

原子力显微镜在畜牧业中的应用前景

江霞,李彦,许梓荣,胡彩虹,夏枚生

(浙江大学 动物科学学院 动物分子营养学教育部重点实验室,浙江 杭州 310029)

[摘要] 原子力显微镜(Atomic force microscope, AFM)是观察样品表面结构的一种新工具,能够检测样品之间的相互作用力,在生理条件下对样品进行实时观察。文章对 AFM 的工作原理及其近年来在畜牧业研究领域中的应用现状进行了综述,并展望了 AFM 在畜牧业领域中的应用前景。

[关键词] 原子力显微镜;畜牧业;微生物

[中图分类号] S81-0

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)11-0057-04

原子力显微镜(Atomic force microscope, AFM),是扫描探针显微镜(Scanning probe microscope, SPM)的一种,由 Binnig 等^[1]于 1986 年发明,其横向分辨率为 2~3 nm,纵向分辨率为 0.5 nm,是观察样品表面结构的一种新工具。原子力显微镜对样品处理要求低,不需要对样品进行脱水、包埋、切片、染色等繁琐处理,具有样品制备简单、操作方便、检测过程快速、分辨率和灵敏度高等优点,且可以在近生理条件下对样品进行动态观察。近年来,原子力显微镜已越来越多地应用于物理、化学、医学等研究领域,但在畜牧业中的应用尚不多见,为此,本文就原子力显微镜在畜牧业中的应用现状及应用前景进行了综述。

1 AFM 的工作原理

AFM 通常以氮化硅作为一个灵敏的弹性微悬臂,微悬臂尖端有一个只有原子大小的探针沿样品表面扫描,针尖与样品间的相互作用力会引起微悬臂的形变,从而使微悬臂背面的激光束位置发生变化,这种变化导致激光反射在光电检测器上后产生不同的电脉冲信号,计算机将这些信息处理成暗和亮的区域,在显示器上可得到放大数万倍的样品表面形貌^[2]。

AFM 主要有接触模式(contact mode)和动态模式(dynamic mode)2 种工作模式^[3]。接触模式扫描时,针尖一直与样品表面接触,优点是扫描速度快,可获得原子级的分辨率,缺点是横向力会影响图

像的原始特征,对易变形的低弹性样品易造成损害。动态模式扫描时,探针针尖始终不与样品表面接触,只在样品表面上方 5~20 nm 距离内扫描,针尖与样品之间的距离是通过保持微悬臂共振频率或振幅的恒定来控制的。该模式的优点是消除了横向力,针尖与样品之间每次接触的时间很短,对样品的损坏小,适用于较柔软的生物分子,缺点是扫描速度略慢。

2 AFM 在畜牧业中的应用

2.1 对饲料添加剂颗粒大小和形态的观察

有研究表明^[4],物质在消化道中的吸收率在很大程度上取决于其在吸收部位的溶解速度和接触面积,减小粒径可以增大暴露在介质中的表面积,提高溶解速度,有利于物质的吸收利用。因而在畜牧业上,越来越多的学者致力于营养物质颗粒大小的研究。纳米材料是指三维中有一维达到 1~100 nm 的物质^[5]。纳米材料具有的表面效应、体积效应、小尺寸效应、量子隧道效应等优异特性,不仅大大改善了原有材料的性质,而且出现了许多新的性能或效应,从而使纳米材料逐渐渗透到饲料工业中。AFM 是观察材料大小和形态的有力工具,可以对制备的饲料添加剂颗粒的大小和形态进行快速测定,并通过相应的计算机软件对图像进行分析,获得表面积、比表面积及体积等量化参数,为分析饲料添加剂的性能提供了科学依据。胥保华^[6]在研究纳米硒对 Avian 肉鸡的生物学效应及其分子机理时,借助

[收稿日期] 2005-03-14

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30100130)

[作者简介] 江霞(1980-),女,山东菏泽人,在读硕士,主要从事细胞生物学研究。

[通讯作者] 许梓荣(1941-),男,浙江长兴人,教授,博士生导师,主要从事动物营养学研究。

AFM 对纳米硒颗粒进行了研究,由 AFM 图像分析得知:纳米硒颗粒分散性良好,呈圆球形,粒径尺寸变化幅度在 40~80 nm,平均粒径 49.5 nm,且粒径在 40~60 nm 的颗粒占纳米硒颗粒的 89%。

2.2 对细胞形态结构及细胞生物过程的观察

2.2.1 对细胞形态结构的观察 AFM 已广泛用于观察各种细胞的表面结构,如对红细胞、血管内皮细胞、巨噬细胞、肾上皮细胞、精细胞、神经母细胞、内皮细胞、淋巴母细胞等细胞的观察^[7]。O'Reilly 等^[8]利用 AFM 对一定数量血红细胞的表面形态及三维结构进行了观测,通过图像可对红细胞的厚度、宽度、表面积、体积等进行测算。Girasole 等^[9]则观察了在药物、低浓度离子等作用下的红细胞与正常红细胞的差别。张汝芝等^[10]用 AFM 观察了人表皮黑素细胞、毛囊无色素黑素细胞和 S91 鼠黑素瘤细胞的形态结构,从 AFM 图像分析得知:正常人表皮黑素细胞有 3 级分支,在主干及分支的顶端和侧缘可见膨出的球形结构;鼠黑素瘤细胞仅有很短的 2 级分支,在 2 级树突近端可见黑素小体;毛囊无色素黑素细胞只有 1 级树突,且仅在树突近端有少数黑素小体。

2.2.2 对细胞形态变化的观察 AFM 独特的成像原理和特性,使其能够对活细胞在生理、病理条件下形态结构的变化进行动态观察。观察时可向 AFM 液体池中注入不同的溶液,用以改变活细胞的液体环境(如 pH 值、离子浓度等),从而引起细胞形态和结构的改变,在这一过程中,AFM 可以对细胞的变化进行实时地动态观测。如:感染病毒后细胞表面形态的改变^[11],成骨细胞在加入底物(钴铬、钛、钛钒等)后细胞形态和细胞弹性的变化^[12],三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)对胰腺外分泌细胞囊泡高度的影响^[13]等。Rotsch 等^[11]用 AFM 观察了在表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)刺激下,腺癌细胞板状伪足增长的过程;Braet 等^[15]用 AFM 观察了肝自然杀伤细胞和结肠癌细胞共培养时的细胞毒性效应。传统的细胞毒性试验方法在效应细胞和靶细胞接触后 1.5~3 h 方可检测到细胞毒性效应,而用 AFM 在 2 种细胞接触后 10 min 即可检测到。在畜牧业上,可借鉴其他学科在研究细胞生物学方面的经验,通过 AFM 检测某些物质对红细胞、淋巴细胞、脾细胞及肝细胞等细胞形态变化的影响,用于衡量动物体的健康状况或评价饲料中某些物质的性能。

2.2.3 对细胞间相互作用的观察 AFM 可对扫

描各点的作用力进行测定,依此原理可以测定 2 种细胞之间的相互作用力。将一种细胞连接在 AFM 扫描探针的尖端,使针尖功能化,对另一种单层排列的细胞进行扫描就可以进行细胞间相互作用的研究。如:在胚胎移植过程中,胚囊与母体组织的最初接触是通过胚囊滋养层细胞与子宫内皮细胞的黏附作用实现的,这种黏附作用对于胚胎移植非常关键。Thie 等^[16]采用前述方法,用 AFM 研究了人子宫内皮细胞系(HEC-1-A, RL 95-2)和人滋养型细胞(JAR)之间的黏附作用。将 JAR 功能性地结合在 AFM 扫描探针的尖端,然后与单层的子宫内皮细胞作用不同的时间段(1, 10, 20 和 40 min),AFM 渐进力曲线(Approach force curves)表明:HEC-1-A 和 RL 95-2 与 JAR 之间均存在排斥性相互作用,但 RL 95-2 的排斥作用力较 HEC-1-A 小,这是由于 RL 95-2 的表面光滑、糖萼(Glycocalyx)薄,而 HEC-1-A 的表面粗糙、糖萼厚。在克服了排斥性相互作用后,接触时间为 20 和 40 min 时,RL 95-2 表现出与 JAR 的特异性结合。这项研究第一次界定了滋养细胞和子宫内皮细胞间的相互作用。AFM 的这一作用,对畜牧业中研究多细胞生物体中细胞与细胞间的相互作用具有重要启示,如可研究动物胚胎移植中细胞的免疫排斥反应,病变细胞与健康细胞间的相互作用等。

2.3 对微生物形态结构及其活动的观察

有关 AFM 用于研究微生物形态结构及其活动的报道较多^[17]。Tollersrud 等^[18]观察了 4 株金黄色葡萄球菌的形态,结果表明无荚膜的 2 株细菌表面光滑,有荚膜的 2 株细菌表面呈粘液状,且通过对微荚膜形态的观察,可以在原子力显微镜下区别这 2 株细菌。Schabert 等^[19]应用 AFM 对溶液中大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)外膜的一种通道形成蛋白(OmpF porin)进行了研究,结果显示 OmpF porin 是由脂质构成的二维晶体,其侧向分辨率为 1 nm,垂直分辨率为 0.1 nm,结果与 X-射线衍射晶体分析的三维立体结构一致。用 AFM 亦可观察到电压和 pH 值变化引起的这种外膜蛋白结构的变化,这种变化与通道的关闭有关,是大肠杆菌细胞对周围环境变化的保护性反应。Haberle 等^[20]用 AFM 观察了痘苗病毒感染单个细胞的过程。用膜片钳技术中的微细吸管固定单个培养的猴肾细胞,将痘苗病毒 M1 株加入培养液中,用 AFM 观察不同培养时间后细胞和病毒的变化,结果发现加入病毒后细胞变得光滑柔软,提示在这种状态下病毒易穿过细

胞膜,但未记录到内吞现象,研究认为这可能是悬臂或探针阻挡了病毒在观察区的穿入。2 h 后,细胞表现出一些大小不一的隆起,隆起逐渐增大,持续 90 s~10 min 后消失,分析认为这是参与病毒组装的蛋白颗粒的胞吐现象。6 h 后,细胞表面出现更大的隆起,宽约 200~300 nm,数分钟后突然消失,在细胞表面留下小的“疤痕”。比较以往的研究认定,这是第一子代病毒通过胞吐作用从细胞中排出的过程。Busscher 等^[21]用 AFM 测量了细菌在固体表面动态和静态粘附时侧向和垂直方向的相互作用力,经分析发现,细菌分泌的多聚物和鞭毛结构在粘附过程和微生物膜形成过程中均具有重要作用。

2.4 对生物大分子的研究

AFM 可用于观察蛋白质、核酸的分子结构及其参与的生理活动等,如:蛋白的聚合^[22]、纤维组装的过程^[23]、胶原的超微结构和组装^[24]、蛋白三维晶体增长的研究^[25]、生物膜的结构变化^[26]、DNA 的装配过程^[27]以及生物大分子之间的交互作用^[28]等。Cheung 等^[29]用多壁碳纳米管探针在室温下可重复获得免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 的 Y 型结构图像,结果与 X-射线衍射的结果一致。免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM) 目前还不能用 X-射线衍射进行分析。Cheung 等^[29]还用多壁碳纳米管探针在室温下清楚地显示了 IgM 对称的五邻体结构,包括 5 对外部的 Fab 片段和 5 个内部的 Fc 片段,个别图像还显示了连接 2 个 Fc 区域的环结构。流感病毒血凝素是一个三聚体蛋白,每个单体由 HA₁ 和 HA₂ 2 个多肽链组成。Epan 等^[30]对血凝素蛋白的 2 个片段 BHA 和 FHA2 进行了研究,用脂质双分子层修饰 AFM 液体池中的云母片,将 BHA 和 FHA2 蛋白溶液注入液体池中,以动态模式观察发现,在中性条件下 2 种蛋白与脂质双分子层结合后均能自组装形成三聚体分子。对环境进行酸化后, FHA2 蛋白横向结合更加明显,脂质层未受到明显干扰;而 BHA 蛋白几乎不受酸化的影响,脂质层中出现小的缺损和孔洞。Kuznelsov 等^[31]将单纯疱疹病毒吸附在云母片上,用 AFM 可以清楚地观察到壳蛋白的结构和衣壳籽粒的中央孔。

动物饲料 90% 以上由植物籽实组成。植物籽实结构极其复杂,其细胞壁由各类纤维组成,而动物吸收植物营养时首先要破坏植物细胞壁以消化和吸收营养物质,这都必须在酶的参与下才能完成。因此,酶制剂的研究和应用是当前畜牧业研究中的一大热点,其中对 β -葡聚糖酶的研究最充分,并已被商业性地用于畜禽饲料中。而 β -葡聚糖酶耐热性差,在饲料加工过程中易失活,利用率低。吕文平^[32]依据结构域基因重组原理,构建了耐热、高酶活性的 β -葡聚糖酶——CAC,并率先用 AFM 研究了重组酶 CAC 和工程菌 *E. coli*-AMY 原酶对 β -葡聚糖超微结构的影响,所得的 AFM 图像清晰、美观。图像中 β -葡聚糖纯品呈规则的网状结构,当 2 种酶分别与 β -葡聚糖反应后, β -葡聚糖的网状结构均被破坏,而重组酶 CAC 对 β -葡聚糖的分解更为彻底、完全。AFM 在 β -葡聚糖酶研究中的应用,为 AFM 用于其他酶制剂的研究展示了广阔的应用前景。

3 结 语

AFM 独特的成像方式使其在物理、化学、医学等领域的应用得到迅速发展。应该看到,国内外的某些研究已经显示了原子力显微镜在用于材料、生物样品等专项研究中的巨大潜力。畜牧工作者也应该将畜牧业领域的研究与原子力显微镜技术结合起来,以便更深刻地阐明动物生理及病理功能的变化,促进畜牧业的发展。

当然,AFM 尽管具有非常独特的性质,但它也只是探索生命科学领域的一个工具,与其他仪器一样,它有其独特的优势,也有不足的一面。例如,应用 AFM 进行观察时,尽管制样简单、分辨率很高,但观察的始终只是样品的外部形态,而无法观测到细胞、细胞器内部形态以及分子运动等;观察的样品受到 AFM 探针半径曲率的限制等。因此,在实际研究过程中,应将 AFM 与其他仪器设备,如透射电子显微镜、激光共聚焦显微镜、核磁共振、X-射线晶体衍射等结合起来,相互补充、相互验证,这样才能获得全面、真实的结果。

[参考文献]

- [1] Binnig G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscope[J]. Physical Review Letters, 1986, 56(9): 930—933.
- [2] Morris V J, Kirby A R, Gunning A P. Atomic Force Microscope for Biologists[M]. London: Imperial College Press, 1999.
- [3] Hansma H G, Vesenka J, Siegerist C, et al. Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force micro-

- scope[J]. Science, 1992, 256: 1180—1184.
- [4] 郭 彤, 许梓荣, 胡彩虹, 等. 纳米科技在畜牧业中的应用前景[J]. 中国畜牧杂志, 2004, 40(1): 49.
- [5] 武晓凤. 纳米技术[J]. 科学, 2001, (12): 20.
- [6] 胥保华. 纳米硒对 Avian 肉鸡的生物学效应及其分子机理的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.
- [7] 杜 鹏. 原子力显微镜在生物医学上的应用[J]. 国外医学分子生物学分册, 2003, 25(3): 187.
- [8] O'Reilly M, McDonnell L, O'Mullane J. Quantification of red blood cells using atomic force microscopy[J]. Ultramicroscopy, 2001, 86(1—2): 107—112.
- [9] Girasole M, Cricenti A, Generosi R, et al. Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study[J]. J Microsc, 2001, 204(Pt 1): 46.
- [10] 张汝芝, 朱文元, 夏明玉, 等. 人表皮黑色素细胞、毛囊无色素黑色素细胞和鼠黑色素瘤细胞的原子力显微镜观察[J]. 临床皮肤科杂志, 2003, 32(11): 631.
- [11] Horber J K N, Haberle W, Ohnesorge F, et al. Investigation of living cells in the nanometer regime with the scanning force microscope[J]. Scanning Microsc, 1992, 6(4): 919—929.
- [12] Domke J, Dannohl S, Parak W J, et al. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2000, 19(4): 367—379.
- [13] Jena B P, Schneider S W, Geibel J P, et al. Gi regulation of secretory vesicle swelling examined by atomic force microscopy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(24): 13317—13322.
- [14] Rotsch C, Jacobson K, Condeelis J, et al. EGF- stimulated lamellipod extension in adenocarcinoma cells[J]. Ultramicroscopy, 2001, 86(1—2): 97—106.
- [15] Braet F, Vermijlen D, Bossuyt V, et al. Early detection of cyto-toxic events between hepatic natural killer cells and colon carcinoma cells as probed with the atomic force microscope[J]. Ultramicroscopy, 2001, 89(4): 265.
- [16] Thie M, Rospel R, Dettmann W, et al. Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces[J]. Hum Rep Rod, 1998, 13(11): 3211.
- [17] 赵铁强, 周为民, 梁瑛娟, 等. 原子力显微镜在生物学研究中的应用进展[J]. 生物技术通讯, 2002, 13(4): 312—314.
- [18] Tollersrud T, Berge T, Andersen S R, et al. Imaging the surface of *Staphylococcus aureus* by atomic force microscopy[J]. APMIS, 2001, 109(7—8): 541.
- [19] Schabert F A, Henn C, Engel A, et al. Native *Escherichia coli* OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy[J]. Science, 1995, 268: 92—94.
- [20] Haberle W, Horber J K, Ohnesorge F M, et al. *In situ* investigation of single living cells infected by viruses[J]. Ultramicroscopy, 1992, 42—44 (Pt B): 1161—1167.
- [21] Busscher H J, Poortinga A T, Bos R, et al. Lateral and perpendicular interaction forces involved in mobile and immobile adhesion of microorganisms on model solid surfaces[J]. Curr Microbiol, 1998, 37: 319—323.
- [22] Drake B, Prater C B, Weisenhorn A L, et al. Imaging crystals, polymers and processes in water with the atomic force microscope[J]. Science, 1989, 243: 1586.
- [23] Kuznetsov Y G, Malkin A J, McPherson A. Self- repair of biological fibers catalyzed by the surface of a virus crystal[J]. Proteins, 2001, 44(3): 392—396.
- [24] Paige M F, Rainey J K. A study of fibrous long spacing collagen ultrastructure and assembly by atomic force microscopy[J]. Micron, 2001, 32(3): 341—353.
- [25] Yau S T, Vekilov P G. Direct observation of nucleus structure and nucleation pathways in apoferritin crystallization[J]. J Am Chem Soc, 2001, 123(6): 1080—1089.
- [26] Rinia H A, Snel M M, Vander E J, et al. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy[J]. FEBS Lett, 2001, 501(1): 92—96.
- [27] Zhou C, Tan Z, Wang C, et al. Branched nanowire based guanine rich oligonucleotides[J]. J Biomol Struct Dyn, 2001, 18(6): 807—812.
- [28] Stolz M, Stoffler D, Aepli U, et al. Monitoring biomolecular interactions by time-lapse atomic force microscopy[J]. J Struct Biol, 2000, 131(3): 171—180.
- [29] Cheung C L, Hafner J H, Lieber C M. Carbon nanotube atomic force microscopy tips: direct growth by chemical vapor deposition and application to high-resolution imaging[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(8): 3809.
- [30] Epand R F, Yip C M, Chernomordik L V, et al. Self assembly of influenza hemagglutinin: studies of ectodomain aggregation by *in situ* atomic force microscopy[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1513(2): 167.
- [31] Kuznetsov Y C, Malkin A J, Lucas R W, et al. Imaging of viruses by atomic force microscopy[J]. J Gen Virol, 2001, 82: 2025.
- [32] 吕文平. 从结构域重组基因构建耐热、高活性 β -葡聚糖酶[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.

(下转第 66 页)

- [8] Boeckx R L, Dakshinamurti K. Effect of biotin on ribonucleic acid-synthesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 383: 282 - 289.
- [9] Baez-Saldana A, Diaz G, Espinoza B, et al. Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 67(3): 131 - 137.

Effects of different biotin addition levels on immune organs development and immune responses in broilers

HAN Chun-fang¹, CAI Hui-yi², YU Hui-min², CAO She-hui¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Animal Nutrition and Feed Science Feed Research Institute, Beijing 100081, China)

Abstract: The experiment aimed to investigate systematically the effect of biotin on immune organs development and immune response in broilers. 100 one-day old AA broilers were allocated into 4 treatments, 5 replicates per treatment, 20 broilers per replicate. The basal diet was wheat-casein-fish meal diet. Biotin was added in the basal diet at 0, 3, 0.9 and 2.7 mg/kg. There were 4 diets including the control of basal diet. The results showed as follows: (1) Biotin deficiency impaired the development of immune organs and reduced their weight index. Addition of biotin enhanced their development and elevated their weight index. (2) Inclusion of biotin enhanced humoral immune response, which elevated serum globin. The antibody titer to Newcastle and IgG content were elevated by addition of biotin. (3) Biotin supplementation enhanced cellular immune response, and addition of biotin enhanced significantly B-lymphocyte and T-lymphocyte transformation ratio in blood.

Key words: biotin; broiler; weight index; cellular immune; humoral immune

(上接第 60 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)11-0057-EA

Application prospects of atomic force microscope in animal husbandry

JIANG Xia, LI Yan, XU Zi-rong, HU Cai-hong, XIA Mei-sheng

(College of Animal Science, Zhejiang University, The Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition,

Ministry of Education, Hangzhou, Zhejiang 310029, China)

Abstract: The atomic force microscope (AFM) is a new useful tool to examine the surface structure of specimens and to evaluate interaction forces between specimens. It can also be used for real-time observation in physiological conditions. In this review, the operational principles of AFM and the progress in animal husbandry in recent years are discussed. Potential applications and prospects of AFM in animal husbandry are also highlighted in this paper.

Key words: atomic force microscope; animal husbandry; microbe