

纳生物学领域的研究进展

李民乾 要小未

(中国科学院上海原子核研究所 上海 201800)

摘要 纳生物学在纳米尺度上研究生物反应机理,主要包括生物大分子的修复、复制和调控等生物过程.同时,根据生物学原理,发展分子工程,主要包括纳机器人和纳信息处理系统.上海原子核所扫描探针显微学研究组在这一领域已取得了丰硕成果.本文简要介绍扫描探针显微学的发展和该所在这方面研究工作的进展与展望.

关键词 纳生物学, 扫描探针显微学, 生物大分子结构, 分子工艺.

1 引言

直接观测物质表面的微观结构一直是人类梦寐以求的愿望.以前,观测表面微观结构的手段主要有光学显微镜、扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)以及场离子显微镜(FIM)等.从分辨能力来讲,光学显微镜由于其分辨率受到衍射效应的限制,不可能用于探测原子结构的奥秘;扫描电镜具有较高的分辨率,它是研究晶体材料的整体性质的有力工具,但除了在极特殊的情况下,它不能分析表面原子结构;透射电镜的分辨率很高,能直接观察到一些薄膜材料的原子结构,但由于它对样品制备有特定的要求,使可观测的对象受到较大限制;场离子显微镜是一种结构简单、对表面特别灵敏并能直接观察表面单个原子的分析工具,但其样品必须制成只有几到几十纳米曲率半径的针尖,并且该样品必须能承受高强电场,这就极大地限制了它的应用范围.

1981年,IBM瑞士苏黎世实验室的G. Binnig和H. Rohrer发明了一种崭新的表面分析仪器——扫描隧道显微镜(STM).它是继透射电镜和场离子显微镜之后具有原子级分辨率的新一代显微镜.与其它各种显微镜相比,STM具有许多优越特性:(1)空间分辨能力高,最佳的横向分辨率和纵向分辨率已分别达0.1nm和0.01nm,完全可分辨单个原子.(2)图像直观,非常有利于表面动态过程

的研究.(3)可获得单原子表面层的局域结构图像,尤宜局部的表面缺陷、表面重构、表面吸附物质等的位置及形貌研究.(4)STM在真空、大气、溶液等环境中都能保持很高的分辨率,不要求特别的样品制备技术,探测过程对样品损伤很小.这对生物样品研究十分重要.(5)在超高真空条件下,STM不仅可获得表面形貌的图像,而且还可通过扫描隧道谱(STS)研究表面的电子结构.如表面价电子轨道状态、表面电荷密度波及表面能隙结构等.

STM以其卓越性能使人类第一次实时地观察到物质表面的形貌和原子的排列状态,成为物理学、化学和生物学等学科研究的新的强有力工具.在物理学中,STM主要用于研究不同条件下的金属和半导体表面结构、表面电子态以及两者之间的相互关系等;在化学中,STM主要用于研究有机或无机分子在表面上的吸附、催化、反应和电化学过程等.

在生命科学中,扫描探针显微学(包括STM及其基础上发展起来的AFM——原子力显微镜)已成为物理学与生物学交叉学科中很有前途的生长点.应用STM和AFM研究核酸及其它生物大分子的精细结构正成为前沿基础研究中的热门课题.这一进展不仅为生物学研究提供了崭新的工具,而且提出了新的思考方式,诞生了新的学科:纳生物学(Nanobiology).这是真正意义上的交叉,有机的交叉.纳生物学研究纳米尺度上的生

物反应机理,其中包括修复、复制和调控等生物过程,并根据生物学原理,发展分子工程,主要包括纳机器人和纳信息处理系统.

STM 和 AFM 不仅能够提供生物结构方面的崭新信息,而且对样品的测量损伤小,可在纳米级水平上直接给出生物大分子的局域结构信息和电子态信息.这对于生物大分子结构与功能的研究、基因调控的研究等都是至关重要的.更为重要的是,它们可工作在溶液环境中,这对生物凝聚过程(生物发展过程)的研究是一个极端重要的优点.另外,STM 和 AFM 不只是在分子水平上和原子水平上进行观察的有力工具,还是细胞超微操作和“分子手术”等改造世界的有力手段.

2 工作进展

1989 年研制成具有国际先进水平的 STM 后,与中国科学院上海细胞生物学研究所、上海生物化学研究所及一些国外实验室合作,开展了物理学与分子生物学交叉的前沿学科研究,即 DNA 和 DNA 蛋白质复合物结构的扫描探针显微学的研究.至今已取得多项国际水平的研究成果.

2.1 B-Form DNA 和 Z-Form DNA 精细结构图像

与上海细胞所合作,在 STM 方法学上进行了大量的实验探索,建立了一套独创的单分子层制样方法,于 1989 年 4 月获得了天然鱼精子 DNA 的高分辨图像.这一结果仅比美国科学家在世界上首次用 STM 获得 DNA 双螺旋结构的直接图像(该成果被美国《大众科学》评为 1989 年全美百项科技成就之首)晚了三个月.1989 年 8 月,又获得了左旋 Z-DNA 的 STM 高分辨图像.这是迄今为止 Z-DNA 的两幅最精美的 STM 高分辨图像之一.美国《大众科学》评论:“1989 年,美国和中国科学家获得了天然 DNA 分子的高分辨 STM 图像”.

2.2 P-DNA 新构型的直接证实

1990 年初,与上海细胞所、莫斯科分子生物学研究所合作,应用 STM 完成了对平行双链 DNA 的直接观察,得到其精细结构的有关参量.理论上,平行双链 DNA 的大沟和小沟的宽度几乎相等,而反平行双链 DNA 的大沟和小沟宽度的比例约为 2:1.观测结果完全符合理论上的预测.从而首次在分子结构上证实了一种与正常的反平行双链 DNA 不同的新构型——平行双链 DNA 的存在.这是在国际上首次用 STM 直接证实一种 DNA 新构型的存在.

2.3 DNA 合成过程的分子水平图像

DNA 合成过程中,DNA 聚合酶与 DNA 的相互作用是重要的研究题目.DNA 聚合酶与 DNA 的复合物如何在聚合状态及删辑状态之间转换,与 DNA 合成的高度真实性有关.美国耶鲁大学的 T. A. Steitz 实验室用 X 光衍射方法研究了 E. coli DNA 聚合酶 I 的结构,并得到了 DNA 聚合酶与 DNA 处于删辑状态的复合物的构像,但还未解决在生理状态下处于聚合状态的 DNA 聚合酶与 DNA 的复合物的构像.

1990 年,与上海生化所合作首次在溶液环境下得到了 E. coli DNA 聚合酶 I 以及它与 DNA 处于聚合状态的复合物的 STM 直观图像.并直观地证明了 DNA 聚合酶在与 DNA 形成复合物时构像发生了改变.这一成果不仅提供了在近生理状态下 DNA 合成过程的新信息,同时,也为研究 DNA 与蛋白质复合物结构提供了一种新方法.

2.4 真核基因调控中发现 Loop 结构

与上海细胞所合作,探索了人体 β 珠蛋白基因 5' 端负调控区 DNA 在与调控蛋白相互作用中,高级结构的可能变化,于 1991 年初成功地获得了基因调控局域结构的重复 STM 图像.这些 STM 图像揭示了 DNA 在调控因子 HMG(1,2)的作用下会形成环结构(Loop Structure)的现象,这对基因调控机制

的理解很有价值. 1991年初, 欧洲 EMBL 杂志主编来上海参观时, 对这一新结果表示了浓厚的兴趣. 著名生物学家谈家桢先生认为这一发现“在国际上是首次”. 此后, 国际上也出现了用 SEM 研究基因调控的环结构的报道. 1992年, 欧洲生物化学家 D. M. J. Lilley 在 Nature 杂志上撰文, 从理论上预测了 DNA 在 HMG(1,2)作用下, 会形成 Loop 结构. 并对 Loop 结构的生物学意义作了高度评价.

最近, 我们又取得了下述进展:

1) 基因调控中的 DNA 高级结构研究

(1) 用 AFM 进行基因调控中的 DNA 高级结构研究. AFM 与样品导电性无关, 有更多的机会提供 DNA 高级结构的信息, 例如超螺旋、环结构等等. 在质粒 DNA 的 AFM 成像研究方面, 与美国加州大学 (UCSB) 的 Prof. P. K. Hansma 合作下, 获得了高分辨的、重复稳定的质粒 DNA 图像, 分辨率达纳米级, 最佳情况下测得 DNA 双链直径为 2.2nm, 与预期值几乎一致, 而且图像在几个小时内重复、稳定. 这为基因调控和 DNA 测序等生物学前沿研究打下了基础.

(2) 由于没有导电性的要求及对衬底缺陷的干扰问题, AFM 可揭示各种类型的 DNA 超螺旋结构: a) 质粒 DNA 的超螺旋及经加热或化学试剂作用, DNA 链完全伸展后的 AFM 图像; b) DNA 形成单个环的简单折叠现象 (没有结合蛋白的情况); c) 质粒 DNA (BS II) 多次包装的超螺旋情况.

(3) 人体 β 珠蛋白的基因调控与 DNA 环结构的现象. 获得了在结合调控蛋白后, 插入质粒的 DNA 调控区形成环结构的 AFM 图像. 这与 STM 结果可相互印证. 上海细胞所对同样的样品作了 TEM 观察, 证实了类似的环结构现象.

(4) DNA 链的原子力切割. AFM 不仅可观察生物大分子, 而且可在纳米尺度上直接对生物大分子进行改性. 通过控制 AFM 针尖与观察物原子间相互作用力的大小, 对 DNA

链上任何位点进行原子力切割, 因为原则上只要作用力大于化学键的结合力即可分割大分子. 这在纳生物学和分子工艺方面都是重大的进展.

2) 高温聚合酶结构的 STM/AFM 研究

1985年, 中国科学院上海生物化学研究所洪国藩课题组在国际上首次获得 BstDNA 聚合酶, 这是一个能耐 65~70°C 高温的 DNA 聚合酶. 在离体条件下, 一般的 DNA 聚合酶只有在 25°C 左右才能保持其生物活性, 而 Bst DNA 聚合酶在 65°C 的高温条件下才能保持最大的生物活性. Bst DNA 聚合酶的发现, 对于真核生物 DNA 顺序测定具有十分重要的意义, 特别对于目前国际上正在展开的人类基因组全结构研究具有关键性的作用. 但是由于 Bst DNA 聚合酶的提纯方法复杂, 提取量很少, 目前难以用 X 光晶体衍射等常规方法研究其结构. 正因如此, 目前国际上对高温聚合酶的结构及其与功能的关系知之甚少. 通过扫描探针显微学并结合生化方法, 研究不同条件下 Bst DNA 聚合酶的结构及其与功能的关系, 已取得如下成果:

1) Bst DNA 聚合酶构像的 AFM 研究

通过国际合作, 初步建立了适宜于蛋白质 AFM 成像的制样方法并优化了测量条件. 在室温条件和甘油环境下, 得到了大范围的 Bst 酶图像, 其良好的稳定性与可重复性表明, 样品牢固地附着在经处理后的云母衬底上. 大范围图像显示出有多个分布比较均匀的 Bst 酶, 并具有两个明显的特征: (1) 各个 Bst 酶的取向是无规的, 这就排除了多针尖的影响; (2) 酶的几何形状及尺度十分一致或相似, 反映出图像的重复可靠. 进一步放大观察, 还获得了单个 Bst 酶的精细结构图像. Bst 酶的直径为 15~16nm, 表观高度为 3nm. 从图像上可以看到, Bst 酶是由两个结构域组成的, 结构域之间有空隙. 这项研究在国际上没有报道.

2) 耐高温 Bst DNA 聚合酶的表面结构

STM 研究

在水溶液环境下,重复获得了高分辨的 STM 直观图像. 图像显示有多个 Bst 酶附着在高序石墨表面,各个酶取向也是随机的. 室温下的 STM 照片表明,高温酶在通常条件下呈梨形结构,表观直径为 11~12nm,高度为 2~3nm. 通过对 STM 及 AFM 的针尖结构与图像的反卷积估算,认为采用 AFM 与 STM 两种不同方法所获得的 Bst DNA 聚合酶图像在形貌上是一致的. 进一步的图像分析表明,Bst DNA 聚合酶的 STM 图像与常温 DNA 聚合酶的 STM 图像相比,在结构形态上很有可能存在差别. 这对于解释 Bst DNA 聚合酶的耐高温特性有重要意义. 这项研究在国际上也无报道.

3 展 望

近年来的一系列进展表明,扫描探针显微学在生物学研究中的应用潜力由演示性进入实质性的阶段,即已可提供可靠的、崭新的结构信息;另外,许多研究也由单一的 STM 过渡到 AFM,对非导体的各类生物样品有更广泛的适用性. 从生物分子至细胞膜、染色体乃至整个细胞,都显示了其强大的应用潜力. 该研究组已经或打算开展的重要工作有:

1) 基因调控中 DNA 高级结构(环结构等)的研究

扫描探针显微学不仅显示了以纳米级分辨研究局域结构的能力,而且加强了结构与功能的联系. 我们认为这是最具魅力和前途的交叉研究领域. 目前国际上刚起步,我国在某些方面还稍稍领先;与这有联系的是 DNA

蛋白质复合物结构的研究,也至关重要,并且充满希望.

2) 蛋白质结构的研究

这是一个新开拓的领域. 以前认为仅能提供表面信息的扫描探针显微学对蛋白质似乎无能为力,可最近一些突破性的进展,改变了这一看法. 在气固相界面,蛋白质会在 L-B 薄膜上转化为二维的结构,结合其它的方法可望提供蛋白质从一维(氨基酸序列)至三维的结构信息. 这对无法获得结晶样品的蛋白质特别重要.

3) 分子操纵与改性

STM/AFM 不仅是观察的工具,而且是在纳米尺度上改造客观世界的手段. 这是跟以往任何显微镜所截然不同的. 利用 STM 针尖与表面分子的相互作用可以按人的意志摆布分子成特定的图形;利用 AFM 针尖与表面样品间的原子力作用可以在 DNA 链上任何位点予以切割. 将 STM 和 AFM 这些分子操纵结合起来就是完整的分子手术. 一个诱人的前景是通过施行分子手术,在纳米尺度上进行基因的改性、修复等“微观基因工程”.

4) DNA 测序的快速物理方法研究

这是美国、德国物理学家的主攻方向. 虽离目标尚有距离,但已获长足进展,应予以重视.

目前以 STM 和 AFM 为代表的扫描探针显微学已发展到一个关键的转折点,不久的将来,可望取得突破,例如发现新的 DNA 构型,观察动态的 DNA 酶的相互作用及对高等生物基因调控过程的深入理解等.

Progresses at SINR on Nanobiology Studies

Li Minqian Yao Xiaowei

(Shanghai Institute of Nuclear Research, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

Abstract Nanobiology studies biological structure and dynamics on (下转 66 页)

上,准备在第三阶段开发有实用意义的通用工业 CT 系统. 目前计划为 71 个探测器系统,最大可检测工件直径不大于 50cm,空间分辨率好于 $100\mu\text{m}$,密度分辨率 $<1\%$. 这一工程将由本所与有关单位合作,争取在 2~3 年内完成.

Progress of Developing Industrial Computerized Tomography

Qiang Yujun Jiang Dazheng Sheng Kanglong

(Shanghai Institute of Nuclear Research, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

Abstract The research activities of industrial computerized tomography (ICT) at SINR is described. Because of its superior qualities in spatial and density resolutions, ICT has been and will be widely used in non-destructive test, quality evaluation and process control.

Key Words industrial computerized tomography, high resolution imaging, non-destructive test.

(上接 28 页)

nanometer scale, including processes such as repair, replication and regulation. At the same time, nanobiology is also extended to the fields of cellur coherence, nanoscale characterization and biocomputing and other nanoscale devices. A group of scanning probes microscopy at Shanghai Institute of Nuclear Research has obtained many excellent results on nanobiology in recent years. This paper introduces the development of scanning probes microscopy and the ongoing research projects of the group.

Key Words nanobiology, scanning probe microscopy, biomolecular structure, molecular craft.