

猪 IL-2 与 IL-6 的融合表达及其产物的促淋巴细胞增殖活性

甄洪花^{1,2}, 王金良¹, 单虎², 孙智远², 赵金花², 沈志强^{1,2*}

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 滨州 256600; 2. 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109)

摘要: 为了获得具有猪白细胞介素-2(pIL-2)和猪白细胞介素-6(pIL-6)双重活性的融合蛋白, 研究其作为高效免疫佐剂的可行性, 作者利用基因重组技术将克隆到的 pIL-2 和 pIL-6 基因的成熟肽片段利用一段柔性 Linker 序列串联, 然后插入到原核表达载体 pBV220 的适当位置, 获得重组质粒 pBVpIL-6-2, 转化 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 (DE3) 和 *E. coli* Rosetta(DE3) 后, 42 °C 诱导表达得到相对分子质量约为 36.7 ku 的重组蛋白 pIL-6-2, 对蛋白进行纯化、复性后用 MTT 法检测其对小鼠脾淋巴细胞的促增殖活性, 结果显示不同浓度的 pIL-6-2 蛋白对小鼠脾淋巴细胞的促增殖活性差异很大, 其中以 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的 pIL-6-2 活性最好。本研究为利用该蛋白作为高效免疫制剂的应用奠定了良好的基础。

关键词: 猪白细胞介素-2; 猪白细胞介素-6; 融合表达; 淋巴细胞增殖活性

中图分类号: S852.4; S859.79

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)06-0741-05

Expression and Authenticate of Lymphocyte Proliferation Activity of Porcine Interleukin-2/Porcine Interleukin-6 Fusion Protein

ZHEN Hong-hua^{1,2}, WANG Jin-liang¹, SHAN Hu², SUN Zhi-yuan²,
ZHAO Jin-hua², SHEN Zhi-qiang^{1,2*}

(1. Shandong Binzhou Animal Science and Veterinary Medicine Institute, Binzhou 256600, China;
2. College of Animal Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: In order to get the fusion protein which has the bioactivities of both porcine interleukin-2 (pIL-2) and porcine interleukin-6 (pIL-6) and explore the feasibility of the fusion protein as immunoadjuvant, the mature peptide genes of pIL-2 and pIL-6 were linked by a fragment which consisted of hydrophilic and low charge base pairs. Then they were subcloned to pBV220 for prokaryotic expression. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21 (DE3) and *E. coli* Rosetta(DE3) and then induced at 42 °C. SDS-PAGE analysis showed that the target protein pIL-6-2 was about 36.7 kDa in molecular weight which existed in inclusion bodies. The biological activity of the expressed protein was authenticated by MTT after being purified and refolded. The results showed that the effects of different concentrations of pIL-6-2 are significantly diverse in inducing the proliferation of lymphoblast cells from the spleen of mice. The concentration of 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pIL-6-2 exhibited the best effect. This study laid foundation for the application of this protein as a novel efficient immune reagent.

Key words: porcine interleukin-2; porcine interleukin-6; fusion expression; lymphocyte proliferation activity

细胞因子在调节动物机体免疫反应时具有多向性、网络性的特点,各种细胞因子之间具有相互协调和相互制约的作用,基于这些特点近年来很多研究者利用基因工程技术将功能类似或功能互补的细胞因子进行组合取得了很多的成果,获得了很多高效多功能的嵌合蛋白质^[1-4]。白细胞介素-2(IL-2)和白细胞介素-6(IL-6)是机体中2种重要的免疫调节因子,具有多种生物学活性^[5],IL-2属于Th1细胞因子,主要发挥细胞免疫功能,IL-6属于Th2细胞因子,主要发挥体液免疫功能,两者在免疫应答系统中相辅相成,在分别刺激细胞与体液免疫的同时也能相互诱导对方而开启另一支路^[6-8]。IL-2和IL-6的这些特点使得其在免疫佐剂的应用中具有很好的效果^[9-10],本研究将两者进行融合表达,意在获得一种具有双重活性,能够平衡Th1和Th2应答的新型、高效的免疫增强剂。研究中采用基因工程的方法将IL-2和IL-6的成熟肽基因串联后进行原核表达得到重组蛋白pIL-6-2,并对纯化、复性后的蛋白进行了促淋巴细胞增殖活性的测定,在表达策略及纯化方法上做了适当的改进,整个过程工序简单,成本低廉,活性较好,对产业化应用具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、菌株及质粒

各种限制酶及T4 DNA连接酶、PCR相关试剂、DNA Marker、UNIT-10柱式DNA胶回收试剂盒均为TakaRa产品;质粒提取试剂盒为上海生工产品;葡萄球菌A蛋白-HRP购自武汉博士德生物工程有限公司;DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥; *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* Rosetta(DE3)和质粒pBV220均为山东省滨州畜牧兽医研究院保存,重组质粒pETIL-2和pMDIL-6为作者构建保存。其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 引物设计与合成

根据已知的pETIL-2和pMDIL-6的基因序列,用Primer5.0软件设计了引物P₂1和P₂2,P₆1和P₆2,P₂1: 5'-GCCTCGAGGGTTCTGGCG-GTGCACCTACTTCAAGCT-3'(含XhoI酶切位点及部分Linker序列),P₂2: 5'-GCGGATCCCT-TAATTATCAAGTCAGT-3'(含BamHI酶切位点); P₆1: 5'-GCGAATTCATGTTCCCTAC-

CCCGGGACGCCTGGAAG-3'(含EcoRI酶切位点), P₆2: 5'-CGCTCGAGGGAACCTCCAC-CTCCATTATCCGAATGGCCCTCA-3'(含XhoI酶切位点及部分Linker序列)。

1.3 猪IL-2、IL-6基因的PCR扩增、克隆及序列测定

以含有IL-2和IL-6基因的质粒pETIL-2和pMDIL-6为模板进行PCR扩增,反应体系(50 μ L)如下:10 \times PCR buffer 5 μ L、引物(10 μ mol \cdot L⁻¹)各2 μ L,dNTPs(2.5 mmol \cdot L⁻¹)2 μ L,rTaq DNA聚合酶1 μ L。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C 40 s,60 $^{\circ}$ C 35 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,35个循环;然后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳分析。回收PCR产物与pMD18T载体进行连接,并用BamHI单酶切确定IL-2基因正向克隆到T载体中,将正确重组的质粒分别命名为pMDIL-2和pMDIL-6,送上海生工进行序列测定。

1.4 重组质粒pBVpIL-6-2的构建与鉴定

用EcoRI和XhoI对pMDIL-2和pMDIL-6进行酶切,回收IL-6的目的片段和含有IL-2的T载体片段,用T4连接酶连接,构建了重组质粒CLT-2-6,然后用EcoRI和BamHI双酶切CLT-2-6和pBV220,回收目的片段和pBV220载体片段,用T4连接酶连接,构建了重组质粒pBVpIL-6-2,并进行PCR和酶切鉴定。

1.5 重组质粒pBVpIL-6-2的诱导表达与鉴定

将鉴定正确的重组质粒pBVpIL-6-2分别转入*E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)和*E. coli* Rosetta(DE3)中,挑选单菌落接种于1 mL含氨苄青霉素(50 μ g \cdot mL⁻¹)的LB培养液,30 $^{\circ}$ C振荡培养过夜,取过夜培养物以1:50~1:100的比例接入新的含氨苄青霉素(50 μ g \cdot mL⁻¹)的LB培养液中,30 $^{\circ}$ C振荡培养至对数中期(OD₆₀₀=0.4~0.6),将温度迅速升至42 $^{\circ}$ C进行诱导表达,将表达产物进行SDS-PAGE初步鉴定,并以制备的兔抗猪IL-2多克隆抗体和兔抗猪IL-6多克隆抗体1:500稀释后分别作为一抗,HRP标记的葡萄球菌A蛋白作为二抗(1:2000倍稀释)进行Western-blot鉴定。

1.6 融合蛋白的纯化、复性与促淋巴细胞增殖活性鉴定

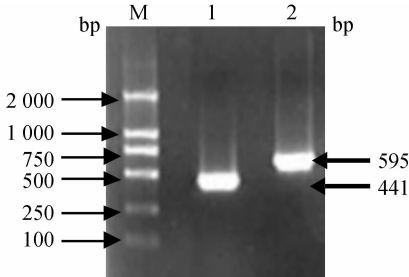
参考相关文献^[11]将诱导表达后的细菌离心收集菌体,采用溶菌酶溶解、超声波破碎、洗涤等方法得到高纯度的包涵体沉淀,用含0.6%SKL的生理

盐水溶解包涵体沉淀,多次反复透析后过滤除菌,用 MTT 法测融合蛋白对小鼠脾淋巴细胞的增殖活性^[12],96 孔板孔中加入 80 μL 小鼠脾淋巴细胞悬液(细胞浓度为 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$)和 80 μL 纯化、复性的融合蛋白(终浓度分别为 0.02、0.04、0.1、0.2、0.4、2、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),每个稀释度设 6 个重复孔,并以 ConA(终浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和生理盐水分别作为阳性和阴性对照组。置于 5% CO_2 培养箱中,37 $^\circ\text{C}$ 培养 44 h 后加入 MTT(5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)30 μL ,继续培养 4 h 后轻轻吸弃上清,每孔加入 DM-SO 100 μL 振荡混匀后用酶标仪读取 OD_{570} 值,测出各孔的 OD_{570} 值后,所有数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 软件进行单因素的方差分析。

2 结果

2.1 猪 IL-2、IL-6 基因的 PCR 扩增结果

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像系统下观察,可见 441、595 bp 左右大小的清晰条带,与预期的 DNA 片段大小相符(图 1),连接 T 载体后测序结果与原序列进行比对,结果一致,信号肽序列部分均已去除,起始密码子 ATG 和 Linker 序列添加成功,IL-2 基因也已正向克隆到 T 载体中。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. IL-2 的 PCR 产物; 2. IL-6 的 PCR 产物

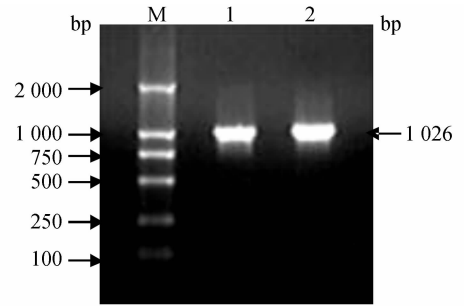
M. DL2000 DNA marker; 1. IL-2; 2. IL-6

图 1 IL-2 和 IL-6 基因的 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of IL-2 and IL-6

2.2 重组质粒 pBVpIL-6-2 的鉴定结果

重组质粒 CLT-2-6 经测序证明 IL-2 和 IL-6 基因已经按照预期目标嵌合在一起,以此为基础所构建的重组质粒 pBVpIL-6-2 用 P_6 1 和 P_2 2 引物进行 PCR 鉴定,扩增片段大小约 1 026 bp(图 2),用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切,可得到大小约 3 666 和 1 026 bp 的 2 个片段(图 3),结果与预期大小相符,表明重组质粒 pBVpIL-6-2 构建成功。

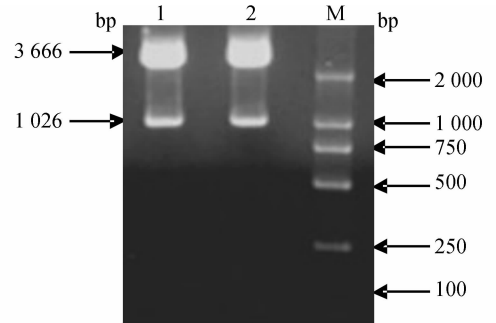


M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1, 2. pBVpIL-6-2 的 P_6 1/ P_2 2 PCR 鉴定

M. DL2000 DNA marker; 1, 2. pBVpIL-6-2(P_6 1/ P_2 2)

图 2 重组质粒 pBVpIL-6-2 的 PCR 鉴定结果

Fig. 2 PCR identification of pBVpIL-6-2



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1, 2. pBVpIL-6-2 的 *EcoR* I、*Bam*H I 酶切产物

M. DL2000 marker; 1, 2. pBVpIL-6-2 digested with *EcoR* I and *Bam*H I

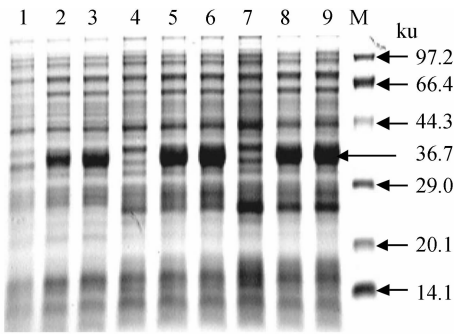
图 3 重组质粒 pBVpIL-6-2 的酶切鉴定

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid digested with restriction enzymes

2.3 重组质粒 pBVpIL-6-2 表达产物的 SDS-PAGE 鉴定与 Western-blot 鉴定结果

SDS-PAGE 结果显示重组质粒在 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)和 Rosetta(DE3)中均可获得大量表达,用 BandScan 软件分析表明,目的蛋白的表达量 2 h 即可达到 35%左右,最高可达 40%以上,在 3 个表达菌中的表达量差异不大,表达的融合蛋白 pIL6-IL2 相对分子质量约为 36.7 ku(图 4),与预期大小相符,而对照无此条带。

Western-blot 鉴定结果表明,所表达的融合蛋白 pIL6-IL2 与兔抗猪 IL-6 抗体和兔抗猪 IL-2 抗体均能发生反应(图 5),而诱导的空白载体则无此反应条带,进一步证实该表达产物为 IL-6 与 IL-2 的融合蛋白,且具有很好的反应原性。

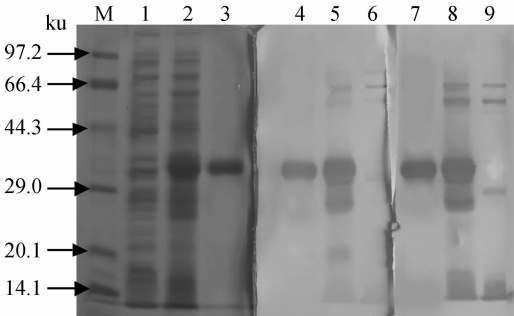


M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 诱导 3 h 的 DH5 α (pBV220); 2, 3. 分别诱导 2, 3 h 的 DH5 α (pBVpIL-6-2); 4. 诱导 3 h 的 Rosetta (pBV220); 5, 6. 分别诱导 2, 3 h 的 Rosetta (pBVpIL-6-2); 7. 诱导 3 h 的 BL21 (pBV220); 8, 9. 分别诱导 2, 3 h 的 BL21 (pBVpIL-6-2)

M. Protein marker; 1. DH5 α (pBV220); 2, 3. DH5 α (pBVpIL-6-2); 4. Rosetta (pBV220); 5, 6. Rosetta (pBVpIL-6-2); 7. BL21 (pBV220); 8, 9. BL21 (pBVpIL-6-2)

图 4 pBVpIL-6-2 表达产物的 SDS-PAGE 鉴定结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of fusion protein



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. Rosetta (pBV220); 2. Rosetta (pBVpIL-6-2); 3. 纯化后的 pIL6-IL2; 4. 纯化后的 pIL6-IL2 (兔抗 pIL-6 为一抗); 5. Rosetta (pBVpIL-6-2) (兔抗 pIL-6 为一抗); 6. Rosetta (pBV220) (兔抗 pIL-6 为一抗); 7. 纯化后的 pIL6-IL2 (兔抗 pIL-2 为一抗); 8. Rosetta (pBVpIL-6-2) (兔抗 pIL-2 为一抗); 9. Rosetta (pBV220) (兔抗 pIL-2 为一抗)

M. Protein marker; 1. Rosetta (pBV220); 2. Rosetta (pBVpIL-6-2); 3. Purified pIL6-IL2; 4. Purified pIL6-IL2 (IL-6 Ab as first antibody); 5. Rosetta (pBVpIL-6-2) (IL-6 Ab as first antibody); 6. Rosetta (pBV220) (IL-6 Ab as first antibody); 7. Purified pIL6-IL2 (IL-2 Ab as first antibody); 8. Rosetta (pBVpIL-6-2) (IL-2 Ab as first antibody); 9. Rosetta (pBV220) (IL-2 Ab as first antibody)

图 5 融合蛋白 pIL6-IL2 的 Western-blot 鉴定结果

Fig. 5 Western-bolt analysis of pIL6-IL2

2.4 融合蛋白的促淋巴细胞增殖活性鉴定结果

纯化后的 pIL6-IL2 蛋白纯度可达 90% 以上, 复性后进行促小鼠脾淋巴细胞增殖活性检测, 结果见表 1, 可以看出不同浓度的 pIL6-IL2 对小鼠脾淋

巴细胞的增殖活性差异很大, 其中以 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 pIL6-IL2 具有最高的促小鼠脾淋巴细胞的增殖活性, 与生理盐水对照组相比差异显著, 随着浓度的降低 (到 $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 活性略有下降, 而高浓度 (20 和 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 pIL6-IL2 对小鼠脾淋巴细胞无增殖活性, 甚至有抑制作用。

表 1 重组蛋白 pIL6-IL2 的促淋巴细胞增殖活性鉴定结果

Table 1 Lymphocyte proliferation activity of recombinant pIL6-IL2

组别 Group	$\bar{x} \pm s$ (OD ₅₇₀)
$0.02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pIL6-IL2	0.4018 ± 0.0340^b
$0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pIL6-IL2	0.4176 ± 0.0165^b
$0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pIL6-IL2	0.4458 ± 0.0673^b
$0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pIL6-IL2	0.4195 ± 0.0415^b
$0.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pIL6-IL2	0.3035 ± 0.0230^c
$2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pIL6-IL2	0.2400 ± 0.0162^{cd}
$20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pIL6-IL2	0.1790 ± 0.0165^d
生理盐水 Normal saline	0.2172 ± 0.0306^d
$5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ConA	0.5390 ± 0.1122^a

同列右上角标有不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$), 标有相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)

In the same column at the right-high corner, there are some different miniscules, which stand for conspicuous diversity ($P < 0.05$) and there are same miniscules which stand for inconspicuous diversity ($P > 0.05$)

3 讨论

本研究选用了原核表达载体 pBV220 进行表达, pBV220 使用了很强的 PRPL 双启动子, 是一种温控型的高效原核表达载体, 改变工程菌的培养温度即可控制目的基因的表达, 这一点比用诱导剂诱导表达的系统要节省操作步骤和成本。为了高效表达具有双重活性的 IL-2 和 IL-6 融合蛋白, 在构建表达载体的过程中考虑了以下因素: (1) 去除了 IL-2 和 IL-6 的信号肽序列 (分别是前 20 和前 25 个氨基酸), 信号肽序列一般含有很多疏水性的氨基酸, 降低目的蛋白的表达量, 将其去除对蛋白的功能并没有影响, 并且去除信号肽后的复性蛋白稳定性更好, 不易沉淀。(2) 将 IL-6 基因设计在 IL-2 基因的前面, 之前在 IL-2 和 IL-6 单独表达的过程中发现 IL-6 的表达量远远高于 IL-2 的表达量, 所以将 IL-6 基因设计在离启动子近的位置上。(3) pBV220 表达载体含人工合成的高效 SD 序列和适宜 SD 序列至起始密码子 ATG 间距离, 本研究将目的基因与 pBV220 载体上 EcoR I 位点相连, 以保持 SD 序列与启动子 ATG 距离最佳。(4) 为了使 IL-2 和 IL-6

两种分子在肽链的折叠过程中互不干扰而发挥预想的协同效应,本研究在参考相关文献^[13]的基础上稍作改进,选用了一段亲水性、低电荷效应的氨基酸 Linker 将 2 个分子进行连接。被用作 Linker 的氨基酸有 Gly、Ser、Pro、Ala、Thr 等,其中以 (Gly₄Ser)₃ 多肽应用最为广泛,本试验中作者在 IL-6 和 IL-2 之间加入了 1 段由 11 个氨基酸组成的柔性 Linker (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Leu-Glu-Gly-Ser-Gly-Gly),另外,IL-2 N 端前 7 个氨基酸为 Ala-Pro-Thr-Ser-Ser-Ser-Thr,本身可以作为 Linker 的有效成分,用 SOPMA 程序分析其串联序列的二级结构,可知两分子的折叠并未发生相互干扰现象,但是否能够得到真正具有两者双重活性的融合蛋白还需要进一步的研究。

本试验构建的重组质粒 pBVpIL-6-2 在 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3) 和 *E. coli* Rosetta(DE3) 中均可获得大量表达,表达量差异不大,最高表达量可达 40% 以上,目的蛋白的大量表达以致形成了不溶性的包涵体,虽然方便了提取纯化的步骤,给后续的复性也带来了一定的难题。本试验使用了尿素和人工合成的烷基阴离子去垢剂 SKL(十二烷基肌氨酸钠)2 种方法溶解包涵体,与尿素相比 SKL 的透析复性过程简单便利,不需要进行梯度透析,透析复性后的蛋白也具有很好的促淋巴细胞增殖活性。

试验中通过对 7 个不同浓度的 pIL6-IL2 进行促小鼠淋巴细胞增殖试验发现不同浓度的 pIL6-IL2 对小鼠脾淋巴细胞的促增殖活性差异很大,0.2、0.1、0.04、0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4 个低浓度蛋白的促增殖活性较好,过高浓度(20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 pIL6-IL2 不仅没有促增殖作用,反而会抑制其增殖,其 OD 值略低于生理盐水对照组,表明 pIL6-IL2 的生物学活性存在一个剂量相关性,在临床应用中要注意选择合适的剂量。

4 结 论

本试验成功构建了重组表达质粒 pBVpIL-6-2,并在大肠杆菌中成功表达了猪 IL-2 和 IL-6 的融合蛋白 pIL6-IL2,纯化、复性后在适当浓度时具有明显的促小鼠淋巴细胞增殖活性,此研究结果为利用该蛋白作为高效免疫增强剂的开发及产业化应用奠定了良好的基础。

参考文献:

[1] 闫若潜,吴志明,张志凌,等.猪 α 干扰素/白细胞介素

2 基因的融合表达及活性研究[J].畜牧兽医学报,2009,40(2):248-255.

- [2] 苏丹,李栋,程驰,等.改组猪 IL-2 基因与 CpG 序列对猪伪狂犬病灭活疫苗免疫应答的影响[J].中国兽医学,2008,38(9):767-771.
- [3] ZHANG L H, TIAN X S, GUO Y, et al. Effect of transgenic expression of porcine interleukin-6 gene and CpG sequences on immune responses of newborn piglets inoculated with Pseudorabies attenuated vaccine[J]. *Res Vet Sci*, 2006, 80(3): 281-286.
- [4] ZHANG H, CHENG C H, ZHENG M, et al. Enhancement of immunity to an Escherichia coli vaccine in mice orally inoculated with a fusion gene encoding porcine interleukin 4 and 6 [J]. *Vaccine*, 2007, 25(41): 7094-7101.
- [5] 沈志强,汪明,赵德明,等.杂交猪 IL-2 和 IL-6 全基因克隆及序列分析[J].黑龙江畜牧兽医,2009,(10):23-25.
- [6] CAMILLE A, FLAMME L, PEARCE E J. The absence of IL-6 does not affect Th2 cell development *in vivo*, but does lead to impaired proliferation, IL-2 receptor expression, and B cell responses[J]. *J Immunol*, 1999, 162: 5829-5837.
- [7] UYTENHOVE C, COULIE P G, SNICK J V. T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6, the murine hybridoma/plastocytoma growth factor[J]. *J Exp Med*, 1988, 167: 1417-1427.
- [8] JOSEPH S B, MINER K T, CROFT M. Augmentation of naive, Th1 and Th2 effector CD4 responses by IL-6, IL-1, and TNF[J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(1): 277-289.
- [9] 张怀,高春生,蒋媛媛,等.重组白细胞介素-2 对固始鸡免疫机能的影响[J].中国畜牧兽医,2009,36(7):48-50.
- [10] 谢彩华,闫若潜,崔保安,等.鸡白细胞介素-6 的原核表达及其对疫苗免疫增强效果的研究[J].中国预防兽医学报,2008,30(7):557-561.
- [11] 严琳,何启盖,陈焕春,等.猪 IL-2 与 IL-6 的原核表达及其对伪狂犬病基因缺失疫苗的佐剂效应研究[J].中国农业科学,2003,36(10):1213-1218.
- [12] 张芳,郭华柱,吴华.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):355-358.
- [13] YAN L, QIN Y L, BEI W C, et al. Expression of an interleukin-6-interleukin-2 fusion protein (pIL-6-IL-2) in *P. pastoris* [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2004, 15(3): 240-246.