

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202001009

禽 β -防御素6和9基因的克隆、表达及活性分析*

李怡彤, 耿 姝, 殷冬冬, 邵 颖, 薛 媚, 涂 健, 宋祥军, 祁克宗**
(安徽农业大学生命科学学院, 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:【目的】探究重组禽 β -防御素6(AvBD6)、禽 β -防御素9(AvBD9)蛋白的原核表达及其生物学特性。【方法】将AvBD6和AvBD9成熟肽基因克隆到表达载体pGEX-6P-1上, 进而将重组表达质粒转化到BL21(DE3)pLysS感受态中, 用IPTG进行诱导表达后对其进行纯化, SDS-PAGE电泳分析重组蛋白AvBD6和AvBD9的表达情况, 继而检测其体外抗菌活性并用透射电镜观察细菌形态变化, 检测重组蛋白对鸡红细胞的溶血活性。【结果】重组AvBD6和AvBD9蛋白诱导表达的分子量约为30 ku, 且主要在上清中表达。2种重组蛋白对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有抗菌活性。电镜观察显示: 菌体内容物外泄, 损伤严重, 并且重组蛋白对鸡红细胞无溶血活性。【结论】本研究制备的AvBD6和AvBD9重组蛋白具有良好的生物安全性和抑菌效果, 为进一步研究其抗菌机制及临床初步应用奠定了基础。

关键词: 禽 β -防御素6; 禽 β -防御素9; 原核表达; 重组蛋白; 抗菌活性

中图分类号: S 831.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X(2020)06-0996-08

Cloning, Expression and Activity Analysis of Avian β -Defensin 6 and 9

LI Yitong, GENG Shu, YIN Dongdong, SHAO Ying, XUE Mei,
TU Jian, SONG Xiangjun, QI Kezong

(School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Anhui Provincial Key Laboratory of
Veterinary Pathology and Disease Control, Hefei 230036, China)

Abstract: [Purpose] To explore the prokaryotic expression and its biological characteristics of recombinant avian defensins 6 (AvBD6) and avian defensins 9 (AvBD9). [Method] The mature peptide genes of AvBD6 and AvBD9 were cloned into the expression vector pgex-6p-1, and the recombinant expression plasmids pgex-6p-1-AvBD6 and pgex-6p-1-AvBD9 were constructed. Then the recombinant expression plasmid was transformed into BL21(DE3)pLysS. Purification after IPTG induced protein expression SDS-PAGE was used to analyze the protein expression of AvBD6 and AvBD9, then to detect their antibacterial activity *in vitro* and to observe the morphological changes of bacteria with transmission electron microscope. In addition, the hemolytic activity of recombinant protein on chicken erythrocytes was detected. [Results] By SDS-PAGE analysis, the molecular weight of the induced AvBD6 and AvBD9 is about 30 ku, and it was mainly expressed in the supernatant. The recombinant protein had antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Electron microscopic observation showed that the bacterial contents leaked out and the damage was seri-

收稿日期: 2020-01-07 修回日期: 2020-07-19 网络首发时间: 2020-11-11 08:43:16

*基金项目: 安徽高校协同创新项目(GXXT-2019-035); 国家自然科学基金项目(31772707)。

作者简介: 李怡彤(1994—), 女, 安徽宿州人, 在读硕士研究生, 主要从事动物疫病防治研究。

E-mail: 841881968@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 祁克宗(1963—), 男, 安徽淮北人, 博士, 教授, 主要从事兽医病理生物学与疫病防控的研究。E-mail: qkz@ahau.edu.cn

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20201110.1308.003.html>



ous, and the hemolytic activity of the recombinant protein to chicken red blood cells was very low.

[**Conclusion**] The recombinant protein of AvBD6 and AvBD9 prepared in this study has good biological safety and antibacterial effect, and laid a foundation for further study of its antibacterial mechanism and preliminary clinical application.

Keywords: avian β -defensin 6; avian β -defensin 9; prokaryotic expression; recombinant protein; antibacterial activity

当前,在家禽养殖中为了降低禽类被病原菌感染的发病率,抗生素被广泛使用。长期使用抗生素容易导致家禽体内抗生素残留和细菌耐药性增强等问题,并通过食物链直接危害人类身体健康^[1]。鉴于此,抗生素替代现已成为研究热点。

禽 β -防御素 (avian β -defensins, AvBDs) 是一类在禽体内广泛分布的内源性阳离子短肽,具有广泛的杀菌活性、细胞毒性和免疫趋化作用。因禽类异噬性细胞缺乏氧化机制,故 AvBDs 构成的非氧化机制在禽类机体的天然免疫系统中发挥着重要作用^[2-4]。AvBDs 的抗菌原理^[5-6]与抗生素不同,不易产生耐药性;其具有分子量小、热稳定性及水溶性较好、动物采食后不会在体内造成药物残留等优势,被作为绿色饲料添加剂及新型抗菌药物的开发价值也逐渐被关注。AvBDs 的制备途径有多种,如从鸡体内提取、化学方法合成、原核表达^[7]及真核表达^[8];其中,体内提取和化学合成过程繁杂、效率低且成本高,真核表达产量较少,而原核表达系统因其操作简单、成本低和产量高等优点,被用于生产 AvBDs,为解决以上难题提供了一种简易可行的手段。

AvBD6 和 AvBD9 均在鸡的消化道、肝脏、嗦囊和肾脏气管等组织器官大量表达。本研究在前人研究的基础上,用 PCR 扩增了 AvBD6 和 AvBD9 的基因,并将基因连接至 pGEX-6P-1 载体,对其进行诱导表达,并对其表达产物进行活性分析及安全性检测,为 AvBD6 和 AvBD9 的生物活性研究及安全性评价提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂材料

DH5 α 感受态细胞和 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞购自北京擎科新业生物技术有限公司;禽致病性大肠杆菌 AE17、金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923)、表达载体 pGEX-6P-1、AvBD6 及 AvBD9 鼠源抗体均由兽医病理生物学与疫病防控安徽

省重点实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 引物的设计与合成

根据 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) 中收录的鸡 AvBD6 的基因序列 (序列号 NM_001001193) 和鸡 AvBD9 的基因序列 (序列号 NM_001001611), 依据大肠杆菌的密码子偏好性对成熟肽基因序列进行优化 (表 1), 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 根据人工合成的 AvBD6 和 AvBD9 优化基因序列以及引物设计原则, 利用 Primer 5.0 分别设计 AvBD6 的扩增引物 P1、P2 和 AvBD9 的扩增引物 P3、P4 (表 2), 下划线为酶切位点。

表 1 优化后 AvBD6 和 AvBD9 成熟肽基因序列
Tab. 1 Optimized AvBD6 and AvBD9 mature peptide gene sequences

合成基因 synthetic gene	成熟肽基因序列(5'→3') gene sequence
AvBD6	AGCCCGATTTCATGCATGTCGTTATCAGCGTGGTGTGTTGTA TTCCGGGTCCGTGTCGTTGGCCGTATTATCGTGTGGTAG CTGTGGTAGCGGTCTGAAAAGCTGTTGTGTTCGTAATCGT TGGGCC
AvBD9	GCAGATACCCTGGCATGTCGTCAGAGCCATGGTAGCTGT AGCTTTGTTGCATGTCGTGCACCGAGCGTTGATATTGGTA CCTGTCGTGGTGGTAAACTGAAATGTTGAAATGGGCAC CGAGCAGC

表 2 根据 AvBD6 和 AvBD9 成熟肽基因设计引物
Tab. 2 Primers designed according to AvBD6 and AvBD9 mature peptide genes

合成基因 synthetic gene	引物序列(5'→3') primer sequence	酶切位点 enzyme site
AvBD6	P1: CGCAGCCCGATTTCATGCATGTC P2: CCGTAAGGCCCAACGATTACGAACA	BamH I EcoR I
AvBD9	P3: CGCGCAGATACCCTGGCATG P4: CCGTAAGCTGCTCGGTGCCCAT	BamH I EcoR I

1.2.2 重组表达载体的构建

以 AvBD6 和 AvBD9 成熟肽 cDNA 为模板, 用 1.2.1 节中合成的引物进行扩增, 将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并使用柱式 DNA 胶回收

试剂盒进行胶回收。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I [购自宝生物工程 (大连) 有限公司] 分别对目的片段和载体 pGEX-6P-1 进行双酶切, 后经电泳鉴定及胶回收纯化。将胶回收后的目的片段 *AvBD6* 和 *AvBD9* 分别与载体 pGEX-6P-1 按以下体系 16 ℃ 作用 12 h: *AvBD6* 或 *AvBD9* 各 7.5 μL、载体 0.5 μL、T4 连接酶和 T4 buffer 各 1 μL。将连接产物分别转化至 DH5α 感受态细胞, 并涂布于有氨苄西林 (Amp) 抗性的固体 LB 板, 置于 37 ℃ 培养 12 h, 挑取单克隆进行 PCR 鉴定, 并将阳性菌送至上海生工生物工程有限公司测序, 测序正确质粒命名为 pGEX-6P-1-*AvBD6* 和 pGEX-6P-1-*AvBD9*。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达及纯化

将重组质粒分别转化至表达菌 BL21 (DE3)pL-ysS 中, 挑取单克隆并鉴定。将阳性克隆接种于含有 Amp 的液体 LB 培养基中, 37 ℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG, 在 16 ℃ 条件下诱导表达 16 h。将诱导表达后的菌液 5000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 置于冰上超声破碎 (110 HZ 超声裂解细菌细胞, 工作时间 3 s, 间歇 5 s, 超声时间 15 min), 10000 r/min 离心 10 min 后分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 分析蛋白存在形式。按照 GST 标签蛋白纯化试剂盒说明书纯化重组蛋白, 并用 BCA 蛋白检测试剂盒测定纯化后重组蛋白的含量。

1.2.4 重组蛋白 Western-blot 验证

纯化后的蛋白经过 12.5% SDS-PAGE 分离, 100 mA、60 min 湿转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉于 37 ℃ 封闭 2 h, 加入用封闭液 1 : 500 稀释的 *AvBD6* 和 *AvBD9* 鼠源抗体, 37 ℃ 孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 加 1 : 2000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG, 室温下孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 后用 ECL 显色观察。

1.2.5 重组蛋白对指示菌最低抑菌质量浓度 (MIC) 的测定

将待测指示菌禽致病性大肠杆菌 AE17 和金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923) 分别培养至 OD₆₀₀ 值为 1.0, 稀释至 1×10^5 CFU/mL。分别将 2 种蛋白倍比稀释 5 个质量浓度 (300.0、150.0、75.0、37.5 和 18.8 μg/mL), 后各取 50 μL 加入 96 孔板中, 每孔中加入 150 μL 稀释后的菌液。空白组

为 150 μL LB 培养基和 50 μL 的 PBS, 对照组为 150 μL 菌液和 50 μL PBS。将 96 孔板放入 37 ℃ 培养箱内静置培养, 测量 OD₆₀₀ 值, 每组试验均重复 3 次并统计分析。

1.2.6 透射电镜观察抑菌效果

纯化后的 *AvBD6* 和 *AvBD9* 分别与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在 28 ℃ 培养箱过夜共培, 离心后用 PBS 洗涤 3 次, 将沉淀样品置于 2.5% 的戊二醛中固定, 再用 1% OsO₄ 固定, 然后通过脱水、包埋、超薄切片、铀和铝染色制备样品。对照组用 PBS 代替重组蛋白后做相同处理。对制备的样品使用扫描电镜观察并拍照。

1.2.7 重组蛋白溶血试验

为了验证重组蛋白对鸡血红细胞是否具有溶血性, 以期重组蛋白应用于临床鸡体内试验奠定基础, 也为其安全性评价提供参考, 本研究进行重组蛋白溶血试验。将新鲜鸡血加入枸橼酸盐溶液中, 冰中静置使其分层后取下层鸡血红细胞, 用 0.9% 灭菌生理盐水将鸡血红细胞稀释至 2%, 并用灭菌生理盐水将 3 种重组蛋白稀释至终质量浓度为 50、150 和 300 mg/L。每种质量浓度的蛋白各取 20 μL 分别加入不同的无菌离心管中, 用 0.9% 无菌生理盐水作阴性对照, 0.2% Triton-100 作为阳性对照; 分别向每管加入 180 μL 稀释的鸡血红细胞。每组设置 3 个重复, 37 ℃ 孵育 1 h, 1000 r/min 离心 10 min 后取上清, 测 OD₅₆₀ 值, 每个样品做 3 个平行测定, 并按以下公式计算其溶血率, 取平均值。

$$\text{溶血率} = (\text{OD}_{\text{重组蛋白}} - \text{OD}_{\text{Triton}}) / (\text{OD}_{\text{生理盐水}} - \text{OD}_{\text{Triton}}) \times 100\%。$$

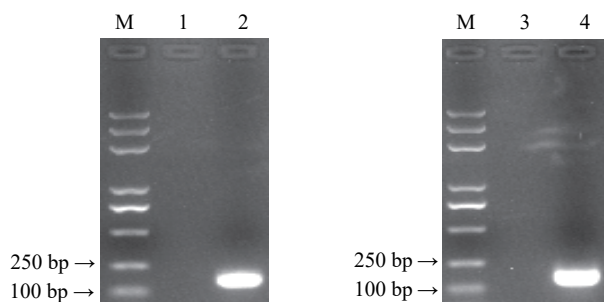
2 结果与分析

2.1 *AvBD6* 和 *AvBD9* 基因扩增

由图 1 可知: 以 *AvBD6* 和 *AvBD9* 成熟肽 cDNA 为模板, 均扩增出大小约 125 bp 的片段, 与预期大小相符。

2.2 双酶切鉴定

由图 2 可知: 重组质粒经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切, PCR 扩增产物与酶切后目的片段大小一致, 均约为 125 bp。测序结果表明: *AvBD6* 和 *AvBD9* 基因均未发生碱基突变或缺失, 说明 pGEX-6p-1-*AvBD6* 和 pGEX-6p-1-*AvBD9* 重组表达质粒构建成功。

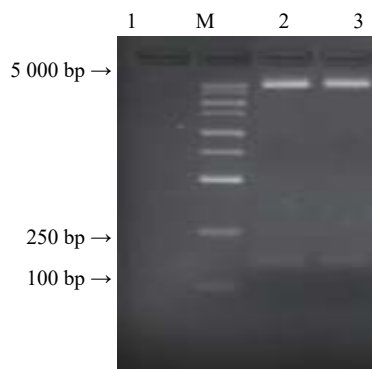


注: M. DNA 分子量标准; 1 和 3. 阴性对照; 2. *AvBD6* PCR 产物; 4. *AvBD9* PCR 产物。

Note: M. DNA molecular weight standard; 1 and 3. negative controls; 2. *AvBD6* PCR product; 4. *AvBD9* PCR product.

图 1 鸡 *AvBD6* 和 *AvBD9* 基因 PCR 产物电泳检测

Fig. 1 Identification of PCR products of chicken *AvBD6* and *AvBD9* gene by electrophoresis



注: M. DNA 分子量标准; 1. 阴性对照; 2. 重组质粒 pGEX-6p-1-*AvBD6* 双酶切产物; 3. 重组质粒 pGEX-6p-1-*AvBD9* 双酶切产物。

Note: M. DNA molecular weight standard; 1. negative control; 2. recombinant plasmid pGEX-6p-1-*AvBD6* double enzyme products; 3. recombinant plasmid pGEX-6p-1-*AvBD9* double enzyme products.

图 2 重组质粒 pGEX-6p-1-*AvBD6* 和 pGEX-6p-1-*AvBD9* 的双酶切后电泳检测

Fig. 2 Electrophoresis detection of recombinant plasmid pGEX-6p-1-*AvBD6* and pGEX-6p-1-*AvBD9* after double enzyme digestion

2.3 *AvBD6* 和 *AvBD9* 融合蛋白的诱导表达及纯化

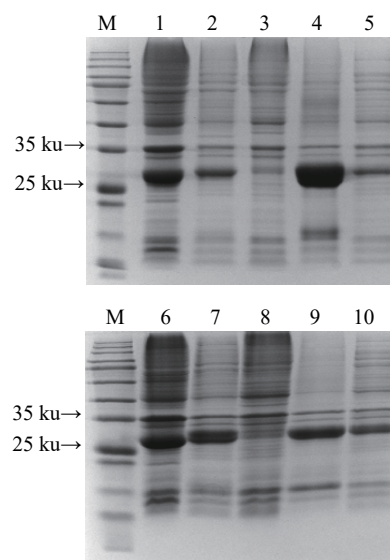
经 SDS-PAGE 电泳鉴定, 重组质粒 pGEX-6P-1-*AvBD6* 和 pGEX-6P-1-*AvBD9* 表达的融合蛋白大小约为 30 ku, 符合预期大小, 且 2 种融合蛋白均以可溶形式表达 (图 3)。对重组蛋白的上清液纯化, 得到纯度较高的目的蛋白 (图 4)。

2.4 重组蛋白 Western-blot 验证

Western-blot 结果显示: 2 种重组蛋白均出现特异性条带, 而空载体未见反应 (图 5)。

2.5 重组蛋白对多种指示菌最低抑菌质量浓度 (MIC) 的测定

由图 6 可知: 重组蛋白 *AvBD6* 和 *AvBD9* 均

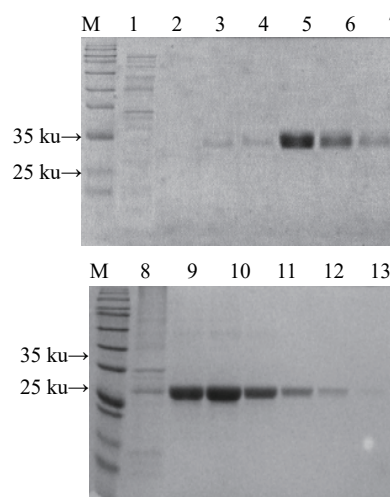


注: M. 蛋白分子量标准; 1 和 6. 诱导空载体; 2. 诱导后的 *AvBD6* 表达产物; 3. 未诱导的 *AvBD6* 表达产物; 4. *AvBD6* 的上清表达产物; 5. *AvBD6* 的包涵体表达产物; 7. 诱导后的 *AvBD9* 表达产物; 8. 未诱导的 *AvBD9* 表达产物; 9. *AvBD9* 的上清表达产物; 10. *AvBD9* 的包涵体表达产物。

Note: M. protein molecular weight standard; 1 and 6. induced empty vector; 2. induced *AvBD6* expression product; 3. uninduced *AvBD6* expression product; 4. supernatant expression product of *AvBD6*; 5. inclusion body expression product of *AvBD6*; 7. induced *AvBD9* expression product; 8. uninduced *AvBD9* expression product; 9. supernatant expression product of *AvBD9*; 10. inclusion expression products of *AvBD9*.

图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins



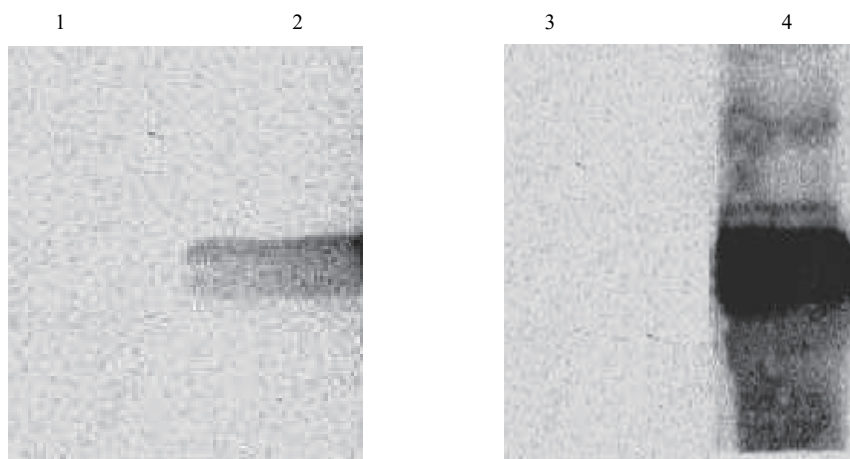
注: M. 蛋白分子量标准; 1~7. 重组 *AvBD6* 第 1~7 次洗脱后结果; 8~13. 重组 *AvBD9* 第 1~7 次洗脱后结果。

Note: M. protein molecular weight standard; 1-7. results after 1 to 7 times eluting of recombinant *AvBD6*; 8-13. results after 1 to 7 times eluting of recombinant *AvBD9*.

图 4 重组蛋白的纯化结果

Fig. 4 Recombinant protein purification results

对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有一定的抑菌效果。与阳性对照相比, 重组蛋白 *AvBD6* 和 *AvBD9*

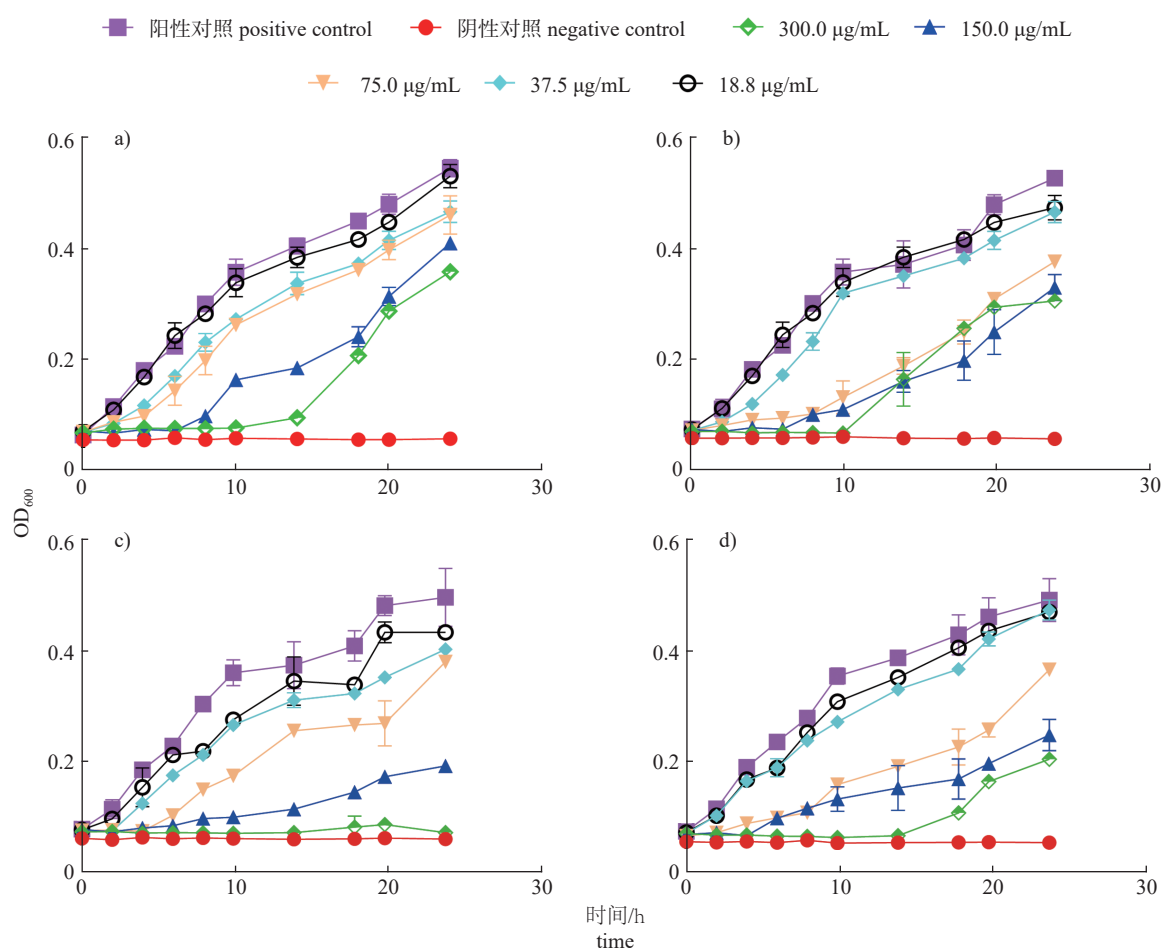


注：1 和 3. 空载体；2. pGEX-6p-1-AvBD6 重组菌的表达；4. pGEX-6p-1-AvBD9 重组菌的表达。

Note: 1 and 3. empty vector; 2. expression of pGEX-6p-1-AvBD6 recombinant bacteria; 4. expression of pGEX-6p-1-AvBD9 recombinant bacteria.

图 5 重组蛋白 Western-blot 分析

Fig. 5 Western-blot analysis of recombinant protein



注：a) 和 b) 重组 AvBD6 分别对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性；c) 和 d) 重组 AvBD9 分别对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性。

Note: a) and b) antibacterial activity of recombinant AvBD6 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively; c) and d) antibacterial activity of recombinant AvBD9 against *E. coli* and *S. aureus*, respectively.

图 6 最小抑菌质量浓度测定

Fig. 6 Determination of the minimum inhibitory mass concentration

质量浓度为 150.0 mg/L 时,对指示菌大肠杆菌具有明显的抑制作用;当质量浓度为 75.0 mg/L 时,对金黄色葡萄球菌具有明显的抑制作用。

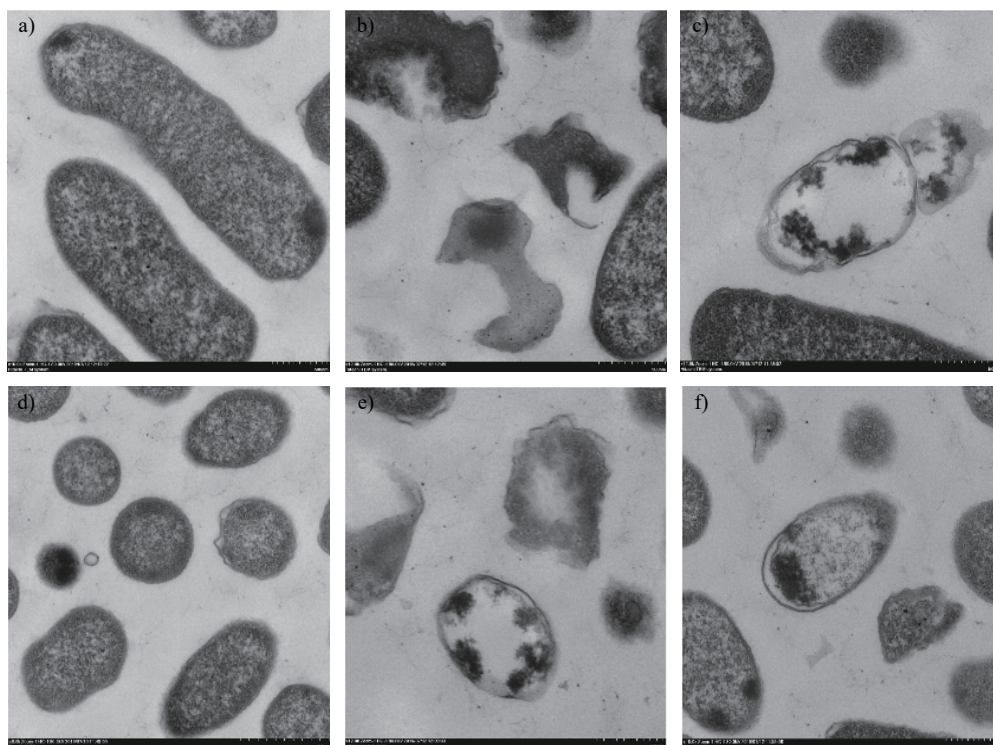
2.6 抑菌效果的电镜观察

透射电镜观察(图7)发现:对照组的菌体完整,外观饱满圆润,表面光滑平直,未见菌体细胞膜穿破皱缩以及内容物外泄的现象;试验组的菌体出现了明显的皱缩且伴有细胞壁表面凹陷及

内容物外泄等明显症状。说明2种重组蛋白都能破坏大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌体的完整性,从而直观地表现出其具有明显的杀菌效果。

2.7 重组蛋白溶血试验

由图8、9可知:重组AvBD6和AvBD9在50、150和300 mg/L下均未引起鸡红细胞破裂溶解的现象,而阴性对照组出现明显的红细胞溶解现象,说明2种重组蛋白的溶血活性极低。

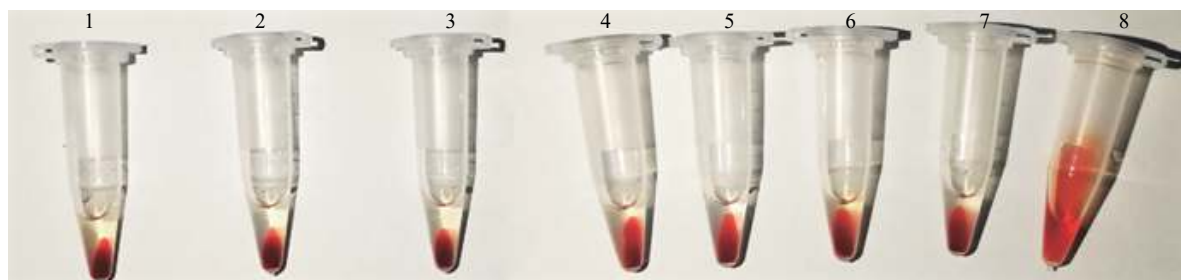


注: a) 对照组大肠杆菌菌体形态; b) AvBD6 与大肠杆菌共培养后的菌体形态; c) AvBD9 与大肠杆菌共培养后的菌体形态; d) 对照组金黄色葡萄球菌菌体形态; e) AvBD6 与金黄色葡萄球菌共培养后的菌体形态; f) AvBD9 与金黄色葡萄球菌共培养后的菌体形态。

Note: a) morphology of *E. coli* in control group; b) morphology of *E. coli* after co-culture of AvBD6; c) morphology of *E. coli* after co-culture of AvBD9; d) morphology of *S. aureus* in control group; e) morphology of *S. aureus* after co-culture of AvBD6; f) morphology of *S. aureus* after co-culture of AvBD9.

图7 透射电镜观察抑菌结果

Fig. 7 Transmission electron microscope observation of the bacteriostasis



注: 1~3. AvBD6 50、150 和 300 mg/L; 4~6. AvBD9 50、150 和 300 mg/L; 7. 0.9% 生理盐水; 8. Triton-100。

Note: 1-3. AvBD6 50, 150, 300 mg/L; 4-6. AvBD9 50, 150, 300 mg/L; 7. normal saline (0.9% NaCl); 8. Triton-100.

图8 重组蛋白溶血试验结果

Fig. 8 Results of the recombinant protein hemolysis test

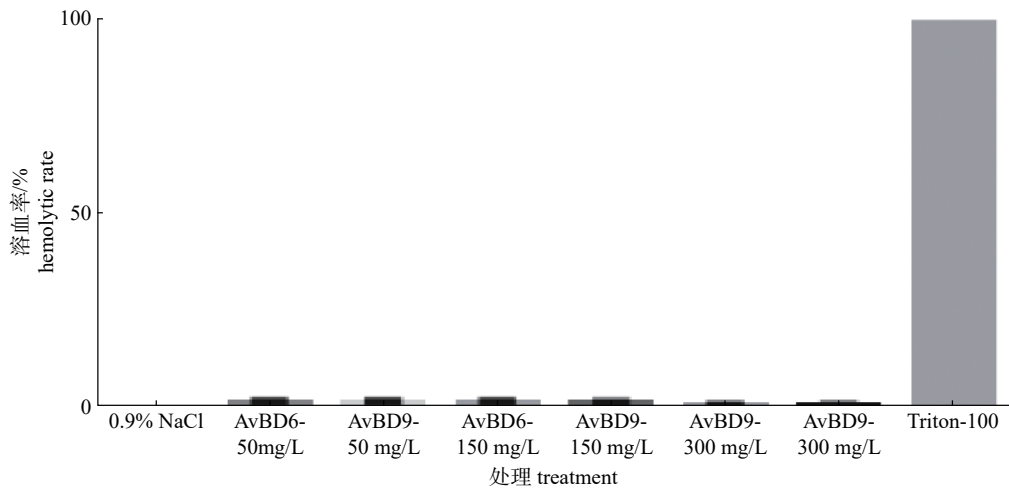


图 9 重组蛋白溶血活性
Fig. 9 Hemolytic activity of recombinant protein

3 讨论

禽 β-防御素在体内分布广泛，是鸡体抵御外界病原微生物入侵的第一道屏障，在机体的先天免疫防御系统中发挥着十分重要的作用^[9-11]。随着养禽业中抗生素的滥用，导致病菌耐药性增加，人们开始迫切的寻求一种新的有效的绿色抗生素替代品。禽 β-防御素因其自身具有广谱抑菌、抗病毒、不易产生耐药、参与机体重要的免疫调节和无毒副作用等众多优势使其有望成为一种新型高效的绿色添加剂。研究表明：禽 β-防御素具有很强的杀菌活性^[12-13]，然而防御素分子质量很小，且在机体内含量非常少，分离提纯困难，因此化学合成和基因工程技术成为主要获得手段^[14]。但化学合成成本高，不利于大量生产，所以基因工程方法相较而言更具有优势。目前已经有很多禽 β-防御素通过原核表达系统大量表达的研究^[15-17]。韩宗玺等^[18]对 *AvBD6* 进行诱导表达，但大部分重组蛋白存在于包涵体中；许兰娇等^[7]和冯培祥等^[19]分别对 *AvBD9* 的研究也发现其主要表达于包涵体中，本研究的 *AvBD6* 和 *AvBD9* 均在上清表达，比前人研究更具优势。

本研究按照大肠杆菌密码子偏好性，对 *AvBD6* 和 *AvBD9* 成熟肽基因序列进行了优化，后续采用原核表达载体 pGEX-6P-1 对禽 *AvBD6* 和 *AvBD9* 进行重组表达。由于防御素对宿主菌具有毒害作用，故本研究选择 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞为其宿主菌株。BL21(DE3)pLysS 感受态细胞携带 pLysS 质粒，pLysS 含有表达 T7

溶菌酶的基因，可以更为严谨控制 T7 聚合酶的表达。T7 溶菌酶可以作用于大肠杆菌细胞壁上的肽聚糖溶解大肠杆菌，降低 T7 启动子后面的目的基因的表达背景，但是不影响 IPTG 诱导产生的蛋白表达水平，适合表达毒性蛋白。由于受宿主菌的影响，温度对于目的蛋白的表达具有重要影响^[20]，摸索温度条件后采用低温、低转速和低浓度的 IPTG 对 2 种重组蛋白诱导；其中，*AvBD6* 在上清液具有一定的表达，*AvBD9* 全部表达于上清液中。后续抑菌试验证明 2 种重组蛋白对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都具有良好的抑菌效果，重组蛋白 *AvBD6* 和 *AvBD9* 对指示菌大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌质量浓度均分别为 150.0 和 75.0 mg/L。本研究在透射电镜下可直观地看到大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌体被重组蛋白破坏，更加佐证了防御素的杀菌效果，但其杀菌机理还有待后续研究。

当前养殖业面临的抗生素滥用问题突出，不仅导致耐药菌产生，而且畜产品抗生素的残留会经过食物链影响人类的生命健康。鉴于此，动物性食品安全是事关公共健康的重大问题，减少抗生素使用，降低畜禽药物残留有利于提高食品安全水平。自 2020 年起，中国正式开始全面实行“禁抗、限抗、无抗”政策，因此，寻求绿色有效的抗生素替代品，已成为目前畜禽生产经营者和科学研究工作者共同关注的热点问题。本研究结果为抗生素替代的研究提供了数据支撑，为防御素的抗菌机理研究和绿色健康养殖的拓展奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 李民欢. 鸡AvBD7成熟肽在大肠杆菌中的表达及抗菌活性分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- [2] MEADE K G, O'FARRELLY C. β -defensins: farming the microbiome for homeostasis and health[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 3072. DOI: [10.3389/fimmu.2018.03072](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03072).
- [3] PATIL A A, CAI Y, SANG Y, et al. Cross-species analysis of the mammalian β -defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract[J]. *Physiological Genomics*, 2005, 23(1): 5. DOI: [10.1152/physiolgenomics.00104.2005](https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00104.2005).
- [4] XIAO Y J, HUGHES A L, 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. DOI: [10.1186/1471-2164-5-56](https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-56).
- [5] YANG M, ZHANG C Y, ZHANG M Z, et al. Beta-defensin derived cationic antimicrobial peptides with potent killing activity against gram negative and gram positive bacteria[J]. *BMC Microbiology*, 2018, 18: 54. DOI: [10.1186/s12866-018-1190-z](https://doi.org/10.1186/s12866-018-1190-z).
- [6] YANG M, ZHANG C Y, ZHANG M Z, et al. Novel synthetic analogues of avian β -defensin-12: the role of charge, hydrophobicity, and disulfide bridges in biological functions[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17: 43. DOI: [10.1186/s12866-017-0959-9](https://doi.org/10.1186/s12866-017-0959-9).
- [7] 许兰娇, 洪智敏, 司微, 等. 鸡 β -防御素-9的融合表达及其多克隆抗体的制备与鉴定[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(3): 603. DOI: [10.3969/j.issn.1006-267x.2013.03.019](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-267x.2013.03.019).
- [8] 张永正. 鸡AvBD9毕赤酵母组成型高效表达及其条件优化[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- [9] 王秋玲, 徐倩倩, 张婷婷, 等. 重组鹅 β -防御素12蛋白的原核表达及生物学特性[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(9): 1973. DOI: [10.13344/j.microbiol.china.150885](https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.150885).
- [10] HARMON B G. Avian heterophils in inflammation and disease resistance[J]. *Poultry Science*, 1998, 77(7): 972. DOI: [10.1093/ps/77.7.972](https://doi.org/10.1093/ps/77.7.972).
- [11] CADWELL K, NIRANJANI S S, ARMSTRONG V L, et al. AvBD1 nucleotide polymorphisms, peptide antimicrobial activities and microbial colonisation of the broiler chicken gut[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 637. DOI: [10.1186/s12864-017-4034-6](https://doi.org/10.1186/s12864-017-4034-6).
- [12] 付连军, 莫索, 贺元欣, 等. 鸡 β -防御素Gal-3在大肠杆菌中的诱导表达[J]. *西北农业学报*, 2013, 22(3): 11. DOI: [10.7606/j.issn.1004-1389.2013.03.003](https://doi.org/10.7606/j.issn.1004-1389.2013.03.003).
- [13] TU J, QI K Z, XUE T, et al. Construction of recombinant *Pichia pastoris* carrying a constitutive AvBD9 gene and analysis of its activity[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 25(12): 2082. DOI: [10.4014/jmb.1506.06056](https://doi.org/10.4014/jmb.1506.06056).
- [14] 马得莹, 张婷婷, 徐杨, 等. 重组鸡 β -防御素2蛋白的表达与生物学活性鉴定[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(8): 56. DOI: [10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2015.08.010](https://doi.org/10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2015.08.010).
- [15] MA D Y, WANG R Q, LIAO W Y, 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. DOI: [10.1007/s12275-009-0068-z](https://doi.org/10.1007/s12275-009-0068-z).
- [16] WANG R Q, MA D Y, LIN L J, et al. Identification and characterization of an avian β -defensin orthologue, avian β -defensin 9, from quails[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2010, 87(4): 1395. DOI: [10.1007/s00253-010-2591-6](https://doi.org/10.1007/s00253-010-2591-6).
- [17] MA D Y, ZHOU C Y, ZHANG M Y, 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 & Infectious Diseases*, 2012, 35(2): 197. DOI: [10.1016/j.cimid.2012.01.006](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.01.006).
- [18] 韩宗玺, 廖文艳, 王瑞琴, 等. 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.
- [19] 冯培祥, 朱梅胜, 杨莉, 等. 鸡 β -防御素Gal-9 cDNA的克隆、表达及其抑菌活性的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(6): 997. DOI: [10.11843/j.issn.0366-6964.2014.06.019](https://doi.org/10.11843/j.issn.0366-6964.2014.06.019).
- [20] MATSUMOTO T, TAKAHASHI S, UEDA M, et al. Preparation of high activity yeast whole cell biocatalysts by optimization of intracellular production of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 17(3/4/5): 143. DOI: [10.1016/S1381-1177\(02\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00021-8).

责任编辑: 何馨成