

“大通牦牛” *Lfcin* 基因克隆及生物信息学分析

裴杰, 阎萍, 冯瑞林, 梁春年, 郭宪, 曾玉峰, 包鹏甲, 朱新书, 褚敏

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050)

摘要 [目的]克隆“大通牦牛”*Lfcin* 基因,为将该基因应用于饲料工业和养殖业提供依据。[方法]利用 PCR 技术从“大通牦牛”基因组 DNA 中获得乳铁蛋白素(*Lactoferricin*, *Lfcin*)基因序列;将 *Lfcin* 基因连接到 pGEM-T easy 载体,送至生物公司测序;将“大通牦牛”与奶牛的 *Lfcin* 基因序列进行比对;同时,对牦牛、奶牛、人、小鼠等物种的 *Lfcin* 蛋白进行序列分析和进化树分析。[结果]克隆获得了含“大通牦牛”LF(*Lactoferrin*)第二外显子的 DNA 序列,共 778 bp,其中 *Lfcin* 基因编码区长 75 bp,编码 25 个氨基酸;序列分析显示,克隆获得的牦牛 DNA 序列与奶牛该序列存在 11 个碱基的变异;牦牛和奶牛的 *Lfcin* 蛋白质序列完全相同,各物种 *Lfcin* 蛋白具有较高的同源性;进化树分析表明 *Lfcin* 进化树符合物种进化规律。[结论]该研究为 *Lfcin* 基因在原核或真核细胞中的表达研究以及进一步研究 *Lfcin* 蛋白的生活活性奠定了基础。

关键词 牦牛; *Lfcin* 基因; 克隆; 生物信息学

中图分类号 S823 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)18-08380-03

Clone and Bioinformatic Analysis of *Lfcin* Gene of Datong Yak

PEI Jie et al (Lanzhou Institute of Animal Science and Veterinary Pharmaceutics, China Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730050)

Abstract [Objective] The experiment aimed to provide reference for using this gene into feed industry and breeding industry by cloning *Lfcin* gene of Datong Yak. [Method] PCR method was used to obtain gene sequence of *Lactoferricin* (*Lfcin*) from genomic DNA of Datong Yak. The *Lfcin* gene was connected to pGEM-T easy vector then it was sequenced by Biology Company. The *Lactoferricin* (*Lfcin*) gene of Datong Yak was compared with that of cow. Meanwhile, *Lfcin* genes of yak, cow, human and mouse were conducted sequence analysis and phylogenetic analysis. [Result] Through clone, the DNA sequence of Datong Yak containing exon 2 was obtained and it was 778 bp. Among them, the coding region of *Lfcin* gene was 75 bp and it encoded 25 amino acids. It was concluded from sequence analysis that there were 11 variant bases in DNA sequences of yak and cow while the *Lfcin* protein sequences of yak and cow were same, so *Lfcin* protein of all species had high homology. The phylogenetic analysis showed that *Lfcin* phylogenetic tree accorded with species evolution laws. [Conclusion] The research laid foundations for expression study of *Lfcin* gene in prokaryotic cells and eukaryotic cells as well as further study of biological activity of *Lfcin* protein.

Key words Yak; *Lfcin* gene; Clone; Bioinformatics

“大通牦牛”是在青藏高原自然生态条件下,人工培育的第一个肉用型牦牛新品种,因其育成于青海省大通种牛场而得名。牦牛是我国特有牛种之一,是具有重要经济价值的稀有景观物种,对低温高海拔地区的恶劣环境有极强的耐受能力。其特性是能在其他家畜难以生存的高寒环境中正常繁衍生息,对寒冷严酷、空气含氧量少、气压低的高原生态环境适应性强,能充分利用其他家畜难以利用的高山草原,生产乳、肉、毛、皮等产品^[1]。

同时,乳铁蛋白(LF, *Lactoferrin*)不仅参与铁的转运,而且具有广谱抗菌、抗氧化、抗癌、调节免疫系统等重大生物功能^[2-3],被认为是一种新型抗菌、抗癌药物和极具开发潜力的食品和饲料添加剂。乳铁蛋白素(*Lactoferricin*, *Lfcin*)是从乳铁蛋白 LF 上被胃蛋白酶水解下来的 25 个氨基酸残基的小肽,位于乳铁蛋白第二外显子,是乳铁蛋白的抗菌活性中心,其抗菌活性是 LF 的几百倍^[4]。*Lfcin* 具有广谱抗菌活性,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有效,同时具有抗真菌、抗病毒、抑制肿瘤细胞生长、参与免疫调节等多种生物学功能和维持动物肠道菌群正常生态稳定的功能,从而起到提高动物生产性能的作用^[5]。

抗生素作为抗菌促生长剂添加到饲料中由来已久,但其广泛和大量应用导致动物性食品中药物残留等问题也愈来愈令人担忧。因此寻找一种安全、环保和高效的新型抗菌制

剂已成为当务之急。目前对 LF 和 *Lfcin* 基因的研究主要集中在人、牛和小鼠上,而在牦牛上的相关研究还未见报道。牦牛 *Lfcin* 基因的克隆及之后生物工程生产方面的研究将使其作为添加剂应用于饲料工业和养殖业成为可能,并为我国创制具有自主知识产权的人类抗菌新药提供了可能。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 血样、细菌菌株及载体。“大通”牦牛血样取自青海省大通牛场;大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 购于天为时代公司; pGEM-T easy 克隆载体为 Promega 公司产品。

1.1.2 分子生物学试剂。LA *Taq* 聚合酶,限制性内切酶 *Apa* I, *Sal* I 和 dNTPs 均为 TaKaRa 公司产品;琼脂糖由上海 YITO 公司生产;XGal、IPTG、琼脂粉购于 Sigma 公司;T₄ DNA 连接酶为 Promega 公司产品;DNA 凝胶回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购于 TIANGEN 公司;胰蛋白胍、酵母浸出粉由 OXOID 公司生产。

1.1.3 引物的设计与合成。根据 GenBank 收录的奶牛 LF 基因 NC_007320 设计 1 对引物 P1:5'-CCAGCATGGAGTGGT-CAT-3'/P2:5'-TGGTGGTGGTGGTGGT-3'。引物由上海生工生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取。以成年“大通”牦牛的血液组织为材料,用酚氯仿方法提取基因组 DNA^[5]。

1.2.2 扩增、回收目的基因。以“大通”牦牛基因组 DNA 为模板,P1、P2 为引物,扩增 *Lfcin* 基因。PCR 反应体系:10 \times LA 扩增缓冲液 20 μ l, 10 mmol/L dNTP 混合物 4 μ l, 20

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(BR F070105)。

作者简介 裴杰(1979-),男,内蒙古牙克石人,助理研究员,从事分子遗传学研究。E-mail: douglaspei@126.com

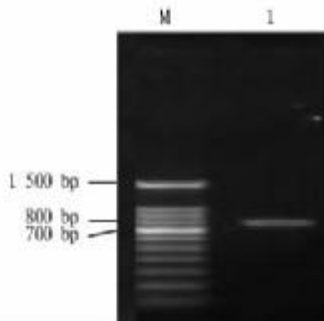
收稿日期 2009-03-05

mmol/L引物 P1 4 μ l, 20 mmol/L 引物 P2 4 μ l, 模板 DNA 1 μ g, LA *Taq* DNA 聚合酶 1 μ l, 加超纯水至 200 μ l, 混匀后, 以每份 20 μ l 分装成 10 管。PCR 反应条件: Lid 105 $^{\circ}$ C, 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒回收 PCR 产物, 并以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测回收产物。

1.2.3 重组质粒 pGEM-T/*Lfcin* 的构建。将回收的 PCR 产物和 pGEM-T easy 载体在 *T₄* 连接酶的作用下, 于 16 $^{\circ}$ C 连接 1 h 后, 4 $^{\circ}$ C 连接过夜, 构建重组质粒 pGEM-T/*Lfcin*。

1.2.4 重组子的构建鉴定和阳性重组子测序。将重组质粒转化至感受态 *E. coli* DH5 α 菌中, 转化产物于 37 $^{\circ}$ C 100 r/min 培养 90 min, 涂于含有 Amp、X-gal、IPTG 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 14 h。在固体 LB 培养基上挑取白色阳性菌落, 接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 225 r/min 过夜培养。通过菌液 PCR 对所获得的大肠杆菌进行鉴定, 同时提取质粒, 用 *Apa* I、*Sal* I 内切酶双酶切鉴定。将 PCR 和酶切鉴定均为阳性的菌落送至上海生工生物公司测序。

1.2.5 对 *Lfcin* 基因进行序列比对。将扩增获得的含 *Lfcin* 基因的牦牛 DNA 序列与奶牛相应的 DNA 区域用生物软件进行序列比对。



注: M 为 DNA 分子质量标准; 1 为 PCR 扩增产物。
Note: M. DNA marker; 1. PCR amplified products.

图 1 *Lfcin* 基因 PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig.1 The PCR amplification electrophoretogram of *Lfcin* gene

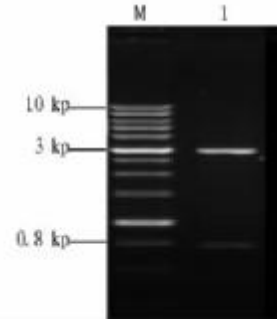
1.2.6 不同物种 *Lfcin* 序列分析。在 GenBank 中检索奶牛、

人、猪、狗、绵羊、小鼠和大猩猩的 *Lfcin* 蛋白质序列, 采用生物软件对这些物种的进化树进行分析。

2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 1 条约 800 bp 的 DNA 片段, 与预期 DNA 片段(778 bp)大小一致(图 1)。

2.2 目的基因的克隆与重组子的鉴定 以 *Apa* I、*Sal* I 内切酶双酶切 pGEM-T/*Lfcin* 质粒, 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 得到 1 条约 3 000 bp 的 pGEM-T 线性片段和约 800 bp 的插入片段(图 2), 与预期结果完全相同。



注: M 为 DNA 分子质量标准; 1 为 pGEM-T/*Lfcin*。质粒的 *Apa* I、*Sal* I 内切酶双酶切片段。

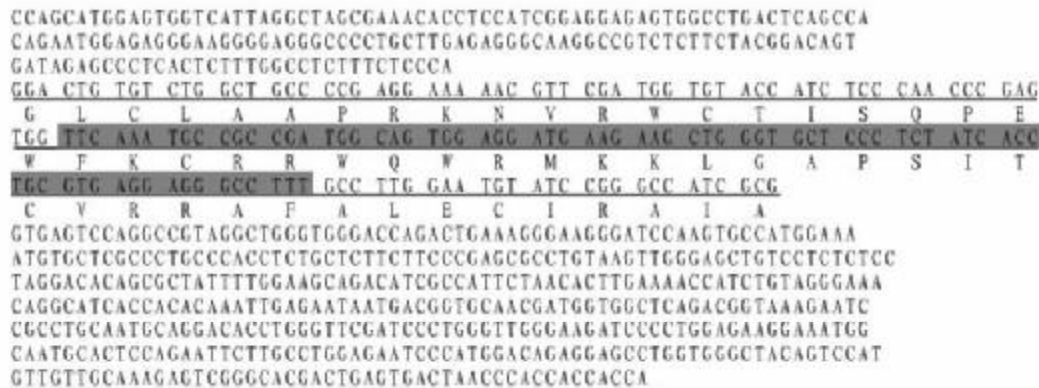
Note: M. DNA marker; 1. Plasmid pGEM-T/*Lfcin* digested by *Apa* I and *Sal* I

图 2 质粒 pGEM-T/*Lfcin* 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction identification of vector pGEM-T/*Lfcin*

将 PCR 鉴定和酶切鉴定均为阳性的重组子送至上海生工生物公司测序。序列分析证实该 DNA 片段大小为 778 bp, 其中 *LF* 基因第二外显子长 165 bp, 编码 55 个氨基酸, *Lfcin* 多肽占 25 个氨基酸(图 3)。

2.3 牦牛和奶牛 *Lfcin* 基因的序列比对 将扩增获得的含牦牛 *LF* 基因第二外显子的 DNA 序列与奶牛相应区域的 DNA 序列用生物软件进行序列比对。结果发现, 在 *LF* 基因第二个显子以外, 2 个物种存在 7 个碱基的差异; 而在 *LF* 基因第二外显子之内存在 2 个碱基的差异, 这 2 个碱基其中之一包含于 *Lfcin* 基因编码区(图 4)。



注: 画线部分为 *LF* 基因第二外显子; 阴影部分为 *Lfcin* 基因编码区。
Note: The second exon of *LF* gene was underlined; the coding region of *Lfcin* was shadowed.

图 3 重组质粒 pGEM-T/*Lfcin* 测序结果

Fig.3 Sequencing results of *Lfcin* gene in pGEM-T vector

2.4 牦牛和奶牛 *Lfcin* 蛋白的序列分析 在 GenBank 中检索不同物种 *Lfcin* 蛋白的氨基酸序列, 用生物软件对这些序

```

牦牛 CCAGCATGGAGTGGTCAATTAGGCTAGCGAAACACCTCATCGGAGGAGAGTGGCTGACTCAGCCACAGAATGAGAGGGAAAGGGGAGGGCCCTGCTTG 100
奶牛 CCAGCATGGAGTGGTCAATTAGGCTAGCGAAACACCTCATCGGAGGAGAGTGGCTGACTCAGCCACAGAATGAGAGGGAAAGGGGAGGGCCCTGCTTG 100

牦牛 AGAGGGCAAGGGCGTCTCTTACGGACAGTATAGAGCCCTCACTCTTTGGCCCTCTTTCTCCAGGACTGTGTCTGGCTGCCCGAGGAAAAAGCTTG 200
奶牛 AGAGGGCAAGGGCGTCTCTTACGGACAGTATAGAGCCCTCACTCTTTGGCCCTCTTTCTCCAGGACTGTGTCTGGCTGCCCGAGGAAAAAGCTTG 200

牦牛 ATGGTGTACCATCTCCCAACCAGTGGTTCAAATGCCGCCGATGGCAGTGGAGGATGAAGAAAGCTGGGTGCTCCCTCTATCACCTGCTGAGGAGGGCC 300
奶牛 ATGGTGTACCATCTCCCAACCAGTGGTTCAAATGCCGCCGATGGCAGTGGAGGATGAAGAAAGCTGGGTGCTCCCTCTATCACCTGCTGAGGAGGGCC 300

牦牛 TTTGCTTGGAAATGTATCCGGGCCATCCGGGTGAGTCCAGGCCGTAGGCTGGGTGGGACCAGACTGAAAGGGAAAGGGATCCAAAGTCCATGGAAATGTG 400
奶牛 TTTGCTTGGAAATGTATCCGGGCCATCCGGGTGAGTCCAGGCCGTAGGCTGGGTGGGACCAGACTGAAAGGGAAAGGGATCCAAAGTCCATGGAAATGTG 400

牦牛 CTCGCCCTGCCCCCTCTCTGCTCTCTTCTCCGAGCGCCTGTAAGTTGGGAGCTGTCTCTCTCTCCTAGGACACAGCGTATTTTGGAAAGCAGACATGCCAT 500
奶牛 CTCGCCCTGCCCCCTCTCTGCTCTCTTCTCCGAGCGCCTGTAAGTTGGGAGCTGTCTCTCTCTCCTAGGACACAGCGTATTTTGGAAAGCAGACATGCCAT 500

牦牛 TCTAACATTTGAAAAACATCTGTAGGGAAACGGCATCACACACAAATGAGAATAATGACGGTGCACAGATGGTGGCTCAGATGGTAAAGAAATCCGCC 600
奶牛 TCTAACATTTGAAAAACATCTGTAGGGAAACGGCATCACACACAAATGAGAATAATGACGGTGCACAGATGGTGGCTCAGATGGTAAAGAAATCCGCC 600

牦牛 TGCAATGCAGGACACCTGGGTTGATCCCTGGGTTGGGAAGATCCCTGGAGAAGGAAATGGCAATGCACTCCAGAAATTTTGCCTGGAGAATCCCATGG 700
奶牛 TGCAATGCAGGACACCTGGGTTGATCCCTGGGTTGGGAAGATCCCTGGAGAAGGAAATGGCAATGCACTCCAGAAATTTTGCCTGGAGAATCCCATGG 700

牦牛 ACAGAGGAGCCTGGTGGGCTACAGTCCATGTTGTTGCAAAGAGTCCGGCCAGGACTGAGTGACTAACCCACCACCACCA 778
奶牛 ACAGAGGAGCCTGGTGGGCTACAGTCCATGTTGTTGCAAAGAGTCCGGCCAGGACTGAGTGACTAACCCACCACCACCA 778

```

注:阴影部分为2个品种间的碱基差异。

Note: The base difference was shadowed.

图4 奶牛与牦牛含第二外显子DNA比对结果

Fig.4 Second exon DNA contrast results of cow and yak

列进行分析。结果显示,各物种的Lfcin蛋白在氨基酸序列上存在较高的同源性,其中牦牛和奶牛的Lfcin蛋白氨基酸序列完全一致(图5)。采用生物软件对牦牛进化树分析显示,Lfcin蛋白进化树符合物种进化规律(图6)。

Lfcin结构、功能、作用机制及基因工程已成为近年来学者研究与关注的热点问题^[6]。

Lfcin除通过与细胞膜结合、增加膜通透性,使细胞内容物泄露而导致细胞死亡外,同时也能够进入细胞,通过与胞内DNA物质结合,发挥生物学功能^[7]。但无论是破坏细胞膜结构,还是进入细胞与胞内分子结合,Lfcin都必须首先与细胞膜结合,Lfcin两性结构性和碱性基团在这一过程中起了关键作用。由于真核细胞膜磷脂成分主要为电中性的磷脂酰胆碱,而原核细胞膜含有大量带负电荷的磷脂酰甘油,使膜带有净负电荷。因此,呈强碱性的Lfcin通过与原核细胞膜上的负电荷基团产生静电吸引而与胞膜结合,却不能与正常真核细胞膜结合,这也解释了Lfcin特异性作用于原核细胞而对真核细胞无效的原因^[7]。在Lfcin与微生物胞膜作用过程中,LfcinB第4~9位(RRWQWR)氨基酸残基被认为是LfcinB的活性中心,其中3个Arg残基侧链与细胞膜成分通过正负电荷吸引,而Trp的芳香环结构与磷脂头部的甘油相互作用,通过疏水作用将小肽锚定在胞膜上,其中Trp残基的大小、形状及其芳香特性起重要作用。LfcinB由于含有2个Trp残基,其他Lfcin仅有1个Trp,因此解释了LfcinB体外抗菌作用最强的原因^[8-9]。



注:阴影部分为不同品种的氨基酸差异。

Note: The amino acid difference of different varieties was shadowed.

图5 不同物种Lfcin蛋白序列比对结果

Fig.5 Contrast results of Lfcin proteins of different species

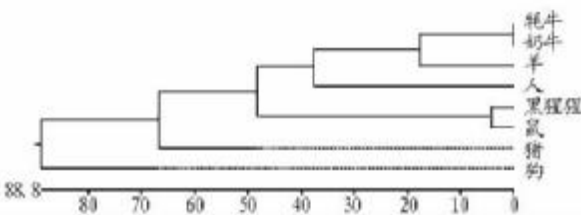


图6 不同物种Lfcin蛋白质进化树分析

Fig.6 Phylogenetic tree of Lfcin protein of different species

3 讨论

抗生素的滥用已威胁到人类自身健康和动物的持续健康生产,因此科学工作者必须寻找安全的新型抗生素替代物解决该问题。乳铁蛋白是乳铁蛋白在酸性环境下经胃蛋白酶作用从N端释放的一段多肽,是一类富含Trp的小分子抗菌肽。研究发现,Lfcin除不能结合铁离子外,具备乳铁蛋白的所有生物学活性^[4]且具有普通抗生素所不具有的一系列优点,包括广谱能力和不易产生耐药性的特点,能抑制病毒、真菌增殖和抑杀肿瘤细胞,但对真核细胞几乎没有毒性,加上Lfcin不含稀有氨基酸和外源化学成分,是一种健康安全的产品,显示了Lfcin替代抗生素的巨大潜能。因此,关于

然而天然分离LfcinB产量低、工艺复杂,成本昂贵,人工合成LfcinB及其衍生物费用更高,无法大规模生产,成为LfcinB广泛应用的重要制约因素。随着现代生物技术的发展,利用转基因方法将作为蛋白肽类的乳铁蛋白转入其他生物中表达,是解决工业用LfcinB来源不足最具潜力的途径。已有许多学者克隆了人、牛和猪乳铁蛋白基因,并在细菌、真菌、植物和动物细胞中成功表达,且正在研究表达产物在医学和动物营养中的应用效果,但研究焦点集中在人和牛乳铁蛋白及其Lfcin^[10]上。目前Nakamura等^[11]用昆虫细胞表达了LfcinB N端部分,国内华南农业大学的温刘发在进行毕赤酵母表达LfcinB基因的研究,而张晶晶等^[12]通过DNA转染的方法实现了LfcinB在莎能奶山羊乳腺上皮细胞中表达。

(下转第8395页)

2.5 m,父、母本行间距 20.0 cm。父本株行距 16.5 cm × 26.4 cm,每穴插 1 粒种子苗。母本株行距 13.3 cm × 13.3 cm,双本栽插,每穴插足 4 个以上茎蘖苗,插足 39 万蔸/hm²,插足基本苗 150 万株/hm²。

3.4 施足底肥,早施追肥,不施或少施保化肥 父本移栽前施水稻专用肥 300 kg/hm² 作基肥,父本 4 叶 1 心,小苗带土移栽,移栽后 3~4 d 用尿素 112.5 kg/hm²、过磷酸钙 75 kg/hm²、氯化钾 60 kg/hm² 混合施于父本行间,浅水施肥,自然落干,干湿交替,通气发根,促父本早发返青分蘖。由于母本茎秆粗壮,耐肥抗倒,母本移栽时用(N、P、K 含量均为 16%)进口复合肥 900 kg/hm² 作底肥,栽后 4~5 d,用尿素 450 kg/hm²,加进口叶喃丹 75 kg/hm²,父母本同施。母本幼穗分化 2~3 期,追施促花肥 75 kg/hm²。由于父本对 N 素较敏感,母本叶片较宽大,为避免影响割叶赶粉效果,父、母本后期基本不施保花肥,苗情明显落黄田块,可酌量少施保花肥,一般不超过 60 kg/hm²。

3.5 正确施用母本“九二〇”,避免母本裂颖和假性结实 母本 M98A 对“九二〇”特别敏感,若“九二〇”使用不当,不仅易引发倒伏,且可能造成母本裂颖和假性结实现象发生,导致严重减产和种子质量下降。母本 M98A“九二〇”正确施用的原则是:适当推迟、适量减少施用。父母本花期相遇良好的情况下,母本首次使用“九二〇”一般在见穗 15%~20%,连续 3 d 用完,第 1 天喷施 45 g/hm²,第 2 天施用 75~

90 g/hm²,第 3 天施用 75~90 g/hm²。母本 M98A“九二〇”施用应注意两个方面:一是总量控制在 225 g/hm² 左右,严格控制 300 g/hm² 以内;二是盛花期严禁大剂量喷施“九二〇”,否则极易引起母本受精后颖壳不能闭合,灌浆受阻,甚至出现假性受精现象。

3.6 及时正确识别母本杂株,保证种子质量 ①苗期除杂。母本 M98A 苗期具有生理白化现象,1~2 叶期出现白化,4 叶后叶色转为正常。凡在 2~3 叶母本白化期间,非白化的绿色苗均为杂株,应及时拔取;②花期除杂。M98A 花期具有嵌合不育现象,即有时田间出现少数单株的几朵颖花中有 1~2 个雄蕊呈淡黄色,有轻微散粉现象。这是 M98A 亲本遗传的正常现象,一般自交结实率较低,不会影响种子纯度。若整穗颖花花药呈淡黄色,有明显散粉的杂株,则应在每天上午赶粉之前整穴拔除。

3.7 喷施根外营养,增加千粒重 M98A 千粒重较低,仅 23 g 左右。虽然异交率较高,但千粒重是影响制种产量的重要因素。赶粉结束后,用磷酸二氢钾加美洲星或其他叶面营养剂,连续喷施 2 次,能明显提高母本籽粒饱满度,增加 M98A 千粒重,从而提高制种产量。

参考文献

[1] 庆榕. 高异交率籼型三系不育系 M98A 的选育与利用[J]. 杂交水稻, 2005, 20(4): 9-10.

(上接第 8382 页)

为此,笔者克隆牦牛 *Lfcin* 基因,为生产含 *Lfcin* 基因的饲料添加剂提供依据。

克隆获得的牦牛与奶牛相应的 DNA 序列进行对比发现,2 个牛品种间该序列存在 9 个碱基的变异。*LF* 基因第二外显子内 2 个品种间存在 2 个碱基的变异,*Lfcin* 基因内 2 个品种间存在 1 个碱基的变异。而所产生的碱基变异并没有在 *LF* 基因第二外显子和 *Lfcin* 基因内造成氨基酸的变异,这说明牦牛和奶牛的 *Lfcin* 蛋白质序列完全相同。各物种 *Lfcin* 蛋白质序列比对表明,不同物种间 *Lfcin* 蛋白质存在较高的保守性,这说明 *Lfcin* 蛋白在物种进化过程中起重要作用。今后,可将 *Lfcin* 基因编码区连接于原核或真核表达载体,使其在相应的细胞中表达;纯化表达获得的目的蛋白,研究该蛋白的抗菌、抗病毒、抗肿瘤等生物活性。

参考文献

[1] 张容昶. 中国的牦牛[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1989.
[2] BROCK J H. The physiology of lactoferrin[J]. Biochem Cell Biol, 2002, 80(1): 1-6.
[3] SEBASTIEN F, ROBERT W. Lactoferrin-a multifunctional protein with an-

timicrobial properties[J]. Molecular Immunology, 2003, 40: 395-405.

- [4] BELLAMY W, TAMAUCHI K, WAKABAYASHI H, et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1992, 1121: 130-136.
[5] WANG Y Z, XU C L, AN Z H, et al. Effect of dietary bovine lactoferrin on performance and antioxidant status of piglets[J]. Animal Feed Science and Technology, 2008, 140: 326-336.
[6] 冯兴军, 王建华, 杨雅麟. 乳铁蛋白(Lactoferrin)作用机制研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(1): 23-26.
[7] HILDE Ulvatne, OJAN SAMUELSEN, HAUKLAND HANNE H, et al. Lactoferrin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 237: 377-384.
[8] GIFFORD J L, HUNTER H N, VOGEL H J. Lactoferrin: a Lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(22): 2588-2598.
[9] 杨雪峰, 王清华, 马石楠. 乳铁蛋白的生理功能及其在畜牧生产中的应用[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(22): 5886-5887.
[10] 黄海青, 汪以真. 乳铁蛋白肽的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(6): 15-18.
[11] NAKAMURA I, WATANABE A, TSUNEMITSU H, et al. Production of recombinant bovine lactoferrin N-lobe in insect cells and its antimicrobial activity[J]. Protein Expr Purif, 2001, 21(3): 424-431.
[12] 张晶晶, 刘凤军, 彭淑英, 等. 人乳铁蛋白基因乳腺特异性表达载体的构建及转染研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007(1): 29-33.