

谷笑笑,王振华,潘康成,等. 藏猪 $\beta$ -防御素2基因克隆及原核表达载体的构建[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 848-853.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.019

## 藏猪 $\beta$ -防御素2基因克隆及原核表达载体的构建

谷笑笑<sup>1</sup>, 王振华<sup>2</sup>, 潘康成<sup>1</sup>, 张立平<sup>3</sup>, 周尧<sup>3</sup>

(1.四川农业大学动物医学院动物微生态研究中心,四川 成都 611130; 2.成都农业科技职业学院,四川 成都 611130; 3.绵阳泰科生物技术有限公司,四川 绵阳 621000)

**摘要:** 为了构建藏猪 $\beta$ -防御素2(pBD-2)成熟肽原核表达载体,从藏猪肝组织中提取总RNA,通过RT-PCR获取pBD-2目的基因,并与pMD19-T载体连接构建重组质粒,命名为pMD19T-pBD-2;以pMD19T-pBD-2质粒为模板,克隆pBD-2成熟肽cDNA序列并构建成熟肽pET-32a-pBD-2表达质粒。结果显示,藏猪pBD-2基因全长为298 bp,与野猪和家猪的pBD-2基因同源性分别达100.0%和98.9%;藏猪pBD-2基因具有1个完整的开放阅读框,编码69个氨基酸组成的多肽,包含21个氨基酸残基的信号肽、11个氨基酸残基的前导肽和37个氨基酸残基的成熟肽;编码的pBD-2成熟肽稳定性较好,分子量4 085.78,等电点8.89,具有6个半胱氨酸(Cys)残基,7个带正电荷和2个带负电荷的氨基酸残基,为亲脂性和亲水性多肽;从pMD19T-pBD-2质粒中亚克隆得到长度为114 bp藏猪pBD-2成熟肽cDNA序列,菌落PCR、酶切和测序鉴定证明成功构建了成熟肽pET-32a-pBD-2原核表达质粒。

**关键词:** 藏猪;  $\beta$ -防御素2; 克隆; 原核表达载体

**中图分类号:** S858.28 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)04-0848-06

## Cloning and construction of prokaryotic expression vector of porcine $\beta$ -defensin-2 gene of Tibetan swine

GU Xiao-xiao<sup>1</sup>, WANG Zhen-hua<sup>2</sup>, PAN Kang-cheng<sup>1</sup>, ZHANG Li-ping<sup>3</sup>, ZHOU Yao<sup>3</sup>

(1. Animal Microecology Institute, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Chengdu Agricultural College, Chengdu 611130, China; 3. Mianyang Taike Biotechnology Co. Ltd., Mianyang 621000, China)

**Abstract:** To construct the prokaryotic expression vector of porcine  $\beta$ -defensin-2 (pBD-2) mature peptide of Tibetan pig, the pBD-2 gene amplified by RT-PCR was cloned into pMD19-T vector to construct pMD19T-pBD-2 plasmid which was used as a template to amplify pBD-2 mature peptide fragment. The Tibetan pig pBD-2 gene was 298 bp in length, and shared sequence similarities of 98.8% and 100.0% with domestic pigs and wild boars respectively. The pBD-2 gene has a complete open reading frame encoding a 69-amino-acid polypeptide which contains a signal peptide consisting of 21 amino acid residues, a leader peptide consisting of 11 amino acid residues and a mature peptide consisting of 37 amino acid residues. The stable pBD-2 mature peptide is 4 085.78 in molecular weight, with isoelectric point of 8.89, and is a lipophilic and hydrophilic polypeptide containing six cysteine residues, seven positively charged amino acid residues and two negatively charged amino acid residues. A 114-bp Tibetan pig pBD-2 mature peptide cDNA sequence was subcloned from pMD19T-pBD-2 plasmid. Colony PCR, enzymatic digestion and sequencing verified the successful construction of prokaryotic expression vector pET-32a-pBD-2.

**Key words:** Tibetan swine;  $\beta$ -defensin-2; cloning; prokaryotic expression vector

收稿日期:2017-03-02

基金项目:四川省高等学校科技创新团队资助项目(KM406183.1);  
四川农业大学学科双支计划项目(03570434)

作者简介:谷笑笑(1994-),女,河北武邑人,硕士研究生,主要从事动物微生物生态学研究。

通讯作者:潘康成, (E-mail) pankangcheng71@126.com

随着细菌和真菌耐药性的不断增强,人们对内源性的抗微生物肽越来越重视,试图将抗菌肽作为普通

抗生素的替代品<sup>[1-3]</sup>。防御素属于抗菌肽家族中的一员,广泛存在于动植物体内,抗菌谱广,具有抑制或杀灭细菌、真菌和被膜病毒等多种病原微生物的能力,能够参与机体免疫系统的调节,在机体抗感染过程中扮演重要角色<sup>[4-8]</sup>;此外,防御素还可作为生长促进剂添加到饲料中,改善动物生产性能<sup>[9-11]</sup>。根据氨基酸序列和结构的不同,可将动物防御素分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\theta$ 三类,其中, $\beta$ -防御素是一种富含半胱氨酸(Cys)的阳离子多肽,一般含38~42个氨基酸残基,主要由动物的上皮组织产生,是动物黏膜组织抵御病原微生物的第一道天然屏障<sup>[12-13]</sup>。pBD-2是猪源抗菌肽中较重要的一种防御素,广泛分布于猪的皮肤、胃肠道、呼吸道、肝脏、脾脏等器官中<sup>[14-16]</sup>,pBD-2成熟肽由37个氨基酸残基组成,含6个Cys残基,分子量小,活性稳定,但是由于其在体内表达量低,提取或化学合成成本较高,所以利用基因工程技术生产pBD-2是最有效的途径<sup>[17]</sup>。目前大量的研究表明,通过人工合成的pBD-2成熟肽,其cDNA序列可在大肠杆菌或酵母中表达<sup>[11,17-21]</sup>。

藏猪是高原、高寒放牧的小型猪种,具有抗病力强、耐粗饲等特点<sup>[22]</sup>。目前对藏猪的研究主要集中在生长发育、繁殖和对藏猪抗病能力有关基因的研究,如IL-2基因的克隆表达,pBD-1、抗菌肽pR-39、肝杀菌肽等有关基因在组织中的表达<sup>[23-25]</sup>,而对pBD-2基因的克隆与表达尚未见报道。因此,本研究拟从藏猪肝组织逆转录获取pBD-2基因,并对该基因进行序列分析,从而获取成熟肽cDNA序列,构建原核表达载体,以期研究其表达、生物活性及其在疾病、免疫中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验猪肝组织 藏猪肝脏采自四川农业大学雅安校区养殖场(引种于四川省甘孜州),猪屠宰后,立即取猪肝脏放入液氮中保存。

1.1.2 质粒与菌株 克隆载体pMD19-T和表达载体pET-32a,购自宝生物工程(大连)有限公司,大肠杆菌DH5 $\alpha$ 和BL21(DE23)由四川农业大学动物医学院动物微生态研究中心提供。

1.1.3 酶和试剂 柱式小量质粒提取试剂盒、RNA抽提试剂盒和DNA胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司,2 $\times$ Taq Master Mix、Prime

Script RT-PCR Kit和T4 DNA连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 PCR引物设计及合成 根据NCBI报道的野猪pBD-2基因序列(登录号:AY506573.1、NM\_214442.2)和合成的pBD-2基因序列(登录号KF671230.1),利用计算机软件DNASTAR进行基因序列分析,在编码区外侧的保守序列设计1对扩增引物,上游引物(Primer 1)为5'-CCTCTCCTTCGCGGCAT-3',下游引物(Primer 2)为5'-CTTCACCTGGCCTGTGTGTC-3'。获得扩增并测序的pBD-2基因序列,经软件分析预测其成熟肽,并设计1对扩增成熟肽cDNA序列的引物Primer 3和Primer 4,分别为5'-CGCGGATCCGACCACTACATATGTGCCAA-3'(下划线表示Bam H I酶切位点)和5'-CCCAAGCTTTCAGCGGATGCAGCACTTGG-3'(下划线表示Hind III酶切位点)。引物由大连宝生物工程(大连)公司合成。

1.2.2 藏猪肝组织总RNA的提取 取约100 mg液氮保存的藏猪肝组织,加液氮研磨至粉末,转至1.5 ml洁净的离心管中,加入450  $\mu$ L Buffer Rlysis-AG,参照RNA抽提试剂盒说明书进行,总RNA提取液于1%琼脂糖电泳验证。

1.2.3 藏猪pBD-2基因序列的RT-PCR扩增 RT-PCR反应体系(20  $\mu$ l):总RNA溶液5  $\mu$ l,引物(20  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ l,5 $\times$ cDNA合成缓冲液4  $\mu$ l,dNTP混合物(各10 mmol/L)1  $\mu$ l,RNase-free水7  $\mu$ l,RTase(15 U/ $\mu$ l)2  $\mu$ l。在反转录管中75  $^{\circ}$ C变性8 min,冰浴5 min后进行RT-PCR反应,42  $^{\circ}$ C 45 min,95  $^{\circ}$ C 5 min,合成cDNA。pBD-2基因扩增反应体系(20  $\mu$ l):cDNA溶液2  $\mu$ l,Primer 1(20  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ l,Primer 2(20  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ l,2 $\times$ Taq PCR Master Mix 10  $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l。PCR反应:94  $^{\circ}$ C 3 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 45 s,72  $^{\circ}$ C 40 s,共35个循环,72  $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.4 pMD19T-pBD-2重组质粒的构建 RT-PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测正确后,使用试剂盒回收,回收产物与pMD19-T载体连接,连接产物转化E.coli DH5 $\alpha$ 感受态细胞,涂布于LB琼脂平板(含100  $\mu$ g/ml Amp)上,37  $^{\circ}$ C有氧培养24 h。选取白色单菌落接种于LB液体培养液(含100  $\mu$ g/ml Amp)中,37  $^{\circ}$ C 160 r/min培养过夜。取5  $\mu$ l菌液加入到95  $\mu$ l去离子水中,沸水浴10 min,进行菌落

PCR 鉴定。提取阳性转化子的重组质粒,并送往英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。将正确的阳性质粒命名为 pMD19T-*pBD-2*,并对 *pBD-2* 基因进行生物信息学分析。

**1.2.5 藏猪 *pBD-2* 成熟肽 cDNA 序列扩增、纯化及酶切鉴定** 以 pMD19T-*pBD-2* 质粒为模板,采用 Primer 3 和 Primer 4 为引物扩增 *pBD-2* 成熟肽 cDNA 序列。*pBD-2* 基因扩增反应体系: pMD19T-*pBD-2*溶液 1  $\mu$ l, Primer 3 (20  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l, Primer 4 (20  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l, 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 10  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ l, 总体积 20  $\mu$ l。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 64  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经琼脂凝胶电泳检测正确后,用试剂盒纯化回收,回收产物用 *Bam*H I、*Hind* III 在 37  $^{\circ}$ C 双酶切 2 h。*pBD-2* 基因双酶切反应体系: 回收产物 43  $\mu$ l, *Bam* H I (8~20 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, *Hind* III (2~10 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 10 $\times$ 酶切缓冲液 5  $\mu$ l, 总体积 50  $\mu$ l。经琼脂糖凝胶电泳检测并回收。

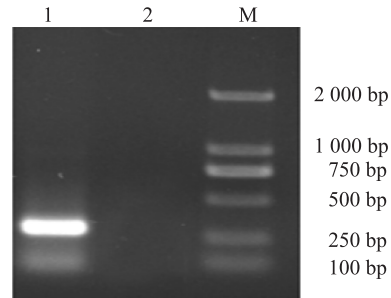
**1.2.6 原核表达载体 pET-32a-*pBD-2* 的构建及鉴定** 扩大培养含 pET-32a 质粒的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  后,用试剂盒提取 pET-32a 质粒,琼脂糖凝胶电泳检测并回收空载质粒。pET-32a 质粒 37  $^{\circ}$ C 水浴双酶切 3 h(酶切体系同方法 1.2.5),酶切反应液经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后, DNA 试剂盒回收。将双酶切产物进行 16  $^{\circ}$ C 连接过夜。连接体系: 双酶切回收产物 12  $\mu$ l, 双酶切 pET-32a 质粒 4  $\mu$ l, T4 连接酶 (350 U/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l, 10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ l, 总体积 20  $\mu$ l。连接产物转化至 *E. coli* BL21(DE23) 感受态细胞,涂布于 LB 琼脂平板(含 50  $\mu$ g/ml Amp), 37  $^{\circ}$ C 有氧培养 24 h。挑取单菌落接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中,于 37  $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡 18 h。提取质粒进行 PCR 鉴定及 *Bam* H I、*Hind* III 双酶切鉴定,鉴定正确的阳性转化子菌液送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序鉴定。

## 2 结果

### 2.1 藏猪 pMD19-T-*pBD-2* 质粒的构建

根据已发表的猪 *pBD-2* 基因序列设计引物进行 RT-PCR 扩增,获得的产物大小约为 300 bp(图 1)。将琼脂糖凝胶中的目标条带纯化回收,回收产物与克隆载体 pMD19-T 进行连接,构建 pMD19T-*pBD-2* 质粒。经抗性平板筛选和 PCR 鉴定,挑取的 8 个单菌落均能扩增得到与目的基因大小一致的 DNA 片

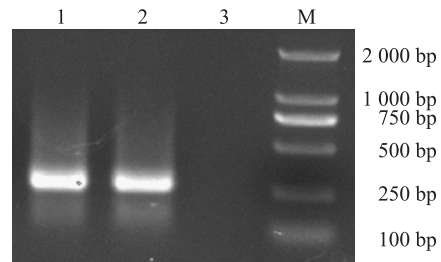
段,其中 2 个目的条带明显(图 2),说明 RT-PCR 获得的藏猪 *pBD-2* 基因与 pMD19-T 载体连接成功。



M: DL2000 DNA marker; 1: PCR 产物; 2: 阴性对照。

图 1 RT-PCR 扩增藏猪 *pBD-2* 基因全长序列

Fig.1 Amplification of Tibetan swine *pBD-2* gene full length sequence



M: DL2000 marker; 1、2: 阳性菌株; 3: 阴性对照。

图 2 pMD19-T-*pBD-2* 质粒的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of recombinant plasmid pMD19-T-*pBD-2*

### 2.2 藏猪 *pBD-2* 基因的序列分析

将 PCR 鉴定结果阳性的菌株送到英潍捷基公司进行测序,测序结果表明克隆得到的藏猪 *pBD-2* 基因序列长度为 298 bp(图 3)。将基因序列在 NCBI 核酸数据库中进行 BLAST 比对,结果显示,获得的 *pBD-2* 基因与 GenBank 中野猪 *pBD-2* 序列 (AY506573.1、NM\_214442.2) 的同源性为 100%。同时也与赵炎葱<sup>[26]</sup>报道的家猪 *pBD-2* 基因序列进行比较,同源性也高达 98.9%。

### 2.3 藏猪 *pBD-2* 基因编码区及编码的氨基酸序列分析

将测序获得的藏猪 *pBD-2* 基因序列在 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> 上在线分析,结果显示,该基因具有一个完整的开放阅读框 (ORF), 长度为 210 bp, 共编码由 69 个氨基酸组成的多肽(图 3)。将 *pBD-2* 基因编码区序列在 MEGA5.1 软件上进行蛋白质编码核苷酸序列分析,采用 NJ 法构建系

```

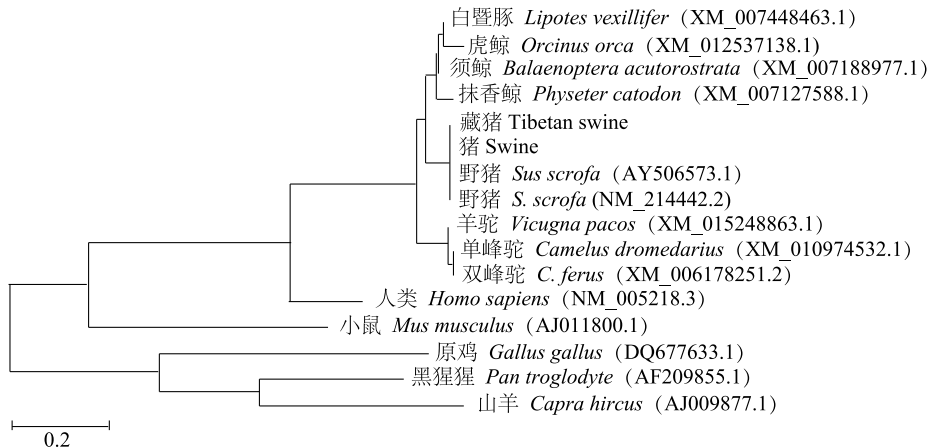
1 CCTCTCCTTCCCTGGGCATCCGGCCACCACCTGCCGCCGCCATGAGGGCCCTCTGCTTGC
                                     M R A L C L
61 TGCTGCTGACTGTCTGCCTCCTCTCTTCCAGCTGGCTGCAGGTATTAACCTGCTTACGG
   L L L T V C L L S S Q L A A G I N L L T
121 GTCTTGGCCAGAGGTCCGACCACTACATATGTGCCAAGAAAGGGGGACCTGCAACTTCT
   G L G Q R S D H Y I C A K K G G T C N F
181 CCCCCTGCCCGCTCTTCAACAGGATTGAAGGGACCTGTTACAGTGGCAAGGCCAAGTGCT
   S P C P L F N R I E G T C Y S G K A K C
241 GCATCCGCTGACCCCTGAGCCAGAAGCCACAGCAGAGGGGACACACAGGCCAAGTGAAG
   C I R *

```

图 3 藏猪 *pBD-2* 基因序列和开放阅读框Fig.3 Sequence and open reading frame of Tibetan swine *pBD-2* gene

统发育树(图 4)。结果显示,藏猪 *pBD-2* 基因编码区与野猪 (AY506573.1、NM\_214442.2) 和赵炎葱<sup>[26]</sup>报道的猪 *pBD-2* 基因编码区序列同源性均为 100%,与须鲸、白暨豚、抹香鲸、虎鲸、羊驼、单峰驼和双峰驼的同源性也较高,达到 88%~92%,与现代智人的同源性仅为 71%。说明藏猪 *pBD-2* 编码区序列与野猪和家猪具有高度的同源性和保守性。将推导的氨基酸序列提交到 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 在线分析,结果显示,ORF 区编码 69 个氨基酸的 *pBD-2* 前原肽中包含 N 端 21 个氨基

酸残基的信号肽、11 个氨基酸残基的前导肽和 C 端 37 个氨基酸残基的成熟肽。在 <http://web.expasy.org/protparam/> 中分析预测的 *pBD-2* 成熟肽氨基酸残基序列,发现 *pBD-2* 成熟肽具有 6 个 Cys 残基,7 个带正电荷的氨基酸残基(1 个组氨酸 H,2 个精氨酸 R,4 个赖氨酸 K)和 2 个带负电荷的氨基酸残基(1 个天冬氨酸 D,1 个谷氨酸 E),其分子量为 4 085.78,等电点为 8.89,属于碱性多肽,稳定性较好,在大肠杆菌中半衰期大于 10 h,在酵母中的半衰期仅 3 min,该防御素成熟肽既有亲脂性也有亲水性。

图 4 藏猪 *pBD-2* 基因系统发育树分析Fig.4 The phylogenetic tree of Tibetan pig based on the coding regions of *pBD-2* genes

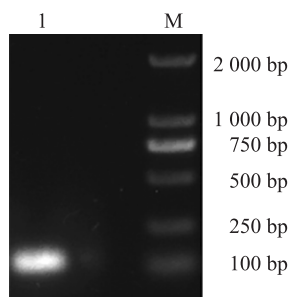
## 2.4 藏猪 *pBD-2* 成熟肽 cDNA 序列及 pET-32a-*pBD-2* 表达载体

以质粒 pMD19T-*pBD-2* 为模板,采用引物 Primer 3 和 Primer 4 进行扩增,对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定分析,得到 1 条约 110 bp 的目的条带(图 5)。采用双酶切验证提取的 pET-32a 质粒,并对转化后的阳性克隆进行筛选,最终获得 1 条约 110 bp 的目的条带(图 6)。对重组质粒进行 *Bam* H

I、*Hind* III 双酶切鉴定,获得约 110 bp 的目的条带和约 5 900 bp 的质粒片段,与预期结果相符(图 7)。

将鉴定正确的阳性克隆子菌液进行测序鉴定,获得 114 bp 的 *pBD-2* 成熟肽 cDNA 序列,该序列与 GenBank 中野猪 *pBD-2* 基因序列 (AY506573.1、NM\_214442.2) 的同源性为 100%。说明成功扩增得到藏猪 *pBD-2* 成熟肽 cDNA 序列和成功构建了 pET-32a-*pBD-2* 表达质粒。

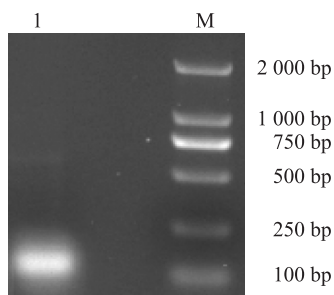




M: DL2000 DNA marker; 1: pBD-2 成熟肽 PCR 产物。

图 5 藏猪 pBD-2 成熟肽 cDNA 序列的扩增

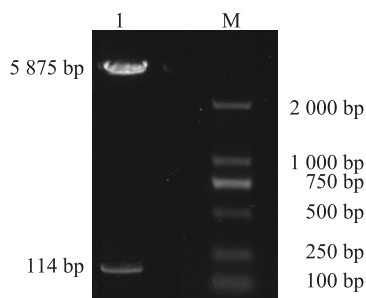
Fig.5 Amplification of pBD-2 mature peptide cDNA sequence of Tibetan swine



M: DL2000 DNA marker; 1: pBD-2 成熟肽 PCR 产物。

图 6 原核表达载体 pET-32a-pBD-2 的 PCR 鉴定

Fig.6 PCR identification of prokaryotic expression vector pET-32a-pBD-2



M: DL2000 DNA marker; 1: *Bam* H I/*Hind* III 酶切产物。

图 7 原核表达载体 pET-32a-pBD-2 的酶切鉴定

Fig.7 Identification of prokaryotic expression vector pET-32a-pBD-2 by restriction enzymatic digestion

### 3 讨论

猪 $\beta$ -防御素 2(pBD-2)是一类重要的具有抗菌活性的阳离子碱性多肽,富含半胱氨酸,在先天性免疫作用中发挥重要作用。由于 pBD-2 具有其独特

的分子结构及其特殊的功能,目前成为研究和应用的热点。近年来,由于食品安全问题备受关注,养殖业上“禁抗”呼声越来越高,因此 pBD-2 在动物生产中具有广阔的应用前景<sup>[9]</sup>。本研究根据 NCBI 发表的野猪 pBD-2 基因 (AY506573.1、NM\_214442.2) 和合成的 pBD-2 基因 (KF671230.1) 序列设计并合成了引物,成功克隆得到藏猪全长为 298 bp 的 pBD-2 基因,与野猪 pBD-2 基因的同源性达 100.0%,而与赵炎葱<sup>[26]</sup>报道的家猪 pBD-2 基因的同源性为 98.9%。结果表明,藏猪 pBD-2 基因与野猪相比未发生突变,而与家猪之间有一定的遗传差距。进一步将该基因的编码区序列在 MEGA5.1 软件上进行蛋白质编码核苷酸序列分析,发现藏猪 pBD-2 基因编码区与野猪 (AY506573.1、NM\_214442.2) 和家猪的 pBD-2 基因编码区序列同源性均为 100.0%。推测由于藏猪是高原、高寒放牧的小型猪种,为藏区原始品种,具有与野猪相同的耐粗饲、抗病力极强等表型特点,其 pBD-2 基因未发生突变;而家猪在高度驯化过程中,长期的选择压力造成家猪 pBD-2 基因发生了点突变,但其表达具有执行功能的成熟肽 cDNA 序列及成熟肽氨基酸序列未发生改变。同时该结果也表明猪 pBD-2 基因编码区及成熟肽序列在物种上具有高度的保守性。

防御素成熟肽是去掉信号肽和前导肽后才具有抗菌活性的一种阳离子多肽,在 N-端与 C-端尽量不能有多余的氨基酸残基,否则会影响它的天然活性<sup>[27]</sup>。本试验将藏猪 pBD-2 基因推导的氨基酸序列进行在线分析,发现 ORF 区编码 69 个氨基酸中, C-末端 37 个氨基酸残基为成熟肽序列,该成熟肽具有 6 个 Cys 残基,7 个带正电荷和 2 个带负电荷的氨基酸残基,分子量为 4 085.78,等电点为 8.89,属于碱性多肽,在大肠杆菌中半衰期大于 10 h,在酵母中的半衰期仅 3 min,属于稳定性多肽,既有亲脂特性,也有亲水特性。藏猪 pBD-2 成熟肽中 6 个 Cys 的作用是形成分子内二硫键,使成熟肽在空间上正确折叠从而发挥其生物学作用。pBD-2 成熟肽为富含阳离子的小肽,在与微生物细胞膜中阴性磷脂分子之间的静电吸引中起着重要作用;具有亲脂性和亲水性的两亲性结构,有助于 pBD-2 成熟肽分子进入微生物细胞膜磷脂双分子层中,破坏微生物细胞膜的通透性,起到抑制和杀灭微生物的作用。

本试验通过对藏猪 pBD-2 基因的分析及其成熟

肽分子特性的预测,发现该成熟肽具有稳定性。针对此特点,设计特异性引物对 *pBD-2* 基因进行亚克隆,获得藏猪 *pBD-2* 成熟肽 cDNA 序列,转入 pET-32a 载体中,构建原核表达载体 pET-32a-*pBD-2*。PCR、双酶切、测序鉴定结果表明,成熟肽 cDNA 基因序列长度为 114 bp,与野猪和家猪 *pBD-2* 基因编码区序列同源性达 100.0%,构建的表达载体完全正确,原核表达载体 pET32a-*pBD-2* 构建成功。这为进一步研究藏猪 *pBD-2* 的原核表达、抗菌活性及其机理等奠定了良好的基础。

## 参考文献:

- [1] 刘伟,皮雄娥,王欣. 抗菌肽与肠道健康研究新进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(10): 1537-1543.
- [2] 刘梦芸,冯凤琴. 抗生素替代品在鸡养殖中的应用研究进展[J]. 粮食与饲料工业, 2016(11): 47-51.
- [3] CUNHA N B D, COBACHO N B, VIANA J F C, et al. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts[J]. Drug Discovery Today, 2016, 22(2): 234-248.
- [4] 卢顺,高其双,彭霞,等. 禽类防御素的分子生物学研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2016(1): 136-139.
- [5] 朱颜鑫,江滢. 人防御素的抗病毒活性及机制[J]. 医学综述, 2016, 22(6): 1066-1069.
- [6] 孟庆刚,李琦,赵鹏伟,等. 防御素的免疫相关作用[J]. 黑龙江畜牧兽, 2014(7): 44-46.
- [7] MATTAR E H, ALMEHDAR H A, YACIOUB H A, et al. Antimicrobial potentials and structural disorder of human and animal defensins[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2016, 28(4): 95-111.
- [8] SAFRAZ M, SULEMAN M, TIKOO S, et al. Immune responses to *in ovo* vaccine formulations containing inactivated fowl adenovirus 8b with poly[di(sodium carboxylatoethylphenoxy)] phosphazene (PCEP) and avian beta defensin as adjuvants in chickens[J]. Vaccine, 2017, 35(6): 981-986.
- [9] 王丹玉,彭子欣,王洪彬,等. 猪防御素的研究进展及其在饲料中的应用[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(5): 86-90.
- [10] 徐雅萍,刘红健,倪涌城,等. 复合防御素对初产母猪繁殖性能的影响[J]. 饲料研究, 2016(22): 32-33, 46.
- [11] PENG Z, WANG A, FENG Q, et al. High-level expression, purification and characterisation of porcine  $\beta$ -defensin 2 in *Pichia pastoris* and its potential as a cost-efficient growth promoter in porcine feed[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5487-5497.
- [12] 魏洪涛,王国珍,李慧,等.  $\beta$ -防御素的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(18): 4640-4643.
- [13] 陈惠娟,毛若雨,滕达,等. 二硫键及其连接方式对防御素抗菌功能的影响研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(9): 32-37.
- [14] SANG Y, PATIL A A, ZHANG G, et al. Bioinformatic and expression analysis of novel porcine  $\beta$ -defensins[J]. Mammalian Genome, 2006, 17(4): 332-339.
- [15] MAO X, QI S, YU B, et al. Dietary l-arginine supplementation enhances porcine  $\beta$ -defensins gene expression in some tissues of weaned pigs[J]. Livestock Science, 2012, 148(1): 103-108.
- [16] 李美荃,刘红,张春勇,等. 防御素基因在乌金猪与约大乌猪组织中的表达及东亚飞蝗抗菌活性物质对防御素基因表达的调节作用[J]. 动物营养学报, 2016, 28(7): 2096-2105.
- [17] 徐海涛,马立保,何启盖,等. 猪防御素基因 *pBD-2* 在大肠杆菌中的重组和融合表达[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(5): 101-104.
- [18] 张定勇,孙蕾,杨利敏,等. 猪  $\beta$  防御素 2 与猪  $\gamma$  干扰素在毕赤酵母中的融合表达及生物学活性比较[J]. 生物工程学报, 2010, 26(12): 1652-1659.
- [19] 胡翰,于宾宾,何启盖. 猪  $\beta$ -防御素 2 成熟肽在酵母中的表达[J]. 微生物学报, 2011, 51(5): 704-709.
- [20] 谢飞,吴雅琨,冯秋月,等. 猪  $\beta$ -防御素-2 基因在大肠杆菌中的融合表达及抑菌活性检测[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(2): 6-9.
- [21] SEO E J, WEIBEL S, WEHKAMP J, et al. Construction of recombinant *E. coli* Nissle 1917 (EcN) strains for the expression and secretion of defensins[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2012, 302(6): 276-287.
- [22] 强巴央宗,谢庄,田发益. 高原藏猪现状与保种策略[J]. 中国畜牧杂志, 2001, 37(6): 46-47.
- [23] 王丽焕. 藏猪白细胞介素-2 基因的克隆及表达活性研究[D]. 成都: 四川大学, 2003.
- [24] 程驰,孙文魁,陈义辉,等. *pBD-1* 和 *PR-39* 基因在藏猪与约克夏猪免疫组织中的表达水平的比较研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2014, 35(3): 1-6.
- [25] XIONG H T, GAO Y H, LIU D, et al. High level of hepcidin mRNA expression is associated with high production of immune factors in Tibetan pigs[J]. Livestock Science, 2015, 171: 73-77.
- [26] 赵炎葱. 猪  $\beta$  防御素 2 基因的克隆表达及其活性分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
- [27] CHANG C I, CHEN L H, HU Y F, et al. Determining the cleavage site for the mature antimicrobial peptide of *Nile tilapia*  $\beta$ -defensin using 2D electrophoresis, western blot, and mass spectrometry analysis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 62: 41-46.

(责任编辑:张震林)