

· 专 论 ·

单分子水平高分子相互作用的 AFM 成像与单分子力谱研究*

张文科**

(吉林大学化学学院 超分子结构与材料国家重点实验室 长春 130012)

摘 要 结合作者近期的研究工作,重点介绍了如何把原子力显微镜(AFM)成像及单分子力谱结合(包括原位结合或者离位结合)起来,研究高分子之间的相互作用.本文涉及生物高分子(主要是核酸-蛋白质体系)以及合成高分子体系(如聚氧乙烯,PEO)的相关研究工作.对于生物高分子体系,主要以长链核酸(如双螺旋DNA及RNA)为探针,首先利用AFM成像(包括静态AFM成像及溶液中原位成像)考察了蛋白与DNA结合后对DNA拓扑构象的影响规律;接着讲述利用AFM单分子力谱揭示双螺旋DNA外力诱导下构象转变的本质以及利用双螺旋DNA的力学指纹谱来研究蛋白质结合对指纹谱的影响规律,从而揭示DNA结合蛋白对DNA动态构象的影响规律.同时还尝试将此方法用于研究完整病毒(烟草花叶病毒)颗粒中RNA与蛋白质外壳间的相互作用,拓展AFM单分子力谱方法在相对复杂生物体系中核酸与蛋白相互作用研究中的应用.对于合成高分子体系,主要讲述了如何利用AFM成像及单分子力谱来研究高分子凝聚态(这里主要是高分子单晶)中的分子间相互作用.选取了PEO为研究对象,首先利用AFM成像来定位高分子单晶中的单个聚合物链,然后将该聚合物链从其单晶中提拉出来直接定量测得高分子单晶中的分子间相互作用强度等信息.这些定量的分子间、分子内相互作用信息对于揭示DNA复制等重要生命过程的分子机理以及高性能高分子材料的分子设计具有重要意义.

关键词 原子力显微镜,单分子力谱,核酸-蛋白质相互作用,聚合物单晶

原子力显微镜技术(AFM)自从其发明以来被广泛的用于纳米尺度表面形貌的研究.基于其不同于传统方法(例如,电镜)的成像原理,人们不需要将样品进行染色或者标记,而直接将待研究的目标分子固定到平整的固体基片表面,再利用其尖锐的探针在样品表面进行光栅扫描,最终可以得到单个分子(甚至是原子)的高清晰图像^[1].不同于在其之前出现的扫描隧道显微镜(STM),AFM不需要导电的基底,而且可以很好地在真空中、空气中以及水溶液中实现成像,大大拓宽了它的应用领域.从AFM发明时起,它就被广泛地应用于生物高分子(尤其是DNA)的成像研究,获得了关于单个生物高分子的构象状态等信息^[2].另外,通过将两种可以发生相互作用(或者可以发生反应)的生物大分子(例如,DNA和DNA结合蛋白)混合,并将其复合物铺展到平整的固体基片表面,人们可以从分子水平给出二者结合模式的信息,通过对反应体系在不同时间段

取样并成像分析,可以得到反应动力学信息.由于AFM可以在接近生理环境条件下工作,人们甚至可以用它来原位检测单分子水平的酶促反应,揭示了许多生物学过程的分子机理^[2].作为一种有效的单分子成像手段,AFM可以直观地展示分子间作用模式以及发生过程.但是,与其他成像技术一样,我们无法从AFM图像中得到分子间或分子内相互作用的定量信息.为此人们又在AFM技术的基础上专门开发出了用于检测微小力的实验方法——单分子力谱(single-molecule force spectroscopy, SMFS)^[3].通过将待研究的分子桥连到AFM的针尖及固体基片之间,然后对其进行Z方向的拉伸操纵,可以直接测得单个高分子链的弹性以及分子内及分子间的相互作用强度.迄今为止,人们利用AFM单分子力谱技术获得了许多有关外力诱导下单个聚合物分子的构象转变机理,例如无规线团结构的熵弹性,高分子单链弹性与取代基、立构规整性以及溶液环境(例如,溶

* 庆祝沈家骢院士80华诞专稿;2011-04-19收稿,2011-05-19修稿;国家自然科学基金(基金号20844003,20834003,20974039)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: zhangwk@jlu.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11124

剂极性、pH 值)等之间的关系,高分子在液固界面的吸附与解吸附,生物大分子多聚糖在外力诱导下的椅-船式构象转变,蛋白质的解折叠,DNA 的熔融解链等^[4~8].除了高分子单个链弹性行为的研究之外,力谱还广泛用于各种分子间弱相互作用的直接测量,包括 π - π 相互作用,协同多价作用,互补 DNA 链段之间的结合强度等^[9~11].

1 AFM 成像研究 DNA 与 DNA 结合蛋白之间的相互作用

1.1 空气相静态成像研究

核酸与蛋白质的相互作用贯穿于分子生物学中心法则的每一个环节,在单分子水平对这些蛋白质与核酸的作用机理以及相互作用的影响因素的研究,有助于深化人们对 DNA 复制(或者病毒复制、感染)等重要生命过程发生的分子机理的认识,从而为最终实现对 DNA 复制等过程的人为调控奠定基础.

静态 AFM 成像可以直观地给出 DNA(或者 RNA)与蛋白质间的结合模式.通过把利用分子生物学方法提纯的 DNA 及蛋白质按照一定配比在适当的缓冲溶液中混合,让二者形成复合物.接着将此复合物的溶液稀释到适合 AFM 成像的浓度(确定标准通常依据样品中 DNA 的终浓度,一般为 $1 \sim 2 \mu\text{g/mL}$),然后将溶液滴加到平整的固体基片表面(如云母片)吸附一定时间,在最终氮气干燥样品之前,分别用缓冲溶液及纯水润洗掉吸附较弱的样品和除掉大部分的无机盐.如果只是使用样品缓冲液而不用水来润洗样品,会导致最终在干燥样品的时候有大量无机盐的颗粒析出,干扰成像.由于许多 DNA 结合蛋白在中性溶液中都会体现某种正电性,所以比较容易吸附到负电性的云母片表面.尽管 DNA 本身呈现负电性,不易吸附到云母片上,但是其与 DNA 结合蛋白形成复合物之后就比较容易实现吸附了^[12].对于一些不容易在纯云母上吸附的 DNA-蛋白质复合物,可以通过利用二价阳离子(如 Mg^{2+} 或 Ni^{2+})处理云母片表面(或者直接将二价阳离子加入到溶液中)^[13].如果担心二价离子的引入干扰 DNA-蛋白质复合物的稳定性,还可以尝试采用氨基硅烷化试剂处理云母片表面,产生正电性的表面,有利于复合物的吸附^[14].

DNA 与蛋白质在形态上的差异是人们利用 AFM 成像研究二者相互作用的基础.双螺旋 DNA

是一种半刚性的高分子,它倾向于以伸展的线链状形态存在.而蛋白质由于其分子链的柔性以及复杂的分子内相互作用,往往以线团状结构呈现.根据蛋白质与 DNA 结合模式的不同(例如,序列特异性与否),可以对 DNA 的构象产生不同的影响.对于序列特异性的蛋白,AFM 成像可以给出蛋白在 DNA 上的结合位点分布情况.有些蛋白质可以通过与 DNA 结合将 2 条 DNA 链段拉近形成环状(loop)、盘状(disk)、或者轨道状复合结构,如图 1 所示.图 1(a)是一种具有序列专一性 DNA 结合蛋白(HPV E2)^[13],通过调控 E2 蛋白可以识别的 DNA 序列(E2BS)在长链 DNA 模板上的位置,可以直接从 AFM 图像判断该蛋白是否与此种 DNA 结合并依靠蛋白间的相互作用成环.实验发现天然型 HPV E2 蛋白能够结合目标 DNA 片段上的 2 个结合位点,而且还可以通过蛋白二聚体的形成进一步将该 DNA 片段环化,见图 1(a)中间的 3 个图片.而该蛋白的 3 个突变体却只具有 DNA 结合能力(见图 1(a)底部一行图片中的箭头所示)但没有将 DNA 环化的能力.类似的,对于没有序列选择性的 DNA 结合蛋白,AFM 成像也可以较直观地给出他们的结合模式.比如,枯草芽胞杆菌的 DnaD 蛋白可以与环状(质粒)或者线链型双链 DNA 结合,并产生结合诱导的蛋白聚集,从而形成了圆盘状的复合物,如图 1(b)所示^[12].而该 DnaD 蛋白的羧基端结构域(C-domain)却体现出了与天然全蛋白不同的 DNA 结合性质,它只是在 DNA 片段局域形成了小的聚集体,如图 1(c)所示^[15].此外,枯草芽胞杆菌中另外一种引发体蛋白 DnaB 具有将两条 DNA 片段桥连起来形成类似铁轨状排列的结构^[12].尽管其它生物化学方法(例如,电泳)也可以给出 DNA 是否与蛋白质的结合信息,但是 AFM 以其很少的样品用量以及可以直观给出单分子状态(而不是统计平均)的信息等优点,成为人们表征这两种生物大分子相互作用的重要手段.

1.2 原位动态成像研究

由于 AFM 还可以实现溶液相成像,所以上面提到的空气相的研究从理论上来说是可以直接转移到溶液相来做.其样品制备的前面几个步骤与空气相成像基本一致,只是在吸附完后,直接用成像缓冲液(通常含有一定量的二价镁离子或者镍离子)润洗后就可以直接用于液相成像.这样可以减少空气相成像中样品干燥步骤有可能引起的

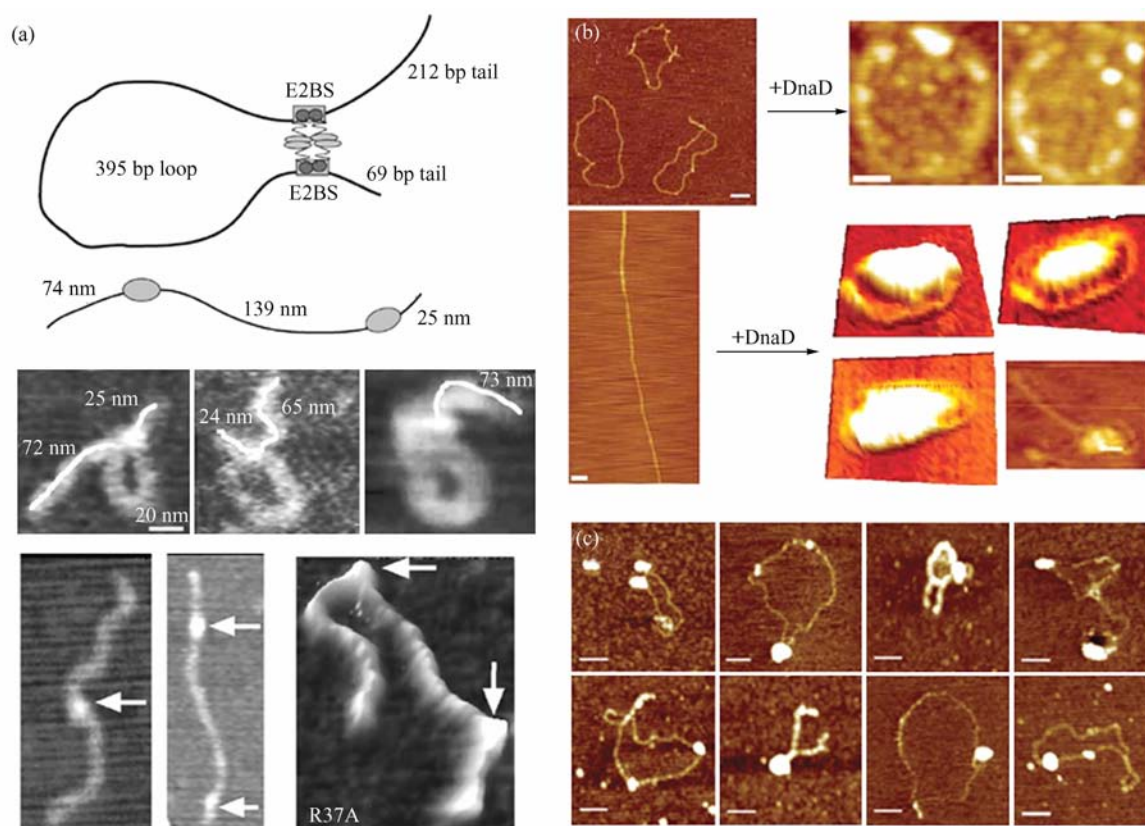


Fig. 1 (a) Schematic drawing of HPV-16 E2 protein (both wild-type and mutants) binding on the DNA template and the related AFM images. The wild-type can bind to the template DNA and form loop structure, while the mutant can only bind to the substrate but not loop the template^[13]; (b) The remodelling of plasmid and linear dsDNA by wild-type DnaD protein from *Bacillus subtilis*^[12]; (c) the binding of C-terminal domain of DnaD protein on plasmid dsDNA^[15]

The scale bars represent 100 nm and 200 nm in (b) and (c), respectively. (Copyrights 2008 American Society for Microbiology, 2005 Elsevier, and 2006 John Wiley and Sons)

样品聚集等假象。但是,溶液相成像也有其弊端,比如由于溶剂化作用 DNA 或者蛋白质与基片之间的作用可能会被削弱,扫描成像的时候探针与样品的接触力需要更加精细的调控。溶液相成像的一个最大的优点是在接近生理环境条件下对一些生物大分子之间相互作用实现原位、动态观测,从单分子水平揭示二者的作用机理。这样的实验对样品的制备方法以及扫描参数的设置提出了更高的要求:既需要保证样品能被固定在基片表面而且又不能固定得太牢固(即需要给予它们一定的运动自由度);既要求能够清晰成像(需要足够的接触力),又要防止样品被针尖刮走。正是由于其较高的实验难度,相关研究报道不像空气相研究那么多。

图 2 给出了我们最近的一个研究工作,在此研究中我们采用原位溶液相成像方法跟踪了一种 DNA 解旋酶复合物(RepD-PcrA)对双螺旋 DNA 的解链过程,揭示了其解链机理^[16]。AFM 图像中

左上角的数字代表距离向体系中添加三磷酸腺苷(ATP)的时间,即第 1 幅图是在加 ATP 之前 10 min 的图像,接着是刚加完 ATP 以及加完 ATP 后不同时间段的原位 AFM 图像。我们的实验结果显示,该解旋酶即使在被固定(在基片上)的条件下,通过水解 ATP 仍然可以将双螺旋 DNA 牵拉过来实现 DNA 的解链。体现在图像上,其中的那条短链的长度在不断地变小,而左下角处的环状结构(来源于被解旋酶解链后又重新复合的 DNA 片段)的尺寸在逐渐增大(见图 2 左侧示意图中的绿色线条,以及右图中代表相应长度的蓝色数值的变化)。值得指出的是,由于基底的限制作用从 AFM 成像实验所得出的解旋速率要明显低于溶液相实验的结果^[16]。但从另外一个角度来看,此效应对于观测一些传统方法难以跟踪的快过程发生的模式又是有利的。

尽管 AFM 成像可以直观给出 DNA 与蛋白分子的结合模式(静态或动态),但是关于蛋白质与

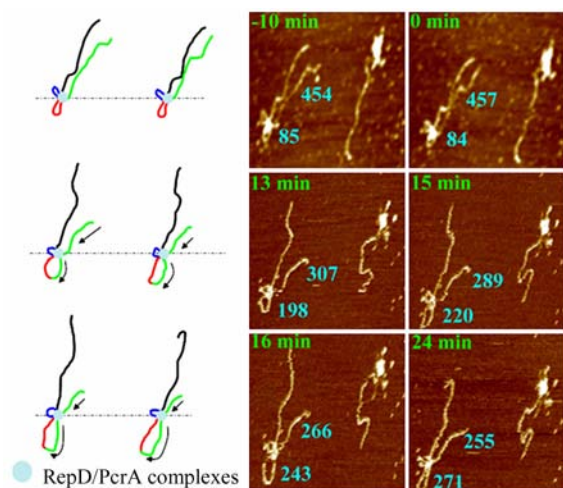


Fig. 2 *in situ* time-lapse AFM imaging of RepD/PcrA helicase and dsDNA interactions at various times after addition of ATP, as indicated. For clarity, a representation of the changes observed over time is shown on the left alongside the actual images. The times relative to the time-point of ATP addition (defined as time zero) and the actual length changes of the linear double strands are indicated^[16]. (Copyright 2007 Elsevier)

DNA 结合后究竟引起了 DNA 双螺旋结构(或稳定性)怎样的变化,二者的结合强度如何等问题却无法给出答案.而下面将要讲到的聚合物单分子力谱可以很好地回答这些问题.

2 DNA 与 DNA 结合蛋白之间相互作用的 AFM 单分子力谱研究

单分子力谱方法研究聚合物分子内、分子间相互作用有两种基本模式:一种是将待研究的聚合物分别固定到 AFM 针尖及固体基片表面,通过让探针及样品接触然后分离可以直接测得二者的分子间作用强度;另外一种模式,是将其中一种高分子(A)链桥连于 AFM 针尖及固体基片之间.首先获得该聚合物链的单分子力谱(即力学指纹谱),然后向体系中引入另外一种(或几种)高分子(B),考察高分子(B)添加前后高分子(A)力谱的变化,从而得出两种高分子的结合信息.接下来我们将讲述如何利用单分子力谱的第二种模式研究 DNA 与蛋白质的相互作用,即以长链双螺旋 DNA 为探针研究 DNA 结合蛋白与 DNA 之间的相互作用.

2.1 外力诱导下 DNA 双螺旋构象转变机理

对 DNA 双螺旋结构的力学稳定性的研究有助于我们深入理解许多重要的生命过程,比如

DNA 复制以及基因重组与突变等.关于双螺旋 DNA 在大约 65 pN 外力诱导下构象转变的机理一直存在两种富有争议的观点:一种认为,在此构象转变过程中双螺旋 DNA 的构象从天然 B-DNA 状态转变为过度拉伸的状态(S-DNA),但是双链 DNA 中的碱基对并没有被破坏(即 DNA 仍然以双链的形式存在);而另外一种观点认为在此过程中双链 DNA 发生熔融(melting)解链,产生了单股 DNA 片段.如果从实验角度验证这两种构象转变机理,有两个因素决定所得结果的准确性:第一,所用 DNA 片段的完整性.该 DNA 片段必须完好,没有缺口(nicking)或者链段局部变性;第二,用于捕捉单股 DNA 片段的添加剂分子不影响双链 DNA 的稳定性.我们通过利用枯草芽孢杆菌单股 DNA 结合蛋白(SSB)与单股 DNA 特异性结合而不与双链 DNA 作用的性质,采用精心制备的长度适中的 DNA 片段以及温和的样品固定方法^[17],并结合 AFM 单分子力谱技术揭示了外力诱导下双链 DNA 构象的本质.我们的实验结果表明,双螺旋 DNA 在被拉伸到其完全伸展长度之后,在 65 pN 左右的外力作用下,发生了部分熔融解链,产生了单股 DNA 片段.解链的程度随着拉伸长度的增加而逐渐增大,同时也随着 DNA 链处于拉伸状态的停留时间的增加而增大. SSB 蛋白的存在可以捕捉到这些单股 DNA,阻碍了互补 DNA 链在弛豫过程中的快速复合(hybridization),导致了拉伸与弛豫力曲线之间滞后效应的出现(如图 3(b))所示.由于这些单股 DNA 片段是在外力作用下产生的,从而限制了 SSB 蛋白与之有效结合.在弛豫过程中,这些结合得不是十分牢固的 SSB 蛋白由于 DNA 互补链的碱基配对作用而被从单股 DNA 上剥落,双链 DNA 重新回复到没有蛋白结合的状态,如图 3 所示^[18].这些结果对于深入理解 DNA 复制以及蛋白质与 DNA 的作用机理具有重要意义.

2.2 利用长链双螺旋 DNA 为探针研究蛋白质与 DNA 之间的相互作用

外力诱导下 DNA 构象转变机理的揭示有助于深化我们对 DNA 复制过程中 DNA 解链的认识,同时也为我们更好地利用 DNA 为探针并结合其力学指纹谱研究 DNA 结合蛋白与 DNA 之间的相互作用规律奠定了基础.

正如我们在第一部分提到的那样,AFM 成像只能直观地给出蛋白质与 DNA 的结合模式以及

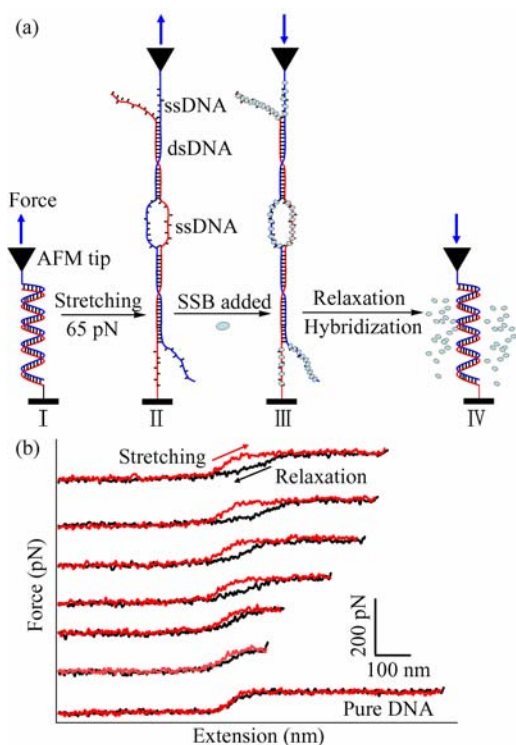


Fig. 3 (a) Possible model for force-induced conformation transition a dsDNA and SSB-DNA interactions; (b) Typical stretching and relaxation curves in the absence (bottom one) and presence of SSB protein with increasing stretching length^[18]. (Copyright 2010 American Chemical Society)

对 DNA 分子构象的影响. 那么蛋白质的结合对于双螺旋 DNA 的稳定性产生了怎样的影响, 这一问题我们通过采用与 2.1 节中类似的样品制备及固定方法, 首先获得了纯 DNA 的力学谱. 然后分别研究了 DnaD 蛋白及其结构域加入以后 DNA 力学指纹谱的变化^[19].

图 4(a) 给出了归一化后的拉伸-弛豫曲线, 从图可以看出 DnaD 全蛋白的存在导致了两个效应的出现: 第一, 拉伸力曲线上出现了锯齿状多峰信号 (红色点线), 而且曲线上出现初始信号的位置明显前移 (比较 $L1$ 与 $L2$); 第二, 力平台的长度变小, 而且 DNA 的完全伸展长度增大 ($L4 > L2$). 对于第一种效应, 如果我们结合前面 AFM 成像 DNA 与 DnaD 全蛋白的结果 (图 1(b)), 并不难理解. 即, 由于 DnaD 蛋白可以环化线链型 DNA, 形成圆盘状结构, 将 DNA 分子的两个末端距离拉近. 在对这样的 DnaD-DNA 复合物的拉伸过程中, 首先受力的是末端的 DNA 片段, 导致表观拉伸长度变小 (比较图 4(b), I 与 III). 进一步拉伸, DNA 与蛋白复合物形成的盘状结构被逐步

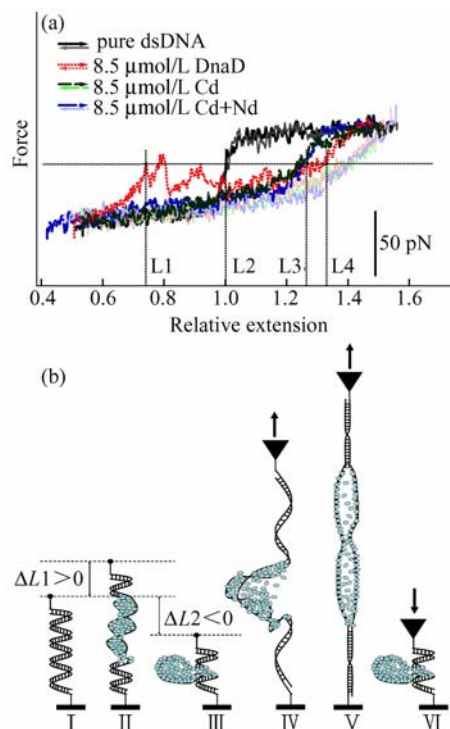


Fig. 4 (a) Comparison of the effects of native DnaD and its domains on the nanomechanical properties of DNA. All the force curves were normalized and superposed for direct comparison. $L1 \sim L4$ indicate the relative end-to-end lengths of dsDNA in the presence ($L1$, $L3$, $L4$) or absence ($L2$) of native DnaD and its separate domains. $L1$ indicates the apparent end-to-end length of dsDNA due to scaffold formation in the presence of native DnaD, while $L4$ indicates the end-to-end length due to duplex untwisting by native DnaD. $L3$ indicates the relative end-to-end length of dsDNA in the presence of Cd (or Cd + Nd); (b) A schematic model to explain the effects of DnaD on the double helix of the DNA. DnaD binds to DNA and untwists the duplex to a paranemic form (I to II). As the concentration increases it forms a scaffold (II to III). The changes in the end-to-end length relative to the naked duplex are indicated. As the DNA is pulled the scaffold is disrupted (IV), the duplex melts (V), while the protein remains bound to DNA as it is relaxed (VI)^[19]. (Copyright 2008 Elsevier)

破坏, 产生锯齿状信号. 从第二种效应我们可以看出, 由于蛋白质的结合导致了双螺旋 DNA 的含量的下降以及 DNA 完全伸展长度的增大. 这种效应的综合结果是使双螺旋 DNA 解旋 (甚至解链), 因为从前面双螺旋 DNA 构象转变机理的研究可以知道, 部分解链的 DNA 会导致其完全伸展长度的增加 (对比图 3 中的拉伸与弛豫曲线) 而这与 DnaD 蛋白的生物学功能 (解链 DNA 便于解旋酶

的加载)相一致. 另外, 对于该蛋白的 C 端结构域而言, 前面的静态 AFM 成像研究结果显示它可以与双链 DNA 结合, 但是它却无法‘环化’DNA 并形成圆盘结构, 因此对双链 DNA 的构象影响较小(图 1c). 这一点相应的拉伸曲线上可以更加清楚地看出来(图 4 中的点划线), 在相同浓度的 C 结构域存在的条件下, DNA 力谱中 65 pN 左右的平台长度的减小程度没有全蛋白存在时的大(图 4, $L_4 > L_3$), 而且也没有出现锯齿形的拉伸曲线. 说明 C 结构域具有弱化双螺旋 DNA 结构的作用, 但不如 DnaD 全蛋白有效. 同样由于分立的 N 结构域几乎不与 DNA 结合, 所以 C 结构域与 N 结构域的物理混合物也无法体现全蛋白 DnaD 对 DNA 构象的改变作用. 因此 DnaD 蛋白的两个结构域只有通过共价键连接起来才能实现其生物学功能^[19].

3 烟草花叶病毒颗粒中基因组 RNA 与蛋白质外壳之间的作用

正如前面提到过的那样, 核酸-蛋白质相互作用机理的研究对理解许多重要的生命过程具有重要意义. 通过将活体体系中的核酸和蛋白分离纯化, 然后在体外进行复合继而利用单分子成像及操纵技术对其进行研究是人们认识复杂体系的一条有效途径. 同时, 如果我们能够在更加接近生命活体体系的环境下(例如, 活细胞中)研究核酸与蛋白的相互作用, 得出的信息将会更加具有参考价值和指导意义. 当然要实现这样一个目标对于 AFM 单分子力谱来说还有很长的路要走, 还将面临来自实验及数据分析等诸多方面的挑战^[20].

为了在此方面进行一些探索, 我们选取了结构相对简单的植物病毒——烟草花叶病毒(TMV)为研究对象, 研究完整病毒颗粒中基因组 RNA 与蛋白质外壳之间的相互作用. 从其被发现至今一个多世纪的时间跨度内, TMV 一直是人们从事病毒研究以及大分子组装及解组装研究的一个模型体系. TMV 颗粒具有一个中空管状结构, 管的主体由大约 2130 个相同的衣壳蛋白亚单元螺旋排列组成, RNA 基因组镶嵌于由衣壳蛋白所形成的螺旋沟槽之中. TMV 颗粒的内径是 4 nm, 外径为 18 nm, RNA(螺旋)的直径是 8 nm(如图 5(A)所示). 尽管 TMV 的静态结构的研究已经给出了许多有意义的结果, 但是在完整病毒颗粒当中 RNA 基因组与衣壳蛋白之间的结合强度方面

的研究却鲜见报道. 而研究二者的相互作用强度及影响因素对于揭示 RNA 与衣壳蛋白之间的解组装及组装机理具有重要意义.

从 TMV 的结构可以知道, RNA 基因组被蛋白质外壳所包裹, 只有病毒颗粒两个末端(5'和 3')的 RNA 是与外界最接近的. 因此, 我们通过精细调控(比如通过巯基修饰衣壳蛋白的 N 末端, 或者通过 pH 调控), 将 TMV 病毒颗粒以竖直方式固定在固体基片表面, 然后利用 AFM 针尖与 TMV 5'端的 RNA 之间的物理吸附作用, 将 RNA 基因组从其蛋白质外壳中逐步提拉出来^[21]. 我们得到了带有锯齿型平台的拉伸曲线(如图 5(B)), 平台的高度在 400 pN 左右. 为了证明该平台对应 RNA 从衣壳蛋白上的解组装过程, 我们进一步分析了在弛豫过程中的分子链弹性行为. 实验结果表明, 弛豫曲线在较低力区域(小于 80 pN 的熵弹性区域)可以很好地被蠕虫链(worm-like chain, WLC)模型拟合, 给出的拟合参数(相关长度约 0.6 nm)与单股 DNA 的相关参数很接近. 另外, 该弛豫曲线可以与 Poly(A) RNA 的拉伸曲线很好地叠加并重合到一起(如图 5(B)中的插图所示), 证明弛豫曲线对应纯 RNA 链段的弹性行为, 而拉伸曲线中的力学信号也就极有可能来源于 RNA 的拉伸. 当 RNA 水解酶引入样品体系后, 锯齿形平台出现的几率明显下降, 而且弛豫曲线中经常出现外力突然降低到零的情况(对应 RNA 水解酶切断 RNA 链段的过程), 进一步证实锯齿形平台来源于 RNA 而不是衣壳蛋白的拉伸. 拉伸曲线中的锯齿状力学信号可以归结为 RNA 基因组中不同碱基序列与衣壳蛋白之间不同的结合强度. 为了验证此假设, 我们分别统计分析了拉伸曲线上相邻锯齿之间的距离以及 RNA 基因组中相邻 AAG 序列之间的距离. 如图 5(C)所示, 这两种统计分布的柱状图非常类似, 进一步支持我们关于锯齿峰以及力平台来源的猜测. 通过此种实验设计, 我们直接测得了 RNA 从其蛋白质外壳上解组装所需外力的大小, 该解组装机力随着拉伸速率的增加而增大, 随着 pH 值的增加而降低. 研究还发现, 解组装的 RNA 在适宜条件下(以那些没有被破坏的 RNA-衣壳蛋白复合物作为‘成核中心’)可以从内向外重新组装到其蛋白质外壳上(见图 5A(c)), 体现在连续拉伸力曲线中锯齿平台的再次出现(见图 5(D)中曲线 2, 4, 12, 15)^[21]. 通过此研究我们将 AFM 单分子力谱方法

拓展到相对复杂生物体系中核酸与蛋白质相互作用的研究中,同时有望将该技术应用到 TMV 病毒感染机理的研究.类似地,此方法还可以用于其它

杆状病毒(比如 H1N1)中核酸与蛋白质的相互作用研究.

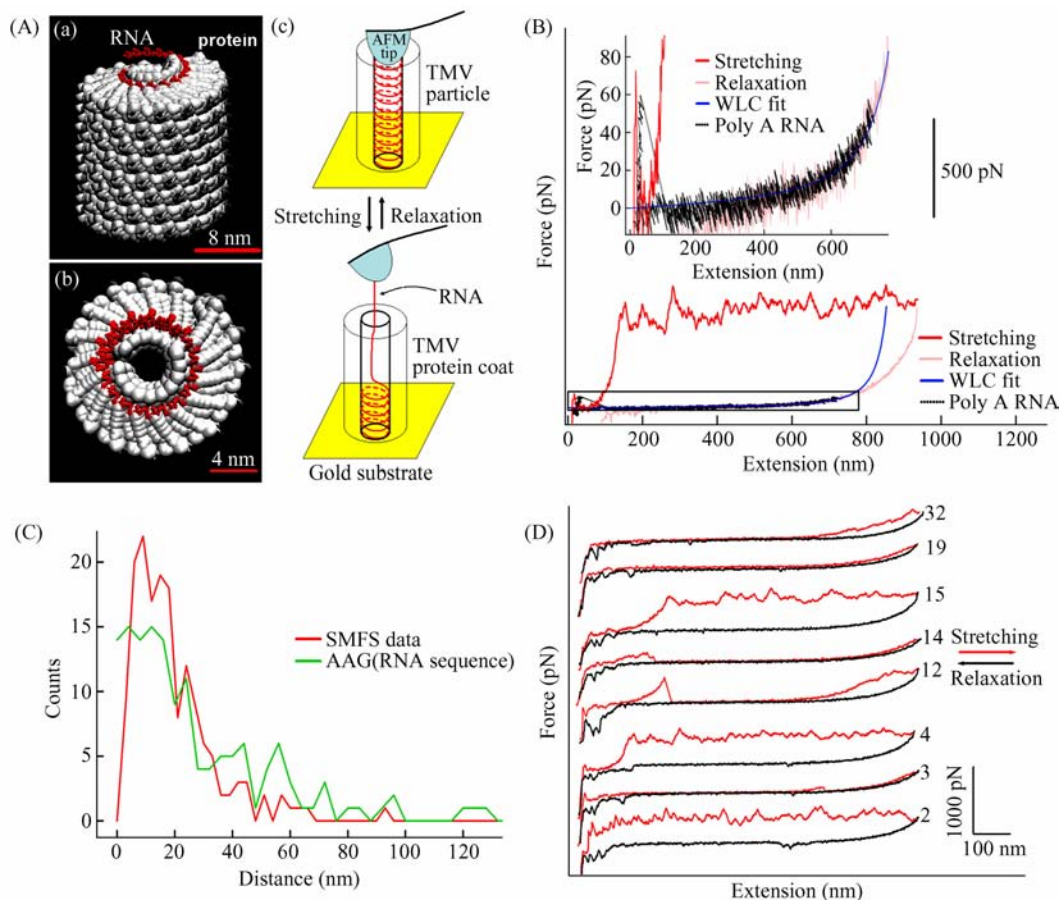


Fig. 5 (A) (a) Structure of TMV (*ca.* 1/17 of the total length), (b) its cross section, and (c) schematic illustration of the SMFS experiment on RNA stretching; (B) Typical stretching and relaxation curves superimposed with a WLC fit (blue solid curve) and a stretching curve of poly(A) RNA (black dotted curve). The inset shows an enlarged version of the superimposition region below 100 pN; (C) Distribution of the width between adjacent sawtooth-like peaks in the stretching curves (red trace) and distribution of the calculated distance between adjacent AAGs in the TMV RNA genome sequences (green trace); (D) Repeated stretching and relaxation of the same RNA molecule without rupture. The order of the stretching-relaxation cycle is marked numerically^[21]. (Copyright 2010 American Chemical Society)

4 聚氧乙烯(PEO)单晶中高分子链之间的相互作用

直接研究单个高分子链在结晶过程中的行为以及高分子晶体中链段间的相互作用,对于揭示结晶过程的分子机理具有重要意义.我们以末端含有单个巯基(HS)修饰的聚氧乙烯为原料,利用自晶种法(self-seeding)从其稀溶液中培养出 PEO 单晶.由于高分子链在晶体中的折叠特征,导致巯基末端随机分布在 PEO 单晶的上下表面,为晶体在基片上的有效固定奠定了基础.接着,我们分别用氨基硅烷化试剂以及偶联剂分子(*N*-[α -马来

酰亚胺乙酰基]琥珀酰亚胺酯, AMAS)分别处理硅片表面,最终获得了马来酰亚胺修饰的硅片^[22].通过晶体表面的巯基与马来酰亚胺之间的化学反应,将 PEO 单晶固定到基片表面.在力谱探测过程中,我们采取两套实验方案(如图 6(A)):无规探测(random picking)与金纳米粒子定位(gold nanoparticle positioning)与操纵.对于第一种模式,我们利用镀金的 AFM 探针在晶体表面选定区域进行点阵式力谱探测,依靠探针与高分子晶体表面巯基之间的键合作用(金-硫键)直接将高分子链末端连接到 AFM 针尖上,在探针与样品的分离过程中,该高分子链将会被从晶体中提

拉出来. 我们得到了带有平台的力曲线(如图 6B(a)所示), 通过对平台高度进行统计分析, 我们得到两个最可几的力值分别是 15 pN 及 42 pN (如图 6B(b)所示). 解吸附以及速率依赖性对比

实验表明, 42 pN 左右的平台很可能对应着 PEO 链从晶体中提拉出来的过程, 而 15 pN 左右的平台来源于 PEO 链从晶体表面的解吸附^[22].

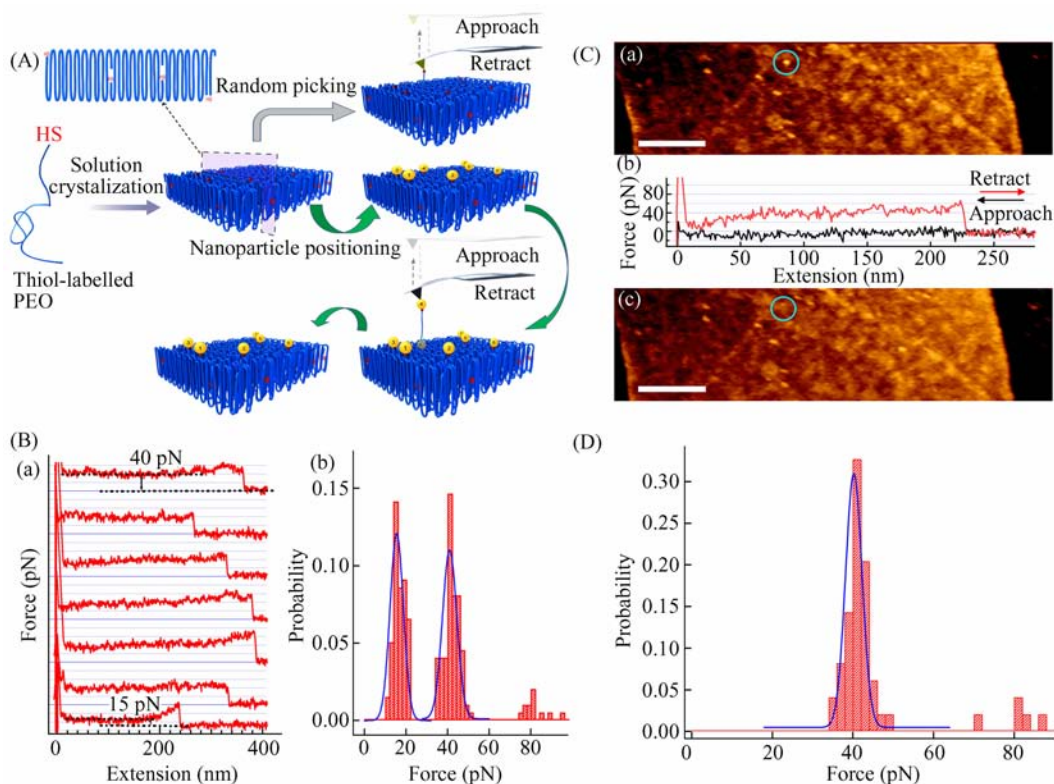


Fig. 6 (A) Schematic drawing of AFM-based SMFS experiment on PEO single crystals; (B) (a) Typical stretching curves obtained on HS-PEO—OCH₃ single crystals using the random picking method, (b) Force distribution of the corresponding force plateaus; (C) SMFS experiment on a gold-nanoparticle-labeled PEO single crystal. (a) Part of the single crystal was imaged first to locate the GNP, and then the selected GNP, as marked by the blue circle, was picked up by an AFM tip, (b) The corresponding force-extension signal was recorded, (c) The same area of the single crystal was imaged again, and the corresponding GNP had disappeared; (D) Statistical analysis on the plateau forces produced a most probable force of 40 pN^[22]. The scale bars in Fig. 6(c) represent 200 nm (Copyright 2011 American Chemical Society)

为了进一步证实我们的观点, 采用了更加精细的实验方案二(即, 金纳米粒子定位). 在此方案中, 用金纳米粒子来标记晶体表面的巯基末端, 首先利用 AFM 成像来定位特定的纳米微粒(图 6C(a)), 接着通过对纳米粒子的操纵而实现相应高分子链的拉伸, 也可以得到带有平台的力-拉伸信号(图 6C(b)), 最后对样品的同一区域再次扫描, 选定的纳米粒子消失了(图 6C(c))进一步证实所得到的力学信号来源于高分子链从晶体中被提拉出来的过程. 通过对这些平台进行统计分析, 得到了最可几力值为 40 pN, 这与方案一中的结果(42 pN)非常接近. 在方案二中, 我们用到的金纳米粒子直径在 3 ~ 5 nm 之间, 而 PEO 的分子量也比较大(48.5×10^3), 再加上高分子链折叠的特

性(晶体厚度为 10 nm), 在大多数情况下 1 个金纳米粒子只与 1 条高分子链作用, 而同时与两条链作用的几率只有 1% ~ 4% (如果考虑到非整数折叠导致部分高分子链末端被包埋在晶体中的事实, 该几率会更低)^[22]. 综合以上事实, 我们可以确定将单个 PEO 链从其单晶中提拉出来所需的外力大小约为 40 pN (拉伸速率为 2 $\mu\text{m/s}$). 另外, 图 6B(b) 以及 6(D) 中出现在 80 pN 左右的少量力信号可能对应着 2 条 PEO 链同时被从晶体中提拉出来的过程. 除了实验研究外, 我们还利用受控分子动力学模拟(steered molecular dynamic simulation, SMD)模拟了 PEO 链从单晶中被拉伸出来的过程. 当模拟中假定 PEO 链遵循近邻规整折叠模型时, 模拟给出的力-拉伸距离曲线的形状

与我们的实验数据非常相近;而当假定 PEO 链采取非近邻折叠时拉伸曲线不再平整而是出现大范围波动(尚未发表数据).这些都进一步支持我们的 AFM 实验以及 Keller 等关于高分子单晶的近邻规整折叠模型.值得指出的是有些力曲线(占总力曲线数目的 14%)的起始部分或者末端(接近断裂)的部分具有偏离中间平台区域的特性(即曲线这些部分有倾斜,如图 6B(a)倒数第二、第三条曲线和图 6C(b)),这意味着 PEO 链末端折叠的规整程度不如位于中间部分的链段.换句话说,力曲线中平台的平整程度可以反映出高分子链折叠的规整程度.该研究将单分子力谱方法从溶液中、单分子高弹态研究^[4,5]成功拓展到了凝聚态(单晶)高分子研究中.我们相信该方法可以用于从单分子水平研究各种其它高分子的结晶行为,并有望从单分子水平揭示聚合物的结晶机理.

5 结语与展望

AFM 成像与单分子力谱这两种单分子观测与操纵技术已经在材料及生命科学领域得到了广泛的应用,而将二者有机结合起来(包括原位及离位结合)更有利于从深层次揭示分子间及分子内相互作用的本质.随着仪器性能及可操控性的

不断改进(比如,新型 AFM 仪器对样品固定的要求不再那么苛刻,另外扫描参数也可以实现自动优化),AFM 相关技术将在分子间及分子内相互作用方面得到更加广泛的应用.就 AFM 单分子力谱而言,近年来乃至今后相当长一个时期,AFM 单分子力谱的一个重要发展趋势之一是立足已知高分子的力学指纹谱,逐渐增加体系的复杂性,既考虑分子内相互作用又考虑分子间作用,解决更加复杂体系中的相关问题.就高分子材料领域而言,在溶液中高弹态的单链弹性行为研究成熟之后,下一步如何实现由单个分子向多分子聚集体,比如高分子晶体和高分子纤维等,的跨越将是非常具有挑战性和前景的研究方向之一.该研究将有望建立高分子微观与介观(乃至宏观)研究之间的桥梁.当然,伴随着体系复杂性的增加,除了 AFM 单分子力谱技术外,可能还需要结合其它微观、介观手段(比如 AFM 成像,单分子荧光以及理论模拟等)来共同实现这一目标.生命科学领域也一样,未来研究体系也将趋向复杂化,比如对核酸与蛋白质相互作用的研究将不只局限于某一种因素(如,某种蛋白质)的影响,而是多种因素(比如多种不同蛋白)共同作用的规律.只有这样才能使相关研究不断地接近真实的生命体系与过程,获得更加丰富的信息.

REFERENCES

- 1 Binnig G, Quate CF, Gerber C. *Phys Rev Lett*, 1986, 56: 930 ~ 933
- 2 Hansma H G. *Annu Rev Phys Chem*, 2001, 52: 71 ~ 92
- 3 Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, Gaub H E. *Science*, 1997, 275: 1295 ~ 1297
- 4 Zhang W K, Zhang X. *Prog Polym Sci*, 2003, 28: 1271 ~ 1295
- 5 Zhang Wenke(张文科), Wang Chi(王弛), Zhang Xi(张希). *Chin Sci Bull(科学通报)*, 2003, 48: 1113 ~ 1126
- 6 Li H B, Liu B B, Zhang X, Gao C X, Shen J C, Zou G T. *Langmuir*, 1999, 15: 2120 ~ 2124
- 7 Zhang W K, Zou S, Wang C, Zhang X. *J Phys Chem B*, 2000, 104: 10258 ~ 10264
- 8 Gunari N, Balazs A C, Walker G C. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 10046 ~ 10047
- 9 Zhang Yiheng(张义恒), Wang Zhiqiang(王治强), Zhang Xi(张希). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2009, (10): 973 ~ 979
- 10 Strunz T, Oroszlan K, Schäfer R, Güntherodt H J. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 11277 ~ 11282
- 11 Zhang Wenke(张文科). *Nano-mechanical Detection of Single Molecules(单分子的纳米力学探测)*. Doctoral Dissertation of Jilin University (吉林大学博士学位论文), 2002
- 12 Zhang W K, Carneiro M J V M, Turner I J, Allen S, Roberts C J, Soutanas P. *J Mol Biol*, 2005, 351: 66 ~ 75
- 13 Hernandez-Ramon E E, Burns J E, Zhang W K, Walker H F, Allen S, Antson A A, Maitland N J. *J Virol*, 2008, 82: 4853 ~ 4861
- 14 Lyubchenko Y L, Shlyakhtenko L S. *Methods*, 2009, 47: 206 ~ 213
- 15 Carneiro M J V M, Zhang W K, Ioannou C, Scott D J, Allen S, Roberts C J, Soutanas P. *Mol Microbiol*, 2006, 60: 917 ~ 924
- 16 Zhang W K, Dillingham M S, Thomas C D, Allen S, Roberts C J, Soutanas P. *J Mol Biol*, 2007, 371: 336 ~ 348
- 17 Zhang W K, Barbagallo R, Madden C, Roberts C J, Woolford A, Allen S. *Nanotechnology*, 2005, 16: 2325 ~ 2333
- 18 Liu N N, Bu T J, Song Y, Zhang W, Li J J, Zhang W K, Shen J C, Li H B. *Langmuir*, 2010, 26: 9491 ~ 9496
- 19 Zhang W K, Machon C, Orta A, Phillips N, Roberts C J, Allen S, Soutanas P. *J Mol Biol*, 2008, 377: 706 ~ 714

- 20 Dufrêne Y F, Evans E, Engel A, Helenius J, Gaub H E, Müller D J. *Nat Methods*, 2011, 8:123 ~ 127
- 21 Liu N N, Peng B, Lin Y, Su Z H, Niu Z W, Wang Q, Zhang W K, Li H B, Shen J C. *J Am Chem Soc*, 2010, 132:11036 ~ 11038
- 22 Liu K, Song Y, Feng W, Liu N N, Zhang W K, Zhang X. *J Am Chem Soc*, 2011, 133:3226 ~ 3229

AFM IMAGING AND SINGLE-MOLECULE FORCE SPECTROSCOPY STUDIES ON MACROMOLECULAR INTERACTIONS AT SINGLE-MOLECULE LEVEL

ZHANG Wenke

(*State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials, College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012*)

Abstract The investigations on macromolecular interactions at the single-molecule level using atomic force microscopy (AFM) imaging and AFM-based single-molecule force spectroscopy (SMFS), with an emphasis on the combination of these two methods, have been discussed on the base of the author's recent work in related fields. First, AFM imaging (including static air phase and in situ liquid phase AFM imaging) is used to detect the effect of protein-binding on the topology of double stranded DNA (dsDNA) based on the characteristic (spaghetti-like) AFM image of dsDNA. Then, SMFS study on the nature of force-induced conformation transition of dsDNA is demonstrated. The force-fingerprint of dsDNA can then be used to study protein-DNA interactions revealing the effects of protein-binding on the dynamic conformation of dsDNA. In addition, the application of AFM-based SMFS in the investigation of RNA-protein coat interactions in an intact plant virus, tobacco mosaic virus (TMV), has been demonstrated. To realize this, a TMV particle is immobilized perpendicularly on a gold-coated substrate. The genetic RNA can then be pulled step-by-step out of the TMV particle through its 5' opening. This study extends the force spectroscopy technique to the investigation of nucleic acid-protein interactions in more complicated biological systems (*i. e.*, in the virus particle). Finally, the attempt in the quantitative study of polymer interactions in a polyethylene oxide (PEO) single crystal is successfully accomplished by pulling a single PEO chain via its thiol-labelled end out of its single crystal by a good in situ combination of AFM imaging and SMFS. The generality of the established method in the investigation of crystallization of other polymers is discussed. This quantitative information on inter- and intramolecular interactions of macromolecules is useful in revealing the mechanism of many important biological processes (such as DNA replication) as well as in the design of high-performance polymer materials.

Keywords Atomic force microscopy, Single-molecule force spectroscopy, Nucleic acid-protein interaction, Polymer single crystal