

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20720121150028

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

“一步法”构建大肠杆菌类黑色素聚合物 包裹及其抗紫外抗酶解性能研究

One-step Deposition of Melanin-like Polymer on individual
Escherichia Coli cells Exhibiting an Special Effect of UV- and
Lysozyme - Resistance

孙洲

指导教师姓名: 石 巍 教授

专 业 名 称: 材料物理与化学

论文提交日期: 2015 年 月

论文答辩时间: 2015 年 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

尽管紫外线只占到达地球表面的阳光辐射能量中的一小部分，但若长期暴露于这部分紫外辐射之下，几乎所有的有机生命体都将直接或间接地因受到光损伤而导致其遗传物质核酸遭受破坏，进而造成机体死亡。为了应对太阳光中的这部分紫外辐射，某些微生物已经进化出了许多生物化学或生物行为光保护机制。黑色素，由于其具有很强光吸收和良好能量转换性质，可以将有害辐射能高效地转换为热能进而耗散至周围环境中，黑色素一直被认为是所有已知的光保护机制中最高效的。因此，结合黑色素的性质，人们可以使用其来提高某些生物工程菌的抗紫外性能，在生物医学领域开拓出更广阔的应用前景。

基于贻贝足丝蛋白独特的粘附性启发，人们发现多巴胺单体（Dopamine）可以在水溶液中自发氧化聚合，形成纳米尺寸级的聚多巴胺（Polydopamine, PDA）类黑色素颗粒物，并且聚多巴胺（PDA）表现出很好的粘附性，能够通过迈克尔加成（Michael addition）或者席夫碱反应（Schiff base reaction）与含有氨基（ $-NH_2$ ）或者巯基（ $-SH$ ）官能团的分子发生共价偶联，具有很好的潜在修饰性质。

本文结合聚多巴胺（PDA）与天然黑色素的类似性及其独特的粘附性，运用聚多巴胺对大肠杆菌菌体进行粘附包裹，制备出聚多巴胺包裹大肠杆菌核壳结构（*E. coli*@PDA）。本文的主要研究工作如下所述：

- （1）合成聚多巴胺类黑色素纳米颗粒，并对其物理化学性质进行系列表征；
- （2）优化聚多巴胺对大肠杆菌的包裹条件，并对包裹产物进行实验表征；
- （3）对包裹产物进行抗紫外性能以及抗酶解性能的评估。

本文的主要研究结果如下：聚多巴胺纳米颗粒（PDA）在水中具有很好的稳定性且颗粒尺寸可以通过反应体系酸碱性进行调控，其具有与黑色素十分类似的光吸收性质且化学组成官能团也与黑色素相似，经过测定其光热能量转换效率达到 43%。聚多巴胺包裹层具有小分子通透性，能够保证包裹物的活性。经过聚多巴胺包裹的大肠杆菌具有一定的抗紫外与抗酶解特性，且聚多巴胺包裹层对包裹菌的生长具有一定的延迟生长效应。

关键词：多巴胺；聚多巴胺；黑色素；紫外吸收；细菌包裹

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

In nature, almost all the organisms would gain cellular photodamage which directly or indirectly destroys their nucleic acids from prolonged exposure to UV radiation, although UV radiation constitutes only a minor proportion of the sunlight. In the microbiota, in order to protect themselves against UV radiation, certain microbes have evolved some important photoprotective mechanisms, such as biochemical protection or biobehaviour protection. Of all these types of mechanisms known to act as sunscreens, melanin turns out to be the most effective one, due to its excellent ability to absorb UV radiation and high conversion rate to dissipate harmful radiant energy into heat. Therefore, melanin owns significant potential to endow fragile organisms such as recombinant or bioengineered microbes with photoprotective ability. And successfully integrating them with exogenous melanin becomes key topics of this technology.

Inspired by mussel adhesive foot protein, dopamine monomer (DA) was reported to self-polymerize into melanin-like nanoparticles, named polydopamine (PDA) in aqueous solution by air oxidation, and exhibiting excellent adhesivity to virtually all organic or inorganic substrates. More importantly, it is proved to be loads of functional groups such as $-OH$ or $-NH_2$ in its chemical structure, which can be used as cross-linkers for further modification via Michael addition or Schiff base reaction.

Herein, combining the similarity with natural melanin and chemical adhesivity of melanin-like PDA nanoparticles, we prepared PDA encapsulated *Escherichia Coli* cells (*E. coli*@PDA), showing many interesting properties. The main work in this paper included as following:

- (1). Synthesizing melanin-like PDA nanoparticles, exploring its physicochemical properties.
- (2). Optimizing conditions for PDA shell formation on *E. coli* cells, characterizing the prepared *E. coli*@PDA product.
- (3). Evaluating the Uviolet- and Lyso-resistance of PDA shell.

It was found that: PDA nanoparticles was highly stable in natural water, showed a

continuing morphology changes with NaOH amounts varying, exhibited a similar UV-Vis absorption properties to natural melanin and demonstrated an excellent radiant energy dissipation capability with a photothermal conversion efficiency (η) up to 43%. The prepared PDA shell proved to be mechanically durable and selectively permissible retaining cellular metabolically active and viability, and show bit of inhibitory effects on the growth of encapsulated cells. More importantly, the aromatic PDA shells not only provided cells protection against UV radiation, allowing cells to remain metabolically active after prolonged exposure to UV radiation, but also demonstrated excellent resistance to lysozyme. Additionally, on the basis of the chemical reactivity of PDA, the cell surface can be further functionalized for applications of interests. We believe our work provide new insights for both fundamental research and applications of cell encapsulation.

Keywords: Dopamine; Polydopamine; Melanin; UV absorbing; Cell encapsulation

目录

摘要	I
Abstract	III
第一章 绪论	1
1.1 多巴胺概述	1
1.1.1 多巴胺简介.....	1
1.1.2 受贻贝启发的粘附性.....	2
1.1.3 多巴胺的主要聚合方式.....	4
1.1.4 聚多巴胺的结构模型及其聚合机理.....	5
1.1.4.1 类真黑色素聚合模型.....	6
1.1.4.2 芳环共价聚合骨架模型.....	7
1.1.4.3 非共价自聚与共价聚合混合模型.....	7
1.1.4.4 广义条件模型.....	9
1.2 聚多巴胺与黑色素的相关性及其理化性质	11
1.2.1 光学性质：光吸收与荧光性.....	11
1.2.2 顺磁性.....	12
1.2.3 自由基掩蔽性.....	12
1.2.4 导电性.....	13
1.2.5 粘附性.....	13
1.2.6 金属离子螯合与氧化还原性.....	14
1.2.7 化学活性.....	15
1.2.8 生物相容性以及生物可降解性.....	17
1.2.9 聚多巴胺的其他性质.....	18
1.3 细胞包裹概述	19
1.3.1 材料的生物相容性.....	20
1.3.2 包裹层的通透性.....	20
1.3.3 包裹层的机械稳定性.....	21
1.4 聚多巴胺的现有应用	21

1.4.1 聚多巴胺在能源领域的应用.....	21
1.4.1.1 电池	21
1.4.1.2 超级电容器	23
1.4.1.3 催化剂.....	24
1.4.2 聚多巴胺在生物医学领域的应用.....	25
1.4.2.1 细胞粘附包裹和图案化	25
1.4.2.2 组织工程	27
1.4.2.3 体内癌症光热治疗	28
1.5 本论文的研究目的和主要研究内容	28
第二章 类黑色素纳米颗粒的合成及表征.....	29
2.1 前言	29
2.2 实验部分	29
2.2.1 实验试剂和仪器.....	29
2.2.2 类黑色素纳米颗粒的合成.....	31
2.2.3 表征手段.....	32
2.2.3.1 场发射扫描电镜 (FESEM) 表征.....	32
2.2.3.2 紫外可见光吸收光谱 (UV-vis) 表征.....	32
2.2.3.3 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 表征	32
2.2.3.4 表面 Zeta 电位 (ζ -potential) 表征	33
2.2.3.5 能量转换效率表征	33
2.3 结果与讨论	33
2.3.1 不同碱度条件下类黑色素纳米颗粒的形貌分析.....	33
2.3.2 类黑色素纳米颗粒的红外表征.....	35
2.3.3 类黑色素纳米颗粒紫外可见光吸收光谱表征.....	35
2.3.4 类黑色素纳米颗粒的表面电位表征.....	36
2.3.5 类黑色素纳米颗粒光能转换效率表征.....	37
2.4 本章小结	39
第三章 微生物的培养、类黑色素纳米颗粒包裹及表征	40
3.1 前言	40

3.2 实验部分	40
3.2.1 实验试剂和仪器.....	40
3.2.2 微生物的培养.....	42
3.2.3 微生物的聚多巴胺包裹.....	43
3.2.4 表征手段.....	44
3.2.4.1 场发射扫描电镜 (FESEM) 表征.....	44
3.2.4.2 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 表征	44
3.2.4.3 紫外可见光吸收光谱 (UV-vis) 表征.....	45
3.2.4.4 表面 Zeta 电位 (ζ -potential) 表征	45
3.3 结果与讨论	45
3.3.1 聚多巴胺包裹微生物过程分析.....	45
3.3.2 包裹条件中微生物生长期的选择.....	47
3.3.3 不同包裹条件下场发射扫描电镜 (FESEM) 表征	49
3.3.4 不同包裹条件下表面 Zeta 电位 (ζ - potential) 表征	51
3.3.5 不同包裹条件下傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 表征.....	52
3.3.6 不同包裹条件下紫外可见吸收光谱 (UV-vis) 表征.....	53
3.4 本章小结	54
第四章 微生物聚多巴胺包裹抗紫外与抗酶解性能研究	56
4.1 前言	56
4.2 实验部分	57
4.2.1 实验试剂和仪器.....	57
4.2.2 聚多巴胺包裹大肠杆菌生长曲线测定.....	58
4.2.3 聚多巴胺包裹大肠杆菌对紫外直接刺激反应评估.....	59
4.2.4 聚多巴胺包裹大肠杆菌抗紫外性能评估.....	60
4.2.5 聚多巴胺包裹大肠杆菌抗酶解性能评估.....	60
4.3 结果与讨论	60
4.3.1 聚多巴胺包裹层对大肠杆菌生长抑制效果.....	62
4.3.2 大肠杆菌紫外刺激敏感性及其绿色荧光蛋白活性	63
4.3.3 不同实验条件下大肠杆菌抗紫外辐射性能.....	66

4.3.4 不同实验条件下大肠杆菌抗酶解性能.....	67
4.4 本章小结	68
第五章 主要结论和研究展望	70
5.1 主要结论	70
5.2 研究展望	71
参 考 文 献	72
发表论文.....	85
致 谢	86

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chaper 1 Introduction	1
1.1 Overview of dopamine	1
1.1.1 Overview of dopamine.	1
1.1.2 Adhesivity inspired by mussel.	2
1.1.3 The main polymerization methods of dopamine	4
1.1.4 The structure model of polydopamine	5
1.1.4.1 Eumelanin model	6
1.1.4.2 Covalent polymeric skeleton model.	7
1.1.4.3 Covalent and non covalent model	7
1.1.4.4 Generalized model	9
1.2 The Physicochemical properties and correlations between polydopamine and eumalanin	11
1.2.1 Optical property	11
1.2.2 Paramagnetism.	12
1.2.3 Free radicals masking	12
1.2.4 Conductivity.	13
1.2.5 Adhesivity	13
1.2.6 Metal ion chelating and redox property.	14
1.2.7 Chemical reactivity	15
1.2.8 Biocompatibility and biodegradation.	17
1.2.9 Other properties of polydopamine	18
1.3 Overview of cell encapsulation	19
1.3.1 Biocompatibility	20
1.3.2 The permeability of coating layer	20
1.3.3 The mechanical stability of coating layer	21
1.4 The existing application of polydopamine	21

1.4.1 Polydopamine in the field of energy application	21
1.4.1.1 Batteries	21
1.4.1.2 Supercapacitor.	23
1.4.1.3 Catalyst	24
1.4.2 Polydopamine in the field of biomedical application	25
1.4.2.1 Cell adhesion, encapsupation and patterning	25
1.4.2.2 Tissue engineering.	27
1.4.2.3 Photothermal therapy	28
1.5 Main purpose and contents	28
Chaper 2 The synthesis and characterization of melanin-like nanoparticles	29
2.1 Intruduction.	29
2.2 Experimental section	29
2.2.1 Experiment reagents and Instruments	29
2.2.2 The synthesis of melanin-like nanoparticle	31
2.2.3 Analytical methods.	32
2.2.3.1 Field emission scan electron microscopy (FESEM) characterization.	32
2.2.3.2 UV-visible absorption spectrum (UV-vis) characterization.	32
2.2.3.3 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) characterization	32
2.2.3.4 Surface Zeta potential (ζ -potential) characterization.	33
2.2.3.5 Energy conversion efficiency	33
2.3 Results and discussion	33
2.3.1 Morphology analysis of Polydopamine under different basicity	33
2.3.2 FT-IR analysis of polydopamine	35
2.3.3 UV-vis analysis of polydopamine	35
2.3.4 ζ -potential analysis of polydopamine	36
2.3.5 Energy conversion efficiency of polydopamine	37
2.4 Conclusions.	39
Chaper 3 Microbial culture, encapsulation and characterization	40
3.1 Introduction.	40
3.2 Experimental section	40

3.2.1 Experiment reagents and Instruments	40
3.2.2 Microbial culture	42
3.2.3 Microbial encapsulation of polydopamine.....	43
3.2.4 Analytical methods.	44
3.2.4.1 Field emission scan electron microscopy (FESEM) characterization.....	44
3.2.4.2 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) characterization.....	44
3.2.4.3 UV-visible absorption spectrum (UV-vis) characterization.....	45
3.2.4.4 Surface Zeta potential (ζ -potential) characterization.	45
3.3 Results and discussion	45
3.3.1 Encapsulation process analysis	45
3.3.2 The choice of growth period for encapsulation	47
3.3.3 FESEM analysis under different coating conditions	49
3.3.4 Surface potential analysis under different coating conditions	51
3.3.5 FT-IR analysis under different coating conditions.....	52
3.3.6 UV-vis analysis under different coating conditions.	53
3.4 Conclusions.....	54
Chaper 4 UV and lysozyme resistance property of polydopamine coating	56
4.1 Introduction	56
4.2 Experimental section	57
4.2.1 Experiment reagents and Instruments.	57
4.2.2 The growth curve analysis of coated and uncoated <i>E. coli</i> s	58
4.2.3 The direct sensitivity to UV of coated and uncoated <i>E. coli</i> s	59
4.2.4 The evaluation of UV resistance of polydopamine coating.....	60
4.2.5 The evaluation of lysozyme resistance of polydopamine coating	60
4.3 Results and discussion	60
4.3.1 The growth inhibition effect of polydopamine coating	62
4.3.2 The UV sensitivity and relative GFP activity of <i>E. coli</i> s.	63
4.3.3 The UV resistance property of coated <i>E. coli</i> s.	66
4.3.4 The lysozyme resistance of coated <i>E. coli</i> s	67
4.4 Conclusions.....	68

Chapter 5 Summaries	70
5.1 Conclusions.....	70
5.2 Expectations.....	71
References.....	72
Published dissertation.....	85
Acknowledgements	86

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 绪论

1.1 多巴胺概述

1.1.1 多巴胺简介

多巴胺($C_6H_3(OH)_2-CH_2-CH_2-NH_2$), 英文名 Dopamine, DA, 是一种脑内分泌物, 属于一种脑内神经传导递质可以帮助细胞传导脉冲化学信号, 相对分子量为 153。对光线敏感, 极易被氧化, 遇氧马上自发氧化变色。多巴胺最常见的使用形式为其盐酸盐形式, 即多巴胺盐酸盐 (dopamine hydrochloride), 它是一种颜色为白色或是类白色的有光泽晶体, 无臭、味微苦, 易溶解于水、甲醇、乙醇; 微溶于氯仿、乙醚、苯、甲苯。熔点 $243^{\circ}C-249^{\circ}C$ ^[1]。多巴胺的结构示意图如图 1-1 所示。

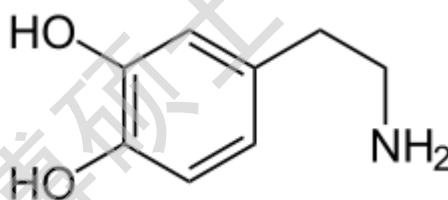


图 1-1 多巴胺单体 (DA) 的结构式

Fig. 1-1 The chemical structure of DA

多巴胺晶体主要有两种传统的制备方法^[1]: 可以通过二羟基苯丙氨酸在多巴脱羧酶的作用下直接生产, 其反应结构式如图 1-2 所示。



图 1-2 多巴胺制备反应式^[1]

Fig. 1-2 The preparation of dopamine^[1]

此外, 多巴胺晶体也可以先由香兰素 (3-甲氧基-4-羟基苯甲醛) 与硝基甲

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.