

# 携带猪 $\gamma$ 干扰素基因逆转录病毒载体的构建 及其在猪肾细胞(PK-15)中的表达

姚清侠, 刘新文, 钱平, 郭东春, 陈焕春\*

(华中农业大学畜牧兽医学院动物病毒室 武汉 430070)

**摘 要** 将梅山猪  $\gamma$  干扰素基因定向插入逆转录病毒载体 pLXSN(neor) 构建逆转录病毒重组质粒, 利用脂质体介导法将重组质粒转染逆转录病毒包装细胞系 PA317, 转染细胞经含 G418(400  $\mu$ g/mL) 培养基筛选一周后获得稳定产毒的 PA317 细胞系。从细胞培养上清中提取 RNA, 进行 RT-PCR 检测, 扩增到目的片段; 将上清感染猪肾细胞(PK-15) 经含 G418(400  $\mu$ g/mL, 600  $\mu$ g/mL 和 800  $\mu$ g/mL) 的 DMEM 筛选一周, 间接免疫荧光表明表达的猪  $\gamma$  干扰素主要锚定于细胞膜。收取 PK-15 细胞上清, 在牛肾细胞(MDBK) 上进行干扰素抗病毒活性检测, 结果显示重组病毒表达的猪  $\gamma$  干扰素抗水泡性口炎病毒(VSV) 的活性为 1200IU/10<sup>6</sup> cells·48h。以表达的干扰素处理 PK-15 细胞后, 经细胞病变抑制法测定, 重组猪  $\gamma$  干扰素可以抵抗口蹄疫病毒(FMDV) 感染。试验结果表明猪  $\gamma$  干扰素基因已成功插入逆转录病毒基因组并在 PK-15 细胞中表达, 表达的重组猪  $\gamma$  干扰素具有较强的抗病毒生物活性。

**关键词**: 猪  $\gamma$  干扰素, 逆转录病毒, PA317 细胞, PK-15 细胞, 表达, 抗病毒活性, 水泡性口炎病毒, 口蹄疫病毒

**中图分类号**: Q78 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2007)01-0141-04

干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 是由激活的 T 细胞和 NK 细胞产生的一种多功能细胞因子, 具有抗病毒、抗肿瘤、诱导免疫细胞分化、调节免疫反应等作用<sup>[1,2]</sup>。猪  $\gamma$  干扰素 cDNA 全长 501bp, 编码 23 个氨基酸的信号肽和 143 个氨基酸的成熟蛋白。它的抗病毒功能的发挥主要是通过与其细胞膜上的特异性  $\gamma$  干扰素受体 (IFNGR) 相结合, 从而使受体的两个多肽亚单位 IFNGR1 和 IFNGR2 发生二聚化, 导致位于受体上的 Janus 激酶 Jak1 和 Jak2 相互靠近, 从而激活并启动 JAK-STAT 途径, 激活各种抗病毒基因启动子, 生成多种抗病毒蛋白, 参与机体的病毒防御体系<sup>[3,4]</sup>。而它的免疫调节功能主要体现在: 它能够增加 MHC I 和 MHC II 类分子在细胞膜上的表达, 促进 T 细胞分化, 介导 CD8<sup>+</sup> T 细胞的免疫反应等等<sup>[5-8]</sup>。

但是动物体内一般情况下不产生干扰素, 即使在病毒的诱导下也仅产生微量的干扰素, 难以提纯。国外 Dijkman 等<sup>[9]</sup>于 1990 年率先在基因水平上开始了对猪  $\gamma$  干扰素的研究, 国内郭瀛军等<sup>[10]</sup>于 2001 年首次克隆报道了猪  $\gamma$  干扰素基因序列。以原核或酵母系统表达真核基因虽然具有产量高的优点, 然而其产物纯化工艺复杂, 与天然产物结构可能存在差异。逆转录病毒载体介导的基因转移技术是一种较为成熟的基因转移方法。该方法具有许多优势: 含有目的基因的病毒载体可感染多种细胞, 可广泛用于体外实验和动物实验, 逆转录病毒 RNA 基因的 cDNA 拷贝可稳定整合进被感染细胞的染色体中, 而宿主细胞通常不受损害, 并随细胞的分裂传递给子代; 载体一旦整合到宿主细胞就可长期表

达。至今尚未见利用逆转录病毒表达猪  $\gamma$  干扰素的相关报道。

本研究将中国当地品种梅山猪的  $\gamma$  干扰素基因, 定向插入逆转录病毒载体 pLXSN, 获得了可稳定产毒的 PA317 细胞系, 并将该介导猪  $\gamma$  干扰素的缺陷型重组逆转录病毒感染猪肾细胞(PK-15), 成功表达猪  $\gamma$  干扰素, 为体外研究猪  $\gamma$  干扰素抗病毒功能、作用机理等奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒和细胞**: 口蹄疫病毒(O/ES/2002) 为 O 型 FMDV、水泡性口炎病毒(VSV)、牛肾细胞(MDBK) 及猪肾细胞(PK-15) 均由本室保存, 包装细胞系 PA317, 由哈尔滨兽医研究所童光志研究员惠赠。VSV 的 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>-7.383</sup>/mL, FMDV 的 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>-5.8</sup>/mL。

**1.1.2 质粒**: pMD18-T-PoIFN $\gamma$  由本室构建(以 RT-PCR 方法从梅山猪外周血淋巴细胞中克隆到猪  $\gamma$ -干扰素全长基因 501bp, 将它插入 pMD18-T 载体)。与包装细胞系配套使用的逆转录病毒载体 pLXSN(neo<sup>r</sup>) 购自 Clontech 公司。

**1.1.3 酶和试剂**: T4 DNA 连接酶、限制性内切酶(EcoR I、BamH I)、Taq DNA 聚合酶和一步法 RT-PCR 试剂盒均购自宝生物(TaKaRa)公司; 脂质体转染试剂盒 Lipofection Reagent 2000、Polybrene 及 G418 均购自 GIBCO 公司; RNA 提取试剂盒 RNA-SolV<sup>®</sup> Reagent 购自美国 OMEGA 公司。猪 IFN- $\gamma$  标准品

基金项目: 国家 863 计划(2002AA245071)、湖北省科技攻关项目(2004AA202B01)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-27-87282608; E-mail: Hzauvet@public.wh.hb.cn

作者简介: 姚清侠(1980-), 女, 武汉人, 博士研究生, 研究方向为病毒分子生物学和免疫学。E-mail: yaoqingxia@sohu.com

收稿日期: 2006-04-24; 接受日期: 2006-07-21; 修回日期: 2006-08-14

为 Genetimes 公司产品, FITC 标记的羊抗兔 IgG 购自 Pierce 公司。其他试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.2 猪 $\gamma$ 干扰素基因逆转录病毒载体的构建

以 pMD18-T-PoIFN $\gamma$  为模板, 设计一对引物, 并在上、下游引物两端分别引入 *EcoR* I、*Bam*H I 酶切位点, 扩增梅山猪  $\gamma$  干扰素基因。上游引物 P1: 5'-TTGAATTC~~CCACCATGCAGGCGCCCTTTTT~~-3' (*EcoR* I); 下游引物 P2: 5'-TTGGATCCGATGACAATTATTTT ATG-3' (*Bam*H I)。反应体系(50.0 $\mu$ L)为: 模板为 500 倍稀释的 pMD18-T-PoIFN $\gamma$  1.0 $\mu$ L, 10 $\times$  PCR 缓冲液 5.0 $\mu$ L, 2mmol/L dNTPs 4.0 $\mu$ L, P1、P2 引物各 1.0 $\mu$ L(终浓度为 10pmol/L)。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增的 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析, 回收目的片段。

将回收的目的片段与用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切回收的逆转录病毒载体 pLXSN(5.8kb)于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  提取质粒进行酶切鉴定, 获得的阳性重组质粒命名为 pLXSN-PoIFN $\gamma$ 。提取纯化的 pLXSN-PoIFN $\gamma$  及 pLXSN 质粒, 测定 DNA 含量和纯度, 用于转染。

### 1.3 高滴度产毒细胞系的建立及 RT-PCR 鉴定

将 PA317 细胞以  $2 \times 10^5$  个/mL 浓度加入 24 孔细胞培养板, 待细胞长至 60%~70% 左右进行转染。根据脂质体转染试剂盒 Lipofection Reagent 2000 说明书, 利用脂质体介导法将纯化的质粒 pLXSN-PoIFN $\gamma$  及 pLXSN 分别转染逆转录病毒 PA317 包装细胞。待细胞长成单层, 用含 400mg/L G418 的 DMEM 筛选一周, 获得阳性细胞克隆经扩增培养后, 收取病毒上清, 于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。同时提取细胞上清的总 RNA, 以 DNA 酶去除 DNA 后进行 RT-PCR 扩增干扰素基因。按照一步法 RT-PCR 试剂盒说明书扩增全长 PoIFN- $\gamma$  cDNA。反应条件: 50 $^{\circ}$ C 30min, 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 58.5 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定反应产物。

### 1.4 病毒上清感染 PK-15 细胞

取 2mL 病毒上清接种长成 60%~70% 的单层 PK-15 细胞, 加入终浓度为 8mg/L 的 polybrene, 于 37 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$  培养 1h。然后加入 8mL 新鲜的 DMEM 继续培养 48h。待细胞长满传代时, 依次以含 400mg/L、600mg/L 和 800mg/L G418 的 DMEM 筛选, 获得抗性细胞, 扩增备用。

### 1.5 间接免疫荧光(IFA)检测

将 PK-15 细胞以  $2 \times 10^5$  个/mL 接种 24 孔细胞培养板, 48h 后, 细胞以甲醇固定 5min, PBS 洗 3 次, 室温吹干, 加入 1:100 稀释的兔抗猪  $\gamma$  干扰素高免血清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, PBS 洗 3 次, 加入 1:2000 稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, PBS 洗 3 次。荧光显微镜下观察记录, 同时设空载体逆转录病毒感染的 PK-15 细胞、正常 PK-15 细胞为阴性对照。

### 1.6 PK-15 细胞上清 PoIFN- $\gamma$ 生物学活性检测

待 PK-15 细胞贴壁后 48h 收取上清, 采用微量细胞病变抑制法<sup>[1]</sup>测定其活性, 以牛肾细胞株 MDBK 为测定细胞, VSV 病毒为攻击病毒, 同时设猪  $\gamma$  干扰素标准品为对照。另

外, 将上清以 pH2 的盐酸处理过夜或 65 $^{\circ}$ C 作用 1h 或与特异性的猪  $\gamma$  干扰素抗体(本室制备)37 $^{\circ}$ C 作用 1h 后检测其抗病毒活性。

### 1.7 PoIFN- $\gamma$ 对口蹄疫病毒的抑制作用

收取感染 pLXSN-PoIFN $\gamma$  的 PK-15 细胞上清, 分别经 2256 倍比稀释后加入长满的正常 PK-15 细胞, 24h 后以 100TCID $_{50}$  的 FMDV(O/ES/2002)攻毒, 观察表达的 PoIFN- $\gamma$  对口蹄疫病毒的抑制作用。

## 2 结果

### 2.1 pLXSN-PoIFN $\gamma$ 重组逆转录病毒载体的鉴定

重组病毒载体 pLXSN-PoIFN $\gamma$  经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切可得到预期的约 501bp 的目的片段及 5.8kb 载体片段。另外, PCR 及测序结果也表明猪  $\gamma$  干扰素基因插入逆转录病毒载体 pLXSN 中(图略)。

### 2.2 PA317 细胞和 PA317/pLXSN-PoIFN $\gamma$ 细胞的比较

将转染 pLXSN-PoIFN $\gamma$  的 PA317 细胞系(命名为 PA317/pLXSN-PoIFN $\gamma$ )和转染对照质粒 pLXSN 的 PA317 细胞系(命名为 PA317/pLXSN)及正常对照 PA317 细胞, 分别用含 400 $\mu$ g/mL G418 的培养基筛选一周(正常对照 PA317 细胞全部死亡), 从 PA317/pLXSN-PoIFN $\gamma$  细胞上清中利用 RT-PCR 扩增到目的大小片段(501bp), 而 pLXSN 质粒对照细胞及正常 PA317 细胞上清中未扩出此带(图略), 说明携带猪  $\gamma$  干扰素基因的 pLXSN-PoIFN $\gamma$  重组子已整合入包装细胞 PA317 中, 并能产生重组猪  $\gamma$  干扰素的逆转录病毒粒子。

### 2.3 PoIFN- $\gamma$ 在 PK-15 细胞中的表达

将经 G418 加压筛选得到的 PK-15 细胞接种 24 孔板, 48h 后按上述方法进行 IFA, 结果表明, 荧光显微镜下可以见到 PK-15 细胞膜上有亮绿色的荧光, 而空载体逆转录病毒感染的 PK-15 细胞没有可见荧光(图 1)。结果证明, PoIFN- $\gamma$  在 PK-15 细胞中能良好表达, 且表达的 PoIFN- $\gamma$  锚定于细胞膜。

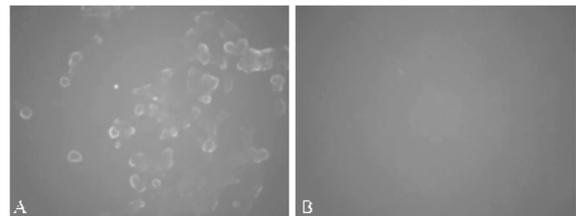


图 1 IFA 检测 PoIFN- $\gamma$  在 PK-15 细胞中的表达

Fig. 1 The PoIFN- $\gamma$  expressed in PK-15 cells detected with IFA. A: PK-15 cells infected with recombinant retrovirus; B: PK-15 cells infected with retrovirus control.

### 2.4 PK-15 细胞上清 PoIFN- $\gamma$ 生物学活性的检测

将经 G418 加压筛选得到的 PK-15 细胞接种 6 孔板, 48h 后收取细胞上清, 检测游离的 PoIFN- $\gamma$  的生物学活性。以不同的稀释滴度与 MDBK 细胞共孵育 24h 后, 以 100TCID $_{50}$  的水泡性口炎病毒(VSV)攻击, 检测结果表明, 逆转录病毒表达的蛋白对 VSV 表现出较高的抗病毒活性, 能够有效抑制 VSV 病毒对 MDBK 细胞的致病变作用(图 2)。将抑制 50% 细胞病

变的干扰素的最高稀释度定为一个干扰素单位,其抗病毒效价达到  $1200 \text{ IU}/10^6 \text{ cells} \cdot 48\text{h}$ 。

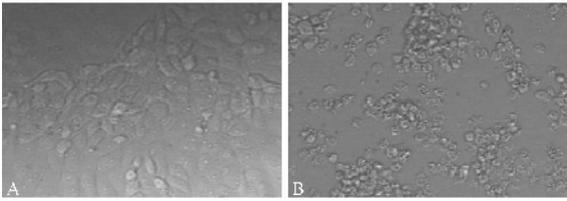


图2 重组逆转录病毒表达 PoIFN- $\gamma$  的抗病毒 (VSV) 活性检测

Fig.2 The detection for anti-VSV activity of the PoIFN- $\gamma$  expressed by retrovirus. A: MDBK cells pretreated with supernatant of PK-15 which was infected by recombinant retrovirus and attacked by 100 TCID<sub>50</sub> VSV after 24h. B: MDBK cells pretreated with supernatant of PK-15 which was infected by control empty retrovirus and attacked by 100 TCID<sub>50</sub> VSV after 24h.

另外,将上清经 pH 2.0 的盐酸处理过夜或 65℃ 作用 1h 或与特异性的猪  $\gamma$  干扰素抗体 37℃ 作用 1h 后,其抗病毒活性下降至原活性的 0% ~ 20%,符合  $\gamma$  干扰素的生物学特性(对酸敏感)而且特异性的猪  $\gamma$  干扰素抗体能中和它的抗病毒活性证明了 PK-15 细胞表达的是猪  $\gamma$  干扰素(表 1)。

表 1 rPoIFN- $\gamma$  的生物学特性

Table 1 Characteristics of recombinant porcine IFN- $\gamma$

Treatment*	rPoIFN- $\gamma$ activity remaining(%)
65℃ for 1h	10
pH 2.0	10 ~ 20
Rabbit anti-PoIFN $\alpha$	100
Rabbit anti-PoIFN $\gamma$	0
Preimmune serum	100

\* These assays utilized vesicular stomatitis virus on MDBK cell lines.

将上清经 2 ~ 256 倍比稀释后加入长满的 PK-15 细胞,24h 后以 100TCID<sub>50</sub> 的 FMDV(O/ES/2002) 攻毒,可见 2 ~ 16 倍稀释的重组猪  $\gamma$  干扰素尚可保护 PK-15 细胞(表 2)。

表 2 rPoIFN- $\gamma$  抗 FMDV 病毒结果

Table 2 Anti-FMDV activity of recombinant PoIFN- $\gamma$

Group	Challenged by FMDV	CPE <sub>50</sub>							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
rPoIFN- $\gamma$	100TCID <sub>50</sub> O/ES/2002	-	-	-	-	+	+	+	+
Control	100TCID <sub>50</sub> O/ES/2002	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : CPE<sub>50</sub> positive ; - : CPE<sub>50</sub> negative.

### 3 讨论

利用逆转录病毒载体将外源基因导入靶细胞是基因转导的有效方法之一。逆转录病毒载体高效地将外源基因导入靶细胞的同时,还可以将外源基因有效地整合到宿主细胞

基因组中,并随细胞分裂而稳定地遗传给后代,故外源基因不易丢失。本研究所用的逆转录病毒载体为复制缺陷型的逆转录病毒载体 pLXSN,它缺失了编码内部结构蛋白、逆转录酶及膜蛋白等的部分基因,因而具有良好的安全性<sup>[12]</sup>。

$\gamma$  干扰素是 II 型干扰素中唯一的成员,它在免疫调节的能力上更胜于 I 型干扰素,它能增加 MHC I、II 类分子的表达,促进 Th0 向 Th1 的分化,介导 CD8<sup>+</sup> T 细胞的免疫反应,因而成为一种细胞免疫的重要评价指征。越来越多的研究表明, $\gamma$  干扰素具有作为免疫增强佐剂的潜力<sup>[13-15]</sup>。虽然利用原核表达系统表达外源基因具有产量高的优点,然而由于所表达的是真核基因,故其表达产物的分子结构与天然蛋白分子的结构可能存在差异,这显然不利于对猪  $\gamma$  干扰素功能、活性、作用机制等方面的研究。同时,现在使用的多数真核表达载体(pcDNA3.1、pCIneo 等)转染细胞后是以附加体的形式存在,随着细胞系的传代可能丢失,而逆转录病毒感染细胞后是整合入宿主细胞基因组,所以不会随着细胞的传代而丢失,建立的细胞系能稳定的分泌表达外源基因。

本研究构建了携带有猪 IFN- $\gamma$  基因的逆转录病毒载体,用重组质粒转染逆转录病毒包装细胞 PA317 经 G418 加压筛选后,用其上清接种新鲜的 PK-15 细胞再次加压。由于包装后的逆转录病毒不具复制能力,但是,病毒 DNA 可整合到感染细胞的基因组中,复制后通过分裂可传至子代细胞,因此,利用新霉素抗性基因对稳定表达目的基因的细胞进行筛选,从而筛选到高表达的细胞株。经 G418 加压筛选后得到稳定表达猪  $\gamma$  干扰素的 PK-15 细胞,收集细胞培养上清,病毒病抑制实验表明重组猪 IFN- $\gamma$  具有较高的抗病毒生物活性,其在牛肾细胞(MDBK)上的抗水泡性口炎病毒(VSV)的活性为  $1200 \text{ IU}/10^6 \text{ cells} \cdot 48\text{h}$ 。另外,它在 PK-15 细胞中也有一定的抗口蹄疫病毒(FMDV)的作用。

利用逆转录病毒表达外源基因是当今基因治疗的成熟技术之一,由于它具有的独特优点,在基因治疗的临床和实验研究中多采用这一体系,本研究首次利用逆转录病毒表达猪  $\gamma$  干扰素,为下一步在体外研究猪  $\gamma$  干扰素对不同病毒在不同细胞中的抗病毒作用、及作用机理等奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] Muller U, Steinhoff U, Reis LF, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 1994, **264** (5167): 1918 - 1921.
- [2] Minagawa T, Ishiwata K, Kajimoto T. Feline interferon-omega treatment on canine parvovirus infection. *Vet Microbiol*, 1999, **69** (1-2): 51 - 53.
- [3] Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microb Rev*, 2001, **14** (4): 778 - 809.
- [4] Bazhan SI, Likhoshval VA, Belova OE. Theoretical analysis of the regulation of interferon expression during priming and blocking. *J Theor Biol*, 1995, **175** (2): 149 - 160.
- [5] Kloetzel PM, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, 2004, **16** (1): 47-58.

- [ 6 ] Van den Eynde BJ, Morel S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasom. *Curr Opin Immunol* 2001, **13**(2): 147-153.
- [ 7 ] Boehm U, Klamp T, Groot M, *et al.* Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997, **15**(1): 749-795.
- [ 8 ] Wang J, Michalak TI. Comparison of biological activity of recombinant woodchuck interferon gamma and tumor necrosis factor alpha produced in baculovirus and *Escherichia coli* expression systems. *Cytokine*, 2005, **30**(1): 22-34.
- [ 9 ] Dijkmans R, Vandenbroeck K, Beaken E, *et al.* Sequence of the porcine interferon-gamma gene. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(14): 42-59.
- [ 10 ] 郭瀛军, 吴丹, 陈蕊雯, 等. 猪  $\gamma$  干扰素基因的克隆、表达及其纯化. *生物工程学报* 2001, **17**(2): 183-186.
- [ 11 ] 张德震, 吴淑华, 侯云德, 等. 重组人  $\gamma$  干扰素的纯化. *病毒学报*, 1989, **5**(1): 3-8.
- [ 12 ] 王继英, 张大龙, 杜立新. 携带猪 J3 干扰素基因的鸡输卵管生物反应器逆转录病毒载体的构建. *生物技术*, 2003, **13**(3): 1-2.
- [ 13 ] Scheerlinck JY. Genetic adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine*, 2001, **19**(17-19): 2647-2656.
- [ 14 ] Kim JJ, Nottingham LK, Tsai A, *et al.* Antigen-specific humoral and cellular immune responses can be modulated in rhesus macaques through the use of IFN-gamma, IL-12, or IL-18 gene adjuvants. *J Med Primatol*, 1999, **28**(4-5): 214-223.
- [ 15 ] Kim JJ, Yang JS, Montaner L, *et al.* Coimmunization with IFN-gamma or IL-2, but not IL-13 or IL-4 cDNA can enhance Th1-type DNA vaccine-induced immune responses *in vivo*. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, **20**(3): 311-319.

## Construction of recombinant retroviral vector carrying porcine interferon-gamma and its expression in porcine kidney cells (PK-15)

YAO Qing-xia, LIU Xin-wen, QIAN Ping, GUO Dong-chun, CHEN Huan-chun\*

(Laboratory of Animal Virology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** : Porcine interferon-gamma (PoIFN- $\gamma$ ) of Chinese local brand, Meishan porcine, was cloned and inserted into retroviral vector pLXSN (neo<sup>r</sup>). Using Lipofectamine<sup>TM</sup>, this recombinant plasmid was transfected into retroviral packing cell line, PA317 cells. These transfected cells were selected by DMEM containing 400  $\mu$ g/mL G418 for one week. RNA was extracted from the supernatant of these selected PA317 cells and the PoIFN- $\gamma$  gene could be amplified by RT-PCR. Porcine kidney cells and PK-15 cells were infected by the supernatant and were selected by 400  $\mu$ g/mL, 600  $\mu$ g/mL and 800  $\mu$ g/mL G418, respectively. Those PK-15 cells were detected by indirect immunofluorescence assay and it was found that PoIFN- $\gamma$  mainly anchored in cellular membrane. The supernatant of the selected PK-15 was tested for the antiviral bioactivity after 48 hours of passage. The anti-VSV (vesicular stomatitis virus) activity in MDBK (bovine kidney cell) was 1200IU/10<sup>6</sup> cells. In addition, the effect of rPoIFN $\gamma$ -anti-FMDV was determined using cytopathic effect inhibition. The results indicate that PoIFN- $\gamma$  has been inserted into retroviral vector and recombinant retrovirus has been successfully packaged in PA317 cells. Furthermore, this retrovirus can infect PK-15 cells and express PoIFN- $\gamma$  with natural antiviral bioactivity and can inhibit VSV and FMDV.

**Keywords** : Porcine interferon-gamma ; Retroviral vector ; PA317 ; PK-15 ; Expression ; Antiviral activity ; VSV ; FMDV