

原子力显微镜技术在病毒学研究中的进展

张燕玲, 杨慧, 薛小平

西北工业大学生命学院, 陕西西安 710072

关键词: 原子力显微镜; 病毒; 超微结构

中图分类号: Q-336 文献标识码: A 文章编号: 2095-0136 (2011) 05-0391-04

The development of atomic force microscopy in virological research

ZHANG Yan-ling, YANG Hui, XUE Xiao-ping

Faculty of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an, Shaanxi 710072, China

Corresponding author: XUE Xiao-ping, E-mail: xiaoping@fmmu.edu.cn

Key words: Atomic force microscope; Virus; Ultrastructure

病毒是以核酸和蛋白质衣壳为主要结构单位的微小粒子, 具有传染性和寄生性, 某些病毒如人类免疫缺陷病毒 (HIV)、丙型肝炎病毒 (HCV) 及乙型肝炎病毒 (HBV) 感染已经成为全球社会公共卫生问题^[1-2], 因此加强病毒病原学研究对保障人民健康和国家安全具有重要意义。现代生物学和生物物理学技术的发展使病毒学研究不仅局限于对病毒的检测和防治, 更加深入到纳米分子水平。近年来研究表明, 随着原子力显微镜技术 (atomic force microscopy, AFM) 在生命科学领域尤其是在病毒学研究中的应用, 人们可对各类病毒粒子超微结构如包膜蛋白、DNA/RNA 实现精细观测、对病毒和受体相互作用力进行测定、以及对病毒致病机制进行研究等, 这使 AFM 成为病毒学研究不可或缺的手段之一^[3]。

1 原子力显微镜基本工作原理

原子力显微镜是一种通过扫描探针与样品表面原子相互作用引起激光束发生位移, 经过计算机系统采集和处理信号, 从而形成样品表面形貌图像的新型分析仪器, 其工作原理是将微悬臂一端固定于扫描器前端, 另一端固化一个针尖, 通过针尖尖端原子与样品表面原子间相互极微弱的排斥力, 使微悬臂发生位移, 通过微悬臂背面反射光点在光学检测器上的位置变化可转换成力的变化, 且位移与力的变化成正比, 从而最终还原出样品表面形貌图像。AFM 的显著特

点是将高空间分辨率与敏感且准确的力学感应性相结合, 不但能够对生理状态下的细胞和微粒形态成像、大小进行测量, 而且可以实时动态地研究样品结构与功能之间的关系^[4], 从而获取相关生物学信息。

近年来人们逐渐探索运用原子力显微镜对生物样品结构、特性和相互作用力等生物物理现象进行纳米水平的观测及显微操作, 如检测生物粒子相互作用前后的超微结构变化, 研究受体结合位点数量和定位分布, 以及测量活体细胞表面受体和配体之间相互作用力大小, 检测精确度达 pN 级^[5-7]。

2 原子力显微镜在病毒学研究中的应用

2.1 原子力显微镜在病毒形貌及超微结构的研究应用 原子力显微镜可对病毒粒子包膜、衣壳、DNA/RNA 等结构高分辨成像, 并且可以在空气或溶液, 原位细胞表面或病理切片等不同环境和状态下观察不同形态的病毒粒子, 其对病毒形貌结构成像与 X 射线衍射和 cryo-电子显微镜观测结果一致^[3]。Wu 等在用原子力显微镜检测化学剂诱导病毒形态变化的研究中发现, 药物球松素 (pinostrobin) 可导致 I 型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus-1, HSV-1) 形貌和大小发生显著变化, 并且伴随药物处理时间的增长和剂量的增加, HSV-1 包膜形态逐渐受损, 最终导致病毒裂解和失活^[8]; Kuznetsov 等用原子力显微镜观察卫星烟草花叶病毒 (satellite tobacco mosaic virus) 单链 RNA, 发现在 4℃ 和 65℃ 条件下 RNA 分别呈现“封闭”和“开放”状态, 在 EDTA 存在下加热到 75~85℃ 可完全打开 RNA, 长度大于 280 nm^[9]; 在对感染淡水藻类的 PBCV-1 病毒的观察中, 显示其直径为 190 nm 左右, 表面晶格由三聚衣壳蛋白以 p3 对称形式组成, 病毒晶体呈蜂巢状,

基金项目: 国家自然科学基金 (31000067); 西北工业大学基础科研基金 (JC200921)

作者简介: 张燕玲, 博士研究生, 主要从事空间分子微生物学研究

通讯作者: 薛小平, E-mail: xiaoping@fmmu.edu.cn

降解后形成大小一致具有 $T=1$ 或 3 的二十面体球形病毒样粒子, 并伴有线状单链 DNA 和未知功能纤维出现^[10]; 在对鼠白血病病毒 (mouse leukemia virus, MuLV) 观察中, 显示其大小分布模式为 145 nm, 显著大于人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus), 且几乎没有大小完全相同的该病毒粒子, 病毒表面有结状凸起, 可能为病毒通过细胞膜出芽的痕迹, 核直径为 65 nm, 衣壳厚度为 35 ~ 40 nm^[11]; 在对 Mason-Pfizer 猴病毒 (monkey virus) 和 I 型人类免疫缺陷病毒融合蛋白 DeltaPro-CANC 的研究中, 发现该蛋白形态和大小在这两种病毒中有显著差异^[12]; Chen 等用原子力显微镜观察酿酒酵母表达重组乙肝病毒核心抗原 (rHBcAg), 发现其形貌结构与天然状态下 HBcAg 相似, 均包含两种大小不同的粒子, 直径分别约为 31.3 nm 和 22.5 nm, 说明 rHBcAg 具有二态性^[13]; 此外原子力显微镜还被用于观测多种病毒组成和形貌, 如痘病毒、H1N1 型流感病毒、腺病毒等病毒粒子, 可呈现病毒三维图像、表面特征、以及内部核酸形态结构^[14-16]。目前, 研究人员仍在不断改良和创新原子力显微镜对各种类型病毒粒子的超微结构分析功能。

2.2 原子力显微镜在病毒感染机制研究中的应用

病毒粒子首先通过与宿主细胞表面受体结合, 进而入侵细胞引发感染, 原子力显微镜可从纳米水平直接观测病毒表面抗原与宿主细胞相互作用的过程、结合后细胞形貌变化、以及病毒感染对细胞内部蛋白和遗传物质功能的影响。Negishi 等在用原子力显微镜研究腺病毒与受体 HS (heparan sulfate) 的相互作用中发现, 2 型和 3 型腺病毒与该受体结合, 而 1 型和 5 型腺病毒与该受体不结合, 其结果与之前研究结论相符, 即 1 型和 5 型腺病毒不通过 HS 受体引发感染, 该方法对于研究其他类型病毒与细胞相互作用具有实用价值, 并为抗病毒筛查治疗提供良好的检测平台^[17]; Kuznetsov 等运用原子力显微镜研究感染鼠白血病病毒的 NIH 3T3 细胞发现, 大量成熟病毒粒子吸附在细胞表面和细胞内骨架基质中, 而 gPr80 (gag) 基因突变的病毒感染细胞后细胞表面未见正常病毒粒子或仅见极少量病毒, 细胞表面覆以管状病毒结构, 说明该基因突变可导致病毒不能正常组装, 从而不能增殖出芽^[18]; Ghosh 等在 2 型登革病毒 (dengue 2 virus) 与血小板相互作用研究中发现, 在人类自然感染病毒剂量状态下, 受感染血小板发生细胞膜结构、细胞脱粒、出现丝状伪足和微管扩张等变化, 说明该病毒可直接作用于血小板并引发血小板减少症^[19]; Di Bucchianico 在研究马莱克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 感染引发的鸡 T 细

胞系染色质结构重组和基因表达变异过程中, 运用原子力显微镜在纳米级别观察 G 显带染色体的遗传稳定性和染色体畸变, 发现 1 号和 3 号染色体分别发生 [78, WZ, dup (1p)(p22-p23)] 和 [78, WZ, cht, del (3)(q2.10)] 变异^[20]; Moloney 等用有包膜病毒和无包膜病毒分别感染细胞, 用原子力显微镜观察不同种类病毒入侵细胞和从细胞中释放对细胞的影响, 结果显示这两种病毒对细胞的形貌影响差异无统计学意义^[21], 说明有包膜和无包膜病毒感染的差异性可能不局限于对细胞形貌的改变; Attinti 等运用原子力显微镜检测 phiX174、MS2 和 Aichi 三种病毒与固体表面的相互作用力, 评估了不同病毒在物体表面的滞留和转运行为^[22], 提示不同病毒与细胞的相互作用关系存在差异。本实验室在用原子力显微镜观察汉坦病毒 (Hantaan virus) 感染 Vero-E6 细胞的研究中发现, 随病毒稀释度不同, 感染细胞核表面出现孔洞数量和细胞表面光滑程度将有差别, 近似反映出病毒感染细胞的动态过程^[23]。将原子力显微镜运用于病毒学研究, 能够更加直接和客观地反映真实的病毒入侵和复制过程, 为阐明病毒感染机制提供一种新的研究手段。

2.3 原子力显微镜在病毒学其他方面的研究应用

原子力显微镜可作为一种力学传感器研究分子间相互作用的新技术, 也可广泛应用于病毒学研究中。如将配体分子偶联于探针针尖, 通过与活细胞表面或固相受体分子的接触与分离, 测量受体与配体间的结合力大小^[22]; dos Santos Riccardi 等通过原子力显微镜发明了新型的无需标记的电化学 DNA 杂交法检测丙型肝炎病毒 (HCV)^[24]; Nettikadan 等通过运用原子力显微镜和 "ViriChip", 可对多种病毒实现抗体捕获, 从而检测和鉴别病毒种类^[25]; Weroniski 等运用 Time-lapse 原子力显微镜技术研究庚型肝炎病毒 (hepatitis G virus, HGV) NS3 蛋白 505-514 微肽段在脂蛋白层的生长状况, 发现其生长速率为 4~5 nm/s, 同时溶液浓度、机械损伤和 pH 值等因素变化都可引起该短肽生长行为变化^[26]; Kuznetsov 等用原子力显微镜长期实时动态观察二十面体病毒 (icosahedral virus) 晶体生长情况^[27]; Trinh 等用烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 校准原子力显微镜探针, 通过 TMV 三维结构成像解释高度的成像特征, 并适用于其他各种球状病毒粒子^[5]; 在对病毒降解过程研究中, Kiselyova 等用原子力显微镜研究马铃薯病毒 X (potato virus X, PVX) 在运动蛋白 (movement protein, MP) TGBp1 作用下分解的过程, 发现 TGBp1 与病毒表面螺旋蛋白 (CP-helix) 末端的结合将导致病毒 RNA 进入可译状态, 从而使

整个螺旋形病毒粒子呈现线性降解^[28]。

3 小 结

近年来分子生物学和生物物理学技术的发展为开展单分子/单细胞水平生物大分子之间相互作用研究提供了可能。作为新型光电精密测控技术,原子力显微镜技术在单分子/单细胞水平生物大分子相互作用分析及相互作用力的检测中应用最广,是当前生物物理学新技术与新方法的研究热点,将原子力显微镜技术引入传染病的病原学研究,对于推动从宏观向微观深入的病毒学研究有着重要的理论与实践意义^[3]。近年有研究表明将原子力显微镜技术与激光光镊、电子显微镜、X 射线衍射、生物化学、分子生物学等技术结合应用于生命科学研究具有广泛的应用前景,如实现更加高分辨率的光学捕获和操控模型,以及对细胞等生物粒子实现荧光标记检测等^[29-30],有利于从纳米水平和单细胞水平揭示病毒与宿主受体结构功能的构效关系和相互作用机制,从而真正在单分子水平上开展病毒学研究,同时也将促进分子微生物学和生物力学的相互交融,促进相关学科纵深发展。

参考文献

- [1] Victoria MB, Victoria Fda S, Torres KL, *et al.* Epidemiology of HIV/HCV coinfection in patients cared for at the Tropical Medicine Foundation of Amazonas [J]. Braz J Infect Dis, 2010, 14 (2): 135-140.
- [2] Fabris P, Baldo V, Baldovin T, *et al.* Changing epidemiology of HCV and HBV infections in Northern Italy: a survey in the general population [J]. J Clin Gastroenterol, 2008, 42 (5): 527-532.
- [3] Kuznetsov YG, McPherson A. Atomic force microscopy in imaging of viruses and virus-infected cells [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2011, 75 (2): 268-285.
- [4] Wright CJ, Shah MK, Powell LC, *et al.* Application of AFM from microbial cell to biofilm [J]. Scanning, 2010, 32 (3): 134-149.
- [5] Trinh MH, Odorico M, Bellanger L, *et al.* Tobacco mosaic virus as an AFM tip calibrator [J]. J Mol Recognit, 2011, 24 (3): 503-510.
- [6] Han SW, Mieda S, Nakamura C, *et al.* Successive detection of insulin-like growth factor-II bound to receptors on a living cell surface using an AFM [J]. J Mol Recognit, 2011, 24 (1): 17-22.
- [7] Fung CK, Xi N, Yang R, *et al.* Quantitative analysis of human keratinocyte cell elasticity using atomic force microscopy (AFM)[J]. IEEE Trans Nanobioscience, 2011, 10 (1): 9-15.
- [8] Wu N, Kong Y, Zu Y, *et al.* Activity investigation of pinostrobin towards herpes simplex virus-1 as determined by atomic force microscopy [J]. Phytomedicine, 2011, 18 (2-3): 110-118.

- [9] Kuznetsov YG, Dowell JJ, Gavira JA, *et al.* Biophysical and atomic force microscopy characterization of the RNA from satellite tobacco mosaic virus [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38 (22): 8284-8294.
- [10] Kuznetsov YG, Gurnon JR, Van Etten JL, *et al.* Atomic force microscopy investigation of a chlorella virus [J]. PBCV-1. J Struct Biol, 2005, 149 (3): 256-263.
- [11] Kuznetsov YG, Low A, Fan H, *et al.* Atomic force microscopy investigation of isolated virions of murine leukemia virus [J]. J Virol, 2005, 79 (3): 1970-1974.
- [12] Kuznetsov YG, Ulbrich P, Haubova S, *et al.* Atomic force microscopy investigation of Mason-Pfizer monkey virus and human immunodeficiency virus type 1 reassembled particles [J]. Virology, 2007, 360 (2): 434-446.
- [13] Chen H, Lu JH, Liang WQ, *et al.* Purification of the recombinant hepatitis B virus core antigen (rHBcAg) produced in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and comparative observation of its particles by transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM) [J]. Micron, 2004, 35 (5): 311-318.
- [14] Kuznetsov YG, Gershon PD, McPherson A. Atomic force microscopy investigation of vaccinia virus structure [J]. J Virol, 2008, 82 (15): 7551-7566.
- [15] Liu YF, Hu KX, Hong YJ, *et al.* Study on the morphology of influenza virus A by atomic force microscopy [J]. Bingdu Xuebao, 2008, 24 (2): 106-110. (in Chinese)
- 刘燕飞, 胡孔新, 洪一江, 等. 利用原子力显微镜对 A 型流感病毒的形态学研究 [J]. 病毒学报, 2008, 24 (2): 106-110.
- [16] Chen H. Atomic force microscopy of recombinant adeno-associated virus-2 prepared by centrifugation [J]. Scanning, 2007, 29 (5): 238-242.
- [17] Negishi A, Chen J, McCarty DM, *et al.* Analysis of the interaction between adeno-associated virus and heparan sulfate using atomic force microscopy [J]. Glycobiology, 2004, 14 (11): 969-977.
- [18] Kuznetsov YG, Datta S, Kothari NH, *et al.* Atomic force microscopy investigation of fibroblasts infected with wild-type and mutant murine leukemia virus (MuLV) [J]. Biophys J, 2002, 83 (6): 3665-3674.
- [19] Ghosh K, Gangodkar S, Jain P, *et al.* Imaging the interaction between dengue 2 virus and human blood platelets using atomic force and electron microscopy [J]. J Electron Microsc (Tokyo), 2008, 57 (3): 113-118.
- [20] Di Bucchianico S, Giardi MF, De Marco P, *et al.* Cytogenetic stability of chicken T-cell line transformed with Marek's disease virus; atomic force microscope, a new tool for investigation [J]. J Mol Recognit, 2011, 24 (4): 608-618.
- [21] Moloney ML, McDonnell L, O'Shea H. Atomic force microscopy analysis of enveloped and non-enveloped viral entry into, and egress from, cultured cells [J]. Ultramicroscopy, 2004, 100 (3-4): 163-169.
- [22] Attinti R, Wei J, Kniel K, *et al.* Virus' (MS2, phiX174, and Aichi) attachment on sand measured by atomic force microscopy and their transport through sand columns [J]. Environ Sci

Technol, 2010, 44 (7): 2426-2432.

[23] Tang RH, Xue XP, Yin HC, *et al.* Apply AFM to observe the different cell surface between normal Vero E6 cell and Vero E6 cell contracted by Hantaan virus [J]. Zhongguo Shiyan Zhen-duanxue, 2008, 12 (5): 598-601. (in Chinese)

唐蕊华, 薛小平, 尹焕才, 等. 用原子力显微镜观察汉坦病毒感染前后 Vero E6 细胞的形貌变化 [J]. 中国实验诊断学, 2008, 12 (5): 598-601.

[24] dos Santos Riccardi C, Kranz C, Kowalik J, *et al.* Label-free DNA detection of hepatitis C virus based on modified conducting polypyrrole films at microelectrodes and atomic force microscopy tip-integrated electrodes [J]. Anal Chem, 2008, 80 (1): 237-245.

[25] Nettikadan SR, Johnson JC, Mosher C, *et al.* Virus particle detection by solid phase immunocapture and atomic force microscopy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311 (2): 540-545.

[26] Weronki KJ, Cea P, Diez-Perez I, *et al.* Time-lapse atomic force microscopy observations of the morphology, growth rate, and spontaneous alignment of nanofibers containing a peptide-amphiphile from the hepatitis G virus (NS3 protein)[J]. J Phys Chem B, 2010, 114 (1): 620-625.

[27] Kuznetsov YG, Malkin AJ, Lucas RW, *et al.* Atomic force microscopy studies of icosahedral virus crystal growth [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2000, 19 (4): 333-346.

[28] Kiselyova OI, Yaminsky IV, Karpova OV, *et al.* AFM study of potato virus X disassembly induced by movement protein [J]. J Mol Biol, 2003, 332 (2): 21-25.

[29] Liu B, Yang L, Wang Y. Optical trapping force combining an optical fiber probe and an AFM metallic probe [J]. Opt Express, 2011, 19 (4): 3703-3714.

[30] Madl J, Rhode S, Stangl H, *et al.* A combined optical and atomic force microscope for live cell investigations [J]. Ultramicroscopy, 2006, 106 (8-9): 645-651.

收稿日期: 2011-07-27 修回日期: 2011-08-25 责任编辑: 刘磊

论文撰写规范

数字使用请按 GB/T 15835-1995《出版物上数字用法的规定》用法。

概数和约数

相邻的两个数字并列连用表示概数，必须使用汉字，连用的两个数字之间不得用顿号“、”隔开。

示例：二三米 一两个小时 三五天 三四个月 十三四吨 一二十个 四十五六岁 七八十种
二三百架次 一千七八百元 五六万套

带有“几”字的数字表示约数，必须使用汉字。

示例：几千年 十几天 一百几十次 几十万分之一

用“多”“余”“左右”“上下”“约”等表示的约数一般用汉字。如果文中出现一组具有统计学和比较意义的数字，其中既有精确数字，也有用“多”“余”等表示的约数时，为保持局部体例上的一致，其约数也可以使用阿拉伯数字。

代号、代码和序号

部队番号、文件稿号、证件号码和其他序号，用阿拉伯数字。序数词即使是多位数也不能分节。

示例：84062 部队 国家标准 GB 2312-80 国办发〔1987〕9 号文件 总 3147 号 国内统一刊号 CN11-1399 21/22 次特别快车 HP-3000 型电子计算机 85 号汽油 维生素 B12