

牛乳铁蛋白素抗菌活性及抗菌活性位点

安美忱 刘 宁*

(东北农业大学 食品学院 乳品科学教育部重点实验室 哈尔滨 黑龙江 150030)

摘要: 牛乳铁蛋白素(Bovine Lactoferricin, LfcinB)是乳铁蛋白在酸性环境下经胃蛋白酶作用N端释放的一段多肽,它具有多种生物学功能。研究 LfcinB 广谱抗菌性及改变 LfcinB 氨基酸序列对其抗菌能力的影响,寻找 LfcinB 抗菌作用的结构位点。人工合成 LfcinB,采用琼脂扩散法测定 LfcinB 抗菌图谱。人工合成丙氨酸取代3位半胱氨酸的 LfcinB、丙氨酸取代8位色氨酸的 LfcinB 和去掉2个半胱氨酸的 LfcinB 样品,测定最小抑菌浓度,确定 LfcinB 抗菌活性位点。研究结果表明:LfcinB 抗菌图谱广,可抑制多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌和霉菌,且对热和 pH 稳定,不能被多种蛋白酶失活,其中 LfcinB 第八位的色氨酸和分子内二硫键为其重要抗菌作用位点。

关键词: 牛乳铁蛋白素, 抗菌活性, 活性位点, 人工合成

Antibacterial Activity and Antibacterial Action Sites of Bovine Lactoferricin

AN Mei-Chen LIU Ning*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: Bovine Lactoferricin is a fragment of polypeptide which derives from N-terminal of bovine lactoferrin when it is digested by pepsin in acid condition. It has many biological functions. This study was designed to research the antibiosis spectrum of LfcinB and the key functional active site of the LfcinB by amino acid substitution and peptide sequence modification. Antimicrobial spectrum of the artificial synthesized LfcinB was determined by agar-well diffusion method. The antibacterial active sites were confirmed by minimal inhibitory concentration assays. After the Cysteine at the third site and the tryptophan at the eighth site of LfcinB were substituted by alanine, or two cysteine of LfcinB were respectively, the minimal inhibitory concentration of the three artificially modified LfcinBs was assayed. Results showed that LfcinB had a broad-spectrum of antibiosis, it could restrain various bacteria, such as Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, fungus and mycetes. LfcinB was stable to heat and pH, it could not be inactivated by many protease. The tryptophan at the eighth site and the intramolecular disulfide bond formed between two cysteins played a key role for antibiosis, as the functional active sites of LfcinB.

Keywords: Bovine Lactoferricin (LfcinB), Antibacterial ability, Active site, Artificial synthesis

基金项目: 东北农业大学创新团队基金资助(No. CXT007-3-1)

*通讯作者: Tel: 86-451-55191827; Fax: 86-451-55190340; 信箱: ningliu6666@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-03-13; 接受日期: 2009-04-24

各种感染性疾病日益严重地威胁着人类的健康,虽然新的抗生素不断被发现,但是随之而来的细菌耐药性日益增强和人类对抗生素滥用,导致3到5年致病菌就会对这种药物产生耐药性,如果再不遏止这种趋势,那么我们很快将没有与细菌对抗的有效武器,很多小病也能致命。因此,必须寻找安全的新型抗生素替代物以解决该问题。

牛乳铁蛋白素(Bovine Lactoferrin, LfcinB)是乳铁蛋白在酸性环境下经胃蛋白酶作用N端释放的一段多肽^[1],来源于牛乳铁蛋白的第17~41位氨基酸,由25个氨基酸残基组成,包括5个Arg、3个Lys和多个芳香族氨基酸残基,具有强碱性,等电点大于8.5,分子量为3126D,其中的2个Cys通过形成分子内二硫键使LfcinB分子呈环状结构,LfcinB一级结构如(图1)^[2]。LfcinB分子的环状结构使其更易与细菌细胞膜结合,而其带正电荷的色氨酸能与带负电荷的细胞膜作用,导致细菌细胞膜破裂,内物流失,细菌死亡。由于LfcinB具有普通抗生素所不具有的一系列优点,特别是广谱的抗菌能力和不易产生耐药性的特点;此外它在抑制病毒和真菌增殖、抑杀肿瘤细胞的同时,对真核细胞几乎没有毒性^[3-5],这些特性使得LfcinB在抗生素耐药性日益严峻的情况下,其应用前景和使用价值备受重视。因此,关于LfcinB的结构、生物学功能、作用机制、抑菌效果等已成为近年来学者研究与关注的热点问题。

本研究主要以人工合成的LfcinB为研究对象,采用琼脂扩散法测定LfcinB抗菌图谱,同时人工合成丙氨酸取代3位半胱氨酸的LfcinB、丙氨酸取代八位色氨酸的LfcinB和去掉2个半胱氨酸的LfcinB样品,测定最小抑菌浓度,确定LfcinB抗菌作用位点。

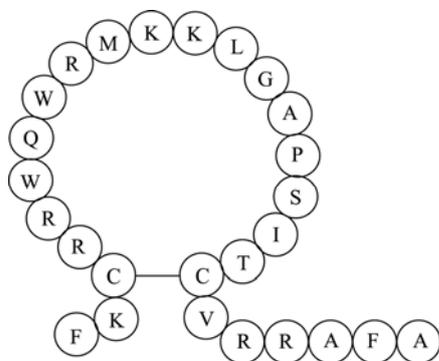


图1 LfcinB一级结构图
Fig. 1 Primary structure chart of LfcinB

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验原料:乳铁蛋白购自Sigma公司,LfcinB、丙氨酸取代三位半胱氨酸的LfcinB、丙氨酸取代八位色氨酸的LfcinB和去掉2个半胱氨酸的LfcinB样品均由上海生工合成,纯度95%以上。

1.1.2 指示菌菌株及来源:大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922 购自黑龙江省微生物研究所,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC25923、沙门氏菌(*Salmonella*) ATCC14028 购自中国药品生物制品检定所,荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) As 1.1082 购自中科院微生物所保藏中心,葡萄酒酵母(*Saccharomyces ellipsoideus*)分离自葡萄酒发酵液中;红酵母(*Rhodotorula* sp.)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)分离自土壤中,其他指示菌由乳品科学教育部重点实验室(东北农业大学)工业微生物菌种保藏中心(KLDS-DICC)提供。

1.1.3 培养基:乳杆菌选用MRS培养基(北京路桥),乳球菌选用M17培养基(青岛海博),酵母和霉菌选用马铃薯蔗糖培养基,其他指示菌选择营养肉汤培养基(北京奥博星)。

1.1.4 主要试剂和仪器:胃蛋白酶、 α -糜蛋白酶和胰蛋白酶购自Sigma公司,蛋白酶K(Amresco,美国),木瓜蛋白酶(德国), α -淀粉酶(北京奥博星)。DU 800(Beckman coulter公司),DHP-9082型电热恒温培养箱(上海-恒科有限公司),Hirayama HVE-50型高压灭菌器(日本Hirayama公司),微量进样器(德国Eppendorf公司),光学显微镜(Olympus),BCN-1360型生物洁净工作台(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 LfcinB 抗菌图谱测定:选取有代表性的革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母和霉菌做指示菌。抗菌图谱测定采用琼脂扩散法。1.2%的素琼脂,按每平皿10 mL倾倒在无菌平皿中晾干;制备含0.7%琼脂适宜指示菌生长的软琼脂培养基,冷至50°C左右,每100 mL接入0.6 mL过夜培养的指示菌菌液,在底层有琼脂的平皿上倾倒8 mL含有指示菌的软琼脂培养基晾干;用打孔器在涂有指示菌的培养基上打孔,孔直径8 mm;在孔中加入200 μ L浓度为1 mg/mL的LfcinB溶液,超净工作台上放置3 h;

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

置于适宜培养条件下进行培养,用游标卡尺测量抗菌圈直径^[6]。

1.2.2 LfcinB 对温度、pH 和酶的敏感性:取等量 LfcinB 溶液,分别在 60°C、80°C、100°C 和 121°C 保持 10 min 和 30 min,用冰冷却后做抗菌实验。LfcinB 溶液用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 分别调 pH 2~10,37°C 下温育 2 h,做抗菌实验。LfcinB 溶液用 HCl、NaOH 调节 pH 为以下各酶的最适作用 pH,按终浓度 1 mg/mL 分别加入胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、 α -糜蛋白酶、木瓜蛋白酶和 α -淀粉酶,37°C 下温育 2 h,按 1.2.1 方法做抗菌实验,各实验重复 3 次。

1.2.3 LfcinB 对指示菌的作用方式:取 20 mL LfcinB 溶液加入到 100 mL 培养到稳定期(测定 OD_{560})的大肠杆菌 ATCC25922 菌液中,每间隔 1 h 从每份中取少量测定 OD_{560} ,同时取 1 mL 梯度稀释后用平板计数法测定活菌数^[7]。

1.2.4 最小抑菌浓度测定(MIC):选取大肠杆菌 ATCC25922 和金黄色葡萄球菌 ATCC25923 做指示菌。将乳铁蛋白、LfcinB、丙氨酸取代 3 位半胱氨酸的 LfcinB、丙氨酸取代 8 位色氨酸的 LfcinB 和去掉 2 个半胱氨酸的 LfcinB 样品配成 1000 μ g/mL 的母液。分别吸取适量的母液与营养肉汤培养基混合配成 2 mL 最终浓度为 500 μ g/mL、450 μ g/mL、

400 μ g/mL、300 μ g/mL、200 μ g/mL、150 μ g/mL、120 μ g/mL、100 μ g/mL、80 μ g/mL、60 μ g/mL、40 μ g/mL、20 μ g/mL、10 μ g/mL 和 0 μ g/mL 的稀释液,然后在每管内加入培养到稳定期的指示菌菌液,使每管最终菌液浓度约为 5×10^5 CFU/mL。以培养基中不含有 LfcinB 并接种菌液的试管为空白对照,置 37°C 培养箱中培养 16 h 后测定 OD_{560} 值,得到各样品的 MIC^[8]。

2 结果与分析

2.1 LfcinB 的抗菌图谱

由(表 1)可见 LfcinB 对 34 种指示菌中的 30 种有不同程度的抗菌作用,能抑制多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母和霉菌,是一种广谱的抗菌肽。

2.2 LfcinB 对温度、pH 和酶的敏感性

LfcinB 表现出良好的热稳定性,随着温度和加热时间的延长,LfcinB 的抗菌圈直径虽有下降的趋势,但下降趋势缓慢,LfcinB 抑菌活力受温度影响较小,显示出良好的热稳定性。LfcinB 在 pH 2~10 范围内,均有抗菌作用,其抗菌活力不受 pH 影响(表 2)。LfcinB 在胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶 K 作用下,仍具有抗菌作用,但是在 α -糜蛋白酶和 α -淀粉酶作用下,失去抗菌活性(图 2)。

表 1 LfcinB 的抗菌图谱
Table 1 Antimicrobial spectrum of LfcinB

指示菌名称 Indicator strain	菌株编号 Strain number	抑菌作用 Antimicrobial activity	指示菌名称 Indicator strain	菌株编号 Strain number	抑菌作用 Antimicrobial activity
乳酸乳球菌乳酸亚种 <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KLDS4.0322	-	植物乳杆菌 <i>L. plantarum</i>	KLDS1.0317	+
乳酸乳球菌乳脂亚种 <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	KLDS4.0316	-	发酵乳杆菌 <i>L. fermentum</i>	\	+
粪肠球菌 <i>E. faecalis</i>	KLDS6.0638	+	发酵乳杆菌 <i>L. fermentum</i>	\	+
粪肠球菌 <i>E. faecalis</i>	KLDS6.0319	+	卷曲乳杆菌 <i>L. crispatus</i>	\	+
屎肠球菌 <i>E. faecium</i>	KLDS6.0640	+	鼠李糖乳杆菌 <i>L. rhamnosus</i>	KLDS1.0385	+
屎肠球菌 <i>E. faecium</i>	KLDS6.0332	+	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	ATCC25923	+
嗜热链球菌 <i>S. thermophilus</i>	KLDS3.0610	-	荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	As 1.8202	+
短乳杆菌 <i>L. brevis</i>	KLDS1.0355	+	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	\	+
短乳杆菌 <i>L. brevis</i>	KLDS1.0409	+	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	ATCC25922	+
布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i>	KLDS1.0364	+	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	ATCC14028	+

续 表

指示菌名称 Indicator strain	菌株编号 Strain number	抑菌作用 Antimicrobial activity	指示菌名称 Indicator strain	菌株编号 Strain number	抑菌作用 Antimicrobial activity
布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i>	KLDS1.0406	+	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	\	+
德氏乳杆菌保加利亚亚种 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	KLDS1.0325	+	恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	\	+
德氏乳杆菌保加利亚亚种 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	KLDS1.0324	+	啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	\	+
马乳酒样乳杆菌 <i>L. kefiranofaciens</i>	KLDS1.0373	+	葡萄酒酵母 <i>S. ellipsoideus</i>	\	+
嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	KLDS1.8701	+	红酵母 <i>Rhodotorula</i>	\	+
嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	KLDS1.0327	+	毛霉 <i>mucor</i>	\	+
植物乳杆菌 <i>L. plantarum</i>	KLDS1.0314	+	黑曲霉 <i>A. niger</i>	\	-

注: +: 为可产生明显的抗菌圈; -: 为不能产生明显的抗菌圈; \: 表示指示菌暂无编号。

Note: +: Clear inhibitory zone observed; -: No inhibitory zone observed; \: No strain numbers.

表 2 LfcinB 对温度、pH 和酶的敏感性
Table 2 Factors affecting the antimicrobial activity of LfcinB

抑菌活力(抑菌圈直径, 单位: mm) Antimicrobial activity (the diameter of the inhibition zones, unit: mm)					
温度 + 时间 Temperature+Time	LfcinB	pH	LfcinB	酶(1mg/mL) Enzyme (1mg/mL)	LfcinB
室温 Room temperature	11.56 ± 0.24	2.0	9.55 ± 0.52	胃蛋白酶 Pepsin	10.28 ± 0.56
60°C 10 min	11.23 ± 0.58	3.0	9.83 ± 0.68	胰蛋白酶 Trypsin	9.78 ± 0.66
60°C 30 min	11.14 ± 0.40	4.0	10.38 ± 0.37	木瓜蛋白酶 Papain	10.65 ± 0.35
80°C 10 min	10.78 ± 0.36	5.0	11.54 ± 0.55	α -糜蛋白酶 α -Chymotrypsin	\
80°C 30 min	9.86 ± 0.56	6.0	11.76 ± 0.32	α -淀粉酶 α -amylase	\
100°C 10 min	9.14 ± 0.50	7.0	11.82 ± 0.12	蛋白酶 K Proteinase K	10.74 ± 0.24
100°C 30 min	8.64 ± 0.48	8.0	11.24 ± 0.45		
121°C 10 min	9.34 ± 0.52	9.0	9.34 ± 0.86		
121°C 30 min	8.74 ± 0.35	10.0	8.64 ± 0.78		

注: 直径为 8.0 mm ± 0.2 mm 的孔中加入 200 μ L LfcinB 溶液; \: 没有明显抗菌圈。

Note: Wells (8.0 mm ± 0.2 mm) were filled with 200 μ L of LfcinB; \: No inhibitory zone observed.

2.3 LfcinB 对指示菌的作用方式

接入 LfcinB 的菌液 OD_{560} 在 5 h 后和空白对照菌液相比未发生明显变化, 说明指示菌总数变化不大。指示菌初始菌落数为 8.22×10^8 CFU/mL, 接入 LfcinB 以后活菌数急剧减少, 与空白对照菌液相比, 5 h 后活菌数减少了 99.27%, 下降了 2 个数量级(图 3)。

2.4 最小抑菌浓度测定

由图 4 可见不同样品对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度不同, LfcinB 为 30 μ g/mL, 是乳铁蛋白的 130 倍, 说明 LfcinB 的抗菌能力远远强于乳铁蛋白。

丙氨酸取代 8 位色氨酸的 LfcinB、丙氨酸取代 3 位半胱氨酸的 LfcinB 和去掉 2 个半胱氨酸的 LfcinB 样品的最小抑菌浓度分别为 80 μ g/mL、120 μ g/mL 和 150 μ g/mL, 抗菌能力低于 LfcinB。

由图 5 可见不同样品对大肠杆菌的最小抑菌浓度不同, LfcinB 为 20 μ g/mL, 是乳铁蛋白的 150 倍, 说明 LfcinB 的抗菌能力远远强于乳铁蛋白。丙氨酸取代八位色氨酸的 LfcinB、丙氨酸取代 3 位半胱氨酸的 LfcinB 和去掉 2 个半胱氨酸的 LfcinB 样品的最小抑菌浓度分别为 60 μ g/mL、100 μ g/mL、120 μ g/mL, 抗菌能力低于 LfcinB。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

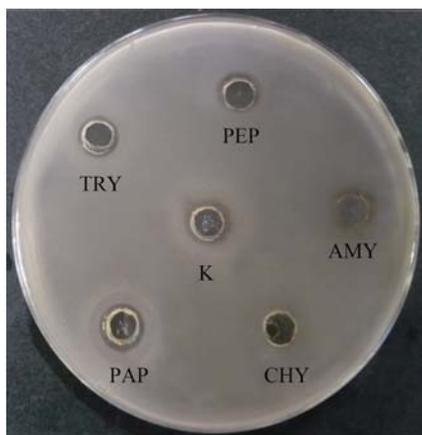


图2 LfcinB对蛋白酶的敏感性

Fig. 2 The sensitivity of LfcinB to proteinase

注: PEP: 蛋白酶; TRY: 胰蛋白酶; PAP: 木瓜蛋白酶; CHY: 糜蛋白酶; AMY: 淀粉酶; K: 蛋白酶K.

Note: PEP: Pepsin; TRY: Trypsin; PAP: Papain; CHY: α -chymotrypsin; AMY: α -amylase; K: Proteinase K.

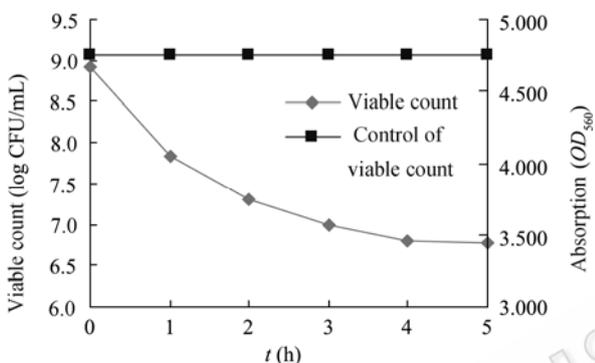


图3 LfcinB对大肠杆菌ATCC25922的作用

Fig. 3 Effect of LfcinB on *E. coli* ATCC25922

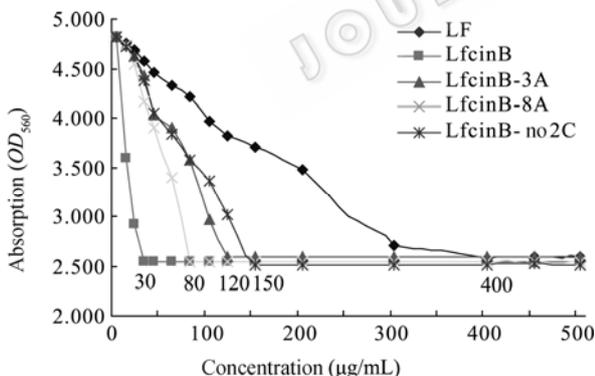


图4 不同样品对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度

Fig. 4 The MIC of different samples to *S. aureus*

注: LF: 牛乳铁蛋白; LfcinB: 牛乳铁蛋白素; LfcinB-3A: 丙氨酸取代3位半胱氨酸的LfcinB; LfcinB-8A: 丙氨酸取代8位色氨酸的LfcinB; LfcinB-缺失2C: 去掉2个半胱氨酸的LfcinB.

Note: LF: Lactoferrin; LfcinB: Lactoferricin; LfcinB-3A: The cysteine at the third site of LfcinB was substituted by alanine; LfcinB-8A: The tryptophan at the eighth site of LfcinB was substituted by alanine; LfcinB-loss2C: Two cysteine of LfcinB were abscised.

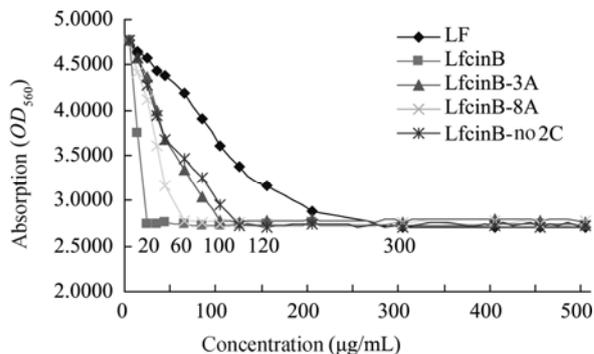


图5 不同样品对大肠杆菌的最小抑菌浓度

Fig. 5 The MIC of different samples to *E. coli*

注: LF: 牛乳铁蛋白; LfcinB: 牛乳铁蛋白素; LfcinB-3A: 丙氨酸取代3位半胱氨酸的LfcinB; LfcinB-8A: 丙氨酸取代8位色氨酸的LfcinB; LfcinB-缺失2C: 去掉2个半胱氨酸的LfcinB.

Note: LF: Lactoferrin; LfcinB: Lactoferricin; LfcinB-3A: The cysteine at the third site of LfcinB was substituted by alanine; LfcinB-8A: The tryptophan at the eighth site of LfcinB was substituted by alanine; LfcinB-loss2C: Two cysteine of LfcinB were abscised.

3 讨论

LfcinB作为一种安全的新型抗生素替代物在食品行业中应用,首先要考虑它的热稳定性,在食品加工过程中温度经常改变,而LfcinB的抗菌活力不随温度的变化而减弱,显示出良好的热稳定性。不同食品具有不同的pH, LfcinB在pH 2~10范围内均具有抗菌活性,说明LfcinB的抗菌活力不受pH影响,绝大部分蛋白酶不能破坏LfcinB结构, LfcinB在酶的作用下仍具有抗菌活性,因此LfcinB作为天然的防腐剂可广泛应用于食品行业。

LfcinB的抗菌方式是杀菌,因为接入LfcinB的大肠杆菌菌液OD₅₆₀在5h后和空白对照菌液相比未发生明显变化,但是活菌数减少99.27%,说明LfcinB的抗菌方式是杀菌。

LfcinB第8位的色氨酸和第3位的半胱氨酸是它的重要抗菌作用位点。通过最小抑菌浓度测定发现, LfcinB的抗菌活性约为乳铁蛋白的150倍。LfcinB的第3位半胱氨酸被丙氨酸取代导致其分子内二硫键被打开, LfcinB的环状结构被破坏, LfcinB与细菌细胞膜的结合能力下降,导致其抗菌活力下降。LfcinB的第8位色氨酸被丙氨酸取代导致其带正电荷的氨基酸减少,减弱了LfcinB与带负电荷的细菌细胞膜的作用,导致了LfcinB抗菌活力的下降,说明第8位的色氨酸和第3位的半胱氨酸对抗菌起重要作用^[9,10]。半胱氨酸为LfcinB氨基酸序列中唯

一带负电的氨基酸,去掉 2 个半胱氨酸后,抗菌活力下降,说明半胱氨酸对抗菌起重要作用,根据最小抑菌浓度测定数据初步判断,LfcinB 的第 8 位色氨酸在抗菌过程中比第 3 位半胱氨酸作用明显,但 LfcinB 的第 8 位色氨酸和第 3 位半胱氨酸都是它的重要抗菌活性位点和必需位点。

4 结论

LfcinB 抗菌图谱广,可抑制多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌和霉菌,且对热和 pH 稳定,不能被多种蛋白酶失活,LfcinB 抗菌方式是杀菌,LfcinB 第 8 位的色氨酸和 3 位的半胱氨酸为其重要抗菌作用位点,因为第 20 位的半胱氨酸与第 3 位半胱氨酸形成二硫键,构成侧链环肽结构,所以第 20 位的半胱氨酸与第 3 位半胱氨酸的作用可能是相等的。其中第 8 位色氨酸在抗菌过程中比第 3 位半胱氨酸作用明显。综上,LfcinB 能抑制产品在加工及销售中滋生的有害细菌,延长产品货架期,同时可起到天然防霉防腐剂的作用,显示了 LfcinB 广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Saito Hitoshi, Miyakawa Hiroshi, Tomita Mamoru, *et al.* Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *Journal of Dairy Science*, 1991, **74**(11): 3724–3730.
- [2] Wakabayashi H, Takase M, Tomita M. Lactoferrin derived from milk protein lactoferrin. *Current Pharmaceuti-*
- cal Design*, 2003, **9**: 1277–1287.
- [3] Jamie S Mader, Jayme Salsman, David M Conrad, *et al.* Bovine lactoferrin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther*, 2005, **4**(4): 612–624.
- [4] Jamie S Mader, Angela Richardson, Jayme Salsman, *et al.* Bovine lactoferrin causes apoptosis in Jurkat T-leukemia cells by sequential permeabilization of the cell membrane and targeting of mitochondria. *Experimental cell research*, 2007, **313**: 2634–2650.
- [5] Suzanne J Furlong, Nealed Ridgway, David W hoskin. Modulation of ceramide metabolism in T-leukemia cell lines potentiates apoptosis induced by the cationic antimicrobial peptide bovine lactoferrin. *International Journal of oncology*, 2008, **32**: 537–544.
- [6] 胡志和,董莹,庞广昌,等.乳铁蛋白和乳铁素的抗菌活性比较. *食品科学*, 2005, **26**(8): 99–102.
- [7] Hilde Ulvatne, Hanne Husom Haukland, Lars H Vorland, *et al.* Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferrin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, **50**: 461–467.
- [8] Keith S Hoek, Joanne M Milne, Paula Grieve, *et al.* Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides. *Antimicrobial Agents and Chemo Therapy*, 1997, **41**(1): 54–59.
- [9] Strøm MB, Rekdal Ø, Svendsen JS. Antibacterial activity of 15-residue lactoferrin derivatives. *J Peptide Res*, 2000, **56**: 265–274.
- [10] Strøm Morten B, Bengt Erik Haug, Øystein Rekdal, *et al.* Important structural features of 15-residue lactoferrin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity. *Biochem Cell Biol*, 2002, **80**: 65–74.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一,主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展,其内容要求新颖丰富,观点明确,论述恰当,应包含作者自己的工作内容和见解。因此,作者在动笔之前必须明确选题,一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面,在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势,即掌握其内在的精髓,深入到专题研究的本质,论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望,提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外,作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法,辅以注释,客观而有少量评述,使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是:在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文,引用文献数量不限。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>