学校编码：10384　　　　　　　　　　　　　　　　　　分类号___密级___

学号：20520131151678　　　　　　　　　　　　　　　　　　UDC___

厦门大学

硕 士 学位论文

基于酸响应性探针的细菌免疫吞噬过程成像研究

Optical tracking of bacterial immune phagocytosis based on acid-responsive probes

田云鹏

指导教师姓名：韩守法 教授

专 业 名 称：化学生物学

论文提交日期：2016 年 5 月

论文答辩时间：2016 年 5 月

学位授予日期：2016 年　月

答辩委员会主席：__________

评　　阅　　人：__________

2016 年 5 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

Optical tracking of bacterial immune phagocytosis based on acid-responsive probes

A Thesis Presented

by

Yunpeng Tian

Supervisor: Prof. Shoufa Han

Submitted to the graduated school of Xiamen University

for the degree of master of science

May 2016

Department of Chemistry, Xiamen University

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（　　　　　　　　　　　　　　　　）课题（组）的研究成果，获得（　　　　　　　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　　　　　　　）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　　月　　日解密，解密后适用上述授权。

（　　　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　　月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

摘要......I
Abstract......III
第一章 绪论......1
1.1 细胞的内吞作用......1
1.1.1 吞噬作用及其功能......2
1.1.2 LC3 相关的吞噬作用......2
1.1.3 与吞噬作用相关的疾病......3
1.1.4 吞噬作用的研究现状......4
1.2 细菌的结构......7
1.2.1 细菌的形态......7
1.2.2 细胞壁的结构与功能......8
1.2.3 对于细菌成像的研究进展......9
1.3 酸响应性荧光探针与吞噬作用......15
1.3.1 酸响应性荧光探针的应用......15
1.3.2 吞噬过程中细菌所处的环境......16
1.4 本工作的研究目标及主要内容......17
参考文献......21
第二章 酸响应探针用于细菌的荧光标记......29
2.1 引言......29
2.2 材料与方法......30
2.2.1 实验试剂和材料......30
2.2.2 dRB-Dan-TPP 的合成......31
2.2.3 ROX-lactam-D-Lys 的合成......32
2.2.4 ROX-lactam-L-Lys 的合成......34
2.2.5 ROX-lactam-D-ASP 的合成......35
2.2.6 N-Cou-D-Lys 的合成......36
2.2.7 ROX-lactam-D-Lys 的 pH 滴定......37
2.2.8 dRB-Dan-TPP 标记细菌对酸的响应......39

厦门大学博硕士论文摘要库

2.2.9 ROX-lactam-Lys 标记细菌对酸的响应......39
2.2.10 流式细胞仪检测被 ROX-lactam-D-Lys 标记的细菌对酸的响应......40
2.2.11 利用 ROX-lactam-D-Lys 和 FITC-D-Lys 对细菌进行双重标记......40
2.3 实验结果与讨论......41
2.3.1 利用跨膜电势非共价键标记细菌......41
2.3.2 共价键连接酸响应探针罗丹明内酰胺到细菌肽聚糖......43
2.3.3 L 型氨基酸连接的荧光分子对细菌的标记效果......46
2.3.4 不同的 D 构型的氨基酸对与肽聚糖的标记......46
2.3.5 利用 ROX-D-ASP 和 N-Cou-D-Lys 对细菌进行双重标记......47
2.4 小结......48
参考文献......49
第三章 荧光标记细菌与免疫细胞的相互作用成像......57
3.1 引言 57
3.2 材料与方法 59
3.2.1 实验试剂和材料......59
3.2.2 Raw 264.7 吞噬 dRB-Dan-TPP 标记的细菌......60
3.2.3 Raw 264.7 吞噬 ROX-lactam-D-Lys 和 FITC-D-Lys 共同标记的细菌......60
3.2.4 ROX-D-ASP 和 N-Cou-D-Lys 双重标记的金黄色葡萄球菌感染 HeLa 细胞......60
3.3 结果与讨论 61
3.3.1 RB-Dan-TPP 标记的细菌用于观察吞噬作用......61
3.3.2 ROX-Lactam-D-Lys 和 FITC-D-Lys 标记的细菌示踪吞噬作用......62
3.3.3 吞噬溶酶体酸度介导细菌上荧光探针的激活......64
3.3.4 细菌感染细胞时自噬的观察......66
3.4 总结 68
参考文献......69
第四章 结语与展望 **73**
硕士期间发表的论文 **75**
致谢 **77**

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese I
Abstract in English III
Chapter 1 Introduction 1
1.1 Endocytosis of cell 1
1.1.1 Phagocytosis and it's functions 2
1.1.2 LC3-associated phagocytosis 3
1.1.3 Phagocytosis-associated diseases 3
1.1.4 Research status of phagocytosis 4
1.2 The structure of bacteria 8
1.2.1 Morphology of bacteria 8
1.2.2 Structure and function of the cell wall 8
1.2.3 Research advances in imaging for bacteria 10
1.3 Acid-responsive fluorescent probes and phagocytosis 16
1.3.1 Application of acid-responsive fluorescent probes 16
1.3.2 The environment of bacteria in phagocytosis 17
1.4 The objective of this work and the main content 18
References 21
Chapter 2 The fluorescence labeling of bacteria with acid-responsive probes 29
2.1 Introduction 29
2.2 Materials and Methods 30
2.2.1 Reagents and materials 30
2.2.2 Synthesis of dRB-Dan-TPP 31
2.2.3 Synthesis of ROX-lactam-D-Lys 32
2.2.4 Synthesis of ROX-lactam-L-Lys 34
2.2.5 Synthesis of ROX-lactam-D-ASP 35
2.2.6 Synthesis of N-Cou-D-Lys 36
2.2.7 pH titration of ROX-lactam-D-Lys 37
2.2.8 The response of dRB-Dan-TPP labeled bacteria to acid 39
2.2.9 The response of ROX-lactam-Lys labeled bacteria to acid 39
2.2.10 The response of ROX-lactam-D-Lys labeled bacteria to acid measured by flow cytometry 40

厦门大学博硕士论文摘要库

2.2.11 Double-labeling bacteria by Rox-D-Lys and FITC-D-Lys 40
2.3 Results and discussion 40
2.3.1 Non-covalently labeling bacteria by transmembrane potential 41
2.3.2 Acid-responsive probes covalently attached to bacterial peptidoglycan 43
2.3.3 The effect of L-amino acids linking fluorescent molecular labeled bacteria 45
2.3.4 Different D-amino acid labeled peptidoglycan 46
2.3.5 Double-labeling bacteria by ROX-D-ASP and N-Cou-D-Lys..47
2.4 Conclusions 48
References 49
Chapter 3 A fluorescently labelled bacteria for imaging interaction of pathogens and immune cells 57
3.1 Introduction 57
3.2 Materials and Methods 59
3.2.1 Reagents and materials 59
3.2.2 Phagocytosis of dRB-Dan-TPP loaded bacteria by Raw 264.7...60
3.2.3 Phagocytosis of ROX-lactam-D-Lys and FITC-D-Lys labeled bacteria by macrophages 60
3.2.4 ROX-D-ASP and N-Cou-D-Lys dual-labeled *S. aureus* infect HeLa cells 60
3.3 Results and discussion 61
3.3.1 Tracking phagocytosis of bacteria Labeled with dRB-Dan-TPP 61
3.3.2 Tracking Phagocytosis of Bacteria Covalently Labeled with ROX-Lactam-D-Lys and FITC-D-Lys 62
3.3.3 Phagolysosomal acidity triggered turn-on fluorescence of ROX-lactam anchored on bacterial peptidoglycan 64
3.3.4 The observation of autophagy infected by bacterial 68
3.4 Conclusions 68
References 69
Chapter 4 Conclusion and Prospect 73
Publications 75
Acknowledgement 77

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

细菌感染与免疫杀死代表着病原体与宿主相互关系中很重要的两个方面，研究细菌感染与免疫反应的关系，有助于对病原体致病机理的理解。吞噬作用作为生命体防御感染的一道防线，是最古老的，也是最基本的防卫机制之一。吞噬细胞通过吞噬感染的细菌形成吞噬体，随后吞噬体逐渐与溶酶体融合形成吞噬溶酶体。溶酶体是细胞的消化器官，其内部 pH 为 4~5, 含有各种水解酶。细菌在吞噬溶酶体内被酸性 pH 及水解酶的协同作用降解杀死。

细胞吞噬作用异常则会导致机体的免疫功能缺陷，从而引发一系列的疾病。能够实时追踪细菌吞噬作用的过程对于研究病原微生物的致病机理具有重要意义。目前研究中常利用荧光素标记的乳胶粒子、绿色荧光蛋白(GFP)转染的大肠杆菌来观测吞噬作用。但是这些方法存在诸多缺点，比如乳胶粒子不能模仿真实的细菌感染细胞；GFP 转染的方法不适用于所有的细菌，GFP 荧光一直存在，并且 GFP 的荧光在溶酶体酸性条件下会减弱，导致观测时背景信号很高，不便于区分细胞内外的细菌；同时 GFP 作为一种荧光蛋白在溶酶体中易被降解丧失活性。因此需要发展一种新颖的、简单的可用于示踪病原体入侵细胞的方法。

为了克服以上缺点，我们希望合成一种溶酶体酸响应性荧光探针，将其引入细菌上。当细菌被吞噬细胞吞噬时，在细胞外无荧光进入细胞内产生荧光。为此我们通过非共价键和共价键两种标记细菌的方式来评估其对吞噬成像的效果。第一种是用带有正电荷的三苯基膦基团连接酸响应探针，通过细菌细胞膜跨膜电势差聚集到细菌内部细胞质中实现对细菌的荧光标记。第二种是用 D 型氨基酸连接的酸响应探针共价键标记细菌细胞壁。细菌在生长过程中，吸收 D 型氨基酸构建细胞壁从而把荧光分子代谢到肽聚糖上。细菌在 pH 中性的细胞质中无荧光，而如果被内吞到吞噬溶酶体，探针被酸激活则产生荧光。这种方法有效降低了观察时的背景信号。同时我们合成了一系列探针，实现了用不同颜色的荧光对不同种类细菌的双重标记，这种标记方法几乎不改变细菌表面的天然结构，有效用于自然条件下微生物与宿主细胞间的相互作用的研究。

为了实时动态观测吞噬作用我们采用 D 型赖氨酸连接的酸激活荧光探针罗丹明 101（ROX）内酰胺分子标记细菌，同时用异硫氰酸荧光素（FITC）连接的 D 型

厦门大学博硕士论文摘要库

赖氨酸共同标记，借助于 FITC 的荧光一直存在，可作为内标分子指示吞噬前后细菌的位置。细菌被吞噬之前，ROX 无荧光，当细菌进入吞噬溶酶体内，ROX 被酸激活产生荧光。利用吞噬前无荧光吞噬后产生荧光这一变化来跟踪细菌被细胞吞噬后的情况。实验结果显示，D 型赖氨酸连接的 ROX 内酰胺分子可以有效的标记革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的细胞壁，完成对吞噬作用实时观测。

实验结果证明我们的方法具有如下优点：该荧光分子具有很好的稳定性在吞噬溶酶体中不容易被降解；该探针在中性 pH 时无荧光而进入吞噬溶酶体后产生荧光有效降低观测时的背景信号；该方法几乎不改变细菌表面的天然结构，有益于研究自然条件下细菌与宿主细胞间的相互作用。

关键词：细菌、肽聚糖、荧光成像、吞噬作用

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Bacterial infection and immunological eradiation are two key aspets of hosts-pathogen interplay. A precise understanding of host-pathogen interaction is critical for treatment variety of infectious diseases. Phagocytosis is an effective anti-bacteria defense. Phagocytes engulf bacteria to the phagosomes, which then fuse with lysosomes to form phagolysosomes. Lysosomes are the digestive organelle of cells, lysosomes are feathered by acidic luminal pH (pH 4-5), and contains many hydrolytic enzymes. Bacteria endocytosis into lysosomes degraded by the effects of acidic pH and these hydrolytic enzymes.

Abnormal phagocytosis results in disrupted immuity homeostasis and leads to repeated bacterial infection. Realtime visualization pathogen phagocytosis is of significance for studying pathogenesis. Currently phagocytosis is examined by fluorescently labeled latex particles, or green fluorescent protein (GFP) transfected *Escherichia coli* (*E. coli*). These approaches have many shortcomings, with limited choice of bacteria, are often incapable of differentiating ingested particles from extracellular particles owing to intrinsic "always-on" fluorescence, as well as the fluorescence of GFP would be degraded and quenched in the lysosomes.

In order to overcome these problems, we synthesized lysosomal pH responsive probes. We realized the fluorescence labeling of bacteria via non-covalently and covalently forms, and evaluated the effects of phagocytosis imaging. The first way is to use triphenylphosphonium (TPP is a cationic hydrophilic vector) conjugated rhodamine-lactam accumulate in the bacterial cytoplasm due to the transmembrane potentials of bacterial cell membrane. The second way is to use D-Lysine conjugated with ROX-lactam for covalent incorporation into the bacterial cell wall. Bacteria readily absorb D-amino acids to peptidoglycan. Utilizing this metabolic pathway, Rox-D-Lys was incorporated into peptidoglycan. Bacteria have non-fluorescent in neutral cytoplasm, if swallowed into phagolysosomes, would be activated by acid and given fluorescent. This method will effectively reduce the background signal when observeing phagocytosis. We have

厦门大学博硕士论文摘要库

synthesized a series of probes achieved dual-labeling with different fluorescent colors in different types of bacteria. This method hardly changed the natural structure of the bacterial surface, which is beneficial for reconstitution of the natural bacteria-host cell interaction.

To real-time dynamic observe phagocytosis, we used the covalent labeling of bacterial peptidoglycan with D-lysine conjugated rhodamine X-lactam activatable to acidic pH to give intense fluorescence and D-lysine conjugated FITC which serves as the internal signal reference. Before the bacteria are swallowed, ROX have no fluorescence. When bacteria enter phagolysosome, the fluorescence of ROX activated by acid. By the use of the changes in fluorescence to track bacterial phagocytosi.

As shown by the results, Culturing of *E. coli* and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) with D-lysine conjugated rhodamine-lactam and fluorescein isocyanate (FITC) leads to efficient metabolic incorporation of FITC and rhodamine-lactam into bacterial peptidoglycan. Which could be real time and in situ tracking of phagocytosis. The fluorescent molecule has a good stability in phagolysosomes, which has non-fluorescent in neutral pH and given fluorescent in phagolysosomes. This way maintains the integrity of bacterial surface molecular landscape, which is beneficial for reconstitution of the natural bacteria-host cell interaction.

Key Words: bacteria, pepdioglycan, fluorescence imaging, phagocytosis

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the "Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database". Full texts are available in the following ways:
1. If your library is a CALIS member libraries, please log on http://etd.calis.edu.cn/ and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库