

重组鸡抗菌肽 Gallinacin-9 的原核表达 及其抗菌活性的鉴定

韩宗玺², 马得莹^{1*}, 刘胜旺², 李一经³

(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生物技术
国家重点实验室禽传染病研究室, 哈尔滨 150001; 3. 东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 采用 RT-PCR 方法, 从鸡舌组织中扩增到 Gallinacin-9 (*Gal-9*) 基因, 测序表明 *Gal-9* 为 201 bp, 其成熟肽由 67 个氨基酸残基组成。进一步将克隆的 *Gal-9* 基因亚克隆到大肠杆菌原核表达载体 pGEX-6p-1 的 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切位点上, 构建重组表达质粒 pGEX-*Gal-9*, 经序列分析鉴定确证目的基因克隆入载体的预期位点。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21, 于 37 °C 诱导培养不同时间, SDS-PAGE 电泳表明该基因在大肠杆菌中高水平表达, 表达的重组鸡 *Gal-9* 融合蛋白相对分子质量约为 32 ku。重组蛋白占菌体总蛋白的 40%。表达的重组鸡 *Gal-9* 融合蛋白以包涵体的形式存在。重组蛋白经纯化后, 分别以对数生长中期的大肠杆菌 BL21 (DE3-) 株与致病性链球菌 CAB 株为检测菌, 利用薄层平皿琼脂糖孔穴扩散法测定了重组 *Gal-9* 蛋白的抗菌活性, 结果表明, 重组 *Gal-9* 对这 2 种细菌都具有抗菌活性。

关键词: Gallinacins-9; 鸡; 融合蛋白; 抗菌活性

中图分类号: S852.42; Q78

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)10-1426-06

Expression of Recombinant Gallinacin-9 from Chicken in *E. coli* and Determination of Its Antimicrobial Activity

HAN Zong-xi², MA De-ying^{1*}, LIU Sheng-wang², LI Yi-jing³

(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; 3. College of Animal Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Gallinacin (*Gal*) -9 was cloned from tongue of chicks by RT-PCR and sequenced. The full length cDNA of *Gal-9* consists of 201 bp, encoding 67 amino acids. The cDNA of chicken *Gal-9* gene was sub-cloned into *EcoR* I and *Sal* I sites of pGEX-6p-1 vector to construct recombinant plasmid pGEX-*Gal-9*. The recombinant plasmid was transfected into *E. coli* BL21 and the transformed bacteria was induced with IPTG. It was demonstrated by SDS-PAGE that a 32 kDa protein which was equal to chicken *Gal-9* protein in molecular weight was expressed in *E. coli* BL21. The recombinant fusion protein was purified. The recombinant *Gal-9* was expressed as inclusion bodies. The recombinant *Gal-9* exhibit expected anti-*E. coli* and anti-Pathogenic streptococcus activity, as measured by inhibition zone assaying.

Key words: Gallinacins-9; chick; fusion protein; antibacterial activity

收稿日期: 2007-09-05

基金项目: 国家自然科学基金(30600435); NOVUS 国际科研基金; 黑龙江省教育厅重点项目(1153LZ05)

作者简介: 韩宗玺(1978-), 男, 甘肃古浪人, 硕士, 主要从事动物病毒分子生物学及分子免疫学研究

* 通讯作者: 马得莹(1971-), 女, 副教授, 博士, 从事动物营养与分子免疫学方面的研究, Tel: 0451-55190862, E-mail: mdy296@yahoo.cn

多年来,饲用抗生素被广泛用于降低畜禽发病率和维持健康^[1]。然而,长期使用抗生素,尤其是人用抗生素会导致抗生素在畜产品中残留及细菌耐药性的产生,威胁人类健康^[2-3]。另外,抗生素的长期使用还会导致畜产品风味变差,而养殖业的发展在很大程度上依赖畜产品品质。因此,生产者迫切需要一种既有效又有利于环保的新方法来控制畜禽疾病、改善畜产品品质。抗菌肽(Antibacterial peptides)也称为肽类抗生素(Peptide antibiotics)或天然抗生素(Natural antibiotics),是生物体产生的一类具有广谱抗菌活性的小分子多肽。抗菌肽在自然界分布极为广泛,存在于细菌、植物、脊椎和无脊椎动物中,是天然免疫的重要效应分子^[4-5]。由于抗菌肽为机体内产生的天然成分,具有广谱抗菌、抗病毒和免疫增强作用,并且对机体无毒害、无残留^[4],因此,有望成为新的饲用添加剂服务于畜牧养殖业。然而,由于天然抗菌肽分子量小,在机体内含量很少,分离提纯困难,故天然产量非常有限。化学合成与基因工程为获得抗菌肽的主要手段。由于化学合成抗菌肽成本太高,因此,通过基因工程的方法在特定宿主内大量表达抗菌肽不失为一条有效的途径。

禽抗菌肽属 β -防御素类,为防御素三大亚类(α 、 β 与 θ)之一,为禽先天性免疫的重要组成部分,在禽的防御系统中发挥重要作用^[6]。至今,已从鸡、火鸡、鸵鸟和企鹅等体内分离到 20 余种禽 β -防御素^[7-14]。根据 Lynn 等^[9]的报道,在已发现的 12 种鸡 β -防御素(Gallinacin-1~Gallinacin-12)(Gal-1~Gal-12)中,Gal-9 成熟肽由 67 个氨基酸残基组成。其 cDNA 片段为 201 bp。本研究根据 Lynn 等^[9]的报道,采用 RT-PCR 法,从鸡舌组织中克隆到 Gal-9 基因,并在此基础上进行了原核表达和表达产物的活性鉴定。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

21 日龄 SPF 鸡,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 载体与受体菌

质粒载体 pMD18-T 为宝生物(大连)有限公司产品;受体菌为 JM83,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所生物技术国家重点实验室保存。原核表达载体 pGEX-6p-1 为 Gibco 公司产品。

1.3 工具酶与主要试剂

限制性核酸内切酶、M-MLV 鼠源反转录酶、TaqDNA 聚合酶、T₄DNA 连接酶、RNA 提取 Trizol 试剂盒均为 Gibco 公司产品;限制性内切酶 EcoR I、Sal I,Marker(DL-2000)和 IPTG 为宝生物工程(大连)有限公司产品;凝胶回收试剂盒为上海生物工程责任有限公司产品;GST Resin 蛋白纯化试剂盒为 Novagen 公司产品。其他相关试剂均为国产分析纯。

1.4 引物

根据 Lynn 等^[9]已发表的鸡 Gal-9 cDNA 基因序列设计引物:上游引物 5'-ATGCAGATCCTGCCTCTCCTCTTTGCT-3';下游引物 5'-TCAGGAATACCATCGGCTCCGGCAGCAGAA-3',引物由上海生物工程有限公司合成。

1.5 RT-PCR

1.5.1 鸡舌组织总 RNA 提取 取鸡舌组织约 0.1 g,按 Trizol 试剂盒说明方法提取总 RNA。

1.5.2 cDNA 的合成 取上述总 RNA 20 μ L,加 3 μ L Oligo dT 和 3 μ L dNTPs,进行常规反转录反应。

1.5.3 PCR 扩增 PCR 扩增体系按 TaKaRa Ex TaqTM酶使用说明进行,总反应体系为 25 μ L。反应热循环参数:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 25 个循环;于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增结束后取 4 μ L PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶中进行初步电泳鉴定,观察结果。然后按照 DNA 片段纯化/回收试剂盒说明书分别进行电泳、纯化、回收。

1.6 克隆与测序

将回收产物与 pMD18-T 载体进行连接,再将连接产物转化 JM83 株 *E. coli* 感受态细胞,以 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)和异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)作底物,挑取阳性白色菌落于 Amp⁺的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇菌培养过夜,用碱裂解法^[15]小量提取质粒。

将 RNA 酶消化后的质粒进行 PCR 扩增反应,电泳观察结果,将鉴定为阳性的质粒委托上海生物工程有限公司测序。

1.7 原核表达载体的构建与表达

1.7.1 原核表达重组质粒 pMD18-T-Gal-9 的制备

根据对表达载体 pGEX-6p-1 与重组子 pMD18-T-Gal-9 酶切位点分析,设计 1 对 Gal-9 表达引物,上游引物:5'-GGATCCCCGGAATTCATGCAGA-

TCCTGCCTCTC-3';下游引物:5'-TCAGGAAT-ACCATCGGCTCCGGCAGCAGAA-3',其中将 *EcoR* I 酶切位点引入到上游引物。以重组克隆 pMD18-T-Gal-9 质粒为模板,进行 PCR 扩增,扩增结束后取 4 μ L 产物在 2% 琼脂糖凝胶中进行初步电泳鉴定,观察结果。然后分别进行电泳、纯化、回收。将回收产物亚克隆于 pMD18-T 载体,质粒的鉴定与测序同前。

1.7.2 原核表达载体的构建与测序 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切上述重组质粒,将鸡 *Gal-9* 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 Amp⁺ 琼脂平板上筛选阳性克隆。小量法提取质粒进行酶切和 PCR 鉴定后委托上海生物工程有限公司进行序列测定,阳性质粒命名为 pGEX-Gal-9。

1.7.3 重组鸡 Gal-9 融合蛋白的诱导表达 将阳性重组质粒 pGEX-Gal-9 转化大肠杆菌 BL21,挑取单个菌落在 LB (Amp⁺) 培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养。待 OD_{590 nm} 值达到 0.3~0.5 时加入 IPTG (终浓度为 0.6 mmol/L) 进行诱导。分别在诱导后 2、3、4、6 h 取菌样。将不同时间段收集的菌样于 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 5 min,收获细菌沉淀。在沉淀中加入 1/10 菌液体积的 1 \times SDS 凝胶上样缓冲液,煮沸 5 min,冰浴 2 min。

1.7.4 SDS-PAGE 电泳 将加入缓冲液处理过的样品进行 SDS-PAGE 电泳(积层胶浓度为 5%,分离胶为 12%)。电泳后,经考马斯亮蓝染色,甲醇-冰乙酸脱色液脱色观察结果。通过薄层扫描,确定蛋白质的表达量。

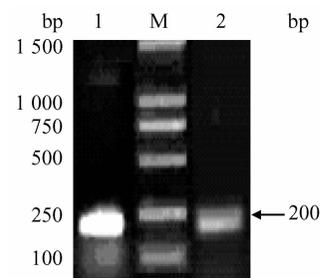
1.7.5 融合蛋白的纯化 采用 Novagen 蛋白质纯化试剂盒,按照试剂盒说明书进行操作。

1.7.6 重组鸡 Gal-9 融合蛋白的活性鉴定 分别取保存的大肠杆菌 BL21(DE3-) 株与致病性链球菌 CAB 株接种于 5 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床过夜培养。分别取 0.5 mL 培养液接种于新鲜的 5 mL LB 中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养至对数生长期。分别取 200 μ L 细菌培养液,涂于 2 个 LB 琼脂平板,放置片刻。待菌液稍干后,用直径 3 mm 的灭菌打孔器打孔若干个,分别在孔中加入 50 μ L PBS(作对照)和 50 μ L 纯化蛋白。将平板置 37 $^{\circ}$ C 培养 1 h 后,倒置继续培养 18 h,观察抑菌效果。

2 结果

2.1 鸡 Gal-9 基因的 RT-PCR 扩增、克隆与测序

取鸡舌组织,提取组织细胞总 RNA,用鸡 *Gal-9* 基因特异引物,采用 RT-PCR 技术扩增得到约 200 bp 的核酸片段,将该片段克隆到 pMD18-T 载体后经 PCR 扩增鉴定,得到了与预期大小(约 201 bp)一致的片段(图 1)。用末端双脱氧链终止法对鉴定为阳性的 *Gal-9* 质粒进行核苷酸测序,得到鸡的 *Gal-9* cDNA 及其推导的氨基酸序列,该 cDNA 由 201 个碱基组成,其成熟肽由 67 个氨基酸残基组成,与已发表的序列一致(GenBank No. AY534897)^[9]。



1. PCR of recombinant plasmid; 2. RT-PCR of *Gal-9*; M. DL2000 marker

图 1 鸡 *Gal-9* 基因 RT-PCR 产物电泳分析与重组质粒的 PCR 鉴定

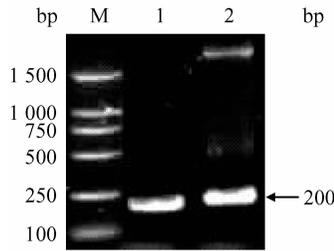
Fig. 1 Electrophoretic analysis of *Gal-9* RT-PCR and products identification of recombinant plasmid

2.2 重组表达质粒的构建与鉴定

取已克隆到 pMD18-T 载体的 *Gal-9* 基因重组质粒,用重新设计的表达用引物进行 PCR 扩增,得到的产物经 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,可见一条约 200 bp 的特异性 DNA 片段,与理论设计相符(图 2)。将 *Gal-9* 亚克隆获得的疑似阳性重组质粒经 *EcoR* I/*Sal* I 双酶切及 PCR 扩增,以 2% 琼脂糖凝胶电泳显示,扩增产物及酶切插入片段长约 200 bp,均符合目的基因相对分子质量。重组质粒测序结果表明编码 *Gal-9* 成熟蛋白基因正确地插入到原核表达载体的目的位点。

2.3 重组鸡 Gal-9 蛋白的表达与纯化

SDS-PAGE 结果显示,诱导培养后的菌体蛋白与未诱导的对照菌相比较,有一条非常明显的表达蛋白条带。诱导后 2~6 h 表达量无明显差异。参



1. PCR product of recombinant plasmid pGEX-Gal-9; 2. Product of restriction enzyme digestion by *EcoRI* and *SalI*; M. DL2000 marker

图 2 鸡 Gal-9 质粒 PCR 与质粒酶切的鉴定产物电泳分析

Fig. 2 Electrophoretic analysis of Gal-9 plasmid PCR and enzyme digestion products

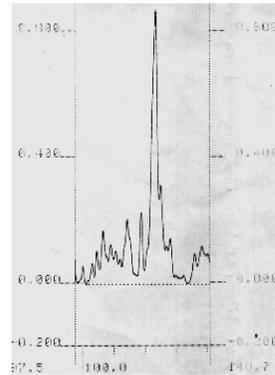
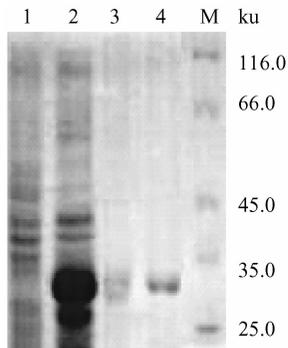


图 4 Gal-9 表达产物 SDS-PAGE 薄层灰度扫描

Fig. 4 Thin layer scanning profiles of the Gal-9 expressed product separated on SDS-PAGE

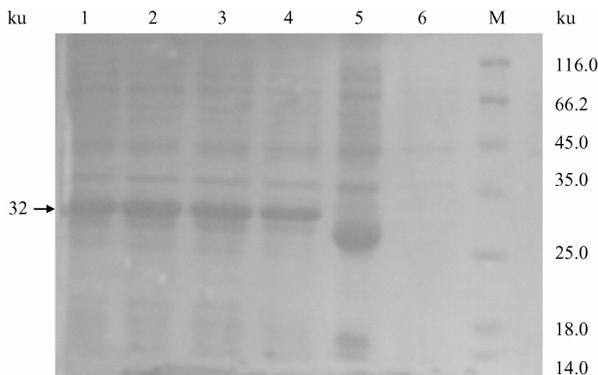
照相对分子质量标准,该融合蛋白约 32 ku(图 3)。凝胶薄层灰度扫描分析显示,表达的融合蛋白约占总菌体蛋白的 40%(图 4)。将诱导的菌体细胞离心、裂解后,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,如图 5 所示,大部分 Gal-9 蛋白在沉淀中,表明表达的重组 Gal-9 在 *E. coli* BL21 中以包涵体的形式存在。沉淀经溶解、亲和层析纯化融合蛋白后,SDS-PAGE 检测,结果可见约 32 ku 的蛋白带,与预期蛋白相符。



M. Protein maker; 1. Control; 2. Inclusion bodies; 3. Supernatant product; 4. Purified protein of Gal-9

图 5 表达产物的纯化

Fig. 5 Purification of expression products



M. Protein marker; 1-4. Total protein of BL21 containing Gal-9 on 2, 3, 4, 6 h after induction with IPTG, respectively; 5. pGEX; 6. Control

图 3 重组 Gal-9 融合蛋白的表达

Fig. 3 Expression of recombinant Gal-9

2.4 重组鸡 Gal-9 蛋白抗菌活性的测定

分别以对数生长中期的大肠杆菌 BL21(DE3-)株与致病性链球菌 CAB 株为检测菌,利用薄层琼脂糖孔穴扩散法测定了重组 Gal-9 蛋白的抗菌活性,加入重组蛋白的孔均出现明显的抑菌环(图 6),

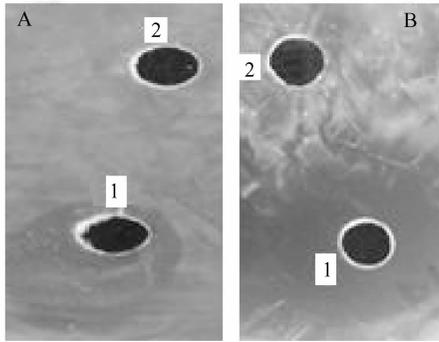
对照孔周围的细菌生长未受抑制,表明重组 Gal-9 对这两种细菌都具有抗菌活性。

3 讨论

研究表明,抗菌肽除了具有广谱的抗菌活性外,同时还有高效的抗真菌、病毒、原虫和抗肿瘤活性^[6]。因此,这类抗菌物质显示了在医学和农业上潜在的研究和应用价值。由于禽嗜性细胞中缺乏氧化机制^[16],因此,禽 β -防御素在禽类的先天性免疫中发挥重要作用。开展禽抗菌肽的研究具有重要意义。

3.1 Gal-9 基因的扩增

本试验根据 Lynn 等^[9]的报道,设计特异性引



1. Recombinant Gal-9; 2. Control (PBS)

图6 重组 Gal-9 蛋白对大肠杆菌(A)和致病性链球菌(B)的抗菌活性

Fig. 6 The antimicrobial activity of recombinant Gal-9 against *Escherichia coli* strain(A) and *Pathogenic streptococcus* (B)

物,从鸡舌组织中扩增出 Gal-9 基因, Gal-9 基因由 201 个碱基组成,与 Lynn 等的报道一致。已知,禽抗菌肽属 β -防御素类。其主要分子特征为含有由 6 个半胱氨酸残基组成的 3 个二硫键。分子中氨基酸残基数量为 60~100 个。Evans 等于 1994 年从鸡和火鸡的嗜性白细胞中分别分离到 2 个鸡嗜性多肽(CHP-1 和 CHP-2)和 3 个火鸡嗜性多肽(THP-1、THP-2 和 THP-3)^[7]。同年,Harwig 等^[12]在鸡白细胞发现另外 4 种抗菌肽,并命名为 gallinacins,分别为 Gal-1、Gal-2、Gal-3 和 Gal-1 α 。根据其分子特征,将其归为 β -防御素类。在其后的 20 多年中,人们陆续从鸡、火鸡、鸵鸟和企鹅等体内分离到约 14 种新的 β -防御素。它们分别是 10 个鸡 β -防御素: Gal-4、Gal-5、Gal-6、Gal-7、Gal-8、Gal-9、Gal-10、Gal-11、Gal-12 和 LEAP-2; 1 个火鸡 β -防御素: Gallopavin(GPV-1); 1 个鸵鸟 β -防御素: Ostricacin-1(OSP-1); 2 个企鹅 β -防御素: Sphenicins(Sphe)-1 和 Sphe-2^[8-14]。

3.2 抗菌肽的原核表达

本研究采用 GST 基因融合表达系统表达 Gal-9,获得了理想的表达效果,诱导蛋白表达量占细胞总蛋白的 40%,并且大部分以包涵体的形式存在。以包涵体的形式存在不仅能保护目的蛋白免受蛋白酶降解,同时,由于以无活性的包涵体形式存在,不会影响宿主菌的生长。由于抗菌肽天然产量低,对于较短的基因,化学合成是较为常用的手段,它对设计序列的忠实性避免了常用的 PCR 方法由于错误

配对带来的不便。但化学合成由于成本和技术的限制,合成的长度有一定的限制,并且多为线性的,不具备复杂的二级结构。因此,利用基因工程技术生产抗菌肽具有广阔的前景。多年来,已进行了大量关于基因工程表达重组抗菌肽的探索,但由于抗菌肽对宿主菌 *E. coli* 有很强的杀伤力,因而不能在 *E. coli* 中直接表达。抗菌肽在原核表达多采用融合蛋白方式,表达后再对产物进行裂解纯化,得到有抗菌活性的表达产物。本研究采用的表达方法有效地克服了抗菌肽原核表达中存在的困难,提高了重组抗菌肽的活性与纯化效果。

3.3 禽 β -防御素的抗菌活性

本研究选用大肠杆菌与致病性链球菌为检测菌,利用薄层平皿琼脂糖孔穴扩散法测定了重组 Gal-9 的抗菌活性,结果表明,重组 Gal-9 对这 2 种细菌都具有抗菌活性。由此可见,鸡内源性抗菌肽—— β -防御素对革兰氏阳性和阴性菌均有不同程度的抗菌活性。许多研究表明,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。Brune 等^[17]发现,鸡嗜性细胞能抑制大肠杆菌、白色葡萄球菌、白色念球菌和粘质沙雷菌的生长。随后研究发现,至少有 3 种抗菌肽参与上述抗菌作用。近几年研究发现,许多禽 β -防御素对革兰氏阳性菌(如枯草芽孢杆菌)以及革兰氏阴性菌(如白色念球菌)有抗菌作用^[7-8,10-13]。Evans 等^[7]研究发现, Gal-1、Gal-2、THP-1 和 THP-3 在体外都能杀灭白色假死酵母、肠炎沙门氏菌和空肠弯曲杆菌,但是对多杀性巴斯德氏菌无杀灭作用;除了 THP-3,其它 3 种 β -防御素都能杀灭禽博德特氏菌、大肠埃希氏菌和鼠伤寒沙门氏菌。因此,推测 THP-3 跟其他防御素的抗菌差异是因为 THP-3 与其它 3 个防御素同源性低。这 4 种防御素都不能杀灭鸡传染性支气管炎病毒,这可能由于这 4 种防御素无法中和这种包膜病毒,也可能是作用环境中存在有高浓度的离子,抑制了防御素作用的发挥。综合本研究与上述研究结果,鸡内源性抗菌肽,对革兰氏阳性和阴性菌均有不同程度的抗菌活性。

关于重组鸡 Gal-9 蛋白的原核表达及其体外抗菌活性的研究尚未见报道,本研究结果为今后开发全新高效抗生素类药物和禽类饲料添加剂提供了理论基础。本研究结果表明,禽防御素在预防和治疗细菌感染中具有潜在的应用价值,值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] DONOGHUE D J. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? [J]. *Poult Sci*, 2003, 82:618-621.
- [2] PESCHEL A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? [J]. *Trends Microbiol*, 2002, 10: 179-186.
- [3] ROE M T, PILLAI S D. Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria[J]. *Poult Sci*, 2003, 82:622-626.
- [4] KAGAN B L, SELSTED M E, GANZ T, et al. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 210-214.
- [5] SATCHELL D P, SHEYNIS Y, 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]. *J Bio Chem*, 2003, 278: 13 838-13 846.
- [6] SUGIARTO H, YU P L. Avian antimicrobial peptides: the defense role of β -defensins [J]. *BBRC*, 2004, 323:721-727.
- [7] EVANS E W, BEACH G G, WUNDERLICH J. Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils[J]. *J Leukoc Biol*, 1994, 56(5):661-665.
- [8] EVANS E W, BEACH K M, MOORE M W. Antimicrobial activity of chicken and turkey heterophil peptides CHP1, CHP2, THP1, and THP3[J]. *Vet Microbiol*, 1995, 47:295-303.
- [9] LYNN D J, HIGGS R, GAINES S. Bioinformatic discovery and initial characterisation of nine novel antimicrobial peptide genes in the chicken [J]. *Immunogenetics*, 2004, 56(3):170-177.
- [10] THOUZEAU C, LE MAHO Y, FROGET G. Sphenicins, avain β -defensins in preserved stomach contents of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus*[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:51 053-51 058.
- [11] YU P L, CHOUDHURY S D, AHRENS K. Purification and characterization of the antimicrobial peptide, ostricacin[J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23:207-210.
- [12] HARWIG S S L, SWIDEREK K M, KOKRYAKOV V N. Gallinacins-cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes[J]. *FEBS Letters*, 1994, 342: 218-285.
- [13] HIGGS R, LYNN D J, GAINES S. The synthetic form of a novel chicken beta-defensin identified in silico is predominantly active against intestinal pathogens [J]. *Immunogenetics*, 2005, 57(1-2): 90-98.
- [14] 张辉华,毕英佐,曹永长,等.鸡 β -防御素-1 cDNA 的克隆及在毕赤酵母中的表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(8):767-772.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等.分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德译. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1992:19-22.
- [16] HARMON B G. Avian heterophils in flammation and disease resistance [J]. *Poult Sci*, 1998, 77:972-977.
- [17] BRUNE K, LEFFELL M S, SPITZNAGEL J K. Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophile leukocyte [J]. *Infect Immun*, 1972, 5:283-287.