

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_

学号: 32720131150539

UDC\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

细菌铁代谢平衡体系对抗生素共有  
杀菌通路的影响研究

The impact of iron metabolism system on a common  
mechanism of antimicrobial lethality

冯锦芝

指导教师姓名: 王岱 副教授

专业名称: 流行病学与卫生统计学

论文提交日期: 2016年04月

论文答辩时间: 2016年05月

学位授予时间: 2016年06月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评阅人: \_\_\_\_\_

2016年5月

细菌铁代谢平衡体系对抗生素共有杀菌通路的影响研究

冯锦芝

指导教师：王岱 副教授

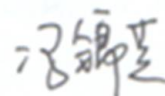
厦门大学

## 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(病原微生物与抗感染治疗)课题(组)的研究成果,获得(病原微生物与抗感染治疗)课题(组)经费或实验室的资助,在(病原微生物与抗感染治疗实验室完成。(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):



2016 年 05 月 25 日

## 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。

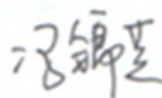
本学位论文属于：

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）：



2016年 05月 25日

## 摘 要

传统研究认为不同种类的抗生素有其各自不同的杀菌途径，然而近年人们发现了一条抗生素杀菌的共用通路，那就是当细菌细胞受到抗生素致死性刺激时，呼吸链将代谢异常产生大量活性氧簇（ROS），而铁离子对 ROS 介导的杀菌至关重要。本研究参阅近年来国内外研究结果，通过基因突变、铁离子竞争物等实验方法着重研究了细菌铁代谢系统与抗生素共有杀菌途径之间的关系，重点讨论抗生素刺激下铁离子的调控及其与抗生素介导 ROS 形成的相互作用关系。对于细菌耐药机制的研究与寻找新型药物作用靶点、开发新药有重要意义。

本研究对铁储存蛋白相关基因（*dps*、*ftnA*、*ftnB*、*bfr*）及铁调控蛋白相关基因（*fur*）进行了系统性的敲除，测试其突变基因对抗生素杀菌效力的影响；并首次系统地研究了铁代谢相关蛋白在抗生素杀菌共有途径中的作用，为相关工作的进一步开展奠定基础；同时应用铁离子竞争物硝酸镓筛选耐受菌株，并发现其耐受菌株对多种抗生素有耐药现象。

研究发现，铁相关蛋白的缺失对抗生素杀菌效果有一定影响，但基于细菌铁平衡系统的复杂性，细菌铁蛋白体系如何影响抗生素杀菌及细菌胞内的氧化还原反应相关机制尚不明确。然而，鉴于铁离子在细菌代谢、氧化还原呼吸链及电子传递中始终发挥着至关重要的作用，寻找合适的细菌铁相关蛋白作为有应用前景的抗生素增强剂作用靶点有很强的实际意义。

**关键词：**铁代谢；抗生素；活性氧簇

## Abstract

Previous work suggested that different antibiotics could kill bacteria via various targets or mechanisms respectively. However, a common mechanism of bactericidal antibiotics was reported recently. When bacteria suffered lethal stress by antibiotics, reactive oxygen species (ROS) was induced by abnormal respiratory chain reaction in which iron plays a key role. By reviewing current research progress regarding antibiotic resistance and iron related proteins in bacteria, this study focused on the interaction between bacterial iron metabolism system and the common mechanism of bactericidal antibiotics using various laboratory approaches, such as gene editing and adding Ferric competitor. It was also discussed in this thesis for the possible linkage/interaction between the regulation of ferrous ion and ROS induced by antibiotics. This common bacterial killing mechanism would have a significant impact on the future research for drug-resistance, drug target screening, infection controlling and novel drug design.

It has been systematically knocked out for genes essential for iron storage system (*dps*, *ftnA*, *ftnB*, *bfr*), Ferric iron uptake global transcriptional repressor (*fur*) and those mutants have also been tested for their impact on antimicrobial lethality. Furthermore, for the first time, it has been systematically explored for the role of iron metabolism system in a common ROS pathway of antimicrobial lethality which provided further information for our future study on related research works. Several tolerant mutants have been screened using GaN which is a competitor of Ferric ion and our study discovered that those mutants are resistant to various antimicrobials.

Our results suggested that the deficiency of iron related protein affected antimicrobial lethality. Due to the complexity of balancing iron metabolism, it is still not unveiled for the mechanism of the involvement of iron related protein in antimicrobial lethality and ROS pathway in bacteria. However, because of the important role of iron ion in cell metabolism, respiratory chain reaction and electron transfer, it is still practically important to looking for a suitable iron related protein as a new target for antimicrobial enhancers.

**Keywords:** Iron homeostasis; Antibiotics; ROS

厦门大学博硕士论文摘要库

## 缩 略 词 表

Oxo	Oxolinic acid	奥索利酸
Cipro	Ciprofloxacin	环丙沙星
Kan	Kanamycin	卡那霉素
Amp	Ampicilin	氨苄青霉素
MIC	Minimum inhibitory concentration	最小抑菌浓度
Hr	Hour	小时
Min	Minute	分钟
Sec/s	Second	秒
UV	Ultraviolet	紫外线
OD	Optical density	光密度
GaN	Gallium Nitrate	硝酸镓
Rpm	Revolutions per minute	转数每分钟
ROS	Reactive oxygen species	活性氧簇
Dps	DNA-bind protein of starved cells	饥饿细胞的 DNA 结合型蛋白
Ftn	Ferritins	铁蛋白
Bfr	Bacterioferritins	细菌铁蛋白
Fur	Ferric-uptake regulator protein	铁吸收调节蛋白



# 目 录

中文摘要.....	III
英文摘要.....	IV
<b>第一章 绪论</b> .....	1
<b>1.1 抗生素杀菌</b> .....	1
<b>1.2 铁蛋白与抗生素杀菌机制之间的关联</b> .....	2
1.2.1 铁与氧化还原机制.....	2
1.2.2 抗生素杀菌与氧化还原机制.....	3
1.2.3 细菌铁代谢系统.....	4
1.2.3.1 细菌铁吸收系统.....	5
1.2.3.2 细菌铁储存系统.....	6
1.2.3.2.1 Ftn.....	7
1.2.3.2.2 Bfr.....	8
1.2.3.2.3 Dps.....	8
1.2.3.3 细菌铁调控的基因表达系统.....	9
<b>第二章 材料与方法</b> .....	10
<b>2.1 实验设备及主要试剂配制</b> .....	10
2.1.1 实验仪器设备.....	10
2.1.2 实验试剂.....	10
2.1.3 主要试剂配制.....	11
<b>2.2 实验方法</b> .....	13
<b>第三章 铁代谢体系与抗生素共有杀菌通路</b> .....	22
<b>3.1 铁储存蛋白相关突变菌株的构建</b> .....	22
3.1.1 实验菌株背景介绍.....	22

3.1.2 双突变菌株的构建.....	23
3.1.3 利用 P1 噬菌体转导技术构建铁蛋白多突变菌株.....	26
3.1.4 CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术.....	30
<b>3.2 铁储存相关蛋白突变菌株生长及杀菌相关实验结果分析.....</b>	<b>37</b>
3.2.1 铁相关蛋白与过氧化氢 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 杀菌.....	39
3.2.1.1 Dps 蛋白与 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 杀菌.....	40
3.2.1.2 FtnA 蛋白与 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 杀菌.....	41
3.2.1.2 FtnA 蛋白与 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 杀菌.....	41
3.2.1.4 Bfr 蛋白与 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 杀菌.....	43
3.2.2 铁相关蛋白与喹诺酮类药物杀菌.....	43
3.2.2.1 铁相关蛋白与 Oxo 杀菌.....	44
3.2.2.1.1 Dps 蛋白与 Oxo 杀菌.....	45
3.2.2.1.2 Bfr 蛋白与 Oxo 杀菌.....	46
3.2.2.1.3 FtnA 蛋白与 Oxo 杀菌.....	47
3.2.2.1.4 FtnB 蛋白与 Oxo 杀菌.....	48
3.2.2.1.5 Fur 蛋白与 Oxo 杀菌.....	49
3.2.2.2 铁相关蛋白与 Cipro 杀菌.....	50
3.2.2.2.1 Fur 蛋白与 Cipro 杀菌.....	51
3.2.3 铁相关蛋白与 β-内酰胺类抗生素杀菌.....	52
3.2.3.1 Dps 蛋白与 Amp 杀菌.....	52
3.2.3.2 FtnA 蛋白与 Amp 杀菌.....	53
3.2.3.3 FtnB 蛋白与 Amp 杀菌.....	54
3.2.3.4 Bfr 蛋白与 Amp 杀菌.....	55
3.2.3.5 Fur 蛋白与 Amp 杀菌.....	56
<b>3.3 铁代谢体系与硝酸镓杀菌.....</b>	<b>57</b>
3.3.1 硝酸镓耐受菌株的筛选.....	58
3.3.2 硝酸镓耐受菌株的获得与验证.....	59
3.3.3 GaN-2 的多重耐药.....	62

第四章 讨论与展望 .....	65
4.1 Dps 蛋白在 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 杀菌中的显著保护作用 .....	65
4.2 铁储存蛋白的敲除可以部分影响胞内游离铁水平 .....	65
4.3 铁储存蛋白敲除对胞内 ROS 水平的影响 .....	66
4.4 Fur 对 Cipro 杀菌途径的显著影响 .....	67
4.5 硝酸镓耐受菌株的多重耐药性 .....	67
4.6 硝酸镓耐受菌株与 ROS .....	68
4.7 铁蛋白与抗生素共有杀菌通路 .....	69
4.8 展望 .....	71
附件 .....	72
参考文献 .....	74
致谢 .....	78

# Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	III
<b>Abstract in English</b> .....	IV
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 Antimicrobials</b> .....	1
<b>1.2 Iron related proteins and antimicrobial lethality</b> .....	2
1.2.1 Iron and ROS .....	2
1.2.2 Antimicrobial lethality and ROS .....	3
1.2.3 Iron metabolism system in bacteria.....	4
1.2.3.1 Iron uptake system in bacteria .....	5
1.2.3.2 Iron storage system in bacteria .....	6
1.2.3.2.1 Ftn (Ferritins) .....	7
1.2.3.2.2 Bfr (Bacterioferritins) .....	8
1.2.3.2.3 Dps (DNA-bind protein of starved cells); .....	8
1.2.3.3 Regulation of iron metabolism in bacteria .....	8
<b>Chapter 2 Materials and Methods</b> .....	10
<b>2.1 Devices and reagents</b> .....	10
2.1.1 Devices.....	10
2.1.2 Reagents.....	10
2.1.3 Recipes for media and buffers.....	11
<b>2.2 Methods</b> .....	12
<b>Chapter 3 Iron related proteins and a common mechanism of antimicrobial lethality</b> .....	22
<b>3.1 The construction of <i>Escherichia coli</i> mutants (iron related proteins)</b> .....	22
3.1.1 Background of <i>Escherichia coli</i> strains involved in this study.....	22
3.1.2 The construction of double knockout (iron related proteins) strains .....	23
3.1.3 The construction of multi-knockout (iron related proteins) strains using P1 phage transduction .....	25

3.1.4 CRISPR/Cas9 gene editing technique .....	30
<b>3.2 Bacterial killing assay in <i>Escherichia coli</i> mutants (Iron related proteins) .....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Iron related proteins and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> lethality .....	38
3.2.1.1 Dps and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> lethality .....	40
3.2.1.2 FtnA and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> lethality .....	41
3.2.1.3 FtnB and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> lethality .....	42
3.2.1.4 Bfr and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> lethality .....	42
3.2.2 Iron related proteins and quinolones lethality.....	43
3.2.2.1 Iron related proteins and Oxolinic Acid lethality .....	44
3.2.2.1.1 Dps and Oxolinic Acid lethality.....	45
3.2.2.1.2 Bfr and Oxolinic Acid lethality.....	46
3.2.2.1.3 FtnA and Oxolinic Acid lethality.....	47
3.2.2.1.4 FtnB and Oxolinic Acid lethality.....	48
3.2.2.1.5 Fur and Oxolinic Acid lethality.....	49
3.2.2.2 Iron related proteins and Ciprofloxacin lethality.....	50
3.2.2.2.1 Fur and Ciprofloxacin lethality.....	51
3.2.2.3 Iron related proteins and β- Lactam lethality.....	52
3.2.2.3.1 Dps and Ampicilin lethality .....	53
3.2.2.3.2 FtnA and Ampicilin lethality .....	54
3.2.2.3.3 FtnB and Ampicilin lethality .....	54
3.2.2.3.4 Bfr and Ampicilin lethality .....	55
3.2.2.3.5 Fur and Ampicilin lethality.....	56
<b>3.3 Iron metabolism system and GaN lethality .....</b>	<b>57</b>
3.3.1 The screening of GaN tolerant mutants.....	58
3.3.2 The examination of GaN tolerant mutants .....	60
3.3.3 Multi-durg resistance of GaN-2 strain.....	62
<b>Chapter 4 Discussion and Perspective .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1 Dps significantly protects bacteria from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lethality .....</b>	<b>65</b>
<b>4.2 Iron related proteins affect free iron level in bacterial cytosol .....</b>	<b>65</b>

<b>4.3 Fur regulates free iron level in bacterial cytosol</b> .....	66
<b>4.4 Knocking out iron storage protein affects ROS level in bacteria</b> .....	67
<b>4.5 Multi-durg resistance of GaN tolerant mutants</b> .....	67
<b>4.6 Linkage between GaN tolerant mutants and ROS</b> .....	68
<b>4.7 Iron related proteins and a common mechanism of antimicrobial lethality</b> .....	69
<b>4.8 Prospect</b> .....	71
<b>Appendices</b> .....	72
<b>References</b> .....	75
<b>Acknowledgement</b> .....	78

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 绪论

### 1.1 抗生素杀菌

抗生素的广泛应用是医学史上的重大里程碑之一，不仅从传染性疾​​病手中挽救了千百万生命，还为外科手术等现代医学治疗手段的安全实施保驾护航。然而，细菌对抗生素耐药性的产生与不断积累严重威胁抗生素的疗效，如果我们不能很快扭转细菌耐药性的快速增长趋势，我们很快就会步入无药可用的所谓“后抗生素时代”。由于细菌死后不可复生、不再突变，增强抗生素的杀菌效果可以快速降低细菌总量，减少耐药突变菌产生的机会，帮助预防和控制耐药性的产生<sup>[1]</sup>。

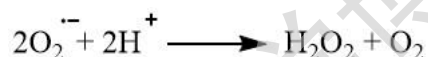
传统研究表明，抗生素主要通过抑制细菌细胞壁的合成、破坏细菌细胞膜、干扰细菌蛋白质的合成以及抑制细菌核酸的转录与复制来杀菌抑菌。尽管不同种类的抗生素有其各自特异的杀菌途径，但近年研究发现几大类抗生素的一个共同杀菌通路。当细菌受到抗生素的致死性威胁时会产生一系列刺激信号，可以引起细胞氧化性损伤的活性氧簇（ROS）就由这些信号刺激产生，ROS 是生物体内一类与氧代谢有关的含氧自由基、包括了易形成自由基的过氧化物，主要有超氧阴离子、过氧化氢、羟基自由基以及一氧化氮（NO）等。ROS 破坏铁硫簇释放大量的游离二价铁参与 Fenton 反应的氧化过程产生大量的羟自由基，在羟自由基的作用下，细胞 DNA 损伤、脂质过氧化、蛋白质等生物大分子降解，最终导致细胞的死亡<sup>[2]</sup>。可见，铁硫簇的破坏、铁离子的浓度失衡是导致羟自由基生成以及细胞死亡的关键因素，而胞内铁离子浓度本身则受到细菌铁代谢系统的精密调控，这种全局调控能够确保细菌胞内铁吸收、储存和利用与胞外铁供应相适应，从而确保胞内游离铁离子浓度在有害浓度之下。因此细菌铁代谢体系的正常运作与抗生素介导的 ROS 杀菌极有可能密切联系。

## 1.2 铁蛋白与抗生素杀菌机制之间的关联

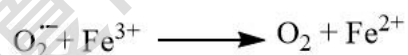
### 1.2.1 铁与氧化还原机制

尽管对于细菌来说保持生长期铁离子供应是十分重要的，但是保证它们的胞内铁离子水平在一个安全无毒范围下也同样重要，这就要求胞内铁不过度地与活性氧簇发生反应。分子氧的还原态派生物是有氧新陈代谢的自然产物，而部分活性氧簇正是来源于此，超氧化物和过氧化物作为氧的单电子或双电子还原产物，一般只具备中等的生理学活性。但在过多的氧化压力刺激下或是当游离亚铁离子过多时往往会破坏这个平衡态，生成对细胞具有高度氧化压力的产物，最终造成对细胞的伤害。

铁原子大范围的氧化还原电势与易得失电子的特性使得它们具有一定的毒性。一方面分子氧经  $\text{Fe}^{2+}$  得到一个电子还原成超氧自由基  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，活跃的超氧自由基能接受其他电子和两个质子形成过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )，超氧化物和过氧化氢均是分子氧不完全还原反应的副产物，它们间的平衡是通过超氧化物歧化酶调节的<sup>[3]</sup>。



另一方面来说，亚铁离子能通过 Fenton 反应与过氧化氢反应生成异常活跃同时有害的羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ )，与此同时，超氧自由基  $\text{O}_2^{\cdot-}$  将三价铁还原为二价铁。



综合来说，以上产生了氢氧根、羟自由基和分子氧的反应就是 Haber-Weiss 反应，这个反应只有在诸如铁等氧化还原催化剂的存在下才发生。反应式如下：



保护细胞免受这些潜在有毒的游离铁和游离自由基攻击的方式之一就是铁相关蛋白的存在。Simone Pellicciari 研究发现，在幽门螺杆菌中，高铁或氧化应激压力刺



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.