

原子力显微镜对纳米生物结构的观察和操纵

王莉娟, 张英鸽

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 原子力显微镜不仅能对纳米生物结构进行观察, 而且也能对其进行操纵。对纳米生物结构的观察已深入到生物大分子结构水平。原子力显微镜对生物大分子的操纵包括从染色质中提取 DNA 用于基因分析、对膜蛋白的结构进行观察、对蛋白构象进行可控操纵等。这些纳米技术的应用将揭示生物系统更多的结构和功能信息。

关键词: 原子力显微技术; 单个生物大分子的观察; 操纵

中图分类号: Q66, Q71

1 引言

研究生物大分子复杂的排列方式对于了解其结构和功能是必需的, 为了对其有更加深入的观察, 需要有合适的工具, 为我们提供所需的分子水平的信息。原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM) 不仅能对单个分子进行观察, 而且能对它进行可控操纵。从原子力显微镜诞生至今^[1], 在生物大分子的观察和操纵方面已取得了明显的进展, 表现出独有的特点。AFM 技术的样品制备简单, 甚至无需样品制备, 其破坏性较其他常用生物技术 (如电镜、光镜) 要小得多; AFM 能在多种环境 (包括空气、真空和液体) 中运作, 可在生理条件下对生物分子直接成像, 还能对活细胞进行实时动态观察; 能提供生物分子和生物表面的分子 / 亚分子水平分辨率的三维图像 (现在已经能达到原子级分辨率); 能以纳米尺度的分辨率观察局部的电荷密度和物理特性, 测量分子间 (如受体和配体) 的作用力; 能对单个生物分子进行操纵。在观察的同时, 由 AFM 获得的信息还能与其它分析技术和显微技术互补, 这是其它生物检测技术所难以比拟的。尤其是近几年, 将 AFM 的成像和对生物分子的操纵能力相结合, 实现了对细胞乃至单个分子进行精确可控的修饰, 成为其成像和功能研究的一种独特的研究方法, 并取得了较大进展。本文就此做一综述。

2 对染色体的观察和分析及 DNA 的分离

除少数 RNA 病毒外, DNA 几乎是所有生物遗传信息的携带者。在真核细胞中, 每个 DNA 分子都被包装到一个染色体中。在扫描探针显微镜 (scanning tunnel microscopy, STM) 的早期测试中, DNA 分子是一个很好的样品。最初的成果使人们憧憬用 STM 来进行 DNA 测序。虽然这个目标没有实现, 但在潮湿的大气环境中使用 STM 获得双链 DNA 的图像却成为事实^[2]。随着 AFM 技术的发展, 特别是原子力显微镜的轻敲模式 (tapping mode, TM-AFM) 的应用, 在丙醇中获得了双链 DNA 的高分辨率图像, 图 1^[3]显示的是一右手螺旋 DNA 的亚结构。

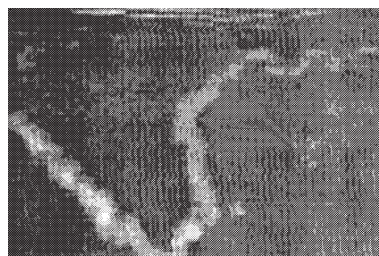


Fig.1 A TM-AFM image of double-strand DNA absorbed on mica and imaged in propanol

收稿日期: 2003-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30271501)

通讯作者: 王莉娟, 电话: (010)66931623,

E-mail: ztwlj1979@sina.com

1994年 Fritzsche 等^[4]对人类染色体、1995年 Vesenka 等^[5]对昆虫染色体、1995年 Winfield 等^[6]对植物染色体分别得到了不同的 AFM 成像。这种相对较新的显微技术可以提供未经修饰的染色体的高分辨率三维图像,其 50 nm 以下的表面特征都能得到清晰观察。与光镜已能够对特定的染色体进行识别和发现发生遗传突变的染色体相比,这些初步的成像显示出这项技术在观察和分析染色体结构方面具有较大的潜能。另外,由 AFM 图像所计算出的染色体体积也成为进行染色体组型分析的依据^[7]。

除了被用做染色体形态的观察,AFM 还可以用来从染色体中提取遗传物质^[8]。用原子力显微镜的轻敲模式对染色体进行分析后选择合适的位点并标记,然后改用接触模式,当施与探针上的力大于 17 nN 时,所需遗传物质就会黏附在探针上被提取出来。被分离的 DNA 经过 PCR 扩增后,最后用 FISH 荧光来鉴定过程的特异性。不久的将来,AFM 与荧光显微镜、PCR 技术、FISH 技术相结合,将可能在细胞遗传学研究方面发挥重要的作用。

3 对膜蛋白的分析

细胞间的相互作用包括相邻细胞之间通过细胞质膜的相互联系,这种联系是由膜蛋白所介导的。如相邻细胞质膜间的间隙连接,构成它的基本单位——连接子,每个连接子是由 6 个相似或相同的跨膜蛋白亚单位组成,例如从埃希杆菌中提取的 Ompf 外膜蛋白和从羊眼晶状体中发现的主体内在蛋白 (MIP)。纯化的膜蛋白经再构建后,依然能够相互作用形成“三明治”样结构。在以往的研究中人们已经认识到连接子和 MIP 的结构和功能在细胞间相互作用中的重要性并对其进行了阐述,但是却没能用具体的实验手段来证明外膜蛋白之间的相互作用与具体的生物功能相关。而原子力显微镜的出现使这一研究成为可能。目前原子力显微镜已成为观察嵌于脂质双分子层中的膜蛋白结构的有力工具^[9],从而为其功能的研究提供了线索。

通常情况下,缝隙连接是由两层细胞质膜组

成。相邻细胞质膜上的两个连接子相对便形成了一个间隙连接单位。当用原子力显微镜来观察分离的缝隙连接时,可以用接触模式通过增加施加于 AFM 悬臂上的力将上层膜去除,这种通过 AFM 探针的机械性的去除方式使隐藏的膜蛋白结构得以观察^[10]。1994年, Schabert 和 Engel 用上述方法观察了从埃希杆菌中提取的 Ompf 外膜蛋白。340 个氨基酸长的单体 Ompf 多肽折叠形成 16 个反向平行的 β - 折叠片从而形成了一个穿膜的中空 β - 桶状跨膜结构,其膜内肽链形成的孔洞的大小决定了跨膜离子和亲水性物质转运的大小,最大约为 64 ku。细胞外表面连接 β - 折叠片的肽链比胞质面长,它们高出膜面约 (1.3 ± 0.2) nm。观察肯定了 Ompf 的三聚体结构,但形成孔腔的三个区域的亚细胞结构却比较模糊。这暗示,形成突起的肽链具有较高的延展性。

在眼晶状体细胞中表达的 MIP 是 AQP 家族的重要成员。1998年, Hasler 等^[11]用 AFM 探针将 MIP 间隙连接的上层膜移去一小部分后对其表面结构进行了观察。AFM 图象显示 MIP 蛋白形成双层的晶体结构且相邻 MIP 蛋白间通过细胞外部分相互作用。其四聚体结构在相邻的细胞质膜上位置高度对应,呈舌-唇样的作用模式。结果提示,在体内连续的 MIP 通道由一个细胞延伸到另一个细胞,且其连接子在细胞质膜间的高度对应与细胞之间的黏附和眼部晶状体细胞独特结构的形成有关^[12]。

4 参与光合作用的蛋白的观察

PS I 和 PS II 是绿色植物和藻类的两种光合系统。每个反应中心都由许多亚基组成。如 PS I 有 11 个蛋白亚单位,其中三个亚单位 PsaC、-D 和 -E 通过静电引力黏附于该复合物的外表面。1998年, Fotiadis 等^[13]用 AFM 观察发现,PS I 复合物是由一些上下排列的 2D 晶体组成的,三个膜外的亚基高出脂质双分子层约 3.5 nm。采用 AFM 接触模式反复观察某一区域,其外部的三个亚基就会消失,从而得到反应中心内部的清晰成像。因此可以说,AFM 探针就象微型手术刀一样移去了个别蛋白亚基,从而使其它隐藏的结构得以研究。

5 对蛋白表面延展性和适应性改变的观察

当用原子力显微镜对质膜进行观察时, 菌视紫质的三聚体排列成边长约为 6.2 nm 的三角形结构。将 100 pN 的力施于 AFM 悬臂, 菌视紫质的表面呈稳定的构象。质膜表面最高的突起代表连结跨膜 α - 折叠 E 和 F 的多肽链。将 200 pN 的力施于 AFM 悬臂, 菌视紫质的结构发生显著改变。在探针的作用下, 连接 E 和 F 的链偏向一边, 连接 A 和 B、C 和 D 的 α - 折叠的较短的链和菌视紫质 C 末端的区域变得可见。这种结构的改变是可逆的。这种结构特点解释了在质子泵发挥作用的过程中 F 折叠构型发生剧烈改变, 是其内在延展性的主要原因。除了显示 AFM 能够对膜蛋白进行纳米尺度的观察外, 结果同样显示出其对肽链原始构象进行观察和可控制操纵的敏感性。

同样, 用力诱导产生的具有延展性的蛋白区域构象的可逆变化在 $\phi 29$ 噬菌体连接体^[13]上同样得到了观察。正如 E、F 链的延展性对菌视紫质质子的跨膜转运效率非常重要一样, $\phi 29$ 噬菌体连接体末端的延展性对于 DNA 的转运非常重要。

6 抗原及抗体间键的断裂

免疫标记和其它标记技术已作为一种成熟的手段用于电镜和光镜, 它们为生物学家提供了大量细胞及分子水平的有用资料。近年来, 标记技术开始在光镜和原子力显微镜相结合方面有所应用^[14]。如在观察细胞方面, 可以通过荧光染色法确保我们所观察的是细胞的浆膜面。然而, 在大多数情况下, 生物标本在标记前都要经过化学固定, 因此 AFM 所观察到的并不是其原始结构。

目前, 人们发现了一种替代的方法。众所周知, 抗体能够特异性地识别抗原, 所以我们可以使用抗体标记法来确定在生理条件下所观察到的膜蛋白图像是浆膜面还是外膜面。用 AFM 来观察菌视紫质, 在低分辨率下, 不能识别吸附于云母表面的膜结构, 但是在高分辨率情况下, 我们得到了两种不同的膜表面图像, 这种结果提示我们有可能同时看到了菌视紫质的浆膜面和外膜面。为了进行鉴别, 在膜蛋白与云母吸附的过程中, 加入可与浆膜面的蛋白 C 末端特异性结合的抗体共同孵育后观

察。结果可以看到, 有些膜表面 (浆膜面) 比较粗糙, 而有些 (外膜面) 仍然非常光滑。特异结合于浆膜面的抗体在施与 AFM 悬臂 >0.8 nN 的力时其键可断裂从而被去除, 我们即可观察到其浆膜面的结构。但当探针离开几分钟, 膜表面又重新与缓冲液中的抗体相结合。

7 对蛋白分子内作用力的测定

蛋白正常功能的发挥, 不仅要有正确的一级结构, 更重要的是要有正确的立体构象, 而立体构象的维持是蛋白分子内部相互作用的结果。近年来, 神经病理学和遗传学以及转基因动物模型研究提供了强有力的证据, 表明蛋白质的错误折叠与疾病有关并提出了构象病的概念^[15]。构象病的防治首先需要对蛋白质的折叠原理有深入的了解。蛋白质靠复杂的非共价作用保持构象的稳定, 用机械的或化学的方法使这些非共价键断裂会引起蛋白伸展。Carrión-Vazquez 等^[16]用两种方法使同一蛋白伸展, 一种采用变性剂的化学法, 一种是用 AFM 施力使蛋白伸展的机械法。结果表明, 两种方法所得的结果基本相同 (伸展速度常数分别为 10.9×10^{-4} 和 $3.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)。同时用 AFM 还可以直接检测维持蛋白构象的作用力大小。在测量时, AFM 的探针尖端接近吸附有蛋白分子的基底表面, 施加大约 1 nN 的力于探针尖端, 使其与样品接触 1 s, 分子的末端被针尖粘住。随后, 针尖离开基底, 在针尖离开过程中, 处于针尖与基底之间的蛋白分子伸展形成“桥接力”, 这个力被实时动态地测量出来, 这样就得到了单个分子伸展形成的力伸展曲线, 分析力伸展曲线就能在单个分子水平上研究蛋白质的折叠行为。

8 多糖的观察

目前对生物大分子的研究主要是核酸和蛋白质, 但也有几例研究透明质酸 (HA) 的报道。透明质酸是大分子量的多糖类物质, 存在于结缔组织细胞分子基质中。它高度亲水, 在关节中起润滑剂的作用。在浓度达到 1 g/L 时已能通过内部相互作用链形成稳定的网状结构。在组织中 HA 形成的网可以作为一个筛子, 允许小分子通过, 这就对组织内水溶解物和营养运输做出了贡献。1993 年

Turley等在细胞表面发现一定数量的 HA 受体, 而且有迹象表明 HA 在细胞和组织中担负发展和分化的任务, 所以对 HA 的研究有重要意义。但因为这种分子的柔韧性, 以及对湿度、pH 的敏感性, 固、液态形状非常不同, 很难用 X 射线、EM、NMR 等常规方法进行研究。最近 Jacoboni^[17]用 AFM 进行研究, 样品制备简单, 不做任何物理、化学的预处理, 也不需任何强烈的脱水措施, 甚至不必沉浸在丁醇中。他们也没有用盐溶液, 因盐的小结晶会影响分辨率。他们把样品在水合状态沉浸于亲水的云母和疏水的石墨基底上, 展现出 HA 分子的形象。为了更好地确定 HA 分子在溶液中链间和链内的相互作用, 采用了不同的溶液浓度, 从 0.001~1 g/L, HA 分子量由 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ u。AFM 结果表明, 对于大分子量的 HA, 浓度高于 1 g/L 时, 无论在云母或石墨上都能形成稳定的三维网状结构。HA 对云母比对石墨有更好的固定作用, 当沉浸于石墨时, 施与探针 3 nN 的力就能将分子移走, 当沉浸于云母时, 需施加超过 80 nN 的力, 所以在石墨上只能用轻敲模式。在云母表面网与 HA 浓度无关, 1~0.1 g/L 都能形成网状结构且厚度相当一致, 大多数在 0.3~0.4 nm, 说明由单层分子组成, 分布的细丝是单个 HA 链。而在石墨表面, 网依赖于 HA 的浓度, 网状结构比在云母上形成的更规则而厚度不一致, 观察不到单一分子层, 且 HA 聚集比云母缺乏秩序。表明既有强的链间的横向聚集力, 又有强的 HA 与云母间的亲水作用力, 结果显示与溶液中的三级结构一致。说明多重链间的相互作用对网的形成是必要的, 此项研究对网状结构的力学原理和网的成因提供了线索。

9 小结及展望

综上所述, 我们可以看到: (1) 在染色体结构的分析以及对特定 DNA 片段的可控提取中, AFM 技术不仅实现了在生理条件下观察生物大分子, 而且具有机械性微型手术刀的功能。这种应用的延伸和改良将使 AFM 成为细胞遗传学研究的有利工具。(2) 对上层膜结构的机械性去除使隐藏的膜表面结构得到了观察, 使我们获得了许多有关结构和功能的有用信息。AFM 有可能成为观察活体细胞和探索其内在结构的有用工具。(3) 在对 PS I 的观察中, AFM 探针将个别亚基同蛋白复合物分离后, 对隐藏的反应中心内部结构进行了高分辨率的观

察。因此, 使用 AFM 可用于观察一些隐藏的生物大分子的内部结构。(4) 将 AFM 的操纵和观察功能相结合, 已成为研究分子间相互作用的有力手段。

总之, 现在的 AFM 已成为集观察、操纵、分析于一身的多功能显微镜。最近几年, AFM 的使用已使我们获得了大量可靠的信息。随着科技的不断发展, 仪器的不断更新, AFM 必将在生物大分子结构、动力学和生物分子相互作用的研究方面发挥更大作用。

参考文献:

- [1] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986,56(9):930-933
- [2] Guckenberger R, Heim M, Cevc G, Knapp HF, Wiegand W, Hillebrand A. Scanning tunneling microscopy of insulators and biological specimens based on lateral conductivity of ultrathin water film. *Science*, 1994,266(5190):1538-1540
- [3] Hansma HG, Laney DE, Bezanilla M, Sinsheimer RL, Hansma PK. Applications for atomic force microscopy of DNA. *Biophys J*, 1995,68:1672-1677
- [4] Fritzsche W, Schaper A, Jovin TM, Henderson E. Probing chromatin with the scanning force microscope. *Chromosoma*, 1994,103:231-236
- [5] Vesenka J, Mosher C, Schaus S, Ambrosio L, Henderson E. Combining optical and atomic force microscopy for life sciences research. *Biotechniques*, 1995,19:240-248
- [6] Winfield M, McMaster TJ, Karp A, Miles MJ. Atomic force microscopy of plant chromosomes. *Chromosome Res*, 1995,3:128-131
- [7] Fritzsche W, Henderson E. Volume determination of human metaphase chromosomes by scanning force microscope. *Chromosoma*, 1996,103:231-236
- [8] Thalhammer S, Stark RW, Muller S, Wienberg J, Heckl WH. The atomic force microscope as a new microdissecting tool for the generation of genetic probes. *J Struct Biol*, 1997,119:232-237
- [9] Engel A, Muller DJ. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nature Struct Biol*, 2000,7:715-718
- [10] Hoh JH, Lal R, John SA, Revel JP, Arnsdorf MF. Atomic force microscopy and dissection of gap junctions. *Science*, 1991,253:1405-1408
- [11] Hasler L, Walz T, Tittmann P, Gross H, Kistler J, Engel A. Purified lens major intrinsuc protein (MIP) forms highly ordered tetragonal two-dimensional arrays by reconstitution. *J Mol Biol*, 1998,279:855-864
- [12] Fotiadis D, Hasler L, Muller DJ, Kistler J, Engel A. Surface tongue-and-groove contours on lens MIP facilitate cell-to-cell adhesion. *J Mol Biol*, 2000,300:779-789

- [13] Fotiadis D, Muller DJ, Tsiotis G, Hasler L, Tittmann P, Mini T, Jenö P, Gross H, Engel A. Surface analysis of the photosystem I complex by electron and atomic force microscope. *J Mol Biol*, 1998,283:83~94
- [14] Vesenka J, Guthhold M, Tang CL, Keller D, Delain E, Bustamante C. Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope. *Ultramicroscope*, 1992,42-44:1243~1249
- [15] Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet*, 1997,350(9071):134~138
- [16] Carrion-Vazquez M, Oberhauser AF, Fowler SB. Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999,96(7):3694~3699
- [17] Jacoboni I, Valdre U, Mori G, Quaglino D, Quagli-Ronchetti I. Hyaluronic acid by atomic force microscopy. *J Struct Biol*, 1999,126(1):52~58

OBSERVATION AND MANIPULATION OF BIOLOGICAL STRUCTURES WITH AFM

WANG Li-juan, ZHANG Ying-ge

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Many biologists had a dream of physically touching and manipulating the biomolecules they are investigating. With the invention of the atomic force microscope (AFM), this dream is coming true. AFM observation of the nanostructure of the biological samples has deepened the general understanding of biomolecules. Examples of AFM application in nanomanipulation include the extraction of chromosomal DNA for genetic analysis, the dissection of biological membranes, and the controlled modulation of protein conformation etc. Future application of these nanotechniques will reveal new information on the structure, function and assembly of biomolecules. Here, recent applications of AFM to imagining and manipulating biological systems are reviewed.

Key Words: Atomic force microscope; Single molecule imaging; Nanomanipulation