

鸭 β -防御素 5 基因的分离、鉴定及其生物学作用

张可心^{1,2} 蔺利娟^{1,2} 韩宗玺² 邵昱昊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)

摘要: 为克隆与表达鸭 β -防御素 5 (AvBD5) 基因及测定其生物学特性, 采用 RT-PCR 方法从鸭肺脏组织中扩增到鸭 AvBD5, 将测得的序列与已发现的禽 β -防御素和部分哺乳类动物 β -防御素的氨基酸序列构建进化树进行同源性分析。结果显示鸭 AvBD5 cDNA 大小为 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, 分别在分子内形成 Cys1-Cys5、Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6 共 3 对二硫键, 与鸡 AvBD5 氨基酸同源性高达 97%。进一步将其亚克隆到大肠杆菌 pGEX-6p-1 载体中进行原核表达。重组 GST 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, 以及该重组 GST 融合蛋白对溶血活性的影响。鸭 AvBD5 重组蛋白分子量约为 32 kD, 具有良好的抗菌活性, 对 11 种细菌均有不同程度的抑制作用, 高盐浓度对其抗菌活性有一定影响。此外, 该重组蛋白对红细胞溶血活性极低。

关键词: 鸭 AvBD5, 重组蛋白, 抗菌活性

Isolation, characterization, and determination on bioactivity of duck avian beta-defensin 5

ZHANG Ke-Xin^{1,2} LIN Li-Juan^{1,2} HAN Zong-Xi² SHAO Yu-Hao²
LIU Sheng-Wang² MA De-Ying^{1*}

(1. Institute of Animal Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

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

Abstract: To clone, express and characterize the antimicrobial activity of duck AvBD5, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to amplify duck AvBD5 gene from lung of duck in the present study. Furthermore, phylogenetic relationships of the duck AvBD5 with AvBDs from other avian species and some mammalian beta-defensin 5 were analyzed. Sequence analysis showed that the cDNA of duck AvBD5 consisted of 201 bp nucleotides, encoding a polypeptide of 66 amino acids. The β -defensin has six conserved cysteines that form three disulfide bonds in a C1-C5, C2-C4,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30972110)

* 通讯作者: Tel: 86-451-55190862; ✉ mdy296@yahoo.cn

收稿日期: 2011-04-25; 接受日期: 2011-07-27

and C3-C6 conformation. It was demonstrated that duck AvBD5 shared 97% amino acid homology with chicken AvBD5. The cDNA of duck AvBD5 was sub-cloned on pGEX-6p-1 vector to construct recombinant plasmid pGEX-duck AvBD5. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 and the bacteria were induced with IPTG. After purification, antibacterial activity of the purified recombinant protein was investigated. In addition, effect of ionic strength on the antibacterial activity, and hemolytic activity of the purified recombinant protein were investigated. It was demonstrated that a 32 kD protein in molecular weight was highly expressed. The purified recombinant duck AvBD5 exhibited extensive antimicrobial activity against 11 strain bacteria, including Gram-positive and Gram-negative investigated. In high salt ions conditions, antibacterial activity of recombinant duck AvBD5 protein was decreased. In addition, the recombinant protein of hemolysis activity was extremely low.

Keywords: Duck AvBD5, Recombinant protein, Antimicrobial activity

多年来, 饲用抗生素被广泛地用于降低畜禽发病率 and 维持健康。然而长期使用抗生素, 会导致抗生素在畜产品中残留及细菌耐药性的产生, 并通过食物链威胁人类健康。因此, 寻找一种代替抗生素的新型抗菌制剂已经成为目前研究的热点之一。防御素(Defensin)是一类内源性抗菌肽, 广泛存在于动物、植物、昆虫体内, 是富含精氨酸残基的阳离子多肽, 其主要的分子特征是由 6 个半胱氨酸残基形成的 3 对二硫键, 具有抗革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、原生动物、某些真菌以及被膜病毒(如疱疹类病毒)的特性^[1-2]。防御素的杀菌机制不同于传统的抗生素, 它不是通过抑制细菌的代谢过程来杀死细菌, 而是直接在细菌细胞膜上穿孔, 使细胞内的活性物质泄漏导致细菌死亡^[3], 避免了传统抗生素导致的菌株抗药性和残留等问题, 从而成为具有开发前景的抗菌制剂。目前, 已从脊椎动物体内分离出许多防御素, 根据防御素分子内半胱氨酸的位置和连接方式的差异, 可分为 α -防御素、 β -防御素和 θ -防御素^[4-5]。禽防御素属 β -防御素类, 含有 6 个稳定的半胱氨酸残基, 分别以 Cys1-Cys5、Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6 连接成 3 对二硫键, 分子中氨基酸残基数量为 60-100 个。1994 年, Evans 等从鸡异嗜性白细胞中分离到 2 个鸡异嗜性多肽并命名为 CHP-1 和 CHP-2^[4]; 随后, 又发现 3 个火鸡异嗜性多肽: 火鸡 AvBD1、AvBD2 和 AvBD3 (原名为 THP1、THP2 和 THP3)^[5]。至今, 人们已在鸡、火鸡、鸵鸟、企鹅、鸭及鹌鹑等禽类体内陆续分离到 30 多种禽 β -防御

素^[4-9]。禽 β -防御素广泛分布于机体消化系统、呼吸系统、免疫系统和泌尿生殖系统^[10-12], 是机体抵御外界微生物侵袭的第一道化学屏障。大量研究表明, 无论天然还是人工合成的禽 β -防御素都具有广谱的抗菌活性, 能够抑制包括细菌、真菌等在大量病原微生物的生长^[12-17]。此外, 其它物种的一些防御素对某些病毒、原虫和肿瘤细胞也具有选择性杀伤作用^[18]。

目前, 已实现鸭 AvBD2^[13]、AvBD9^[14] 和 AvBD10^[14] 在大肠杆菌的表达, 这些重组鸭 β -防御素不仅具有广谱的抗菌活性, 而且对不同的酸碱度和温度具有很高的稳定性^[13,15]。本研究根据鸡 AvBD5 的 cDNA 保守序列设计引物, 从鸭组织中克隆到一个新的禽 β -防御素基因, 并对该基因进行同源性分析以确定其命名。同时原核表达重组蛋白, 并测定其体外抗菌活性, 为进一步开展鸭防御素的研究与应用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物: 21 日龄 SPF 麻鸭 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。

1.1.2 菌株和质粒载体: 大肠杆菌菌株(BL21, TG1)由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所保存, pMD18-T 载体购自大连宝生物公司, 原核表达载体 pGEX-6p-1 购自 Gibco 公司。四联球菌(ATCC 2835)、猪霍乱沙门氏菌(CVCC 2140)、大肠杆菌(DE3)、枯

草芽孢杆菌(ATCC 9193)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)、奇异变形杆菌(ATCC 29245)、绿脓杆菌(ATCC 9027)、鸡白痢沙门氏菌(C79-11-S11)、多杀性巴氏杆菌(ATCC 6529)、乳酸菌(ATCC 33222)和兔波氏杆菌(ATCC 33222)均购自中国兽药监察所。

1.1.3 试剂: *Ex Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I、IPTG 购自大连宝生

物公司; RNA 提取 TRIzol™ 试剂盒、M-MLV 鼠源反转录酶购自 Invitrogen 公司; 凝胶回收试剂盒购自北京鼎国生物技术公司; GST Resin 蛋白纯化试剂盒购自 Novagen 公司。

1.1.4 引物: 根据 GenBank 上提交的鸡 AvBD5 (NM_001001608) 基因序列设计两对引物 P1/P2、P3/P4, 均由上海生物工程公司合成(表 1)。

表 1 本研究使用的 PCR 引物序列
Table 1 The PCR primers used in this study

| 引物名称 Primer name | 序列 Sequence (5'→3') | 引入的酶切位点 Enzyme site introduced |
|---------------------|--|-----------------------------------|
| P1 | ATGCAGATCCTGCCTCTCTCTTTGCT | - |
| P2 | TCAGGAATACCATCGGCTCCGGCAGCAGAA | - |
| P3 | <u>GAATTC</u> ATGCAGATCCTGCCTCTCTTTGCT | <i>EcoR</i> I |
| P4 | GTCGACTCAGGAATACCATCGGCTCCGGCA | <i>Sal</i> I |

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取: 取鸭肺脏组织约 0.1 g 左右, 按照 TRIzol™ 试剂盒方法提取总 RNA, 体系为 20 μL。

1.2.2 RT-PCR: 反转录按 40 μL 体系进行, 在上述 RNA 管中加入三蒸水(DEPC 处理), 混匀后移入另一个 0.5 mL Eppendorf (EP)管中, 依次加入 50 pmol/L OligodT 3 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL, 70 °C 水浴 5 min, 冰浴 2 min; 再于反应管中加入 5×第一链合成缓冲液(Buffer) 8 μL、0.1 mol/L DTT 4 μL, 37 °C 水浴 2 min; 再加入 1 μL M-MLV 鼠源反转录酶混匀, 37 °C 水浴 2 h, 即为 cDNA 模板。引物为 P1/P2, PCR 扩增体系按 *Ex Taq*™ 酶使用说明进行。反应循环参数为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 25 个循环; 72 °C 10 min。扩增结束后取 4 μL PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶中进行初步电泳鉴定, 观察结果。

1.2.3 基因克隆及序列分析: 对目的条带的 PCR 产物进行回收, 与 pMD18-T 载体连接, 经 PCR 鉴定后, 将阳性重组质粒 pMD18-T-duck AvBD5 送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。应用 DNASTar 软件将测序结果与已知的禽 β-防御素及部分哺乳类动物 β-防御素 5 氨基酸序列进行同源性比较, 并绘制进化树分析其遗传进化关系。

1.2.4 重组表达质粒的构建: 对表达载体

pGEX-6p-1 与重组质粒 pMD18-T-duck AvBD5 进行酶切位点分析, 将 *EcoR* I 和 *Sal* I 两个酶切位点分别加入到上游引物和下游引物, 合成表达用引物 P3/P4。用 PCR 法从重组质粒 pMD18-T-duck AvBD5 进行扩增鸭 AvBD5 基因片段, 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切将鸭 AvBD5 基因亚克隆到原核表达载体 pGEX-6p-1 上, 构建重组表达质粒 pGEX-duck AvBD5, 并进行 PCR 和双酶切鉴定, 将阳性质粒进行测序。

1.2.5 重组鸭 AvBD5 的诱导表达及纯化: 将阳性重组质粒 pGEX-duck AvBD5 转化大肠杆菌 BL21, 挑取单个菌落在含有 Amp 的 LB 培养基中, 37 °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、3、4、5、6、7 h 取菌样, 加入适量的 PBS (pH 7.4) 和 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%, 分离胶为 12%), 经考马斯亮蓝染色, 甲醇-冰乙酸脱色液脱色。并用薄层扫描仪进行扫描分析, 确定重组蛋白的表达量。按照 Novagen 公司的蛋白纯化试剂盒说明书进行包涵体的纯化、溶解、复性和透析, 并测定重组蛋白的浓度。

1.2.6 重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白抗菌活性的鉴定: 采用菌落计数法测定重组鸭 AvBD5-GST 融合

蛋白的抗菌活性^[9,19]。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 7.4) 稀释重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白, 终浓度分别为 10、25、100 mg/L, 分别取 250 μ L 加入无菌离心管中, 同时设 PBS 为对照, 分别吸取每株细菌培养物 10 μ L 至管中, 每组设 3 个重复, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 3 h 后, 各管分别加 100 μ L 的低浓度培养基(LB:PBS 为 1:1 000), 继续 37 $^{\circ}$ 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 μ L 接种在营养琼脂平板上, 每管分别做 3 个平行, 37 $^{\circ}$ 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。根据接种量和稀释倍数计算每管原液中的细菌数量, 并绘制细菌存活率和重组蛋白浓度的折线图, 细菌的存活率(%)=存活细菌数/阴性对照细菌数 \times 100%。每个样品做 3 个平行测定, 取平均值。

1.2.7 NaCl 浓度对重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白抗菌活性的影响: 选取一种革兰氏阴性菌(多杀性巴氏杆菌)和一种革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)为检测菌, 用灭菌的去离子水调整氯化钠(NaCl)的浓度, 使终浓度分别为 0、20、50、150 mmol/L。然后用上述含不同 NaCl 浓度的缓冲液稀释重组鸭 AvBD5-GST 蛋白浓度至 100 mg/L, 各取 250 μ L 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 μ L。每组设 3 个重复, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 3 h 后, 各管分别加 100 μ L 相应 NaCl 浓度缓冲液的低浓度培养基, 继续 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 3 h。方法同 1.2.6。

1.2.8 重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白对溶血活性的影响: 用无菌 PBS (pH 7.4) 将新鲜鸭红细胞稀释为 2%–3%, 用 PBS 稀释重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白, 终浓度分别为 100、250、500 mg/L, 取 20 μ L 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 μ L 稀释好的红细胞。每组设 3 个重复, 37 $^{\circ}$ 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, 溶血指数(%)=($OD_{蛋白}$

$-OD_{PBS}$)/($OD_{Triton-100}-OD_{PBS}$)^[20]。每个样品做 3 个平行测定, 取平均值。

1.2.9 统计分析: 结果以平均数 \pm 标准误表示。所有数据均采用 SAS(1996)^[21]软件的 ANOVA 法进行方差分析。

2 结果

2.1 鸭 AvBD5 的基因克隆与序列分析

本研究根据 GenBank 提交的鸡 AvBD5 的基因序列, 设计特异性引物, 从鸭肺脏组织 cDNA 中扩增到约 200 bp 特异性的目的基因片段, 与目的基因大小相符(图 1)。将该片段克隆到 pMD18-T 载体中, 选鉴定为阳性的质粒进行核苷酸测序。分析表明该片段由 201 个碱基组成, 编码 66 个氨基酸残基, 分子内含有 6 个位置保守的半胱氨酸残基, 分别在分子内形成 Cys1–Cys5、Cys2–Cys4 和 Cys3–Cys6 3 对二硫键(图 2)。采用 DNASTar 中 MegAlign 软件对已知的 AvBDs 及部分哺乳类动物 β -防御素 5 氨基酸序列进行比较分析并绘制分子遗传进化树, 经同源性分析表明, 该基因与鸡 AvBD5 氨基酸序列同源性最高, 为 97% (图 3)。因此, 我们将它命名为鸭 AvBD5。将该基因序列录入 GenBank (登录号: JF949720)。

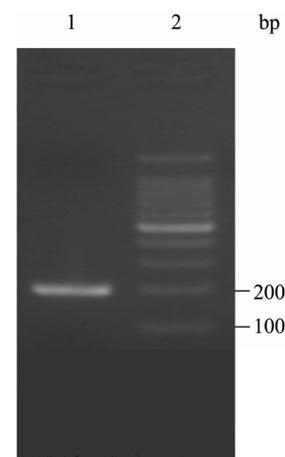


图 1 鸭 AvBD5 RT-PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoretic analysis of duck AvBD5 RT-PCR products

注: 1: 鸭 AvBD5 RT-PCR 产物; 2: DNA marker.

Note: 1: Duck AvBD5 RT-PCR products; 2: DNA marker.

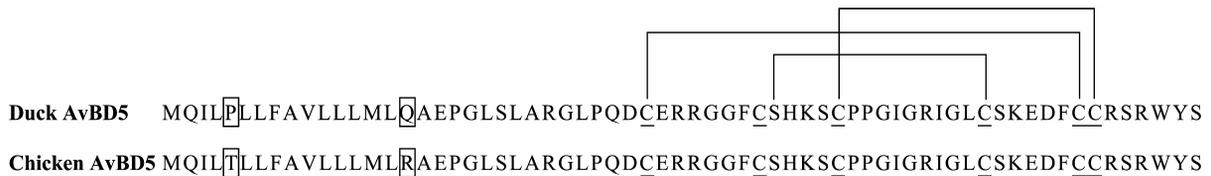


图 2 鸭 AvBD5 基因推导的氨基酸序列与对应的鸡 AvBD5 氨基酸序列

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of duck AvBD5 and chicken AvBD5

注: 1: 下划线标出保守的半胱氨酸且连接为分子内二硫键的连接方式; 2: 外加方框的为不同的氨基酸。

Note: 1: The conserved six cysteines (C) are underlined and linked to show intramolecular disulfide bond connectivity; 2: The amino acids that differ among respective AvBDs are framed.

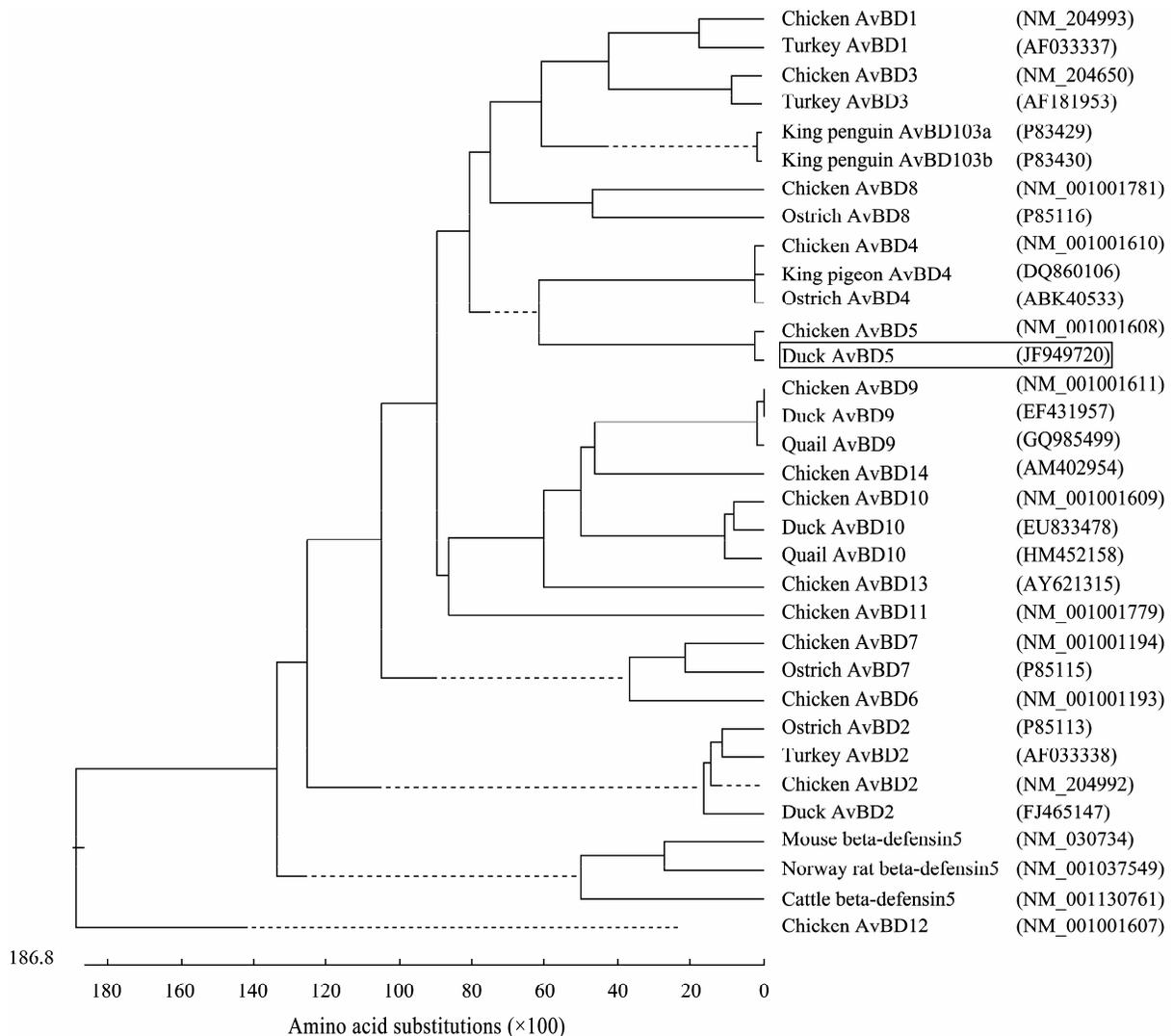


图 3 鸭 AvBD5 基因与其它的禽 β -防御素及哺乳动物 β -防御素 5 基因系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic relationships based on the amino acid sequences of the duck AvBD5 and other AvBDs and β -defensin-5 from some mammalian animals

注: 外加方框的为本研究中的鸭 AvBD5 基因; 括号内为基因的登录号; 分支长度代表遗传距离。

Note: The duck AvBD5, sequenced in the present study, is boxed. Access numbers are in parenthesis. Branch lengths represent genetic distance.

2.2 重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白表达和纯化

用 PCR 法从重组质粒 pMD18-T-duck AvBD5 进行扩增鸭 AvBD5 基因片段, 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切将鸭 AvBD5 基因亚克隆到原核表达载体 pGEX-6p-1 上, 重组表达质粒经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切和 PCR 鉴定及测序, 结果表明该片段与目的基因序列一致。经 SDS-PAGE 电泳结果显示, 诱导后的菌体总蛋白与诱导前相比有一条明显的特异条带, 与预期大小约 32 kD 相符。诱导 2-7 h 后,

表达量无明显变化。经薄层扫描分析, 表达量占菌体总蛋白的 46%。诱导的菌体细胞经离心和裂解后, 分别取其上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示大部分鸭 AvBD5-GST 融合蛋白在沉淀中, 表达的重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白以包涵体的形式存在于 *E.coli* BL21 中。100 mL 诱导物经纯化后, 可获得 13.52 mg 的纯化蛋白。SDS-PAGE 检测, 可见约 32 kD 的蛋白条带, 与预期的蛋白大小相符。(图 4)

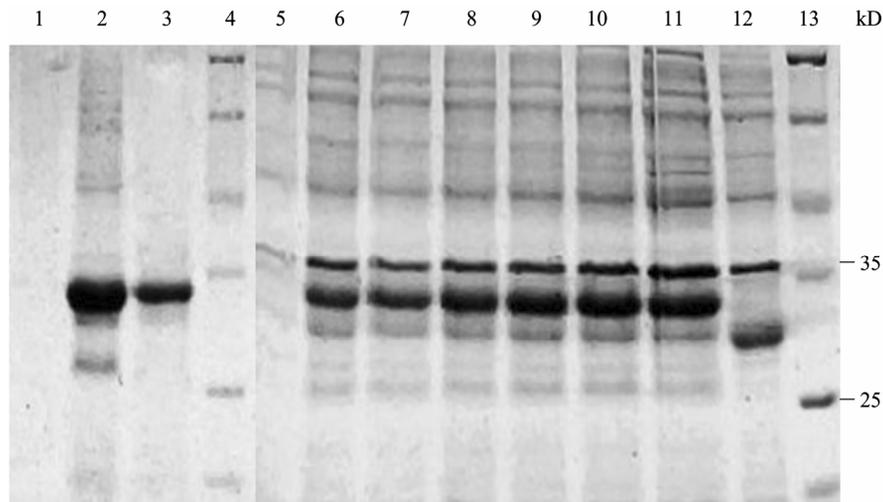


图 4 重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白的表达与纯化

Fig. 4 Expression and purification of recombinant duck AvBD5-GST

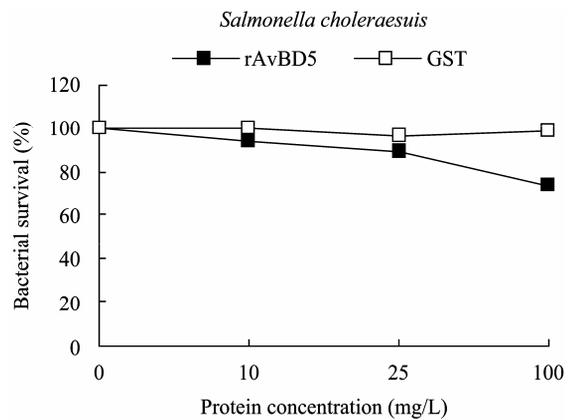
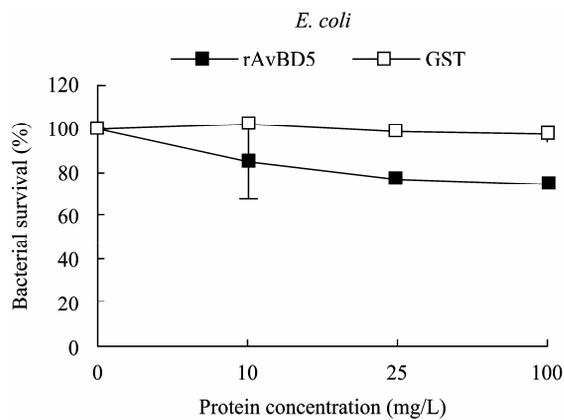
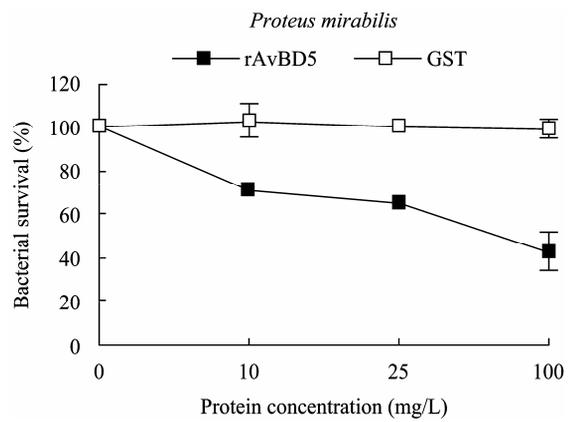
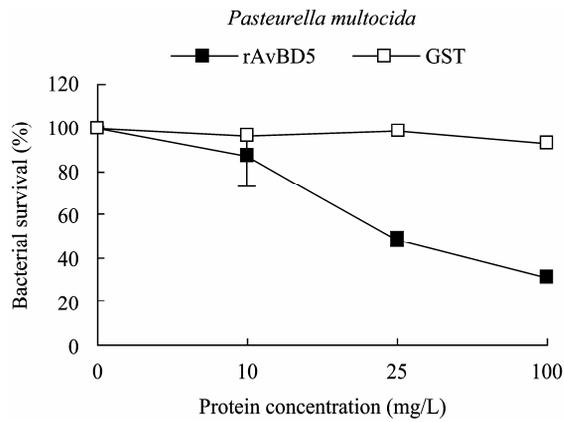
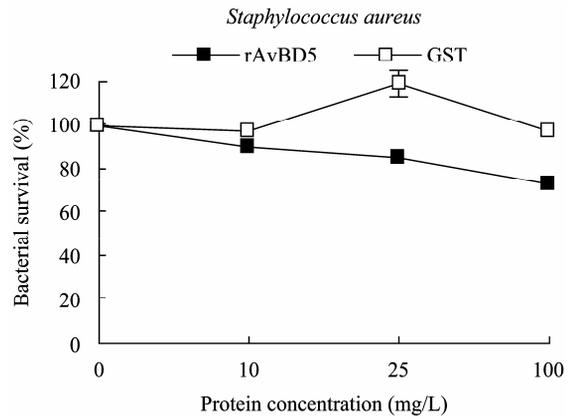
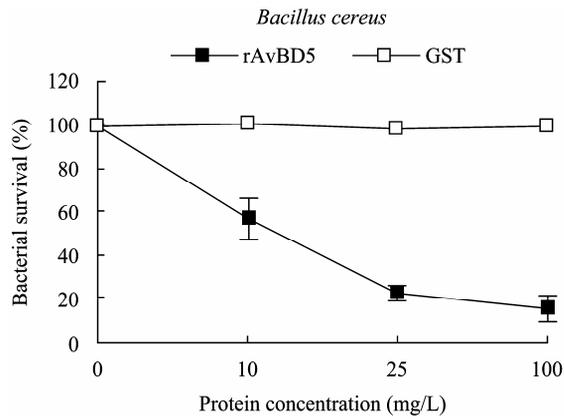
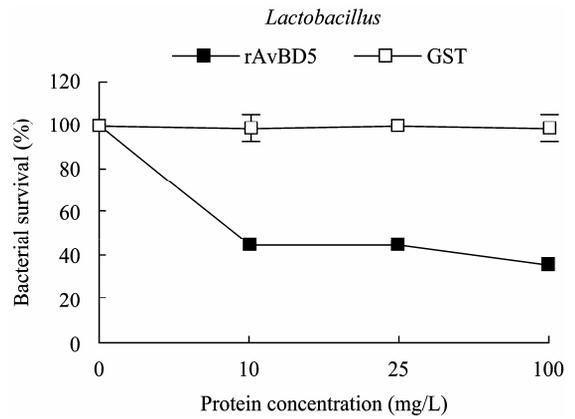
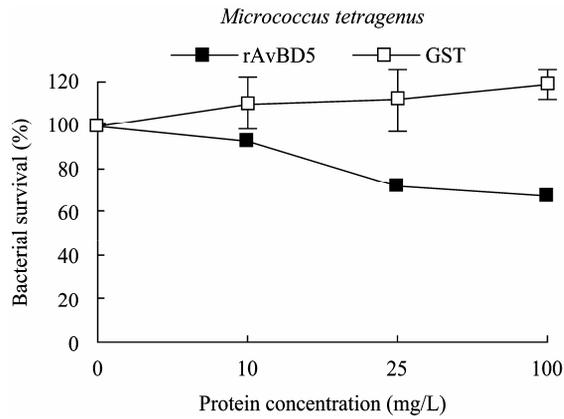
注: 1: 上清; 2: 包涵体; 3: 纯化蛋白; 4: 蛋白质 Marker; 5: 无诱导; 6-11: IPTG 诱导 2-7 h 后融合蛋白表达; 12: GST 蛋白; 13: 蛋白质 Marker.

Note: 1: Supernatant; 2: Inclusion body; 3: Purified protein; 4: Protein marker; 5: Total protein of BL 21 containing duck AvBD5-GST without IPTG induction; 6-11: Total protein of BL21 containing duck AvBD5-GST on 2-7 h, after induction with IPTG; 12: GST protein; 13: Protein marker.

2.3 重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白及标签蛋白 GST 的抗菌活性

本试验采用菌落计数法测定重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白和 GST 标签蛋白对 4 种革兰氏阳性菌和 7 种革兰氏阴性菌的抗菌活性(图 5)。结果表明: 重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白对枯草芽孢杆菌、乳酸菌和多杀巴氏杆菌具有较强的抑菌活性($P < 0.01$); 对绿脓杆菌、四联球菌、奇异变形杆菌、大肠杆菌、

鸡白痢沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和猪霍乱沙门氏菌具有中度的抑菌活性($P < 0.05$); 对兔波土杆菌的抑菌活性较弱, 仅当重组蛋白浓度白达到 100 mg/L, 才有显著抑菌活性($P < 0.05$)。在重组蛋白浓度 0-100 mg/L 这个梯度范围内, 随着重组蛋白浓度的增加, 其抗菌活性增强。GST 标签蛋白几乎对所测细菌没有抑制作用, 两种蛋白对比可得出重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白具有一定的抗菌作用的结论。



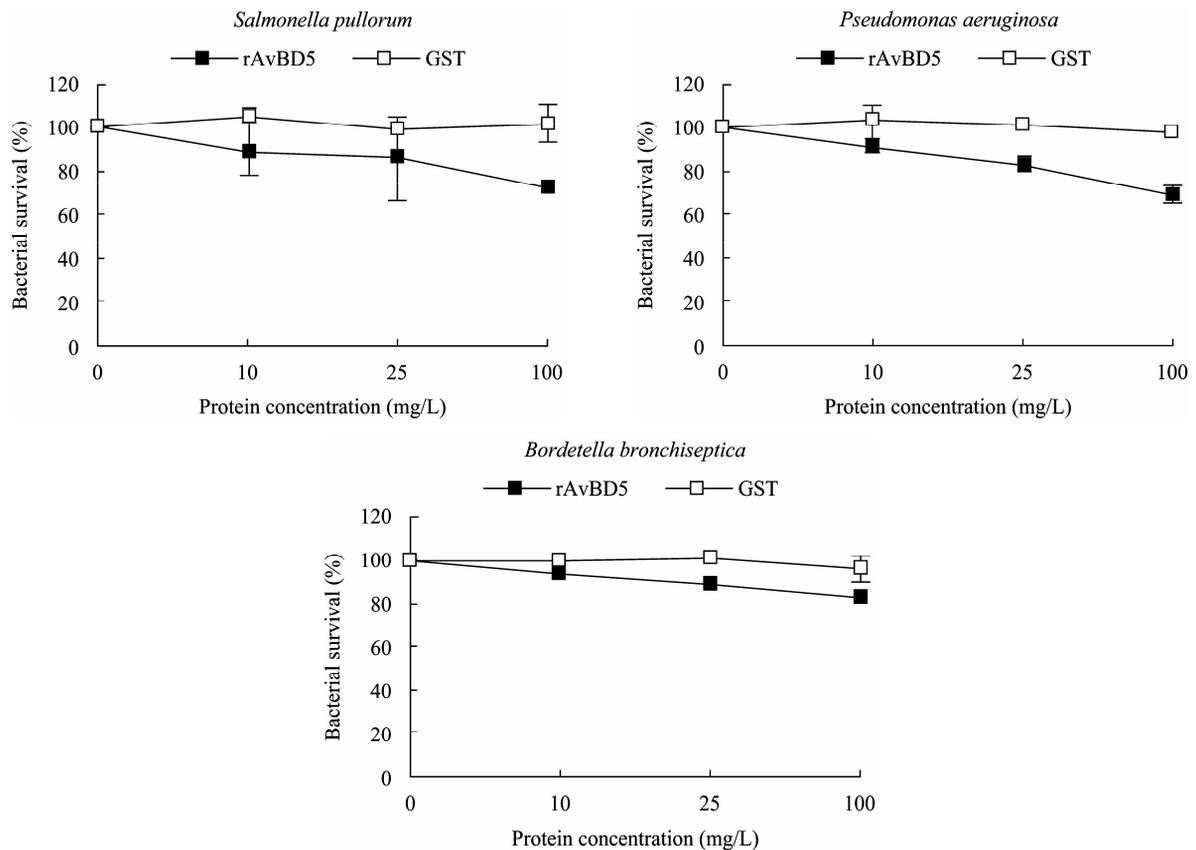


图 5 重组鸭 AvBD5-GST 蛋白和 GST 标签蛋白的抗菌活性

Fig. 5 The antimicrobial activity of recombinant AvBD5-GST proteins and GST protein

2.4 NaCl 浓度对重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白抗菌活性的影响

如图 6 所示, 高浓度 NaCl 条件下, 重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白对多杀性巴氏杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用有降低趋势, 但差异不显著 ($P>0.05$)。

2.5 重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白对溶血活性的影响

重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白对鸭血红细胞的溶血活性极低(重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白浓度为 500 mg/L 时溶血活性为 7.47%), 与阴性对照相比差异不显著 ($P>0.05$)(表 2)。

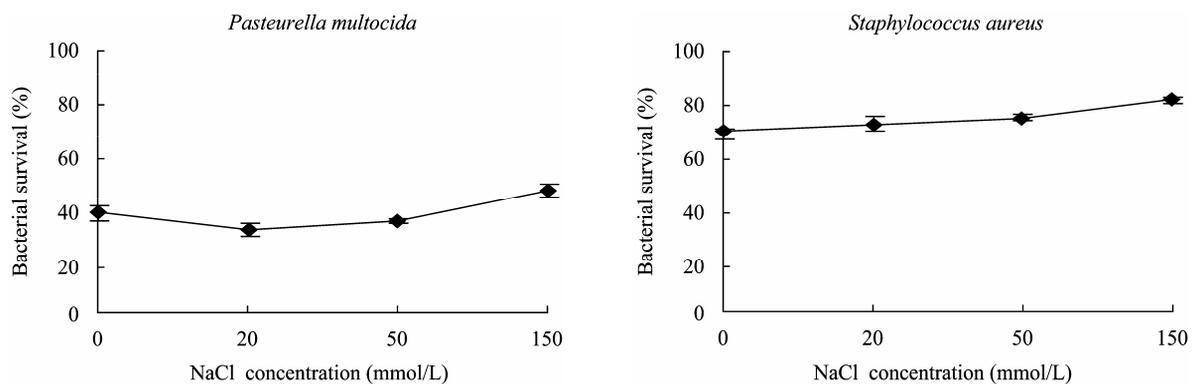


图 6 在不同 NaCl 浓度下, 100 mg/L 的重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白的抗菌活性

Fig. 6 The antimicrobial activity of recombinant duck AvBD5-GST protein with 100 mg/L under different NaCl concentration

表2 重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白的溶血活性
Table 2 The hemolysis activity of recombinant duck AvBD5-GST

| 重组蛋白浓度 Recombinant protein concentration (mg/L) | 溶血活性 Haemolysis (%) |
|--|------------------------|
| 阴性对照(PBS) Negative control | 0±0.00 |
| 100 | 2.87±1.98 |
| 250 | 5.17±1.72 |
| 500 | 7.47±0.99 |
| 阳性对照(Triton X-100) Positive control | 100±0.00 |

3 讨论

本试验根据已发表的鸡 AvBD5 (NM_001001608)的基因,设计特异性引物,利用 RT-PCR 方法从鸭的肺脏组织克隆到鸭 AvBD 基因。经序列测定表明,该基因大小为 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,分别在分子内形成 Cys1-Cys5、Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6 共 3 对二硫键,这是 β -防御素的基本结构单元^[1,4]。其成熟肽中还富含阳离子氨基酸和疏水性氨基酸,这种结构对于 AvBDs 的抗菌作用极为关键。通过 DNASTar 的 MegAlign 软件将该基因的氨基酸序列与其它 AvBDs 进行分析比较,发现鸭 AvBD5 和鸡 AvBD5 同源性高达 97%。鸭 AvBD5 和哺乳动物的 AvBD5 同源性较低,与小鼠的同源性仅有 25%。这种现象可能是在进化过程中,不同物种面临不同的病原侵袭,其氨基酸水平发生变异而出现了多样性,造成了差异^[4]。

禽类的嗜嗜性细胞中缺乏氧化机制,没有超氧根离子和髓过氧化物酶,于是更多的依赖于非氧化机制(由少数几种酶、阳离子蛋白质和多肽完成)发挥抗菌作用^[7,15-16]。而禽 β -防御素这种阳离子多肽型的免疫因子,在禽类先天性免疫中发挥重要作用。近几年研究发现,许多禽 β -防御素对革兰氏阳性菌以及革兰氏阴性菌都有抗菌作用^[4-5,9,14]。本研究采用原核表达系统,在大肠杆菌中表达重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白,与其它 β -防御素一样,重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白能够对枯草芽孢杆菌、奇异变形杆菌、多杀性巴氏杆菌和乳酸菌在内的 11 种细菌均产生不同程度的抑制作用。当重组蛋白浓度降至 10 mg/L 时,对乳酸菌、枯草芽孢杆菌也有较

强抑制作用。我们将该重组蛋白的标签 GST 也进行抑菌活性的测定,结果表明,该标签蛋白不具有抗菌的活性,这就更加确定了该重组蛋白的抗菌活性。虽然学者们对于禽 β -防御素的抗菌机制尚未完全清楚,但是大多数研究者们认为这些抗菌肽的抗菌和抑菌的关键在于双亲结构(亲水和亲脂)和阳离子性(带正电荷的精氨酸)^[3,16,18]。此外,不同种类的防御素对细菌的抑制程度有所不同。鸡 AvBD9 对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都有较强的杀菌性,可以杀灭金黄色葡萄球菌、白色念球菌和大肠杆菌,但对鼠伤寒沙门氏菌几乎没有抑制作用^[17]。本研究中重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白对枯草芽孢杆菌和乳酸菌的抑制作用强,而对兔波土杆菌的抑制作用很弱,推测这可能与防御素种类和自身结构有一定的关系^[3,18]。高浓度 NaCl 条件会对重组鸭 AvBD5-GST 蛋白造成一定的影响,可能由于达到一定浓度的单价阳离子与防御素这种阳离子多肽竞争地结合到细菌质膜,干扰了防御素的抗菌机制,从而降低了其抗菌活性。重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白无显著溶血性,不会对细胞造成危害,这为实现防御素在禽类饲料添加剂和兽医临床等方面的应用提供了理论依据。

4 结论

本研究从鸭肺脏组织中扩增到鸭 AvBD5 基因,该基因片段大小为 201 bp,编码 66 个氨基酸残基。鸭 AvBD5 与鸡 AvBD5 氨基酸同源性为 97%。重组鸭 AvBD5-GST 融合蛋白的分子量约为 32 kD,该重组蛋白对枯草芽孢杆菌、奇异变形杆菌、乳酸菌和多杀性巴氏杆菌等均有抑制作用。在高浓度 NaCl 的条件下,该重组蛋白对多杀性巴氏杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性降低。此外,该重组蛋白对鸭血红细胞无明显溶血活性。

参考文献

- [1] van Dijk A, Veldhuizen EJA, Haagsman HP. Avian defensins[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 124(1/2): 1-8.
- [2] Sugiarto H, Yu PL. Avian antimicrobial peptides: the

- defense role of β -defensins[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 323(3): 721–727.
- [3] Higgs R, Lynn DJ, Gaines S, et al. The synthetic form of a novel chicken β -defensin identified in silico is predominantly active against intestinal pathogens[J]. *Immunogenetics*, 2005, 57(1/2): 90–98.
- [4] Kawaguchi A, Suzuki T, Kimura T, et al. Functional analysis of an alpha-helical antimicrobial peptide derived from a novel mouse defensin-like gene[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 398(4): 778–784.
- [5] Evans EW, Beach GG, Wunderlich J, et al. Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1994, 56(5): 661–665.
- [6] Evans EW, Beach FG, Moore KM, et al. Antimicrobial activity of chicken and turkey heterophil peptides CHP1, CHP2, THP1, and THP3[J]. *Veterinary Microbiology*, 1995, 47(3/4): 295–303.
- [7] Xiao YJ, Hughes AL, Ando J, et al. A genome-wide screen identifies a single β -defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins[J]. *BMC Genomics*, 2004, 5(1): 56–67.
- [8] Hata TR, Gallo RL. Antimicrobial peptides, skin infections, and atopic dermatitis[J]. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 2008, 27(2): 144–150.
- [9] Ma DY, Liu SW, Han ZX, et al. Expression and characterization of recombinant gallinacin-9 and gallinacin-8 in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2008, 58(2): 284–291.
- [10] Wang RQ, Ma DY, Lin LJ, et al. Identification and characterization of an avian β -defensin orthologue, avian β -defensin 9, from quails[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(4): 1395–1405.
- [11] Milona P, Townes CL, Bevan RM, et al. The chicken host peptides, gallinacins 4, 7, and 9 have antimicrobial activity against *Salmonella* serovars[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 356(1): 169–174.
- [12] Yu PL, Choudhury SD, Ahrens K. Purification and characterization of the antimicrobial peptide, ostricacin[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(3): 207–210.
- [13] Thouzeau C, Le Maho Y, Froget G, et al. Spheniscins, avian β -defensins in preserved stomach contents of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(51): 51053–51058.
- [14] Ma DY, Wang RQ, Liao WY, et al. Identification and characterization of a novel antibacterial peptide, avian β -defensin 2 from ducks[J]. *The Journal of Microbiology*, 2009, 47(5): 610–618.
- [15] Ma DY, Liao WY, Wang RQ, et al. Two novel duck antibacterial peptides, avian β -defensins 9 and 10, with antimicrobial activity[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(11): 1447–1455.
- [16] Yang YR, Jiang YB, Yin QQ, et al. Chicken intestine defensins activated murine peripheral blood mononuclear cells through the TLR4-NF- κ B pathway[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 133(1): 59–65.
- [17] Derache C, Esnault E, Bonsergent C, et al. Differential modulation of β -defensin gene expression by *Salmonella* Enteritidis in intestinal epithelial cells from resistant and susceptible chicken inbred lines[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(9): 959–966.
- [18] 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[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(3): 912–922.
- [19] Soman SS, Arathy DS, Sreekumar E. Discovery of *Anas platyrhynchos* avian β -defensin 2 (Apl_AvBD2) with antibacterial and chemotactic functions[J]. *Molecular Immunology*, 2009, 46(10): 2029–2038.
- [20] Yu K, Park K, Kang SW, et al. Solution structure of a cathelicidin-derived antimicrobial peptide, CRAMP as determined by NMR spectroscopy[J]. *The Journal of Peptide Research*, 2002, 60(1): 1–9.
- [21] SAS Institute. SAS User's Guide: Statistics. Cary: SAS Institute Inc, 1996.