

猪杀菌/通透性增加蛋白基因 siRNA 载体构建及干扰效果评价

吴正常¹, 殷学梅¹, 夏日炜¹, 孙寿永¹, 朱国强², 吴圣龙^{1*}, 包文斌^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009)

摘要: 本研究旨在构建并筛选猪(*Sus scrofa*) *BPI* 基因的高效 siRNA 干扰载体, 为在细胞水平上研究猪 *BPI* 基因的功能和作用机制提供基础。参照猪 *BPI* 基因(GenBank 登录号: EF436278)全长编码区序列, 设计其特异性发夹 siRNA 干扰片段, 并将其克隆插入 pcDNA 6.2-GW/EmGFPmiR 干扰载体中, 构建猪 *BPI* 基因 4 个干扰 siRNA 表达载体 RB1、RB2、RB3 和 RB4, 1 个阴性对照 NC, 并通过 PCR 和测序进行验证, 构建成功后转染猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 并检测其干扰效率。结果发现, 所构建的 4 个特异性 siRNA 载体均可显著降低猪 *BPI* 基因 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 其中 RB4 载体干扰效果最好, 其干扰效率达到 69%。本研究成功筛选可靶向干扰猪 *BPI* 基因的高效 siRNA, 为今后在细胞水平进一步研究 *BPI* 基因对猪肠道革兰阴性菌感染抗性的作用及其机制奠定了试验基础。

关键词: 猪; *BPI* 基因; siRNA 载体; RNA 干扰

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)03-0491-06

Construction and Evaluation of Porcine Bactericidal/Permeability-increasing Protein Gene (*BPI*) siRNA Expression Vector

WU Zheng-chang¹, YIN Xue-mei¹, XIA Ri-wei¹, SUN Shou-yong¹, ZHU Guo-qiang²,
WU Sheng-long^{1*}, BAO Wen-bin^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: This study was conducted to construct and select the efficient siRNA interference vector for porcine *BPI* gene, which provided the foundation for studying the function and mechanism of porcine *BPI* gene at the cellular level. Referring to the whole coding sequence of porcine *BPI* gene (GenBank accession number: EF436278), porcine *BPI* specific hairpin siRNA fragments were designed and inserted into pcDNA 6.2-GW/EmGFPmiR vector. Four pairs of siRNA expression vectors (RB1, RB2, RB3, RB4) and one pair of negative control (NC) were constructed by PCR and sequencing verification. Then the above vectors were transfected into IPEC-J2 intestinal epithelial cell and further the interference effect was detected. The results showed that 4 *BPI*-specific siRNA vectors all reduced the *BPI* gene mRNA expression ($P < 0.05$). Meanwhile the interference effect of RB4 vector was the best, whose efficiency reached 69%. This study successfully screened out the efficient siRNA vector which could exclusively interfere porcine *BPI* gene expression, which provided experimental basis for further studying the *BPI* gene function and mechanism for the re-

收稿日期: 2014-05-16

基金项目: 国家自然科学基金(31172183; 31140027); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2014ZX08006-001B); 江苏省科技支撑计划(BE2012330; BE2013345; BE2014357); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 吴正常(1987-), 男, 江苏南京人, 博士生, 主要从事猪遗传育种研究, E-mail: wuzhengchang@126.com

* 通信作者: 包文斌, 博士, 研究员, 主要从事猪抗病育种研究, E-mail: wbbao@yzu.edu.cn; 吴圣龙, 研究员, 博导, 主要从事猪遗传育种研究, E-mail: slwu@yzu.edu.cn

sistance to gram-negative bacteria infection in porcine intestinal tract at the cellular level.

Key words: porcine; *BPI* gene; siRNA vector; RNA interference

杀菌/通透性增加蛋白(Bactericidal/permeability-increasing protein, BPI)是嗜中性粒细胞(Poly-morphonuclear neutrophils, PMNs)分泌的一种阳离子抗菌糖蛋白,不仅可以杀灭革兰阴性细菌(Gram-negative bacterial, GNB)、中和内毒素(脂多糖),还具有促进补体活化、抑制炎性介质释放和抗真菌等功能,在机体天然防御系统中发挥着重要作用^[1-2]。目前 BPI 已被认为是极有发展前途的新一代高效杀菌、中和内毒素的药物蛋白,在抗微生物感染中具有有良好的应用前景。A. Chockalingam 等^[3]人工合成了含有人 BPI 两个活性区域(氨基酸 90~99 和 148~161)的衍生肽,这两个活性区域分别具有杀菌和中和内毒素作用。R. G. Little 等^[4]对 BPI 结构与功能的研究发现 BPI 具有结合并中和肝素的功能,可能具有抑制血管生成作用;S. Alexander 等^[5]研究表明, BPI 第 148~161 位氨基酸(第 3 个结构域)多肽在活体内具有强大的抗真菌活性。相对于人 *BPI* 基因功能的研究来说,猪 *BPI* 的研究相对滞后,猪 *BPI* 基因位于染色体 7q21-23, 包含 15 个外显子和 14 个内含子^[6],目前已经研究表明 *BPI* 基因外显子 4 和 10 多态性与猪对沙门氏菌的易感性有关,进而把 *BPI* 基因确立为抗病育种候选基因^[7]。肠毒素性大肠杆菌 F18(ECEC F18)菌株是引起仔猪腹泻和水肿病的主要革兰阴性菌,本课题组前期研究发现,猪 *BPI* 基因 mRNA 表达水平与 *E. coli* F18 菌株感染有关^[8-10]。*E. coli* F18 菌株主要依靠菌毛黏附于小肠上皮细胞,从而引起仔猪发病,因此猪 *BPI* 基因是否具有抵抗 *E. coli* F18 菌株感染作用有待细胞水平上进一步验证。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种利用 RNA 分子在 mRNA 水平关闭相应序列基因的表达或使其沉默的技术,也就是序列特异性的转录后基因沉默, RNAi 技术已经成为研究基因功能的一种重要手段。

本研究以猪 *BPI* 基因为研究对象,设计合成多个 siRNA 表达载体,分别转染猪小肠上皮细胞 IPEC-J2,通过分析其转染效率及对 *BPI* 基因表达水平的影响来评价干扰效果,筛选得到靶向该基因的高干扰效率 siRNA,为今后在细胞水平开展猪 *BPI* 基因的功能研究及其作用机制奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞 干扰载体 pcDNATM 6.2-GW/EmGFPmiR 购自 Invitrogen 公司(Catalog No. K4936-00),克隆宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存, IPEC-J2 小肠上皮细胞系由美国宾夕法尼亚大学惠赠。

1.1.2 试剂与酶 载体构建试剂盒 BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP 购自 Invitrogen 公司(Catalog No. K4936-00)、胎牛血清、DMEM 培养基(GIBCO 公司,美国)、LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent、PureLink HiPure Plasmid DNA Kit (Invitrogen, Catalog No. K2100-03)、T4 DNA Ligase、Ligation Buffer、Annealing Buffer、TRIZOL 均购自 Invitrogen 公司; SYBR premix ExTaq (TaKaRa, 大连)、脂质体 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, 美国)。

1.2 引物与 siRNA 设计

根据已发表的猪 *BPI* 和 *GAPDH* 基因序列设计 Real-time PCR 引物。*BPI* 基因引物设计参照 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中 NM_001159307 序列,遵循跨外显子设计等原则利用 Primer express 2.0 软件进行设计,由上海英骏生物技术有限公司合成。*BPI* 基因预期扩增片段长度为 136 bp,正向引物:5'-ATATCGAATCTGCGCTCCGA-3';反向引物:5'-TTGATGCCAACCATCTCTGTCC-3'。以 *GAPDH* 作为内参基因,正向引物:5'-ACATCATCCCTGCTTCTACTGG-3';反向引物:5'-CTCGGACGCTGCTTCAC-3',预期扩增片段长度为 187 bp。

运用 Invitrogen RNAi Designer 软件,对猪 *BPI* 基因(GenBank 登录号:EF436278)编码区不同位置靶序列,设计 4 条 siRNA 干扰序列(RB1、RB2、RB3 和 RB4)和 1 条阴性对照序列(NC)(表 1),并运用 BLAST 工具将选定序列与猪基因组进行比对,确保序列的特异性。模板(5'→3')设计包括:(1)正义链 5'端添加 TGCTG,反义链 5'端添加 CCTG;(2)21 nt 干扰序列的互补序列;(3)正义链 loop 环:GTTTTGGCCACTGACTGAC,反义链 loop 环:GTCAGTCAGTGGCCAAAAC。

表 1 siRNA 载体序列及引物设计

Table 1 siRNA vector sequence and primer design

siRNA 载体名称 siRNA vector name	干扰序列 Interference sequence	miRNA 寡聚单链 DNA (5'→3') miRNA oligomerization single-stranded DNA
RB1	ATAACGTCCTTTCCCAAAGTA	F: TGCTGATAACGTCCTTTCCCAAAGTAGTTTT- GGCCACTGACTGACTACTTTGGAAGGACGTTAT R: CCTGATAACGTCCTTCCAAAGTAGTCAGTCA- GTGGCCAAAACACTACTTTGGGAAAGGACGTTATC F: TGCTGATTCTGTCCACTTTGGCTGTCGTTTTG- GCCACTGACTGACGACAGCCAGTGGACAGAAT R: CCTGATTCTGTCCACTGGCTGTCGTCAGTCAG- TGGCCAAAACGACAGCCAAAGTGGACAGAATC F: TGCTGACAAAGGTGAGGTCAAGGCCAGTTTT- GGCCACTGACTGACTGGCCTTGCTCACCTTTGT R: CCTGACAAAGGTGAGCAAGGCCAGTCAGTCA- GTGGCCAAAACACTGGCCTTGACCTCACCTTTGTC F: TGCTGTCCAGGAGCAGCTTGTTCACGTTTTG- GCCACTGACTGACGTTGAACACTGCTCCTGGA R: CCTGTCCAGGAGCAGTGTTCAACGTCAGTCAG- TGGCCAAAACGTTGAACAAGCTGCTCCTGGAC F: TGCTGAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTG- GCCACTGACTGACGCTCCACGCAGTACATTT R: CCTGAAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAG- TGGCCAAAACGTCCTCCACGCGCAGTACATTT
RB2	ATTCTGTCCACTTTGGCTGTC	
RB3	ACAAAGGTGAGGTCAAGGCCA	
RB4	TCCAGGAGCAGCTTGTTC AAC	
NC	AAATGTACTGCGCGTGGAGAC	

1.3 siRNA 载体构建及验证

1.3.1 退火 将 4 对合成好的 miRNA 寡聚单链 DNA 用 ddH₂O 溶解成 100 μmol · L⁻¹, 退火体系为 20 μL: 10 × Oligo annealing buffer 2 μL, 正义链 (100 μmol · L⁻¹) 5 μL, 反义链 (100 μmol · L⁻¹) 5 μL, ddH₂O 8 μL。将 4 份上述 Oligo 混合物在 95 °C 加热 5 min, 然后放置室温自然冷却 20 min, 形成双链 DNA。

1.3.2 连接和转化 将退火的双链 DNA 继续稀释成 10 nmol · L⁻¹ 浓度, 用 T4 DNA 连接酶将退火产物和 miRNA 表达载体 pcDNATM 6. 2-GW/EmGFPmiR 连接, 反应体系为 20 μL: 5 × ligation buffer 缓冲液 4 μL, pcDNA6. 2-GW/EmGFP 载体 2 μL, 退火产物 (10 nmol · L⁻¹) 4 μL, T4 DNA 连接酶 (1 U · μL⁻¹) 1 μL, ddH₂O 9 μL, 在室温条件下连接 30 min。将重组质粒转化感受态细胞 DH5α, 琼脂平板培养菌落, 37 °C 培养过夜。

1.3.3 阳性克隆载体筛选和鉴定 每组挑选 4 个大小适宜的单菌落接种于 3 mL LB 液体培养基 (含 Amp 100 ng · mL⁻¹) 37 °C 摇床振荡培养 12 h, 将菌液以 pcDNATM 6. 2-GW/EmGFPmiR 载体通用引物 (正向测序引物: 5'-GGCATGGACGAGCTG-

TACAA-3', 反向测序引物: 5'-CTCTAGATCAAC-CACTTTGT-3') 进行 PCR 筛选含有插入片段序列的阳性克隆。进一步测序验证重组克隆中插入序列是否与设计的 Oligo 序列一致。验证无误后扩增质粒, 制备纯化的重组质粒 DNA。

1.4 干扰效果评价

1.4.1 细胞培养及转染 利用普通质粒小抽试剂盒抽提重组质粒, 猪小肠上皮细胞系 IPEC-J2 在 2 mL 完全培养液 (F12 : DMEM = 1 : 1, 10% 胎牛血清) 进行培养, 培养条件为 7 °C、5% CO₂。按照 1.0 × 10⁶ 的密度接种于 6 孔板, 培养至 70% ~ 80% 时进行转染处理。参照脂质体 LipofectamineTM 2000 说明书, 分为 5 组: RB1 组、RB2 组、RB3 组、RB4 组和阴性对照组 NC, 每组 3 个重复, 转染 24 h 后提取细胞总 RNA。

1.4.2 检测 BPI 基因 mRNA 表达情况 转染 24 h 后, 利用 Trizol 法分别提取 5 组细胞的总 RNA, 反转录合成 cDNA, 应用 SYBR 试剂盒, 以 GAPDH 作为内参基因, 进行实时荧光定量 RT-PCR 反应, PCR 扩增目的 DNA 片段反应体系为 25 μL: 模板 1.0 μL, 10 × PCR buffer 2.5 μL, Mg²⁺ (25 mmol · L⁻¹) 1.5 μL, 引物 (10 μmol · L⁻¹) 各

0.5 μL , dNTP (10 $\text{m mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , *Taq* 酶 (5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , 以及 ddH₂O 18.3 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 min 后,扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,33 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。收集熔解曲线,相对定量的结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行处理,计算 *BPI* 基因 mRNA 相对表达量。

2 结果

2.1 阳性克隆菌液 PCR 检测及克隆测序鉴定

每组挑选菌落进行培养,用载体通用引物扩增,得到 PCR 产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 产物片段大小约为 278 bp,与预期结果相符,表明 RB1、RB2、RB3、RB4 和阴性对照 NC 均为阳性克隆(图 1)。阳性克隆测序,测序结果(图 2)与设计的序列完全吻合,表明猪 *BPI* 基因的 siRNA 干扰载体构建成功。

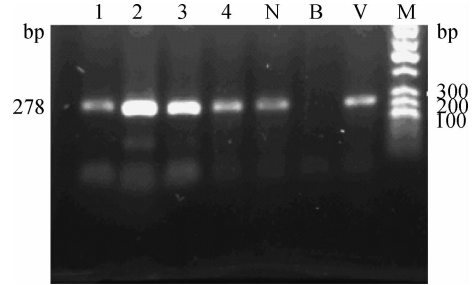
2.2 重组表达质粒转染效率

重组质粒 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR-RB1~RB4 分别转染 IPEC-J2 小肠上皮细胞,在倒置荧光显微镜下观察可见靶细胞发出绿色荧光(图 3),这表明通过重组表达质粒转入细胞的 *BPI* 干扰片段均可在靶细胞中有效表达。

2.3 干扰载体对 *BPI* 基因表达的影响

猪 *BPI* 基因 siRNA 重组质粒转染猪 IPEC-J2 小肠上皮细胞,每组设置 3 个重复,分别转染 24 h,提取细胞 RNA 进行 RT-PCR 分析,结果见图 4。

与阴性对照组(NC)相比,RB1、RB2、RB3 和 RB4 均显著降低了 *BPI* 基因在猪 IPEC-J2 小肠上皮细胞中的表达量($P < 0.05$),它们的干扰效率分别为 48%、63%、46% 和 69%,由此可以看出 RB4 载体的干扰效果最好。



1~4. RB1、RB2、RB3 和 RB4 siRNA 重组质粒;N. 阴性对照;B. 空白对照;V. pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR 空载体;M. DNA 相对分子质量标准
1-4. RB1, RB2, RB3 and RB4 siRNA recombinant plasmids, respectively; N. Negative control; B. Blank control; V. pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR vector; M. DNA marker

图 1 菌液 PCR 产物鉴定结果

Fig. 1 Result of bacterial PCR products

3 讨论

RNA 干扰是高度保守的双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA) 介导的相应 mRNA 降解的基因沉默机制,作为沉默特定基因的新技术,为基因功能的研究提供了一种高效、简便的方法^[11-13]。RNAi 首先是 siRNA 的获得,目前 siRNA 的获得

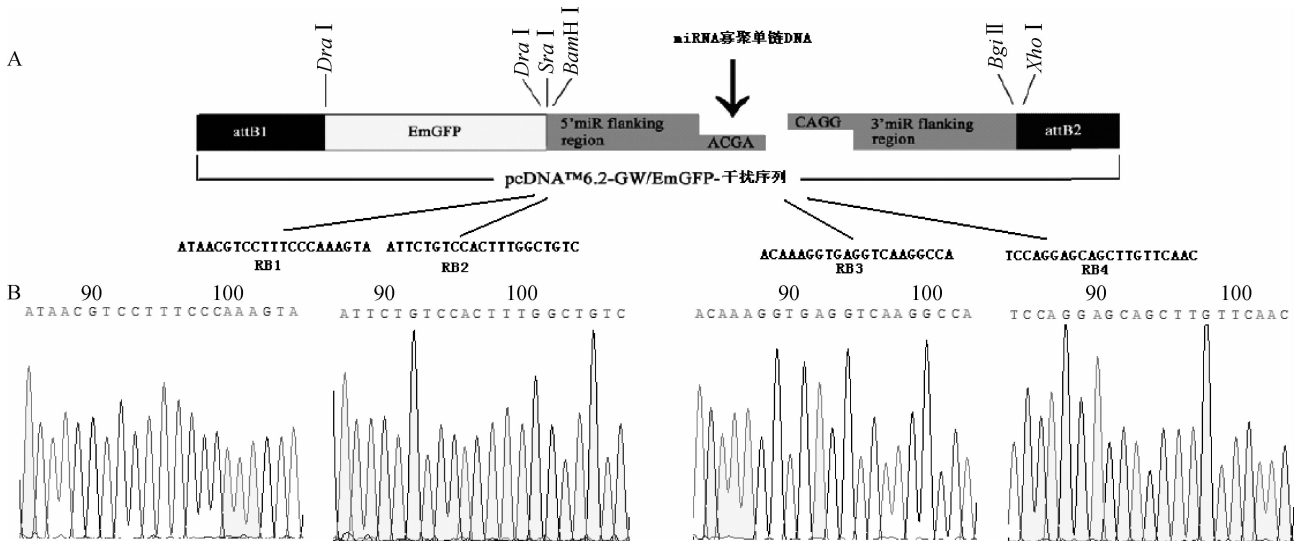
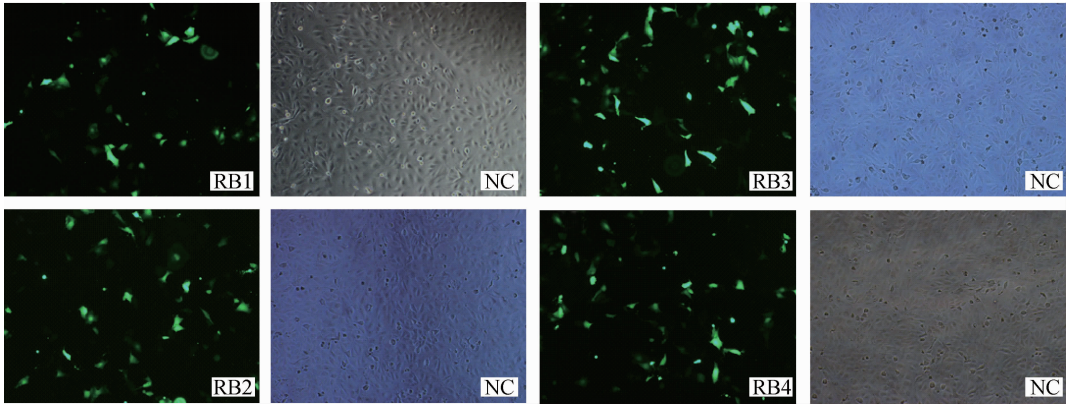


图 2 *BPI* 基因 4 个 siRNA 干扰序列插入 pcDNATM6.2-GW/EmGFP/miR 载体的位置模式图(A)和测序图(B)

Fig. 2 Location model map (A) and sequencing map (B) of 4 siRNA interference sequences of *BPI* gene inserted into the pcDNATM6.2-GW/EmGFP/miR vector

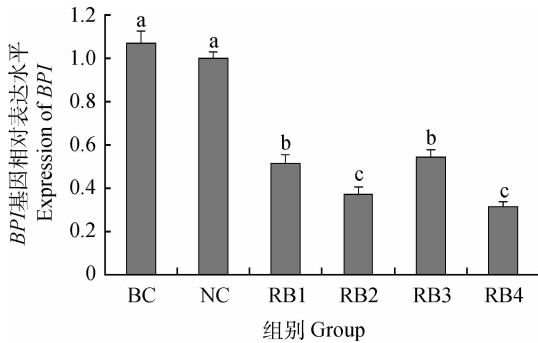


RB1、RB2、RB3 和 RB4 分别代表了 pcDNATM 6. 2-GW/EmGFPmiR-RB1、RB2 RB3、RB4 质粒侵染 IPEC-J2 小肠上皮细胞荧光显微镜观察结果

RB1、RB2、RB3 and RB4 represent fluorescence microscope observation of IPEC-J2 intestinal epithelial cells infected by pcDNATM 6. 2-GW/EmGFPmiR-RB1, RB2, RB3, RB4

图 3 BPI 干扰质粒侵染 IPEC-J2 小肠上皮细胞荧光显微镜观察

Fig. 3 Fluorescence microscope observation of IPEC-J2 intestinal epithelial cells infected by BPI interference plasmid



BC. 空白对照; NC. 阴性对照; RB1、RB2、RB3 和 RB4. 干扰载体。a、b 和 c. 不同字母之间差异显著 ($P < 0.05$)。内参基因为 *GAPDH*, $n=3$

BC. Blank control; NC. Negative control; RB1, RB2, RB3 and RB4. Interference vector. a, b, c. Different letters represent significant difference ($P < 0.05$). The reference gene was *GAPDH*, $n=3$

图 4 干扰载体转染猪 IPEC-J2 小肠上皮细胞后 BPI 基因 mRNA 的相对表达量

Fig. 4 Expression level of BPI mRNA in porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells transfected with interference vector

方式有多种,最常用的是人工化学合成与载体表达,化学合成的 siRNA 不仅成本高,在体外也容易被 RNase 降解,转染至细胞内起瞬时干扰作用,不能长期稳定地发挥作用,效果不稳定,尤其对于一些原代细胞,转染效率偏低,降低了试验结果的可靠性。其次是 siRNA 设计,一般 RNAi 成功与否关键在于 siRNA 的设计,许多学者在大量试验基础上总结了详细的 siRNA 设计原则^[14-15]。然而大多数情况下,在所设计的 siRNAs 中,一般只有 1/5 能有效地沉

默目的基因^[16],因此高干扰效率 siRNAs 的筛选对今后试验开展至关重要。本研究在此基础上,以 pcDNATM 6. 2-GW/EmGFPmiR 为 siRNA 的表达载体,成功构建了猪 BPI 基因的 4 种特异性 siRNA 表达载体,分别通过转染猪小肠上皮细胞,评价其干扰效率。结果发现,构建的干扰载体中干扰效率最高能达到 69%,并且显著降低了 BPI 基因在猪小肠上皮细胞中的表达水平。

近年来,有关学者对 BPI 蛋白结构和功能已经进行了比较系统的理论研究。BPI 蛋白 N 末端区具有较强的杀灭革兰阴性菌和中和内毒素作用,其 LPS 结合区域位于 80~100 氨基酸;而 C 末端区能避免 BPI 蛋白被细胞内酶消化降解,保持 BPI 蛋白结构的稳定性,同时还可以增强机体细胞的免疫调理作用^[17-18],研究表明,BPI 蛋白或其功能性氨基酸片段对大肠杆菌、志贺痢疾杆菌、沙门氏菌、变形杆菌、奈瑟球菌等多种革兰阴性菌具有的抑制或杀灭作用,且这种抑制或杀灭作用与其和细菌相互作用的时间有关^[19-20],结合 BPI 功能来看,BPI 具有很强的杀菌能力,而大肠杆菌 F18 菌株是肠道中主要的革兰阴性菌,也是导致断奶仔猪腹泻的主要病原菌。本课题组前期研究发现猪 BPI 基因表达上调与 F18 大肠杆菌抗性相关^[8-10],由此推测猪 BPI 可能也具有杀灭 F18 大肠杆菌的作用,但这均有待进一步在细胞水平上进行相关验证与分析。本试验成功筛选可靶向干扰猪 BPI 基因的高效 siRNA,下一步可以利用本试验成功构建的高干扰效率 siRNA 载体来转染猪小肠上皮细胞系,同时结合猪小肠上皮

细胞与革兰阴性菌的体外黏附试验,在细胞水平上进一步研究猪 *BPI* 是否可以抑制或杀灭革兰阴性菌。除此之外,还可以进一步分析 *BPI* 干扰是否可以影响到其调控通路中其它基因的表达,为 *BPI* 基因作用机制的研究提供一定的依据。

参考文献 (References):

- [1] WEISS J, MUELLO K, VICTOR M, et al. The role of lipopolysaccharides in the action of the bactericidal/permeability-increasing neutrophil protein on the bacterial envelope[J]. *J Immunol*, 1984, 132(6): 3109-3115.
- [2] IOVINE N M, ELABACH P, WEISS J. An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(20): 10973-10978.
- [3] CHOCKALINGAM A, MCKINNEY C E, RINALDI M, et al. A peptide derived from human bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) exerts bactericidal activity against Gram-negative bacterial isolates obtained from clinical cases of bovine mastitis[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 125(2): 80-90.
- [4] LITTLE R G, KELNER D N, LIM E, et al. Functional domains of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI23)[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(3): 1865-1872.
- [5] 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.
- [6] SHI X W, MELLENCAMP M A, TUGGLE C K. Compete cDNA cloning and polymorphisms at porcine BPI; associations with bacterial load and immune response traits in pigs[C]. Plant and Animal Genome Conference Proceedings, 2003: 231.
- [7] CHRISTOPHER K T, THOMAS J S, SHI X W, et al. Genetic markers for improved disease resistance in animals (BPI)[C]. United States, Kind Code: A1, Patent Application: 20040234980, Nov 25.
- [8] 叶兰, 瞿臣, 刘璐, 等. 仔猪 *BPI* 基因表达水平与大肠杆菌 F18 菌株感染的关系[J]. 遗传, 2011, 33(11): 1225-1230.
- YE L, ZI C, LIU L, et al. Study on the relationship between the expression of *BPI* gene and *Escherichia coli* F18 infection in piglets[J]. *Hereditas*, 2011, 33(11): 1225-1230. (in Chinese)
- [9] LIU L, WANG J, ZHAO Q H, et al. Genetic variation in exon 10 of the *BPI* gene is associated with *Escherichia coli* F18 susceptibility in Suta piglets [J]. *Gene*, 2013, 523: 70-75.
- [10] ZHU J, ZI C, WU Z C, et al. Age-dependent expression of the *BPI* gene in Suta piglets[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(2): 2120-2126.
- [11] ELBASHIR S M, HARBORTH J, WEBER K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. *Methods*, 2002, 26(2): 199-213.
- [12] 尹志红, 王恩峰, 白瑞, 等. RNAi 对小鼠胚胎成纤维细胞中 *MC1R* 基因表达的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(2): 218-224.
- YIN Z H, WANG E F, BAI R, et al. Effect of RNAi on *MC1R* expression in mouse embryo fibroblasts[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(2): 218-224. (in Chinese)
- [13] 徐正刚, 杨伦, 曾勇庆, 等. RNA 干扰沉默 *PID1* 基因肉兔模型的构建[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(5): 750-756.
- XU Z G, YANG L, ZENG Y Q, et al. Construction of transgenic rabbit model by RNA interfering *PID1* gene[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(5): 750-756. (in Chinese)
- [14] TUSCHL T. Selection of siRNA sequences for mammalian RNAi[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2006, doi:10.1101/pdb.prot4339.
- [15] DALLAS A, JOHNSTON B H. Design and chemical modification of synthetic short shRNAs as potent RNAi triggers[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 942: 279-290.
- [16] KAPADIA S B, BRIDEAU-ANDERSEN A, CHISARI F V. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(4): 2014-2018.
- [17] LITTLE R G, KELNER D N, LIM E. Functional domains increasing protein (rBPI23) of recombinant Bactericidal/permeability-increasing protein[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(3): 1865-1872.
- [18] OOI C E, WEISS J, DOERFLER M E, et al. Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils [J]. *J Exp Med*, 1991, 174: 649-655.
- [19] WEISS J, BECKERDITE-QUAGLIATA S, ELBACH P. Resistance of gram-negative bacteria to purified bactericidal leukocyte proteins; relation to binding and bacterial lipopolysaccharide structure[J]. *J Clin Invest*, 1980, 65(3): 619-628.
- [20] LEVY O. A neutrophil-derived anti-infective molecule: bactericidal/permeability-increasing protein[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(11): 2925-2931.