

# 猪 $\beta$ 干扰素在毕赤酵母中的分泌表达及其对伪狂犬病毒的抑制作用

曹瑞兵, 周国栋, 周海霞, 包晶晶, 陈溥言\*

(南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

**摘要:**为了研制高活性的重组猪  $\beta$  干扰素,对 PoIFN- $\beta$  成熟蛋白第 3、7 和 164 位的 3 个氨基酸密码子进行毕赤酵母偏嗜性改造并构建了酵母表达载体 pPICZ $\alpha$ -PIB。pPICZ $\alpha$ -PIB 经 Sac I 酶切线性化后电转化导入毕赤酵母菌株 X-33。多株 PCR 鉴定为阳性的酵母转化子经甲醇诱导发酵分泌表达了 PoIFN- $\beta$ , 其中 B1 株酵母的 PoIFN- $\beta$  产量最高,约为  $2.5 \times 10^5$  U/mL,其表达量约为  $60 \mu\text{g/mL}$ ,比活为  $4.17 \times 10^6$  U/mg。将发酵上清液用 PEG20000 浓缩后进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测,结果表明表达产物是分子量约为 28kDa 和 25kDa 蛋白的混合物,两者均可与 PoIFN- $\beta$  阳性抗血清发生特异反应。表达产物比 PoIFN- $\beta$  理论推导分子量(约 20.8kDa)大,推测可能是表达产物发生了不同程度的糖基化。重组 PoIFN- $\beta$  对伪狂犬病毒在细胞中增殖可呈现抑制作用,并且 rPoIFN- $\beta$  对伪狂犬病毒在 MDBK 细胞上早期增殖的抑制效果最为明显。

**关键词:**猪  $\beta$  干扰素,毕赤酵母,分泌表达,伪狂犬病毒,抗病毒

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)03-0412-06

干扰素是一类动物机体产生的多功能分泌蛋白,涉及抗病毒、细胞生长调节和免疫激活等。 $\beta$  干扰素(Interferon beta, IFN- $\beta$ )主要由成纤维细胞产生,具有诱导细胞产生多种抗病毒蛋白、增强自然杀伤细胞的活性、增加抗原提呈细胞 MHC I 型分子表达以及抑制白细胞增殖等功能,在人类主要用于治疗多发性硬化症<sup>[1]</sup>。IFN- $\beta$  氨基酸序列和抗原性与 IFN- $\alpha$  显著不同,但与 IFN- $\alpha$  结合同样的受体,发挥相似的生物学活性,因此都属于 I 型干扰素。

Weingartl 和 Derbyshire 等<sup>[2]</sup>用聚肌胞(ployl:C)刺激猪肾细胞 PK-15 获得了具有较高抗病毒活性的猪  $\beta$  干扰素(Porcine interferon beta, PoIFN- $\beta$ ),发现 PoIFN- $\beta$  可较好地抑制猪流感病毒、轮状病毒和水疱性口炎病毒在猪肾细胞上的增殖。Artursson 等<sup>[3]</sup>于 1992 年首次克隆了 PoIFN- $\beta$  编码基因并证明其在猪基因组中只存在 1 个拷贝。PoIFN- $\beta$  基因全基因为 561bp,编码 165 个氨基酸的成熟蛋白和 21 个氨基酸的信号肽, PoIFN- $\beta$  成熟蛋白部分含有 3 个半胱氨酸和 3 个 N-糖基化位点。在氨基酸水平上 PoIFN- $\beta$  与人类  $\beta$  干扰素的同源性为 63%,而与猪  $\alpha$  干扰素的同源性只有 32%。

我们在前期的研究中克隆了 PoIFN- $\beta$  基因并在大肠杆菌中进行了表达,表达产物以包涵体的形式

存在,纯化的复性后产物的抗病毒活性为  $5.6 \times 10^5$  U/mg<sup>[4]</sup>。毕赤酵母是一种新型的外源基因表达系统,已有多种蛋白在此系统中高效表达<sup>[5-7]</sup>,不存在原核表达系统的内毒素难以去除的问题,也不存在哺乳动物细胞表达系统的病毒和支原体污染等问题,并可进行类似高等真核生物的信号肽剪切和糖基化等翻译后加工<sup>[8]</sup>。表达载体 pPICZ $\alpha$  的醇氧化酶启动子 AOX1 可用甲醇严格调控,表达盒的 N 端带有引导分泌表达的  $\alpha$ -MF 信号肽序列,表达产物可分泌到上清。本研究应用毕赤酵母表达系统来表达 PoIFN- $\beta$ ,获得分泌表达的高活性重组 PoIFN- $\beta$ ,并研究其对伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PrV)的抗病毒作用,为实现重组 PoIFN- $\beta$  工程化生产和进一步研究其生物学功能提供实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、病毒株、细胞和动物:**大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、MDBK 细胞、RK-13 细胞、143 TK<sup>-</sup> 细胞、水疱性口炎病毒(Vesicular Stomatitis Virus, VSV)和伪狂犬病毒上海株(Pseudorabies Virus, PrV-SH)均为本室保存。毕赤酵母(*Pichia pastoris*) X-33 和分泌型酵母表达载体 pPICZ $\alpha$  为 Invitrogen

基金项目 南京农业大学青年科技创新基金(KJ05013)

\* 通讯作者。Tel: 86-25-84396028; Fax: 86-25-84396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

作者简介 曹瑞兵(1976-),男,江苏海安人,博士,讲师,主要从事动物分子病毒学与免疫学研究。E-mail: crb@njau.edu.cn

收稿日期 2005-09-01,接受日期 2005-12-05,修回日期 2005-12-29

公司产品。5 周龄的清洁级 BALB/c 雌性小鼠购自扬州大学实验动物中心。

**1.1.2 主要试剂** : 含 PoIFN- $\beta$  全基因的克隆载体 pGEM-TB 由本室构建保存。蛋白质分子量标准购自中国科学院上海生化与细胞研究所。限制性核酸内切酶、连接酶、*ExTaq* 聚合酶、核酸分子量标准均购自大连 TaKaRa 公司。层析介质购自安玛西亚公司。酵母培养基 Peptone、YNB(W/O) 为 Difco 公司产品, Easy Select™ Pichia Expression Kit 和 Zeozin™ 均为 Invitrogen 公司产品, 羊抗鼠 IgG-HRP、生物素购自华美生物工程公司, 其它试剂均为分析纯。

## 1.2 引物的设计和合成

根据文献[1]设计一对引物用于扩增和改造 PoIFN- $\beta$  成熟蛋白编码基因。引物序列为 P1 5'-ATA GAATTC ATGAGCTACGATGTGCTTCGTAC -3' (*EcoRI*); P2 : 5'-CGATCTAGAGAGTTACGGAGGTAATCTGTAAG TC-3' (*Xba I*)。另设计一对醇氧化酶(AOX1)基因特异引物用于检测外源基因是否插入酵母基因组, 引物序列为 P3 :5'-GACTGGTCCAATTGACAAGC-3'; P4 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'。引物由上海博亚生物技术公司合成。

## 1.3 PCR 扩增

PCR 反应中模板为含 PoIFN- $\beta$  全基因的质粒 pGEM-TB, 总体积为 50 $\mu$ L, 其中 10  $\times$  buffer 5 $\mu$ L, 25mmol/L Mg<sup>2+</sup> 3 $\mu$ L, 2.5mmol/L dNTP 4 $\mu$ L, 20pmol/ $\mu$ L 引物 P1、P2 各 1 $\mu$ L, 模板 2 $\mu$ L, *ExTaq* 0.5 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 33.5 $\mu$ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 54 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 90s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。

## 1.4 pPICZ $\alpha$ A-PIB 载体的构建

将改造的 PoIFN- $\beta$  成熟蛋白基因和表达载体 pPICZ $\alpha$ A 用 *EcoRI* 和 *Xba I* 进行双酶切, 回收酶切片段, PoIFN- $\beta$  基因和 pPICZ $\alpha$ A 载体按 3:1 的摩尔比 4 $^{\circ}$ C 过夜连接。转化氯化钙法制备的感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。挑取低盐 LB 平板上的 Zeocin 抗性菌落, 提质粒用 *EcoRI* 和 *Xba I* 进行双酶切鉴定。将获得的阳性重组载体命名为 pPICZ $\alpha$ A-PIB, 送上海博亚生物技术公司测序。

## 1.5 酵母细胞的转化及鉴定

参照 Easy Select™ Pichia Expression Kit 的说明, 制备毕氏酵母菌株 X-33 的感受态细胞, 并将 *Sac I* 单酶切的线性化重组质粒 pPICZ $\alpha$ A-PIB 经电转化导入感受态细胞, 电转化的条件为 1.5kV、25 $\mu$ F 和 200 $\Omega$ 。将电转化后的酵母细胞涂板于含 100 $\mu$ g/mL Zeozin™ 的 YPDS 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 2d。挑选 Zeozin™ 抗

性克隆复制到 MM 平板和 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3d 后筛选出在两种培养基上都能正常生长良好的 Mut<sup>+</sup> 菌落。将这些菌落进一步复制到 Zeozin™ 浓度为 500 $\mu$ g/mL 的 YPDS 平板筛选出多拷贝整合的酵母克隆。挑选单个克隆接种于含 100 $\mu$ g/mL Zeozin™ 的 YPD 培养液, 取少量发酵菌体按文献[9]介绍的煮沸冻溶法提取酵母基因组, 应用 PoIFN- $\beta$  基因特异引物 PCR 鉴定其基因是否整合酵母基因组, 用醇氧化酶(AOX1)基因特异引物 PCR 鉴定猪  $\beta$ -干扰素基因是否插入 AOX1 启动子部位。

## 1.6 酵母重组子的诱导表达

将筛选的多个酵母克隆接种于 BMGY 培养液, 30 $^{\circ}$ C 震荡培养 16 ~ 20h ( $OD_{600}$  约为 4.0 ~ 6.0), 3000r/min 离心 5min 收集细胞, 用 BMMY 培养液重悬并调节浓度至  $OD_{600}$  约为 1.0, 30 $^{\circ}$ C 震荡培养每隔 24h 补加甲醇至终浓度为 1%, 连续培养 4d。每 24h 取样一份, 测定蛋白表达量及其抗病毒活性, 确定最佳收获时机。

## 1.7 鼠抗 PoIFN- $\beta$ 抗体的制备

取 6 周龄的清洁级 BALB/c 雌性小鼠 5 只, 每只小鼠腹腔注射原核表达的 PoIFN- $\beta$  与等体积的弗氏完全佐剂的乳化物 400 $\mu$ L, 约含抗原 30 ~ 40 $\mu$ g; 3 周后用等量的重组 PoIFN- $\beta$  和弗氏非完全佐剂乳化后腹腔注射进行二免; 再过 3 周后每只小鼠腹腔注射重组 PoIFN- $\beta$  200 $\mu$ L。3d 后按常规方法采血制备抗血清, ELISA 测定效价。

## 1.8 表达产物的 ELISA 检测及 Western blot 鉴定

将收集的发酵液 8000r/min 离心 15min, 尽可能除去酵母细胞。用 ELISA 进行表达产物的初步检测, 主要步骤为将待检样品倍比稀释后加到包被兔抗 PoIFN- $\beta$  IgG 的酶标板, 阳性对照为原核表达的 PoIFN- $\beta$ , 阴性对照为相同处理的空载体转化酵母菌发酵液; 一抗为原核表达的重组猪  $\beta$ -干扰素免疫小鼠制备的阳性血清, 二抗为羊抗鼠 IgG-HRP; S/N > 2.1 且 P  $\geq$  0.3 判断为阳性。取 20mL ELISA 阳性的上述处理的发酵上清, 置截流分子量为 10000Da 的透析袋, 用 PEG20000 反透析浓缩。取 10 倍浓缩的发酵上清加入等体积的 2  $\times$  SDS 上样缓冲液, 煮沸 5min。将上述样品进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测分析。

## 1.9 表达产物的处理及抗病毒活性测定

将发酵液 8000r/min 离心 15min, 取上清用 0.45 $\mu$ m 的滤膜过滤后, 用 0.1mol/LPBS (pH7.2) 充分透析。用 0.22 $\mu$ m 的滤膜过滤除菌, 至 4 $^{\circ}$ C 保存备

用。应用微量细胞病变抑制法检测干扰素抗病毒活性,采用 MDBK 细胞-VSV(水泡性口炎病毒)系统,具体步骤参照文献[10],将抑制 50% 细胞病变出现孔最大稀释度的干扰素定义为 1 个干扰素活性单位(U)。

### 1.10 rPoIFN- $\beta$ 对 PRV-SH 在 MDBK、RK-13 细胞和 143 TK-细胞中增殖的影响

用含 10% 小牛血清的 DMEM 营养液将 rPoIFN- $\beta$  稀释为 1000U/mL。在 96 孔细胞培养板上用 100 $\mu$ L/孔的 rPoIFN- $\beta$  分别预处理 MDBK 细胞、RK-13 细胞和 143 TK-细胞 24h,同时设各种细胞的空白对照。作用结束后,弃去培养上清,用无血清的培养液洗涤一次,每孔加入 100 $\mu$ L 1000TCID<sub>50</sub>/mL PRV-SH 病毒液,吸附 1h。弃去上清,加入含 2% 小牛血清的维持液,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 继续培养,观察各处理的病变出现情况。

### 1.11 PRV-SH 在 rPoIFN- $\beta$ 预处理的 MDBK 细胞中的增殖试验

胰酶消化的 MDBK 细胞记数后用营养液稀释到适当的密度,滴加到 3 块 24 孔板,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养待细胞贴壁。分别将含 1000U/mL 和 100U/mL rPoIFN- $\beta$  的完全培养液按 1mL/孔加入 24 孔板的细胞中,每个浓度 6 个孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中作用。20~24h 后弃去培养液,用无血清的培养液洗涤一次,每孔加入 1mL 1000TCID<sub>50</sub>/mL PRV-SH 病毒液,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中吸附 1h 后弃去上清,每孔加入 1mL 含 2% 小牛血清的营养液。同时设病毒对照和细胞对照各 6 个孔。分别于接毒后 12h、24h 和 48h 取出一块 24 孔板,置 -20 $^{\circ}$ C 冻存。冻融 2 次后用 RK-13 细胞测定各处理中 3 个细胞孔中的 PRV-SH 滴度。按 Reed-Muench 法计算病毒 TCID<sub>50</sub>。试验重复 3 次。

### 1.12 数据分析

每个处理取 3 个平行样,试验重复 3 次,平均值作为统计数据,用平均数  $\pm$  标准误 (Mean  $\pm$  SE) 表示。数据用 SAS 和 Microsoft Excel 软件分析,差异显著性采用 Student's T 检验。

## 2 结果

### 2.1 PoIFN- $\beta$ 基因的扩增、克隆和测序分析

以 pGEM-TB 为模板,应用引物 P1 和 P2 PCR 扩增出大小约为 515bp 的片段。用 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切后插入 pPICZ $\alpha$ A 载体的 *Eco*R I 和 *Xba* I 位点

间,获得重组载体 pPICZ $\alpha$ A-PIB。测序结果表明插入基因为阅读框对位的完整的 PoIFN- $\beta$  成熟蛋白编码基因,且编码 PoIFN- $\beta$  的第 3、7 和 164 位氨基酸的密码子分别由酵母稀有密码子改造为偏嗜密码子 TAC、CGT 和 CGT。

### 2.2 酵母转化及获得克隆的鉴定结果

线性化的 pPICZ $\alpha$ A-PIB 电转化毕赤酵母 X-33 感受态细胞获得 100 多个 Zeozin<sup>TM</sup> 抗性克隆。在这些克隆中筛选出 25 个在 MM 和 MD 两种培养基上都正常良好生长的 Mut<sup>+</sup> 菌落。进一步用高浓度的 Zeozin<sup>TM</sup> 培养基筛选得到 5 个多拷贝克隆。应用猪  $\beta$ -干扰素特异引物 P1 和 P2 及醇氧化酶特异引物 P3 和 P4 进行 PCR 鉴定,结果(图 1)表明在筛选的菌株中 PoIFN- $\beta$  基因已整合到酵母染色体的 AOX1 位置。

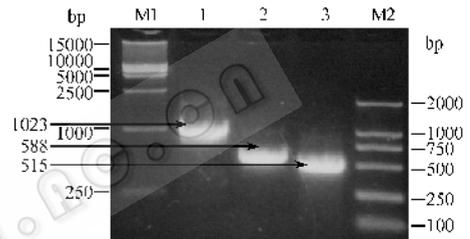


图 1 PCR 鉴定酵母中的 poIFN- $\beta$  基因

Fig. 1 Identification of the gene of poIFN- $\beta$  in yeast by PCR. M1. Marker DL15000; 1. Products of PCR from pPICZ $\alpha$ A-PIB transformed yeast; 2. Products of PCR from pPICZ $\alpha$ A transformed yeast cells; 3. poIFN- $\beta$  gene; M2. Marker DL2000.

### 2.3 阳性酵母克隆的诱导表达及表达产物的检测

先将获得的 5 株酵母克隆进行小量甲醇诱导培养,检测 PoIFN- $\beta$  的表达情况。ELISA 检测结果表明编号为 B1 克隆酵母菌的发酵上清中 PoIFN- $\beta$  的含量较高。PEG20000 浓缩的表达上清进行 SDS-PAGE,可见有两条分子量约为 25kDa 和 28kDa 的条带(图 2),而空白对照和阴性对照的相应位置没有条带。

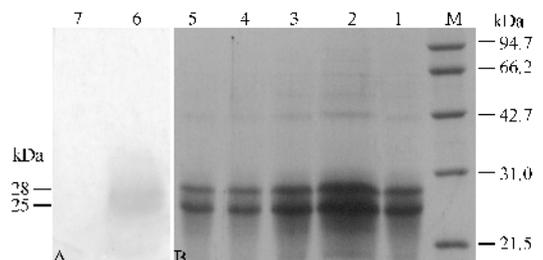


图 2 表达产物 SDS-PAGE (A) 及 Western blot (B) 鉴定

Fig. 2 Expressed products analyzed by SDS-PAGE and Western blot. M. Protein Marker; 1~5. Expressed products from five selected clones namely A2, B1, E4, F2 and G1; 6. Western blot result of expressed product of B1; 7. Western blot result of expressed product of pPICZ $\alpha$ A transformed yeast cells.

进一步的 Western blot 结果(图 2)表明这两条带均可与 PoIFN- $\beta$  阳性抗血清发生特异反应,都具有良好 PoIFN- $\beta$  抗原性。

## 2.4 表达产物的产量及抗病毒活性检测

将克隆 B1 进一步放大诱导培养,测定不同诱导时间的发酵上清中表达产物活性。最早可在诱导后 24h 检测到 PoIFN- $\beta$ ,诱导后 72h 的发酵上清抗病毒活性最高,达  $2.5 \times 10^5$  U/mL;随着诱导时间的继续延长发酵上清抗病毒活性反而降低,到 96h 时只有  $1.89 \times 10^5$  U/mL,可能是表达产物被蛋白酶水解所致。因此确定诱导时间为 72h。

采用薄层扫描 B1 克隆诱导后 72h 的表达产物电泳结果,估测 25kDa 和 28kDa 的条带蛋白约占总蛋白的 82%。根据微量蛋白检测仪的测定得知,其上清中可溶蛋白的总浓度为  $73 \mu\text{g/mL}$ ,因此重组猪

$\beta$ -干扰素的表达量约为  $60 \mu\text{g/mL}$ ,其比活为  $4.17 \times 10^6$  U/mg。

## 2.5 rPoIFN- $\beta$ 预处理 MDBK、RK-13 细胞和 143TK-细胞对 PRV-SH 增殖的影响

用 1000U/mL rPoIFN- $\beta$  预处理的 MDBK 细胞与未处理的对照相比,出现 PRV-SH 病变的时间推迟,病变的严重程度也较轻(图 3),尤其在出现病变的早期对比最明显。用 1000U/mL 的 rPoIFN- $\beta$  预处理的 RK-13 细胞和 143TK-细胞与未处理的对照相比,在接种 PRV-SH 后病变的出现时间和严重程度并没有明显的差异。此外,PRV-SH 在 MDBK 细胞上的病变特征表现为细胞塌陷,形成空圈(图 3),并迅速扩散。而 PRV-SH 在 RK-13 细胞和 143TK-细胞则具有明显的溶细胞特征。

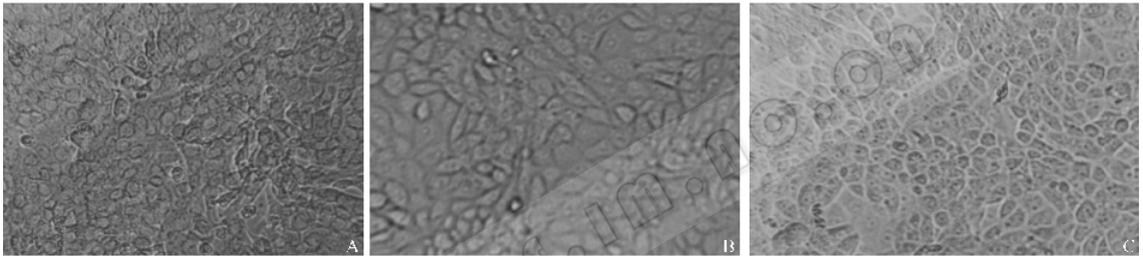


图 3 PrV SH 株在不同处理的 MDBK 细胞上的病变

Fig. 3 Cell pathological effects of pseudorabies virus SH strain in different treated MDBK cells. A: Severe CPE of PrV in MDBK cell; B: CPE of PrV in rPoIFN- $\beta$  pretreated MDBK cells; C: Control MDBK cells.

## 2.6 rPoIFN- $\beta$ 预处理 MDBK 细胞对 PrV-SH 增殖的影响

PrV-SH 在 1000U/mL 和 100U/mL rPoIFN- $\beta$  处理及对照 MDBK 细胞中不同时间的病毒增殖滴度有明显差异。数据分析结果(图 4)表明:接毒后 12h,两

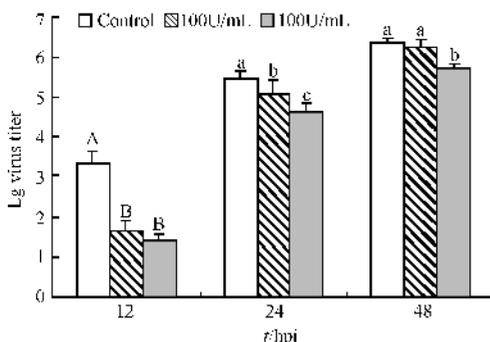


图 4 接毒后不同时间各处理组 MDBK 细胞中的 PrV-SH 增殖滴度的比较

Fig. 4 Comparison of PrV titers in different treated MDBK cells during different times after virus inoculation. Mean values with different superscripts (A, B, C) are extra-significantly different  $P < 0.01$  and with (a, b, c) are significantly different  $P < 0.05$ .

种浓度的 rPoIFN- $\beta$  处理组中病毒滴度与对照组中的病毒滴度差异均极显著;1000U/mL rPoIFN- $\beta$  处理组与 100U/mL rPoIFN- $\beta$  处理组之间的作用差异不显著。接毒后 24h 不同处理的 3 组细胞中的 PRV-SH 滴度均显著。到接毒后 48h,100U/mL rPoIFN- $\beta$  处理组与对照组中的 PRV-SH 滴度差异不显著,而 1000U/mL rPoIFN- $\beta$  处理组与对照组和 100U/mL rPoIFN- $\beta$  处理组的病毒滴度均差异显著。

## 3 讨论

本研究实现了 PoIFN- $\beta$  基因在毕赤酵母中的高效分泌表达,获得的稳定分泌表达 PoIFN- $\beta$  的酵母菌株 B1 在 BMMY 培养基中经甲醇诱导发酵 72h 后,上清液中 rPoIFN- $\beta$  的活性为  $2.5 \times 10^5$  U/mL,表达量约为  $60 \mu\text{g/mL}$ ,rPoIFN- $\beta$  比活为  $4.17 \times 10^6$  U/mg。

在前期的研究中用大肠杆菌表达的 PoIFN- $\beta$  经复杂性和纯化后的比活为  $5.6 \times 10^5$  U/mg,因此酵母表达 PoIFN- $\beta$  的活性显著高于大肠杆菌表达的 PoIFN- $\beta$ 。大肠杆菌表达的 PoIFN- $\beta$  以包涵体的形式存在。

需经提取、变性、复性和纯化后才具有活性。酵母表达的 PoIFN- $\beta$  直接以有活性的形式分泌到发酵上清液中,不需要变性和复性等生产工艺,发酵上清液中的杂蛋白含量很低,更易进行大规模的生产。而且毕赤酵母表达的 PoIFN- $\beta$  发生了糖基化修饰,更接近于 PoIFN- $\beta$  在猪体内的存在形式。

本研究中 PoIFN- $\beta$  表达产物的分子量分别约为 25kDa 和 28kDa,均高于 PoIFN- $\beta$  成熟蛋白和 C 端融合蛋白的理论推导分子量 22kDa。黄海等<sup>[11]</sup>应用毕赤酵母表达的猪  $\alpha$  干扰素时也发现理论分子量为 22kDa 的 PoIFN $\alpha$  由于糖基化作用其酵母表达产物为 26.8 kDa。PoIFN- $\beta$  成熟多肽由 165 个氨基酸组成,成熟多肽中含 3 个糖基结合位点 Asn-X-Ser/Thr,分别位于 73~75Aa、80~82Aa、152~154Aa 位。因此,推测分子量偏大可能是 PoIFN- $\beta$  表达产物发生不同程度的糖基化,但其确切原因还有待今后的去糖基化分析或分离纯化后进一步研究。

在研究中发现诱导表达的后期,随着时间的延长(72h 至 96h),表达上清的抗病毒活性反而有些下降。这可能是由于酵母在发酵过程中产生了少量的胞外蛋白酶,目前已有一些办法解决这一问题<sup>[12]</sup>。如在培养基中添加蛋白酶或酪蛋白水解物作为蛋白酶的底物,改变培养基的 pH 值,以降低蛋白酶的活性,使用蛋白酶缺陷酵母菌株来表达外源蛋白,如 SMD1163、SMD1168 等;点突变外源蛋白基因的个别位点,改变其蛋白序列中蛋白酶的作用部位使其免受蛋白酶的破坏。

研究发现伪狂犬病毒在重组 PoIFN- $\beta$  处理的 RK-13 和 143TK<sup>-</sup> 细胞中病变产生时间与严重程度与对照组没有差异,推测这两种细胞表面没有或很少存在 PoIFN- $\beta$  可结合的受体。而 MDBK 对 PoIFN- $\beta$  较为敏感,rPoIFN- $\beta$  处理后可明显抑制伪狂犬病毒的病变成形。

PrV-SH 接种 MDBK 细胞后的 12h,1000U/mL 和 100U/mL rPoIFN- $\beta$  处理组与对照组的病毒平均滴度差异均极显著,表明 1000U/mL 和 100U/mL rPoIFN- $\beta$  均可有效抑制 PrV-SH 在 MDBK 细胞上的早期复制。

而接毒后 48h,1000U/mL rPoIFN- $\beta$  处理组与 100U/mL rPoIFN- $\beta$  处理组和对照组差异显著,而后两组的差异不显著,表明 PrV 存在着一定的拮抗干扰素抗病作用的能力,但是这种拮抗能力与干扰素的抗病毒能力的作用结果与干扰素的剂量有关。本研究为重组 PoIFN- $\beta$  的工程化生产及其抗病毒作用的进一步研究奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Nachum D, Pamela BY. Interferon and the central nervous system. *European Journal of Pharmacology*, 2005, **523**: 1 - 15.
- [ 2 ] Derbyshire JB. The interferon sensitivity of selected porcine viruses. *Can J Vet Res*, 1989, **53**(1): 52 - 55.
- [ 3 ] Artursson K, Gobl A, Lindersson M, et al. Molecular cloning of a gene encoding porcine interferon-beta. *J Interferon Res*, 1992, **12**(3): 153 - 160.
- [ 4 ] 曹瑞兵,包晶晶,周海霞,等. 猪  $\beta$ -干扰素的原核表达及其对猪流行性腹泻病毒的抑制作用研究. *中国病毒学*, 2004, **19**(3): 364 - 368.
- [ 5 ] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**(1): 45 - 66.
- [ 6 ] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *BioTechnology*, 1993, **11**(8): 905 - 910.
- [ 7 ] Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, et al. Production of epidermal growth factor in yeast: high level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple genecopings. *Gene*, 1991, **105**: 205 - 212.
- [ 8 ] 齐连权,陈 薇,来大志,等. 毕赤酵母表达系统研究进展. *中国生物工程杂志*, 2002, **22**(6): 45 - 47.
- [ 9 ] 剧 海,梁东春,郭 刚,等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较. *天津医药*, 2003, **31**(5): 270 - 272.
- [ 10 ] 曹瑞兵,周 斌,陈溥言,等. 猪  $\gamma$ -干扰素的基因克隆、改造、表达及其活性测定. *南京农业大学学报*, 2003, **26**(2): 71 - 75.
- [ 11 ] 黄 海,谢 蓓,于瑞嵩,等. 猪 IFN $\alpha$  基因在毕赤酵母中的高效分泌表达. *遗传*, 2005, **27**(2): 215 - 220.
- [ 12 ] 李洪钊,李亮助,孙强明,等. 巴斯德毕赤酵母表达系统优化策略. *微生物学报*, 2003, **43**(2): 288 - 292.

## Secreted expression of porcine interferon beta in *Pichia pastoris* and its inhibition effect on the replication of pseudorabies virus

CAO Rui-bing, ZHOU Guo-dong, ZHOU Hai-xia, BAO Jing-jing, CHEN Pu-yan\*

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract** : In order to develop recombinant porcine interferon beta with high bioactivity, the rare codes that encoded 3th, 7th and 164th amino acids of porcine interferon beta mature protein were mutant into bias codes of *Pichia pastoris* and then the modified gene was introduced to yeast secreted expression vector pPICZ  $\alpha$ A which resulted in pPICZ $\alpha$ A-PIB. The SacI linearized plasmid pPICZ $\alpha$ A-PIB was transformed into *Pichia pastoris* X-33 by electroporation. The transformants were identified by PCR using PolFN- $\beta$  and AOX1 specific primers. The expression of PolFN- $\beta$  was induced with methanol. Several positive clones were obtained and the one namely B1 produced the highest level of PolFN- $\beta$ . The B1 was further fermented in shake-flask in larger volume. The concentration of the secreted PolFN- $\beta$  was about 60  $\mu$ g/mL and its antiviral activity is about  $2.5 \times 10^5$  U/mL, so the specific activity of porcine interferon beta produced by the *Pichia pastoris* is approximately  $4.17 \times 10^6$  U/mg. The expressed supernatant was concentrated and identified by SDS-PAGE and Western blot. There are two major proteins with respective molecular mass of approximately 25kDa and 28kDa in the supernatant. The results of Western blot indicated that the two proteins were positively reacted and manifested well PolFN- $\beta$  antigenicity. In contrast with the deduced theoretical molecular mass value of PolFN- $\beta$ , the expressed two major proteins were larger which maybe due to the difference of glycosylation. The antiviral effect of recombinant porcine interferon beta (rPolFN- $\beta$ ) on Pseudorabies virus (PrV) was studied in the present experiment. The result indicated that rPolFN- $\beta$  could effectively inhibit the replication of PrV in MDBK cells, especially during the early phase of the virus replication.

**Keywords** : Porcine interferon beta ; *Pichia pastoris* ; Secreted expression ; Pseudorabies virus ; Anti-virus

\* Corresponding author. Tel : 86-25-84396028 ; Fax : 86-25-84396335 ; E-mail : aid@njau.edu.cn

Received : 1 September 2005 / Accepted : 5 December 2005 / Revised : 29 December 2005