细菌表面镀镍的透射电子显微镜与原子力显微镜表征

王 静 何世颖 徐丽娜 顾 宁*

(国家分子和生物分子电子学实验室, 东南大学生命科学与医学工程系, 南京 210096. * 联系人, E-mail: guning@seu.edu.cn)

摘要 近年来微生物细胞由于尺寸小、几何外形标准多样和资源丰富等特点成为制备金属纳米结构或材料极具吸引力的生物模板。以典型的革兰氏阴性菌——大肠杆菌为模板通过无电子化学镀成功制备了具有标准杆状外形的表面镀镍的纳米金属材料, 并利用原子力显微镜和透射电子显微镜对化学镀镍前后的大肠杆菌作了形貌学上的表征、测量与对比。结果显示, 空白对照菌表面平整光滑并在云母基底表面表现出较显著的铺展效应; 经过活化和化学镀镍后的菌细胞表面粗糙度明显增大, 并在基本保持原有菌模板外形的基础上, 其高宽比有所增大。超薄切片结果表明, 菌细胞表面的金属镍镀层分布均匀, 其厚度处于纳米量级。

关键词 生物模板 原子力显微镜 透射电子显微镜 金属化 菌细胞

近年来, 金属纳米结构或材料由于在电子学、力学、光学和传感器等领域巨大的应用潜能引起了国内外众多学者和科学家的极大兴趣和关注^[1,2]。而利用生物模板制备纳米金属结构或材料更是成为一种全新和极具吸引力的趋势。在众多的生物模板中, 比如DNA分子^[3~5]、微管^[6,7]、蛋白质^[8,9]和天然花粉颗粒^[10], 微生物细胞由于天生的外形尺寸小(一般在1 μm)、几何外形标准且多样(例如球状、杆状、管状、螺旋状、玉米状或香蕉状)和资源丰富等特点已成为备受关注的候选模板之一。应用现有的微加工手段是很难获得具有如此之小尺寸的标准的三维金属纳米结构的。目前被用于制备金属纳米结构或材料的微生物细胞主要集中于一些革兰氏阳性菌^[11~13]。在本文中, 我们选用具有直柱外形的大肠杆菌, 一种典型的革兰氏阴性菌作为微生物细胞模板来进行表面金属镀镍的研究。

现代分析技术表明微生物细胞壁的主要成分有蛋白质、多聚糖、磷壁酸和脂多糖等^[14~16]。与这些分析技术相比, 原子力显微镜由于分辨率高、制样简单和工作环境灵活等优点在表面科学领域显示出了巨大的优越性。近年来已陆续有研究者利用原子力显微镜对微生物细胞表面形貌及其构成的生物膜在固体表面的黏附力作了大量的研究^[17~19]。但迄今为止, 结合基于微生物细胞的金属纳米结构或材料与原子力显微镜表征的研究还未见报道。

本文采用了无电子化学镀的方法在菌细胞模板表面沉积金属镍。由于无需电流, 并且对于基底材料的种类和外形没有限制, 无电子化学镀可在任意基底表面上镀覆均匀的金属层。我们在利用原子力显微镜对空白对照和化学镀镍后的菌细胞作形貌表征、测量与对比的同时, 也利用透射电子显微镜和超薄切片技术对其表征结果作了相应的对照和验证。该项研究的目的是为该类基于菌细胞的复合金属纳米结构或材料在纳米科学领域可能的广泛应用提供丰富可靠的形貌学信息。

1 材料和方法

() 细菌的培养。大肠杆菌 ATCC 25922 在 37 条件下采用常规的 LB 肉汤培养基培养 5 h 后, 离心清洗并用纯水稀释保存待用。

() 菌细胞的活化和化学镀镍。无电子化学镀是一种待镀金属阳离子被化学还原的氧化还原过程, 该氧化还原反应只有在合适的具有催化性的表面才能进行。因此首先我们选用了一种不含锡的钯离子溶液作为活化液。在菌细胞表面的活化过程中, 带正电的金属钯离子通过与细胞壁表面带负电的脂多糖分子之间的静电作用吸附到菌细胞表面, 从而为进一步的金属化提供了成核中心。将菌细胞溶液和新鲜配制的钯离子溶液在室温下作用 15 min 后, 高速离心分离清洗, 然后在 80 条件下将已活化后的菌溶

液与适量的化学镀液混合作用 20 min. 该镀液含有 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8 g/L, N_2H_4 27 mL/L, $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa}$ 10 g/L, NaOH 5 g/L 和一些稳定剂, 其 pH 为 11.7. 最后通过高速离心清洗数次获得最终产物.

() 原子力显微镜表征. 所采用的原子力显微镜为美国 DI 的 Nanoscope a 型产品, 成像模式为接触式. 所有成像在相对湿度为 50%~60% 的空气中进行. 所用的氮化硅探针的弹性系数为 0.06 N/m. 图像分析由其自带软件(4.32 版本)完成. 出于简单化和对比性的考虑, 所有最终分析数值修正到 0.1 nm. 所有原子力显微镜图片除经平滑处理外未作任何处理. 制样基片选用新解理的云母片, 用移液枪将约 40 μL 的样品溶液滴至基底表面, 作用 10 min 后用清水清洗基片数次, 氮气吹干后待表征. 为最大程度地保证处于金属化不同阶段的菌细胞之间形貌的可比性, 除非特别地说明, 所有样品均选自同一批菌株并且在干燥 4 h 之内完成 AFM 表征.

() 透射电子显微镜和超薄切片表征. 所采用

的透射电子显微镜为日本的 Hitachi JEOL 产品. 对于超薄切片制样, 首先将金属化前后的菌细胞室温保存在 3% 的戊二醛溶液中 3 h, 用磷酸彻底清洗, 然后再在 1% 的锇酸中室温保存 3 h, 经过丙酮脱水、环氧丙烷浸泡、包埋和环氧树脂固定后待表征, 所用透射电子显微镜为日本的 Hitachi H-600 型产品.

2 结果与讨论

2.1 空白对照与金属化后的菌细胞的透射电子显微镜表征

图 1 分别显示了金属化前后的大肠杆菌的透射电子显微镜图片. 从图 1(a)可看出单个空白菌细胞外形轮廓清晰, 细胞壁表面光滑, 外形尺寸约为 $1 \mu\text{m} \times 500 \text{ nm}$. 在经过活化和化学镀镍短短的 30 s 后, 可观察到金属镍基本上以纳米颗粒的形式在菌细胞表面发生快速沉积, 其粒径主要分布在 4~6 nm 范围内(图 1(b)和(d)). 随着金属化时间的延长, 沉积在菌细胞表面的金属镍颗粒的分布密度和其粒径均有一定的

图 1 空白对照菌和金属化后的菌细胞的 TEM 表征

(a) 空白对照菌; (b) 依次经过钨离子活化和化学镀 30 s 后的菌细胞; (c) 依次经过钨离子活化和化学镀 15 min 后的菌细胞, 其中插图为电子衍射花样. (d)和(e)分别为依据图(b)和(c)得到的金属镍颗粒的粒径分布直方图

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-15-1748>

提高(图 1(c)和(e)). 但我们也观察到沉积的金属镍颗粒的分布密度在菌细胞表面的不同区域有着些许微小的差异, 这种现象的产生可能与化学镀反应中活化速度等工艺因素的影响导致了菌细胞壁表面活性基团分布得不均一有关, 这种局域活性的差异加上反应过程中产生的大量气流可能对金属镍纳米颗粒在菌表面的沉积速度和密度产生影响^[10]. 超薄切片的透射电子显微镜表征结果进一步证实了菌细胞表面纳米级金属镍镀层的生成(图 2).

图2 空白对照菌和金属化后的菌细胞的超薄切片 TEM 表征

(a) 空白对照菌; (b) 依次经过钯离子活化和化学镀 15 min 后的

菌细胞 <https://engine.scichina.com/doi/10.1360/psb2007-52-15-1748>

2.2 空白对照与金属化后的菌细胞的原子力显微镜表征

由图 3(a), 我们可观察到吸附于云母基片上的大肠杆菌由于细胞间的相互作用在云母表面形成了一层单细胞的生物膜, 局部的 AFM 三维图像显示出个别菌细胞由于干燥脱水发生了变形而导致细胞壁塌陷(图 3(b)). 对于任意选取的一个菌细胞, 通过对其截面分析与测量(图 3(c)), 可看出杆状菌细胞在云母基片上的附着使得其微观形貌的横截面曲线并不呈圆形或半圆形, 而是呈拱形, 细胞形貌特征的高度与宽度显得不成比例(高 $\times$ 宽 = 60.3 nm $\times$ 781.3 nm), 表明在大气条件下菌细胞于云母基片表面发生了较明显的铺展作用. 粗糙度是表征材料表面几何特性的主要参数之一, 对样品表面粗糙度的测量与分析是现代 AFM 分析技术中一项不可缺少的内容. 考虑到单个菌细胞的大小和对比的方便, 我们以单个菌细胞表面的约 300 nm $\times$ 300 nm 大小的 AFM 高度形貌图作为粗糙度的测量分析范围. 由空白对照菌的测量结果可知, 其表面非常平整, 算术平均偏差 R_a 和均方根偏差 RMS 分别仅为 1.1 和 0.9 nm(图 3(d)). 在分别对至少 50 个空白对照和化学镀镍后菌细胞表面作表面粗糙度的测量与统计后, 其 R_a 和 RMS 的均值如图 4 所示.

表面金属镀镍后的大肠杆菌细胞形态饱满、轮廓分明, 并且各细胞间表现出了较好的分散性(图 5(a)). 与空白对照菌相比, 其表面粗糙度明显增大, 并且单个菌细胞的高宽比有较大的提高(图 5(b)和(c)). 由原子力显微镜相图可清楚地观察到大量纳米颗粒较均匀地分布在菌细胞表面(图 5(d)).

我们以微生物细胞为模板通过无电子化学镀方法成功制备出了金属镍薄层包覆的复合纳米材料, 并利用透射电子显微镜和原子力显微镜对空白对照和金属化后的菌细胞作了形貌学表征、测量与对比. 与空白对照菌相比, 表面镀镍的菌细胞发生了一些形貌上的明显变化, 比如高宽比和表面粗糙度等. 基于现代先进的分析测试技术提供的大量丰富的形貌和微观结构上的信息, 我们将有可能对该类特殊的复合纳米材料的独特性质作进一步的研究, 例如已见报道的表面微观力学特性^[20]等, 并更深入地开发其将来在纳米电子学、纳米磁学和纳米力学领域的应用潜能.

图 3 空白对照菌的 AFM 表征

(a) 较大范围的 AFM 高度图像显示由空白对照菌构成的生物膜; (b) 图(a)局部放大的三维图像显示出个别菌细胞由于干燥脱水发生了变形; (c) 任意选取的单个菌细胞的截面分析显示出其三维尺寸为 1992.0 nm × 781.3 nm × 60.3 nm; (d) 菌细胞表面粗糙度分析

图 4 空白对照和金属化后的大肠杆菌表面粗糙度的对照

图5 金属化后的菌细胞的 AFM 表征

(a) 较大范围的 AFM 高度图像显示出金属化后的菌细胞间良好的分散性; (b) 图(a)的局部放大的三维图像; (c) 单个金属化后菌细胞的截面分析显示出三维尺寸为 1053.0 nm $\times$ 523.9 nm $\times$ 110.4 nm; (d) AFM 相位图像提供了更为细致的形貌信息, 图像大小为 1.64 μm $\times$ 1.64 μm

致谢 感谢东南大学分析测试中心的徐爱群老师在透射电子显微镜表征工作方面给与的大力支持与帮助。

参 考 文 献

- Ely O, Pan C, Amiens C, et al. Nanoscale bimetallic $\text{Co}_x\text{Pt}_{1-x}$ particles dispersed in poly(vinylpyrrolidone): Synthesis from organometallic precursors and characterization. *J Phys Chem*, 2000, B104(4): 695—702
- Schmid G, Chi L F. Metal clusters and colloids. *Adv Mater*, 1998, 10: 515—526[DOI]
- Braun E, Eichen Y, Sivan U, et al. DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. *Nature*, 1998, 391(19): 775—778[DOI]
- Keren K, Krueger M, Gilad R, et al. Sequence-specific molecular lithography on single DNA molecules. *Science*, 2002, 297(5): 72—75[DOI]
- Ford W, Harnack O, Yasuda A, et al. Platinated DNA as precursors to templated chains of metal nanoparticles. *Adv Mater*, 2001, 13: 1793—1797[DOI]
- Kirsch R, Mertig M, Pompe W, et al. Three-dimensional metallization of microtubules. *Thin Solid Films*, 1997, 305: 248—253[DOI]
- Markowitz M, Baral S, Brandow S, et al. Palladium ion assisted formation and metallization of lipid tubules. *Thin Solid Films*, 1993, 224: 242—247[DOI]
- Mertig M, Kirsch R, Pompe W, et al. Fabrication of highly oriented nanocluster arrays by biomolecular templating. *Eur Phys J D*, 1999, 9: 45—48[DOI]
- Wong K K W, Mann S. Biomimetic synthesis of cadmium sulfide-ferritin nanocomposites. *Adv Mater*, 1996, 8: 928—931[DOI]
- Xu L N, Zhou K C, Xu H F, et al. Copper thin coating deposition on natural pollen particles. *Appl Surf Sci*, 2001, 183: 58—61[DOI]
- 黎向锋, 李雅芹, 蔡军, 等. 微生物细胞磁性金属化研究. *科学通报*, 2003, 48(2): 145—148
- Berry V, Saraf R F. Self-assembly of nanoparticles on live bacterium: An avenue to fabricate electronic devices. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 6668—6673[DOI]
- Berry V, Rangaswamy S, Saraf R F. Highly selective, electrically conductive monolayer of nanoparticles on live bacteria. *Nano Lett*, 2004, 4(5): 939—942[DOI]
- Amiel C, Marie L, Denis C, et al. FTIR spectroscopy and taxonomic purpose: Contribution of the classification of lactic acid bacteria. *J Travert*, 2001, 81: 249—255
- Curk M C, Peladan F, Hubert J C. Fourier transform infrared(FTIR) spectroscopy for identifying lactobacillus species. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, 123: 241—248[DOI]
- Beveridge T J. Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int Rev Cytol*, 1981, 72: 229—317
- Beech I B. The potential use of atomic force microscopy for studying corrosion of metals in the presence of bacterial biofilms—an overview. *Int Biodet Biodeg*, 1996, 37: 141—149[DOI]
- Beech I B, Cheung C W S, Johnson D B, et al. Comparative studies of bacterial biofilms on steel surfaces using atomic force microscopy and environmental scanning electron microscopy. *Biofouling*, 1996, 10: 65—77
- Grantham M C, Dove P M. Bacterial-mineral interactions: Investigations using Fluid Tapping Mode atomic force microscopy. *Geochim Cosmochim Acta*, 1996, 60: 2473—2480[DOI]
- Wang J, He S Y, Xu L N, et al. Probing nanomechanical properties of nickel coated bacteria by nanoindentation. *Mater Lett*, 2006, 61(3): 917—920[DOI]