

猪白细胞介素18成熟蛋白基因克隆及在不同原核表达系统中的表达

郑兰兰^{1,2}, 崔保安^{1,2}, 陈红英^{1,2}, 贾云飞¹, 陈瑞亮¹, 方忠意^{1,2}

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: RT-PCR方法直接从猪脾脏淋巴细胞中扩增出猪白细胞介素18成熟蛋白基因的cDNA, 克隆到pGEM-T载体, 构建重组质粒pGEM-T pIL18, 转化*E. coli* JM109感受态细胞, 取PCR和酶切鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定。测序结果表明, pIL-18成熟蛋白基因核苷酸长度为474 bp, 编码157个氨基酸。将其分别克隆到表达载体pQE30、pET-28a、pGEX6P-1中, 构建重组表达质粒pQE-mpIL18、pET-mpIL18、pGEX-mpIL18。用IPTG诱导表达, 重组菌菌体裂解物SDS-PAGE可检测到相对分子质量分别为19 000、21 000、45 000的重组蛋白。经薄层扫描分析, pQE-mpIL18、pET-mpIL18、pGEX-mpIL18菌体裂解物分别占菌体总蛋白的17%、28%、27%, 均以包涵体形式存在。

关键词: 猪白细胞介素18; 成熟蛋白; 原核表达

中图分类号: S831

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)03-0075-05

Cloning of Porcine Interleukin-18 Mature Gene and Its Expression in Different Prokaryotic Expression Vectors

ZHENG Lan-lan^{1,2}, CUI Bao-an^{1,2}, CHEN Hong-ying^{1,2},

JIA Yun-fei¹, CHEN Rui-liang¹, FANG Zhong-yi^{1,2}

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

2 Henan Animal Food Safety Key Laboratory, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Porcine interleukin-18 mature protein gene was amplified from porcine spleen cells by RT-PCR. PCR product was cloned into the T vector pGEM-T for sequencing. The result showed that the nucleotide sequence of this gene was 474 bp, which encodes 157 amino acids. It was subcloned into the prokaryotic expressing plasmid vectors pQE30, pET-28a, pGEX6P-1, and transformed into host *E. coli* strain JM109 or BL21 for expression. The expression of pIL-18 mature protein gene was identified by SDS-PAGE. The result revealed that the expression products were fusion protein with relative molecular mass of 19 000, 21 000, 45 000, respectively, and the percentage of expression protein in *E. coli* protein was 17%, 28%, 27% respectively.

Key words: porcine interleukin-18; mature protein; prokaryotic expression

白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)又称为干扰素 γ 诱导因子(interferon gamma inducing factor, IGIF)。1995年日本学者Okamura等^[1]从中毒性休克的鼠肝脏中克隆出了该因子。1996年Ushio^[2]等从鼠cDNA库中筛选到人IGIF基因,其序列与所有已知的细胞因子不同,并能在大肠杆菌中表达,且生

物活性多样,如抗病毒、抗结核分支杆菌、抗真菌^[3]、抗肿瘤免疫^[4]、抗变态反应性疾病作用^[5]及前炎因子活性^[6],将其正式命名为IL-18。1999年Muneta等^[7-8]从猪肺泡巨嗜细胞中克隆到pIL-18,并证明表达的pIL-18成熟蛋白比前体蛋白具有更高的活性。因此,IL-18不论在基础研究还是在临床运用方面都

收稿日期: 2007-01-07

作者简介: 郑兰兰(1982—),女,硕士研究生; 通讯作者: 崔保安(1948—),男,教授, E-mail: baoancui@henau.edu.cn

基金项目: “十五”国家食品安全重大攻关专项(2001BA804A30-11); 河南省杰出人才创新基金(0621002100)

具有巨大的应用前景^[7-8]。本研究选择河南省普遍喂养的良杂猪,对其 IL-18 成熟蛋白基因进行扩增及序列测定,并实现了其在大肠杆菌 3 个不同表达载体中的初步表达,从中选择更适合的载体,提高表达量,为下游的纯化工作、研制新型免疫佐剂和免疫调节剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 组织材料

6 月龄河南良杂猪脾脏采自郑州市郑荣肉联场。

1.2 菌种和质粒

基因工程菌 JM109 为宝生物工程(大连)有限公司产品。基因工程菌 BL21 为北京天为时代有限公司产品。pGEM-T Easy Vector System 为 Promega 公司产品。pQE30、pGEX6P-1、pET-28a 表达载体由河南省动物性食品安全重点实验室保存。

1.3 酶类和主要试剂

EZ Spin Column Total RNA Isolation Kit、AMV Single Step RT-PCR Kit 为 BBI 公司产品。Ex Taq DNA 聚合酶、EcoR I、Sph I、Xho I、Pst I 限制性内切酶为宝生物工程(大连)有限公司产品。质粒回收试剂盒与 PCR 产物凝胶回收试剂盒为杭州维特洁生化技术有限公司产品。

1.4 RT-PCR 引物设计与合成

应用 DNASTar (Version 4.0) 及 Primer (Version 5.0) 基因分析软件,参照 GenBank 发表的 pIL-18 cDNA (AB010003) 基因序列分别设计 2 对引物。第 1 对引物 PCR 扩增产物用于连接表达载体 pQE30,并在上游引物中加入 Pst I 酶切位点,下游引物中加入 Sph I 酶切位点;第 2 对引物 PCR 扩增产物用于连接表达载体 pGEX6P-1、pET-28a,并在上游引物中加入 EcoR I 酶切位点,下游引物中加入 Xho I 酶切位点。

第 1 对:上游引物 P1:5'-GATGCATGCTACTTTG-GCAAGCTT-3',下游引物 P2:5'-TCCCTGCAGCTAGT-TCTTGTITTTG-3';第 2 对:上游引物 P3:5'-CGCGAAT-TCTACTTTGGCAAGCTT-3',下游引物 P4:5'-CGC-CTCGAGCTAGTTCCTTGTITTTG-3'。

1.5 良杂猪脾细胞总 RNA 提取

无菌采取脾脏,收集淋巴细胞培养物,按 EZ Spin Column Total RNA Isolation Kit 总 RNA 抽提试剂盒提取 RNA。分别取 5 μ L 测定 RNA 的浓度和完整性。

1.6 良杂猪 IL-18 成熟蛋白基因 RT-PCR 扩增

用 AMV Single Step RT-PCR Kit 进行 PCR 扩增。反应的循环参数为:40 $^{\circ}$ C 30 min,94 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 15 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,36 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。同时设立无模板的阴性对照。反应结

束后,取 5 μ L PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)电泳检测 PCR 结果。

1.7 良杂猪 IL-18 成熟蛋白基因克隆与序列分析

将电泳回收产物与 pGEM-T 载体室温作用 1 h,连接产物转化 JM109 感受态细胞,在含有 X-gal、IPTG 和 Amp(氨苄霉素)的 LB 琼脂平板培养基上培养 16 h,挑取白斑菌落接种含有 Amp 的 LB 肉汤,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12~16 h。提取重组质粒,进行 PCR 及酶切电泳鉴定。选择鉴定为 IL-18 成熟蛋白基因重组阳性的质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定。测序结果与其他品种猪的成熟蛋白基因序列进行比较分析。

1.8 重组表达质粒的构建

分别用 Sph I、Pst I 和 EcoR I、Xho I 将 pIL-18 片段释出,定向克隆到同样处理的 pQE30、pGEX6P-1、pET-28a 载体中,构建重组表达质粒。再将连接产物转化 JM109 感受态细胞。提取重组质粒,进行 PCR 及酶切电泳鉴定。选择鉴定为重组阳性的质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定,验证重组质粒读码框的正确性。

1.9 pIL-18 成熟蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

将 pQE-mpIL18 转化大肠杆菌 JM109 后挑选单菌落,接种含 Amp (60 mg/L) 的 LB 培养基中;将 pGEX-mpIL18 转化大肠杆菌 BL21 后挑选单菌落,接种 Amp (60 mg/L) 的 2 $\times$ YT 培养基中;将 pET-mpIL18 转化大肠杆菌 BL21 后挑选单菌落,接种含卡那霉素 (50 mg/L) 的 2 $\times$ YT 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.6~1.0,加入 IPTG (终浓度 0.8 mmol/L) 25 $^{\circ}$ C 诱导 3~5 h。收集菌体,离心除去上清液,重悬于 PBS 中,冻融 2 次,超声破碎后,加 2 $\times$ 上样缓冲液煮沸 5 min,用 12 % SDS-PAGE 检测目的蛋白表达情况。

2 结果

2.1 良杂猪 IL-18 成熟蛋白基因的 RT-PCR 扩增

从良杂猪脾淋巴细胞提取细胞总 RNA,利用 RT-PCR 技术扩增产物,琼脂糖凝胶电泳初步检测表明,获得了约 474 bp 的 IL-18 基因条带(图 1)。

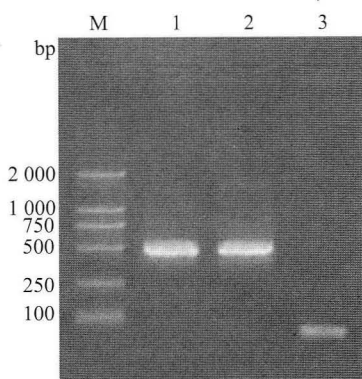
2.2 良杂猪 IL-18 成熟蛋白基因序列测定

选择酶切和 PCR 鉴定为 pIL-18 成熟蛋白基因重组阳性的质粒进行正反 2 个方向的序列测定,报告的核苷酸序列为 474 bp,编码 157 个氨基酸(图 2)。

2.3 良杂猪 IL-18 成熟蛋白基因序列分析

将所测的猪 IL-18 成熟蛋白基因序列与 GenBank

下载读取的 AB010003、AF176949、AY262109、NM1997 序列进行比较. 猪 IL-18 成熟蛋白基因 (CEPIG) 与 AB010003、AF176949、AY262109、NM1997 氨基酸的相似性分别为 99.0%、98.5% 和 99.8%、99.0% (图 3).



M: DNA marker DL2000; 1, 2: RT-PCR 产物; 3: 阴性对照

M: DNA marker DL2000; 1, 2: RT-PCR product; 3: negative control

图 1 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product

TACITTTGGCAAGCTTGAACCTAAACTCTCAATCATACGAAATCTGAACGACCAAGTC
Y F G K L E P K L S I I R N L N D Q V
CTTTTCATTAAACGAGGACATCAAGCCGTGTTTGAGGATATGCCTGATTCTGACTGT
L F I N Q G H Q A V F E D M P D S D C
TCAGATAATGCACCTCAGACCGTATTATTATATATATGTATAAGATAGCCTCACTAGA
S D N A P Q T V F I I Y M Y K D S L T R
GGTCTGGCAGTAACCAATCTCTGTGACGTGAAGAAAATGTCTACTCTCTCTGTAAG
G L A V T I S V Q C K K M S T L S C K
AACAAAACCTTTCTCTTAAGGAAATGAGTCTCTCTGATAATATTGATGATGAAGGA
N K T L S F K E M S P P D N I D D E G
AATGACATCATATTCTTTAGAGAAGTGTCTCTGGACATGATGATAAGATACAGTTT
N D I I F F Q R S V P G H D D K I Q F
GAGTCTTCATTGTACAAAGGATACTTTCTAGCTTGTAAGAAAGAGAACGACCTTTTC
E S S L Y K G Y F L A C K K E N D L F
AAACTCAITTTGAAAGAAAGGATGAATGTGGAGATAAATCTGTAAATGTTCACTGTT
K L I L E D E C G D K S V L A M F T V
CAAAACAAGAACTAG
Q N K N *

图 2 IL-18 成熟蛋白基因的核苷酸序列与氨基酸序列结果

Fig. 2 Nucleotide sequence and amino acids sequence of IL-18

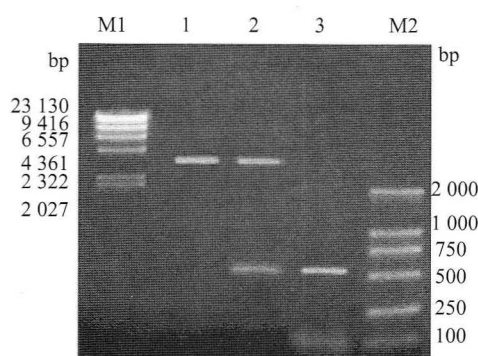
		percent similarity					
percent divergence		1	2	3	4	5	
	1		99.0	98.5	99.8	99.0	1 CEPIG.SEQ
	2	0.2		98.7	100.0	100.0	2 AB010003.SEQ
	3	0.8	0.7		99.3	98.7	3 AF176949.SEQ
	4	0.2	0.0	0.7		100.0	4 AY262109.SEQ
	5	0.2	0.0	0.7	0.0		5 NM1997.SEQ
		1	2	3	4	5	

图 3 猪 IL-18 基因的核苷酸序列与 GenBank 下载序列之间氨基酸相似性比较

Fig. 3 Similarities of the amino acids between the IL-18 sequence and other related sequences

2.4 良杂猪 pQE-mpIL18 重组表达质粒的构建

将猪 IL-18 成熟蛋白基因的 PCR 回收产物与 pQE30 表达载体同时 *Sph* I + *Pst* I 双酶切, 构建重组质粒, 转化 JM109 后挑选白色菌落鉴定. 分别以菌液、抽提重组质粒为模板进行 PCR, 电泳均出现 1 条长约 474 bp 条带; 重组质粒经 *Pst* I 酶切, 电泳出现 1 条约 3 400 bp 的条带; 经 *Sph* I + *Pst* I 酶切, 电泳出现 2 条带: 其中一条带为载体质粒, 约 3 400 bp, 另一条带为克隆的 IL-18 成熟蛋白基因片段, 约 474 bp (图 4). 测序结果表明该转化菌的质粒中确实含有目的基因片段, 且读码框正确, 重组质粒 pQE-mpIL18 构建成功.



M1: λ -Hind III digest; 1: 阴性对照; 2: 重组质粒双酶切; 3: 重组质粒 PCR 产物; M2: DNA marker DL2000

M1: λ -Hind III digest; 1: negative control; 2: recombinant plasmid digestion by *Sph* I + *Pst* I; 3: recombinant plasmid PCR product; M2: DNA marker DL2000

图 4 重组质粒 PCR 和酶切鉴定图

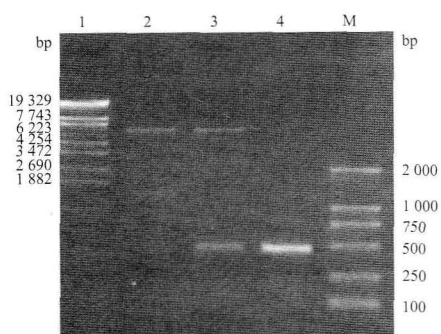
Fig. 4 Identification of recombinant plasmid by digestion (*Sph* I + *Pst* I) and PCR

2.5 良杂猪 pGEX-mpIL18、pET-mpIL18 重组表达质粒的构建

将猪 IL-18 成熟蛋白基因的 PCR 回收产物与 pGEX6P-1、pET-28a 表达载体同时 *Eco* R I + *Xho* I 双酶切, 纯化回收后构建重组质粒, 转化 BL21 后挑选白色菌落, 分别以菌液、抽提重组质粒为模板进行 PCR、电泳, 出现 1 条长约 474 bp 的条带; 重组质粒经 *Eco* R I 酶切、电泳分别出现 1 条大小约 4 900 bp、5 400 bp 的条带; 经 *Eco* R I + *Xho* I 酶切电泳分别出现 2 条带: 其中一条带为载体质粒, 分别约 4 900 bp、5 400 bp, 另一条带为所克隆的 IL-18 成熟蛋白基因片段, 约 474 bp (图 5、6). 测序结果表明该转化菌的质粒中确实含有目的基因片段, 且读码框正确, 重组质粒 pGEX-mpIL18、pET-mpIL18 构建成功.

2.6 重组菌菌体裂解物的 SDS-PAGE 结果

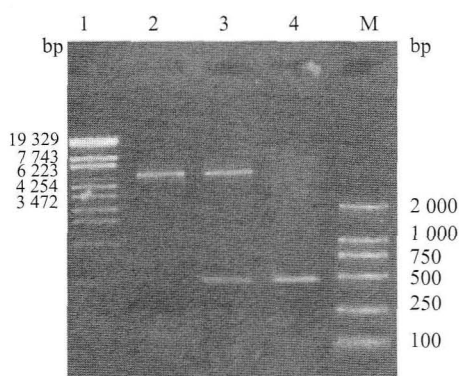
pQE-mpIL18 重组菌菌体裂解物可在相对分子质量约 19 000 处出现 1 条特异的融合蛋白条带, 而



1: λ -EcoT14 I digest; 2: 阴性对照; 3: 重组质粒双酶切; 4: 重组质粒 PCR 产物; M: DNA marker DL2000

1: λ -EcoT14 I digest; 2: negative control; 3: recombinant plasmid digestion by *EcoR* I + *Xho* I; 4: recombinant plasmid PCR product; M: DNA marker DL2000

图5 重组表达质粒 pGEX - mpIL18 PCR 和酶切鉴定图
Fig. 5 Identification of recombinant plasmid pGEX-mpIL18 by digestion (*EcoR* I + *Xho* I) and PCR

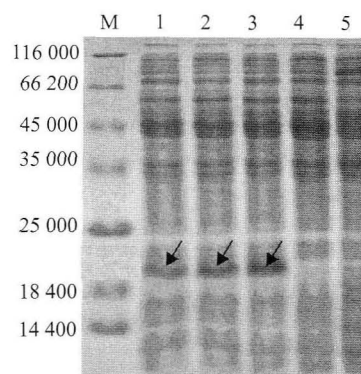


1: λ -EcoT14 I digest; 2: 阴性对照; 3: 重组质粒双酶切; 4: 重组质粒 PCR 产物; M: DNA marker DL2000

1: λ -EcoT14 I digest; 2: negative control; 3: recombinant plasmid digestion by *EcoR* I + *Xho* I; 4: recombinant plasmid PCR product; M: DNA marker DL2000

图6 重组表达质粒 pET - mpIL18 PCR 和酶切鉴定图
Fig. 6 Identification of recombinant plasmid pET - mpIL18 by digestion (*EcoR* I + *Xho* I) and PCR

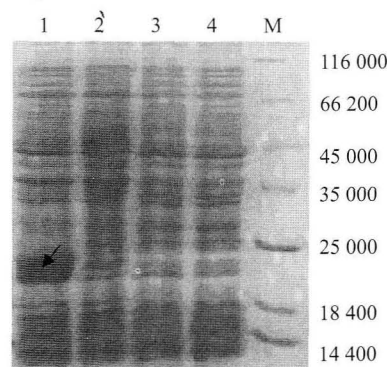
非重组的 pQE30 质粒菌培养物样品中, 未见明显的条带(图7)。pET-mpIL18 重组菌菌体裂解物可在相对分子质量约 21 000 处出现 1 条特异的融合蛋白条带, 而非重组的 pET-28a 质粒转化菌培养物样品中, 未见明显的条带(图8)。pGEX-mpIL18 重组菌菌体裂解物可在相对分子质量 45 000 处出现 1 条特异的融合蛋白条带, 而非重组的 pGEX6P-1 质粒转化菌培养物诱导样品中, 约在 26 000 处有一 GST-Tag 融合标签条带(图9), 均与预期结果相符。薄层扫描分析证实 3 种重组蛋白分别约占菌体总蛋白量的 17%、28%、27%。分析表达蛋白可溶性, 证实融合蛋白均以包涵体形式表达。



M: 低相对分子质量标准蛋白质; 1~3: 重组质粒表达产物; 4~5: 空载体表达产物

M: low relative molecular mass of protein marker; 1-3: products of recombinant pQE-mpIL18 expressing in JM109; 4-5: products of plasmid pQE30 expressing in JM109

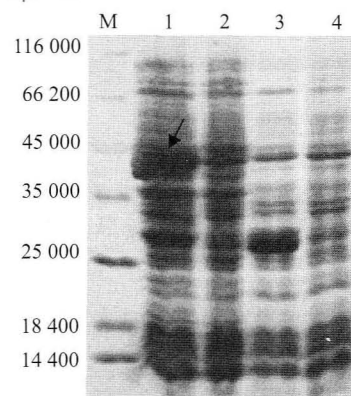
图7 表达重组 pQE-mpIL18 菌株的 SDS-PAGE 分析
Fig. 7 SDS-PAGE result of the recombinant bacteria expressing pQE-mpIL18



1: 重组质粒表达产物; 2: 重组质粒未诱导产物; 3: 空载体表达产物; 4: 空载体未诱导产物; M: 低相对分子质量标准蛋白质

1: products of recombinant pET-mpIL18 expressing in BL21 by IPTG inducing; 2: negative control; 3: products of plasmid pET-28a expressing in BL21; 4: negative control; 5: low relative molecular mass of protein marker

图8 表达重组 pET-mpIL18 菌株的 SDS-PAGE 分析
Fig. 8 SDS-PAGE result of the recombinant bacteria expressing pET-mpIL18



M: 低相对分子质量标准蛋白质; 1: 重组质粒诱导表达产物; 2: 重组质粒未诱导产物; 3: 空载体诱导表达产物; 4: 空载体未诱导产物

M: low relative molecular mass of protein marker; 1: products of recombinant pGEX-mpIL18 expressing in BL21 by IPTG inducing; 2: negative control; 3: products of plasmid pGEX6p-1 expressing in BL21; 4: negative control

图9 表达重组 pGEX-mpIL18 菌株的 SDS-PAGE 分析
Fig. 9 SDS-PAGE result of the recombinant bacteria expressing pGEX-mpIL18

3 讨论

本研究采用直接从脾细胞扩增猪 IL-18 的方法,无须 PHA + LPS^[9-10] 进行诱导,大大简化了操作. IL-18 是一种多效应的细胞因子,必须切除信号肽才表现出活性^[11]. 本研究中表达的 pIL-18 融合蛋白保持其完整蛋白的活性,这为其表达产物作为佐剂或者治疗剂在临床的应用,以及研究 pIL-18 在各种疾病中的免疫调节作用奠定了基础.

本研究发现, pQE-mpIL18 重组质粒在 JM109 感受态细胞中即可进行表达,无须再转化入 M15,且在 JM109 与 M15 工程菌中的表达量并无明显差别;而 pET-mpIL18、pGEX-mpIL18 重组质粒在 JM109 中不能表达,必须转入 BL21 才能得到有效表达,推测这是载体本身的特性所决定的. 而且 IL-18 在不同的表达载体中其表达量也各不相同,在 pGEX6P-1、pET-28a 载体中的表达量明显高于 pQE30. 可见,多花费些时间与精力来摸索目的基因与载体、诱导条件之间的关系是很有价值的.

本实验选用的 pGEX6P-1 载体特点是在表达蛋白的 N 端融合了一完整的谷胱甘肽硫转移酶基因,空载体表达的为 26 000 的谷胱甘肽转移酶蛋白;选用的 pET-28a 表达载体在表达蛋白 N 端附加有 34 个氨基酸,附加的氨基酸中含有 6 个组氨酸的标记蛋白 (histidine-tagged),空载体表达的为 2 000 ~ 3 000 的组氨酸蛋白,故将含编码成熟猪 IL-18 基因克隆入表达载体 pET-28a 后,得到的重组质粒可表达 N 端带 His 的融合蛋白,大小为 21 000 与预期的目的产物蛋白大小一致. pQE30 载体本身大小在表达产物中可以忽略不计,而 mpIL-18 自身表达产物的大小约为 19 000,故 3 种重组质粒在宿主菌中表达融合蛋白大小依次为 45 000、21 000 和 19 000.

选择一种合适的表达系统对外源基因的高效表达至为关键,我们曾用这 3 种表达系统对 pIFN- α 基因进行了反复表达尝试,但未能获得成功(结果未显示),这可能是由于该基因的独特性不适合于在这些体系中表达. 为获得目的蛋白的高效表达,需要对影响表达的各种参数(高表达菌株的筛选、诱导培养前细菌生长状况、诱导剂浓度、诱导时间等)进行优化选择,经反复摸索,最终确定诱导前 $D_{600\text{nm}} = 0.6$, $c_{\text{IPTG}} = 0.8\text{ mmol/L}$ (终浓度)诱导 4 h 较理想.

经 SDS-PAGE 分析可知,所得到的 3 种重组蛋白均以包涵体的形式存在,包涵体可以使表达的重

组蛋白免受蛋白酶水解,也容易纯化,有利于下游工作的继续进行. 显然,本研究为进一步研究和开发利用 IL-18 奠定了基础.

参考文献:

- [1] OKAMURE H, TSUTSUI H. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cell [J]. *Nature*, 1995 (378): 88-91.
- [2] DINARELLO C A, NOVICK D Y. Overview of interleukin-18 more than an interleukin- γ inducing factor [J]. *Leukocyte Biol*, 1998 (63): 658-664.
- [3] TANAKA H, NARITA M, TERAMOTO S, et al. Role of interleukin 18 and T helper type 1 cytokines in the development of mycoplasma pneumoniae pneumonia in adults [J]. *Chest*, 2002, 121 (5): 1493-1497.
- [4] DINARELLO C A. Interleukin 18, a proinflammatory cytokine [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2000, 11 (3): 483-486.
- [5] YAMANAKA R, TSUCHIYA N, YAJIMA N, et al. Induction of an antitumor immunological response by an intratumoral injection of dendritic cells pulsed with genetically engineered semliki forest virus to produce interleukin-18 combined with the systemic administration of interleukin 12 [J]. *J Neurosurg*, 2003, 99 (4): 746-753.
- [6] OKAMOTO I, KOHNA K, TANIMOTO T, et al. IL-18 prevents the development of chronic graft versus host disease in mice [J]. *J Immunol*, 2000, 164 (11): 6067-6074.
- [7] MUNETA Y, SHIMOJI Y, YOKOMIZO Y, et al. Molecular cloning of porcine interleukin-1 beta converting enzyme and differential gene expression of IL-1 beta converting enzyme, IL-1 beta, and IL-18 in porcine alveolar macrophages [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, 19 (11): 1289-1296.
- [8] MUNETA Y, MORI Y, SHIMOJI Y, et al. Porcine interleukin-18: cloning, characterization of the cDNA and expression with the baculovirus system [J]. *Cytokine*, 2000, 12 (6): 566-572.
- [9] 景志忠, 奚永喜. 猪白细胞介素 18 基因的克隆及其序列分析 [J]. *中国兽医科技*, 2004, 34 (7): 3-7.
- [10] 郑敏, 金宁一, 张洪勇. 猪白细胞介素 18 成熟蛋白基因的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. *中国兽医学报*, 2003, 23 (5): 430-432.
- [11] MUNETA Y, ZHAO H K, INUMARU S, et al. Large-scale production of porcine mature interleukin-18 (IL-18) in silk worms using a hybrid baculovirus system [J]. *J Vet Med Sci*, 2003, 65: 219-223.

【责任编辑 柴 焰】