

微管在APS-云母上的固定和AFM成象

陈圣福 韩公社 阎隆飞 李民乾

摘要 · 借鉴原子力显微镜(AFM)和相差显微镜的微管研究的制样方法,应用(3-氨基丙基)-三乙氧基硅烷(3-aminopropyl)-triethanoxysilane(APS)-云母作为微管的AFM成象和性质研究的衬底,获得了满意的结果。它不仅比常用的硅烷化硅片衬底有更好的平整性,而且具有操作更加简便的优点。本方法对进一步研究微管的性质和动力学研究非常重要
关键词 · 原子力显微镜,衬底,微管,APS-云母

Immobilizing microtubule on APS-mica and imaging with · atomic force microscopy

CHEN Shengfu · LI Minqian ·

Shanghai Institute of Nuclear Research, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800

HAN Gongshe · YEN Longfei

China Agricultural University, College of Biological Science, Beijing 100094

Abstract We found (3-aminopropyl)-triethanoxysilane (APS)-mica is an ideal kind of substrate for microtubule and is easily prepared. This method could be very useful in investigating microtubules properties and dynamic processes under near-nature environment.

Key words · Atomic force microscope, Substrate, Microtubule, APS-mica ·

原子力显微镜(AFM)技术从诞生^[1-3]就以其不同于原有电子显微镜技术的优点在生物样品研究中得到了广泛应用。为了进一步展开对生物样品的研究,除了原子力显微镜的成象方式和针尖制备方法需改进外,制样方法的探索仍然是扩展这一技术在生物样品中应用的一个重要方面^[4]特别是近生理条件下的原子力显微镜成象以及动力学过程研究的出现^[5],带来了样品固定和保持样品活性的矛盾,这对原子力显微镜的制样技术提出了更高的要求

· · 由于原子力显微镜技术本身成象方式的要求,对衬底的平整度有着特殊的要求一般采用有较大晶面的材料作为原子力显微镜的衬底,例如:云母、高序石墨、硅片以及用特殊方法制备的大面积平整的金膜^[6]是通常选用的衬底材料。对一些平整度要求不高的样品,衬底还可以用光学玻璃。但是,由于以上几种材料的表面性质比较单一,不能适应原子力显微镜的研究对象的复杂多变的要求,所以对衬底材料表面的修饰变得非常重要。

· · 在硅片、金、以及玻璃表面上的自组织膜技术是一种非常成熟的技术^[7]。利于双

功能的修饰剂可以得到不同功能团的表面,从而获得不同化学活性的衬底表面,以适应不同研究对象的要求。由于硅片和大面积平整的金膜比较昂贵和较大的起伏,而玻璃本身表面起伏太大,所以利用云母的原子级平整表面进行修饰具有非常重要的价值。然而,至今还未有云母表面形成硅烷自组织膜机制的报道,是否能够形成均匀致密的单分子膜也并不十分清楚,所以,制备原子级平整的APS-云母仍然是各国AFM实验室致力于完善的一个基本实验基础。应用APS修饰的云母已经在DNA分子操纵中得到初步应用^[8],且结果非常理想。因此完善APS-云母在生物样品方面的应用有其特殊意义。

· 我们通过在云母上修饰APS,发现云母表面仍然保持极好的平整性,且明显地改善了衬底对微管的吸附和偶联能力,为进一步的微管动力学研究奠定了基础。

1 实验样品与方法

· · 在超净工作台上,将新解理的云母浸入新配制的40mL的1% APS水溶液中约3—5min。取出APS修饰的云母用双蒸水充分冲洗,氮气吹干,保存于洁净容器中。

· · 1:1的新聚合的微管溶液(蛋白浓度为3mg/mL,聚合条件参照文献[8])与8%的戊二醛混合液滴在APS-云母上,覆盖石蜡膜将溶液展开,固定时间约30min。固定后,用双蒸水漂洗4次,用氮气吹干,暂时保存于干燥器中(保存时间小于8h)。样品尽快用原子力显微镜成象。

· · 原子力显微镜的成象方式是在大气下的轻敲模式,并且控制成象时的相对湿度小于40%,减小水膜对成象的影响。原子力显微镜和针尖均为Digital Instruments Inc. (Santa Barbara, CA, USA)产品,显微镜型号是Nanoscope IIIa。

2 结果与讨论

· · 图1是APS修饰以后的云母表面的AFM图象(扫描范围 $2\mu\text{m}\times 2\mu\text{m}$),从原子力显微镜图象我们可以看到修饰后的云母表面仍然保持大面积的平整,这种平整度非常符合原子力显微镜研究的要求。图2显示的是洁净硅片的AFM图象(扫描范围 $2\mu\text{m}\times 2\mu\text{m}$)。与修饰以后的云母表面的AFM图象相比,APS-云母明显比硅片的平整度好。而且,我们制作的APS-云母不存在用传统制备硅烷化表面的方法所导致的多岛状或球状的缺陷。另外,云母与常用的硅烷化材料(硅片)相比,云母材料具有容易获取且价格较低的优势。特别是新解理的云母表面非常洁净,不存在硅片等材料的预处理的繁复操作,为提高实验效率并发挥AFM的优点打下了必要的基础。并且在云母表面同样增加了活性官能团($-\text{NH}_2$)。我们可以利用这些吸附在云母表面上的官能团,用双官能团的戊二醛等试剂将微管偶联到这些修饰的表面。

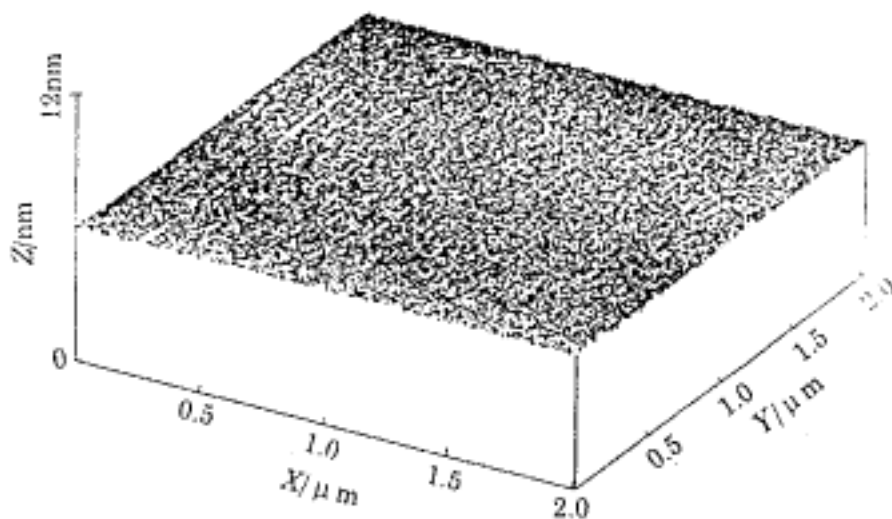


图1 大面积平整的APS-云母表面的AFM图象
Fig.1 AFM image of large-scale APS-mica surface

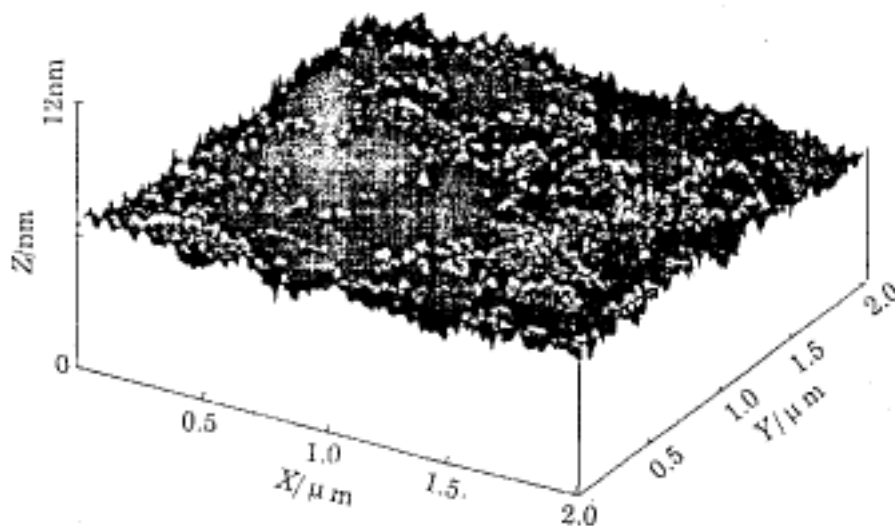


图2 清洁的硅片表面的AFM图象
Fig.2 · AFM image of cleaned silica surface ·

· · 图3表示微管在云母表面直接吸附,再经双蒸水快速漂洗后的结果(扫描范围 $3.8\mu\text{m} \times 3.8\mu\text{m}$,由于微管蛋白聚合时缓冲溶液中的盐浓度较高,为了避免在干燥时析出小分子盐的晶体影响原子力显微镜的成像,漂洗这一步骤是通常使用的方法)。图3中仅留下微管沉积后又被冲走的痕迹,这可能是由于微管与云母的表面有相同的电荷性质(都带有一定的负电荷),而且相对流体阻力较大,从而导致吸附效果较差。

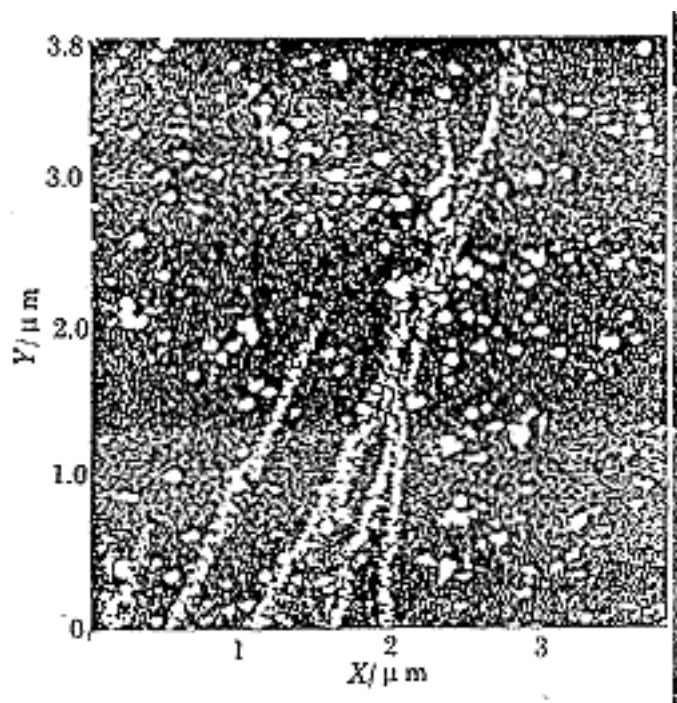


图3 微管吸附在云母表面漂洗后的痕迹的AFM图象
Fig.3 AFM image of trace of washed · microtubule on mica

· · 图4是微管通过戊二醛耦合在APS-云母表面后的原子力显微镜的图象（扫描范围 $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ ），图中的微管与文献报道的结果一致，且背景清晰。这说明APS-云母对微管有非常好的偶联能力，也证明了APS-云母体系中APS的氨基是在APS-云母体系的最表层，否则戊二醛不可能很好地与微管偶联，这是因为在水溶液中硅烷羟基与戊二醛缩合的可能性非常小。从文献[9]可知，微管偶联到 NH_2 表面时，它的生物活性不会受到改变，力蛋白仍然可以在微管上移动。所以展开进一步的微管性质以及动力学过程的研究是有充分理由的。

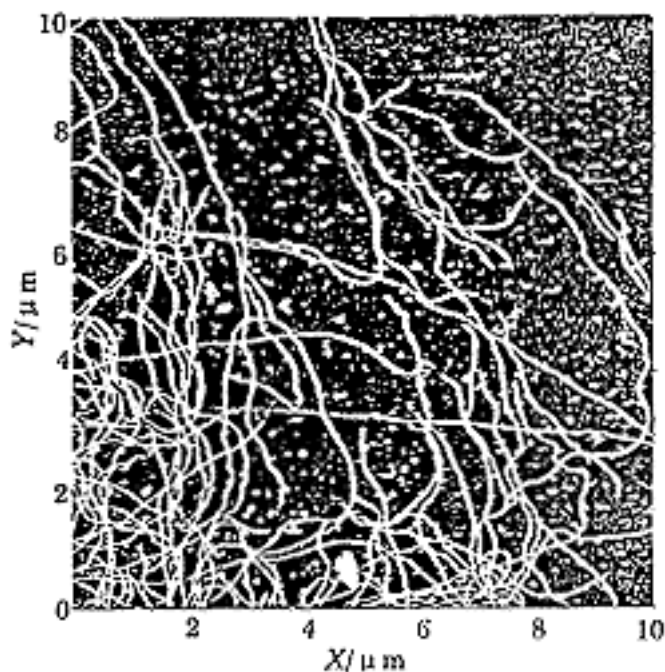


图4 微管固定在ASP-云母表面的AFM图象

Fig.4 · AFM image of microtubules coupled on APS-mica

· · 总之,APS修饰的云母是一种理想的微管原子力显微镜研究的衬底材料。它不仅表面平整,氨基表面密度合适,可以牢固地吸附并键合微管,而且能够保持微管的生物活性,为深入研究微管的性质,尤其是在近生理条件下的动力学过程的研究奠定了良好的基础。

联系人 阎隆飞 李民乾

作者单位:陈圣福 李民乾 中国科学院上海原子核研究所·上海·201800

韩公社 阎隆飞 中国农业大学生物学院·北京·100094

参考文献

- 1 Vinckier Anja, Ilse Heyvaert, An D'Hoore. Ultramicroscopy, 1995,57:337-343
- 2 Gelfand V I, Bershadsky A D. Annu Rev Cell Biol, 1991,7:93-116
- 3 Binnig D, Quate C F, Geerber C. Phys Rev Lett, 1986,56:930-933
- 4 Bustamante Carlos, Keller David. Phys Today, 1995,(12)48:32-38
- 5 Sandor Kasas, Neil H Thomson, Bettye L Smith. Biochem, 1997,(3)36:461-468
- 6 Woodard Nathan G, Gregory P Lafyatis. J Vac Sci Technol(A), 1996,14:332-335
- 7 Z1Abraham Ulman. An introduction to ultrathin organic films from langmuir-blodgett to self-assmbly,Z1Part three, self-assembled monolayers, Boston, Academic Press, Inc. 237-301 ·
- 8 OUYANG Zhenqian, HU Jun, CHEN Shengfu,et al. J Vac Sci Technol, 1997,(B)15(4):1385-1387
- 9 Turner David C, CHANG Chunyen, FANG Kan. Biophys J, 1995,69:2782-2789

收稿日期 · 1998-02-26

修回日期 · 1998-05-07