

## 烟草花叶病毒结构的原子力显微镜研究\*

张平城 白春礼 成英俊 吴浚翰<sup>①</sup>

戴长春 王中怀 方 晔

(中国科学院化学研究所 北京 100080)

(<sup>①</sup> 华南师范大学分子生物工程中心 广州 510631)

**摘要** 取 5  $\mu\text{l}$  溶解在 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中的烟草花叶病毒 (0.2 mg/ml), 将其滴加在新鲜剥离的云母表面上, 然后用 0.5% 的磷钨酸染色。所得样品在大气下用原子力显微镜进行成像, 用 AFM 可以清楚地观察到棒状的 TMV 拓扑结构, 用磷钨酸染色后的 TMV 样品能稳定地吸附在新鲜剥离的云母表面上, 可靠的 TMV 的 AFM 像在大气下可容易地获得。

**关键词:** 原子力显微镜, 烟草花叶病毒, 结构, 成像, 染色

在生物学发展的历史过程中, 显微镜长期以来是研究细胞、病毒及生物大分子的形态及结构的重要工具。扫描隧道显微镜的研制成功是显微学上的一场革命。它导致了一系列扫描探针显微镜[原子力显微镜 (AFM)、激光力显微镜 (LAFM)、磁力显微镜 (MFM)、弹道电子发射显微镜 (BEEM)、光子扫描隧道显微镜 (PSTM)]的诞生(白春礼, 1992)。这些仪器通过一个探针接近被测物体的表面, 从而取得其表面在空间分辨上的某些特性信息。如隧道电流 (tunneling current)、相互作用力 (interaction force)、离子电导性 (ion conductance)、温度 (temperature) 等。在这一系列用于生物学研究的仪器中, 最有前途的应首推原子力显微镜 (Binnig 等, 1986; Rugar 等, 1990; Hansma 等, 1992)。

烟草花叶病毒呈现为长 300 nm, 直径 18 nm 的圆柱形结构, 其中心含有 1 个约 4 nm 的沟槽 (Namba 等, 1989)。这种病毒由 2130 个相同的蛋白亚基组成, 每个亚基包含 158 个氨基酸残基, 病毒蛋白外壳围绕一个约 6400 个核苷酸的单股 RNA 形成。围绕单股 RNA 的蛋白亚基具有螺旋形结构, 其螺距为 2.3 nm (Stubbs 等, 1974)。

本文采用本实验室新近研制成功的激光检测原子力显微镜, 对吸附在新鲜剥离的云母表面上的烟草花叶病毒的结构进行了成像。

\* 国家自然科学基金和中国科学院基金资助项目。

本文 1993 年 3 月 14 日收到。

## 材料及方法

烟草花叶病毒样品由 Witz 博士提供。该病毒悬浮在 20 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.0) 中, 病毒浓度为 0.2 mg/ml, 将 1 滴上述溶液 (大约为 5—10  $\mu$ l) 滴加到新鲜剥离的云母表面上, 约 1 min 后, 用一小滤纸条沿液滴的边缘将残液吸干, 然后立即加 5  $\mu$ l 浓度为 0.5% 的磷钨酸溶液 (使用前用氢氧化钠溶液将酸碱度调至 pH 7.0) 于吸附的 TMV 样品上, 时间约为 1 min, 此后用滤纸条将残余的磷钨酸染色液吸去, 经过上述步骤处理的 TMV 样品用 AFM 成像。

研究中采用的 AFM 装置将另文详细描述 (吴浚翰等, 1992), 微悬臂的偏转可以敏感地通过测量在位置敏感检测器上的反射激光光束的位置变化检测出来。所有结果均在大气下室温成像得到。图像采用恒力模式测量, 氮化硅微悬臂采用 Digital Instruments Inc. 产品, 其力常数  $K$  为 0.12 N/m (200  $\mu$ m 长度), 带有锥形的针尖, 图象尺寸通过采用同一微悬臂对云母成像后进行定标。AFM 图象数据用 180 $\times$ 180 点阵存贮。除非特别声明, 所给图象均为未经滤波处理的原始数据。

## 结果及讨论

用前述方法 (见材料及方法部分) 制备的 TMV 样品用 AFM 进行成像。对于浓度



图1 烟草花叶病毒(TMV)的 AFM 图象

Fig. 1 AFM image of tobacco mosaic virus

TMV 吸附在新鲜剥离的云母表面上, 然后用 0.5% 的磷钨酸染色, 扫描范围为 1807 nm $\times$ 2900 nm。图中 3 个相互分开的单个 TMV 颗粒可以清楚地观察到, 颗粒长度大约为 533 nm, 可能为两个 TMV 分子通过末端粘结形成的二聚体。

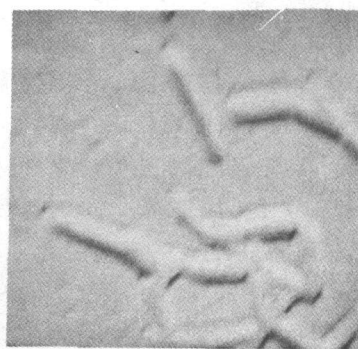


图2 在另一扫描区域获得的 TMV 图象

Fig. 2 TMV image obtained in other scanning region

扫描范围为 1807 nm $\times$ 2900 nm。单个病毒颗粒仍然可以分清, 有的病毒分子粘结成更长的颗粒。

为 0.2 mg/ml 的 TMV 病毒颗粒, 所得的 AFM 图象如图 1 所示, 相互分开的单个病毒颗粒可以清楚地观察到。可见, 该样品浓度是较合适的。TMV 分子的分布既不太密也不太稀, 并且很容易在吸附基底表面上找到。图中单个病毒颗粒的长度约为 533 nm, 宽度为 50—80 nm 之间, 长度大约比单个 TMV 分子的实际长度长两倍, 这种结构实际上是很容易理解的, 因为 TMV 分子很容易通过末端之间的相互粘附而形成更长的颗粒, 这种形态类似于用 TEM 获得的结果 (Namba 等, 1989)。用 AFM 所观察到的 TMV 颗粒的宽度大约为 TEM 结果的 3—5 倍 (Namba 等, 1989), 这种明显的增宽效应类似于 Vensenka 等 (1992) 及 Bustamante 等 (1992) 对 DNA 成像的结果。在他们的报道中, 用 AFM 所观察到的 DNA 的表观宽度为 10—15 nm, 大约为 DNA 的实际螺旋直径的 5—7 倍。

在本文中, TMV 分子中的中心沟槽没有观察到, 由蛋白亚基堆积形成的螺旋结构的螺距也不能通过 AFM 实验加以识别。很可能有若干种因素限制了 AFM 对生物材料成像的分辨率, 如 AFM 成像的针尖锐度不够; 生物材料的柔性降低了 AFM 观察的分辨率; 大量的磷钨酸染色剂分子沉积在 TMV 颗粒上, 使其精细结构的分辨造成困难。针尖太钝、生物材料的柔性以及盐的沉积这 3 个因素是造成 TMV 颗粒的表观宽度大大加宽的重要原因。

图 2 和图 3 分别是在两个不同扫描区域中对染色的 TMV 颗粒进行观察所得的 AFM 图象。根据前述方法 (见材料及方法部分) 制得的样品, 可以观察到彼此分开或相互重叠的 TMV 分子, 并且图 1、2、3 中的 TMV 图象是很稳

定、易重复的。我们曾经用染色及不染色两种方法制备了 TMV 样品, 然后对其进行成像。结果对于不染色的样品, 较难找到稳定吸附的 TMV 图象, 而染色后的样品, 则较易成像和重复。磷钨酸可能对 TMV 分子在云母表面上的吸附有稳定作用, 结果使其在针尖扫描时不易发生移动。磷钨酸的染色同样可能有利于增加病毒的刚性。在图 1 至 3 实验中, 我们总是采用新鲜剥离的云母表面作为基底, 它具有明显的亲水性, 很显然, 这是有利于 TMV 分子在云母表面上吸附的。由上我们可以推测, TMV 的染色及采用新鲜剥离的云母可能是获得稳定可重复的 AFM 图象的两个重要因素。尽管可靠的成像生物材料 (如 TMV 病毒) 已不成问题, 但要增加分辨率来分辨单个分子中的精细结构尚需作许多努力。

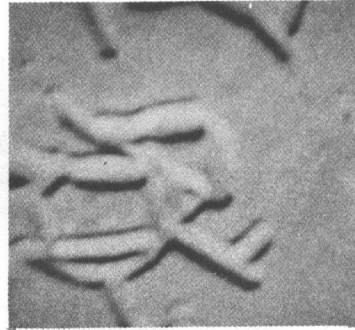


图 3 烟草花叶病毒的 AFM 图象

Fig. 3 AFM image of tobaccomosaic virus

制样条件与图 1 相同, 在图中可以看到相互重叠的 TMV 颗粒, 右下角最短的病毒颗粒长度约为 368 nm, 接近于单个 TMV 分子的长度。

致谢: 我们十分感谢 Witz 博士及 Engel 教授提供的 TMV 样品。

### 参 考 文 献

- 白春礼. 1992. 扫描隧道显微镜及其应用, 上海科学出版社, 91—132.
- Binnig G, Quate C F, Gerber C. 1986. *Phys. Rev. Lett.*, **56**: 930—933.
- Bustamante C, Vesenka J, Tang C L *et al.* 1992. *Biochemistry*, **31**: 22—26.
- Hansma H G, Vesenka J, Siegerist C *et al.* 1992. *Science*, **256**: 1180—1184.
- Namba K, Pattanayek R, Stubbs G. 1989. *J. Mol. Biol.*, **208**: 307.
- Rugar D, Hansma P. 1990. *Physics Today*, 23—30.
- Stubbs G J. 1974. *Acta Cryst.*, A **30**: 639.
- Vesenka J, Guthold M, Tang C L *et al.* 1992. *Ultramicroscopy*, **42—44**: 1243—1249.

## Tobacco Mosaic Virus Observed with Atomic Force Microscope

Zhang Pingcheng Bai Chunli Cheng Yingjun  
Wu Junhan Dai Changchun Wang Zhonghuai Fang Ye  
(Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100080)

Tobacco mosaic virus (TMV) suspended in 20 mmol/L phosphate buffer, pH 7, at concentration of 0.2 mg/ml was deposited on freshly cleaved mica surface, then stained with 0.5% buffered phosphotungstic acid solution. The TMV samples treated by the above procedures were imaged with AFM in air at room temperature. The structure of TMV imaged with AFM were analyzed and discussed.

**Key words:** AFM, TMV, Structure, Imaging, Staining