

原子力显微镜在纳米生物学研究中的应用

蒋青青¹ 张利娟² 张钰¹ 郭彦¹ 任炜¹ 张晓晖¹ 王鑫艳^{1*}

(¹中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; ²重庆市畜牧科学院, 重庆 402460)

摘要 原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)自从1986年发明以来,作为一种重要的单分子研究工具,在包括细胞粘附、蛋白折叠以及蛋白间的相互作用等生物学过程的研究中得到了广泛应用。本文主要介绍原子力显微镜的原理,着重于研究相互作用时能垒大小的确定,以及常用的单分子表面修饰方法。

关键词 原子力显微镜(AFM); 单分子; 能垒; 表面修饰

1 引言

蛋白之间正常的相互作用是机体发挥其生理学功能的基础。目前的生化方法可以检测出蛋白间相互作用的亲和力或速度常数。尽管这些方法可以估测出蛋白相互作用的速率和自由能的指标,但是它们不能检测相互作用动力学的重要特征,而那些恰恰可以揭示各种不同的中间态或替代反应途径。

近几十年,很多可以直接用于测量生物分子间相互作用这一动态过程的高分辨率的技术迅速发展,包括原子力显微镜、光镊和生物膜力学探针等单分子技术。其中,原子力显微镜拥有低至纳米和微秒水平的超高分辨率,为实时测量单分子间的相互作用提供了新的途径^[1,2]。采用单分子技术避免了其他方法的内在缺陷,使实时检测单个分子间的相互作用成为可能^[1,3,4]。因此单分子技术无疑成了理解控制蛋白间结合、解离和过渡态能级图的有力工具^[2,5]。

此外,在细胞表面,外力作用可以不断的拉伸分子。比如细胞迁移时,利用单分子技术,可以观察在牵引力诱导下细胞表面粘附受体受到粘附和去粘附的循环过程^[6]。而传统的生物技术要揭示蛋白间相互作用的内力和外力的影响往往难以实现^[7]。但是,采用原子力显微镜之类的单分子工具,则可以直接测出保持蛋白复合体的力,并可测量反应过程中的压力和拉力^[2],有助于深入研究细胞表面及蛋白间相互作用的动力学能级和确定能垒。本文就原子力显微镜的原理、方法及其作为单分子工具在蛋白间相互作用研究中的应用做一简要综述,着重阐述研究相互作用时能垒大小的确定,以及常用的单分子表面修饰方法。

2 原子力显微镜简介

2.1 原子力显微镜工作原理

原子力显微镜主要包括微悬臂、探针、样品台、能精确移动样品台或微悬臂的压电陶瓷转换器、以及用于记录微悬臂反射光偏移变化的包含了激光和光电探测器的光学偏转系统(图1)。微悬臂的尖部置于倒置显微镜上,实时采集光学和原子力显微镜信号,从而能够实时观察到细胞形态,更适宜对活细胞进行研究。

原子力显微镜最早被用作成像工具^[8],通过有弹性的微悬臂扫描来探测样品的形貌。在成像模式下,原子力显微镜是通过在X和Y轴方向,扫描连在其悬臂末端的探针在接触样品时实现的。在做样品表面扫描时,压电陶瓷不断的校正微悬臂的位置从而保持偏离常数不变,通过探测探针的位置变化,可以转化得到原子级分辨率的样品表面形貌图。

为了把偏离转换为力单位,微悬臂必须经过校准测量,然后算出微悬臂的弹性系数 k_c 。校准微悬臂的方法有2种^[9]:应用已知的力常数F测出微悬臂的偏离 x ^[9],或者测量微悬臂的热共振频率^[10]。目前最常用的方法是根据Hutter和Bechhoefer的方法^[10],把微悬臂看做一个简谐的谐振器,振动模式下每接收到一个自由度的热能 $k_B T/2$,微悬臂即可从已测量过的微悬臂偏离方差 $\langle x^2 \rangle$ 来计算其弹性系数,即 $1/2k_c T = 1/2k_c \langle x^2 \rangle$,其中 k_B 和T分别代表波尔兹曼常数和绝对温度。

收稿日期: 2010-01-05 接受日期: 2010-08-31

中国科学院知识创新工程重要方向项目百人计划(No.0813S11411)

资助项目

*通讯作者。Tel: 021-54921192, Fax: 021-54921191, E-mail: xinyanwang 2008@hotmail.com

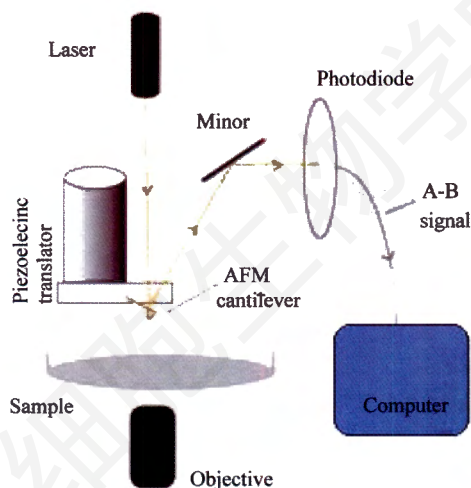


Fig.1 Schematic of the atomic force microscope (AFM)

一束激光直接打在微悬臂上,继而反射到裂像光电二极管上面,通过不同的A-B信号就反映出施加给探针的力。微悬臂小位移时遵从胡克定律,所以微悬臂弹性系数校正后的光电二极管信号即反映了探针和样品间的相互作用力。

2.2 典型的原子力显微镜力曲线

采用力扫描模式,原子力显微镜可以在单分子水平测定两个相对独立表面间的相互作用,出现就是典型的原子力显微镜力曲线。

当微悬臂上抬时,通过测量相对于“零点力”的偏移量,得到悬臂接触表面后返回的曲线,从而得到单个蛋白复合体间分开的力(图2)。在很多实验中,微悬臂的移动速度达到每秒几个微米时,力的曲线通过测定微悬臂速度就可得到。由于介质中存在阻力,

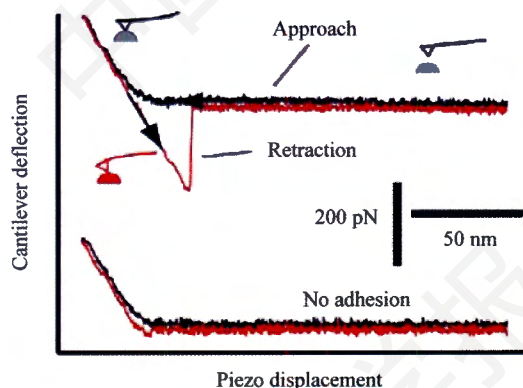


Fig.2 A representative unbinding trace

A representative atomic force microscope (AFM) force scan (i.e., optical signal vs piezo displacement) under force scan mode. The two interacting surfaces are the AFM tip functionalized with streptavidin and an agarose bead with immobilized biotin.

微悬臂在自由接近和向后拉时将经受一个与速率成比例的弯曲常数。阻力不仅取决于微悬臂的速率和随温度变化的介质的粘性,还取决于微悬臂的自身特点、样品的形貌、以及微悬臂与样品的接触和分开过程^[11]。

采用原子力显微镜的力扫描模式, Lee^[12]和 Florin^[13]直接测出了单个亲和素和生物素解开的力。尽管这种方法 1994 年才第一次报道,到现在已有数百种蛋白间相互作用的研究采用了这种或者类似的方法。

在研究抗生物素蛋白链菌素(streptavidin)与生物素(biotin)的相互作用时,所检测出的是典型的力曲线:测量开始后,压力首先增大,然后移动琼脂糖小球逐渐接近微悬臂。小球和微悬臂接触前,偏离/力信号保持在稳定基线对应的零点力处。小球与微悬臂接触后,微悬臂就向上弯曲,导致偏离/力信号发生正向变化。当达到了预设的力时(本例中是 200 pN),压力就停止增加。抗生物素蛋白链菌素和生物素在预设的接触时间内彼此接触。当压力开始回缩,并逐渐移动小球回到它最初的位置时,微悬臂向下偏转,从而揭示了这段时间内的粘附接触过程。小球继续回缩,作用于抗生物素蛋白链菌素和生物素的电压逐渐增加,直到最后链断裂,通过在回缩轨迹上陡的垂直跃迁即可看出。最后,微悬臂退回到最初零力的静止位置。

2.3 探针与基底的表面修饰

在研究蛋白-蛋白相互作用的时候,蛋白或者配体被固定在原子力显微镜微悬臂的探针上,相互作用的受体被连接在一个合适的表面。当两个表面相互接触,探针离开表面时分子的相互作用力被悬臂的形变反映出来。因此合适的探针和样品处理对于这类研究的成功是非常重要的。修饰探针的方法通常包括物理吸附和使用带有特殊基团交联分子的共价连接,修饰基底与修饰探针的方法相似。物理吸附或共价连接,云母、聚苯乙烯、玻璃以及镀金的云母表面,都是常用的使用基底。

2.3.1 物理吸附 常用的物理吸附方法见图 3A,在戊二醛的帮助下,小分子蛋白可以吸附在探针或基底表面,如生物素,然后可以通过与表面吸附的分子有作用的蛋白把后续所需的蛋白固定在基底或探针的表面。Franco 和 Yves^[14]在 2005 年对细胞凝集素和肝素的相互作用的研究中使用了这个方法。

2.3.2 共价连接 共价连接,就是将蛋白利用交联剂共价结合在基底或者探针表面,这种方法虽然程序较物理吸附复杂,但是效果稳定,固定也更为牢固。

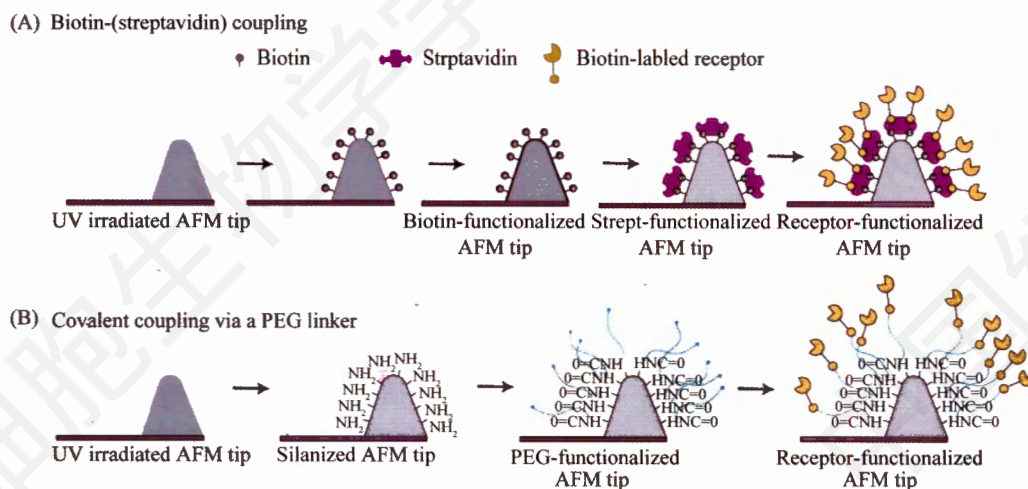


Fig.3 Schematics of surface chemistries commonly used for modifying atomic force microscope (AFM) tips

A: functionalization of AFM tips with streptavidin using physisorption. B: covalent coupling of proteins via a heterobifunctional poly(ethylene glycol) (PEG) cross-linker: The amine-reactive N-hydroxysuccinimide (NHS) end of the cross-linker reacts with amines on the silicon tip, yielding a stable amide bond, and the reactive 2-[pyridyldithio] propionate (PDP) group forms a bond with free thiols presented by cysteines in the protein, resulting in a stable disulfide bond. UV, ultraviolet.

具体的表面修饰过程见图 3B 所示, 首先使用硅烷偶联剂将表面活化, 然后使用双功能交联分子 PEG, 最后连接所需要的受体或者蛋白。

在镀金云母表面上修饰的时候, 可直接使用带有 -SH 巯基的分子, 形成金-硫键。在裸云母或者玻璃表面修饰的时候, 要使用硅烷偶联剂将可进行后续反应的基团引入。常用的硅烷偶联剂有氨丙基三乙氧基硅烷(aminopropyltriethoxysilane, APTES)和 γ -巯丙基三甲氧基硅烷(3-mercaptopropyl trimethoxysilane, MPTES)。

氨丙基三乙氧基硅烷(APTES), 分子式如图 4A, 分子中的 C-NH₂ 键内氨基可与酸、羧酸酯、醛、酮、卤代烃、酰胺和腈等进行反应。

γ -巯丙基三甲氧基硅烷(MPTES), 分子式如图 4B, 可将 -SH 引入修饰表面, 进行后续实验。

聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG), 分子式 HO(CH₂CH₂O)_nH, 由环氧乙烷聚合而成, 长度可控, 具有良好的可溶性与生物惰性。在表面修饰中常使用两端具有活性基团的线性的 PEG 分子作为修饰中的交

联剂。

常用的活性基团有 N-羟基丁二酰亚胺(N-Hydroxy succinimide, NHS)、马来酰胺(Maleimide, MAL)、氨基三乙酸(nitrilotriacetic acid, NTA), 将在下文进行介绍。

N-羟基丁二酰亚胺(NHS), 是常用的与氨基反应的基团, 图 5 示为聚乙二醇末端修饰的 N-羟基丁二酰亚胺与氨基酸上的氨基反应的过程。需要特殊说明的是, 在 N-羟基丁二酰亚胺反应的溶液体系中, 要避免三羟甲基氨基甲烷(Tris)的出现, 因为其带有的氨基会与目的分子上的氨基产生竞争, 从而降低修饰的效率。

马来酰胺(MAL), 可与 -SH 巯基反应生成共价键, 图 6 为 PEG 末端修饰的 MAL 与氨基酸上的巯基反应

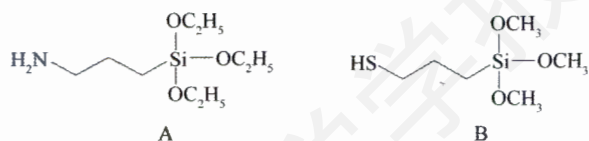


Fig.4 Silane coupling agent

A: APTES; B: MPTES.

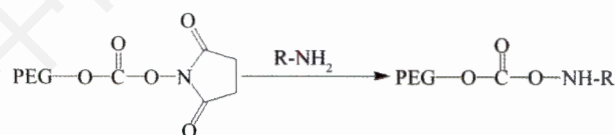


Fig.5 Reaction between NHS and NH₂

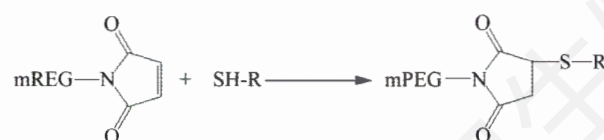


Fig.6 Reaction between MAL and hydrosulfide group

的过程。

氨基三乙酸(NTA), 可在Ni离子存在的下与带有Histag的蛋白质发生结合, 这里要特殊说明的是NTA-Histag 之间的连接不是共价键, 而是配位键, 但是有研究显示NTA与Histag之间的作用力足够大, 可用于原子力显微镜研究蛋白-蛋白相互作用的实验^[15]。

3 原子力显微镜研究生物单分子及其相互作用

3.1 原子力显微镜在生物分子相互作用中的能垒测量

能垒是反应生物分子相互作用时由一个状态转换到另一个状态的屏障, 分子在两个不同状态的自由能之间, 越过能垒才能进行反应的发生。然而, 一个恒定的拉力在原子力显微镜实验中很难维持, 所以一个动态的力学方法在确定外力作用下的解离速率被广泛应用于受体-配体复合物。通常使用Bell-Evans模型^[16,17], 描述了外力对键解离时速率的影响。

在上述描述中, 拉力中变化的速率, $rf=df/dt$, 被称作“加载速度(Loading rate)”, 可在实验中通过不同的悬臂抬起速率和 k 或弹性系数来控制。对于很多配体受体的相互作用, 解离的力已经显示随加载速度来改变。在这些研究中, 根据解离的力和加载速度可用来解释配体-受体复合体的能垒。

如下图7A, TS1和TS2是两种状态间不同的势能, 在没有外力施加的时候, 复合物解离的动力学被外界能垒所决定(例如TS2), 外界的力使能垒倾斜并且抑制了外界能垒。在势能中进一步增加的力被内力能垒所抑制(例如TS1)。7B所示为两个很尖锐

的能垒的级联反应得线形的拟合。斜率的增加说明了外部能垒已经被内部能垒抑制, 内部能垒已经变成了主要影响解离阻力的动力。

3.1.1 蛋白质的折叠与去折叠 蛋白质具有四级结构, 在外力的作用下会被去折叠, 成为一级的线性结构。泛素是一种广泛存在真核细胞中的小分子蛋白, 多个泛素通过K48形式的异肽键连接形成特定连接的泛素链, 当给这个泛素链施加外力, 泛素就会依次去折叠形成线性的氨基酸链, 哥伦比亚大学的Schlierf、Li和Fernandez对泛素的去折叠现象及其机制进行了研究^[18,19]。当泛素去折叠后, 外力仍维持在一个较小的水平, 则可观察到蛋白的重折叠现象, Fernandez使用原子力显微镜的力钳模式(Force-Clamp Spectroscopy)成功地观察到了泛素重折叠的力曲线^[20]。

3.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用 图8为经过共价修饰的蛋白相互作用示意图: 首先使用硅烷偶联剂(MPTES/APTES)将活性基团引入探针和基底表面, 然后使用双功能基团的PEG作为交联分子, 然后与蛋白共价连接(有6His的蛋白还可以通过NTA进行修饰)。

将蛋白固定在探针表面, 向基底靠近, 就可以和底面修饰的蛋白发生相互作用, 可以精确测量出几十甚至十几皮牛顿的力, 从而进一步计算蛋白-蛋白相互作用之间的能垒大小。

3.2 基于原子力显微镜的单分子水平活细胞研究

原子力显微镜相比较传统扫描显微镜来说最大的优点就是可在细胞的生理条件下进行实验, 从而得到传统条件下无法得到的许多重要数据, 除活体成像外, 还可进行细胞的压弹性测量, 蛋白与细胞表面的

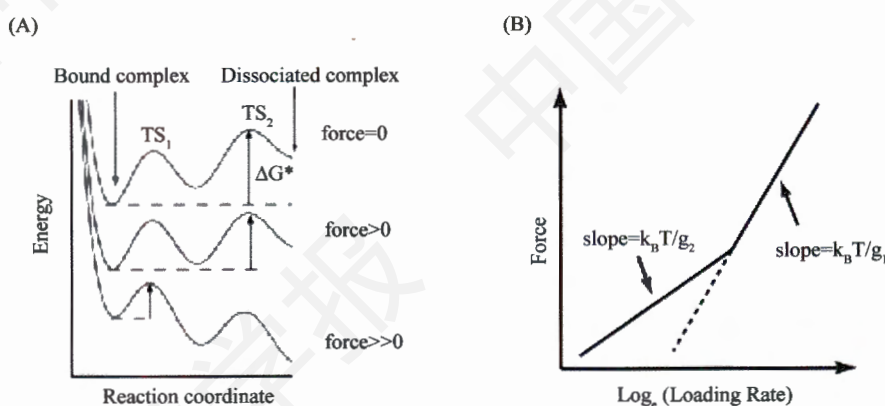


Fig.7 Dynamic force spectroscopy

A: effects of an applied force on a protein-protein interaction potential consisting of two transition states. B: two linear regimes are predicted for a cascade of two sharp energy barriers.

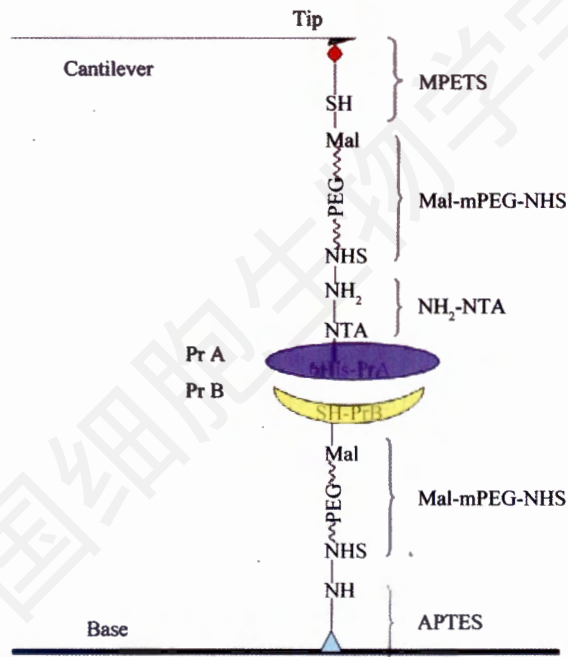


Fig.8 Schematic of covalent immobilized protein-protein interaction

Shows the agent used in modification. PrA and PrB are two types of protein which have interaction between them.

蛋白进行相互作用, 以及细胞之间发生的相互作用。

蛋白纯化后的特性可能和它们在生理状态下不同, 所以最好在活细胞上研究蛋白间的相互作用。但是活细胞表面比包被在小球或者云母上的单个蛋白要复杂得多。此外, 细胞表面受体密度低以及存在非特异性结合都是问题。目前亲和成像位点实验给原子力显微镜研究蛋白间相互作用提供了定位, 亲和成像使原子力显微镜的配基与受体相互作用力的测量与成像功能相结合。

3.2.1 细胞压弹性测量 细胞弹性是细胞的基本性质之一, 它随着细胞种类、不同时期、不同应激状态等不同而不同, 由细胞骨架控制, 对于细胞的运动、分化等都有着重要的意义。早在1998年, A-Hassan 就利用原子力显微镜测量了马-达二氏犬肾(细胞系), 得出细胞性并不与形貌的高度相关的结论, 并对细胞表面的弹性进行了粗略的扫描, 构建了细胞表面弹性分布图^[21]。

3.2.2 靶向定位蛋白分布的活细胞/细胞膜测量(force mapping) 和传统的显微镜一样, 原子力显微镜的发明起初是被用于成像, 可以利用其探针细微的形变描述被扫描样品的形貌。此外, 原子力显微镜还可以记录探针与底面之间修饰的不同样品的力曲线, 与成像功能结合, 即可进行靶向定位蛋白分布的活细胞测量。与传统的荧光显微镜不同, 原子力显微镜可以真实地反映出蛋白的分布和作用力的大小, 是其他任何手段都难以同时实现的。

Kim通过在探针上包被嗅蛋白抗体, 得到了嗅蛋白(olfactory marker protein, OMP)在鼻骨中的分布图^[22]。

Grandbois 利用凝集素(lectin)和A型红细胞膜蛋白间的相互作用, 还将A型红细胞从O型红细胞中分离出来^[23]。

3.2.3 细胞-细胞相互作用 AFM 原子力显微镜也被用于细胞和细胞黏附的研究。和早期的研究不同, 原子力显微镜是将一个细胞粘在微悬臂的末端, 当作探针来进行相互作用的研究。该方法允许配基和受体在更接近自然环境下作用。这种方法潜在的应用包括细胞激活后的黏附调节, 比如将一个白细胞粘在用刀豆A修饰过的微悬臂上, 来研究白细胞和其他细胞间的相互作用。

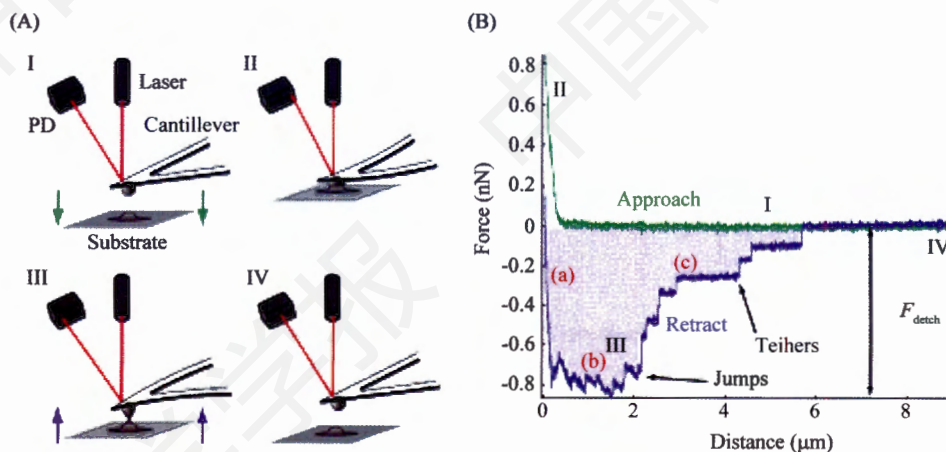


Fig.9 Single-cell force spectroscopy

Depiction of a cell-adhesion measurement (A) for which characteristic approach (green) and retraction (blue) traces are shown (B)^[24].

如图 9A^[32]所示, 细胞和基底发生相互作用。被测量的基底可以是另一个细胞, 一个功能化的表面或器官的表面。被悬臂背面反射的激光束打在光电探测器上的位置反应出加在探针上的力。在下压的阶段(被绿色箭头标注)。细胞(探针)被压在基底上直到达到一个预置的力(通常小于 1nN)。经过一段 0 至 20 分钟的时间接触后, 细胞从基底抬起(蓝色箭头标记), 一个力-距离的曲线就被记录下来。图 9B^[24]所示为对应的细胞黏附的信号, 随着细胞拉力的增加, 基底和细胞之间的键依次断开(AIII)直到细胞与底面完全分开。最大的向下的力产生于原子力显微镜悬臂的分离的力(F_{detach})。在细胞从底面分离的过程中, 两种类型的分子解离事件发生。在第一个事件中铆定在细胞外层上的受体当随力的增加而解离(表示为跃迁)。第二个解离事件发生在当受体没有铆定而被从细胞膜上拉了起来, 在解离力-距离曲线中, 长的持续相同的力的平台通常表示拉起的链。图中阴影的部分代表了细胞从基底上去黏附测量的工作。

4 结语

经过 20 多年来的发展, 原子力显微镜的灵敏度在不断的增加, 技术也日趋成熟。但是由于原子力显微镜仪器昂贵, 操作复杂, 使其应用受到了一定的限制。随着原子力显微镜的市场化和软件开发的成熟化, 这一缺陷也将逐渐得到改善, 使操纵及其结果的分析更加人性化。除了高分辨率成像, 原子力显微镜正作为一种单分子力谱技术, 在用于阐明分子和细胞的生物物理特性方面发挥越来越重要的作用。

参考文献(References)

- Wennmalm S, Simon SM. Studying individual events in biology. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 419-46.
- Greenleaf WJ, Woodside MT, Block SM. High-resolution, single-molecule measurements of biomolecular motion. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2007; 36: 171-90.
- Barkai E, Jung Y, Silbey R. Theory of single-molecule spectroscopy: beyond the ensemble average. *Annu Rev Phys Chem* 2004; 55: 457-507.
- Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 1986; 56(9): 930-3.
- Bustamante C, Macosko JC, Wuite GJ. Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(2): 130-6.
- Orsello CE, Lauffenburger DA, Hammer DA. Molecular properties in cell adhesion: a physical and engineering perspective. *Trends Biotechnol* 2001; 19(8): 310-6.
- Bustamante C, Chemla YR, Forde NR, Izhaky D. Mechanical processes in biochemistry. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 705-48.
- Sader JE, Larson I, Mulvaney P, White LR. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Rev Sci Instrum* 1995; 66: 3789.
- Senden T, Ducker W. Experimental determination of spring constants in atomic force microscopy. *Langmuir* 1994; 10(4): 1003-1004.
- Hutter J, Bechhoefer J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum* 1993; 64: 1868.
- Janovjak H, Struckmeier J, Muller DJ. Hydrodynamic effects in fast AFM single-molecule force measurements. *Eur Biophys J* 2005; 34(1): 91-6.
- Lee G, Kidwell D, Colton R. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy. *Langmuir* 1994; 10(2): 354-357.
- Florin EL, Moy VT, Gaub HE. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* 1994; 264(5157): 415-7.
- Dupres V, Menozzi F D, Loch C, Clare BH, Abbott NL, Cuenot S, et al. Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria. *Nat Methods* 2005; 2(7): 515-20.
- Verbelen C, Gruber HJ, Dufrene YF. The NTA-His6 bond is strong enough for AFM single-molecular recognition studies. *J Mol Recognit* 2007; 20(6): 490-4.
- Bell GI. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* 1978; 200(4342): 618-27.
- Evans E, Ritchie K. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J* 1997; 72(4): 1541-55.
- Schlierf M, Li H, Fernandez JM. The unfolding kinetics of ubiquitin captured with single-molecule force-clamp techniques. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(19): 7299-304.
- Carrion-Vazquez M, Li H, Lu H, Marszalek PE, Oberhauser AF, Fernandez JM. The mechanical stability of ubiquitin is linkage dependent. *Nat Struct Biol* 2003; 10(9): 738-43.
- Fernandez JM, Li H. Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein. *Science* 2004; 303(5664): 1674-8.
- A-Hassan E, Heinz WF, Antonik MD, D'Costa NP, Nageswaran S, Schoenenberger CA, et al. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys J* 1998; 74(3): 1564-78.
- Kim H, Asgari F, Kato-Negishi M, Ohkura S, Okamura H, Arakawa H, et al. Distribution of olfactory marker protein on a tissue section of vomeronasal organ measured by AFM. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008; 61(2): 311-4.
- Grandbois M, Dettmann W, Benoit M, Gaub HE. Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope. *J Histochem Cytochem* 2000; 48(5): 719-24.
- Helenius J, Heisenberg CP, Gaub HE, Muller DJ. Single-cell force spectroscopy. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 11): 1785-91.

Atomic Force Microscopy in Nano-biological Study

Qing-Qing Jiang¹, Li-Juan Zhang², Yu Zhang¹, Yan Guo¹, Wei Ren¹, Xiao-Hui Zhang¹, Xin-Yan Wang^{1*}

(¹*Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, CAS, Shanghai 200031, China;*

²*Chongqing academy of animal science, Chongqing 402460, China)*

Abstract Since its invention in 1986, the atomic force microscope (AFM) has emerged as a flexible and powerful tool for exploring a variety of biological processes, including cell adhesion, protein folding, and protein-protein interactions. This review focuses on the application of the AFM to studies of protein-protein interactions. It describes the commonly used methodologies and reviews the theoretical framework used to analyze single-molecule protein-protein unbinding measurements. This review summarizes recent progress in the field and shows that the AFM provides an excellent tool for probing interactions on the cell surface, for understanding the energy landscapes that govern the dynamics of protein interactions, and the common used method of surface modification.

Key words atomic force microscope(AFM); single-molecule; energy barrier; surface modification

Received: January 5, 2010 Accepted: August 31, 2010

This work was supported by One Hundred Person Project of the Chinese Academy of Sciences(No.0813S11411)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921192, Fax: 86-21-54921191, E-mail: xinyanwang2008@hotmail.com