

胶原蛋白组装过程原子力显微镜的观测*

张小燕^{1,2**} 范晓东¹ 高新² 白海涛² 李延²

(¹西北工业大学理学院 西安 710072) (²西北大学化工学院 西安 710069)

摘要 阐述一种特殊胶原蛋白物质的组装过程,即加入 α_1 -酸性糖蛋白后形成的纤维长距胶原蛋白.通过透析改变胶原蛋白溶液与 α_1 -酸性糖蛋白混合液的pH值,在不同的pH值阶段利用原子力显微镜法(AFM)来辨析稳定的中间结构,获得可靠且分辨率高的样品图像.从而观察到了每个阶段中间纤维的形态和直径.结果表明纤维长距胶原蛋白形成过程中存在明显的中间体.

关键词 原子力显微镜, 胶原蛋白, 组装, 形态, 图像

胶原蛋白具有纳米级的空间尺度,光学显微镜以及电子显微镜均无法在纳米水平上研究高分子生物材料的动态过程,对其研究需要发展空间分辨率是纳米量级(或更小),同时时间分辨率是毫秒量级的新的技术.用这些技术对天然高分子样品进行观测和控制,就可以再一次扩大人们的视野,使天然高分子的研究进到一个动态的纳米水平中.

Binnig 和 Rohrer 发明的扫描隧道显微镜 (STM) 在 1982 年第一次产生了原子级分辨图像^[1].这就是为显微镜扫描探索生物材料测定的技术发展铺平了道路,例如,纤维长距胶原样本的测定与处理.所有这些技术的操作都基于相同的原理——在光栅扫描样本表面期间,监控器对探针末段和样本表面之间的相互作用力进行监控^[2].显示数字的不同就说明探针与样本被扫描区域的相互作用力不同.原子力显微镜也是基于同样的原理.但原子力显微镜所观察到的图像比 STM 更易于解释,原因在于力的等高图比密度的等高图更加忠实于表面实际形态.

本实验利用原子力显微镜法对胶原蛋白的组装进行了研究.

1 实验部分

1.1 材料

小牛皮胶原(Sigma 公司),醋酸(分析纯)、 α_1 -酸性糖蛋白溶液(纯度 99%,来源于牛血清)(Gibicol 公司).

1.2 仪器

原子力显微镜 (AFM) (Autoprobe CP Research; Thermo Microscope 仪器公司).

1.3 实验方法

1.3.1 体外纤维长距胶原组装 将 I 型纯度为 99% 的小牛皮胶原溶解到 0.01 mol/L 的醋酸溶液中,使其浓度达到 1 mg/mL,轻微摇晃.在 4℃ 过夜,形成浅灰色分散液.在 4℃ 下以约 47808 g 的加速度离心分离 1 h,除去残留不溶物.离心分离后,倒出上层清液,得到 1 mg/mL 酸化胶原储备液.这些胶原蛋白储备液是由若干重要的胶原单体和低聚物组成.

在储备液与同体积的 0.5 mg/mL 的 α_1 -酸性糖蛋白溶液结合之前,通过一个 0.45 μm 的渗滤器对其渗滤,形成悬浊液. α_1 -酸性糖蛋白溶液在使用前可直接制备,取一定量的酸性糖蛋白在 4℃ 下溶解在 0.01 mol/L HAc 溶液中即可.然后把含有 0.5 mg/mL 胶原蛋白的悬浊液与 0.25 mg/mL 的 α_1 -酸性糖蛋白溶液转移到浸湿的分子量取舍点为 12 ~ 14 kDa 的渗析管中密封.然后,在 21℃ 的去离子水浴中透析.8 mL 的悬浊混合液需要在 300 mL 水中进行透析.悬浊液最初的 pH = 3.5.经过一夜的透析后升高至 pH = 5.5.

1.3.2 纤维长距胶原蛋白透析液的取样 透析 30 min 后,将透析管从水浴中取出停止透析并记录 pH 值和光散射强度读数.用 pH 值和光散射测量时,需要将 2 mL 的悬浊液临时从透析管移到聚苯乙烯管中.该法需要 5 ~ 10 min,之后迅速将

其倒回透析管中,再放入水浴中继续透析.为了进行光散射和 pH 测量,透析就要周期性中断,但是因为不能把最终产物与静态下组装的纤维长距胶原蛋白相区别,所以假定中断限度相当小,虽然这很可能在某种程度上影响过程的动力学.中断的时间间隔(5~10 min)相对于整个透析期间(12 h 以上)也保持在很短限度里.

1.3.3 原子力显微镜法 用去离子水将 10 μL 的样品稀释 10 倍,得到原子力显微镜成像需要的样品.立刻将样品沉积在新劈开的云母表面,然后在环境温度和常压下晾干.采用 III 型超高频示波器成像,以接触模式操作.正锥体氮化硅探针的刚度系数是 0.58 N/m,通过对高度模式下各个纤维图像的横截面进行测量,得到了纤维的直径,长度以及条带周期.当进行直径测量时,为了避免宽度测量所固有的探针旋绕问题,采用纤维的最大高度要超出培养基^[3,4].

选择样品在环境温度和常压下干燥,利用加压气体如氮气防止样本变形.在这种条件下,10 min 内就会使半滴样本蒸发干燥.在原子力显微镜成像之前把稀释的样本加入到去离子水中.使去离子水或缓冲溶液的原因就是防止引入额外的盐而使图像变得复杂.

2 结果与讨论

本文是通过测试透析期间的反应混合物来探索组装路径的研究.在反应进行的时间段中提取一部分反应混合物,进行原子力显微镜成像.

2.1 预组装

在纤维长距胶原蛋白组装前,悬浊液含有酸化的小牛皮 I 型胶原蛋白与牛血清 α_1 -酸糖蛋白.原子力显微镜对沉积在云母上的悬浊液成像表明,偶然的细丝状物质(见图 1b)出现只会形成一般的膜层(见图 1a)典型稀释过的样本在原子力显微镜扫描成像中,样本小液滴沉积部分的整个表面被蛋白质膜层覆盖,观察到的丝状物质相当小,还不到扫描样本的 5%.这些细丝的直径有 3~7 nm(由于这些细丝埋入到了背景蛋白质的微纤维中,所以很难精确测量),长度仅有几微米.在大量的纤维源实验中获得的部分样本间的微纤维的特征和表面形态是与此纤维结构一致的.

根据形态透视图法,预组装溶液中的细丝状物质类似于支配天然胶原组装的柔韧微纤维,这和用原子力显微镜观察到的情形是一致的^[5,6].据

推测,它们大概是原始成胶物质残留物,在储备液制备的酸化过程中没有完全溶解在单体里,在随后的离心过滤阶段也没被除去.虽然这些步骤能除去这种物质,但仍可能残存极少量的纤维.然而,假如这些物质真正以一定量存在的话,它们很可能会影响组装,所以必须把它们的存在量降到最低.

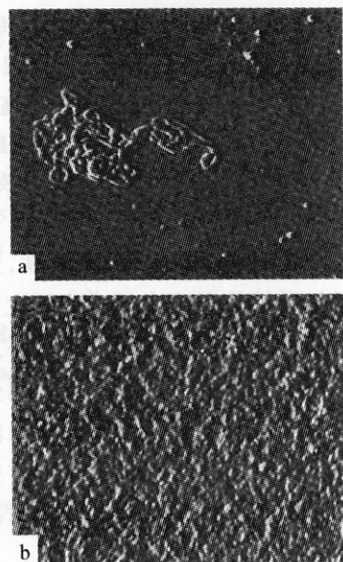


Fig. 1 Acidified pre-dialysis precipitating solution containing type I collagen and α_1 -acid glycoprotein

Contact mode AFM deflection images: (a) microfibrillar clump (4 μm $\times$ 4 μm); (b) typical protein film on mica substrate, as in background of (a) (2 μm $\times$ 2 μm)

2.2 组装阶段

2.2.1 组装早期(pH $\leq$ 4) 透析早期的 2~6 h 在没有任何特征的蛋白薄膜背景上出现了越来越明显的卷曲微纤维.到了这个阶段末期,至少 80% 的原子力显微镜扫描区域含有这种团块,而且其外观占据了图像的大部分,类似于图 2. 图 1(a) 的完全孤立团块区与图 2(a) 较大聚集区是原子力显微镜扫描所观察到的典型特征,这种特征可以分别在透析前的混合物与接近早期末端的混合物中观察到.因此,当团聚超过了增长的数目时,这些微纤维的形态就不能辨别了(由于纤维以及埋入蛋白质膜层的微纤维本身的缠绕特性,不可能在成像浓度情况下采用微纤维超微结构的定量分析,大概的纤维尺寸都是相同的,直径是 3~7 nm,长度是几微米).

2.2.2 组装中间阶段(pH = 4~6) 在组装中间阶段,透析 5~12 h,出现了不同的纤维形态.当透析溶液 pH = 4 时,原子力显微镜成像中发现有

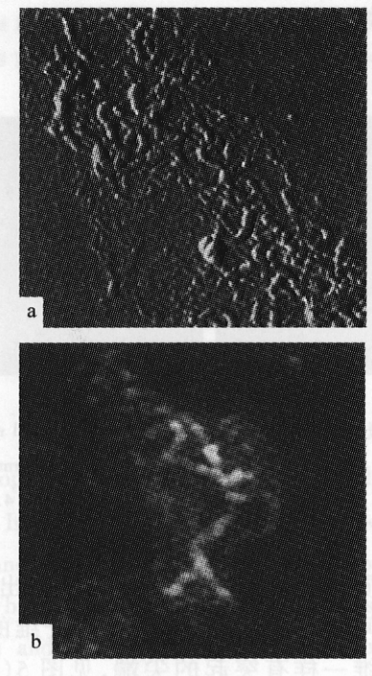


Fig. 2 Dialyzing FLS(fibrous long spacing) collagen solution in early stage of fibrillogenesis at pH 3.66
Contact mode AFM images demonstrating curly microfibril structures with no resolved banding (a) deflection image (3 $\mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$); (b) height image (2 $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$; black:0 nm, white:30 nm)

细小的纤维结构存在,其中一些条带周期为 270 nm.这些结构可见图 3(a)~(d).这些带形与成熟的纤维长距胶原纤维的带形相匹配.纵断面的插图见图 3(b)~(d),用 135 nm 的点线分割以便观察.此图说明了条带的产生是由于原细纤维表面突起造成,这个突起大约比条带高出 2~3 nm.这个组装阶段,纤维的直径与长度分别约为 3~12 nm 和 3~20 μm .随着 pH 值的升高,这些细丝的直径通常会增大.以前关于纤维长距胶原蛋白的研究发现了原细纤维的存在,那时把原细纤维看作是组装的潜在中间体^[7].在这个组装阶段,观察

到的纤维与原细纤维的尺寸相似(虽然条带不确定).

随着透析的进一步进行(也是随着时间和 pH 的增加),可以清晰地观察到大量的纤维聚合物的带形(见图 4a~d).根据条带和长度以及形成原细纤维的超微结构的存在,发现这些纤维与文献报道的成熟纤维长距胶原纤维有一定的相似处^[7,8](图 5).与成熟纤维相比较,这个组装阶段的纤维似乎由更多的松散原细纤维或微纤维的一种或两种组成.一般情况下,胶原蛋白纤维会与云母强烈结合.而且,成胶聚合物的典型特征是由沉积物影响的,这明显超出了探针旋绕的影响.然而,这里所观察到的结构相当的平,就像图 4(a)~(c)所示.和云母的相互作用也削弱了原细纤维.我们称这些横向的聚合结构为中间纤维,以示与其它纤维形态的区别.

在组装中,纤维的堆积紧凑了,且它们在培养基上的中间纤维看上去还没有变平,就像图 4(d)中所示的在 pH=4.25 时采集的样本一样.现在的直径为 10~20 nm.根据这个组装阶段所获得的原子力显微镜图像,发现组装早期形成的原细纤维有横向相联,从而形成了中间纤维,这样其表面突起就被记录.当中间纤维继续相联时,分支也会明显看到,与图 4 的情形一样.很明显,纤维分支的条带周期能记录到,这就进一步证明了那些突起的排列是构成原细纤维的要素.

根据原子力显微镜图像,原细纤维与中间纤维似乎没有低 pH 值时微纤维更具柔韧性,或许是由于它们直径与长度的比率较大的缘故.这个组装阶段混浊程度提高较快的更直接原因可能是这些低柔韧纤维结构数量和直径的增加.观察到的组装步骤中的具有周期性突起原细纤维是横

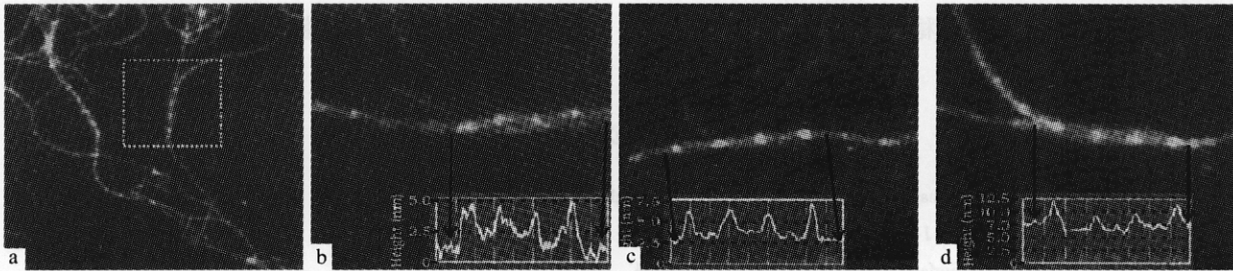


Fig. 3 Protofibril structures observed during the early intermediate stage of FLS collagen fibrillogenesis
Contact mode AFM height images (black:0 nm height): (a) typical clusters of protofibrils at pH 4.25 (5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$; white:35 nm); (b)~(d) 2 $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$; (b) protofibril at pH 4 (white:15nm), (c) protofibril at pH 4 (white:10 nm), and (d) 90° rotated zoom of boxed region in (a) (white:30 nm); Insets in (b)~(d): longitudinal-sections along indicated portion of fibril — the vertical lines are separated by 135 nm - 1/2 the FLS collagen banding period.

向相联,这与以前在成熟纤维中观察原细纤维存在性的资料一致. 现在的研究为辨别中间结构以

及对它们组成成分的思索提供了资料.

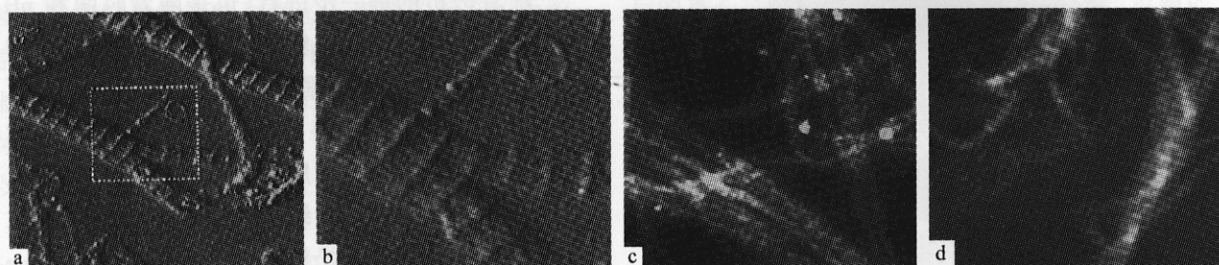


Fig. 4 Structures observed during late intermediate stage of FLS collagen fibrillogenesis

Contact mode AFM deflection images: (a) relatively loosely associated intermediate fibrils at pH 4.25 ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$); (b) zoom in boxed region of (a) demonstrating protofibrillar constitution of intermediate fibrils ($2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$); and, height images (black: 0 nm height): (c) intermediate fibrils demonstrating loosely associated protofibrils at pH 4.25 ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$; white: 40 nm) and, (d) showing tightly associated protofibrils at pH 4.40 ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$; white: 75 nm).

2.2.4 组装最后阶段($\text{pH} \geq 4.6$) 开始透析 10~18 h, $\text{pH} = 4.6$, 与以前通过原子力显微镜和电子显微镜观察到的成熟纤维长距胶原纤维簇开始出现(图 5). 这些纤维的特征在 270 nm 空白区直径为几十到几百纳米, 长度为几微米. 成熟纤维中的原细纤维很明显, 周围的培养基上也有明显的纤维物质, 但没有看到典型的条带, 这或许是微

纤维的本质. 从图 4 和图 5 的比较可看出, 成熟纤维不像中间纤维那样更紧凑. 中间纤维的分支也和成熟纤维一样有突起的尖端, 见图 5(b). 在纤维长距胶原纤维中有时也能观察到钝的尖端, 就像文献[7]提到的一样. 不管这些云母沉积物捕获的纤维尖端是真的稳定还是准稳定结构, 它们的表面都可被观察到.



Fig. 5 Structures observed during fibril maturation stage of FLS collagen fibrillogenesis

Contact mode AFM deflection images: typical later growth stage fibrils observed at pH 4.59 (a) ($2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$) and at pH 4.9 (b) ($10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$)

综上所述, 通过原子力显微镜法, 获得了胶原蛋白不同组装阶段的高分辨率图像. 在预组装和组装阶段, 借助原子力显微镜观察到了微纤维、原细纤维以及中间纤维这些稳定的中间体. 这些可

靠且分辨率高的图像为探测胶原蛋白的体外组装路径提供了很好的依据. 从而, 根据这些图像可以看到不同组装阶段的中间纤维结构的变化, 以及胶原蛋白是如何进行组装的.

REFERENCES

- 1 Friess W, Schlapp M. *Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2001, 51: 259 ~ 265
- 2 Holmes D F, Graham H K, Trotter J A. *Micro*, 2001, 32: 273 ~ 285
- 3 Copere V M De, Rouxhet P G. *Surface Science*, 2001, 49(3): 395 ~ 404
- 4 Dufrene Y F, Machal T G, Rouxhet P G. *Applied Surface Science*, 1999, 144-145: 638 ~ 643
- 5 Chicon R, Ortuno M, Abellan J. *Surf Sci*, 1987, 181: 107 ~ 111
- 6 Keller D. *Surf Sci*, 1991, 253: 353 ~ 364
- 7 Gale M, Pollanen M S, Markiewicz P, Goh M C. *Biophys J*, 1995, 68: 2124 ~ 2128
- 8 Goh M C, Paige M F, Gale M A, Yadegari I, Edirisinghe M, Strzelczyk J. *Physica A*, 1997, 239: 95 ~ 102

9 Paige M F, Rainey J K, Goh M C. *Biophys J*, 1998, 74:3211 ~ 3216

10 Paige M F, Rainey J K, Goh M C. *Micro*, 2001, 32:341 ~ 353

OBSERVATION OF COLLAGEN ASSEMBLY PROCESS BY USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY

ZHANG Xiaoyan^{1,2}, FAN Xiaodong¹, GAO Xin², BAI Haitao², LI Yan²

(¹ Dept of Chemical Engineering, Northwest Polytechnic University, Xi'an 710072)

(² College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069)

Abstract The assembly process of a particular collagen, the fibrous long spacing collagen formed by adding α_1 -acid glycoprotein, was studied in detail. The pH of the mixture of collagen and α_1 -acid glycoprotein was changed by dialysis. In each pH stage, stable intermediate structures were resolved by atomic force microscopy (AFM). The reliable and high-resolution images were obtained. The intermediate morphologies and diameters in every stage are observed by correlation the fibril diameters with length-wise growth in native type fibrils and by comparing the diameters and their morphologies of segmental long spacing collagen crystallites. These experimental studies demonstrated clearly the existence of intermediates in the formation process of fibrous long spacing collagens.

Key words Atomic force microscopy, Collagen, Assembly, Morphology, Image