

鸡 IL-18 真核表达质粒与新城疫病毒 F 基因疫苗联合免疫探讨

谢安新*, 尹会方*, 温纳相, 黄桂菊, 赵明秋, 郑海华, 黄青云
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:为探讨鸡 IL-18 基因真核表达质粒 pcDNA-chIL-18 在新城疫病毒(NDV) F 基因疫苗免疫中的作用, 克隆了新城疫病毒标准株 F₄₈E₉ 的 F 基因, 构建 F 基因重组真核表达质粒 pcDNA-F; 将 11 日龄试验鸡分为 4 组, 每组 10 只, 14 日龄一免, 28 日龄二免, 分别肌注 pcDNA-F、pcDNA-F + pcDNA-chIL-18、新城疫传统疫苗(14 日龄 NDV 弱毒疫苗首免, 28 日龄 NDV 油苗二免)、生理盐水, 一免疫后第 7、14、21、28 d 均采血进行 ND 抗体(ELISA)检测和 T 淋巴细胞转化(MTT)试验; 第 29 d 均肌注 50LD₅₀ NDV 强毒 F₄₈E₉ 株。结果显示: 免疫保护效率, 生理盐水组 0/10, pcDNA-F 免疫组 3/10, pcDNA-F + pcDNA-chIL-18 免疫组 5/10, 新城疫传统疫苗免疫组 10/10; ND 抗体水平, pcDNA-F 免疫组与 pcDNA-F + pcDNA-chIL-18 免疫组无差异($P > 0.05$), 均显著低于传统疫苗免疫组($P < 0.05$); T 细胞转化水平, pcDNA-F + pcDNA-chIL-18 免疫组明显高于 pcDNA-F 免疫组($P < 0.05$), pcDNA-F 免疫组与传统疫苗免疫组无差异($P > 0.05$)。试验结果综合显示 pcDNA-F 免疫试验鸡可产生一定程度的免疫保护; pcDNA-chIL-18 对 pcDNA-F 具有一定的免疫增强作用。

关键词:新城疫病毒; F 基因; 基因疫苗; 白细胞介素 18 基因

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)02-0082-05

Immunization of Newcastle Disease Virus F Gene DNA Vaccine with Chicken IL-18 Gene Eukaryotic Expression Plasmid

XIE An-xin*, YIN Hui-fang*, WEN Na-xiang, HUANG Gui-ju, ZHAO Ming-qiu,
ZHENG Hai-hua, HUANG Qing-yun

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To study the effect of immunization of newcastle disease virus (NDV) F DNA vaccine with chicken IL-18 gene eukaryotic expression plasmid (pcDNA-chIL-18), F gene of NDV strain F₄₈E₉ was amplified by RT-PCR. The eukaryotic expression plasmid pcDNA-F (DNA vaccine) was constructed by inserting F gene into the pcDNA 3.1 vector. 11-day-old chickens were divided into 4 groups, 10 chickens per group. 14-day-old chickens were primarily immunized by injected intramuscularly and boosted immunized 14 days later after primary immunization, respectively with pcDNA-F, pcDNA-F combined pcDNA-chIL-18, ND attenuated vaccine and NS. On days 7, 14, 21 and 28 post-immunization, peripheral blood antibody response to NDV and T lymphocyte transformation ratio were detected by ELISA and LTT (MTT), respectively. Every chicken was challenged with 50LD₅₀ NDV strain F₄₈E₉ at 29 day post immunization. The results showed that the pcDNA-F group obtained 3/10 protection, the pcDNA-F combined pcDNA-chIL-18 group obtained 5/10 protection. Their protection effect were less than that of ND conventional vaccine group (10/10). Antibody titers against NDV of the pcDNA-F combined pcDNA-chIL-18 group had little difference than that of the pcDNA-F group ($P > 0.05$). T lymphocyte transformation ratio of the pcD-

收稿日期: 2008-05-12

作者简介: 谢安新(1975—), 男, 硕士; 尹会方(1976—), 男, 博士研究生; *: 对本文贡献相同; 通讯作者: 黄青云(1946—), 男, 教授, E-mail: huangqingyunte@163.com

基金项目: 广东省自然科学基金(20043227)

NA-F combined pcDNA-chIL-18 group was significantly higher than that of the pcDNA-F group ($P < 0.05$). It is concluded that pcDNA-F could produce some protection to the immunized chickens, and pcDNA-chIL18 could produce some immunoenhancing effects to the chickens immunized with pcDNA-F.

Key words: newcastle disease virus(NDV); F gene; DNA vaccine; IL-18 gene

白细胞介素 18(IL-18)是多功能细胞免疫调节因子^[1-3]. 关于 IL-18 作 DNA 疫苗免疫增强剂的研究报告在医学领域已有较多^[4-6],而在家禽方面尚少. 本研究组曾克隆鸡 IL-18 基因^[7],构建鸡 IL-18 基因真核表达质粒,试验表明 pcDNA-chIL-18 在 COS7 细胞中能瞬时表达鸡 IL-18 蛋白,用 pcDNA-chIL-18 直接肌注具有明显促进鸡 T 淋巴细胞转化作用^[8]. 本研究组也曾构建禽巴氏杆菌 C₄₈₋₁ 外膜蛋白 H(ompH) 基因真核表达质粒 pcDNA-ompH, ompH 基因与 chIL-18 基因真核共表达质粒 pcDNA-ompH-chIL-18, 鸡的免疫试验显示, pcDNA-ompH-chIL-18 比 pcDNA-ompH 的免疫效果明显提高^[9].

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的禽类的急性、高度接触性传染病. 自 1926 年发现至今仍在世界流行^[10],我国也时有发生,造成严重损失. 免疫预防新城疫一直应用灭活疫苗加弱毒疫苗. 灭活疫苗免疫保护期短,弱毒疫苗免疫保护效果虽好,但潜在毒力返强及与野毒基因重组的危机. NDV 血清型单一,NDV 囊膜上的融合蛋白 F 参与病毒脂蛋白囊膜与宿主细胞膜的融合,是 NDV 的主要毒力因子和保护性抗原. F 基因常作为研究新型 NDV 基因疫苗的候选基因^[11]. 国内外已有应用 F 基因与真核表达质粒 pcDNA3.1 重组的 pcDNA-F 作基因疫苗^[12],以鸡 IL-2 基因真核表达质粒 pcDNA-chIL-2 作 pcDNA-F 免疫增强剂的研究报告^[13].

为探讨鸡 IL-18 基因真核表达质粒 pcDNA-chIL-18 在 NDV F 基因疫苗免疫中的作用. 本研究克隆新城疫病毒中国标准株(NDVF₄₈E₉)的 F 基因,构建 F 基因真核表达质粒 pcDNA-F,以 pcDNA-chIL-18 与 pcDNA-F 进行试验鸡的联合免疫试验.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与细胞 NDVF₄₈E₉ 来自中国兽医药品监察所, COS7 细胞由华南农业大学兽医学院禽病教研室惠赠.

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 JM109 为华美生物工程公司产品, pGEM-T Easy 载体为宝生物工程(大连)有限公司产品, pcDNA-3.1(+) 质粒由华南农业大学兽医微生物学教研室保存, 鸡 IL-18 基因重组真

核表达质粒 pcDNA-chIL-18 由温纳相博士构建^[8].

1.1.3 试验动物与疫苗 1 日龄健康粤黄鸡购自华南农业大学实验鸡场. NDV 油佐剂灭活苗, NDV 弱毒疫苗克隆 30(Clon 30, C30), 购自广东省疫苗供应站.

1.1.4 主要试剂 细胞基础培养基 DMEM(high glucose)、RNA 抽提试剂盒为 GIBCO BRL 公司产品; 各种限制性内切酶和 AMV 反转录酶、TaqDNA 聚合酶、T₄DNA 连接酶、RNA 酶抑制剂均为大连宝生物工程有限公司产品; 脂质体(Lipofectamine 2000)为 Invitrogen 公司产品; 辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗鸡 IgG 抗体为广州博理生物科技有限公司产品; NDV 高免鸡血清自制; 鸡新城疫抗体 ELISA 检测试剂盒购自中检维康技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 NDV F₄₈E₉ F 基因 RT-PCR、克隆及序列分析

按常规方法将 NDV F₄₈E₉ 接种于 10 日龄鸡胚繁殖, 按 RNA 提取试剂盒说明提取病毒 RNA. 依 GenBank 中发表的 NDV F 基因序列和真核表达质粒 pcDNA3.1(+) 的多克隆位点设计一对引物, 预扩增片段为 1 662 bp, 覆盖完整 F 基因, P1 5'-CCAAGCTTATGGGCCCCAAATCTTCTACC-3' 的 5' 端含 Hind III 酶切位点, P2 5'-CGGGATCCTCAGATTCT-TGTAGTGGCCCTC-3' 的 5' 端含 BamH I 酶切位点, 由上海博亚公司合成. 按 AMV 反转录酶产品说明 RT NDV RNA 的 cDNA, 按 Taq DNA 聚合酶应用说明 PCR 扩增 F 基因, 电泳回收 PCR 产物, 按 pGEM-T Easy 载体说明连接. 连接产物转化大肠杆菌 JM109, 挑取白色菌落接种到 LB 培养基中, 振荡培养后提取质粒, 经酶切和 PCR 鉴定连接正确的 F 基因克隆质粒送上海博亚公司测序. 应用 DNAsis(V2.0) 软件, 将所测序列与 GenBank 中的 NDVF 基因序列比较.

1.2.2 F 基因真核表达载体 pcDNA-F 的构建 将 pGEM-T-F 用 BamH I 和 Hind III 双酶切、电泳、回收纯化 F 基因片段, 与用相同双酶切的真核表达载体 pcDNA-3.1(+) 连接、转化大肠杆菌 JM109, 经 PCR 和 BamH I、Hind III 双酶切鉴定后, 小量抽提、纯化重组质粒 pcDNA-F, 按脂质体说明书转染 COS7 细胞进行表达, 通过 Western-blot 验证 pcDNA-F 的表达产物与新城疫抗血清具有免疫反应活性后, 大量抽提、纯化重组质粒 pcDNA-F, 测定浓度^[14].

1.2.3 免疫试验 试验鸡分组免疫:将1日龄健康粤黄鸡40只严格隔离饲养至11日龄,HI检测全群的ND母源抗体滴度均小于 $2\log_2$,随机分为4组,每组10只.第1组为pcDNA-F免疫组:参照文献[15]每只鸡左腿股内侧肌注0.5 mg/mL的普鲁卡因200 μ L作预处理,14日龄在同一部位肌注pcDNA-F,每只200 μ g,28日龄再肌注200 μ g;第2组为pcDNA-F+pcDNA-chIL-18免疫组:同样于11日龄先用普鲁卡因预处理,14日龄每只肌注pcDNA-F、pcDNA-chIL-18各200 μ g,28日龄再肌注各200 μ g;第3组为传统疫苗免疫组:14日龄以NDV弱毒苗C30滴鼻0.2 mL/只,28日龄肌注NDV灭活油苗0.2 mL/只;第4组为非免疫对照组:14日龄、28日龄肌注生理盐水0.2 mL/只.免疫后持续观察各组鸡的精神、食欲及排泄.

试验鸡NDV抗体检测及T淋巴细胞转化(MTT)试验:各组试验鸡于免疫前1 d、一免后第7、14 d,二免后第7、14 d,每组随机取5只,每只心脏采血2.5 mL.取0.5 mL血分离血清,56 $^{\circ}$ C 30 min灭活后照鸡新城疫抗体ELISA检测试剂盒说明检测NDV抗体.另2 mL血抗凝,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,以ConA诱导培养后,进行T淋巴细胞转化(MTT)试验^[10].

应用SPSS11.0软件按Duncan's分析法对各组NDV抗体效价和T细胞转化数据进行统计比较.

试验鸡攻毒保护试验:二免后第15 d各组试验鸡均按50LD₅₀肌注NDVF₄₈E₉新鲜鸡胚液,即1 mL/只,观察14日,统计存活率.

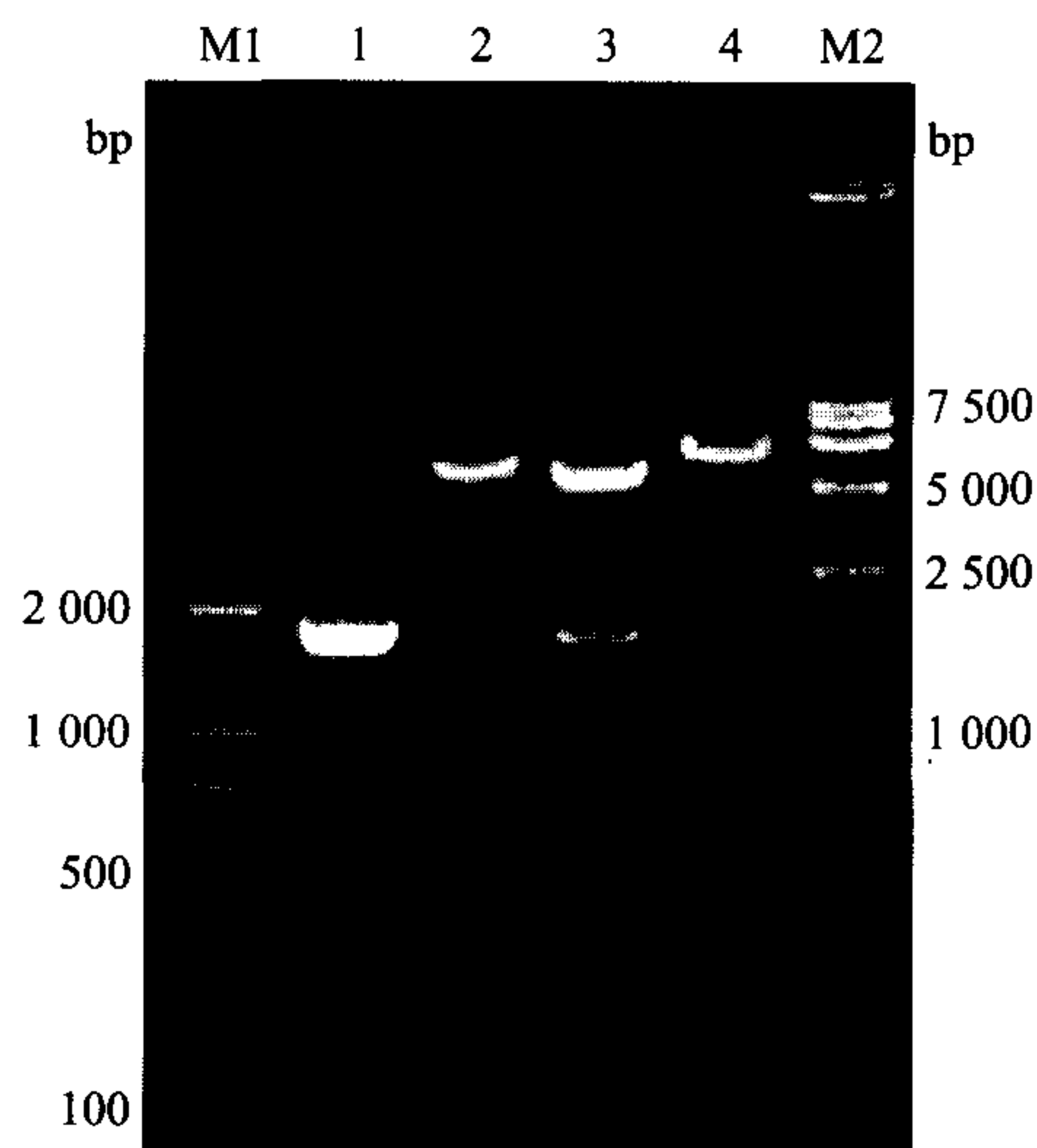
2 结果与分析

2.1 F基因的克隆及F基因重组真核表达质粒pcDNA-F的构建

NDV RNA的RT-PCR产物电泳出现1条约1.7 kb的预期目的条带(图略);将该片段回收、连接至pGEM-T Easy载体,转化JM109,提取重组质粒进行PCR、电泳,也出现1条约1.7 kb的目的片段(图略);对重组质粒进行Hind III单酶切得到1条约4.7 kb的片段,进行BamH I/Hind III双酶切得到约3.0 kb及约1.7 kb的片段(图略).克隆的F基因测序结果为预期的1 662 bp,与国内外NDV流行株F基因序列的相似性为93%~99%(图略).

F基因与真核表达质粒pcDNA3.1(+)的重组子PCR,结果出现1条约1.7 kb的目的条带,Hind III单酶切,结果出现1条约7.1 kb的条带,BamH I/Hind III双酶切,结果出现1条约5.4 kb的条带和1条约

1.7 kb的条带(图1).表明F基因已成功插入质粒pcDNA3.1(+)中.

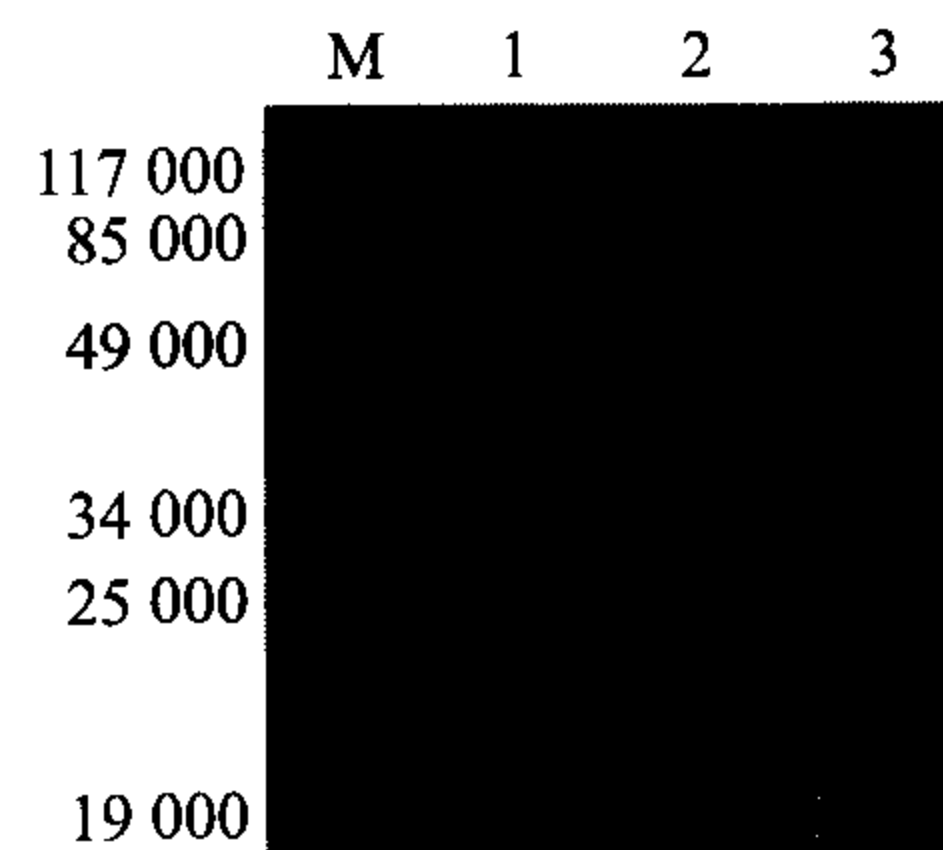


M1: DNA Marker DL2000; M2: DNA Marker DL15000; 1: pcDNA-F的PCR产物; 2: pcDNA3.1(+)的Hind III酶切产物; 3: pcDNA-F的BamH I/Hind III双酶切产物; 4: pcDNA-F的Hind III酶切产物

图1 pcDNA-F的PCR和酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pcDNA-F by PCR and digestion with restriction enzyme

pcDNA-F转染COS7细胞培养48 h的表达产物,用NDV高免鸡血清进行Western-blot,结果出现相对分子质量约59 000的特异条带(图2),表明pcDNA-F在COS7细胞中表达NDV F蛋白.



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1, 2: pcDNA-F表达产物; 3: pcDNA3.1表达产物对照

图2 pcDNA-F表达产物的Western-blot分析

Fig. 2 Western-blot analysis of the expression product of pcDNA-F

2.2 pcDNA-F与pcDNA-chIL-18免疫鸡的观察

鸡只免疫后直至攻毒前,均未见异常反应.

2.3 试验鸡血清ND抗体水平检测统计结果

由表1可见,免疫前1 d各组鸡ND抗体水平无明显差异.肌注生理盐水(对照)组ND抗体水平一直无明显变化. pcDNA-F组和pcDNA-F+pcDNA-chIL-18组一免后7~28 d ND抗体水平均持续上升,均显著高于对照组($P < 0.05$);但2组之间均差异不显著($P > 0.05$);而2组均显著低于NDV弱毒苗C30+灭活苗免疫组($P < 0.05$).结果综合表明

pcDNA-F 肌注鸡体诱导的体液免疫不及常规 ND 疫苗,pcDNA-chIL-18 不起提高 pcDNA-F 的体液免疫作用.

表 1 ELISA 检测试验鸡血清 NDV 抗体结果 (P/N 值, $\bar{x} \pm DS$, $n = 5$)

Tab.1 The testing results of NDV antibodies by ELISA (P/N value, $\bar{x} \pm DS$, $n = 5$) in immunized chicks

免疫后 时间/d	NDV 抗体滴度(ELISA)			
	pcDNA-F	pcDNA-F + pcDNA-chIL-18	NDV C30 + 灭活疫苗	生理盐水
0	188 ± 9.82a	197 ± 14.07a	179 ± 9.57a	185 ± 13.58a
7	223 ± 15.41a	243 ± 14.67a	563 ± 13.57b	201 ± 10.79c
14	245 ± 17.13a	265 ± 15.51a	834 ± 40.27b	198 ± 18.83c
21	268 ± 23.89a	283 ± 23.21a	2 535 ± 142.17b	179 ± 10.84c
28	382 ± 16.25a	417 ± 20.33a	3 762 ± 221.52b	210 ± 18.49c

1)表中数字均为 $D_{570\text{ nm}}$ 的平均值,同行数字后具不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法)

2.4 试验鸡 T 淋巴细胞转化 (MTT) 试验统计结果

由表 2 可见,免疫前 1 d 各组鸡 T 淋巴细胞转化水平无差异. 肌注生理盐水(对照)组也一直无明显变化. pcDNA-F 免疫组与 NDV 弱毒苗 C30 + 灭活苗免疫组一免后 7 ~ 28 d 均明显高于肌注生理盐水(对照)组 ($P < 0.05$),但 2 组之间则差异不显著 ($P > 0.05$). pcDNA-F + pcDNA-chIL-18 免疫组一免后 7 ~ 28 d 均明显高于 pcDNA-F 免疫组及 NDV C30 弱毒苗 + 灭活苗免疫组 ($P < 0.05$).

表 2 试验鸡 T 淋巴细胞转化 (MTT) 试验结果 ($\bar{x} \pm DS$, $n = 5$)

Tab.2 The testing results of T lymphocyte transformation (MTT) test ($\bar{x} \pm DS$, $n = 5$) in immunized chicks

免疫后 时间/d	$D_{570\text{ nm}}$			
	pcDNA-F	pcDNA-F + pcDNA-chIL-18	NDV C30 + 灭活疫苗	生理盐水
0	0.128 2 ± 0.024a	0.138 6 ± 0.021a	0.134 6 ± 0.023a	0.134 8 ± 0.020a
7	0.219 5 ± 0.028a	0.265 4 ± 0.037b	0.228 6 ± 0.045a	0.139 8 ± 0.024c
14	0.265 6 ± 0.041a	0.333 8 ± 0.030b	0.287 8 ± 0.039a	0.128 6 ± 0.033c
21	0.324 2 ± 0.042a	0.425 8 ± 0.039b	0.331 6 ± 0.043a	0.132 4 ± 0.029c
28	0.363 2 ± 0.039a	0.493 6 ± 0.040b	0.355 8 ± 0.034a	0.135 4 ± 0.039c

1)表中数字均为 $D_{570\text{ nm}}$ 的平均值,同行数字后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法)

2.5 攻毒保护试验结果

二免后第 15 d 各组鸡只均肌注 NDVF₄₈E₉,每只 50LD₅₀,观察 14 d. 结果(表 3)显示对照组全部死亡,常规疫苗免疫组保护率 10/10,pcDNA-F 免疫组保护率 3/10, pcDNA-F + pcDNA-chIL-18 免疫组保护率 5/10.

表 3 免疫保护试验结果

Tab.3 The results of immune protective test

组别	试验鸡数	成活鸡数	保护率
pcDNA-F	10	3	3/10
pcDNA-F + pcDNA-chIL-18	10	5	5/10
C30 + 灭活疫苗	10	10	10/10
生理盐水	10	0	0

3 讨论

本研究克隆 NDV 中国标准毒株 F₄₈E₉ 的 F 基因,序列分析结果与国内外流行毒株 F 基因的相似性达 93% ~ 99%,表明具有代表性. 构建的 pcDNA-F 转染 COS7 细胞瞬时表达产物,Western-blot 试验结果表明 pcDNA-F 表达的 F 蛋白具有良好的免疫反应性.

多数研究者以肌注接种基因疫苗. 有研究表明,肌注接种 HB 基因疫苗前数天,接种部位注射适量普鲁卡因,具有提高外源 DNA 摄取、表达和免疫应答作用,免疫效果也与免疫次数及剂量相关^[15]. 本研究试采用接种 pcDNA-F 前 3 d,预先给试验鸡肌注 0.5 mg/mL 普鲁卡因 200 μ L/只,并于 14、28 d 2 次免疫,每次肌注 pcDNA-F 200 μ g/只的方法. 但本试验结果与姜永厚等^[13]报告的未作预处理,一次肌注 pcDNA-F 200 μ g/只的免疫保护效果相同.

本试验结果 pcDNA-F + pcDNA-chIL-18 免疫组的 T 细胞转化水平虽明显高于 pcDNA-F 免疫组及 C30 + NDV 灭活苗免疫组 ($P < 0.05$),但其 ND 抗体水平与 pcDNA-F 组无明显差异 ($P > 0.05$),且都显著低于 NDV C30 弱毒苗 + 灭活苗免疫组 ($P < 0.05$);pcDNA-F + pcDNA-chIL-18 免疫组的免疫保护效率虽比 pcDNA-F 免疫组的 3/10 提高到了 5/10,但仍未及 C30 + NDV 灭活苗免疫组的 10/10. 这也再次证明鸡抗 NDV 感染免疫是以体液免疫为主的.

综合本研究结果看来,NDV F 基因真核表达质粒 pcDNA-F 肌注鸡体可诱导产生一定的 ND 抗体水平和 T 细胞转化水平,产生一定程度的免疫保护作用. 其免疫保护效果与相关报告相似 (3/10)^[13]. pcDNA-chIL-18 肌注鸡体具有一定的提高 pcDNA-F 的免疫保护作用. 其作用未见提高 pcDNA-F 诱导 ND 抗体水平,只见提高代表机体细胞免疫功能指标之一的 T 细胞转化水平. 要应用 pcDNA-chIL-18 使 pcDNA-F 基因疫苗达到与传统 ND 疫苗的免疫保护效果,有待继续研究.

(下转第 89 页)

参考文献:

- [1] 区又君,李加儿,陈福华. 驼背鲈的形态和生物学性状[J]. 中国水产科学, 1999, 6(1): 24-26.
- [2] 区又君,廖锐,李加儿. 驼背鲈的年龄与生长特征[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 623-632.
- [3] 区又君,谢菁. 驼背鲈的染色体核型分析[J]. 南方水产, 2007, 3(5): 49-53.
- [4] LAINING A, RACHMANSYAH, AHMAD T, et al. Apparent digestibility of selected feed ingredients for humpback grouper, *Cromileptes altivelis* [J]. Aquaculture, 2003, 218: 529-538.
- [5] SHAPAWI R, NG W, MUSTAFA S. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in diets formulated for the humpback grouper, *Cromileptes altivelis* [J]. Aquaculture, 2007, 273: 118-126.
- [6] HUGHES G M. Scanning electron microscopy of the respiratory surfaces of trout gills [J]. J Zool, 1979, 187: 443-453.
- [7] 郭淑华,王良臣. 鲤鳃表面结构扫描电镜研究[J]. 水生生物学报, 1988, 12(1): 54-58.
- [8] 韩桢锸,宋学君,岳丙宜. 草鱼鳃扫描电镜研究[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 1992, 15(2): 12-17.
- [9] 方展强,邱玫,王春风. 剑尾鱼鳃结构的光镜、扫描和透射电镜观察[J]. 电子显微学报, 2004, 23(5): 553-559.
- [10] 李加儿,区又君,刘匆. 红笛鲷和卵形鲳鲹的扫描电镜观察与功能探讨[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(6): 45-50.
- [11] LEWIS S V, PORTER I C. A scanning electron microscopic study of the gills of lamprey, *Lampetra fluniatilis* (L.) [J]. Micron, 1976, 7: 205-211.
- [12] 黄建华,李加儿,刘匆,等. 鲢点石斑鱼和大眼鳊的扫描电镜观察[J]. 动物学研究, 2005, 26(1): 82-88.
- [13] 但学明,张耀光,谢小军. 南方鲇鳃的光镜和扫描电镜观察[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 1999, 24(6): 665-673.
- [14] 董双林,李群,王莉,等. 几种鲤科鱼类鳃的研究: I 呼吸面积的研究[J]. 大连水产学院学报, 1989, 4(3/4): 41-46.
- [15] 李加儿,许晓娟,区又君,等. 浅色黄姑鱼鳃结构及其呼吸面积的研究[J]. 南方水产, 2008, 4(1): 22-27.
- [16] 王志余,董双林. 鲢鳃丝扫描电镜观察[J]. 大连水产学院学报, 1990, 5(2): 69-86.
- [17] LAURENT P. Gill internal morphology [M]//HOAR W S, RANDALL D J. Fish Physiology: Vol. 10A: Gills. New York: Academic Press, 1984: 148-151.
- [18] HOSSLER F E, RUBY J R, MELLWAIN T D. The gill arch of the mullet, *Mugil cephalus*: II. Modification in surface ultrastructure and Na/K-ATPase content during adaptation to various salinities [J]. J Exp Zool, 1979, 208: 399-405.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第85页)

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] USHIO S, NAMBA M, OKURA T, et al. Cloning of the cDNA for human IFN- γ -inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein [J]. Immunol, 1996, 156(11): 4274-4279.
- [3] SCHNEIDER K, PUEHLER F, BAEUBRLE D, et al. cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18 [J]. Interferon Cytokine Res, 2000(20): 879-883.
- [4] BILLAUT-MULOT O, IDZIOREK T, LOYENS M, et al. Modulation of cellular and humoral immune responses to a multiepitopic HIV DNA vaccine by interleukin-18 DNA immunization/viral protein boost [J]. Vaccine, 2001, 19(20): 2803-2811.
- [5] 陈建忠,朱海红,刘克洲,等. IL-18 重组体联合 HBVS 基因核酸疫苗免疫小鼠的实验[J]. 中华传染病杂志, 2000, 20(3): 156-159.
- [6] WINFRIED G D, HANNEKE V Z, NICOLETTE C S, et al. Potentiation of humoral immune responses to vaccine antigen by recombinant chicken IL-18 (rChIL-18) [J]. Vaccine, 2005, (23): 4212-4218.
- [7] 温纳相,黄青云,陈金顶. 鸡 IL-18 基因克隆与序列测定[J]. 动物医学进展, 2003, 24(2): 64-66.
- [8] 温纳相,黄青云,束长娥. 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.
- [9] 曹素芳,黄青云,韩先干,等. 禽巴氏杆菌 C₄₈₋₁ 外膜蛋白 H 基因与鸡 IL-18 基因真核共表达载体的构建及表达[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(4): 382-384.
- [10] 高彦生,王冲,胡媛. 2006 年 11 月国际动物疫情[J]. 中国动物检疫, 2007, 34(1): 163-166.
- [11] 王兴龙. 新城疫病毒分子生物学[J]. 动物科学与动物医学, 2001, 18(3): 28-30.
- [12] 程相朝,吴庭才,张春杰,等. NDV 基因 DNA 疫苗对新城疫病毒灭活油乳苗的免疫协同作用[J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(10): 901-905.
- [13] 姜永厚,刘忠贵,陈奖励,等. 鸡 IL-2 在新城疫病毒基因疫苗免疫中的作用[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(1): 22-24.
- [14] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁,黎孟枫,译. 北京:科学出版社, 1998: 59-55.
- [15] DAVIS H L, MICHEL M L, WHALEN R G. DNA-based immunization for hepatitis B induces continuous secretion of antigen and high levels of circulating antibody[J]. Human Molecular Genetics, 1993, (13): 420-424.

【责任编辑 柴 焰】