

新西兰白兔 γ -干扰素在昆虫细胞中的表达及其活性测定

王芳¹ 胡波¹ 任雪枫² 范志宇¹ 张则斌¹ 徐为中¹ 何孔旺¹

(1. 江苏省农业科学院 兽医研究所 农业部动物疫病免疫与诊断重点开放实验室 国家兽用生物制品工程技术研究中心 江苏 南京 210014; 2. 江苏省动物疫病预防控制中心 江苏 南京 210036)

摘要: 用 RT-PCR 方法对 ConA 刺激后的新西兰白兔外周血淋巴细胞(PBMC)扩增家兔 γ -干扰素(IFN- γ)基因并进行测序,测序结果显示,与 GenBank 公布的序列核苷酸同源性达到 99.4%~99.6%,氨基酸同源性为 98.8%~99.4%;然后通过克隆、转化将家兔 γ -干扰素基因转入转移载体 pFastBacTM1,得到重组转移载体 pFastBacTM1-IFN- γ ,用 pFastBacTM1-IFN- γ 转化含有穿梭载体 Bacmid 的大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞,经筛选得到重组穿梭载体 Bacmid-IFN- γ ,用此质粒转染 Sf9 昆虫细胞,得到重组病毒 rAcV-Bac-IFN- γ ,经 RT-PCR 鉴定,结果显示重组 IFN- γ 在 Sf9 昆虫细胞中得到表达。用兔 IFN- γ ELISA 试剂盒测得重组兔 IFN- γ 的浓度为 1 950 pg/mL。细胞病变抑制法结果显示,重组兔 IFN- γ 在 MDCK 上显示了较高的抗病毒活性,并测得重组兔 IFN- γ 的活性约为 5.12×10^5 U/mg。

关键词: 家兔; γ -干扰素; 克隆; 重组杆状病毒

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)03-0009-05

Expression of IFN- γ of New Zealand Rabbit in Insect Cells and Its Antiviral Activity

WANG Fang¹ HU Bo¹ REN Xue-feng² FAN Zhi-yu¹,
ZHANG Ze-bin¹ XU Wei-zhong¹ HE Kong-wang¹

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Animal Disease Control Center, Nanjing 210036, China)

Abstract: The cDNA specific for New Zealand rabbit IFN- γ was amplified by reverse transcription polymerase from the rabbit peripheral blood lymphocytes(PBMC) stimulated by Concavadin A and sequenced. The sequencing results indicated that the IFN- γ gene was complete, and the homology of nucleotide and amino acid sequence of rabbit IFN- γ comparing the reference sequence in GenBank are 99.4%~99.6% and 98.8%~99.4%. The rabbit IFN- γ gene then was inserted into the transferring vector pFastBacTM1 by the means of cloning and transforming, and the pFastBacTM1-IFN- γ was constructed. The recombinant shuttle vector Bacmid-IFN- γ was obtained by transforming *Escherichia coli* DH10Bac holding shuttle vector Bacmid with pFastBacTM1-IFN- γ . A recombinant baculovirus named as rAcV-Bac-IFN- γ was obtained by transfecting Sf9 insect cells with Bacmid-IFN- γ . The identification by RT-PCR showed that the recombinant protein of IFN- γ was expressed in Sf9 insect cells. The concentration of recombinant rabbit IFN- γ detected by rabbit IFN- γ ELISA Kit was 1 950 pg/mL. As a result, the recombinant rabbit IFN- γ was verified to be of high cytokine activity by inhibiting the cyto-pathogenic effect, which was about 5.12×10^5 U/mg.

Key words: Rabbit; IFN- γ ; Cloning; Recombinant baculovirus

干扰素(Interferon, IFN)是一种具有广谱抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等活性的细胞因子。1957年

收稿日期: 2010-04-19

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(nyhyzx07-040); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(nycytx-44)

作者简介: 王芳(1972-),女,新疆伊宁人,副研究员,博士,主要从事畜禽传染病免疫机理及防控方法研究。

由英国科学家 Isaacs 等^[1]在利用鸡胚绒毛尿囊膜研究流感病毒干扰现象时首先发现。它是在特定的抗原刺激下由细胞分泌的一类具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节功能等生物活性的糖蛋白,是发现最早、研究最多、第一个克隆化、第一个用于临床治疗疾病的细胞因子^[2]。根据它们的来源和结构分为 α 、 β 、 γ 三型, $IFN-\gamma$ 又称为免疫干扰素,主要由抗原和有丝分裂原刺激的 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞和 NK 细胞产生^[3],是一种具有抗病毒和免疫调节功能的细胞因子^[4,5]。因此,兔 $IFN-\gamma$ 作为一种新型抗病毒制剂和免疫增强剂,在提高现有疫苗的保护率和增强动物免疫机能方面具有广阔的应用前景。

目前,猪、犬、鸡等多种动物的 $IFN-\gamma$ 基因被成功克隆并表达^[6-8]。与人类和其他哺乳动物相比,兔 $IFN-\gamma$ 的研究比较滞后,在我国近年仅有极少数有关家兔的 $IFN-\gamma$ 基因的研究报道^[9,10]。本试验克隆了新西兰白兔 $IFN-\gamma$ 全基因,并成功构建了兔 $IFN-\gamma$ 重组杆状病毒,实现了 $IFN-\gamma$ 在昆虫细胞的高效表达,为重组兔 $IFN-\gamma$ 的研究、生产及其在养兔业中的应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、细胞与菌种

Sf9 昆虫细胞、pFastBacTM 1 质粒、大肠杆菌 DH10Bac 由扬州大学秦爱建教授惠赠。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂 RNAiso Regent、ExTaqTM (5 U/ μ L)、DNA Marker DL-2000 及 DL-45000、pMD-18T 载体、限制性内切酶 *EcoR* I、和 *Sal* I、T4 DNA Ligase(大连宝生物工程有限公司);小量胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司);胰蛋白胨(Tryptone)、酵母提取物(Yeast extract)(OXOID 公司);昆虫培养基 Grace's、胎牛血清 FBS(GIBCO 公司);转染试剂 LipofectaminTM 2000(Invitrogen 公司);淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司;ConA 购自 SIGMA 公司。兔 $IFN-\gamma$ ELISA 试剂盒为 RapidBio Lab. 公司(美国加利福尼亚州)产品。

1.3 淋巴细胞的分离培养

取肝素抗凝的兔新鲜外周血 1 mL,与 Hank's 液 1:1 混匀,小心加于 2 mL 细胞分离液的液面上,1 500 r/min 离心 15 min,吸取环状乳白色细胞层,经 PBS 洗涤 2 次后,沉淀用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基稀释至适当浓度,加入 24 孔细胞板中,并加入终浓度为 10 μ g/mL 的 ConA,于 37℃、5%

CO₂ 细胞培养箱中培养 8 h 后收集细胞。

1.4 $IFN-\gamma$ RNA 的提取

将 DEPC(Diethyipyrocarbonate,焦碳酸二乙酯)处理过的水按 1:10 加入收集细胞中,研磨成悬液,装入用 DEPC 处理过的 1.5 mL EP 管中,于 -20℃ 反复冻融 3 次;4℃,以 7 200 r/min 离心 20 min,取上清 200 μ L;加入 Trizol 800 μ L,振荡混匀后,室温放置 10 min;加入氯仿 210 μ L,剧烈振荡后,室温放置 1 min;4℃,10 000 r/min 离心 15 min,取上层水相 750 μ L;加入 0.5 mL 异丙醇混匀,-20℃ 放置 15 min;4℃,10 000 r/min 离心 10 min;去上清,加入 75% 乙醇 1 mL 洗涤;4℃,8 000 r/min 离心 5 min,去上清;室温干燥 20 min,加入 DEPC 处理过的水 10 μ L,使充分溶解。

1.5 RT-PCR

1.5.1 引物设计 参照 GenBank 的中报道的比利时野兔的 $IFN-\gamma$ 序列(NM001081991),设计合成了一对特异性的引物: P1: 5'-GCGGAATTCATGAGT-TATACAAG-3'; P2: 5'-ATGGTACCTCAGTACTTGGA-3',分别在上下游中引入 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切位点,以下划线表示。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.5.2 反转录 反转录体系为: 10 \times Buffer 1.0 μ L、10 mmol/L dNTPs 1.0 μ L、下游引物 0.5 μ L、RNA 酶抑制剂 0.25 μ L、RNA 模板 1.0 μ L、AMV 反转录酶 0.5 μ L、H₂O(DEPC 处理) 3.75 μ L,总体积为 10 μ L,瞬间离心混匀,30℃ 反应 10 min,42℃ 孵育 30 min,99℃ 5 min,-20℃ 保存备用。

1.5.3 PCR 反应体系为: 10 \times Reaction Buffer 2.5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L、2.5 mmol/L dNTPS 2.0 μ L、50 mmol/L P1 0.5 μ L、50 mmol/L P2 0.5 μ L、模板 cDNA 4.0 μ L、ddH₂O 13.5 μ L、*rTaq* polymerase 0.5 μ L,总体积 25 μ L,瞬间离心混匀,采用热盖进行 PCR 扩增反应: 94℃ 变性 5 min,94℃ 变性 45 s,50℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,30 个循环后,72℃ 延伸 10 min,结束反应。

1.6 T/A 克隆与鉴定

用核酸凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,然后按照 pMD-19T-Vector 试剂盒说明,将目的片段克隆入 pMD-19T-Vector,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞。挑选单菌落培养并提取质粒,用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切,37℃ 2 h,筛选阳性克隆并送至大连宝生物工程有限公司(大连市)测序。

1.7 重组转移载体的构建

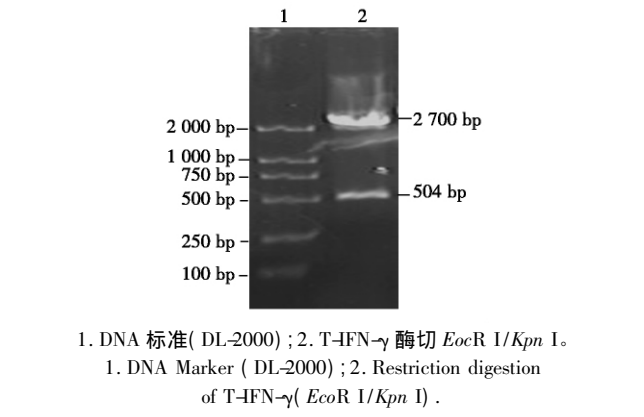
用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Kpn* I 分别消化供

体质粒 pFastBacTM1 和 T/A 克隆,回收目的片段,用 T4 DNA Ligase 4℃ 连接 12 h,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。筛选阳性克隆,得到重组转移载体 pFastBacTM1-IFN- γ 。

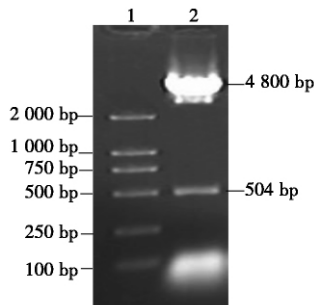
- 1.8 重组杆状病毒穿梭质粒的获得及鉴定
- 1.8.1 重组杆状病毒穿梭质粒的构建和提取 将 pFastBacTM1-IFN- γ 质粒转化含有穿梭载体 Bacmid 的 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞,37℃,于 LB 液体培养基中,培养 4 h 后,取 100 μ L 转化产物涂于含有 50 μ g/mL 卡那霉素、7 μ g/mL 庆大霉素、10 μ g/mL 四环素以及 100 μ g/mL X-gal 和 20 μ g/mL IPTG 的 LB 平板上,37℃,培养 48 h 后,挑选白色菌落,在同样的含三种抗生素的 LB 平板上继续接种传代一次,获得纯培养,接种含有三种抗生素的 LB 液体培养基中,37℃,振摇(180 r/min)培养 24 h,用提取重组穿梭质粒 DNA 专用的溶液 I、II、III,提取 bacmid 质粒(见杆状病毒表达系统手册)。
- 1.8.2 重组杆状病毒穿梭质粒的鉴定 以重组 Bacmid DNA 为模板,以通用 pUCM13 上、下游引物进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系及 PCR 扩增反应条件见杆状病毒表达系统手册。鉴定为阳性的重组质粒命名为 Bacmid-IFN- γ 。
- 1.9 转染昆虫细胞
- 以 LipofectaminTM2000 为共转染试剂,按照说明转染 Sf9 单层细胞。转染后每 12 h 观察一次,直到细胞病变明显时,收集细胞及上清液,作为重组杆状病毒原液-20℃保存。将含目的基因 IFN- γ 的重组杆状病毒命名为 rAcV-Bac-IFN- γ 。
- 1.10 重组病毒的传代与初步鉴定
- 1.10.1 重组病毒的传代 将第一代病毒液冻融两次后,以 1% 体积比接种 Sf9 细胞,得到第 2 代重组病毒。
- 1.10.2 RT-PCR 鉴定重组病毒 收集第 2 代感染重组病毒的 Sf9 细胞,按照前文所述方法提取细胞 RNA,以目的基因上下游引物进行 RT-PCR,并以未感染重组病毒的 Sf9 细胞作为对照。
- 1.11 重组兔 IFN- γ 浓度的测定
- 将收集第 3 代重组病毒感染的 Sf9 细胞,7 d 后,收集细胞及其培养基,于-20℃反复冻融 3 次,以 10 000 r/min 离心 10 min,去上清液,用兔 IFN- γ ELISA 试剂盒中标准品稀释液分别做 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280 稀释,同时将标准品(1000 pg/mL)以 1:1、2:1、4:1、8:1、16:1、32:1、64 稀释做 ELISA,做标准品的标准曲线,依据标准曲线和样品曲线,测定重组兔 IFN- γ 的浓度。

- 1.12 重组兔 IFN- γ 抗病毒活性测定
- 重组兔 IFN- γ 抗病毒活性测定采用犬肾细胞 MDCK-VSV(水泡性口炎病毒)系统微量细胞病变抑制法^[11]。将 MDCK 细胞接种于 96 孔板,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 12~16 h 至细胞生长成单层,去除细胞培养基,依次加入倍比稀释的干扰素样品,每个稀释度各加 8 孔,同时设病毒对照孔 6 孔、细胞对照孔 2 孔;于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,去除干扰素溶液,用 100 TCID₅₀ 的 VSV 攻击,细胞对照孔不加含病毒的培养基,再培养 1~2 d。待病毒对照孔细胞全部或 75% 以上出现明显病变时,在倒置显微镜下观察结果。将抑制 50% VSV 产生的细胞病变(CPE₅₀)干扰素的最高稀释度定为 1 个干扰素单位(U)。

- 2 结果与分析
- 2.1 兔 IFN- γ 基因片段的扩增和测序
- 将 RT-PCR 反应产物克隆入 pMD18-T 载体后,酶切鉴定结果显示,有两条大小分别为 2 700 bp 和 504 bp 左右的片段;阳性质粒 T-IFN- γ 测序结果表明,插入目的基因全长 504 bp(图 1),测序结果显示,所测序列与 GenBank 公布的序列核苷酸同源性达到 99.4%~99.6%,氨基酸同源性为 98.8%~99.4%,阅读框架正确。



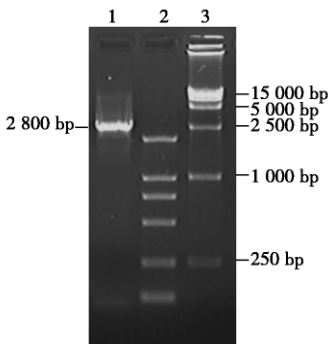
- 图 1 T-IFN- γ 双酶切结果
- Fig.1 Restriction enzyme digest of T-IFN- γ
- 2.2 重组转移载体的酶切鉴定
- 重组转移载体 pFastBac1-IFN- γ 酶切消化后,经琼脂糖凝胶电泳,可见两条大小分别为 4 800 bp 和 504 bp 左右的片段(图 2)。
- 2.3 重组表达载体的 PCR 鉴定
- 以 pUC/M13 上、下游引物对重组质粒 Bacmid-IFN- γ 的进行 PCR 鉴定,扩增产物大小约为 2 800 bp(图 3),证明转座已成功,重组杆状病毒表达载体构建完成。



1. 重组转移载体的酶切 (*EcoR* I/*Kpn* I); 2. DNA 标准 (DL-2000)。
1. Restriction digestion of pFastBac1-IFN- γ (*EcoR* I/*Kpn* I); 2. DNA Marker (DL-2000)

图 2 重组转移载体的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme digestion of recombinant transfer vector



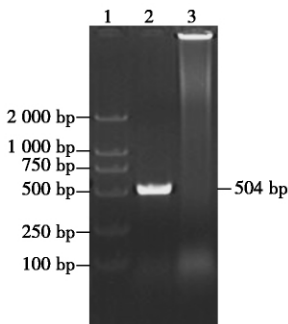
1. 重组表达载体的 PCR 鉴定; 2. DNA 标准 (DL-2000); 3. DNA 标准 (DL-45000)。
1. PCR analysis of recombinant Bacmid; 2. DNA Marker (DL-2000); 3. DNA Marker (DL-45000) .

图 3 重组 Bacmid 的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR analysis of recombinant Bacmid

2.4 转染后的细胞病变

重组穿梭质粒 Bacmid-IFN- γ 转染 Sf9 细胞 5 d 后观察到细胞肿大变圆, 分裂停止, 细胞间紧密连接消失, 细胞折光性增强, 而正常细胞则无此变化, 说明转染成功。



1. DNA 标准 (DL-2000); 2. 感染重组病毒的细胞; 3. 未感染重组病毒的细胞。
1. DNA Marker (DL-2000); 2. Cell infected recombinant virus; 3. Cell no infected recombinant virus.

图 4 重组病毒的 RT-PCR 鉴定

Fig. 4 RT-PCR analysis of recombinant virus

2.5 RT-PCR 鉴定重组病毒

提取感染第 2 代重组病毒的 Sf9 细胞 RNA, 以

目的基因上、下游引物进行 RT-PCR, 电泳条带约为 504 bp (图 4), 说明目的基因已经随杆状病毒基因组整合入 Sf9 细胞中, 并在细胞中进行表达, 而未感染重组病毒的细胞对照未出现相应的条带。

2.6 重组兔 IFN- γ 浓度的测定

用兔 IFN- γ ELISA 试剂盒做标准品的标准曲线 (图 5), 同时将表达的兔 IFN- γ 以 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280 稀释做 ELISA, 依据标准品的浓度, 推测重组兔 IFN- γ 的浓度为 1950 pg/mL。

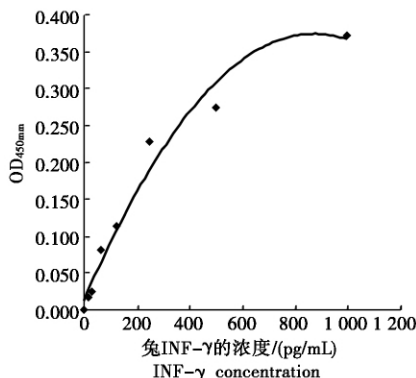


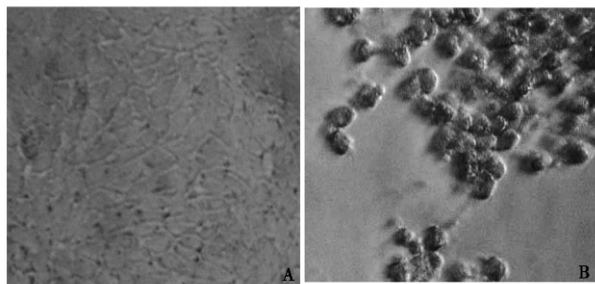
图 5 兔 IFN- γ ELISA 试剂盒做标准品的曲线

Fig. 5 The curve of standard

sample by rabbit IFN- γ ELISA kit

2.7 重组兔 IFN- γ 抗病毒活性测定

重组兔 IFN- γ 抗病毒活性测定采用犬肾细胞 MDCK-VSV (水泡性口炎病毒) 系统微量细胞病变抑制法。多次重复活性试验表明, 重组兔 IFN- γ 在 MDCK 上显示了较高的抗病毒活性, 能有效地抑制 VSV 对细胞的破坏作用 (图 6)。将抑制 50% VSV 产生的细胞病变 (CPE₅₀) 的干扰素最高稀释度定为 1 个干扰素单位, 测得重组兔 IFN- γ 的活性约为 5.12×10^5 U/mg。



A. 事先用重组兔 IFN- γ 处理过的 MDCK 细胞在接种 VSV 后未见有细胞病变; B. VSV 在 MDCK 细胞上的病变。

A. After inoculated with VSV, None cell pathological changes was observed on MDCK cells which have been previously treated with recombinant rabbit IFN- γ ; B. Cyto-pathogenic effect of VSV on MDCK cells.

图 6 重组兔 IFN- γ 对 VSV 的抑制作用

Fig. 6 Inhibition effect of recombinant rabbit IFN- γ on VSV on MDCK cell

3 讨论

γ -干扰素具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等生物学活性,人类 γ -干扰素在临床疾病的防治中应用十分广泛。动物 γ -干扰素作为生物制剂或疫苗免疫增强剂也具有较好的应用前景。目前已有重组猪、鸡和犬等 γ -干扰素的表达与应用^[12-14],而家兔干扰素方面的研究较少。兔 γ -干扰素为 II 型干扰素,可激活巨噬细胞和 NK 细胞,并促进其活性,促进 CTL 成熟及活性,促进多种细胞表达 MHC I 类和 MHC II 类分子,在免疫调控中处于中心地位^[15]。

本研究用杆状病毒表达系统对兔 IFN- γ 进行了表达。研究发现,杆状病毒作为基因表达载体,具有表达产物具有活性的优点。昆虫细胞对蛋白质表达后修饰加工的方式与哺乳动物细胞接近。能识别并正确地进行信号肽的切除及磷酸化、糖基化等反应,表达产物具有很高的生物活性,其抗原性、免疫原性均与天然蛋白相似^[16]。因此,本研究表达的兔 IFN- γ 与原核表达系统表达的 IFN- γ ^[9]相比,可能更接近于天然的兔 IFN- γ 。本研究用兔 IFN- γ ELISA 试剂盒检测重组 IFN- γ 及其浓度也证实了这一点,因为兔 IFN- γ ELISA 试剂盒是用于检测兔血清中 IFN- γ 的,我们用它来检测表达的兔 IFN- γ ,结果也出现了阳性反应,说明用此系统表达兔 IFN- γ 更接近于天然。另外,杆状病毒只感染非脊椎动物,对家兔等畜禽及人类都十分安全,因此有利于重组兔 IFN- γ 的相关研究和临床应用。

兔 IFN- γ 作为一种新型抗病毒制剂和免疫增强剂,在提高现有疫苗的保护率和增强动物免疫机能方面具有广阔的应用前景。本试验成功构建了兔 IFN- γ 重组杆状病毒,实现了 IFN- γ 在昆虫细胞的高效表达。重组兔 IFN- γ 活性试验表明,重组兔 IFN- γ 在 MDCK 上显示了较高的抗病毒活性,能有效地抑制 VSV 对细胞的破坏作用。本研究为进一步研究重组兔 IFN- γ 免疫调节功能,以及在养兔业应用打下了良好的基础。

参考文献:

[1] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon [J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957, 147(927) :

258 - 267.

[2] Billiau A. Interferon: The path ways of discovery I. Molecular and cellular aspects [J]. Cytokine and Growth Factor Reviews, 2006, 17: 381 - 409.

[3] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001.

[4] Muller U, Steinhoff U, Reis I F, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense [J]. Science, 1994, 264: 1918 - 1921.

[5] Premraj A, Sreekumar E, Rasool T J. Cloning and biological characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) interferon- γ [J]. Mol Immunol, 2006, 43(6) : 717 - 724.

[6] 秦立廷, 王喜军, 胡森, 等. 猪 γ -干扰素在重组杆状病毒中的表达及其抗病毒活性的测定 [J]. 生物工程学报, 2007; 23(3) : 386 - 391.

[7] Digby M R, Lowenthal J W. Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene [J]. J Interferon Cytokine Res, 1995, 15(11) : 939 - 945.

[8] Devos K, Duerinck F, Van Audenhove K, et al. Cloning and expression of the canine interferon-gamma gene [J]. J Interferon Res, 1992, 12(2) : 95 - 102.

[9] 孟庆玲, 乔军, 才学鹏, 等. 兔 IFN- γ 基因的克隆、遗传进化分析及其表达 [J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 43(4) : 7 - 11.

[10] 黄道超, 杨光友, 赖松家. 中国大耳白肉兔 IFN- γ 、IL-2 和 IL-4 基因的克隆测序与进化分析 [J]. 四川农业大学学报, 2007, 25(4) : 468 - 474.

[11] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 武汉: 湖北科学出版社, 1998: 275 - 276.

[12] 曹瑞兵, 蔡梅红, 陈德胜, 等. 猪 γ -干扰素双顺反子表达载体的构建及在大肠杆菌中的表达 [J]. 中国兽医学报, 2004, 24(1) : 52 - 55.

[13] 董建宝, 谢芝勋, 孙建华, 等. 广西三黄鸡 γ -干扰素基因真核表达载体的构建及表达 [J]. 西南农业学报, 2008, 21(1) : 167 - 169.

[14] 杨琪, 夏春, 赵德, 等. 犬干扰素- γ cDNA 的克隆及其在鼠骨髓瘤细胞(SP2/0) 中表达 [J]. 生物工程学报, 2002, 18(3) : 365 - 368.

[15] Williams J G, Jurkovich G J, Maier R V. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine [J]. J Surg Res, 1993, 54(1) : 79 - 93.

[16] Possee R D. Baculoviruses as expression vectors [J]. Opin Biotech, 1997, 8: 569 - 572.