

研究报告

鸡细胞外脂肪酸结合蛋白特异性结合肠杆菌素抑制弯曲菌生长

张浩南^{1,2}, 崔一芳², 郭芳芳², 丁保安^{*1}, 徐福洲^{*2}

1 青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016

2 北京市农林科学院畜牧兽医研究所 畜禽疫病防控技术北京市重点实验室, 北京 100097

张浩南, 崔一芳, 郭芳芳, 丁保安, 徐福洲. 鸡细胞外脂肪酸结合蛋白特异性结合肠杆菌素抑制弯曲菌生长[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 654-667.

ZHANG Haonan, CUI Yifang, GUO Fangfang, DING Bao'an, XU Fuzhou. Chicken extracellular fatty acid-binding protein specifically binds to enterobactin to inhibit the growth of *Campylobacter*[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 654-667.

摘要:【背景】弯曲菌(*Campylobacter*)是一种重要的食源性病原细菌,在鸡肠道内高水平定殖,鸡天然免疫在该菌定殖中的作用机制尚未解析。【目的】探究鸡天然免疫相关的细胞外脂肪酸结合蛋白(extracellular fatty acid-binding protein, Ex-FABP)通过特异性结合肠杆菌素抑制弯曲菌生长的活性,为宿主发挥天然免疫功能提供理论基础。【方法】通过敲除大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)的 *entB* 基因构建不分泌肠杆菌素的表达宿主菌,原核表达纯化鸡 Ex-FABP 蛋白和人源脂钙蛋白 2 (lipocalin-2, Lcn2), Western blotting 鉴定表达蛋白与肠杆菌素特异性结合,分别在富铁和限铁培养条件下,验证 Ex-FABP 和 Lcn2 对大肠杆菌、沙门氏菌(*Salmonella*)及 *entB* 基因突变株的抑菌活性,继而通过外源添加肠杆菌素鉴定 Ex-FABP 和 Lcn2 对不同宿主源弯曲菌的抑菌活性。【结果】利用构建的宿主菌 BL21(DE3)的 *entB* 基因突变株,成功表达和纯化 Ex-FABP 和 Lcn2 蛋白,体外结合试验证实表达蛋白可与肠杆菌素特异性结合。在限铁培养条件下,Ex-FABP 和 Lcn2 对仅分泌肠杆菌素的大肠杆菌 AN102 具有显著抑制生长的作用,而对大肠杆菌 ATCC 25922、沙门氏菌 CVCC 1806、CVCC 1800 及对应的 *entB* 缺失株均无抑制作用。最后证实 Ex-FABP 和 Lcn2 通过特异性结合肠杆菌素对 5 株不同宿主来源的弯曲菌均有显著抑制生长的作用。【结论】鸡 Ex-FABP 蛋白具有与 Lcn2 类似的功能,即在限铁环境下可特异性结合肠杆菌素,通过阻断细菌利用肠杆菌素摄取铁的途径来抑制其生长,发挥宿主天然免疫功能,为开发新型弯曲菌防控策略提供了理论依据。

关键词: 细胞外脂肪酸结合蛋白; 脂钙蛋白 2; 肠杆菌素; *entB* 基因; 弯曲菌

资助项目: 北京市农林科学院创新能力建设专项(KJCX20220422); 北京市农林科学院畜牧兽医研究所改革与发展基金(XMS202408)

This work was supported by the Special Program on Science and Technology Innovation Capacity Building of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (KJCX20220422), and the Research and Development Foundation of Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (XMS202408).

*Corresponding authors. E-mail: DING Bao'an, dingbaoan1967@163.com; XU Fuzhou, fuzhouxu@163.com

Received: 2024-08-26; Accepted: 2024-09-30; Published online: 2024-10-24

Chicken extracellular fatty acid-binding protein specifically binds to enterobactin to inhibit the growth of *Campylobacter*

ZHANG Haonan^{1,2}, CUI Yifang², GUO Fangfang², DING Bao'an^{*1}, XU Fuzhou^{*2}

1 College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

2 Beijing Key Laboratory for Prevention and Control of Infectious Diseases in Livestock and Poultry, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract: **[Background]** *Campylobacter* is a genus of major foodborne pathogens that colonize the chicken intestine at high levels. The chicken innate immune response to *Campylobacter* colonization remains to be fully elucidated. **[Objective]** To investigate the activity of extracellular fatty acid binding protein (Ex-FABP) related to chicken innate immunity in inhibiting the growth of *Campylobacter* by specifically binding to enterobactin, providing a theoretical basis for revealing the function of the host innate immunity against *Campylobacter* infection. **[Methods]** We knocked out the *entB* gene from *Escherichia coli* BL21(DE3) to construct a strain that did not secrete enterobactin. Chicken Ex-FABP and human lipocalin-2 (Lcn2) were expressed in the engineered strain and purified. Western blotting was employed to examine the binding of the expressed proteins to enterobactin. The inhibitory activities of Ex-FABP and Lcn2 against *E. coli*, *Salmonella*, and their mutant strains with *entB* knockout were verified under iron-rich and iron-limited culture conditions, respectively. Then, the inhibitory activities of Ex-FABP and Lcn2 against *Campylobacter* derived from different hosts were examined by addition of enterobactin. **[Results]** Ex-FABP and Lcn2 were successfully expressed in the constructed BL21(DE3) mutant with *entB* knockout. The *in vitro* binding assays confirmed that the expressed proteins could specifically bind to enterobactin. Under the iron-limited culture condition, Ex-FABP and Lcn2 significantly inhibited the growth of *E. coli* AN102 capable of secreting enterobactin but had no inhibitory effects on *E. coli* ATCC25922, *Salmonella* CVCC1806/CVCC1800, and corresponding mutant strains with *entB* knockout. Finally, it was confirmed that Ex-FABP and Lcn2 inhibited the growth of five *Campylobacter* strains derived from different host species by specifically binding to enterobactin. **[Conclusion]** Chicken Ex-FABP has a similar function to Lcn2. Under iron-limited conditions, it can specifically bind to enterobactin and inhibit bacterial growth by blocking the enterobactin-mediated iron uptake, thus triggering the host innate immune function. The findings provide a theoretical basis for developing new approaches to control *Campylobacter*. **Keywords:** extracellular fatty acid binding protein (Ex-FABP); lipocalin-2 (Lcn2); enterobactin; *entB* gene; *Campylobacter*

细菌在宿主体内生长和定殖过程中, 需要克服苛刻的生存环境, 比如细菌生长必需的铁离子, 在健康宿主肠道中浓度约为 10^{-24} mol/L, 而细菌生长所需浓度为 10^{-5} – 10^{-7} mol/L, 为捕

获生长所需的铁离子, 细菌分泌和利用对铁离子具有高亲和力的铁载体(siderophore), 因而铁载体在细菌定殖宿主体内过程中发挥关键作用^[1-2]。肠杆菌素(enterobactin, Ent)是由肠杆菌

科(*Enterobacteriaceae*)细菌分泌的一种小分子铁载体(分子量 670 Da),在已知铁载体中对 Fe^{3+} 具有最高的亲和力($K_d=10^{-49}$ mol/L),在细菌捕获铁离子维持其生长代谢方面具有重要作用^[3]。

当细菌进入宿主体内后,细菌脂多糖或鞭毛与细胞 Toll 样受体结合,激活 MyD88 依赖性 NF- κ B 信号通路,刺激肠道免疫细胞和上皮细胞分泌一种脂质运载蛋白 lipocalin 2 (Lcn2)^[4-5]。Lcn2 特异性捕获细菌分泌的肠杆菌素,抑制细菌的生长定殖,保护宿主抵抗细菌感染造成的损伤,在宿主营养免疫(nutritional immunity)处于重要地位^[6]。近年来在家禽体内鉴定了一种与 Lcn2 结构和功能类似的蛋白——胞外脂肪酸结合蛋白(extracellular fatty acid binding protein, Ex-FABP),可特异性结合肠杆菌素,体外试验证实抑制沙门氏菌(*Salmonella*)的生长^[7]。晶体结构分析显示,Ex-FABP 与铁载体结合的腔室更宽更浅,不但可结合肠杆菌素,还可结合糖基化修饰的肠杆菌素,推测与 Ex-FABP 发挥特异性营养免疫有关^[8]。

弯曲菌(*Campylobacter*)是最常见的食源性病原细菌之一,感染人引起腹泻性肠炎,还与多种自身免疫性疾病如格林-巴利综合征等密切相关^[9]。带菌的家禽及产品是人感染的主要来源,据统计人弯曲菌感染病例中 50%–80%与家禽直接相关^[10],然而目前生产中尚无切实可行的产品或措施来控制弯曲菌感染^[11],深入研究弯曲菌在家禽肠道内定殖机制对其防控具有重要意义。弯曲菌自身不能分泌肠杆菌素,但可利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)分泌的肠杆菌素促进其在缺铁环境中生长^[12-15],但在家禽肠道内,Ex-FABP 捕获肠杆菌素对弯曲菌定殖的影响尚未解析。

本试验以 Ex-FABP 蛋白为研究对象,验证 Ex-FABP 蛋白对大肠杆菌和沙门氏菌生长的影响,鉴定 Ex-FABP 与肠杆菌素结合对不同宿主

源弯曲菌生长的影响,以期为防控弯曲菌提供潜在的作用靶标。

1 材料与方法

1.1 样品

本试验所用的菌株和质粒信息如表 1 所示。弯曲菌菌株接种于 MH 肉汤或平板,置 42 °C 三气培养箱(5% O_2 、10% CO_2 、85% N_2)培养^[17];大肠杆菌和沙门氏菌菌株接种于 LB 肉汤或平板,于 37 °C 常规培养;培养基中添加抗生素浓度分别为:氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氯霉素 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。实验动物购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司。动物实验获得北京市农林科学院畜牧兽医研究所实验动物伦理审查委员会批准,实验动物伦理审查编号: IHVM11-2405-73。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

细菌 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0; 细菌 MH 培养基, BD Difco 公司; T-medium 限铁培养基(g/L): NaCl 5.800, KCl 3.700, CaCl_2 0.133, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.100, NH_4Cl 1.100, KH_2PO_4 0.272, Tris 12.100, Na_2SO_4 0.142, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.000 2, 酪蛋白氨基酸 0.500, 亮氨酸 0.050, 脯氨酸 0.050, 色氨酸 0.005, 维生素 B1 0.005, 葡萄糖 2.000。

限制性内切酶, NEB 公司; 质粒提取试剂盒、RNA 提取试剂盒和反转录试剂, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 肠杆菌素和 L-阿拉伯糖, Sigma-Aldrich 公司; HRP 标记 6×His 标签蛋白, BBI 生命科学有限公司; 肠杆菌素单抗由本实验室制备^[18]; HRP-羊抗鼠二抗, Abcam 公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒, Thermo Fisher 公司。

电穿孔仪, Bio-Rad 公司; 核酸测定仪和三气培养箱, Thermo Fisher 公司; 全自动生长曲线分析仪, Oy Growth Curves Ab 公司。

表 1 本试验所用的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 Strain or plasmid	特征 Description	来源或参考文献 Source or reference
<i>Campylobacter</i>		
NCTC 11168	人源空肠弯曲菌参考菌株 NCTC 11168 Human <i>C. jejuni</i> reference strain NCTC 11168	[16]
ChCj3	鸡源空肠弯曲菌分离株 Chicken <i>C. jejuni</i> isolate	[17]
DuCj2	鸭源空肠弯曲菌分离株 Duck <i>C. jejuni</i> isolate	[17]
BoCj2	牛源空肠弯曲菌分离株 Bovine <i>C. jejuni</i> isolate	[17]
PoCc5	猪源结肠弯曲菌分离株 Porcine <i>C. coli</i> isolate	[17]
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)	大肠杆菌表达宿主菌 <i>E. coli</i> expression strain	诺唯赞公司 Vazyme
BL21(DE3) Δ entB	缺失突变 <i>entB</i> 基因的表达宿主菌 The <i>entB</i> knockout <i>E. coli</i> expression strain	本试验 This study
AN102	分泌肠杆菌素的大肠杆菌菌株 Ent-secreting <i>E. coli</i> strain AN102	[14]
AN102 Δ entB	缺失突变 <i>entB</i> 基因不分泌肠杆菌素菌株 The <i>entB</i> knockout <i>E. coli</i> strain AN102 without Ent secretion	[12]
ATCC 25922	大肠杆菌参考菌株 <i>E. coli</i> reference strain ATCC25922	[12]
ATCC 25922 Δ entB	缺失突变 <i>entB</i> 基因不分泌肠杆菌素菌株 The <i>entB</i> knockout <i>E. coli</i> strain ATCC25922 without Ent secretion	[12]
<i>Salmonella</i>		
CVCC 1806	鼠伤寒沙门氏菌参考菌株 <i>S. typhimurium</i> reference strain	本实验室保存 Our laboratory
CVCC 1806 Δ entB	缺失突变 <i>entB</i> 基因不分泌肠杆菌素菌株 The <i>entB</i> knockout <i>S. typhimurium</i> strain without Ent secretion	本试验 This study
CVCC 1800	鸡白痢沙门氏菌参考菌株 <i>S. pullorum</i> reference strain	本实验室保存 Our laboratory
CVCC 1800 Δ entB	缺失突变 <i>entB</i> 基因不分泌肠杆菌素菌株 The <i>entB</i> knockout <i>S. pullorum</i> strain without Ent secretion	本试验 This study
Plasmid		
pKD3	λ Red 重组系统所用质粒	[12]
pKD46	Plasmids used in the λ Red recombination system	[12]
pCP20		[12]
pCE2 TA/Blunt-Zero vector	基因克隆质粒载体 Gene cloning vector	Vazyme
pET32a	原核表达质粒载体 Prokaryotic expression vector	Novagen
pCE-ExFABP	克隆 Ex-FABP 重组质粒 Recombinant plasmid of cloning Ex-FABP	本试验 This study
pCE-Lcn2	克隆 Lcn2 重组质粒 Recombinant plasmid of cloning Lcn2	本试验 This study
pET-ExFABP	表达 Ex-FABP 重组质粒 Recombinant plasmid of expressing Ex-FABP	本试验 This study
pET-Lcn2	表达 Lcn2 重组质粒 Recombinant plasmid of expressing Lcn2	本试验 This study

1.3 引物设计

λ Red 重组系统质粒鉴定引物和大肠杆菌 *entB* 基因突变所用引物参考文献[12]; 沙门氏菌 *entB* 基因突变所用引物见表 2; 根据 GenBank 中 Ex-FABP 基因序列(AF121346)和人源 Lcn2 基因序列(NM_005564), 设计 2 个基因片段表达引物见表 2。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 细菌 *entB* 基因缺失株的构建

参照文献[12]的方法, 利用 λ Red 同源重组系统构建 BL21(DE3)、沙门氏菌 CVCC 1800 和 CVCC 1806 的 *entB* 基因缺失突变株。首先以质粒提取试剂盒提取 pKD3 质粒的 DNA 为模板, 以 EC-KZ-F/R、Sal-KZ-F/R (表 2)为引物, PCR 扩增两端为 *entB* 基因的同源臂序列, 中间为氯霉素抗性基因(C_m)片段。PCR 反应体系: 2 \times Phanta Flash Master Mix DNA 聚合酶 12.5 μ L, pKD3 质粒 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C

3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s、50 $^{\circ}$ C 15 s、72 $^{\circ}$ C 50 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增产物经 *Dpn* I 消化后回收, 回收产物经电击转入含有 pKD46 质粒的 BL21(DE3)中, 筛选 C_m 替换 *entB* 基因的突变株, 再转入 pCP20 质粒, 消除 C_m 基因, 分别获得 BL21(DE3) $\Delta entB$ 、CVCC 1800 $\Delta entB$ 和 CVCC 1806 $\Delta entB$ 基因缺失突变株。

1.5 逆转录 PCR

分别取 SPF 鸡盲肠上皮组织和培养良好的 Caco-2 细胞, 利用 RNA 提取试剂盒抽提总 RNA, 进而利用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 分别利用 FABP-F/R 和 Lcn2-F/R 引物对(表 2)扩增 Ex-FABP 和 Lcn2 基因片段。PCR 反应体系: 2 \times Phanta Flash Master Mix DNA 聚合酶 25 μ L, cDNA 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物经电泳和测序正确后纯化备用。

表 2 引物信息

Table 2 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)	特征 Description
Sal-YZ-F	GAGATGGCAATCCCGAAAC	1 132	沙门氏菌 <i>entB</i> 基因敲除验证引物
Sal-YZ-R	GTCGCTCCCATACGCAA		Primers for <i>Salmonella entB</i> gene knockout
Sal-KZ-F	<u>ATGGCAATCCCGAAACTACAGTCTTACGCGCTGCCCA</u> <u>CCGCACTGGATATCCCGACCAACAGATTGCAGCATTAC</u> CACGTC	1 168	扩增包含沙门氏菌同源臂的打靶片段 (下划线为同源臂序列) Amplifying the target fragment containing <i>Salmonella</i> homologous arms (the sequences of homologous arms were underlined)
Sal-KZ-R	<u>CGCCCACCAGGCGTCAATGGTCGGGTTTTTCGCCAGC</u> <u>ATCACGAAGTCGATATCGCCGTCATATGAATATCCTC</u> CTTAGTT		
EC-KZ-F	TTATTTACCTCGCGGGAGAGTAGCTTCCACCAGGCG <u>TTCGATGGTCGGGTAGATTGCAGCATTACACGTC</u>	1 163	扩增包含大肠杆菌同源臂的打靶片段(下 划线为同源臂序列) Amplifying the target fragment containing <i>E. coli</i> homologous arms (the sequences of homologous arms were underlined)
EC-KZ-R	ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACTGCCGG <u>AGTCTCACGATATCATATGAATATCCTCCTTAGTT</u>		
FABP-F	CGGGATCCGCCACAGTGCCGGACAGG (<i>Bam</i> H I)	487	扩增 Ex-FABP 基因
FABP-R	CCCTCGAGCCCACTTTCATCAACGCTGCATTC (<i>Xho</i> I)		Amplification of Ex-FABP gene
Lcn2-F	CGGGATCCGCCAGGACTCCACCTCAGACCT (<i>Bam</i> H I)	553	扩增 Lcn2 基因
Lcn2-R	CCCTCGAGCCCGCTCGATACACTGGTCGAT (<i>Xho</i> I)		Amplification of Lcn2 gene

1.6 重组质粒的构建

将上述 PCR 纯化产物与 pCE2 TA/Blunt-Zero 克隆载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞在氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)双抗性平板上筛选阳性克隆, 分别命名为 pCE-ExFABP 和 pCE-Lcn2。用质粒提取试剂盒提取 pCE-ExFABP 和 pCE-Lcn2 质粒的 DNA, 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后回收插入片段, 与同样双酶切的 pET32a 表达质粒 DNA 进行连接, 转化 DH5 α 感受态细胞在抗性平板上筛选阳性克隆, 分别命名为 pET-ExFABP 和 pET-Lcn2。

1.7 原核表达与蛋白纯化

将重组质粒 pET-ExFABP、pET-Lcn2 和空载体 pET32a 分别转化 BL21(DE3) Δ *entB* 感受态细胞, 筛选鉴定后获得用于蛋白表达的克隆菌株。不同菌株培养过夜后按 2% 的接种量转接于 50 mL LB+Amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至菌液 OD_{600} 值为 0.6–0.8, 加入 1 mmol/L IPTG 进行诱导表达, 继续培养 6 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 1 min 取菌体, 通过 SDS-PAGE 鉴定目的基因表达水平, 进而利用超声破碎仪(300 W, 4 $^{\circ}\text{C}$, 工作 2 s, 间隙 3 s, 共 40 min)裂解菌体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 20 min 取上清, 用 His 标签蛋白琼脂糖树脂纯化目的蛋白, 纯化蛋白用超滤管去除盐离子并浓缩, BCA 试剂盒测定蛋白浓度后保存备用。

1.8 表达蛋白与肠杆菌素结合试验

用 DMSO 将肠杆菌素纯品溶解为 1 mmol/L 的溶液, 加入 PBS 溶液中配制成 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 肠杆菌素, 取 500 μL 与同样浓度的纯化 Ex-FABP、Lcn2 或 6 \times His 标签蛋白混合, 室温作用 2 h, 利用 5 kDa 超滤管离心纯化混合物, 经 PBS 洗涤去除未结合肠杆菌素, 收集纯化的混合物, 进行 SDS-PAGE 电泳, 并用未结合肠杆菌素的蛋白作为对照, 经蛋白转印后, 分别与 HRP 标

记 His 标签蛋白抗体(1:10 000)或者肠杆菌素单抗(1:8 000)^[18]和 HRP 标记羊抗鼠二抗(1:8 000)进行反应, 通过 Western blotting 鉴定纯化蛋白与肠杆菌素特异性结合情况。

1.9 表达蛋白抑菌试验

参照发表的文献[8,19]鉴定表达的 Ex-FABP 和 Lcn2 蛋白体外抑制大肠杆菌和沙门氏菌生长的情况。分别利用 LB 肉汤培养大肠杆菌 AN102、ATCC 25922 和沙门氏菌 CVCC 1806、CVCC 1800, 以及这些菌株的 *entB* 基因缺失突变株(表 1), 5 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 用 T-medium 限铁培养基^[18]洗涤菌体, 转接入新鲜 T-medium 限铁培养基中培养过夜。调整所有菌株 OD_{600} 值到 1.0, 以 1% 接种量接入新鲜 T-medium 限铁培养基, 添加 Ex-FABP、Lcn2 或 6 \times His 标签蛋白(5 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 同时添加或不添加 FeCl_3 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 利用全自动生长曲线分析仪测定 24 h 生长情况, 绘制不同菌株的生长曲线。

鉴定表达的 Ex-FABP 和 Lcn2 蛋白体外抑制弯曲菌生长的情况。利用 MH 肉汤培养 NCTC 11168 菌株至 OD_{600} 为 0.1, 转接新鲜 MH 肉汤, 添加铁螯合剂 DFO (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$)和肠杆菌素 (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 然后加入 Ex-FABP、Lcn2 或 6 \times His 标签蛋白(5 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 置三气培养箱中生长, 每 4 h 测定 OD_{600} 值, 共培养 36 h, 同时利用 MH 平板计数不同培养条件下弯曲菌的活菌数。进而利用不同动物来源分离的弯曲菌分离株, 在上述培养条件下接种后, 每 4 h 测定 OD_{600} 值测定不同分离株生长情况, 绘制不同菌株的生长曲线。

1.10 表达蛋白与细菌分泌的肠杆菌素结合试验

参照 1.9 中培养方法在 T-medium 限铁培养基过夜培养大肠杆菌 AN102、ATCC 25922 和沙门氏菌 CVCC 1806、CVCC 1800, 以及这些菌株的 *entB* 基因缺失突变株(表 1), 调整所有菌株

OD_{600} 值到 1.0, 以 1% 接种量接入新鲜 T-medium 限铁培养基, 在培养液中添加 Ex-FABP 或 Lcn2 蛋白 (5 $\mu\text{mol/L}$), 12 h 后各收集菌液 5 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 3 min 取上清, 经 0.22 μm 滤膜过滤后利用 5 kDa 超滤管离心纯化上清, 经 PBS 洗涤去除未结合的肠杆菌素, 收集浓缩的混合物, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转印后经肠杆菌素单抗 (1:8 000) 和 HRP 标记羊抗鼠二抗 (1:8 000) 反应, 鉴定纯化蛋白与大肠杆菌或沙门氏菌分泌的肠杆菌素特异性结合情况。

1.11 统计学分析

利用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析并作图, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 细菌 *entB* 基因缺失株鉴定结果

利用 λRed 同源重组系统分别构建成功大肠杆菌 BL21(DE3)、沙门氏菌 CVCC 1800 和 CVCC 1806 菌株的 *entB* 基因缺失突变株, PCR 结果显示, 大肠杆菌 BL21(DE3) (图 1A) 和沙门氏菌 CVCC 1800/1806 (图 1B) 的亲本株、携带 C_m 基因突变株及去除 C_m 基因的突变株的扩增

产物大小均与预期结果相符。

2.2 原核表达及蛋白纯化结果

利用 RT-PCR 分别自鸡盲肠上皮组织和 Caco-2 细胞样品中扩增出 Ex-FABP (487 bp) 和 Lcn2 (553 bp) 基因片段, 并且测序结果相符。在将 2 个基因片段分别插入克隆载体和表达载体后, 在 IPTG 诱导下, 重组表达质粒 pET-ExFABP、pET-Lcn2 和空载体 pET32a 分别表达约 38、40 和 20 kDa 的蛋白条带 (图 2A), 与预期结果相符; 表达蛋白经 His 标签蛋白亲和层析柱纯化后电泳结果如图 2B 所示。

2.3 表达蛋白与肠杆菌素结合试验结果

表达的 Ex-FABP 和 Lcn2 蛋白均带有 6 \times His 标签蛋白, 因而无论与肠杆菌素结合与否, 用 HRP 标记 His 标签蛋白抗体进行 Western blotting, 均呈阳性反应 (图 3A); 但当用肠杆菌素单抗进行 Western blotting, 只有与肠杆菌素结合的 Lcn2 和 Ex-FABP 蛋白呈阳性反应, 而 His 标签蛋白不能与肠杆菌素发生结合反应 (图 3B)。表明表达的 Ex-FABP 和 Lcn2 均可特异性与肠杆菌素结合。

2.4 表达蛋白对大肠杆菌和沙门氏菌抑制生长的结果

在富铁 (培养基中添加 10 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3) 培

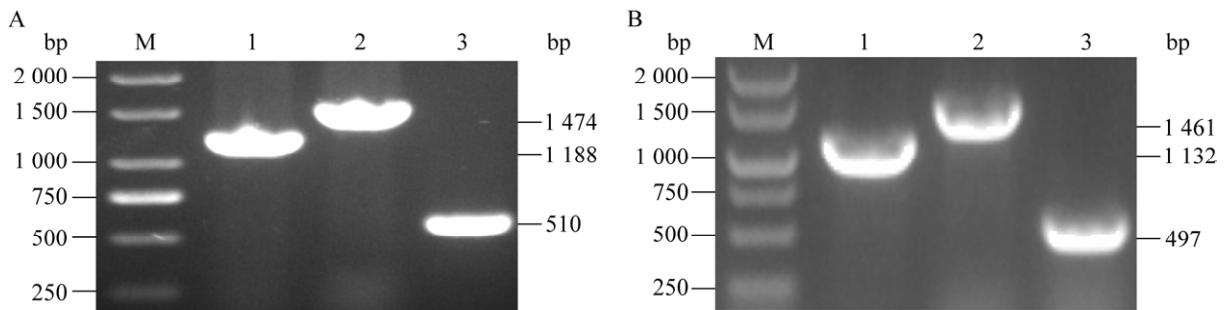


图 1 细菌 *entB* 基因缺失株鉴定结果 A: 大肠杆菌 BL21(DE3); B: 沙门氏菌 CVCC 1800/1806。M: DL2000 DNA Marker; 1: 亲本株; 2: 携带 C_m 抗性基因突变株; 3: 消除 C_m 抗性基因突变株。

Figure 1 Identification of the *entB* gene deleted bacterial mutants. A: *E. coli* BL21(DE3); B: *Salmonella* CVCC1800/1806. M: DL2000 DNA Marker; 1: Parental strain; 2: Mutant strain carrying the C_m resistance gene; 3: Mutant strain deleting the C_m resistance gene.

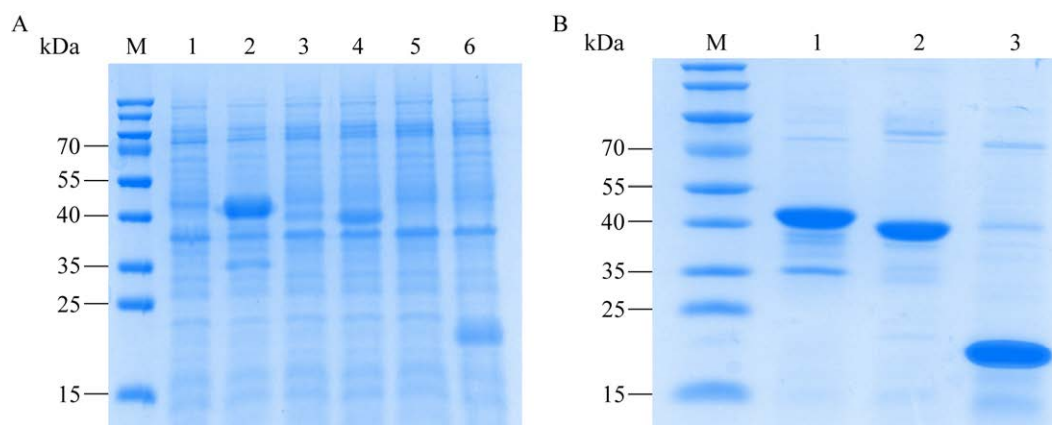


图 2 原核表达及蛋白纯化鉴定结果 A: SDS-PAGE 检测诱导前后蛋白表达结果。M: 蛋白 marker; 1: 诱导前 pET-Lcn2; 2: 诱导后 pET-Lcn2; 3: 诱导前 pET-ExFABP; 4: 诱导后 pET-ExFABP; 5: 诱导前 pET32a; 6: 诱导后 pET32a。B: SDS-PAGE 检测蛋白纯化结果。M: 蛋白 marker; 1: 纯化的 Lcn2; 2: 纯化的 Ex-FABP; 3: 纯化的 6×His 标签蛋白。

Figure 2 Identification of the prokaryotic expression and protein purification. A: Detection of protein expression before and after induction using SDS-PAGE. M: Protein marker; 1: Uninduced pET-Lcn2; 2: Induced pET-Lcn2; 3: Uninduced pET-ExFABP; 4: Induced pET-ExFABP; 5: Uninduced pET32a; 6: Induced pET32a. B: Detection of the purified proteins using SDS-PAGE. M: Protein marker; 1: Purified Lcn2; 2: Purified Ex-FABP; 3: Purified 6×His tagged protein.

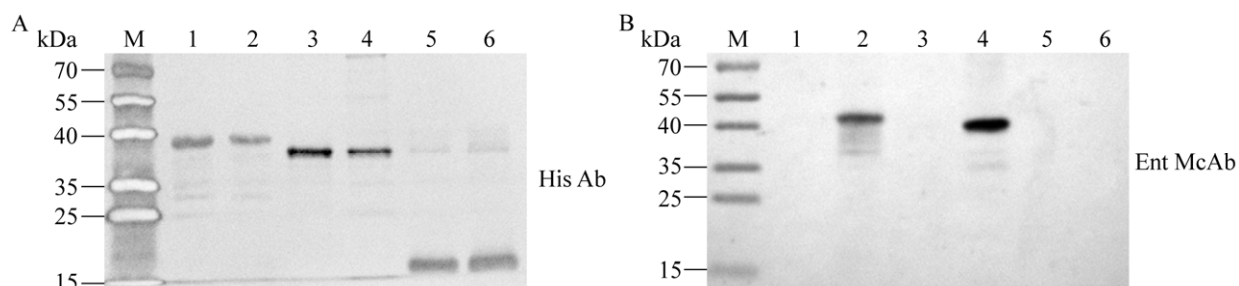


图 3 表达蛋白与肠杆菌素结合试验结果 A: HRP 标记 His 标签蛋白抗体检测的 Western blotting 结果; B: 肠杆菌素单抗检测的 Western blotting 结果。M: 蛋白 marker; 1: Lcn2; 2: 肠杆菌素结合的 Lcn2; 3: Ex-FABP; 4: 肠杆菌素结合的 Ex-FABP; 5: His 标签蛋白; 6: 肠杆菌素结合的 His 标签蛋白。

Figure 3 Binding results of expressed protein and enterobactin. A: Western blotting results using the HRP-labelled His tagged protein antibody. B: Western blotting results using the monoclonal antibody against enterobactin. M: Protein marker; 1: Lcn2; 2: Lcn2-Ent; 3: Ex-FABP; 4: Ex-FABP-Ent; 5: His-tagged protein; 6: His-tagged protein-Ent.

养条件下, 大肠杆菌 AN102、ATCC 25922 和沙门氏菌 CVCC 1806、CVCC 1800, 以及这些菌株的 *entB* 基因缺失突变株, 培养基中添加 Ex-FABP、Lcn2、His 标签蛋白或 PBS 对照, 不同时间点测

定的生长曲线显示均无显著差异(图 4, 图 5)。

在 T-medium 限铁培养基培养条件下, 添加 Ex-FABP 或 Lcn2 表达蛋白的大肠杆菌 AN102 亲本株生长能力显著低于添加 His 标签蛋白或

PBS 对照(图 4A), 而 AN102 Δ *entB* 突变株添加不同组分间无显著差异, 但生长能力低于亲本株(图 4B); ATCC 25922 亲本株和 *entB* 基因缺失突变株添加不同组分间也无显著差异, 但突变株生长能力低于亲本株(图 4C、4D)。沙门氏菌 CVCC 1806 和 CVCC 1800 以及 *entB* 基因缺失突变株添加不同组分间也无显著差异(图 5), CVCC 1806 突变株生长能力低于亲本株(图 5A、5B), 而 CVCC 1800 突变株生长能力与亲本株无显著差异(图 5C、5D)。

2.5 表达蛋白与细菌分泌的肠杆菌素结合试验结果

在接种大肠杆菌或沙门氏菌的限铁培养基中, 添加 Ex-FABP 或 Lcn2 表达蛋白共培养后,

用肠杆菌素单抗对培养上清进行 Western blotting 检测, 结果显示, 大肠杆菌 AN102 和 ATCC 25922 亲本株, 以及沙门氏菌 CVCC 1806 和 CVCC 1800 亲本株均可分泌肠杆菌素, 与 Ex-FABP 或 Lcn2 表达蛋白特异性结合, 而它们的 *entB* 基因缺失突变株由于不分泌肠杆菌素, 未检测到与表达蛋白结合的特异性条带(图 6)。

2.6 表达蛋白对弯曲菌的抑菌结果

在 MH 肉汤中添加 DFO 的限铁培养条件下, 空肠弯曲菌 NCTC 11168 生长完全被抑制, 而在添加肠杆菌素后可恢复正常生长^[14]。在此培养条件下, 添加 Ex-FABP 或 Lcn2 表达蛋白的 NCTC 11168 培养 20–36 h 的生长能力显著低于添加 His 标签蛋白或 PBS 对照, 菌落计数也显示

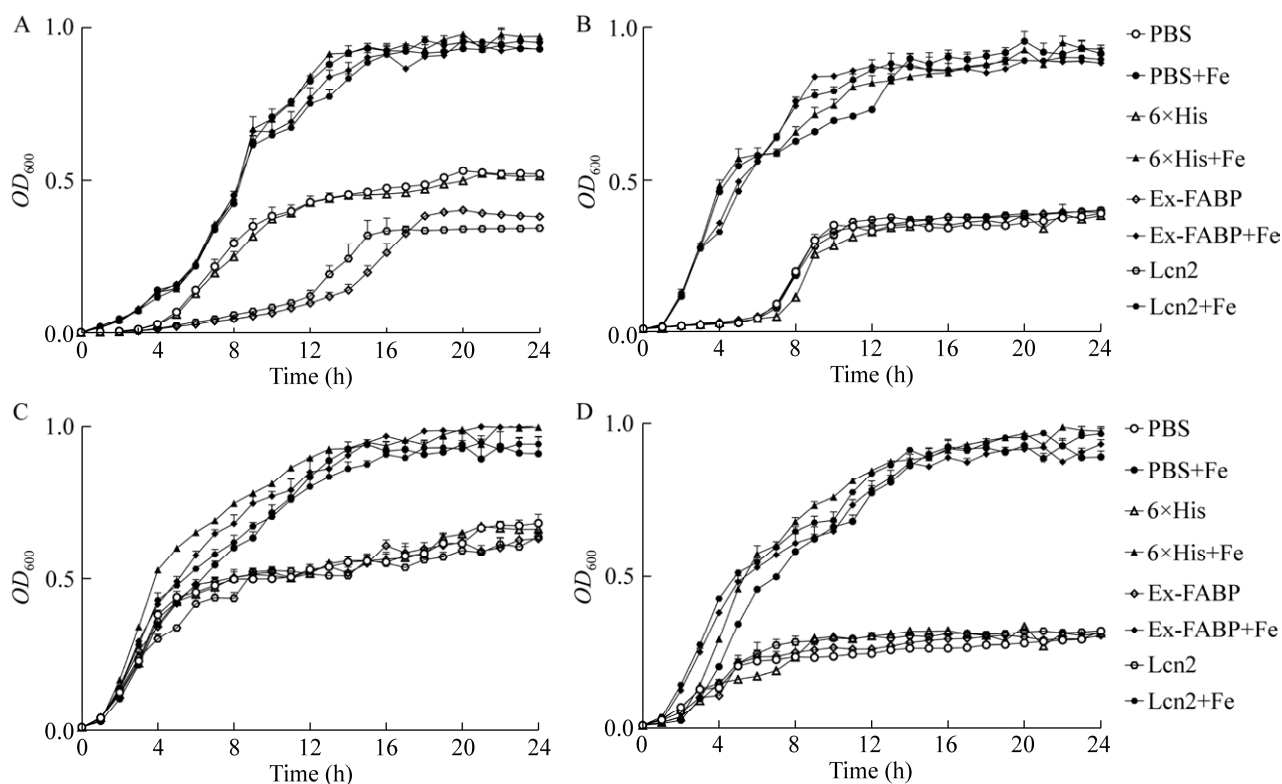


图 4 表达蛋白对大肠杆菌抑制生长的结果 A: 菌株 AN102; B: 菌株 AN102 Δ *entB*; C: 菌株 ATCC 25922; D: 菌株 ATCC 25922 Δ *entB*。

Figure 4 Inhibiting the growth of *Escherichia coli* by the expressed proteins. A: Strain AN102; B: Strain AN102 Δ *entB*; C: Strain ATCC 25922; D: Strain ATCC 25922 Δ *entB*.

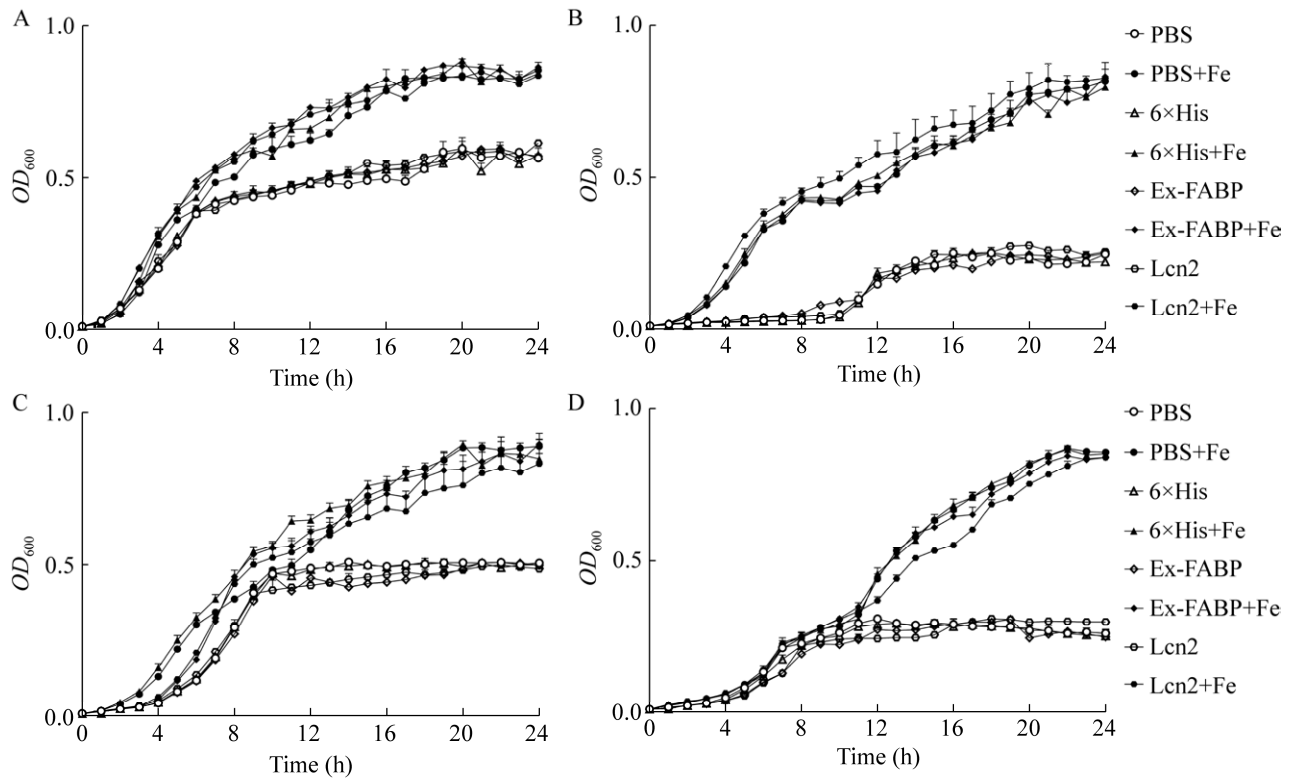


图5 表达蛋白对沙门氏菌抑制生长的结果 A: 菌株 CVCC 1806; B: 菌株 CVCC 1806 Δ entB; C: 菌株 CVCC 1800; D: 菌株 CVCC 1800 Δ entB。

Figure 5 Inhibiting the growth of *Salmonella* by the expressed proteins. A: Strain CVCC 1806; B: Strain CVCC 1806 Δ entB; C: Strain CVCC 1800; D: Strain CVCC 1800 Δ entB.

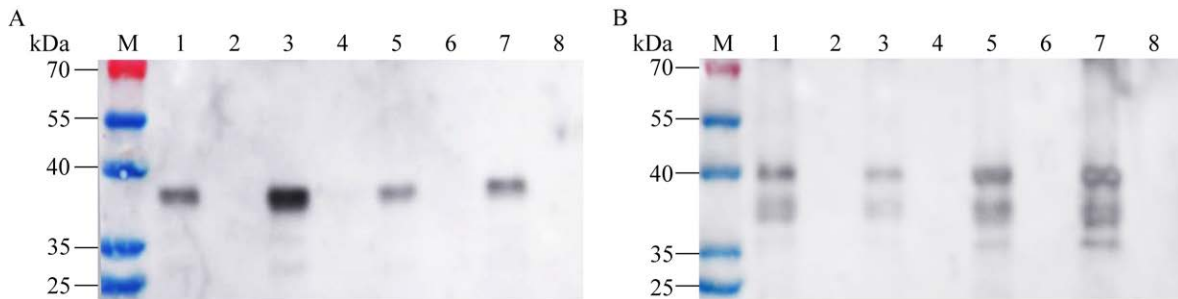


图6 表达蛋白与细菌分泌的肠杆菌素结合试验结果 A: Ex-FABP 结合肠杆菌素的 Western blotting 结果; B: Lcn2 结合肠杆菌素的 Western blotting 结果。M: 蛋白 marker; 1: 菌株 ATCC 25922; 2: 菌株 ATCC 25922 Δ entB; 3: 菌株 AN102; 4: 菌株 AN102 Δ entB; 5: 菌株 CVCC 1800; 6: 菌株 CVCC 1800 Δ entB; 7: 菌株 CVCC 1806; 8: 菌株 CVCC 1806 Δ entB。

Figure 6 Results of expressed proteins binding to enterobactin secreted by bacteria. A: Western blotting results of Ex-FABP binding to enterobactin. B: Western blotting results of Lcn2 binding to enterobactin. M: Protein marker; 1: Strain ATCC 25922; 2: Strain ATCC 25922 Δ entB; 3: Strain AN102; 4: Strain AN102 Δ entB; 5: Strain CVCC 1800; 6: Strain CVCC 1800 Δ entB; 7: Strain CVCC 1806; 8: Strain CVCC 1806 Δ entB.

同样的结果(图 7)。进一步利用不同宿主来源的弯曲菌分离株,在上述培养条件下,添加 Ex-FABP 或 Lcn2 表达蛋白的弯曲菌培养 12–36 h 的生长能

力显著低于添加 His 标签蛋白或 PBS 对照(图 8)。表明 Ex-FABP 和 Lcn2 通过特异性结合肠杆菌素对不同弯曲菌菌株均有抑制生长的效果。

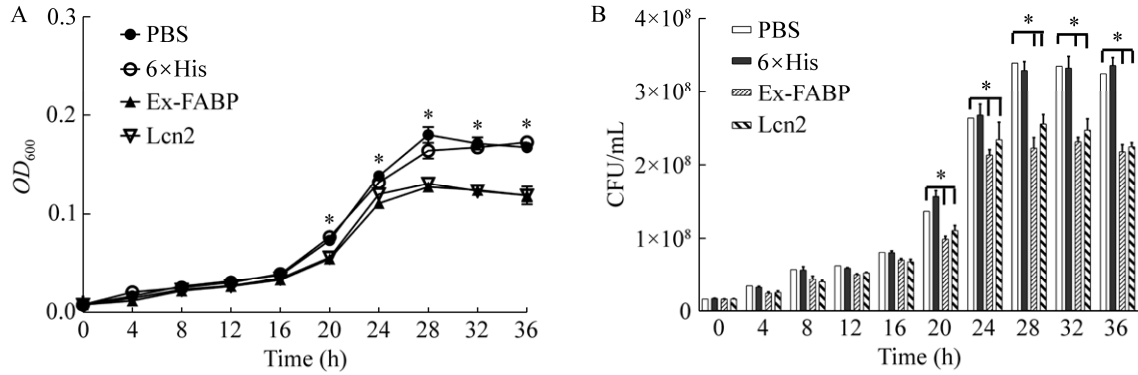


图 7 表达蛋白抑制空肠弯曲菌 NCTC 11168 生长的结果 A: OD_{600} 值呈现的抑菌结果; B: 菌落计数呈现的抑菌结果。

A: OD_{600} 值呈现的抑菌结果; B: 菌落计数呈现的抑菌结果。

Figure 7 Inhibiting the growth of *C. jejuni* NCTC 11168 by the expressed proteins. A: Antibacterial results presented by OD_{600} value; B: Antibacterial results presented by colony counting. *: $P < 0.05$.

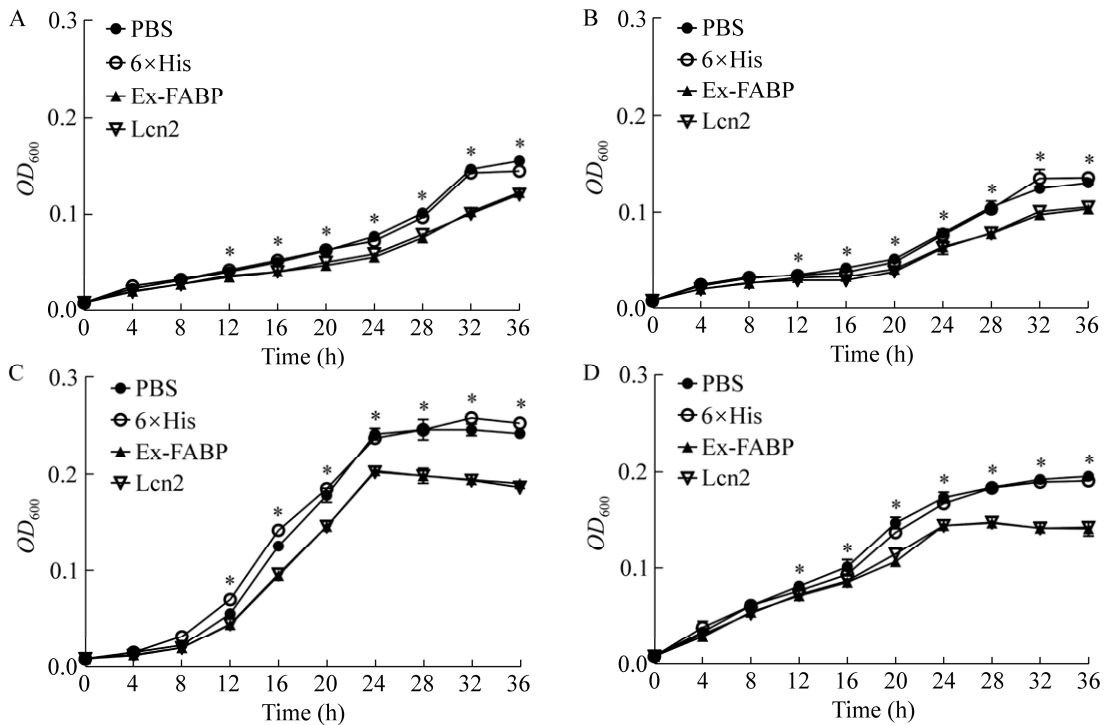


图 8 表达蛋白抑制不同宿主源弯曲菌生长的结果 A: 鸡源空肠弯曲菌; B: 鸭源空肠弯曲菌; C: 牛源空肠弯曲菌; D: 猪源结肠弯曲菌。

A: 鸡源空肠弯曲菌; B: 鸭源空肠弯曲菌; C: 牛源空肠弯曲菌; D: 猪源结肠弯曲菌。

Figure 8 Inhibiting the growth of different host-derived *Campylobacter* strains by the expressed proteins. A: ChCj3; B: DuCj2; C: BoCj2; D: PoCc5. *: $P < 0.05$.

3 讨论

目前已有研究证实鸡 Ex-FABP 蛋白可特异性结合肠杆菌素等铁载体, 体外抑制铁载体依赖的细菌生长^[7-8,19], 与哺乳动物 Lcn2 具有类似的功能。例如, Correnti 等^[8]利用 M9 限铁培养基研究显示表达的 Ex-FABP 可抑制大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的生长, 但不抑制铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的生长; Garénaux 等^[19]利用 RPMI 1640 培养基(含 HEPES 缓冲液和 10%胎牛血清)证实表达的 Ex-FABP 可抑制大肠杆菌 K-12 的生长。本研究利用 T-medium 限铁培养基鉴定了 Ex-FABP 的抑菌活性, 不但验证了 Ex-FABP 对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌活性, 而且还利用不分泌肠杆菌素的突变菌株及不分泌但可利用肠杆菌素的弯曲菌菌株, 进一步证实了鸡 Ex-FABP 蛋白能够通过特异性结合肠杆菌素抑制细菌的生长。

目前 Ex-FABP 抑菌作用的研究主要集中在产生铁载体的肠杆菌科细菌。铁载体结合试验及晶体结构分析显示, Ex-FABP 既可结合肠杆菌素, 还可结合副球菌素(parabactin)、儿茶酚型噬铁素(bacillibactin)、单糖基化肠杆菌素(monoglucosylated enterobactin)等铁载体, 而且推测其还可结合沙门菌素(salmochelin)来发挥更多生物学活性^[8], 但后来试验证实 Ex-FABP 不能结合 salmochelin、气杆菌素(aerobactin)、耶尔森杆菌素(yersiniabactin)等铁载体^[7,19]。Julien 等^[7,20]研究结果证实, 在限铁条件下, Ex-FABP 可抑制沙门氏菌依赖肠杆菌素的生长, 但对沙门氏菌依赖 salmochelin 的生长则无抑制作用。本试验结果也显示, 在限铁条件下添加 Ex-FABP 可抑制分泌肠杆菌素的大肠杆菌的生长, 而对不分泌肠杆菌素的突变菌株无抑制作用; 而且 Ex-FABP 对能够分泌其他铁载体的大

肠杆菌 ATCC 25922 和沙门氏菌 CVCC 1806、CVCC 1800 均无抑制作用; 此外, Ex-FABP 能够通过捕获肠杆菌素来抑制弯曲菌的生长, 这进一步证实 Ex-FABP 通过特异性结合肠杆菌素抑制细菌的生长。

在原核表达过程中, 为避免表达 Ex-FABP 和 Lcn2 蛋白的 BL21(DE3)菌株所分泌的肠杆菌素造成表达蛋白直接与其结合, 通常使用不分泌肠杆菌素的突变菌株作为表达菌株, 如 Garénaux 等^[19]与 Wang 等^[21]利用 *entD* 基因突变株作为表达菌株, 而 Julien 等^[7]与 Correnti 等^[8]采用 *entB* 基因突变株作为表达菌株, 由于 *entD* 和 *entB* 基因均为细菌合成肠杆菌素的关键基因, 因而本研究构建 BL21(DE3) *entB* 基因缺失株作为表达宿主菌, 并成功表达未与肠杆菌素结合的 Ex-FABP 和 Lcn2 蛋白, 从而保持其结合肠杆菌素的活性。

Ex-FABP 晶体结构分析显示, 其含有 2 个结合配体的腔室, 其中之一结合肠杆菌素等铁载体, 另一个可结合溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA), LPA 是一种细胞信号分子, 因而 Ex-FABP 除结合铁载体发挥抑菌活性, 可能在调节宿主生理和免疫功能等方面同样发挥重要作用^[8]。研究显示, *Lcn2* 基因敲除小鼠肠道内的大肠杆菌含量增加 200 倍, 并且空肠内出现显著的免疫细胞浸润, 造成菌群失调^[22], 提示 Ex-FABP 在维持鸡肠道菌群平衡方面同样发挥作用。

鉴于弯曲菌自身不能分泌肠杆菌素等铁载体, 但可利用其他细菌分泌的肠杆菌素促进其在宿主体内生长和定殖, 因而降低肠道内肠杆菌素含量可显著降低弯曲菌的定殖水平^[23]。研究显示, 利用表达 Lcn2 蛋白的乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)饲喂小鼠, 可显著抑制大肠

杆菌的生长,降低肠道炎症和应激反应^[24]。此结果提示提升鸡肠道内 Ex-FABP 蛋白水平有利于降低肠杆菌素含量和弯曲菌的定殖水平,是一种潜在的安全有效的新型防控弯曲菌策略。

4 结论

本研究成功表达特异性结合肠杆菌素的鸡 Ex-FABP 蛋白,在限铁培养条件下,可显著降低仅分泌肠杆菌素的大肠杆菌生长能力,同时可显著抑制弯曲菌的生长,为利用 Ex-FABP 蛋白防控弯曲菌提供新的策略。

致谢

感谢中国疾病预防控制中心张茂俊博士惠赠人源空肠弯曲菌参考菌株 NCTC 11168;感谢扬州大学兽医学院朱国强博士惠赠 λ Red 重组系统。

REFERENCES

- [1] GOLONKA R, YEOH BS, VIJAY-KUMAR M. The iron tug-of-war between bacterial siderophores and innate immunity[J]. *Journal of Innate Immunity*, 2019, 11(3): 249-262.
- [2] ELLERMANN M, ARTHUR JC. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, 105: 68-78.
- [3] RAYMOND KN, DERTZ EA, KIM SS. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(7): 3584-3588.
- [4] FLO TH, SMITH KD, SATO S, RODRIGUEZ DJ, HOLMES MA, STRONG RK, AKIRA S, ADEREM A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron[J]. *Nature*, 2004, 432(7019): 917-921.
- [5] XIAO X, YEOH BS, VIJAY-KUMAR M. Lipocalin 2: an emerging player in iron homeostasis and inflammation[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2017, 37: 103-130.
- [6] MURDOCH CC, SKAAR EP. Nutritional immunity: the battle for nutrient metals at the host-pathogen interface[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(11): 657-670.
- [7] JULIEN LA, FAU C, BARON F, BONNASSIE S, GUÉRIN-DUBIARD C, NAU F, GAUTIER M, KARATZAS KA, JAN S, ANDREWS SC. The three lipocalins of egg-white: only ex-FABP inhibits siderophore-dependent iron sequestration by *Salmonella enteritidis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 913.
- [8] CORRENTI C, CLIFTON MC, ABERGEL RJ, ALLRED B, HOETTE TM, RUIZ M, CANCEDDA R, RAYMOND KN, DESCALZI F, STRONG RK. Galline ex-FABP is an antibacterial siderocalin and a lysophosphatidic acid sensor functioning through dual ligand specificities[J]. *Structure*, 2011, 19(12): 1796-1806.
- [9] FACCIOLÀ A, RISO R, AVVENTUROSO E, VISALLI G, DELIA SA, LAGANÀ P. *Campylobacter*: from microbiology to prevention[J]. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 2017, 58(2): E79-E92.
- [10] TAHA-ABDELAZIZ K, SINGH M, SHARIF S, SHARMA S, KULKARNI RR, ALIZADEH M, YITBAREK A, HELMY YA. Intervention strategies to control *Campylobacter* at different stages of the food chain[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(1): 113.
- [11] JOHNSON TJ, SHANK JM, JOHNSON JG. Current and potential treatments for reducing *Campylobacter* colonization in animal hosts and disease in humans[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 487.
- [12] 时晨欣, 崔一芳, 申学阳, 焦晓丽, 郭芳芳, 丁保安, 徐福洲. 大肠杆菌肠杆菌素对空肠弯曲菌的促生长作用研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2024, 51(8): 3585-3594.
- [13] SHI CX, CUI YF, SHEN XY, JIAO XL, GUO FF, DING BA, XU FZ. Effects of *Escherichia coli* enterobactin on growth promotion of *Campylobacter jejuni*[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 51(8): 3585-3594 (in Chinese).
- [14] PALYADA K, THREADGILL D, STINTZI A. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(14): 4714-4729.
- [15] XU FZ, ZENG XM, HAIGH RD, KETLEY JM, LIN J. Identification and characterization of a new ferric enterobactin receptor, CfrB, in *Campylobacter*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(17): 4425-4435.
- [16] ZENG XM, XU FZ, LIN J. Molecular, antigenic, and functional characteristics of ferric enterobactin receptor CfrA in *Campylobacter jejuni*[J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(12): 5437-5448.
- [17] PARKHILL J, WREN BW, MUNGALL K, KETLEY JM, CHURCHER C, BASHAM D, CHILLINGWORTH T, DAVIES RM, FELTWELL T, HOLROYD S, JAGELS K, KARLYSHEV AV, MOULE S, PALLAN MJ, PENN CW, QUAIL MA, RAJANDREAM MA, RUTHERFORD KM, van VLIET AH, WHITEHEAD S, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences[J]. *Nature*, 2000, 403(6770): 665-668.
- [18] 郭家卉, 崔一芳, 李鹏祥, 申学阳, 曹晓亚, 马洪海, 郭芳芳, 丁保安, 徐福洲. 不同宿主源弯曲菌黏附侵袭肠上皮细胞及在鸡肠道内定殖的比较[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(12): 5150-5158.
- [19] GUO JH, CUI YF, LI PX, SHEN XY, CAO XY, MA

- HH, GUO FF, DING BA, XU FZ. Comparison on adhesion and invasion to intestinal epithelial cells and chicken intestine colonization of *Campylobacter* strains from different hosts[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(12): 5150-5158 (in Chinese).
- [18] CUI YF, WANG HW, GUO FF, CAO XY, WANG X, ZENG XM, CUI GL, LIN J, XU FZ. Monoclonal antibody-based indirect competitive ELISA for quantitative detection of Enterobacteriaceae siderophore enterobactin[J]. *Food Chemistry*, 2022, 391: 133241.
- [19] GARÉNAUX A, HOULE S, FOLCH B, DALLAIRE G, TRUESDELL M, LÉPINE F, DOUCET N, DOZOIS CM. Avian lipocalin expression in chickens following *Escherichia coli* infection and inhibition of avian pathogenic *Escherichia coli* growth by Ex-FABP[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 152(1/2): 156-167.
- [20] JULIEN LA, BARON F, BONNASSIE S, NAU F, GUÉRIN C, JAN S, ANDREWS SC. The anti-bacterial iron-restriction defence mechanisms of egg white; the potential role of three lipocalin-like proteins in resistance against *Salmonella*[J]. *Biometals*, 2019, 32(3): 453-467.
- [21] WANG HW, ZENG XM, MO YM, HE B, LIN HN, LIN J. Enterobactin-specific antibodies induced by a novel enterobactin conjugate vaccine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(10): e00358-19.
- [22] KLÜBER P, MEURER SK, LAMBERTZ J, SCHWARZ R, ZECHEL-GRAN S, BRAUNSCHWEIG T, HURKA S, DOMANN E, WEISKIRCHEN R. Depletion of lipocalin 2 (LCN2) in mice leads to dysbiosis and persistent colonization with segmented filamentous bacteria[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23): 13156.
- [23] CUI YF, GUO FF, GUO J, CAO XY, WANG HW, YANG B, ZHOU HZ, SU X, ZENG XM, LIN J, XU FZ. Immunization of chickens with the enterobactin conjugate vaccine reduced *Campylobacter jejuni* colonization in the intestine[J]. *Vaccines*, 2020, 8(4): 747.
- [24] PIU S, CHASSAING B, YEOH BS, VIENNOIS E, XIAO X, KENNETT MJ, SINGH V, VIJAY-KUMAR M. Ectopic expression of innate immune protein, lipocalin-2, in *Lactococcus lactis* protects against gut and environmental stressors[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2017, 23(7): 1120-1132.