

原子力显微镜 (AFM) 在细菌生物被膜研究中的应用

杨闪闪, 黄巧云, 蔡鹏

华中农业大学 资源与环境学院 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070

杨闪闪, 黄巧云, 蔡鹏. 原子力显微镜 (AFM) 在细菌生物被膜研究中的应用. 生物工程学报, 2017, 33(9): 1399-1410.
Yang SS, Huang QY, Cai P. Application of atomic force microscopy (AFM) to study bacterial biofilms. Chin J Biotech, 2017, 33(9): 1399-1410.

摘要: 原子力显微镜 (AFM) 作为一项重要的表面可视化技术, 以其独特的优势 (纳米级的空间分辨率、皮牛级灵敏度、免标记、可在溶液环境下工作) 被广泛应用于生物被膜的研究。AFM 不仅可以在近生理环境下对生物被膜表面超微形貌进行可视化表征, 同时还可以通过纳米压痕对生物被膜的机械特性 (弹性和粘性) 进行定量测量, 利用 AFM 单细胞和单分子力谱技术可以获得生物被膜形成过程中细胞-基底以及细胞-细胞之间的相互作用力, 为生物被膜的实时原位系统研究提供了可行性。本文简述了 AFM 的基本操作原理, 综述了近年来 AFM 用于生物被膜表面超微结构成像、机械特性测量以及相互作用力研究方面的进展, 并对 AFM 在生物被膜研究中面临的问题和未来的发展方向进行了讨论。

关键词: 原子力显微镜, 细菌生物被膜, 超微形貌, 机械特性, 相互作用力

Application of atomic force microscopy (AFM) to study bacterial biofilms

Shanshan Yang, Qiaoyun Huang, and Peng Cai

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Resource and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: Because of the nanometre resolution, piconewton force sensitivity, label-free technique and the ability to operate in liquid environments, atomic force microscopy (AFM) has emerged as a powerful tool to explore the biofilm development processes. AFM provides three-dimensional topography and structural details of biofilm surfaces under *in-situ* conditions. It also helps to generate key information on the mechanical properties of biofilm surfaces, such as elasticity and stickiness. Additionally, single-molecule and single-cell force spectroscopies can be applied to measure the strength of adhesion, attraction, and repulsion forces between cell-solid and cell-cell surfaces. This paper outlined the basic principle

Received: May 9, 2017; **Accepted:** July 27, 2017

Supported by: National Key Research Program of China (No. 2016YFD0800206), National Natural Science Foundation of China (No. 41522106).

Corresponding author: Peng Cai. Tel/Fax: +86-27-87288618; E-mail: cp@mail.hzau.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2016YFD0800206), 国家自然科学基金 (No. 41522106) 资助。

网络出版时间: 2017-08-24

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170824.0943.001.html>

of AFM technique and introduced recent advances in the application of AFM for the investigation of ultra-morphological, mechanical and interactive properties of biofilms. Furthermore, the existing problems and future prospects were discussed.

Keywords: atomic force microscopy (AFM), bacterial biofilms, ultra-morphology, mechanical properties, interaction forces

生物被膜是微生物通过表面粘附,由自身分泌的胞外聚合物包裹形成的微生物聚集体,是环境微生物存在的主要形式^[1-2]。细菌在固相表面形成生物被膜一般依次经历以下5个阶段:细菌运移、初始粘附、微菌落形成、生物被膜成熟和脱落^[3]。目前,生物被膜的可视化研究主要依赖于各种成像技术,如激光共聚焦显微镜(CLSM)、原子力显微镜(AFM)、扫描电子显微镜(SEM)等各种显微成像技术^[4]。AFM作为一项重要的表面探测技术,具有纳米级的空间分辨率和皮牛级力灵敏度^[5],可在溶液环境下监测,不需要对细胞进行固定、标记、染色等预处理^[6],这使其特别适合于探测复杂的生物体系如生物被膜。自AFM出现以来,已在生物被膜研究方面得到了广泛应用,如生物被膜的超微结构成像^[7-9]、机械特性测量^[10-11]、膜表面大分子的原位成像与机械特性表征^[12-13]、单分子力谱^[14]、单细胞力谱^[15]等。尤其是近年来,AFM的性能不断增强,如高速扫描AFM使得获取一幅图像的时间降至毫秒级^[16],峰值力轻敲成像模式可以同时获取多个反映样本物理特性的参数(如形貌、能量耗散、弹性模量、粘附力、形变等)^[17],多频AFM技术则可对细胞内部结构进行成像^[18],这些技术的进步提升了AFM在生物被膜研究中的应用能力。基于此,本文在介绍AFM成像与力曲线测量原理的基础上,总结了近年来AFM在生物被膜表面超微形貌成像、机械特性测量、生物被膜内细胞-基底以及细胞-细胞相互作用力方面的进展,并对AFM研究中面对的困难和未来的发展方向进行了讨论。

1 AFM 简介

AFM 主要有激光发生器、附有针尖的微悬臂、压电陶瓷扫描器、反射镜、四象限光电检测器以及反馈控制系统等6部分构成(图1A)。力敏感弹性微悬臂一端固定,另一端附有微小的针尖,当针尖对固定的样品进行扫描时,针尖-样品间相互作用力会引起微悬臂变形,由激光源发出的一束激光照射到微悬臂的背面,经反光镜反射到光电检测器上,通过反馈控制系统即可记录样品的表面形貌或样品-针尖间作用力等方面的信息^[5,19-21]。可用于样品表面成像^[22]、机械特性测量^[23]、相互作用力^[24]等方面的研究。

1.1 超微结构成像原理

AFM 成像模式主要有接触模式和轻敲模式两种。在接触模式下,探针针尖与样品之间的相互作用力(即悬臂梁形变量)保持恒定;在轻敲模式下,探针振动的振幅保持恒定。对于细菌样品,目前最常用的AFM成像模式是轻敲模式^[9],特别是在生物被膜成像、膜表面大分子高分辨率原位成像^[25]等方面,轻敲模式横向剪切力小且有助于获得高分辨率图像。

1.2 AFM 力曲线测量原理

AFM 探针相对于样品在 z 方向做逼近-回退的往复运动的过程中,通过记录微悬臂偏转量以及扫描管的位移量,根据胡克定理可绘制样品与针尖之间的作用力随扫描管位置变化曲线,简称力曲线(图1B)。力曲线的具体物理意义为:探针未接触样品时,探针针尖与样品之间没有作用

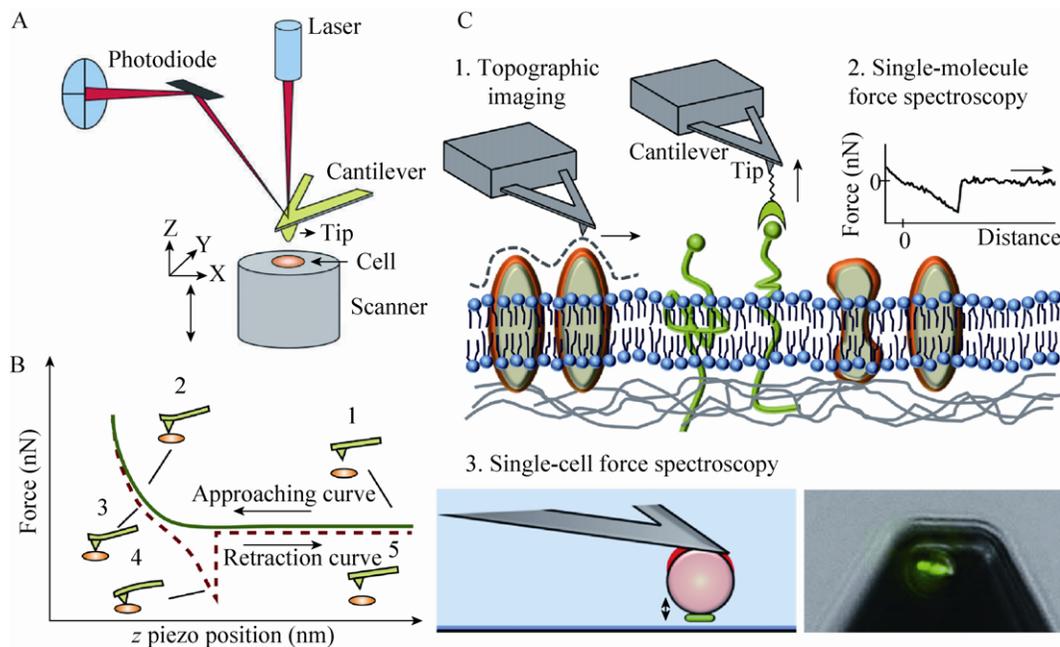


图 1 AFM 结构、成像以及力曲线测量原理^[5-6]

Fig. 1 The principle of AFM imaging and cellular mechanical properties measurement. (A) The main components of AFM. (B) A schematic diagram of an idealised force-distance curve. (C1) The tip scans the cell surface in buffer with nanometer-scale resolution. (C2) The small interaction force between the tip and cell surface molecules and the tip is generally labeled with a ligand to detect, localize, and manipulate individual receptors. (C3) Single-cell force spectroscopy involves attaching a single live cell to the AFM cantilever, for instance using a colloidal probe coated with bioinspired polydopamine polymers^[5-6].

力, 探针受力为零, 悬臂梁初始形变量为零, 此过程在力曲线上表现为一条水平基线 (图 1B, 过程 1); 针尖接触并对样品进行挤压时, 微悬臂受样品排斥作用而发生向上偏转, 直至达到偏转阈值, 此过程在力曲线上表现为排斥力逐渐增大 (图 1B, 过程 2); 微悬臂达到偏转阈值后, 探针开始逐渐趋离样品, 由于微悬臂仍受斥力, 所以该过程在力曲线上表现为排斥力逐渐减小 (图 1B, 过程 3); 当微悬臂向上的偏转量减小为零后, 探针与样品之间的作用力由排斥力(正值)变为粘滞力(负值), 此时微悬臂向下偏转直到克服最大粘滞力

而脱离样品表面后偏转恢复为零, 该过程在力曲线上表现为向下的峰 (图 1B, 过程 4); 之后针尖已完全脱离样品, 探针针尖与样品之间没有作用力, 在探针进一步回退过程中微悬臂受力为零, 该过程在力曲线上表现为一条水平基线 (图 1B, 过程 5)。通过对该力曲线进行校正和模型分析, 可以得到样品的弹性和粘性等一系列机械特性^[26-28]; 将特定的生物大分子如凝集素连接到 AFM 扫描探针的尖端, 制备分子或单分子探针 (图 1C-2), 借助生物大分子之间特异性 (配体-受体) 的相互作用, 可以对生物被膜表面的某些大分

子(蛋白、多糖、DNA等)定位^[5,12],定量分析生物被膜中分子与分子以及分子与细胞之间的作用力^[27];同样的,将细菌细胞固定在AFM扫描探针的尖端,制备细胞或单细胞探针(图1C-3),可以在细胞水平定量分析生物被膜形成过程中细胞-基底以及细胞-细胞之间的相互作用力^[29,30]。

2 生物被膜的超微形貌成像

利用AFM对细胞超微形貌进行成像包括在空气中成像和在溶液中成像两种方式^[31]。在空气中对生物被膜进行成像时,干燥过程使生物被膜失去水分而变得坚硬,因此成像空间分辨率较高^[7]。例如,Oh等^[32]在空气中对聚丙烯材料表面不同形成时间的生物被膜进行AFM成像,观察到培养3d的生物被膜细胞成簇状分布,胞外聚合物围绕细胞存在。Volle等^[33]对5种细菌进行AFM成像,观察到枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*、恶臭假单胞菌*Pseudomonas putida*、大肠杆菌*Escherichia coli* ZK1056生物被膜细胞表面有约1 μm长的菌毛和约8 μm长的鞭毛,而*E. coli* ML35的生物被膜细胞没有鞭毛但有约4 μm长的菌毛,藤黄微球菌*Micrococcus luteus*生物被膜细胞既没有鞭毛也没有菌毛。利用AFM研究单物种生物被膜和多物种生物被膜的结构差异,Feng等^[34]发现空肠弯曲杆菌*Campylobacter jejuni* F38011与其他细菌(金黄色葡萄球菌*Staphylococcus aureus*、肠道沙门氏菌*Salmonella enterica*、铜绿假单胞菌*Pseudomonas aeruginosa*)混合培养形成的生物被膜中细胞排列更紧凑,表面粗糙度不到*C. jejuni*生物被膜的1/8。通过对紫色色杆菌*Chromobacterium violaceum* ATCC 31532野生株和缺失信号分子

释放能力的*C. violaceum* NCTC 13274突变株形成的生物被膜进行AFM成像,Kamaeva等^[35]发现野生株生物被膜细胞表面存在大量的胞质膜内陷结构,而突变株表面则非常光滑,表明*C. violaceum*通过胞质膜内陷结构接收和释放信号分子,调控生物被膜的形成。空气中对生物被膜进行成像虽有助于认识细胞表面的超微形貌,但将生物被膜细胞暴露在空气中会不可避免地导致细胞本身结构的改变,从而给成像结果的解释带来困难^[22]。此外,空气中成像获得的通常是静态图像,不能获取生物被膜形成过程中表面超微结构动态变化的信息^[36]。在溶液环境下对细胞进行AFM成像时,首先需要将细胞固定到基底^[7]。为了增强生物被膜细胞与基底之间的粘附效果,可在基底表面覆盖一层带正电荷的高分子聚合物,通过静电吸附作用固定细胞,但交联剂的引入可能会对细胞的生长及结构产生影响^[37]。Liu等^[38]利用AFM在生理条件下成功地实现了纳米尺度生物被膜形成过程的原位实时追踪(图2),并从纳米力学的角度划分了生物被膜形成的不同阶段。Li等^[39]利用同样的方法原位监测嗜热硫酸化硫杆菌*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*在黄铁矿表面成膜的动态过程,发现成膜初期细菌通过释放胞外聚合物在基底形成一层条件膜促进细胞的初始粘附,并观测在生物被膜形成中过程不断有新合成的小尺寸矿物形成且均匀分布在生物被膜周围。Huang等^[40]利用AFM发现,相对于富营养的LB培养基,土壤矿物(蒙脱石、高岭石、针铁矿)表面的细菌(*E. coli* TG1, *B. subtilis* 168, *P. putida* KT2440, 根癌农杆菌*Agrobacterium tumefaciens* EHA105)在贫营养的M9培养基中更易形成生物被膜。

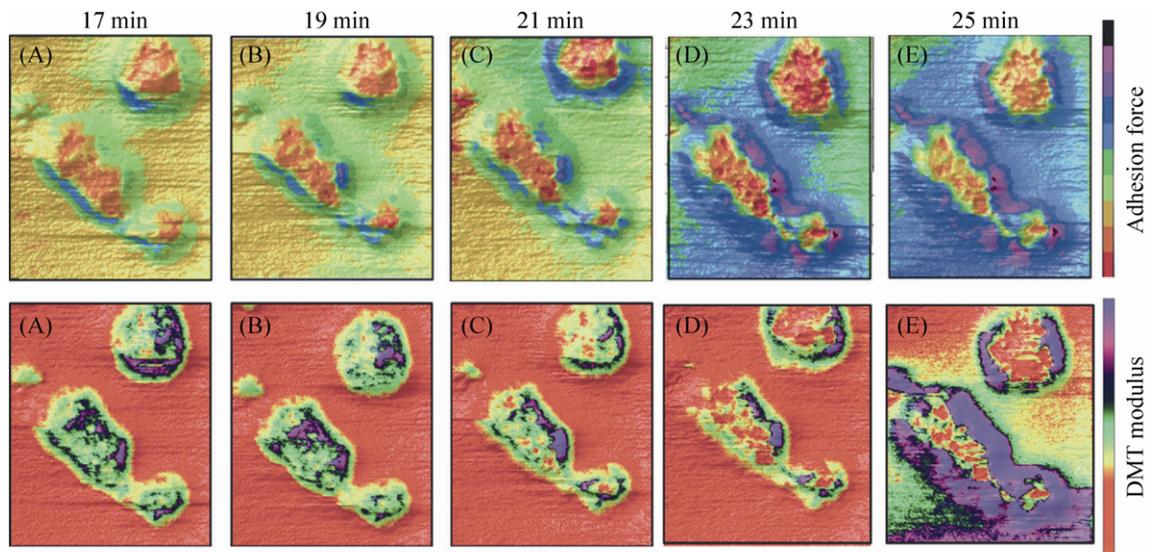


图 2 不同时间尺度下 *S. mutans* 初期生物被膜的 AFM 成像^[38]

Fig. 2 *In-situ*, time-lapse ($t=17, 19, 21, 23, 25$ min) AFM measurements on adhesion force (up) and DMT elastic modulus (down) of *S. mutans* biofilm at the initial attachment stage. Scan size = $1.7 \mu\text{m} \times 1.7 \mu\text{m}$ ^[38].

由于 AFM 本身不具有特异性识别能力, 使得大部分情况下仅从 AFM 图像中难以辨识出人们感兴趣的细胞精细结构, 因此研究人员大多借助特定化学或生物分子修饰的 AFM 探针, 利用生物大分子之间特异性的抗原-抗体作用对细胞表面特定生物分子的分布、结构和机械特性进行研究 (图 3)^[5,41]。例如, 利用外源凝集素与菌体表面碳水化合物特异性结合的特性, Fahs 等^[13]用 3 种不同类型凝集素 (刀豆素、麦胚素以及来自 *P. aeruginosa* PAO1 的外源凝集素) 修饰的探针对荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* CIP 生物被膜表面的多糖进行组分鉴定, 发现培养 24 h 的生物被膜中含有大量由葡萄糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺等单糖分子组成的多糖, 利用虫链模型拟合修饰的探针与多糖分子之间的力曲线, 推断出这些多糖组分可能与 EPS 的多肽组分相关联。Quiles 等^[42]对 LB 中培养 3 h 和 24 h

的 *P. fluorescens* 胞外糖原进行成像分析, 结果显示培养 3 h 样品的成像区内有 80% 的区域检测不到糖原的存在, 而培养 24 h 样品的成像区内这一数值降到了 7%, 证明在没有生长压力的情况下细菌也可以产生大量的糖原; 进一步分析探针与糖原之间的力曲线发现, 随着培养时间的增加, 糖原分子通过增加糖链的长度和支链的数量

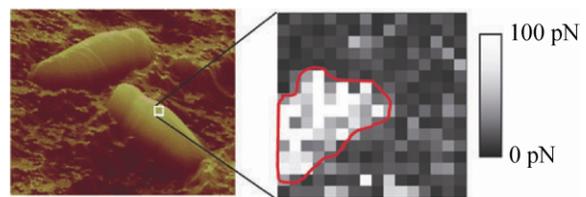


图 3 活细胞表面的分子识别位点成像^[5]

Fig. 3 Mapping molecular recognition sites on living cells. Topographic image (left) showing two living mycobacteria on a polymer support and adhesion force map (right) recorded on a single cell with a heparin-modified tip^[5].

完成胞外多糖的积累。Francius 等^[41]分别对鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG 野生株和突变株表面的半乳糖和甘露糖进行分布成像。结果发现与野生型菌株相比,突变型菌体表面多糖的粘附性、多糖分子长度及菌体表面两种多糖分子的密度都大大降低。

3 生物被膜的机械特性

生物被膜的机械特性(如硬度、粘弹性)在膜的形成和空间结构的稳定性中起着重要作用^[43]。在不利的生存环境下如干燥、抗生素处理或水流冲击,细菌通过释放胞外聚合物增加自身的粘性,使细胞更易在基底形成生物被膜进而保护自身细胞^[26],或通过增加自身的硬度来抵抗剪切力的伤害^[44]。Oh 等^[45]利用 AFM 研究养分对生物被膜形成的影响,纳米压痕的结果显示,探针和生物被膜表面的粘性随培养时间的延长而逐渐增加,表明随着生物被膜的成熟,细胞开始释放胞外聚合物并在生物被膜表面积累;且低养分条件下 *E. coli* O157:H7 生物被膜的粘性要大于营养丰富条件下形成的生物被膜。对革兰氏阳性菌(*B. subtilis*、*M. luteus*)和革兰氏阴性菌(*E. coli* ML35、*E. coli* ZK1056、*P. putida*)生物被膜的机械特性测定结果显示,革兰氏阳性菌形成的生物被膜粘弹性要大于革兰氏阴性菌细胞,这主要是由于两种类型细菌的细胞壁结构不同所致^[33](革兰氏阳性菌的细胞壁是由一层厚而致密的肽聚糖和磷壁酸组成,革兰氏阴性菌的细胞壁较薄,只含有少量的肽聚糖)^[46]。游离态细胞由于缺少 EPS,其与探针之间的作用力要明显小于探针与生物被膜之间的作用力^[47]。Nunez 等^[48]利用 AFM 研究 *E. coli* 生物被膜受蛭弧菌 *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J 攻击前后的生理

变化,AFM 超微结构成像显示,*B. bacteriovorus* 入侵后 *E. coli* 生物被膜中细胞由棒状变为球形,表面纹理变小并且可以观察到入侵 *E. coli* 细胞的 *B. bacteriovorus* 在细胞内的生长圈,正常 *E. coli* 细胞的硬度是 *B. bacteriovorus* 感染细胞的 3 倍,感染细胞与 AFM 探针之间的粘附力远大于正常细胞。Li 等^[39]利用 AFM 测定了黄铁矿表面 *S. thermosulfidooxidans* 生物被膜的表面粘性,发现生物被膜表面粘性大小分布很不均一,细胞与细胞以及细胞与基底接触处的粘性较其他区域的大,这可能是由于 EPS 优先在这些区域积累导致的。在不同的温度(28、33、37、42 °C)条件下,生物被膜的粘性也不一样,*P. aeruginosa* 在 37 °C 时粘性最大((10.8±0.2) pN/nm),而此时生物被膜中胞外聚合物的量也最多^[49]。Quiles 等^[50]将 AFM 与傅里叶全反射红外光谱(ATR-FTIR)结合评价抗菌肽的杀菌效果,纳米压痕的结果显示,低浓度(12.5 mg/L)处理后,*P. fluorescens* 生物被膜中细胞的高度(由 200 降到 125 nm)和弹性都减小(由 0.018 降到 0.015 pN/nm),高浓度(100 mg/L)处理后,细胞高度(400 nm)和弹性(0.061 pN/nm)都增加且都高于未经处理的细胞;结合 ATR-FTIR 指纹图谱的信息,作者认为在低浓度时细胞吸附抗菌肽的同时也分解磷脂双分子层,从而导致膜的通透性增加,弹性减弱;高浓度时,大量吸附的抗菌肽代替磷脂阻塞了由于分解出现的孔洞,反而使细胞的通透性降低,弹性增强;上述结果表明低浓度的抗菌肽具有更强的杀菌效果。

4 生物被膜形成过程中的作用力

在生物被膜形成过程中,细菌利用细胞表面的大分子或释放到胞外的聚合物如多糖、蛋白、

核酸和脂类等,使自身吸附在固相表面或将细胞聚集在一起,形成具有一定机械稳定性的三维空间结构体^[1]。细胞的初始吸附和聚集受各种分子间相互作用力的调控,包括特异性(如配体-受体之间的分子识别)和非特异性(如氢键、疏水作用力、范德华力、静电作用力等)的相互作用力^[51]。因此,了解生物被膜形成过程中的力学信息有助于我们更好地认识生物被膜的形成机理从而有效地调控和利用生物被膜。

4.1 细胞与基底的作用力

粘附是生物被膜形成的第一步也是最关键的步骤^[3]。AFM 单细胞探针测定的结果显示,乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 的 SdrC 蛋白过量表达细胞与甲基修饰的疏水性表面之间存在强的相互作用,大小在 5 000 到 20 000 pN 之间,而与羟基修饰的亲水表面或缺失 SdrC 蛋白突变株与疏水表面之间的作用力则都在 5 000 pN 以下,证实生物被膜形成初始阶段, SdrC 蛋白通过疏水作用调控细胞的粘附^[52]。利用相同的研究手段,Chatel 等^[53]发现 *P. fluorescens* 通过表面的 LapA 蛋白调控细胞在疏水表面上的粘附。Boks 等^[54]利用 AFM 研究 4 种表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis* 与亲水或疏水表面之间的相互作用,发现当接触时间小于 5 s 时,4 种细菌与两种类型表面之间的作用力都在 0.4 nN 左右,随着时间的增加,细胞与甲基修饰的疏水表面之间的作用力基本没有变化,作者认为这可能是由于疏水作用的时间较短,细菌借助疏水作用在短时间内克服细胞与表面之间的能障并迅速固定在基底;对于亲水的玻璃表面,细胞与之接触 10 s 后两者之间的作用显著增加,接触 60 s 时达到稳定,最大作用力为 1.9 nN,对探针与基

底分离时的力曲线进行泊松分析,发现 *S. epidermidis* 与亲水表面接触时,细胞主要是通过氢键作用(占总作用力的 80%)粘附在基底。Beaussart 等^[55]利用 AFM 定量评价 *P. aeruginosa* 四型菌毛在细菌吸附中的贡献,发现菌毛与疏水基底之间发生非配位相互作用。比较野生株和菌毛缺失突变株与玻璃基底之间的作用力,证实革兰氏阴性菌 (*E. coli*、*P. putida*) 主要是通过菌毛的非配位作用调控其在玻璃表面的粘附。Huang 等^[40]研究发现 *E. coli* TG1 与土壤矿物针铁矿之间存在强的相互作用,作用力大小为 97 pN。Lower 等^[56]利用 AFM 检测到希瓦氏菌 *Shewanella oneidensis* 在厌氧条件与针铁矿有较强的粘附力,通过将细胞与针铁矿相互作用的力谱图和针铁矿薄膜包被探针与重组 MtrC 或 OmcA 分子相互作用的力谱图进行比对,推知外膜多肽与针铁矿之间存在键合作用^[57]。Xu 等^[58]测定了 *E. coli* ZK1056 包被的悬臂梁和 5 种不同材质表面之间的作用力,发现悬臂梁与不同材料之间分离时,力的断裂距离与细胞表面菌毛的长度吻合,证明菌毛调控 *E. coli* ZK1056 在不同化学材料表面的粘附行为。Diao 等^[59]利用 AFM 研究了不同盐浓度下嗜酸氧化亚铁硫杆菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的粘附行为,发现不同盐浓度下胞外聚合物和细菌胞外附件如菌毛可通过调整自身的构象影响细菌在黄铜矿表面的粘附行为。

4.2 细胞与细胞的作用力

细胞与细胞之间的相互作用对于生物被膜的形成和 3D 结构的维持至关重要,同时还影响着生物被膜中细胞的存活、基因的表达、细胞的运动以及分化^[51]。在生物被膜形成过程中,细

菌通过膜表面的大分子或释放到胞外的多聚物(多糖、蛋白、核酸以及脂类等)将细胞聚集在一起,维持生物被膜结构的稳定性^[1]。三聚体自转运蛋白(TAAs)是革兰氏阴性菌如伯克霍尔德菌 *Burkholderia cepacia* 表面一种常见的蛋白, El-Kirat-Chatel 等^[60]利用 AFM 单分子力谱证实两个 TAAs 蛋白之间存在相互作用,力的大小为 118 pN;通过拟合不同加载力条件下的力曲线,发现 TAAs 蛋白之间存在弱的亲同性相互作用,推断细胞表面的 TAAs 蛋白通过亲同性相互作用参与调控 *B. cepacia* 生物被膜的形成。Feuille 等^[52]利用 AFM 单细胞探针技术研究 *L. lactis* 细胞表面蛋白 SdrC 在生物被膜形成过程中的作用,结果显示,两个过量表达 SdrC 的细胞之间接触 1 ms 后可检测到的最大粘附力为 98 pN,接触 100 s 后作用力增加到 230 pN,而接触相同时间的蛋白过表达细胞与蛋白缺失细胞以及两个蛋白缺失细胞之间均未检测到力的存在,证实 *L. lactis* 借助 SdrC 蛋白调控细胞-细胞之间的相互作用;单细胞探针技术分析两个野生型耐甲氧苯青霉素 *S. aureus* 细胞之间的相互作用,发现短时间接触后,记录的力曲线中有 8% 出现了 SdrC-SdrC 蛋白相互作用的特征峰,长时间接触后特征峰出现的概率增加到 29%,从而明确了 SdrC 蛋白在金黄色葡萄球生物被膜形成过程中的贡献。利用相似的研究方法, Bausier 等^[61]证实 *S. aureus* 表面的 FnBPA 蛋白参与调控生物被膜的形成,单细胞探针的结果显示,两个过量表达 FnBPA 蛋白的细胞之间的作用力大小为 800–2 000 pN;单分子探针的结果显示,单个 FnBPA 蛋白与过表达 FnBPA 的细胞之间的作用力大小为 125 pN,说明可能有多对 FnBPA 蛋白参与两个细胞之间的相互作用;利用 FnBPA 修

饰的单分子探针对细胞表面进行成像,通过分析得出蛋白过表达的细胞表面 FnBPA 密度约为 2 000 个/ μm^2 ,依据 Hertz 理论可知两个细胞的接触面积约为 0.004 μm^2 ,从而推算出约有 8 对 FnBPA 蛋白参与细胞间的相互作用;进一步分析细胞-细胞作用过程中的力曲线,作者最终提出有 10 对 FnBPA 蛋白参与两个 *S. aureus* 细胞间的相互作用。PIA 是一种存在于胞外聚合物中的阳离子多聚糖, Dague 等^[62]利用 AFM 单细胞探针技术证实其参与调控细胞-细胞间的相互作用,而且实验的结果显示,细胞间的作用力会随离子强度的增加而降低,当离子强度增加到 500 mmol/L 时,两个过表达 PIA 的 *S. epidermidis* 细胞间检测不到相互作用的力,表明 PIA 是通过静电作用参与调控生物被膜的形成。Vanzieleghem 等^[63]利用羧基修饰的探针对不同离子强度下表达 PIA 的 *S. epidermidis* 进行成像,发现在生理条件下 (pH 7.4),随着离子强度由 0.1 mmol/L 增加到 150 mmol/L,带负电荷的探针在细胞表面检测到力的概率由 79% 下降到零,可见离子强度通过改变细胞表面阳离子多聚糖的电荷性质影响生物被膜的形成。Dague 等^[64]发现在不含有 Zn^{2+} 的溶液中,两个 *S. aureus* 细胞之间发生相互作用的概率为 5%–31%,添加 Zn^{2+} 后这一概率增加到 80%–100%;利用 AFM 对细胞表面进行成像分析,结果显示添加 Zn^{2+} 后细胞表面变得更加平滑,弹性和粘性都明显增加,表明 Zn^{2+} 通过改变细胞表面大分子的空间结构来调控生物被膜形成过程中细胞-细胞之间的相互作用。

5 展望

AFM 的出现为纳米尺度下原位可视化表征

生物被膜表面超微形貌、定量研究生物被膜机械特性以及膜形成过程中细胞与基底、细胞与细胞之间的相互作用力提供了强有力的支撑,为深入开展生物被膜研究带来了新机遇。例如,在土壤学领域,土壤生物被膜可以增加群落整体对有毒有害物质的耐受性,避免原生动物的捕食,增加水平基因转移的频率等,开展土壤生物被膜的研究对于深入理解土壤生物过程的本质,更好地调控生物参与的养分循环、污染物降解和土壤健康具有重要意义。土壤生物被膜中微生物大多以多物种形式存在,利用 AFM 阐明生物被膜中关键物种之间的相互作用机制,对于认识和调控土壤生物被膜至关重要。但 AFM 在生物被膜研究中的应用目前仍面临如下诸多挑战: 1) 生物被膜组成非常复杂,除了细胞外还含有各种类型的生物大分子,目前的单分子探针技术只能对膜表面个别的多糖和蛋白进行定位分析。因此,应加快研发更多新的分子探针以及同时识别多种分子的探针,以实现纳米尺度下对生物被膜表面多种组分的同时识别、定位和成像。2) 样品机械特性的研究主要集中在弹性和粘性等表征,缺乏对力曲线数据的深度挖掘,应考虑与模拟生物学和数字信息技术相结合,以得到更多有价值的生物表面性质信息。3) AFM 仅能获得生物被膜表面的信息,难以对膜内不同深度的结构和化学信息进行探究。因此,AFM 需要与其他检测技术联合使用,目前 AFM 技术已与激光扫描共聚焦显微镜、荧光显微镜、透射电子显微镜、流式细胞术、拉曼显微镜等^[13,65]技术结合使用,多技术的联合将成为 AFM 技术的发展趋势。

REFERENCES

- [1] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(9): 623–633.
- [2] Sun XJ, Gao CH, Huang QY, et al. Multispecies biofilms in natural environments: an overview of research methods and bacterial social interactions. *J Agric Res Environ*, 2017, 34(1): 6–14 (in Chinese).
孙晓洁, 高春辉, 黄巧云, 等. 自然环境中的多物种生物膜: 研究方法及其社群相互作用. *农业资源与环境学报*, 2017, 34(1): 6–14.
- [3] Berk V, Fong JCN, Dempsey GT, et al. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science*, 2012, 337(6091): 236–239.
- [4] Chatterjee S, Biswas N, Datta A, et al. Atomic force microscopy in biofilm study. *Microscopy*, 2014, 63(4): 269–278.
- [5] Hinterdorfer P, Dufrêne YF. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2006, 3: 347–355.
- [6] Dufrêne YF. Atomic force microscopy in microbiology: new structural and functional insights into the microbial cell surface. *mBio*, 2014, 5(4): e01363–14.
- [7] Wright CJ, Shah MK, Powell LC, et al. Application of AFM from microbial cell to biofilm. *Scanning*, 2010, 32(3): 134–149.
- [8] Tsofigkas AH, Bowen J, Winn M, et al. Characterisation of spin coated engineered *Escherichia coli* biofilms using atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, 89: 152–160.
- [9] Dorobantu LS, Goss GG, Burrell RE. Atomic force microscopy: a nanoscopic view of microbial cell surfaces. *Micron*, 2012, 43(12): 1312–1322.
- [10] Arce FT, Carlson R, Monds J, et al. Nanoscale Structural and mechanical properties of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *J Bacteriol*, 2009, 191(8): 2512–2520.
- [11] Safari A, Habimana H, Allen A. The significance of calcium ions on *Pseudomonas fluorescens* biofilms—a structural and mechanical study. *Biofouling*, 2014, 30(7): 859–869.
- [12] Formosa C, Lachaize V, Galés C, et al. Mapping

- HA-tagged protein at the surface of living cells by atomic force microscopy. *J Mol Recognit*, 2015, 28(1): 1–9.
- [13] Fahs A, Quilès F, Jamal D, et al. *In situ* analysis of bacterial extracellular polymeric substances from a *Pseudomonas fluorescens* biofilm by combined vibrational and single molecule force spectroscopies. *J Phys Chem B*, 2014, 118(24): 6702–6713.
- [14] El-Kirat-Chatel S, Boyd CD, O'Toole GA, et al. Single-molecule analysis of *Pseudomonas fluorescens* footprints. *ACS Nano*, 2014, 8(2): 1690–1698.
- [15] Beaussart A, El-Kirat-Chatel S, Sullan RM, et al. Quantifying the forces guiding microbial cell adhesion using single-cell force spectroscopy. *Nat Protoc*, 2014, 9(5): 1049–1055.
- [16] Ando T. High-speed AFM imaging. *Curr Opin Struct Biol*, 2014, 28: 63–68.
- [17] Dufrêne YF, Martínez-Martín D, Medalsy I, et al. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. *Nat Methods*, 2013, 10(9): 847–854.
- [18] Scheuring S, Dufrêne YF. Atomic force microscopy: probing the spatial organization, interactions and elasticity of microbial cell envelopes at molecular resolution. *Mol Microbiol*, 2010, 75(6): 1327–1336.
- [19] Cappella B, Dietler G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surf Sci Rep*, 1999, 34(1/3): 1–3, 5–104.
- [20] Butt HJ, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: technique, interpretation and applications. *Surf Sci Rep*, 2005, 59(1/6): 1–152.
- [21] Wu HY, Huang QY, Cai P, et al. Application of Atomic Force Microscopy (AFM) in studies of bacterial adhesion on solid surfaces. *Chin J Appl Environ Biol*, 2010, 16(4): 596–602 (in Chinese). 吴华勇, 黄巧云, 蔡鹏, 等. 原子力显微镜技术在固相表面细菌吸附研究中的应用. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(4): 596–602.
- [22] Baniasadi M, Xu Z, Gandee L, et al. Nanoindentation of *Pseudomonas aeruginosa* bacterial biofilm using atomic force microscopy. *Mater Res Express*, 2014, 1(4): 045411.
- [23] Daniels SL, Pressman JG, Wahman DG. AFM structural characterization of drinking water biofilm under physiological conditions. *J Microbiol Meth*, 2016, 6(7): 5812–5816.
- [24] Harimawan A, Rajasekar A, Ting YP. Bacteria attachment to surfaces-AFM force spectroscopy and physicochemical analyses. *J Colloid Interface Sci*, 2011, 364(1): 213–218.
- [25] Heinisch JJ, Lipke PN, Beaussart A, et al. Atomic force microscopy-looking at mechanosensors on the cell surface. *J Cell Sci*, 2012, 125(18): 4189–4195.
- [26] Shen Y, Huang CH, Monroy GL, et al. Response of simulated drinking water biofilm mechanical and structural properties to long-term disinfectant exposure. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(4): 1779–1787.
- [27] Yu XT, Yang ZB, Wang XY, et al. AFM single molecule force spectroscopy and recent progress of its applications in the study of biomolecules on live mammalian, bacterial and fungal cell surfaces. *Prog Biochem Biophys*, 2016, 43(1): 28–43 (in Chinese). 于小婷, 杨忠波, 王鑫艳, 等. AFM 单分子力谱技术及其在活体细胞和菌体表面生物大分子研究中的最新进展. *生物化学与生物物理进展*, 2016, 43(1): 28–43.
- [28] Hirai N, Mun MK, Masuda T, et al. Atomic force microscopy analysis of biofilms formed on different plastics. *Mater Technol*, 2014, 30(S5): B57-B60.
- [29] Ozkan AD, Topal AE, Dana A, et al. Atomic force microscopy for the investigation of molecular and cellular behavior. *Micron*, 2016, 89: 60–76.
- [30] Sheng XX, Ting YP, Pehkonen SO. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. *J Colloid Interface Sci*, 2007, 310(2): 661–669.
- [31] Beech IB, Smith JR, Steele AA, et al. The use of atomic force microscopy for studying interactions

- of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2002, 23(2/3): 231–247.
- [32] Oh YJ, Lee NR, Jo W, et al. Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 2009, 109(8): 874–880.
- [33] Volle CB, Ferguson MA, Aidala KE, et al. Spring constants and adhesive properties of native bacterial biofilm cells measured by atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2008, 67(1): 32–40.
- [34] Feng JS, Lamour G, Xue R, et al. Chemical, physical and morphological properties of bacterial biofilms affect survival of encased *Campylobacter jejuni* F38011 under aerobic stress. *Int J Food Microbiol*, 2016, 238: 172–182.
- [35] Kamaeva AA, Vasilchenko AS, Deryabin DG. Atomic force microscopy reveals a morphological differentiation of *chromobacterium violaceum* cells associated with biofilm development and directed by N-hexanoyl-L-homoserine lactone. *PLoS ONE*, 2014, 9(8): e103741.
- [36] Mathieu L, Bertrand I, Abe Y, et al. Drinking water biofilm cohesiveness changes under chlorination or hydrodynamic stress. *Water Res*, 2014, 55: 175–184.
- [37] Krapf MEM, Lartiges BS, Merlin C, et al. Polyethyleneimine-mediated flocculation of *Shewanella oneidensis* MR-1: impacts of cell surface appendage and polymer concentration. *Water Res*, 2012, 46(6): 1838–1846.
- [38] Liu BH, Yu LC. *In-situ*, time-lapse study of extracellular polymeric substance discharge in *Streptococcus mutans* biofilm. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 150: 98–105.
- [39] Li Q, Sand W. Mechanical and chemical studies on EPS from *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: from planktonic to biofilm cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 153: 34–40.
- [40] Huang QY, Wu HY, Cai P, et al. Atomic force microscopy measurements of bacterial adhesion and biofilm formation onto clay-sized particles. *Sci Rep*, 2015, 5: 16857.
- [41] Francius G, Lebeer S, Alsteens D, et al. Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria. *ACS Nano*, 2008, 2(9): 1921–1929.
- [42] Quilès F, Polyakov P, Humbert F, et al. Production of extracellular glycogen by *Pseudomonas fluorescens*: spectroscopic evidence and conformational analysis by biomolecular recognition. *Biomacromolecules*, 2012, 13(7): 2118–2127.
- [43] Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(3): 199–210.
- [44] Abe Y, Skali-Lami S, Block JC, et al. Cohesiveness and hydrodynamic properties of young drinking water biofilms. *Water Res*, 2012, 46(4): 1155–1166.
- [45] Oh YJ, Jo W, Yang Y, et al. Influence of culture conditions on *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 2007, 107(10/11): 869–874.
- [46] Tripathi P, Beaussart A, Andre G, et al. Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron*, 2012, 43(12): 1323–1330.
- [47] Diao MX, Taran E, Mahler S, et al. Quantifying adhesion of acidophilic bioleaching bacteria to silica and pyrite by atomic force microscopy with a bacterial probe. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 115: 229–236.
- [48] Núñez ME, Martin MO, Chan PH, et al. Predation, death, and survival in a biofilm: *Bdellovibrio* investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005, 42(3/4): 263–271.
- [49] Kannan A, Gautam P. A quantitative study on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Springerplus, 2015, 4: 379.
- [50] Quilès F, Saadi S, Francius G, et al. *In situ* and real time investigation of the evolution of a *Pseudomonas fluorescens* nascent biofilm in the presence of an antimicrobial peptide. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1858(1): 75–84.
- [51] Busscher HJ, Norde W, van der Mei HC. Specific molecular recognition and nonspecific

- contributions to bacterial interaction forces. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(9): 2559–2564.
- [52] Feuillie C, Formosa-Dague C, Hays LMC, et al. Molecular interactions and inhibition of the staphylococcal biofilm-forming protein SdrC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(14): 3738–3743.
- [53] El-Kirat-Chatel S, Beaussart A, Boyd CD, et al. Single-cell and single-molecule analysis deciphers the localization, adhesion, and mechanics of the biofilm adhesin LapA. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(2): 485–494.
- [54] Boks NP, Busscher HJ, van der Mei HC, et al. Bond-strengthening in staphylococcal adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces using atomic force microscopy. *Langmuir*, 2008, 24(22): 12990–12994.
- [55] Beaussart A, Baker AE, Kuchma SL, et al. Nanoscale adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *ACS Nano*, 2014, 8(10): 10723–10733.
- [56] Lower SK, Hochella MF, Beveridge TJ. Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between *Shewanella* and α -FeOOH. *Science*, 2001, 292(5520): 1360–1363.
- [57] Lower HB, Shi L, Yongsunthorn R, et al. Specific bonds between an iron oxide surface and outer membrane cytochromes MtrC and OmcA from *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol*, 2007, 189(13): 4944–4952.
- [58] Xu H, Murdaugh AE, Chen W, et al. Characterizing pilus-mediated adhesion of biofilm-forming *E. coli* to chemically diverse surfaces using atomic force microscopy. *Langmuir*, 2013, 29(9): 3000–3011.
- [59] Diao MX, Nguyen TAH, Taran E, et al. Effect of energy source, salt concentration and loading force on colloidal interactions between *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells and mineral surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 132: 271–280.
- [60] El-Kirat-Chatel S, Mil-Homens D, Beaussart A, et al. Single-molecule atomic force microscopy unravels the binding mechanism of a *Burkholderia cenocepacia* trimeric autotransporter adhesin. *Mol Microbiol*, 2013, 89(4): 649–659.
- [61] Herman-Bausier P, El-Kirat-Chatel S, Foster TJ, et al. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein a mediates cell-cell adhesion through low-affinity homophilic bonds. *Microbiology*, 2015, 6(3): e00413–415.
- [62] Formosa-Dague C, Feuillie C, Beaussart A, et al. Sticky matrix: adhesion mechanism of the staphylococcal polysaccharide intercellular adhesin. *ACS Nano*, 2016, 10(3): 3443–3452.
- [63] Vanzieleghem T, Courniot N, Herman-Bausier P, et al. Role of ionic strength in staphylococcal cell aggregation. *Langmuir*, 2016, 32(29): 7277–7283.
- [64] Formosa-Dague C, Speziale P, Foster TJ, et al. Zinc-dependent mechanical properties of *Staphylococcus aureus* biofilm-forming surface protein SasG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(2): 410–415.
- [65] Dufrene YF. Understanding forces in biofilms. *Nanomedicine*, 2015, 10(8): 1219–1221.

(本文责编 郝丽芳)



蔡鹏 博士，华中农业大学资环学院教授，教育部青年长江学者，国家万人计划首批“青年拔尖人才”，国家自然科学基金优秀青年基金和全国百篇优秀博士学位论文获得者。现担任中国土壤学会土壤生物与生物化学专业委员会委员、《农业资源与环境学报》编委等学术职务。主要从事土壤生物化学与环境方向研究，在土壤矿物-有机物-微生物相互作用、土壤生物膜形成机制、重金属和病原菌污染土壤修复等研究方面取得了一些有价值的研究成果，发表SCI论文60余篇，作为副主编参编教材1本。获国际环境生物地球化学学会 Wolf Vishniac 奖和中国土壤学会优秀青年学者奖。