

鸽 β -防御素 5 基因克隆及其抗菌活性

辛胜男^{1,2}, 张可心^{1,2}, 张名岳^{1,2}, 韩宗玺², 邵昱昊², 刘晓丽², 刘胜旺², 马得莹¹

1 东北农业大学 动物营养研究所, 黑龙江 哈尔滨 150030

2 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室/禽传染病研究室, 黑龙江 哈尔滨 150001

辛胜男, 张可心, 张名岳, 等. 鸽 β -防御素 5 基因克隆及其抗菌活性. 生物工程学报, 2012, 28(11): 1294-1305.
Xin SN, Zhang KX, Zhang MY, et al. Cloning and antimicrobial activity of pigeon avian β -defensin 5. Chin J Biotech, 2012, 28(11): 1294-1305.

摘要: 从鸽的骨髓和肝组织中扩增到 2 个禽 β -防御素 (*AvBD*) 基因, 在大肠杆菌中高效表达, 检测其重组蛋白的抗菌活性。应用 RT-PCR 方法从鸽的骨髓和肝脏组织中扩增 *AvBD5* 基因, 根据已发现的禽 β -防御素和部分哺乳类动物 β -防御素-5 的氨基酸序列构建系统进化树, 将该基因克隆到大肠杆菌原核表达载体 pGEX-6p-1 上进行原核表达, 对该重组蛋白进行纯化, 测定体外抗菌活性与理化特性。测序得到这 2 个基因的 cDNA 大小均为 201 bp, 编码 66 个氨基酸残基, 内含 6 个位置保守的半胱氨酸残基。经遗传进化分析发现, 该基因推导的两组氨基酸序列与鸭 *AvBD5* 的同源性最高, 分别为 87.9% 和 78.8%, 这两组氨基酸序列的同源性为 83.3%。因此, 将其分别命名为鸽 *AvBD5 α* (骨髓) 和鸽 *AvBD5 β* (肝脏)。进一步将这两个基因分别亚克隆到大肠杆菌 pGEX-6p-1 载体中进行原核表达。两个重组融合蛋白经纯化后, 通过菌落计数法测定其体外抗菌活性, 盐离子浓度对其抗菌活性的影响, 及其融合蛋白的溶血活性。结果表明, 重组鸽 *AvBD 5 α* 、*AvBD 5 β* 融合蛋白的分子量约为 32 kDa。具有明显的抗菌活性, 对 12 种细菌均有不同程度的抑制作用, 高盐浓度对其抗菌活性显著影响。此外, 这两个重组蛋白对红细胞无显著溶血活性。

关键词: 鸽 β -防御素 5, 重组蛋白, 抗菌活性

Received: May 14, 2012; **Accepted:** July 24, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30972110).

Corresponding author: Deying Ma. Tel: +86-451-55190862; E-mail: mdy296@yahoo.cn

国家自然科学基金 (No. 30972110) 资助。

Cloning and antimicrobial activity of pigeon avian β -defensin 5

Shengnan Xin^{1,2}, Kexing Zhang^{1,2}, Mingyue Zhang^{1,2}, Zongxi Han², Yuhao Shao², Xiaoli Liu², Shengwang Liu², and Deying Ma¹

1 College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

2 Division of Avian Infectious Disease, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, Heilongjiang, China

Abstract: The objective of the study was to clone avian β -defensin (*AvBD*) 5 gene from pigeon bone marrow tissues and liver tissues, to express the recombinant *AvBD5* protein in *E. coli*, and to determine its antimicrobial activity. The mRNA of duck *AvBD5* was cloned from pigeon bone marrow tissues and liver tissues by RT-PCR. In addition, phylogenetic relationships between amino acid sequence of the pigeon *AvBD5*, *AvBDs* from other avian species, and some mammalian beta-defensin-5 were analyzed. The cDNA of pigeon *AvBD5* was sub-cloned into pGEX-6p-1 vector to construct recombinant plasmid pGEX-pigeon *AvBD5*. The recombinant protein was expressed into *E. coli* and purified. Antimicrobial activity and physical-chemical stability of the recombinant fusion protein were measured *in vitro*. The complete nucleotide sequence of both cDNAs contained 201 bp nucleotides, encoding a polypeptide of 66 amino acids. Both β -defensins have six conserved cysteines. Phylogenetic relationships were analyzed. Both pigeon *AvBDs* shared the highest amino acid homology (87.9% and 78.8%) with duck *AvBD5*. So it was named as pigeon *AvBD5 α* (bone marrow) and *AvBD5 β* (liver). Both recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21 and the bacteria were induced with Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG). After purification, antibacterial activity of the purified was investigated. In addition, effect of ionic strength on the antibacterial activity, and hemolytic recombinant protein activity of the purified recombinant protein were investigated. A 32 kDa protein was highly expressed. Both purified recombinant pigeon *AvBD5 α* and *AvBD5 β* exhibited extensive antimicrobial activities against 12 bacteria, including Gram-positive and Gram-negative. In high salt ions concentrations, antibacterial activity of both recombinant proteins was decreased. In addition, the hemolysis activity of recombinant protein was extremely low.

Keywords: pigeon β -defensin 5, recombinant protein, antimicrobial activity

近年来, 抗生素滥用所引发的问题日益受到人们的关注, 因此, 研究无污染、无残留、无毒副作用的新型抗菌制剂代替抗生素作为饲料添加剂已成为畜牧业要解决的首要问题。抗菌肽是生物体内产生的一类具有广谱抗菌活性的小分子肽, 是机体先天性免疫系统的重要组成部分, 在抵抗外源病原体的入侵方面发挥重要作用^[1-3]。因此, 开展禽 β -防御素研究对于进一步探讨禽 β -防御素在体内、外的作用及其机理具

有重要意义。禽 β -防御素 (β -defensin, *AvBD*) 是一类广泛存在于禽体内的抗菌肽, 是禽类先天免疫防御系统的重要组成部分, 在机体局部抗感染与免疫方面发挥着重要作用, 是机体抵御外界微生物侵袭的第一道化学屏障, 并且具有广谱抗菌、抗病毒和免疫增强作用, 对机体无毒害、无残留, 因此进一步研究禽 β -防御素在体内、外的作用及其机理具有重要意义。目前已从鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸵鸟和企鹅等禽类体内分离到 40 余

种禽 β -防御素,其主要分子特征为含有位置保守的 6 个半胱氨酸残基组成的 3 对二硫键^[4]。大量的研究表明,无论是人工合成还是天然的禽 β -防御素都具有广谱的抗菌活性,能够抑制包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、细菌、真菌等在内的大量病原微生物的生长^[5-8]。另外,其他种的一些防御素还具有抗病毒并提高机体免疫的特性^[1,9-12]。禽 β -防御素广泛分布于机体各个组织器官,包括消化系统、呼吸系统、免疫系统和泌尿生殖系统^[3,13-15]。目前,有关鸽子 β -防御素还尚未见到报道,由于禽 β -防御素在禽先天性免疫和获得性免疫方面均发挥着重要作用,而骨髓是重要的免疫器官,肝脏又是新陈代谢的重要器官,因此本实验采用 RT-PCR 方法从鸽的骨髓和肝脏组织中分别扩增到 2 个新的禽 β -防御素基因,并制备了这两个基因的重组蛋白,同时对这两个重组蛋白的生物学特性进行了初步分析,为重组禽 β -防御素在家禽生产中的应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

鸽子 3 只,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

表 1 PCR 引物序列与预期产物长度

Table 1 PCR primers and predicted length of product

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
Pigeon AvBD5 cloning primers	ATGCAGATCCTGCCTCTCCTCTTTGCT	201
Pigeon AvBD5 cloning primers	TTCTGCTGCCGAGCCGATGGTATTCCTGA	201
Pigeon AvBD5 expression primers	GAATTCATGCAGATCCTGCCTCTCTTTGCT	213
Pigeon AvBD5 expression primers	GTCGACTCAGGAATACCATCGGCTCCGGCA	213

1.1.2 菌株与载体

大肠杆菌 (BL21) 株由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室禽传染病研究室保存;四联球菌 (ATCC 2835)、金黄色葡萄球菌 (ATCC 29213)、沙门氏菌 (ATCC 14028)、枯草芽胞杆菌 (ATCC 9193)、奇异变形杆菌 (ATCC 29245)、嗜酸乳杆菌 (ATCC 4356)、绿脓杆菌 (ATCC 9027)、多杀性巴氏杆菌 (ATCC 6529)、鸡白痢菌 (C79-11-S11)、猪霍乱沙门氏菌 (CVCC 2140)、兔波氏杆菌 (ATCC 33222) 均购自中国兽医药品监察所。pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。pGEX-6p-1 载体购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 试剂

ExTaq DNA 聚合酶、*rTaq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、IPTG 购自宝生物工程 (大连) 有限公司;M-MLV 鼠源反转录酶、RNA 提取 TRizol 试剂盒均购自 Invitrogen 公司;凝胶回收试剂盒购自美国 OMEGA 公司;GST Resin 蛋白纯化试剂盒购自 Novagen 公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.4 引物

根据鸡的 *AvBD5* (GenBank Accession No. AY534897) 的基因序列,设计了 2 对 PCR 引物分别用于基因克隆与重组蛋白的表达 (表 1)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取

取鸽骨髓、肝脏组织各 0.1 g 左右, 按照 TRIzol 试剂盒方法提取总 RNA, 体系为 10 μ L。

1.2.2 RT-PCR

用 DEPC 处理过的蒸馏水 10.5 μ L 将上述提取的 RNA 溶解, 混匀后移入另一 0.5 mL DEPC 处理过的 Eppendorf (EP) 管中, 依次加入 Oligo dT 1.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 70 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 冰浴 2 min; 再于反应管中加入 4 μ L 5 \times 第一链合成缓冲液、2 μ L DTT, 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 min; 再加入 0.5 μ L M-MLV 鼠源反转录酶混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 即为 cDNA 模板。根据 GenBank 上提交的鸡 *AvBD 5* 基因序列 (GenBank Accession No. AY534897) 设计一对引物, 即 P1/P2。

PCR 总反应体系为 25 μ L, 按 *ExTaq* DNA 聚合酶使用说明进行。反应循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 观察结果。

1.2.3 基因克隆及序列分析

对大小吻合的目的条带的 PCR 产物按 OMEGA 凝胶回收试剂盒的步骤进行合并回收, 连接 pMD 18-T Simple Vector, 提取质粒并将 PCR 鉴定为阳性的质粒送北京六合华大基因股份有限公司进行测序。

1.2.4 禽 β -防御素的遗传进化分析

将得到的鸽 *AvBD 5* 序列应用 DNASTar 软件与已知的禽 β -防御素基因及部分哺乳动物的 β -防御素基因序列做同源性比较, 并采用 DNASTar

中的 Clustal V 软件绘制分子遗传进化树, 分析其遗传进化关系。

1.2.5 重组表达质粒的构建、原核表达及蛋白纯化

对原核表达载体 pGEX-6p-1 和重组质粒进行酶切位点分析, 设计一对表达引物, 即 P3/P4。

用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切将 pMD18-T-AvBD 5 亚克隆到表达载体 pGEX-6p-1 上, 命名为 pGEX-P-AvBD 5, 将阳性质粒进行测序。

将阳性重组质粒 pGEX-AvBD 5 转化到大肠杆菌 BL21, 挑取单个菌落在含有氨苄抗性 (Amp) 的 Luria-Bertani (LB) 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养。当 OD_{600} 值达到 0.5 时加入 IPTG (终浓度为 0.6 mmol/L) 进行诱导。分别在 2 h、4 h、6 h 取菌样, 6 000 \times g 离心 5 min, 弃上清, 向沉淀中加入 80 μ L PBS (pH 7.4) 和 80 μ L 1 \times SDS 凝胶上样缓冲液, 煮沸 10 min 后冰浴冷却, 然后进行 SDS-PAGE 电泳 (积层胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%), 经考马斯亮蓝染色, 甲醇-冰乙酸脱色液脱色, 用薄层扫描仪进行分析以确定重组蛋白表达量。按照 Novagen 蛋白纯化试剂盒的说明书进行蛋白纯化, 并测定蛋白浓度。

1.2.6 重组鸽 AvBD5 蛋白抗菌活性及理化性质的测定

采用菌落计数法测定重组融合蛋白的抗菌活性。将 1.1.2 中各株细菌培养至对数生长期, 然后用相应的培养基稀释细菌至 2×10^6 CFU/mL, 先用无菌 PBS (pH 7.3) 稀释重组融合蛋白, 终浓度分别为 10 μ g/mL、25 μ g/mL、100 μ g/mL 和 200 μ g/mL, 各取 250 μ L 分别加入无菌 EP 管中,

同时设 PBS 为对照, 分别吸取每株细菌培养物 10 μL 至管中, 每组设 3 个重复, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 3 h 后, 各管分别加 100 μL 的低浓度培养基 (LB : PBS 为 1 : 1 000), 继续 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 3 h, 将各管样品分别作不同倍数的稀释, 每个稀释度分别取 200 μL 接种在营养琼脂平板上, 每管分别作 3 个平行, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 18 h 后, 观察并记录每个营养琼脂平板上的菌落数量, 取相同稀释度的 3 个营养琼脂平板菌落的平均值作为该稀释度样品的菌落数量。根据蛋白浓度和稀释倍数计算每管原液中的细菌数量, 选取最适合的蛋白浓度计算细菌存活率并绘制重组蛋白抗菌图。

1.2.7 不同盐离子浓度对重组鸽 AvBD5-GST 融合蛋白抗菌活性的影响

用灭菌的去离子水调整氯化钠 (NaCl) 的浓度, 使终浓度分别为 50、100、150 mmol/L。然后用上述含不同 NaCl 浓度的缓冲液稀释重组鸽 AvBD5-GST 蛋白浓度至 100 mg/L, 各取 250 μL 分别加入无菌离心管中, 相应 NaCl 浓度的稀释液作为阴性对照, 分别向每管加入细菌培养物 10 μL , 每组设 3 个重复, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 3 h 后, 各管分别加 100 mL 相应的低浓度培养基, 继续 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 3 h。方法同 1.2.6。

1.2.8 重组鸽 AvBD5-GST 融合蛋白对溶血活性的影响

用无菌 PBS (pH 7.4) 将新鲜鸡红细胞稀释为 2%~3%, 用 PBS 稀释重组鸽 AvBD5-GST 融合蛋白, 终浓度分别为 100、250、500 mg/L, 取 20 μL 分别加入无菌离心管中, 同时设 PBS 为阴性对照, 0.2% Triton X-100 为阳性对照, 分别

向每管加入 180 μL 稀释好的红细胞。每组设 3 个重复, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 1 000 $\times g$ 离心 10 min 后取上清, 用微量分光光度计测 OD_{560} 值并计算溶血指数。每个样品作 3 个平行测定, 取平均值。

1.2.9 统计分析

抗菌活性以下式计算: 细菌的存活率 (%) = 存活细菌数/阴性对照细菌数 $\times 100\%$ 。细菌的存活率以平均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所得数据采用 SAS8.0 软件的 ANOVA 法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 鸽 AvBD5 基因的克隆与序列分析

本研究根据鸡 AvBD 5 的基因序列, 设计 1 对特异性引物, 从鸽骨髓和肝脏组织中分别扩增到 2 个约 200 bp 的特异性的目的基因片段, 与目的基因大小相符 (图 1)。对目的片段分别进行回收后连接到 pMD 18-T Simple 载体, 对阳性质粒测序, 测序结果有两种, 经序列分析, 基因大小均为 201 bp, 编码 66 个氨基酸, 分子内含有禽 β -防御素的特征性氨基酸结构, 即由 6 个位置保守的半胱氨酸残基组成, 分别在分子内形成 1~5、

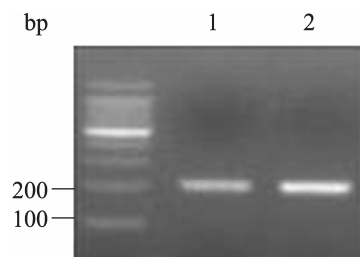


图 1 鸽 AvBD 5 RT-PCR 产物分析

Fig. 1 Analysis of pigeon AvBD5 RT-PCR products. M: DNA marker; 1: bone marrow issues AvBD5 RT-PCR products; 2: liver issues AvBD5 RT-PCR products.

2~4、3~6 共 3 对二硫键 (图 2)。氨基酸序列同源性分析表明,这两个多肽与鸭 AvBD5 的同源性最高,分别为 87.9% (骨髓) 和 78.8% (肝脏);与鸡 AvBD5 的同源性分别为 84.8% (骨髓) 和 75.8% (肝脏)。因此,根据 Lynn 等命名法,

我们将该基因命名为鸽 AvBD 5 α (骨髓) 和鸽 AvBD 5 β (肝脏)。采用 DNASTar 软件中 Clustal V 方法将鸽 β -防御素 5 氨基酸序列与其他的 AvBDs 的序列进行比较,绘制分子遗传进化树 (图 3)。

```
Pigeon AvBD5 $\alpha$ :
  MQILPLLFAVLLMLQAAAGLSLPRGSPQDCERRGGFCQRSCPPGIGRIGCSKEVFCCRSRWYS
Pigeon AvBD5 $\beta$ :
  MQILPLLFAVLLVMLQGAAGLSLARGSPQDCQRRGGFCRGSCPPGIGRIGVGSEREEFCCRSRWYS
Duck AvBD5:
  MQILPLLFAVLLMLQAEPLSLARGLPQDCERRGGFCSHKSCPPGIGRIGLSKEDFCCRSRWYS
Chicken AvBD5:
  MQILTLLFAVLLMLRAEPLSLARGLPQDCERRGGFCSHKSCPPGIGRIGLSKEDFCCRSRWYS
```

图 2 鸽 AvBD 5 基因的编码区核苷酸序列与推导的氨基酸序列

Fig. 2 Alignment of nucleotide and amino acid sequences of pigeon AvBD 5 and the corresponding peptides.

2.2 鸽 AvBD 5 α 、AvBD 5 β 蛋白表达和纯化

经 SDS-PAGE 电泳结果显示,诱导后的菌体与诱导前的菌体相比,诱导后的菌体有一条明显的特异条带,与预期大小 (32 kDa) 相符。诱导 2、4、6 h 后,表达量无明显变化,但相比之下诱导 4 h 左右表达量相对较多 (图 4、5)。

2.3 重组鸽 AvBD 5 α 和鸽 AvBD 5 β 的抗菌活性

本研究采用菌落计数法,选用 4 种革兰氏阳性菌和 8 种革兰氏阴性菌作为检测菌。结果表明 GST 标签蛋白几乎没有抗菌活性,而不同浓度重组鸽 AvBD 5 α 和鸽 AvBD 5 β 蛋白对多杀性巴氏杆菌、绿脓杆菌、四联球菌和金黄色葡萄球菌均有较强的抗菌活性,对鸡白痢沙门氏菌和兔波氏杆菌的抗菌活性较弱,另外重组鸽 AvBD 5 α 的抗菌活性与重组鸽 AvBD 5 β 无显著差异。当蛋白浓度为 100 mg/L 时抗菌活性最理想,因此我们选择重组蛋白浓度为 100 mg/L 时的抗菌活性数

据绘制抗菌图 (图 6)。另外,为了比较不同禽源 AvBD 5 的抗菌活性高低,我们将鸡、鸭、鹅 AvBD 5 的抗菌活性与鸽 AvBD 5 α 和鸽 AvBD 5 β 的进行比较 (图 6) (鸡、鸭、鹅 AvBD 5 的抗菌活性数据引自文献[16-18])。结果发现,与其他禽源 AvBD 5 相比,鸽的 AvBD 5 α 和 AvBD 5 β 对金黄色葡萄球菌、四联球菌、绿脓杆菌与兔波士杆菌的抗菌活性较高。对鸡白痢沙门氏菌的抗菌活性较低。

2.4 NaCl 浓度对重组鸽 AvBD 5 α 和鸽 AvBD 5 β 的抗菌活性的影响

在高浓度 NaCl 条件下,重组鸽 AvBD 5 α 和鸽 AvBD 5 β 蛋白对多杀性巴氏杆菌的抑制作用有降低趋势,当 NaCl 浓度为 150 mmol/L 时,重组蛋白对多杀性巴氏杆菌抗菌活性显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与其他禽源 β -防御素相比差异也不显著 ($P > 0.05$) (图 7) (鸡、鸭、鹅 AvBD 5 的抗菌活性数据引自文献[16-18])。

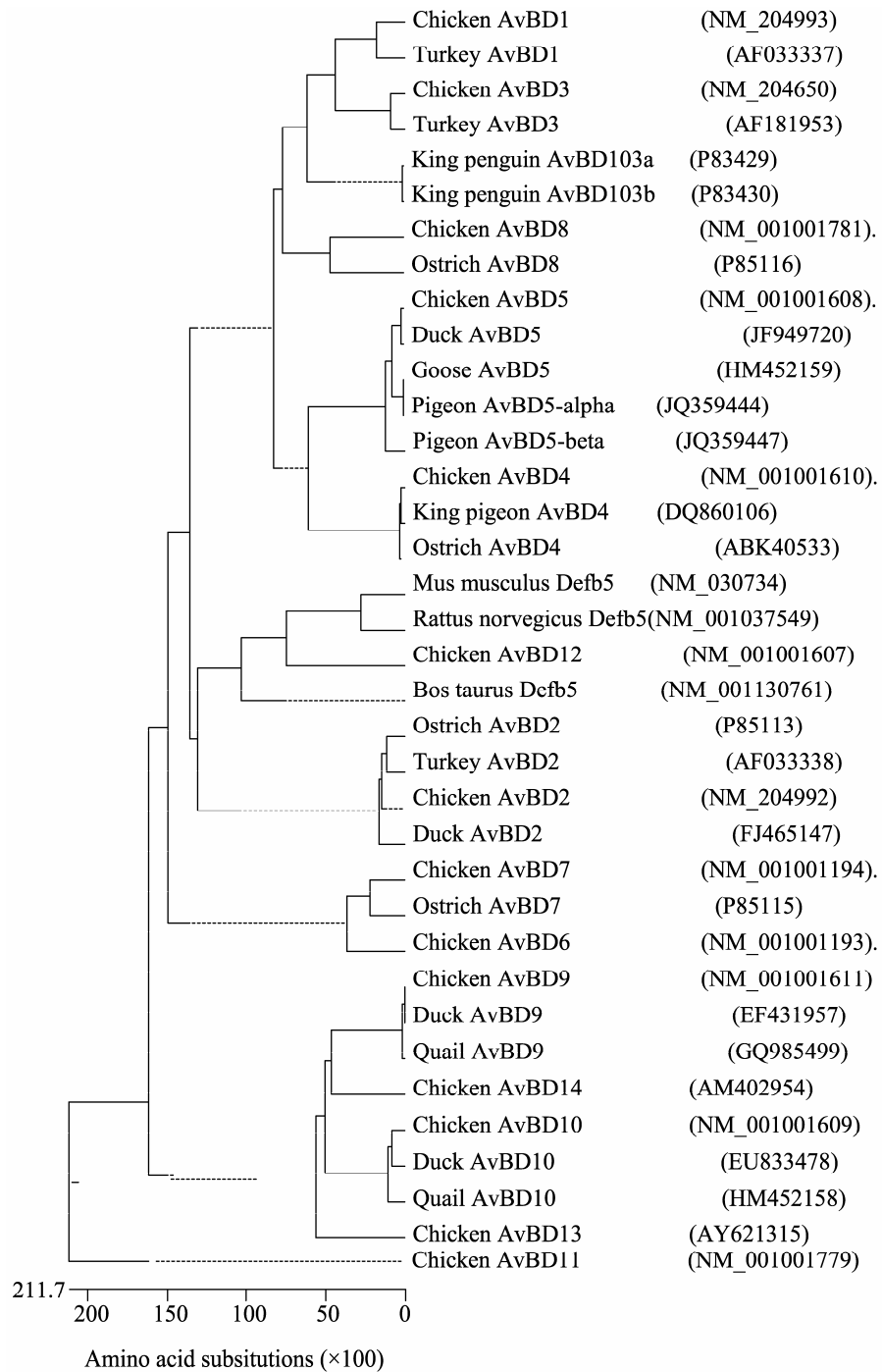


图3 鸽 AvBD 5 α 、AvBD 5 β 与禽 β -防御素及部分哺乳动物 β -防御素基因系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic relationships based on the sequence of pigeon-AvBD 5 α , AvBD 5 β , AvBDs and partial mammalian beta-defensins.

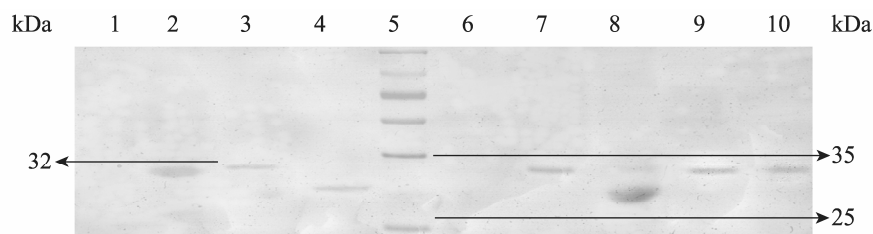


图 4 重组 pigeon-AvBD 5 α 融合蛋白表达分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant pigeon-AvBD 5 α fusion protein expressed in the *E. coli* BL21. 1: supernatant; 2: inclusion body; 3: purified protein of pigeon AvBD 5 α ; 4: purified GST; 5: protein marker; 6: total protein of BL21 containing pigeon-AvBD 5 α without IPTG induction; 7: total protein of BL21 containing pigeon-AvBD 5 α on 4 h after induction with IPTG; 8: GST protein; 9: total protein of BL21 containing pigeon-AvBD 5 α on 2 h after induction with IPTG; 10: total protein of BL21 containing pigeon-AvBD 5 α on 6 h after induction with IPTG.

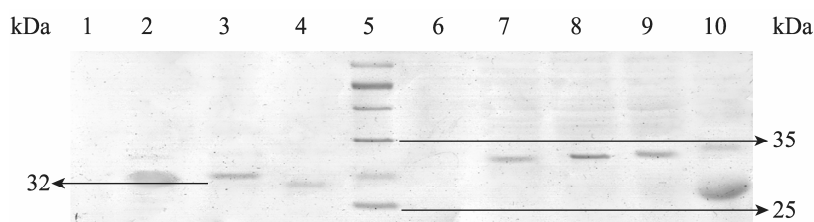


图 5 重组 pigeon-AvBD 5 β 融合蛋白表达分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant pigeon-AvBD 5 β fusion protein expressed in the *E. coli* BL21. 1: supernatant; 2: inclusion body; 3: purified protein of pigeon AvBD 5 β ; 4: purified GST; 5: protein marker; 6: total protein of BL21 containing pigeon-AvBD 5 β without IPTG induction; 7: total protein of BL21 containing pigeon-AvBD 5 β on 2 h after induction with IPTG; 8: total protein of BL21 containing pigeon-AvBD 5 β on 4 h after induction with IPTG; 9: total protein of BL21 containing pigeon-AvBD 5 β on 6 h after induction with IPTG; 10: GST protein.

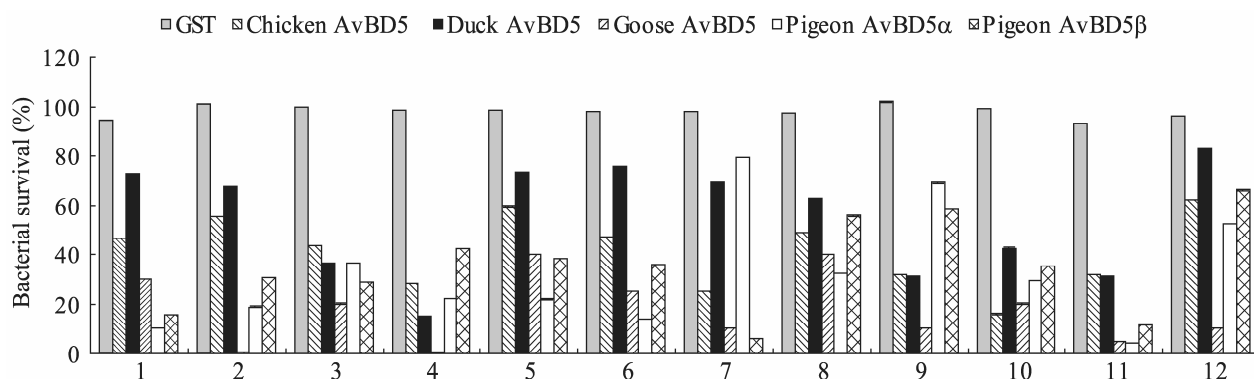


图 6 重组鸡 AvBD5、鸭 AvBD5、鹅 AvBD5、鸽 AvBD 5 α 、鸽 AvBD 5 β 和 GST 蛋白的抗菌活性

Fig. 6 The antimicrobial activity of recombinant chicken AvBD5, duck AvBD5, goose AvBD5, pigeon AvBD 5 α , pigeon AvBD 5 β , and GST against bacterial strains. 1: *Staphylococcus aureus*; 2: *Micrococcus tetragenus*; 3: *Lactobacillus*; 4: *Bacillus cereus*; 5: *Salmonella choleraesuis*; 6: *E. coli*; 7: *Pseudomonas aeruginosa*; 8: *Salmonella*; 9: *Salmonella pullorum*; 10: *Proteus mirabilis*; 11: *Pasteurella multocida*; 12: *Bordetella bronchiseptica*.

2.5 重组鸽 AvBD 5 α 与鸽 AvBD 5 β 融合蛋白对溶血活性的影响

重组鸽 AvBD 5 α 、鸽 AvBD 5 β 融合蛋白对鸭血红细胞的溶血活性极低, 与阴性对照相比差

异不显著 ($P>0.05$)。与阳性对照相比差异极显著 ($P<0.01$), 与其他禽源 β -防御素相比差异也不显著 ($P>0.05$) (图 8) (鸡、鸭、鹅 AvBD 5 的抗菌活性数据引自文献[16-18])。

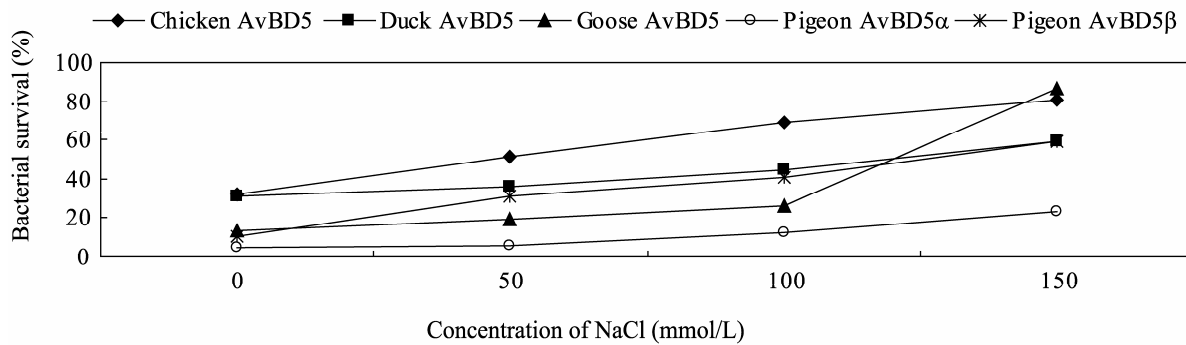


图 7 盐离子浓度对重组鸡、鸭、鹅 AvBD5 及鸽 AvBD5 α 、鸽 AvBD5 β 抗多杀性巴氏杆菌的影响
Fig. 7 Effects of salinity on the antibacterial activity of chicken AvBD5, duck AvBD5, goose AvBD5, pigeon AvBD5 α , pigeon AvBD5 β against *P. multocida*.

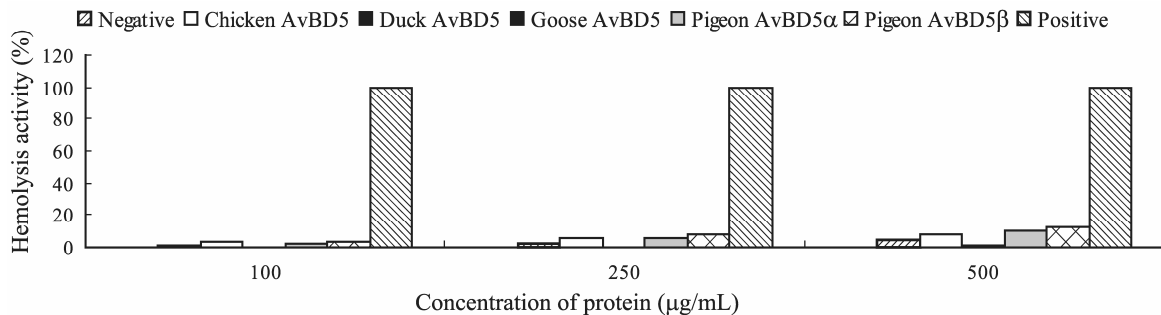


图 8 重组鸡、鸭、鹅 AvBD5 及鸽 AvBD5 α 、鸽 AvBD5 β 蛋白的溶血活性
Fig. 8 The hemolysis activity of recombinant chicken AvBD5, goose AvBD5, pigeon AvBD5 α , AvBD5 β protein.

3 讨论

本研究是据 Lynn 等^[12]已发表的鸡 *AvBD 5* (AY534897) 的基因, 设计特异性引物, 采用 RT-PCR 的方法从鸽的骨髓组织和肝脏组织中分别克隆出 2 个禽 β -防御素基因。cDNA 大小均为 201 bp, 编码 66 个氨基酸残基, 这两个多肽氨基

酸同源性为 83.3%。分子内含有禽 β -防御素的特征性氨基酸结构, 即由 6 个位置保守的半胱氨酸残基组成, 分别在分子内形成 1~5、2~4、3~6 共 3 对二硫键。将该基因推导的氨基酸序列与其他物种的 *AvBDs* 氨基酸序列进行同源性比较发现, 该基因与鸭 *AvBD 5* 氨基酸同源性最高, 分别为 87.9% 和 78.8%。因此, 将该基因命名为

鸽 *AvBD 5 α* (骨髓) 和鸽 *AvBD 5 β* (肝脏)。这种基因序列多态性的存在可能是由于基因组中单核苷酸发生了变异^[14], 但多态性并未影响基因的结构, 发生碱基突变的基因大小仍为 201 bp, 编码 66 个氨基酸。

目前蛋白表达主要有真核表达系统和原核表达系统, 原核表达系统 (大肠杆菌表达系统) 是目前常用的表达系统之一, 但由于抗菌肽分子小, 易被蛋白酶降解, 对宿主菌 *E. coli* 有很强的杀伤力, 因而不能在 *E. coli* 中直接表达。此外, 小分子表达产物分离、纯化较困难, 而以融合蛋白形式表达则可克服这些问题, 融合表达后再对产物进行裂解纯化, 会得到有抗菌活性的表达产物。融合蛋白在 *E. coli* BL21 中是以包涵体的形式存在, 这样不仅能保护目的蛋白免受蛋白酶降解, 也不会影响宿主菌的生长^[1-2,9], 从而避免了由于抗菌肽对宿主菌 *E. coli* 较强的杀伤力而不能在 *E. coli* 中直接表达的问题。本实验选择了 GST 基因融合表达系统中的 pGEX-6p-1 载体对鸽 *AvBD 5 α* 和鸽 *AvBD 5 β* 基因进行原核表达。经 SDS-PAGE 电泳分析表明, 大部分蛋白以不溶的、无活性的包涵体形式存在。包涵体是大量表达的重组蛋白形成的致密颗粒, 能保护目的蛋白不受蛋白酶降解, 而且不影响宿主菌的生长, 有利于产物的分离, 所以包涵体对于提高重组蛋白的产量和稳定性非常重要。由于目的蛋白形成包涵体后不具有生物活性, 因此, 本试验采用的 Novagen 公司的 Protein Refolding Kit 蛋白纯化试剂盒是针对包涵体进行溶解、复性和透析, 并可以使二硫键正确折叠, 从而纯化出有活性的目的蛋白。

禽类的防御素是一种新型抗菌活性肽, 它是

一类富含精氨酸的阳离子低分子多肽。在禽的先天性免疫中发挥着重要的作用^[15-16]。防御素的正电荷和双亲结构是抗菌的关键, 防御素的杀菌活性与精氨酸的含量有关, 精氨酸含量高的杀菌活性强。大量研究表明, 无论是重组表达、天然存在或是人工合成的防御素, 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性、细菌、真菌、分歧杆菌、霉菌、螺旋体、病毒 (如流感病毒、疱疹病毒、艾滋病病毒) 等均具有很强的杀伤活性^[1-2,17,19], 具有高效广谱抗菌作用, 无毒副作用, 不会使病原微生物菌株变异产生抗药性^[5,13,17-19]。目前, 对于禽 β -防御素的抗菌机制还没有统一的说法, 比较公认的说法就是形成离子通道, 即防御素通过静电作用被吸附到细菌表面, 然后将疏水端插入细菌膜中, 从而改变其膜的结构, 在菌膜上造成穿孔从而使细菌裂解死亡^[21]。本研究测定了重组鸽 *AvBD 5 α* 、重组鸽 *AvBD 5 β* 和 GST 蛋白对 12 种细菌的抗菌活性。结果表明重组鸽 *AvBD 5 α* 、重组鸽 *AvBD 5 β* 蛋白对这 4 种革兰氏阳性菌和 8 种革兰氏阴性菌均有较强的抑制作用, 且对不同菌种的抑制作用强弱也有所不同, 推测可能与防御素本身的结构有关, 鸽 *AvBD 5 α* 和鸽 *AvBD 5 β* 的序列都富含大量带正电荷的氨基酸, 鸽 *AvBD 5 α* 含有 8 个带正电荷的氨基酸 (7 个精氨酸, 1 个赖氨酸), 鸽 *AvBD 5 β* 含有 8 个精氨酸。将鸽 *AvBD 5 α* 和鸽 *AvBD 5 β* 与其他禽源 β -防御素 5 比较发现, 其所带正电荷数无显著差异, 但鸽 *AvBD 5 α* 和鸽 *AvBD 5 β* 所带负电荷氨基酸数目最少 (1 个天冬氨酸, 2 个谷氨酸), 增加了多肽表面的正电荷数, 从而增加了其抗菌活性。但鸡 *AvBD5*、鸭 *AvBD5*、鹅 *AvBD5* 对鸡白痢沙门氏菌的抗菌活性要高于鸽 *AvBD 5 α* 和鸽 *AvBD 5 β* , 这可能是由于防御素

自身结构上的差异导致对细菌的选择和抗性程度的不同。对于大部分细菌来讲, 鸽 AvBD 5 α 的抗菌活性明显高于鸽 AvBD 5 β , 这可能是由于鸽 AvBD 5 α 和鸽 AvBD 5 β 的 DNA 序列中一些单核苷酸发生碱基转换和颠换, 这是最常见的一种变异形式, 这种变异形式被称为单核苷酸多态性, 它们可能会影响蛋白质的结构或基因表达水平。同时本研究将该重组蛋白的标签 GST 也进行了抗菌活性的测定, 结果表明 GST 标签不具有抗菌活性, 这也更肯定了重组蛋白的抗菌活性^[1-2,9,22]。高浓度 NaCl 对重组鸽 AvBD 5 α 和重组鸽 AvBD 5 β 的抗菌活性均有一定影响, Tomita 等也报道了其他离子对防御素抗菌活性的影响, 发现某些二价阳离子能够强烈的抑制防御素的抗菌活性, 这表明对抗菌性的影响是由于离子强度而不是特定离子^[23-24]。这可能是由于与防御素竞争性地结合到带负电荷的细菌表面, 从而影响了防御素和细菌质膜的结合, 影响防御素杀菌效力的发挥, 还可能是由于高盐浓度加速某些白细胞的凋亡, 影响其趋化作用、吞噬作用, 影响防御素的产生。此外, 重组鸽 AvBD 5 α 和重组鸽 AvBD 5 β 对红细胞溶血活性极低, 一般来说, 溶血作用与肽分子结构中的疏水残基含量有关, 疏水残基含量越高则往往溶血作用也越强^[25]。这些研究结果为今后 AvBDs 重组蛋白作为一种高效的肽类抗生素和禽类饲料添加剂等应用的可能性提供了理论依据。

目前, 对于鸽防御素的研究还有存在很多问题有待进一步探讨, 本研究克隆出的鸽 AvBD 5 α 、鸽 AvBD 5 β 及其生物学特性的研究结果为禽 β -防御素代替抗生素成为新一代抗菌制剂提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] Ma DY, Wang RQ, Liao WY, et al. Identification and characterization of a novel Antibacterial peptide, avian β -defensin 2 from ducks. *J Microbiol*, 2009, 47(5): 610–618.
- [2] Ma DY, Liao WY, Wang RQ, et al. Two novel duck antibacterial peptides, avian β -defensins 9 and 10, with antimicrobial activity. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(11): 1447–1455.
- [3] Froy O. Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signaling pathway. *Cell Microbiol*, 2005, 7(10): 1387–1397.
- [4] Sugiarto H, Yu PL. Avian antimicrobial peptides: the defense role of beta-defensins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(3): 721–727.
- [5] Sugiarto H, Yu PL. Identification of three novel ostricacins: an update on the phylogenetic perspective of beta-defensins. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 27(3): 229–235.
- [6] Thouzeau C, Maho YL, Froget G, et al. Avian β -defensins in preserved stomach contents of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus*. *J Biol Chem*, 2003, 278(51): 51053–51058.
- [7] Milona P, Townes CL, Bevan RM, et al. The chicken host peptides, gallinacins 4, 7, and 9 have antimicrobial activity against *Salmonella serovars*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(1): 169–174.
- [8] Van Dijk A, Veldhuizen EJ, Haagsman HP. Avian defensins. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 124(1/2): 1–18.
- [9] Ma DY, Liu SW, Han ZX, et al. Expression and characterization of recombinant gallinacin-9 and gallinacin-8 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2008, 58(2): 284–291.
- [10] Higgs R, Lynn DJ, Gaines S, et al. The synthetic form of a novel chicken beta-defensin identified in silico is predominantly active against intestinal pathogens. *Immunogenetics*, 2005, 57(1/2): 90–98.
- [11] Smith JG, Nemerow GR. Mechanism of adenovirus

- neutralization by Human alpha-defensins. *Cell Host Microbe*, 2008, 3(1): 11–19.
- [12] Lynn DJ, Higgs R, Galine S, et al. Bioinformatic discovery and initial characterisation of nine novel antimicrobial peptide genes in the chicken. *Immunogenetics*, 2004, 56(3): 170–177.
- [13] Buck CB, Day PM, Thompson CD, et al. Human alpha-defensins block papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(5): 1516–1521.
- [14] Smith AJP, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20(1): 43–49.
- [15] Kawaguchi A, Suzuki T, Kimura T, et al. Functional analysis of an alpha-helical antimicrobial peptide derived from a novel mouse defensin-like gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(4): 778–784.
- [16] Zhou CY, Zhang MY, Ma DY, et al. Isolation, identification and tissues distribution of goose avian β -defensin 10. *Sci Agric Sin*, 2011, 78: 51–58.
周财源, 张名岳, 马得莹, 等. 鹅 β -防御素 10 基因的分选、鉴定与组织分布分析. *中国农业科学*, 2011, 78: 51–58.
- [17] Zhou CY, Lin LJ, Ma DY, et al. Cloning and bioactivity characterization of goose avian β -defensin 5. *Acta Vet Zootech Sin*, 2011, 47: 295–303.
周财源, 蔺利娟, 马得莹, 等. 鹅 β -防御素 5 基因克隆与生物学特性的初步分析. *畜牧兽医学报*, 2010, 47: 295–303.
- [18] Zhang KX, Lin LJ, Ma DY, et al. Isolation, characterization, and determination on bioactivity of duck avian beta-defensin 5. *Microbiol China*, 2011, 38(11): 1688–1697.
张可心, 蔺利娟, 马得莹, 等. 鸭 β -防御素 5 基因的分选、鉴定及其生物学作用. *微生物学通报*, 2011, 38(11): 1688–1697.
- [19] Ma DY. Cloning and expression of Avian beta-defensins in *E. coli*[D]. Ha'erbin: Northeast Agricultural University, 2011.
马得莹. 鸡 β -防御素基因的克隆及其在原核中的表达[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- [20] Liao WY, Ma DY, Wang RQ, et al. mRNA Cloning, evolutionary analysis and biological characterization of duck avian Beta-defensin 10. *Acta Vet Zootech Sin*, 2009, 40(9): 1320–1326.
廖文艳, 马得莹, 王瑞琴, 等. 鸭 β -防御素 9 基因的克隆、遗传进化分析及其生物学特性的初步研究. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(9): 1320–1326.
- [21] Van Dijk A, Veldhuizen EJA, Kalkhove SIC, et al. The β -defensin gallinacin-6 is expressed in the chicken digestive tract and has antimicrobial activity against food-borne pathogens. *Antimicrob Agents Ch*, 2007, 51(3): 912–922.
- [22] Ma DY, Zhou CY, Zhang MY, et al. Functional analysis and induction of four novel goose (*Anser cygnoides*) avian β -defensins in response to salmonella enteritidis infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2012, 35(2): 197–207.
- [23] Wang RQ, Liao WY, Ma DY, et al. Cloning, expression and bioactivity characterization of duck avian β -defensin 2. *Sci Agric Sin*, 2009, 42(10): 3685–3692.
王瑞琴, 廖文艳, 马得莹, 等. 鸭 β -防御素 2 基因的克隆, 表达和表达产物的生物学特性分析. *中国农业科学*, 2009, 42(10): 3685–3692.
- [24] Wang RQ, Ma DY, Lin LJ, et al. Identification and characterization of an avian β -defensin orthologue, avian β -defensin 9, from quails. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(4): 1395–1405.
- [25] Tomita T, Hitomi S, Nagase T, et al. Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2. *Microbiol Immunol*, 2000, 44(9): 749–754.
- [26] Zasloff M. magainins A class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation characterization of two active forms and partial cDNA sequence of a precursor. *Prac Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(15): 5449–5455.