

猪白细胞介素-2 基因在大肠杆菌中的表达 及其生物学活性测定

郭小参¹, 陈红英¹, 崔 沛², 贾艳艳¹, 崔保安¹, 方剑玉³, 王振亚¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省动物疫病预防控制中心, 河南 郑州 450008;

3 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095)

【摘 要】 【目的】在大肠杆菌中表达猪白细胞介素-2(pIL2), 并鉴定其生物学活性。【方法】以含猪 IL-2 基因的重组质粒 pGEM-pIL2 为模板, PCR 扩增 IL-2 基因。将猪 IL-2 基因定向克隆到原核表达载体 pGEX-6p-1 中, 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)感受态细胞, 在 IPTG 诱导下表达融合蛋白 GST-pIL2, 并应用甲基噻唑基四唑(MTT)试验测定融合蛋白的生物学活性。【结果】以含有猪 IL-2 基因的重组质粒 pGEM-pIL2 为模板, PCR 扩增出 1 条约 420 bp 的带。所获重组质粒 pGEX-pIL2 经酶切、测序鉴定, 证实含有目的片段, 且连接、构建正确。SDS-PAGE 电泳结果显示, 可检测到相对分子质量约为 42 ku 的 GST-pIL2, Western-blot 证实 GST-pIL2 能与兔抗猪 IL-2 单克隆抗体发生特异性反应。表达蛋白经薄层层析扫描分析, 表达量约占菌体总蛋白的 40%。MTT 试验证实, 表达产物经变性、复性后能极显著促进猪脾淋巴细胞增殖。【结论】猪 IL-2 基因在大肠杆菌中得到表达, 表达的蛋白具有一定的生物学活性。

【关键词】 猪白细胞介素-2; 原核表达; 生物学活性

【中图分类号】 S851.31

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)11-0001-06

Expression of huainan porcine interleukin-2 in *Escherichia coli* and bioactivity analysis

GUO Xiao-can¹, CHEN Hong-ying¹, CUI Pei², JIA Yan-yan¹, CUI Bao-an¹,
FANG Jian-yu³, WANG Zheng-ya¹

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

2 Henan Center for Animal Diseases Control and Prevention, Zhengzhou, Henan 450008, China;

3 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: 【Objective】 This study developed prokaryotic expression system which can express porcine interleukin-2 (pIL2) in *Escherichia coli*, and identified the bioactivity of the recombinant protein. 【Method】 Porcine IL-2 gene was amplified with recombination plasmid pGEM-pIL2 as a template, porcine IL-2 was cloned into the prokaryotic expression vector of pGEX-6p-1 and transformed into *E. coli* BL21(DE3) competent cells, which can express fused protein GST-pIL2 in *E. coli* BL21(DE3) by IPTG inducing. 【Result】 A 420 bp fragment was amplified by PCR. DNA sequencing result showed that the sequence of the recombinant prokaryotic expression plasmid pGEX-pIL2 in the reading frame and the ligation part was correct. The expressed product was identified by SDS-PAGE and Western-blot. The expressed protein was about 42 ku and it could react with rabbit against porcine IL-2 monoclonal antibody. MTT essay confirmed that the ex-

* [收稿日期] 2009-03-14

[基金项目] 国家农业科技成果转化资金项目(2007BAD07A06)

[作者简介] 郭小参(1982—), 男, 河南许昌人, 在读硕士, 主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。

[通信作者] 崔保安(1948—), 男, 河南荥阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

pressed product can enhance lymphocyte proliferation. 【Conclusion】 Porcine IL-2 gene can express in *E. coli*, and the expressed protein has bioactivity.

Key word: porcine interleukin-2; prokaryotic expression; bioactivity

白细胞介素-2(Interleukin-2, IL-2)是最早发现的一种具有广泛生物学活性的细胞因子,是由激活 T 淋巴细胞产生的一类 Th1 型细胞因子,在抗肿瘤、抗毒素、免疫调节及感染性疾病的治疗中具有重要作用。IL-2 能够有效地提高机体的免疫功能,促进 T、B 淋巴细胞的增殖,增强 NK 细胞、单核巨噬细胞等的杀伤活性,在免疫应答系统中具有十分重要的免疫生理调节效应^[1-3]。1976 年, Morgan 等^[4]首次报道发现该细胞因子,并命名为 T 细胞生长因子(TCGF),在 1979 年第二届细胞因子研究会上定名为 IL-2。

目前,对鸡、牛 IL-2 基因的研究较多,均已在原核和真核表达系统中表达^[5-7],其中鸡的重组 IL-2 能与多种病原疫苗一起使用,可显著提高免疫水平,减少应激,缓解疫苗的副反应,并有很强的治疗作用^[8-10]。目前,对猪 IL-2(pIL2)基因的研究较少。本试验从已经构建的 pGEM-pIL2 重组载体中克隆出猪 IL-2 成熟蛋白基因,在大肠杆菌中进行表达,并对其表达产物的生物学活性进行鉴定,以期猪 IL-2 作为免疫佐剂在疫苗免疫中的促进作用研究,以及猪 IL-2 细胞因子 ELISA 试剂盒的研制积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 猪 IL-2 基因的重组质粒 pGEM-pIL2,由河南省动物性食品安全重点实验室构建并保存;原核表达载体 pGEX-6p-1,由河南省动物性食品安全重点实验室保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)、DH5 α 感受态细胞,购自大连宝生物工程公司。

1.1.2 主要试剂 *Ex Taq* DNA 聚合酶,异丙基- β -D-硫代半乳糖(IPTG),二硫苏糖醇(DTT),限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 等,均购自宝生物工程(大连)有限公司;GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,购自上海捷瑞生物工程有限公司;B 型质粒小量快速提取试剂盒,为北京博大泰克生物基因技术有限公司产品;兔抗猪 IL-2 单克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标羊抗兔 IgG,均为 Bioszune 公司产品。

1.2 猪 IL-2 基因的 PCR 扩增

根据重组质粒 pGEM-pIL2 的猪 IL-2 基因序列

设计 1 对引物,上、下游引物的 5' 端分别引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线部分),上游引物序列为:5'-GCA GAATTCGCACCTACTTC AAG CT-3';下游引物序列为:5'-CCG CTCGAGTCAAG TCAGTGTGAG-3'。该引物扩增长度为 423 bp,含猪 IL-2 成熟蛋白基因。以 pGEM-pIL2 重组质粒为模板,扩增猪 IL-2 成熟蛋白基因,PCR 反应体系为:重组质粒 pGEM-pIL2 1 μ L,上游引物(50 μ mol/L) 1 μ L、下游引物 P2(50 μ mol/L) 1 μ L, Premix *Taq* 预混酶 25 μ L,补充灭菌去离子水至 50 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 40 s,55 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。取 5 μ L PCR 产物,用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)进行电泳检测。

1.3 重组表达质粒 pGEX-pIL2 的构建及鉴定

回收 PCR 产物,经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后,与经同样酶切处理的 pGEX-6p-1 载体片段相连接,构建重组表达载体 pGEX-pIL2,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。挑取白斑菌落接种于含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 肉汤培养基,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12~16 h。提取重组质粒 pGEX-pIL2 进行 PCR 及 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。挑选 2 个双酶切和 PCR 鉴定均为阳性的重组菌进行序列测定,验证重组质粒读码框的正确性。

1.4 猪 IL-2 基因在大肠杆菌的诱导表达与鉴定

将鉴定为阳性的重组质粒 pGEX-pIL2 转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,挑取单个白色菌落,接种于含有 50 μ g/mL Amp 的 LB 肉汤培养基,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,然后按 1:100 比例(体积比)扩大振荡培养,待 $OD_{600\text{ nm}}$ 值达 0.6 左右时,加入 IPTG(终浓度为 1.0 mmol/L),37 $^{\circ}$ C 培养诱导 5 h 收集菌体,同时以含有重组质粒 pGEX-pIL2 的未诱导的重组菌、含有表达质粒 pGEX-6p-1 的诱导细菌和未诱导细菌为对照,对诱导表达菌裂解产物进行 SDS-PAGE 鉴定。

SDS-PAGE 电泳结束后,转至硝酸纤维素膜(NC)上,35 V 转印 3 h,将转印好的 NC 膜用 50 g/L 脱脂乳封闭,然后与兔抗猪 IL-2 单克隆抗体作用,经含有吐温-20 的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液(TBST)洗涤后,与 HRP 标羊抗兔 IgG 作用,最后

以 3,3-二氨基联苯胺 (DAB) 显色,观察特异性条带。

1.5 重组蛋白的纯化与复性

收集表达融合蛋白产物的菌液,7 000 r/min 离心 15 min,用 TE1 (10.0 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1.0 mmol/L EDTA)缓冲液重悬,加入终浓度为 0.5 mg/L 的溶菌酶和体积分数 1% Triton X-100,作用 30 min。经超声波裂解后,10 000 r/min 离心 10 min,收集包涵体沉淀,依次用 TE2 (10.0 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、1.0 mmol/L EDTA、体积分数 1% Triton X-100)和 TE3 (10.0 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1.0 mmol/L EDTA 、2 mol/L 尿素)各洗涤沉淀 2 次,加入变性液(8 mol/L 尿素、10.0 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、10.0 mmol/L DTT)溶解包涵体沉淀,根据变性溶解的目的蛋白浓度,在变性液中加入相应体积的稀释液(含 1 mmol/L 还原型谷胱甘肽和 0.1 mmol/L 的氧化型谷胱甘肽),4℃放置 20 h 以上,对目的蛋白进行复性。取复性后的重组蛋白,用缓冲液(20.0 mmol/L Tris-HCl)4℃透析 48 h,透析液每 6 h 换 1 次,用蔗糖浓缩重组蛋白,紫外吸收法测复性蛋白质的浓度,过滤除菌后置-20℃保存备用。

1.6 重组蛋白生物学活性的测定

参考王彦彬等^[1]的方法分离猪淋巴细胞,用 RPMI1640 培养液稀释后,调整细胞浓度为 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,加入纯化复性后的猪 IL-2 蛋白,使其终浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$,加入到 96 孔细胞培养板中培养,同时设无蛋白的细胞液为阴性对照。将 96 孔板置于

37℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 48 h,然后每孔加入 20 μL 甲基噻唑基四唑 (MTT, 5.0 mg/mL),再在 37℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中继续培养 4 h,每孔加入 100 μL 二甲亚砜 (DMSO),混匀,震荡 3 min,在酶标仪上测 A_{570} 值。

2 结果与分析

2.1 猪 IL-2 成熟蛋白基因的扩增

利用特异性引物,以重组质粒 pGEM-pIL2 为模板进行 PCR 扩增,结果显示,在约 420 bp 处有 1 条清晰带(图 1),与预期结果相符。

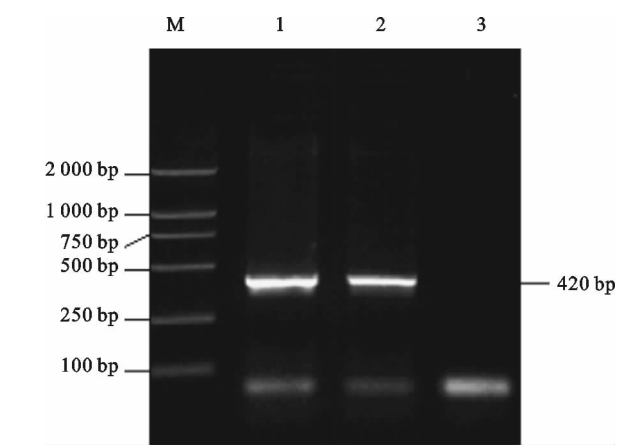


图 1 猪 IL-2 基因的 PCR 扩增结果
M, DL2000 DNA Marker; 1, 2. 阳性 PCR 产物;
3. 阴性对照

Fig.1 PCR result of IL-2 gene for pig
M, DL2000 DNA Marker; 1, 2. Positive PCR product;
3. Negative control

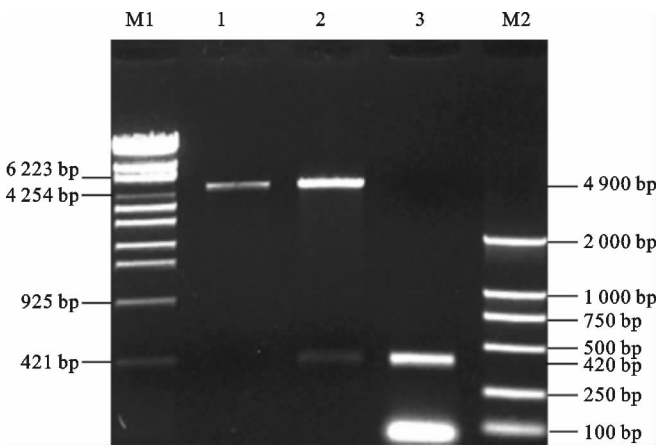


图 2 重组质粒 pGEX-pIL2 的 PCR 和双酶切鉴定结果

M1, λ -EcoT 14 I digest DNA Marker; 1. 阴性对照; 2. 重组质粒 pGEX-pIL2 双酶切产物;
3. 重组质粒 pGEX-pIL2 的 PCR 产物; M2, DL2000 DNA Marker

Fig.2 Identification of recombinant plasmid by digestion ($EcoR$ I + Xho I) and PCR

M1, λ -EcoT 14 I digest DNA Marker; 1. Negative control; 2. Recombinant plasmid digestion by $EcoR$ I + Xho I ;
3. Recombinant plasmid PCR product; M2. DL2000 DNA Marker

2.2 重组表达质粒 pGEX-pIL2 的鉴定

对重组质粒 pGEX-pIL2 进行 PCR 扩增,结果扩增出 1 条 420 bp 左右的目的条带;经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切,出现了 2 条带,其中 1 条带为载体条带,长度约为 4 900 bp,另 1 条为插入的目的条带,长度约为 420 bp;空载体 pGEX-6p-1 经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切,结果只有 1 条 4 900 bp 的条带,与预期结果相符(图 2)。对将经 PCR 和双酶切鉴定为阳性的重组质粒进行测序,测序结果与猪 IL-2 基因的编码区序列完全一致,表明重组质粒 pGEX-pIL2 中含有目的基因片段,且读码框正确。上述结果表明,重组质粒 pGEX-pIL2 构建成功。

2.3 融合蛋白 GST-pIL2 的 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 电泳结果显示,含有重组质粒 pGEX-pIL2 的重组菌液出现 1 条约为 42 ku 的融合蛋白 GST-pIL2,与预期结果相一致;而只含表达质粒 pGEX-6p-1 的 BL21(DE3),在 26.0 ku 处有 1 条明显的蛋白带(谷胱甘肽转移酶,GST);含有重组质粒 pGEX-pIL2 的未诱导重组菌及未含重组质粒和表达载体的宿主菌 BL21(DE3),均未出现这一条带(图 3),表明含有重组质粒 pGEX-pIL2 的重组菌可诱导表达含猪 IL-2 的融合蛋白 GST-pIL2。薄层扫描分析结果显示,表达蛋白占菌体总蛋白的 40%。

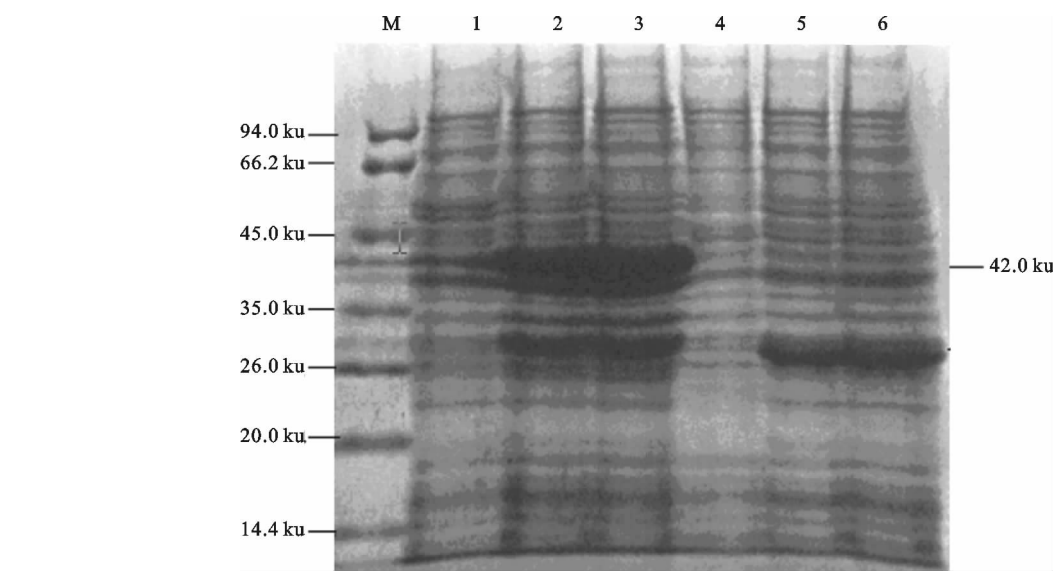


图 3 融合蛋白 GST-pIL2 的 SDS-PAGE 电泳结果
M. 低分子量蛋白 Marker;1. 重组质粒在 *E. coli* BL21(DE3) 中未诱导;2,3. 重组质粒在 *E. coli* BL21(DE3) 中诱导表达的产物;
4. 空载体在 *E. coli* BL21(DE3) 中未诱导产物;5,6. 空载体在 *E. coli* BL21(DE3) 中诱导表达的产物

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fusion protein GST-pIL2
M. Low MW standard protein Marker;1. Products of plasmid GEX-pIL2 expressing in *E. coli* BL21(DE3) before IPTG inducing;
2,3. Products of plasmid GEX-pIL2 expressing in *E. coli* BL21(DE3) after IPTG inducing;
4. Products of pGEX-6p-1 expressing in *E. coli* BL21(DE3) before IPTG inducing;
5,6. Products of pGEX-6p-1 expressing in *E. coli* BL21(DE3) after IPTG inducing

2.4 融合蛋白 GST-pIL2 的 Western-blot 分析

Western-blot 分析显示,融合蛋白 GST-pIL2 能与兔抗猪 IL-2 单克隆抗体发生反应,在约 42 ku 处出现特异性条带,而空白载体在同一处未出现任何蛋白条带(图 4),表明诱导表达的目的蛋白是重组猪 IL-2。

2.5 重组猪 IL-2 蛋白的质量浓度及纯度测定

表达蛋白经变性与复性后,用紫外分光光度计

测得其质量浓度为 0.47 mg/mL,纯度达到 95%(图 5)。

2.6 重组蛋白的生物学活性测定

测定结果显示,加有猪 IL-2 蛋白的试验组 A_{570} 平均值为 1.72 ± 0.072 ,对照组 A_{570} 平均值为 1.23 ± 0.069 ,可知试验组 A_{570} 值明显高于对照组,且差异极显著($P < 0.01$)。表明猪 IL-2 表达蛋白能极显著地提高猪淋巴细胞的转化率,具有生物学活性。

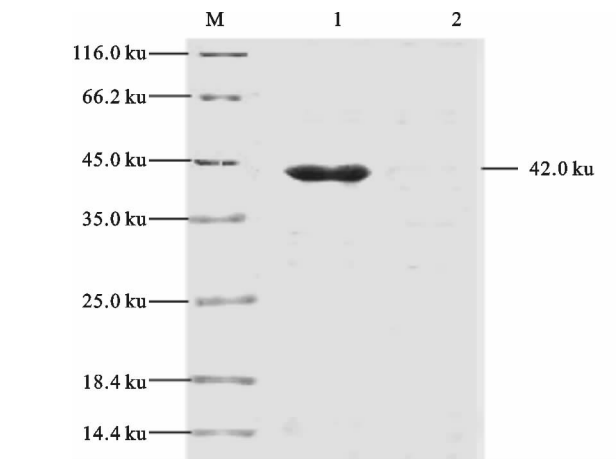


图 4 融合蛋白 GST-pIL2 的 Western-blot 分析
M. 低分子量蛋白 Marker;1. 在 *E. coli* BL21(DE3)中表达的重组猪 IL-2 蛋白;2. 阴性对照
Fig. 4 Western-blot analysis of fusion protein GST-pIL2
M. Low MW standard protein Marker;1. The recombinant porcine IL-2 protein expressed in *E. coli* BL21(DE3);
2. Negative control

3 讨 论

目前,随着分子免疫学的发展,对 IL-2 的免疫学应用研究逐步深入,发现 IL-2 不但可以作为免疫增强佐剂和治疗剂,而且在某些疾病的诊断中还有一定的指示作用^[12],因此获得 IL-2 蛋白,并对其生物学活性和功能进行研究就显得尤为重要。选择高效的表达系统是外源基因高效表达的重要前提^[13]。目前 *E. coli* 是最常用的原核表达系统工具。通常将重组质粒导入 *E. coli* 中,主要用于蛋白质的大量表达,在蛋白质的纯化、定位及功能分析方面也有一定价值^[14]。本试验所采用的表达载体为 pGEX-6p-1 原核表达载体,该载体是不含 *LacZ* 基因的 GST 融合表达载体,空载体表达的为 26 ku 的谷胱甘肽转移酶(GST)蛋白,具有诱导型启动子、氨苄抗性筛选标记和有效的转录终止子,表达产物以融合蛋白出现,这使得外源蛋白更稳定^[15]。本试验诱导的重组菌在 42 ku 处出现了 1 条很粗的条带,而诱导的空载体只在 26 ku 处出现了 1 条条带,与预期结果相符;表达蛋白经薄层层析扫描分析,表达量约占菌体总蛋白的 40%,说明重组猪 IL-2 在大肠杆菌中得到了很好表达。

影响原核表达量的因素有许多,其中 IPTG 浓度和诱导时间对表达量的影响最大^[16]。在研究过程中,本试验曾对 IPTG 诱导浓度、诱导时间进行试验,结果发现,IPTG 浓度为 0.2~1.0 mmol/L 时,

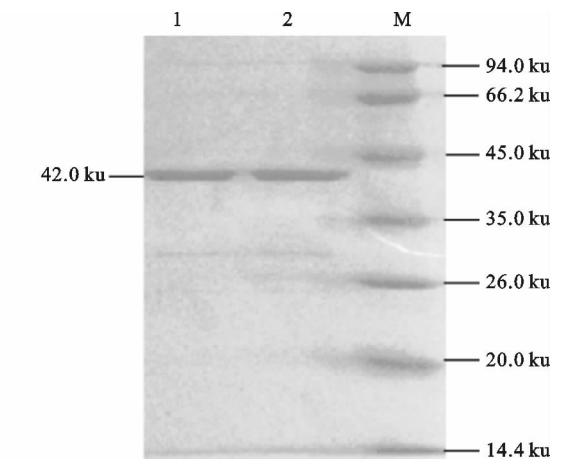


图 5 纯化重组猪 IL-2 蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果
1,2. 纯化的重组猪 IL-2 蛋白;M. 低分子量蛋白 Marker
Fig. 5 Analysis of purified recombinant porcine IL-2 protein by SDS-PAGE
1,2. Purified recombinant porcine IL-2 protein;
M. Low MW standard protein Marker

lac 操纵子得以完全启动,目的蛋白的表达量相似,但 IPTG 浓度高时对表达宿主菌具有一定的毒害作用,且 IPTG 价格昂贵。因此,确定 IPTG 的最低诱导有效浓度,一方面可降低对大肠杆菌代谢的负面影响,另一方面可降低试验成本。本试验通过对 1~10 h 不同诱导时间的菌液检测发现,重组菌在诱导 1 h 时就开始少量表达,3 h 时表达量明显增加,5 h 时达到高峰,然后表达量开始下降,诱导 6~10 h 时表达量只有菌体蛋白总量的 20%,且基本保持稳定。尽管采用的大肠杆菌 BL21(DE3)为蛋白酶缺陷菌株,但诱导时间过长,随着细菌代谢产物的增加,插入的外源蛋白仍不可避免地会被宿主所降解,从而不利于表达蛋白的收获及纯化。

本研究中,表达的蛋白经 Western-blot 分析,发现其能很好地被兔抗猪 IL-2 单克隆抗体所识别,说明重组蛋白具有良好的反应原性;表达蛋白经纯化、变性、复性后能明显促进猪脾淋巴细胞的增殖,具有较强的生物学活性。这为进一步研究猪 IL-2 功能性蛋白作为免疫佐剂在疫苗免疫中的促进作用,以及开发研制猪 IL-2 细胞因子 ELISA 试剂盒奠定了基础。

[参考文献]

[1] Allen E M, Weir J P, Martin S, et al. Role of coexpression of IL-2 and Herpes simplex virus proteins in recombinant vaccine virus vectors on levels of induced immunity [J]. Viral Immu-

- nol, 1990, 3(3): 207-215.
- [2] Flexner C, Hugin A, Moss B. Prevention of vaccine virus in immunodeficient mice by vector directed IL-2 expression [J]. Nature, 1987, 330(6145): 259-261.
- [3] Kogut M, Roothwell L, Kaiser P. Differential effects of age on chicken heterophil fictional activation by recombinant chicken interleukin-2 [J]. Dev Comp Immunol, 2002, 26(9): 817-830.
- [4] Morgan D A, Ruscetti F W, Gallo R. Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows [J]. Science, 1977, 193(4257): 1007-1008.
- [5] Cerretti D P, McKereghan K, Larsen A, et al. Cloning, sequence and expression of bovine interleukin-2 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(10): 3223-3227.
- [6] Cao M J, Wu G P, Guo C, et al. Expression of chicken interleukin-2 in insect cells [J]. Biochemistry (Mosc), 2005, 70(11): 1223-1226.
- [7] 许 健, 樊拥军, 李 龙, 等. 鸡白细胞介素-2 在毕赤酵母细胞中的表达 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2004, 4(8): 339-342.
- Xu J, Fan Y J, Li L, et al. The expression of chicken interleukin 2 in Pichia yeast [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University: Medical Sciences, 2004, 4(8): 339-342. (in Chinese)
- [8] Reeves R, Spies A G, Nissen M S, et al. Molecular cloning of a functional bovine interleukin 2 cDNA [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(10): 3228-3232.
- [9] Kumar S, Ahi Y S, Salunkhe S S, et al. Effective protection by high efficiency bicistronic DNA vaccine against infectious bursal disease virus expressing VP2 protein and chicken IL-2 [J]. Vaccine, 2009, 27(6): 864-869.
- [10] Park J H, Sung H W, Yoon B I, et al. Protection of chicken against very virulent IBDV provided by *in ovo* priming with DNA vaccine and boosting with killed vaccine and the adjuvant effects of plasmid-encoded chicken interleukin-2 and interferon-gamma [J]. J Vet Sci, 2009, 10(2): 131-139.
- [11] 王彦彬, 卢中华, 康相涛, 等. 固始鸡白细胞介素-2 的克隆、表达及其表达蛋白活性的检测 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(5): 66-71.
- Wang Y B, Lu Z H, Kang X T, et al. Cloning and expression of gushi-chicken interleukin-2 gene and detection of its biological activity [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2006, 34(5): 66-71. (in Chinese)
- [12] 张 芳, 郭万柱, 吴 华, 等. 荣昌猪白细胞介素-2 基因的原核表达 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(5): 354-358.
- Zhang F, Guo W Z, Wu H, et al. The prokaryotic expression of Rongchang porcine IL-2 [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29(5): 354-358. (in Chinese)
- [13] 田兆菊, 郑玉姝, 胡敬东, 等. 牛 IL-18 成熟蛋白基因在昆虫细胞中的表达及其活性 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(3): 277-279.
- Tian Z J, Zheng Y S, Hu J D, et al. Expression of bovine IL-18 mature protein in insect cells and activity [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2007, 23(3): 277-279. (in Chinese)
- [14] 刘文强, 赵宏坤. 山羊白细胞介素-18 成熟蛋白的表达 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(7): 1523-1527.
- Liu W Q, Zhao H K. Expression of goat IL-18 mature protein [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(7): 1523-1527. (in Chinese)
- [15] Harper S, Speicher D W. Expression and purification of GST fusion proteins [J]. Curr Protoc Protein Sci, 2001, 6: 195-199.
- [16] Schneider K, Puehler F, Baeuble D, et al. cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18 [J]. Journal of Interferon Cytokine Research, 2000, 20(10): 879-883.