

鲍曼不动杆菌铁蛋白的抗氧化功能研究

谭潇^{1,2} 李冉辉² 游晓星^{2*} 蒋传好² 黄泽智¹

(1. 邵阳医学高等专科学校 湖南 邵阳 422000)

(2. 南华大学 病原微生物研究所 特殊病原体防控湖南省重点实验室 湖南 衡阳 421001)

摘要:【目的】克隆鲍曼不动杆菌铁蛋白(*Abferritin*)基因, 并研究其抗氧化功能。【方法】荧光定量 PCR 检测氧化应激下 *Abferritin* 基因的表达量, 并将其基因克隆到表达载体 pET28a 以构建重组质粒 pET28a-*Abferritin*, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)得到重组菌 BL/pET28a-*Abferritin*, IPTG 诱导目的蛋白表达并利用镍柱亲和层析纯化该蛋白。比色法测定 *Abferritin* 蛋白的 Fe^{2+} 氧化酶活性, 自由基清除实验测定其抗氧化功能。菌落计数法观察重组大肠杆菌在 H_2O_2 应激条件下的存活率。【结果】*Abferritin* 基因在氧化应激下表达增高。重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中高效表达, 通过 Ni^{2+} 亲和层析纯化获得了 *Abferritin* 蛋白。该蛋白具有 Fe^{2+} 氧化酶活性, 能有效减少氧自由基的形成及提高大肠杆菌抵抗氧化应激的能力。【结论】氧化应激能诱导 *Abferritin* 基因表达上调, 且该蛋白具有亚铁氧化酶活性和抗氧化功能。

关键词: 鲍曼不动杆菌, 铁蛋白, 抗氧化活性

The anti-oxidative activity of *Acinetobacter baumannii* ferritin proteinTAN Xiao^{1,2} LI Ran-Hui² YOU Xiao-Xing^{2*} JIANG Chuan-Hao² HUANG Ze-Zhi¹

(1. Shaoyang Medical College, Shaoyang, Hunan 422000, China)

(2. Hunan Provincial Key Laboratory for Special Pathogens Prevention and Control, Institution of Pathogenic Biology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to clone the ferritin gene *Abferritin* from *Acinetobacter baumannii* and identify its anti-oxidative activity. [Methods] Relative expression of *Abferritin* under oxidative stress was analyzed by real-time PCR. The gene encoding sequence of *Abferritin* was inserted into the pET28a vector to generate the pET28a-*Abferritin* recombinant plasmid. This plasmid was transformed into the *E. coli* BL21(DE3) to create transformed strain of BL/pET28a-*Abferritin*. The *Abferritin* protein was expressed by IPTG induction and was purified by Ni^{2+} -affinity chromatography. Kinetics of Fe^{2+} oxidation which catalyzed by *Abferritin* protein was determined by spectrophotometric analysis. Anti-oxidative activity of *Abferritin* was examined by the radical scavenging assay. Survival ratios of the recombinant and control *E. coli* under the oxidative

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31000091); 特殊病原体防控湖南省重点实验室资助项目(湘科计字[2014]5 号, 湘教通[2012]312 号)

*通讯作者: Tel: 86-734-8282913; 信箱: youxiaoxing2013@gmail.com

收稿日期: 2014-06-10; 接受日期: 2014-09-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-28

stress of H_2O_2 were also measured. **[Results]** Expression level of *Abferritin* was up-regulated in *A. baumannii* under oxidative stress. Abferritin protein was expressed in *E. coli* BL21(DE3) and was purified successfully. Ferroxidase activity assay demonstrated that the Abferritin protein could convert Fe^{2+} to Fe^{3+} . The hydroxyl radicals were scavenged by the Abferritin protein *in vitro* and the ectopic expression of Abferritin could increase the survival ratios of *E. coli* cells under the oxidative stress. **[Conclusion]** *Abferritin* was strongly up regulated under oxidative stress and the Abferritin protein exhibited ferroxidase and anti-oxidative activity.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Ferritin protein, Anti-oxidative activity

氧自由基(Reactive oxygen species, Ros)是生物机体内含有氧原子并且性质活泼物质的总称^[1]。Ros 是细胞正常代谢的产物,免疫应答、抗生素等外源性刺激可引起 Ros 的增高。Ros 极易与 DNA、蛋白质和脂类物质反应,从而造成机体损伤^[1]。为了对抗免疫应答过程中 Ros 的毒性作用,病原性细菌可能具备多种 Ros 降解机制从而逃避机体的免疫清除^[1-2]。目前已证实某些细菌的铁蛋白(Ferritin)在抗氧化中发挥重要作用。Ferritin 蛋白具有亚铁氧化酶活性,催化 Fe^{2+} 生成 Fe^{3+} 并能够储存 Fe^{3+} 。同时也能抑制 Fenton 反应,减少氧自由基的产生从而发挥抗氧化功能^[3-4]。

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)是一类在自然界广泛分布的条件致病革兰氏阴性杆菌^[5]。该菌对湿热、紫外线、化学消毒剂及氧化胁迫具有极强的抵抗力。此外该菌容易产生多重耐药、泛耐药及全耐药^[6-8]。多种抗生素杀灭细菌的一个共同作用机制是诱导 Ros 生成^[1]。如多粘菌素能诱导 Ros 产生而清除鲍曼不动杆菌,抑制 Ros 生成后可削弱多粘菌素的抗菌效应,研究显示鲍曼不动杆菌可能具备一些抗氧化机制对抗抗生素的损伤^[9],但迄今未见鲍曼不动杆菌抗氧化相关蛋白的报道。本研究旨在初步探讨鲍曼不动杆菌铁蛋白的抗氧化功能,从而为其抗氧化的机制提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂

鲍曼不动杆菌购自美国 ATCC (ATCC17978);大肠杆菌 Top10、大肠杆菌 BL21(DE3)和表达载体

pET28a 由本实验室保存;反转录试剂盒、细菌 DNA 提取试剂盒、ExTaq 酶、小量质粒 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *Nde* I、*Bam*H I、T4 DNA 连接酶和 IPTG 购自美国 Fermentas 公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;PCR 引物由上海 Invitrogen 公司合成; Ni^{2+} 亲和层析柱购自美国 GE 公司,其他化学试剂购自上海生物工程股份有限公司。

1.2 基因表达量的检测

挑取鲍曼不动杆菌克隆接种于 LB 培养基,37 °C、200 r/min 培养过夜。取 50 μ L 菌液接种到 5 mL LB 培养基,培养 6 h 后加入终浓度 2 mmol/L 马来酸二乙酯模拟氧化应激环境 1 h 或 2 h。12 000 r/min 离心 2 min,收菌,利用 TaKaRa RNA 提取试剂盒提取总 RNA,并将其反转录成 cDNA。利用荧光定量检测不动杆菌 *Abferritin* 基因的表达。依据 GenBank 中查到的 *Abferritin* 基因和内参 16S rRNA 序列^[10],设计定量 PCR 引物,用于扩增 *Abferritin* 基因的上游引物 AbF: 5'-GCTTAAACA-AGATTATGAA-3';下游序列为 AbR: 5'-TTTGGT-TTGGCACCT-3';扩增片段大小为 103 bp。内参 16S rRNA 上游引物 SF: 5'-CGTTACTCGCAGAA-TAAGCACCG-3';下游引物 SR: 5'-ACCTGGAA-TTCTACCATC-3';扩增片段为 202 bp。定量 PCR 体系为 2 \times SYBR Premix ExTM TaqII 12.5 μ L, 50 \times ROX Reference Dye 0.5 μ L, 10 μ mol/L 的上、下游引物各 1 μ L, cDNA 模板 0.5 μ L,最后加 RNase-free 去离子水至 25 μ L。反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 31 s, 40 个循环,在每个循

环退火时收集信号,得到 16S rRNA 和 *Abferritin* 基因的 C_t 值,计算 *Abferritin* 基因的相对表达量。

1.3 鲍曼不动杆菌 *Abferritin* 基因的扩增

GenBank 中查得不动杆菌 *Abferritin* 基因全长,设计上游引物: 5'-CCCATATGCGTGGCAATCAGAA-3' (下划线为 *Nde* I 酶切位点), 下游引物: 5'-CCCTCGAGTTAAATTTGAGACTGGATAT-3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点)。以 ATCC17978 不动杆菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增不动杆菌 *Abferritin* 基因。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 45 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 利用胶回收试剂盒回收 *Abferritin* 基因 PCR 产物。

1.4 表达载体的构建与鉴定

将 pET28a 载体和回收的 *Abferritin* 片段各自用 *Nde* I 和 *Bam*H I 进行酶切。胶回收酶切产物, 将回收的 pET28a 和 *Abferritin* 在 T4 DNA 连接酶作用下 16 °C 连接过夜, 转化大肠杆菌 Top10, 涂布于含 Kana 的 LB 琼脂平板, 37 °C 培养 16 h。挑取阳性转化子提取质粒进行酶切鉴定, 阳性菌株送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

1.5 重组蛋白的表达与纯化

将构建成功的表达载体 pET28a-*Abferritin* 转化大肠杆菌 BL21(DE3)得到重组菌 BL/pET28a-*Abferritin*。随后接种于 LB 培养基中 37 °C、200 r/min 培养过夜, 将过夜培养的菌液按 1:100 的体积接种 LB 培养基; 待菌液培养至 OD_{600} 约为 0.5 时加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 离心收集菌体, PBS 重悬, 冰浴超声破碎后 12 000 r/min 离心 20 min, 上清经 0.45 μ m 滤膜过滤后上样于 Ni^{2+} 亲和层析柱, 用洗涤缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 0.3 mol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗柱, 并用洗脱缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 0.3 mol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗脱, 收集目的蛋白, 除盐后冻干, SDS-PAGE 检测纯化结果, Bradford 法测定 *Abferritin* 蛋白的含量。

1.6 *Abferritin* 蛋白促铁氧化动力学分析

由于 Fe^{3+} 在波长 310 nm 处具有特异性吸收光谱, 而 Fe^{2+} 并不存在这种吸收光谱, 可以利用该特性来检测溶液中 Fe^{3+} 浓度的变化。用缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5) 新鲜配制 100 μ mol/L 的底物反应体系 $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 。取 0.1 mg *Abferritin* 蛋白加入到 1 mL 终浓度为 10 μ mol/L 的 $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 溶液, 混匀后立即利用分光光度计记录 310 nm 处的吸光值, 每隔 5 s 记录一次, 共 120 s, 以未加 *Abferritin* 蛋白的 $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 溶液为阴性对照。

1.7 *Abferritin* 蛋白羟基自由基清除实验

采用 2-脱氧核糖降解法测定 *Abferritin* 蛋白羟基自由基清除实验。配制 400 μ L 样品溶液: 10 μ mol/L $FeSO_4$, 100 μ mol/L H_2O_2 , 2.8 mmol/L 二脱氧核糖, 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4), 10 μ mol/L Ascorbic acid 和不同浓度的 *Abferritin* 蛋白/BSA 蛋白。将样品溶液 37 °C 处理 5 min 后, 取 200 μ L 样品溶液加入到 100 μ L 的 10% 三氯乙酸 (质量体积比) 和 100 μ L 的 1% 硫代巴比妥酸 (质量体积比)。80 °C 反应 1 h, 12 000 r/min 离心 5 min。冷却后测定其吸光度 ($A_{532}-A_{600}$), 根据丙二醛的摩尔吸光系数 1.56×10^5 L/(mol \times cm), 计算 *Abferritin* 蛋白和 BSA 蛋白对氧自由基的半抑制浓度值 (IC_{50})。

1.8 大肠杆菌重组子抗氧化实验

将能表达 *Abferritin* 蛋白的大肠杆菌和含空载体的对照菌置于 LB (含有 50 mg/L Kana) 液体培养基中培养。当 OD_{600} 为 0.5 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L。诱导培养 4 h。将大肠杆菌分别用 0.5 或 1.0 mmol/L 的 H_2O_2 处理 20 min。将处理后的菌液梯度稀释 10^4-10^7 倍, 涂于 LB 平板, 菌落计数。

1.9 统计学分析

所有实验重复 3 次, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 GraphPad Prism 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表明有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 氧化胁迫提高鲍曼不动杆菌 *Abferritin* 基因的表达

荧光定量 PCR 结果显示, 2 mmol/L 马来酸二乙酯处理后, 鲍曼不动杆菌 *Abferritin* 基因表达量明显增高。当处理 1 h 时, *Abferritin* 基因的表达提高了 4.8 倍, 处理 2 h 后, *Abferritin* 基因的表达提高了 5.7 倍(图 1)。

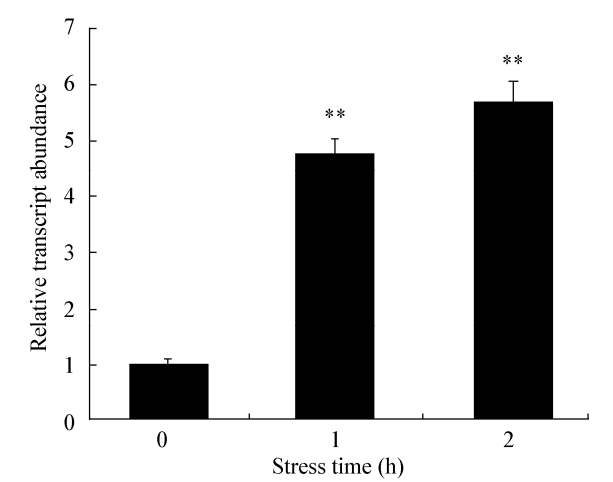


图 1 氧化应激对 *Abferritin* 基因表达的影响
Figure 1 The relative expressions of the *Abferritin* under oxidative stress
注: **: 与对照组(0 h)相比 $P<0.01$.
Note: **: $P<0.01$ as compared with control (0 h).

2.2 *Abferritin* 基因的扩增和重组质粒的鉴定

以鲍曼不动杆菌基因组为模板, 扩增 *Abferritin* 基因, 其片段大小约为 470 bp, 与预期大小一致(图 2)。重组质粒 pET28a-*Abferritin* 利用 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切后可以见到两条带, 其中 5 000 bp 左右的片段为载体, 小片段为 *Abferritin* 基因, 大小约为 470 bp, 与预期相符(图 3)。DNA 测序结果与 GenBank 登录号 AHB92462.1 序列一致。

2.3 *Abferritin* 蛋白的表达与纯化

将构建好的重组质粒 pET28a-*Abferritin* 转化到 BL21(DE3), 然后诱导 *Abferritin* 蛋白的表达, 经 SDS-PAGE 电泳分离, 与空白对照相比, 诱导组

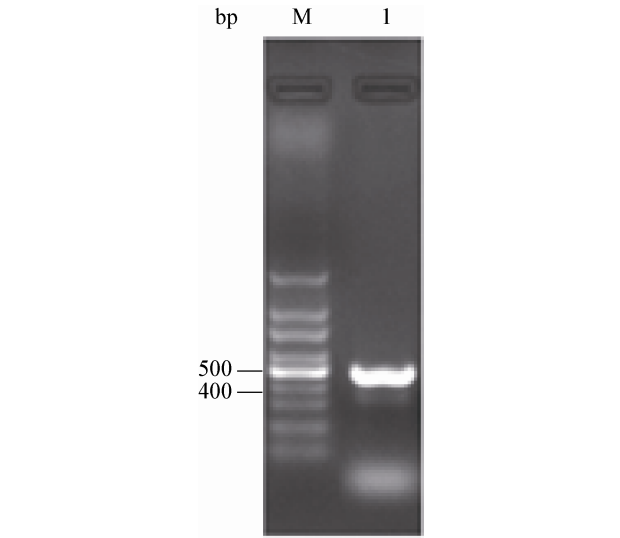


图 2 *Abferritin* 基因 PCR 扩增产物电泳图
Figure 2 Electrophoretic profile of PCR product of the *Abferritin* gene
注: M: Marker; 1: *Abferritin* 基因扩增产物.
Note: M: Molecular weight marker; 1: *Abferritin* gene.

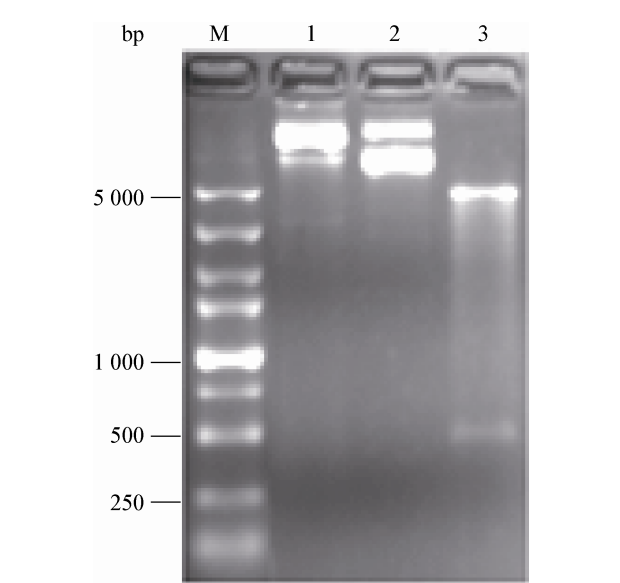


图 3 pET28a-*Abferritin* 的酶切鉴定
Figure 3 Identification of plasmid pET28a-*Abferritin* by digestion
注: M: DNA marker; 1: pET28a 空载体; 2: pET28a-*Abferritin* 重组质粒; 3: pET28a-*Abferritin* 重组质粒经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切产物.
Note: M: DNA marker; 1: pET28a plasmid; 2: pET28a-*Abferritin* plasmid; 3: pET28a-*Abferritin* digested with *Nde* I and *Bam*H I .

在 20 kD 左右有明显条带,与预期理论分子量一致(图 4)。用镍离子柱亲和纯化,透析,其纯度约为 98%。

2.4 Abferritin 蛋白的促铁氧化动力学分析

未加入 Abferritin 蛋白的 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 溶液吸收光值约为 0.05,并且在 2 min 内基本不变,加入 Abferritin 蛋白后,反应体系中 310 nm 处的吸光值发生了急剧变化,在 30 s 内从 0.05 快速上升到 0.45 (图 5)。

2.5 Abferritin 蛋白的抗氧化分析

为了验证鲍曼不动杆菌 Abferritin 蛋白的抗氧化功能,利用 2-脱氧核糖降解法检测 Abferritin 蛋白是否能减弱 Fe^{2+} 参与的 Fenton 反应。羟基自由基清除能力用半抑制浓度 (IC_{50}) 表示。结果发现 Abferritin 蛋白的 IC_{50} 值约为 0.6 g/L,而阳性对照 BSA 蛋白的 IC_{50} 约为 0.9 g/L,表明 Abferritin 蛋白清除氧自由基的能力强于 BSA (图 6)。

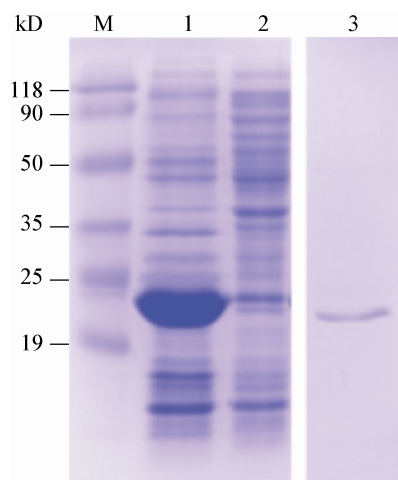


图 4 Abferritin 重组蛋白的诱导表达与纯化

Figure 4 The expression and purification of recombinant Abferritin protein

注: M: 蛋白 Marker; 1: 重组菌 BL21/pET28a-Abferritin 的诱导产物; 2: 对照菌 BL21/pET28a 的诱导产物; 3: 经 Ni^{2+} 亲和层析纯化后的 Abferritin 蛋白。

Note: M: Molecular weight marker; 1: The proteins of BL21/pET28a-Abferritin induced by IPTG; 2: The proteins of BL21/pET28a induced by IPTG; 3: The Abferritin protein after purified by Ni^{2+} pillar.

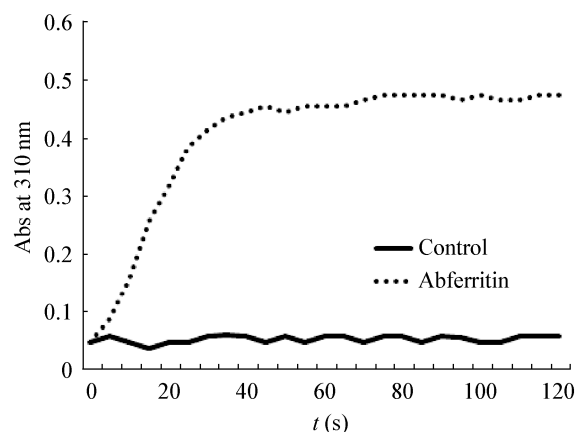


图 5 Abferritin 蛋白催化亚铁离子氧化动态曲线图

Figure 5 Kinetics of the iron oxidation and incorporation in Abferritin

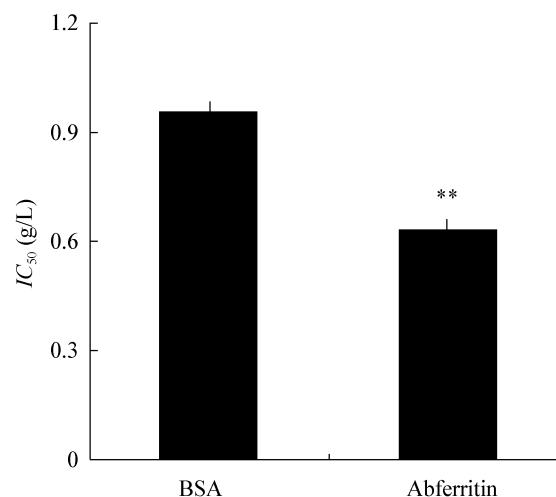


图 6 Abferritin 蛋白和 BSA 蛋白清除氧自由基的 IC_{50} 值
Figure 6 Antioxidative activities of Abferritin and BSA protein were indicated as IC_{50}

注: **: 与对照 BSA 相比 $P < 0.01$.

Note: **: $P < 0.01$ as compared with BSA.

2.6 氧化应激对 Abferritin 转化的大肠杆菌存活率的影响

将能表达 Abferritin 蛋白的转基因大肠杆菌 BL/pET28a-Abferritin 和转空载体的对照菌 BL/pET28a 分别加入终浓度为 0、0.5 和 1.0 mmol/L 的 H_2O_2 处理 20 min。由图 7 可知,在相同的 H_2O_2 浓度时,转空载体对照菌株的存活率明显低于转 Abferritin 基因的 BL/pET28a-Abferritin 菌株。

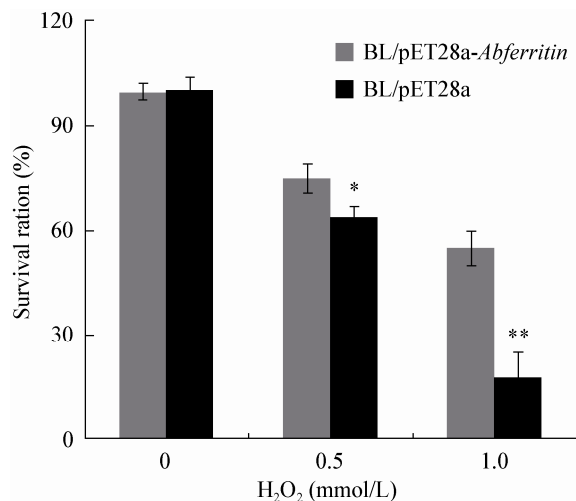


图 7 BL/pET28a-*Abferritin* 重组子和对照菌 BL/pET28a 经不同浓度 H₂O₂ 胁迫后的存活率

Figure 7 The survival ratios of BL/pET28a-*Abferritin* and BL/pET28a under the stresses of different concentrations of H₂O₂

注: 与对照(BL/pET28a)相比, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, as compared with the control (BL/pET28a).

3 讨论

Ferritin 蛋白是一种保守性较强的多亚基蛋白, 通常是由 24 个单体构成一个复合物。此复合物在细胞中发挥多重功能, 一是将机体里过剩的铁储存, 使机体减少氧自由基的产生, 免受氧化伤害; 二是当铁离子不足时, 释放储存的铁离子供机体正常使用^[11]。研究证实沙门氏菌和单核细胞增生李斯特氏菌的 Ferritin 类似蛋白可以结合铁离子^[12-13], 减少细菌体内的氧自由基含量, 从而保护细菌免受抗生素的伤害。结核分枝杆菌的 *Ferritin* 基因功能缺失后, 容易被抗生素和宿主免疫系统产生的氧自由基杀死, 这些研究表明 Ferritin 蛋白在细菌抵抗氧化胁迫中起重要功能^[14]。

鲍曼不动杆菌能黏附在各种物品的表面, 普遍存在于自然环境和医院, 其生长条件极其简单, 能够快速的适应各种环境^[15]。鲍曼不动杆菌能快速获得耐药性, 现今流行和暴发的鲍曼不动杆菌都具有多重耐药性和泛耐药性^[5-6, 15]。我们在鲍曼不动

杆菌中发现一个 *Ferritin* 类似基因 *Abferritin*。本研究检测了氧化胁迫下 *Abferritin* 基因的表达量, 荧光定量 PCR 结果表明胁迫 1 h 后, 鲍曼不动杆菌 *Abferritin* 基因的表达量上调 4.8 倍, 2 h 后上调 5.7 倍, 这表明氧化应激条件下能快速诱导鲍曼不动杆菌 *Abferritin* 基因表达以对抗各种氧化应激对其的损伤。

为了研究 *Abferritin* 蛋白的抗氧化功能及其作用机理, 本研究利用基因工程的方法从鲍曼不动杆菌克隆到 *Abferritin* 基因, 构建了 pET28a-*Abferritin* 原核表达载体, 并在大肠杆菌中得到高效表达, 利用亲和纯化得到 *Abferritin* 蛋白。体外实验证实 *Abferritin* 蛋白具有亚铁氧化酶活性, 能够催化亚铁离子生成铁离子。*Abferritin* 蛋白能够阻止 Fenton 反应, 减少氧自由基的产生, 具有抗氧化的能力, 且抗氧化能力强过哺乳动物的抗氧化蛋白 BSA。故推测鲍曼不动杆菌 *Abferritin* 蛋白通过结合铁离子从而减轻各种因素所致的氧化损伤。同时, 本研究还观察了转化有 *Abferritin* 基因和转空载体(对照)的大肠杆菌在氧化应急条件下的存活率, 发现 *Abferritin* 基因的表达能够提高大肠杆菌在氧化应激条件下的存活率, 说明 *Abferritin* 蛋白能赋予大肠杆菌抵抗氧化胁迫的能力。

鲍曼不动杆菌是医院感染中的重要病原体之一, 该菌的抗氧化机制并不清楚。本研究发现氧化胁迫能够诱导 *Abferritin* 基因表达上调, 同时证明 *Abferritin* 蛋白具有亚铁氧化酶活性和抵抗氧化应激的功能, 这可能是鲍曼不动杆菌发挥致病作用的一种新机制。

参考文献

- [1] Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics[J]. *Cell*, 2007, 130(5): 797-810.
- [2] 严卓彦, 许镇坚, 许光治, 等. 耐辐射奇球菌 *dps* 突变株的构建和蛋白功能初步研究[J]. *微生物学报*, 2014, 47(5): 610-615.
- [3] Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 66: 75-87.

- [4] Zhao G, Ceci P, Ilari A, et al. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(31): 27689-27696.
- [5] Lima AL, Oliveira PR, Paula AP. *Acinetobacter* infection[J]. The New England Journal of Medicine, 2008, 358(26): 1271-1281.
- [6] Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(12): 939-951.
- [7] Dy ME, Nord JA, LaBombardi VJ, et al. The emergence of resistant strains of *Acinetobacter baumannii*: clinical and infection control implications[J]. Infection Control and Hospital Epidemiology, 1999, 20(8): 565-567.
- [8] Hirai Y. Survival of bacteria under dry conditions: from a viewpoint of nosocomial infection[J]. The Journal of Hospital Infection, 1991, 19(3): 191-200.
- [9] Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, et al. Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(11): 5642-5649.
- [10] Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, et al. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis[J]. Genes & Development, 2007, 21(5): 601-614.
- [11] Kilic MA, Spiro S, Moore GR. Stability of a 24-meric homopolymer: comparative studies of assembly-defective mutants of *Rhodobacter capsulatus* bacterioferritin and the native protein[J]. Protein Science, 2003, 12(8): 1663-1674.
- [12] Calhoun LN, Kwon YM. The ferritin-like protein Dps protects *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from the Fenton-mediated killing mechanism of bactericidal antibiotics[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2011, 37(3): 261-265.
- [13] Krawczyk-Balska A, Lipiak M. Critical role of a ferritin-like protein in the control of *Listeria monocytogenes* cell envelope structure and stability under beta-lactam pressure[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77808.
- [14] Pandey R, Rodriguez GM. A ferritin mutant of *Mycobacterium tuberculosis* is highly susceptible to killing by antibiotics and is unable to establish a chronic infection in mice[J]. Infection and Immunity, 2012, 80(10): 3650-3659.
- [15] Ni W, Cui J, Liang B, et al. *In vitro* effects of tigecycline in combination with colistin (polymyxin E) and sulbactam against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. The Journal of Antibiotics, 2013, 66(12): 705-708.