

引用格式:

戴珊, 赵燕, 刘芬, 滕慧, 张学文. 牛乳铁蛋白功能片段在大肠埃希菌中的表达及其抑菌活性验证[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(5): 38–43.

DAI S, ZHAO Y, LIU F, TENG H, ZHANG X W. Lactoferrin functional fragments in *Escherichia coli* and its activity verification [J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(5): 38–43.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



牛乳铁蛋白功能片段在大肠埃希菌中的表达及其抑菌活性验证

戴珊, 赵燕, 刘芬, 滕慧, 张学文*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 以pET-30a和pEGX为出发载体, 构建牛乳铁蛋白功能片段(BlfFf)基因工程表达的非融合性表达质粒(pET-BlfFf)和融合性表达质粒(pEGX-BlfFf), 并在大肠埃希菌BL21中诱导了蛋白表达。SDS-PAGE分析结果表明, pET-BlfFf表达的目标蛋白主要以包涵体形式存在, 而pEGX-BlfFf表达的目标蛋白则可大量溶于细胞破碎上清液中, 说明后者更适合表达可溶性目标蛋白。pEGX-BlfFf诱导表达产物经GST标签填料柱亲和层析纯化后, 可制备出可溶性融合蛋白GST-BlfFf, 其产量约为60 mg/L。该蛋白经凝血酶去除GST标签, 获得纯化的目标肽。BlfFf的生物活性试验结果表明, 经过胃蛋白酶水解后的多肽对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌均具有抗菌活性。

关键词: 牛乳铁蛋白功能片段; 大肠埃希菌表达; 蛋白纯化; 抑菌活性

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)05-0038-06

Lactoferrin functional fragments in *Escherichia coli* and its activity verification

DAI Shan, ZHAO Yan, LIU Fen, TENG Hui, ZHANG Xuewen*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: Using pET-30a and pEGX as starting vectors, the non-fusion expression plasmids pET-BlfFf and the fusion expression plasmids pEGX-BlfFf were constructed for preparation of bovine lactoferrin functional fragment(BlfFf) and the protein expression was induced in *Escherichia coli* BL21. SDS-PAGE analysis showed that the target protein expressed from pET-BlfFf is mainly in the form of inclusion bodies, while the target protein expressed with pEGX-BlfFf could be dissolved in a large number of cell-shredding supernatants. This indicates that the pEGX-BlfFf is more applicable for soluble BlfFf production. The pEGX-BlfFf expression product was purified by GST label affinity column chromatography, and the soluble protein GST-BlfFf was purified. The yield was about 60 mg/L. The target protein BlfFf was finally purified after remove its GST by treated with thrombin. The bioactivity analysis of BlfFf showed that the peptides from BlfFf hydrolyzed by pepsin shows antibacterial activity against both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keywords: bovine lactoferrin functional fragment(BlfFf); expression in *E.coli*; protein purification; antibacterial activity

乳铁蛋白(lactoferrin, Lf)是具有多种生理活性的天然蛋白, 存在于哺乳动物的体液中, 在乳汁中的含量最高, 在畜牧业、食品工业领域有非常广阔的应用前景^[1]。来源于牛乳中的牛乳铁蛋白(Blf)具有抗氧化、

抗肿瘤、抗炎和抗菌等生物学功能, 已被美国食品和药物管理局认定为安全的食品添加剂(GRAS)^[2-5]。Blf在普通牛奶中的产率仅有0.02 mg/mL^[6-7], 因而直接从牛奶中分离获取Blf成本较高, 应用受限。运用基因

收稿日期: 2024-03-21

修回日期: 2024-08-10

基金项目: 山东大益生物科技有限公司项目(xczx-2023133)

作者简介: 戴珊(1998—), 女, 湖南常德人, 硕士研究生, 主要从事生物技术与工程研究, 2362148618@qq.com; *通信作者, 张学文, 博士, 教授, 主要从事分子遗传学研究, xwzhang@hunau.net

工程方法有望大量生产制备出活性Blf。

Blf多肽链在二级结构的基础上折叠成高度相似且彼此对称的2个片段,分别命名为N端和C端^[8-9],N末端区域有较强的生物活性^[10],直接表达Blf的N端功能多肽片段(BlfFf)更具有实用价值,可作为饲用抗生素的替代品。

IGLESIAS-FIGUEROA等^[11]利用AOX1启动子在毕赤酵母KM71-H中成功表达了Blf。WANG等^[12]对牛乳铁蛋白肽(LfcinB)进行了人工设计和优化,得到牛乳铁蛋白衍生肽(LfcinBD),利用甲醇诱导在毕赤酵母GS115细胞中表达LfcinBD,经验证,LfcinBD对金黄色葡萄球菌的抑菌活性强于LfcinB的。SUN等^[13]将LfcinB与人溶菌酶(hLY)融合,利用GAP启动子,在毕赤酵母GS115中融合表达。TANG等^[14]融合牛乳铁蛋白A肽段(LFA)和牛乳铁蛋白C肽段(LFC),融合肽(LFA-LFC)在巴斯德毕赤酵母KM71中获得表达,其杀菌活性强于LFA和LFC的。

郭东华等^[15]开展了LfcinB在大肠埃希菌中的表达研究,发现表达蛋白主要以包涵体的形式存在,进行较复杂的蛋白复性后其效果不理想。

已有研究^[16]表明,谷胱甘肽芳基转移酶(GST)标签与目标蛋白的融合表达,能够有效地运用于抗菌肽的原核表达和纯化,显著提高融合蛋白的溶解

度。pEGX载体是大肠埃希菌表达系统中含有GST标签的载体,笔者运用pEGX载体构建GST与牛乳铁蛋白功能肽(BlfFf)融合表达的载体pEGX-BlfFf,并与利用pET30a载体构建的pET-BlfFf非融合型表达载体作比较,在大肠埃希菌BL21中诱导重组蛋白的表达,分析2种载体表达和制备蛋白的差异性;利用pEGX-BlfFf载体表达的可溶性融合蛋白GST-BlfFf检验经胃蛋白酶处理的多肽的抑菌活性,以期后续工业化生产与应用打下基础。

1 材料与方法

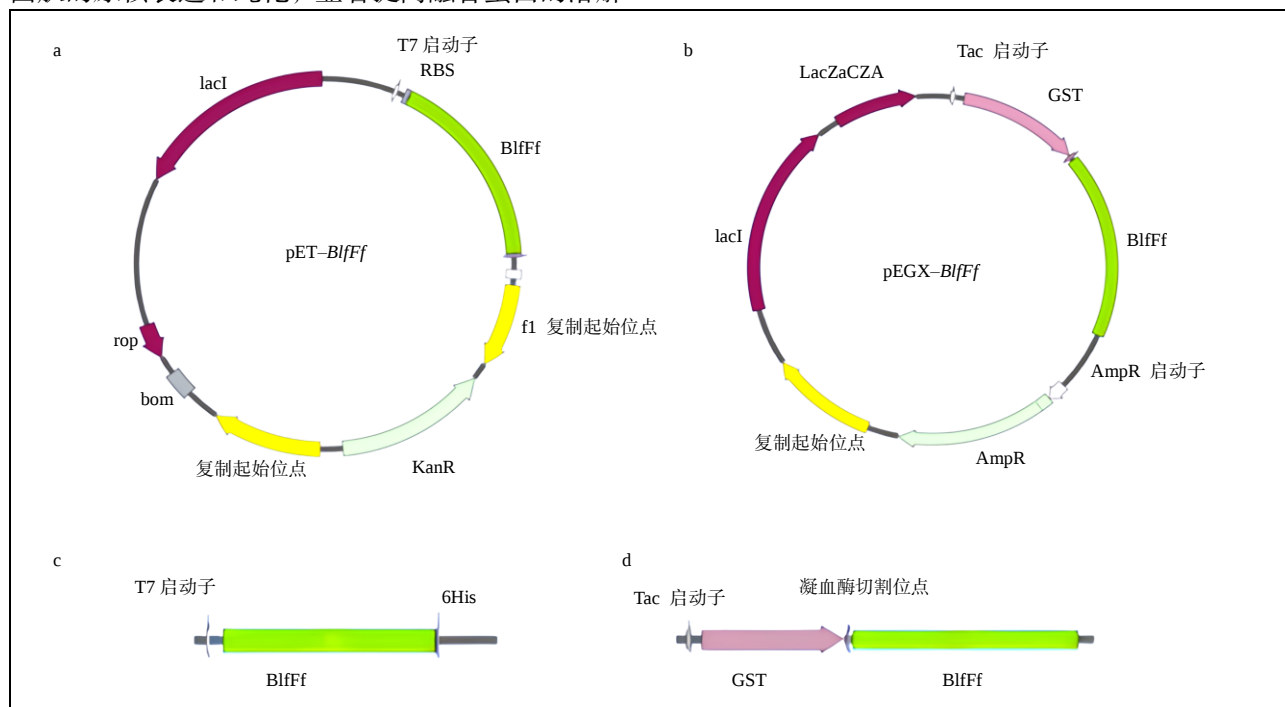
1.1 材料

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)菌株DH5 α 、BL21(DE3)均由湖南农业大学基因工程与细胞生物学实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 pET-BlfFf和pEGX-BlfFf重组表达载体的构建

构建BlfFf表达重组载体的结构如图1所示。牛乳铁蛋白基因(BlfFf)序列来源于NCBI数据库,编号M63502.1。为实现在大肠埃希菌表达系统中的高效表达,对该基因的编码序列进行密码子优化,以符



a pET-BlfFf重组载体; b pEGX-BlfFf重组载体; c pET-BlfFf重组载体上目标基因区域; d pEGX-BlfFf重组载体上目标基因区域。

图1 BlfFf表达重组载体的结构

Fig.1 The structure of BlfFf expression vectors

合大肠埃希菌的密码子使用偏好性。使用SnapGene4.1.9和DNAMAN6.0软件设计特异性引物,交由生工生物工程(上海)有限公司合成目标基因和引物序列。以pET30a(湖南福来格生物公司惠赠)和pEGX(长沙丰晖生物公司)为载体,采用同源重组技术构建pET-*BlfFf*和pEGX-*BlfFf*表达载体。将*BlfFf*基因片段和线性化载体混合,加入重组反应体系,37℃孵育1 h后,将反应产物转化至大肠埃希菌DH5 α ,使用含相应抗生素的LB平板筛选转化子,并通过单菌落PCR技术鉴定阳性克隆子。选取2株阳性克隆子在LB培养液中扩大培养,提取质粒DNA,经测序正确后保存质粒。

1.2.2 表达细菌发酵与蛋白多肽的诱导表达

将pET-*BlfFf*单菌落接种于含卡那霉素(Kan)的50 mL LB培养液,同时将pEGX-*BlfFf*单菌落接种于含有氨苄青霉素(Amp)的50 mL LB培养液,于37℃、180 r/min过夜培养。按照1:100的比例将菌液接种至TB培养基中,当菌液OD_{600 nm}值升至0.6时加入IPTG(1 mmol/L)于25℃、180 r/min诱导4 h。取2 mL菌液转至微量离心管中,6 000 r/min、4℃离心10 min,收集菌体。加入600 μ L 1×PBS缓冲溶液(4℃)重悬菌体;采用超声波破碎菌体:20%的超声强度,破碎时间为2 s,间隔时间为3 s,直至溶液呈半透明状态。超声处理注意避免产生气泡而导致GST标签断裂。12 000 r/min、4℃离心10 min,分离出上清液和沉淀,其中沉淀用150 μ L ddH₂O重悬。蛋白样品与5×loading buffer按照4:1的比例充分混匀,加热煮沸8~10 min,进行SDS-PAGE凝胶检测。在12% SDS聚丙烯酰胺凝胶中各加入10 μ L上清进行电泳。电泳检测条件如下:浓缩胶电泳工作电压80 V,20 min;分离胶电泳工作电压120 V,80 min。SDS-PAGE胶固定20 min、染色1 h,脱色30 min后拍照观察。

1.2.3 表达蛋白多肽产物的纯化

借助pEGX的GST标签,采用GST-tag Purification Resin介质进行亲和层析纯化得到目标蛋白。取50%的GST-tag Purification凝胶20 mL,4℃、1 000 r/min离心10 s,弃去液体,重复平衡2次。样品和GST-tag Purification凝胶混匀后,放置水平摇床上结合2 h。将样品与凝胶混匀装入空柱管

中,开启底部封口,收集100 μ L流穿液以供后续研究。使用1×PBS缓冲液清洗填料,收集流穿液(清洗5次,每次10 mL,各收集100 μ L用于后续检测)。使用洗脱缓冲液洗脱目的蛋白(洗脱10次,每次5 mL),每5 mL洗脱液用超滤管浓缩成400 μ L,即获得GST-*BlfFf*。通过凝血酶切除GST标签,28℃酶切4 h,获得*BlfFf*。

1.2.4 *BlfFf*抑菌活性的测定

分别取100 μ L大肠埃希菌菌液(OD_{600 nm}值为0.5~0.6)和金黄色葡萄球菌菌液(OD_{600 nm}值为0.5~0.6)涂布于固态LB培养基,按照1:100加入10 mg/mL胃蛋白酶液和*BlfFf*溶液,于37℃酶解20 min。待菌液吸收后,打孔后分别注入100 μ L未酶解和酶解的*BlfFf*蛋白溶液,以胃蛋白酶液作为阴性对照,1 mg/mL 氨苄青霉素(Amp)作为阳性对照,于37℃培养10~12 h,观察并拍照。

2 结果与分析

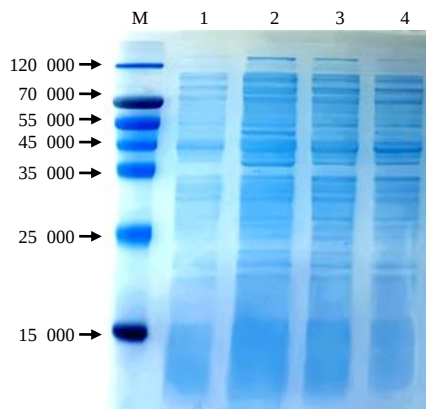
2.1 pET-*BlfFf*和pEGX-*BlfFf*表达载体的结构验证

利用同源重组法构建pET-*BlfFf*和pEGX-*BlfFf*重组载体,其中pET-*BlfFf*中直接表达*BlfFf*,利用6His标签纯化目的蛋白;pEGX-*BlfFf*中*BlfFf*与GST融合。将重组质粒转化至大肠埃希菌。随机挑取转化板上的单菌落,进行单菌落PCR检测,结果显示,所选单菌落均为阳性克隆子。分离质粒后测序,验证了其序列的正确性。

2.2 诱导表达获得目标多肽

2.2.1 pET-*BlfFf*在大肠埃希菌中的诱导表达

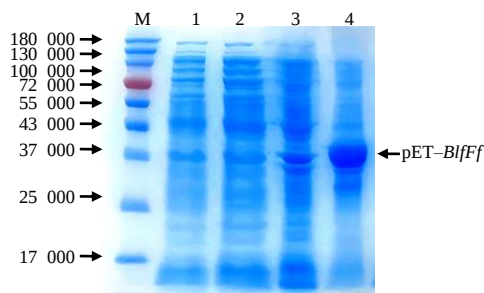
以IPTG诱导处理的BL21和转pET空载体的BL21为空白对照,未进行IPTG诱导处理的转pET-*BlfFf*的BL21为阴性对照,收集诱导4 h的菌体并用超声波破碎,收集上清和沉淀,进行SDS-PAGE检测,发现在上清液中,经IPTG诱导的pET-*BlfFf*大肠埃希菌未见诱导条带(图2)。后续用菌体沉淀进行SDS-PAGE,发现在相对分子质量35 000~45 000处有明显蛋白诱导条带(图3),该条带大小与预期的相对分子质量38 900大致相当,说明目标蛋白*BlfFf*诱导表达成功,主要以包涵体的形式表达,存在于沉淀中。



M 相对分子质量标准品; 1 IPTG诱导的BL21上清(空白对照);
2 IPTG诱导的pET上清(空载体对照); 3 未诱导的pET-*BlfFf*上清;
4 IPTG诱导的pET-*BlfFf*上清。

图2 pET-*BlfFf*在大肠埃希菌中诱导表达的上清液
SDS-PAGE检测结果

Fig.2 SDS-PAGE detection results of supernatant from *E.coli* with
pET-*BlfFf* induced by IPTG



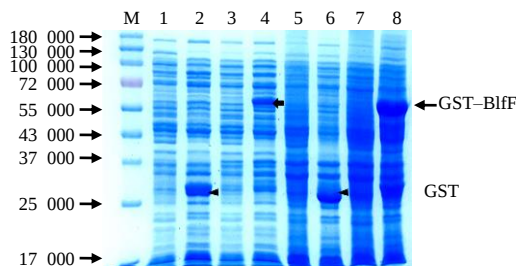
M 相对分子质量标准品; 1 IPTG诱导的BL21沉淀物(空白对照);
2 IPTG诱导的pET沉淀物(空载体对照); 3 未诱导的pET-*BlfFf*沉淀
物; 4 IPTG诱导的pET-*BlfFf*沉淀物。

图3 pET-*BlfFf*在大肠埃希菌中诱导表达的沉淀物
SDS-PAGE检测结果

Fig.3 SDS-PAGE detection results of precipitates from *E.coli* with
pET-*BlfFf* induced by IPTG

2.2.2 pEGX-*BlfFf*在大肠埃希菌中的诱导表达

以IPTG诱导处理的BL21和转pEGX的BL21为空白对照, 未进行IPTG诱导处理的转pEGX-*BlfFf*的BL21为阴性对照, 对通过超声波破碎所得的菌体裂解上清液和沉淀进行SDS-PAGE检测, 发现经IPTG诱导的转pEGX-*BlfFf*的BL21破碎上清液和沉淀均在相对分子质量55 000~72 000处有明显蛋白诱导条带(图4), 条带大小与预期的相对分子质量64 900大致相当, 说明pEGX-*BlfFf*基因融合表达成功。目的蛋白以包涵体和可溶性蛋白2种形式存在, 证实GST标签可以增加融合蛋白的可溶性, 有利于后续的纯化。



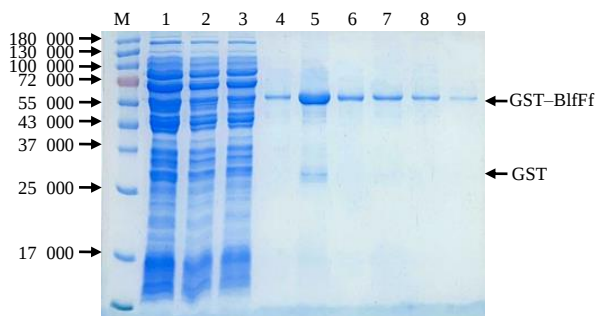
M 相对分子质量标准品; 1 IPTG诱导的BL21上清(空白对照);
2 IPTG诱导的pEGX上清(空载体对照); 3 未诱导的pEGX-*BlfFf*上清;
4 IPTG诱导的pEGX-*BlfFf*上清; 5 IPTG诱导的BL21沉淀(空白对照);
6 IPTG诱导的pEGX沉淀(空载体对照); 7 未诱导的pEGX-*BlfFf*沉淀;
8 IPTG诱导的pEGX-*BlfFf*沉淀。

图4 pEGX-*BlfFf*在大肠埃希菌中的诱导表达SDS-PAGE检测
结果

Fig.4 SDS-PAGE detection results of proteins expressed from
pEGX-*BlfFf*

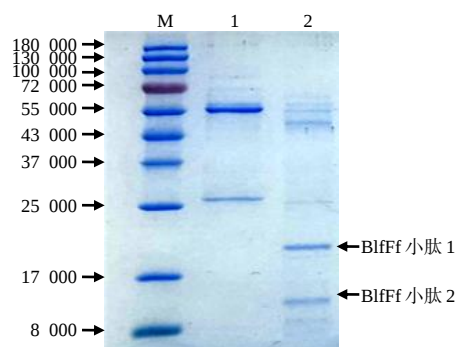
2.3 柱结合纯化和分离目标多肽

通过GST-tag Purification Resin 纯化后的pEGX-*BlfFf*菌体的破碎上清液, 经SDS-PAGE检测, 结果显示在相对分子质量64 900处有明显的特异性条带, 随着洗脱体积的增加, 蛋白纯度提高, 尤其5泳道样品GST-*BlfFf*蛋白含量最高, 说明GST-*BlfFf*蛋白较易在2倍柱体积条件下洗脱, 但存在1条杂蛋白GST, 可能是超声波破碎导致少量目标蛋白的GST断裂(图5)。为了获得纯化的*BlfFf*蛋白, 用凝血酶去除GST标签, 经SDS-PAGE检测, 切割后的样品中, *BlfFf*小肽1与小肽2的相对分子质量总和大小为38 900, 说明GST标签被切除且*BlfFf*被酶解成为了2个小肽(图6)。



M 相对分子质量标准品; 1 细菌裂解液; 2 流穿液;
3 洗涤液; 4~9 洗脱GST-*BlfFf*溶液。

图5 GST亲和层析纯化GST-*BlfFf*的SDS-PAGE检测结果
Fig.5 SDS-PAGE detection results of GST-*BlfFf* purified by
GST affinity chromatography



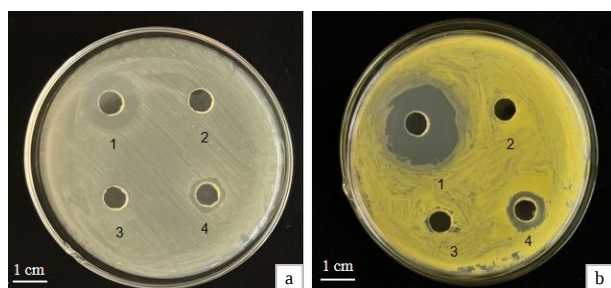
M 相对分子质量标准品; 1 切割前样品; 2 切割后样品。

图6 酶切GST标签后纯化BlfFf的SDS-PAGE检测结果

Fig.6 SDS-PAGE of BlfFf prepared by removing the GST tag from GST-BlfFf through enzyme digestion

2.4 BlfFf的抗菌活性

BlfFf的平板抑菌试验结果(图7)表明, BlfFf未经胃蛋白酶水解, 没有表现出抗菌活性, 而经胃蛋白酶水解后的蛋白溶液对大肠埃希菌DH5 α 和金黄色葡萄球菌具有较明显的抑制作用, 说明BlfFf在胃蛋白酶水解后释放了牛乳蛋白素Lfcin B和LFampin的抗菌活性肽。



a 大肠埃希菌; b 金黄色葡萄球菌。

1 1 mg/mL Amp溶液; 2 10 mg/mL胃蛋白酶溶液; 3 未加胃蛋白酶处理的GST-BlfFf蛋白溶液; 4 加胃蛋白酶处理的GST-BlfFf蛋白溶液。

图7 BlfFf酶解液的体外抑菌活性

Fig.7 Analysis of *in vitro* antibacterial activity of enzymatic hydrolyzed BlfFf

3 结论与讨论

在重组蛋白的基因工程生产中, 有动物细胞生物反应器、植物细胞表达、昆虫细胞、酵母及原核细胞等多种表达系统。从蛋白制备的难易程度和成本效益来看, 最合适的还是大肠埃希菌原核表达系统。大肠埃希菌表达系统具有遗传背景清晰、操作简单、繁殖快、易大规模发酵等优点。利用pET-BlfFf载体表达的BlfFf, 目标蛋白基本以包涵体形式存

在。虽然包涵体不利于蛋白质功能的发挥和利用, 但它产量高, 便于纯化, 倘能建立起合适的BlfFf包涵体的溶解与复性条件, 获得有完全活性的多肽产物, 则可以为BlfFf的生产建立起更有效率的表达模式。可溶性蛋白GST-BlfFf, 易于直接纯化, 但产率不高, 可能是受体细胞受到了蛋白积累的抑制作用的缘故。

GST标签融合目的蛋白的促溶效果具有差异性, 高度疏水或相对分子质量大于100 000的蛋白质在被GST标记时倾向于形成不溶的聚集体和包涵体, 使其失去活性, 加入Triton X和CHAPS等洗涤剂可以增强融合物的溶解度^[17]。天然GST以同二聚体的形式存在, 当与同样可以寡聚的靶蛋白融合时, 可以形成相对分子质量较大的复合物, 不易从结合的谷胱甘肽树脂中洗脱。在使用GST-tag Purification Resin纯化时, 可以采取添加防止二聚化包括改变盐或pH, 或添加强还原剂, 如二硫苏糖醇(DTT)^[18]等策略。

测定结果表明, BlfFf蛋白对革兰阴性菌和革兰阳性菌有较明显的抑菌活性。乳铁蛋白对细菌的抑菌效果主要是通过铁剥夺、膜渗透和酶抑制3种途径^[1,19]实现的。乳铁蛋白作用于革兰阴性菌的双层膜, 在疏水核心形成一个空隙, 此时细菌用单分子层填满它, 最后膜变薄导致破裂^[20-21]。当乳铁蛋白与革兰阳性菌反应时, 由于乳铁蛋白本身带正电荷, 与细胞壁上的磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)产生静电吸引, 破坏细胞膜的正常生理活动, 导致细胞内容物渗出, 最后死亡^[22]。铁离子是细胞生长的营养剂, 乳铁蛋白对铁离子具有非常高的结合力, 从而竞争吸附细胞的铁离子, 致使细胞生长缓慢最后死亡^[23]。BlfFf蛋白对革兰阴性菌和革兰阳性菌的抑菌活性可能是通过铁剥夺和膜渗透两种机制产生的。

参考文献:

- [1] GONZÁLEZ-CHÁVEZ S A, ARÉVALO-GALLEGOS S, RASCÓN-CRUZ Q Lactoferrin: structure, function and applications[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2009, 33(4): 301.e1-301.e8.
- [2] KELL D B, HEYDEN E L, PRETORIUS E The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 1221.

- [3] KRUZEL M L, ZIMECKI M, ACTOR J K. Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1438.
- [4] MAYEUR S, SPAHIS S, POULIOT Y, et al. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2016, 24(14): 813–836.
- [5] SUPERTI F. Lactoferrin from bovine milk: a protective companion for life[J]. *Nutrients*, 2020, 12(9): 2562.
- [6] SHIMAZAKI K I, KAWAGUCHI A, SATO T, et al. Analysis of human and bovine milk lactoferrins by rotofor and chromatofocusing[J]. *International Journal of Biochemistry*, 1993, 25(11): 1653–1658.
- [7] JIN L, LI L H, ZHOU L X, et al. Improving expression of bovine lactoferrin N-lobe by promoter optimization and codon engineering in *Bacillus subtilis* and its antibacterial activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(35): 9749–9756.
- [8] ANDERSON B F, BAKER H M, NORRIS G E, et al. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1989, 209(4): 711–734.
- [9] MOORE S A, ANDERSON B F, GROOM C R, et al. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 274(2): 222–236.
- [10] VOGEL H J. Lactoferrin, a bird's eye view[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2012, 90(3): 233–244.
- [11] IGLESIAS-FIGUEROA B, VALDIVIEZO-GODINA N, SIQUEIROS-CENDÓN T, et al. High-level expression of recombinant bovine lactoferrin in *Pichia pastoris* with antimicrobial activity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(6): 902.
- [12] WANG L, WANG Y L, LV Z L, et al. Design of bovine lactoferricin-derived peptide and its expression and activity in *Pichia pastoris*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 534: 822–829.
- [13] SUN J, JIANG J, LIU L F, et al. Expression of the hybrid antimicrobial peptide lactoferrin-lysozyme in *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, 66(2): 202–208.
- [14] TANG X S, TANG Z R, WANG S P, et al. Expression, purification, and antibacterial activity of bovine lactoferrampin-lactoferricin in *Pichia pastoris*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(3): 640–651.
- [15] 郭东华, 孙东波, 孙斌, 等. 牛乳铁蛋白肽基因(LfcinB)的合成及其在大肠杆菌中的表达[J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(3): 451–454.
- [16] KOSOBOKOVA E N, SKRYPNIK K A, KOSORUKOV V S. Overview of fusion tags for recombinant proteins[J]. *Biochemistry(Moscow)*, 2016, 81(3): 187–200.
- [17] DECEGLIE S, LIONETTI C, ROBERTI M, et al. A modified method for the purification of active large enzymes using the glutathione S-transferase expression system[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 421(2): 805–807.
- [18] VINCKIER N K, CHWOROS A, PARSONS S M. Improved isolation of proteins tagged with glutathione S-transferase[J]. *Protein Expression and Purification*, 2011, 75(2): 161–164.
- [19] OCHOA T J, SIZONENKO S V. Lactoferrin and prematurity: a promising milk protein?[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2017, 95(1): 22–30.
- [20] LU Y, ZHANG T F, SHI Y, et al. PFR peptide, one of the antimicrobial peptides identified from the derivatives of lactoferrin, induces necrosis in leukemia cells[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20823.
- [21] ZWEYTICK D, DEUTSCH G, ANDRÄ J, et al. Studies on lactoferricin-derived *Escherichia coli* membrane-active peptides reveal differences in the mechanism of N-acylated versus nonacylated peptides[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(24): 21266–21276.
- [22] LEON-SICAIROS N, CANIZALEZ-ROMAN A, DE LA GARZA M, et al. Bactericidal effect of lactoferrin and lactoferrin Chimera against halophilic *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Biochimie*, 2009, 91(1): 133–140.
- [23] EID R, ARAB N T T, GREENWOOD M T. Iron mediated toxicity and programmed cell death: a review and a re-examination of existing paradigms[J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Molecular Cell Research*, 2017, 1864(2): 399–430.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 罗维