

AFM 单分子力谱技术及其在活体细胞和菌体表面生物大分子研究中的最新进展*

于小婷¹⁾ 杨忠波²⁾ 王鑫艳³⁾ 汤明杰²⁾ 王占忠^{1)**} 王化斌^{2)**}

¹⁾ 天津大学化工学院, 天津 300072; ²⁾ 中国科学院重庆绿色智能技术研究院, 跨尺度制造技术重庆重点实验室, 重庆 400714;

³⁾ 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 国家蛋白质科学中心, 上海 200031

摘要 生命活动过程与生物分子内或生物分子间机械力的作用密不可分。原子力显微镜具有极高的力学分辨率, 可以在近生理条件下对生物样品进行力学测量, 是研究生物体系力学相互作用的理想工具。基于原子力显微镜的单分子力谱 (AFM-SMFS) 技术可以在单分子、单细胞水平测量生物分子内或生物分子间的相互作用。本文首先扼要介绍了 AFM-SMFS 技术, 包括 AFM-SMFS 的基本原理、力谱测量及分析方法(蠕虫链模型、自由连接链模型和自由旋转链模型)以及探针的化学修饰方法(硅/氮化硅探针和镀金探针的修饰); 重点介绍了利用 AFM-SMFS 技术对活体细胞表面蛋白(转化生长因子 β 1、CD20、热休克蛋白以及蛋白酪氨酸激酶)和糖类分子(葡萄糖和甘露糖)的近期研究进展; 随后介绍了利用 AFM-SMFS 技术对活菌体表面蛋白(肝素结合血凝黏附素和 Als5p 黏附蛋白)和糖类分子(半乳糖、甘露糖、B 族碳水化合物、荚膜多糖、 α -甘露聚糖、 β -甘露聚糖、 β -葡聚糖以及几丁质)的近期研究进展; 最后对 AFM-SMFS 技术的缺点和发展前景进行了总结和展望。

关键词 原子力显微镜, 单分子力谱, 生物大分子, 细胞, 细菌, 真菌

学科分类号 Q6, Q2, Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0204

生物大分子(如 DNA、RNA、糖类及蛋白质等)具有重要的生物学功能, 在遗传、生长、发育、进化及病变等许多重大生命活动中都发挥着不可替代的作用。生物大分子的化学特性和这些分子之间如何协同组装成生物大分子复合物和细胞亚结构, 及其在细胞物质与能量代谢过程中的功能是分子细胞科学研究的基本问题。因此, 研究生物大分子的相互作用, 有利于深入地理解生命过程, 更清楚地认识生命本质, 在学术和应用方面都具有非常重要的意义。

从物理学的角度, 生物分子内及分子间的相互作用, 如生物分子内部结构的变化及分子间相互识别作用都可以用力学来定性和定量研究。单分子水平上的探测手段是研究上述作用力的必然要求。随着科学研究的深入, 目前已发展出多种单分子检测技术, 如基于原子力显微镜 (atomic force spectroscopy, AFM) 的单分子力谱 (single molecule force spectroscopy, SMFS) 技术^[1-2]、光学镊子 (optical

tweezers) 技术^[3]、磁镊 (magnetic tweezers) 技术^[4] 等。上述几种单分子检测技术具有不同的力学分辨能力和力学动态测量范围, 故适用于不同的研究对象 (表 1)^[5-6]。光学镊子是通过利用光陷阱捕获微米级小球并对其操纵的一种先进技术。利用光学镊子进行单分子力谱研究的基本原理是: 将生物分子一端固定在基底上, 将另一端黏附在经修饰的微球上, 而后驱动微球在 z - 方向上运动, 进一步根据小球受力及运动位移的关系得到生物分子的力学特性。

* 重庆市基础前沿项目 (cstc2013jcyjC00001), 中国科学院仪器装备项目 (生物大分子太赫兹成像光谱仪研制), 国家青年科学基金项目 (21407145), 重庆市应用开发项目 (cstc2013yykfC00007), 国家 973 项目 (2015CB755401) 和中国科学院重庆绿色智能技术研究院创新基金 (用于癌细胞检测的多功能近场太赫兹显微镜研制) 资助。

** 通讯联系人。

王占忠. Tel: 022-27400291, E-mail: wzz7698@tju.edu.cn

王化斌. Tel: 023-65935795, E-mail: wanghuabin@cigit.ac.cn

收稿日期: 2015-09-20, 接受日期: 2015-11-02

该技术的主要不足之处在于: a. 在测量时, 光束一定程度上会对生物样品造成光损伤和热损伤; b. 光陷阱在捕获微球时具有非特异性, 任何物体都有可能被捕获, 并且任何对光造成的干扰都会影响光陷阱的稳定性, 因此, 要求待测生物样品具有非常高的纯度和非常低的浓度^[6]. 利用磁镊进行单分子力谱研究的基本原理是: 磁场作用于一个磁性微球, 将生物分子一端固定在基底上, 另一端黏附在经修饰的磁性微球上, 而后驱动磁性微球在 z 方向上运动或在 $x-y$ 平面内扭转, 进一步根据磁性微球受力及运动位置变化的关系得到生物分子的力学特性. 磁镊的主要技术缺点在于: 在测量过程中对

磁性微球的位移检测是通过相机拍照实现的, 因此, 对磁性微球位置检测的精准性和实时性受到相机的像素和响应时间的限制^[7]. 除上述缺点之外, 由于光镊和磁镊能够稳定检测的最大作用力一般约为 100 pN, 因此, 这两种单分子操纵技术难以用来探测亲和力比较强的单分子对以及共价键断裂等生物过程. 在生化检测方面, 虽然免疫分析法(包括放射免疫分析法及荧光免疫分析等)可以对待测生物分子进行定量分析, 但是却无法揭示生物单分子对间相互作用及解离的动态过程. 因此, 研发 AFM-SMFS 技术是其他单分子操纵技术及生化检测手段的有力补充.

Table 1 A comparison of three important single molecule detection methods^[5-6]

表 1 对比三种重要的单分子探测方法^[5-6]

方法	力学分辨能力 /pN	动态测量范围	典型应用
原子力显微镜	>1	$\geq 1 \mu\text{s}$	DNA, 蛋白质, 多糖, 高分子聚合物
光镊	0.1~100	$\geq 10 \text{ms}$	肌动蛋白, DNA, RNA, 蛋白质, 分子马达
磁镊	0.01~100	$\geq 1 \text{s}$	DNA 分子的拉伸和扭转

AFM 是由 Binnig 等^[8]在 1986 年发明的, 由于它具有极高的成像分辨率(10^{-10}m)、力学分辨率(10^{-12}N)、可在生理溶液环境下工作等诸多优点, 因而在生物领域被广泛应用^[9-10]. 基于 AFM 的单分子力谱(AFM-SMFS)技术可在单分子或单细胞水平对生物大分子相互作用进行研究, 已成为研究生物大分子相互作用不可或缺的测量工具, 如测量 DNA^[11-12]、蛋白质^[13]和氨基酸^[14]分子的力学指纹谱、酶与底物^[15]以及抗原与抗体^[16]等之间特异性相互作用. 关于这些方面的研究已经有相关综述^[17]. 为了促进 AFM-SMFS 技术在前沿生物学领域研究中的应用, 本文主要总结和阐述了 AFM-SMFS 技术在活体细胞、细菌和真菌表面生物大分子检测方面的最前沿应用.

1 基于原子力显微镜单分子力谱技术

AFM-SMFS 技术是在 AFM 技术的基础上发展起来的, 它是定量探测分子内或分子间微小作用力的力学检测技术, 涉及到的技术主要包括: AFM 力学测量、AFM 探针的化学修饰(功能化)和应用适当物理模型对测得的力学曲线进行拟合分析.

1.1 基于原子力显微镜单分子力谱技术的基本原理

AFM(图 1a)的核心部件是 AFM 探针, 即: 一

个带有细小针尖(tip)的微悬臂(cantilever), 微悬臂实际上是一个微小的力传感器. AFM 的力学测量原理是: AFM 探针相对样品在 z 方向运动, 在该过程中探针针尖趋近样品、接触样品、挤压样品和趋离样品, 系统会自动记录微悬臂偏转量及压电陶瓷扫描管(piezo tube)在 z 方向上的位移; 根据胡克定律可以计算出针尖与样品之间的作用力 $F=-k \cdot m$ (k 为微悬臂的弹性系数, m 为微悬臂的偏转量); 将受力与扫描管位置变化绘图(图 1b)即可得到力-扫描管位置变化曲线(包括趋近曲线(approach curve)和回退曲线(retraction curve)), 简称力曲线. 力曲线的具体物理意义为: a. 在 AFM 探针趋近样品但未与样品接触的过程中, AFM 探针与样品之间没有作用力, 故探针受力为零, 微悬臂未发生偏转, 此过程在力曲线上表现为一条水平基线(图 1b, 过程 1); b. 当探针针尖接触样品后并对样品进行挤压的过程中, 微悬臂受到样品的排斥作用力而发生向上偏转, 直至达到偏转阈值, 此过程在力曲线上表现为排斥力逐渐增大(图 1b, 过程 2); c. 微悬臂达到偏转阈值后, 探针开始逐渐趋离样品, 由于微悬臂仍受到排斥力, 所以该过程在力曲线上表现为排斥力逐渐减小(图 1b, 过程 3); d. 当微悬臂向上的偏转量减小为零后, 探针与样

品之间的作用力由排斥力(正值)变为黏滞力(负值),此时微悬臂向下偏转直到克服最大黏滞力而脱离样品表面后偏转恢复为零,该过程在力曲线上表现为向下的峰(图 1b, 过程 4); e. 由于针尖已完全脱离样品, 探针与样品之间没有作用力, 在探针进一

步回退过程中微悬臂受力为零, 该过程在力曲线上表现为一条水平基线(图 1b, 过程 5). 通过对该完整力曲线进行校正和模型分析, 可以得到样品的压弹性和黏弹性等一系列力学特性^[18-20].

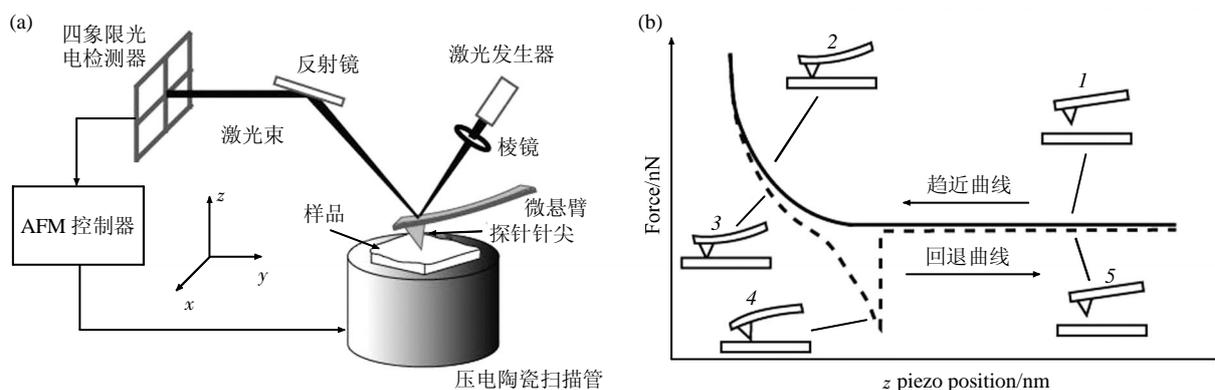


Fig. 1 Schematic diagrams of atomic force microscopy (a) and approach and retraction curves of force vs piezo position/displacement in the z direction (b). PSPD in (a) represents position-sensitive photodetector

图 1 原子力显微镜的原理及力-扫描管位置变化曲线示意图

(a) 原子力显微镜的原理示意图, 图中 PSPD 代表位置灵敏光电检测器. (b) 原子力显微镜力-扫描管位置变化曲线示意图, 包括趋近力曲线(实线)和回退力曲线(虚线).

AFM-SMFS^[21-22]是对回退曲线(力-扫描管位置变化曲线)进行深入分析而得到关于生物大分子本身拉伸特性或与其他分子/物质作用力特性的一种力学分析方法(图 2). 首先对回退曲线进行校正, 从扫描管本身位移(d)去除微悬臂本身的向下偏转量(Δ), 得到针尖在 z 方向上实际运动的距离(R) (图 2a). 然后绘制微悬臂受力 F 与探针末端的位移

R 的关系图, 便可得到力-距离曲线/拉伸力曲线(图 2b). 利用物理模型, 如蠕虫链模型、自由连接链模型以及自由旋转链模型等对拉伸力曲线进行拟合分析, 可得到目标分子本身拉伸的生物物理学性质, 对拉伸力曲线中的解离峰进行分析, 得到相应的解离力, 从而得到生物大分子对之间的特异性相互作用方面信息.

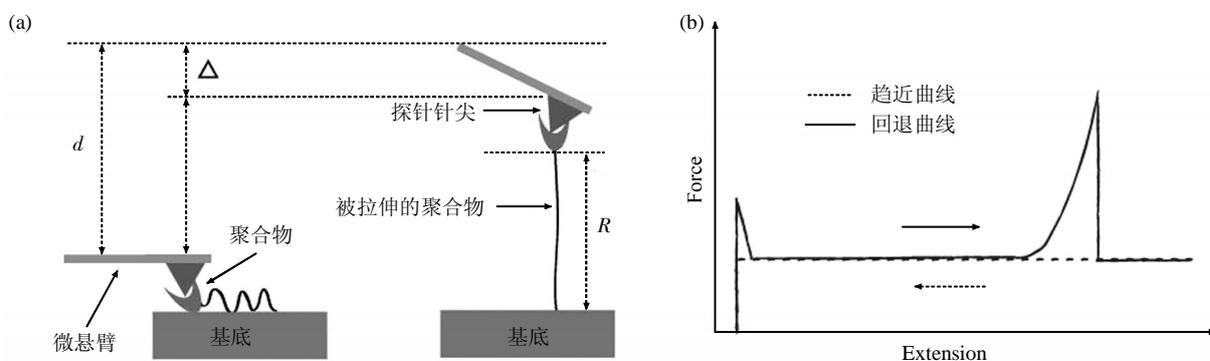


Fig. 2 Schematic diagrams of stretching a polymer on a substrate (a) and the recorded force curve simultaneously (b), using AFM-SMFS

图 2 基于原子力显微镜的单分子力谱(AFM-SMFS)技术拉伸聚合物的示意图

(a) 受力机理分析图. 其中 d 为微悬臂基座或扫描管在 z 方向的抬升位移; Δ 为微悬臂向下偏转的距离; R 为探针针尖末端与衬底表面之间的距离(被拉伸聚合物分子段的末端距). (b) 单分子力谱示意图.

1.2 生物大分子力谱测量及分析方法

在 AFM-SMFS 中, 有两种基本测量体系: 一种是对单个生物大分子本身进行拉伸, 即将生物大分子的一端固定在针尖上, 将其另一端固定在其他表面(如将其固定在修饰的基底上或天然连接在细胞表面), 然后利用 AFM-SMFS 技术对其本身的性质进行拉伸研究, 如 DNA 分子力学指纹谱的测量^[23]; 另一种是对相互作用的一对生物大分子进行拉伸, 即将其中一个生物大分子的一端固定在针尖上, 而让其另一端与其他生物分子进行识别反应, 然后对其拉伸, 从而得到该分子对之间的作用特性, 如生物素与亲和素的相互作用力可以通过该技术进行测量^[24].

对生物大分子本身的弹性力学性质可以选择合适的理论模型(图 3), 如蠕虫链模型(worm-like chain, WLC)^[25](公式 1)、自由连接链模型(freely jointed chain, FJC)^[26-27](公式 2)或自由旋转链模型(freely rotating chain, FRC)^[27-28](公式 3)等, 对力曲线进行拟合得到拟合参数如分子的本身长度、拉伸长度和机械特性等. 生物大分子的机械特性参数主要是持续长度(l_p , 蠕虫链模型)、库恩长度(l_k , 自由

连接链模型)或旋转单位长度(l_b , 自由旋转链模型).

$$F \frac{l_p}{k_B \cdot T} = \frac{R}{L[F]} + \frac{1}{4(1-R/L[F])^2} - \frac{1}{4} \quad (1)$$

$$R = L[F] \cdot \left[\coth \left(\frac{F \cdot l_k}{k_B \cdot T} \right) - \frac{k_B \cdot T}{F \cdot l_k} \right] \quad (2)$$

$$R = L[F] \cdot \left[1 - \frac{k_B \cdot T}{2F \cdot l_b} \right] \quad (3)$$

(1)(2)(3)式中, R 为在回复力 F 作用下单个高分子的末端距, $L[F]$ 为高分子的伸直长度, k_B 为波尔兹曼常数, T 为温度. 其中 $L[F]$ 、 l_p 、 l_k 及 l_b 是模型拟合的自由参数, l_k 和 l_p 分别对应于图 3b 和图 3c 中的 l 值. School 等^[11]利用 FJC 模型拟合分析了单链核酸(DNA 和 RNA)过渡转变(overstretch transition)的力学指纹谱. Cui 等^[27]利用 FRC 和 FJC 模型拟合分析了单链 DNA 的黏弹性. Cheng 等^[29]利用 WLC 模型拟合分析了串联的蛋白结构域(I27₈)在磷酸缓冲液中结构域的解折叠过程. Lv 等^[30]利用 WLC 模型拟合分析了串联的蛋白质结构域(GB1-G6)₄ 在 Tris-HCl 缓冲液中有无 Ca^{2+} 存在的状态下 G6(凝溶胶蛋白)的解折叠变化情况.

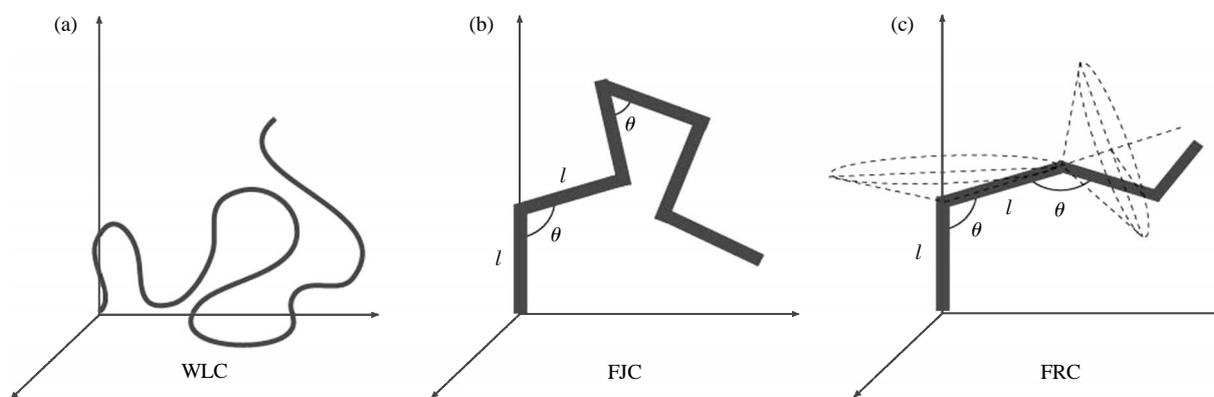


Fig. 3 Schematic diagrams of (a) the worm-like chain model (WLC), (b) the freely jointed chain model (FJC), and (c) the freely rotating chain model (FRC)

图 3 拉伸力曲线拟合的理论模型

(a) 蠕虫链模型; (b) 自由连接链模型; (c) 自由旋转链模型示意图. 蠕虫链模型是具有恒定弯曲弹性且无微观结构的半柔性均质线链; 自由连接链模型的键长 l 固定, 键角 θ 任意, 键在任何方向上取向几率相等; 自由旋转链模型的键长 l 固定, 键角 θ 固定, 键可以在键角允许的范围内自由旋转.

通过对实验所得拉伸力曲线模型拟合可得到分子内或分子间的生物物理信息. 如利用蠕虫链模型(WLC)拟合分析单个串联重复序列的肌联蛋白解折叠力曲线^[31]可以得到肌联蛋白各个结构域展开的轮廓长度和相应的持续长度等信息(图 4a), 用该模型

拟合相互作用的单分子对链霉亲和素与生物素标记的 G-四链体 DNA 相互作用的拉伸力曲线^[32], 可以得到 G-四链体 DNA 伸展开的轮廓长度及相应的持续长度等信息(图 4b).

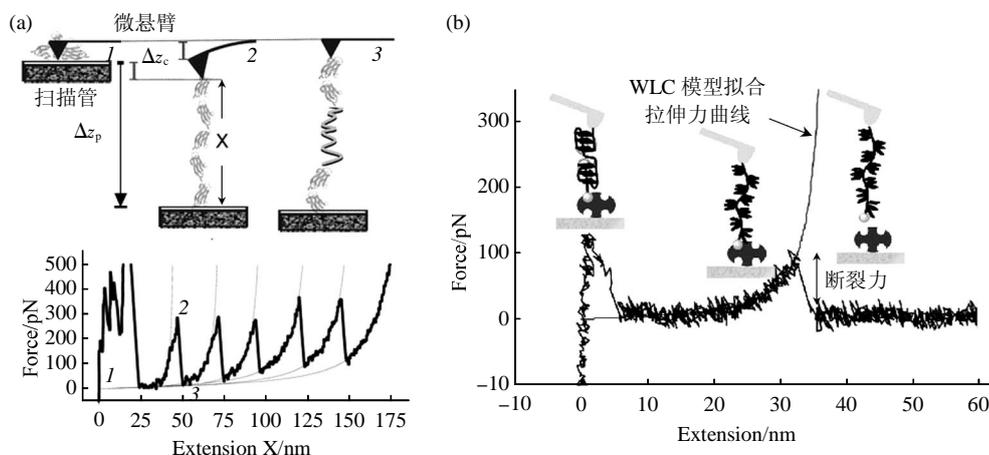


Fig. 4 The analysis of stretching force curves using the WLC model^[31-32]

图 4 利用理论模型对单个生物大分子和相互作用的一对生物大分子的拉伸力曲线进行拟合分析^[31-32]

(a) 利用蠕虫链模型拟合分析串联重复序列的肌联蛋白的解折叠力曲线；(b) 利用蠕虫链模型拟合分析生物素标记的单分子 G-四链体 DNA 与链霉亲和素相互作用的拉伸力曲线。

1.3 AFM 探针的功能化修饰

在 AFM-SMFS 实验中，许多情况下需要对 AFM 探针针尖进行适当的化学修饰。针尖化学修饰的方法有多种，其中比较常用的修饰方法是商品化的硅或氮化硅探针经化学处理(如食人鱼洗液(98% H₂SO₄: 30% H₂O₂=7: 3)清洗)使其表面暴露出大量硅羟基(—Si—OH)，再对探针表面硅羟基进一步硅烷化、醚化或氢硅化等，或者直接将镀金针尖进行巯基化处理。经上述处理后的探针进一步与交联剂(如聚乙二醇)连接，最终可以实现将具有或修饰上对应基团的生物大分子连接到探针表面。

1.3.1 硅探针的化学修饰

硅探针的化学修饰方法主要包括三种，即探针的硅烷化、醚化和氢硅化。a. 探针的硅烷化是探针化学修饰的主要方法之一，此方法基于探针表面活化的硅羟基与硅烷化试剂(如 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES)、3-氨基丙基二甲基甲氧基硅烷(3-aminopropyldimethylmethoxysilane, APS))反应，在针尖表面形成含有所需化学基团的有机单分子层^[33-34](图 5a)。b. 探针的醚化是利用醇类(通常是乙醇胺)与探针表面活化的羟基(—OH)反应，形成末端含有氨基(—NH₂)的有机单分子层^[34](图 5b)。c. 在探针的氢硅化中，首先对探针表面用 1% 的氢氟酸(HF)处理形成氢化的硅表面，然后利用氢化表

面与烯烃加成反应，通过 Si—C 共价键将有机分子连接到针尖表面^[35](图 5c)。

1.3.2 镀金探针的化学修饰

比较常用的镀金层探针的化学修饰方法，是镀金探针表面与烷硫醇的巯基通过金硫键之间的强非特异性相互作用，形成稳定的自组装单分子层^[33, 36]。通常采用热蒸镀的方法在针尖表面镀金：首先在硅针尖表面热蒸镀一层厚度为 3~5 nm 起黏附作用的铬层，随后镀一层厚度为 15~100 nm 的金层^[36-37]。为了控制针尖表面目标分子的密度，可以通过将目标烷硫醇与其他烷硫醇按一定比例混合后在镀金针尖表面形成混合型自组装单分子层^[38-39]。

1.3.3 功能化探针表面修饰生物大分子

氨基化的探针表面可与交联剂如 NHS-PEG-M (PEG 为聚乙二醇，M 代表各种化学基团，如 MAL、NHS、aldehyde 及 acetal 等)的 NHS(N-羟基丁二酰亚胺)基团(图 6a)^[16, 40-41]、戊二醛的醛基(—CHO)(图 6b)等连接^[42-43]；巯基化的探针表面可与交联剂如 MAL-PEG-M 的 MAL(马来酰胺)基团连接^[44-45](图 6c)；镀金探针可与烷硫醇的巯基连接^[32](图 6d)，再进一步与交联剂(如 MAL-PEG-M)连接。若生物大分子本身或经修饰后在其表面含有可与上述经修饰的化学分子自由端的化学基团反应，则可将生物大分子连接在探针上，如 P-factor 表面暴露的巯基基团可直接与 NHS-PEG-MAL 的 MAL

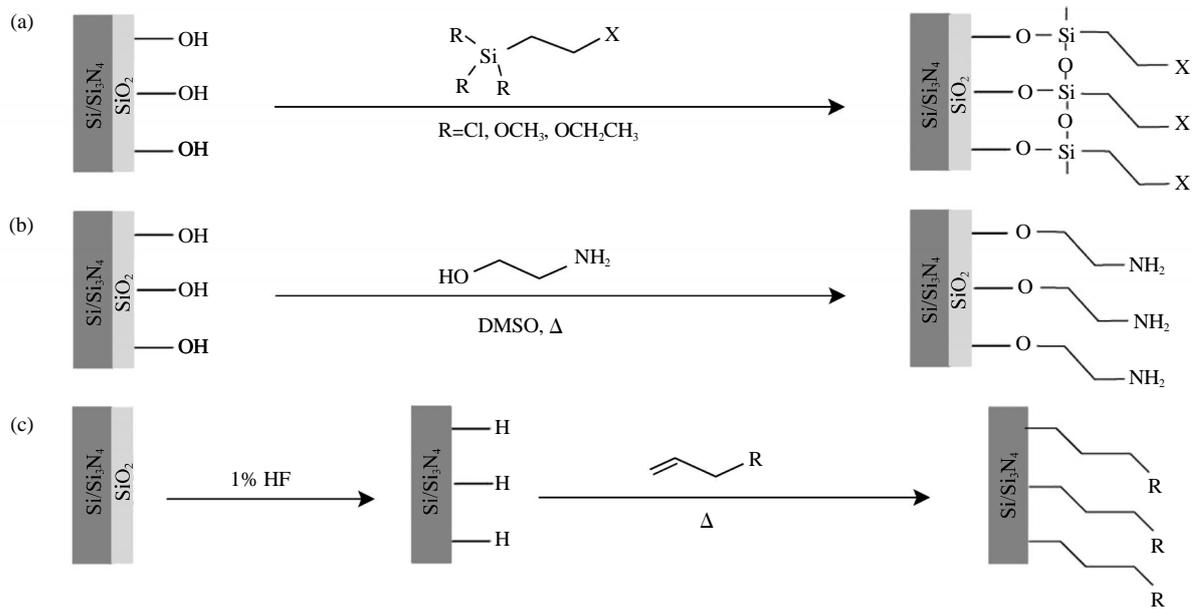


Fig. 5 Chemical modifications of the surface of silicon or nitride silicon AFM tips

图 5 硅或氮化硅探针的化学修饰

(a) 硅烷化. (b) 醚化. (c) 硅烷化. 其中, X 代表 NH₂、SH 和 COOH 等化学基团或者其他化学物质; R 代表烃类衍生物.

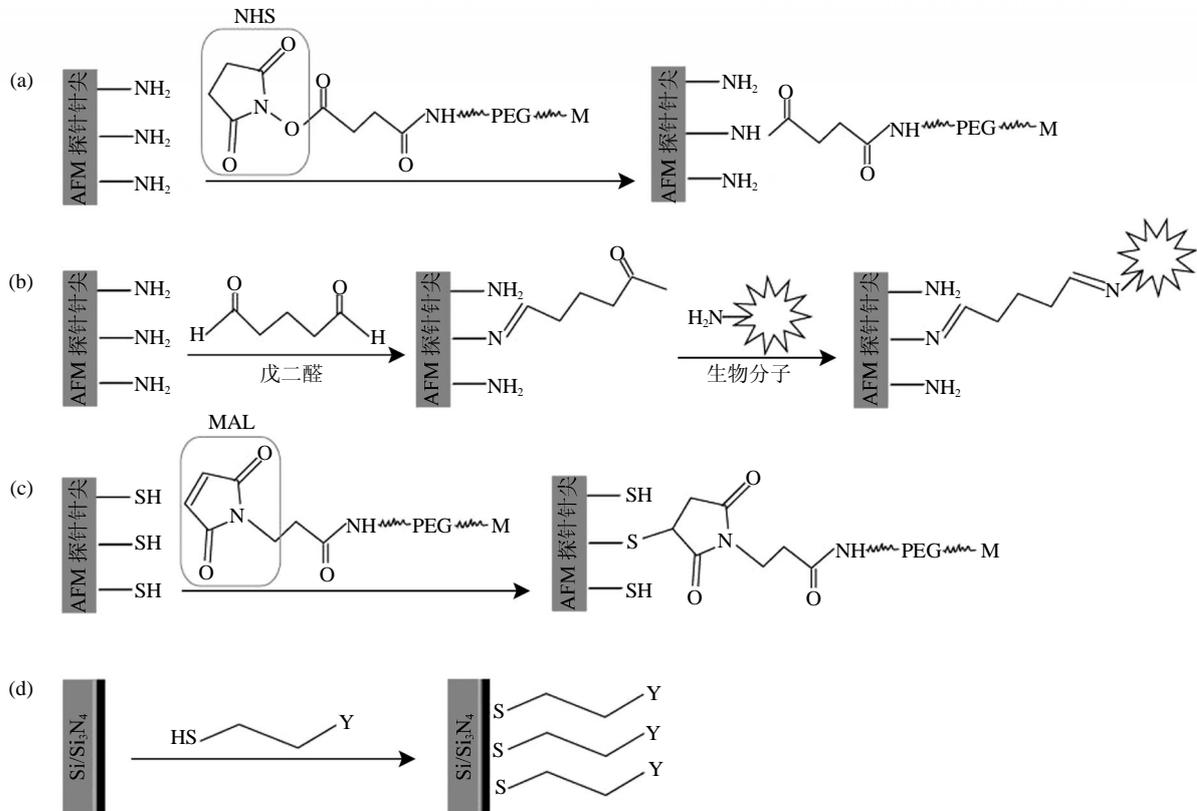


Fig. 6 Coupling reactions between the surface of functionalized AFM tips and chemical groups

图 6 功能化探针与不同化学基团的耦合反应

(a) 氨基与 N-羟基丁二酰亚胺(NHS)的耦合反应. (b) 氨基与醛基的耦合反应. (c) 巯基与马来酰氨(MAL)的耦合反应. (d) 金镀层与烷硫醇形成的自组装单分子层. 其中, M 代表 MAL、NHS、aldehyde 及 acetal 等; Y 代表 HS、OH 及 COOH 等.

基团相连^[41](图 6c); 酶或抗体等蛋白表面暴露的氨基基团可直接与戊二醛的醛基^[42]或 NHS-PEG-aldehyde 中的 aldehyde 基团^[34](图 6b)、MAL-PEG-NHS 中的 MAL 基团^[16, 46]连接等. 若所连生物大分子表面不含有相应连接基团, 可对生物大分子进行适当的化学修饰, 如对 dsDNA 的 5' 端进行巯基化、氨基化及生物素化等^[47-48]修饰, 然后将其连接到功能化(修饰)的 AFM 针尖上.

2 利用单分子力谱技术对活细胞表面蛋白质分子和多糖分子的研究

近年来, AFM-SMFS 技术在活体细胞表面生物大分子的研究和应用方面已成为国际研究的新热点, 具有很广阔的发展前景^[49]. 该技术为探测各类型细胞表层分子的功能和特性提供了新思路和新方法: 可以很直观地了解目标分子与特异性结合分子相互作用的力学信息, 深入了解所需探测的目标分子在活体细胞表面的分布情况及外界环境刺激下的变化情况. 这些研究对于深入了解细胞表面分子的生物化学特性以及这些表面分子对细胞内部信号通路的功能具有重要意义.

细胞是生物体基本的结构和功能单位, 细胞膜表面分布着多种特异性结合位点, 因此涉及复杂的生物大分子间相互作用, 如膜表面受体蛋白与相应配体、碳水化合物与外源凝集素、抗体与抗原及细胞黏附分子与胞外基质等. 这些物质之间的相互作用对细胞内外物质运输及信号传导具有重要的作用^[49].

2.1 利用单分子力谱技术对细胞表面蛋白质分子的研究

AFM-SMFS 可以在生理条件下对活细胞表面受体 / 配体以及抗原 / 抗体的特异性作用位点实现实时原位的探测, 使人们深入了解细胞表面生物分子的生理功能. 在过去的几年里, AFM-SMFS 技术在细胞表面生物分子相互作用及诱导相关生理过程的研究取得了重大突破. 下面以几个典型的例子介绍单分子力谱技术在活细胞表面生物大分子研究方面的重要进展.

首先, AFM-SMFS 技术在机体免疫调节、细胞增殖分化和凋亡等重要的生理过程中起着重要作用的转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$), 与其受体相互作用方面的研究取得了突破性进展. TGF- $\beta 1$ 的受体 I (T β R I) 和受体 II (T β R II) 是定位于细胞膜表面的跨膜蛋白. 在活细

胞信号转导中 TGF- $\beta 1$ 与 T β R I / T β R II 之间的特异性相互作用方面已有研究表明^[50]: TGF- $\beta 1$ 不能单独与 T β R I 结合; TGF- $\beta 1$ 虽然可以单独与 T β R II 结合, 但是 T β R II 的信号转导却依赖 T β R I. 因此, TGF- $\beta 1$ 通过招募并结合 T β R I 和 T β R II 两种受体实现信号转导. Yu 等^[45]首次从生物物理学角度考虑, 利用 AFM-SMFS 技术对活细胞信号转导中 TGF- $\beta 1$ 与 T β R I / T β R II 之间特异性相互作用机制进行了探讨和分析(图 7). 通过 AFM 与荧光显微镜(fluorescence microscope)联用, 利用荧光标记的方法, 将修饰 TGF- $\beta 1$ 的 AFM 探针分别对仅表达绿色荧光标记的 TGF- $\beta 2$ 型受体(T β R II -GFP)的 HEK293A 细胞(人胚胎肾细胞)和同时表达绿色荧光标记的 TGF- $\beta 1$ 型受体(T β R I -GFP)和红色荧光标记的 TGF- $\beta 2$ (T β R II -RFP)型受体的 HEK293A 细胞进行 AFM-SMFS 探测. 结果表明, 当细胞同时表达两种受体时, TGF- $\beta 1$ 与 T β R I / T β R II 之间的作用力明显高于细胞只表达 T β R II 时 TGF- $\beta 1$ 与 T β R II 之间的作用力, 即 T β R I 的表达会提高 TGF- $\beta 1$ /T β R II 复合物的稳定性, 使细胞中信号更有利于转导. 由此可见, 利用 AFM-SMFS 技术可以在单分子水平来定量和定性研究抗体与受体的识别反应, 为深入研究活体细胞信号转导机制提供了新途径和新方法.

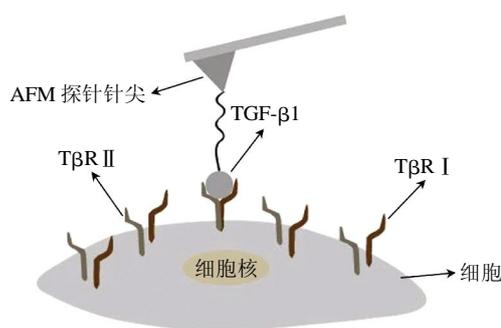


Fig. 7 Schematic diagram of measuring the interaction between TGF- $\beta 1$ and its receptor T β R I / T β R II on living cell surface using AFM-SMFS^[40]

图 7 利用基于原子力显微镜单分子力谱(AFM-SMFS)技术在活体细胞测量转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)及其受体 T β R I / T β R II 的相互作用示意图^[40]

其次, 在抗体与抗原相互作用研究方面, AFM-SMFS 技术也起着非常重要的作用. CD20 是一种在 B 淋巴细胞中大量表达的跨膜蛋白, 是 B 淋巴细胞表面的标识物; 而利妥昔单抗(Rituximab)

是一种嵌合的单克隆抗体药物, 它的作用靶点为 CD20. 体外实验表明, 当 Rituximab 与纵贯 B 淋巴细胞膜的 CD20 结合时, 会引发 B 淋巴细胞溶解的免疫反应. Li 等^[46]利用 AFM-SMFS 技术并结合荧光染色的方法首次探测了淋巴瘤病人 B 细胞膜上的 CD20 与抗肿瘤药物 Rituximab 之间的相互作用. 通过对病理细胞进行固定和利用荧光染色的方法识别出癌细胞, 而后将 Rituximab 连接在 AFM 探针针尖上, 应用 AFM-SMFS 技术探测到病理癌细胞表面的 CD20 与 Rituximab 之间相互作用力主要集中在 110~140 pN 范围内. 此研究结果加深了人们对淋巴瘤病理细胞 CD20 与 Rituximab 的作用在定量性质方面的认识, 为深入研究药物/受体的分子作用机理提供了技术思路和实验方法. 已有研究表明, 在抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用

(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)中, Rituximab 的抗原结合片段 (fragment antigen binding, Fab)先与淋巴瘤细胞表面的 CD20 结合, 随后, 抗体的结晶片段 (crystalline fragment, Fc)再与自然杀伤 (natural killer, NK)细胞表面的结晶片段受体 (fragment crystallizable receptor, FcR)结合, 在这种状态下 NK 细胞会释放溶解癌细胞的穿孔蛋白和颗粒酶^[51](图 8a). 因此, ADCC 效应不仅取决于肿瘤细胞表达的 CD20 与抗癌药物 Rituximab 之间的相互作用, 也取决于 NK 细胞表达的 FcR 与 Rituximab 之间的相互作用. 为了从单分子水平深入了解多类型细胞的分子间相互作用, 该课题组从癌症患者骨髓活组织检查中分离出细胞(包括肿瘤细胞、NK 细胞、红细胞及白细胞等), 然后利用 AFM-SMFS 技术和荧光染色的方法探测在 ADCC

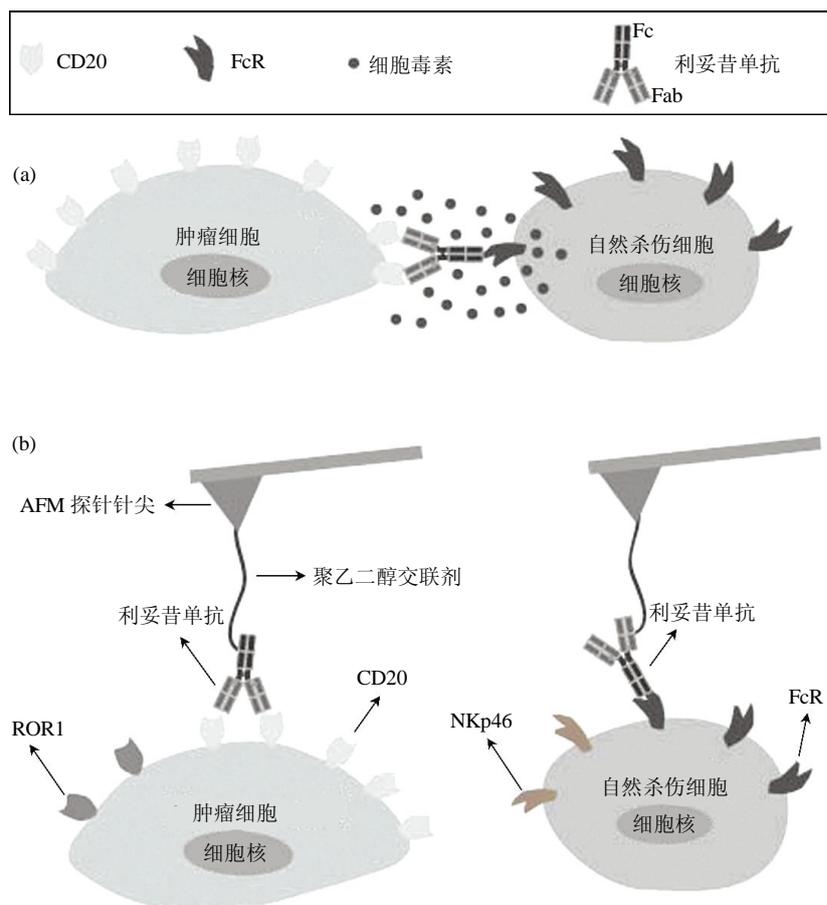


Fig. 8 Rituximab-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mechanism and two types of molecular recognition interactions using SMFS^[2]

图 8 Rituximab 诱导的抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用机制及利用单分子力谱 (AFM-SMFS) 技术的两种分子识别作用^[2]
(a) Rituximab 的抗原结合片段 Fab 先与淋巴瘤细胞表面的 CD20 结合, 随后 Rituximab 的结晶片段 Fc 再与 NK 细胞表面的 FcR 结合, 此状态下 NK 细胞会释放溶解癌细胞的穿孔蛋白和颗粒酶. (b) 在 Rituximab 诱导的抗体依赖细胞介导的细胞毒性过程中, 利用单分子力谱 (AFM-SMFS) 技术探测两种分子对 (CD20-Rituximab 和 FcR-Rituximab) 的识别作用, ROR1 是 B 淋巴瘤细胞表面的特异性荧光标识物, NKp46 是自然杀伤细胞表面的特异性荧光标识物.

过程中 CD20-Rituximab 和 FcR-Rituximab 两种分子对的亲和力以及 CD20、FcR 分别在淋巴瘤细胞和 NK 细胞表面的分布情况^[2](图 8b)。结果表明, CD20-Rituximab 的结合力明显大于 FcR-Rituximab 的结合力, 这与传统的放射免疫测定结果中 CD20-Rituximab 的结合常数明显大于 FcR-Rituximab 的结合常数相一致, 此实验结果为药物与靶细胞作用靶点相互作用的原位快速检测方法的发展提供了新的可能性。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)与其抗体的作用是另一个应用 AFM-SMFS 技术的重要例子。HSPs 是一种当细胞受到某些不利因素(如高热、缺血、缺氧、感染及化学物质等)刺激时, 可在短时间内大量合成的具有高度保守性的应激蛋白, 它在许多恶性细胞和组织中过度表达^[52]。HSPs 依据其分子质量(ku)命名, 如 HSP60、HSP70 及 HSP90 等。Pflster 等^[53]首次从生物物理学角度利用 AFM-SMFS 技术结合激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLMS), 研究了在热应激作用下人脐静脉内皮细胞(HUVECs)大量表达的 HSP60 与其单克隆抗体 Ab II -13 之间特异性相互作用。将 Ab II -13 连接到 AFM 针尖上, 然后分别对经热刺激的细胞和没有经热刺激的细胞进行力谱测量, 结果表明, 经热刺激的细胞表面 HSP60 与其抗体 Ab II -13 结合活性明显高于没有经热刺激的细胞, 并测得细胞表面 HSP60 与 Ab II -13 特异性相互作用力为(59±2) pN。同时, 通过力谱测量及荧光显微镜成像可知, 在热应激作用下, HUVECs 会表达大量的 HSP60, 这些 HSP60 主要分布于细胞表面。

除此之外, 利用 AFM-SMFS 技术对核酸适配体(aptamer)的研究也有所报道。核酸适配体是从体外筛选得到的一类寡聚 DNA 或 RNA 分子, 它的功能与抗体相似, 均能与配体高效、专一地结合, 同时具有抗体无法比拟的诸多优势, 如结合靶分子的范围广泛、核酸适配体的特异性和亲和力均比抗体高、分子质量小、体外合成简单、可进行多种化学修饰且无免疫原性等。它在生物和医药领域应用比较广泛的是对靶物质的检测与分析, 通过将荧光试剂等各种报告基团定点标记在核酸适配体上, 在一定条件下核酸适配体能够与靶物质发生相互作用, 通过检测报告基团的信号, 实现对靶物质的检测与分析。然而一些研究者质疑合成的核酸适配体是否能像天然抗体那样与相应配体牢固结合, 为了

解决这一问题, O'donoghue 等^[54]从生物物理学角度利用 AFM-SMFS 技术研究人宫颈癌细胞(HeLa cell)表面的 PTK7(蛋白酪氨酸激酶)与其适配体以及与其抗体之间的特异性相互作用, 测得 HeLa 细胞表面 PTK7 与其适配体 sgc8 之间的解离力大小为(46±26) pN, 与其抗体之间的解离力大小为(68±33) pN。通过此实验得知, PTK7 与其适配体 sgc8c 和抗体之间的解离力很相近, 且为适配体与其配体相互作用的检测提供了新方法, 为适配体的筛选和开发提供了定量研究的有效手段。

2.2 利用单分子力谱技术对细胞表面糖类分子的研究

碳水化合物在生物体中起着非常重要的作用, 可增强蛋白质分子的稳定性, 调节多种细胞活动, 在机体免疫防御、细胞增长、细胞间识别和黏附以及其他生物功能中起着基础性作用。碳水化合物的改变与多种病理过程密切相关, 如肿瘤转移、类风湿关节炎等。外源凝集素与碳水化合物之间的相互作用是糖生物学的基础, 外源凝集素可以与碳水化合物高特异性、高亲和力地结合, 比如麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)可与葡萄糖特异性结合, 何首乌凝集素(polygonum multiflorum lectin, PMA)可与甘露糖特异性结合。为了从生物物理学角度探讨外源凝集素与碳水化合物相互作用的力学机制, Zhao 等^[40]利用 AFM-SMFS 技术研究了正常细胞和癌细胞表面碳水化合物与外源凝集素之间的相互作用。通过将 WGA 和 PMA 分别连接到 AFM 针尖表面, 利用 AFM-SMFS 技术分别对比研究了 WGA 与犬肾细胞(MDCK cell)和人宫颈癌细胞表面葡萄糖(glucose)之间的相互作用, PMA 与 MDCK 细胞和 HeLa 细胞表面甘露糖(mannose)之间的相互作用, 同时, 研究了正常细胞和癌细胞表面碳水化合物 - 外源凝集素的结合动力学。结果表明, WGA 与葡萄糖之间的解离力在 HeLa 癌细胞中为(96±47) pN(加载速度: 4.5 nN/s), 在 MDCK 正常细胞中为(60±38) pN(加载速度: 1.7 nN/s); PMA 与甘露糖之间的解离力在 HeLa 癌细胞中为(61±16) pN(加载速度: 1.0 nN/s), 在 MDCK 正常细胞中为(146±29) pN(加载速度: 2.5 nN/s)。通过结合动力学绘制解离力与加载速度的曲线, 分析得到碳水化合物 - 外源凝集素复合物在癌症细胞中比在正常细胞中更不稳定。此研究结果为进一步研究其他碳水化合物 - 外源凝集素复合物的特异性相互作用提供了思路, 同时, 也有利于对肿瘤转移、扩增和侵袭

等过程进行深入研究.

3 利用单分子力谱技术对活菌体表面蛋白质和多糖分子的研究

细菌和真菌表面的黏附蛋白和多糖及糖类衍生物结构与功能均十分复杂, 它们参与菌体细胞多种生命活动过程, 如保护菌体免受外界不利环境条件的影响、介导菌体病原体与宿主细胞的相互作用、促进菌体在活体表面黏附及生物膜(biofilm)形成等. 近年来, 虽然对菌体表面蛋白质和糖类的化学结构和功能的研究已取得诸多成果, 但是在单分子水平对菌体表面蛋白质和糖类分子的黏附性以及结构特性的认识还知之甚少. 有幸的是, Dufrene 课题组利用 AFM-SMFS 技术在多种菌体表面的不同种类的蛋白质和糖类分子研究方面取得了突破性进展, 填补了菌体表面单个生物大分子研究方面的空白. 下面以几个典型的例子介绍 AFM-SMFS 技术对细菌和真菌表面蛋白质和糖类分子的近期研究进展.

3.1 利用单分子力谱技术对细菌表面蛋白质和糖类分子的研究

3.1.1 利用单分子力谱技术对细菌表面蛋白质分子的研究

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)是引起结核病的病原菌, 它可以侵染全身各组织器官, 以肺部结核感染尤为多见, 已受到人们的广泛关注. 而肝素结合血凝黏附素 (heparin-binding haemagglutinin adhesin, HBHA)是结核分枝杆菌的一种表面蛋白, 它作为结合分枝杆菌的重要致病因子和黏附因子, 在细菌侵染和黏附过程中起着重要作用. 虽然在识别和鉴定病原菌黏附性方面已取得诸多研究成果, 但由于缺少合适的探测技术, 黏附素与宿主细胞受体之间的相互作用力及黏附素在菌体表面的分布情况的研究还了解甚少. Dupres 等^[55]利用 AFM-SMFS 技术将肝素 (heparin)连接到探针上, 首次探测了结核杆菌表面的 HBHA 与肝素之间的黏附力大小, 并用力谱成像的方法探究了 HBHA 在菌体表面的纳米分布情况. 结果表明: HBHA 单体与肝素之间的结合力在 50 pN 左右, 对应的 117 pN 的作用力是肝素同时与 2 个单体 HBHA 分子或与 1 个二聚体 HBHA 分子发生分子间相互作用所致, 并且 HBHA 与肝素之间的黏附力及黏附频率在一定接触时间范围内随着作用时间的增加而逐渐递增, 说明接触时间的延长有利于

HBHA 与肝素分子构象发生适当改变达到最优结合状态. 同时, 通过特异性力学图谱可得知, HBHA 并不是均匀地分布于结核分枝杆菌的表面, 而是以非规则的纳米尺度的聚集态(nanodomain)形式分布于细菌表面.

3.1.2 利用单分子力谱技术对细菌表面多糖分子的研究

鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG)作为益生菌, 存在于胃肠道和泌尿生殖道中. 普遍猜测该细菌的健康效应的发挥与其黏附到上皮细胞表面以及黏液的能力密切相关. LGG 表面的多糖分子是其黏附功能发挥的一个重要因子. 但是对于 LGG 菌体表面多糖的分布、黏附性以及分子结构特性还了解不多, 故 Francius 等^[56]利用 AFM-SMFS 技术通过外源凝集素与菌体表面碳水化合物特异性结合的特性, 将相应的外源凝集素修饰到 AFM 针尖表面, 对野生型(wild-type)和衍生突变型(CMPG5413)的 LGG 菌株表面分布的半乳糖和甘露糖(也可能是葡萄糖)进行了力谱测量. 由于绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的外源凝集素(PA-I)可与半乳糖特异性结合, 外源凝集素伴刀豆球蛋白 A(lectin concanavalin A, ConA)可以与甘露糖(或葡萄糖)特异性结合, 故将 PA-I 和 ConA 分别连接到探针上, 分别对 LGG 菌体(包括野生型和突变型)表面的半乳糖和甘露糖(或葡萄糖)进行力谱测量. 结果表明, 对于野生型菌株和突变型菌株, 其菌体表面多糖(甘露糖和半乳糖)的黏附性、分子长度及多糖在菌体表面的空间分布密度都有很大差异: 在野生型菌株中, 菌体表面的甘露糖和半乳糖分布密度高、黏附性好且多糖分子长度长(半乳糖分子比甘露糖分子的长度更长); 与野生型菌株相比, 突变型菌体表面多糖的黏附性、多糖分子长度及菌体表面两种多糖分子的密度都大大降低(图 9).

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)又名 B 族链球菌(group B streptococcus, GBS), 它寄生于妇女生殖道内, 可引起女性泌尿生殖道感染以及诱发新生儿重症肺炎、脑膜炎、败血症和蜂窝织炎等疾病^[57]. 在无乳链球菌中, 荚膜多糖 (capsular polysaccharide, CPS)是主要的毒力因子; 而 B 族碳水化合物(group B carbohydrate, GBC)在 GBS 菌体表面肽聚糖的生物合成和细胞分裂中扮演着重要角色. 尽管 CPS 和 GBC 在 GBS 菌体中的作用均很重要, 但是对于这些含糖聚合物在菌体表面的分

布特性却鲜有报道. 故 Beaussart 等^[58]利用 AFM-SMFS 技术结合高分辨率的透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 分析了 CPS 和 GBC 在野生型(wild-type, WT)和两种突变型(GBC 缺失菌株 $\Delta gbcO$ 、CPS 缺失菌株 $\Delta cpsE$) GBS 菌体表面的纳米级分布情况. TEM 分析结果揭示了在 WT 菌体中, 肽聚糖被几纳米 GBC 薄层覆盖, 随后被 CPS 厚层(15~45 nm)所包被; AFM-SMFS 实验表明, CPS 均匀地分布于 WT 菌体表面, 但在 $\Delta cpsE$ 突变型菌体表面很难检测到

CPS, 而在 $\Delta gbcO$ 突变型菌体表面发现 CPS 过度表达. 此外, 利用特异性外源凝集素修饰的 AFM 针尖对 WT 和两种突变型菌株进行力谱成像表明, 对于 $\Delta cpsE$ 突变型菌株肽聚糖会暴露于菌体表面, 而对于 WT 菌株和 $\Delta gbcO$ 突变型菌株肽聚糖并未暴露于菌体表面. 由此表明, CPS 在 WT 菌株表面形成均相屏障避免底层肽聚糖暴露于环境中, 肽聚糖表面 GBC 的存在并不会妨碍利用特异性配体对肽聚糖的探测(图 10).

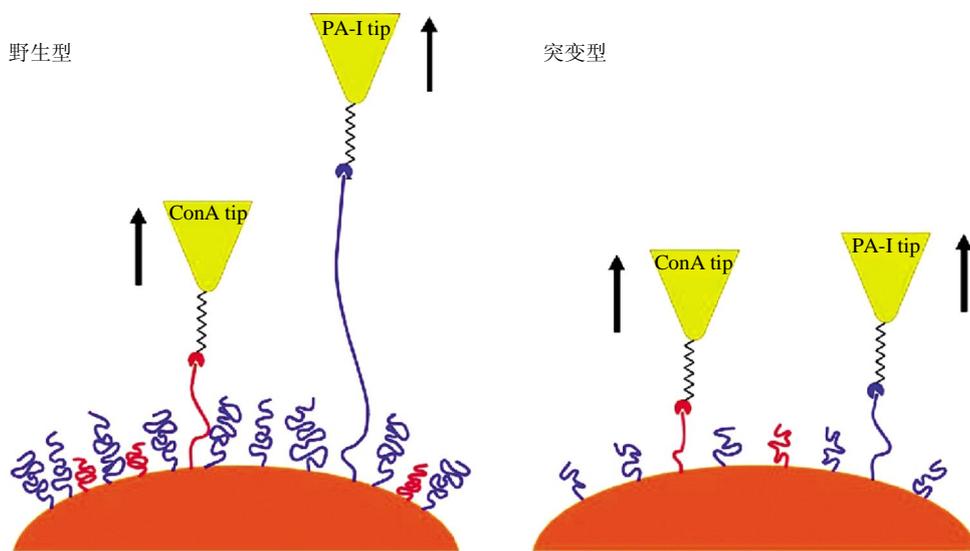


Fig. 9 Spatial organization and conformational properties of the different polysaccharide molecules detected on LGG using lectin concanavalin A(ConA) and the lectin from *Pseudomonas aeruginosa* (PA- I) terminated tips^[56]

图 9 利用外源凝集素伴刀豆球蛋白 A(ConA)和从绿脓假单胞菌中提取的外源凝集素(PA- I)修饰的 AFM 针尖对鼠李糖乳杆菌(LGG)表面不同多糖分子的空间分布及结构特性进行探测^[56]

在野生型鼠李糖乳杆菌表面(左图), 甘露糖和半乳糖分子数量比较多, 甘露糖分子具有中等的拉伸长度(红色), 半乳糖分子的拉伸长度更长(蓝色); 在突变型鼠李糖乳杆菌表面(右图), 两种多糖分子在鼠李糖乳杆菌表面的分布密度都很稀疏且分子长度都变短.

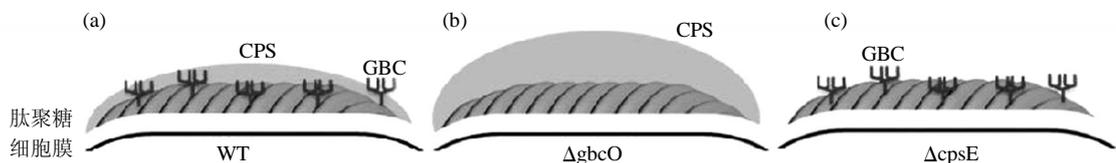


Fig. 10 Schematic diagrams of the wild-type and mutated *Streptococcus agalactiae* cell wall^[58]

图 10 野生型和突变型无乳链球菌菌体壁结构示意图^[58]

(a)野生型(WT). (b) $\Delta gbcO$ (突变型 B 族碳水化合物(GBC)缺失菌株). (c) $\Delta cpsE$ (突变型荚膜多糖(CPS)缺失菌株).

3.2 利用单分子力谱技术对真菌表面蛋白质和糖类分子的研究

3.2.1 利用单分子力谱技术对真菌表面蛋白质分子的研究

菌体与宿主相互接触并相互作用需要依赖菌体

表面的黏附蛋白, 深入理解黏附蛋白如何发挥黏附作用是细胞生物学中的一个重要问题. Alsteens 等^[59]利用 AFM-SMFS 技术对真菌表面 Als5p 黏附蛋白的特性做了探索性研究. 在 AFM-SMFS 实验中, 为了便于对菌体表面的 Als5p 蛋白进行探测, 首先

在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)表面表达出 N 端带有 V5 抗原表位(V5 epitope)的 Als5p 蛋白, 然后将可识别 V5 抗原表位及 Ig 结构域的 anti-V5 抗体(antibody)修饰在 AFM 针尖上(图 11). 从菌体表面黏附力图谱(adhesion force maps)中得知:

a. Als5p 蛋白均匀地分布于野生型菌体表面, 且无群集(cluster)现象产生; b. 当对此区域进行二次、三次黏附力图谱测量时发现, 不仅重复测量区域的 Als5p 蛋白发生群集, 而且在菌体表面相隔较远区域(remote area)的 Als5p 蛋白同样也发生群集; c.

群集程度随 AFM 针尖上抗体与细菌表面 Als5p 蛋白的作用时间递增; d. 对热灭活(heat-killed)菌体用特异性探针进行探测时, 同样发现群集现象; e. 在多组对比实验中(无 Als5p 蛋白表达的菌体、非功能化的探针及用非特异抗体修饰的探针等)均无群集现象产生. 据此推测, 在特异性外力诱导下 Als5p 蛋白会产生群集现象, 使菌体表面的 Als5p 蛋白分子发生重排, 并且这种群集现象与活菌体的新陈代谢无关. 该研究说明, 外力诱导引起黏附蛋白群集可能是激活细胞黏附性的一个重要机制.

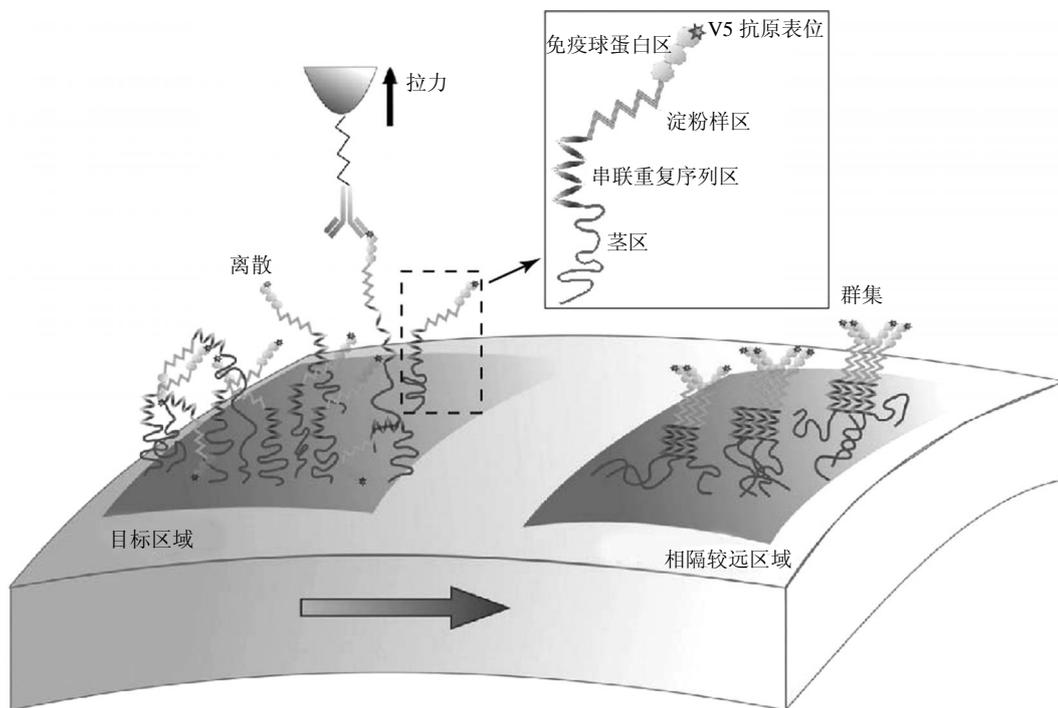


Fig. 11 Proposed mechanism for the Als5p nanoadhesome^[59]

图 11 Als5p 纳米黏附域形成机制^[59]

利用皮牛级作用力拉伸单分子 Als5p 蛋白, 引发 Als5p 在整个细胞表面群集的形成和蔓延. Als5p 分子长度为 70~120 nm, 它们在邻近区域具有转动灵活性, 允许细胞表面相互邻近的 Als5p 分子相互作用而发生群集, 此过程的发生不需要 Als5p 蛋白质分子在细胞表面自由扩散. 图上方的插图示意了一个带有 V5 抗原表位(V5 epitope)的 Als5p 分子结构.

对真菌表面蛋白分子的研究工作还包括 Sasuga 等^[40]利用 AFM-SMFS 技术研究了粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的信息素(P-factor)及其对应的细胞表面受体 Mam2 之间的相互作用. 将 P-factor 连接到功能化的 AFM 针尖表面, 在加载速度为 1.74 $\mu\text{m/s}$ 条件下, 测得 P-factor 与 Mam2 之间作用力为 120pN. Mam2 是一种重要的 G 蛋白偶联受体(GPCRs), Mam2 与 P-factor 的相互作用在粟酒裂殖酵母形成合子过程中具有重要信息介导作用, 因此该研究为认识 GPCRs 介导的信号传导

过程提供了新思路.

3.2.2 利用单分子力谱技术对真菌表面多糖分子的研究

除了对真菌表面的蛋白质分子进行研究, Dufrene 课题组还对真菌表面的多糖分子做出了开拓性的工作. 念珠菌属作为真菌界酵母科条件致病菌, 免疫系统受损的患者很容易被此致病菌严重侵袭. 在真菌侵袭过程中, 菌体细胞壁多糖是免疫细胞受体识别的主要靶点. 由于各菌体的细胞壁组分以及相应宿主受体的不同, 可以引发多种特异性宿

主炎症反应. 为了深入理解真菌细胞壁多种糖类分子的识别机制、种类多样性及其在菌体表面的分布情况, El-Kirat-Chatel 等^[60]利用 AFM-SMFS 技术结合流式细胞术(flow cytometry)对酵母科菌体表面的多种糖类分子进行了研究. 首先采用流式细胞术结合免疫识别和荧光标记的方法对白色念珠菌细胞壁的多种糖类分子进行检测, β -甘露聚糖(β -mannans)和 α -甘露聚糖(α -mannans)的检测结果显示呈阳性, 表明二者分布于菌体细胞壁的最外层, β -葡聚糖(β -glucans)和几丁质(chitin)的检测结果显示呈阴性, 表明分布于菌体细胞壁内层的 β -葡聚糖和几丁质无法用流式细胞术直接进行探测. 随后利用 β -甘露聚糖、 α -甘露聚糖、 β -葡聚糖和几丁质分别可与 β -甘露聚糖抗体(anti- β -man)、外源凝集素伴刀豆球蛋白 A(ConA)、 β -葡聚糖抗体(anti- β -glu)和外源凝集素麦胚凝集素(WGA)特异性结合的性质, 将相应的抗体和外源凝集素修饰到 AFM 针尖上. 利用 AFM-SMFS 技术对两种致病菌包括白色念珠菌(*Candida albicans*)和平滑念珠菌(*Candida glabrata*)以及非致病菌酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞壁表面多糖进行了力谱测量和分析

(图 12). 结果表明: α -甘露聚糖和 β -1, 2-甘露聚糖(β -1, 2-mannans)均存在于菌体表面. 其中, 空间分布不均一的 β -1, 2-甘露聚糖大量分布于致病菌白色念珠菌和平滑念珠菌表面, 可与免疫细胞特异性作用, 并且在白色念珠菌表面的分布密度更高、分子长度更长, 但是对于 β -1, 2-甘露聚糖在白色念珠菌表面的高密度分布和具有较长长度的特性是否更有利于机体发生免疫应答还有待进一步研究. α -甘露聚糖均一地分布于上述三种酵母菌表面, 白色念珠菌中的部分 α -甘露聚糖的长度相对较长. 由于 β -葡聚糖和几丁质存在于细胞壁内层, 故不能通过功能化的探针对它们进行直接探测, 因此需采用热处理方法暴露出内部细胞壁组分, 再利用 AFM-SMFS 技术进行探测. 探测结果发现: 两种致病菌(白色念珠菌和平滑念珠菌)的 β -葡聚糖的拉伸长度或柔韧性均强于非致病菌酿酒酵母, 这可能是引起不同菌体细胞壁纳米力学特性不同的原因; 几丁质作为酵母菌细胞壁内层的主要组成成分, 在白色念珠菌中含量非常丰富, 可能在加强菌体细胞壁力学性能和影响细胞的免疫识别方面发挥着重要作用^[61].

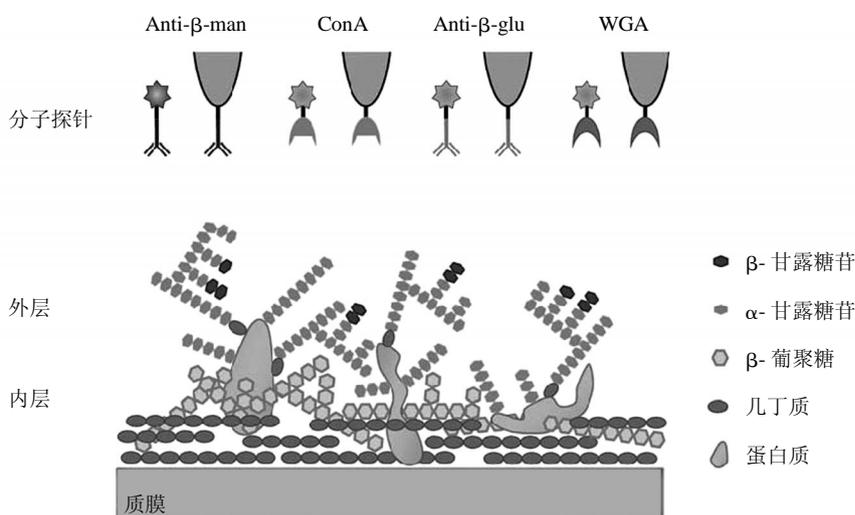


Fig. 12 Use of single-molecule AFM and fluorescence methods for probing the density, distribution and extension of yeast cell wall glycoconjugates^[60]

图 12 利用 AFM-SMFS 技术结合荧光标记方法探测酵母细胞壁表面糖类分子的密度、分布及分子拉伸情况^[60]

如图所示, 对于某些种类的酵母细胞, 内层细胞壁层包含几丁质和 β -1, 3-葡聚糖(β -1, 3-glucans), 外层细胞壁包含 α -甘露聚糖(α -mannans, 由 α -甘露糖苷(α -mannosides)构成)和 β -1, 2-甘露聚糖(β -mannans, 由 β -甘露糖苷(β -mannosides)构成). 图片的上部给出了用于荧光染色和 AFM-SMFS 技术检测的分子探针(利用相应抗体和外源凝集素功能化的探针)的图示.

4 展 望

AFM-SMFS 技术已成为研究生物大分子内和

生物大分子间相互作用的重要工具, 可以在近生理条件下从单分子水平对许多重要的生化过程进行认识. 但是 AFM-SMFS 技术也有其自身的一些缺点:

a. 通常需要将生物大分子(如抗体或外源凝集素)连接在探针上, 该过程涉及到复杂的化学修饰技术; b. 利用 AFM-SMFS 对细胞类生物大分子进行测量时, 一次仅能对一个细胞进行测量, 而且需要在测量统计的基础上才能得到结论, 因此实验和分析过程比较耗时, 实验效率比较低; c. 使用 AFM-SMFS 仅能获得细胞或菌体样品表面信息, 难以获得这些生物体内部分子信息, 因此需要与其他技术联合使用. 目前, 将 AFM-SMFS 技术与激光扫描共聚焦显微镜^[53]、荧光显微镜^[2]、透射电子显微镜^[58]、流式细胞术^[60]及分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟^[29]等技术结合使用已逐渐引起重视, 这将成为 AFM-SMFS 技术的发展趋势.

参 考 文 献

- [1] Zhu R, Howorka S, Proll J, *et al.* Nanomechanical recognition measurements of individual DNA molecules reveal epigenetic methylation patterns. *Nat Nanotechnol*, 2010, **5**(11): 788–791
- [2] Li M, Xiao X, Zhang W, *et al.* AFM analysis of the multiple types of molecular interactions involved in rituximab lymphoma therapy on patient tumor cells and NK cells. *Cell Immunol*, 2014, **290**(2): 233–244
- [3] Zhong M C, Wei X B, Zhou J H, *et al.* Trapping red blood cells in living animals using optical tweezers. *Nat Commun*, 2013, **4**: 1768
- [4] Gollnick B, Carrasco C, Zuttion F, *et al.* Probing DNA helicase kinetics with temperature-controlled magnetic tweezers. *Small*, 2015, **11**(11): 1273–1284
- [5] Zhang W, Zhang X. Single molecule mechanochemistry of macromolecules. *Prog Polym Sci*, 2003, **28**(8): 1271–1295
- [6] Neuman K C, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2008, **5**(6): 491–505
- [7] De Vlaminck I, Dekker C. Recent advances in magnetic tweezers. *Ann Rev Biophys*, 2012, **41**: 453–472
- [8] Binnig G, Quate C F. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, **56**(9): 930–933
- [9] Shi X L, Zhang X J, Xia T, *et al.* Living cell study at the single-molecule and single-cell levels by atomic force microscopy. *Nanomedicine-Uk*, 2012, **7**(10): 1625–1637
- [10] Ramachandran S, Teran Arce F, Lal R. Potential role of atomic force microscopy in systems biology. *WIREs Syst Biol Med*, 2011, **3**(6): 702–716
- [11] Scholl Z N, Rabbi M, Lee D, *et al.* Origin of overstretching transitions in single-stranded nucleic acids. *Phys Rev Lett*, 2013, **111**(18): 188302
- [12] Calderon C P, Chen W H, Lin K J, *et al.* Quantifying DNA melting transitions using single-molecule force spectroscopy. *J Phys-Condens Mat*, 2009, **21**(3): 34114
- [13] Petrosyan R, Bippes C A, Walheim S, *et al.* Single-molecule force spectroscopy of membrane proteins from membranes freely spanning across nanoscopic pores. *Nano Lett*, 2015, **15**(5): 3624–3633
- [14] Li Y, Qin M, Li Y, *et al.* Single molecule evidence for the adaptive binding of DOPA to different wet surfaces. *Langmuir*, 2014, **30**(15): 4358–4366
- [15] Elias M. Puchner, Alexander Alexandrovich, Ay Lin Kho, *et al.* Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(52): 21045–21045
- [16] Li M, Xiao X, Liu L, *et al.* Atomic force microscopy study of the antigen-antibody binding force on patient cancer cells based on ROR1 fluorescence recognition. *J Mol Recognit*, 2013, **26** (9): 432–438
- [17] Scholl Z N, Li Q, Marszalek P E. Single molecule mechanical manipulation for studying biological properties of proteins, DNA, and sugars. *WIREs Nanomed Nanobi*, 2014, **6**(3): 211–229
- [18] Wallace J M. Applications of atomic force microscopy for the assessment of nanoscale morphological and mechanical properties of bone. *Bone*, 2012, **50**(1): 420–427
- [19] Wang H, Wilksch J J, Lithgow T, *et al.* Nanomechanics measurements of live bacteria reveal a mechanism for bacterial cell protection: the polysaccharide capsule in *Klebsiella* is a responsive polymer hydrogel that adapts to osmotic stress. *Soft Matter*, 2013, **9**(31): 7560–7567
- [20] Wang H, Wilksch J J, Struggnell R A, *et al.* Role of capsular polysaccharides in biofilm formation: an AFM nanomechanics study. *ACS Appl Mater Inter*, 2015, **7**(23): 13007–13013
- [21] Hugel T, Seitz M. The study of molecular interactions by AFM force spectroscopy. *Macromol Rapid Comm*, 2001, **22**(13): 989–1016
- [22] Giannotti M I, Vancso G J. Interrogation of single synthetic polymer chains and polysaccharides by AFM-based force spectroscopy. *Chemphyschem*, 2007, **8**(16): 2290–2307
- [23] Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub H E. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat Struct Biol*, 1999, **6**(4): 346–349
- [24] Han X, Qin M, Pan H, *et al.* A versatile "multiple fishhooks" approach for the study of ligand-receptor interactions using single-molecule atomic force microscopy. *Langmuir*, 2012, **28**(26): 10020–10025
- [25] Fernandez V I, Kosuri P, Parot V, *et al.* Extended Kalman filter estimates the contour length of a protein in single molecule atomic force microscopy experiments. *Rev Sci Instrum*, 2009, **80** (11): 113104
- [26] Morfill J, Kuhner F, Blank K, *et al.* B-S transition in short oligonucleotides. *Biophys J*, 2007, **93**(7): 2400–2409
- [27] Cui S, Yu Y, Lin Z. Modeling single chain elasticity of single-stranded DNA: A comparison of three models. *Polymer*, 2009, **50**(3): 930–935
- [28] Livadaru L, Netz R R, Kreuzer H J. Stretching response of discrete semiflexible polymers. *Macromolecules*, 2003, **36**(10): 3732–3744
- [29] Cheng B, Wu S, Liu S, *et al.* Protein denaturation at a single-molecule level: the effect of nonpolar environments and its

- implications on the unfolding mechanism by proteases. *Nanoscale*, 2015, **7**(7): 2970–2977
- [30] Lv C, Gao X, Li W, *et al.* Single-molecule force spectroscopy reveals force-enhanced binding of calcium ions by gelsolin. *Nat Commun*, 2014, **5**: 4623
- [31] Marszalek P E, Dufrene Y F. Stretching single polysaccharides and proteins using atomic force microscopy. *Chem Soc Rev*, 2012, **41**(9): 3523–3534
- [32] Funayama R, Nakahara Y, Kado S, *et al.* A single-molecule force-spectroscopic study on stabilization of G-quadruplex DNA by a telomerase inhibitor. *Analyst*, 2014, **139**(16): 4037–4043
- [33] Xue Y, Li X, Li H, *et al.* Quantifying thiol-gold interactions towards the efficient strength control. *Nat Commun*, 2014, **5**: 4348
- [34] Wildling L, Unterauer B, Zhu R, *et al.* Linking of sensor molecules with amino groups to amino-functionalized AFM tips. *Bioconjugate Chem*, 2011, **22**(6): 1239–1248
- [35] Buriak J M. Organometallic chemistry on silicon and germanium surfaces. *Chemical Reviews*, 2002, **102**(5): 1271–1308
- [36] Wang M S, Palmer L B, Schwartz J D, *et al.* Evaluating protein attraction and adhesion to biomaterials with the atomic force microscope. *Langmuir*, 2004, **20**(18): 7753–7759
- [37] Hinterdorfer P, Dufrene Y F. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2006, **3**(5): 347–355
- [38] Boozer C, Chen S, Jiang S. Controlling DNA orientation on mixed ssDNA/OEG SAMs. *Langmuir*, 2006, **22**(10): 4694–4698
- [39] Wieland J A, Gewirth A A, Leckband D E. Single molecule adhesion measurements reveal two homophilic neural cell adhesion molecule bonds with mechanically distinct properties. *J Biol Chem*, 2005, **280**(49): 41037–41046
- [40] Zhao W, Cai M, Xu H, *et al.* A single-molecule force spectroscopy study of the interactions between lectins and carbohydrates on cancer and normal cells. *Nanoscale*, 2013, **5**(8): 3226–3229
- [41] Sasuga S, Abe R, Nikaido O, *et al.* Interaction between pheromone and its receptor of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* examined by a force spectroscopy study. *J Biomed Biotechnol*, 2012, **2012**: 804793
- [42] Da Silva A C, Deda D K, Da Roz A L, *et al.* Nanobiosensors based on chemically modified AFM probes: a useful tool for metsulfuron-methyl detection. *Sensors*, 2013, **13**(2): 1477–1489
- [43] Deda D K, Pereira B B S, Bueno C C, *et al.* The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. *Mater Res*, 2013, **16**(3): 683–687
- [44] Yang H, Yu J, Fu G, *et al.* Interaction between single molecules of Mac-1 and ICAM-1 in living cells: an atomic force microscopy study. *Exp Cell Res*, 2007, **313**(16): 3497–3504
- [45] Yu J, Wang Q, Shi X, *et al.* Single-molecule force spectroscopy study of interaction between transforming growth factor beta 1 and its receptor in living cells. *J Phys Chem B*, 2007, **111**(48): 13619–13625
- [46] Li M, Xiao X, Liu L, *et al.* Imaging and measuring the molecular force of lymphoma pathological cells using atomic force microscopy. *Scanning*, 2013, **35**(1): 40–46
- [47] Kim Y, Kim E S, Lee Y, *et al.* Reading single DNA with DNA polymerase followed by atomic force microscopy. *J Am Chem Soc*, 2014, **136**(39): 13754–13760
- [48] Zhang T B, Zhang C L, Dong Z L, *et al.* Determination of base binding strength and base stacking interaction of DNA duplex using atomic force microscope. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 9143
- [49] Wang C, Yadavalli V K. Investigating biomolecular recognition at the cell surface using atomic force microscopy. *Micron*, 2014, **60**: 5–17
- [50] Zuniga J E, Groppe J C, Cui Y, *et al.* Assembly of TbetAR I : TbetAR II : TGFbeta ternary complex *in vitro* with receptor extracellular domains is cooperative and isoform-dependent. *J Mol Biol*, 2005, **354**(5): 1052–1068
- [51] Adams G P, Weiner L M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(9): 1147–1157
- [52] Gimenez Ortiz A, Montalar Salcedo J. Heat shock proteins as targets in oncology. *Clin Transl Oncol*, 2010, **12**(3): 166–173
- [53] Pfister G, Strohm C M, Perschinka H, *et al.* Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. *J Cell Sci*, 2005, **118**(Pt 8): 1587–1594
- [54] O'donoghue M B, Shi X, Fang X, *et al.* Single-molecule atomic force microscopy on live cells compares aptamer and antibody rupture forces. *Anal Bioanal Chem*, 2012, **402**(10): 3205–3209
- [55] Dupres V, Menozzi F D, Loch C, *et al.* Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria. *Nat Methods*, 2005, **2**(7): 515–520
- [56] Francius G, Lebeer S, Alsteens D, *et al.* Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria. *ACS Nano*, 2008, **2**(9): 1921–1929
- [57] Rosini R, Margarit I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Front Cell Infect Mi*, 2015, **5**: 6
- [58] Beaussart A, Pechoux C, Trieu-Cuot P, *et al.* Molecular mapping of the cell wall polysaccharides of the human pathogen *Streptococcus agalactiae*. *Nanoscale*, 2014, **6**(24): 14820–14827
- [59] Alsteens D, Garcia M C, Lipke P N, *et al.* Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(48): 20744–20749
- [60] El-Kirat-Chatel S, Beaussart A, Alsteens D, *et al.* Single-molecule analysis of the major glycopolymers of pathogenic and non-pathogenic yeast cells. *Nanoscale*, 2013, **5**(11): 4855–4863
- [61] Mora-Montes H M, Netea M G, Ferwerda G, *et al.* Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect Immun*, 2011, **79**(5): 1961–1970

AFM Single Molecule Force Spectroscopy and Recent Progress of Its Applications in The Study of Biomolecules on Live Mammalian, Bacterial and Fungal Cell Surfaces*

YU Xiao-Ting¹⁾, YANG Zhong-Bo²⁾, WANG Xin-Yan³⁾, TANG Ming-Jie²⁾,
WANG Zhan-Zhong^{1)**}, WANG Hua-Bin^{2)**}

¹⁾ School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

²⁾ Chongqing Key Laboratory of Multi-Scale Manufacturing Technology, Chongqing Institute of Green and Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences, Chongqing 400714, China;

³⁾ Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Mechanical forces are always involved in a biological process in which intra- and/or inter-biomolecular interactions are essential. Atomic force microscopy (AFM) is an ideal technique that can be used to investigate the mechanical interactions occurred in biological system, due to its high resolution in force measurement and its capability of working in near-physiological conditions. Single-molecule force spectroscopy based on AFM (AFM-SMFS) has an extraordinary ability to interrogate the intra- and/or inter-biomolecular interactions at the single-molecule and/or single-cell level. In this review, the basic principle of AFM-SMFS, and the techniques including AFM tip modifications (silicon/nitride silicon and gold-coated silicon tips), force spectroscopy measurement and data analysis (the worm-like chain model, the freely jointed chain model and the freely rotating chain model) required in AFM-SMFS, are briefly introduced. The emphasis is given on the recent progress made in investigating biomolecules, including proteins (transforming growth factor β 1, CD20, Heat Shock Proteins, PTK7, heparin-binding haemagglutinin adhesion and Als5p adhesion proteins) and carbohydrates (glucose, mannose, galactose, group B carbohydrate, capsular polysaccharide, α -mannans, β -mannans, β -glucans and chitin) existing on mammalian, bacterial and fungal cell surfaces. Finally, the limitations of AFM-SMFS and its future applications have been summarized.

Key words atomic force microscope, single molecule force spectroscopy, biomacromolecule, cell, bacteria, fungus

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0204

* This work was supported by grants from The Fundamental & Advanced Research Project of Chongqing(cstc2013jcyjC00001), Scientific Equipment Research Project of Chinese Academy of Sciences(Development of THz imaging spectrometer for biomacromolecules), National Science Foundation for Young Scientists of China(21407145), Application Development Project of Chongqing(cstc2013yykfC00007), National Basic Research Program of China(2015CB755401)and Startup Foundation for Advanced Talents of CIGIT (Development of multifunctional near-field THz microscopy for the detection of early-stage cancerous cells).

**Corresponding author.

WANG Zhan-Zhong. Tel: 86-22-27400291, E-mail: wzz7698@tju.edu.cn

WANG Hua-Bin. Tel: 86-23-65935795, E-mail: wanghuabin@cigit.ac.cn

Received: September 20, 2015 Accepted: November 2, 2015