

## 猪 $\gamma$ 干扰素的表达及其抗病毒活性的安全检测

贺番<sup>1,2</sup>, 孙元<sup>1</sup>, 葛金英<sup>1</sup>, 李淼<sup>1</sup>, 常天明<sup>1</sup>, 步志高<sup>1</sup>, 仇华吉<sup>1</sup>

1 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

2 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018

**摘要:** 为了提高干扰素抗病毒活性测定的生物安全性, 本研究使用含有 GFP 的复制缺陷型水疱性口炎病毒 (VSV $\Delta$ G\*G) 为指示病毒, 分别对经原核表达系统和杆状病毒表达系统表达的重组猪  $\gamma$  干扰素 (PoIFN- $\gamma$ ) 在 MDBK 细胞上进行抗病毒活性测定。结果显示: 由杆状病毒表达的重组 PoIFN- $\gamma$  具有高度抗病毒活性, 其抗病毒活性为  $10^5$  IU/mL, 原核表达的重组 PoIFN- $\gamma$  纯化后经缓慢复性也会产生一定的抗病毒活性, 其抗病毒活性为 32 IU/mL。该方法与利用表达 GFP 的重组水疱性口炎病毒 (VSV\*GFP) 所检测的干扰素抗病毒活性结果完全一致, 表明复制缺陷型病毒 VSV $\Delta$ G\*G 可作为复制型重组病毒的替代品, 使得干扰素抗病毒活性检测更加安全、准确。

**关键词:** 猪  $\gamma$  干扰素, 杆状病毒, 抗病毒活性检测

## Expression of porcine interferon- $\gamma$ and its safe antiviral assay

Fan He<sup>1,2</sup>, Yuan Sun<sup>1</sup>, Jinying Ge<sup>1</sup>, Miao Li<sup>1</sup>, Tianming Chang<sup>1</sup>, Zhigao Bu<sup>1</sup>, and Huaji Qiu<sup>1</sup>

1 State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

2 College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

**Abstract:** In order to ensure the biosafety of the IFN- $\gamma$  antiviral activity assay, we used a replication-deficient VSV carrying GFP as an interferon sensitive indicator virus (VSV $\Delta$ G\*G). The antiviral activities of porcine IFN- $\gamma$  expressed in *Escherichia coli* and in baculovirus on MDBK cells were assessed. The results showed that the antiviral activity of porcine IFN- $\gamma$  expressed in baculovirus could reach  $10^5$  IU/mL, while the porcine IFN- $\gamma$  expressed in *E. coli* showed some antiviral activity (32 IU/mL) after refolding. The results of the VSV $\Delta$ G\*G-based antiviral assay were almost identical to that of the VSV\*GFP-based assay, suggesting it is highly feasible to use VSV $\Delta$ G\*G as a substitute for VSV\*GFP, making assays for IFN- $\gamma$  antiviral activity safer and more accurate.

**Keywords:** porcine interferon- $\gamma$ , baculovirus, antiviral activity

干扰素 (Interferon, IFN) 是在特定的诱生剂作用下, 由细胞产生的一种具有高度生物活性的糖蛋白, 在同种动物细胞上具有广谱抗病毒活性。1957年, Isaacs 等首先发现病毒感染的细胞能产生一种因

子, 作用于其他细胞能干扰病毒的复制, 因而命名为干扰素<sup>[1]</sup>。目前已知干扰素并不能直接杀伤病毒, 而是诱导宿主细胞产生数种酶, 干扰病毒的基因转录或病毒蛋白组分的翻译。根据产生干扰素细胞的

Received: November 20, 2009; Accepted: January 28, 2010

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2005CB523202).

Corresponding author: Huaji Qiu. Tel: +86-451-85935041; E-mail: huajiqiu@hvri.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2005CB523202) 资助。

来源不同、理化性质和生物学活性的差异,可分为 I 型和 II 型 IFN, I 型 IFN 主要包括 IFN- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\omega$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 、 $\epsilon$ 、 $\xi$  和  $\tau$  等, II 型 IFN 只有 IFN- $\gamma$  一种<sup>[2]</sup>。IFN- $\gamma$  主要由机体内活化的 T 淋巴细胞和 NK 细胞产生<sup>[3]</sup>。当抗原、PHA 或 ConA 刺激后 T 细胞分泌产生 IFN- $\gamma$ , 通常与 IL-2 的产生相一致。IFN- $\gamma$  对酸敏感, 具有抑制病毒复制调节作用, 但其抗病毒作用比 I 型干扰素弱<sup>[4]</sup>, 主要参与诱导主要组织相容性抗原 (MHC) 的表达和免疫调节效应, 也称为免疫干扰素。

猪  $\gamma$  干扰素 (PoIFN- $\gamma$ ) 的编码基因为 501 bp, 编码 166 个氨基酸, 前 23 个氨基酸为信号肽, 后 143 个氨基酸为成熟活性蛋白, 天然活性状态为同源二聚体的糖蛋白, 单体没有生物学活性<sup>[5]</sup>。由于 IFN- $\gamma$  具有独特的免疫调节功能和抗肿瘤作用, 是机体细胞免疫评价的重要指标之一, 故其在疾病的诊断、治疗和预防等方面具有广阔的应用前景。1981 年, Godkin 等首先将 IFN- $\gamma$  基因克隆成功<sup>[6]</sup>。1990 年, Dijikmans 等克隆了含内含子的 PoIFN- $\gamma$  基因<sup>[7]</sup>。随后, Vandenbroeck 等分段克隆了 PoIFN- $\gamma$  基因的外显子并将其拼接为完整基因后在大肠杆菌<sup>[8]</sup>和昆虫细胞<sup>[9]</sup>中进行了表达。1999 年 Cencic 等在兔肾细胞中表达了 PoIFN- $\gamma$ <sup>[10]</sup>。国内研究者也先后利用不同表达系统表达了 PoIFN- $\gamma$ , 但抗病毒活性较低或不具有活性<sup>[11-14]</sup>。

干扰素生物学活性定量分析的研究从干扰素被发现以来就一直没有间断过。抗病毒分析方法 (Antiviral assay, AVA) 是第一个建立起来的检测 IFN 样品相对活性或效能的生物学方法<sup>[15]</sup>。现有的干扰素生物学活性鉴定与定量分析方法普遍存在费时、繁琐、不够精确、特异性差等一系列缺陷, 亟待改进。近年来我国有研究者利用表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的重组水疱性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus) (VSV\*GFP)<sup>[16]</sup>以及 MDBK-Mxp-luc 细胞系来检测牛  $\beta$  干扰素的抗病毒活性<sup>[17]</sup>, 使检测过程更加便捷、准确。

将外源提供的病毒囊膜蛋白包装在缺失编码相同蛋白基因病毒的核酸上所形成的病毒, 称为复制缺陷型病毒。复制缺陷型病毒具有安全性好、易于检测、宿主范围广泛等优点, 虽然其缺少复制能力,

但是在研究病毒进入过程、受体鉴定、中和抗体检测、疫苗评价等方面具有重要作用。本研究利用表达 GFP 的复制缺陷型 VSV (VSV $\Delta$ G\*G)<sup>[18]</sup>代替复制型重组病毒 VSV\*GFP, 通过对大肠杆菌和重组杆状病毒表达的 PoIFN- $\gamma$  在 MDBK 细胞上进行抗病毒生物学活性测定, 建立了一种干扰素生物学活性定量分析方法, 该方法与利用重组 VSV\*GFP 病毒的抗病毒活性检测方法所测定结果完全符合, 且比后者更为安全、准确。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

PoIFN- $\gamma$  编码基因由上海英骏生物有限公司合成 (含 6 个 His 标签的编码序列, 以便于蛋白的纯化)。原核表达质粒 pET-30a(+), 杆状病毒转移载体 pFastBacHT B 及感受态 DH10Bac<sup>TM</sup> 受体菌及转染试剂 (Cellfectin reagent) 购于美国 Invitrogen 公司。质粒 pVSV-G、Sf9 细胞、MDBK 细胞均由本实验室保存。PoIFN- $\gamma$  单抗购自 SANTA 公司, 荧光素 (FITC) 标记的羊抗鼠荧光二抗、抗 His 标签单抗、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司。VSV\*GFP 及 VSV $\Delta$ G\*G 参见文献报道<sup>[16,18]</sup>。

### 1.2 原核表达重组 PoIFN- $\gamma$ 蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化和鉴定

#### 1.2.1 重组蛋白的表达

将合成的 PoIFN- $\gamma$  基因经 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制酶双酶切后克隆于原核表达质粒 pET-30a(+) 的相应位点, PoIFN- $\gamma$  基因阅读框架与 His 标签融合。鉴定正确后转化 BL21, 用 IPTG 诱导, 进行 SDS-PAGE 分析。

#### 1.2.2 原核表达重组蛋白的鉴定

参照文献<sup>[19]</sup>方法进行 Western blotting 鉴定。一抗为 PoIFN- $\gamma$  单抗和抗 His 标签单抗 (用 PBS 溶液分别做 1:100 和 1:3000 稀释), 二抗为红外荧光抗鼠二抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG (1:4000 稀释), 利用红外荧光扫描仪检测结果和用 DAB 显色。

#### 1.2.3 重组蛋白的纯化

根据 His-Bind 纯化试剂盒说明书, 利用 Ni<sup>2+</sup> 树脂柱对大肠杆菌表达的重组 PoIFN- $\gamma$  (His-PoIFN- $\gamma$ ) 进

行纯化。

### 1.3 PoIFN- $\gamma$ 基因在昆虫杆状病毒系统中的表达及鉴定

#### 1.3.1 重组杆粒的获得

将合成的 PoIFN- $\gamma$  基因经 *Bam*H I 和 *Aat* II 限制性酶切后克隆于杆状病毒转移载体 pFastBacHT B 的相应位点, 获得重组转移载体 pFB-PoIFN- $\gamma$ 。转化大肠杆菌 DH10Bac<sup>TM</sup> 感受态细胞得到重组杆粒 rBacmidPoIFN- $\gamma$ , 利用 M13 通用引物对其进行 PCR 鉴定。

#### 1.3.2 重组病毒的获得

参照 Cellfectin reagent 试剂盒说明书, 将鉴定为阳性的 rBacmidPoIFN- $\gamma$  转染 Sf9 细胞, 获得的重组杆状病毒 rBacPoIFN- $\gamma$  上清, 提取基因组后利用 M13 通用引物对其进行 PCR 鉴定。扩大培养 rBacPoIFN- $\gamma$ , 将细胞超声波破碎进行 Western blotting 检测。

#### 1.3.3 杆状病毒表达蛋白的鉴定

参照文献 [19] 方法进行间接免疫荧光试验 (IFA) 与 Western blotting 鉴定。一抗为抗 PoIFN- $\gamma$  单抗, 间接免疫荧光试验二抗为 FITC 标记羊抗猪 IgG, Western blotting 二抗为红外荧光抗鼠二抗, 利用红外荧光扫描仪检测结果。

### 1.4 重组 PoIFN- $\gamma$ 抗病毒活性测定与比较

按文献报道的方法<sup>[20]</sup>, 用 VSV\*GFP/MDBK 细胞系统测定重组 PoIFN- $\gamma$  抗病毒活性, 以  $2 \times 10^4$  细胞/孔的密度将 MDBK 细胞铺于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 加入  $10^1 \sim 10^8$  不同稀释度的 rBacPoIFN- $\gamma$  感染 Sf9 细胞上清 (含有重组 PoIFN- $\gamma$ ) 以及倍比稀释后的经纯化、缓慢复性的原核表达的 His-PoIFN- $\gamma$ ,  $37^\circ\text{C}$  作用过夜, 同时设不加重重组蛋白的孔为对照。100 PFU/孔 VSV\*GFP 感染细胞, 1 h 后换完全培养液, 24 h 后荧光显微镜观察结果, 以荧光亮度为对照孔 50% 的最高稀释度为抗病毒活性单位 (IU)。

### 1.5 VSV $\Delta$ G\*G 的制备及毒价测定

采取脂质体转染法用 4  $\mu\text{g}$  表达 VSV G 蛋白的质粒 pVSV-G 转染 BHK21 细胞, 转染后 6 h 更换培养基。20 h 后用复制缺陷型水疱性口炎病毒 (VSV $\Delta$ G\*G) 进行转导, 24 h 后收集细胞上清, 3000 r/min 离心 10 min 以清除细胞碎片, 测定毒价。

### 1.6 利用 VSV $\Delta$ G\*G 检测重组 PoIFN- $\gamma$ 抗病毒活性

按照文献报道的方法<sup>[20]</sup>, 将 MDBK 细胞铺于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 加入  $10^1 \sim 10^8$  不同稀释度的重组 PoIFN- $\gamma$  (rBacPoIFN- $\gamma$  感染 Sf9 细胞上清), 以及倍比稀释后的经纯化、缓慢复性的 His-PoIFN- $\gamma$ ,  $37^\circ\text{C}$  作用过夜。100 PFU/孔 VSV $\Delta$ G\*G 感染细胞, 1 h 后换完全培养液, 24 h 后荧光显微镜观察结果, 以荧光亮度为对照孔 50% 的最高稀释度为抗病毒活性单位 (IU)。

### 1.7 相对荧光强度测定

按照 1.6 中的方法分别利用 VSV\*GFP 和 VSV $\Delta$ G\*G 对不同稀释度的重组 PoIFN- $\gamma$  进行抗病毒活性检测。用以上两种病毒转导 MDBK 细胞 24 h 后, 用裂解液将细胞处理 30 min, 取 200  $\mu\text{L}$  置于 96 孔读数板中, 在 FLX800-Microplate Fluorescence Reader (Bio-TEK 公司产品) 上测定每孔中的相对荧光强度。

## 2 结果

### 2.1 PoIFN- $\gamma$ 基因在大肠杆菌中的表达

用抗 His 标签单抗进行 Western blotting, 结果表明原核表达的 His-PoIFN- $\gamma$  蛋白大小为 25 kDa, 与预期结果相符。同时设含有 His 标签的无关蛋白为阳性对照, pET-30a(+) 空载体转化菌为阴性对照。利用 PoIFN- $\gamma$  单抗的 Western blotting 结果进一步证实目的蛋白获得表达 (图 1、2)。

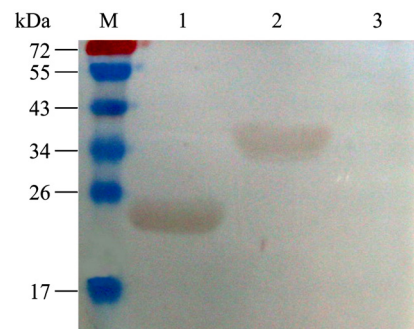


图 1 用抗 His 标签单抗对 His-PoIFN- $\gamma$  蛋白进行 Western blotting 分析

Fig. 1 Western blotting analysis of His-PoIFN- $\gamma$  protein with anti-His-tag McAb. M: PageRuler<sup>TM</sup> prestained protein ladder; 1: purified His-PoIFN- $\gamma$  protein; 2: irrelevant E2 protein with His-tag served as the positive control; 3: pET-30a vector-transformed *E. coli* cells served as the negative control.

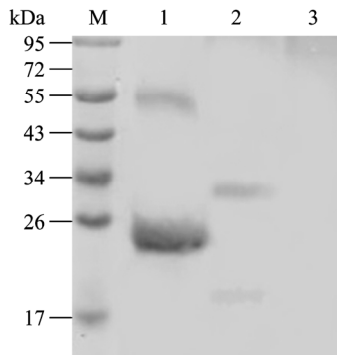


图 2 用抗 PoIFN- $\gamma$  单抗对重组 PoIFN- $\gamma$  进行 Western blotting 分析

Fig. 2 Western blotting analysis of recombinant PoIFN- $\gamma$  with anti PoIFN- $\gamma$  McAb. M: PageRuler™ prestained protein ladder; 1: His-PoIFN- $\gamma$  protein after purification served as the positive control; 2: Baculovirus-expressed recombinant PoIFN- $\gamma$  protein; 3: Baculovirus-expressed recombinant E2 protein of CSFV as the negative control.

## 2.2 PoIFN- $\gamma$ 基因在昆虫细胞中的表达

将重组杆状病毒 rBacPoIFN- $\gamma$  接种 Sf9 细胞, 72 h 内细胞病变完全, 收集细胞进行破碎, 12 000 r/min 离心 10 min 以去除细胞碎片, 进行 Western blotting 检测。

结果表明, 原核表达的 His-PoIFN- $\gamma$  经正确的纯化、缓慢复性后可恢复有活性的二聚体形式 (图 2), 之后的抗病毒活性检测也进一步证实了该结论。杆状病毒表达的重组 PoIFN- $\gamma$  主要以二聚体形式存在, 大小为 34 kDa 与预期结果相符 (图 2), 超声裂解可少量破坏其二聚体形式。

## 2.3 IFA 检测 PoIFN- $\gamma$ 在昆虫细胞中的表达

分别以 rBacPoIFN- $\gamma$  感染 Sf9 细胞, 至细胞病变达 90% 时将细胞固定, 用 1:100 稀释的抗 PoIFN- $\gamma$  单抗进行 IFA 检测, 同时以 1:100 稀释的抗猪瘟 E2 蛋白的单抗为阴性对照。结果显示, 抗 PoIFN- $\gamma$  单抗检测 rBacPoIFN- $\gamma$  感染 Sf9 细胞显示阳性荧光信号 (图 3A), 而抗猪瘟 E2 蛋白的单抗则荧光信号为阴性 (图 3B), 表明 PoIFN- $\gamma$  在昆虫细胞中获得表达。

## 2.4 重组 PoIFN- $\gamma$ 的抗病毒活性

利用 VSV\*GFP/MDBK 系统测定重组 PoIFN- $\gamma$  抗病毒活性, 以不同浓度杆状病毒表达重组 PoIFN- $\gamma$  上清以及原核表达纯化后 PoIFN- $\gamma$  作用 MDBK 细

胞, 37°C 过夜, 感染 VSV\*GFP, 24 h 后观察结果。结果显示, 未加重重组 PoIFN- $\gamma$  空白对照, 细胞出现细胞病变, 10<sup>3</sup> 倍稀释可以完全抑制 VSV\*GFP 的复制, 细胞无明显细胞病变, 且无荧光出现, 10<sup>4</sup> 和 10<sup>5</sup> 倍稀释部分抑制 VSV\*GFP 的复制, 10<sup>6</sup> 倍稀释几乎不能抑制 VSV\*GFP 的复制, 10<sup>5</sup> 倍稀释组的荧光亮度约为空白对照组的一半, 测得其抗病毒活性为 10<sup>5</sup> IU/mL (图 4A); 用相同浓度杆状病毒表达的猪瘟病毒 E2 蛋白上清作用 MDBK 细胞的对照组细胞也出现典型的细胞病变同时可观察到大量荧光 (图 4B); 只用重组 PoIFN- $\gamma$  处理的 MDBK 细胞状态良好, 无细胞病变, 与正常 MDBK 细胞无差异 (图 5A)。而原核表达的 HisPoIFN- $\gamma$  在稀释 32 倍后则完全失去抗病毒活性, 表明 PoIFN- $\gamma$  的空间结构对其生物学活性会产生很大影响。

## 2.5 利用复制缺陷型病毒检测重组 PoIFN- $\gamma$ 抗病毒活性

利用复制缺陷型病毒 VSV $\Delta$ G\*G/MDBK 系统重新对重组 PoIFN- $\gamma$  抗病毒活性进行测定, 期望找到一种更加安全、准确的检测方法。结果表明, 利用复制缺陷型病毒测定重组 PoIFN- $\gamma$  的抗病毒活性与利用重组病毒 VSV\*GFP 所测定的结果完全一致 (图 6)。复制缺陷型病毒作为复制型重组病毒的替代品也会引起细胞病变 (图 5B)。

## 2.6 两种病毒检测 PoIFN- $\gamma$ 抗病毒活性的比较

通过检测相对荧光强度比较不同稀释度重组 PoIFN- $\gamma$  在 VSV\*GFP/MDBK 和 VSV $\Delta$ G\*G/MDBK 系统的抗病毒活性, 结果表明, 两种系统的测定结果尽管存在差异, 但总体趋势一致 (图 7), 说明复制缺陷型病毒能够作为复制型重组病毒的替代品用于抗病毒活性检测。

## 3 讨论

干扰素一直是病毒学、细胞学、分子生物学、临床医学、免疫学、肿瘤学等相关领域的研究热点。干扰素与特异性抗体不同, 其主要发挥的是抗病毒感染效力。对干扰素进行 AVA 检测时需要用干扰素

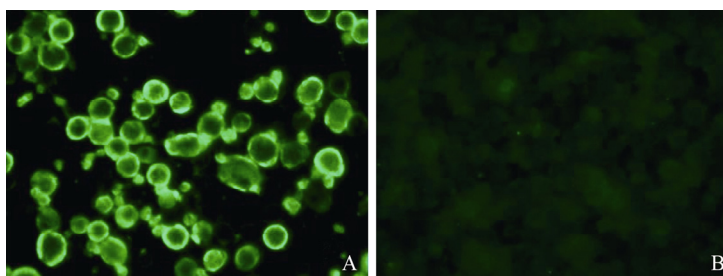


图 3 用 IFA 检测重组杆状病毒感染 Sf9 细胞中的 PoIFN- $\gamma$  表达情况

Fig. 3 Detection of the PoIFN- $\gamma$  expression in Sf9 cells infected with the recombinant baculovirus rBacPoIFN- $\gamma$ . (A) Sf9 cells infected with rBacPoIFN- $\gamma$  expressing PoIFN- $\gamma$ . (B) Sf9 cells infected with the recombinant baculovirus expressing E2 protein served as the negative control.

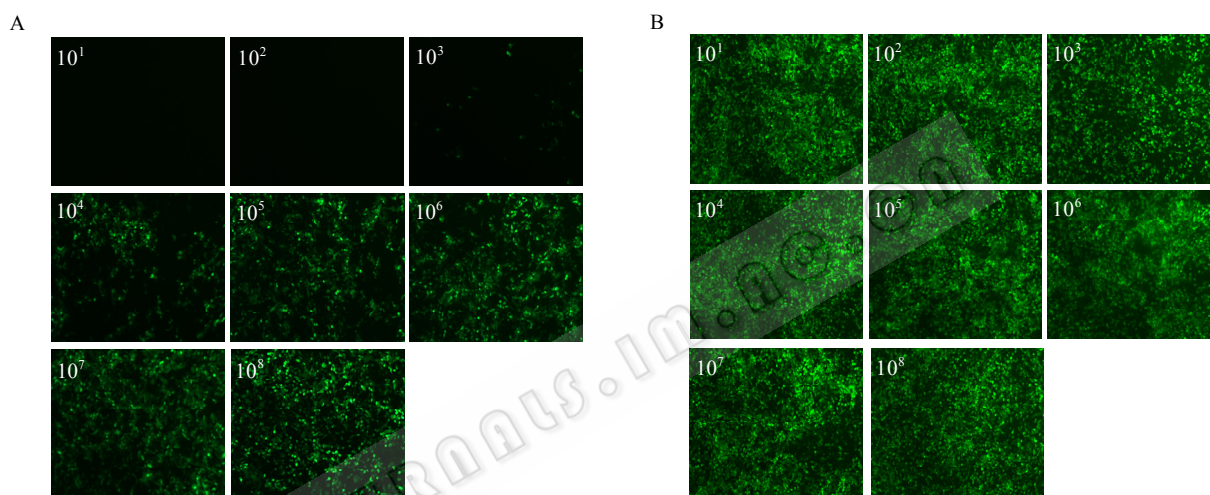


图 4 不同浓度重组杆状病毒表达的重组 PoIFN- $\gamma$  抑制 VSV\*GFP 在 MDBK 细胞上复制

Fig. 4 Inhibition of the replication of VSV\*GFP in MDBK cells with differently diluted recombinant PoIFN- $\gamma$  expressed from recombinant baculovirus. (A) Baculovirus-expressed recombinant PoIFN- $\gamma$  at different dilutions. (B) Baculovirus-expressed recombinant E2 protein of CSFV at different dilutions.

提前 24 h 处理细胞, 诱导细胞产生数种酶, 以抵抗病毒的感染, 进一步干扰病毒的基因转录或病毒蛋白组分的翻译, 从而达到抑制病毒复制的作用。如果说中和试验是利用中和抗体将病毒中和, 从量上减少病毒的感染能力; 干扰素就是从质上对细胞产生作用, 使其抗感染能力增强。

IFN- $\gamma$  单体没有生物学活性, 其天然活性形式为两条单体链结合形成的同型二聚体形式, 它能诱导巨噬细胞产生细胞因子, 具有免疫调节功能, 是机体细胞免疫的重要检测指标之一, 在疾病的诊断、治疗和预防等方面具有广阔的应用前景。IFN- $\gamma$  基因在正常情况下处于抑制状态, 只有在某些刺激因子的刺激下才能表达, 同时 IFN- $\gamma$  产量低、纯化困难、

成本比较高, 难以大量制备, 随着基因工程技术的迅速发展, 可以利用该技术大量制备 IFN- $\gamma$ 。目前广泛采用的原核表达系统虽然可以将 IFN- $\gamma$  蛋白大量表达, 但是纯化、复性工艺复杂, 而且表达产物在结构、生物学活性与真正天然干扰素相比存在明显差距。昆虫杆状病毒表达系统具有与高等真核细胞类似的蛋白质修饰、加工和转运体系, 经常用来表达具有特定结构功能的蛋白。由杆状病毒表达的重组蛋白在抗原性、免疫原性和功能上均与天然蛋白相似。因此, 杆状病毒载体表达系统是研究蛋白的结构和功能的一个有力工具。本研究同时利用原核表达系统和杆状病毒表达系统分别表达 PoIFN- $\gamma$  并进行抗病毒活性分析, 结果表明: 与原核表达系统

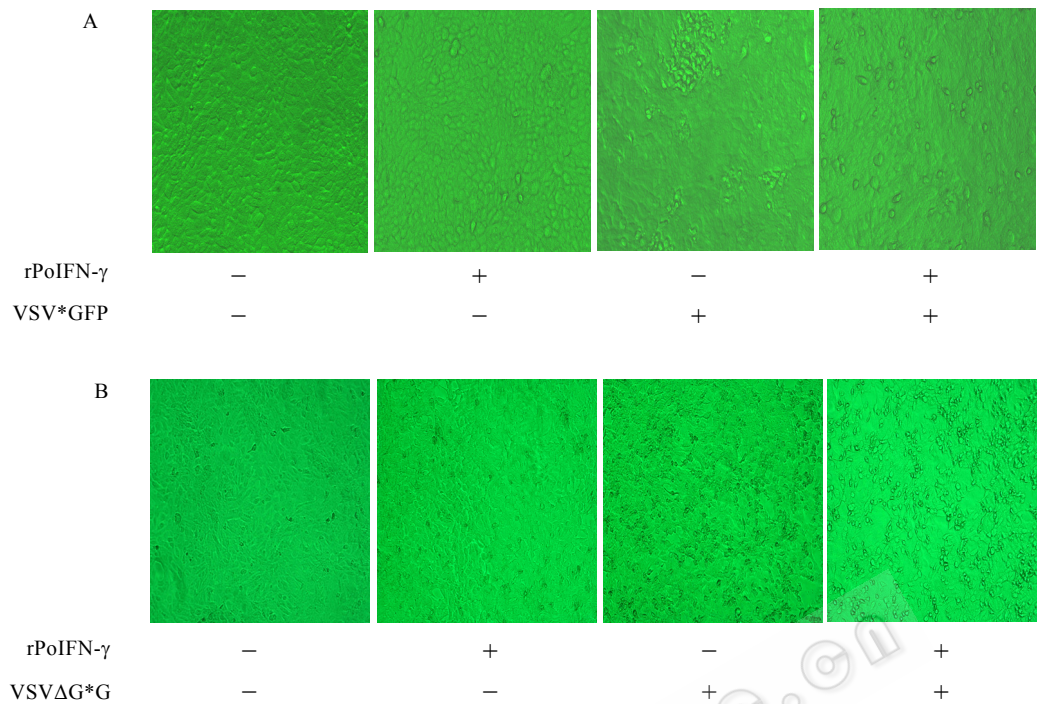


图 5 VSV\*GFP (A) 或 VSVΔG\*G (B) 感染 MDBK 细胞产生的细胞病变  
 Fig. 5 Cytopathic effects (CPE) produced in MDBK cells infected with VSV\*GFP (A) or VSVΔG\*G (B).

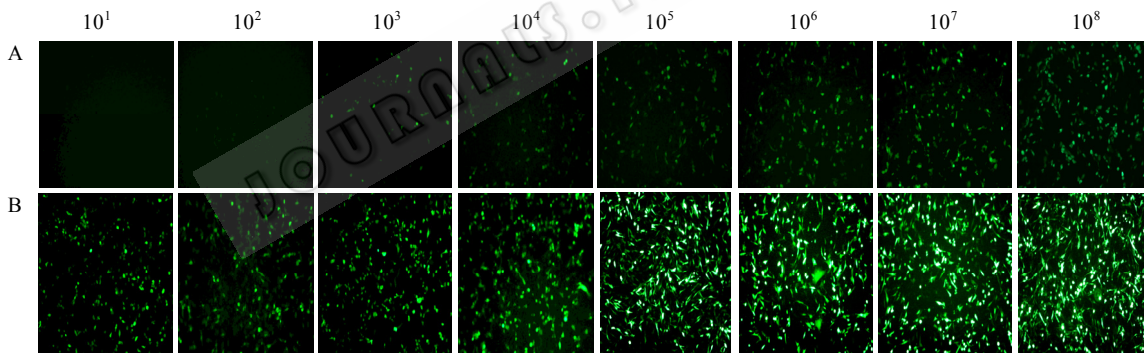


图 6 重组杆状病毒表达的不同浓度 PoIFN-γ 对 VSVΔG\*G 感染 MDBK 细胞的抑制作用  
 Fig. 6 Inhibition of infection of VSVΔG\*G in MDBK cells with differently diluted PoIFN-γ expressed from recombinant baculovirus. (A) Baculovirus-expressed recombinant PoIFN-γ protein of different dilutions. (B) Baculovirus-expressed recombinant E2 protein of CSFV of different dilutions.

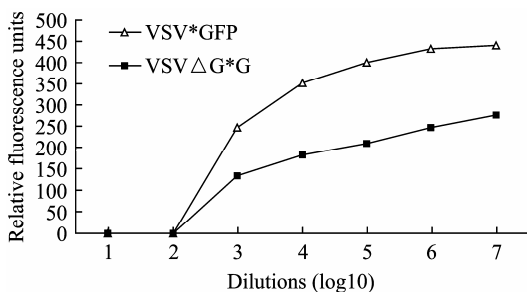


图 7 利用两种病毒检测重组 PoIFN-γ 抗病毒活性的比较  
 Fig. 7 Comparison of recombinant PoIFN-γ antiviral activity using the two virus systems.

相比，杆状病毒表达系统可以对外源蛋白进行多种翻译后加工和修饰，表达的重组蛋白更接近天然结构。抗病毒活性检测表明经杆状病毒表达的 PoIFN-γ 的抗病毒活性可达 10<sup>5</sup> IU/mL，而原核表达 PoIFN-γ 经纯化后缓慢复性也会产生少量的二聚体，产生较低的抗病毒活性。本研究获得的重组 PoIFN-γ 为后续单克隆抗体的制备以及最终建立评价机体细胞免疫水平的检测 PoIFN-γ 酶联免疫斑点法 (Enzyme linked immunospot assay, ELISPOT) 提

供技术支持。

在众多干扰素生物学活性的研究方法中,AVA 是最常用的检测方法<sup>[15]</sup>,而且适用各种类型的干扰素,成本较低,一般实验室都具备进行抗病毒分析的条件,现在仍被广泛使用。AVA 检测包含两方面的内容:抵抗病毒感染和抑制病毒复制。其中,抵抗病毒的感染是检测的基础,只有先抵抗病毒的侵染才能进一步抑制病毒的复制。AVA 检测的判定时间对检测结果十分重要,检测一般都是在用病毒感染细胞 20 h 之后进行观测,这时主要测定的是干扰素对病毒的抗感染能力。若是以测定干扰素抑制病毒的复制能力为主,在加入病毒后不同的时间会出现不同的结果,对检测结果的准确性会有很大的影响。本研究采用复制缺陷型病毒作为指示病毒则解决了这一问题。AVA 常用的指示病毒为 VSV、脑炎心肌炎病毒 (Encephalomyocarditis virus, EMCV)、塞姆利基森林病毒 (Semliki forest virus, SFV)、辛德比斯病毒 (Sindbis virus)、门戈病毒 (Mengovirus)<sup>[12]</sup>等。其中 VSV 是最常用的病毒之一,它对干扰素很敏感,复制很快,在多种细胞株上都能够生长至很高滴度<sup>[21]</sup>。AVA 常用的细胞系有 MDBK、A549、WISH、HeLa、Hep2、FS4、FL、2D9 和 L929 等。AVA 判定方法有病毒复制抑制试验 (Virus yield-reduction assay, VYRA)<sup>[22-24]</sup>、蚀斑抑制试验 (Plaque reduction assay, PRA)<sup>[25]</sup>、病毒蛋白表达或 RNA 合成抑制试验等,但最常用的细胞病变抑制试验 (Cytopathic effect reduction assay, CPERA)。VYRA 需要滴定每个孔病毒的滴度,非常费时费力。而 CPERA 则相对简单,节省时间,使用也较为广泛。CPERA 常采用半数 CPE 抑制作为 IFN 活性判断的终点,CPE 可肉眼观察,但主观性太强以至于准确性较差,因此,大部分 IFN 定量工作者均采用细胞染色 (结晶紫、MTT、MTS 或茶酚蓝黑等) 的方法,增加判断的准确性<sup>[15,25]</sup>。目前市场上有许多商品化的人和鼠干扰素的单克隆抗体,因此可以直接用 ELISA 检测干扰素的相对含量<sup>[26]</sup>。这不需要准备细胞,干扰素样品可以直接检测,操作方便。但其缺

点是检测的是干扰素的抗原性,有抗原性而无活性的干扰素分子会影响干扰素活性的判断<sup>[27]</sup>。

反向遗传技术使得构建带有报告基因的 VSV 成为现实。在 VSV 中插入 GFP 获得重组病毒 VSV\*GFP,可以在病毒增殖时通过荧光显微镜观察 GFP 蛋白的表达而判断病毒的增殖情况,可以很容易地进行蚀斑计数,并可以使用荧光酶标仪对 GFP 的表达进行定量<sup>[16]</sup>。2007 年,陈伟业使用表达 GFP 的重组 VSV (VSV\*GFP) 在 MDBK 细胞上进行了干扰素抗病毒活性滴定<sup>[17]</sup>。此方法在 96 孔细胞培养板上操作,通过 GFP 检测定量半数病毒复制抑制来替代通过细胞染色定量半数 CPE 抑制,利用仪器检测 GFP 的相对荧光值 (RFU) 来定量 GFP 蛋白的相对含量。这与细胞染色方法定量半数 CPE 相比,步骤得到极大简化。

VSV 是人畜共患病原,涉及到 VSV 的所有操作,包括具有增殖能力的重组病毒,应有高等级的生物安全设施,因此测定干扰素活性所用病毒的安全性及实验结束后对环境及试剂与耗材的无害化处理问题越来越引起人们的疑虑。本研究利用表达 GFP 的复制缺陷型 VSV (VSV $\Delta$ G\*G) 来代替表达 GFP 的复制型重组 VSV\*GFP,分别对原核及杆状病毒表达的 PoIFN- $\gamma$  在 MDBK 细胞上进行了抗病毒生物活性测定。VSV $\Delta$ G\*G 是通过将外源表达 VSV 的 G 蛋白包装在缺失了 G 蛋白基因、携带 GFP 基因的 VSV 基因组中所获得的一种复制缺陷型病毒。与野生型病毒相比,其核酸分子上编码 G 蛋白的基因被删掉,因而不能复制,只有外源提供 G 蛋白后才能使其重新包装成为新的子代病毒,所以这种病毒在宿主细胞中只能进行“一个细胞周期”的感染,生物安全性高;同时由于该病毒不能进行复制,更有利于定量检测。本研究中利用复制缺陷型病毒 VSV $\Delta$ G\*G 测定重组 PoIFN- $\gamma$  的抗病毒活性检测结果与利用复制型重组病毒 VSV\*GFP 的抗病毒活性检测结果完全符合,同时使用复制缺陷型病毒进行检测会避免检测结果随时间的改变而改变的问题,使得对干扰素的活性检测更为安全、准确。

## REFERENCES

- [1] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference I. The interferon. *Proc R Soc Lond B: Biol Sci*, 1957, **147**(927): 258–267.
- [2] Cann AJ. Principles of Molecular Virology. Beijing: Science Press, 2006: 177–178.  
卡恩. 分子病毒学原理. 北京: 科学出版社, 2006: 177–178.
- [3] Williams JG, Jurkovich GJ, Maier RV. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine. *Surg Res*, 1993, **54**(1): 79–93.
- [4] Chen XM, Xue QH, Zhu RG, *et al.* Comparison of antiviral activities of porcine interferon type I and type II. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(6): 806–812.  
陈雪梅, 薛清华, 祝荣格, 等. 猪 I 型与 II 型干扰素的克隆、表达与抗病毒活性比较. 生物工程学报, 2009, **25**(6): 806–812.
- [5] Boehm U, Klamp T, Groot M. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, 1997, **15**: 749–795.
- [6] Godkin JD, Bazer FW, Moffatt J, *et al.* Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocyst at day 13–21. *Reprod Fertil*, 1982, **65**(1): 141–150.
- [7] Dijkmans R, Vandenbroeck K, Beaken E, *et al.* Sequence of the porcine interferon-gamma (IFN-gamma) gene. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(14): 42–59.
- [8] Vandenbroeck K, Dijkmans R, van Aerschot A, *et al.* Engineering by PCR-based exon amplification of the genomic porcine interferon- $\gamma$  DNA for expression in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **180**(3): 1408–1415.
- [9] Vandenbroeck K, Willems L, Billiau A, *et al.* Glycoform heterogeneity of interferon-gamma expressed in Sf9 cells. *Lymphokine Cytokine Res*, 1994, **13**(4): 253–258.
- [10] Cencic A, Lefevre F, Koren S, *et al.* Tertacyclin controlled expression of glycosylated porcine interferon-gamma in mammalian cells. *Animal Biotechnol*, 1999, **10**(1/2): 63–79.
- [11] Guo YJ, Wu D, Chen RW, *et al.* Cloning, high level expression and purification of porcine IFN- $\gamma$ . *Chin J Biotech*, 2001, **17**(2): 183–186.  
郭瀛军, 吴丹, 陈蕊雯, 等. 猪  $\gamma$  干扰素基因的克隆、表达及纯化. 生物工程学报, 2001, **17**(2): 183–186.
- [12] Yan LP, Zhou YJ, Qiu HJ, *et al.* Expression of porcine interferon- $\gamma$  and preparation of rabbit antisera against porcine interferon- $\gamma$ . *Chin J Prev Vet Med*, 2004, **26**(4): 252–255.
- [13] Qin LT, Wang XJ, Hu S, *et al.* Expression of porcine gamma-interferon in recombinant baculovirus and determination of its antiviral activity. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(3): 386–391.  
秦立廷, 王喜军, 胡森, 等. 猪  $\gamma$  干扰素在重组杆状病毒中的表达及其抗病毒活性的测定. 生物工程学报, 2007, **23**(3): 386–391.
- [14] Qin LT. Cloning and expression of bovine, chicken, porcine interferon-gamma and production of monoclonal antibodies. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2006.  
秦立廷. 牛、鸡和猪  $\gamma$ -干扰素的克隆表达与单克隆抗体的研制. 泰安: 山东农业大学, 2006.
- [15] Pestka S, Meager A. Interferon standardization and designations. *J Interferon Cytokine Res*, 1997, **17**(Suppl): S9–14.
- [16] Wen ZY, Ge JY, Hu S, *et al.* Rescue of a recombinant vesicular stomatitis virus expressing enhanced green fluorescent protein. *Chin J Prev Vet Med*, 2007, **29**(12): 905–910.  
温志远, 葛金英, 胡森, 等. 表达增强绿色荧光蛋白重组水疱性口炎病毒印第安纳株的构建. 中国预防兽医学报, 2007, **29**(12): 905–910.
- [17] Chen WY. Generation of several CHO cell lines stably expressing bovine, porcine and chicken beta interferon and evaluation of their bioactivity. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.  
陈伟业. 重组牛、猪和鸡  $\beta$  干扰素在 CHO 细胞中的高效稳定表达及其生物学活性研究. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [18] Ge J, Wen Z, Wang X, *et al.* Generating vesicular stomatitis virus pseudotype bearing the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike envelope glycoprotein for rapid and safe neutralization test or cell-entry assay. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, **1081**: 246–248.
- [19] Hou Q, Peng WP, Sun Y, *et al.* Expression of the truncated E2 protein of classical swine fever virus in *Escherichia coli* and preparation of a monoclonal antibody against the E2 protein. *Vet Sci China*, 2008, **38**(1): 6–10.  
侯强, 彭伍平, 孙元, 等. 猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原区编码基因的原核表达及其单克隆抗体的制备. 中国兽医科学, 2008, **38**(1): 6–10.
- [20] Kenji M, Akihiko U, Takehiro K, *et al.* Production of biologically active recombinant bovine interferon- $\gamma$  by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae. *Cytokine*, 2001, **13**(1):



- 18-24.
- [21] Goorha RM. Preparation and assay of vesicular stomatitis virus. *Methods Enzymol*, 1981, 78(Pt A): 309-312.
- [22] Weigent DA, Stanton GJ, Langford MP, *et al.* Virus yield-reduction assay for interferon by titration of infectious virus. *Methods Enzymol*, 1981, 78(Pt A): 346-351.
- [23] Stanton GJ, Langford MP, Dianzani F. Virus yield-reduction assay for interferon by titration of Sindbis virus hemagglutinin. *Methods Enzymol*, 1981, 78(Pt A): 351-357.
- [24] Jameson P, Grossberg SE. Virus yield-reduction assays for interferon: picornavirus hemagglutination measurements. *Methods Enzymol*, 1981, 78(Pt A): 357-368.
- [25] 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.
- [26] Garrison TL, Hung F, Izotova L, *et al.* ELISA measurement of interferons. *Biotechniques*, 2002, Suppl: 98-100.
- [27] Diaz de Arce H, Artursson K, L'Haridon R, *et al.* A sensitive immunoassay for porcine interferon-alpha. *Vet Immunol Immunopathol*, 1992, 30(4): 319-327.



## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 药用植物生理生态学

阮晓 王强 颜启传 编著

978-7-00-000000-0 ¥86.00 2010年3月出版

本书内容可分为两个部分,第一部分(第1~第7章)系统介绍了植物生长发育、光合作用、呼吸作用,营养物质的运输、分配和积累,以及植物对矿质营养利用过程的生理生态与调控的内容;第二部分(第8~第17章)介绍了在特殊生境中水生植物生理生态、植物对逆境生理适应过程、植物化感作用、植物细胞悬浮培养过程,以及高山草甸、荒漠生境、低山丘陵、热带和亚热带、湿地和海洋药用植物的生长发育过程、次生代谢物积累与对环境变化适应之间关系的内容。全书内容丰富、实用,涵盖了药用植物生理生态学的基本理论和最新研究进展。

本书可为中医药研究机构和高等院校从事植物药化学、药用植物生理学、植物生态学和资源植物学科研与教学工作的人员提供参考,也可作为生物和制药专业学生的教材。



### 中国大山包黑颈鹤自然保护区植物

李恒 钟兴耀 编著

978-7-03-026790-0 ¥286.00 2010年3月出版

本书记载了“国际重要湿地”——中国大山包黑颈鹤国家级自然保护区境内的野生、栽培和外来入侵植物 72 科 197 属 358 种。介绍了每种植物的系统位置,中文名称、拉丁学名,生态生活型,形态特征,物候,以及在大山包的分布地点、海拔和生境,凭证标本,自然分布状况和分布区类型,经济用途。每种植物附彩色图版一幅,显示该植物在保护区的分布地点及形态特征。

本书可供植物学、植物地理学、植物生态学、资源植物学、鸟类学、环境科学工作者,大专院校有关专业的师生以及广大的大自然爱好者参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:周文宇(010-64031535)

网上订购:www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目