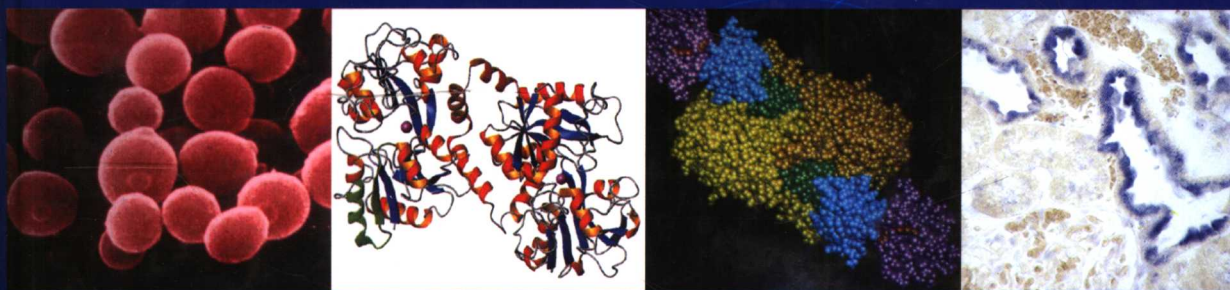


乳铁蛋白

生物功能及基因表达

陈历俊 姜铁民 编著



科学出版社

www.sciencep.com

乳铁蛋白生物功能及基因表达

陈历俊 姜铁民 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书介绍了国内外研究乳铁蛋白的现状和发展趋势,共分九章。第一、二章概括和总结了乳铁蛋白分子结构、基本特性和主要生物功能及其作用机制;第三章概括了乳铁蛋白降解产物——乳铁蛋白肽结构、功能及其制备的研究进展;第四章主要介绍了目前乳铁蛋白主要分离纯化方法及其在乳品、医药和农业方面的广泛应用;第五章介绍了乳铁蛋白基因组成及其表达调控机制;第六章至第八章介绍了人乳铁蛋白基因在真菌、植物和乳腺组织中转基因研究的最新进展;第九章总结了乳铁蛋白检测方法及其重组人乳铁蛋白的主要特性。

本书适合于生物类科研院校师生及相关研究与技术人员等使用。

图书在版编目(CIP)数据

乳铁蛋白生物功能及基因表达/陈历俊,姜铁民编著. —北京:科学出版社, 2007

ISBN 978-7-03-018358-3

I. 乳… II. ①陈…②姜… III. 铁蛋白-基因表达-研究 IV. Q78

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第005474号

责任编辑:夏 梁/责任校对:赵桂芬

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007年2月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2007年2月第一次印刷 印张: 12 3/4 插页: 1

印数: 1—2 000 字数: 247 000

定价: 40.00 元

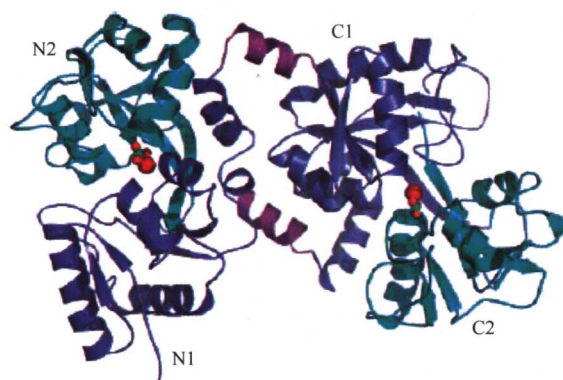
(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

前 言

乳铁蛋白是一种分子质量为 70~80 kDa 的糖蛋白,广泛分布于哺乳动物乳汁和其他多种组织及其分泌液中,具有广泛的生物学活性,包括广谱抗菌作用、消炎、抑制肿瘤细胞生长及调节机体免疫反应等,被认为是一种新型抗菌、抗癌药物和极具有开发潜力的食品、化妆品和饲料添加剂。

乳铁蛋白作为一种具有广泛而独特的生物学功能和理化特性的功能蛋白,在食品与医药方面的应用与开发研究日益受到全球的关注。近年来,其研究在我国也得到了长足的发展,仅婴幼儿配方奶粉及抗癌保健品方面即已形成规模巨大的市场。但这些昂贵的源于牛乳的乳铁蛋白几乎全部依赖进口,因此,很久以来,如何获得廉价人乳铁蛋白一直是开发乳铁蛋白遇到的最大难题。利用基因工程技术大规模开发人乳铁蛋白,不仅满足市场对该产品的需求,扩大应用范围,同时可避免天然乳铁蛋白应用可能带来的副作用,成为乳铁蛋白研究的热点和发展趋势。本书在参阅了国内外大量文献资料的基础上,结合北京三元食品公司技术中心的科研成果,比较系统地介绍了乳铁蛋白的分子结构和生物功能及应用,并重点介绍了过去 10 多年来,人乳铁蛋白基因在真菌、植物和乳腺组织中转基因研究的最新进展,突出利用转基因技术规模化生产人乳铁蛋白的可行性和重要性。

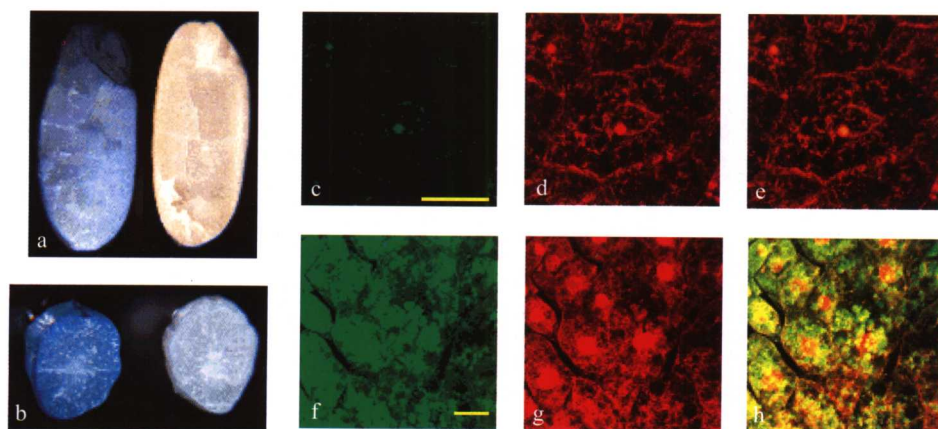
本书的出版倾注了许多人的心血。陈历水参与了部分章节的编写。贾士乾先生提供的关于毕赤酵母表达系统的相关资料和乳铁蛋白表达的研究成果,有助于本书第六章的完成。科学出版社夏梁博士丰富的编辑经验和专业水平,不仅提高了本书的出版质量,而且使本书能很好地与国际图书出版接轨。周伟明、蒋荣、张晨光、范丽芳、乔为仓等对本书的撰写给予了很大帮助,在此表示衷心的感谢。由于编著水平和资料收集的局限,书中难免存在疏漏或错误,恳请读者不吝指正。



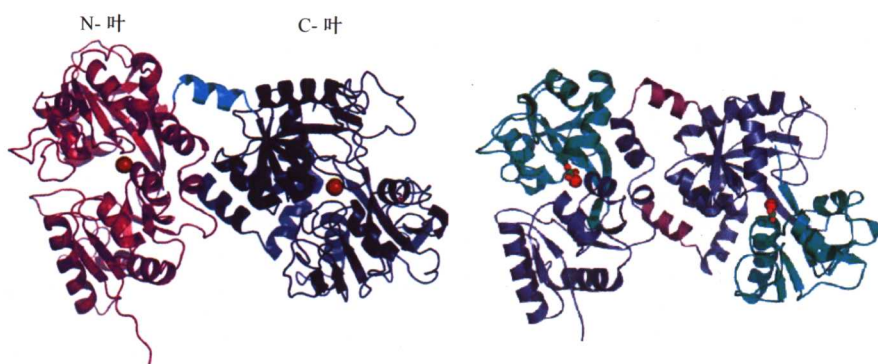
彩图 1 铁饱和和型人乳铁蛋白三维结构



彩图 2 铁饱和和型牛乳铁蛋白三维结构



彩图3 转基因与非转基因水稻种子中重组人乳铁蛋白免疫组化分析结果



彩图4 转基因牛乳中 rhLF (左) 与天然 hLF (右) 带状图比较

目 录

前言

第一章 乳铁蛋白分子结构与基本特性	1
1.1 乳铁蛋白简介	1
1.2 乳铁蛋白的分布及含量	2
1.2.1 分布与含量	2
1.2.2 影响乳铁蛋白含量的因素	3
1.2.3 乳铁蛋白的代谢	6
1.3 乳铁蛋白的基本结构	7
1.3.1 一级结构	7
1.3.2 二级结构	9
1.3.3 高级结构	9
1.3.4 乳铁蛋白的糖基化结构	12
1.4 乳铁蛋白的基本特性	15
1.4.1 理化特性	15
1.4.2 乳铁蛋白的生物特性	18
1.5 分类	20
参考文献	20
第二章 乳铁蛋白生物学功能及其受体	24
2.1 乳铁蛋白的主要生物学功能	24
2.1.1 参与铁代谢	25
2.1.2 抗微生物功能	27
2.1.3 免疫调节和抗感染	37
2.1.4 抗氧化作用	42
2.1.5 作为细胞生长因子	44
2.1.6 抗肿瘤	45
2.1.7 其他生理功能	46
2.2 乳铁蛋白作用机制及影响因素	48
2.2.1 乳铁蛋白抗微生物作用机制	48
2.2.2 影响乳铁蛋白功能活性的因素	50
2.3 乳铁蛋白受体	52
2.3.1 哺乳动物细胞乳铁蛋白受体	53

2.3.2 微生物细胞乳铁蛋白受体·····	58
2.3.3 其他乳铁蛋白受体·····	59
参考文献·····	59
第三章 乳铁蛋白肽研究进展 ·····	68
3.1 乳铁蛋白肽结构·····	69
3.1.1 牛乳铁蛋白肽·····	69
3.1.2 人乳铁蛋白肽·····	71
3.1.3 其他哺乳动物乳铁蛋白肽·····	72
3.1.4 结构和功能的关系·····	72
3.2 乳铁蛋白肽的理化和生物学特性·····	74
3.3 乳铁蛋白肽的生物功能及作用机制·····	75
3.3.1 乳铁蛋白肽的抗菌作用·····	76
3.3.2 抗真菌作用·····	80
3.3.3 抗病毒作用·····	81
3.3.4 抗炎与免疫调节作用·····	82
3.3.5 抗肿瘤作用·····	82
3.3.6 调控基因表达·····	83
3.4 乳铁蛋白肽的制备·····	84
3.4.1 天然乳铁蛋白肽的分离纯化·····	84
3.4.2 转基因制备·····	84
参考文献·····	85
第四章 乳铁蛋白分离纯化及其应用 ·····	88
4.1 乳清中乳铁蛋白的分离纯化·····	88
4.1.1 原料预处理·····	88
4.1.2 分离纯化·····	89
4.1.3 展望·····	94
4.2 乳铁蛋白应用·····	95
4.2.1 乳铁蛋白在食品中的应用·····	95
4.2.2 医药方面的应用·····	99
4.2.3 化妆品中的应用·····	104
4.2.4 在农业中的应用·····	105
4.3 存在问题及展望·····	106
参考文献·····	107
第五章 乳铁蛋白基因表达及其调控 ·····	111
5.1 乳铁蛋白基因·····	111

5.2 乳铁蛋白基因表达及其调控	114
5.2.1 乳铁蛋白基因组织表达差异	114
5.2.2 乳铁蛋白基因表达的调控	115
参考文献	119
第六章 人乳铁蛋白基因在真菌中表达	122
6.1 人乳铁蛋白基因在真菌中表达概述	123
6.1.1 酵母表达系统	123
6.1.2 丝状真菌表达系统	124
6.2 人乳铁蛋白基因在酵母细胞中的分泌表达	125
6.2.1 重组载体构建	125
6.2.2 转基因酵母菌株的建立	127
6.2.3 重组人乳铁蛋白基因的细胞高密度发酵表达	131
6.2.4 影响乳铁蛋白表达的主要因素	133
6.3 展望	139
参考文献	140
第七章 人乳铁蛋白基因在植物及动物细胞中表达	144
7.1 植物表达系统概述	144
7.1.1 表达途径及表达系统	144
7.1.2 植物遗传转化技术	145
7.1.3 植物基因表达优化策略	148
7.2 人乳铁蛋白基因在植物中表达现状	150
7.2.1 在烟草中表达	151
7.2.2 在薯类中表达	153
7.2.3 在水稻中表达	154
7.2.4 在番茄中表达	155
7.2.5 在其他植物系统中表达	156
7.2.6 展望	157
7.3 人乳铁蛋白在动物细胞中表达	157
7.3.1 昆虫细胞中表达	157
7.3.2 乳腺上皮细胞中表达	158
参考文献	159
第八章 乳腺生物反应器生产人乳铁蛋白	161
8.1 乳腺生物反应器概述	162
8.1.1 概念及原理	163
8.1.2 乳腺生物反应器的构建	163

8.1.3 乳腺生物反应器的应用	169
8.2 利用动物乳腺生物反应器生产人乳铁蛋白	170
8.2.1 利用乳腺生物反应器生产乳铁蛋白的特点	170
8.2.2 建立转人乳铁蛋白基因动物及鉴定	171
8.2.3 乳腺生物反应器生产人乳铁蛋白的现状	174
8.3 存在问题及发展前景	176
8.3.1 存在问题	176
8.3.2 发展前景	177
参考文献	177
第九章 重组乳铁蛋白纯化、检测及特性	180
9.1 重组蛋白纯化	180
9.2 乳铁蛋白检测方法	180
9.2.1 免疫学检测法	180
9.2.2 高效液相色谱法	183
9.2.3 分光光度法	183
9.2.4 PCR 检测法	183
9.3 重组乳铁蛋白主要特性	184
9.3.1 理化特性	184
9.3.2 生物特性	189
9.3.3 稳定性分析	191
9.4 重组乳铁蛋白的主要生物功能	193
9.5 重组乳铁蛋白的展望	194
参考文献	194

彩版

第一章 乳铁蛋白分子结构与基本特性

1.1 乳铁蛋白简介

乳铁蛋白 (lactoferrin, LF) 是乳汁中一种重要的非血红素铁结合糖蛋白, 主要由乳腺上皮细胞表达和分泌, 最初由 Sorensen 等于 1939 年在动物乳中发现, 并由 Groves 首先从牛乳中分离获得, 因与铁结合形成的复合物呈红色, 故称之为“红蛋白”。1961 年, Blanc 和 Isliker 将从人乳中分离获得的此种蛋白正式命名为乳铁蛋白。在发现之初, 乳铁蛋白被认为是一种与铁转运和存储有关的蛋白, 所以又称之为乳转铁蛋白 (lactotransferrin)。现已知乳铁蛋白是一种分子质量为 70~80kDa 的糖蛋白, 属于转铁蛋白家族成员, 虽与血清转铁蛋白 (transferrin) 在化学属性、分子质量、二硫键结构和抗菌特性等方面类似, 但二者在氨基酸组成、碳水化合物成分、抗原性、生物特性和功能方面存在很大差异, 因此是两种不同的物质^[1,2]。

乳铁蛋白广泛分布于哺乳动物乳汁和其他多种组织及其分泌液中 (包括泪液、精液、胆汁、滑膜液等内、外分泌液和嗜中性粒细胞), 由一条多肽单链和 2~4 条多聚糖侧链组成, 其二级结构主要由 α -螺旋和 β -折叠交替排列而成, 且 α -螺旋明显多于 β -折叠; 乳铁蛋白的高级结构是在二级结构基础上, 由多肽链折叠成两个对称的球状叶, 即 N 叶和 C 叶, 每个叶又包含两个结构域 (N1、N2 和 C1、C2) 和一条裂隙, 裂隙处为铁离子结合位点^[3~6]。乳铁蛋白及其蛋白降解产物——乳铁蛋白肽 (lactoferricin, Lfcin) 具有广泛的生物学活性, 包括广谱抗菌作用、消炎、抑制肿瘤细胞生长及调节机体免疫反应等, 被认为是一种新型抗菌、抗癌药物和极具开发潜力的食品、化妆品和饲料添加剂^[7,8], 如美国食品药品监督管理局早已允许乳铁蛋白作为食品添加剂用于运动、功能性食品。

由于乳铁蛋白所具有的独特功能和特性, 乳铁蛋白已引起许多国家的关注。美国 Baylor 医学院、Agennix 公司、Genpharm 公司开发了人乳铁蛋白在真菌、细菌和哺乳动物细胞及乳腺中表

达的技术,并利用重组人乳铁蛋白开发新的治疗药物和抗微生物化合物;而荷兰 Pharming 公司利用转基因技术,从转基因牛乳汁中生产的人乳铁蛋白收率达 1.0mg/ml 以上;日本也在乳铁蛋白领域开展了大量的研究工作,如日本北里研究所和企业合作,通过临床试验证实牛奶中乳铁蛋白能使丙型肝炎病毒减少,可望成为丙型肝炎的一种辅助治疗方法。最近, Naidu 等^[9]将天然牛乳铁蛋白改造成为一种活性乳铁蛋白(activated lactoferrin, ALF),具有乳铁蛋白同样的生物学功能和更强的抗菌活性,能阻碍微生物吸附或黏附,促进生物体表面活的或死的微生物分离,抑制微生物生长繁殖,中和内毒素活性。目前,ALF 主要用于新鲜肉类防腐的辅助剂。

自 1992 年在檀香山举行第一次关于乳铁蛋白国际会议以来,该会议每隔一年举行一次,就乳铁蛋白性质、结构、体内外重组表达、临床研究等方面的最新发现进行讨论交流,到 2006 年为止已召开了七次。随着乳铁蛋白作用机制的不断阐明和开发应用范围的不断扩大,乳铁蛋白将在农业、食品和药品及化妆品等方面有广阔的应用前途。

1.2 乳铁蛋白的分布及含量

研究发现,哺乳动物乳汁中含有少量激素、生长因子、乳铁蛋白、低聚半乳糖和源于酪蛋白的多种活性肽等多种生物活性物质,具有极其重要的生理、药理功能。其中乳铁蛋白及其水解产物——乳铁蛋白肽是动物体内非特异性免疫系统中的重要成员之一,具有抗菌、免疫调节、抗氧化、抗病毒、刺激双歧杆菌生长、促进幼体动物消化道发育和促进铁吸收等多种生理功能。目前,国内外都在从多角度对乳铁蛋白产品进行研究开发。

1.2.1 分布与含量

乳铁蛋白广泛分布于人与哺乳动物家畜的多种组织及外分泌液中(如人乳、牛乳)。人乳中乳铁蛋白浓度约为 1.0~3.2mg/ml,是牛乳的 10 倍(牛乳中含量为 0.02~0.35mg/ml),其含量仅次于酪蛋白,占普通母乳总蛋白的 20%,在泌乳期间,乳铁蛋白含量随着泌乳时间的不同而发生改变,如人初乳中乳铁

蛋白可达 6~14mg/ml, 常乳期降至 1mg/ml。

除乳汁外, 消化、呼吸和生殖系统等分泌液中也含有一定量的乳铁蛋白, 如泪液、精液、羊水、小肠分泌液、关节液等, 但其含量远远低于乳汁, 特别是初乳中的乳铁蛋白量。血液中乳铁蛋白主要来自多核细胞 (polymorphonuclear cell, PMNs) 的次级颗粒, 骨髓、子宫内膜及胎盘等也能分泌少量乳铁蛋白进入血液, 因此其含量并不与嗜中性粒细胞数量呈正相关, 但与所脱颗粒数目直接相关。人体各组织液中乳铁蛋白含量见表 1.1^[1,10~12]。

表 1.1 人体组织分泌液中乳铁蛋白的含量

分泌液	含量(mg/ml)	分泌液	含量(mg/ml)
人初乳	>7.0	精浆	0.4~1.9
人常乳	1.0~3.2	滑液	0.01~0.08
泪液	0.1~2.2	唾液	0.007~0.01
血清	0.0004~0.002	胆汁	0.01~0.04
胰液	0.5	胃液	0.5~1.0
鼻分泌液	0.1	尿液	0.001

1.2.2 影响乳铁蛋白含量的因素

动物体液中乳铁蛋白含量随动物种类、泌乳时间、胎次及个体的不同有所差别, 机体健康状况则是影响血液中乳铁蛋白水平的重要因素。

1. 动物种类

乳铁蛋白含量在不同动物之间存在着明显的种属特异性, 其中人乳中最高, 尤其是初乳中浓度可达到 6~14mg/ml, 常乳为 1~3.2mg/ml; 猪、豚鼠、小鼠和马乳中浓度为 0.2~2.0 mg/ml; 奶牛、山羊等动物中含量较低, 它们乳中的乳铁蛋白浓度约为 0.02~0.2mg/ml; 而大鼠、兔和狗是几种几乎没有发现有乳铁蛋白存在的哺乳动物^[1]。但在乳铁蛋白含量较低的动物乳汁中, 转铁蛋白含量却较高, 其原因可能与这类蛋白的功能有关。表 1.2 为采用免疫化学和氮分析方法测定的不同动物乳汁和中性粒细胞中的乳铁蛋白含量^[13]。

表 1.2 不同动物乳汁和中性粒细胞中乳铁蛋白含量^[13]

动物乳汁(mg/ml)				中性粒细胞				
1~5	0.1~1	0.01~0.1	<0.05	4+	3+	2+	1+	<1+
人类	豚鼠	奶牛	大鼠	人类	小鼠	仓鼠	奶牛	大鼠
	小鼠	山羊	家兔	猫		家兔	猪	
	马	猪	狗	狗				

注:4+,含量非常高;3+,含量高;2+,含量中等;+1,含量低;<1+,含量甚微

2. 泌乳时间

乳中乳铁蛋白浓度在整个泌乳期呈规律性变化,其含量随母体泌乳时间的延长呈下降趋势,但到哺乳末期乳铁蛋白浓度可再次回升^[14]。据有关资料报道,人分娩后的第一天,即初乳中乳铁蛋白浓度可高达 14.0mg/ml,第三天为 4.9mg/ml,第 50 天为 2.1mg/ml,第 210 天仍可维持 1.6mg/ml 的水平;而牛乳中乳铁蛋白含量与之相比则要低得多,母牛产后第一天的初乳中其浓度为 1.0mg/ml 以上,24 小时后降至 0.42mg/ml,15 天后为 0.22mg/ml,但在非哺乳期仍保持较高的含量(图 1.1)^[15]。一般情况下,同一个体常乳中乳铁蛋白含量约为初乳的 20%。

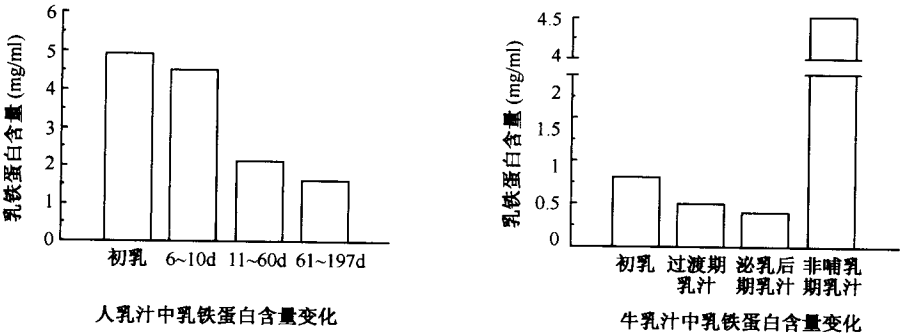


图 1.1 不同哺乳阶段人及牛乳中乳铁蛋白含量变化

王静华、汪以真等^[16,17]利用半定量 RT-PCR 方法检测了在不同泌乳阶段,小白鼠乳腺组织中乳铁蛋白基因表达的差异。结果表明,在小白鼠的整个泌乳阶段,乳铁蛋白基因表达量呈两种变化趋势,即在泌乳第 1 日到 18 日呈现下降趋势,而在泌乳第 18 日到 25 日呈现升高趋势。这一结果与小白鼠本身的生长发育

特性及生理规律相符。在刚刚开始泌乳时,乳腺组织中乳铁蛋白基因高量表达,增加了分泌到乳汁中的乳铁蛋白量,这与初乳中各种营养免疫成分含量比较高的特点一致;随着泌乳的进行,乳汁中各种免疫成分含量逐渐减少,但到了泌乳后期,也就是干乳期,乳腺组织乳铁蛋白基因的表达量明显升高,这与乳铁蛋白的抗菌、杀菌功能密不可分。因为在干乳期,乳腺组织中残留的乳汁为微生物生长提供了非常好的营养源,容易引起乳腺组织微生物感染,而乳铁蛋白表达量升高,发挥其抗菌、杀菌功能,有效减少了微生物感染的发生。

据此推测,乳铁蛋白可能具有生长因子及保护非泌乳期乳腺和新生哺乳动物的作用。一方面促进新生个体自身免疫体系的建立和快速发育,帮助新生个体防御多种感染性疾病;另一方面,由于母体在妊娠期为了不对胎儿产生免疫排斥作用,通常处于一定的免疫抑制状态,分娩后高浓度的乳铁蛋白也有助于母体自身免疫机能的恢复。另外,新生个体对铁的需求量很大,乳铁蛋白具有很高的铁离子结合特性,能够帮助幼仔从有限的食物中获取足量铁元素,满足自身发育的需要^[18]。

3. 母体健康状况

人乳中乳铁蛋白含量的高低还与母亲营养、健康状况有关。在缺铁母体的乳汁中,乳铁蛋白浓度正常,而在蛋白营养不良的母体中,乳铁蛋白浓度降低。另外,在患乳房炎的牛乳中,乳铁蛋白含量明显升高,这表明乳腺在遭到病原攻击时能产生大量乳铁蛋白抵御疾病的侵袭。

血液中乳铁蛋白在粒细胞成熟期的早、中幼粒细胞阶段开始表达并储存于中性粒细胞的次级颗粒中,其表达呈激素依赖性。血清中乳铁蛋白含量相对比人乳和泪液中要低,正常情况下,血清中乳铁蛋白含量低于 0.001mg/ml,而乳汁和泪液中乳铁蛋白含量分别高达 1.0~3.2mg/ml 和 0.4~1.2mg/ml。通常中性粒细胞释放的乳铁蛋白不含铁离子,具有较强的抗菌作用,血清乳铁蛋白水平在铁超载、炎症、感染性疾病、肿瘤进展期时增加,如正常情况下,每 10^6 个嗜中性粒细胞中含有 3 μ g 乳铁蛋白,感染时乳铁蛋白合成明显增加,每天可高达 30g,其中约 30% 释放于血中,发挥各种生理功能。因此,血清乳铁蛋白浓度升高可作为炎症反应的一个指标。

关于血清中乳铁蛋白水平与嗜中性粒细胞数量的相关性存在不同研究结果,因为测定过程应用的抗凝剂、铁离子饱和程度的不同,静脉穿刺和分析之间的间隔和乳铁蛋白聚合作用都影响着乳铁蛋白的测定结果^[19]。

4. 妊娠时间

妊娠期间,乳铁蛋白含量也呈规律性变化。母体血浆中含量在前 29 周保持增加趋势,以后逐渐稳定;羊水中前 20 周检测不到乳铁蛋白,第 30 周开始迅速增加,直至妊娠终止前都维持较高水平。有资料报道,在胚胎发育到 3~4 个细胞时期,就能检测到乳铁蛋白表达,并持续到植入子宫前的胚泡阶段,然后要到妊娠后半阶段,才从嗜中性粒细胞、消化道和呼吸道上皮细胞中检测到乳铁蛋白,而新生儿出生后 15 周血浆中的乳铁蛋白含量可达成人水平^[1,20]。

另外,铁离子浓度也影响着乳汁中乳铁蛋白水平。Wang 等^[21]研究发现,如果在泌乳期添加铁离子,能显著提高乳腺组织中乳铁蛋白 mRNA 含量。

1.2.3 乳铁蛋白的代谢

乳铁蛋白主要通过肝脏和脾脏从血循环中清除,肾脏也起一定作用,这是因为在胎尿中出现了乳铁蛋白及其降解片段^[20]。乳铁蛋白的半衰期非常短,在鼠中仅为 10min。

血清乳铁蛋白在骨髓细胞成熟阶段合成后,以脱铁形式储存在中性粒细胞二级颗粒及少量三级颗粒中。这些被储存的乳铁蛋白最终有两种去处,一是被分泌到周围组织或血液中;二是同颗粒一起与噬菌体发生融合。多核细胞向血液循环分泌乳铁蛋白主要依赖于粒细胞脱粒因子,而后者又依赖于鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC)和 Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的活性,多核细胞分泌乳铁蛋白多发生在铁超载、炎症、感染性疾病和肿瘤进展期。而分泌到血液循环或组织间隙中的乳铁蛋白,一方面通过受体介导的胞吞作用被网状内皮系统细胞,如巨噬细胞、单核细胞等内吞,并将结合的铁离子转移给转铁蛋白;另一方面被肝巨噬细胞、内皮细胞和肝实质细胞直接摄取,在肝脏内完成代谢过程。此外,肾脏也能将乳铁蛋白直接从

血液中清除。利用¹²⁵I标记人乳铁蛋白和组织放射性计数方法,证实肝脏和脾脏能很快从血液循环中摄取乳铁蛋白,而且在第一个24小时内,99%的乳铁蛋白出现在尿液中^[19]。乳铁蛋白的详细代谢机制还需进一步研究。

1.3 乳铁蛋白的基本结构

乳铁蛋白是一类广泛存在于哺乳动物体液中的天然糖蛋白,由一条分子质量约为80kDa的多肽链和1~4个糖基组成,与血浆中传递铁离子的转铁蛋白有很密切地联系。随着近二十年来对乳铁蛋白的广泛研究,发现不同来源的乳铁蛋白除在氨基酸序列和糖基结构、数目上存在一定差异外,它们的三维立体结构均无明显差别。其中,对牛和人乳铁蛋白的结构研究比较透彻,二者氨基酸序列具有70%以上的同源性,空间构象也极为相似,以下内容均以人和牛乳铁蛋白为代表进行介绍。

1.3.1 一级结构

目前,已明确乳铁蛋白多肽链的一级结构,大约由690个氨基酸组成。人、牛、猪和小鼠乳铁蛋白分别含有703、689、685和707个氨基酸残基,其中Glu、Asp、Leu和Ala含量较高,除含少量Cys外,几乎不含其他含硫氨基酸。研究证明,铁传递蛋白家族的蛋白成员具有相当高的氨基酸序列同源性,如人、猪和牛乳铁蛋白之间的氨基酸同源性达65%~69%^[1,19,22];其他哺乳动物,如山羊、骆驼、马和水牛等的氨基酸序列也已确定。图1.2对人和牛、猪、小鼠乳铁蛋白的氨基酸序列进行了比较,同时标出了一般认同的铁离子结合位点。

此外,乳铁蛋白分子N端(1~333或1~338)与C端(346~692或339~703)两个球状结构之间也具有37%的同源性,即125个氨基酸组成完全相同,因此人们认为乳铁蛋白是由编码分子量为40kDa的蛋白质基因,于500亿年前倍增后才形成目前分子量为80kDa的两个结构域^[1,19]。