

激光对枯草杆菌 AS1.831 细胞壁的选择激发作用*

徐 浩

(中国科学院微生物研究所, 北京)

根据一个说明乙酰葡萄糖胺和乙酰壁酸关系的简化模型, 计算了可能引起选择激发的激光的波数。用由恒化器培养的枯草杆菌细胞做材料, 实验检查了激光对细胞壁成份的选择激发作用。观察到功率密度约为 $10^6 [W][cm]^{-1}$ 的二氧化碳激光可使革兰氏染色阳性细菌变为阴性。它表明细胞壁已发生改变, 但无显微及亚微水平上的征兆。用红外光谱法检查, 发现经激光辐照后, 在波数为 900 厘米^{-1} 处有一个峰消失了, 而这里正是 β -糖苷式的醛缩醇键接。这一现象说明生物大分子中也有选择激发现象存在, 也证明所提出的模型和计算可近似地描绘实际情况。还发现, 在激光辐照过强条件下, 选择性激发作用有变劣的趋势, 这可能是造成我本实验中激发光源和激发谱线略有位置上推移的原因。

细菌细胞壁的研究工作已有过许多报道。人们非常有兴趣于用化学方法对细胞壁进行选择性地破坏或裂解, 但用物理方法选择性地破坏细胞壁某些组分的工作, 则尚未见报道。近年来, 激光作为一种高度单色的强光源出现, 由于其极短的脉冲时间, 人们试图以物理方法有选择性地破坏某些生物材料的化学结构^[1,2]。由于细胞壁在细菌中的功能, 作者觉得以物理方法有选择性地破坏细菌的细胞壁, 而不波及其它结构, 将会有很大的理论上和应用上的意义。基于以上设想, 进行了本文所述的试验, 现将结果报告如下。

材料和方法

菌株及其培养

用枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) AS 1.831 为试验菌株^[3], 该菌株兰氏染色阳性反应明确。

菌株用单级流量控制恒化器作连续培养。通气量约为 0.5 升/分, 培养液体积约 300 毫升, 培养温度为 32°C 。培养基成分是:

A: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3.0 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 克, KCl 0.6 克, 蒸馏水 2.4 升; 用 6N NaOH 调 pH 至 7.2, 8 磅 (psig) 灭菌 30 分钟。

B: D-葡萄糖 30 克, 蒸馏水 600 毫升; 用 6N NaOH 调 pH 至 7.2, 8 磅灭菌 30 分钟。

用前将 A、B 两液混合。

恒化培养的稀释率 $D = 0.12$ 。根据恒化培养的计算公式^[4], 其细胞分裂率是: $q = 1.44 \times 0.12 = 0.17$ 。即细胞群体的全部在 6 小时内会分裂一次。此时培养物内无芽孢, 不致影响细胞壁的制备。按时取稳态生长的样品, 4000 转/分离心 15 分钟, 离心洗涤菌体两次后, 将菌体涂抹在 25×25 毫米的盖玻片上, 干后待用。

为了选定可能引起细胞壁选择激发作用的激光波数, 设计了细胞壁中主要成份的简化模型, 再选定化学键的力常数, 据此计算可采用的激光波长。为此, 我们选定了波长为 10.6 微米的红外区的二氧化碳激光。由于它的脉冲小于 1 微秒, 热效应可忽略不计。

取上述盖玻片涂片, 在上述波长的激光下辐照 10—20 次。辐照时用薄纸遮挡一半盖玻片, 以此半为对照。辐照后立即将盖玻片上的材料进行

本文于 1977 年 8 月 15 日收到。

* 本工作自始至终得到中国科学院物理研究所许多同志的支持, 特别是李克学同志与作者反复讨论, 提出了宝贵的意见。唐福海、徐积仁等同志提供了激光器件。中国科学院动物研究所、化学研究所和植物研究所提供了红外光谱分析条件。恒化器为本所严桂生和李玉宣两同志制作。

革兰氏染色^[5],高倍镜及油镜显微镜检查,彩色及黑白摄影。同时用电子显微镜观察处理及对照样品的整体细胞,并摄影。

取由上述方法培养之菌体,按前法^[6]制备细胞壁。将壁涂抹在盖玻片上,以 800 或 1000 毫焦尔的辐照量,波长 10.6 微米的激光处理。由于细胞壁粘附在盖玻片上,极难刮取,故直接在盖玻片上用扫描电子显微镜进行观察。观察方法是:将盖玻片转靶喷镀钨合金后,在背面涂导电胶 Dotite,再用胶布固定在铜片上观察并摄影。

激光处理后是否有选择性激发引起的分子水平上的变化,主要采用红外光谱法进行检查。样品作成 KBr 压片用 IR-10 型红外光谱仪,或作成 NaCl 压片,用 Unicam SP200 型红外光谱仪测定红外吸收光谱。所用样品,有时是同一批细胞壁分为对照及处理样品,有时是同一样品制成压片并经红外光谱测定后,再用激光辐照,然后再分析此基块物质(matrix material)内细胞壁的红外吸收光谱的改变。

实验设计和实验结果

由于振动能级的量子化特点,有的工作者^[1]认为对生物材料的选择激发当属可能,但有关实验结果的报道还不多。由于激光微束法无论如何也达不到分子水平的结构,我们一直希望找到一种合适波长的激光,用以选择性地破坏细胞壁,激光脉冲甚短,又是强大的单色光源,应有此可能。

我们将细胞壁的主要构成单元——乙酰壁酸或乙酰葡萄糖胺视为一质量较大的球,而其醛缩醇形成的键中之氧,则可看成一个小球,连接着二者的化学键,则相当于一弹簧,这样就可将整个系统看作一个谐振子系统。激光辐照无异是给它们加了一个交变的力场,推动此谐振子振动。若施加的激光频率等于谐振子系统的本征振动频率,则激光引起的振动会因为越过量子化的能带而使细胞壁受到破坏。但选择激发的特异性,会因激光的能量强度超过其阈值而递减,因此必须选定合适的辐照

量。

在细菌细胞壁的化学结构中,其主要骨架是两种氨基糖的链,因此我们的模型是将其简化成一维晶格来处理,并按下列公式^[7]估计激光波长与对壁可能引起的选择激发作用的关系:

$$\omega_{\pm}^2 = f \left(\frac{1}{M_1} + \frac{1}{M_2} \right) \pm f \sqrt{\left(\frac{1}{M_1} + \frac{1}{M_2} \right)^2 - \frac{4}{M_1 M_2} \sin^2 \frac{qa}{2}}$$

在这里, M_1 取两种氨基糖分子量的近似平均值,以 250 道尔顿计, M_2 为氧原子量,为 16 道尔顿,则其绝对质量分别为:
 $M_1 = 250 \times 1.67 \times 10^{-24} = 4.2 \times 10^{-22}$ [克]
 $M_2 = 16 \times 1.67 \times 10^{-24} = 2.7 \times 10^{-23}$ [克]
 从而

$$\frac{1}{M_1} = 2.4 \times 10^{21} \text{ [克]}^{-1}$$

$$\frac{1}{M_2} = 3.7 \times 10^{22} \text{ [克]}^{-1}$$

由于正弦的绝对值是由 0 到 1, 因此 $\sin^2 \frac{qa}{2}$ 为 1 时 ω_{\pm}^2 的值相应最大或相应最小。而求得的则是正弦的周期函数。

伸长力常数较难给定,在这里我们参比 CH 基和 CCl 基的伸长力常数^[8],取 f 值为:

$$f = 4 \times 10^5 \text{ [达因] [厘米]}^{-1}$$

由于以上所取各值都是近似的,模型也是简化的,因此所算出的激光波长只可能是近似值,但它仍然是安排实验所必需的。

经过计算

$$\omega_{\pm}^2 = 4 \times 10^5 \times (3.9 \times 10^{22} \pm 3.4 \times 10^{22}) \text{ (秒)}^{-2}$$

从而

$$\omega_+^2 = 2.9 \times 10^{28},$$

$$\omega_-^2 = 0.2 \times 10^{28}$$

开方,取其正值,其频率 ω 即为

$$\omega_1 = 1.70 \times 10^{14},$$
$$\omega_2 = 0.45 \times 10^{14}$$

$$\therefore \nu = \frac{\omega}{2\pi}$$

$$\therefore \nu_1 = \frac{1.70}{6.2} \times 10^{14} = 0.28 \times 10^{14}$$

$$\nu_2 = \frac{0.45}{6.2} \times 10^{14} = 0.07 \times 10^{14}$$

由于波长和频率的关系是 $C = \lambda \nu$, 而 $C = 3 \times 10^{18} \text{ \AA}$, 因此,

$$\lambda_1 = \frac{3 \times 10^{18}}{0.28 \times 10^{14}}$$

$$= 10.7 \times 10^4 \text{ \AA} \text{ (或 } 10.7 \text{ 微米)}$$

$$\lambda_2 = \frac{3 \times 10^{18}}{0.07 \times 10^{14}}$$

$$= 42.9 \times 10^4 \text{ \AA} \text{ (或 } 42.9 \text{ 微米)}$$

根据以上计算做出的估计, 和有关 $4000\text{--}650 \text{ cm}^{-1}$ 波数的红外线辐射性质的资料^[9], 考虑到激光器件的可给性, 我们采用了波长为 10.6 微米的 CO_2 红外激光, 作为辐照细胞壁的光源。

按以上实验设计, 将由恒化器中按时取出的菌体涂片, 用能量强度为 200—1200 毫焦耳的不同剂量激光辐照。由于红外激光不透过玻璃辐照时菌体涂片层应面向激光源, 辐照后对涂片进行革兰氏染色。在未辐照前, 细菌细胞的染色呈均一和整齐的革兰氏阳性反应, 经能量强度为 800 毫焦耳以上(约为 $10^6 \text{ [瓦特][厘米]}^{-2}$ 的功率密度) 的激光辐照后, 细菌细胞形态虽未改变, 但革兰氏染色呈阴性反应(图版 I-2)。这应认为是激光造成了细胞壁的损坏。激光能量强度和革兰氏染色反应之间的关系, 示于表中。由表中可见, 800 毫焦耳是该细菌细胞壁革兰氏染色反应由阳性变为阴性的一个阈值区。

辐照后的整体细胞, 经电子显微镜照片检查, 未发现可识别的形态变化。

表 不同能量强度的激光处理后枯草杆菌 AS1.831 革兰氏染色的反应

剂量 (毫焦耳)	200	400	600	800	1000	1200
革兰氏 染色反应	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性	阴性

由于在整体细胞形态上未找到激光辐照后革兰氏染色反应变化的解释, 我们又对细胞壁制备物进行了激光辐照(800 毫焦耳 \times 20 次), 并对细胞壁的形态进行了分析, 对经辐照后的涂抹在盖玻片上的细胞壁, 用扫描电子显微镜进行了就位观察, 由照片(图版 I-1)中看, 所摄下的是一个比较完整的壁的碎片, 但并无明显可见的损伤或孔洞。这一现象可以是一个旁证, 证明革兰氏染色反应改变的原因是激光辐照引起了分子水平的结构改变。

红外吸收光谱分析

激光是否在细胞壁诸成份的化学键水平上由于选择激发作用而造成损坏, 从而引起了革兰氏染色反应的变化? 我们检查了辐照前后的细胞壁红外吸收光谱。结果见图 1—3。

激光辐照前的壁, 其红外吸收光谱上, 在波数约为 900 厘米^{-1} 处有一吸收峰, 参照已有资料^[9-11], 它是吡喃糖的 β -键接的醛缩醇 (acetal), 即葡萄糖 β -键接的糖苷键^[12](其红外吸收峰在 $891 \pm 7 \text{ 厘米}^{-1}$ 处)。经辐照后, 这个吸收峰消失了, 这表明该醛缩醇键发生了变化, 可能是被摧毁了。

我们认为, 虽然所用的激光(波长 10.6 微米相应的波数为 940 厘米^{-1})和受辐照后细胞壁红外光谱变化的区域(波数为 900 厘米^{-1})之间略有距离, 仍应看成是激光辐照造成了细胞壁的选择激发。谱线推移可能是: 1) 大分子内部可能有的能量转移; 2) 大分子内部的能量耗损; 3) 激光

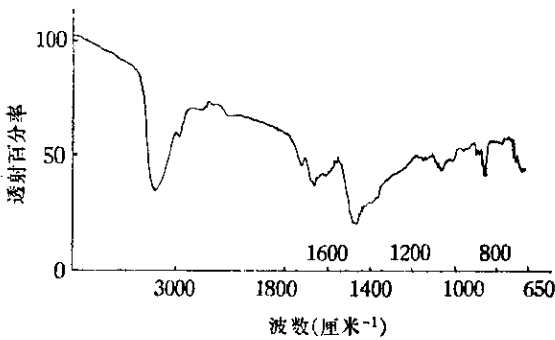


图1 未经激光处理的枯草杆菌 AS1.831 细胞壁的红外吸收光谱 (NaCl 压片)

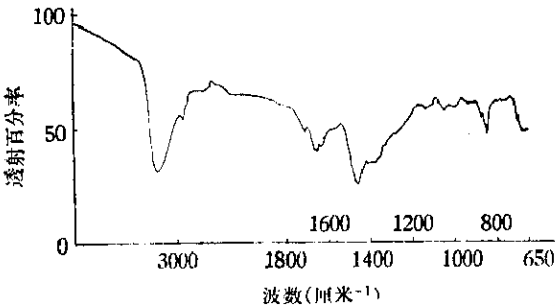


图2 枯草杆菌 AS1.831 细胞壁涂片经激光辐照后的红外吸收光谱 (NaCl 压片)

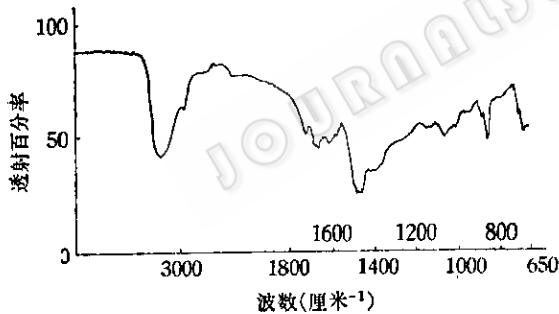


图3 枯草杆菌 AS1.831 细胞壁在基块物质·NaCl 压片内经激光辐照后的红外吸收光谱

强度稍稍超过阈值后所造成的选择性劣变。

由实验结果看,根据计算所估计的可能引起选择性激发作用的波数值,大体反映了真实情况。也就是说,激光引起革兰氏染色反应改变,从分子水平上说,发生在位于靠近糖苷键的本征振动频率之处,它使细胞的外包被的化学结构发生了变化^[13]。

激光作为一种强光源,其选择激发作

用的理论,与我们的实验实践极其有关,它制约着选择性作用的条件,当然也就决定着选择性的可能与优劣。

根据最近的看法,在强光影响下选择性作用虽然存在,但它可能有所破坏,有变劣的可能。由于我们的实验材料是一种生物大分子,它受到激光的辐照而导致选择激发,因而对我们所得到的实验结果的解释,和强光影响的理论有着密切关系。

讨 论

无论从学理上或从应用上看,激光对细菌细胞壁的选择激发作用都有重要意义,它有可能进一步开拓激光在医学上的应用。我们的实验结果说明,选择激发作用的应用不只局限于小分子或同位素的分离等固有领域,同样也可能应用于复杂的大分子,当然在这方面还有待进一步开展研究工作。

参 考 资 料

- [1] Letokov, V. S.: *J. Photochem.* 4:185—191, 1975.
- [2] Susi, H.: In "Structure and Stability of Biological Macromolecules" (Timasheff, S. N. and G. D. Fasman, eds.), New York, Marcel Dekker, 1969.
- [3] 徐 浩、江慧修、乔宝义: *微生物学报*, 15 (1): 31—36, 1975.
- [4] Kubitschek, H. E.: *Introduction to Research with Continuous Cultures*, Ch. 2, 3, New Jersey, Prentice-Hall, Inc., 1970.
- [5] Conn, H. J.: *Manual of Microbiological Methods*, 15—18, New York, McGraw-Hill Book Co. Inc., 1957.
- [6] 中国科学院微生物研究所细胞生物学组: *微生物学报*, 17 (1): 57—61, 1977.
- [7] Madelung, O.: *Festkorpertheorie I*: 118—119, Berlin, Springer Verlag, 1972.
- [8] Herzberg, G.: *Molecular Spectra and Molecular Structure*, Vol. II, 193, Table 50, New York, D. van Nostrand Co. Inc., 1945.
- [9] Rao, C. N. R.: *Chemical Applications of Infrared Spectroscopy*, Ch. 1, 189—191, New York and London, Acad. Press, 1963.

- [10] Barker, S. A., E. J. Bourne, M. Stacey, and D. H. Whiffen: *J. Chem. Soc.*, 171, 4211. 1954.
- [11] Barker, S. A. and R. Stephens: *ibid.* 4550. 1954.
- [12] Baker, R.: *Organic Chemistry of Biological Compounds*, 142—146, New Jersey, Prentice-Hall, Inc., 1971.
- [13] Mandelstam, J. and K. McQuillen: *Biochemistry of Bacterial Growth*, 2nd ed. 68—103, London, Blackwell, 1973.

THE SELECTIVE EXCITATION EFFECT OF LASER TO THE CELL WALL OF A *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN AS 1.831

Xu Hao

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

1. To harvest the steady state *B. subtilis* cells for experimental work by using of chemostat culture methods.

2. In accordance with a simplified cell wall model we calculated out the wavelength for selective excitation of murein by laser, a CO₂ apparatus with wavelength of 10.6 μm .

3. Using CO₂ laser to treat the cells of *B. subtilis* we observed that the Gram stain reaction turned from positive to negative, indicating that some changes occurred in the cell wall of the bacteria. But microscopic and submicroscopic observations gave no clue on the cause of this change both from intact cell and from prepared murein.

4. The threshold value of the Gram stain change is about 1mw/cm².

5. The wave number of the laser used is 940 cm⁻¹. The absorption band of

acetal bond is 891 \pm 7 cm⁻¹. Comparing the infra-red absorption spectrum of the laser treated and untreated mureins, an absorption peak at ca. 900 cm⁻¹ disappeared after irradiation. So it is obvious that the CO₂ laser made a selective excitation on the molecular level of the cell wall. The slight disagreement between the laser wavelength and the excitation position might be due to the peculiarity of the macro-molecules and the overdosing.

6. The selective excitation phenomenon observed in the laser treated cell wall might be significant both theoretically and practically. It showed that the selective excitation phenomenon presented at the level of macro-molecules as well. And it might widen the use of laser in the fields of medicine and agriculture.