

鸡 *IL-2* 基因的克隆、序列分析及蛋白结构预测

谢昆¹, 蒋成砚¹, 胡俊杰^{1,2}, 全舒舟¹, 宋银银¹

¹红河学院生命科学与技术学院, 云南蒙自 661100;

²云南大学生命科学学院, 昆明 650091)

摘要:根据 GenBank 中已发表的鸡白细胞介素 2 (IL-2)mRNA 基因序列, 利用 Premier 5.0 软件设计一对特异性引物, 采用 RT-PCR 技术, 以 ConA 刺激的鸡外周血淋巴细胞为材料, 从总 RNA 中扩增出鸡 *IL-2* 基因。经琼脂糖凝胶电泳显示扩增片段约为 432 bp, 分离纯化片段, 克隆入 pMD-18T 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 获得阳性重组质粒, 经酶切鉴定, 测序结果显示, 该基因全长 432 bp, 含有一个 432bp 的开放阅读框, 编码 143 个氨基酸。生物软件分析结果表明该序列与 GenBank 中发表的鸡的 *IL-2* 的核苷酸序列同源性为 98.8%, 与黄牛、马、鸡、绵羊、牛、犬、人、山羊、鼠、水牛的核苷酸同源性分别为 31.2%、28.2%、27.3%、30.6%、26.2%、31.7%、30.1%、30.8%、26.6%、30.6%。与 GenBank 中发表的鸡 *IL-2* 编码的氨基酸序列同源性为 95.8%, 与上述动物的氨基酸序列同源性分别为 7.6%、7.6%、9.7%、7.6%、6.9%、10.4%、11.8%、7.6%、9.0%、7.6%、10.4%。这表明鸡的 *IL-2* 基因被成功克隆, 它存在着种属特异性。这为进一步研究该基因的生物学作用特别是利用 *IL-2* 增强 DNA 疫苗的免疫效果奠定了基础。

关键词:鸡白细胞介素-2; 克隆; 序列分析; 蛋白结构预测

中图分类号: S831, Q78

文献标志码: A

论文编号: 2010-1982

Cloning and Sequence Analysis of Gallus *IL-2* Gene and Prediction of Protein Structure

Xie Kun¹, Jiang Chengyan¹, Hu Junjie^{1,2}, Quan Shuzhou¹, Song Yinyin¹

¹College of Life Science and Technology, Hong He University, Mengzi Yunnan 66110;

²Faculty of Biology, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract: According to GenBank in the *IL-2* cDNA sequences, using Premier 5.0 software design a pairs of specific primer, the local Dorking inject 100 μ g/ml Con A, total RNA was extracted from feeding 24 hours lymphocyte from spleen, by RT-PCR cloning colony *IL-2* cDNA fragment. The DNA fragments were analyzed use DNASTar software between different species identity for comparison. Sequence analysis showed that *IL-2* gene has an open reading frames for 432 nucleotide acids, encoding 143 amino acids and most of signal peptide, compared with published on Genbank, the nucleotide identity was 98.8%、31.2%、28.2%、27.3%、30.6%、26.2%、31.7%、30.1%、30.8%、26.6%、30.6%. compared with published on Genbank, the Amino acids was 95.8%、7.6%、7.6%、9.7%、7.6%、6.9%、10.4% 11.8%、7.6%、9.0%、7.6%、10.4% with cattle, horse, cat, sheep, bovine, canis, people, capra, mice, cow of *IL-2* sequence comparison The gallus *IL-2* gene was successfully cloned, there is a species-specific. And construct a based on further study the biological effects of *IL-2* gene in particular the use of *IL-2* enhance the immune effect of DNA vaccine.

Key words: chicken interleukin-2; cloning; sequence analysis; prediction of protein structure

0 引言

白细胞介素 2 (Interleukin-2, IL-2) 主要是由活化的

T 淋巴细胞产生的一类重要的淋巴因子, 具有广泛的生物学特性。可以促进 T、B 淋巴细胞的增殖和分化,

基金项目:红河学院重点学科建设项目“生物化学与分子生物学”(071010); 红河学院博硕科研启动项目“鸡 *IL-2* 基因的克隆和表达”(XS205026)。

第一作者简介:谢昆, 男, 1975 年出生, 讲师, 云南昆明人, 硕士, 主要从事动物细胞因子克隆方面的研究。通讯地址: 661100 云南蒙自红河学院生命科学与技术学院。Tel: 0873-3699787, E-mail: xk_biology2@126.com。

收稿日期:2010-07-01, **修回日期:**2010-09-15。

并可增强NK细胞、单核细胞等的杀伤活性,在抗肿瘤、抗病毒、免疫调节及感染性疾病的治疗中具有重要作用^[1]。1982年Schauenstem等^[2]首先发现了鸡脾淋巴细胞分泌一种类似哺乳动物白细胞介素2一样活性的细胞因子。1983年Taniguchi等^[3]人首先成功克隆人的 $IL-2$ 基因以来,随着分子生物学的发展和基因工程技术的革新,PCR技术被应用到细胞因子的克隆中来,并大大缩短了基因克隆的时间,近年来人们对 $IL-2$ 进行了大量的研究,许多动物如牛^[4]、绵羊^[5]、山羊^[6]、鸡^[7]、狗^[8]、马^[9]、猪^[10]、人^[11]、鼠^[12]的 $IL-2$ 基因已被成功克隆。直到1997年,Sundick等^[13]用激活的鸡脾淋巴细胞构建了一个cDNA文库,才获得了鸡 $IL-2$ 基因克隆,使 $IL-2$ 的研究步入分子平。根据GenBank上发表的鸡 $IL-2$ 的mRNA序列(NM_204153),采用RT-PCR技术扩增出鸡的 $IL-2$ 基因,并将其与GenBank其他物种如马,狗,人序列同源性进行了比对,对其氨基酸序列进行了预测,为 $IL-2$ 的研究做进一步的探索,为 $IL-2$ 蛋白的表达和生物学活性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鸡血采自蒙自农贸市场,取50 mL左右血液于预先加入1 mL的肝素钠溶液(10 mg/mL)的无菌离心管中,摇匀备用。

1.2 菌株与质粒

大肠杆菌E.coli DH5 α 细胞为红河学院分子生物学实验室保存,pMD18-T Vector购自大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司

1.3 鸡外周血淋巴细胞的分离与培养

采用密度为1.080的淋巴细胞分离液分离鸡外周血淋巴细胞,将分离的淋巴细胞密度调至 5×10^6 个/mL,假如终浓度为50 μ g/mL的ConA,0.5%CO₂,40℃的二氧化碳培养箱中培养18 h。

1.4 鸡淋巴细胞总RNA的提取

将培养18 h后的淋巴细胞,4℃ 2000 r/min离心3 min。弃上清,加1 mL Trizol试剂,一步法提取总RNA,具体方法参照《分子克隆实验指南》^[14]。

1.5 鸡 $IL-2$ 基因的RT-PCR扩增

根据GenBank中已报道的鸡的 $IL-2$ 基因cDNA序列(NM_204153)的高度保守区,利用引物设计软件Primer 5.0设计如下一对引物:

P1: 5'-GGGACACTGCCATGATGTGCA-3'

P2: 5'-GCTTATTTTTGCAGATATCT-3'。

使用RT试剂盒反转录合成cDNA,然后进行PCR的扩增,PCR反应程序为:94℃预变性5 min;94℃变性

30 s;53℃退火30 s;72℃延伸30 s,循环扩增30次;最后72℃延伸10 min,扩增结束后取10 μ L产物进行电泳检测。

1.6 基因的亚克隆

将回收后的PCR产物4.5 μ L与载体PDM18-T Vector 0.5 μ L相连接,并加入Ligation Solution1 5.0 μ L。转化JM109感受态细菌,经含有氨苄青霉素的平板筛选培养,挑取菌落,提取重组质粒。

1.7 重组质粒的鉴定

将提取的重组质粒进行EcoRI和BamHI双酶切鉴定和PCR鉴定。

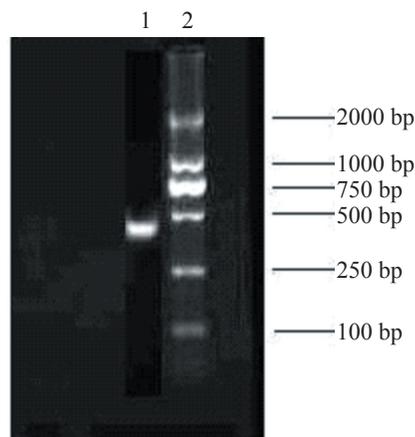
1.8 鸡 $IL-2$ 基因的序列测定和分析

琼脂糖凝胶电泳鉴定为阳性的PCR产物送交上海生工测序,应用DNAstar软件对测定的黄牛 $IL-2$ 基因进行序列分析、同源性比较和进化树分析。

2 结果

2.1 鸡 $IL-2$ 基因的RT-PCR扩增

取PCR产物5 μ L经1.5%琼脂糖凝胶电泳后,显示有一500 bp左右的条带,与预计的片段大小一致(图1)。



1: 鸡 $IL-2$ 基因的RT-PCR扩增产物; 2: DL2000 Marker

图1 鸡 $IL-2$ 基因的RT-PCR扩增

2.2 鸡 $IL-2$ 基因的克隆及酶切分析

重组质粒经PCR鉴定和EcoRI、BamHI双酶切鉴定,PCR鉴定结果显示在432 bp处有特异性条带,而双酶切出现一条约2500 bp的载体大片段和一条约432 bp的目的片段,大小均与预计相符。说明鸡 $IL-2$ 基因已重组到载体中(图2,图3)。

2.3 鸡 $IL-2$ 基因序列测定及分析

对酶切和PCR鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定,经大连宝生物公司测序后,得到了鸡 $IL-2$ 基因的全序列。该基因全长432 bp,编143个氨基酸。利



1: DNA Marker 2000
2: pMD18-T-IL-2 重组质粒的 PCR 结果

图2 重组质粒的 PCR 鉴定



1: DNA Marker 2000
2: pMD18-T-IL-2 重组质粒的双酶切结果

图3 pMD18-T-IL-2 重组质粒的双酶切结果

用 DNAMAN 软件将所克隆得到的鸡 *IL-2* 因子基因序列与 GenBank 中已发表的鸡 *IL-2* 因子基因序列比较, 发现在第共有 5 个基因位点突变, 从第一位起始密码

子开始分别为第 10、146、275、322、420 位(图 4)。

2.4 鸡 *IL-2* 基因编码的氨基酸序列分析

利用 DNAMAN 软件将所克隆得到的鸡 *IL-2* 基因

1	ATGATGTGCTAAGTACTGATCTTTGGCTGTATTTTCGGTAG	40
2	-----A-----	40
1	CAATGCTAATGACTACAGCTTATGGAGCATCTCTATCATC	80
2	-----	80
1	AGAAAAATGGAAAACTCTTCAAACATTAATAAAGGATTTA	120
2	-----	120
1	GAAATATTGGAAAAATATCAAGAATAACATTCATCTCGAGC	160
2	-----G-----	160
1	TCTACACACCAACTGAGACCCAGGAGTGCACCCAGCAAAC	200
2	-----	200
1	TCTGCAGTGTTACCTGGGAGAAGTGGTTACTCTGAAGAAA	240
2	-----	240
1	GAAACTGAAGATGACACTGAAATTAAGAAGAATATGTAA	280
2	-----T-----	280
1	CTGCTATTCAAAATATCGAAAAGAACCTCAAGAGTCTTAC	320
2	-----	320
1	GGTTCTAAATCACACCGGAAGTGAATGCAAGATCTGTGAA	360
2	--G-----	360
1	GCTAACAAACAAGAAAAAATATCCTGATTTTCTCCATGAAC	400
2	-----T-----	400
1	TGACCAACTTTGTGAGATATCTGCAAAAAATAA	432
2	-----	432

1: 克隆的到得鸡 *IL-2* 基因序列; 2: GenBank 发表的鸡 *IL-2* 基因序列

图4 克隆的到得鸡 *IL-2* 基因序列与 GenBank 发表的 *IL-2* 序列对比

```

1  ATGATGTGCTAAGTACTGATCTTTGGCTGTATTTGGTAGCAATGCTAATGACTACAGCT
1  M M C * V L I F G C I S V A M L M T T A

61  TATGGAGCATCTCTATCATCAGAAAAATGGAAAACCTTCAAACATTAATAAAGGATTTA
21  Y G A S L S S E K W K T L Q T L I K D L

121  GAAATATTGGAAAATATCAAGAATAACATTCATCTCGAGCTCTACACACCAACTGAGACC
41  E I L E N I K N N I H L E L Y T P T E T

181  CAGGAGTGCACCCAGCAAACCTCTGCAGTGTACCTGGGAGAAGTGGTACTCTGAAGAAA
61  Q E C T Q Q T L Q C Y L G E V V T L K K

241  GAACTGAAGATGACACTGAAATTAAGAAGAATATGTAAGTCTATTCAAAATATCGAA
81  E T E D D T E I K E E Y V T A I Q N I E

301  AAGAACCTCAAGAGTCTTACGGTTCTAAATCACACCGGAAGTGAATGCAAGATCTGTGAA
101  K N L K S L T V L N H T G S E C K I C E

361  GCTAACACAAGAAAAAATATCCTGATTTTCTCCATGAACTGACCAACTTTGTGAGATAT
121  A N N K K K Y P D F L H E L T N F V R Y

421  CTGCAAAAATAA
141  L Q K *
    
```

图5 鸡*IL-2*因子基因编码的氨基酸序列

进行序列预测后结果如下(图5),用DNASar 进行分析确定*IL-2* cDNA 全长432 bp,编码143个氨基酸。预测蛋白质分子量为16359.92 D,等电点为5.224。

2.5 鸡*IL-2*基因同源性比较和进化树分析

利用DNASar 软件将克隆得到的鸡的*IL-2*基因与其他几种脊椎动物的*IL-2*基因进行同源性比较和进化树分析后发现,鸡*IL-2*与GenBank上发表的鸡的*IL-2*基因的同源性比较高,达到98.8%。而与牛和鼠

的*IL-2*基因同源性比较低,分别为26.2%和26.6%。(图6,图7)

2.6 鸡*IL-2*基因与其他动物*IL-2*基因编码的氨基酸同源性比较及进化树分析

利用DNASar 对克隆所得的鸡*IL-2*基因序列进行氨基酸序列推导后与以上各基因所推导的氨基酸序列进行同源性比较与进化树分析后发现,氨基酸的同源性基因的同源性差异比较大(图8),进化关系差

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	■	98.8	31.2	28.2	27.3	30.6	26.2	31.7	30.1	30.8	26.6	30.6	1	鸡IL-2
2	1.2	■	31.0	28.2	27.8	30.3	26.4	31.7	30.3	30.6	27.1	30.3	2	GenBank鸡IL-2
3	207.5	215.7	■	51.5	50.3	97.0	31.2	63.5	48.3	95.9	35.3	98.9	3	黄牛
4	350.0	350.0	76.8	■	62.0	51.5	31.8	36.5	65.5	50.3	34.7	51.7	4	马
5	350.0	350.0	76.5	50.8	■	49.9	31.6	35.1	68.6	48.8	37.8	50.3	5	猫
6	229.0	247.5	3.3	76.8	77.8	■	31.0	64.1	48.9	98.9	34.2	98.1	6	绵羊
7	350.0	350.0	178.2	176.6	183.9	180.0	■	30.3	29.0	30.8	28.3	31.2	7	牛
8	181.0	181.3	55.4	140.2	145.2	53.9	183.7	■	34.2	63.2	35.0	63.9	8	犬
9	350.0	350.0	81.0	43.7	37.1	79.0	216.8	151.7	■	48.3	36.1	48.5	9	人
10	203.8	209.5	4.5	80.0	81.1	1.2	182.0	55.8	81.0	■	33.5	97.0	10	山羊
11	310.9	293.2	145.2	157.2	132.4	153.6	236.5	143.2	134.4	159.2	■	34.6	11	鼠
12	220.0	231.3	1.2	76.1	76.5	2.1	176.8	54.4	80.3	3.3	150.0	■	12	水牛
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

图6 鸡*IL-2*基因与同其他各种脊椎动物*IL-2*基因的源性比较

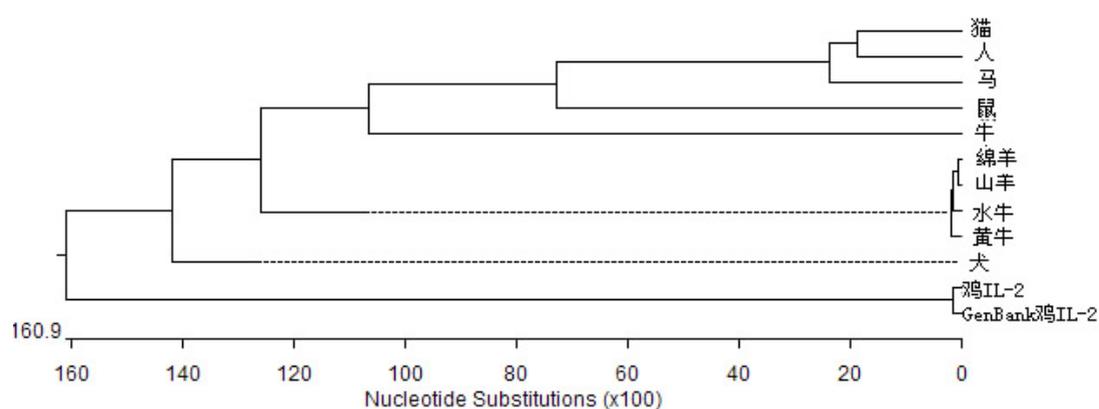


图7 鸡 *IL-2* 基因与其他各种脊椎动物 *IL-2* 基因进化树比较

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
1	█	95.8	7.6	7.6	9.7	7.6	6.9	10.4	11.8	7.6	9.0	7.6	10.4	1	鸡 <i>IL-2</i>
2	2.9	█	8.3	6.9	9.0	8.3	6.9	10.4	10.4	8.3	9.0	8.3	11.1	2	GenBank鸡 <i>IL-2</i>
3	754.0	661.0	█	31.5	34.2	94.2	11.5	48.1	33.1	91.7	16.7	97.4	34.8	3	黄牛
4	754.0	1000.0	144.5	█	45.6	31.5	11.4	22.1	46.3	29.5	16.8	32.2	41.6	4	马
5	524.0	586.0	124.4	87.6	█	33.5	7.1	20.6	54.5	31.0	17.4	34.2	74.2	5	猫
6	754.0	661.0	5.8	144.5	127.5	█	11.5	48.7	33.8	96.8	16.0	96.2	35.5	6	绵羊
7	945.0	1000.0	422.0	422.0	775.0	422.0	█	13.5	7.1	10.9	13.2	11.5	7.7	7	牛
8	482.0	487.0	91.7	213.0	220.0	89.6	357.0	█	22.7	46.8	18.6	48.7	18.7	8	犬
9	418.0	487.0	133.9	85.6	61.5	130.7	775.0	207.0	█	31.8	17.5	33.1	49.4	9	人
10	754.0	661.0	8.9	156.5	140.9	2.8	451.0	96.0	140.9	█	14.7	93.6	32.9	10	山羊
11	577.0	586.0	273.0	296.0	273.0	284.0	357.0	244.0	262.0	309.0	█	16.0	14.8	11	鼠
12	754.0	661.0	2.1	140.9	124.4	3.6	422.0	89.6	133.9	6.5	284.0	█	34.8	12	水牛
13	482.0	451.0	121.4	100.6	32.5	118.6	661.0	244.0	74.5	130.7	323.0	121.4	█	13	猪
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		

图8 鸡 *IL-2* 基因编码的氨基酸与其他动物 *IL-2* 基因编码氨基酸同源性分析

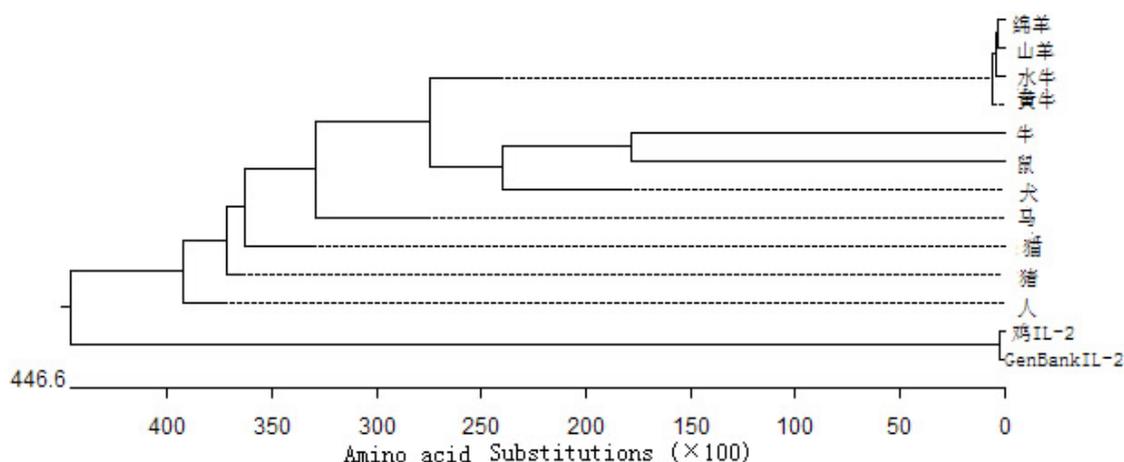


图9 鸡 *IL-2* 基因编码氨基酸与其他动物 *IL-2* 基因编码氨基酸序列进化树分析

异也比较明显(图9)

2.7 鸡 *IL-2* 蛋白二级结构预测

利用 DNASTar 对克隆所得鸡的 *IL-2* 基因序列的推导氨基酸序列进行蛋白质二级结构预测与抗原性分

析后发现,鸡的 *IL-2* 的推导蛋白的空间结构具有 7 个 α 螺旋, 6 个 β 折叠, 8 个转角和 3 处无规则卷曲, 对其进行疏水性分析后发现鸡 *IL-2* 基因序列的推导蛋白质具有较强的亲水性, 只有一个强疏水位点, 在第 10, 11

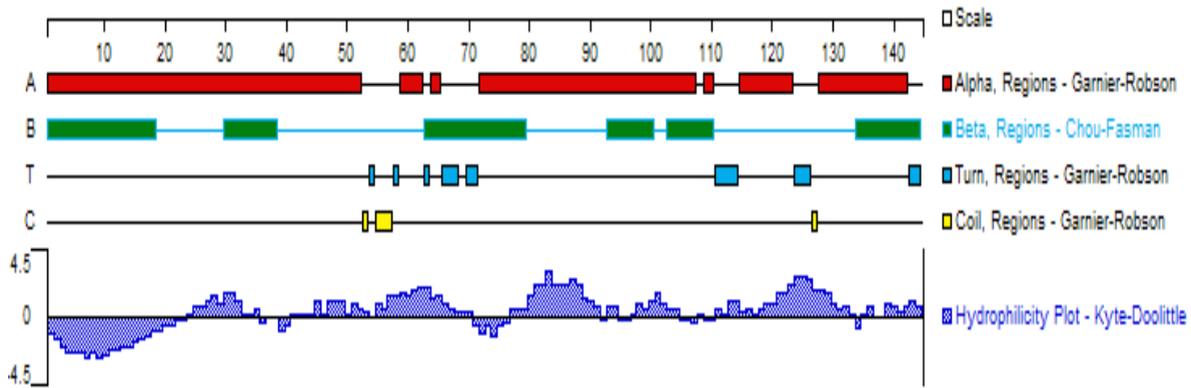


图10 鸡 IL-2 蛋白二级结构预测与分析

位氨基酸处。(图10)

3 讨论

白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 主要是由活化的 T 淋巴细胞产生的一类重要的淋巴因子, 具有广泛的生物学特性。可以促进 T、B 淋巴细胞的增殖和分化, 并可增强 NK 细胞、单核细胞等的杀伤活性^[5], 在抗肿瘤、抗病毒、免疫调节及感染性疾病的治疗中具有重要作用。根据 GenBank 中报道的鸡 IL-2 基因的高度保守区序列, 利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物, 克隆得到 IL-2 基因的开放阅读框由 432 个核苷酸组成, 编码 143 个氨基酸。经测序与序列分析证明得到了鸡的 IL-2 基因。该基因的成功克隆将为进一步研究它的生物学活性以及作为肿瘤疫苗和 DNA 疫苗的免疫佐剂奠定了物质基础。与 GenBank 上登录的参考序列相比较, 其中有 5 个碱基发生变异, 这 5 个碱基的变异导致蛋白水平上 5 个氨基酸残基的变异。

细胞因子基因通常处于沉默状态, 其表达具有时空性^[6], 只有当受到刺激原致敏后才进行转录和表达, IL-2 基因也不例外, 所以利用有丝分裂原如刀豆蛋白 A (ConA) 液刺激诱导鸡脾脏后再提取细胞总 RNA, 利用 RT-PCR 技术成功克隆了鸡 IL-2 基因。

通过对鸡的 IL-2 与其他几种脊椎动物的 IL-2 的核苷酸序列以及各自所推导的氨基酸序列进行同源性比较与进化树分析后发现, 测出的鸡的 IL-2 与 GenBank 上发表的鸡的 IL-2 的同源性最高, 分别为 98.8% 和 95.8%, 从进化关系上看, 二者的在进化树上的距离最为接近, 可能可以说明他们在系统进化过程中一直处在相同的分支上, 即表明侧出的鸡和 GenBank 上发表的鸡在进化关系上可能具有密切的亲缘关系。与牛的 IL-2 的同源性最低, 只有 26.2% 和 6.9%, 若以这个基因为依据应可以表明鸡类与牛类的

亲缘关系比较远。

应用生物信息学技术和分子生物学软件, 对鸡白细胞介素 (IL-2) 蛋白二级结构进行了预测和分析。对于鸡 IL-2 编码的氨基酸序列的二级结构预测结果显示, 鸡白细胞介素的空间结构比较复杂, 有 7 个 α 螺旋, 6 个 β 折叠, 8 个转角和 3 处无规则卷曲。对其进行疏水性分析后发现鸡 IL-2 基因序列的推导蛋白质具有较强的亲水性, 只有一个强疏水位点, 在第 10, 11 位氨基酸处。它的蛋白质相对分子大小 16359.92 D, 等电点为 5.224。这将为利用生物技术为鸡增强抗病能力提供依据。

参考文献

- [1] Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin 2 [J]. Nature, 1983, 5906(302): 305-310.
- [2] Zelus D, Robinson Rechav M, Delacore M, et al. Fast evolution of interleukin 2 in mammals and positive selection in remnants [J]. J Mol Evol, 2000, 51(3): 234-244.
- [3] Sundick R S, Gil Dixon. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL2 and IL5C [J]. The Journal of Immunology, 1997, 159: 720-725.
- [4] Reeves R, Spies A G, Nissen M S, et al. Molecular cloning of a functional bovine interleukin 2 cDNA [J]. Proc Natl Acad Sci, 1986, 83(10): 3228-3232.
- [5] Reeves R, Elton T S, Nissen M S, et al. Posttranscriptional gene regulation and specific binding of the nonhistone protein HMG-I by the 3' untranslated region of bovine interleukin 2 cDNA [J]. Proc Natl Acad Sci, 1987, 84(18): 6531-6535.
- [6] Seow H F, Rothel J S, Radford, et al. The molecular cloning of ovine interleukin 2 gene by the polymerase chain reaction [J]. JOURNAL Nucleic Acids Res, 1990, 18(23): 717
- [7] Beyer J C, Cheevers W P. Direct Submission [M]. Joseph C. Beyer, Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State

- University, Bustad Hall, Pullman, WA, 1995.
- [8] Kaiser P, Mariani P. Promoter sequence exon Intron structure and synteny of genetic location show that a chicken with T cell proliferative activity is IL 15. *Immunogenetics*[J]. 1999, 49: 26-35.
- [9] Lawson S, Rothwell L, Kaiser P. Turkey and chicken interleukin 2 Cross reaction in vitro proliferation assays despite limited amino acid sequence identity [J]. *Interferon Cytokine Res*, 2000, 20(2): 161-170.
- [10] Vandergriff E V, Horohov D W. Molecular cloning and expression of equine interleukin2[J]. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 1993, 39(4), 395-406.
- [11] Lefevre F. Direct Submission[M] Submitted (15-MAR-1991) F. Lefevre, Lab de Virologie et d'Immunologie Moleculaires, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherche de Jouy-en-Josas, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, FRANCE.
- [12] Lobashevsky A L, Manwaring J E, Travis M M, et al. Effect of desensitization in solid organ transplant recipients depends on some cytokines genes polymorphism[J]. *Transpl Immunol*, 2009, 21(3): 169-178.
- [13] Molloy M J, Zhang W, Usherwood E J. Cutting edge: IL-2 immune complexes as a therapy for persistent[J]. *Immunol*, 2009, 182(8), 4512-4515.
- [14] J 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著, 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002: 132-138.
- [15] 鞠佃文, 曹雪涛, 王宝梅, 等. CD 自体基因联合 IL 基因治疗的抗肿瘤作用及免疫机理[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19(2): 148-151.
- [16] 李宏梅. 重组的鸡 IL-2 作为免疫增强剂的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2000.