

## 研究快报

## 人工操纵病毒的原子力显微镜研究\*

胡 钧<sup>1)</sup> 张志鸿

(复旦大学生理学和生物物理学系, 上海 200433)

欧阳振乾 陈圣福 李民乾

(中国科学院上海原子核研究所, 上海 201800)

**摘要** 人工操纵生物大分子是目前科学研究的一个前沿领域, 我们利用改进的“分子梳”方法, 首次实现了复杂的体系——一种线性噬菌体病毒的人工拉直与定向. 这种操纵是在大面积平整的固体表面实现的, 并利用原子力显微镜对拉直前后的病毒进行了观察与测量.

**关键词** 分子操纵, 病毒, 原子力显微镜 (AFM)

**学科分类号** Q633

人工操纵原子、分子近几年成为科学研究的一个前沿领域. 原子、分子的人工操纵开始从简单的无机分子到有机分子, 目前已进入到生物大分子层次<sup>[1]</sup>. 对生物大分子的人工操纵, 难度较大, 但意义更为重要. 例如, 对 DNA 的人工操纵在近一二年内引起了生物物理界的广泛兴趣<sup>[2, 3]</sup>. 对生物大分子的人工操纵, 不仅可以导致生物大分子特性的新的信息的获得 (如 DNA 的弹性等<sup>[3]</sup>), 新的生物学方法出现 (如直接快速的基因作图<sup>[4]</sup>), 也为生物大分子的应用提供了更为广泛的前景 (如利用 DNA 研究长链状分子动力学构象与物理因素的相关性问题<sup>[5, 6]</sup>, 制作分子导线<sup>[7]</sup>等).

从发展趋势上看, 下一步研究的目标将是对更为复杂的超分子体系进行直接的人工操纵. 但是, 对比 DNA 更为复杂的分子体系的人工操纵难度更大, 更具有挑战性. 我们的前期工作已实现了对 DNA 分子的人工拉直操纵, 并可以把 DNA 排布成纳米尺度的二维网格<sup>[7, 8]</sup>. 在此基础上, 我们又开始进行了更复杂体系——病毒的人工操纵的研究, 本文将介绍我们人工操纵噬菌体病毒的初步尝试.

## 1 材料与方法

病毒样品采用野生型线性噬菌体 (fd-tet-

GOD1), 由上海生物化学研究所提供<sup>[9]</sup>. 野生型线性噬菌体 (fd-tet-GOD1) 先用缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L 巯基乙醇, 配成 pH 7.6) 稀释成浓度为每毫升 A<sub>260</sub> 值为 0.1~0.2. 然后用 10% 甘油溶液将其再稀释 1 000 倍用于作人工操纵及原子力显微镜 (AFM) 观测.

常规的 AFM 样品制备: 将一滴稀释后的样品溶液 (约 2  $\mu$ l) 滴在 APS 云母片<sup>[6]</sup>上, 用一小片封口膜将溶液缓慢展开, 等待约 1 min 后用重蒸水冲洗云母表面. 然后用 AFM 观测样品.

操纵方法采用改进的“分子梳”方法. 该方法可以实现 DNA 的拉直与排布. 其工作原理是利用流体对生物分子的拉力以及固体表面对生物分子的粘着力两者协同作用, 把 DNA 拉直, 具体方法参见文献 [6, 7]. 我们认为, 从原理上, 该方法也适合于线性病毒的操纵.

利用原子力显微镜 (AFM) 直接在纳米尺度上观察操纵. 本实验中所用原子力显微镜

\* 中国科学院九五重大项目 (KJ951-A01-603), 中国科学院生物科学与技术特别支持 (ST2-2-16) 和上海生命中心资助项目.

<sup>1)</sup> 中国科学院上海原子核研究所, 上海 201800.

收稿日期: 1997-10-13, 修回日期: 1997-12-28

是美国 DI 公司 (Digital Instrument, Santa Babara, California) Nano III 产品. AFM 在轻敲模式下工作, 整个系统处在空气中, 相对湿度约 40%, 室温.

## 2 结果与讨论

图 1 显示了采用常规自然沉积方法制备的野生型线性噬菌体 (fd-tet-GOD1) 样品, 可

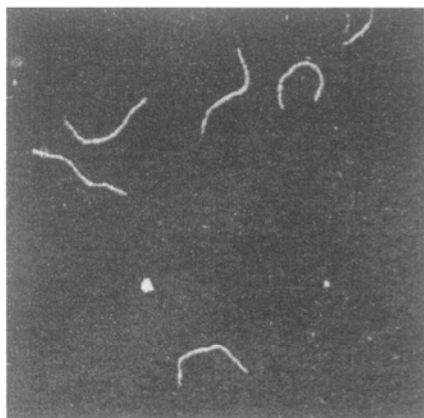


图 1 野生型线性噬菌体 (fd-tet-GOD1) 的 AFM 图象

样品采用常规的沉积吸附干燥制样法, 衬底是经过 APS 修饰的云母表面. AFM 工作在轻敲模式, 扫描范围  $4.85\ \mu\text{m} \times 4.85\ \mu\text{m}$ . 可以看出, 噬菌体病毒在衬底表面呈自然弯曲状和随机取向.

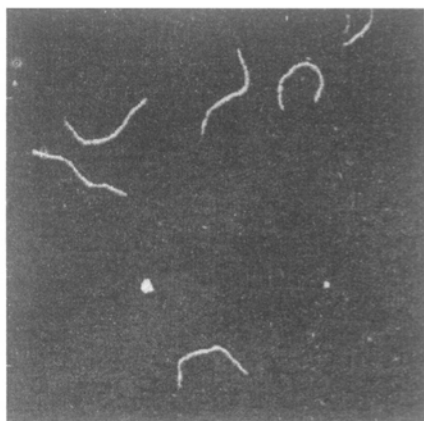


图 2 经过“分子梳”方法将野生型线性噬菌体 (fd-tet-GOD1) 拉直并定向在 APS 云母表面  
AFM 成象条件同图 1.

以看出, 噬菌体病毒在衬底表面呈随机取向, 病毒分子由于自身柔性, 呈各种弯曲状. 这里所用病毒分子长为  $1.2\ \mu\text{m}$ , 与预期结果及前人数据 (吴晓华. 博士学位论文“原子力显微镜在生物大分子结构研究中的应用”) 一致. 经过“分子梳”方法处理后, 结果由图 2 显示. 可以看出, 病毒都被拉直了, 除一端略有弯曲外, 并且有同一朝向, 但噬菌体的头尾还不能判别.

由于 APS 对生物大分子有很好的吸附力, 在制样过程中双蒸水冲洗时, 线性噬菌体已经被 APS 膜牢固地吸附在云母表面, 噬菌体不会发生移动, 所以仍能保持自然的吸附状态. 即表现为图 1 的结果. 在“分子梳”方法制样时, 线性噬菌体的端头首先接触到 APS 云母表面的机会很大, 这一端很快被固定在 APS 膜上. 另一端仍随水流运动, 因此可以迅速将它拉直. 所以, 对噬菌体的拉力可能会与噬菌体的本身长度, 噬菌体在液体中的形状以及水流的速度有关. 从 DNA 拉直的经验上看, 长度越短, 越难拉直. 一般 DNA 拉直操纵的 DNA 长度都在  $10\ \mu\text{m}$  以上. 由于我们的实验中采用的噬菌体样品较短 ( $1.2\ \mu\text{m}$ ), 拉伸力较小, 拉直应当很困难. 实验结果中病毒能拉直得这么好, 确实也出乎我们的意料.

在“分子梳”梳理过程中, 水流对病毒的拉力足以使病毒变直. 这种拉力会不会影响病毒的结构和功能, 是一个很有趣的问题. 我们详细测量并对比了病毒拉直前后的长度, 但在目前的测量误差范围内, 还不能肯定拉直的病毒分子长度是否有显著变化, 更精细的测量尚需进一步的研究. 至于对病毒各亚基的装配, 外壳蛋白和核酸的相互作用都直接影响到病毒对宿主细胞的感染过程, 因而研究经人工操纵后病毒的生物学功能是我们要继续探索的课题.

利用“分子梳”方法, 实现了野生型线性噬菌体 (fd-tet-GOD1) 病毒的人工拉直与定向, 并利用原子力显微镜进行了观察与测量.

致谢 本工作样品由中国科学院上海生物化学研究所提供, 在此表示衷心感谢.

参 考 文 献

1 Austin R H, Brody J P, Cox E C *et al.* Stretch genes. *Physics Today*, 1997, **50** (2): 32~ 38

2 Bensimon A, Simon A, Croquette C V *et al.* Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science*, 1994, **265** (5181): 2096~ 2098

3 Smith S B, Cui Y J, Bustamante C. Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 1996, **271** (5250): 795 ~ 798

4 Weier H-U G, Wang M, Mullikin J C *et al.* Quantitative DNA fiber mapping. *Human Molecular Genetics*, 1995, **4** (10): 1903~ 1910

5 Perkins T T, Smith D E, Chu S. Single polymer dynamics in an elongation flow. *Science*, 1997, **276**: 2016~ 2021

6 汪新文, 白春礼, 田 芳等. 原子力显微镜研究不同温度下质粒 DNA 结构变化. *生物物理学报*, 1996, **12** (4): 554~ 557

7 Oyang Z Q, Hu J, Chen S F *et al.* Molecular patterns by manipulating DNA molecules. *J Vac Sci & Tech (B)*, 1997, **15** (4): 1385~ 1387

8 Hu J, Wang M, Weier H-U G *et al.* Imaging of single extended DNA molecules on flat (aminopropyl) triethoxysil-

lane mica by atomic force microscopy. *Langmuir*, 1996, **12** (7): 1696~ 1700

**Atomic Force Microscopy Study of the Manipulation of Virus.** HU Jun, ZHANG Zhi-hong (*Department of Physiology and Biophysics, Fudan University, Shanghai 200433, China*); OU YANG Zhen-qian, CHEN Sherr-fu, LI Mir-qian (*Shanghai Institute of Nuclear Research, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China*).

**Abstract** Manipulation of macromolecules is becoming an interesting research subject both in physics and biology recently. Linear phage virus has been aligned in one direction on atomic flat surfaces by a special method named “molecular combing”. Atomic force microscopy was used to check the results. The related mechanism has been discussed.

**Key words** molecular manipulating, virus, atomic force microscopy (AFM)