

# 光动力对金黄色葡萄球菌的杀伤作用及其 AFM 观察\*

任雅清<sup>1</sup>, 唐书泽<sup>1</sup>, 金花<sup>2</sup>, 吴希阳<sup>1</sup>, 毕水莲<sup>1</sup>, 陈振强<sup>3</sup>

1(暨南大学食品科学系, 广东 广州, 510632) 2(暨南大学化学系, 广东 广州, 510632)

3(暨南大学光电工程系, 广东 广州, 510632)

**摘要** 通过细菌菌落计数以及原子力显微镜图像研究了血卟啉甲醚对金黄色葡萄球菌的光动力杀伤作用。结果表明: HMME 在金黄色葡萄球菌菌液中的最强吸收峰为 392 nm, 溴钨灯光源波长范围 350 ~ 2500 nm, 能满足 HMME 所需的波长; HMME 浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  接受溴钨灯光源光照 30 min 能杀死 82.2% 的金黄色葡萄球菌; 原子力显微镜图像显示其灭菌机制是 HMME 在光照条件下导致菌体破裂, 细胞内容物大量外泄; 无光照条件下, HMME 对金黄色葡萄球菌杀伤效果不显著。

**关键词** 血卟啉甲醚, 金黄色葡萄球菌, 光动力杀伤作用, AFM 图像

光动力对细胞的灭活作用首次发现于 20 世纪初, 目前光动力效应在医疗上应用比较广泛, 称之为光动力学疗法 (photodynamic therapy, PDT), 主要用于恶性肿瘤和一些良性疾病的治疗<sup>[1]</sup>。近年来, 由于抗生素的毒副作用以及抗生素抗性菌的出现使得光敏剂在杀菌上的研究与开发得到关注<sup>[2,3]</sup>。

血卟啉甲醚 (Hematoporphyrin monomethyl Ether, HMME) 是一类卟啉光敏剂, 作为天然产物, 材料来源安全, 作为一种环境友好抗菌剂, 在杀死有害菌的同时, 保留环境中固有的有益菌<sup>[4]</sup>。HMME 已在临床应用于肿瘤及鲜红斑痣等的治疗, 是一种有应用前景的光敏剂<sup>[5]</sup>。

原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 可以直接观察样本表面缺陷、表面重构、表面吸附体的形态和位置等, 可以实时地得到样品在真实空间中表面的三维图像。由于 AFM 独特观察成像特点, 在过去的十年中, 随着设备和技术的不断的改进, 它已经能对大量的生物结构成像, 特别是在纳米水平对菌细胞表层结构方面取得一定进展<sup>[6]</sup>。到目前为止, 国内尚无应用原子显微镜对光动力杀菌的研究报道。本实验首次应用 AFM 对金黄色葡萄球菌的结构进行观察, 初步探讨光动力对金黄色葡萄球菌的杀伤作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

第一作者: 硕士研究生 (唐书泽教授为通讯作者)。

\* 广州市科技攻关项目 (06A1910139), 粤港招标项目 (2005A20303002)。

收稿日期: 2008-02-25, 改回日期: 2008-05-06

#### 1.1.1 菌种

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 广州市疾病预防控制中心。

#### 1.1.2 主要试剂及配制

HMME (10 mg/mL, 上海红绿光光敏剂研究所有限公司) 于 4℃ 避光保存; 0.1 mol/L 的磷酸缓冲溶液 (PBS), 调 pH=7.2, 灭菌备用。用 PBS 稀释 10 mg/mL 的 HMME 至浓度为 10, 50 和 250  $\mu\text{g/mL}$ , 于 4℃ 避光保存。

#### 1.1.3 培养基

LB 液体培养基 (蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, NaCl 10 g) 调 pH=7.0, 灭菌备用; LB 固体培养基; 细菌计数培养基 (蛋白胨 5.0 g, 酵母膏 2.5 g, D-葡萄糖 1.0 g, 琼脂 15.0 g) 调 pH=7.0, 灭菌备用。

#### 1.1.4 主要仪器和设备

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 75 W 溴钨灯光源, 北京卓立汉光仪器有限公司; 石英比色皿 (1 cm), 上海棱光技术有限公司; 原子力显微镜, Autoprobe CP Research, 美国 Thermomicroscope 公司。

## 1.2 试验方法

#### 1.2.1 细菌的接种及培养

挑取菌种单菌落, 接种于 3 mL LB 液体培养基中, 37℃ 下振荡培养至对数生长期, 将该菌悬液以 1:100 的比例接种于 100 mL LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 3 h 后离心 (4 000 r/min, 10 min), 弃上清, 悬浮菌体于 PBS, 使得  $OD_{600}=0.7$  (相当于  $10^7$  cfu/mL 左右), 将此菌悬液置 4℃ 备用。

#### 1.2.2 HMME 在金黄色葡萄球菌菌液中的吸收光谱

菌悬液中加入 HMME 配制成 HMME 浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的样品溶液,以菌悬液为参考样品,用紫外可见分光光度计测吸光度。

### 1.2.3 不同浓度的 HMME 对菌种的作用

参考郑瑜谦的试验方法<sup>[7]</sup>和 Pakshamani 等的试验浓度<sup>[8]</sup>

取 4.5 mL 的菌悬液,放入灭菌试管中,分别取 0.5 mL HMME 稀释液至菌悬液中,配置 HMME 终浓度为 1, 5 和 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。37℃ 避光孵育 30 min,孵育后的样品进行光照,即每个试管取出 1 mL 放入石英比色皿中,将比色皿放在距离 75 W 溴钨灯光源 1 cm 处进行光照,光源的光功密度为 200  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ,光照时间 30 min。另外一组孵育 30 min 不光照。分别从 2 组不同浓度的 HMME 的菌悬液中取 100  $\mu\text{L}$  加入到 900  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液中 1:10 梯度稀释,再分别取各浓度 100  $\mu\text{L}$  到制好的细菌计数培养基平皿中,迅速均匀涂布,倒置于 37℃ 生化培养箱中恒温培养,24 h 后取出进行菌落计数并绘制失活率柱形图。实验重复 3 次,取平均值。

$$\text{失活率}/\% = \frac{N-n}{N} \times 100$$

$N$ -对照组个数平均值,  $n$ -实验组个数平均值

### 1.2.4 金黄色葡萄球菌的 AFM 图像

取不同浓度 HMME 的菌悬液 5  $\mu\text{L}$ ,涂布在新剥离的云母片上,1.5% 的戊二醛固定 5 min。然后用蒸馏水轻轻漂洗,风干后用 AFM 观察。试验采用 100  $\mu\text{m}$  扫描器,UL20B 硅探针,力常数为 2.8  $\text{N}/\text{m}$ ,在轻敲模式(tapping mode)下进行扫描,所得图像以仪器随机软件(Thermo microscopes Proscan Image Processing Software Version 2.1)进行平滑处理与数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HMME 的吸收光谱

图 1 为 HMME 在金黄色葡萄球菌菌液中的吸收光谱,从图中可看出在 392 nm 处有一个最强吸收峰,其余 3 个峰依次为 504、538 和 569 nm。光敏剂是一类具有光活性的化合物,能选择性的富集于特定的组织,在适当波长光的激发下能产生光动力效应而破坏靶细胞<sup>[9]</sup>。试验中所选取溴钨灯光源的光谱范围为 350~2500 nm,满足 HMME 所需的波长。

### 2.2 不同梯度浓度的 HMME 对金黄色葡萄球菌的光动力杀伤作用

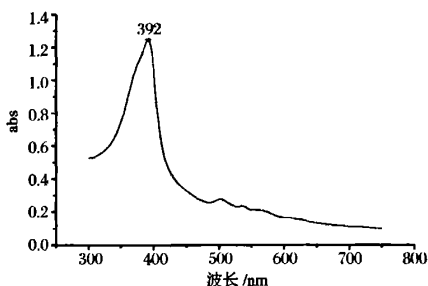


图 1 HMME 在金黄色葡萄球菌菌液中的吸收光谱

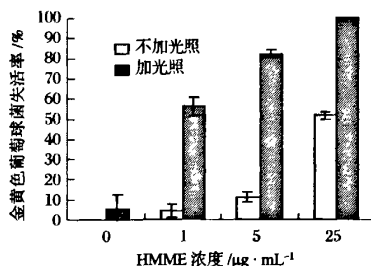


图 2 不同的 HMME 浓度与金黄色葡萄球菌失活率之间的关系

由图 2 可知, HMME 对金黄色葡萄球菌的光动力杀伤作用非常强,光照下 HMME 浓度在 1, 5 和 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时分别能杀死 56.1%、82.2% 和 99.9% 金黄色葡萄球菌;未经光照处理,则分别杀死 4.2%、11.1% 和 51.7%。因此,光照条件下,一定浓度范围内,金黄色葡萄球菌的失活率随 HMME 浓度的增大而显著增加。未经光照处理,杀菌效果明显没有采取光照后理想。可见, HMME 接受了一定时间的光源光照后,才能更好的激发其光动力效应。

卟啉类光敏剂的杀菌作用可能主要是通过单重态氧起作用,即光照条件下,光敏剂的三重态氧与基态分子氧发生能量传递产生单重态氧,它是一种高反应活性的物质,具有亲电性,能高效的氧化生物分子因此能有效杀死金黄色葡萄球菌<sup>[10]</sup>。

### 2.2 金黄色葡萄球菌的 AFM 观察

图 3 为未经处理的金黄色葡萄球菌,图中为 3 个金黄色葡萄球菌相连,细胞分界不清,菌体呈较规则的球形,表面没有起伏凹陷或其他生理构造,直径约为 1  $\mu\text{m}$  左右。

图 4 为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HMME 光照 30 min 后的金黄色葡萄球菌 AFM 图,可见菌体已经有明显的损伤,细胞发生变形,表面有裂纹产生,此样品中细菌外壁被破坏的数量越来越多,但几乎没有发现部分或完全

破裂的细胞

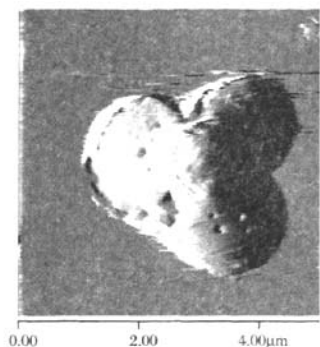


图3 *S. aureus* 未经处理的 AFM 图像

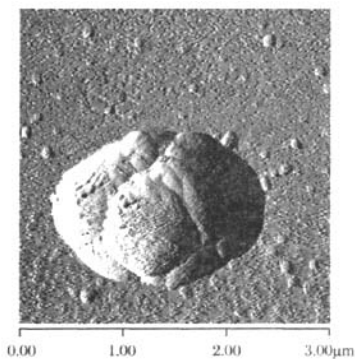


图4 1  $\mu\text{g/mL}$  HMME 处理 *S. aureus* 的 AFM 图像

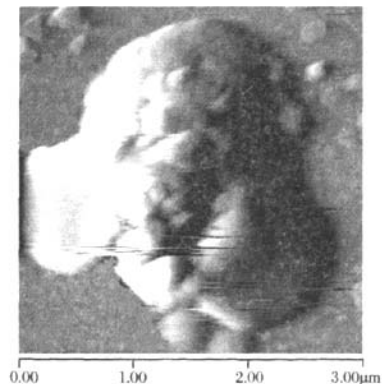


图5 5  $\mu\text{g/mL}$  HMME 处理 *S. aureus* 的 AFM 图像

图5为5  $\mu\text{g/mL}$  HMME光照30 min后的金黄色葡萄球菌 AFM 图,此样品中已有较多细胞破损,细胞膜破裂导致细胞内容物大量外泄。HMME 浓度为25  $\mu\text{g/mL}$ 光照30 min后,同样导致样品中大量细胞破损。Peak 等人研究表明,光动力效应能导致细菌细胞膜破损,内容物外泄,从而导致细菌死

亡<sup>[11]</sup>。本研究观察到的金黄色葡萄球菌 AFM 图像进一步证实了这种论证。

### 3 结 论

HMME 对金黄色葡萄球菌有很强的光动力杀伤作用,HMME 浓度为5  $\mu\text{g/mL}$  接受溴钨灯光源光照30 min 能杀死82.2%的金黄色葡萄球菌,原子力显微镜图像从形态学上显示其灭菌机制是 HMME 在光照条件下造成金黄色葡萄球菌菌体破裂,细胞内容物大量外泄,从而导致细菌死亡。金黄色葡萄球菌是一种可引起人类和动物化脓感染的重要致病菌,也是造成人类食物中毒的常见致病菌之一<sup>[12]</sup>。本实验研究的光动力杀伤作用可以作为一种有效的杀灭金黄色葡萄球菌技术应用在实际的工作中。其中也还存在着不少的问题,需要在以后的研究加以完善。

### 参 考 文 献

- 1 Ochsner M. Photodynamic therapy. The clinical perspective. Review on applications for control of diverse tumors and non-tumorous disease [J]. *Arzneim-Forsch/Drug Res*, 1997, 47: 1185-1194
- 2 Luksiene Z, Peculyte D, Jurkoniene S, et al. Inactivation of possible fungal food contaminants by photosensitization [J]. *Food Technol Biotechnol*, 2005, 43(4): 335~341
- 3 Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of gram negative bacteria; problems and possible solutions [J]. *Photovhem. Photobiol*, 1990, 5(B): 811~816
- 4 唐 蕾,诸葛健. 天然光敏剂的光动力抗菌作用[J]. *中国抗生素杂志*, 2004, 29(11): 703~706
- 5 于 丽,李晓原. 第二代光敏剂血卟啉单甲醚及其临床应用研究进展[J]. *生物医学工程与临床*, 2005, 9(6): 365~368
- 6 Dufrene Y F. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces ; from reconstituted cell surface layers to living cells[J]. *Micron*, 2001, 32: 153 ~ 165
- 7 郑瑜谦,闫福华,陈锦灿,等. 一种新型光敏剂对牙周致病细菌的体外抗菌研究[J]. *口腔医学研究*, 2006, 22(4): 368~371
- 8 Tripathi R, Mohan H, Kamat J P. Modulation of oxidative damage by natural products [J]. *Food Chemistry*, 2007(100): 81~89
- 9 唐 蕾,诸葛健. 天然光敏剂的光动力抗菌作用[J]. *中国抗生素杂志*, 2004, 29(11): 703~706
- 10 Minnock A, Vernon D, Schofiels J, et al. Mechanism of

- uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antibicrob [J]. Agents Chemother*, 2000, 44: 522~527
- 11 Peak M J, Johnson J S, Tuveson R W, et al. Inactivation by monochromatic near-UV radiation of an *Escherichia coli* hemA8 mutant grown with and without delta-aminolevulinic acid: the role of DNA vs. membrane damage [J]. *Photochem Photobiol*, 1987, 45: 473~478
- 12 柞 荣. 葡萄球菌毒素和葡萄球菌毒素病[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992

## Photodynamic Inactivation of *Staphylococcus aureus* and Its AFM Images

Ren Yaqing<sup>1</sup>, Tang Shuze<sup>1</sup>, Jin Hua<sup>2</sup>, Wu Xiyang<sup>1</sup>,

Bi Shuilian<sup>1</sup>, Chen Zhenqiang<sup>3</sup>

1(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

2(Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

3(Department of Optoelectronic Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**ABSTRACT** The photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* by hematoporphyrin monomethyl ether were investigated through the absorption spectrum of HMME in *S. aureus* suspension, reduction of colony unit and atomic force microscopy images. Results showed that the absorption peak of HMME was 392 nm, the wavelength from 350 nm to 2500 nm of the irradiation source could cater the HMME with the required wavelength; 82.2% of *S. aureus* were photoinactivated and most cell membrane was damaged with cell contents leakage from the cell by illumination with 30 min light in the presence of 5  $\mu\text{g/mL}$  HMME; The cell killing effect to *S. aureus* with illumination was more obvious than in the dark at the same concentration of HMME. *S. aureus* was very sensitive to the photodynamic inactivation of HMME.

**Key words** HMME, *Staphylococcus aureus*, Photodynamic inactivation, AFM image

信  
息  
窗

### 日本合成能将人造氨基酸折叠成蛋白质的酶

日本理化研究所和东京大学共同合成了能将人造氨基酸正确折叠成蛋白质的融合酶。这项成果将可能带来多种拥有新功能的蛋白质,贡献于生物技术、医药等行业。

上述 2 家机构共同发表新闻公报说,生物体内的蛋白质由 20 种氨基酸根据 DNA 中包含的遗传信息按照一定的数量和顺序结合而成。目前,增加蛋白质中氨基酸的种类,特别是将自然界并不存在的人造氨基酸组合入蛋白质,人为地使蛋白质拥有多样化的功能的相关研究正成为各国科学家关注的焦点。但是这样的尝试等于是试图改变由遗传信息决定的生命体的最根本的构成要素,实现起来非常困难。尤其是与蛋白质合成相关的酶,参与着遗传信息的表达过程,要人为地改变它们更是难上加难。而且,众所周知,酶作为蛋白质的一种,具备一定的立体构造,替换其中的一部分或者企图将别的蛋白质的一部分添加进去,都会造成整个立体结构的崩溃。

公报说,理化研究所和东京大学的这一联合研究小组此前曾成功合成了组合入人造氨基酸“iodoTyr”的蛋白质。“iodoTyr”和天然存在的酪氨酸只有一个碘原子的差异。为了合成能正确区分“iodoTyr”和酪氨酸的酶,研究人员决定借用天然酶的作用机制。天然酶的一种苯丙氨酸-tRNA 合成酶有时会误将酪氨酸当成苯丙氨酸,后者与转运核糖核酸结合,但苯丙氨酸-tRNA 合成酶立刻会觉察到自己的失误,随后就又令酪氨酸从转运核糖核酸上脱离。苯丙氨酸-tRNA 合成酶的这种功能被称为校正功能。而酪氨酸-tRNA 合成酶则没有这样的校正功能。

据此,研究小组成员将苯丙氨酸-tRNA 合成酶的校正功能区域移植进原本区分不了“iodoTyr”和酪氨酸的“iodoTyrRS”,这样如果转运核糖核酸错误地与酪氨酸结合的话,校正功能区域会立刻发挥作用使两者分离,而只有与“iodoTyr”结合的转运核糖核酸才能到达核糖体。

在实验中,研究人员成功利用植入了校正功能区域的融合酶“iodoTyrRS”,有选择地将人造氨基酸“iodoTyr”组合进蛋白质。

公报说,运用这样的融合酶,就有可能轻而易举地将人造氨基酸组合进普通的蛋白质中,这样就能够大量合成各种各样的新种类蛋白质。这些蛋白质可充当高效药品的原料、高性能工业用酶和生物原料。