

牛 $\alpha 0$ 干扰素在毕赤酵母中的分泌表达 及抗病毒活性鉴定

彭统全, 邵建伟, 张润祥, 曹 翀, 马 波, 高明春*, 王君伟*

(东北农业大学 动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 克隆牛 $\alpha 0$ 干扰素 (BoIFN- $\alpha 0$) 成熟肽基因, 使其在真核细胞中表达, 并研究其表达蛋白质的活性。通过 PCR 方法扩增得到 BoIFN- $\alpha 0$ 成熟肽基因, 然后将其连接到含分泌信号肽序列的 *Pichia pastoris* 表达载体 pPICZ α A 上, 构建重组质粒 pPICZ α A-BoIFN- $\alpha 0$, 重组质粒经 *Pme* I 酶切线性化后电转化宿主菌 GS115。转化子经 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ zeocinTM 筛选和 PCR 鉴定, 阳性重组菌经甲醇诱导后实现了 BoIFN- $\alpha 0$ 在毕赤酵母系统中的分泌表达。结果表明: SDS-PAGE 和 Western blot 结果显示表达产物相对分子质量约为 18 和 21 ku, 推测表达产物发生了一定程度的糖基化。细胞病变抑制试验结果表明, 重组 BoIFN- $\alpha 0$ 具有较高的抗病毒活性, 达到 $5.72 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。这些研究结果为牛 IFN- α 的更深层次应用奠定了基础。

关键词: 牛 BoIFN- $\alpha 0$ 亚型; 巴斯德毕赤酵母; 分泌表达; 抗病毒活性

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)01-0124-06

Expression of the Bovine Interferon Alpha0 with Antiviral Activity in *Pichia Pastoris*

PENG Tong-quan, SHAO Jian-wei, ZHANG Run-xiang, CAO Chong,

MA Bo, GAO Ming-chun*, WANG Jun-wei*

(College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In this study, we cloned BoIFN- $\alpha 0$ mature peptide gene and expressed it in the eukaryocyte, and also studied the activity of this protein. To achieve secretory expression of bovine interferon- $\alpha 0$ (BoIFN- $\alpha 0$) in *Pichia pastoris*, the BoIFN- $\alpha 0$ mature peptide gene was synthesized by PCR and inserted into the secreted expression vector pPICZ α A. The *Pme* I linearized resultant recombinant plasmid was transformed into *P. pastoris* GS115 by electroporation and the positive recombinant strains *P. pastoris* were selected by $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of zeocinTM and identified by PCR with the AOX1 primers and the specific primers. The positive recombinant strains were induced with methanol and achieved secretory expression in *P. pastoris* Yeast expression system. The products in culture medium were detected by SDS-PAGE and Western blot. The SDS-PAGE results showed that the recombinant protein was expressed in the supernatant with molecular of 18 and 21 kDa (with the difference of glycosylation). Furthermore, the BoIFN- $\alpha 0$ was able to efficiently inhibiting virus replication in vesicular stomatitis virus (VSV)/MDBK cells detection system and its antiviral activity was about $5.72 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. These results provided a basis for further application of BoIFN- α .

Key words: BoIFN- $\alpha 0$; *Pichia pastoris*; secretory expression; antiviral activity

收稿日期: 2014-05-26

基金项目: 现代农业(奶牛)产业技术体系(CARS-37); 国家科技支撑计划项目(2012BAD12B05); 国家科技支撑计划子课题(2012BAD12B03-3); 黑龙江省科技攻关项目(GA09B302)

作者简介: 彭统全(1987-), 男, 河南商丘人, 硕士生, 主要从事兽医微生物与免疫学研究, E-mail: ptqneau@126.com

* 通信作者: 王君伟, 教授, E-mail: jwwang@neau.edu.cn; 高明春, E-mail: gaomingchun@163.com

α 干扰素(interferon- α , IFN- α) 属于 I 型干扰素,是迄今发现的最大的一个干扰素基因家族,具有抑制病毒增殖、抗肿瘤以及加强 NK 细胞杀伤病原感染细胞的能力^[1-2]。1996 年 P. J. Chaplin 等从病毒感染的牛肠上皮细胞中克隆出 BoIFN- α ^[3],牛 IFN- α (BoIFN- α)多基因家族至少由 10~12 个亚型基因组成,亚型之间同源性很高。已报道的牛 IFN- α A、B、C、D、E、F、G、H 八个亚型核苷酸相似性在 93.6%~97.2%,氨基酸相似性在 91.0%~95.2%,核苷酸和氨基酸相似性均超过了 90%以上。牛 IFN- α 和人 IFN- α 、鼠 IFN- α 氨基酸序列相似性分别为 65%和 57%。不同亚型可能是由不同细胞或同一细胞在不同时期分泌的,但由于缺乏系统的对比研究,其生物学活性是否有差异目前还不清楚^[4]。作者根据牛 IFN- α 基因在牛 8 号染色体上的序列位置,命名本研究的干扰素 α 亚型为 IFN- $\alpha 0$ (GenBank: NM_174085)。牛 α 干扰素蛋白是由 567 个核苷酸编码一个开放阅读框(ORF),其中 23 个氨基酸编码其信号肽,166 个氨基酸组成其成熟多肽。BoIFN- $\alpha 0$ 核苷酸与已知的牛 α 干扰素亚型相似性均在 94%以上,最高为 96.14%,最低为 94.56%。BoIFN- $\alpha 0$ 成熟肽由 166 个氨基酸组成, YinOYang 1.2Server 预测含有 4 个 O-糖基化位点,无 N-糖基化位点; Arg-33、Tyr-123 为保守残基, 29—35、123—140 为保守区域, Cys1-Cys99 和 Cys29-Cys139 组成两个二硫键; 二级结构主要由 A~E 5 个 α -螺旋组成。毕赤酵母表达系统是最近二十年发展起来的一种成熟的真核表达系统,是高效表达外源蛋白质的理想系统^[5]。研究表明,重组 BoIFN- α 在体外具有抗多种病毒的作用和多种免疫调节功能^[6-10]。本研究实现了重组牛 IFN- $\alpha 0$ 亚基因在毕赤酵母中的高效表达,并对其表达产物进行了抗病毒活性研究,本研究为新型抗病毒制剂的研制与临床应用准备了基础材料。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体和试剂

酵母表达所用质粒 pPICZ α -A 载体和菌株 GS115 购自美国 Invitrogen 公司。大肠杆菌 DH5 α 、水泡性口炎病毒(VSV)为本实验室保存。蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司;限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; zeocinTM 为 Invitrogen 公司产品,生物素购自华美生物工程

公司,其他试剂均为国产或进口分析纯。牛肾细胞(MDBK)由本实验室保存;DMEM 培养基为 Invitrogen 公司产品;胎牛血清购自天津灏阳公司。毕赤酵母专用培养基 BMMY、BMGY、YPD 等参考 Invitrogen 公司毕赤酵母培养基说明书配制。

1.2 重组质粒 pPICZ α A-BoIFN- $\alpha 0$ 的构建

PCR 扩增的牛 $\alpha 0$ 干扰素基因胶回收产物和表达载体 pPICZ α -A 用 *Xho* I 和 *Eco*R I 进行双酶切按 3:1 的摩尔比混匀,16℃ 连接过夜,转化氯化钙法制备的 DH5 α 感受态大肠杆菌。挑取低盐 LB 平板上的 zeocin 抗性菌落,提质粒,用 *Xho* I 和 *Eco*R I 进行双酶切鉴定和测序验证,将获得的阳性重组质粒命名为 pPICZ α A-BoIFN- $\alpha 0$ 。

1.3 电转及筛选

将重组质粒 pPICZ α A-BoIFN- $\alpha 0$ 以 *Pme* I 酶切线性化。按照毕赤酵母表达说明书制备 GS115 感受态,取 85 μ L,与 7 μ L *Pme* I 单酶切线性化的重组质粒混匀,然后转移到冰预冷的 0.2 cm 的电转化杯中,把电转化杯在冰上放置 5 min 后再在电穿孔仪上用脉冲电流电击一次,电击条件:电压 1 500 V,电容 25 μ F,电阻 200 Ψ ,温度 0℃。电击结束,立即加入 1 mL 冰预冷的 1 mol·L⁻¹ 山梨醇,轻轻混匀,把电转化杯放入 30℃ 温育 1 h 左右,加入 1 mL YPD 培养基至 1.5 mL EP 管中,30℃ 180 r·min⁻¹ 1 h,取 400 μ L 菌液涂在含有 100 μ g·mL⁻¹ zeocin 抗生素的 YPDS 固体培养基平板上,置 30℃ 恒温培养 2~4 d,挑取典型菌落,接种于 YPD 培养基中,30℃,220 r·min⁻¹ 振荡培养 36 h。

1.4 转化子的 PCR 检测

按照文献[11]介绍的煮沸法提取酵母基因组,用醇氧化酶(AOX1)基因特异引物和目的片段的特异性引物鉴定牛 α 干扰素基因是否插入 AOX1 启动子部位。扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 50 s、60℃ 50 s、72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 10 min。扩增结束,取 3 μ L 反应液做琼脂糖电泳观察。如果是阳性重组酵母菌株,通过上述引物对扩增的片段为 1 080 bp 左右。用目的片段的特异性引物鉴定,扩增的片段长度应为 500 bp 左右。

1.5 酵母重组子的诱导表达

挑取阳性转化子于 BMGY 培养基中培养至 OD_{600 nm} 为 2~6,4℃,3 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,加 BMMY 培养基悬浮至 OD_{600 nm} 为 1,转至挡板三角

摇瓶, 30 °C, 220 r · min⁻¹ 培养 96 h, 每隔 24 h 添加甲醇至终体积分数为 1%, 以保持诱导的持续表达。

1.6 表达产物的处理和 Western blot 检测

将发酵液 5 000 r · min⁻¹, 4 °C 离心 15 min, 取上清经 60% 硫酸铵浓缩, 沉淀用 PBS 重悬, PBS 透析后经 BCA 蛋白检测试剂盒检测分泌蛋白质的蛋白质质量浓度。用 0.22 μm 滤膜过滤上清, 用于蛋白质抗病毒活性鉴定。参照《分子克隆实验方法指南》(第 3 版) 进行 Western blot 检测。对表达的蛋白质按常规方法进行 SDS-PAGE, 转印至醋酸纤维素膜上, 0.05 g · mL⁻¹ 脱脂乳 4 °C 封闭过夜, PBST 洗膜 3 次, 一抗为本实验室制备的兔源抗 BoIFN-α 多抗血清(免疫原为本实验室表达纯化后的 BoIFN-α A 亚型蛋白), 37 °C 恒温摇床 80 r · min⁻¹ 作用 1 h; 二抗为 HRP 标记羊抗兔 IgG, 37 °C 恒温摇床 80 r · min⁻¹ 作用 1 h, PBST 洗膜 3 次, 经 4-CN 显色出现反应条带后, 去离子水冲洗终止反应, 观察结果。

1.7 表达产物的抗病毒活性测定

用 96 孔细胞培养板常规培养 MDBK 细胞至单层后每孔加入 100 μL 4 倍倍比稀释的 BoIFN-α0, 37 °C 孵育 24 h 后用 100 TCID₅₀ VSV 攻毒 48 h 后观察细胞病变的抑制结果, 同时设细胞对照和病毒对照。以抑制 50% 细胞病变(CPE₅₀) 的最高干扰素稀释度为 1 个活性单位(U)。

2 结果

2.1 目的基因的扩增和重组质粒的构建

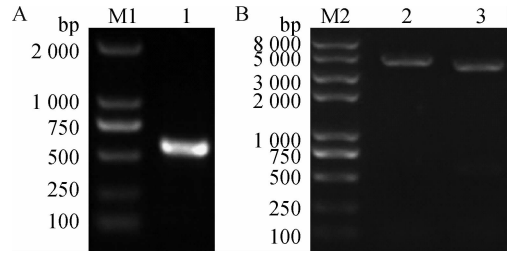
扩增 BoIFN-α0, 获得大小约为 500 bp 的目的片段(图 1) 将 BoIFN-α0 基因克隆至载体 pPICZαA 中, 获得重组质粒 pPICZαA-BoIFN-α0, 并进行酶切和测序验证, 酶切结果如图 1B, EcoR I 单酶切片段大小为 4 100 bp 左右, EcoR I 和 Xho I 双酶切一条带大小 3 600 bp, 另一条带大小 500 bp 左右。测序结果表明目的序列与 Bos taurus IFN-alpha C(IFN-αC, GenBank: NM_174085) 相似性达到 99%, pPICZαA-BoIFN-α0 构建正确。

2.2 含 BoIFN-α0 基因的重组酵母菌株的鉴定

通过 AOX1 基因特异性引物对和目的片段特异性引物做 PCR 鉴定, 以重组 BoIFN-α0 基因的酵母菌株染色体为模板, 分别扩增出现 1 080 bp(图 2A) 的条带和 500 bp(图 2B) 左右的条带。

2.3 阳性重组酵母的诱导表达和 Western blot 鉴定

通过不同时段取样的电泳分析, 发现重组酵母



M1. Trans2K DNA 相对分子质量标准; 1. BoIFN-α0 的 PCR 产物; M2. Trans2K PlusII DNA 相对分子质量标准; 2. pPICZαA-BoIFN-α0 的 EcoR I 酶切产物; 3. pPICZαA-BoIFN-α0 的 EcoR I 和 Xho I 酶切产物

M1. Trans2K DNA marker; 1. PCR product of BoIFN-α0; M2. Trans2K PlusII DNA marker; 2. pPICZαA-BoIFN-α0 digested by EcoR I; 3. pPICZαA-BoIFN-α0 digested by EcoR I and Xho I

图 1 PCR 扩增(A) 及重组载体 pPICZαA-BoIFN-α0 的酶切鉴定(B)

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product(A) and restriction enzyme assay of recombinant vector pPICZαA-BoIFN-α0(B)

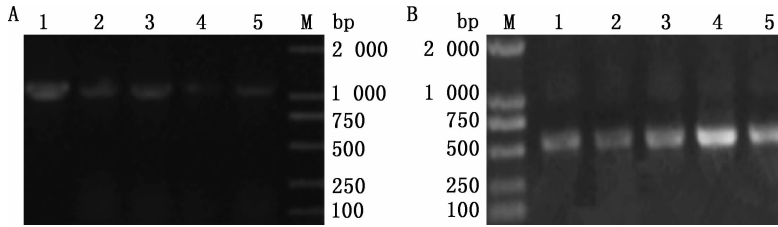
在诱导 96 h 时的表达量最高, 表达产物相对分子质量约为 18 和 21 ku(图 3A), 而根据 BoIFN-α0 成熟肽和 C 端融合蛋白的编码基因推导的蛋白质大小为 18 ku。其中一条表达蛋白质大小比其推导相对分子质量大 3 ku, 推测可能是因为表达产物发生了一定程度的糖基化。Western blot 结果显示在 18 和 21 ku 处可见特异性条带(图 3B), 证实均为 BoIFN-α0 基因表达产物, 并且 BoIFN-α0 为可溶性分泌表达。

2.4 表达产物的抗病毒活性检测

经 60% 饱和硫酸粗纯后的重组 BoIFN-α0 用于抗病毒活性鉴定。重组 BoIFN-α0 孵育 MDBK(100 μL · 孔⁻¹), 24 h 后接毒 VSV, 100 TCID₅₀ · 孔⁻¹, 48 h 后用显微镜观察细胞病变情况, 显示高浓度的重组 BoIFN-α0 对病毒的抑制作用明显, 对细胞的保护率达到 100%, 但随着稀释度的增加, 重组 BoIFN-α0 对细胞的保护率下降, 稀释度达到 100 × 4⁷ 时对细胞没有保护作用(图 4)。结果表明: 分泌型 BoIFN-α0 具有良好的抗病毒活性, 经 Reed-Muench 法计算, 重组 BoIFN-α0 在 MDBK/VSV 系统中抗病毒活性为 5.72 × 10⁶ U · mg⁻¹。

3 讨论

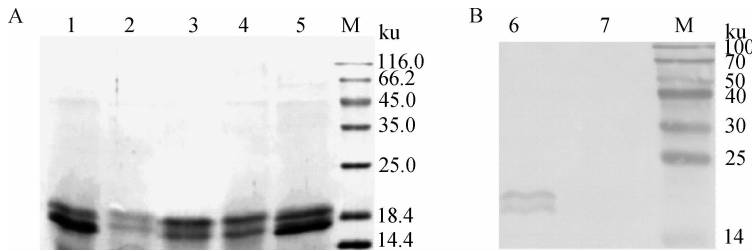
IFN-α 基因是一类无内含子的多基因家族, 主要在病毒感染的外周血白细胞、淋巴瘤细胞或骨髓瘤细胞中表达, 从动物体内纯化的 IFN-α 中发现,



A. AOX1 扩增; B. BoIFN- $\alpha 0$ 扩增; M. Trans2K DNA 相对分子质量标准; 1~5. 选择的 5 株重组酵母的 PCR 产物
 A. AOX1 amplification; B. BoIFN- $\alpha 0$ amplification; M. Trans2K DNA marker; 1-5. Products of PCR from 5 selected clones

图 2 PCR 鉴定酵母中 BoIFN- $\alpha 0$ 基因

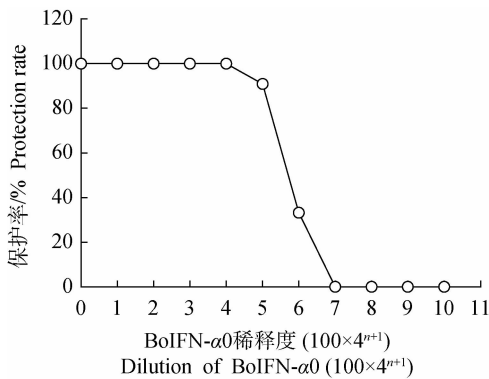
Fig. 2 Identification of the gene of BoIFN- $\alpha 0$



M. 蛋白质分子质量标准; 1~5: 选择的 5 株重组酵母的表达产物; 6. 阳性重组菌的培养上清; 7. 阴性对照
 M. Standard protein marker; 1-5. Expressed products from 5 selected clones; 6. Cultural supernatants of positive strain; 7. Negative control

图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析(A)和 Western blot 检测(B)

Fig. 3 SDS-PAGE analysis (A) and Western blot (B) Identification of expressed products



横坐标 0~11 系 n 分别为 0~11 时的稀释度
 0-11 of x axis is the dilutions when $n=0-11$

图 4 重组 BoIFN- $\alpha 0$ 的活性检测

Fig. 4 Activity assay of recombinant BoIFN- $\alpha 0$

有多种序列和性质上存在差异的亚型。在人的基因组中克隆出了 12 种基因属于 IFN- α 家族, 鼠体内 IFN- α 编码基因存在 14 种亚型, 其中 IFN- $\alpha 4$, IFN- $\alpha 11$, IFN- $\alpha 12$ 亚型比其他亚型有更高的活性, IFN- $\alpha 7/10$ 与其他亚型比较活性较低^[12]。X. Tan 等克隆了大熊猫 IFN- α 的 12 个亚型, 研究发现 IFN- $\alpha 3/4/8$ 三个亚型比其他亚型有更高的抗病毒活性, 比 IFN- $\alpha 6$ 高出四倍。然而 IFN- $\alpha 2/5/7/11$ 的活性比

IFN- $\alpha 6$ 更低^[13]。BoIFN- α 由 567 个核苷酸编码 1 个开放阅读框 (ORF), 其中包括 23 个氨基酸的信号肽和 166 个氨基酸的成熟多肽^[14]。并且它们之间存在着不同的活性, 但各个亚型之间差异性却鲜有报道。毕赤酵母是一种新型的外源基因表达系统, 已有多种蛋白质在此系统中高效表达。它是一种甲基营养型酵母, 在缺乏葡萄糖、甘油等碳源时, 可利用甲醇作为唯一碳源而生长。其醇氧化酶 (AOX1) 启动子受甲醇的严格控制, 可调控外源蛋白质的高效表达。其既具有原核表达系统的高表达量、可大规模培养和成品低廉的优点, 又具有真核表达系统可进行蛋白翻译后修饰、加工和折叠等优点^[15]。本研究获得的稳定分泌表达重组牛 $\alpha 0$ 干扰素的酵母菌株在 BMMY 培养基中经甲醇诱导发酵 96 h 后, 发酵上清经 60% 饱和硫酸铵沉淀, PBS 透析后用 BCA 蛋白检测试剂盒测得其质量浓度为 $1.917 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 比活为 $5.72 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。而崔子寅、李学仁利用毕赤酵母表达 BoIFN- αA 、奶牛 α 干扰素在 MDBK/VSV 系统抗病毒活性为 $8.93 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $5.1 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。比较后发现 BoIFN- $\alpha 0$ 抗病毒活性较 BoIFN- αA 低, 略高于奶牛

α 干扰素, 差异不明显, 但高于原核表达的牛 α 干扰素 10 倍以上^[16]。分析其原因, 与原核表达系统相比, 巴斯德毕赤酵母对分泌的目的蛋白可以进行类似高等真核生物的信号肽的剪切、二硫键形成、糖基化、磷酸化修饰等蛋白质加工过程。而且酵母表达的重组牛 α 干扰素不需要变性、复性等生产工艺, 因此更易进行大规模的生产。本研究对发酵上清采用饱和硫酸铵沉淀蛋白质, 离心浓缩, PBS 透析, 尽可能排除培养基长时间发酵对蛋白质活性的影响, 也利于蛋白质的保存。目前 IFN 的研究多以人 IFN- α 为主, 人用重组 IFN- α 主要用于抗肿瘤和抗病毒研究, 已用于临床^[17-18]。市场上已有商品化的重组猪 IFN- α 和重组犬 IFN- α , BoIFN- α 研究相对较少^[19], 而对 BoIFN- α 各个亚型抗病毒活性差异的系统研究更少。本研究为以后研究 BoIFN- α 各个亚型的生物活性差异奠定基础, 并对未来研究高效 BoIFN- α 抗病毒制剂提供物质和理论基础。

参考文献 (References):

- [1] PLATIS D, FOSTER G R. High yield expression, refolding, and characterization of recombinant interferon alpha 2/alpha 8 hybrids in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 31(2): 222-230.
- [2] DIGBY M R, LOWENTHAL J W. Cloning and expression of the chicken interferon- γ gene [J]. *J Interf Cytok Res*, 1995, 15(11): 939-945.
- [3] CHAPLIN P J, ENTRICAN G, GELDER K I, et al. Cloning and biologic activities of a bovine interferon-alpha isolated from the epithelium of a rotavirus-infected calf [J]. *J Interf Cytok Res*, 1996, 16(1): 25-30.
- [4] 史喜菊, 汪明, 夏春. 牛干扰素研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2005, 41(6): 41-43.
SHI X J, WANG M, XIA C, et al. The research progress of bovine interferon [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2005, 41(6): 41-43. (in Chinese)
- [5] 欧阳立明, 张惠展, 张嗣良, 等. 巴斯德毕赤酵母的基因表达系统研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(2): 151-154.
OUYANG L M, ZHANG H Z, ZHANG S L, et al. Advances in the studies of *Pichia pastoris* as a heterologous gene expression system [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2000, 27(2): 151-154. (in Chinese)
- [6] 李学仁. 重组奶牛 α 、 γ 干扰素的研制及其抗病毒作用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
LI X R. The development and antiviral activity of recombinant bovine interferon alpha and gamma [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [7] CHARLESTON B, FRAY M D, BAIGENT S, et al. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(8): 1893-1897.
- [8] PERLER L, SCHWEIZER M, JUNGI T W, et al. Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and-independent pathways. [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(4): 881-887.
- [9] CHINSANGARAM J, PICCONE M E, GRUBMAN M J. Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon [J]. *J Virol*, 1999, 73(12): 9891-9898.
- [10] ESPARZA I, GONZÁLEZ J C, VIÑUELA E. Effect of interferon-alpha, interferon-gamma and tumour necrosis factor on African swine fever virus replication in porcine monocytes and macrophages. [J]. *J Gen Virol*, 1988, 69(12): 2973-2980.
- [11] 崔子寅. 具抗病毒活性无冗余氨基酸牛 α 干扰素 (A 亚型) 表达策略研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
CUI Z Y. Expression strategies research of antiviral activities and aminoacid with no redundancy bovine interferon alpha A [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [12] VAN PESCH V, LANAYA H, RENAULD J C, et al. Characterization of the murine alpha interferon gene family [J]. *J Virol*, 2004, 78(15): 8219-8228.
- [13] TAN X, TANG Y, YANG Y, et al. Gene cloning, sequencing, expression and biological activity of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) interferon- α [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(11): 3061-3069.
- [14] 李学仁, 曹瑞兵, 李斐, 等. 奶牛 α 干扰素在毕赤酵母中的分泌表达及其生物活性测定 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(9): 64-68.
LI X R, CAO R B, LI F, et al. Secreted expression of bovine interferon-alpha in *Pichia pastoris* and its antiviral activity determination [J]. *China Biotechnology*, 2005, 25(9): 64-68. (in Chinese)

- [15] 郭雨刚. 毕赤酵母表达系统及其应用[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2012.
GUO Y G. Applications in *Pichia pastoris* expression system [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2012.
- [16] 刘颖, 刘华兰, 杨利国, 等. 奶牛 α 干扰素克隆表达和生物学活性分析[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(11): 1495-1499.
LIU Y, LIU H L, YANG L G, et al. Cloning and expression of interferon-alpha from bovine and its antiviral activity analysis[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30(11): 1495-1499. (in Chinese)
- [17] 徐冬梅. 干扰素- α 在治疗慢性乙型肝炎中的应用[J]. 中外医疗, 2011(10): 182.
XU D M. Application of interferon alpha in the treatment of chronic hepatitis B[J]. *China Foreign Medical Treatment*, 2011(10): 182. (in Chinese)
- [18] 王靖, 张晓乐. 阿德福韦酯和重组人干扰素 α -2b 治疗慢性乙型肝炎的药物经济学评价[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(10): 853-854.
WANG J, ZHANG X L. Pharmacoeconomics evaluation for the treatment of chronic hepatitis B of adefovir ester and human recombinant interferon alpha 2b [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2009, 29(10): 853-854. (in Chinese)
- [19] 王延群, 张璐, 李玉明, 等. 牛 α 干扰素在毕赤酵母中的高效分泌表达及活性鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(10): 845-848.
WANG Y Q, ZHANG L, LI Y M, et al. High-level secretory expression of bovine alpha interferon in *Pichia pastoris* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35(10): 845-848. (in Chinese)

(编辑 白永平)