

猪 I 型与 II 型干扰素的克隆、表达及抗病毒活性比较

陈雪梅, 薛清华, 祝荣格, 付显华, 杨利敏, 孙蕾, 刘文军

中国科学院病原微生物及免疫学重点实验室 中国科学院微生物研究所分子病毒中心, 北京 100101

摘要: 干扰素(IFN)是由多种细胞受病毒感染或其他生物诱导剂刺激而产生的天然蛋白质, 主要功能为抗病毒增殖、调节免疫反应和激活免疫细胞等。本研究克隆并测序了猪干扰素(PoIFN) α 、 γ 、 $\alpha\gamma$ 及 ω 基因。构建原核表达载体 pET-His/PoIFN- α 、pET-His/PoIFN- γ 、pET-His/PoIFN- $\alpha\gamma$ 和 pET-His/PoIFN- ω , 转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)进行表达, 经纯化、复性得到具有生物学活性的蛋白。用细胞病变抑制法在 Marc-145/PRRSV、Marc-145/VSV、PK-15/VSV、Vero/VSV、MDBK/VSV 系统上进行抗病毒活性测定, 结果表明猪 α 和 $\alpha\gamma$ 融合干扰素有较为显著的抗病毒活性, 抗 PRRSV 活性高达 10^8 U/mg; 猪 γ 干扰素活性效价约为 α 干扰素的 1/2 到 1/3; 猪 ω 干扰素几乎未检测到抗病毒活性, 需进一步验证。本研究对干扰素在抗病毒、提高机体免疫方面的应用提供了理论依据。

关键词: 猪干扰素, 抗病毒活性

Comparison of antiviral activities of porcine interferon type I and type II

Xuemei Chen, Qinghua Xue, Rongge Zhu, Xianhua Fu, Limin Yang, Lei Sun, and Wenjun Liu

Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Center for Molecular Virology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Interferons (IFNs) are natural proteins produced by wide variety of cells in response to viral infection or other biological inducers, and they execute diversified functions as antiviral defense, immune activation and cell growth regulation. Four genes encoding porcine interferons (PoIFN), PoIFN- α , PoIFN- γ , PoIFN- $\alpha\gamma$ or PoIFN- ω , were cloned and sequenced. The four types of porcine interferon genes were subcloned into the pET-His vector, and expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3). The recombinant products were purified and renaturalized from inclusion bodies to obtain a native state of well biological activity. Antiviral activity assays for porcine interferons were performed and evaluated by standard procedures in following cell/virus test systems: Marc-145/PRRSV, Marc-145/VSV, PK-15/VSV, Vero/VSV or MDBK/VSV. The data showed that both PoIFN- α and PoIFN- $\alpha\gamma$ demonstrated significant antiviral activities, and the titer of them against PRRSV was up to 10^8 U/mg. PoIFN- γ had approximately half or one-thirds antiviral activity of PoIFN- α . PoIFN- ω showed inconspicuous antiviral activity.

Keywords: porcine interferon, antiviral activity

Received: March 18, 2009; **Accepted:** April 21, 2009

Supported by: Ministry of Science and Technology of China Program (No. 2006BAD06A04), Hundreds of Talents Program of Chinese Academy of Sciences.

Corresponding author: Wenjun Liu. Tel: +86-10-64807497; Fax: +86-10-64807503; E-mail: liuwj@im.ac.cn

国家科技支撑计划(No. 2006BAD06A04), 中国科学院百人计划资助。

干扰素是人或动物细胞受到病毒感染等刺激后由巨噬细胞、淋巴细胞及体细胞产生的一类多功能细胞因子,是天然免疫反应的重要成分。根据其抗原特性、分子序列结构的差异,干扰素可分为 3 大类: I 型、II 型和 ω 型。I 型干扰素缺少内含子,包括 IFN- α 、 β 、 ω 、 σ 、 τ 、 ω 、 κ 、 ξ 等多个亚型,主要功能为“抗病毒细胞因子”; II 型干扰素即 IFN- γ , 又称为免疫干扰素; 最近在人、鼠、鸟和鱼中新发现了 ω 型干扰素,包括 IFN- λ 1、IFN- λ 2 和 IFN- λ 3 [1-4]。1985 年, Hauptmann 和 Swetly 首先从人淋巴瘤 cDNA 中发现了干扰素 ω 基因[5], 该基因被认为是在 116~132 万年前从干扰素 α 基因进化而来[6]。目前研究发现 ω 干扰素基因在各种哺乳动物中广泛存在,如山羊、绵羊、牛、马、兔和猫等[2,7],但在犬基因组中该基因缺失[8]。1991 年, Mege 发现了 5 个猪 ω 干扰素基因,其中 2 个是假基因,另外 3 个可编码功能蛋白[9]。

我国是养猪大国,猪圆环病毒病、猪繁殖与呼吸综合征、猪伪狂犬病等多种猪病毒性传染病给养猪业带来了巨大的经济损失。目前我国虽广泛接种各种猪病疫苗,仍不能有效控制疾病流行。动物用基因工程干扰素具有无药物残留、无副作用等特点,属于新型的蛋白质类兽药。干扰素通过激活细胞中多种功能基因的转录,调节各信号传导通路的协同作用,能够发挥广谱抗病毒、调节免疫细胞以及免疫调节等多种生物学功能,对体外抑制多种病毒的增殖,已初见成效[10,11]。因此研究开发这种新型的抗感染药物具有积极的现实意义。

本实验克隆、表达及纯化了猪干扰素 PoIFN- α 、PoIFN- γ 、PoIFN- $\alpha\gamma$ 和 PoIFN- ω ,并用细胞病变抑制法详细比较了 4 种猪源干扰素在不同细胞系上,对不同病毒的抗病毒活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 、Rosetta(DE3)为本实验室保存;pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;pET-His 表达载体购自基因动力公司。

1.1.2 细胞系、病毒株

牛肾细胞(MDBK)、非洲绿猴肾细胞(Vero)、猴

肾细胞(Marc-145)、猪肾细胞(PK-15);水泡性口炎病毒(VSV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)由本实验室保存。

1.1.3 试剂、引物

各种工具酶购自 TaKaRa 公司; Trizol 试剂、superscriptTM III first-strand synthesis system for RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司; Ni-NTA 纯化柱购自 QIAGEN 公司; DMEM 细胞培养基购自 Gibco 公司; 质粒提取和胶回收试剂盒为 Promega 生物技术公司产品。引物由上海生工公司合成; 测序由上海生工公司完成。

1.2 方法

1.2.1 提取总 RNA、RT-PCR 合成 cDNA

以 Trizol 试剂法分别从猪外周血细胞、被 VSV 感染 12 h 后的 PK-15 细胞中提取总 RNA。以总 RNA 为模板,用 Invitrogen superscriptTM first-strand synthesis system for RT-PCR 试剂盒反转录合成 cDNA。

1.2.2 PCR 扩增目的基因、T 载体的构建

分别根据 GenBank 公布的猪 α 干扰素(Accession No. M28623)、猪 γ 干扰素(Accession No. EU249804)序列,以猪外周血细胞 cDNA 为模板,PCR 扩增 PoIFN- α 和 PoIFN- γ 基因成熟区序列;设计融合引物,以 PoIFN- α 与 PoIFN- γ 基因成熟区序列为模板,PCR 扩增其融合基因,即 PoIFN- $\alpha\gamma$,为保证融合基因所编码蛋白的正确空间构象和正常生物学活性,在 2 个基因中间引入了短核苷酸链“ggcgggggtggcagcgggtggcgggggatca”,编码氨基酸“GGGSGGGGS”;根据猪 ω 干扰素序列(GenBank 上定义为 *S. scrofa domestica* PoIFN-alpha-5 gene, Accession No. X57196),以病毒感染的 PK-15 细胞 cDNA 为模板,PCR 扩增 PoIFN- ω 基因成熟区序列。上述引物均引入了 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点(表 1)。将 PoIFN- α 、PoIFN- γ 、PoIFN- $\alpha\gamma$ 和 PoIFN- ω 的 PCR 纯化产物分别亚克隆入 pMD18-T 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定正确后,送上海生工公司测序。

1.2.3 PoIFN- ω 序列分析

用 MegAlign 程序对已获得的 PoIFN- ω 基因与 GenBank 数据库中其他干扰素基因经 Clustal W 法比对,并构建核苷酸和蛋白质序列进化树。

表 1 克隆目的基因 PoIFN- α 、PoIFN- γ 、PoIFN- $\alpha\gamma$ 和 PoIFN- ω 的引物

Table 1 Primers for cloning of target genes

Genes	Primers	Primer sequences (5'-3')
PoIFN- α	Forward	cgcggatccatgtgtgacctgcctcagaccc
	Reverse	cccaagcttactccttctctgagtctgtct
PoIFN- γ	Forward	cgcggatccatgtgttactgccaggcgccttt
	Reverse	cccaagcttattttgatgctctctggcctt
PoIFN- ω	Forward	cgcggatccatgtgtgacctgtctcagaa
	Reverse	cccaagcttaggatgacccaggtctac
PoIFN- $\alpha\gamma$	Forward	cgcggatccatgtgtgacctgcctcagaccc
	Fusion -reverse	ccgccaccgctgccaccccgccctctcttccc tgag
	Fusion -forward	tggcagcgggtggcggggatcatcttactgccag gcgc
	Reverse	cccaagcttattttgatgctctctggcctt

1.2.4 原核表达质粒 pET-His/PoIFN- α 、pET-His/PoIFN- γ 、pET-His/PoIFN- $\alpha\gamma$ 和 pET-His/PoIFN- ω 的构建及表达

将测序正确的重组质粒 pMD18/PoIFN- α 、pMD18/PoIFN- γ 、pMD18/PoIFN- $\alpha\gamma$ 和 pMD18/PoIFN- ω 进行 BamH I 和 Hind III 双酶切后, 亚克隆入同样双酶切的原核表达载体 pET-His, 新的重组质粒分别命名为 pET-His/PoIFN- α 、pET-His/PoIFN- γ 、pET-His/PoIFN- $\alpha\gamma$ 和 pET-His/PoIFN- ω 。重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta(DE3), 37°C 培养至 OD_{600} 值达 0.5~0.6, IPTG 诱导 4 h。表达产物进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.5 重组猪干扰素 α 、 γ 、 $\alpha\gamma$ 和 ω 的纯化与复性

收集表达菌体, 超声破菌后 SDS-PAGE 检测, 重组蛋白以包涵体形式表达。包涵体依次用 PBS、2 mol/L 尿素和 1 mol/L NaCl 溶液各洗涤 2 遍, 6 mol/L 盐酸胍中室温变性 5 h 或 4°C 过夜至基本溶解, 12 000 r/min 离心 15 min, 分离出上清, 溶于 Buffer B (8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.01 mol/L Tris·Cl, pH 8.0), 加入已用 Buffer B 平衡的 Ni-NTA Agarose, 室温搅拌 30 min 后上柱。用 pH 梯度洗脱目的蛋白, 收集洗脱液, SDS-PAGE 检测后保存含有目的蛋白的洗脱液。在冷库中(4°C), 按 1:30 将目的蛋白洗脱液逐滴加入复性液, 同时不断搅拌以避免产生沉淀, 随后 4°C 静置 48 h。复性液成分为: 0.5 mol/L 精氨酸、2.5 mmol/L EDTA、10%~20% 甘油、0.1 mol/L Tris 和 1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽。稀释复性后的 PoIFN- α 、PoIFN- γ 、PoIFN- $\alpha\gamma$ 和 PoIFN- ω 在生物安全柜中经 0.22 μm 滤器过滤除菌, 4°C 保存。蛋白浓

度由 Bradford 法检测^[12]。

1.2.6 重组猪干扰素 α 、 γ 、 $\alpha\gamma$ 和 ω 的抗病毒活性检测

比较干扰素 PoIFN- α 、PoIFN- γ 、PoIFN- $\alpha\gamma$ 、PoIFN- ω 在不同细胞系上抗不同种病毒的活性。所用的细胞系/对应的病毒: Marc-145/PRRSV、Marc-145/VSV、PK-15/VSV、Vero/VSV、MDBK/VSV。测定方法是以细胞病变(CPE)抑制为基础的抑制微量测定法^[13-15]。将状态良好的细胞按 $2.5 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^5$ 个/mL 的密度, 100 μL /孔接种到 96 孔板中, 37°C、5% CO_2 条件下培养 6~8 h, 直至细胞单层、贴壁。将预稀释(根据干扰素对细胞毒性实验等预实验调整预稀释倍数)后的干扰素样品按 4 倍依次稀释 6 个梯度, 稀释液为含 10% FBS 的 DMEM 细胞培养基, 每个梯度可设 2~4 个重复。18 h 后, 换入用不含血清的 DMEM 培养基稀释的病毒液(300~500 TCID₅₀), 同时设置加病毒不加干扰素的阳性对照组和加干扰素及病毒的阴性对照组。约 30 h(VSV)或 72 h(PRRSV)后, 阳性对照组出现 90%以上细胞病变时, 进行结晶紫染色, 用酶标仪(Tekan, Grödig, Austria)在 570 nm 波长读值, 根据 Reed-Muench 法计算干扰素的抗病毒活性效价^[15]。抗病毒活性测定实验重复 2~3 次。

2 结果

2.1 PoIFN- α 、PoIFN- γ 和 PoIFN- $\alpha\gamma$ 基因鉴定

PoIFN- α 、PoIFN- γ 和 PoIFN- $\alpha\gamma$ 的去信号肽基因经 1%琼脂糖凝胶电泳检测有特异目的条带, 测序结果表明克隆的基因大小分别为 501 bp、441 bp 和 969 bp, 符合预期。

2.2 PoIFN- ω 基因序列分析

从 VSV 感染的 PK-15 细胞总 RNA 中克隆得到去掉 N 端 23 个氨基酸信号肽的基因, 测序结果表明该成熟区序列大小为 504 bp, 编码 168 个氨基酸。经 GenBank 数据库比对, 发现其登录号为 X57196, 归为猪干扰素 α 干扰素家族。然而, 通过与其他哺乳动物干扰素基因序列比对分析, 得出结论认为该基因应属于 ω 干扰素家族, 理由如下: 1)该基因的核苷酸和蛋白质序列与 ω 干扰素家族的同源性比其与 α 干扰素家族的同源性略高(表 2); 2)该基因编码半胱氨酸(Cys)和脯氨酸(Pro)的位置更接近于 ω 干扰素家族, 如 1、29、86、99、133 和 134 位氨基酸; 3)该基因所编码蛋白序列在 109~113 位存在 5 个氨基酸缺

失, 在 C 端有 6 个延伸氨基酸, 这与 ω 干扰素家族的特征相符, 而 α 干扰素家族不存在此特征(图 1)^[2]; 4) 用 MegAlign 程序以 Clustal W 法进行比对, 构建了核苷酸和蛋白质序列进化树, 该基因与 ω 干扰素家族均在一个分支上(图 2)。

2.3 重组猪干扰素 α 、 γ 、 $\alpha\gamma$ 和 ω 的表达、纯化与复性
 重组质粒转化 Rosetta(DE3) 大肠杆菌, 37°C IPTG 诱导 4 h, 目的蛋白能高效表达。经 SDS-PAGE

检测, 重组蛋白 PoIFN- α 、PoIFN- γ 、PoIFN- $\alpha\gamma$ 和 PoIFN- ω 的大小分别约为 19 kD、17 kD、36 kD 和 19 kD。表达产物经包涵体洗涤、过柱纯化后, 蛋白纯度能达 90% 以上 (图 3)。纯化后的包涵体经稀释复性可得到 N 末端正确加工和二硫键正确形成的具有生物学活性的蛋白质。Bradford 法检测终浓度分别约为 0.148 mg/mL、0.139 mg/mL、0.106 mg/mL 和 0.128 mg/mL。

表 2 猪、人、猫和牛干扰素在核苷酸和氨基酸水平上的全序列(含信号肽)相似性

Table 2 Similarities (%) of nucleotides (top line) and amino acids (bottom line) full-length sequences among porcine, human, feline and bovine interferon

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	*	79.2	75.9	82.2	1.2	1.0	1.5	1.0	68.8	68.8	65.3	71.2	PoIFN alpha
2	71.0	*	77.3	78.6	6.1	3.6	4.4	4.2	72.4	72.5	66.1	72.4	HuIFN alpha
3	36.0	46.3	*	75.4	0.8	0.8	3.8	1.9	68.5	70.3	64.9	70.2	FeIFN alpha
4	69.2	62.1	56.1	*	4.4	2.3	1.0	0.8	70.3	69.3	64.9	70.8	BoIFN alpha
5	22.0	19.4	15.7	24.1	*	75.4	81.4	87.3	1.3	0.8	1.7	1.9	PoIFN gamma
6	19.9	18.8	12.0	15.2	67.0	*	77.4	76.0	7.5	8.1	1.7	7.5	HuIFN gamma
7	22.9	19.3	19.8	20.3	73.3	63.4	*	81.8	3.6	1.7	1.9	2.1	FeIFN gamma
8	23.0	24.6	25.1	21.5	82.7	70.2	72.8	*	3.8	3.5	2.7	6.7	BoIFN gamma
9	22.9	50.9	36.0	31.3	20.9	17.8	18.2	22.0	*	81.6	75.9	84.3	PoIFN omega
10	60.3	64.0	51.4	43.0	21.5	20.9	18.2	23.6	60.5	*	73.8	78.5	HuIFN omega
11	51.9	17.3	41.6	40.7	19.9	18.8	19.3	19.9	44.2	53.6	*	76.3	FeIFN omega
12	17.3	63.6	57.5	63.6	22.5	19.4	30.7	20.9	34.9	70.5	65.9	*	BoIFN omega

* same sequences.



图 1 干扰素成熟区氨基酸序列比较

Fig. 1 Alignment of mature amino acid sequences of interferons. Conserved positions of cysteine and proline residues present in real lined box, and an extension of six amino acids at the C-terminal presents in dotted lined box.

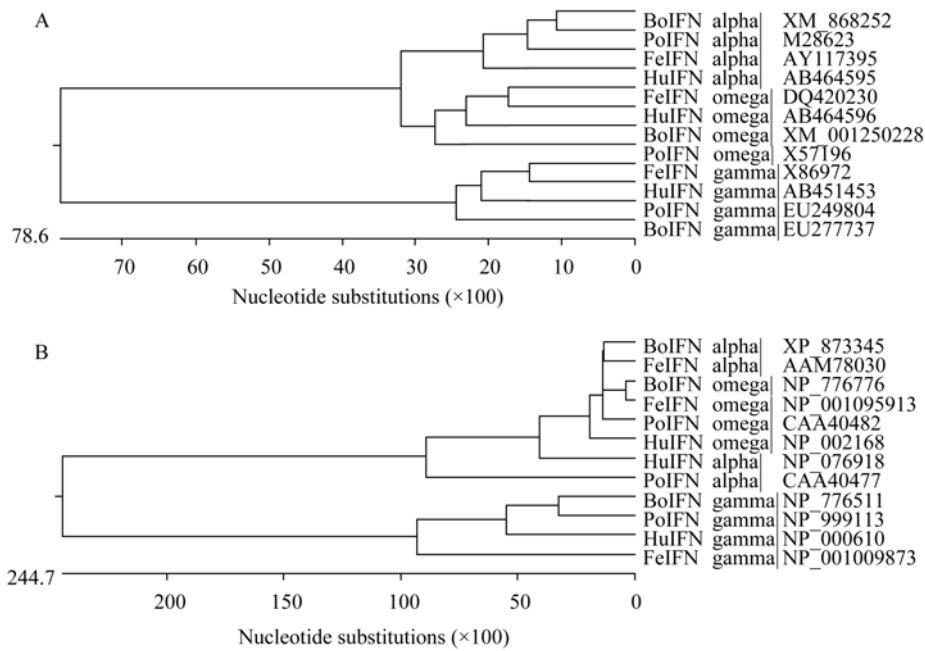


图 2 干扰素核苷酸和氨基酸序列进化树

Fig. 2 Phylogenetic trees of interferons. (A) Phylogenetic trees based on nucleotide sequences. (B) Phylogenetic trees based on amino acid sequences.

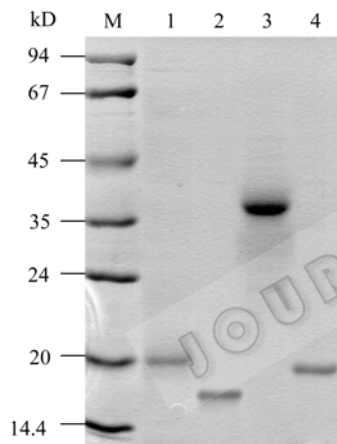


图 3 SDS-PAGE 检测纯化的 PoIFN- α 、PoIFN- γ 、PoIFN- $\alpha\gamma$ 和 PoIFN- ω 蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified PoIFN- α , PoIFN- γ , PoIFN- $\alpha\gamma$ and PoIFN- ω protein. M: protein marker; 1: purified PoIFN- α protein; 2: purified PoIFN- γ protein; 3: purified PoIFN- $\alpha\gamma$ protein; 4: purified PoIFN- ω protein.

2.4 重组猪干扰素 α 、 γ 、 $\alpha\gamma$ 和 ω 的抗病毒活性比较

用细胞病变抑制和结晶紫染色法在 Marc-145、PK-15、Vero、MDBK 等细胞上测定了干扰素抗 VSV 或 PRRS 病毒的活性, 再以 Reed-Muench 方法计算其效价, 结果表明猪 α 和 $\alpha\gamma$ 融合干扰素均有较为显著的抗病毒活性, 猪 γ 干扰素活性约为 α 干扰素的 1/2 到 1/3(表 3, 图 4), 而猪干扰素 ω 几乎未检测到活性(数据未给出)。值得注意的是, 在体外实验中, 猪干

扰素 α 、 γ 、 $\alpha\gamma$ 对 PRRSV 的抗病毒活性效价高达 $10^7 \sim 10^8$ U/mg, 说明干扰素极有潜力成为治疗猪繁殖与呼吸综合征的新型蛋白质类药物。

表 3 猪干扰素在不同细胞系上对不同病毒的抗病毒活性比较

Table 3 Antiviral activities of porcine interferons against different virus on various cell line

	Antiviral activities ($\times 10^5$ U/mg)				
	Marc-145 / PRRSV	Marc-145 / VSV	PK-15 / VSV	Vero / VSV	MDBK / VSV
pIFN- α	246	4.32	8.45	2.45	268
pIFN- γ	87.8	2.28	4.14	0.95	53.2
pIFN- $\alpha\gamma$	159	2.38	7.80	2.09	174

3 讨论

本实验克隆表达了猪 I 型及 II 型干扰素的 4 个基因, PoIFN- α 、PoIFN- γ 、PoIFN- $\alpha\gamma$ 和 PoIFN- ω , 并研究了其抗病毒生物学活性。其中 PoIFN- α 、PoIFN- γ 基因序列已发布在 GenBank 数据库^[16], 曹瑞兵^[17]、Xia^[18]、Cencic^[19]等在原核或真核中也成功表达了这 2 种猪干扰素, 并检测了其生物学活性。PoIFN- $\alpha\gamma$ 是 I 型和 II 型干扰素的融合基因。PoIFN- ω 基因虽早在 1991 年已被发现^[9], 但却被误归到 α 干扰素家族, 通过比对基因和蛋白序列、比较保守氨基酸 Cys 和

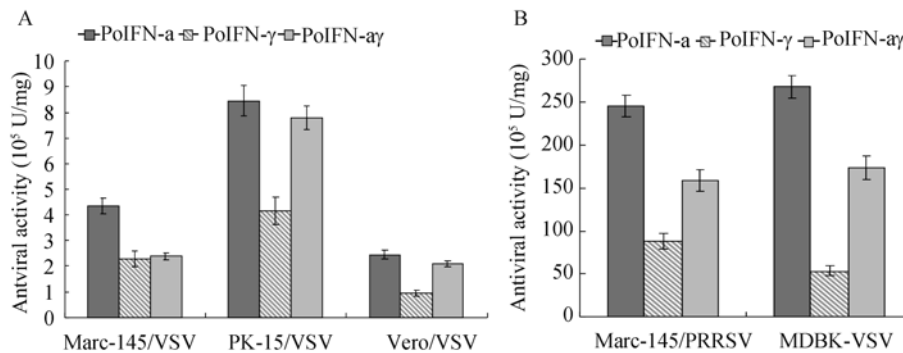


图 4 猪干扰素在不同细胞系上对不同病毒的抗病毒活性比较

Fig. 4 Antiviral activities of porcine interferons against different virus on various cell line.

Pro 的位置、构建进化树等手段, 作出结论认为该基因属于 α 干扰素家族。

在体外实验中, 用细胞病变抑制法比较了原核表达的 4 种猪干扰素的抗病毒活性。结果表明, PoIFN- α 、PoIFN- γ 和 PoIFN- $\alpha\gamma$ 均能抑制 VSV 或 PRRSV 感染 Marc-145、PK-15、Vero 或 MDBK 细胞, 猪干扰素在同源和不同源细胞系中都表现了较好的抗病毒生物活性, 初步显示了其抗病毒的高效性和广谱性。由于测活系统的细胞系和病毒种类不同, 干扰素和细胞中干扰素受体的相互作用有差异, 统计学方法计算得到的效价变化范围较大: 在 Marc-145/PRRSV 或 MDBK/VSV 系统中, 干扰素的活性效价较高, 达到了 $10^7 \sim 10^8$ U/mg, 而其他系统中, 效价大约为 10^5 U/mg。然而, 猪干扰素 ω 在各个系统中均未表现出抗病毒活性, 可能存在的原因有: 该蛋白本身活性很低, 在体外实验中无法检测; 表达和复性工艺未能使干扰素恢复成具有生物活性的蛋白质。对此需要进行进一步的研究。

此外, 尽管 PoIFN- $\alpha\gamma$ 融合干扰素在体外实验中并未表现出更为显著的、叠加的生物学活性, 但该蛋白结合了 I 型干扰素在抗病毒方面及 II 型干扰素在免疫调节方面的优势, 这些特性很可能使该干扰素在猪病毒性疾病的临床治疗上发挥更优越的效果。

基因工程干扰素能够快速发挥抗病毒作用, 提高动物机体免疫功能, 增强抗病防病能力, 不仅对猪流感、猪水疱病、猪轮状病毒感染、猪传染性胃肠炎、猪繁殖与呼吸综合征等病毒感染都具有一定的预防效果, 且能与灭活疫苗、抗体类药物联用, 弥补免疫空白期, 增强免疫效果, 无药物残留, 是值

得研究和推广的新型蛋白质药物。

REFERENCES

- [1] Lefevre F, Boulay V. A novel and atypical type one interferon gene expressed by trophoblast during early pregnancy. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 19760–19768.
- [2] Roberts RM, Liu L, Alexenko A. New and atypical families of type I interferons in mammals: Comparative functions, structures, and evolutionary relationships. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol*, 1997, **56**: 287–325.
- [3] Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, 2004, **202**: 8–32.
- [4] Chevaliez S, Pawlotsky JM. Interferons and their use in persistent viral infections. *Handb Exp Pharmacol*, 2009, **189**: 203–41.
- [5] Hauptmann R, Swetly P. A novel class of human type I interferons. *Nucl Acids Res*, 1985, **13**(13): 4739–4749.
- [6] Hughes AL. The evolution of the type I interferon gene family in mammals. *J Mol Evol*, 1995, **41**: 539–548.
- [7] Yang LM, Xue QH, Liu WJ, *et al*. Cloning and characterization of a novel feline IFN-omega. *J Interferon Cytokine Res*, 2007, **27**(2): 119–27.
- [8] Himmler A, Hauptmann R, Adolf GR, *at al*. Structure and expression in *Escherichia coli* of canine interferon-alpha genes. *J Interferon Res*, 1987, **7**(2): 173–83.
- [9] Mege D, Lefevre F, Labonnardiere C. The porcine family of interferon-omega: Cloning, structural analysis, and functional studies of five related genes. *J Interferon Res*, 1991, **11**(6): 341–50.
- [10] Overend C, Mitchell R, He D, *et al*. Recombinant swine beta interferon protects swine alveolar macrophages and MARC-145 cells from infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gener Virol*, 2007, **88**: 925–931.
- [11] Moraes MP, de Los Santos T, Koster M, *et al*. Enhanced antiviral activity against foot-and-mouth disease virus by a combination of type I and II porcine interferons. *J Virol*,

- 2007, **81**(13): 7124–35.
- [12] Zhang LX, Zhang TF, Wang JZ. The Protein Protocols Handbook. Beijing: Science Press, 2000: 42–46.
张龙翔, 张庭芳, 汪家政. 蛋白质手册. 北京: 科学出版社, 2000: 42–46.
- [13] John A, Armstrong. Semi-micro dye-binding assay for rabbit interferon. *Appl Microbiol*, 1971, **21**(4): 723–725.
- [14] Sara Rubinstein, Philip C, Familletti, *et al*. Convenient assay for interferons. *J Virol*, 1981, **37**(2): 755–758.
- [15] Chinese Pharmacopoeia Commission. The Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing: Chemical Industry Press, 2005, appendix XC: 56–57.
国家药典委员会编. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2005, 附录 X C: 56–57.
- [16] Lefevre F, La Bonnardiere C. Molecular cloning and sequencing of a gene encoding biologically active porcine alpha-interferon. *J Interferon Res*, 1986, **6**(4): 349–60.
- [17] Cao RB, Xu XQ, Zhou B, *et al*. Gene modification and high prokaryotic expression of porcine interferon alpha-1. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(2): 291–294.
曹瑞兵, 徐学清, 周斌, 等. 猪 $\alpha 1$ -干扰素的基因改造与高效原核表达. 生物工程学报, 2004, **20**(2): 291–294.
- [18] Xia C, Dan W, Wu WX, *et al*. Cloning and expression of interferon- α/γ from a domestic porcine breed and its effect on classical swine fever virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, **104**(1–2): 81–89.
- [19] Cencic A, Lefevre F, Koren S, *et al*. Tetracycline-controlled expression of glycosylated porcine interferon-gamma in mammalian cells. *Anim Biotechnol*, 1999, **10**(1–2): 63–79.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

可再生能源的微生物转化技术

宋安东 等 编著

978-7-03-024586-1 ¥ 55.00 2009年5月出版

本书在分析当前全球面临的能源和环境危机的基础上, 阐述了利用生物质转化为主要的生物炼制的内涵, 将微生物技术与可再生能源转化有机结合起来, 全面论述了利用微生物技术转化可再生能源的基础理论、基本工艺、基本装备、应用情况和发展前景。内容主要包括生物炼制、生物沼气、生物氢气、生物乙醇、生物丁醇、生物柴油、生物采油、生物燃料电池、煤炭的生物转化、能源的净化等方面, 为读者展示了能源微生物技术的全貌。本书是一部全面反映可再生能源生物转化的新技术、新材料、新方法、新进展的集理论性和实践性为一体的专著。

本书可以作为生物、环境、能源、生物化工等领域有关科研人员、生产技术人员参考书, 也可作为高等院校的生物技术、生物科学、生物工程、生物化工、能源工程、资源利用等专业的研究生、本科生的教学用书。



现代生物能源技术——美国国家可再生能源实验室生物能源技术报告

美国国家可再生能源实验室 编著

鲍杰 译 叶勤 金浩 校

978-7-03-024519-9 ¥ 48.00 2009年5月出版

本书第一篇是玉米秸秆生产燃料乙醇的过程设计与技术经济评价技术报告, 由美国国家可再生能源实验室(NREL)于2002年完成。该报告中的过程设计和技术经济评价模型对新的技术进展带来的成本削减预测非常有用, 可以对新的技术进展转换为过程设计上的改进和经济效益上的提高进行快速评价。第二篇是基于生物质来源的高附加值生物基化学品与材料的筛选, 由美国国家可再生能源实验室和太平洋西北国家实验室(PNNL)于2003年完成。它是对生物质来源的所有可能的化学品与材料进行的一项大规模调研和筛选项目, 从技术潜力与现状、对石油产品的替代性、成本等角度出发, 在300种以上的生物基化学品中筛选出了12种最重要的砌块中间体化学品, 并详细列出了可能的研发路线。

本书内容实用、翔实、丰富, 不同于一般学术著作, 几乎所有内容都对我国正在起步的生物能源行业有直接和重要的参考价值, 对政府决策者和工业界投资者来说也是重要的参考资料。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>