

研究报告

鸽 β -防御素 1 基因的克隆及其生物学作用鉴定李妍妍^{1,2} 徐杨^{1,2} 张婷婷^{1,2} 徐倩倩^{1,2} 韩宗玺² 刘胜旺² 马得莹^{1*}

(1. 东北农业大学 动物科技学院 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:【目的】从鸽子组织中克隆鸽子 β -防御素 1 (AvBD1) 基因, 在大肠杆菌中表达重组鸽子 AvBD1 蛋白, 测定其生物学特性。【方法】应用 RT-PCR 法从鸽子骨髓组织中扩增鸽子 AvBD1 基因, 采用 Real-time PCR 法检测该基因在鸽子组织器官中的表达分布。将该基因亚克隆到大肠杆菌原核表达载体 pProEX-HTa 的 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切位点上, 构建重组表达质粒 pProEX-pigeon AvBD1, 将重组质粒进行诱导表达; 对该重组蛋白进行纯化, 通过菌落计数法测定其体外抗菌活性与理化特性。【结果】从鸽子骨髓组织中克隆到鸽子 AvBD1 基因, 其 cDNA 大小为 198 bp, 编码 65 个氨基酸, 经序列相似性分析, 鸽子 AvBD1 与鸭 AvBD1 氨基酸序列相似性最高(81.5%)。鸽子 AvBD1 主要分布于免疫系统和消化系统组织中。Tricine-SDS-PAGE 电泳结果表明, 重组鸽子 AvBD1 蛋白分子量约 8.8 kD, 与预期大小一致。该重组蛋白具有广谱抗菌活性, 高盐浓度显著降低其抗菌活性。此外, 该重组蛋白的溶血活性极低。【结论】从鸽子骨髓组织中克隆到鸽子 AvBD1 基因, 其主要分布在机体的免疫系统和消化系统中。该重组蛋白具有广谱抗菌活性, 高盐浓度显著降低其抗菌活性, 且该重组蛋白的溶血活性极低。

关键词: 鸽子 AvBD1, 重组蛋白, 抗菌活性, 组织分布

Cloning and bioactivity determination of pigeon avian beta-defensin 1

LI Yan-Yan^{1,2} XU Yang^{1,2} ZHANG Ting-Ting^{1,2} XU Qian-Qian^{1,2} HAN Zong-Xi²
LIU Sheng-Wang² MA De-Ying^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, 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: [Objective] The study was conducted to clone avian beta-defensin1 (AvBD1) gene from pigeon tissues, expression of recombinant AvBD1 protein in *Escherichia coli* and determine its biological characteristics. **[Methods]** The AvBD1 gene was amplified from bone marrow of pigeon by RT-PCR, differential mRNA expression of this gene was evaluated by real-time PCR. The cDNA of pigeon AvBD1 was sub-cloned into *EcoR* I and *Xho* I sites of pProEX-HTa vector to construct recombinant plasmid pProEX-pigeon AvBD1, the recombinant plasmid was expressed into *E. coli*, the bacteria in-

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金; 黑龙江省应用技术与开发计划项目(No. PC13S02)

*通讯作者: Tel: 86-451-55190862; 邮箱: mdy296@sohu.com

收稿日期: 2013-11-06; 接受日期: 2014-01-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-16

duced with IPTG. The recombinant protein was purified, antimicrobial activity, physio-chemical characteristics of the recombinant protein were measured by colony counting assays *in vitro*. **[Results]** Sequence analysis showed that the cDNA of pigeon AvBD1 consisted of 198 bp nucleotide, encoding a polypeptide of 65 amino acids. Homology analysis showed that pigeon AvBD1 shared the highest percentage of amino acid homology (81.5%) with duck AvBD1. The mRNA was widely expressed in immune system and digestive system. It was demonstrated by Tricine-SDS-PAGE that a 8.8 kD protein which was equal to pigeon pProEX-HTa AvBD1 protein in molecular weight was expressed. The purified recombinant pigeon AvBD1 exhibit extensive antimicrobial activity. In high salt ions conditions, the antibacterial activity was significantly decreased. In addition, little hemolysis of erythrocytes was observed at any concentration of the peptide. **[Conclusion]** The pigeon AvBD1 gene was successfully cloned from bone marrow, the mRNA was widely expressed in immune system and digestive system. The recombinant protein exhibit extensive antimicrobial activity, has little hemolytic properties. High salt concentration significantly decreased its antibacterial activity.

Keywords: Pigeon AvBD1, Recombinant protein, Antimicrobial activity, Tissues distribution

抗生素在预防细菌感染、防治畜禽疾病方面发挥了重要作用,但近年来抗生素滥用所引发的问题也日益受到人们关注。应用新型抗菌制剂替代抗生素作为饲料添加剂,已成为当前国内外研究的一项重要内容。禽 β -防御素(β -Defensin, AvBD)是一类广泛存在于禽体内的内源性阳离子抗菌肽^[1],具有广谱抗菌、抗病毒和免疫增强作用^[2-3]。它的作用机制之一是通过在微生物细胞膜上形成电压依赖式离子通道,改变膜内外的通透性最终导致胞体死亡^[4]。由于其独特的抗菌机制,微生物对其不易产生耐药性,是有应用前景的新型“抗生素替代品”^[5]。禽 β -防御素一般由 60-100 个氨基酸组成,前体分子由 64-68 个氨基酸残基组成,信号序列和前导序列为 21-32 个氨基酸残基。在整个氨基酸序列中只有 2 种氨基酸残基(共 8 个)高度保守,第一种是位于 N 末端的甘氨酸(2 个);第二种是半胱氨酸(6 个),分别以 Cys1-Cys5、Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6 连接成 3 对二硫键及 β -片层结构^[6-9]。这种结构可以使小分子防御素紧密联接以防御蛋白酶水解,所以在富含蛋白的吞噬溶酶体环境中仍能保持其特性。大量研究表明,禽 β -防御素具有广谱抗菌活性,能有效杀灭包括细菌和真菌在内的许多病原微生物^[10-17]。防御素的产生非常快,比 IgM 快 100 多倍^[18],是动物机体内最理想的先天性免疫防线。目前,禽 β -防御素已成为免疫学和分子生物学研究

的热点,它必将推动绿色养殖事业的发展。

本研究采用 RT-PCR 法从鸽子骨髓组织克隆到一个新的禽 β -防御素,并对该基因进行相似性分析以确定其命名(鸽子 AvBD1)。在此基础上采用大肠杆菌融合表达系统表达重组鸽子 AvBD1 蛋白,测定其体外抗菌活性及其理化特性,检测该基因在鸽子组织器官中的分布,为进一步开展禽 β -防御素的研究与应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物: 2 月龄的健康鸽子 5 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 菌株与质粒载体: 大肠杆菌菌株(Rosseta, TG1)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)、大肠杆菌(DE3)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)、枯草芽孢杆菌(ATCC 9193)、鸡白痢沙门氏菌(C79-11-S11)购自中国兽药药品监察所。pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。表达载体 pProEX-HTa 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 工具酶和主要试剂: Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA Ligase、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、IPTG 购自宝生物工程(大连)有限公司;RNA 提取 TRIzol 试剂盒购自 Invitrogen 公司;凝胶回收试剂盒购自美国 OMEGA 公司;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 GenBank 上提交的鸡 AvBD1 (NM_204993)基因序列设计两对引物 P1/P2 和 P3/P4, 其中 P1/P2 为克隆引物, P3/P4 为表达引物; 在 P3/P4 的 5'端分别加入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点 (表 1)。引物均由华大基因科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆及序列分析: 取鸽子骨髓组织约 0.1 g, 按 TRIzol 试剂盒说明方法提取总 RNA, 运用 RT-PCR 法进行扩增, 引物为 P1/P2, 反应体系按 One Step SYBR Prime Script RT-PCR Kit^{II} 试剂盒说明进行, 反应程序为: 92 °C 5 min; 95 °C 10 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。扩增结束后将产物在 2%琼脂糖凝胶中进行初步鉴定, 观察结果。回收目的片段, 连接 pMD18-T Vector 载体, 小量提取质粒, 并进行 PCR 鉴定, 将阳性重组质粒送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。应用 DNAMAN 软件将所得基因序列与已知的禽 β-防御素基因及部分哺乳动物的 β-防御素基因序列进行比较, 并用 MEGA 软件绘制分子遗传进化树, 分析其遗传进化关系; 并将该基因推导的氨基酸序列与相关的禽 AvBDs 氨基酸序列进行相似性比较。

1.2.2 原核表达重组质粒的构建: 以重组质粒 pMD18-T-pigeon AvBD1 为模板进行 PCR 扩增, 将扩增产物用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后亚克隆到原核表达载体 pProEX-HTa 上, 构建重组表达质粒 pProEX-pigeon AvBD1, 并进行 PCR 和双酶切鉴

定, 将阳性质粒送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.2.3 重组鸽子 AvBD1 蛋白的诱导表达与纯化: 将重组表达质粒 pProEX-pigeon AvBD1 转化大肠杆菌 Rosseta 感受态细胞, 挑取单个菌落在含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中 37 °C 振荡培养, 当 OD₆₀₀ 值达到 0.7 时, 无菌取出 1 mL 培养物作为诱导前对照, 并加入 IPTG (终浓度为 0.6 mmol/L) 进行诱导。分别在诱导 2、4、6 h 各取出 1 mL 培养物, 将不同时间段收集的培养物于 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 向沉淀中加入适量的 PBS (pH 7.4) 和 SDS 凝胶上样缓冲液, 沸水裂解并冰浴后进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳, 经考马斯亮蓝染色, 乙醇-冰乙酸脱色液脱色后观察结果。按照 Novagen 公司蛋白纯化试剂盒说明书进行蛋白纯化和复性, 并测定蛋白浓度。

1.2.4 重组鸽子 AvBD1 蛋白抗菌活性测定: 以 1.1.2 所述菌株为检测菌, 采用菌落计数法测定纯化后的重组蛋白抗菌活性^[10,19]。将各株细菌培养至对数生长期, 然后用相应培养基稀释细菌液至 2×10⁶ CFU/mL; 用无菌 PBS (pH 7.4) 稀释纯化后的重组蛋白和 His 标签蛋白至终浓度分别为 50、100、250、500 mg/L, 分别取 250 μL 加入无菌离心管中, 同时设 PBS 为阴性对照, 分别吸取每株细菌培养物 10 μL 至管中, 每组设 3 个重复, 37 °C 振荡孵育 4 h 后, 将各管样品分别作不同倍数稀释, 每个稀释度分别取 100 μL 滴种在相应营养琼脂平板上, 37 °C 培养箱孵育 12 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(%)=
$$\frac{\text{存活细菌数}}{\text{阴性对照细菌数}} \times 100$$

1.2.5 不同 NaCl 浓度对重组鸽子 AvBD1 蛋白抗菌活性的影响: 选取大肠杆菌(G⁻)和四联球菌(G⁺)

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	序列 Sequence (5'→3')	预期产物长度 Product size (bp)
P1	AAACCATGCGGATCGTGTACC TGC	265
P2	ATGGGGGTTGTTTCCAGGAGC	
P3	GAATTCATGACCTGGCTCCA GG	150
P4	CTCGAGTCAACCCCATATATT TTTGCA	

为检测菌, 用灭菌的去离子水调整氯化钠(NaCl)浓度, 使终浓度分别为 0、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子 AvBD1 蛋白至终浓度为 250 mg/L, 各取 250 μL 分别加入无菌离心管中, 同时设不同 NaCl 浓度的缓冲液为阴性对照, 每组设 3 个重复, 37 °C 振荡孵育 4 h, 方法同 1.2.4。

1.2.6 重组鸽子 AvBD1 蛋白溶血试验: 用无菌 PBS (pH 7.4)制备 2%~3%新鲜鸡红细胞悬液, 用 PBS 稀释重组鸽子 AvBD1 蛋白至终浓度分别为 100、250、500 mg/L, 各取 20 μL 分别加入无菌离心管中, 同时设 PBS 为阴性对照, 0.2% Triton-100 为阳性对照, 分别向每管加入 180 μL 红细胞悬液。每组设 3 个重复, 37 °C 孵育 1 h, 1 000×g 离心 10 min 后取上清, 用微量分光光度计测 OD₅₆₀ 值并计算溶血指数。

溶血指数(%)=(OD_{蛋白}-OD_{PBS})/(OD_{Triton}-OD_{PBS})^[20]

1.2.7 鸽子 AvBD1 基因在组织中的表达: 取鸽子法氏囊、脾脏、骨髓、肝脏、盲肠扁桃腺、哈德氏腺、小肠、直肠、大肠、十二指肠、胰腺、舌、食道、喉头、气管、腺胃、肌胃、肺脏、肾脏、皮肤、脑组织提取总 RNA, 以各组织 RNA 为模板, 重组质粒为标准品进行 Real-time PCR 反应, 反应体系按 One Step SYBR Prime Script RT-PCR Kit^{II} 试剂盒说明进行, 分别检测内参基因 β-Actin 和鸽子 AvBD1, 每个样品做 5 个重复, 取其平均值进行分析、绘制图表。

基因相对表达量= $\frac{\text{目标基因拷贝数}}{\text{内参基因拷贝数}} \times 10^3$

Pigeon AvBD1 MRIVYLL**F**P**L**LLLLA**Q**GAAGS**T**LAPGN**K**Q**C**LREKGF**C**GFLK**C**S**F**FFVVS**G**K**C**S**R**FF**F**CK**N**I**W**G
Duck AvBD1 MRIVYLL**F**P**F**ILLLV**Q**GAAGS**S**LAPRN**K**E**K**CHREKGF**C**GFLK**C**S**F**FFIIS**G**K**C**S**R**FF**F**CK**K**I**F**G
Goose AvBD1 MRIVYLL**F**P**F**ILLLV**Q**GAAGS**S**LVPGN**K**Q**C**HREKGF**C**GFLN**C**P**F**FGIS**G**K**C**S**R**FF**F**CK**K**L**F**G
Turkey AvBD1 MRIVYLL**F**P**F**ILL**A**QGAAGS**S**LALG**K**RE**K**CL**R**NGF**C**AF**L**K**C**PTLSV**I**SG**T**C**S**R**F**Q**V**CK**T**LL**G**
Chicken AvBD1 MRIVYLL**L**P**F**ILL**A**QGAAGS**S**QALGR**K**SD**C**FRKSG**F**CA**F**LK**C**PS**L**TLIS**G**K**C**S**R**F**Y**LCK**R**I**W**G

图 2 鸽子 AvBD1 基因推导的氨基酸序列与相关的禽 AvBDs 氨基酸序列比较

Figure 2 Alignment of amino acid sequences of pigeon AvBD1 and related AvBDs from other avian species

注: 下划线标出高度保守的半胱氨酸; 多肽之间不同的氨基酸加粗。
Note: The highly conserved six cysteines (C) are underlined; The amino acids that differ among respective AvBDs are in bold.

1.2.8 统计分析: 结果以平均数±标准差表示。所有数据均采用 SAS (1996)^[21]软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 鸽子 AvBD1 基因克隆与序列分析

从鸽子骨髓组织提取总 RNA, 以 P1/P2 特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 得到约 260 bp 的基因片段, 与其同源基因在鸡基因组中片段大小基本相符(265 bp), 见图 1。基因序列分析表明其编码区含有 198 个碱基, 编码 65 个氨基酸残基。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 Cys1-Cys5、Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6 3 对二硫键(图 2)。应用 DNAMAN 软件将鸽子 AvBD1 基因序列与已知禽 β-防御素基因及部分哺乳动物 β-防御素 1 基因序列进行比较, 并绘制遗传进化树(图 3),

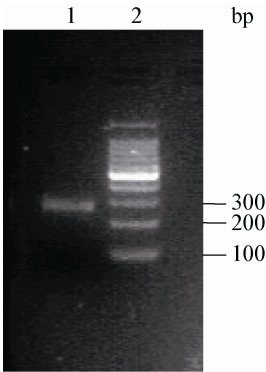


图 1 鸽子 AvBD1 RT-PCR 产物电泳分析

Figure 1 Electrophoretic analysis of pigeon AvBD1 RT-PCR product

注: 1: 鸽子 AvBD1 RT-PCR 产物; 2: DNA marker.

Note: 1: Pigeon AvBD1 RT-PCR product; 2: DNA marker.

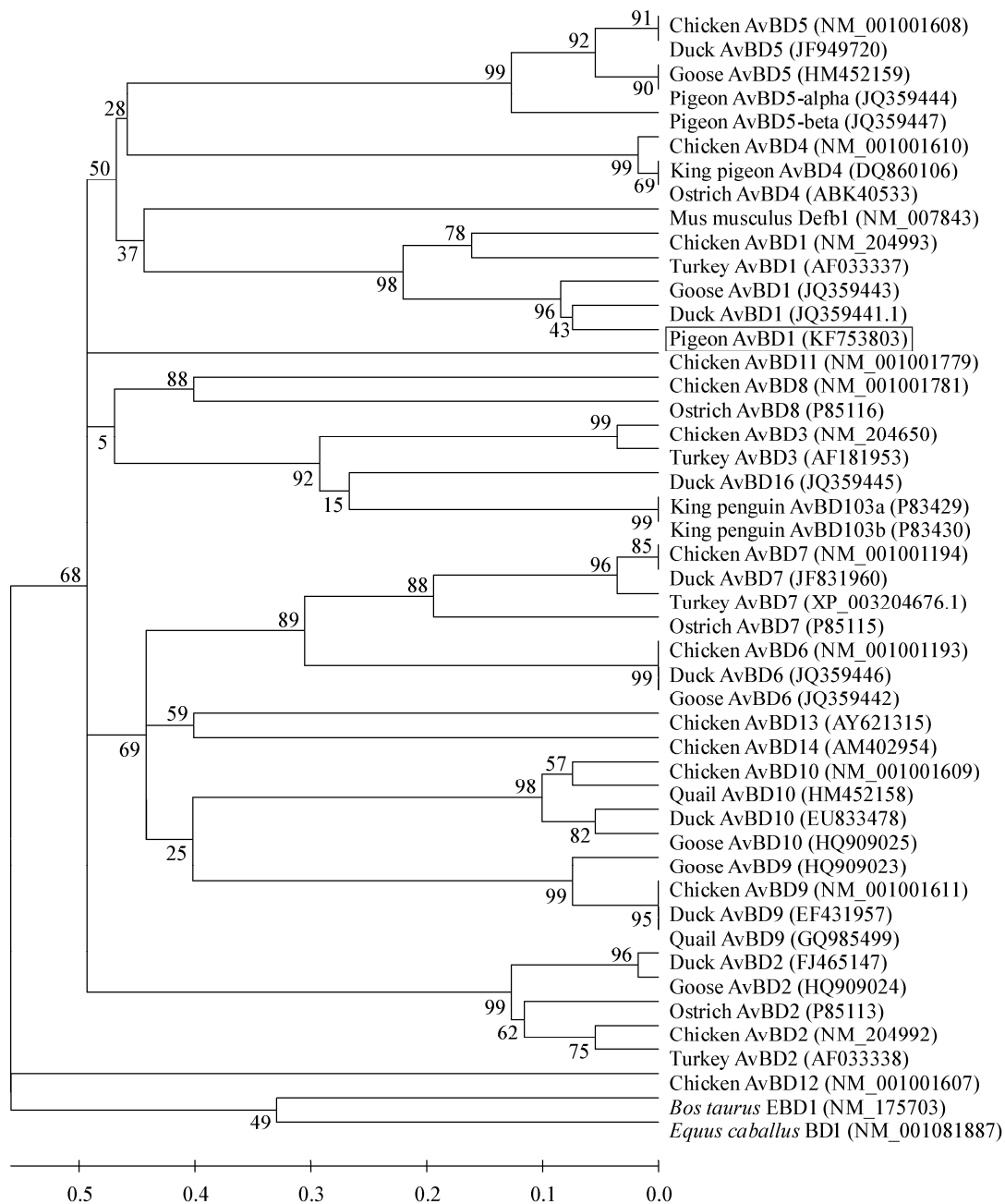


图3 鸽子 AvBD1 基因与其它禽 β -防御素及部分哺乳动物 β -防御素 1 基因系统进化树分析

Figure 3 Phylogenetic relationships based on the gene sequences of the pigeon AvBD1 and other AvBDs and β -defensin-1 from some mammalian animals

注：外加方框的为本研究中的鸽子 AvBD1 基因；括号内为基因的登录号；分支长度代表遗传距离。

Note: The pigeon AvBD1, sequenced in this present study is boxed. Access numbers are shown in bracket. Branch lengths represent genetic distance.

发现该基因与禽 β -防御素 1 基因在同一分支。将该基因推导的氨基酸序列与已发现的禽 β -防御素 1 的氨基酸序列进行比较, 结果显示: 该氨基酸与鸭 AvBD1 氨基酸相似性最高为 81.54%, 与鹅、鸡、火鸡 AvBD1 氨基酸相似性依次分别为 78.5%、66.1% 和 66.1%。因此, 我们将其命名为鸽子 AvBD1。将该基因序列录入 GenBank (登录号: KF753803)。

2.2 重组鸽子 AvBD1 蛋白的表达与纯化

以重组质粒 pMD18-T-pigeon AvBD1 为模板进行 PCR 扩增。将表达用重组质粒与表达载体 pProEX-HTa 分别经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 回收目的片段, 连接后转入表达菌株 Rosseta 感受态细胞中, 构建重组表达质粒并进行双酶切和 PCR 鉴定及测序。结果表明, 该片段与目的基因序列一致; 经 Tricine-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约 8.8 kD, 与预期大小相符; 诱导 2、4、6 h 后, 可见诱导 6 h 的表达量最大。诱导的菌体细胞经离心和裂解后, 分别取上清和沉淀进行 Tricine-SDS-PAGE 分析, 可见大部分重组蛋白存在于沉淀中, 表达重组鸽子 AvBD1 蛋白以包涵体的形式存在于 *E. coli* 中。采用 Novagen 蛋白质纯化试剂盒对重组蛋白进行纯化, 将获得的重组蛋白运用分光光度仪测得浓度为 1 700 mg/L。对纯化后的蛋白进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳, 可见约 8.8 kD 蛋白带, 与预期蛋白大小相符(图 4)。

2.3 重组鸽子 AvBD1 蛋白抗菌活性测定

本实验采用菌落计数法测定重组鸽子 AvBD1 蛋白抗菌活性(图 5)。结果表明: His 标签蛋白无抗菌活性, 而不同浓度重组鸽子 AvBD1 蛋白对四联球菌和大肠杆菌具有较强的抗菌活性($P<0.01$), 对鸡白痢沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌具有中度抗菌活性($P<0.05$), 在重组蛋白浓度 0–500 mg/L 这个梯度范围内, 随着重组蛋白浓度增加, 其抗菌活性增强。

2.4 不同 NaCl 浓度对重组鸽子 AvBD1 蛋白抗菌活性的影响

如图 6 所示, 高浓度 NaCl 条件下, 重组鸽子 AvBD1 蛋白对大肠杆菌和四联球菌的抑制作用有降低趋势, 当 NaCl 浓度为 150 mmol/L 时, 该重组蛋白对四联球菌的抗菌活性显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.5 重组鸽子 AvBD1 蛋白对溶血活性的影响

试验结果显示(图 7), 重组鸽子 AvBD1 蛋白在 100、250 和 500 mg/L 三个浓度梯度下溶血率分别为 0.39%、1.55% 和 1.94%, 与阴性对照相比均差异不显著($P>0.05$)。

2.6 鸽子 AvBD1 基因在组织中的表达分布

经 Real-time PCR 检测发现, 鸽子 AvBD1 基因在肝脏中表达量最高; 在法氏囊、骨髓、小肠、大肠、舌、喉头中大量表达; 在脾脏、盲肠扁桃体、食道、气管、肺脏、肾脏中中等表达; 而在哈德氏腺、直肠、十二指肠、胰腺、腺胃、肌胃、皮肤、脑中未检测到表达(图 8)。

3 讨论

目前, 关于禽 β -防御素已有较多研究报道, 其主要集中在鸡、火鸡、鸭、鹅和鸵鸟等禽类^[10–16],

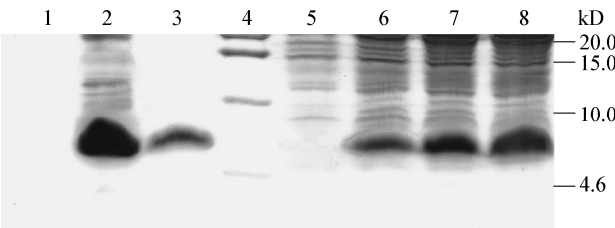


图 4 重组鸽子 AvBD1 蛋白的表达与纯化
Figure 4 Expression and purification of recombinant pigeon AvBD1

注: 1: 上清液; 2: 包涵体; 3: 纯化蛋白; 4: 蛋白质 Marker (kD); 5: 无诱导; 6–8: IPTG 诱导 2、4、6 h 后重组蛋白表达。

Note: 1: Supernate; 2: Inclusion body; 3: Purified protein; 4: Protein marker (kD); 5: Total protein of Rosseta containing pigeon AvBD1 without IPTG induction; 6–8: Total protein of Rosseta containing pigeon AvBD1 on 2, 4, 6 h, after induction with IPTG.

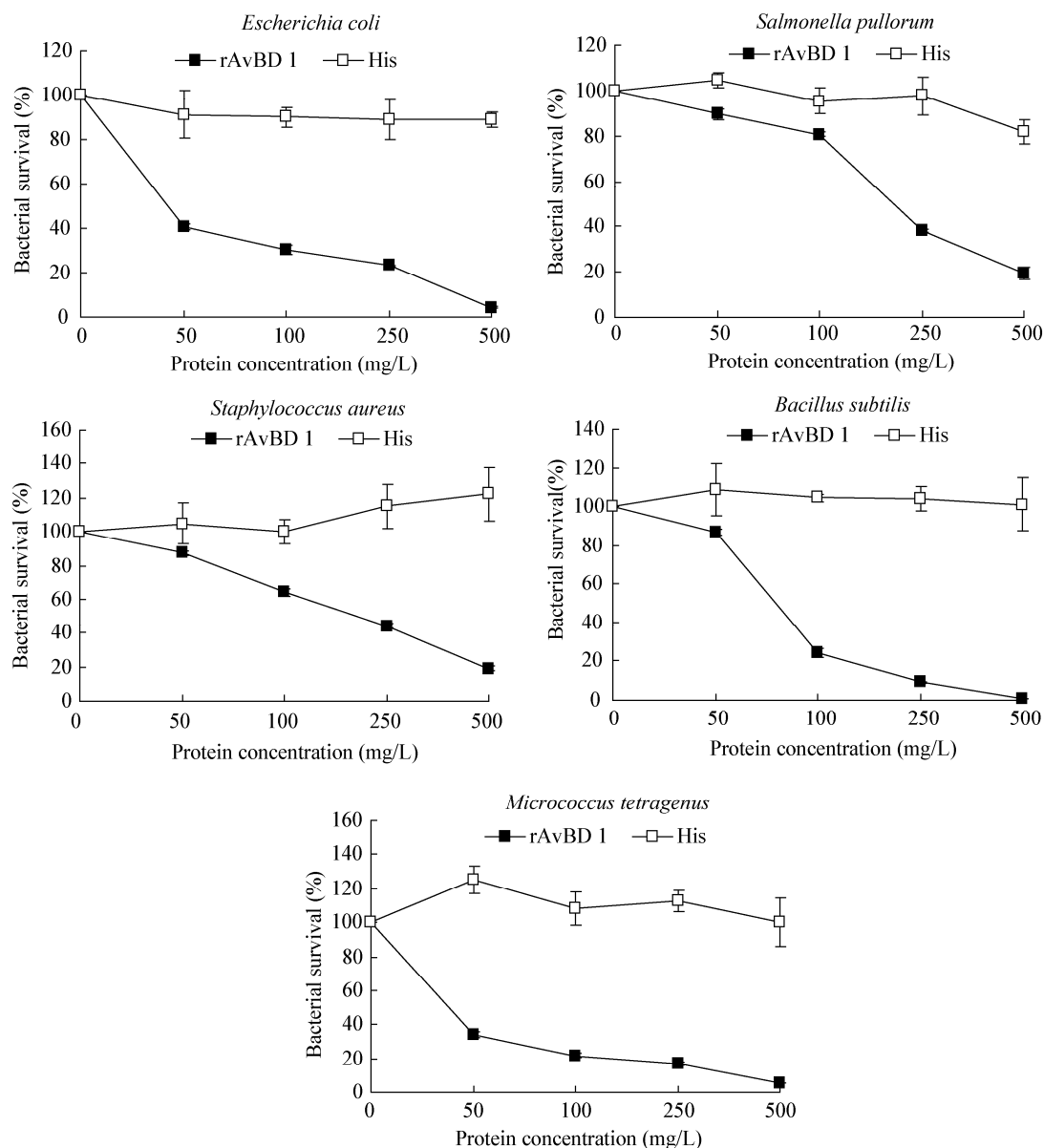


图5 重组鸽子 AvBD1 蛋白和 His 标签蛋白的抗菌活性

Figure 5 The antimicrobial activity of recombinant AvBD1 protein and His protein

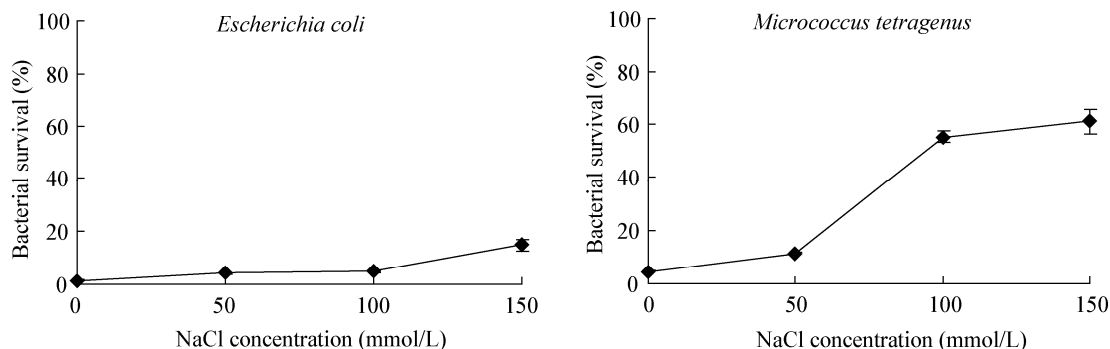


图6 在不同 NaCl 浓度下 250 mg/L 重组鸽子 AvBD1 蛋白的抗菌活性

Figure 6 The antimicrobial activity of recombinant pigeon AvBD1 protein with 250 mg/L under different NaCl concentration

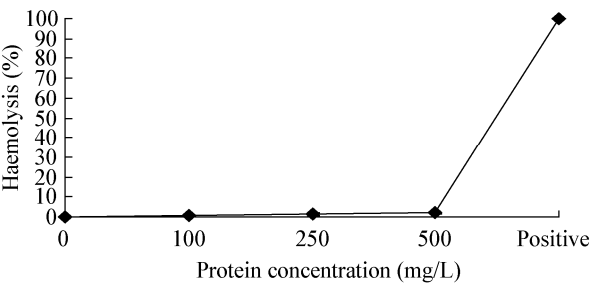


图 7 重组鸽子 AvBD1 蛋白的溶血活性
Figure 7 The hemolysis activity of recombinant pigeon AvBD1 protein

但有关鸽子 β-防御素仅有 AvBD5^[22]。为进一步研究鸽子 β-防御素, 本试验根据 GenBank 中提交的鸡 AvBD1 序列, 设计特异性引物, 采用 RT-PCR 法从鸽子骨髓组织扩增到鸽子 AvBD1 基因。该基因与已发现的其它禽 AvBDs 基因一样, 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 1-5、2-4 和 3-6 三对二硫键以及两个位置保守 GXC 序列, 这 8 个保守的氨基酸基团被称为 β-防御素的特征性结构, 是 β-防御素的基本结构单元^[8-11]。测序结果显示, 该基因编码区大小为 198 bp, 编码 65 个氨基酸残基, 由含 21 个氨基酸残基的信号肽及紧随其后含 44 个氨基酸残基的成

肽组成。N 端的信号肽序列富含亮氨酸, 具有疏水性; 成熟的 C 端由于富含精氨酸和赖氨酸而带正电荷, 可以通过静电作用与细菌表面带负电荷的磷脂相结合, 为发挥其抗菌活性奠定基础。从遗传进化树上可发现该基因与禽 AvBD1 在同一分支上, 将该基因推导的氨基酸序列与已发现的禽 AvBD1 氨基酸序列进行比较, 发现该氨基酸与鸭 AvBD1 的氨基酸相似性最高为 81.5%, 与鹅、鸡、火鸡 AvBD1 氨基酸相似性分别为 78.5%、66.1%和 66.1%。表明鸽子 AvBD1 在同一种属不同品种间差异甚微; 但鸽子 AvBD1 与哺乳动物防御素 1 的相似性较低, 这种现象可能是在进化过程中, 不同物种面临不同病原侵袭, 其氨基酸水平发生变异导致防御素出现多样性^[2,4]。

大量研究表明, 不论是天然存在、人工合成或重组表达的防御素, 都具有广谱抗菌活性, 能有效杀灭包括细菌和真菌在内的许多病原微生物^[10-17,22-23]。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,

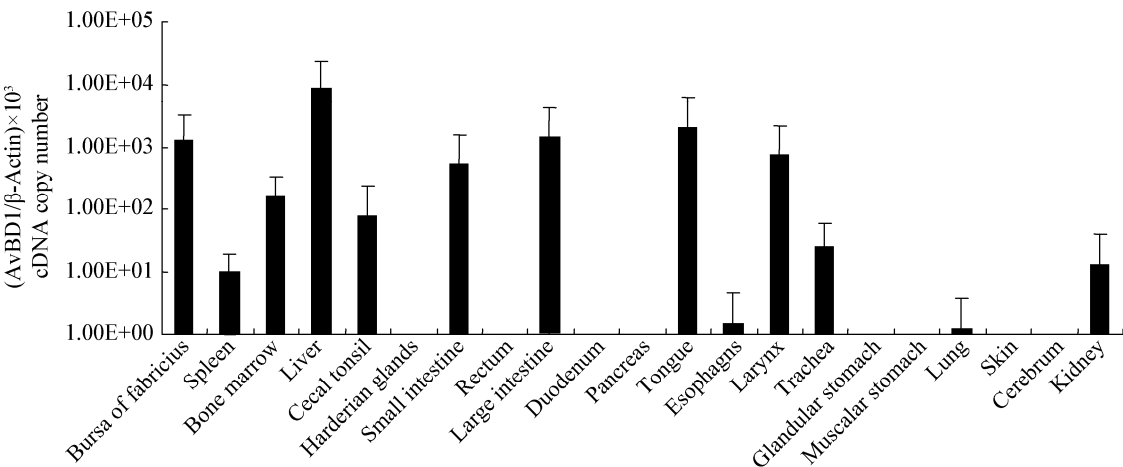


图 8 鸽子 AvBD1 基因在鸽子组织器官中的相对表达量
Figure 8 The relative expression of AvBD1 mRNA in tissues of pigeon

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* 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,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^[1-4,10]。为研究鸽子 AvBD1 的生物学作用,本试验采用原核表达系统表达重组蛋白,经 Tricine-SDS-PAGE 电泳结果表明:该蛋白大部分以不溶的、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^[22]。由于目的蛋白形成包涵体后不具有生物活性,因此,本试验采用蛋白纯化试剂盒针对包涵体进行溶解和复性,从而获得具有活性的目的蛋白。经抗菌活性测定,该重组蛋白对金黄色葡萄球菌、四联球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和鸡白痢沙门氏菌均有显著抑菌作用;另外,当蛋白浓度低至 50 mg/L 时,对大肠杆菌和四联球菌仍然存在较强抑制作用。为研究纯化后重组蛋白的抗菌活性是否受 His 标签影响,本研究测定 His 标签蛋白对检测菌的抗菌活性,结果表明:该标签蛋白不具有抑菌活性,这充分证明了禽 β -防御素具有广谱抗菌活性的特点。与其他种类的防御素相似,在高盐离子条件下,该重组蛋白抗菌活性显著下降^[10,14-16]。研究表明抗菌活性的减弱主要取决于电荷离子,二价阳离子(如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+})相对于一价阳离子(Na^{+} 、 K^{+})具有较高抑制其抗菌活性的能力^[24-25]。此外,重组鸽子 AvBD1 蛋白无显著溶血活性,不会对细胞造成危害。与前人有关其他 AvBDs 的研究结果一致^[8,11-14,26]。

为抵御外界病原体入侵,在禽体内,其 β -防御素分布广泛^[4,10-18,23]。本研究发现,鸽子 AvBD1 在机体的免疫系统和消化系统中广泛分布。由此推

测,当机体发生感染时,AvBD1 在组织器官中起着重要的防御作用,是机体抵抗病原体的第一道防线;消化系统是体内极易受到大量病原微生物攻击的部位,该防御素在上述组织中的大量表达说明该防御素对维护消化系统的完整性发挥了重要作用。研究表明禽 β -防御素主要分布于呼吸道、胃肠道、生殖道表面和腺体中,不仅具有广谱抗微生物活性、调节免疫、抗微生物黏附等作用,且不会对宿主细胞产生毒副作用^[2-3,10-18],这使得大量生产具有高度抗菌活性而对宿主细胞无毒害作用的防御素成为可能。但是如何生产出大量高抗菌活性、低细胞毒副作用的防御素并广泛运用于生产实践,有待进一步探讨。

4 结论

本研究从鸽子骨髓组织中克隆到鸽子 AvBD1 基因,该基因编码区片段大小为 198 bp,编码 65 个氨基酸。鸽子 AvBD1 与鸭 AvBD1 氨基酸相似性最高为 81.5%,其主要分布在机体的免疫系统和消化系统中。重组鸽子 AvBD1 蛋白分子量大小约 8.8 kD,具有广谱抗菌活性;在高盐离子浓度条件下,该重组蛋白对四联球菌和大肠杆菌的抑菌活性显著降低。此外,该重组蛋白对鸡红细胞的溶血活性极低。

参考文献

- [1] Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence[J]. Current Opinion Immunology, 1999, 11(1): 23-27.
- [2] Van DA, Veldhuizen EJA, Haagsman HP. Avian defensins[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2008, 124(1/2): 1-8.
- [3] Brune K, Leffell MS, Spitznagel JK. Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophile leukocyte[J]. Infection and Immunity, 1972, 5(3): 283-287.
- [4] Huang GT, Zhang HB, Kim D, et al. A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin 2 antimicrobial activities *in vivo*[J]. Human Gene Therapy, 2002, 13(17): 2017-2025.
- [5] Wang L, Yang YR, Liang HD, et al. Study on the mechanism and genetic engineering of avian defensins[J]. Progression Veterinary Medicine, 2007, 28(10): 81-84.
- [6] Sugiarto H, Yu PL. Avian antimicrobial peptides: the defense role of β -defensins[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 323(3):

- 721-727.
- [7] White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1995, 5(4): 521-527.
- [8] Martin E, Ganz T, Lehrer RI. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1995, 58(2): 128-136.
- [9] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(9): 710-720.
- [10] Ma DY, Liu SW, Han ZX, et al. Expression and characterization of recombinant gallinacin-9 and gallinacin-8 in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression Purification*, 2008, 58(2): 284-291.
- [11] 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.
- [12] Thouzeau C, Maho YL, Froget G. Avian β -defensins in preserved stomach contents of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 51053-51058.
- [13] Ma D, Zhang K, Zhang M, et al. Identification, expression and activity analyses of five novel duck beta-defensins[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47743.
- [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] 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: 59-65.
- [16] 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.
- [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] Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 24(6): 536-547.
- [19] Soman SS, Arathy DS, Sreekumar E. Discovery of *Anas platyrhynchos* avian β -defensin 2 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[M]. Cary: SAS Institute Inc, 1996.
- [22] 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[J]. *生物工程学报*, 2012, 28(11): 1294-1305.
- [23] 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[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2012, 35(2): 197-207.
- [24] Radhakr IY, Haml KG, Yenuguet SL, et al. Identification, characterization and evolution of a primate β -defensin gene cluster[J]. *Genes and Immunity*, 2005, 6(3): 203-210.
- [25] Enno KV, Knut AD, Axel S. Synthesis and structure activity relationship of β -defensin3, multi-functional peptides of the immune system[J]. *Journal of Peptide Science*, 2006, 122: 243-357.
- [26] Ma DY, Zhang MY, Zhang K, et al. Identification of three novel avian beta-defensins from goose and their significance in the pathogenesis of *Salmonella*[J]. *Molecular Immunology*, 2013, 56: 521-529.