

自组装金属离子——脱氧核酶复合纳米颗粒制备及其体外抗菌活性研究

李仁熙, 李娴晰, 李雨橙, 付李俊, 潘青山*

江西科技师范大学药学院, 江西 南昌 330013

DOI:10.61369/RSTD.2026020003

摘要: 传统抗生素耐药情况日益严峻, 很多抗生素的治疗效果达不到预期, 新型抗菌药物的开发迫在眉睫。金属离子在抗菌方面可以通过抑制细菌细胞壁的形成、结合菌体内的大分子物质等机理抑制细菌的正常生长繁殖, 脱氧核酶可以切割细菌产生的 β -内酰胺酶, 从而减少细菌耐药性的产生, 从而达到优良的抗菌效果。在金属离子中, 铜离子对脱氧核酶有较高的亲和性, 所以本文旨在通过自组装策略以铜离子和脱氧核酶为底物, 合成一种新型抗菌化合物铜离子-脱氧核酶 (Cu-DNAzyme, Cu-Dzy) 复合纳米颗粒。

关键词: 金属离子; 脱氧核酶; 自组装; 抗菌

Study on Preparation of Self-Assembled Metal Ion-DNAzyme Composite Nanoparticles and Their Antibacterial Activity In Vitro

Li Renxi, Li Xianxi, Li Yucheng, Fu Lijun, Pan Qingshan*

School of Pharmacy, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang, Jiangxi 330013

Abstract: The situation of traditional antibiotic resistance is becoming increasingly severe, and the treatment effect of many antibiotics cannot meet expectations. The development of new antibiotics is urgent. Metal ions can inhibit the normal growth and reproduction of bacteria through mechanisms such as inhibiting the formation of bacterial cell walls and binding to macromolecules within the bacterial body. Deoxyribonucleases can cleave β -lactases produced by bacteria, thereby reducing the development of bacterial resistance and achieving excellent antibacterial effects. In metal ions, copper ions have a high affinity for deoxyribonucleases. Therefore, this study aims to synthesize a novel antibacterial compound (Cu-DNAzyme, Cu-Dzy) composite nanoparticles, using copper ions and deoxyribonucleases as substrates through self-assembly strategy.

Keywords: metal ions; deoxyribozyme; self-assembly; antibacterial

引言

抗生素最早发现于20世纪, 在后面的世界大战中抗生素得到了广泛的使用治疗细菌感染, 挽救了成千上万人的生命。但同时随着科学进步和人工智能时代的到来, 随之而来的人类面临的风险挑战也不断严峻, 一些超级细菌对人类生命的危害的报道也不断出现在人们的视野, 人们对此产生了极大的恐慌, 科学工作者也在不断研究新型抗菌药物以此来迎接新的挑战。开发新药的过程及周期都非常长, 目前通过高通量筛选、虚拟筛选、基因编辑技术和靶向蛋白降解技术等现代技术手段^[1], 科学家能够快速筛选和优化先导化合物, 并且设计出了很多实验证明有很好抗菌效果的化合物, 为临床药物治疗提供了很多有利的依据。尽管挑战依然存在, 但科学界的持续创新为应对抗生素耐药性带来了希望。未来, 通过加强全球合作、优化用药策略、推动技术创新, 人类终将在与耐药菌的博弈中找到新的平衡点。正如青霉素的发现改变了20世纪的医学史一样, 新一代抗菌策略的突破必将为人类健康带来新的曙光。

项目基金:

国家自然科学基金 (22264015)

2024年国家级大学生创新训练计划项目 (202411318031)

作者简介: 李仁熙, 2023年9月就读于江西科技师范大学。现为江西科技师范大学药学院本科生, 在潘青山教授的指导下进行研究。目前主要研究领域为材料合成及抗菌性能研究。

通讯作者: 潘青山, 江西科技师范大学药学院教授、研究生导师。2020年湖南大学分析化学专业博士学位毕业后到江西科技师范大学大学工作至今。目前主要从事功能生物纳米材料可控合成等方面的研究工作, 主持国家自然科学基金项目1项, 江西省杰出青年基金项目1项, 完成省自科面上项目1项。发表论文30余篇, 包括 Chemical Engineering Journal, Acta Biomaterialia 等。邮箱: pqs2016@163.com

一、细菌的耐药性机制

近年来, 由于抗生素的大量滥用, 导致很多细菌产生了耐药性, 这种报道屡见不鲜, 例如, 在根除幽门螺旋杆菌, 临床上常使用四联疗法或三联疗法来治疗, 如果没有遵医嘱或者随意滥用, 容易导致幽门螺旋杆菌对抗菌药物产生耐受性等。细菌耐药性产生的原因是多方面的。主要有以下几种原因: ①细菌产生灭活抗生素的酶, 例如, 对青霉素等耐药的细菌会产生 β -内酰胺酶来破坏化合物。②抗菌药物作用靶点发生改变, 细菌通过改变自身与药物结合的作用靶点, 来防止药物作用于细菌。③细菌通透性的改变。④细菌存在主动外排系统, 可以通过主动外排泵将进入菌体的药物泵出体外。⑤形成细菌生物被膜以及出现牵制机制等^[2]。

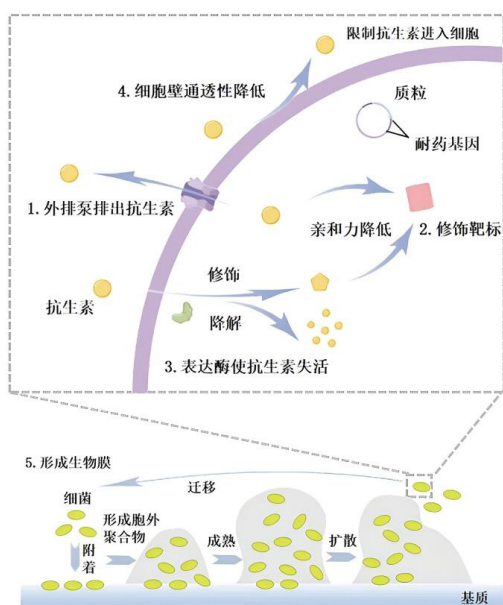


图1 细菌耐药机制

二、自组装铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒的合成

根据文献的相关研究, 合成自组装铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒的方法如下^[3]: 在典型的 Cu-Dzy 合成中, DNAzyme 和 Cu^{2+} 的混合物在 95°C 孵育 3 h, 离心用水洗涤。

首先制备不同浓度的氯化铜溶液, 使用分析天平分别称取 0.135 g、0.269 g 和 0.538 g 的二水氯化铜分别溶于适量的去离子水中, 并用去离子水分别定容至 100 mL, 各自混匀后分别得到浓度为 10 mM、20 mM 和 40 mM 的氯化铜溶液。取适量浓度为 20 mM 的氯化铜溶液与等体积的浓度为 20 μM 的脱氧核酶, 加入到装有搅拌子的微量瓶中进行搅拌使其充分混合, 并在 95°C 下孵育 3 h。待反应体系完全反应后, 准备洁净的离心管, 使用移液枪准确取反应混合液转移至离心管中。将离心管对称放入高速离心机转子内, 设置离心参数为 14000 rpm, 离心时间 10 分钟, 启动离心程序。离心结束后, 小心取出离心管置于管架上, 用移液枪缓慢吸弃上清液, 注意避免扰动管底沉淀, 之后用去离子水清洗离心

沉淀三遍, 以确保除去未反应的原料及杂质, 最终所得沉淀即为合成的铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒。

(一) 材料的表征

将所得的复合纳米颗粒在扫描电子显微镜下观察并进行表征。具体说明如下: 取少量实验所获得的铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒的固体, 加入一定量的无水乙醇并进行超声使其溶解并使组分分散均匀。而后取少量混合均匀的溶液滴于硅胶板上, 并使其自然风干, 等完全风干后将其置于电子显微镜下, 观察纳米颗粒的形状及大小后调节清晰并进行拍摄, 得出自组装纳米颗粒的 SEM 图。

(二) 金黄色葡萄球菌的生长曲线及 MIC 实验

金黄色葡萄球菌菌液的培养: 首先在无菌条件下, 将金黄色葡萄球菌接种至含有特定成分 (包括铵盐、葡萄糖及必需无机盐) 的培养基中。接种完成后, 将培养基置于恒温培养箱内, 设定培养温度为 37°C。

菌液的稀释: 将上述的金黄色葡萄球菌培养至细菌处于对数期 ($\text{OD}_{600}=0.6-0.8$), 配置浓度约 109 CFU/mL 的菌液, 并将该菌液稀释 1000 倍使用。

药液的准备: 精密称定 2.4 中所制备的铜离子浓度为 40 mM 的铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒 1.024 mg, 加入 1 mL Tris-HCl 缓冲溶液溶解, 制得浓度为 1024 $\mu\text{g/mL}$, 同上分别制得浓度为 1024 $\mu\text{g/mL}$ 脱氧核酶溶液和二水氯化铜溶液。

铺板: 将样品分为三组, 分别为 Cu^{2+} 组, DNAzyme 组, 及 Cu -DNAzyme 组。取一块 96 孔板, 在 96 空板的最上排、最下排、和最左排各加入 200 μL 培养液, 作为阴性对照。从第三列开始, 每个孔内加入 100 μL 培养液, 在第二列孔加入 200 μL 的浓度为 1024 $\mu\text{g/mL}$ 的药液, 然后从第二列孔吸 100 μL 入第三列孔, 混匀后吸 100 μL 入第四列孔, 依次等比稀释 (二倍稀释) 至第十列孔 (十个浓度), 从第十个孔吸取 100 μL 药液弃掉, 第十一列孔中不加入药液。将稀释好的菌液吸取 100 μL 加入除上排、下排、左排以外的孔中 (即最后两列列为菌液对照), 所得的混合后的菌液中药物浓度分别为培养液、1024、512、256、128、64、32、16、8、4、0 $\mu\text{g/mL}$ 。加完菌液后, 将 96 孔板放在恒温恒湿培养箱中培养 0、2、4、6、8、10、12、24、48 h 后在酶标仪处检测 OD_{600} , 绘制生长曲线。

(三) 细菌平板涂布测抑菌率

本实验所用菌种为金黄色葡萄球菌, 具体实验步骤如下所示: 整个实验在超净工作台中进行, 准备 4 个添加有铵盐、葡萄糖和无机盐的培养基。

菌液的涂布: 准备好 2.5.1 中稀释的菌液, 用酒精棉擦拭移液枪进行消毒, 吸取 100 μL 稀释后的菌液滴加至培养基表面, 取出浸泡于 75% 的酒精中的涂布棒, 略微晾干后在酒精灯火焰上方灼烧灭菌, 待涂布棒冷却后将刚滴入的菌液均匀涂布开, 涂布时应注意均匀分布, 避免涂成厚重的一片和将菌液涂布至边缘而影响计数。涂布棒使用后置于酒精灯上消毒后浸泡于 75% 的酒精中。

样品的涂布: 准备好 2.5.1 中稀释的同浓度的不同药液和 0.9% 的生理盐水, 以生理盐水组为例, 用干净的酒精棉擦拭移液枪进

行消毒，吸取100 μ L 0.9%生理盐水滴加至培养基表面，取出浸泡于75%的酒精中的涂布棒，略微晾干后在酒精灯火焰上方灼烧灭菌，待涂布棒冷却后将刚滴入的菌液均匀涂布开。剩下三组（Cu²⁺组、DNAzyme组、Cu-DNAzyme组）样品重复上述操作。将全部涂布好的培养基置于恒温培养箱中，设置培养温度为37 $^{\circ}$ C，培养12–24 h。到时间后将培养基从恒温培养箱中取出并计数全部菌落数，后计算其对应的抑菌率。

三、结果与讨论

（一）铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒 SEM表征分析

在实验部分，通过自组装策略合成了铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒，为了进一步了解该复合物的结构形状以及尺寸大小等相关信息，我们通过扫描电镜对其进行了结构表征，实验结果如图2所示，图中标尺为200 nm，可以较为清楚的观测到复合物的结构与形状，纳米颗粒呈近似球形，分布较为均匀，且较多颗粒黏连在一起成团片状，边缘模糊不行，在其表面上有多个球状颗粒，这些球状颗粒大小在100–200 nm左右，形状相似边缘相对清晰。这表明该方法能较好的制得铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒。

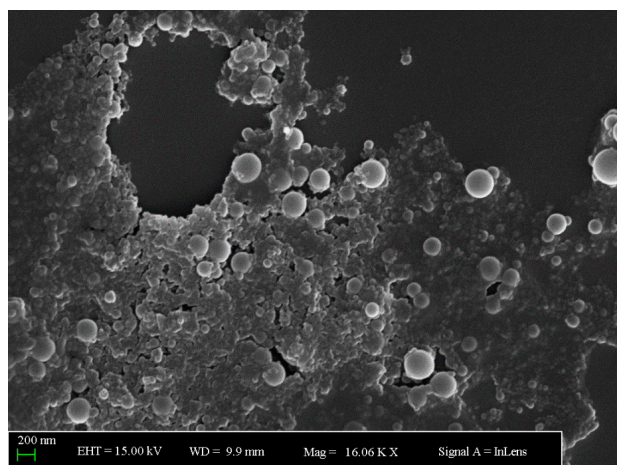


图2 标尺为200 nm时铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒的SEM图

（二）不同浓度的铜离子溶液制得Cu-DNAzyme纳米颗粒 SEM表征分析

基于铜离子浓度对纳米颗粒的合成可能造成影响，合成了10 mM、20 mM、40 mM的铜离子和脱氧核酶复合纳米颗粒在扫描电镜下来观察各自的SEM图，所得结果如下图所示，根据3可知，图片的标尺均为200 nm，当铜离子的浓度为10 mM时，所得的纳米颗粒形状不一，且大小相差悬殊，可知当铜离子浓度为10 mM时，不能得到最佳的纳米颗粒。根据图3可知，当铜离子浓度为20 mM时可以看见很多分子连成团片状，黏连在一起，边缘模糊，表面有球状物的形成，形成的球状物的直径在100–300 nm之间。根据图片3可知，当铜离子浓度为40 mM时，所得的纳米颗粒较为分散，某些粒子保持了一定的独立性，但有些粒子粘连成团状，所得粒子形状和大小相对均一，且结构较为完整的圆球的直径在100–200 nm之间。

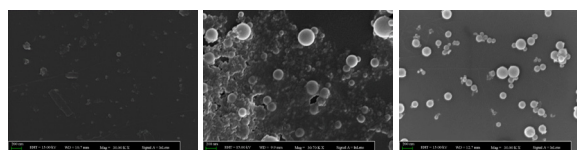


图3 铜离子浓度为10 mM、20 mM、40 mM时的铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒的SEM图

（三）金黄色葡萄球菌生长曲线及MIC实验结果

本实验使用96孔板和酶标仪测定金黄色葡萄球菌的生长曲线和最小抑菌浓度，将样品分为三组，即分别为Cu²⁺组、DNAzyme组、Cu-DNAzyme组，并分别在0、2、4、6、8、10、12、24、48 h时取出恒温培养箱中的样品，并通过多功能酶标仪测OD600值，由测得的数据作生长曲线所得实验结果如图所示，各组 and 空白对照组相比较含有不同浓度的Cu²⁺、DNAzyme、Cu-DNAzyme的药液样本里处于对数生长期的细菌量较不加药液的空白对照组的细菌量有所减少，表明Cu²⁺、DNAzyme、Cu-DNAzyme对金黄色葡萄球菌有不同的程度的抗菌作用。

由图4.1可知，空白对照组的细菌在前2 h内生长较为缓慢，2 h后细菌的生长速度逐渐加快，并呈指数增加，在12 h后达到相对平稳。其中含铜离子的药液浓度分别为4、8、16、32、64、128 μ g/mL时，在4 h后进入生长对数期，12 h后进入相对稳定期，当含铜离子浓度达到256 μ g/mL时，细菌未见明显生长，即Cu²⁺组的MIC为256 μ g/mL。由图4.2可知，空白对照组的金黄色葡萄球菌在2 h前生长曲线较为平稳，生长较为缓慢，当2h后细菌开始出现明显的生长，生长进入对数期，12 h后生长曲线逐渐平稳，细菌生长达到稳定期，当含有DNAzyme药液的浓度分别为4、8、16、32、128、256 μ g/mL时细菌在2 h后生长开始达到对数期12 h后生长达到平稳期，浓度为512 μ g/mL的药液从4 h后开始达到生长的对数期，12 h达到生长的平稳期。浓度为1024 μ g/mL的药液并未见明显的细菌生长，所以DNAzyme组的MIC为1024 μ g/mL。由图4.3可知，空白对照组的金黄色葡萄球菌在2 h前生长曲线较为平稳，生长较为缓慢，当2 h后细菌开始出现明显的生长，生长进入对数期，12 h后生长曲线逐渐平稳，细菌生长达到稳定期，当含有Cu-DNAzyme药液的浓度分别为4、8、16、32、64 μ g/mL时细菌在4 h后生长开始达到对数期12 h后生长达到平稳期，浓度为128、256、512、1024 μ g/mL的药液并未见明显的细菌生长，所以Cu-DNAzyme组的MIC为128 μ g/mL。

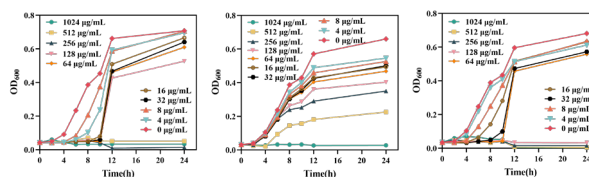


图4 铜离子组、DNAzyme组、Cu-DNAzyme组金黄色葡萄球菌生长曲线

（四）细菌平板涂布测抑菌率实验结果

经过16个小时的培养后，所得培养基如图所示，通过计数得生理盐水组的金黄色葡萄球菌的菌落数为1334；Cu²⁺组的金黄色

葡萄球菌的菌落数为222，其抑菌率经计算为83.36%、DNAzyme组金黄色葡萄球菌的菌落数为172，其抑菌率经计算为87.11%、Cu-DNAzyme组金黄色葡萄球菌的菌落数为9，其抑菌率经计算为99.33%。根据标准，抑菌率大于50%则证明有抑菌作用，所以Cu²⁺、DNAzyme、Cu-DNAzyme均有抑菌作用，且Cu-DNAzyme复合纳米颗粒的抗菌效果最为显著。

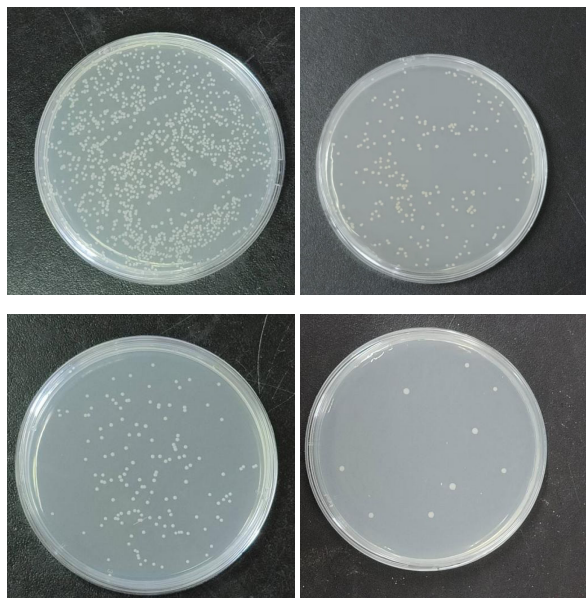


图5 生理盐水组、铜离子组、DNAzyme组、Cu-DNAzyme组金黄色葡萄球菌平板

(五) 实验结论

本文通过一系列SEM表征分析、体外抗菌实验分析得到以下相应结论：

1. 通过观察不同浓度铜离子与脱氧核酶组成的纳米颗粒的扫描电子显微镜图，相比于铜离子浓度为10 mM和20 mM时，其中铜离子浓度为40 mM时，所得的纳米颗粒结构更加完整，大小更

加均一，较少黏连成片状，且铜离子浓度为20 mM的纳米颗粒较铜离子浓度为10 mM的纳米颗粒更加完整，所以铜离子浓度对自组装的纳米颗粒的合成有一定的影响，且铜离子浓度越高，合成的纳米颗粒越完整均一。

2. 相较于单一使用铜离子或者脱氧核酶作为抗菌物质，自组装铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒抗菌效果更好，其最小抑菌浓度为128 μg/mL，且其抑菌率达到了99.33%。

四、全文结论与展望

实验结果表明，我们以铜离子和脱氧核酶为原料合成了铜离子-脱氧核酶复合纳米颗粒，并通过扫描电镜观察其外形为圆球形，且形状较为均一，大小在100-300 nm范围内。后续实验设计配制不同浓度铜离子与脱氧核酶进行自组装结合，并分别对它们进行SEM表征，结果显示，当铜离子的浓度为40 mM时，所得的纳米颗粒外形最好。后对所合成的铜离子浓度为40 mM的纳米颗粒进行体外抗菌分析，其对金黄色葡萄球菌的抑菌率可达99.33%，相比于单一以铜离子或脱氧核酶作为抑菌剂，其抑菌效果更好，抗菌效果更加明显且它最小抑菌浓度(MIC)为128 μg/mL。且实验结果表明铜离子浓度对合成反应有一定的影响，且浓度越高，影响作用越明显，铜离子对脱氧核酶的亲和性越高。这种独特的分子剪刀特性，使其在生物传感器开发、基因调控等领域展现出巨大应用价值。与此同时，金属离子如银离子(Ag⁺)、铜离子(Cu²⁺)等因其固有的抗菌活性，长期以来被广泛应用于各种抗菌场景。通过巧妙的自组装技术将这两者结合起来，可以产生显著的协同效应，还具有以下优势：首先，纳米尺度的载体可以促进金属离子的可控释放，延长其抗菌作用时间；再者，通过合理设计，还可以实现对特定病原菌的靶向识别和杀伤。

参考文献

- [1] 李荣, 范月蕾, 赵晓勤, 等. 新药研发进展与发展态势分析 [J]. 生命科学, 2025, 37(1): 86-96.
- [2] 杜煜, 陈晓辉, 姚佳, 等. 细菌耐药机制及新型抗菌药物研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2025, 20(03): 397-400.
- [3] Liu C, Chen Y, Zhao J, et al. Self-Assembly of Copper-DNAzyme Nanohybrids for Dual-Catalytic Tumor Therapy [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(26): 14324-14328.