

# 鸡 $\beta$ -防御素 Gal-9 cDNA 的克隆、表达及其抑菌活性的研究

冯培祥<sup>1</sup>, 朱梅胜<sup>1</sup>, 杨莉<sup>1</sup>, 檀学进<sup>2</sup>, 潘福星<sup>1</sup>, 齐娟<sup>3</sup>, 郭妍妍<sup>3</sup>, 张毅<sup>4</sup>, 尹燕博<sup>1,3\*</sup>

(1. 青岛农业大学 动物科技学院, 青岛 266109; 2. 青岛市畜牧兽医研究所, 青岛 266100;

3. 青岛澳兰百特生物工程有限公司, 青岛 266101; 4. 中国动物卫生与流行病学中心, 青岛 266032)

**摘要:** 旨在克隆鸡  $\beta$ -防御素 Gal-9 基因, 对其预测的成熟肽基因进行原核表达, 并对产物进行抑菌活性的检测。根据 GenBank 发表的鸡  $\beta$ -防御素基因 Gal-9(NM\_001001611.2) 设计引物, 采用 RT-PCR 方法从鸡食道中扩增得到鸡  $\beta$ -防御素 Gal-9 基因, 将该成熟肽基因克隆到原核表达载体 pET-32a(+), 于 EcoR I / Xho I 双酶切位点上, 构建重组原核表达质粒 pET-32a-Gal-9。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 于 37 °C 进行诱导表达。结果扩增出 Gal-9, 其 cDNA 为 204 bp, 成熟肽编码 42 个氨基酸。SDS-PAGE 电泳表明, 重组鸡 Gal-9 蛋白大小约为 25 ku, 与预期大小一致, 重组蛋白主要以包涵体形式存在。重组鸡 Gal-9 蛋白对金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、粪肠球菌(ATCC 29212)、大肠杆菌(ATCC 25922)、酵母菌(GS115) 都能产生抑菌作用, 最小抑菌浓度分别为 62.50、31.75、125.00、31.75 mg · L<sup>-1</sup>。成功获得了鸡  $\beta$ -防御素 Gal-9 成熟肽基因的表达产物, 证实了重组鸡 Gal-9 蛋白具有广谱的抗菌活性, 体外抑菌试验为其在家禽生产中应用提供了理论基础。

**关键词:** 鸡;  $\beta$ -防御素; Gal-9; 重组蛋白表达; 抑菌活性

中图分类号: S852.42

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)06-0997-07

## cDNA Cloning, Expression and Antibacterial Activity Analysis of Chicken $\beta$ -defensin Gal-9

FENG Pei-xiang<sup>1</sup>, ZHU Mei-sheng<sup>1</sup>, YANG Li<sup>1</sup>, TAN Xue-jin<sup>2</sup>, PAN Fu-xing<sup>1</sup>,

QI Juan<sup>3</sup>, GUO Yan-yan<sup>3</sup>, ZHANG Yi<sup>4</sup>, YIN Yan-bo<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Qingdao 266100, China; 3. Qingdao Oland-Better Bioengineering Co., Ltd, Qingdao 266101, China; 4. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China)

**Abstract:** The aim of this study was to clone and express the chicken  $\beta$ -defensin Gal-9 gene, and detect the antibacterial activity of the expressed product. The Gal-9 gene was amplified from chicken's esophagus by RT-PCR, with primers based on the chicken Gal-9 (NM\_001001611.2) sequence in GeneBank, then it was cloned into pET-32a(+) vector using the restriction sites of EcoR I / Xho I. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and induced at 37 °C. The length of Gal-9 cDNA was 204 bp, and encoding 42 amino acid mature peptide. The product was confirmed to be about 25 kD in size by SDS-PAGE. It was mainly expressed in the form of inclusion body. The recombinant chicken Gal-9 protein showed bacteriostatic action on *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), and yeast (GS115). The minimum inhibitory concentration was 62.50, 31.75,

收稿日期: 2013-11-20

基金项目: “十二五”农村领域国家高技术研究发展计划(863)项目(2012AA101303); 山东省现代农业产业技术体系家禽创新团队项目(SDAIT-13-011-03)

作者简介: 冯培祥(1988-), 男, 汉族, 山东胶南人, 硕士生, 主要从事生物制品学及动物传染病学研究, E-mail: fpx198@163.com

\* 通信作者: 尹燕博, 教授, 博士, E-mail: yanboyin2011@163.com

125.00, 31.75 mg · L<sup>-1</sup>. The results presented here demonstrate that the *Gal-9* mature peptide gene, chicken  $\beta$ -defensin, was successfully expressed. The expressed protein showed broad-spectrum antimicrobial activity, which indicated the recombinant chicken *Gal-9* protein could be potentially used for prevention and treatment.

**Key words:** chicken;  $\beta$ -defensins; *Gal-9*; recombinant protein expression; antibacterial activity

防御素是一类极为重要的内源性抗菌肽,其不仅是宿主免疫系统的重要组成部分,而且具有广谱的抗菌活性。防御素能有效灭杀细菌、真菌以及病毒(如 HIV 病毒)等病原微生物<sup>[1-2]</sup>。根据空间结构差异,防御素可分为  $\alpha$ -防御素、 $\beta$ -防御素和  $\theta$ -防御素 3 类<sup>[3-4]</sup>。其中在鸡体内,相应基因共编码 14 种防御素,都属于  $\beta$ -防御素家族,依次被命名为 *Gal-1*~*Gal-14*。大量研究证实,鸡  $\beta$ -防御素对革兰阳性菌、革兰阴性菌和真菌都有抑制和杀伤作用<sup>[5-8]</sup>。禽  $\beta$ -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<sup>[9]</sup>,其中 *Gal-9* 主要在食道和嗉囊中表达量较高<sup>[10]</sup>。当前由于在养殖业中长期应用抗生素导致的耐药性问题剧增,而鸡  $\beta$ -防御素不易使病原微生物产生耐药性,是一类具有非常良好应用前景的“抗生素替代品”<sup>[11-12]</sup>。目前除了鸡  $\beta$ -防御素 *Gal-14* 外,其余的鸡  $\beta$ -防御素基因已经通过基因工程方法获得了表达。在前人研究的基础上,作者拟从鸡食道克隆鸡  $\beta$ -防御素基因 *Gal-9*,并进行遗传进化分析,然后原核表达重组 *Gal-9* 蛋白并测定其体外抑菌活性及理化特性,为重组鸡  $\beta$ -防御素在家禽生产中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

21 日龄 SPF 白羽肉鸡,由青岛澳兰百特生物

表 1 引物序列

Table 1 The Primers sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	片段长度/bp Fragment length
P1	TCCACAGCAGAGGACAATC	
P2	AACTGCGTGGTTCAGTGAGG	250
P3	CGGAATTCGCTGACACCTTAGCATGC	
P4	CCCTCGAGGGAGCTGGGTGCCCATTTG	126

### 1.5 基因克隆与序列分析

取 21 日龄鸡放血致死,取食道组织,按 TRIzol<sup>TM</sup> 试剂盒说明书方法提取总 RNA,之后按 DNA 反转录试剂鼠源反转录酶 M-MLV 说明书反转录成

工程有限公司提供。

### 1.2 菌株与载体

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株、BL21(DE3)菌株、酵母菌(GS115)由本实验室保存。粪肠球菌(ATCC 29212)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、大肠杆菌(ATCC 25922)均购自青岛绿谷商贸有限公司。pET-32a(+ )由本实验室保存。pMD19-T 载体购自大连宝生物有限公司。

### 1.3 主要试剂和仪器

各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶、Ex *Taq* DNA 聚合酶、凝胶纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、DL5000 DNA Marker、DL2000 DNA Marker 等均购于大连宝生物有限公司。TRIzol Reagent RNA 提取试剂盒、鼠源反转录酶 SuperScript TMIIRT 购自 Invitrogen 公司。Protein Refolding Kit 蛋白纯化试剂盒购自 Novagen 公司。

主要仪器包括杭州朗基 PCR 基因扩增仪(MG25+ )、北京君意垂直电泳仪(JY300C)等。

### 1.4 PCR 引物设计与合成

根据 GenBank 发表的鸡  $\beta$ -防御素基因 *Gal-9* mRNA(NM\_001001611.2)的基因序列,利用 Primer 5.0 设计引物。编码区扩增引物为 P1 和 P2,成熟肽扩增引物为 P3 和 P4,分别带有 *EcoR* I 和 *Xho* I 的酶切位点(表 1 下划线部分)。

cDNA,然后以 cDNA 为模板,用引物 P1/P2 按以下程序进行 PCR 扩增:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,30 个循环;72 °C 终延伸 8 min。结束后,PCR 产物用 2% 琼脂

糖凝胶电泳检查结果,并用胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物。纯化的目的片段与 pMD19-T 载体相连,经 PCR 鉴定后,将阳性重组质粒送往北京华大科技公司测序并命名为 pMD19-T-Gal-9。将测序得到的正确序列应用 MEGA4 软件对已知的禽  $\beta$ -防御素及部分哺乳动物  $\beta$ -防御素核苷酸序列进行同源性比较分析,并绘制进化树。

### 1.6 原核表达载体的构建

采用特异性引物 P3/P4,用 PCR 方法从重组质粒 pMD19-T-Gal-9 中扩增 Gal-9 成熟肽基因片段,纯化后将产物和 pET-32a(+ )质粒分别用 *EcoR* I / *Xho* I 双酶切后进行胶回收,将纯化后的 Gal-9 成熟肽基因片段和 pET-32a(+ )载体经 T4 连接酶 16  $^{\circ}\text{C}$  连接后转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布 Amp/LB 平板,挑取阳性菌落测序,将测序准确的菌液抽提质粒,进行酶切和 PCR 鉴定,将其命名为 pET-32a-Gal-9。将该重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞。

### 1.7 重组蛋白的诱导表达及纯化

将阳性克隆菌接种于 LB (Amp + 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  150  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡过夜。次日取培养物按 1 : 100 再次接种于上述 500 mL LB 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  250  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养至 OD<sub>600 nm</sub> 值为 0.6 ~ 0.8 时,加入终浓度为 0.6  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IPTG 37  $^{\circ}\text{C}$  150  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  过夜诱导培养,分别于诱导前和诱导后取样 1 mL 细菌培养物,离心回收菌体,加入适量 PBS 重悬菌体后加等量 2 $\times$  蛋白上样缓冲液,煮沸 10 min,离心取上清进行 SDS-PAGE 电泳。按照 Novagen 公司的蛋白纯化试剂盒说明书进行包涵体的纯化、复性和透析,并测定重组蛋白的浓度。同时诱导、表达并纯化空载体 pET-32a(+ ),方法同上。

### 1.8 表达产物体外抑菌活性及理化特性测定

1.8.1 对不同细菌抗菌活性的测定 以“1.2”中的菌种为检测菌,利用琼脂糖孔穴扩散法测定重组鸡 Gal-9 蛋白和 pET-32a(+ )蛋白的抗菌活性。将各株细菌培养至对数生长期,然后用相应的培养基稀释细菌至 10<sup>5</sup> CFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,取 200  $\mu\text{L}$  涂布无抗性 LB 及 YPD 平板。放置片刻,待菌液稍干后,用直径 6 mm 的灭菌打孔器打孔若干,分别在孔中加入 Gal-9 蛋白、pET-32a(+ )蛋白、阴性对照 (PBS) 及阳性对照 Amp+ 各 50  $\mu\text{L}$  (酵母菌用 Zeocin+, 于 30  $^{\circ}\text{C}$  培养),将平板正面向上 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后,观

察有无抑菌效果。

### 1.8.2 Gal-9 蛋白对温度和 pH 稳定性的测定

分别取 100  $\mu\text{L}$  蛋白若干份,分别置于 -70、-20、4、40、60、80、100  $^{\circ}\text{C}$  处理 30 min 后取出,以金黄色葡萄球菌为检测菌进行温度的抗菌活性测定,方法同“1.8.1”。另取重组蛋白若干,以 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 HCl 将蛋白的 pH 调至 10,取出 100  $\mu\text{L}$  作为抗菌试验,同时,设相同 pH 的 PBS 作为对照;然后将剩下蛋白的 pH 调至 8,以此类推,直至将蛋白的 pH 调至 4,将调至不同 pH (4、5、6、7、8、9、10) 的蛋白 100  $\mu\text{L}$ ,以金黄色葡萄球菌为检测菌进行抗菌活性测定,方法同前。

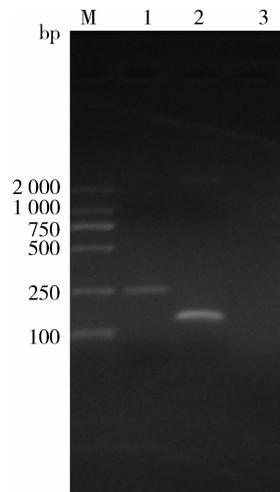
### 1.9 表达产物最小抑菌浓度的测定

用 BCA 蛋白检测试剂盒按说明书测纯化得到的 Gal-9 成熟肽的蛋白浓度。按 M. R. Levensgood 等<sup>[13]</sup>的方法测定 Gal-9 对各种细菌的最小抑菌浓度。

## 2 结果

### 2.1 鸡 $\beta$ -防御素 Gal-9 基因克隆与进化树分析

利用 RT-PCR 扩增得到与预期大小相符片段 (250 bp),由测序结果可知编码区 (204 bp) 及预测成熟肽序列 (126 bp) 与 Gal-9 mRNA 序列相似性为 100%。电泳结果见图 1。利用分子生物学软件将



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1. *Gal-9* 基因 PCR 产物 (250 bp);2. *Gal-9* 成熟肽基因 PCR 产物 (126 bp);3. 阴性对照

M. DL2000 DNA marker;1. PCR product of *Gal-9* (250 bp);2. PCR product of mature peptide of *Gal-9* (126 bp);3. Negative control

图 1 Gal-9 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoresis analysis of Gal-9 product

鸡 $\beta$ -防御素 *Gal-9* 基因与禽类及其它部分哺乳动物 $\beta$ -防御素基因构建了系统进化发育树,见图2。由进化树可知,鸡 $\beta$ -防御素 *Gal-9* 基因与禽类 $\beta$ -防御素在进化分支上较近,与其它哺乳动物 $\beta$ -防御素进化上相对较远。

## 2.2 重组表达质粒的酶切鉴定

重组质粒测序结果准确证实成功构建原核表达质粒 pET-32a-*Gal-9*。经双酶切鉴定,电泳得到约 5 900、126 bp 的 2 条条带,与预期大小一致,表明获得阳性重组体(图 3)。

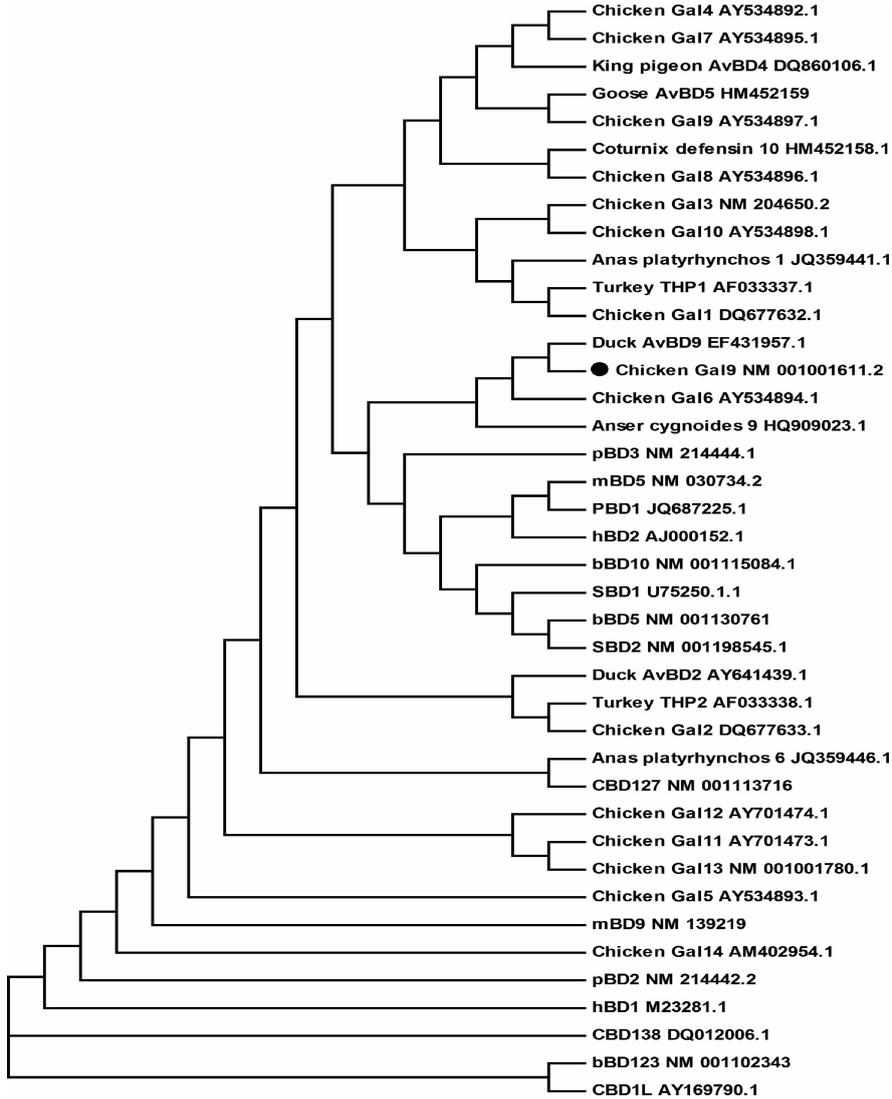


图 2 鸡 *Gal-9* 与禽 $\beta$ -防御素及部分哺乳动物 $\beta$ -防御素基因的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic relationships based on the sequence of the *Gal-9*, avain-AvBDs and partial mammalian  $\beta$ -defensins

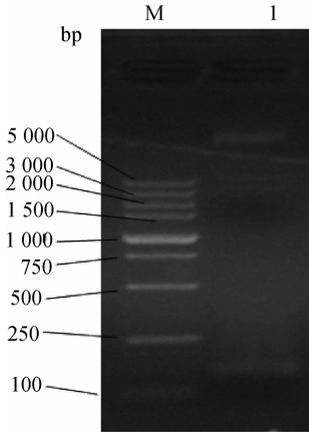
## 2.3 重组鸡 *Gal-9* 蛋白的原核表达与纯化

SDS-PAGE 结果显示,经 IPTG 诱导后的菌体与未诱导菌体相比,有 1 条明显的蛋白表达条带。诱导后 4~8 h 内蛋白的表达量没有明显的差异。参照蛋白相对分子质量标准,该重组蛋白的相对分子质量约为 25 ku (图 4)。诱导的菌体经离心和裂解后,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示,鸡 *Gal-9* 蛋白主要以包涵体形式存在于 *E.*

*coil* BL21 中。重组蛋白的包涵体经溶解、纯化后,测定重组蛋白的浓度为  $860 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。同样方法纯化 pET-32a(+),测得其浓度为  $470 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。SDS-PAGE 电泳检测可见约 25、20 ku 的蛋白条带,与预期蛋白大小相符(图 4)。

## 2.4 重组 *Gal-9* 蛋白抗菌活性及理化特性测定

采用琼脂糖孔穴扩散法来测定重组蛋白 *Gal-9* 对 4 种菌的抗菌活性。结果表明,重组蛋白 *Gal-9*



M. DL5000 DNA 相对分子质量标准;1. 重组质粒 pET-32a-Gal-9 酶切产物

M. DL5000 DNA marker; 1. The products of recombinant plasmid pET-32a-Gal-9

图 3 重组表达质粒 pET-32a-Gal-9 的 *EcoR* I、*Xho* I 酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pET-32a-Gal-9 digested by *EcoR* I and *Xho* I

对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠杆菌、酵母菌 (GS115) 都能产生明显的抑菌效果, 抑菌圈大小分别为 15、20、13、25 mm。阴性对照和空载体 pET-32a 均没有抑菌活性, 无抑菌圈。

在温度和 pH 试验中, 经不同温度处理后, 结果显示, 重组 Gal-9 蛋白对金黄色葡萄球菌仍有较强的抑菌效果。重组 Gal-9 蛋白经酸碱度调节后, 在 pH 为 4.0、5.0 时没有产生抑菌圈, 随着 pH 的升高, 重组 Gal-9 产生明显的抑菌圈, 且在 pH 为 8.0 时, 抑菌圈最大, 约为 20 mm。

### 2.5 重组鸡 Gal-9 蛋白对几种菌的最小抑菌浓度 (MIC) 测定结果

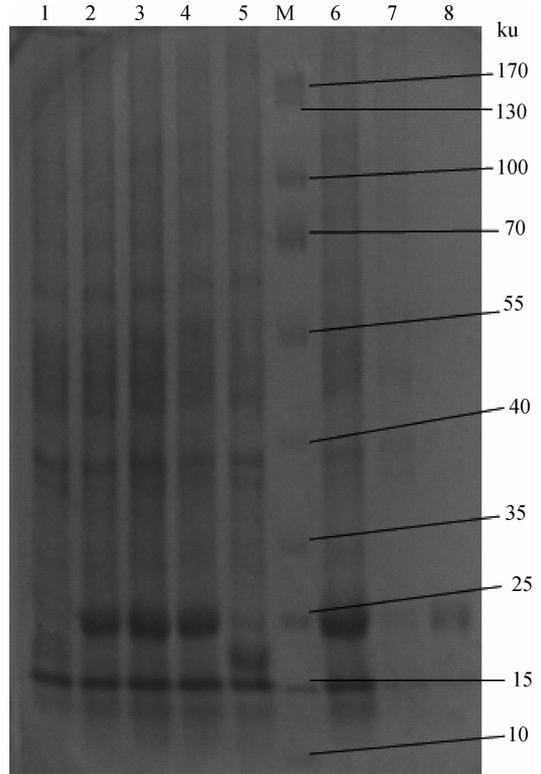
按 M. R. Levensgood 等<sup>[13]</sup>的方法测定 Gal-9 对以下细菌的最小抑菌浓度 (MIC), 最后结果见表 2。

表 2 鸡 Gal-9 成熟肽蛋白最小抑菌浓度的测定

Table 2 Determination of MIC of chicken Gal-9 mature peptide

革兰阳性菌 Gram-positive microorganism	最小抑菌 浓度 MIC	革兰阴性菌 Gram-negative microorganism	最小抑菌浓度 MIC	真菌 Fungi	最小抑菌 浓度 MIC
金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923) <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	62.50	大肠杆菌 (ATCC 25922) <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	125.00	毕赤酵母 (GS115) <i>Pastoris</i> (GS115)	31.75

MIC. Minimum inhibitory concentration



1. 未诱导重组菌表达产物; 2~4. IPTG 诱导 4、6、8 h 后蛋白表达产物; 5. 诱导空载体 pET-32a; M. 蛋白分子质量标准; 6. 包涵体; 7. 上清; 8. 纯化后蛋白

1. Expression products from the induced recombinant bacteria without induction; 2-4. Total protein of BL21 containing Gal-9; 5. Induced empty vector pET-32a; M. Protein molecular weight standards; 6. Inclusion body; 7. Supernatant; 8. Purified protein

图 4 重组鸡 Gal-9 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expressed recombinant Gal-9

### 3 讨论

作者根据 Y. Xiao 等<sup>[14]</sup>已发表的鸡 Gal-9 (NM\_001001611.2) 的基因设计特异性引物, 扩增出的鸡

*Gal-9* 基因及其成熟肽基因与其相似性为 100%。从进化树分析发现,鸡  $\beta$ -防御素 *Gal-9* 与鸭  $\beta$ -防御素 *Gal-9* 和鸡  $\beta$ -防御素 *Gal-6* 之间的相似性最高。不同禽  $\beta$ -防御素之间存在较高的相似性,但是不同禽  $\beta$ -防御素与哺乳动物  $\beta$ -防御素之间的相似性较低。表明鸡  $\beta$ -防御素 *Gal-9* 存在种属差异性,而同一种属不同物种之间差异性较小。鉴于禽类和哺乳动物间都存在  $\beta$ -防御素相似性较低的现象,很多学者用达尔文进化的理论来解释,物种之间能感染的病原体不同,就导致一些基因发生有利于自身的显著突变,来抵御外界病原体,进而导致物种间相似性较低<sup>[15]</sup>。

禽类的防御素是一种内源性的阳离子多肽,在禽的先天性免疫中发挥着重要的作用。现在大量研究表明,无论是重组表达、天然存在或是人工合成的防御素,对革兰阳性菌、革兰阴性菌、霉菌、螺旋体、病毒(如流感病毒、疱疹病毒、艾滋病病毒)等均具有很强的杀伤活性<sup>[7,16-19]</sup>。与其它防御素一样,本试验重组表达的鸡 *Gal-9* 蛋白也有着广谱的抗菌活性。其对革兰阳性菌(如金黄色葡萄球菌、粪肠球菌)、革兰阴性菌(如大肠杆菌)及真菌(如毕赤酵母 GS115)都有较强的抑菌作用。在对鸡 *Gal-9* 蛋白的温度和酸碱度测定中,结果显示对温度和酸碱度有一定的稳定性。在 pH 6.0 就呈现抑菌效果,在 pH 8.0 的条件下,鸡 *Gal-9* 蛋白抗菌活性最好。说明该蛋白对碱性的耐受力更强一些。这与周财源等<sup>[15]</sup>报道的鹅重组 AvBD-5 蛋白的特性相符合。另据一些研究表明,不同种类的防御素抑菌种类及最小抑菌浓度有所不同,如重组鸡 *Gal-7* 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等有抑制作用,而对白色念珠球菌则无抑制作用<sup>[20]</sup>。报道的重组鸡 *Gal-10* 对革兰阳性菌和阴性菌都能产生抑菌活性,但对猪霍乱沙门菌无抗菌活性<sup>[21]</sup>。重组鸭 AvBD-10 对多杀性巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌等都有抑制作用<sup>[22]</sup>,国外 Y. Sang 等<sup>[23]</sup>首次从健康犬睾丸组织内扩增出 *cBD1*,并通过化学合成的方法证实了其对革兰阳性、阴性菌有杀菌作用,对支原体也有抑制作用。推测这可能与防御素的种类、自身结构与分布组织部位有一定的关系。据报道,防御素可以通过对核苷酸密码子优化,使其抗菌活性提高<sup>[24]</sup>。本试验克隆的鸡  $\beta$ -防御素 *Gal-9* 基因,是其天然序列,未加以改造和设计,若想通过基因工程方法获取更高抗菌活性的鸡  $\beta$ -防御素,需选择大肠杆菌偏好的密码子对

*Gal-9* 成熟肽基因进行密码子优化,相关结论待于试验进一步验证。

## 4 结 论

从鸡食道中克隆到鸡 *Gal-9* 基因,该基因编码区大小为 204 bp,成熟肽编码区为 126 bp,编码 42 个氨基酸。重组融合蛋白相对分子质量约为 25 ku,通过体外抑菌试验证实了该蛋白对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠杆菌、酵母菌(GS115)都能产生明显的抑菌效果,该蛋白对温度有一定的稳定性,在碱性条件下,抑菌效果较为显著。重组鸡 *Gal-9* 对金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、粪肠球菌(ATCC 29212)、大肠杆菌(ATCC 25922)、酵母菌(GS115)的最小抑菌浓度分别是 62.50、31.75、125.00、31.75 mg · L<sup>-1</sup>。

## 参考文献:

- [1] BRUNE K, LEFFELL M S, SPITZNAGEL J K. Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophile leukocytes[J]. *Infect Immun*, 1972, 5(3): 283-287.
- [2] SUGIARTO H, YU P L. Avian antimicrobial peptides: the defense role of  $\beta$ -defensins[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(3): 721-727.
- [3] SCHUTTE B C, MCCRAY P J.  $\beta$ -defensins in lung host defense[J]. *Annu Rev Physiol*, 2002, 64: 709-748. <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.physiol.64.081501.134340>.
- [4] WANG W, COLE A M, HONG T, et al. Retrocyclin, an antiretroviral theta-defensin, is a lectin[J]. *J Immunol*, 2003, 170(9): 4708-4716.
- [5] MA D, WANG R, LIAO W, et al. Identification and characterization of a novel antibacterial peptide, avian  $\beta$ -defensin 2 from ducks[J]. *J Microbiol*, 2009, 47(5): 610-618.
- [6] SUGIARTO H, YU P L. Identification of three novel ostricacins: an update on the phylogenetic perspective of beta-defensins[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 27(3): 229-235.
- [7] MA D Y, LIU S W, HAN Z X, et al. Expression and characterization of recombinant gallinacin-9 and gallinacin-8 in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expr Purif*, 2008, 58(2): 284-291.
- [8] MILONA P, TOWNES C L, BEVAN R M, et al. The chicken host peptides, gallinacins 4, 7, and 9, have an-

- timicrobial activity against *Salmonella serovars* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356 (1): 169-174.
- [9] 张祥斌, 毕英佐, 曹永长, 等. 胡须鸡  $\beta$ -防御素 Gal-1 ~Gal-13 基因克隆、序列分析及其在组织中分布[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(4): 597-603.
- [10] VAN D A, VELDHUIZEN E J, KALKHOVE S I, et al. The beta-defensin gallinacin-6 is expressed in the chicken digestive tract and has antimicrobial activity against food-borne pathogens [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(3): 912-922.
- [11] HUANG G T, ZHANG H B, KIM D, et al. A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human  $\beta$ -defensin 2 antimicrobial activities *in vivo* [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(17): 2017-2025.
- [12] 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.
- [13] LEVENGOOD M R, KNERR P J, OMAN T J, et al. *In vitro* mutasynthesis of lantibiotic analogues containing nonproteinogenic amino acids [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(34): 12024-12025.
- [14] XIAO Y, HUGHES A L, ANDO J, et al. A genome-wide screen identifies a single beta-defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins [J]. *BMC Genomics*, 2004, 5(1): 56.
- [15] 周财源, 蔺利娟, 韩宗玺, 等. 鹅  $\beta$ -防御素基因克隆与生物学特性的初步分析[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(8): 1193-1200.
- [16] HIGGS R, LYNN D J, GAINES S, et al. 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.
- [17] GANZ T. Defensins and other antimicrobial peptides: a historical perspective and an update [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2005, 8(3): 209-217.
- [18] 韩宗玺, 廖文艳, 王瑞琴, 等. 重组鸡  $\beta$ -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.
- [19] MA D, LIAO W, WANG R, et al. Two novel duck antibacterial peptides, avian beta-defensins 9 and 10, with antimicrobial activity [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19 (11): 1447-1455.
- [20] 李民欢, 祁克宗, 涂 健, 等. 鸡  $\beta$ -防御素 7 在大肠杆菌中的表达及活性分析[J]. 微生物学通报, 2012, 39(12): 1778-1786.
- [21] 廖文艳, 马得莹, 韩宗玺, 等. 重组鸡  $\beta$ -防御素 10 蛋白的原核表达及其抗菌活性的测定[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(10): 765-769.
- [22] 廖文艳, 马得莹, 王瑞琴, 等. 鸭  $\beta$ -防御素 10 基因的克隆、遗传进化分析及其生物学特性的初步研究[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(9): 1320-1326.
- [23] SANG Y, ORTEGA M T, BLECHA F, et al. Molecular cloning and characterization of three beta-defensins from canine testes [J]. *Infect Immun*, 2005, 73 (5): 2611-2620.
- [24] 王 威, 王联结. 阳离子抗菌肽分子设计的研究现状[J]. 食品工业科技, 2010, 31(1): 442-445, 448.

(编辑 白永平)