

陈冬梅, 沈文, 刘恺, 等. 巴什拜羊 *BPI* 基因的克隆与真核表达[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 39–42.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.010

巴什拜羊 *BPI* 基因的克隆与真核表达

陈冬梅¹, 沈文¹, 刘恺², 郭海英¹, 陈凯丽³, 孙延鸣¹

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003; 2. 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市动物园, 新疆乌鲁木齐 830094;
3. 石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003)

摘要:从巴什拜羊外周血多形核粒细胞(PMN)中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增出巴什拜羊 *BPI* 基因片段, 将其克隆至 pPIC9K 载体中, 构建真核表达质粒 pPIC9K-BPI, 经 PCR、酶切及测序鉴定正确后, 电转化至毕赤酵母 GS115 中并用甲醇诱导表达, SDS-PAGE 鉴定重组 BPI 蛋白的表达, 通过微量肉汤稀释法检测重组 BPI 蛋白的抑菌活性。结果表明: RT-PCR 扩增获得 597 bp 巴什拜羊 *BPI* 基因; 经 PCR、酶切及测序鉴定证实成功构建 *BPI* 基因的真核表达载体, SDS-PAGE 检测结果表明, 重组 BPI 蛋白成功表达, 通过抑菌试验表明表达的重组 BPI 蛋白具有明显抑菌活性。

关键词:巴什拜羊; 杀菌性; 通透性增加蛋白; 毕赤酵母; 基因克隆; 真核表达

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0039-04

我国是养羊大国, 新疆维吾尔自治区是我国主要的绵羊生产基地, 巴什拜羊是新疆乃至国内外不可多见的绵羊地方优良品种, 具有特殊的生物学特性^[1], 原产自新疆维吾尔自治区裕民县。该羊具有生长发育速度快、生产性能高、抗病力强等特征, 其羔羊成活率达 95% 以上, 是发展我国重要的羊品种资源^[2]。杀菌性/通透性增加蛋白(BPI)主要存在于人、哺乳动物的多形核粒细胞(PMN)嗜天青颗粒中, 是 PMN 的主要抗菌成分^[3-5], 具有杀菌、中和内毒素以及促进补体活化增强调理功能的作用。Vander 等发现, BPI 蛋白可以诱导血管内皮细胞的凋亡, 抑制血管生成, 在体外血管生成试验中, 在 1.8 μmol/L 浓度下作用 24 h 后 BPI 蛋白能够抑制 81% 的血管生成, 这一发现使 BPI 蛋白有望用于治疗癌症或与血管形成有关的疾病^[6]。BPI 蛋白在抗真菌感染^[7]、抗弓形虫感染^[8]等领域也有非常重要的意义。2005 年, 美国食品药品监督管理局批准 rBPI21/rBPI23 进行 II ~ III 期临床试验, 该临床试验主要研究儿童急性脑膜炎菌血症、出血、腹腔感染、肝切除以及胆管纤维化导致的严重感染, 还有其他革兰氏阴性菌、内毒素进入血液循环而造成的致病、致死等症状^[9]。Levy 证实了 rBPI21 不仅可以降低病死率, 显著降低血液 IL-6 的水平, 还可以减少感染性并发症和成人呼吸窘迫综合征的发生率^[10]。周红等从猪 PMN 中提取了猪源 BPI 蛋白, 发现猪源性 BPI 蛋白具有中和内毒素、杀灭革兰氏阴性菌的作用^[11]。朱璟研究 *BPI* 基因对猪抗 F18 大肠杆菌感染的功能及机理^[12]。2004 年, Alexander 等用腺病毒介导的 *BPI* 转基因小鼠模型进行体内外试验, 均显示腺病毒为载体的重组 *BPI* 介导的基因转化可以进行细胞外分泌, 且分泌的 BPI 蛋白可以

中和脂多糖 LPS, 并且减少致炎细胞因子 TNF-α 和巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)的产生^[13]。但有关羊 *BPI* 基因的功能还未见报道。本试验从巴什拜羊外周血中提取多形核粒细胞 PMN 总 RNA, 经 RT-PCR 获得 *BPI* 目的基因片段, 构建巴什拜羊 *BPI* 真核表达载体, 并对其表达产物进行生物活性检测, 旨在为进一步深入研究巴什拜羊重组 BPI 蛋白的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物、菌株与载体

本试验所用的 5 只巴什拜羊由石河子大学动物科技学院试验站提供。巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株及表达载体 pPIC9K 为新疆农垦科学院兽医研究所薄新文研究员馈赠, DH5α 菌株由石河子大学动物科技学院生化实验室保存。抑菌试验所用的大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922、沙门氏菌(*Salmonella* spp.) ATCC14028、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC25923 均为石河子大学动物科技学院中兽医实验室馈赠。

1.2 主要试剂

反转录试剂盒, 限制性内切酶 *Sna*B I、*Not* I、*Sac* I 和 *Taq* 聚合酶均购自 TaKaRa 公司; T₄ DNA 连接酶购自天根生化科技有限公司; 蛋白 marker 购自 Fermentas 公司; 酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒、质粒小量提取制备试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA marker DL 2501、DNA Marker DL 2503 购自上海捷瑞生物工程有限公司; D-山梨醇、酵母氮碱(YNB)、G418、生物素均购自北京索莱宝科技有限公司; 普通肉汤培养基中的蛋白胨、酵母提取物购自上海坤肯生物化工有限公司; 中性粒细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。

1.3 目的片段的扩增及重组表达质粒 pPIC9K-BPI 的构建

巴什拜羊 *BPI* 基因 cDNA 全长序列由笔者所在实验室通过 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)获得, 登录号为 KF523344。根据该基因的 ORF 设计活性段表达引物, 上游引

收稿日期: 2014-09-16

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31160525)。

作者简介: 陈冬梅(1989—), 女, 广西南宁人, 硕士研究生, 主要从事兽医临床学研究。E-mail: 450157170@qq.com。

通信作者: 孙延鸣, 博士, 教授, 主要从事临床兽医学研究。E-mail: sym@shzu.edu.cn。

物为 5'-TACGTA ATGACCAACCCAGGCATCGTG-3', 下游引物为 5'-GCGGCCGCTCATAGTTTGCTGTCCTGGCAG-3'。通过颈静脉采集巴什拜羊血液, 用肝素抗凝, 按照中性粒细胞分离液说明书方法分离外周血中性粒细胞。用 Trizol 法抽提巴什拜羊中性粒细胞总 RNA。提取的总 RNA 用无菌 DEPC 水溶解, 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。以提取的 PMN 总 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA, 再以 cDNA 模板进行 PCR 扩增。反应条件: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 40 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 32 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。用 *Not* I、*Sna*B I 分别对巴什拜羊 *BPI* 基因及 pPIC9K 表达载体进行双酶切, 用 T4 DNA 连接酶在 16 ℃ 连接过夜, 将 10 μL 连接产物转化于 100 μL 感受态细胞 DH5α, 涂布于含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上, 于 37 ℃ 恒温箱中静止过夜培养。挑取单个菌落, 接种于 5 mL 含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 ℃ 220 r/min 振荡过夜培养。取 2~3 mL 菌液, 提取质粒, 进行双酶切、PCR 鉴定, 同时将 1 mL 菌液和 5 μL 质粒送往北京六合华大基因科技股份有限公司测序, 将测序结果正确的重组质粒命名为 pPIC9K-BPI。

1.4 重组表达质粒 pPIC9K-BPI 的转化与鉴定

按 Riffault 等的方法^[14] 制备感受态酵母菌 GS115, 取 80 μL 感受态 GS115 与 20 μL 线性化的重组表达质粒 pPIC9K-BPI 混合, 电击转化后涂布于 MD 平板上, 28 ℃ 孵育 3 d, 每天观察菌落的生长情况。挑取单菌落, 用酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒提取酵母基因组 DNA, 以其为模板, 分别用表达引物和用酵母载体上的通用引物 (α -Factor: 5'-TACTATTGCCAGCATTCGCTGC-3', 3' AOX1: 5'-GCAAATGCGATTCTGACATCC-3') 进行基因型、表型鉴定。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳分析, 根据扩增片段的大小判断酵母染色体中是否有目的基因片段插入。基因型鉴定中 PCR 的反应条件: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 40 s, 63 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s, 32 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。若能够扩增出 1 条目的条带, 再进行表型鉴定, 表型鉴定的反应条件: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 40 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 32 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。在表型鉴定中, 若能扩增出 2 条带, 一条是含有目的基因片段的扩增条带, 另一条是野生型 *AOX1* 基因的扩增带, 约为 2.2 kb, 则为阳性转化子即 Mut+ (甲醇利用野生型) 表型特征。

1.5 重组菌株 GS115/pPIC9K-BPI 的表达与 SDS-PAGE 分析

将 PCR 鉴定正确的重组酵母菌 GS115/pPIC9K-BPI 接种于 50 mL YPD 培养基中, 于 28 ℃ 培养至 *D* 值为 4 时,

6 000 r/min 离心 3 min, 收集菌体。将富集的菌体转接于 250 mL BMMY 培养基中继续培养。每隔 24 h 加入终浓度为 0.5% 的甲醇诱导表达。同时按 0、24、48、72、96、108 h 分别取 1 mL 菌液样品, 离心收集上清、菌体, 并将上清、菌体分别进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.6 抑菌试验检测表达产物的活性

1.6.1 不同浓度的重组 BPI 蛋白对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用 在配好的普通肉汤培养基中加入重组 BPI 蛋白, 使其终浓度分别为 5、10、20、40、80 μg/mL, 将大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌稀释至浓度为 0.01 亿 CFU/mL, 取 30 μL 接种于含有各种浓度重组蛋白的肉汤培养基中。另外在不含重组 BPI 蛋白的肉汤培养基中分别加入 30 μL 大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌作为阳性对照, 不含细菌也不含有重组蛋白的普通肉汤培养基设为阴性对照。在 96 孔板中以微量稀释法测定重组 BPI 蛋白的抑菌活性, 37 ℃ 培养 12 h 后使用酶标仪在 600 nm 波长下进行观察并记录其 *D* 值^[15]。重复 3 次, 取平均值 (下同)。

1.6.2 3 个不同浓度重组 BPI 蛋白对大肠杆菌的抑制作用 在普通肉汤培养基中加入重组 BPI 蛋白, 使其终浓度为 20、40、80 μg/mL, 将 30 μL 大肠杆菌加入其中。阴性对照与阳性对照设置同上。37 ℃ 下分别培养 1、2、3、4、5 h, 设置酶标仪在 600 nm 波长下, 对 96 孔板进行扫描, 测定 *D* 值, 保存数据。

1.7 数据处理

数据以“平均值 ± 标准差”表示, 采用 SPSS 13.0 软件对所测数据进行 Two-way ANOVA 方差分析, 比较重组 BPI 蛋白的抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 RNA 的完整性与纯度

从巴什拜羊 PMN 中提取的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 可见明显的 28S、18S、5S 条带 (图 1), 说明提取总 RNA 基本没有降解, 具有较好的完整性。对其进行紫外分光光度分析得出 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的值 > 1.8, 表明 RNA 具有较高的纯度, 符合反转录要求。

2.2 重组表达质粒 pPIC9K-BPI 的 PCR 与双酶切鉴定

重组表达型质粒 pPIC9K-BPI 经 *Not*、*Sna*B I 双酶切和 PCR 鉴定, 均得到了大小为 597 bp 的条带, 与预期片段大小相符合 (图 2、图 3)。测序结果正确, 表明目的片段已正确插入到真核表达载体中。

2.3 重组菌株 GS115/pPIC9K-BPI 的 PCR 鉴定

挑取 YPD-G418 平板上的单个菌落, 以重组菌株的

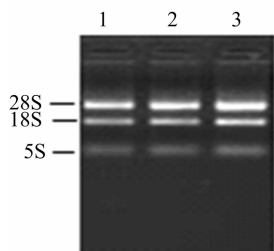


图1 巴什拜羊外周血多形核粒细胞RNA电泳图

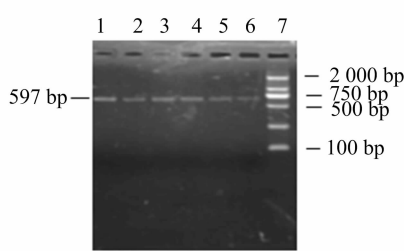


图2 巴什拜羊 *BPI* 片段 PCR 鉴定

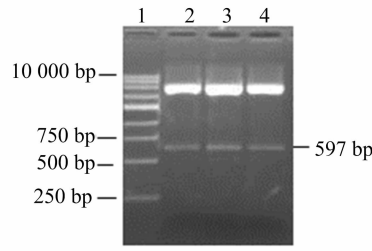


图3 重组表达质粒 pPIC9K-BPI 的酶切鉴定

DNA 为模板,分别进行基因型、表型鉴定。在基因型鉴定中可见阳性转化子条带大小为 597 bp,与预期条带大小相符合(图 4)。在表型鉴定中,用酵母通用引物进行 PCR 扩增鉴定,可见阳性转化子能扩增出 2 条带,一条是含有目的基因片段的扩增条带,约 597 bp,另一条是野生型 *AOXI* 基因的扩增带,约 2.2 kb,为 Mut + (甲醇利用野生型)表型 PCR 鉴定特征(图 5)。

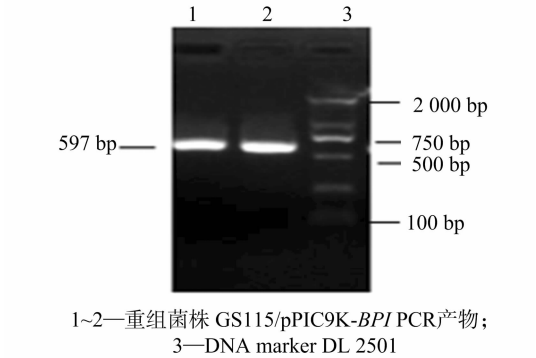


图4 重组菌株 GS115/pPIC9K-*BPI* 的 PCR 基因型鉴定

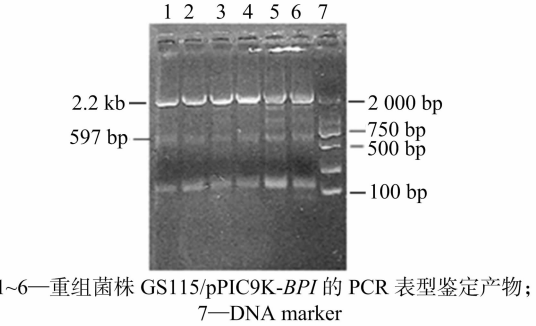


图5 重组菌株 GS115/pPIC9K-*BPI* 的 PCR 表型鉴定

2.4 重组菌株 GS115/pPIC9K - *BPI* 表达产物的 SDS - PAGE 分析

将重组菌株 GS115/pPIC9K - *BPI* 经甲醇诱导表达后,分别收集上清、菌体,上清经过 SDS - PAGE 分析,在约 43 ku 处出现条带,与预期目的蛋白分子量相符,在空载质粒对照组和 0 h 表达载体未见有条带,表明 *BPI* 蛋白成功表达(图 6),收集的菌体没有表达出目的蛋白。

2.5 抑菌试验检测重组 *BPI* 的蛋白活性

表 1 表明,各试验组细菌的阳性对照组(肉汤培养基中

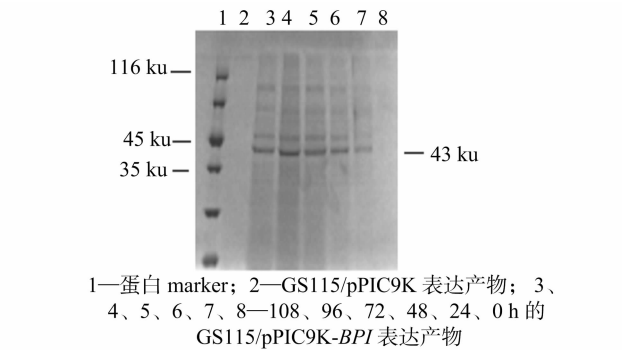


图6 重组菌株 GS115/pPIC9K-*BPI* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

表 1 不同浓度重组 *BPI* 蛋白对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>D</i> 值		
	大肠杆菌	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌
阳性对照	1.05 \pm 0.1	1.08 \pm 0.08	1.03 \pm 0.08
5	0.94 \pm 0.05	0.96 \pm 0.02	1.04 \pm 0.06
10	0.87 \pm 0.08	0.88 \pm 0.08	1.06 \pm 0.11
20	0.68 \pm 0.03a	0.67 \pm 0.04a	1.05 \pm 0.11b
40	0.42 \pm 0.04aA	0.47 \pm 0.07aA	1.06 \pm 0.05bB
80	0.12 \pm 0.01aA	0.13 \pm 0.01aA	1.06 \pm 0.05bB
阴性对照	0.10 \pm 0.002	0.10 \pm 0.002	0.10 \pm 0.003

注:同行数据后不同小写字母表示差异显著,不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),不标字母表示差异不显著。

分别加入大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌)*D* 值基本一致,阴性对照组(肉汤培养基)的 *D* 值也基本一致。当蛋白浓度为 5、10 $\mu\text{g/mL}$ 时,大肠杆菌组、沙门氏菌组与金黄色葡萄球菌组的 *D* 值差异不显著。当蛋白浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,大肠杆菌组、沙门氏菌组的 *D* 值显著低于金黄色葡萄球菌组。当蛋白浓度为 40、80 $\mu\text{g/mL}$ 时,大肠杆菌、沙门氏菌组的 *D* 值极显著低于金黄色葡萄球菌组。由此可见,重组 *BPI* 蛋白的浓度在 20 $\mu\text{g/mL}$ 以上可以抑制大肠杆菌、沙门氏菌的生长,对金黄色葡萄球菌没有抑制作用。

表 2 中,0 h 各组 *D* 值基本一致;培养 3 h,重组 *BPI* 蛋白组浓度为 20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 时以及阴性对照组均显著低于阳性对照组;培养 4、5 h,重组 *BPI* 蛋白组浓度为 40、80 $\mu\text{g/mL}$ 以及阴性对照组均极显著低于阳性对照组,说明 20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 重组 *BPI* 蛋白能显著抑制大肠杆菌生长。

表 2 3 种不同浓度的重组 *BPI* 蛋白对大肠杆菌的抑制作用

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>D</i> 值					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
阳性对照	0.107 \pm 0.010	0.190 \pm 0.030	0.336 \pm 0.050	0.523 \pm 0.060a	0.770 \pm 0.040aA	0.855 \pm 0.040aA
20	0.111 \pm 0.002	0.147 \pm 0.030	0.230 \pm 0.020	0.312 \pm 0.030b	0.482 \pm 0.030bAB	0.522 \pm 0.020bAB
40	1.108 \pm 0.010	0.124 \pm 0.010	0.190 \pm 0.020	0.231 \pm 0.030b	0.311 \pm 0.020cB	0.367 \pm 0.020cB
80	0.112 \pm 0.001	0.111 \pm 0.001	0.119 \pm 0.002	0.120 \pm 0.001b	0.123 \pm 0.005cB	0.129 \pm 0.004cB
阴性对照	0.107 \pm 0.007	0.107 \pm 0.008	0.110 \pm 0.003	0.110 \pm 0.020b	0.111 \pm 0.001cB	0.103 \pm 0.007cB

注:同类数据后不同小写字母表示差异显著,不同小写字母表示差异极显著,不标字母表示差异不显著。

3 结论与讨论

本试验选用 pPIC9K 表达载体,并在巴斯德毕赤酵母表

达系统进行表达。pPIC9K 载体可以快速筛选高拷贝整合转化子,并且具有来自转座子 Tn903 的卡那霉素耐药基因,能够根据基因剂量效应,对 G418 的抗性水平快速筛选出高拷贝

的转化子,高拷贝整合的转化子能够提高外源基因的表达量^[16]。本试验中,笔者充分利用该载体的特性,先进行高拷贝整合的转化子筛选,然后再进行表达,结果发现重组蛋白表达量高达 28 mg/mL。巴斯德毕赤酵母作为真核表达系统,具有严格调控外源蛋白的表达、加工修饰表达产物、表达量高、营养要求低等优点。此外,巴斯德毕赤酵母中表达产物可分泌至胞外,有利于表达产物的分离纯化^[17]。本试验选用 pPIC9K 表达载体,构建 pPIC9K - *BPI* 表达质粒,并在巴斯德毕赤酵母表达系统进行表达,结果表明,用此技术表达重组蛋白高效、稳定、表达产物易于纯化。天然 BPI 蛋白由 456 个氨基酸残基组成的碱性蛋白,含 N 端、C 端、中间连接单位 3 部分组成,经蛋白酶水解后可裂解为 N 端片段、C 端片段,N 端功能片段具有天然 BPI 的完整杀菌、中和细菌脂多糖(LPS)等活性^[18]。目前有 2 种 BPI 蛋白获取方法,但使用柱层析法获得的 BPI 蛋白工作量大,获取量低,成本高。而 Gazzano - Santoro 等用逆转录 PCR 的方法获得分子量为 23 ku 的重组蛋白 rBPI23,由于具有较高的活性,且容易获取,广泛应用于临床试验,将人的 BPI N - 末端的 cDNA 扩增转入细胞载体后通过田仓鼠卵细胞中表达重组蛋白^[19]。由于目前国内外采用基因工程方法在猪、鼠、兔和牛上都获得了重组 BPI 蛋白。在此之前,笔者所在实验室通过 RACE 技术获得了巴什拜羊 *BPI* 基因全长 cDNA 序列(GenBank 登录号为 KF523344),本试验根据此序列设计特异性引物进行 PCR 扩增,克隆出巴什拜羊 BPI N - 端序列,并在巴斯德毕赤酵母中成功表达出 43 ku 的含有 199 个氨基酸的重组 BPI 蛋白,经过抑菌试验检测该重组蛋白具有明显的抑菌活性,为研究绵羊 BPI 蛋白的其他生物学功能奠定基础。PMN 细胞内诸多抗菌成分中,BPI 是唯一能够直接对革兰氏阴性菌发挥杀菌作用和中和内毒素作用的抗菌物质,被誉为“超级抗生素”^[20]。本试验中巴什拜羊重组 BPI 蛋白对 G⁻ 菌均具有杀菌活性,但对 G⁺ 无明显效果。研究发现,BPI 的 N 端、C 端均含有 1 个非极性的脂质结合口袋,该非极性口袋为 BPI 与 LPS 相互作用的位点。BPI 分子 N 端的碱性氨基酸残基比酸性氨基酸残基多 16 个,而 C 端的碱性氨基酸残基比酸性氨基酸残基少 2 个。BPI 蛋白分子 N 端和 C 端电荷的不对称分布促使的带正电荷的 N 端更加能够促进 BPI 分子与 G⁻ 菌细胞壁上带负电荷的 LPS 之间的结合而起杀菌作用^[21]。

参考文献:

- [1] 决肯·阿尼瓦什. 巴什拜羊生物学特性及其遗传多样性研究[D]. 南京:南京农业大学,2010.
- [2] 决肯·阿尼瓦尔,韩业东,李齐发,等. 巴什拜羊微卫星标记多态性及其与生长指标关联性分析[J]. 中国农业科学,2010,43(16):3425 - 3432.
- [3] Domingues M M, Castanho M A, Santos N C. rBPI(21) promotes lipopolysaccharide aggregation and exerts its antimicrobial effects by (Hemi) fusion of PG - containing membranes[J]. PLoS One,2009,4(12):e8385.
- [4] Elsbach P, Weiss J. Role of the bactericidal/permeability - increasing protein in host defence[J]. Current Opinion in Immunology,1998,10(1):45 - 49.
- [5] Marra M N, Wilde C G, Collins M S, et al. The role of bactericidal/permeability - increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin[J]. Journal of Immunology,1992,148(2):532 - 537.
- [6] Vander S D, Toebes E A, Haseman J R, et al. Bactericidal/permeability increasing protein inhibit angiogenesis via induction of apoptosis in vascular endothelial cells[J]. Blood,2000,96(1):176 - 181.
- [7] de Lucca A J, Walsh T J. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,1999,43(1):1 - 11.
- [8] Arnold H, Horwitz, Paul M, et al. Fungicidal peptides from bactericidal/permeability - increasing protein (BPI) act synergistically with fluconazole on a variety of candida strains[M]. Toronto: ICAAC, 1997:928 - 1001.
- [9] 程玉磊, 祁克宗, 潘玲, 等. 杀菌性/通透性增加蛋白的生物学功能及其应用[J]. 动物医学进展,2005,26(3):16 - 18.
- [10] Levy O. A neutrophil - derived anti - infective molecule: bactericidal/permeability - increasing protein[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2000,44(11):2925 - 2931.
- [11] 周红, 郑江, 肖光夏. 猪源杀菌性/通透性增加蛋白对革兰阴性菌的作用[J]. 中华传染病杂志,1999,17(1):47 - 48.
- [12] 朱璟. *BPI* 基因对断奶仔猪 F18 大肠杆菌抗性的功能分析[D]. 扬州:扬州大学,2012.
- [13] Alexander S, Bramson J, Foley R, et al. Protection from endotoxemia by adenoviral - mediated gene transfer of human bactericidal/permeability - increasing protein[J]. Blood,2004,103(1):93 - 99.
- [14] Riffault S, Carrat C, van Reeth K, et al. Interferon - α - producing cells are localized in gut - associated lymphoid tissues in transmissible gastroenteritis virus (TGEV) infected piglets[J]. Veterinary Research,2001,32(1):71 - 79.
- [15] 徐红, 陈裕充, 温海, 等. Neo - Sensitab 纸片法与微量稀释法检测常见酵母菌对酮康唑敏感性的比较[J]. 检验医学,2004,19(5):385 - 386.
- [16] Scorer C A, Clare J J, McCombie W R, et al. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high - level foreign gene expression[J]. Biotechnology,1994,12(2):181.
- [17] Yamada M, Azuma T, Matsuba T, et al. Secretion of human intracellular aspartic proteinase cathepsin E expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* and characterization of produced recombinant cathepsin E[J]. Biochimica et Biophysica acta,1994,1206(2):279 - 285.
- [18] 周宇麒. 杀菌性/通透性增加蛋白(BPI)研究和进展[J]. 医学综述,2001,7(10):588 - 590.
- [19] Gazzano - Santoro H, Parent J B, Grinna L, et al. High - affinity binding of the bactericidal/permeability - increasing protein and a recombinant amino - terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide[J]. Infection and Immunity,1992,60(11):4754 - 4761.
- [20] Gray P W, Flaggs G, Leong S R, et al. Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein, structural and functional correlations[J]. Journal of Biological Chemistry,1989,264(16):9505 - 9509.
- [21] Bülow E, Gullberg U, Olsson I. Structural requirements for intracellular processing and sorting of bactericidal/permeability - increasing protein(BPI): comparison with lipopolysaccharide - binding protein[J]. Journal of Leukocyte Biology,2000,68(5):669 - 678.