

鸡 β -防御素 7 在大肠杆菌中的表达及活性分析

李民欢¹ 祁克宗^{1*} 涂健¹ 钟瑾^{2*}

(1. 安徽农业大学 动物科技学院 安徽 合肥 230036)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘 要: 【目的】根据鸡 β -防御素 7 (Gal-7) 的成熟肽基因序列合成基因, 构建表达 Gal-7 的大肠杆菌工程菌, 研究重组鸡防御素 Gal-7 成熟肽的体外生物活性。【方法】将合成的 gal-7 基因克隆到大肠杆菌表达载体 pGEX-6p-1 中, 得到重组质粒 pGEX-6p-gal7, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导表达得到含 GST 标签的融合蛋白 GST-Gal7; 之后用 Prescission 蛋白酶将 GST 标签切除, 并对成熟肽进行质谱分析; 再利用琼脂打孔扩散法检测 Gal-7 成熟肽的体外抑菌活性, 用 2 倍稀释法测定对指示菌的最低抑菌浓度。【结果】成功构建 Gal-7 大肠杆菌异源表达工程菌, 表达纯化的重组 Gal-7 成熟肽质谱鉴定分子量为 5 516 Da, 其对黄色微球菌(NCIB 8166)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、粪肠球菌(ATCC 29212)、大肠杆菌(CMCC 44102)均有抑菌活性, 最低抑菌浓度分别为 16.875、67.5、67.5、135 mg/L。【结论】获得表达鸡 Gal-7 成熟肽的大肠杆菌工程菌, 并且切除 GST 标签的 Gal-7 成熟肽具有生物活性。

关键词: β -防御素, Gal-7 成熟肽, 异源表达, 抗菌活性

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA10Z320); 高等学校省级优秀青年人才基金立项项目(No. 2009SQRZ036)

*通讯作者: 祁克宗: Tel: 86-551-5786305; 信箱: qkz@ahau.edu.cn

钟瑾: Tel: 86-10-64807401; 信箱: zhongj@im.ac.cn

收稿日期: 2012-03-22; 接受日期: 2012-05-30

Heterologous expression of chicken beta-defensin-7 in *Escherichia coli* and antimicrobial activity analysis

LI Min-Huan¹ QI Ke-Zong^{1*} TU Jian¹ ZHONG Jin^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] In order to study the antimicrobial activity of Gal-7 mature peptide *in vitro*, we constructed an engineered *E. coli* strain contains chicken beta-defensin-7 (*gal-7*) gene encoding Gal-7 mature peptide published previously. **[Methods]** Based on the gene sequence, we synthesized the *gal-7* gene, cloned into pGEX-6p-1 prokaryotic expression vector and subsequently transformed into the *E. coli* BL21(DE3). The *E. coli* strain contains the expression vector was induced with IPTG and the fusion protein GST-Gal7 was purified by affinity chromatograph, then Prescission protease was used to remove GST-label to form Gal-7 mature peptide. The molecular weight of purified Gal-7 mature peptide was monitored by MALDI-TOF-MS and antimicrobial activity was tested by the agar well diffusion assay. Besides 2-fold dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration of Gal-7 mature peptide. **[Results]** We successfully constructed the engineered *E. coli* strain expressing pGEX-6p-Gal7 and GST-label was cleaved by Prescission protease. The molecule weight of purified Gal-7 mature peptide was 5 516 Da, it exhibited antimicrobial activity against *Micrococcus flavus* (NCIB 8166), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (CMCC 44102) with MICs 16.875, 67.5, 67.5, 135 mg/L respectively. **[Conclusion]** The GST-Gal7 protein was successfully expressed in *E. coli*, besides the Gal-7 mature peptide without GST-label showed antimicrobial activity against several indicator strains.

Keywords: Beta-defensin, Gal-7 mature peptide, Heterologous expression, Antimicrobial activity

阳离子抗菌肽(Cationic antimicrobial peptides, CAMPs)或天然抗生素(Natural antibiotics),是机体中存在的一种广谱的具有抑菌作用的多肽,也是宿主免疫系统的重要组成部分,它在防御病原微生物入侵方面起到关键作用^[1-2]。到目前为止,已经有超过 800 种的阳离子抗菌肽被鉴定,主要包括细菌素、防御素等。防御素(Defensin)是一类富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽,它一般由 18-54 个氨基酸组成,相对分子质量为 4 000-6 000 Da 左右,分子中含有 6 个半胱氨酸残基,形

成 3 对分子内二硫键,从而使多肽环形成反向平行的 β -片状结构,其主要是由脊椎动物和无脊椎动物分泌产生^[3-4]。根据防御素的空间结构,可分为 α -防御素、 β -防御素和 θ -防御素 3 类^[3-6]。防御素有很强的抑菌活性,能有效灭杀细菌、真菌以及病毒(如: HIV 病毒)等病原微生物^[7-8]。对于防御素的作用机理^[9-10],通常认为它是通过破坏病原微生物的细胞膜来发挥杀伤作用。鸡体内的基因共编码产生 14 种防御素,都属于 β -防御素家族,依次被命名为 *gal-1-gal-14*,它们密集地

分布在染色体的3q3.5–3q3.7, 长度约为86 kb^[11]。鸡β-防御素在体内组织分布也不同, 其中 *gal-7* 主要存在于鸡的骨髓中^[11], 在抵御微生物侵袭方面起到重要作用。

目前, 家禽养殖业十分发达, 而以集中养殖为主要模式的养殖方式使禽类更易受到病原菌侵袭。为了降低禽类的发病率, 抗生素被广泛应用于禽类中。但是, 长期使用抗生素会导致抗生素残留和细菌耐药性问题, 进而通过食物链危害人类的健康。因此, 在现实的养殖过程中迫切需要一种高效、无毒害、无残留的生物防御素来替代抗生素, 以保障养殖业的健康发展, 降低养殖业对生态环境的破坏, 由此可知, 开发不易产生耐药性的新型抗菌药物具有深远的意义。鸡β-防御素由于其来源和作用机制, 不易使病原微生物产生抗药性, 是一类具有非常良好应用前景的“抗生素替代品”^[12–13]。由于鸡体内防御素含量低, 分离纯化困难, 因此很难通过常规手段大量纯化得到这种天然的防御素蛋白; 而近年来, 随着基因工程技术的快速发展, 其被广泛应用于防御素的表达。先前的报道中发现禽防御素的表达方式主要有两种途径: 大肠杆菌表达系统和毕赤酵母表达系统^[14]。相对于鸡防御素的真核表达, 以大肠杆菌为代表的原核表达系统容易放大进行规模化生产, 且成本较低、效率较高, 适用于防御素生产研究。本实验通过大肠杆菌系统成功表达了融合蛋白 GST-Gal7, 利用 Prescission 蛋白酶切割 GST 标签, 得到鸡 Gal-7 成熟肽, 并对其体外

抑菌活性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒: 菌株大肠杆菌 BL21(DE3)、黄色微球菌(NCIB 8166)、白色念珠菌(ATCC 10231)和白色念珠菌(ATCC 90029)为中国科学院微生物研究所提供; 质粒 pGEX-6P-1 和菌株金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、粪肠球菌(ATCC 29212)、大肠杆菌(CMCC 44102)为安徽农业大学动物病理学实验室保存。鸡 *gal-7* 成熟肽的基因序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.2 酶与试剂: 限制性内切酶购于 NEB 公司, T4 DNA 连接酶购于 Fermentas 公司, EX *Taq* 酶购于 TaKaRa 公司, 质粒提取、PCR 产物回收试剂盒均购于 Axygen 公司, DNA marker 购于中科瑞泰(北京)生物科技有限公司, 蛋白电泳 Marker 购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, GST-SefinoseTM Resin、Prescission 蛋白酶购于上海生工生物工程技术有限公司, BCA 试剂盒购于 Thermo Scientific 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物的设计与合成: 根据 GenBank 中登记的 *gal-7* 基因序列(登录号 DQ858344), 应用 Premier 5.0 软件设计 1 对引物(表 1) P1 的 5'端含有 *EcoR* I 酶切位点, P2 的 5'端含有 *Sal* I 酶切位点。设计好的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 PCR 扩增所用引物
Table 1 PCR primers used for amplification

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	酶切位点 Enzyme site
P1 Sense primer	CGGAATTCAGGCCTATTGATACTTGTAGGCTT	<i>EcoR</i> I
P2 Anti-sense primer	ACGCGTCGACTCAGCTCCTCCATCCCCTT	<i>Sal</i> I

1.2.2 PCR 扩增鸡 *gal-7* 成熟肽基因序列: 以鸡 *gal-7* 成熟肽基因为模板, 用 1.2.1 中合成的引物扩增出鸡 *gal-7* 成熟肽基因片段。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增获得鸡 *gal-7* 成熟肽基因。

1.2.3 重组表达载体的构建及鉴定: PCR 扩增产物经纯化后用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切并回收纯化, 然后与经相同酶切并纯化的 pGEX-6P-1 质粒连接, 转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞并用具有氨苄青霉素抗性的平板筛选转化子, 后经 PCR 扩增和质粒提取, 限制性酶切鉴定重组菌株, DNA 序列测定(北京博尚生物技术有限公司)获得正确的重组表达载体 pGEX-6P-*gal7*。以上所有步骤均参照《分子克隆实验指南》^[15]实验方法进行。

1.2.4 重组蛋白的诱导表达和条件优化: 将测序正确的菌株接种于 3 mL LB 液体培养基中, 经过条件优化摸索出最佳诱导的 IPTG 浓度、温度及时间, 从而提高上清的表达量。重组蛋白诱导表达条件如下: 将振荡培养过夜的 *E. coli* BL21(DE3)/pGEX-6P-*gal7* 菌液 3 mL 转接至 500 mL 含有 100 mg/L 的青霉素 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养, 待 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG), 在 16 °C 条件下诱导表达 24 h。收集破碎细胞, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测 GST-Gal7 的诱导表达情况。

1.2.5 蛋白纯化及质谱鉴定: 将诱导表达好的菌液进行离心, 收集菌体。菌体重悬于磷酸盐缓冲液(PBS)中, 超声裂解细胞, 离心收集上清经微孔滤膜(0.22 μ m)过滤后, 采用 GST-SefinioseTM Resin 亲和柱层析分离纯化蛋白。融合蛋白用 Prescission 蛋白酶进行柱上切, 分离纯化, 收集 Prescission 蛋白酶酶切洗脱液, SDS-PAGE 电泳检测。为了进一步提纯蛋白, 将洗脱液进行超滤

(超滤膜截留分子量是 9 kD), 4 500 r/min、2 h, SDS-PAGE 电泳检测。收集超滤管底部溶液用 C18 ZipTip 柱处理后, 样品进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析。

1.2.6 表达产物的抑菌活性检测: 采用打孔扩散法检测^[16]。(1) 指示菌平板的制备: 将指示菌黄色微球菌(NCIB 8166)于 S1 培养基平板划线, 30 °C 过夜培养后于 4 °C 冰箱放置备用; 将指示菌金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、粪肠球菌(ATCC 29212)、大肠杆菌(CMCC 44102)于 LB 培养基平板划线, 37 °C 过夜培养后放置 4 °C 冰箱备用; 白色念珠菌(ATCC 10231)和白色念珠菌(ATCC 90029)于 BS 培养基平板上划线, 25 °C 过夜培养后放置 4 °C 冰箱备用。用接种环从平板上刮取一环菌体, 加入适量无菌水(约 3 mL), 振荡混匀, 倒入 300 mL 融化并冷却至适当温度的 S1、LB 或 BS 固体培养基中, 混匀并倒入玻璃培养皿内, 待其自然冷却凝固。(2) 抑菌活性检测: 反应产物抑菌活性测定。用内径约 7 mm 的打孔器分别在黄色微球菌(NCIB 8166)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、粪肠球菌(ATCC 29212)、大肠杆菌(CMCC 44102)、白色念珠菌(ATCC 10231)和白色念珠菌(ATCC 90029)等指示菌平板上均匀打孔, 依次加入 100 μ L 负对照无菌水、100 μ L 正对照氨苄青霉素或正对照 Nisin [注: 仅黄色微球菌(NCIB 8166)指示平板是以 Nisin 为正对照]、100 μ L 待测样品, 超净工作台中放置 20 min, 使得样品充分扩散。黄色微球菌(NCIB 8166)在 30 °C 培养箱内孵育, 金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、粪肠球菌(ATCC 29212)、大肠杆菌(CMCC 44102)在 37 °C 培养箱内孵育, 白色念珠菌(ATCC 10231)和白色念珠菌(ATCC 90029)移至 25 °C 培养箱内孵育, 24 h 后观察结果, 照相保存。

1.2.7 表达产物的最小抑菌浓度测定: 用 BCA (Bicinchoninic acid)蛋白检测试剂盒按照说明书

测纯化得到的 Gal-7 成熟肽(质谱分析鉴定正确)的蛋白浓度。最小抑菌浓度(MIC)测量参照 Levensgood 等^[17]的方法, 具体步骤如下:

(1) 将待测指示菌培养至 OD_{600} 为 0.9–1.0 (对数中期), 用新鲜的指示菌培养基将菌液稀释 10 倍;

(2) 接下来的操作都在 96 孔板中进行, 首先将 Gal-7 成熟肽 2 倍稀释成一系列梯度, 各取 50 μ L 加入不同的孔中;

(3) 将 150 μ L 稀释后的菌液加入上述孔中, 组成 200 μ L 的体系, 同时做对照组为 150 μ L 新鲜的指示菌培养基和 50 μ L 的无菌水, 空白组为 150 μ L 的菌液和 50 μ L 的无菌水, 平行两次实验;

(4) 将 96 孔板放入适合指示菌培养温度的培养箱内静置培养, 测量孔道内液体的 OD_{600} 值, 刚开始 5 h, 每隔 1 h 测一次, 随后至 24 h 测一次;

(5) 最小抑菌浓度取使菌液 OD_{600} 值不变的最小浓度。

2 结果

2.1 PCR 扩增鸡 *gal-7* 成熟肽基因序列

将 *gal-7* 基因进行体外合成, 并以其为模板, P1、P2 为引物, 经 PCR 扩增得到约 120 bp 的鸡 *gal-7* 成熟肽基因, 结果见图 1。

2.2 重组表达载体的构建及鉴定

PCR 扩增产物鸡 *gal-7* 成熟肽基因经纯化后用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切并回收纯化, 然后与经相同酶切并纯化的 pGEX-6p-1 质粒连接, 转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞并用具有氨苄青霉素抗性的平板筛选转化子。提取的重组质粒用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 在约 5 000 bp 和 120 bp 处分别出现一条目的条带 pGEX-6p-1 和 *gal-7* (图 2)。酶切显示正确的质粒送公司测序, 结果表明重组载体构建成功。

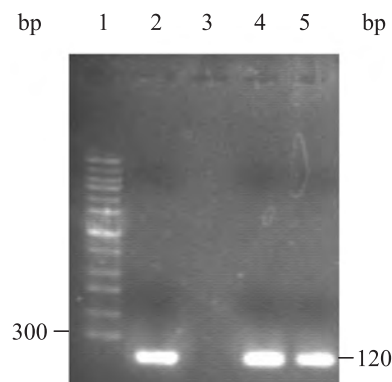


图 1 鸡 Gal-7 成熟肽基因 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of gene fragments encoding Gal-7 mature peptide

注: 1: DNA marker; 2: PCR 正对照; 3: PCR 负对照; 4, 5: PCR 扩增产物。

Note: 1: DNA marker; 2: Positive control; 3: Negative control; 4, 5: PCR products.

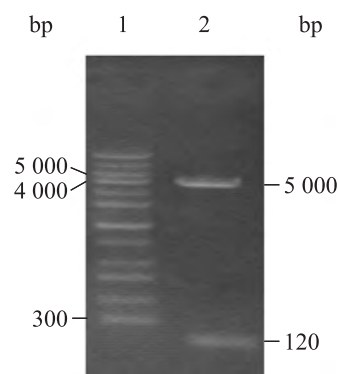


图 2 重组质粒 pGEX-6P-*gal7* 的酶切鉴定

Fig. 2 Double-digestion of recombinant plasmid pGEX-6P-*gal7*

注: 1: DNA marker; 2: *EcoR* I / *Sal* I 双酶切后片段。

Note: 1: DNA marker; 2: Gene fragments after double-digested by *EcoR* I / *Sal* I enzymes.

2.3 重组蛋白的优化诱导表达

通过对不同诱导温度、时间、IPTG 浓度下融合蛋白的可溶性表达分析表明, 融合蛋白在 16 $^{\circ}$ C、0.1 mmol/L 的 IPTG 浓度下诱导 24 h, 可溶性蛋白的表达量明显提高。收集细胞裂解后的上清液, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 该重组蛋白 GST-Gal7 的分子质量约为 31 kD (图 3)。

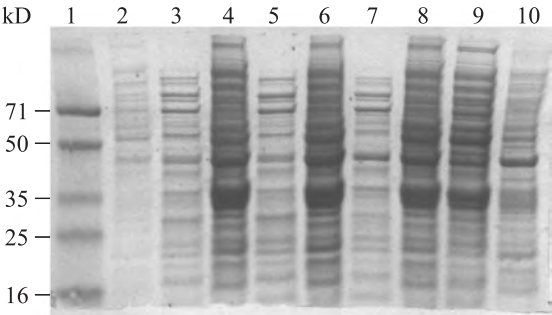


图 3 SDS-PAGE 电泳检测不同条件下融合蛋白的表达情况

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fusion protein in different conditions

注: 1: Protein marker; 2: 诱导前; 3、5、7、9: 30 °C、25 °C、20 °C、16 °C 诱导后上清; 4、6、8、10: 30 °C、25 °C、20 °C、16 °C 诱导后沉淀。

Note: 1: Protein marker; 2: The pGEX-6p-Gal7 in supernatant before induction; 3, 5, 7, 9: Supernatant after induction at 30 °C, 25 °C, 20 °C, 16 °C; 4, 6, 8, 10: Precipitation after induction at 30 °C, 25 °C, 20 °C, 16 °C.

2.4 蛋白纯化、SDS-PAGE 电泳检测和质谱鉴定

将优化表达后的菌液进行离心, 超声破碎细胞后离心收集裂解上清, 上清经过微孔滤膜 (0.22 μm) 过滤后加样到 GST-SefinioseTM Resin 层析柱进行亲和层析纯化, 收集 Prescission 蛋白酶

酶切洗脱液, SDS-PAGE 电泳检测。超滤进一步纯化后, SDS-PAGE 电泳检测。结果表明 Prescission 蛋白酶可以将融合蛋白切开, 得到的 Gal-7 成熟肽的分子质量约为 6 kD (图 4A、4B)。收集超滤管底部溶液用 C18 ZipTip 柱处理后, 样品进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析, 质谱鉴定分子量为 5 516 Da (图 5), 此分子量与形成 2 个二硫键成熟肽的理论分子量相符, 纯化得到的 Gal-7 成熟肽序列和预测分子量见表 2。

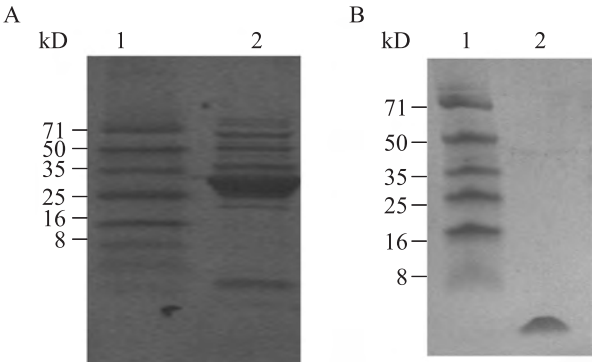


图 4 Gal-7 成熟肽纯化

Fig. 4 Purification of Gal-7 mature peptide

注: A: Gal-7 成熟肽的亲和层析纯化; B: Gal-7 成熟肽的超滤纯化。1: Protein marker; 2: Gal-7 成熟肽。

Note: A: Purification of Gal-7 mature peptide by affinity chromatography; B: Purification of Gal-7 mature peptide by ultrafiltration. 1: Protein marker; 2: Gal-7 mature peptide.

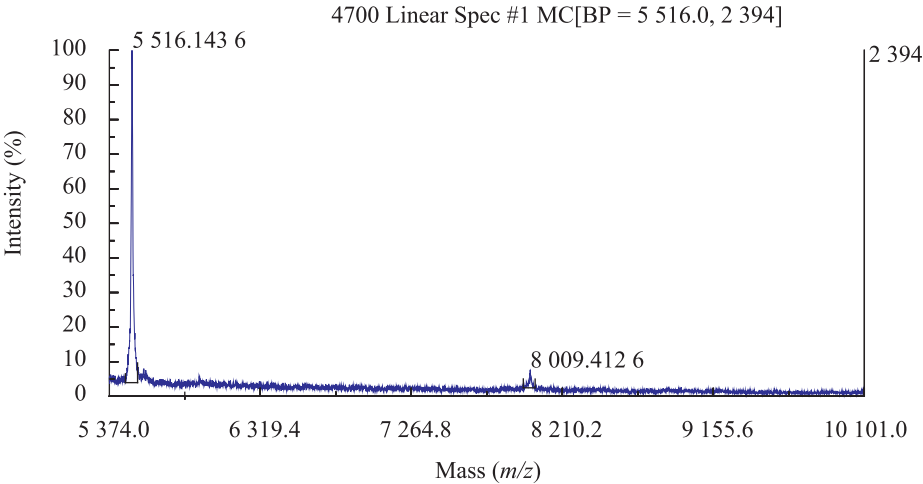


图 5 MALDI-TOF-MS 结果

Fig. 5 MALDI-TOF-MS of purified Gal-7 mature peptide

表 2 纯化得到的 Gal-7 成熟肽序列和预测分子量
Table 2 Purified Gal-7 mature peptide sequence and molecular weight

Peptide	Amino acid sequence	Predicted mass (Da)
Gal-7	GPLGSPEFRPIDTCRLRNGICFPGICPRPYWIGTCNNGIGSCCARGWRS	5 520.35

2.5 表达产物的抑菌活性检测

采用打孔扩散法检测纯化得到的鸡成熟肽 Gal-7 对各个指示菌的抑菌情况, 结果如图 6 所示: 纯化得到的鸡成熟肽 Gal-7 对黄色微球菌 (NCIB 8166)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、粪肠球菌(ATCC 29212)、大肠杆菌(CMCC 44102) 都有抑菌活性。但是, 鸡 β -防御素 Gal-7 成熟肽对白色念珠菌(ATCC 10231)和白色念珠菌(ATCC 90029)无抑菌作用。由此可知, 体外条件下纯化得到的鸡 β -防御素 Gal-7 成熟肽对一些特定的指示菌具有抑菌活性。

2.6 表达产物的最小抑菌浓度测定

先用 BCA 蛋白检测试剂盒测纯化得到的 Gal-7 成熟肽(质谱分析鉴定正确)的蛋白浓度, 再根据 Levengood 等^[17]的方法测量纯化得到的鸡 Gal-7 成熟肽对不同指示菌的最小抑菌浓度 (MIC), 最后的结果见表 3。

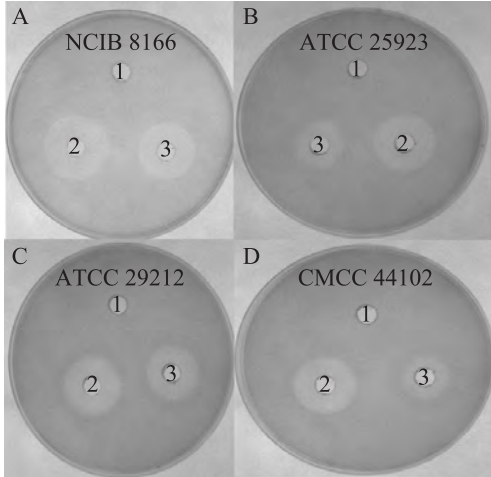


图 6 Gal-7 成熟肽的抑菌活性检测
Fig. 6 Antimicrobial activity assay of Gal-7 mature peptide
注: A: 黄色微球菌(NCIB 8166); B: 金黄色葡萄球菌(ATCC 25923); C: 粪肠球菌(ATCC 29212); D: 大肠杆菌(CMCC 44102); 1: 负对照(H₂O); 2: 正对照(氨苄青霉素或者 Nisin); 3: Gal-7 成熟肽。
Note: A: *Micrococcus flavus* (NCIB 8166); B: *S. aureus* (ATCC 25923); C: *E. faecalis* (ATCC 29212); D: *E. coli* (CMCC 44102); 1: Negative control (H₂O); 2: Positive control (Ampicillin or Nisin); 3: Gal-7 mature peptide.

表 3 鸡 Gal-7 成熟肽最小抑菌浓度的测定
Table 3 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of chicken Gal-7 mature peptide

革兰氏阳性菌 Gram-positive microorganism	最小抑 菌浓度 MIC (mg/L)	真菌 Fungi	最小抑 菌浓度 MIC (mg/L)	革兰氏阴性菌 Gram-negative microorganism	最小抑 菌浓度 MIC (mg/L)
黄色微球菌(NCIB 8166) <i>Micrococcus flavus</i> (NCIB 8166)	16.875	白色念珠菌(ATCC 10231) <i>Candida albican</i> (ATCC 10231)	>540	大肠杆菌(CMCC 44102) <i>E. coli</i> (CMCC 44102)	135
金黄色葡萄球菌(ATCC 25923) <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	67.500	白色念珠菌(ATCC 90029) <i>Candida albican</i> (ATCC 90029)	>540		
粪肠球菌(ATCC 29212) <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	67.500				

3 讨论

之前的研究表明, 禽异嗜性细胞中缺乏氧化机制^[18], 因而禽 β -防御素在禽类的先天性免疫中发挥重要作用。近几年, 家禽养殖发展迅猛, 集中养殖使禽类更易受到病原微生物侵袭, 为了降低禽类的发病率, 急需引入新的抗菌肽药物如禽防御素等应用于养禽业中。但是, 从鸡体内提取防御素和通过化学方法合成防御素代价太高, 从而制约了其大规模应用, 采用基因工程方法生产防御素是解决这个难题的一种有效手段。目前, 常用的原核和真核表达系统分别是: 大肠杆菌表达系统和毕赤酵母表达系统^[14]。相对而言, 大肠杆菌表达系统容易放大、便于规模化生产, 而且成本低、效率高。但由于防御素对大肠杆菌有很强的杀伤活性, 所以常采用融合蛋白的方式进行表达, 表达后再对融合产物进行酶切处理, 得到具有抗菌活性的蛋白。Milona 等^[19]采用 *His* 基因表达系统表达了重组鸡 Gal-7, 抑菌活性检测表明, 重组蛋白对肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌都具有抑制作用。在原核表达系统中, GST 融合表达系统比 *His* 表达系统的蛋白表达量更高且可溶性更好, 此外, GST 标签有助于保护重组蛋白免受胞外蛋白酶的降解并提高其稳定性, 可在温和、非变性条件下洗脱, 保留了蛋白的抗原性和生物活性。根据上述情况, 本实验通过 GST 融合表达系统, 表达了 pGEX-6P-Gal7 融合蛋白, 再用 Prescission 蛋白酶切除 GST 标签, 最终纯化获得有活性的鸡成熟肽 Gal-7。综上所述, 采用 GST 融合表达系统高效地表达目的蛋白, 体外抑菌活性取得了较理想的结果。

根据防御素分子的空间结构和抗菌机理可知, 成熟肽分子中的 3 对二硫键对活性至关重要。杨涛等^[20]对 Gal-8 的研究表明, 二硫键对其活性有影响; Ling Y. 等^[21]对二硫键的研究也证明

了二硫键在抗菌方面起到关键作用。本实验中, 利用大肠杆菌原核表达系统表达纯化得到的 Gal-7 成熟肽经过质谱鉴定推断出蛋白分子间形成了 2 个二硫键, 且 Gal-7 成熟肽对黄色微球菌(NCIB 8166)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、粪肠球菌(ATCC 29212)、大肠杆菌(CMCC 44102)均有抑菌作用, 表明鸡成熟肽 Gal-7 形成了活性结构从而可以发挥抑菌活性。

禽防御素具有广谱的抗菌活性, 能有效地杀死各种病原微生物, 而且作用机理特殊, 不容易使病原微生物产生抗药性, 因此对其开展活性表达及特性研究具有重要的应用价值。本研究通过大肠杆菌表达系统表达鸡成熟肽 Gal-7, 并对其表达条件进行了优化探索: 通过改变诱导浓度、诱导时间、诱导温度等条件, 采用低温、低转速、低 IPTG 浓度诱导表达, 得到了大量的可溶性蛋白。随后通过一系列的纯化过程后得到切除 GST 标签的鸡 Gal-7 成熟肽并进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析, 质谱鉴定分子量为 5 516 Da, 得到的质谱鉴定结果与预测蛋白分子量相比较, 推断出蛋白分子间形成了 2 个二硫键。而鸡成熟肽 Gal-7 的体外抑菌试验表明, 它对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都有抑菌作用, 表现出较好的生物学活性。这些研究结果为新型防御素饲料添加剂的开发提供了实验数据, 为防御素的工业化生产奠定了一定的科学基础。

参考文献

- [1] Ganz T. Microbiology: gut defence[J]. Nature, 2003, 422(6931): 478-479.
- [2] Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, et al. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin[J]. Nature, 2003, 422(6931): 522-526.
- [3] Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response[J]. Nature

- Immunology, 2005, 6(6): 551–557.
- [4] Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals[J]. Current Opinion in Immunology, 2002, 14(1): 96–102.
- [5] Yang D, Biragyn A, Kwak LW, et al. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal[J]. Trends in Immunology, 2002, 23(6): 291–296.
- [6] Tang YQ, Yuan J, Ösapay G, et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins[J]. Science, 1999, 286(5439): 498–502.
- [7] Brune K, Leffell MS, Spitznagel JK. Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophile leukocytes[J]. Infection and Immunity, 1972, 5(3): 283–287.
- [8] Sugiarto H, Yu PL. Avian antimicrobial peptides: the defense role of β -defensins[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 323(3): 721–727.
- [9] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(3): 238–250.
- [10] Sugiarto H, Yu PL. Mechanisms of action of ostrich β -defensins against *Escherichia coli*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 270(2): 195–200.
- [11] 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.
- [12] Huang GT, Zhang HB, Kim D, et al. A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human β -defensin 2 antimicrobial activities *in vivo*[J]. Human Gene Therapy, 2002, 13(17): 2017–2025.
- [13] 王璟, 杨玉荣, 梁宏德, 等. 禽类防御素作用机理及基因工程研究进展[J]. 动物医学进展, 2007, 28(10): 81–84.
- [14] 刘媛媛, 赵宝华. 防御素的研究进展和应用前景[J]. 中国医药生物技术, 2009, 4(4): 303–306.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] Lovian V. Antibiotic in Laboratory Medicine Baltimore[M]. London: William and Williams, 1980.
- [17] Levensgood MR, Knerr PJ, Oman TJ, et al. In vitro mutasynthesis of lantibiotic analogues containing nonproteinogenic amino acids[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(34): 12024–12025.
- [18] Harmon BG. Avian heterophils in inflammation and disease resistance[J]. Poultry Science, 1998, 77(7): 972–977.
- [19] 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.
- [20] 杨涛, 钟瑾, 涂健, 等. 鸡 β -防御素-8 cDNA 在大肠杆菌中的融合表达[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(11): 1018–1022.
- [21] Lin YH, Teng KL, Huan LD, et al. Dissection of the bridging pattern of bovicin HJ50, a lantibiotic containing a characteristic disulfide bridge[J]. Microbiological Research, 2011, 166(3): 146–154.