



两种根癌农杆菌储铁蛋白功能的鉴定和体外自组装

周琴, 高苗苗, 潘晓玥, 王浩, 徐楠, 郭敏亮*

扬州大学 生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009

周琴, 高苗苗, 潘晓玥, 王浩, 徐楠, 郭敏亮. 两种根癌农杆菌储铁蛋白功能的鉴定和体外自组装[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4234-4247.

ZHOU Qin, GAO Miaomiao, PAN Xiaoyue, WANG Hao, XU Nan, GUO Minliang. Functional identification and *in vitro* self-assembly of two ferritins of *Agrobacterium fabrum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4234-4247.

摘要: 【目的】验证根癌农杆菌(*Agrobacterium fabrum*, 以前也叫 *Agrobacterium tumefaciens*)两种储铁蛋白——饥饿细胞的 DNA 结合蛋白(DNA-binding protein from starved cells, Dps)和细菌铁蛋白(bacterioferritin, Bfr)——的编码基因 *atu2477* 和 *atu2771* 的功能。确定 Bfr 编码基因的开放阅读框。研究末端融合、血红素和个别关键氨基酸突变对 Bfr 功能和体外自组装的影响。探讨两种储铁蛋白的可能应用潜力。【方法】通过质粒将编码储铁蛋白的基因重新引入根癌农杆菌储铁蛋白缺失突变体中, 回补储铁蛋白, 验证回补的储铁蛋白编码基因是否能表达出具有储铁能力的储铁蛋白。用非变性凝胶电泳分离细胞粗提液中的蛋白质, 铁特异性染色的方法鉴定电泳分离的蛋白质中是否有储铁蛋白。将不同的肽或蛋白质融合到储铁蛋白的末端, 通过异源过量表达和纯化储铁蛋白的重组蛋白, 用非变性凝胶电泳分析这些重组蛋白在体外的自组装。用血红素重构处理和氨基酸定点突变的方法研究血红素和个别关键氨基酸对 Bfr 功能和体外自组装的影响。【结果】非变性凝胶电泳和铁特异性染色结果显示, 在根癌农杆菌的野生菌株、其相关突变体以及对应的回补菌株中, 均仅检测到 Bfr 的表达, 未检测到 Dps 的存在。当分别回补能编码 161 个和 169 个氨基酸 Bfr 的基因后, 发现野生型菌株中的 Bfr 与回补编码 161 个氨基酸 Bfr 的回补菌株一样大。多肽和蛋白质的末端融合对 Bfr 的功能和自组装有一定影响, 但不会使 Bfr 完全失去功能和自组装能力。结果还表明, 血红素和预测可络合血红素铁的 Met₆₀ 的替换也只影响 Bfr 的功能和自组装, 并未使 Bfr 功能完全丧失。【结论】根癌农杆菌主要通过 Bfr 存储铁元素。*bfr* 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)以少见的 UUG 为起始密码子, 编码产生包含 161 个氨基酸的蛋白质, 而非 169 个氨基酸。根癌农杆菌的 *dps* 基因在本文的测定条件下均处于不表达状态。根癌农杆菌的 Bfr 和 Dps 蛋白均比较稳定, 能够承受末端的多

资助项目: 国家自然科学基金(31870118, 32300151, 22278350)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31870118, 32300151, 22278350).

*Corresponding author. E-mail: guoml@yzu.edu.cn

Received: 2024-04-28; Accepted: 2024-07-16; Published online: 2024-07-19

肽或蛋白质融合, 不会使蛋白质的结构完全破坏, 因此, 经适当改造后具有开发应用的潜力。

关键词: 根癌农杆菌; 储铁蛋白; 细菌铁蛋白 Bfr; 来自饥饿细胞的 DNA 结合蛋白 Dps; 蛋白质纳米笼; 蛋白质自组装

Functional identification and *in vitro* self-assembly of two ferritins of *Agrobacterium fabrum*

ZHOU Qin, GAO Miaomiao, PAN Xiaoyue, WANG Hao, XU Nan, GUO Minliang*

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] This study aims to validate the functions of two ferritin-encoding genes: bacterioferritin (Bfr)-encoding gene (*atu2771*) and DNA-binding protein from starved cells (Dps)-encoding gene (*atu2477*), in *Agrobacterium fabrum*, to determine the open reading frame (ORF) of the Bfr-encoding gene, to investigate the effects of terminal fusion, heme group, and key residues on the function and self-assembly of *A. fabrum* Bfr, and to explore the potential applications of the two ferritin nano-cages. **[Methods]** We re-introduced the two ferritin-encoding genes into the ferritin-deficient mutants of *A. fabrum* respectively *via* plasmids to verify if the re-introduction could complement the ferritins of the ferritin-deficient mutants and thus validate the functions of the two genes. Native PAGE was employed to separate the ferritins in the crude extract of *A. fabrum* and potassium ferrocyanide (an iron-specific staining reagent) was used to stain the ferritins. Various peptides or protein were fused to the termini of two ferritins to test if the terminal fusion would affect the functions and self-assembly of the two ferritins. Site-directed mutation was then employed to test the effects of the key residue and heme group on the function and self-assembly of Bfr. **[Results]** Iron-specific staining on the ferritins separated by native PAGE showed that the Bfr-encoding gene expressed Bfr in all the tested *A. fabrum* strains, whereas the Dps-encoding gene expressed Dps in none of the tested *A. fabrum* strains. Complementary experiment with two different Bfr-encoding ORFs (encoding 161 residues and 169 residues) showed that Bfr in the wild type was encoded by the ORF encoding 161 residues. The results demonstrated that terminal fusions with different peptides or protein influenced but did not abolish the function and self-assembly of Bfr. The substitution of Met₆₀, which was predicted to chelate the iron of heme, indicated that heme affected the function and self-assembly of Bfr but was not indispensable. **[Conclusion]** *A. fabrum* utilizes Bfr to store iron. The ORF of the Bfr-encoding gene utilizes UUG (a rare start code) as its start code and encodes a Bfr composed of 161 residues. The Dps-encoding gene of *A. fabrum* expressed in none of the tested conditions. The structures of both Bfr and Dps of *A. fabrum* are stable enough to withstand the terminal fusion with various peptides or protein, suggesting that both Bfr and Dps nano-cages demonstrate great promise for biotechnological applications.

Keywords: *Agrobacterium fabrum*; ferritin; bacterioferritin (Bfr); DNA-binding protein from starved cells (Dps); protein nano-cage; protein self-assembly

根癌农杆菌(*Agrobacterium fabrum*)是一种广泛存在于土壤中的兼性植物病原菌(facultative phytopathogen),为革兰氏阴性菌,能够侵染大多数双子叶植物,导致冠瘿瘤疾病(crown gall tumor disease)的发生^[1]。根癌农杆菌的致病机制是:将其自身质粒上的部分 DNA 片段转运至宿主细胞,使宿主发生遗传转化而致病^[2-3]。由于根癌农杆菌能将外源基因转入宿主并使之发生遗传转化,因此,根癌农杆菌已改造成为一种应用最广泛的植物和真菌转基因工具菌^[4-6]。

铁是生物所需微量元素中最重要的一种元素,与细胞内的各种代谢途径和生物学过程密切相关。铁在细胞中存在的离子价态为二价(Fe^{2+})和三价(Fe^{3+})。三价铁的可溶性差,生物一般只吸收和利用二价铁^[7]。然而,当细胞吸收过量的 Fe^{2+} 后,会引发芬顿(Fenton)反应,产生活性自由基,对细胞形成毒害^[8]。为了应对过量的 Fe^{2+} 可能对细胞造成的毒害,而又不会使细胞内缺少可利用的 Fe^{2+} ,生物进化出一类能够维持细胞内铁平衡的储铁蛋白(ferritin),将可溶的二价铁转变成不溶的三价铁存储在储铁蛋白内腔,当细胞需要铁时,再将三价铁还原成二价铁,从储铁蛋白内腔释放出来^[9]。

在原核生物中存在三类不同的储铁蛋白:典型的铁蛋白(classical or typical ferritin, Ftn)、细菌铁蛋白(bacterioferritin, Bfr)和来自饥饿细胞的 DNA 结合蛋白(DNA-binding protein from starved cells, Dps)^[10]。Bfr 和 Dps 只存在于原核生物中。Dps 为 12 聚体纳米笼结构,被认为起着保护 DNA 免受氧化性破坏的作用^[11-12]。Ftn 广泛存在于原核与真核生物中,不含血红素,为 24 聚体纳米笼结构。与 Ftn 一样, Bfr 也是 24 聚体纳米笼结构,但每个 24 聚体 Bfr 含有 12 个血红素。Bfr 的内腔能存储大量以类似铁矿石形式存在的 Fe^{3+} ^[13]。一个 24 聚体纳米笼结构

的 Bfr 分子可以存储多达 2 700 个 Fe^{3+} 和大量的无机磷^[14-15]。

储铁蛋白的高级结构非常保守,来自不同生物的储铁蛋白外壳均为蛋白质纳米笼结构,铁存储在笼的内腔。纳米级多亚基蛋白质笼在多个领域具有广泛的应用前景^[16-18]。这类纳米笼能够在体外组装,具有生物兼容性和可降解性,可用于药物、医学影像试剂和生物活性物质的定位递送,以及纳米颗粒疫苗的制备,也可用作纳米反应器制备半导体、各种金属及其氧化物或合金的纳米颗粒;储铁蛋白的外壳是一种珍贵的纳米级蛋白质笼结构,目前已有部分储铁蛋白在特定领域实现了初步的应用;开发出更多体外重组可控的储铁蛋白,可进一步扩大其应用场景^[13,19]。Bfr 由 24 个相同的亚基构成,2 个亚基以对称的方式形成二聚体,在对称轴的位置有一个血红素,血红素中的铁与 2 个亚基中 Met 的硫络合,将 2 个亚基聚合在一起。12 个含有血红素的二聚体进一步聚合成近似球状的 24 聚体笼结构。Bfr 蛋白质笼的直径约为 12 nm,内腔直径约为 8 nm。血红素、多肽链中的某些氨基酸和所处溶液的特性严重影响 24 聚体纳米笼的组装^[20]。Dps 由 12 个相同的亚基构成,Dps 蛋白质笼较小,更加接近球状,其直径约为 9 nm,内腔直径约为 4.5 nm;Dps 的内腔大约能储存 500 个 Fe^{3+} ;Dps 蛋白质笼结构比 Bfr 稳定^[19,21]。

根癌农杆菌的基因组在 2001 年就分别由 2 个独立的实验室完成测序^[22-23]。在根癌农杆菌的基因组中无编码 Ftn 的基因,只注释出 2 个储铁蛋白编码基因:一个是 Bfr 的编码基因 *atu2771*,另一个是 Dps 的编码基因 *atu2477*。从完成测序到现在的 20 多年间,根癌农杆菌基因组的注释进行了多次修正,其中对 Bfr 的编码基因 *atu2771* 的注释有 2 种不同的起始位点。一种

是以 AUG 为起始密码子的阅读框(AAK88486.2), 编码 169 个氨基酸;另一种是以少见的 UUG 为起始密码子的阅读框(NP_355701.1 和 WP_006310955.1), 编码 161 个氨基酸。以 AUG 为起始密码子的阅读框 N-端多 8 个氨基酸。此前,我们对根癌农杆菌储铁蛋白的生理功能进行了深入研究,证明储铁蛋白的缺失显著降低根癌农杆菌胞内铁含量、减弱其抗氧化性和致病能力^[24]。为进一步解析根癌农杆菌储铁蛋白的部分生物化学特性和探讨其可能的应用潜力,本研究将在蛋白质层次对根癌农杆菌的储铁蛋白的储铁能力和体外组装进行深入研究。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

根癌农杆菌(*A. fabrum*)野生菌株为基因组测序用的菌株 C58, Ti 质粒为胭脂碱型。根癌农杆菌的 Bfr 缺失菌株 Δbfr 、Dps 缺失菌株 Δdps 和 Bfr-Dps 双缺失菌株 ΔbdF , 由 C58 敲除这两种蛋白质的编码基因所得,均为全编码框无痕删除突变体^[24]。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株用作构建质粒的宿主菌, BL21(DE3) 菌株用作表达蛋白质的宿主菌。大肠杆菌用 LB 培养基培养。根癌农杆菌用富营养培养基 MG/L (mannitol-glutamate/lysogeny broth)或全合成培养基 AB 蔗糖培养基培养,根据细菌质粒所携带的抗性,在培养基中添加相应的抗生素,具体配方参见文献[25-26]。全合成 AB 蔗糖培养基中 $FeSO_4$ 的浓度提高至 30 $\mu mol/L$ 。本研究所用的质粒见表 1,质粒构建采用同源重组酶将目的片段与需要的载体质粒片段相连,重组酶连接可以避免因无合适的酶切位点需要在连接处改变个别氨基酸的问题。构建质粒时,利用 PCR 扩增技术获取目的片段和所需的载体质粒

片段。在扩增目的 DNA 片段引物的 5'-端引入 8-10 个与载体质粒片段末端同源的核苷酸,同样,在扩增载体片段引物的 5'-端也引入 8-10 个与目的片段末端同源的核苷酸。用这样设计的引物来扩增目的片段和载体片段,得到的目的片段和载体片段的两端会分别含有 16-20 bp 的相互同源序列,这满足了同源重组酶进行同源重组连接的要求,目的片段和载体片段的连接处不会出现因用限制酶切载体需要替换个别核苷酸的问题。构建质粒的具体步骤按产品说明书进行。表达定点突变蛋白质的质粒用 PCR 方法来构建。质粒通过热激转化法转入大肠杆菌中,通过电穿孔转移法转入根癌农杆菌中^[26]。

1.2 储铁蛋白的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和铁特异性染色

根癌农杆菌的储铁蛋白经非变性凝胶电泳分离后,用亚铁氰化钾(potassium ferrocyanide)对储铁蛋白内腔的三价铁进行特异性染色形成普鲁士蓝(prussian blue),在凝胶上可以看到清晰的蓝色条带,其他蛋白质在凝胶上不显示任何条带。细胞的收集、裂解和电泳参见文献[28-29],并稍作修改。具体操作如下:离心(4 000 r/min 离心 5 min)收集等量的待测根癌农杆菌细胞,用 10 mmol/L、pH 7.4 的磷酸缓冲溶液洗涤 2 次,将细胞沉淀悬浮在 200 μL 细菌裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,甘油体积分数 20%, 20 mg/mL 溶菌酶, 0.2 mg/mL DNase, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L $MgCl_2$, 1% Triton X)中,悬浮细胞在 37 $^{\circ}C$ 保温 30 min,室温放置 1 h,然后放入液氮中速冻再融化,反复冻融 2 次,再加入适量直径为 1 mm 玻璃珠,涡旋振荡 15 min, 4 $^{\circ}C$ 、12 000 r/min 离心 20 min,上清液即为根癌农杆菌的细胞粗提液。将 40 μL 粗提液与 10 μL 电泳样品液(1mol/L Tris-HCl pH 6.8, 0.25%溴酚蓝,甘油体积分数 25%)混合,得到用于电泳的

表 1 本研究所用的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Purpose and properties	Source
pCB301-bfr	Carrying <i>bfr</i> gene and its native promotor for the complementation of Bfr to ferritin-deficient mutants	[24]
pCB301-dps	Carrying <i>dps</i> gene and its native promotor for the complementation of Dps to ferritin-deficient mutants	[24]
pUCA-19	Plasmid pUC19 carrying an <i>A. fabrum</i> replicon and using <i>lac</i> promotor to promote gene expression for the complementation of ferritin to ferritin-deficient mutants	[27]
pBfr-161 ^{aug}	pUCA-19 carrying <i>bfr</i> ORF to code 161 amino acids with AUG as the start code for the complementation of Bfr	This study
pBfr-161 ^{uug}	pUCA-19 carrying <i>bfr</i> ORF to code 161 amino acids with UUG as the start code for the complementation of Bfr	This study
pBfr-169	pUCA-19 carrying <i>bfr</i> ORF to code 169 amino acids with AUG as the start code for the complementation of Bfr	This study
pHis-bfr ¹⁶⁹	pUCA-19 expressing Bfr with 169 amino acids and 6×His fused to the N-terminus for the complementation of Bfr	This study
pHis-bfr ¹⁶¹	pUCA-19 expressing Bfr with 161 amino acids and 6×His fused to the N-terminus for the complementation of Bfr	This study
pBfr ¹⁶⁹ -His	pUCA-19 expressing Bfr with 169 amino acids and 6×His fused to the C-terminus for the complementation of Bfr	This study
pBfr ¹⁶¹ -His	pUCA-19 expressing Bfr with 161 amino acids and 6×His fused to the C-terminus for the complementation of Bfr	This study
pHis-tse-bfr ¹⁶⁹	pUCA-19 expressing Bfr with 169 amino acids and N-terminal fusion of 58 amino acids from pET-30 (including: 6×His-thrombin site-S-Tag-enterokinase site) for the complementation of Bfr	This study
pEgfp-bfr ¹⁶⁹	pUCA-19 expressing Bfr with 169 amino acids and eGFP fused to the N-terminus for the complementation of Bfr	This study
pSP94-bfr ¹⁶⁹	pUCA-19 expressing Bfr with 169 amino acids and N-terminal fusion of hepatocellular carcinoma-targeted peptide SP94 for the complementation of Bfr	This study
pBfr-169 ^{M60L}	pUCA-19 expressing Bfr with 169 amino acids and Met ₆₀ was changed to Leu	This study
pET-30	Expression vector to over-express His-tagged fusion protein in <i>E. coli</i>	Novagen
pET-His-bfr ¹⁶⁹	pET-30 over-expressing Bfr with 169 amino acids and 6×His fused to the N-terminus	This study
pET-bfr ¹⁶⁹ -His	pET-30 over-expressing Bfr with 169 amino acids and 6×His fused to the C-terminus	This study
pET-His-bfr ¹⁶¹	pET-30 over-expressing Bfr with 161 amino acids and 6×His fused to the N-terminus	This study
pET-bfr ¹⁶¹ -His	pET-30 over-expressing Bfr with 161 amino acids and 6×His fused to the C-terminus	This study
pET-His-dps	pET-30 over-expressing Dps and 6×His fused to the N-terminus	This study
pET-dps-His	pET-30 over-expressing Dps and 6×His fused to the C-terminus	This study
pET-His-bfr ¹⁶⁹ ^{M60L}	pET-30 over-expressing Bfr with 169 amino acids, in which Met ₆₀ was changed to Leu and 6×His was fused to the N-terminus	This study
pET-bfr ¹⁶⁹ ^{M60L} -His	pET-30 over-expressing Bfr with 169 amino acids, in which Met ₆₀ was changed to Leu and 6×His was fused to the C-terminus	This study

样品。取 20 μL 样品用于非变性凝胶(2.5%浓缩胶, 7.5%分离胶)电泳(4 °C, 60 V 恒压 8 h), 分离储铁蛋白。电泳后的凝胶用酸性亚铁氰化钾

溶液[150 mmol/L HCl, 25 mmol/L K₄Fe(CN)₆]染色 20 min^[30]。如果颜色不够深, 可用 3,3'-二氨基联苯胺进一步染色^[31]。

1.3 重组根癌农杆菌储铁蛋白的异源表达、纯化及组装体分析

重组蛋白的表达和纯化采用常规的方法, 将蛋白质融合成具有末端 His-tag 的重组蛋白, 利用 Ni-凝胶颗粒亲和色谱纯化重组蛋白^[26,32]。将表 1 中能编码各种不同重组根癌农杆菌储铁蛋白的质粒分别引入大肠杆菌(*E. coli*) BL21(DE3) 表达, 表达菌培养至合适的菌密度后, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导, 根据不同重组蛋白的表达情况, 适当调整诱导时间和温度, 4 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。将收集的细胞悬浮在 10 mmol/L、pH 7.4 的磷酸缓冲液中, 用超声波破碎细胞, 离心收集上清液即为含有重组根癌农杆菌储铁蛋白的粗提液。用 Proteinlos Ni-IDA Resin 吸附带 His-tag 的重组根癌农杆菌储铁蛋白, 然后, 用洗脱液(150 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4)将吸附的重组根癌农杆菌储铁蛋白洗下, 透析去除咪唑即得纯化的重组根癌农杆菌储铁蛋白。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定重组蛋白的纯度, 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析重组根癌农杆菌储铁蛋白的体外组装。

1.4 重组根癌农杆菌细菌铁蛋白的血红素重构

测定血红素对根癌农杆菌 Bfr 组装的影响, 参考文献[33-34]的方法。首先, 将纯化的 Bfr 重组蛋白在 65 °C 解聚, 然后加入氯化血红素(终浓度 12 μ mol/L), 保温 5–15 min 后, 冷却至室温并放置 1 h, 最后将未结合的血红素透析去除。

1.5 蛋白质浓度测定

重组蛋白的分离纯化及电泳样品的蛋白质浓度测定采用考马斯亮蓝 G-250 比色法, 以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白。

1.6 根癌农杆菌 Bfr 结构的预测和模拟

根癌农杆菌 Bfr 单体的结构由 Alpha-fold

网站(<https://alphafold.ebi.ac.uk/>)预测生成。Bfr 二聚体和纳米笼的结构模型由 SWISS-MODEL 网站(<https://swissmodel.expasy.org/>)模拟生成。结构图通过软件 ChimeraX 绘制。

2 结果与分析

2.1 两种根癌农杆菌储铁蛋白的表达和储铁功能鉴定

根癌农杆菌基因组中注释出编码 Bfr 和 Dps 两种储铁蛋白的编码基因。尽管先前已对缺乏 Bfr 和 Dps 基因的根癌农杆菌突变体细胞内的铁含量进行了测定, 但关于这两种储铁蛋白各自具体的铁储存机制与贡献, 我们仍知之甚少。本研究利用亚铁氰化钾与三价铁的专一性反应形成普鲁士蓝, 用以检测这两种蛋白的储铁情况。分别将根癌农杆菌 Bfr、Dps 的单缺失和双缺失突变体菌株, 以及在这些缺失突变体中分别引入 pCB301-bfr 和 pCB301-dps 质粒的回补菌株, 在 AB 培养基中培养 48 h, 收集等量细胞, 提取细胞粗提液, 用非变性凝胶电泳分离后亚铁氰化钾染色, 结果显示, 根癌农杆菌能够表达具有储铁能力的 Bfr, 而 Bfr 的缺失突变体未出现能够被亚铁氰化钾染色的蛋白质条带, 所引入的 Bfr 回补质粒能够完全回补 Bfr 缺失突变体。结果还显示, 无论是野生型、Bfr 单缺失突变体还是 Dps 回补菌株均检测不到能够被亚铁氰化钾染色的 Dps (图 1)。

2.2 根癌农杆菌细菌铁蛋白编码框的确定

在根癌农杆菌的基因组数据中, 预测的细菌铁蛋白 Bfr 的编码框有两种。一种是以常见的 AUG 为起始密码子, 编码 169 个氨基酸。序列比对发现, 169 个氨基酸的根癌农杆菌 Bfr 阅读框比其他细菌的 Bfr 在 N-端多 8 个氨基酸(图 2A), 于是, 将根癌农杆菌的 Bfr 阅读框修改为以 AUG 后的第 9 个密码子 UUG 为起始密

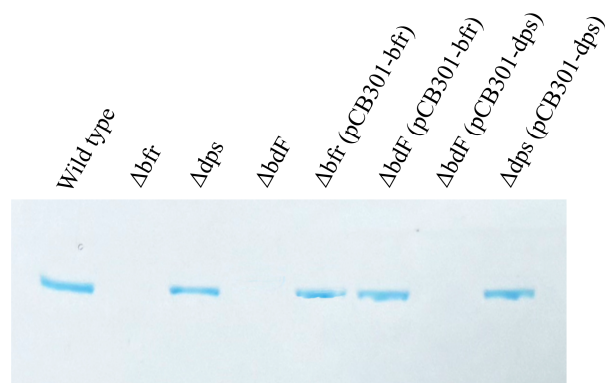


图 1 根癌农杆菌 Bfr 和 Dps 编码基因功能鉴定
Figure 1 Functional identification of *Agrobacterium fabrum* Bfr-encoding and Dps-encoding genes. Crude extracts from different *A. fabrum* strains were separated by native PAGE and the separated proteins were stained by potassium ferrocyanide. Wild type: C58 strain; Δbfr : *bfr*-deletion mutant; Δdps : *dps*-deletion mutant; Δbdf : Double (*bfr*, *dps*)-deletion mutant; pCB301-bfr: Plasmid expressing Bfr with the native promoter of *bfr* gene; pCB301-dps: Plasmid expressing Dps with the native promoter of *dps* gene.

码子的另一种编码框, 这种编码框编码的 Bfr 与其他细菌中的 Bfr 氨基酸序列更接近。因此, 在后来的基因注释中, 将根癌农杆菌 Bfr 基因阅读框的起始密码子修改为 UUG (图 2A)。

以 UUG 为起始密码子是非常罕见的, 而且多数情况下表达效率也比较低。为了确定根癌农杆菌 Bfr 到底是以 AUG 为起始密码子, 还是以 UUG 为起始密码子, 我们构建了 3 种不同的根癌农杆菌 Bfr 表达质粒: pBfr-169 (用 *lac* 启动子, AUG 为起始密码子表达 169 个氨基酸 Bfr)、pBfr-161^{uug} (用 *lac* 启动子, AUG 为起始密码子表达 161 个氨基酸 Bfr) 和 pBfr-161^{uug} (用 *lac* 启动子, UUG 为起始密码子表达 161 个氨基酸 Bfr)。用这 3 种质粒分别回补根癌农杆菌的储铁蛋白缺失突变体, 然后, 分别检测这 3 种质粒是否能使突变体重新表达出能储铁的 Bfr。

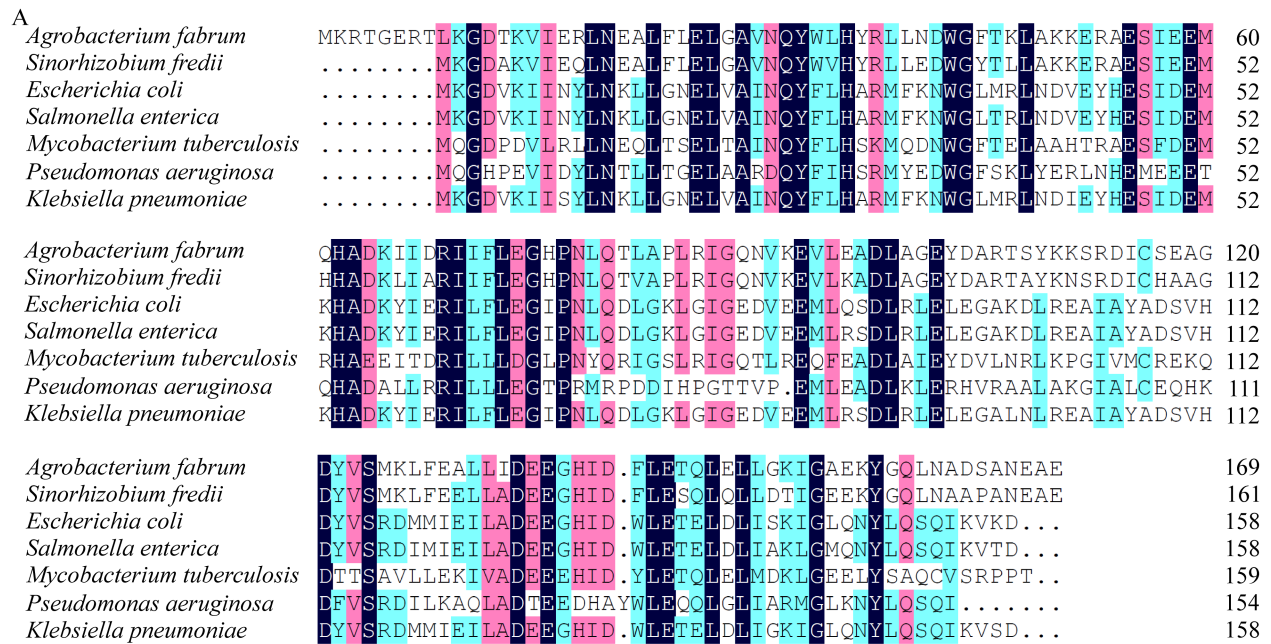
如图 2B 所示, 用 *lac* 启动子, 以 AUG 为起始密码子, 能表达出具有储铁能力的 161 个和 169 个氨基酸的 Bfr。根据图 2B 中 Bfr 的电泳迁移距离可以判断野生型根癌农杆菌 Bfr 是 161 个氨基酸, 意味着野生型是以 UUG 为起始密码子。然而, 当用载体质粒中的 *lac* 启动子, 以 UUG 为起始密码子(引入 pBfr-161^{uug} 质粒)时, 却不能使 Bfr 缺失突变体重新表达出 Bfr, 说明野生型 *bfr* mRNA 中的 UUG 上游序列可能影响以 UUG 为起始密码子的翻译。

2.3 末端融合对根癌农杆菌细菌铁蛋白储铁功能的影响

根据模拟的 Bfr 结构(图 3A), 多肽链的 N-端在 24 聚体的表面, C-端在 24 聚体的里表面。前面的结果(图 2B)也说明无论 N-端是否含 8 个氨基酸都不影响其储铁功能。为探讨根癌农杆菌 Bfr 的应用潜力, 需构建其融合蛋白并大量表达该蛋白, 因此设计了多种融合方式(图 3B), 以测试不同的融合方式对根癌农杆菌 Bfr 储铁功能的影响。将能表达不同融合蛋白的质粒分别引入根癌农杆菌的储铁蛋白缺失突变体 Δbdf , 检测细胞提取液中是否有能储铁的蛋白质。如图 3C 所示, 在根癌农杆菌 Bfr 的 C-端和 161 个氨基酸的 Bfr¹⁶¹ N-端直接融合 6 个组氨酸均会使 Bfr 失去储铁能力。而在 169 个氨基酸的 Bfr¹⁶⁹ N-端融合某些肽段后, 尽管这些肽段的融合会影响 Bfr 的储铁能力, 但所测试的全部 Bfr¹⁶⁹ N-端融合蛋白均具有一定的储铁能力。这些结果说明 Bfr¹⁶⁹ N-端多出的 8 个氨基酸可能为融合肽段起了连接臂的作用, 降低了融合肽段对 Bfr 储铁功能的影响。

2.4 根癌农杆菌两种储铁蛋白的异源表达及体外组装

用大肠杆菌异源表达根癌农杆菌储铁蛋白的组氨酸标签融合蛋白, 结果显示, 不管是在



Sequence encoding the first ten amino acids of the N-terminus of *A. fabrum* Bfr

AUG AAG AGA ACA GGA GAG CGG ACA UUG AAA GGC G....
 M K R T G E R T L K G

B

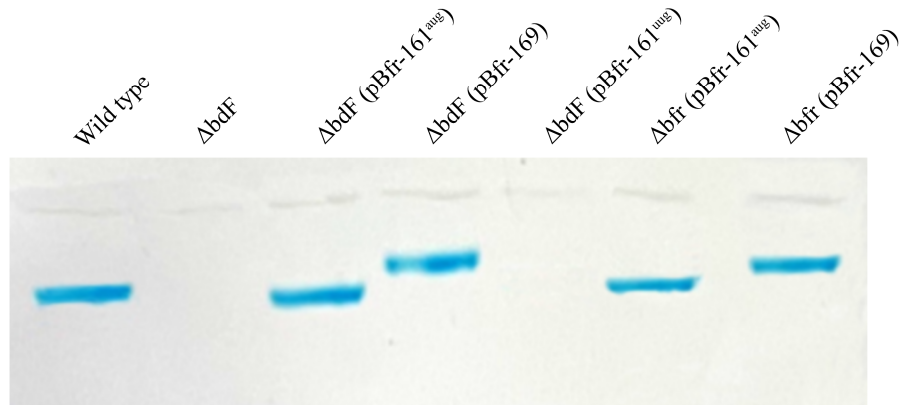


图 2 根癌农杆菌 Bfr 开放阅读框的确定

Figure 2 Verification of *Agrobacterium fabrum* Bfr ORF. A: Sequences alignment of Bfr proteins from seven different bacteria. B: Ferritin-deficient mutants were complemented by plasmids carrying two different *bfr* ORFs with different start codes. The expression of *bfr* gene was promoted by *lac* promoter.

N-端还是 C-端融合 6 个组氨酸,根癌农杆菌的 Bfr 和 Dps 都能在大肠杆菌中大量表达,可利用融合的组氨酸纯化得到高纯度的融合蛋白(图 4A)。用非变性凝胶电泳分析这些融合蛋白发现,根癌农杆菌的 Bfr 与其他细菌的 Bfr 相似,在溶液中

以单体、二聚体和 24 聚体的形式存在(图 4B)。从图 4 中各条带的染色程度可以看出,不同的末端融合方式对 Bfr 聚合体的形成影响不同,但均不会完全阻止 24 聚体的形成,其中 Bfr¹⁶⁹ 的 N-端融合 6 个组氨酸的 His-bfr¹⁶⁹ 重组蛋白形

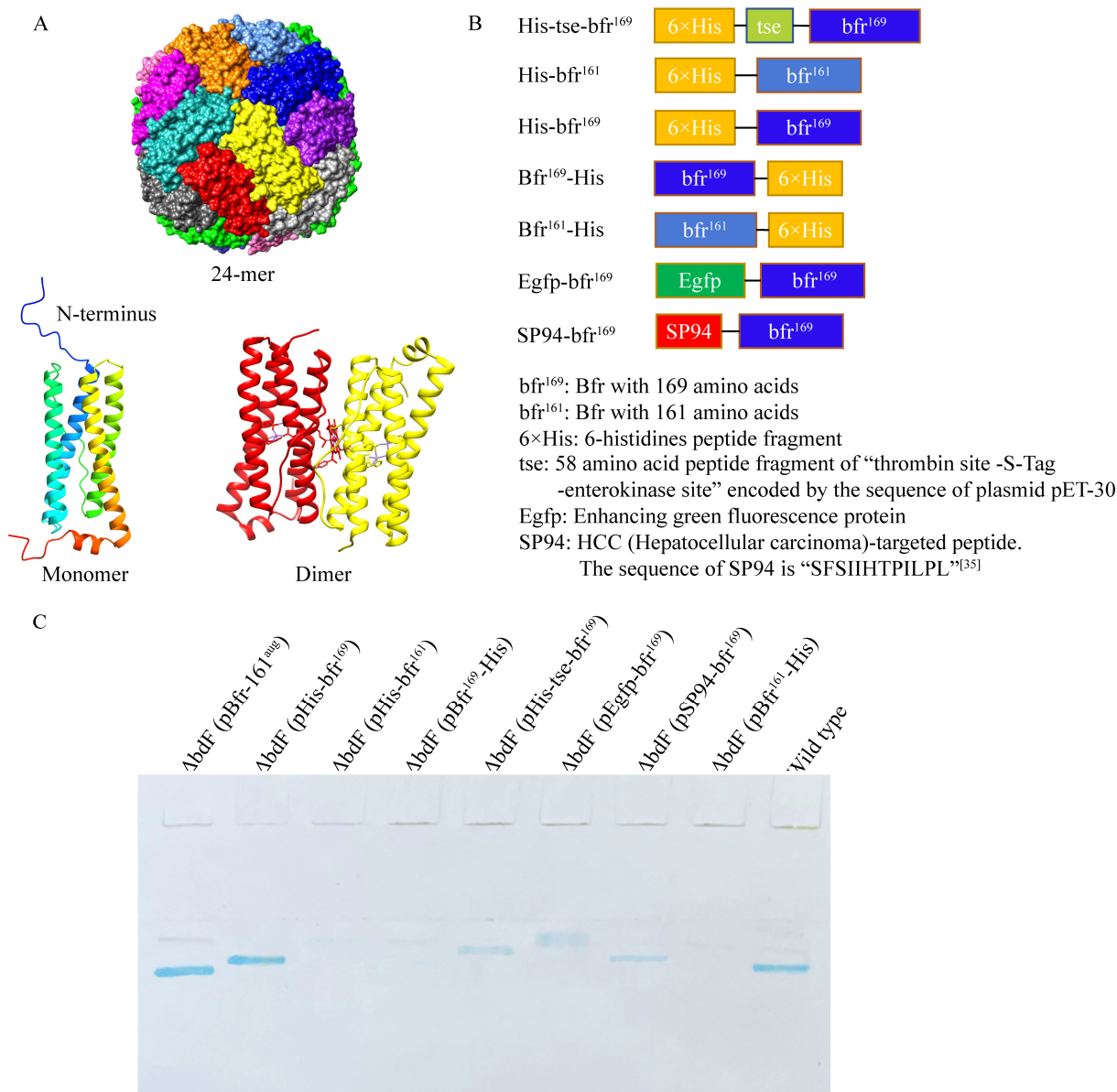


图 3 末端融合对根癌农杆菌 Bfr 功能的影响

Figure 3 The effects of terminal fusions on the function of *Agrobacterium fabrum* Bfr. A: Structure models of monomer, dimer and 24-mer of *A. fabrum* Bfr modelled by AlphaFold and SWISSMODEL. B: The peptides or protein fused to the termini of *A. fabrum* Bfr with 161 or 169 amino acids. The right represents the N-terminus of the fusion Bfr. The left represents the C-terminus of the fusion Bfr. C: Bfr proteins fused with different peptides or protein were stained by potassium ferrocyanide after separated by native PAGE.

成的 24 聚体最多。值得注意的是，根癌农杆菌的 Dps，无论是在 N-端还是在 C-端融合 6 个组氨酸均能形成很稳定的 12 聚体，在凝胶电泳的泳道中看不到其他条带(图 4B)。

2.5 血红素和 Met₆₀ 替换对根癌农杆菌细菌铁蛋白体外组装的影响

细菌铁蛋白 Bfr 的典型特征是，在二聚体的对称轴位置有一个血红素，并且通过与 2 个

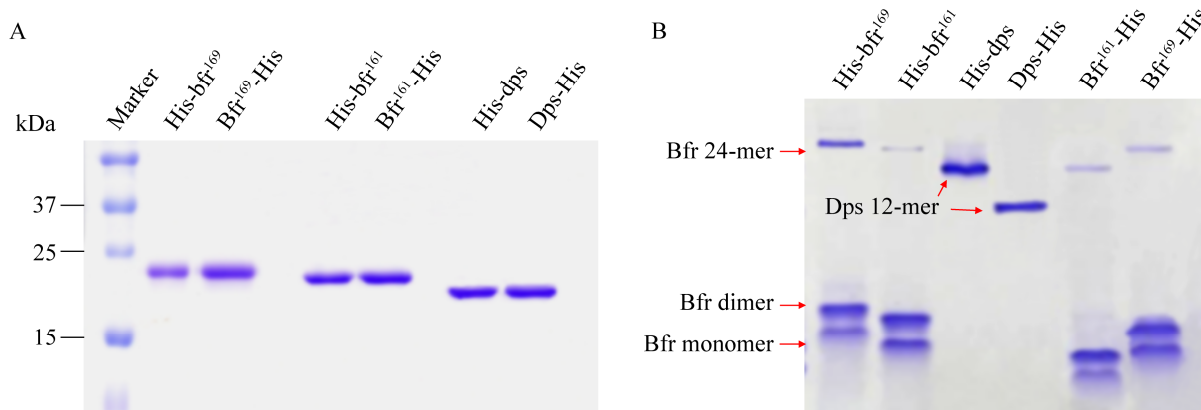


图 4 根癌农杆菌 Bfr 和 Dps 的寡聚体分析

Figure 4 Analysis on the oligomers of *Agrobacterium fabrum* Bfr and Dps. A: Purified His-tagged Bfr and Dps were analyzed by SDS-PAGE. B: Oligomers of *A. fabrum* Bfr and Dps. Purified His-tagged Bfr and Dps were allowed to self-assembled *in vitro* and then analyzed by native PAGE.

亚基中的甲硫氨酸形成配位键, 使二聚体更易形成。根据根癌农杆菌 Bfr 的氨基酸序列比对(图 2A)和结构模拟(图 3A)结果, 第 60 位的 Met 可能是与血红素络合影响二聚体形成的关键氨基酸, 因此, 我们构建了 Met₆₀ 替换成 Leu 的根癌农杆菌 Bfr 变异体 Bfr^{M60L}。通过异源表达, 纯化得到了 4 种 169 个氨基酸的 Bfr¹⁶⁹ 重组蛋白: His-bfr¹⁶⁹ (Bfr¹⁶⁹ 的 N 末端融合 6 个 His)、Bfr¹⁶⁹-His (Bfr¹⁶⁹ 的 C 末端融合 6 个 His)、His-bfr¹⁶⁹^{M60L} (Bfr¹⁶⁹ 的 Met₆₀ 替换成 Leu, N 末端融合 6 个 His)和 Bfr¹⁶⁹^{M60L}-His (Bfr¹⁶⁹ 的 Met₆₀ 替换成 Leu, N 末端融合 6 个 His)。用血红素对这 4 种重组蛋白的聚合体进行重构, 将经血红素处理前后的 4 种蛋白质进行非变性凝胶电泳分析, 结果见图 5A。无论是否经血红素处理或络合血红素的 Met₆₀ 存在与否, 根癌农杆菌的 Bfr 均能形成一定量的 24 聚体。然而, 血红素处理显著提升了含有 Met₆₀ Bfr 的 24 聚体的量, 而对变异体 Bfr^{M60L} 的 24 聚体的量影响很小。尽管变异体 Bfr^{M60L} 仍能形成一部分 24 聚体, 但形成的聚合体(包括 2 聚体和 24 聚体)明显少得

多, 说明 Met₆₀ 和血红素对根癌农杆菌 Bfr 形成 24 聚体是非常重要的, 但并不是必不可少的。我们进一步用变异体 Bfr^{M60L} 回补根癌农杆菌的储铁蛋白缺失突变体 Δ bdf, 结果显示, 变异体 Bfr^{M60L} 仍保留了一定的储铁功能(图 5B)。

3 讨论与结论

相当一部分细菌中同时含有 Ftn、Bfr 和 Dps 三类储铁蛋白, 而在根癌农杆菌的基因组中只有 2 个储铁蛋白 Bfr 和 Dps 的编码基因^[24]。本研究的结果(图 1)发现, 根癌农杆菌的 Bfr 编码基因具有生物学功能, 能够表达出具有储铁功能的蛋白质, Dps 的编码基因在本研究的测定条件下未观察到其能表达出具有储铁功能的蛋白质。然而, 早期对根癌农杆菌 Dps 的研究结果显示, 异源表达纯化的根癌农杆菌 Dps 具有吸收和释放铁的能力, 但不能结合 DNA^[36]。本研究结果证明, 异源表达的根癌农杆菌 Dps 能够形成稳定的 12 聚体, 在非变性胶电泳中看不到其他条带(图 4B)。这说明根癌农杆菌的 Dps 编码基因能够编码出有功能的 Dps 蛋白, 但是,

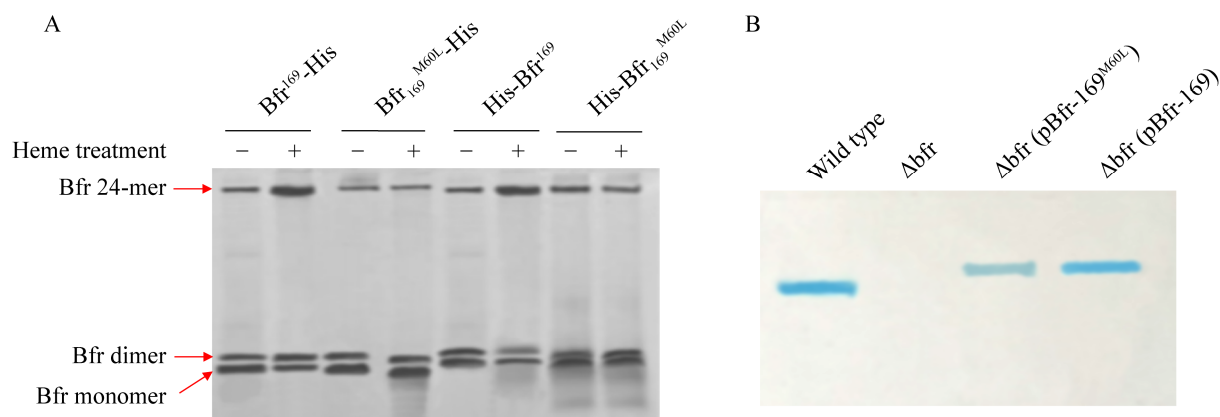


图 5 血红素和 Met60 替代对根癌农杆菌 Bfr 体外组装和功能的影响

Figure 5 Effects of heme and Met₆₀ substitution on the *in vitro* self-assembly and function of *Agrobacterium fabrum* Bfr. A: Effects of heme and Met₆₀ substitution on the *in vitro* self-assembly of Bfr. His-tagged Bfr¹⁶⁹ or Bfr₁₆₉^{M60L} proteins were treated (+) or untreated (-) by heme, and then separated by native PAGE. B: Met₆₀ substitution on the function of Bfr.

在用铁特异性染色检测根癌农杆菌细胞粗提液电泳结果时却看不到能储铁的 Dps (图 1)。我们推测, 在本研究的条件下, 根癌农杆菌的 Dps 编码基因可能未表达。因此, 根癌农杆菌 Dps 编码基因的表达调控机理和在细胞内的准确功能值得进一步研究。从这些结果中我们也可以判断, 在根癌农杆菌中起储铁和调节细胞铁平衡功能的是 Bfr, 而不是 Dps。即使是在 Bfr 缺失的情况下, Dps 也不能替代 Bfr 为细胞存储铁。

尽管三类储铁蛋白在形成聚合体时差别较大, 但是亚基的结构却非常相似, 都是以四段 α -螺旋结构为主体; 在原核生物中区分一种储铁蛋白是 Ftn 还是 Bfr 的关键是血红素, 而不是亚基的氨基酸序列和三级结构, 因此, 依据氨基酸序列比对来注释的细菌 Ftn 和 Bfr 编码基因经常会出现错误^[8,29,37]。本研究结果显示, 血红素的处理明显促进根癌农杆菌 Bfr 形成 24 聚体, Met₆₀ 的替换也明显减少根癌农杆菌 Bfr 形成 24 聚体, 用变异体 Bfr^{M60L} 回补缺失突变体时, 尽管仍有一定的储铁能力, 但储铁能力显著下降, 说明根癌农杆菌 Bfr 行使完整功能时

需要血红素, 因此, 根癌农杆菌基因组中注释的 Bfr 编码基因是正确的。失去血红素络合能力的 Bfr 仍然具有一定的储铁能力, 说明血红素不是 Bfr 行使功能的决定因素, 因此, 从某种程度上说 Ftn 可能是在 Bfr 失去血红素络合能力之后进化出来的, 两者的进化关系可能非常近, 只要极个别氨基酸发生突变就可能从 Bfr 转变成 Ftn。这也进一步解释了为什么在细菌基因组的 *fnt* 和 *bfr* 基因注释中经常会出现错误。

容易获得并能方便调控其聚合和解聚的纳米笼蛋白质聚合体具有非常广阔的应用前景, 特别是在医疗领域具有极高的应用价值; 目前已经将个别 Ftn 应用到抗癌药物和医疗影像造影剂的定点递送, 以及纳米颗粒疫苗的制备^[13,35,38-39]。要使纳米笼结构的蛋白质聚合体实现实质性的应用至少需具备 3 个条件: (1) 能大量制备; (2) 能够融合其他多肽或可进行适当的化学修饰; (3) 可在相对较温和的条件下控制蛋白质聚合体的解聚和聚合。根癌农杆菌的 Dps 蛋白不管是在 N-端还是 C-端融合 6 个 His 都能形成稳定的 12 聚体, 满足可大量表达和纯化的条件, 只

要进一步找到控制其解聚的方法, Dps 就具备了可开发应用的条件。作为抗癌药物和医疗影像造影剂定点递送的载体, 需要连接上能被靶细胞识别的配基或信号肽; 作为纳米颗粒疫苗的载体, 也需要在表面接上抗原。本研究的结果显示, 根癌农杆菌 Bfr 的 N-端在分别融合 3 种不同大小的多肽或蛋白质后, 仍然能够形成 24 聚体并具有储铁功能, 说明其纳米笼结构能够承受多肽甚至蛋白质的融合, 如果能够进一步改进其纳米笼的稳定性, 也可以满足实质性开发应用所需的全部条件。

作者贡献声明

周琴: 执行实验, 数据收集和整理, 论文初稿撰写; 高苗苗: 执行实验, 数据收集和整理; 潘晓玥: 执行实验, 数据收集和整理; 王浩: 协助实验操作、参与论文讨论; 徐楠: 协助实验操作、参与论文讨论; 郭敏亮: 研究构思和设计, 论文撰写和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] de CLEENE M, de LEY J. The host range of crown gall[J]. The Botanical Review, 1976, 42(4): 389-466.
- [2] GUO ML, YE JY, GAO DW, XU N, YANG J. *Agrobacterium*-mediated horizontal gene transfer: mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(1): 259-270.
- [3] LACROIX B, CITOVSKEY V. Genetic factors governing bacterial virulence and host plant susceptibility during *Agrobacterium* infection[J]. Advances in Genetics, 2022, 110: 1-29.
- [4] 胡懋, 曾杨璇, 苗华彪, 赵元昊, 黄遵锡. 根癌农杆菌介导真菌遗传转化的研究及应用[J]. 微生物学报, 2021, 48(11): 4344-4363.
- [5] HU M, ZENG YX, MIAO HB, ZHAO YH, HUANG ZX. Research and application of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated fungal genetic transformation[J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4344-4363 (in Chinese).
- [6] DESMET S, DHOOGHE E, de KEYSER E, van HUYLENBROECK J, MÜLLER R, GEELLEN D, LÜTKEN H. Rhizogenic agrobacteria as an innovative tool for plant breeding: current achievements and limitations[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(6): 2435-2451.
- [7] TIWARI M, MISHRA AK, CHAKRABARTY D. *Agrobacterium*-mediated gene transfer: recent advancements and layered immunity in plants[J]. Planta, 2022, 256(2): 37.
- [8] EXPERT D. Iron, an element essential to life[M]//Molecular Aspects of Iron Metabolism in Pathogenic and Symbiotic Plant-Microbe Associations. Dordrecht: Springer, 2012: 1-6.
- [9] RIVERA M. Bacterioferritin: structure, dynamics, and protein-protein interactions at play in iron storage and mobilization[J]. Accounts of Chemical Research, 2017, 50(2): 331-340.
- [10] BRADLEY JM, le BRUN NE, MOORE GR. Ferritins: furnishing proteins with iron[J]. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2016, 21(1): 13-28.
- [11] PLAYS M, MÜLLER S, RODRIGUEZ R. Chemistry and biology of ferritin[J]. Metallomics: Integrated Biometal Science, 2021, 13(5): mfab021.
- [12] ARNOLD AR, ZHOU A, BARTON JK. Characterization of the DNA-mediated oxidation of dps, a bacterial ferritin[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(35): 11290-11298.
- [13] ORBAN K, FINKEL SE. Dps is a universally conserved dual-action DNA-binding and ferritin protein[J]. Journal of Bacteriology, 2022, 204(5): e0003622.
- [14] GUO ML, GAO MM, LIU JJ, XU N, WANG H. Bacterioferritin nanocage: structure, biological function, catalytic mechanism, self-assembly and potential applications[J]. Biotechnology Advances, 2022, 61: 108057.
- [15] HAGEN WR. Maximum iron loading of ferritin: half a century of sustained citation distortion[J]. Metallomics: Integrated Biometal Science, 2022, 14(9): mfac063.
- [16] PARIDA A, MOHANTY A, KANSARA BT, BEHERA RK. Impact of phosphate on iron

- mineralization and mobilization in nonheme bacterioferritin B from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Inorganic Chemistry*, 2020, 59(1): 629-641.
- [16] 马龙, 范克龙. 纳米酶和铁蛋白新特性的发现和应用[J]. 自然杂志, 2020, 42(1): 1-11.
- MA L, FAN KL. The finding and application of the novel properties of nanozyme and ferritin[J]. *Chinese Journal of Nature*, 2020, 42(1): 1-11 (in Chinese).
- [17] JUTZ G, van RIJN P, SANTOS MIRANDA B, BÖKER A. Ferritin: a versatile building block for bionanotechnology[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(4): 1653-1701.
- [18] SONG NN, ZHANG JL, ZHAI J, HONG JJ, YUAN C, LIANG MM. Ferritin: a multifunctional nanoplatfrom for biological detection, imaging diagnosis, and drug delivery[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2021, 54(17): 3313-3325.
- [19] KURUPPU AI, TURYANSKA L, BRADSHAW TD, MANICKAM S, GALHENA BP, PARANAGAMA P, de SILVA R. Apoferritin and Dps as drug delivery vehicles: some selected examples in oncology[J]. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 2022, 1866(2): 130067.
- [20] van der VEN AM, GYAMFI H, SUTTISANSANEE U, AHMAD MS, SU ZD, TAYLOR RM, POOLE A, CHIOREAN S, DAUB E, URQUHART T, HONEK JF. Molecular engineering of *E. coli* bacterioferritin: a versatile nanodimensional protein cage[J]. *Molecules*, 2023, 28(12): 4663.
- [21] DUBROVIN EV, DADINOVA LA, PETOUKHOV MV, SOSHINSKAYA EY, MOZHAEV AA, KLINOV DV, SCHÄFFER TE, SHTYKOVA EV, BATISHCHEV OV. Spatial organization of Dps and DNA-Dps complexes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2021, 433(10): 166930.
- [22] WOOD DW, SETUBAL JC, KAUL R, MONKS DE, KITAJIMA JP, OKURA VK, ZHOU Y, CHEN L, WOOD GE, ALMEIDA NF Jr, WOO L, CHEN Y, PAULSEN IT, EISEN JA, KARP PD, SR DB, CHAPMAN P, CLENDENNING J, DEATHERAGE G, GILLET W, et al. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58[J]. *Science*, 2001, 294(5550): 2317-2323.
- [23] GOODNER B, HINKLE G, GATTUNG S, MILLER N, BLANCHARD M, QUROLLO B, GOLDMAN BS, CAO Y, ASKENAZI M, HALLING C, MULLIN L, HOUMIEL K, GORDON J, VAUDIN M, IARTCHOUK O, EPP A, LIU F, WOLLAM C, ALLINGER M, DOUGHTY D, et al. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58[J]. *Science*, 2001, 294(5550): 2323-2328.
- [24] YANG J, PAN XY, XU YJ, LI Y, XU N, HUANG ZW, YE JY, GAO DW, GUO ML. *Agrobacterium tumefaciens* ferritins play an important role in full virulence through regulating iron homeostasis and oxidative stress survival[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(9): 1167-1178.
- [25] 徐楠, 徐宇娟, 孙盼, 宗仁杰, 郭敏亮. 根癌农杆菌 *vbp2* 基因启动子转录调控的探析[J]. 生物技术通报, 2021, 37(12): 41-49.
- XU N, XU YJ, SUN P, ZONG RJ, GUO ML. Exploration of the transcriptional regulation of *Agrobacterium tumefaciens vbp2* promoter[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(12): 41-49 (in Chinese).
- [26] 宗仁杰, 高苗苗, 张梦琪, 王浩, 徐楠, 郭敏亮. 根癌农杆菌化学受体 MCP1912 调节趋化响应功能的鉴定[J]. 微生物学报, 2022, 62(5): 1949-1961.
- ZONG RJ, GAO MM, ZHANG MQ, WANG H, XU N, GUO ML. Functional identification of *Agrobacterium tumefaciens* chemoreceptor MCP1912 in regulating chemotactic response[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1949-1961 (in Chinese).
- [27] GUO ML, JIN SG, SUN DY, HEW CL, PAN SQ. Recruitment of conjugative DNA transfer substrate to *Agrobacterium* type IV secretion apparatus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(50): 20019-20024.
- [28] PUNCHI HEWAGE AND, YAO HL, NAMMALWAR B, GNANASEKARAN KK, LOVELL S, BUNCE RA, ESHELMAN K, PHANIRAJ SM, LEE MM, PETERSON BR, BATTAILLE KP, REITZ AB, RIVERA M. Small molecule inhibitors of the BfrB-bfd interaction decrease *Pseudomonas aeruginosa* fitness and potentiate fluoroquinolone activity[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(20): 8171-8184.
- [29] YAO HL, SOLDANO A, FONTENOT L, DONNARUMMA F, LOVELL S, CHANDLER JR, RIVERA M. *Pseudomonas aeruginosa* bacterioferritin is assembled from FtnA and BfrB subunits with the relative proportions dependent on the environmental oxygen availability[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(3): 366.
- [30] SUBHADARSHANEE B, MOHANTY A, JAGDEV MK, VASUDEVAN D, BEHERA RK. Surface charge

- dependent separation of modified and hybrid ferritin in native PAGE: impact of lysine 104[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics*, 2017, 1865(10): 1267-1273.
- [31] WEDDERHOFF I, KURSULA I, GROVES MR, ORTIZ de ORUÉ LUCANA D. Iron binding at specific sites within the octameric HbpS protects streptomycetes from iron-mediated oxidative stress[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71579.
- [32] WANG H, ZHANG MQ, XU YJ, ZONG RJ, XU N, GUO ML. *Agrobacterium fabrum* *atu0526*-encoding protein is the only chemoreceptor that regulates chemoattraction toward the broad antibacterial agent formic acid[J]. *Biology*, 2021, 10(12): 1345.
- [33] MOHANTY A, PARIDA A, SUBHADARSHANEE B, BEHERA N, SUBUDHI T, KOOCHANA PK, BEHERA RK. Alteration of coaxial heme ligands reveals the role of heme in bacterioferritin from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Inorganic Chemistry*, 2021, 60(22): 16937-16952.
- [34] WONG SG, ABDULQADIR R, Le BRUN NE, MOORE GR, MAUK AG. Fe-haem bound to *Escherichia coli* bacterioferritin accelerates iron core formation by an electron transfer mechanism[J]. *The Biochemical Journal*, 2012, 444(3): 553-560.
- [35] JIANG B, ZHANG RF, ZHANG JL, HOU YX, CHEN XH, ZHOU M, TIAN XY, HAO CY, FAN KL, YAN XY. GRP78-targeted ferritin nanocaged ultra-high dose of doxorubicin for hepatocellular carcinoma therapy[J]. *Theranostics*, 2019, 9(8): 2167-2182.
- [36] CECI P, ILARI A, FALVO E, CHIANCONE E. The Dps protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not bind to DNA but protects it toward oxidative cleavage: X-ray crystal structure, iron binding, and hydroxyl-radical scavenging properties[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(22): 20319-20326.
- [37] YAO HL, JEPKORIR G, LOVELL S, NAMA PV, WEERATUNGA S, BATTAIL KP, RIVERA M. Two distinct ferritin-like molecules in *Pseudomonas aeruginosa*: the product of the *bfrA* gene is a bacterial ferritin (FtnA) and not a bacterioferritin (Bfr)[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(23): 5236-5248.
- [38] 苏恺, 范葶莉, 宋勤叶. 铁蛋白纳米载体及其在生物医学领域的应用潜力[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(4): 909-919.
- SU K, FAN TL, SONG QY. Ferritin nanocarrier and its application potential in the field of biomedicine[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(4): 909-919 (in Chinese).
- [39] 向建全, 周彩玉, 张若飞, 曾凡才, 范克龙. 铁蛋白装载“铁-阿霉素”新策略[J]. *中国科学(生命科学)*, 2021, 51(7): 871-878.
- XIANG JQ, ZHOU CY, ZHANG RF, ZENG FC, FAN KL. A new strategy of loading ferritin with “iron-Dox” complex[J]. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2021, 51(7): 871-878 (in Chinese).