

# 鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*) IL-10 基因的克隆及表达分析\*

肖凡书<sup>1,2</sup> 昌鸣先<sup>2</sup> 孙 军<sup>3</sup> 肖调义<sup>1</sup> 聂 品<sup>2\*\*</sup>

1. 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128;

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

3. 暨南大学水生生物研究所, 广州 510632

**摘要** 白细胞介素 10(IL-10)是一种作用广泛的抗炎细胞因子, 主要功能是限制和最终终止炎症反应. 用 RACE (rapid amplification of cDNA ends)-PCR 方法扩增出鲢白细胞介素 10(IL-10)的 cDNA, 其全长为 1248 nt, 包含 5'非编码区 156 nt, 3'非编码区 552 nt, 开放阅读框 540 nt. 鲢 IL-10 的开放阅读框编码 179 个氨基酸, 其中包含构成两对二硫键的 4 个保守半胱氨酸. RT-PCR 结果显示鲢 IL-10 mRNA 主要在脾脏、鳃、头肾和肌肉中表达. 将鲢 IL-10 完整开放阅读框克隆到原核融合表达载体 pET-32a-c(+)上, 转入大肠杆菌 Rosetta-gami (DE<sub>3</sub>) 内进行表达, 经 SDS-PAGE 电泳后显示重组融合蛋白在分子量约 39 ku 处有明显表达带, 与预期分子量大小一致, 且主要以不可溶的包涵体形式存在. 变性条件下利用 His·Bind 树脂成功纯化了融合蛋白, 将其免疫家兔, 获得兔多克隆抗鲢 IL-10 抗体, Western blot 检测到兔多克隆抗鲢 IL-10 抗体可有效地与重组蛋白结合. 这些结果为进一步研究 IL-10 的功能奠定了基础.

**关键词** 鲢 IL-10 克隆 组织表达 原核表达

1989 年 Fiorentino 等<sup>[1]</sup>发现小鼠 T 辅助细胞株能分泌一种新的细胞因子, 该因子能有效抑制 Th1 细胞株细胞因子的合成, 故称为细胞因子合成抑制因子(CSIF), 后被命名为 IL-10. 在 EB 病毒基因组中也有一段开放阅读框与 IL-10 具有明显同源性, 被命名为 BCRF1 或 vIL-10<sup>[2]</sup>. IL-10 主要由肥大细胞、T 细胞、B 细胞、EB 病毒转化的 B 淋巴细胞和激活的角质细胞产生<sup>[3]</sup>. 它不仅可通过抑制 Th1 细胞增殖和 IL-2, 干扰素- $\gamma$ , 淋巴毒素等细胞因子的产生来抑制免疫应答, 还可作为与 IL-3 和 IL-4 的协同因子刺激未成熟肥大细胞的增殖, 具有 B 细胞活化增殖和分化效应<sup>[4]</sup>.

IL-10 是一分子质量为 35—40 ku 的单链糖蛋

白, 其 cDNA 已在哺乳动物及病毒中克隆成功<sup>[5-7]</sup>. 近来在鲤(*Cyprinus carpio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)等鱼类中也成功地得以克隆<sup>[8-10]</sup>. 鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)是一种滤食性鱼类, 是世界淡水鱼产量的重要组成部分<sup>[11]</sup>, 它还在藻类水华控制方面起着重要作用<sup>[12]</sup>. 本研究对鲢 IL-10 的全长 cDNA 进行了克隆及序列分析, 通过 RT-PCR 分析了其在正常鲢组织中的表达情况, 并将 IL-10 在大肠杆菌中进行了高效表达, 通过免疫家兔获得了多克隆抗体, 为了解 IL-10 基因的功能及其在机体内的免疫机制奠定了基础.

2005-07-08 收稿, 2005-08-25 收修改稿

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30130150)

\*\* 通讯作者, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

宿主菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DE<sub>3</sub> 和 DH5 $\alpha$ , 表达载体为 pET-32a-c (+) (以下简称 pET-32 a), 均由本实验室保存; T4 DNA 连接酶、ExTaq DNA 聚合酶、DL2000 分子质量标准 and SDS-PAGE 低分子量标准蛋白均购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶购自 Promega 公司; RNA 提取试剂盒购自 Sigma 公司; His · Bind 树脂购自 Novagen 公司; 胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 质粒小量提取试剂盒和质粒纯化试剂盒为 SbS 公司产品.

### 1.2 总 RNA 的提取

实验鲢(约 450 g)购自华中农业大学水产站, 取头肾约 0.1 g, 按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA.

### 1.3 RACE-PCR 扩增 IL-10 cDNA

cDNA 的合成按 SMART cDNA Synthesis Kit (Clontech)操作手册进行, 将所提鲢头肾总 RNA 反转录为 cDNA 第一链. 据鲢、虹鳟和红鳍东方鲀 IL-10 的保守序列, 设计鲢 IL-10 的正、反向简并引物 IL-10-F1 和 IL-10-R1(表 1)扩增鲢 IL-10 cDNA 的中间片段, PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 后接 35 个循环(94 $^{\circ}$ C 30 s, 49 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min. 使用 Primer Premier 5.00 软件

表 1 鲢 IL-10 扩增引物及表达所用引物

引物	核苷酸序列(5'-3')
IL-10-F1	C(TA)G(CT)G(CA)G(CA)(CT)TGAAG(AG)(AT)GCTC
IL-10-R1	(GCAT)(GA)TC(AC)AGCTC(TC)CCCATG-GCTTT
IL-10-F2	AGCGGGATATGGTCAAATGTAGG
IL-10-R2	CAGCTGTTGGCAGAATGGTCTCC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGC
IL-10-ExpF	ATTTGTGGAGGGCTTTCTCTGTG
IL-10-ExpR	TCTTTGATGCCAGATACTGTTC
ActinF	CCTTCTGGGTATGGAGTCTTG
ActinR	AGAGTATTTACGCTCAGGTGGG
IL-10-F	AGGGGTACCAGAATGATTTTCTCTAGAGTC
IL-10-R	AGGAAGCTTTTAGTGCTTTTCTCTCTTT-GATGCC

设计鲢 IL-10 的特异引物 IL-10-F2 和 IL-10-R2, 分别用引物对 IL-10-F2 与 UPM(Universal Primer Mix), IL-10-R2 与 UPM 扩增鲢 IL-10 的 5' 和 3' 端序列. PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 后接 35 个循环(94 $^{\circ}$ C 30 s, 61 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min. PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶回收试剂盒对目的片段进行纯化, 纯化产物与 pMD-18T 载体连接, 转化于大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 将经 PCR 检测为阳性克隆测序(上海华诺生物科技有限公司完成).

### 1.4 序列分析

将测序所得到的 cDNA 序列用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)的 BLASTN, BLASTX 和 TBLASTX 软件进行同源基因的搜索, 查找与其相关的同源序列; 氨基酸序列的推断通过 ExpASy 网站(<http://au.expasy.org/>)的 Translate 程序完成; 氨基酸序列同源性比较由 ClustalW1.8 程序完成; 信号肽预测使用 SignalP 3.0 软件.

### 1.5 RT-PCR 分析

实验用 3 尾鲢(体重(80 $\pm$ 2.5)g)同时取自中国科学院水生生物研究所关桥渔场, 驯养一周后分别取其肝脏、脑、脾脏、鳃、脊髓、头肾、肠、心脏和肌肉, 提取各组织总 RNA. 使用 RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)并按其说明书进行逆转录合成 cDNA. 根据鲢 IL-10 保守序列设计表达引物 IL-10ExpF 和 IL-10ExpR, 内参  $\beta$ -actin 的引物为 ActinF 和 ActinR(表 1), 分别用这两对引物进行 PCR 扩增. 50  $\mu$ L 反应体系程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 后接 25—45 个循环(94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min. 为避免扩增达平台期, 分别用琼脂糖凝胶电泳检测 25, 30, 35, 40 及 45 个循环的扩增产物, 最后展示第 35 个循环的扩增结果.

### 1.6 原核表达载体的构建及质粒重组

用引物 IL-10-F 和 IL-10-R(表 1)扩增已获得的 IL-10cDNA 序列上的完整开放阅读框. 上游引物含有 *Kpn* I 酶切位点(GGTACC)和起始密码子(ATG), 下游引物含 *Hind* III 酶切位点

(AAGCTT)及终止密码子(TAA). PCR反应条件为: 94℃预变性3 min; 后接33个循环, 每个循环依次包含94℃ 30 s, 62℃ 45 s, 72℃ 60 s; 最后于72℃延伸5 min. 同时用质粒小量提取试剂盒提取pET-32a质粒, 用*Kpn* I和*Hind* III双酶切IL-10和pET-32a表达载体并进行纯化, 而后连接并转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 将PCR鉴定阳性菌落pET-32a-IL-10测序检测基因有无移码或突变.

### 1.7 重组质粒的诱导表达及SDS-PAGE鉴定

从大肠杆菌中提取重组pET-32a-IL-10质粒, 将重组质粒转化到DE<sub>3</sub>感受态细胞, PCR鉴定阳性菌落, 菌液按1:100稀释于新鲜含氨苄青霉素100  $\mu$ g/mL, 卡那霉素15  $\mu$ g/mL, 四环素12.5  $\mu$ g/mL, 氯霉素34  $\mu$ g/mL LB培养液, 37℃培养至OD<sub>600</sub>  $\approx$  0.6时, 加异丙基硫代 $\beta$ -半乳糖苷(IPTG)至终浓度为1 mmol/L, 再在37℃与25℃分别诱导2, 4, 6和8 h, 经PBS洗涤后超声破碎菌体, 离心收集上清和包涵体沉淀, 用12% SDS-PAGE鉴定分析重组蛋白在不同诱导时间段的表达量.

### 1.8 兔多克隆抗体的制备

将400 mL重组菌液在37℃条件下诱导4 h, 经超声波破碎后, 离心收集包涵体沉淀并在变性条件下用His·Bind树脂进行纯化, 步骤详见His·Tag融合蛋白纯化操作手册. 用所纯化的蛋白对家兔进行如下免疫: 初次免疫用300  $\mu$ L(约1  $\mu$ g/ $\mu$ L)样品多点注射兔淋巴结和脚掌; 2周后加强免疫一次, 150  $\mu$ L样品于背部皮下、脚掌多点注射家兔; 2周后再加强免疫一次. 第三次注射11 d后, 自颈动脉取血, 将血清分离后于-80℃保存.

### 1.9 Western blot

将诱导表达后的重组蛋白按常规方法转印至硝酸纤维素膜(NC膜)上, 封闭1 h后加入兔抗鲢IL-10的多克隆抗体于室温下孵育2 h; 然后加入碱性磷酸酶耦联的山羊抗兔IgG, 室温下孵育1 h, NBT/BCIP显色10 min.

## 2 结果

鲢IL-10的全长cDNA(GenBank登录号:

DQ058295)由1248 nt组成, 其编码区有540 nt, 推导编码179个氨基酸, 预测分子质量为19.69 ku. 5'非编码区长156 nt, 3'非编码区长552 nt, 在3'非编码区存在4个mRNA不稳定信号ATTTA和1个mRNA的加尾信号AATAAA(图1). 鲢IL-10含6个 $\alpha$ 螺旋, 且在相对较保守的F螺旋中的第153-169个氨基酸处(GVYKAMGELDMLFKYIE), 含有IL-10家族的特征序列(G-X2-KA-X2-[D, E]-X-D-[ILV]-[FLY]-[FILMV]-X2-[ILMV][EK-QR])[<sup>13</sup>]. 此外, 在第1-22个氨基酸处, 存在一个信号肽(MIFSRVIFSALVMLLLSESAQC); 在第31, 80, 127和133个氨基酸处, 含有4个构成两对二硫键(Cys-31与Cys 127, Cys80与Cys 133)的保守半胱氨酸.

鲢IL-10的组织表达如图3所示, 鲢IL-10主要在脾脏、鳃、头肾、肌肉中表达, 脑、心脏和肠中也有少量表达, 而在肝脏和脊髓中几乎没有表达.

重组质粒pET-32a-IL-10测序结果表明IL-10的基因序列和读码框都与预期的完全一致. 将重组质粒转入大肠杆菌DE<sub>3</sub>感受态细胞内经IPTG诱导后, SDS-PAGE结果表明: 未诱导前重组蛋白仅有微弱表达, 诱导后则大量表达; 37℃条件下诱导时, 目的蛋白基本上是以不可溶的包涵体存在, 而在25℃诱导同样长的时间, 可溶蛋白量并无明显增长, 包涵体中目的蛋白量则明显低于在37℃条件下诱导的量; 37℃条件下诱导2 h后的菌液中目的蛋白量明显少于诱导4, 6和8 h后的量, 但诱导4 h之后表达量便无明显增长; 明显的蛋白特征带出现在39 ku处, 与理论估计的相对分子量相符. 通过计算机软件分析, 融合蛋白的理论等电点为8.61. 将包涵体溶于6 mmol/L尿素结合缓冲液, 利用其载体上含His·Tag融合标签的特性进行纯化, 得单一的目的蛋白电泳图带(图4). 用制备的兔抗鲢重组IL-10多克隆抗体对表达产物及未转染重组质粒的宿主菌进行免疫印迹实验, 结果显示表达产物在目的蛋白处有一条较粗的蛋白印迹带, 未诱导及重组菌超声波后上清中有较淡条带(图5).



						<u>A</u>
Carp	1	MVFSGVILS-ALVMFLLSDSAQCRRVDCKTD	E	CSFVEGFPVRLKELRSAYREIQNFYESN		
Silver carp	1	MFSRVIFS-ALVMLLLSESAQCRRVDCKSE	E	CSFVEGFPVRLKELRSAYREIQRFYESN		
Rainbow	1	MSPCSLLSLLLAALQCEHAQCRRVPCSDR	E	CSFVEGFPVRLKELRTAFSTIRDYEAN		
Torafugu	1	MTPGSLLS---VLLLLCCACTVWCAALCNR	E	CSFVEGFPARLKMLRENYSQIRDYEAN		
Chicken	1	-----MQTCCQALLLLAACTLPAHCLEPT	E	LHFSELLPARLRELRVKFEEIKDYFQSR		
Human	1	--MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSEN	E	THFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMK		
consensus	1	. . . . .	E	* . . . . * . . . . *		
		<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	
Carp	60	D-DMEP-LLDENVQONINSPYGG	H	HVMNEILRFYLDTILPTAVQKDHLS---	KTPINSIG	
Silver carp	60	D-DLEP-LLNENVQONINSPYGG	H	HVMNEILRFYLETILPTAVQKNLHP---	KTPIDSIG	
Rainbow	61	D-ELETSLLDEGILHHLKSPVGG	H	HAMDSILKFYLDTVLPTAMNNRTQNND	FKSPIDSIG	
Torafugu	58	D-DLDIVLLDQSI VDTFKTPFAG	H	HLMDGILRFYLD SVLPRALATVTAETR	NLKP HVESIQ	
Chicken	55	DDELNIQLLSSELLDEFKGTFG	Q	QSVSEMLRFYTDEVLPRAMQTSTSHQ---	Q-SMGDLG	
Human	59	D-QLDNLLKESLLEDFKGYLGG	Q	QALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIK---	A-HVNSLG	
consensus	61	* . . . * . . . . .	Q	* . . . * . . . . .	. . . . .	
		<u>D</u>		<u>E</u>	<u>F</u>	
Carp	115	NIFQDLKRDMRKERNYFS	K	QNP-LEIASIKNSYEKMKEK	GVSKAMGELDILFKYIEOYLA	
Silver carp	115	SIFQDLKRDMVKERKYFS	K	KNP-FEFATIKNSYEKMKEK	GVYKAMGELDMLFKYIEOYLA	
Rainbow	120	NIFHELKKEIVQERNYFS	K	KKP-FDINEFISSYEKMQDKGLYKAMGELD	LLFN YIEEYLV	
Torafugu	117	QIFDQLKIEVTNCKHYFA	K	KNR-FDINVLNSTYTKMEDKGLYKAMGELD	LLFN YIENYLA	
Chicken	111	NMLLGLKATMRRCHRF	T	CEKRSKAIKQIKETFEKMDENGIYKAMGE	FDIFIN YIEEYLL	
Human	114	ENLKTLLRLRLRRCLRFL	P	ENKSKAVEQVKNAFNKLOEKGIYKAMSE	FDIFIN YIEAYMT	
consensus	121	. . . * . . . . .	P	. . . . .	* . . . * . . . . .	
		<u>F</u>				
Carp	174	SKRVKHL-				
Silver carp	174	SKREKH--				
Rainbow	179	SKRRKH--				
Torafugu	176	SKRRRNVA				
Chicken	171	MRRRK---				
Human	174	MKIRN---				
consensus	181	. . . . .				

图2 鲢IL-10与其他动物IL-10氨基酸序列同源性比较

相同氨基酸用“\*”指示,相似的氨基酸用“.”指示,保守区域用方框表示,推导的6个α螺旋(A-F)用上划线表示,4个构成二硫桥的半胱氨酸以黑色背景显示,图中比较序列的GenBank登录号为: Carp BAC76885; Silver carp DQ058295; Rainbow trout BAD20648; Torafugu CAD62446; Chiken CAF18432; Human CAG46825

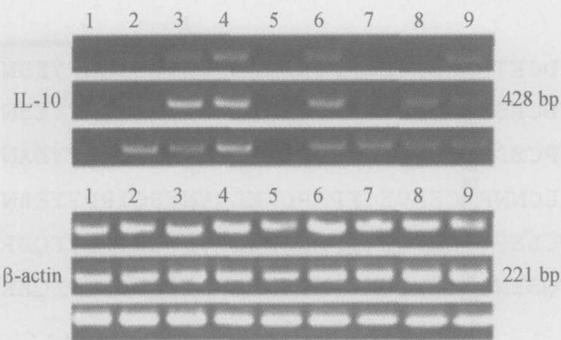


图3 RT-PCR检测鲑IL-10组织表达结果

1—9依次为肝脏、脑、脾脏、鳃、脊髓、头肾、肠、心脏、肌肉

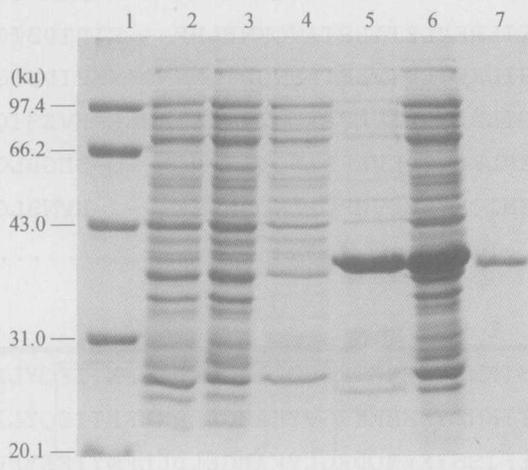


图4 pET-32a-IL-10表达产物的SDS-PAGE分析

1. 分子质量标准; 2. 大肠杆菌 pET-32a(DE3) 菌体总蛋白; 3. 未诱导的 pET-32a-IL-10(DE3) 菌体总蛋白; 4 和 5. 诱导 4 h 的 pET-32a-IL-10(DE3) 菌体总蛋白上清和沉淀; 6. 诱导 4 h 的 pET-32a-IL-10(DE3) 菌体总蛋白; 7. 纯化蛋白

人 IL-10 结构中形成两对二硫键, 如破坏了这两对二硫键, 则人 IL-10 活性丧失<sup>[14]</sup>, 因此这 4 个 Cys 对 IL-10 空间结构的形成和功能起决定性作用. 在低等脊椎动物鲑以及其他 3 种鱼类的 IL-10 中也同样存在相应的残基, 说明由这 4 个 Cys 所形成的二硫键在 IL-10 的分子进化中具有普遍重要的意义. 在人和鸡的成熟肽链中只有构成两对二硫键的 4 个半胱氨酸, 而在 4 种鱼类成熟肽链 N 末端都另外存在着两个半胱氨酸, 这两个半胱氨酸是否构成二硫键值得深入探讨.

对鱼类 IL-10 的组织表达已有报道. Inoue 等<sup>[10]</sup>报道在虹鳟中 IL-10 在鳃中表达最强, 在头肾、脾脏和肠中有较弱的表达; Zou 等<sup>[8]</sup>研究表明

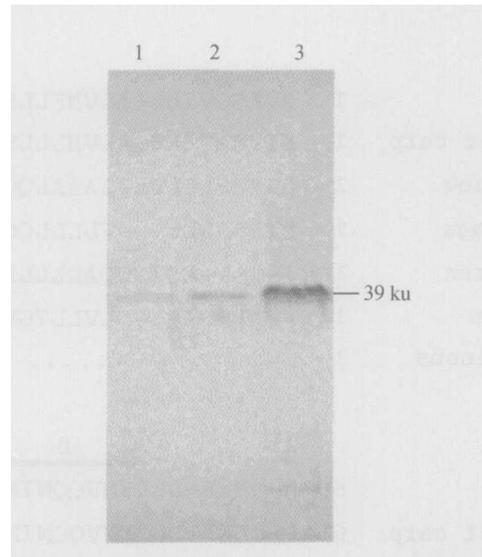


图5 pET-32a-IL-10 表达产物的免疫印迹

1 和 3. 诱导 4 h 的 pET-32a-IL-10(DE3) 菌体总蛋白上清和沉淀; 2. 未诱导的 pET-32a-IL-10(DE3) 菌体总蛋白

在河豚中 IL-10 在肝脏和肾脏中有明显表达, 在肠和脊髓中表达较弱; 在鲤中, IL-10 在头肾和肠中大量表达, 其次是在鳃和脾脏中<sup>[9]</sup>; 在鲑中, IL-10 除了在脊髓中没有检测到表达外, 在所检测的其他组织中均有不同程度的表达. IL-10 在不同鱼类的不同组织中表达差异可能与起始模板量以及循环数的差异有关. 此外, 无论是在鲑, 还是在已经报道的 3 种鱼类 IL-10 组织表达的研究中可以看出, IL-10 在大多数组织中的组成性表达量是很低的, 这与人 IL-10 组成性表达的结果一致<sup>[15]</sup>.

我们在构建原核表达载体的研究中选用了功能强大的 pET-32a 作为表达载体. 由于鱼类 IL-10 的重组表达未见报道, 为获得最佳表达量, 该研究摸索了 IPTG 诱导的时间及培养温度对 IL-10 表达的影响. 鲑 IL-10 无论是在高温还是在低温主要以不溶的包涵体形式存在, 在 37°C 条件下鲑 IL-10 重组蛋白的表达量在 4 h 后已趋饱和, 这些研究结果为表达其他鱼类的 IL-10 以及研究鲑 IL-10 的功能奠定了基础.

Western blot 分析结果表明在未诱导菌及诱导菌超声波破碎后的上清中有较淡的单一一条带, 诱导菌超声波破碎后的沉淀中有较深条带, 这和 SDS-PAGE 结果中目的蛋白主要以不溶的包涵体形式存在是一致的, 这也充分说明了兔多克隆抗体能有效

识别重组蛋白。

### 参 考 文 献

- 1 Fiorentino D F, Bond M W, Mosmann T R. Two types of mouse T helper cell IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 1989, 170(6): 2081—2095
- 2 Hsu D H, de Waal-Malefyt R, Fiorentino D F, et al. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science*, 1990, 250(4982): 830—832
- 3 Spits H, de Waal-Malefyt R. Functional characterization of human IL-10. *Int Arch Allergy Immunol*, 1992, 99(1): 8—15
- 4 Mosmann T R. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol*, 1994, 56: 1—26
- 5 Sergei V K, Simona S, Lara S I, et al. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1695—1700
- 6 Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang M N, et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: Homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(4): 1172—1176
- 7 Perkins H D, van Leeuwen B H, Hardy C M, et al. The complete cDNA sequences of IL-2, IL-4, IL-6 and IL-10 from the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Cytokine*, 2000, 12(6): 555—565
- 8 Zou J, Clark M S, Secombes C J. Characterization, expression and promoter analysis of an interleukin 10 homologue in the puffer fish, *Fugu rubripes*. *Immunogenetics*, 2003, 55(5): 325—335
- 9 Savan R, Igawa D, Sakai M. Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Eur J Biochem*, 2003, 270(23): 4647—4654
- 10 Inoue Y, Kamota S, Ito K, et al. Molecular cloning and expression analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-10 cDNAs. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 18(4): 335—344
- 11 Opuszynski K, Shireman J V. *Herbivorous Fisher-Culture and Use for Weed Management*. Boca Raton Ann Arbor London Tokyo: CRC Press, 1995
- 12 谢 平. 鲢、鳙与藻类水华控制. 北京: 科学出版社, 2003
- 13 Huang J Y, Brutlag D L. The EMOTIF database. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(1): 202—204
- 14 Windsor W T, Syto R, Tsarbopoulos A, et al. Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. *Biochemistry*, 1993, 32(34): 8807—8815
- 15 Kube D, Platzer C, von Knethen A, et al. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine*, 1995, 7(1): 1—7