



研究报告

稳定表达禽 β 防御素6的DF-1细胞系的建立及其抑菌活性

涂健 李芳果 李怡彤 殷冬冬 邵颖 宋祥军 祁克宗*

安徽农业大学兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室 安徽 合肥 230036

摘要:【背景】禽 β 防御素6是禽体内分泌的一类抗菌肽,在抵抗病原入侵和免疫调节中发挥着重要作用,但其常规表达方式效率较低,难以在产业化生产中加以应用。【目的】建立稳定表达AvBD6的细胞系,并检测其表达产物对耐药大肠杆菌的抗菌活性,为其他防御素表达提供参考。【方法】利用显微镜观察构建真核重组表达载体pLOV-eGFP-AvBD6转染至293T细胞后的转染效率;收集293T细胞上清液并感染DF-1细胞,通过嘌呤霉素加压筛选稳定表达株;利用RT-PCR和Western Blot分别检测目的基因在转录水平和蛋白水平的表达情况;利用扫描电镜观察细胞培养上清液对耐药大肠杆菌的抗菌效果及其对菌体的损伤。【结果】成功构建重组表达载体pLOV-eGFP-AvBD6,筛选出稳定表达AvBD6的DF-1细胞系,而且目的基因在转录水平和蛋白水平均有表达;细胞培养上清显著降低大肠杆菌和副伤寒沙门菌存活率,对金黄色葡萄球菌的抗菌活性较低。【结论】建立了稳定表达AvBD6的DF-1细胞系,其表达产物对耐药大肠杆菌具有良好的抗菌效果,对推动防御素的应用提供技术支持。

关键词: 禽 β 防御素6, DF-1细胞, 稳定表达, 抗菌活性

Establishment of DF-1 cell lines with stable expression of avian β -defensin 6 and its antimicrobial activityTU Jian LI Fangguo LI Yitong YIN Dongdong SHAO Ying SONG Xiangjun
QI Kezong*

Anhui Province Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

Abstract: [Background] Avian β -defensin 6, an antimicrobial peptide secreted by avian, plays an important role in the resistance to pathogen invasion and immune regulation. However, its conventional expression is inefficient and difficult to be applied in industrial production. [Objective] In order to establish a stable expression of AvBD6 cell line, and detect the antibacterial activity of AvBD6 expression products against drug-resistant *E. coli*, it can provide reference for the expression of other defensive hormones. [Methods] Observe the transfection efficiency of the constructed eukaryotic recombinant expression vector pLOV-eGFP-AvBD6 after transfection into 293T cells using an inverted microscope; Collect supernatant of

Foundation items: Collaborative Innovation Project of Anhui Universities (GXXT-2019-035); National Natural Science Foundation of China (31502038, 31972644)

*Corresponding author: E-mail: qkz@ahau.edu.cn

Received: 19-05-2020; **Accepted:** 16-07-2020; **Published online:** 30-09-2020

基金项目: 安徽高校协同创新项目(GXXT-2019-035); 国家自然科学基金(31502038, 31972644)

*通信作者: E-mail: qkz@ahau.edu.cn

收稿日期: 2020-05-19; **接受日期:** 2020-07-16; **网络首发日期:** 2020-09-30

293T cells and infect DF-1 cells, and select stable expression strains by puromycin pressure; Use RT-PCR and Western Blot to detect the expression of the target gene at the transcription level and protein level; Use scanning electron microscopy to observe the antibacterial effect of the cell culture supernatant on drug-resistant *E. coli* and the damage to the bacteria. **[Results]** The recombinant expression vector pLOV-EGFP-AvBD6 was successfully constructed, and DF-1 cell lines expressing AvBD6 were screened out. The target gene was expressed at both transcription and protein levels. Cell culture supernatant not only significantly reduced the survival rate of *Escherichia coli* and *Salmonella paratyphi*, but low antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. **[Conclusion]** DF-1 cell lines with stable expression of AvBD6 were successfully established. The expression products of DF-1 cells have significant antibacterial effects on drug-resistant *E. coli*, and have certain guiding significance for the expression and industrial application of defensins.

Keywords: avian β-defensin 6, DF-1 cells, stable expression, antimicrobial activity

研究发现, 抗生素滥用不仅导致动物产生耐药性, 疾病诊断困难, 而且残留抗生素通过食物链进入人体, 对人体健康构成巨大威胁^[1]。近年来, 抗生素替代品的研究逐渐成为热点, 截至目前, 植物活性物质、益生菌微生态制剂、噬菌体等替抗产品得到广泛研究, 但存在着非动物机体自身分泌易产生不良反应、活力不稳定等弊端^[2]。因此, 寻求一种能够替代抗生素的绿色安全药物显得尤为迫切。

防御素是机体先天免疫及获得性免疫的重要组成部分, 参与机体内最初的防御活动, 可杀灭细菌、真菌等病原微生物^[3]。禽 β 防御素-6 (Avian β-Defensin 6, AvBD6) 是 β 防御素的一种, 为富含半胱氨酸且具有生物活性的小分子内源性抗菌肽, 热稳定性和水溶性较好, 是宿主自身防御第一防线的重要组成部分, 具有广谱抗微生物活性的功能, 在动物体内可吸收分解成氨基酸, 无残留, 对动物细胞无毒害作用^[4-8]。AvBD6 抗菌机制一般认为是其带正电荷的残基结合于带有负电荷的病原菌菌膜表面, 进而在表面形成孔道, 带负电荷的疏水残基进入细胞膜内, 改变细胞膜通透性, 致使细胞内容物外漏而死亡^[9]。该独特机制不易导致细菌耐药性的产生, 因此, AvBD6 作为替抗药物具有独特优势。

本研究利用慢病毒表达载体系统构建真核表达重组质粒 pLOV-eGFP-AvBD6, 通过转染 293T 细胞, 包装慢病毒并感染 DF-1 细胞, 经嘌呤霉素筛选, 获得稳定表达 AvBD6 的 DF-1 细胞系, 命名为 DF-1-AvBD6, 然后收集 DF-1-AvBD6 的表达产

物, 用其培养耐药大肠杆菌, 检测其抗菌活性, 以期为 AvBD6 的临床使用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒及菌株

大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自宝生物工程(大连)有限公司; 293T 细胞、DF-1 细胞、pET-32a-AvBD6 质粒、慢病毒系统 pLOV-CMV-eGFP、pSPAX2 和 pMD2.G 质粒均由本实验室保存; 禽致病性大肠杆菌临床分离株、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、大肠杆菌(CMCC44102)和副伤寒沙门菌(ATCC9150)由兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室保存^[10]。禽致病性大肠杆菌临床分离株耐药信息如表 1 所示。

表 1 禽致病性大肠杆菌临床分离株药敏信息
Table 1 Drug sensitivity information of clinical isolates of pathogenic *E. coli* from avian

药物 Drug	菌株编号 Strain No.			
	AH-01	AH-25	AH-62	AH-65
氨苄西林 Ampicillin	R	R	R	R
头孢噻肟 Cefotaxime	S	R	S	S
强力霉素 Doxycycline	R	R	R	R
氯霉素 Chloramphenicol	S	R	R	R
氟甲喹 Flumequine	S	S	I	I
多粘菌素 Polymyxin	S	S	S	S
磷霉素钠 Fosfomycin sodium	S	R	S	S
卡那霉素 Kanamycin	I	R	I	R
氟苯尼考 Florfenicol	R	R	R	I

注: R: 耐药; I: 中介; S: 敏感
Note: R: Resistance; I: Intermediate; S: Sensitive

1.1.2 主要试剂和仪器

Lipofectamine2000 , Invitrogen 公司 ; *Taq* DNA 聚合酶、M-MLV、同源重组酶, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 无内毒素质粒提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 嘌呤霉素、ECL 发光试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; HRP 标记的兔抗鼠 IgG, 武汉博士德生物工程有限公司; AvBD6 鼠源抗体, 由本实验室保存(实验室前期通过优化 AvBD6 序列, 在此基础上构建了原核重组表达载体 pET-32a-AvBD6, 转化至 *E. coli* BL21 诱导表达, 重组蛋白基本在上清表达, 纯化后免疫 6 周龄 BALb/c 鼠, 采血制备血清)。化学发光成像系统, Bio-Rad 公司; 低温冷冻高速离心机, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 重组表达载体 pLOV-eGFP-AvBD6 的构建

依据同源重组酶说明书设计包含同源臂的 AvBD6 引物及载体引物, 序列见表 2。

以实验室保存的 pET-32a-AvBD6 质粒为模板, pLOV-eGFP-AvBD6-F/R 为引物, 扩增 AvBD6 基因; 以 pLOV-CMV-eGFP-EF1a-PuroR 载体为模板, pLOV-eGFP-F/R 为引物, 扩增载体使其线性化, PCR 反应体系均为: 模板 DNA 20 ng, 正、反向引物各 0.5 pmol, *Taq* DNA 聚合酶 2.5 U, 用灭菌双蒸水补足 10 μ L。PCR 反应条件均为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测

PCR 产物并进行胶回收, 产物采用 DNA 无缝克隆技术进行同源重组(方法参照 ClonExpress II One Step Cloning Kit 说明书)后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 阳性菌液进行测序鉴定, 提取质粒, 重组质粒命名为 pLOV-eGFP-AvBD6。

1.3 稳定表达 AvBD6 细胞系的构建

1.3.1 AvBD6 转染 293T 细胞包装慢病毒

病毒包装参照文献[11], 收取上清液即为 AvBD6 慢病毒上清, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。同时以转染空载体 pLOV-eGFP、pSPAX2 和 pMD2.G 质粒包装的慢病毒感染的 DF-1 细胞为阴性对照, 正常的 DF-1 细胞为空白对照。

1.3.2 嘌呤霉素工作浓度的确定

嘌呤霉素工作浓度的确定参照文献[12]。

1.3.3 慢病毒感染 DF-1 细胞系及稳定细胞系的筛选

待 DF-1 细胞密度长至 80%左右, 用 1.3.1 中收集的上清进行感染, 感染 24 h 后重复感染一次。加入含 1 μ g/mL 嘌呤霉素的细胞培养液进行筛选, 48 h 更换一次新的嘌呤霉素培养液, 之后利用含 1 μ g/mL 工作浓度的嘌呤霉素培养液进行加压筛选得到稳定表达的细胞系。

1.3.4 AvBD6 基因组 mRNA 转录水平检测

用 Trizol 法提取第 20 代 DF-1-AvBD6 细胞的基因组总 RNA, 用 M-MLV 反转录获得 cDNA, 以 cDNA 为模板, 用引物 AvBD6-F/R 进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件和体系同 1.2 节。PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。

表 2 PCR 扩增 AvBD6 的特异性引物
Table 2 Specific primers for PCR amplification of AvBD6

引物名称	引物序列	扩增产物大小
Primers name	Primers sequence (5'→3')	Product size (bp)
AvBD6-F	AGCCCGATTCATGCATGT	125
AvBD6-R	GCTGCTCGGTGCCCATTT	
pLOV-eGFP-AvBD6-F	<u>GATGATGACGACAAAGCTAGC</u> AGCCCGATTCATGCATGT	
pLOV-eGFP-AvBD6-R	<u>GCGGCCGCTCAGTTATCTAGG</u> CTGCTCGGTGCCCATTT	166
pLOV-eGFP-F	GCTAGCTTTGTCGTCATCATC	8 521
pLOV-eGFP-R	CTAGATAACTGAGCGGCCGC	

注: 下划线部分表示同源臂序列
Note: The underlined part represents the sequence of homologous arms

1.3.5 DF-1-AvBD6 细胞系传代稳定性检测

1 000×g 离心 10 min 收集 DF-1-AvBD6 细胞上清液 5 mL, 冷冻干燥浓缩后取 50 μ L 与 SDS 上样缓冲液混匀, 煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 加入制备的一抗 (1:500) 37 °C 孵育 1 h, TBST 清洗, 加入 HRP 标记的 IgG 二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h, TBST 清洗, 最后利用 ECL 显色曝光。同时设置阴性对照和空白对照。

1.3.6 重组 AvBD6 抗药活性检测及最小抑菌浓度测定

收集稳定表达 AvBD6 细胞系和转染空载体的不含抗生素的细胞培养上清液, 分别设为试验组和对照组, 试验组蛋白浓度为 30.96 mg/L。将培养的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和副伤寒沙门菌数调整为 1×10^4 CFU/mL 组, 之后分别取 10 μ L 已定量的菌液分别混入实验组和对照组的培养液各 200 μ L, 37 °C 孵育 1、2、3、4、5 和 6 h 后, 用酶标仪在 600 nm 波长下读取吸光度。取试验组吸光度与对照组吸光度的比值, 将此比值作为耐药大肠杆菌的存活率, 每组实验均重复 3 次, 并统计分析。最小抑菌浓度的测定参照文献[13]。

选取 AH-25 作为供试细菌并调整浓度为 10^4 CFU/mL, 后参照参考文献[14]的方法制备扫描电镜样品, 将离心及 PBS 清洗后的细菌置于 2.5% 戊二醛溶液中固定 2 h, 于乙醇中进行梯度脱水, 每次 10–15 min, 脱水后的样品浸泡在 100% 丙酮中进行真空干燥, 然后进行黏台、镀金, 用扫描电镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体 pLOV-eGFP-AvBD6 的构建

以质粒 pET-32a-AvBD6 为模板扩增出 125 bp 的目的片段, 与预期大小相符(图 1)。构建的真核表达质粒 pLOV-eGFP-AvBD6 分别扩增出大小约为 8 521 bp 载体和 166 bp 目的基因条带(图 2), 表明质粒构建成功。测序结果表明, AvBD6 基因未发生碱基突变或缺失。

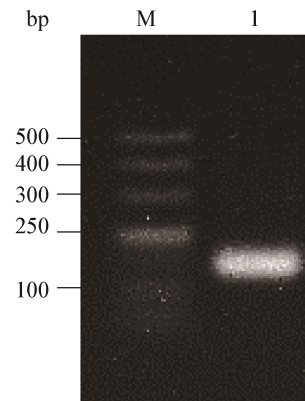


图 1 AvBD6 基因 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of AvBD6 gene PCR amplification product

注: M: DL500 DNA Marker; 1: AvBD6 的 PCR 扩增产物

Note: M: DL500 DNA Marker; 1: PCR amplification product of AvBD6

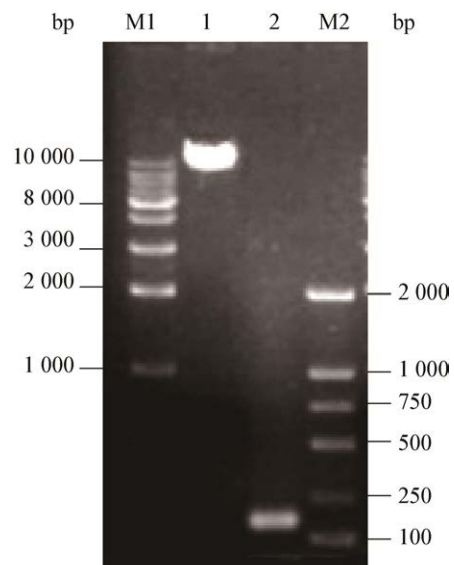


图 2 pLOV-eGFP-AvBD6 质粒电泳图

Figure 2 pLOV-eGFP-AvBD6 plasmid electrophoresis map

注: M1: DL10000 DNA Marker; M2: DL2000 DNA Marker; 1: pLOV-eGFP 质粒; 2: AvBD6

Note: M1: DL10000 DNA Marker; M2: DL2000 DNA Marker; 1: pLOV-eGFP plasmid; 2: AvBD6

2.2 嘌呤霉素工作浓度的确定

在添加不同浓度的嘌呤霉素培养 24 h 后, 各组 DF-1 细胞均出现生长停滞的现象; 培养至第 3 天时各组细胞开始大量死亡; 第 10 天时, 除 1 μ g/mL

嘌呤霉素的培养液中细胞少量存活, 其余各组细胞全部死亡, 表明 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 为最小致死浓度, $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度为最佳筛选浓度。

2.3 慢病毒感染 DF-1 细胞系及稳定细胞系的筛选结果

脂质体 Lipofectamine2000 介导 pLOV-eGFP-AvBD6 质粒转染 293T 细胞 24 h 后, 荧光显微镜下观察瞬时转染后绿色荧光信号分布。取 293T 细胞培养上清液感染 DF-1 细胞, 以 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素工作浓度进行细胞筛选后得到细胞多克隆, 通过 3 轮有限稀释法纯化将稳定表达 AvBD6 的单细胞克隆扩大培养, 获得 DF-1-AvBD6 细胞系(图 3)。

2.4 细胞基因组中 AvBD6 mRNA 转录水平的检测

选取第 20 代 DF-1-AvBD6 细胞, 提取细胞的 RNA 并反转录合成 cDNA, 然后用特异性引物 AvBD6-F 和 AvBD6-R 扩增 AvBD6 基因。结果表明, RT-PCR 检测第 20 代 DF-1-AvBD6 细胞能测出 AvBD6 基因, 而 DF-1 细胞中未检测出(图 4)。从而表明, AvBD6 基因能在 DF-1-AvBD6 细胞中转录成 mRNA。

2.5 AvBD6 蛋白在 DF-1-AvBD6 细胞系的表达

将 DF-1-AvBD6 细胞传代至第 20 代, 选取第 20 代的 DF-1-AvBD6 细胞系上清进行 Western Blot 检测。结果显示, 空白组和阴性对照组细胞上清中未检测到目的蛋白, 而 DF-1-AvBD6 中可见条带

清晰的目的蛋白(图 5)。

2.6 重组 AvBD6 抗药活性检测

细胞培养上清液与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及副伤寒沙门菌作用不同时间后读取吸光度, 结果显示, 随着孵育时间的增加, 供试菌的存活率逐渐降低, 孵育 5 h 时大肠杆菌和副伤寒沙门菌的存活率低于 40%, 金黄色葡萄球菌高于 60%, 作用 6 h 后, 供试菌的存活率均开始上升(图 6), 表明 AvBD6 的抗菌效果与时间具有相关性。重组蛋白 AvBD6 对供试细菌的最小抑菌浓度为 $15\text{--}30\text{ }\mu\text{g/mL}$ (表 3)。扫描电镜检测抑菌活性发现, 经 AvBD6 作用 6 h 后的 AH-25 菌体干瘪皱缩, 变形扭曲, 表面凹凸不平。对照组菌体完整饱满, 表面光滑(图 7)。扫描电镜显示, AvBD6 对供试细菌具有明显的损伤作用。

3 讨论与结论

替抗、无残留添加剂的研究成为新时期畜牧养殖业绿色可持续发展的首要任务, 抗菌肽作为目前最具开发潜力之一的微生态制剂, 在食品安全与公共卫生领域具有重要发展潜力。近年来, 防御素广谱的抗菌活性且不易产生耐药性的特点引起广泛关注, 关于防御素的进化、在组织中的分布、抗菌特性、免疫活性等方面研究较多^[15-16], 然而, 由于其体外表达面临较多困难, 截至目前, 防御素虽有研究但尚未得到广泛应用。对此, 本研究选取了

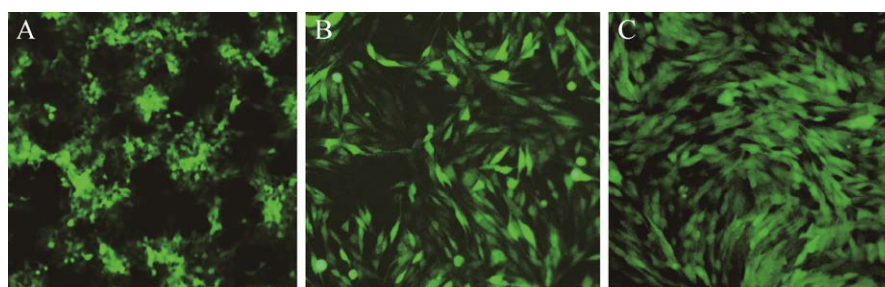


图 3 慢病毒包装及细胞系筛选结果图(100×)

Figure 3 Lentiviral packaging and cell line screening results (100×)

注: A: 慢病毒质粒共转染 293T 细胞荧光图; B: 阴性对照; C: DF-1-AvBD6

Note: A: Fluorescence map of 293T cells co-transfected with lentivirus plasmid; B: Negative control; C: DF-1-AvBD6

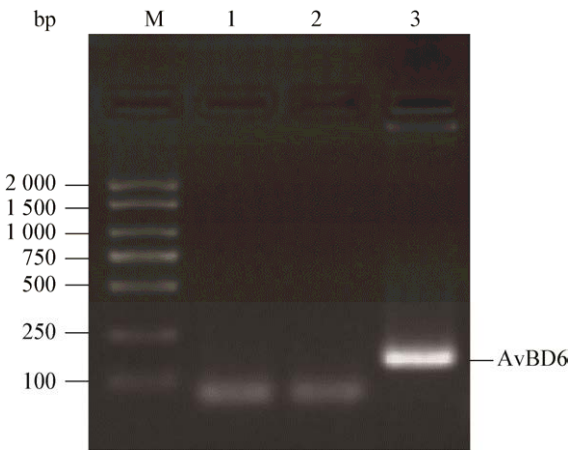


图 4 AvBD6 转录水平检测
Figure 4 AvBD6 transcription level detection
注: M: DNA 分子量标准; 1: 空白对照; 2: 阴性对照; 3: DF-1-AvBD6
Note: M: DNA Marker; 1: Blank control; 2: Negative control; 3: DF-1-AvBD6

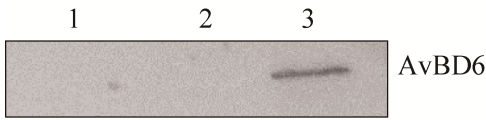


图 5 Western Blot 检测 DF-1-AvBD6 细胞系中 AvBD6 蛋白的表达
Figure 5 Western Blot detection of AvBD6 protein expression in DF-1-AvBD6 cell line
注: 1: 空白对照; 2: 阴性对照; 3: DF-1-AvBD6
Note: 1: Blank control; 2: Negative control; 3: DF-1-AvBD6

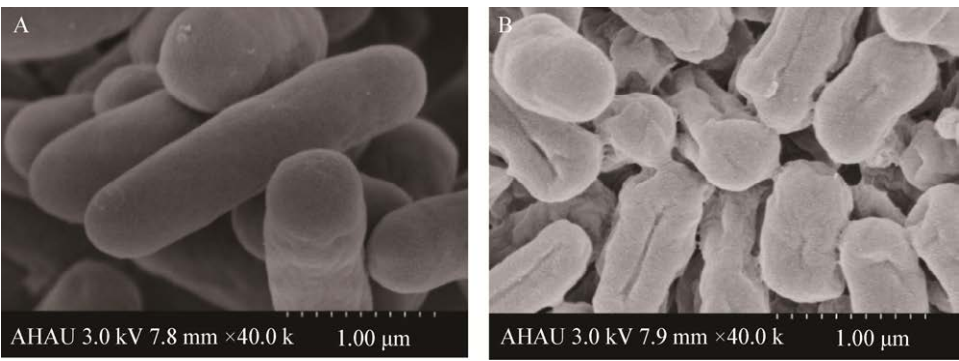


图 7 扫描电镜检测 AvBD6 抑菌效果
Figure 7 Scanning electron microscope detection of antibacterial effect of AvBD6
注: A: 对照组(40 k); B: 试验组(40 k)
Note: A: Control group (40 k); B: Experimental group (40 k)

表 3 重组蛋白 AvBD6 的最小抑菌浓度测定
Table 3 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of recombinant AvBD6

细菌	最小抑菌浓度
Bacteria	MIC (μg/mL)
大肠杆菌(CMCC 44102)	20
<i>Escherichia coli</i>	
大肠杆菌(AH-01)	20
<i>Escherichia coli</i>	
大肠杆菌(AH-25)	20
<i>Escherichia coli</i>	
大肠杆菌(AH-62)	20
<i>Escherichia coli</i>	
大肠杆菌(AH-65)	20
<i>Escherichia coli</i>	
副伤寒沙门菌(ATCC 9150)	15
<i>Salmonella paratyphi</i>	
金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	

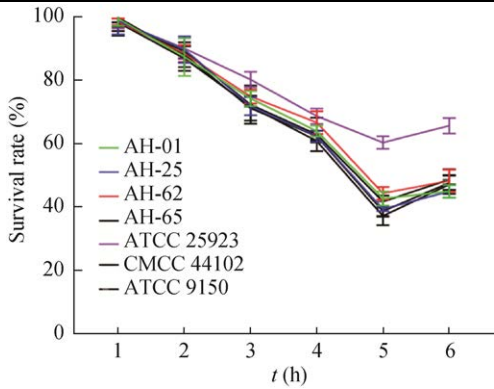


图 6 DF-1-AvBD6 细胞培养上清的抗菌活性
Figure 6 Antibacterial activity of DF-1-AvBD6 cell culture supernatant

相较于其他防御素在骨髓组织中表达量极其丰富,对骨髓造血系统起着重要保护作用并参与内源和适应性免疫的 AvBD6 作为研究对象,在构建一种体外稳定表达防御素方法的同时,可为其他种类防御素的表达提供参考。

研究发现 AvBD6 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、鸡白痢沙门氏菌等均有较强的抗菌活性^[17-19]。但由于 AvBD6 在机体表达量极低,其常规获取方法有化学合成和原核表达 2 种,因 AvBD6 氨基酸数目较多,合成用来维持肽稳定性和良好抗菌活性的二硫键较为困难,李景鹏等^[20]曾将防御素基因分成 4 个片段,采用固相亚磷酸法进行化学合成,但成本高昂且无法大规模合成,不适合临床生产使用。原核表达的蛋白大都在原核表达系统中添加了融合标签,韩宗玺等^[13]采用 GST 表达载体 pGEX-6p-1 进行了 AvBD6 表达,由于 GST 标签分子量较大且包涵体表达,不仅增加了纯化步骤,而且导致目的蛋白结构与天然结构有差异,造成蛋白生物学活性较低,抑菌活性下降。真核表达系统是可表达复杂蛋白的系统,补充了原核蛋白表达系统缺乏的部分功能,能指导蛋白进行正确折叠,提供复杂的翻译后修饰功能,使表达的蛋白更具天然活性。基于此,本研究采用慢病毒表达系统建立稳定表达禽 β 防御素 6 的 DF-1 细胞系,有效解决了化学合成与原核表达 2 种获取方式的弊端,使目的蛋白高效表达的同时,保证其天然活性。

慢病毒是目前使用较为广泛的构建稳转细胞系的一种方法,相较于质粒转染细胞操作较为复杂,但是慢病毒能将外源基因有效稳定地整合到细胞染色体中,既能达到基因转移的目的,又可以保证生物安全性,感染细胞种类广泛、效率高,导入基因片段容量大^[21],而且导入的目的基因可以高效地抵抗转录沉默影响^[22]。本研究选择三质粒慢病毒载体系统成功构建了重组 pLOV-eGFP-AvBD6 慢病毒表达载体,而且根据观察到的慢病毒颗粒绿色荧光,表明 293T 细胞中成

功包装出具有活性的慢病毒颗粒,将获得的病毒原液感染 DF-1 细胞后,进一步利用嘌呤霉素抗性进行筛选发现,AvBD6 基因在 mRNA 及蛋白表达水平明显高于不携带 AvBD6 基因的慢病毒感染的细胞,证明 AvBD6 基因已转入 DF-1 细胞并合成了目的蛋白,成功构建出稳定表达 AvBD6 的细胞系,这为大量合成 AvBD6 提供了良好的实验基础。

在重组 AvBD6 抗药活性检测中,本研究对大肠杆菌、副伤寒沙门菌及金黄色葡萄球菌等模式菌及临床分离的禽致病性大肠杆菌进行了评估,总体抑菌趋势一致,但相较而言对金黄色葡萄球菌抑菌活性较低,推测是由于其细胞壁较厚所致^[23]。为了凸显防御素的抗菌活性,本试验选取了耐药性最强的大肠杆菌进行电镜观察,发现其表达产物对多重耐药大肠杆菌具有一定的抗菌活性,耐药菌的存活率随着时间的延长而逐渐下降,会出现一个作用最佳时间点,但随着时间的推移,耐药菌的存活率又开始上升。二硫键是蛋白质形成特定空间结构的重要化学键,与蛋白的生物活性有关。二硫键的断裂会造成多肽链伸展,使得蛋白的高级结构发生改变,导致蛋白失去部分生物活性。二硫键数目越多,蛋白越稳定,而禽防御素成熟肽较短,一般仅含有 3-4 个二硫键,所以蛋白稳定性较弱。因此,耐药菌的存活率在后期稍有上升,可能与蛋白的二硫键断裂造成的蛋白部分活性损失有关。

本研究证实了一种可稳定表达 AvBD6 蛋白的 DF-1 细胞系方案,为研究细菌耐药性和抗生素替代提供了新思路,同时也为其他防御素的表达提供了参考。

REFERENCES

- [1] Pan W, Liu H, Ai HT, Lv XJ, Cui JL. Study on the current status of antibiotic residues and control strategies in livestock manure[J]. *Animal Industry and Environment*, 2020(7): 8-10 (in Chinese)
潘伟,刘辉,艾华庭,律祥君,崔金良. 畜禽粪便抗生素残留和控制策略的现状研究[J]. *畜牧业环境*, 2020(7): 8-10

- [2] Gao X, Liu E, Zhao R, Li J, Shan CQ, Wang GQ, Liu Y, Jiang GT. Research progress of antibiotic substitutes[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(1): 41-44,47 (in Chinese)
高鑫, 刘恩, 赵荣, 李娟, 单春乔, 王杲强, 刘艳, 江国托. 抗生素替代品研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(1): 41-44,47
- [3] Wei W, Li HJ, Wang X, Zhang QZ, Cao GF. Research advances on *in vivo* tissue expression and *in vitro* expression of defensin in livestock[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2019, 40(4): 52-57 (in Chinese)
魏薇, 李海军, 王鑫, 张齐政, 曹贵方. 家畜防御素体内组织表达及体外表达研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40(4): 52-57
- [4] Cheng YY, Prickett MD, Gutowska W, Kuo R, Belov K, Burt DW. Evolution of the avian β -defensin and cathelicidin genes[J]. BMC Evolutionary Biology, 2015, 15(1): 188
- [5] Sugiarto H, Yu PL. Avian antimicrobial peptides: the defense role of β -defensins[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2004, 323(3): 721-727
- [6] Van Dijk A, Hedegaard CJ, Haagsman HP, Heegaard PMH. The potential for immunoglobulins and host defense peptides (HDPs) to reduce the use of antibiotics in animal production[J]. Veterinary Research, 2018, 49(1): 68
- [7] Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human β -defensins[J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2006, 63(11): 1294-1313
- [8] Li Y, Wang JR, Sun HB. Research progress in preparation of antimicrobial peptides and their mechanisms of action[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2015, 32(2): 465-469 (in Chinese)
李燕, 王嘉榕, 孙红宾. 抗菌肽的制备和抗菌机制研究进展[J]. 生物医学工程学杂志, 2015, 32(2): 465-469
- [9] Zhang YX, Shi Y, Wang RX, Gong YB, Fan MH, Liao Z. Transcriptome of *Boleophthalmus pectinirostris* skin and analysis of antimicrobial peptide related unigenes[J]. Life Science Research, 2018, 22(1): 26-35 (in Chinese)
张毓霞, 石戈, 王日昕, 宫延斌, 范美华, 廖智. 大弹涂鱼皮肤转录组测序及抗菌肽基因分析[J]. 生命科学研究, 2018, 22(1): 26-35
- [10] Zhu LJ. Isolation and identification, analysis of pathogenicity and drug resistance of APEC in some regions of Anhui province[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese)
朱丽君. 安徽部分地区 APEC 分离鉴定及其致病性与耐药性分析[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2018
- [11] Tang DY, Zhu HB, Wu JM, Du WH, Wang D, Zhao XM, Chen HZ, Lin XK. Establishment of sheep fibroblast cell line with *Myostatin* gene silencing[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2011, 42(10): 1368-1373 (in Chinese)
唐大运, 朱化彬, 吴健敏, 杜卫华, 王栋, 赵学明, 陈汉忠, 林秀坤. *Myostatin* 基因沉默绵羊成纤维细胞系的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(10): 1368-1373
- [12] Yang KK, Zhang C, Wang YH, Yin DD, Yu ZR, Liu GQ, Zhu J, Li G, Zhao CC, Li YD, et al. Establishment of MDBK cell lines stably expressing Peste des petits ruminants virus (PPRV) receptor *Nectin-4*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(10): 1814-1820 (in Chinese)
杨侃侃, 张成, 王元红, 殷冬冬, 俞赵荣, 刘光清, 朱杰, 李刚, 赵长城, 李永东, 等. 稳定表达小反刍兽疫病毒受体 *Nectin-4* 的 MDBK 细胞系的建立[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(10): 1814-1820
- [13] Han ZX, Liao WY, Wang RQ, Shao YH, Ma DY. Expression and characterization of chicken avian beta-defensin 6[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2009, 31(6): 476-480 (in Chinese)
韩宗玺, 廖文艳, 王瑞琴, 邵昱昊, 马得莹. 重组鸡 β -防御素 6 基因的表达和生物学特性的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(6): 476-480
- [14] Shi JS, Ross CR, Chengappa MM, Sylte MJ, McVey DS, Blecha F. Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, 40(1): 115-121
- [15] Li J, Liu Y, Niu JB, Zhang GS, Zhang W, Zhang BL, Wu XK, Chen XM, Li SW, Chen T, et al. Progress on the study of AvBDs[J]. China Poultry, 2019, 41(2): 39-43 (in Chinese)
李娟, 刘阳, 牛军波, 章高森, 张威, 张昆林, 伍修锐, 陈熙明, 李师翁, 陈拓, 等. 禽类 β -防御素的研究进展[J]. 中国家禽, 2019, 41(2): 39-43
- [16] Yi DS, Wei XD, Miao YJ, Chen YF. Cloning and expression of avian beta defensin 7 gene from chicken[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2018, 45(2): 130-134 (in Chinese)
易道生, 魏晓东, 缪永建, 陈燕飞. 鸡 β -防御素 7 的克隆及表达[J]. 广东农业科学, 2018, 45(2): 130-134
- [17] Tu J, Wang B, Qi KZ, Wen JL, Zhou XH, Wang XY, Liu HM. Avian beta-defensins' expression in chickens infected with *Salmonella Pullorum* and molecular designing for reshaped defensin[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2014, 50(12): 9-12 (in Chinese)
涂健, 王斌, 祁克宗, 温俊柳, 周秀红, 汪雪雁, 刘红梅. 禽防御素在雏鸡抗鸡白痢沙门菌感染中的表达及其分子设计[J]. 中国兽医杂志, 2014, 50(12): 9-12
- [18] Wang XW, Kang XT. Advance in avian defensins[J].

- Progress in Veterinary Medicine, 2006, 27(12): 19-23 (in Chinese)
王新卫, 康相涛. 禽类防御素研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(12): 19-23
- [19] Hong SH, Wu YJ, Gong DQ. Study progress on the avian β -defensins[J]. China Feed, 2010(22): 8-10,15 (in Chinese)
洪胜辉, 武艳军, 龚道清. 禽类 β -防御素的研究进展[J]. 中国饲料, 2010(22): 8-10,15
- [20] Li JP, Li CM, He HB, Cui RH, Guo RC, Shi SY, Zhou J. Chemical synthesis and cloning of defensin gene[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 1995(4): 383-387 (in Chinese)
李景鹏, 李成梅, 何洪彬, 崔仁海, 郭荣昌, 石绍业, 周静. 防御素基因的化学合成及克隆[J]. 东北农业大学学报, 1995(4): 383-387
- [21] Li DC, Wang Q, Liu CX, Duan HW, Zeng XW, Zhang B, Li XD, Zhao J, Tang SF, Li ZF, et al. Aberrant expression of miR-638 contributes to benzo (a) pyrene-induced human cell transformation[J]. Toxicological Sciences, 2012, 125(2): 382-391
- [22] Janečka JE, Miller W, Pringle TH, Wiens F, Zitzmann A, Helgen KM, Springer MS, Murphy WJ. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates[J]. Science, 2007, 318(5851): 792-794
- [23] Yang XK, Zou YL, Sun M, Zheng JS. Study on antimicrobial action and bacteriostatic mechanism of the marine microbial lysozyme[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(5): 62-68 (in Chinese)
杨向科, 邹艳丽, 孙谧, 郑家声. 海洋微生物溶菌酶的抑菌作用及抑菌机理初步研究[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(5): 62-68

2021 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-3)

序号	活动名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
23	中国微生物学会第十二次全国会员代表大会暨 2021 年学术年会	中国微生物学会	2021 年 10 月 29 日— 11 月 2 日	800	云南 昆明	杨海花 王旭 010-64807200
24	第二十三次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	2021 年 10-11 月	600	天津	马挺 13902089678
25	第四届合成微生物学与生物制造学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	2021 年 11 月	300	广东 广州	刘建忠 020-84110115
26	微生物资源学术研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	待定	500	浙江 杭州	李学伟 15911158308
27	第二届全国根际微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	2021 年 11 月	300	江苏 南京	张瑞福 18705198006
28	第十四届全国土壤微生物学术讨论会暨第七届全国微生物肥料生产技术研发研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	2021 年 11 月	350	广东 广州	姜昕 马鸣超 010-82108702, 82105091
29	2021 年生物制品年会	中国微生物学会生物制品专业委员会	2021 年 11 月	3 000	江苏 南京	毛群颖 18810054059
30	工业发酵过程优化控制年会	中国微生物学会生化过程模型与控制委员会	2021 年 11-12 月	200	广州 珠海	夏建业 13761030390
31	干扰素与细胞因子在临床与基础中的新进展	中国微生物学会干扰素与细胞因子专业委员会	2021 年 11 月	200	江苏 苏州	潘健 15150137126
32	新发病毒免疫培训班	中国微生物学会病毒学专业委员会	待定	300	线上	吴莹 15901455682