Archive of SID

مقاله پژوهشی

تولید و خالص سازی اینترفرون لوکوسیت گاوی مقاوم اسید

دکتر محسن ابوالحسنی [1]، دکتر کرن جکبسن [2]

چکیده

پیش زمینه و هدف : لوکوسیت خون محیطی گاو در اثر ویروس‌ها اینترفرون ترشح می‌کنند. این اینترفرون می‌تواند در عفونت‌های ویروسی گاوی مورد استفاده بالینی قرار گیرد. به‌همین دلیل برای خالص سازی و بازیافت بیشتر اینترفرون گاوی به‌روشی مناسب نیاز می‌باشد.

مواد و روش‌ها: اینترفرون‌لوکوسیت خون محیطی‌گاوکه در اثر تحریک با سندای ویروس تولید شده به‌کمک پتاسیم تیوسیانید در pH ۳/۵ رسوب داده شد و با کروماتوگرافی ستونی سفادکس ۱۰۰- ، همراه با اتیلن‌گلیکول خالص گردید. برای بازیافت و خلوص بیشتر اینترفرون از روش الکتروفورز (SDS-PAGE) استفاده شد.

یافته‌ها: استفاده از ۲۵٪ اتیلن‌گلیکول و یک مولار نمک طعام در بافر کروماتوگرافی ستونی باعث بازیافت بیش از ۹۳٪ فعالیت اینترفرون شد، در حالی‌که بدون افزایش اتیلن‌گلیکول فقط ۲۵٪ فعالیت اینترفرون حاصل شد. اینترفرون خالص شده توسط الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت و یک باند ۱۹کیلو دالتونی که فعالیت اینترفرون داشت به‌دست آمد.

بحث و نتیجه گیری : این روش برای تولید مقدار مناسب اینترفرون خالص طبیعی جهت تولید منوکلنال آنتی‌بادی در مطالعات بیولوژیکی مناسب می‌باشد.

گل واژگان : اینترفرون گاوی، اینترفرون مقاوم اسید، خالص کردن، ویروس سندای

مجلهٔ پزشکی ارومیه ، سال چهاردهم ، شمارهٔ چهارم ، ص ۲۸۵ - ۲۷۶ ، زمستان ۱۳۸۲

آدرس مکاتبه : تهران - انستیتو پاستور ایران ، گروه ایمونولوژی . E.Mail: Mabolhassani@yahoo.com

۱ - دانشیار گروه ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران

۲ - استاد گروه ایمونولوژی دانشگاه جورجیا ایالات متحده آمریکا

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

دانشمندان نشان داده‌اند که وقتی لوکوسیت گاو در معرض ویروس یا ریبونوکلوتید مصنوعی تحریک کننده اینترفرون قرار گیرد مقدار زیادی اینترفرون تولید می‌کند (۴ ، ۱). اینترفرون تولید شده، گاو را علیه چالش با ویروس همولوگوس و هترولوگوس محافظت می کند. فعالیت ضد ویروسی اینترفرون گاوی طبیعی و نوترکیب علیه ویروس‌های پاتوژنیک گاوی در آزمایشگاه نشان داده شده است (۳، ۱۴ ، ۱۰) . تاکنون مطالعات کلینیکی محدودی با اینترفرون گاوی نوترکیب صورت گرفته است (۱۷ ، ۱۵)، ولی به‌دلیل نیاز به تولید زیاد اینترفرون طبیعی، کاربرد آن محدود بوده است (۱۹ ، ۱۸) .

اینترفرون طبیعی لوکوسیت شامل مخلوطی از زیر گروه اینترفرون آلفا است، در حالی‌که اینترفرون نوترکیب شامل یک زیر گروه می‌باشد (۲۱ ، ۲۰). تفاوت فعالیت ضد ویروسی زیر گروه‌های اینترفرون تا ۲۰۰ برابر است (۲۲). پس از تزریق عضلانی، اینترفرون طبیعی در لوکوسیت‌ها بهتر از اینترفرون نوترکیب جذب می‌شود (۲۳) همچنین، پس از تزریق عضلانی میزان از بین رفتن زیر گروه‌های اینترفرون نوترکیب باهم تفاوت دارند (۲۴). مطالعات نشان داده است بیمارانی‌که اینترفرون نوترکیب دریافت می‌کنند آنتی‌بادی ضد اینترفرون در آن‌ها ایجاد می‌شود (۲۵) ولی این آنتی‌بادی فعالیت اینترفرون طبیعی خالص شده را خنثی نمی‌کند. اینترفرون طبیعی لوکوسیت به تریسین حساس و در pH = ۲ حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و حرارت‌های، ۲۰- و ۷۰- درجه سانتیگراد پایدار است (۲۶).

در این مقاله اینترفرون لوکوسیت‌گاوی در اثر تحریک ویروسی تولید و برای مطالعات بیولوژیکی و تهیه منوکلنال آنتی‌بادی خالص می‌شود.

مواد و روش

تولید اینتر فرون گاوی :

اینترفرون‌گاوی طبق روش جکبسون[1] و همکاران تولید شد(۲۶). به‌طور خلاصه، مقدار ۱۰-۲ لیتر خون از ورید گردن ۱۰-۶ گاو سالم گرفته شد و سلول‌های لایه سطحی[2] جمع‌آوری و لوکوسیت‌ها با شستن آمونیوم کلراید ۰/۸۳ درصد جداگردید. لوکوسیت‌ها در محیط ایگل[3] حاوی ۰/۴ درصد یا ۲ درصد سرم جنینی گاوی[4] و یا بدون آن در فلاسک‌های اسپینر[5] در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. لوکوسیت‌ها ($۱/۲ \times ۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر) ابتدا بوسیله ۶۰ واحد هماگلوتینه کننده در میلی‌لیتر سندای ویروس تحریک و پس از دو ساعت با ۲۴۰ واحد هماگلوتینه کننده دیگر ویروس تحریک شدند. پس از ۲۰ ساعت، محلول صاف شده حاوی اینترفرون گاوی جدا و ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰×g سانتریفوژ شد.

تست اینترفرون :

فعالیت ضد ویروسی اینترفرون به روش اثر سیتوپاتیک[6] تعیین شد(۱۹). در این روش از سلول کلیه گاوی[7] و ویروس وزیکولار استوماتایتیس[8] جهت چالش استفاده گردید. قبل از آزمایش محلول حاوی اینترفرون به‌مدت ۲ ساعت در حرارت ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد (۱۷۵۰۰×g) تا ویروس تحریک کننده خارج شود(۱۹).

غلیظ کردن محلول ناخالص اینترفرون :

محلول صاف شده حاوی اینترفرون به کمک پتاسیم تیوسولفات، طبق روش برگ و هرون[9] (۲۷) تغلیظ شد. به‌طور خلاصه پتاسیم تیوسولفات جامد به آهستگی به محلول سرد

1- *Jacobsen*
2- *Buffy coat*
3- *Eagle*
4- *Fetal Bovine Serum (FBS)*
5- *Spinner*
6- *Microtiter Cytopathic Effect (CPE)*
7- *MDBK*
8- *Vesicular Stomatitis*
9- *Berg and Heron*

www.SID.ir

Archive of SID

اینترفرون اضافه گردید. تا غلظت نهایی ۰/۵ مولار به‌دست آید. سپس، به کمک اسید کلریدریک دو نرمال pH به ۳/۵ رسانده شد. پس از یک شب در حرارت ۴ درجه رسوب حاوی اینترفرون به کمک سانتریفوژ (۴۰ دقیقه در ۴ درجه با سرعت g × ۲۳۰۰) جدا و در حداقل بافر فسفات نمکی[1] pH ۷/۲ حل شد. رسوب غیر قابل حل با یک مولار نمک طعام و ۲۵٪ اتیلن گلیکول یک شب دیالیز شد و پس از تعیین فعالیت اینترفرون برای خالص سازی به‌کار رفت.

خالص سازی اینترفرون به وسیله ژل فیلتراسیون :

نود میلی‌گرم اینترفرون غلیظ شده در ۱۵ میلی لیتر بافر فسفات به داخل ستون (cm ۱۰۰ × ۲/۵) ریخته شد و فراکشن های ۲/۵ میلی لیتری جمع آوری و پس از غلیظ کردن با اولترافیلتراسیون و دیالیز کردن علیه بافرفسفات به کمک ۰/۲ میکرون استریل شد و برای آزمایش فعالیت اینترفرون به کار رفت. از بافر فسفات حاوی یک مولار نمک طعام و ۲۵٪ اتیلن گلیکول برای جدا سازی اینترفرون در ستون استفاده شد.

SDS-PAGE :

فراکشن هایی که فعالیت اینترفرون داشتند در ژل اکریل آمید ۱۰٪ طبق روش لاملی[2] (۲۸) الکتروفورز شدند. برای مقایسه، اینترفرون نوترکیب گاوی آلفا-۱ (سیباگایگی، آمریکا) و اینترفرون طبیعی کنار هم الکتروفورز شدند. برای نشان دادن فعالیت اینترفرون، ژل های رنگ نشده با قطعات ۲ میلیمتری تقسیم و پس از له کردن ژل و قراردادن در ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات و ۱۸ ساعت تکان دادن، محلول استریل و برای فعالیت اینترفرون به‌کار رفت .

اثر سرم گاوی و اتیلن‌گلیکول در بازیافت اینترفرون خالص شده :

برای خالص کردن اینترفرون از سه روش استفاده شد(جدول۱).

در روش یک A، محلول ناخالص اینترفرون حاوی ۲٪ سرم گاوی و برای حل رسوب اینترفرون و شستشوی ستون از بافر فسفات استفاده شد. به‌دلیل این‌که تمام رسوب اینترفرون در این بافر حل نمی‌شود، رسوب حل نشده را در بافر حاوی یک مولار نمک و ۲۵٪ اتیلن‌گلیکول حل کرده و به ستون اضافه گردید و برای شستن ستون از این بافر استفاده شد (روش یک B). در روش دوم محلول ناخالص اینترفرون حاوی ۰/۴ درصد سرم گاوی به‌کار رفت و در کلیه موارد از بافر فسفات استفاده شده در آزمایش سوم، محلول ناخالص اینترفرون بدون سرم گاوی به‌کار برده شد و در مراحل خالص کردن از بافر فسفات حاوی یک مولار نمک و ۲۵٪ اتیلن گلیکول استفاده شد.

نتایج

اثر سرم گاوی و اتیلن‌گلیکول در بازیافت اینترفرون خالص :

با کاهش مقدار سرم گاوی در محیط کشت لوکوسیت‌ها، بازیافت اینترفرون از رسوب کاهش پیدا کرد (جدول ۱) . ولی در نمونه بدون سرم گاوی، فعالیت اختصاصی اینترفرون خالص شده از ستون بیشتر از نمونه سرم‌دار (۲٪) بود در مقابل ($۱۰^{۴} \times ۶/۴$ واحد در میلی‌گرم) ($۱۰^{۴} \times ۵/۵$ واحد در میلی‌گرم) . به‌دلیل اینکه جهت تهیه منوکلنال آنتی‌بادی به ناخالصی کمتری نیاز است از اینترفرون بدون سرم گاوی برای مراحل بعدی استفاده شد. با استفاده از ۲۵٪ اتیلن گلیکول و یک مولار نمک در بافر فسفات برای حل دوباره رسوب و شستن ستون، مقدار بازیافت کل اینترفرون ۱۰ برابر افزایش یافت (از ۳/۵٪ به ۳۴/۶٪). همچنین، همان‌طور که جدول یک نشان می‌دهد، افزودن اتیلن-گلیکول به بافر ستون نیز درصد بازیافت اینترفرون را افزایش می‌دهد (۷۲٪ در روش یک B ، ۹۴٪ در روش سوم با مقایسه باروش دوم ۲۵٪).

1- Phosphate-Buffered-Saline (PBS)

2- Laemmli

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی فعالیت اینترفرون خالص در فراکشن‌ها :

شکل ۱ فراکشن های محلول اینترفرون بدون سرم جنینی گاوی را از ستون سفادکس ۱۰۰- G نشان می‌دهد. فراکشن‌هایی که فعالیت اینترفرون دارند وزن مولکولی آنها بین ۱۷ تا ۳۰ کیلو دالتون می باشد (فراکشن‌های ۲۵۰ تا ۳۱۰) حداکثر فعالیت اینترفرون در ناحیه حدود ۲۰ کیلو دالتون مشاهده گردید.

آنالیز اینترفرون خالص شده توسط SDS-PAGE :

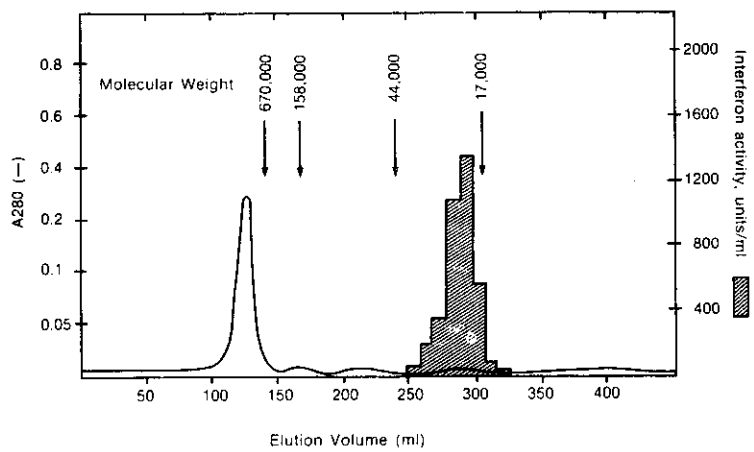
فراکشن‌هایی‌که فعالیت اینترفرون بالایی داشتند توسط فیلتر شرکت آمیکون با محدوده مولکولی ده هزار دالتون غلیظ و تحت شرایط احیاء شده در ژل آکریل آمید ۱۰٪ الکتروفروز شدند. شکل ۲ اینترفرون خالص شده بدون سرم گاوی خالص شده توسط ستون را نشان می‌دهد که فقط دارای یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۹ کیلو دالتونی می‌باشد. وزن مولکولی اینترفرون خالص شده با اینترفرون آلفا-۱ نوترکیب گاوی و بتا- لاکتوگلوبولین B استاندارد مقایسه شد و پس از رنگ‌آمیزی با رنگ نقره باند اضافی مشاهده نگردید. برای اثبات اینکه باند پروتئینی ۱۹ کیلو دالتونی اینترفرون می‌باشد ژل مشابه رنگ نشده را به‌قطعات ۲ میلیمتری جداکرده و پس از جداسازی پروتئین ۱۹ کیلو دالتونی فعالیت ضد ویروسی دارد و اینترفرون می‌باشد.

جدول شماره ۱ : اثر غلظت سرم گاوی در محلول اینترفرون و اثر بافر مورد استفاده در بازیافت اینترفرون از ستون سفادکس .

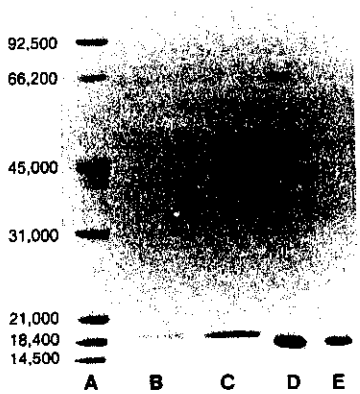
شرایط	روش مورد مطالعه			
	۱A	۱B	۲	۲
درصد سرم گاوی در محلول اینترفرون	۲	۲	۰/۰۴	-
واحد محلول اینترفرون (۱۰۰۰ ×)	۷۵۰	۷۵۰	۱۲۱۸	۱۴۴۰
واحد اینترفرون حاصل از رسوب (۱۰۰۰ ×)	انجام نشد	۳۶۰	۲۰	۷
اینترفرون حاصل از رسوب (درصد)	انجام نشد	۴۸	۱۶/۸	۰/۵
با فرمول مورد استفاده	بافر فسفات نمکی	تیلن گلیکول - نمک بافر فسفات نمکی	بافر فسفات نمکی	تیلن گلیکول - نمک بافر فسفات نمکی
واحد اینترفرون حاصل از ستون	۲۶۲۵۰	۲۵۹۳۵۰	۵۱۶۷۴	۶۷۴۷
واحد اینترفرون حاصل از ستون (درصد)	انجام نشد	۷۲	۲۵	۹۴
کلی اینترفرون حاصل رسوب و ستون (درصد)	۳/۵	۳۴/۶	۴/۲	۰/۵
فعالیت اختصاصی اینترفرون (U/mg) حاصل از ستون	انجام نشد	$۵/۵\times۱۰^{۴}$	۴×۱۰^{۴}	$۶/۴\times۱۰^{۴}$

www.SID.ir

Archive of SID



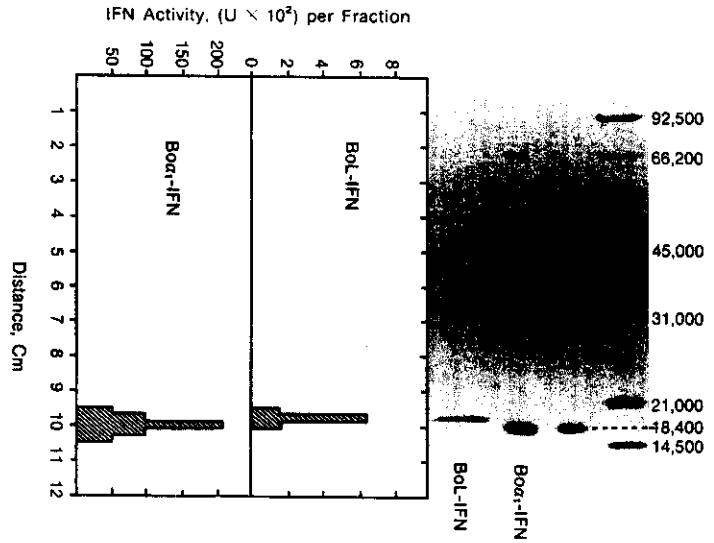
شکل شماره ۱ : خالص سازی اینترفرون گاوی توسط ستون سفادکس ۱۰۰ - G. اینترفرون غلیظ شده به ستون ریخته شد و فراکشن‌ها پس از شستشوی ستون توسط بافر فسفات حاوی یک مولار نمک و ۲۵٪ اتیلن گلیکول جمع‌آوری و جهت فعالیت اینترفرون مورد آزمایش قرار گرفتند.



شکل شماره ۲ : SDS-PAGE اینترفرون خالص شده توسط ستون. پنج میکروگرم نمونه (شامل ۹۰۰ واحد اینترفرون) در شرایط احیاء الکتروفورز و سپس با کوماسی بلور رنگ آمیزی شد. رنگ آمیزی با رنگ نقره باند پروتئینی جدیدی را نشان ندارد. A، وزن مولکولی استاندارد، B و C، اینترفرون گاوی، D، اینترفرون گاوی نوترکیب و E، بتالاکتوگلوبولین B استاندارد با وزن مولکولی ۱۸/۴۰۰ دالتون.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل شماره ۳ : مقایسه آنالیز SDS-PAGE و فعالیت اینترفرون گاوی طبیعی با اینترفرون گاوی نوترکیب در ژل آکریل‌آمید. آزمایش نشان می‌دهد که باند پروتئین خالص شده از ستون کروماتوگرافی اینترفرون می‌باشد. ژل با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شده و با رنگ نقره باند جدیدی مشاهده نگردید.

بحث

چندین گونه اینترفرون طبیعی لوکوسیت انسان شناسایی و با روش های معمول(۲۸ ، ۲۹)، الکتروفورز در پلی‌اکریلامید و سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) (۲۷) کروماتوگرافی جذبی، منوکلنال و پلی کلنال آنتی بادی (۳۰ ، ۳۱) یا با دستگاه کروماتوگرافی فشار زیاد (HPLC) (۳۲) خالص گردیدند.

در این مقاله، اینترفرون گاوی حاصل از خون محیطی که توسط ویروس سندای تحریک شده است با ستون کروماتوگرافی و الکتروفورز خالص شده و یک باند پروتئینی ۱۹ کیلو دالتونی با فعالیت ضد ویروسی به‌دست آمد. فاکتورهایی که در مراحل خالص سازی اینترفرون اثر می‌گذارند شامل حذف سرم گاوی از محیط کشت و افزودن نمک طعام یک مولار و ۲۵٪ اتیلن گلیکول به بافر (برای حل رسوب و شستن ستون) می‌باشند.

حذف سرم گاوی روی تیتر اینترفرون اثری ندارد ولی، به حذف پروتئین‌های ناخواسته در تهیه اینترفرون کمک می‌کند. با این وجود، حذف سرم گاوی بازیافت اینترفرون را از رسوب کاهش می‌دهد. بازیافت اینترفرون از رسوب، بدون وجود سرم گاوی، ۰/۵ درصد بود. در حالی‌که با حضور ۲٪ سرم گاوی به ۴۸ درصد رسید. به‌دلیل این که اینترفرون به سایر پروتئین‌ها مانند آلبومین متصل می‌شود مقدار یک مولار نمک و اتیلن گلیکول برای جداسازی اینترفرون از پروتئین‌های ناخواسته مؤثر می‌باشد.

اینترفرون به‌دست آمده مانند اینترفرون لوکوسیت انسانی(۲۷)، در pH=۲ پایدار است (۲۶) و پس‌از حرارت ۱۰۰درجه همراه با سدیم دو دسیل‌سولفات و مرکاپتواتانل فعالیت بیولوژیک خود را از دست نمی‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

اخیراً نشان داده شده است که اینترفرون آلفا-2b به‌تنهایی یا همراه با ریباویرین برای معالجه عفونت ویروس هپاتیت C مزمن در آمریکا مورد تائید قرار گرفته است. هم‌چنین، این اینترفرون پس از افزودن در عرض یک ساعت پس از عفونت تولید ۵۰٪ ویروس اسهال گاوی را با ۳ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر متوقف می کند. فعالیت اینترفرون همراه با ۱۳۸ میکرومول N-بوتیل داکسی فوجیریمایسین حدود ۵۸ بار افزایش پیدا می‌کند(۳۳). اینترفرون گاوی نیز ممکن است همراه با این یا سایر مواد اثر سینرژیک داشته باشد و در معالجه بیماری‌های ویروسی گاوی مؤثر باشد.

References

1- Rosenquist BD, Loan RW: Production of circulating interferon in the bovine species. Am J Vet Res, 1969, 30: 1293-1303.

2- Theil KW, Mohanty SB, Hetrick FM: Effects of poly I: C on infectious bovine rhinotracheitis virus infection in calves. Proc Soc Exp Biol Med, 1971, 137: 1176-1179.

3- La Bonnardiere C, De Vaureix C, L'Haeidon R, Scherrer R: Weak susceptibility of rotavirus to bovine interferon in calf kidney cells. Arch Virol, 1980, 2: 167-170.

4- Vanden Broecke C, Schweres A, Dagenais L, Goossens A, Maenhoudt M, Pastoret PP, Werenne J: Interferon response in colostrum - deprived newborn calves infected with bovine rotavirus: Its possible role in the control of the pathogenicity. Ann Rech Vet, 1984, 15 (l): 29-34.

5- Todd JD, Volenec FJ, Paton IM: Interferon in nasal secretions and sera of calves after intranasal administration of a virulent infectious bovine rhinotracheitis virus: Association of interferon in nasal secretions with early resistance to challenge with virulent virus. Infect Immunol, 1972, 5: 699-706.

6- Straub C, Ahl R: Local interferon production in cattle after intranasal infection with a virulent IBR/IPV virus and its effects on a subsequent infection with foot and mouth disease virus. Zentralbl Veterinaermed Reihe B, 1976, 5-6: 470-482.

7- Cummins JM, Rosenquist BD: Protection of calves against rhinovirus infection by nasal secretion interferon induced by infectious bovine rhinotracheitis virus. Am J Vet Res, 1980, 41: 161-165.

8- Cummins JM, Rosenquist BD: Partial protection of calves against parainfluenza3 virus infection by nasal-secretion interferon induced by infectious bovine rhinotracheitis virus. Am J Vet Res, 1982, 43: 1334-1338.

www.SID.ir

Archive of SID

9- Cummins JM, Rosenquist BD: Temporary protection of calves against adenovirus infection by nasal secretion interferon induced by infectious bovine rhinotracheitis virus. Am J Vet Res, 1982, 43: 955-959.

10- Polatnick J, Richmond JY: Viral interference phenomena induced by foot and mouth disease temperature sensitive mutants in bovine kidney cells. Arch Virol, 1962, 61: 105-114.

11- Fulton RW, Downing M.M, Cummins JM: Antiviral effects of bovine interferons on bovine respiratory tract viruses. J Clin Microbiol, 1984, 19: 492-497.

12- Fulton RW, Burge LJ, McCraken JS, Effect of recombinant DNA-derived bovine and human interferons on replication of bovine herpesvir-us-1, parainfluenza-3, and respiratory syncytial viruses. Am J Vet Res, 1986, 47: 751-753.

13- Gillespie JH, Robson DS, Scott FW, Schiff EI: In vitro protective effect of bacteria -derived bovine alpha interferon I I against selected bovine viruses. J Clin Microbiol, 1985, 22: 912-914.

14- Hofmann VW, Danner K, Seeger K: Erste Erfahrungen bei der Behandlung von virusbedingten Kalberdurchfallen mit gentechnisch erzeugtem interferon. Dtsch Tieraerztl Wochenschr, 1985, 92: 278-280.

15- Babiuk LA, Bielefeldt Ohmann H, Gifford G, Czarniecki CW, Scialli VT, Hamilton EB: Effect of bovine alpha1 interferon on bovine herpesvirus type 1-induced respiratory disease. J Gen Virol, 1985, 66: 2383-2394.

16- Babiuk LA, Lawman MJP, Gifford GA: Use of recombinant bovine alpha1 interferon in reducing respiratory disease induced by bovine herpes virus type 1. Antimicrob Agents Chemother, 1987, 31 (5): 752-757.

17- Gillespie J, Scott F, Geissinger C, Schiff E: The prophylactic effects of E. cohderived bovine interferon alphal-I on bovine virus diarrhoea virus disease in calves after intramuscular administration. J Vet Med B, 1986, 33: 771-776.

18- Jacobsen KL, Rockwood GA, Abolhassani M, Evans DL: Chitwood, S.W. and Charamella, L., 1988. Kinetics of the large-scale production of bovine leukocyte interferon with 3 different virus inducers. Am J Vet Res, 1989, 49 (9): 1441-1446.

19- Jacobsen KL, Abolhassani M, Chitwood S: Effect of Sendai inducing virus in cytopathic effect inhibition assay of bovine leukocyte interferon. Vet Immunol Immunopathol, 1988, 18: 237-244.

20- Stewart WE, Desmyter J: Molecular hetero-

www.SID.ir

Archive of SID

geneity of human leukocyte interferon: Two populations differing in molecular weights, requirements for renaturation and cross -species antiviral activity. Virology, 1975, 67: 68-78.

21- Bodo G, Adolf GR: Separation and characterization of human IFN-alpha subtypes. In: E. DeMaeyer and H. Schellekens (Editors), The Biology of the Interferon System. 1st ed, Amsterdam, Elsevier, 1983: 113-118.

22- La Bonnardiere C, Cohen J, Contrepois M: Interferon activity in rotavirus-infected newborn calves. Ann Rech Vet, 1981, 12 (1): 85-91.

23- Gutterman JU, Fine S, Quesada J, Horning S, Levine J, Alexanian R, Bernhardt L, Kramer M, Spiegel H, Colburn W, Trown P, Merigan T, Dziewanowski Z: Recombinant leukocyte A interferon: pharmacokinetics, single-dose tolerance, and biologic effects in cancer patients. Ann Intern Med, 1982, 96: 549-556.

24- Borden EC, Hawkins MJ, Merritt JA, Ball LA, Grossbard E, Kramer M: Comparison of the biological effects in man of two recombinant interferons alpha (rA and rD). Abstract 3rd Ann Internal Congress Interferon Res Miami, 1982.

25- Steiss RG, Smith JW, Urba WJ, Clark JW, Itri LM, Evans LM, Schoenberger C, Longo DL, Resistance to recombinant interferon alpha-2 in hairy-cell leukemia associated with neutralizing anti-interferon antibodies. New Engl J Med, 1988, 318 (22): 1409-1413.

26- Jacobsen KL, Rockwood GA, Abolhassani M, Evans DL, Chitwood SW, Charamella L: Bovine leukocyte interferon: Characterization and large-scale production. J Interferon Res, 1988, 8 (2): 133-138.

27- Berg K, Heron L: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified human leukocyte interferon and the antiviral and anticellular activities of the different interferon species. J Gen Virol, 1980, 50: 441-446.

28- Berg K, Heron L: The complete purification of human leukocyte interferon. Scand J Immunol, 1980, 11: 489-502.

29- Zoon KC, Miller D, Nedden DZ, Hunkapiller MW: Human leukocyte-derived alpha- interferons: Purification and amino-terminal-amino-acid sequence of two components. J Interferon Res, 1982, 2: 253-259.

30- Berg K, Heron L, Hamilton R: Purification of human interferons by antibody affinity chromatography using highly absorbed anti-interferon. Scand J Immunol, 1978, 8: 429-436.

31- Secher DS, Burke DC: A monoclonal

www.SID.ir

Archive of SID

antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon. Nature, 1980, 285: 446-450.

32- Rubinstein M, Levy WP, Moschera JA, Lai C, Herschberg RD, Bartlett RT, Pestka S: Human leukocyte interferon: Isolation and characterization of several forms. Arch Biochem Biophys, 1981, 210: 307-318.

33- Ouzounov S, Mehta A, Dwek RA, Block TM, Jordan R: The combination of interferon alpha-2b and n-butyl deoxynojirimycin has a greater than additive antiviral effect upon production of infectious bovine viral diarrhea virus (BVDV) in vitro: implications for hepatitis C virus (HCV) therapy. Antiviral Res, 2002, 55 (3):425-435.

www.SID.ir