

# 转铁蛋白及其抗体分子间作用的原子力显微镜探测

杨培慧 郑志雯 曾谷城 蔡继业

(暨南大学化学系, 广州 510632; 华南理工大学特种功能材料及其制备新技术教育部重点实验室, 广州 510640.  
E-mail: typh@jnu.edu.cn)

**摘要** 采用原子力显微镜对饱和铁转铁蛋白和脱铁转铁蛋白与转铁蛋白抗体之间的相互作用进行研究。对转铁蛋白抗体层层自组装在喷金基片表面并且与抗原蛋白之间特异性结合的形貌进行了表征。通过原子力显微镜对分子间力的曲线的探测, 比较了饱和铁转铁蛋白和脱铁转铁蛋白与抗体之间的作用力的差异。实验表明, 饱和铁转铁蛋白与抗体分子之间结构互相嵌合, 结合更加紧密; 分子间力的曲线亦显示饱和铁转铁蛋白与抗体之间的特异性结合力明显大于脱铁转铁蛋白。

**关键词** 饱和铁转铁蛋白 脱铁转铁蛋白 转铁蛋白抗体 原子力显微镜

原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)是研究生物大分子结构及分子间相互作用的一种新型显微技术, 它具有纳米级分辨率, 能够在近生理条件下对生物样品进行观察。分子间的相互作用在生物学领域中相当普遍, 如配体-受体、抗原-抗体之间的结合、信息传递分子间的结合等, 是生物体中信息传递的基础。已有文献报道AFM用于研究互补的DNA链间、细胞黏附分子间及配体-受体间的相互作用力<sup>[1,2]</sup>; 生物素(Biotin)和抗生物素蛋白链菌素(Streptavidin)分子之间具有很强的特异性结合力, 是运用AFM力的曲线模式探测分子间作用力的良好示范<sup>[3]</sup>。目前, 分子间作用力的探测是扫描探针显微学的前沿课题<sup>[4,5]</sup>。

转铁蛋白(transferrin, Tf)是一种铁结合蛋白, 具有转运铁的功能。它主要包含两种形式: 饱和铁转铁蛋白(*holo*-Tf)和脱铁转铁蛋白(*apo*-Tf)。在生理环境中, Tf及其受体(TfR)复合物的内吞作用是细胞铁摄入的主要途径<sup>[6]</sup>, Tf结合到细胞表面的TfR上, 结合的亲和力取决于Tf结合铁的程度, 其受体与*holo*-Tf的结合力比*apo*-Tf高几十倍, 一般认为只有含铁的Tf分子才会被受体结合<sup>[7]</sup>。基于转铁蛋白及其受体之间结合的亲和力存在着明显的差异, 将影响到蛋白质的生物功能, 而*holo*-Tf和*apo*-Tf与抗体分子之间特异性识别的亲和力是否也有所不同, 本文将利用原子力显微镜对转铁蛋白与抗体之间的相互作用的形貌以及力的曲线进行探测。

## 1 实验

### 1.1 仪器与试剂

AFM: Autoprobe CP Research (美国 Thermo 仪器

公司), 采用轻敲模式成像, 扫描探针为商用氮化硅针尖, 微悬臂长度为 180  $\mu\text{m}$ , 力常数为 3.2 N/m。

人*holo*-Tf, *apo*-Tf, 纯度>98%(Sigma公司); 其浓度通过紫外吸收光谱法<sup>[8]</sup>测定,  $\epsilon_{\text{apo-Tf}}(278\text{ nm})=9.3 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ ,  $\epsilon_{\text{holo-Tf}}(278\text{ nm})=11.3 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ 。根据 $A=\epsilon bc$ , 由测得的吸光度计算转铁蛋白的实际浓度。

转铁蛋白抗体(*anti*-Tf), 效价 1:40, 上海生化试剂公司; 戊二醛(GA)(25%水溶液); 邻氨基苯硫醇(*o*-ABT), 纯度 99%, 浙江寿尔福化学有限公司; 其余试剂除注明外均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。实验中所有玻璃器皿均用 1.0 mol/L  $\text{HNO}_3$ 浸泡, 蒸馏水冲洗干净后使用。

### 1.2 AFM 分析

首先将玻片在乙醇和二次水中超声清洗 15 min, 将晾干的玻片表面用离子溅射仪真空喷镀一层均匀的纳米金, 将金片放在溶液中通过化学吸附进行层层自组装, *o*-ABT, GA, *anti*-Tf, *holo*-Tf/*apo*-Tf 依次吸附到基片表面, 用接触模式(contact mode)在空气中扫描获取 AFM 图像。

对针尖修饰转铁蛋白后采用力的曲线模式获取分子间作用力的曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 分子自组装过程及抗原-抗体分子间结合的形貌探测

(1) 金基片表面自组装过程的AFM探测。在玻片上真空喷镀纳米金作为基底进行分子自组装, 依次修饰*o*-ABT, GA, *anti*-Tf, *holo*-Tf或*apo*-Tf, 观察金片表面各层分子的组装情况。图1中镀金玻璃基片表面

呈现粒度均匀排列有序的扁平 Au 岛，粒度大约在 20~45 nm 左右，其均方根粗糙度( $R_{rms}$ )为 4.98 nm.

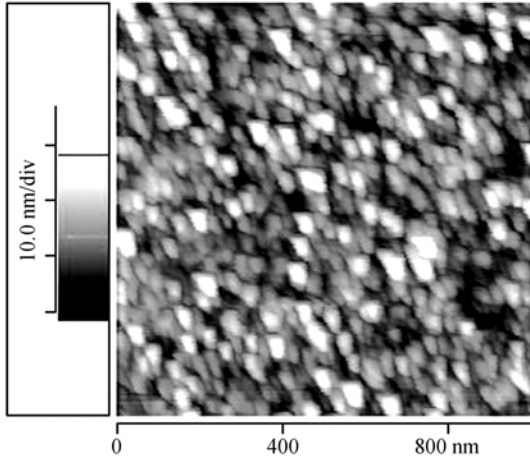


图 1 镀金基片的 AFM 形貌图

在室温下，把镀金玻片浸入硫醇溶液中，在 Au-溶液界面，硫醇分子的一端巯基 S 原子与 Au 表面强烈相互作用形成 Au—S 键诱导吸附单分子层。这是一个放热过程，从热力学角度分析它有利于单层的形成，因而吸附分子将尽可能多地与基片表面键

合从而达到最紧密排列，分子间的范德华力(色散力和取向力)也促使分子紧密排列<sup>[10,11]</sup>。硫醇分子的另一端基在单层表面影响表面的化学功能性，对自组装膜而言，基底表面的晶格取向是至关重要的，其好坏直接影响分子膜的质量，由于成膜过程中的表面化学反应具有选择性，这种选择性决定吸附分子的取向而影响膜的有序性。硫醇-*o*-ABT 自组装单分子层的形貌见图 2(b)，当 *o*-ABT 单分子自组装到金基底表面时，可观察到纳米金表面均匀覆盖一层分子层，均方根粗糙度降低为 3.19 nm。将修饰 *o*-ABT 后的基片放入到 GA 溶液中继续组装 24 h，硫醇和 GA 分子之间发生交联，结合 GA 后使基片表面更加平整光滑(见图 2(c))，其均方根粗糙度进一步降低为 0.5 nm，这是由于分子更倾向于在缺陷处发生作用，掩盖了原本粗糙的表面。通过 GA 交联将 *anti*-Tf 固定到基片上，可观察到 *anti*-Tf 分子在基底表面有序排列，见图 2(d)，由于 *anti*-Tf 为生物大分子，当它与 GA 交联被固定后，表面的均方根粗糙度又增加到 4.80 nm。因此，通过 AFM 探测，直观地观察到 *anti*-Tf 分子通过该固定方法可均匀地覆盖在基片的表面。

(2) 抗原-抗体相互作用的形貌表征。将上述固

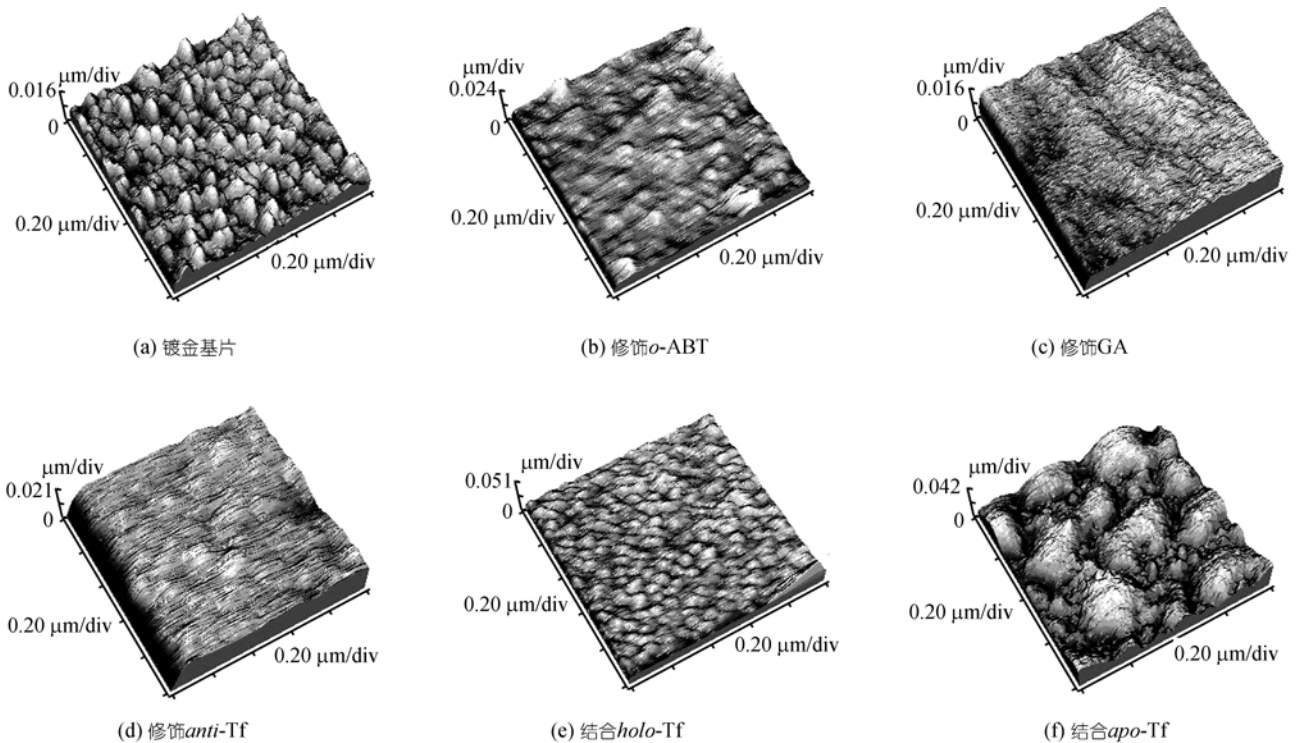


图 2 镀金基片表面分子层层自组装形貌 3D 图

定好抗体的基片分别浸入含有 *holo-Tf* 和 *apo-Tf* 的 PBS(pH7.2)的缓冲溶液中作用 30 min, 使抗原蛋白与固定在基片上的抗体进行识别、发生免疫反应, 然后基片经高纯水冲洗后于空气中进行 AFM 成像. 由图 2 可见, 抗体与两种抗原蛋白结合后表面形貌明显不同, 图 2(e)为结合 *holo-Tf* 分子后表面呈现分布均匀的纺锤形排列, 因为转铁蛋白分子结构中含有两个结构相似由一短肽连接的球形臂, 每个臂的两个结构域结合铁时处于闭合状态, 这时结构类似纺锤形, 这正是实验中所观察到的形貌, 此外, 由于 *anti-Tf* 与 *holo-Tf* 结合紧密, 分子间互相嵌合, 或者分子在缺陷处发生作用, 掩盖了粗糙的表面, 使其表面的粗糙度较 *anti-Tf* 低, 均方根粗糙度为 3.25 nm. 而 *apo-Tf* 与 *anti-Tf* 结合后表面呈现凹凸不平, 粗糙度较大, 均方根粗糙度 13.11 nm, 由于蛋白质分子较容易聚集, 当基片经一定修饰后, 分子间的自组装往往使分子排列更加均匀有序, 而当分子与基底分子作用较弱时, 蛋白质分子更趋向于聚集, 导致 *apo-Tf* 分子间聚

集成小丘状, 从而使表面粗糙度明显增大, 见图 2(f). 不同自组装层表面均方根粗糙度的比较见表 1.

表 1 自组装过程基片表面均方根粗糙度变化

自组装过程修饰	Au	<i>o</i> -ABT	GA	<i>anti-Tf</i>	<i>holo-Tf</i> / <i>apo-Tf</i>
均方根粗糙度 ( $R_{rms}$ )/nm	4.98	3.19	0.50	4.80	3.25/13.11

## 2.2 转铁蛋白-转铁蛋白抗体分子间力的曲线的探测

(1) 针尖和基底的修饰. AFM的工作原理基于原子与原子之间的相互作用力, 当一根十分尖锐的微探针在纵向充分逼近样品表面至数纳米甚至更小间距时, 微探针尖端的原子和样品表面的原子之间将产生相互作用的原子力, 原子力的大小与间距之间存在一定的曲线关系, 其反映了针尖和样品间的相互作用的特性<sup>[9]</sup>. 为了探测Tf-*anti-Tf*分子间特异性识别的作用力, 本研究将*holo-Tf*和*apo-Tf*分别修饰到AFM针尖上, 针尖修饰按以下方法进行: 在室温下, 依次在无水乙醇浸泡 30 min, HF溶液中浸泡

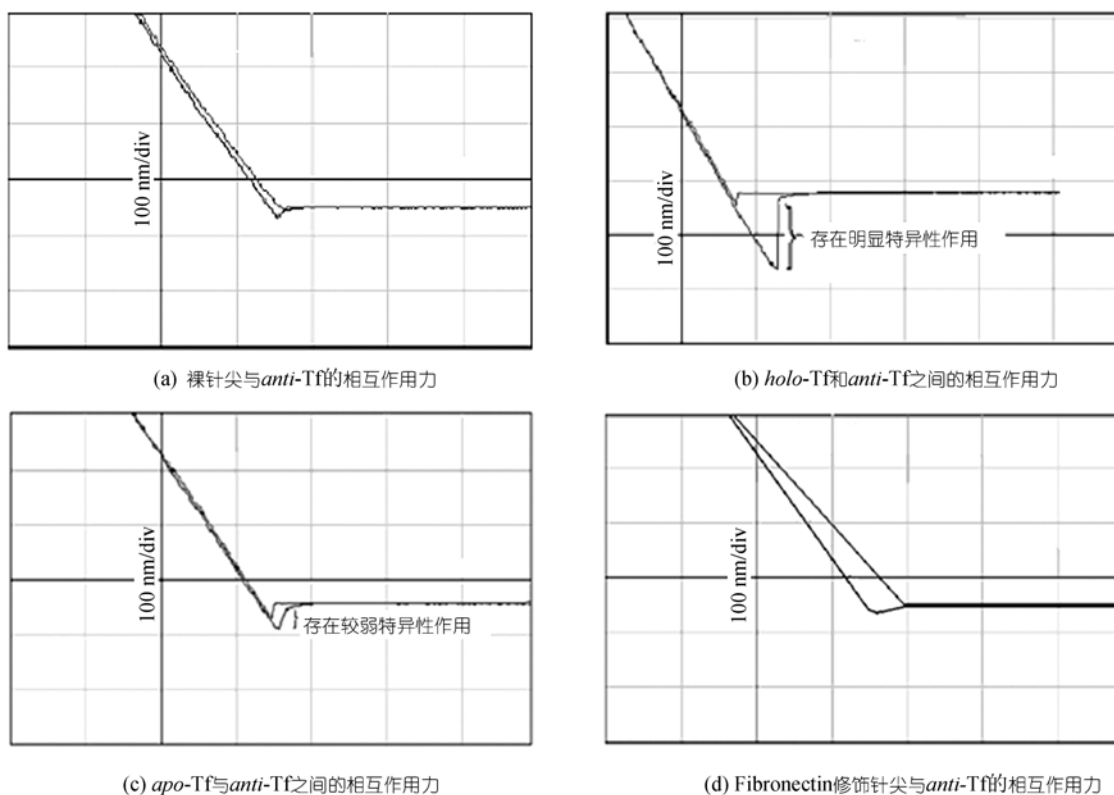


图 3 蛋白质与抗体之间相互作用力的曲线

30 s,  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}=1:1:5$  溶液中浸泡 30 min, 在 90 °C 恒温水浴下于 98% 浓硫酸: $\text{H}_2\text{O}=7:3$  溶液中浸泡 2 h, 于 1% APTES(3-aminopropyltriethoxysilane) 甲苯溶液浸泡 1 h, GA 溶液中修饰 1 h, 进一步在 *holo*-Tf 或 *apo*-Tf 的 PBS 缓冲溶液中组装 1 h, 使抗原蛋白固定在针尖上。

(2) 力的曲线测试. *anti*-Tf 按照上部分的方法固定到喷金玻璃基片上, 于空气中在 AFM 力曲线模式下, 将修饰 Tf 的针尖逐渐逼近固定有 *anti*-Tf 的基片表面, 获取抗原-抗体分子之间的作用力曲线. 结果见图 3, 曲线尖端最低点部分与水平线之间的距离为分子间作用力的大小, 图 3(a) 为裸针尖与 *anti*-Tf 基片表面作用力的曲线, 从曲线可看到几乎不存在分子间的作用力. 当修饰 *holo*-Tf 的针尖逐渐逼近 *anti*-Tf 基片时, 分子间相互作用力的曲线见图 3(b), 其分子间作用力明显增强; 当修饰 *apo*-Tf 的针尖作用于 *anti*-Tf 基片时, 其分子间作用力较弱, 明显小于 *holo*-Tf 与 *anti*-Tf 之间的作用力, 见图 3(c). 为了进一步验证针尖修饰 Tf 后与基片上的 *anti*-Tf 是否存在特异性识别, 本实验采用用 Fibronectin(纤维连接蛋白) 按照同样的方法修饰于针尖上作封阻实验, 由图 3(d) 可见, 其分子间的作用力非常弱, 说明 Fibronectin 与 *anti*-Tf 之间不存在特异性识别, 因此, 本实验结果可反映出 *holo*-Tf 和 *apo*-Tf 与 *anti*-Tf 分子之间特异性识别以及作用力的差别。

### 3 结论

以上实验结果表明, 利用 *o*-ABT 自组装在金基底表面形成单分子层, 通过 GA 交联将 *anti*-Tf 固定在金基片上, 原子力显微镜探测到 *holo*-Tf 和 *apo*-Tf 与 *anti*-Tf 之间分子识别形貌的差异, *anti*-Tf 与 *holo*-Tf 分子结构上嵌合更为紧密, 该差异可能与其分子之间结合力的大小有关; 原子力显微镜力的曲线表明, *anti*-Tf 与 *holo*-Tf 之间的分子结合力明显大于 *apo*-Tf 与 *anti*-Tf 之间的分子结合力。

致谢 本工作为广东省自然科学基金(批准号:021190)和国家自然科学基金(批准号:60278014)资助项目, 广东省科技攻关项目(批准号:2002C32404)及广州市科技计划项目(批准号:2003Z3-D2041)。

### 参 考 文 献

- 1 Mazzola L T, Frank C W, Fodor S P, et al. Discrimination of DNA hybridization using chemical force microscopy. *Biophys J*, 1999, 76(6): 2922~2933
- 2 Horton M, Charras G, Lehenkari P. Analysis of ligand-receptor interactions in cells by atomic force microscopy. *J Recept Signal Transduct*, 2002, 22(1-4): 169~190 [DOI]
- 3 Wong J, Chikoti A, Moy V T. Direct force measurements of the streptavidin-biotin interaction. *Biomol Eng*, 1999, 16(1-4): 45~55 [DOI]
- 4 Janicijevic A. The molecular machines of DNA repair: scanning force microscopy analysis of their architecture. *J Microscopy*, 2003, 212(3): 264~273 [DOI]
- 5 Morris V J. Probing molecular interaction in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 2004, 15(6): 291~298 [DOI]
- 6 Qian Z M, Tang P L, Wang Q. Iron crosses the endosomal membrane by a carrier-mediated process. *Prog Biophys Mol Biol*, 1997, 67(1): 1~15 [DOI]
- 7 Qian Z M, Pu Y M, Tang P L. Transferrin-bound iron uptake by reticulocyte: Current knowledge and aspects to be investigated. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1997, 24(1): 8~13
- 8 Harris W R, Yang B S, Abdollahi S, et al. Steric restrictions on the binding of large metal ions to serum transferrin. *J Inorg Biochem*, 1999, 76(3-4): 231~242 [DOI]
- 9 Fenter P, Eberhardt A. Self-assembly of n-alkyl thiols as disulfides on Au(111). *Science*, 1994, 266(5188): 1216~1219
- 10 Karsten W, Eike M, Neil G C, et al. Scanning tunneling microscopy of self-assembled phenylene ethynylene oligomers on Au(111) substrates. *J American Chemical Society*, 2004, 126(4): 1229~1235 [DOI]
- 11 Harald G, Masato A, Hirokazu T. Force curve measurement of self-assembled organic monolayers bound covalently on silicon (111). *Mol Cryst Liq Cryst*, 2002, 377: 33~36 [DOI]

(2005-04-19 收稿, 2005-07-21 接受)