

# 猪白细胞介素 18 基因的克隆、表达及生物学活性检测

郑兰兰<sup>1,2</sup>, 贾云飞<sup>1</sup>, 崔保安<sup>1,2</sup>, 陈红英<sup>1,2</sup>, 魏战勇<sup>1,2</sup>, 陈瑞亮<sup>1</sup>

1 河南农业大学 牧医工程学院, 郑州 450002

2 河南省动物性食品安全重点实验室, 郑州 450002

**摘要:** 通过 RT-PCR 方法直接从猪脾脏淋巴细胞中扩增出猪白细胞介素 18(pIL-18)成熟蛋白基因的 cDNA, 克隆到 pGEM-T 载体, 构建重组质粒 pGEM-T-IL18, 转化 *E.coli* JM109 感受态细胞, 取 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定。测序结果表明, pIL-18 成熟蛋白基因核苷酸长度为 474 bp, 编码 157 个氨基酸。将其克隆到表达载体 pGEX6P-1 中, 构建重组质粒 pGEX-IL18, 转化 *E.coli* BL21 感受态细胞, 用 IPTG 诱导表达。重组菌菌体裂解物 SDS-PAGE 可检测到相对分子质量为 45 kD 的重组蛋白, 占菌体总蛋白的 28% 左右, 以包涵体形式存在。对包涵体进行洗涤, 用 MTT 法测定表明, 重组蛋白能明显刺激猪脾脏 T 淋巴细胞增殖反应的活性。

**关键词:** 猪白细胞介素 18, 成熟蛋白, 原核表达, 活性检测

## Gene Cloning, Expression and Activity Detection of Porcine Interleukin-18 Mature Protein in *Escherichia coli*

Lanlan Zheng<sup>1,2</sup>, Yunfei Jia<sup>1</sup>, Baoan Cui<sup>1,2</sup>, Hongying Chen<sup>1,2</sup>, Zhanyong Wei<sup>1,2</sup>, and Ruiliang Chen<sup>1</sup>

1 College of Animal Husbandry And Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2 Henan Key Laboratory for Animal Food Safety, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** Porcine interleukin-18 mature protein gene was amplified from porcine spleen cells by RT-PCR. PCR product was cloned into the T vector pGEM-T for sequencing. The nucleotide sequence of this gene was 474 bp. Then, it was subcloned into the prokaryotic expressing plasmid vector pGEX6P-1 and transformed into host *E. coli* strain BL21 for expression. The expression of pIL-18 mature protein gene was identified by SDS-PAGE. The expression product was fusion protein with molecular weight of 45 kD and the percentage of expression protein in *E. coli* protein was 28%. The protein was purified by washing of inclusion bodies and the activity was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT).

**Keywords:** porcine interleukin-18, mature protein gene, prokaryotic expression, purification, activity detection

白细胞介素 18(Interleukin-18, IL-18)又称为干扰素 $\gamma$ 诱生因子(interferon gamma inducing factor, IGIF), 能诱导 Th1 等细胞产生大量 IFN- $\gamma$ 。1995 年日本学者 Okamura 等<sup>[1]</sup>首次报告中从中毒性休克的鼠肝脏中克隆出了该因子。1996 年 Ushio<sup>[2]</sup>等从鼠 cDNA 库中筛选到人 IGIF 基因, 其序列与所有已知的细胞

因子不同, 并能在大肠杆菌中表达, 且生物活性多样, 如抗病毒、抗结核分支杆菌、抗真菌<sup>[3]</sup>、抗肿瘤免疫<sup>[4]</sup>、抗变态反应性疾病作用<sup>[5]</sup>及前炎因子活性<sup>[6]</sup>, 故将其正式命名为白细胞介素 18。1999 年 Muneta 等<sup>[7,8]</sup>成功地从猪肺泡巨嗜细胞中克隆到 pIL-18, 并证明表达的 pIL-18 成熟蛋白比前体蛋白具有更高的

活性。因此, IL-18 不论在基础研究还是在临床运用方面都具有巨大的应用前景<sup>[7-8]</sup>。

查阅国内外文献, 目前对猪 IL-18 的研究主要集中在英系、法系等纯种猪上, 对一些饲养范围较大的地方品种猪研究较少, 而因其具有一定的种属差异性, 故不同品种猪 IL-18 的功能与作用可能存在一定的区别。河南省是我国的畜牧业大省, 本研究选择河南省普遍饲养的良杂猪, 对其 IL-18 基因进行扩增及序列测定, 实现了成熟蛋白基因在大肠杆菌中的初步表达, 并对表达产物进行了初步提纯及生物活性测定。其结果为进一步针对河南普遍饲养的杂种猪研制新型免疫佐剂和免疫调节剂奠定了基础。

## 1 材料

### 1.1 组织材料

6 月龄河南良杂猪脾脏采自郑州市郑荣肉联场。

### 1.2 菌种和质粒

基因工程菌 JM109, 购自宝生物工程(大连)有限公司; 基因工程菌 BL21, 购自北京天为时代有限公司; pGEM-T Easy Vector System, 购自 Promega 公司; pGEX6P-1 原核表达载体, 由本实验室保存。

### 1.3 酶类和主要试剂

EZ Spin Column Total RNA Isolation Kit, 购自 BBI 公司; AMV Single Step RT-PCR Kit, 购自 BBI 公司; Ex Taq DNA 聚合酶、EcoR I、Xho I 限制性内切酶等, 购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR 产物凝胶回收试剂盒, 购自杭州维特洁生化技术有限公司; 质粒回收试剂盒, 购自北京博大泰克基因技术有限公司; MTT, 购自宝生物工程(大连)有限公司。

## 2 方法

### 2.1 RT-PCR 引物设计与合成

应用 DNASTAR(Version 4.0)及 Primer(Version 5.0) 基因分析软件, 参照 GenBank 发表的 pIL-18 cDNA (AB010003)基因序列设计一对引物。并在上游引物中加入 EcoR I 酶切位点, 下游引物中加入 Xho I 酶切位点。引物理论跨幅包括 IL-18 成熟蛋白基因约 500 bp, 由上海生物工程技术有限公司合成。

上游引物 P1: 5'-CGCGAATTCTACTTTGGCAAGCTT-3'

下游引物 P2: 5'-CGCCTCGAGCTAGTTCTT-GTTTTG-3'

### 2.2 猪脾细胞总 RNA 提取

无菌采取脾脏, 收集淋巴细胞培养物, -80°C 保存或直接用于总 RNA 的提取。细胞总 RNA 的提取按 EZ Spin Column Total RNA Isolation Kit 总 RNA 抽提试剂盒提取, 将 RNA 保存于 -20°C 或 -70°C。取 5 μL 以 A260/A280 测定 RNA 的浓度, 另取 5 μL 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

### 2.3 猪 IL-18 成熟蛋白基因 RT-PCR 扩增

用 AMV Single Step RT-PCR Kit 直接进行 PCR 扩增。取 RNA 10 μL, 2 × RT-PCR Buffer 25 μL, 上、下游引物各 1 μL, AMV RT/Taq Mix 1 μL, MgSO<sub>4</sub> 5 μL, DEPC 水 10 μL, 反应的循环参数为: 40°C 30 min, 94°C 2 min; 94°C 15 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min, 36 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。同时设立无模板的阴性对照。反应结束后, 取 5 μL PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)进行电泳检测 PCR 结果。

### 2.4 猪 IL-18 成熟蛋白基因克隆

将电泳回收产物与 pGEM-T 载体进行连接反应, 室温作用 1 h 后, 再将连接产物转化 JM109 感受态细胞, 在含有 X-gal、IPTG 和 Amp 的 LB 琼脂平板培养基上培养 16 h, 挑取白斑菌落接种含有 Amp 的 LB 肉汤, 37°C 振荡培养 12~16 h。按质粒回收试剂盒说明提取重组质粒, 再进行 PCR 及酶切电泳检测鉴定。选择酶切和 PCR 鉴定为 IL-18 成熟蛋白基因重组阳性的质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定。

### 2.5 重组表达质粒的构建

分别用 EcoR I、Xho I 将 pIL-18 片段释出, 定向克隆到同样处理的 pGEX6P-1 载体中, 构建重组表达质粒。再将连接产物转化 BL21 感受态细胞, 在含有 Amp 的 LB 琼脂平板培养基上培养 16 h, 挑取白斑菌落接种含有 Amp 的 LB 肉汤, 37°C 振荡培养 12~16 h。按质粒提取试剂盒说明提取重组质粒, 再进行 PCR 及酶切电泳检测鉴定。选择酶切和 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定, 验证重组质粒读码框的正确性。

### 2.6 pIL-18 成熟蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

将 pGEX-IL18 挑选单菌落, 接种含 Amp(60 mg/

L)的  $2 \times$  YT培养基中,  $37^{\circ}\text{C}$  振摇培养至  $OD_{600}=0.6\sim 1.0$ , 加入IPTG(终浓度  $0.8\text{mmol/L}$ )  $25^{\circ}\text{C}$  诱导  $3\sim 5$  h。收集菌体, 离心除去上清, 重悬于PBS中, 冻融2次, 超声破碎后, 加  $2 \times$  上样缓冲液煮沸5 min, 用12% SDS-PAGE检测目的蛋白表达情况, 电泳完毕后将凝胶用考马斯亮蓝染色, 进行薄层扫描分析目的蛋白的相对含量。

### 2.7 pIL-18 成熟蛋白表达产物的纯化

收集诱导表达菌体, 重悬于  $1/10$  原培养体积的  $50\text{mmol/L}$  Tris-HCl pH 8.0、 $2\text{mmol/L}$  EDTA缓冲液, 加入溶菌酶至终浓度为  $100\text{mg/L}$ , 再加入  $1/10$  体积的1% TritonX-100,  $37^{\circ}\text{C}$  作用30 min, 置冰浴中超声裂解, 每次超声6 s静置2 s, 至不再粘稠,  $12\ 000\text{r/min}$  离心15 min, 沉淀依次用含  $1\text{mol/L}$  NaCl、 $0.5\%$  TritonX-100、含  $2\text{mol/L}$  和  $4\text{mol/L}$  尿素的上述缓冲液进行洗涤, 最后用含  $8\text{mol/L}$  尿素、 $20\text{mmol/L}$  Tris-HCl pH 8.0、 $2\text{mmol/L}$  EDTA、 $2\text{mmol/L}$  巯基乙醇的缓冲液溶解过夜,  $12\ 000\text{r/min}$  离心10 min, 收集上清液检查,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 2.8 pIL-18 成熟蛋白纯化产物的活性检测

纯化复性的pIL-18 基因原核表达产物促进猪T细胞转化试验(MTT法): 无菌取60日龄健康猪脾脏, 在冷PBS液中将其剪碎,  $120\text{目}$  尼龙网中磨碎过滤, 用淋巴细胞分层液分离, 用RPMI1640培养液作100倍稀释, 计数后, 加不含细胞因子的培养液调整细胞密度为  $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$  细胞/mL, 加入pIL-18 基因原核表达、纯化、复性后的产物使终浓度为  $200\ \mu\text{g/mL}$ , 灭活小牛血清  $5.0\%$ , 双抗  $100\text{IU/mL}$ 。转移到96孔细胞培养板中, 每孔  $100\ \mu\text{L}$  细胞悬液, 并设阴性和空白对照组。将96孔板置于  $37^{\circ}\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱培养48 h; 每孔加入  $20\ \mu\text{L}$  MTT( $5.0\text{mg/mL}$ ), 再  $37^{\circ}\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱培养  $3\sim 4$  h; 每孔加入  $100\ \mu\text{L}$   $20\%$  SDS- $0.01\text{mol/L}$  HCL溶液, 混匀,  $37^{\circ}\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱继续培养  $3\sim 4$  h。以空白对照孔调零, 波长  $570\text{nm}$  测每个孔的OD值, 并取  $OD_{570}$  的平均值。

## 3 结果

### 3.1 良杂猪 IL-18 成熟蛋白基因的 RT-PCR 扩增

从良杂猪脾淋巴细胞提取细胞总RNA, 然后利用RT-PCR技术扩增产物, 琼脂糖凝胶电泳初步检测表明, 获得了  $474\text{bp}$  IL-18 成熟蛋白基因条带

(见图1)。

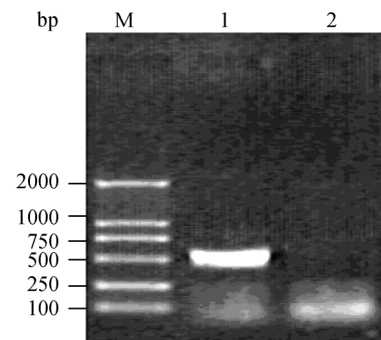


图1 PCR产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis map for RT-PCR product

Lane M: DL2000; Lane 1: RT-PCR product; Lane 2: negative control

### 3.2 良杂猪 IL-18 基因的克隆及鉴定

将猪IL-18基因的RT-PCR产物经纯化回收后, 插入到pGEM-T载体质粒的外源基因插入位点, 构建重组质粒, 转化JM109后挑选白色菌落, 直接以菌液为模板进行PCR、电泳, 出现一条长约  $474\text{bp}$  条带; 抽提重组质粒再进行PCR、电泳, 同样出现一条长约  $474\text{bp}$  的特异条带; 重组质粒经 *Sal*I 酶切、电泳出现一条大小约  $3600\text{bp}$  的带; 经 *Eco*R I + *Sal*I 酶切电泳出现两条带: 其中一条带为载体质粒, 约  $3000\text{bp}$ , 另一条带为所克隆的IL-18成熟基因片段, 为  $474\text{bp}$  (见图2)。

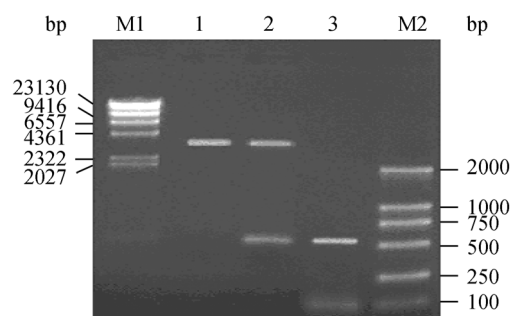


图2 重组质粒PCR和酶切鉴定图

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by digestion (*Eco*R I + *Sal*I) and PCR

Lane M1:  $\lambda$ -EcoT14 I digest; Lane 1: negative control; Lane 2: recombinant plasmid digestion by *Sph*I + *Pst*I; Lane 3: recombinant plasmid PCR product; Lane M2: DL2000

### 3.3 良杂猪 IL-18 基因序列测定及分析

选择酶切和PCR鉴定为pIL-18成熟蛋白基因重组阳性的质粒送宝生物工程(大连)有限公司, 进行正反两个方向的序列测定, 报告的核苷酸序列为

474 bp, 编码 157 个氨基酸。该序列已被 GenBank 收录, 序列号为 DQ 499825。将其基因序列与 GenBank 下载读取的 AB010003 序列进行比较分析,

核苷酸同源性为 99.8%, 氨基酸的同源性为 99%, 在第 550 位处 (以 ATG 为 1 计)由 A→G, 存在有意义突变。

```
TACTTTGGCAAGCTTGAACCTAAACTCTCAATCATAACGAAATCTGAACGACCAAGTCCT
Y F G K L E P K L S I I R N L N D Q
TTTCATTAACCAGGGACATCAAGCCGTGTTTGAGGATATGCCTGATTCTGACTGTTCAG
V L F I N Q G H Q A V F E D M P D S
ATAATGCACCTCAGACCGTATTATTATATATATGTATAAAGATAGCCTCACTAGAGGTCT
D C S D N A P Q T V F I I Y M Y K D S
GGCAGTAACCATCTCTGTGCAGTGTAAGAAAATGTCTACTCTCTCTGTAAGAACAAA
L T R G L A V T I S V Q C K K M S T L S
ACTCTTTCCTTAAAGGAAATGAGTCCTCTGATAATATTGATGATGAAGGAAATGACATC
C K N K T L S F K E M S P P D N I D D
ATATTCTTTCAGAGAAGTGTTCTCGACATGATGATAAGATACAGTTTGAGTCTTCATTG
E G N D I I F F Q R S V P G H D D K I Q
TACAAAGGATACTTTCTAGCTTGTAAGAAAAGAGAACGACCTTTTCAAACCTATTTTAA
F E S S L Y K G Y F L A C K K E N D L F K L
AGAAAAGGATGAATGTGGAGATAAATCTGTATGTTCACTGTTCAAAC AAGAAGTAG
I L E D E C G D K S V M F T V Q N K N *
```

图 3 核苷酸序列及其编码的氨基酸

Fig.3 The nucleotide sequence and deduced amino acids

### 3.4 良杂猪 pGEX-IL18 重组表达质粒的构建

将猪 IL-18 基因的 PCR 回收产物与 pGEX6P-1 表达载体同时 *EcoR* I/*Xho* I 双酶切, 纯化回收后构建重组质粒, 转化 BL21 后挑选白色菌落, 直接以菌液为模板进行 PCR、电泳, 出现一条长约 474 bp 的条带; 抽提重组质粒再进行 PCR、电泳, 同样出现一条长约 474 bp 的特异性条带; 重组质粒经 *EcoR* I 酶切、电泳出现一条大小约 4 900 bp 的带; 经 *EcoR* I/*Xho* I 酶切电泳出现两条带: 其中一条带为载体质粒, 约 4 900 bp, 另一条带为所克隆的 IL-18 基因片段, 约 474 bp(见图 4)。测序结果表明该转化菌的质粒中确实含有目的基因片段, 且读码框正确, 重组质粒 pGEX-IL18 构建成功。

### 3.5 重组菌菌体裂解物的 SDS-PAGE 结果

重组菌菌体裂解物可在相对分子质量 45 kD 处出现 1 条特异的蛋白条带。本实验选用的 pGEX6P-1 载体特点是在表达蛋白的 N 端融合了一完整的谷胱甘肽硫转移酶基因, 空载体表达的为 26 kD 的谷胱甘肽硫转移酶蛋白, 故非重组的 pGEX6P-1 质粒转化菌培养物诱导样品中, 约在 26 kD 处有一 GST-Tag 融合标签条带, 具体见图 5。因为原核表达系统表达的蛋白不经过糖基化等翻译后加工过程, 所以测得

的相对分子质量与 pIL-18 去糖基化后相对分子质量为 19 kD 是相符的。

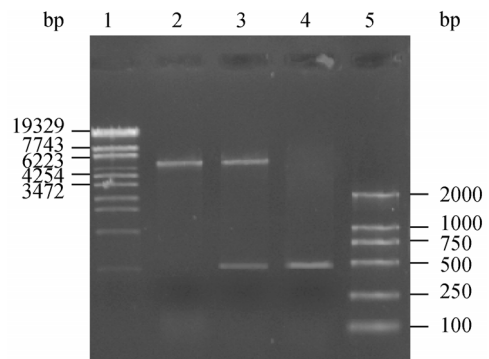


图 4 重组表达质粒 PCR 和酶切鉴定图

Fig.4 Identification of recombinant plasmid by digestion (*EcoR* I/*Xho* I) and PCR

Lane 1: -EcoT14 digest; Lane 2: Negative Control; Lane 3: Recombinant plasmid digestion by *EcoR* I/*Xho* I; Lane 4: Recombinant plasmid PCR product; Lane 5: DL2000

### 3.6 免疫印迹分析

原核重组表达载体 pGEX-IL18 表达的重组猪 IL-18 经 SDS-PAGE 电泳, 进行免疫印迹检测, 出现 1 条特异性的抗-抗体结合带, 具体见图 6。根据分子量的大小推测, 这条带的分子量与目的蛋白的分子

量相同, 从而证明原核系统中表达的目的蛋白是重组猪 IL-18。

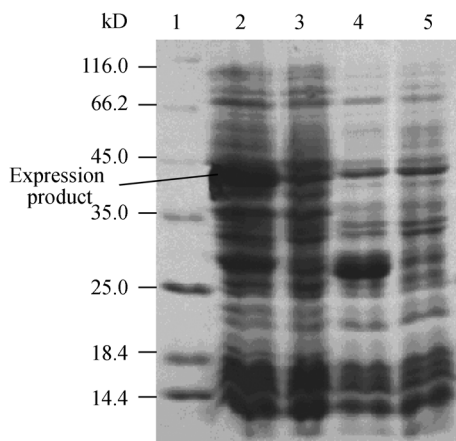


图5 表达重组 pGEX-IL18 菌株的 SDS-PAGE 分析  
Fig.5 SDS-PAGE result of the recombinant bacteria Expressing pGEX-IL18

Lane 1: low relative molecular mass of protein marker; Lane 2: products of recombinant pGEX-mpIL18 expressing in BL21 by IPTG inducing; Lane 3: negative control; Lane 4: products of plasmid pGEX6p-1 expressing in BL21; Lane 5: negative control

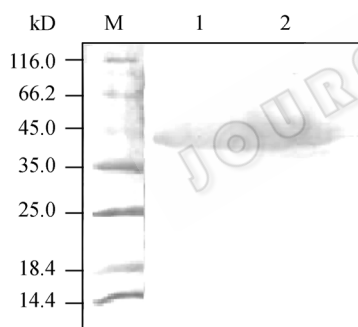


图6 表达产物 Western-blotting 分析

Fig.6 Western-blotting analysis of expression product  
M: protein MW marker; 1-2: recombinant pIL-18

### 3.7 pIL-18 重组蛋白的提纯结果

经超声波破碎、尿素裂解和复性后, pIL-18 重组蛋白产物溶液透明, 无明显可见沉淀。SDS-PAGE 显示仅含预期大小的一条条带,  $OD$  值计算其蛋白浓度为 2 mg/mL。

### 3.8 原核表达 pIL-18 诱导猪 T 细胞转化试验结果

由表 1 可见 pIL-18 能明显提高猪淋巴细胞的转化率, pIL-18 试验组与对照组的平均  $OD$  值差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 说明有一定的生物学活性。

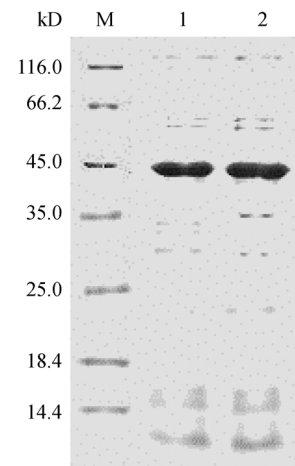


图7 纯化表达重组 pGEX-IL18 菌株的 SDS-PAGE 分析

Fig.7 SDS-PAGE result of the purified products of recombinant bacteria Expressing pGEX-IL18

Lane M: low relative molecular mass of protein marker; Lane 1,2: purified products of recombinant pGEX-IL18 expressing in BL21 by IPTG inducing

表1 猪淋巴细胞转化试验结果 ( $OD_{570}$ )

Table 1 The result of porcine's lymphocyte transforms test ( $OD_{570}$ )

No.	Lymphocyte /pIL-18	Lymphocyte/1640Medium
1	0.345	0.188
2	0.367	0.196
3	0.354	0.191
4	0.318	0.201
5	0.370	0.187
6	0.333	0.176
7	0.384	0.202
8	0.353	0.177
9	0.390	0.174
10	0.356	0.252
SI( $n=10$ )	$0.357 \pm 0.0250$	$0.194 \pm 0.0263$

## 4 讨论

白介素是由淋巴细胞、单核细胞或其它非单核细胞产生的细胞因子, 它在细胞间的相互作用、免疫调节、造血以及炎症过程中起重要调节作用。IL-18 是 1995 年新发现的一种细胞因子, 是一种高活性、多功能的生物活性糖蛋白, 能诱导 Th1 等细胞产生大量 IFN- $\gamma$ , 而且可以直接激活 IFN- $\gamma$  的启动子, 其诱导 IFN- $\gamma$  产生的能力比 IL-12 还要强很多。

此外, IL-18 能够增强 NK 细胞的细胞毒活性作用, 提高机体的细胞免疫水平, 达到预防和控制微生物感染、抑制肿瘤发生的目的。因此, IL-18 可望成为疫苗的一种重要的免疫佐剂。克隆不同品种猪 IL-18 基因, 有助于利用基因工程技术表达不同品种猪 IL-18, 实现对活性高的重组猪 IL-18 的筛选。

本研究从河南良杂猪脾脏中分离淋巴细胞, 无须 PHA+LPS<sup>[9,10]</sup> 进行诱导, 直接用于抽提总 RNA, RT-PCR 成功克隆到 IL-18 基因。究其原因, 推测是猪脾脏中 IL-18 基因含量远远高于外周血液, 故能直接抽提 RNA, 从而进一步简化试验操作, 节省时间, 并避免了细胞培养过程中存在污染的问题。将得到的成熟蛋白基因在大肠杆菌中进行了初步的表达, 其表达量占菌体的 28% 左右, 并且主要以包涵体的形式存在于沉淀中, 便于提取和纯化。

近年来, 有报道指出 IL-18 成熟蛋白基因可直接在 JM109 感受态细胞中进行表达, 但本试验做了尝试, 结果 pGEX-IL18 重组质粒在 JM109 中不能表达, 必须转入 BL21 才能得到有效表达, 推测这是载体本身的特性所决定的, 即不同的载体所对应的感受态细胞有所差别。此外, 在诱导条件的摸索过程中发现, 当 IPTG 浓度在 0.6~1.0 mmol/L 之间时, 蛋白表达量并无明显变化, 可见, 多花费些时间与精力来摸索目的基因与载体之间的关系是很有价值的。

MTT(四甲基偶氮唑盐)可作为线粒体中琥珀酸脱氢酶的底物。当有活细胞存在时, 线粒体内琥珀酸脱氢酶可将淡黄色的 MTT 还原成紫兰色的 Formazan, 将结晶的 Formazan 溶解释放, 可根据所测的 OD 值反映活细胞的数量和活性, 从而推知待检样品中 IL-18 的水平。该方法无同位素污染的危险, 不需要特殊设备, 在掌握良好的实验条件下, MTT 法的敏感性可接近 3 H-TdR 同位素掺入法。已有许多报道证明 MTT 法是检测动物白细胞介素生物活性的可靠方法。

IL-18 主要是由巨噬细胞样细胞产生, 如单核巨噬细胞, 肝中的枯否氏细胞, 肺泡巨嗜细胞, 肠上皮细胞等。因此, 国外报道的 pIL-18 都是从猪肺泡巨嗜细胞或者肠上皮细胞中扩增到的, 但在实际操作中上述细胞获取比较困难。本研究采用直接从脾脏细胞扩增的方法, 大大简化了操作。IL-18 是一种多效应的细胞因子, 必须切除信号肽才表现出活

性<sup>[11]</sup>。本研究中表达的 pIL-18 融合蛋白保持其完整蛋白的活性, 这为其表达产物作为佐剂或者治疗剂在临床的应用, 以及研究 pIL-18 在各种疾病中的免疫调节作用奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Okamura H, Tsutsui H. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cell. *Nature*, 1995, **378**: 88-91.
- [2] Dinarello CA, Novick DY. Overview of interleukin-18 more than an interleukin- $\gamma$ -inducing factor. *Leukocyte Biol*, 1998, **63**: 658-664.
- [3] Tanaka H, Narita M, Teramoto S, et al. Role of interleukin 18 and T helper type 1 cytokines in the development of mycoplasma pneumoniae pneumonia in adults. *Chest*, 2002; **121**(5): 1493-1497.
- [4] Dinarello CA. Interleukin 18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw*, 2000, **11**(3): 483-486.
- [5] Yamanaka R, Tsuchiya N, Yajima N, et al. Induction of an antitumor immunological response by an intratumoral injection of dendritic cells pulsed with genetically engineered Semliki Forest virus to produce interleukin-18 combined with the systemic administration of interleukin 1. *J Neurosurg*, 2003, **99**(4): 746-753.
- [6] Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T, et al. IL-18 prevents the development of chronic graft versus host disease in mice. *J Immunol*, 2000, **164**(11): 6067-6074.
- [7] Muneta Y, Shimoji Y, Yokomizo Y, et al. Molecular cloning of porcine interleukin-1 beta converting enzyme and differential gene expression of IL-1beta converting enzyme, IL-1 beta, and IL-18 in porcine alveolar macrophages. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, **19**(11): 1289-1296.
- [8] Muneta Y, Mori Y, Shimoji Y, et al. Porcine interleukin 18: cloning, characterization of the cDNA and expression with the baculovirus system. *Cytokine*, 2000, **12**(6): 566-572.
- [9] Jing Z, Dou Y. Cloning and sequencing of the porcine interleukin-18. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2004, **34**(7): 3-7.  
景志忠, 龚永喜. 猪白细胞介素 18 的克隆与序列分析. *中国兽医科技*, 2004, **34**(7): 3-7.
- [10] Zheng M, Jin NY, Zhang HY. Cloning and expression of porcine interleukin-18 mature protein gene in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2003, **23** (5): 430-432.  
郑敏, 金宁一, 张洪勇. 猪白细胞介素 18 成熟蛋白基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达. *中国兽医学报*, 2003, **23** (5): 430-432.
- [11] Muneta Y, Zhao HK, Inumaru S, et al. Large-scale production of porcine mature Interleukin-18(IL-18) in silk worms using a hybrid baculovirus system. *J Vet Med Sci*, 2003, **65**: 219-223.