

郭建军, 曾 静, 袁 林, 等. 多角体包裹型猪 α 干扰素在昆虫细胞中的表达[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(23): 41–44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.012

多角体包裹型猪 α 干扰素在昆虫细胞中的表达

郭建军, 曾 静, 袁 林, 邱小忠

(江西省科学院微生物研究所, 江西南昌 330096)

摘要: 为了获得多角体包裹的重组猪 α 干扰素, 应用 Bac-to-Bac 昆虫细胞杆状病毒表达系统, 将多角体蛋白基因和编码成熟猪 α 干扰素的基因分别构建到 pFastBac Dual 载体的 PH、P10 启动子下, 以多角体蛋白 H1 α -螺旋序列为信号肽。将构建质粒转化 DH10BacTM 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 Sf9 昆虫细胞获得重组病毒。通过间接免疫荧光、Western-Blot 证明, 多角体蛋白与猪 α 干扰素实现共表达, 在信号肽引导下猪 α 干扰素被包埋进多角体; 用微量细胞病变抑制法检测显示, 多角体包裹的猪 α 干扰素有抗病毒活性, 效价达到 5 亿 U/mg 以上。应用在昆虫细胞中表达的多角体包裹型猪 α 干扰素, 在临床上为猪病毒性疾病的防治与治疗奠定了基础。

关键词: 猪干扰素; 多角体; 杆状病毒表达; 抗病毒活性

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0041-04

干扰素 (interferon, 简称 IFN) 是人和动物细胞受到特定干扰素诱生剂刺激后, 产生的一种具有广谱抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等多种功能的细胞因子^[1-2], 是现今最理想的一种抗病毒生物制剂^[3]。猪 α 干扰素 (porcine interferon, 简称 PoIFN α) 属于干扰素 I 型, 机体的多种体细胞受病毒感染时均可产生猪 α 干扰素, 具有较强的抗病毒作用^[4-5]。PoIFN α 基因全长 570 bp, 编码含 189 个氨基酸残基的前体蛋白, 其中前 23 个氨基酸为信号肽, 其后的 166 个氨基酸为成熟的猪 α

干扰素蛋白^[1-2]。猪 α 干扰素主要由单核细胞产生, 有多个亚型, 各亚型结构相似, 其活体形式为单体。大量试验表明, 猪 α 干扰素对猪繁殖与呼吸综合征病毒^[6-7]、口蹄疫病毒^[8]和猪传染性胃肠炎病毒^[9]等具有抑制作用。

多角体是由同源结合的多角体蛋白分子三聚体相互作用组装成的致密蛋白晶体形成的, 多角体能够有效保护包埋的异源蛋白免受外界物理和生物化学作用的降解^[10-11], 保持异源蛋白的稳定性和生物学功能, 使其具有抗辐射、抗高温、持久缓释等作用^[12]。Ikeda 等将目的蛋白基因与多角体蛋白基因共表达, 且目的蛋白被包埋进多角体蛋白内^[13]; 在不良环境刺激下, 受多角体保护的外源蛋白在较长时间内保持活性。Mori 等利用多角体蛋白将成纤维细胞生长因子 II 固定入多角体中并成功检测了其稳定性和生物活性^[14]。

利用昆虫病毒 Bac-to-Bac 表达系统, 以多角体蛋白氨基端的 H1 α -螺旋序列作为多角体蛋白识别信号序列与猪

收稿日期: 2016-07-04

基金项目: 江西省重大科技创新研究项目 (编号: 20124ACF01100);

江西省科学院对外合作项目 (编号: H2014004)。

作者简介: 郭建军 (1984—), 男, 江西抚州人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为有益微生物与动物营养。E-mail: gjj@whu.edu.cn。

通信作者: 袁 林, 博士, 副研究员, 研究方向应用微生物学与动物营养。E-mail: yuanlin2003cn@aliyun.com。

范国强等研究表明, 悬铃木外植体在黑暗条件下培养 3 d 后, 再放置在光照时间为 16 h/d 的条件下培养, 不仅可以促进悬铃木体细胞胚胎的发生, 而且提高了体胚诱导率^[12], 与本试验结果一致。

参考文献:

- [1] 于丽萍. 花叶俱美的室内植物——白掌[J]. 绿化与生活, 2002(2): 28.
- [2] 周丽依, 曹 静, 邝哲师, 等. 园艺植物体胚发生及植株再生技术研究[J]. 热带作物学报, 1998, 19(2): 15–19.
- [3] 高亦珂. 几种百合组织培养及体细胞胚发生技术的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.
- [4] Centeno M L, Rodrigue R, Berros B, et al. Endogenous hormonal content and somatic embryogenic capacity of *Corylus avellana* L. cotyledons[J]. Plant Cell Reports. 1997, 17(2): 139–144.
- [5] 杨映银, 桂耀林, 郭仲探. 裸子植物体细胞胚胎发生和人工种子

- 的研究[J]. 种子, 1995(3): 25–30
- [6] 曹 静, 周丽依, 邝哲师, 等. 白鹤芋花序体细胞胚胎发生及植株再生研究[J]. 农业生物技术学报, 1995, 3(3): 81–85.
- [7] 邝哲师, 周丽依, 马雪筠, 等. 香蕉和荔枝体胚发生两种不同途径的研究 (简报)[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(3): 210.
- [8] 吕秀立, 施季森. 欧洲七叶树体细胞胚胎发生研究[J]. 分子植物育种, 2003, 1(5): 649–654.
- [9] 穆红梅, 夏 冰, 汪 仁, 等. 以花序轴为外植体的中国石蒜的组织培养研究[C]//中国观赏园艺研究进展, 2014: 280–284.
- [10] 王 丽, 鲍晓明, 黄百渠, 等. 香雪兰外植体形态学极性决定的体细胞胚胎发生[J]. 植物学报, 1998, 40(2): 138–143.
- [11] Martin K P, Madassery J. Direct and indirect somatic embryogenesis on cotyledon explants of *Quassia amara* L., an antileukaemic drug plant[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 2005, 41(1): 54–57.
- [12] 范国强, 黎 明, 贺富青, 等. 悬铃木体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 林业科学, 2004, 40(3): 71–74.

α 干扰素融合,将多角体蛋白基因和含猪 α 干扰素融合基因分别构建到 pFastBac Dual 载体的 PH、P10 启动子下,实现多角体蛋白与猪 α 干扰素共表达,在信号肽引导下自我组装,将猪 α 干扰素包埋入多角体内,以期获得高效、稳定、广谱抗病毒活性的多角体包裹型干扰素制剂,为猪病毒性疾病的防治与治疗提供新的解决方案。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 质粒和宿主菌 多角体基因 *polyh* 和猪干扰素 *PoIFN α* 完整基因连接在 pUC57 载体上的克隆质粒,由江西省生物化工工程技术中心保存;杆状病毒转移载体 pFastBacDual,购自 Invitrogen 公司;大肠杆菌 DH5 α 、DH10BacTM,由江西省科学院微生物研究所分子生物学研究室保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶为 Fermentas 公司产品;高保真 DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 凝胶回收试剂盒、T₄ DNA 连接酶、MiniBest Bacterial Genomic DNA Extraction Kit 等,购自 TaKaRa 公司;二氨基联苯胺 (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 α 一抗为 Santa Cruz 公司的产品,异硫氰酸荧光素 (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。蛋白质标准分子质量 marker,5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal)、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.1.3 细胞和病毒 Sf9 昆虫细胞、Vero 细胞和水疱性口炎病毒 (VSV) - 绿色荧光蛋白 (GFP) (能表达 GFP 的重组水疱性口炎病毒),由浙江大学农业部动物疫病病原学与免疫控制重点开放实验室保存。

Sf9 细胞由笔者所在研究室继代保存。用 Gracés + 10% 胎牛血清 (FBS) 于 28 °C 培养;Gracés 培养基、DMEM 细胞培养基、转染试剂 Cellfectin Reagent 和优级胎牛血清,购自 Gibco 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 共表达转移载体的构建 以 GenBank 中已发表的多角体基因 *polyh* (登录号:GQ924589) 为基础,在上、下游引物中分别添加 *Bam*H I / *Not* I 位点,由上海捷瑞生物工程有限公司合成并插入 pUC57 载体形成质粒 pUC57 - *polyh*。用 *Bam*H I / *Not* I 双酶切将 *polyh* 基因从 pUC57 载体上切下来,经过胶回收纯化,构建到 pFastBacDual 载体 PH 启动子下游相应的位点,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取阳性克隆进行测序验证,获得多角体表达载体 pPH。

以 GenBank 中已发表的猪 α 干扰素 (登录号:ABB51633) 为基础,对原始序列的 GC 含量、限制性内切酶和密码子偏好性等方面进行优化,并在优化后的基因序列的 5' 端加入 *Xho* I 位点、HI 信号肽和柔性连接肽 *kozak* 序列,3' 端加入 *Kpn* I 位点,然后由上海捷瑞生物工程有限公司合成并插入 pUC57 载体形成质粒 pUC57 - *PoIFN α* 。将 *HI* - *PoIFN α* 片段用 *Xho* I / *Kpn* I 从 pUC57 上酶切下来,经过胶回收纯化,构建到 pPH 载体 P10 启动子下游相应的位点,将连接产物转

化大肠杆菌 DH5 α ,挑取阳性克隆测序验证,获得多角体基因 *polyh* 与猪 α 干扰素基因 *PoIFN α* 共表达转移载体 pPH - *PoIFN α* 。

1.2.2 表达 r*PoIFN α* 重组杆状病毒的构建与鉴定 利用 AcMNPV Bac - to - Bac 系统,根据产品说明书构建重组杆状病毒质粒 (简称 Bacmid, Invitrogen 公司):分别将共表达转移载体 pPH - *PoIFN α* 和多角体表达载体 pPH 转化 *E. coli* DH10BacTM 感受态细胞,将菌液涂于含有 X - gal (40 μ g/mL)、IPTG (24 μ g/mL)、卡那霉素 (50 μ g/mL)、庆大霉素 (100 μ g/mL) 和四环素 (30 μ g/mL) 的培养基平板上,经蓝白斑筛选,提取质粒进行鉴定。采用 Cellfectin Reagent 将 rBacmid - *polyh* - *PoIFN α* 转染对数生长期的 Sf9 昆虫细胞,细胞出现病变,提取重组杆状病毒基因组 DNA,用 M13 引物 (M13 - F: 5' - GTTTTCCAGTCACGAC - 3'; M13 - R: 5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3') 进行 PCR 扩增特异性片段,鉴定重组杆状病毒。

1.2.3 间接免疫荧光检测 r*PoIFN α* 的表达 用鉴定正确的穿梭质粒 rBacmid - *polyh* - *PoIFN α* 接种对数生长期的 Sf9 昆虫细胞,28 °C 培养 72 h,至出现形态病变时,收获细胞,用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤后,将悬液滴于载玻片上,自然干燥,用预冷的丙酮 - 乙醇 (3 : 2) 固定 5 min。以鼠抗 *PoIFN α* 抗体 (1 : 2 500) 作一抗,用 FITC 标记的羊抗鼠抗体 (1 : 250) 作二抗,用荧光显微镜观察结果。同时以 rBacmid - *polyh* 感染的细胞作对照。

1.2.4 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 和 Western Blot 检测 r*PoIFN α* 的表达 用上述 rBacmid - *polyh* - *PoIFN α* 接种对数生长期的 Sf9 昆虫细胞,用 30 mL PBS 悬浮后用超声波破碎,15 000 r/min 离心收集多角体。将 Percoll 与 PBS 按 9 : 1 的体积比混合,调节 pH 值至 7.2,12 000 r/min 离心 20 min 收集纯净的多角体。最后将纯化的多角体悬浮于含有 0.1% SDS 的 0.01 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 值 7.2) 中,室温放置 5 min,然后用 PBS 洗涤 2 次得到最终纯化的多角体。

对上述纯化的多角体进行 SDS - PAGE 电泳,电转印至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜,用含 10% 脱脂乳的 PBST 封闭过夜,以鼠抗 *pIFN - α* (1 : 500) 作为一抗,作用 2 h,用 PBST 洗涤,后用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (1 : 2 500) 作二抗,作用 1 h,用二氨基联苯胺显色试剂盒检测。

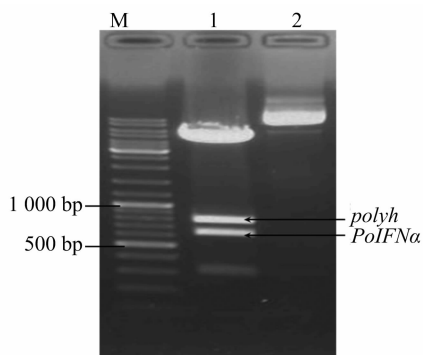
1.2.5 猪 α 干扰素的抗病毒活性测定 参照文献 [4 - 5] 的方法,在 Vero/VSV - GFP 系统上采用微量细胞病变抑制法测定多角体包裹的猪 α 干扰素的抗病毒活性。荧光倒置显微镜下观察 GFP 表达及病毒感染复制情况。以 VSV - GFP 病毒对照组细胞完全出现病变 (即荧光数量为 100%) 为标准判定干扰素抗病毒活性,将能抑制 50% 细胞病变的样品最高稀释度定义为 1 个抗病毒活性单位。

2 结果与分析

2.1 多角体与 *PoIFN α* 共表达转移载体 pPH - *PoIFN α* 的构建

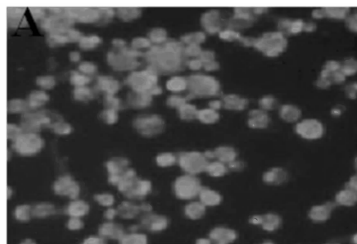
对重组质粒 pPH - *PoIFN α* 用 *Bam*H I / *Not* I、*Xho* I / *Kpn* I 进行酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳结果显示,酶切产物小片段与

预期大小相符,大片段与载体大小相符,详见如图 1。结果表明,多角体蛋白基因插入到载体 pFastBac Dual 质粒 PH 启动子下的 *Bam*H I 和 *Not* I 之间;猪 α 干扰素基因已成功插入到载体 pFastBac Dual 质粒 P10 启动子的 *Xho* I 和 *Kpn* I 之间。酶切鉴定正确后,对相应质粒进行核酸测序。



M—DNA 分子质量标准; 1—共表达转移载体 pPH-PoIFN α 酶切产物 (*Bam*H I、*Not* I、*Xho* I、*Kpn* I); 2—共表达转移载体质粒 pPH-PoIFN α

图1 重组共表达转移载体 pPH-PoIFN α 的酶切鉴定结果



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

图2 间接免疫荧光试验检测 rBacmid-polyh-PoIFN α 感染 Sf9 昆虫细胞中 rPoIFN α 的表达情况

2.3 多角体包裹型猪干扰素的形成及验证

用重组子 rBacmid-polyh-PoIFN α 转染 Sf9 细胞 48 h 后,在显微镜下观察可见细胞多呈圆形,生长状态较差,细胞质内可观察到少量具有强折光性的结晶颗粒;继续培养后,细胞出现病变,细胞内充满颗粒,细胞附着力减弱,开始脱壁上浮并且个别细胞解体成颗粒状物散落至细胞培养液中,而正常细胞中没有发现多角体颗粒。

以重组 Bacmid 感染的细胞为阴性对照,用重组 rBacmid-polyh 和重组 rBacmid-polyh-PoIFN α 感染昆虫细胞 Sf9。培养 96 h 后,收获感染的细胞。超声波破碎细胞,离心收集多角体。SDS-PAGE 检测发现,重组 rBacmid-polyh 和重组 rBacmid-polyh-PoIFN α 感染昆虫细胞 Sf9 后,有 1 条相同大小的条带,与预测的多角体蛋白分子量一致,重组 rBacmid-polyh-PoIFN α 感染昆虫细胞 Sf9 后,在 19 ku 处还出现条带(图 3-A)。

重组猪干扰素 rPoIFN α SDS-PAGE 结果显示,在 19 ku 处出现 1 条带,转膜后以鼠抗 PoIFN α 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。由图 3-B 可见,Western Blot 检测出现 1 条特异性的抗原-抗体结合带,进一步验证多角体包埋的蛋白为猪干扰素。

2.4 多角体包裹型猪干扰素抗病毒活性的检测

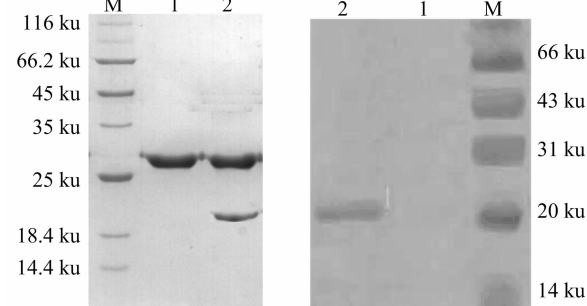
用微量细胞病变抑制法在 Vero/VSV-GFP 系统上进行猪 α 干扰素抗病毒活性测定。在倒置荧光显微镜下观察可

用 MegAlign 程序比对表明,设计在猪 α 干扰素蛋白 N 端的融合 H1 信号肽和柔性连接肽 *kozak* 序列组成 PoIFN α 基因及多角体蛋白基因序列与测序结果序列完全正确,且读码框正确,表明多角体基因 polyh 与猪 α 干扰素基因 PoIFN α 共表达转移载体 pPH-PoIFN α 构建成功。

2.2 猪 α 干扰素在昆虫细胞中的表达

用 pPH-PoIFN α 质粒转化 AcMNPV Bac-to-Bac 系统的 *E. coli* DH10BacTM 感受态细胞,得到同时表达 polyh-PoIFN α 基因的重组 rBacmid-polyh-PoIFN α 。rBacmid-polyh-PoIFN α 用 M13F、M13R 引物进行 PCR 鉴定和测序比对分析,表明猪 α 干扰素 PoIFN α 基因片段插入至正确位置。

用重组子 rBacmid-polyh-PoIFN α 转染 Sf9 细胞 48 h 后,细胞出现病变,细胞内充满颗粒,细胞附着力减弱,开始脱壁上浮并且个别细胞解体成颗粒状物散落至细胞培养液中,而正常细胞中没有发现多角体颗粒。间接免疫荧光试验结果显示,rBacmid-polyh-PoIFN α 感染 Sf9 昆虫细胞显示强荧光信号,而以 rBacmid-polyh 感染 Sf9 昆虫细胞荧光信号呈阴性(图 2),表明 rPoIFN α 在 Sf9 昆虫细胞中获得表达。



M—低分子量标准蛋白质; 1—重组 rBacmid-polyh 感染 Sf9 细胞后分离的多角体; 2—重组 rBacmid-polyh-PoIFN α 感染 Sf9 细胞后分离的多角体

图3 重组猪干扰素 rPoIFN α SDS-PAGE 和 Western Blot 检测

见,细胞对照组中的细胞仍完全良好生长,无荧光出现,病毒对照组各孔中几乎 100% 细胞出现荧光,且有细胞病变。VSV-GFP 在 Vero 细胞中的繁殖情况与绿色荧光蛋白的表达呈正相关,以荧光细胞数为病毒对照孔 50% 的最高稀释度为干扰素的效价。抗病毒活性测定结果表明,多角体包裹型猪 α 干扰素有较为明显的抗病毒活性,效价能达到 5 亿 U/mg 以上。

3 讨论

猪 PoIFN α 作为广谱抗病毒的细胞因子,具有高效、无药

物残留、无副作用^[1-2]等优点,属于新型蛋白质类兽药,对多种猪传染性病毒病具有一定的防治效果,在养猪业中应用前景广阔^[6]。用白细胞生产干扰素,效果确切,但价格昂贵。体外表达 PoIFN α 进行免疫增强作用和抗病毒作用等^[5-9] 相关研究已有报道,利用酵母表达干扰素,其表达量极低^[15]。至今,人们已用大肠杆菌^[16]、酵母^[15]、哺乳动物细胞^[17] 和昆虫杆状病毒^[4-5] 等表达系统表达过猪干扰素,从表达产物的抗病毒活性来看,真核表达产物要好于原核表达产物。

本研究利用昆虫病毒 Bac-to-Bac 表达系统,以多角体蛋白氨基端的 H1 α -螺旋序列作为多角体蛋白识别信号序列,信号序列和猪 α 干扰素融合,将多角体蛋白基因和含猪 α 干扰素融合基因分别构建到 pFastBac Dual 载体的 PH、P10 启动子下,通过与病毒骨架重组,获得重组昆虫病毒,多角体蛋白和猪 α 干扰素在昆虫细胞中共表达。预测重组蛋白 PoIFN α 分子量为 19 ku,SDS-PAGE 电泳结果显示,在此位置有明显条带。Western Blot 结果表明,表达的猪 α 干扰素 rPoIFN α 具有免疫学活性。

Mori 等利用改良的杆状病毒表达载体,在培养的昆虫细胞内进行 BmCPV 多角体蛋白基因的体外表达,结果表明,BmCPV 的多角体蛋白可以进行自我包装,在没有其他病毒因子的存在下能够组装成多角体晶体结构^[14]。研究还发现,多角体不仅可以对异源病毒粒子进行包装,还可以对一些异源蛋白进行包埋^[18]。Ijiri 等将蛋白激酶 C 包裹进质型多角体中,并发现包裹型的蛋白激酶 C 相对于没有经过包裹的蛋白有更强生物学活性和持续的药物缓释效果^[19]。

本研究成功构建了共表达多角体蛋白基因和猪 α 干扰素基因的重组杆状病毒。为了实现猪 α 干扰素被多角体蛋白包埋,形成多角体包裹的猪 α 干扰素。笔者在构建杆状病毒转移载体时引入以多角体蛋白氨基端的 H1 α -螺旋序列作为多角体蛋白识别信号序列,将要表达的猪 α 干扰素基因连接在 H1 α -螺旋序列 3'端。PH 启动子和 P10 启动子均是杆状病毒的极晚期启动子,具有极强的表达效率,并且相互之间无干扰性^[20],本研究将多角体蛋白基因和含猪 α 干扰素融合基因分别构建到 pFastBac Dual 载体的 PH 启动子和 P10 启动子下,实现多角体蛋白与猪 α 干扰素共表达,在信号肽引导自我组装下将猪 α 干扰素包埋进多角体蛋白内,使被多角体包裹的猪 α 干扰素保持稳定的抗病毒活性。

用微量细胞病变抑制法在 Vero/VSV-GFP 系统上进行猪干扰素抗病毒活性测定,用 VSV-GFP 代替野生型 VSV 具有快速简单、灵敏度高的特点^[21]。抗病毒活性测定结果表明,多角体包裹猪干扰素 α 有较为明显的抗病毒活性,为进一步进行动物试验提供了物质基础。多角体包裹猪干扰素 α 结合了猪干扰素 α 在抗病毒方面的优点及多角体具有的耐酸、抗高温、持久缓释等特性的优势,这些特性很可能使表达产物在猪病毒性疾病的临床治疗和预防中发挥更优越的效果。

参考文献:

- [1] Gresser I. The antitumor effects of interferon: a personal history[J]. Biochimie, 2007, 89(6/7): 723-728.
- [2] Marcus P I. Celebrating the 50th anniversary of the discovery of interferon[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2007, 27(2): 87-89.
- [3] 郑 鸣,边传周,王老七,等. 猪干扰素 α 、 β 和 γ 的融合表达及活性[J]. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1840-1847.
- [4] 钟鲁龙,易咏竹,丁 农,等. 猪 α 干扰素在家蚕中表达及其抗病毒活性测定[J]. 生物技术进展, 2013(4): 252-256.
- [5] 王彦彬,崔保安,陈红英,等. 猪干扰素 α 在昆虫细胞中分泌表达及其抗病毒活性检测[J]. 中国农业科学, 2009, 42(4): 1435-1441.
- [6] 魏浩激. 重组猪干扰素 α 抗猪传染性胃肠炎病毒的研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2014.
- [7] 闫若潜,赵雪丽,赵明军,等. 猪 α 干扰素的原核表达及抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒活性测定[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(7): 570-574.
- [8] Chinsangaram J, Moraes M P, Koster M, et al. Novel viral disease control strategy: adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease[J]. Journal of Virology, 2003, 77(2): 1621-1625.
- [9] Jordan L T, Derbyshire J B. Antiviral action of interferon - alpha against porcine transmissible gastroenteritis virus [J]. Veterinary Microbiology, 1995, 45(1): 59-70.
- [10] 相兴伟. 家蚕 BmNPV ODV-E56/BmP95 的生物学功能及多角体包埋外源蛋白的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [11] 张铁岭. BmCPV 与 BmNPV 多角体对异源蛋白的包埋特性研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2011.
- [12] 刘璐璐. 杆状病毒蛋白激酶调控多角体组装及病毒感染的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [13] Ikeda K, Nakazawa H, Shimo-Oka A, et al. Immobilization of diverse foreign proteins in viral polyhedra and potential application for protein microarrays[J]. Proteomics, 2006, 6(1): 54-66.
- [14] Mori H, Shukunami C, Furuyama A, et al. The immobilization of bioactive FGF-2 into cubic proteinous micro-crystals (*Bombyx mori* cypovirus polyhedra) that are insoluble in a physiological cellular environment[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282: 17289-17296.
- [15] 刘 健,陈瑞爱,刘珊珊,等. 猪 α 干扰素基因经密码子改造在毕赤酵母菌中的高效分泌表达[J]. 华南农业大学学报, 2011, 32(1): 93-97.
- [16] 刘 娜,李春秋,高 晶,等. 猪干扰素 α -1 基因的原核表达与多克隆抗体制备[J]. 畜牧与饲料科学, 2014, 35(12): 1-4.
- [17] 杜以军,姜 平,李玉峰,等. 猪 α 干扰素重组腺病毒的构建及其抗口蹄疫病毒活性研究[J]. 中国病毒学, 2006, 21(4): 390-393.
- [18] 郭建军,袁 林,曾 静,等. 多角体包埋异源蛋白的杆状病毒表达系统构建[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(2): 184-187.
- [19] Ijiri H, Nakatani T, Ido H, et al. Immobilization of protein kinase C into cypovirus polyhedra [J]. Journal of Insect Biotechnology & Sericulture, 2010, 79(1): 15-20.
- [20] 田飞鹏. 杆状病毒介导 O 型口蹄疫病毒 P12A 和 3C 基因在 Sf9 细胞和 BHK 细胞中的共表达[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [21] Matsumoto G, Hirohata R, Hayashi K, et al. Control of angiogenesis by VEGF and endostatin - encapsulated protein microcrystals and inhibition of tumor angiogenesis [J]. Biomaterials, 2014, 35(4): 1326-1333.