

研究简报

# 重组马 $\gamma$ -干扰素抗病毒活性测定及单克隆抗体抑制活性鉴定

白宇, 陈伟业, 童铁钢, 张维军, 徐树兰, 王群, 孙庆歌, 刘光亮, 步志高, 吴东来

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

**摘要:** 为了测定大肠杆菌和杆状病毒表达的重组马 $\gamma$ -干扰素是否具有抗病毒活性, 利用这两种干扰素处理马胎肾细胞(EFK-78), 然后接种表达绿色荧光蛋白(GFP)的重组水泡性口炎病毒(VSV\*GFP), 观察干扰素对病毒表达GFP的抑制, 测出其抗病毒活性单位分别为  $1 \times 10^3$  AU/mL、 $1 \times 10^5$  AU/mL。评价了制备的九株抗重组马 $\gamma$ -干扰素单克隆抗体是否可抑制重组马 $\gamma$ -干扰素抗病毒活性, 证实其中一株可中和重组马 $\gamma$ -干扰素的抗病毒活性。结果表明: 杆状病毒表达的马 $\gamma$ -干扰素具有较高的抗病毒活性, 其活性可被一株制备的抗重组马 $\gamma$ -干扰素单克隆抗体抑制; 首次获得原核表达的具有抗病毒活性的马 $\gamma$ -干扰素。

**关键词:** 马 $\gamma$ -干扰素, 抗病毒活性测定, 单克隆抗体

## Antiviral Activity Determination of Recombinant Equine Interferon-gamma and Identification Inhibited Antiviral Activity of Monoclonal Antibodies

Yu Bai, Weiye Chen, Tiegang Tong, Weijun Zhang, Shulan Xu, Qun Wang, Qingge Sun, Guangliang Liu, Zhigao Bu, and Donglai Wu

National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, Harbin 150001, China

**Abstract:** Equine interferon-gamma (eIFN- $\gamma$ ) expressed both in *E. coli* and baculovirus were evaluated for antiviral activity against recombinant Vesicular Stomatitis Virus expressing green fluorescence protein (rVSV-GFP) in EFK-78 cells. The assays were conducted in 96-well plate. Virus infectivity was measured by quantifying GFP-positive cells, instead of quantifying the CPE reduction. Prior to infection of EFK-78 cells with rVSV-GFP, the cells were incubated with eIFN- $\gamma$ . The GFP expression in the EFK-78 cells dramatically decreased in the cells treated with eIFN- $\gamma$  in a dose-dependent manner, comparing with the mock-treated cells. The titers of antiviral activity were  $1 \times 10^3$  AU/mL and  $1 \times 10^5$  AU/mL of eIFN- $\gamma$  expressed from *E. coli* and baculovirus, respectively. The antiviral activities of the recombinant eIFN- $\gamma$  were highly efficient and specific, as it was blocked by mAbs against eIFN- $\gamma$ .

**Keywords:** equine IFN- $\gamma$ , antiviral assay, monoclonal antibody

**Received:** August 23, 2007; **Accepted:** September 28, 2007

**Supported by:** the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10A203) and the key Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. ZJN-0602-01).

**Corresponding author:** Donglai Wu. Tel: +86-431-85935088; E-mail: dlwu@hvri.ac.cn

国家高科技发展计划(863)项目(No. 2006AA10A203); 黑龙江省自然科学基金重点项目(No. ZJN-0602-01)资助。

干扰素(Interferon, IFN)是一族具有抗病毒, 影响细胞生长、分化和调节免疫功能等活性的蛋白质, 是发现最早、研究最多、第一个克隆化、第一个用于临床治疗疾病的细胞因子<sup>[1,2]</sup>。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 $\alpha$ 、 $\beta$ 两个亚型, 分别由淋巴细胞和成纤维细胞产生, 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 细胞, 促进 MHC I 类分子提呈抗原。II 型 IFN 为 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ ), 主要由 T 细胞和 NK 细胞产生<sup>[3]</sup>, 与 I 型 IFN 相比有多种免疫学活性, 具有促进 MHC I 和 II 类抗原表达、增强 APC 细胞与 T 细胞的相互作用、增强辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞的产生等诸多免疫调节活性, 既可以单独作为生物制剂应用于疾病的防治, 也可作为免疫佐剂增强疫苗的免疫效果<sup>[4]</sup>。

由于 IFN- $\gamma$ 在免疫反应中的重要作用, 近些年来多种畜禽 IFN- $\gamma$ 基因被克隆、测序并在原核和真核表达系统中表达及测定其生物学活性<sup>[5,6]</sup>。马 IFN- $\gamma$ 全基因编码 166 个氨基酸(aa), 其中包括 20 aa 的信号肽, 信号肽切除后, 产生 146 aa 的 IFN- $\gamma$ 单体, 有两个糖基化位点, 天然活性状态的 IFN- $\gamma$ 是由两个 IFN- $\gamma$ 单体经非共价交联形成的二聚体糖蛋白<sup>[7]</sup>。自从 IFN 被发现具有抗病毒、抗增殖、免疫刺激等生物活性以来, IFN 的抗病毒活性定量分析的研究就从未间断过。历史上, 抗病毒分析方法是第一个建立起来的检测干扰素样品相对活性或效能的生物学方法<sup>[8]</sup>。

本研究利用表达绿色荧光蛋白(GFP)的重组水泡性口炎病毒(VSV\*GFP)作为指示病毒对大肠杆菌和杆状病毒表达的重组马 IFN- $\gamma$ 进行抗病毒活性测定, 并测定了抗重组马 IFN- $\gamma$ 单克隆抗体抑制重组马 IFN- $\gamma$ 的抗病毒活性作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

重组马 IFN- $\gamma$ 、抗重组马 IFN- $\gamma$ 单抗和主要试剂马 IFN- $\gamma$ 单克隆抗体和抗重组马白细胞介素-18(IL-18)单克隆抗体、大肠杆菌表达的重组马 IFN- $\gamma$ (his-eIFN- $\gamma$ )和杆状病毒表达的重组马 IFN- $\gamma$ (HyeIFN- $\gamma$ )均由本实验室制备; 培养基 DMEM 购于 GIBCOBRL 公司(USA); 胎牛血清购于 PAA 公司(Austria)。VSV\*GFP 和 MDBK 细胞由哈尔滨兽医

研究所步志高研究员提供; 马胎肾细胞(EFK-78)由本研究室保存。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 大肠杆菌和杆状病毒表达的重组马 IFN- $\gamma$ 抗病毒活性的测定

基于 VSV\*GFP 的检测方法参考文献[9], 具体步骤如下: 待 EFK-78 细胞于 25 cm<sup>2</sup>底面积的细胞瓶中生长至密度为 100%, 胰酶消化后重悬于 20 mL 含 8% FBS 的 DMEM 培养液(即 1:4 比例传代), 以每孔 200  $\mu$ L 细胞悬液加于 96 孔细胞培养板放入 37°C 5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h, 待细胞长至密度为 90%, 弃去细胞培养液; 用含 8% FBS 的 DMEM 培养液将重组马 IFN- $\gamma$ 稀释为 1:10、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>、1:10<sup>6</sup>, 加入到 96 孔细胞板中 37°C 5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h, 同时设有空白孔(Blank control, BC)和病毒对照孔(Virus control, VC); 弃去细胞培养液, 用含 2% FBS 的 DMEM 培养液稀释 VSV\*GFP, 除 BC 孔以外每孔加入病毒稀释液 100  $\mu$ L(30 000 PFU); 细胞于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 孵育 16~24 h, 待 VC 孔的 CPE 约为 100%时, 荧光倒置显微镜下观察 GFP 表达; 判定: 以 VC 孔为参照, 以表达绿色荧光减少为 VC 孔 50%的最高稀释度为一个抗病毒活性单位(Antiviral unit, AU)。

#### 1.2.2 抗重组马 IFN- $\gamma$ 单克隆抗体抑制重组马 IFN- $\gamma$ 抗病毒活性作用的鉴定

取 100 AU 的 HyeIFN- $\gamma$ 分别与 1:10、1:100、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16 000 不同稀释度的 9 株抗重组马 IFN- $\gamma$ 单克隆抗体 37°C 作用 1 h, 同时设非抗重组马 IFN- $\gamma$ 单克隆抗体(抗重组马 IL-18 单抗)与 100 AU 的 HyeIFN- $\gamma$ 作用组作为对照, 将混合液体作用 EFK-78 细胞 37°C 5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h, 弃去细胞培养液, 用含 2% FBS 的 DMEM 培养液稀释 VSV\*GFP 每孔加入病毒稀释液 100  $\mu$ L(30 000 PFU); 细胞于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 孵育 16~24 h, 待 VC 孔的 CPE 约为 100%时, 倒置荧光显微镜下观察 GFP 表达水平来判定单克隆抗体是否具有抑制干扰素抗病毒活性的能力。

## 2 结 果

### 2.1 大肠杆菌和杆状病毒表达重组马 IFN- $\gamma$ 抗病毒活性的测定

利用 VSV\*GFP-EFK 细胞系统测定重组马 IFN- $\gamma$ 抗病毒活性, 以不同浓度的重组马 IFN- $\gamma$ 作用

EFK 细胞后, 感染 VSV\*GFP, 待 VC 孔的 CPE 约为 100% 时荧光显微镜观察。结果显示: 未加重组马 IFN- $\gamma$  的 VC 孔出现大量荧光(图 1L), 10 和 100 倍稀释的 HyeIFN- $\gamma$  可完全抑制 VSV\*GFP 的复制(图 1A, 1B),  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$  倍稀释的 HyeIFN- $\gamma$  可部分抑制 VSV\*GFP 的复制(图 1C, 1D, 1E, 1F),  $1 \times 10^5$  倍 HyeIFN- $\gamma$  稀释孔的荧光亮度约为对照组的一半(图 1E), 测得重组 HyeIFN- $\gamma$  活性为  $1 \times 10^5$  AU/mL。  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^4$  倍稀释的 his-eIFN- $\gamma$  可部分抑制 VSV\*GFP 的复制(图 1H, 1I, 1J, 1K),  $1 \times 10^3$  倍

his-eIFN- $\gamma$  稀释孔的荧光亮度约为对照组的一半(图 1J), 测得重组 his-eIFN- $\gamma$  活性为  $1 \times 10^3$  AU/mL。

## 2.2 抗重组马 IFN- $\gamma$ 单抗抑制重组马 IFN- $\gamma$ 抗病毒活性的鉴定

单抗抑制重组马 IFN- $\gamma$  抗病毒活性结果表明: HyeIFN- $\gamma$  的抗病毒活性可以有效的被单抗 SB10 所抑制, 完全阻断 100 AU HyeIFN- $\gamma$  对 VSV\*GFP 复制抑制作用的有效稀释倍数为 4000, 而另外八株抗重组马 IFN- $\gamma$  单抗及抗重组马 IL-18 单抗则不能阻断 HyeIFN- $\gamma$  的抗病毒活性(见图 2)。

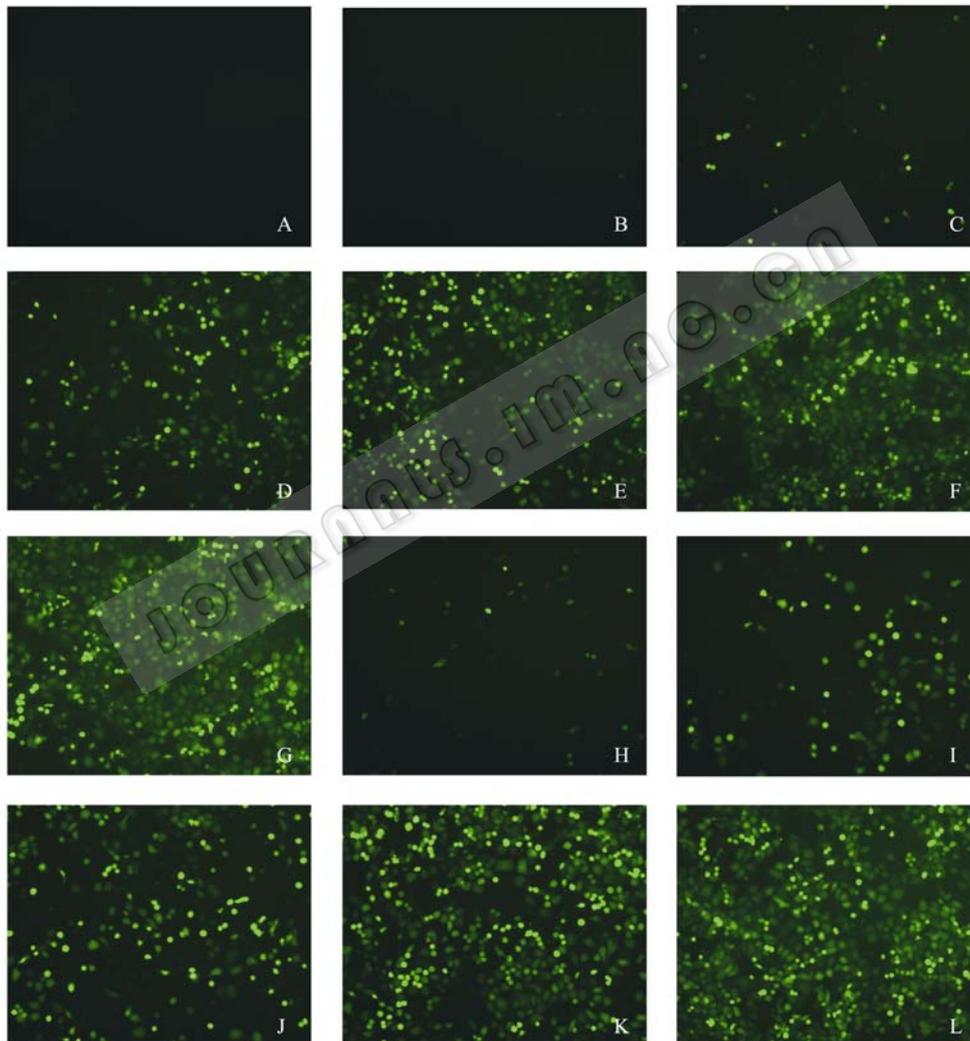


图 1 利用 VSV\*GFP-EFK 系统测定两种重组马 IFN- $\gamma$  抗病毒活性

Fig. 1 Inhibition of VSV\*GFP in EFK cell by recombinant eIFN- $\gamma$

A: HyeIFN- $\gamma$  10 dilution; B: HyeIFN- $\gamma$   $10^2$  dilution; C: HyeIFN- $\gamma$   $10^3$  dilution; D: HyeIFN- $\gamma$   $10^4$  dilution; E: HyeIFN- $\gamma$   $10^5$  dilution; F: HyeIFN- $\gamma$   $10^6$  dilution; G: HyeIFN- $\gamma$   $10^7$  dilution; H: his-eIFN- $\gamma$  10 dilution; I: his-eIFN- $\gamma$   $10^2$  dilution; J: his-eIFN- $\gamma$   $10^3$  dilution; K: his-eIFN- $\gamma$   $10^4$  dilution; L: virus control

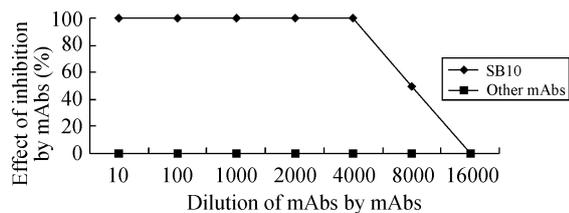


图2 单克隆抗体抑制 HyeIFN- $\gamma$  抗病毒活性曲线  
Fig. 2 Curves of inhibited antiviral activity by mAbs

### 3 讨论

相对于 I 型干扰素生物学活性的作用模式, IFN- $\gamma$  具有严格的种属特异性<sup>[10]</sup>。本研究中还发现重组马 IFN- $\gamma$  在异源的牛 MDBK 细胞上的抗病毒活性要低于其在 EFK-78 细胞上抗病毒活性两个数量级(数据未显示), 结果与 Sabine Gutmann<sup>[11]</sup> 报道相一致。

IFN- $\gamma$  具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等生物学活性, 人 IFN- $\gamma$  在临床疾病的防治中早有应用, 动物 IFN- $\gamma$  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。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, 而且产量低、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- $\gamma$ 。自从 1994 年马 IFN- $\gamma$  基因克隆及测序工作完成后, 该基因已经成功地在几种表达系统中表达并且重组蛋白的生物学活性得到鉴定, 但是具有抗病毒活性且带有纯化标签的重组马 IFN- $\gamma$  至今未见报道, 而且原核表达的重组马 IFN- $\gamma$  均报道为无抗病毒活性<sup>[12,13]</sup>。本研究对原核和真核表达的重组马 IFN- $\gamma$  进行抗病毒活性检测, 首次获得具有抗病毒活性的原核表达的重组马 IFN- $\gamma$ , 而且该表达系统表达的重组蛋白带有六个组氨酸标签, 使得纯化程序简便易行, 可为今后马病临床治疗及基础免疫学研究奠定物质基础。

由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所研制的马传染性贫血病疫苗对世界范围内控制马传贫起到了重要作用。然而, 由于缺乏有效的特异性细胞免疫学研究手段, 对马传染性贫血病减毒疫苗免疫机制的研究还处于临床免疫阶段, 至今尚未对该疫苗诱导的细胞免疫反应特性进行深入系统的研究, 形成较为完整的动物疫苗免疫学理论。近期的研究表明,

马传染性贫血病弱毒疫苗可诱导马外周血单核细胞中 IFN- $\gamma$  基因高效转录其转录水平与弱毒疫苗的免疫保护密切相关<sup>[14]</sup>。而本研究中鉴定的具有抑制马 IFN- $\gamma$  抗病毒活性作用的单抗, 可应用于体内外马 IFN- $\gamma$  生物学活性测定系统中, 尤其在研究马传染性疾病中马 IFN- $\gamma$  诱导的免疫反应和保护反应形成中所起的作用。

通常利用细胞病变抑制法测定 IFN 抗病毒活性, 通过噬斑数量确定其活性单位。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, 即可确定其感染和复制情况, 基于 VSV\*GFP 的 AVA 分析方法, 实质上是把 IFN 对病毒复制抑制的检测转变成检测 GFP 表达的抑制。因此, 使用 VSV\*GFP 作为指示病毒, 在 EFK 细胞上测定重组马 IFN- $\gamma$  抗病毒活性时, 采用测定荧光强度代替传统的噬斑数量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<sup>[9]</sup>。

### REFERENCES

- [1] Billiau A. Interferon: the path ways of discovery. I. Molecular and cellular aspects. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2006, **17**: 381-409.
- [2] Sun WM, Wang HQ. Cytokine research technology, 1<sup>st</sup>ed. Beijing: People Public Health Press, 1999.  
孙卫民, 王惠琴. 细胞因子研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [3] Williams JG, Jurkovich GJ, Maier RV. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine. *Journal of Surgical Research*, 1993, **54**(1): 79-93.
- [4] Hughes HP. Cytokine adjuvants: lessons from the past-guidelines of the future? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1998, **63**: 131-138.
- [5] Wu WX, Xia C, Wang M, et al. Molecular cloning of swine interferon gamma cDNA and its expression in *E. coli*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2002, **10**(3): 255-258.  
吴文学, 夏春, 汪明, 等. 猪 $\gamma$ 干扰素 cDNA 的分子克隆与在大肠杆菌中的表达. 农业生物技术学报, 2002, **10**(3): 255-258.
- [6] Qin LT, Wang XJ, Zhao L, et al. Expression of chicken gamma-interferon in recombinant baculovirus and determination of its antiviral activity. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2007, **29**(3): 212-216.  
秦立廷, 王喜军, 赵莉, 等. 鸡 $\gamma$ -干扰素在重组杆状病

- 毒中的表达及抗病毒活性的测定. 中国预防兽医学报, 2007, **29**(3): 212-216.
- [7] Curran JA, Argyle DJ, Cox P, *et al.* Nucleotide sequence of the equine interferon gamma cDNA. *The Journal of Sequencing and Mapping*, 1994, **4**: 405-407.
- [8] Meager A. Biological assays for interferons. *Journal of Immunological Methods*, 2002, **261**(1-2): 21-36.
- [9] Meager A. Assays for antiviral activity. *Methods in Molecular Biology*, 2004, **249**: 121-134.
- [10] Yalma T, McGuire TC, Perryman LE. Preliminary characterization of equine interferons and their antiviral activities on bovine, ovine, and human cells. *Journal of Interferon Research*, 1982, **2**: 363-370.
- [11] Gutmann S, Zawatzky R, Muller M. Characterisation and quantification of equine interferon gamma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005, **104**: 105-115.
- [12] Steinbach F, Mauel S, Beier I. Recombinant equine interferons: expression cloning and biological activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2002, **84**: 83-95.
- [13] Wu DL, Murakami K, Liu NH, *et al.* Expression of biologically active recombinant equine Interferon- $\gamma$  by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae. *Cytokine*, 2002, **20**: 63-69.
- [14] Wang Y, Zhang XY, Wei LL, *et al.* Elevation of IFN- $\gamma$  transcription level in peripheral blood mononuclear cells of EIAV vaccinated horses. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2006, **22**(4): 436-439.  
王盈, 张晓燕, 魏丽丽, 等. EIAV 减毒疫苗免疫后马外周血单个核细胞中 IFN- $\gamma$  的转录. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, **22**(4): 436-439.

### 中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中科院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 具有北京市工商行政管理局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学、菌物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)、Abstracts of Mycology (美国“菌物学文摘”)、Index of Fungi (英国“菌物索引”)、Review of Plant Pathology (英国“植物病理学文摘”)、Bibliography of Systematic Mycology (英国“系统菌物学文献目录”)、Bibliographie der Pflanzenschutz literature(德国“植物保护文献目录”)、《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜、)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如果您有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请通过新地址汇款(收款单位: 中国科学院微生物研究所, 开户银行: 中国工商银行北京分行海淀镇支行, 帐号: 0200004509089117425)。

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521 电子信箱: gg@im.ac.cn 联系人: 武文 王闵

网址: <http://journals.im.ac.cn>