

鸡蛋卵转铁蛋白铁结合能力及性质的研究

杜华英, 吴磊燕, 朱丽琴, 杨武英, 蒋艳, 徐明生

(江西农业大学食品科学与工程学院, 江西省高校天然产物研究与开发重点实验室, 江西南昌 330045)

摘要: 本试验研究了鸡蛋卵转铁蛋白与不同浓度铁离子的结合能力, 以及卵转铁蛋白在不同 pH 值和 NaHCO_3 条件下与铁离子的结合能力; 采用差示扫描量热仪(DSC)和圆二色性(CD)光谱分析卵转铁蛋白铁饱和度对其热变性温度和结构的影响。结果表明, 铁离子与卵转铁蛋白的摩尔比值在 2.2 左右时, 卵转铁蛋白铁达到完全饱和; 在中性和偏碱性的条件下, 卵转铁蛋白对铁结合能力比较高; 卵转铁蛋白铁结合能力随着 NaHCO_3 浓度的增加而增强, 当其浓度超过 75 mmol/L 以后, 铁结合能力基本保持不变。卵转铁蛋白铁饱和度越高, 其热变性温度越高, 由去铁卵转铁蛋白的 63.41 °C 到饱和铁卵转铁蛋白的 83.29 °C; 去铁卵转铁蛋白比饱和铁卵转铁蛋白的远紫外 CD 光谱带更加趋于负值, α -螺旋含量有微小的减少, 减少量为 4.40%, 而 β -折叠、 β -转角和别的含量均有所增加, 增加量分别为: 2.80%、1.20%、12.90%; 在近紫外 CD 光谱区, 饱和铁卵转铁蛋白的三级结构发生了较为明显的变化。

关键词: 卵转铁蛋白; 铁结合能力; 热变性温度; 结构

文章编号: 1673-9078(2015)4-109-114

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.018

Analysis of the Iron-binding Capacity and Characteristics of Hen Egg Ovotransferrin under Different Conditions

DU Hua-ying, WU Lei-yan, ZHU Li-qin, YANG Wu-ying, JIANG Yan, XU Ming-sheng

(College of Food Sci-Eng, Jiangxi Agriculture University, Key Laboratory of Education in Natural Product Research and Development, Nanchang 330045, China)

Abstract: The binding capacity of hen egg ovotransferrin (OVT) to different concentrations of iron ions was studied under multiple pH conditions and NaHCO_3 concentrations. The effects of iron saturation on the thermal denaturation temperature and structure of OVT were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) and circular dichroism (CD) spectrum analysis. The results showed that complete iron saturation was obtained at an approximate iron ion to OVT molar ratio of 2.2. OVT exhibited higher iron-binding capacity under neutral or slightly alkaline pH conditions. The iron-binding capacity of OVT also increased with the increase in NaHCO_3 concentration; however, a steady-state level was reached at NaHCO_3 concentrations exceeding 75 mmol/L. The thermal denaturation temperature of OVT increased corresponding to the increase in iron saturation, and was observed to be 63.41 °C and 83.29 °C for apo-ovotransferrin (apo-OVT) and holo-ovotransferrin (holo-OVT), respectively. Apo-OVT showed a more negative band in the far-ultraviolet CD spectrum compared to holo-OVT; the α -helical content of apo-OVT decreased by 4.4%, while that of β -sheet strands, β -turns, and other structures increased by 2.80%, 1.20%, and 12.90%, respectively. The tertiary structure of holo-OVT displayed an obvious change in the near-ultraviolet region of the CD spectrum.

Key words: ovotransferrin; iron-binding capacity; thermal denaturation temperature; structure

转铁蛋白(Transferrin)是单一肽链的蛋白质, 是人体内一种重要的铁元素载体, 许多疾病都与血清中转铁蛋白的含量变化有关, 如缺铁性贫血、急性肝炎及蛋白质缺乏等。转铁蛋白是一种能转运 Fe^{3+} 的铁结合蛋白, 是一种非血红素结合铁的 β -球蛋白^[1],

收稿日期: 2014-08-05

基金项目: 江西省自然科学基金项目 (20114BAB204026); 江西省教育厅项目 (gjj98134)

作者简介: 杜华英 (1979-), 女, 实验师, 研究方向为天然产物研究与开发

通讯作者: 徐明生 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向为畜产品加工

分子能可逆地结合两个 Fe^{3+} , 同时结合两个 CO_3^{2-} 或 HCO_3^- , 阴离子的结合与 Fe^{3+} 的结合是协同的。有研究表明, 酪氨酸残基在转铁蛋白与铁的结合过程起着关键的作用, 转铁蛋白分子在结合铁离子前后结构是不完全相同: 未结合铁离子时, 转铁蛋白的分子呈较开放、疏松结构; 结合了铁离子后, 转铁蛋白的配体同铁离子之间相互作用使得整个分子结构变得更加紧密^[2]。卵转铁蛋白(Ovotransferrin, OVT)以前称作卵伴白蛋白, 是一种糖蛋白, 属于转铁蛋白家族的成员^[3], 具有抗菌、抗病毒、免疫调节、抗癌和抗氧化等作用

[4-5]。卵转铁蛋白的每个分子中有 2 个配位中心可与铁、铜或锌等金属离子结合,结合了金属离子的卵转铁蛋白构象发生了较大变化,结构变得更紧密,也更加稳定,比去铁转铁蛋白具有更强的抵御热和蛋白水解酶作用的能力,同时也会影响到与受体的结合^[6]。结合了铁离子的卵转铁蛋白可以作为一种生物补铁剂,通常铁剂和铁剂强化食品常被用来防治缺铁性贫血。但是,由于普通铁剂对粘膜的刺激,而对胃肠道刺激大^[7],使吸收利用率降低。对转铁蛋白铁制剂的研究表明,其易被组织和器官利用,同时能促进核酸和蛋白质代谢,减少体内氧化导致的副作用,提高机体免疫力,对机体的细胞损伤具有保护作用^[8-9],因而可以成为机体有益的成分被吸收和利用。

本试验研究了环境因素对卵转铁蛋白铁结合能力的影响,并对不同铁饱和度卵转铁蛋白的变性温度及结构进行了分析,为研究开发卵转铁蛋白生物铁制剂的制备提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

OVT:鸡蛋清经去卵粘蛋白、盐析后获得卵转铁蛋白粗提物,采用两步 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换层析分离纯化制得卵转铁蛋白,纯度为 97.53%^[10];三氯化铁、碳酸氢钠、Tris、柠檬酸等均为分析纯;透析袋 12000~14000 购自 Sigma 公司。

UV-754 紫外分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;TGL-20M 高速台式冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;TAS-990 原子吸收分光光度计,北京普析通用有限责任公司;FD-1 型真空冷冻干燥机,北京博医康技术公司;DSC Q100,美国;圆二色谱仪,法国 Bilogic 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 卵转铁蛋白铁结合能力的测定

将纯化后的卵转铁蛋白溶于 pH 8.5, 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中,配制成 4 mg/mL 的卵转铁蛋白溶液。取 5 mL 此溶液,加入适量新鲜配制的 0.6 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 分别配制 Iron/OVT 摩尔比值为 0.2、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、3.0、4.0、5.0、6.0 溶液,在 25 °C 下反应 20 min,于 465 nm 处测其吸光值。

1.2.2 影响卵转铁蛋白铁结合能力的环境因素

1.2.2.1 pH 值对卵转铁蛋白铁结合能力的影响

称取适量纯化后的样品溶解在 pH 3.5~8.5 的 20

mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中,配制成 4 mg/mL 的卵转铁蛋白溶液,加入等量的 0.6 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,配制成 Iron/OVT 摩尔比值为 3.0 的溶液,在 25 °C 下反应 20 min,然后在 280、465 nm 处测定吸光值。当 A_{280}/A_{465} 的比值近似 22 时,表明卵转铁蛋白铁完全饱和^[11],因此可以依据 A_{280}/A_{465} 的比值计算分析卵转铁蛋白铁结合能力。

1.2.2.2 NaHCO_3 浓度对卵转铁蛋白铁结合能力的影响

称取适量纯化后的样品溶解在 pH 8.5、浓度为 0~150 mmol/L 的 NaHCO_3 、20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中,配制成 4 mg/mL 的卵转铁蛋白溶液,加入等量的 0.6 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,配制成 Iron/OVT 摩尔比值为 3.0 的溶液,在 25 °C 下反应 20 min,于 280、465 nm 处测定吸光值,卵转铁蛋白铁结合能力计算方法同 1.2.2.1。

1.2.3 铁完全饱和卵转铁蛋白(holo-OVT)的制备

将纯化后的卵转铁蛋白溶解在 pH 8.5, 75 mmol/L NaHCO_3 , 20 mmol/L 的 Tris-HCl 溶液中,配制成 4 mg/mL 的卵转铁蛋白溶液。取 5 mL 此溶液,加入 1.0 mL 新鲜配制的 0.6 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,反应 1 h,离心去除沉淀,经去离子水透析 48 h,真空冷冻干燥备用。

1.2.4 去铁卵转铁蛋白(apo-OVT)的制备

去铁卵转铁蛋白的制备是根据卵转铁蛋白的铁结合能力低于柠檬酸盐的原理进行的,方法如下:将卵转铁蛋白溶液在含有 0.1% EDTA 的 0.05 mol/L 的柠檬酸盐中透析 24 h,然后用过量的去离子水透析 48 h。卵转蛋白中的铁离子被柠檬酸盐结合掉,从而使卵转铁蛋白处于缺铁状态,用过量的去离子水去除杂离子,收集卵转铁蛋白冷冻干燥备用。

1.2.5 铁饱和度的测定

1.2.5.1 铁标准曲线的绘制

准确吸取 100 $\mu\text{g/mL}$ 铁标准溶液,0 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL、3 mL、5 mL 分别放入 100 mL 容量瓶中,然后用 0.5 mol/L 硝酸溶液定量至 100 mL,混匀。

原子吸收分光光度测定操作参数:灯电流:4 mA;波长 284.3 nm;狭缝 0.2 nm,燃烧头高度 10 mm。以铁浓度 C 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,绘制出标准曲线。

由图 1 可见,在试验范围内,吸光度与铁浓度几乎是正比关系,其中 A-C 关系式为: $A=0.0771C+0.002$ ($\mu\text{g/mL}$), $R^2=0.99902$ 。

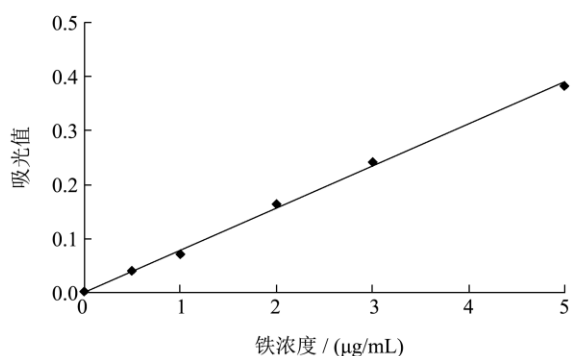


图1 铁标准曲线

Fig.1 Standard curve for iron

1.2.5.2 样品的制备

精确称取待测卵转铁蛋白制剂约 40 mg, 于 250 mL 消化瓶中, 加混合酸 (硝酸+高氯酸=4+1) 消化液 20~30 mL, 消化瓶上加放锥形漏斗, 置于电炉上加热消化。如未消化好且酸液过少时, 再补加几毫升混合酸消化液, 继续加热消化, 直至无色透明为止。再加几毫升水, 加热以除去多余的硝酸。待消化瓶中的液体接近 2~3 mL 时, 取下冷却。用去离子水洗并转移至 100 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 待测。

1.2.5.3 铁饱和度的计算

理论上, 1 个卵转铁蛋白分子可以结合 2 个 Fe^{3+} , 卵转铁蛋白的相对分子量约为 77600^[5, 12]。铁饱和度根据铁离子的含量推算, 100% 铁饱和度的卵转铁蛋白中铁含量 1.45 μg ($55.85 \times 2 / 77600$), 即铁饱和度 $100\% = 1.45 \text{ mgFe/g OVT}$ 。用原子吸收分光光度法测定待测样品中铁的含量 C_{Fe} ($\mu g/mg$ 样品)。铁饱和度根据下式计算^[13]:

$$\text{铁饱和度} = \frac{C_{Fe}}{1.45} \times 100\%$$

1.2.6 含铁量对卵转铁蛋白变性温度的影响

用差示扫描量热仪 (DSC) 测定卵转铁蛋白的变性温度。测定温度的范围为 25~140 $^{\circ}C$, 升温速度为 10 $^{\circ}C/min$ 。每次样品用量 2~3 mg, 氮气的流速为 60 mL/min。

1.2.7 含铁量对卵转铁蛋白结构的影响

用圆二色谱仪研究 Fe^{3+} 对卵转铁蛋白结构的影响。近紫外扫描波长范围: 250~320 nm, 远紫外扫描波长范围: 190~250 nm。称取一定量的样品溶解在去离子水中, 待完全溶解后, 用 0.22 μm 的 Milipore 膜过滤, 近紫外使用的样品浓度是 1 mg/mL, 样品池宽度为 10 mm, 远紫外使用的样品浓度是 0.1 mg/mL, 样品池宽度为 2 mm, 去离子水为空白对照液, 每个样品在室温下扫描 3 次, 结果取其平均值, 用 Bio-Kine 32 软件分析得到的结构, 并用 Dicroprot 2000 软件分析

远紫外的二级结构组成。

2 结果与讨论

2.1 卵转铁蛋白铁结合能力

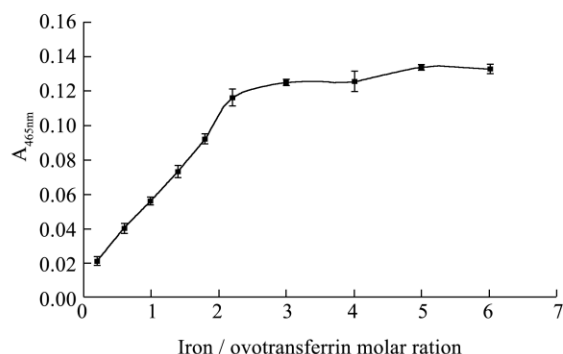


图2 铁结合能力的测定

Fig.2 Determination of the iron-binding capacity of ovotransferrin

图 2 显示, 随着 Iron/OVT 比值的增加, OVT 的 A_{465} 值呈线性增加, OVT 逐渐被饱和。当 Iron/OVT 增加至 2.2 左右以后, A_{465} 值变化不大, 与理论上, 1 个 OVT 分子可以结合 2 个 Fe^{3+} 基本一致。

2.2 影响卵转铁蛋白铁结合能力的环境因素

2.2.1 pH 值对卵转铁蛋白铁结合能力的影响

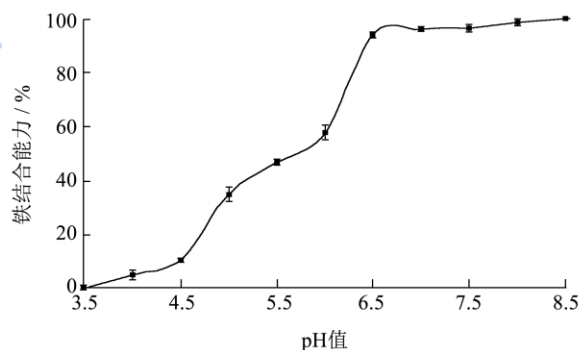


图3 pH 值对铁结合能力的影响

Fig.3 The effect of different pH conditions on the iron-binding capacity of ovotransferrin

根据 A_{280}/A_{465} 比值^[11], 假设当 pH 8.5 时, 铁饱和度为 100%, 而在 pH 3.5, 铁饱和度为 0%, 可估算在一定的 pH 值, 转铁蛋白的铁饱和度。由图 3 可看出, 随着 pH 值的增加, 卵转铁蛋白铁饱和度呈上升趋势, 表明了卵转铁蛋白与铁的结合能力取决于 pH 值的大小。简珊^[14]也研究了 pH 值对卵转铁蛋白铁结合铁离子能力的影响, 得出的结论是: 碱性溶液状态下 (pH 7~10), OVT 容易结合 Fe^{3+} ; 而在酸性条件下 (pH 4~5), OVT 不易与 Fe^{3+} 结合, 以游离的无铁 OVT 的状态存在。可以看出本

试验得到的结果与其基本一致。

转铁蛋白的铁结合位点位于 N-叶和 C-叶，每叶在内部缝隙处都有一个铁结合位点。此二叶具有较高的重叠性，即 N-端的组成大约有 40% 与 C-端组成相似，此部分要被限制分解成两部分，每部分都有一个单独的铁结合位点。每一个铁离子与转铁蛋白上的 4 个残基相连，2 个酪氨酸(Tyr)，1 个天冬氨酸(Asp)，1 个组氨酸(His)^[15]，由于 Asp 是酸性氨基酸，当环境 pH 偏碱性时，Asp 带有大量的负电荷，Try 在碱性条件下也可离解出一个酚羟基。高的净电荷引起分子间强烈静电斥力导致蛋白质分子结构的充分展开，促使卵转铁蛋白环状结构打开，暴露出铁结合样点，利于卵转铁蛋白结合带正电荷的 Fe³⁺。因此，中性和偏碱性的环境能提高卵转铁蛋白铁结合能力。

2.2.2 NaHCO₃ 浓度对卵转铁蛋白铁结合能力的影响

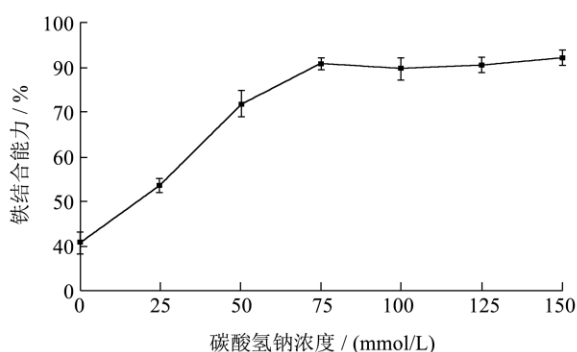


图 4 NaHCO₃浓度对铁结合能力的影响

Fig.4 The effect of varying NaHCO₃ concentrations on the iron-binding capacity of ovotransferrin

图 4 表明，NaHCO₃ 浓度的增加有利于铁结合能力的增强，但当其浓度达 75 mmol/L 以后，这种作用效果就不明显了。

在转铁蛋白结构中，HCO₃⁻ 会和一些碱性氨基酸残基（如 Arg121、Lys210）连接在一起，起到一种增效阴离子的作用，使蛋白质组分与 Fe³⁺ 的结合更加紧密。Thomas^[16] 也研究了乳铁蛋白结合的 Fe³⁺ 机制，并认为乳铁蛋白从环境中摄取铁的机制为：第一步是蛋白质的铁结合位点周围的氨基酸残基与 HCO₃⁻ 相互作用，第二步是在增效阴离子 HCO₃⁻ 的作用下，环境 Fe³⁺ 被吸引到铁结合位点上。因此当转铁蛋白的空穴部位已经被 HCO₃⁻ 饱和以后，就不能体现增效作用了。本实验的结果与 Thomas 的结果基本相似。说明卵转铁蛋白与乳铁蛋白，在结构上非常相似。

2.3 卵转铁蛋白铁饱和度的测定

1 号样品：去铁卵转铁蛋白；2 号样品：纯化后的

卵转铁蛋白；3 号样品：纯化后的卵转铁蛋白与铁离子结合后的样品。通过采用原子吸收法测定各样品中的铁饱和度，每个样品做三个平行样，结果如下：

表 1 卵转铁蛋白铁饱和度的测定

Table 1 Determination of the iron saturation levels of ovotransferrin

样品	空白对照	1	2	3
铁饱和度±标准差/%	0	1.39±0.04	10.23±0.82	92.11±1.28

由表 1 可知，纯化后所得的卵转铁蛋白与铁离子结合后铁饱和度可达 92.11%，纯化后卵转铁蛋白铁饱和度为 10.23%，去铁卵转铁蛋白铁饱和度为 1.39%。从结果可以发现自制饱和的卵转铁蛋白铁的饱和度接近理论值，说明自制卵转铁蛋白具有较好的螯合铁离子能力。

2.4 含铁量对卵转铁蛋白变性温度的影响

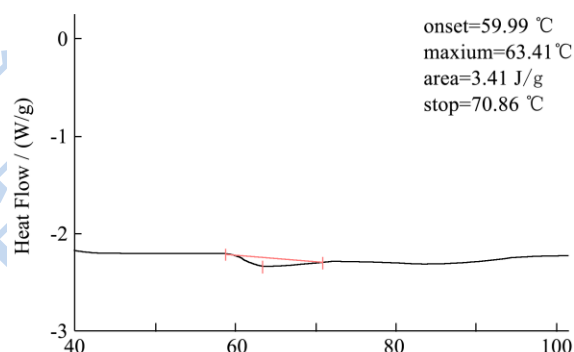


图 5 去铁卵转铁蛋白的 DSC 扫描图

Fig.5 DSC curves of apo-OVT

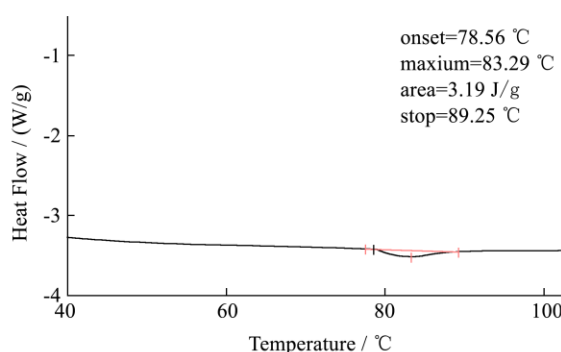


图 6 饱和铁卵转铁蛋白的 DSC 扫描图

Fig.6 DSC curves of holo-OVT

从上图中可以看出，去铁卵转铁蛋白有个变性峰，它的变性峰值温度为 63.41 °C。随着铁饱和度的增加，卵转铁蛋白变性温度也增加，当卵转铁蛋白铁饱和度达 92.11% 时，变性峰值温度为 83.29 °C。从图 5 和图 6 可知，随着铁饱和度的增加，卵转铁蛋白变性温度提高。这与 Thomas 报道铁饱和度为 18% 的天然人乳转铁蛋白、铁完全饱和的人乳转铁蛋白的变性温度分

别为 71.85 °C 和 94.52 °C^[17]是相似的。

2.5 含铁量对卵转铁蛋白结构的影响

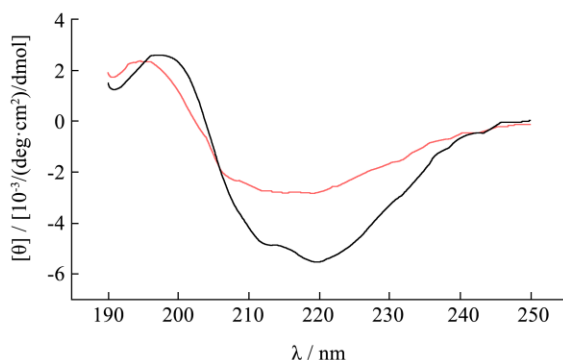


图 7 卵转铁蛋白远紫外圆二色性光谱图

Fig.7 Far-UV CD spectra of ovotransferrin

注: a: 去铁卵转铁蛋白, b: 饱和铁卵转铁蛋白。

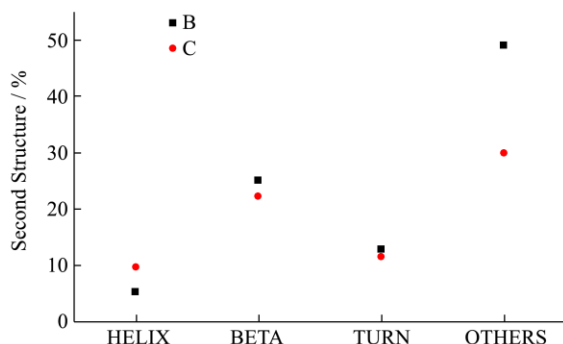


图 8 含铁量对卵转铁蛋白二级结构的影响

Fig.8 The effect of different iron saturation levels on the secondary structure of OVT

注: B:去铁卵转铁蛋白, C:饱和铁卵转铁蛋白。

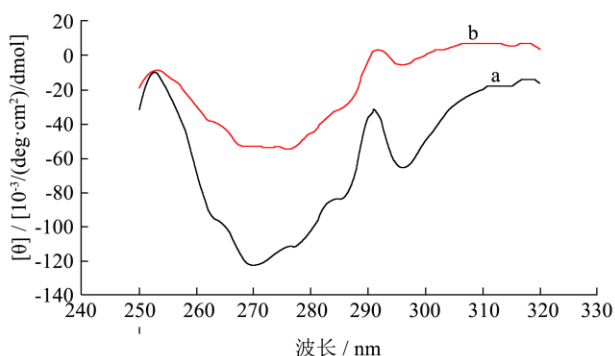


图 9 卵转铁蛋白近紫外圆二色性光谱图

Fig.9 Near-UV CD spectra of OVT

注: a: 去铁卵转铁蛋白, b: 饱和铁卵转铁蛋白。

圆二色(Circular Dichroism, 简称CD)是研究偏振光对不对称分子作用的一种技术^[18], 当分子对左、右圆偏振光的吸收不同时就可以观察到圆二色光谱, 其中蛋白质250nm以下的圆二色光谱是由肽键中氨基生色

团决定的^[19], 在190~240 nm的波长范围内, 圆二色光谱可灵敏地检测出蛋白质二级结构的变化情况。

远紫外CD光谱主要反映肽键的圆二色性, 在蛋白质或多肽的规则二级结构中, 肽键是高度有规律排列的, 其排列的方向性决定了肽键能级跃迁的分裂情况。具有不同二级结构的蛋白质或多肽所产生CD光谱带的位置、吸收的强弱都不相同。由图7和图8可知, 去铁卵转铁蛋白与饱和铁卵转铁蛋白相比, 二者蛋白质的结构是有少许的区别, α -螺旋含量有所减少, 减少量为4.40%, 而 β -折叠、 β -转角和它的含量均有所增加, 增加量分别: 2.80%、1.20%、12.90%, 由此可以推断出, 去铁卵转铁蛋白蛋白质结构是展开的, 有利于与 Fe^{3+} 结合, 而完全结合了 Fe^{3+} 的饱和卵转蛋白结构更加的紧密。蛋白质中芳香氨基酸残基, 如色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)及二硫键处于不对称微环境时, 在近紫外区250~320 nm, 表现出CD信号^[20]。研究表明: 色氨酸在290及305 nm处有精细的特征CD峰; 酪氨酸在275 nm及282 nm有CD峰; 苯丙氨酸在255、260及270 nm有弱的但比较尖锐的峰带; 另外芳香氨基酸残基在远紫外光谱区也有CD信号; 二硫键的变化信息反映在整个近紫外CD谱上。实际的近紫外CD光谱形状与大小受蛋白质中芳香氨基酸的种类、所处环境(包括氢键、极性基团及极化率等)及空间位置结构(空间位置小于1 nm的基团形成偶极子, 虽然这对CD光谱的贡献不是很明显)的影响。由图9可以看出, 饱和铁卵转铁蛋白与去铁卵转铁蛋白的近紫外CD光谱发生了较为明显的不同, 饱和卵转铁蛋白的三级结构发生了较为明显变化。

3 结论

3.1 分离纯化所得的卵转铁蛋白真空冷冻干燥制品, 缺铁卵转铁蛋白为白色絮状固体, 含铁卵转铁蛋白为粉红色絮状固体, 易溶于水。

3.2 自制的去铁卵转铁蛋白铁饱和度、纯化后所得卵转铁蛋白铁饱和度、纯化后的铁卵转铁蛋白饱和度分别为 1.39%、10.23%、和 92.11%。

3.3 当 pH 呈中性和偏碱性时, 铁结合能力最强; $NaHCO_3$ 浓度为 75 mmol/L 时有利于铁结合能力。

3.4 用 DSC 测定卵转铁蛋白的变性温度, 发现铁含量越大变性温度越高, 可能是铁改变了转铁蛋白的结构。

3.5 运用远紫外区和近紫外区的 CD 光谱, 研究 Fe^{3+} 与卵转铁蛋白结合, 对其结构的影响, 结果表明, 缺铁卵转铁蛋白与饱和铁卵转铁蛋白的二级结构及三级

结构均有所不同。

参考文献

- [1] Spik G. The biochemistry and physiology of iron [M]. New York: Elsevier Science Publishing Co, Inc, 1982
- [2] He Q Y, Mason A B, Woodworth R C, et al. In equivalence of the two tyrosine ligands in the N-lobe of human serum transferrin [J]. *Biochemistry*, 1997, 36: 14853-14860
- [3] Mazurier J, Metz-Boutigue MH, Jolles J, et al. Human lactotransferrin: molecular, functional and evolutionary comparisons with human serum transferrin and hen ovotransferrin [J]. *Experientia*, 1983, 39(2): 135-141
- [4] Giansanti F, Leboffe L, Pitari G, et al. Physiological roles of ovotransferrin. *biochim. Biophys [J]. Acta*, 2012(1820): 218-225
- [5] Wu J, Acero-Lopez A. Ovotransferrin: structure, bioactivities, and preparation [J]. *Food Res. Int.*, 2012, (46): 480-487
- [6] 冯佑民,冯敏琦,张新堂,等.转铁蛋白结构与功能的研究[J]. *生物化学与生物物理学报*,1990,22(3):257-262
FENG You-min, FENG Min-qi, ZHANG Xin-tang, et al. Studies on the structure and function of transferrin [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1990, 22(3): 257-262
- [7] 周永昌.蛋与蛋制品工艺学[M].北京:中国农业出版社,1995
- [8] Jennifer Kovacs-Nolan, Marshall Phillips, Yoshinori Mine. Advances in the value of eggs and egg components for human health [J]. *J. Agric. Food Chem*, 2005, 53: 8421-8431
- [9] Sugino H., itoda T., Juneja L R. General chemical composition of hen eggs. in hen eggs, their basic and applied science [M]. CRC Press: New York, 1997: 13-24
- [10] 徐明生,杜华英,蒋艳,等.鸡蛋清中卵转铁蛋白的分离纯化[J]. *食品工业科技*.2009,30(6):209-211
XU Ming-sheng, DU Hua-ying, JIANG Yan, et al. Separation and purification of ovotransferrin in hen egg white [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2009, 30(6): 209-211
- [11] Van Renswoude J, Bridges KR, et al. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: identification of nonlysosomal acidic compartment [J]. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1982, 79: 6186-6190
- [12] Williams J, Elleman TC, Kingston IB, et al. The primary structure of hen ovotransferrin [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1982, 122:297-303
- [13] Foley AA, Bates GW. The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction [J]. *Anal. Biochem*, 1987, 162: 296-300
- [14] 简姗.铁离子(III)螯合对鸡蛋卵转铁蛋白构象、消化性和过敏原性的影响[D].南昌:南昌大学.2012
- [15] Gomme P T, McCann K B, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions [J]. *Drug Discovery Today*, 2005, 10(4): 267-273
- [16] Thomas D Y, Kenneth N R. Lactoferrin: The role of conformational changes in its iron binding and release [J]. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115(15): 6765-6768
- [17] 林克椿.生物物理技术:波谱技术及其在生物学中的应用[M].高等教育出版社.1989
- [18] Pelton J T, McLean L R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure [J]. *Analytical biochemistry*. 2000, 277(2): 167-176
- [19] Kelly SM, Price NC. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 1997, 1338(2): 161-185