

# 合作猪干扰素 $\gamma$ 基因的克隆与序列分析

李富强, 张小丽, 马小军, 罗秀刚, 岳燕, 姜力飞, 王恩丽, 时帅峰

(甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 运用 RT-PCR 和 PCR 技术克隆基因, 应用 DNASTar 对获得的 cDNA 及推测的氨基酸序列进行分析。从合作猪脾脏组织中克隆 *IFN- $\gamma$*  cDNA ORF 全长 501 bp, 共编码 166 个氨基酸, N 端具有由 23 个氨基酸组成的信号肽, 该蛋白预测的分子质量为 19.418 5 kDa, 等电点为 9.54, 合作猪 *IFN- $\gamma$*  核苷酸序列上共发现 9 个磷酸化位点, 分别为 Ser (7)、Thr (1)、Tyr (1); 2 个 N-糖基化位点, 分别在第 39 位和第 106 位 Asn 处。序列比较结果表明, 合作猪 *IFN- $\gamma$*  基因序列与藏猪、印度猪种、内江猪、牛、狗的同源性较高, 与人类和鸡的同源性较低。对于小分子蛋白质和多肽, 有义突变和无义突变对于同源性分析及系统进化的分析影响较大, 应结合核苷酸和氨基酸 2 个层面综合分析, 并且 *IFN- $\gamma$*  和高原低氧作用于机体产生的 NO, 能有效地抑制寄生虫病的发生。

**关键词:** 合作猪; *IFN- $\gamma$* ; 克隆; 序列分析

中图分类号: S828; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)04-0031-06

## Cloning and Sequence Analysis of *Interferon- $\gamma$* cDNA of Hezuo Pig

LI Fu-qiang, ZHANG Xiao-li, MA Xiao-jun, LUO Xiu-gang, YUE Yan, JIANG Li-fei,  
WANG En-li, SHI Shuai-feng

(Faculty of Animal Medical, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** *IFN- $\gamma$*  gene was cloned by RT-PCR, the cDNA was cloned and sequenced which structure of its encoding protein were predicted by using DNASTar software. Sequence analysis results showed that the *IFN- $\gamma$*  gene ORF was 501 bp and encoded 166 amino acids, including a signal peptide of 23 amino acids (aa) at the N terminal. Relative molecular weight of the encoding protein was 19.418 5 kDa, and the isoelectric point (pI) was 9.54. There were 9 phosphorylation sites including 7 Sers, 1 Thr and 1 Tyr. In addition, 2 N-glycosylation sites were found at Asn about 39th and 106th in the line. Sense mutation and nonsense mutation in small protein or polypeptide have large influence on the analysis of system evolution and percent identity, so it should be multianalysis on nucleotide and amine acid. *IFN- $\gamma$*  and plateau and hypoxia induced body to produce NO. It could inhibit parasitic disease effectively.

**Key words:** Hezuo pig; *IFN- $\gamma$* ; Cloning; Sequence analysis

合作猪是我国独有的高原藏猪品种之一, 该猪种体小、肉鲜、瘦肉率高、耐粗饲、适应力强, 是医学上理想的动物模型。目前, 对合作猪抗病性状的遗传基础还缺乏足够的认知, 势必会影响这一品种资源的有效利用<sup>[1-2]</sup>。干扰素- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ , *IFN- $\gamma$* ) 是一种具有强烈抗肿瘤和免疫调节作用的细胞因子, 主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生, 无论在细胞免疫还是体液免疫过程中都发挥着重要作用<sup>[3-4]</sup>。因此, 克隆合作猪 *IFN- $\gamma$*  基因、研究其结构

与功能对中国猪品种资源的开发和利用具有重要的意义。1990 年, Dijkmans 等<sup>[5]</sup>首先克隆了含有内含子的猪 *IFN- $\gamma$*  基因。随后, Vandenbroeck 等<sup>[6]</sup>通过分段克隆猪 *IFN- $\gamma$*  基因的外显子并将其拼接的方法得到完整基因后进行了原核表达。目前, 国内外主要从 2 个方向研究: 一是蛋白的表达。人们通过原核载体、真核载体尝试在原核细胞和真核细胞内对重组的干扰素基因进行高效表达, 提纯蛋白制成各种药剂或与其他重组基因融合表达提高免疫作

收稿日期: 2013-03-27

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目 (096RJZA005)

作者简介: 李富强 (1987-), 男, 河北唐山人, 硕士, 主要从事动物免疫与抗病研究。

通讯作者: 马小军 (1972-), 男, 甘肃泾川人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物免疫与抗病、动物中毒与营养代谢病研究。

用<sup>[7-9]</sup>。但随着研究的深入,干扰素制剂的缺点与不足日渐显露<sup>[10-11]</sup>。二是基因多态性的研究。李娟娟<sup>[12]</sup>、王大力<sup>[13]</sup>、Fan<sup>[14]</sup>等均在 *IFN- $\gamma$*  内含子 1, 内含子 3, 外显子 4 等位置发现多处突变位点, 其中 874 A>T 与多种疾病相关<sup>[15-17]</sup>。但对于 *IFN- $\gamma$*  的结构、功能、作用机理研究较少, 而且对于 *IFN- $\gamma$*  的研究也是参照 I 型干扰素进行。分离、克隆合作猪脾脏淋巴细胞 *IFN- $\gamma$*  基因, 通过序列及分子特征分析, 明确合作猪 *IFN- $\gamma$*  与其他物种 *IFN- $\gamma$*  的同源性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品 取自甘肃省甘南藏族自治州合作市散养条件下的成年合作猪脾组织。脾组织存于液氮中保存备用。

1.1.2 试剂盒及试剂 RNAiso plus( Total RNA 提取试剂)、PrimeScript® RT-PCR Kit、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 均购自 TaKaRa 公司; pBM19-T 快速克隆试剂购自 Biomed 公司; DH5 $\alpha$  感受态细胞购自天根公司。

### 1.2 方法

1.2.1 引物合成 根据 GenBank 上登载的猪 *IFN- $\gamma$*  序列( AY188090) 在其阅读框外侧用 Primer 3 Input 软件设计引物: 上游引物: 5'-GCTAACTCTCTCCGAAACAATGA-3', 下游引物: 5'-TATTGCAGGCAGGATGACAA-3', 上述引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2.2 总 RNA 的提取 按 RNAiso plus( Total RNA 提取试剂) 说明书操作, 获得合作猪脾脏总 RNA。用 PrimeScript® RT-PCR Kit 试剂盒对总 RNA 进行反转录, 获得 cDNA, -20 °C 保存待用。

1.2.3 基因的扩增 采用 50  $\mu$ L 反应体系: 10  $\times$  Buffer 5  $\mu$ L, dNTP( 10 mmol/L each) 2  $\mu$ L, 上、下游引物( 20 pmol/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, TaKaRa Ex Taq HS( 5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, cDNA 5  $\mu$ L, RNase Free dH<sub>2</sub>O 36.5  $\mu$ L。反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 循环 32 次; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后按照 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 说明书要求直接进行凝胶回收。

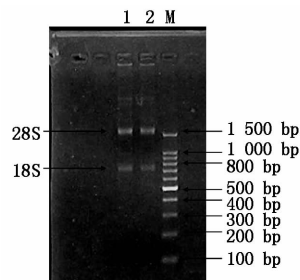
1.2.4 基因克隆与生物信息学分析 将回收的 540 bp 处 DNA 条带产物与 pBM19-T 载体相连接, 采用快速连接的方法, 即 1  $\mu$ L 载体加入 4  $\mu$ L 目的片段, 30 °C 连接 30 min, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 其中加入

X-gal 和 IPTG 后涂布含氨苄青霉素( 100  $\mu$ g/mL) 的平板, 挑取白色菌斑, 接种含氨苄青霉素的 LB 培养液, 37 °C 250 r/min 振摇过夜。取 1  $\mu$ L 菌液进行 PCR 鉴定, 将初步鉴定正确的菌液送华大基因生物公司进行通用引物测序, 并利用生物软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 完整性鉴定

取 4  $\mu$ L 提取的总 RNA 溶液, 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后可清晰看见 28S 和 18S 的 RNA 条带, 并且 28S 是 18S 亮度的 2 倍, 表明无降解现象, 所提取的 RNA 完整, 可用于下一步试验( 图 1)。



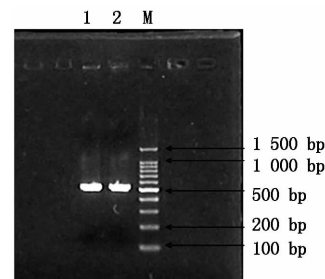
M. 100 bp DNA 分子质量梯度标准; 1~2. 合作猪总 RNA。  
M. 100 bp DNA Ladder Maker; 1~2. Hezuo pig total RNA.

图 1 合作猪脾脏总 RNA 鉴定

Fig. 1 Identification of total RNA of Hezuo pig

### 2.2 合作猪脾脏淋巴细胞 *IFN- $\gamma$* 基因 cDNA 的体外扩增

以提取的总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 技术, 扩增出大小约为 540 bp 的特异性目的条带, 与预计大小相符。而且条带亮度较强, 说明扩增产物的量较大。并且无杂带, 说明特异性良好( 图 2)。



M. 100 bp DNA 分子质量梯度标准; 1~2. RT-PCR 扩增产物。  
M. 100 bp DNA Ladder Maker; 1~2. RT-PCR products.

图 2 合作猪 *IFN- $\gamma$*  RT-PCR 扩增

Fig. 2 The PCR product of Hezuo pig *IFN- $\gamma$*  gene

### 2.3 菌落 PCR 鉴定

为了验证重组质粒是否为阳性, 挑取蓝白筛选后的白色菌落进行 PCR 反应, 扩增的片段与预期分子量 540 bp 一致, 而且为单一条带, 可以证明重组质粒为阳性, 目的片段已经连接到 pBM19-T 克隆载体上( 图 3)。

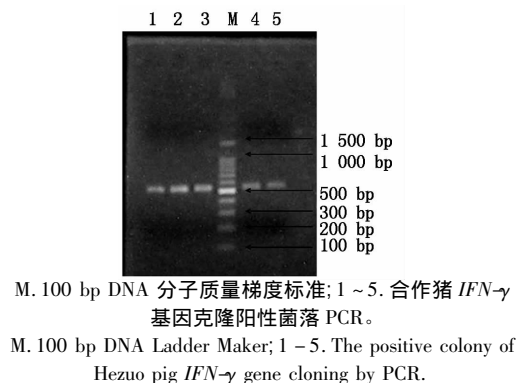


图3 合作猪 *IFN- $\gamma$*  基因克隆阳性菌落 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of positive colony of Hezuo pig *IFN- $\gamma$*  gene cloning by PCR

## 2.4 序列测定与分析

测序结果如图4所示,与NCBI GenBank上登载的猪 *IFN- $\gamma$*  基因序列完全一致,序列全长540 bp,含有一个完整的开放阅读框(ORF)501 bp,共编码166个氨基酸,运用Geneva大学的ExPASy服务器的ProtParam([www.expasy.ch/tools/protparam.html](http://www.expasy.ch/tools/protparam.html))对合作猪 *IFN- $\gamma$*  分子进行分析,结果表明:其分子量为19.418 5 kDa,等电点为9.54,含赖氨酸(Lys, K)最多为17个(10.2%),含有半胱氨酸3个,分别位于第13,17,23位。在20种常见的氨基酸中,不含有组氨酸(His)。其蛋白不稳定指数(Instability index, II)为40.20 > 40,属于不稳定蛋白。

GCTAACTCTCTCCGAAACA																
5'	ATG	AGT	TAT	ACA	ACT	TAT	TTC	TTA	GCT	TTT	CAG	CTT	TGC	GTG	ACT	45
1	M	S	Y	T	T	Y	F	L	A	F	Q	L	C	V	T	
5'	TTG	TGT	TTT	TCT	GGC	TCT	TAC	TGC	CAG	GCG	CCC	TTT	TTT	AAA	GAA	90
1	L	C	F	S	G	S	Y	C	Q	A	P	F	F	K	E	
5'	ATA	ACG	ATC	CTA	AAG	GAC	TAT	TTT	AAT	GCA	AGT	ACC	TCA	GAT	GTA	135
1	I	T	I	L	K	D	Y	F	N	A	S	T	S	D	V	
5'	CCT	AAT	GGT	GGA	CCT	CTT	TTC	TTA	GAA	ATT	TTG	AAG	AAT	TGG	AAA	180
1	P	N	G	G	P	L	F	L	E	I	L	K	N	W	K	
5'	GAG	GAG	AGT	GAC	AAA	AAA	ATA	ATT	CAG	AGC	CAA	ATT	GTC	TCC	TTC	225
1	E	E	S	D	K	K	I	I	Q	S	Q	I	V	S	F	
5'	TAC	TTC	AAA	TTC	TTT	GAA	ATC	TTC	AAA	GAT	AAC	CAG	GCC	ATT	CAA	270
1	Y	F	K	F	F	E	I	F	K	D	N	Q	A	I	Q	
5'	AGG	AGC	ATG	GAT	GTG	ATC	AAG	CAA	GAC	ATG	TTT	CAG	AGG	TTC	CTA	315
1	R	S	M	D	V	I	K	Q	D	M	F	Q	R	F	L	
5'	AAT	GGT	AGC	TCT	GGG	AAA	CTG	AAT	GAC	TTC	GAA	AAG	CTG	ATT	AAA	360
1	N	G	S	S	G	K	L	N	D	F	E	K	L	I	K	
5'	ATT	CCG	GTA	GAT	AAT	CTG	CAG	ATC	CAG	CGC	AAA	GCC	ATC	AGT	GAA	405
1	I	P	V	D	N	L	Q	I	Q	R	K	A	I	S	E	
5'	CTC	ATC	AAA	GTG	ATG	AAT	GAT	CTG	TCA	CCA	AGA	TCT	AAC	CTA	AGA	450
1	L	I	K	V	M	N	D	L	S	P	R	S	N	L	R	
5'	AAG	CGG	AAG	AGA	AGT	CAG	ACT	ATG	TTC	CAA	GGC	CAG	AGA	GCA	TCA	495
1	K	R	K	R	S	Q	T	M	F	Q	G	Q	R	A	S	
5'	AAA	TAA														501
1	K															
5'	TTG	TAT	CTG	CCT	GCA	AATA										

图4 合作猪 *IFN- $\gamma$*  核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig.4 The sequence of cDNA and amino acid of Hezuo pig *IFN- $\gamma$*

		同源性 Percent identity									
离散度 Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8		
	1		83.0	30.7	86.8	75.2	86.8	86.6	86.8	1	牛 Bovine. seq
	2	19.4		32.3	82.2	77.8	81.8	82.0	82.2	2	犬 Canine. seq
	3	194.9	174.5		31.5	32.1	31.1	31.7	31.5	3	鸡 Chicken. seq
	4	14.6	20.4	185.6		74.7	99.6	99.8	100.0	4	合作猪 Hezuo. seq
	5	30.4	26.4	176.7	31.4		74.7	74.5	74.7	5	人 Human. seq
	6	14.6	21.0	189.7	0.4	31.4		99.4	99.6	6	印度猪种 India sus scrofa. seq
	7	14.8	20.7	183.6	0.2	31.7	0.6		99.8	7	内江猪 Neijiang porcine. seq
	8	14.6	20.4	185.6	0.0	31.4	0.4	0.2		8	藏猪 Tibet porcine. seq
		1	2	3	4	5	6	7	8		

图5 合作猪与其他物种 *IFN- $\gamma$*  核苷酸序列同源性比对

Fig.5 Percent identity of *IFN- $\gamma$*  between Hezuo pig and other animals

## 2.5 同源性分析

用 DNASTar 软件将克隆的合作猪 *IFN- $\gamma$*  基因序列与 GenBank 中登陆的藏猪、印度猪种、牛、内江猪、犬、人类、鸡等动物的参考序列进行比对,发现合

作猪 *IFN- $\gamma$*  基因序列与藏猪、印度猪种、内江猪、牛、狗的同源性较高,分别为 100%、99.6%、99.8%、86.8%、82.2%;与人类的同源性次之,为 74.7%;与鸡的同源性最低,仅为 31.5% (图 5、6)。

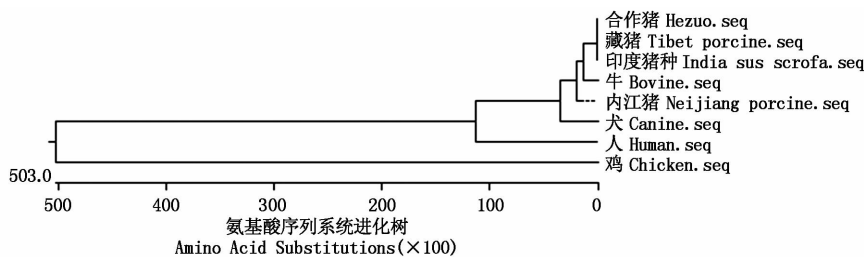


图 6 合作猪与其他物种 *IFN- $\gamma$*  氨基酸序列系统进化树

Fig. 6 Amino acid substitutions of Hezuo pig and other animals *IFN- $\gamma$*

## 2.6 合作猪 *IFN- $\gamma$* 蛋白分子信号肽预测

运用丹麦技术大学生物序列分析中心开发的 SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 软件基于神经网络算法对 *IFN- $\gamma$*  蛋白分子进行信号肽预测,从图 7 中可以看出:合作猪 *IFN- $\gamma$*  氨基酸序列在第 23 和第 24 个氨基酸残基之间有一个可能的剪切位置,所以认为其 1~23 是信号肽区段。

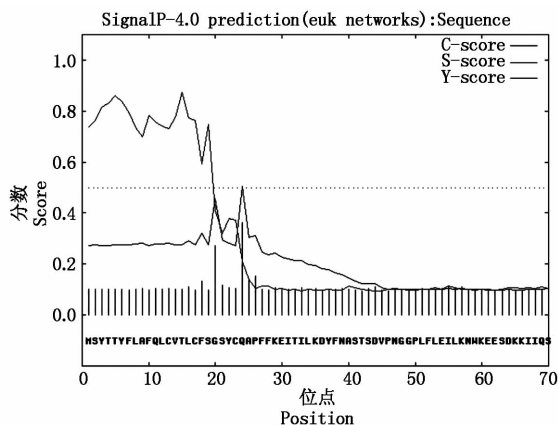


图 7 合作猪 *IFN- $\gamma$*  信号肽分析

Fig. 7 Signal peptide analysis for Hezuo pig *IFN- $\gamma$*

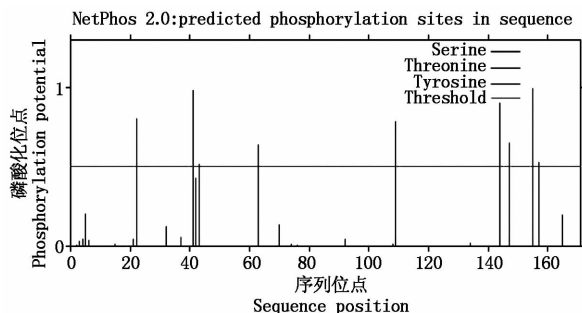


图 8 合作猪 *IFN- $\gamma$*  磷酸化作用位点分析

Fig. 8 Phosphorylation analysis for Hezuo pig *IFN- $\gamma$*

## 2.7 合作猪 *IFN- $\gamma$* 蛋白分子磷酸化位点分析

运用神经网络预测法,对不同蛋白分子磷酸化作用位点的丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、酪氨酸 (Tyr) 通过 NetPhos 2.0 在线磷酸化位点预测服务

器,对合作猪 *IFN- $\gamma$*  的磷酸化位点进行预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>),如图 8 结果表明:合作猪 *IFN- $\gamma$*  氨基酸序列中共发现 9 个磷酸化位点,分别为 Ser(7)、Thr(1)、Tyr(1)。

## 2.8 合作猪 *IFN- $\gamma$* 蛋白分子糖基化位点分析

运用 NetNGlyc 1.0 及 NetOGlyc 3.1 服务器,对合作猪 *IFN- $\gamma$*  蛋白分子进行 N-和 O-糖基化位点预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services>),图 9 结果表明:合作猪 *IFN- $\gamma$*  氨基酸序列中共有 2 个 N-糖基化位点,分别位于 39 和 106;图 10 结果表明:合作猪 *IFN- $\gamma$*  氨基酸序列中的 O-糖基化位点预测值达不到阈值。

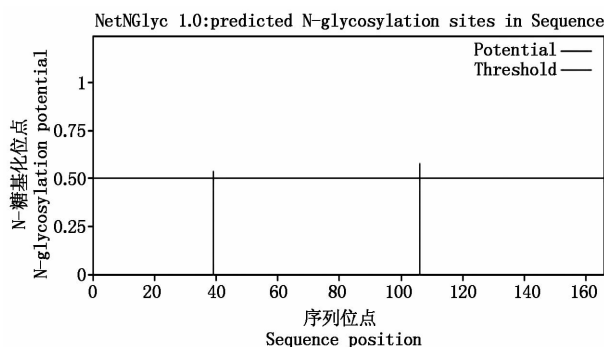


图 9 合作猪 *IFN- $\gamma$*  N-糖基化位点预测

Fig. 9 Prediction of N-glycosylation sites for Hezuo pig *IFN- $\gamma$*

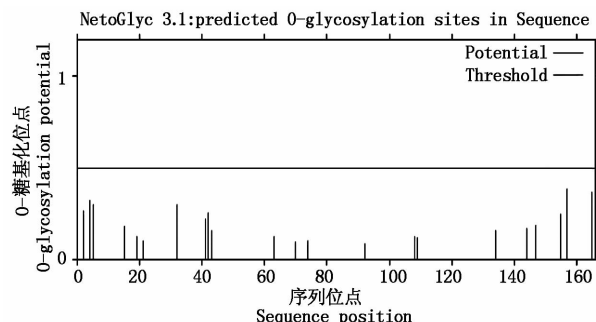


图 10 合作猪 *IFN- $\gamma$*  O-糖基化位点预测

Fig. 10 Prediction of O-glycosylation sites for Hezuo pig *IFN- $\gamma$*

## 3 讨论

猪 *IFN- $\gamma$*  基因定位于 5p12-q11<sup>[18]</sup>,属于 II 型干

扰素,虽然相对于 I 型干扰素生物学活性较弱,但 II 型干扰素能直接诱导蛋白激酶、磷酸二酯酶等的合成,促使巨噬细胞杀灭吞入的微生物<sup>[19]</sup>;对鸡球虫感染的研究表明,鸡骨髓巨噬细胞在 ChIFN- $\gamma$  的作用下可以释放出 NO,在宿主产生免疫应答过程中,NO 起免疫效应分子作用,因此,NO 的释放是巨噬细胞抑制鸡球虫的主要机制<sup>[20]</sup>。在低氧环境下,机体内 VEGF-A 通过促进新生血管生长、增加血管的通透性、诱导内源性一氧化氮合酶产生 NO、促进血管舒张等一系列生理反应来减缓缺氧对组织的损伤<sup>[21]</sup>。由此可知,散养于高原地区的合作猪有着低寄生虫感染率并非只是机体免疫力高,高原低氧的环境也会通过机体抑制疾病的发生。

预测合作猪 IFN- $\gamma$  分子量为 19.418 5 kDa,与内江猪 IFN- $\gamma$  的分子量 19.4 kDa 相当<sup>[22]</sup>,高于人 IFN- $\gamma$  的分子量 17.126 kDa<sup>[23]</sup>。但等电点高于内江猪(pI 9.313),高于人类(pI 8.3~8.5)<sup>[24]</sup>。合作猪 IFN- $\gamma$  含有半胱氨酸 3 个,分别位于第 13、17、23 位,不形成二硫键。其蛋白不稳定指数(Instability index, II)为 40.20 > 40,属于不稳定蛋白,而 IFN- $\gamma$  是二聚体蛋白或四聚体蛋白,与实际相符。

合作猪 IFN- $\gamma$  基因序列与藏猪、印度猪种、内江猪、牛、狗的同源性较高,分别为 100%、99.6%、99.8%、86.8%、82.2%;但是在氨基酸水平上合作猪 IFN- $\gamma$  分子与牛的同源性高于内江猪。这是因为每个氨基酸残基有很多种密码子表示,而脱氧核糖核酸只有 4 种,这就导致不同氨基酸之间的密码子相近。当某个位点的核苷酸发生突变但氨基酸没有改变时,氨基酸水平的同源性与核苷酸水平的同源性相同;当某个位点的核苷酸发生突变引起氨基酸的改变时,由于核苷酸的数量是氨基酸的 3 倍,这就导致核苷酸水平的同源性变化不大,而氨基酸水平的同源性变化很大。本研究中选用的内江猪 IFN- $\gamma$  基因序列在第 327、396 位发生突变,均发生氨基酸残基的改变,这就导致氨基酸水平上牛的同源性比内江猪的同源性要高,但这并不影响干扰素的种属差异性。因牛与猪分别属于偶蹄目的牛科和猪科,所以这也从分子水平佐证了孙范五等<sup>[25]</sup>提出的 IFN- $\gamma$  具有目以下的交叉活性这一观点。

合作猪 IFN- $\gamma$  分子 N 端前 23 个氨基酸为信号肽,与其他猪种相同。不同物种的 IFN- $\gamma$  分子的信号多肽的数目是不等的,小鼠、牛、人的 IFN- $\gamma$  和猪是相同的都是 23 个,而鸡是 19 个<sup>[23]</sup>。信号肽的作用是提供给核糖体能结合在膜上的必要联系,主要分为 4 步:第一步是信号识别颗粒(Signal recogni-

tion particle,SRP)识别信号序列,然后 SRP 与膜上的 SRP 受体结合,接着核糖体再与膜结合,蛋白质经过膜,信号肽被切除,蛋白质通过膜分泌出去<sup>[26]</sup>。

合作猪 IFN- $\gamma$  氨基酸序列中共发现 9 个磷酸化位点,分别为 Ser(7)、Thr(1)、Tyr(1)。磷酸化对于蛋白的活性起着重要作用,但对于 IFN- $\gamma$  分子磷酸化与去磷酸化对其功能有何影响目前没有相关研究。

合作猪 IFN- $\gamma$  氨基酸序列中共有 2 个 N-糖基化位点,分别位于 39、106 位 Asn 处,没有发现 O-糖基化位点。与人 IFN- $\gamma$  不同,人 IFN- $\gamma$  分子在 25、97 位 Asn 处有 2 个糖基化位点<sup>[27]</sup>。MuIFN- $\gamma$  中第 19、71 位也有 2 个 N 糖基化位点<sup>[23]</sup>,关于干扰素的糖基化作用,目前尚不清楚。一般认为是用于细胞膜表面受体的识别。

#### 参考文献:

- [1] 郑丕留. 中国猪品种志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [2] 马江. 甘南藏族自治州畜牧志[M]. 兰州: 甘肃民族出版社, 1993.
- [3] Rodriguez-Carreno M P, Lopez-Fuertes L, Revilla C *et al.* Phenotypic characterization of pig IFN- $\gamma$ -producing lymphocytes by flow cytometry[J]. Journal of Immunological Methods, 2002, 259(1-2): 171-179.
- [4] Charley B, McCullough K, Martinod S. Antiviral and antigenic properties of recombinant pig interferon  $\gamma$  [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1988, 19(2): 95-103.
- [5] Dijkmans R, Vandenbroeck K, Beuken E *et al.* Sequence of the porcine interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) gene [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(14): 4259.
- [6] Vandenbroeck K, Dijkmans R, Van Aerschoot A *et al.* Engineering by PCR-based exon amplification of the genomic piginterferon- $\gamma$  DNA for expression in *Escherichia coli* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991, 180(3): 1408-1415.
- [7] Moraes M P, Santos T D, Koster M *et al.* Enhanced antiviral activity against foot-and-mouth disease virus by a combination of type I and II pig interferons [J]. Journal of Virology, 2007, 81(13): 7124-7135.
- [8] 郑鸣, 边传周, 王老七等. 猪干扰素  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  的融合表达及活性 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1840-1847.
- [9] 万博, 鲍登克, 乔松林等. 猪  $\alpha$  干扰素的表达及在 PAM 细胞系中抗 PRRSV 活性检测 [J]. 河南农业科学, 2010(3): 93-95, 99.
- [10] 张利萍. 干扰素及其临床应用(续) 四干扰素制剂及

- 其应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(1): 73-77.
- [11] 卫学军, 侯云德. 干扰素及其临床应用(续) 八干扰素- $\alpha 2b$  临床治疗的副反应[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(3): 238-241.
- [12] 李娟娟, 马小军. 合作猪 *Nramp1* 基因和  $\gamma$ -IFN 基因多态性分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [13] 王大力, 刘畅, 周淑世, 等. 猪干扰素- $\gamma$  基因多态性及部分免疫指标关联性分析[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(3): 370-374.
- [14] Fan Y H, Chow K C, Huang S Y, et al. A missense polymorphism in pig *interferon- $\gamma$*  cDNA affects antiviral activity of the protein variant[J]. Molecular Immunology, 2007, 44(13): 3297-3304.
- [15] Liptrott N J, Egan D, Back D J, et al. *IFN- $\gamma$*  874A > T genotype is associated with higher CCR5 expression in peripheral blood mononuclear cells from HIV + patients[J]. Acquired Immune Deficiency Syndromes, 2011, 58(5): 442-445.
- [16] Liu F, Li B, Wei Y G, et al. *IFN- $\gamma$*  + 874 A/T polymorphism and cancer risk: an updated analysis based on 32 case-control studies[J]. Cytokine, 2011, 56(2): 200-207.
- [17] Tian C, Zhang Y G, Zhang J, et al. The + 874T/A polymorphism in the *interferon- $\gamma$*  gene and tuberculosis risk: an update by meta-analysis[J]. Human Immunology, 2011, 72(11): 1137-1142.
- [18] Ellegren H P, Chowdhary B, Johansson M, et al. A primary linkage map of the pig genome reveals a low rate of genetic recombination[J]. Genetics, 1994, 137: 1089-1100.
- [19] 崔治中, 崔保安. 兽医免疫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [20] 雷娜, 陈书明. 鸡 IFN- $\gamma$  基因克隆表达及其抗球虫研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(7): 178-181.
- [21] 吴晓云, 阎萍, 梁春年, 等. 牦牛 VEGF-A 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 华北农学报, 2012, 27(4): 48-53.
- [22] 黄亚平, 郭万柱, 李晓琪. 内江猪  $\gamma$  干扰素基因的克隆、序列分析及真核表达载体的构建[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(5): 60-63.
- [23] 侯云德. 分子病毒学[M]. 北京: 学苑出版社, 1990: 598-642.
- [24] 张丽兰, 张丽萍. 干扰素及其临床应用(续) 十一 II、III 型干扰素[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(5): 394-397.
- [25] 孙范五, 钮家琪. 关于干扰素的种属特异性问题[J]. 国外医学, 1982(2): 59-63.
- [26] 本杰明·卢因(Lewin B). 基因 VIII[M]. 余龙, 江松敏, 赵寿元, 主译. 北京: 科学出版社, 2005.
- [27] Ealick S E, Cook W J, Vijay-Kumar S, et al. Three-dimensional structure of recombinant human interferon- $\gamma$  [J]. Science, 1991, 252(5006): 698-702.