

## 猪干扰素 $\alpha$ 在昆虫细胞中分泌表达及其抗病毒活性检测

王彦彬, 崔保安, 陈红英, 王亚宾, 张红英, 魏战勇

(河南农业大学牧医工程学院/河南省动物性食品安全重点实验室, 郑州 450002)

**摘要:** 【目的】为获得重组猪干扰素  $\alpha$ 。【方法】本研究应用 Bac-to-Bac 杆状病毒/昆虫细胞表达系统, 将编码成熟猪干扰素  $\alpha$  基因插入供体质粒 pFastBac I 多克隆位点, 置于 pH 启动子控制下, 昆虫可识别的蜂素信号肽 (honeybee melittin signal peptide, HBM) 取代猪干扰素  $\alpha$  原有信号肽以实现分泌型表达, 并在 C 端融合 6 个组氨酸标签以利于纯化。将构建质粒转化 DH10 感受态细胞进行同源重组, 经抗性和蓝白斑筛选, 获得重组穿梭质粒 Bacmid, 转染对数生长期的 Sf9 昆虫细胞获得重组杆状病毒。【结果】重组蛋白通过间接免疫荧光、Western-blot 证明重组蛋白在重组杆状病毒感染的昆虫细胞中获得分泌表达。通过在猪肾细胞 (PK-15) 上抑制水泡性口炎病毒 (VSV) 致病变作用检测重组蛋白的抗病毒活性, 结果表明: 昆虫细胞上清的抗病毒效价达到  $1.07 \times 10^5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 昆虫细胞裂解液的抗病毒效价为  $3.15 \times 10^4 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。【结论】应用蜂素信号肽实现猪干扰素  $\alpha$  在昆虫细胞上分泌表达, 为临床上防治猪病毒性疫病奠定了基础。

**关键词:** 猪; 干扰素; 杆状病毒; 昆虫细胞; 表达; 抗病毒活性

## Secreted Expression of Porcine Interferon-Alpha in Insect Cells and Its Antiviral Activity Detection

WANG Yan-bin, CUI Bao-an, CHEN Hong-ying, WANG Ya-bin, ZHANG Hong-ying, WEI Zhan-yong

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University/Key Laboratory of Animal-Derived Food Safety of Henan Province, Zhengzhou 450002)

**Abstract:** 【Objective】The objective of this study is to get porcine recombinant interferon (PoIFN)- alpha. 【Method】Sequences derived from porcine interferon-alpha were cloned and expressed in insect cells with a C-terminal 6×Histidine tag. The authentic signal sequences of porcine interferon-alpha were substituted with the honeybee melittin signal sequences, the sequences were cloned into the baculovirus pFastBac I vector of the Bac-to-Bac Baculovirus expression system. 【Result】The recombinant proteins were successfully detected in Sf9 cells by immunofluorescence assay and in the culture supernatant by western blot analysis. The recombinant PoIFN-alpha were verified to be of high antiviral activity by inhibiting the cytopathic effect of vesicular stomatitis virus in PK-15 cells, which is about  $1.07 \times 10^5 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  in supernatant and  $3.05 \times 10^4 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  in insect cells, respectively. 【Conclusion】Using the honeybee melittin signal peptides in baculovirus expression vectors are capable of secreting expression of PoIFN- alpha in insect cells. This cytokine will be explored as a potential therapeutic agent for porcine diseases.

**Key words:** porcine; interferon; baculovirus; insect cell; expression; antiviral activity

## 0 引言

【研究意义】干扰素 (interferon, IFN) 是一类具有抗病毒、抗肿瘤、激活淋巴细胞和抑制细胞增殖

以及免疫调节等多项功能的细胞因子<sup>[1-3]</sup>。特别在近几年, 猪瘟、猪呼吸与繁殖综合征、猪圆环病毒等病毒性传染病严重危害着中国养猪业的健康发展, 给养猪业带来了巨大的经济损失<sup>[4]</sup>。因此, 开发出高效、无

收稿日期: 2008-04-17; 接受日期: 2008-12-24

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划专项 (2006BAD06A08)

作者简介: 王彦彬 (1969-), 男, 河南郑州人, 讲师, 博士研究生, 研究方向为兽医病原学和分子免疫学。E-mail: ybwang2008@126.com。通信作者崔保安 (1948-), 男, 河南郑州人, 教授, 研究方向为兽医病原学和分子免疫学。Tel: 0371-63558878; E-mail: baoancui@henau.edu.cn

毒、无残留的抗病毒生物制品, 干扰素无疑是当前研究的热点。干扰素  $\alpha$  属于 I 型, 机体的多种体细胞受病毒感染时均可产生, 具有较强的抗病毒作用, 干扰素  $\gamma$  属于 II 型, 除具有抗病毒作用外, 还具有免疫调节作用, 主要是由被激活的 T 细胞和 NK 细胞产生<sup>[5]</sup>。猪干扰素  $\alpha$  (porcine interferon  $\alpha$ , PoINF- $\alpha$ ) 基因全长 570 bp, 编码 189 个氨基酸, N 端 23 个氨基酸为信号肽, 成熟的 PoINF- $\alpha$  包含 166 个氨基酸, 具有显著的抗病毒功能<sup>[6]</sup>, 试验表明 PoINF- $\alpha$  对猪呼吸与繁殖综合征病毒<sup>[7-8]</sup>、口蹄疫病毒<sup>[9]</sup>、伪狂犬病病毒<sup>[10]</sup>和传染性胃肠炎病毒<sup>[11]</sup>等具有抑制作用, 但内源性 PoINF- $\alpha$  往往因为病毒的抑制或诱生能力低而不能发挥作用<sup>[12-13]</sup>。另外病毒通过编码某种蛋白阻断干扰素的信号传导, 产生对干扰素的免疫逃避<sup>[14-15]</sup>。【前人研究进展】1986 年 Lefevre 等<sup>[6]</sup>首先报道克隆出 PoINF- $\alpha$  基因以来, 国内外科研人员应用基因工程技术生产重组 PoINF- $\alpha$ , 目前已有报道应用大肠杆菌<sup>[16]</sup>、毕赤酵母<sup>[17]</sup>和动物细胞<sup>[18]</sup>等表达系统中成功表达出具有生物学活性的重组蛋白。但在大肠杆菌中表达重组蛋白往往以非活性的包涵体形式存在。在毕赤酵母和动物细胞中表达, 重组蛋白的产量一般不高。【本研究切入点】应用杆状病毒/昆虫细胞表达系统来生产重组 PoINF- $\alpha$  在国内还未检索到相关报道。杆状病毒/昆虫细胞表达系统与大肠杆菌和毕赤酵母表达系统相比具有显著的特点: 一是超强的表达效率, 最高表达量可达总蛋白的 50%; 二是对表达产物具有翻译后加工能力, 可保持蛋白产物发挥其生物学活性的天然结构; 三是无内毒素污染, 生物安全性高等<sup>[19-21]</sup>。【拟解决的关键问题】本研究应用 Bac-to-Bac 表达系统中 pFastBac I 载体, 将编码 PoINF- $\alpha$  基因置于 polyhedrin 启动子控制下。为达到分泌表达, 提高表达量和减少细胞内源性蛋白酶对表达蛋白的降解, 本研究引入蜂素信号肽 (honeybee melittin signal peptide, HBM) 取代原有的信号肽。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒、宿主菌和主要试剂 PoINF- $\alpha$  完整基因连接在 pGEM-T 载体上的克隆质粒 pGEM-PoINF $\alpha$  由河南省动物性食品安全重点实验室构建并保存; 大肠杆菌 JM109 亦由该室保存; 杆状病毒转移载体 pFastBac I 购自 Invitrogen 公司; *EcoR* I、*Hind* III 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Pfu DNA Polymerase、

Ex Taq DNA Polymerase 均购自大连宝生物工程有限公司。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.1.2 试剂 Gracés 培养基, 转染试剂 Cellfectin Reagent 和优级胎牛血清购自 Gibco, DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。鼠抗猪干扰素  $\alpha$  一抗是 Serotec 公司产品, 荧光素 (FITC) 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中杉生物技术公司, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司。

1.1.3 细胞和病毒 Sf9 昆虫细胞、猪肾细胞 (PK-15) 和猪水泡口炎病毒 (VSV) 由河南省动物性食品安全重点实验室保存。

### 1.2 蜂素信号肽基因和编码成熟 PoINF- $\alpha$ 片段的扩增

根据参考文献[22]设计 1 对引物, 上游引物 P1 含 *EcoR* I 酶切位点和 ATG 起始密码子, 上、下游引物之间有 19 个碱基的互补。

P1: 5'-gatcgaattcatgaattcttagtcaacgttgccctgttttatggtcg-3',

P2: 5'-atccgcatagatgtaagaatgtatacaccataaaaacaaggc-3'。

P1、P2 引物互为模板, PCR 扩增编码蜂素信号肽基因, 预计扩增长度为 76 bp, 扩增片段命名为 HBM。循环参数为: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 10 min, 共 30 个循环; 72℃延伸 10 min。PCR 产物用 10 g·L<sup>-1</sup> 低熔点琼脂糖凝胶进行电泳、回收纯化。

根据重组质粒 pGEM-PoINF $\alpha$  的猪 IFN- $\alpha$  基因序列设计 1 对引物, 上游引物 5'端与蜂素信号肽编码基因有 15 bp 的互补, 下游引物在终止密码子前加入了编码 6 个组氨酸的碱基序列和 *Hind* III 酶切位点。

P3: 5'-tacatctatgctggattgtgacctgectcagacccac-3';

P4: 5'-catgaagcttagtgatggtgatggtgatgctcttcttctgagctgtc-3'

以重组质粒 pGEM-PoINF $\alpha$  为模板, 用 Pfu DNA Polymerase 扩增表达片段基因, 预期 PCR 扩增片段长度为 544 bp, 命名为 PoINF- $\alpha$ 。循环参数为: 94℃预变性 10 min; 94℃变性 45 s, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环; 72℃延伸 10 min。PCR 产物用 10 g·L<sup>-1</sup> 低熔点琼脂糖凝胶进行电泳、回收纯化。

### 1.3 蜂素信号肽编码序列和 PoINF- $\alpha$ 表达片段的 PCR 连接

根据文献方法[23], 通过 PCR 扩增, 构建嵌合体基因片段。经纯化的 HBM 和 PoINF- $\alpha$  各取 1  $\mu$ l, 用

Pfu DNA Polymerase 进行 PCR 5 个循环预扩增, 然后加入引物 P1 和 P4, 继续进行 PCR 扩增, 循环参数为: 94℃ 预变性 10 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 32 个循环; 72℃ 延伸 10 min。预计扩增片段长度为 605 bp, 前端带有 *EcoR* I 酶切位点, 后端带有 *Hind* III 酶切位点, 命名为 HBM-PoIFN $\alpha$ -6His。

#### 1.4 杆状病毒转移载体的构建与鉴定

将扩增片段 HBM-PoIFN $\alpha$ -6His 进行胶纯化, 然后用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行消化, 连接到经同样酶消化的 pFastBac I 载体质粒上。转化 JM109 感受态细胞, 进行氨苄抗性平板筛选, 挑取若干个克隆进行扩增, 小量提取质粒, 进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切鉴定, 筛选得到阳性质粒, 命名为 pFastBac-PoIFN $\alpha$ 。酶切鉴定为阳性的重组菌进行序列测定以验证插入序列的正确性。

#### 1.5 表达 rPoIFN- $\alpha$ 重组杆状病毒的构建与鉴定

将转移载体 pFastBac-PoIFN $\alpha$  转化 DH10, 经蓝白斑筛选, 提取质粒, PCR 鉴定穿梭质粒 rBacmid-HBM-PoIFN- $\alpha$ -6His。采用 Cellfectin Reagent 将 rBacmid-HBM-PoIFN- $\alpha$  转染对数生长期的 Sf9 昆虫细胞, 经 5~7 d 或细胞出现病变时, 提取重组杆状病毒基因组 DNA, 用 M13 上下游引物进行 PCR 扩增特异性片段, 鉴定重组杆状病毒。M13 上下游引物位于 *lacZ $\alpha$* -互补区 *mini-attTn7* 的侧翼, 重组杆状病毒 PCR 产物预计为 2 300 bp+插入片段, 野生杆状病毒为 300 bp。鉴定后扩增种毒, 进行蚀斑减数试验测定种毒效价, 4℃ 遮光保存。

#### 1.6 间接免疫荧光检测 rPoIFN- $\alpha$ 的表达

鉴定正确的穿梭质粒 rBac-PoIFN- $\alpha$  接种对数生长期的 Sf9 昆虫细胞, 28℃ 培养 72 h, 至出现形态病变时, 收获细胞, PBS 洗涤后, 悬液滴于载玻片上, 自然干燥, 用预冷的丙酮-乙醇 (3 : 2) 固定 5 min。以鼠抗 PoIFN- $\alpha$  抗体 (1 : 2 500) 作一抗, 用 FITC 标记的羊抗鼠抗体 (1 : 50) 作二抗, 荧光显微镜观察结果。同时野生型杆状病毒感染的细胞作对照。

#### 1.7 SDS-PAGE 和 Western blot 检测 rPoIFN- $\alpha$ 的表达

上述 rBac-PoIFN- $\alpha$  接种对数生长期的 Sf9 昆虫细胞, 28℃ 培养至 96 h, 收集上清 80 ml, 经 300 000×g 超速离心后, 经镍亲和层析柱纯化, 进行 SDS-PAGE 电泳, 电转印至硝酸纤维素膜, 用含 10% 脱脂乳 PBST 封闭过夜, 以鼠抗 PoIFN- $\alpha$  抗体 (1 : 2 500) 作一抗,

作用 2 h, PBST 洗涤, 用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 2 500) 作二抗, 作用 1 h, DAB 显色试剂盒检测。

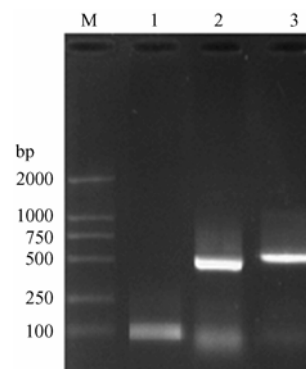
#### 1.8 rPoIFN- $\alpha$ 在 PK 细胞上对 VSV 的抑制作用

细胞病变抑制法测定重组干扰素的抗病毒活性, 本研究应用猪肾细胞 PK-15-VSV 系统测定。将抑制 50% 细胞病变 (CPE50) 出现孔的干扰素最高稀释度定为 1 个干扰素活性单位 (U)。以重组杆状病毒感染 96 h 的昆虫细胞上清与上清等体积稀释的细胞裂解液, 分别作抗病毒活性检测。

## 2 结果与分析

#### 2.1 蜂素信号肽编码序列与编码成熟 PoIFN- $\alpha$ 基因片段连接结果

将包含 *EcoR* I 酶切位点的编码信号肽基因片段和编码猪干扰素  $\alpha$  成熟蛋白基因片段纯化后, 各取 1  $\mu$ l 进行 5 个循环预扩增, 然后加入特异引物继续进行 PCR 扩增。其产物经 10 g·L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶电泳鉴定出现约 600 bp 左右的条带, 与预期大小一致 (图 1)。



M: DNA Marker DL2000; 1: 蜂素信号肽; 2: 猪干扰素  $\alpha$  基因; 3: 连接蜂素信号肽的猪干扰素  $\alpha$  基因

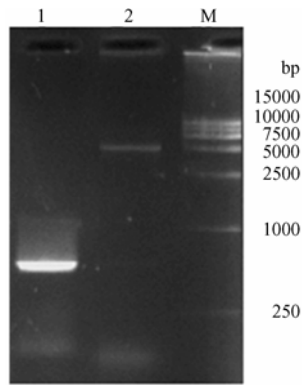
M: DNA Marker DL2000; 1: HBM; 2: PoIFN $\alpha$ ; 3: HBM-PoIFN $\alpha$ -6His

#### 图 1 PoIFN- $\alpha$ 基因与蜂素信号肽基因的 PCR 连接产物的鉴定

Fig. 1 PCR results of PoIFN- $\alpha$  and PoIFN $\alpha$  fused with HBM

#### 2.2 pFastBac-PoIFN- $\alpha$ 转移载体的鉴定

电泳结果显示, 重组质粒 pFastBac-PoIFN- $\alpha$  进行 PCR、电泳, 出现 1 条长约 600 bp 的特异条带; 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切、电泳出现 2 条带: 一条带为载体, 约为 5 200 bp, 另一条为插入的目的条带, 约为 600 bp, 与预期结果相符 (图 2)。序列测序表明, 该转化菌的质粒中含有目的基因片段, 且读码框正确, 重组质粒 pFastBac-PoIFN- $\alpha$  构建成功。



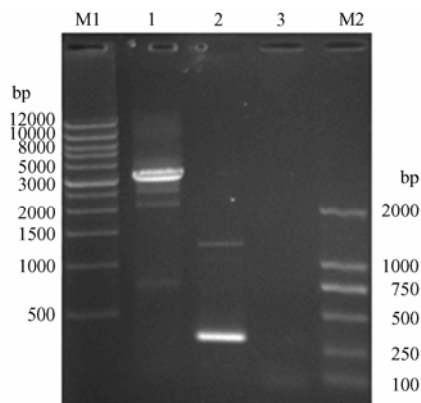
1: PoINF $\alpha$ PCR 产物; 2: *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切重组转移载体的产物; M: DNA marker DL15000  
1: PoINF $\alpha$ PCR product; 2: Production of recombinant transfer vector digested with *Eco*R I and *Hind* III; M: DNA marker DL15000

图 2 重组转移载体的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant transfer vector digestion with *Eco*R I and *Hind* III

### 2.3 重组杆状病毒 PCR 鉴定及电镜观察

以重组杆状病毒基因组 DNA 为模板, 用 M13 上下游引物进行 PCR 扩增。电泳结果在约 3 000 bp 处显示有特异性片段, 野生杆状病毒对照则出现 300 bp 的片段 (图 3), 与预测结果一致。



M1: DNA marker DL12000; 2: 重组杆状病毒的 PCR 产物; 3: 野生杆状病毒的 PCR 产物; M2: DNA marker DL2000  
M1: DNA marker DL12000; 1: PCR product of recombinant baculovirus; 2: PCR product of wild baculovirus; 3: Negative control of Sf9 insect cells; M2: DNA marker DL2000

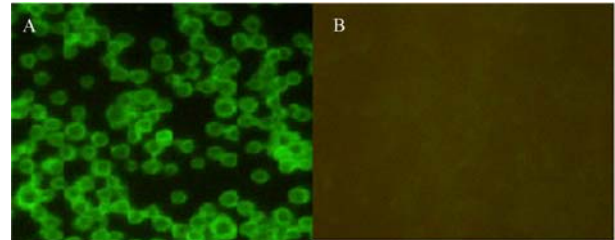
图 3 重组杆状病毒的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of recombinant baculovirus

### 2.4 间接免疫荧光检测 rPoINF $\alpha$ 的表达

间接免疫荧光试验结果显示, rBac-PoINF $\alpha$  感染

Sf9 昆虫细胞显示强荧光信号, 并且荧光信号主要分布在细胞膜上 (图 4-A), 而以野生杆状病毒感染 Sf9 昆虫细胞荧光信号阴性 (图 4-B), 结果表明 rPoINF $\alpha$  在 Sf9 昆虫细胞中获得表达。



A: 重组杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞; B: 野生杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞  
A: Sf9 insect cells infected by rBac-PoINF $\alpha$ ; B: Sf9 insect cells infected by wild baculovirus

图 4 IFA 检测 rBac-PoINF $\alpha$  感染 Sf9 昆虫细胞中 rPoINF $\alpha$  的表达

Fig. 4 IFA detection of expression of rPoINF $\alpha$  in the Sf9 insect cells infected with rBac-PoINF $\alpha$

### 2.5 SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果

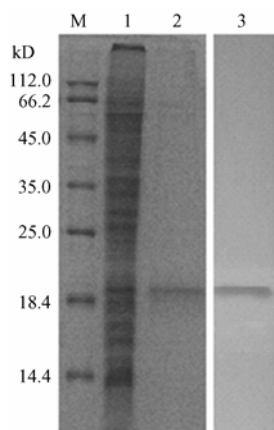
重组杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞 96 h, 收集上清超速浓缩, 镍亲和层析柱纯化进行 SDS-PAGE, 在 19 kD 处出现 1 条带, 转膜后以鼠抗 PoINF $\alpha$  抗体为一抗, 用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作二抗进行免疫印迹检测, 出现 1 条特异性的抗原-抗体结合带 (图 5)。

### 2.6 重组蛋白抗病毒活性的检测

收集上清和昆虫细胞, 将细胞以与上清等量的 PBS 稀释并裂解, 分别以 10 倍比稀释分别处理猪肾细胞 (PK15) 24 h, 然后以 100TCID<sub>50</sub> 猪水泡性口炎病毒 (VSV) 感染, 检测结果表明, 细胞上清中的重组蛋白和昆虫细胞内重组蛋白对 VSV 均表现出较高的抑制活性, 以抑制 50% 细胞病变的干扰素的最高稀释度定为 1 个干扰素活性单位, 上清的抗病毒效价达到  $1.07 \times 10^5$  U $\cdot$ ml<sup>-1</sup>, 昆虫细胞裂解液的抗病毒效价为  $3.15 \times 10^4$  U $\cdot$ ml<sup>-1</sup>。

## 3 讨论

随着基因工程技术的发展, 体外表达 PoINF $\alpha$  进行免疫增强作用和抗病毒作用等相关研究已有报道<sup>[24-25]</sup>。常用的表达系统主要有大肠杆菌和酵母表达系统。大肠杆菌表达系统由于操作简单、表达量高等优点被广泛应用于动物干扰素的研究, 但该系统也存



M: 低分子量标准蛋白质; 1: rBac-PoINF- $\alpha$  感染的 Sf9 昆虫细胞; 2: 镍亲和层析柱纯化的培养上清; 3: 纯化 rPoINF- $\alpha$  的 Western blot  
 M: Low MW standard protein marker; 1: Sf9 infected with rBac-PoINF- $\alpha$ ; 2:  $\text{Ni}^{2+}$  column purification of the culture supernatant infected with rBac-PoINF- $\alpha$ ; 3: Western blot of purified recombinant protein

图 5 重组猪干扰素  $\alpha$  SDS-PAGE 和 Western blot 检测

Fig. 5 Analysis of recombinant PoINF- $\alpha$  by SDS-PAGE and Western blot

在不足之处, 其一是对表达的外源蛋白不能进行转录后修饰。尽管 PoINF- $\alpha$  无 N-糖基化位点, 但昆虫细胞仍然进行 O-糖基化修饰; 其二是对表达的外源蛋白不能正确折叠, 常以非活性的构象存在, 恢复其活性必须要经过变性复性等繁琐步骤, 并且其产量较低。因此在应用中受到一定程度的限制。酵母表达系统表达量普遍偏低, 并且其糖基化模式与动物细胞糖基化模式差异较大。

本研究应用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统<sup>[26]</sup>, 该系统分为 3 个部分: Bacmid 穿梭载体, 供体质粒和辅助质粒。AcMNPV 的多角体蛋白基因被 mini-F 复制子、卡那霉素抗性基因、Tn7 细菌转座子靶位 attTn7 及  $\beta$ -半乳糖苷酶  $\alpha$  肽的部分 DNA 片段取代。mini-F 复制子使杆状病毒以大质粒的形式在 DH10Bac 菌中自主复制, 并保持低拷贝数。在转移载体中, 外源基因位于 polyhedrin 启动子之下, 并携带一个庆大霉素抗性基因, 两侧为 Tn7 的左右臂。用转移载体转化含 Bacmid 的 DH10Bac 菌株时, 在辅助质粒(该质粒为四环素抗性筛选标志)提供转座酶的情况下, 通过转座插入 Tn7, 转座子靶位点 attTn7, 从而阻断了 lacZ 基因的表达。在含卡那霉素、庆大霉素、四环素及 x-gal 和 IPTG 的培养基上挑取白色菌落, 即可得到重组 Bacmid, 突破了多年来必须在活细胞内重组病毒基因

组的束缚。Bacmid 质粒在大肠杆菌中既可以复制, 又对鳞翅目昆虫细胞具有感染性。与传统的杆状病毒载体系统相比, 其显著的优点: 一是缩短了重组病毒构建所需的时间; 二是由于重组病毒 DNA 在细菌内产生, 可根据菌斑颜色筛选即蓝白斑筛选, 不存在野生型和非重组型病毒交叉污染的问题, 因此不需要传统繁琐的空斑分析来纯化重组病毒, 而且转座率高, 纯化率达 100%。

哺乳动物细胞因子基因, 原有的信号肽往往不能被昆虫细胞识别, 在杆状病毒和昆虫细胞表达系统上不能达到分泌表达, 并且其表达量也低<sup>[27]</sup>。Tessier 等报道蜂素信号肽能够增强外源蛋白在昆虫细胞中分泌表达, 提高表达量<sup>[28]</sup>, 因此本试验通过 PCR 构建嵌合体基因, 引入了蜂素信号肽基因取代原有的信号肽, 间接免疫荧光表明重组 PoINF- $\alpha$  在昆虫细胞内实现了分泌表达, 其荧光信号主要分布在细胞膜上。不带信号肽和携带原有信号肽的干扰素  $\alpha$  在杆状病毒/昆虫细胞表达系统表达(资料待发表), 不带信号肽的糖蛋白主要分布在细胞内, 而携带原有信号肽的糖蛋白主要分布在细胞膜上, 其表达的蛋白虽然可以被传递到细胞外, 但却不能被剪切, 在上清中存在的量少, 到后期被重组杆状病毒感染的昆虫细胞发生溶解后, 随着细胞裂解释放出来。本研究引入蜂素信号肽达到了增强表达量的作用。

## 4 结论

本研究克隆的 PoINF- $\alpha$  基因编码序列中经分析没有 N-糖基化位点, 重组蛋白在 SDS-PAGE 上的表观分子量与预测的大小一致, 为 19 kD。收集 80 ml 培养上清, 进行超速离心浓缩, 镍亲和层析柱纯化, 进行 SDS-PAGE 电泳, 同样出现 19 kD 的纯化条带。Western blot 试验在 19 kD 也显现强信号反应。培养上清和昆虫细胞进一步通过在 PK-15 细胞上对猪水泡性口炎病毒(VSV)的抑制作用, 表明重组蛋白具有较高的抗病毒活性, 证明 PoINF- $\alpha$  已在昆虫细胞中成功实现了表达, 为临床上用于病毒性疫病的防治奠定了基础。

## References

- [1] Samuel C E. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(4): 778-809.
- [2] Marcus P I. Celebrating the 50th anniversary of the discovery of interferon. *Journal of Interferon Cytokine Research*, 2007, 27(2): 87-89.

- [3] Friedman R M. On The discovery of interferon. *Journal of Interferon Cytokine Research*, 2007, 27(3): 175-180.
- [4] 杨宗照, 方维焕. 猪瘟合并猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)和猪圆环病毒 2 型(PCV2)感染. 中国兽医学报, 2006, 26(3): 240-242. Yang Z Z, Fang W H. HCV Co-infecting with PRRSV and PCV2. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2006, 26(3): 240-242. (in Chinese)
- [5] Pfeffer L M, Dinarello C A, Herberman R B, Williams B R, Borden E C, Bordens R, Walter M R, Nagabhushan T L, Trotta P P, Pestka S. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Research*, 1998, 58: 2489-2499.
- [6] Leferre F, Labonnardiere C. Molecular cloning and sequencing of a gene encoding biologically active porcine alpha-interferon. *Journal of Interferon Research*, 1986, 6 (4): 349-360.
- [7] Buddaert W, Van Reeth K, Pensaert M. *In vivo* and *in vitro* interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1998, 440: 461-467.
- [8] Chang H W, Jeng C R, Liu J J, Lin T L, Chang C C, Chai M Y, Tsai Y C, Pang V F. Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. *Veterinary Microbiology*, 2005, 108 (3/4): 167-177.
- [9] Chinsangaram J, Moraes M P, Koster M, Grubman M J. Novel viral disease control strategy: adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease. *Journal of Virology*, 2003, 77(2): 1621-1625.
- [10] Pol J M, Broekhuysen-Davies J M, Wagenaar F, La Bonnardièrre C. The influence of porcine recombinant interferon-alpha 1 on pseudorabies virus infection of porcine nasal mucosa *in vitro*. *The Journal of General Virology*, 1991, 72(4): 933-938.
- [11] Jordan L T, Derbyshire J B. Antiviral action of interferon-alpha against porcine transmissible gastroenteritis virus. *Veterinary Microbiology*, 1995, 45 (1): 59-70.
- [12] Albina E, Carrat C, Charley B. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 1998, 18 (7): 485-490.
- [13] Nfon C K, Ferman G S, Toka F N, Gregg D A, Golde W T. Interferon-alpha production by swine dendritic cells Is inhibited during acute infection with Foot-and-Mouth Disease Virus. *Viral Immunology*, 2008, 21(1): 68-77.
- [14] Kochs G, García-Sastre A, Martínez-Sobrido L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *Journal of Virology*, 2007, 81(13): 7011-7021.
- [15] Lin R J, Chang B L, Yu H P, Liao C L, Lin Y L. Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. *Journal of Virology*, 2006, 80 (12): 5908-5918.
- [16] 陈 涛, 于瑞嵩, 刘惠莉, 李 震, 曹祥荣. 重组猪干扰素基因定点突变及在大肠杆菌中的表达. 生物工程学报, 2002, 18(3): 339-342. Chen D, Yu R S, Liu H L, Li Z, Cao X R. Site-directed Mutation of PoIFN- $\alpha$  and Its Expression in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2002, 18(3): 339-342. (in Chinese)
- [17] 葛 丽, 李 震, 于瑞嵩, 刘惠莉, 张德福, 周智爱, 尹逊和. 猪 a 干扰素基因在毕赤酵母中的分泌表达. 中国兽医学报, 2005, 25(3): 289-292. Ge L, Li Z, Yu R S, Liu H L, Zhang D F, Zhou Z A, Yin X H. Secretive expression of porcine IFN- $\alpha$  in yeast *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2005, 25(3): 289-292. (in Chinese)
- [18] 杜以军, 姜 平, 李玉峰, 王先炜. 猪 a 干扰素重组腺病毒的构建及其抗口蹄疫病毒活性研究. 中国病毒学, 2006, 21(4): 390-393. Du Y J, Jiang P, Li Y F, Wang X W. Construction of recombinant adenovirus containing porcine IFN- $\alpha$  genes and activity of anti-swine Foot-and-mouth Disease virus. *Virologica Sinica*, 2006, 21(4): 390-393. (in Chinese)
- [19] Kidd I M, Emery V C. The use of baculoviruses as expression vectors. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 1993, 42(2/3): 137-159.
- [20] Hu Y C. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, 26(4): 405-416.
- [21] Summers M D. Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides. *Advances in Virus Research*, 2006, 68: 3-73.
- [22] Van der Geld Y M, Smook M L, Huitema M G, Harmsen M C, Limburg P C, Kallenberg C G. Expression of recombinant proteinase 3, the autoantigen in Wegener's granulomatosis, in insect cells. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 264 (1/2): 195-205.
- [23] Congote L F, Li Q. Accurate processing and secretion in the baculovirus expression system of an erythroid-cell-stimulating factor consisting of a chimaera of insulin-like growth factor II and an insect insulin-like peptide. *Biochemical Journal*, 1994, 299(1): 101-107.
- [24] Cheng G, Zhao X, Yan W Y, Wang W F, Zuo X P, Huang K, Liu Y,

- Chen J, Wang J L, Cong W, Liu M Q, Gao H H, Chen J L, Lu Y G, Zheng Z X. Alpha interferon is a powerful adjuvant for a recombinant protein vaccine against foot-and-mouth disease virus in swine, and an effective stimulus of *in vivo* immune response. *Vaccine*, 2007, 25(28): 5199-5208.
- [25] Xia C, Wu D, Wu W X, Wan J Q, Wang L, Yang T Ya, Wang Q, Ning Y B. Cloning and expression of interferon-alpha/gamma from a domestic porcine breed and its effect on classical swine fever virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005, 104(1/2): 81-89.
- [26] Luckow V A, Lee S C, Barry G F, Olins P O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 1993, 67(8): 4566-4579.
- [27] Jarvis D L, Summers M D, Jr Garcia A, Bohlmeier D A. Influence of different signal peptides and prosequences on expression and secretion of human tissue plasminogen activator in the baculovirus system. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(22): 16754-16762.
- [28] Tessier D C, Thomas D Y, Khouri H E, Laliberté F, Vernet T. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene*, 1991, 98(2): 177-183.

(责任编辑 林鉴非)