

病原微生物的原子力显微镜研究进展

刘保友 李雪玲 张广民

绝大多数微生物在演化过程中对环境和生态压力进行选择形成了具有轮廓清晰的细胞壁,是外部环境和原生质体间的界线,具有维持细胞形状、控制细胞生长和分裂、抗膨压、作为分子筛和介导分子识别细胞间的相互作用。微生物表面的结构、性质和功能一直为微生物学的热门研究领域。对微生物表面的了解可归功于过去 30 年电子显微镜的巨大发展。使用传统的透射电子显微镜(TEM)和扫描电子显微镜(SEM)获得了大量有关微生物细胞表面结构的信息,但必须进行样品处理(如干化、染色及其他特殊处理)和真空条件下观察获得,不能直接观察生理状态下的活微生物细胞。低温技术使得电镜高分辨率观察接近生理状态的细胞结构,然而直接观察水溶液或培养液中的微生物细胞仍是不可能的。同样,其他细胞表面成像分析方法(如 X-射线光电子波谱学、红外光谱学等)也需要对细胞进行如染色的处理,从而导致观察结果的失真。典型微生物细胞的直径在一个微米左右而真核细胞可超过 100 μm ,而大分子的尺寸在 1 到几十个纳米的范围内变化。因此,对于仪器设备,1 nm 至 105 nm 范围内的成像能力是必要的。需要一个能以高分辨率探测单个细胞的表面和单个分子并且不破坏其结构的新工具。

基于“近场显微镜”概念的扫描探针显微镜(SPM)满足了以上的要求,是对电镜等技术和方法的重要补充。SPM 记录的信息不是干涉信号而是强度信号,这极大地改善了仪器设备的最终分辨率。原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)是 SPM 的一个成员并扩展了 SPM 在观察非传导性表面的应用,为分析研究生物样品表面的结构和性质提供了前所未有的机会。迄今,微生物是 AFM 的重要研究内容,反之,AFM 为研究微生物表面结构和性质提供了重要的技术手段。

一、AFM 及其研究微生物的优势

AFM 是 1986 年由 Binnig 等发明的,逐渐成为纳米生物学方面的重要研究工具。AFM 通过感受尖细探针与样品表面间的力获得相关信息,而传统光学显微镜通常依赖于入射光束,受到衍射限的限制,具有较低的分辨率。AFM 可在真空、空气和生理状态下实时地提供样品表面超微结构的高分辨率图像。用 AFM 获得的信息主要是个体水平上的,而大多数其他技术和方法获得的结果是大量生物样品的平均信息。在与微生物相容的液态环境下原位获得的图像和力曲线可提供直观和定量的形态信息,尤其是高的垂直分辨率。AFM 不仅仅是一个获得

作者单位:200240 上海交通大学生物医学工程系(刘保友、李雪玲);山东农业大学(刘保友、张广民)

通讯作者:李雪玲 Email:lixueling@sjtu.edu.cn

表面结构的成像工具,而且可利用悬臂的高灵敏性测得微生物样品的物理性质(如表面亲/疏水性等)和分子间的相互作用(如分子键联等)。这些性质的获得能够让人们更清楚地了解微生物表面结构与功能之间的关系。

二、AFM 及其研究微生物的技术环节

AFM 及其研究微生物的技术环节:(1)样品制备技术。与其他显微镜技术一样,制样也是 AFM 技术的关键所在,直接关系到所得结果的真实性。尽管较早地认识到 AFM 在研究动物细胞方面的潜力^[1],但是由于样品制备方面的困难,早期 AFM 在微生物细胞方面尝试是很有限的。这是因为与动物细胞相比,微生物细胞具有一定的刚性以及不具有在衬底上铺展的性质,造成了细胞和衬底间的接触面积较小,从而导致在探针扫描过程中细胞被移动从而产生假像。迄今,所采取的固定方法因学者和研究对象的不同而有所差异;(2)微生物样品的预处理。用 AFM 观察微生物要获得高质量图像及真实性质需要高纯度的样品,故要去除培养基成分及胞外分泌物质。对于液态培养的细菌,多采用反复离心和冲洗的方法进行预处理。对于固态培养的细菌,报道得较少。Lister 等^[2]直接刮取耐辐射球菌菌苔,置于衬底不锈钢上,依次在丙酮、乙醇和超纯水中利用超声波对样品进行预处理;(3)衬底的选择和修饰。由于研究对象不同,固定的最适条件差别很大,故研究者选用的衬底及衬底修饰剂等各有不同,还没有更为普遍的制样方法。迄今,选用的衬底有云母、玻璃、不锈钢片^[2]、聚苯乙烯塑料^[3]等。其中,云母多被多聚赖氨酸或凝胶所修饰,不同学者操作的具体步骤也不甚一致^[4-6]。对于玻璃衬底,直接使用^[7,8],也可用聚醚酰亚胺^[9-12]、硅烷化试剂^[13]等进行修饰;(4)细胞在衬底上的固定。制样最为关键的步骤是如何把生物样品固定在衬底上,以保证在成像过程中不发生移动产生假象。迄今为止,研究者对不同的微生物细胞采取了不同的固定方法。最为简单的方法是,用移液器吸取 5~10 μl 的细胞悬浮液滴加到新剥离的云母或者玻璃衬底^[7,8]上并在空气中干燥或者用氮气吹干。较为优化的方法是对玻璃、云母等衬底进行修饰以提高其黏附细胞的能力。Doktycz 等^[4]对固定在被多聚赖氨酸或凝胶修饰云母上的细菌进行成像,结果表明凝胶覆层的云母表面优于多聚赖氨酸覆层的表面,并且可允许 AFM 在溶液或气体中对细菌细胞反复地多次成像。AFM 对微生物细胞成像的第二个问题是样品(或探针)的垂直运动距离。该垂直运动一般局限于几个微米,对于大的样品表面(如真菌孢子)难于成像。简便又好的固定方法是把细胞诱捕在多孔膜^[14-17]中。同时也避免了风干和化学处理可能引起的表面分子变性作用。简述该方法如下,细胞穿过多孔膜时被温和地诱捕在含有等大孔的多聚膜上,把滤膜剪成适当的大小,用小块双面胶将其粘到铁片上。但缺点是不适合对杆状细胞的固定;(5)成像模式/参数对结果的影响。细菌表面比较柔软,如细菌表面具有均匀分布的柔软海绵网状结构,这导致了 AFM 在细菌中应用的另一主要挑战是在针尖扫描力的作用下细菌表面发生变形,从而无法确定针尖和样品间的接触点。现在有两种方法来解决接触点的问题:一是忽略表面的长程力,即假设针尖和细菌间

的相互作用纯粹是由细菌表面变形引起的;二是假设细菌具有线性的弹性性质,而所有力曲线非线性部分皆被认为是静电和空间表面力作用的结果。有些学者对针尖可影响细菌的表面结构进行了研究。在 AFM 扫描过程中,Boonaert 等^[15]研究了细菌表面的纳米形貌结构随成像参数(如成像力、扫描速率等)改变而发生的变化情况。沟槽产生的方向与扫描方向一致,其深度随着成像力的增加而加深。但是,沟槽的多少不随成像力的改变而变化。这些沟槽尽管揭示了 AFM 探针影响着细胞表面的观察,但也提供了有关细胞表面纳米机械性质的信息。Bolshakova 等^[5]在空气、水和细菌培养基中用不同 AFM 操作模式分别对大肠杆菌进行了成像观察,结果表明在不同的成像条件下细菌表面形貌和大小有较大差别。

三、AFM 在微生物学研究中的应用

AFM 不仅仅可获得微生物样品的高分辨率图像,而且还可获得有关样品的硬度、弹性、电磁性等机械性质的信息。起初,学者主要使用 AFM 检测和操纵不同二维蛋白晶体的表面层。但随着 AFM 设备、成像技术、制样技术等方面的发展,利用 AFM 对微生物活细胞的研究越来越多,越来越深入。

1. 细胞表面晶体结构的观察和操纵:之所以细菌表面层的蛋白晶体成为高分辨率成像的完美体系,是因为它们具有较高的稳定性和结构的规律性。AFM 可以 0.5 ~ 1 nm 的侧向分辨率和 0.1 ~ 0.2 nm 的垂直分辨率对单个蛋白成像并可检测其构象变化。这些蛋白主要包括六角组装中间体层(HPI)^[18,19]、膜孔蛋白 OmpF 和水孔蛋白晶体^[21]等。Müller 等^[18]在缓冲液中观察了固定在新剥离云母上耐辐射菌的 HPI 层,分析了内外表面的性质,测得单层 HPI 的高度以及以不同方式形成的双层 HPI 的高度,并观察到了单个 HPI 的构象变化。Sleytr 等^[20]综述了晶质状细菌细胞表面层的性质和 AFM 在纳米生物技术中的应用潜力。Scheuring 等^[21]获得了膜孔蛋白 OmpF、水孔蛋白-Z 和噬菌调理素的构象空间,并从大量单分子形貌中计算出了结构域的运动幅度。同时,一些学者在活生物样品上也观察到了其表面的细微结构。Lister 等^[2]原位观察到了耐辐射菌 HPI 的晶格。因此,可以说 AFM 的出现为在生理状态下直接观察微生物表面结构提供了可能性。

另外,一些学者对蛋白质分子间的相互作用力进行了探讨。Müller 等^[25]结合成像和操纵技术研究了耐辐射菌 HPI 层单个原体间的相互作用。对 HPI 层成像后,通过增加针尖-样品之间的接触力使得针尖黏附到单个原体上,结果证明拉出单体的力约为 300 pN。而 Oesterhelt 等^[26]对嗜盐菌紫膜上的细菌视紫红质进行了成像和操纵,对单个细菌视紫红质的展开途径进行了研究,发现不同的螺旋与紫膜之间具有 100 ~ 200 pN 范围内的结合力。

2. 揭示细胞的动态发育过程:用 AFM 可实时地观察细胞的如生长、出芽等动态过程。最近,一些学者记录了真菌孢子和酵母表面的高分辨率形貌图像,分析了结构变化与功能间的关系。

孢子在真菌生活史中起着至关重要的作用,这是因为孢子是真菌的营养繁殖

体,可大范围地进行传播和度过不良环境。这引起了许多学者的兴趣。Bruno C. 等^[6]和 van der Aa 等^[27]用 AFM 观察了米曲霉菌孢子表面,休眠孢子表面覆盖着一层不受扫描探针影响的晶质状小棒层;而萌发孢子表面变得很粗糙,主要由软的粒状物质覆盖并受扫描探针的影响。Dufrêne 等^[28]在白腐菌休眠孢子上观察到了与米曲霉菌休眠孢子同样的小棒层,这与早期的冰冻蚀刻实验结果相一致;然而,大部分的萌发孢子表面是光滑的,并存在黏附力,仅局部由粗糙的颗粒状结构所覆盖着,作者认为这些颗粒状结构是小棒层的残留物并且不具有黏附力。可看出,细胞表面大分子的变化对孢子表面性质起着重要作用,小棒层与休眠孢子的存在和传播密切相关,而萌发孢子的表面黏附力增加有利于孢子在物体表面的黏附和孢子聚集,从而便于侵染。

酵母为单细胞真核生物,主要以芽殖的方式进行繁殖并在母细胞上留下芽痕。Ahimou 等^[29]使用多孔膜固定啤酒酵母细胞,用 AFM 在酵母细胞表面上明显观察到芽殖后留下的芽痕,而其他表面区域表现的均一光滑。

3. 单细胞药物筛选:AFM 在微生物中的另一个应用是可在单个细胞水平上研究如变性剂、抗生素、抗菌肽等药剂以及酶的作用效果,为研究其作用机理提供了强有力的手段。

脂多糖(LPS)在 G^- 细菌表面形成表面层,起着选择性渗透的作用。早在 1958 年 EDTA 就被用来破坏 LPS 层从而增加了细菌细胞的渗透性。从早期的观察,可以推断出渗透性主要依赖于 LPS 分子和脂蛋白的密度以及其组织结构。然而,早期由于缺乏描述生理状态下细微结构的高分辨率技术,很难获得其内在机制或直接把分子甚至纳米水平的结构与所观察到的渗透性变化联系起来。AFM 满足了这一要求。Amro 等^[30]获得了大肠埃希菌外膜上 LPS 层的图像,成千上万个 LPS 分子形成 LPS 束,相邻的 LPS 束紧密地组装在一起,这可在一定程度上说明 LPS 层为 G^- 细菌提供了有效的渗透作用。作者用 AFM 观察 EDTA 处理后的大肠埃希菌,发现表面上的 LPS 分子从 LPS 束中释放出来,并导致细胞的渗透性增加。EDTA 破坏 LPS 层的机制是由于它螯合了稳定 LPS 层的金属离子。也有报道,稀土金属可改变微生物细胞的渗透性。Liu 等^[31]使用 AFM 研究了稀土金属 La^{3+} 对大肠埃希菌的影响, La^{3+} 可替代稳定 LPS 层的二价金属离子(Ca^{2+} 、 Mg^{2+}),从而影响了 LPS 层的稳定性,改变了该层的形貌,影响了外膜的渗透性及其他功能。作者同时用 SEM 和感应耦合电浆质谱仪证实了用 AFM 观察到的结果。

β -内酰胺抗菌素通过特异地干扰与肽聚糖代谢有关的酶改变了微生物的形貌而呈现抗微生物活性。Braga 等^[8]用 AFM 研究了被不同浓度的抗生素头孢地嗪处理大肠埃希菌后的形态变化。Supra-MICs 的头孢地嗪导致了大肠埃希菌细胞的死亡;而 Sub-MICs 的头孢地嗪导致了大肠埃希菌细胞的丝状化。

在系统发生树中,包括动物在内的生物体皆产生抵抗微生物的物质(如肽)。自然抗菌肽参与大多数多细胞生物体的天然免疫作用,是抵抗微生物侵染的第一

道防线。现在,研究者致力于提高抗菌肽的药效及其特异性以致于它们对微生物而不是对哺乳动物具有毒性。为了实现这个目标,在微观水平上理解这些药剂的作用机制是至关重要的。相应地,AFM 也开始应用于研究抗菌肽对微生物的作用效果。Arnaldo da Silva Jr. 等^[6]使用 AFM 对从蛙皮血细胞中分离出的抗菌肽 PGLa 处理后的大肠埃希菌进行了成像并测定其细胞硬度。处理 5 min 后,细胞壁硬度丧失,随之而来的是形态特征的变化以及由于外膜破解造成胶囊的形成和菌毛的脱落;30 min 的处理导致整个细胞的破裂,仅剩最下边的细胞成分黏附在衬底上。而 Mg^{2+} 的添加可在一定程度上抑制 PGLa 的作用效果,这意味着 PGLa 是通过把 Mg^{2+} 从 LPS 中替换出来而与外膜发生相互作用的。Anderson 等^[7]结合 TEM 和 AFM 研究了两种抗菌肽 SMAP29 和 OaBac5mini 对金黄色葡萄球菌的作用效果,SMAP29 引起细胞的裂解和死亡,而 OaBac5mini 通过干扰细胞内部的组分起到抑制细胞分裂的作用,结果与以前其他技术和方法报道的相一致。

溶菌酶是一种自然存在于蛋白、人的唾液、眼泪或其他体液之中的酶,能毁坏某些细菌的细胞壁,从而可用作温和的抗菌剂。Bolshakova 等^[5]用溶菌酶处理大肠埃希菌后,在液态下直接观察到了该酶对表面的降解效果以及表面刚性的丧失,并最终导致细菌形状的剧烈变化。Ahimou 等^[29]用蛋白酶和淀粉葡萄糖苷酶溶液处理啤酒酵母后,用 AFM 间隔一定时间记录了单细胞的形貌图像。蛋白酶的处理增加了细胞表面的粗糙度,形成了具有突出边缘的凹坑,这是因为蛋白酶降解了甘露糖蛋白;然而对于淀粉葡萄糖苷酶溶液处理过的酵母细胞,未见表面形貌的改变,这与细胞壁的生化组分有关,可证实 AFM 可用于研究一些物质的组成。

4. 细胞在固体表面的黏附作用:微生物的黏附和聚集在自然环境和生产过程中扮演着重要的角色。要深入了解固体界面上这些微生物细胞的行为,有必要研究细胞表面的结构、化学组分和物理化学性质。在生产过程中细菌黏附是必须考虑的,是因为细菌黏附直接影响到细菌生物膜的形成。同时,生物膜的形成也是牢固细胞黏附的关键环节。细菌以生物膜的形式存在要比游离状态的细菌具有更强的抗性。细菌黏附分为两步,一是细菌直接附着到衬底上,是可逆、非特异性的过程;二是,细菌与物体表面发生的特异性结合使得细菌黏附成为不可逆的事件,即细菌牢固地黏附在衬底表面上。正是因为细菌表面大分子和胞外聚合物影响着黏附和生物膜的性质和动力学,故引起了学者用 AFM 对胞外聚合物(EPS)和细菌表面大分子进行研究的兴趣。Kolari 等^[34]对无鞭毛和无菌毛的短杆状耐辐射菌在不锈钢和盖玻片上的黏附机制进行了研究,细胞在液态环境下随着扫描发生移动,但是扫描不能使细菌从表面上分离出来,并表明了该细菌黏附主要依赖于蛋白质状的 EPS。Bruno C. van der Aa 等^[3]在细菌生长适宜的条件下,研究了吸附在聚苯乙烯上的 EPS,EPS 改变了衬底表面的性质使得衬底表面黏附力发生明显的改变;在不适于细菌生长的环境条件下,在衬底上未发现明显的 EPS,也未发现衬底表面性质的改变。这些结果为蛋白质状 EPS 可增加细菌黏附提供了直接证据。

表面大分子覆盖在微生物细胞的表面,影响着微生物与外界环境间的相互作用。如前所述,萌发前后孢子表面性质的变化能反应出其功能的转变^[27-28]。Bruno C. van der Aa 等^[27]在米曲霉菌孢子表面与探针间获得的 approach 曲线中,对于休眠孢子,曲线不呈现明显的长程排斥力;而对于萌发的孢子,一直能够观察到长程排斥力。Dufrêne 等^[32]利用 AFM 对细菌的表面层、真菌孢子和几种细菌进行对比研究获得了大量的 approach 和 retraction 曲线,这些依赖于微生物种类、生理状态和环境条件的曲线反应了不同微生物的长程力、黏附力和机械性质等物理性质有所不同。Beech 等^[33]综述了利用 AFM 对微生物在金属表面上形成生物膜的研究概况。Hanna 等^[35]用 AFM 并结合其他技术研究了大肠埃希菌的包被多糖 colanic acid 在黏附过程中所起的作用,结果表明 colanic acid 不提高细菌的黏附作用,而是阻碍了大肠埃希菌和惰性衬底之间的特异性结合作用。Schaer-Zammaretti 等^[36]对不同乳酸细菌的弹性和黏附性获得了 force-volume 图像,对于具有表面层的细菌,呈现较大的硬度和较小的黏附作用,这与具有蛋白小棒层的真菌休眠孢子有相似之处;而对于无表面层的乳酸菌则呈现出明显的粘着峰,这与表面的多糖和蛋白质成分是相一致的。多数 G⁻ 细菌表面覆盖着一层起着选择性渗透的 LPS 层,该层在细菌黏附中是否起着作用得到了较多的研究。Velegol 等^[9]研究了可能影响 AFM 力曲线的因素,发现 LPS 对力曲线的形状不起作用,戊二醛只影响曲线的线性部分,静电性质对曲线非线性部分不起作用。这就意味着非线性部分主要由于细菌表面层的变形造成的。Abu-Lail 等^[38]研究了 LPS 在大肠埃希菌 JM109 的如黏附、保持、转移等生命过程中所起的作用,用 EDTA 部分地去除表面 LPS 后细胞与针尖间的黏附性能发生了改变,并且处理后的细菌与针尖间的排斥力减小。Burks 等^[11]用 AFM 在不同长度的 LPS 的大肠埃希菌 K12 细胞上获得的力曲线基本上相同。同时,结合其他技术研究表明,LPS 的分子长度并不是该菌在多孔基质中黏附的唯一决定因素。

5. 细胞的弹性等机械性质的测定:AFM 不仅仅可对样品表面的形貌进行高分辨率成像,而且还可以测量整个或局部微生物细胞的纳米机械性质。机械性质直接体现了微生物细胞的表面结构与性质功能间的关系。Henny C. van der Mei 等^[39]通过 AFM 研究了原纤维和无原纤维链状球菌的表面柔性,从力曲线中可得出无原纤维菌株比原纤维菌株的硬度大得多。Touhami 等^[40]测得了酵母啤酒酵母芽痕处硬度为其他细胞表面的 10 倍,分别为 (6.1 ± 2.4) MPa 和 (0.6 ± 0.4) MPa,这与芽痕处壳多糖的积聚有关联。

有一种使用 AFM 测定细胞壁弹性的方法,即用 AFM 针尖向固体表面的凹槽内压生物样品,从而获得细菌细胞壁的弹性。Xu 等^[41]测定产甲烷细菌亨氏甲烷螺菌 GP1 鞘的弹性模量为 2×10^{10} 至 4×10^{10} N/m²。在一定压力作用下鞘才可延伸,这说明只有当活细胞内的压力达到一定量值时细胞才释放出甲烷气体。Yao 等^[42]使用 AFM 测得了大肠埃希菌 K-12 和假单胞菌 PAO1 胞壁质的厚度和弹性。风干的大肠埃希菌胞壁质的厚度分别为 3.0 nm 和 1.5 nm,水化的胞壁质的厚

度是风干的 2 倍;水化的大肠埃希菌胞壁质弹性模量为 $2.5 \times 10^7 \text{ N/m}^2$,在移去针尖后胞壁质恢复到原来状态,而干化的大肠埃希菌胞壁质弹性模量在 $3 \times 10^8 \sim 4 \times 10^8 \text{ N/m}^2$ 范围内,并且针尖时常会破坏胞壁质;当胞壁质的长轴与凹槽平行时,不易发生变形,这与肽聚糖在细胞壁上的走向相一致。

另外,AFM 的高灵敏性可以被用来测定局部的纳米机械运动,Pelling 等^[17]在啤酒酵母细胞壁上测得了依赖于温度并具有特征频率的局部纳米机械运动,根据所测得的细胞表面的弹性系数($K_{\text{cell}} = 0.06 \pm 0.025 \text{ N/m}$)和振幅(约 3 nm)可得到该运动所需要的力为 0.2 nN。被叠氮化钠处理的细胞不呈现特征性的运动,表明这种纳米机械运动需要能量 ATP 才可进行。

6. 细胞表面电荷的测定:局部的静电性质在许多生物过程中扮演着重要的角色。弄清楚生物系统结构与功能间的关系需要了解静电相互作用的强度和方位。以足够的分辨率对蛋白质等大分子的静电性质进行直接测定报道得较少。然而,用 AFM 探针可对缓冲溶液中生物样品表面的电荷进行探测以作分析。Philippson 等^[43]对大肠埃希菌跨膜通道 OmpF 膜孔蛋白的静电电势进行了成像制图,记录了不同离子强度下 OmpF 膜孔蛋白电势的差别,结果与包埋在脂双分子层中的 OmpF 膜孔蛋白的静电估计值相一致。Camesano 等^[44]在不同 pH 值的情况下研究了腐臭假单胞菌 KT2442 与 AFM 硅氮化物针尖之间的相互作用。对于 KT2442 和 G4,随着 pH 的增加,AFM 悬臂和样品间的排斥力随之增加,这可能因为随着 pH 增加多糖所带的电荷增加,在分子内部产生了排斥作用,从而导致细菌的表面分子随着 pH 增加进一步延伸。

7. 其他:细菌能够适应环境中的物理和化学变化。例如,由于微生物持续地消耗资源,自然环境中一般含有非常有限的碳源和能量。细菌究竟如何适应环境中的变化? Steinberger 等^[45]研究了在营养被剥夺时铜绿假单胞菌的变化情况,结果表明细菌通过延伸来适应营养的缺乏,这与以前报道的饥饿反应情况(如细胞体积减小、比表面积增加等)有所不同。

细胞壁有助于质膜抵抗膨压,其首要作用就是抵抗膨压和阻止渗透性裂解。用 AFM 对细菌细胞的膨压也得到了初步研究。Arnoldi 等^[46]用 AFM 研究得出了趋磁细菌格瑞菲斯瓦尔德磁螺菌的膨压在 85 ~ 150 kPa 范围内,并在理论上做了详尽的叙述与分析。Yao 等^[14]在不同的液体环境中测定了球状细菌肠球菌和杆状细菌铜绿假单胞菌的膨压。有的学者研究了外部气压对细菌的影响,Hult 等^[47]研究表明醋酸菌表面的微纤维聚合物在 30 个大气压的环境条件下变得更为粗大。

四、结论与展望

AFM 作为探测微生物表面结构形貌和获得弹性等信息的工具已在一定程度上成为现实。值得注意的是,用 AFM 获得了单个膜蛋白的构像变化,对于蛋白质的结构与功能的关系提供了新的手段;对于活的微生物细胞进行高分辨率进行成像虽然较为困难,但是已经获得了大量的结构和生理变化信息,特别是研究用变

性剂、抗生素、抗菌肽等处理后的微生物样品,对于探讨药剂的作用机理提供了更为直观的信息。如前所述,一个其他技术和方法不能媲美的 AFM 优点是可探测物体表面的物化性质、表面硬度和大分子的弹性等,从而更加地有助于人们理解细胞表面的功能。

然而,研究者还应该意识到 AFM 在微生物中应用是比较复杂的以及对图像解释需要较为专业的知识。现在还存在其他一些棘手的问题,一是 AFM 针尖在扫描时造成细胞的变形,降低了侧向分辨率以及引起了力曲线的变形。二是细胞在针尖和悬臂的侧向运动的作用力下可能发生移动,这就需要更为优化的微生物细胞固定方法。

总之,随之样品制备技术、成像条件和仪器设备的改善将使得 AFM 能更为简便地以高的分辨率实时观察生理状态下的微生物细胞、直接在微生物细胞表面原位观察构像变化、探测表面的物化性质及研究特异性分子间的相互作用。

参 考 文 献

- 1 Hüberle W, Hübner JKH, Binnig G. Force microscopy on living cells. *J Vac Sci Technol B*, 1991, 9:1210-1213.
- 2 Lister TE, Pinheiro PJ. In vivo atomic force microscopy of surface proteins on deinococcus radiodurans. *Langmuir*, 2001, 17:2624-2628.
- 3 van der Aa BC, Dufrene YF. In situ characterization of bacterial extracellular polymeric substances by AFM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 23:173-182.
- 4 Doktycz MJ, Sullivan CJ, Hoyt PR, et al. AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy*, 2003, 97:209-216.
- 5 Bolshakov AV, Kiselyova OI, Filonov AS, et al. Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy*, 2001, 86:121-128.
- 6 da Silva Jr. A, Teschke O. Effects of the antimicrobial peptide PGLa on live Escherichia coli. *Biochimica Biophysica Acta*, 2003, 1643:95-103.
- 7 Anderson RC, Haverkamp RG, Yu PL. Investigation of morphological changes to Staphylococcus aureus induced by ovine-derived antimicrobial peptides using TEM and AFM. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 240:105-110.
- 8 Braga PC, Ricci D. Atomic force microscopy: application to investigation of Escherichia coli morphology before and after exposure to cefodizime. *Antimicrob Agents Ch*, 1998, 42:18-22.
- 9 Velegol SB, Logan BE. Contributions of bacterial surface polymers, electrostatics, and cell elasticity to the shape of AFM force curves. *Langmuir*, 2002, 18:5256-5262.
- 10 Velegol SB, Pardi S, Li X, et al. AFM imaging artifacts due to bacterial cell height and AFM tip geometry. *Langmuir*, 2003, 19:851-857.
- 11 Burks GA, Velegol SB, Paramonova E, et al. Macroscopic and nanoscale measurements of the adhesion of bacteria with varying outer layer surface composition. *Langmuir*, 2003, 19:2366-2371.
- 12 Razatos A, Ong YL, Sharma MM, et al. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:11059-11064.
- 13 Abu-Lail NI, Camesano TA. Elasticity of Pseudomonas putida KT2442 surface polymers probed with single-molecule force microscopy. *Langmuir*, 2002, 18:4071-4081.
- 14 Yao X, Walter J, Burke S, et al. Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 23:213-230.
- 15 Boonaert CJP, Toniazzo V, Mustin C, et al. Deformation of Lactococcus lactis surface in atomic force microscopy study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 23:201-211.
- 16 Bruno C. van der Aa, Michel RM, Asther M, et al. Stretching cell surface macromolecules by atomic force microscopy. *Langmuir*, 2001, 17:3116-3119.

- 17 Pelling AE, Sehati S, Gralla EB, et al. Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 2004, 305:1147-1150.
- 18 Müller DJ, Baumeister W, Engel A. Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer of *Deinococcus radiodurans* monitored by atomic force microscopy. *J Bacteriol*, 1996, 178: 3025-3030.
- 19 Stark M, Müller C, Müller DJ, et al. From images to interactions: high-resolution phase imaging in tapping-mode atomic force microscopy. *Biophys J*, 2001, 80:3009-3018.
- 20 Sleytr UB, Sára M, Pum D, et al. Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Prog Surf Sci*, 2001, 68: 231-278.
- 21 Scheuring S, Müller DJ, Stahlberg H, et al. Sampling the conformational space of membrane protein surfaces with the AFM. *Eur Biophys J*, 2002, 31:172-178.
- 22 Heymann JB, Müller C, Müller DJ. Sampling effects influence heights measured with atomic force microscopy. *J Microsc*, 2002, 207:43-51.
- 23 Persike N, Pfeiffer M, Guckenberger R, et al. Direct observation of different surface structures on high-resolution images of native halorhodopsin. *J Mol Biol*, 2001, 310:773-780.
- 24 Meier T, Matthey U, Henzen F, et al. The central plug in the reconstituted undecameric C cylinder of a bacterial ATP synthase consists of phospholipids. *FEBS Lett*, 2001, 505:353-356.
- 25 Müller DJ, Baumeister W, Engel A. Controlled unzipping of a bacterial surface layer with atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:13170-13174.
- 26 Oesterhelt F, Oesterhelt D, Pfeiffer M, et al. Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science*, 2000, 288:143-146.
- 27 van der Aa BC, Asther M, Dufrêne YF. Surface properties of *Aspergillus oryzae* spores investigated by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 24:277-284.
- 28 Dufrêne YF, Boonaert CJP, Gerin PA, et al. Direct probing of the surface ultrastructure and molecular interactions of dormant and germinating spores of *phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol*, 1999, 181:5350-5354.
- 29 Ahimou F, Touhami A, Dufrêne YF. Real-time imaging of the surface topography of living yeast cells by atomic force microscopy. *Yeast*, 2003, 20:25-30.
- 30 Amro NA, Kotra LP, Wadu-Mesthrige K, et al. High-resolution atomic force microscopy studies of the *Escherichia coli* outer membrane: structural basis for permeability. *Langmuir*, 2000, 16:2789-2796.
- 31 Liu P, Liu Y, Lu ZX, et al. Study on biological effect of La^{3+} on *Escherichia coli* by atomic force microscopy. *J Inorg Biochem*, 2004, 98:68-72.
- 32 Dufrêne YF, Boonaert CJP, van der Mei HC, et al. Probing molecular interactions and mechanical properties of microbial cell surfaces by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 2001, 86:113-120.
- 33 Beech IB, Smith JR, Steele AA, et al. The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 23:231-247.
- 34 Kolari M, Schmidt U, Kuismanen E, et al. Firm but slippery attachment of *Deinococcus geothermalis*. *J Bacteriol*, 2002, 184: 2473-2480.
- 35 Hanna A, Berg M, Stout V, et al. Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb*, 2003, 69:4474-4481.
- 36 Schaer-Zammaretti P, Ubbink J. Imaging of lactic acid bacteria with AFM—elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy*, 2003, 97:199-208.
- 37 Wang J, Huang N, Yang P, et al. The effects of amorphous carbon films deposited on polyethylene terephthalate on bacterial adhesion. *Biomaterials*, 2004, 25:3163-3170.
- 38 Abu-Lail NI, Camesano TA. Role of lipopolysaccharides in the adhesion, retention, and transport of *Escherichia coli* JM109. *Environ Sci Technol*, 2003, 37:2173-2183.
- 39 van der Mei HC, Busscher HJ, Bos R, et al. Direct probing by atomic force microscopy of the cell surface softness of a fibrillated and nonfibrillated oral streptococcal strain. *Biophys J*, 2000, 78:2668-2674.
- 40 Touhami A, Nysten B, Dufrêne YF. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. *Langmuir*, 2003, 19:4539-4543.
- 41 Yao X, Jericho M, Pink D, et al. Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy. *J Bacteriol*, 1999, 181:6865-6875.
- 42 Xu W, Mulhern PJ, Blackford BL, et al. Modeling and measuring the elastic properties of an archaeal surface, the sheath of *methanospirillum hungatei*, and the implication for methane production. *J Bacteriol*, 1996, 178:3106-3112.

- 43 Philippsen A, Im W, Engel A, et al. Imaging the electrostatic potential of transmembrane channels: atomic probe microscopy of OmpF porin. *Biophys J*, 2002, 82:1667-1676.
- 44 Camesano TA, Logan BE. Probing bacterial electrosteric interactions using atomic force microscopy. *Environ Sci Technol*, 2000, 34:3354-3362.
- 45 Steinberger RE, Allen AR, Hansma HG, et al. Elongation correlates with nutrient deprivation in *Pseudomonas aeruginosa*-unsaturated biofilms. *Microb Ecol*, 2002, 43:413-423.
- 46 Arnoldi M, Fritz M, Bauerlein E, et al. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys Rev E*, 2000, 62:1034-1044.
- 47 Hult EL, Yamanaka S, Ishihara M, et al. Aggregation of ribbons in bacterial cellulose induced by high pressure incubation. *Carbohydr Polym*, 2003, 53:9-14.

(收稿日期:2006-12-14)

(本文编辑:成军)