

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(5):704-709; 4 May 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

猪 β 防御素 2 成熟肽在酵母中的表达

胡翰^{1,2#}, 于宾宾^{1,2#}, 何启盖^{1,2*}

¹华中农业大学动物医学院, ²农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070

摘要:【目的】将猪 β 防御素 2 成熟肽基因片段正确整合到酵母基因组染色体上, 从而得到稳定的猪 β 防御素 2 成熟肽的毕赤酵母表达株。实现猪 β 防御素 2 成熟肽的表达。【方法】首先参考酵母偏爱密码子, 设计 3 段引物序列, 利用 PCR 技术扩增得到 β 防御 2 成熟肽基因, 构建了重组质粒 pPIC9k-GST-pBD-2 和 pPIC9k-pBD-2。将线性化的重组质粒电转化到毕赤酵母 KM71 细胞中。最后筛选得到酵母阳性克隆, 通过不断调节表达条件, 实现猪 β 防御素 2 成熟肽的表达。【结果】将 GST-pBD-2 基因序列和 pBD-2 基因序列分别成功整合到酵母 KM71 基因组中, 重组毕赤酵母工程菌构建成功; 重组酵母蛋白 GST-pBD-2 和 PBD-2 都成功获得了表达; PBD-2 成熟肽表达上清对猪霍乱沙门氏菌弱毒株 C500 有一定的抑制作用。【结论】获得表达 pBD-2 成熟肽的酵母菌株, 本实验是用真核细胞表达 pBD-2 成熟肽的一次探索, 为后续大量表达 pBD-2 成熟肽方法的研究打下了基础。

关键词: 猪 β 防御素 2, 成熟肽, 真核表达, 活性实验

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 05-0704-06

抗菌肽 (Antibacterial peptide) 又叫抗微生物肽 (Antimicrobial peptide) 或抗生素肽 (Antibiotics peptide), 是生物体受到外界病原微生物入侵时产生的一类带正电荷的小分子活性多肽^[1]。目前在猪体内, 关于防御素活性和功能的报道很少, 除 β -防御素外, α -, θ -防御素都没有提到过^[2]。据报道, 通过生物信息学方法的鉴定, 发现在猪体内共编码了 11 种 β -防御素, 这些猪 β -防御素基因被命名为: pBD-1、pBD-2、pBD-3、pBD-4、pBD-104、pBD-108、pBD-114、pBD-123、pBD-125、pBD-129、pBD-2E^[3]。与大多数 β -防御素不同, pBD-2 和 pBD-3 在骨髓和其它组织中表达, 包括胸腺、脾脏、淋巴结、十二指肠

和肝脏等。包括 pBD-2 和 pBD-3 在内的其它 6 种 pBD 在肺脏和皮肤中表达。其中研究较多的是 pBD-1 和 pBD-2, pBD-1 已经研究到了蛋白质水平。有人发现 pBD-2 基因在猪小肠内有表达^[4]。

目前猪防御素的表达主要有两种途径: 大肠杆菌表达系统与毕赤酵母表达系统。在猪 β 防御素家族中, pBD-1 的研究报道较多, 如罗刚等^[5]将 pBD-1 的基因在大肠杆菌进行了融合表达。近些年来, 酵母表达系统的研究逐渐增多, 有大量表达成功的报道, 但是除了在毕赤酵母中得到了大量表达外, 在其它如酿酒酵母中表达量却很低。解民等^[6]将人工合成的不含有信号肽的 pBD-2 基因克隆到表

基金项目: 国家生猪现代产业技术体系 (nycytx-009)

* 通信作者。Tel: +86-27-87286974; Fax: +86-27-87281795; E-mail: heqigai@yahoo.com

作者简介: #对本文有同等贡献。胡翰 (1987-), 男, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 从事抗菌肽的研究; 于宾宾 (1986-), 男, 河南平顶山人, 硕士研究生, 从事抗菌肽的研究。

收稿日期: 2010-11-22; **修回日期:** 2010-02-28

达载体 pPIC9K 中,在毕赤酵母 GS115 中表达出含有 52 个氨基酸的 pBD-2;Veldhuizen 等^[7]用人工合成含有 37 个氨基酸的 pBD-2,开展了其抑菌活性、抗病毒活性和溶血活性的研究。由于原核表达系统会影响蛋白的生物活性,而其它的一些真核系统表达的蛋白虽然具有较高的活性,但其操作复杂、生长缓慢、表达量低。本实验主要探索用毕赤酵母对 pBD-2 成熟肽进行表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:大肠杆菌 DH5 α 、猪霍乱沙门氏菌 C500⁻ (asd⁻) 由华中农业大学动物医学院传染病室保存。毕赤酵母 KM71、SMD1168 菌株为湖北大学余晓岚惠赠,毕赤酵母 GS115 菌株和分泌型真核表达质粒 pPIC9k 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:TaqDNA 聚合酶、dNTPs、

T4 DNA Ligase、限制性内切酶 (*EcoR* I、*SnaB* I、*Not* I、*Sal* I)、DNA Marker 购自大连宝生物工程有限公司;胰蛋白胨和酵母提取物购自英国 OXOID 公司;山梨醇、YNB、生物素、TSA (Tryptic Soy Broth)、TSB (Tryptic Soy Agar) 均购自 BD 公司;丙烯酰胺、双丙烯酰胺、TEMED、过硫酸铵购自 Sigma 公司;标准蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司;G418 购自日本博光公司;辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠/羊 IgG 购自 SBA 公司;其它常用试剂均为国产分析纯试剂。HPS-160 生化培养箱购自哈尔滨东联电子技术开发有限公司;5810R 和 5415D 冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司;UV-IV 紫外分析仪购自北京六一仪器厂;HQL150C 恒温摇床购自中国科学院武汉科学仪器厂。

1.1.3 引物:通用引物 AOX1 及 GST-L、GST-R 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。设计的引物见表 1。

表 1 PCR 扩增所用引物
Table 1 PCR primers used for amplification

| Primer | Sequence(5'→3') | Target sequence | Size/bp |
|--------|------------------------------|-------------------------|---------|
| GST-L | CCGCTCGAGAAAAGAATGTCCCCTATAC | GST | 678 |
| GST-R | GGAATTCGGATCCACGCGGAACAGAT | | |
| 5'AOX1 | GACTGGTTCCAATTGACAAGC | α signal peptide | 492 |
| 3'AOX1 | GGCAAATGCGATTCTGCAT | | |

1.2 pBD-2 成熟肽基因片段的扩增

根据 NCBI 报道的 (pBD-2) (登录号: NM-214442),参考毕赤酵母偏好密码子,在不改变氨基酸序列的前提下改变基因序列中的部分密码子。根据改造后的基因序列设计 3 个 DNA 片段:pBD-2-L: 5'-GGAATTCGATCATTACATTTGTGCTAAGAAGGG TGGTACTTGTAACCTTTTCTCCA-3', pBD-2-M: 5'-AGAGTAACAAGTACCTTCAATTCTGTAAACAATGG ACATGGAGAAAAGTTACA-3',pBD-2-R:5' TAAAGC GGCCGCTTATCTAATACAACACTTAGCCTTACCAGA GTAACAAGTACC-3'。在片段 pBD-2-L 的 5'端添加 *EcoR* I 酶切位点及 1 个保护性碱基,在片段 pBD-2-R 的 3'端引入 *Not* I 酶切位点及 4 个保护性碱基,设计好的 DNA 片段送上海生工生物工程技术有限公司合成。

用以上 3 条引物序列片段经 SOE-PCR(重叠延伸 PCR)技术可得到 pBD-2 成熟肽所对应的 DNA 全长序列。片段 pBD-2-L、pBD-2-M 和 pBD-2-R 按

2:1:2 的比例混合后在 PCR 仪中重叠延伸得到全长。反应条件:94℃ 2 min;94℃ 30 s;52℃ 30 s;72℃ 30 s;进行 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物回收后置于 -20℃ 保存。

1.3 酵母表达载体的构建

用 *EcoR* I 和 *Not* I 两种限制性内切酶分别对 pBD-2 的 PCR 回收产物、pPIC9k-GST 载体和 pPIC9k 载体进行双酶切,并回收酶切产物,把 pBD-2 分别克隆链接到 pPIC9k-GST 载体和 pPIC9k 载体中,分别构建表达载体 pPIC9k-GST-pBD-2 和 pPIC9k-pBD-2。

1.4 毕赤酵母 KM71 感受态细胞的制备

从 -80℃ 挑取酵母单菌落,接种至含有 5 mL YPD 培养基的 10 mL 细菌瓶中,30℃、250 r/min 培养过夜。取 50 μ L 的培养物接种至含有 50 mL 新鲜培养基的 200 mL 三角摇瓶中,28-30℃、250 r/min 培养 3-4 h,至培养基开始浑浊时取出。将细胞培养物于 4℃、0.2 \times g 离心 5 min,置于冰上。用 25 mL

的冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬; $0.2 \times g$ 离心 5 min, 置于冰上; 10 mL 冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬。 $0.2 \times g$ 离心 5 min, 置于冰上; 用 2 mL 冰预冷的 1 mol/L 的山梨醇溶液将菌体沉淀重悬。 $0.2 \times g$ 离心 5 min, 置于冰上; 用 200 μ L 的冰预冷的 1 mol/L 的山梨醇溶液将菌体沉淀重悬, 置于冰上, 现做现用。

1.5 线性化表达质粒后并电转化毕赤酵母菌 KM71

用 Sal I 分别对表达载体 pPIC9k-GST-pBD-2 和 pPIC9k-pBD-2 进行单酶切, 并回收 DNA 片段。将回收的 DNA 片段电转化酵母 KM71 感受态细胞, 设置电转仪参数: 电压 1.5 kV; 电容 25 μ F; 电阻 200 Ω 。挑取 Muts 阳性转化子, 分别接种于含 0.25, 1.0, 2.0 mg/mL G418 的 YPD 培养基平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 筛选多拷贝转化子。挑取单个 KM71 阳性转化子, 于 YPD 培养基中培养, 进行 PCR 鉴定。

1.6 阳性转化子的诱导表达、SDS-PAGE 及 Western blot 分析

将 pPIC9k-GST-pBD-2 和 pPIC9k-pBD-2 转化成功的酵母阳性转化子分别接种于含有 50 mL BMGY 培养基的三角瓶中, 28 $^{\circ}$ C, 250 r/min 培养 16 h, 4 $^{\circ}$ C 静置 2-4 h, 无菌条件下, 直接倒掉上清, 保留沉淀, 添加 BMMY (pH 6.0) 培养基 100 mL 于三角瓶中, 轻轻摇匀重悬菌体, 28 $^{\circ}$ C 条件下进行甲醇诱导培养 120 h, 每隔 24 h 补加 100% 甲醇至终浓度为 1.0% (V/V)。另外, 按 0、24、48、72、96 和 120 h 时间点分别取 1 mL 菌液样品, 置于 1.5 mL EP 管中, 4 $^{\circ}$ C $13.4 \times g$ 离心 2-3 min, 分别收集上清和菌体, 将诱导上清进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。用 Western-blotting 检测方法, 将 SDS-PAGE 中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 用 1:2000 的鼠源 GST 抗体作为一抗, 1:4000 的羊抗小鼠 IgG 作为二抗, 最后用二氨基联苯胺 (DAB) 显色。

1.7 pBD-2 表达上清抑菌活性试验

从 37 $^{\circ}$ C 培养过夜的平板上挑取猪霍乱沙门氏菌弱毒株 C500 单菌落, 在 5 mL 的 TSB 培养基中 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 孵育 6-8 h, 达到对数生长期, 将菌液浓度调至 5.0×10^5 CFU/mL。将冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右的 TSA 培养基, 铺到直径为 9 cm 的平板内, 厚度约为 8 mm, 培养基凝固后, 取 100 μ L 菌液在培养基表

面涂匀。用无菌的打孔器在平板上均匀的打下 3 个孔, 其中一个孔内添加 100 μ L pBD-2 成熟肽的酵母表达上清, 另外 2 个孔分别添加 100 μ L 空载体的酵母表达上清和酵母培养基。37 $^{\circ}$ C 过夜培养 18-20 h, 观察抑菌结果, 照相保存。

2 结果

2.1 重组毕赤酵母菌株 KM71/ pPIC9k-GST-pBD-2 和 KM71/ pPIC9k-pBD-2 的鉴定

用 AOX 通用引物进行 PCR 扩增的结果显示, 阳性重组酵母的扩增带为 1283 bp 的产物条带 (AOXI 上、下游引物之间序列 492 bp、pBD-2 片段 133 bp 和 GST 片段 678 bp 之和), 空载体对照 pPIC9k 仅扩出 492 bp 的条带。结果说明, GST-pBD-2 基因序列已经整合到酵母 KM71 基因组中。

用 AOX 通用引物进行 PCR 扩增的结果显示, 阳性重组酵母的扩增带为 625 bp 的产物条带 (AOXI 上、下游引物之间序列 492 bp 和 pBD-2 片段 133 bp 之和), 空载体对照 pPIC9k 仅扩出 492 bp 的条带。结果说明, pBD-2 基因序列已经整合到酵母 KM71 基因组中。

2.2 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

对 pPIC9k-GST-pBD-2 和 pPIC9k-pBD-2 转化成功的酵母阳性转化子进行小量诱导表达, 由于本实验采取的是分泌表达形式, 因此直接取表达上清液

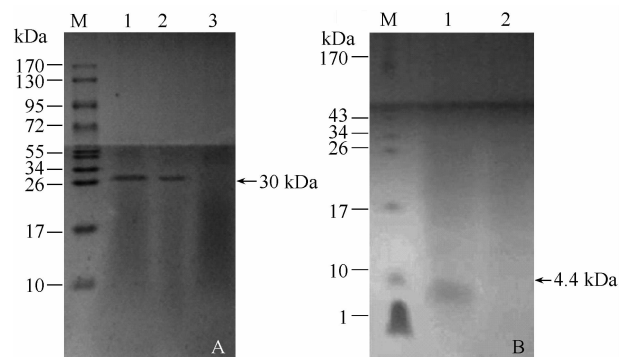


图1 GST-pBD-2 (A) 和 pBD-2 (B) 重组酵母表达上清 Tricine-SDS-PAGE 电泳

Fig. 1 Tricine-SDS-PAGE electrophoresis of expression supernatant of GST-pBD-2 recombinant yeast (A) and pBD-2 recombinant yeast (B). A: M. Protein Marker 1. GST-pBD-2 2. Empty vector control; B: M. Protein Marker, 1. pBD-2, 2. Empty vector control.

分别做电泳分析(图 1-A、1-B)。图 1-A 中的第一泳道中蛋白大小在 26 kDa 与 34 kDa 之间,与目的蛋白约 30 kDa 的大小相符合,表明 GST-pBD-2 蛋白得到表达。图 1-B 中第一泳道中蛋白大小在 1 kDa 与 10 kDa 之间,与目的蛋白 pBD-2 的大小约 4.4 kDa 相符合,表明 pBD-2 蛋白获得表达。

用 GST 商品化抗体作 Western 检测 GST-pBD-2 的表达情况(图 2),从图中发现有大小约 30 kDa 的条带,表明 GST-pBD-2 成功得到表达。

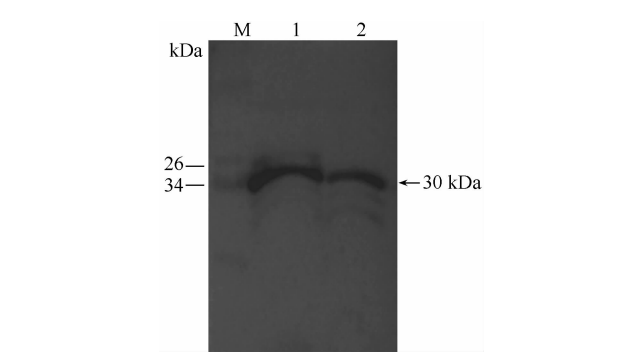


图 2 GST-pBD-2 蛋白 Western blot
Fig. 2 WesternBlot of Protein GST-pBD-2. M. Protein Marker, 1. GST-pBD-2, 2. GST.

2.3 抑菌活性试验结果

根据样品在平板上产生的抑菌圈(图 3)判断: pBD-2 成熟肽表达上清对猪霍乱沙门氏菌株 C500⁻ 有抑制作用。本实验针对其它标准菌株也进行了实验,但效果不明显,所以本试验表达出来的 pBD-2 成熟肽的活性有局限性。

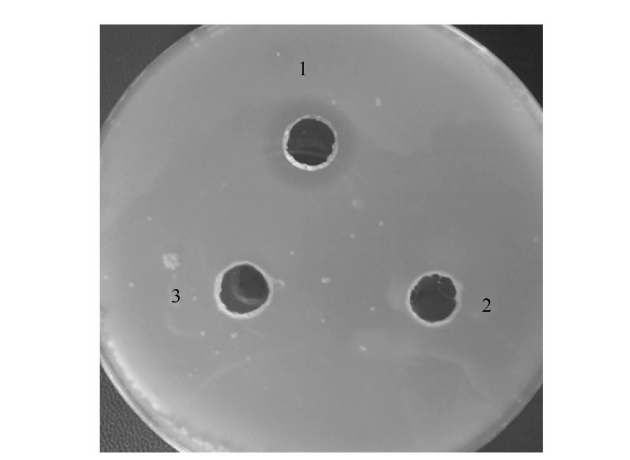


图 3 pBD-2 成熟肽对 C500⁻ 的抑菌效果
Fig.3 resistance of pBD-2 mature peptide to C500.
1. pBD-2 mature peptide supernatant, 2. empty vector control, 3. culture medium of yeast.

3 讨论

目前,猪防御素的表达的主要有两种途径:大肠杆菌表达系统与毕赤酵母表达系统。姜丽华等^[9]进行了 pBD-1 在毕赤酵母的表达。王微等^[10]成功的实现 pBD-2 基因在 HEK293T 细胞中的表达。此外,昆虫杆状病毒表达系统虽然可行,但是由于病毒感染昆虫细胞的效率、表达量低和成本高等原因,还未看到有利用此表达系统大量表达猪防御素的报道^[11]。近些年来,酵母表达系统的研究逐渐增多,有大量表达成功的报道,其中大部分都是用毕赤酵母进行表达。

根据防御素的空间结构和抗菌作用机理推断,成熟肽区域的三对二硫键对其活性有很大的影响。pBD-2 成熟肽去掉了信号肽和前片段的电荷保护后成为一种阳离子多肽,才使它有了抗菌的活性,因此 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。Veldhuizen 等通过合成的 pBD-2 成熟肽,证实了其有很好的抗菌活性。本研究没有采用基因克隆的方法从猪的组织中获得 pBD-2 成熟肽基因,而是通过合成三条引物片段,用一定的 PCR 技术扩增获得 pBD-2 成熟肽基因。采用这种方法获得基因,主要有以下 2 个出发点:首先,pBD-2 成熟肽基因序列较小,合成引物片段的方法操作更简单,稳定性更高,成本更低廉;第二,合成的引物片段可以根据巴斯德毕赤酵母的偏爱密码子来改造核算序列,能使蛋白表达量提高。本研究将 pBD-2 成熟肽基因插在 α 信号肽后面实现目的蛋白的分泌表达。

本研究将构建好的重组表达质粒 pPIC9k-GST-pBD-2 和 pPIC9k-pBD-2 线性化后,用高效简便的电击转化的方法将重组载体转化到毕赤酵母 KM71 中,经筛选得到稳定的阳性酵母转化子。通过不断的摸索表达条件,如改变诱导的方式、用量、诱导时间、诱导温度、pH 值、培养转速、添加蛋白酶抑制剂等方法对重组酵母进行诱导表达,使外源蛋白表达量在 AOX1 的启动下有所提高。pBD-2 成熟肽较短,分子质量小,纯化鉴定比较困难,融合表达能在一定程度上克服不足。本研究进行的 GST-pBD-2 融合蛋白表达量不高,但是 GST 经 Western blot 检测,GST 表达量却很高,可能的原因是 pBD-2 成熟肽

的降解或提前终止导致 GST 量的积累。

实验起初使用本实验室保存的表型为 Mut⁺ 的菌株,包括 GS115 株和 SMD1168 (湖北大学余晓岚惠赠),一直没有成功表达,后改换表型为 Muts 的 KM71 菌株,虽然有表达,但是表达量不高,这与以下几个因素有关:毕赤酵母系统的信号肽切割效率比较低,常使目的蛋白的 N-端多出几个氨基酸残基^[12],这不但影响分泌效率,还对 pBD-2 成熟肽的结构和功能有一定的影响;筛选的重组子表型同 pBD-2 成熟肽基因整合的拷贝数和高表达特性不一定对应,需要建立更好的挑选高效表达阳性重组子的方案;pBD-2 成熟肽在表达和纯化过程中易被降解;pBD-2 成熟肽在表达中可能会进行影响结构与活性的无关修饰等^[13]。另外,甲醇型毕赤酵母是用甲醇诱导表达的,甲醇有一定的毒性,限制了进一步的应用,如何尽量去除产物中的甲醇也是需要进一步研究。

由于天然的 pBD-2 成熟肽还没有纯化到,体外表达和体内产生的成熟肽活性相似程度有多大还不清楚。目前现阶段还没有商品化的 pBD-2 成熟肽抗体和关于防御素类抗菌肽的纯化工艺报道,因此 pBD-2 成熟肽的直接鉴定和纯化工艺的开发仍是亟待解决的问题。本研究中的抑菌实验表明,酵母培养基和空载体的表达上清液对猪霍乱沙门氏菌弱毒株 C500⁻ 没有抑制作用,但 pBD-2 成熟肽的酵母表达上清对其有一定的抑制作用,但这种活性不是很高,这与 pBD-2 成熟肽表达量低,活性屏蔽等原因有关。

本研究中 pBD-2 成熟肽基因在毕赤酵母中得到表达,克服了 pBD-2 天然提取繁琐,化学合成成本高等缺陷,成功构建了酵母工程菌,对后续工业化生产 pBD-2 成熟肽的研究具有极高的参考价值。

参考文献

- [1] Milner SM, Ortega MR. Reduced antimicrobial peptide expression in human burn wounds. *Burns*. 1999, 25: 411-413.
- [2] Shi J, Zhang G, Wu H, Ross C, Blecha F, Ganz T. Porcine epithelial beta-defensin 1 is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations. *Infection and Immunity*. 1999, 67: 3121-3127.
- [3] Sang YM, Patil AA, Zhang GL, Ross CR, Blecha F. Bioinformatic and expression analysis of novel porcine β -defensins. *Mammalian Genome*, 2006, 332-339.
- [4] Veldhuizen EJA, Dijk A, Tersteeg MHG, Kalkhove SIC, Meulen J, Niewold TA, Haagsman HP. Expression of beta-defensins pBD-1 and pBD-2 along the small intestinal tract of the pig: lack of upregulation in vivo upon *Salmonella typhimurium* infection. *Molecular Immunology*. 2007, 44: 276-283.
- [5] 罗刚,魏泓. 猪防御素基因 PBD-I 在大肠杆菌中的重组和融合表达. 遗传 (*Journal of Genetics and Genomics*). 2003, 25: 146-150.
- [6] 解民. β 防御素 2 基因酵母工程菌的构建和表达. 河北农业大学硕士学位论文,2008.
- [7] Veldhuizen EJA, Rijnders M, Claassen EA, Dijk A, Haagsman HP. Porcine beta-defensin-2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria. *Molecular Immunology*. 2008, 45: 386-394.
- [8] 杨湘越,兰小鹏,孙树汉. 巴斯德毕赤酵母真核蛋白表达系统的研究进展. 福建医药杂志 (*Fujian Medical Journal*). 2003, 25: 177-180.
- [9] 姜丽华,卢海蓉,黄德新,易俊波,李凌云,林枫. 猪 β -防御素 1 基因在毕赤酵母中的分泌表达. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*). 2006, 22: 1036-1039.
- [10] 王微,解民,吴凌娟,靳慧君,韩冬梅,仲飞. 猪 β -防御素-2 基因在 HEK293T 细胞中的表达. 河北农业大学学报 (*Journal of Agricultural University of Hebe*). 2009, 32: 78-81.
- [11] Bals R, Goldman M, Wilson J. Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infection and immunity*. 1998a, 66: 1225.
- [12] Cabral KM, Almeida MS, Valente AP, Almeida FC, Kurtenbach E. Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expression and Purification*. 2003, 31: 115-122.
- [13] 王艾平,王军平,粟永萍. 防御素基因工程制备研究进展. 微生物学通报 (*Microbiology*). 2008, 35: 436-442.

Expressing of porcine β -defensin-2 mature peptide in the yeast

Han Hu^{1,2#}, Binbin Yu^{1,2#}, Qigai He^{1,2*}

¹College of Veterinary Medicine, ²State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: [**Objective**] To construct the recombinant *Pichia pastoris* KM71 in which Porcine β -defensin-2 (pBD-2) mature peptide could be stably expressed and the antimicrobial effect was evaluated. [**Method**] According to the requirement of yeast codon bias for protein expression, three pairs of primers were designed for development of SOE-PCR to amplify the genes coding pBD-2 mature peptide. The resultant genes were cloned into pPIC9k and pPIC9k-Gultathione S Transferase (GST) vectors to yield the recombinant expressing vector, pPIC9K-pBD-2 and pPIC9k-GST-pBD-2. The two recombinant plasmids were linearized, followed by transformation with *Pichia pastoris* KM71 cells to produce the positive clones of recombinant yeasts. The expression conditions were continuously optimized to produce mature peptide of pBD-2. [**Result**] Gene fragments for GST-fusion PBD-2 and pBD-2 alone were amplified and integrated into genomic chromosome of the yeast KM71, respectively, and the recombinant yeasts were obtained; GST-fusion pBD-2 peptide and singular pBD-2 peptide were successfully expressed. The mature peptide of pBD-2 showed a certain inhibition effect on the growth of the *Salmonella choleraesuis* C500⁻ strain. [**Conclusion**] The pBD-2 was expressed successfully and casted a light for massive production of the pig defensin, a new antimicrobial agent.

Keywords: Porcine β -defensin-2, mature peptide, eukaryotic expression, activity in vitro

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Modern Porcine Industry Technology Research System (nycytx-009)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87286974; Fax: +86-27-87281795; E-mail: heqigai@yahoo.com

#Those authors contributed equally to this work.

Received: 22 November 2010/Revised: 28 February 2011

系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour-Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作[参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应表明"树"上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为"Time New Roman",字号为"8p"。可以选用两种方式——(A)文件格式为"*.Tif",分辨率为 600 线;(B)文件格式为"word",画出树,输入文字。