

猪 IL-18 基因真核表达质粒的构建及其表达产物的生物学活性

邵攀峰¹, 崔 沛², 郑兰兰¹, 魏战勇¹, 盛 敏², 崔保安¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省动物疫病预防控制中心, 河南 郑州 450008)

[摘 要] **【目的】**构建猪 IL-18 的重组质粒,检测其表达产物的生物学活性,为进一步研究猪 IL-18 基因的结构与功能奠定基础。**【方法】**通过 PCR 技术从含猪 IL-18 全基因的克隆质粒中扩增猪 IL-18 基因,定向克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(+)中,构建重组质粒 pIL-18,在脂质体作用下转染猪肾 PK15 细胞。**【结果】**重组质粒 pIL-18 经酶切、测序鉴定,证实含有目的片段,且连接、构建正确。通过 RT-PCR 检测,证实了猪 IL-18 在 PK15 细胞中的表达;SDS-PAGE 分析结果表明,表达产物是与猪 IL-18 相符的约 22 ku 的蛋白条带;Western blot 证实,表达产物能与猪 IL-18 单克隆抗体发生特异性反应。pIL-18 对 H1 亚型猪流感灭活疫苗免疫增强作用的研究表明,pIL-18 能够提高猪流感灭活疫苗诱发的细胞免疫应答。**【结论】**成功地构建了猪 IL-18 的重组质粒 pIL-18,并在 PK15 细胞中获得了瞬时表达,且具有一定的免疫原性。

[关键词] 猪白细胞介素 18;真核表达;生物学活性;猪流感灭活疫苗

[中图分类号] S828.2;Q782

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)12-0085-06

Construction of eukaryotic expression plasmid of porcine IL-18 gene and identification of bioactivity of its expressed protein

SHAO Pan-feng¹, CUI Pei², ZHENG Lan-lan¹, WEI Zhan-yong¹,
SHENG Min², CUI Bao-an¹

(1 College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Henan Province Center for Animal Diseases Control and Prevention, Zhengzhou, Henan 450008, China)

Abstract: **【Objective】**The research was to construct eukaryotic expression vector of porcine IL-18 and detect bioactivity of its expressed protein. **【Method】**Porcine IL-18 gene was amplified by PCR with recombinant plasmid pGEM-IL-18 as a template. The PCR product was digested with *EcoR* I and *Xho* I, then inserted into eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) to generate an expression plasmid pIL-18 and transfected into the PK15 cells by lipofectamine 2000. **【Result】**Porcine IL-18 mRNA expression was found in the PK15 cells. SDS-PAGE and Western blot indicated that porcine IL-18 gene had already inserted into PK15 cell chromosome. The results showed that recombinant protein was about 22 ku. The recombinant protein can react with porcine IL-18 monoclonal antibody. Immunoenhancement effect of recombinant expression plasmid pIL-18 on swine influenza vaccine was observed by proliferation response of the T lymphocytes from spleen. It can obviously enhance the cell-mediated immune response. **【Conclusion】**The recombinant plasmid pIL-18 was constructed, and its expression protein had bioactivity.

Key words: porcine interleukin-18; eukaryotic expression; bioactivity; swine influenza vaccine

* [收稿日期] 2009-04-02

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划专项(2006BAD06A08)

[作者简介] 邵攀峰(1982—),男,河南周口人,硕士,主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。

[通信作者] 崔保安(1948—),男,河南荥阳人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

白细胞介素 18 (Interleukin-18, IL-18) 又称 IFN- γ 诱导因子^[1], 具有多种生物学功能。其能刺激 Th1 等细胞产生 IFN- γ 、GM-CSF、IL-2 等细胞因子, 增强 Fas 介导的细胞毒作用, 促进 T 细胞的增殖, 因此 IL-18 在抗病毒、抗肿瘤、抗超敏反应等方面有着潜在的应用前景^[2-4]。

1999 年, Muneta 等^[5-6]成功地从猪肺泡巨嗜细胞中克隆到了猪 IL-18, 并证明表达的猪 IL-18 成熟蛋白较前体蛋白具有更高的活性。而国内有关猪白细胞介素 18 (Porcine IL-18, pIL-18) 的研究起步较晚, 直到 2003 年, 郑敏等^[7]克隆了猪 IL-18 成熟蛋白基因, 并在大肠杆菌中进行了原核表达, 随后景志忠等^[8]报道了长白猪的 IL-18 基因序列, 温纳相等^[9]克隆了新兴猪 IL-18 成熟蛋白基因, 沈国顺等^[10-12]构建了共表达 PRRSV GP5、GP3 和猪 IL-18, FMDV P12A、3C 和猪 IL-18 的重组鸡痘病毒及其免疫原性研究, 结果表明, 猪 IL-18 能增强免疫力。但目前国内尚未见有关猪 IL-18 重组真核表达质粒的报道。因此, 本研究在成功克隆河南杂交猪 IL-18 全基因的基础上^[13], 构建了猪 IL-18 基因真核表达质粒, 并对其表达产物的生物学活性进行了初步鉴定, 以期为进一步研究猪 IL-18 基因对猪源常规疫苗以及基因疫苗的免疫增强作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌体、质粒及细胞系 真核表达载体 pcDNA3.1(+) 购自 Invitrogen 公司。猪 IL-18 的克隆质粒 pGEM-pIL18, 由河南省动物性食品安全重点实验室构建并保存。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 和 PK15 细胞, 均由河南省动物性食品安全重点实验室保存。

1.1.2 种毒和抗原 H1 亚型猪流感 (SI) 灭活疫苗和 H1 亚型猪流感血凝 (HA) 抗原, 均购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

1.1.3 试验小白鼠 20 日龄清洁级昆明小白鼠, 购自郑州大学试验动物中心。

1.1.4 酶及试剂 Ex Taq DNA 聚合酶, DNA Marker DL 2000, 限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I 等, 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。QIAquick gel extraction kit, 购自 Qiagen 公司。UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒, 购自上海生物工程公司。AMV Single Step RT-PCR kit 试剂盒, 购自 BBI 公司。LipofectamineTM 2000 Reagent 转染试剂

盒, 购自 Invitrogen 公司。RPMI 1640、PHA、MTT 试剂和淋巴细胞分离液, 均购自华美生物工程公司。

1.2 PCR 扩增猪 IL-18 基因

根据 pGEM-pIL18 质粒的猪 IL-18 基因序列设计 1 对引物, 上、下游引物分别加入 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点 (下划线部分): 上游引物为 5'-AT-AGAATTCATATGGCTGCTGAACCGG-3'; 下游引物为 5'-CGC CTCGAGCTAGTTCTTGT TTTT-3', 该对引物扩增长度为 579 bp, 含猪 IL-18 基因全序列。以文献 [13] 中的 pGEM-IL-18 质粒 DNA 为模板, 按常规体系进行 PCR 扩增, 程序为: 94 °C 预变性 5 min; 然后 94 °C 1 min, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 36 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min 后置 4 °C 保存。反应结束后, PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL EB) 进行电泳, 并用 QIAquick gel extraction kit 进行目的片段回收。

1.3 重组质粒 pIL-18 的构建

用 *Eco*R I + *Xho* I 双酶切 PCR 产物, 电泳、回收猪 IL-18 基因片段。将猪 IL-18 基因片段定向插入到同样处理的真核表达载体 pcDNA3.1(+) 中, 构建重组质粒 pIL-18, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。挑取生长良好的白色菌落, 接种到含有 Amp 的 LB 肉汤培养基中扩增培养, 37 °C 振荡培养 12~16 h。提取重组质粒, 进行 PCR 及 *Eco*R I、*Xho* I 酶切鉴定。将 PCR 和酶切鉴定正确的重组质粒 pIL-18 送宝生物工程 (大连) 有限公司进行测序, 以确定插入片段的核苷酸序列和阅读框架的正确性。

1.4 重组质粒 pIL-18 转染 PK15 细胞

以质粒提取试剂盒提取 pIL-18 质粒 DNA, 经紫外分光光度计测定所提取质粒的含量。参照 Aubin 等^[14]的方法, 用 LipofectamineTM 2000 Reagent 转染试剂盒转染重组质粒 pIL-18 到 PK15 细胞中。同时设转染空载体 pcDNA3.1(+) 和不转染质粒细胞 2 组对照。

1.5 瞬时表达产物的鉴定

1.5.1 RT-PCR 检测细胞中猪 IL-18 基因的 mRNA 以 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒, 提取转染后 48 h 及阴性对照的 PK15 细胞总 RNA, 用猪 IL-18 基因的特异性引物, 按 AMV Single Step RT-PCR kit 试剂盒说明书进行 RT-PCR 检测。电泳检测扩增结果。

1.5.2 瞬时表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析 取转染 48 h 的 PK15 细胞及阴性对照细胞上清, 经透析浓缩后进行 SDS-PAGE 检测。SDS-

PAGE 电泳结束后,将凝胶上的蛋白转印至硝酸纤维素膜(NC)上,用猪 IL-18 单克隆抗体(1 : 5 000)作一抗,用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠(1 : 10 000)作二抗,进行 Western blot 反应。

1.6 猪 IL-18 重组质粒对猪流感灭活疫苗的免疫增强作用

将 140 只 20 日龄小白鼠随机分成 4 组,35

只/组。具体分组及免疫情况见表 1。21 日龄首次免疫,35 日龄 2 次免疫;每组小白鼠均于接种后第 1,2,3,4,5,6,7 和 8 周时,各随机抽取 4 只小鼠摘除眼球静脉采血,分离血清进行血凝抑制(Hemagglutination inhibition, HI)抗体检测,以观察 HI 抗体的动态变化;同时,剖解小鼠,无菌采取脾脏制备淋巴细胞悬液,以 MTT 法进行淋巴细胞转化试验。

表 1 试验分组及免疫情况

Table 1 Test grouping and vaccination

组别 Group	小白鼠数 No. of mice	胸肌注射疫苗及重组质粒剂量 Vaccine and recombinant plasmid dose vaccinated intramuscularly
联合免疫组 Combination vaccinated group	35	pIL-18 (1 μg/μL) 100 μL/只和猪流感灭活疫苗 1 头份 pIL-18 (1 μg/μL) 100 μL per chicken and SI inactivated vaccine 1 dose
单疫苗组 Vaccine vaccinated group	35	猪流感灭活疫苗 1 头份 SI inactivated vaccine 1 dose
pIL-18 组 pIL-18 group	35	pIL-18 (1 μg/μL) 100 μL/只 pIL-18 (1 μg/μL) 100 μL per chicken
pcDNA3.1(+)组 pcDNA3.1(+) group	35	pcDNA3.1(+) (1 μg/μL) 100 μL/只 pcDNA3.1(+) (1 μg/μL) 100 μL per chicken

1.7 T 淋巴细胞转化试验

参考文献[15]的方法,用 MTT 法测定 T 淋巴细胞转化反应。将鼠脾脏剪碎,120 目钢网中磨碎过滤,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,用 DMEM 培养液调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,加入终质量浓度为 20 μg/mL 的 PHA,灭活小牛血清 2%,双抗 100 IU/mL。将细胞悬液转移到 96 孔细胞培养板的孔中,每孔 100 μL 细胞悬液,做 4 个重复孔。另设阴性对照 4 孔和不含细胞的培养液空白对照孔 1 个。将 96 孔板置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 40~48 h;每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL),再在 37 ℃、体积分数 5%CO₂ 培养箱中培养 3~4 h;每孔加入 100 μL 10% SDS,0.01 mol/L HCl 溶液,混匀,轻轻吹打,继续置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱培养 3~4 h。将空白对照孔调零,测定 OD_{570 nm} 值。

1.8 统计学分析

利用软件 SPSS 11.5,按生物统计学的方差分析法对试验数据进行比较处理。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pIL-18 的鉴定

重组质粒 pIL-18 经 *EcoR* I 酶切得到 1 条约 6.0 kb 的条带;用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后,得到 5.4 kb 和 0.6 kb 2 条带(图 1)。应用扩增猪 IL-18 的特异引物,以重组质粒为模板进行 PCR 扩增、电泳,出现 1 条约 0.6 kb 的特异性条带(图 1),与预期结果一致。PCR 和酶切鉴定为阳性的重组质粒,经进一步测序后证明,重组质粒 pIL-18 中插入的猪

IL-18 基因的核苷酸序列及阅读框完全正确。

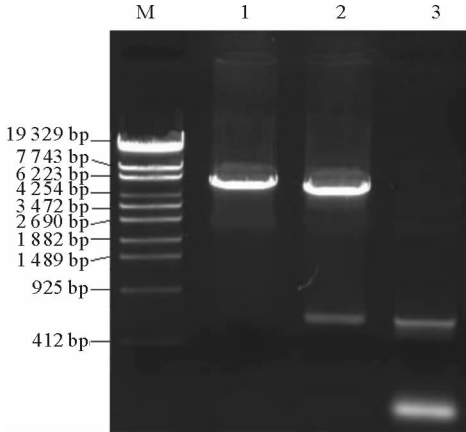


图 1 重组质粒 pIL-18 的酶切和 PCR 鉴定结果
M, DNA Marker λ-*Eco*T14 I digest;1, *EcoR* I 酶切 pIL-18;2, *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pIL-18;
3, pIL-18 的 PCR 产物

Fig.1 Identification of recombinant plasmid pIL-18 by digestion (*EcoR* I ,*EcoR* I + *Xho* I) and PCR
M, DNA Marker λ-*Eco*T14 I digest;1, Recombinant plasmid pIL-18 digestion by *EcoR* I ;2, Recombinant plasmid pIL-18 digestion by *EcoR* I and *Xho* I ;
3, PCR product of recombinant plasmid pIL-18

2.2 重组质粒 pIL-18 在哺乳动物细胞中的表达

2.2.1 pIL-18 转染 PK15 细胞后的 RT-PCR 鉴定
用猪 IL-18 的特异性引物进行 RT-PCR 检测,结果表明,重组质粒 pIL-18 转染组在 579 bp 处出现特异性扩增带,与猪 IL-18 大小相符,而空载体 pcDNA3.1(+)转染组无此条带(图 2)。

2.2.2 转染重组质粒 pIL-18 的 PK15 细胞上清 SDS-PAGE 和 Western blot 分析
取瞬时转染细胞和阴性对照细胞上清液进行 SDS-PAGE,电泳结

果表明,转染重组质粒组得到了大小约 22 ku 的条带,对照组无此条带(图 3)。Western blot 检测表明,该表达产物能与猪 IL-18 单克隆抗体发生反应

(图 4)。表明猪 IL-18 基因在 PK15 细胞中获得了瞬时表达,并具有一定的免疫原性。

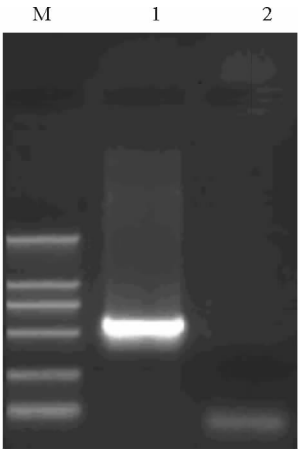


图 2 重组质粒 pIL-18 转染 PK15 细胞后的 RT-PCR 鉴定结果

M. DNA Marker DL 2000;1. 重组质粒 pIL-18 转染 PK15 细胞组;2. 空载体对照组

Fig. 2 RT-PCR products of mRNA from PK15 cells transfected by recombinant plasmid pIL-18
M. DNA Marker DL 2000;1. RT-PCR product of pIL-18;2. pcDNA3. 1(+) control

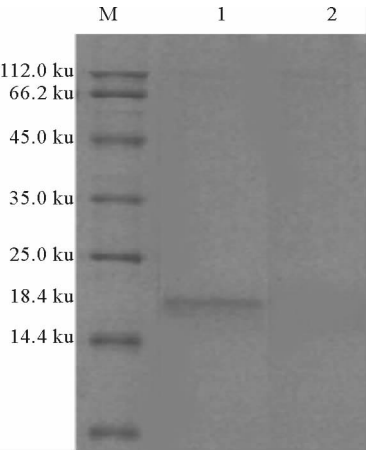


图 4 重组质粒 pIL-18 表达产物的 Western blot 分析
M. 低分子量蛋白 Marker;1. 重组质粒 pIL-18 的表达产物;2. pcDNA3. 1(+)对照

Fig. 4 Western blot analysis of expression products by recombinant plasmid pIL-18

M. Low MW standard protein Marker;1. Expression products of pIL-18;2. pcDNA3. 1(+) control

2.3 重组质粒 pIL-18 对猪流感 HI 抗体的影响

由图 5 可以看出,重组质粒 pIL-18 和猪流感灭活疫苗联合免疫后,HI 抗体水平稳定上升,第 4 周时达到高峰,第 8 周仍保持较高水平;猪流感灭活疫苗免疫组的抗体水平同样稳定地上升,较联合免疫

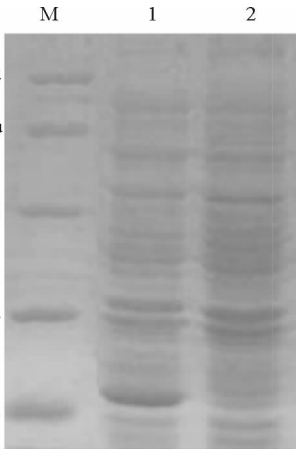


图 3 转染重组质粒 pIL-18 的 PK15 细胞上清 SDS-PAGE 分析

M. 低分子量蛋白 Marker;1. 重组质粒 pIL-18 转染组;2. PK15 细胞对照组

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of supernatant of transfected PK15 cells by recombinant plasmid pIL-18
M. Low MW standard protein Marker;1. Supernatant of transfected PK15 cells by pIL-18;2. Supernatant of PK15 cells
组稍低,但差异不明显($P>0.05$);重组质粒 pIL-18 和 pcDNA3. 1(+)组保持未免疫的抗体水平,第 7 周后逐渐下降至 0。

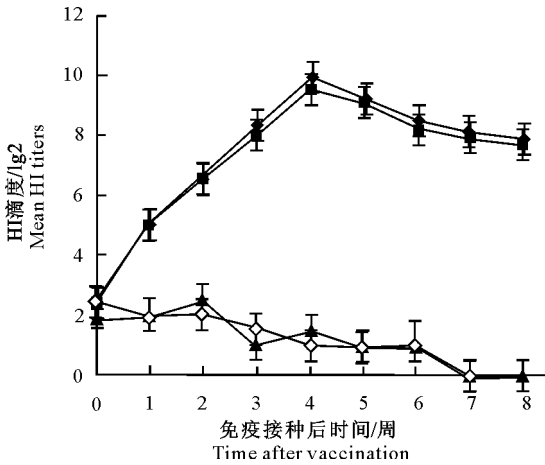


图 5 各试验组小白鼠血清 HI 抗体的动态变化
—◆—, pIL-18+猪流感灭活疫苗;—■—, 猪流感灭活疫苗 SI;
—▲—, pIL-18;—◇—, pcDNA3. 1(+)

Fig. 5 Alteration of HI antibody of mice post-inoculation
—◆—, pIL-18+SI inactivated vaccine;—■—, SI inactivated vaccine;
—▲—, pIL-18;—◇—, pcDNA3. 1(+)

2.4 鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖反应效果

在免疫后的不同时期,分别采取各试验组小白

鼠脾脏,分离 T 淋巴细胞,经 PHA 刺激后,应用 MTT 法测定 T 淋巴细胞的增殖动态,结果如图 6 所示。由图 6 可见,pIL-18 和猪流感灭活疫苗联合免疫组的 $OD_{570\text{ nm}}$ 值在免疫 2 周后明显高于单纯疫苗免疫组,差异极显著($P<0.01$);只接种 pIL-18 免疫组与猪流感灭活疫苗免疫组之间差异不明显,但仍明显高于空载体对照组($P<0.05$)。结果表明,猪流感灭活疫苗与 pIL-18 联合免疫对鼠 T 淋巴细胞的转化功能较仅用疫苗免疫明显提高,单独用 pIL-18 注射的鼠 T 淋巴细胞转化功能较空载体对照组也有明显增强。

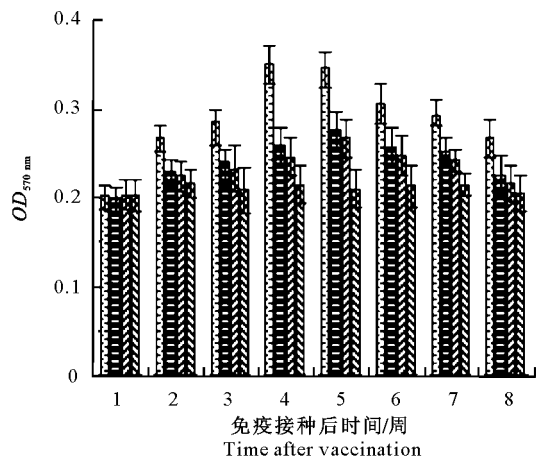


图 6 各试验组小白鼠脾脏T淋巴细胞转化反应的动态变化
■ pIL-18+猪流感灭活疫苗; ■ 猪流感灭活疫苗;
▨ pIL-18; □ pcDNA3.1(+)
Fig.6 Alteration of T lymphocytes proliferative response of mice post-inoculation
▨ pIL-18+SI in activated vaccine; ■ SI inactivated vaccine;
▨ pIL-18; □ pcDNA3.1(+)

3 讨 论

我国是世界第一养猪大国,猪病是制约我国养猪业健康发展的主要因素,同时也对人类健康存在着巨大隐患。疫苗免疫是当前预防和控制传染病的主要措施,但目前使用的常规疫苗存在免疫效率低与安全性差两大难题。细胞因子作为佐剂使用,可以增强疫苗的免疫效力,且已经在构建基因工程疫苗方面显示出广阔的应用前景。IL-18 是近年来新发现的一种重要的细胞免疫调节因子,具有多种生物学功能。已有研究显示,IL-18 是机体免疫应答,尤其是细胞免疫应答中的一种重要细胞因子,可作为疫苗的免疫佐剂^[16]。

郑敏等^[7]已构建了猪 IL-18 基因重组原核表达质粒,并在大肠埃希氏菌中进行了表达。原核表达系统具有表达量高、操作简单等优点而被广泛采用,

但是直接利用大肠杆菌表达的重组 IL-18 作佐剂,仍有较大困难。这是因为,大肠杆菌为原核表达系统,该系统表达的蛋白存在非糖基化形式和非天然状态折叠等缺陷,这使得表达的蛋白分子失去天然结构,因而对其重组蛋白的活性还存在争议^[17];另外,要使 IL-18 发挥佐剂效应,就必须使其到达抗原应答部位,而体外表达的重组 IL-18 被机体转运至特定部位是极其困难的。真核表达系统则不同,它对重组蛋白可进行糖基化、折叠等修饰作用,使得重组蛋白在结构和生物学活性等方面更接近于天然蛋白,因此,真核表达系统在研究中也广泛使用。沈国顺等^[10-12]将 PRRSV GP5、GP3 和 FMDV P12A、3C 分别与猪 IL-18 在重组鸡痘病毒中进行了共表达,但重组鸡痘病毒不能 2 次免疫。鉴于上述原因,本研究利用真核表达载体 pcDNA3.1(+),构建了猪 IL-18 基因真核表达质粒,以期能够获得活性更接近于天然猪 IL-18 的基因工程蛋白,为进一步研究猪 IL-18 基因对猪源常规疫苗以及基因疫苗的免疫增强作用奠定基础。

本研究通过 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点,将猪 IL-18 基因片段定向连接到 pcDNA3.1(+)的相应位点,构建了猪 IL-18 重组质粒 pIL-18,转染 PK15 细胞后,表达产物能与猪 IL-18 单克隆抗体发生特异性反应。pIL-18 与 H1 亚型猪流感灭活疫苗联合接种后,试验小白鼠所产生的 HI 抗体与单纯 H1 亚型猪流感灭活疫苗免疫组差异不显著($P>0.05$);而鼠 T 淋巴细胞增殖试验表明,联合免疫组的试验小白鼠 T 淋巴细胞对 PHA 的反应,强于单纯疫苗免疫组,差异极显著($P<0.01$),其中,T 淋巴细胞的增殖反应从接种后第 2 周开始一直高于单纯疫苗免疫组,且两组之间均表现为极显著差异($P<0.01$),这与沈国顺等^[10-12]的研究结果一致。表明,猪 IL-18 的重组质粒 pIL-18 在鼠体内得到了良好表达,表达产物具有明显地增强猪流感灭活疫苗诱导细胞免疫的作用。

本研究选用的免疫方式是肌肉注射,这是因为骨骼肌细胞是目前所知摄取外源 DNA 效率最高的组织;与其他器官相比,骨骼肌细胞具有独特的 T 管和细胞膜穴样结构,在细胞 DNA 的摄入过程中起着极为重要的作用^[18]。基因疫苗免疫后能诱导特异性 CTL 以及 Th 细胞和体液应答,这可能是由不同机理造成的。Th 细胞和抗体(B 细胞)应答的产生,可能的机理是少量内源性合成肽从转染细胞连续地排出或在细胞死亡后释放出来,胞外蛋白被

“专职的”抗原递呈细胞吞到外周的胞浆间隙中,经过加工处理,在内质网中生成的 MHC 形成抗原肽 MHC 类分子复合物,然后被高尔基体运送至抗原递呈细胞表面供 Th 细胞识别,导致 Th 细胞活化、增殖、分化为效应 Th 细胞,并分化一系列的细胞因子,从而发挥 Th 细胞的辅助效应。在 Th 细胞帮助下,B 细胞活化、增殖、分化为浆细胞,合成并分泌抗体,形成体液免疫应答,但确切的免疫发生机制需进一步验证。基因疫苗的研究尚处于试验阶段,由于接种剂量很少,受各种因素的影响大,不同研究者的研究结果差异较大,目前尚没有行之有效的关于基因疫苗的接种剂量、次数、途径以及预处理等方面的试验资料。本试验结果表明,基因疫苗的抗原基因表达量水平低,因此今后应致力于基因疫苗的免疫发生、免疫程序方面的研究,尽快使基因疫苗应用于生产实践。

[参考文献]

- [1] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells [J]. Nature, 1995, 378(2): 88-91.
- [2] Fujioka N, Akazawa R, Ohashi K, et al. Interleukin-18 protects mice against acute herpes simplex virus type 1 infection [J]. J Virol, 1999, 73(2): 2401-2409.
- [3] Kanda T, Tanaka T, Sekiguchi K, et al. Effect of interleukin-18 on viral myocarditis enhancement of interferon-gamma and natural killer cell activity [J]. J Mo Cell Cardiol, 2000, 32(12): 2163-2171.
- [4] Marshall DJ, Rudnick K A, McCarthy S G, et al. Interleukin-18 enhances Th1 immunity and tumor protection of a DNA vaccine [J]. Vaccine, 2006, 24(3): 244-253.
- [5] Muneta Y, Shimoji Y, Yokomizo Y, et al. Molecular cloning of porcine interleukin-1 beta converting enzyme and differential gene expression of IL-1 beta converting enzyme, IL-1 beta, and IL-18 in porcine alveolar macrophages [J]. J Interferon Cytokine Res, 1999, 19(11): 1289-1296.
- [6] Muneta Y, Mori Y, Shimoji Y, et al. Porcine interleukin 18: cloning, characterization of the cDNA and expression with the baculovirus system [J]. Cytokine, 2000, 12(6): 566-572.
- [7] 郑敏, 金宁一, 张洪勇, 等. 猪白细胞介素 18 成熟蛋白基因的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23(5): 430-432.
Zheng M, Jin N Y, Zhang H Y, et al. Cloning and expression of porcine interleukin-18 mature protein gene in *Escherichia coli* [J]. Chin J Vet Sci, 2003, 23(5): 430-432. (in Chinese)
- [8] 景志忠, 窦永喜, 侯俊林, 等. 猪白介素-18 基因的克隆及其序列分析 [J]. 中国兽医科技, 2004, 34(7): 3-7.
Jing Z Z, Dou Y X, Hou J L, et al. Cloning and sequence analysis of porcine interleukin-18 gene [J]. Chinese Journal of Vet-

- erinary Science and Technology, 2004, 34(7): 3-7. (in Chinese)
- [9] 温纳相, 陈瑞爱, 裴福福, 等. 新兴猪 IL-18 成熟蛋白基因的克隆与序列分析 [J]. 中国兽医科技, 2005, 35(1): 64-66.
Wen N X, Chen R A, Pei Z F, et al. Cloning and sequencing of interleukin-18 mature protein gene [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2005, 35(1): 64-66. (in Chinese)
- [10] 沈国顺, 金宁一, 秦晓光, 等. 表达 PRRSV GP5、GP3 和猪 IL-18 的重组鸡痘病毒的构建及鉴定 [J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(6): 583-585.
Shen G S, Jin N Y, Qin X G, et al. Construction and identification of recombinant fowlpox virus expressing GP5/GP3 of pig reproduction and respiration syndrome virus (PRRSV) and swine IL-18 [J]. Chin J Biologicals, 2006, 19(6): 583-585. (in Chinese)
- [11] Ma M X, Jin N Y, Shen G S, et al. Immune responses of swine inoculated with a recombinant fowlpox virus co-expressing P12A and 3C of FMDV and swine IL-18 [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008, 121(1/2): 1-7.
- [12] Shen G S, Jin N Y, Ma M X, et al. Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus coexpressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18 [J]. Vaccine, 2007, 25(21): 4193-4202.
- [13] 崔保安, 郑兰兰, 陈红英, 等. 杂交猪白细胞介素 18 全基因的克隆与序列分析 [J]. 畜牧与兽医, 2007, 39(6): 1-3.
Cui B A, Zheng L L, Chen H Y, et al. Cloning and sequencing of interleukin-18 gene in an inbred pig [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2007, 39(6): 1-3. (in Chinese)
- [14] Aubin R A, Weinfeld M, Taghavi M, et al. Highly effective delivery of foreign DNA to adherent cells via polybrene/DM-SO-assisted gene transfer [J]. Methods in Molecular Biology, 1997, 62: 319-342.
- [15] 温纳相, 黄青云, 陈荣光, 等. 鸡 IL-18 基因重组真核表达载体的构建及其表达产物的生物学活性 [J]. 中国兽医科技, 2005, 35(7): 547-550.
Wen N X, Huang Q Y, Chen R G, et al. Construction of eukaryotic express vector of chicken IL-18 gene and identification of bioactivity of its expressed protein [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2005, 35(7): 547-550. (in Chinese)
- [16] Degen W G, van Zuilekom H I, Scholtes N C, et al. Potentiation of humoral immune responses to vaccine antigens by recombinant chicken IL-18 (rChIL-18) [J]. Vaccine, 2005, 23(33): 4212-4218.
- [17] Lambrecht B, Gonze M, Morales D, et al. Comparison of biological activities of natural and recombinant chicken interferon-gamma [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1999, 70(3/4): 257-267.
- [18] Fynan E F, Webster R G, Fuller D H, et al. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(24): 11478-11482.