

## 原子力显微镜在生物分子间相互作用力的研究

陈茜 蔡继业

(暨南大学化学系 广州 510632)

**摘要** 近年来原子力显微镜在测量生物分子间的相互作用力方面取得显著的进步。本文综述原子力显微镜原理以及在生物分子间相互作用方面的研究,为人们理解分子的识别进程,提供一个新的研究方法。

**关键词** 原子力显微镜 生物分子相互作用 单分子力谱 蛋白质 DNA

原子力显微镜 (Atomic Force Microscope, AFM) 是 1986 年由美国 IBM 公司的 Binnig 和 Stanford 大学的 Quate 等发明的<sup>[1]</sup>。AFM 具有原子级的空间分辨率高的特点,其中横向分辨率为 0.1nm,纵向分辨率为 0.01nm。制样方法简单,能在接近生理环境的条件下(如溶液中)操作,利用它对生物样品进行高分辨成像,已成为生物学研究的常用技术,广泛应用于结构生物学、分子生物学、细胞生物学等各领域。利用 AFM 皮牛级的测力灵敏度来研究生物分子间的非共价作用(一般认为单对生物分子间的非共价作用力为几十到几百皮牛),使得具有分辨率高、成本低、消耗低、工作范围宽等一系列优点,已被大量应用于表面分析领域,通过对表面形貌的分析、归纳、总结,可进一步得到更深层次的信息,为人类对微观世界的探索提供理想的工具。

目前利用 AFM 不仅可以观察到水合活细胞的结构<sup>[2-4]</sup>、还可以测定细胞壁的弹力<sup>[5, 6]</sup>、探测聚合物分子的表面构象以及绘制其官能团的图像<sup>[4-7]</sup>、确定分子识别的位点<sup>[8, 9]</sup>。所有的这些处于亚细胞水平的性质用传统的方法很难检测,因为其尺寸太小。而如今则可以利用 AFM 的高分辨率表征样品表面形貌,并分析研究与作用力相对应的各种表面性质。作为研究样品表面形貌和表面力学性质的有力工具,AFM 可以探测到探针和生物样品之间的微小作用力,从而可对生物样品间的力学关系及样品表面电荷分布、磁畴分布、聚集状态等结构特征进行评价<sup>[10]</sup>。从而被作为测量生物分子间的相互作用力的重要工具。

### 1 AFM 的工作原理及探针与样品间的作用

AFM 主要由装有细微针尖(顶端半径可达几个纳米)的弹性微悬臂、压电陶瓷扫描管、检测系统和反馈控制系统等组成(见图 1)<sup>[11, 12]</sup>。当针尖靠近样品表面进行水平扫描成像时,针尖与样品间微

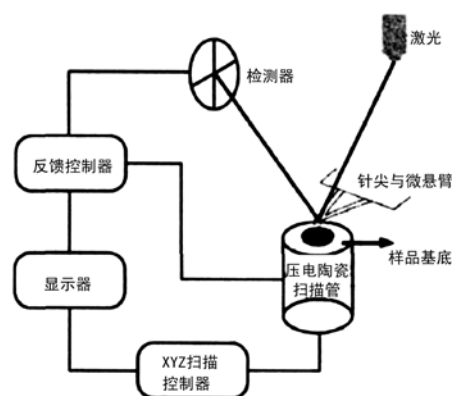


图 1 AFM 的主要组成部分

弱的相互作用力引起微悬臂发生形变,使得通过微悬臂背面反射到光电检测器的激光束发生偏转,在恒力模式下反馈系统根据检测到的偏转位置变化不断调整针尖与样品的距离,保持针尖-样品间的相互作用力恒定不变。这样,针尖随着样品表面的起伏而改变高度,得到样品的表面形貌图像。如果将针尖相对样品在竖直方向来回运动,系统则记录在针尖逼近基底和从基底回退提拉过程中微悬臂弯曲方向和弯曲程度的变化(见图 2),再将这一变化转化为力值(力  $F$  的大小等于针尖弹性常数  $k$  与弯曲程度  $x$  的乘积,  $F=kx$ ) 随距离变化曲线,即得到力谱测量过程中的力-距离曲线。通过化学反应或物理吸附将需要研究的分子对(如配体和受体)分别固定于 AFM 的针尖和基底表面,当存在配体/受体特异结合时,力-距离曲线中的回退曲线就会显

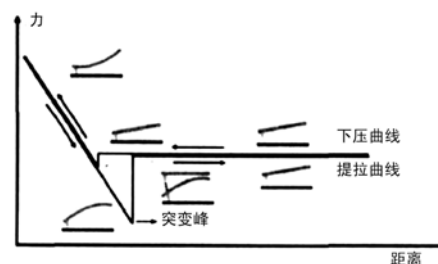


图 2 AFM 的典型力-距离曲线

示突变峰,反映配体/受体成键相互作用力强度及它们的结合/解离性质。根据分子对数目不同,单分子力谱的测定方法可分为多分子对法和单分子对法。前者主要通过测量多对分子来推算单对分子的相互作用力;后者则是通过控制固定在针尖和基底上的分子密度,使针尖和样品的有效接触面积内最多只有一对分子形成复合物,通过统计所测力值分布的最可几值,直接得到单分子力,这也是目前在单分子力谱研究中应用最为广泛的方法。为获得用于统计的单分子力值分布图,修饰配体的针尖往往要在修饰受体的基底上经过上千次的反复提拉,并不是每次都能在力-距离曲线上检测到特异作用力,有一定的成键几率(通常小于30%)。因此,通过单分子力谱的测定,可同时获得配体受体相互作用力大小和成键几率两个参数来共同表征配体受体的亲和力<sup>[13]</sup>。实际上,单分子力谱测定的是生物分子形成复合。

针尖与样品表面可能发生形变,从而有形变力;若探针和样品接触到液体,则常会观察到它们表面带有电荷,产生静电力;此外,特定磁性材料的探针和样品,可能会有磁力;另外,样品表面可能存在液体而产生表面张力,以及一些由于彼此间化学结合而产生的化学力。若对探针和样品进行预处理和精心设计,可避免形变力、静电力、磁力、表面张力、化学作用力等影响,作为近似计算,可以只考虑斥力和范德华力<sup>[14]</sup>。但在一些特殊过程中,若需要检测样品的形变能力、静电荷、磁畴和化学基团分布、表面张力系数等参数,则需要利用这些力进行表征。

## 2 生物分子间相互作用

生物分子作用力的研究,在某种意义上说,就是对生命体功能活动中最根本原理的研究。这也为人们理解生命原理,提供一个新的研究手段和途径。生物领域的相互作用包括生物分子结构中某些特异位置之间的各种弱键作用。根据简单模型得到的生物分子间的作用力需经过理论计算进行推断,其结果太理想化因而很难真实反映生物分子的实际状况,同时也无法动态反映生物体内的分子运动过程。

AFM可实时测量生理状态生物样品分子间的作用力的动态变化。是AFM的一个十分重要的功能<sup>[15]</sup>。这对于了解生物分子的结构和物理特性是非常有意义的。因为这种作用力决定两种分子的相互吸引或者排斥,接近或者离开,化学键的形成或

者断裂,生物分子立体构像的维持或者改变等等。在分子间作用力的支配下,还同时支配着生物体内的各种生理现象、生化现象、药物药理现象以及离子通道的开放或关闭,受体与配体的结合或去结合,酶功能的激活或抑制等等。

对于单分子,一个重要方面是研究单个分子之间的作用力,这也是联系单个分子和结构性质的一个重要桥梁。目前主要利用原子力显微镜单分子力谱法(single molecule force spectroscopy)对单分子水平上分子间相互作用力进行测定。

### 2.1 抗体/抗原间的相互作用

单分子力谱法建立后便广泛用于表征抗体/抗原分子的亲和力<sup>[16-18]</sup>。抗体与抗原的相互作用在免疫反应的研究中有重要价值。Kim<sup>[19]</sup>等研究抗微生物肽对脂多糖(LPS)和免疫蛋白(脂多糖结合蛋白LBP和CD14)间相互作用的影响。脂多糖结合蛋白LBP和受体蛋白CD14同LPS的结合可触发败血症性休克引发的免疫响应,但具体机制仍不清楚。测定针尖上固定的LBP蛋白和基底上脂双层生物膜中CD14的相互作用力,发现LPS存在下形成LPS-LBP复合物后与CD14间的结合力明显高于LBP和CD14间的结合力,且LPS的糖链区越长,结合力越大,说明LPS尤其是其糖链区在LBP与CD14的结合上起着重要作用。同时发现抗微生物肽多粘霉素B能特异性地抑制LBPLPS和CD14的结合。

Hinterdorfer等<sup>[20]</sup>研究白蛋白抗体与抗原的相互作用力,并改进蛋白质的固定方法,通过一段PEG高分子聚合物链将蛋白质与表面相连,这样不仅增加抗体抗原的空间自由度,而且能从力-距离曲线图上将其特异性相互作用与针尖和基底的非特异性相互作用力区分开来,成为目前固定蛋白质的常用方法。并进一步用修饰抗体的针尖对抗原样品扫描<sup>[21]</sup>,发展将AFM测力模式和扫描成像相结合的识别成像技术。采用交变磁场驱动表面被磁化的AFM微悬臂,可同时得到成像点的图像信息与分子间相互作用力,即同时获得高分辨的形貌像和识别像,克服AFM成像只能给出分子的形状和大小信息的局限,使得AFM对成像分子的种类和成份具备一定的识别能力。

### 2.2 DNA与其它物质复合时的相互作用

DNA与其他物质静态构型以及复合过程中相互作用动力学研究是DNA研究一个热点。AFM不仅可以研究整个复合物分子立体结构和空间构

象,同时还可以利用某些特殊抗体蛋白或 RNA 分子在缓冲体系中与 DNA 相互作用过程中重要结构参数变化来探究 DNA 区域分子构型。Yolanda D Tseng<sup>[22]</sup> 等用 AFM 研究棘霉素粘合在 DNA 分子上对其结构影响。Jiao<sup>[23]</sup> 对抑瘤蛋白 p53 与 DNA 相互作用动力学进行研究。Ben-zanilla<sup>[24]</sup> 等观察 DNA 被 DNA 酶降解成片段动态过程。Krautbauer<sup>[25]</sup> 直接测定 DNA 构象及与小分子结合后调控变化过程。Jett<sup>[26]</sup> 对 DNA 链上蛋白质结合位点进行确定。曲梅花<sup>[27]</sup> 等研究人神经 tau 蛋白与 DNA 相互作用,通过凝胶阻滞实验表明,人类神经 tau 能够与不同来源 DNA( $\lambda$  DNA, 质粒 DNA 以及 PCR 产物)相结合,形成 tau - DNA 复合物,原子力显微镜直接证实 tau 与线性质粒 DNA 相结合形成串珠样结构。采用单克隆抗体 Tau -1 进行免疫组织化学实验显示,神经 tau 不但弥散地分布在 SY5Y 细胞系细胞质内,同时也存在于细胞核中,并形成染色致密斑点,因此得出神经 tau 在细胞核中可能参与某种重要生物学功能结论。

### 2.3 蛋白质 /DNA 的相互作用

通常利用 AFM 成像可观测蛋白质 /DNA 的结合。Krasnoslobodtsev 等<sup>[28]</sup> 研究 DNA 限制性内切酶 SfiI 与双链 DNA 复合物的单分子力谱,推测 SfiI 与双链 DNA 结合形成能瞬间分离的动态复合物。SfiI 特异识别的 DNA 序列中有一段间隔序列,它不与 SfiI 结合,但其序列的改变却能改变蛋白质 /DNA 复合物的解离速度,从而影响 SfiI 酶的切割速度。解转录因子与其 DNA 元件的相互作用是研究基因表达和调控的基础。徐永春等<sup>[29]</sup> 建立利用单分子力谱研究转录因子与 DNA 启动子相互作用的方法,并应用于检测多种新发现的植物转录因子与其 DNA 元件 DRE 和 ERE 的结合,结果表明 AFM 在测定转录因子与其 DNA 启动子作用力方面具有很高的灵敏度:转录因子 DNA 结合域中单个关键氨基酸的突变或者启动子核心序列中单个碱基被其他碱基取代,都使得两者的结合力和结合几率大大减弱。AFM 具有耗样量少、制样简单、快速、灵敏等优越性,有望成为表征转录因子,确定其 DNA 响应元件和进行功能基因组研究的新工具。

### 2.4 DNA 分子的拉直

AFM 研究 DNA 一重大突破是证明 DNA 可以在水、缓冲溶液以及各种溶剂体系,如乙醇等中顺利成像,成为 DNA 分子拉直有力工具。用同一扫描探针在空气或丙醇中修饰 DNA 分子,在较小扫

描范围内,在增加扫描力同时,DNA 就可以被切断。因此可以利用 AFM 对 DNA 链进行切割和对切割片断进行获取。AFM 力谱技术也被应用到 DNA 考察之中。Krautbauer<sup>[30]</sup> 等利用 AFM 单分子力谱技术系统研究人工和天然短链 DNA 分子开链行为。利用 AFM 单分子力谱技术可以分辨 10 个碱基对特定相互作用力变化情形。Albrecht<sup>[31]</sup> 等更是利用此技术检测到单碱基突变引起不同作用力,为定量表征和解释 DNA 单个序列提供非常有价值热力学模型。

### 2.5 蛋白质的去折叠

蛋白的折叠结构已为人们所熟知,人们利用其它光谱方法已经对其结构进行过研究,而对于这种折叠结构的稳定性以及折叠结构形成的推动力的直接研究仍然较少。蛋白的折叠结构,尤其是分子内折叠结构,对于其许多生理功能的实现具有重要作用。许多机械蛋白的链内都包含有靠分子内相互作用形成的多个独立的结构域。由于蛋白折叠的能量形貌是未知的,所以蛋白的力学性质或折叠机理无法从热力学分析中得到。而 AFM 则可以解决这一难题。通过将蛋白的两端分别连接于原子力显微镜的针尖和基底之间的力操纵,人们可以直接检测到该结构域的力学稳定性。AFM 成像与操纵的联合允许其能够从宏观到单分子尺度上对生物系统进行精确和可控的修饰和研究。

结构学、化学和形态学研究显示,S 层是生物进化过程中最为原始的一种膜结构,它们完全掩盖细胞的表面。它们由单个蛋白分子组成,同时由于熵的驱动而使得该膜具备组装成单分子阵列的能力。用 AFM 对 HPI 层的内表面成像可以获得聚集体间相互作用的认识。对 HPI 层成像后,通过加强探针 - 样品间的接触时间或力度可将个体蛋白原体与 AFM 探针相连接以实现 AFM 探针的功能化,这样便允许 AFM 用于测量蛋白的单分子力谱。AFM 单分子力谱也可用于分子内相互作用的研究,如将蛋白质、DNA 等生物大分子的两端分别固定于 AFM 针尖和基底,进行“单分子拉伸实验”,研究这些生物大分子的机械性质和折叠 / 去折叠过程。许多功能蛋白依靠分子内的各种相互作用维持其稳定的三维结构,对溶液中具有一定构象的蛋白质进行拉伸,可以得到蛋白质解折叠的势能图,分析蛋白质去折叠过程中的构象变化。

## 3 结束语

生物分子作用力的研究,在某种意义上说,就



是对生命体功能活动中最根本原理的研究。为人们理解生命原理,提供一个新的研究手段和途径。传统的方法是根据简单模型得到的生物分子间的作用力需经过理论计算进行推断,其结果太理想化因而很难真实反映生物分子的实际状况,同时也无法动态反映生物体内的分子运动过程。而利用 AFM 可实时测量生理状态生物样品分子间的作用力的动态变化。

基于 AFM 测量技术不断地完善,各种衍生化的扫描显微镜形式层出不穷,样品的制备技术不断提高。另外,人们正在努力发展各种新的理论模型,将实验与理论模拟相结合去揭示许多生命现象中的一些本质规律。对生命现象中一些基本过程就会有一个更深的认识;同时生物大分子作为天然的纳米材料,深入了解其生物力学性质对纳米器件的设计与制造也具有实际意义。

#### 参考文献

- Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, 56(9): 930~3
- Touhami, A., et al. Atomic force microscopy of cell growth and division in staphylococcus aureus[J]. *Bacteriol*. 2004, 186:3286~3295
- Plomp, M., Leighton, T.J., Wheeler, K.E., Hill, H.D. & Malkin, A.J. In vitro high-resolution structural dynamics of single germinating bacterial spores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007, 104:9644~9649
- Dague, E., et al. High-resolution cell surface dynamics of germinating aspergillus fumigatus conidia[J]. *Biophys* 2008, 94:656~660
- Touhami, A., Nysten, B. et al. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. *Langmuir* 2003, 19:4539~4543
- Gaboriaud, F., Baillet, S., Dague, E. & Jorand, F. Surface structure and nanomechanical properties of shewanella putrefaciens bacteria at two pH values(4 and 10) determined by atomic force microscopy[J]. *Bacteriol*. 2005, 187: 3864~3868
- Dague, E. et al. Chemical force microscopy of single live cells. *Nano Lett*. 2007, 7:3026~303
- Dupres, V. et al. Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesions on living bacteria. *Nat. Methods*, 2005, 2:515~520
- Gilbert, Y. et al. Single-molecule force spectroscopy and imaging of the vancomycin/D-Ala-D-Ala interaction. *Nano Lett*. 2007, 7:796~801
- Zhu Jie, Sun Runguang. Applications of atomic force microscopy to the structures and functions of single protein molecule (in Chinese) [J]. *Chinese journal of analytical chemistry*, 2006, 34(5):735~740
- 白春礼, 田芳, 罗克. 扫描力显微术 [M], 北京: 科学出版社, 2000
- Dufrene YF. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology[J]. *Bacteriol*, 2002, 184(19): 5205~13
- Horton M, Charras G, Lehenkari P. Analysis of legend-receptor interaction in cells by atomic force microscopy[J]. *Receipt Signal Transduction Res*, 2002, 22(1~4):169~90
- Zhu Jie, Sun Runguang. Introduction to atomic force microscope and its manipulation (in Chinese)[J], *Life science instruments*, 2005, 3(1):22~26
- Zhu Jie, Application of atomic force microscope to nano-structure and nanomanipulation in Biology (in Chinese) [J]. *Nan science & Technology*, 2005, 2(3):42~46
- Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber HJ, et al. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(8): 3477~81
- Kienberger F, Kada G, Mueller H, et al. Single molecule study of antibody-antigen interaction strength versus intramolecular antigen stability[J]. *Mol Biol*, 2005, 347: 597~606
- Neuert G, Albrecht C, Pamir E, et al. Dynamic force spectroscopy of the digoxigenin-antibody complex[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(2): 505~9
- Kim JS, Jang S, Kim U, et al. AFM studies of inhibition effect in binding of antimicrobial peptide and immune proteins[J]. *Langmuir*, 2007, 23(21): 10438~40
- Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber HJ, et al. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(8): 3477~81
- Kienberger F, Ebner A, Gruber HJ, et al. Molecular recognition imaging and force spectroscopy of single biomolecule[J]. *Acc Chem Res*, 2006, 39(1): 29~36
- Yolanda D Tseng, Ge Haifang, Wang Xiuzhu, et al. Atomic force microscopy study of the structural effects induced by echinomycin binding to DNA[J]. *Mol Biol*, 2005, 345: 745~758
- Jiao Yuekan, Dmitry I Cherny, Gudrun Heim, Dynamic interactions of p53 with DNA in solution by time ~ lapse atomic force microscopy [J]. *Mol Biol*, 2001, 314:233~243
- Bezanilla M, Drake B, Nudler E, et al. Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope[J]. *Biophys*, 1994, 67(6): 2454~2459
- Krautbauer R, Pope LH, Schrader TE, et al. Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy [J] *FEBS Lett*, 2002, 510: 154~158
- Jett SD, Cherny DI, Subramaniam V, et al. Scanning force microscopy of the complexes of p53 core domain with supercoiled DNA [J] *Mol Biol*, 2000, 299(3): 585~592
- 曲梅花, 李辉, 徐艳娟等. 人神经 tau 蛋白与 DNA 相互作用 [J], *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31(10):918~923

好,从现场实验看,(a)与(c)由于接触点较多,需要更大的功率镍才能熔化,功率增大后会出现钼丝局部过热造成部分镍块不能熔化,持续增大功率更会造成钼丝熔断使溅射失败,而(b)形状镍块受热集中更容易达到熔点,且熔化速度快,故效果较好。

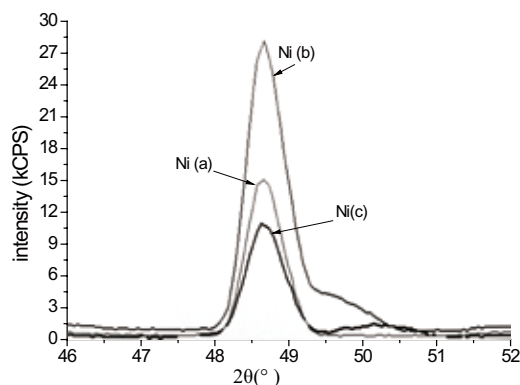


图3 三种形状钼丝溅射镍 X 荧光扫描图

### 2.3 功率调节对溅射的影响

采用  $\Phi = 1.20\text{mm}$  的钼丝根据其长短不同,

一般在 3.0~3.4 kVA 的条件下使镍块熔化,如果直接将功率调至熔化功率,会出现局部过热导致整块不熔或者接触点熔化镍块掉落,因此需要一个预热功率,实验证明,在功率为 2.0~2.2 kVA 下预热 30s,然后加功率至 3.0~3.4 kVA 溅射效果最好。

### 3 结论

结合 X 荧光光谱数据,依据上述实验获得的溅射镍电极工艺,具有成功率高、速度快、效率高的特点,实验证明,一次溅射工艺采用 0.020g 镍块,可获得厚度为 50~100nm 的镍膜,为半导体材料采用镍形成欧姆接触提供保障。

#### 参考文献

- 1 杨慧. SiC 体材料欧姆接触的制备,第九届全国 X-射线衍射学术大会暨国际衍射数据中心(ICDD)研讨会论文集,2006,381~382
- 2 蒲红斌. 退火 Ni/3C-SiC 欧姆接触的影响,固体电子学研究进展,2005,(1):52~55

## Application of X-ray fluorescence spectra in the sputtering process research

Dong Yanhui Li Guangping Zheng Qingyu

(China Electronics Technology Group Corporation NO.46 Research Institute, Tianjin 300192)

**Abstract** This article discusses the semiconductor ohmic contact material nickel electrode sputtering process by the use of X fluorescence spectrometry, the process to form a short, high efficiency, easy access to a better ohmic contact.

**Key words** X-ray fluorescence spectrometry Nickel Sputtering process

(上接第9页)

28 Krasnosl obodtsev AV, Shlyakhtenko LS, Lyubchenko YL. Probing interactions within the synaptic DNA-Sfil complex by AFM force spectroscopy[J]. Mol Biol, 2007, 365(5):1407~16

29 Xu Yongchun, Shi Xiaoli, Fang Xiaohong et al. Biomolecular interaction study by atomic force microscopy

single-molecule force spectroscopy[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences. 2008, 20(1):39~45

30 Krautbauer R, Rief M, Gaub HE | Unzipping DNA oligomers [J] Nano Lett 2003,3:493~496

31 Albrecht C, Blank K, Lalic Multhaler M, et al. DNA: A programmable force sensor[J]. Science, 2003,301: 367~370

## Biomolecular interaction study by atomic force microscopy

Chen Qian Cai Jiye

(Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632)

**Abstract** During the past decade, remarkable advances have been made in using atomic force microscopy (AFM) for measuring the forces of the interaction between biomolecular. This article reviewed the principle of AFM and the study of the interaction between biomolecular, providing fundamental insights into molecular recognition processes.

**Key words** Atomic force microscopy Biomolecular interaction Single molecule force spectroscopy Protein DNA