生 物 工 程 学 报
journals.im.ac.cn
cjb@im.ac.cn

Chin J Biotech 2011, December 25; 27(12): 1711−1721
Chinese Journal of Biotechnology ISSN 1000-3061
©2011 *CJB*, All rights reserved.

动物及兽医生物技术

鹅β-防御素 3 基因的分离、鉴定及其表达产物的生物学特性

张名岳[1,2]，周财源[1,2]，韩宗玺[2]，邵昙昊[2]，刘胜旺[2]，马得莹[1]

1 东北农业大学 动物营养研究所，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，哈尔滨 150001

摘　要：为了克隆鹅β-防御素 (AvBD) 3 基因，并在原核表达重组鹅 AvBD3 蛋白，进一步研究鹅 AvBD3 蛋白的生物学特性，利用 RT-PCR 方法从鹅脾脏和法氏囊组织中扩增到鹅 AvBD3 基因片段，其 cDNA 片段大小为 182 bp，编码 60 个氨基酸残基。经同源性分析发现鹅 AvBD3 氨基酸序列与鸡 AvBD3 氨基酸序列同源性最高，为 100%。将该基因亚克隆到原核表达载体 pGEX-6p-1 的 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切位点上，构建重组表达质粒 pGEX-goose AvBD3。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21，于 37 ℃用 IPTG 诱导表达，SDS-PAGE 电泳表明，重组鹅 AvBD3 蛋白在原核高效表达（分子量约 31 kDa）。该重组蛋白经纯化后测定其体外抗菌活性与理化特性，结果显示，重组鹅 AvBD3 蛋白具有广谱的抗菌活性，对 12 种细菌，包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有抑菌作用。高盐离子浓度显著降低重组鹅 AvBD3 蛋白的抗菌活性。此外，该重组蛋白的溶血活性极低，并对酸碱度具有较高的稳定性。

关键词：鹅 AvBD3，融合蛋白，抗菌活性，盐浓度，溶血活性，酸碱度

Isolation, identification and bioactivity characterization of goose avian β-defensin 3

Mingyue Zhang[1,2], Caiyuan Zhou[1,2], Zongxi Han[2], Tanhao Shao[2], Shengwang Liu[2], and Deying Ma[1]

1 *Institute of Animal Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin* 150030, *China*
2 *Division of Avian Infectious Disease, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin* 150001, *China*

Abstract: The objective of the study was to clone avian β-defensin (AvBD) 3 gene from goose tissues, express the recombinant AvBD3 protein in *Escherichia coli*, and determine its antimicrobial activity. The mRNA of goose AvBD3 was cloned from spleen and bursa of Fabricius of the gooses by RT-PCR. The sequence analysis showed that the genefragment of AvBD3 contained 182 bp, and encoded 60 amino acids. Homology analysis showed that goose AvBD3 shared the highest percentage of amino acid homology (100%) with chicken AvBD3. The cDNA of goose AvBD3 was sub-cloned into *Bam*H I and *Sal* I sites of pGEX-6p-1 vector to

Received: April 27, 2011; **Accepted:** August 29, 2011
Corresponding author: Deying Ma. Tel: +86-451-55190862; E-mail: mdy296@yahoo.cn

construct recombinant plasmid pGEX-goose AvBD3. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 and the bacteria was induced with IPTG. It was demonstrated by SDS-PAGE that a 31 kDa protein which was equal to goose AvBD3 protein in molecular weight was highly expressed. The purified recombinant goose AvBD3 exhibited extensive antimicrobial activity against twelve bacteria strains, including Gram-positive and Gram-negative investigated. At high salt ions conditions, antimicrobial activity of recombinant goose AvBD3 protein against both *Staphylococcus aureus* and *Pasteurella multocida* decreased significantly. In addition, hemolysis activity of the recombinant protein was extremely low, and the recombinant protein remained antimicrobial activity under different pH values.

Keywords: goose AvBD3, fusion protein, antibacterial activity, salt concentration, hemolysis activity, pH values

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]，是禽类先天免疫防御系统的重要组成部分，在禽先天性免疫和获得性免疫方面均发挥着重要作用[2-3]，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、且病源微生物不易产生耐药性[3-6]。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。自 Evans 等 1994 年从鸡和火鸡的异嗜性白细胞中分别分离到 2 个鸡异嗜性多肽 CHP-1 和 CHP-2 至今[8]，已从鸡[7-14]、火鸡[8-9]、鸽子[11]、鸵鸟[11,15-16]、企鹅[17]、鸭[18-19]、鹌鹑[20]和鹅[21-22]等动物体内分离到 30 余种禽 β-防御素，其主要的分子特征是含有位置保守的由 6 个半胱氨酸残基组成的 3 对二硫键[5]，在空间上形成 3 个稳定的 β 片层结构[23-25]，氨基酸残基数量为 60~100 个，同哺乳动物 β-防御素一样，禽 β-防御素的前体肽由信号肽、前片段、成熟肽组成。大量研究表明，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，还对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌都具有抑制或杀伤作用[4,16,20,26-27]。

对鹅抗菌肽的研究只在近两年才开始，还处于起步阶段，目前已实现鹅 AVBD5[22]和鹅 AVBD10[21]在大肠杆菌的表达。因此，本研究在前人研究的基础上，采用 RT-PCR 法首次从鹅脾脏和法氏囊组织中克隆到鹅 AvBD3 基因，并进行了遗传进化分析，在此基础上采用大肠杆菌表达系统表达了重组鹅 AvBD3 蛋白，并测定了其体外抗菌活性和盐溶液离子浓度以及酸碱度的变化对重组蛋白抗菌活性的影响以及溶血特性，为进一步开展对鹅 β-防御素的研究与应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

15 日龄 SPF 鹅 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。

1.2 菌株及质粒

大肠杆菌 BL21 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。

1.3 工具酶及主要试剂

ExTaq DNA 聚合酶、*rTaq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Sal* Ⅰ、IPTG 购自宝生物工程 (大连) 有限公司；M-MLV 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上海生工生物工程技术服务有限公司；GST Resin 蛋白纯化试剂盒购自 Novagen 公司；其他试剂均为国产分析纯。

表 1 CR 引物序列与预期产物长度

Table 1 CR primer sequences and predicted product lengths

Primer name	Primer sequence (5′–3′)	Enzyme site introduced (underline)
P1	GAACTGCCACTCAGTGCAGAAT	–
P2	ATGGGGGTTGTTTCCAGGAGC	–
P3	GGATCCATGACTGCCACTCAGTG	*Bam*H Ⅰ
P4	GTCGACTCAATGGGGGTTGTTTC	*Sal* Ⅰ

1.4 PCR 引物的设计与合成

根据鸡 AvBD3 的 cDNA 序列 (GenBank Accession No. NM_204650)，设计了 2 对 PCR 引物：其中以 P1/P2 引物扩增的目的片段为 182 bp，P3/P4 引物的 5′端分别含有 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶切位点，扩增的目的片段长为 198 bp。引物均由华大基因科技有限公司合成。

1.5 基因克隆及测序分析

取 15 日龄鹅肝脏组织，进行组织处理，再按 TRIzol 试剂盒说明方法提取总 RNA。进行常规反转录聚合酶链式反应，反应体系中引物为 P1/P2。PCR 扩增体系按 *ExTaq*TM 酶使用说明进行，总反应体系为 25 μL。扩增产物在 2%琼脂糖凝胶中进行初步鉴定。回收阳性的目的片段与 pMD18-T 载体连接，连接产物转化感受态细胞 TG1，用碱裂解法小量提取质粒，并经 PCR 检测获得重组质粒，送上海生工生物工程公司进行测序，测序正确的即为 pMD18-T-AvBD3。将获得序列应用 DNAStar 软件中的 MegAlign 程序与已知的禽 β-防御素基因及部分哺乳动物的 β-防御素 3 基因序列做同源性比较，并采用 DNAStar 中的 Clustal V 软件绘制进化树[28]。

1.6 核表达载体的构建及重组蛋白的表达

采用特异性引物 P3/P4，用 PCR 方法从质粒 pMD18-T-AvBD3 中扩增鹅 β-防御素基因编码鹅 AvBD3 成熟肽基因片段，用 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切将鹅 AvBD3 基因亚克隆到原核表达载体 pGEX-6p-1 中，构建重组表达载体。酶切后的连接产物转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞，在含有氨苄抗性 (Amp) 的 Luria-Bertani (LB) 液体培养基中筛选阳性克隆。小量法提取质粒进行酶切和 PCR 鉴定后进行序列测定，阳性质粒命名为 pGEX-goose AvBD3。取已鉴定为阳性的活化菌液 100 μL，接种于 10 mL 含有 Amp 的 LB 液体培养基中 37 ℃培养，待 OD_{590} 值达到 0.5 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，分别在诱导后 2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h 取 1 mL 菌样放到无菌 Eppendorf (EP) 管中保存。将不同时间段收集的菌样于 4 ℃、3 000 r/min 离心 5 min，收获细菌沉淀，加入 1∶1 体积的 PBS 缓冲液和 2×SDS，沸水裂解并冰浴，然后进行 SDS-PAGE 电泳检测。电泳后，经考马斯亮蓝染色，甲醇-乙酸脱色液脱色观察结果。

1.7 鹅 AvBD3 重组蛋白的纯化及浓度测定

按照 Novagen 公司的蛋白纯化试剂盒说明书进行包涵体的纯化、溶解与复性，并采用考马斯亮兰法测定蛋白浓度。

1.8 鹅 AvBD3 重组蛋白的抗菌活性测定

取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、兔波氏杆菌、枯草芽胞杆菌、猪霍乱沙门氏菌、沙门氏菌接种于 5 mL 不含 Amp 的 LB 液体培养基中，四联球菌、多杀性巴氏杆菌、绿脓杆菌、鸡白痢菌、奇异变形杆菌接种于 5 mL 含有 5%血清的不含 Amp 的 LB 液体培养基中，嗜酸乳杆菌接种于 5 mL MRS 液体培养液中，37 ℃摇床培养过夜；第 2 天取出 0.5 mL 培养物接种于新鲜的 5 mL 相应的液体培养基中，37 ℃摇床培养至对数生长中期，然后用相应的液体培养基稀释细菌至 2×10^6 CFU/mL，分别吸取每株细菌培养物 10 μL 至无菌 EP 管中，将重组鹅 AvBD3 融合

蛋白用 pH 7.3 的 PBS 分别稀释成 0 mg/L 阴性对照)、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L，各取 250 μL 分别加入对应的已加入 250 μL PBS 无菌 EP 管中，充分混匀使各管中蛋白终浓度分别为 0 mg/L (阴性对照)、25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L，再从各自管中取出 250 μL 加入到对应的已加入菌的 EP 管中，每组重复 3 个管。37 ℃条件下振荡培育 3 h，加入 100 μL 1∶1 000 用 PBS 稀释的对应液体培养基，37 ℃条件下继续振荡培育 3 h[29]，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 滴种在 3 个营养琼脂平板上，37 ℃温箱培育 18 h，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。利用 Excel 2003 制作抗菌肽浓度与细菌存活率关系的曲线。

细菌的存活率 (%)=存活细菌数/阴性对照细菌数×100%。

1.9 盐离子浓度变化对鹅 AvBD3 重组蛋白抗菌活性影响的试验

选取金黄色葡萄球菌和多杀性巴氏杆菌为检测菌，用 PBS 和灭菌的去离子水调整氯化钠 (NaCl) 的浓度，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鹅 AvBD3 蛋白浓度为 100 mg/L，同时设不同 NaCl 浓度的缓冲液为阴性对照，各取 250 μL 分别加入无菌离心管中，分别向每管加入细菌培养物 10 μL。每组设 3 个重复，37 ℃振荡孵育 3 h 后，各管分别加 100 μL 相应的低浓度培养基，继续 37 ℃振荡孵育 3 h。方法同 1.8。

1.10 鹅 AvBD3 重组蛋白溶血试验

用无菌的 PBS (pH 7.4) 将新鲜鹅红细胞稀释为 2%~3%，用 PBS 稀释重组鹅 AvBD3 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-100 为阳性，分别向每管加入 180 μL 稀释好的红细胞。每组设 3 个重复，37 ℃温箱培养 1 h，1 000 r/min 离心 10 min 后取上清，用微量分光光度计测 OD_{560} 值，计算溶血活性。

溶血活性 (%)=$(OD_{Amp}-OD_{PBS})/(OD_{Triton}-OD_{PBS})$×100%。

1.11 酸碱度变化对鹅 AvBD3 重组蛋白抗菌活性影响的试验

取重组鹅 AvBD3 蛋白若干份，以 0.1 mol/L 的 HCl 和 2 mmol/L NaOH 将重组蛋白的 pH 分别调至 4、6、7、9 和 10，以枯草芽胞杆菌为检测菌进行组鹅 AvBD3 蛋白 (200 mg/L) 抗菌活性测定，以不经酸碱处理的重组鹅 AvBD3 蛋白作阳性对照，pH 7.3 的 PBS 为阴性对照，方法同 1.8。

2 结果与分析

2.1 鹅 AvBD3 基因克隆与序列分析

根据 GenBank 提交的鸡 AvBD3 的基因序列，设计特异性引物，从鹅脾脏和法氏囊组织中经 PCR 扩增到一个约 200 bp 的片段，结果与目的基因 (182 bp) 大小相符 (图 1)，连接到 pMD-18-T 载体上，并经序列分析显示，基因大小为 182 bp，编码 60 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 1−6、2−4、3−5 共 3 对二硫键。采用 DNAStar 软件中的 MegAlign 程序将该基因与已知的部分禽 β-防御素基因及部分哺乳类动物基因的核苷酸与氨基酸序列进行同源性分析比较发现，该基因与鸡 AvBD3 氨基酸序列同源性最高，为 100% (图 2)。因此，我们将它命名为鹅 AvBD3。

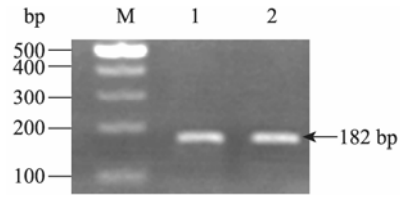

图 1 鹅 AvBD3 RT-PCR 产物电泳分析

Fig. 1 PCR products of goose AvBD3. M: DNA marker; 1: PCR products of goose spleen AvBD3; 2: PCR products of goose bursa AvBD3.

MRIVYLLIPFFLLFLQGAAGTATQ**C**RIRGGF**C**RVGS**C**RFPHIAIGK**C**ATFIS**CC**GRAYEVDALNSVRTSPWLLAPGNNPH
Chicken AvBD3
----------TATQ**C**RIRGGF**C**RVGS**C**RFPHIAIGK**C**ATFIS**CC**GRAYEVDALNSVRTSPWLLAPGNNPH
Goose AvBD3

图 2　鹅 AvBD3 基因推导的氨基酸序列与对应的鸡 AvBD3 氨基酸序列的比较

Fig. 2　Alignment of amino acid sequences of goose AvBD3 and chicken AvBD3.

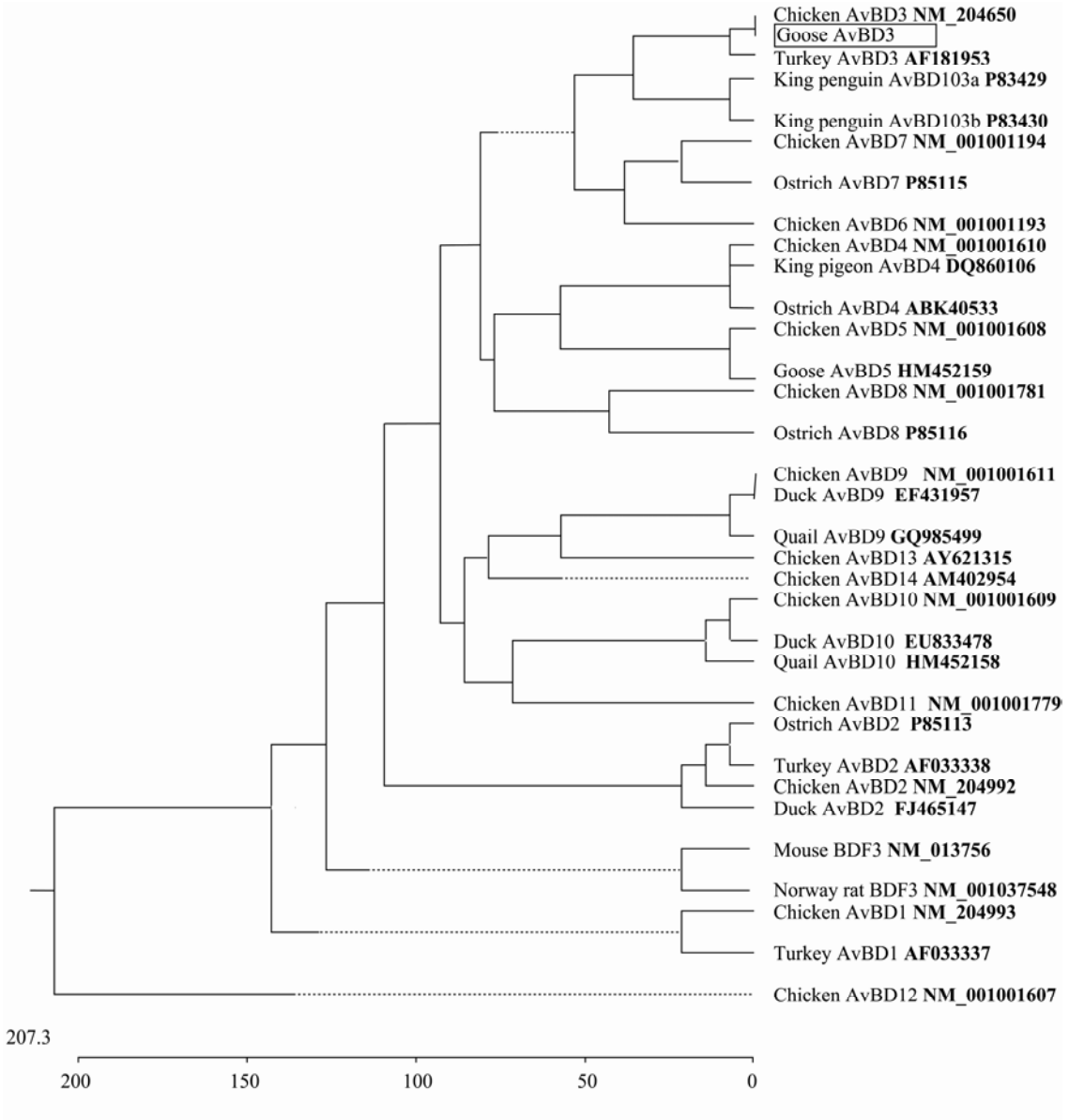

图 3　鹅 AvBD3 基因与其他的禽 β-防御素及哺乳动物 β-防御素 3 基因系统进化树分析

Fig. 3　Phylogenetic relationships based on amino acid sequences of the goose AvBD3 and other AvBDs and β-defensin 3 from some mammalian animals. The goose AvBD3 identified in the present study is in the box; Due to GenBank on NCBI no longer accepts nucleotide sequences shorter than 200 bp from 2011, the goose AvBD3 gene wasn't assigned accession number.

2.2 重组鹅 AvBD3 蛋白原核表达和纯化

将表达用重组质粒与表达载体 pGEX-6p-1 分别经 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切，回收的目的片段和 pGEX-6p-1，连接后转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中，构建 pGEX-goose-AvBD3 重组质粒。选取阳性克隆进行双酶切鉴定 (图 4)。重组质粒测序结果表明将编码鹅 AvBD3 成熟蛋白基因正确地插入到原核表达载体的目的位点。经诱导后进行 SDS-PAGE 分析，同时设未诱导的重组菌作为对照，其中诱导的重组菌中出现了一条明显的表达蛋白条带，以分子量标准作参照其分子量约为 31 kDa，与预期结果一致，诱导 2、3、4、5、6、7 h 后，可见诱导 6 h 的表达量最大。同时用超声波将诱导的菌体裂解后，分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析，可见大部分重组蛋白存在于沉淀中，表明表达的重组鹅 AvBD3 在大肠杆菌 BL21 中以包涵体的形式存在 (图 5)。采用 Novagen 蛋白质纯化试剂盒对重组蛋白进行纯化，获得的鹅 AvBD3 融合蛋白运用分光光度仪测得的浓度为 2 300 mg/L。对纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，观察结果显示可见约 31 kDa 大小的蛋白带，与预期蛋白相符 (图 5)。

2.3 菌落计数法测定鹅 AvBD3 重组蛋白的抗菌活性

采用菌落计数法测定 GST 蛋白和鹅 AvBD3 重组蛋白对 12 种细菌的抗菌活性 (图 6)。结果显示，

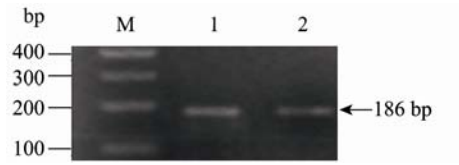

图 4 重组质粒 pGEX-AvBD3 的 PCR 及双酶切鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant plamid pGEX-AvBD3 by PCR and enzyme digestion. M: DNA marker; 1: PCR product of pGEX-AvBD3; 2: pGEX-AvBD3 digested with *Bam*H I and *Sal* I.

GST 蛋白对 12 种细菌都没有抗菌活性。与此相反，鹅 AvBD3 重组蛋白对所有测定的细菌都具有显著抑菌作用 ($P<0.05$)，并且，随着鹅 AvBD3 重组蛋白浓度的增加，活菌菌落数量逐渐减少，即其抗菌活性逐渐增强。其中，鹅 AvBD3 重组蛋白对枯草芽胞杆菌、奇异变形杆菌、金黄色葡萄球菌、多杀性巴氏杆菌和绿脓杆菌的抗菌活性最强，对大肠杆菌、沙门氏菌、鸡白痢菌、猪霍乱沙门氏菌、嗜酸乳杆菌的抗菌活性较强，对四联球菌、兔波氏杆菌的抗菌活性一般 (图 6)。

2.4 菌落计数法测定盐离子浓度对鹅 AvBD3 重组蛋白抗菌活性影响

试验结果表明，无论是以革兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌) 还是革兰氏阴性菌 (多杀性巴氏杆菌) 作为检测菌，浓度为 100 mg/L 的鹅 AvBD3 重组蛋白都随着盐浓度的升高 (0~150 mmol/L)，检测菌存

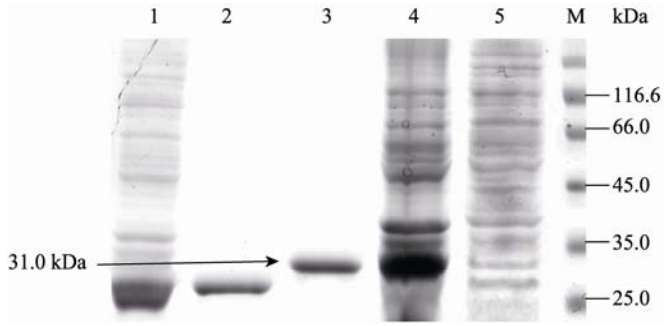

图 5 重组鹅 AvBD3-GST 融合蛋白的表达与纯化

Fig. 5 Expression and purification of recombinant goose AvBD3-GST. 1: GST; 2: purified GST; 3: purified protein of goose AvBD3; 4: inclusion bodies with goose AvBD3; 5: supertant; M: protein molecular weight marker.

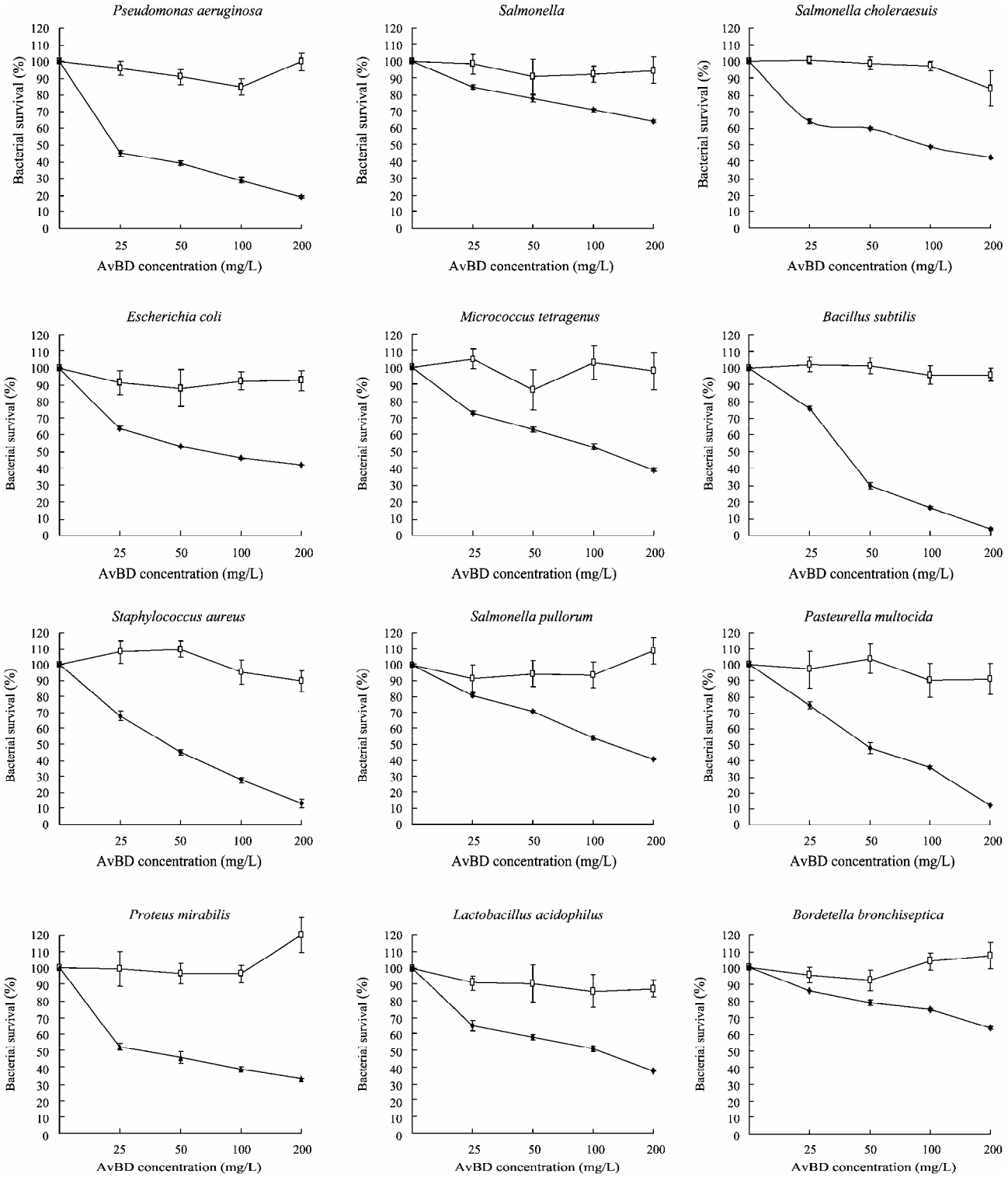

图 6 菌落计数法测定不同浓度的重组鹅 AvBD3 蛋白对 12 种细菌的抗菌活性

Fig. 6 The antimicrobial activity of recombinant AvBD3 protein with various concentrations against twelve bacteria by colony-counting assays —□—GST; —▲—G-AVBD3.

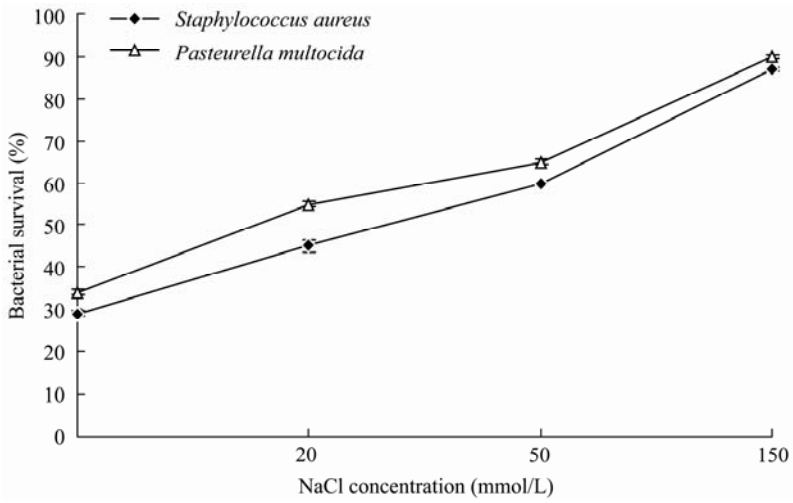

图 7 盐离子浓度对重组鹅 AvBD3 蛋白抗金黄色葡萄球菌和多杀性巴氏杆菌活性影响

Fig. 7 Effects of salinity on the antibacterial activity of goose AvBD3 against *S. aureus* or *P. multocida*.

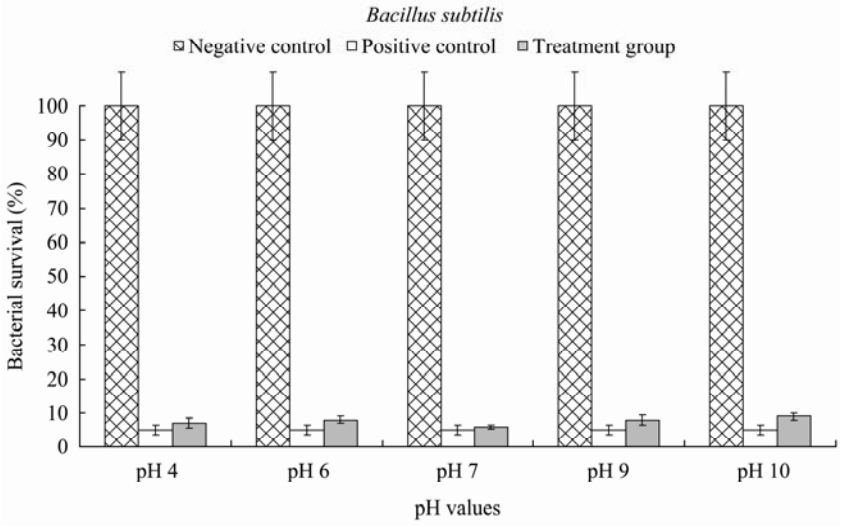

图 8 重组鹅 AvBD3 蛋白在不同 pH 条件下对枯草芽胞杆菌的抗菌活性

Fig. 8 The antimicrobial activity of recombinant goose AvBD3 against *B. subtilis* under different pH treatments.

活率都不断上升 (图 7)，即鹅 AvBD3 重组蛋白的抗菌活性不断下降。同时，当盐离子浓度达到 150 mmol/L 的高浓度时，鹅 AvBD3 重组蛋白的抗菌活性显著降低 ($P<0.01$)。表明，高盐离子浓度显著降低鹅 AvBD3 重组蛋白的抗菌活性。

2.5 鹅 AvBD3 重组蛋白溶血试验

鹅 AvBD3 重组蛋白溶血试验结果显示，鹅 AvBD3 重组蛋白在 100、250、500 三个浓度梯度下溶血率分别为 1.06%、3.19%、4.79%，与阴性对照相比，均差异不显著 ($P>0.05$)，表明鹅 AvBD3 重组蛋白对鹅红细胞无明显毒害作用。

2.6 菌落计数法测定酸碱度变化对鹅 AvBD3 重组蛋白抗菌活性影响

从图 8 可以看到，浓度为 200 mg/L 的鹅 AvBD3 重组蛋白随着酸碱度的变化 (pH 4~10)，检测菌的存活率都很低 (低于 10%)，即经过不同酸碱度处

理后，鹅 AvBD3 重组蛋白对枯草芽胞杆菌仍具有明显的抗菌活性 ($P<0.05$)，这说明该重组蛋白对酸碱度变化具有稳定性。同时从图 8 中还能看出，该重组蛋白在 pH 7 的条件下抗菌活性较强，而随着 pH 的升高或降低，重组蛋白抗菌活性稍有减弱的趋势。

3 讨论

本研究根据 GenBank 中提交的鸡 AvBD3 的序列，设计特异性引物进行 PCR 扩增，结果从鹅脾脏和法氏囊组织中克隆到 AvBD 基因，该基因与已发现的其他物种的 AvBDs 一样，分子内含有 6 个半胱氨酸残基分别在分子内形成的 3 对二硫键，这些结构符合 β-防御素的特征性结构。经同源性分析得知该基因与鸡 AvBD3 氨基酸序列同源性最高，为 100%，因此，将其命名为鹅 AvBD3。通过绘制进化树将鹅 AvBD3 基因的氨基酸序列与已发现的禽 β-防御素基因和部分哺乳动物 β-防御素 3 基因的氨基酸序列进行分析比较发现，这种高同源性现象在不同禽类的 AvBDs 中也普遍存在 (图 3)，如鸡 AvBD1 与火鸡 AvBD1、鸡 AvBD9 与鸭 AvBD9 等，这表明鹅 AvBD3 基因在同一种属不同种类间差异甚微。但鹅 AvBD3 基因与部分哺乳动物的 β-防御素 3 基因 (如鼠类 β-防御素 3) 同源性很低，又表明鹅 AvBD3 基因存在较大的种属特异性。

目前，通过基因工程技术获得防御素已经成为普遍的获得禽防御素的手段，而大肠杆菌表达系统是常用的表达系统之一。本实验室采用 GST 基因融合表达系统已经成功原核表达了包括鸭 AvBD2[18]、AvBD9[19]、AvBD10[19]、鹌鹑 AvBD9[20]在内的许多禽 AvBD 融合蛋白，之所以采用 GST 基因融合表达系统的原因首先是由于禽防御素的分子量很小，表达产物分离、纯化较困难，并且对大肠杆菌有很强的杀伤力，所以不能在大肠杆菌中直接表达；其次，GST 融合表达系统表达的融合蛋白常以无活性的包涵体形式存在，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。

本试验为了研究重组鹅 AvBD3 蛋白的抗菌活性，成功表达了带有 GST 标签的重组鹅 AvBD3 蛋白，抗菌活性测定结果显示，鹅 AvBD3 重组蛋白对枯草芽胞杆菌、奇异变形杆菌、金黄色葡萄球菌、多杀性巴氏杆菌和绿脓杆菌的抗菌活性最强，对大肠杆菌、鸡白痢菌、猪霍乱沙门氏菌、沙门氏菌、嗜酸乳杆菌的抗菌活性较强，对四联球菌、兔波氏杆菌的抗菌活性一般，而且鹅 AvBD3 重组蛋白在不同酸碱度条件处理后仍具有明显的抗菌活性，这表明鹅 AvBD3 重组蛋白不但具有广谱抗菌活性，同时对酸碱度的变化也有很强的稳定性，这与 van Dijk 等[34]和 Zhou 等[22]的报道一致。这充分证明了禽 β-防御素具有广谱抗菌活性的特点。在这里值得一提的是，已有研究证明了 GST 标签没有抗菌活性，因此鸡 AvBDs 的抗菌效价并未因带有 GST 标签而被改变[18-19,26]，本研究结果与前人一致。由于禽异嗜性细胞中缺乏氧化机制，更多地依赖非氧化机制发挥抗菌作用[30]，因此，禽 β-防御素作为一种阳离子多肽有着独特的防御机制和细胞介导的防御反应，在禽先天性免疫中发挥重要作用[31-33]。此外，本实验还证明了浓度为 100 mg/L 的鹅 AvBD3 重组蛋白在高盐离子浓度 (150 mmol/L) 的条件下，仍能发挥其抗菌活性，但是活性不太强，这与鸡 AvBD9 在 150 mmol/L NaCl 作用下仍具有抗菌活性的报道结论相符[34]，同时鹅 AvBD3 重组蛋白随着盐浓度的升高 (0 mmol/L~150 mmol/L)，对两种检测菌的抗菌活性不断下降也说明高盐离子浓度变化确实对鹅 AvBD3 重组蛋白抗菌活性产生了影响，为了证实高浓度 NaCl 对抗菌肽活性的影响，Goldman 等化学合成了 hBD-1 的成熟肽[35]，观察其在不同盐浓度下的抗菌活性变化，结果证明当 NaCl 浓度从 50 mmol/L 升高到 125 mmol/L 时，hBD-1 的活性急剧下降为原来的 12%。Meegalla 等也研究表明，当 NaCl 浓度从 20 mmol/L 升高到 150 mmol/L 时，hBD-2 的抗菌活性下降到原来的 1/8[36]。但盐离子浓度是如何

影响抗菌肽抗菌活性的还不太清楚，这也正需要我们在今后的研究中不断探索。本研究结果还表明，鹅 AvBD3 重组蛋白对鹅红细胞无溶血活性以及能够耐受酸碱度变化的特性。这些研究结果为日后禽β-防御素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。

4 结论

本研究从鹅脾脏和法氏囊组织中克隆到鹅 AvBD3 基因，该基因片段大小为 182 bp，编码 60 个氨基酸。鹅 AvBD3 与鸡 AvBD3 的氨基酸同源性为 100%。重组鹅 AvBD3 融合蛋白分子量大小为 31 kDa，该重组蛋白具有广谱抗菌活性。在高盐离子浓度条件下，该重组蛋白对金黄色葡萄球菌和多杀性巴氏杆菌的抗菌活性显著降低，但是仍具有抗菌活性。此外，该重组鹅 AvBD3 蛋白对鹅红细胞的溶血活性极低以及对酸碱度的变化具有稳定性。

REFERENCES

[1] Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. Curr Opin Immunol, 1999, 11(1): 23−27.

[2] Satchell DP, Sheyins T, Shirafuji Y, et al. Interactions of mouse Paneth cell alpha-defensins and alpha-defensin precursors with membranes. Prosegment inhibition of peptide association with biomimetic membranes. J Biol Chem, 2003, 278(16): 13838−13846.

[3] Brune K, Leffell MS, Spitznagel JK. Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophile leukocyte. Infect Immun, 1972, 5(3): 283−287.

[4] Van Dijk A, Veldhuizen EJA, Haagsma HP. Avian defensins. Vet Immunol Immunop, 2008, 124(1/2): 1−18.

[5] Sugiarto H, Yu PL. Avian antimicrobial peptides: the defense role of β-defensins. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(3): 721−727.

[6] Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, et al. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependention-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(1): 210−214.

[7] 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. Immunogenetics, 2005, 57(1/2): 90−98.

[8] Evans EW, Beach FG, Moore KW, et al. Antimicrobial activity of chicken and turkey heterophil peptides CHP1, CHP2, THP1, and THP3. Vet Microbiol, 1995, 47(3/4): 295−303.

[9] Evans EW, Beach GG, Wunderlich J, et al. Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. J Leukoc Biol, 1994, 56(5): 661−665.

[10] Zhao CQ, Nguyen T, Liu LD, et al. Gallinacin-3, an inducible epithelial β-defensin in the chicken. Infect Immun, 2001, 69(4): 2684−2691.

[11] Lynn DJ, Higgs R, Lloyd AT, et al. Avian β-defensin nomenclature: a community proposed update. Immunol Lett, 2007, 110(1): 86−89.

[12] Lynn DJ, Higgs R, Gaines S, et al. Bioinformatic discovery and initial characterisation of nine novel antimicrobial peptide genes in the chicken. Immunogenetics, 2004, 56(3): 170−177.

[13] Harwig SSL, Swiderek KM, Kokryakov VN, et al. Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes. FEBS Lett, 1994, 342(3): 281−285.

[14] 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. BMC Genomics, 2004, 5(1): 56−67.

[15] Yu PL, Choudhury SD, Ahrens K. Purification and characterization of the antimicrobial peptide, ostricacin. Biotechnol Lett, 2001, 23(3): 207−210.

[16] Sugiarto H, Yu PL. Identification of three novel ostricacins: an update on the phylogenetic perspective of β-defensins. Int J Antimicrob Agents, 2006, 27(3): 229−235.

[17] Thouzeau C, Le MY, Froget G, et al. Spheniscins, avian β-defensins in preserved stomach contents of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus*. J Biol Chem, 2003, 278(51): 51053−51058.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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.

[21] 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 基因的分离、鉴定与组织分布分析. 中国农业科学, 2011, 78: 51−58.

[22] Zhou CY, Lin LJ, Han ZX, et al. Cloning and initial characterization of goose avian β-defensin. Acta Vet Zoo Sin, 2011, 42(8): 1193−1200.
周财源, 蔺利娟, 韩宗玺, 等. 鹅 β-防御素基因克隆与生物学特性的初步分析. 畜牧兽医学报, 2011, 42(8): 1193−1200.

[23] White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins. Curr Opin Struct Biol, 1995, 5(4): 521−527.

[24] Martin E, Ganz T, Lehrer RI. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. J Leukoc Biol, 1995, 58(2): 128−136.

[25] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol, 2003, 3(9): 710−720.

[26] Ma DY, Liu SW, Han ZX, et al. Expression and characterization of recombinant gallinacin-9 and gallinacin-8 in *Escherichia coli*. Protein Express Purif, 2008, 58(2): 284−291.

[27] 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.

[28] Higgins DG, Sharp PM. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. Gene, 1988, 73(1): 237−244.

[29] Soman SS, Arathy DS, Sreekumar E. Discovery of Anas platyrhynchos avian β-defensin 2 (Apl_AvBD2) with antibacterial and chemotactic functions. Mol Immunol, 2009, 46(10): 2029−2038.

[30] Harmon BG. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. Poul Sci, 1998, 77(7): 972−977.

[31] Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. Biopolymers, 1999, 47(6): 415−433.

[32] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat Rev Mirobiol, 2005, 3(3): 238−250.

[33] Sugiarto H, Yu PL. Mechanisms of action of ostrich β-defensins against *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 2007, 270(2): 195−200.

[34] 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 Chemother, 2007, 51(3): 912−922.

[35] Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, et al. Human β-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. Cell, 1997, 88(4): 553−560.

[36] Bals R, Wang XR, Meegalla RL, et al. Mouse β-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs. Infect Immun, 1999, 67(7): 3542−3547.