

牛 γ -干扰素在重组杆状病毒中的表达及其抗病毒活性的测定

秦立廷^{1,2}, 王喜军¹, 胡 森¹, 刘思当², 步志高^{1*}

(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 山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

(³ 内蒙古农业大学动物科学与医学学院 呼和浩特 010018)

(⁴ 南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘 要 研究利用 Bac-To-Bac 杆状病毒表达系统构建含有牛 γ -干扰素(Bovine interferon- γ , BoIFN- γ)完整开放阅读框的供体质粒 pFastBacTM 1-BoIFN- γ , 转化 DH₁₀Bac⁺ 感受态细胞获得重组穿梭质粒 rBacmid-BoIFN- γ , 转染 sf9 昆虫细胞挽救表达 BoIFN- γ 的重组杆状病毒 rBac-BoIFN- γ 。采用抗 BoIFN- γ 单克隆抗体作为一抗进行间接免疫荧光(IFA)及间接 ELISA 检测, 表明 BoIFN- γ 在重组杆状病毒 rBac-BoIFN- γ 感染的 sf9 昆虫细胞中获得正确表达。利用 VSV * GFP-MDBK 细胞系统测定 rBoIFN- γ 抗病毒活性, 重组杆状病毒表达重组 BoIFN- γ (rBoIFN- γ)能有效抑制水疱性口炎病毒(VSV)在牛肾细胞(MDBK)上的复制, rBac-BoIFN- γ 感染 sf9 昆虫细胞上清抗病毒活性为 2×10^5 IU/mL, 而且其抗病毒活性可以被鼠抗原核表达重组 BoIFN- γ 免疫血清阻断。结果表明, rBoIFN- γ 在重组杆状病毒 rBac-BoIFN- γ 感染的 sf9 昆虫细胞中获得良好表达, 并具有高效抗病毒活性。

关键词: γ -干扰素; 牛; 重组杆状病毒; 抗病毒活性

中图分类号: Q78, Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)03-0503-05

干扰素(Interferon, IFN)是在特定的抗原刺激下由细胞分泌的一类具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节功能等生物活性的糖蛋白, 是发现最早、研究最多的细胞因子。根据 IFN 的细胞来源和结合受体不同, 将 IFN 分为 I 型和 II 型。I 型 IFN 主要有 α 、 β 两个亚型, 分别主要由淋巴细胞和成纤维细胞产生^[1], 它们作用于同一受体, 可抑制病毒 DNA 复制和蛋白质合成, 活化 NK(Natural killer)细胞, 促进 MHC I(Major histocompatibility complex I)类分子提呈抗原。II 型 IFN 为 γ -干扰素, 主要由 T 细胞和 NK 细胞产生^[2], 与 I 型 IFN 相比除具有广谱抗病毒活性外还有多种免疫学活性, 既可以单独作为生物制剂应用于一些疾病的防治, 又可作为免疫佐剂增强疫苗的免疫效果^[3,4]。

1986 年 Douglas 等^[5]以人 γ -干扰素基因为探针从牛的 cDNA 文库中克隆出牛 γ -干扰素(Bovine interferon- γ , BoIFN- γ)基因, 此后国内外学者利用基因工程技术生产重组 BoIFN- γ (rBoIFN- γ)的研究也开始兴起。与原核表达系统相比, 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

达重组蛋白更接近天然结构。为此, 本研究采用 BAC-TO-BAC 杆状病毒表达系统(BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System)对 BoIFN- γ 全基因进行了表达, 构建含有 BoIFN- γ 完整开放阅读框(ORF)的重组杆状病毒, 感染昆虫细胞表达出具有高效抗病毒活性的 rBoIFN- γ 。国内外研究表明, BoIFN- γ 在抗水疱性口炎病毒、口蹄疫病毒、牛病毒性腹泻病毒、牛呼吸道合胞体病毒、牛白血病病毒以及副流感-3 型的试验中均取得了良好效果^[6~8]。我国每年因牛病毒性疾病的爆发给养牛业带来巨大损失, 研制出具有抗病毒活性和免疫调节活性的基因工程 rBoIFN- γ 在牛病防治上具有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株、质粒和细胞 表达绿色荧光蛋白报告基因的重组水疱性口炎病毒 VSV * GFP 由本实验室构建、滴定并保存。质粒 pMD18-T-BoIFN- γ (BoIFN- γ 基因克隆于 EcoR V 位点) 原核表达质粒 pET-30a(+) 供体质粒 pFastBacTM 1(Invitrogen);

基金项目: 国家科技攻关项目(2004BA519A19, 2005BA711A10), 国家 973 项目(2005CB523200)

* 通讯作者。Tel: 86-451-85935062, E-mail: zgb@hvri.ac.cn

作者简介: 秦立廷(1981-), 男, 山东泰安人, 硕士, 主要分子免疫学和分子病毒学研究。E-mail: qinliting@yahoo.com.cn

其他作者: 李志中^{1,3}, 陈伟业^{1,4}, 葛金英¹

收稿日期: 2006-10-12, 接受日期: 2007-01-05, 修回日期: 2007-02-09

DH10Bac 感受态细胞(Invitrogen), BL21、DH5 α 感受态细胞, sf9 昆虫细胞, MDBK 细胞, 骨髓瘤细胞(SP2/0)均由本实验室保存。

1.1.2 试剂、引物和仪器 Grace's 培养基, DMEM 培养基, 转染试剂(Cellfectin Reagent)购自 Invitrogen 公司。ELISA 板购自 Costar 公司。细胞培养板购自 Orange 公司。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)标记的山羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司。哺乳动物瞬时表达重组 BoIFN- γ 由本实验室制备并鉴定(文章未发表)。引物(BoIFN- γ -f、BoIFN- γ -r; M13-48f、M13-47r)由上海博亚生物有限公司合成。DMIRES2 荧光显微镜(Leica)。Benchmark plus 酶标仪(Bio-Rad)。

1.2 抗 BoIFN- γ 单克隆抗体的制备

以原核表达载体构建引物 BoIFN- γ -f(5'-CTCCGGATCA GAATTC CAGGGCCAGTT-3')和 BoIFN- γ -r(5'-CATGCC GTCGACTCGACTATTATACAT-3')扩增 BoIFN- γ 不包含信号肽序列的 469bp 基因片段, 将 PCR 扩增目的片段 EcoR I 和 Sal I 限制酶双酶切后克隆于原核表达质粒 pET-30a(+)EcoR I 和 Sal I 位点, BoIFN- γ 蛋白表达框架与 His 标签融合。转化 BL21 IPTG 诱导, SDS-PAGE 检测融合蛋白表达, Ni 化琼脂糖柱纯化。原核表达重组 BoIFN- γ 蛋白作为抗原, 按 10mg/只的剂量腹腔和后肢肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠, 首免弗氏完全佐剂乳化, 二免、三免弗氏不完全佐剂乳化, 间隔时间 3 周, 第三次免疫后(采血分离血清, 制备鼠抗原核表达重组 BoIFN- γ 免疫血清), 加强免疫一次, 3d 后取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合, 以哺乳动物细胞表达重组 BoIFN- γ 作为抗原利用间接 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞, 经 3 次有限稀释, 最终获得一株稳定分泌抗 BoIFN- γ 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 制备腹水, 测定效价, -20℃ 保存备用。

1.3 表达 rBoIFN- γ 重组杆状病毒 rBac-BoIFN- γ 的构建与鉴定

EcoR I 和 Sal I 双酶切 pMD18-T-BoIFN- γ , 将编码 BoIFN- γ 完整 ORF 克隆至 pFastBacTM 1, 构建 pFastBacTM 1-BoIFN- γ (pFast-BoIFN- γ)。将 pFast-BoIFN- γ 转化 DH10Bac, 提取质粒, PCR 筛选阳性重组穿梭质粒 rBacmid-BoIFN- γ , 制备高纯度阳性重组穿梭质粒, 采用 Cellfectin^R Reagent 转染 sf9 昆虫细胞, 待细胞出现病变后, 参照文献 [10] 进行重组病毒扩增, 蛋白酶 K-SDS-酚/氯仿抽提病毒基因组 DNA, M13-48f(5'-GTTTTC CAGTCACGAC-3')和 M13-47r(5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')为引物 PCR 验证

BoIFN- γ 基因在杆状病毒中获得稳定重组, 重组病毒命名为 rBac-BoIFN- γ 。扩增种毒, 进行效价滴定后 4℃ 保存备用。

1.4 间接 IFA 检测 rBoIFN- γ 表达

上述 rBac-BoIFN- γ 种毒液按 1:10 体积比感染新鲜制备 sf9 昆虫细胞, 至细胞病变达 90% 时, 收获细胞用 PBS 洗涤, 重悬滴于载玻片上, 自然阴干后 95% 乙醇固定, 同时设野生型杆状病毒感染细胞为阴性对照。分别以 1:100 稀释抗 BoIFN- γ 单克隆抗体和相同倍数稀释的注射 SP2/0 小鼠腹水为一抗。PBST(0.05% Tween20)洗涤后加入 1:50 倍稀释 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 作用 30min, PBST 洗涤后荧光显微镜观察结果。

1.5 间接 ELISA 检测 rBoIFN- γ 表达

收取 rBac-BoIFN- γ 感染 sf9 昆虫细胞上清作为抗原, 以 Na₂CO₃、NaHCO₃ (pH = 9.6) 缓冲液分别做 1:5、1:10、1:20、1:40 稀释, 按每孔 100 μ L 包被 ELISA 板 4℃ 过夜, 10% 脱脂乳封闭, 以抗 BoIFN- γ 单克隆抗体为一抗, 并将其做 1:10² ~ 1:10⁷ 系列稀释, 1:2500 稀释 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 为二抗, 设 1:5 稀释野生杆状病毒感染 sf9 昆虫细胞上清包被阴性对照, 底物 OPD 作用 15min, 2mol/L 硫酸终止反应后, 测定 OD₄₉₀。每个稀释度至少设 3 个平行孔, 取平均值。另外, 将 rBac-BoIFN- γ 感染 sf9 昆虫细胞以 5mL PBS 重悬, 反复冻融 3 次, 超声处理后离心取上清 1:10 稀释, 利用上述方法进行 ELISA 检测。

1.6 rBoIFN- γ 抗病毒活性测定

参照文献 [11], 用 VSV * GFP-MDBK 细胞系统测定 rBoIFN- γ 抗病毒活性, 以 2 \times 10⁴ cells/孔密度将 MDBK 细胞铺于 24 孔板, 待细胞贴壁后, 分别加入 2 \times 10⁵ ~ 2 \times 10⁶ 不同倍数稀释 rBac-BoIFN- γ 感染 sf9 细胞的培养上清(rBoIFN- γ)和 2 \times 10⁵ ~ 2 \times 10⁶ 不同倍数稀释野生杆状病毒感染细胞的培养上清, 37℃ 作用过夜, 并设空白对照。100pfu/孔 VSV * GFP 感染细胞, 1h 后换完全培养液, 24h 后荧光显微镜观察结果, 以荧光亮度为对照组 50% 的最高稀释度为一个病毒抑制单位(IU)。

1.7 rBoIFN- γ 抗病毒活性阻断试验

以 2 \times 10⁴ cells/孔密度将 MDBK 细胞铺于 24 孔板, 待细胞贴壁后, 取 100IU 的 rBoIFN- γ 与不同稀释度的鼠抗原核表达重组 BoIFN- γ 免疫血清室温作用 1h, 同时设非免疫鼠血清与 100IU 的 rBoIFN- γ 作用对照组, 将混合液体作用 MDBK 细胞过夜, 100pfu/孔 VSV * GFP 感染细胞, 1h 后换完全培养液, 24h 后荧光显微镜观察结果。

2 结果

2.1 重组杆状病毒 rBac-BoIFN- γ 的构建与鉴定

为构建表达 BoIFN- γ 基因的重组杆状病毒,首先将 BoIFN- γ 完整 ORF 克隆至供体质粒 pFastBacTM 1,构建 pFast-BoIFN- γ ,*Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切后获得约 4760bp 和 550bp 两个片段,与理论预期值相符。将 pFast1-BoIFN- γ 转化至 DH₁₀Bac,经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定获得重组穿梭质粒 rBacmid-BoIFN- γ 。进一步提取重组质粒 rBacmid-BoIFN- γ 转染 sf9 昆虫细胞,收获重组杆状病毒 rBac-BoIFN- γ ,提取病毒基因组 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,表明 BoIFN- γ 基

因在杆状病毒中获得重组。

2.2 间接 IFA 检测 rBoIFN- γ 的表达

分别以 rBac-BoIFN- γ 和野生杆状病毒感染 sf9 昆虫细胞,至细胞病变达 90% 时收集细胞制备涂片,分别以 1:100 抗 BoIFN- γ 单克隆抗体和相同倍数稀释的注射 SP2/0 小鼠腹水为一抗进行间接 IFA 检测。结果抗 BoIFN- γ 单克隆抗体检测 rBac-BoIFN- γ 感染 sf9 昆虫细胞均显示强荧光信号,并且荧光主要集中在细胞膜上(图 1-A),而 1:100 稀释注射 SP2/0 小鼠腹水则荧光信号阴性(图 1-B);以野生型杆状病毒感染 sf9 昆虫细胞制备涂片,1:100 稀释抗 BoIFN- γ 单抗检测荧光信号也为阴性(图 1-C),结果表明 rBoIFN- γ 在 sf9 昆虫细胞中获得表达。

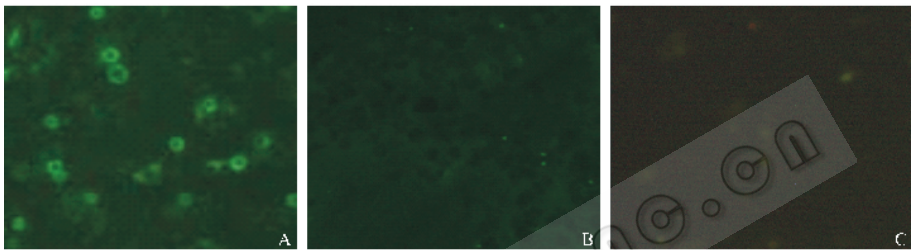


图 1 IFA 检测 rBoIFN- γ 在 rBac-BoIFN- γ 感染 sf9 昆虫细胞中的表达
Fig.1 IFA detecting expression of rBoIFN- γ in sf9 insect cells infected with rBac-BoIFN- γ .

2.3 间接 ELISA 检测 rBoIFN- γ 的表达

收取 rBac-BoIFN- γ 感染 sf9 昆虫细胞上清作为抗原,分别以 1:5、1:10、1:20 和 1:40 进行稀释,按每孔 100 μ L 包被 96 孔 ELISA 板,以 10 倍系列稀释的抗 BoIFN- γ 单克隆抗体为一抗,1:2500 稀释 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 为二抗,底物 OPD 作用 15min,2mol/L 硫酸终止反应后,测定 OD₄₉₀。结果:rBac-BoIFN- γ 感染 sf9 昆虫细胞培养上清 5 倍、10 倍、20 倍稀释包被 ELISA 板检测 OD₄₉₀ 相近,40 倍稀释 OD₄₉₀ 值明显

降低;单克隆抗体 1000 倍稀释后 P/N 值仍大于 2.0 (图 2);10 倍稀释细胞裂解物 OD₄₉₀ 低于相同倍数稀释细胞培养上清,表明 rBoIFN- γ 在 sf9 昆虫细胞中获得表达,并且大部分借助信号肽分泌在细胞上清中。

2.4 rBoIFN- γ 抗病毒活性测定

利用 VSV * GFP-MDBK 细胞系统测定 rBoIFN- γ 抗病毒活性,以不同倍数稀释 rBac-BoIFN- γ 感染 sf9 昆虫细胞的培养上清(rBoIFN- γ)和不同倍数稀释野生杆状病毒感染 sf9 昆虫细胞的培养上清分别作用 MDBK 细胞过夜,感染 VSV * GFP,24h 后荧光显微镜观察。结果显示:未加 rBoIFN- γ 的对照孔出现大量荧光(图 3-D),VSV * GFP 在 MDBK 细胞中大量复制,同样 2 \times 10² 和 2 \times 10³ 倍稀释的野生杆状病毒感染 sf9 昆虫细胞上清组也出现大量荧光(图 3-F,3-G),不能抑制 VSV * GFP 的复制,但是 20 倍稀释时可以非特异性的部分抑制 VSV * GFP 在 MDBK 细胞中的复制。2 \times 10⁴ 倍稀释 rBoIFN- γ 可以完全抑制 VSV * GFP 的复制,无荧光出现(图 3-A) 2 \times 10⁵ 和 2 \times 10⁶ 倍稀释 rBoIFN- γ 可部分抑制 VSV * GFP 的复制,2 \times 10⁵ 倍稀释孔的荧光亮度约为对照组的一半(图 3-B,C),测得 rBoIFN- γ 活性为 2 \times 10⁵ IU/mL。

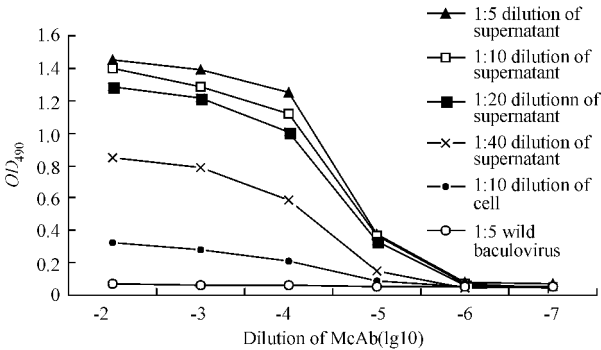


图 2 间接 ELISA 检测 rBoIFN- γ 在 rBac-BoIFN- γ 感染 sf9 昆虫细胞的表达

Fig.2 Indirect ELISA detecting expression of rBoIFN- γ in sf9 insect cells supernatant infected with rBac-BoIFN- γ .

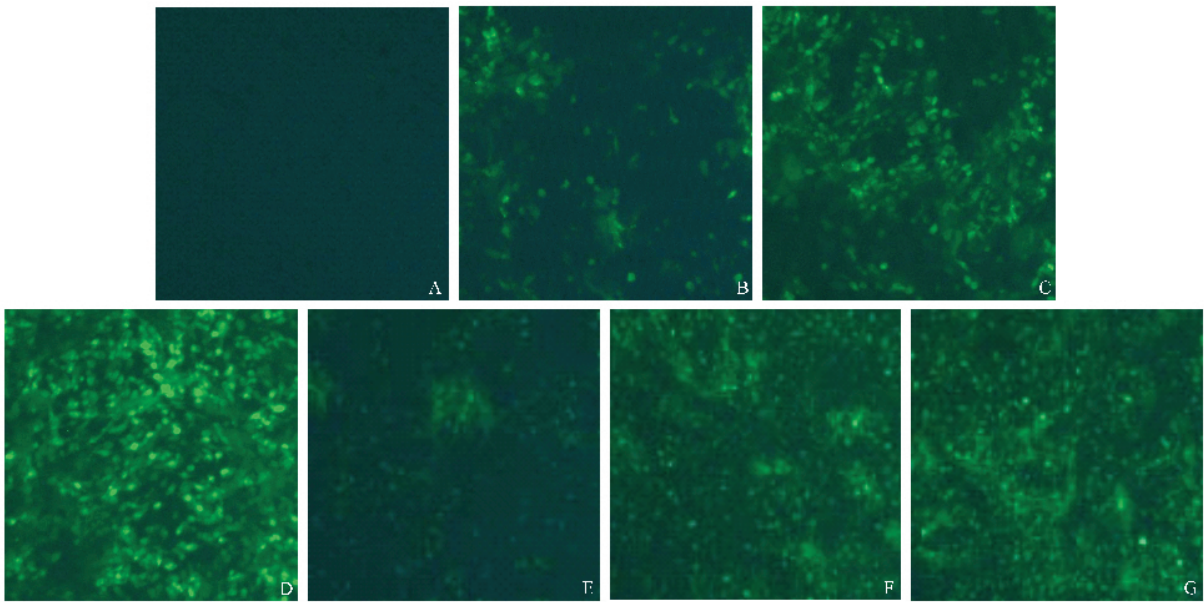


图3 利用 VSV * GFP-MDBK 系统测定 rBoIFN-γ 抗病毒活性

Fig.3 Determination of rBoIFN-γ antiviral activity by VSV * GFP-MDBK system. A ~ C : Dilution of supernatant of sf9 insect cells infected with rBac-BoIFN-γ (2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 respectively) D : negative control E ~ G : Dilution of supernatant of sf9 insect cells infected by wild baculovirus (2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 respectively)

2.5 重组 BoIFN-γ 抗病毒活性阻断试验

利用 VSV * GFP-MDBK 细胞系统间接证实 rBoIFN-γ 抗病毒活性 ,用不同稀释度的鼠抗原核表达重组 BoIFN-γ 免疫血清与 100IU 的 rBoIFN-γ 室温下结合 1h ,作用 MDBK 细胞过夜 ,感染 VSV * GFP , 24h 后荧光显微镜观察。结果表明 rBoIFN-γ 的抗病毒活性可以有效地被鼠抗原核表达重组 BoIFN-γ 免疫血清阻断。完全阻断 100IU 的 VSV * GFP 感染性的有效稀释倍数为 64 ,非免疫鼠血清则完全不能阻断 rBoIFN-γ 的抗病毒活性(图 4)。

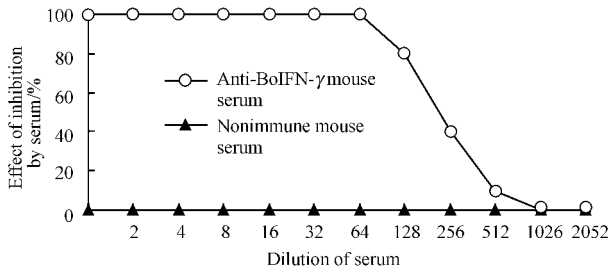


图4 鼠抗原核表达重组 BoIFN-γ 免疫血清阻断 rBoIFN-γ 抗病毒活性

Fig.4 Blocking antiviral activity of rBoIFN-γ by anti-BoIFN-γ mouse serum.

3 讨论

γ-干扰素具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等生物学活性 ,人 γ-干扰素在临床疾病的防治中早有应用 ,动物 γ-干扰素作为生物制剂或疫苗佐剂也具有

较好的应用前景 ,许多国家已经将动物细胞因子的开发利用作为研究重点。γ-干扰素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 ,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 γ-干扰素。

本研究构建了含有 BoIFN-γ 完整 ORF 的重组杆状病毒 ,感染 sf9 昆虫细胞有效表达出 rBoIFN-γ。以抗 BoIFN-γ 单克隆抗体为一抗 ,间接 IFA 和间接 ELISA 证实 rBoIFN-γ 在 sf9 昆虫细胞中获得良好表达。进行间接 IFA 检测 BoIFN-γ 表达时 ,发现荧光主要集中在细胞膜上 ,胞浆中荧光相对较少。同时利用 rBac-BoIFN-γ 感染 sf9 昆虫细胞培养上清为包被抗原进行间接 ELISA 试验的 OD_{490} 明显高于以 rBac-BoIFN-γ 感染 sf9 昆虫细胞裂解物的数值 ,结果表明 ,细胞培养上清含有大量 rBoIFN-γ ,rBoIFN-γ 在信号肽的引导下被分泌到细胞培养上清中 ,为以后 rBoIFN-γ 的提纯提供便利。

传统的 IFN 抗病毒活性是利用细胞病变抑制法测定 ,通过噬斑的数量而确定其活性单位。本研究采用的重组 VSV * GFP 可以在宿主细胞内复制 ,并表达绿色荧光蛋白 ,通过观察荧光强度和数量确定其感染和复制情况 ,即可测定 rBoIFN-γ 的抗病毒活性。因此 ,使用 VSV * GFP 作为攻击病毒 ,在 MDBK 细胞上测定 rBoIFN-γ 抗病毒活性时 ,采用测定荧光强度或数量代替传统的噬斑计数而确定其活性

单位,使得 IFN 抗病毒活性的测定更加准确和简便。采用 VSV * GFP 在 MDBK 的感染复制抑制试验初步研究了 rBoIFN- γ 抗病毒活性,并证实 rBoIFN- γ 具有高效抗病毒活性,rBac-BoIFN- γ 感染 sf9 昆虫细胞上清抗病毒效价可达 2×10^5 IU/mL,而相同倍数稀释的野生杆状病毒感染细胞上清不具有抗病毒活性,仅在 20 倍稀释时能非特异性的部分抑制 VSV * GFP 在 MDBK 中的复制。

Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统采用杆状病毒穿梭载体技术大大缩短了病毒纯化和鉴定的时间,由原来的几个月时间缩短到几周。重组杆状病毒感染 sf9 昆虫细胞表达的 rBoIFN- γ 进行了多种翻译后修饰,接近于天然 BoIFN- γ ,具有较高的生物学活性,而且杆状病毒具有高度的种属特异性,仅感染昆虫,对脊椎动物无感染性,其表达产物安全可靠,经过简单处理即可以直接应用于畜禽疾病的临床治疗。

参 考 文 献

- [1] Cann AJ. Principle of Molecular Virology. 4th ed. Beijing: Scientific Press, 2006: 177-178.
- [2] Williams JG, Jurkovich GJ, Maier RV. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine. *J Surg Res*, 1993, **54**(1): 79-93.
- [3] 程 坚, 刘秀梵, 彭大新. 共表达 H9 亚型禽流感病毒血凝素基因和鸡 II 型干扰素基因的重组鸡痘病毒构建及其免疫效力. *病毒学报*, 2003, **19**(1): 52-55.
- [4] Schijns VE, Scholtes NC, Zuilekom HI, et al. Facilitation of antibody forming response to viral vaccine antigens in young cats by recombinant baculovirus-expressed feline interferon-gamma. *Vaccine*, 2002, **20**(13-14): 1718-1724.
- [5] Douglas PC, Kata M, Alf L. Cloning, sequence, and expression of bovine interferon- γ . *J Immunol*, 1986, **136**(12): 44561-4564.
- [6] Perler L, Schweizer M, Jungi T, et al. Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon dependent and independent pathways. *J Gen Virol*, 2000, **81**(4): 881-887.
- [7] Inmaculada E, Juan C, Eladio V. Effect of interferon- α and interferon- γ and tumour necrosis factor on African swine fever virus replication in porcine monocytes and macrophages. *J Gen Virol*, 1988, **69**(12): 2973-2980.
- [8] Sentsui H, Murakami K, Inoshima Y, et al. Anti-viral effect of recombinant bovine interferon- γ on bovine Leukaemia virus. *Cytokine*, 2001, **16**(6): 227-231.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993.
- [10] Tomoshi N, Satoko I, Eiko S, 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.
- [11] Kenji M, Akihiko U, Takehiro K, et al. Production of biologically active recombinant bovine interferon- γ by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae. *Cytokine*, 2001, **13**(1): 18-24.
- [12] Garbutt M, Liebscher R, Jensen VW, et al. Properties of replication competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of Filoviruses and Arenaviruses. *J Virol*, 2004, **78**(10): 5458-5465.
- [13] Ayato T, Clinton R, Hideo G, et al. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(26): 14764-14769.

Expression of bovine interferon gamma in recombinant baculovirus and determination of its antiviral activity

QIN Li-ting^{1,2}, WANG Xi-jun¹, Hu Sen¹, LIU Si-dang², BU Zhi-gao^{1*}

(¹ Key Laboratory of National Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Harbin 150001, China)

(² College of Animal Science and Technology, Shandong Agriculture University, Taian 271000, China)

(³ College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China)

(⁴ College of Animal Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract The full-length bovine interferon gamma (BoIFN- γ) cDNA including the secretion signal peptide coding region was recloned into baculovirus honor vectors pFastBacTM1 of Bac-To-Bac system. These recombinant plasmids pFastBacTM1-BoIFN- γ were transformed into DH₁₀Bac host bacteria to get recombinant shuttle plasmids, rBacmid-BoIFN- γ . Recombinant baculovirus, rBac-BoIFN- γ , was generated for expressing BoIFN- γ , by transfecting recombinant Bacmid-BoIFN- γ with Cellfectin^R Reagen into sf9 insect cells. BoIFN- γ efficiently expressed by recombinant baculovirus in sf9 cells was testified by indirect immunofluorescence assay and indirect ELISA with monoclonal antibody against Bovine interferon- γ . Furthermore, VSV * GFP, recombinant Vesicular Stomatitis Virus expressing green fluorescence protein and MDBK were used to determine the anti-viral activity of rBoIFN- γ . The result shows rBoIFN- γ could inhibit the replication of the VSV * GFP in MDBK cells and the antiviral activity of supernatant was 2×10^5 IU/mL. The antiviral activity of rBoIFN- γ could be blocked by anti-BoIFN- γ mouse serum. The results demonstrated that the recombinant baculovirus could express BoIFN- γ efficiently and rBoIFN- γ had high antiviral activity.

Keywords: Interferon gamma; bovine; recombinant baculovirus; antiviral activity

Foundation item: Chinese National Programs for Science and Technology Development (2004BA519A19, 2005BA711A10); Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523200)

* Corresponding author. Tel: 86-451-85935062; E-mail: zgh@hvri.ac.cn

Other authors: LI Zhi-zhong^{1,3}, CHEN Wei-ye^{1,4}, GE Jin-ying¹

Received: 12 October 2006 / Accepted: 5 January 2007 / Revised: 9 February 2007

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn