

金黄色葡萄球菌细胞内生物大分子含量变化的光镊拉曼光谱研究*

Study on Bio-Macromolecular Level Changes in *Staphylococcus aureus* Cells during Batch Cultivation Using Laser Tweezers Raman Spectroscopy

陶站华¹, 孙美娟²

TAO Zhanhua¹, SUN Meijuan²

(1. 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530007; 2. 百色学院物理与电信工程系, 广西百色 533000)

(1. Laboratory of Biophysics of Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Department of Physics and Telecommunication Engineering of Baise University, Baise, Guangxi, 533000, China)

摘要:【目的】利用光镊拉曼光谱技术(Laser Tweezers Raman Spectroscopy, LTRS)研究金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)细胞内主要生物大分子含量的动态变化, 探寻监测微生物代谢状态变化的有效工具。【方法】收集分批培养过程不同时间点金黄色葡萄球菌细胞的拉曼光谱, 观察其特征峰依赖时间的变化特点。【结果】归属于核酸的特征峰, 如 667 cm^{-1} 峰, 724 cm^{-1} 峰, 781 cm^{-1} 峰, 809 cm^{-1} 峰和 $1\ 574\text{ cm}^{-1}$ 峰在整个分批生长阶段持续降低, 在对数生长期下降幅度尤其剧烈, 反映了对数生长期细胞分裂快速, DNA 复制活跃; 与蛋白质相关的特征峰, 如 850 cm^{-1} 峰, $1\ 001\text{ cm}^{-1}$ 峰和 $1\ 662\text{ cm}^{-1}$ 峰, 在对数生长期显著增强, 而到稳定期峰强度基本维持恒定。【结论】光镊拉曼光谱技术能实时监测生物样品内生物大分子的含量, 是单细胞水平上研究微生物代谢状态变化的有效工具。

关键词: 金黄色葡萄球菌 拉曼光谱 激光镊子 单细胞分析

中图分类号: O657.37 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2016)01-0031-04

Abstract: 【Objective】The dynamic change in content of major biological molecules inside *Staphylococcus aureus* cells in batch cultivation was investigated using laser tweezers Raman spectroscopy. 【Methods】Raman spectra of *Staphylococcus aureus* cells sampled at various time points of batch cultivation were recorded to observe time-dependent changes of the characteristic peaks. 【Results】The intensities of characteristic bands at 667 cm^{-1} , 724 cm^{-1} , 781 cm^{-1} , 809 cm^{-1} and $1\ 574\text{ cm}^{-1}$, assigned to nucleic acids, decreased continuously throughout the batch growth, and the intensities of these bands dropped even more drastically, especially during the exponential growth phase, which could be attributed to the rapid cell division and active DNA replication in the exponential growth stage. In the meantime, the intensities of Raman peaks around 850 cm^{-1} , $1\ 001\text{ cm}^{-1}$ and $1\ 662\text{ cm}^{-1}$, associated with proteins, increased significantly during the exponential growth phase, and then remained relatively constant during the stationary phase. 【Conclusion】The experimental results show that laser tweezers Raman spectroscopy can monitor the content of bio-macromolecules in real time and serve as an efficient tool for analyzing the changes in metabolic states of microorganisms at single cell level.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Raman spectroscopy, laser tweezers, single cell analysis

收稿日期: 2015-09-25

作者简介: 陶站华(1971-), 男, 副研究员, 主要从事生物光谱学研究。

* 广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118193)和广西科学院基本科研业务费项目(15YJ22SL08)资助。

0 引言

【研究意义】金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 简称金葡菌, 是临床上重要的病原菌, 是引起临床感染及手术切口感染的主要致病菌之一, 可引起局部化脓感染, 也可引起肺炎、伪膜性肠炎、心包炎, 甚至败血症、脓毒症等全身感染^[1]。它在生长过程中, 由于外部环境的不断变化, 细菌细胞必需实时对环境信号的刺激作出响应, 表现为细胞形态的改变, 细胞内生物大分子组成及含量的变化。金葡菌的代谢状态对其耐药性以及对其宿主的毒力作用均有重要影响。因此, 深入了解金葡菌生长过程中细胞内生物大分子的变化对理解其致毒机理以及感染的预防和治疗具有重要意义。【前人研究进展】生物样品中的主要成分(核酸、蛋白质、脂类、碳水化合物)可以对入射光进行非弹性散射, 产生特征性的拉曼光谱。一个生物样品的拉曼光谱包含上千个像素点, 可以同时涵盖多种物质成分的信息^[2]; 另外, 由于每种物质的特征峰强度与该物质的浓度成正比, 所以拉曼光谱可以同时反映细胞中多种生物大分子含量的动态变化情况。由于拉曼光谱技术在灵敏度、分辨率、无损伤等方面具有的优势, 该技术日益在细胞生物学^[3]、微生物学^[4]、医学诊断^[5-6]、药物研究^[7]等领域显示出良好的应用前景。光镊拉曼光谱技术(Laser Tweezer Raman Spectroscopy, LTRS)将光镊技术和拉曼光谱技术结合起来, 其原理是利用高度汇聚的激光束, 囚禁溶液中的活细胞, 同时激发细胞内分子的拉曼散射^[8-9]。该技术充分结合了共焦显微、光镊、拉曼光谱的优点, 进一步提高了检测的灵敏度、准确度。【本研究切入点】研究微生物与环境相互作用过程中细胞内生物大分子变化特点的传统方法, 是对收集的大量微生物样本破碎细胞后分别提取核酸、蛋白质、脂类等成分, 再对每种成分分别定量^[10-11]。这种方法样本需求量大, 处理过程复杂, 而且无法获得单细胞水平生物分子动态变化的信息。因此, 本研究拟利用 LTRS 技术表征金葡菌分批培养各阶段的代谢状态。【拟解决的关键问题】通过监测并分析金葡菌在不同时间点拉曼光谱特征峰的变化, 获知细菌细胞内不同生物大分子的实时动态变化规律。

1 材料与方法

1.1 菌种

金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 培养基

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母提取物 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L。LB 固体培养基在液体培养基的基础上添加 15 g/L 琼脂粉。各培养基于 121℃ 灭菌 20 min。

1.3 细菌培养及样品制备

挑取 LB 固体培养基上的金葡菌单菌落接种于 LB 液体培养基中, 37℃, 200 r/min 过夜培养后, 以 10% 比例转接于含有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 摇瓶中, 37℃, 200 r/min 培养 31.5 h。分别于 1.5 h, 3.0 h, 4.5 h, 6.0 h, 7.5 h, 9.0 h, 10.5 h, 13.5 h, 16.5 h, 19.5 h, 22.5 h, 25.5 h, 28.5 h 和 31.5 h 取 1 mL 菌液用于测定菌体密度和拉曼光谱。

菌体密度的测定方法: 将菌液用无菌水适当稀释后测量 600 nm 处的吸光度 OD_{600} 。用于拉曼光谱测定的菌液先经过 5 000 r/min 离心 5 min 后, 以 PBS 洗涤 2 次, 然后按照 10 μ L 菌液稀释为 1 mL 待测样品的比例以 PBS 稀释, 加入 0.1% (V/V) Tween 80 涡旋振荡 1 min 以制备单细胞悬液。

1.4 光谱收集及数据处理

实验中所用的光镊拉曼光谱系统按照文献^[10-11]所述方法建立。将细菌悬液置于样品槽内, 100 \times 油浸物镜下光镊随机俘获单个细胞, 将目标细胞提升至石英片上方 5 μ m 左右, 激光强度调整为 45 mW, 信号累积时间为 30 s, 收集目标细胞的拉曼光谱。此时收集的光谱是带有背景的细胞拉曼光谱。再于细胞附近以相同条件收集背景拉曼光谱, 每个样品收集 30 个单细胞的拉曼光谱, 3 个背景光谱。

光谱的预处理采用 Matlab 7.0 编写的程序进行, 每个细胞的原始光谱分别经过背景扣除, 5 点 Savitzky-Golay 平滑, 基线校正, 得到细胞的实际光谱。光谱图的绘制及光谱数据的统计分析在软件 Origin 8.5 中进行。

2 结果与分析

2.1 生长曲线

由金葡菌 ATCC 6538 生长曲线(图 1)可知, 0~1.5 h 为延滞期, 1.5~9 h 为对数期, 9 h 到培养终点均为稳定期。

2.2 拉曼光谱

分别选取延滞期(1.5 h), 对数生长期(3.5 h)和稳定期(19.5 h)金葡菌拉曼光谱的平均光谱(30 个细胞的单细胞光谱的平均), 进行特征峰的归属指认(表 1)及不同生长阶段拉曼光谱差别的比较(图 2)。

由图 2 可以看到,不同生长阶段金黄色葡萄球菌的拉曼光谱差别明显,例如,随着培养时间的推移,667 cm^{-1} ,724 cm^{-1} ,1 001 cm^{-1} ,1 574 cm^{-1} 以及 1 662 cm^{-1} 等特征峰强度都有不同程度的变化。

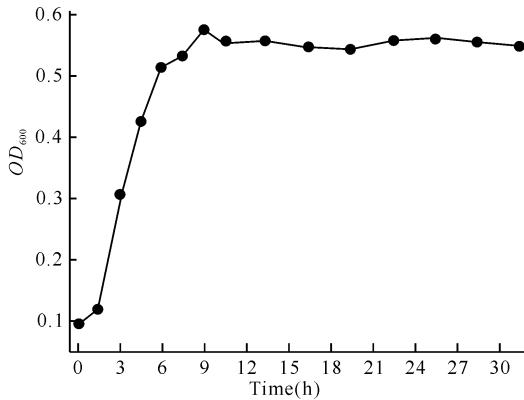


图 1 金黄色葡萄球菌的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Staphylococcus aureus*

表 1 金黄色葡萄球菌拉曼光谱主要特征峰归属^[12-13]

Table 1 Assignment of the major Raman bands of *Staphylococcus aureus* cells

峰位置 Peak position(cm^{-1})	峰归属 Peak assignment(cm^{-1})
667	鸟嘌呤环呼吸振动 G ring br.
724	腺嘌呤 Adenine
781	DNA O-P-O 伸缩振动; U、C、T 环呼吸振动 DNA O-P-O str.; U、C、T ring br.
809	RNA O-P-O 伸缩振动 RNA O-P-O str.
850	酪氨酸 Tyr
1 001	苯丙氨酸苯环呼吸峰 Phe ring br.
1 094	DNA O-P-O 伸缩振动 DNA O-P-O str.
1 244	A、U NH_2 环模 A、U NH_2 ring mode
1 451	蛋白质/脂类 CH 变形, CH_2 弯曲振动 protein/ lipid CH def, CH_2 banding
1 574	腺嘌呤, 鸟嘌呤环模 A、G ring mode
1 662	蛋白质酰胺 I 带 protein amide I band

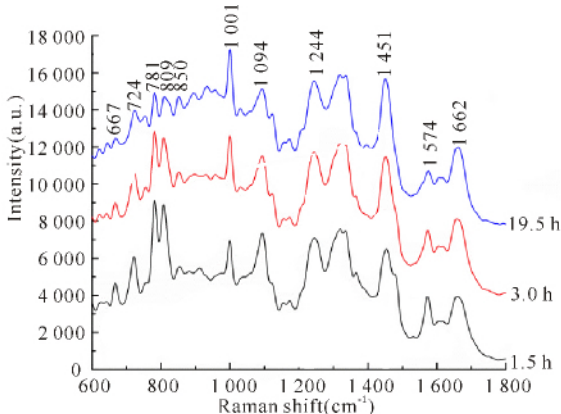


图 2 不同生长阶段金黄色葡萄球菌细胞的拉曼光谱

Fig. 2 Raman spectra of *Staphylococcus aureus* cells during various growth stages

2.3 拉曼光谱特征峰的动态变化

细胞内每种生物大分子的不同基团都可能产生拉曼散射,且散射强度与激发区域内物质分子的含量成正比,因此不同特征峰强度的时间依赖性变化曲线(图 3)可以追踪细胞内主要生物分子含量的动态变化情况,提供细胞代谢状态的实时信息。按照不同特征峰的归属类别(核酸或蛋白质)以及曲线的动态变化趋势可以将曲线分成 2 组, A 组归属于核酸(图 3a),而 B 组则是来源于蛋白质(图 3b)的特征峰。总体而言,源于核酸的拉曼光谱峰强度随着时间的推移持续下降(A 组),在延滞期和对数生长期(1.5~9 h)下降尤其剧烈,其中下降最明显的 3 个峰 724 cm^{-1} 峰,781 cm^{-1} 峰和 809 cm^{-1} 峰在对数生长期将近结束时(9 h)的峰强度降低为对数生长期起始时(1.5 h)强度的 1/2。这是由于在对数生长期,绝大多数细胞处于细胞分裂状态, DNA 复制活跃, DNA 含量加

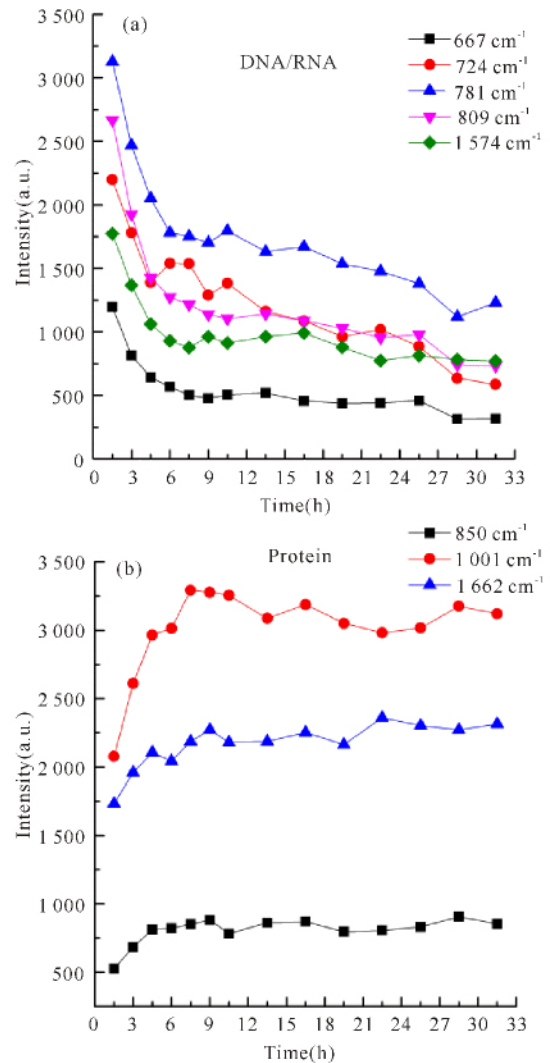


图 3 金黄色葡萄球菌拉曼光谱各特征峰强度的时间依赖性变化

Fig. 3 Time dependant changes in the band intensities of Raman spectra of *Staphylococcus aureus* cells

倍,而稳定期细胞大多处于静止状态,DNA含量仅相当于复制期的一半。归属于蛋白质的特征峰强度(B组,850 cm^{-1} 峰,1 001 cm^{-1} 峰和1 662 cm^{-1} 峰)在对数生长期显著增强,而到稳定期峰强度基本维持恒定,其中,1 001 cm^{-1} 峰来源于蛋白质苯丙氨酸残基,峰形尖锐,基本对称,周围没有其他物质峰的干扰,是反映样品内蛋白质含量变化灵敏的标志。蛋白质含量随生长时间而增加可能是细菌细胞对环境中营养成分的消耗胁迫所作的响应,这种现象在其他细菌中也可以见到^[14]。

以上结果表明,光镊拉曼光谱技术能实时追踪微生物培养过程中细胞代谢状态的变化。与传统的检测手段相比,基于拉曼光谱的方法具有以下优点:(1)样品需求量小,10 μL 或更少体积的菌液进行适当稀释后就可以满足测定需要;(2)样品处理简单,可以对活细胞进行实时监测;(3)可以同时样品中的多种组分进行定量分析,对于每种组分,光谱中可以有多个特征峰与之对应,定量结果相互验证,进一步提高了结果的可靠性;(4)作为一种单细胞分析手段,可以提供群体中细胞间异质性的信息。

3 结论

本文研究金黄色葡萄球菌分批生长时拉曼光谱特征峰的时间依赖性变化特点。结果显示,归属于核酸的特征峰,如667 cm^{-1} 峰,724 cm^{-1} 峰,781 cm^{-1} 峰,809 cm^{-1} 峰和1 574 cm^{-1} 峰随着培养时间的延长而持续降低,在对数生长期下降幅度尤其剧烈,反映了对数生长期细胞的快速分裂和DNA的活跃复制;同时,与蛋白质相关的特征峰,如850 cm^{-1} 峰,1 001 cm^{-1} 峰和1 662 cm^{-1} 峰,在对数生长期显著增强,而到稳定期峰强度基本维持恒定,体现了细菌细胞对环境中营养物质消耗所作的响应。这表明光镊拉曼光谱技术能实时监测微生物细胞内生物大分子的动态变化,获取有关代谢状态的相关信息,与传统分析手段相比,具有单细胞无损分析、提供信息丰富、样本需求量小、高效可靠等优势。

参考文献:

[1] KENNY J G, WARD D, JOSEFSSON E, et al. The *Staphylococcus aureus* response to unsaturated long chain free fatty acids: Survival mechanisms and virulence implications[J]. PLoS One, 2009, 4(2): e4344.
 [2] SCHUSTER K C, REESE I, URLAUB E, et al. Multidimensional information on the chemical composition of single bacterial cells by confocal Raman microspectroscopy [J]. Analytical Chemistry, 2000, 72(22): 5529-

5534.
 [3] PASCUT F C, KAIRA S, GEORGE V, et al. Non-invasive label-free monitoring the cardiac differentiation of human embryonic stem cells *in vitro* by Raman spectroscopy [J]. Biochimica Et Biophysica Acta -General Subjects, 2013, 1830(6): 3517-3524.
 [4] CHIU Y F, HUANG C K, SHIGETO S. *In vivo* probing of the temperature responses of intracellular biomolecules in yeast cells by label-free Raman microspectroscopy [J]. Chembiochem, 2013, 14(8): 1001-1005.
 [5] LI Z F, CHEN Y, LI Y Z, et al. Raman microspectroscopy as a diagnostic tool to study single living nasopharyngeal carcinoma cell lines [J]. Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire, 2013, 91(3): 182-186.
 [6] BARMAN I, DINGARI N C, SAHA A, et al. Application of Raman spectroscopy to identify microcalcifications and underlying breast lesions at stereotactic core needle biopsy [J]. Cancer Research, 2013, 73(11): 3206-3215.
 [7] LIY T, QU L L, LID W, et al. Rapid and sensitive *in situ* detection of polar antibiotics in water using a disposable Ag-graphene sensor based on electrophoretic preconcentration and surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 43: 94-100.
 [8] XIE C G, LI Y Q. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques [J]. Journal of Applied Physics, 2003, 93(5): 2982-2986.
 [9] XIE C G, DINNO M A, LI Y Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells [J]. Optics Letters, 2002, 27(4): 249-251.
 [10] RESCH A, ROSENSTEIN R, NERZ C, et al. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(5): 2663-2676.
 [11] PELZ A, WIELAND K P, PUTZBACH K, et al. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(37): 32493-32498.
 [12] MOVASAAGHI Z, REHMAN S, REHMAN I U. Raman spectroscopy of biological tissues [J]. Applied Spectroscopy Reviews, 2007, 42(5): 493-541.
 [13] NOTINGHER I, VERRIER S, HAQUE S, et al. Spectroscopic study of Human lung epithelial cells (A549) in culture: Living cells versus dead cells [J]. Biopolymers, 2003, 72(4): 230-240.
 [14] CHUNG H J, BANG W, DRAKE M A. Stress response of *Escherichia coli* [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2006, 5(3): 52-64.

(责任编辑:尹 闯)