

原子力显微镜在多糖结构研究中的进展

王秀艳, 董丽松*

(中国科学院长春应用化学研究所, 高分子物理与化学国家重点实验室, 长春 130022)

摘要: 简述了原子力显微镜(AFM)的工作原理和特点, 以及在多糖, 特别是在淀粉结构研究中的进展。

关键词: 原子力显微镜; 单分子力谱; 多糖; 淀粉

随着高新技术的发展, 多糖的结构已在不同层次上进行了研究。比如, 采用核磁共振(NMR)技术确定多糖的组成和分子结构; 采用 X 射线衍射(XRD)技术确定多糖的空间有序结构; 采用电子显微镜和光学显微镜观察多糖的形态。近十余年来, 原子力显微镜^[1](AFM)的出现和不断完善, 对研究多糖的分子形貌和精细结构提供了极大的方便。本文将从 AFM 的原理和在多糖结构研究方面取得的进展两方面进行综述, 以求促进我国在该领域的发展。

1 原子力显微镜

1.1 AFM 的工作原理

AFM 是在扫描隧道显微镜(STM)基础上发展起来的, 是基于量子力学理论中的隧道效应。它使用一个尖锐的探针扫描试样的表面, 通过检出及控制微传感探针与被测样表面之间力的相互作用对被测表面进行扫描测量, 其横向分辨率可达 0.1nm , 纵向分辨率可达 0.01nm 。因此, AFM 能够准确地获得被测表面的形貌或图像。AFM 工作原理见图 1^[2]。

在两个相互接近的物质间, 一定有相互作用力发生, 因而在原理上 AFM 观察对于试样没有任何限制, 研究对象可以是有机固体、聚合物以及生物大分子等。不断地开发与改进后的今天, AFM 已经有了各种变形, 如摩擦力显微镜(FFM)、粘弹性显微镜(SVM)、磁力显微镜(MFM)、静电力显微镜(EFM)、表面电位显微镜(SEPM)和近场扫描光学显微镜(NSOM)等。这些显微镜可以分别用来研究材料表面的力学特性、电磁特性、表面电位分布、光学特性等, 已经在有机、无机、半导体、光记录材料及生物材料等领域得到广泛的应用。

1.2 AFM 的成像模式

AFM 的成像操作模式主要有接触模式(contact mode)和非接触模式(noncontact mode), 即轻敲模式。前者将针尖与样品间的力或距离设为一定值(1nN 或 1nm), 记录 z 方向扫描器的移动而获得样品的表面形态或样品的图像, 适于观察原子、分子的图像; 后者又称为动态力显微镜(dynamic force microscopy, DFM)^[3,4], 悬臂在 z 方向驱动共振, 控制振幅或相差, 记录 z 方向扫描器移动而成像, 针尖与样品可以接触, 也可以不接触, 适于易形变的软物质如生物分子表面, 成像模式见图 2。

DFM 成像时的引力弱于接触模式 AFM 测量时的排斥力, 不会破坏观察的分子或使其变形。

作者简介: 王秀艳(1966—), 女, 吉林舒兰人; 2001 年毕业于中科院长春应用化学研究所物理化学专业, 获硕士学位, 现在该所攻读博士学位, 主要从事生物降解高分子微观结构研究;

* 通讯联系人。

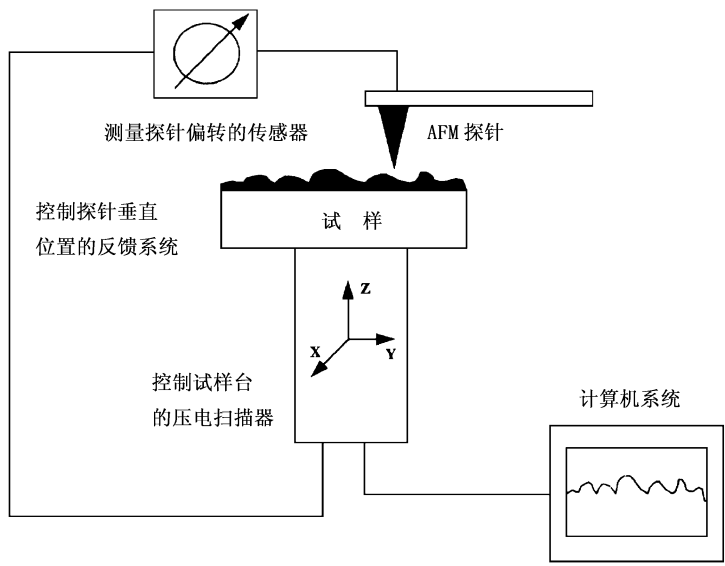


图 1 AFM 的原理图

Figure 1 Principle schematic of atomic force microscope

DFM 模式中的针尖和生物聚合物之间的界面力约等于聚合物链和云母表面间的范德华引力,所以不需要特殊的方法把聚合物固定在基质上,因此物理吸附的聚合物的分子级成像成为可能^[5]。

1.3 AFM 的成像环境

多糖、DNA 和蛋白质等生物大分子,按照不同的实验目的要求,可以在真空、大气、氮气、水及缓冲溶液,有机介质如乙醇和丁醇等环境下进行 AFM 扫描研究;还可以进行高温和低温成像。一般地,在空气中成像时,探针和样品分子表面难以避免有一层水膜,致使扫描时探针穿透这层水膜而产生强大的毛细力(几个到几百 nN),很容易损坏软性的生物大分子。因此,如采用在空气中成像的方式,一般对于空气中的含水量有一定要求(如<30%),否则影响图像的质量^[6]。

AFM 可以观测导体,也可以观测不良导体和绝缘体;还可以在不同的环境下操作;不需要象透射电镜(TEM)成像时的重金属染色和 STM 所用的金属涂层,节约了时间和费用,还避免了使用金属时产生的人为因素^[3]。因此,AFM 是近年发展起来的一种能够达到原子级别的表面结构分析仪器,已经发展成为表面分析领域最通用的显微分析方法。

1.4 AFM 样品的载体

AFM 样品的载体选择范围很大,包括云母片、玻璃片、石墨、抛光硅片、二氧化硅和某些生物膜等,其中最常用的是新剥离的云母片,主要原因是其非常平整且容易处理。要注意的是云母片表面带负电荷,研究多糖时需要修饰,如用 NiCl_2 ^[7] 润饰云母。而抛光硅片要用 Piranha 溶液(浓硫酸与 30% 双氧水的 7:3 混合液)在 90℃ 下煮 1h^[8]。利用电性能测试时需要导电性能良好的载体,如石墨

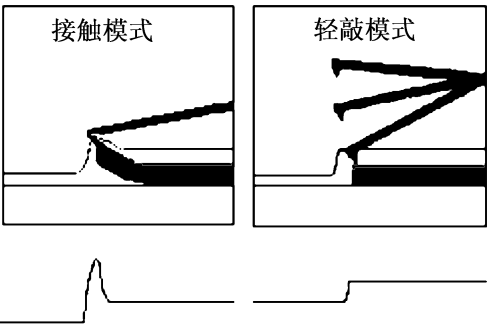


图 2 AFM 扫描模式的成像对比

Figure 2 Imaging contrast of AFM scan mode

或镀有金属的基片。Kirby 等^[9]报道多糖样品经正丁醇沉淀后可以在载体上比较牢地固定而顺利成像。

1.5 AFM 探针的扫描速率

扫描速率对 AFM 成像也有很大影响^[10]。纤维素单晶的表面高度随探针速度的增加而变低;当速度大到一定值时,表面变平坦。AFM 的扫描速率,即针尖速度为:

$$v_{\text{tip}} = f \times l \times 2$$

式中 v_{tip} ——针尖扫描速度, nm/s; f ——扫描频率, Hz; l ——扫描长度, nm。

实验发现,扫描频率低于 8 Hz 时,图像较清楚。对于不同的模式,不同的探针,不同的样品,有其合适的扫描频率。从保护探针和获得较好图像两方面考虑,选择扫描速率为 1 Hz 者较多。

2 AFM 在多糖结构研究中的应用

多糖是一类很重要的生物活性大分子,在生物体内不仅参与能量的储存和传递,而且也作为细胞骨架材料。其中的糖链作为糖蛋白、糖脂、蛋白聚糖等糖缀合物的组成成分,在生命体内形成各种各样的分子群。生物合成糖链的基因研究表明,糖链在细胞间的识别、粘附、发生、分化、癌化、信息传递等过程中起重要作用,糖链研究成为后基因研究的中心课题。所以,对多糖的研究具有深远的意义。目前,采用 AFM 对多糖分子^[11,12]的研究,还远远落后于核酸、蛋白质和磷脂生物膜等生物材料。

2.1 多糖分子结构的 AFM 研究

低分子量的多糖一般溶于水,为 AFM 试样的制备带来了方便。蔡林涛^[7]等将纯化后的虫草多糖制成 0.01 mg/mL 的水溶液,滴在 Ni^{2+} 离子处理过的新剥离的云母上,干燥后进行 AFM 扫描观察。虫草多糖分子链呈分枝结构,而且互相缠绕,链之间通过糖单元不同的连接方式衍生出许多大大小小的环,尺寸在 50~240 nm 范围,单链的厚度为 1.8 nm,长度为几个 μm ,宽度为 20~40 nm。宽度远大于单链分子的估算值,同样的现象也出现在 DNA 的 AFM 观察中^[13]。其原因是 AFM 探针的曲率半径在 5~20 nm 范围内,不够小,导致扫描时存在增宽效应。

用 AFM 观察到西洋参多糖(PPQ-d)^[14]的分子链聚集状态。PPQ-d 呈多股紧密并行螺旋形排列。由于多糖中含有糖醛酸,形成糖链间氢键缔合,多个糖链缠绕成股,每股螺旋直径 200~250 nm。由于不能给出分子间氢键的距离,还无法推算出组成每股螺旋的糖链数目。

硬葡聚糖 [β -(1-3)-D-葡聚糖]因具有抗癌活性和三重原始螺旋结构的刚性,用 TEM^[15,16] 观察到其线形-三重螺旋与环状-三重螺旋结构的转化。同样的工作用 DFM 模式^[5]也进行了研究。硬葡聚糖分子链呈环状和线形三重螺旋结构。从 250 个单硬葡聚糖链的 40 幅 DFM 图像,计算得到数均链长 $189 \pm 97 \text{ nm}$ 。根据已知的硬葡聚糖螺旋的线形原子质量密度,得出 $M_n = (4.15 \pm 1.71) \times 10^5$ 。用同样的 DFM 图像数据,还得到了链宽 $18 \pm 7 \text{ nm}$,链高 $0.80 \pm 0.5 \text{ nm}$ 。而硬葡聚糖的纤维晶 X-ray 衍射研究^[17]给出的三重螺旋直径为 1.7 nm。产生不一致的可能原因:一是与云母表面吸附的大分子上存在单或多层水有关;二是样品因干燥和吸附到云母上而使多糖分子产生变形。

果胶(pectin)多糖来源于植物细胞壁,对植物也有一系列的活化功能,是已知存在的最复杂的天然聚合物^[18],在食品和制药工业上十分重要。Kirby^[11]和 Round 等^[19,20]分别用 AFM 研究了果胶的支化和网状结构。支化的存在会影响果胶的粘度,即使在浓度很低的溶液中,仍然存在单个聚合物的聚集体。Kirby 等^[11]在液态介质醇中对细菌多糖黄原胶和 acetan,植物多糖角叉聚糖和果胶进

行 AFM 成像。与传统的金属涂覆和复制比较,AFM 图像的分辨率更高。尤其是对 acetan 的观察,获得了清晰的螺旋结构图像。此外,还获得了角叉聚糖和 gellan 胶的网络结构。丁醇环境下不同介质 K^+ 离子和四甲基铵对 gellan 胶的网络和凝胶形成的影响也能够通过 AFM 所检测^[21]。

Doi 等^[22]对纤维素的二醋酸酯衍生物单晶结构进行了 AFM 观察,得到的晶体单层厚度约为 30 nm,与理论计算值 29 nm 非常的符合。Hanley 等^[10]采用 AFM 与 TEM 对比的方法研究了纤维素微纤结构,在涂碳的铜网上,两种方法给出了一致的纤维素微纤的形貌图像(AFM 的针速度为 10^5 nm/s)。并且 AFM 还清楚地给出了铜网上外来沉积物的图像,这是 TEM 不易观察到的。但是,AFM 图像的微纤的宽度远大于 TEM 的观察结果,即 AFM 的增宽效应。这与探针形状对样品形状的卷积有关^[23],还与扫描速率有关。

2.2 单分子力谱研究多糖的指纹结构特征

单分子力谱是研究分子内和分子间相互作用的一种重要手段,是一种基于 AFM 的新型实验技术^[12,24,25],可获得大分子的 force-extension 谱,从而得到其弹性;聚合物的弹性起源于熵,可用自由链模型或蠕虫链模型来描述。多糖的弹性受吡喃环的力诱导构象转变的支配,这些转变在 force-extension 谱中产生指纹特征,为吡喃环的稳态构象和这类糖苷键的特征,从而能够识别溶液中单个多糖分子,而任何其它谱技术却做不到。

Li 等^[26]用单分子力谱研究了羧甲基淀粉(CMS)和羧甲基纤维素(CMC),并进行了比较。CMS 纤维的弹性随着其长度而线性地变化。在 CMS 的力谱中存在一个平稳段,约 300 pN,为 α -(1,4) 苷键所特有,这表明力诱导的构象转变为 α -(1,4) 苷键连接的多聚糖的纳米力学的指纹特征,而 CMC 为 β -(1,4) 苷键连接则不具备。

单分子力谱,为在分子水平上研究大分子单链的力学性质开辟了广阔的前景,目前已经得到了生物大分子葡聚糖^[12,26,27]、黄原胶^[28,29]、果胶^[30]的详尽力谱,为深入研究多糖的结构与功能关系奠定了基础。单分子力谱实验需要在缓冲溶液中进行^[12,24~31]。

单分子力谱,也用来研究其它的生物大分子。Oberhauser 等^[32]用单分子 AFM 研究 fibronectin (FN)的力学性能和单 FN III。认为在蛋白质 FN 中的力诱导产生的构象变化可以调控细胞外基质的组装,构成其弹性和伸长率的基础。

此外,单分子 AFM 研究多糖还可以进行分子动态 AFM 模拟^[33,34]。其中文献[34]采用分子动态拉伸模拟的手段,以椅式构象的 β -和 α -16 个葡聚糖(纤维素和淀粉)为分子模型,对单分子 AFM 进行了模拟研究,计算了 force/extension 曲线。根据构象的转变,在分子水平上计算 β -和 α -(1,4) 葡萄糖的弹性。

2.3 淀粉粒的 AFM 研究

淀粉是多糖家族中重要的一员,主要来源于谷类和薯类植物,是由葡萄糖残基通过糖苷键连接起来的多羟基化合物,有直链和支链(枝杈状)两种分子,分别称为直链淀粉和支链淀粉。

淀粉的初生态是颗粒状,大小与外形因来源不同而有所区别。马铃薯淀粉颗粒为球形,外径在 15~100 μ m 范围内,玉米淀粉颗粒为多边形,外径在 5~25 μ m 之间,而稻米的更小为 3~8 μ m^[35]。对淀粉结构的认识分为淀粉颗粒的表面形态结构和内部结构,淀粉的分子链结构。

在通常条件下,受环境限制和淀粉颗粒容易吸水特性的影响,淀粉颗粒的 SEM 图像较平滑,给出的是淀粉颗粒的轮廓像,很难给出表面的细微结构。采用 AFM 方法,能够很好地提高分辨率,获得清晰的细微结构。Baldwin 等^[36,37]用 AFM 研究了土豆和小麦淀粉颗粒表面。两类淀粉具有不同的表面形貌,土豆淀粉粒表面有许多突起部分,直径在 100~300 nm,在相对平坦的面上,包含一些

10~50nm 的微结构;而小麦淀粉的突起部分相当少,表面较平滑。但是,也有 10~50nm 的微结构存在。Baldwin 等认为这些突起部分代表淀粉颗粒表面的支链淀粉侧链簇的末端,与“blocklets”结构相对应。

烘干的马铃薯淀粉粒的 AFM 图像^[38]见图 3a,其表面有许多小结构,与原淀粉的表面相似。冷冻处理使表面产生环状突起,300nm 大小,40~70nm 深,见图 3b。Krok 等^[38]认为这些突起是内部结晶的支链淀粉侧链簇因水的作用而渗出到表面产生的。他的 AFM 图像还给出了有水和无水的淀粉粒表面形貌。

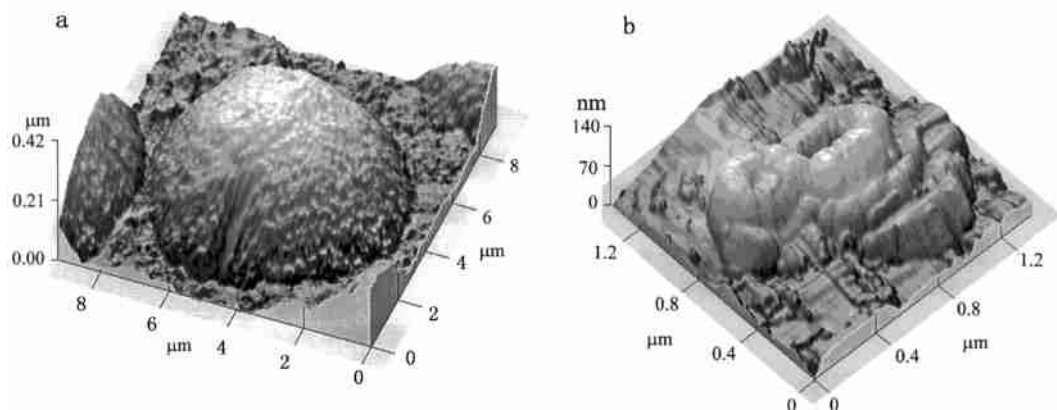


图 3 马铃薯淀粉的 AFM 图像

a—烘干淀粉粒;b—冻干淀粉粒

Figure 3 AFM images of potato starch:a·dried starch granule;b·frozen starch granule

玉米淀粉颗粒切片的 AFM 图像^[39]揭示了淀粉颗粒内辐射状聚集结构。从图像可看到淀粉颗粒中心部分的核区(脐)有序性稍差。将淀粉粒用温和的酸处理,除去淀粉颗粒中的非晶部分,则清楚地给出较小的 blocklets 结构,约 10~30nm 大小。详见图 4。

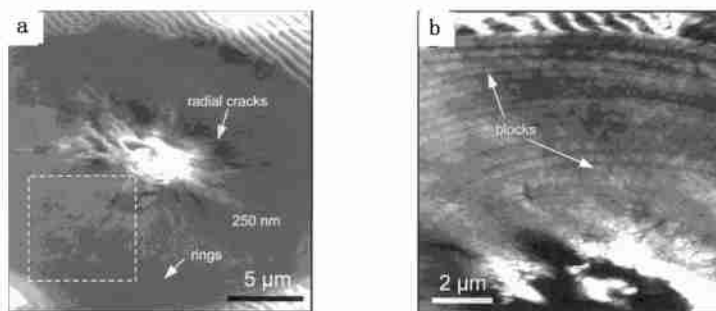


图 4 近淀粉脐中心截面的接触模式形貌图像

a—突起的中心有放射状裂缝;b—跨越生长环的小 blocklets, 环距约 450nm

Figure 4 Contact mode images showing central sections near to the granule hilum;

a·the raised center has radial cracks;b·small blocks spanning the growth rings~400—500 nm in size

Ridout 等^[40]给出了包埋玉米和马铃薯淀粉粒切片的超结构。但是,并不象光学显微镜那样容易观察到淀粉的生长环,只是偶尔会在淀粉粒的某个部分看到生长环。Ridout 等采用高分辨 AFM 给出了 blocklet 结构,大小与形状和文献中 TEM 观察到的结果相近。Ohtani^[41]的不同来源淀粉的高

分辨 AFM 图像,给出了淀粉粒内直径约为 30nm 的精细结构,这些精细结构与 blocklet 结构相对应。

Nordmark 等^[42, 43]研究了高直链(70%)玉米淀粉的再生态球形结构。他们将处理过的淀粉颗粒包埋在 Spurr 树脂中,切片后用 AFM 为其成像。实验观察到再生的淀粉颗粒具有径向取向结晶的 lamellae 层,并且颗粒中心带有脐区。由于研究的是高直链淀粉,因此认为该球形主要由线形或微支化的淀粉聚合物构成。

尽管 AFM 在多糖结构方面的研究报道不多,但是,AFM 的特点已经为多糖结构的深入研究提供了极大的方便。低温(Cryo)-AFM 技术的出现、探针尖端制备技术的完善等都必将促进多糖结构研究的不断深入。结合其它现代表征手段,多糖寡糖片段和多糖单链的构象以及多糖与缀合物的空间关系等工作将成为进一步研究的重点。淀粉原生态的结构与成因,支链淀粉的分子结构和凝聚态结构图象将是近期的研究热点。AFM 独特的性能将会在高糖类大分子的结构研究中显示美妙的前景。

参考文献:

- [1] Binnig G, Quate C F, Gerber Ch. Phys Rev Lett, 1986, 56, 930.
- [2] Yalamanchili M R, Veeramani S, Azevedo M A D. Colloids and Surface A, 1998, 133, 77.
- [3] Giessibl F J. Science, 1995, 267, 68.
- [4] Giles R, Cleveland J P, Manne S, et al. Appl Phys Lett, 1993, 63, 617.
- [5] McIntire T M, Penner R M, Brant D A. Macromolecules, 1995, 28, 6375.
- [6] Bustamante C, Keller D. Phys Today, 1995, 48, 32.
- [7] 蔡林涛, 李萍, 陆祖宏. 电子显微学报, 1999, 18, 103.
- [8] Schönher H, Chechik V, Stirling C. J Am Chem Soc, 2000, 122(15), 3679.
- [9] Kirby A R, Gunning A P, Morris V J. Carbohydr Res, 1995, 267, 161.
- [10] Hanley S J, Giasson J, Revol J F. Polymer, 1992, 33, 4639.
- [11] Kirby A R, Gunning A P, Morris V J. Biopolymers, 1996, 38, 355.
- [12] Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, et al. Science, 1997, 275, 1295.
- [13] Bustamante C, Vesonka J, Tang C L, et al. Biochemistry, 1992, 31, 22.
- [14] 马秀俐, 白玉白, 孙允秀, 等. 吉林大学自然科学学报, 2000(1), 105.
- [15] Stokke B T, Elgsaeter A, Brant D A, et al. Macromolecules, 1991, 24, 6349.
- [16] Stokke B T, Elgsaeter A, Brant D A, et al. Biopolymers, 1993, 33, 193.
- [17] Bluhm T L, Deslandes Y, Marchessault R H, et al. Carbohydr Res, 1982, 100, 117.
- [18] Carpita N C, Gibeaut D M. Plant J, 1993, 3, 1.
- [19] Round A N, Rigby N M, MacDougall A J, et al. Carbohydr Res, 2001, 331, 337.
- [20] Round A N, MacDougall A J, Ring S G, et al. Carbohydr Res, 1997, 303, 251.
- [21] Gunning A P, Kirby A R, Ridout M J, et al. Macromolecules, 1996, 29, 6791.
- [22] Iwata T, Doi Y. Macromolecules, 1997, 30, 6683.
- [23] Patil R, Kim S J, Reneker D H, et al. Polym Commun, 1990, 31, 455.
- [24] Florin E L, Moy V T, Gaub H E. Science, 1994, 264, 415.
- [25] Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, et al. Science, 1997, 276, 1109.
- [26] Li H B, Gaub H E, Zhang X, et al. Chem Phys Lett, 1999, 305, 197.
- [27] Marszalek P E, Oberhauser A F, Pang Y P, et al. Nature, 1998, 396, 661.
- [28] Li H B, Rief M, Oesterhelt F, et al. Adv Mater, 1998, 10, 316.
- [29] Camesano T A, Wilkinson K J. Biomacromolecules, 2001, 2, 1184.
- [30] Marszalek P E, Pang Y P, Li H B, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96, 7894.

- [31] 李宏斌, 张希, 沈家骢. 高等学校化学学报, 1998, 19, 824.
- [32] Oberhauser A F, Fernandez C B, Fernandez J M. J Mol Biol, 2002, 319, 433.
- [33] Heymann B, Grubmüller H. Chem Phys Lett, 1999, 305, 202.
- [34] Heymann B, Grubmüller H. Chem Phys Lett, 1999, 303, 1.
- [35] French D. Starch; Chemistry & Technology. New York; Academic Press, 1984, 183.
- [36] Baldwin P M, Davies M C, Melia C D. Int J Biological Macromolecules, 1997, 21, 103.
- [37] Baldwin P M, Adler J, Daviest M C, et al. J Cereal Science, 1998, 27, 255.
- [38] Krok F, Szymońska J, Tomasik P, et al. Applied Surface Science, 2000, 157, 382.
- [39] Baker A A, Miles M J, Helbert W. Carbohydr Res, 2001, 330, 249.
- [40] Ridout M J, Gunning A P, Parker M L, et al. Carbohydr Polym, 2002, 50, 123.
- [41] Ohtani T, Yoshino T, Hagiwara S, et al. Starch/Stärke, 2000, 52(5.S.), 150.
- [42] Nordmark T S, Ziegler G R. Carbohydr Res, 2002, 337, 1467.
- [43] Nordmark T S, Ziegler G R. Carbohydr Polym, 2002, 49, 439.

Advances in Study on the Structure of Polysaccharide by Atomic Force Microscopy

WANG Xiu-yan, DONG Li-song*

(State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract: The principle and some features of atomic force microscopy (AFM) are briefly reviewed. And advances in study on the structure of polysaccharide, especially starch by AFM are presented.

Key words: Atomic force microscopy (AFM); Single-molecule force spectroscopy; Polysaccharide; Starch

(上接 84 页)

- [22] Diallo M S, Balogh L, Shafagati A, et al. Environ Sci Technol, 1999, 33(5), 820~824.
- [23] Winnik F M, Duff J M, Sacripante G G, et al. US 5256516, 1993.
- [24] 吴彤, 罗运军, 周贵忠. 高分子材料科学与工程, 2002, 18(6), 119~121.

Synthesis and Application of Poly(amide amine) Dendrimer

ZHENG Shi-zhao, XU Wei-jian*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: Poly(amide amine) dendrimer is a new class of macromolecule that emanates from a central core and has a defined number of generation and functional terminal groups. This polymer may be widely applied in catalyst, medicine, bionomy and industry in view of its high symmetry, a great number of terminal groups and interior cavity. After providing its synthesis, characterization and structure performance, this paper covers the modifications and applications of poly(amide amine) dendrimer.

Key words: Poly(amide amine) dendrimer; Synthesis; Characterization; Modification; Application