

网络出版时间:2014-09-10 18:19

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.043

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.043.html>

牦牛 β -防御素 5 基因的原核表达及 表达产物的抑菌活性

符 梅,熊显荣,兰道亮,李 键

(西南民族大学 生命科学与技术学院,动物遗传育种重点实验室,四川 成都 610041)

【摘 要】 【目的】克隆与表达牦牛 β -防御素 5(BNBD5)基因,检测其重组蛋白的体外抗菌活性。【方法】采用 RT-PCR 方法从牦牛肺组织中扩增 BNBD5 基因成熟肽编码区,根据已发现的哺乳动物 β -防御素 5 和部分禽 β -防御素 5 的序列构建遗传进化树。将 BNBD5 基因亚克隆到原核表达载体 pET-32a(+) 的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切位点上,构建重组表达质粒 pET32a-BNBD5。将重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21,用 IPTG 于 37 °C 进行诱导表达,SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达情况,并对该重组蛋白进行纯化,测定其体外抑菌活性。【结果】克隆得到了 BNBD5 基因成熟肽编码片段,其长度为 138 bp,编码 45 个氨基酸残基,内含 6 个位置保守的半胱氨酸残基。经遗传进化分析发现,该基因序列与黄牛的 mRNA 同源性最高,可达到 86.2%。经 IPTG 诱导,获得了分子质量为 25 ku 的牦牛 β -防御素-5 成熟肽融合蛋白。琼脂糖扩散结果表明,0.08 mg/mL 的纯化蛋白对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌均有抗菌作用。【结论】牦牛 BNBD5 成熟肽在大肠杆菌中得到了成功表达,其产物对革兰氏阴性菌(大肠杆菌)和革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)均有抗性。

【关键词】 牦牛; β -防御素 5;重组蛋白;抑菌活性

【中图分类号】 S823.8⁺5

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)10-0022-07

Prokaryotic expression and antibacterial activity of β -defensin 5 in yak

FU Mei,XIONG Xian-rong,LAN Dao-liang,LI Jian

(Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding,College of Life Science and Technology,
Southwest University for Nationalities,Chengdu,Sichuan 610041,China)

Abstract: 【Objective】 The purpose of this study was to clone and express yak β -defensin 5 gene (BNBD5) and to determine its antibacterial activity. 【Method】 The mature peptide of encoding yak BNBD5 was cloned from lung tissues by RT-PCR. In addition, phylogenetic relationships between nucleotide sequence of yak BNBD5 and BNBD5 of other species were analyzed by DNASTar. The mature peptide of yak BNBD5 was sub-cloned into pET-32a(+) vector between *Bam*H I and *Xho* I site to construct recombinant plasmid pET32-BNBD5. Then, the BNBD5 fusion protein was induced to express in BL21 by IPTG at 37 °C and SDS-PAGE was used to detect the expression. The expression product was purified for detection of antibacterial activity *in vitro*. 【Result】 Mature peptide of encoding yak BNBD5 was obtained with 138 bp nucleotides and 45 amino acids, including 6 conserved cysteines. Phylogenetic analysis showed that yak BNBD5 shared the highest nucleotide homology (86.2%) with *Bos taurus*. The molecular weight of expression product was approximately 25 ku after IPTG induction. The agar diffusion method demonstrated that purified mature peptide protein with concentration of 0.08 mg/mL had obvious antimicrobial activity

【收稿日期】 2013-07-17

【基金项目】 国家科技支撑计划项目(2012BAD13B06);西南民族大学中央高校基本科研业务费专项(13NZYQN24,TS11126)

【作者简介】 符 梅(1988—),女,海南儋州人,在读硕士,主要从事细胞与胚胎工程研究。E-mail:397385684@qq.com

【通信作者】 李 键(1967—),男,四川理县人,教授,博士,主要从事动物生殖调控研究。E-mail:lijian@swun.cn

against *S. aureus* and *E. coli*. 【Conclusion】 The mature peptide successfully expressed in *E. coli* and the product had resistance to both Gram negative (*E. coli*) and Gram positive (*S. aureus*) bacteria.

Key words: yak; BNBD5; recombinant protein; antimicrobial activity

牦牛生活在青藏高原 3 000~5 000 m 海拔的高寒地带,是高原地区牧民的主要经济来源,其对低温、低氧、低压的高原环境有较强的适应能力,能充分利用其他家畜难以利用的高山草原环境^[1]。良好的高原生态环境保障了牦牛奶天然、绿色的品质,纯净的奶源环境造就了绿色的牦牛奶。哺乳类动物防御素是一类广泛存在于哺乳类动物体内的内源性抗微生物肽,在宿主天然免疫过程中发挥着重要的作用,当机体受外源病原体入侵时,可以激活机体的第一道防御屏障,启动机体先天性免疫反应和获得性免疫反应。防御素除具有广谱的抗细菌活性外,还对真菌、病毒等具有一定的抗性,且与一些传统抗生素等具有协同抗微生物的作用。因其对机体无毒副作用,所以研究哺乳类动物防御素在体内、外的抗菌作用及其机理具有重要意义。防御素(Defensin)最早是由美国科学家 Lehrer 等^[2]于 1993 年发现并命名的,并从人的嗜中性白细胞中分离纯化得到 3 种阳离子小肽,发现其具有特殊的生物学活性及功能。依据其半胱氨酸残基位置及二硫键连接方式的不同,防御素可分为 α 、 β 和 θ 3 大类^[3]。 β -防御素(β -defensins)是肽抗生素中较为重要的一种,是具有广谱抗菌活性的多功能肽,其抗菌谱包括革兰氏阴性、阳性菌,病毒和真菌^[4-5]。Diamond 等^[6]于 1991 年首次在牛的气管黏膜上皮细胞中发现 β -防御素,并将其命名为 TAP,之后又在牛的舌黏膜上皮中发现了舌抗菌肽 LAP。1993 年, Selsted 等^[7]从牛的中性粒细胞中分离了 13 种 β -防御素(BNBD1~BNBD13)。研究表明, TAP、LAP、BNBD1~BNBD13 等 β -防御素对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、克雷伯肺炎杆菌、绿脓杆菌和念珠菌属等乳房炎病原菌有抗菌活性^[8]。Goldammer 等^[9]研究发现,在患乳房炎奶牛的乳腺组织中, β -防御素 5 的表达量是平时的 4~13 倍;原位杂交显示,病原微生物可诱导局部感染区的乳腺上皮细胞内的 β -防御素 5 的表达上升,进一步证明 β -防御素 5 在奶牛乳房炎的发生、预防过程中具有重要作用^[10]。到目前为止,尚未见到关于牦牛 β -防御素 5 方面的报道。本研究构建了牦牛 β -防御素 5(BNBD5)基因的原核表达载体 pET32-BNBD5,诱导 BNBD5 融合蛋白在大肠杆菌中表达,并对其表达产物的抗菌生物活性进行评价,

以期防御素替代抗生素成为新型的抗菌药物提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)购自天根(北京)公司。金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)由西南民族大学动物遗传育种重点实验室保存。pMD19-T 克隆载体购自 TaKaRa(大连)公司, pET-32a(+)表达载体购自 Novagen 公司。RNA 提取 Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司,凝胶回收试剂盒购自 Axygen(北京)公司,反转录试剂盒购自 Promega 公司。IPTG 购自天根(北京)公司, HisTrap^TMFF 蛋白纯化柱购自 GE 公司,限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 和 T4 DNA ligase 连接酶均购自 NEB 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 PCR 扩增引物的设计与合成

根据 NCBI 已公布的黄牛 BNBD5 基因序列(登录号: AJ278799),利用 Primer 5 设计 1 对引物 P1/P2。上游引物 P1: 5'-CGGGATCCGGATT TACTCAAGTAGTAAGAAATC-3', 下游引物 P2: 5'-CCCTCGAGTTACCACCTCCTGCAGCAT-3', 分别在上、下游引物 5'端添加 *Bam*H I 和 *Xho* I 的酶切位点(划线部分),并在其前端添加保护性碱基。引物由 Invitrogen(上海)公司合成。

1.3 BNBD5 基因的克隆与序列分析

取牦牛肺组织 100 mg,加入 1 mL Trizol 液氮研磨提取总 RNA,按照 Promega 试剂盒反转录获得 cDNA。以牦牛肺组织的 cDNA 为模板,PCR 扩增 BNBD5 基因,扩增体系为: Ex Taq 12.5 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,模板(1 500 ng/ μ L) 1 μ L,双蒸水补足 25 μ L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 25 s, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。取 6 μ L 扩增产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶中进行初步电泳鉴定。胶回收产物与 pMD19-T 载体连接,经 PCR 鉴定后,将阳性重组质粒 pMD19-BNBD5 送 Invitrogen(上海)公司进行测序。用 MEGA5.0 软件将牦牛 BNBD5 基因序列与其他动物 β -防御素 5 的 mRNA 序列进行比较,构建系统进化树。

1.4 BNBD5 基因原核表达载体的构建

将重组质粒 pMD19-BNBD5 与原核表达载体 pET-32a(+) 分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切,将牦牛 *BNBD5* 基因亚克隆到原核表达载体 pET-32a(+) 上,构建重组表达载体 pET32-BNBD5,用其转化 DH5 α ,挑选克隆进行菌液 PCR 鉴定,并提取重组表达载体进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,将阳性质粒送 Invitrogen (上海)公司测序。

1.5 重组牦牛 BNBD5 蛋白的诱导表达

将阳性重组质粒 pET32-BNBD5 转化大肠杆菌 BL21(DE3),挑取单个菌落接种于含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素(Amp)的 5 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜培养,次日取培养物按照 1:100(体积比)的比例接种于 50 mL 含有 Amp(100 μ g/mL)的 LB 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 进一步扩大培养。当菌液 OD_{600} = 0.6 时,加入 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达,于诱导不同时间(0,1,2,3,4,5,6 h)各取 2 mL 菌样,8 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀,加入 50 μ L PBS (pH=7.4)和 50 μ L 2 $\times$ SDS 凝胶上样缓冲液,煮沸 10 min,然后进行 SDS-PAGE 电泳(5%的浓缩胶,15%的分离胶)。

1.6 重组牦牛 BNBD5 蛋白的纯化

取 10 mL 含目的蛋白的菌液接种到 1 L LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡 6 h,4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,加入磷酸盐缓冲液重悬,超声破碎(200 W,超声 6 s,停 9 s,直到样品澄清)后 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,分别收集上清和沉淀。沉淀用体积分数 1% Triton 和 2 mol/L 的尿素各洗 2 次,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀,然后用 8 mol/L 尿素溶解沉淀(1 g 湿质量加入 10 mL 尿素),4 $^{\circ}$ C 过夜,12 000 r/min 离心 20 min,收集上清用 0.45 μ m 滤膜过滤,然后用 His-Trap^TMFF 纯化柱纯化蛋白,并对纯化蛋白进行 SDS-PAGE 分析。将纯化后的蛋白放入透析袋,然后将透析袋依次放入含 6,4,2,1 mol/L 尿素的复性液中于 4 $^{\circ}$ C 各透析 2 h,最后将透析袋置于不含尿素的磷酸盐缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜,使蛋白质在此过程中复性。

1.7 重组牦牛 BNBD5 蛋白体外抑菌活性的检测

参照文献[11-12]的 Bradford 法检测纯化的重组蛋白的浓度。根据前人对牛防御素的最小抑菌试验^[11-12],采用琼脂扩散法,分别取对数生长期的大肠

杆菌和金黄色葡萄球菌(各 5×10^6 CFU)涂 LB 平板,将经高压灭菌过的滤纸片蘸取 0.08 和 0.10 mg/mL 纯化后的重组蛋白溶液,置于倒好的无抗生素的 LB 固体平板上,同时设氨苄青霉素为阳性对照,纯化的 pET-32a(+)空载蛋白为阴性对照,于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,观测以滤纸片为中心的抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 牦牛 β -防御素 5 基因的克隆与序列分析

本研究根据 GenBank 上提交的黄牛 *BNBD5* 的基因序列,利用 RT-PCR 从牦牛肺组织中扩增得到约 138 bp 的牦牛 *BNBD5* 基因片段(图 1),与目的基因片段长度相符,编码 45 个氨基酸残基(图 2),并且含有防御素的特征性分子结构,即在特定位置上有 6 个保守的半胱氨酸残基,分别在分子内形成 Cys1-Cys5、Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6 共 3 对二硫键。同源性分析表明,牦牛 *BNBD5* 基因与黄牛 *BNBD5* 同源性最高,达 86.2%,与其他物种 *BNBD5* 的同源性为 21.0%~79.7%(表 1)。牦牛 *BNBD5* 基因的系统进化分析结果见图 3。

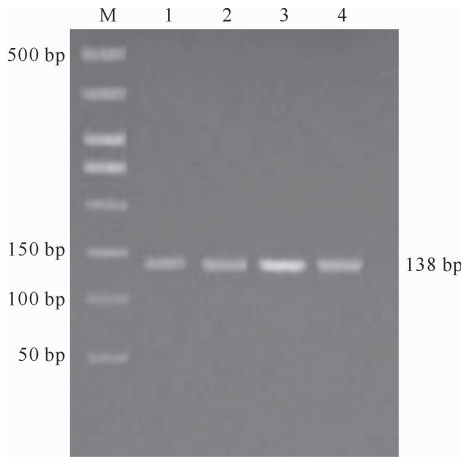


图 1 牦牛 β -防御素 5 基因的 PCR 扩增
M, 50 bp DNA Marker; 1~4. *BNBD5* 基因的 PCR 产物
Fig. 1 PCR amplification of yak *BNBD5* gene
M, 50 bp DNA Marker; 1-4. PCR product of mature peptide of *BNBD5*

2.2 牦牛 BNBD5 基因原核表达载体的构建

重组质粒 pET32-BNBD5 经 PCR 检测,获得了 138 bp 的目的片段,*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后也得到 138 bp 的片段(图 4),证明外源基因片段已成功插入到质粒中。

GGATTCTACTCAAGTAGTAAGAAATCCTCTAAGCTGCCGAGGAATACAGGAATCTGTGT
G F T Q V V R N P L S C R R N T G I C V
GCCGATCAGGTGCCCTGGCAACATGAGACAGATTGGCACCTGTCTCGAAGCCCCAGTAA
P I R C P G N M R Q I G T C L E A P V
AATGCTGCAGGAGGTGGTAA
K C C R R W

图 2 牦牛 *BNBD5* 基因序列及其编码的氨基酸序列
下划线标示保守的半胱氨酸

Fig. 2 Nucleotide sequence of *BNBD5* gene mature peptide and the amino acid sequence
Underlined are conserved cysteines

表 1 β -防御素 5 基因核酸序列的同源性比较

Table 1 Homologous comparison of *BNBD5* gene nucleotide sequence

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		19.6	21.7	20.3	22.5	20.3	21.7	23.0	22.5	28.1
2	198.1		23.2	19.6	22.5	23.9	26.8	20.0	21.0	20.0
3	133.4	122.7		76.1	33.3	36.2	36.2	43.7	86.2	41.5
4	120.5	124.8	22.7		26.8	30.4	29.7	45.2	79.7	44.4
5	171.6	143.0	99.8	112.5		90.6	84.1	28.1	29.7	23.0
6	179.3	137.4	96.5	114.0	8.5		81.9	30.4	32.6	23.7
7	172.0	172.9	95.5	110.9	15.5	19.3		29.6	31.2	26.7
8	138.3	161.0	71.0	60.5	117.8	114.7	112.6		48.1	68.1
9	142.9	107.3	14.3	19.9	106.6	104.4	110.9	57.2		44.4
10	153.4	154.7	67.3	67.3	181.9	165.1	164.8	39.1	60.4	

注:1~10 分别为人、冈比亚按蚊、黄牛、山羊、原鸡、鹅、鸽子、褐鼠、牦牛、小鼠。对角线以上为同源性数据,对角线以下为差异性数据。

Note:The number of 1—10 is *Homo sapiens*, *Anopheles gambiae*, *Bos taurus*, *Capra hicus* beta defensin, *Gallus gallus* Gal, *Anser cygnoides*, *Columba livia*, *Rattus norvegicus*, yak, *Mus musculus*, respectively. Data above the diagonal is similarity and the below is diversity.

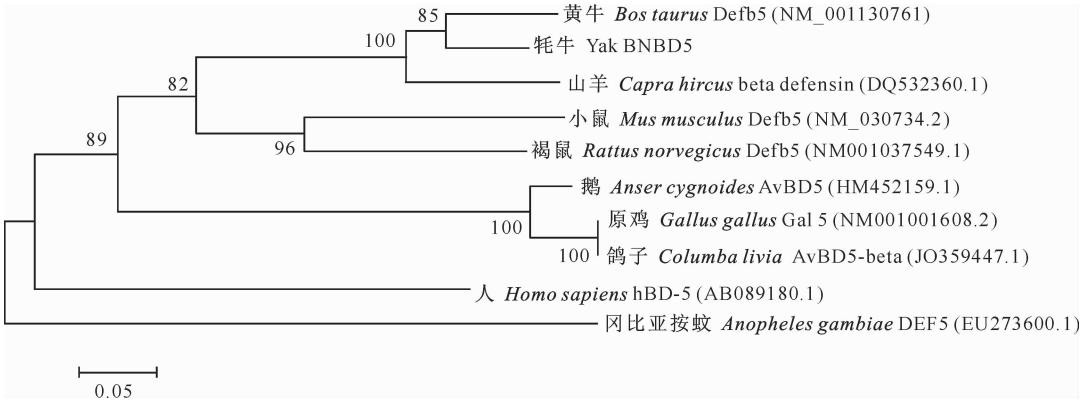


图 3 牦牛与其他物种 *BNBD5* 基因的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *BNBD5* of yak and other species

2.3 牦牛 *BNBD5* 重组蛋白的表达及纯化

SDS-PAGE 电泳结果(图 5)表明,与诱导前的菌体相比,诱导后的菌体有 1 条明显的特异性条带,与预期大小 25 ku 相符合,诱导后,表达量明显增加。*BNBD5* 重组蛋白主要以包涵体的形式存在,上清中蛋白因浓度太低几乎检测不到,*BNBD5* 蛋白经

亲和层析纯化后可得到比较纯的融合蛋白(图 6)。

2.4 pET32-*BNBD5* 融合蛋白的抑菌活性

将纯化后的 *BNBD5* 基因成熟肽融合蛋白进行体外抑菌试验,结果(图 7)显示, *BNBD5* 基因成熟肽融合蛋白对革兰氏阴性菌(*E. coil*)具有较强的抑菌活性。当其质量浓度为 0.08 mg/mL 时,抑菌圈

直径为 7.21 mm;当其质量浓度达到 0.10 mg/mL 时,可看到明显的抑菌效果,抑菌圈直径为 7.62 mm;但抑菌圈都小于氨苄青霉素(13.5 mm),而纯化的空载蛋白无抑菌圈。*BNBD5* 基因成熟肽融合蛋白对革兰氏阳性菌(*S. aureus*)也有较强的抑菌活

性。当其质量浓度为 0.08 mg/mL 时可以观察到抑菌圈,抑菌圈直径为 5.61 mm;当其质量浓度为 0.10 mg/mL 时抑菌效果较明显,抑菌圈直径为 6.73 mm;但氨苄青霉素的抑菌圈(12.7 mm)更大,纯化的空载蛋白亦无抑菌圈。

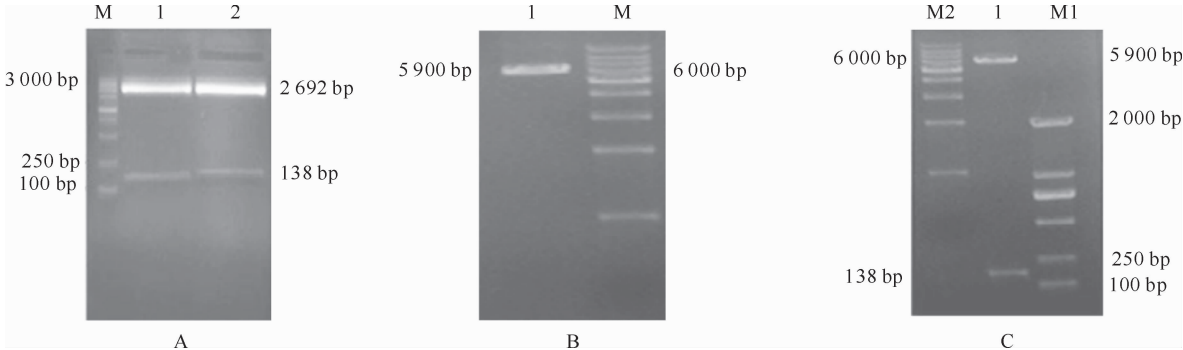


图 4 重组质粒 pET32-BNBD5 的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切分析

(A)M. DL5000 DNA Marker;1~2. 质粒 pMD19-BNBD5 的双酶切;(B)M. 1 kb DNA ladder;1. 质粒 pET-32a(+) 的双酶切;
(C)M1. DL2000 DNA Marker;M2. 1 kb DNA ladder;1. 质粒 pET32-BNBD5 的双酶切

Fig. 4 Double enzyme digestion of the recombinant plasmid pET32-BNBD5 by *Bam*H I and *Xho* I

(A)M. DL5000 DNA Marker;1-2. Double enzyme digestion of pMD19-BNBD5;(B)M. 1 kb DNA ladder;1. Double enzyme digestion of the plasmid pET-32a(+);(C)M1. DL2000 DNA Marker;M2. 1 kb DNA ladder;1. Double enzyme digestion of pET32-BNBD5

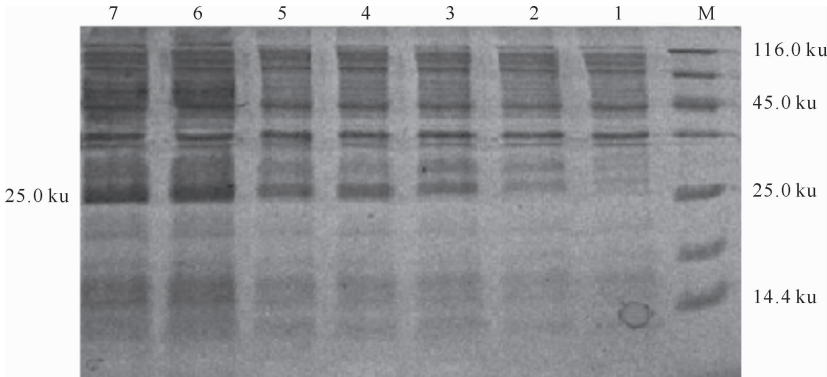


图 5 牦牛 BNBD5 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白 Marker;1. 未诱导的重组表达菌;2~7. 重组表达菌分别诱导 1,2,3,4,5 和 6 h 的融合蛋白

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of yak BNBD5 fusion protein

M. Protein Marker;1. Total protein of BL21 containing yak pET32-BNBD5 without IPTG induction;
2-7. pET32-BNBD5 induced with IPTG for 1,2,3,4,5, and 6 h, respectively

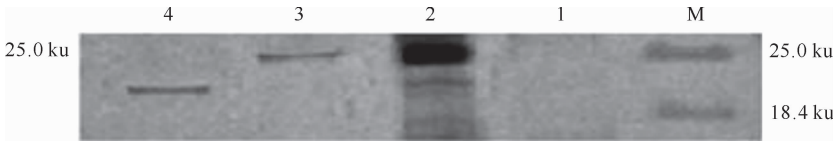


图 6 融合蛋白 BNBD5 表达形式的鉴定及纯化蛋白的 SDS-PAGE

M. 蛋白 Marker;1. 重组蛋白在上清中的表达;2. 重组蛋白在沉淀中的表达;3. 纯化后的重组蛋白;4. pET-32a(+) 纯化蛋白

Fig. 6 Identification of the expression of fusion protein and purified fusion protein

M. Protein Marker;1. The expression of fusion protein of BNBD5 in supernatant;2. The expression of fusion protein of BNBD5 in sediment;3. The purified protein product;4. The purified pET-32a(+) protein

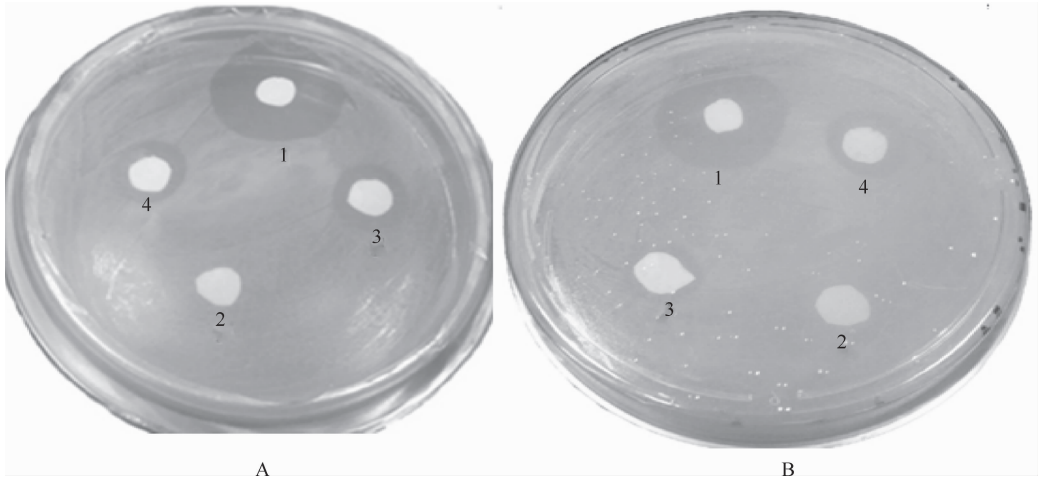


图 7 重组牦牛 BNBD5 蛋白抑菌活性的检测
A 和 B 分别是融合蛋白对大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)抗性的检测结果;1. Amp 阳性对照;
2. 纯化的 pET-32a(+)蛋白阴性对照;3,4. 分别为 0.10 和 0.08 mg/mL 纯化的 BNBD5 融合蛋白

Fig. 7 Detection of the antibacterial activity of recombinant BNBD5

A and B are the detection of antimicrobial activities of recombinant to *E. coli* and *S. aureus*, respectively. 1. Amp as positive control;2. Purified pET-32a(+) as negative control;3 and 4 are 0.10 and 0.08 mg/mL purified BNBD5 fusion proteins, respectively

3 讨 论

防御素是一种具有代表性的内源抗菌肽,其广泛表达于哺乳动物的组织细胞中。大量研究表明,无论是重组表达还是人工合成的防御素,对细菌、真菌,甚至一些被膜病毒^[13]都有很强的杀伤力,且无毒副作用,不会使病原微生物产生耐药性^[14-16]。但动物体内天然防御素较少,分离成本较高,使得防御素的利用受到限制,因此通过基因工程手段在体外获得 3~5 ku 的防御素分子^[17-19],可在一定程度上扩大其利用范围,但如何提高表达水平及表达产物的稳定性,使合成的防御素有更好的杀菌活力及更广谱的杀菌效果还需深入研究。

本研究根据已发表的黄牛 *BNBD5*(AJ278799)基因序列,设计特异性引物,利用 RT-PCR 方法从牦牛肺组织中克隆了牦牛 *BNBD5* 基因成熟肽编码区。经测序分析,该成熟肽编码区大小为 138 bp,编码 45 个氨基酸残基,内含 6 个位置保守的半胱氨酸残基,分别在分子内形成 Cys1-Cys5、Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6 3 对二硫键,这是 β -防御素的基本结构单元^[20-21]。将该基因成熟肽序列与其他物种的 *BNBD5* 成熟肽序列进行同源性分析发现,该基因与黄牛 *BNBD5* 的同源性最高,可达 86.2%。从遗传进化树可知,哺乳类动物和禽类都存在 β -防御素,但他们的同源性都比较低。针对这一现象,很多学者用达尔文进化论来解释^[22-23],认为不同物种感染的病

原体有可能不同,为了抵御外源病原体,一些基因就会发生有利于自身的突变,从而导致防御素在物种间的同源性较低。

大肠杆菌原核表达系统是目前常用的表达系统之一,以其表达的融合蛋白多以包涵体的形式存在,这样既能保护目的蛋白不被蛋白酶降解,又能提高重组蛋白的产量及稳定性,且不会影响目标蛋白的功能及活性^[24-25]。本试验采用 His 组氨酸标签融合表达系统进行牦牛 *BNBD5* 的原核表达,用 GE 公司的 HisTrap^TMFF 纯化柱纯化蛋白,在包涵体的溶解、复性及透析过程中加入 2 mmol 的 β -巯基乙醇有助于二硫键的正确折叠,从而使纯化的目的蛋白有活性。防御素的抗菌机理非常复杂,他们对微生物作用的活性与特异性主要取决于他们的理化性质,例如阳离子净电荷和疏水性质、 β -防御素结构、低聚反应、蛋白水解稳定性等。目前对于防御素的抗菌机制并没有统一的说法,普遍被大家接受的说法是胞膜攻击作用,即抗菌肽作用于细菌的细胞膜,破坏膜的完整性使离子通透性失衡,细胞内容物大量渗出而导致细胞死亡^[26]。本研究制备的重组牦牛 *BNBD5* 融合蛋白对革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌都具有抑菌活性;空载体纯化的蛋白不具有抑菌活性,不影响重组蛋白的活性,这与前人的研究结果^[27-28]一致。但由于本试验都只选了 1 种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌进行抑菌活性研究,因此不能说明纯化的重组蛋白对其他细菌的抑菌活性,这是

本研究的不足之处。

本试验克隆的牦牛 *BNBD5* 成熟肽在 BL21 中得到了高效表达,且纯化的蛋白对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有很强的抗性,可为防御素代替抗生素成为新型的抗菌药物提供理论依据,但有关牦牛防御素的抗菌作用机制等还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 熊显荣,高川,符梅,等. 供体细胞来源和 TSA 处理对牦牛 iSCNT 胚胎重编程的影响 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(10):9-13.
Xiong X R, Gao C, Fu M, et al. Effects of donor cell and TSA treatment on reprogramming of yak-bovine iSCNT embryos [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2012, 40(10):9-13. (in Chinese)
- [2] Lehrer R L, Lichtenstein A K, Ganz T. Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells [J]. Annu Rev Immunol, 1993, 11:105-128.
- [3] Luenser K, Ludwig A. Variability and evolution of bovine β defensin genes [J]. Genes Immun, 2005, 6(2):115-122.
- [4] Yang D, Chertov O, Bykovskaia S, et al. β -defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 [J]. Science, 1999, 286:525-528.
- [5] Garcta R C, Krause A, Schulz S, et al. Human β -defensin 4: A novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity [J]. FASEB J, 2001, 15(10):1819-1821.
- [6] Diamond G, Zasloff M, Eck H, et al. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: Peptide isolation and cloning of a cDNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(9):3952-3956.
- [7] Selsted M E, Tang Y Q, Morris W L, et al. Purification, primary structures and antibacterial activities of β -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils [J]. J Biol Chem, 1993, 268(9):6641-6648.
- [8] Roosen S, Exner K, Paul S, et al. Bovine β -defensins: Identification and characterization of novel bovine β -defensin genes and their expression in mammary gland tissue [J]. Mamm Genome, 2004, 15(10):834-842.
- [9] Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, et al. Mastitis increase mammary mRNA abundance of β -defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2) and TLR4 but not TLR9 in cattle [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11(1):174-185.
- [10] Yang W, Molenaar A, Kurts-Ebert B, et al. NF- κ B factors are essential, but not the switch, for pathogen-related induction of the bovine beta-defensin 5 encoding gene in mammary epithelial cells [J]. Mol Immunol, 2006, 43(3):210-225.
- [11] 赵建乐. 牛 β -防御素 BNBD11 在大肠杆菌中的表达及抑菌活性鉴定 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 2011.
Zhao J L. Expression of bovine neutrophil β -defensin 11 in *Escherichia coli* and its antibacterial activity analysis [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2011. (in Chinese)
- [12] 苏健. 猪 β -防御素 1 基因在大肠杆菌中的表达与活性鉴定 [D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2012.
Su J. Expression and activity identification of porcine β -defensin-1 gene in *E. coli* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [13] 王静华,李有志,汪以真. 哺乳动物体内的防御素 [J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(1):45-46.
Wang J H, Li Y Z, Wang Y Z. Defense in the body of mammalian [J]. Chinese Journal Veterinary Medicine, 2004, 40(1):45-46. (in Chinese)
- [14] Buck C B, Day P M, Thompson C D, et al. Human alpha-defensins block papilloma virus infection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(5):1516-1521.
- [15] 张可心, 蒯利娟, 马得莹, 等. 鸭 β -防御素 5 基因的分离、鉴定及其生物学作用 [J]. 微生物学通报, 2011, 38(11):1688-1697.
Zhang K X, Lin L J, Ma D Y, et al. Isolation, characterization, and determination on bioactivity of duck avian beta-defensin 5 [J]. Microbiol China, 2011, 38(11):1688-1697. (in Chinese)
- [16] 周财源, 蒯利娟, 马得莹, 等. 鹅 β -防御素 5 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.
Zhou C Y, Lin L J, Ma D Y, et al. Cloning and initial characterization of goose avian β -defensin [J]. Acta Vet Zootech Sin, 2011, 42(8):1193-1200. (in Chinese)
- [17] Wang Z, Wang G S. APD: The antimicrobial peptide database [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32:590-592.
- [18] Yeaman M R, Yount N Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance [J]. Pharmacol Rev, 2003, 55(1):27-55.
- [19] Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection [J]. Respir Res, 2010, 1(3):141-150.
- [20] Kawaguchi A, Suzuki T, Kimura T, et al. Functional analysis of an alpha-helical antimicrobial peptide derived from a novel mouse defensin-like gene [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(4):778-784.
- [21] van Dijk A, Veldhuizen E J, Haagsman H P. Avian defensins [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008, 124(1/2):1-18.
- [22] Higgs R, Lynn D J, Gaines S, et al. The synthetic form of a novel chicken β -defensin identified in silico is predominantly active against intestinal pathogens [J]. Immunogenetics, 2005, 57(1/2):90-98.
- [23] Ganz T. Defensins and other antimicrobial peptides: A historical perspective and an update [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2005, 8:209-217.
- [24] 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]. J Microbiol, 2009, 47(5):610-618.
- [25] Ma D Y, Liao W Y, Wang R Q, et al. Two novel duck antibacterial peptides, avian β -defensins 9 and 10, with antimicrobial activity [J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(11):1447-1455.

Publishing House, 2006:103-113. (in Chinese)

[9] Filippo B, Maria F. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity [J]. Trends in Immunology, 2002, 23(4):201-208.

[10] Tsai Y T, Cheng P C, Liao J W, et al. Effect of the administration of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 on Peyer's patch-mediated mucosal immunity [J]. International Immunopharmacology, 2010, 10:791-798.

[11] Taro K, Shizuo A. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity [J]. Cell, 2011, 34:637-650.

[12] Murphy, Kenneth. Immunobiology [M]. 7th ed. America: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2008:462-464.

[13] Sandra J V, Jeroen D, Sonja I G, et al. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity [J]. Current Opinion in Immunology, 2007, 19:435-440.

[14] Santhakumar M, Bali P. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors [J]. Seminars in Immunology, 2009, 21:185-193.

[15] Tobias A O. Mechanisms of probiotic actions: A review [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2010, 300:57-62.

[16] Jean-Nicolas T, Mansour M. Key roles of dendritic cells in lung infection and improving anthrax vaccines [J]. Cell, 2010, 16(7):303-312.

(上接第 28 页)

[26] Dekker N, Cox R C, Kramer R A, et al. Substrate specificity of the integral membrane protease OmP determined by spatially addressed peptide libraries [J]. Biochemistry, 2001, 40(6):1694-1701.

[27] Wu J, Wang C, He H, et al. Molecular analysis and recombinant expression of bovine neutrophil β -defensin 12 and its antimicrobial activity [J]. Springer, 2010, 10:1033-1043.

[28] Zhang M, Liu J, Yang Z, et al. Expression, purification and characterization of human ubiquitin-activating enzyme, UBE1 [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(3):1413-1419.

欢迎订阅 2015 年《中国种业》

《中国种业》是由农业部主管,中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。

刊物目标定位:以行业导刊的面目出现,并做到权威性、真实性和及时性。覆盖行业范围:大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植、种子机械等,信息量大,技术实用。

读者对象:各级种子管理、经营企业的领导和技术人员,各级农业科研、推广部门人员,大中专农业院校师生,农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊,大 16 开,每期 8 元,全年 96 元。国内统一刊号:CN 11-4413/S,国际标准刊号:ISSN 1671-895X,全国各地邮局均可订阅,亦可直接汇款至编辑部订阅,挂号需每期另加 3 元。

邮发代号:82-132

地 址:(100081)北京市中关村南大街 12 号 中国种业编辑部

电 话:010-82105796(编辑部);010-82105795(广告发行部)

传 真:010-82105796

网 址:www.chinaseedqks.cn

E-mail:chinaseedqks@sina.com;chinaseedqks@163.com