞,用 IP 细胞裂解液裂解后以 13 000 r/min(离心半径 8.5 cm)离心 5 min,取上清,加入 5×SDS-PAGE 电泳上样缓冲液,制备蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并转移到硝酸纤维素膜上,分别以抗 his 抗体和抗 Flag 抗体为一抗,(1 : 5000)为二抗进行 Western blot 鉴定。

**2.6 免疫荧光法检测 HA2-HMf 的表达** 按 1% 体积比将 P2 代重组杆状病毒接种 Sf9 细胞,同时设立阴

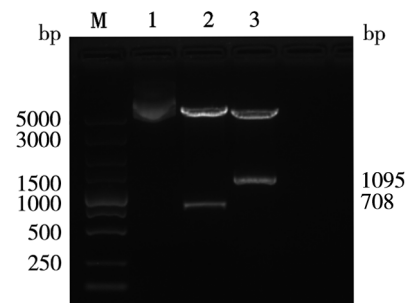
性对照。待细胞出现明显病变后弃去培养基,PBS 清洗 3 次;用预冷的 4% 多聚甲醛室温固定 10 min,弃固定液,PBS 洗 3 次;加入终浓度 0.1% TritonX-100 和 2% BSA 破膜封闭 30 min,PBS 洗 3 次;加入抗 his 抗体和抗 Flag 抗体(1 : 1000 稀释),37 °C 孵育 1 h,PBS 洗 3 遍;加入 FITC 标记 Goat Anti-Mouse IgG H&L 1 : 2000 稀释),37 °C 孵育 1 h,PBS 洗 2 遍,荧光显微镜观察并拍照。

**2.7 重组杆状病毒感染** 悬浮 sf9 细胞,收取细胞悬液,通过超离、蔗糖密度梯度离心获得重组蛋白,利用电子显微镜对重组蛋白进行分析。

## 结 果

### 1 重组质粒 pFastBacDual-HA2-HMf 的构建与鉴定

双酶切载体和重组质粒,通过连接、转化、挑菌培养以及测序获得阳性重组质粒。测序正确的 pFastBacDual-HA2-HMf 分别用 EcoR I /Hind III 和 Xho I/Kpn I 双酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,酶切目的片段分别为 708 bp 和 1 095 bp 左右(图 1),与合成的 pGH-T-HA2, pGH-T-HMf 片段大小预期一致。



M DNA 标志物(5000) 1 重组穿梭质粒 pFBD-HA2-HMf 2 pFBD-HA2-HMf EcoR I 和 Hind III 双酶切 3 pFBD-HA2-HMf Xho I 和 Kpn I 双酶切

图 1 重组转移质粒鉴定

M DNA marker(5000) 1 recombinant shuttle plasmid pFBD-HA2-HMf 2 pFBD-HA2-HMf EcoR I and Hind III double digestion 3 pFBD-HA2-HMf Xho I and Kpn I double digestion

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid by enzyme digestion

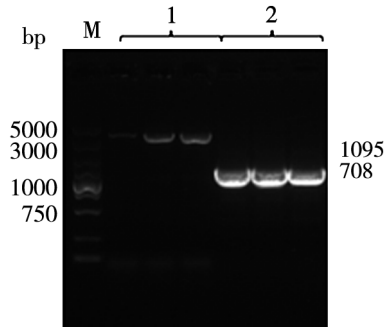
### 2 重组杆粒 rBacmid-HA2-HMf PCR 的构建与鉴定

重组质粒 pFastBacDual-HA2-HMf 转化 DH10BAC 感受态细胞,加入 SOC 培养基震荡培养,通过三次蓝白斑筛选,随机挑菌进行 PCR 检测。利用通用引物 Puc/M13F、p10R 和 Puc/M13R、PHF 对重组杆粒进行 PCR 鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳分析酶片段分别为 2 800 bp 和 1 400 bp 左右(图 2),与预期大小相符,HA2-HMf 基因与杆状病毒基因重组成功。

### 3 重组 Bacmid 转染 Sf9 昆虫细胞情况

将重组 Bacmid 转染 sf9 昆虫细胞,分别在转后第 3 d 和第 5 d 在普通倒置荧光显微镜下观察细胞的变化。其中对照细胞无明显变化,细胞生长良好,大小均

一。重组 Bacmid 转染细胞在第 3 d 变大变圆且停止生长;第 5 d 时细胞大量死亡,漂浮细胞增多(图 3)。

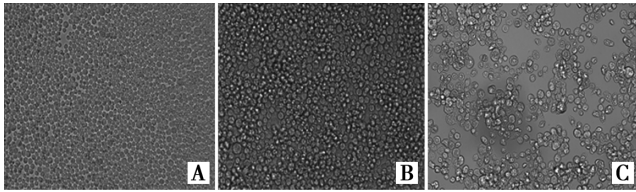


M DNA 标志物(5000) 1 Puc/M13F、p10R 引物 PCR 扩增 Bacmid-HA2-HMf 产物 2 Puc/M13R PHF 引物 PCR 扩增 Bacmid-HA2-HMf 产物

图 2 重组杆粒 PCR 鉴定

M DNA marker (5000) 1 Puc/M13F, p10R primer PCR amplification Bacmid HA2-HMf product 2 Puc/M13R PHF primer PCR amplification Bacmid HA2-HMf product

Fig. 2 PCR identification of recombinant plasmid



A 正常 sf9 细胞 B 重组杆粒感染 72 h 的 sf9 细胞 C 重组杆粒感染 120 h 的 sf9 细胞

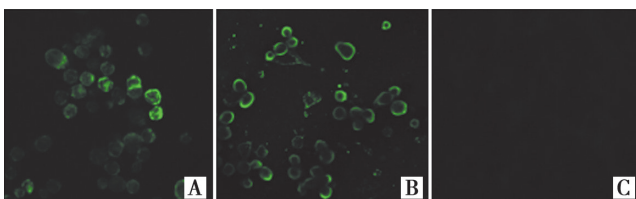
图 3 重组杆状病毒的拯救(100×)

A Normal sf9 Cells B Recombinant Rodent Infected sf9 Cells for 72h C Recombinant Rodent Infected sf9 Cells for 120 h

Fig. 3 sf9 insect cells transfected with rBacmid(100×)

#### 4 HA2-HMf 表达的免疫荧光检测

用重组病毒 rBacmid-HA2-HMf 感染 sf9 细胞,利用抗 His 鼠源单抗和抗 Flag 鼠源单抗分别作为一抗进行间接免疫荧光试验,检测 HA2-HMf 的表达,结果如图 4。重组杆状病毒感染的细胞检测到绿色荧光,而正常细胞无荧光信号,表明外源基因成功表达。



A 一抗为 Anti-Flag 鼠单抗 B 一抗为 Anti-His 鼠单抗 C 阴性对照

图 4 重组杆粒感染 sf9 细胞的免疫荧光检测

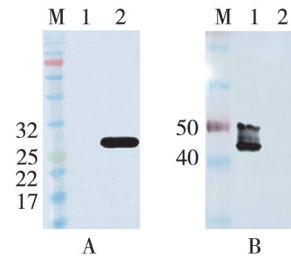
A First antibody is Anti-Flag mouse monoclonal antibody B Anti-His mouse monoclonal antibody C negative control

Fig. 4 Indirect immunofluorescence identification

#### 5 Western blot 检测目的蛋白的表达

用重组杆状病毒 rBacmid-HA2-HMf 感染 sf9 细

胞,收集感染后第 3 代细胞培养物,经 SDS-PAGE 电泳后转膜,以抗 His 鼠单抗和抗 Flag 鼠单抗抗体为一抗进行 Western blot,检测目的蛋白的表达,结果如图 5。感染 rBacmid-HA2-HM2e-Ferritin 的 sf9 细胞表达蛋白与相应抗体反应条带分别位于 26、42 ku 处,与预期结果一致。未感染 rBacmid 的 sf9 无反应条带。



A 一抗为 mAb Anti-Flag 的 Western blot M 蛋白分子质量标准 1 空白对照 2 重组蛋白与相应抗体反应条带 B 一抗为 mAb Anti-6×His 的 Western blot M 蛋白分子质量标准 1 重组蛋白与相应抗体反应条带 2 空白对照组。

图 5 重组蛋白的 Western blot 检测

A Western blot with mAb Anti-Flag as the first antibody M Protein Molecular Quality Standard 1 Blank control 2 Recombinant protein and corresponding antibody reaction bands B The first antibody is mAb Anti 6×His Western blot M Protein Molecular Quality Standard 1 recombinant protein reacted with corresponding antibody 2 blank control group

Fig. 5 Western blot detection of recombinant protein

#### 6 重组蛋白透射电镜观察

用 P3 代重组杆状病毒 rBacmid-HA2-HMf 感染悬浮 sf9 细胞,收集细胞悬液,超速离心后进行蔗糖密度梯度离心;蛋白用 PBS 重悬,超速离心以去除蔗糖,然后置于透射电镜下观察,结果如图 6,可观察到重组蛋白形成的 20 nm 左右的类病毒样颗粒。

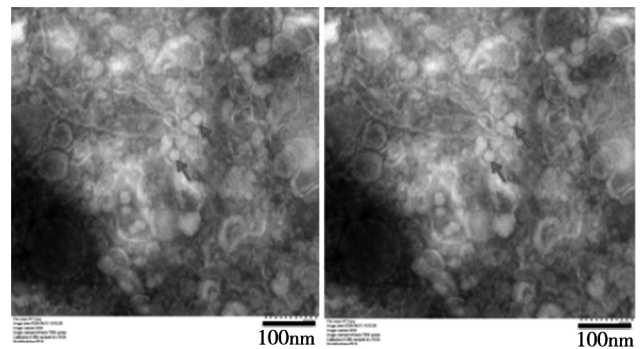


图 6 透射电镜观察重组蛋白形成的类病毒样颗粒  
Fig. 6 Transmission electron microscope observation of recombinant protein

#### 讨论

流感病毒血清型众多,抗原易突变,能够感染人和动物。人感染季节性流感可出现多种症状,甚至引起死亡<sup>[15]</sup>。疫苗对预防流感有效,目前市售的流感病毒疫苗主要包括全病毒灭活疫苗、裂解疫苗、亚单位疫苗

和减毒活疫苗,每种疫苗均含有甲型 H1 亚型、H3 亚型和乙型 3 种流感病毒或抗原组份<sup>[16]</sup>。由于以上三价疫苗所含病毒亚型覆盖面较广,生产工艺较为完善,因此成为主流的抗流感病毒疫苗<sup>[17]</sup>。然而流感病毒具有较高的抗原突变性,疫苗毒种的选择成为疫苗研发的主要难题,亟需研发一种免疫原性强、安全性高、广谱持久的通用性流感疫苗。

Bac-to-Bac 表达系统已经成为生产病毒样颗粒的重要技术平台之一,该系统自 1994 年被开发至今,已经有超过 40 多种病毒的 VLPs 由该系统成功包装制备,且多种 VLPs 候选疫苗在不同的动物模型中均取得了良好的免疫效果,并有部分产品已经上市或处于临床试验阶段,其中既包括动物用 VLPs 疫苗也包括人用 VLPs 疫苗,且仍有很多实验室仍在继续使用该系统包装不同病毒的 VLPs,同时也在不断的升级该系统,使其使用更加便利。

本研究通过 Bac-to-Bac<sup>®</sup> 杆状病毒表达系统表达流感外源基因,将 H1/H3/B 亚型流感的保守序列 HA2 串联 M2e 和 Ferritin 基因构成的 HA2-M2e-Ferritin 基因,在其 C 端加入 His 标签,在 HA2 茎部区结构域 C 端插入 Flag 标签,以利于蛋白的表达鉴定。通过双酶切鉴定,HA2 和 HMf 基因成功插入 pFastBac<sup>TM</sup> 双载体。经蓝白斑筛选获得重组杆粒,脂质体法将重组杆粒转染 sf9 细胞,成功拯救出杆状病毒。经 IFA、Western blot 和 TEM 鉴定,通过杆状病毒系统成功表达出双组分流感重组蛋白,且该蛋白具有良好的反应原性,能够形成约 20 nm 的类病毒样颗粒,为新型流感疫苗的研发提供了理论依据。

#### 【参考文献】

- [1] Wu Y, Gao GF. "Breathing" hemagglutinin reveals cryptic epitopes for universal influenza vaccine design[J]. Cell, 2019 (177):1086-1088.
- [2] Stadlbauer D, Zhu X, McMahon M, et al. Broadly protective human antibodies that target the active site of influenza virus neuraminidase[J]. Science, 2019, 366(6464):499-504.
- [3] Wei CJ, Crank MC, Shiver J, et al. Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges [J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(4):239-252.
- [4] Fiers W, De Filette M, El Bakkouri K, et al. M2e-based universal influenza A vaccine[J]. Vaccine, 2009(27):6280-6283.
- [5] Ameghi A, Pilehvar-Soltanahmadi Y, et al. Protective immunity

against homologous and heterologous influenza virus lethal challenge by immunization with new recombinant chimeric HA2-M2e fusion protein in balb/c mice[J]. Viral. Immunol. 2016(29):228-234.

- [6] Deng L, Kim JR. Protein nanoparticle vaccine based on flagellin carrier fused to influenza conserved epitopes confers full protection against influenza A virus challenge[J]. Virology 2017 (509):82-89.
- [7] Feng J, Zhang M. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2 [J]. Virol. J. 2006(3):102.
- [8] Stepanova LA, Mardanova ESL. Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses A subtypes. [J] Biomed Sci. 2018(25):33.
- [9] Lu ZJ, Xie YX, Yu HZ, et al. Identification and functional analysis of an iron-binding protein, ferritin heavy chain subunit, from the swallowtail butterfly, Papilio xuthus[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2019(1):102.
- [10] Safdar A, Cox MM. Bacculovirus-expressed influenza vaccine. A novel technology for safe and expeditious vaccine production for human use [J]. Expert Opin Inverting Drugs, 2007, 16 (7): 927-934.
- [11] Zhou HB, Yu ZJ, Hu Y, et al. The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus [J]. Plosone, 2009(4):1-5.
- [12] Baz M, Abed Y, Nehme B, et al. Activity of the oral neuraminidase inhibitor A-322278 against the oseltamivir-resistant H274Y (A/H1N1) influenza virus mutant in mice [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009(53):791-793.
- [13] Mcauley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, et al. Influenza virus neuraminidase structure and functions [J]. Frontiers in Microbiology, 2019(20):10.
- [14] Tan L, Lu H, Zhang D, et al. Protection against H1N1 influenza challenge by a DNA vaccine expressing H3/H1 subtype hemagglutinin combined with MHC class II-restricted epitopes [J]. Virol J, 2010(1):363.
- [15] 于志君, 崔力文, 程凯慧, 等. 季节性流感疫苗研究进展[J]. 传染病信息, 2018, 31(5):470-474.
- [16] Blokhina EA, Mardanova ES, Stepanova LA, et al. Plant-produced recombinant influenza A virus candidate vaccine based on flagellin linked to conservative fragments of M2 Protein and hemagglutinin[J]. Plants, 2020, 9(2):162.
- [17] 闫若潜, 杜向党. 流感病毒基因组结构及其编码蛋白研究进展 [J]. 动物医学进展, 2004(1):32-35.

【收稿日期】 2022-11-19 【修回日期】 2023-02-09