

重组杆状病毒表达牛 β 干扰素及其生物学活性研究

陈伟业^{1,2}, 肇慧君², 王喜军², 黄克和^{1*}, 步志高^{2*}

(¹南京农业大学动物医学院 南京 210095)

(²中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 哈尔滨 150001)

摘 要 本研究构建了表达牛 β 干扰素的重组杆状病毒, 感染 sf9 细胞后, 分别采用免疫荧光和免疫印迹证实了重组 BoIFN- β 的表达存在于细胞内和培养上清中。采用表达绿色荧光蛋白的水疱性口炎病毒(VSV * GFP)检测分泌到细胞上清中重组 BoIFN- β 的抗病毒活性, 可达到 $10^{6.0}$ AU/mL。同时重组 BoIFN- β 还可以激活鸡 Mx 启动子控制的萤光素酶报告基因的转录表达。综上, 本研究采用杆状病毒表达系统, 重组牛 β 干扰素以分泌形式高水平表达, 且具有天然 I 型干扰素的生物学活性。

关键词: 牛 β 干扰素; 抗病毒活性; Mx 启动子; 重组杆状病毒

中图分类号: Q936 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2007)06-0992-05

干扰素(interferon, IFN)是于 1957 年作为干扰病毒繁殖的物质被发现的, 其主要分为 I 型和 II 型, I 型 IFN 主要包括 IFN- α 、 β 、 ω 、 δ 、 κ 、 ϵ 、 ξ 和 τ 等, II 型 IFN 只有 IFN- γ 一种^[1,2]。I 型 IFN 中 IFN- α 主要由白细胞产生, IFN- β 主要来自成纤维细胞, IFN- α 和 β 具有相似的生物学活性, 结合同样的细胞表面受体, 能够诱导一系列细胞内蛋白表达, 继而发挥抗病毒、抗细胞增殖和调节免疫应答^[2,3]。

近年, 由于没有特效抗病毒的化学药物, 而病毒却变异迅速, 出现了禽流感、SARS 等病毒性疾病的爆发和流行, 迫切需要有效的抗病毒药物^[4-6], 而 I 型 IFN 由于其强大的抗病毒和免疫调节生物学功能, 成为病毒病防治的重要武器。因此, 研制出天然活性重组牛 I 型 IFN 在牛病毒病防治上具有十分重要的意义。杆状病毒(Baculovirus)表达技术已经成功表达了许多有活性的细胞因子, 其能够较好地表达重组蛋白糖基化和剪切折叠, 比原核表达系统更优越, 表达产物比活性更高, 更适合细胞因子的表达^[7,8]。

I 型 IFN 发挥其抗病毒生物学功能的途径之一, 是经由 JAK-STAT 信号转导途径激活 Mx 启动子(Mx promoter, Mxp), 表达的 Mx 蛋白(Mx protein)能够抑制负链 RNA 病毒复制^[9,10]。Mxp 可用于特异地检测 I 型 IFN 的生物学活性, 其中鸡 Mxp 可同时用于特异检测鸡和哺乳动物 I 型 IFN 的生物学活性^[11-13]。

本实验室建立的 MDBK-Mxp-luc 细胞系, 其中的鸡 Mxp 能够在牛 I 型 IFN 作用下表达萤光素酶(luciferase, luc)报告基因, 可用于猪和牛 I 型 IFN 的生物活性检测。

本研究克隆了牛 β 干扰素基因, 并构建了重组牛 β 干扰素杆状病毒, 并对其表达重组牛 β 干扰素的生物学活性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞株和毒株: 含有牛 β 干扰素的质粒 pMD18-BoIFN- β 和原核表达质粒 PET32-BoIFN- β 由本实验室构建保存。供体质粒 pFastBacTM 1 (Invitrogen) DH₁₀Bac 及 BL21 大肠杆菌感受态细胞 (Invitrogen) sf9 细胞系、马达氏牛肾细胞系(MDBK)均由本实验室保存; 稳定整合鸡 Mx 启动子控制表达萤光素酶(luciferase, luc)报告基因的 MDBK-Mxp-luc 细胞系由本实验室建立并保存, 可用于分析检测牛 I 型 IFN 的生物学活性; 鸡胚成纤维细胞(Chicken embryo fibroblasts, CEFs)采用 10 日龄的 SPF 鸡胚常规方法制备; 表达增强绿色荧光蛋白重组水疱性口炎病毒(VSV * GFP)由本实验室通过反向遗传技术构建; MDBK 细胞系滴定 PFU 后 -70℃ 保存。

1.1.2 主要试剂与仪器: Ni-NTA 琼脂糖亲和树脂、硝酸纤维素膜购自 Pierce 公司; 辣根过氧化物酶标

基金项目: 国家 973 项目(2005CB523202)

* 通讯作者。步志高, E-mail: zgb@hvri.ac.cn, 黄克和(并列第一通讯作者), E-mail: khhuang@njau.edu.cn

作者简介: 陈伟业(1980-)男, 江苏东海人, 博士研究生, 主要从事分子免疫学和分子病毒学的研究。E-mail: zhenweiy1980@yahoo.com.cn

其他作者: 曹文雁², 葛金英², 温志远²

收稿日期: 2007-01-31; 接受日期: 2007-03-22; 修回日期: 2007-07-21

记的羊抗鼠 IgG、鱼皮蛋白购自 Sigma 公司;高亮萤光素酶检测试剂(Bright-Glo Luciferase assay system)购自 Promega 公司;各种限制性内切酶和 Ex-*Taq* 酶都购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶购自 MBI 公司;质粒中量提取试剂盒购自 Qiagen 公司;96 孔白色板(96 well white plate)购自 Corning 公司;荧光倒置显微镜为 LEICA 公司产品;检测发光的仪器 Microplate Fluorescence Reader(FLX800)为 Bio-Tek 公司产品;CEQ8000 自动测序仪为 Beckman 公司产品。各种细胞培养基、昆虫细胞转染试剂 Cellfectin Reagent、Trizol 和 M-MLV 反转录试剂盒购于 Invitrogen 公司。

1.2 重组杆状病毒的构建与表达

从 pMD18-BoIFN- β 上以 *Sal* I / *Xba* I 双酶切下 BoIFN- β 的 ORF 克隆至以同样双酶切的质粒 pFastBacTM1 构建 pFastBacTM1-BoIFN- β 。将 pFastBacTM1-BoIFN- β 转化至 DH₁₀Bac, 经蓝白筛选挑取白色菌落,提取质粒,以 M13-48f(5'-GTTTCCAGTCACGAC-3') 和 M13-47r(5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 为引物进行 PCR 筛选阳性重组穿梭质粒 rBacmid-BoIFN- β 制备高纯度阳性重组穿梭质粒,使用 Cellfectin Reagent 转染至 sf9 细胞,待细胞出现病变后,按文献[14]进行重组病毒嗜斑纯化和病毒扩增。收取纯化后病毒感染的 sf9 细胞,提病毒基因组 DNA,以 M13-48f 和 M13-47r 为引物进行 PCR 验证 BoIFN- β 基因在纯化病毒中获得稳定重组,重组病毒命名为 rBac-BoIFN- β 。扩增种毒滴定后,于 4℃ 保存备用。

rBac-BoIFN- β 病毒液和野生型杆状病毒按 1:10 体积比感染新鲜制备 sf9 细胞,至细胞病变达 90% 时收获细胞培养上清,0.22 μ m 滤器过滤后,分别命名为 BoIFN- β _{rBac} 和 mock_{Bac},分装后于 -70℃ 保存备用。

1.3 IFN 的抗病毒活性检测

IFN 抗病毒活性定量检测的操作步骤如下:MDBK 细胞于 96 孔细胞板中生长至密度为 100%,弃上清,每孔加 10 倍梯度稀释 IFN 样品 100 μ L,每个稀释倍数设 3 个平行对照孔,37℃ 及 5% CO₂ 培养条件下处理 24h 后,弃上清,用含 2% FBS 的 DMEM 稀释 VSV * GFP,按每孔 30000 PFU(100 μ L)加入病毒稀释液,同时设未经转染上清处理,只加病毒液的病毒对照(Virus Control, VC)孔。接毒后至 VC 孔的 CPE 约为 100% 时,荧光倒置显微镜下观察 GFP 表达及病毒感染复制情况,以 VC 孔为参照,每毫升中以表达绿色荧光数减少为 VC 孔 50% 的平均最高稀释度为一个抗病毒活性抑制单位(AU)。

1.4 BoIFN- β 多克隆抗体的制备

原核表达质粒 PET32-BoIFN- β 转化到 BL21,用

0.5mM IPTG 诱导 3h 后,SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白表达。表达产物参照 Ni-NTA 琼脂糖亲和树脂纯化说明书纯化后,透析除去尿素。

以纯化的 BoIFN- β 原核表达蛋白免疫 BALB/C 小鼠,免疫前断尾采血,分离免疫前小鼠血清,然后按常规程序免疫小鼠并采血分离血清,于 -20℃ 保存备用。

1.5 间接免疫荧光

rBac-BoIFN- β 病毒液按 1:10 体积比感染新鲜制备 sf9 细胞,至细胞病变达 90% 时,弃去细胞上清, PBS 洗涤后依次在室温下以 PBS 配制的 3% 多聚甲醛固定 15min, PBS 配制的 0.2% TritonX-100 通透细胞膜 10min, PBST(0.05% Tween20)配制的 1% BSA 封闭 1h,同时设野生型杆状病毒感染细胞为阴性对照。以 PBST 1:100 稀释的 BoIFN- β 小鼠多抗为一抗,同时设小鼠免疫前血清为一抗的对照;PBST 1:50 倍稀释荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, PBST 洗涤后荧光倒置显微镜下观察结果。

1.6 免疫印迹鉴定

rBac-BoIFN- β 按 1:10 体积比感染于无血清培养基中培养的 sf9 细胞,待细胞病变达 90% 时,收获细胞培养上清,于冰水浴中每 100ml 边搅拌边徐徐加入 55.6g 硫酸铵。静置 30min 后,10000 \times g 离心 20min 收集沉淀,去上清,将沉淀悬浮于 1~2 倍沉淀体积的 20mmol/L Tris-HCl(pH7.4)溶液,再于 20mmol/L Tris-HCl(pH7.4)溶液中透析除去硫酸铵。得到的浓缩样品依次进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电转印至硝酸纤维素膜,5% 鱼皮蛋白(PBST 配制)封闭过夜,以上述制备的 BoIFN- β 小鼠多抗 PBST 1:100 稀释作为一抗, PBST 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 为二抗, DAB 显色 3~5min 后加去离子水终止。

1.7 Mxp 的激活反应与萤光素酶的检测

MDBK-Mxp-luc 细胞于 24 孔板中过夜密度约 100% 时,加入以含有 5% FBS 的 DMEM 10 倍梯度稀释的上述 BoIFN- β _{rBac} 和 mock_{Bac} 样品,每个稀释度设 3 个平行孔,并设未处理空白对照孔(Blank Control, BC),37℃ 及 5% CO₂ 培养 6h 后,参照高亮萤光素酶检测系统说明书检测萤光素酶的表达。

2 结果

2.1 rBac-BoIFN- β 的构建与表达产物的抗病毒活性滴定

提取重组杆状病毒 rBac-BoIFN- β 的病毒基因组 DNA,以 M13-48f 和 M13-47r 为引物进行 PCR 鉴定,扩增出特异的 2.8kb 的产物,而野生型杆状病毒扩

出约 300bp 的产物,表明 PoIFN- γ 基因在杆状病毒中获得重组。

BoIFN- β_{rBac} 的抗病毒活性采用 VSV * GFP 于 MDBK 细胞上进行抗病毒活性滴定(图 1),表明 BoIFN- β_{rBac} 的抗病毒活性约为 $10^{6.0}$ AU/mL。同时 mock_{Bac} 的 10 倍稀释度几乎完全抑制了 VSV * GFP 的复制,但 100 倍稀释度无抗病毒活性。

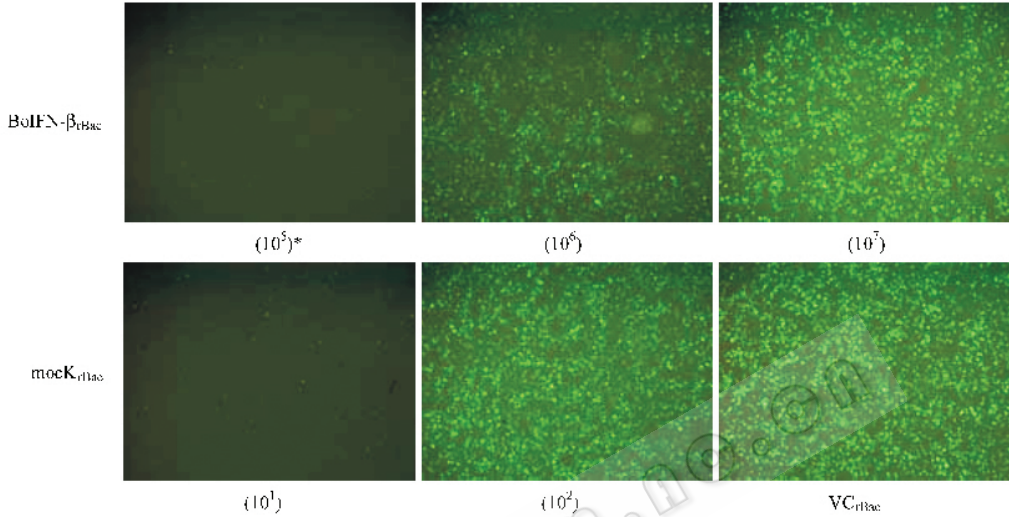


图 1 rBac-BoIFN- β 感染 sf9 上清的抗病毒活性滴定

Fig. 1 The antiviral activity assay of the supernatants of rBac-BoIFN- β using VSV * GFP. When MDBK cells formed monolayer and was about 100% density in 96 well dishes, cell culture supernatants was discarded, then the cells were incubated for 24 hours with tenfold serially diluted IFN samples as described above in an incubator at 37°C with 5% CO₂. Then the supernatants were discarded, each well was inoculated with 30000 pfu VSV * GFP in 100 μ L DMEM containing 2% FBS and were incubated for another 16-24 hours. Virus control (VC) was the well free from IFN sample but with addition of VSV * GFP. When 100% CPE formed in VC well, the highest dilution of the well with 50% GFP expression in the VC well was defined as one antiviral activity unit (AU) per ml. The supernatant of rBac-BoIFN- β and wild type baculovirus infecting sf9 cells was named BoIFN- β_{rBac} and mock_{Bac} respectively. The antiviral activity of BoIFN- β_{rBac} is about $10^{6.0}$ AU/ml. * The number in () is the dilution of the IFN samples.

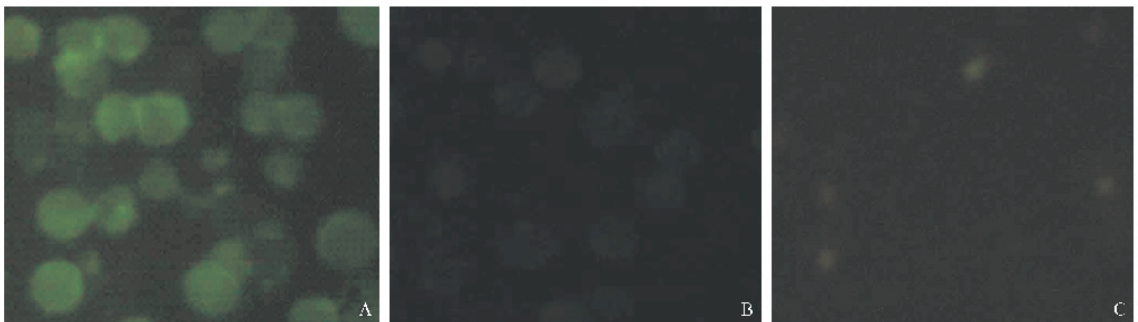


图 2 间接免疫荧光检测重组 BoIFN- β 在 rBac-BoIFN- β 感染 sf9 细胞中的表达

Fig. 2 Confirming the expression of recombinant BoIFN- β in the insect cells infected with rBac-BoIFN- β using indirect immunofluorescent assay (IFA). Polyclonal antibody to BoIFN- β was collected from BALB/c mice immunized by BoIFN- β protein expressed by *E. coli* and the control serum was collected from BALB/c mice before immunization. sf9 cells was infected with rBac-BoIFN- β , and polyclonal antibody to BoIFN- β (A) and control serum (B) were used as first antibody. sf9 cells was infected with wild type baculovirus (C), and polyclonal antibody to BoIFN- β was used as first antibody.

2.3 免疫印迹鉴定 BoIFN- β 在 sf9 细胞上清的表达
图 3 表明: rBac-BoIFN- β 感染的 sf9 细胞后,重

2.2 间接免疫荧光检测 BoIFN- β 在 sf9 细胞的表达
以上述制备的 BoIFN- β 小鼠多抗为一抗检测 rBac-BoIFN- β 感染的 sf9 细胞发出强阳性荧光信号(图 2-A),同时用免疫前小鼠血清检测则为荧光信号阴性(图 2-B);以 BoIFN- β 小鼠多抗为一抗检测野生型杆状病毒感染的 sf9 细胞也为荧光信号阴性(图 2-C)结果表明 BoIFN- β 在 sf9 细胞中获得了表达。

组 BoIFN- β 以分泌到 sf9 细胞培养上清中的方式获得正确表达,产物分子量约为 20kDa;同时,阴性杆

状病毒感染 sf9 细胞的上清未显示此条带。

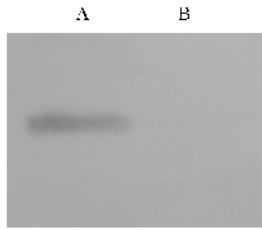


图3 免疫印迹检测重组 BoIFN-β 在 rBac-BoIFN-β 感染 sf9 细胞上清中的表达

Fig. 3 Confirming the expression of recombinant BoIFN-β in the supernatant of the sf9 cells infected with rBac-BoIFN-β using Western blotting. The protein in serum-free insect cell culture medium of rBac-BoIFN-β (A) and that of wild type baculovirus-infected sf9 cells (B) was precipitated by 85% (w/v) ammonium sulphate. Then the precipitation was analyzed by Western blotting using polyclonal antibody against BoIFN-β described above as first antibody, and using the HRP-sheep-against mouse IgG conjugate as second antibody.

2.4 MDBK-Mxp-luc 分析 BoIFN-β_{rBac} 的生物学活性

图4表明:低至 10^6 稀释度的 BoIFN-β_{rBac} 都可激活 Mxp 表达萤光素酶, $10^4 \sim 10^6$ 稀释度与萤光素酶表达量成良好的线性关系; mock_{Bac} 只有10倍稀释度激活 Mxp 表达了较高水平的萤光素酶,100倍稀释度以上不能激活 Mxp; 以上检测结果与抗病毒活性滴定结果相符合。因此 rBac-BoIFN-β 表达的重组 BoIFN-β 具备天然 I 型干扰素的生物学功能和较高的生物学活性。

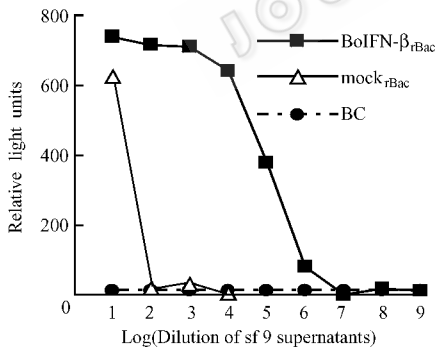


图4 MDBK-Mxp-luc 分析 BoIFN-β_{rBac} 的生物学活性

Fig. 4 The bioactivity assay of BoIFN-β_{rBac} using MDBK-Mxp-luc cells. MDBK-Mxp-luc cells formed confluent monolayer in 24 well dishes, then the supernatants of sf9 infected by rBac-BoIFN-β (BoIFN-β_{rBac}) and wild type baculovirus (mock_{Bac}) diluted by ten-fold series were added, and MDBK-Mxp-luc cells were incubated in an incubator at 37°C with 5% CO₂ for 6 hours, and the expressed luciferase were assayed using Glo-Luciferase assay system (Promega) as recommended by the manufacturer. The well free from sf9 supernatants was set as blank control (BC).

3 讨论和结论

病毒复制抑制试验是目前检测干扰素的生物学

活性的传统方法。传统方法抗病毒活性的判定标准主要有3种方法,观察细胞病变(cytopathic effect, CPE)、噬斑(plaque)计数和细胞染色,但3种方法都很容易产生较大误差,重复性差,精确度低^[15,16]。作为改进,本研究使用表达 GFP 的重组 VSV 病毒替代野生型 VSV 病毒,可以通过荧光蛋白的表达来反映病毒感染复制的数量程度,进而判定 IFN 对病毒复制的抑制程度,判定更准确敏感(数据未显示),重复性显著改善。

除了抗病毒活性定量检测方法外,报告基因检测以其敏感性高、准确性好和使用安全等优点而成为研究 IFN 生物学活性及定量检测和分析的得力工具。本实验室建立的 MDBK-Mxp-luc 细胞系内有鸡 Mx 启动子控制表达的萤光素酶报告基因,可用于检测牛的 I 型 IFN 的生物学活性。rBac-BoIFN-β 表达的重组 BoIFN-β 即使 10^4 倍稀释也能作用于 MDBK-Mxp-luc 细胞激活 Mxp 表达了高水平的萤光素酶,并且 $10^4 \sim 10^6$ 稀释度的生物学活性与激活表达的萤光素酶水平几乎成线性关系,与抗病毒活性检测相符合,表明其具备天然 I 型 IFN 的生物学功能。

在病毒病层出不穷的今天,I 型 IFN 在人类的抗病毒治疗中已有重要的应用,例如人乙型肝炎的治疗^[17]。在动物病毒病的治疗中,IFN 的应用虽然还处在探索阶段,但是人的临床治疗经验预示了其较好的应用前景。而 IFN 应用于临床治疗则需要的活性较高、热源少且廉价的 IFN 产品,其可以通过杆状病毒表达系统来实现。杆状病毒表达系统表达水平高,能够对蛋白进行完整的翻译后加工,其表达的蛋白具有完整的生物学功能,且可安全地用于畜禽疾病的临床治疗,非常适合细胞因子的表达^[18,19]。

在本研究中,间接免疫荧光和免疫印迹都表明 rBac-BoIFN-β 感染 sf9 细胞后重组 BoIFN-β 获得了表达,且主要分泌到细胞上清中,上清的抗病毒活性可达 $10^{6.0}$ AU/mL,分泌表达还有利于今后的产业化;同时重组 BoIFN-β 能够激活 Mx 启动子,表明其具有天然 I 型 IFN 的生物学功能,也验证了杆状病毒表达系统良好的翻译后修饰能力;虽然绝对表达量小,直接用细胞或感染 sf9 上清进行 SDS-PAGE 电泳或免疫印迹都不能检测到重组 BoIFN-β 的表达(数据未显示),但是其较高的抗病毒活性和生物学活性都显示表达产物具有极高的比活性,这是原核表达系统无法比拟的,并将有利于今后临床治疗的应用。

结论,本研究构建的 rBac-BoIFN-β 表达的重组 BoIFN-β 具有天然 I 型 IFN 相同的生物学功能,表达水平高,抗病毒活性可达 $10^{6.0}$ AU/mL,且具有极高的比活性,具有良好的市场和临床治疗应用前景。

参 考 文 献

- [1] Lefevre F, Boulay V. A novel and atypical type one interferon gene expressed by trophoblast during early pregnancy. *J Biol Chem*, 1993 **268**(26): 19760 – 19768.
- [2] Meager A. The Interferons: Characterization and Application, 1 ed: John Wiley publishing company 2006.
- [3] Vilcek J. Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. *Immunity* 2006 **25**(3): 343 – 348.
- [4] Li Z, Chen H, Jiao P, *et al.* Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol*, 2005 **79**(18): 12058 – 12064.
- [5] Chen H, Deng G, Li Z, *et al.* The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**(28): 10452 – 10457.
- [6] Morgenstern B, Michaelis M, Baer P C, *et al.* Ribavirin and interferon-beta synergistically inhibit SARS-associated coronavirus replication in animal and human cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 **326**(4): 905 – 908.
- [7] Lambrecht B, Gonze M, Morales D, *et al.* Comparison of biological activities of natural and recombinant chicken interferon-gamma. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999 **70**(3–4): 257 – 267.
- [8] Cha HJ, Dalal NG, Vakharia VN, *et al.* Expression and purification of human interleukin-2 simplified as a fusion with green fluorescent protein in suspended Sf-9 insect cells. *J Biotechnol*, 1999 **69**(1): 9 – 17.
- [9] Asano A, Ko JH, Morozumi T, *et al.* Polymorphisms and the antiviral property of porcine Mx1 protein. *J Vet Med Sci* 2002 **64**(12): 1085 – 1089.
- [10] Kolb E, Laine E, Strehler D, *et al.* Resistance to influenza virus infection of Mx transgenic mice expressing Mx protein under the control of two constitutive promoters. *J Virol*, 1992 **66**(3): 1709 – 1716.
- [11] Simon A, Fah J, Haller O, *et al.* Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines. *J Virol*, 1991 **65**(2): 968 – 971.
- [12] Files JG, Gray JL, Do LT, *et al.* A novel sensitive and selective bioassay for human type I interferons. *J Interferon Cytokine Res*, 1998 **18**(12): 1019 – 1024.
- [13] Schumacher B, Bernasconi D, Schultz U, *et al.* The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. *Virology*, 1994 **203**(1): 144 – 148.
- [14] Nagata T, Ishikawa S, Shimokawa E, *et al.* High level expression and purification of bioactive bovine interleukin-18 using a baculovirus system. *Vet Immunol Immunopathol* 2002 **87**(1–2): 65 – 72.
- [15] Ferreira PC, Peixoto ML, Silva MA, *et al.* Assay of human interferon in Vero cells by several methods. *J Clin Microbiol*, 1979 **9**(4): 471 – 475.
- [16] Meager A. Biological assays for interferons. *J Immunol Methods*, 2002 **261**(1–2): 21 – 36.
- [17] Capalbo M, Actis C, Maurizia R, *et al.* Treatment of chronic hepatitis B with beta interferon given intramuscularly: a pilot study. *Ital J Gastroenterol*, 1992 **24**(4): 203 – 205.
- [18] Ailor E, Betenbaugh MJ. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr Opin Biotechnol*, 1999 **10**(2): 142 – 145.
- [19] Luckow VA, Summers MD. High level expression of nonfused foreign genes with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology*, 1989 **170**(1): 31 – 39.

Expression of recombinant bovine beta-interferon by baculovirus system and evaluation of its bioactivity

CHEN Wei-ye^{1,2}, ZHAO Hui-jun², WANG Xi-jun², HUANG Ke-he^{1*}, BU Zhi-gao^{2*}

(¹ College of Veterinary Medicine, Nanjing agricultural University, Nanjing 210095, China)

(² National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: In this paper, a recombinant baculovirus containing the ORF of bovine interferon- β (BoIFN- β) gene, rBac-BoIFN- β , was generated to express recombinant BoIFN- β (rBoIFN- β) in sf9 insect cells. The expression of rBoIFN- β in rBac-BoIFN- β infecting sf9 cells and its supernatants was confirmed by indirect immunofluorescence assay and Western blot. The antiviral activity of rBoIFN- β in the supernatant can reach $10^{6.0}$ AU/mL evaluated by the antiviral assay with VSV * GFP that expressed green fluorescence protein and rBoIFN- β could stimulate the expression of luciferase reporter gene controlled by chicken Mx promoter. All the results showed that rBac-BoIFN- β constructed here could express high level recombinant BoIFN- β in secreted form that had the bioactivity of natural type I IFN.

Keywords: bovine beta interferon; antiviral assay; Mx promoter; recombinant baculovirus

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523202)

* Corresponding author. Tel: 86-451-85935063; E-mail: zgb@hvri.ac.cn; Tel: 86-25-84395507; E-mail: khhuang@njau.edu.cn

Other authors: CAO Wen-yan², GE Jin-ying², WEN Zhi-yuan²

Received: 31 January 2007/ Accepted: 22 March 2007/ Revised: 21 July 2007