

文章编号 :1000-6281(2005)03-0238-05

基于原子力显微镜技术的 单个生物大分子压弹性研究

周星飞^{1,2,4},孙洁林³,米丽娟^{1,2},王化斌^{1,2},胡 钧^{1,3*}

(1 中国科学院上海应用物理研究所,上海 201800;2 中国科学院研究生院,北京 100039;
3 上海交通大学 Bio-X 生命科学中心,上海 200030;4 宁波大学物理系,浙江 宁波 315211)

摘 要: 单个生物大分子力学性质已经成为一个新兴的研究领域,近几年来由于单分子技术的不断发展,这个领域取得了许多突破性的进展。本文介绍了基于原子力显微镜技术的几种单分子压弹性测量技术及这些技术的具体应用,同时也简要阐述了这些技术的局限性。另外对这个领域的发展也进行了初步地探讨。

关键词: 生物大分子;压弹性;原子力显微镜

中图分类号: Q66;TG15.21⁺5.7 **文献标识码:** A

随着纳米测量技术的发展(如纳米磁珠、光镊子、原子力显微镜等),尤其是皮牛 pN(10^{-12} 牛顿)测量技术的出现使人们能够研究单个生物大分子(DNA 和蛋白质分子)的动力学行为,且能对其进行直接操纵^[1-3],从而在单分子水平上对 DNA 和蛋白质的力学性质(弹性或柔性)进行研究^[4-6]。近年来单个生物分子力学性质的研究引起了人们很大的兴趣。这是因为从物理学角度看,单个分子的弹性是否与宏观物体的弹性相同是一个值得探讨的问题;从生物学角度看,生物大分子一般都具有一定的柔性,即在微小的外力作用下会发生构象的改变,从而导致其功能的变化,单分子弹性的研究将有助于揭示其结构与功能之间的动力学规律,探索潜在的生物学特别是遗传学的意义;此外,生物大分子是一类颇受重视的天然纳米材料^[7],从材料科学角度看,单分子力学性质的研究对于纳米器件的组装和连接也十分重要,它将直接影响纳米器件最终的工作性能。

目前,在利用原子力显微镜技术研究单个生物大分子力学性质方面,大量研究工作主要集中在单分子的拉伸特性上,通常采用的方法是将一个大分子的一端固定在修饰过的衬底表面,用原子力显微镜的针尖拉伸另一端,有关单分子拉伸特性已经报道了大量令人兴奋的研究成果^[1,3-6,8,9],同时也有很多优秀的评述文章^[10,11],其中最具有代表意义的是对单个 DNA 分子的拉弹性的研究(stretching

elasticity)^[1,3,5,6,8,12-15]。最近有不少研究组开始探索单个分子的压缩特性^[16,17],他们通常采用的方法是用原子力显微镜的针尖去压分散在衬底表面的单个分子。在本文中,我们首先评述基于原子力显微镜技术的几种单分子压弹性测量方法及其具体应用,然后简要阐述这些方法在研究单个 DNA 分子压弹性时的局限性。

1 静态力曲线方法(接触模式下的力曲线)

原子力显微镜在接触模式下针尖与样品的作用力可以很精确地控制,通常采用接触模式的力曲线(force-distance curve)可以较好地测量柔软样品的压弹性。其具体方法如图 1 所示:首先在硬样品(如玻璃或云母)的表面做一条力曲线(区域 2),然后将要研究的单分子样品取代硬样品重新做力曲线(区域 3),此时不能改变任何实验条件。针尖与样品间相互作用力 F 可根据胡克定律算出: $F = k \times d$,其中 k, d 分别是悬臂弹性系数及悬臂的偏折量(软样品表面的凹陷量可由在软的和硬的样品表面获得的力曲线相减得到)。根据所用针尖的不同,可用 Hertz 公式计算出样品的弹性模量^[16]:

$$d^3 = 9(1 - \mu_{ip})^2 F^2 / (16 RE)$$

其中 μ_{ip}, R, E 分别是样品的泊松系数(一般软样品取 1/3),针尖半径及样品的弹性模量。

收稿日期:2005-01-22;修订日期:2005-02-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 10335070, No. 10304011)。

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 10335070, No. 10304011)。

作者简介:周星飞(1975-),男(汉族),浙江人,博士。

*通讯作者:胡钧(1964-),男(汉族),四川人,教授,博士研究生导师。E-mail:jhu@sju.edu.cn

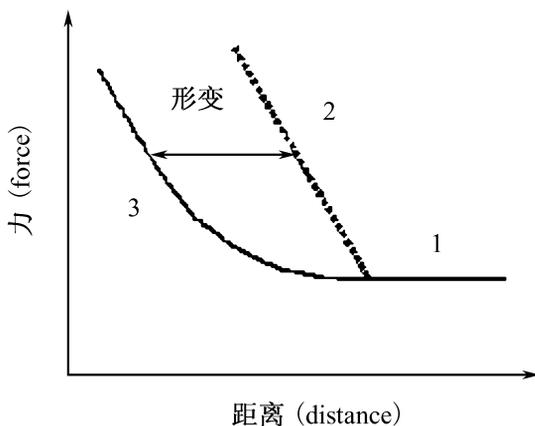


图1 在硬(2)与软(3)样品上的力曲线示意图。(1)表示针尖还没有接触到样品的区域。

Fig. 1 Schematic representation of force-distance curves on a hard (2) and soft sample (3). The picture (1) shows the region with no contact between the tip and sample.

利用接触模式下的力曲线在单分子力学性质的研究中已经做了大量的工作,得到了在纳米尺度下许多与宏观状态下不同的特性^[18]。在早期的生物分子研究中,实验大多是在液体下进行的,这样比较接近生物分子的生理状态。Radmacher等人研究了液体下分散在云母表面的单个溶菌酶分子的压弹性^[16],用赫兹模型计算到它的弹性模量是 0.5 ± 0.2 GPa,这个结果与其宏观晶体的压缩率较接近(0.2~1 GPa),同时在做力曲线时他们比较了在云母上与溶菌酶蛋白分子上针尖的 Lifting-off 值,得到蛋白分子的粘度(viscosity)为 800 ± 400 pN。魏青青等人也用力曲线的方法研究了不同功能状态的兔骨骼肌 ryanodine 受体/钙释放通道(RyR₁)的弹性^[19]。首先对处于抑制状态的 RyR₁ 进行测量,接着用 5 mmol/L 的 AMP 和 50 μmol/L 的 Ca²⁺ 将其激活,发现它的弹性模量有较明显的升高,然后将缓冲液换为无 AMP 和 Ca²⁺ 的抑制性溶液后,发现其弹性模量又有较明显的下降。但采用其他抑制剂(如钌红)和激动剂(咖啡因)时,RyR₁ 的弹性没有明显的变化。另外他们也注意到每次实验测量得到 RyR₁ 的弹性模量的误差很大,这可能是由于在液态下针尖与样品的作用力要比大气中复杂而且热漂移较大引起的。

近来许多研究组也经常在大气中测量单分子的压弹性。Zhao 等人用导电原子力显微镜在空气中测量了单个 azurin 蛋白分子的弹性^[20],计算得到弹性模量为 14 GPa。实验发现其应变-应力曲线几乎

是线性的而且通过原点,说明这是一种弹性形变。另外 Tsukruk 等人也在大气环境中比较了单个分枝分子(single dendritic molecules)与其聚合体的弹性差异^[21,22],发现聚合体的弹性(250 ± 30 MPa)要明显大于单体的弹性(150 ± 25 MPa),他们认为这可能是由于聚合体形成的网状结构使其变得较硬。

2 动态力曲线方法(Tapping mode 下的力曲线)

除了利用接触模式下的力曲线以外,有些研究组也采用 Tapping-mode AFM(TM-AFM)下的力曲线来测量单分子的力学性质。其工作原理如图 2 所示:当针尖远离样品时针尖做自由振动(区域 1),针尖趋近样品时,其振幅逐渐减小(区域 2 或 3)。对于不可压缩的样品(区域 2)而言,针尖振幅的减小等于扫描管在 z 方向的移动距离,因此针尖的振幅是线性衰减的;对于软样品(区域 3),由于样品的形变会导致振幅-距离曲线和硬样品有很大的不同,要使针尖振幅的衰减量与在硬样品表面相同,针尖就必须进一步趋近样品,这个额外的移动距离就是样品的形变量。由于在 TM-AFM 模式下针尖与样品之间既有引力又有斥力相互作用,要精确计算针尖对样品的作用力比较困难^[18,23],因此动态力曲线方法使用较少,但可以对不同样品做相对比较。Overney 等人利用此方法比较了聚合物分子的粘弹性^[24]。我们也曾尝试在空气中测量 DNA 分子的压弹性,尽管很难精确判别针尖与 DNA 分子的初始接触点而不能精确计算得到 DNA 分子的细微形变,不过在 Force-Volume 图上可以很明显的看到 DNA 分子的反差(图 3),说明 DNA 分子很软。

3 轻敲模式(Tapping mode)方法

原子力显微镜在接触模式下工作可以获得高分辨率的图像,但对于生物分子,针尖与生物分子的接触会产生很大的侧向力,从而对其表面造成一定损伤,为了克服这个侧向力以及在接触模式下的不稳定性,人们经常采用 TM-AFM 来研究柔软的生物大分子。在 TM-AFM 中通过改变 Amplitude set-point(Asp)值,可以方便地控制针尖与样品的相互作用,同时利用 Phase images 可以精确地确定针尖与样品的初始接触点^[25]。

Yu 等人曾用逐步改变 Asp 的办法来测量碳纳米管的压弹性^[26]。但通常在 TM-AFM 下为了维持反馈让针尖跟踪样品表面所需要的力(trace force)大

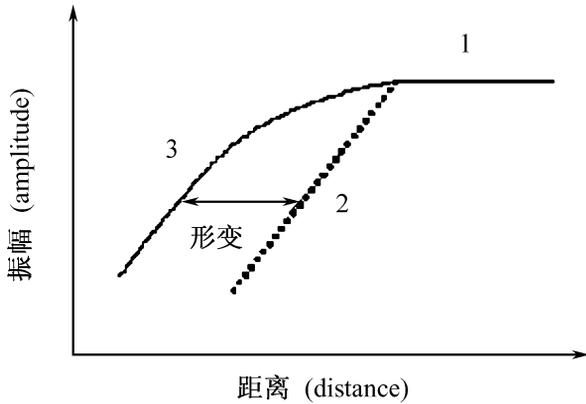


图 2 在硬(2)与软(3)样品上的针尖振幅与距离曲线示意图。(1)表示针尖还没有接触到样品的区域。

Fig. 2 Schematic representation of amplitude-distance curves on a hard (2) and soft sample (3). The picture (1) shows the situation with no contact between the tip and sample.

约为几纳牛顿(10^{-9} 牛顿),这个量级的力足以使生物大分子产生较大的形变,因为维持生物分子的稳定结构及自然折叠状态的力大约为 $100 \text{ pN}^{[27]}$ 。在 TM-AFM 模式下,针尖与样品的相互作用正比与 KA/Q ,其中 K, A, Q 分别是针尖的弹性常数、振幅和品质因子。为了减小针尖对样品的作用力, Tamayo 等人将调 Q 技术应用用于原子力显微镜^[28],即利用电子学的原理将 Q 值增大来调控针尖与样品的相互作用,在液体下针尖对样品的作用力可以控制在几十皮牛顿。Humphris 等人采用调 Q 技术测得在液体下 DNA 分子的高度约为 $1.3 \text{ nm}^{[29]}$,比用传统的 TM-AFM 测得的数值(约 0.7 nm)要大一倍。另外, Antognozzi 等人为了减小 TM-AFM 下针尖

与样品的作用力而提出了 shear force microscopy (ShFM)^[30,31],这是一种非接触的成像模式。利用 ShFM 他们在空气中测得的 DNA 分子高度 ($1.1 \pm 0.2 \text{ nm}$) 要明显大于同一区域在 TM-AFM 测得的高度 ($0.6 \pm 0.1 \text{ nm}$)。

4 跳跃模式(Jump mode)方法

Jump mode (JM) 结合了 Lift-mode, Tapping-mode, Pull-mode 以及 Force volume 的特点^[32,33]。JM 的一个很大的优点就是当针尖在 z 方向远离样品表面时进行侧向移动避免了对样品的刮伤以及针尖自身的损伤。Moreno-Herreto 等人利用 JM 与接触模式分别在液体下观察了同一区域 DNA 分子的形貌^[32],结果表明 JM 很好地消除了针尖对样品的侧向力,因而获得高质量的形貌图;同时他们还用 JM 与 TM 在液体下对同一区域的 DNA 分子的高度进行测量,实验表明用 JM 测到的 DNA 高度 ($1.4 \pm 0.3 \text{ nm}$) 稍大于 TM 下测得的结果 ($1.1 \pm 0.3 \text{ nm}$),说明在 JM 工作模式下针尖对 DNA 的压力较小。

JM 的力曲线也经常用来研究生物分子的压弹性。Ivanovska 等人在纳米尺度下研究了 bacteriophage $\phi 29$ 的压弹性^[34],得到其压弹性模量大约为 1.8 GPa ,同时还观察到了细菌外壳的局部结构对相同外力有不同的响应;另外他们利用原子力显微镜的针尖研究了细菌外壳的损坏特性(breakage),计算得到细菌外壳能经受大约几个纳牛顿的外力,此时其形变量约为原始高度的 30% 。Pablo 等人也用 JM 的力曲线测量了微管蛋白的压弹性^[35],在小力区微管蛋白的应变与应力曲线呈线性变化,可以用空壳模型与有限元模型进行定量描述,在这个受力区域,其弹性模量为 0.8 GPa ,当外力增大到一定

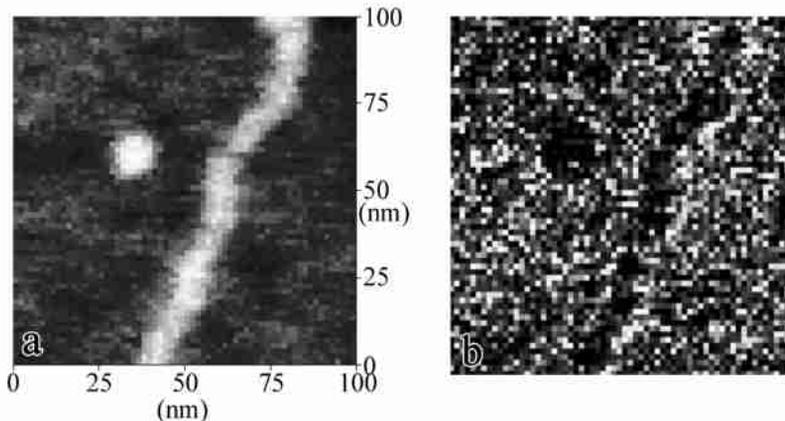


图 3 a:表示单个 DNA 分子的形貌图;b:相应的 Force-Volume 图。

Fig. 3 The topography of single DNA molecules deposited on Mica surface (a), and the corresponding Force-Volume image (b).

程度后,应变与应力曲线偏离线性关系,他们认为这可能是由于微管壁的塌陷造成的。要精确研究单个蛋白分子的压弹性,Pablo等人认为关键就是要施加一个大小可控的且小于0.5 nN的外力^[36],在JM下要产生这样小的外力,就必须采用很软的针尖(弹性常数为0.05 N/m)。

5 总结与展望

单个生物大分子力学性质的研究是一个很重要的问题,因为它与诸多的生物学过程密切相关。近年来由于单分子技术的不断发展,这个领域已经取得了许多突破性的进展,单分子力学已成为生物物理的一个热点问题。但同时我们也看到还有许多问题没有得到解决。譬如,作为一个细长的柔软分子,DNA的弹性主要由三个基本弹性组成:纵向(沿双螺旋方向)拉伸弹性、横向(沿直径方向)压缩弹性以及扭转弹性。尽管人们在单分子压弹性研究方面已经做了很多努力,取得了大量的研究成果,但据我们所知,作为单分子压弹性研究的试金石,单个DNA分子压弹性的数据至今还没有得出。这是因为DNA分子的直径只有约2 nm,为了在小力区($F < 0.5$ nN)精确测量其压弹性,在其上施加的作用力与相应的形变测量的精度必须分别达到 ~ 0.1 nN和 ~ 0.1 nm,这对目前的原子力显微技术是很大的挑战:(1)采用接触模式下的力曲线方法,如果在液体下进行实验,针尖要受到很大的粘滞力,而且液体下的热漂移很严重;如果在空气中测量,由于Jump-into-contact(~ 1.0 nm)现象的存在,尽管人们已经用了很多精力包括利用针尖修饰等各种途径去尽量减小这个值,可至今还没有完全克服,因此很难精确测量DNA分子的初始形变。(2)利用TM-AFM下的力曲线,在液体下针尖与样品的作用力很复杂,不能判别是否为斥力相互作用;而在空气中,我们在Force-Volume图上观测到了DNA分子的反差,由于很难判别针尖与样品的初始接触点而不能定量地计算它的形变。(3)传统的TM-AFM需要较大的trace force(~ 1.0 nN)才能稳定成像,此时已经把生物分子压得很扁^[37,38]。(4)利用Jump mode方法可以很好地控制针尖与样品间的作用力(~ 50 pN),但必须采用软针尖,此时热扰动会引起大约1.0 nm的针尖振幅波动,因此很难精确地得到DNA分子的径向形变^[36]。

目前单分子压弹性测量的各种方法还有其各自的局限性,与其他传统的测试方法相比还不够成熟。

尽管如此,我们依然欣喜地看到许多物理学家、化学家、生物学家及材料科学家都被吸引到这个新兴领域,这势必极大地推动该领域的发展。目前人们正在不断地完善各种基于原子力显微镜技术的单分子力学测量技术,如把它与单分子荧光、单分子拉曼光谱结合起来就很可能给出更新更有说服力的结果。另外,在发展单分子实验技术的同时,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单分子实验现象中的一些本质规律。我们期待随着单分子技术的不断发展,实验精度的不断提高,能够早日提供小力区DNA分子的压弹性模量,结合其拉弹性与扭弹性的数据,可以给出DNA分子力学性质的完整描述。总之,单分子力学是蓬勃发展的新兴的交叉领域,当人们积累了大量的单分子力谱的信息后,对生命现象中一些基本过程就会有一个更深的认识;同时单个生物大分子作为天然的纳米材料,深入了解其力学性质对纳米器件的设计与制造也有很重要的意义。

参考文献:

- [1] Bustamante C, Bryant Z, Smith S B. *Nature*, 2003, 421: 423-427.
- [2] Smith S B, Finzi L, Bustamante C. *Science*, 258: 1122-1125.
- [3] Hugel T, Holland N B, Cattani A, et al. *Science*, 2002, 296: 1103-1106.
- [4] Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, et al. *Science*, 1997, 276: 1109-1112.
- [5] Anselmetti D, Fritz J, Smith B, et al. *Single Mol*, 2000, 1: 53-58.
- [6] Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub H E. *Nature Struct Biol*, 1999, 6: 346-349.
- [7] Seeman N C. *Nature*, 2003, 421: 427-431.
- [8] Zhou H J, Zhang Y, Our Yang Z C. *Phys Rev Lett*, 1999, 82(22): 4560-4563.
- [9] Zhang W K, Zhang X. *Prog Polym Sci*, 2003, 28: 1271-1295.
- [10] Bao G. *J Mech Phys Solids*, 2002, 50: 2237-2274.
- [11] Merkel R. *Phys Rep*, 2001, 346: 343-385.
- [12] Coleman B D, Olson W K, Swigon D. *J Chem Phys*, 2003, 118(15): 7127-7140.
- [13] Bryant Z, Stone M D, Gore J, et al. *Nature*, 2003, 424: 338-341.
- [14] Tsai L, Luo L F, Sun Z R. *J Biomol Struct Dyn*, 2002, 20(1): 127-134.
- [15] Bustamante C, Smith S B, Liphard J, et al. *Curr Opin Struct Bio*, 2000, 10: 279-285.

- [16] Radmacher M, Fritz M, Cleveland J P, et al. *Langmuir*, 1994, 10:3809-3814.
- [17] Tan S, Sherman Jr R L, Ford W T. *Langmuir*, 2004, 20: 7015-7020.
- [18] Cappella B, Dietler G. *Surf Sci Rep*, 1999, 34:1-104.
- [19] 魏青青, 程晓阳, 陈克樱, 等. *中国科学 (C 辑)*, 2001, 31 (6):565-573.
- [20] Zhao J W, Davis J J, Sansom M S P, et al. *J Am Chem Soc*, 2004, 126:5601-5609.
- [21] Shulha H, Zhai X, Tsukruk V V. *Macromolecules*, 2003, 36: 2825-2831.
- [22] Tsukruk V V, Shulha H, Zhai X. *Appl Phys Lett*, 2003, 82 (6):907-909.
- [23] Paulo A S, Garcia R. *Phys Rev B*, 2002, 66:041406.
- [24] Overney R M, Leta D P. *Phys Rev Lett*, 1996, 76(8):1272-1275.
- [25] Knoll A, Magerle R, Krausch G. *Macromolecules*, 2001, 34: 4159-4165.
- [26] Yu M F, Kowalewski T, Ruoff R S. *Phys Rev Lett*, 2000, 85 (7):1456-1459.
- [27] Strick T, et al. *Physics Today*, 2001, 54:32-37.
- [28] Tamayo J, Humphris A D L, Owen R J. *Biophys J*, 2001, 81: 526-537.
- [29] Humphris A D L, Round A N, Miles M J, et al. *Surf Sci*, 2001, 491:468-472.
- [30] Antognozzi M, Szczelkun M D, Round A N, et al. *Single Mol*, 2003, 2-3:105-110.
- [31] Humphris A D L, Antognozzi M, McMaster T J. *Langmuir*, 2002, 18:1729-1733.
- [32] Moreno-Herrero F, de Pablo P J, Fernandez-Sanchez R, et al. *Appl Phys Lett*, 81(14):2620-2622.
- [33] de Pablo P J, Colchero J, Gomez-Herrero J, et al. *Appl Phys Lett*, 73(22):3300-3302.
- [34] Ivanovska I L, de Pablo P J, Ibarra B, et al. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101(20):7600-7605.
- [35] de Pablo P J, Schaap T A T, Mackintosh F C, et al. *Phys Rev Lett*, 2003, 91:098101.
- [36] de Pablo P J, Schaap T A T, Schmidt C F. *Nanotechnology*, 2003, 14:143-146.
- [37] Moreno-Herrero H, Colchero J, Baro A M. *Untramicroscopy*, 2003, 96:167-174.
- [38] 吕军鸿, 吴世英, 王国华, 等. *电子显微学报*, 2003, 22 (3):185-188.

Investigation of the compression elasticity of single biomacromolecules by atomic force microscopy

ZHOU Xing-fei^{1,2,4}, SUN Jie-lin³, MI Li-juan^{1,2}, WANG Hua-bin^{1,2}, HU Jun^{1,3,*}

(1 Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academic of Science, Shanghai 201800;

2 Graduate School of the Chinese Academic of Science, Beijing 100039;

3 Bio-X Life Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030;

4 Department of Physics, Ningbo University, Ningbo Zhejiang 315211, China)

Abstract: The study of the mechanical properties of single biomacromolecules has emerged as a new field in which great advances have been made recently due to the developments in single molecular experimental techniques. Here we introduced some measurement techniques based on the atomic force microscopy for compression elasticity of single molecules, and demonstrated the concrete applications and the limitations of these techniques. In addition, the advances in this exciting field were also prospected.

Keywords: biomacromolecules; compression elasticity; atomic force microscopy

* Corresponding author