

朱 桃,张双玉,张路阳,等. 枯草芽孢杆菌 4 种环脂肽抗猪 δ 冠状病毒的研究[J]. 江苏农业科学,2024,52(4):182–186,192.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2024.04.027

枯草芽孢杆菌 4 种环脂肽抗猪 δ 冠状病毒的研究

朱 桃^{1,2}, 张双玉^{1,2}, 张路阳¹, 钟纯燕³, 陈悦雯¹, 李基棕², 李 彬², 罗楚平¹

(1. 淮阴工学院,江苏淮安 223002; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所,江苏南京 210014;

3. 黔西南民族职业技术学院生物工程系,贵州兴义 562400)

摘要:为探究从枯草芽孢杆菌 Bs 916 中提取的表面活性素、罗克霉素、泛革素及杆菌霉素 L 4 种抗菌肽对猪 δ 冠状病毒 (PDCoV) 的抗病毒作用。首先采用 CCK-8 法确定抗菌肽对细胞无毒性的最佳浓度范围,随后分别采用 RT-qPCR、Western blot 及 IFA 3 种方法检测 Bs 916 中 4 种环脂肽对 PDCoV 的抗病毒效果。结果显示,4 种环脂肽在浓度 $\leq 50 \mu\text{g/mL}$ 时对细胞无毒性,同时具有良好的抗病毒效果。相同条件下,罗克霉素抗病毒效果最佳,其次为表面活性素。本研究从枯草芽孢杆菌 Bs 916 中提取的表面活性素、罗克霉素、泛革素及杆菌霉素 L 可抑制 PDCoV 在细胞中的增殖,具有良好的抗病毒作用,其中以罗克霉素和表面活性素的抗病毒效果最佳,可为抗 PDCoV 药物研发提供理论支持。

关键词:表面活性素;罗克霉素;泛革素;杆菌霉素 L;猪 δ 冠状病毒

中图分类号:S852.65⁺1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2024)04–0182–05

猪 δ 冠 状 病 毒 (porcine deltacoronavirus, PDCoV) 属于冠状病毒科,冠状病毒属,是一种新型猪肠道致病冠状病毒,主要导致新生仔猪急性腹泻、呕吐和脱水^[1–4]。PDCoV 是一种包膜病毒,基因组全长约 25.4 kb,编码 15 个成熟的非结构蛋白 (nsp 2–16)、4 个结构蛋白 (棘突蛋白 S、包膜蛋白 E、膜蛋白 M、核衣壳蛋白 N) 和 3 种辅助蛋白 (NS6、NS7、NS7a)^[5–6]。在这些蛋白中,N 蛋白是表达量最为丰富的多功能结构蛋白,其基因全长 1 029 bp,共编码 343 个氨基酸。N 蛋白发生在病毒感染早期,是最早产生免疫反应的抗原蛋白,最先刺激机体产生抗体,此外,它在结构和功能上具有保守性强和种属特异性^[7–8],因此,PDCoV–N 蛋白常被用于分子生物学诊断技术。PDCoV 是一种新发现的猪腹泻病毒,其传播速度快,从最初 2012 年发现于香港^[1]后,于 2014 年即于美国暴发^[9],随后蔓延至全球^[10]。PDCoV 不仅对养猪业造成极大影响,还会跨物种感染牛、鸡甚至是人^[11–14],危害公共健康。

因此,建立快速有效的预防措施,找到抑制病毒的特效药物至关重要。

脂肽 (lipopeptide) 是一类由脂肪酸和多肽分子组成的生物分子,具有一系列独特的物理和生物学性质。其广泛存在于自然界中,包括细菌、真菌、植物和动物等生物体内。目前,已发现枯草芽孢杆菌能够产生多种类型的环脂肽,根据环肽的结构可分为三大家族:表面活性素、泛革素和伊枯草素。大量研究表明,芽孢杆菌产生的脂肽,具有多种生物活性,其中包括抗真菌、抗细菌、抗炎症、抗病毒及抗肿瘤等生物活性^[14–18],但关于它们抗病毒、抗肿瘤生物活性鲜有报道。芽孢杆菌的脂肽,已经广泛应用于农业、生物医药、环保、食品工业等领域^[15–19]。然而,关于芽孢杆菌产生的抗菌肽在抗病毒方面的研究,大部分倾向于表面活性素抗病毒方向,而对泛革素和伊枯草素的抗病毒作用效果未见有报道。有研究表明,表面活性素是抗包膜病毒的万能武器^[17]。早在 1997 年,有研究证明,枯草芽孢杆菌产生的表面活性素可抑制广谱病毒,如猴泡沫病毒 (SFV)、单纯疱疹病毒 (HSV–1、HSV–2)、猫杯状病毒 (FCV)、猴免疫缺陷病毒 (SIV)、鼠脑心肌炎病毒 (EMCV)、水泡型口炎病毒 (VSV)^[20]。2006 年,Huang 等从枯草芽孢杆菌 fmbj 上提取主要含有表面活性素、泛革素的抗菌脂肽,进行体外抗病毒试验,研究发现抗菌脂肽对伪狂犬病毒 (PRV)、猪细小病毒 (PPV)、新城疫病毒 (NDV)、法氏囊病毒

收稿日期:2023–05–17

基金项目:江苏省重点研发计划(编号:BE2021324);江苏省农业自主创新资金(编号:[CX(21)3127])。

作者简介:朱 桃(1994—),女,河南商丘人,硕士研究生,主要从事非洲猪瘟疫苗研究。E-mail:1694490993@qq.com。

通信作者:李 彬,博士,研究员,主要从事动物腹泻病防控技术等研究,E-mail:libinana@126.com;罗楚平,博士,教授,主要从事微生物代谢产物研究,E-mail:luochuping@163.com。

(IBDV)有直接灭活作用,可有效抑制 NDV 和 IBDV 的感染和复制^[21]。Wang 等证明枯草芽孢杆菌 OKB 105 及其表面活性素可抑制传染性胃肠炎病毒 (TGEV)进入细胞,并且表面活性素以剂量依赖的方式减少 TGEV 的斑块产生^[22]。这些研究结果表明,枯草芽孢杆菌衍生的肽是一种高效的抗病毒化合物,是研发抗病毒药物及抗病毒疫苗较好的候选者。

本研究基于笔者所在实验室提取的高纯度芽孢杆菌抗菌肽(罗克霉素^[23]、表面活性素、泛革素及杆菌霉素 L),旨在探索这 4 种抗菌肽是否对 PDCoV 具有抑制作用,为抗病毒药物的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、病毒及抗菌肽 LLC-PK1 细胞购自中国兽药检验所,LLC-PK1 细胞培养条件为 37 ℃ 5% CO₂,所用培养基为 DMEM + 10% 胎牛血清(FBS);PDCoV 毒株 CZ2020,其滴度为 10^{6.25} TCID₅₀/mL,来自江苏省农业科学院兽医研究所;表面活性素、罗克霉素、泛革素及杆菌霉素 L 由笔者所在实验室提纯所得,所有抗菌肽先用 DMEM 培养基稀释为 1 mg/mL,作为母液置于 -20 ℃ 冰箱保存备用,后续试验所涉及的抗菌肽稀释溶剂,均用含有 7.5 μg/mL 胰酶的 DMEM 培养基。此外,本试验于 2021 年 12 月 25 日于江苏省农业科学院兽医研究所完成。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、DMEM 培养基,购自 Gibco 公司;Cell Counting kit 8 (CCK-8) 试剂盒,购自北京索莱宝科技有限公司;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒,购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;RIPA(强)蛋白裂解液、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 和 β-actin,均购自上海碧云天生物技术有限公司;FITC 标记的羊抗猪荧光二抗,购自 Abcam 公司;PDCoV-N 蛋白单克隆抗体及 PDCoV 抗猪阳性血清,来自江苏省农业科学院兽医研究所。

1.1.3 主要仪器 蛋白电泳仪及蛋白转印仪,购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司;倒置荧光显微镜,购自日本 Olympus 公司;实时荧光定量 PCR 仪及 CO₂ 培养箱,购自美国 Thermo Fisher 公司;ELx 800 酶标仪,购自美国 BioTek 公司。

1.2 方法

1.2.1 抗菌肽对细胞的毒性测定 首先采用含有 7.5 μg/mL 胰酶的 DMEM 培养基,将 4 种抗菌肽分别稀释至 100、50、10、5 μg/mL。将 LLC-PK1 细胞

均匀地铺在 96 孔细胞板上,37 ℃ 5% CO₂ 条件下培养,细胞长满单层后用无菌的磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗 3 次,加入上述稀释好的不同浓度的抗菌肽,每孔 100 μL。同时设空白对照,每个试验组设置 3 个重复。过夜培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,在细胞培养箱避光培养 3 h,采用 ELx 800 酶标仪读取 450 nm 处的吸光度。细胞活力 = $(D_{\text{抗菌肽}} - D_{\text{培养基}}) / (D_{\text{空白}} - D_{\text{培养基}}) \times 100\%$ 。

1.2.2 抗菌肽对病毒增殖的影响 将 LLC-PK1 细胞铺在 24 孔细胞板中,37 ℃ 5% CO₂ 条件下培养,待细胞长满单层后,采用 PBS 清洗细胞 3 次,加入 MOI=0.01 的 PDCoV 病毒液,每孔 500 μL。在细胞培养箱继续培养 1.0~1.5 h,期间每隔 0.5 h 轻轻摇晃 1 次细胞板,使病毒更好地融合细胞。将融合好的细胞板用 PBS 清洗 3 次,加入不同浓度的抗菌肽,每孔 500 μL,即 50、10、5 μg/mL,每组试验设 3 个重复,将只感染了病毒不加抗菌肽的细胞孔设为空白对照,继续培养 24 h。重复本试验,细胞板用于后续检测。收集上清和细胞,用于后续 RT-qPCR、蛋白免疫印迹(Western blot)及间接免疫荧光(IFA)试验。

1.2.3 RNA 提取与 RT-qPCR 使用 RNA 提取试剂盒提取“1.2.2”节上清中的 RNA,通过反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。用超敏高耐受探针法检测试剂对 cDNA 进行扩增,所用引物:正向序列 5'-ATCGACCACATGGCTCCAA-3';反向序列 5'-CAGCTCTTGCCCATGTAGCT-3';探针序列 5'-CACACCAGTCGTTAAGCATGGCAA_gGCT-3'。

1.2.4 Western blot 检测 取“1.2.2”节中制作好的 24 孔细胞板,PBS 清洗 3 次后加入 100 μL RIPA 细胞裂解液,室温下裂解 10 min 后刮取细胞碎片,收集蛋白液。取 40 μL 蛋白液样品与 5 × 蛋白上样缓冲液混合,置于金属浴中 100 ℃ 煮样 10 min。取 10 μL 煮好的样品加入 12.5% 蛋白胶样品孔,90 V 电压下使样品迁移至分离胶后将电压升至 120 V。提前将滤纸与硝酸纤维素(NC)膜浸泡于转膜液中,采用三明治法,将胶体放于滤纸与 NC 膜中间,用滚轮轻轻去除气泡。打开蛋白快速转印仪运行 15 min。转印后的 NC 膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,PBST 清洗 3 次,每次 10 min。加入稀释比为 1:5 000—抗(PDCoV-N 蛋白单克隆抗体)或 β-actin (1:1 000)室温下孵育 2 h,PBST 清洗后加入稀释比为 1:10 000 二抗(山羊抗小鼠)室温孵

育 2 h, 最后加入 ECL 显色液进行曝光显色。

1.2.5 IFA 检测 取“1.2.2”节中制作好的 24 孔细胞板, PBS 清洗 3 次后加入预冷的无水乙醇 -20°C 固定 30 min, 弃去无水乙醇, PBS 洗涤 3 次。每孔加入 $500\ \mu\text{L}$ 5% 脱脂奶粉, 37°C 封闭 1 h, PBS 清洗 3 次, 每次 3 ~ 4 min。每孔加入稀释比为 1 : 500 的 PDCoV 猪血清 $500\ \mu\text{L}$, 37°C 孵育 2 h, PBS 清洗后每孔避光加入 FITC 标记山羊抗猪荧光二抗 $500\ \mu\text{L}$, 稀释比为 1 : 500, 继续孵育 1 h 后用 PBS 清洗 3 次至无非特异性结合, 置于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.6 数据处理 用 GraphPad Prism 9 对数据进行统计分析, 各组试验数据采用 One-way ANOVA 进行统计分析, 用 t 检验法对数据进行差异性分析。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽对 LLC-PK1 细胞活性的影响

为确定抗菌肽药物的最佳浓度, 设置浓度梯度由高到低依次为 100、50、10、5 $\mu\text{g/mL}$ 检测抗菌肽对细胞的毒性。试验采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性, 在酶标仪上读取样品吸光度 (D), 计算细胞存活率。由图 1 可知, 抗菌肽对细胞安全浓度范围为 50 $\mu\text{g/mL}$ 以下, 此时细胞生长状态与对照孔形态无差异, 细胞活力达 100%; 当抗菌肽药物浓度达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞出现不同程度的皱缩、破裂现象。

2.2 RT-qPCR 检测结果

为了研究抗菌肽对 PDCoV 增殖的影响, 笔者所在课题组分别向感染了该病毒的细胞中加入浓度为 50、10、5 $\mu\text{g/mL}$ 的 4 种抗菌肽, 并采用 RT-qPCR

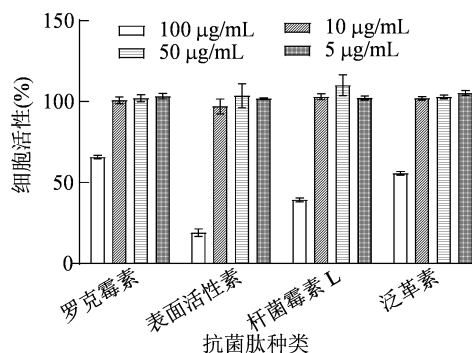
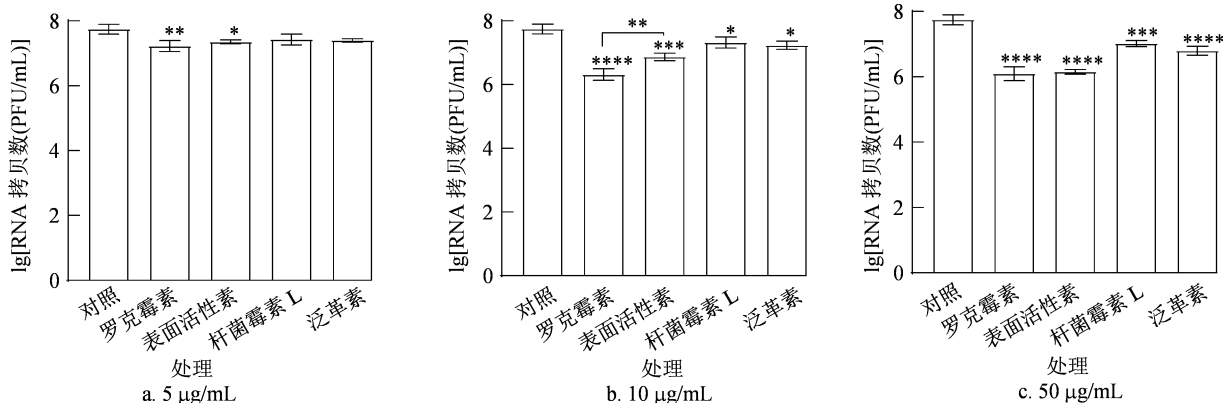


图1 抗菌肽对细胞活性的影响

检测细胞内病毒 RNA 的变化。由图 2 可知, 随着抗菌肽浓度的增加, 细胞内病毒载量逐渐降低, 说明抗菌肽能够在安全浓度范围内通过剂量依赖的方式发挥更好的抗病毒效果。当抗菌肽浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 仅有罗克霉素 ($P < 0.01$) 和表面活性素 ($P < 0.05$) 能显著抑制病毒增殖, 而泛草素和杆菌霉素 L 则不具有显著的抗病毒效果。当抗菌肽浓度达到 10 $\mu\text{g/mL}$ 时, 4 种抗菌肽均能显著抑制病毒增殖, 其中罗克霉素 ($P < 0.0001$) C_T 值高达 25.93, 其次是表面活性素 ($P < 0.001$), C_T 值高达 23.96。当抗菌肽浓度升至 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 4 种抗菌肽均能显著抑制病毒增殖。

2.3 Western blot 检测 PDCoV-N 蛋白的表达

为进一步探索抗菌肽对 PDCoV 增殖的影响, 向“1.2.2”节中制作好的细胞板中加入蛋白裂解液获取蛋白, 采用 Western blot 方法检测 PDCoV-N 蛋白的表达水平。由图 3 可知, 感染了 PDCoV 的细胞, 在浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 4 种抗菌肽作用下, 可完全抑制病毒增殖, Western blot 法完全检测不到 PDCoV-N 蛋白特异性条带。而罗克霉素和表面活性素在低至 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 即可完全抑制病毒增殖。



*, **, ***, **** 分别表示与对照相比在 0.05、0.01、0.001、0.0001 水平上差异显著

图2 RT-qPCR 检测病毒 RNA 变化

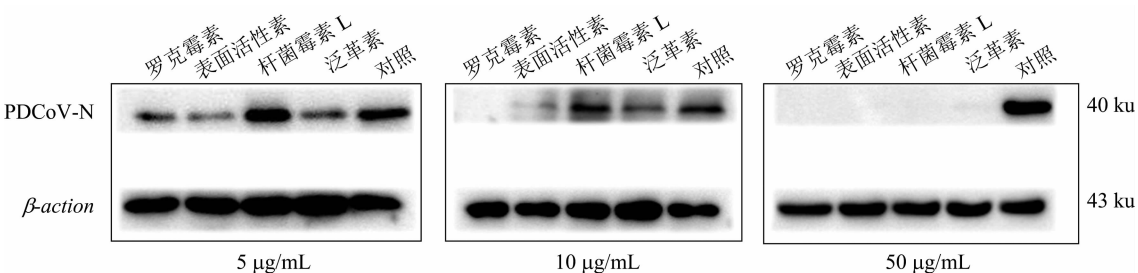


图3 Western blotting 检测 PDCoV-N 蛋白的表达

2.4 间接免疫荧光 (IFA) 检测结果

采用 IFA 方法检测“1.2.2”节细胞板中细胞存在的病毒,在倒置显微镜下观察荧光量,进一步确定抗菌肽抗病毒效果。由图 4 可知,当浓度为 5 μg/mL 的抗菌肽作用于感染了 PDCoV 的细胞时,并未对病毒增殖产生显著的影响;当抗菌肽浓度升

至 10 μg/mL 时,罗克霉素和表面活性素表现出最佳的抗病毒效果;而当抗菌肽浓度达到 50 μg/mL 时,所有抗菌肽均表现出较好的抗病毒效果。这一结果与笔者所在课题组之前使用 RT-qPCR 检测病毒 RNA 变化、Western blot 检测 PDCoV-N 蛋白的表达水平得到的结论一致。

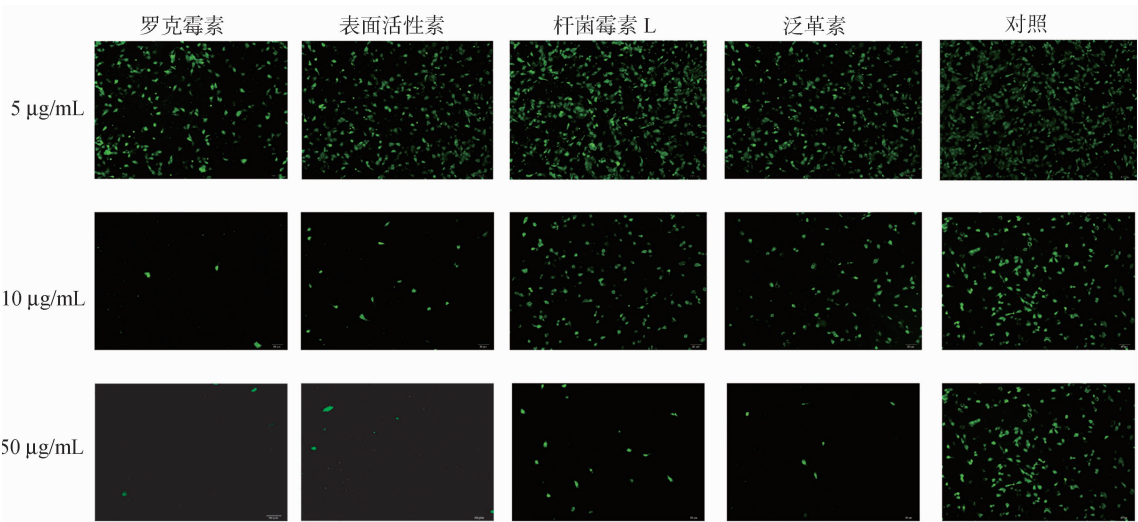


图4 IFA 检测 PDCoV 水平

3 讨论与结论

PDCoV 是一种新发现的具有包膜的 RNA 病毒,它以膜融合的方式侵入宿主细胞,引起仔猪严重腹泻。目前,尚未研制出有效的疫苗和特效治疗药物。在抗 PDCoV 药物研究中,具有红藻凝集素性质的格瑞弗森 (griffithsin) 及褪黑激素类性质的褪黑激素 (melatonin)、吲哚 (indole)、色胺 (tryptamine)、L-色氨酸 (L-tryptophan) 已被证实具有抗病毒能力^[24-25]。枯草芽孢杆菌分泌的脂肽类物质也有抗病毒作用,但未有报道作为抗 PDCoV 药物的研究。表面活性素是枯草芽孢杆菌的衍生物,有研究表明它是一种膜融合抑制剂^[26],具有抗多种包膜病毒的生物活性^[20-21],如单纯疱疹病毒、水疱性口炎病毒、猴免疫缺陷病毒和新城疫病毒。罗克霉素是笔者

所在团队新发现的脂肽类抗生素,被证实具有抗病毒活性^[23]。泛草素和杆菌霉素 L 在抗病毒活性方面未有报道。

本研究首先将表面活性素、罗克霉素、泛草素和杆菌霉素 L,以 100、50、10、5 μg/mL 浓度梯度作用于 LLC-PK1 细胞,发现 4 种抗菌肽在 100 μg/mL 浓度下,细胞形态会发生不同程度的皱缩、破裂现象,说明抗菌肽浓度达到 100 μg/mL 时具有细胞毒性,其中表面活性素和杆菌霉素 L 对 LLC-PK1 细胞毒性最强,这可能与它们具有较强的溶血活性有关^[27]。表面活性素、泛草素和杆菌霉素 L 都有表面活性剂的特性^[28-29],表面活性剂具有一定毒性,会使红细胞溶血^[30]。然而,由于表面活性剂种类繁多,其毒性也因此存在差异。其中阳离子表面活性素具有较高的溶血活性和细胞毒性^[31];相比之下,泛草素

虽然同样具有表面活性剂特性,但并不会引起强烈的溶血活性和细胞毒性。目前,泛革素的作用机制仍需进一步深入研究。本研究采用 RT-qPCR、Western blot 和 IFA 等方法检测了不同浓度的抗菌肽对 PDCoV 增殖的影响。研究发现,当罗克霉素和表面活性素的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,它们表现出较强的抗病毒效果;而泛革素和杆菌霉素 L 的完全抑制作用需要 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度。随着抗菌肽浓度的递增,其抗病毒效果也越好,这一结果与 Han 等的研究结果^[32]一致。在 4 种抗菌肽中,罗克霉素表现出最好的抗病毒效果,表面活性素次之,而泛革素和杆菌霉素 L 的效果相对较弱。

综上所述,笔者所在实验室从枯草芽孢杆菌 Bs 916 中提取的 4 种抗菌肽(表面活性素、罗克霉素、泛革素和杆菌霉素 L),浓度范围在 5~50 $\mu\text{g/mL}$ 内,能够有效抑制猪 δ 冠状病毒在细胞中的增殖,同时不会引发细胞毒性。其中,罗克霉素表现出最好的抗病毒效果,其次是表面活性素,泛革素和杆菌霉素 L 也具有一定的抗病毒活性。这一结论为寻找有效的 PDCoV 治疗方法提供了新思路 and 理论支持。此外,根据文献报道,抗菌肽除了具有抗菌作用外,还可能在免疫调节、组织修复和细胞凋亡等方面发挥重要作用。因此,这些抗菌肽具有广阔的应用前景,可被开发成为治疗 PDCoV 感染或其他病原微生物感染的新型药物。未来的研究可进一步挖掘这些抗菌肽的分子机制,深入了解其在宿主免疫调节中的作用以及对其其他病原体的杀灭作用,为新药物的开发提供更多的理论基础和实践指导。

参考文献:

- [1] Woo P C Y, Lau S K P, Lam C S F, et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(7): 3995–4008.
- [2] Xu Z C, Zhong H L, Zhou Q F, et al. A highly pathogenic strain of porcine deltacoronavirus caused watery diarrhea in newborn piglets [J]. *Virologica Sinica*, 2018, 33(2): 131–141.
- [3] Zhang J L, Chen J F, Liu Y, et al. Pathogenicity of porcine deltacoronavirus (PDCoV) strain NH and immunization of pregnant sows with an inactivated PDCoV vaccine protects 5-day-old neonatal piglets from virulent challenge [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(2): 572–583.
- [4] Li B X, Zheng L L, Li H Y, et al. Porcine deltacoronavirus causes diarrhea in various ages of field-infected pigs in China [J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(9): BSR20190676.
- [5] Sun W C, Wang L, Huang H X, et al. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus (PDCoV) in Shandong Province, China [J]. *Virus Research*, 2020, 278: 197869.
- [6] Zhang H L, Liang Q Q, Li B X, et al. Prevalence, phylogenetic and evolutionary analysis of porcine deltacoronavirus in Henan Province, China [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2019, 166: 8–15.
- [7] Homwong N, Jarvis M C, Lam H C, et al. Characterization and evolution of porcine deltacoronavirus in the United States [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 123: 168–174.
- [8] Chang C K, Lo S C, Wang Y S, et al. Recent insights into the development of therapeutics against coronavirus diseases by targeting N protein [J]. *Drug Discovery Today*, 2016, 21(4): 562–572.
- [9] Wang L Y, Byrum B, Zhang Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7): 1227–1230.
- [10] Dong N, Fang L R, Zeng S L, et al. Porcine deltacoronavirus in mainland China [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(12): 2254–2255.
- [11] Li W T, Hulsweil R J G, Kenney S P, et al. Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(22): E5135–E5143.
- [12] Jung K, Hu H, Saif L J. Calves are susceptible to infection with the newly emerged porcine deltacoronavirus, but not with the swine enteric alphacoronavirus, porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(8): 2357–2362.
- [13] Ajesh K, Sudarshani S, Arunan C, et al. Kannurin, a novel lipopeptide from *Bacillus cereus* strain AK1: isolation, structural evaluation and antifungal activities [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 115(6): 1287–1296.
- [14] Liang Q Q, Zhang H L, Li B X, et al. Susceptibility of chickens to porcine deltacoronavirus infection [J]. *Viruses*, 2019, 11(6): 573.
- [15] Zhu Z W, Zhang B Y, Cai Q H, et al. A critical review on the environmental application of lipopeptide micelles [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 339: 125602.
- [16] Sumi C D, Yang B W, Yeo I C, et al. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2015, 61(2): 93–103.
- [17] Zhao H B, Shao D Y, Jiang C M, et al. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(15): 5951–5960.
- [18] Revathi K, Chandrasekaran R, Thanigaivel A, et al. Effects of *Bacillus subtilis* metabolites on larval *Aedes aegypti* L. [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2013, 107(3): 369–376.
- [19] Lucera A, Costa C, Conte A, et al. Food applications of natural antimicrobial compounds [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 287.
- [20] Vollenbroich D, Özel M, Vater J, et al. Mechanism of inactivation of

- 2015,35(1):1-4.
- [2] Dettori M L, Pazzola M, Paschino P, et al. Association between the *GHR*, *GHRHR*, and *IGFI* gene polymorphisms and milk yield and quality traits in Sarda sheep[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(11):9978-9986.
- [3] 马 晓, 胡 毅, 熊 钢, 等. 生长激素受体及其基因研究进展[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2010, 36(增刊1):58-62.
- [4] 唐贤飞. *GH* 和 *GHR* 基因对贵州地方黄牛生长性能的影响[J]. 畜禽业, 2021, 32(9):47, 49.
- [5] 杨 洁, 赫 佳, 王丹碧, 等. InDel 标记的研究和应用进展[J]. 生物多样性, 2016, 24(2):237-243.
- [6] Liu W, Yu Y, Li G, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the promoter of the growth hormone-releasing hormone receptor gene are associated with growth and reproduction traits in chickens[J]. Animal Genetics, 2012, 43(5):564-569.
- [7] Komisarek J, Michalak A, Walendowska A. The effects of polymorphisms in *DGAT1*, *GH* and *GHR* genes on reproduction and production traits in Jersey cows[J]. Animal Science Papers and Reports, 2011, 29(1):29-36.
- [8] He L B, Kang Z H, Kang Y X, et al. Goat CMTM2:mRNA expression profiles of different alternative spliced variants and associations analyses with growth traits[J]. 3 Biotech, 2020, 10(3):1-10.
- [9] Wu M L, Zhao H D, Tang X Q, et al. Novel InDels of *GHR*, *GHRH*, *GHRHR* and their association with growth traits in seven Chinese sheep breeds[J]. Animals, 2020, 10(10):1883.
- [10] Tsushima T. Techniques of growth hormone receptor assay[J]. Nippon Rinsho, 1976, 34(3):461-465.
- [11] Gencheva D G, Velikov K P, Veleva P M. Association analysis of nucleotide polymorphisms in growth hormone (GH) and its receptor (GHR) with body weight in Californian rabbits[J]. World Rabbit Science, 2022, 30(1):95-102.
- [12] Cobanoglu O, Kul E, Gurcan E K, et al. Determination of the association of *GHR/AluI* gene polymorphisms with milk yield traits in Holstein and Jersey cattle raised in Turkey[J]. Archives Animal Breeding, 2021, 64(2):417-424.
- [13] 郑嘉辉, 冷奇颖, 张为露, 等. 矮小型芦花鸡 *GHR* 基因突变类型分析及其与正常体型芦花鸡发育差异研究[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(10):1978-1989.
- [14] Sahu A R, Eichitra V J, Rajendran R, et al. Association analysis of novel SNPs in exon 10 of the growth hormone receptor gene with growth traits in Indian sheep[J]. Veterinarski Arhiv, 2020, 90(6):593-602.
- [15] Akhatayeva Z, Li H X, Mao C, et al. Detecting novel Indel variants within the *GHR* gene and their associations with growth traits in Luxi Blackhead sheep[J]. Animal Biotechnology, 2022, 33(2):214-222.
- [16] Johansson A, Jonasson I, Gyllensten U. Extended haplotypes in the growth hormone releasing hormone receptor gene (*GHRHR*) are associated with normal variation in height[J]. PLoS One, 2009, 4(2):e4464.
- [17] 雷初朝, 蓝贤勇, 等. 2 个奶山羊品种 *GHRHR* 基因多态性及其与生长发育性状关系研究[C]//中国动物遗传育种研究进展——第十五次全国动物遗传育种学术讨论会论文集. 杨凌: 中国畜牧兽医学学会, 2009:401.
- [18] Zhao S P, Jin H, Xu L, et al. Polymorphisms of the growth hormone releasing hormone receptor gene affect body conformation traits in Chinese Dabieshan cattle[J]. Animals, 2022, 12(13):1601.
- (上接第 186 页)
- enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis* [J]. Biologicals, 1997, 25(3):289-297.
- [21] Huang X Q, Lu Z X, Zhao H Z, et al. Antiviral activity of antimicrobial lipopeptide from *Bacillus subtilis* fmbj against pseudorabies virus, porcine parvovirus, Newcastle disease virus and infectious bursal disease virus *in vitro* [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2006, 12(4):373-377.
- [22] Wang X Q, Hu W W, Zhu L Q, et al. *Bacillus subtilis* and surfactin inhibit the transmissible gastroenteritis virus from entering the intestinal epithelial cells [J]. Bioscience Reports, 2017, 37(2):BSR20170082.
- [23] 罗楚平. 枯草芽孢杆菌 Bs916 产罗克霉素、表面活性素、杆菌霉素和泛草素的结构鉴定、合成途径及生物学功能[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [24] Tang R F, Guo L J, Fan Q J, et al. Porcine deltacoronavirus infection is inhibited by Griffithsin in cell culture[J]. Veterinary Microbiology, 2022, 264:109299.
- [25] Zhai X F, Wang N N, Jiao H Q, et al. Melatonin and other indoles show antiviral activities against swine coronaviruses *in vitro* at pharmacological concentrations [J]. Journal of Pineal Research,
- 2021, 71(2):e12754.
- [26] Yuan L F, Zhang S, Wang Y H, et al. Surfactin inhibits membrane fusion during invasion of epithelial cells by enveloped viruses[J]. Journal of Virology, 2018, 92(21):e00809-e00818.
- [27] 罗楚平, 张 婧, 季冬淳, 等. 表面活性素、杆菌霉素 L、罗克霉素和泛草素 4 种脂肽类抗生素高效制备方法及其生物学活性[J]. 西南农业学报, 2018, 31(11):2307-2314.
- [28] Kaspar F, Neubauer P, Gimpel M. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review[J]. Journal of Natural Products, 2019, 82(7):2038-2053.
- [29] 李道明, 王 瑛, 陈 超, 等. 芽孢杆菌几种重要抗菌脂肽研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(5):1768-1783.
- [30] Agarwal V, Gupta V, Bhardwaj V K, et al. Avoiding hemolytic Anemia by understanding the effect of the molecular architecture of gemini surfactants on hemolysis[J]. Langmuir, 2021, 37(12):3709-3720.
- [31] 刁兆玉, 成 朋, 王仲妮. 表面活性剂溶血作用的研究进展[J]. 食品与药品, 2010, 12(3):125-129.
- [32] Han S R, Munang'andu H M, Yeo I K, et al. *Bacillus subtilis* inhibits viral hemorrhagic septicemia virus infection in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) intestinal epithelial cells [J]. Viruses, 2020, 13(1):28.