

## 重组鸡 $\gamma$ -干扰素在昆虫细胞中的高效表达

孔桂美 许金俊 秦爱建\* 金文杰 刘岳龙

(扬州大学 江苏省动物预防医学重点实验室 扬州 225009)

**摘 要** 将鸡  $\gamma$ -干扰素(ChIFN- $\gamma$ )基因克隆到载体 pFASTBAC1 中,构建转移载体 pFASTBAC1-ChIFN- $\gamma$ ,然后转化 DH10Bac 感受态大肠杆菌,通过位点特异性转座,将 ChIFN- $\gamma$  基因整合到 Bacmid 穿梭载体中,构建表达质粒 Bacmid-ChIFN- $\gamma$ 。通过脂质体将表达质粒转染 Sf9 昆虫细胞,用间接免疫荧光试验鉴定重组鸡  $\gamma$ -干扰素(rChIFN- $\gamma$ )的表达;通过水泡性口炎病毒感染鸡胚成纤维细胞(CEF)的细胞病变抑制试验,检测 rChIFN- $\gamma$  的活性。研究表明,感染重组杆状病毒的 Sf9 细胞能高效表达 rChIFN- $\gamma$ ,且当每个细胞的感染量为 1 个病毒时,细胞在感染 96h 后,rChIFN- $\gamma$  基因表达产物的活性最高,达到  $10^6 \sim 10^{7.2}$  U/mL。以 rChIFN- $\gamma$  进行对新城疫病毒(NDV)F48E8 株、禽流感 H5N1 病毒(AIV-H5)和马尔克斯氏病病毒(MDV)GA 株的抗病毒活性试验,发现 rChIFN- $\gamma$  对 AIV-H5 和 MDV GA 株病毒有明显的抑制其致细胞病变作用,但对 NDV F48E8 株病毒在体外不能抑制其致细胞病变作用,仅能在病毒滴度上表现抑制效果。

**关键词** 重组鸡  $\gamma$ -干扰素 杆状病毒 表达 抗病毒作用

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)05-0697-05

鸡  $\gamma$ -干扰素(ChIFN- $\gamma$ )是由活化的 T 细胞和 NK 细胞受有丝分裂原或特异性抗原刺激后产生的一种细胞因子,分子量为 17~20kD。IFN- $\gamma$  具有抗病毒、抗肿瘤细胞生长、分化的生物学活性等,在免疫调节中起重要作用。ChIFN- $\gamma$  基因由 Digby 和 Lowenthal<sup>[1]</sup>于 1995 年首次克隆,随后国内外学者先后用大肠杆菌、COS 细胞、杆状病毒、鸡痘病毒、禽腺病毒以及植物烟草花叶病毒表达 ChIFN- $\gamma$ ,对其生物学活性进行了大量研究<sup>[2-6]</sup>。本实验室也成功克隆出了 ChIFN- $\gamma$  基因<sup>[7]</sup>,并在大肠杆菌和 COS 细胞上进行了表达和初步应用,发现原核表达的 rChIFN- $\gamma$  没有抗病毒活性,COS 细胞瞬时表达的 rChIFN- $\gamma$  活性较低。本研究应用 BAC-to-BAC 系统对 ChIFN- $\gamma$  进行了高效表达,通过表达条件的优化,使表达产物在特定的时间内和特定的接种剂量下活性最高,从而为开发和应用 rChIFN- $\gamma$  奠定了坚实的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌株** 鸡  $\gamma$  干扰素基因的重组真核表达质粒(pDNA-ChIFN- $\gamma$ )由本室构建<sup>[7]</sup>;pFASTBAC<sup>TM</sup>1 和 DH10Bac 购自 GIBCO 公司;大肠杆

菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  由本室保存。

**1.1.2 细胞和病毒**:草地贪夜蛾卵巢细胞系(Spodoptera frugiperda 9, Sf9)、水泡性口炎病毒(Vesicular Stomatitis Virus, VSV)、鸡新城疫病毒(Newcastle Disease Virus, NDV)F48E8 标准强毒株、禽流感病毒(Avian Influenza Virus, AIV)H5N1 和鸡马尔克斯氏病病毒(Marek's Disease Virus, MDV)GA 株均由本室保存。

**1.1.3 试剂**:脂质体转染试剂(LIPOFECTIN Reagent)和 Grace's 昆虫细胞培养基购自 GIBCO 公司;琼脂糖回收试剂盒,限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I 购自 TaKaRa 公司;质粒纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司;FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;鼠抗 rChIFN- $\gamma$  高免血清参照文献<sup>[7]</sup>方法制备。

**1.2 杆状病毒重组鸡  $\gamma$ -干扰素转移载体 pFASTBAC1-ChIFN- $\gamma$  的构建**

用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切真核质粒 pDNA-ChIFN- $\gamma$ ,回收 ChIFN- $\gamma$  片段,与同样酶切的 pFASTBAC1 回收产物 4 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化大肠杆菌(*E. coli*)DH5 $\alpha$  感受态细菌,筛选出的重组质粒命名为 pFASTBAC1-ChIFN- $\gamma$ 。

\* 通讯作者。Tel 86-514-7979224, Fax 86-514-7979217, E-mail: aijian@ yzu. edu. cn

作者简介:孔桂美(1978-),女,江苏泰兴人,硕士研究生,研究方向是细胞因子和免疫机理的研究。E-mail: kongguimei@sina.com.cn

收稿通知 2004-12-23,修回日期 2005-07-11

### 1.3 重组杆状病毒表达质粒 Bacmid-ChIFN- $\gamma$ 的构建和鉴定

取 DH10Bac 感受态细胞, 加入 1ng pFASTBAC1-ChIFN- $\gamma$  转座后, 用 SOC 培养基 10 倍梯度稀释培养物, 各取 100 $\mu$ L 涂布 Luria 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 ~ 48h, 挑取白色菌落, Luria 平板(含卡那霉素、庆大霉素、四环素、IPTG 和 X-Gal 抗生素板)进行 4 次筛选纯化, 阳性质粒命名为 Bacmid-ChIFN- $\gamma$ , 提取阳性质粒 DNA 用于下一步转染。

### 1.4 Sf9 细胞的转染和间接免疫荧光检测

将重组质粒 Bacmid-ChIFN- $\gamma$  用脂质体转染试剂按 GIBCO BRL 公司说明书中的转染程序转染 Sf9 细胞, 27 $^{\circ}$ C 培养 5h 后换用含血清的 Grace's 培养液。同时转染野生病毒 DH10Bac, 作为阴性对照。3d 后观察细胞病变, 收集转染后 72h 的细胞上清, 500g 离心 5min, 收集上清 4 $^{\circ}$ C 避光保存, 即为 P1 代。转染 5d 后, 细胞用 -20 $^{\circ}$ C 预冷的丙酮-乙醇(3:2)固定 5min, PBS 洗 3 次, 室温吹干, 加入 1:100 稀释的鼠抗鸡干扰素- $\gamma$  高免血清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, PBS 洗 3 次, 加入 1:150 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, PBS 洗 3 次。荧光显微镜下观察记录, 同时设野生型病毒基因组转染 Sf9 细胞、Sf9 正常细胞作为阴性对照。

### 1.5 重组杆状病毒的扩增和表达条件的优化

将病毒分别以不同的 MOI(每个细胞的病毒感染量)感染 Sf9 细胞并于感染后不同时间收集表达产物上清。用 10 倍梯度稀释重组干扰素(每孔 100 $\mu$ L)致敏次代鸡胚成纤维细胞 24h, 然后加入 100 $\mu$ L 100TCID<sub>50</sub> 的 VSV, 24 ~ 48h 后观察细胞半数保护情况, 按照刘长暖等<sup>[8]</sup>的方法测定鸡干扰素- $\gamma$  的活性, 用 Reed-Muench 法进行计算, 最终确定重组病毒的最佳感染量和最佳蛋白表达时间。以每 mL 干扰素样品的最高稀释度仍能保护半数细胞(50%)免受病毒攻击的稀释度的倒数定义为 1 个干扰素单位(U)。

### 1.6 重组 ChIFN- $\gamma$ 抗病毒活性测定

按照步骤 1.5 测定的结果将表达产物进行系列稀释, 每孔加 100 $\mu$ L, 将单层鸡胚成纤维细胞分别致敏 24h 和 48h 后, 然后再分别接种 1、10 和 100  $\times$  TCID<sub>50</sub> 的 NDV F48E8 病毒, 10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub> 禽流感病毒(H5N1) 24h 后观察半数细胞保护情况, 用同样方法致敏单层鸡胚成纤维细胞后接种不同空斑数的 MDV GA 株, 待病毒吸附 5h 后, 加入 1% 琼脂和维持液混合液覆盖, 5d 后观察空斑增殖抑制情况。设野

生型病毒感染的细胞培养上清和正常细胞培养上清作为病毒致病的阳性对照。结果用 SPSS 软件对统计数据进行分析。

## 2 结果

### 2.1 转移质粒的酶切鉴定

将 ChIFN- $\gamma$  基因从真核质粒 pcDNA-ChIFN- $\gamma$  中用 EcoR I 和 Not I 双酶切后克隆到转移载体 pFASTBAC1 中, 经过 DNA 纯化和双酶切鉴定, 证明获得的重组转移质粒 pFASTBAC1-ChIFN- $\gamma$  正确。经测序分析, 进一步证明基因序列正确无误<sup>[7]</sup>。

### 2.2 rChIFN- $\gamma$ 在 Sf9 细胞中表达

取上述重组 DNA 质粒(Bacmid-ChIFN- $\gamma$ )转染 Sf9 细胞, 5d 后按上述方法进行 IFA, 结果表明, 荧光显微镜下可以见到 Sf9 胞浆内和胞膜上都有亮绿色的荧光, 而野生病毒转染的 Sf9 细胞、正常 Sf9 细胞没有可见荧光。这一结果证明 rChIFN- $\gamma$  在 Sf9 细胞中得到良好表达(图 1)。

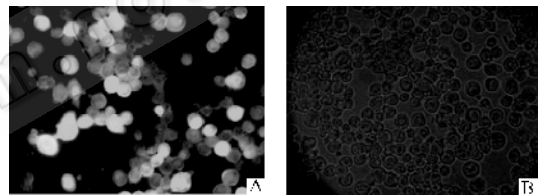


图 1 转染 Sf9 细胞 5d 后的 IFA 检测结果

Fig. 1 Indirect immunofluorescence assay of Sf9 insect cells at 5 days post-transfection with Bacmid-ChIFN- $\gamma$

A. Sf9 cells transfected with Bacmid-ChIFN- $\gamma$ ; B. Sf9 cells transfected with wild virus Bacmid(DH10Bac).

### 2.3 Sf9 细胞上清中含有高效价的 rChIFN- $\gamma$ 活性

取不同的 MOI 分别感染 Sf9 细胞, 于感染后不同时间收集细胞上清, 按 10 倍梯度稀释, 致敏次代 CEF 24h 后加入 100TCID<sub>50</sub> 的 VSV, 再间隔 24h 后观察细胞保护情况。结果发现, rChIFN- $\gamma$  的表达是随时间和 MOI 的变化而变化的, 当 MOI = 1 时, rChIFN- $\gamma$  表达量呈明显稳定的上升趋势, 且活性也相对最高, 96h 达到表达高峰, MOI = 2 时也是如此, 但表达量略低于 MOI = 1, 而 MOI = 2, 4, 6, 8, 10, rChIFN- $\gamma$  表达在感染后 72h 达到了高峰, 由于细胞裂解较多, 所以采样时 rChIFN- $\gamma$  活性不是很高, 从感染后 96 ~ 144h, 细胞全部裂解, 所以在 96h 收集破碎细胞和细胞上清测定蛋白活性(表 1)。连续 4 次实验结果表明干扰素感染量为 MOI = 1 为最佳感染量, 感染后 96h 为最佳收获时间, 测得的干扰素的活性高达  $1.58 \times 10^6$  U/0.1mL。将 4 次的测定结果取平均值后

进行绘图如下(图2)。表达的干扰素对温度比较敏感,在4℃避光可保存3个月,活性仍能保持在 $1 \times 10^6$  U/0.1mL,37℃ 1d 降到 $1 \times 10^5$  U/0.1mL,58℃处理1h 活性下降到 $1 \times 10^4$  U/0.1mL,而放液氮和-20℃冻融一次后的活性下降到 $1 \times 10^5$  U/0.1mL,但能保持该活性半年不变。表达的干扰素对pH也比较敏感,研究发现干扰素在pH=5~7,4℃处理1h时,活性为 $1 \times 10^6$  U/0.1mL左右,但pH小于5、大于7时干扰素活性下降到 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  U/0.1mL。

表1 不同感染量和时间对重组鸡  $\gamma$ -干扰素表达的影响(U/100 $\mu$ L)

Table 1 The time course of the rChIFN- $\gamma$  expressed in Sf9 cells infected with different dosage of the virus

t/h	MOI					
	1	2	4	6	8	10
24	$10^{4.00}$	$10^{4.00}$	$10^{5.00}$	$10^{4.80}$	$10^{4.57}$	$10^{5.00}$
48	$10^{4.50}$	$10^{4.80}$	$10^{4.59}$	$10^{4.50}$	$10^{4.571}$	$10^{5.57}$
72	$10^{5.66}$	$10^{5.66}$	$10^{5.66}$	$10^{5.50}$	$10^{5.80}$	$10^{5.80}$
96	$10^{6.20}$	$10^{6.10}$	$10^{5.57}$	$10^{5.50}$	$10^{5.80}$	$10^{5.50}$
120	$10^{4.66}$	/	/	/	/	/
144	$10^{4.00}$	/	/	/	/	/

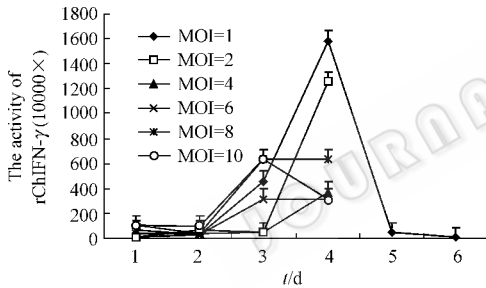


图2 重组鸡  $\gamma$ -干扰素活性测定

Fig.2 Determination of bioactivity of rChIFN- $\gamma$  expressed in the Sf9 cells supernatants

2.4 rChIFN- $\gamma$ 能抑制MDV GA对CEF的致病变作用但对NDV F48E8仅能抑制其在细胞上的增殖

用不同量的重组干扰素分别致敏 CEF 24h 和 48h,接种不同 TCID<sub>50</sub> 含量的 F48E8,结果发现在 24h 内重组干扰素对细胞几乎没有保护作用,细胞均表现出病变。用血凝实验测定细胞上清中的病毒血凝价,从感染后第 3 天开始,连续 5d,直到阳性感染细胞全部死亡,然后将各稀释度第 5 天的血凝价平均值列表如下(表 2),从表中也可以看出,对照组和试验组的细胞都有血凝价,经统计学分析组与组之间差异不显著( $P > 0.05$ )。用 GA( $1.6 \times 10^4$  PFU/mL)稀释到一定的空斑数后,感染致敏过 24h 的 CEF,吸附 5h 后加琼脂覆盖维持 5d,台盼蓝(0.3%)染色计数空斑。结果发现重组干扰素致敏过的 CEF 病毒

形成的空斑数明显少于对照组(正常上清)(表 3),从表中可以看出干扰素对 MDV GA 的空斑抑制作用与干扰素的用量呈正相关,经 SPSS 软件统计分析干扰素加入组与对照组之间差异显著( $P < 0.05$ )。

表2 rChIFN- $\gamma$  干扰素抑制 NDV 的血凝测定结果

Table 2 rChIFN- $\gamma$  antiviral activity against NDV

NDV	IFN/U			
	10000	1000	100	Control
1TCID50	1.5 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	4	5
10TCID50	2.5 <sup>a</sup>	4	4	5
100TCID50	3	4	5	5

<sup>a</sup> The results of hemagglutination assay denominate 2<sup>n</sup>, the numbers among the table refer to n. a Significant difference ( $P < 0.05$ ).

表3 rChIFN- $\gamma$ 对马立克氏病病毒的空斑抑制作用

Table 3 rChIFN- $\gamma$  antiviral activity against MDV

IFN/U	Mean plaque (PFU)		Rate of inhibition/%	
	160 PFU	1600 PFU	160 PFU	1600 PFU
Control	158	1597	1.25	0.19
10 <sup>2</sup>	10 <sup>a</sup>	213 <sup>a</sup>	93.75 <sup>a</sup>	86.69 <sup>a</sup>
10 <sup>3</sup>	2 <sup>a</sup>	120 <sup>a</sup>	98.75 <sup>a</sup>	92.50 <sup>a</sup>
10 <sup>4</sup>	0 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	96.38 <sup>a</sup>
10 <sup>5</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>

a Significant difference ( $P < 0.05$ ).

2.5 rChIFN- $\gamma$ 有显著的抗AIV(H5N1)病毒对细胞的致病变作用

按上述方法致敏并感染 AIV 病毒,然后用血凝实验测定细胞上清中的血凝价,从感染后 24h 开始,连续 10d 测血凝价(表 4),从表中可以看出 rChIFN- $\gamma$  对 AIV H5N1 有明显抑制作用,且 rChIFN- $\gamma$  的量为 100U 以上时,对 10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub> AIV 病毒都能表现出很好的抑制效果。

表4 rChIFN- $\gamma$ 抗10<sup>4</sup>TCID50 AIV的抑制结果

Table 4 rChIFN- $\gamma$  antiviral activity against AIV(10<sup>4</sup> TCID50)

IFN/U	Days post-infection									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10000	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
1000	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
100	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
10	0.5	1	4	4	3.5	2	3.5	3	2	3
Control	1	1	5	5	4	3	4	4	3	4.5

<sup>a</sup> The results of hemagglutination assay denominate 2<sup>n</sup>, the numbers among the table refer to n. a: Significant difference ( $P < 0.05$ ).

3 讨论

鸡干扰素- $\gamma$ 是一种具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节活性的细胞因子,可作为免疫佐剂和生长促进剂<sup>[9]</sup>。因在抗感染免疫中机体本身产生的干扰素- $\gamma$ 量很少,所以人们就考虑利用基因工程方法体外

大量表达干扰素- $\gamma$ 。自从 ChIFN- $\gamma$  被 Digby 和 Lowenthal<sup>[1]</sup>克隆出后,已有很多关于 rChIFN- $\gamma$  表达的报道,绝大多数是用大肠杆菌表达的,由于原核表达产物不能进行翻译后修饰,其生物学活性往往较低。本实验室<sup>[7]</sup>也成功克隆出 ChIFN- $\gamma$ ,在大肠杆菌进行了表达和初步应用,发现原核表达的 ChIFN- $\gamma$  主要以包涵体形式存在,细菌裂解上清无抗病毒活性。杆状病毒表达载体系统是目前最具应用前景的真核表达系统之一,它具有对外源基因容量大,操作方便,不污染环境,表达产物得到较充分的翻译后修饰<sup>[10]</sup>。Lambrecht 等<sup>[2]</sup>证明杆状病毒表达的 ChIFN- $\gamma$  与用有丝分裂原激活脾脏 T 细胞产生的天然干扰素具有相类似的物理化学特性以及生物学活性,且感染后的昆虫细胞上清中的干扰素含量较高,达到 100 ~ 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Weinning 等<sup>[11]</sup>报道的纯化的 His-ChIFN- $\gamma$  的抗病毒活性为 500U/mg, Lillehoj 和 Chof<sup>[12]</sup>用杆状病毒表达的重组抗病毒活性为  $2 \times 10^5$  U/mL, Kazuaki 等<sup>[3]</sup>用杆状病毒表达的 ChIFN- $\gamma$ -His 和 ChIFN- $\gamma$  THis 纯化后的活性为  $(1.6 \sim 7.8) \times 10^5$  U/mL (以每 mL 干扰素样品的最高稀释度仍能使细胞 100% 免受病毒的攻击的稀释度的倒数定义为 1 个干扰素单位)。本研究通过对表达条件的优化使感染后昆虫细胞上清中的 rChIFN- $\gamma$  活性达到  $(1 \sim 1.58) \times 10^{6-7}$  U/mL (每 mL 干扰素样品的最高稀释度仍能使细胞 50% 免受病毒的攻击的稀释度的倒数定义为 1 个干扰素单位),且昆虫细胞上清易于收获,为体外大量制备高效价廉的重组  $\gamma$ -干扰素奠定了基础。

在畜牧业生产中,滥用抗生素已经引起大量耐药菌的出现和药物残留,对人类和动物疾病的控制十分不利。细胞因子作为免疫应答的自然介导物和调节物,在临床上具有良好的应用前景。随着基因工程技术的发展,干扰素的生产成本大大降低,使其在家禽业的应用成为可能<sup>[13-16]</sup>。Michael 等<sup>[9]</sup>报道用表达鸡  $\gamma$ -干扰素的重组腺病毒治疗艾美尔球虫感染取得了显著的疗效,能控制感染鸡的体重减轻。John 等<sup>[4]</sup>报道用重组鸡干扰素- $\gamma$  可作为免疫佐剂和生长促进剂。本研究用杆状病毒表达的 rChIFN- $\gamma$  进行抗病毒初步研究发现其具有很强的抗病毒能力,但对不同病毒的抗病毒能力差异显著,对 NDV (F48E8 株)几乎无可见细胞病变抑制作用,但从血凝实验可以看出有一定的抑制作用,rChIFN- $\gamma$  对禽流感的抑制作用最为明显,对不同接种量的病毒都有明显的抑制作用;对 MDV(GA 株)的空斑抑制作

用也非常明显,造成这种差异的原因可能是因为 NDV 本身是一种强的干扰素诱生剂,病毒对干扰素有一定的抵抗能力,病毒在逃避干扰素的作用机理上不同于其他病毒<sup>[17]</sup>。MDV 是一种细胞结合型 DNA 病毒,生长复制比较慢,在机体中也主要是细胞免疫为主,对干扰素比较敏感。当然,干扰素对不同病毒抑制的效果差异的原因和机制还有待进一步研究。重要的是,作者认为在应用干扰素进行疾病治疗时必须首先了解干扰素抗某种病毒的效果,目前这项工作正在进行中。

## 参 考 文 献

- [1] Digby M R, Lowenthal J W. Cloning and expression of the chicken interferon- $\gamma$  gene. *J Interferon and Cytokine Res*, 1995, **15**: 939 - 945.
- [2] Lambrecht B, Gonze M, Morales D, et al. Comparison of biological activities of natural and recombinant chicken interferon-gamma. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999, **70**: 257 - 267.
- [3] Kazuaki T, Makiyo K W, Naomi O. High level expression of C-terminal truncated recombinant chicken interferon- $\gamma$  in baculovirus vector system. *J Vet Med Sci*, 2002, **64**(2): 95 - 100.
- [4] John W L, Terri E O, David A, et al. Cytokine therapy: a natural alternative for disease control. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999, **72**: 183 - 188.
- [5] Dawson W O. Tobamovirus-plant interactions. *Virology*, 1992, **186**: 359 - 367.
- [6] 程 坚, 吴艳涛, 彭大新, 等. 鸡  $\gamma$ -干扰素基因的克隆与鉴定. *农业生物技术学报*, 2000, **8**(3): 236 - 237.
- [7] 戴建华, 秦爱建, 许金俊, 等. 鸡  $\gamma$ -干扰素基因的克隆及其在原核和真核系统中的表达. *中国预防兽医学报*, 2003, **25**(4): 249 - 253.
- [8] 刘长暖, 刘 兰, 王军志, 等. 应用结晶紫染色法测定干扰素效价. *中国生物制品学杂志*, 1999, **12**(1): 36 - 38.
- [9] Michael A J, Cathryn P, John W L. Delivery of avian cytokines by adenovirus vectors. *Developmental and Comparative Immunology*, 2000, **24**: 343 - 354.
- [10] 杨 林, 张晓馨, 陈新华, 等. 人白细胞介素-12(hIL-12)基因在杆状病毒表达载体系统中的表达. *微生物学报*, 2001, **41**(1): 35 - 42.
- [11] Weining K C, Schultz U, Munster U, et al. Biological properties of recombinant chicken interferon- $\gamma$ . *Eur J Immunol*, 1996, **26**: 2440 - 2447.
- [12] Lillehoj H S, Choi K D. Recombinant chicken interferon-gamma-mediated inhibition of *Eimeria tenella* development *in vitro* and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acerrulina* challenge infection. *Avian Dis*, 1998, **42**: 307 - 314.
- [13] John W L, Benedicte L, Thierry P V, et al. Avian cytokines-the natural approach to therapeutics. *Developmental and Comparative Immunology*, 2000, **24**(2): 355 - 365.

- [ 14 ] Lowenthal J W , York J J , O'Neil T E , *et al.* *In vivo* effects of chicken interferon- $\gamma$  during infection with *Eimeria* . *J Interferon and Cytokine Res* , 1997 , **17** : 551 - 558 .
- [ 15 ] Song K D , Lillehoj H S , Choi K D , *et al.* Expression and functional characterization of recombinant chicken interferon-gamma . *Vet Immunol Immunopatho* , 1997 , **58** : 321 - 333 .
- [ 16 ] MiChalski W P , Shiell B J , O'Neil T E , *et al.* Recombinant chicken IFN- $\gamma$  expressed in *Escherichia coli* : analysis of C-terminal truncation and effect on biologic activity . *J Interferon and Cytokine Res* , 1999 , **19** : 383 - 392 .
- [ 17 ] Gotoh B , Komatsu T , Takeuchi K , *et al.* Paramyxovirus strategies for evading the interferon response . *Rev Med Virol* , 2002 , **12** ( 6 ) : 337 - 357 .

## High level expression of recombinant chicken interferon-gamma in insect cells

KONG Gui-mei XU Jin-jun QIN Ai-jian\* JIN Wen-jie LIU Yue-long

( Key Laboratory of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China )

**Abstract** : The recombinant transfer vector pFastBac1-ChIFN- $\gamma$  was constructed by plasmid pcDNA-ChIFN- $\gamma$  digested with *EcoR* I and *Not* I enzymes and cloned into pFastbac1. Then the transfer vector was transformed into *E. coli* competent cells DH10Bac which contained the bacmid with amini-attTn7 target site and the helper plasmid. The recombinant bacmid-ChIFN- $\gamma$  was generated by transposing the mini-Tn7 element located in pFastBac1-ChIFN- $\gamma$  to the mini-attTn7 attachment site on the Bacmid. Subsequently the recombinant Bacmid-ChIFN- $\gamma$  was transfected into the Sf9 insect cells mediated by lipofectin to produce recombinant baculovirus and express recombinant ChIFN- $\gamma$  ( rChIFN- $\gamma$  ) products. The result showed that the rChIFN- $\gamma$  was successfully expressed in Sf9 cells infected with the recombinant virus by indirect immunofluorescence assay ( IFA ) at 5 days post-transfection. The biological activity of rChIFN- $\gamma$  was identified by its inhibition to *Vesicular stomatitis virus*-induced cytotoxicity of chicken embryonic fibroblasts ( CEF ) *in vitro*. The results showed that the most efficient expression of rChIFN- $\gamma$  could be obtained at 96h post-infection with multiplicity of infection ( MOI ) equal to 1. It is interesting that the viruses such as *Avian influenza virus* H5N1 or *Marek's disease virus* ( GA strain ) could not grow in CEF pre-treated with rChIFN- $\gamma$ . Cell pathogenic efficient ( CPE ) in the CEF infected with H5N1 and GA strain is apparently inhibited by the rChIFN- $\gamma$ . However only difference between the HA titres of the supernatant of the pre-treated cells is observed without any obvious inhibition effect in CEF infected with *Newcastle disease virus* ( F48E8 strain ).

**Key words** : Recombinant chicken interferon- $\gamma$  , Baculovirus , Expression , Antiviral activity

\* Corresponding author. Tel : 86-514-7979224 ; Fax : 86-514-7979217 ; E-mail : aijian@yzu.edu.cn

Received date : 12-23-2004

## 本期广告索引

企业	版位	企业	版位
镇江东方生物工程设备技术有限公司	封底	上海国强生化工程装备有限公司	文前 III / IV
GE Healthcare Bio-sciences ( 原名 Amersham Biosciences )	封二	镇江达森发酵设备有限公司	文前 V
冷泉港生物科技股份有限公司	封三	上海保兴生物设备工程有限公司	文前 VI
北京天为时代科技有限公司	文前 I / II	扬中市威柯特生物工程设备公司	文后 I