

# 鸡集落刺激因子(CSF)基因的克隆、序列分析及蛋白结构预测

谢 昆<sup>1,2</sup>,朱志雄<sup>1</sup>,杨 军<sup>1</sup>

(1. 红河学院 生命科学与技术学院,云南 蒙自 661100;2. 云南省天然药物与化学生物学重点实验室,云南 蒙自 661100)

**摘要:**根据 GenBank 中报道的红原鸡集落刺激因子(Colony-stimulating factor,CSF) cDNA 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对特异性引物,对本地肉鸡注射 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ConA 试剂,饲养 24 h 后,取脾脏提取淋巴细胞总 RNA,利用 RT-PCR 技术克隆集落刺激因子(CSF)的 cDNA 片段。对克隆片段进行测序,并利用 DNASTAR 软件进行不同物种间同源性比较。序列分析表明,CSF 的 cDNA 开放阅读框为 435 bp,编码 144 个氨基酸,与红原鸡的序列比较,其核苷酸的同源性为 98.4%,氨基酸的同源性为 95.2%,同人、犬、印度野牛、野猪、绵羊和老鼠的 CSF 序列作比较,其核苷酸的同源性分别为 28.7%、29.2%、33.6%、30.8%、29.4%和 34.7%,氨基酸的同源性分别为 8.3%、9.0%、15.3%、12.4%、11.0%和 12.0%。然后利用 DNASTAR 和 DNAMAN 软件,对鸡 CSF 的结构进行预测,结果表明,鸡 CSF 基因为一结构松散的蛋白分子。鸡的 CSF 基因被成功克隆,它存在着种属特异性。这为进一步研究该基因的生物学作用特别是利用 CSF 增强 DNA 疫苗的免疫效果奠定了基础。

**关键词:**克隆;鸡;集落刺激因子;序列分析;蛋白质结构预测

**中图分类号:**Q785 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)02-0036-06

## Cloning and Sequence Analysis of Chicken CSF Gene and Prediction of Protein Structure

XIE Kun<sup>1,2</sup>, ZHU Zhi-xiong<sup>1</sup>, YANG Jun<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Honghe University, Mengzi 661100, China;

2. Key Lab of Yunnan Province of Natural Medicines and Chemical Biology, Mengzi 661100, China)

**Abstract:** According to the gallus colony stimulating factor (colony-stimulating factor, CSF) cDNA sequences published by GenBank, a pairs of specific primer was designed, the local dorking was injected 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ConA, total RNA was extracted from feeding 24 hours lymphocyte from spleen, then dorking colony stimulating factor (CSF) cDNA fragment was cloned by RT-PCR technology. Following the DNA fragments was analyzed by DNASTAR software, then homology was compared between dorking CSF and other animals CSF. Result showed that dorking CSF gene was 435 bp in size with an ORF encoding 141 amino acids residues, the nucleotide homology between dorking CSF and CSF gene of Gallus, human, canis, Bos taurus, Sus scrofa, sheep, mice was respectively 98.4%, 28.7%, 29.2%, 33.6%, 30.8%, 29.4% and 34.7%, Amino acids homology was respectively 95.2%, 8.3%, 9.0%, 15.3%, 12.4%, 11.0% and 12.0%. Using DNASTAR and DNAMAN software predicate protein structure of dorking CSF, results showed that the dorking CSF protein was a loose protein. The chicken CSF gene was successfully cloned, there is a species-specific. And construct a based on further study the biological effects of CSF gene in particular the use of CSF enhance the immune effect of DNA vaccine.

**Key words:** Cloning; Dorking; Colony-stimulating factor; Sequence analysis; Prediction of protein structure

集落刺激因子(Colony stimulating factor, CSF)是一组在体内外均能强烈刺激骨髓造血干细胞增殖、分化并形成细胞集落的低分子细胞因子。骨髓干细

胞在分化过程中需要相应的集落刺激因子,如前粒细胞在粒细胞集落刺激因子作用下分化成粒细胞,前单核细胞在巨噬细胞集落刺激因子作用下分化成

收稿日期:2008-12-30

基金项目:红河学院生物化学与分子生物学重点学科建设项目(071010);红河学院博硕科研启动项目(XS205026)

作者简介:谢 昆(1975-),男,云南昆明人,主要从事动物细胞因子克隆方面的研究。

单核细胞,前粒细胞-单核细胞在粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子作用下生成粒细胞和单核细胞<sup>[1]</sup>。

1977 年 Burges 等<sup>[2]</sup>在小鼠肺组织培养上清液中发现一种能刺激粒细胞和巨噬细胞形成集落的因子,因此命名为粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (Granu-locyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)。1984 年和 1985 年,小鼠<sup>[3]</sup>和人<sup>[4-6]</sup> GM-CSF 的 cDNA 分别被克隆,1995 年,Inumaru S 等<sup>[7,8]</sup>首次获得了猪 GM-CSF 的 cDNA,随后国内学者舒邓群<sup>[11]</sup>、宋勤叶<sup>[9]</sup>、窦永喜<sup>[10]</sup>等成功克隆出了猪粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF),李敏雄等<sup>[11]</sup>克隆了人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。GM-CSF 的体外克隆与其他细胞因子如 IL-2、-干扰素的体外克隆一致,皆能由有丝分裂原物质如 ConA、PHA 等刺激脾脏淋巴细胞、外周血淋巴细胞产生<sup>[12,13]</sup>。有关鸡集落刺激因子 (CSF) 基因的成功克隆,国内外还未见报道。本研究对鸡集落刺激因子 cDNA 进行了克隆和序列分析,以期进一步研究其生物学活性及其在基因工程疫苗中的应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

35 日龄的肉鸡购买于新安所梨花市场。

### 1.2 试剂

RT 试剂盒购于 MBI 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于天根生物工程研究所;50 mmol/L, pH 7.4 Trizol 试剂购于 macgene 公司;DL2000 Marker 购于大连宝生物工程有限公司;刀豆蛋白 A (ConA) 和焦炭酸二乙酯 (DEPC) 购于 Sigma 公司;RPMI 1640 淋巴细胞培养液购于赛墨飞世尔生物化学制品 (北京) 有限公司;TaqDNA 聚合酶为上海申能博彩公司产品;100 mL D-Hank s 液为红河学院分子生物学实验室自行配制。

### 1.3 鸡脾脏淋巴细胞总 RNA 的提取

35 日龄肉鸡肌肉注射 2 mL 100  $\mu$ g/mL 的刀豆蛋白 A (ConA),饲养 24 h 后,取其脾脏放入研钵,加入 5 mL D-Hank s 液研磨 5 min,2 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,在沉淀中加入 1 mL Trizol 试剂,一步法提取总 RNA<sup>[14]</sup>。

### 1.4 鸡集落刺激因子 cDNA 的合成

取总 RNA 5  $\mu$ L,置于 0.2 mL 离心管中,加入 Oligo (dT) 1  $\mu$ L,DEPC 水 6  $\mu$ L,轻轻混合 3~5 s,70  $^{\circ}$ C 5 min 后取出,置于冰上,再加入 5  $\times$ RT Buffer 试剂 4  $\mu$ L,RNA inhibitor (20 U/ $\mu$ L) 试剂 1  $\mu$ L,10 mmol/L

dNTP 2  $\mu$ L,轻轻混匀后 37  $^{\circ}$ C 水浴加热 5 min,再加入 M-MLV 1  $\mu$ L,总体积 20  $\mu$ L,42  $^{\circ}$ C 1 h,70  $^{\circ}$ C 10 min 后-20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.5 鸡集落刺激因子的 PCR 扩增

根据 GenBank 中报道的鸡集落刺激因子基因 cDNA 序列 (序列号 NM-001007078),利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计如下一对特异性引物:

P<sub>1</sub>:5'-AGATGCTGCCCCAGCTCACTAT-3' 22 bp

P<sub>2</sub>:5'-CTTAGATGCAGICTTTCTCCTC-3' 22 bp

引物包括起始密码子和终止密码子,预计扩增的 ORF 片段长度为 435 bp,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

在一洁净无菌的 0.2 mL 薄壁 PCR 管中依次加入超纯水 16  $\mu$ L,10  $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L,10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L,2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L,P<sub>1</sub> (100 pmol) 0.5  $\mu$ L,P<sub>2</sub> (100 pmol) 0.5  $\mu$ L,共 25  $\mu$ L。循环条件如下:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min 后取 5  $\mu$ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 PCR 产物纯化回收

将目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下放入干净的离心管中,采用 TENGGEN 生物工程公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段,具体方法参考说明书。

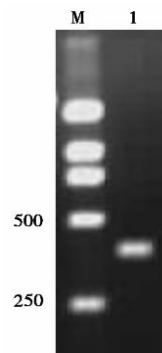
### 1.7 PCR 产物的序列测定和序列分析

将回收纯化的目的 DNA 片段送交上海生物工程有限公司测序,测序结果用 DNASTAR 软件进行序列分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸡 CSF 的 RT-PCR 扩增结果

1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,可见 250~500 bp 之间有一条特异性条带,与预期结果一致 (图 1)。



M. DNA Marker DL 2000;1. 鸡 CSF 基因 RT-PCR 的扩增产物。  
M. DNA Marker DL 2000;1. RT-PCR product of chicken CSF gene.

图 1 鸡 CSF 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR amplification product of chicken CSF gene

## 2.2 鸡 CSF 基因的测序结果

利用 DNAMAN 软件将所克隆得到的肉鸡 CSF 基因与国外发表的白羽肉鸡 CSF 基因的序列作对比,可以看出,克隆的肉鸡 CSF 基因大小 435 bp,共

有 7 个核苷酸与白羽肉鸡 CSF 基因不一致,分别是第 55,99,113,163,222,254 和 277 位(图 2,上为 RT-PCR 产物,下为国外发表的白羽肉鸡 CSF 基因序列)。

```

1   ATGCTGGCCCAGCTCACTATTCTGCTTGCCTCGGGGTGCTCTGCAGCCCTGCGCCACCC
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1   ATGCTGGCCCAGCTCACTATTCTGCTTGCCTCGGGGTGCTCTGCAGCCCTGCGGCCACCC
61  ACAACATACTCCTGCTGCTACAAAGGTACACCATCCTGAAGAAATAACGAGTCACCTTG
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
61  ACAACATACTCCTGCTGCTACAAAGGTACACCATCCTGAAGAAATAACGAATCACCTTG
121 GAGAGCACAGCGGCCACAGCAGGTCTGCTCGGTACCCATGGACATCAGGGATAAAACC
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
121 GAGAGCACAGCGGCCACAGCAGGTCTGCTCGGTACCCATGCACATCAGGGATAAAACC
181 TGCTCGGTAAACAACCTGAAAACATTCATAGAGTCCTTGAACAAAATGGGACAGAGGAA
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
181 TGCTCGGTAAACAACCTGAAAACATTCATAGAGTCCTTGAATACAAATGGGACAGAGGAA
241 GAAAGCGGAATCGCTTTTCAGCTGAACAGAGTTCACGAGTGTGAACGCCCTCTTCTCGAAC
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
241 GAAAGCGGAATCGCCTTTTCAGCTGAACAGAGTTCACAAGTGTGAACGCCCTCTTCTCGAAC
301 ATAACCTCCACCCCGCAGGTTCCTGATAAGGAATGTAGAACTGCACAAGTATCGAGGGAA
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
301 ATAACCTCCACCCCGCAGGTTCCTGATAAGGAATGTAGAACTGCACAAGTATCGAGGGAA
361 AAATTCAAAGAGGCATTAAAAACTTTCTTTATTTACCTCTCTGATGTGCTCCAGAGGAG
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
361 AAATTCAAAGAGGCATTAAAAACTTTCTTTATTTACCTCTCTGATGTGCTCCAGAGGAG
421 AAAGACTGCATCTAA
   |||||||||||||||
421 AAAGACTGCATCTAA

```

图 2 肉鸡 CSF 基因与白羽肉鸡 CSF 基因核苷酸序列比较

Fig. 2 Nucleotides sequence comparison between dorking CSF gene and white feather chicken CSF gene

```

1   ATGCTGGCCCAGCTCACTATTCTGCTTGCCTCGGGGTGCTCTGCAGCCCTGCGGCCACCC
1   M L A Q L T I L L A L G V L C S P A A T
61  ACAACATACTCCTGCTGCTACAAAGGTACACCATCCTGAAGAAATAACGAAATCAGCTTG
21  T T Y S C C Y K V Y T I L E E I T N H L
121 GAGAGCACAGCGGCCACAGCAGGTCTGCTCGGTACCCATGCACATCAGGGATAAAACC
41  E S T A A T A G L S S V P M H I R D K T
181 TGCTCGGTAAACAACCTGAAAACATTCATAGAGTCCTTGAATACAAATGGGACAGAGGAA
61  C L R N N L K T F I E S L N T N G T E E
241 GAAAGCGGAATCGCCTTTTCAGCTGAACAGAGTTCACAAGTGTGAACGCCCTCTTCTCGAAC
81  E S G I A F Q L N R V H K C E R L F S N
301 ATAACCTCCACCCCGCAGGTTCCTGATAAGGAATGTAGAACTGCACAAGTATCGAGGGAA
101 I T P T P Q V P D K E C R T A Q V S R E
361 AAATTCAAAGAGGCATTAAAAACTTTCTTTATTTACCTCTCTGATGTGCTCCAGAGGAG
121 K F K E A L K T F F I Y L S D V L P E E
421 AAAGACTGCATCTAA
141 K D C I *

```

图 3 鸡 CSF 基因序列与其编码的氨基酸序列

Fig. 3 The nucleotides sequence of dorking CSF gene and encoding amino acids sequence

## 2.3 鸡 CSF 基因编码的氨基酸序列分析

利用软件 DNAMAN 对鸡 CSF 基因编码的氨基酸进行预测,预测表明鸡 CSF 基因编码 144 个氨基酸(图 3)。

## 2.4 鸡 CSF 基因与其他动物 CSF 基因同源性比较和进化树分析

利用 DNASTar 软件将克隆得到的肉鸡 CSF 基因

与其他几种脊椎动物的 CSF 基因进行同源性比较,可以看出肉鸡 CSF 基因与红原鸡 CSF 基因的同源性最高,达到 98.4%,与人 CSF 基因同源性最低,只有 28.7%左右(图 4)。进化树分析结果可以看出肉鸡与红原鸡进化关系最为接近,其次为老鼠,较远的为犬和人(图 5)。

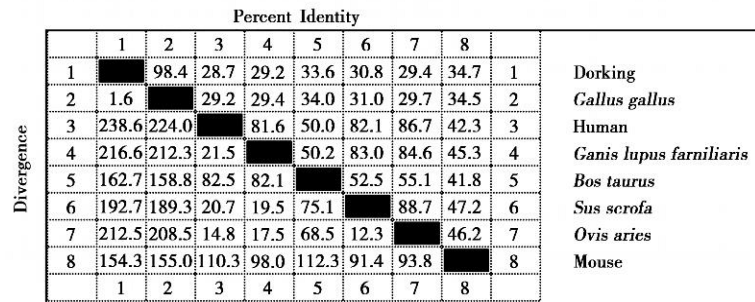


图 4 鸡 CSF 基因与其他动物 CSF 基因同源性比较

Fig. 4 The homology comparison between dorking CSF gene and other animal CSF gene

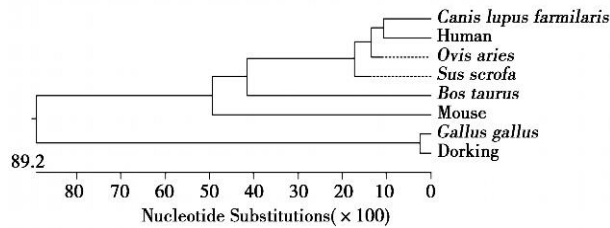


图 5 鸡 CSF 与其他各种动物 CSF 基因进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis between dorking CSF gene and other animal CSF gene

2.5 鸡 CSF 基因编码的氨基酸与其他动物 CSF 基因编码氨基酸序列同源性分析与进化树的分析

利用 DNASTar 对克隆所得到的肉鸡 CSF 基因编码的氨基酸序列与以上动物 CSF 基因编码的氨基酸序列进行同源性比较与进化树分析后可以看出，肉鸡 CSF 基因编码的氨基酸序列与红原锦鸡 CSF 基因编码的氨基酸序列同源性最高，为 95.2%，与人 CSF 基因编码的氨基酸序列同源性最低，为 8.3%（图 6），进化关系差异也比较明显（图 7）

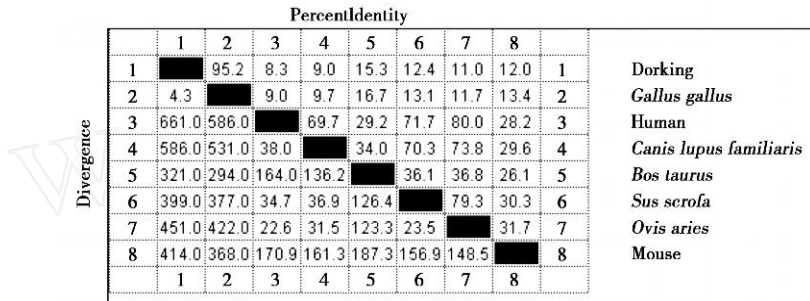


图 6 克隆的肉鸡 CSF 基因编码氨基酸与其他动物 CSF 基因编码氨基酸序列同源性比较

Fig. 6 Homology comparison of amino acids between dorking CSF and other animals CSF

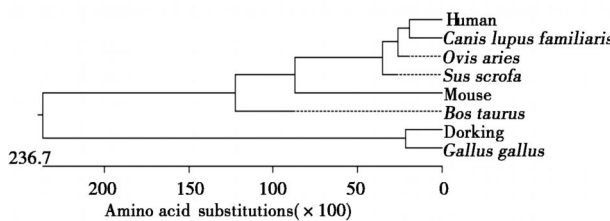


图 7 鸡 CSF 编码的氨基酸与其他动物编码氨基酸进化树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree analysis of amino acids sequence between chicken CSF and other animal CSF

2.6 蛋白质二级结构预测与抗原性分析

用 DNASTar 对所克隆鸡 CSF 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，可以看到鸡 CSF 基因推导的蛋白质空间结构具有 7 个螺旋，4 个折叠，6 个转角和 7 个不规则卷曲。抗原性强的氨基酸位点比较多，比如 54~68 和 72~82 这两段位点。而非抗原性的氨基酸位点少而且强度也比较弱，比如 1~18 和 43~52 位点。鸡 CSF 编码的蛋白质具有较多的亲水性位点，比如

51~69 和 71~81，只有 1~18 位一个强疏水位点（图 8）。

3 讨论

集落刺激因子（CSF）是一种具有免疫调节和多项潜能造血的分子，可以刺激和活化巨噬细胞、中性粒细胞和各种 APCs 的增殖、分化<sup>[15]</sup>。常用作 DNA 疫苗的免疫佐剂，以克服 DNA 疫苗免疫原性差的缺陷<sup>[16]</sup>。在免疫调节方面，将具有抗肿瘤作用的细胞因子基因导入宿主体内，并使之稳定有效地表达，使体内持续存在一定水平的内源性细胞因子以发挥抗肿瘤作用。集落刺激因子（CSF）在肿瘤疫苗和细胞疫苗研究中已初显成效，目前正用于恶性肿瘤的临床试验研究。它不仅可诱导在 T 细胞免疫反应中起关键作用的 DC 细胞成熟、分化，而且在免疫治疗过程中可增强主要和次要的抗体反应，以促进 DC 等 APC 分化、成熟和活化及上调 CD86 表达水平，增强中性粒细胞、单核巨噬细胞、酸性粒细胞对肿瘤细胞

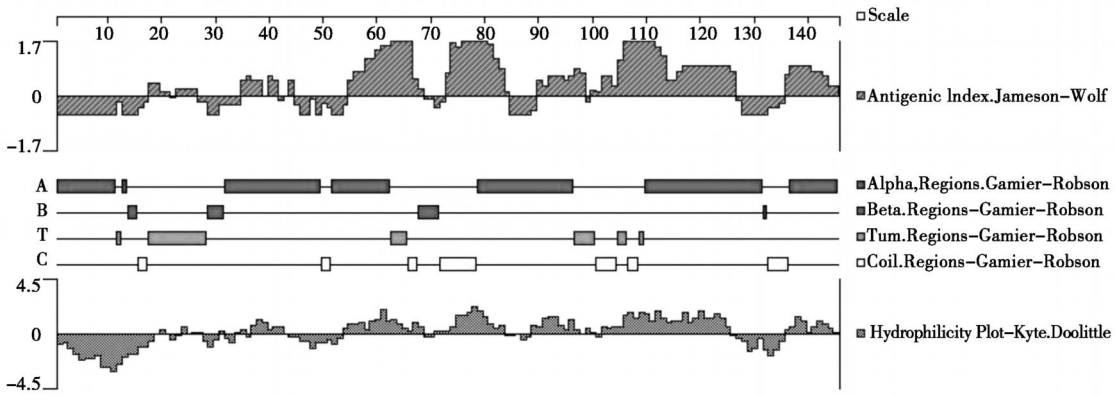


图8 鸡 CSF 蛋白质二级结构预测与抗原性分析

Fig.8 Prediction of secondary structure and antigenicity analysis of dorking CSF protein

的吞噬作用和 ADCC 效应等活性,促进 Th、Tc、NK 在肿瘤部位浸润,抑制肿瘤细胞生长<sup>[17]</sup>。本试验成功克隆了鸡的集落刺激因子 (CSF) 基因,并进行了测序,该基因的成功克隆将为进一步研究它的生物学活性以及作为肿瘤疫苗和 DNA 疫苗的免疫佐剂奠定了物质基础。

细胞因子基因通常处于沉默状态,其表达具有时空性,只有当受到刺激原致敏后才进行转录和表达,集落刺激因子 (CSF) 基因也不例外,所以本试验利用刀豆蛋白 A (ConA) 液刺激诱导鸡 PBMC 后再提取细胞总 RNA,利用 RT-PCR 技术成功克隆了鸡集落刺激因子 (CSF) 基因。本实验室利用该方法先后克隆了鲫鱼 IFN、奶牛 IL-2 等细胞因子基因,由此说明用刀豆蛋白 A (ConA) 可以诱导刺激不同种细胞因子在体外转录和表达。

本研究克隆的集落刺激因子 (CSF) 基因完整的阅读框长为 435 bp,编码 144 个氨基酸的前体蛋白。与 GenBank 上登录的白羽肉鸡 CSF 参考序列相比较,其中有 7 个碱基发生变异,这 7 个碱基的变异导致蛋白水平上 7 个氨基酸残基的变异。

肉鸡集落刺激因子 (CSF) 与红原鸡、人及其他脊椎动物进化树分析比较发现与红原鸡亲缘关系最近,与其他脊椎动物亲缘关系都较远,在氨基酸序列水平上,仍然是与红原鸡亲缘关系最近,而与其他脊椎动物亲缘关系都较远,说明他们在系统进化过程中可能一直处在相同的分支上。在基因序列和氨基酸序列同源性分析中,除红原鸡外,肉鸡和其他的脊椎动物的同源性都较低,这预示着不同物种的集落刺激因子 (CSF) 具有结构差距过大,不能互相通用而发挥相似的作用。

DNA 测序的速度,远远超过蛋白质结构的测定和分析速度,而且目前蛋白质结构测定和分析难度大、费用高,某些蛋白质难以形成晶体而无法进行结构分析,因此,依据蛋白质序列预测蛋白质可能的结

构显得非常重要。通过预测,可获得蛋白质的部分结构信息,一方面可进行蛋白质结构的改造,使其活性、稳定性等方面更为理想;另一方面可进行药物分子设计,使药物与受体更易结合,充分发挥药物的治疗作用<sup>[18]</sup>。本试验应用生物信息学技术和分子生物学软件,对集落刺激因子 (CSF) 蛋白二级结构进行了预测和分析。结果表明,鸡集落刺激因子 (CSF) 结构较为简单,其中螺旋、无规则卷曲和转角相对较多。对蛋白亲水区及结构区域预测时发现,在位点 51~124 这段蛋白较强亲水区域内有 3 个螺旋,1 个折叠,4 个转角和 4 个无规则卷曲,这说明集落刺激因子 (CSF) 结构较为松散,依次为依据还能利用同源建模的方法预测出集落刺激因子 (CSF) 成熟蛋白的 3D 结构。在抗原性分析一项中在位点 52~128 之间基因的抗原性最强,而此段区域的亲水性较强,结构较为松散,这似乎说明在亲水性越强的区域结构越松散,抗原性也越强。这将为利用生物技术为鸡增强抗病能力提供依据。

目前蛋白结构预测的方法及程序比较多,但欧洲分子生物学实验室提供的 PDH 程序被认为是目前最好的蛋白二级结构预测程序,其采用在蛋白质数据库中搜索相似序列和神经网络相结合的方法,从而提高了预测的准确度,其平均准确率超过 72%,最佳者达 90% 以上;此外,本试验在对基因抗原性、蛋白质二级和三级结构、蛋白质亲水区等方面的预测中,也采用目前认为的较为理想的预测方法,希望提高预测的准确性,得到较为理想的鸡集落刺激因子 (CSF) 结构信息。已获得的一些研究结果也证实了我们预测的结果是准确的<sup>[19,20]</sup>。

养鸡业在我国国民经济中占据着相当重要的地位,但是鸡的一些烈性传染病,比如今年对我国危害较大的禽流感,严重威胁了养鸡业的进一步发展。研究发现,集落刺激因子 (CSF) 在疾病的治疗、预防及作为疫苗佐剂方面具有广泛的应用前景,集落刺

激因子 (CSF) 基因的成功克隆为开发细胞因子产品鉴定了基础。

### 参考文献:

- [1] 舒邓群, 茆达干, 曹少先, 等. 猪粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM - CSF) 基因的克隆和序列分析及其基因表达 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(2): 240 - 246.
- [2] Burges A W, Camakaris J, Metcalf D. Purification and properties of colony - stimulating factor from mouse lung conditioned medium [J]. J Biol Chem, 1977, 252(6): 1998 - 2003.
- [3] Gough N M, Gough J, Metcalf D, et al. Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator. Granulocyte - macrophage colony stimulating factor [J]. Nature, 1984, 309(5971): 763 - 767.
- [4] Wong G G, Witek J S, Temple P A, et al. Human GM - CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins [J]. Science, 1985, 228(4701): 810 - 815.
- [5] Cantrel M A, Anderson D, Cerretti D P, et al. Cloning, sequence, and expression of a human granulocyte/macrophage colony - stimulating factor [J]. Proc Natl Acad Sci, 1985, 82(18): 6250 - 6254.
- [6] Lee F, Yokota T, Otsuka T, et al. Isolation of cDNA for a human granulocyte - macrophage colony - stimulating factor by functional expression in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci, 1985, 82(13): 4360 - 4364.
- [7] Inumaru S, Takamatsu H. cDNA cloning of porcine granulocyte - macrophage colony - stimulating factor [J]. Immunology and Cell Biology, 1995, 73(5): 474 - 476.
- [8] Cho Y W, Lee D Y, Shin S J, et al. Kinetic study of porcine GM - CSF expression in porcine alveolar macrophages and spleen cells [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 39(1): 61 - 67.
- [9] 宋勤叶, 杨汉春, 郭 鑫, 等. 猪粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 cDNA 的克隆与序列分析 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 526 - 529.
- [10] 窦永喜, 才学鹏, 景志忠. 猪粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子基因的克隆、序列分析及蛋白结构预测 [J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(6): 473 - 478.
- [11] 李敏雄, 陈盛强, 刘启才, 等. 人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 cDNA 的克隆及鉴定 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2006, 20(2): 105 - 107.
- [12] 陈红英, 崔保安, 李新生, 等. 地方品种固始鸭 - 干扰素基因的克隆与分子进化分析 [J]. 华北农学报, 2007, 22(3): 1 - 4.
- [13] 郭小参, 崔保安, 陈红英, 等. 淮南猪 IL22 全基因的克隆与遗传进化分析 [J]. 华北农学报, 2008, 23(4): 14 - 18.
- [14] 郑晓飞. RNA 实验技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 24 - 26.
- [15] Dunham S P, Bruce J. Isolation, expression and bioactivity of feline granulocyte macrophage colony stimulating factor [J]. Gene, 2004, 332: 97 - 106.
- [16] Iwasaki M, Adachi Y, Minamino K, et al. Mobilization of bone marrow cells by G - CSF rescues mice from cisplatin - induced renal failure, and M - CSF enhances the effects of GM - CSF [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(3): 658 - 666.
- [17] Ripa R S, Jorgensen E, Wang Y, et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte - colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST - elevation myocardial infarction: result of the double - blind, randomized, placebo - controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial [J]. Circulation, 2006, 113(16): 1983 - 1992.
- [18] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: A review [J]. J Vet Dis Invest, 2000, 12: 3 - 14.
- [19] Buzzo M P, Yang J, Casella G, et al. Hematopoietic stem cell mobilization with G - CSF induces innate inflammation yet suppresses adaptive immune gene expression as revealed by microarray analysis [J]. Exp Hematol, 2007, 35(9): 1456 - 1465.
- [20] Kuhlmann M T, Kirchhof P, Klocke R, et al. G - CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis [J]. J Exp Med, 2006, 203(1): 87 - 97.