

谢 昆, 蒋成砚, 唐秀华, 等. 犬 γ -干扰素基因的克隆、序列分析及蛋白质结构预测[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 170-175.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.026

犬 γ -干扰素基因的克隆、序列分析及蛋白质结构预测

谢 昆^{1,2}, 蒋成砚^{1,2}, 唐秀华¹, 周文树¹, 王海荣¹, 汪 镜¹

(1.红河学院生命科学与技术学院, 云南 蒙自 661199; 2.云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南 蒙自 661199)

摘要: 根据 GenBank 上犬 γ -干扰素基因 (*IFN- γ*) 序列 (序列号 W0318193), 利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物, 应用 RT-PCR 技术从 100 μ g/ml ConA 刺激 24 h 后的犬外周血淋巴细胞总 RNA 中扩增出 γ -干扰素基因, 测序后应用 DNASTar 软件对克隆的犬 γ -干扰素基因进行序列分析, 并与 GenBank 上发表的犬、牛、大熊猫、鸡、牦牛、人、猪、野猪、斑马鱼、土拨鼠等的 *IFN- γ* 基因序列进行同源性比较。结果显示, 克隆的犬 *IFN- γ* 基因大小 501 bp, 编码 166 个氨基酸, 与犬、牛、大熊猫、鸡、牦牛、人、猪、野猪、斑马鱼、土拨鼠 *IFN- γ* 基因的核苷酸序列同源性分别为 98.4%、81.6%、26.1%、26.1%、22.7%、22.7%、80.8%、81.0%、28.5% 和 25.0%; 氨基酸序列同源性分别为 95.8%、72.5%、5.4%、5.4%、6.6%、6.6%、68.9%、69.5%、5.4% 和 5.4%。运用 DNASTar 软件对犬 γ -干扰素进行蛋白结构预测的结果显示, 犬 γ -干扰素蛋白含有 10 个 α -螺旋、9 个 β -折叠、11 个 β -转角和 5 个无规则卷曲。

关键词: 犬; γ -干扰素基因; 克隆; 序列分析; 蛋白质结构预测

中图分类号: S858.292 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2016)01-0170-06

Cloning and sequence analysis of canis γ -interferon gene and prediction of its protein structure

XIE Kun^{1,2}, JIANG Cheng-yan^{1,2}, TANG Xiu-hua¹, ZHOU Wen-shu¹, WANG Hai-rong¹, WANG Jing¹

(1. College of Life Science and Technology, Honghe University, Mengzi 661199, China; 2. Key Laboratory of Crops with High Quality and Efficient Cultivation and Security Control, Yunnan Higher Education Institutions, Mengzi 661199, China)

Abstract: Based on canis interferon (IFN) gene sequence on GenBank, specific primers were designed using Primer 5.0 software, and canis γ -IFN gene was amplified by RT-PCR from the RNA extracted from peripheral blood lymphocytes stimulated with ConA for 24 h. The cloned γ -IFN gene was a size of 501-bp fragment encoding 166 amino acids. The nucleotide sequence of the canis γ -IFN gene shared homologies of 98.4%, 81.6%, 26.1%, 26.1%, 22.7%, 22.7%, 80.8%, 81.0%, 28.5%, and 25.0% with canis on GenBank, buffalo, ailuropoda, chicken, yak, human, swine, wild boar, zebrafish, and marmot, respectively, and the amino acid sequence encoded by canis γ -IFN gene shared homologies of 95.8%, 72.5%, 5.4%, 5.4%, 6.6%, 6.6%, 68.9%, 69.5%, 5.4%, 5.4%, respectively. The protein structure predicted with DNASTar software reveals that the secondary structure of canis protein γ -IFN consists of ten α -helices, nine β -folds, eleven β -corners and five random coils.

Key words: canis; γ -interferon gene; cloning; sequence analysis; prediction of protein structure

收稿日期: 2015-05-30

基金项目: 云南省科技厅应用基础研究面上项目 (2010ZC151、2010CD088); 红河学院博士专项项目 (XJ15B13)

作者简介: 谢 昆 (1979-), 男, 云南富民人, 博士研究生, 主要从事动物生物化学与分子生物学研究。(Tel) 18314020659; (E-mail) xk_biology2@126.com

干扰素是在特定的诱导剂作用下,由细胞产生的一种具有高度生物学活性的糖蛋白质,它不仅具有 I 型 IFN(IFN- α 、IFN- β)的抗病毒和抗肿瘤活性,还具有促进 MHC II 抗原表达、增强 APC 细胞与 T 细胞的相互作用、增强 T 细胞辅助抗体产生和细胞毒性 T 细胞产生等诸多免疫调节活性^[1-2]。大多数动物如犬^[3-4]、藏獒犬^[5]、猪^[6]、野猪^[7]、人^[8]、鸡^[9-12]、大熊猫^[13]、大鼠^[14-15]、牦牛^[16-17]、黄牛^[18]、水牛^[19]的 IFN- γ 基因已被报道,人、猪、牛^[20]、鸡、大鼠等 IFN- γ 已获得重组蛋白质。在国内,黄道超等^[13]成功克隆了大熊猫 IFN- γ ,夏春等^[11]于 2005 年成功克隆了鸡 γ -干扰素,景志忠等^[16]于 2008 年成功克隆牦牛 γ -干扰素基因,但对犬 IFN- γ 基因(Canis interferon γ gene, *CalFN- γ*)的研究还鲜有报道。本研究拟应用 RT-PCR 技术,从 ConA 刺激 24 h 的犬外周血淋巴细胞中克隆 IFN- γ 基因,并对其序列进行分析,以期为进一步研究犬 IFN- γ 基因的体外表达和生物学活性检测以及免疫疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

犬(土狗)外周血采自蒙自大园梓路鸿泰狗肉米线馆,取 50 ml 左右血液于预先加入 1 ml 的肝素钠溶液(10 mg/ml)的无菌离心管中,摇匀,备用。

1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 细胞为红河学院生命科学与技术学院动物学实验室保存, pMD18-T vector 购自大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司。

1.3 犬外周血淋巴细胞的分离与培养

采用密度为 1.080 的淋巴细胞分离液分离犬外周血淋巴细胞,将分离的淋巴细胞密度调至 1 ml 5×10^6 个,加入终浓度为 30 μ g/ml ConA,于含 0.5% CO₂ 的二氧化碳培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。

1.4 犬淋巴细胞总 RNA 的提取

将培养 18 h 后的淋巴细胞于 4 $^{\circ}$ C 2 000 r/min 离心 3 min。弃上清液,加 1 ml Trizol 试剂,一步法提取总 RNA,具体方法参照《分子克隆实验指南》^[18]。

1.5 犬 γ 干扰素 *CalFN- γ* 基因的 RT-PCR 扩增

按照 Fermentas 公司的 RT 试剂盒说明操作合成 cDNA,再根据 GenBank 上的犬 IFN- γ cDNA 序列(NM_00 1003245)设计 1 对特异性引物,引物如

下:P1 5'-GCGAATTCCTTATTTTCGATGCTCTGCGG-3'; P2 5'-CGGGATCCATGAATTATACAAGCT-3';然后进行 PCR 扩增,PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环扩增 30 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,扩增结束后取 5.0 μ l 产物进行电泳检测。

1.6 基因的亚克隆

将回收后的 PCR 产物 4.5 μ l 与载体 PDM18-T vector 0.5 μ l 相连接,并加入 Ligation solution1 5.0 μ l。转化 JM109 感受态细菌,经含有氨苄青霉素的平板筛选培养,挑取菌落,提取重组质粒。

1.7 重组质粒的鉴定

将提取的重组质粒进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定和 PCR 鉴定。

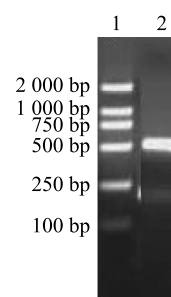
1.8 犬 γ 干扰素 *CalFN- γ* 基因的序列测定和分析

将鉴定为阳性的菌液送交上海生工生物工程股份有限公司测序,应用 DNASTar 软件对测定的犬 *CalFN- γ* 基因进行序列分析、同源性比较和进化树分析。

2 结果

2.1 *CalFN- γ* 基因的 RT-PCR 扩增

取 PCR 产物 5.0 μ l 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,显示有 1 条约 500 bp 左右的条带,与预计的片段大小一致(图 1)。



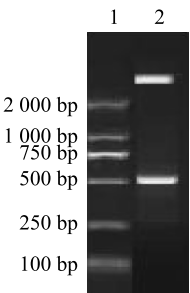
1: DL2000 marker; 2: *CalFN- γ* 基因。

图 1 *CalFN- γ* 基因的 RT-PCR 扩增

Fig.1 RT-PCR amplification of canis γ -interferon gene(*CalFN- γ*)

2.2 重组质粒的双酶切鉴定

重组质粒经 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切鉴定,结果显示有 1 条约 2 500 bp 的载体大片段和一条约 500 bp 的目的片段,大小均与预计相符,说明 *CalFN- γ* 基因已重组到载体中(图 2)。



1:DL2000 marker;2:pMD18-T-CalIFN- γ 重组质粒。

图 2 pMD18-T-CalIFN- γ 重组质粒的双酶切鉴定结果

Fig.2 Identification of pMD18-T-CalIFN- γ recombinant plasmid by double enzyme digestion

2.3 CalIFN- γ 基因的序列测定及分析

鉴定为阳性的菌株,经大连宝生物公司测序后,得到了 CalIFN- γ 基因的全序列(图 3)。该基因全长 501 bp,编码 166 个氨基酸。与 GenBank 中发表的

犬 CalIFN- γ 基因序列比较发现有 8 个位点不一致,从第一位起始密码子开始分别为第 24、103、106、203、284、384、408 和 455 位。

2.4 CalIFN- γ 基因所编码的氨基酸序列分析

CalIFN- γ 的序列及其氨基酸分析如图 4,预测蛋白质分子量为 19 382.38,等电点为 9.211。用 DNASTar 进行分析确定 CalIFN- γ 基因全长 501 bp,编码 166 个氨基酸(图 4)。

2.5 CalIFN- γ 基因同源性比较和进化树分析

利用 DNASTar 软件将克隆得到的 CalIFN- γ 基因与国外报道的犬、牛、大熊鸡、牦牛、人、猪、野猪、斑马鱼、土拨鼠等 IFN- γ 基因序列进行同源性比较和进化树分析后发现,犬与国外报道的犬 γ -干扰素基因的同源性极高,达到 98.4%。而与其他动物的 γ -干扰素的同源性却比较低,为 22.7%~81.6%(表 1)。进化树分析后发现犬与牛、猪、野猪 γ -干扰素基因的进化关系最接近,从这一点可以间接表明克隆结果是正确的(图 5)。

GenIFN- γ	ATGAATTATACAAGCTATATCTTAGCTTTTCAGCTTTGCGTGATTTTGTTCTTCTGGCTGTAAGTGTGAGGCCATGTT	80
CalIFN- γ	ATGAATTATACAAGCTATATCTTAGCTTTTCAGCTTTGCGTGATTTTGTTCTTCTGGCTGTAAGTGTGAGGCCATGTT	80
GenIFN- γ	TTTAAAGAAATAGAAAACCTAAAGGAATATTTAATGCAAGTAATCCAGATGTATCGGACGGTGGGTCTCTTTTCGTAG	160
CalIFN- γ	TTTAAAGAAATAGAAAACCTAGAAATATTTAATGCAAGTAATCCAGATGTATCGGACGGTGGGTCTCTTTTCGTAG	160
GenIFN- γ	ATATTTTGAAGAAATGGAGAGAGGAGAGTGACAAAACAATCATTGAGGCCAAATTGTCTCTTTCTACTTGAAACTGTTT	240
CalIFN- γ	ATATTTTGAAGAAATGGAGAGAGGAGAGTGACAAAACAATCATTGAGGCCAAATTGTCTCTTTCTACTTGAAACTGTTT	240
GenIFN- γ	GACAACTTTAAAGATAACCCAGATCATTCAAAGGAGCATGGATACCATCAAGGAAGACATGCTTGCCAAGTCTCTAAATAG	320
CalIFN- γ	GACAACTTTAAAGATAACCCAGATCATTCAAAGGAGCATGGATACCATCAAGGAAGACATGCTTGCCAAGTCTCTAAATAG	320
GenIFN- γ	CAGCACCAGTAAGAGGGAGGACTTCCTTAAGCTGATTCAAATTCCTGTGAACGATCTGCAGGTCCAGCGCAAGCGGATAA	400
CalIFN- γ	CAGCACCAGTAAGAGGGAGGACTTCCTTAAGCTGATTCAAATTCCTGTGAACGATCTGCAGGTCCAGCGCAAGCGGATAA	400
GenIFN- γ	ATGAACATCAAAAGTGATGAATGATCTCTACCAAGATCCAACCTAAGGAAGCGGAAAAGGAGTCAGAATCTGTTTCGA	480
CalIFN- γ	ATGAACATCAAAAGTGATGAATGATCTCTACCAAGATCCAACCTAAGGAAGCGGAAAAGGAGTCAGAATCTGTTTCGA	480
GenIFN- γ	GGCCGCAGAGCATCGAAATAA	501
CalIFN- γ	GGCCGCAGAGCATCGAAATAA	501

方框表示不一致的核苷酸。

图 3 CalIFN- γ 基因测序

Fig.3 Sequencing of CalIFN- γ gene

MNYTSYIFAFQLCVILCSSGCNCQAMFFKEIENLEKYFNASNPDVSDGSLFVDILKKWRE
ESDKTINQSQIVSFYLLKFDNFKNQIIQRSMDIHKEDMLGKFLNSSTSKREDFLKLIIQIPVN
DLQVQRKAINELIKVMNDLSPRSNLRKPKRSQNLFRGRASK.

图 4 CalIFN- γ 基因所编码的氨基酸序列分析

Fig.4 Amino acids sequence encoded by CalIFN- γ

表 1 *CaIFN- γ* 基因与其他动物 *IFN- γ* 基因编码的核苷酸同源性比较
Table 1 The homology between *CaIFN- γ* gene and other animals' *IFN- γ* genes

干扰素基因	同源性 (%)										
	犬 γ -干扰素基因	GenBank 犬 γ -干扰素基因	牛 γ -干扰素基因	大熊猫 γ -干扰素基因	鸡 γ -干扰素基因	牦牛 γ -干扰素基因	人 γ -干扰素基因	猪 γ -干扰素基因	野猪 γ -干扰素基因	斑马鱼 γ -干扰素基因	土拨鼠 γ -干扰素基因
犬 γ -干扰素基因	-	98.4	81.6	26.1	26.1	22.7	22.7	80.8	81.0	28.5	25.0
GenBank 犬 γ -干扰素基因	1.6	-	82.8	25.7	25.7	22.7	22.7	82.0	82.2	28.7	24.8
牛 γ -干扰素基因	21.2	19.6	-	27.3	27.3	22.7	22.7	86.4	86.6	28.3	25.1
大熊猫 γ -干扰素基因	323.7	348.3	350.0	-	100.0	28.9	28.9	26.9	26.9	27.4	27.0
鸡 γ -干扰素基因	323.7	348.3	350.0	0	-	28.9	28.9	26.9	26.9	27.4	27.0
牦牛 γ -干扰素基因	350.0	350.0	350.0	224.0	224.0	-	100.0	21.9	22.1	25.9	27.3
人 γ -干扰素基因	350.0	350.0	350.0	224.0	224.0	0	-	21.9	22.1	25.9	27.3
猪 γ -干扰素基因	22.3	20.7	15.1	288.5	288.5	350.0	350.0	-	99.3	27.1	25.9
野猪 γ -干扰素基因	22.0	20.4	14.8	288.5	288.5	350.0	350.0	0.2	-	27.3	25.9
斑马鱼 γ -干扰素基因	231.6	226.6	247.5	394.3	294.3	350.0	350.0	273.1	267.8	-	60.7
土拨鼠 γ -干扰素基因	350.0	350.0	350.0	244.0	244.0	305.5	305.5	350.0	350.0	46.3	-

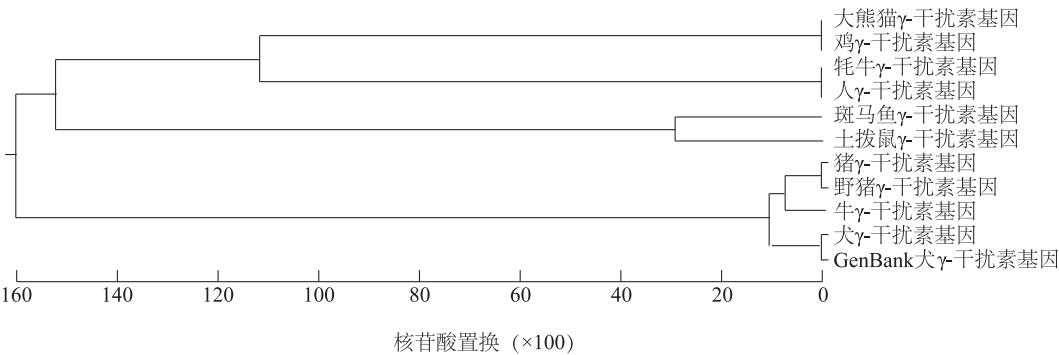


图 5 *CaIFN- γ* 与其他动物 *IFN- γ* 基因进化树分析结果
Fig.5 Phylogenetic tree analysis between *CaIFN- γ* gene and other animals' *IFN- γ* gene

2.6 *CaIFN- γ* 基因所编码的氨基酸序列与其他动物 *IFN- γ* 基因所编码的氨基酸序列同源性和进化树比较

将克隆的 *CaIFN- γ* 基因所编码的氨基酸与国外报道的犬、牛、大熊猫、鸡、牦牛、人、猪、斑马鱼、土拨鼠等 *IFN- γ* 基因所编码的氨基酸序列进行同源性比较与进化树分析,并用 DNASTar 对其编码氨基酸序列进行蛋白质二级结构预测,结果发现,氨基酸的同源性与基因的同源性差异不大(表 2),进化基本来自 4 个分支(图 6)。

2.7 *CaIFN- γ* 蛋白的二级结构预测与抗原性分析

用 DNASTar 软件对所克隆 *CaIFN- γ* 基因序列编码的氨基酸序列进行蛋白质二级结构预测与抗原性

分析后,可以看到 *CaIFN- γ* 基因推导的蛋白质空间结构具有 10 个 α -螺旋, 9 个 β -折叠, 11 个 β -转角和 5 个无规则卷曲。抗原性强的氨基酸位点比较多,比如 40~50 位、55~65 位和 140~166 位这 3 个段位点。而非抗原性的氨基酸位点少而且强度也比较弱,比如 1~17 位点。*CaIFN- γ* 蛋白具有较多的亲水性位点,比如 515~68 位点和 140~166 位点,疏水位点较少,比如 1~17 位点(图 7)。

3 讨论

近年来,随着对细胞因子研究的不断深入和分子生物学技术的发展,大量的细胞因子得以克隆,许多细胞因子基因工程药物推向市场,为治疗畜禽疾病提供

了新的手段,同时创造了巨大的经济和社会效益。

γ -干扰素的研究在各种动物的领域中已经有很多成果,但是由于关注度和研究难度的问题,使得犬 γ -干扰素的研究工作非常滞后,因此在国内的研究比较少。近年来,养犬业发展十分迅速,犬的种类和数

量也越来越多,疾病尤其是病毒病严重危害着犬的健康与生存。而犬细胞因子特别是 γ -干扰素的抗病毒和免疫调节活性等作用在犬病治疗中已引起广泛关注^[21]。因此,对犬 γ -干扰素的克隆与序列分析就显得尤其重要。

表 2 *CalFN- γ* 基因所推导氨基酸与其他动物 *IFN- γ* 基因推导的氨基酸同源性分析

Table 2 Homology comparison of amino acids between *CalFN- γ* and other animals *IFN- γ*

干扰素	同源性 (%)										
	犬 γ -干扰素	GenBank 犬 γ -干扰素	牛 γ -干扰素	大熊猫 γ -干扰素	鸡 γ -干扰素	牦牛 γ -干扰素	人 γ -干扰素	猪 γ -干扰素	野猪 γ -干扰素	斑马鱼 γ -干扰素	土拨鼠 γ -干扰素
犬 γ -干扰素	-	95.8	72.5	5.4	5.4	6.6	6.6	68.9	69.5	5.4	5.4
GenBank 犬 γ -干扰素	-	-	74.9	4.2	4.2	6.6	6.6	71.3	71.9	5.4	4.8
牛 γ -干扰素	-	-	-	7.2	7.2	7.2	7.2	76.0	76.6	4.8	6.0
大熊猫 γ -干扰素	-	-	-	-	100.0	5.4	5.4	5.4	5.4	8.3	8.3
鸡 γ -干扰素	-	-	-	-	-	5.4	5.4	5.4	5.4	8.3	8.3
牦牛 γ -干扰素	-	-	-	-	-	-	100.0	6.0	6.6	9.0	8.4
人 γ -干扰素	-	-	-	-	-	-	-	6.0	6.6	9.0	8.4
猪 γ -干扰素	-	-	-	-	-	-	-	-	98.8	4.8	3.6
野猪 γ -干扰素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.8	3.6
斑马鱼 γ -干扰素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46.8
土拨鼠 γ -干扰素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

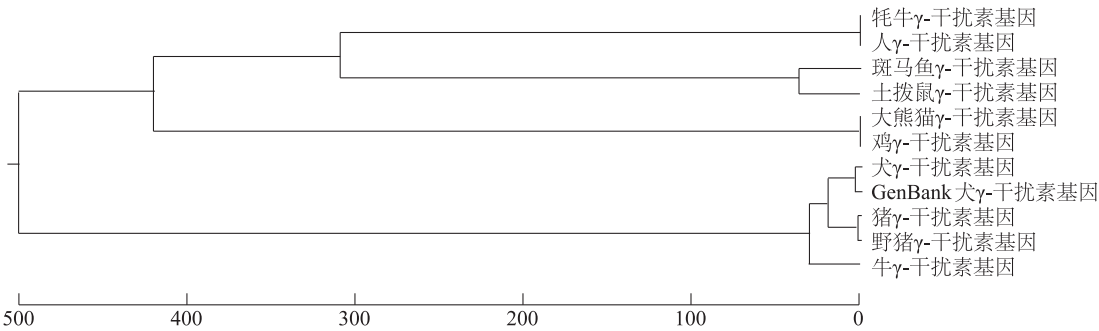


图 6 *CalFN- γ* 基因推导氨基酸与其他动物 *IFN- γ* 基因的推导氨基酸进化树分析

Fig.6 Phylogenetic analysis of amino acid sequences encoded by *CalFN- γ* and other animals' *IFN- γ* genes

目前关于犬 *IFN- γ* 基因的克隆、核苷酸序列分析、氨基酸序列分析及二级结构预测还未见报道。本试验根据报道的犬 γ -干扰素基因 (*CalFN- γ*), 利用 RT-PCR 技术从 ConA 刺激的犬外周血淋巴细胞中克隆出基因, 并应用分子生物学软件对犬 *IFN- γ* 核苷酸序列和编码的氨基酸序列进行了进化树比较

和同源性分析,同时预测了犬 *IFN- γ* 的二级结构,具有一定的创新性。

不同动物同一种细胞因子的同源性分析和进化树比较一般采用全基因 (ORF) 进行比较,原因在于很多动物的细胞因子如干扰素、白细胞介素基因序列较小,一般不超过 1 000 bp,不同动物同一种细胞

因子的保守区序列相似度很大,难以比较出异同,因此试验中我们对不同动物 γ -干扰素基因和氨基酸序列进行了同源性比较和进化树分析。通过对 *CaIFN- γ* 与其他几种动物的 *IFN- γ* 的核苷酸序列进行同源性比较与进化树分析后发现, *CaIFN- γ* 与牛 *IFN- γ* 的同源性最高,为 72.5%,从进化关系上看,二者在进化树上的距离最为接近,说明它们在系统进化过程中一直处在相同的分支上,即表明它们在进化关系上可能具有密切的亲缘关系,但单从该进化树来看还不能准确确定犬在进化过程中的遗传关系。*CaIFN- γ* 基因与人、鸡的 *IFN- γ* 的同源性最低,只有 22.7% 和 26.1%。本试验犬 γ -干扰素基因的成功克隆为研究干扰素在抗病原菌、抗病毒等方面的作用奠定了坚实基础。

参考文献:

- [1] 余 斌. 抗猪 γ -干扰素单克隆抗体的制备及定量抗原捕获 ELISA 检测方法的初步建立 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [2] 王永娟, 王 岑, 朱善元, 等. 4 种方法制备外周血淋巴细胞总 RNA 对鹅 α 干扰素的影响比较 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43 (5): 204-206.
- [3] 陈忠广, 张桂红, 夏春丽, 等. 犬干扰素- γ 的稀释复性及活力测定 [J]. 东北农业大学学报, 2008, 39 (9): 82-86.
- [4] 王 艳, 王海震, 瑞 兵, 等. 犬 γ -干扰素基因的高效表达及其活性测定 [J]. 中国病毒学, 2005, 2 (2): 189-192.
- [5] 陈红英, 董海聚, 崔保安, 等. 藏獒犬 α -干扰素全基因的克隆与序列分析 [J]. 安徽农业大学学报, 2009, 36 (1): 124-127.
- [6] 潘晓梅, 窦永喜, 曹学鹏, 等. 猪干扰素- γ 的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2008, 6 (3): 163-169.
- [7] 周庆丰, 陈 丽, 龚朋飞, 等. 三种猪 I 型干扰素基因的克隆与序列分析 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2009, 4 (34): 17-19.
- [8] 费峥峥, 关怡新, 姚善涇, 等. 重组人干扰素- γ 复性过程中体外活性检测方法研究 [J]. 微生物学通报, 2004, 31 (3): 65-69.
- [9] 董亚青, 朱文斗, 王琳琳, 等. 鸡 α -干扰素在毕赤酵母中的表达及其表达条件优化 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43 (11): 275-277.
- [10] 王宏华, 凌红丽, 马向东, 等. 乳糖诱导重组鸡 γ -干扰素基因在大肠杆菌中的表达 [J]. 中国动物检疫, 2008, 25 (6): 44-48.
- [11] 夏 春, 汪 明. 丝羽乌骨鸡干扰素基因分子克隆与序列分析 [J]. 中国免疫志, 2000 (5): 22-24.
- [12] 韦 琴, 吴士筠, 梅 辉, 等. 鸡 α 干扰素在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达及抗病毒功能初探 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42 (10): 49-51.
- [13] 黄道超, 张志和, 杨光友, 等. 大熊猫 γ -干扰素基因的克隆与序列分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30 (1): 36-38.
- [14] 吴碧华, 龙存国, 胡长林, 等. 大鼠脑出血灶周围区内和血浆中干扰素- γ 基因及蛋白的表达 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2006, 3 (13): 2-7.
- [15] 李德萍, 王 康, 戴 勇, 等. 大鼠肾移植移植植物中 γ -干扰素和 γ -干扰素诱导基因表达研究 [J]. 中国现代医学杂志, 1986, 17 (24): 66-69.
- [16] 景志忠, 李玉萍, 窦永喜, 等. 牦牛 α -干扰素基因的克隆及其原核表达的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30 (3): 99-105.
- [17] 陆宏开. 我国牦牛的传染病及其研究进展 [J]. 四川草原, 1990, 12 (2): 51-62.
- [18] 史喜菊, 夏 春, 汪 明, 等. 黄牛 *IFN- α* 基因的克隆、表达及抗病毒活性研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26 (2): 100-114.
- [19] 许金俊, 秦爱建, 刘岳农, 等. 水牛 γ -干扰素基因的克隆及其在大肠杆菌中表达 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2003, 4 (1): 5-9.
- [20] 汪 明, 史喜菊, 夏 春, 等. 荷斯坦奶牛 *IFN- α* 基因的克隆表达和抗病毒活性分析 [J]. 中国兽医杂志, 2004, 40 (1): 13-17.
- [21] 吴志光, 夏 春, 汪 明. 北京鸭 II 型干扰素基因分子克隆与序列分析 [J]. 中国兽医科技, 2001, 31 (3): 7-11.

(责任编辑: 袁 伟)