

T 细胞 IFN- γ 表达水平检测方法的建立及其在马传染性贫血疫苗免疫机理研究中的应用

林跃智^{1,2}, 邓喜林^{1,2}, 沈楠¹, 赵立平¹, 孟庆来³, 马建¹, 王君伟², 邵一鸣³, 周建华^{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 东北农业大学病毒免疫室, 哈尔滨 150030)

(³ 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心, 北京 100050)

摘要: 【目的】马传染性贫血病毒 (EIAV) 弱毒疫苗致弱机制和免疫保护机理的研究可以为慢病毒疫苗的研究提供重要的模型。为探讨 IFN- γ 表达水平与疫苗保护性免疫的关系, 本研究旨在建立一种准确、有效地检测 EIAV 感染马不同 T 细胞亚型表达 IFN- γ 水平的方法。【方法】我们将分离的马传弱毒疫苗免疫马 (FDDV)、强毒感染马 (LV) 和健康马的外周血单核细胞 (PBMC), 体外分别经病毒 (FDDV) 和 PMA/Inomycin 激活、BFA 阻断蛋白分泌、荧光标记马的特异性表面抗体和 IFN- γ 抗体等过程后, 进行流式检测。【结果】疫苗免疫马产生的特异性 IFN- γ 水平为 CD4⁺1.7±0.9%/CD8⁺6.1±1.2%, 而强毒组则为 CD4⁺0.6±0.1%/CD8⁺2.4±0.9%。【结论】本研究建立的多荧光参数流式细胞术同时检测细胞内 IFN- γ 染色和淋巴细胞亚型的方法, 具有良好的特异性, 稳定性和重复性。为研究 EIAV 弱毒疫苗免疫保护机制奠定了基础。

关键词: IFN- γ ; 马传染性贫血病毒; 流式细胞法

中图分类号: S852.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 06-0800-06

IFN- γ 通常是由识别特异性抗原的效应 CD8⁺T 细胞产生, 也可由 CD4⁺T 细胞和 NK 细胞分泌, 具有抗病毒, 免疫调节和抗细胞异常增殖的作用^[1]。大量研究表明 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 等细胞因子与细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 活性相关, 可以作为细胞杀伤功能评价的间接指标^[2]。因此, 通过检测分泌这些细胞因子的抗原特异性 T 细胞, 可以在一定程度上取代 CTL 活性评价, 成为衡量 T 淋巴细胞免疫功能的重要指标, 并且已在 HIV, SHIV 等多种病毒疫苗免疫评价中广泛应用^[3,4]。然而, 由于缺乏有效的检测试剂和方法, 马 IFN- γ 的细胞特异性表达以及与病毒感染状态关系等研究受到阻滞。有研究发现牛的 IFN- γ 特异性多克隆抗体与马 IFN- γ 存在交叉反应,

可以有效检测到马 IFN- γ 的表达, 已在马疱疹病毒 (EHV-1) 的研究中应用^[5,6]。马传染性贫血病毒 (EIAV) 弱毒疫苗作为唯一大规模应用的慢病毒疫苗, 对其免疫保护机理的研究一直受到关注。细胞免疫在控制病毒复制, 延缓疾病进程的作用已得到证实。然而, 检测方法的缺乏使对马传弱免疫机理的研究仍停留在结合抗体和中和抗体的评价上, 不能全面分析弱毒疫苗诱导免疫反应的强度和类型。因此, 在已有的研究基础上, 我们对 EIAV 疫苗免疫马 IFN- γ 的检测方法进行了探索, 建立了应用细胞内累积细胞因子染色和多种荧光参数的流式细胞法, 以检测 EIAV 强毒株及疫苗株接种马的 IFN- γ 的表达状态, 并可同时对表达 IFN- γ 的 T 细胞亚型进行分类, 以便更准确, 全

基金项目: 黑龙江省发展高新技术产业专项资金项目(FW05B007); 哈尔滨市科技攻关计划项目(2006AA3AS040); 中国农业科学院一级岗位人才基金

*通讯作者。Tel: +86-451-85935040; Fax: +86-451-85935024; E-mail: jianhua_uc@yahoo.com

作者简介: 林跃智(1978-), 女, 黑龙江省望奎人, 博士研究生, 从事病毒分子生物学与免疫学研究。E-mail: sndhr@163.com

收稿日期: 2007-11-26; 修回日期: 2008-02-16

面地分析不同 T 细胞亚型表达 IFN- γ 的水平与免疫保护的相关性。在确定该方法可靠性之后, 我们已经将该方法应用于 EIAV 减毒疫苗免疫机理的研究中。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒种及刺激原: EIAV 疫苗株 FDDV, EIAV 强毒株 LV 均由本实验室保存。经密度梯度离心纯化 FDDV。EIAV 的 p26 和 p15 蛋白由本实验室原核表达纯化。含有 EIAV 核心蛋白基因 (*gag*) 的重组痘苗病毒由中国疾病预防控制中心性病艾滋病中心提供。*gag* 保守区短肽序列: KTWVAIAAVKMGLQIN-TVNGAK; STFSILKAKFERKTANTTKKQS; MGLQ-INTVNGAKSTFSILKAKFER; GPKEPYPEFVDRLLS-QIKSEGHPADITKFLTD 由西安美联公司合成。

1.1.2 实验动物: 本次实验所用马匹购自通辽, 雄性, 2~3 岁, 试验前经两次琼扩检测均为 EIAV 阴性。马匹随机分为 EIAV 强毒株 (LV)、疫苗株 (FDDV) 和健康对照 3 个组。强毒株和疫苗株分别经颈部皮下接种到试验马体内。

1.1.3 主要试剂和仪器: 人白细胞介素 IL-2 购自 Roche 公司, 马血清、细胞培养制剂 1640 购自北京原平浩生物技术公司, 其余试剂均为国产分析纯。马 CD4 和 CD8 表面抗体购自 VMRD 公司, goat anti-mouse IgG1 和 mouse anti-canine IFN- γ polyclonal antibody 购自 Serotec 公司, PMA、Ionomycin、Saponin 和 BFA 等检测试剂均购自 Sigma 公司。CO₂ 恒温培养箱 (HEAL-FORCE HF90, 上海医用仪表厂), 台式离心机 (Eppendorf 5810R), 流式细胞仪 (Beckman, FC500)。

1.2 马外周血单核细胞 (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 的制备

采集马肝素抗凝全血 20 mL, 2000 \times g 离心 15min, 吸取白细胞富集层与 2 倍体积的 PBS (pH 7.1) 混匀, 将 PBS-细胞混合液缓慢加入等量的淋巴细胞分离液中, 500 \times g 离心 10 min。吸取中间的白细胞富集层, 加入等体积的 PBS, 300 \times g 离心 10 min。重悬细胞沉淀, PBS 洗 3 次。用含有 20 U/mL IL-2 的 1640 完全培养液 (10% 马血清, 100 U/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素, 1% 谷胺酰氨, 1% HEPES, pH 7.1) 重悬细胞, 计数备用。

1.3 胞内染色

分离的 PBMC 按照 3×10^5 cell/孔加入到 96 孔板中, 每个样品共设 3 个病毒刺激孔 (5×10^7 pfu EIAV),

37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养 24 h 后加入 BFA 阻断剂 (10 μ g/mL), 继续培养 5 小时。同时设立 PMA (25 μ g/mL) 和 Ionomycin (1 μ M) 阳性对照孔。孵育后, 将刺激的细胞 300 \times g 离心 10 min, 用 PBS (含 1% FBS) 清洗 2 次并重悬。将每孔细胞平均分为 2 份, 分别加入鼠抗马 CD4 和 CD8 单克隆抗体 (1 μ L/孔) 室温孵育 30 min。PBS (含 1% FBS) 清洗 2 次后加入 APC 标记抗鼠 IgG 的荧光二抗。室温孵育 30 min, PBS (含 1% FBS) 清洗 2 次后重悬。每孔加入 100 μ L 多聚甲醛 (2%) 室温固定 10 min, 也可 4 过夜。用含 1% 皂素的 PBS (50 μ L/孔) 进行细胞膜穿孔, 以允许抗体的进入。按照 1 μ L/孔的剂量加入抗体 CC302 (mouse anti-canine IFN- γ polyclonal antibody)。室温孵育 30 min 后, 用 PBS (含 1% FBS) 将未结合的抗体洗去。重悬细胞, 进行流式分析。

1.4 流式检测及分析

使用 Beckman FC500 流式细胞仪, 每个样品分析 10000 个细胞。获取的数据经 Cell Quest 软件分析。首先通过前散射 (FS) 和侧散射 (SS), 在二维散点图中划出淋巴细胞区。然后通过 Filter 1 (494nm) 和 Filter 4 (650 nm) 进行光波收集。

2 结果

2.1 有效刺激原的选择

有效的刺激原在体外能够被致敏 T 细胞捕获、加工和提呈, 刺激细胞产生效应功能。在本次试验中, 我们分别选取了 *gag* 基因原核表达产物 p15 (20 μ g/mL) 和 p26 (20 μ g/mL)、表达 *gag* 的重组痘苗病毒 (RVV)、4 种位于 *gag* 保守区的短肽 (20 μ g/mL) 以及纯化的

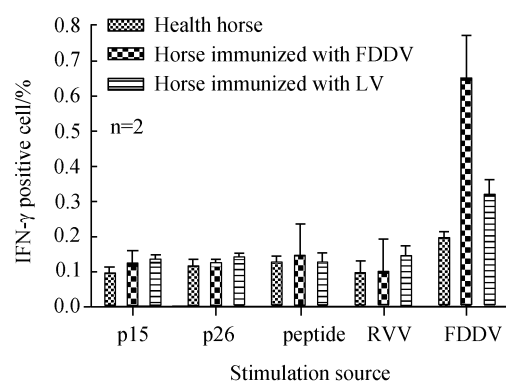


图 1 不同刺激原诱导的 IFN- γ 表达阳性 PBMC 细胞百分比

Fig. 1 Comparison of IFN- γ -inducing efficiencies on PBMC of different stimulators, including recombinant EIAV p15 and p26 proteins, peptide mixture (EIAV *gag* region), recombinant viral vector (containing EIAV *gag*) and EIAV vaccine strain FDDV.

FDDV 完整病毒(5×10^7 pfu)作为体外刺激物。结果表明:强毒株、疫苗株和对照组的 PBMC 都检测到 IFN- γ 的表达,但只有纯化的 FDDV 能够有效的刺激 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞表达病毒特异性的 IFN- γ (n=2)(图 1)。

2.2 体外刺激时间的确定

适当的刺激时间是检测细胞因子的关键。因此,我们选择了不同时间点进行检测。结果发现,CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞存在应答的不一致性和刺激剂量的依赖性。结果显示(图 2),以 FDDV 为刺激原时,CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞体外刺激的最佳时间分别是 18 和 30 h。同时,我们也发现在一定抗原剂量范围内($1 \sim 7 \times 10^7$ pfu),刺激强度与 IFN- γ 表达水平存在正相关性。

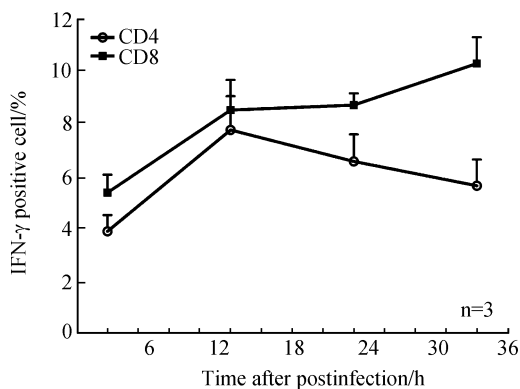


图 2 不同时间刺激后表达 IFN- γ 的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞数百分比

Fig. 2 Comparison of IFN- γ positive cells in CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes that were stimulated with FDDV for different times.

2.3 阻断时间的优化

BFA 具有阻止蛋白质从内质网向高尔基体转运的功能。细胞因子的检测则是通过 BFA 将分泌的细胞因子阻滞在胞内而实现的。但 BFA 与细胞长时间培养会产生一定的毒性。因此,我们对 BFA 的作用时间进行了优化。结果表明 BFA 可以有效的阻止 IFN- γ 的分泌。而对于马 IFN- γ 的检测,5 h 是最佳的阻断时间(图 3)。

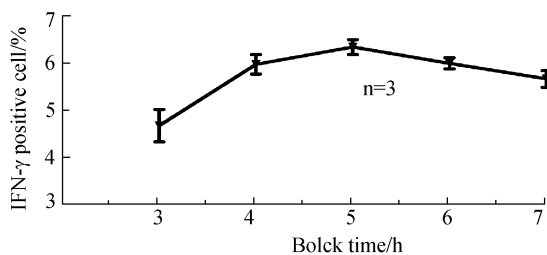


图 3 不同阻断时间表达 IFN- γ 的 PBMC 细胞数百分比
Fig. 3 Comparison of IFN- γ positive cells in CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes that were blocked with BFA for different times.

2.4 流式细胞术检测表达 IFN- γ 的 T 细胞比例和亚型

采用双染法对表达 IFN- γ 的不同 T 细胞比例和亚型进行检测。首先通过前散射和侧散射二维散点圈圈定 PBMC,然后再根据 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞标记抗体(APC)和 IFN- γ 标记抗体(FITC)进行 T 细胞亚型和 IFN- γ 阳性细胞群划分。图 4 为该方法的代表性检测结果。如图所示,(G1+G2)区为 CD4⁺/CD8⁺T 在 PBMC 中的比例,(G2+G4)区为表达 IFN- γ 的 PBMC 的总细胞数,G2 区则显示表达 IFN- γ 的 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例。因此,我们选用 G2/G1+G2 表示 CD4⁺/CD8⁺T 细胞中表达 IFN- γ 的 CD4⁺/CD8⁺T 细胞所占的比例。由图 4 可见,疫苗株免疫马诱导产生的 IFN- γ 表达阳性 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比例均明显高于强毒感染马和健康马。

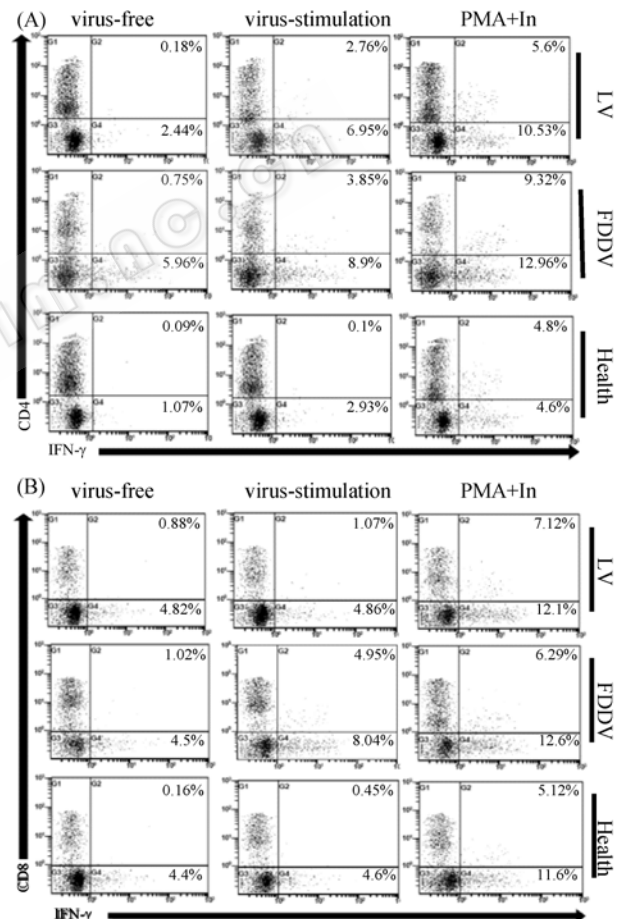


图 4 不同试验组马匹表达 IFN- γ 的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞比例和亚型检测

Fig. 4 Representative flow cytometry data showing IFN- γ positive populations in CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) lymphocytes. Cells were prepared from horses that inoculated with LV, FDDV or saline (health control), and were then stimulated with medium (virus-free), FDDV (virus-stimulated) or PMA+Ionomycin, respectively. Values in the G2 region of histograms denote the % of CD8⁺ lymphocytes that expressing IFN- γ .

2.5 不同病毒接种马抗原特异性 IFN- γ 的检测

在建立了流式细胞仪检测 IFN- γ 的双染色法之后, 我们采用该方法对疫苗免疫马(免疫 5 个月)、强毒感染马(急性发病期)和健康马进行了定点检测, 对该方法的应用进行了检测。图 5-A 显示了不同试验组马匹 CD4⁺T 细胞 EIAV 特异性 IFN- γ 的表达情况。结果表明: 表达 IFN- γ 的 PBMC 主要以 CD8⁺T 细胞为主。免疫马(3#, 4#)表达 IFN- γ 的 CD4⁺T 细胞比例(1.7±0.9%)明显高于强毒感染马(4#, 0.6±0.1%)和健康马(1#, 0.05±0.06%)。图 5-B 为不同各试验组马匹 CD8⁺T 细胞 EIAV 特异性 IFN- γ 的表达情况, 也呈现与图 5-A 相似的 IFN- γ 阳性细胞比例(免疫马 vs 强毒马: 6.1±1.2% vs 2.4±0.9%)。结果明确显示, 所建立的能同时检测 IFN- γ 的表达状态和 T 细胞亚型的双染色流式细胞仪法具有良好的重复性和特异性。

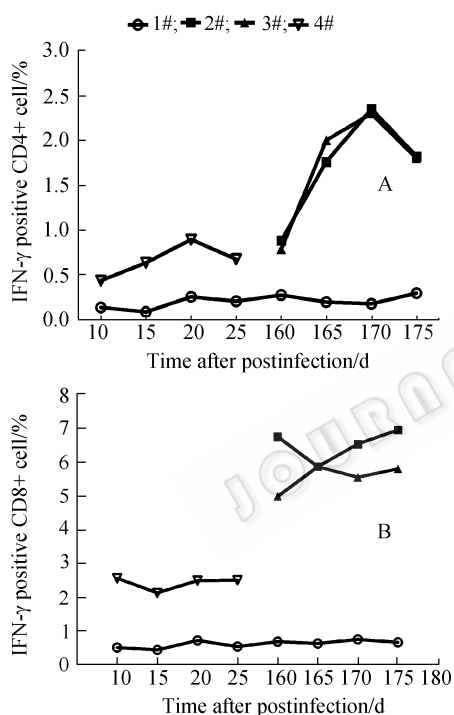


图 5 不同试验组 CD4⁺T(A)和 CD8⁺T(B)细胞表达 IFN- γ 的比较

Fig. 5 Comparison the level of IFN- γ production by CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes following stimulation PBMC form horses immunized with LV (2#), FDDV (3#, 4#) and health (1#).

3 讨论

CTL 活性测定曾是评价特异性细胞免疫水平的经典方法, 包括 Cr51 释放法以及使用荧光素的 PKH-26/CFSE^[7]和 EuTDA 法^[8]。但这些方法费时, 需要大量效应细胞和靶细胞的长期培养, 而且 Cr51

还存在辐射危害^[9]。目前, 对人细胞免疫的研究已经存在多种替代方法。其中检测细胞因子, 特别是对 IFN- γ 的检测可以用来评价抗原特异性的细胞免疫水平^[10]。IFN- γ 是由 T 细胞和 NK 细胞分泌产生的 I 型干扰素, 是免疫系统中一种重要的调节因子。可刺激被病毒致敏的细胞表达 MHC- I 类分子, 增强 CTL 的活性, 还能引起多种细胞表达 MHC- I 类分子, 并可通过促进 MHC- I 类分子限制的 CD4⁺ Th 细胞, 活化和放大免疫应答的识别期。IFN- γ 还是主要的单核细胞活化因子, 可增强 NK 细胞溶解病毒或感染细胞的功能。因此, IFN- γ 是介导 Th1 型应答, 包括 CTLs 应答过程中非常重要的免疫调节因子, 协助 CTL 清除感染细胞, 阻止疾病的进展^[11]。目前的研究已经确定 IFN- γ 的表达与 CTLs 杀伤活性具有明确的相关性, CD8⁺T 细胞表达和分泌 IFN- γ 的水平可以代表 CTLs 的杀伤能力^[12]。但应注意, 细胞因子染色法检测 IFN- γ 的合成是评价大量的病毒特异性淋巴细胞, 包括那些克隆扩增后走向凋亡的细胞, 而 CTL 所检测的只是一小群在体内仍保持生存能力的抗原特异性 CD8⁺T 细胞。因此, IFN- γ 法的检测下限要高于 CTL, 也就克服了由于初始效应 CTL 激活而诱导细胞凋亡以致检测不到 CTL 活性的情况^[13]。另外, 胞内染色法与 ELISPOT 法检测 IFN- γ 水平具有很好的相关性^[14], 而流式细胞术具有多色荧光染色的优势, 可以对不同的细胞亚型进行同步分析。

本研究成功建立了一种评价马 T 细胞功能的检测方法, 具有良好的精确性。不但可以检测马 IFN- γ 的表达, 还可以从不同 T 细胞亚型上进行分析, 为免疫保护机理的研究提供更多信息。我们通过 PMA 非特异刺激活化 T 细胞, 有效地检测到马 IFN- γ 的表达并确定了抗体 CC302 的有效性。在 EIAV 特异性检测中, 我们采用纯化的 FDDV 感染 PBMC 中单核细胞的方法。在培养过程中, 病毒在单核细胞内不断表达并提呈有效的抗原给效应细胞。与其他刺激原相比, 全病毒由于包含多种抗原表位, 可以被广泛的提呈, 激活更多的效应细胞。更为重要的是, 不同的抗原诱导产生 IFN- γ 的能力上存在差异。HIV-1 的研究中发现, *gag* 和 *nef* 基因产物在诱导 IFN- γ 能力上具有拮抗作用^[15]。也有研究表明 HIV-1 感染者针对不同抗原所表达的 IFN- γ 在疾病的不同时期具有不一致性^[16]。在本次试验中我们也比较了多种刺激原的诱导能力。

结果表明 EIAV 全病毒刺激导致较高的胞内 IFN- γ 合成。通过多种条件的优化,我们确定了检测马传贫病毒特异性 IFN- γ 的条件。应用该方法对马传贫强毒感染马,疫苗免疫马和健康马 IFN- γ 的表达情况进行了检测。结果表明:3 组动物 PBMC 中 IFN- γ 的表达都是以 CD8⁺ T 为主,而疫苗免疫马表达 IFN- γ 水平明显高于强毒感染马和健康马。我们的其他研究提示,EIAV 疫苗株免疫马除了明显诱导 CD8⁺T 细胞表达 IFN- γ 外,还增强 CD4⁺T 淋巴细胞介导的免疫反应。EIAV 疫苗株的这种对 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞特异性活性诱导是否与疫苗株的保护性相关,有待进一步证实。综上所述,本次研究所建立的方法为马传贫疫苗免疫机理的研究建立了基础。

参 考 文 献

- [1] Connolly NC, Riddler SA, Rinaldo CR. Proinflammatory cytokines in HIV disease—a review and rationale for new therapeutic approaches. *AIDS Rev*, 2005, 7(3): 168–180.
- [2] Maecker HT, Maino VC, Picker LJ. Immunofluorescence analysis of T-cell responses in health and disease. *J Clin Immunol*, 2000, 20(6): 391–399.
- [3] Amara RR, Ibegbu C, Villinger F, *et al.* Studies using a viral challenge and CD8 T cell depletions on the roles of cellular and humoral immunity in the control of an SHIV-89.6P challenge in DNA/MVA-vaccinated macaques. *Virology*, 2005, 343(2): 246–255.
- [4] Cao J, McNevin J, Holte S, *et al.* Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon-secreting CD8⁺ T cells in primary HIV-1 infection. *J Virol*, 2003, 77(12): 6867–6878.
- [5] Paillot R, Daly JM, Juillard V, *et al.* Equine interferon gamma synthesis in lymphocytes after in vivo infection and in vitro stimulation with EHV-1. *Vaccine*, 2005, 23(36): 4541–4551.
- [6] Breathnach CC, Soboll G, Suresh M, *et al.* Equine herpesvirus-1 infection induces IFN-gamma production by equine T lymphocyte subsets. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 103(3-4): 207–215.
- [7] Hemmrich K, Meersch M, von Heimburg D, *et al.* Applicability of the dyes CFSE, CM-DiI and PKH26 for tracking of human preadipocytes to evaluate adipose tissue engineering. *Cells Tissues Organs*, 2006, 184(3-4): 117–127.
- [8] Arthur C, Flaig T, Su LJ, *et al.* The effect of ultrasonic irradiation on doxorubicin-induced cytotoxicity in three human bladder cancer cell lines. *Ultrasonics*, 2007, 46(1): 68–73.
- [9] Burchiel SW, Kerkvliet NL, Gerberick GF, *et al.* Assessment of immunotoxicity by multiparameter flow cytometry. *Fundam Appl Toxicol*, 1997, 38(1): 38–54.
- [10] Sun Y, Iglesias E, Samri A, *et al.* A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J Immunol Methods*, 2003, 272(1-2): 23–34.
- [11] Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 65–91.
- [12] Scheibenbogen C, Romero P, Rivoltini L, *et al.* Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN-gamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *J Immunol Methods*, 2000, 244(1-2): 81–89.
- [13] McMichael AJ, O'Callaghan CA. A new look at T cells. *J Exp Med*, 1998, 187(9): 1367–1371.
- [14] Karlsson AC, Martin JN, Younger SR, *et al.* Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *J Immunol Methods*, 2003, 283(1-2): 141–153.
- [15] Novitsky VA, Gilbert PB, Shea K, *et al.* Interactive association of proviral load and IFN-gamma-secreting T cell responses in HIV-1C infection. *Virology*, 2006, 349(1): 142–155.
- [16] Chouquet C, Autran B, Gomard E, *et al.* Correlation between breadth of memory HIV-specific cytotoxic T cells, viral load and disease progression in HIV infection. *Aids*, 2002, 16(18): 2399–2407.

A flow cytometric assay for the expression of interferon gamma in T lymphocytes and its application in the study of EIAV-induced immune response

Yuezhi Lin^{1,2}, Xilin Deng^{1,2}, Nan Shen¹, Liping Zhao¹, Qinglai Meng³,
Jian Ma¹, Junwei Wang², Yiming Shao³, Jianhua Zhou^{1*}

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

(²Northeast Agricultural University, Harbin 150001, China)

(³National Center for AIDS Control and Prevention, Beijing 100050, China)

Abstract: [Objective] The attenuated vaccine of equine infectious anemia virus (EIAV) is the first lentiviral vaccine that provides solid protection against the infection of EIAV virulent strains. Study of the immune response induced by EIAV vaccine is an important approach to understand the immunity to other lentiviruses. IFN- γ expressed by specifically stimulated lymphocytes is an important indicator for the evaluation of T cell-mediated immunity. A flow cytometry based assay was established in this study to accurately and effectively detect IFN- γ expression in different subtypes of T lymphocytes in EIAV-infected horses. **[Methods]** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared from horses inoculated with EIAV vaccine strain FDDV (fetal donkey dermal-attenuated virus vaccine), virulent strain LV or saline (health control), were stimulated *in vitro* with FDDV or PMA + Inomycin. Brefeldin A was added into the cell culture to block protein secretions. Stimulated cells were then labeled with monoclonal antibodies specific for equine CD4 and CD8 surface markers, as well as an IFN- γ -specific monoclonal antibody. Flow cytometry was applied to detect CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes expressing IFN- γ . **[Results]** IFN- γ positive cell population isolated from FDDV-immunized horses was 1.7 \pm 0.9% in CD4⁺ T cells and 6.1 \pm 1.2% in CD8⁺ T cells (n=4). In contrast, only 0.6 \pm 0.1% of IFN- γ positive cells in CD4⁺ subset and 2.4 \pm 0.9% of IFN- γ positive cells in CD8⁺ subset of T cells were detected for PBMC isolated from LV-infected horses (n=4). **[Conclusion]** The multi-fluorescence cell flowmetry detecting both the IFN- γ expressing cells and subsets of T lymphocytes simultaneously, is specific, stable and reproducible in evaluating antigen-specific response of IFN- γ -producing lymphocytes. This is an essential approach to study the protective immunity induced by EIAV vaccine.

Keywords: INF- γ ; Equine Infectious Anemia Virus (EIAV); flow cytometry

Supported by the Heilongjiang Provincial Grant (FW05B007), the Harbin City Grant (2006AA3AS040) and the Grant for Outstanding Scientists from Chinese Academy of Agricultural Sciences

*Corresponding author. Tel: +86-451-85935040; Fax: +86-451-85935024; E-mail: jianhua_uc@yahoo.com

Received: 11 November 2007/ Revised: 16 February 2008

答 作 者 问

问: 我的文章现已审查完毕, 并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询, 如果文章修改后, 再次投递, 是否还需要交稿件受理费? 是否仍然用原论文编号提交?

答: 这要分 2 种情况, (1)如果你的文章已经被通知“退稿”了, 那么修改之后再投来的文章将按“新稿件”处理, 从程序上来讲和新投稿件是一样的, 仍需要缴纳稿件受理费。但是为便于稿件审理, 请作者在投稿时在文题的后面加上“原稿件号+修后再投”字样。(2)如果是编辑部在审稿意见中要求您修改后再经本刊“复审”, 则不作为新稿处理, 请作者直接将修改稿上传到远程系统中, 不再另交稿件受理费。