

针尖的分子生物物理力学研究进展*

孙晋美 郭万林†

南京航空航天大学纳米科学研究所, 南京 210016

摘 要 围绕包括扫描探针显微镜在内的各种探针技术下核酸、蛋白质等生物分子及生物材料的生物力学与力-电耦合实验研究, 较系统地总结了分子层次或纳米尺度下生物分子和材料的力学性能的扫描探针显微镜、光镊、磁镊等探针技术的实验研究方法和主要进展, 进而探讨了在“针尖”这个极小、极特殊环境下的分子生物物理力学研究状况. 通过介绍借助探针技术研究相关生物物质的结构、力学、电学等性能以及提出的一些理论模型, 指出探针技术在生物分子(包括遗传物质和蛋白质)力学性能、纳米生物材料结构及分子仿生等研究中的广泛意义. 提出多场耦合作用下的针尖的生物物理力学研究必定是将来研究的重点; 将针尖的分子生物力学的物理实验研究与分子物理力学理论、计算科学相结合, 发展分子物理力学虚拟实验技术是本领域的一个重要发展方向.

关键词 分子生物物理力学, 探针技术, 扫描探针显微镜, 弹性, 多场耦合, 自组装

1 概述

1981 年 Binning 和 Rohrer 利用量子理论中的隧道效应发明了扫描隧道显微镜 (scanning tunneling microscopy, STM)^[1], 并很快应用到生物科学的研究中. 以后又出现了许多同 STM 技术相似的一系列扫描探针显微镜 (scanning probe microscopy, SPM)^[2], 其不是采用物镜成像, 而是采用尖锐的探针, 扫描待测样品表面的性质. 扫描探针显微镜包括: 原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM)^[2], 摩擦力显微镜 (friction force microscopy, FFM)^[3], 磁力显微镜 (magnetic force microscopy, MFM)^[4] 等, 其中 AFM 以其自身的优势, 例如样品制备简单、可在多种环境中操作、纳米尺度观察和操纵等, 其应用领域逐渐从最初的物理学、力学、材料学拓展到生物科学领域. 我们之前已经总结了关于针尖的化学物理力学^[5]方面的研究, 本文综述了以 SPM 为主要手段, 结合光镊 (optical tweezers)^[6]、磁镊 (magnetic tweezers)^[7]、玻璃微针 (glass needles)^[8]、生物膜力探针 (biomembrane force probe)^[9]、表面力仪 (surface force apparatus, SFA)^[10] 和纳米压痕仪 (nanoindenter)^[11] 等其它

测量针尖与样品间作用力的仪器, 研究生物分子、生物材料的物理力学性能与行为的主要方法和重要进展.

1.1 AFM 的工作原理、工作模式及碳纳米管针尖

AFM 的基本工作原理如图 1 所示. 微力测量主要由非常灵敏的弹性微悬臂结构实现, 其通常由氮化硅 (Si_3N_4) 制成, 力常数在 0.01~100 N/m 之间. 微悬臂尖端有一个很尖的探针用来在样品表面扫描, 当探针在样品表面扫描时, 由于样品表面原子结构起伏不平, 悬臂也就随之起伏, 于是激光二极管发出的激光束的反射也就起伏. 光电二极管将其接收、放大, 即可获得样品表面凹凸信息的原子结构图像. 针尖与样品之间的作用力可以导致微悬臂的弯曲 (或者有时是扭转), 这种相互作用力主要是针尖原子和样品表面原子之间的作用力, 其反映了样品的许多物理、力学、化学和电学等性质, 例如分子间的相互作用, 表面的疏水性, 摩擦力等. 大多数 AFM 将样品台安装在一个由 4 片压电体组成的扫描管上, 可以得到纳米及埃精度的三维位移. 一般来说, 扫描范围越小精度越高. 新型 AFM 在精度控制和新功能开发方面取

收稿日期: 2005-10-19, 修回日期: 2006-07-20

* 国家自然科学基金 (10372044, 50275073), 江苏省自然科学基金, 教育部创新团队和科技创新工程重大项目培育资金 (705021) 资助项目

† E-mail: nsiguo@nuaa.edu.cn

得很多进步, 但基本原理是相同的。

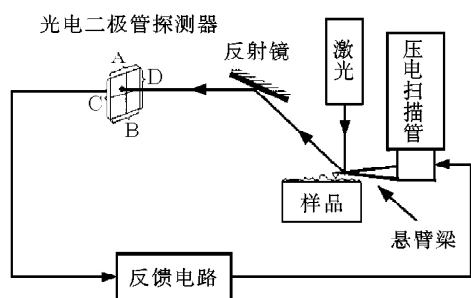


图 1 AFM 基本工作原理 [12]

AFM 有 3 种不同的工作模式: 接触模式 (contact mode)、非接触模式 (non-contact mode) 和轻敲模式 (tapping mode), 如图 2 所示。接触模式是指扫描过程中探针与样品表面紧密接触并在表面上滑动, 靠针尖与样品之间相接触原子间的排斥力来获得稳定且高分辨率的样品表面形貌图。但由于针尖在样品表面上滑动及样品表面与针尖的黏附力, 可能使得针尖受到损害, 样品产生变形, 故不太适合易变形的低弹性样品。非接触模式是控制探针在样品表面上方 5~20 nm 距离处扫描, 探针始终不与样品表面接触, 因此针尖不会对样品造成污染或产生破坏, 但是实际操作时针尖易被吸附在样品表面, 造成图像数据不稳定。轻敲模式则介于两者之间, 是指在扫描表面时悬臂梁在其共振频率处振荡, 在靠近表面时悬臂梁的振荡运动经历衰减, 导致振幅比远离表面时低, 使得扫描时保持不变的信号。因为针尖在振荡, 其只在很短的时间内扫描或接触样品, 大大减小作用在分子上的侧向力。因此这种模式可以成像非常精密的生物样品, 例如细胞、DNA 和蛋白质分子, 并使其在生理环境中可以部分性地自由运动。

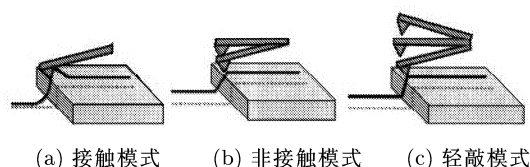


图 2 AFM 的 3 种工作模式 [13]

无论是单分子成像还是力的测量, AFM 所能达到的分辨率最终受到针尖结构的限制。传统的针尖是由单晶硅或氮化硅制作的, 其曲率半径为 5~15 nm, 由于较脆弱针尖形状和尺寸在成像时易发生变化。碳纳米管 (nanotubes, CNTs) [14] 针尖的出

现有效解决了这个问题, 其曲率半径只有 1.5~6 nm, 分辨率可达到分子级精度, 并且碳纳米管有极好的化学和机械稳定性以保证受较大负载时不发生破裂或塑性变形。所以碳纳米管 AFM 针尖, 特别是具有特定化学和生物识别能力的碳纳米管针尖在生物分子和材料的研究方面有着广泛的应用。

第 1 根碳纳米管原子力显微镜针尖是由获得诺贝尔奖的美国莱斯大学的 Smalley [15] 手工操作, 将多壁碳纳米管 (multi-walled carbon nanotubes, MWNTs) [14] 粘到传统的硅针尖上, 制备过程是在光镜下进行的。利用生物显微操纵器控制微悬臂针尖和碳纳米管的位置, 将涂有黏附剂的 AFM 针尖去接触簇状的多壁碳纳米管, 然后轻轻地拉出, 这样就在针尖末端粘附上一根碳纳米管。手工方法虽然简单, 但花费很长时间才能完成一个针尖的制作。利用化学气相沉积方法就可以实现批量生产分辨率极高的单壁碳纳米管 (single-walled carbon nanotubes, SWNTs) [16], 方法有两种: 一是先沉淀金属晶体到 AFM 针尖上, 再通过化学气相沉积法生长 SWNT; 二是将传统的 AFM 单晶硅针尖的顶端磨平, 然后在这个磨平面上蚀刻出孔, 电化学沉淀铁催化剂到孔隙中, 最后通过化学气相沉积法在孔中生长 SWNTs [17]。但是研究发现 SWNTs 的刚度较小, 易发生屈曲。最近我国学者发现碳纳米锥 [18] 兼有 MWNTs 的高侧向刚度和 SWNTs 的端部直径小的优点, 将会是更理想的 AFM 针尖材料 [19]。

1.2 其它主要探针技术的工作原理

“光镊”被称为无形的机械手, 是贝尔实验室的 Ashkin 等人 [6] 于 1986 年首次研制出来的。它们利用激光动量转移产生的辐射压力形成具有梯度力场的光学陷阱, 处在陷阱中的微粒受到梯度力场的作用而被“钳住”。这个光学陷阱像是一把小镊子, 因此被称为“光镊”或光学捕捉机。光镊可实现生物分子和纳米颗粒的无损微 / 纳米级操作, 从而成为物理学、生物学和化学研究中的重要工具。我国科学家于 2004 年成功研制了世界上首个包含有 3 个独立光学微机械手的纳米光镊系统 [20], 其由三路光镊、双路高精度探测和纳米操控系统组成。作为一种纳米位移的操控手段和粒子间微小相互作用力的探针, 纳米光镊系统具有研究个体、活体、实时动态、无菌无损操作的特点和先进的数据分析和图像软件处理能力, 因而在生物物理力学领域具有良好的应用前景。

磁镊主要用于生物分子的操纵, 其工作原理很简单: 将生物分子的一端固定于基底, 另一端固定于磁

性的珠子上, 移动或转动磁铁就可以导致珠子的移动或转动, 从而实现对生物分子的拉伸以及扭转.

生物膜力探针技术是由 Evans^[9] 率先使用的. 它是由一个在张力的作用下可变形 $10\sim 20\ \mu\text{m}$ 的囊泡作为力传感器, 张力大小的控制是通过改变膜内外的静水压力差而实现的. 这个技术的优势在于力传感器的量程可以从 $10\sim 15\ \text{N}$ 到 $10\sim 19\ \text{N}$. 生物膜力探针可用来检测配体 - 受体、抗原 - 抗体之间的键力.

2 针尖的生物分子的物理力学研究

众所周知, 动态的生命有机体具有比任何一种工程材料系统都复杂的新陈代谢、控制、感知、复制和凋亡等综合功能. 在过去几十年, 人们已经对各种有机体和组织的结构、力学响应和生物功能之间的关系开展了研究工作. 生物细胞是构成生命的基本单位, 具有分子的合成、分类、存储和传输, 基因信息的表达, 信号的识别、传递和转换以及分子马达的驱动等多种功能^[21], 所以认识细胞与亚细胞的结构和性能有着重要的意义. 包括蛋白质和核酸在内的生物分子的研究又是理解细胞和亚细胞及其内部组织的关键所在, 这就是人们用尽各种实验和理论方法研究生物分子的原因.

AFM 自发明之日起就一直被广泛用于生物分子的结构和物理力学性能的研究, 主要是由于它具有其它成像技术无法比拟的独特优点: 一是 AFM 可以在液体, 例如水、各种缓冲液、丙醇和丁醇中操作, 因此可得到接近生理条件下生物系统详细的静态和动态信息; 二是 AFM 可以在分辨率分别高于 $1\ \text{pN}$ 和 $1\ \text{nm}$ 的力和位移下机械探测和操纵单细胞和生物分子; 三是结合高速扫描下的连续成像, 可以实现

AFM 原位实时操纵样品^[22,23]; AFM 可以在针尖和基体间施加电压, 从而实现对样品的物理性质的测控. 这里主要讨论的是 AFM 和光镊、磁镊等测量针尖和样品间作用力的技术在研究核酸和蛋白质等生物分子在外力作用下的结构和力学性能变化方面及其电学性能方面的应用.

2.1 核酸

核酸包括脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acids, DNA) 和核糖核酸 (ribonucleic acids, RNA) 是生命的本质所在. 典型的 DNA 分子是右手螺旋双链结构: B - 型 (B-DNA), $0.34\ \text{nm}/\text{碱基对}$ (base pairs, bp) 如图 3 所示. 互补的沃森 - 克里克碱基对: 腺嘌呤 - 胸腺嘧啶 (adenine-thymine, A-T) 和胞核嘧啶 - 鸟嘌呤 (cytosine-guanine, G-C) 内的氢键将双链相连. 碱基对用于组装 DNA 和 RNA 新链, 通过基因调制蛋白质及其它与 DNA 有关的蛋白质与 DNA 的相互作用来实现信息传递和蛋白质的生产. 这些相互作用常常导致 DNA 的扭曲、拉伸和弯曲, 所以 DNA 和 RNA 的弹性有着非常重要的生物意义, 例如 DNA 的抗弯和抗扭刚度对其如何在复制时缠绕组蛋白以形成染色体和超螺旋, 如何在与蛋白质相互作用时弯曲, 以及如何压缩到病毒的一个有限空间内都有影响^[24]. 下面主要讨论利用 AFM 和光镊等探针技术对 DNA 的结构、力学性能和导电性等方面的实验研究和理论发展.

自从 Lindsay 等人^[25] 第 1 次用 AFM 获得 DNA 的图像以来, AFM 已经成为研究核酸分子结构的重要工具. AFM 可以清晰地观察在体外生理状态下的各种 DNA 分子的三维结构, 并可估算出分子的宽度和高度, 尤其可以精确地测算高度^[26]. 还可以进行 DNA 的序列识别^[22], 分子级的操作例如拉伸、扭转等.

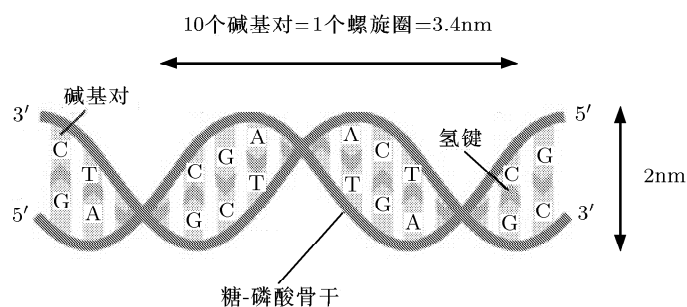
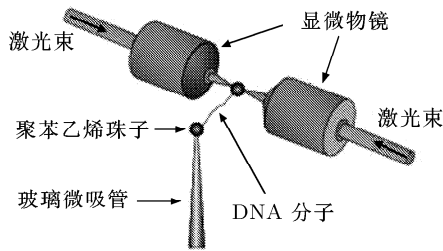


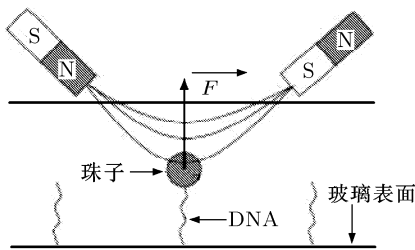
图 3 双螺旋 DNA 链示意图^[24]

2.1.1 DNA 的拉伸

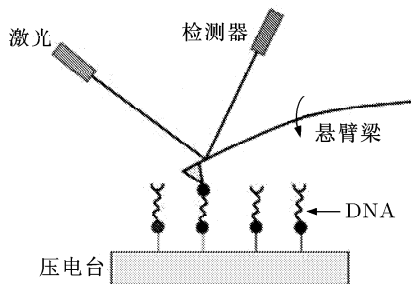
短截的双链 (double-stranded, ds)DNA 呈短棒状, 长的 dsDNA 在任意方向弯曲形成卷. 光镊、磁镊和 AFM 实验均可用于测量作用在 DNA 和 RNA 单分子上的力. 在实验中 DNA 分子的一端附着在固定基体表面上, 另一端在常力作用下伸展或伸展到固定位置, 如图 4 所示.



(a) 光镊: DNA 单分子一端粘着在光陷阱的聚苯乙烯珠子上, 另一端粘着在玻璃吸管的珠子上, 移动微吸管拉伸单分子



(b) 磁镊: DNA 单分子一端粘着在磁珠上, 另一端粘着在玻璃上, 磁珠受到外部磁场产生的常力作用拉伸单分子



(c) AFM: DNA 单分子一端粘着在臂梁上, 另一端粘着在压电台上, 当压电台沿远离悬臂梁方向移动时单分子被拉伸, 通过测量悬臂梁的变形测得作用力

图 4 3 种 DNA 拉伸实验方法示意图 [27]

伸展作用下 DNA 的变形有 4 种不同状态: 拉伸力 $f < 0.08 \text{ pN}$, $0.08 \text{ pN} \leq f < 12 \text{ pN}$, $12 \text{ pN} \leq f <$

65 pN 和 $f \geq 65 \text{ pN}$, 如图 5 所示.

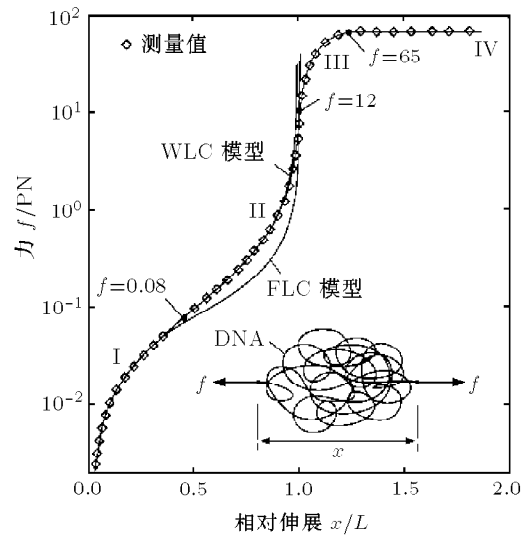


图 5 拉伸作用下 DNA 变形的 4 个状态 [24]

I 为熵弹性阶段; II 为虫链阶段; III 为总长度延长阶段; IV 为过度拉伸阶段

当 $f < 0.08 \text{ pN}$ 时, DNA 分子的变形主要受熵弹性 [28] 的控制. 熵弹性理论用于解释 DNA 和其它一些聚合物材料例如橡胶的弹性性能. 当聚合物处于松弛状态时形成缠绕的结构, 因为这样使得构成链的各节的熵最大; 当伸展聚合物时由于熵的减少而产生回复力, 这就是熵弹性. 拉伸 DNA 分子为更长的链是导致熵减的, 因为拉伸越长可能的构象就减少, 直到完全伸展态时 DNA 的熵达到最低, 即没有弯曲.

描述 DNA 链熵弹性的最简单模型是高斯链 (Gaussian chain, Gc) 模型 [29]: 认为聚合物链是由相互独立的节构成, 在无外力作用时各个节是方向无关的, 在较小的力作用下力 f 与链的伸展长度 x 之间成线性关系, 即

$$\frac{fA}{k_B T} = \frac{3x}{2L} \quad (1)$$

其中 k_B 是玻尔兹曼常数; T 是绝对温度; A 是持续长度, 即聚合物链中保持直接相关的两节之间的距离, 是链的固有参数, 在 25°C 的生理缓冲液中, ds-DNA 的 $A \approx 50 \text{ nm}$, 单链 (single-stranded, ss)DNA 的 $A \approx 1 \text{ nm}$; L 是 DNA 分子的总长度, 即完全伸展时的长度.

DNA 的熵弹性的另一种模型是自由连接链 (freely joined chain, FJC) 模型 [30]: 认为聚合物链也是由相互间转动无关的节构成, 但无伸展性. 当缠

绕的 DNA 分子被拉伸时力 f 与伸展长度 x 的关系是

$$x = L \left[\coth \frac{2fA}{k_B T} - \frac{k_B T}{2fA} \right] \quad (2)$$

当力 $f \leq k_B T / (2A)$ 时, 与 Gc 模型给出的方程一致; 当 $f < k_B T / A$ 时, FJC 模型与实验测量的数据相当吻合 (见图 5). 但是力再大时, FJC 模型不能再用于描述 DNA 的行为, 这时需要一种更为详细的模型, 即虫链 (worm-like chain, WLC) 模型 [28].

当 $0.08 \text{ pN} \leq f < 12 \text{ pN}$ 时, DNA 的抗弯刚度变得很重要, 以拉格朗日方程为基础的 WLC 模型可以更精确地描述 DNA 的弹性

$$E = \frac{k_B T}{2} \int_0^L A k^2 ds - fx \quad (3)$$

其中 k 是 DNA 链的曲率. 尽管 WLC 模型的准确的力 - 伸展关系很复杂, 但通过插值公式得到比较精确的力 - 伸展关系, 即

$$\frac{fA}{k_B T} = \frac{x}{L} + \frac{1}{4(1-x/L)^2} - \frac{1}{4} \quad (4)$$

当伸展长度 x 很小时, DNA 分子可看作是线性弹簧 (如同 FJC 模型中描述的), 但是随着 x 变大 DNA 分子逐渐变成非线性的 (见图 5): $2 \sim 3 \text{ pN}$ 的力就可以拉伸 DNA 到其总长度的 90%, 当 x 接近 L 时力急剧增加.

当 $12 \text{ pN} \leq f < 65 \text{ pN}$ 时, DNA 的总长度延长. 因为 WLC 模型中有不可伸展假设, 即式 (4) 中当 $x=L$ 时力 f 为无限大, 当然这是不现实的. 假设 DNA 骨干的伸展与外力成线性关系, 修正式 (3) 得到

$$E = \frac{k_B T}{2} \int_0^L A k^2 ds - \frac{1}{2} \int_0^L K \left(\frac{s}{s_0} - 1 \right)^2 ds - fx \quad (5)$$

其中 K 是拉伸模量, s_0 是参考长度 (例如 0.34 nm/bp). 当首尾距离大于总长度时, 解式 (5) 得到

$$\frac{x}{L} = 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{fA}} + \frac{f}{K} \quad (6)$$

其在 $12 \text{ pN} \leq f < 65 \text{ pN}$ 时有效.

当力 f 达到 65 pN 时, dsDNA 结构会发生可逆的转变成为一种伸展型, 其长度是正常 B-DNA 的 1.7 倍. 这种可逆的过度拉伸 dsDNA 究竟是什么模

型, Caron 等人 [31] 提出一种特殊的碱基对结构 S-DNA (0.58 nm/bp). 但是也有证据表明过度拉伸的 DNA 只是由 ssDNA 的两支相互独立链构成的 [32], 所以对这一问题尚存疑问, 要求高分辨率下探测单分子结构的方法得到进一步改善.

以上讨论的是拉伸时 DNA 分子不受扭转约束的情况. 如果 dsDNA 在受到拉伸时不能自由旋转, 过度拉伸的结构转换就不会出现在 f 为 65 pN 时, 而是在 110 pN 时. 展开 DNA 的力 - 伸展曲线表明 f 分别在 50 pN 和 110 pN 时出现结构转换, 而且随着 DNA 链结构转换数量的增加, 在 f 为 50 pN 时出现的转换更多. 过度展开 DNA 导致在 f 为 25 pN 时出现一个例外转换, 其归因于 DNA 超螺旋的展开 [33]. 另外作用在 DNA 上的扭转应力会受到许多生理环境的影响, 所以对结构转换与溶液条件的关系进行详细研究也是很重要的. Krautbauer 等人 [34] 比较了 DNA 单分子与 berenil, cisplatin 和 ethidium bromide 3 种小分子粘合时 DNA 分子的力 - 伸展关系, 发现其与这些黏合分子的浓度有很大关系.

2.1.2 DNA 的扭曲

超螺旋是 DNA 分子另一种重要的变形模式, 其对基因复制、转录和重组有很大的影响. DNA 分子的超螺旋通常用两个参数描述 [35]: T_W 为沿着分子的螺旋圈数和 W_R 为 DNA 轴绕其自身的卷绕数. 例如松弛线性的 DNA 分子的 T_W 等于碱基对数除以 10.4 (B-DNA 中每圈包含的碱基对数), W_R 为零. DNA 分子的两端受到扭转限制时 T_W 和 W_R 的总和, 即链环数 Lk 在连续变形下不改变. DNA 分子的超螺旋型与松弛型的链环数之比为超螺旋度 σ

$$\sigma = \Delta Lk / Lk_0 \quad (7)$$

其中 $\Delta Lk = Lk - Lk_0$, Lk_0 是无扭转约束时 DNA 的 Lk 值. 当 σ 为正值时 DNA 分子是过旋的; 当 σ 为负值时 DNA 分子是欠旋的. 多数生命有机体中都有 σ 约为 -0.06 的欠旋 DNA 分子.

为了更好地理解 DNA 超螺旋中涉及的力学问题, 科学家对线性 DNA 单分子的扭曲进行大量实验研究, 例如采用磁镊、玻璃微针等方法. DNA 分子的一端附着在处理过的盖玻片上, 另一端粘着在小磁珠上, 通过施加磁场在拉伸 DNA 分子的同时实现过旋和欠旋. 人们进行了两种实验: 恒超螺旋作用下力 - 伸展关系的研究和恒力作用下伸展 - 超螺旋关系的研究. 这些实验显示了在恒定拉力和适当离子条件下 λ 噬菌体 (一种细菌病毒) 中 DNA 的 3 种状态

(如图 6 所示):

(1) $f < 0.5 \text{ pN}$ 时, DNA 分子的过旋和欠旋本质上是一样的. DNA 分子的扭曲导致同向双股或超螺旋的形成, 就像一个扭曲的管子. 这些三级结构的出现使得 DNA 分子首尾之间长度以 40 nm/圈 缩短, 表明 DNA 分子的超螺旋度对其伸展性有重要影响.

(2) $0.5 \text{ pN} < f < 3 \text{ pN}$ 时, DNA 分子的过旋和欠旋截然不同, 过旋 DNA 持续收缩而欠旋 DNA 的伸展不再随 σ 发生变化, 作用在分子上的扭矩足够大而诱导欠旋 DNA 分子发生部分变性.

(3) $f > 3 \text{ pN}$ 时, 无论过旋还是欠旋, DNA 分子的行为均与扭矩无关. 过旋 DNA 分子呈现为一种新的“内面向外”过度扭曲结构, 称为 P 型 (pauling form) DNA. 对不同超螺旋度的力 - 伸展曲线的分析与数值模拟共同表明, P-DNA 是每个螺旋圈中有 2.6 个碱基对的双螺旋结构, 磷酸骨干扭曲进入结构内而碱基对暴露在外面.

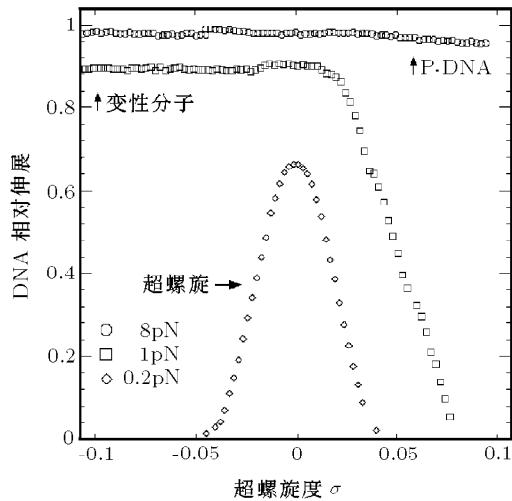


图 6 恒力作用下 DNA 超螺旋度与相对伸展的关系 [36]

近些年来, 人们已经发展了几种拉伸超螺旋 DNA 的模型. 例如通过将扭转能扩展到 WLC 模型中, Moroz 等人 [37] 成功地发展了一种承受轻度扭曲的 DNA 模型, 得到伸展长度 x 和力 f 的关系为

$$\frac{x}{L} = 1 - \frac{1}{2} \left(\frac{Af}{k_B T} - \left(\frac{\tau}{2} \right)^2 - \frac{1}{32} \right)^{-1/2} + \frac{f - k_B T D \omega_0^2 \sigma}{\gamma} + \frac{A}{L \lambda} \quad (8)$$

其中, C 是扭转持续长度; D 和 γ 分别是待定的特征长度和力; $\omega_0 = 1.85 \text{ nm}^{-1}$; τ 是与所需扭曲对应的无量纲扭矩, $\tau = \omega_0 \sigma / \left[1/C + 1 / \left(4A \sqrt{Af/k_B T} \right) \right]$;

$\lambda = Af/k_B T - \tau^2$. 与实验相结合得到 $A=49 \text{ nm}$, $C=120 \text{ nm}$, $D=50 \text{ nm}$. C 的值比实验结果 ($C=75$) 略高.

2.1.3 DNA 的解链

在 DNA 复制过程中 DNA 螺旋必须产生力以解开双链. 将 λ 噬菌体的 dsDNA 的一条链粘着在基体表面上, 利用玻璃微针或光镊拉伸另一条链, 人们首次测得机械分离 dsDNA 的互补双链所需的解链力在 $10 \sim 15 \text{ pN}$ 之间. 解链力与沿分子方向的局部 G-C 含量与 A-T 含量之比有关, 即取决于 DNA 局部序列 [38].

Rief 等人 [39] 利用 AFM 测量 dsDNA 分子的机械性能, 观察到典型的黏 - 滑 (或锯齿) 信号. 在粘滞阶段张力随着链的伸展而增加, 直到存储的能量大到可以解开最靠近 DNA 的双链交叉点处的碱基对. 接着是滑移阶段, 这时一系列碱基对的断裂使得能量耗散而张力减小 (可参见图 9). 在拉伸导致的相变过程中 dsDNA 解链为两条单链, 其在松弛时由于自补序列的作用而重组为“发卡”结构. 直接解链这些发卡结构得到解开 G-C 碱基对所需的力是 $20 \pm 3 \text{ pN}$, 解开 A-T 所需的是 $9 \pm 3 \text{ pN}$, 所以断裂力的大小由碱基对序列决定.

Koch 等人 [40] 利用增强反馈的光学捕捉机解链与蛋白质相粘合的 DNA 单分子的双螺旋, 探测蛋白质与 DNA 的相互作用. 当解链到达一个粘合蛋白质分子的位置时, 可观察到张力突然增加, 随后又突然降低. 通过分析这个展开“事件”过程中的解链力得出蛋白质 - DNA 复合体的空间分布和动态性质.

2.1.4 DNA 的导电性

单链之间极为特定的粘合性、序列的任意合成性及自组装性 [41] 使得 DNA 非常适用于纳米电子器件中作为组装纳米电路的模板和元件. 直径约为 2 nm 的 dsDNA 可以看作分子纳米线, 通过碱基对可以构成导电网络. 毫无疑问, DNA 的电学性能是决定其在纳米技术中的发展的主要因素, 然而 DNA 的序列结构、分子长度、分子形式 (如束、网状结构或单分子)、所处的环境 (主要是水分子和补偿离子)、制备和探测方式等对其导电性都有很大影响 [42]. 导电原子力显微镜 (conducting-atomic force microscopy, c-AFM) 不仅可以在纳米尺度上表征表面形貌, 而且还可以直接得到 DNA 的电学性质, 所以得以广泛应用.

首先在 DNA 单分子的导电性研究方面, de Pable 等人 [43] 大量沉淀长度超过 40 nm 的 λ -DNA 单

分子到云母基体上, 使用金属 AFM 针尖接触 DNA 分子的另一端来探测其导电性, 没有观察到电流. 后来 Zhang 等人^[44] 在类似的实验中得到相同的结果, 他们平行拉伸金属电极之间的多个 DNA 单分子, 在给定电压下没有测到电流. Watanable 等人^[45] 利用 CNT-AFM 进行实验得到不同的结果, 两个电极之间的偏置电压为 2V, DNA 分子长度约为 2nm 时测得电流是 2nA, 长度为 6~20nm 时电流降为不到 0.1nA. DNA 长分子的导电性较差的结论进一步又被 Bockrath 等人^[46] 进行的电子力显微镜 (electrostatic force microscope, EFM) 实验支持. Cohen 等人^[47] 利用 c-AFM 测量电荷流经含有 26 个 bp 复合序列的 dsDNA 单分子时的情况, 得到 S 形 I-V 曲线, 电压为 2V 时的电流超过 220nA.

其次在 DNA 分子束和 DNA 网络的电学性能研究方面, de Pable 等人^[43] 也对 DNA 分子束做过类似的 c-AFM 实验, 测得 poly(dG)-poly(dC) 束的导电率是 DNA 分子长度 (50~250nm) 的函数, 结果清楚表明导电性是由 DNA 分子长度决定的. Terawaki 等人^[48] 使用点接触电流成像原子力显微镜 (point-contact current imaging AFM, PCI-AFM) 测量固定在云母表面的 DNA 网络的导电性. PCI-AFM 可以同时得到形貌成像和高分辨率的电流成像, 以提供生物和软材料的电性质的相关信息. 湿度为 0% 即干态时没有看到 DNA 网络和云母表面的电流的区别; 湿度为 60%, 偏置电压为 5V 时 DNA 的电流比云母表面高 20pA.

Heim 等人^[49] 借助 c-AFM 探讨了接触电极和基体表面对 DNA 传导性的影响. 电极是金属的还是有机, 电极是直接和 DNA 接触还是使用大束 DNA 作为缓冲, 都对 DNA 的导电性有重要影响. 在 DNA 和金属电极之间插入有机半导体缓冲膜可以改善其接触可靠性, 而直接金属蒸镀常常破坏 DNA 并阻碍电流的测量. 基体表面的化学性质是疏水的还是亲水的, 表面是带电的还是电中性的, 也对 DNA 的导电性有影响. 另外 DNA 水合壳中的水分子和补偿离子也起到重要作用, 长时间暴露于真空或干氮后传导性会大大降低.

2.2 蛋白质

蛋白质是细胞的主要组成部分 (约占细胞干重的 60%), 是生物中最丰富的分子. 蛋白质可以执行多种细胞功能例如信号传递、生物分子的传输、生物反应的调控和新陈代谢. 20 种氨基酸通过疏水力、静电相互作用和氢键构成不同序列排布, 从而形成不

同蛋白质. 蛋白质由四级结构组成: 氨基酸序列是基本结构; 由于氢键相互作用而形成的 α -螺旋和 β -层是蛋白质的二级结构; 蛋白质区域即 α -螺旋和 β -层压缩而成的折叠球单元是三级结构; 通过多肽环或二级结构连接而成的多域是蛋白质的四级结构, 如图 7 所示. 因为许多蛋白质或蛋白质域大致是圆形的, 所以又叫球蛋白.

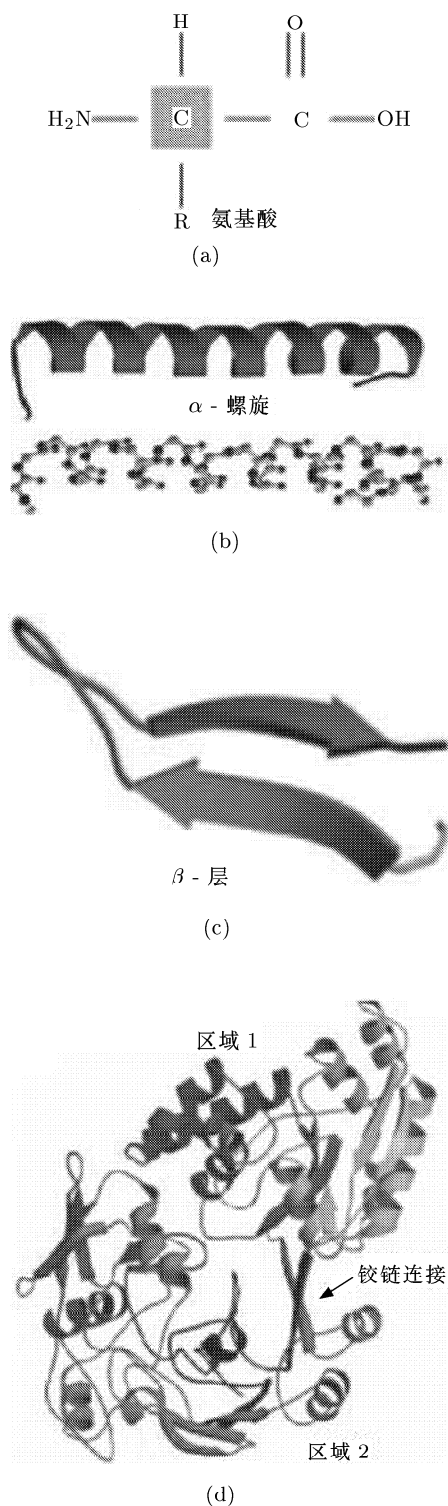


图 7 蛋白质的结构^[21]

蛋白质独特的三维结构也叫构象^[24], 其中的折叠结构中的原子空间分布决定蛋白质的功能. 机械力可以改变蛋白质分子的构象, 这样的改变又会影响蛋白质 - 蛋白质和蛋白质 - DNA 的识别、粘附和解开, 导致后续生物化学过程的变化. 下面主要讨论以 SPM 为主的探针技术在蛋白质切割、变形、相互作用及导电性等方面的研究进展.

2.2.1 纳米切割膜蛋白

考虑到 AFM 的独特性质, 针尖作为分子解剖刀首先被用于 DNA 单分子的成像和切割, 后来又被用于间隙连接的分离. 间隙连接是动物细胞中通过连接蛋白实现的细胞间连接, 由两层细胞质膜构成. 在间隙连接的连接点处油脂双层不直接相连, 而是由两个连接蛋白对接形成通道. 在 AFM 成像时增加作用在微悬臂上的力, 将间隙连接的上层膜揭开, 从而可以研究下层膜的结构. 同样的方法还成功用于研究孔蛋白 (OmpF) 和眼晶状体水通道主体内在蛋白 (major intrinsic protein). 另外针尖还可以切割蛋白质复合体单分子, 例如光系统 I 复合体, 研究膜蛋白和外蛋白之间的分界面情况. 这些例子都表明 AFM 针尖在分子“手术”方面的广泛用途^[50,51].

2.2.2 蛋白质的折叠和展开

人们最早是通过研究 Titin 蛋白得到力 - 伸展曲线是锯齿型的^[52], 后来研究胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的键蛋白 (tenascin, TN) 得到类似的结论. Titin 也被称为 connectin, 是连接构成横纹肌 (striated muscle) 的 A - 段和 I - 段的一种巨型蛋白. 该蛋白与肌肉的收缩、弹性及细胞核中的染色体凝聚有关. 蛋白质执行机械功能时, 其中的蛋白质区域可以展开和再折叠. 例如由于力的作用产生 Titin 蛋白的伸展, 从而导致 Titin 中的免疫球蛋白区域 (Ig) 和纤维连接蛋白区域 (FN, 其中最常见的是 FN - III) 展开. Ig 和 FN - III 区域都是所谓的 β - 三明治结构, 广泛存在于各种蛋白质中^[53].

利用 AFM 对蛋白质分子进行展开和再折叠实验, 研究拉伸力对蛋白质功能的影响. 实验方法与对 DNA 双螺旋进行拉伸的方法类似, 多区域蛋白质分子在微悬臂梁的氮化硅针尖和由压电调节精确控制的基体之间被拉伸如图 8 所示. 蛋白质吸附在基体上, 当针尖与基体靠近又分离时蛋白质因为吸引力而附着在针尖上. 当针尖与基体的距离增加时, 蛋白质伸长而产生回复力使得悬臂弯曲 (态 1 \rightarrow 态 2), 一个区域展开使得蛋白质的自由长度增加, 悬臂上的力恢复到零 (态 3), 再次拉伸导致悬臂上又产生回复力

(态 4).

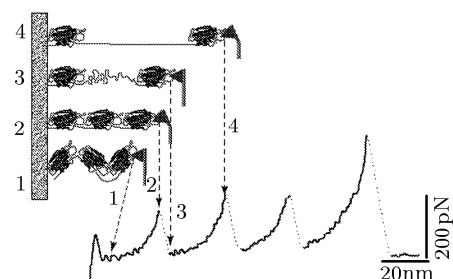


图 8 AFM 拉伸作用下多区域蛋白质的变形和展开过程^[53]

AFM 的拉伸作用下 Titin 蛋白的 Ig 区域以典型的锯齿模式进行变形和展开, 如图 9 所示. 力 - 伸展曲线中的顶点对应各个展开区域. 随着蛋白质的拉长, 回复力增加. 但是当达到一定力时其中的一个区域展开, 就像解开绳子的一个结, 这种解开突然增加蛋白质的长度而使得作用在悬臂上的力降为零. 接着继续拉伸而回复力再次增加, 直到第 2 个结打开. 所以力 - 伸展曲线是锯齿型, 顶点的数目对应区域的个数. 当拉伸速度为 $1 \mu\text{m/s}$ 时, 锯齿顶点的最大力在 $150 \sim 300 \text{ pN}$ 之间变化. 顶点高度有随着每次展开而增加的趋势, 这表明各个区域有不同的机械稳定性, 并且较不稳定的区域先展开. 尽管 Titin 蛋白的结构非常复杂, 但是其熵弹性仍可以用描述聚合物弹性的 WLC 模型 (上节所述的式 (4)) 来描述, 其中持续长度 $A=0.4 \text{ nm}$, 总长度 $L = L_0 + n\lambda (n=0,1,2,\dots,6)$, $L_0=58 \text{ nm}$ 是第 1 个顶点对应的总长度, λ 在 $28 \sim 29 \text{ nm}$ 之间, 到最后一个顶点时 L 达到 227 nm . 另外 TN 中的各个 FN - III 区域的展开也可用 WLC 模型描述.

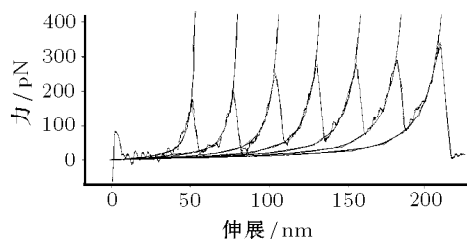


图 9 Titin 蛋白的 Ig8 区域 (由 8 个 Ig 节组成) 展开模式^[52]

当基体恢复到其初始位置时, 被拉伸的蛋白质松弛下来会产生再折叠. 随后再对蛋白质进行展开时发现区域的折叠恢复状况取决于先后两次拉伸之间的时间间隔. 另外, Kellermayer 等人^[54]使用光镊研究了 Titin 蛋白分子的展开 - 折叠转换过程, 测量拉伸 Titin 单分子所需的力表明 Titin 的变形就像

一个高度非线性熵弹簧。展开过程开始于 f 为 20~30 pN 时, 随之发生相变。而在松弛过程中, 只有当分子松弛缩短约为总长度 (即完全伸展长度) 的一半时再折叠才开始, 并且大量再折叠出现在 f 为 2.5 pN 左右时。但是仍有一部分蛋白质 (5%~40%) 一直保持展开状态, 其行为符合持续长度 A 为 20 Å 的 WLC 模型。

2.2.3 蛋白质间的相互作用

细胞中的蛋白质 - 蛋白质和蛋白质 - DNA 的识别和相互作用主要由受体 - 配体的构象匹配和电荷互补决定, 以确保像“锁 - 钥匙”样的黏合特异性。所以受体 - 配体黏合包的局部 3D 几何形状对其黏合特性有很大影响, 好的构象匹配产生强而持久的黏合态, 反之亦然。其根本原因在于黏合作用主要通过大量非共价键如氢键实现的。单个氢键的作用虽然很弱, 但大量氢键的集合作用却是很强大的。因为氢键只有短程作用, 为了形成大量氢键, 受体构象与配体构象之间必须具有良好匹配。

AFM、SFA、光镊和生物力探针等针尖测量技术的进步使得人们可以定量分析单个分子键的纳米机械性能, 从而确定蛋白质间力的大小和作用距离, 进一步推导蛋白质的结构与其粘合连接的稳定性之间的关系^[55]。为了实现 AFM 对蛋白质之间的受体 - 配体黏合力的测量, 必须对针尖进行功能化修饰, 例如粘着抗体或蛋白质受体。目前有两种比较成熟的技术: 其一是利用化学吸附作用使溶液中的分子覆盖在针尖上; 其二是利用共价键耦合将分子直接粘着在针尖上。AFM 定量测得蛋白质之间的受体 - 配体黏合力在 15~250 pN 之间^[56]。Marshall 等人^[57]通过线性增加 AFM 拉伸力来拉伸单个键直到键断裂, 发现键断裂所需的力取决于加载过程, 进而得到键寿命。Nevo 等人^[58]借助 AFM 研究 GTPase Ran 蛋白及其受体蛋白 importin β 1 之间的相互作用, 发现其导致配体 - 受体复合体的形成。这种复合体分别以高、低拉伸强度两种能量截然不同的形式存在, 并且外力作用可以使复合体向高拉伸强度形式转化。

2.2.4 生物分子马达

生物分子马达是一类特殊的蛋白质, 主要包括驱动蛋白、阻凝蛋白、动力蛋白、ATP 合酶、DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶, 在肌肉收缩、细胞分裂, 信号传递和 DNA 复制等许多细胞过程中起到重要作用。

驱动蛋白是被最广泛研究的生物马达分子之一, 是细胞内大规模自组装的主要物质。使用典型的单珠光学捕捉机, 科学家发现驱动蛋白是通过一

个行走机制沿名为微管的管道运动的, 就像一个走钢丝者沿一条钢丝走动一样^[59,60]。后来 Carter 等人^[61]还出乎意料地发现负载荷可以改变驱动蛋白行走的固有方向性, 使其向后走, 这种向后行进模式是由 ATP 控制的。并且无论前进还是后退驱动蛋白都是在微秒级以每步 8 nm 沿微管行走。

人们利用光镊对 DNA 和 RNA 聚合酶单分子进行研究, 表明施加在酶上的力可以影响细胞的 DNA 复制和抄写。在核苷三磷酸浓度饱和的情况下施加 14~25 pN 的力, E. coli RNA 聚合酶会停止作用, 基因抄写速度也随着施加力的增加而降低^[62,63]。Wuite 等人^[64]利用光学捕捉机进行单分子实验, 还发现 T7 DNA 聚合酶沿其单链 DNA 的移动速度受到作用在 DNA 上的拉力影响, 从而认为拉力作用下 DNA 的变形可以影响 DNA - 聚合酶的相互作用。

2.2.5 蛋白质的导电性

蛋白质电子传递的研究不仅对阐述生物能量传递具有重要的意义, 而且有助于促进生物分子在分子电子器件中的应用。金属蛋白以其固有的电化学和电学特性在光合作用和呼吸作用中起到重要作用, 其中铜蓝蛋白具有良好的电化学性质和明确的分子结构, 常常作为研究蛋白质电子传递的模型分子^[65]。Zhao 等人^[66~68]借助 c-AFM 研究了铜蓝蛋白单分子的电荷传输特性, 得到压缩力与 I-V 曲线的关系, 进而利用修正的 Simmons 公式进行解释。修正的 Simmons 公式认为在两个电极上的非平衡费米级转移是 I-V 曲线不对称的原因, 所以才能精确描述了观察到的行为。

Andolfi 等人^[69]结合 SPM 与 STM 探测吸附在金电极上的两种白杨质体蓝素 (一种在叶绿体的光合作用中作为电子传递体的含铜蛋白) 的突变变种: PCSS 和 PCSH 的电性能和形貌, 并对这两种金属蛋白突变变种的性能进行了比较。

铁蛋白是包含在动物、植物、真菌核细胞中的一类很稳定的储存离子的蛋白质。由于其特殊的磁性、电化学性质和结构组装机能, 铁蛋白用作碳纳米管生长的催化剂以及合成磁性、传导和半导纳米晶体的模板。Xu 等人^[70]借助 c-AFM 对马脾铁蛋白进行了导电性测量。马脾铁蛋白由外径 12 nm、内径 8 nm 的脱铁核铁蛋白壳及内部填充的全铁蛋白构成。他们发现全铁蛋白的传导率是脱铁核铁蛋白的 5~15 倍, 铁蛋白的蛋白质壳是电子转移的隧道能垒。通过壳时的传导性可能是限制电子转移的因素所以改变蛋白质壳可能改善电子转移状况。

Bonanni 等人^[71]通过自由含硫团将酵母菌的细胞色素 c 蛋白质分子 (YCC) 化学吸附在金电极上, 利用 SPM 研究被固定 YCC 分子的形貌和电子转移性能. 利用硫醇团与亚铁血红素功能团的相互作用将 YCC 单层固定在 Au 基体上, 覆盖 Au 的针尖以接触模式进行探测, 通过 I - V 曲线得到电阻与 c - AFM 扫描力的关系.

2.3 计算科学对生物分子的物理力学研究的重要补充

尽管使用 SPM 等单分子实验可以得到生物单分子的成像和快速操纵, 但是目前没有一种实验方法可以完整地提供生物分子的详细结构参数, 例如过度拉伸 S-DNA 和过度扭曲 P-DNA 的结构确定主要是建立在分子模拟基础上. 随着计算机技术的进步和理论方法的不断改进, 分子动力学 (molecular dynamics, MD)^[72] 模拟和量子力学 (quantum mechanics, QM)^[73,74] 方法发挥了越来越重要的作用, 能够更好地描述和预测生物分子的动力学及其功能. 计算科学与针尖的分子生物力学的物理实验研究相结合, 发展分子物理力学虚拟实验技术对本领域的研究具有重要意义.

分子动力学模拟是建立在经典牛顿运动定律的数值解基础上的, 作用在每个原子上的力都表示为关于原子位置的势函数的负梯度. 作为实验的重要补充, 分子动力学模拟可以提供比 AFM 实验更复杂的力, 通过计算分子内和分子间相互作用力可以更深入地理解生物化学和生物物理方面问题. 在 SPM 实验基础上, 使用分子动力学方法模拟生物核酸和蛋白质等生物分子在外力作用下的构象和机械性能的变化, 蛋白质 - 蛋白质和 DNA - 蛋白质等的相互作用, 受体 - 配体的黏合作用等. 其中拉伸分子动力学 (steered molecular dynamics, SMD)^[75] 是借助分子动力学技术对生物分子进行外力调控的方法, 在原子水平上考察分子在外力作用下的动力学行为, 研究分子的结构与功能间的关系, 与单分子实验 AFM 的工作原理相似. SMD 的应用主要集中在两个方面: 生物分子复合物的解离和单分子的拉伸, 如 Titin 分子不同区域的拉伸.

虽然分子动力学模拟在生物方面取得了很大进步, 但是仍然有局限性: 最大时间尺度只有几个纳秒, 比许多生物分子的特征松弛时间快得多; 现在很多生物分子还没有适合的相互作用势; 分子动力学模拟是经验的, 其势函数取决于实验数据和理论假设, 或通过量子力学方法来确定. 量子力学方法是以薛定

谔方程的近似解为基础, 根据原子核和电子的相互作用描述分子, 根据原子核的最小能量分布描述分子的几何结构. 因为量子力学方法不需要经验校正, 甚至在没有实验数据的时候也可用于分子系统和性能的研究, 其结果比其它模拟计算方法有更坚实的物理理论基础. 但是由于计算量的限制量子力学计算还不能用于计算完整的蛋白质分子等, 只能针对其中的一部分展开研究. 第一原理的量子力学已经用于核酸和蛋白质的结构、功能和性能以及酶的反应机制等许多问题.

总之, SPM 是成像、切割和操纵生物分子的综合性工具, 可与光镊、SFA 等其它探针技术结合对核酸和蛋白质等分子进行纳米级操纵, 研究分子结构和物理力学性能在纳米操纵下的变化. 进一步需要利用探针技术研究 DNA、RNA 和蛋白质的结构和性能变化如何影响 DNA - 蛋白质、RNA - 蛋白质、蛋白质 - 蛋白质相互作用以及蛋白质和核酸的变形在 DNA 压缩、基因复制时所起的作用等. DNA 分子的极易合成性及良好的弹性使其成为分子“把手”和更复杂的纳米系统的理想材料, 用来操纵其它分子. 已有科学家使用 DNA“把手”展开 RNA 分子, 为生物分子操纵的研究开辟了一种新方法. 导电原子力显微镜已经成为研究核酸和蛋白质等生物分子电学性能的重要工具, 已经进行了大量传导性的实验研究. 但是作为一种生命软物质, 生物分子构象的微小变化都会影响其电性质, 因此力 - 电 - 环境的耦合研究是其将来应用于纳米电子器件所必需的. 针尖生物物理力学的发展使得人们以前所未有的分辨率观察和控制生物分子, 从而促进量子力学和分子力学模拟等计算科学的改进, 同时计算科学的进步也为实验提供预测和新方向, 结合二者发展的分子物理力学虚拟实验技术必将对生物力学的研究有着深远的意义.

3 针尖的生物材料的物理力学研究

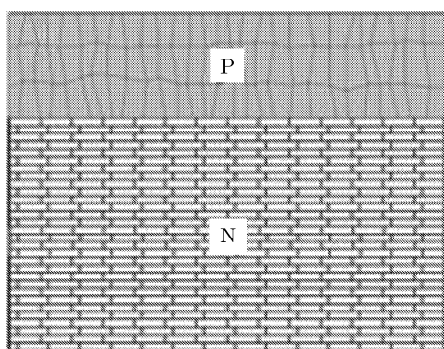
在环境温度和大气条件下生物有机体依靠分子间的共价、非共价作用自组装成包含有机和无机成分的合成材料, 具有独特的微米 / 纳米分阶层结构和特殊性能^[76]. 蜘蛛丝、鹿角、刺猬的刺、动物的骨头、鲍鱼和牡蛎的壳等大量生物材料都具有独特的性能. 例如软体动物壳的真珠质主要由 95% 的文石 (CaCO₃ 的一种矿石结构) 和不到 5% 的生物有机成分组成, 但是它的韧性超过其组成材料的 1000 倍^[77]. 还有植物叶表面表现为强疏水性, 使其有极

好的自洁功能^[78]。骨头的压电效应在其生长和断裂愈合过程中起到重要作用^[79]。随着SPM等技术的广泛应用,人们希望在纳米尺度研究生物材料的独特结构与其对应的特殊性能的关系,尤其研究生物分子对材料性能的影响,促进材料自组装技术的发展。

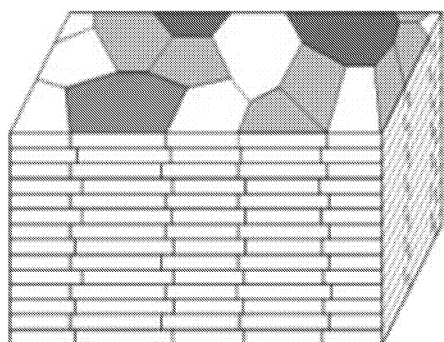
3.1 贝壳

鲍鱼壳是软体动物壳体的典型代表,具有纳米级结构和很好的机械性能。下面讨论以AFM为主的探针技术在鲍鱼壳研究方面取得的进步。Wang等人^[80]沿红鲍鱼壳的薄片边缘将壳体横向劈开,通过AFM观察暴露出的珍珠质层的文石片的表面形貌。发现大量直径约为30~100 nm,间距为60~100 nm的突起颗粒,构成山顶和山谷错落分布的形貌。

Li等人^[81]利用AFM与扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)研究了红鲍鱼壳的纳米尺度结构,对鲍鱼壳的横截面进行AFM成像,观察了鲍鱼壳的两种不同的微观结构组成:棱柱外层(成分是方解石, CaCO_3 的一种矿石结构)和珍珠质内层,示意图如图10。



(a) 横断面的结构图。P为棱柱层, N为珍珠质层

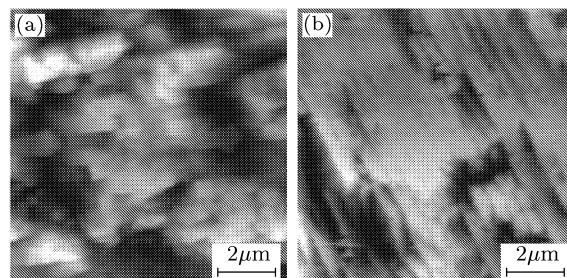


(b) 珍珠质层: 其中的文石片为不规则的多边形

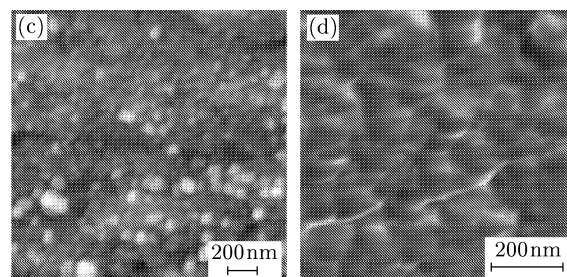
图10 鲍鱼壳微米/纳米结构示意图^[81]

我们对红鲍鱼壳进行了类似的实验,得到比较一致的结果如图11所示。鲍鱼壳的横断面的AFM成像表明文石片的厚度约为500 nm,长度约为3 μm ,各

文石片之间是有机聚合物夹层,因此横断面就像一面砖墙(见图11(a))。图11(b)中的文石片与图11(a)相比更为狭长,我们认为与样品取自壳体的不同位置有关。在更高分辨率下对其鲍鱼壳的横断面进行AFM形貌和相位进行成像,发现每个文石片上都有大量多边形纳米级颗粒,其直径约为30~100 nm(见图11(c),见图11(d))。此外,沿鲍鱼壳边缘劈开得到的样品表面上同样发现这样的颗粒,从而确定各个文石片都是由大量纳米颗粒构成的。



(a) 和 (b) 为文石片层的形貌图



(c) 和 (d) 为纳米颗粒的形貌图和相位图

图11 珍珠质横断面的AFM成像

Li等人^[81]还利用微米/纳米压痕仪在抛光的鲍鱼壳样品上生成微米/纳米裂纹,再用光学显微镜和AFM对裂纹生成进行辅助观察,来研究鲍鱼壳的硬度和弹性模量及其在微米/纳米尺度下的变形和断裂机制。他们认为在生物矿化过程中,纳米颗粒沿相同的结晶方向聚集堆垛而成的文石片产生的极高的黏着力是珍珠质具有高断裂韧性的原因之一。石灰质层是脆性的,裂纹沿各个拐角扩散开来;而珍珠质层是塑性的,裂纹只生成在平行于文石片的两个拐角,沿另外两个拐角出现滑移带,即文石片出现滑移,如图12所示。滑移吸收了断裂能而将破坏限制在裂纹周围很小的区域,所以文石片的滑移是珍珠质具有高断裂韧性的另一个原因。我们新近的量子力学模拟表明:理想 CaCO_3 晶体的拉伸强度达到22 GPa,比珍珠质的拉伸强度170 MPa^[82]大得多,因此如何将 CaCO_3 材料合成为强度更接近理想 CaCO_3 晶体的结构,使其具有更高的强度是个值得探讨的问题。

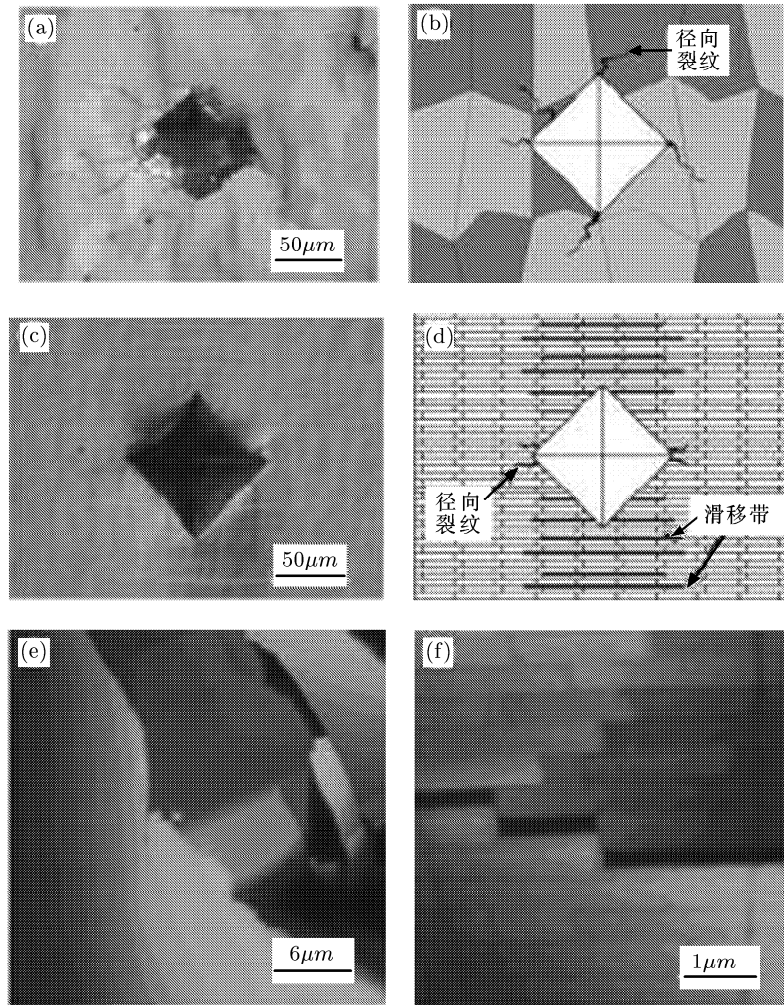


图 12 鲍鱼壳截面的断裂成像和示意图 [81]

(a) 和 (b) 分别为石灰质层截面微压痕的光学显微成像和相应的裂纹扩展示意；(c) 和 (d) 分别为珍珠质层截面微压痕的光学显微成像和相应的裂纹扩展示意；(e) 和 (f) 分别为石灰质和珍珠质层截面裂纹扩展的 AFM 成像，(f) 中可以看到裂纹的滑移

贝壳的结构和力学性能的 AFM 研究，激发人们模仿这种生物材料的纳米结构组成，合成力学性能极好的新材料。Tang 等人 [83] 找到一种新的合成方法，将聚合电解质和黏土自组装为一种类似珍珠质的材料，其抗拉伸强度接近于珍珠质。

下面我们再讨论贝壳中不足 5% 的生物有机基质，其由蛋白质、糖蛋白和多聚糖组成，控制 CaCO_3 晶体的生长，对晶体的结构和贝壳的机械性能有着重要影响。根据蛋白质组成在矿化过程中的不同功能进行分类 [84]：构成骨架的不可溶、不可萃取的 β 片丝状蛋白基体；控制晶体生长的可萃取的多聚阴离子蛋白质；直接涉及到晶体成核和生长的蛋白质，例如从文石层中提取的蛋白质吸附在 β -壳质或丝蛋白基体上，可以实现生物体外对碳酸钙结构的成核和生长的控制。这 3 种蛋白质以外的其它蛋白质也在贝壳的生物矿化过程中起到重要作用，例如晶内蛋白可能影响方解石晶体的最终形貌特征。

丝状蛋白含有反平行 β 层二级结构，由氨基乙酸和丙氨酸含量较高的多肽链组成，例如从牡蛎 *Pinctada fucata* 中提取的丝状蛋白 MSI60。人们推测丝状蛋白用于建立粗大的结构框架作为自组装片层，在片层基础上可溶蛋白聚集并控制形成矿化壳体结构。Levi-Kalisman 等人 [85] 利用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 研究了含水状态下双壳类 *Atrina* 的珍珠质有机基质的结构，发现丝状蛋白不能在片层内成像。他们认为至少在矿化前丝状蛋白是以一种含水凝胶体的形式存在的，在矿化中这种水凝胶体可能被矿物质替代，丝状蛋白被转移到晶体内和晶体之间。Zhang 等人 [86] 研究了牡蛎 *P. fucata* 中的不可溶基质蛋白质 MSI7 的结构和基因表达。生物体外实验发现 MSI7 能加速 CaCO_3 的成核和沉淀，所以推测其可能参与了贝壳骨架的形成。

人们对从鲍鱼壳的方解石部分提取的 6 种

24~110kDa 可溶蛋白质在控制贝壳结构形成中的功能进行生物体外研究, 将这些蛋白质不均匀附着在方解石表面上, AFM 观察到其影响生长的方解石表面的阶层边缘, 并用于控制方解石和文石结晶相的自动更替. Tsukamoto 等人^[87]研究了牡蛎 *P. fucata* 壳的特殊酸性可溶基质蛋白 Aspein 的结构及其对方解石生长的控制作用.

Lustrin A 是一种分布在贝壳文石片层间不可溶基质中分离出的蛋白质. Zhang 等人^[88]利用 AFM 伸展实验发现鲍鱼壳中含有 LustrinA 的真珠质呈现典型的锯齿力 - 伸展曲线, 与 Titin 等弹性蛋白质的展开和再折叠很类似. 除了弹性行为, Lustrin A 还有与文石片的粘合相互作用, 通过蛋白质 - 矿物质和蛋白质 - 大分子相互作用实现的.

人们利用 “flat pearl”^[89] 方法可以对沉淀的蛋白质和矿物晶体进行详细的化学和物理分析. “flat pearl” 方法就是将玻璃滑片之类的薄基体嵌入活的软体动物的外套膜之下, 而后在薄基体上沉淀生长出新壳的方法. 通过 TEM 和 SEM 定期观察沉淀状态, 从而跟踪鲍鱼壳的生长过程^[90]: 首先从外套膜分泌出蛋白质初层控制定向方解石晶体的成核和生长; 接着发生晶体的更替转为文石晶体的 *c* - 轴 (垂直于蛋白质初层方向) 定向成核与生长, 两种晶体的形成都是由特定的可溶阴离子蛋白质控制的, 这些蛋白质和无机离子间的相互作用会控制哪种矿物相成核生长, 蛋白质的不同基因表达诱导从方解石到文石的相变的发生; 最后可溶阴离子蛋白质继续指引结晶过程以控制 CaCO_3 的结构和方向.

尽管人们已经从贝壳中提取出多种蛋白质, 并对其结构、基因表达和在生物矿化过程中起到的作用进行了大量研究, 但是仍有许多未解之谜. Mount 等人^[91]在牡蛎壳的新生部分开一个槽口以诱导牡蛎去修复, 通过 SEM 发现一种含有 CaCO_3 晶体的血球细胞聚集到槽口处进行修复工作. 在有机片层上的晶体成核与血球细胞有关, 这与传统上认为的外套膜分泌的有机胶质是 CaCO_3 晶体的来源的观点不一致. 总之关于生物矿化还有许多待探讨之处, 同时这些研究工作对仿生材料的开发和养珠业的发展有着重要意义.

3.2 其他生物材料

除了贝壳的结构和性能的研究, SPM 还广泛用于其他生物材料的研究中. Diebel 等人^[92]使用 MFM 确认了虹鳟鱼牙齿里的铁磁物的磁畴结构为单畴结构, 并证实磁场强度对鱼的行为及生理响

应有影响. Dupres 等人^[93]利用 AFM 研究了在不同溶剂中头发的表面电位和润湿性的关系. Gurden 等人^[94]对头发结构进行 AFM 成像, 并提出一种计算方法来自动分析这些结果, 根据头发样品的性能进行分类. 最近 Fantner 等人^[95]发表了他们在人体骨骼研究方面的新进展: 借助 AFM 和 SEM 发现一种 “胶” 使骨骼中的矿化胶原纤维结合在一起, 其在对抗骨折及修复小裂纹中发挥重要作用. 利用 AFM 拉伸矿化胶原纤维时发现这种 “胶” 含有牺牲键, 在骨骼受到应力时可以展开以帮助骨骼减震, 而当应力解除时又会重新盘绕成原来的结构. 因此这种 “胶” 被形象地称为 “分子减震器”, 与鲍鱼壳中的有机成分有异曲同工之处.

3.3 计算科学对生物材料的物理力学研究的补充

作为探针技术的重要补充, 以分子动力学为主的计算科学已经在生物材料的研究领域取得重大成绩, 进而推动了探针实验技术的发展. 高华健小组^[96]运用断裂力学的 Griffith 准则对纳米尺度下生物材料中的缺陷影响进行了深入研究, 发现当珍珠质中的碳酸钙矿物质层的厚度降低到 30nm 时, 矿物质层的断裂和破坏强度变得对其自身缺陷不敏感. 当生物材料尺寸减小到和材料微观缺陷尺度接近或可比时, 施加软边界可以显著提高结构的缺陷自修复能力. 因此我们在已有理论的基础上提出软硬边界条件下的缺陷自修复的理论模型, 得到和分子动力学模拟一致的理论预测趋势, 然后应用该模型研究了生物材料尤其是贝壳多级结构中碳酸钙层内缺陷自修复的问题, 发现纳米尺度以及蛋白质层在碳酸钙层表面形成的软边界使得生物材料中的碳酸钙层具备良好的缺陷自修复能力, 并且越软的蛋白质层越容易修复矿物质层表面上的缺陷^[97]. Bruet 等人^[98]的研究表明置于人造海水中的贝壳的强度比起新鲜贝壳有所降低, 这一结果也归结到含量极少的蛋白质对材料强度的重要影响. 因此分子动力学的模拟已经不够, 需要采用量子力学的方法进一步讨论蛋白质与矿物质的相互作用. 所以计算科学的发展为针尖的生物材料的物理力学研究及仿生设计提供了一种全新的思路.

总之, SPM 与纳米压痕仪、SEM、TEM 等实验技术相结合对生物材料的不同纳 / 微米结构和独特性能开展了大量研究. 上述总结了贝壳的分阶层结构与其良好的力学性能的关系, 还重点讨论了有机基质 (蛋白质) 在贝壳形成过程中及对其性能的重要作用. 所以生物材料纳米力学的 SPM 研究对人们开

发具有优异性能的自组装纳米材料有着重大意义。

4 结 语

本文总结了以 SPM 为主, 包括光 / 磁镊、生物力探针和纳米压痕仪等的探针技术在生物物理力学方面的应用和发展, 主要从生物分子和生物材料两个方面展开。

在生物分子研究方面, AFM 和光 / 磁镊等可以在生物体外近生理条件下实时原位地探测核酸、蛋白质等分子的结构和物理力学性能, 从而进一步研究结构、性能变化与分子功能的关系。c-AFM 可以在样品与基体间施加电压的同时进行成像, 因此在生物分子的导电性方面得到广泛应用, 为核酸和蛋白质分子在纳米电路和纳米电子器件中的应用提供理论和技术支持。在生物材料研究方面, SPM 因为其高分辨率的成像和力测量性质, 而广泛用于生物材料中的微 / 纳米分阶层结构及与之对应的独特性能的研究。文中着重讨论了借助 AFM 研究以鲍鱼壳为代表的贝壳的微 / 纳观结构、力学性能及有机基质在贝壳生长过程中的作用, 这些探索为合成高性能的仿生材料提供了新思路, 即利用自下而上的“自组织”方法合成具有分阶层结构的新材料, 使其具有类似于生物材料的优异性能。但是, 我们应当看到探针技术的生物物理力学研究还存在很多问题, 主要是受到探针实验技术的限制, 例如变形过程中蛋白质分子的精确成像及相关的力学问题, 其涉及的几何变形只有几个埃到几十纳米, 特征时间跨越皮秒到秒多个尺度。关于生物材料的结构与其特殊性能的深入联系, 尤其是生物分子在材料中的作用机制究竟是怎样的, 都是尚未明了的重要问题。

总之, 探针技术与物理力学的耦合发展, 使我们以前所未有的视角研究生物分子和材料的外在表象与内在本质, 从大自然中获得更多宝贵的知识。针尖的生物物理力学的实验与理论研究是针尖力学的重要组成部分, 与计算科学相结合的分子物理力学虚拟实验技术必将有广阔的发展前景。

参 考 文 献

- 1 Binnig G, Rohrer H. Scanning tunneling microscope. *Health Phys Acta*, 1982, 55(3): 726~735
- 2 Binning G, Quate C F. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, 56: 930~933
- 3 Marti O, Colchero J, Mlynek J. Combined scanning force and friction microscopy of mica. *Nanotechnology*, 1990, 1: 141~144
- 4 Rugar D, Mamin H J, Guethner P, et al. Magnetic force microscope-General principles and application to longitudinal recording media. *J Appl Phys*, 1990, 68(3): 1169~1183
- 5 郭万林, 台国安, 姜燕. 针尖的化学物理力学研究. *力学进展*, 2005, 35(4): 585~599
- 6 Chu S, Bjorkholm J E, Ashkin A, et al. Experimental observation of optically trapped atoms. *Phys Rev Lett*, 1986, 57(3): 314~317
- 7 Smith S B, Finzi L, Bustamante C. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 1992, 258: 1122~1126
- 8 Heidemann S R, Kaeck S, Buxbaum R E, et al. Direct observations of the mechanical behaviors of the cytoskeleton in living fibroblasts. *J Cell Biol*, 1999, 145(1): 109~122
- 9 Evans E, Ritchie K. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J*, 1997, 72(4):1541~1555
- 10 Helm C A, Knoll W, Israelachvili JN. Measurement of ligand-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(18): 8169~8173
- 11 Oliver W C, Pharr G M. An improved technique for determining hardness and elastic-modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res*, 1992, 7: 1564~1583
- 12 Reich Z, Kapon R, Rnevo R, et al. Scanning force microscopy in the applied biological sciences. *Biotechnol. Adv*, 2001, 19: 451~485
- 13 黄惠忠等编著. 纳米材料分析. 北京: 化学工业出版社, 2003. 54~60
- 14 Iijima S. Helical microtubes of graphitic carbon. *Nature*, 1991, 354: 56~58
- 15 Dai H, Hafner J H, Smalley R E, et al. Nanotubes as nanoprobes in scanning probe microscopy. *Nature*, 1996, 384: 147~150
- 16 Iijima S, Ichihashi T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, 1993, 363: 603~605
- 17 Hansma H G. Surface biology of DNA by atomic force microscopy. *Annu Rev Phys Chem*, 2001, 52: 71~92
- 18 Zhang G, Jiang X, Wang E. Tubular Graphite Cones. *Science*, 2003, 300: 472-474
- 19 Zhang G, Wang E, Guo W. Identical chirality of tubular graphite cones controlled by radial layer-by-layer growth. *Phys Rev B*, 2005, 71: 113411
- 20 纳米光镊装置. *科学之友*, 2004, (05): 18
- 21 Bao G, Suresh S. Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nat Mater*, 2003, 2: 715~725
- 22 Woolley A T, Guillemette C, Li Cheung C, Housman D E, Lieber C M. Direct haplotyping of kilobase-size DNA using carbon nanotube probes. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(7): 760~763
- 23 Fotiadis D, Scheuring S, Muller S A, et al. Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. *Micron*, 2002, 33(4): 385~397
- 24 Bao G. Mechanics of biomolecules. *J Mech Phys Solids*, 2002, 50: 2237~2274

- 25 Han W, Lindsay S M, Dlakic M, et al. Kinked DNA. *Nature*, 1997, 386: 563
- 26 Hoyt P R, Doktycz M J, Warmack R J, et al. Spin column isolation of protein-DNA interactions from complex protein mixtures for AFM imaging. *Ultramicroscopy*, 2001, 86: 139~143
- 27 Williams M C, Rouzina I. Force spectroscopy of single DNA and RNA molecules. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12: 330~336
- 28 Bustamante C, Marko J F, Siggia E D, et al. Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science*, 1994, 265: 1599~1600
- 29 de Gennes P G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Ithaca: Cornell University Press, 1979
- 30 Doi M, Edwards S F. *The Theory of Polymer Dynamics*. New York: Oxford University Press, 1986
- 31 Cluzel P, Lebrun A, Caron F, et al. DNA: an extensible molecule. *Science*, 1996, 271: 792~794
- 32 Williams M C, Rouzina I, Bloomfield V A. Thermodynamics of DNA interactions from single molecule stretching experiments. *Acc Chem Res*, 2002, 35: 159~166
- 33 Leger J F, Romano G, Sarkar A, et al. Structural transitions of a twisted and stretched DNA molecule. *Phys Rev Lett*, 1999, 83: 1066~1069
- 34 Krautbauer R, Pope L H, Schrader T E, et al. Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy. *FEBS Lett*, 2002, 510(3): 154~158
- 35 Strick T, Allemand J F, Croquette V, et al. Twisting and stretching single DNA molecules. *Prog Biophys Mol Biol*, 2000, 74: 115~140
- 36 Allemand J F, Bensimon D, Croquette V. Stretching DNA and RNA to probe their interactions with proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 2003, 13(3): 266~274
- 37 Moroz J D, Nelson P. Torsional directed walks, entropic elasticity, and DNA twist stiffness. *PNAS*, 1997, 94(26): 14418~14422
- 38 Essevaz-Roulet B, Bockelmann U, Heslot F. Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *PNAS*, 1997, 94(22): 11935~11940
- 39 Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub H E. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat Struct Biol*, 1999, 6: 346~349
- 40 Koch S J, Shundrovsky A, Jantzen B C, et al. Probing protein-DNA interactions by unzipping a single DNA double helix. *Biophys J*, 2002, 83: 1098~1105
- 41 Kim E, Whitesides G M. Use of minimal free energy and self-assembly to form shapes. *Chem Mater*, 1995, 7: 1257~1264
- 42 Endres R G, Cox D L, Singh R R. Colloquium: The quest for high-conductance DNA. *Rev Mod Phys*, 2004, 76: 195~214
- 43 de Pabre P J, Moreno-Herrero F, Colchero J. Absence of dc-Conductivity in lambda-DNA. *Phys Rev Lett*, 2000, 85: 4992~4995
- 44 Zhang Y, Austin R H, Kraeft J, et al. Insulating Behavior of lambda-DNA on the Micron Scale. *Phys Rev Lett*, 2002, 89: 198102
- 45 Watanabe H, Manabe C, Shigematsu T, et al. Single molecule DNA device measured with triple-probe atomic force microscope. *Appl Phys Lett*, 2001, 79: 2462~2464.
- 46 Bockrath M, Markovic N, Shepard A, et al. Scanned conductance microscopy of carbon nanotubes and lambda-DNA. *Nano Lett*, 2002, 2: 187~190
- 47 Cohen H, Nogues C, Naaman R, et al. Direct measurement of electrical transport through single DNA molecules of complex sequence. *PNAS*, 2005, 102(33): 11589~11593
- 48 Terawaki A, Otsuka Y, Lee H, et al. Conductance measurement of a DNA network in nanoscale by point contact current imaging atomic force microscopy. *Appl Phys Lett*, 2005, 86: 113901~113903
- 49 Heim T, Deresmes D, Vuillaume D. Conductivity of DNA probed by conducting-atomic force microscopy: Effects of contact electrode, DNA structure, and surface interactions. *J App Phys*, 2004, 96(5): 2927~2936
- 50 Engel A, Muller D J. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(9): 715~718
- 51 张益, 胡钧, 李民乾. 基于纳米操纵的 DNA 分子手术. *世界科学*, 2005(6): 24~26
- 52 Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, et al. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 1997, 276: 1109~1112
- 53 Fisher T E, Oberhauser A F, Carrion-Vazquez M, et al. The study of protein mechanics with the atomic force microscope. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24(10): 379~384
- 54 Kellermayer M S, Smith S B, Granzier H L, et al. Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science*, 1997, 276: 1112~1116
- 55 Leckband D. Nanomechanics of adhesion proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 2004, 14: 524~530
- 56 Lehenkari P P, Charras G T, Nesbitt S A, et al. New technologies in scanning probe microscopy for studying molecular interactions in cells. *Expert Rev Mol Med*, 2000, 2: 1~19
- 57 Marshall B T, Long M, Piper J W, et al. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*, 2003, 423: 190~193
- 58 Nevo R, Stroh C, Kienberger F, et al. A molecular switch between alternative conformational states in the complex of Ran and importin beta1. *Nat Struct Biol*, 2003, 10: 553~557
- 59 Hua H, Chung J, Gelles J. Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements. *Science*, 2002, 295: 844~848
- 60 Woehlke G, Schliwa M. Walking on two heads: the many talents of kinesin. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1: 50~58
- 61 Carter N J, Cross R A. Mechanics of the kinesin step. *Nature*, 2005, 435: 308~312

- 62 Yin H, Wang M D, Svoboda K, et al. Transcription against an applied force. *Science*, 1995, 270: 1653~1656
- 63 Wang M D, Schnitzer M J, Yin H, et al. Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science*, 1998, 283: 902~907
- 64 Wuite G J, Smith S B, Young M, et al. Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity. *Nature*, 2000, 404: 103~106
- 65 赵健伟, 王楠. 导电原子力显微镜对蛋白质在分子水平上的电学表征. *高等学校化学学报*, 2005, 26(4): 751~753
- 66 Zhao J, Davis J J. Force dependent metalloprotein conductance by conducting atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 2003, 14: 1023~1028
- 67 Zhao J, Davis J J, Sansom M S, et al. Exploring the electronic and mechanical properties of protein using conducting atomic force microscopy. *J Am Chem Soc*, 2004, 126 (17): 5601~5609
- 68 Zhao J, Davis J J. Molecular electron transfer of protein junctions characterised by conducting atomic force microscopy. *Colloid Surf B*, 2005, 40: 189~194
- 69 Andolfi L, Bonanni B, Canters G W, et al. Scanning probe microscopy characterization of gold-chemisorbed poplar plastocyanin mutants. *Surf Sci*, 2003, 530: 181~194
- 70 Xu D, Watt G D, Harb J N, et al. Electrical Conductivity of Ferritin Proteins by Conductive AFM. *Nano Letter*, 2005, 5(4): 571~577
- 71 Bonanni B, Alliata D, Andolfi L, et al. Yeast cytochrome c on gold electrode: a robust hybrid system for bio-nanodevices. Fourth IEEE Conference on Nanotechnology. *Munich, Germany*, 2004, 17~19
- 72 Allen M P. Introduction to molecular dynamics simulation. *NIC Series*, 2004, 23: 1~28
- 73 彭桓武. 量子理论的诞生和发展 —— 从量子论到量子力学. *物理*, 2001, 30(05): 256~270
- 74 Friesner R A, Beachy M D. Quantum mechanical calculations on biological systems. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, 8: 257~262
- 75 Isralewitz B, Gao M, Schulten K. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 11: 224~230
- 76 Sarikaya M, Tamerler C, Jen A K, et al. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nat Mater*, 2003, 2(9): 577~585
- 77 Sellinger A, Weiss P M, Nguyen A, et al. Continuous self-assembly of organic-inorganic nanocomposite coatings that mimic nacre. *Nature*, 1998, 394: 256~260
- 78 Feng L, Li S, Jiang L, et al. Super-hydrophobic surfaces from natural to artificial. *Adv Mater*, 2002, 14(24): 1857~1860
- 79 Halperin C, Mutchnik S, Agronin A, et al. Piezoelectric effect in human bones studied in nanometer scale. *Nano Lett*, 2004, 4(7): 1253~1256
- 80 Wang R Z, Suo Z, Evans A G, et al. Deformation mechanisms in nacre. *J Mater Res*, 2001, 16(9): 2485~2493
- 81 Li X, Chang W C, Chao Y J, et al. Nanoscale structural and mechanical characterization of a natural nanocomposite material: The shell of red abalone. *Nano Lett*, 2004, 4(4): 613~617
- 82 Jackson A P, Vincent J R F, Turner R M. The mechanical design of nacre. *Proc R Soc Lond B*, 1988, 234: 415~425
- 83 Tang Z, Kotov N A, Magonov S, et al. Nanostructured artificial nacre. *Nat Mater*, 2003, 2(6): 413~418
- 84 Kaplan D L. Mollusc shell structures: novel design strategies for synthetic materials. *Curr Opin Solid State Mater Sci*, 1998, 3: 232~236
- 85 Levi-Kalisman Y, Falini G, Addadi L, et al. Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *J Struct Biol*, 2001, 135: 8~17
- 86 Zhang Y, Xie L, Meng Q, et al. A novel matrix protein participating in the nacre framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Comp Biochem Phys B*, 2003, 135: 565~573
- 87 Tsukamoto D, Sarashina I, Endo K. Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320: 1175~1180
- 88 Zhang B, Wustman B A, Morse D, et al. Model peptide studies of sequence regions in the elastomeric biomineralization protein, Lustrin A. I. The C-domain consensus-PG-, -NVNCT-motif. *Biopolymers*, 2002, 63(6): 358~369
- 89 Fritz M, Belcher A M, Radmacher M, et al. Flat pearls from biofabrication of organized composites on inorganic substrates. *Nature*, 1994, 371: 49~51
- 90 Belcher A M, Wu X H, Christensen R J, et al. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature*, 2002, 381: 56~58
- 91 Mount A S, Wheeler A P, Paradkar R P, et al. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science*, 2004, 304: 297~300
- 92 Diebel C E, Proksch R, Green C R, et al. Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature*, 2000, 406: 299~302
- 93 Dupres V, Camesano T, Langevin D, et al. Atomic force microscopy imaging of hair: correlations between surface potential and wetting at the nanometer scale. *J Colloid Interface Sci*, 2004, 269(2): 329~335
- 94 Gurden S P, Monteiro V F, Longo E, et al. Quantitative analysis and classification of AFM images of human hair. *J Microsc*, 2004, 215(1): 13~23
- 95 Fantner G E, Hassenkam T, Kindt J H, et al. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat Mater*, 2005, 4(8): 612~616
- 96 Gao H J, Ji B H, Jager I L, et al. Materials become insensitive to flaws at nanoscale: Lessons from nature. *PNAS*, 2003, 100(10): 5597~5600
- 97 Guo Y F, Guo W L. Self-healing properties of flaws in nanoscale materials: Effects of soft and hard molecular dy-

namics simulations and boundaries studied using a continuum mechanical model. *Phys.Rev.B*, 2006, 73, 085411
98 Bruet B J F, Qi H J, Boyce M C, et al. Nanoscale morpho-

logy and indentation of individual nacre tablets from the gastropod mollusc *Trochus niloticus*. *J Mater Res*, 2005, 20(9): 2400~2419

ADVANCES IN MOLECULAR BIOLOGICAL AND PHYSICAL MECHANICS AT PROBE TIPS*

SUN Jinmei GUO Wanlin †

Institution of Nano Science, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China

Abstract The review considers the experiments of biological mechanics with coupling of force and electric field with biological molecules and materials in probe techniques. Experimental methods and main research findings are summarized systemically about the mechanical properties of biological molecules and materials at nano-scale at the tips of scanning probe microscope, optical tweezers, magnetic tweezers and so on. Then the advances in molecular biological and physical mechanics studies in the tiny and super-special environment between the tip and the substrate are discussed. Probe techniques have significant importance in revealing the physical mechanical properties of biological molecules (including DNA and proteins), characterizing the structures of biological materials and for molecular bionics. It is envisaged that molecular biological and physical mechanics studies in the multi-field coupling environments under the probe tips will be an important field for future researches. It is necessary to combine experimental investigations with theoretical analyses and computational simulations in the tip mechanics, and the development in the virtual experimental technique of molecular physical mechanics will be an important trend.

Keywords molecular biological and physical mechanics, probe techniques, scanning probe microscope, entropic elasticity, multi-field coupling, self-assembly

* The project supported by the National Natural Science Foundation of China (10372044, 50275073), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (PCSIRT) and the Cultivation Fund of the Key Scientific and Technical Innovation Project of the Ministry of Education of China (705021)

† E-mail: nsiguo@nuaa.edu.cn